



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0109239
(43) 공개일자 2024년07월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07H 15/26 (2006.01) A61K 47/54 (2017.01)
A61P 31/14 (2006.01) C07H 1/00 (2006.01)
C07H 23/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07H 15/26 (2013.01)
A61K 47/546 (2017.08)
(21) 출원번호 10-2024-7011675
(22) 출원일자(국제) 2022년09월09일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년04월08일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2022/075109
(87) 국제공개번호 WO 2023/036932
국제공개일자 2023년03월16일
(30) 우선권주장
21195975.4 2021년09월10일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
유니베르시트카슬리끄드루벡
벨기에왕국루벡-라-뉘브베-1348플라스트뤼니베르
시테1올르위니베르시테르
유니베르시테 드 나무르 에이에스비엘
벨기에 5000 나무르 뤼 드 브뤼셀 61
(72) 발명자
알스틴스 데이비드
벨기에, 1325 코로이-르-그랑, 세망 드 라 덤 28
빈센트 스테판
벨기에, 7022 현, 뤼 데 카나디앙 212
(74) 대리인
특허법인한얼

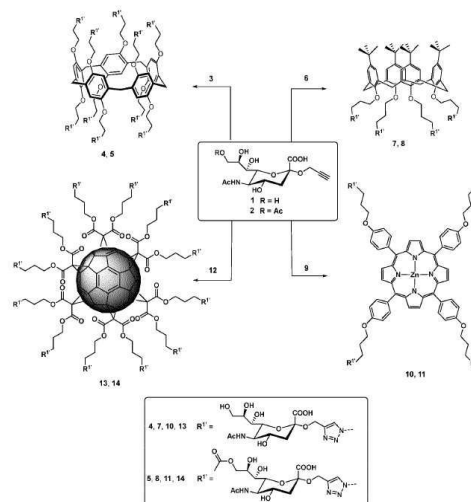
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 아세틸화 시알산 글리코클러스터 및 감염성 질환을 치료하기 위한 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 매크로사이클에 공유 결합으로 연결된 적어도 2개의 아세틸화-시알산을 포함하는 글리코클러스터에 관한 것이며, 여기서 상기 매크로사이클은 포르피린, 필라라렌, 칼릭사렌 및 풀러렌으로부터 선택된다. 한 실시양태에 따르면, 각각의 아세틸화-시알산은 4-O-아세틸화-시알산, 7-O-아세틸화-시알산, 8-O-아세틸화-시알산 및 9-O-아세틸화-시알산으로부터 독립적으로 선택된다. 본 발명은 또한 코로나바이러스 감염과 같은 감염성 질환의 치료 및/또는 예방에 사용하기 위한 글리코클러스터에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 31/14 (2018.01)

C07H 1/00 (2013.01)

C07H 23/00 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

매크로사이클(macrocyclic)에 공유 결합으로 연결된 적어도 2개의 아세틸화-시알산(acetylated-sialic acid)을 포함하는 글리코클러스터(glycocluster)로서,

여기서 상기 매크로사이클이 포르피린, 필라라렌, 칼릭사렌 및 풀러렌(fullerene)으로부터 선택되고;

각각의 아세틸화-시알산이 4-O-아세틸화-시알산, 7-O-아세틸화-시알산, 8-O-아세틸화-시알산 및 9-O-아세틸화-시알산으로부터 독립적으로 선택되는 글리코클러스터.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 글리코클러스터가 상기 매크로사이클에 공유 결합으로 연결된 적어도 4개의 아세틸화-시알산을 포함하는 글리코클러스터.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 각각의 아세틸화-시알산이 7-O-아세틸화-시알산 및 9-O-아세틸화-시알산으로부터 독립적으로 선택되는 글리코클러스터.

청구항 4

제3항에 있어서, 각각의 아세틸화-시알산이 9-O-아세틸화-시알산인 글리코클러스터.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 매크로사이클이 포르피린으로부터 선택되고, 바람직하게는 [Zn(테트라페닐포르피린)] 및 테트라페닐포르피린으로부터 선택되는 글리코클러스터.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 글리코클러스터가 적어도 하나의 안지오텐신-전환 효소 2 (ACE2) 결합 억제제를 추가로 포함하고; 바람직하게는 안지오텐신-전환 효소 2 (ACE2) 결합 억제제가 ACE2 결합 억제제 펩티드, ACE2 결합 억제제 단백질 및 항-ACE2 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로부터 선택되는 글리코클러스터.

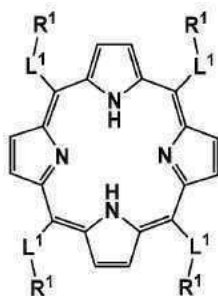
청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 글리코클러스터가 화학식 I, Ia, II, III 또는 IV의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 및/또는 용매화물인 글리코클러스터:

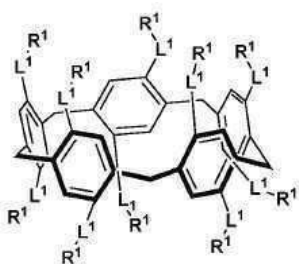
화학식 I



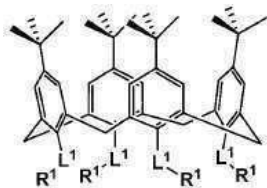
화학식 Ia



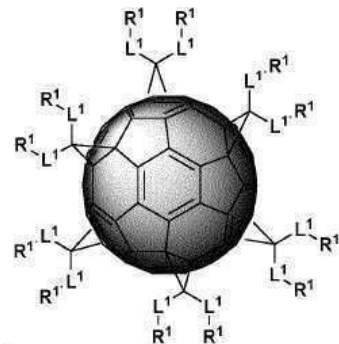
화학식 II



화학식 III



화학식 IV



여기서,

각각의 L^1 은 독립적으로:

- 단일 결합 또는

- 알킬, 헤테로알킬, 알케닐, 알키닐, 아릴, 알킬아릴, 아릴알킬, 헤테로아릴, 헤테로아릴알킬 및 알킬헤테로아릴로부터 선택되는 링커(linker)이고;

여기서 상기 알킬, 헤테로알킬, 알케닐, 알키닐, 아릴, 알킬아릴, 아릴알킬, 헤테로아릴, 헤테로아릴알킬 또는 알킬헤테로아릴은 임의로 적어도 하나의 커플링 생성물(coupling product)을 포함하고;

각각의 R^1 은 아세틸화-시알산 및 ACE2 결합 억제제로부터 독립적으로 선택되고; 단, 적어도 2개의 R^1 은 아세틸화-시알산이고;

M은 금속 양이온이다.

청구항 8

제7항에 있어서, 각각의 L^1 이 알킬, 헤테로알킬, 알킬아릴, 아릴알킬, 헤테로아릴알킬 및 알킬헤테로아릴로부터 선택되는 링커이고; 여기서, 상기 알킬, 헤테로알킬, 알킬아릴, 아릴알킬, 헤테로아릴알킬 또는 알킬헤테로아릴이 하나 또는 두 개의 커플링 생성물을 포함하고; 바람직하게는 상기 커플링 생성물 중 적어도 하나가 트리아졸릴인 글리코클러스터.

청구항 9

제7항 또는 제8항에 있어서, 각각의 L^1-R^1 이 $-(CH_2)_m-R^C-(CH_2)_n-R^1$, $-O-(CH_2)_m-R^C-(CH_2)_n-R^1$, $-C(O)-(CH_2)_m-R^C-(CH_2)_n-R^1$, $-C(O)O-(CH_2)_m-R^C-(CH_2)_n-R^1$, $-페닐-(CH_2)_m-R^C-(CH_2)_n-R^1$ 및 $-페닐-O-(CH_2)_m-R^C-(CH_2)_n-R^1$ 로부터 선택되고;

여기서 R^C 가 커플링 생성물, 바람직하게는 트리아졸릴이고; m 및 n이 독립적으로 1 내지 8 범위, 바람직하게는 1 내지 4 범위의 정수이고, 각각의 R^1 이 제7항에 정의된 바와 같은 글리코클러스터.

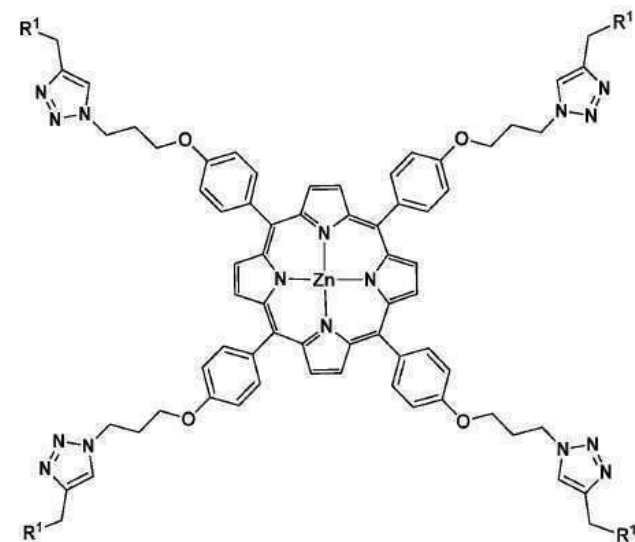
청구항 10

제7항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 R^1 이 9-O-아세틸화-시알산인 글리코클러스터.

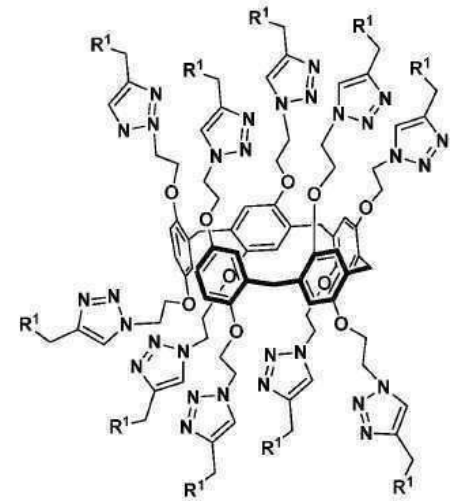
청구항 11

제10항에 있어서, 상기 글리코클러스터가 화학식 011, 005, 008 또는 014의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 및/또는 용매화물인 글리코클러스터:

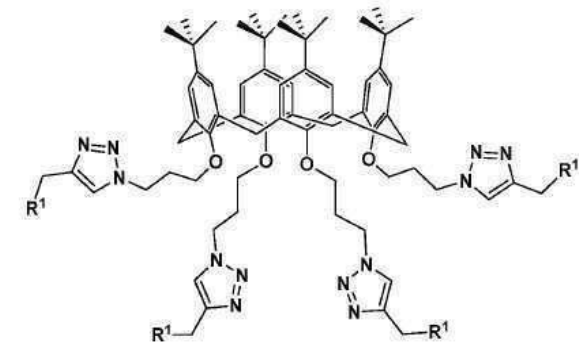
화학식 011



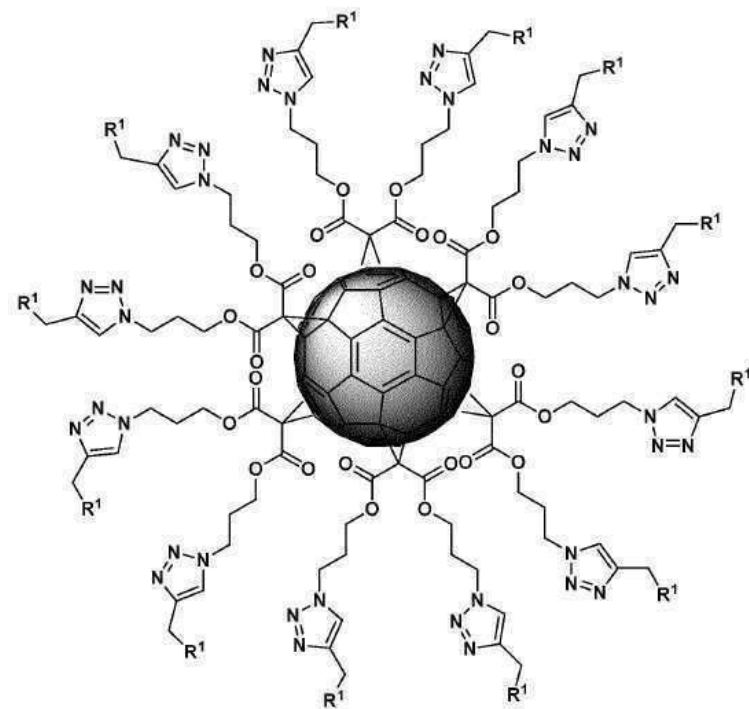
화학식 005



화학식 008

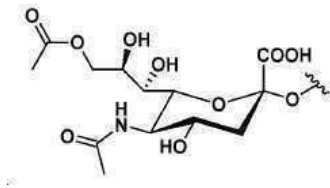


화학식 014



여기서 각각의 R^1 은 화학식 9-AcSA이고:

화학식 9-AcSA



여기서 파선은 글리코클러스터에 대한 R^1 의 부착 지점을 나타낸다.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 따른 글리코클러스터 및 적어도 하나의 약제학적으로 허용되는 담체(carrier)를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 13

약제(medicament)로서 사용하기 위한, 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 따른 글리코클러스터 또는 제12항에 따른 약제학적 조성물.

청구항 14

감염성 질환, 바람직하게는 코로나바이러스 또는 피코르나바이러스 감염, 보다 바람직하게는 SARS-CoV-2 감염의 치료 및/또는 예방에 사용하기 위한, 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 따른 글리코클러스터 또는 제12항에 따른 약제학적 조성물.

청구항 15

각각의 상기 아세틸화-시알산과 상기 매크로사이클의 커플링, 바람직하게는 말단 알킨과 아지드 사이의 반응이 트리아졸릴 그룹의 형성을 야기하는 커플링의 단계를 포함하는, 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 따른 글리코클러스터를 제조하기 위한 공정.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 감염성 질환의 치료 분야에 속하며, 감염성 질환, 특히 SARS-CoV-2 감염의 치료에 사용하기 위한 복수의 아세틸화 시알산을 포함하는 신규한 글리코클러스터(glycocuster)에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 코로나바이러스(CoV)는 *Coronaviridae* 과, *Orthocoronavirinae* 아과의 바이러스이다. 이들은 양성-센스 단일-가닥 리보핵산(RNA) 게놈 및 나선형 뉴클레오캡시드를 가진 외피 바이러스이다. 이들의 이름은 이들의 독특한 형태, 즉 왕관-유사 외관을 제공하는 이들의 외피 표면에서 돌출된 일련의 곤봉 모양의 스파이크에 기인한다. 코로나바이러스는 또한 비정상적으로 큰 RNA 게놈 및 특정 복제 전략을 특징으로 한다. RNA 바이러스 및 특히 코로나바이러스는 조류 뿐만 아니라 포유류에서 광범위한 호흡기, 전신, 위장 및 신경 질환의 원인이 된다.

[0003] 코로나바이러스는 약 50년 전 영국과 미국에서 인간에게서 처음 확인되었다. 이들은 그 이후로 일반적으로 감기와 같은 경증 호흡기 전염병만을 유발하는 것으로 간주되었다. 20세기 초, 두 가지 고병원성 코로나바이러스가 처음 확인되었다: 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스(SARS-CoV) 및 중등 호흡기 증후군 코로나바이러스(MERS-CoV). 이전의 코로나 바이러스 감염과 달리, SARS 및 MERS는 중증 호흡기 질환이며 수백 명의 사망자를 낳았다. 2019년 말, 우한(중국)에서 신종 감염성 호흡기 질환이 발생했고, 결국 그 원인은 신종 인간 코로나 바이러스 SARS-CoV-2로 확인되었다. SARS-CoV-2의 게놈은 SARS-CoV의 게놈과 약 80% 동일성을 공유하며 박쥐 코로나 바이러스 BatCoV RaTG13의 게놈과 약 96% 동일하다. SARS-CoV-2 감염으로 인한 질환은 "코로나바이러스 질환 2019"("COVID19")로 불린다. COVID-19는 2020년에 심각한 세계적 규모의 전염병으로 빠르게 부상하였다.

- [0004] SARS-CoV-2 감염은 상당수의 감염 대상체에게 무증상으로 남아 있는 것으로 간주된다. 증상이 있는 환자의 경우, COVID-19는 일반적으로(약 80%) 증상이 발열, 기침 또는 기타 호흡기 증상(예를 들어 경증 호흡 곤란 또는 가슴 답답함), 두통, 피로 또는 근육통, 및 후각 및 미각 상실을 포함할 수 있는 경미한 중증도의 호흡기 질환으로 나타난다. 그러나, 일부 환자(약 15%)는 호흡곤란, 저산소증 또는 폐렴("COVID-19 폐렴")을 포함한 심각한 증상을 발병한다. 소수의 사례(약 5%)에서, 호흡 부전, 쇼크 또는 다장기 부전과 같은 심각한 증상이 관찰된다. COVID-19 환자의 약 20%는 입원이 필요하며 이의 일부(약 5%)는 중환자실(ICU)에 입원해야 하는 것으로 추정된다. 일부 사례에서 장기의 영구 손상이 관찰되었으며, 일부 환자는 회복 후 몇 달이 지나도 다양한 영향을 계속 경험한다("장기 COVID"). 따라서, COVID-19는 상당한 고통과 사망을 유발하고, 또한 전 세계의 많은 의료 시스템을 위태롭게 한다.
- [0005] SARS-CoV-2에 대한 여러 백신이 다양한 국가에서 승인되고 배포되었다. 이와는 대조적으로, 예방 및/또는 치료 목적으로 바이러스를 억제하는 약물을 개발하기 위한 작업이 진행 중이지만, COVID-19의 1차 치료는 여전히 대증 치료와 지원 치료 및 격리와 같은 보조 조치로 남아 있다. 더욱이, 일부 대규모 백신 접종 캠페인은 많은 국가에서 상당한 단점에 직면해 있으며, 가까운 장래에 많은 사람들이 COVID-19의 영향을 받을 가능성이 높다.
- [0006] 따라서, 코로나바이러스 감염, 특히 SARS, MERS 또는 COVID-19와 같은 질환을 유발하는 코로나바이러스 호흡기 감염의 효과적인 치료 및/또는 예방이 여전히 필요하다. 특히, 코로나바이러스 복제에 대해 매우 효율적이고, 심각한 부작용이 거의 또는 전혀 없으며, 화학적 안정성이 우수하고/하거나 비용이 저렴한 치료제가 필요하다.
- [0007] 숙주 세포로의 SARS-CoV 진입은 바이러스 표면에서 돌출된 동종삼량체를 형성하는 이의 막관통 스파이크(S) 당단백질에 의해 매개된다. S 당단백질은 숙주 세포 수용체(수용체-결합 도메인(RBD))를 포함한 S1 서브유닛)에 결합하거나 바이러스 및 세포 막의 융합(S2 서브유닛)을 담당하는 두 개의 기능적 서브유닛을 포함한다. 이전에 SARS-CoV의 세포 수용체로 확인된 안지오텐신-전환 효소 2(ACE2)가 또한 신종 코로나바이러스(SARS-CoV-2)의 수용체로서 작용한다. SARS-CoV의 경우, 비리온 표면 상의 S 당단백질이 수용체 인식 및 막 융합을 매개한다. 최근, SARS-CoV-2의 S 당단백질의 RBD의 존재하에서 전장 인간 ACE2에 대해 수득된 고분해능 초저온 전자 현미경 구조는 ACE2 이량체에 대한 두 개의 S-당단백질 삼량체의 동시 결합을 시사하였다. S2 서브유닛은 융합 펩티드의 바로 상류에 위치한 숙주 프로테아제에 의해 추가로 절단되어, 광범위한 비가역적 구조적 변화를 겪는 당단백질의 활성화를 유도하여 막 융합 과정을 촉진한다.
- [0008] ACE2에 대한 S-단백질 결합은 이미 광범위하게 연구되어 감염에서의 중심적인 역할에 대한 합의에 도달했지만, 여러 연구들은 다른 세포 표면 분자의 공동-수용체/부착 인자의 중추적인 역할을 시사한다. 특히, 최근에는 ACE2 외에도 9-O-아세틸-시알로글리칸이 세포에 대한 SARS-CoV-2 결합의 초기 단계에 관여할 수 있다는 것이 제안되었다(Yang, J. *et al.*, Nature Communications, 2020, Vol. 11, Article number: 4541). 아세틸화-시알산(acetylated-sialic acid)과 코로나바이러스 S 당단백질 및 코로나바이러스 헤마글루티닌 에스테라제의 결합이 또한 보고되었다(Tortorici, M. A. *et al.*, Nature Structural Molecular Biology, 2019, Vol. 26, pp. 481-489). 따라서, 이러한 예비 정보에 기초하여, 시알산 유도체는 SARS-CoV-2 스파이크 단백질 S와 숙주 세포 간의 상호작용을 차단하기 위한 경쟁적 억제제로 작용할 가능성이 있을 수 있으며, 이러한 상호작용이 통상적으로 감염의 첫 번째 단계를 매개한다고 생각할 수 있다(Tortorici, M. A. *et al.*, Nature Structural Molecular Biology, 2019, Vol. 26, pp. 481-489).
- [0009] 그러나, 시알산과 이의 아세틸화 유도체가 SARS-CoV-2의 스파이크 단백질에, 적어도 약하게, 결합할 가능성이 있다고 제안되었지만, 이들 두 탄수화물 중 어느 것이 최적의 파트너가 될 수 있는지 정의하는 직접적인 정량적 증거는 없다(Yang, J. *et al.*, Nature Communications, 2020, Vol. 11, Article number: 4541; Nguyen, K. *et al.*, Viruses, May 2021, Vol. 13, No. 5, p. 927).
- [0010] 더욱이, 시알산 또는 이의 유도체와 같은 개별 글리칸은 일반적으로 이들의 단백질 표적에 대해 상대적으로 낮은, 전형적으로 기껏해야 중간 정도의 친화성을 갖는 것으로 당업계에 공지되어 있다(Sauter, N. K. *et al.*, Biochemistry 1989, Vol. 28, p. 8388; Dormitzer, P. R. *et al.*, Journal of Virology, October 2002, Volume 76, No. 20, pp. 10512-10517). 이것은 본 출원의 실시예에서 추가로 입증되어 있다. 개별 시알산 및 이의 유도체의 제한된 친화성은 이러한 글리칸을 바이러스 감염의 실제 치료 및/또는 예방에 직접 사용하기에 부적합하게 만든다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 놀랍게도, 본 출원인은, 적어도 두 개의 시알산 또는 이의 유도체가 특정 매크로사이클(macrocyclic)(예를 들어 포르피린, 펄라라렌, 칼릭사렌 및 풀러렌(fullerene))에 연결될 때, 수득된 글리코클러스터는 시알산의 낮은 친화성에도 불구하고 숙주 세포에 대한 SARS-CoV-2 초기 부착의 강력한 경쟁자임을 입증하였다. 따라서, 매크로사이클에 연결되지 않는 시알산("유리" 시알산)과 뚜렷히 대조적으로, 본 발명의 글리코클러스터는 COVID-19와 같은 감염성 질환의 치료 및/또는 예방에 사용하기에 적합하다. 따라서 본 발명은 COVID-19와 같은 바이러스 감염에 대한 새로운 약제(medicament)의 길을 열어준다.

과제의 해결 수단

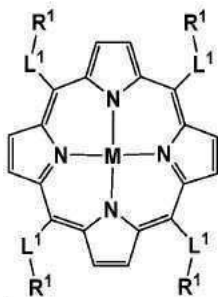
[0012] 본 발명은 매크로사이클에 공유 결합으로 연결된 적어도 2개의 아세틸화-시알산을 포함하는 글리코클러스터에 관한 것이며, 여기서 상기 매크로사이클은 포르피린, 펄라라렌, 칼릭사렌 및 풀러렌으로부터 선택되고; 여기서 각 아세틸화-시알산은 4-O-아세틸화-시알산, 7-O-아세틸화-시알산, 8-O-아세틸화-시알산 및 9-O-아세틸화-시알산으로부터 독립적으로 선택된다.

[0013] 한 실시양태에 따르면, 글리코클러스터는 상기 매크로사이클에 공유 결합으로 연결된 적어도 4개의 아세틸화-시알산을 포함한다. 한 실시양태에 따르면, 각 아세틸화-시알산은 7-O-아세틸화-시알산 및 9-O-아세틸화-시알산으로부터 독립적으로 선택된다. 한 실시양태에서, 각 아세틸화-시알산은 9-O-아세틸화-시알산이다.

[0014] 한 실시양태에 따르면, 매크로사이클은 포르피린으로부터 선택되며, 바람직하게는 [Zn(테트라페닐포르피린)] 및 테트라페닐포르피린으로부터 선택된다. 한 실시양태에 따르면, 글리코클러스터는 적어도 하나의 안지오텐신-전환 효소 2(ACE2) 결합 억제제를 추가로 포함하고; 바람직하게는 안지오텐신-전환 효소 2(ACE2) 결합 억제제는 ACE2 결합 억제제 펩티드, ACE2 결합 억제제 단백질 및 항-ACE2 항체 또는 이들의 항원-결합 단편으로부터 선택된다.

