



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0104392  
(43) 공개일자 2019년09월09일

- |   |   |
|---|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)<br/>A61K 47/54 (2017.01) A61K 31/713 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류<br/>A61K 47/554 (2017.08)<br/>A61K 31/713 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2019-7023505</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2018년01월09일<br/>심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2019년08월09일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/IL2018/050031</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2018/127927<br/>국제공개일자 2018년07월12일</p> <p>(30) 우선권주장<br/>62/443,822 2017년01월09일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인<br/>아포센스 엘티디.<br/>이스라엘 49170 페타크-티바 키르야트 마탈론 하<br/>오템 스트리트 5-7</p> <p>(72) 발명자<br/>지브 일란<br/>이스라엘 4441805 크파르 사바 세자프 스트리트 5<br/>듀브로브스키 요셉<br/>이스라엘 6910201 텔아비브 아인슈타인 스트리트<br/>36<br/>그림베르크 하기트<br/>이스라엘 4636722 헤르츨리야 데이비드 시모니 22</p> <p>(74) 대리인<br/>유미특허법인</p> |
|---|---|

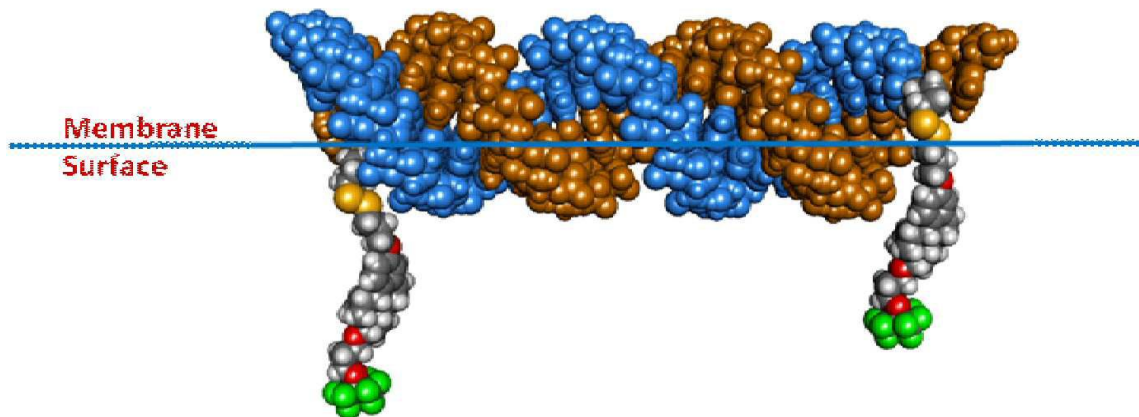
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 분자의 막투과 전달을 위한 화합물 및 방법

(57) 요약

본 발명은 새로운 분자 전달 시스템에 연결된, siRNA와 같은 거대분자 약물을 포함하는 접합체 및 그 전구체에 관한 것이다. 이 새로운 시스템은 인지질 세포막과 같은 생물학적 장벽을 투과하는 siRNA나 안티센스 올리고뉴클레오타이드(ASO)와 같은 유전 약물의 전달에 특히 유리하다. 본 신규 전달 시스템은 막 내부 전계에 의해 에너지가 공급되는 막투과 전달 모이어티 및 세포질에서 환원되도록 설계된 레독스-반응성 디설파이드 모이어티를 포함하고, 이에 따라 적재 약물을 방출하여 그 표적 부위에서 약학적 효능을 발휘하게 한다. 이는 혈장 단백질의 존재 또는 부재 모두에서 작용한다.

대표도 - 도1b



(52) CPC특허분류

**C07J 41/0072** (2013.01)

**C07J 51/00** (2013.01)

**C12N 15/113** (2013.01)

**C12N 2310/14** (2013.01)

**C12N 2310/321** (2013.01)

**C12N 2310/3515** (2013.01)

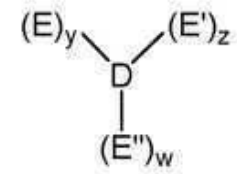
---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

하기 식(I):



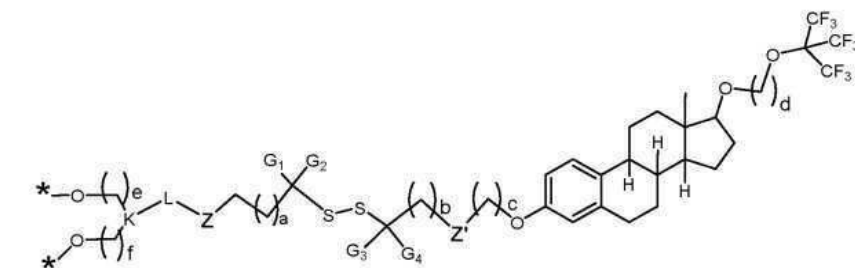
식 (I)

의 구조를 갖는 접합체, 식(I)의 구조로 표시되는 화합물의 약학적으로 허용되는 염, 수화물, 용매화물 및 금속 킬레이트, 및 그 염의 용매화물 및 수화물로부터 선택되는 접합체로서,

D는 소분자 약물, 펩타이드, 단백질, 및 천연 또는 변형 단일 가닥 또는 이중 가닥 DNA 또는 RNA, siRNA 또는 ASO로 이루어진 군으로부터 선택된 생물학적 막을 통해 전달되는 약물이고,

y, z 및 w는 각각 0, 1, 2, 3, 4, 5 또는 6에서 독립적으로 선택된 정수이며, 각 정수가 0일 때 이는 각각의 E 모이어티가 부재함을 의미하고; y, z 또는 w 중 하나 이상은 0과 상이하며;

E, E' 또는 E''는 동일하거나 상이할 수 있으며, 각각은 독립적으로 식(II):



식(II)

의 구조를 갖는 화합물, 식(II)의 구조로 표시되는 화합물의 약학적으로 허용되는 염, 수화물, 용매화물 및 금속 킬레이트, 및 그 염의 용매화물 및 수화물로부터 선택되며,

상기 식에서, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, G<sub>3</sub> 및 G<sub>4</sub>는 각각 독립적으로 수소, 메틸 또는 에틸로 이루어진 군으로부터 선택되고, 2개 이상의 G기는 수소이며;

Z 및 Z'는 각각 독립적으로 부재(null); -CH<sub>2</sub>-; -NH-; -N(R')-; -C(H)(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>[N(R'')(R''')]-; 및 -N(R')-C(O)-C(H)(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>[N(R'')(R''')]-로 이루어진 군에서 선택되고, 여기에서 각각의 R', R'' 및 R'''는 각각 수소, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> 알킬; 또는 C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> 알킬 아민으로 이루어진 군에서 선택되고, 여기서, 아민은 1차, 2차 또는 3차 아민이며; n은 0, 1, 2, 3, 또는 4의 정수를 나타내고; n = 0은 부재(null)를 의미하며; Z 또는 Z' 중 하나 이상은 아민이고;

L은 부재; 에테르; 아마이드; 에스테르; 카르보네이트; 카르바메이트 기(들); 각각이 하이드록실 또는 아민 기(들)로 선택적으로 치환된 1 내지 4개의 탄소 원자를 포함하는 1개 또는 2개의 탄화수소 사슬; 또는 이들의 임의의 조합으로부터 선택되는 링커이고;

K는 부재, -CH- 및 -N-으로부터 선택되고;

a는 0, 1, 2, 3 및 4로 이루어진 군으로부터 선택된 정수이며;

b는 0, 1, 2, 3 및 4로 이루어진 군으로부터 선택된 정수이고;

c는 1, 2, 3 및 4로 이루어진 군으로부터 선택된 정수이며;

d는 2, 3 및 4로 이루어진 군으로부터 선택된 정수이고;

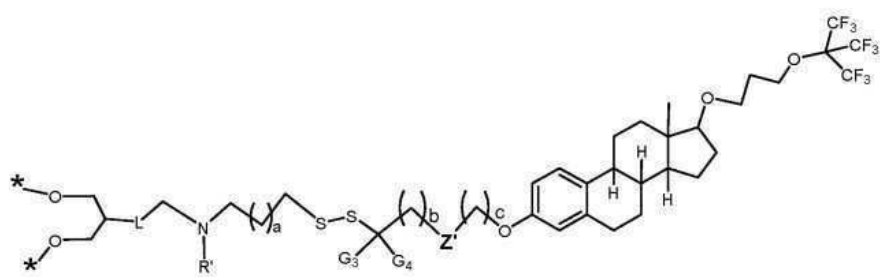
e, f는 각각 정수이며, 0, 1, 2 및 3으로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;

\*는 수소; D에의 연결점; 알코올용 보호기에의 연결점; 인산염, 황산염 또는 카르복시기에 대한 연결점; 및 고체 지지체에 대한 연결점으로 이루어진 군에서 선택되는,

접합체.

## 청구항 2

제1항에 있어서, E, E' 또는 E" 중 하나 이상이 하기 식(III):



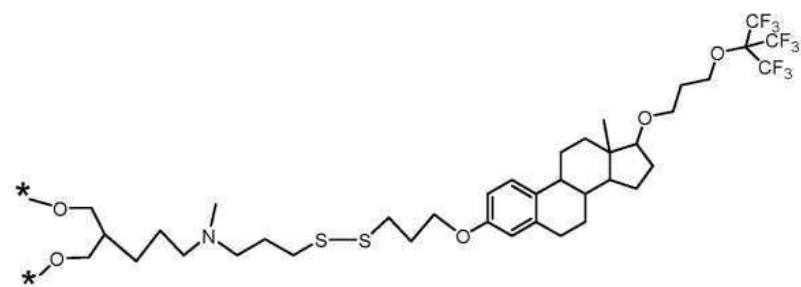
식(III)

의 구조를 갖는 화합물, 식(III)의 구조로 표시되는 화합물의 약학적으로 허용되는 염, 수화물, 용매화물 및 금속 킬레이트, 및 그 염의 용매화물 및 수화물로부터 선택되고,

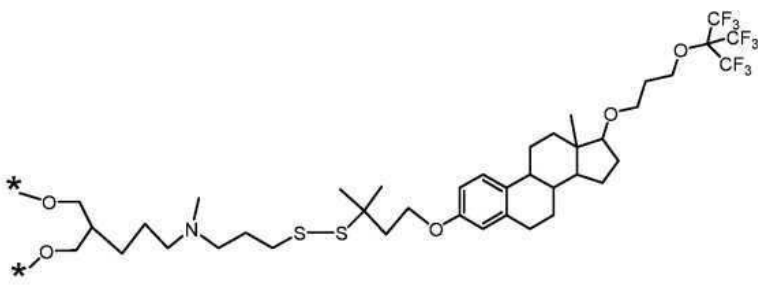
상기 식에서 Z', R', L, G<sub>3</sub>, G<sub>4</sub>, a, b, c 및 \*는 상기 식(II)에서 정의된 바와 같은, 접합체.

## 청구항 3

제2항에 있어서, E, E' 또는 E" 중 적어도 하나가 하기 식 (IV) 또는 (IVa):



식(IV)

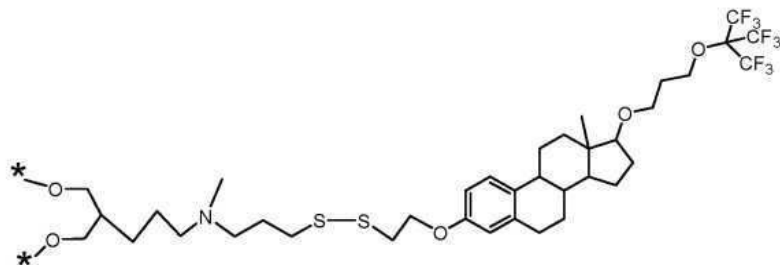


식(IVa)

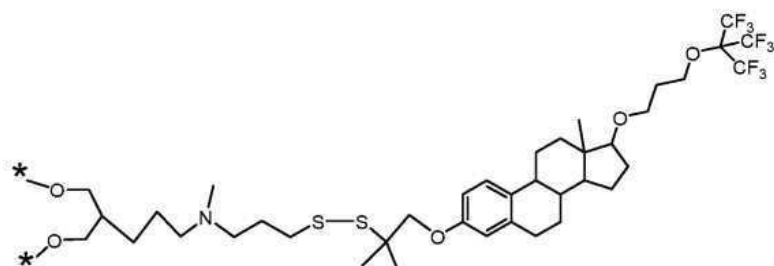
의 구조를 갖는 화합물, 식(IV) 또는 (IVa)의 구조로 표시되는 화합물의 약학적으로 허용되는 염, 수화물, 용매 화물 및 금속 킬레이트, 및 그 염의 용매화물 및 수화물로부터 선택되는, 접합체.

#### 청구항 4

제2항에 있어서, E, E' 또는 E" 중 하나 이상이 하기 식(V) 또는 (Va):



식(V)

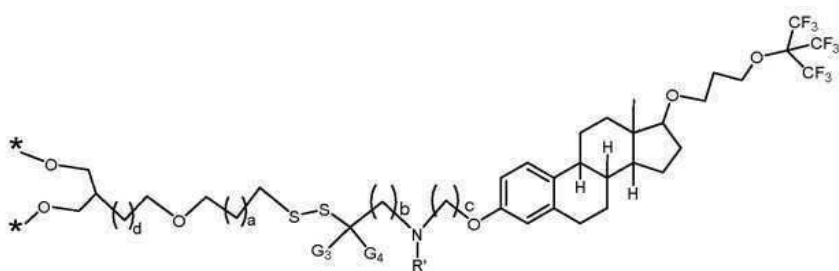


식(Va)

의 구조를 갖는 화합물, 식(V) 또는 식(Va)의 구조로 표시되는 화합물의 약학적으로 허용되는 염, 수화물, 용매 화물 및 금속 킬레이트, 및 그 염의 용매화물 및 수화물로부터 선택되는, 접합체.

#### 청구항 5

제1항에 있어서, E, E' 또는 E" 중 적어도 하나가 하기 식(VI):



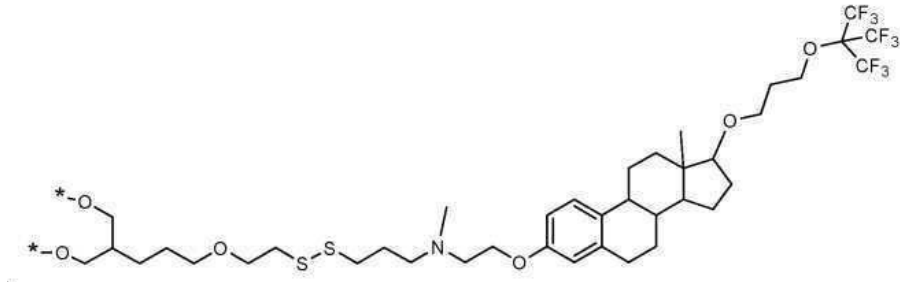
식(VI)

의 구조를 갖는 화합물, 식(VI)의 구조로 표시되는 화합물의 약학적으로 허용되는 염, 수화물, 용매화물 및 금속 킬레이트, 및 그 염의 용매화물 및 수화물 중에서 선택되고,

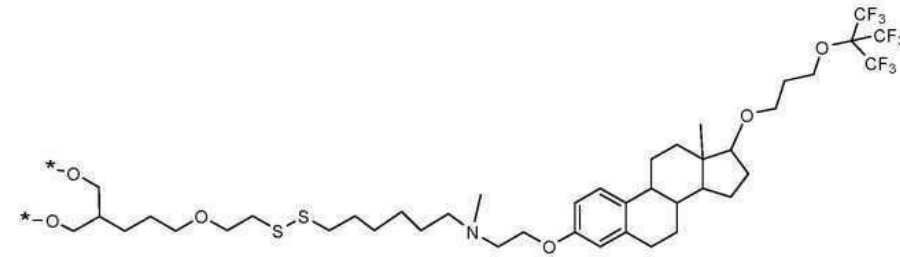
상기 식에서 R', G<sub>3</sub>, G<sub>4</sub>, a, b, c, d 및 \*는 상기 식(II)에서 정의된 바와 같은, 접합체.

## 청구항 6

제5항에 있어서, E, E' 또는 E" 중 하나 이상은 하기 식 (VII) 또는 (VIIa):



식(VII)

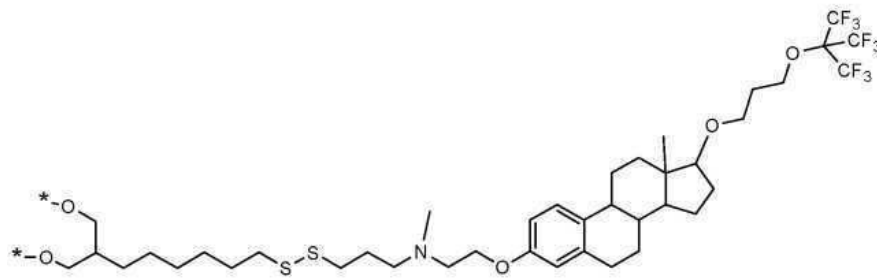


식(VIIa)

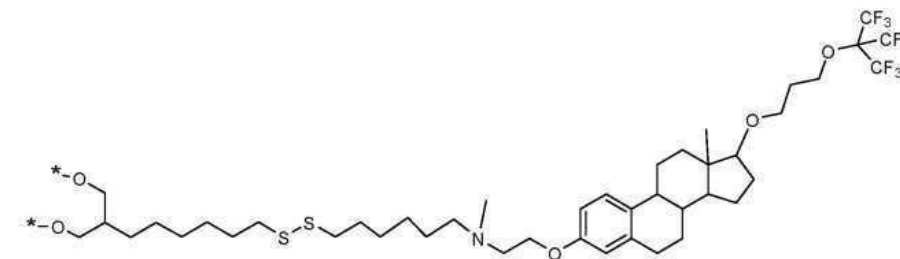
의 구조를 갖는 화합물, 식 (VII) 또는 (VIIa)의 구조로 표시되는 화합물의 약학적으로 허용되는 염, 수화물, 용매화물 및 금속 킬레이트, 및 그 염의 용매화물 및 수화물 중에서 선택되는, 접합체.

## 청구항 7

제2항에 있어서, E, E' 또는 E" 중 적어도 하나가 하기 식 (VIII) 또는 (VIIIa):



식(VIII)



식(VIIIa)

의 구조를 갖는 화합물, 식 (VIII) 또는 (VIIIa)의 구조로 표시되는 화합물의 약학적으로 허용되는 염, 수화물,

용매화물 및 금속 킬레이트, 및 그 염의 용매화물 및 수화물 중에서 선택되는, 접합체.

#### 청구항 8

상기 식 (I), (II), (III), (IV), (IVa), (V), (Va), (VI), (VII), (VIIa), (VIII) 또는 (VIIIa) 중 어느 하나의 구조를 갖고, 약물에 부착된 접합체.

