(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년07월25일
(11) 등록번호 10-2559979
(24) 등록일자 2023년07월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/127 (2006.01) *A61K 31/7088* (2006.01)
A61K 31/7105 (2006.01) *A61K 47/22* (2017.01)
A61K 48/00 (2006.01) *A61K 9/51* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 9/1271 (2013.01)
A61K 31/7088 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-7008910(분할)
(22) 출원일자(국제) 2015년06월24일
심사청구일자 2023년04월10일
(85) 번역문제출일자 2023년03월14일
(65) 공개번호 10-2023-0041838
(43) 공개일자 2023년03월24일
(62) 원출원 특허 10-2022-7012131
원출원일자(국제) 2015년06월24일
심사청구일자 2022년04월12일
(86) 국제출원번호 PCT/US2015/037392
(87) 국제공개번호 WO 2015/200465
국제공개일자 2015년12월30일
(30) 우선권주장
62/016,512 2014년06월24일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
KR1020110129969 A
US20130158021 A1

(73) 특허권자
샤이어 휴먼 지네틱 테라피즈 인크.
미국 매사추세츠 (우편번호 02421) 렉싱턴 샤이어 웨이 300
(72) 발명자
데로사, 프랑크
미국 01824 매사추세츠 첼름스퍼드 마운트 오번 스트리트26
카브, 스리랑
미국 02451 매사추세츠 월섬 스턴스 힐 로드 4504
히어틀라인, 마이클
미국 01719 매사추세츠 박스버러 리드 팜 로드 167
(74) 대리인
특허법인 남앤남

전체 청구항 수 : 총 17 항 심사관 : 홍승우

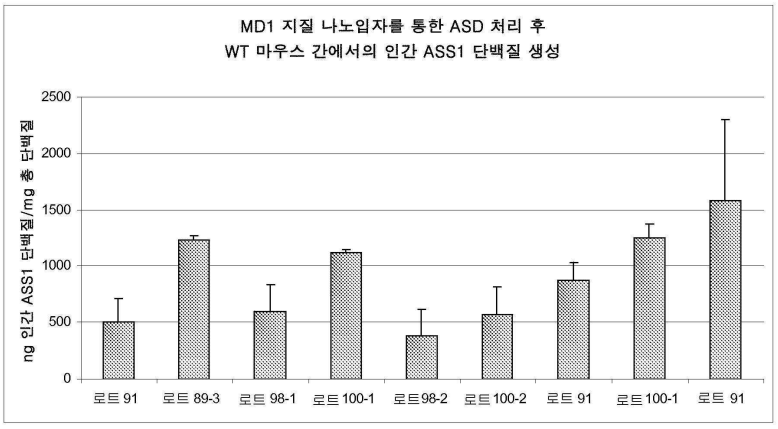
(54) 발명의 명칭 **핵산의 전달용 입체화학적으로 풍부한 조성물**

(57) 요 약

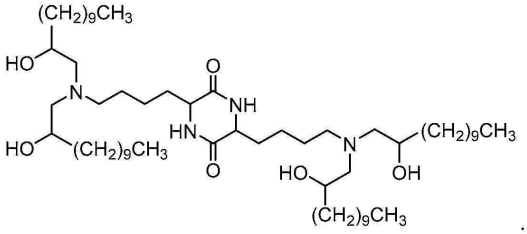
식 I의 1종 이상의 화학 단위체를 포함하는 조성물로서, 상기 단위체 각각은 식 I의 화합물, 이의 약제학적으로

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도1



허용가능한 염, 이의 용매화물, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염의 용매화물이고:



I

상기 조성물 중 식 I의 화학 단위체의 총량의 제1 역치 양 초과인 것을 특징으로 하는 상기 조성물은, 식 I.a의 화학 단위체(상기 제1 역치 양은 50%임)이거나; 또는 식 I.b.1의 화학 단위체(상기 제1 역치 양은 25%임)이거나; 또는 식 I.b.2의 화학 단위체(상기 제1 역치 양은 25%임)이거나, 상기 식 I.a, I.b.1, 및 I.b.2의 화학 단위체는 본 명세서에 기재되어 있는 조성물, 그리고 예를 들면, 생체내 폴리뉴클레오타이드의 전달을 위한, 그와 같은 조성물을 사용하는 방법이 부분적으로 제공된다.

(52) CPC특허분류
A61K 31/7105 (2013.01)
A61K 47/22 (2013.01)
A61K 48/0025 (2013.01)
A61K 9/1272 (2013.01)
A61K 9/5123 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

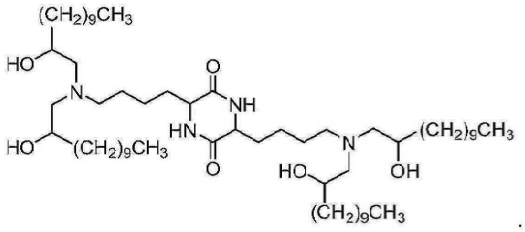
단백질을 암호화하는 mRNA;

비-양이온성 지질;

PEG-변형 지질;

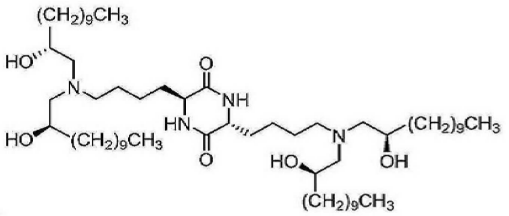
콜레스테롤; 및

식 I의 하나 이상의 화학 단위체를 포함하며, 상기 단위체 각각은 식 I의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염이고:



I

지질 나노입자 중 식 I의 화학 단위체의 총량의 50% 초과는 식 I.a.i의 화학 단위체인 것을 특징으로 하는, 지질 나노입자:



I.a.i,

청구항 2

제1항에 있어서, 식 I.a.i의 화학 단위체의 양은 70% 초과인, 지질 나노입자.

청구항 3

제1항에 있어서, 식 I.a.i의 화학 단위체의 양은 80% 초과인, 지질 나노입자.

청구항 4

제1항에 있어서, 식 I.a.i의 화학 단위체의 양은 90% 초과인, 지질 나노입자.

청구항 5

제1항에 있어서, 식 I.a.i의 화학 단위체의 양은 95% 초과인, 지질 나노입자.

청구항 6

제1항에 있어서, 비-양이온성 지질은 DSPC (1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린), DPPC (1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포콜린), DOPE (1,2-디올레일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민), DOPC (1,2-디올레일-sn-글리세로-3-포스포티딜콜린) DPPE (1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민), DMPE (1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민), 및 DOPG (1,2-디올레오일-*sn*-글리세로-3-포스포-(1'-*rac*-글리세롤))로 이루

어진 군에서 선택되며; 그리고

PEG-변형된 지질은 C_6-C_{20} 길이의 알킬 사슬(들)을 갖는 지질에 공유결합된, 최대 5 kDa의 길이를 갖는 폴리(에틸렌) 글리콜 사슬을 포함하는, 지질 나노입자.

청구항 7

제6항에 있어서, 비-양이온성 지질은 DOPE이고 PEG-변형된 지질은 DMG-PEG2K인, 지질 나노입자.

청구항 8

제1항에 있어서, mRNA에 의해 암호화되는 단백질은 세포질 단백질인, 지질 나노입자.

청구항 9

제1항에 있어서, mRNA에 의해 암호화되는 단백질은 분비된 단백질인, 지질 나노입자.

청구항 10

제1항에 있어서, mRNA에 의해 암호화되는 단백질은 효소인, 지질 나노입자.

청구항 11

제1항에 있어서, mRNA에 의해 암호화되는 단백질은 세포내 효소인, 지질 나노입자.

청구항 12

제11항에 있어서, mRNA에 의해 암호화된 단백질은 요소 대사 또는 리소좀 축적 대사성 장애와 관련된 효소인, 지질 나노입자.

청구항 13

제1항에 있어서, mRNA에 의해 암호화된 단백질은 막통과 단백질인, 지질 나노입자.

청구항 14

제1항에 있어서, mRNA에 의해 암호화된 단백질은 이온 통로 단백질인, 지질 나노입자.

청구항 15

제1항에 있어서, mRNA는 하나 이상의 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는, 지질 나노입자.

청구항 16

제15항에 있어서, 하나 이상의 변형된 뉴클레오타이드는 슈도우리딘, N-1-메틸-슈도우리딘, 2-아미노아데노신, 2-티오티미딘, 이노신, 피롤로-피리미딘, 3-메틸 아데노신, 5-메틸시티딘, C-5 프로피닐-시티딘, C-5 프로피닐-우리딘, C5-브로모우리딘, C5-플루오로우리딘, C5-아이오도우리딘, C5-메틸시티딘, 7-데아자아데노신, 7-데아자-구아노신, 8-옥소아데노신, 8-옥소구아노신, O(6)-메틸구아닌, 및 2-티오시티딘으로 이루어진 군에서 선택되는, 지질 나노입자.

청구항 17

제1항에 있어서, mRNA는 비변형되는, 지질 나노입자.

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

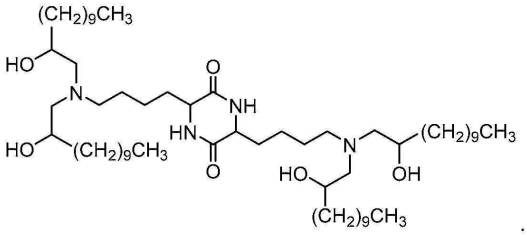
[0001] **배경**

[0002] 지질을 사용하는 핵산의 전달은 다양한 질환의 치료를 위해 광범위하게 탐구되었다. 높은 효율 및 저독성을 갖는 핵산, 예컨대 짧은 간섭하는 RNA (siRNA) 및 메신저 RNA (mRNA)을 전달할 수 있는 지질 및/또는 지질 조성물에 대한 큰 요구가 여전히 있다.

발명의 내용

[0003] **요약**

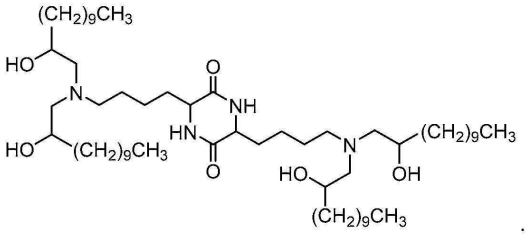
[0004] 다른 것들 중에서, 본 발명은 mRNA를 전달하기 위해 입체화학적으로 풍부한 지질을 포함하는 조성물을 제공한다. 본 발명은, 아래의 식 I의 입체화학적으로 풍부한 지질을 포함하는 조성물이, 큰 유효성이 있고 mRNA를 전달하고 암호화된 단백질을 *생체내*에서 생산할 때 예상외로 저독성을 갖는다는 놀라운 발견을 부분적으로 기반으로 한다:



[0005] **I**

[0006] 본 발명자들은, mRNA 전달용으로 사용될 때, 식 I의 입체화학적으로 풍부한 조성물이, 예를 들면, 극적으로 저급 알라닌 아미노기전달효소 (ALT) 및 아스파르테이트 아미노기전달효소 (AST) 발현 수준에 의해 입증된 것과 동일한 지질의, 입체화학적으로 비-풍부하지 않거나 입체화학적으로 덜 풍부한 조성물과 비교하여 놀랍게도 저독성이라는 것을 발견했다. 참고 표 1 내지 8.

[0007] 일부 구현예에서, 본 발명은 식 I의 1종 이상의 화학 단위체를 포함하는 조성물을 제공하고, 상기 단위체 각각은 식 I의 화합물:

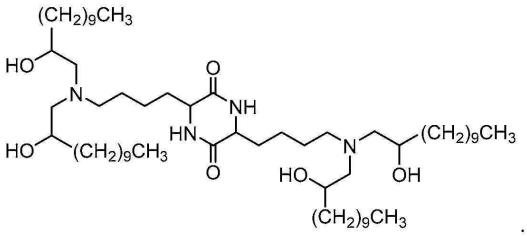


[0008] **I**

[0009] 이의 약제학적으로 허용가능한 염, 이의 용매화물, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염의 용매화물이고,

[0010] 상기 조성물은, 상기 조성물 중 식 I의 화학 단위체의 총량의 제1 역치 양 이상이 식 I.a, I.b.1, I.b.2, I.c, I.d, I.e, I.f, I.g, 또는 I.h의 화학 단위체이라는 것을 특징으로 하고, 이들 각각은 독립적으로 아래에서 정의되고 기재되어 있다.

[0011] 일부 구현예에서, 본 발명은 식 I의 1종 이상의 화학 단위체를 포함하는 조성물을 제공하고, 상기 단위체 각각은 식 I의 화합물:

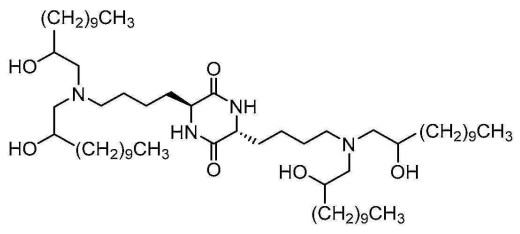


[0012] **I**

[0013] 이의 약제학적으로 허용가능한 염, 이의 용매화물, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염의 용매화물이고,

[0014] 상기 조성물 중 식 I의 화학 단위체의 총량의 제1 역치 양 이상을 특징으로 하는 조성물은 하기이다:

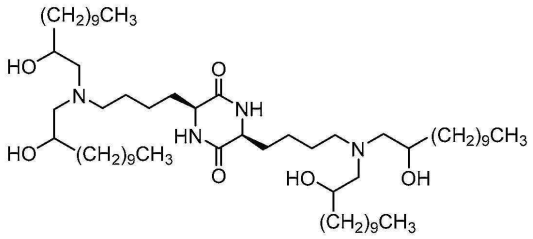
[0015] 식 I.a의 화학 단위체:



[0016] **I.a**

[0017] (상기 제1 역치 양은 50%임); 또는

[0018] 식 I.b.1의 화학 단위체:

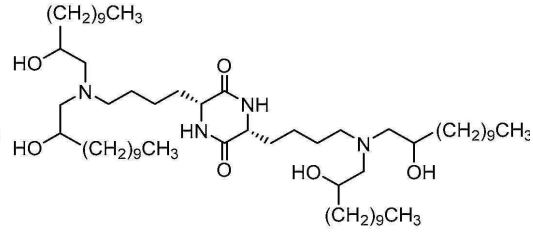


I.b.1

[0019] ,

[0020] (상기 제1 역치 양은 25%임); 또는

[0021] 식 I.b.2의 화학 단위체:

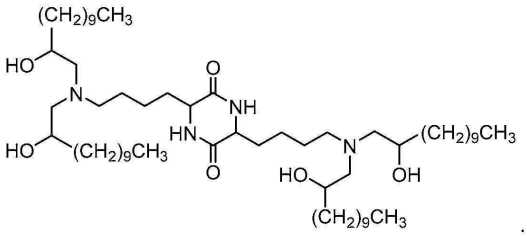


I.b.2

[0022] ,

[0023] (상기 제1 역치 양은 25%임).

[0024] 일부 구현예에서, 본 발명은 식 I의 1종 이상의 화학 단위체를 포함하는 조성물을 제공하고, 상기 단위체 각각은 식 I의 화합물:



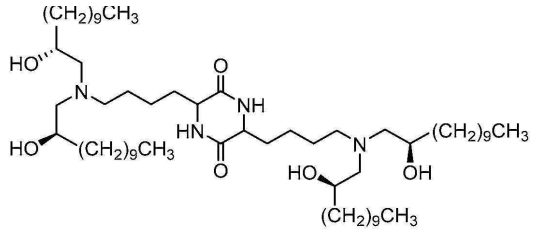
I

[0025] ,

[0026] 이의 약제학적으로 허용가능한 염, 이의 용매화물, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염의 용매화물이고,

[0027] 상기 조성물 중 식 I의 화학 단위체의 총량의 제1 역치 양 초과를 특징으로 하는 조성물은 하기이다:

[0028] 식 I.c의 화학 단위체:

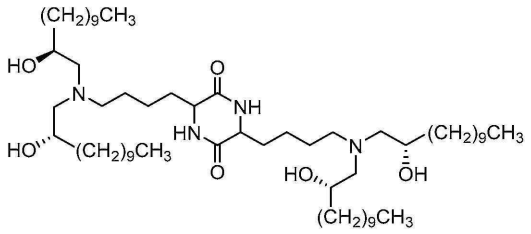


I.c

[0029] ,

[0030] (상기 제1 역치 양은 6.25%임); 또는

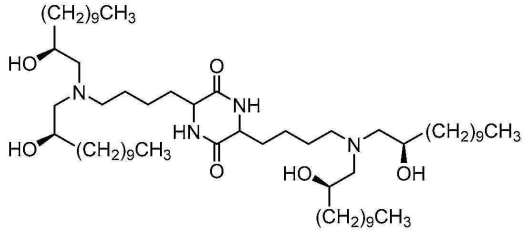
[0031] 식 I.d의 화학 단위체:



[0032] **I.d** ,

[0033] (상기 제1 역치 양은 6.25%임); 또는

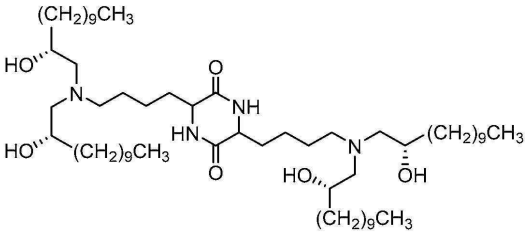
[0034] 식 I.e의 화학 단위체:



[0035] **I.e** ,

[0036] (상기 제1 역치 양은 25%임); 또는

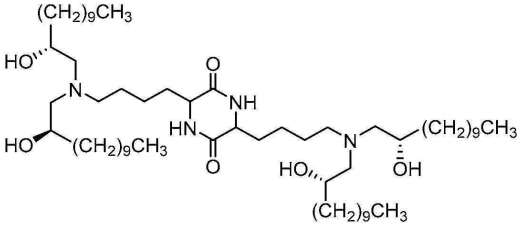
[0037] 식 I.f의 화학 단위체:



[0038] **I.f** ,

[0039] (상기 제1 역치 양은 25%임); 또는

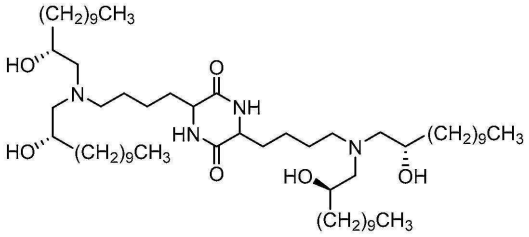
[0040] 식 I.g의 화학 단위체:



[0041] **I.g** ,

[0042] (상기 제1 역치 양은 12.5%임); 또는

[0043] 식 I.h의 화학 단위체:



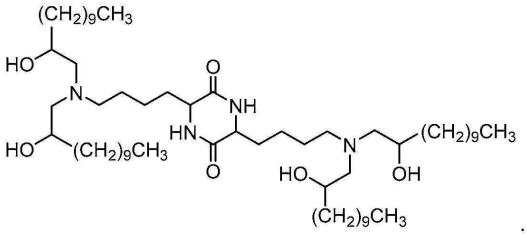
I.h

[0044] ,

[0045] (상기 제1 역치 양은 25%임).

[0046] 일부 구현예에서, 제1 역치 양은 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%이다. 일부 구현예에서, 제1 역치 양은 50%이다. 일부 구현예에서, 제1 역치 양은 70%이다. 일부 구현예에서, 제1 역치 양은 80%이다. 일부 구현예에서, 제1 역치 양은 95%이다.

[0047] 일부 구현예에서, 본 발명은 식 I의 1종 이상의 화학 단위체를 포함하는 조성물을 제공하고, 상기 단위체 각각은 식 I의 화합물:



I

[0048] ,

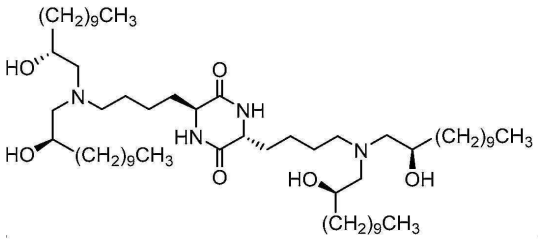
[0049] 이의 약제학적으로 허용가능한 염, 이의 용매화물, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염의 용매화물이고,

[0050] 상기 조성물은, 상기 조성물 중 식 I의 화학 단위체의 총량의 제1 역치 양 이상이 식 **I.a**, **I.b.1**, **I.b.2**, **I.c**, **I.d**, **I.e**, **I.f**, **I.g**, 또는 **I.h**로부터 선택된 제1 식의 화학 단위체이라는 것을 특징으로 하고; 그리고

[0051] 상기 조성물 중 제1 식의 화학 단위체의 총량의 제2 역치 양 이상은 제1 식의 동일한 입체이성질체의 화학 단위체이다.

[0052] 일부 구현예에서, 상기 조성물 중 식 I의 화학 단위체의 총량의 제1 역치 양 이상은 식 I.a의 화학 단위체이다.

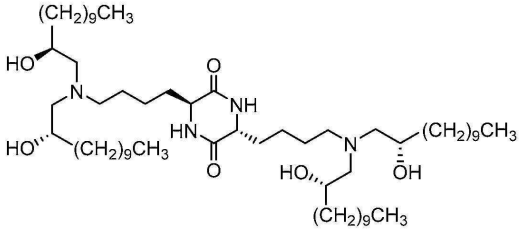
[0053] 일부 구현예에서, 상기 조성물 중 식 I.a의 화학 단위체의 총량의 제2 역치 양 이상은 식 I.a.i의 화학 단위체이다:



[0054] .

[0055] **I.a.i** (즉, *R4-SR-cKK-E12*)

[0056] 일부 구현예에서, 상기 조성물 중 식 I.a의 화학 단위체의 총량의 제2 역치 양 이상은 식 I.a.ii의 화학 단위체이다:

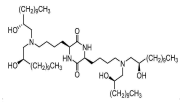


[0057]

[0058] I.a.ii (즉, *S4-SR-cKK-E12*)

[0059] 일부 구현예에서, 상기 조성물 중 식 I의 화학 단위체의 총량의 제1 역치 양 이상은 식 I.b.1의 화학 단위체이다.

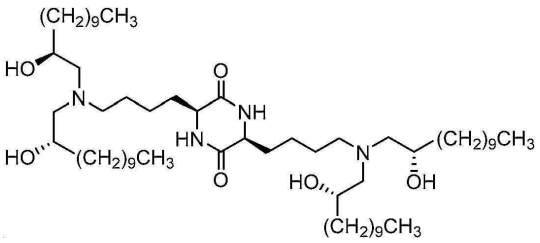
[0060] 일부 구현예에서, 상기 조성물 중 식 I.b.1의 화학 단위체의 총량의 제2 역치 양 이상은 식 I.b.1.i의 화학 단위체이다:



[0061]

[0062] I.b.1.i (즉, *R4-SS-cKK-E12*)

[0063] 일부 구현예에서, 상기 조성물 중 식 I.b.1의 화학 단위체의 총량의 제2 역치 양 이상은 식 I.b.1.ii의 화학 단위체이다:

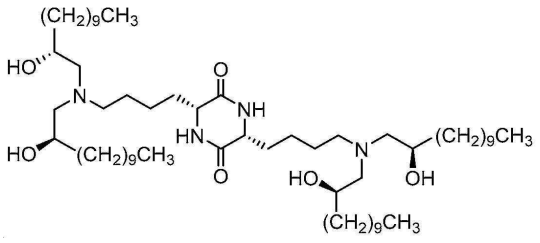


[0064]

[0065] I.b.1.ii (즉, *S4-SS-cKK-E12*)

[0066] 일부 구현예에서, 상기 조성물 중 식 I의 화학 단위체의 총량의 제1 역치 양 이상은 식 I.b.2의 화학 단위체이다.

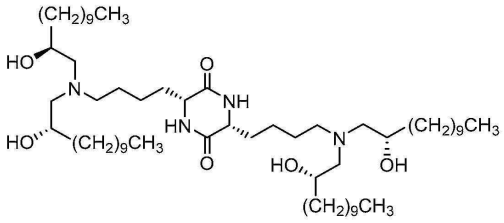
[0067] 일부 구현예에서, 상기 조성물 중 식 I.b.2의 화학 단위체의 총량의 제2 역치 양 이상은 식 I.b.2.i의 화학 단위체이다:



[0068]

[0069] I.b.2.i (즉, *R4-RR-cKK-E12*)

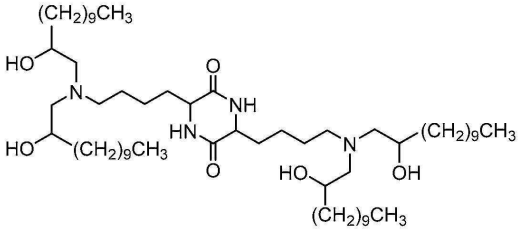
[0070] 일부 구현예에서, 상기 조성물 중 식 I.b.2의 화학 단위체의 총량의 제2 역치 양 이상은 식 I.b.2.ii의 화학 단위체이다:

[0071] 

[0072] I.b.2.ii (즉, *S4-RR-cKK-E12*)

[0073] 일부 구현예에서, 제2 역치 양은 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%이다. 일부 구현예에서, 제2 역치 양은 50%이다. 일부 구현예에서, 제2 역치 양은 70%이다. 일부 구현예에서, 제2 역치 양은 80%이다. 일부 구현예에서, 제2 역치 양은 95%이다.

[0074] 일부 구현예에서, 본 발명은 식 I의 1종 이상의 화학 단위체를 포함하는 조성물을 제공하고, 상기 단위체 각각은 식 I의 화합물:

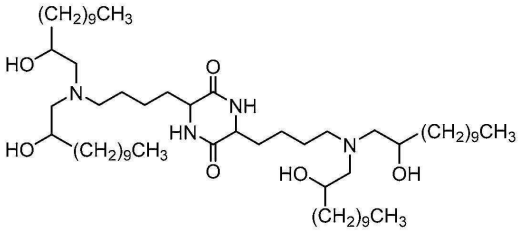


[0075] **I**,

[0076] 이의 약제학적으로 허용가능한 염, 이의 용매화물, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염의 용매화물이고,

[0077] 상기 조성물은, 조성물 중 식 I의 화학 단위체의 총량의 제3 역치 양 이상이 식 I의 화학 단위체인 것을 특징으로 한다.

[0078] 일부 구현예에서, 본 발명은 식 I의 1종 이상의 화학 단위체를 포함하는 조성물을 제공하고, 상기 단위체 각각은 식 I의 화합물:



[0079] **I**,

[0080] 이의 약제학적으로 허용가능한 염, 이의 용매화물, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염의 용매화물이고,

[0081] 상기 조성물은, 조성물 중 식 I의 화학 단위체의 총량의 제3 역치 양 이상이 식 I의 동일한 입체이성질체의 화학 단위체인 것을 특징으로 한다.

[0082] 일부 구현예에서, 식 I의 입체이성질체는 식 I.a.i, I.a.ii, I.b.1.i, I.b.1.ii, I.b.2.i, 또는 I.b.2.ii의 구조를 갖는다.

[0083] 일부 구현예에서, 본 조성물의 총량의 제3 역치 양 이상은 식 I.a.i, I.a.ii, I.b.1.i, I.b.1.ii, I.b.2.i, 또는 I.b.2.ii의 화학 단위체이다. 일부 구현예에서, 본 조성물의 총량의 제3 역치 양 이상은 식 I.a.i의 화학 단위체이다. 일부 구현예에서, 본 조성물의 총량의 제3 역치 양 이상은 식 I.a.ii의 화학 단위체이다. 일부 구현예에서, 본 조성물의 총량의 제3 역치 양 이상은 식 I.b.1.i의 화학 단위체이다. 일부 구현예에서, 본 조성물의 총량의 제3 역치 양 이상은 식 I.b.1.ii의 화학 단위체이다. 일부 구현예에서, 본 조성물의 총량의 제3 역치 양 이상은 식 I.b.2.i의 화학 단위체이다. 일부 구현예에서, 본 조성물의 총량의 제3 역치 양 이상은 식 I.b.2.ii의 화학 단위체이다.

[0084] 일부 구현예에서, 제3 역치 양은 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% (w/w)이다. 일부 구현예에서, 제3 역치 양은 50% (w/w)이다. 일부 구현예에서, 제3 역치 양은 70% (w/w)이다. 일부 구현예에서, 제3 역치 양은 80% (w/w)이다. 일부 구현예에서, 제3 역치 양은 85% (w/w)이다. 일부 구현예에서, 제3 역치 양은 95% (w/w)이다.

[0085] 일부 구현예에서, 제공된 조성물은 추가로, 암호화된 단백질의 *생체내* mRNA 전달 및 발현을 위해 1종 이상의 mRNA를 포함한다.

[0086] 일부 구현예에서, 본 발명은 mRNA 및 암호화된 단백질의 고도로 효율적인 *생체내* 전달 및 발현 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 *생체내* mRNA의 전달 방법을 제공하고, 상기 방법은 전달이 필요한 대상체에게 mRNA를 포함하는 제공된 조성물을 투여하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 이의 저독성으로 인해, 본 조성물은 더 많이 전달된 mRNA, 더 높은 단백질 발현 수준 및/또는 더 낮은 투여 빈도를 허용하고, 그렇게 함으로써 더 강하고, 더 안전하며 더 특허-친화적인 mRNA 요법을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0087] 도 1은 식 I의 화합물을 포함하는 지질 나노입자에 의한 치료 시 야생형 마우스 간에서 생체내 인간 ASS1 단백질 생산의 결과를 묘사한다.

정의

본 발명을 더 쉽게 이해시키기 위해, 어떤 용어들이 우선 하기 정의된다. 하기 용어들 및 다른 용어들에 대한 추가의 정의는 명세서 전체에 걸쳐 기재된다. 발명의 배경을 설명하고 이의 실시에 관하여 추가의 상세한 내용을 제공하기 위한 본원에 참조된 공보 및 다른 참조 자료는 이로써 참고로 편입된다.

아미노산: 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "아미노산"은, 이의 가장 넓은 의미에서, 폴리펩타이드 사슬 내로 편입될 수 있는 임의의 화합물 및/또는 물질을 나타낸다. 일부 구현예에서, 아미노산은 일반적인 구조 H_2N-C(H)(R)-COHO를 갖는다. 일부 구현예에서, 아미노산은 천연 발생 아미노산이다. 일부 구현예에서, 아미노산은 합성 아미노산이며; 일부 구현예에서, 아미노산은 d-아미노산이고; 일부 구현예에서, 아미노산은 l-아미노산이다. "표준 아미노산"은 천연 발생 펩타이드에서 통상적으로 발견되는 20개의 표준 l-아미노산 중 어느 것을 나타낸다. "비표준 아미노산"은, 그것이 합성으로 제조되든 천연 공급원으로부터 수득되든지 무관하게, 표준 아미노산 이외의 임의의 아미노산을 나타낸다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "합성 아미노산"은, 비제한적으로, 염, 아미노산 유도체 (예컨대 아미드), 및/또는 치환물을 포함하는, 화학적으로 변형된 아미노산을 포함한다. 펩타이드에서 카복실- 및/또는 아미노-말단 아미노산을 포함하는 아미노산은 메틸화, 아미드화, 아세틸화, 보호 그룹, 및/또는 이의 활성에 부정적으로 영향을 미치지 않으면서 펩타이드의 순환 반감기를 변화시킬 수 있는 다른 화학 그룹으로의 치환에 의해 변형될 수 있다. 아미노산은 디설파이드 결합에 참여할 수 있다. 아미노산은 1개 또는 후번역 변형, 예컨대 1종 이상의 화학 단위체 (*예를 들면*, 메틸 그룹, 아세테이트 그룹, 아세틸 그룹, 포스페이트 그룹, 포르밀 모이어티, 이소프레노이드 그룹, 설페이트 그룹, 폴리에틸렌 글리콜 모이어티, 지질 모이어티, 탄수화물 모이어티, 바이오틴 모이어티 *등*)와의 회합을 포함할 수 있다. 용어 "아미노산"은 "아미노산 잔기"와 상호교환적으로 사용되며, 유리 아미노산 및/또는 펩타이드의 아미노산 잔기를 나타낼 수 있다. 상기 용어가 유리 아미노산을 나타내는지 또는 펩타이드의 잔기를 나타내는지는 상기 용어가 사용되는 맥락으로부터 분명할 것이다.