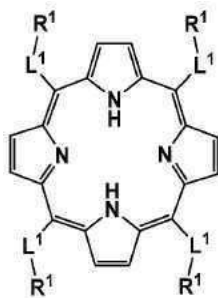
[0015] 한 실시양태에 따르면, 글리코클러스터는 화학식 I, Ia, II, III 또는 IV의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 및/또는 용매화물이다:

[0016] [화학식 I]



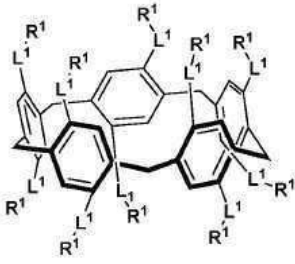
[0017]

[0018] [화학식 Ia]



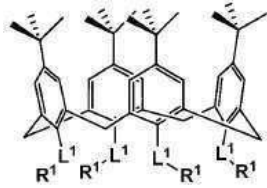
[0019]

[0020] [화학식 II]



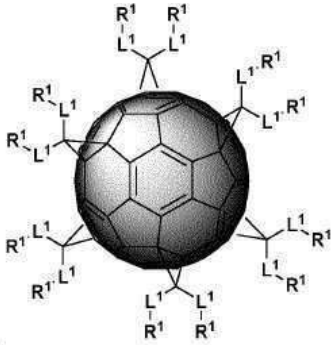
[0021]

[0022] [화학식 III]



[0023]

[0024] [화학식 IV]



[0025]

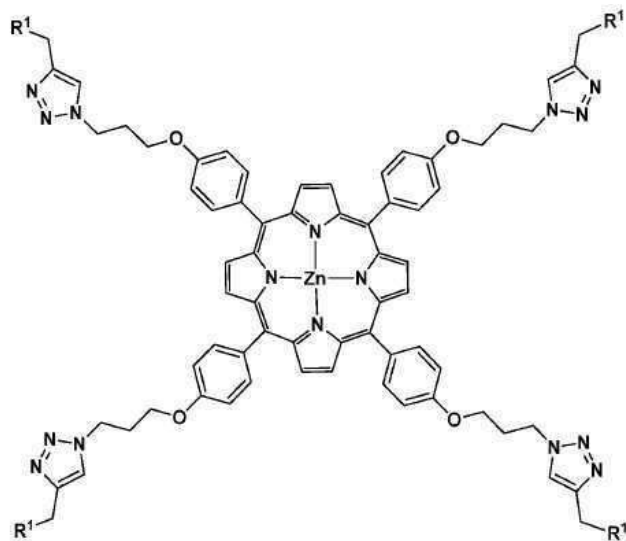
[0026] 여기서 각각의 L^1 은 독립적으로: 단일 결합 또는 알킬, 헤테로알킬, 알케닐, 알키닐, 아릴, 알킬아릴, 아릴알킬, 헤테로아릴, 헤테로아릴알킬 및 알킬헤테로아릴로부터 선택되는 링커(linker)이고; 여기서 상기 알킬, 헤테로알킬, 알케닐, 알키닐, 아릴, 알킬아릴, 아릴알킬, 헤테로아릴, 헤테로아릴알킬, 또는 알킬헤테로아릴은 임의로 적어도 하나의 커플링 생성물(coupling product)을 포함하고; 각각의 R^1 은 아세틸화-시알산 및 ACE2 결합 억제제로부터 독립적으로 선택되고; 단 적어도 2개의 R^1 은 아세틸화-시알산이고; M 은 금속 양이온이다.

[0027] 한 실시양태에 따르면, 각각의 L^1 은 알킬, 헤테로알킬, 알킬아릴, 아릴알킬, 헤테로아릴알킬 및 알킬헤테로아릴로부터 선택되는 링커이고; 여기서, 상기 알킬, 헤테로알킬, 알킬아릴, 아릴알킬, 헤테로아릴알킬 또는 알킬헤테로아릴은 하나 또는 두 개의 커플링 생성물을 포함하고; 바람직하게는 상기 커플링 생성물 중 적어도 하나는 트리아졸릴이다.

[0028] 한 실시양태에 따르면, 각각의 L^1-R^1 은 $-(CH_2)_m-R^C-(CH_2)_n-R^1$, $-O-(CH_2)_m-R^C-(CH_2)_n-R^1$, $-C(O)-(CH_2)_m-R^C-(CH_2)_n-R^1$, $-C(O)O-(CH_2)_m-R^C-(CH_2)_n-R^1$, $-페닐-(CH_2)_m-R^C-(CH_2)_n-R^1$ 및 $-페닐-O-(CH_2)_m-R^C-(CH_2)_n-R^1$ 로부터 선택되고; 여기서 R^C 는 커플링 생성물, 바람직하게는 트리아졸릴이고; m 및 n 은 독립적으로 1 내지 8 범위, 바람직하게는 1 내지 4 범위의 정수이고, 각각의 R^1 은 상기 정의된 바와 같다. 한 실시양태에 따르면, 각각의 R^1 은 9-O-아세틸화-시알산이다.

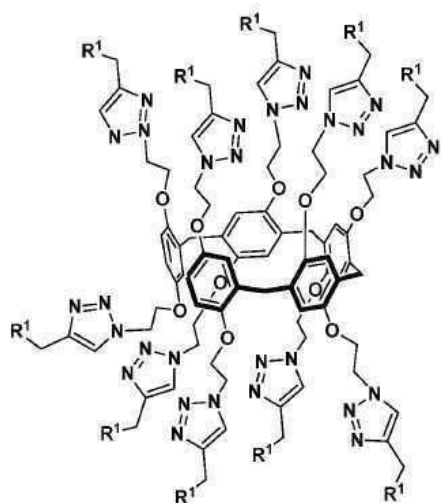
[0029] 한 실시양태에 따르면, 글리코클러스터는 화학식 011, 005, 008 또는 014의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 용매화물이다:

[0030] [화학식 011]



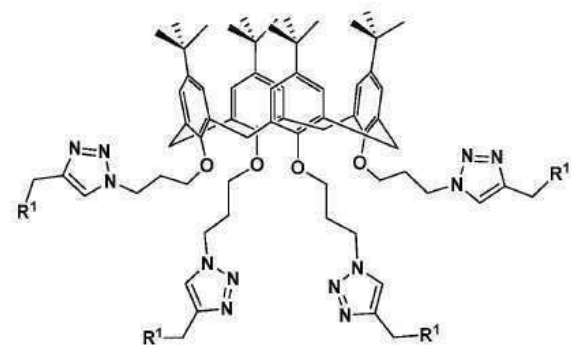
[0031]

[0032] [화학식 005]



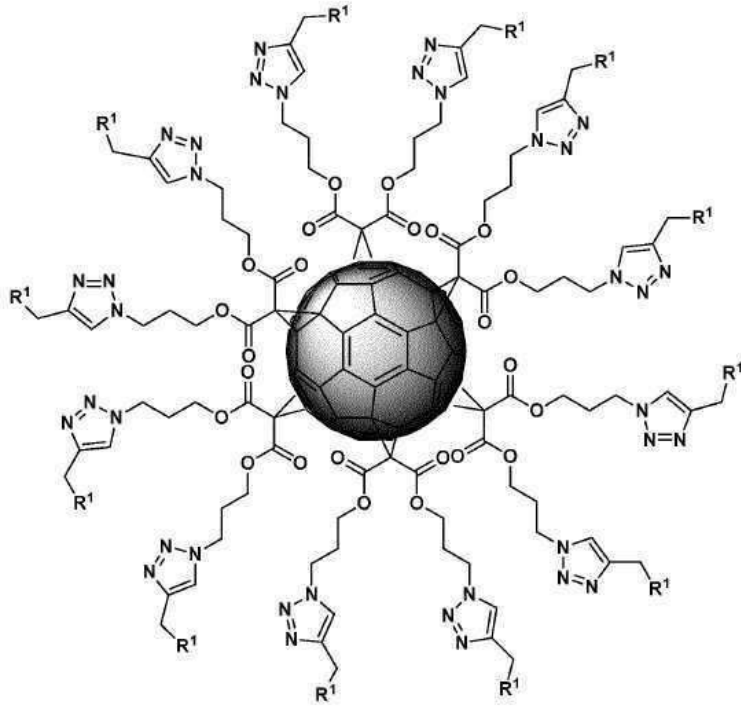
[0033]

[0034] [화학식 008]



[0035]

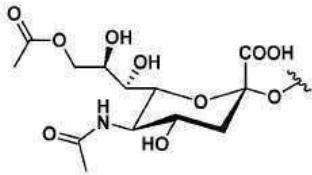
[0036] [화학식 014]



[0037] ;

[0038] 여기서 각각의 R^1 은 화학식 9-AcSA이다:

[0039] [화학식 9-AcSA]



[0040]

[0041] 여기서 파선은 글리코클러스터에 대한 R^1 의 부착 지점을 나타낸다.

[0042] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 글리코클러스터 및 적어도 하나의 약제학적으로 허용되는 담체(carrier)를 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 또한 약제로서 사용하기 위한 본 발명에 따른 글리코클러스터 또는 본 발명에 따른 약제학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 또한 감염성 질환, 바람직하게는 코로나바이러스 또는 피코르나바이러스 감염, 보다 바람직하게는 SARS-CoV-2 감염의 치료 및/또는 예방에 사용하기 위한 본 발명에 따른 글리코클러스터 또는 본 발명에 따른 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[0043] 본 발명은 또한 각각의 아세틸화-시알산과 매크로사이클의 커플링, 바람직하게는 말단 알킨과 아지드 사이의 반응이 트리아졸릴 그룹의 형성을 야기하는 커플링의 단계를 포함하는 본 발명에 따른 글리코클러스터를 제조하기 위한 공정에 관한 것이다.

[0044] 정의

[0045] 본 발명에서, 하기 용어들은 다음과 같은 의미를 갖는다:

[0046] **화학적 정의**

[0047] 본 발명의 화합물을 설명할 때, 사용되는 용어들은 달리 지시되지 않는 한, 하기 정의에 따라 해석되어야 한다. 화학 치환기가 화학 그룹의 조합인 경우, 분자에 대한 치환기의 부착 지점은 나열된 마지막 화학 그룹에 의한 것이다. 예를 들어, 아릴알킬 치환기는 알킬 모이어티(moiety)를 통해 분자의 나머지 부분에 결합되며, 다음과 같이 표시될 수 있다: "아릴-알킬-".

[0048] 기호 "Ac"로 표시되는 "아세틸" 또는 "에타노일"은 화학식 $CH_3-C(=O)-$ 의 메틸 아실 모이어티를 지칭한다.

- [0049] "알켄" 또는 "알케닐"은 적어도 하나의 이중 결합 및 전형적으로 2 내지 12개의 탄소 원자, 바람직하게는 3 내지 6개의 탄소 원자를 포함하는 선형 또는 분지형 탄화수소 사슬을 지칭한다. 알케닐 그룹의 비제한적인 예는 에테닐, 2-프로페닐, 2-부테닐, 3-부테닐, 2-펜테닐 및 이의 이성질체, 2-헥세닐 및 이의 이성질체 및 2,4-펜타디에닐을 포함한다.
- [0050] "알킬"은 전형적으로 1 내지 12개의 탄소 원자, 바람직하게는 1 내지 6개의 탄소 원자, 보다 바람직하게는 1 내지 3개의 탄소 원자를 포함하는 포화된 선형 또는 분지형 탄화수소 사슬을 지칭한다. 본 발명에서, 알킬 그룹은 1가 또는 2가일 수 있다(즉, "알킬렌" 그룹은 "알킬" 정의에 포함된다). 알킬 그룹의 비제한적인 예는 메틸, 에틸, *n*-프로필, *i*-프로필, *n*-부틸, *i*-부틸, *s*-부틸 및 *t*-부틸, 펜틸 및 이의 이성질체(예를 들어 *n*-펜틸, *i*-펜틸), 및 헥실 및 이의 이성질체(예를 들어 *n*-헥실, *i*-헥실)를 포함한다. 바람직한 알킬 그룹은 메틸, 에틸, *n*-프로필, *i*-프로필, *n*-부틸, *s*-부틸 및 *t*-부틸을 포함한다.
- [0051] "알킬아릴"은 알킬 그룹으로 치환된 아릴 그룹을 지칭한다: 알킬-아릴-.
- [0052] "알킬헥테로아릴"은 알킬 그룹으로 치환된 헥테로아릴 그룹을 지칭한다: 알킬-헥테로아릴-.
- [0053] "알킨" 또는 "알키닐"은 적어도 하나의 삼중 결합 및 전형적으로 2 내지 12개의 탄소 원자, 바람직하게는 3 내지 6개의 탄소 원자를 포함하는 선형 또는 분지형 탄화수소 사슬을 지칭한다. 알키닐 그룹의 예는 에티닐, 2-프로피닐, 2-부티닐, 3-부티닐, 2-펜티닐 및 이의 이성질체, 및 2-헥시닐 및 이의 이성질체를 포함한다.
- [0054] "아미드"는 연결 $-(C=O)-NH-$ 를 갖는 작용 그룹을 지칭한다.
- [0055] "아미도"는 $-(C=O)-NH_2$ 그룹을 지칭한다.
- [0056] "아민"은 $-NH_2$ 그룹 및 2차 아민 $-NHR$ 을 지칭하며, 여기서 R은 수소와는 상이하고, 바람직하게는 R은 알킬 그룹이다.
- [0057] "아미노"는 그룹 $-NH_2$ 를 지칭한다.
- [0058] "아미노옥시"는 $-O-NH_2$ 그룹을 지칭한다.
- [0059] "아릴"은 적어도 하나의 방향족 환을 포함하는 사이클릭 다중불포화 방향족 하이드로카빌 그룹을 지칭한다. 아릴 그룹은 하나의 환을 가질 수 있거나(즉, 페닐) 또는 함께 융합된(예를 들어, 나프틸) 또는 공유 결합으로 연결된 다수의 방향족 환을 가질 수 있다. 전형적으로, 아릴 그룹은 5 내지 12개의 탄소 원자, 바람직하게는 6 내지 10개의 탄소 원자를 갖는다. 방향족 환은 임의로 이에 융합된 1 내지 2개의 추가 환(사이클로알킬, 헥테로사이클로알킬 또는 헥테로아릴)을 포함할 수 있다. 아릴은 또한 적어도 하나의 환이 방향족인 한, 본원에 열거된 카보사이클릭 시스템의 부분적으로 수소화된 유도체를 포함하는 것으로 의도된다. 아릴 그룹의 비제한적인 예는 페닐, 비페닐, 비페닐레닐, 5- 또는 6-테트라리닐, 나프탈렌-1- 또는 -2-일, 4-, 5-, 6- 또는 7-인데닐, 1-, 2-, 3-, 4- 또는 5-아세나프틸레닐, 3-, 4- 또는 5-아세나프테닐, 1- 또는 2-펜탈레닐, 4- 또는 5-인다닐, 5-, 6-, 7- 또는 8-테트라하이드로나프틸, 1,2,3,4-테트라하이드로나프틸, 1,4-디하이드로나프틸, 1-, 2-, 3-, 4- 또는 5-피레닐을 포함한다. 바람직한 아릴 그룹은 페닐이다.
- [0060] "아릴알킬"은 아릴 그룹으로 치환된 알킬 그룹을 지칭한다: 아릴-알킬-.
- [0061] "아지드"는 화학식 $-N_3$ 의 그룹을 지칭한다.
- [0062] 그룹 앞에 오는 " (C_x-C_y) "는 화학 분야의 일반적인 용어에 따라 그룹이 x 내지 y개의 탄소 원자를 포함함을 의미한다.
- [0063] "카복실산"은 화학식 $-COOH$ 의 그룹을 지칭한다.
- [0064] "커플링 작용기(Coupling function)"는 다른 작용 그룹과 반응하여 결합 또는 원자의 선형 그룹과 같은 공유 결합을 형성할 수 있는 작용 그룹을 지칭한다. 따라서 적절한 반응 조건하에서 반응성인 커플링 작용기는 상이한 분자의 다른 커플링 작용기와 화학적으로 반응하여 새로운 공유 결합을 형성할 수 있다. 커플링 작용기는 일반적으로 다른 분자에 대한 부착 지점을 나타낸다. 커플링 작용기는 일반적으로 친핵성, 친전자성 및/또는 광활성 그룹을 포함한다. 커플링 작용기의 비제한적인 예는 알코올; 알켄; 알킨(예를 들어, $-C\equiv CH$); 아민; 아미드; 아미노옥시; 무수물, 예를 들어 글루타르산 무수물, 숙신산 무수물 또는 말레산 무수물; 아지드; 카복실산; 활성 카복실산, 예를 들어 산 무수물 또는 산 할라이드; 클로로포르메이트; 활성 에스테르, 예를 들어 N-하이드록시

숙신이미드 에스테르, N-하이드록시글루타르이미드 에스테르 또는 말레이미드 에스테르; 글루타메이트; 할라이드 (할로겐 원자); 할로아세트아미드(즉, $-\text{NH}-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{X}$ 모이어티, 여기서 X는 할로겐 원자이다) 예를 들어 클로로아세트아미드, 브로모아세트아미드 또는 요오도아세트아미드; 하이드라지드; 이소시아네이트; 이소티오시아네이트; 케톤; 말레이미드; 노르보넨; 포스폰산; 실록시; 테트라진 및 티올을 포함한다. 두 커플링 작용기 사이의 반응은 본원에 정의된 바와 같은 "커플링 생성물"을 야기할 수 있다.

[0065] "커플링 생성물"은 상이한 분자에서 두 커플링 작용기 사이의 반응으로부터 발생하는 커플링 작용기의 잔기(residue), 예를 들어 기능적으로 관련된 원자 그룹(예를 들어 아미드 $-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-$ 그룹 또는 이중 결합) 또는 헤테로사이클(예를 들어 2가 트리아졸릴 그룹)을 지칭한다. 즉, 커플링 생성물은 두 커플링 작용기 사이의 커플링 반응 후에 하나 또는 두 개의 커플링 작용기(들)의 남아있는 것이다. 예를 들어, 2개의 커플링 작용기 A와 B 사이의 커플링 반응은 하기 표 1에 나타난 바와 같은 하기 커플링 생성물을 유도할 수 있고, 여기서 X는 할로겐 원자(예를 들어, Br 또는 Cl)를 나타낸다. 커플링 생성물은 본원에 정의된 바와 같은 "링커"에 포함될 수 있다.

[0066] 표 1: 커플링 작용기 및 생성물의 예

R-커플링 작용기 A	R'-커플링 작용기 B	R-커플링 생성물-R'
R-N ₃	R'-C≡CH	R-트리아졸릴-R'
R-NH ₂	R'-COOH	R-NH(C=O)-R'
R-SH	R'-SH	R-S-S-R'
R-OH	R'-(에폭사이드)	R-OCH ₂ CH(OH)-R'
R-NH ₂	R'-(에폭사이드)	R-NHCH ₂ CH(OH)-R'
R-SH	R'-(에폭사이드)	R-SCH ₂ CH(OH)-R'
R-NH ₂	R'-CHO	R-N=CH-R'
R-NH ₂	R'-NCO	R-NH(C=O)NH-R
R-NH ₂	R'-NCS	R-NH(C=S)NH-R'
R-SH	R'-(C=O)CH ₃	R-(C=O)CH ₂ S-R'
R-SH	R'-O(C=O)X	R-S(C=O)O-R'
R-CH=CH ₂	R'-SH	R-CH ₂ CH ₂ S-R'
R-OH	R'-NCO	R-O(C=O)NH-R'
R-SH	R'-(C=O)CH ₂ X	R-SCH ₂ (C=O)-R'
R-NH ₂	R'-(C=O)N ₃	R-NH(C=O)-R'
R-COOH	R'-COOH	R-(C=O)O(C=O)-R'
R-SH	R'-X (R-할로겐)	R-S-R'
R-NH ₂	R'-CH ₂ -C(NH ₂ ⁺)-OCH ₃ (“Pinner 염”)	R-NH-C(NH ₂ ⁺)-CH ₂ -R'
R-NHNH ₂	R'-CHO	R-NHNH=CH-R'
R-CH=CH-B(OH) ₂	R'-X	R-CH=CH-R'
R-C≡CH	R'-X	R-C≡C-R'

[0067] "공유 결합으로 연결된"은 2개의 모이어티가 직접적으로, 즉, 단일, 이중 또는 삼중 공유 결합(전형적으로 단일 결합)에 의해, 또는 간접적으로, 즉, 복수의 공유 결합을 포함하는 본원에 기재된 바와 같은 "링커"에 의해 함께 공유 결합되는 것을 의미한다.

[0069] "글리코클러스터"는 글리칸의 클러스터, 즉 복수의 글리칸 단위를 포함하는 분자 또는 분자의 앙상블을 지칭한다. 따라서, 글리코클러스터는 적어도 2개의 다당류, 올리고당 및/또는 단당류 모이어티, 전형적으로 적어도 2개의 단당류를 포함한다. 글리코클러스터에서, 글리칸 단위는 공통 스캐폴드(scaffold)(예를 들어, 매크로사이클, 중합체 또는 금속 나노입자)에 대한 이들의 결합에 의해 그룹화되며, 서로 상대적으로 가깝다. 글리코클러스터는 종종 약물 전달을 위해 사용되지만, 본 발명에서는 감염성 질환의 치료에 사용하기 위한 세포 결합 및/또는 감염력(infectivity)의 억제제로서 사용될 수 있다.

[0070] "할라이드", "할로" 또는 "할로겐"은 불소, 염소, 브롬 또는 요오드 원자; 바람직하게는 염소 또는 브롬 원자를

지칭한다.

[0071] "**헤테로알킬**"은 하나 이상의 탄소 원자가 산소, 질소 및 황으로부터 선택되는 헤테로원자로 대체된 본원에 정의된 바와 같은 알킬 그룹을 지칭한다. 헤테로알킬 그룹에서, 헤테로원자는 알킬 사슬을 따라 탄소 원자에만 결합되며, 즉, 각각의 헤테로원자는 적어도 하나의 탄소 원자에 의해 임의의 다른 헤테로원자로부터 분리된다. 질소 및 황 헤테로원자는 임의로 산화될 수 있고, 질소 헤테로원자는 임의로 사급화될 수 있다. 헤테로알킬은 탄소 원자를 통해서만 다른 그룹 또는 분자에 결합하며, 즉, 결합 원자는 헤테로알킬 그룹에 포함된 헤테로원자 중에서 선택되지 않는다. 헤테로알킬의 비제한적인 예는 알콕시, 에테르 및 폴리에테르, 2차 아민, 3차 아민 및 티오에테르를 포함한다.

[0072] "**헤테로아릴**"은 서로 융합되거나 공유 결합된 하나 또는 두 개의 환을 가지며, 여기서 적어도 하나의 환은 방향족이고, 이들 환 중 하나 이상에서 하나 이상의 탄소 원자는 산소, 질소 및/또는 황 원자로 대체되는, 5 내지 12개 탄소 원자, 바람직하게는 6 내지 10개 탄소 원자를 포함하는 방향족 환 또는 방향족 환 시스템을 지칭한다. "헤테로아릴"은 또한 본원에 정의된 바와 같은 "아릴" 그룹으로 보일 수 있으며, 여기서 아릴 그룹의 적어도 하나의 탄소 원자는 헤테로원자로 대체되고, 생성된 분자는 화학적으로 안정하다. 질소 및 황 헤테로원자는 임의로 산화될 수 있고, 질소 헤테로원자는 임의로 사급화될 수 있다. 헤테로아릴 그룹의 비제한적인 예는 푸라닐, 티오펜일, 피라졸릴, 이미다졸릴, 옥사졸릴, 이속사졸릴, 티아졸릴, 이소티아졸릴, 트리아졸릴, 옥사디아졸릴, 티아디아졸릴, 테트라졸릴, 옥사트리아졸릴, 티아트리아졸릴, 피리디닐, 피리미딜, 피라지닐, 피리다지닐, 옥사지닐, 디옥시닐, 티아지닐, 트리아지닐, 이미다조[2,1-b][1,3] 티아졸릴, 티에노[3,2-b]푸라닐, 티에노[3,2-b]티오펜일, 티에노[2,3-d][1,3]티아졸릴, 티에노[2,3-d]이미다졸릴, 테트라졸로[1,5-a]피리디닐, 인돌릴, 인돌리지닐, 이소인돌릴, 벤조푸라닐, 이소벤조푸라닐, 벤조티오펜일, 이소벤조티오펜일, 인다졸릴, 벤즈이미다졸릴, 1,3-벤즈옥사졸릴, 1,2-벤즈이속사졸릴, 2,1-벤즈이옥사졸릴, 1,3-벤조티아졸릴, 1,2-벤조이소티아졸릴, 2,1-벤조이소티아졸릴, 벤조트리아졸릴, 1,2,3-벤즈옥사디아졸릴, 2,1,3-벤즈옥사디아졸릴, 1,2,3-벤조티아디아졸릴, 2,1,3-벤조티아디아졸릴, 티에노피리디닐, 퓨리닐, 이미다조[1,2-a]피리디닐, 6-옥소-피리다진-1(6H)-일, 2-옥소피리딘-1(2H)-일, 6-옥소-피리다진-1(6H)-일, 2-옥소피리딘-1(2H)-일, 1,3-벤조디옥솔릴, 퀴놀리닐, 이소퀴놀리닐, 신놀리닐, 퀴나졸리닐 및 퀴녹살리닐을 포함한다.

[0073] "**헤테로아릴알킬**"은 헤테로아릴 그룹으로 치환된 알킬 그룹을 지칭한다: 헤테로아릴-알킬-.

[0074] "**하이드록실**"은 -OH 그룹을 지칭한다.

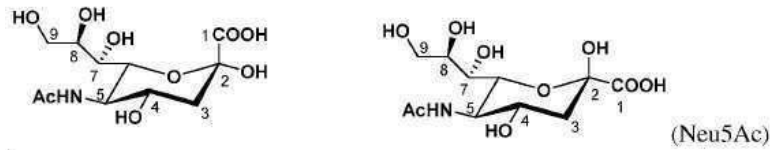
[0075] "**케톤**"은 연결성 C-(C=O)-C를 갖는 작용 그룹을 지칭한다.

[0076] "**링커**"는 2개의 분자를 서로 공유 결합시키고 안정한 공유 결합에 의해 함께 결합된 C, N, O, S 및 P로부터 선택되는 일련의 다가 원자를 포함하는 모이어티를 지칭한다. 모이어티는 전형적으로 1 내지 30개의 원자, 예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 또는 30개 원자를 포함한다. 링커는 선형 또는 비선형일 수 있으며, 일부 링커는 펜던트 측쇄 또는 펜던트 작용 그룹 또는 둘 다를 갖는다. 한 실시양태에서, 링커는 단일, 이중, 삼중 또는 방향족 탄소-탄소 결합, 탄소-질소 결합, 질소-질소 결합, 탄소-산소 결합 및 탄소-황 결합의 임의의 조합으로 구성된다. 한 실시양태에서, 링커는 알킬, -C(O)NH-, -C(O)O-, -NH-, -S-, -O-, -C(O)-, -S(O)-, -S(O)₂ 및 5원 또는 6원 모노사이클릭 아릴 또는 헤테로아릴로부터 선택되는 모이어티의 조합으로 구성된다. 한 실시양태에서, 링커는 본원에 정의된 바와 같은 적어도 하나의 "커플링 생성물", 전형적으로 하나 또는 두 개의 커플링 생성물을 포함한다. 이러한 맥락에서, "포함하다"는 링커가 적어도 하나의 커플링 생성물에 의해 중단될 수 있음(즉, 커플링 생성물이 링커의 원자 사슬에 혼입됨) 및/또는 링커가 적어도 하나의 커플링 생성물로 말단화될 수 있음(즉, 커플링 생성물이 링커를 말단화시킴)을 의미한다. 이 실시양태에서, 커플링 생성물은 링커의 일부로 간주되며, 이는 특히 커플링 생성물의 원자가 링커의 총 원자 개수에 포함됨을 의미한다.