#### 청구항 9

제8항에 있어서, 약물이 siRNA, ASO 또는 치료 단백질로 이루어진 군으로부터 선택되는 거대분자 약물인, 접합체.

#### 청구항 10

제8항에 따른 접합체, 및 약학적으로 허용가능한 염 또는 담체를 포함하는 약학 조성물.

#### 청구항 11

세포를 제8항에 따른 접합체 또는 제10항에 따른 약학 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하고, 상기 세포는 배양 중이거나 살아있는 동물 또는 사람 개체에 존재하는, 약물을 생물학적 세포 내로 전달하는 방법.

#### 청구항 12

제10항에 따른 약학 조성물의 치료 유효량을, 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 의학적 장애의 치료 방법.

#### 청구항 13

제10항에 따른 약학 조성물을 개체의 생체 내로 투여하는 단계를 포함하는, 생물학적 장벽을 통한 약물의 전달 방법으로서, 상기 생물학적 장벽은 혈액-뇌 장벽, 혈액-안구 장벽 또는 혈액-태아 장벽인, 약물의 전달 방법.

#### 청구항 14

식 (I), (II), (III), (IV), (IVa), (V), (Va), (VI), (VII), (VIIa), (VIII) 및 (VIIIa) 중 어느 하나의 구조를 갖는, E, E' 또는 E" 모이어티, 및 본 발명의 접합체의 형성동안 제거되거나 변형될 예정인 화학적 모이어티를 포함하는, 전구체 분자.

#### 청구항 15

제14항에 있어서, 제거되거나 변형될 예정인 화학적 모이어티가 히드록실, 디메톡시트리틸 비스-(4-메톡시페닐)페닐메틸(DMT) 및 포스포르아미데이트로 이루어진 군에서 선택되는, 전구체 분자.

#### 청구항 16

제14항에 있어서, D는 단백질 약물이고,

전구체는 하기 구조 A 또는 B:



의 구조를 포함하며,

상기 식에서, W는 식 (II), (III), (IV), (IVa), (V), (Va), (VI), (VII), (VIIa), (VIII) 및 (VIIIa) 중 어느 하나에 따른 E, E' 또는 E" 모이어티로부터 선택되고,

상기 전구체는 그의 N-히드록시숙신이미드(NHS) 모이어티를 통해 단백질의 라이신 측쇄의 아민기에 결합하게 되는,

D에 E, E' 또는 E"의 부착을 위한, 전구체.

#### 청구항 17

siRNA의 5' 말단 각각에서 식 (II), (III), (IV), (IVa), (V), (Va), (VI), (VII), (VIIa), (VIII) 및 (VIIIa) 중 어느 하나에 따른 E, E' 또는 E" 모이어티에 연결된 siRNA 듀플렉스

를 포함하는 집합체.

#### 청구항 18

siRNA의 5' 말단 각각에서 및 siRNA 듀플렉스 내의 내부 위치에서, 식 (II), (III), (IV), (IVa), (V), (Va), (VI), (VII), (VIIa), (VIII) 및 (VIIIa) 중 어느 하나에 따른 E, E' 또는 E" 모이어티에 연결된 siRNA 듀플렉스

를 포함하는 집합체.

#### 청구항 19

생체 내 또는 시험관 내에서, 리포솜 또는 생물학적 세포의 인지질 막의 외측 레플릿의 변형 및 중심적 구조 교란을 유도하는 방법으로서,

상기 방법은 본 발명의 집합체를 인지질 막과 상호작용시키는 단계를 포함하고,

상기 집합체는

siRNA의 5' 말단 각각에서 및 siRNA 듀플렉스 내의 내부 위치에서, 식 (II), (III), (IV), (IVa), (V), (Va), (VI), (VII), (VIIa), (VIII) 및 (VIIIa) 중 어느 하나에 따른 E, E' 또는 E" 모이어티에 연결된 siRNA 듀플렉스

를 포함하는,

방법.

#### 청구항 20

제19항에 있어서, 인지질 막에서 엔도사이토시스 및/또는 플립-플롭을 유도하는, 방법.

### 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 시험관 내 및 생체 내에서, 그 중에서도 임상 환경에서, 이용되는 세포 내로의 생물학적 막을 통한 분자 및 고분자의 전달을 위한 화합물, 전달 시스템 및 방법에 관한 것이다.



## 배경 기술

[0002] 최근 몇 년간의 주요 과학적 진보 중 하나는 인간 게놈지도 작성의 완성하여 약물 치료를 위한 수많은 새로운 표적을 생성한 것이다. 이들 표적 중 다수가 세포 내에 존재하고, 유전 물질이나 단백질과 같은 거대분자 약물에 의해 다루어질 필요가 있다. 이 분야에서 특히 흥미로운 점은 작은 간섭 RNA(siRNA; small interfering RNA)를 사용하는 RNA 간섭에 의해 특정 유전자의 발현을 침묵시키는 능력이 최근에 발견되었다는 것이다. RNA 간섭은 세포 생물학적 시스템[그 중에서도, siRNA를 제공하기 위해 더 긴 이중 염기 서열을 절단하는 Dicer 단백질 복합체; 및 RNA-유도 침묵 복합체(RISC; RNA-induced silencing complex)]과 함께 작용할 수 있는 짧은 (약 19-27 염기쌍) 이중 가닥 RNA 서열(siRNA로 명명함)을 활용하는 것에 기초하는데, 이를 통해 번역을 억제하고 특정 mRNA 서열의 분해를 위해 마킹하여, 번역 단계에서 유전자 발현을 억제하는 작용을 할 수 있다. 특정 전령 RNA(mRNA)에 상보적인 미변형 또는 화학적으로 변형된 DNA 분자의 짧은 서열(보통 13-25 뉴클레오타이드)인 안티센스 올리고뉴클레오타이드(ASO)는 또한 특정 질병-관련 표적 단백질의 발현을 억제하고 그 생산을 차단한다. 새로운 세포내 표적을 표적화하는 것을 목표로 하는 다른 거대분자 약물은 단백질 약물이다. 그러나, 이러한 의료 보호에 대한 접근법의 엄청난 잠재적 이점에도 불구하고, 그러한 거대분자를 세포 내로 전달하는 것은, 상대적으로 크고 고도로 하전된 올리고뉴클레오타이드의 구조로 인해 상당히 어려운 과제로 남아 있다. 예를 들어, siRNA는 13kDa의 평균 분자량을 가지며, 40-50개의 음으로 하전된 인산염 그룹을 가지고 있다. 실제로, 올리고뉴클레오타이드의 막투과 전달에는 매우 큰 에너지 장벽의 극복이 요구된다. 따라서 시험관 내 및 생체 내에서 생물학적 막을 거쳐 거대분자 약물을 전달하기 위한 새로운 도구에 대한 요구가 충족되지 못하고 있다.

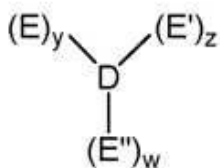
## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0003] 본 발명은 새로운 분자 전달 시스템에 연결된, siRNA와 같은 거대분자 약물을 포함하는 접합체 및 그 전구체에 초점을 둔다. 이 새로운 시스템은 인지질 세포막과 같은 생물학적 장벽을 투과하는 siRNA나 안티센스 올리고뉴클레오타이드(ASO)와 같은 유전 약물의 전달에 특히 유리하다. 본 신규 전달 시스템은 막 내부 전계(electrical field)에 의해 에너지가 공급되는 막투과 전달 모이어티 및 세포질에서 환원되도록 설계된 레독스-반응성 디설파이드 모이어티를 포함하고, 이에 따라 적재 약물(cargo drugs)을 방출하여 그 표적 부위에서 약학적 효능을 발휘하게 한다. 이는 혈장 단백질의 존재 또는 부재 모두에서 작용한다.

### 과제의 해결 수단

[0004] 본 발명의 일 구체예에서, 하기 식(I):



[0005]

[0006] 식(I)

[0007] 에 제시된 바와 같은 구조를 갖는 접합체, 식(I)에 기재된 바와 같은 구조로 표시되는 화합물의 약학적으로 허용되는 염, 수화물, 용매화물 및 금속 킬레이트, 및 그 염의 용매화물 및 수화물을 제공한다.

[0008] D는 소분자 약물, 펩타이드, 단백질 및 천연 또는 변형 단일 가닥 또는 이중 가닥 DNA 또는 RNA, siRNA 또는 ASO로 이루어진 군으로부터 선택된 생물학적 막을 통해 전달되는 약물이고;

[0009] y, z 및 w는 각각 0, 1, 2, 3, 4, 5 또는 6에서 독립적으로 선택된 정수이며, 각 정수가 0일 때 이는 각각의 E 모이어티가 부재함을 의미하고; y, z 또는 w 중 하나 이상은 0과 상이하하며;

[0010] E, E' 또는 E"는 동일하거나 상이할 수 있고, 각각은 독립적으로 식(II):

[0011]

[0012]

[0013]

[0014]

[0015]

[0016]

[0017]

[0018]

[0019]

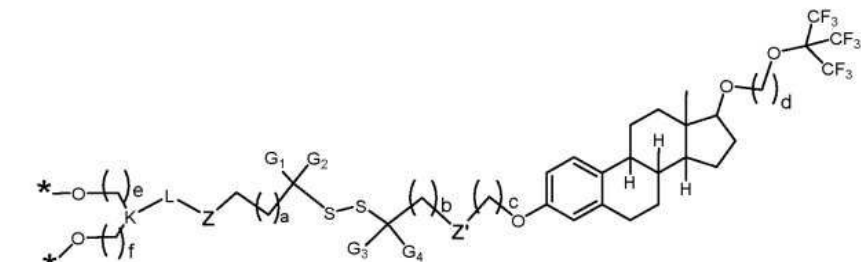
[0020]

[0021]

[0022]

[0023]

[0024]



식(II)

에서 나타낸 바와 같은 구조를 갖는 화합물, 식(II)에 기재된 바와 같은 구조로 표시되는 화합물의 약학적으로 허용되는 염, 수화물, 용매화물 및 금속 킬레이트, 및 그 염의 용매화물 및 수화물일 수 있다.

상기 식에서, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, G<sub>3</sub> 및 G<sub>4</sub>는 각각 독립적으로 수소, 메틸 또는 에틸로 이루어진 군으로부터 선택되고, 2개 이상의 G기는 수소이며;

Z 및 Z'는 각각 독립적으로 부재(null); -CH<sub>2</sub>-; -NH-; -N(R')-; -C(H)(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>[N(R'')(R''')]-; 및 -N(R')-C(O)-C(H)(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>[N(R'')(R''')]-로 이루어진 군에서 선택되고, 여기에서 각각의 R', R'' 및 R'''는 수소, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> 알킬; 또는 C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> 알킬 아민으로 이루어진 군에서 선택되고, 여기서, 아민은 1차, 2차 또는 3차 아민이며; n은 0, 1, 2, 3, 또는 4의 정수를 나타내고; n = 0은 부재(null)를 의미하며; Z 또는 Z' 중 하나 이상은 아민이고;

L은 부재; 에테르; 아마이드; 에스테르; 카르보네이트; 카르바메이트 기(들); 각각이 하이드록실 또는 아민 기(들)로 선택적으로 치환된 1 내지 4개의 탄소 원자를 포함하는 1개 또는 2개의 탄화수소 사슬; 또는 이들의 임의의 조합으로부터 선택되는 링커이며;

K는 부재, -CH- 및 -N-으로부터 선택되고;

a는 0, 1, 2, 3 및 4로 이루어진 군으로부터 선택된 정수이며;

b는 0, 1, 2, 3 및 4로 이루어진 군으로부터 선택된 정수이고;

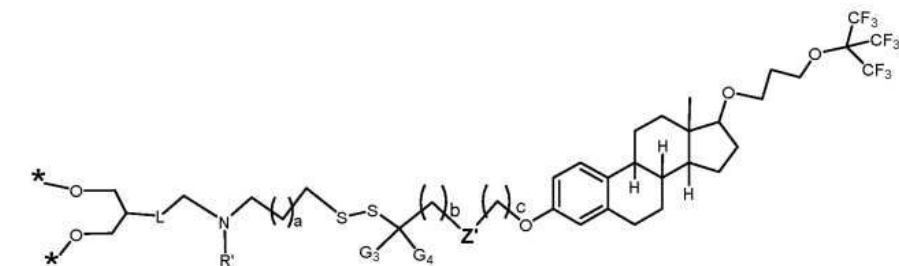
c는 1, 2, 3 및 4로 이루어진 군으로부터 선택된 정수이며;

d는 2, 3 및 4로 이루어진 군으로부터 선택된 정수이고;

e, f는 각각 정수이며, 0, 1, 2 및 3으로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;

\*는 수소; D에의 연결점; 알코올용 보호기에의 연결점; 인산염, 황산염 또는 카르복시기에 대한 연결점; 및 고체 지지체에 대한 연결점으로 이루어진 군에서 선택된다.

또 다른 실시 양태에서, E, E' 또는 E" 중 하나 이상이 하기 식(III):

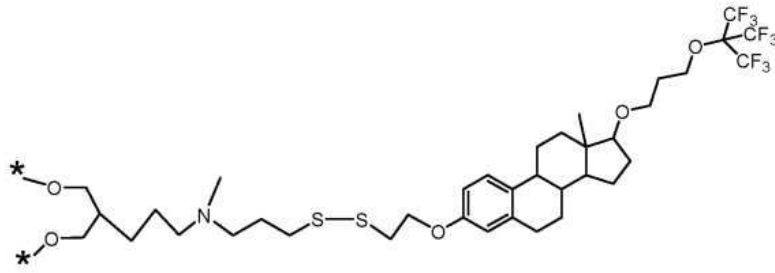


식(III)

에 제시된 바와 같은 구조를 갖는 화합물, 식(III)에 기재된 바와 같은 구조로 표시되는 화합물의 약학적으로 허용되는 염, 수화물, 용매화물 및 금속 킬레이트, 및 그 염의 용매화물 및 수화물인, 식(I)에 따른 집합체를

제공하며, 상기 식에서 Z', R', L, G<sub>3</sub>, G<sub>4</sub>, a, b, c 및 \*는 상기 식(II)에서 정의된 바와 같다.

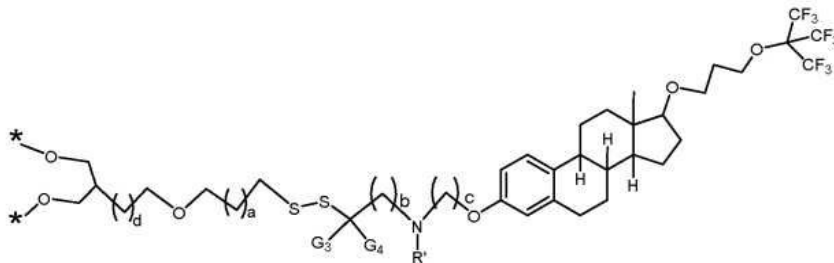
또 다른 실시 양태에서, E, E' 또는 E" 중 하나 이상이 하기 식(V):



식(V)

에 제시된 바와 같은 구조를 갖는 화합물, 식(V)에 기재된 바와 같은 구조로 표시되는 화합물의 약학적으로 허용되는 염, 수화물, 용매화물 및 금속 킬레이트, 및 그 염의 용매화물 및 수화물인, 식(III)에 따른 접합체를 제공한다.

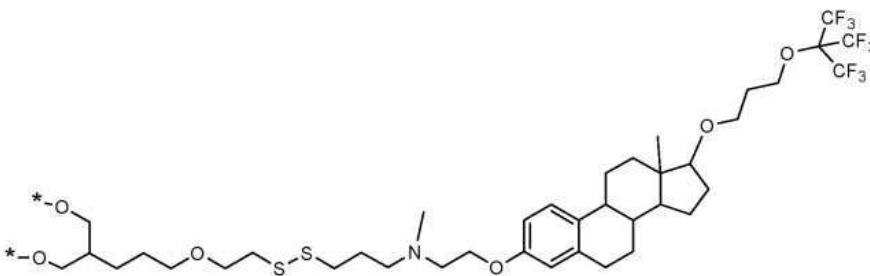
본 발명의 또 다른 구체예에서, 본 발명은 E, E' 또는 E"의 적어도 하나가 하기 식(VI):



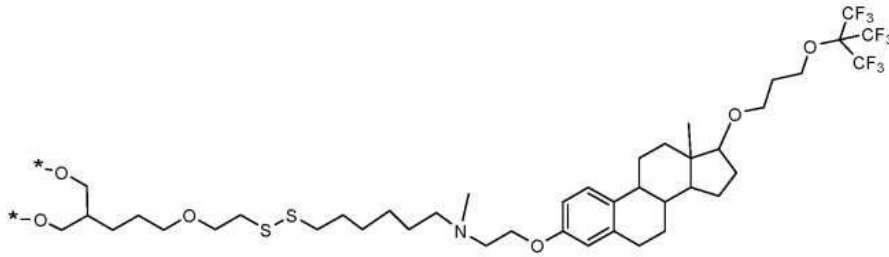
식(VI)

에서 나타낸 바와 같은 구조를 갖는 화합물, 식(VI)에 기재된 바와 같은 구조로 표시되는 화합물의 약학적으로 허용되는 염, 수화물, 용매화물 및 금속 킬레이트, 및 그 염의 용매화물 및 수화물인, 식(I)에 따른 접합체를 제공한다. 상기 식에서 R', G<sub>3</sub>, G<sub>4</sub>, a, b, c, d 및 \*는 상기 식(II)에서 정의된 바와 같다.

보다 특정한 실시 양태에서, E, E' 또는 E" 중 하나 이상은 하기 식(VII) 또는(VIIa):



[0038] 식(VII)

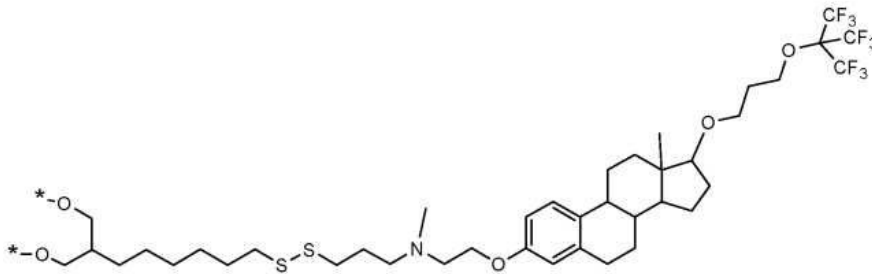


[0039]

[0040] 식(VIIa)

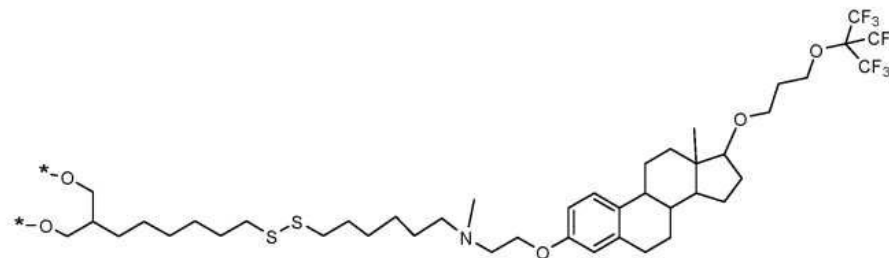
[0041] 에서 나타낸 바와 같은 구조를 갖는 화합물, 식(VII) 또는(VIIa)에 기재된 바와 같은 구조로 표시되는 화합물의 약학적으로 허용되는 염, 수화물, 용매화물 및 금속 킬레이트, 및 그 염의 용매화물 및 수화물인, 식(VI)에 따른 접합체를 제공한다. 상기 식(VII)에서 E 모이어티는 **Apo-Si-K-93-A**로 명명된다.

