(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0017466
(43) 공개일자 2022년02월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/127 (2006.01) *A61K 47/14* (2017.01)
A61K 47/20 (2017.01) *A61K 9/51* (2006.01)
A61P 3/06 (2006.01) *A61P 43/00* (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01) *C07C 323/25* (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)
(52) CPC특허분류
A61K 9/1271 (2013.01)
A61K 47/14 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-7000096
(22) 출원일자(국제) 2020년06월04일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2022년01월03일
(86) 국제출원번호 PCT/US2020/036085
(87) 국제공개번호 WO 2020/247604
국제공개일자 2020년12월10일
(30) 우선권주장
62/857,111 2019년06월04일 미국(US)

(71) 출원인
트러스티즈 오브 티프츠 칼리지
미국 02155 매사추세츠 메드포드 발루 홀
(72) 발명자
수, 차오빙
미국 02421 매사추세츠 렉싱턴 배틀 그린 로드 27
왕, 밍
미국 02143 매사추세츠 서머빌 윌러비 스트리트 21
(74) 대리인
특허법인 남앤남

전체 청구항 수 : 총 37 항

(54) 발명의 명칭 **MRNA 전달을 위한 합성 지질**

(57) 요 약

인간 지단백질 대사 장애 또는 심혈관 질환의 치료가 필요한 대상체에 지질, CRISPR/Cas9 mRNA 및 단일 가이드 RNA(sgRNA)를 포함하는 리피도이드 나노입자를 투여하는 것을 포함하는 인간 지단백질 대사 장애 또는 심혈관 질환을 치료하는 방법이 제공된다.

(52) CPC특허분류
A61K 47/20 (2013.01)
A61K 48/0041 (2013.01)
A61K 9/0019 (2013.01)
A61K 9/5123 (2013.01)
A61P 3/06 (2018.01)
A61P 43/00 (2018.01)
A61P 9/00 (2018.01)
C07C 323/25 (2013.01)
C12N 15/113 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

인간 지단백질 대사 장애 또는 심혈관 질환의 치료가 필요한 대상체에 지질, CRISPR/Cas9 mRNA 및 단일 가이드 RNA(sgRNA)를 포함하는 리피도이드 나노입자를 투여하는 것을 포함하는 인간 지단백질 대사 장애 또는 심혈관 질환을 치료하는 방법으로서,

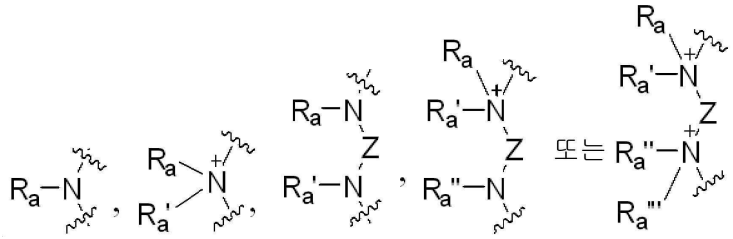
sgRNA는 단일 가이드 안지오포이에틴-유사 3(sgANGPTL3) 또는 단일 가이드 전구단백질 전환효소 서브틸리신/켁신 타입 9(sgPCSK9)이고;

지질은 하기 화학식 I로 표시되는 지질 또는 이의 약학적으로 허용되는 염인, 방법:

$R^{헤드}$-$R^{지질}$ (I)

상기 식에서,

$R^{헤드}$는

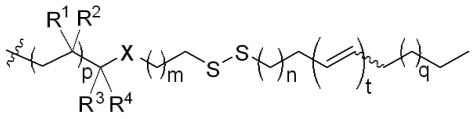


이며,

R^a, $R^{a'}$, $R^{a''}$ 및 $R^{a'''}$는 각각 독립적으로 $R^{지질}$, H, C_1-C_{20} 알킬, C_2-C_{20} 알케닐, C_2-C_{20} 알키닐, C_3-C_{20} 사이클로알킬, C_1-C_{20} 헤테로알킬, C_1-C_{20} 헤테로사이클로알킬, 아릴 또는 헤테로아릴이고, 여기서 R^a 및 $R^{a'}$ 또는 $R^{a''}$ 및 $R^{a'''}$는 둘 모두 $R^{지질}$이 아니며;

Z는 C_1-C_{20} 이가 지방족 라디칼, C_1-C_{20} 이가 헤테로지방족 라디칼, 이가 아릴 라디칼 또는 이가 헤테로아릴 라디칼이고;

$R^{지질}$ 각각은 독립적으로



이며,

상기 식에서,

R^1 및 R^2는 H, OH, NHR^{30} 또는 SH이고;

R^3 및 R^4는 모두 H이거나; R^3 및 R^4는 함께 취해져서 옥소(=O) 기를 형성하고;

X는 CH_2, O, NR^{30} 또는 S이고;

R^{30}은 H, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알케닐 또는 C_{1-6} 알키닐이고;

m은 1-3으로부터 선택되는 정수이고;

n은 1-14로부터 선택되는 정수이고;

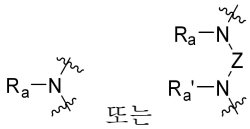
p는 0 또는 1이고;

q는 1-10으로부터 선택되는 정수이고;

t는 0, 1 또는 2이다.