[0077] "**매크로사이클**"은 필라라렌, 칼릭사렌, 포르피린, 풀러렌, 크라운 에테르 및 사이클로텍스트린과 같은 12원 이상의 환을 함유하는 분자 또는 이온을 지칭한다. 단순성 및 명확성을 위해, 본 출원에서, "매크로사이클" 용어 및 이의 임의의 특정 속(예를 들어, 필라라렌, 칼릭사렌, 포르피린 및 풀러렌)은 매크로사이클 자체 및 단일 결합에 의해 직접 또는 본원에 정의된 "링커"를 통해 다른 분자와 매크로사이클의 결합으로부터 발생하는 임의의 매크로사이클-기반 모이어티를 모두 지칭한다. 필요한 경우, 후자는 구체적으로 "**매크로사이클의 잔기**" 또는 "**매크로사이클 잔기**"로 지칭될 것이다.

[0078] "**펩티드**"는 펩티드 결합에 의해 함께 연결된 50개 미만의 아미노산으로 구성된 아미노산의 선형 중합체를 지칭한다.

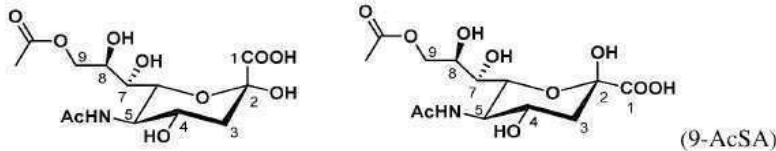
[0079] "시알산" 또는 "SA"는 당업계의 일반적인 지식에 따라, 9-탄소 골격을 갖는 알파-케토산 당의 부류에 속하는 당 당류를 지칭한다. 특히, 시알산은 하기 화학식의 아세틸뉴라민산(Neu5Ac)을 지칭한다.



[0080]

[0081] 카복실산이 축 위치(axial position)에 있는 구성은 알파-아노머인 반면, 카복실산이 적도 위치(equatorial position)에 있는 구성은 베타-아노머이다. 다른 분자에 결합될 때, 시알산은 주로 알파-아노머이다. 시알산에 대한 탄소 번호매김은 상기 화학식에 나타난 바와 같다(왼쪽: 알파-아노머, 오른쪽: 베타-아노머).

[0082] 시알산은 당업계의 일반적인 의미에 따라 "아세틸화"될 수 있으며, 즉, 시알산 중의 그룹(전형적으로 수소 원자)는 아세틸 그룹으로 대체될 수 있다. Neu5Ac는 아세틸화 아민(AcHN)을 포함하지만, 본 출원에서, 아세틸화가 하이드록실(OH) 그룹 및 아민 둘 다에 있는 시알산만이 본 발명의 의미에서 "아세틸화"된 것으로 간주된다. 특히, "아세틸화-시알산"은 4, 7, 8 및 9 위치에 있는 적어도 하나의 하이드록실(OH)이 아세틸 그룹으로 치환되어 아세테이트 모이어티($-OC(O)CH_3$)를 야기하는 시알산이다. 아세트산과의 에스테르화 반응을 포함하여, 시알산 내의 하나 이상의 위치의 아세틸화를 위한 합성 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 특히, 아세틸화-시알산은 하기 화학식의 9-O-아세틸-시알산(9-AcSA)을 지칭할 수 있다(왼쪽: 알파-아노머, 오른쪽: 베타-아노머).



[0083]

[0084] 시알산 또는 아세틸화-시알산은 단일 공유 결합에 의해 직접 또는 링커를 통해 천연 또는 인공일 수 있는 다른 화합물에 결합될 수 있다. 예를 들어, 본 발명에서, 시알산 및/또는 아세틸화-시알산은 글리코클러스터를 형성하기 위해 매크로사이클에 결합된다. 비-아세틸화 하이드록실은 특히 공유 결합을 수득하기 위한 커플링 작용기로서 사용될 수 있다. 단순성 및 명확성을 위해, 본 출원에서 "시알산" 용어 및 이의 임의의 특정 속(예를 들어, 아세틸화-시알산)은 시알산 당당류 자체 및 단일 결합에 의해 직접 또는 본원에 정의된 "링커"를 통해 시알산과 다른 분자의 커플링으로부터 생성되는 임의의 시알산-기반 모이어티를 모두 지칭한다. 필요한 경우, 후자는 구체적으로 "시알산의 잔기" 또는 "시알산 잔기"로 지칭될 것이다. 시알산이 비-아세틸화 하이드록실(예를 들어, 위치 2의 하이드록실)에 의해 다른 분자에 결합될 때, 남은 산소는 정의 및 표현 목적을 위해 시알산 잔기의 일부로 간주된다.

[0085] "실록시"는 작용기 $-O-Si(R)_3$ 를 지칭하고, 여기서 R은 예를 들어 알킬 또는 아릴을 나타낸다.

[0086] "트리아졸릴"은 화학식 (즉, 트리아졸)의 헤테로아릴의 1가, 2가 또는 3가 유도체, 예를 들어 또는 를 지칭한다.

[0087] **일반적인 정의**

[0088] "약"은 본원에서 대략, 대충, 그 주위 또는 영역을 의미하기 위해 사용된다. 숫자 앞의 "약"이라는 용어는 숫자 값의 플러스 또는 마이너스 10%를 의미한다. "약"이라는 용어가 숫자 범위와 함께 사용되는 경우, 제시된 숫자 값의 위와 아래로 경계를 10% 확장함으로써 해당 범위를 수식한다.

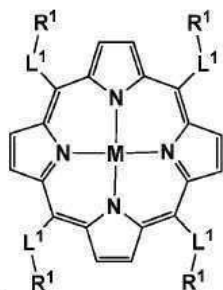
[0089] "투여", 또는 이의 변형태(예를 들어, "투여하는")은 병태, 증상 또는 질환이 치료 및/또는 예방되어야 하는 환자에게 치료제(예를 들어, 본 발명의 화합물)를 단독으로 또는 약제학적으로 허용되는 조성물의 일부로서 제공하는 것을 의미한다.

[0090] "인간"은 신생아, 유아, 아동, 청소년 및 성인을 포함한 모든 발달 단계의 남성 또는 여성 대상을 지칭한다.

- [0091] "환자"는 의료 관리를 받기를 기다리고 있거나 받고 있거나, 의료 시술의 대상체이고/될 것인 동물, 전형적으로 온혈 동물, 바람직하게는 인간을 지칭한다. 환자는 또한 예방적 치료 또는 시술의 대상체일 수 있다.
- [0092] "약제학적으로 허용되는"은 조성물의 구성분이 서로 상용성이고 투여받는 환자에게 해롭지 않은 것을 의미한다.
- [0093] "약제학적으로 허용되는 담체"는 동물, 바람직하게는 인간에게 투여될 때 부작용, 알레르기성 또는 기타 바람직하지 않은 반응을 일으키지 않는 부형제(excipient)를 지칭한다. 이것은 임의의 및 모든 용매, 분산 매질, 코팅제, 항균제 및 항진균제, 등장성 및 흡수 지연제 등을 포함한다. 인간 투여를 위해, 제제는 예를 들어 FDA 사무소 또는 EMA와 같은 규제 기관에서 요구하는 무균성, 발열성, 일반 안전성 및 순도 표준을 충족해야 한다.
- [0094] "예방하다", "예방하는" 및 "예방"은 병태 및/또는 질환 및/또는 이의 수반되는 증상 중 어느 하나의 발병을 지연 또는 배제하거나, 환자가 병태 또는 질환에 걸리는 것을 금지하거나, 환자가 병태 및/또는 질환 및/또는 이의 수반되는 증상 중 어느 하나에 걸릴 위험을 줄이는 것을 지칭한다.
- [0095] "전구약물(prodrug)"은 *생체내* 생체전환 산물이 치료제(활성 약물)인 치료제(예를 들어, 본 발명의 화합물)의 약리학적으로 허용되는 유도체를 지칭한다. 전구약물은 전형적으로 증가된 생체이용률(bioavailability)을 특징으로 하며, *생체내에서* 활성 화합물로 쉽게 대사된다. 전구약물의 비제한적인 예는 아마이드 전구약물 및 카복실산 에스테르 전구약물, 특히 알킬 에스테르, 사이클로알킬 에스테르 및 아릴 에스테르를 포함한다.
- [0096] "용매화물"은 화합물을 하나 이상의 용매의 하나 이상의 분자의 화학량론적 양 또는 화학량론 미만의 양과 함께 포함하는 분자 복합체를 지칭하며, 전형적으로 용매는 예를 들어, 에탄올과 같은 약제학적으로 허용되는 용매이다. "수화물"이라는 용어는 용매가 물(H₂O)인 경우를 지칭한다.
- [0097] "치료제", "활성 약제학적 성분" 및 "활성 성분"은 건강과 관련된 치료적 사용을 위한 화합물을 지칭한다. 특히, 치료제(예를 들어, 본 발명의 화합물)는 질환, 바람직하게는 감염성 질환을 치료 및/또는 예방하기 위해 지시될 수 있다. 활성 성분은 또한 다른 치료제의 치료 활성을 개선하기 위해 지시될 수 있다.
- [0098] "치료적 유효량"(줄여서 "유효량")은 투여받는 환자에서 원하는 치료 또는 예방 효과를 달성하기에 충분한 치료제(예를 들어, 본 발명의 화합물)의 양을 지칭한다.
- [0099] "치료하다", "치료하는" 및 "치료"는 병태 및/또는 질환 및/또는 이의 수반되는 증상 중 어느 하나, 예를 들어 감염성 질환을 완화, 약화 또는 폐지하는 것을 지칭한다.
- [0100] 상세한 설명
- [0101] 글리코클러스터
- [0102] 본 발명은 매크로사이클에 공유 결합으로 연결된 적어도 2개의 아세틸화-시알산을 포함하는 글리코클러스터에 관한 것이다. 본 출원에서, "글리코클러스터" 및 "본 발명의 화합물" 및 이와 유사한 문구는 동의어이다.
- [0103] 한 실시양태에 따르면, 글리코클러스터는 매크로사이클에 공유 결합으로 연결된 적어도 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15 또는 16개의 아세틸화 시알산을 포함한다. 한 실시양태에서, 글리코클러스터는 매크로사이클에 공유 결합으로 연결된 적어도 4개의 아세틸화 시알산을 포함한다. 한 실시양태에 따르면, 글리코클러스터는 매크로사이클에 공유 결합된 4개의 아세틸화 시알산을 포함한다("사량체(tetramer)"). 한 실시양태에 따르면, 글리코클러스터는 매크로사이클에 공유 결합된 10개의 아세틸화 시알산을 포함한다("십량체(decamer)"). 한 실시양태에 따르면, 글리코클러스터는 매크로사이클에 공유 결합된 12개의 아세틸화 시알산을 포함한다("십이량체(dodecamer)").
- [0104] 한 실시양태에 따르면, 각각의 아세틸화-시알산은 완전히 아세틸화되지 않으며, 즉 위치 4, 7, 8 및 9 상의 적어도 하나의 OH 그룹은 아세틸로 치환되지 않는다. 한 실시양태에서, 각각의 아세틸화-시알산은 위치 4, 7, 8 및 9 중 1, 2, 3 또는 4개 위치에서 아세틸화된다. 한 실시양태에서, 각각의 아세틸화-시알산은 1, 2 또는 3개 위치에서 아세틸화된다. 한 실시양태에서, 각각의 아세틸화-시알산은 1 또는 2개 위치에서 아세틸화된다. 한 실시양태에서, 각각의 아세틸화-시알산은 위치 7 및 9에서 아세틸화된다.
- [0105] 한 실시양태에 따르면, 각각의 아세틸화-시알산은 적어도 하나의 OH 그룹을 포함한다. 한 실시양태에서, 각각의 아세틸화-시알산은 하나의 OH 그룹을 포함한다. 한 실시양태에서, 각각의 아세틸화-시알산은 2개의 OH 그룹을 포함한다. 한 실시양태에서, 각각의 아세틸화-시알산은 3개의 OH 그룹을 포함한다. 한 실시양태에서, 각각의 아세틸화-시알산은 4개의 OH 그룹을 포함한다.

- [0106] 한 실시양태에 따르면, 각각의 아세틸화-시알산은 하나의 위치에서만 아세틸화되며, 즉, 각각의 아세틸화-시알산은 4-O-아세틸화-시알산, 7-O-아세틸화-시알산, 8-O-아세틸화-시알산 및 9-O-아세틸화-시알산으로부터 독립적으로 선택된다. 한 실시양태에 따르면, 각각의 아세틸화-시알산은 7-O-아세틸화-시알산, 8-O-아세틸화-시알산 및 9-O-아세틸화-시알산으로부터 독립적으로 선택된다. 한 실시양태에 따르면, 각각의 아세틸화-시알산은 7-O-아세틸화-시알산 및 9-O-아세틸화-시알산으로부터 독립적으로 선택된다. 한 실시양태에서, 각각의 아세틸화-시알산은 4-O-아세틸화-시알산이다. 한 실시양태에서, 각각의 아세틸화-시알산은 7-O-아세틸화-시알산이다. 한 실시양태에서, 각각의 아세틸화-시알산은 8-O-아세틸화-시알산이다. 한 실시양태에서, 각각의 아세틸화-시알산은 9-O-아세틸화-시알산이다.
- [0107] 어떠한 이론에도 얽매이지 않고, 본 출원인은 완전히 아세틸화되지 않은 시알산, 특히 하나의 OH만 아세틸화되는 시알산이 바이러스 친화성 또는 억제 측면에서, 특히 SARS-CoV-2에 대해 유리하다고 믿는다.
- [0108] 전형적으로, 매크로사이클은 포르피린, 필라라렌, 칼릭사렌 및 풀러렌으로부터 선택된다.
- [0109] 한 실시양태에 따르면, 매크로사이클은 포르피린으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, 포르피린은 포르핀 또는 테트라페닐포르피린으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, 포르피린은 4개의 질소 원자에 의해 배워된 금속 양이온을 가지며 질소 원자에 부착된 수소를 갖지 않는다("포르피린 킬레이트"). 비제한적인 예는 [Zn(포르핀)] 및 [Zn(테트라페닐포르피린)]을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 포르피린은 4개의 질소 원자에 의해 배워된 어떠한 양이온도 갖지 않으며, 2개의 수소가 질소 원자에 부착된다("포르피린 유리 염기").
- [0110] 한 실시양태에 따르면, 매크로사이클은 필라라렌으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, 필라라렌은 필라르[5]아렌으로부터 선택된다.
- [0111] 한 실시양태에 따르면, 매크로사이클은 칼릭사렌으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, 칼릭사렌은 칼릭스[4]아렌으로부터 선택된다.
- [0112] 한 실시양태에 따르면, 매크로사이클은 풀러렌으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, 매크로사이클은 버크민스터 풀러렌(buckminsterfullerenes)이라고도 불리는 C₆₀-풀러렌으로부터 선택된다.
- [0113] 본 발명에 있어서, 매크로사이클은 아세틸화-시알산 치환기를 제외하고는 치환되지 않을 수 있다(비치환될 수 있다). 본 발명에서, 매크로사이클은 추가의 치환기, 예를 들어, 수용성 치환기 또는 바이러스와 상호작용하기 쉬운 치환기를 포함할 수 있다.
- [0114] 한 실시양태에 따르면, 글리코클러스터는 적어도 하나의 안지오텐신-전환 효소 2(ACE2) 결합 억제제를 포함한다. 한 실시양태에서, ACE2 결합 억제제는 ACE2 결합 억제제 펩티드 또는 단백질이다. 한 실시양태에서, ACE2 결합 억제제는 ACE2 결합 억제제 펩티드이다. 한 실시양태에서, ACE2 결합 억제제는 ACE2 결합 억제제 단백질이다. 한 실시양태에서, ACE2 결합 억제제는 항-ACE2 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 예를 들어 항-ACE2 단클론 항체이다. 한 실시양태에서, ACE2 결합 억제제 펩티드는 S1 당단백질의 RBD 도메인과의 복합체로 ACE2 수용체의 서열에 따라 설계된다. 한 실시양태에서, ACE2 결합 억제제 펩티드는 참고 문헌에 기재된 바와 같이 아미노산 서열 EEQAKTFLDKFNHEAEDLFYQSS(서열 번호 1)로 이루어진 펩티드[22-44], 아미노산 서열 LGKGDFR(서열 번호 2)로 이루어진 [351-357], 아미노산 서열 EEQAKTFLDKFNHEAEDLFYQSSLASWNYNTNITEE(서열 번호 3)으로 이루어진 [22-57] 및 아미노산 서열 EEQAKTFLDKFNHEAEDLFYQSSGLKGDFR(서열 번호 4)로 이루어진 [22-44-g-351-357]로부터 선택된다: Yang, J. *et al.*, Nature Communications, 2020, Vol. 11, Article number: 4541.
- [0115] 한 실시양태에 따르면, 글리코클러스터는 S 단백질과 결합하기 쉬운 적어도 하나의 다른 치환기, 예를 들어 항체, 항체 단편, 나노바디 또는 렉틴을 포함한다.
- [0116] 한 실시양태에 따르면, 글리코클러스터는 화학식 I의 화합물이다:

[0117] 화학식 I

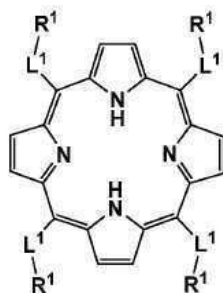


[0118]

[0119] 화학식 I에서, **M**은 아연, 철, 구리, 망간, 은, 금, 코발트, 니켈, 주석, 카드뮴, 납 또는 바나듐 양이온과 같은 금속 양이온이다. 한 실시양태에서, 금속 양이온은 2 또는 3의 양전하, 바람직하게는 2의 양전하를 갖는다. 한 실시양태에서, **M**은 아연(II), 철(II), 철(III), 구리(II), 구리(III), 망간(II), 망간(III), 은(II), 은(III), 금(III), 코발트(II), 코발트(III), 니켈(II), 니켈(III), 주석(II), 카드뮴(II), 납(II), 바나듐(II) 및 바나듐(III)으로부터 선택되는 금속 양이온이다.

[0120] 한 실시양태에 따르면, 글리코클러스터는 화학식 Ia의 화합물이다:

[0121] 화학식 Ia



[0122]

[0123] 화학식 I 및 Ia에서, 각각의 L^1 은 독립적으로 단일 결합 또는 알킬, 헤테로알킬, 알케닐, 알키닐, 아릴, 알킬아릴, 아릴알킬, 헤테로아릴, 헤테로아릴알킬, 및 알킬헤테로아릴로부터 선택되는 링커이고; 여기서 알킬, 헤테로알킬, 알케닐, 알키닐, 아릴, 알킬아릴, 아릴알킬, 헤테로아릴, 헤테로아릴알킬 또는 알킬헤테로아릴은 임의로 적어도 하나의 커플링 생성물을 포함한다. 한 실시양태에서, 각각의 L^1 은 알킬, 헤테로알킬, 알킬아릴, 아릴알킬, 헤테로아릴알킬 및 알킬헤테로아릴로부터 선택되는 링커이고; 여기서 알킬, 헤테로알킬, 알킬아릴, 아릴알킬, 헤테로아릴알킬 또는 알킬헤테로아릴은 적어도 하나의 커플링 생성물을 포함한다. 한 실시양태에서, 링커는 하나 또는 두 개의 커플링 생성물(들)을 포함한다. 한 실시예에서, 링커는 하나의 커플링 생성물(즉, 단 하나의 커플링 생성물)을 포함한다. 한 실시양태에서, 커플링 생성물 중 적어도 하나는 트리아졸릴이다.

[0124] 화학식 I 및 Ia에서, 각각의 R^1 은 아세틸화-시알산 및 ACE2 결합 억제제로부터 독립적으로 선택되고; 단, 적어도 2개의 R^1 은 아세틸화-시알산이다.

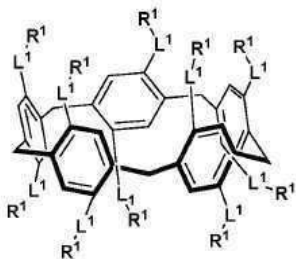
[0125] 한 실시양태에서, 각각의 L^1-R^1 은 $-(CH_2)_m-R^C-(CH_2)_n-R^1$, $-O-(CH_2)_m-R^C-(CH_2)_n-R^1$, $-C(O)-(CH_2)_m-R^C-(CH_2)_n-R^1$, $-C(O)O-(CH_2)_m-R^C-(CH_2)_n-R^1$, $-페닐-(CH_2)_m-R^C-(CH_2)_n-R^1$ 및 $-페닐-O-(CH_2)_m-R^C-(CH_2)_n-R^1$ 로부터 선택되고; 여기서 R^C 는 커플링 생성물이고, **m** 및 **n**은 독립적으로 1 내지 8 범위의 정수이다. 한 실시양태에서, R^C 는 트리아졸릴이다. 한 실시양태에서, **m**은 1 내지 6 범위, 바람직하게는 1 내지 4 범위, 보다 바람직하게는 2 내지 4 범위, 보다 바람직하게는 2 또는 3의 정수이다. 한 실시양태에서, **n**은 1 내지 4 범위, 바람직하게는 1 내지 3 범위, 보다 바람직하게는 1 또는 2, 보다 바람직하게는 1의 정수이다.

[0126] 한 실시양태에서, 각각의 L^1-R^1 은 $-페닐-O-(CH_2)_m-R^C-(CH_2)_n-R^1$ 이고; 여기서 R^C 는 커플링 생성물이고, **m** 및 **n**은 독립적으로 1 내지 8 범위의 정수이다.

[0127] 한 실시양태에서, 각각의 R^1 은 7-O-아세틸화-시알산 및 9-O-아세틸화-시알산으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, 각각의 R^1 은 7-O-아세틸화-시알산이다. 한 실시양태에서, 각각의 R^1 은 9-O-아세틸화-시알산이다.

[0128] 한 실시양태에 따르면, 글리코클러스터는 화학식 II의 화합물이다:

[0129] 화학식 II



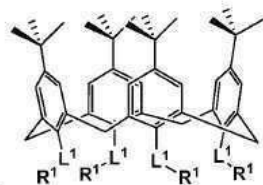
[0130]

[0131] 여기서 L^1 및 R^1 은 화학식 I 및 Ia 하에 상기 정의된 바와 같다.

[0132] 한 실시양태에서, 각각의 L^1-R^1 은 $-O-(CH_2)_m-R^C-(CH_2)_n-R^1$ 이고; 여기서 R^C 는 커플링 생성물이고, m 및 n 은 독립적으로 1 내지 8 범위의 정수이다. 한 실시양태에서, R^C 는 트리아졸릴이다. 한 실시양태에서, m 은 1 내지 6 범위, 바람직하게는 1 내지 4 범위, 보다 바람직하게는 2 내지 4 범위, 보다 바람직하게는 2 또는 3의 정수이다. 한 실시양태에서, n 은 1 내지 4 범위, 바람직하게는 1 내지 3 범위, 보다 바람직하게는 1 또는 2, 보다 바람직하게는 1의 정수이다.

[0133] 한 실시양태에 따르면, 글리코클러스터는 화학식 III의 화합물이다:

[0134] 화학식 III



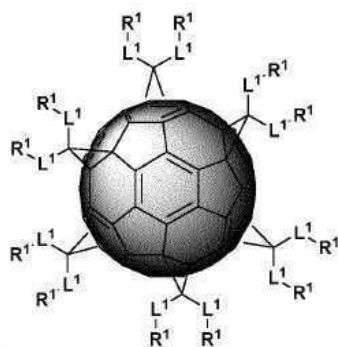
[0135]

[0136] 여기서 L^1 및 R^1 은 화학식 I 및 Ia 하에 상기 정의된 바와 같다.

[0137] 한 실시양태에서, 각각의 L^1-R^1 은 $-O-(CH_2)_m-R^C-(CH_2)_n-R^1$ 이고; 여기서 R^C 는 커플링 생성물이고, m 및 n 은 독립적으로 1 내지 8 범위의 정수이다. 한 실시양태에서, R^C 는 트리아졸릴이다. 한 실시양태에서, m 은 1 내지 6 범위, 바람직하게는 1 내지 4 범위, 보다 바람직하게는 2 내지 4 범위, 보다 바람직하게는 2 또는 3의 정수이다. 한 실시양태에서, n 은 1 내지 4 범위, 바람직하게는 1 내지 3 범위, 보다 바람직하게는 1 또는 2, 보다 바람직하게는 1의 정수이다.

[0138] 한 실시양태에 따르면, 글리코클러스터는 화학식 IV의 화합물이다:

[0139] 화학식 IV



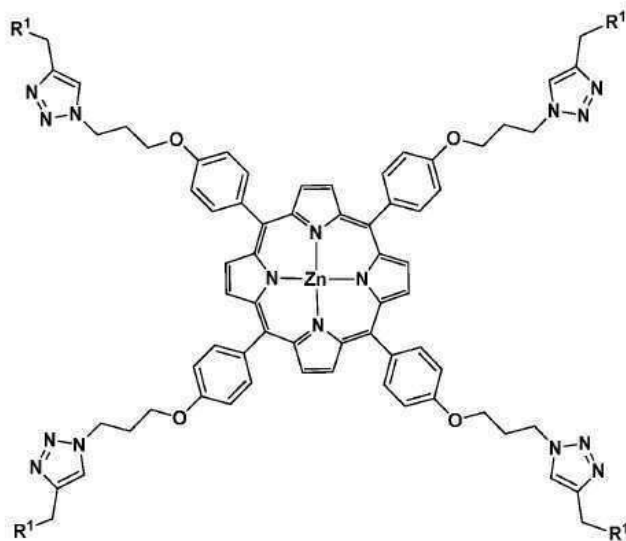
[0140]

[0141] 여기서 L^1 및 R^1 은 화학식 I 및 Ia 하에 상기 정의된 바와 같다.