동물: 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "동물"은 동물계의 임의의 구성원을 나타낸다. 일부 구현예에서, "동물"은 임의의 발달 단계에 있는 인간을 나타낸다. 일부 구현예에서, "동물"은 임의의 발달 단계에 있는 비-인간 동물을 나타낸다. 특정 구현예에서, 비-인간 동물은 포유동물 (*예를 들면*, 설치류, 마우스, 랫트, 토끼, 원숭이, 개, 고양이, 양, 소, 영장류, 및/또는 돼지)이다. 일부 구현예에서, 동물은, 비제한적으로, 포유동물, 새, 파충류, 양서류, 어류, 곤충, 및/또는 벌레를 포함한다. 일부 구현예에서, 동물은 형질전환 동물, 유전적으로-조작된 동물, 및/또는 클론일 수 있다.

대략 또는 약: 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "대략" 또는 "약"은, 목적하는 하나 이상의 값에 적용될 때, 언급된 기준 값에 유사한 값을 나타낸다. 특정 구현예에서, 용어 "대략" 또는 "약"은, 다르게 언급되지 않는 한 또는 달리 맥락으로부터 분명하지 않는 한 (단 그와 같은 수가 100%의 가능한 값을 초과하지 않는 경우), 언급된 기준 값의 양 방향 (더 크거나 더 적음)으로 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 또는 그 미만 내에 속하는 값의 범위를 나타낸다.

화학 단위체: 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "화학 단위체"는 화합물, 이의 염 또는 용매화물, 또는 화합물, 이의 염 또는 용매화물의 임의의 조합을 포함한다.

전달: 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "전달"은 국부 및 전신 전달 둘 모두를 포함한다. 예를 들면, mRNA의 전달은, mRNA가 표적 조직에 전달되고, 암호화된 단백질이 발현되고, 표적 조직 내에서 유지되는 상황("국부 분배" 또는 "국부 전달"로도 지칭됨), 및 mRNA가 표적 조직으로 전달되고, 암호화된 단백질이 발현되고, 환자의 순환 시스템 (예를 들면, 혈청) 내로 분비되고, 조직적으로 분배되고, 다른 조직에 의해 흡수되는 상황("전신 분배" 또는 "전신 전달"로도 지칭됨)을 포함한다.

발현: 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 핵산 서열의 "발현"은 mRNA를 폴리펩타이드로 번역하고/하거나, 다중 폴리펩타이드 (예를 들면, 항체의 중쇄 또는 경쇄)를 온전한 단백질 (예를 들면, 항체)로 조립하고/하거나 폴리펩타이드 또는 완전히 조립된 단백질 (예를 들면, 항체)의 번역후 변형을 나타낸다. 본원에서, 용어들 "발현" 및 "생산" 및 문법적 동등물은 상호교환가능하게 사용된다.

기능적: 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "기능적" 생물학적 분자는 그것을 특징짓는 특성 및/또는 활성을 나타내는 형태의 생물학적 분자이다.

반감기: 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "반감기"는 핵산 또는 단백질 농도 또는 활성과 같은 양에 대해 기간의 개시시 측정된 이의 값의 절반으로 떨어지는데 필요한 시간이다.

개선하다, 증가하다 또는 감소하다: 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어들 "개선하다", "증가하다" 또는 "감소하다" 또는 문법적 동등물은 기준선 측정치, 예컨대 본원에 기재된 처리의 개시 전 동일한 개체에서의 측정치, 또는 본원에 기재된 처리의 부재 하에 대조군 대상체 (또는 다중 대조군 대상체)에서의 측정치에 상대적인 값을 나타낸다. "대조군 대상체"는 치료될 대상체와 동일한 질환 형태로 고통받는 대상체이며, 치료될 대상체와 대략 동일한 연령이다.

시험관내: 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "*시험관내*"는 다중-세포성 유기체 내에서 보다는 인공 환경, *예를 들면*, 시험관 또는 반응 용기에서, 세포 배양 등에서 발생하는 사건을 나타낸다.

생체내: 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "*생체내*"는 다중-세포성 유기체, 예컨대 인간 및 비-인간 동물 내에서 발생하는 사건을 나타낸다. 세포 기반 시스템의 맥락에서, 상기 용어는 (예를 들면, *시험관내* 시스템과는 대조적으로) 살아 있는 세포 내에서 발생하는 사건을 나타내는데 사용될 수 있다.

단리된: 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "단리된"은 (1) (천연 및/또는 실험적인 환경에서) 초기에 생산될 때 회합된 성분의 적어도 일부로부터 분리되고/되거나 (2) 인간의 손에 의해 생산되고/되거나 제조되고/되거나 제작된 물질 및/또는 단위체를 나타낸다. 단리된 물질 및/또는 단위체는 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99%, 또는 약 99% 초과의 초기에 회합된 다른 성분으로부터 분리될 수 있다. 일부 구현예에서, 단리된 제제는 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99% 또는 약 99% 초과의 순도이다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 물질은, 그것이 다른 성분을 실질적으로 함유하지 않는 경우 "순수"하다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 단리된 물질 및/또는 단위체의 퍼센트 순도 계산은 부형제 (*예를 들면*, 버퍼, 용매, 물 등)를 포함하지 않아야 한다.

국부 분배 또는 전달: 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어들 "국부 분배", "국부 전달" 또는 문법적 동등물은 조직 특이적 전달 또는 분배를 나타낸다. 전형적으로, 국부 분배 또는 전달은 mRNA에 의해 암호화된 단백질 (예를 들면, 효소)이 번역되고 세포내로 또는 환자의 순환 시스템으로 도입되는 것을 피하는 제한된 분비로 발현되는 것을 필요로 한다.

메신저 RNA (mRNA): 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "메신저 RNA (mRNA)"는 적어도 1종의 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 의미한다. mRNA는, 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 변형된 및 비변형된 RNA 둘 모두를 포함한다. mRNA는 하나 이상의 암호화 및 비-암호화 영역을 함유할 수 있다. mRNA는 천연 공급원으로부터 정제되고, 재조합 발현 시스템을 사용하여 생산되고, 임의로 정제되고, 화학적으로 합성 등이 될 수 있다. 적절한 경우, *예를 들면*, 화학적으로 합성된 분자의 경우에, mRNA는 뉴클레오사이드 유사체 예컨대 화학적으로 변형된 염기 또는 당을 갖는 유사체, 골격 변형 등을 포함할 수 있다. mRNA 서열은 다르게 명시되지 않는 한 5'에서 3' 방향으로 주어진다. 일부 구현예에서, mRNA는 천연 뉴클레오사이드 (*예를 들면*, 아데노신, 구아노신, 시티딘, 우리딘); 뉴클레오사이드 유사체 (*예를 들면*, 2-아미노아데노신, 2-티오티미딘, 이노신, 피롤

로-피리미딘, 3-메틸 아데노신, 5-메틸시티딘, C-5 프로피닐-시티딘, C-5 프로피닐-우리딘, 2-아미노아데노신, C5-브로모우리딘, C5-플루오로우리딘, C5-아이오도우리딘, C5-프로피닐-우리딘, C5-프로피닐-시티딘, C5-메틸시티딘, 2-아미노아데노신, 7-데아자아데노신, 7-데아자구아노신, 8-옥소아데노신, 8-옥소구아노신, O(6)-메틸구아닌, 및 2-티오시티딘); 화학적으로 변형된 염기; 생물학적으로 변형된 염기 (*예를 들면*, 메틸화된 염기); 삽입된 염기; 변형된 당류 (*예를 들면*, 2'-플루오로리보오스, 리보오스, 2'-데옥시리보오스, 아라비노오스, 및 헥소스); 및/또는 변형된 포스페이트 그룹 (*예를 들면*, 포스포로티오에이트 및 5'-*N*-포스포르아미다이트 연결기) 이거나 이들을 포함한다.

일부 구현예에서, mRNA는 1종 이상의 비표준 뉴클레오타이드 잔기를 포함한다. 비표준 뉴클레오타이드 잔기는, 예를 들면, 5-메틸-시티딘 ("5mC"), 슈도우리딘, 및/또는 2-티오-우리딘 ("2sU")을 포함할 수 있다. 그와 같은 잔기 및 mRNA 내로 이의 편입에 관한 논의에 대해서는, 예를 들면, 미국 특허 번호 8,278,036 또는 WO2011012316을 참조한다. mRNA는 U 잔기의 25%가 2-티오-우리딘이고, C 잔기의 25%가 5-메틸시티딘인 RNA로서 정의된 RNA일 수 있다. RNA의 사용에 대한 교시는 미국 특허 공개공보 US20120195936 및 국제 공개공보 WO2011012316에 개시되며, 이 둘 모두는 이로써 그 전체가 참고로 편입되어 있다. 비표준 뉴클레오타이드 잔기의 존재는 동일한 서열을 갖지만 오직 표준 잔기만을 함유하는 대조군 mRNA보다 mRNA를 더 안정하게 하고/하거나 덜 면역원성이 되게 할 수 있다. 추가 구현예에서, mRNA는 이소시토신, 슈도이소시토신, 5-브로모우라실, 5-프로피닐우라실, 6-아미노퓨린, 2-아미노퓨린, 이노신, 디아미노퓨린 및 2-클로로-6-아미노퓨린 시토신으로부터 선택된 1종 이상의 비표준 뉴클레오타이드 잔기, 뿐만 아니라 이들 변형 및 다른 핵염기 변형의 조합을 포함할 수 있다. 특정 구현예는 추가로, 푸라노스 고리 또는 핵염기에 대한 추가의 변형을 포함할 수 있다. 추가의 변형은, 예를 들면, 당 변형 또는 치환 (예를 들면, 2'-O-알킬 변형, 잠겨진 핵산 (locked nucleic acid; LNA) 중 하나 이상)을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, RNA는 추가의 폴리뉴클레오타이드 및/또는 펩타이드 폴리뉴클레오타이드 (PNA)와 복합되거나 혼성화될 수 있다. 당 변형이 2'-O-알킬 변형인 구현예에서, 그와 같은 변형은, 비제한적으로, 2'-데옥시-2'-플루오로 변형, 2'-O-메틸 변형, 2'-O-메톡시에틸 변형 및 2'-데옥시 변형을 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 임의의 이들 변형은 0-100%의 뉴클레오타이드 - 예를 들면, 0% 초과, 1%, 10%, 25%, 50%, 75%, 85%, 90%, 95% 또는 100%의 구성요소 뉴클레오타이드에서 개별적으로 또는 조합하여 존재할 수 있다.

핵산: 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "핵산"은, 이의 가장 넓은 의미에서, 폴리뉴클레오타이드 사슬 내로 편입되거나 편입될 수 있는 임의의 화합물 및/또는 물질을 나타낸다. 일부 구현예에서, 핵산은 포스포디에스테르 연결을 통해 폴리뉴클레오타이드 사슬 내로 편입되거나 편입될 수 있는 화합물 및/또는 물질이다. 일부 구현예에서, "핵산"은 개별적인 핵산 잔기 (*예를 들면*, 뉴클레오타이드 및/또는 뉴클레오사이드)를 나타낸다. 일부 구현예에서, "핵산"은 개별적인 핵산 잔기를 포함하는 폴리뉴클레오타이드 사슬을 나타낸다. 일부 구현예에서, "핵산"은 RNA 뿐만 아니라 단일 및/또는 이중-가닥 DNA 및/또는 cDNA를 포함한다.

환자: 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "환자" 또는 "대상체"는 제공된 조성물이, *예를 들면*, 실험적, 진단적, 예방적, 성형적 및/또는 치료적 목적을 위해 투여될 수 있는 임의의 유기체를 나타낸다. 전형적인 환자는 동물 (*예를 들면*, 포유동물 예컨대 마우스, 랫트, 토끼, 비-인간 영장류, 및/또는 인간)을 포함한다. 일부 구현예에서, 환자는 인간이다. 인간은 출생전 및 출생후 형태를 포함한다.

약제학적으로 허용가능한: 용어 "약제학적으로 허용가능한"은, 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 타당한 의료 판단의 범위 내에서, 과도한 독성, 자극, 알러지성 반응, 또는 다른 문제 또는 합병증 없이 인간 및 동물의 조직과 접촉하여 사용하기에 적합하고, 합리적인 유익/유해 비율에 상응하는 물질을 나타낸다.

폴리머: 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "폴리머"는 적어도 3개 (예를 들면, 적어도 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100개 등)의 반복적인 공유 결합된 구조 단위로 구성된 화합물을 나타낸다.

염: 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "염" 또는 "약제학적으로 허용가능한 염"은, 타당한 의료 판단의 범위 내에서, 과도한 독성, 자극, 알러지성 반응 등이 없이 인간 및 하등 동물의 조직과 접촉하여 사용하기에 적합하고, 합리적인 유익/유해 비율에 상응하는 염들을 나타낸다. 약제학적으로 허용가능한 염은 당해 기술에 공지되어 있다. 예를 들면, 에스. 엠. 버지(S. M. Berge) 등은 하기 참조에서 약제학적으로 허용가능한 염을 상세히 기재한다: *J. Pharmaceutical Sciences* (1977) 66:1-19. 본 발명의 화합물의 약제학적으로 허용가능한 염은 적합한 무기 및 유기 산 및 염기로부터 유도된 것들을 포함한다. 약제학적으로 허용가능한, 비독성 산 부가 염의 예는 무기 산 예컨대 염산, 브롬화수소산, 인산, 황산 및 과염소산 또는 유기 산 예컨대 아세트산, 옥살산, 말레산, 타르타르산, 시트르산, 석신산 또는 말론산과 함께 형성되거나 당해 기술에 사용된 다른 방법 예컨대

이온 교환에 의해 형성된 아미노 그룹의 염이다. 다른 약제학적으로 허용가능한 염은 아디페이트, 알기네이트, 아스코르베이트, 아스파르테이트, 벤젠설포네이트, 벤조에이트, 바이설페이트, 보레이트, 부티레이트, 캄포레이트, 캄포르설포네이트, 시트레이트, 사이클로펜탄프로피오네이트, 디글루코네이트, 도데실설페이트, 에탄설포네이트, 포르메이트, 푸마레이트, 글루코헵토네이트, 글리세로포스페이트, 글루코네이트, 헤미설페이트, 헵타노에이트, 헥사노에이트, 하이드로아이오다이드, 2-하이드록시-에탄설포네이트, 락토바이오네이트, 락테이트, 라우레이트, 라우릴 설페이트, 말레이트, 말레에이트, 말로네이트, 메탄설포네이트, 2-나프탈렌설포네이트, 니코티네이트, 니트레이트, 올레이트, 옥살레이트, 팔미테이트, 파모에이트, 펙티네이트, 퍼설페이트, 3-페닐프로피오네이트, 포스페이트, 피크레이트, 피발레이트, 프로피오네이트, 스테아레이트, 석시네이트, 설페이트, 타르트레이트, 티오시아네이트, p-톨루엔설포네이트, 운데카노에이트, 발레레이트 염 등을 포함한다. 적절한 염기로부터 유도된 염은 알칼리 금속, 알칼리토 금속, 암모늄 및 N+(C1-4알킬)4 염을 포함한다. 대표적인 알칼리 또는 알칼리토금속 염은 나트륨, 리튬, 칼륨, 칼슘, 마그네슘 등을 포함한다. 추가의 약제학적으로 허용가능한 염은, 적절한 경우, 반대이온 예컨대 할라이드, 하이드록사이드, 카복실레이트, 설페이트, 포스페이트, 니트레이트, 설포네이트 및 아릴 설포네이트를 사용하여 형성된, 비독성 암모늄, 4차 암모늄, 및 아민 양이온을 포함한다. 추가의 약제학적으로 허용가능한 염은 사원화된 알킬화된 아미노 염을 형성하기 위해 적절한 친전자체, 예를 들면, 알킬 할라이드를 사용한 아민의 사원화로부터 형성된 염을 포함한다.

전신 분배 또는 전달: 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어들 "전신 분배", "전신 전달" 또는 문법적 동등물은 전신 또는 전체 유기체에 영향을 주는 전달 또는 분배 기전 또는 접근법을 나타낸다. 전형적으로, 전신 분배 또는 전달은, "국부 분배 또는 전달"의 정의와 비교해서, 신체 순환 시스템, 예를 들면, 혈류를 통해 달성된다.

대상체: 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "대상체"는 인간 또는 임의의 비-인간 동물 (예를 들면, 마우스, 랫트, 토끼, 개, 고양이, 소, 돼지, 양, 말 또는 영장류)을 나타낸다. 인간은 출생전 및 출생후 형태를 포함한다. 많은 구현예에서, 대상체는 인간이다. 대상체는 환자일 수 있으며, 이는 질환의 진단 또는 치료를 위해 의료 제공자에게 출석한 인간을 나타낸다. 용어 "대상체"는 본원에서 "개체" 또는 "환자"와 상호교환적으로 사용된다. 대상체는 질환 또는 장애로 고통받을 수 있거나 또는 질환 또는 장애에 걸리기 쉬울 수 있지만, 질환 또는 장애의 증상을 나타낼 수 있거나 나타내지 않을 수 있다.

실질적으로: 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "실질적으로"는 전체 또는 거의-전체 정도(extent 또는 degree)의 목적하는 특징 또는 특성을 나타내는 정성적 상태를 나타낸다. 생물학적 분야의 숙련가는, 생물학적 및 화학 현상이 거의 완료되지 않고/않거나 완료되게 진행되지 않거나 절대적인 결과를 달성하지 않거나 방해하지 않음을 이해할 것이다. 따라서, 용어 "실질적으로"는 많은 생물학적 및 화학 현상에서 내재된 완전성의 잠재적 결핍을 포착하기 위해 본원에 사용된다.

표적 조직: 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "표적 조직"은 치료될 질환에 의해 영향을 받는 임의의 조직을 나타낸다. 일부 구현예에서, 표적 조직은 질환-관련된 병리, 증상, 또는 특징을 나타내는 조직을 포함한다.

치료적으로 유효한 양: 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 치료제의 "치료적으로 유효한 양"은, 질환, 장애, 및/또는 병태를 앓고 있거나 이들에 걸리기 쉬운 대상체에게 투여될 때, 질환, 장애, 및/또는 병태의 증상(들)을 치료하고/하거나 진단하고/하거나 예방하고/하거나 이의 개시를 지연하는데 충분한 양을 의미한다. 치료적으로 유효한 양은 전형적으로 적어도 하나의 단위 용량을 포함하는 투약 레지멘을 통해 투여됨이 당해 분야의 숙련가에게 이해될 것이다.

치료하는: 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "치료하다", "치료" 또는 "치료하는"은 특정한 질환, 장애, 및/또는 병태의 하나 이상의 증상 또는 특징을 부분적으로 또는 완전히 완화하고/하거나, 개선시키고/시키거나, 경감시키고/시키거나, 억제하고/하거나, 예방하고/하거나, 이의 개시를 지연시키고/시키거나, 이의 중증도를 감소시키고/시키거나 이의 발생정도를 감소시키기 위해 사용된 임의의 방법을 나타낸다. 치료제는 질환과 관련된 병리의 발병 위험을 감소시킬 목적으로 질환의 징후를 나타내지 않고/않거나 질환의 초기 징후만을 나타내는 대상체에게 투여될 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0088] 본 발명은, 다른 것들 중에서, 입체화학적으로 풍부한 지질 조성물을 사용하여 *생체내* mRNA를 전달하기 위한 지질 조성물 및 방법을 제공한다.

[0089] ***지질 조성물***

[0090] 일부 구현예에서, 본 발명은 식 I의 1종 이상의 화학 단위체를 포함하는 조성물을 제공하고, 상기 단위체 각각은 식 I의 화합물, 이의 약제학적으로 허용가능한 염, 이의 용매화물, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염의 용매화물이고,

[0091] 상기 조성물은, 상기 조성물 중 식 I의 화학 단위체의 총량의 제1 역치 양 이상이 식 I.a, I.b.1, I.b.2, I.c, I.d, I.e, I.f, I.g, 또는 I.h의 화학 단위체인 것을 특징으로 한다.

[0092] 일부 구현예에서, 제공된 조성물은, 상기 조성물 중 식 I의 화학 단위체의 총량의 제1 역치 양 초과가 식 I.a, I.b.1, I.b.2, I.c, I.d, I.e, I.f, I.g, 또는 I.h의 화학 단위체인 것을 특징으로 한다. 일부 구현예에서, 제공된 조성물은, 상기 조성물 중 식 I의 화학 단위체의 총량의 제1 역치 양이 식 I.a, I.b.1, I.b.2, I.c, I.d, I.e, I.f, I.g, 또는 I.h의 화학 단위체인 것을 특징으로 한다.

[0093] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 식의 "화학 단위체"는 식의 화합물, 이의 약제학적으로 허용가능한 염, 이의 용매화물, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염의 용매화물이다.

[0094] 일부 구현예에서, 제1 역치 양은 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%이다. 일부 구현예에서, 제1 역치 양은 50%이다. 일부 구현예에서, 제1 역치 양은 70%이다. 일부 구현예에서, 제1 역치 양은 80%이다. 일부 구현예에서, 제1 역치 양은 95%이다.

[0095] 일부 구현예에서, 본 조성물은, 상기 조성물 중 식 I의 화학 단위체의 총량의 제1 역치 양 이상이 식 I.a의 화학 단위체인 것을 특징으로 한다. 일부 구현예에서, 본 조성물은, 상기 조성물 중 식 I의 화학 단위체의 총량의 제1 역치 양 초과가 식 I.a의 화학 단위체인 것을 특징으로 한다. 일부 구현예에서, 본 조성물은, 상기 조성물 중 식 I의 화학 단위체의 총량의 제1 역치 양이 식 I.a의 화학 단위체인 것을 특징으로 한다. 일부 구현예에서, 제1 역치 양은 50%이다. 일부 구현예에서, 제1 역치 양은 70%이다. 일부 구현예에서, 제1 역치 양은 80%이다. 일부 구현예에서, 제1 역치 양은 90%이다. 일부 구현예에서, 제1 역치 양은 95%이다.

[0096] 일부 구현예에서, 본 조성물은, 상기 조성물 중 식 I의 화학 단위체의 총량의 제1 역치 양 이상이 식 I.b.1의 화학 단위체인 것을 특징으로 한다. 일부 구현예에서, 본 조성물은, 상기 조성물 중 식 I의 화학 단위체의 총량의 제1 역치 양 초과가 식 I.b.1의 화학 단위체인 것을 특징으로 한다. 일부 구현예에서, 본 조성물은, 상기 조성물 중 식 I의 화학 단위체의 총량의 제1 역치 양이 식 I.b.1의 화학 단위체인 것을 특징으로 한다. 일부 구현예에서, 제1 역치 양은 25%이다. 일부 구현예에서, 제1 역치 양은 50%이다. 일부 구현예에서, 제1 역치 양은 70%이다. 일부 구현예에서, 제1 역치 양은 80%이다. 일부 구현예에서, 제1 역치 양은 90%이다. 일부 구현예에서, 제1 역치 양은 95%이다.

[0097] 일부 구현예에서, 본 조성물은, 상기 조성물 중 식 I의 화학 단위체의 총량의 제1 역치 양 이상이 식 I.b.2의 화학 단위체인 것을 특징으로 한다. 일부 구현예에서, 본 조성물은, 상기 조성물 중 식 I의 화학 단위체의 총량의 제1 역치 양 초과가 식 I.b.2의 화학 단위체인 것을 특징으로 한다. 일부 구현예에서, 본 조성물은, 상기 조성물 중 식 I의 화학 단위체의 총량의 제1 역치 양이 식 I.b.2의 화학 단위체인 것을 특징으로 한다. 일부 구현예에서, 제1 역치 양은 25%이다. 일부 구현예에서, 제1 역치 양은 50%이다. 일부 구현예에서, 제1 역치 양은 70%이다. 일부 구현예에서, 제1 역치 양은 80%이다. 일부 구현예에서, 제1 역치 양은 90%이다. 일부 구현예에서, 제1 역치 양은 95%이다.

[0098] 일부 구현예에서, 본 조성물인 것을 특징으로 한다 상기 조성물 중 식 I의 화학 단위체의 총량의 제1 역치 양 이상이 식 I.c의 화학 단위체인 것을 특징으로 한다. 일부 구현예에서, 본 조성물인 것을 특징으로 한다 상기 조성물 중 식 I의 화학 단위체의 총량의 제1 역치 양 초과가 식 I.c의 화학 단위체인 것을 특징으로 한다. 일부 구현예에서, 본 조성물은, 상기 조성물 중 식 I의 화학 단위체의 총량의 제1 역치 양이 식 I.c의 화학 단위체인 것을 특징으로 한다. 일부 구현예에서, 제1 역치 양은 6.25%이다. 일부 구현예에서, 제1 역치 양은 12.5%이다. 일부 구현예에서, 제1 역치 양은 25%이다. 일부 구현예에서, 제1 역치 양은 50%이다. 일부 구현예에서, 제1 역치 양은 70%이다. 일부 구현예에서, 제1 역치 양은 80%이다. 일부 구현예에서, 제1 역치 양은 90%이다. 일부 구현예에서, 제1 역치 양은 95%이다.

[0099] 일부 구현예에서, 본 조성물은, 상기 조성물 중 식 I의 화학 단위체의 총량의 제1 역치 양 이상이 식 I.d의 화학 단위체인 것을 특징으로 한다. 일부 구현예에서, 본 조성물은, 상기 조성물 중 식 I의 화학 단위체의 총량의 제1 역치 양 초과가 식 I.d의 화학 단위체인 것을 특징으로 한다. 일부 구현예에서, 본 조성물은, 상기 조성물 중 식 I의 화학 단위체의 총량의 제1 역치 양이 식 I.d의 화학 단위체인 것을 특징으로 한다. 일부 구현예에서, 제1 역치 양은 6.25%이다. 일부 구현예에서, 제1 역치 양은 12.5%이다. 일부 구현예에서, 제1 역치 양은 25%이

다. 일부 구현예에서, 제1 역치 양은 50%이다. 일부 구현예에서, 제1 역치 양은 70%이다. 일부 구현예에서, 제1 역치 양은 80%이다. 일부 구현예에서, 제1 역치 양은 90%이다. 일부 구현예에서, 제1 역치 양은 95%이다.

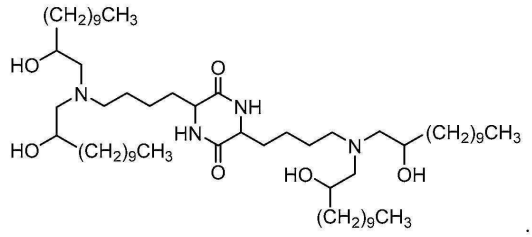
[0100] 일부 구현예에서, 본 조성물은, 상기 조성물 중 식 I의 화학 단위체의 총량의 제1 역치 양 이상이 식 I.e의 화학 단위체인 것을 특징으로 한다. 일부 구현예에서, 본 조성물은, 상기 조성물 중 식 I의 화학 단위체의 총량의 제1 역치 양 초과가 식 I.e의 화학 단위체인 것을 특징으로 한다. 일부 구현예에서, 본 조성물은, 상기 조성물 중 식 I의 화학 단위체의 총량의 제1 역치 양이 식 I.e의 화학 단위체인 것을 특징으로 한다. 일부 구현예에서, 제1 역치 양은 25%이다. 일부 구현예에서, 제1 역치 양은 50%이다. 일부 구현예에서, 제1 역치 양은 70%이다. 일부 구현예에서, 제1 역치 양은 80%이다. 일부 구현예에서, 제1 역치 양은 90%이다. 일부 구현예에서, 제1 역치 양은 95%이다.

[0101] 일부 구현예에서, 본 조성물은, 상기 조성물 중 식 I의 화학 단위체의 총량의 제1 역치 양 이상이 식 I.f의 화학 단위체인 것을 특징으로 한다. 일부 구현예에서, 본 조성물은, 상기 조성물 중 식 I의 화학 단위체의 총량의 제1 역치 양 초과가 식 I.f의 화학 단위체인 것을 특징으로 한다. 일부 구현예에서, 본 조성물은, 상기 조성물 중 식 I의 화학 단위체의 총량의 제1 역치 양이 식 I.f의 화학 단위체인 것을 특징으로 한다. 일부 구현예에서, 제1 역치 양은 25%이다. 일부 구현예에서, 제1 역치 양은 50%이다. 일부 구현예에서, 제1 역치 양은 70%이다. 일부 구현예에서, 제1 역치 양은 80%이다. 일부 구현예에서, 제1 역치 양은 90%이다. 일부 구현예에서, 제1 역치 양은 95%이다.

[0102] 일부 구현예에서, 본 조성물은, 상기 조성물 중 식 I의 화학 단위체의 총량의 제1 역치 양 이상이 식 I.g의 화학 단위체인 것을 특징으로 한다. 일부 구현예에서, 본 조성물은, 상기 조성물 중 식 I의 화학 단위체의 총량의 제1 역치 양 초과가 식 I.g의 화학 단위체인 것을 특징으로 한다. 일부 구현예에서, 본 조성물은, 상기 조성물 중 식 I의 화학 단위체의 총량의 제1 역치 양이 식 I.g의 화학 단위체인 것을 특징으로 한다. 일부 구현예에서, 제1 역치 양은 12.5%이다. 일부 구현예에서, 제1 역치 양은 25%이다. 일부 구현예에서, 제1 역치 양은 50%이다. 일부 구현예에서, 제1 역치 양은 70%이다. 일부 구현예에서, 제1 역치 양은 80%이다. 일부 구현예에서, 제1 역치 양은 90%이다. 일부 구현예에서, 제1 역치 양은 95%이다.

[0103] 일부 구현예에서, 본 조성물은, 상기 조성물 중 식 I의 화학 단위체의 총량의 제1 역치 양 이상이 식 I.h의 화학 단위체인 것을 특징으로 한다. 일부 구현예에서, 본 조성물은, 상기 조성물 중 식 I의 화학 단위체의 총량의 제1 역치 양 초과가 식 I.h의 화학 단위체인 것을 특징으로 한다. 일부 구현예에서, 본 조성물은, 상기 조성물 중 식 I의 화학 단위체의 총량의 제1 역치 양이 식 I.h의 화학 단위체인 것을 특징으로 한다. 일부 구현예에서, 제1 역치 양은 25%이다. 일부 구현예에서, 제1 역치 양은 50%이다. 일부 구현예에서, 제1 역치 양은 70%이다. 일부 구현예에서, 제1 역치 양은 80%이다. 일부 구현예에서, 제1 역치 양은 90%이다. 일부 구현예에서, 제1 역치 양은 95%이다.

[0104] 일부 구현예에서, 본 발명은 식 I의 1종 이상의 화학 단위체를 포함하는 조성물을 제공하고, 상기 단위체 각각은 식 I의 화합물:



I

[0105] ,

[0106] 이의 약제학적으로 허용가능한 염, 이의 용매화물, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염의 용매화물이고,

[0107] 상기 조성물은, 상기 조성물 중 식 I의 화학 단위체의 총량의 제1 역치 양 이상이 식 I.a, I.b.1, I.b.2, I.c, I.d, I.e, I.f, I.g, 및 I.h로부터 선택된 제1 식의 화학 독립제인 것을 특징으로 하고;

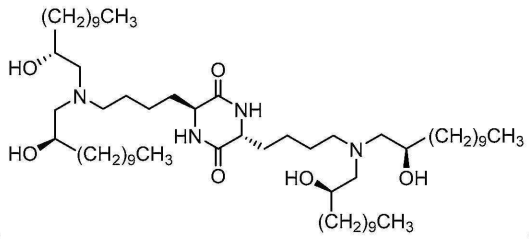
[0108] 상기 조성물 중 제1 식의 화학 단위체의 총량의 제2 역치 양 이상은 제1 식의 동일한 입체이성질체의 화학 단위체이다.

[0109] 일부 구현예에서, 상기 조성물 중 식 I의 화학 단위체의 총량의 제1 역치 양 초과는 식 I.a, I.b.1, I.b.2, I.c, I.d, I.e, I.f, I.g, 및 I.h로부터 선택된 제1 식의 화학 단위체이다. 일부 구현예에서, 상기 조성물 중

식 I의 화학 단위체의 총량의 제1 역치 양은 식 I.a, I.b.1, I.b.2, I.c, I.d, I.e, I.f, I.g, 및 I.h로부터 선택된 제1 식의 화학 단위체이다. 일부 구현예에서, 상기 조성물 중 제1 식의 화학 단위체의 총량의 제2 역치 양 초과는 제1 식의 동일한 입체이성질체의 화학 단위체이다. 일부 구현예에서, 상기 조성물 중 제1 식의 화학 단위체의 총량의 제2 역치 양은 제1 식의 동일한 입체이성질체의 화학 단위체이다.

[0110] 일부 구현예에서, 제1 식은 식 I.a이다. 일부 구현예에서, 상기 조성물 중 식 I의 화학 단위체의 총량의 제1 역치 양 이상은 식 I.a의 화학 단위체이고, 그리고 조성물 중 식 I.a의 화학 단위체의 총량의 제2 역치 양 이상은 식 I.a의 동일한 입체이성질체의 화학 단위체이다.