[0042] 또 다른 실시 양태에서, 본 발명은 E, E' 또는 E"의 적어도 하나가 하기 식(VIII) 또는(VIIIa):



[0043]

[0044] 식(VIII)



[0045]

[0046] 식(VIIIa)

[0047] 에 나타낸 바와 같은 구조를 갖는 화합물, 식(VIII) 또는(VIIIa)에 기재된 바와 같은 구조로 표시되는 화합물의 약학적으로 허용되는 염, 수화물, 용매화물 및 금속 킬레이트, 및 그 염의 용매화물 및 수화물인, 식(II)에 따른 접합체를 제공한다. 상기 식(VIIIa)에서 E 모이어티는 **Apo-Si-K-63-A**로 명명된다.

[0048] 일부 구현예에 따르면, 본 발명은 시험관 내 또는 생체 내에서 생물학적 막을 통해 세포 내로 약물을 전달하는 방법에 관한 것으로서, 상기 방법은 세포를 본원에 기재된 바와 같은 접합체와 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0049] 또 다른 구현예에 따르면, 본 발명은 치료가 필요한 환자의 의학적 장애를 치료하는 방법에 관한 것이고; 상기 방법은 본원에 기재된 바와 같은 접합체를 포함하는 약학 조성물의 치료적 유효량을 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0050] 다른 실시 양태에 따르면, 본 발명은 의학적 용도로, 예를 들어, 인간 또는 수의학 약제에서 사용하기 위한 본원에 기재된 접합체에 관한 것이다.

[0051] 또 다른 실시 양태에 따르면, 본 발명은 식(II), (III), (IV), (IVa), (V), (Va), (VI), (VII), (VIIa), (VIII) 또는 (VIIIa)에 나타낸 바와 같은, E, E' 또는 E" 모이어티 중 하나 이상의 용도, 및 치료를 필요로 하

는 환자의 의학적 장애를 치료하기 위한, 본원에 기재된 접합체의 제조를 위한 약제에 관한 것이다. 또 다른 실시 양태에 따르면, 본 발명은 치료가 필요한 환자에서 의학적 장애를 치료하기 위한 의약의 제조에서의 본원에 기재된 접합체의 용도에 관한 것이다. 본 발명의 일부 실시 양태에서, 의학적 장애는 암이다. 다른 구현예에서, 접합체는 항-감염성을 가지고, 세균성 또는 바이러스성 감염과 같은 감염성 질환의 치료에 유용할 것이다.

### 도면의 간단한 설명

[0052] 도 1a, 1b 및 1c는 하기 사항들을 입증한다: 도 1a는 siRNA 이중 가닥의 5'말단에 각각 위치한 2개의 E 모이어티를 포함하는 본 발명의 접합체를 도시한다. 도 1b는 접합체가 막과 상호 작용할 때, 막 표면에 평행한 상태로 siRNA가 존재하고, 외측 막 리플렛(leaflet)의 변형 및 구조적 혼란(strain and structural perturbation)을 유도하는 위치로 존재하는 접합체를 도시한다. 도 1c는 변형과 구조적 혼란의 결과로, 접합체에 의해 유도된 엔도사이토시스를 도시한다. 화살표는 엔도사이토시스의 소포를 예시한다.

도 2a, 2b, 2c 및 2d는 3개의 E 모이어티를 포함하는 본 발명의 siRNA 접합체의 구조를 예시한다. 도 2a는 세포의 공간에서 손상되지 않은 접합체를 도시한다. 도 2b는 세포질 내의 환원 조건에서 E 모이어티의 절단을 도시한다. 도 2c는 21/23-뉴클레오타이드 듀플렉스를 생성하고, 이로써 가이드의 잔여 모이어티를 제거하는 RNA 듀플렉스의 절단을 도시한다. 도 2d는 E 모이어티의 잔여 두 스템프(stump)와 함께 헬리카아제에 의한 패신저 가닥의 제거, 및 RISC 복합체 내로 그대로 전달될 준비가 된 가이드 가닥을 남기는 것을 도시한다.

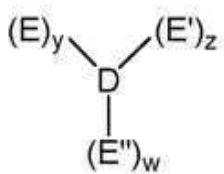
도 3은 본 발명의 접합체를 10% BSA로 인큐베이션시의 단백질-결합 및 단백질-프리 분획(화살표)을 나타낸다. 프로테이나아제 K(PK)의 처리로 모든 단백질-결합 접합체를 복구하였다.

도 4는 감소된 글루타티온(2시간동안 1mM)과 함께 인큐베이션할 때, 본 발명의 접합체(화살표)의 환원성 절단을 나타낸다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0053] 본 발명은 생물학적 막 및 생물학적 장벽을 가로질러 약물을 전달하도록 고안된, 분자 전달 시스템과 연결된 접합체 및 이의 전구체에 관한 것으로서, 이에 제한되는 것은 아니지만, 올리고뉴클레오타이드와 같은 거대분자 약물, 일부 구현예에서는 siRNA와 같은 거대분자 약물을 포함하는 접합체 및 전구체에 관한 것이다. 이러한 신규 전달 시스템은 막 내부 전계에 의해 에너지가 공급되는 막투과 전달 모이어티 및 세포질에서 감소되도록 설계된 레독스-반응성 디설파이드 모이어티를 포함하고, 이에 따라 적재 약물(cargo drugs)을 방출하여 그 표적 부위에 서 약학적 효능을 발휘하도록 한다. 이는 혈장 단백질의 존재 또는 부재 모두에서 작용한다

[0054] 본 발명의 일 구체예에서, 하기 식(I):



[0055]

[0056] 식 (I)

[0057] 에 제시된 바와 같은 구조를 갖는 접합체, 식(I)에 기재된 바와 같은 구조로 표시되는 화합물의 약학적으로 허용되는 염, 수화물, 용매화물 및 금속 킬레이트, 및 그 염의 용매화물 및 수화물을 제공한다.

[0058] D는 소분자 약물, 펩타이드, 단백질, 및 천연 또는 변형 단일 가닥 또는 이중 가닥 DNA 또는 RNA, siRNA 또는 ASO로 이루어진 군으로부터 선택된 생물학적 막을 통해 전달되는 약물이고;

[0059] y, z 및 w는 각각 0, 1, 2, 3, 4, 5 또는 6에서 독립적으로 선택된 정수이며, 각 정수가 0일 때 이는 각각의 E 모이어티가 부재함을 의미하고; y, z 또는 w 중 하나 이상은 0과 상이하며;

[0060] E, E' 또는 E"는 동일하거나 상이할 수 있으며, 각각은 독립적으로 식(II):

[0061]

[0062]

[0063]

[0064]

[0065]

[0066]

[0067]

[0068]

[0069]

[0070]

[0071]

[0072]

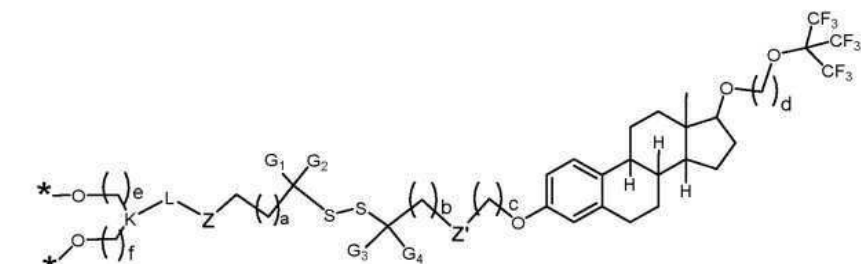
[0073]

[0074]

[0075]

[0076]

[0077]



식(II)

에서 나타낸 바와 같은 구조를 갖는 화합물, 식(II)에 기재된 바와 같은 구조로 표시되는 화합물의 약학적으로 허용되는 염, 수화물, 용매화물 및 금속 킬레이트, 및 그 염의 용매화물 및 수화물일 수 있다.

상기 식에서, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, G<sub>3</sub> 및 G<sub>4</sub>는 각각 독립적으로 수소, 메틸 또는 에틸로 이루어진 군으로부터 선택되고, 2개 이상의 G기는 수소이며;

Z 및 Z'는 각각 독립적으로 부재(null); -CH<sub>2</sub>-; -NH-; -N(R')-; -C(H)(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>[N(R'')(R''')]-; 및 -N(R')-C(O)-C(H)(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>[N(R'')(R''')]-로 이루어진 군에서 선택되고, 여기에서 각각의 R', R'' 및 R'''는 각각 수소, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> 알킬; 또는 C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> 알킬 아민으로 이루어진 군에서 선택되고, 여기서, 아민은 1차, 2차 또는 3차 아민이며; n은 0, 1, 2, 3, 또는 4의 정수를 나타내고; n = 0은 부재(null)를 의미하며; Z 또는 Z' 중 하나 이상은 아민이고;

L은 부재; 에테르; 아마이드; 에스테르; 카르보네이트; 카르바메이트 기(들); 각각이 하이드록실 또는 아민 기(들)로 선택적으로 치환된 1 내지 4개의 탄소 원자를 포함하는 1개 또는 2개의 탄화수소 사슬; 또는 이들의 임의의 조합으로부터 선택되는 링커이고;

K는 부재, -CH- 및 -N-으로부터 선택되고;

a는 0, 1, 2, 3 및 4로 이루어진 군으로부터 선택된 정수이며;

b는 0, 1, 2, 3 및 4로 이루어진 군으로부터 선택된 정수이고;

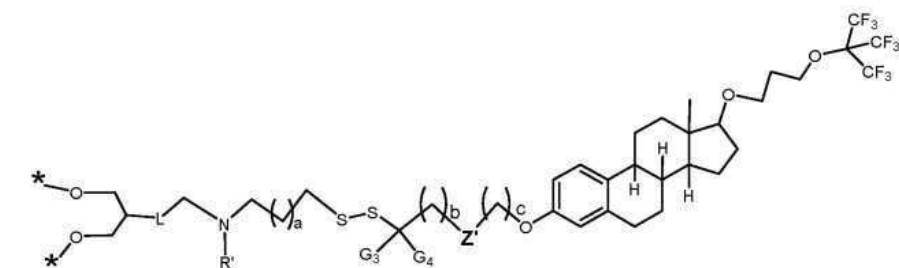
c는 1, 2, 3 및 4로 이루어진 군으로부터 선택된 정수이며;

d는 2, 3 및 4로 이루어진 군으로부터 선택된 정수이고;

e, f는 각각 정수이며, 0, 1, 2 및 3으로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;

\*는 수소; D에의 연결점; 알코올용 보호기에의 연결점; 인산염, 황산염 또는 카르복시기에 대한 연결점; 및 고체 지지체에 대한 연결점으로 이루어진 군에서 선택된다.

또 다른 실시 양태에서, E, E' 또는 E" 중 하나 이상이 하기 식(III):

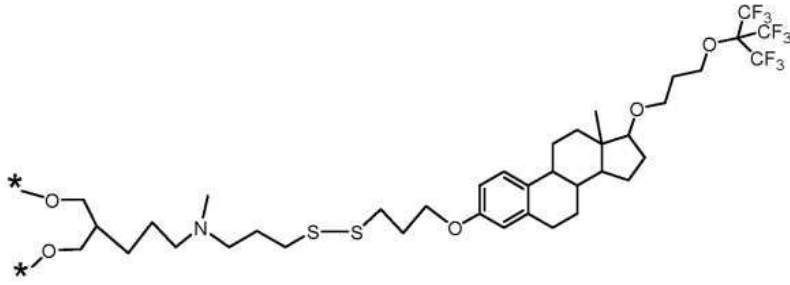


식(III)

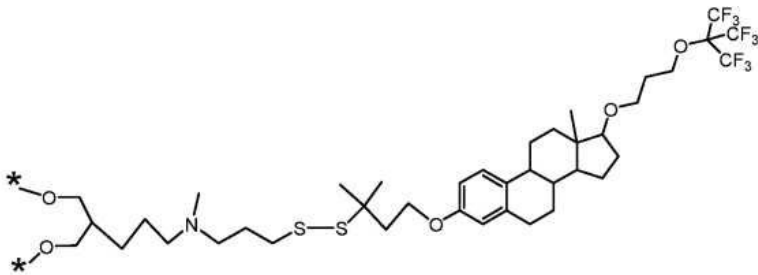
에 제시된 바와 같은 구조를 갖는 화합물, 식(III)에 기재된 바와 같은 구조로 표시되는 화합물의 약학적으로 허용되는 염, 수화물, 용매화물 및 금속 킬레이트, 및 그 염의 용매화물 및 수화물인, 식(I)에 따른 집합체를

제공하며, 상기 식에서 Z', R', L, G<sub>3</sub>, G<sub>4</sub>, a, b, c 및 \*는 상기 식(II)에서 정의된 바와 같다.

다른 실시 양태에서, 본 발명은 E, E' 또는 E" 중 적어도 하나가 하기 식 (IV) 또는 (IVa):



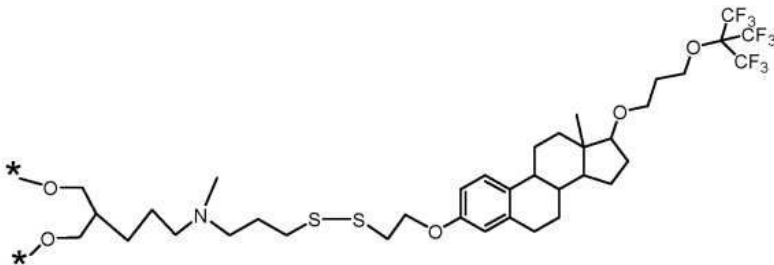
식(IV)



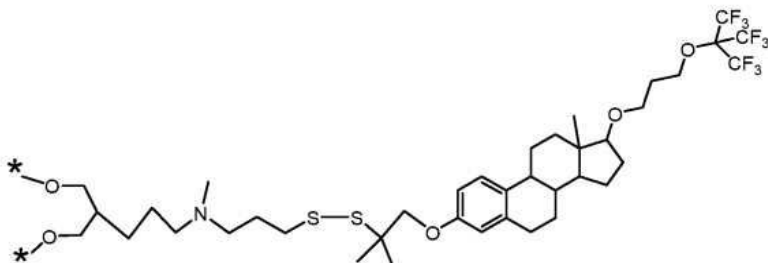
식(IVa)

에 나타낸 바와 같은 구조를 갖는 화합물, 식(IV) 또는 (IVa)에 기재된 바와 같은 구조로 표시되는 화합물의 약학적으로 허용되는 염, 수화물, 용매화물 및 금속 킬레이트, 및 그 염의 용매화물 및 수화물인, 식(III)에 따른 집합체를 제공한다.

또 다른 실시 양태에서, E, E' 또는 E" 중 하나 이상이 하기 식(V) 또는 (Va):



식(V)



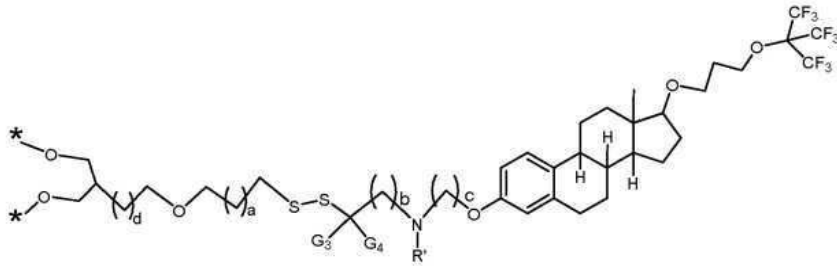
식(Va)

에 제시된 바와 같은 구조를 갖는 화합물, 식(V) 또는 식(Va)에 기재된 바와 같은 구조로 표시되는 화합물의 약학적으로 허용되는 염, 수화물, 용매화물 및 금속 킬레이트, 및 그 염의 용매화물 및 수화물인, 식(III)에 따른



접합체를 제공한다.

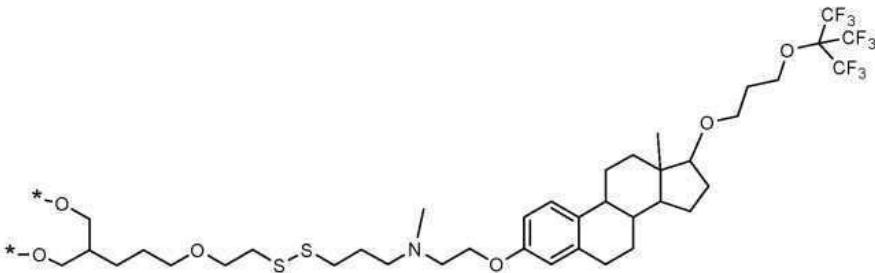
본 발명의 또 다른 구체예에서, 본 발명은 E, E' 또는 E"의 적어도 하나가 하기 식(VI):



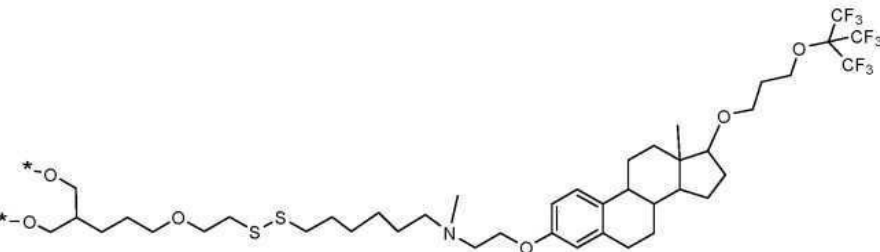
식(VI)

에서 나타낸 바와 같은 구조를 갖는 화합물, 식(VI)에 기재된 바와 같은 구조로 표시되는 화합물의 약학적으로 허용되는 염, 수화물, 용매화물 및 금속 킬레이트, 및 그 염의 용매화물 및 수화물인, 식(I)에 따른 접합체를 제공한다. 상기 식에서 R', G<sub>3</sub>, G<sub>4</sub>, a, b, c, d 및 \*는 상기 식(II)에서 정의된 바와 같다.