[0142] 한 실시양태에서, 각각의 L^1-R^1 은 $-C(O)O-(CH_2)_m-R^C-(CH_2)_n-R^1$ 이고; 여기서 R^C 는 커플링 생성물이고, m 및 n 은 독립적으로 1 내지 8 범위의 정수이다. 한 실시양태에서, R^C 는 트리아졸릴이다. 한 실시양태에서, m 은 1 내지 6 범위, 바람직하게는 1 내지 4 범위, 보다 바람직하게는 2 내지 4 범위, 보다 바람직하게는 2 또는 3의 정수이다. 한 실시양태에서, n 은 1 내지 4 범위, 바람직하게는 1 내지 3 범위, 보다 바람직하게는 1 또는 2, 보다 바람직하게는 1의 정수이다.

[0143] 한 실시양태에 따르면, 글리코클러스터는 화학식 011의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 용매 화물이다:

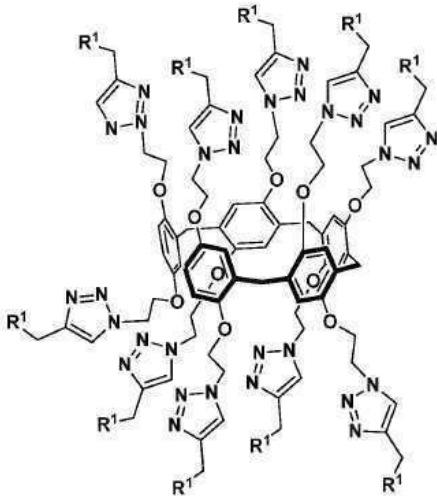
[0144] 화학식 011



[0145]

[0146] 한 실시양태에 따르면, 글리코클러스터는 화학식 005의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 용매 화물이다:

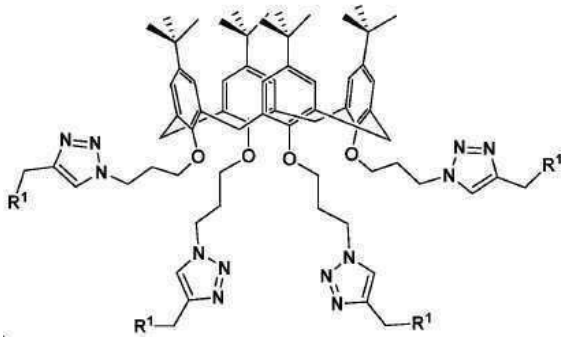
[0147] 화학식 005



[0148]

[0149] 한 실시양태에 따르면, 글리코클러스터는 화학식 008의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 용매 화물이다:

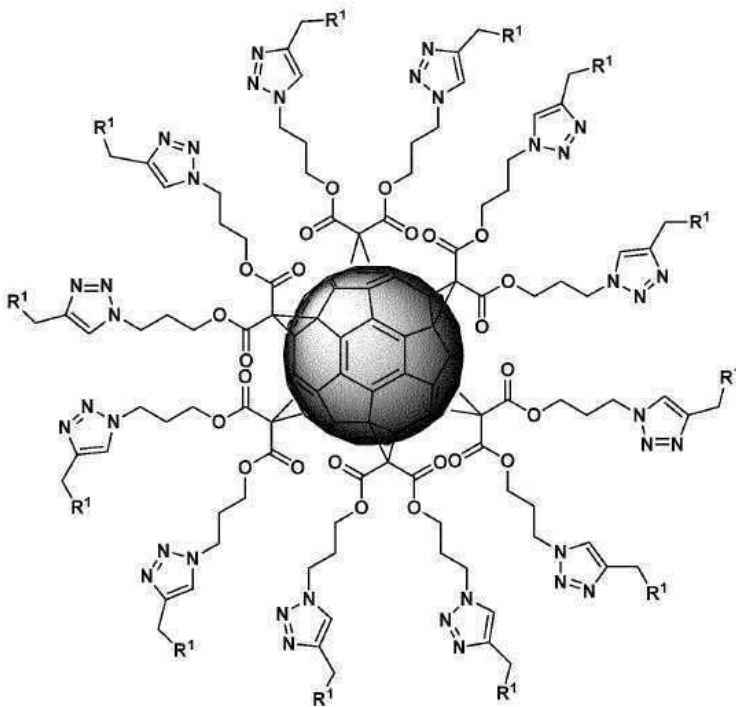
[0150] 화학식 008



[0151]

[0152] 한 실시양태에 따르면, 글리코클러스터는 화학식 014의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 용매 화물이다:

[0153] 화학식 014

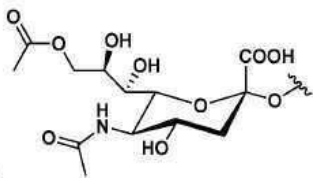


[0154]

[0155] 상기 화학식 011, 005, 008 및 014에서, 각각의 R^1 은 화학식 I 및 Ia 하에 기재된 바와 같다.

[0156] 한 실시양태에서, 상기 화학식 011, 005, 008 및 014에서, 각각의 R^1 은 화학식 9AcSA이다.

[0157] 화학식 9AcSA



[0158]

[0159] 여기서 파선은 글리코클러스터에 대한 R^1 의 부착 지점을 나타낸다.

[0160] 한 실시양태에서, 글리코클러스터는 각각의 R^1 이 화학식 9AcSA인 본원의 화학식 011, 005, 008 및 014의 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 용매화물, 즉 본원의 **실시예 1**에 나타난 바와 같은 화합물 011, 005, 008 및 014, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 용매화물로부터 선택된다.

[0161] 본 발명의 화합물(예를 들어, "글리코클러스터" 또는 "화학식 I")에 대한 본원의 모든 언급은 이의 염, 바람직 하게는 약제학적으로 허용되는 염, 용매화물, 다성분 복합체 및/또는 액정에 대한 언급을 포함한다. 본 발명의 화합물에 대한 본원의 모든 언급은 이의 다형체 및/또는 결정 습성(crystal habit)에 대한 언급을 포함한다. 본 발명의 화합물에 대한 모든 언급은 이의 약제학적으로 허용되는 전구약물에 대한 언급을 포함한다. 본 발명의 화합물에 대한 모든 언급은 중수소화 화합물을 포함하는 동위원소-표지된 화합물에 대한 언급을 포함한다.

[0162] 본 발명의 화합물(예를 들어, "글리코클러스터" 또는 "화학식 I") 및 이의 하위화학식(subformula)은 적어도 하나의 비대칭 중심(들)을 함유하며, 따라서 상이한 입체이성질체 형태로 존재할 수 있다. 따라서, 본 발명의 화합물에 대한 모든 언급은 모든 가능한 입체이성질체에 대한 언급을 포함하며, 라세미 화합물 뿐만 아니라 개별 적인 거울상 이성질체 및 이의 비-라세미 혼합물도 포함한다. 화합물이 단일 거울상 이성질체로 요구되는 경우, 이러한 단일 거울상 이성질체는 입체특이적 합성에 의해, 최종 생성물 또는 임의의 통상적인 중간체의 분해에 의해, 또는 당업계에 공지된 바와 같은 키랄 크로마토그래피 방법에 의해 수득될 수 있다. 최종 생성물, 중간체, 또는 출발 물질의 분해는 당업계에 공지된 임의의 적합한 방법에 의해 수행될 수 있다.

- [0163] 본 발명의 화합물은 약제학적으로 허용되는 염의 형태일 수 있다. 약제학적으로 허용되는 염은 이의 산 부가 및 염기 염을 포함한다. 적합한 산 부가염은 비-독성 염을 형성하는 산으로부터 형성된다. 예는 아세테이트, 아디페이트, 아스파르테이트, 벤조에이트, 베실레이트, 중탄산염/탄산염, 중황산염/황산염, 붕산염, 캄실레이트, 시트레이트, 시클라마이트, 에디실레이트, 에실레이트, 포르메이트, 푸마레이트, 글루셉테이트, 글루코네이트, 글루쿠로네이트, 헥사플루오로포스페이트, 히벤제이트, 염산염/염화물, 브롬화수소/브롬화물, 요오드화수소/요오드화물, 이세티오네이트, 락테이트, 말레이트, 말레에이트, 말로네이트, 메실레이트, 메틸설페이트, 나프틸레이트, 2-납실레이트, 니코티네이트, 질산염, 오로에이트, 옥살레이트, 팔미테이트, 파모에이트, 인산염/인산수소/인산이수소, 피로글루타메이트, 사카레이트, 스테아레이트, 숙시네이트, 탄네이트, 타르트레이트, 토실레이트, 트리플루오로아세테이트 및 지나포에이트 염을 포함한다. 적합한 염기 염은 비-독성 염을 형성하는 염기로부터 형성된다. 예는 알루미늄, 아르기닌, 벤자틴, 칼슘, 콜린, 디에틸아민, 2-(디에틸아미노)에탄올, 디올아민, 에탄올아민, 글리신, 4-(2-하이드록시에틸)-모르폴린, 라이신, 마그네슘, 메글루민, 모르폴린, 올아민, 칼륨, 나트륨, 트로메타민 및 아연 염을 포함한다. 산 및 염기의 헤미염(hemisalt), 예를 들어 헤미설페이트 및 헤미칼슘 염이 또한 형성될 수 있다. 화합물이 염기성 그룹 뿐만 아니라 산성 그룹을 함유하는 경우, 화합물은 또한 내부 염을 형성할 수 있으며, 이러한 화합물은 본 발명의 범위 내에 있다. 화합물이 수소-공여성 헤테로원자(예를 들어, NH)를 함유하는 경우, 본 발명은 또한 상기 수소 원자가 분자 내의 염기성 그룹 또는 원자로 전달됨으로써 형성된 염 및/또는 이성질체를 포괄한다.
- [0164] 본 발명의 화합물의 약제학적으로 허용되는 염은 다음 방법 중 하나 이상에 의해 제조될 수 있다: (i) 화합물을 목적하는 산과 반응시킴으로써; (ii) 화합물을 목적하는 염기와 반응시킴으로써; (iii) 화합물의 적절한 전구체로부터 산- 또는 염기-불안정 보호 그룹을 제거함으로써 또는 목적하는 산을 사용하여, 적절한 사이클릭 전구체, 예를 들어, 락톤 또는 락탐을 개환함으로써; 및/또는 (iv) 적절한 산과의 반응에 의해 또는 적절한 이온 교환 컬럼에 의해 화합물의 하나의 염을 다른 염으로 전환시킴으로써. 이러한 모든 반응은 전형적으로 용액에서 수행된다. 염은 용액으로부터 침전되어 여과에 의해 수집될 수 있거나 용매의 증발에 의해 회수될 수 있다. 염의 이온화 정도는 완전히 이온화된 것에서 거의 비이온화된 것까지 다양할 수 있다.
- [0165] **약제학적 조성물**
- [0166] 본 발명은 또한 본원에 기재된 바와 같은 본 발명의 화합물 및 적어도 하나의 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다.
- [0167] 한 실시양태에 따르면, 약제학적 조성물은 적어도 또 다른 치료제를 추가로 포함한다. 한 실시양태에서, 치료제는 항바이러스제이다. 한 실시양태에서, 적어도 또 다른 치료제는 본원에 기재된 바와 같은 안지오텐신-전환 효소 2(ACE2) 결합 억제제이다. 하나의 특정 실시양태에서, 효소 2(ACE2) 결합 억제제는 글리코클러스터에 의해 벡터화된다.
- [0168] 본 발명의 화합물은, 단독으로 또는 함께, 각각의 투여 경로에 적합한 종래의 비독성 약제학적으로 허용되는 담체, 보조제 및 비히클을 함유하는 적절한 투여 단위 제형으로 제형화될 수 있다.
- [0169] **의학적 사용 및 치료 방법**
- [0170] 본 발명은 또한 약제로서 사용하기 위한 본원에 기재된 바와 같은 본 발명의 화합물, 또는 본원에 기재된 바와 같은 본 발명의 약제학적 조성물에 관한 것이다.
- [0171] 본 발명은 또한 감염성 질환의 치료 및/또는 예방에 사용하기 위한 본원에 기재된 바와 같은 본 발명의 화합물, 또는 본원에 기재된 바와 같은 본 발명의 약제학적 조성물에 관한 것이다.
- [0172] 한 실시양태에 따르면, 감염성 질환은 코로나바이러스 감염 또는 피코르나바이러스 감염이다. 한 실시양태에서, 감염성 질환은 코로나바이러스 감염이다.
- [0173] 한 실시양태에서, 코로나바이러스는 알파 코로나바이러스 또는 베타 코로나바이러스, 바람직하게는 베타 코로나바이러스이다. 알파 코로나바이러스의 비제한적인 예는 인간 코로나바이러스 229E(HCoV-229E) 및 때때로 HCoV-NH 또는 뉴 헤이븐 인간 코로나바이러스로도 알려진 인간 코로나바이러스 NL63을 포함한다. 베타 코로나바이러스의 비제한적인 예는 인간 코로나바이러스 OC43(HCoV-OC43), 인간 코로나바이러스 HKU1(HCoV-HKU1), 이전에 신종 코로나바이러스 2012 또는 HCoV-EMC로 알려진 중동 호흡기 증후군-관련 코로나바이러스(MERS-CoV), SARS-CoV-1 또는 SARS-클래식으로도 알려진 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스(SARS-CoV), 및 2019-nCoV 또는 신종 코로나바이러스 2019로도 알려진 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스(SARS-CoV-2)를 포함한다. 한 실

시양태에서, 코로나바이러스는 HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-OC43, HCoV-HKU1, MERS-CoV, SARS-CoV-1 및 SARS-CoV-2로부터 선택된다. 한 실시양태에서, 코로나바이러스는 MERS-CoV, SARS-CoV-1 및 SARS-CoV-2로부터 선택된다.

[0174] 한 실시양태에 따르면, 코로나바이러스는 SARS 코로나바이러스이다. 한 실시양태에서, 코로나바이러스는 SARS-CoV-1 또는 SARS-CoV-2이다. 한 실시양태에서, 코로나바이러스는 중증 급성 호흡기 증후군(SARS)을 유발하는 SARS-CoV(SARSCoV-1이라고도 함)이다. 한 실시양태에서, 코로나바이러스는 COVID19를 유발하는 SARS-CoV-2이다.

[0175] 본 출원에서, "코로나바이러스" 또는 "SARS-CoV-2"에 대한 언급은 현재 확인된 모든 변이체를 포함한다. 한 실시양태에 따르면, 코로나바이러스는 SARS-CoV-2 팬데믹(계통 A 또는 B)의 원래의 일배체형(haplotype) 또는 이의 변이체이다. 한 실시양태에서, 코로나바이러스는 SARS-CoV-2 알파(계통 B.1.1.7 및 이의 하위-계통)이다. 한 실시양태에서, 코로나바이러스는 SARS-CoV-2 베타(계통 B.1.351 및 이의 하위-계통)이다. 한 실시양태에서, 코로나바이러스는 SARS-CoV-2 감마(계통 P.1 및 이의 하위-계통)이다. 한 실시양태에서, 코로나바이러스는 SARS-CoV-2 델타(계통 B.1.617.2, XD, XF, XS, 및 이의 하위-계통)이다. 한 실시양태에서, 코로나바이러스는 SARS-CoV-2 엡실론(계통 B.1.427, B1.429 및 이의 하위-계통)이다. 한 실시양태에서, 코로나바이러스는 SARS-CoV-2 제타(계통 P.2 및 이의 하위-계통)이다. 한 실시양태에서, 코로나바이러스는 SARS-CoV-2 에타(계통 B.1.525 및 이의 하위-계통)이다. 한 실시양태에서, 코로나바이러스는 SARS-CoV-2 세타(계통 P.3 및 이의 하위-계통)이다. 한 실시양태에서, 코로나바이러스는 SARS-CoV-2 이오타(계통 B.1.526 및 이의 하위-계통)이다. 한 실시양태에서, 코로나바이러스는 SARS-CoV-2 카파(계통 B.1.617.1 및 이의 하위-계통)이다. 한 실시양태에서, 코로나바이러스는 SARS-CoV-2 람다(계통 C.37 및 이의 하위-계통)이다. 한 실시양태에서, 코로나바이러스는 SARS-CoV-2 뮤(계통 B.1.621 및 이의 하위-계통)이다. 한 실시양태에서, 코로나바이러스는 SARS-CoV-2 오미크론(계통 B.1.1.529, BA.1, BA.2, BA.3, BA.4, BA.5, XE 및 이들의 하위-계통)이다. 모든 SARS-CoV-2 변이체의 목록은 cov-계통 웹사이트, https://cov-lineages.org/lineage_list.html에서 찾을 수 있다.

[0176] 한 실시양태에서, COVID-19는 중등도 COVID-19이다. 한 실시양태에서, COVID19는 경증 내지 중등도(mild-to-moderate) COVID-19이다. 한 실시양태에서, COVID-19는 경증 COVID-19이다. 한 실시양태에서, COVID-19는 경증 내지 중등 COVID-19이다. 한 실시양태에서, COVID-19는 중등 COVID-19이다. COVID-19를 앓고 있는 대상체는 입원할 수 있거나 입원하지 않을 수 있다.

[0177] 한 실시양태에서, COVID-19 중증도는 세계보건기구(WHO)의 중증도 기준에 따라 평가되며, 이는 다음과 같다:

[0178] - 경증: 영상에서 폐렴의 징후가 없는 경미한 임상 증상을 보이는 경우.

[0179] - 중등도: 폐렴의 방사선학적 소견과 함께 발열 및 호흡기 증상을 보이고 (O_2): $3L/min < 산소 < 5L/min$ 를 필요로 하는 경우.

[0180] - 중증: 다음 기준 중 어느 것을 충족하는 경우: 호흡 곤란(호흡수(RR) ≥ 30 회 호흡/분); 산소 포화도(SpO_2) $\leq$ 주변 공기에서 휴식시 93%; 또는 $SpO_2 \leq 97\%$ 과 $O_2 > 5L/min$; 산소의 동맥 분압/흡기 산소 비율의 비(PaO_2/FiO_2) $\leq 300mmHg$ ($1 mmHg = 0.133kPa$), 고-고도 지역(해발 1,000미터 이상의 고도)에서 PaO_2/FiO_2 는 다음 공식에 의해 보정되어야 한다: $PaO_2/FiO_2[\text{급하기}][\text{대기압}(mmHg)/760]$; 및/또는 24-48시간 이내에 명백한 병변 진행 $> 50\%$ 을 보인 흉부 영상.

[0181] - 중대(critical): 다음 기준 중 어느 것을 충족하는 경우: 호흡 부전 및 기계 환기 필요; 쇼크; 및/또는 ICU 치료가 필요한 기타 장기 부전. 한 실시양태에서, COVID-19 중증도 및/또는 진행은 하기 표 2에 나타난 바와 같은 WHO 10-점 진행 척도로 평가된다.

[0182] 표 2: COVID-19의 WHO 10-점 진행 척도

WHO 10-점 진행 척도	기술어	점수
감염되지 않음	감염되지 않음; 바이러스 RNA 검출되지 않음	0
걸어다닐 수 있음	무증상; 바이러스 RNA 검출	1
걸어다닐 수 있음	유증상; 독립적임	2
걸어다닐 수 있음	유증상; 도움 필요	3
입원: 경증 질환	입원; 산소 요법 없음	4
입원: 경증 질환	입원; 마스크 또는 비강 캐놀러(nasal prong)에 의한 산소	5
입원: 중증 질환	입원; 비침습적 환기(NIV) 또는 고유량에 의한 산소	6
입원: 중증 질환	삽관 및 기계 환기, $PaO_2/FIO_2 \geq 150$ mmHg 또는 산소 포화도 대 흡기 산소 분율 비 ($SpO_2/FIO_2 \geq 200$ mmHg)	7
입원: 중증 질환	기계 환기, $PaO_2/FIO_2 < 150$ mmHg 또는 $SpO_2/FIO_2 < 200$ mmHg, 또는 승압제 (노르에피네프린 > 0.3 $\mu\text{g/kg/min}$)	8
입원: 중증 질환	기계 환기, $PaO_2/FIO_2 < 150$ mmHg 및 승압제 (노르에피네프린 > 0.3 $\mu\text{g/kg/min}$), 또는 투석 또는 ECMO	9
사망	사망	10

[0183]

[0184] 한 실시양태에서, 본 발명에 따라 치료될 대상체는 COVID-19를 앓고 있고 1 내지 5 범위, 바람직하게는 2 내지 4 범위; 3 내지 6 범위, 바람직하게는 4 내지 5 범위; 또는 5 내지 9 범위, 바람직하게는 6 내지 8 범위의 COVID-19의 WHO 10-점 진행 척도(표 2에 기재된 바와 같이)의 점수를 갖는다.

[0185] 본 발명의 화합물 또는 약제학적 조성물은 경구, 비경구(예를 들어, 근육내, 복강내, 정맥내, ICV, 수조내 주사 또는 주입, 피하 주사, 또는 이식), 흡입 스프레이, 비강, 질, 직장, 설하 또는 국소 투여 경로에 의해 투여될 수 있다. 감염성 질환의 치료 및/또는 예방에 있어서, 적절한 투여량 수준은 1일당 환자 체중 kg당 약 0.01 내지 500mg(mg/kg/일)일 수 있으며, 이는 단일 또는 다중 용량으로 투여될 수 있다. 전형적으로, 투여량 수준은 약 0.1 내지 약 250 mg/kg/일, 바람직하게는 약 0.5 내지 약 100 mg/kg/일, 보다 바람직하게는 약 2.5 내지 약 20 mg/kg/일일 것이다. 화합물은 1일당 1 내지 4회, 바람직하게는 1일당 1회 또는 2회의 섭생으로 투여될 수 있다. 그러나, 임의의 특정 환자에 대한 구체적인 용량 수준 및 투여 빈도는 변할 수 있으며 사용된 특정 화합물의 활성, 그 화합물의 대사 안정성 및 작용 길이, 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별, 식이, 투여 모드 및 시간, 배설 속도, 약물 조합, 특정 질환의 중증도 및 치료를 받는 숙주를 포함하는 다양한 요인에 의존할 것임을 이해할 것이다.

[0186] 본 발명은 또한 감염성 질환의 치료 및/또는 예방을 위한 약제의 제조에 있어서의 본원에 기재된 바와 같은 본 발명의 화합물, 또는 본원에 기재된 바와 같은 본 발명의 약제학적 조성물의 용도에 관한 것이다. 본 발명은 또한 본원에 기재된 바와 같은 본 발명의 화합물 또는 본원에 기재된 바와 같은 본 발명의 약제학적 조성물의 치료적 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하여, 이의 필요로 하는 대상체에서 감염성 질환의 치료 및/또는 예방을 위한 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 감염성 질환의 치료 및/또는 예방에 있어서의 본원에 기재

된 바와 같은 본 발명의 화합물, 또는 본원에 기재된 바와 같은 본 발명의 약제학적 조성물의 용도에 관한 것이다.

[0187] **글리코클러스터 합성**

[0188] 본 발명에서, 글리코클러스터는 당업계에 공지된 임의의 합성 방법에 의해 제조될 수 있다. 특히, 아세틸화-시알산과 매크로사이클 사이에 공유 결합을 생성하기 위한 적절한 합성 방법은 유기 화학의 숙련가의 일반적인 지식의 일부이다.

[0189] 한 실시양태에 따르면, 아세틸화-시알산은 위치 2, 4, 7, 8 또는 9 상의 적어도 하나의 비-아세틸화 하이드록실 그룹에 의해 매크로사이클에 연결될 수 있다. 한 실시양태에서, 아세틸화-시알산은 위치 2 또는 4 상의 하이드록실에 의해 매크로사이클에 연결된다. 한 실시양태에서, 아세틸화-시알산은 위치 2 상의 하이드록실에 의해 매크로사이클에 연결된다. 위치 2 상의 하이드록실은 아세틸화-시알산의 다른 측면과 관련된 생물학적 활성을 손상시키지 않으면서 아세틸화-시알산을 매크로사이클에 연결시키는데 특히 유리하다.

[0190] 한 실시양태에 따르면, 비-아세틸화 하이드록실 그룹은 커플링 작용기로서 사용되고, 매크로사이클의 상응하는 커플링 작용기(예를 들어, 할로카본, 카복실산 또는 아민)와 반응하여 아세틸화-시알산과 매크로사이클 사이의 결합을 형성한다(예를 들어, 에테르, 에스테르 또는 아마이드 결합). 또 다른 실시양태에 따르면, 하이드록실 그룹은 먼저 하이드록실 이외의 커플링 작용기를 포함하는 그룹으로 치환되고/되거나 하이드록실 이외의 커플링 작용기로 전환된 다음 다른 커플링 작용기가 매크로사이클의 상응하는 커플링 작용기와 반응하여 아세틸화-시알산과 매크로사이클 사이의 결합을 형성한다.

[0191] 한 실시양태에 따르면, 글리코클러스터는 구리(I)-촉매된 아지드-알킨 사이클로부가(CuAAC)에 의해 제조된다. 한 실시양태에서, 글리코클러스터는 구리(I) 촉매, 예를 들어 구리(I) 염(예를 들어, 브롬화구리 또는 요오드화구리), 또는 구리(II) 염(예를 들어, 황산구리)의 혼합물 및 환원제(예를 들어, 아스코르브산나트륨)의 존재하에 제조된다.

[0192] 한 실시양태에 따르면, 글리코클러스터는 아지드(N_3)를 포함하는 아세틸화-시알산의 적어도 2당량을 적어도 2개의 말단 알킨($-C\equiv CH$)을 포함하는 매크로사이클과 반응시킴으로써 제조된다. 한 실시양태에서, 아세틸화-시알산은 $-O-(CH_2)_n-N_3$ 그룹을 포함하고, 여기서 n 은 1 내지 8 범위의 정수이다. 한 실시양태에서, 매크로사이클은 적어도 2개의 $-O-(CH_2)_m-C\equiv CH$ 그룹을 포함하고, 여기서 m 은 1 내지 8 범위의 정수이다.

[0193] 또 다른 실시양태에 따르면, 글리코클러스터는 말단 알킨($-C\equiv CH$)을 포함하는 아세틸화-시알산의 적어도 2당량을 적어도 2개의 아지드(N_3)를 포함하는 매크로사이클과 반응시킴으로써 제조된다. 한 실시양태에서, 아세틸화-시알산은 $-O-(CH_2)_n-C\equiv CH$ 그룹을 포함하고, 여기서 n 은 1 내지 8 범위의 정수이다. 한 실시양태에서, 매크로사이클은 적어도 2개의 $-O-(CH_2)_m-N_3$ 그룹을 포함하고, 여기서 m 은 1 내지 8 범위의 정수이다.