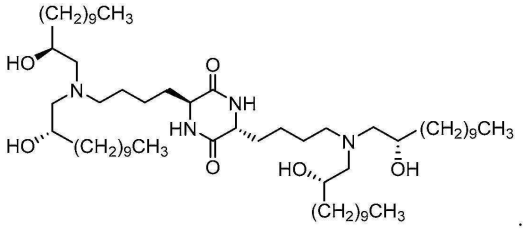
[0111] 일부 구현예에서, 식 I.a의 입체이성질체는 식 I.a.i의 구조를 갖는다:



[0112] .

[0113] I.a.i (즉, *R4-SR-cKK-E12*)

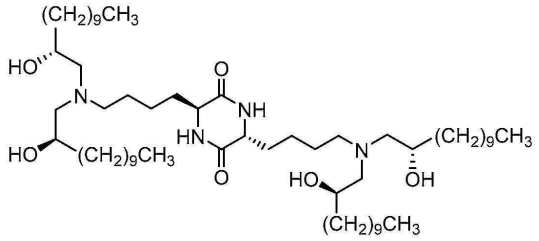
[0114] 일부 구현예에서, 식 I.a의 입체이성질체는 식 I.a.ii의 구조를 갖는다:



[0115] .

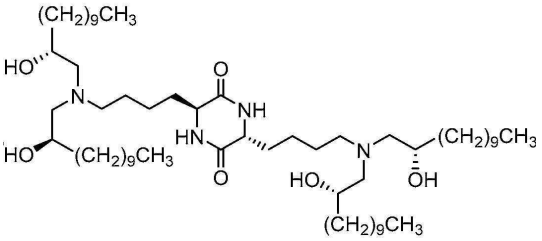
[0116] I.a.ii (즉, *S4-SR-cKK-E12*)

[0117] 일부 구현예에서, 식 I.a의 입체이성질체는 식 I.a.iii의 구조를 갖는다:



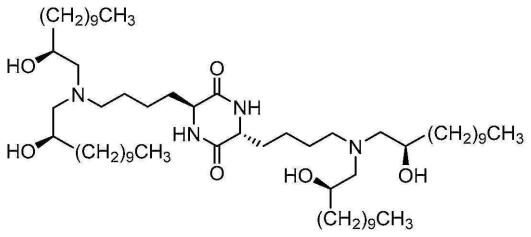
[0118] **I.a.iii** .

[0119] 일부 구현예에서, 식 I.a의 입체이성질체는 식 I.a.iv의 구조를 갖는다:



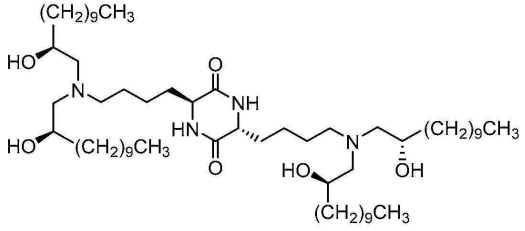
[0120] **I.a.iv** .

[0121] 일부 구현예에서, 식 I.a의 입체이성질체는 식 I.a.v의 구조를 갖는다:



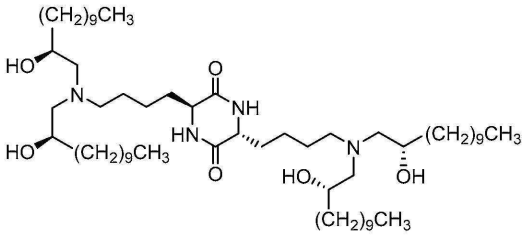
[0122] **I.a.v** .

[0123] 일부 구현예에서, 식 I.a의 입체이성질체는 식 I.a.vi의 구조를 갖는다:



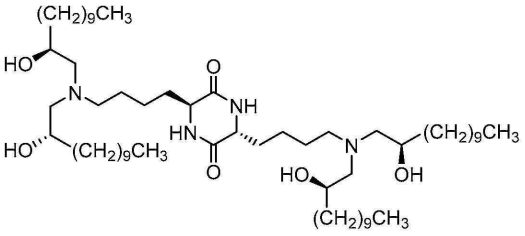
[0124] **I.a.vi** .

[0125] 일부 구현예에서, 식 I.a의 입체이성질체는 식 I.a.vii의 구조를 갖는다:



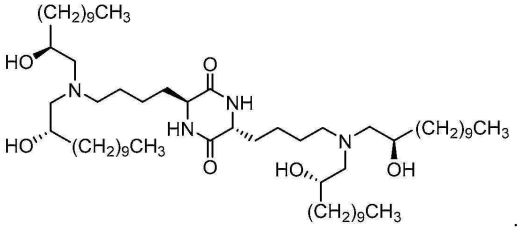
[0126] **I.a.vii** .

[0127] 일부 구현예에서, 식 I.a의 입체이성질체는 식 I.a.viii의 구조를 갖는다:



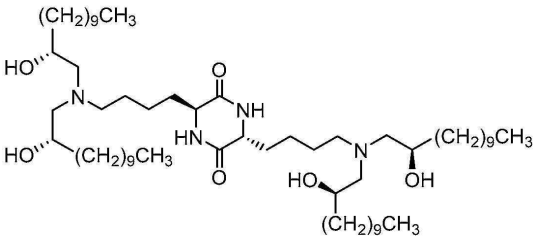
[0128] **I.a.viii** .

[0129] 일부 구현예에서, 식 I.a의 입체이성질체는 식 I.a.ix의 구조를 갖는다:



[0130] **I.a.ix** .

[0131] 일부 구현예에서, 식 I.a의 입체이성질체는 식 I.a.x의 구조를 갖는다:



[0132] **I.a.x**

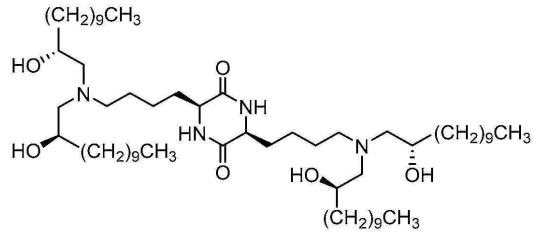
[0133] 일부 구현예에서, 조성물 중 식 I.a의 화학 단위체의 총량의 제2 역치 양 이상은 식 I.a.i의 화학 단위체이다. 일부 구현예에서, 조성물 중 식 I.a의 화학 단위체의 총량의 제2 역치 양 이상은 식 I.a.ii의 화학 단위체이다. 일부 구현예에서, 조성물 중 식 I.a의 화학 단위체의 총량의 제2 역치 양 이상은 식 I.a.iii의 화학 단위체이다. 일부 구현예에서, 조성물 중 식 I.a의 화학 단위체의 총량의 제2 역치 양 이상은 식 I.a.iv의 화학 단위체이다. 일부 구현예에서, 조성물 중 식 I.a의 화학 단위체의 총량의 제2 역치 양 이상은 식 I.a.v의 화학 단위체이다. 일부 구현예에서, 조성물 중 식 I.a의 화학 단위체의 총량의 제2 역치 양 이상은 식 I.a.vi의 화학 단위체이다. 일부 구현예에서, 조성물 중 식 I.a의 화학 단위체의 총량의 제2 역치 양 이상은 식 I.a.vii의 화학 단위체이다. 일부 구현예에서, 조성물 중 식 I.a의 화학 단위체의 총량의 제2 역치 양 이상은 식 I.a.viii의 화학 단위체이다. 일부 구현예에서, 조성물 중 식 I.a의 화학 단위체의 총량의 제2 역치 양 이상은 식 I.a.ix의 화학 단위체이다.

[0134] 일부 구현예에서, 제1 식은 식 I.b.1이다. 일부 구현예에서, 상기 조성물 중 식 I의 화학 단위체의 총량의 제1 역치 양 이상은 식 I.b.1의 화학 단위체이고, 그리고 조성물 중 식 I.b.1의 화학 단위체의 총량의 제2 역치 양 이상은 식 I.b.1의 동일한 입체이성질체의 화학 단위체이다.

[0135] 일부 구현예에서, 식 I.b.1의 입체이성질체는 식 I.b.1.i (*즉, R4-SS-cKK-E12*)의 구조를 갖는다.

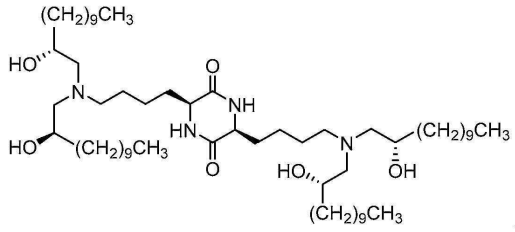
[0136] 일부 구현예에서, 식 I.b.1의 입체이성질체는 식 I.b.1.ii (*즉, S4-SS-cKK-E12*)의 구조를 갖는다.

[0137] 일부 구현예에서, 식 I.b.1의 입체이성질체는 식 I.b.1.iii의 구조를 갖는다:



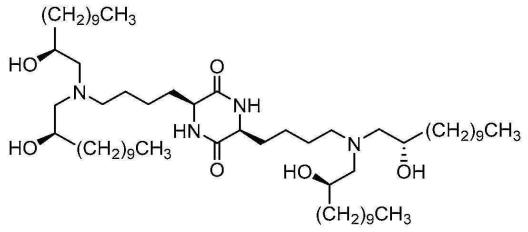
[0138] **I.b.1.iii**

[0139] 일부 구현예에서, 식 I.b.1의 입체이성질체는 식 I.b.1.iv의 구조를 갖는다:



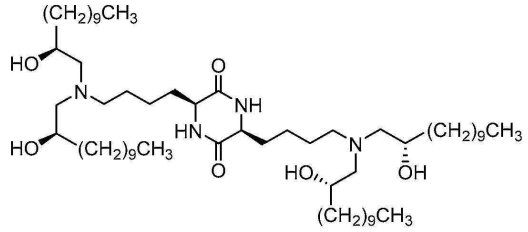
[0140] **I.b.1.iv**

[0141] 일부 구현예에서, 식 I.b.1의 입체이성질체는 식 I.b.1.v의 구조를 갖는다:



[0142] **I.b.1.v**

[0143] 일부 구현예에서, 식 I.b.1의 입체이성질체는 식 I.b.1.vi의 구조를 갖는다:



[0144] **I.b.1.vi**

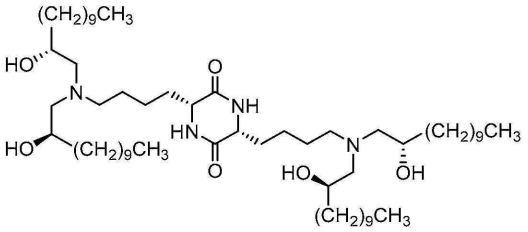
[0145] 일부 구현예에서, 조성물 중 식 I.b.1의 화학 단위체의 총량의 제2 역치 양 이상은 식 I.b.1.i의 화학 단위체이다. 일부 구현예에서, 조성물 중 식 I.b.1의 화학 단위체의 총량의 제2 역치 양 이상은 식 I.b.1.ii의 화학 단위체이다. 일부 구현예에서, 조성물 중 식 I.b.1의 화학 단위체의 총량의 제2 역치 양 이상은 식 I.b.1.iii의 화학 단위체이다. 일부 구현예에서, 조성물 중 식 I.b.1의 화학 단위체의 총량의 제2 역치 양 이상은 식 I.b.1.iv의 화학 단위체이다. 일부 구현예에서, 조성물 중 식 I.b.1의 화학 단위체의 총량의 제2 역치 양 이상은 식 I.b.1.v의 화학 단위체이다. 일부 구현예에서, 조성물 중 식 I.b.1의 화학 단위체의 총량의 제2 역치 양 이상은 식 I.b.1.vi의 화학 단위체이다.

[0146] 일부 구현예에서, 제1 식은 식 I.b.2이다. 일부 구현예에서, 상기 조성물 중 식 I의 화학 단위체의 총량의 제1 역치 양 이상은 식 I.b.2의 화학 단위체, 및 조성물 중 식 I.b.2의 화학 단위체의 총량의 제2 역치 양 이상은 식 I.b.2의 동일한 입체이성질체의 화학 단위체이다.

[0147] 일부 구현예에서, 식 I.b.2의 입체이성질체는 식 I.b.2.i (*즉, R4-RR-cKK-E12*)이다.

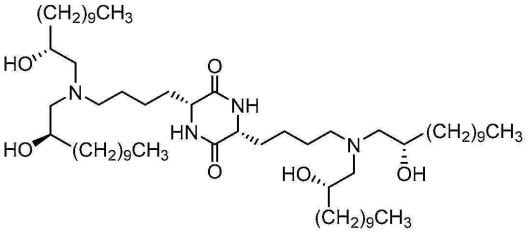
[0148] 일부 구현예에서, 식 I.b.2의 입체이성질체는 식 I.b.2.ii (*즉, S4-RR-cKK-E12*)이다.

[0149] 일부 구현예에서, 식 I.b.2의 입체이성질체는 식 I.b.2.iii의 구조를 갖는다:



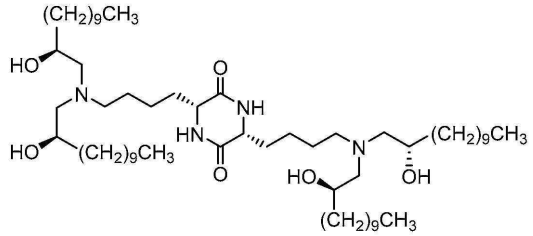
[0150] **I.b.2.iii**

[0151] 일부 구현예에서, 식 I.b.2의 입체이성질체는 식 I.b.2.iv의 구조를 갖는다:



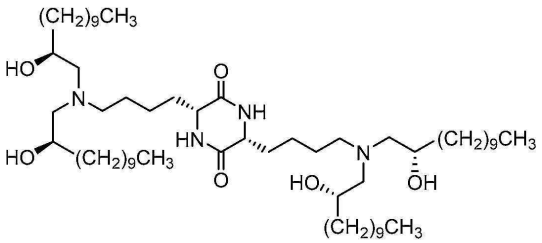
[0152] **I.b.2.iv**

[0153] 일부 구현예에서, 식 I.b.2의 입체이성질체는 식 I.b.2.v의 구조를 갖는다:



[0154] **I.b.2.v**

[0155] 일부 구현예에서, 식 I.b.2의 입체이성질체는 식 I.b.2.vi의 구조를 갖는다:



[0156] **I.b.2.vi**

[0157] 일부 구현예에서, 조성물 중 식 I.b.2의 화학 단위체의 총량의 제2 역치 양 이상은 식 I.b.2.i의 화학 단위체이다. 일부 구현예에서, 조성물 중 식 I.b.2의 화학 단위체의 총량의 제2 역치 양 이상은 식 I.b.2.ii의 화학 단위체이다. 일부 구현예에서, 조성물 중 식 I.b.2의 화학 단위체의 총량의 제2 역치 양 이상은 식 I.b.2.iii의 화학 단위체이다. 일부 구현예에서, 조성물 중 식 I.b.2의 화학 단위체의 총량의 제2 역치 양 이상은 식 I.b.2.iv의 화학 단위체이다. 일부 구현예에서, 조성물 중 식 I.b.2의 화학 단위체의 총량의 제2 역치 양 이상은 식 I.b.2.v의 화학 단위체이다. 일부 구현예에서, 조성물 중 식 I.b.2의 화학 단위체의 총량의 제2 역치 양 이상은 식 I.b.2.vi의 화학 단위체이다.

[0158] 일부 구현예에서, 제1 식은 식 I.c이다. 일부 구현예에서, 상기 조성물 중 식 I의 화학 단위체의 총량의 제1 역치 양 이상은 식 I.c의 화학 단위체이고, 조성물 중식 I.c의 화학 단위체의 총량의 제2 역치 양 이상은 식 I.c의 동일한 입체이성질체의 화학 단위체이다. 일부 구현예에서, 식 I.c의 입체이성질체는 식 I.a.i의 구조를 갖는다. 일부 구현예에서, 식 I.c의 입체이성질체는 식 I.b.1.i의 구조를 갖는다. 일부 구현예에서, 식 I.c의 입체이성질체는 식 I.b.2.i의 구조를 갖는다. 일부 구현예에서, 상기 조성물 중 식 I.c의 화학 단위체의 총량의 제2 역치 양 이상은 식 I.a.i의 화학 단위체이다. 일부 구현예에서, 상기 조성물 중 식 I.c의 화학 단위체의 총량의 제2 역치 양 이상은 식 I.b.1.i의 화학 단위체이다. 일부 구현예에서, 조성물 중 식 I.c의 화학 단위체의 총량의 제2 역치 양 이상은 식 I.b.2.i의 화학 단위체이다.

[0159] 일부 구현예에서, 제1 식은 식 I.d이다. 일부 구현예에서, 상기 조성물 중 식 I의 화학 단위체의 총량의 제1 역치 양 이상은 식 I.d의 화학 단위체이고, 그리고 상기 조성물 중 식 I.d의 화학 단위체의 제2 역치 양 이상은 식 I.d의 동일한 입체이성질체의 화학 단위체이다. 일부 구현예에서, 식 I.d의 입체이성질체는 식 I.a.ii의 구조를 갖는다. 일부 구현예에서, 식 I.d의 입체이성질체는 식 I.b.1.ii의 구조를 갖는다. 일부 구현예에서, 식 I.d의 입체이성질체는 식 I.b.2.ii의 구조를 갖는다. 일부 구현예에서, 조성물 중 식 I.d의 화학 단위체의 총량의 제2 역치 양 이상은 식 I.a.ii의 화학 단위체이다. 일부 구현예에서, 조성물 중 식 I.d의 화학 단위체의 총량의 제2 역치 양 이상은 식 I.b.1.ii의 화학 단위체이다. 일부 구현예에서, 조성물 중 식 I.d의 화학 단위체의 총량의 제2 역치 양 이상은 식 I.b.2.ii의 화학 단위체이다.

[0160] 일부 구현예에서, 제1 식은 식 I.e이다. 일부 구현예에서, 상기 조성물 중 식 I의 화학 단위체의 총량의 제1 역치 양 이상은 식 I.e의 화학 단위체이고, 조성물 중 식 I.e의 화학 단위체의 총량의 제2 역치 양 이상은 식 I.e의 동일한 입체이성질체의 화학 단위체이다. 일부 구현예에서, 식 I.e의 입체이성질체는 식 I.a.iii의 구조를 갖는다. 일부 구현예에서, 식 I.e의 입체이성질체는 식 I.a.v의 구조를 갖는다. 일부 구현예에서, 식 I.e의 입체이성질체는 식 I.b.1.iii의 구조를 갖는다. 일부 구현예에서, 식 I.e의 입체이성질체는 식 I.b.2.iii의 구조를 갖는다. 일부 구현예에서, 조성물 중 식 I.e의 화학 단위체의 총량의 제2 역치 양 이상은 식 I.a.iii의 화학

단위체이다. 일부 구현예에서, 조성물 중 식 I.e의 화학 단위체의 총량의 제2 역치 양 이상은 식 I.a.v의 화학 단위체이다. 일부 구현예에서, 조성물 중 식 I.e의 화학 단위체의 총량의 제2 역치 양 이상은 식 I.b.1.iii의 화학 단위체이다. 일부 구현예에서, 조성물 중 식 I.e의 화학 단위체의 총량의 제2 역치 양 이상은 식 I.b.2.iii의 화학 단위체이다.

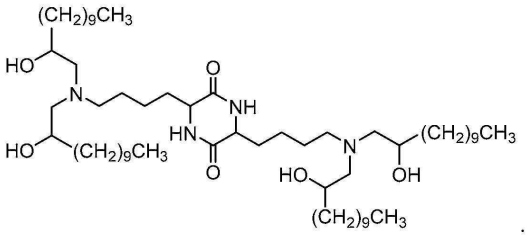
[0161] 일부 구현예에서, 제1 식은 식 I.f이다. 일부 구현예에서, 상기 조성물 중 식 I의 화학 단위체의 총량의 제1 역치 양 이상은 식 I.f의 화학 단위체이고, 그리고 상기 조성물 중 식 I.f의 화학 단위체의 제2 역치 양 이상은 식 I.f의 동일한 입체이성질체의 화학 단위체이다. 일부 구현예에서, 식 I.f의 입체이성질체는 식 I.a.vii의 구조를 갖는다. 일부 구현예에서, 식 I.f의 입체이성질체는 식 I.a.ix의 구조를 갖는다. 일부 구현예에서, 식 I.f의 입체이성질체는 식 I.b.1.vi의 구조를 갖는다. 일부 구현예에서, 식 I.f의 입체이성질체는 식 I.b.2.vi의 구조를 갖는다. 일부 구현예에서, 조성물 중 식 I.f의 화학 단위체의 총량의 제2 역치 양 이상은 식 I.a.iii의 화학 단위체이다. 일부 구현예에서, 조성물 중 식 I.f의 화학 단위체의 총량의 제2 역치 양 이상은 식 I.a.ix의 화학 단위체이다. 일부 구현예에서, 조성물 중 식 I.f의 화학 단위체의 총량의 제2 역치 양 이상은 식 I.b.1.vi의 화학 단위체이다. 일부 구현예에서, 조성물 중 식 I.f의 화학 단위체의 총량의 제2 역치 양 이상은 식 I.b.2.vi의 화학 단위체이다.

[0162] 일부 구현예에서, 제1 식은 식 I.g이다. 일부 구현예에서, 상기 조성물 중 식 I의 화학 단위체의 총량의 제1 역치 양 이상은 식 I.g의 화학 단위체이고, 그리고 상기 조성물 중 식 I.g의 화학 단위체의 제2 역치 양 이상은 식 I.g의 동일한 입체이성질체의 화학 단위체이다. 일부 구현예에서, 식 I.g의 입체이성질체는 식 I.a.iv의 구조를 갖는다. 일부 구현예에서, 식 I.g의 입체이성질체는 식 I.a.viii의 구조를 갖는다. 일부 구현예에서, 식 I.g의 입체이성질체는 식 I.b.1.iv의 구조를 갖는다. 일부 구현예에서, 식 I.g의 입체이성질체는 식 I.b.2.iv의 구조를 갖는다. 일부 구현예에서, 조성물 중 식 I.g의 화학 단위체의 총량의 제2 역치 양 이상은 식 I.a.iv의 화학 단위체이다. 일부 구현예에서, 조성물 중 식 I.g의 화학 단위체의 총량의 제2 역치 양 이상은 식 I.a.viii의 화학 단위체이다. 일부 구현예에서, 조성물 중 식 I.g의 화학 단위체의 총량의 제2 역치 양 이상은 식 I.b.1.iv의 화학 단위체이다. 일부 구현예에서, 조성물 중 식 I.g의 화학 단위체의 총량의 제2 역치 양 이상은 식 I.b.2.iv의 화학 단위체이다.

[0163] 일부 구현예에서, 제1 식은 식 I.h이다. 일부 구현예에서, 상기 조성물 중 식 I의 화학 단위체의 총량의 제1 역치 양 이상은 식 I.h의 화학 단위체이고, 그리고 상기 조성물 중 식 I.h의 화학 단위체의 제2 역치 양 이상은 식 I.h의 동일한 입체이성질체의 화학 단위체이다. 일부 구현예에서, 식 I.h의 입체이성질체는 식 I.a.vi의 구조를 갖는다. 일부 구현예에서, 식 I.h의 입체이성질체는 식 I.b.1.v의 구조를 갖는다. 일부 구현예에서, 식 I.h의 입체이성질체는 식 I.b.2.v의 구조를 갖는다. 일부 구현예에서, 상기 조성물 중 식 I.h의 화학 단위체의 총량의 제2 역치 양 이상은 식 I.a.vi의 화학 단위체이다. 일부 구현예에서, 상기 조성물 중 식 I.h의 화학 단위체의 총량의 제2 역치 양 이상은 식 I.b.1.v의 화학 단위체이다. 일부 구현예에서, 상기 조성물 중 식 I.h의 화학 단위체의 총량의 제2 역치 양 이상은 식 I.b.2.v의 화학 단위체이다.

[0164] 일부 구현예에서, 제2 역치 양은 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%이다. 일부 구현예에서, 제2 역치 양은 50%이다. 일부 구현예에서, 제2 역치 양은 70%이다. 일부 구현예에서, 제2 역치 양은 80%이다. 일부 구현예에서, 제2 역치 양은 85%이다. 일부 구현예에서, 제2 역치 양은 90%이다. 일부 구현예에서, 제2 역치 양은 95%이다.

[0165] 일부 구현예에서, 본 발명은 식 I의 1종 이상의 화학 단위체를 포함하는 조성물을 제공하고, 상기 단위체 각각은 식 I의 화합물:



.

[0166] I ,

[0167] 이의 약제학적으로 허용가능한 염, 이의 용매화물, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염의 용매화물이고,

[0168] 상기 조성물은, 조성물 중 식 I의 화학 단위체의 총량의 제3 역치 양 이상이 식 I의 화학 단위체인 것을 특징으

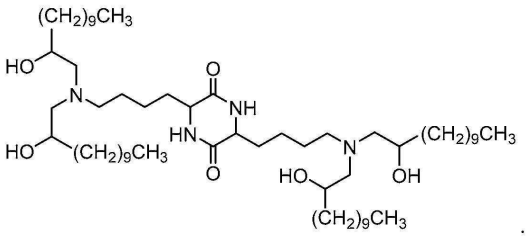
로 한다.

[0169] 일부 구현예에서, 제공된 조성물은, 상기 조성물 중 식 I의 화학 단위체의 총량의 제3 역치 양 초과는 식 I의 화학 단위체인 것을 특징으로 한다. 일부 구현예에서, 제공된 조성물은, 조성물 중 식 I의 화학 단위체의 총량의 제3 역치 양은 식 I의 화학 단위체인 것을 특징으로 한다.

[0170] 일부 구현예에서, 제공된 조성물은, 조성물 중 식 I의 화학 단위체의 총량의 제3 역치 양 이상이 식 I.a, I.b.1, I.b.2, I.c, I.d, I.e, I.f, I.g, 또는 I.h의 화학 단위체인 것을 특징으로 한다. 일부 구현예에서, 제공된 조성물은, 조성물 중 식 I의 화학 단위체의 총량의 제3 역치 양 이상이 식 I.a의 화학 단위체인 것을 특징으로 한다. 일부 구현예에서, 제공된 조성물은, 조성물 중 식 I의 화학 단위체의 총량의 제3 역치 양 이상이 식 I.b.1의 화학 단위체인 것을 특징으로 한다. 일부 구현예에서, 제공된 조성물은, 조성물 중 식 I의 화학 단위체의 총량의 제3 역치 양 이상이 식 I.b.2의 화학 단위체인 것을 특징으로 한다. 일부 구현예에서, 제공된 조성물은, 조성물 중 식 I의 화학 단위체의 총량의 제3 역치 양 이상이 식 I.c의 화학 단위체인 것을 특징으로 한다. 일. 일부 구현예에서, 제공된 조성물은, 조성물 중 식 I의 화학 단위체의 총량의 제3 역치 양 이상이 식 I.d의 화학 단위체인 것을 특징으로 한다. 일부 구현예에서, 제공된 조성물은, 조성물 중 식 I의 화학 단위체의 총량의 제3 역치 양 이상이 식 I.e의 화학 단위체인 것을 특징으로 한다. 일부 구현예에서, 제공된 조성물은, 조성물 중 식 I의 화학 단위체의 총량의 제3 역치 양 이상이 식 I.f의 화학 단위체인 것을 특징으로 한다. 일부 구현예에서, 제공된 조성물은, 조성물 중 식 I의 화학 단위체의 총량의 제3 역치 양 이상이 식 I.g의 화학 단위체인 것을 특징으로 한다. 일부 구현예에서, 제공된 조성물은, 조성물 중 식 I의 화학 단위체의 총량의 제3 역치 양 이상이 식 I.h의 화학 단위체인 것을 특징으로 한다.

[0171] 일부 구현예에서, 제공된 조성물은, 조성물 중 식 I의 화학 단위체의 총량의 제3 역치 양 이상이 식 I.a.i, I.a.ii, I.a.iii, I.a.iv, I.a.v, I.a.vi, I.a.vii, I.a.viii, I.a.ix, I.b.1.i, I.b.1.ii, I.b.1.iii, I.b.1.iv, I.b.1.v, I.b.1.vi, I.b.2.i, I.b.2.ii, I.b.2.iii, I.b.2.iv, I.b.2.v, 및 I.b.2.vi의 화학 단위체인 것을 특징으로 한다.

[0172] 일부 구현예에서, 본 발명은 식 I의 1종 이상의 화학 단위체를 포함하는 조성물을 제공하고, 상기 단위체 각각은 식 I의 화합물:



.

[0173] **I**

,

[0174] 이의 약제학적으로 허용가능한 염, 이의 용매화물, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염의 용매화물이고,

[0175] 상기 조성물은, 조성물 중 식 I의 화학 단위체의 총량의 제3 역치 양 이상이 식 I의 동일한 입체이성질체의 화학 단위체인 것을 특징으로 한다.

[0176] 일부 구현예에서, 제공된 조성물은, 상기 조성물 중 식 I의 화학 단위체의 총량의 제3 역치 양 초과가 식 I의 동일한 입체이성질체의 화학 단위체인 것을 특징으로 한다. 일부 구현예에서, 제공된 조성물은, 조성물 중 식 I의 화학 단위체의 총량의 제3 역치 양은 식 I의 동일한 입체이성질체의 화학 단위체인 것을 특징으로 한다.

[0177] 일부 구현예에서, 식 I의 입체이성질체는 식 I.a.i, I.a.ii, I.a.iii, I.a.iv, I.a.v, I.a.vi, I.a.vii, I.a.viii, 또는 I.a.ix의 구조를 갖는다. 일부 구현예에서, 식 I의 입체이성질체는 식 I.a.i의 구조를 갖는다. 일부 구현예에서, 식 I의 입체이성질체는 식 I.a.ii의 구조를 갖는다. 일부 구현예에서, 식 I의 입체이성질체는 식 I.a.iii의 구조를 갖는다. 일부 구현예에서, 식 I의 입체이성질체는 식 I.a.iv의 구조를 갖는다. 일부 구현예에서, 식 I의 입체이성질체는 식 I.a.v의 구조를 갖는다. 일부 구현예에서, 식 I의 입체이성질체는 식 I.a.vi의 구조를 갖는다. 일부 구현예에서, 식 I의 입체이성질체는 식 I.a.vii의 구조를 갖는다. 일부 구현예에서, 식 I의 입체이성질체는 식 I.a.viii의 구조를 갖는다. 일부 구현예에서, 식 I의 입체이성질체는 식 I.a.ix의 구조를 갖는다.

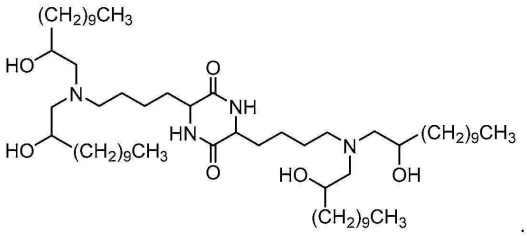
[0178] 일부 구현예에서, 식 I의 입체이성질체는 식 I.b.1.i, I.b.1.ii, I.b.1.iii, I.b.1.iv, I.b.1.v, 또는

I.b.1.vi의 구조를 갖는다. 일부 구현예에서, 식 I의 입체이성질체는 식 I.b.1.i의 구조를 갖는다. 일부 구현예에서, 식 I의 입체이성질체는 식 I.b.1.ii의 구조를 갖는다. 일부 구현예에서, 식 I의 입체이성질체는 식 I.b.1.iii의 구조를 갖는다. 일부 구현예에서, 식 I의 입체이성질체는 식 I.b.1.iv의 구조를 갖는다. 일부 구현예에서, 식 I의 입체이성질체는 식 I.b.1.v의 구조를 갖는다. 일부 구현예에서, 식 I의 입체이성질체는 식 I.b.1.vi의 구조를 갖는다.

[0179] 일부 구현예에서, 식 I의 입체이성질체는 식 I.b.2.i, I.b.2.ii, I.b.2.iii, I.b.2.iv, I.b.2.v, 또는 I.b.2.vi의 구조를 갖는다. 일부 구현예에서, 식 I의 입체이성질체는 식 I.b.2.i의 구조를 갖는다. 일부 구현예에서, 식 I의 입체이성질체는 식 I.b.2.ii의 구조를 갖는다. 일부 구현예에서, 식 I의 입체이성질체는 식 I.b.2.iii의 구조를 갖는다. 일부 구현예에서, 식 I의 입체이성질체는 식 I.b.2.iv의 구조를 갖는다. 일부 구현예에서, 식 I의 입체이성질체는 식 I.b.2.v의 구조를 갖는다. 일부 구현예에서, 식 I의 입체이성질체는 식 I.b.2.vi의 구조를 갖는다.