청구항 2

제1항에 있어서, $R^{헤드}$가



또는

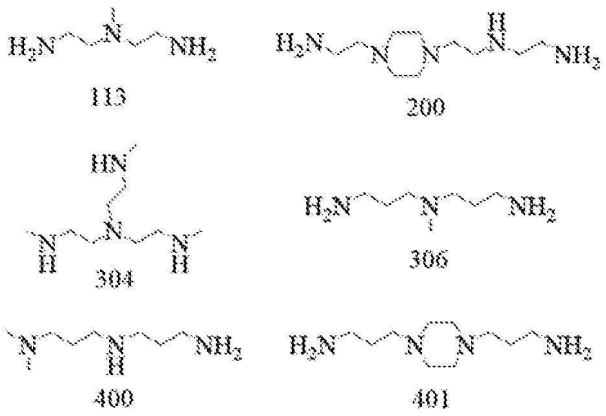
인, 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, R^{a} 및 $R^{a'}$가 $R^{지질}$, H 또는 C_1-C_{20} 알킬인, 방법.

청구항 4

제2항에 있어서, $R^{헤드}$가 하기로 구성된 군으로부터 선택되는 화합물로부터 유도되는, 방법:



.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, R^{1} 및 R^{2}가 H인, 방법.

청구항 6

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, R^{1}이 H이며; R^{2}가 OH인, 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, R^{3} 및 R^{4}가 H인, 방법.

청구항 8

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, R^{3} 및 R^{4}가 함께 취해져서 옥소(=O) 기를 형성하는, 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, Z가 CH_2, O 또는 NR^{30}인, 방법.

청구항 10

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, Z가 CH_2인, 방법.

청구항 11

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, Z가 O인, 방법.

청구항 12

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, Z가 NR^{30}인, 방법.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, m이 1 또는 2인, 방법.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, n이 4-12로부터 선택되는 정수인, 방법.

청구항 15

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, n이 6-10으로부터 선택되는 정수인, 방법.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, p가 0인, 방법.

청구항 17

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, p가 1인, 방법.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, q가 2-8로부터 선택되는 정수인, 방법.

청구항 19

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, q가 4-8로부터 선택되는 정수인, 방법.

청구항 20

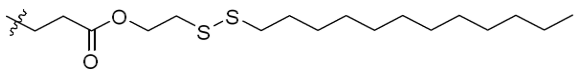
제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, t가 0인, 방법.

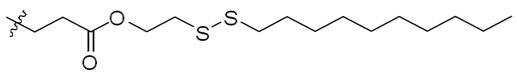
청구항 21

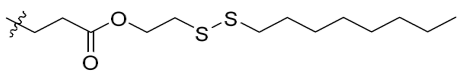
제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, t가 1인, 방법.

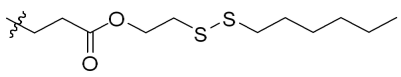
청구항 22

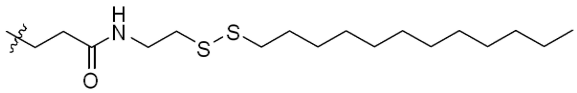
제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, $R^{지질}$ 각각이 독립적으로 하기로 구성된 군으로부터 선택되는, 방법:

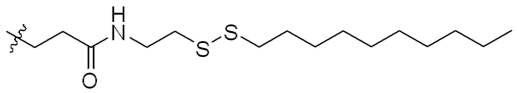

,

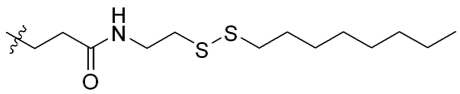

,

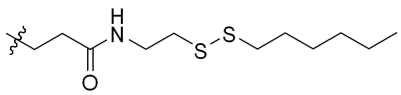

,

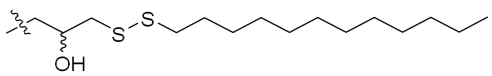

,

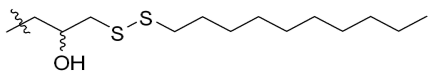

,

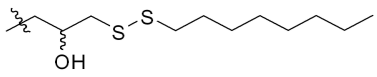

,

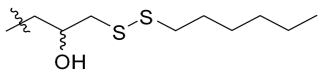

,


,


,

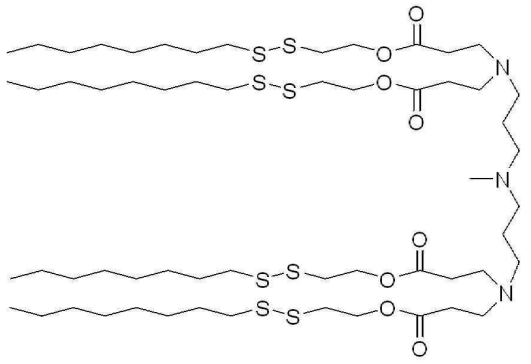

,

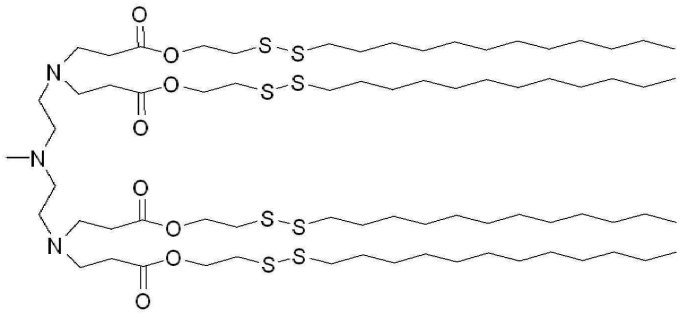

및

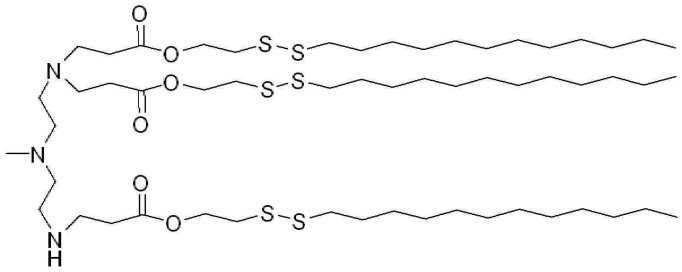

.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 지질이 하기로 구성된 군으로부터 선택되는, 방법:


,


및



.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 지질 대 CRISPR/Cas9 mRNA의 비가 약 3:1 내지 약 15:1인, 방법.

청구항 25

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 지질 대 CRISPR/Cas9 mRNA의 비가 약 7.5:1인, 방법.

청구항 26

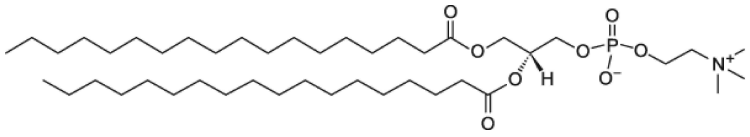
제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 리피도이드 나노입자가 콜레스테롤을 추가로 포함하는, 방법.

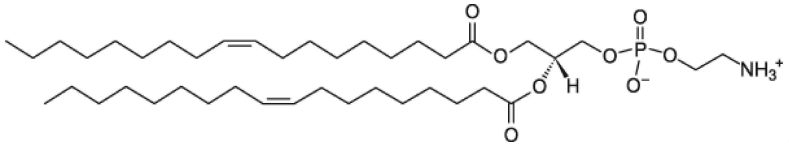
청구항 27

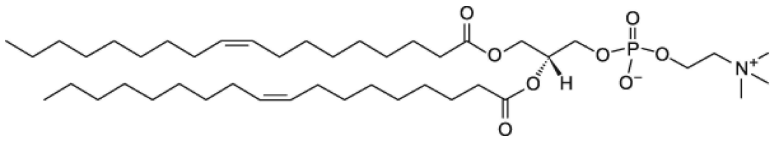
제26항에 있어서, 지질 대 콜레스테롤의 비가 약 1:1 내지 약 2:1인, 방법.

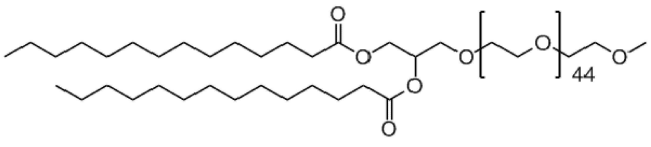
청구항 28

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 리피도이드 나노입자가 DOPE, DSPC 또는 DOPC; 및 DMG-PEG2K를 추가로 포함하며; 여기서

DSPC는  의 구조를 가지며,

DOPE는  의 구조를 가지며,

DOPC는  의 구조를 가지며,

DMG-PEG2K는  의 구조를 갖는, 방법.

청구항 29

제28항에 있어서, 리피도이드 나노입자가 DOPC 및 DMG-PEG2K를 포함하는, 방법.

청구항 30

제29항에 있어서, 지질 대 DOPC의 비가 약 4:1 내지 약 6:1이며; 지질 대 DMG-PEG2K의 비가 약 4:1 내지 약 100:1 내지 약 4:1 내지 약 20:1인, 방법.

청구항 31

제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 리피도이드 나노입자가 약 25 nm 내지 약 1000 nm의 입자 크기를 갖는, 방법.