도면의 간단한 설명

[0194] **도 1**은 α -프로파르길 시알산(α -p-SA) **001** 또는 α -프로파르길 아세틸화 시알산(α -p-9-AcSA) **002** 및 아지드 화합물 **003**, **006**, **009** 및 **012**로부터 SA- 또는 9-AcSA-유래 글리코클러스터 **004-014**의 제조 방법을 보여주는 도식이다(**실시예 1-d**의 **반응식 3**에 나타냄).

도 2는 **실시예 2.1**에 기재된 바와 같이, 유리 1mM 9-AcSA로 차단하기 전 및 후, S1 작용화된 팁과 9-AcSA, SA 또는 스트렙타비딘으로 코팅된 표면 사이에서 측정된 특정 결합 확률(binding probabilities, BP)을 보여주는 상자 플롯이다. 하나의 데이터 포인트는 1024개의 FD 곡선에 대해 수득된 결합 주파수(binding frequency, BF)를 나타낸다. 상자의 사각형은 평균을 나타내고, 색상이 있는 상자는 25th 및 75th 백분위수를 나타내고, 수염은 가장 높은 값과 가장 낮은 값을 나타낸다. 상자의 선은 중앙값을 나타낸다. $N = 9$ 랩은 3개의 독립적인 실험에 걸쳐 조사하였다. p-값은 Origin에서 2-표본 t 검정에 의해 결정되었다.

도 3은 **실시예 2.2**에 기재된 바와 같이, 홀드 시간(hold time)의 함수로서 S1과 9-AcSA 사이에 플로팅된 결합 주파수(BF)를 보여주는 그래프이다. 단일-지수 감쇠 곡선(선)에 대한 데이터의 최소제곱 피팅은 프로브된 상호작용의 평균 운동 온-레이트(k_{on})를 제공한다. 추가 계산(k_{off}/k_{on})은 K_D 를 야기한다. 하나의 데이터 포인트는 1024개의 FD 곡선에 대해 수득된 BF를 나타낸다.

도 4 내지 9는 실시예 2.5에 기재된 바와 같이, SA- 또는 9-AcSA-유래 글리코클러스터의 항-결합 특성의 스크리닝 결과를 보여준다.

도 4-8은 시험된 분자의 억제 효율을 보여주는 히스토그램이며, 이는 증가하는 농도(1-100 μ M)의 시험된 분자와 배양 전 및 후에 9AcSA와 SARS-CoV-2 사이의 상호작용에 대한 결합 확률(BP)을 측정함으로써 평가된다. 정규화된 히스토그램은 1, 10 또는 100 μ M의 유리 아세틸화 시알산(9AcSA) (도 4), SA- 및 9-AcSA-필러[5]아렌 004 및 005 (도 5), SA- 및 9-AcSA-폴러렌 013 및 014 (도 6), SA- 및 9-AcSA-포르피린 010 및 011 (도 7) 또는 SA- 및 9-AcSA-칼릭스[4]아렌 007 및 008 (도 8)과 배양 전 및 후 9AcSA와 SARS-CoV-2 사이의 상호작용에 대한 상대적 BP를 보여준다.

도 9는 실시예 2.5에 기재된 바와 같이 증가하는 농도(1-100 μ M)의 아세틸화된 시험 분자 9-AcSA- α -p, 005, 008, 011 및 014와 배양 후 결합 확률(BP)의 감소를 보여주는 그래프이다. 데이터는 SA 텐드리머 농도당 적어도 N = 3개의 독립적인 실험(팁 및 샘플)을 대표한다. p-값은 origin에서 2-표본 t 검정에 의해 결정되었다. 오차 막대는 평균 값의 표준 편차(s.d.)를 나타낸다.

도 10 및 11은 실시예 2.6에 기재된 바와 같이 낮은 농도의 모델 표면 상의 아세틸화 SA(9-O-아세틸화 SA) 및 살아있는 세포(CHO-세포)에 대한 SARS-CoV-2 결합을 억제하기 위한 9-AcSA-포르피린 글리코클러스터 011 효율의 프로빙 결과를 보여준다.

도 10은 증가하는 농도(0.001-100 μ M)의 9-AcSA-포르피린 글리코클러스터 011과 배양 전 및 후의 SARS-Cov-2와 9-O-아세틸화 SA 모델 표면 간의 상호작용의 상대적 결합 값을 보여주는 상자 그림이다.

도 11은 증가하는 농도(0.1-10 μ M)의 9-AcSA-포르피린 글리코클러스터 011과 배양 전 및 후의 SARS-Cov-2와 CHO-세포 간의 상호작용의 상대적 결합 값을 보여주는 상자 그림이다.

도 12는 실시예 2.7에 기재된 바와 같이, 감염력 분석의 결과, 즉 유리 SA, 유리 9-AcSA, SA-포르피린 010 및 9-AcSA 포르피린 011의 존재하에서 측정된 감염력을 보여주는 히스토그램이다. 각 점은 웰로부터의 감염력을 나타낸다. 색상이 있는 상자는 평균을 나타내고 수염은 평균 값의 s.d.를 나타낸다. 상자의 선은 중앙값을 나타낸다. P 값은 Origin에서 2-표본 t 검정에 의해 결정되었다.

도 13a-b는 S1과 Lec2 또는 CHO 세포 사이(도 13a) 또는 SARS-CoV-2와 Lec2 또는 CHO 세포 사이(도 13b)의 결합 확률(BP, %)의 두 상자 그림이다. n = 10 (도 13a) 또는 12 (도 13b) 맵은 세 가지 독립적인 실험에 걸쳐 조사하였다. P 값은 Origin에서 2-표본 t 검정에 의해 결정되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

실시예

본 발명은 하기의 실시예에 의해 추가로 예시된다.

실시예 1: 합성 및 특성화를 위한 재료, 방법 및 결과

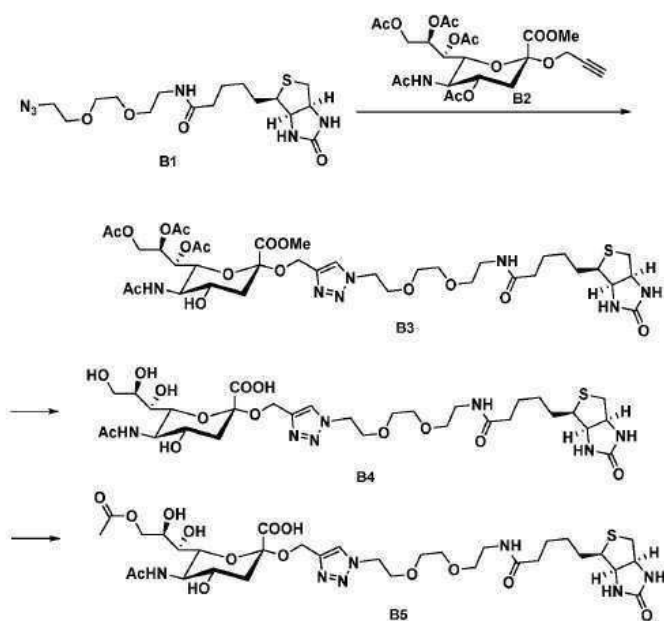
실시예 1-a: 일반적인 재료 및 방법

크로마토그래피에 사용되는 용매는 산업 등급으로 구입하여 사용 전에 추가로 증류하였다. 시약 및 화학물질은 ACS 등급으로 SigmaAldrich 또는 Acros에서 구입하였으며 정제 없이 사용하였다.

모든 반응은 KMnO_4 및 인몰리브덴산 용액을 현상액으로 사용하여 Merck 알루미늄 몰 실리카겔 60-F₂₅₄에서 수행된 박층 크로마토그래피(TLC)에 의해 모니터링하였다. Merck 실리카겔(60, 입자 크기 40-63 μ m)을 섬광 컬럼 크로마토그래피에 사용하였다. NMR 스펙트럼은 용매 피크를 기준으로 하여 JEOL ECX 400 또는 500에 기록되었다. 화합물은 ^1H 및 ^{13}C NMR 뿐만 아니라 ^1H - ^1H 및 ^1H - ^{13}C 상관 실험에 의해 특성화되었다. 다중도를 정의하는 데 사용되는 약어는 다음과 같다: s = 일중향, d = 이중향, t = 삼중향, q = 사중향, m = 다중향 및 br = 광역. 화학적 이동(δ)은 ppm 단위로 보고되며 잔류 용매 신호에 간접적으로 참조된다. 고분해능 질량 스펙트럼(HRMS)은 Bruker maXis Impact QTOF 질량 분석기 및 Bruker MicroTOF-Q II XL 분광계에서 수행되었다.

실시예 1-b: 비오틴화 시알산의 합성 및 특성화

[0202] 화합물 B4 및 B5는 반응식 1에 나타난 바와 같이 제조하였다.



[0203]

[0204] 반응식 1: 비오틴화 시알산 B4 및 B5의 합성

[0205] 중간체 화합물 B1은 공지된 절차에 따라 제조하였다(Jung, D. *et al.* Chemical Communications, 2014, Vol. 50, pp. 3044-3047). 중간체 화합물 B2는 공지된 절차에 따라 제조하였다(Gan, Z. & Roy, R., Canadian Journal of Chemistry, 2002, Vol. 80, pp. 908-916). 화합물 B5는 이전에 기재된 방법에 따라 아세틸화하였다(Ogura, H. *et al.* Carbohydrate Research, 1987, Vol. 167, pp. 77-86).

[0206] 중간체 화합물(B3): 무수 디메틸포름아미드 (DMF) (20 mL) 중의 화합물 B1 (401 mg, 1.0 mmol, 1 equiv.), 화합물 B2 (636 mg, 1.2 mmol, 1.2 equiv.) 및 Et₃N (0.278 mL, 2.0 mmol, 2 equiv.)의 용액에 아르곤 대기 하에 CuI (38 mg, 0.2 mmol, 0.2 equiv.)를 첨가하였다. 용액을 실온에서 12시간 동안 교반하였다. 진공하에 용매를 증발시킨 후, EtOAc (30 mL) 및 포화 염화암모늄 (30 mL)을 첨가하고, 상을 분리하였다. 유기 층을 염수 (30 mL)로 세척하고, MgSO₄로 건조시키고, 여과하고 여액을 감압하에 농축시켰다. 디클로로메탄 (DCM)/MeOH (20:1)을 용출제로서 사용하여 실리카겔 상에서 컬럼 크로마토그래피에 의해 잔류물을 정제하여 백색 고체를 제공하였다 (975 mg, 1.15 mmol, 96% 수율). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) 7.79 (s, 1H, H-12), 6.68 (br, 1H, NH), 6.43 (br, 1H, NH), 5.47 (d, *J* = 46.4 Hz, 1H, 10a), 5.45-5.42 (m, H-8), 5.35-5.32 (m, 1H, H-7), 4.92-4.87 (m, 2H, H-4, H-10b), 4.60-4.53 (m, 4H, H-13, H-17), 4.38-4.33 (m, 2H, H-9a, H-25), 4.16-4.05 (m, 3H, H-5, H-6, H-9b), 3.91 (t, *J* = 5.1 Hz, 2H, H-14), 3.80 (s, 3H, COCH₃), 3.61 (dd, *J* = 6.0, 2.7 Hz, 2H, H-15), 3.56 (dd, *J* = 5.9, 2.7 Hz, 2H, H-15), 3.50 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H, H-17), 3.41-3.40 (m, 2H, H-18), 3.17 (dd, *J* = 11.8, 7.3 Hz, 1H, H-24), 2.95-2.88 (m, 1H, H-28a), 2.77 (d, *J* = 12.9 Hz, 1H, H-3a), 2.62 (dd, *J* = 12.8, 4.6 Hz, 1H, H-28b), 2.24 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, H-20), 2.16 (s, 3H, OCOCH₃), 2.15 (s, 3H, OCOCH₃), 2.03 (s, 3H, OCOCH₃), 2.02 (s, 3H, OCOCH₃), 1.97 (t, *J* = 12.5 Hz, 1H, H-3b), 1.88 (s, 3H, NCOCH₃), 1.77-1.63 (m, 4H, H-21, H-23), 1.48-1.42 (m, 2H, H-22). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 173.5 (C-19), 171.0, 170.80, 170.5, 170.3, 170.2 (C=O, NCOCH₃, OAc), 168.2 (C-1), 164.0 (Cq, C-26), 143.8 (C-11), 124.4 (C-12), 98.6 (C-2), 72.8 (C-6), 70.4 (C-16), 70.1 (C-17), 69.9 (C-15), 69.4 (C-14), 69.2 (C-4), 68.5 (C-8), 67.5 (C-7), 62.6 (C-9), 61.9 (C-25), 60.3 (C-27), 58.4 (C-10), 55.7 (C-24), 53.0 (OCH₃), 50.2 (C-13), 49.2 (C-5), 40.5 (C-28), 39.1 (C-18), 37.9 (C-3), 35.9 (C-20), 28.3 (C-22), 28.1 (C-23), 25.6 (C-21), 23.2 (NCOCH₃), 21.2, 21.0, 2 x 20.9 (OCOCH₃). HRMS (TOF-MS-ESI⁺, *m/z*): C₃₉H₆₀N₇O₁₇S [M+H]⁺에 대한 계산치 930.3761; 실측치 930.3750.

[0207]

화합물 (B4) ("biot-SA"): 무수 MeOH (20 mL) 중의 화합물 **B3** (345 mg, 0.371 mmol, 1 equiv.) 및 NaOMe (40 mg, 0.742 mmol, 2 equiv.)의 용액을 0℃에서 30분 동안 교반한 다음 실온까지 가온시키고 또 다른 1.5시간 동안 교반하였다. 그후, Amberlyst®15 이온-교환 수지를 첨가하여 염기를 중화시켰다. 수지를 여과하고 물 (2 x 5 mL)로 세척하였다. 여액을 감압하에 증발시켜 백색 고체를 수득하였다. 추가 정제 없이, 백색 고체를 물 (15 mL)에 용해시키고 LiOH·H₂O (35 mg, 0.831 mmol, 3 equiv.)를 첨가하였다. Amberlyst®15 이온-교환체를 첨가하기 전에 용액을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 그후, 반응 혼합물을 여과하고, 수지를 물 (2 x 5 mL)로 세척하고 여액을 동결건조시켜 백색 고체를 수득하였다 (186 mg, 0.249 mmol, 90% 수율). ¹H NMR (500 MHz, D₂O) δ 8.06 (s, 1H, H-12), 4.92-4.89 (m, 1H, H-10a), 4.68-4.66 (m, 1H, H-10b), 4.62-4.60 (m, 2H, H-13), 4.57-4.53 (m, 1H, H-27), 4.38-4.34 (m, 1H, H-25), 3.95-3.93 (m, 2H, H-14), 3.88-3.79 (m, 4H, H-5, H-8, H-6, H-9a), 3.76-3.71 (m, 1H, H-4), 3.65-3.55 (m, 6H, H-15, H-16, H-9b, H-7), 3.52-3.49 (m, 2H, H-17), 3.32-3.30 (m, 2H, H-18), 3.27-3.24 (m, 1H, H-24), 2.95-2.90 (m, 1H, H-28a), 2.74-2.68 (m, 2H, H-3a, H-28b), 2.21 (dd, *J* = 13.2, 6.5 Hz, 2H, H-20), 2.01-2.00 (m, 3H, NAc), 1.74 (t, *J* = 12.2 Hz, 1H, H-3b), 1.61-1.48 (m, 4H, H-21, H-23), 1.36-1.33 (m, 2H, H-22). ¹³C NMR (126 MHz, D₂O) δ 176.8 (C=O, NCOCH₃), 175.0 (C-1), 171.8 (C=O, C-19), 165.3 (C=O, C-26), 143.6 (C-11), 125.7 (C-12), 99.5 (C-2), 72.9 (C-6), 71.1 (C-8), 69.7 (C-16), 69.3 (C-17), 68.9 (C-15), 68.7 (C-14), 68.3 (C-7), 67.7 (C-4), 62.9 (C-9), 62.1 (C-25), 60.3 (C-27), 57.2 (C-10), 55.4 (C-24), 51.8 (C-5), 50.1 (C-13), 2 x 39.7 (C-28, C-3), 38.9 (C-18), 35.5 (C-20), 27.9 (C-22), 27.7 (C-23), 25.2 (C-21), 22.1 (NCOCH₃). HRMS (TOF-MS-ESI⁺, *m/z*): C₃₀H₅₀N₇O₁₃S [M+H]⁺에 대한 계산치 748.3182; 실측치 748.3173.

[0208]

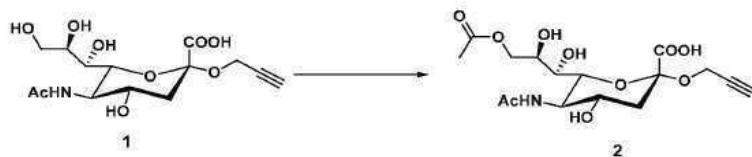
화합물 (B5) ("biot-9-AcSA"): 무수 디메틸설폭사이드 (DMSO) (1.2 mL) 중의 화합물 **B4** (200 mg, 0.267 mmol, 1 equiv.) 및 트리메틸 오르토아세테이트 (0.34 mL, 2.67 mmol, 10 equiv.)의 용액에 *p*-톨루엔설포산 일수화물 (5.0 mg, 0.027 mmol, 0.1 equiv.)을 첨가하였다. 용액을 실온에서 12시간 동안 교반하였다. 그후, DCM (50 mL)을 첨가하여 조 생성물을 침전시켰다. H₂O/MeOH (0-1/3, 구배)를 용출제로서 사용하여 C₁₈ 실리카겔 섬광 크로마토그래피에 의해 조 생성물을 정제하였다. 화합물 **B5**를 함유하는 분획을 합하고 감압하에 농축시켰다. 농축된 용액을 동결건조시켜 목적하는 화합물을 백색 고체로서 수득하였다 (25 mg, 0.0316 mmol, 12%). ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 8.02 (s, 1H, H-12), 4.94 (d, *J* = 12.1 Hz, 1H, H-10a), 4.67 (d, *J* = 12.1 Hz, 1H, H-10b), 4.55-4.55 (m, 2H, H-13), 4.49 (dd, *J* = 7.8, 4.7 Hz, 1H, H-27), 4.38 (dd, *J* = 11.2, 1.8 Hz, 1H, H-25), 4.31 (dd, *J* = 7.9, 4.5 Hz, 1H, H-9a), 4.14-4.06 (m, 2H, H-8, H-9b), 3.90 (t, *J* = 5.1 Hz, 2H, H-14), 3.74-3.71 (m, 2H, H-5, H-4), 3.64-3.60 (m, 3H, H-6, H-16), 3.58-3.56 (m, 2H, H-17), 3.51-3.48 (m, 3H, H-7, H-15), 3.35-3.33 (m, 2H, H-18), 3.20-3.17 (m, 1H, H-24), 2.94-2.84 (m, 2H, H-3a, H-28a), 2.69 (d, *J* = 12.7 Hz, 1H, H-28b), 2.21 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, H-20), 2.05 (s, OCOCH₃), 2.02 (s, NCOCH₃), 1.74-1.71 (m, 1H, H-3b), 1.66-1.5 (m, 4H, H-21, H-23), 1.45-1.41 (m, 2H, H-22). ¹³C NMR (126 MHz, CD₃OD) δ 176.2 (C=O, NCOCH₃), 175.5 (C-1), 174.0 (C=O, 9-O-Ac), 173.1 (C=O, C-19), 166.1 (C=O, C-26), 146.5 (C-11), 125.9 (C-12), 101.9 (C-2), 74.2 (C-6), 71.4 (C-16), 71.2 (C-17), 70.7 (C-8), 2 x 70.6 (C-7, C-15), 70.3 (C-14), 69.6 (C-4), 67.3 (C-9), 63.3 (C-25), 61.6 (C-27), 58.9 (C-10), 57.0 (C-24), 54.1 (C-5), 51.3 (C-13), 42.6 (C-3), 41.1 (C-28), 40.3 (C-18), 36.7 (C-20), 29.7 (C-22), 29.5 (C-23), 26.8 (C-21), 22.6 (NCOCH₃), 20.8 (OCOCH₃). HRMS (TOF-MS-ESI⁺, *m/z*): C₃₂H₅₂N₇O₁₄S [M+H]⁺에 대한 계산치 790.3287; 실측치 790.3287.

[0209]

실시예 1-c: 시알산 유도체의 합성 및 특성화

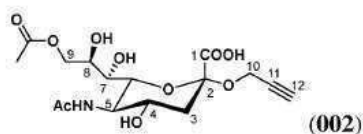
[0210]

중간체 화합물 **001**은 공지된 절차에 따라 제조하였다(Daskhan, G. et al., ChemistryOpen, 2016, Vol. 5, pp. 477-484). 중간체 화합물 **002**는 반응식 2에 나타낸 바와 같이 공지된 절차에 따라 제조하였다(Ogura, H. et al., Carbohydrate Research, 1987, Vol. 167, pp. 77-86).



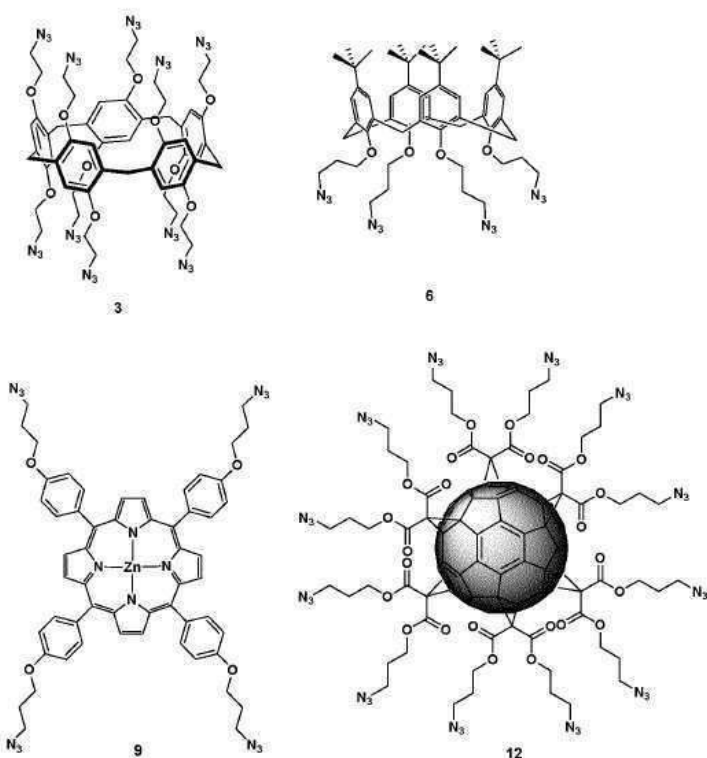
반응식 2: 중간체 화합물 002의 합성

프로프-2-이닐 5-아세트아미도-9-O-아세틸-3,5-디테옥시-D-글리세로- α -D-갈락토-2-오놀로피라노스 (002): 무수 DMSO (4 mL) 중의 화합물 001 (380 mg, 1.1 mmol, 1 equiv.) 및 트리메틸 오르토아세테이트 (1.4 mL, 11 mmol, 10 eq.)의 용액에 *p*-톨루엔설폰산 일수화물 (10 mg, 0.05 mmol, 0.05 equiv.)을 첨가하였다. 용액을 실온에서 12시간 동안 교반하였다. 그후, DCM (20 mL)을 첨가하여 조 생성물을 침전시켰다. 느린 면 여과 후, 여액 상의 고체를 메탄올에 재용해시키고 옮겨서 용매를 증발시켰다. DCM/MeOH (20:3)를 사용한 실리카겔 크로마토그래피에 의해 잔류물을 정제하여 목적하는 화합물 (2)를 백색 고체로서 수득하였다 (167 mg, 0.429 mmol, 39% 수율).



^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 4.42-4.35 (m, 2H, H-9a, H-10a), 4.17-4.03 (m, 3H, H-10b, H-9b, H-8), 3.74-3.65 (m, 2H, H-4, H-5), 3.57-3.54 (m, 1H, H-6), 3.49 (dd, J = 9.2, 1.9 Hz, 1H, H-7), 2.83 (dd, J = 12.3, 4.4 Hz, 1H, H-3a), 2.75 (t, J = 2.4 Hz, 1H, H-13), 2.06 (s, 3H, OCOCH_3), 2.03 (s, 3H, NHCOCH_3), 1.60 (t, J = 11.7 Hz, 1H, H-3b). ^{13}C NMR (126 MHz, CD_3OD) δ 175.6 (C=O, NAc), 173.5 (C-1), 173.1 (C=O, 9-O-Ac), 101.6 (C-2), 80.6 (C-11), 75.0 (C-12), 74.1 (C-6), 70.6 (C-8), 70.5 (C-7), 69.2 (C-4), 67.2 (C-9), 54.0 (C-5), 53.1 (C-10), 42.2 (C-3), 22.7 (NCOCH_3), 20.8 (OCOCH_3). HRMS (TOF-MS-ESI $^+$, m/z): $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{NO}_{10}$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 에 대한 계산치 390.1395; 실측치 390.1395.

실시예 1-d: 글리코클러스터의 합성 및 특성화



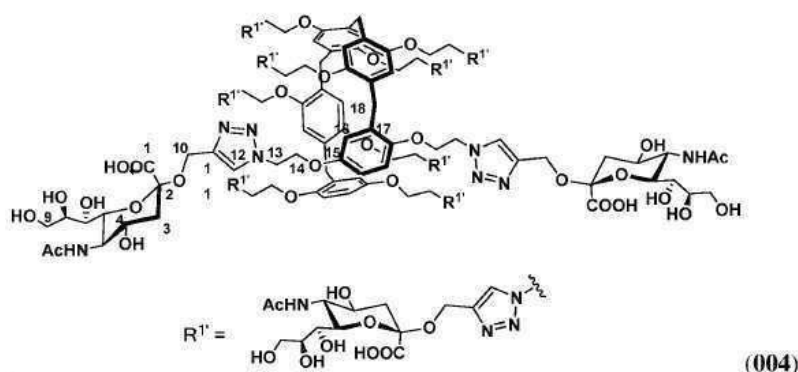
[0218] 반응식 3: 중간체 화합물 003, 006, 009 및 012의 구조

[0219] 중간체 화합물 003은 공지된 절차에 따라 제조하였다(Nierengarten, I. *et al.*, Chemical Communications, 2012, Vol. 48, pp. 8072-8074). 중간체 화합물 006은 공지된 절차에 따라 제조하였다(Tikad, A. *et al.*, Chemistry: A European Journal, 2016, Vol. 22, pp. 13147-13155). 중간체 화합물 009는 공지된 절차에 따라 제조하였다(Tikad, A. *et al.*, Chemistry: A European Journal, 2016, Vol. 22, pp. 13147-13155; and Liu, Y. *et al.*, Angewandte Chemie (International Edition English), 2016, Vol. 55, pp. 7952-7957). 중간체 화합물 012는 공지된 절차에 따라 제조하였다(Nierengarten, J. F. *et al.*, Chemical Communications, 2010, Vol. 46, pp. 3860-3862).