[0180] 일부 구현예에서, 제3 역치 양은 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% (w/w)이다. 일부 구현예에서, 제3 역치 양은 50% (w/w)이다. 일부 구현예에서, 제3 역치 양은 70% (w/w)이다. 일부 구현예에서, 제3 역치 양은 80% (w/w)이다. 일부 구현예에서, 제3 역치 양은 85% (w/w)이다. 일부 구현예에서, 제3 역치 양은 90% (w/w)이다. 일부 구현예에서, 제3 역치 양은 95% (w/w)이다. 일부 구현예에서, 제3 역치 양은 96% (w/w)이다. 일부 구현예에서, 제3 역치 양은 97% (w/w)이다. 일부 구현예에서, 제3 역치 양은 98% (w/w)이다. 일부 구현예에서, 제3 역치 양은 99% (w/w)이다.

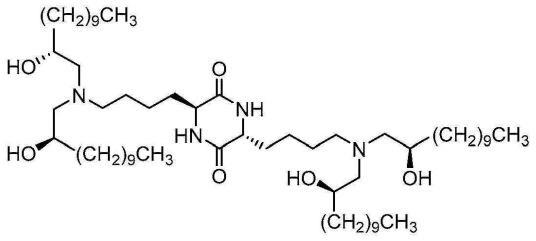
[0181] 일부 구현예에서, 본 발명은 식 I의 1종 이상의 화학 단위체를 포함하는 조성물을 제공하고, 상기 단위체 각각은 식 I의 화합물:



[0182] I

[0183] 이의 약제학적으로 허용가능한 염, 이의 용매화물, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염의 용매화물이고,

[0184] 상기 조성물은, 상기 조성물 중 식 I의 화학 단위체의 총량의 제3 역치 양 초과가 식 I.a.i의 화학 단위체인 것을 특징으로 하고:

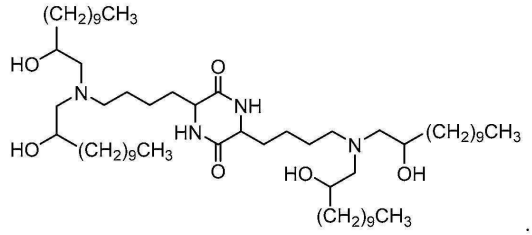


[0185] ,

[0186] I.a.i (즉, *R4-SR-cKK-E12*)

[0187] 상기 제3 역치 양은 50%이다.

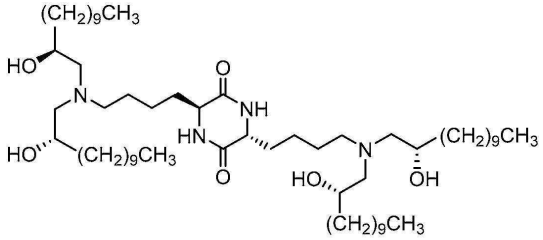
[0188] 일부 구현예에서, 본 발명은 식 I의 1종 이상의 화학 단위체를 포함하는 조성물을 제공하고, 상기 단위체 각각은 식 I의 화합물:



[0189] I ,

[0190] 이의 약제학적으로 허용가능한 염, 이의 용매화물, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염의 용매화물이고,

[0191] 상기 조성물은, 상기 조성물 중 식 I의 화학 단위체의 총량의 제3 역치 양 초과가 식 I.a.ii의 화학 단위체인 것을 특징으로 하고:

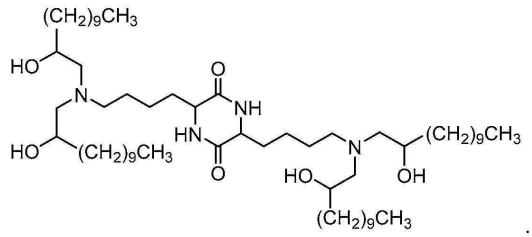


[0192] ,

[0193] I.a.ii (즉, *S4-SR-cKK-E12*)

[0194] 상기 제3 역치 양은 50%이다.

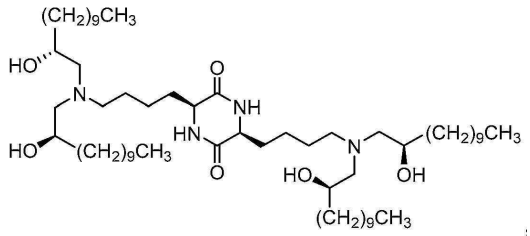
[0195] 일부 구현예에서, 본 발명은 식 I의 1종 이상의 화학 단위체를 포함하는 조성물을 제공하고, 상기 단위체 각각은 식 I의 화합물:



[0196] I ,

[0197] 이의 약제학적으로 허용가능한 염, 이의 용매화물, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염의 용매화물이고,

[0198] 상기 조성물은, 상기 조성물 중 식 I의 화학 단위체의 총량의 제3 역치 양 초과가 식 I.b.1.i의 화학 단위체을 것을 특징으로 하고:

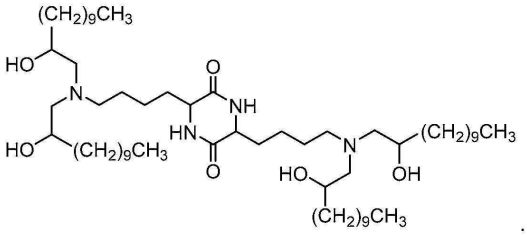


[0199] ,

[0200] I.b.1.i (즉, *R4-SS-cKK-E12*)

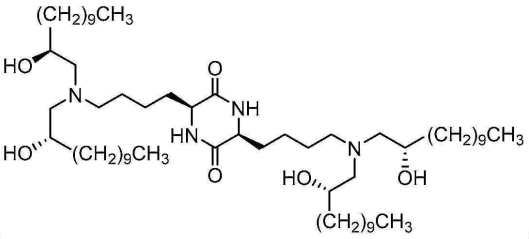
[0201] 상기 제3 역치 양은 50%이다.

[0202] 일부 구현예에서, 본 발명은 식 I의 1종 이상의 화학 단위체를 포함하는 조성물을 제공하고, 상기 단위체 각각은 식 I의 화합물, 이의 약제학적으로 허용가능한 염, 이의 용매화물, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염의 용매화물이고:



[0203] I ,

[0204] 상기 조성물은, 상기 조성물 중 식 I의 화학 단위체의 총량의 제3 역치 양 초과가 식 I.b.1.ii의 화학 단위체인 것을 특징으로 하고:

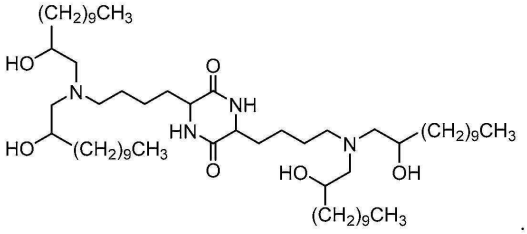


[0205] ,

[0206] I.b.1.ii (즉, *S4-SS-cKK-E12*)

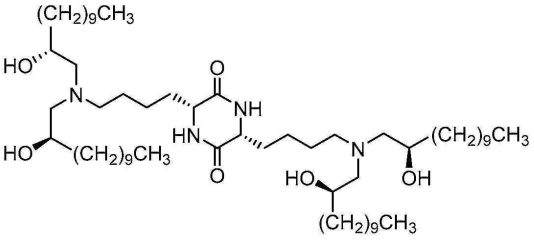
[0207] 상기 제3 역치 양은 50%이다.

[0208] 일부 구현예에서, 본 발명은 식 I의 1종 이상의 화학 단위체를 포함하는 조성물을 제공하고, 상기 단위체 각각은 식 I의 화합물, 이의 약제학적으로 허용가능한 염, 이의 용매화물, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염의 용매화물이고:



[0209] I ,

[0210] 상기 조성물은, 상기 조성물 중 식 I의 화학 단위체의 총량의 제3 역치 양 초과가 식 I.b.2.i의 화학 단위체인 것을 특징으로 하고:

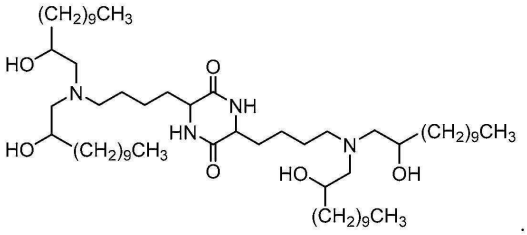


[0211] ,

[0212] I.b.2.i (즉, *R4-RR-cKK-E12*)

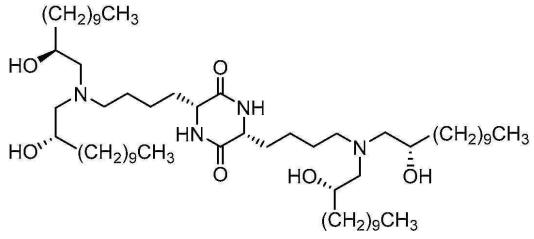
[0213] 상기 제3 역치 양은 50%이다.

[0214] 일부 구현예에서, 본 발명은 식 I의 1종 이상의 화학 단위체를 포함하는 조성물을 제공하고, 상기 단위체 각각은 식 I의 화합물, 이의 약제학적으로 허용가능한 염, 이의 용매화물, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염의 용매화물이고:



[0215] I ,

[0216] 상기 조성물은, 상기 조성물 중 식 I의 화학 단위체의 총량의 제3 역치 양 초과가 식 I.b.2.ii의 화학 단위체인 것을 특징으로 하고:



[0217] ,

[0218] I.b.2.ii (즉, *S4-RR-cKK-E12*)

[0219] 상기 제3 역치 양은 50%이다.

[0220] 일부 구현예에서, 제2 역치 양은 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%이다. 일부 구현예에서, 제2 역치 양은 50%이다. 일부 구현예에서, 제2 역치 양은 70%이다. 일부 구현예에서, 제2 역치 양은 80%이다. 일부 구현예에서, 제2 역치 양은 95%이다.

[0221] ***제제, 예컨대 mRNA의 전달용 리포좀***

[0222] 다른 것들 중에서, 본 발명은 치료제의 전달을 위해 본 명세서에서 기재된 지질 화합물을 포함하는 조성물을 제공한다. 일부 구현예에서, 제공된 조성물은 지질 기반 나노입자, 예컨대 리포좀이다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "리포좀"은 임의의 라멜라, 다중층, 또는 고형 지질 나노입자 소포를 의미한다. 전형적으로, 본 명세서에서 사용된 바와 같은 리포좀은 1종 이상의 지질을 혼합하거나 1종 이상의 지질 및 폴리머(들)을 혼합하여 형성될 수 있다. 따라서, 용어 "리포좀"은, 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 지질 및 폴리머 기반 나노입자 둘 모두를 포함한다. 특히, 본 발명에 따른 리포좀은 본 명세서에서 기재된 지질 화합물을 이온성 지질 성분으로서 편입한다. 비제한적인 예로서, 본 발명에 따른 리포좀은 식 I의 1종 이상의 화학 단위체를 포함하는 조성물을 포함한다. 적합한 리포좀은 제2 또는 추가의 양이온성 지질, 헬퍼 지질 (예를 들면, 비-양이온성 지질 및/또는 콜레스테롤계 지질), PEG-변형된 지질, 및/또는 폴리머를 또한 함유할 수 있다.

[0223] 일부 구현예에서, 양이온성 지질(들) (예를 들면, 식 I의 1종 이상의 화학 단위체를 포함하는 조성물)은 약 30-50% (예를 들면, 약 30-45%, 약 30-40%, 약 35-50%, 약 35-45%, 또는 약 35-40%)%의 리포좀을 몰비로 구성한다. 일부 구현예에서, 양이온성 지질 (예를 들면, 식 I의 1종 이상의 화학 단위체를 포함하는 조성물)은 약 30%, 약 35%, 약 40 %, 약 45%, 또는 약 50%의 리포좀을 몰비로 구성한다. 일부 구현예에서, 리포좀은 제2 지질 또는 추가의 양이온성 지질을 포함한다.

[0224] *제2 또는 추가의 양이온성 지질*

[0225] 일부 구현예에서, 리포좀은 제2 또는 추가의 양이온성 지질을 포함할 수 있다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 어구 "양이온성 지질"은 선택된 pH, 예컨대 생리적 pH에서 순 양전하를 갖는 임의의 수의 지질 종을 의미한다. 몇 개의 양이온성 지질은 상업적으로 이용가능한 많은 문헌에 기재되었다. 본 발명의 조성물 및 방법에서 사용하기 위한 특히 적합한 양이온성 지질은 하기에서 기재된 것들을 포함한다: 국제 특허 공개 WO 2010/053572 (및 특히, 단락 [00225]에서 기재된 C12-200), WO 2012/170930 및 WO 2013063468(이들 각각은 본 명세서에 그 전체가 참고로 편입되어 있음). 특정 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 국제 특허 출원 번호 PCT/US2013/034602 (2013년 3월 29일 출원, 공개 번호 WO 2013/149140, 본 명세서에 참고로 편입되어 있음)에서 기재된 이온화가능 양이온성 지질, 예를 들면, (15Z,18Z)-N,N-디메틸-6-(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디엔-1-일)테트라코사-15,18-디엔-1-아민 (HGT5000), (15Z,18Z)-N,N-디메틸-6-((9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디엔-1-일)테

트라코사-4,15,18-트리엔-1-아민 (HGT5001), 및 (15Z,18Z)-N,N-디메틸-6-((9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디엔-1-일) 테트라코사-5, 15, 18-트리엔-1-아민 (HGT5002)를 포함하는 지질 나노입자를 이용한다.

[0226] 일부 구현예에서, 제2 또는 추가의 양이온성 지질 N-[1-(2,3-디올레일옥시)프로필]-N,N,N-트리메틸염화암모늄 또는 "DOTMA"가 사용된다. (Feigner 등 (Proc. Nat'l Acad. Sci. 84, 7413 (1987); 미국 특허 번호 4,897,355). DOTMA는 단독으로 제형화될 수 있거나 리포좀 수송 비히클 또는 지질 나노입자로의 중성 지질, 디올레오일포스파티딜-에탄올아민 또는 "DOPE" 또는 다른 양이온성 또는 비-양이온성 지질와 조합될 수 있고, 그와 같은 리포좀은 핵산의 표적 세포로의 전달을 향상시키기 위해 사용될 수 있다. 다른 적합한 양이온성 지질은, 예를 들면, 하기를 포함한다: 5-카복시페르밀글리신디옥타데실아미드 또는 "DOGS", 2,3-디올레일옥시-N-[2(스페르민-카복사미도)에틸]-N,N-디메틸-1-프로판아미늄 또는 "DOSPA" (Behr 등 Proc. Nat.'l Acad. Sci. 86, 6982 (1989); 미국 특허 번호 5,171,678; 미국 특허 번호 5,334,761), 1,2-디올레오일-3-디메틸암모늄-프로판 또는 "DODAP", 1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄-프로판 또는 "DOTAP". 추가의 예시적인 양이온성 지질은 또한 하기를 포함한다: 1,2-디스테아릴옥시-N,N-디메틸-3-아미노프로판 또는 "DSDMA", 1,2-디올레일옥시-N,N-디메틸-3-아미노프로판 또는 "DODMA", 1,2-디리놀레일옥시-N,N-디메틸-3-아미노프로판 또는 "DLinDMA", 1,2-디리놀레닐옥시-N,N-디메틸-3-아미노프로판 또는 "DLenDMA", N-디올레일-N,N-디메틸염화암모늄 또는 "DODAC", N,N-디스테아릴-N,N-디메틸암모늄 브로마이드 또는 "DDAB", N-(1,2-디미리스틸옥시프로프-3-일)-N,N-디메틸-N-하이드록시에틸 암모늄 브로마이드 또는 "DMRIE", 3-디메틸아미노-2-(콜레스트-5-엔-3-베타-옥시부탄-4-옥시)-1-(cis,시스-9,12-옥타데카디엔옥시)프로판 또는 "CLinDMA", 2-[5'-(콜레스트-5-엔-3-베타-옥시)-3'-옥사펜톡시)-3-디메틸-1-1-(시스,시스-9', 1-2'-옥타데카디엔옥시)프로판 또는 "CpLinDMA", N,N-디메틸-3,4-디올레일옥시벤질아민 또는 "DMOBA", 1,2-N,N'-디올레일카바밀-3-디메틸아미노프로판 또는 "DOcarbDAP", 2,3-디리놀레오일옥시-N,N-디메틸프로필아민 또는 "DLinDAP", 1,2-N,N'-디리놀레일카바밀-3-디메틸아미노프로판 또는 "DLincarbDAP", 1,2-디리놀레오일카바밀-3-디메틸아미노프로판 또는 "DLinCDAP", 2,2-디리놀레일-4-디메틸아미노메틸-[1,3]-디옥솔란 또는 "DLin- -DMA", 2,2-디리놀레일-4-디메틸아미노에틸-[1,3]-디옥솔란 또는 "DLin-K-XTC2-DMA", 및 2-(2,2-디((9Z,12Z)-옥타데카-9,1 2-디엔- 1-일)-1,3-디옥솔란-4-일)-N,N-디메틸에탄아민 (DLin-KC2-DMA)) (참고, WO 2010/042877; Semple 등, Nature Biotech. 28: 172-176 (2010)), 또는 이들의 혼합물. (Heyes, J., 등, J Controlled Release 107: 276-287 (2005); Morrissey, DV., 등, Nat. Biotechnol. 23(8): 1003-1007 (2005); PCT 공개 WO2005/121348A1). 일부 구현예에서, 양이온성 지질 중 1종 이상은 이미다졸, 디알킬아미노, 또는 구아니디늄 모이어티 중 적어도 하나를 포함한다.

[0227] 일부 구현예에서, 제2 또는 추가의 양이온성 지질은 하기로부터 선택될 수 있다: XTC (2,2-디리놀레일-4-디메틸아미노에틸-[1,3]-디옥솔란), MC3 (((6Z,9Z,28Z,31Z)-헵타트리아콘타-6,9,28,31-테트라엔-19-일 4-(디메틸아미노)부타노에이트), ALNY-100 ((3aR,5s,6aS)-N,N-디메틸-2,2-디((9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디에닐)테트라하이드로-3aH-사이클로펜타[d] [1,3]디옥솔-5-아민)), NC98-5 (4,7,13-트리스(3-옥소-3-(운데실아미노)프로필)-N1,N16-디운데실-4,7,10,13-테트라아자헥사데칸-1,16-디아미드), DODAP (1,2-디올레일-3-디메틸암모늄 프로판), HGT4003 (WO 2012/170889, 이들의 교시는 본 명세서에 그 전체가 참고로 편입되어 있음), ICE (WO 2011/068810, 이들의 교시는 본 명세서에 그 전체가 참고로 편입되어 있음), HGT5000 (국제 특허 공개 WO/2013/149140, 이들의 교시는 본 명세서에 그 전체가 참고로 편입되어 있음) 또는 HGT5001 (시스 또는 트랜스) (WO/2013/149140), 아미노알코올 리피도이드 예컨대 WO2010/053572에서 개시된 것들, DOTAP (1,2-디올레일-3-트리메틸암모늄 프로판), DOTMA (1,2-디-O-옥타데센일-3-트리메틸암모늄 프로판), DLinDMA (Heyes, J.; Palmer, L.; Bremner, K.; MacLachlan, I. "Cationic lipid saturation influences intracellular delivery of encapsulated nucleic acids" J. Contr. Rel. 2005, 107, 276-287), DLin-KC2-DMA (Semple, S.C. 등 "Rational Design of Cationic Lipids for siRNA Delivery" Nature Biotech. 2010, 28, 172-176), C12-200 (Love, K.T. 등 "Lipid-like materials for low-dose in vivo gene silencing" PNAS 2010, 107, 1864-1869).

[0228] *비-양이온성/헬퍼 지질*

[0229] 일부 구현예에서, 제공된 리포좀은 1종 이상의 비-양이온성 ("헬퍼") 지질을 함유한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 어구 "비-양이온성 지질"은 임의의 중성, 쯔비터이온 또는 음이온성 지질을 의미한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 어구 "음이온성 지질"은 선택된 H, 예컨대 생리적 pH에서 순 음전하를 운반하는 임의의 수의 지질 종을 의미한다. 비-양이온성 지질은, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 디스테아로일포스파티딜콜린 (DSPC), 디올레오일포스파티딜콜린 (DOPC), 디팔미토일포스파티딜콜린 (DPPC), 디올레오일포스파티딜글리세롤 (DOPG), 디팔미토일포스파티딜글리세롤 (DPPG), 디올레오일포스파티딜에탄올아민 (DOPE), 팔미토일올레오일포스파티딜콜린 (POPC), 팔미토일올레오일-포스파티딜에탄올아민 (POPE), 디올레오일-포스파티딜에탄올아민 4-(N-말

레이미도메틸)-사이클로헥산-1-카복실레이트 (DOPE-mal), 디팔미토일 포스파티딜 에탄올아민 (DPPE), 디미리스토일포스포에탄올아민 (DMPE), 디스테아로일-포스파티딜-에탄올아민 (DSPE), 16-O-모노메틸 PE, 16-O-디메틸 PE, 18-1-트랜스 PE, 1-스테아로일-2-올레오일-포스파티딜에탄올아민 (SOPE), 또는 이들의 혼합물.

[0230] 일부 구현예에서, 그와 같은 비-양이온성 지질은 단독으로 사용될 수 있지만, 바람직하게는 다른 부형제, 예를 들면, 양이온성 지질과 함께 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 비-양이온성 지질은 리포좀에 존재하는 총 지질의 약 5% 내지 약 90%, 또는 약 10 % 내지 약 70%의 몰비를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 비-양이온성 지질은 중성 지질, 즉, 본 조성물이 제형화되고/거나 투여되는 조건에서 순전하를 운반하지 않는 지질이다. 일부 구현예에서, 리포좀 중 비-양이온성 지질의 백분율은 5% 초과, 10% 초과, 20% 초과, 30% 초과, 또는 40% 초과일 수 있다.

[0231] 콜레스테롤계 *지질*

[0232] 일부 구현예에서, 제공된 리포좀은 1종 이상의 콜레스테롤계 지질을 포함한다. 예를 들면, 적합한 콜레스테롤계 양이온성 지질은, 예를 들면, DC-Choi (N,N-디메틸-N-에틸카복사미도콜레스테롤), 1,4-비스(3-N-올레일아미노-프로필)피페라진 (Gao, 등 Biochem. Biophys. Res. Comm. 179, 280 (1991); Wolf 등 BioTechniques 23, 139 (1997); 미국 특허 번호 5,744,335), 또는 ICE를 포함한다. 일부 구현예에서, 콜레스테롤계 지질은 리포좀에 존재하는 총 지질의 약 2% 내지 약 30%, 또는 약 5% 내지 약 20%의 몰비를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 지질 나노입자 중 콜레스테롤계 지질의 백분율은 5 % 초과, 10% 초과, 20% 초과, 30% 초과, 또는 40% 초과일 수 있다.

[0233] *페길화된 지질*

[0234] 일부 구현예에서, 제공된 리포좀은 하나 이상의 페길화된 지질을 포함한다. 예를 들면, N-옥타노일-스핑고신-1-[석시닐(메톡시 폴리에틸렌 글리콜)-2000] (C8 PEG-2000 세라미드)을 포함하는, 유도된 세라미드 (PEG-CER)와 같은 유도된 지질 및 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)-변형된 인지질의 사용이 또한 하나 이상의 양이온성 및, 일부 구현예에서, 리포좀을 포함하는 다른 지질과 함께 본 발명에 고려된다. 고려되는 PEG-변형된 지질은, 비제한적으로, C_6-C_{20} 길이의 알킬 사슬(들)을 갖는 지질에 공유결합된, 길이가 최대 5 kDa인 폴리에틸렌 글리콜 사슬을 포함한다. 일부 구현예에서, PEG-변형된 또는 페길화된 지질은 페길화된 콜레스테롤 또는 PEG-2K이다. 그와 같은 성분의 부가는 복합체 응집을 예방할 수 있고, 또한 순환 수명(circulation lifetime)을 증가시키고 표적 세포로의 지질-핵산 조성물의 전달을 증가시키는 수단을 제공할 수 있거나 (Klibanov 등 (1990) FEBS Letters, 268 (1): 235-237) 또는 상기 성분은 생체내에서 제형 밖으로 빠르게 교환하도록 선택될 수 있다 (참고, 미국 특허 번호 5,885,613).

[0235] 일부 구현예에서, 특히 유용한 교환가능한 지질은 짧은 아실 사슬 (예를 들면, C_{14} 또는 C_{18})을 갖는 PEG-세라미드이다. 본 발명의 PEG-변형된 인지질 및 유도된 지질은 리포좀에 존재하는 총 지질 중 약 0% 내지 약 15%, 약 0.5% 내지 약 15%, 약 1% 내지 약 15%, 약 4% 내지 약 10%, 또는 약 2%의 몰비를 구성할 수 있다.

[0236] 다양한 구현예에 따르면, 제2 또는 추가의 양이온성 지질, 비-양이온성 지질 및/또는 지질 나노입자를 포함하는 PEG-변형된 지질의 선택, 뿐만 아니라 그와 같은 지질의 서로에 대한 상대적 몰비는 선택된 지질(들)의 특징, 의도된 표적 세포의 성질, 전달되는 mRNA의 특징을 기반으로 한다. 추가의 고려사항들은, 예를 들면, 알킬 사슬의 포화도, 뿐만 아니라 선택된 지질(들)의 크기, 전하, pH, pKa, 융합유도성(fusogenicity) 및 독성을 포함한다. 따라서 몰비는 이에 따라 조정될 수 있다. 일부 구현예에서, 리포좀에서 PEG-변형된 지질의 백분율은 1% 초과, 2% 초과, 5% 초과, 10% 초과 또는 15% 초과일 수 있다.

[0237] *폴리머*

[0238] 일부 구현예에서, 본 발명에 따른 적합한 리포좀은 추가로, 폴리머를 기재된 하나 이상의 양이온성 지질 및, 일부 구현예에서, 본원에 기재된 다양한 지질을 포함하는 다른 담체와 함께 포함한다. 따라서, 일부 구현예에서, 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 리포좀 전달 비히클은 또한 나노입자를 함유하는 폴리머를 포함한다. 적합한 폴리머는, 예를 들면, 폴리아크릴레이트, 폴리알킬시아노아크릴레이트, 폴리락타이드, 폴리락타이드-폴리글라이콜라이드 코폴리머, 폴리카프로락톤, 덱스트란, 알부민, 젤라틴, 알기네이트, 콜라겐, 키토산, 사이클로덱스트린, 프로타민, 페길화된 프로타민, PLL, 페길화된 PLL 및 폴리에틸렌이민 (PEI)을 포함할 수 있다. PEI가 존재하는 경우, 그것은 10 내지 40 kDA 범위의 분자량을 갖는 분지형 PEI, 예를 들면, 25 kDa 분지형 PEI (시그마 (Sigma) #408727)일 수 있다.

[0239] *치료제*

[0240] 본 발명은 임의의 치료제를 전달하기 위해 사용될 수 있다. 구체적으로, 대상체에게 투여될 임의의 치료제는 본원에 기재된 복합체, 피코입자(picoparticle), 나노입자, 극미립자, 교질입자, 또는 리포좀을 사용하여 전달될 수 있다. 제제는 유기 분자 (예를 들면, 치료제, 약물), 무기 분자, 핵산, 단백질, 아미노산, 펩타이드, 폴리펩타이드, 폴리뉴클레오타이드, 표적 치료제, 동위원소로 표지된 유기 또는 무기 분자, 백신, 면역학적 제제 등일 수 있다. 본 발명의 특정 구현예에서, 전달될 제제는 제제의 혼합물일 수 있다.

[0241] 특정 구현예에서, 치료제는 약제학적 활성을 갖는 유기 분자, 예를 들면, 약물이다. 특정 구현예에서, 약물은 항생제, 항-바이러스제, 마취제, 스테로이드제, 항-염증제, 항-신생물성 제제, 항암제, 항원, 백신, 항체, 충혈제거제, 혈압강하제, 진정제, 산아 제한 제제, 항체호르몬제, 항-콜린제, 진통제, 항우울제, 항정신병약, I3-아드레날린 차단제, 이뇨제, 심혈관 활성제, 승압제, 비-스테로이드 항염증제, 영양제 등이다.

[0242] 진단제는 가스; 금속; 양전자 방출 단층촬영 (PET), 컴퓨터 보조 단층촬영 (CAT), 단일 광자 방출 컴퓨터화된 단층촬영, x-선, 형과투시법, 및 자기 공명 영상 (MRI)에서 사용되는 상업적으로 이용가능한 조영제(imaging agent); 및 조영제(contrast agent)를 포함한다. MRI에서 조영제로서 사용하기에 적합한 물질의 예는 가돌리늄 킬레이트, 뿐만 아니라 철, 마그네슘, 망간, 구리, 및 크로뮴을 포함한다. CAT 및 x-선 영상화에 유용한 물질의 예는 요오드계 물질을 포함한다.

[0243] 치료적 및 예방적 제제는, 비제한적으로, 항생제, 영양 보충물, 및 백신을 포함한다. 백신은 단리된 단백질 또는 펩타이드, 불활성화된 유기체 및 바이러스, 사망 유기체 및 바이러스, 유전적으로 변경된 유기체 또는 바이러스, 및 세포 추출물을 포함할 수 있다.

[0244] *폴리뉴클레오타이드*

[0245] 본 발명은 임의의 폴리뉴클레오타이드를 전달하기 위해 사용될 수 있다. 특정 구현예에서, 폴리뉴클레오타이드는 간섭 RNA (RNAi)이다. RNAi의 현상은, 예를 들면, 하기 참조문헌에서 더 상세히 논의된다: Elbashir 등, 2001, *Genes Dev.,* 15:188; Fire 등, 1998, *Nature,* 391:806; Tabara 등, 1999, *Cell,* 99:123; Hammond 등, *Nature,* 2000, 404:293; Zamore 등, 2000, *Cell,* 101:25; Chakraborty, 2007, *Curr. Drug Targets,* 8:469; and Morris and Rossi, 2006, *Gene Ther.,* 13:553. 특정 구현예에서, 폴리뉴클레오타이드는 dsRNA (이중-가닥 RNA)이다. 특정 구현예에서, 폴리뉴클레오타이드는 siRNA (짧은 간섭 RNA)이다. 특정 구현예에서, 폴리뉴클레오타이드는 shRNA (짧은 헤어핀 RNA)이다. 특정 구현예에서, 폴리뉴클레오타이드는 miRNA (마이크로 RNA)이다. 마이크로 RNA (miRNA)는 특히 발생 동안 유전자 발현의 조절을 돕는, 약 21 – 23 뉴클레오타이드 길이의 유전체적으로 암호화된 비-암호화 RNA이다. 예를 들면, Bartel, 2004, *Cell,* 116:281; Novina and Sharp, 2004, *Nature,* 430:161; 및 미국 특허 공개공보 2005/0059005를 참조하며; 또한 Wang and Li, 2007, *Front. Biosci.,* 12:3975; 및 Zhao, 2007, *Trends Biochem. Sci.,* 32:189에서 검토된다. 특정 구현예에서, 폴리뉴클레오타이드는 안티센스 RNA이다.

[0246] 특정 구현예에서, 폴리뉴클레오타이드는 안티센스 제제 또는 RNA 간섭 (RNAi)으로 제공될 수 있다. 예를 들면, 하기를 참조한다: Fire 등, *Nature* 391:806-811, 1998. 안티센스 요법은, 예를 들면, 세포성 환경하에, 세포성 mRNA 및/또는 게놈 DNA, 또는 이의 돌연변이체와 특이적으로 혼성화시켜, 예를 들면, 반응시켜, 예를 들면, 전사 및/또는 번역을 저해함으로써 암호화된 단백질의 발현을 저해하는 단일-가닥 또는 이중-가닥 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 유도체의 투여 또는 *원위치* 제공을 포함하는 것으로 의도된다. 예를 들면, 하기를 참조한다: Crooke "Molecular mechanisms of action of antisense drugs" *Biochim. Biophys. Acta* 1489(1):31-44, 1999; Crooke "Evaluating the mechanism of action of antiproliferative antisense drugs" *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 10(2):123-126, discussion 127, 2000; *Methods in Enzymology* volumes 313-314, 1999. 결합은 종래의 염기쌍 상보성에 의해, 또는, 예를 들면, DNA 듀플렉스에 결합하는 경우에, 이중 헬릭스의 넓은 홈에서의 특이적 상호작용 (즉, 삼중 나선 형성)을 통해서일 수 있다. 예를 들면, 하기를 참조한다: Chan 등, *J. Mol. Med.* 75(4):267-282, 1997.