청구항 32

제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 리피도이드 나노입자가 약 50 nm 내지 약 500 nm의 입자 크기를 갖는, 방법.

청구항 33

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 지단백질 대사 장애가 ANGPTL3 유전자의 기능 상실 돌연변이와 관련된, 방법.

청구항 34

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 심혈관 질환이 전구단백질 전환효소 서브틸리신/켁신 타입 9 유전자(PCSK9)와 관련된, 방법.

청구항 35

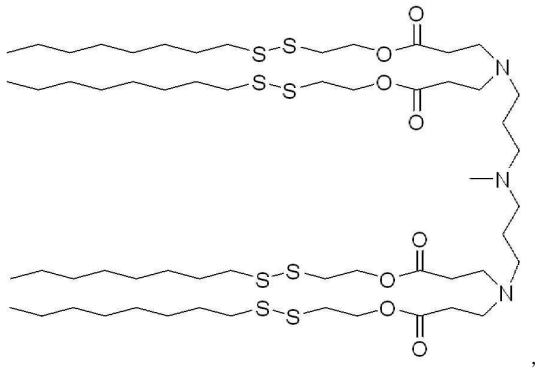
제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 지단백질 대사 장애가 낮은 수준의 혈장 고밀도 지단백질 콜레스테롤, 높은 수준의 혈청 저밀도 지단백질 콜레스테롤 또는 높은 수준의 트리글리세리드와 관련된, 방법.

청구항 36

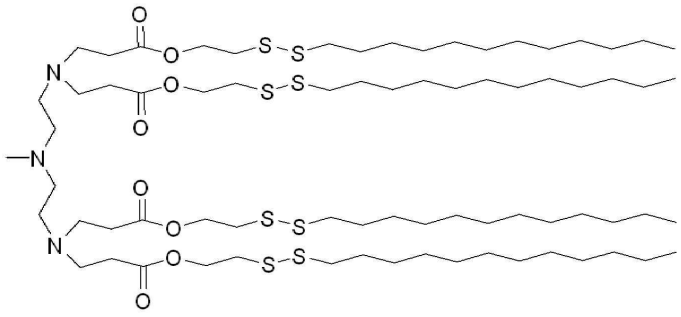
제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 심혈관 질환이 동형접합 가족성 고콜레스테롤혈증 및 고콜레스테롤혈증으로 구성된 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 37

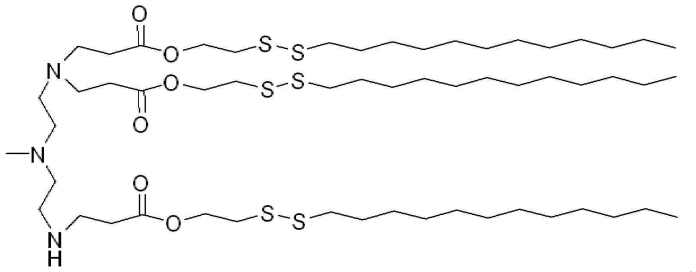
하기로 구성된 군으로부터 선택되는 지질:



,



및



.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련 출원**

[0002] 이 출원은 2019년 6월 4일자로 출원된 미국 가출원 일련 번호 62/857,111의 이익을 청구하며, 그 내용은 그 전체가 인용으로 본원에 포함된다.

[0003] **정부 지원**

[0004] 이 발명은 국립 보건원(National Institutes of Health)에서 수여한 부여 번호 EB024041 및 TR002636에 따라 정부 지원으로 이루어졌다. 정부는 본 발명에 대한 특정 권리를 갖는다.

배 경 기 술

[0005] **배경**

[0006] 안지오포이에틴-유사 3(ANGPTL3)은 혈장 지단백질 수준을 조절하는 역할을 하는 효소이다. ANGPTL3 유전자에 자연적으로 발생하는 기능 상실 돌연변이로 인해 발생하는 ANGPTL3 결핍증이 있는 사람이 있다. 이들 환자들은 이 손실로부터 발생하는 어떠한 명백한 임상적 위험이나 합병증 없이 낮아진 혈중 트리글리세리드(TG) 및 저밀도 지단백질 콜레스테롤(LDL-C)을 나타내었다. 최근의 유전 및 약리학 연구는 이러한 발견을 검증하였으며, ANGPTL3 녹다운이 일부 보호 이점을 제공하여 ANGPTL3를 인간 지단백질 대사 장애의 치료를 위한 매력적인 치료 표적으로 만들 수 있음을 나타내었다. ANGPTL3에 대한 두 가지 다른 치료학적 억제 전략이 최근에 검증되었다. 한 임상 시험에서, 모노클로날 항체를 표적으로 하는 ANGPTL3, 에비나쿠맙은 건강한 인간 지원자에서 LDL-C 및 TG 수치를 효과적으로 감소시키는 것으로 입증되었다. 이러한 결과는 ANGPTL3 메신저 RNA(mRNA)를 표적으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오티드(ASO)의 투여가 마우스에서 감소된 지질 수준뿐만 아니라 감소된 죽상경화증의 진행을 달성하였다는 연구와 일치한다. 더욱이, 인간에서 낮아진 수준의 죽상형성 지단백질이 또한 관찰되었으며, 이들의 I 상 무작위 임상 시험에서 심각한 부작용은 기록되지 않았다. 이러한 관찰은 ANGPTL3의 치료적 길항작용이 지질 수준 및 죽상경화성 심혈관 질환의 발병률을 감소시키는 데 효과적이고 안전하다는 것을 강력하게 입증하였다.