[0220] 화합물 004, 007, 010 및 013 ("SA-글리코클러스터") 및 005, 008, 011 및 014 ("9-As-SA-글리코클러스터")는 도 1에 나타난 바와 같이 황산구리(II)와 나트륨 L-아스코르베이트 또는 브롬화구리(I) 디메틸 설파이드의 조합을 사용하여 클릭 가능한 α -프로파르길 시알산 001 및 002를 다량체 아지드 003, 006, 009 및 0012에 그래프트하여 제조하였다.

[0221] 보다 구체적으로, 과량의 001 또는 002를 실온에서 밤새 혼합 용매 시스템 (1,4-디옥산/ H_2O , 2:1)에서 테트라-아지드 필라르[5]아렌 003과 촉매량의 황산구리(II), 및 나트륨 L-아스코르베이트에 커플링시켰다. 그 후, 004 및 005를 아세톤으로 침전시키고 구리 제거(copper scavenging) (Quadrasil MP) 및 크기-배제 Sephadex®G-25 크로마토그래피로 정제하였다. 정제된 10가(decavalent) 필라르[5]아렌 004 및 005이 각각 74% 및 62% 수율로 수득되었다. 구리와 아연 사이의 이온 교환을 피하고 009의 용해도 특성에 대처하기 위해 포르피린 사량체 010 및 011에 대해 특정 방법을 최적화하였다. 따라서, 더 낮은 촉매량 및 3원 용매 시스템 (THF/DMSO/ H_2O , 3:3:1)이 사용되었다. 4가 포르피린 접합체 010 및 011이 각각 61% 및 87% 수율로 수득되었다. 칼릭스[4]아렌 007 및 008 및 풀러렌 013 및 014가 또한 유사한 커플링 및 정제 프로토콜을 사용하여 높은 수율로 수득되었다. 모든 다량체 중을 ^1H NMR, ^{13}C NMR 및 질량 분석기로 특성화하여 모든 반응의 완료를 확인하였다.

[0222] **화합물 (004):** 1,4-디옥산 (2 mL) 중의 화합물 003 (21 mg, 0.01 mmol, 1 equiv.) 및 화합물 001 (70 mg, 0.20 mmol, 12 equiv.)의 용액에 아르곤 대기하에 H_2O (1 mL) 중의 $CuSO_4$ (3.2 mg, 0.02 mmol, 2 equiv.) 및 NaAsc (13 mg, 0.066 mmol, 6.6 equiv.)의 새로 제조된 용액을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 밤새 격렬하게 교반하였다. 그 후 아세톤 (40 mL)을 첨가하여 구리 생성물을 침전시켰다. 원심분리 후, 조 생성물을 물 (2 mL)에 용해시키고 Quadrasil MP (40 mg)로 처리하여 잔류 구리 이온을 제거하였다. 45 μm 멸균 필터를 통해 여과 후, 여액을 Sephadex® G-25 컬럼에 통과시키고 물로 용출시켰다. DCM/MeOH (1:0.3, $KMnO_4$ 염색)를 사용한 TLC에 의해 이동할 수 없는 분획이 수집되었다. 합한 분획을 동결건조시켜 백색 고체를 수득하였다 (59 mg, 0.0124 mmol, 74% 수율).

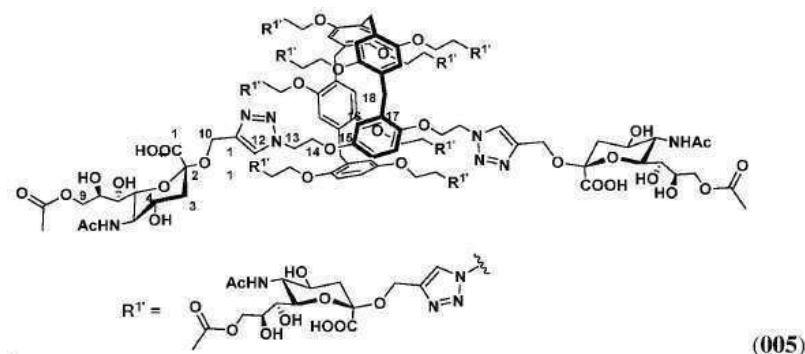


(C-4, C-14), 63.6 (C-9), 57.8 (C-10), 53.2 (C-5), 50.8 (C-13), 41.6 (C-3), 29.0 (C-18), 23.2 (NCOCH₃).

HRMS (TOF-MS-ESI⁻, m/z): C₁₉₅H₂₆₇N₄₀O₁₀₀ [M-3H]³⁻에 대한 계산치 1590.2365; 실측치 1590.2262.

[0225]

화합물 (005): 1,4-디옥산 (1.2 mL) 중의 화합물 **003** (13 mg, 0.01 mmol, 1 equiv.) 및 화합물 **002** (47 mg, 0.12 mmol, 12 equiv.)의 용액에 아르곤 대기하에 H₂O (0.6 mL) 중의 CuSO₄ (3.2 mg, 0.02 mmol, 2 equiv.) 및 NaAsc (13 mg, 0.066 mmol, 6.6 equiv.)의 새로 제조된 용액을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 밤새 격렬하게 교반하였다. 그후, 아세톤 (20 mL)을 첨가하여 조 생성물을 침전시켰다. 원심분리 후, 조 생성물을 물 (2 mL)에 용해시키고 Quadrasil MP (40 mg)로 처리하여 잔류 구리 이온을 제거하였다. 45 μm 멸균 필터를 통한 여과 후, 여액을 Sephadex®G-25 컬럼에 통과시키고 물로 용출시켰다. DCM/MeOH (1:0.3) 및 KMnO₄ 염색을 사용한 TLC 용출에 의해 이동할 수 없는 분획이 수집되었다. 합한 분획을 동결건조시켜 백색 고체를 수득하였다 (32 mg, 0.0062 mmol, 62% 수율).



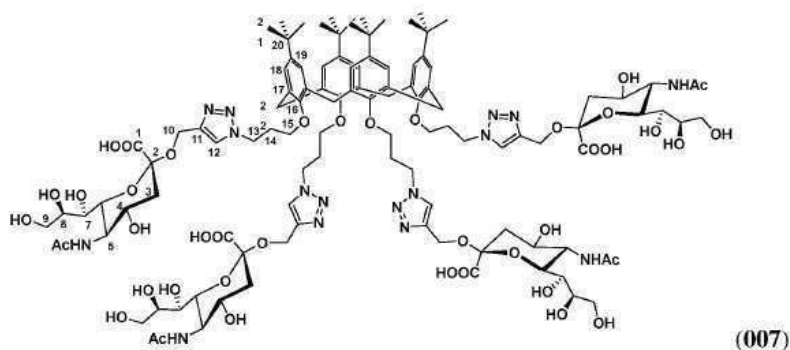
[0226]

[0227]

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 8.16 (br, 10H, 10 x H-12), 6.62 (br, 10H, 10 x H-16), 4.69 (br, 30H, 10 x H-10b, 10 x H-13), 4.37 (br, 20H, 10 x H-9), 4.09 (br, 30H, 10 x H-8, 10 x H-14), 3.76 (br, 40H, 10 x H-4, 10 x H-5, 10 x H-6, 10 x H-18), 3.53 (br, 10H, 10 x H-7), 2.83 (br, 10H, 10 x H-3a), 2.03 (br, 60H, 10 x OCOCH₃, 10 x NCOCH₃), 1.65 (br, 10H, 10 x H-13b). ¹³C NMR (126 MHz, CD₃OD) δ 175.3 (C=O, NCOCH₃), 173.9 (C-1), 173.3 (C=O, 9-O-Ac), 151.0 (Cq, C-15), 146.3 (Cq, C-11), 130.1 (Cq, C-17), 126.0 (C-12), 117.1 (C-16), 101.7 (C-2), 74.3 (C-6), 70.6 (C-8), 69.3 (C-7), 68.6 (C-4, C-14), 67.3 (C-9), 58.9 (C-10), 54.0 (C-5), 51.4 (C-13), 42.1 (C-3), 31.0 (C-18), 22.9 (NCOCH₃), 21.0 (OCOCH₃). HRMS (TOF-MS-ESI⁺, m/z): C₂₁₅H₂₉₃N₄₀O₁₁₀ [M+3H]³⁺에 대한 계산치 1732.2869; 실측치 1732.2863.

[0228]

화합물 (007): 무수 DMSO (1 mL) 중의 화합물 **006** (36 mg, 0.03 mmol, 1 equiv.) 및 화합물 **001** (46 mg, 0.132 mmol, 4.4 equiv.)의 용액에 아르곤 대기하에 CuBr · CH₃SCH₃ (3.7 mg, 0.018 mmol, 0.6 equiv.)를 첨가하였다. 80°C에서 마이크로파 조사(irradiation)하에 4시간 후, 조 생성물을 냉각시키고 DCM (30 mL)을 첨가하여 침전시켰다. 그후 침전물을 물 (2 mL)에 용해시키고 Quadrasil®MP (70 mg)로 처리하여 잔류 구리 이온을 제거하였다. 45 μm 멸균 필터를 통한 여과 후, 여액을 Sephadex® G-15 컬럼에 통과시키고 물로 용출시켰다. DCM/MeOH (1:0.3) 및 KMnO₄ 염색을 사용한 TLC 용출에 의해 이동할 수 없는 분획이 수집되었다. 합한 분획을 동결건조시켜 백색 고체를 수득하였다 (70 mg, 0.0276 mmol, 92% 수율).



[0229]

[0230]

^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 8.03 (s, 4H, 4 x H-12), 6.82 (s, 8H, 8 x H-18), 4.62 (br, 8H, 8 x H-13), 4.35 (br, 4H, 4 x H-22a), 3.89–3.58 (m, 52H, 4 x H-4, 4 x H-5, 4 x H-6, 4 x H-7, 4 x H-8, 4 x H-9, 4 x H-15, 16 x OH), 3.13 (br, 4H, 4 x H-22b), 2.82 (br, 4H, 4 x H-3a), 2.52 (br, 8H, 4 x H-14), 2.02 (s, 12H, 4 x NCOCH_3), 1.66 (br, 4H, 4 x H-3b), 1.08 (s, 36H, 12 x H-21). ^{13}C NMR (126 MHz, CD_3OD) δ 175.3 ($\text{C}=\text{O}$, NCOCH_3), 173.9 (C-1), 154.2 (Cq, C-16), 146.1 (Cq, C-11, C-19), 134.9 (Cq, C-17), 126.4 (C-18), 125.6 (C-12), 101.3 (C-2), 74.50 (C-6), 73.0 (C-15), 70.1 (C-7, C-8), 69.2 (C-4), 64.3 (C-9), 58.4 (C-10), 53.9 (C-5), 48.5 (C-13), 41.9 (C-3), 34.7 (Cq, C-20), 32.0 (C-14, C-21, C-22), 22.9 (NCOCH_3).

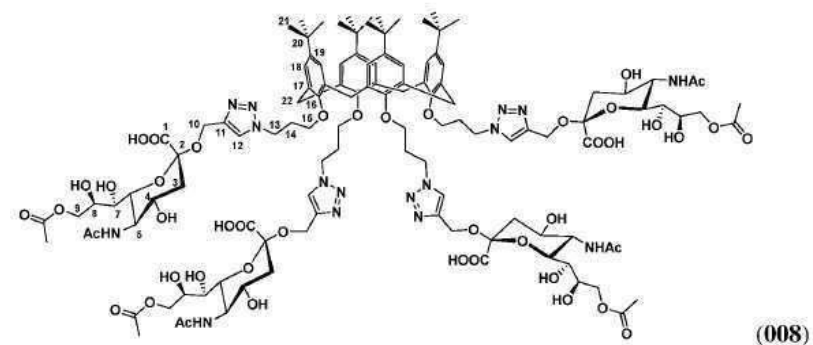
HRMS (TOF-MS-ESI $^+$, m/z): 디콘볼루션(deconvolution) 후 $\text{C}_{120}\text{H}_{170}\text{N}_{16}\text{O}_{44}$ [M] $^+$ 에 대한 계산치 2369.0978; 실측치 2369.0877.

[0231]

화합물 (008): 무수 DMSO (1 mL) 중의 화합물 **006** (37 mg, 0.03 mmol, 1 equiv.) 및 화합물 **002** (51 mg, 0.132 mmol, 4.4 equiv.)의 용액에 아르곤 대기하에 $\text{CuBr} \cdot \text{CH}_3\text{SCH}_3$ (3.7 mg, 0.018 mmol, 0.6 equiv.)을 첨가하였다. 80°C에서 마이크로파 조사하에 4시간 후, 조 생성물을 DCM (30 mL)을 첨가하여 침전시켰다. 그후 침전물을 물 (2 mL)에 용해시키고 Quadrasil®MP (70 mg)로 처리하여 잔류 구리 이온을 제거하였다. 45 μm 멸균 필터를 통한 여과 후, 여액을 Sephadex® G-15 컬럼에 통과시키고 물로 용출시켰다. DCM/MeOH (1:0.3, KMnO_4 염색)를 사용한 TLC 용출에 의해 이동할 수 없는 분획이 수집되었다. 합한 분획을 동결건조시켜 백색 고체를 수득하였다 (62 mg, 0.0244 mmol, 81% 수율).

[0232]

[0233]

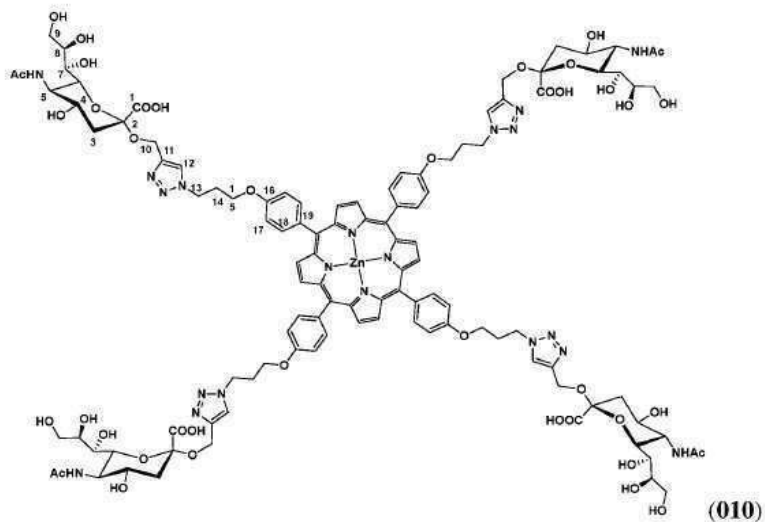


^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 8.21–8.06 (m, 4H, 4 x H-12), 6.82 (s, 8H, 8 x H-18), 4.63 (br, 8H, 4 x H-13), 4.37 (s, 8H, 4 x H-9a, 4 x H-22a), 4.13 (br, 8H, 4 x H-8, 4 x H-9b), 3.88–3.52 (m, 24H, 4 x H-4, 4 x H-5, 4 x H-6, 4 x H-7, 4 x H-15), 3.13 (s, 4H, 4 x H-22b), 2.79 (br, 4H, 4 x H-3a), 2.53 (br, 8H, 4 x H-14), 2.02 (br, 24H, 4 x NCOCH_3 , 4 x OCOCH_3), 1.70 (br, 4H, 4 x H-3b), 1.33 (s, 6H, 2 x H-21), 1.08 (s, 24H, 8 x H-21), 0.85 (s, 6H, 2 x H-21). ^{13}C NMR (126 MHz, CD_3OD) δ 175.3 ($\text{C}=\text{O}$, NCOCH_3), 173.1 ($\text{C}=\text{O}$, C-1, 9-O-Ac), 154.2 (Cq, C-16), 146.4 (Cq, C-11), 146.0 (Cq, C-19), 134.9 (Cq, C-17), 126.4 (Cq, C-12, C-18), 100.8 (C-2), 74.4 (C-6), 72.9 (C-15), 70.5 (C-8), 70.4 (C-7), 69.1 (C-4), 67.4 (C-9),

58.7 (C-10), 53.8 (C-5), 42.0 (C-3), 34.7 (Cq, C-20), 32.0 (C-14, C-21, C-22), 22.75 (OCOCH₃), 20.9 (OCOCH₃). HRMS (TOF-MS-ESI⁺, m/z): 디콘볼루션 후 C₁₂₀H₁₇₀N₁₆O₄₄ [M]에 대한 계산치 2537.1400; 실측치 2537.1298.

[0234]

화합물 (010): THF/DMSO (1.5 mL, 2:3) 중의 화합물 **009** (40 mg, 0.037 mmol, 1 equiv.) 및 화합물 **001** (57 mg, 0.164 mmol, 4.4 equiv.)의 용액에 아르곤 대기하에 H₂O (0.3 mL) 중의 CuSO₄ (2.36 mg, 0.0148 mmol, 0.4 equiv.) 및 NaAsc (8.7 mg, 0.0439 mmol, 1.2 equiv.)의 새로 제조된 용액을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 밤새 격렬하게 교반하였다. 그후, 아세톤 (30 mL)을 첨가하여 조 생성물을 침전시켰다. 그후 조 생성물을 물 (2 mL)에 용해시키고 Quadrasil®MP (80 mg)로 처리하여 잔류 구리 이온을 제거하였다. 45 µm 멸균 필터를 통한 여과 후, 여액을 Sephadex® G-15 컬럼에 통과시키고 물로 용출시켰다. DCM/MeOH (1:0.3, KMnO₄ 염색)를 사용한 TLC 용출에 의해 이동할 수 없는 분획이 수집되었다. 합한 분획을 동결건조시켜 진녹색 고체를 수득하였다 (56 mg, 0.0227 mmol, 61% 수율).



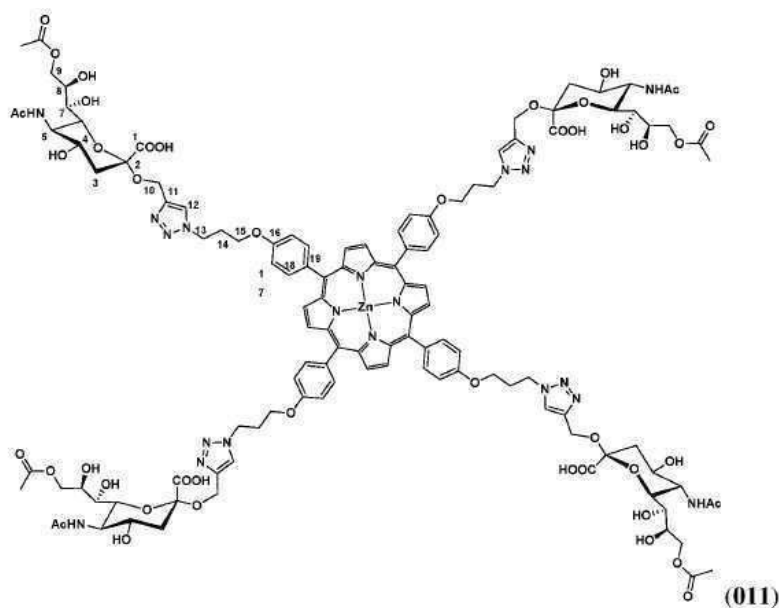
[0235]

[0236]

¹H NMR (400 MHz, D₂O/DMSO-d₆) δ 9.07 (br, 8H, 8 x H-Porph), 8.32 (br, 12H, 4 x H-12, 8 x H-18), 7.51 (br, 8H, 8 x H-17), 3.74 (br, 28H, 4 x H-4, 4 x H-5, 4 x H-6, 4 x H-7, 4 x H-8, 4 x H-9), 2.78 (br, 12H, 4 x H-14, 4 x H-3a), 2.05 (br, 16H, 4 x H-3b, 4 x NCOCH₃). ¹³C NMR (101 MHz, D₂O/DMSO-d₆) δ 176.3 (C=O, NCOCH₃), 173.9 (C-1), 159.5 (C-16), 151.3 (Cq, C-19), 146.6 (Cq, C-11), 137.2 (C-18), 135.5 (Cq, C-Porph), 133.3 (C-Porph), 127.0 (C-12), 121.5 (Cq, C-Porph), 114.5 (C-17), 101.9 (C-2), 74.3 (C-6), 73.1 (C-8), 69.7 (C-4, C-7), 67.0 (C-15), 64.1 (C-9), 59.1 (C-10), 53.4 (C-5), 49.4 (C-13), 41.8 (C-3), 30.9 (C-14), 23.6 (NCOCH₃). HRMS (TOF-MS-ESI⁺, m/z): C₁₁₂H₁₃₄N₂₀O₄₀Zn [M+2H]²⁺에 대한 계산치 1232.4186; 실측치 1232.4390.

[0237]

화합물 (011): THF/DMSO (1.8 mL, 1:1) 중의 화합물 **009** (40 mg, 0.037 mmol, 1 equiv.) 및 화합물 **002** (63 mg, 0.162 mmol, 4.4 equiv.)의 용액에 아르곤 대기하에 H₂O (0.3 mL) 중의 CuSO₄ (2.36 mg, 0.0148 mmol, 0.4 equiv.) 및 NaAsc (8.7 mg, 0.0439 mmol, 1.2 equiv.)의 새로 제조된 용액을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 밤새 격렬하게 교반하였다. 그후, 아세톤 (30 mL)을 첨가하여 조 생성물을 침전시켰다. 조 생성물을 물 (2 mL)에 용해시키고 Quadrasil®MP (80 mg)로 처리하여 잔류 구리 이온을 제거하였다. 45 µm 멸균 필터를 통한 여과 후, 여액을 Sephadex® G-15 컬럼에 통과시키고 물로 용출시켰다. DCM/MeOH (1:0.3)를 사용한 TLC 용출에 의해 이동할 수 없는 분획이 수집되었다. 합한 분획을 동결건조시켜 진녹색 고체를 수득하였다 (82 mg, 0.0323 mmol, 87% 수율).



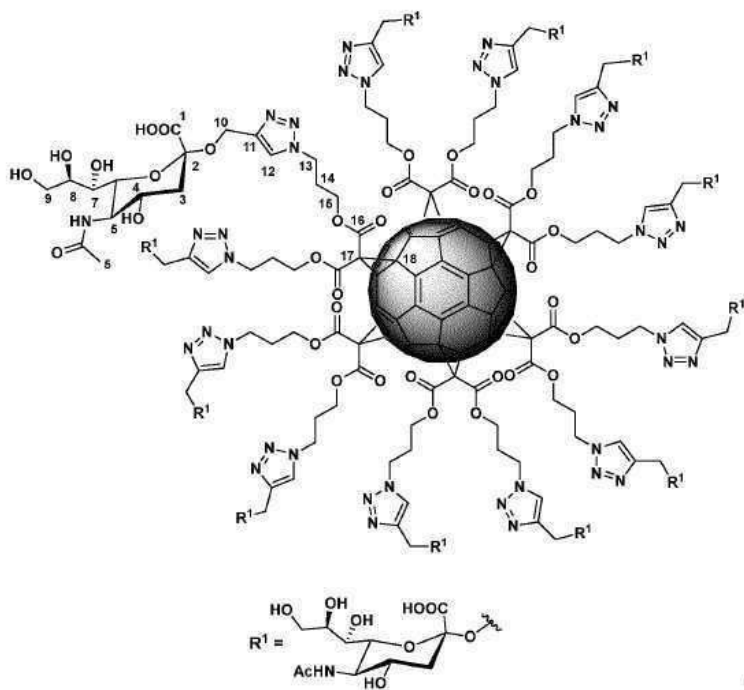
[0238]

[0239]

^1H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ 8.60 (br, 8H, 8 x H-Porph), 8.11 (br, 4 x H-12), 7.72 (br, 8H, 8 x H-18), 6.89 (br, 8H, 8 x H-17), 4.18-4.04 (m, 56H, 4 x H-4 , 4 x H-5 , 4 x H-8 , 4 x H-9 , 4 x H-10 , 4 x H-13 , 4 x H-15 , 12 x OH, 4 x NH), 3.46-3.33 (m, 8H, 4 x H-6 , 4 x H-7), 2.26 (8H, 4 x H-14), 1.88 (br, 28H, 4 x NCOCH_3 , 4 x OCOCH_3 , 4 x H-3b). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO-d_6) δ 174.0 (C=O , NCOCH_3), 172.3 (C=O , C-1 , 9-O-Ac), 158.3 (Cq, C-16), 150.3 (Cq, C-19), 135.7 (C-18), 132.2 (C-Porph), 120.7 (Cq, C-Porph), 113.2 (C-17), 73.1 (C-6), 69.6 (C-8), 68.0 (C-4 , C-7), 67.0 (C-9), 65.2 (C-15), 58.1 (C-10), 53.1 (C-5), 47.8 (C-13), 41.8 (C-3), 30.1 (C-14), 23.1 (NCOCH_3), 21.3 (OCOCH_3). HRMS (TOF-MS-ESI $^+$, m/z): $\text{C}_{120}\text{H}_{140}\text{N}_{20}\text{O}_{44}\text{Zn}$ $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 에 대한 계산치 1313.4228; 실측치 1313.3966.