[0247] 일부 구현예에서, dsRNA, siRNA, shRNA, miRNA, 안티센스 RNA, 및/또는 RNAi는 하나 이상의 다수의 이용가능한 알고리즘을 사용하여 설계되고/되거나 예상될 수 있다. 몇몇 예를 제공하기 위해, 하기 리소스(resource)가 폴리뉴클레오타이드를 설계하고/하거나 예상하는데 이용될 수 있다: 알닐럼 온라인(Alnylum Online), 다르마콘 온라인(Dharmacon Online), 올리고엔진 온라인(OligoEngine Online), 몰레큘라 온라인(Molecula Online), 앰비온 온라인(Ambion Online), 바이오프레드시 온라인(BioPredsi Online), RNAi 웹 온라인(RNAi Web Online), 창 바

이오사이언스 온라인(Chang Bioscience Online), 인비트로겐 온라인(Invitrogen Online), 렌티웹 온라인 겐스크립트 온라인(LentiWeb Online GenScript Online), 프로토콜 온라인(Protocol Online)에서 확인되는 알고리즘; Reynolds 등, 2004, *Nat. Biotechnol.*, 22:326; Naito 등, 2006, *Nucleic Acids Res.*, 34:W448; Li 등, 2007, *RNA*, 13:1765; Yiu 등, 2005, *Bioinformatics*, 21:144; 및 Jia 등, 2006, *BMC Bioinformatics*, 7:271.

[0248] 폴리뉴클레오타이드는 임의의 크기 또는 서열을 가질 수 있으며, 그것은 단일- 또는 이중-가닥일 수 있다. 특정 구현예에서, 폴리뉴클레오타이드는 100개 초과의 염기쌍 길이를 갖는다. 특정 구현예에서, 폴리뉴클레오타이드는 1000개 초과의 염기쌍 길이를 가지며, 10,000개 초과의 염기쌍 길이를 갖는다. 폴리뉴클레오타이드는 당해 기술에 공지된 임의의 수단에 의해 제공될 수 있다. 특정 구현예에서, 폴리뉴클레오타이드는 재조합 기술을 사용하여 조작되었다. 예를 들면, 하기를 참조한다: Ausubel 등, *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons, Inc., New York, 1999); *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., ed. by Sambrook, Fritsch, and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989). 폴리뉴클레오타이드는 또한 천연 공급원으로부터 수득되고 자연에서 보통 발견되는 오염 성분으로부터 정제될 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 또한 실험실에서 화학적으로 합성될 수 있다. 특정 구현예에서, 폴리뉴클레오타이드는 표준 고상 화학을 사용하여 합성된다.

[0249] 폴리뉴클레오타이드는 화학적 또는 생물학적 수단에 의해 변형될 수 있다. 특정 구현예에서, 이들 변형은 폴리뉴클레오타이드의 안정성을 증가시킨다. 변형은 메틸화, 인산화, 말단-캡핑 등을 포함한다.

[0250] *mRNA*

[0251] 본 발명은 임의의 mRNA를 전달하기 위해 사용될 수 있다. mRNA는 전형적으로 DNA로부터의 정보를 리보솜으로 운반하는 RNA의 유형으로 사료된다. mRNA의 존재는 보통 매우 짧으며, 처리 및 번역, 이어서 분해를 포함한다. 전형적으로, 진핵 유기체에서, mRNA 처리는 N-말단 (5') 말단 상의 "캡(cap)"의 부가, 및 C-말단 (3') 상의 "테일(tail)"의 부가를 포함한다. 전형적인 캡은 7-메틸구아노신 캡이며, 이는 제1 전사된 뉴클레오타이드에 대해 5'-5'-삼인산 결합을 통해 연결되는 구아노신이다. 캡의 존재는 대부분의 진핵 세포에서 발견되는 뉴클레아제에 대한 내성을 제공하는데 중요하다. 테일은 전형적으로 폴리아데닐릴 모이어티가 mRNA 분자의 3' 말단에 부가되는 폴리아데닐화 사건이다. 이러한 "테일"의 존재는 mRNA를 엑소뉴클레아제 분해로부터 보호하는 역할을 한다. 메신저 RNA는 전형적으로 리보솜에 의해 단백질을 구성하는 일련의 아미노산으로 번역된다.

[0252] 하나 이상의 펩타이드 (예를 들면, 단백질) 또는 펩타이드 단편으로 번역될 수 있는 임의의 mRNA가 본 발명의 범위 내에 고려된다. 일부 구현예에서, mRNA는 하나 이상의 천연 발생 펩타이드를 암호화한다. 일부 구현예에서, mRNA는 하나 이상의 변형된 또는 비-천연 펩타이드를 암호화한다.

[0253] 일부 구현예에서 mRNA는 세포내 단백질을 암호화한다. 일부 구현예에서, mRNA는 세포질 단백질을 암호화한다. 일부 구현예에서, mRNA는 액틴 세포골격과 관련된 단백질을 암호화한다. 일부 구현예에서, mRNA는 원형질막과 관련된 단백질을 암호화한다. 일부 특정 구현예에서, mRNA는 막통과 단백질을 암호화한다. 일부 특정 구현예에서 mRNA는 이온 통로 단백질을 암호화한다. 일부 구현예에서, mRNA는 핵주변 단백질을 암호화한다. 일부 구현예에서, mRNA는 핵 단백질을 암호화한다. 일부 특정 구현예에서, mRNA는 전사 인자를 암호화한다. 일부 구현예에서, mRNA는 샤페론 단백질을 암호화한다. 일부 구현예에서, mRNA는 세포내 효소 (예를 들면, 요소 대사 또는 리소좀 축적 대사성 장애와 관련된 효소를 암호화하는 mRNA)를 암호화한다. 일부 구현예에서, mRNA는 세포성 대사, DNA 치유, 전사 및/또는 번역에 관여된 단백질을 암호화한다. 일부 구현예에서, mRNA는 세포외 단백질을 암호화한다. 일부 구현예에서, mRNA는 세포외 매트릭스와 관련된 단백질을 암호화한다. 일부 구현예에서 mRNA는 분비된 단백질을 암호화한다. 특정 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법에 사용된 mRNA는 하나 이상의 표적 세포에 의해 주위의 세포외액으로 배출되거나 분비되는 기능적 단백질 또는 효소를 발현시키기 위해 사용될 수 있다 (예를 들면, 호르몬 및/또는 신경전달물질을 암호화하는 mRNA).

[0254] *mRNA의 합성*

[0255] 본 발명에 따른 mRNA는 임의의 다양한 공지된 방법에 따라 합성될 수 있다. 예를 들면, 본 발명에 따른 mRNA는 *시험관내* 전사 (IVT)를 통해 합성될 수 있다. 간단히, IVT는 전형적으로 프로모터를 함유하는 선형 또는 원형 DNA 템플레이트, 리보뉴클레오타이드 삼인산의 풀(pool), DTT 및 마그네슘 이온을 포함할 수 있는 완충계, 및 적절한 RNA 폴리머라제 (예를 들면, T3, T7 또는 SP6 RNA 폴리머라제), DNAse I, 파이로포스파타제, 및/또는 RNAse 저해제와 함께 수행된다. 정확한 조건은 특정 용도에 따라 달라질 것이다.

[0256] 일부 구현예에서, 본 발명에 따른 mRNA의 제조를 위해, DNA 템플레이트가 *시험관내* 전사된다. 적합한 DNA 템플레이트는 전형적으로 *시험관내* 전사를 위한 프로모터, 예를 들면 T3, T7 또는 SP6 프로모터에 이어서 원하는 mRNA를 위한 원하는 뉴클레오타이드 서열, 및 종료 신호를 갖는다.

[0257] 본 발명에 따른 원하는 mRNA 서열(들)을 결정하고 표준 방법을 사용하여 DNA 템플레이트 내로 편입시킬 수 있다. 예를 들면, 원하는 아미노산 서열 (예를 들면, 효소 서열)로부터 개시하여, 사실상 역 번역이 변성된 유전자 암호를 기반으로 수행된다. 이후 최적화 알고리즘이 적합한 코돈의 선택을 위해 사용될 수 있다. 전형적으로, G/C 함량은 한편으로 최고의 가능한 G/C 함량을 달성하ㄷ도록 최적화될 수 있으며, 다른 한편으로 코돈 출현빈도(codon usage)에 따른 tRNA의 빈도의 최상의 가능성을 고려한다. 최적화된 RNA 서열은, 예를 들면, 적절한 디스플레이 장치의 도움으로 그리고 최초 (야생형) 서열과 비교하여 확립되고 표시될 수 있다. 2차 구조물은 또한 안정화 및 불안정화 특성 또는, 각각, RNA의 영역을 계산하기 위해 분석될 수 있다.

[0258] *변형된 mRNA*

[0259] 일부 구현예에서, 본 발명에 따른 mRNA는 비변형된 또는 변형된 mRNA로서 합성될 수 있다. 전형적으로, mRNA는 안정성을 향상시키기 위해 변형된다. mRNA의 변형은 예를 들면, RNA의 뉴클레오타이드의 변형을 포함할 수 있다. 따라서 본 발명에 따른 변형된 mRNA는, 예를 들면, 골격 변형, 당 변형 또는 염기 변형을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, mRNA는 천연 발생 뉴클레오타이드 및/또는 뉴클레오타이드 유사체 (변형된 뉴클레오타이드) (퓨린 (아데닌 (A), 구아닌 (G)) 또는 피리미딘 (티민 (T), 시토신 (C), 우라실 (U))를 비제한적으로 포함함)로부터, 그리고 퓨린 및 피리미딘의 변형된 뉴클레오타이드 유사체 또는 유도체, 예를 들면 1-메틸-아데닌, 2-메틸-아데닌, 2-메틸티오-N-6-이소펜테닐-아데닌, N6-메틸-아데닌, N6-이소펜테닐-아데닌, 2-티오-시토신, 3-메틸-시토신, 4-아세틸-시토신, 5-메틸-시토신, 2,6-디아미노퓨린, 1-메틸-구아닌, 2-메틸-구아닌, 2,2-디메틸-구아닌, 7-메틸-구아닌, 이노신, 1-메틸-이노신, 슈도우라실 (5-우라실), 디하이드로-우라실, 2-티오-우라실, 4-티오-우라실, 5-카복시메틸-아미노-메틸-2-티오-우라실, 5-(카복시하이드록시메틸)-우라실, 5-플루오로-우라실, 5-브로모-우라실, 5-카복시-메틸아미노메틸-우라실, 5-메틸-2-티오-우라실, 5-메틸-우라실, N-우라실-5-옥시아세트산 메틸 에스테르, 5-메틸아미노메틸-우라실, 5-메톡시아미노메틸-2-티오-우라실, 5'-메톡시카보닐메틸-우라실, 5-메톡시-우라실, 우라실-5-옥시아세트산 메틸 에스테르, 우라실-5-옥시아세트산 (v), 1-메틸-슈도우라실, 퀘우오신, β-D-만노실-퀘우오신, 와이부토신, 및 포스포르아미데이트, 포스포로티오에이트, 펩타이드 뉴클레오타이드, 메틸포스포네이트, 7-데아자-구아노신, 5-메틸시토신 및 이노신로서 합성될 수 있다. 그와 같은 유사체의 제제는 하기의 예로부터 당해 분야의 숙련가에게 공지되어 있다: 미국 특허 번호 4,373,071, 미국 특허 번호 4,401,796, 미국 특허 번호 4,415,732, 미국 특허 번호 4,458,066, 미국 특허 번호 4,500,707, 미국 특허 번호 4,668,777, 미국 특허 번호 4,973,679, 미국 특허 번호 5,047,524, 미국 특허 번호 5,132,418, 미국 특허 번호 5,153,319, 미국 특허 번호 5,262,530 및 5,700,642(이의 개시내용은 그 전체가 참고로 편입되어 있음).

[0260] 일부 구현예에서, mRNA (예를 들면, 효소 암호화 mRNA)는 RNA 골격 변형을 함유할 수 있다. 전형적으로, 골격 변형은, RNA 내에 함유된 뉴클레오타이드의 골격의 포스페이트가 화학적으로 변형되는 변형이다. 예시적인 골격 변형은 전형적으로, 메틸포스포네이트, 메틸포스포르아미데이트, 포스포르아미데이트, 포스포로티오에이트 (예를 들면 시티딘 5'-O-(1-티오포스페이트)), 보라노포스페이트, 양으로 하전된 구아니디늄 그룹 등으로 구성된 군으로부터의 변형을 비제한적으로 포함하고, 이것은 포스포디에스테르 연결을 다른 음이온성, 양이온성 또는 중성 그룹으로 대체하는 것을 의미한다.

[0261] 일부 구현예에서, mRNA (예를 들면, 효소 암호화 mRNA)은 당 변형물을 함유할 수 있다. 전형적인 당 변형물은 뉴클레오타이드의 당의 화학 변형물이고, 비제한적으로, 하기로 구성된 군으로부터 선택된 당 변형물을 함유한다: 2'-데옥시-2'-플루오로-올리고리보뉴클레오타이드 (2'-플루오로-2'-데옥시시티딘 5'-삼인산, 2'-플루오로-2'-데옥시우리딘 5'-삼인산), 2'-데옥시-2'-데아민-올리고리보뉴클레오타이드 (2'-아미노-2'-데옥시시티딘 5'-삼인산, 2'-아미노-2'-데옥시우리딘 5'-삼인산), 2'-O-알킬올리고리보-뉴클레오타이드, 2'-데옥시-2'-C-알킬올리고리보뉴클레오타이드 (2'-O-메틸시티딘 5'-삼인산, 2'-메틸-우리딘 5'-삼인산), 2'-C-알킬올리고리보뉴클레오타이드, 및 이의 이성질체 (2'-아라시티딘 5'-삼인산, 2'-아라우리딘 5'-삼인산), 또는 아지도삼인산 (2'-아지도-2'-데옥시-시티딘 5'-삼인산, 2'-아지도-2'-데옥시우리딘 5'-삼인산).

[0262] 일부 구현예에서, mRNA (예를 들면, 효소 암호화 mRNA)는 뉴클레오타이드의 염기의 변형물 (염기 변형물)를 함유할 수 있다. 염기 변형물을 함유하는 변형된 뉴클레오타이드는 또한 소위 염기-변형된 뉴클레오타이드이다. 그와 같은 염기-변형된 뉴클레오타이드의 예는, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 2-아미노-6-클로로퓨린 리보사

이드 5'-삼인산, 2-아미노아데노신 5'-삼인산, 2-티오시티딘 5'-삼인산, 2-티오우리딘 5'-삼인산, 4-티오우리딘 5'-삼인산, 5-아미노알릴시티딘 5'-삼인산, 5-아미노-알릴-우리딘 5'-삼인산, 5-브로모시티딘 5'-삼인산, 5-브로모우리딘 5'-삼인산, 5-아이오도-시티딘 5'-삼인산, 5-아이오도우리딘 5'-삼인산, 5-메틸시티딘 5'-삼인산, 5-메틸-우리딘 5'-삼인산, 6-아자시티딘 5'-삼인산, 6-아자우리딘 5'-삼인산, 6-클로로퓨린 리보사이드 5'-삼인산, 7-데아자아데노신 5'-삼인산, 7-데아자구아노신 5'-삼인산, 8-아자아데노신 5'-삼인산, 8-아지도아데노신 5'-삼인산, 벤즈이미다졸 리보사이드 5'-삼인산, N1-메틸아데노신 5'-삼인산, N1-메틸구아노신 5'-삼인산, N6-메틸아데노신 5'-삼인산, O6-메틸구아노신 5'-삼인산, 슈도우리딘 5'-삼인산, 퓨로마이신 5'-삼인산 또는 크산토신 5'-삼인산.

[0263] *캡 구조*

[0264] 전형적으로, mRNA 합성은 N-말단 (5') 말단 상의 "캡", 및 C-말단 (3') 말단 상의 "테일"의 부가를 포함한다. 캡의 존재는 대부분의 진핵 세포에서 발견되는 뉴클레아제에 대한 내성을 제공하는데 중요하다. "테일"의 존재는 mRNA를 엑소뉴클레아제 분해로부터 보호하기 위해 쓰인다.

[0265] 따라서, 일부 구현예에서, mRNA (예를 들면, 효소 암호화 mRNA)는 5' 캡 구조를 포함한다. 5' 캡은 전형적으로 하기와 같이 부가된다: 먼저, RNA 말단 포스파타제는 말단 포스페이트 그룹 중의 하나를 5' 뉴클레오타이드로부터 제거하고, 이로써 2개의 말단 포스페이트가 남게 되고; 그 다음 구아노신 삼인산 (GTP)는 구아닐릴 전달효소를 통해 말단 포스페이트에 부가되고, 이로써 5'5'5 삼인산 연결이 생성되고; 그리고 그 다음 구아닌의 7-질소는 메틸전달효소에 의해 메틸화된다. 캡 구조의 예는, 비제한적으로, m7G(5')ppp (5'(A,G(5')ppp(5')A 및 G(5')ppp(5')G를 포함한다.

[0266] 일부 구현예에서, 천연 발생 캡 구조는 m^7G(5')ppp(5')N(여기서 N은 임의의 뉴클레오사이드임)의 디뉴클레오타이드 캡을 생기게 하는 제1 전사된 뉴클레오타이드의 5'-말단에 삼인산 브릿지를 통해 연결되는 7-메틸 구아노신을 포함한다. *생체내*, 캡은 효소적으로 부가된다. 캡은 핵 내에 부가되고 효소 구아닐릴 전달효소에 의해 촉진된다. 캡의 RNA의 5' 말단에의 부가는 전사 직후에 일어난다. 말단 뉴클레오사이드는 전형적으로 구아노신이고, 모든 다른 뉴클레오타이드, 즉, G(5')ppp(5')GpNpNp에 대해 역방향에 있다.

[0267] *시험관내* 전사에 의해 생산된 mRNA의 공통의 캡은 이의 5'-말단에서 캡 구조를 갖는 RNA를 얻기 위해 T7 또는 SP6 RNA 폴리머라제와의 *시험관내* 전사에서 디뉴클레오타이드 캡으로서 사용되었던 m^7G(5')ppp(5')G이다. 캡핑된 mRNA의 *시험관내* 합성의 우세한 방법은 전사의 개시제로서 형태 m^7G(5')ppp(5')G ("m^7GpppG")의 전-형성된 디뉴클레오타이드를 이용한다.

[0268] 현재까지, *시험관내* 번역 실험에서 사용된 합성 디뉴클레오타이드 캡의 통상적인 형태는 항-가역적 캡 유사체 ("ARCA") 또는 변형된 ARCA이고, 이것들은, 일반적으로, 2' 또는 3' OH 그룹이 $-OCH_3$로 대체되는 변형된 캡 유사체이다.

[0269] 추가의 캡 유사체는, 하기로 구성된 군으로부터 선택된 화학 구조를 비제한적으로 포함한다: m^7GpppG, m^7GpppA, m^7GpppC; 메틸화되지 않은 캡 유사체 (예를 들면, GpppG); 디메틸화된 캡 유사체 (예를 들면, $m^{2,7}$GpppG), 트리메틸화된 캡 유사체 (예를 들면, $m^{2,2,7}$GpppG), 디메틸화된 대칭 캡 유사체 (예를 들면, m^7Gpppm^{7}G), 또는 항 가역적 캡 유사체 (예를 들면, ARCA; $m^{7\ 2'Ome}$GpppG, $m^{72'd}$GpppG, $m^{7,3'Ome}$GpppG, $m^{7,3'd}$GpppG 및 이의 테트라포스페이트 유도체) (참고, 예를 들면, Jemielity, J. 등, "*Novel 'anti-reverse' cap analogs with superior translational properties*", RNA, 9: 1108-1122 (2003)).

[0270] 일부 구현예에서, 적합한 캡은 m^7G(5')ppp(5')N (여기서 N은 임의의 뉴클레오사이드임)을 얻는 제1 전사된 뉴클레오타이드의 5'-말단에, 삼인산 브릿지를 통해 연결된 7-메틸 구아닐레이트 ("m^7G")이다. 본 발명의 구현예에서 이용된 m^7G 캡의 바람직한 구현예는 m^7G(5')ppp(5')G이다.

[0271] 일부 구현예에서, 캡은 Cap0 구조이다. Cap0 구조는 염기 1 및 2에 부착된 리보오스의 2'-O-메틸 잔기가 없다. 일부 구현예에서, 캡은 Cap1 구조이다. Cap1 구조는 염기 2에서2'-O-메틸 잔기를 갖는다. 일부 구현예에서, 캡은 Cap2 구조이다. Cap2 구조는 염기 2 및 3 둘 모두에 부착된 2'-O-메틸 잔기를 갖는다.

[0272] 다양한 m^7G 캡 유사체는 당해 기술에 공지되어 있고, 이들 중 많은 것이 상업적으로 이용가능하다. 이들은 상기에서 기재된 m^7GpppG, 뿐만 아니라 ARCA 3'-OCH_3 및 2'-OCH_3 캡 유사체를 포함한다 (Jemielity, J. 등, RNA, 9: 1108-1122 (2003)). 본 발명의 구현예에서 사용되는 추가의 캡 유사체는 하기를 포함한다: N7-벤질레이트화된 디뉴클레오사이드 테트라포스페이트 유사체 (Grudzien, E. 등, RNA, 10: 1479-1487 (2004)에서 기재됨), 포스포로티오에이트 캡 유사체 (Grudzien-Nogalska, E., 등, RNA, 13: 1745-1755 (2007)에서 기재됨), 및 U.S. 특허 번호 8,093,367 및 8,304,529(이것은 본 명세서에 참고로 편입되어 있음)에서 기재된 캡 유사체 (바이오티닐화된 캡 유사체 포함).

[0273] *테일 구조*

[0274] 전형적으로,"테일"의 존재는 엑소뉴클레아제 분해로부터 mRNA을 보호하기 위해 쓰인다. 폴리 A 테일은 천연 메신저 및 합성 센스 RNA를 안정화시키는 것으로 생각된다. 따라서, 특정 구현예에서 긴 폴리 A 테일은 mRNA 분자에 부가될 수 있고, 따라서 RNA를 더 안정하게 만든다. 폴리 A 테일은 다양하게 인식된 기술을 사용하여 부가될 수 있다. 예를 들면, 긴 폴리 A 테일은 폴리 A 폴리머라제를 사용하여 합성 또는 *시험관내* 전사된 RNA에 부가될 수 있다 (Yokoe, *등* Nature Biotechnology. 1996; 14: 1252-1256). 전사 벡터는 또한 긴 폴리 A 테일을 암호화할 수 있다. 또한, 폴리 A 테일은 PCR 생성물로부터 직접적인 전사에 의해 부가될 수 있다. 폴리 A는 RNA 리가제로 센스 RNA의 3' 말단에 또한 결찰될 수 있다 (참고, 예를 들면, Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2nd Ed., ed. by Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1991 edition)).

[0275] 일부 구현예에서, mRNA (예를 들면, 효소 암호화 mRNA)는 3' 폴리(A) 테일 구조를 포함한다. 전형적으로, 폴리 A 테일의 길이는 적어도 약 10, 50, 100, 200, 300, 400 적어도 500개의 뉴클레오타이드일 수 있다. 일부 구현예에서, mRNA의 3' 말단 상의 폴리-A 테일은 전형적으로, 약 10 내지 300개의 아데노신 뉴클레오타이드 (*예를 들면*, 약 10 내지 200개의 아데노신 뉴클레오타이드, 약 10 내지 150개의 아데노신 뉴클레오타이드, 약 10 내지 100개의 아데노신 뉴클레오타이드, 약 20 내지 70개의 아데노신 뉴클레오타이드, 또는 약 20 내지 60개의 아데노신 뉴클레오타이드)를 포함한다. 일부 구현예에서, mRNA는 3' 폴리(C) 테일 구조를 포함한다. mRNA의 3' 말단 상의 적합한 폴리-C 테일은 전형적으로, 약 10 내지 200 시토신 뉴클레오타이드 (예를 들면, 약 10 내지 150 시토신 뉴클레오타이드, 약 10 내지 100 시토신 뉴클레오타이드, 약 20 내지 70 시토신 뉴클레오타이드, 약 20 내지 60 시토신 뉴클레오타이드, 또는 약 10 내지 40 시토신 뉴클레오타이드)을 포함한다. 폴리-C 테일은 폴리-A 테일에 부가될 수 있거나 폴리-A 테일을 치환할 수 있다.

[0276] 일부 구현예에서, 폴리 A 또는 폴리 C 테일의 길이는 본 발명의 변형된 센스 mRNA 분자의 안정성 및, 따라서, 단백질의 전사를 조절하기 위해 조정된다. 예를 들면, 폴리 A 테일의 길이의 길이가 센스 mRNA 분자의 반감기에 영향을 줄 수 있기 때문에, 폴리 A 테일의 길이는 조정되어 뉴클레아제에 대한 mRNA의 내성의 수준을 변경시킬 수 있고, 그렇게 함으로써 표적 세포에서 폴리뉴클레오타이드 발현 및/또는 폴리펩타이드 생산의 시간 경과를 조절할 수 있다.

[0277] *5' 및 3' 미번역된 영역*

[0278] 일부 구현예에서, mRNA는 5' 및/또는 3' 미번역된 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, 5' 미번역된 영역은 mRNA의 안정성 또는 번역에 영향을 미치는 1종 이상의 원소, 예를 들면, 철 반응 원소를 포함한다. 일부 구현예에서, 5' 미번역된 영역은 그 길이가 약 50 내지 500개의 뉴클레오타이드일 수 있다.

[0279] 일부 구현예에서, 3' 미번역된 영역은 폴리아데닐화 신호, 세포에서 위치의 mRNA의 안정성에 영향을 주는 단백질에 대한 결합 부위, 또는 miRNA에 대한 하나 이상의 결합 부위 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 3' 미번역된 영역은, 그 길이가 50 내지 500개 뉴클레오타이드 또는 그 초과일 수 있다.

[0280] 예시적인 3' 및/또는 5' UTR 서열은 센스 mRNA 분자의 안정성을 증가시키기 위해 안정한 mRNA 분자 (예를 들면, 글로빈, 액틴, GAPDH, 튜불린, 히스톤, 또는 시트르산 사이클 효소)로부터 유도될 수 있다. 예를 들면, 5' UTR 서열은 뉴클레아제 내성을 개선하고/거나 폴리뉴클레오타이드의 반감기를 개선하기 위해 CMV 급초기 1 (IE1) 유전자, 또는 이의 단편의 부분 서열을 포함할 수 있다. 인간 성장 호르몬 (hGH), 또는 이의 단편을 암호화하는 서열을 폴리뉴클레오타이드 (예를 들면, mRNA)의3' 말단 또는 미번역된 영역에 봉입하여 폴리뉴클레오타이드를 추가로 안정화시키는 것이 또한 고려된다. 일반적으로, 이들 변형은 이의 비변형된 대응물에 대한 폴리뉴클레오타이드의 안정성 및/또는 약력학적 특성 (예를 들면, 반감기)을 개선하고, 예를 들면 *생체내* 뉴클레아제 소화에 대한 그와 같은 폴리뉴클레오타이드' 내성을 개선하기 위해 만들어진 변형을 포함한다.

[0281] 다양한 구현예에 따르면, 임의의 크기 mRNA는 제공된 리포좀에 의해 캡슐화될 수 있다. 일부 구현예에서, 제공된 리포좀은 약 0.5 kb, 1 kb, 1.5 kb, 2 kb, 2.5 kb, 3 kb, 3.5 kb, 4 kb, 4.5 kb, 또는 5 kb 초과 길이의 mRNA를 캡슐화할 수 있다.

[0282] ***리포좀***

[0283] 제공된 조성물에서 사용되는 리포좀은 당해 기술에서 현재 공지된 다양한 기술에 의해 제조될 수 있다. 예를 들면, 다중층 소포 (MLV)는 종래의 기술, 예컨대 지질을 적절한 용매에서 용해시키고, 그 다음 용매를 증발시켜 용기의 내부 상에 박막을 남겨 두거나 분무 건조하여 적합한 컨테이너 또는 용기의 측벽 상에 선택된 지질을 함침시켜 제조될 수 있다. 그 다음 수성상은, MLV이 형성되는 와동 운동과 함께 용기에 부가될 수 있다. 그 다음 단일-라멜라 소포 (ULV)는 다중-라멜라 소포의 균질화, 초음파처리 또는 압출에 의해 형성될 수 있다. 또한, 단일라멜라 소포는 세제 제거 기술에 의해 형성될 수 있다.

[0284] 특정 구현예에서, 제공된 조성물은, 제제, 예컨대 핵산 예를 들면, mRNA가, 리포좀의 표면 둘 모두와 관련되고 동일한 리포좀 내에 캡슐화된 리포좀을 포함한다. 예를 들면, 본 발명의 조성물의 준비 동안에, 양이온성 리포좀은 정전기 상호작용을 통해 mRNA와 회합될 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 조성물의 준비 동안에, 양이온성 리포좀은 정전기 상호작용을 통해 mRNA와 회합될 수 있다.

[0285] 일부 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 리포좀 내에 캡슐화된 mRNA를 포함한다. 일부 구현예에서, 1종 이상의 mRNA 종은 동일한 리포좀 내에 캡슐화될 수 있다. 일부 구현예에서, 1종 이상의 mRNA 종은 상이한 리포좀 내에 캡슐화될 수 있다. 일부 구현예에서, mRNA는 이의 지질 조성물, 지질 성분의 몰비, 크기, 전하 (제타 포텐셜), 표적화 리간드 및/또는 이들의 조합이 상이한 1종 이상의 리포좀 내에 캡슐화된다. 일부 구현예에서, 1종 이상의 리포좀은 양이온성 지질, 중성 지질, PEG-변형된 지질 및/또는 이들의 조합의 상이한 조성물을 가질 수 있다. 일부 구현예에서 1종 이상의 리포좀은 리포좀을 만들기 위해 사용된 양이온성 지질, 중성 지질, 콜레스테롤 및 PEG-변형된 지질의 상이한 몰비를 가질 수 있다.

[0286] 원하는 치료제, 예컨대 핵산 (예를 들면, mRNA)의, 리포좀으로의 편입 과정은 종종 "로딩"이라 칭한다. 예시적인 방법은 하기에서 기재되어 있다: Lasic, 등, FEBS Lett., 312: 255-258, 1992(이것은 본 명세서에 참고로 편입되어 있음). 리포좀-편입된 핵산은 리포좀의 이중층 막 내의 리포좀의 내부 공간에 완전히 또는 부분적으로 위치할 수 있거나, 리포좀 막의 외부 표면과 관련될 수 있다. 핵산의 리포좀으로의 편입은 또한 본 명세서에서 일명 "캡슐화"이고, 상기 핵산은 리포좀의 내부 공간 내에 전적으로 함유된다. mRNA를 수송 비히클, 예컨대 리포좀에 편입시키는 목적은 종종, 핵산 및/또는 시스템을 분해하는 효소 또는 화학물질 또는 핵산의 빠른 배출을 야기하는 수용체를 함유할 수 있는 환경으로부터 핵산을 보호하기 위한 것이다. 따라서, 일부 구현예에서, 적합한 전달 비히클은 상기 비히클 내에 함유된 mRNA의 안정성을 향상시키고/거나 mRNA의 표적 세포 또는 조직으로의 전달을 촉진할 수 있다.

[0287] *리포좀 크기*

[0288] 본 발명에 따른 적합한 리포좀은 다양한 크기로 만들어질 수 있다. 일부 구현예에서, 제공된 리포좀은 이전에 공지된 mRNA 캡슐화 리포좀보다 더 작게 만들어질 수 있다. 일부 구현예에서, 감소된 크기의 리포좀은 mRNA의 더 효율적인 전달과 관련된다. 적절한 리포좀 크기의 선택은 표적 세포 또는 조직의 부위 및 어느 정도까지 리포좀이 만들어지고 있는 적용을 고려할 수 있다.

[0289] 일부 구현예에서, 리포좀의 적절한 크기는 mRNA에 의해 암호화된 항체의 전신 분배를 촉진하도록 선택된다. 일부 구현예에서, mRNA의 어떤 세포 또는 조직으로의 형질감염을 제한하는 것이 요망될 수 있다. 예를 들면, 간세포를 표적으로 하기 위해 리포좀은, 이의 치수가 간에서의 내피 층 라이닝 간 동양혈관의 개창보다 더 작은 크기일 수 있고; 그와 같은 경우에 리포좀은 표적 간세포에 도달하기 위해 그와 같은 내피 개창을 쉽게 관통할 수 있다.

[0290] 대안적으로 또는 추가로, 리포좀은, 리포좀의 치수가 분배를 어떤 세포 또는 조직으로 제한하거나 피하기 위해 충분한 직경인 크기일 수 있다. 예를 들면, 리포좀은, 이의 치수가 내피 층 라이닝 간 동양혈관의 개창보다 더 크고, 이로써 리포좀에서 간세포으로의 분배를 제한하는 크기일 수 있다.