[0007] CRISPR/Cas9(클러스터링된 규칙적 간격의 짧은 회문 반복부 [CRISPR]/CRISPR-결합 단백질 9) 시스템은 가장 혁신적인 게놈 편집 도구 중 하나이다. CRISPR/Cas9는 표적화된(즉, 서열 특이적) 방식으로 DNA 이중 가닥 파손(DSB)을 도입한 다음, NHEJ(비상동 말단 연결) 또는 HDR(상동성 기반 복구)에 의해 DSB를 수리한다. 일시적인 기존의 ASO 또는 항체 요법과 비교하여 CRISPR/Cas9 시스템은 영구적인 기능 상실 표적 유전자 돌연변이를 유도하여 편집된 세포에서 장기적인 치료 효과를 발생시켜 CRISPR/Cas9를 인간 질병의 치료에 유망한 후보로 만든다. 그러나, CRISPR/Cas9 머시너리(machinery)의 안전하고 효율적이며 특이적인 전달은 여전히 굉장한 기술적 과제로 남아 있어, 이러한 기술의 치료학적 적용을 제한하였다. 바이러스 벡터(예컨대, 아데노바이러스 또는 아데노-관련 바이러스)의 사용은 종종 매우 높은 편집 효율성을 제공하지만 원치 않는 삽입 돌연변이 유발 및 적용을 제한하는 잠재적인 생물학적 안전성 문제와 관련하여 상당한 안전 위험을 또한 수반한다. 이에 비해, CRISPR 플라스미드 DNA, 메신저 RNA(mRNA) 및 리보핵단백질(RNP)의 전달을 위해 더 나은 안전성 프로파일을 가진 지질 나노입자(LNP), 금 나노입자 및 고분자 나노입자와 같은 비-바이러스성 나노입자가 일반적으로 전달 효율성을 대가로 개발되었다. 각각의 DNA, mRNA 및 RNP 각각의 포맷에서 CRISPR 전달은 잠재적인 강점을 가지지만 mRNA 전달은 생체내 게놈 편집 응용 프로그램에 특히 유망할 수 있다.

발명의 내용

[0008] 개요

[0009] 일 양태에서, 본 개시내용은 인간 지단백질 대사 장애 또는 심혈관 질환의 치료가 필요한 대상체에 지질, CRISPR/Cas9 mRNA 및 단일 가이드 RNA(sgRNA)를 포함하는 리피도이드 나노입자를 투여하는 것을 포함하는 인간 지단백질 대사 장애 또는 심혈관 질환을 치료하는 방법으로서,

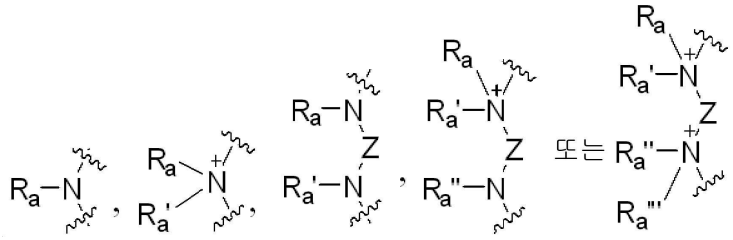
[0010] sgRNA는 단일 가이드 안지오포이에틴-유사 3(sgANGPTL3) 또는 단일 가이드 전구단백질 전환효소 서브틸리신/켁신 타입 9(sgPCSK9)이고;

[0011] 지질은 하기 화학식 I로 표시되는 지질 또는 이의 약학적으로 허용되는 염인, 방법을 제공한다:

[0012] $R^{헤드}$-$R^{지질}$ (I)

[0013] 상기 식에서,

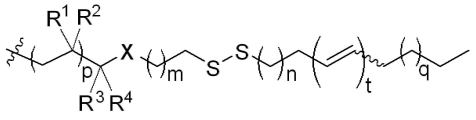
[0014] $R^{헤드}$는

[0015]  이며,

[0016] R^{a}, $R^{a'}$, $R^{a''}$ 및 $R^{a'''}$는 각각 독립적으로 $R^{지질}$, H, C_1-C_{20} 알킬, C_2-C_{20} 알케닐, C_2-C_{20} 알키닐, C_3-C_{20} 사이클로알킬, C_1-C_{20} 헤테로알킬, C_1-C_{20} 헤테로사이클로알킬, 아릴 또는 헤테로아릴이고, 여기서 R^{a} 및 $R^{a'}$ 또는 $R^{a''}$ 및 $R^{a'''}$는 둘 모두 $R^{지질}$이 아니며;