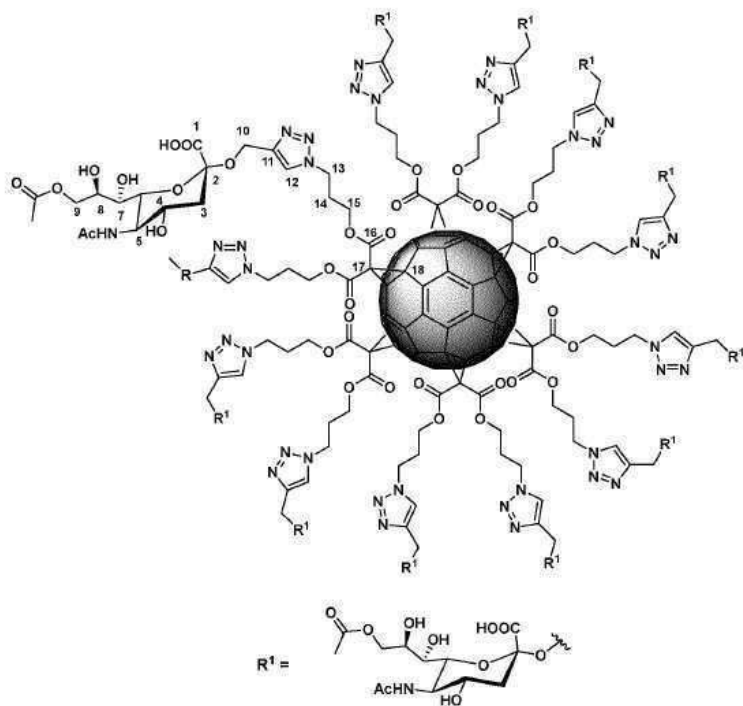
[0240]

화합물 (013): DMSO (1.4 mL) 중의 화합물 **012** (40 mg, 0.0172 mmol, 1 equiv.) 및 화합물 **001** (95 mg, 0.274 mmol, 16 equiv.)의 용액에 아르곤 대기하에 $\text{CuBr} \cdot \text{CH}_3\text{SCH}_3$ (3.5 mg, 0.017 mmol, 1 equiv.)을 첨가하였다. 80 $^\circ\text{C}$ 에서 마이크로파 조사 4시간 후, 용액을 냉각시키고 DCM (30 mL)로 침전시키고, 원심분리하였다. 조 생성물을 물 (2 mL)에 재용해시키고 Quadrasil ®MP (80 mg)로 처리하여 잔류 구리 이온을 제거하였다. 45 μm 멸균 필터를 통한 여과 후, 여액을 Sephadex $^{\text{TM}}$ G-25 컬럼에 통과시키고 물로 용출시켰다. DCM/MeOH를 사용한 TLC 용출에 의해 이동할 수 없는 분획이 수집되었다. 합한 분획을 동결건조시켜 오렌지색 고체를 수득하였다 (89 mg, 0.0137 mmol, 80% 수율).



¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.07–7.97 (m, 12H, 12 x H-12), 4.67 (s, 12H, 12 x H-10a), 4.40 (s, 36H, 12 x H-10b, 12 x H-15), 4.15 (br, 84H, 12 x H-12, 48 x OH, 12 x NH), 3.69–3.29 (m, 84H, 12 x H-4, 12 x H-5, 12 x H-6, 12 x H-7, 12 x H-8, 12 x H-9), 2.67 (s, 12H, 12 x H-3a), 2.15 (s, 24H, 12 x H-14), 1.86 (s, 36H, 12 x NAc), 1.36 (m, 12H, 12 x H-3b). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆) δ 174.0 (C=O, NCOCH₃), 171.9 (C=O, C-1), 164.0 (Cq, C-16), 145.6, 141.5 (C-11, C_{sp2}), 125.2 (C-12), 100.7 (C-2), 73.4 (C-6), 72.1, 69.4, 68.2 (C-18, C-8, C-7, C-4), 65.1 (C-15), 63.6 (C-9), 57.8 (C-10), 53.3 (C-5), 47.2 (C-17, C-13), 41.9 (C-3), 29.4 (C-14), 23.2 (NCOCH₃). HRMS (ESI+-MS, m/z): C₂₈₂H₃₂₈N₄₈O₁₃₂ [M+4H]⁴⁺에 대한 계산치 1623.2468; 실측치 1623.2138.

화합물 (014): DMSO (0.8 mL) 중의 화합물 **012** (22 mg, 0.0096 mmol, 1 equiv.) 및 화합물 **002** (60 mg, 0.154 mmol, 16 equiv.)의 용액에 아르곤 대기하에 CuBr · CH₃SCH₃ (2 mg, 0.0096 mmol, 1 equiv.)을 첨가하였다. 80 °C에서 마이크로파 조사 4시간 후, 용액을 냉각시키고 DCM (30 mL)으로 침전시키고, 원심분리하였다. 조 생성물을 물 (2 mL)에 재용해시키고 Quadrasil®MP (60 mg)로 처리하여 잔류 구리 이온을 제거하였다. 45 μm 멸균 필터를 통한 여과 후, 여액을 SephadexTM G-25 컬럼에 통과시키고 물로 용출시켰다. DCM/MeOH (1:0.3, KMnO₄ 염색)를 사용한 TLC 용출에 의해 이동할 수 없는 분획이 수집되었다. 합한 분획을 동결건조시켜 오렌지색 고체를 수득하였다 (55 mg, 0.00785 mmol, 82% 수율).



[0244]

[0245]

^1H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ 8.24-8.01 (m, 12H, 12 x H-12), 4.94-3.25 (m, 192H, 12 x H-4, 12 x H-5, 12 x H-6, 12 x H-7, 12 x H-8, 12 x H-9, 12 x H-10, 12 x H-13, 12 x H-15), 2.68 (br, 12H, H-3a), 2.16-1.15 (m, 80H, 12 x H-3b, 12 x H-14, 12 x NCOCH_3 , 12 x OCOCH_3). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 173.5 (C=O, NCOCH_3), 171.5 (C=O, C-1, 9-O-Ac), 163.57 (Cq, C-16), 145.7, 145.2 (C-11, $\text{C}_{\text{sp}2}$), 124.5 (C-12), 100.4 (C-2), 72.9 (C-6), 69.4 (C-18, C-8, C-7), 67.8 (C-4), 66.5 (C-9), 64.5 (C-15), 57.64 (C-10), 53.1 (C-5), 46.7 (C-17, C-13), 41.6 (C-3), 29.2 (C-14), 22.9 (NCOCH_3), 21.2 (OCOCH_3). HRMS (ESI+-MS, m/z): $\text{C}_{306}\text{H}_{348}\text{N}_{48}\text{O}_{144}$ $[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$ 에 대한 계산치 1400.6350; 실측치 1400.6368.

[0246]

실시예 2: AcSA-유래 글리코클러스터는 SARS-CoV-2 세포 결합 및 감염력의 강력한 억제제이다

[0247]

재료 및 방법

[0248]

UV-불활성화된 SARS-CoV-2의 생성

[0249]

SARS-CoV-2 (BavPat1 균주, European Virology Archives)를 Vero E6에서 성장시키고 계대배양 3에서 사용하였다. 500 μL 의 계대배양 3 스톱(감염된 세포의 상청액)을 6-웰 디쉬에 첨가하였다. 6-웰 디쉬를 뚜껑이 없는 UV Stratalinker 1800(Stratagene)에 넣고, 바이러스-함유 상청액을 5000J의 UV 조사에 노출시켰다. 바이러스 불활성화는 50,000개의 천연 Vero E6 세포를 포함하는 48-웰 플레이트에 UV 처리된 상청액 10 μL 를 첨가하고 간접 면역형광 분석에 의해 48시간 후 감염을 모니터링함으로써 확인하였다.

[0250]

시알산-코팅된 표면

[0251]

금-코팅된 규소(silicon) 기판을 먼저 에탄올로 세척하고 UV-O 처리(Jetlight)로 15분 동안 세척하였다. 그후 표면을 비오틴화 소 혈청 알부민(BBSA) 용액(PBS 중의 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, Sigma)에서 4℃에서 밤새 배양하였다. PBS로 세정한 후, 스트렙타비딘 한 방울(PBS 중의 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, Sigma)을 4℃에서 1시간 동안 BBSA 표면에 피켓팅한 다음 PBS로 세정하였다. 마지막으로, BBSA-스트렙타비딘 표면을 비오틴화 biot-SA(B4) 또는 biot-9-AcSA(B5) 용액(PBS 중의 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)에 1시간 동안 침지시킨 다음 최종 PBS 세정을 실시하였다. 표면은 반복 스캐닝 하에서 균질하고 안정한 형태를 보였으며 1.1 $\pm$ 0.1 nm의 두께를 나타내었다. 침착된 층의 두께는 부착된 생체분자를 제거하기 위해 표면의 작은 영역(1 μm x 1 μm)을 높은 힘으로 스캔한 다음 동일한 영역의 더 큰 사각형(5 μm x 5 μm)을 낮은 힘으로 이미징함으로써 추정하였다.

- [0252] 바이러스 입자 이미징
- [0253] 80 μL 액적의 바이러스 용액($\sim 10^7$ 개 입자· mL^{-1})을 갖 절단한 운모 기질에 침착시키고 +4°C에서 1시간 동안 배양하였다. MilliQ 물로 10회 세정한 후, 샘플을 37°C에서 1시간 동안 건조시켰다. AFM 이미징은 공기 중에서 PeakForce-Hires-F-A 팁(공칭 스프링 상수 0.4 $\text{N}\cdot\text{m}^{-1}$, Bruker)을 사용하여 PeakForce 태핑 모드에서 수행하였다. 사용된 이미징 매개변수는 다음과 같다: 1 kHz의 팁 진동 주파수, 250 pN의 최대 피크 힘; 0.25 kHz의 스캔 속도 및 라인당 256 픽셀 표시.
- [0254] AFM 팁 작용화
- [0255] AFM 팁 작용화를 위해, NHS-PEG₂₄-Ph-알데히드 링커(Broadpharm)를 사용하였다. AFM 팁(MSCT-D 프로브, Bruker)을 클로로포름에 10분 동안 침지시키고, 에탄올로 세정하고, 여과된 질소의 부드러운 스트림에서 건조시키고, 자외선 및 오존 세척제(JetLight)에서 15분 동안 세척하고, 에탄올아민 용액[디메틸 설폭사이드(DMSO) 6.6mL 중의 에탄올아민 염산염 3.3g]에 밤새 침지시켰다. 그 후, 캔틸레버를 DMSO로 3회, 에탄올로 3회 세척하고, 질소로 건조시켰다. 한편, 3.3mg의 NHS-PEG₂₄-Ph-알데히드 링커를 클로로포름 0.5mL에 용해시켰다. 에탄올아민-코팅된 캔틸레버를 30 μL 트리에틸아민과 함께 이 용액에 침지시켰다. 2시간의 배양 시간 후, 클로로포름으로 3회 세척하고, 질소로 건조시키고, Parafilm(Bemis NA) 상에 별 형태(팁이 서로 마주 보도록 함)로 배치하였다. 50 μL 의 S1-서브유닛 단백질 용액(0.1mg mL^{-1} , Genscript Z03501) 또는 UV-불활성화 SARS-CoV-2 비리온(10^8 개 입자 mL^{-1}) 및 2 μL 의 새로 제조된 NaCNBH_3 용액(0.1M NaOH(aq) 중의 6wt% vol^{-1})을 그 위에 피펫팅하고 4°C에서 1시간 동안 배양하였다. 마지막으로, 5 μL 의 1M 에탄올아민(pH=8)을 10분 동안 액적에 첨가하여 반응을 캔칭시켰다. PBS에서 세척한 후, 팁은 실험시까지 PBS에 보관하였다.
- [0256] 결합 확률(BP) 분석
- [0257] Nanoscope Multimode 8 (Bruker)은 모델 표면에서 힘 분광법(force spectroscopy) 실험을 수행하기 위해 힘-용적(접촉) 모드로 작동되었다(Nanoscope 소프트웨어 v9.1). MSCT-D 프로브(공칭 스프링 상수 0.03N, m^{-1})를 사용하여 램프 크기 200nm, 최대 힘 500pN, 표면 지연 없이 $5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$ 맵을 기록하였다. 샘플은 1Hz의 라인 주파수 및 라인당 32픽셀(32라인)을 사용하여 스캔하였다. 접근 및 후퇴 속도 모두 $1\mu\text{m s}^{-1}$ 에서 일정하게 유지되었다.
- [0258] 억제 가능성의 스크리닝
- [0259] 세포 숙주 표면에 대한 SARS-CoV-2 결합의 첫 번째 단계 동안 시알산의 역할을 연구하기 위해, FD-곡선 기반 AFM을 사용하여 SA(Neu5Ac) 및 9AcSA에 대한 SARS-CoV-2 결합을 비교하고 9-AcSA에 대한 상호작용의 결합 자유-에너지 랜드스케이프(binding free-energy landscape)를 특성화하였다. 시험관내에서 세포-표면 글리칸의 노출을 모방하기 위해, 비오틴화 SA, biot-9-AcSA(B5) 또는 biot-SA(B4)를 스트렙타비딘-코팅된 표면에 고정하고 AFM 이미징 및 스크래칭 실험에 의해 검증하여, $1.1 \pm 0.1\text{nm}$ 두께의 침착된 층이 드러났다. 스파이크 S1 서브유닛과 SA-코팅된 표면 사이의 상호작용은 FD-기반 AFM에 의해 모니터링하였다.
- [0260] SARS-CoV-2와 9AcSA 사이의 결합 친화도에 대한 합성된(9-Ac)-SA-유래 글리코클러스터(실시예 1-d 참조)의 억제 가능성을 연구하기 위해, 상이한 농도(각각 0, 1, 10 및 100 μM)의 SA-글리코클러스터(004, 007, 010 및/또는 013) 및 4개의 9-AcSA-글리코클러스터(005, 008, 011 및/또는 014)와 함께 배양 전 및 후에 결합 확률(BP)(결합 이벤트를 보이는 곡선의 분율)을 측정하였다. 3개의 힘-용적 맵을 임의의 글리코클러스터의 부재하에서 앞서 기재된 바와 같은 3개의 상이한 영역에 대해 기록하였다. 그 후, 시험된 글리코클러스터를 유체 셀에 첨가하고 각 농도에 대해 3개의 맵을 기록하였다.
- [0261] 동적 힘 분광법
- [0262] 동적 힘 분광법 실험은 ForceRobot 300(JPK)을 사용하여 수행하였다. 0.1, 0.2, 1, 5, 10 및 20 $\mu\text{m s}^{-1}$ 의 다양한 후퇴 속도로 결합 확률(BP) 분석과 동일한 매개변수를 사용한다. Origin 소프트웨어(OriginLab)를 사용하여 결과를 DFS 플롯에 표시하고, 뚜렷한 LR 범위에 대한 파열 힘 히스토그램(rupture force histogram)을 생성하고, 앞서 기재된 바와 같이(Alsteens, D. et al., Nature Nanotechnology, 2017, Vol. 12, pp. 177-183) 다양한 힘 분광법 모델을 적용하였다. 이러한 모델을 사용하여 이 상호작용의 에너지 랜드스케이프를 정량

화하고 운동 오프 레이트(kinetic off rate) k_{off} 뿐만 아니라 전이 상태 x_u 까지의 거리를 추출한다. 운동 온-레이트(kinetic on-rate) 분석의 경우, 틱이 표면과 접촉하는 시간인 특정 접촉 시간(t)에 BP를 결정하였다.

[0263] 이러한 데이터를 피팅하고 앞서 기재된 바와 같이 K_b 를 계산하였다(Rankl, C. *et al.*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, Vol. 105, pp. 17778-17783). 간단히 말해서, 상호작용 시간(τ)과 BP의 관계는 다음 수학적 식 1에 의해 설명된다:

[0264] [수학적 식 1]

[0265]
$$BP = A \times [1 - \exp\left(\frac{-(t-t_0)}{\tau}\right)]$$
,

[0266] 여기서 A는 최대 BP이고 t_0 는 지체 시간이다. Origin 소프트웨어를 사용하여 데이터를 피팅하고 τ 를 추출한다. 다음 단계에서, k_{on} 은 다음 수학적 식 2에 의해 계산되었다:

[0267] [수학적 식 2]

[0268]
$$k_{on} = \frac{\frac{1}{2} \cdot 4\pi r_{eff}^3 \cdot N_A}{3n_b \tau}$$
,

[0269] 여기서 r_{eff} 는 구의 반경이고, n_b 는 결합 파트너 수이고, N_A 는 아보가드로 상수(Avogadro constant)이다. 유효 용적 $V_{eff}(4\pi r_{eff}^3)$ 는 상호작용이 발생할 수 있는 용적을 나타낸다. S1 분자의 절반만이 기질 상의 이의 상응하는 수용체와 상호작용할 수 있기 때문에, 이것은 반구(half-sphere)를 야기한다.

[0270] 세포주의 배양

[0271] CHO 세포는 10% FBS(태아 소 혈청), 페니실린(100U/ml-1), 스트렙토마이신($100 \mu\text{g mL}^{-1}$)(Invitrogen) 및 2mM L-글루타민(Sigma)이 보충된 Ham's F12 배지(Sigma)에서 배양하였다. 세포를 습도가 포화된 환경에서 37°C에서 5%의 CO_2 로 하여 배양하였다.

[0272] Lec2 세포의 형질도입

[0273] Lec2 세포를 H2BeGFP 및 액틴-mCherry-발현 렌티바이러스를 사용하여 핵 eGFP 뿐만 아니라 세포질 mCherry를 발현하도록 형질도입하였다.

[0274] Atto488 NHS 에스테르 염료를 사용한 UV-불활성화 SARS-CoV-2 비리온의 표지화

[0275] UV-불활성화 SARS-CoV-2 비리온의 10^8 개 입자. mL^{-1} 용액 200 μL 를 500 μL 의 아세트이트 완충액(pH 4.5)에서 2시간 동안 부드러운 교반하에 Atto488 NHS 에스테르 염료(Atto-Tec)(무수 DMSO 중의 10mM) 10 μL 와 혼합하였다. 그 후 유리 염료를 제거하고 형광 표지된 비리온을 Amicon Ultra-0.5 원심 여과기 장치인 MWCO 10kDa(Sigma)로의 여과를 통해 초기 농도로 농축하였다(정제를 위해 10,000g에서 10분 원심분리, 및 생성물 회수를 위해 1,000g에서 2분).

[0276] 바이러스 결합 분석

[0277] CHO와 Lec2(액틴-mCherry로 형광 표지됨)의 공동-배양물을 Atto488 NHS 에스테르 염료와 결합된 UV-불활성화 SARS-CoV-2 바이러스의 10^8 개 입자. mL^{-1} 용액과 함께 빙상에서 1시간 동안 배양하였다(내재화 방지를 위해). 그 후 세포를 PBS로 3회 세정하고 포름알데히드(15분 동안 PBS 중의 4%)(Invitrogen, Thermo Fisher Scientific)로 고정하였다. PBS로 최종 세척한 후, 40 $\times$ 물 대물렌즈(water objective)를 사용하여 레이저 주사 공초점 현미경(Zeiss LSM 980)으로 세포를 이미징하였다. 이미지를 Zen blue 2.3 소프트웨어(Zeiss)로 분석하였다. z-스택으로부터 단일 이미지를 획득하기 위해 최대 강도 투영을 수행하였다.

[0278] 살아있는 세포에 대한 FD-기반 AFM 및 형광 현미경 검사

[0279] CHO 세포의 AFM 상관 이미지는 도립 표면형광 현미경(Zeiss Observer Z.1) 또는 공초점 레이저 주사 현미경(Zeiss LSM 900)에 결합된 PeakForce QNM 모드(Nanoscope 소프트웨어 v9.2)의 Bioscope Resolve AFM(Bruker)을 사용하여 획득하였다. 모든 실험은 40x 오일 대물렌즈(NA = 0.95)를 사용하여 수행하였다. 세포 이미지(30-50 μ

m^2)는 팁 길이 17 μm , 팁 반경 65nm, 개각도 15°를 갖는 PFQNM-LC 프로브(Bruker)를 사용하여 500pN의 힘으로 기록하였다. 모든 형광 및 AFM 실험은 세포 유형에 따라 Mem α , 뉴클레오시드 또는 Ham's F12 배양 배지에서 37°C의 결합된 AFM 및 형광 현미경 챔버를 사용하여 세포-배양 조건하에서 구현되었다(Alsteens, D. *et al.*, Nature Nanotechnology, 2017, Vol. 12, pp. 177-183). 캔틸레버를 열 잡음 방법(Hutter, J. L. & Bechhoefer, J., Review of Scientific Instruments, 1993, Vol. 64, pp. 1868-1873)을 사용하여 검량하여, 0.08 내지 0.14 N/m 범위의 값을 산출하였다. AFM 팁을 750nm 진폭으로 0.25kHz에서 정현파 방식으로 진동시켰다. 샘플을 0.125Hz의 주파수 및 라인당 128 또는 256 픽셀을 사용하여 스캔하였다. AFM 이미지 및 FD 곡선을 Nanoscope 분석 소프트웨어(v1.9, Bruker), Origin 및 ImageJ(v1.52e)를 사용하여 분석하였다. 세포 표면과 S1 또는 SARS-CoV-2 사이의 결합 해제 이벤트(unbinding event)를 검출하는 개별 FD 곡선은 Nanoscope 분석 및 Origin 소프트웨어를 사용하여 분석하였다. 후퇴 곡선의 기준선은 후퇴 곡선의 마지막 30%에 선형 맞춤을 사용하여 보정하였다. 힘-시간 곡선을 사용하여, 각 과열 이벤트의 하중 속도(기울기)를 결정하였다. 광학 이미지는 Zen Blue 소프트웨어(Zeiss)를 사용하여 분석하였다.

[0280] 9-AcSA 포르피린 첨가의 효과 모니터링

[0281] 살아있는 세포 실험은 세포의 컨플루언트 층(confluent layers)의 적절한 영역을 스캔한 다음 10 nM, 100 nM, 1 μM 또는 10 μM 의 9 AcSA 포르피린 011을 배양 배지에 첨가함으로써 상기한 바와 동일한 방식으로 수행하였다. 그 후 9-AcSA 올리고머를 첨가한 후의 잠재적 변화를 모니터링하기 위해 동일한 영역을 다시 스캔하였다.

[0282] SARS-CoV-2 스파이크 위형 VSV 바이러스의 생산

[0283] 18개 아미노산 잔기 플라즈미드의 C-말단 절단을 갖는 pCG1 SARS-CoV-2 스파이크 단백질을 HEK-293 세포에서 형질감염시켰다. 다음 날, VSV-deltaG 비리온을 세포당 MOI 5 FFU로 세포에 형질도입하였다. 습도가 포화된 환경에서 37°C에서 5%의 CO₂로 1시간 배양한 후, 배지를 제거하고 세포를 PBS로 세척하였다. 형질도입된 세포를 5% FBS, 1% 페니실린, 1% 스트렙토마이신, 2mM L-글루타민, 1mM Na-피루베이트 및 NEAA 뿐만 아니라 항-VSV-G 항체(1:1000)가 보충된 DMEM에서 배양하였다. 생산된 바이러스를 형질도입 다음날 배지로부터 수집하였다. 세포 파편은 원심분리(1250×g, 10분) 및 0.22 μm 필터로 제거하였다.

[0284] 감염력 분석

[0285] A549 또는 A549 ACE2 안정한 세포(1×10^4)를 96-웰 플레이트에 시딩하였다. MOI 5의 위형 바이러스 및 증가하는 농도(0.001 μM , 0.01 μM , 0.1 μM , 1 μM , 10 μM)의 SA(Neu5Ac), 9-AcSA, SA-포르피린 글리코클러스터 010 또는 9-AcSA-포르피린 글리코클러스터 011(실시예 1-d에 나타난 바와 같음)의 혼합물을 실온에서 15분 동안 배양하였다. 혼합물을 배지에 첨가하고 세포를 1시간 동안 배양하였다. 세포를 PBS로 세척하고 신선한 세포 배양 배지에서 24시간 동안 배양하였다. 감염력은 형광을 통해 모니터링하였으며 이미지는 바이오이미저 장치(Amersham Typhoon)로 촬영하였다. 감염된 세포의 수를 Fiji에 의해 계수하였다.

[0286] 결과

[0287] 1. 9-O-아세틸화 시알산(9-O-AcSA)에 대한 S1 서브유닛의 결합

[0288] 현저하게도, 아세틸화 SA(B5)와 비-아세틸화 SA(B4) 사이에 약 3배의 유의한 차이가 관찰되어, SA에 비해 9-AcSA에 대한 S1 서브유닛의 유의하게 더 높은 결합력(avidity)을 입증하였다.

[0289] 또한, 상호작용의 특이성을 추가의 독립적인 대조군 실험을 수행함으로써 확인하였다. 유리 9-AcSA(도 2) 또는 스트렙타비딘(SA 없음)으로만 코팅된 표면을 사용한 두 경쟁 분석은 유의하게 더 낮은 결합 확률(BP)을 초래하였으며, 이는 SARS-CoV-2 S1 도메인과 9-AcSA 상호작용의 특이성을 확인시켜 주었다.

[0290] 2. S1 서브유닛과 9-O-AcSA 간의 상호작용의 동역학

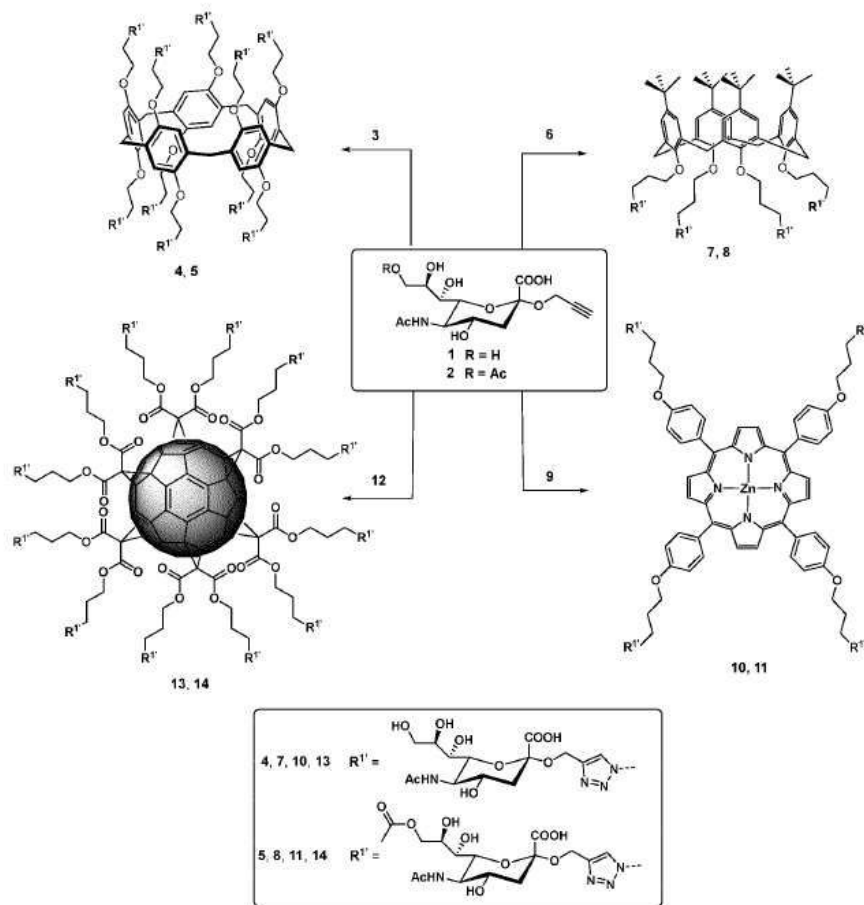
[0291] S1과 9-AcSA 사이의 상호작용에 대한 결합 자유-에너지 랜즈스케이프는 단일 분자 동적 힘 분광법(DFS)을 사용하여 특성화하였다. 접촉 시간이 BP에 미치는 영향을 모니터링함으로써(도 3), 수용체-결합 복합체가 유사-1차-동역학에 의해 근사화될 수 있다고 가정하여 결합 속도(association rate)(k_{on})를 추정하였다. 데이터를 단일지수 성장으로 피팅함으로써, $(4.2 \pm 0.2) \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ 의 k_{on} 을 추출하고 친화도 상수(K_D)를 k_{off} 와 k_{on} 사이의 비율로서 계산하여 $5.7 \pm 5 \mu M$ 의 값을 생성하였다.