[0291] 일부 구현예에서, 적합한 리포좀은 약 500 nm, 450 nm, 400 nm, 350 nm, 300 nm, 250 nm, 200 nm, 150 nm, 125 nm, 110 nm, 100 nm, 95 nm, 90 nm, 85 nm, 80 nm, 75 nm, 70 nm, 65 nm, 60 nm, 55 nm, 또는 50 nm 이하의 크기를 갖는다. 일부 구현예에서, 적합한 리포좀은 약 250 nm 이하 (예를 들면, 약 225 nm, 200 nm, 175

nm, 150 nm, 125 nm, 100 nm, 75 nm, 또는 50 nm 이하)의 크기를 갖는다. 일부 구현예에서, 적합한 리포좀은 약 10 - 250 nm 범위 (예를 들면, 약 10 - 225 nm, 10 - 200 nm, 10 - 175 nm, 10 - 150 nm, 10 - 125 nm, 10 - 100 nm, 10 - 75 nm, 또는 10 - 50 nm 범위)의 크기를 갖는다. 일부 구현예에서, 적합한 리포좀은 약 100 - 250 nm 범위 (예를 들면, 약 100 - 225 nm, 100 - 200 nm, 100 - 175 nm, 100 - 150 nm 범위)의 크기를 갖는다. 일부 구현예에서, 적합한 리포좀은 약 10 - 100 nm 범위 (예를 들면, 약 10 - 90 nm, 10 - 80 nm, 10 - 70 nm, 10 - 60 nm, 또는 10 - 50 nm 범위)의 크기를 갖는다.

[0292] 당해 분야에서 공지된 다양한 대안적인 방법은 리포좀의 집단의 크기조정에 이용가능하다. 하나의 그와 같은 크기조정 방법은 본 명세서에 참고로 편입된 미국 특허 번호 4,737,323에서 기재되어 있다. 배쓰 또는 프로브 초음파처리에 의해 리포좀 서스펜션을 음파처리하면, 약 0.05 마이크론 미만 직경의 작은 ULV로 그 크기가 진행한다. 균질화는 큰 리포좀을 더 작은 것들로 단편화하기 위해 전단 에너지에 의존하는 또 다른 방법이다. 전형적인 균질화 절차에서, MLV는, 선택된 리포좀 크기, 전형적으로 약 0.1 내지 0.5 마이크론이 관측될 때까지, 표준 에멀젼 균질기를 통해 재순환된다. 리포좀의 크기는 하기에서 기재된 바와 같이 준-전기 광산란 (QELS)에 의해 결정될 수 있다: Bloomfield, Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 10:421-150 (1981) (본 명세서에 참고로 편입되어 있음). 평균 리포좀 직경은 형성된 리포좀의 초음파처리에 의해 감소될 수 있다. 간헐적 초음파처리 사이클은 효율적인 리포좀 합성을 안내하기 위해 QELS 평가로 대체될 수 있다.

[0293] ***약제학적 조성물***

[0294] 제제, 예컨대 핵산, 예를 들면, mRNA의 전달 및/또는 mRNA의 *생체내* 발현을 용이하게 하기 위해, 전달 비히클 예컨대 리포좀을 하나 이상의 추가의 핵산, 담체, 표적 리간드 또는 안정화 시약과 함께, 또는 그것이 적합한 부형제와 혼합되는 경우 약리적 조성물로 제형화시킬 수 있다. 약물의 제형화 및 투여 기술은 하기에서 확인될 수 있다: "Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publishing Co., Easton, Pa., latest edition.

[0295] 제공된 리포좀으로-캡슐화된 제제, 예컨대 핵산, 예를 들면, mRNA 및 상기 제제를 함유하는 조성물은, 대상체의 임상 상태, 투여 부위 및 방법, 투여 스케줄링, 대상체의 연령, 성별, 체중, 및 당해 분야에 통상적인 기술을 갖는 임상의와 관련된 다른 인자를 고려하여, 현재의 의료 실시에 따라 투여되고 투약될 수 있다. 본원의 목적을 위한 "유효한 양"은 실험적인 임상 연구, 약리적, 임상 및 의료 분야에서 통상적인 기술을 가진 자들에게 공지된 바와 같은 관련된 고려사항들에 의해 결정될 수 있다. 일부 구현예에서, 투여되는 양은, 당해 분야의 숙련가에 의해 질환 진행, 퇴행 또는 개선의 적절한 척도로 선택되는 것처럼, 증상 및 다른 지표의 적어도 일부의 안정화, 개선 또는 제거를 달성하는데 효과적이다. 예를 들면, 적합한 양 및 투약 레지멘은 적어도 일시적 단백질 (*예를 들면*, 효소) 생산을 유발하는 양 및 투약 레지멘이다.

[0296] 적합한 투여 경로는, 예를 들면, 경구; 직장; 질; 경점막; 기관내 또는 흡입을 포함하는 폐; 또는 장 투여; 진피내, 경피 (국소), 근육내, 피하, 수질내 주사를 포함하는 비경구 전달, 뿐만 아니라 척추강내, 직접적인 심실내, 정맥내, 복강내 및/또는 비강내 투여를 포함한다.

[0297] 대안적으로 또는 추가로, 리포좀으로 캡슐화된 제제, 예컨대 핵산, 예를 들면, mRNA, 및 본 발명의 조성물은 전신 방식보다는 국부 방식으로, 예를 들면, 바람직하게는 지속 방출 제형으로 표적화된 조직 내로 직접 약제학적 조성물의 주사를 통해 투여될 수 있다. 국부 전달은 표적화되는 조직에 따라 다양한 방식으로 영향을 받을 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 조성물을 함유하는 에어로졸은 (코, 기관, 또는 기관지 전달을 위해) 흡입될 수 있거나; 본 발명의 조성물은, 예를 들면, 부상, 질환 징후, 또는 통증 부위 내로 주사될 수 있거나; 조성물은 경구, 기관, 또는 식도 적용을 위해 로젠지로 제공될 수 있거나; 위 또는 창자로의 투여를 위해 액체, 정제 또는 캡슐 형태로 공급될 수 있거나, 직장 또는 질 적용을 위해 좌약 형태로 공급될 수 있거나; 또는 심지어 크림, 점적액 또는 심지어 주사를 사용하여 눈으로 전달될 수 있다. 치료적 분자 또는 리간드와 복합된 제공된 조성물을 함유하는 제형은 심지어 조성물이 이식 부위로부터 주위 세포로의 확산을 가능하게 할 수 있는 폴리머 또는 다른 구조물 또는 물질과 연합하여 수술로 투여될 수 있다. 대안적으로, 그것은 폴리머 또는 지지체를 사용하지 않고 수술로 적용될 수 있다.

[0298] 일부 구현예에서, 제공된 리포좀 및/또는 조성물은 제제의 연장-방출에 적합하도록, 예를 들면, 그 안에 mRNA가 함유되도록 제형화된다. 그와 같은 연장-방출 조성물은 연장된 투약 간격으로 대상체에게 편리하게 투여될 수 있다. 예를 들면, 일 구현예에서, 본 발명의 조성물은 대상체에게 1일 2회, 매일 또는 격일로 투여된다. 바람직한 구현예에서, 본 발명의 조성물은 대상체에게 1주 2회, 1주 1회, 매 10 일, 매 2 주, 매 3 주, 또는 더 바람직하게는 매 4 주, 한달에 한 번, 매 6 주, 매 8 주, 매 2 개월, 매 3 개월, 매 4 개월, 매 6 개월, 매 8 개월, 매 9 개월 또는 매년 투여된다. 연장된 기간에 걸쳐 mRNA를 전달하거나 방출시키는 (예를 들면, 근육내로, 피하

로, 초자체내로의) 데포 투여를 위해 제형화되는 조성물 및 리포좀이 또한 고려된다. 바람직하게는, 이용되는 연장-방출 수단은 안정성을 개선시키기 위해 mRNA에 이루어지는 변형과 조합된다.

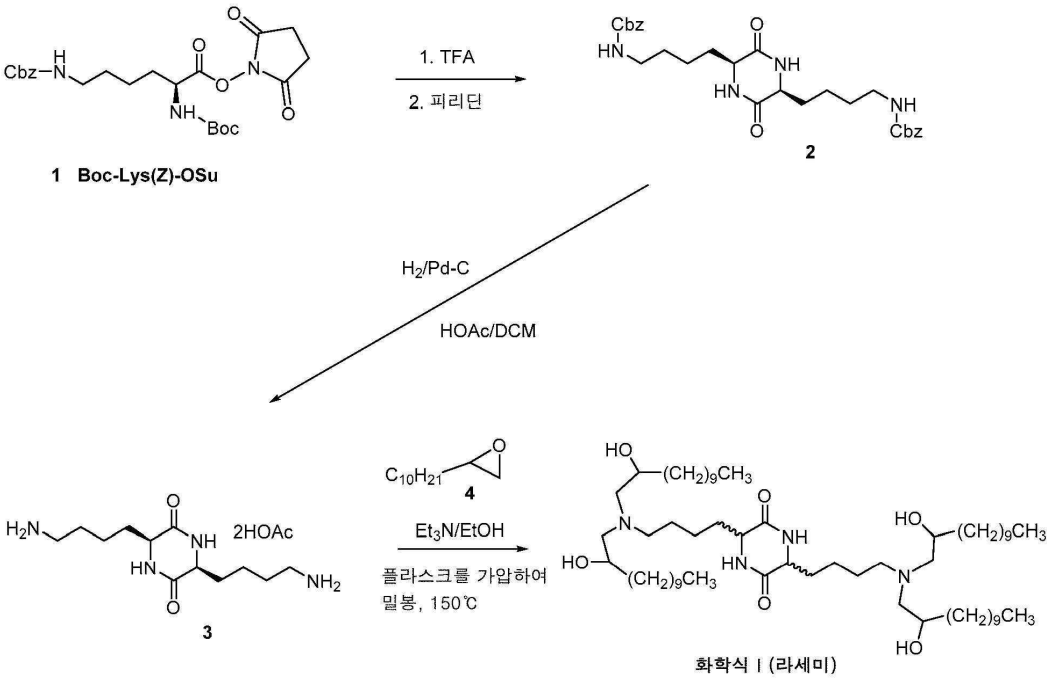
[0299] 예를 들면, 2012년 6월 8일자로 출원된 국제 특허 출원 번호 PCT/US2012/041663, 공개공보 번호 WO 2012/170889 (이의 교시는 본 명세서에 그 전체가 참고로 편입되어 있음)에 개시된 바와 같이, 본원에 개시된 리포좀 중 1종 이상을 포함하는 동결건조된 약제학적 조성물, 및 그와 같은 조성물의 사용을 위한 관련 방법이 또한 본원에 고려된다. 예를 들면, 본 발명에 따른 동결건조된 약제학적 조성물은 투여 전에 재구성될 수 있거나 *생체내*에서 재구성될 수 있다. 예를 들면, 동결건조된 약제학적 조성물은 적절한 투여 형태 (예를 들면, 진피내 투여 형태 예컨대 디스크(disk), 막대(rod) 또는 막)로 제형화되고 투여될 수 있으며 이로써, 투여 형태는 개체의 체액에 의해 생체내에서 경시적으로 다시 수화된다.

[0300] 제공된 리포좀 및 조성물은 임의의 원하는 조직으로 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 제공된 리포좀 또는 조성물에 의해 전달되는 제제, 예를 들면, mRNA는 리포좀 및/또는 조성물이 투여되는 조직에서 발현된다. 일부 구현예에서, 전달되는 mRNA는 리포좀 및/또는 조성물이 투여되는 조직과 상이한 조직에서 발현된다. 전달되는 mRNA가 전달되고/되거나 발현될 수 있는 예시적인 조직은, 비제한적으로, 간, 신장, 심장, 비장, 혈청, 뇌, 골격 근육, 림프절, 피부, 및/또는 뇌척수액을 포함한다.

[0301] 다양한 구현예에 따르면, 전달된 제제, 예를 들면, mRNA의 발현 타이밍은 특정한 의료적 요구에 적합하도록 튜닝될 수 있다. 일부 구현예에서, 전달된 mRNA에 의해 암호화된 단백질의 발현은 제공된 리포좀 또는 조성물의 단일 투여 후 혈청 또는 표적 조직에서 1, 2, 3, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 66, 및/또는 72 시간에 검출가능하다. 일부 구현예에서, mRNA에 의해 암호화된 단백질의 발현은 제공된 리포좀 또는 조성물의 단일 투여 후 혈청 또는 표적 조직에서 1 일, 2 일, 3 일, 4 일, 5 일, 6 일, 및/또는 7 일에 검출가능하다. 일부 구현예에서, mRNA에 의해 암호화된 단백질의 발현은 제공된 리포좀 또는 조성물의 단일 투여 후 혈청 또는 표적 조직에서 1 주, 2 주, 3 주, 및/또는 4 주에 검출가능하다. 일부 구현예에서, mRNA에 의해 암호화된 단백질의 발현은 제공된 리포좀 또는 조성물의 단일 투여 후 1 개월 또는 더 긴 기간 후 검출가능하다.

[0302] **실시예**

[0303] **실시예 1** - *식 I의 라세미 화합물의 합성*



[0304]

[0305] **반응식 1**. *식 I의 라세미 화합물에 대한 합성 경로*

[0306] 라세미 화합물 **10**을, 트리플루오로아세트산에 의한 알파-아미노 *tert*-부틸 카바메이트의 절단 및 수득한 유리 아민의 이량체화로, 보호된 라이신 유도체 **1**, Boc-Lys(Z)-OSu 로부터 제조하여, 3,6-디옥소피페라진 **2**를 형성했다. 촉매적 팔라듐 상의 **2**의 수소화로 1차 디아민 **3**을 얻었고, 이것을 4 당량의 에폭사이드 **4** 및 트리에틸아민으로 처리하여 식 I의 라세미 3,6-디옥소피페라진 **10**을 얻었다.

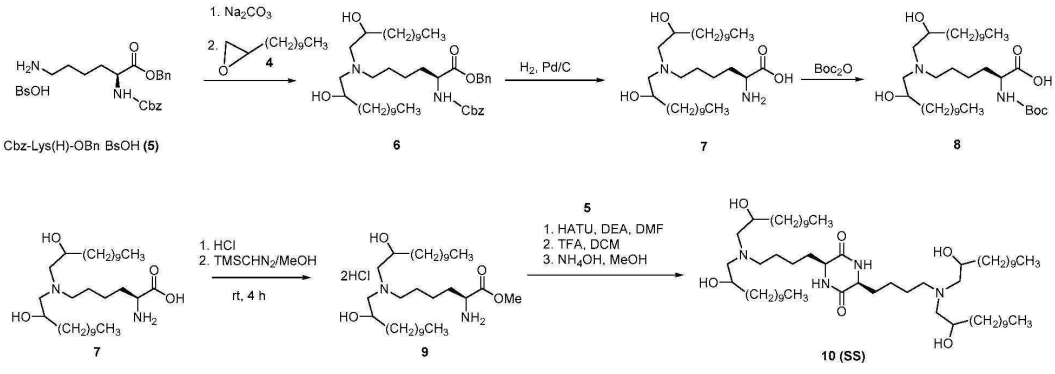
[0307] *디벤질(((2S,5S)-3,6-디옥소피페라진-2,5-디일)비스(부탄-4,1-디일))디카바메이트* **2**: 빙욕으로 냉각된 Boc-Lys(Z)-OSu **1** (50 g)에 TFA (60 mL)을 서서히 부가했다. 수득한 혼합물을 20 분 동안 교반했다. 빙욕을 제거하고 교반을 1 시간 동안 계속했다. TFA를 회전식 증발로 제거했다. 오일성 잔류물을 DMF (80 mL)에서 용해시키고 교반된 피리딘 (무수, 2.5 L)에 서서히 부가했다. 질량 분광분석법은 1시간 후 반응의 완료를 나타내었다. 피리딘을 회전식 증발로 제거하고 잔류물을 EtOAc (2 L)로 희석했다. 20분 교반 후 혼합물을 여과하여 **2**를 황백색 고형물 (밤새 진공 건조 후 20 g. 수율: 73%)로서 얻었다.

[0308] *(3S,6S)-3,6-비스(4-아미노부틸)피페라진-2,5-디온 - 2HOAc* **3**: AcOH (550 mL) 및 DCM (550 mL)의 혼합물 중 화합물 **2**에 Pd/C (10%, 습성. 10 g)을 부가했다. 이러한 혼합물을 H_2 밸룬 하에서 4 시간 동안 교반하고, 이때 질량 분광분석법이 반응의 완료를 나타내었다. 반응 혼합물을 10 분 동안 질소로 씻어 내고 셀라이트를 통해 여과했다. 셀라이트를 MeOH (3 X 250 mL)로 린스했다. 조합된 여과물을 증발시키고 잔류물을 EtOAc (1.0 L)와 함께 30 분 동안 교반했다. 여과로 **3**을 백색 고형물로서 얻었다 (밤새 진공 건조 후 16.37 g. 수율: 114%. ^{1}H NMR은 깨끗한 생성물을 보여주지만 샘플 중 추가의 HOAc에서는 그렇지 않다)

[0309] *3,6-비스(4-(비스(2-하이드록시도데실)아미노)부틸)피페라진-2,5-디온* **10**: 500 mL 압력 플라스크에서 실온에서 교반된 EtOH (75 mL) 중 **3** (15.87 g, 42.2 mmol) 및 **4** (57 mL, 261 mmol)의 혼합물에 Et_3N (23 mL, 165 mmol)을 부가했다. 플라스크를 질소로 5 분 동안 씻어 내고 밀봉했다. 혼합물 (고체 및 액체 슬러리)을 30 분 동안 실온에서 교반하고, 그 다음 150-155 ℃ (오일 배쓰 온도)로 가열하고 5 시간 동안 교반했다. 맑은 용액을 온도가 150 ℃에 도달한 후 수득했다. 실온으로 냉각한 후 반응 용액을 증발시키고 잔류물을 용출물로서 0-30% MeOH/DCM로 9회 및 용출물로서 0-30% MeOH/EtOAc로 2회 플래시 칼럼 크로마토그래피로 정제했다. 용출물로서 DCM 내지 75:22:3 DCM/MeOH/NH4OH (aq.)의 50%의 사용으로 극성이 적은 부산물과 함께 생성물이 공-용출된다. 부산물은 전개 용매로서 30% MeOH/DCM에 의한 TLC시 생성물과 밀접하게 움직였다. 전개 용매로서 30% MeOH/EtOAc에 의한 TLC시 생성물로부터 잘 분리되었다. 칼럼 정제로부터의 순수한 생성물 분획을 풀링하고 증발시켰다. 오일성 잔류물을 Et_2O에서 용해시키고 증발시켰다. 진공 하에서 밤새 건조하여 모든 용매를 제거하고 라세미 화합물 **10**을 밝은 황색 겔 (9.85 g, 수율: 24%)로서 얻었다. ELSD 검출에 의한 HPLC는 동일한 생성물 질량을 갖는 2개의 유사한 크기의 피크를 보여주었다. 원소 분석: (계산치): C, 72.63; H, 12.17; N, 5.64; (관측치): C, 72.25; H, 12.37; N, 5.68. 질량 분광분석법: 993.8 *m/z*.

[0310] 7.15 g의 **3** 및 25.6 mL의 **4** 에 의한 또 다른 시행에서 조 생성물을 용출물로서 0-30% MeOH/EtOAc로 2회 정제하여 2개의 배치의 생성물: 초기 분획으로부터의 1.55 g 배치 및 후기 분획으로부터의 7.38 g 배치를 얻었다. 2개의 배치 모두는 ^{1}H NMR에 의해 순수했다. ELSD 검출에 의한 HPLC는 동일한 생성물 질량을 갖는 7.38 g 배치에 대해서 2개의 유사한 크기의 피크뿐만 아니라 1.55 g 배치에 대해서 단일 생성물 피크를 보여주었다.

[0311] **실시예 2** - *식 I.b.1의 키랄 화합물 (즉, 화합물 10)의 합성.*



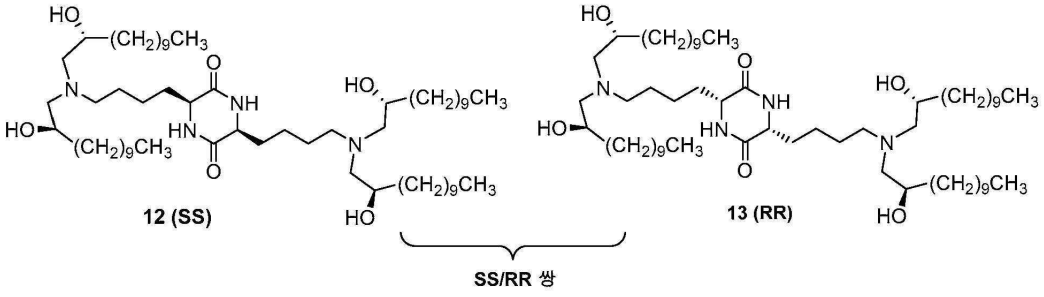
[0312]

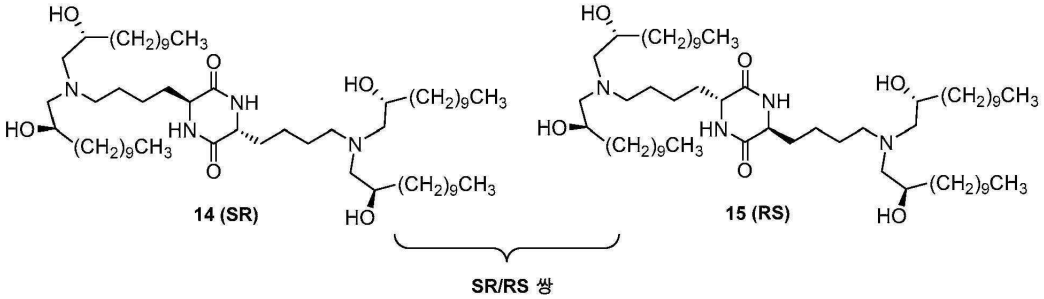
[0313] **반응식 2**. *식 I.b.1의 키랄 화합물 (즉, 화합물 10)에 대한 합성 경로.*

[0314] 키랄 화합물 **10**을 2 당량의 에폭사이드 **4**에 의한 보호된 라이신 유도체 **5**의 *N*-알킬화로 합성하여 디올 **6**을 형성했다. 촉매적 팔라듐 상의 디올 **6**의 수소화로 알파 아미노산 **7**을 형성하고, 이것은 2개의 부분으로 분할된다. 알파 아미노산 **7**의 제1 부분은 *tert*-부틸 카바메이트로서 보호된 이의 알파 아미노 그룹을 가지고 있고, Boc 무수물에 의한 처리시, 카복실산 **8**을 형성했다. 알파 아미노산 **7**의 제2 부분은 메틸 에스테르로 전환된 이의 유리

산을 가지고 있고 아민 9를 형성했다. 카복실산 8 및 아민 9는 비양성자성 용매 예컨대 DMF에서 펩타이드 커플링 시약 예컨대 HATU 및 디에탄올아민을 통해 아미드 중간체로 커플링되고, 아미드 중간체의 *tert*-부틸 카바메이트 그룹은 디클로로메탄 중 트리플루오로아세트산으로 절단되고, 수득한 아미노 에스테르 생성물은 피페라진-2,5-디온 10으로 고리화된다. 모든 키랄 중심에서의 입체화학은 이러한 경로를 통해 보존된다.

[0315] 아래의 키랄 화합물 12-15는 각 키랄 에폭사이드 개시 물질을 사용하여 기재된 합성 경로를 통해 제조된다.

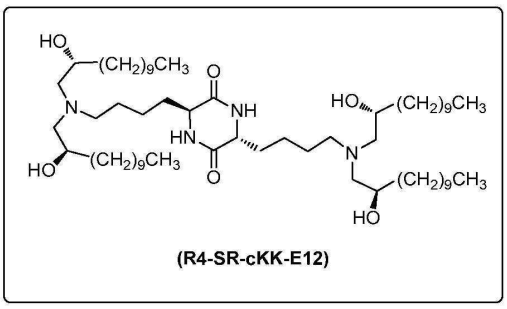




[0316]

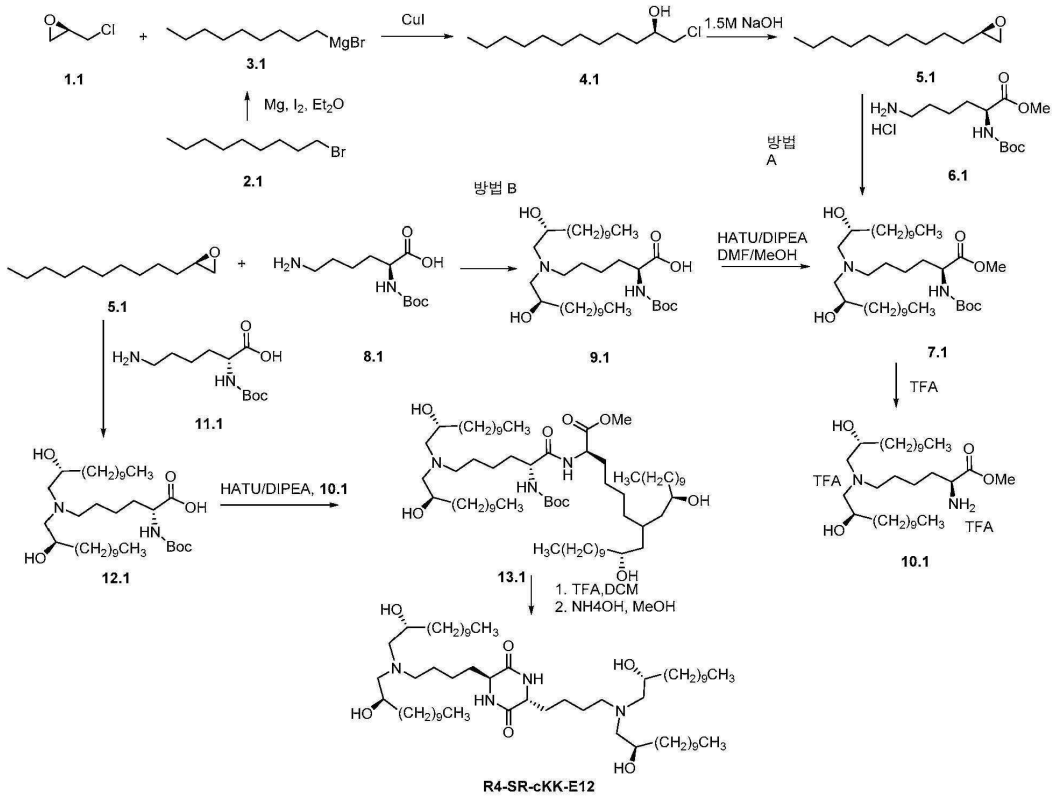
[0317] **반응식 3**. *키랄 화합물 12-15.*

[0318] **실시예 3** - *식 I.a.i의 화합물 (즉, R4-SR-cKK-E12)*



[0319]

[0320] **반응식 4**: *식 I.a.i의 화합물 (즉, R4-SR-cKK-E12)의 합성*



[0321]

[0322] *화합물 3.1의 합성:* 무수 Et_2O (1000 mL) 중 Mg (60 g, 2.5 mol)의 서스펜션에을 하나의 결정의 요오드, 그 다음 1-브로모노난 (25 mL)을 부가했다. 반응을 개시하고 용액은 수조에 의한 반응 플라스크의 가열 후 환류하기 시작했다. 나머지 1-브로모노난 (360 mL, 2.0 mol 총)을 추가의 깔때기를 통해 1.5 시간 내에 부가하여 환류를 유지했다. 부가 후, 반응 용액을 추가 30분 동안 수조로 환류에서 가열하고 그 다음 그것을 실온으로 냉각했다. **3.1**의 이러한 에테르 용액을 다음 반응에서 직접적으로 사용했다.

[0323] *화합물 4.1의 합성:* -78 ℃에서 5 L 3-목 플라스크에서 기계적 교반기로 교반된 무수 THF (1000 mL) 중 CuI (39 g, 0.2 mol)의 서스펜션에 R-에피클로로히드린 (185 g, 2.0 mol) (추가의 깔때기)을 부가했다. 부가 후, **3.1**의 상기 에테르 용액을 1 시간 내에 캐뉼라를 통해 부가했다. 혼합물을 -78 ℃에서 3.5 시간 동안 교반하고, 그 다음 포화된 수성 NH_4Cl (1500 mL) 으로 켄칭했다. 유기 층을 분리했다. 수성 층을 Et_2O (2000 mL)로 추출했다. 조합된 유기상을 염수로 세정하고, ($MgSO_4$) 상에서 건조시키고, 진공 하에서 증발시켰다. 조 생성물을 플래시 칼럼 크로마토그래피 (2.5 kg SiO_2, 헥산 중 0 - 10% EtOAc로 용출됨)로 정제하여 292 g의 **4.1** (수율: 66%)을 밝은 황색 오일로서 얻었다.

[0324] *화합물 5.1의 합성:* MeOH (600 mL) 및 THF (600 mL) 중 **4.1** (292 g, 1.33 mol)의 용액에 수성 NaOH (1.5M, 1000 mL)을 추가의 깔때기를 통해 0 ℃에서 부가했다. 부가 후 반응 혼합물을 실온에서 2.5 시간 동안 교반하고, TLC는 주생성물, 극소량의 개시 물질 (EtOAc: 헥산 = 1: 9, Rf = 0.6)을 보여주었다. THF 및 MeOH를 회전식 증발로 진공 하에서 제거했다. 수성 잔류물을 Et_2O (600 mL X 3)로 추출했다. 조합된 유기상을 염수로 세정하고, $MgSO_4$ 상에서 건조시키고, 증발시켰다. 황색 오일성 잔류물을 칼럼 (SiO_2, 2.5 kg, 헥산 중 0-10% EtOAc로 용출됨)로 정제하여 205 g (84%)의 순수한 **5.1**을 얻었다.

[0325] *화합물 7.1의 합성:* 방법 A: 실온에서 교반되고 있는, DCM (1000 mL) 및 MeOH (71 mL)의 혼합물 중 **6.1** (75 g, 0.25 mol)의 용액에 수성 Na_2CO_3 (2.0 M, 135 mL)을 부가했다. 유기 층을 분리하고 수성 층을 DCM (250 mL x 2)로 추출했다. 조합된 유기상을 Na_2SO_4 상에서 건조시키고 진공 하에서 증발시켰다. 잔류물을 MeOH (375 mL)에서 용해시키고, 그 다음 화합물 **5.1** (185 g, 1.0 mol)을 부가했다. 반응 혼합물을 MS 및 TLC가 주로 원하는 생성물을 보여줄 때까지 실온에서 4일 동안 교반했다. 농축 후, 조 생성물을 플래시 칼럼 크로마토그래피 (2.0 kg

SiO_2, 헥산 중 0 - 60% EtOAc로 용출됨)로 정제하여 **7.1** (131 g, 82%)을 옅은 점성 오일로서 얻었다.

[0326] *방법 B*: MeOH (600 mL) 중 **8.1** (50 g, 0.2 mol)의 서스펜션에 DIPEA (45 mL)을 부가혹, 그 다음 화합물 **5.1** (150 g, 0.813 mol, 4.0 equiv)을 부가했다. 반응 혼합물을 실온에서 7일 동안 교반했다. 용매를 제거하고, 잔류물을 칼럼 (1.0 kg의 SiO_2, EtOAc 중 0 - 30% MeOH로 용출됨)로 정제하여 **9.1**을 왁스성 고형물 (83 g, 67%)로서 얻었다. 0 ℃에서 교반된, DMF (1000 mL) 중 **9.1** (81 g, 0.13 mol)의 용액에 HATU (50.1 g, 0.13 mol), 그 다음 DIPEA (92 mL, 0.52 mol)을 부가했다. 혼합물을 0 ℃에서 40분 동안 교반하고, 그 다음 MeOH (53.2 mL, 10.0 equiv)을 부가했다. 수득한 혼합물을 실온에서 밤새 교반했다. 그 다음 그것을 물 (5000 mL)로 희석하고 EtOAc (500 mL X 4)로 추출했다. 조합된 유기상을 염수 (600 mL X 3)로 세정하고, 무수 $MgSO_4$ 상에서 건조시키고 진공 하에서 증발시켰다. 조 생성물을 칼럼 (1.0 kg의 SiO_2, 헥산 중 0 - 80% EtOAc로 용출됨)로 정제하여 **7.1** (69 g, 55% for 2 단계)을 옅은 점성 오일로서 얻었다.