[0017] Z는 C_1-C_{20} 이가 지방족 라디칼, C_1-C_{20} 이가 헤테로지방족 라디칼, 이가 아릴 라디칼 또는 이가 헤테로아릴 라디칼이고;

[0018] $R^{지질}$ 각각은 독립적으로

[0019]  이며,

[0020] 상기 식에서,

[0021] R^{1} 및 R^{2}는 H, OH, NHR^{30} 또는 SH이고;

[0022] R^{3} 및 R^{4}는 모두 H이거나; R^{3} 및 R^{4}는 함께 취해져서 옥소(=O) 기를 형성하고;

[0023] X는 CH_2, O, NR^{30} 또는 S이고;

[0024] R^{30}은 H, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알케닐 또는 C_{1-6} 알키닐이고;

[0025] m은 1-3으로부터 선택되는 정수이고;

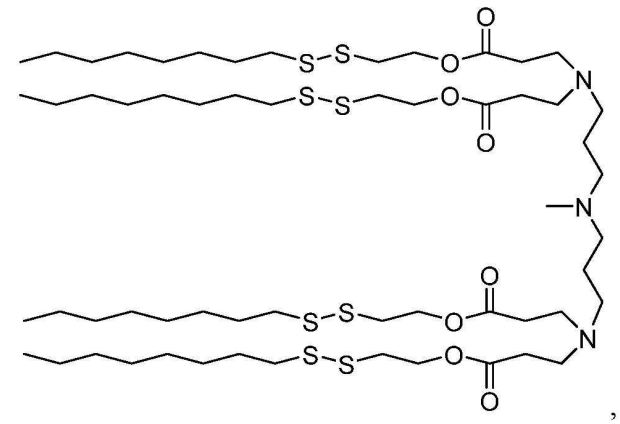
[0026] n은 1-14로부터 선택되는 정수이고;

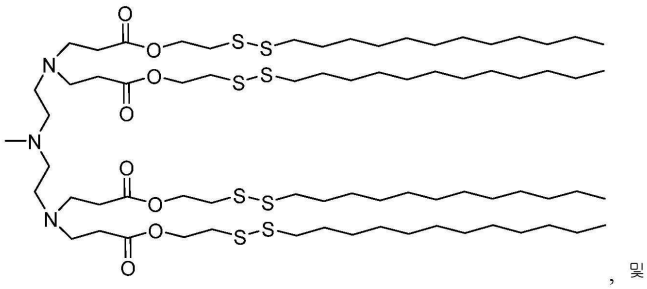
[0027] p는 0 또는 1이고;

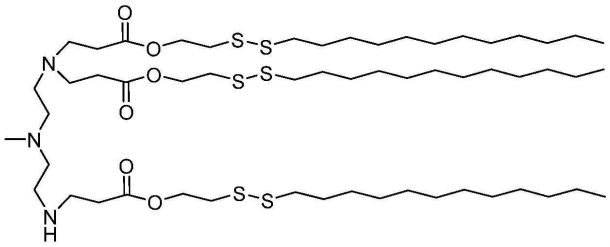
[0028] q는 1-10으로부터 선택되는 정수이고;

[0029] t는 0, 1 또는 2이다.

[0030] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 하기로 구성된 군으로부터 선택되는 지질을 제공한다:

[0031] ,

, 및

.

[0032]

도면의 간단한 설명

[0033] **도면의 설명**

도 1a는 시험관내 및 생체내에서 CRISPR/Cas9 게놈 편집 전달을 위한 생체환원성 지질/Cas9 mRNA/sgRNA 나노입자를 제형화하는 것을 예시하는 시험관내 및 생체내 Cas9 mRNA 전달의 개략도이다.

도 1b는 지질 합성에 사용되는 아민의 합성 경로, 지질 명명법 및 화학 구조를 나타내는 개략도이다.

도 2a는 루시페라제 mRNA 단독(160 ng/mL) 또는 상이한 지질 나노입자의 나노복합체 형태로 처리된 A375 세포의 루시페라제 발현을 나타내는 막대 그래프이다.

도 2b는 RFP mRNA 단독(320 ng/mL) 또는 BAMEA-O16B/RFP mRNA 나노입자 형태로 형질감염된 HeLa 세포를 나타내는 CLSM 이미지이다. 스케일 바: 20 μm.

도 2c는 증가된 농도의 BAMEA-O16B/RFP mRNA로 처리된 HeLa 세포의 mRNA 용량 의존적 RFP 발현을 나타내는 막대 그래프이다. RFP 발현 프로파일은 mRNA 전달 24시간 후에 정량화되었다.