보다 특정한 실시 양태에서, E, E' 또는 E" 중 하나 이상은 하기 식 (VII) 또는 (VIIa):



식(VII)



식(VIIa)

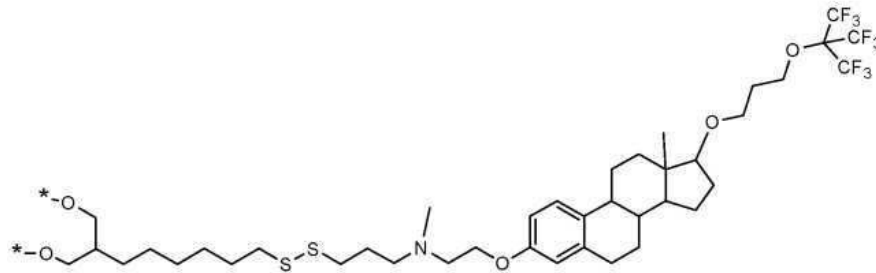
에서 나타낸 바와 같은 구조를 갖는 화합물, 식 (VII) 또는 (VIIa)에 기재된 바와 같은 구조로 표시되는 화합물의 약학적으로 허용되는 염, 수화물, 용매화물 및 금속 킬레이트, 및 그 염의 용매화물 및 수화물인, 식 (VI)에 따른 접합체를 제공한다. 상기 식 (VII)에서 E 모이어티는 **Apo-Si-K-93-A**로 명명된다.



[0100] 또 다른 실시 양태에서, 본 발명은 E, E' 또는 E"의 적어도 하나가 하기 식 (VIII) 또는(VIIIa):

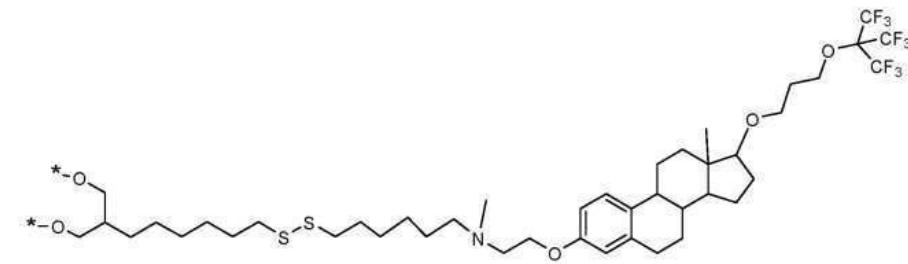
[0101]

[0102]



[0103]

[0104]



[0105]

[0106]

[0107]

[0108]

[0109]

[0110]

식(VIIIa)

에 나타낸 바와 같은 구조를 갖는 화합물, 식 (VIII) 또는 (VIIIa)에 기재된 바와 같은 구조로 표시되는 화합물의 약학적으로 허용되는 염, 수화물, 용매화물 및 금속 킬레이트, 및 그 염의 용매화물 및 수화물인, 식(II)에 따른 접합체를 제공한다. 상기 식 (VIIIa)에서 E 모이어티는 **Apo-Si-K-63-A**로 명명된다.

본 발명의 접합체에 의해 전달되는 약물(즉, 모이어티 D)은 소분자 약물, 또는 펩타이드, 단백질, 또는 올리고뉴클레오타이드(예: 단일 가닥 또는 이중 가닥의 RNA 또는 DNA)와 같은 거대분자일 수 있다. 본 발명의 구체예에서, 전달되는 거대분자는 유전자 침묵을 위한 RNA 가닥, 즉 siRNA(작은 간섭 RNA), 마이크로RNA(miRNA) 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드(ASO)로 작용하도록 고안된 DNA 서열을 포함한다.

일 실시 양태에서, 본 발명은 약물을 생물학적 막을 가로 질러 세포질 내로 또는 혈액-뇌 장벽(BBB), 혈액-안구 장벽(BOB), 혈액-태아 장벽(태반-혈액 장벽) 등과 같은 생물학적 장벽을 통해 전달하는 시스템을 포함하는 신규 접합체에 관한 것이다.

본 발명의 문맥에서 "알코올에 대한 보호기"라는 용어는 히드록시기에 부착된 화학기를 지칭하며, 이는 특정 화학 반응동안 히드록시기를 "마스킹"하고 그 후 잠재적으로 이를 제거하기 위한 것으로서, 본 기술분야에 공지되어 있다. 그러한 보호기의 예로는 아세틸(Ac), 벤조일(Bz), 벤질(Bn), β-메톡시에톡시메틸 에테르(MEM), 디메톡시트리틸, [비스-(4-메톡시페닐)페닐메틸](DMT), 메톡시메틸 에테르(MOM), 메톡시트리틸[(4-메톡시페닐)디페닐메틸](MMT), p-메톡시벤질 에테르(PMB), 피발로일(Pivaloyl; Piv), 테트라히드로피라닐(THP), 테트라히드로푸란(THF), 트리틸(트리페닐메틸, Tr), 실릴 에테르[예로서, 트리메틸실릴(TMS), tert-부틸디메틸실릴(TBDMS), 트리-이소-프로필실릴옥시메틸(TOM) 및 트리이소프로필실릴(TIPS) 에테르], 에톡시에틸 에테르(EE), 포스포르아미다이트(phosphoramidite), N-하이드록시석신이미드(NHS)가 있다.

본 발명의 문맥에서 용어 "전구체"는 접합체의 합성동안 제거되거나 변형될 예정인, 화학 기(들)에 부착된 본 발명의 E, E' 또는 E"에 관한 것이다. 그러한 제거 또는 변형은 합성의 다양한 단계에서 일어날 수 있는데, 이에 제한되는 것은 아니나, 예를 들어, 상기 E, E' 또는 E" 모이어티의 거대분자 약물로의 부착, 예를 들어 올리고뉴클레오타이드 약물과 같은 거대분자 약물에 부착되는 동안 일어날 수 있다.

본 발명의 일 구현예에서, 본 발명은 단백질 또는 올리고뉴클레오타이드(예: siRNA 또는 ASO)와 같은 치료학적으로 유용한 약물을 포함하는 본 발명에 따른 접합체의, 이를 필요로 하는 개체의 의학적 장애 치료를 위한 용도에 관한 것이다. 의학적 장애는 퇴행성 장애, 암, 외상성, 독성 또는 허혈성 상해(ischemic insults), 감염 또는 면역-매개 장애일 수 있으나, 이에 제한되지는 않으며, 특정 단백질(들)이 질병 원인 또는 발병원에서 역할

을 담당하고, siRNA 또는 안티센스 메커니즘을 통해 각각의 유전자의 발현을 조절하거나 또는 항체와 같은 치료 단백질 또는 단백질 대체 요법에 의해 각 단백질의 활성을 조절함으로써 질병-관련 과정을 억제하거나 질환의 근본 원인을 치료하는데 유익한 효과를 가질 수 있는 질병일 수 있다.

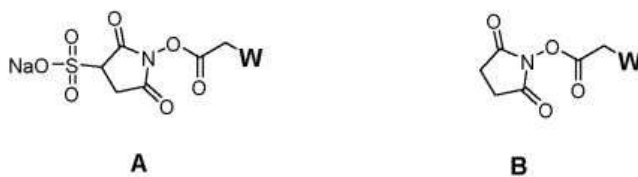
- [0111] 예를 들어, 본 발명의 구현예에 따른 접합체는, 특정 단백질을 암호화하는 DNA 서열에 결합하거나 또는 단백질로의 번역이 일어나는 이의 각 전령 RNA(mRNA)에 결합하는 단일 가닥 또는 이중 가닥의 핵산 가닥(DNA, RNA 또는 이의 화학적 유사체)의 투여를 포함하는 의학적 치료 형태인 안티센스 또는 siRNA 치료법으로서 사용될 수 있다. 이러한 치료법은 각 유전자의 발현을 억제하고, 이로써 질병의 병인 또는 발병원에 역할을 할 수 있는 각각의 질병-관련 단백질의 생성을 방지하도록 작용할 수 있다. 대안적으로, 본 발명의 접합체는 치료 단백질, 또는 Cas9 단백질과 같은 단백질/핵산 복합체를 포함할 수 있다.
- [0112] 본 발명의 문맥에서 "약물" 또는 "의약"이란 용어는 질환을 앓고 있는 환자에게 투여될 때 환자에게 유익한 효과를 발휘할 수 있는 화학 물질에 관한 것이다. 유익한 효과는 증상의 악화, 또는 질병 과정에서 역할을 하는 제제나 물질에 대한 반작용 효과일 수 있다. 약물은 유전자 발현을 억제하도록 투여되는 작은 분자, 또는 단백질 또는 단일- 또는 이중-가닥 RNA 또는 DNA와 같은 거대분자를 포함할 수 있다. 그 중에서, 약물은 siRNA 또는 ASO를 포함할 수 있다. 일부 실시 양태에서, 약물은 퇴행성 장애, 암, 허혈성, 감염성, 독성 외상 또는 면역-매개 장애를 치료하는 것을 목적으로 한다.
- [0113] 본 발명에 따른 용어 "생물학적 막"은 생물학적 시스템과 관련된 임의의 인지질 막을 지칭한다. 그러한 인지질 막의 예로는 세포의 원형질 막, 내세포 막, 또는 혈액-뇌 장벽(BBB), 혈액-안구 장벽(BOB) 또는 혈액-태반 장벽과 같은 생물학적 장벽이 있다.
- [0114] 본 발명의 일 구현예에서, 본 발명은 본원에 기재된 접합체 및 약학적으로 허용 가능한 담체(들) 또는 염(들)을 포함하는 약학적 조성물을 제공한다. 일부 구체예에 따라, 본 발명의 접합체 및 약학적 조성물은 임상 환경에서 생체 내에서 사용될 수 있다.
- [0115] 다른 실시 양태에서, 본 발명은 필요로 하는 환자에서 의학적 장애의 치료에 사용하기 위한, 본 발명의 접합체 또는 본 발명의 접합체를 포함하는 약학 조성물을 포함한다. 본 발명의 추가의 실시 양태에서는, 필요로 하는 환자에서의 의학적 장애를 치료하기 위한 약학적 조성물의 제조에 있어서, 본 발명의 접합체의 사용을 포함한다. 일부 실시 양태에서, 의학적 장애는 암이다.
- [0116] 본 발명의 일 구현예에 따른 접합체는 siRNA, ASO, 항체와 같은 치료 단백질을 세포막을 통해 또는 혈액-뇌 장벽(BBB)과 같은 생물학적 장벽을 통해 전달하는 것을 유리하게 개선할 수 있고, 따라서 효능, 독성 또는 약물동력학과 같은 하나 이상의 측면에서 거대분자 약물의 성능을 개선할 수 있다.
- [0117] 본 발명의 접합체가 다른 약물 전달 시스템보다 유리하도록 설계된 중요한 측면은 알부민에 대한 최적화된 유리 결합 친화력(favorable binding affinity)과 관련되기 때문이다, 이는 한편으로는 체내에서 장기간의 체류 시간을 가능하게 하면서 동시에 신체 전반을 통한 넓은 분포를 제공하고, 혈장 용해 효소에 의한 분해로부터의 보호를 부여할 뿐만 아니라, 다른 한편으로는, 인지질 세포막에 우선적으로 결합하기 위해, 알부민으로부터 접합체를 효과적으로 분리시키는 것을 가능하게 하고, 이후 막을 통해 세포 내로 전달하게 한다.
- [0118] 본 발명의 접합체가 다른 약물 전달체 시스템보다 유리하도록 설계된 또 다른 중요한 측면은 레독스-민감성 모이어티, 즉 디설파이드 기를 포함하는 것과 관련되기 때문이다, 이는 거대분자 약물의 방출과 함께 세포질에서 구조체의 선택적 절단을 제공하고, 그 표적 부위에서 약학적 효과를 발휘하도록 한다.
- [0119] 본 발명의 일 구현예에서, 약물은 siRNA, ASO 또는 치료 단백질로 이루어진 군으로부터 선택되는 거대분자이다.
- [0120] 본 발명의 일 구현예에서, 본 발명은 하기 화학식 (II), (III), (IV), (IVa), (V), (Va), (VI), (VII), (VIIa), (VIII) 또는 (VIIIa) 중 어느 하나에 기재된 바와 같은 구조를 갖는 접합체 및 약학적으로 허용되는 염 또는 담체를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.
- [0121] 본 발명의 일 구현예에서, 배양 중이거나 살아있는 동물 또는 사람 개체에 존재하는 생물학적 세포 내로 약물을 전달하는 방법을 제공하는데, 상기 방법은 세포를 본 발명의 접합체와 접촉시키는 단계를 포함한다.
- [0122] 본 발명의 일 구현예에서, 생물학적 막은 세포막 및 생물학적 장벽으로 구성된 군으로부터 선택되고, 상기 생물학적 장벽은 혈액-뇌 장벽, 혈액-안구 장벽 또는 혈액-태아 장벽인 방법을 제공한다.
- [0123] 본 발명의 일 구현예에서, E, E' 또는 E" 각각이 독립적으로 식 (II), (III), (IV), (IVa), (V), (Va), (VI),

(VII), (VIIa), (VIII) 또는 (VIIIa) 중 어느 하나에 기재된 바와 같은 구조를 갖고, 약물에 부착된 접합체를 제공한다.

[0124] 전술한 바와 같이, 본 발명의 범위는 또한 "전구체"로 불리는 분자를 포함한다. 본 발명의 문맥에서 "전구체"는 식 (II), (III), (IV), (IVa), (V), (Va), (VI), (VII), (VIIa), (VIII) 또는 (VIIIa) 중 어느 하나에 따른 E, E' 또는 E" 모이어티 중 어느 하나를 포함하는 분자인데, 이는 접합체의 합성 중에 제거되거나 변형될 예정인, 즉 D 모이어티를 E, E' 또는 E" 모이어티에 부착하는 단계에서 제거되거나 변형될 예정인 화학 기와 연결된다. 이러한 화학 기의 예로는 포스포르 아마다이트, 아지드, 아세틸렌, [디메톡시트리틸 비스-(4-메톡시페닐)페닐메틸](DMT) 또는 N-히드록시석신이미드(NHS) 기가 있다.

[0125] 본 발명의 보다 구체적인 양태에서, D가 올리고뉴클레오타이드 약물(예: siRNA)인 경우, 본 발명은 E, E' 또는 E"의 D와의 접합동안 제거되거나 변형될 예정인 화학 모이어티가 포스포르아미다이트 및/또는 DMT를 포함하는 전구체를 제공한다.

[0126] 또 다른 전구체는 단백질 약물인 D에 E, E' 또는 E"를 부착시키는 역할을 한다. 상기 전구체에서, E, E' 또는 E" 부분은 하기 구조 A 또는 B 중 하나에 연결된다:



[0127] 

[0128] 상기 식에서, W는 식 (II), (III), (IV), (IVa), (V), (Va), (VI), (VII), (VIIa), (VIII) 또는 (VIIIa) 중 어느 하나에 따른 E, E' 또는 E" 모이어티로부터 선택된다. 상기 전구체는 그의 N-히드록시석신이미드(NHS) 모이어티를 통해 단백질의 라이신 측쇄의 아민기에 결합하는 것을 목적으로 한다.

[0129] 본 발명의 다른 실시양태에서는 식 (I), (II), (III), (IV), (IVa), (V), (Va), (VI), (VII), (VIIa), (VIII) 또는 (VIIIa) 중 어느 하나에 따른 접합체, 및 약학적으로 허용되는 염 또는 담체를 포함하는 약학적 조성물을 포함한다.

[0130] 본 발명은 또한 시험관 내 또는 생체 내에서 유전자 발현을 특이적으로 저해하기 위한 방법을 포함한다. 일 실시 양태에서, 본 방법은 하기 식 (I), (II), (III), (IV), (IVa), (V), (Va), (VI), (VII), (VIIa), (VIII) 또는 (VIIIa) 중 임의의 하나에 따른 접합체 또는 이들의 각 약학적 조성물의 이용을 포함할 수 있는데, 여기에서 D는 특정 유전자의 발현을 침묵시키도록 설계된 siRNA 또는 ASO이다. 일부 실시 양태에서, 유전자는 질병의 병원 또는 발병 이전에 역할을 담당하는 병원성 단백질을 코딩한다. 일부 실시 양태에서, D는 치료 단백질이다.

[0131] 본 발명의 일 구체예에서, 본 발명은 식 (II), (III), (IV), (IVa), (V), (Va), (VI), (VII), (VIIa), (VIII) 또는 (VIIIa) 중 어느 하나에 따른 E, E' 또는 E" 모이어티에 그 말단이 연결된 siRNA를 포함하는 접합체를 제공한다.

[0132] 본 발명의 또 다른 실시 양태에서, 본 발명은 siRNA 말단 각각에서 및 또한 siRNA 듀플렉스의 내부 위치에서, 식 (II), (III), (IV), (IVa), (V), (Va), (VI), (VII), (VIIa), (VIII) 또는 (VIIIa) 중 어느 하나에 따른 E, E' 또는 E" 모이어티에 연결된 siRNA를 포함하는 접합체를 제공한다.

[0133] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 본 발명은 인지질 막의 외부 레플릿(leaflet)에서의 변형 및 중심적 구조 혼란(strain and focal structural perturbations)의 유도 방법을 제공하는데, 상기 방법은 본 발명의 접합체를 인지질 막과 상호작용시키는 단계를 포함하고, 상기 접합체는 siRNA 말단 각각에서 및 또한 잠재적으로 siRNA 듀플렉스의 내부 위치에서, 식 (II), (III), (IV), (IVa), (V), (Va), (VI), (VII), (VIIa), (VIII) 또는 (VIIIa) 중 어느 하나에 따른 구조를 갖는 각각의 E, E' 또는 E" 모이어티(즉, 총 2 내지 3개의 모이어티)에 연결된 siRNA 듀플렉스를 포함하는 접합체이다.

[0134] 본 발명의 접합체의 이러한 구조로 인해, siRNA는 막 표면과 평행하게 막으로 접근하고, E, E' 또는 E" 모이어티는 막 표면과 수직인 막 코어 방향으로 배향되어 있다(도 1a, 1b 및 1c 참조). 고도로 음으로 하전된 siRNA가 막 표면에 결과적으로 근접함으로 인해 인지질 막의 외측 레플릿의 변형 및 중심적 구조 교란이 유도된다.

이러한 외측 막 변형 및 구조적 교란의 유도는 무엇보다 엔도사이토시스의 개시, 또는 하나의 막 레플릿으로부터 나머지 막 레플릿으로의 siRNA를 잠복시킨 접합체의 통과(플립-플롭)의 유도에 유용할 수 있다. 두 공정 모두 잠재적으로 siRNA의 막-투과 전달의 개시 및/또는 전파에 매우 유용하다. 상기 인지질 막은 시험관 내 또는 생체 내에서 제한됨이 없이 어떠한 리포솜 또는 세포막을 포함하는 임의의 인지질 막일 수 있다.