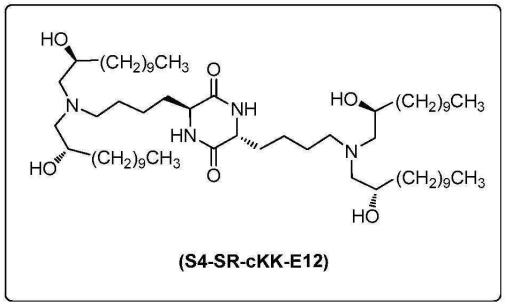
[0327] *화합물 10.1의 합성:* DCM (200 mL) 중 **7.1** (69 g, 0.11 mol)의 용액에 TFA (200 mL)을 부가하고, 혼합물을 실온에서 2 시간 동안 교반하고, MS 검출은 원하는 생성물만을 보여주었다. 모든 용매를 진공 하에서 증발시켜서 115 g의 갈색 착색된 오일-유사 생성물 **10.1**을 얻었고, 이것을 다음 단계에서 추가 정제없이 사용했다.

[0328] *화합물 12.1의 합성:* MeOH (900 mL) 중 **11.1**, Boc-D-라이신 (75 g, 0.305 mol)의 서스펜션에 DIPEA (68 mL) 및 **5.1** (196 g, 1.06 mol)을 부가했다. 혼합물을 실온에서 7일 동안 교반했다. 휘발성물질을 제거하고 조 생성물을 칼럼 (2.5 kg의 SiO_2, EtOAc 중 0 - 40% MeOH로 용출됨)로 정제하여 118 g (63%)의 순수한 화합물 **12.1**을 얻었다.

[0329] *화합물 13.1의 합성:* 빙욕에서 냉각된, DMF 중 **12.1** (67.5 g, 0.11 mol)의 용액 (600 mL, 최대 50 ℃로 30 분 동안 따뜻하게 하여 균질 용액을 얻음)에 HATU (50 g, 0.12 mol) 및 DIPEA (95 mL, 0.55 mol)을 부가했다. 수득한 혼합물을 0 ℃에서 45 분 동안 교반하고, 그 다음 DMF (400 mL) 중 화합물 **10.1** (115 g, 상기에서 수득됨)을 추가의 깔때기를 사용하여 부가했다. 혼합물을 실온에서 밤새 교반했다. 에테르 (1000 mL)을 부가하고, 그 다음 물 (1000 mL)을 부가했다. 유기상을 분리하고; 수성물을 에테르 (250 mL x 2)로 추출했다. 조합된 유기상을 물로 세정하고, 무수 $MgSO_4$ 상에서 건조시키고, 여과하고 농축했다. 잔류물을 칼럼 (1.0 kg의 SiO_2, EtOAc 중 0 - 20% MeOH로 용출됨)로 정제하여 94.2 g (76%)의 화합물 **13.1**을 얻었다.

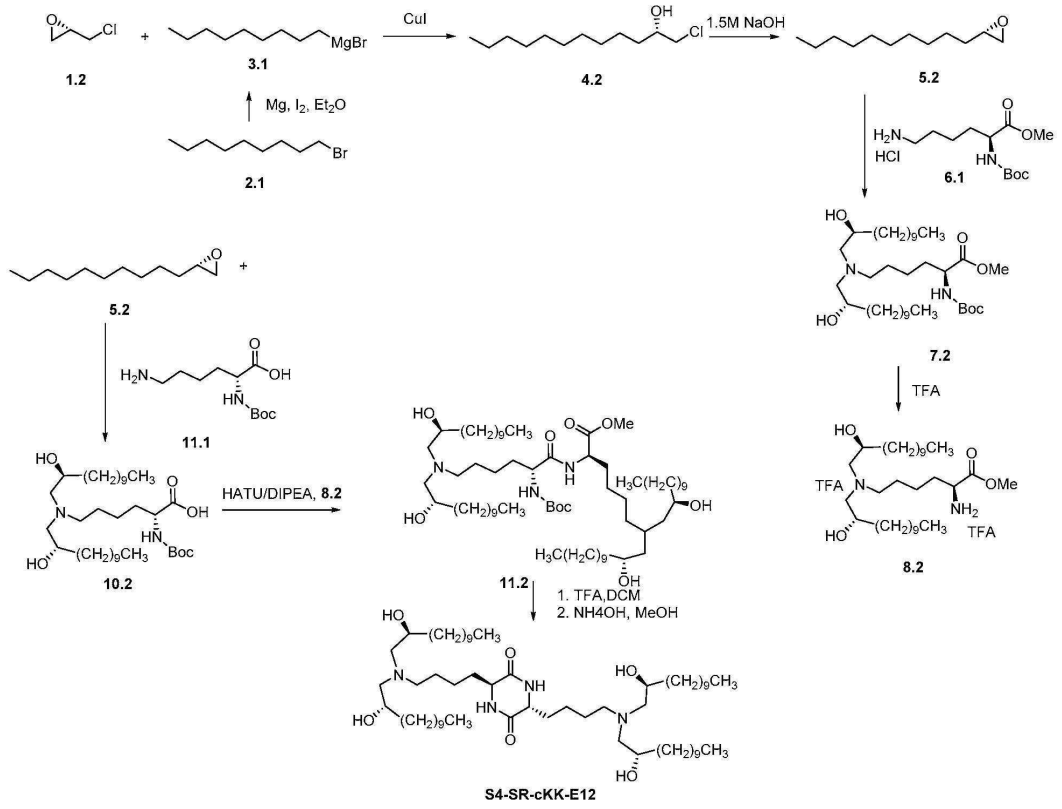
[0330] *식 I.a.i의 화합물 (즉, R4-SR-cKK-E12)의 합성:* DCM (300 mL) 중 **13.1** (94 g, 0.084 mol)의 용액에 TFA (300 mL)를 부가했다. 혼합물을 실온에서 2 시간 동안 교반했다. MS 검출은 완벽한 반응을 보여주었다. 용매를 진공 하에서 증발시켰다. 잔류물을 DCM (500 mL)에서 용해시키고 수성 Na_2CO_3 (1.0 M, 500 mL)로 세정했다. 수성 세척을 DCM (100 mL) 으로 역추출했다. 조합된 유기상을 무수 $NaSO_4$ 상에서 건조시키고 증발시켰다. 잔류물을 MeOH (1500 mL)에서 용해시키고 빙욕으로 냉각했다. 수성 NH_4OH (28%, 80 mL)을 추가의 깔때기를 통해 부가했다. 반응 혼합물을 최대 실온으로 서서히 따뜻해지도록 하고 주위 온도에서 2 일 동안 교반했다. 휘발성물질을 진공 하에서 증발시켰다. 조 생성물을 칼럼 (1.0 kg의 SiO_2, 용매: 1% NH_4OH, 4-9% MeOH, 95-90% EtOAc로 용출됨)로 정제하여 34 g의 순수한 **R4-SR- cKK-E12** 및 22 g의 불순한 **R4-SR- cKK-E12**를 얻었다. 불순한 **R4-SR- cKK-E12**를 칼럼으로 세정하여 12 g의 순수한 **R4-SR- cKK-E12**를 얻었다. 따라서, 총 46 g (55%)의 순수한 **R4-SR- cKK-E12** (고무질 고체)을 수득했다.

[0331] **실시예 4** - *식 I.a.ii의 화합물 (즉, S4-SR-cKK-E12)*

[0332] 

(S4-SR-cKK-E12)

[0333] **반응식 5**: *식 I.a.ii의 화합물 (즉, S4-SR-cKK-E12)의 합성*



[0334]

[0335] *화합물 3.1의 합성:* 무수 Et_2O (600 mL) 중 Mg (30 g, 1.25 mol)의 서스펜션에 하나의 결정의 요오드를 부가하고, 그 다음 1-브로모노난 (30 mL)를 부가했다. 반응을 개시하고 용액은 수조에 의한 반응 플라스크의 가열 후 환류하기 시작했다. 나머지 1-브로모노난 (161mL, 2.0 mol 총)을 추가의 깔때기를 통해 1.5 시간 내에 부가하여 환류를 유지했다. 부가 후, 반응 용액을 환류에서 수조로 추가 30분 동안 가열하고 그 다음 그것을 실온으로 냉각했다. **3.1**의 이러한 에테르 용액을 다음 반응에서 직접적으로 사용했다.

[0336] *화합물 4.2의 합성:* 기계적 교반기로 -78 ℃에서 5 L 3-목 플라스크에서 교반되고 있는, 무수 THF (1000 mL) 중 CuI (19 g, 0.1 mol)의 서스펜션에 S-에피클로로히드린 (92 g, 1.0 mol)을 추가의 깔때기로 부가했다. 부가 후, **3.2**의 상기 에테르 용액을 1 시간 내에 캐뉼라를 통해 부가했다. 혼합물을 -78 ℃에서 3.5 시간 동안 교반하고, 그 다음 포화된 수성 NH_4Cl (400 mL) 으로 켄칭했다. 유기 층을 분리했다. 수성 층을 Et_2O (1000 mL)로 추출했다. 조합된 유기상을 염수로 세정하고, ($MgSO_4$) 상에서 건조시키고, 진공 하에서 증발시켰다. 조 생성물을 플래시 칼럼 크로마토그래피 (2.5 kg SiO_2, 헥산 중 0 - 10% EtOAc로 용출됨)로 정제하여 111.6 g의 **4.2** (수율: 66%)을 밝은 황색 오일로서 얻었다.

[0337] *화합물 5.2의 합성:* MeOH (230 mL) 및 THF (230 mL) 중 **4.2** (111.3 g, 0.506 mol)의 용액에 수성 NaOH (1.5M, 395 mL)을 추가의 깔때기로 0 ℃에서 부가했다. 부가 후 반응 혼합물을 실온에서 2.5 시간 동안 교반하고, TLC는 주생성물 및 극소량의 개시 물질을 보여주었다 (EtOAc: 헥산 = 1: 9, Rf = 0.6). THF 및 MeOH를 회전식 증발로 진공 하에서 제거했다. 수성 잔류물을 Et_2O (200 mL X 3)로 추출했다. 조합된 유기상을 염수로 세정하고, $MgSO_4$ 상에서 건조시키고, 증발시켰다. 황색 오일성 잔류물을 칼럼 (SiO_2, 1.0 kg, 헥산 중 0-10% EtOAc로 용출됨)로 정제하여 81 g (87%)의 순수한 **5.2**를 얻었다.

[0338] *화합물 7.2의 합성:* 실온에서 교반되고 있는, DCM (100 mL) 및 MeOH (10 mL)의 혼합물 중 **6.1** (13 g, 0.044 mol)의 용액에 수성 Na_2CO_3 (2.0 M, 25 mL)를 부가했다. 유기 층을 분리하고 수성 층을 DCM (250 mL x 2)로 추출했다. 조합된 유기상을 Na_2SO_4 상에서 건조시키고 진공 하에서 증발시켰다. 잔류물을 MeOH (60 mL)에서 용해시키고, 그 다음 화합물 **5.2** (32 g, 0.174 mol)을 부가했다. 반응 혼합물을, MS 및 TLC가 주로 원하는 생성물을 보여줄 때까지 실온에서 4일 동안 교반했다. 농축 후, 조 생성물을 플래시 칼럼 크로마토그래피 (600 g SiO_2,

헥산 중 0 - 60% EtOAc로 용출됨)로 정제하여 **7.2** (23 g, 85%)을 옅은 점성 오일로서 얻었다.

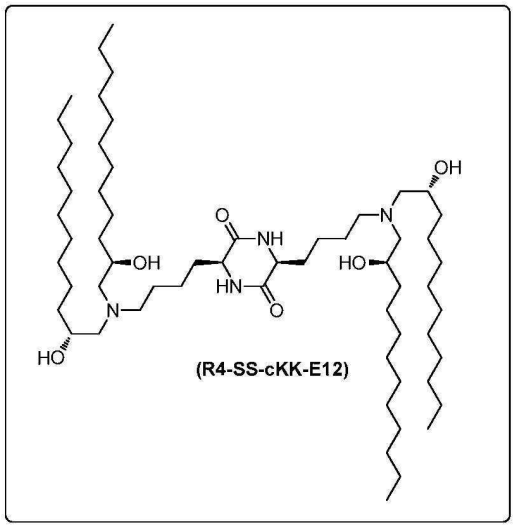
[0339] *화합물 8.2의 합성:* DCM (60 mL) 중 **7.2** (23 g, 0.0366 mol)의 용액에 TFA (60 mL)을 부가하고, 혼합물을 실온에서 2 시간 동안 교반하고, MS 검출은 원하는 생성물만을 보여주었다. 모든 용매를 진공 하에서 증발시켜서 40 g의 갈색 착색된 오일-유사 생성물 **8.2**를 얻었고, 이것을 다음 단계에서 추가 정제없이 사용했다.

[0340] *화합물 10.2의 합성:* MeOH (900 mL) 중 **11.1**, Boc-D-라이신 (14 g, 0.057 mol)의 서스펜션에 TEA (11.6 mL) 및 **5.2** (42 g, 0.228 mol)을 부가했다. 혼합물을 실온에서 7일 동안 교반했다. 휘발성물질을 제거하고 조 생성물을 칼럼 (1.0 kg의 SiO_2, EtOAc 중 0 - 40% MeOH로 용출됨)로 정제하여 24 g (70%)의 순수한 화합물 **10.2**를 얻었다.

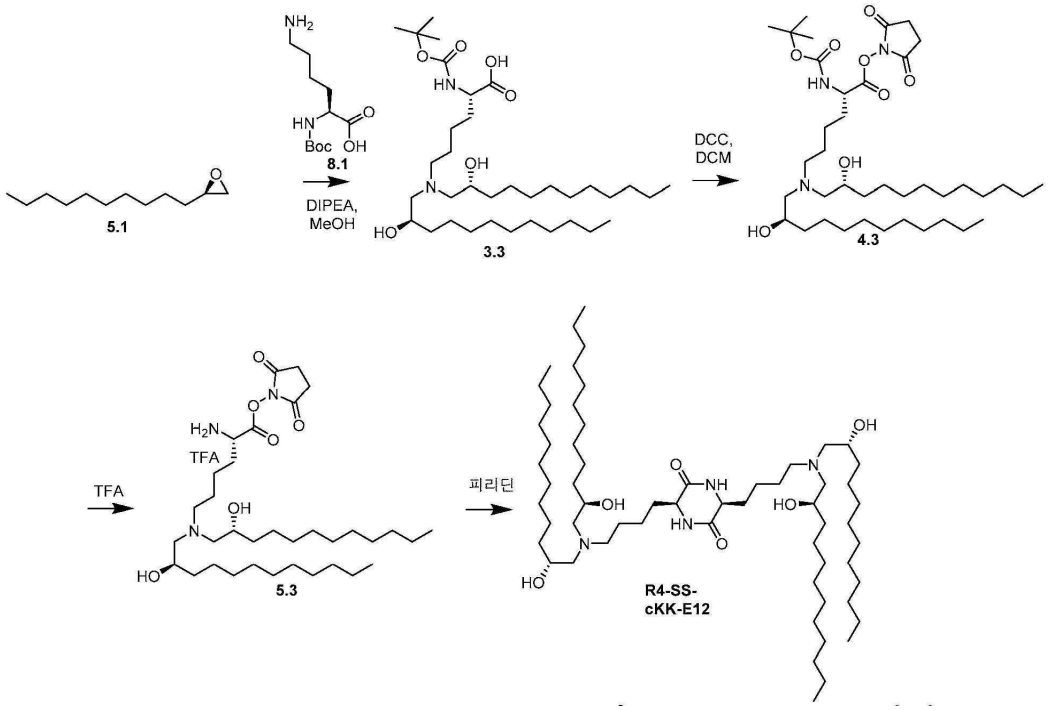
[0341] *화합물 11.2의 합성:* 빙욕으로 냉각되고 있는, DMF (120 mL) 중 **10.2** (9.1 g, 14.82 mmol)의 용액에 HATU (8.4 g, 22.23 mol) 및 DIPEA (25 mL, 148.2 mmol)을 부가했다. 혼합물을 0 ℃에서 45 분 동안 교반하고, 그 다음 DMF (80 mL) 중 화합물 **8.2**를 추가의 깔때기를 사용하여 부가했다. 수득한 혼합물을 실온에서 밤새 교반했다. MS 검출은 개시 물질이 없음을 보여주었다. 에테르 (1000 mL)을 부가하고, 그 다음 물 (1000 mL)를 부가했다. 유기상을 분리하고, 수성을 에테르 (200 mL x 2)로 추출했다. 조합된 유기상을 염수로 세정하고, 무수 $MgSO_4$로 건조시키고, 여과하고 농축했다. 잔류물을 칼럼 (330 g의 SiO_2, EtOAc 중 0 - 20% MeOH로 용출됨)로 정제하여 10.6 g의 원하는 화합물 **11.2**를 얻었다.

[0342] *식 I.a.ii의 화합물 (즉, S4-SR-cKK-E12)의 합성:* DCM (30 mL) 중 **11.2** (10.6 g, 0.084 mol)의 용액에 TFA (30 mL)를 부가했다. 혼합물을 실온에서 2 시간 동안 교반했다. MS 검출은 완벽한 반응을 보여주었다. 용매를 진공 하에서 증발시켰다. 잔류물을 DCM (150 mL)에서 용해시키고 수성 Na_2CO_3 (1.0 M, 200 mL)로 세정했다. 수성 세척을 DCM (100 mL) 으로 역추출했다. 조합된 유기상을 무수 $NaSO_4$ 상에서 건조시키고 증발시켰다. 잔류물을 MeOH (200 mL)에서 용해시키고 빙욕으로 냉각했다. 수성 NH_4OH (28%, 10 mL)을 추가의 깔때기를 사용하여 부가했다. 반응 혼합물을 최대 실온으로 서서히 따뜻해지도록 하고 주위 온도에서 2 일 동안 교반했다. 휘발성물질을 진공 하에서 증발시켰다. 조 생성물을 칼럼 (600 g의 SiO_2, 용매: 1% NH_4OH, 4-9% MeOH, 95-90% EtOAc로 용출됨)로 정제하여 5.1 g의 순수한 **S4-SR-cKK-E12**를 얻었다.

[0343] **실시예 5** - *식 I.b.1.i의 화합물 (즉, R4-SS-cKK-E12)*

[0344] 

[0345] **반응식 6:** *식 I.b.1.i의 화합물 (즉, R4-SS-cKK-E12)의 합성.*

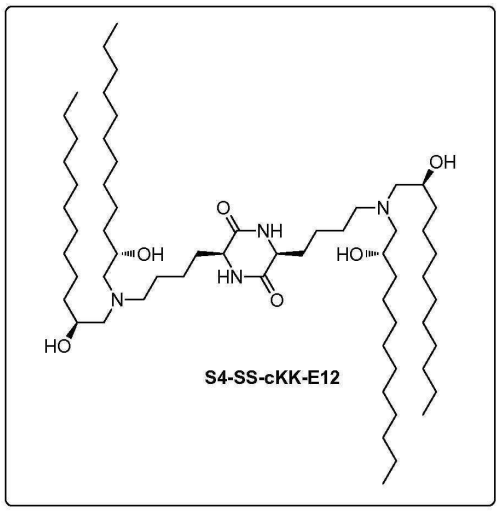


[0346]

[0347] *화합물 3.3 (N^2-(tert-부톡시카보닐)-N^6,N^6-비스((R)-2-하이드록시도데실)-L-라이신)의 합성:* 메탄올 (80 ml) 중 *R*-에폭사이드 (**5.1**, 46 g, 250 mmol), Boc-L-라이신 **8.1** (15 g, 61 mmol), 및 디이소프로필에틸아민 (11 ml)의 혼합물을 실온에서 3일 동안 교반했다. 휘발성물질을 제거하고 황색 오일성 잔류물을 EtOAc/MeOH (100/0 내지 70/30, 20 min)로 용출하는 실리카겔 (330 g)상 크로마토그래피로 정제하여 생성물 **3.3**을 백색 고형물 (9.7 g, 26%)로서 얻었다.

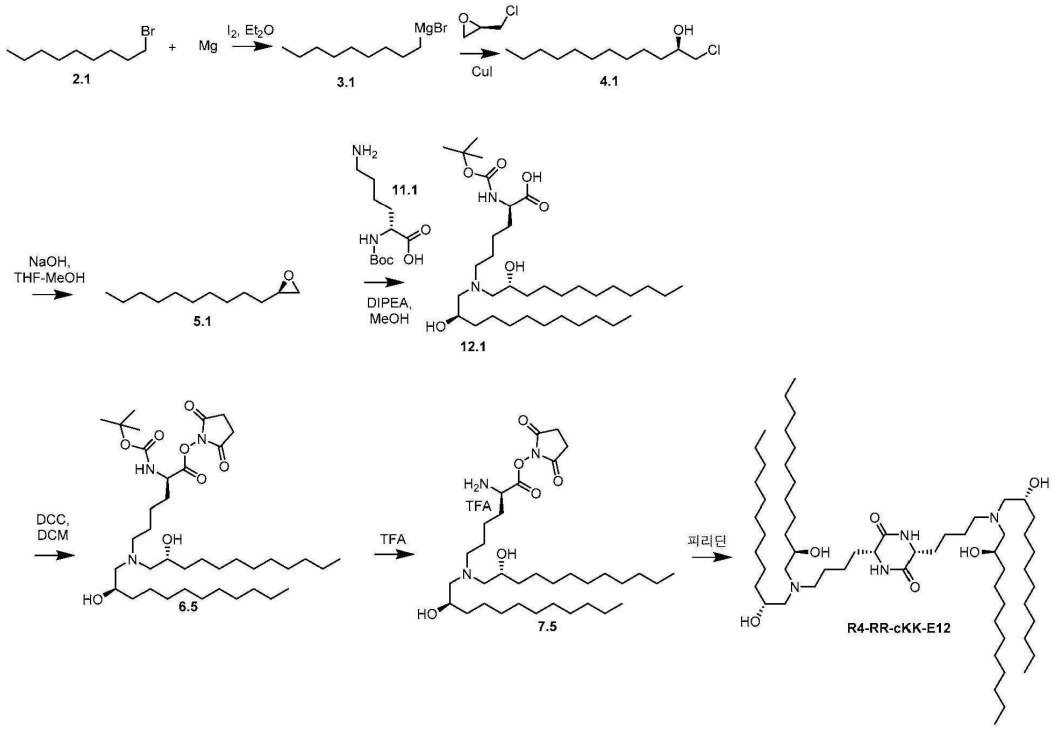
[0348] *식 I.b.1.i의 화합물 (즉, R4-SS-cKK-E12; ((3S,6S)-3,6-비스(4-(비스((S)-2-하이드록시도데실)아미노) 부틸) 피페라진-2,5-디온))의 합성:* DCM (280 ml) 중 **3.3** (7.4 g, 12 mmol) 및 NHS (1.38 g, 12 mmol)의 용액에 DCC (2.97 g, 14.4 mmol)을 부가했다. 반응 혼합물을 실온에서 1.5 시간 동안 교반했다. 그 다음 용매를 제거하고 잔류물 (조물질 **4.3**)을 TFA (30 ml)에서 용해시켰다. 수득한 혼합물을 실온에서 1 시간 동안 교반했다. 그 다음 TFA를 제거하고 DCM (30 ml)을 잔류물에 부가하고, 공-증발시켜 잔류 TFA를 제거했다. 조 **5.3**을 DCM (30 mL)에서 용해시키고 무수 피리딘 (480 mL)에 0 ℃에서 N_2 하에서 부가했다. 수득한 혼합물을 실온에서 밤새 교반했다. 그 다음 피리딘을 제거하고 잔류물을 디에틸 에테르 (300 mL)로 희석했다. 백색 형성된 고형물을 여과로 제거했다. 여과물을 수성 Na_2CO_3 (1M, 150 ml) 및 염수 (150 ml)로 세정하고, Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 농축했다. 잔류물을 3%NH_4OH/7%MeOH/90%EtOAc로 용출하는 칼럼 크로마토그래피 5회 (하나의 330 g 칼럼 그 다음 4개의 80 g 칼럼)로 정제하여 1.05 g의 순수한 **R4-SS-cKK-E12**를 옅은색 검으로서 얻었다. 1.0 g의 **R4-SS-cKK-E12**.

[0349] **실시예 6** - *식 I.b.1.ii의 화합물 (즉, S4-SS-cKK-E12)*



[0350]

[0351] **반응식 7:** *식 I.b.1.ii의 화합물 (즉, S4-SS-cKK-E12)의 합성*



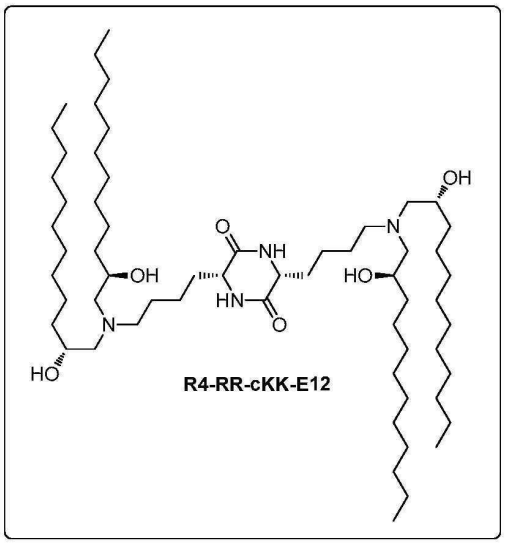
[0352]

[0353] *화합물 3 (N^2-(tert-부톡시카보닐)-N^6,N^6-비스((S)-2-하이드록시도데실)-L-라이신)의 합성:* 메탄올 (80 ml) 중 *S*-에폭사이드 (**5.2**, 46 g, 250 mmol), Boc-L-라이신 **8.1** (15 g, 61 mmol) 및 디이소프로필에틸아민 (11 ml)의 혼합물을 실온에서 8일 동안 교반했다. 휘발성물질을 제거하고 황색 오일성 잔류물을 EtOAc/MeOH (100/0 내지 70/30, 20 min)로 용출하는 실리카겔 (330 g) 상 크로마토그래피로 정제하여 생성물 **3.4**을 백색 고형물 (22 g, 59%)로서 얻었다.

[0354] *식 I.b.1.ii의 화합물 (즉, S4-SS-cKK-E12; ((3S,6S)-3,6-비스(4-(비스((S)-2-하이드록시도데실)아미노)부틸)피페라진-2,5-디온)의 합성:* DCM (280 ml) 중 **3.4** (24.5 g, 40 mmol) 및 NHS (4.6 g, 40 mmol)의 용액에 DCC (9.9 g, 48 mmol)을 부가했다. 반응 혼합물을 실온에서 3 시간 동안 교반했다. 그 다음 용매를 제거하고 잔류물 (조물질 **4.4**)을 TFA (100 ml)에서 0 ℃에서 용해시켰다. 수득한 혼합물을 실온까지 따뜻해지도록 하고 45 분 동안 교반했다. 그 다음 TFA를 제거하고 DCM (120 ml)을 잔류물에 부가하고, 그 다음 공-증발시켜 잔류 TFA를 제거했다. 조 **5.4**을 무수 피리딘 (1.6 L)에서 0 ℃에서 N_2 하에서 용해시키고, 수득한 혼합물을 실온에서 밤새 교반했다. 그 다음 피리딘을 회전증발기로 제거하고, 잔류물을 디에틸 에테르 (1 L)로 희석했다. 백색 형성된 고

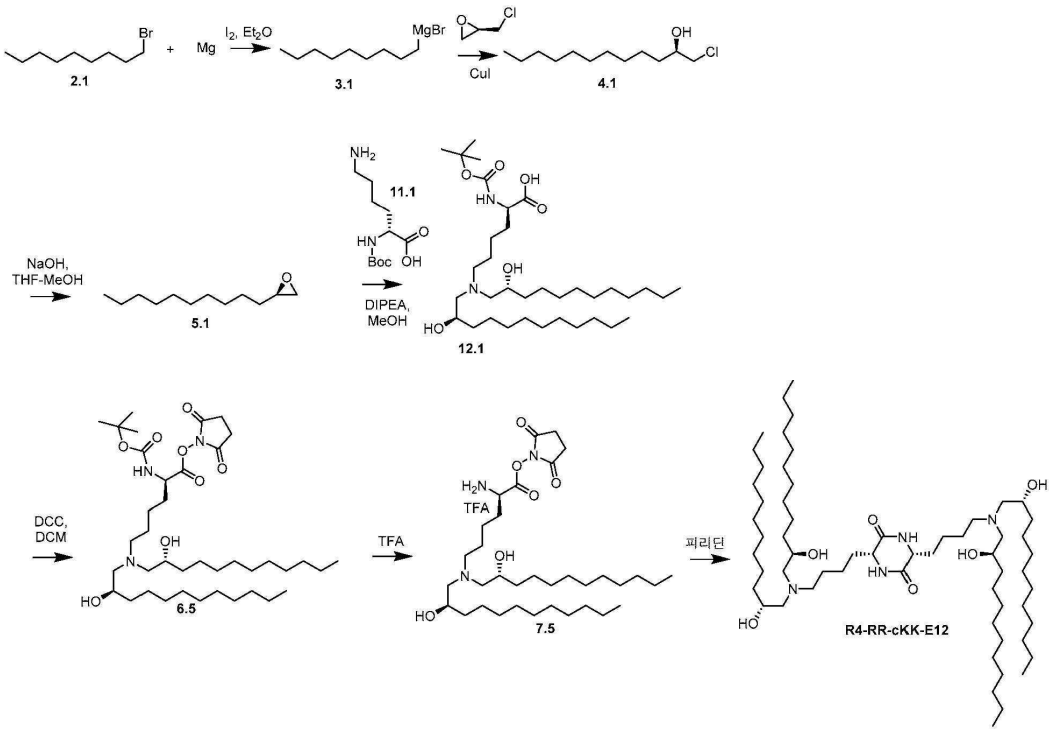
형물을 여과로 제거하고 디에틸 에테르 (200 ml)로 세정했다. 여과물을 수성 Na_2CO_3 (1M, 500 ml) 및 염수 (500 ml)로 세정하고, Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 농축했다. 잔류물을 0-50% (3%NH_4OH/7%MeOH/90% EtOAc)/EtOAc로 용출하는 실리카겔(330 g) 상 칼럼 크로마토그래피로 정제하여 6.8 g TLC 순수한 **S4-SS-cKK-E12** 및 7.1 g 약간 불순한 **S4-SS-cKK-E12**를 얻었다. 6.8 g (6.8 mmol) TLC 순수한 **S4-SS-cKK-E12**를 120 ml의 에틸 아세테이트에서 용해시켰다. Boc_2O (0.22 g, 1.0 mmol)을 부가했다. 혼합물을 실온에서 2 시간 동안 교반했다. 용매를 제거하고 잔류물을 0-50% (3%NH_4OH/7%MeOH/90%EtOAc)/EtOAc로 용출하는 실리카겔(120 g) 상 칼럼 크로마토그래피로 정제하여 5.7 g (84%)의 순수한 생성물 **S4-SS-cKK-E12**를 얻었고, 이것은 아민 부산물이 없었다.

[0355] **실시예 7** - *식 I.b.2.i의 화합물 (즉, R4-RR-cKK-E12)*



[0356]

[0357] **반응식 8:** *식 I.b.2.i의 화합물 (즉, R4-RR-cKK-E12)의 합성*



[0358]

[0359] *화합물 3.1의 합성:* 무수 Et_2O (0.9 L)에서 현탁된 마그네슘 (60 g)에 1-브로모노난 **2.1** (20 mL)을 부가하고, 그 다음 촉매량의 요오드 (50 mg)을 부가했다. 수득한 혼합물을, Mg과 **2.1**과의 반응이 개시될 때까지 뜨거운 수조로 가열했다. 배쓰를 제거하고 나머지 1-브로모노난 (379.1 mL)을 부가하여 완만한 환류를 유지했다. **2.1**의

부가 후, 환류를 추가 30분 동안 뜨거운 수조로 유지했다. **3.1**의 수득한 그리냐드 용액을 냉각하고 다음 단계에서 직접적으로 사용했다.