도 3a는 BAMEA-O16B 및 BAMEA-O16의 화학 구조를 보여준다.

도 3b는 BAMEA-O16B/RNA 나노입자의 세포 흡수 효율을 나타내는 막대 그래프이다.

도 3c는 BAMEA-O16B/Cy3-RNA 또는 BAMEA-O16/Cy3-RNA 나노입자로 처리한 HeLa 세포의 CLSM 이미지이다. HeLa 세포에 전달을 위해 표시된 비율로 지질과 복합된 10 nM Cy3-RNA가 전달되었으며, 엔도솜은 LysoTracker@Green

(스케일 바: 20 μm)을 사용하여 공동 염색되었다.

도 3d는 BAMEA-O16 나노입자의 것보다 HeLa 세포에서 향상된 RFP 발현을 나타내는 BAMEA-O16B/mRNA 전달을 묘사하는 플롯이다.

도 4a는 Cas9 mRNA/sgGFP 단독 또는 BAMEA/Cas9 mRNA/sgGFP 나노입자로 처리된 HEK-GFP 세포의 CLSM 이미지이다. 스케일 바: 20 μm.

도 4b는 빠르고 효율적인 게놈 편집을 위한 BAMEA/Cas9 mRNA/sgGFP 나노입자의 전달을 나타내는 막대 그래프이다. HEK-GFP 세포를 다양한 용량의 Cas9 mRNA 및 sgGFP(13 nM)로 처리하였으며, GFP 발현은 전달 후 다양한 시점에서 정량화하였다.

도 4c는 BAMEA/Cas9 mRNA/sgGFP 나노입자를 사용한 sgRNA 서열 특이적 게놈 편집 및 GFP 녹아웃을 나타내는 플롯이다. GFP-HEK 세포를 BAMEA/Cas9 mRNA/sgGFP 또는 BAMEA/Cas9 mRNA/스크램블 sgRNA 나노입자로 처리하고, GFP 녹아웃 효율을 mRNA 전달 48시간 후에 결정하였다.

도 4d는 BAMEA/Cas9 mRNA/sgHPV18 나노입자의 전달이 효율적이고 선택적으로 HeLa 세포 성장을 금지하였음을 나타내는 플롯이다.

도 5a는 BAMEA-O16B/Cas9 mRNA/Cy3-RNA 나노입자(우측) 또는 Cas9 mRNA/Cy3-RNA(자유)를 주사한 마우스 조직의 생체발광 이미지이다.

도 5b는 BAMEA-O16B/RFP mRNA 나노입자가 주입된 마우스 간의 형광 이미지로서 mRNA가 간세포로 효율적으로 전달되는 것을 나타낸다; 스케일 바: 20 μm.

도 5c는 BAMEA-O16B/Cas9 mRNA/sgPCSK9 나노입자 처리가 마우스 혈청 PCSK9를 효과적으로 감소시켰음을 나타내는 막대 그래프이다. Cas9 mRNA 나노입자 처리의 혈청 PCSK9 수준은 DPBS 대조군으로 주사된 것으로 정규화되었다.

도 6a는 전달 24시간 후 Alarmar Blue 검정법을 이용하여 BAMEA-O16B, PPPDA-N16B, LPF2K 또는 이들의 mRNA 나노복합체의 세포독성 검정을 나타내는 막대 그래프이다.

도 6b는 전달 24시간 후 설포르호다민 B(SRB) 검정법을 이용하여 BAMEA-O16B, PPPDA-N16B, LPF2K 또는 이들의 mRNA 나노복합체의 세포독성 검정을 나타내는 막대 그래프이다.

도 7은 BAMEA-O16B/mRNA 복합체로부터의 GSH-촉발된 mRNA 방출을 나타내는 아가로스 겔 전기영동 이미지이다.

도 8은 HEK-GFP 세포를 Cas9 mRNA(160 ng/mL) 및 sgGFP(13 nM), 상이한 지질 나노입자의 나노복합체로 처리한 후의 GFP 침묵을 나타내는 막대 그래프이며, GFP 발현은 mRNA 전달 후 48시간에 정량화하였다.

도 9는 BAMEA-O16B/Cas9 mRNA/sgRNA 나노입자의 주사전자현미경 사진이다. 스케일 바: 200 nm.

도 10은 HEK 세포에 대한 BAMEA-O16B/Cas9 mRNA/sgRNA 나노입자의 세포독성 검정을 나타내는 막대 그래프이다. HEK 세포를 5 μg/mL 지질과 증가된 농도의 Cas9 mRNA/sgRNA로 구성된 나노복합체를 10시간 동안 처리한 후 Alamar Blue 검정을 사용하여 세포 생존율을 측정하였다.

도 11은 BAMEA-O16B/Luci mRNA 나노입자(우) 또는 자유 mRNA(좌)를 주입한 마우스 조직의 생체발광 영상이다.