[0135] 본 발명의 구현예에 따른 접합체는 의학적 장애의 치료에 사용될 수 있다. 일 구현예에서, 본 발명은 식 (I), (II), (III), (IV), (IVa), (V), (Va), (VI), (VII), (VIIa), (VIII) 또는 (VIIIa) 중 어느 하나에 따른 접합체를 포함하는, 치료적 유효량의 약학 조성물을 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는 의학적 치료를 위한 방법을 포함하며, 여기서 D는 각각의 의학적 장애의 치료에 유용한 약물이다.

[0136] 일 구체예에서, 본 방법은 siRNA 또는 ASO로 유전자 치료하기 위한 것이며, 상기 방법은 식 (I), (II), (III), (IV), (IVa), (V), (Va), (VI), (VII), (VIIa), (VIII) 또는 (VIIIa) 중 어느 하나에 따른 본 발명의 접합체를 포함하는, 치료적 유효량의 약학 조성물을, 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하고, 여기에서 D는 특정 환자의 질환에 역할을 담당하는 유전자의 발현을 억제하는데 유용한 siRNA, ASO 또는 치료 단백질이다.

[0137] 본 발명의 또 다른 실시 양태에서, 본 발명은 치료 단백질에 의한 질환의 의학적 치료 방법을 포함하는데, 여기서 D는 생물학적 인지질 막을 통해 세포로 또는 생물학적 장벽, 예컨대 혈액-뇌 장벽을 통해 전달되는 단백질이다. 상기 세포는 시험관 내 세포 배양물 또는 살아 있는 동물이나 인간 개체의 생체 내에서 존재한다. 일부 실시 양태에서, 세포는 신생물 세포(neoplastic cells)이다. 일부 실시 양태에서, 신생물 세포는 종양 세포이다. 일부 실시 양태에서, 신생물 세포는 전이(metastasis) 내 세포이다. 세포는 진행 세포, 종양유발 제제(oncogenic agent)에 의해 형질감염된 진행 세포, 인간 세포, 전-암성 세포 또는 이들의 임의의 조합일 수 있다. 세포는 시험관 내, 즉 세포 배양물 내, 생체 외, 또는 생체 내, 즉 살아있는 동물 또는 인간 개체 내에서 존재할 수 있다.

[0138] 본 발명의 또 다른 실시 양태에서, D는 예를 들어 돌연변이된 오작동성 단백질을 대체하기 위한 대체 치료법으로서 투여되어 생리학적 필요를 다루는 단백질이다. 또 다른 실시 양태에서, D는 유전자 조절, 무엇보다 DNA 또는 RNA 편집(특정 유전자 서열의 추가, 분열 또는 변화)에서 역할을 하는 단백질을 포함하는 유전자 조절에 역할을 담당하는 단백질이다. 일 실시 양태에서, 상기 단백질은 CRISPR(집합성의 규칙적으로 간격을 둔 짧은 팔린드롬 반복체) 관련 단백질의 구성원일 수 있다. 구체적으로, 상기 단백질은 Cas9 단백질(CRISPR-연관 단백질 9), RNA-유도 DNA 핵산분해 효소 또는 이의 유사체일 수 있거나 포함할 수 있고, 잠재적으로는 이의 가이드 올리고뉴클레오타이드 서열을 함께 포함할 수 있다.

[0139] 본 발명의 구현예 중 하나에서, 본 발명은 의학적 장애의 유전적 치료 방법에 관한 것이고, 상기 방법은 식 (I), (II), (III), (IV), (IVa), (V), (Va), (VI), (VII), (VIIa), (VIII) 또는 (VIIIa) 중 어느 하나에 따른 본 발명의 접합체를 포함하는 치료적 유효량의 약학 조성물을, 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함하며, 여기에서 D는 Cas9와 같은 CRISPR 단백질이고, 적합한 가이드 올리고뉴클레오타이드와 함께 투여되며, 따라서 세포 내로 각각의 가이드 올리고뉴클레오타이드가 장착된 단백질의 전달을 성취하고, 여기에서, CRISPR 단백질은 게놈 편집 활성을 발휘할 수 있다. 본 문맥에서의 가이드 올리고뉴클레오타이드는 Cas9 단백질을 DNA 상의 특정 자리(위치)로 안내하는 RNA 또는 DNA 서열로서, 그 자리에서 이중 가닥 DNA 절단을 유도하여 유전 물질 내의 국소 결합의 수리를 가능하게 하기 위함이다. Cas9의 경우, 가이드 올리고뉴클레오타이드는 짧은 RNA 단편이고, 이는 표적 DNA 자리 서열에 상보적인 서열을 갖는다.

[0140] 따라서, 본 발명의 구현예에 따른 접합체 및 이의 각 약학 조성물뿐만 아니라 이들의 각 방법은 무엇보다 암, 독성 상해, 허혈성 질환, 감염성 질환, 단백질 저장 질환, 외상, 면역 매개 질환 또는 퇴행성 질환 중에서 선택되는 의학적 장애의 치료에 유용할 수 있다.

[0141] 따라서, 본 발명의 일 실시예는 의학적 장애의 치료 방법에 관한 것이며, 상기 방법은 식 (I), (II), (III), (IV), (IVa), (V), (Va), (VI), (VII), (VIIa), (VIII) 또는 (VIIIa) 중 어느 하나에 따른 본 발명의 접합체를 포함하는 치료적 유효량의 약학 조성물을, 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함하며, 여기에서 D는 상기 의학적 장애의 치료에 유용한 약물이다.

[0142] 일부 구현예에 따라, 의학적 장애는 암이다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "암"은 조절되지 않는 증식, 특화 기능의 상실, 불멸성, 현저한 전이 잠재력, 항-세포자멸사 활성의 현저한 증가, 급속 성장 및 증식을 또는 특정한 특징적 형태변화(morphology) 및 세포 마커와 같은 암-유발 세포의 전형적인 특성을 나타내는 세포의 존재를 나타낸다. 일반적으로 암세포는 종양의 형태로 존재하고, 동물 내에 국소적으로 존재하거나 또는 독립적인 세



포로서, 예를 들어 백혈병 세포처럼 혈류 내에서 순환하며 존재한다.

[0143] 신경 장애의 분야에서, 본 발명의 구현예에 따른 접합체는 특히, 알츠하이머 병, 운동 신경 질환(Motor Neuron Disease), 파킨슨병, 헌팅톤병, 다발성 경화증 및 크로이츠펔트-야콥병과 같은 신경퇴행성 장애의 치료에 유용할 수 있다.

[0144] 감염 질환 분야에서, 본 발명의 구현예에 따른 접합체는 무엇보다 항균제 또는 항바이러스제를 각각의 박테리아 또는 바이러스 병원균으로 전달하는데 유용할 수 있다. 따라서, 본 발명의 접합체는 항-감염성을 가질 수 있으며, 따라서 박테리아 또는 바이러스 감염과 같은 감염성 질환의 치료에 유용할 수 있다.

[0145] 다른 구체예에서, 본 발명은 인지질 막을 가로질러 화학적 화합물의 세포 내로의 전달을 강화시키는 본 발명의 화합물의 이용에 관한 것이다. 부착되는 화합물 및 그 요구되는 지시에 따라, 그러한 전달은 다양한 유용성을 가질 수 있다. 예를 들어, 식물에서 이러한 전달은 무엇보다 식물 유전학의 개선을 통해, 또는 각종 곤충, 박테리아 또는 곰팡이를 박멸함으로써 작물의 품질 향상과 양의 증대에 도움이 될 수 있다.

[0146] 이러한 전달은 또한 항균제 또는 항바이러스제를 각각의 박테리아 또는 바이러스성 병원균으로 전달하는데 유용할 수 있다. 따라서, 본 발명의 접합체는 항감염성을 가질 수 있으며, 따라서 박테리아 또는 바이러스 감염과 같은 감염성 질환의 치료에 유용하다. 따라서, 본 발명의 실시 양태에서 항바이러스제 또는 항균제와 결합된 E, E' 또는 E"가 사용된다. 그러한 약제는 무엇보다 감염원의 유전 물질과 상호작용하여 그 복제 또는 대사를 방해하고 그 생존에 영향을 주는 것을 목적으로 하는 유전자 서열일 수 있다.

[0147] 본 발명의 접합체는 생물학적 막을 교차하여 전달하는 특성을 통해, 또한 허혈성, 독성, 외상성 상해(traumatic insults) 또는 병원성 원인의 유전적 병인에 의한 의학적 장애에 의해 유발되는 장애와 같은 다양한 의학적 장애의 치료에 유용할 수 있다.

#### [0148] 실시예

[0149] 이제 본 발명을 더 잘 설명하기 위해, 그리고 본 발명의 구현이 실제로 어떻게 수행될 수 있는지를 설명하기 위해 몇몇 예를 기술할 것이다.

#### [0150] 실시예 1: D 모이어티가 올리고뉴클레오타이드인 본 발명의 구현예에 따른 접합체의 합성을 위한 일반적 방법:

[0151] 초기에, 침묵화될 유전자를 질병의 병인 또는 발병 기전에서의 그 역할에 기초하여 선택하였다. 이어서, 당업계에서 공지된 생체-정보학적 방법에 기초하여, 접합체에 혼입될 뉴클레오타이드 서열을 설계하고 결정하였다(전형적으로 RISC 기질의 경우 19-21 염기쌍의 이중 가닥 RNA 또는 Dicer 기질의 경우 25-29 염기쌍의 이중 가닥 RNA).

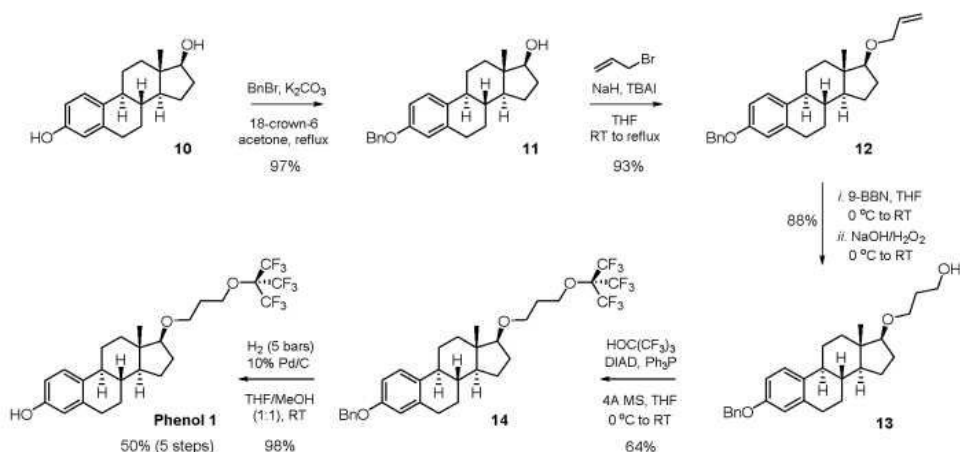
[0152] 3'에서 5' 방향으로 합성을 수행하였다. 고상 합성을 적용하였고, 포스포아미다이트 빌딩 블록을 사용하여, 보호된 2'-데옥시뉴클레오시드(dA, dC, dG 및 T), 리보뉴클레오시드(A, C, G 및 U), 또는 이의 화학적 변형 뉴클레오시드, 예를 들어, LNA(잠긴 핵산; locked nucleic acids) 또는 BNA(가교 핵산; bridged-nucleic acid)로부터 유도하였다. 빌딩 블록은 원하는 siRNA의 서열에 의해 결정된 순서로, 성장하는 올리고뉴클레오타이드 쇄에 순차적으로 커플링된다.

[0153] 올리고뉴클레오타이드의 제조 후에, 본 발명에 따른 하나 이상의 E 유형을 올리고뉴클레오타이드의 빌딩 블록의 일부로서 첨가하였다. 초기에, E 모이어티는 상기 기술한 바와 같이 전구체 형태로 첨가하였다. 본 발명의 화합물의 주요 이점은 식(II), (III), (IV), (IVa), (V), (Va), (VI), (VII), (VIIa), (VIII) 또는 (VIIIa)에 기술된 바와 같은, E, E' 또는 E" 모이어티를 올리고뉴클레오타이드의 5'-말단, 올리고뉴클레오타이드의 3'-말단, 또는 올리고뉴클레오타이드의 내부 위치에 연결하기 위한, 균일한 연결 모이어티를 제공한다는 것이다. 무엇보다, 이러한 전구체 모이어티는 당업계에 공지된 히드록실에 대한 임의의 보호기, 예를 들어, 포스포르아미다이트, 아지드, 아세틸렌, [디메톡시트리틸 비스-(4-메톡시페닐) 페닐메틸](DMT), N-히드록시숙신이미드(NHS) 기를 포함할 수 있다. 사슬의 조립이 완료된 후, 생성물을 고체 지지체로부터 용액으로 방출하였고, 탈-보호 및 수집하였다. 이어서 원하는 접합체를 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)로 분리하여 원하는 접합 올리고뉴클레오타이드를 고순도로 수득하였다. siRNA의 경우, 각각의 상보 RNA 가닥을 개별적으로 합성한 다음, 두 가닥의 어닐링을 당업계에 공지된 표준 조건에서 수행하여 원하는 이중 가닥 siRNA를 생성하였다.

#### [0154] 실시예 2: 스테롤 1의 합성 방법; 본 발명의 E 모이어티의 공통 빌딩 블록:

[0155] 출발 물질인 퍼플루오로-tert부탄올은 상업적으로 입수할 수 있다. 에스트라 디올로부터 출발하여 개략도 1에

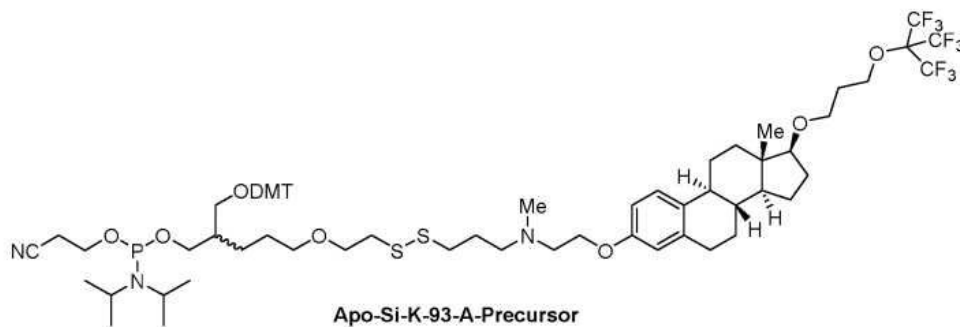
따라 합성을 수행하였다:



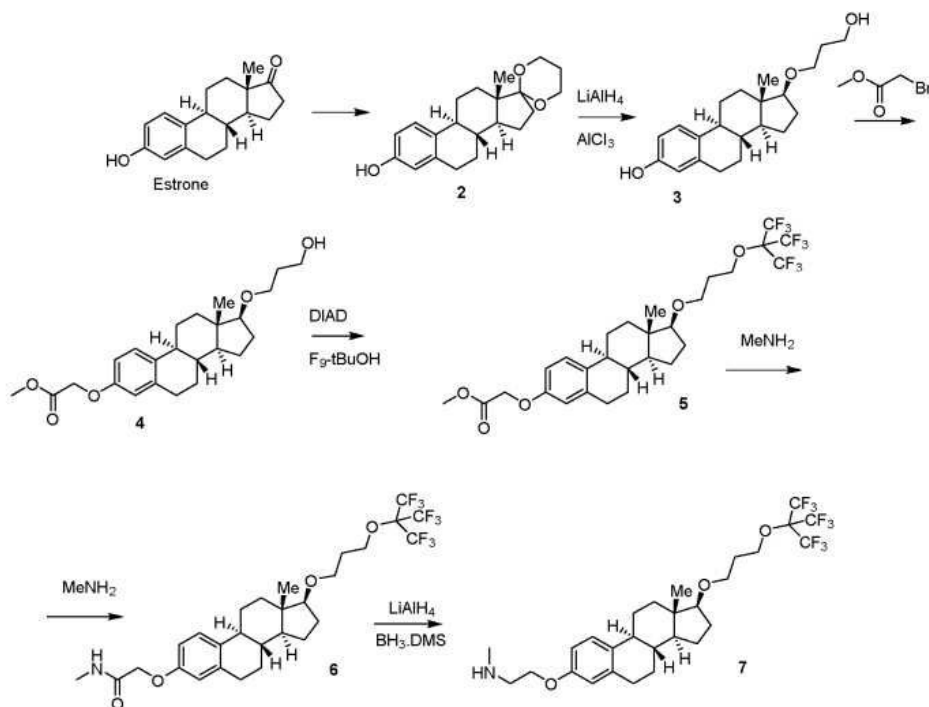
### 반응식 1

에스트라디올을 벤질기에 의해 보호하여 화합물 11을 수득하였다. 최적화된 반응 조건(알릴 브로마이드, NaH, cat. 테트라-*n*-부틸암모늄 브로마이드(TBAI), 테트라하이드로푸란(THF), 환류, 16h) 하에서 알코올 11(25.6g)을 알릴화하여 알릴 에테르 12(21.85g, 77%)를 백색 고체로서 수득하였다(헵탄 및 MeOH 중에서 연속적으로 분쇄하여 정제함). 9-보라비시클로[3.3.1]노난(9-BBN)으로 말단 알켄(21.8g)의 위치-선택적 수소첨가붕소화, 및 표준 산화성 워크업(NaOH/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)을 통해 알코올 13을 제공하였다. 최적화된 반응 조건[디이소프로필 아조디카르복실레이트(DIAD), PPh<sub>3</sub>, 4A 분자체(MS), THF, 실온, 16h] 하에서, 과량의 퍼플루오로-*tert*-부탄올로 알코올 13의 Mitsunobu 반응에 의해 목적하는 에테르 14를 수득하였다. 화합물 14를 용매(5bar, Parr reactor)로서 THF 및 2,2,2-트리플루오로 에탄올의 1:1 혼합물을 사용하여 접촉 수소화(10% Pd/C, RT)함으로써, (약 18시간 후) 페놀 1을 회백색(off-white) 고체로 수득하였다

### 실시예 2 : Apo-Si-K-93-A-전구체의 합성 방법:



[0161] 아민 7의 합성

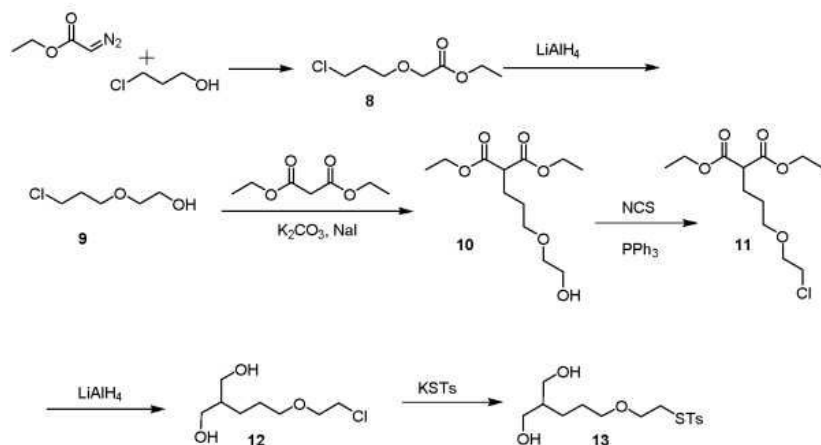


[0162]

[0163] 반응식 1. 아민 7의 합성

[0164] 에스트론을 프로판디올 및 트리메틸 오르토포르메이트로 처리하여 화합물 2를 제공하였다. LiAlH<sub>4</sub> 및 AlCl<sub>3</sub>로 처리하여 고리-개방형 생성물 3을 제공하였다. 페놀을 메틸브로모아세테이트로 알킬화시키고 화합물 4를 수득하였다. 퍼플루오로-tert-부탄올 모이어티를 Mitsunobu 조건(화합물 5)을 사용하여 도입하였다. 화합물 5를 메틸아민으로 처리하여 아마이드 6을 제공하였다. BH<sub>3</sub>.DMS를 사용하여 아마이드를 환원시켜 아민 7을 제공하였다.