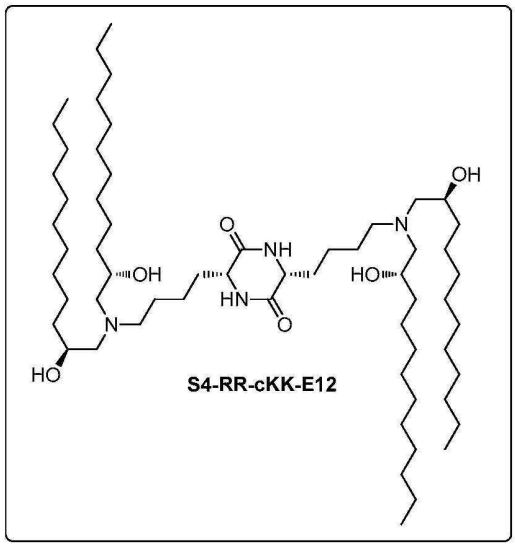
[0360] *화합물 4.1의 합성:* -78 ℃에서 THF (1.5 L)에서 현탁된 CuI (38.1 g)에 *R*-(-)-에피클로로히드린 (156.8 mL)를 부가했다. 그 다음 **3.1**의 상기 그리냐드 용액을, 반응 온도를 <-65 ℃에서 유지하면서 캐뉼라를 통해 부가했다. 수득한 반응 혼합물을 -78 ℃에서 추가의 3 시간 동안 교반했다. 그 다음, 포화된 수성 염화암모늄 용액 (0.8 L)을 주의하여 부가하고, 그 다음 물 (1.0 L)을 부가했다. 수득한 혼합물을 교반하고 실온까지 따뜻해지도록 했다. 유기 층을 분리하고, 수성 층을 Et_2O (0.5 L x 2)로 추출했다. 유기 층을 Et_2O 추출물과 조합하고 수득한 용액을 염수 (0.5 L x 2)로 세정하고, 무수 황산마그네슘 상에서 건조시켰다. 용매를 진공 하에서 증발시키고, 수득한 잔류물을 실리카겔 칼럼 (헥산 내지 20% EtOAc/헥산) 상에서 정제하여 **4.1** (243.5 g, 55%)을 황색 오일로서 제공했다.

[0361] *화합물 5.1의 합성:* 0 ℃에서 교반된, 1:2.6 MeOH-THF (3.6 L) 중 4.1 (243.49 g)의 용액에 수성 NaOH 용액 (1.5 M, 0.89 L, 1.33 몰)을 서서히 부가했다. 수득한 혼합물을 따뜻해지도록 하고 실온에서 3 시간 동안 교반했다. TLC 분석은 **4.1**의 완벽한 사라짐을 보여주었다. 유기 용매를 증발시키고, 수성 층을 Et_2O (1 L + 500 mL x 2)로 추출했다. 유기 추출물을 조합하고, 염수 (600 mL)로 세정하고, 무수 황산마그네슘 상에서 건조시켰다. 용매를 진공 하에서 증발시켜서 잔류물을 얻었고, 이것을 실리카겔 칼럼 (헥산 내지 10% EtOAc/헥산) 상에서 정제하여 에폭사이드 **5.1** (193.7 g, 95%)을 밝은 황색 오일로서 제공했다.

[0362] *화합물 12.1의 합성:* MeOH (1.04 L) 중 *N*-Boc-D-라이신 **11.1** (49.2 g, 0.2 몰) 및 에폭사이드 **5.1** (147.2 g, 0.8 몰)의 혼합물을 실온에서 교반했다. DIPEA (51.9 g, 0.4 몰)을 부가했다. 그 다음, 수득한 혼합물을 8일 동안 교반하고, 그 다음 농축 건조했다. 잔류물을 실리카겔 칼럼 (2 kg, MeOH/DCM, 0 내지 10%) 상에서 정제하여 49.2 g의 주로 순수한 **12.1** (MZ-550-180) 및 58.3 g의 불순한 **12.1**을 얻었고, 이것을 제2 칼럼 (1.5 kg, MeOH/EtOAc, 10 내지 40%)로 정제하여 41.4 g의 주로 순수한 **12.1**을 얻었다. 2개의 주로 순수한 배치를 조합하고 EtOAc (0.5 L)와 함께 3 시간 동안 교반했다. 혼합물을 여과하여 41.4 g 순수한 **12.1**을 백색 고형물로서 얻었다. 여과물을 농축 건조했다. 잔류물을 EtOAc (0.1 L)와 함께 1 시간 동안 교반하고 여과하여 10.6 g의 순수한 **12.1**을 얻었다. 여과물을 농축 건조하고 잔류물을 실리카겔 칼럼 (330 g, MeOH/EtOAc, 10 내지 40%) 상에서 정제하여 제3 배치의 26.9 g 순수한 **12.1**. 총 78.9 g의 순수한 **12.1**을 수득했다. 수율: 64%

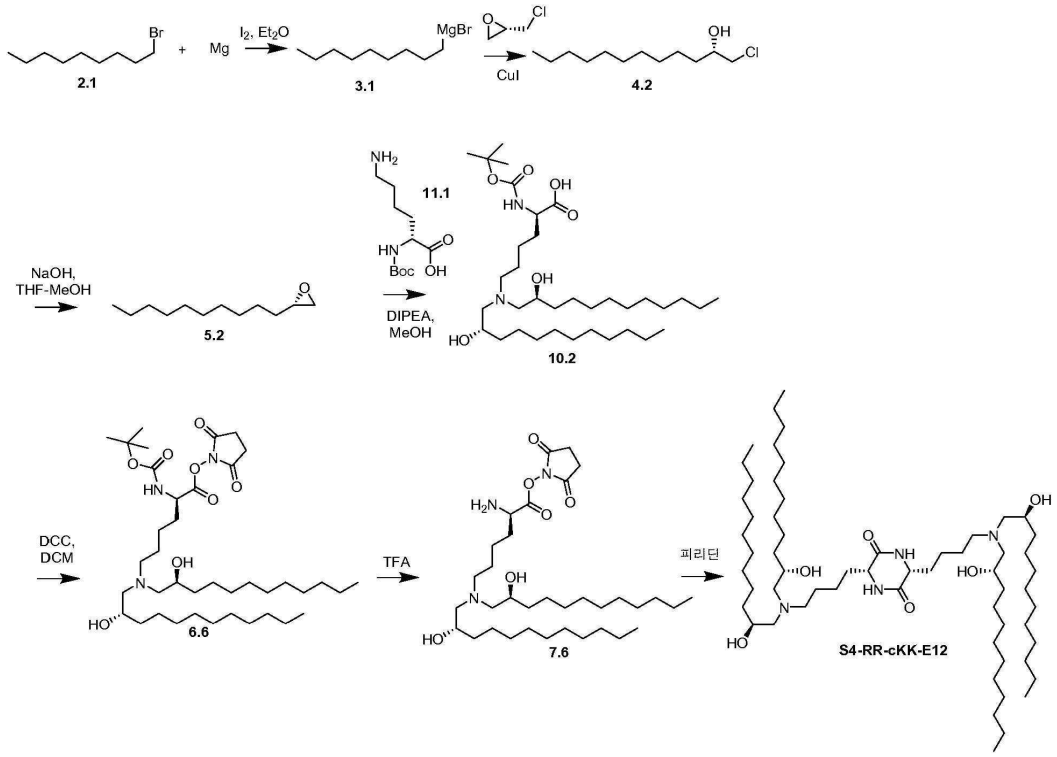
[0363] *식 I.b.2.i의 화합물 (즉, R4-RR-cKK-E12)의 제조:* 배치 1: DCM (70 mL) 중 **12.1** (6.14 g, 10 mmol) 및 *N*-하이드록시석신이미드 (1.15 g, 10 mmol)의 용액에 DCC (2.47 g, 12 mmol)을 부가했다. 수득한 혼합물을 실온에서 3 시간 동안 교반했다. 휘발성물질을 진공 하에서 증발시켜서 잔류물 (NHS 에스테르 **6.5**)을 얻었고, 이것을 TFA (25 mL)에서 용해시키고 0.5 시간 동안 교반했다. TFA를 진공 하에서 제거하고, 잔류물 (화합물 **7.5**)을 0 ℃로 냉각했다. 피리딘 (무수, 400 mL)을 부가하고, 그리고 반응 혼합물을 실온에서 2 시간 동안 교반했다. 피리딘을 진공 하에서 제거하고, 잔류물을 Et_2O (300 mL)에서 현탁시켰다. 고형물을 여과로 제거했다. 여과물을 1 M Na_2CO_3 수용액 (150 mL) 및 염수 (150 mL)로 세정하고, 무수 황산마그네슘 상에서 건조시키고, 농축 건조했다. 잔류물을 칼럼 크로마토그래프 (80 g, 7:3 MeOH-NH_3-H_2O (EtOAc로 4회)/EtOAc, 0 내지 50%)로 분리하여 **R4-RR-cKK-E12**를 고무질 고형물 (2.22 g)로서 얻었다. 다중 침전 및 EtOAc로부터의 분쇄로 순수한 **R4-RR-cKK-E12** (0.46 g)을 검으로서 얻었다.

[0364] **실시예 8** - *식 I.b.2.ii의 화합물 (즉, S4-RR-cKK-E12)*



[0365]

[0366] **반응식 9:** *식 I.b.2.ii의 화합물 (즉, S4-RR-cKK-E12)의 합성*



[0367]

[0368] *화합물 3.1의 합성:* 무수 Et_2O (0.9 L)에서 현탁된 마그네슘 (60 g)에 1-브로모노난 **2.1** (20 mL)을 부가하고, 그 다음 촉매량의 요오드 (50 mg)을 부가했다. 수득한 혼합물을 Mg과 **2.1** 과의 반응이 개시될 때까지 뜨거운 수조로 가열했다. 배쓰를 제거하고 나머지 1-브로모노난 (379.1 mL)을 부가하여 완만한 환류를 유지했다. **2.1**의 부가 후, 환류를 추가 30분 동안 뜨거운 수조로 유지했다. **3.1**의 수득한 그리냐드 용액을 냉각하고 다음 단계에서 직접적으로 사용했다.

[0369] *화합물 4.2의 합성:* -78 ℃에서 THF (1.5 L)에서 현탁된 CuI (38.1 g)에 *S*-(-)-에피클로로히드린 (156.8 mL)을 부가했다. 그 다음 **3.1**의 상기 그리냐드 용액을 반응 온도를 <-65 ℃에서 유지하면서 캐뉼라를 통해 부가했다. 수득한 반응 혼합물을 -78 ℃에서 추가의 3 시간 동안 교반했다. 그 다음, 포화된 수성 염화암모늄 용액 (0.8 L)을 주의하여 부가하고, 그 다음 물 (1.0 L)을 부가했다. 수득한 혼합물을 교반하고 실온까지 따뜻해지도록 했다. 유기 층을 분리하고, 수성 층을 Et_2O (0.5 L x 2)로 추출했다. 유기 층을 Et_2O 추출물과 조합하고 수득한

용액을 염수 (0.5 L x 2)로 세정하고, 무수 황산마그네슘 상에서 건조시켰다. 용매를 진공 하에서 증발시키고, 잔류물을 실리카겔 칼럼 (헥산 내지 20% EtOAc/헥산) 상에서 정제하여 **4.2** (250.8 g, 57%)을 밝은 황색 오일로서 제공했다.

[0370] *화합물 5.2의 합성:* 0 ℃에서 교반된 1:2.6 MeOH-THF (3.9 L) 중 **4.2** (250.8 g)의 용액에 수성 NaOH 용액 (1.5 M, 1.36 몰, 0.90 L)을 서서히 부가했다. 수득한 혼합물을 따뜻해지도록 하고 실온에서 3 시간 동안 교반했다. TLC 분석은 **4.2**의 완변한 사라짐을 보여주었다. 유기 용매를 증발시키고, 수성 층을 Et_2O (1 L + 500 mL x 2)로 추출했다. 유기 추출물을 조합하고, 염수 (600 mL)로 세정하고, 무수 황산마그네슘 상에서 건조시켰다. 용매를 진공 하에서 증발시켜서 잔류물을 얻었고, 이것을 실리카겔 칼럼 (헥산 내지 10% EtOAc/헥산) 상에서 정제하여 **5.2** (195.4 g, 93%)을 밝은 황색 오일로서 제공했다.

[0371] MeOH (1.04 L) 중 *N*-Boc-D-라이신 **11.1** (49.2 g, 0.2 몰) 및 에폭사이드 **5.2** (147.2 g, 0.8 몰)의 혼합물을 실온에서 교반했다. DIPEA (51.9 g, 0.4 몰)을 부가했다. 수득한 혼합물을 그 다음 8일 동안 교반하고, 그 다음 농축 건조했다. 수득한 잔류물을 실리카겔 칼럼 (2 kg, MeOH/EtOAc, 10 내지 30%) 상에서 정제하여 **10.2** (79.9 g, 65%)을 백색 고형물로서 얻었다.

[0372] *식 I.b.2.ii의 화합물 (즉, S4-RR-cKK-E12)의 제조.* DCM (800 mL) 중 **10.2** (61.4 g, 100 mmol) 및 *N*-하이드록시석신이미드 (11.5 g, 100 mmol)의 용액에 DCC (24.7 g, 120 mmol)을 부가했다. 수득한 혼합물을 실온에서 4 시간 동안 교반했다. 휘발성물질을 진공 하에서 증발시켜서 잔류물 (NHS 에스테르 **6.6**)을 얻었고, 이것을 TFA (25 mL)에서 용해시키고 40분 동안 교반했다. TFA를 진공 하에서 제거하고, 잔류물 (화합물 **7.6**)을 0 ℃로 냉각했다. 피리딘 (무수, 3.5 L)을 부가하고, 그리고 반응 혼합물을 실온에서 19 시간 동안 교반했다. 피리딘을 진공 하에서 제거하고, 잔류물을 Et_2O (3.0 L)에서 현탁시켰다. 고형물을 여과로 제거했다. 여과물을 1 M 수성 Na_2CO_3 용액 (1.0 L) 및 염수 (1.0 L)로 세정하고, 무수 황산마그네슘 상에서 건조시키고, 농축 건조했다. 잔류물을 칼럼 크로마토그래프 ((7%MeOH/3%NH_3-H_2O/90%EtOAc)/EtOAc, 0 내지 50%로 용출하는 4 x 330 g 실리카겔 칼럼)로 정제하여 **S4-RR-cKK-E12**를 고무질 고형물 (15.9 g, 16%)로서 제공했다.

[0373] **실시예 9** - *제형*

[0374] 본 명세서에서 기재된 제형은 다양한 핵산 염기 물질을 캡슐화하기 위해 설계된 1종 이상의 양이온성 지질, 헬퍼 지질 및 페길화된 지질을 이용하는 가변 비의 다중-성분 지질 혼합물로 구성되었다. 도처에 이용된 양이온성 지질은 식 I의 화합물 (3,6-비스(4-(비스(2-하이드록시도데실)아미노)부틸)피페라진-2,5-디온)이다. 헬퍼 지질은 (비배타적으로) 하기를 포함할 수 있다: DSPC (1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린), DPPC (1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포콜린), DOPE (1,2-디올레일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민), DOPC (1,2-디올레일-sn-글리세로-3-포스포티딜콜린) DPPE (1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민), DMPE (1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민), DOPG (,2-디올레오일-*sn*-글리세로-3-포스포-(1'-*rac*-글리세롤)), 콜레스테롤, 등. 페길화된 지질은 C_6-C_{20} 길이의 알킬 사슬(들)을 갖는 지질에 공유결합된 최대 5 kDa의 길이를 갖는 폴리(에틸렌) 글리콜 사슬을 (비배타적으로) 포함할 수 있다.

[0375] *메신저 RNA 물질*

[0376] 인간 인자 IX (FIX), 코돈-최적화된 개똥벌레 루시퍼라아제 (FFL) 및 코돈-최적화된 인간 아르기니노석시네이트 합성효소 (ASS1) 메신저 RNA를, 유전자를 암호화하는 플라스미드 DNA 템플레이트로부터의 *시험관내* 전사로 합성하고, 이어서 5' 캡 구조물 (캡 1) (Fechter, P.; Brownlee, G.G. "Recognition of mRNA cap structures by viral and cellular proteins" *J. Gen. Virology* **2005**, *86*, 1239-1249) 및 겔 전기영동에 의해 결정될 때 길이가 대략 250 뉴클레오타이드인 3' 폴리(A) 테일을 부가했다. 각 mRNA 생성물에 존재하는 5' 및 3' 미번역된 영역을 각각 X 및 Y로 표시하고, 서술된 바와 같이 정의한다 (*아래 참조*).

[0377] *코돈-최적화된 인간 아르기니노석시네이트 합성효소 (ASS1) mRNA:*

XAUGAGCAGCAAGGGCAGCGUGGUGCUGGCCUACAGCGGCGGCCUGGACACCAGC
UGCAUCCUGGUGUGGCUGAAGGAGCAGGGCUACGACGUGAUCGCCUACCUGGCCA
ACAUCGGCCAGAAGGAGGACUUCGAGGAGGCCCGCAAGAAGGCCCUGAAGCUGGG
CGCCAAGAAGGUGUUCAUCGAGGACGUGAGCCGCGAGUUCGUGGAGGAGUUCAU
CUGGCCCGCCAUCCAGAGCAGCGCCCUGUACGAGGACCGCUACCUGCUGGGCACC
AGCCUGGCCCGCCCCUGCAUCGCCCGCAAGCAGGUGGAGAUCGCCCAGCGCGAGG
GCGCCAAGUACGUGAGCCACGGCGCCACCGGCAAGGGCAACGACCAGGUGCGCUU
CGAGCUGAGCUGCUACAGCCUGGCCCCCCAGAUCAAGGUGAUCGCCCCCUGGCGC
AUGCCCGAGUUCUACAACCGCUUCAAGGGCCGCAACGACCUGAUGGAGUACGCCA
AGCAGCACGGCAUCCCCAUCCCCGUGACCCCCAAGAACCCCUGGAGCAUGGACGA

[0378]

GAACCUGAUGCACAUCAGCUACGAGGCCGGCAUCCUGGAGAACCCCAAGAACCAG
GCCCCCCCCGGCCUGUACACCAAGACCCAGGACCCCGCCAAGGCCCCCAACACCCC
CGACAUCCUGGAGAUCGAGUUCAAGAAGGGCGUGCCCGUGAAGGUGACCAACGU
GAAGGACGGCACCACCCACCAGACCAGCCUGGAGCUGUUCAUGUACCUGAACGAG
GUGGCCGGCAAGCACGGCGUGGGCCGCAUCGACAUCGUGGAGAACCGCUUCAUCG
GCAUGAAGAGCCGCGGCAUCUACGAGACCCCCGCCGGCACCAUCCUGUACCACGC
CCACCUGGACAUCGAGGCCUUCACCAUGGACCGCGAGGUGCGCAAGAUCAAGCAG
GGCCUGGGCCUGAAGUUCGCCGAGCUGGUGUACACCGGCUUCUGGCACAGCCCCG
AGUGCGAGUUCGUGCGCCACUGCAUCGCCAAGAGCCAGGAGCGCGUGGAGGGCAA
GGUGCAGGUGAGCGUGCUGAAGGGCCAGGUGUACAUCCUGGGCCGCGAGAGCCCC
CUGAGCCUGUACAACGAGGAGCUGGUGAGCAUGAACGUGCAGGGCGACUACGAG
CCCACCGACGCCACCGGCUUCAUCAACAUCAACAGCCUGCGCCUGAAGGAGUACC
ACCGCCUGCAGAGCAAGGUGACCGCCAAGUGA**Y**

[0379]

[0380] *5′ 및 3′ UTR 서열*

X =

GGACAGAUCGCCUGGAGACGCCAUCCACGCUGUUUUGACCUCCAUAGAAGACACC
GGGACCGAUCCAGCCUCCGCGGCCGGGAACGGUGCAUUGGAACGCGGAUUCCCCG
UGCCAAGAGUGACUCACCGUCCUUGACACG

Y =

CGGGUGGCAUCCCUGUGACCCCUCCCCAGUGCCUCUCCUGGCCCUGGAAGUUGCC
ACUCCAGUGCCCACCAGCCUUGUCCUAAUAAAAUUAAGUUGCAUC

[0381]

[0382] *제형화 프로토콜*

[0383] 식 I의 하나 이상의 화합물의 50 mg/mL 에탄올성 용액의 분취량, DOPE, 콜레스테롤 및 DMG-PEG2K를 혼합하고, 3 mL 최종 용적이 되도록 에탄올로 희석했다. 별도로, ASS1 mRNA의 수성 완충 용액 (10 mM 시트레이트/150 mM NaCl, pH 4.5)을 1 mg/mL 스톡으로부터 제조했다. 지질 용액을 수성 mRNA 용액에 빠르게 주사하고, 진탕시켜 20% 에탄올 중 최종 서스펜션을 수득했다. 수득한 나노입자 서스펜션을 여과하고, 1x PBS (pH 7.4)와 정용여과하고, 농축하고, 2-8℃에서 보관했다. 최종 농도 = 0.64 mg/mL ASS1 mRNA (캡슐화됨). Z_{ave} = 78 nm ($Dv_{(50)}$ = 46 nm; $Dv_{(90)}$ = 96 nm).

[0384] ***실시예 10*** *- 정맥내로 전달되는 ASS1 mRNA-로딩된 나노입자를 통해 생산된 ASS1 단백질의 분석:*

[0385] *주입 프로토콜*

[0386] 모든 연구를 각 실험의 개시시 대략 6-8 주령의 수컷 CD-1 마우스를 사용하여 수행했다. 샘플을 1.0 mg/kg의 등가 총용량 (또는 달리 명시된 용량)의 캡슐화된 ASS1 mRNA의 단일 볼러스 테일-정맥 주사에 의해 도입했다. 마우스를 지정된 시점에서 희생시키고, 염수로 관류시켰다.

[0387] *분석용 장기 조직의 단리*

[0388] 각 마우스의 간, 비장, 신장 및 심장을 수거하고, 다른 부분으로 배분하고, 10% 중성 완충된 포르말린에서 보관

하거나 스냅-냉동시키고 분석을 위해 -80℃에서 보관했다.

[0389] *분석용 혈장의 단리*

[0390] 모든 동물을 용량 투여 (± 5%) 후 지정된 시점에서 CO_2 질식에 의해 안락사시킨 후 개흉술 및 말단 심장 채혈을 실시했다. 안락사된 동물 상에서 심장 천자를 통해 전혈 (최대 수득가능한 용적)을 혈청 분리기 튜브에 수집하고, 실온에서 적어도 30 분 동안 응고시키고, 22℃ ± 5℃에서 10 분 동안 9300 g에서 원심분리할 것이며, 혈청이 추출될 것이다. 중간 채혈을 위해, 대략 40-50 μL의 전혈을 얼굴 정맥 천자 또는 테일 스닙(tail snip)를 통해 수집할 것이다. 미처리 동물로부터 수집된 샘플을 연구 동물에 대한 비교를 위해 기준선 ASS1 수준으로 사용했다.

[0391] *효소-결합 면역흡착 검정 (ELISA) 분석*

[0392] *인간 ASS1 ELISA:* 포착 항체로서 마우스 항-ASS1 2D1-2E12 IgG를 이용하고, 2차 (검출) 항체로서 토끼 항-ASS1 #3285 IgG (Shire Human Genetic Therapies)를 사용하는 표준 ELISA 절차를 따랐다. 홀스래디쉬 페록시다아제 (HRP)-콘주게이트된 염소 항-토끼 IgG를 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘 (TMB) 기질액의 활성화를 위해 사용했다. 반응을 20 분 후 2N H_2SO_4를 사용하여 켄칭시켰다. 검출은 몰레큘러 디바이스 스펙트라맥스(Molecular Device SpectraMax) 기기 상에서의 흡수 (450 nm)를 통해 모니터링되었다. 미처리된 마우스 혈청 및 기관 및 인간 ASS1 단백질을 각각 음성 및 양성 대조군으로 사용했다.

[0393] **실시예 11** - *생체내 인간 ASS1 단백질 생산*

[0394] 식 I의 화합물을 포함하는, 코돈-최적화된 hASS1 mRNA-로딩된 지질 나노입자를 통한 인간 ASS1 단백질의 생산을, 상기에서 기재된 바와 같이, CD-1 마우스에서 단일, 볼러스 정맥내 주사로 시험했다. 도 1은 마우스 인간 ASS1 mRNA-로딩된 지질 나노입자를 1.0 mg/kg 용량에서 식 I의 다양한 라세미 및 키랄 화합물로 처리할 때 ELISA를 통해 검출된 인간 ASS1 단백질의 양을 도시한다. 마우스를 주사후 24 시간에 희생시키고, 기관, 예컨대 간을 수거했다.

[0395] ***실시예 12*** - *독성 연구*

[0396] 식 I의 다양한 라세미 및 키랄 화합물에 대한 알라닌 아미노기전달효소 (ALT) 및 아스파르테이트 아미노기전달효소 (AST)의 발현 수준을 측정했다. AST 및/또는 ALT의 발현 수준 증가는 일반적으로 간독성을 유발하는 제제에 의해 야기되었다. 식 I의 키랄 화합물은 일반적으로 낮은 발현 수준의 ALT 및/또는 AST를 산출했고, 즉, 입체화학적으로 풍부하지 않은, 또는 입체화학적으로 덜 풍부한, 동일한 지질 조성물과 비교하여 더 낮은 간독성 사안과 관련된다. 하기 표 1 내지 9를 참조한다.

표 1

[0397]

구조	ALT (U/L)	AST (U/L)	ASS1 (ng/mg 총 단백질)
라세미 혼합물	190 ± 43	212 ± 54	471 ± 309
	201 ± 89	403 ± 42	937 ± 337
	207 ± 84	425 ± 169	497 ± 213
	344 ± 57	555 ± 122	1387 ± 593
	426 ± 112	757 ± 158	1509 ± 598
	457 ± 274	728 ± 126	910 ± 327
	503 ± 201	653 ± 133	1010 ± 154
	618 ± 503	638 ± 273	209 ± 169

표 2

[0398]

구조	ALT (U/L)	AST (U/L)	ASS1 (ng/mg 총 단백질)
라세미 라이신 코어를 갖는 S_4	170 ± 40	132 ± 44	375 ± 244
	155 ± 57	157 ± 38	674 ± 147

표 3

[0399]

구조	ALT (U/L)	AST (U/L)	ASS1 (ng/mg 총 단백질)
라세미 라이신 코어 를 갖는 S_4	188 ± 22	265 ± 122	823 ± 215
	236 ± 163	237 ± 139	568 ± 248

표 4

[0400]

구조	ALT (U/L)	AST (U/L)	ASS1 (ng/mg 총 단백질)
SS 라이신 코어를 갖는 라세미 -OH	378 ± 58	622 ± 76	117 ± 80
	618 ± 503	638 ± 273	209 ± 169

표 5

[0401]

구조	ALT (U/L)	AST (U/L)	ASS1 (ng/mg 총 단백질)
S_4-S,S-cKKE12	226 ± 71	384 ± 233	1121 ± 468

표 6

[0402]

구조	ALT (U/L)	AST (U/L)	ASS1 (ng/mg 총 단백질)
R_4-S,S-cKKE12	175 ± 102	144 ± 35	449 ± 105

표 7

[0403]

구조	ALT (U/L)	AST (U/L)	ASS1 (ng/mg 총 단백질)
S_4-S,R-cKKE12	190 ± 75	193 ± 71	2303 ± 491

표 8

[0404]

구조	ALT (U/L)	AST (U/L)	ASS1 (ng/mg 총 단백질)
R_4-S,R-cKKE12	75 ± 13	82 ±12	264 ± 317
	86 ± 27	119 ± 32	1369 ± 233
	94 ± 22	88 ± 16	467 ±149
	59 ± 13	73 ± 18	401 ±137
	139 ± 28	177 ± 73	1182 ± 150
	180 ± 19	141 ± 25	750 ± 324
	269 ± 80	424 ± 156	2790 ± 464
	123 ± 39	124 ± 22	1113 ± 35
	60 ± 4	49 ± 5	846 ± 226
	70 ± 10	78 ± 24	1082 ± 189

표 9

[0405]

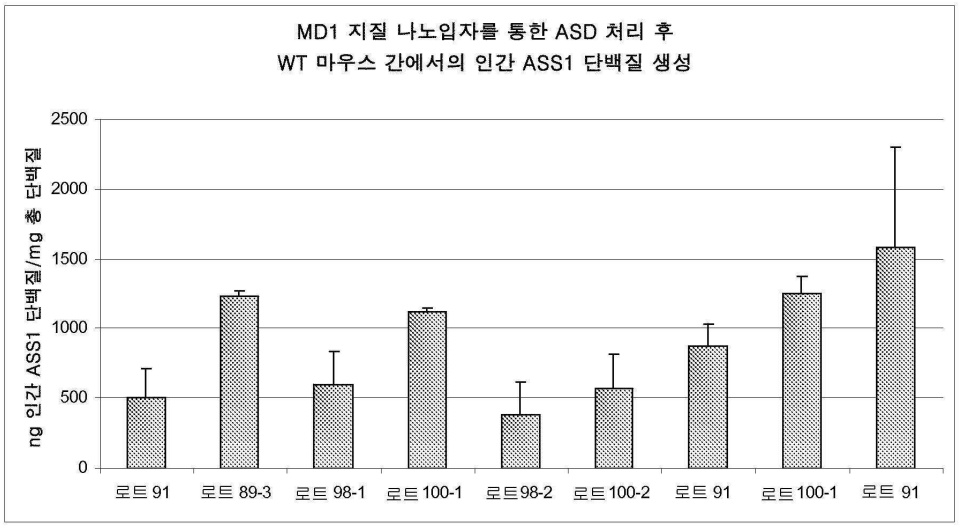
단일 정맥내 용량의 cKK-E12. 스크리닝하기 위해 사용된 24 시간 후-제형은 cKK-E12:DOPE:Chol:DMG-PEG2K였다	구조 배정	ALT	AST

로트 #1	'라세미' 혼합물	885 ± 489	982 ± 350
		207 ± 84	425 ± 169
		504 ± 317	657 ± 176
		503 ± 201	653 ± 133
로트 #2		365 ± 152	604 ± 136
		401 ± 265	586 ± 193
로트 #3		197 ± 50	309 ± 33
로트 #1	S_4-SS	226 ± 71	384 ± 233
로트 #1	R_4-SS	175 ± 102	144 ± 35
로트 #1	S_4-RR	152 ± 9	180 ± 42
로트 #1	R_4-RR	136 ± 34	194 ± 80
로트 #1	S_4-RS/SR	143 ± 29	240 ± 98
		189 ± 47	203 ± 87
로트 #2		190 ± 75	193 ± 71
로트 #1	R_4-RS/SR	86 ± 27	119 ± 32
		75 ± 13	82 ±12
		76 ± 4	79 ± 4
		94 ± 22	88 ± 16
로트 #2		269 ± 80	424 ± 156
		139 ± 28	177 ± 73
		180 ± 19	141 ± 25
		91 ±13	98 ±18
로트 #3		125 ± 47	104 ± 27
로트 #4		94 ± 24	91 ± 14
로트 #5		60 ± 4	49 ± 5
로트 #6		70 ± 10	78 ± 24
로트 #7		308 ± 115	354 ± 128
		123 ± 39	124 ± 22

[0406] 본 발명의 몇 개의 구현예가 본원에 기재되고 실증되더라도, 당해 분야의 숙련가는 기능을 수행하고/하거나 본원에 기재된 결과 및/또는 하나 이상의 이점을 수득하기 위해 다양한 다른 수단 및/또는 구조물을 쉽게 구상할 것이며, 각각의 그와 같은 변화 및/또는 변형은 본 발명의 범위 내에 있는 것으로 간주된다. 더 일반적으로, 당해 분야의 숙련가는, 본원에 기재된 모든 파라미터, 치수, 물질, 및 입체배치가 예시적인 것으로 의도되며, 실제 파라미터, 치수, 물질, 및/또는 입체배치는 본 발명의 교시가 사용되는 특정한 적용 또는 적용들에 의존적일 것임을 쉽게 이해할 것이다. 당해 분야의 숙련가는 단지 일상적인 실험과정을 사용하여 본원에 기재된 본 발명의 특정 구현예에 대한 많은 동등물을 인지하거나 확인할 수 있을 것이다. 따라서, 전술한 구현예는 단지 예로써 주어지며, 첨부된 청구항들 및 이에 대한 동등물의 범위 내에서, 본 발명은 구체적으로 기재되거나 청구된 바와 다르게 실시될 수 있음이 이해되어야 한다. 본 발명은 본원에 기재된 각 개별적인 특징, 시스템, 물품, 물질, 키트, 및/또는 방법에 관한 것이다. 또한, 그와 같은 특징, 시스템, 물품, 물질, 키트, 및/또는 방법 중 2개 이상의 임의의 조합은, 그와 같은 특징, 시스템, 물품, 물질, 키트, 및/또는 방법이 상호간에 모순되지 않으면, 본 발명의 범위 내에 포함된다.

도면

도면1


MD1 지질 나노입자를 통한 ASD 처리 후
WT 마우스 간에서의 인간 ASS1 단백질 생성
ng 인간 ASS1 단백질/mg 총 단백질
2500
2000
1500
1000
500
0
로트 91
로트 89-3
로트 98-1
로트 100-1
로트98-2
로트100-2
로트 91
로트100-1
로트 91