- [0292] μM 범위의 낮은 중간 친화도에 상응하며, 이는 SARS-CoV-2가 숙주 세포 표면에서 9-AcSA와 같은 글리칸을 첫 번째 중간-친화도 발판으로 사용하여 ACE2 수용체에 대한 후속적인 강력한 결합을 촉진한다는 가정을 뒷받침한다.
- [0293] 3. SARS-CoV-2 비리온 수준에서의 결합
- [0294] 비복제 SARS-CoV-2 입자(즉, UV 방사선을 통해 불활성화된 천연 SARS-CoV-2 비리온)를 사용하여 조사된 상호작용의 생리학적 관련성을 평가하였다. 9-AcSA에 대한 이러한 비복제 SARS-CoV-2 입자의 결합은 전체 비리온을 AFM 팁에 이식함으로써 평가하였다. 상호작용은 중간($1\mu\text{m.s}^{-1}$) 및 빠른($20\mu\text{m.s}^{-1}$) 인장 속도에서 조사하였으며, DFS 플롯을 재구성하고 정제된 S1 도메인으로 수득된 데이터와 오버레이하였다.
- [0295] 정제된 S1 도메인으로만 수집된 데이터 또는 전체 비리온으로 수집된 데이터 간에 양호한 일치가 관찰되었다. 단일-분자 수준에서 상이한 파열 힘이 매우 가까웠으며 운동 매개변수도 그러하였다. 비리온 수준에서, 다수 접촉과 호환되는 더 높은 힘이 또한 기록되었다.
- [0296] 4. 살아있는 세포에 대한 상호작용의 검증
- [0297] 다음으로, 정제된 S1 또는 완전 비복제 비리온과 비표지된 CHO 세포, 자연적으로 발현되는 시알산(SA) 및 Lec2 세포(핵 단백질 H2B GFP 및 액틴-mCherry로 형광 표지됨)의 공동-배양물 간의 상호작용을 조사함으로써 살아있는 세포에서 직접 상호작용을 검증하였다. 표면 수용체로서 SA의 역할을 입증하기 위해, CHO 및 Lec2 세포의 공동-배양물에 대해 레이저-주사 공초점 현미경 검사를 수행하였으며 UV-불활성화 SARS-CoV-2 비리온(Atto488-NHS 염료로 형광 표지됨)이 SA-발현 CHO 세포에 우선적으로 결합하는 것을 관찰하였다. 그 후, S1 당단백질 또는 전체 비리온으로 작용화된 AFM 팁을 사용하여, 공동-배양된 CHO 및 Lec2 세포의 컨플루언트 단층을 두 세포 유형을 모두 증식하는 조건을 사용하여 AFM에 의해 스캔하였다.
- [0298] CHO 세포는 유의하게 더 높은 밀도의 접촉 이벤트를 보인 반면(S1의 경우 ~ 9%, SARS-CoV-2의 경우 ~ 13%, 도 13a, S1의 경우 $n = 10$ 개 세포, SARS-CoV-2의 경우 $n = 12$ 개 세포), Lec2 세포는 이러한 이벤트의 희소 분포만을 나타내었으며(S1의 경우 ~ 3%, SARS-CoV-2의 경우 ~ 5%, 도 13b, S1의 경우 $n = 10$ 개 세포, SARS-CoV-2의 경우 $n = 12$ 개 세포), 이는 살아있는 세포에서 SA에 대한 특정 SARS-CoV-2 결합의 확립을 확인시켜 주었다.
- [0299] 5. SA- 및 AcSA-글리코클러스터를 사용한 SARS-Cov-2 결합의 억제
- [0300] SA 또는 9-AcSA로 장식된 8개의 글리코클러스터를 당사의 SMFS 접근법 및 전체 비복제 SARS-CoV-2 입자를 사용하여 이들의 차단 특성에 대해 시험하였다. 먼저, 상업적으로 이용 가능한 1가 9-아세틸화 시알산(9-AcSA)(Carbosynth)의 억제 능력을 0, 1, 10 및 $100\mu\text{M}$ 에서 평가하였다(도 4). 탐색된 농도 범위에 걸쳐 결합 주파수(BF)가 20-30% 정도만 약간 감소하는 것으로 관찰되었다. 이 결과는 실시예 2.2에서도 입증된 바와 같이, (SA에 비해) 더 활동적인 AcSA조차도 SARS-CoV-2 스파이크에 대해 중간 정도의 친화도만을 나타낸다는 것이 이전에 결정되었기 때문에 예상된 것이었다.
- [0301] SA 또는 9-AcSA로 작용화된 4개의 글리코클러스터를 비교하였다(도 5 내지 8). 상대 결합 주파수(BF) 플롯은 SA-글리코클러스터에 대한 억제가 없거나 약간의 억제를 보이는 반면, BF의 점진적이고 효과적인 감소는 9-AcSA-글리코클러스터에 대해 관찰된다. 또한, 모든 9-AcSA 클러스터에 대해 약 $10\mu\text{M}$ 에서 50% 감소가 관찰되었다. 9-AcSA-유래 포르피린 011이 가장 효율적인 억제제로 보이며, $1\mu\text{M}$ 에서 이미 약 50%의 감소에 도달하였다(도 7 및 9).
- [0302] 따라서, 본 출원인은 놀랍게도 포르피린, 필라라렌, 칼릭사렌 및 폴러렌에 공유 결합된 복수의 AcSA가 유리 AcSA의 낮은 친화도에도 불구하고 SARS-CoV-2의 강력한 억제를 유도한다는 것을 입증하였다. 따라서, 본 발명의 글리코클러스터는 COVID-19와 같은 감염성 질환의 치료 및/또는 예방에 사용될 수 있다.
- [0303] 6. AcSA-유래 포르피린의 억제 특성화
- [0304] 첫 번째 스크리닝(본원의 실시예 2.5)에서 포르피린-기반 글리코클러스터(화합물 011)가 SARS-CoV-2 항-결합에 대한 가장 효율적인 9-AcSA-유래 글리코클러스터임을 지적함에 따라, 이의 결합 효능이 더욱 상세하게 특성화되었다.
- [0305] 놀랍게도, 9-AcSA-포르피린 011은 이미 10nM 에서 SARS-CoV-2와 9-AcSA 사이의 프로브된 상호작용의 50% 이상의 감소를 야기하며 농도의 함수로서 지수 감소(exponential decay)를 따르는 것으로 밝혀졌다(도 10).

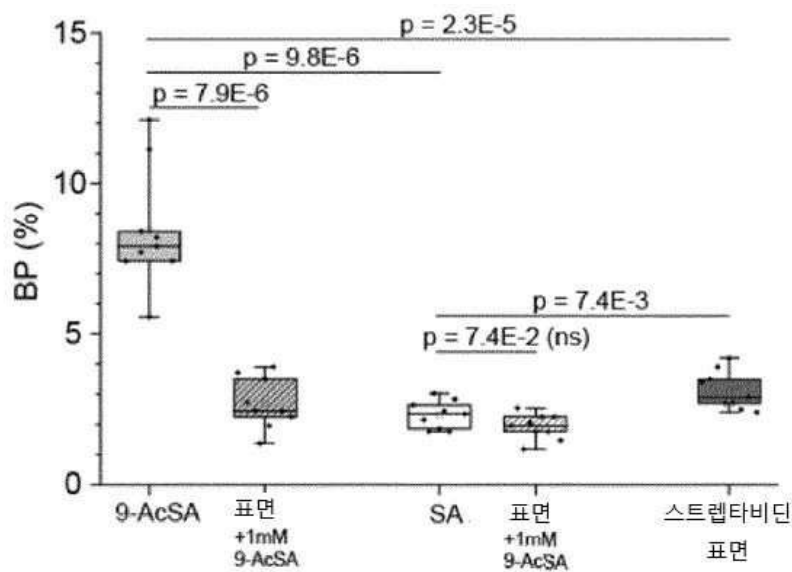
- [0306] 살아있는 세포에 대한 억제 가능성을 조사하였으며 이러한 경향은 생리학적 관련 조건에서도 확인되었다(도 11).
- [0307] 따라서, 본 출원인은 예기치 않게도, 포르피린에 공유 결합된 복수의 AcSA가 유리 AcSA의 낮은 친화도에도 불구하고 낮은 농도에서도 SARS-CoV-2의 특히 유의한 억제를 야기한다는 것을 입증하였다. 따라서, 본 발명의 AcSA-포르피린-기반 글리코클러스터는 COVID-19와 같은 감염성 질환의 치료 및/또는 예방에 사용될 수 있다.
- [0308] 7. AcSA-유래 포르피린의 중화 특성의 특성화
- [0309] 항-접착 능력(실시예 2.5 및 2.6)을 입증한 후, AcSA-포르피린 글리코클러스터 011의 중화 특성, 즉 바이러스의 진입 및 그에 따른 감염을 방지하는 능력을 평가하는 것이 관심의 대상이 되었다. 낮은 생물학적 안전성 조건에서 수행될 수 있는 강력한 바이러스 감염력 분석이 사용되었다. 간단히 말해서, SARS-CoV-2 스파이크 단백질로 상호-보완되고 GFP 리포터 단백질(VSV-SARS-CoV-2)을 암호화하는 증식-부적격(propagation-incompetent) G-결실 수포성 구내염 바이러스(VSV)를 다양한 농도의 간접 분자가 있거나 없는 ACE2 수용체로 형질도입된 A549 세포 및 A549 세포에 사용하였다. A549-ACE2를 MOI 5의 VSV-SARS-CoV-2로 감염시켰다. 감염력은 감염 후 24시간에 세포에서 GFP 형광을 측정함으로써 모니터링하였다. A549 세포는 VSV-SARS-CoV-2에 감염되지 않지만, ACE2의 과발현은 감염을 강력하게 강화한다. 다음으로, VSV-SARS-CoV-2를 SA, 9-AcSA, SA-포르피린 10 및 AcSA-포르피린 11과 함께 배양하면서 감염력 분석을 수행하였다.
- [0310] 예상대로, SA 및 9-SA는 모두 VSV-SARS-CoV-2 감염력을 유의하게 감소시키지 않았다(도 12). 또한, SA-포르피린 010은 VSV-SARS-CoV-2 감염력의 유의한 감소를 제공하지 않았지만, 9-AcSA-포르피린 011은 0.1-1 μ M 범위의 추정된 IC₅₀으로, VSV-SARS-CoV-2 감염력을 유의하게 감소시키는 것을 관찰하였다(도 12).
- [0311] 이러한 세포-기반 분석은 SARS-CoV-2 결합에 대한 시알산의 효과에 대한 이전 결과를 확인시켜 주고, 본 발명의 글리코클러스터에 의한 이의 수용체에 대한 바이러스 결합의 효과적인 억제가 감염력의 유의한 감소로 이어진다는 추가 증거를 확인시켜 준다.
- [0312] 8. 상이한 SARS-CoV-2 계통에 대한 9-AcSA 포르피린 결합의 비교
- [0313] 마지막 순환 변이체에서 관찰된 SARS-CoV-2 돌연변이가 이의 수용체에 대한 바이러스 결합의 억제 효능에 영향을 미치는지 여부를 평가하기 위해, 원래의 Wuhan 균주 또는 최신 Omicron 균주로부터의 S1 도메인에 대한 9-AcSA 포르피린 011의 친화도 측정을 수행하였다. 간단히 말해서, 하나 또는 다른 균주로부터의 스파이크 단백질의 S1 도메인을 생물층 간섭계 센서에 공유적으로 부착시키고 9-AcSA 포르피린 011의 결합을 평가하였다.
- [0314] 친화도 손실은 관찰되지 않았으며, 분석은 Wuhan 균주의 경우 141 ± 4 nM, Omicron 균주의 경우 100 ± 3 nM 정도의 친화도 상수를 제공하였다.
- [0315] 이러한 결과는 SARS-CoV-2의 원래 균주에 대한 아세틸화 시알산 글리코클러스터의 효능을 확인시켜 줄 뿐만 아니라, 원래의 일배체형보다 거의 2년 후에 나타나고 많은 수의 돌연변이를 포함하고 있음에도 불구하고, Omicron 균주에 대해서도 효능을 확인시켜 준다.

도면

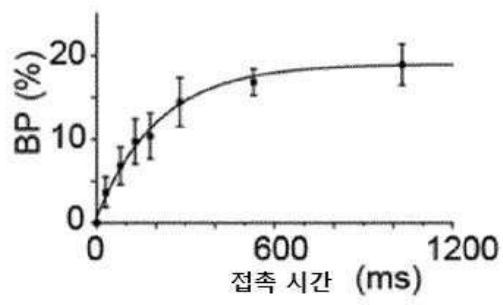
도면1



도면2



도면3



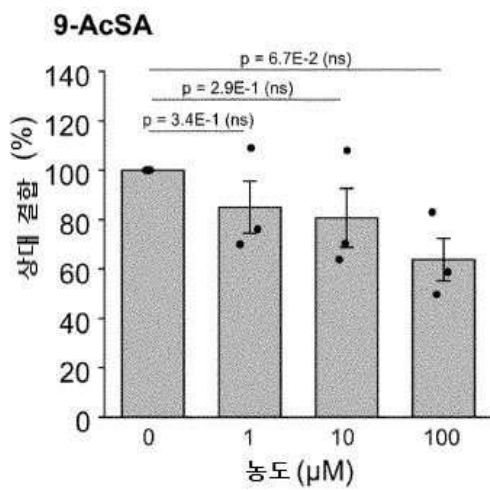
$$k_{\text{off}} = 0.24 \pm 0.20 \text{ s}^{-1}$$

$$x_u = 0.5 \pm 0.1 \text{ nm}$$

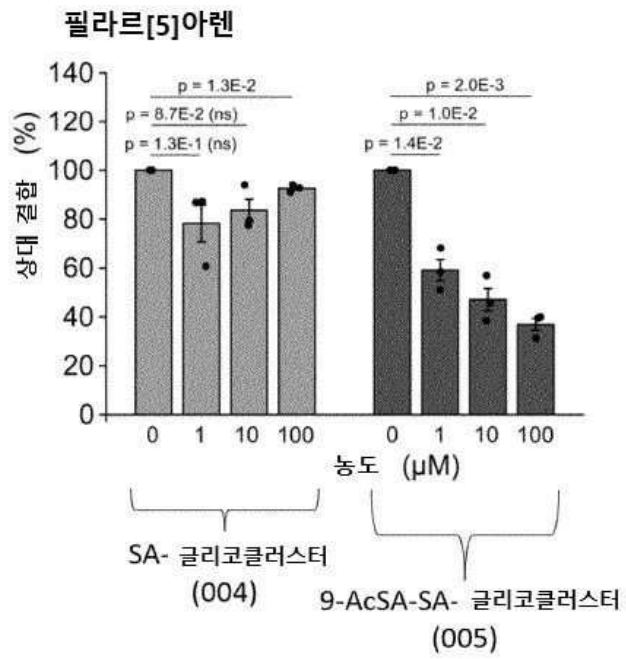
$$k_{\text{on}} = (4.2 \pm 0.3) \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$$

$$K_D = 5.7 \pm 5.0 \text{ } \mu\text{M}$$

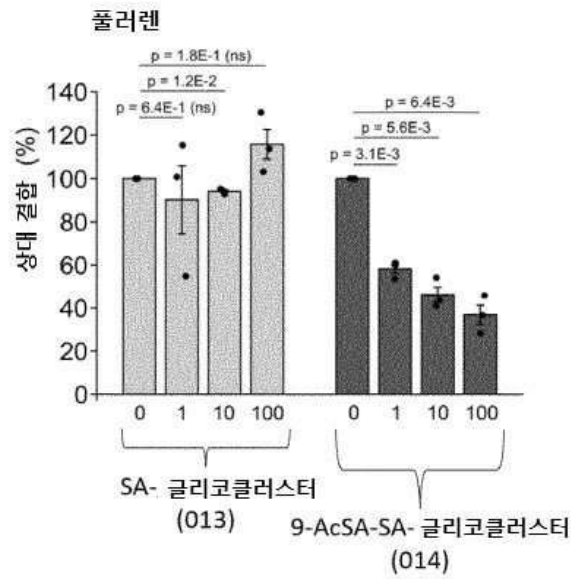
도면4



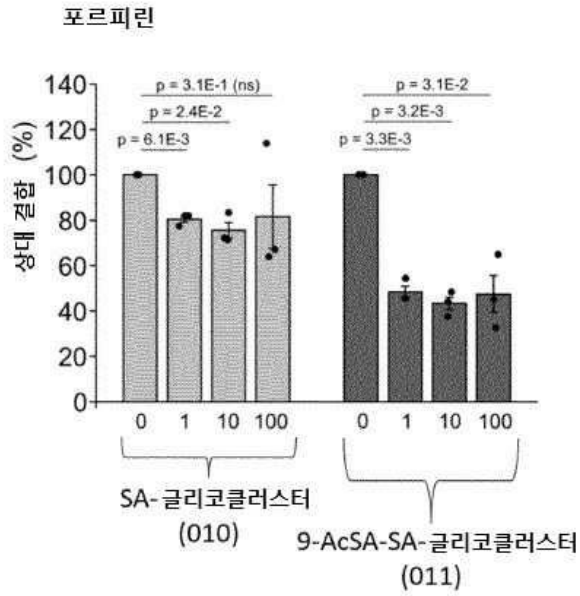
도면5



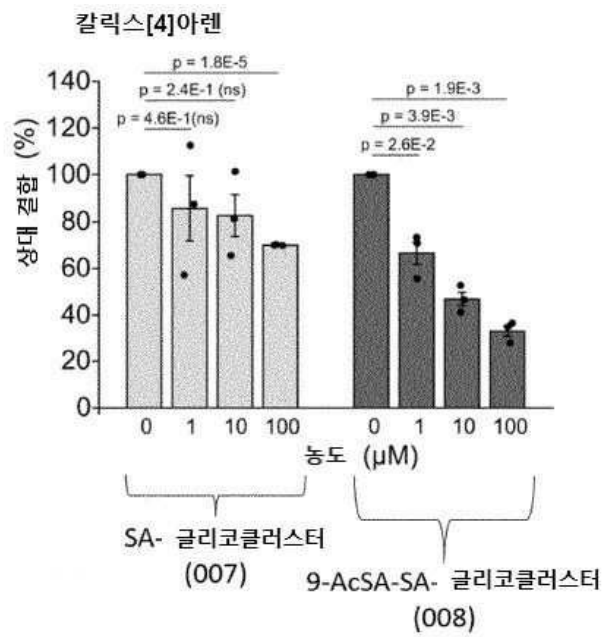
도면6



도면7

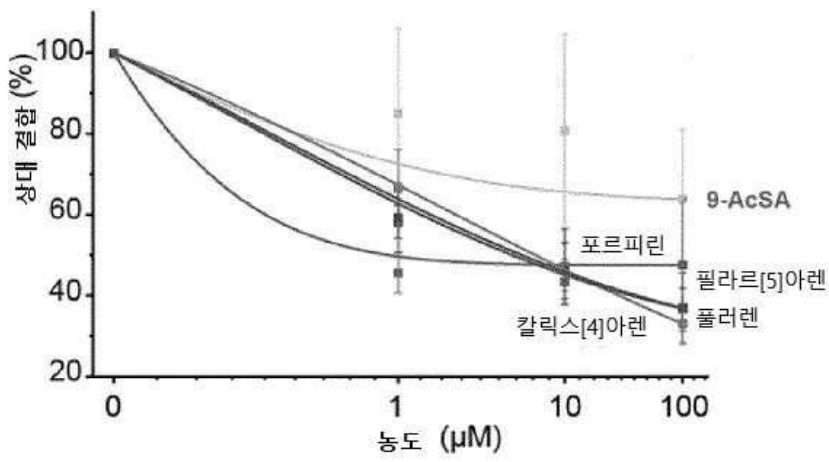


도면8

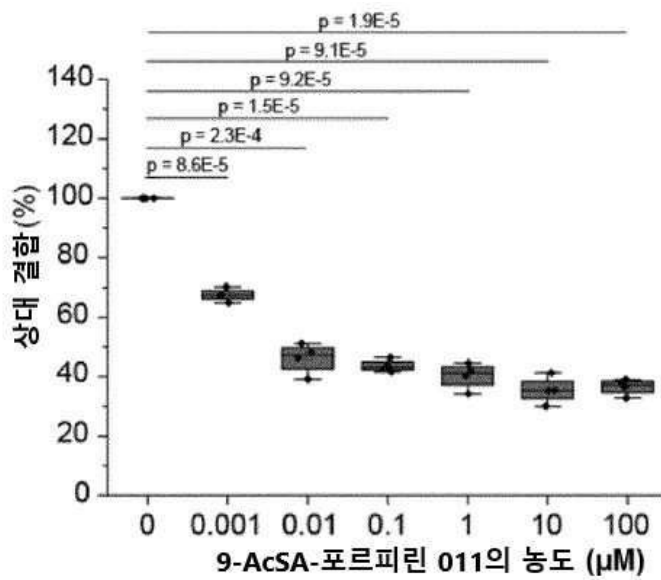


도면9

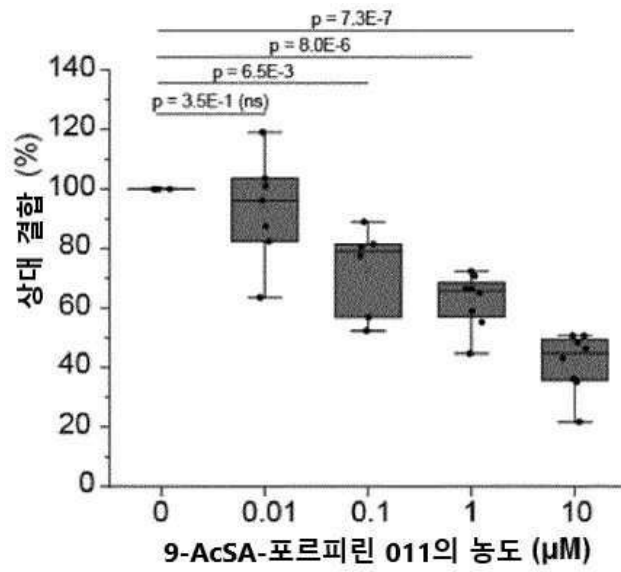
9-AcSA- 글리코클러스터



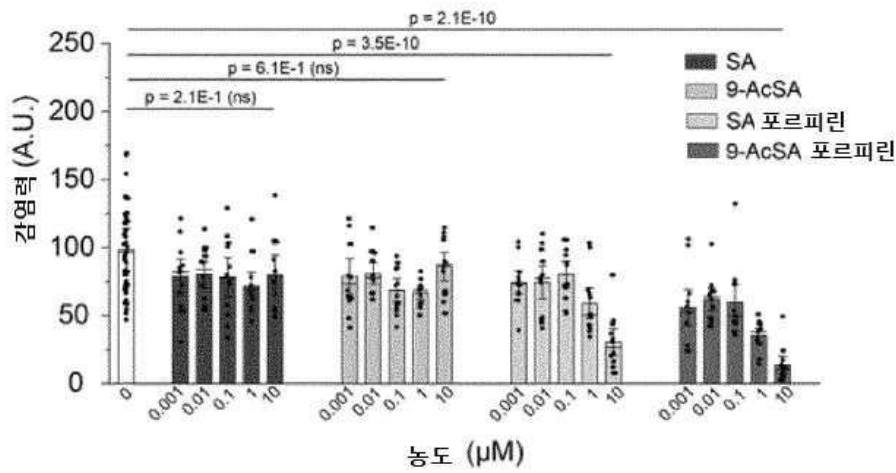
도면10



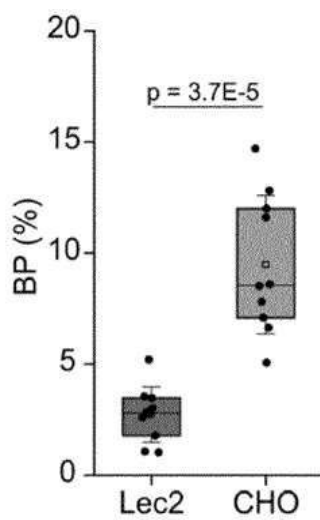
도면11



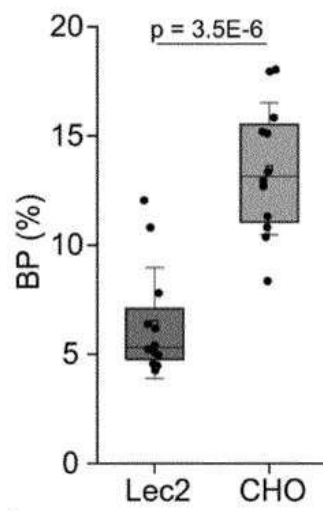
도면12



도면13a



도면13b



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

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