[0165] 티오토실레이트 14의 합성:



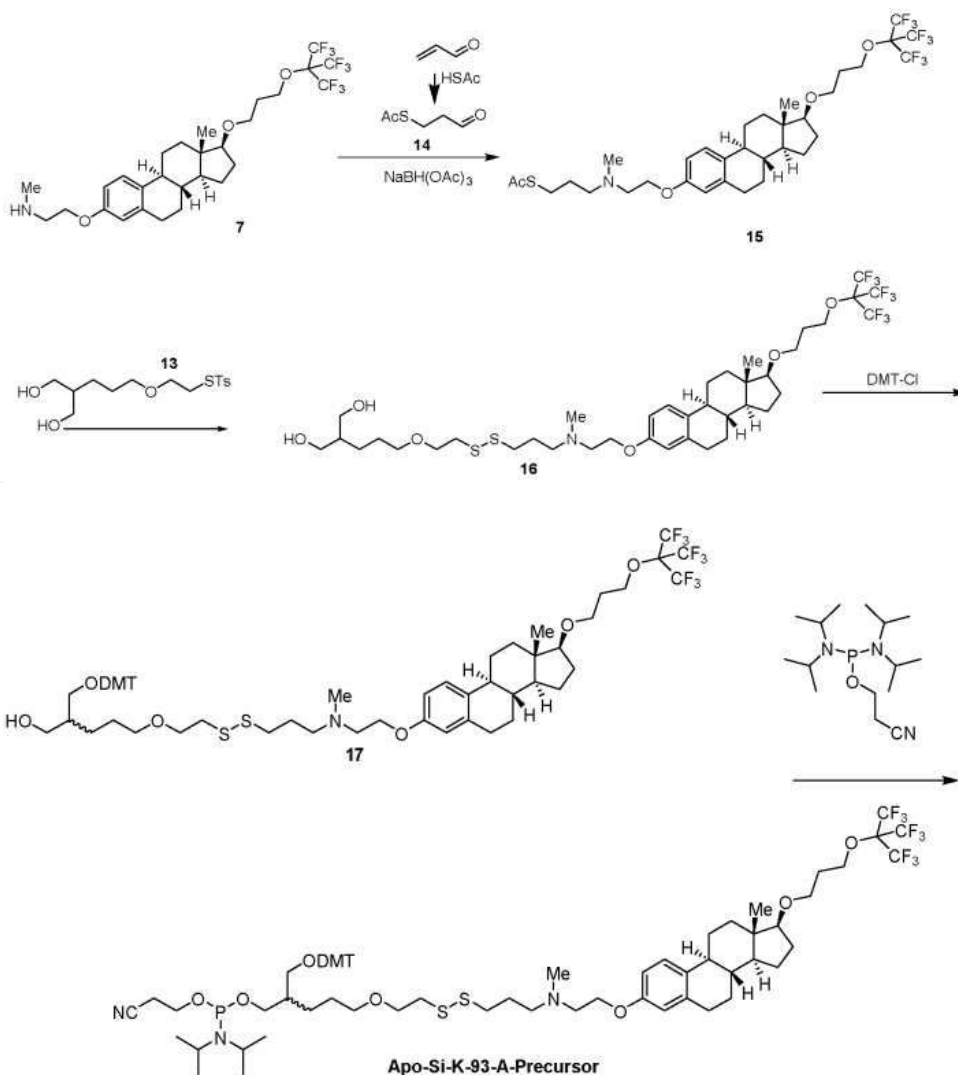
[0166]

[0167] 반응식 2: 티오토실레이트 14의 합성

[0168] 티오토실레이트 13의 합성은 에틸디아조아세테이트와 3-클로로프로판-1-올의 커플링으로 시작하여 에테르 8을 제공하였다. 에스테르의 후속 환원을 통해 알코올 9를 제공하였다. 디에틸 말로네이트를 클로라이드 9로 알킬화시켜 화합물 10을 수득하였다. LiAlH<sub>4</sub>를 사용한 에스테르의 환원을 통해 디올 12를 제공했다. 마지막으로 클로라이드를 칼륨 티오토실레이트로 치환하여 원하는 빌딩 블록 티오토실레이트 13을 제공하였다.

[0169] Apo-Si-K-93-A의 합성

[0170] 하기 합성 계획에 따라 합성을 수행하였다 :



[0172]

### [0173] 반응식 3. Apo-Si-K-93-A 전구체의 합성

[0174] 아민 7을 1-브로모-3-클로로프로판으로 알킬화하였지만, 이러한 조건은 오히려 낮은 수율을 초래한다는 것을 발견했다. 그러나, 우리가 아크롤레인 유도된 티오알데히드 14로 환원성 아민화를 수행했을 때 훨씬 더 높은 수율이 나왔고, 또한 전체 합성 과정에서 티오아세테이트 교환의 필요성이 사라졌다. 아크롤레인을 염기의 존재 하에 티오아세트산으로 처리하여 양호한 전환율을 제공하였다. 목적하는 물질을 플래시 크로마토그래피를 사용하여 55% 수율로 분리하였다. 이어서, 알데히드 14 로의 환원성 아민화를 통해 화합물 15를 59% 수율로 수득하였다.

[0175] 메탄올 중 나트륨 메톡시드를 티오아세테이트 15와 티오톡실레이트 13의 용액에 첨가하였고, 이를 통해 아세테이트를 15로부터 제거하고 생성된 티올을 13과 반응시켜 원하는 비대칭 디설파이드(16)를 형성시켰다. 화합물 16을 DMT-Cl과 반응시켜 모노-보호된 디올 17을 수득하였다. 적합한 포스포라미다이트-작용제와의 반응으로 Apo-Si-K-93-A를 수득하였다. 산-불안정성(acid-labile) 포스포라미다이트 생성물의 정제는 Et<sub>3</sub>N으로 전처리 된 실리카로 플래쉬 크로마토그래피를 사용하여 수행하였다. 최종적으로 4 X 220mg으로 생성되었다.

### [0176] 실험 섹션

[0177] (8R, 9S, 13S, 14S)-13-메틸-6,7,8,9,11,12,13,14,15,16-데카하이드로스포[시클로펜타[a]페난트렌-17,2'-[1,3]디옥산]-3-올(2)

[0178] 톨루엔(300mL) 중 에스트론(67.9g, 0.251mol)의 현탁액에 1,3-프로판 디올(70mL) 및 트리메틸 오르토포름산 (100mL)을 첨가하였다. 현탁액을 pTsOH(1gram, 5mmol)로 처리하고 16시간 동안 60℃로 가온시켰다. 실온으로



냉각시킨 후, 트리에틸 아민(10mL) 및 물(100mL)을 첨가하고 30분 동안 계속 교반하였다. 상을 분리시키고, 유기상을 물(2 x 100mL) 및 염수로 세척한 후, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 상에서 건조시키고 농축하였다. 조물질을 톨루엔(150mL)에 용해시키고 헵탄(750mL)을 서서히 첨가하여 회색시커 백색 침전물을 형성시켰다. 고체를 여과하고 진공 하에 건조시켰다. 화합물 2(71.1g, 217mmol)를 백색 고체로서 86% 수율로 분리하였다.

[0179] (8R, 9S, 13S, 14S, 17S)-17-(3-하이드록시프로폭시)-13-메틸-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-데카하이드로-6H-사이클로펜타[a]페난트렌-3-올(3)

[0180] 0℃에서 THF(1.5L) 중 화합물 2(71.4g, 217mmol)의 용액에 LiAlH<sub>4</sub>(10g, 263mmol) 및 AlCl<sub>3</sub>(116g, 872mmol)를 조심스럽게 첨가하였다. 발열 반응을 일으키며 0℃에서 추가로 30분 동안 교반한 다음, 고체를 3시간 동안 (rotavap을 사용하여) 기계적으로 교반하면서 50℃로 가온시켰다. 혼합물을 0℃로 냉각시키고 포화 염화암모늄 수용액(150mL)을 적가하였다. 혼합물을 추가로 30분 동안 교반한 후, 짧은 경로의 실리카 상에서 여과하고, 고체를 에틸 아세테이트로 세척하였다. 유기층을 수집하고 염수로 세척한 후, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 상에서 건조시키고 농축시켰다. 조물질(89.2)은 주로 화합물 3이지만, 다음 단계 후에 정제하였다.

[0181] 메틸 2-((((8R,9S,13S,14S,17S)-17-(3-하이드록시프로폭시)-13-메틸-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-데카하이드로-6H-시클로펜타[a]페난트렌-3-일)옥시)아세테이트(4)

[0182] 조물질 3(89.4g)을 아세톤(1.25L) 및 MeOH(0.2L)에 용해시키고 탄산칼륨(60g, 435mmol) 및 메틸 브로모아세테이트(50mL, 435mmol)로 처리하였다. 현탁액을 60℃로 가온하고 16시간 동안 계속 교반하였다. TLC에 기초하여, 모든 페놀성 모이어티는 알킬화되었다. 혼합물을 실온으로 냉각시키고 여과시켰다. 여과액을 농축하고, 플래시 크로마토그래피(헵탄 중 용리액 20 내지 30% EtOAc, 모든 불순물을 제거하고, 100% EtOAc로 원하는 물질을 수득함)를 사용하여 추가로 정제하였다.

[0183] 화합물 4(56.7g, 140.3mmol)를 황색 오일로서 65% 수율로 분리하였다.

[0184] 메틸 2-((((8R,9S,13S,14S,17S)-17-(3-((1,1,1,3,3,3-헥사플루오로-2-(트리 플루오로메틸)프로판-2-일)옥시)프로폭시)-13-메틸-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-데카하이드로-6H-사이클로펜타[a]페난트렌-3-일)옥시)아세테이트(5)

[0185] THF(1L) 중 화합물 4(56.7g, 140.3mmol)의 용액에 트리페닐포스핀(55.4g, 211mmol), 노나플루오로-tert-부틸알코올(30mL) 및 디-tert-부틸 아조다이카복실 레이트(38.5g, 167mmol)를 첨가하였다. 혼합물을 TLC가 완전히 전환된 것으로 나타날 때 30분 동안 교반하였다. 헵탄(500mL)을 첨가하고 혼합물을 부분적으로 약 500mL로 농축시켰다. 더 많은 헵탄(1L)을 첨가하고 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다. 침전물이 형성되었고 이를 여과한 후, 여액을 농축하여 미량의 DBAD 및 트리페닐포스핀으로 오염되었지만, 황색 시럽으로서 화합물 5를 수득하였다.

[0186] 2-((((8R, 9S, 13S, 14S, 17S)-17-(3-((1,1,1,3,3,3-헥사플루오로-2-(트리플루오로메틸)프로판-2-일)옥시)프로폭시)-13-메틸-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-데카하이드로-6H-시클로펜타[a]페난트렌-3-일)옥시)-N-메틸아세트아미드(6)

[0187] 화합물 5의 조시럽(crude syrup)을 MeOH(250mL)로 희석하고 40% 수성 메틸아민(350mL)을 첨가하였다. 백색 침전물을 TLC가 완전히 전환된 것으로 보여질 때 1시간 동안 교반하였다. 물(1L)을 첨가하고 고형물을 여과하였다. 잔류물을 물로 세척하고 디클로로메탄(1L)에 용해시켰다. 유기층을 염수로 세척하고, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 상에서 건조시키고, 농축시켰다. ca 7cm 실리카 및 헵탄 중 15% EtOAc의 초기 용출액을 사용하여 추가 정제를 수행하였다. 모든 불순물이 컬럼으로부터 제거될 때, 화합물 6이 100% EtOAc로 용리되었다. 미량의 트리페닐포스핀사이드가 존재함에도 불구하고 화합물 6(82.0g, 132mmol)을 94% 수율로 백색 고체로서 분리하였다.

[0188] 2-((((8R,9S,13S,14S,17S)-17-(3-((1,1,1,3,3,3-헥사플루오로-2-(트리플루오로메틸)프로판-2-일)옥시)프로폭시)-13-메틸-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-데카하이드로-6H-시클로펜타[a]페난트렌-3-일)옥시)-N-메틸에탄-1-아민(7).

[0189] 65℃ THF(500mL) 중 화합물 6(56.0g, 90.5mmol)의 용액에 BH<sub>3</sub>.DMS(56mL, 590mmol)를 적가하였다. 환류를 5시간 더 계속한 다음, 혼합물을 실온으로 냉각시켰다. 혼합물을 MeOH(300mL)에 조심스럽게 용해시키고, HCl(50mL) 중의 4M 디옥산을 첨가하였다. 용액을 30분 동안 환류시킨 후, 실온으로 냉각시키고 농축시켰다. 혼합물을 MeOH(300mL)에 용해시키고 30분 동안 환류시켰다. 냉각 및 농축시킨 후, 시럽을 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(1L)에 용해시

키고 포화 중탄산나트륨 수용액(2x)으로 세척하였다. 유기층을  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  상에서 건조시키고 농축시켰다. 화합물 7(50.0g, 82.6mmol)을 맑은 오일로서 단리하고, 91% 수율로 서서히 고형화시켰다. 미량의 트리페닐포스폭사이드를 갖는 불순물 프로파일은 화합물 6과 유사하였다.

[0190] **티오토실레이트 13의 합성:**

[0191] **에틸 2-(3-클로로프로폭시)아세테이트(8)**

[0192]  $0^\circ\text{C}$ 에서  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (250mL) 중 3-클로로프로판-1-올(20mL, 239mmol)의 용액에 에틸 디아조아세테이트(25mL, 239mmol)를 첨가하였다. 이어서,  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (0.30mL, 2.39mmol, 0.01eq.)를 첨가한 후, 얼음-조를 제거하고, 혼합물을  $37^\circ\text{C}$ 로 가온한 후 가스 발생이 멈출 때까지 그 온도에서 교반하였다(2시간). 혼합물을  $\text{H}_2\text{O}$ (250mL) 및 염수(250mL)로 세척하고,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  상에서 건조시키고 농축하여 에테르 8(44g, 240mmol, 정량)을 황색 오일로서 수득하였다.

[0193] **2-(3-클로로프로폭시)에탄-1-올(9)口**

[0194]  $\text{Et}_2\text{O}$ (750mL) 중  $\text{LiAlH}_4$ (12g, 316mmol)의 얼음-냉각된 현탁액에 에스테르 8(57g, 316mmol)의 용액을 천천히 첨가하고 생성된 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다.  $0^\circ\text{C}$ 에서 KOH(수성 20% 51mL)를 천천히 첨가하여 반응을 퀸칭시켰다. 혼합물을 실온에서 30분 동안 교반한 후, 셀라이트 상에서 여과하였다. 여액을  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  상에서 건조시키고 농축하여 알코올 9(33g, 240mmol, 76%)를 투명한 오일로서 수득하였다.

[0195] **디에틸 2-(3-(2-히드록시에톡시)프로필)말로네이트(10)**

[0196] DMF(500mL) 중의 디에틸 말로네이트(25mL, 166mmol) 및 알코올 9(23g, 166mL)의 용액에  $\text{K}_2\text{CO}_3$ (34g, 249mmol) 및 NaI(25g, 166mmol)를 첨가하고, 생성된 혼합물을  $90^\circ\text{C}$ 에서 64시간 동안 교반하였다.  $\text{H}_2\text{O}$ (1.5L)를 첨가하고 혼합물을  $\text{EtOAc}$ (3x 500mL)로 추출하였다. 조합된 유기층을 염수로 세척하고,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  상에서 건조시키고 농축시켰다. 조물질을 칼럼 크로마토그래피( $\text{EtOAc}$ :헵탄 1:1)를 사용하여 정제하여 생성물 10(17g, 65mmol, 39%)을 투명한 황색 오일로서 수득하였다.

[0197] **디에틸 2-(3-(2-클로로에톡시)프로필)말로네이트 (11)**

[0198]  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (500mL) 중 알코올 10(17g, 65mmol)의 용액에  $\text{PPh}_3$ (26g, 98mmol) 및 N-클로로석신이미드(11g, 78mmol)를 첨가하고 생성된 혼합물을 밤새 실온에서 교반하였다. 헵탄(300mL)을 첨가하고 혼합물을 부분적으로 농축시켰다. 형성된 고체를 여과하고 여액을 농축시켰다. 조 물질을 칼럼 크로마토그래피(헵탄 중 20%  $\text{EtOAc}$ )를 사용하여 정제하여 투명한 오일로서 염화물 11(14g, 49mmol, 75%)을 수득하였다.

[0199] **2-(3-(2-클로로에톡시)프로필)프로판-1,3-디올 (12)**

[0200]  $\text{Et}_2\text{O}$ (500mL) 중  $\text{LiAlH}_4$ (7.3g, 192mmol)의 얼음-냉각된 현탁액에 디에틸에스테르 11(27g, 96mmol)의 용액을 천천히 첨가하고 생성된 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다.  $0^\circ\text{C}$ 에서 KOH(수성 20% 31mL)를 천천히 첨가하여 반응을 퀸칭시켰다. 혼합물을 실온에서 30분 동안 교반한 후, 셀라이트 상에서 여과하였다. 여액을  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  상에서 건조시키고, 농축시켜서 투명한 오일로서 디올 12(14g, 73mmol, 76%)를 수득하였다.

[0201] **S-(2-((5-하이드록시-4-(하이드록시메틸)펜틸)옥시)에틸)4-메틸벤젠-설포노티오에이트 (13)**

[0202] 디올 12(14g, 73mmol)의 용액에 칼륨 티오토실레이트(25g, 110mmol) 및 TBAI(2.7g, 7.3mmol)를 첨가하고, 생성된 혼합물을  $80^\circ\text{C}$ 에서 64시간 동안 교반하였다. 혼합물을 농축시키고, 조물질을 칼럼 크로마토그래피(헵탄 중 40% 아세톤)를 사용하여 정제하여 티오토실레이트 13(5.0g, 14mmol, 20%)을 황색 오일로서 수득하였다.

[0203] **Apo-Si-K-93-A의 합성**

[0204] **S-(3-옥소프로필)에탄티오에이트 (14)**

[0205] 디클로로메탄(250mL) 중 아크롤레인(11g, 196mmol)의 용액에 트리에틸아민(6.9mL, 49mmol) 및 티오아세트산(13.8mL, 195mmol)을 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 밤새 교반한 다음, 농축시켰다. 플래쉬 크로마토그래피(헵탄 중 15%  $\text{EtOAc}$ )를 사용하여 추가 정제하여 화합물 14(14.4g, 109mmol)을 갈색 오일로서 55%의 수율로 수득

하였다.

- [0206] S-(6-((2-(((8R, 9S, 13S, 14S, 17S)-17-(3-((1,1,1,3,3,3-헥사플루오로-2-(트리플루오로메틸)프로판-2-일)옥시)프로폭시)-13-메틸-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-데카히드로-6H-시클로펜타[a]페난트렌-3-일)옥시)에틸)(메틸)아미노)헥실)에탄 티오에이트(15)
- [0207] 1,2-디클로로에탄(500mL) 중 화합물 7(20.6g, 34mmol)의 용액에 아세트산(8.2mL, 136mmol), 알데히드 14(5.4g, 41mmol)를 첨가하고 1분 후에 나트륨 트리아세톡시보로하이드라이드(30g, 141mmol)을 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반한 후, 디클로로메탄을 첨가하고 혼합물을 1M NaOH, 물 및 염수로 세척하였다. 유기층을 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 상에서 건조시키고 농축시켰다. 플래쉬 크로마토그래피(헥탄 중 구배 15% 내지 25% 아세톤 및 0.1% Et<sub>3</sub>N)를 사용하여 추가로 정제하여 화합물 15(14.4g, 20mmol)를 맑은 오일로서 59% 수율로 단리시켰다.
- [0208] 2-(3-(2-((3-((2-(((8R, 9S, 13S, 14S, 17S)-17-(3-((1,1,1,3,3,3-헥사플루오로-2-(트리플루오로메틸)프로판-2-일)옥시)프로폭시)-13-메틸-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-데카히드로-6H-시클로펜타[a]페난트렌-3-일)옥시)에틸)(메틸)아미노)프로필)디설파닐)에톡시)프로필)프로판-1,3-디올 (16)
- [0209] CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(200mL) 및 메탄올(20mL) 중 티오아세테이트 15(1.9g, 2.6mmol) 및 티오토실레이트 13(1.8g, 5.1mmol, 2 eq.)의 용액을 MeOH 중 5.4M NaOMe(1.42mL, 7.7mmol, 3eq.)로 처리하였다. 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다. 혼합물을 NaHCO<sub>3</sub>(200mL) 및 염수(200mL)로 세척하고, 황산 나트륨 상에서 건조시키고, 농축시켰다. 플래쉬 크로마토그래피(헥탄 중 30% 아세톤 + 1% Et<sub>3</sub>N)를 사용하여 추가 정제하여 화합물 16(1.2g, 1.4mmol, 53%)을 황색 오일로서 수득하였다.
- [0210] 2-((비스(4-메톡시페닐)(페닐)메톡시)메틸)-5-(2-((3-((2-(((8R, 9S, 13S, 14S, 17S)-17-(3-((1,1,1,3,3,3-헥사플루오로-2-(트리플루오로메틸)프로판-2-일)옥시)프로폭시)-13-메틸-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-데카히드로-6H-사이클로펜타[a]페난트렌-3-일)옥시)에틸)(메틸)아미노)프로필)디설파닐)에톡시)펜탄-1-올 (17)
- [0211] 화합물 16(1.2g, 1.4mmol)의 용액에 Et<sub>3</sub>N(0.14mL, 1.4mmol, 1당량) 및 DMAP(16mg, 0.14mmol, 0.1당량)을 첨가하였다. 생성된 혼합물에 DMT-Cl(0.47g, 1.4mmol, 1eq.)를 첨가하였다. 생성된 황색 혼합물을 밤새 실온에서 교반한 후, 이를 농축시켰다. 컬럼 크로마토그래피(헥탄 중 20% 아세톤 및 1% Et<sub>3</sub>N)로 정제하여 투명한 황색 오일로서 모노보호된 알코올 17(1.0g, 0.87mmol, 63%)을 수득하였다.
- [0212] 2-((비스(4-메톡시페닐)(페닐)메톡시)메틸)-5-(2-((3-((2-(((8R, 9S, 13S, 14S, 17S)-17-(3-((1,1,1,3,3,3-헥사플루오로-2-(트리플루오로메틸)프로판-2-일)옥시)프로폭시)-13-메틸-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-데카히드로-6H-시클로펜타[a]페난트렌-3-일)옥시)에틸)(메틸)아미노)프로필)디설파닐)에톡시)펜틸(2-시아노에틸)다이소프로필포스포라미다이트(Apo-Si-K-93-A).
- [0213] 디클로로메탄(40mL) 중 모노보호된 디올 17(1.0g, 0.87mmol)의 용액에 2-시아노에틸 N,N,N',N'-테트라이소프로필포스포로디아미다이트(0.4mL, 1.25mmol, 1.3eq.) 및 디클로로메탄 중 0.5M의 N-메틸모르폴린 용액 및 0.25M의 트리플루오로아세트산(2.5mL, 포스포라미다이트 체제에 대한 1당량의 N-메틸모르폴린)을 첨가하였다. 황색 용액을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. TLC는 불완전한 전환을 나타냈으므로 2-시아노에틸 N,N,N',N'-테트라이소프로필포스포로디아미다이트 0.2mL를 추가로 첨가하였다. 1시간 후, 혼합물을 수성 포화 중탄산나트륨으로 퀀칭시키고, 10분 동안 더 교반하였다. 유기층을 분리하고, 황산나트륨 상에서 건조시키고 농축시켰다. 플래쉬 크로마토그래피(헥탄 중 15% 아세톤 및 1% Et<sub>3</sub>N)를 사용하여 추가 정제하여 화합물 Apo-Si-K-93-A(880 mg, 0.64mmol, 74%)를 무색의 오일로서 수득하였다.
- [0214] **실시예 4 : 올리고뉴클레오타이드 사슬 내의 내부 위치에서 본 발명의 E 모이어티의 결합 방식 :**
- [0215] 초기에, E 모이어티는 그 전구체 형태로서 존재하는데, 그 2개의 히드록시기가 DMT[디메톡시트리틸 비스-(4-메톡시페닐)페닐메틸], 및 포스포라미다이트 각각에 의해 보호되어 있다. 통상적으로, 올리고뉴클레오타이드의 합성은 3'에서 5' 방향으로 보호된 뉴클레오타이드를 순차적으로 첨가함으로써 수행된다. 포스포라미다이트는 올리고뉴클레오타이드 사슬의 5' 말단에 있는 히드록시기와의 결합에 사용된다. DMT는 제거되고, 각각의 히드록실기는 사슬에 혼입될 다음 뉴클레오타이드의 3'-하이드록실기에 부착된 포스포라미다이트 부분에 연결된다. siRNA의 센스(Passenger) 및 가이드(Antisense) 가닥 모두의 합성이 완료된 후, 본 기술분야에서 공지된 바와 같이 어닐링 과정이 이루어져 본 발명의 최종 RNA 듀플렉스 집합체가 제공된다. siRNA의 성능 최적

화를 위해, 내부에 위치한 E 모이어티는 센스(Passenger)에 연결되는데, 이 가닥이 RISC 복합체 내에서 제거된 후에는 가이드(Antisense) 가닥이 RISC 유전자 침묵 장치로 중단없이 활성화된다.

[0216] **실시예 5: 레독스 매개 분리 및 세포질 내 E 모이어티의 제거, 및 적재 약물(예: siRNA)의 방출:**

[0217] 본 발명의 E, E' 또는 E'' 모이어티는 siRNA 접합체의 막투과 통과에 필수적이지만, 일단 접합체가 세포질에 도달하면 이들 부분을 제거하고, 이들을 신체로부터 배설하는 것이 바람직하다. 적재 약물이 siRNA인 경우, 이는 siRNA와 유전자 침묵 단백질 복합체(Dicer 및 RISC)의 상호 작용에 있어서 입체적 간섭을 피하기 위해 유리할 수 있다. 또한, E 모이어티로부터 적재 약물을 분리하는 것이 세포 인지질 막에 대한 접합체의 부담을 최소화할 것이고, 따라서 안전성 관점에서 잠재적으로 유리하다. 이러한 목적으로, 본 발명의 모든 E 모이어티는 디설파이드 모이어티를 포함한다. 산화 조건, 즉 세포외 환경에 우세하게 존재하는 조건에서는, 디설파이드 부분은 안정성을 나타내어, 생체 내로 전신 투여시, 접합체가 신체 내에서 퍼져 세포 인지질 막을 가로질러 세포 내로 진입하는 것이 가능하다. 대조적으로, 세포질은 주로 고농도의 글루타티온으로 인해 고도의 환원성 환경인데, 이는 약 4배 수준의 세포질/세포의 공간 농도 구배를 나타낸다. 세포질 내에서 이러한 현저한 환원 조건으로 인해, E 모이어티의 디설파이드 그룹은 세포질 환경에서 감소된다. 결과적으로, 적재 약물(예: siRNA)이 방출되고, 세포질의 표적 부위(예: 유전자 침묵을 위한 Dicer 또는 RISC 단백질 복합체)에서 그 약학적 활성을 발휘한다. 동시에, 스테롤 백본을 갖는 본 발명의 E 모이어티는 다른 스테롤계 분자(예를 들어, 에스트로겐)와 유사하게 직접적으로 또는 신진 대사(예를 들어, 간에서의 사이토크롬 P-450 매개 대사)에 따라 담즙 및/또는 소변을 통해 체내로부터 배설된다.

[0218] **실시예 6: 식 (IVa)에 기재된 구조를 갖는 3개의 E 모이어티를 포함하는 본 발명의 siRNA 접합체의 예시적인 구조 및 그의 각각의 작용 방식.**

[0219] 이 접합체는 도 2a, 2b, 2c 및 2d에 기술되어 있다. 초기에, 접합체는 산화 조건에 있고, 따라서 디설파이드 모이어티를 포함한다. RNA 사슬의 길이가 25 및 27 뉴클레오타이드인 다이서(Dicer) 기질이 예시되어 있다. 더 긴 가닥(Guide, Antisense 가닥)은 엔자임과의 결합에 필요한 2개의 뉴클레오타이드가 3' 말단에 걸려 있다. 또한 센스(Passenger) 가닥은, 양전하를 띤 아미노산으로 덮인 엔자임 내 각 결합 포켓을 차지하기 위해 5' 말단에 자유 인산염을 갖는다. E 모이어티 중 2개는 패신저 가닥과 연결되어 있는데, 하나는 5'-말단에, 다른 하나는 가닥 중간에 있다. 세번째 E 모이어티는 가이드의 5'-말단에 연결된다. 초기에, 접합체는 세포의 공간의 특성을 갖는 산화 조건이고, 따라서 E 모이어티의 디설파이드기가 보존된다. 세포질로 진입시, 주변 환원 조건으로 인해 디설파이드 결합이 감소되고 E 모이어티는 RNA에서 분리되어 체내로부터 배설되어 작은 잔여 스템프(residual stump)가 남는다(도 2b). 이어, Dicer 엔자임은 RNA 듀플렉스를 절단하여 21/23-뉴클레오타이드 길이의 듀플렉스를 생성함으로써 가이드 가닥 상의 스템프를 제거한다(도 2c). RNA 듀플렉스는 세포질 RNA-유도성 침묵 단백질 복합체(RISC)로 진입할 준비가 된다. 첫째로는, 패신저 가닥에 붙은 2개의 잔여 스템프를 포함하여 패신저 가닥의 제거를 수행하는 엔자임 Helicase가 작용한다. 결과적으로(도 2d), 가이드 가닥은 RISC 복합체로 그대로 전달되어 표적 단백질을 암호화하는 mRNA와 상호 작용하여 그 분해를 유도하고, 이에 의해 원하는 유전자의 침묵을 유도한다.

[0220] **실시예 7: Apo-Si-K-93-A의 생물학적 성능:**

[0221] Apo-Si-K-93-A의 생물학적 성능을 하기 측면을 고려하여 평가되었는데, 이는 임상 환경에서 생체 내에서 E 모이어티를 포함하는 접합체의 예상되는 이용에 모두 중요하다. 이 실험을 위해 EGFP 유전자를 침묵시키도록 설계된 다이서의 기질인 두 개의 siRNA 듀플렉스를 사용했다. 듀플렉스 중 하나에서는, Apo-Si-K-93-A 모이어티를 각 RNA 가닥의 5' 말단에 부착하였다(이 듀플렉스는 K-93-A로 지정됨). 두번째 듀플렉스에서는 Apo-Si-K-93-A 모이어티를 각 RNA 가닥의 5' 말단에 부착하였고, 패신저(GUIDE) 가닥을 따라 내부 위치에서 세번째 Apo-Si-K-93-A 모이어티를 14번째 뉴클레오타이드 자리에 부착하였다. 따라서, 이 듀플렉스 가닥은 K-93-A-del-14로 명명되었다. 이들 각각의 구조체에 대한 뉴클레오타이드 서열은 다음과 같다:

[0222] **1. K-93-A 구조체:**

[0223] **센스:** 5'-phos/iApo-Si-K93-A/mAmCrCmCrUmGrArArG rUrUmCrA mUrCmUrG mC rArC rCrArCmCG rUrCrA.

[0224] **안티센스:** /5'-phos/iApo-SiK-93-A/rCrGmGrUrGrUrGmCrAmGrAmUrGrArArCrU rG mGrGmUmCmA.

[0225] **2. K-93-A-del-14:**

[0226] **센스:** /5phos/iApo-Si-K-93-A/mAmCrCmCrUmGrArArGrUrUmCrA/iApo-SiK93-A/ rCmUrG mCrArCrCrArCmCG.



- [0227] **안티센스:** /5phos/iApo-Si-K-93-A/rCrGmGrUrGrGrUrGmCrAmGrAmUrGrArArCrU rUrCrArG mGrGmUmCmA. r은 리보스를 의미한다; m은 메틸화를 의미한다.
- [0228] 두 접합체는 다음과 같은 평가를 받았다.
- [0229] **1. 알부민으로 배양시 단백질-프리 분획물:**
- [0230] 혈액 내로 투여할 때 수행하기 위해, 약물이 혈액 단백질에 결합하는 분획 및 세포의 공간을 통해 세포 내로 자유롭게 이동하는 유리 분획을 모두 갖는 것이 중요하다. Apo-Si-K-93-A의 이러한 측면을 조사하기 위해, 겔 전기영동을 사용하였다: 20 pmole의 RNA 샘플을 트리스 완충액(pH 7.4)로 희석하고, 소혈청 알부민(BSA)을 최종 농도 2mg/mL가 되도록 첨가하였다. 모든 샘플을 밤새 25°C에서 배양하였다. 이 RNA 샘플을 12% 천연 폴리아크릴아미드 겔에 넣고 전기장에서 5V/cm(bio-rad mini protean)로 1시간 동안 이동시켰다. 대조군 샘플에는 BSA가 아닌 물에 희석한 RNA 샘플을 포함시켰다. 반응 혼합물을 37°C에서 2시간 동안 Proteinase K(Sigma)로 처리하였는데, 이는 알부민 단백질 분해를 통해 단백질-결합 접합체를 방출하기 위한 목적이다. 알부민에 강력하게 결합하는 Apo-Si 접합체인 Apo-Si-S1을 양성 대조군으로 사용하였다.
- [0231] **2. 감소된 글루타티온과의 배양시 Apo-Si-K-93의 디설파이드 모이어티의 절단:**
- [0232] Apo-Si-K-93-A의 설계 특징 중 하나는 Apo-Si-K-93-A 모이어티 내에 디설파이드기를 도입하여 세포질 내에서의 우세한 환원 조건에서 선택적으로 절단되어, Dicer와 RISC와 같은 세포질 유전자 침묵 복합체와 상호작용하는 적재 유전 약물을 방출하는 것을 목표로 삼는 것이다. Apo-Si-K-93-A의 이러한 특성을 입증하기 위해, 20 pmole의 RNA 샘플을 1mM의 글루타티온(Sigma)이 보충된 30mM 트리스 완충액(pH 7.4)에 희석시켰다. 모든 샘플을 37°C에서 2시간 동안 배양하였다. 대조 샘플을 물로 희석시켰다. RNA 샘플을 12% 천연 폴리아크릴아미드 겔에 넣고 5V/cm(bio-rad mini protean)의 전기장에서 1시간동안 이동시켰다.
- [0233] **3. 세포 내로의 전달 및 시험관 내에서의 유전자 침묵**
- [0234] Cell Biolabs로부터 얻은 HeLa-EGFP 세포주를, 10% FBS(Gibco), 100U/mL 페니실린 100mg/mL 스트렙토마이신(Biological Industries, Israel) 및 블라스티시딘 10μg/mL로 보충된 Dulbecco 변형 이글스 배지(Gibco) 내에서 성장시켰다. 37°C 인큐베이터에서 5% CO<sub>2</sub> 가습 공기로 세포를 유지하였다. 세포 감염(transfection)하기 하루 전에 세포(40,000 세포/웰)를 항생제 보충제없이 완전한 배지로 24웰 블랙-플레이트 유리 바닥상에 도말하였다. 다음날, 세포를 MNM-접합체에 노출시켰다; 접합체 600nM과 72시간동안 10% BSA로 배양하거나; 또는 접합체 10, 40 및 150nM과 24시간동안 무혈청 조건에서 배양한 다음, 추가 48시간 배양을 위해 완전한 혈청을 첨가하였다. 따라서, 단백질 다운-레귤레이션은 배지가 흡입되었을 때, 세포 감염 72시간 후에 측정되었고, 세포는 HBSS로 세척되었다. EGFP 형광 강도는 여기 파장 488nm, 방출 파장 535nm로 설정된 infinite M200-Pro Multimode Reader(Tecan)로 정량하였다.
- [0235] **결과:**
- [0236] 도 3은 BSA와 함께 항온처리시의 단백질-프리 분획을 보여준다. BSA와 완벽히 상호 작용하는 Apo-Si-S1과는 대조적으로, K-93-A 및 K-93-A-del-14는 BSA와 단지 부차적인 상호작용만을 보여 주었고, 흥미롭게도, 주요 자유 분획이 K-93-A-del-14(Apo93-del-14)(화살표)에서 추가적인 K-93-A 모이어티의 존재에 의해 유의적으로 제거되지 않음을 보여주었다. proteinase K(PK) 처리로 모든 단백질 결합 Apo-Si-S1을 복구하였으며, 또한 K-93-A와 K-93-A-del-14 접합체 모두에서 BSA에 부착된 소분획의 K-93-A를 방출하였다.
- [0237] 도 4는 감소된 글루타티온(2시간동안 1mM)로 K-93-A와 K-93-A-del-14 접합체 모두 항온 처리시 K-93-A와 K-93-A-del-14 접합체(화살표) 모두가 강하게 분열됨을 나타낸다. 중요하게는, 세번째 E 모이어티의 부착은 환원 반응을 감속시키지 않았다. 반응은 비교적 환원제(1mM, 2시간)에 약한 노출 조건에서 일어났다. 이러한 긍정적인 결과는 유전자 침묵에서의 관찰된 효과와 일맥상통한다: 동일한 EGFP siRNA 서열에 부착된 K-93-A 및 K-93-A-del-14가 무혈청 및 혈청+ 조건 모두에서, 용량-의존적 방식으로 EGFP 발현의 현저한 녹-다운(knock-down)을 유도하였다. 혈청(10% BSA)에서, 600nM의 K-93-A는 EGFP 유전자의 24.1±5.0% 다운-레귤레이션을 유도하는 반면, 세번째 내부 E 모이어티의 첨가는 관찰된 유전자 침묵을 50.3% ± 5.0%까지 현저하게 강화시키는 것과 관련이 있었다. 효과적인 유전자 침묵이 또한 무혈청 조건에서 관찰되었는데, K-93-A가 각각 10nM, 40nM 및 150nM의 접합체와 함께 배양시 63.5%, 79.3% 및 86.3%의 유전자 침묵을 유도하였다. K-93-A-del-14는 각각 10nM, 40nM 및 150nM로 처리시 50.3%, 76.6% 및 84.7%의 유전자 침묵을 유도하였다.

[0238] **결론:**

[0239] 시험관 HeLa 세포에서 평가한 바와 같이, **Apo-Si-K-93-A**는 유리한 성능 프로파일을 나타내었고, 이는 siRNA의 생물학적 막을 통한 세포 내로의 전달 도구로서 지속적으로 개발할 가치가 있다. 이러한 E 모이어티는 알부민과의 배양시 큰 자유 분해를 나타냈고, 살아있는 세포의 세포질 내 생리학적 수준에 해당하는 글루타티온 수준에서 다이설파이드 모이어티의 강력한 감소 및 절단을 나타냈으며, 혈장 단백질의 존재 및 부재 모두에서 유효한 유전자 침묵에 우세함을 나타냈다. 중요하게는, **Apo-Si-K-93-A**는 3개 모이어티의 부착을 통해 파악할 수 있는 바와 같이, 그 활성에서 협력성을 나타냈는데, 이는 유전자 침묵의 바람직한 유도시 2개의 모이어티의 부착보다 명백하게 우월한 것으로 밝혀졌다.

[0240] **실시예 7: Apo-Si-K-63-A의 생물학적 성능:**

[0241] 각각 Dicer의 기질인 2개의 siRNA 듀플렉스를 사용하였는데, EGFP 유전자를 침묵시키도록 설계된 것이다. 듀플렉스 중 하나에서는, **Apo-Si-K-63-A** 모이어티가 각 RNA 가닥의 5' 말단에서 부착되었다(이 듀플렉스는 **K-63-A**로 명명함). 두번째 듀플렉스에서는, 각 RNA 가닥의 5' 말단에 **Apo-Si-K-63-A** 모이어티가 부착되었고, 세번째 **Apo-Si-K-63-A** 모이어티는 패신저(Guide) 가닥을 따라 내부 위치에 14번째 뉴클레오타이드 위치에서 부착되었다. 따라서, 이 듀플렉스를 **K-63-A-del-14**로 명명하였다. 이들 각각의 구조체에 대한 뉴클레오타이드 서열은 다음과 같다:

[0242] **1. K-63-A 구조체:**

[0243] **센스:** 5'-phos/**iApo-Si-K63-A**/mAmCrCmCrUmGrArArG rUrUmCrA mUrCmUrG mC rArC rCrArCmCG rUrCrA

[0244] **안티센스:** /5'-phos/**iApo-SiK-63-A**/rCrGmGrUrGrGrUrGmCrAmGrAmUrGrArArCrU rG mGrGmUmCmA

[0245] **2. K-63-A-del-14 구조체:**

[0246] **센스:** /5phos/**iApo-Si-K-63-A**/mAmCrCmCrUmGrArArGrUrUmCrA/**iApo-SiK63-A**/ rCmUrG mCrArCrCrArCmCG

[0247] **안티센스:** /5phos/**iApo-Si-K-63-A**/rCrGmGrUrGrGrUrGmCrAmGrAmUrGrArArCrU rUrCrArG mGrGmUmCmA

[0248] **연구 목표:**

[0249] EGFP 유전자의 발현 침묵에서의 두 구조체의 성능 평가:

[0250] **방법:**

[0251] Cell Biolabs로부터 HeLa-EGFP 세포주를 입수하였다. 10% FBS(Gibco), 100U/mL 페니실린 100mg/mL 스트렙토마이신(Biological Industries, Israel) 및 블라스티시틴 10 $\mu$ g/mL로 보충된 Dulbecco 변형 이글스 배지(Gibco)에서 세포를 성장시켰다. 37°C 인큐베이터에서 5% CO<sub>2</sub> 가습 공기로 세포를 유지하였다. 형질 감염(transfection) 하루 전에 세포(40,000 세포/웰)를 24웰 블랙-플레이트 유리 바닥상에 도말하였다. 다음날, 세포를 10% 혈청의 존재하에서 **K-63-A** 또는 **K-63-A-del-14**에 노출시켰다. 무혈청 형질 감염을 위해 배지를 흡인하고 세포를 HBSS(Hank's Balanced Salt Solution)로 세척한 후, 배지를 무혈청 Opti-MEM(Thermo Fisher Scientific)으로 24시간동안 교체하고, 혈청을 첨가하여 추가 48시간동안 배양하였다. 형질 감염 후 72시간 후에 단백질 발현의 다운-레귤레이션을 측정하였다. 이를 위해, 배지를 흡인하고, 세포를 HBSS로 세척하였다. EGFP 형광 강도는 여기 파장 488nm, 방출 파장 535nm로 설정된 infinite M200-Pro Multimode Reader(Tecan)로 정량하였다

[0252] **결과:**

[0253] 2개의 E 모이어티를 갖는 **K-63-A** 및 3개의 E 모이어티를 갖는 **K-63-A-del-14** 모두가 RGFP의 발현의 효과적인 녹다운을 유도하였다.

[0254] 혈청의 존재하에서, 600nM의 **K-63-A**는 EGFP 발현을 77.6%  $\pm$  1.3%(평균 $\pm$ SD)로 감소시켰다. **K-63-A-del-14**에서는 더 강한 효과가 관찰되었는데, 600nM에서 EGFP 발현을 60.2%  $\pm$  1.0%까지 감소시켰다.

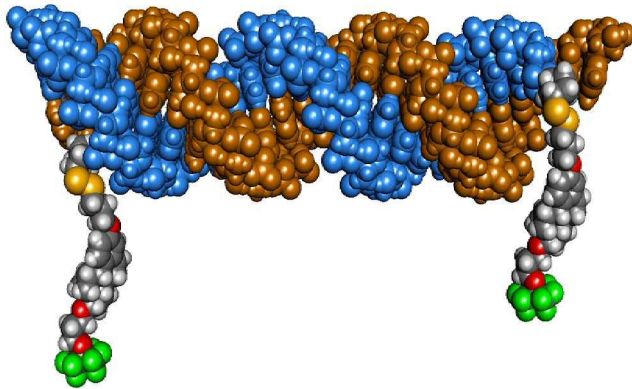
[0255] 무혈청 조건하에서, 강력한 GFP 녹다운이 본 발명의 접합체에 의해 유도되었다. **K-63-A**는 세포가 각각 10, 40 및 150nM에 노출시 EGFP 발현을 75.6%  $\pm$  2.6%, 44.1%  $\pm$  0.05% 및 23.7%  $\pm$  0.62%까지 감소시켰다. **K-63-A-del-14**는 세포가 각각 10, 40 및 150nM에 노출되었을 때 GFP 발현을 83.2%  $\pm$  4.0%, 51.4%  $\pm$  0.07% 및 18.9%  $\pm$  1.3%까지 감소시켰다.

[0256] 결론:

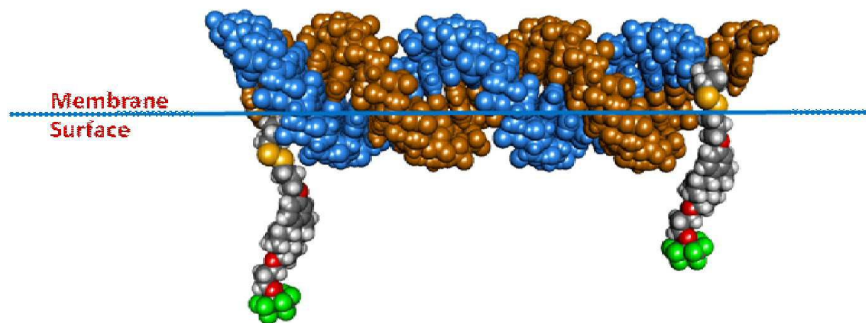
[0257] K-63-A는 인지질 막을 거쳐 거대분자 siRNA를 전달하기 위한 강력한 모이어티이다. 추가적인 K-63-A 모이어티를 설정함으로써, 막-투과 전달 과정에서 협력성과 시너지를 나타냄이 명백하다.

도면

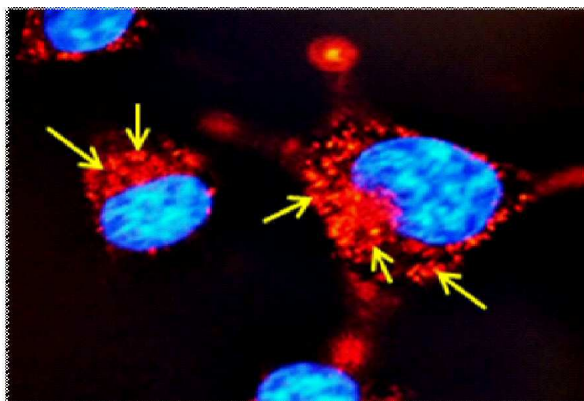
도면1a



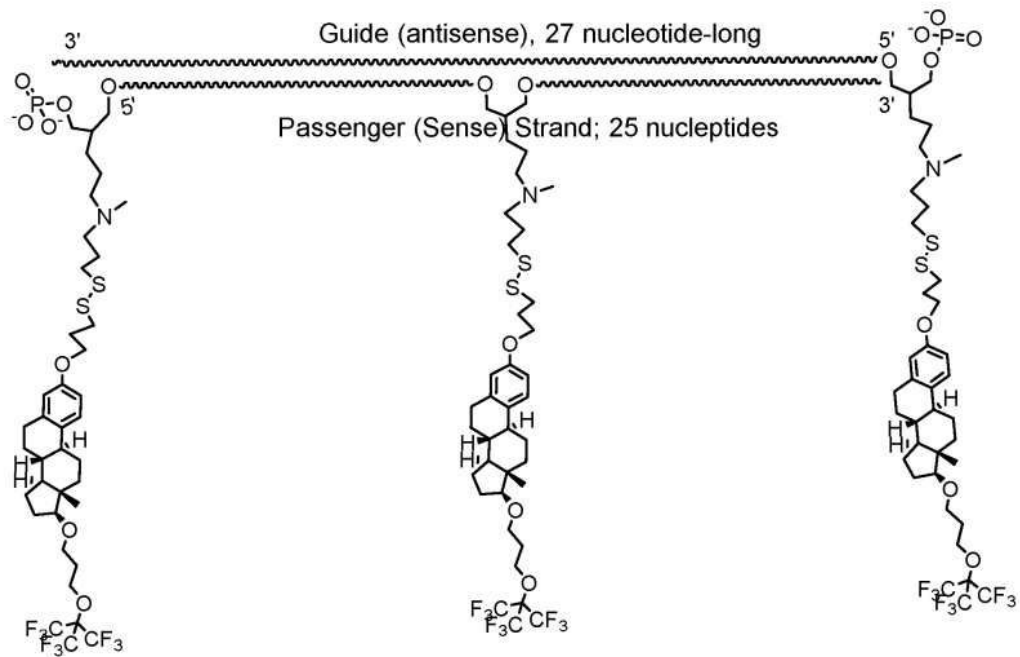
도면1b



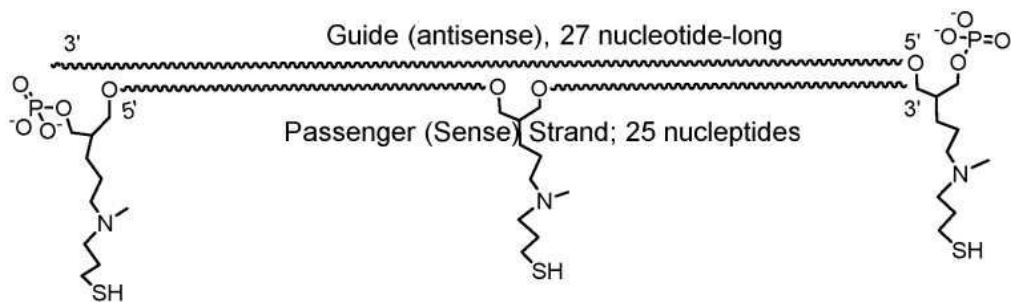
도면1c



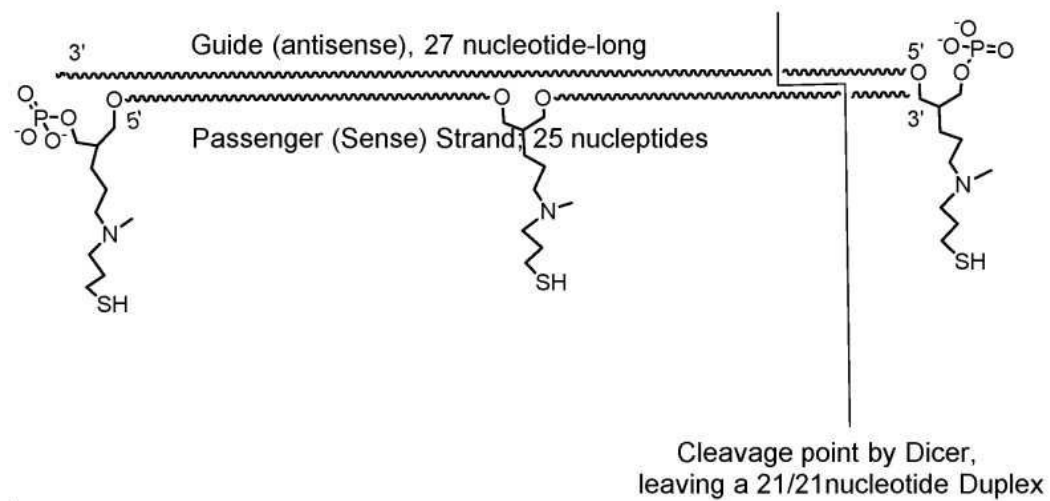
도면2a



도면2b

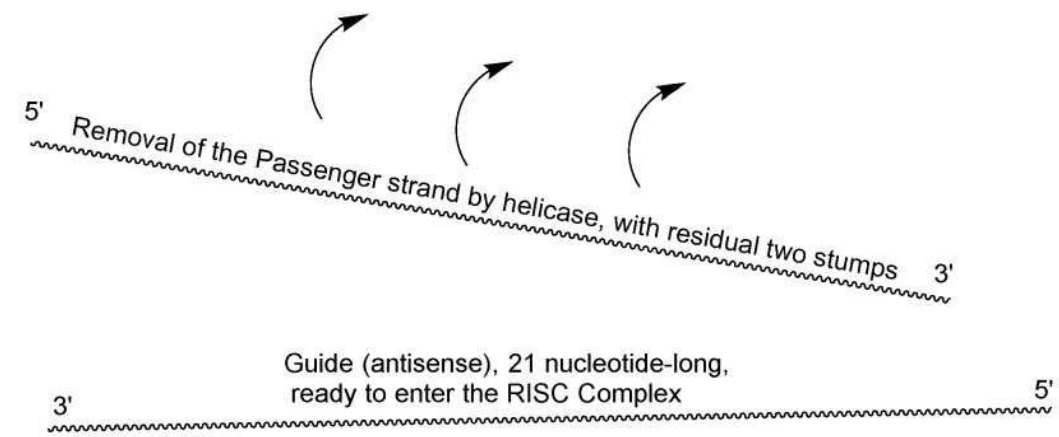


도면2c

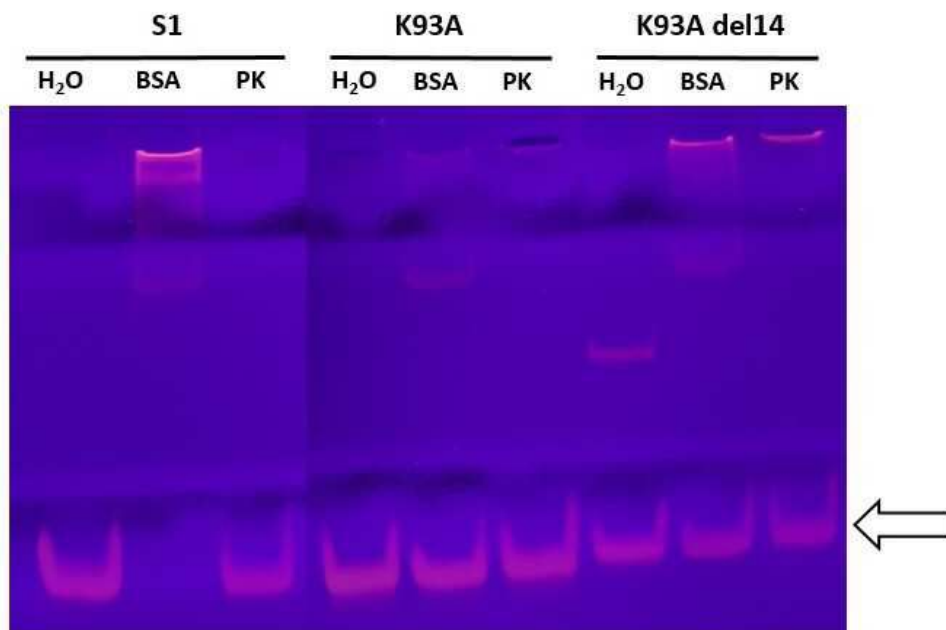




도면2d



도면3



도면4