도 12는 헤마톡실린 및 에오신 염색에 의한 주사 후 2일째 간의 조직학적 분석을 도시한다. 스케일 바, 20 μm.

도 13은 BAMEA-O16B/Cas9 mRNA/sgPCSK9 주사된 마우스에서의 간 기능 시험을 나타내는 막대 그래프이다.

도 14는 혈액 지질 수준을 낮추기 위해 ANGPTL3에서 기능 상실 돌연변이를 유도하기 위한 비-바이러스 지질 나노입자(LNP)-매개된 생체내 CRISPR/Cas9-기반 게놈 편집의 개략도이다. Cas9 mRNA 및 ANGPTL3-특이적 단일 가이드 RNA(sgAngptl3)는 LNP에 캡슐화되고 간 간세포에 전달되어 ANGPTL3 표적 유전자좌에서 게놈 편집을 수행하고, 후속하여 저밀도 지단백질 콜레스테롤(LDL-C) 및 트리글리세리드(TG) 수준을 낮춘다.

도 15a는 테일-분지된 생체환원성 리피도이드의 화학 구조이다.

도 15b는 반딧불이 루시페라제(fLuc) mRNA 용량 0.5 mg/kg 투여 후 6시간째에 Balb/c 마우스(n = 3)에서 측정된 생체환원성 LNP 대 MC3 LNP의 전신 루시페라제 생체발광 강도를 나타내는 막대 그래프이다. 제형: 지질/콜레스테롤/DSPC/DMG-PEG = 50/38.5/10/1.5(몰비), 지질/mRNA = 12.5/1(중량비).

도 15c는 fLuc mRNA로 제형화된 306-O12B LNP의 크기 및 분포의 동적 광산란 그래프이다.

도 16a는 3가지 상이한 인지질의 화학 구조이다.

도 16b는 콜레스테롤, DMG-PEG, 및 상이한 인지질, DSPC 또는 DOPE 또는 DOPC로 제형화된 fLuc mRNA LNP의 효능을 나타내는 막대 그래프이다.

도 16c는 콜레스테롤, DMG-PEG, 및 상이한 인지질, DSPC 또는 DOPE 또는 DOPC로 제형화된 fLuc mRNA LNP의 생체분포를 나타내는 이미지이다.

도 16d는 7개의 상이한 몰비에서 콜레스테롤, DOPC, DMG-PEG로 제형화된 LNP의 제형 파라미터를 나타내는 그래프이다.

도 16e는 0.5 mg/kg의 fLuc mRNA 용량에서 주사 후 6시간째에 Balb/c 마우스에서 다양한 제형의 전신 루시페라제 생체발광 강도를 나타내는 막대 그래프이다.

도 16f는 다양한 306-O12B/mRNA 중량비로 50/38.5/10/1.5 몰비의 콜레스테롤, DOPC, DMG-PEG와 제형화된 LNP에 대한 0.5 mg/kg fLuc mRNA의 주사 후 6시간째 전신 루시페라제 생체발광 강도를 나타내는 막대 그래프이다. (n = 3)

도 17a는 306-O12B LNP를 사용하여 유전자 조작된 tdTomato 리포터 Ai14 마우스에 Cas9 mRNA 및 LoxP-표적화 단일 가이드 RNA(sgLoxP)의 공동 전달의 개략도이다.

도 17b는 1.65 mg/kg의 총 RNA 용량에서 Cas9 mRNA/sgLoxP(1/1.2, wt)를 캡슐화하는 LNP가 투여된 Ai14 마우스로부터 수집된 기관의 생체외 이미지이고, tdTomato 형광은 IVIS 이미징 시스템에 의해 검출되었다.

도 17c는 tdTomato 신호가 간 간세포에서 주로 발현됨을 보여주는 간 절편의 공초점 형광 현미경 이미지이다. (스케일 바: 20 μm)

도 18a는 2:1, 1:1.2 및 1:2 질량비의 Cas9 mRNA 및 sgAngptl3과 제형화된 306-O12B LNP의 주사 후 삽입결실(Indel) 백분율을 나타내는 그래프이다. (n = 5).

도 18b는 2:1, 1:1.2 및 1:2 질량비의 Cas9 mRNA 및 sgAngptl3과 제형화된 306-O12B LNP의 주사 후 혈청 ANGPTL3 수준을 나타내는 그래프이다. (n = 5)

도 19a는 3.0 mg/kg의 총 RNA 용량의 Cas9 mRNA 및 sgAngptl2 공동로딩된 306-O12B LNP가 투여된 후 7일째에 마우스의 ANGPTL3 단백질, 트리글리세리드 및 LDL-C 수준의 간 및 혈청 분석에서 삽입결실의 차세대 서열 분석을 나타내는 그래프이다. MC-3 LNP를 양성 대조군으로 사용하였다. (n = 5 또는 6). $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$.

도 19b는 각 처리군에서 가장 많이 편집된 마우스에서 특정 편집된 대립유전자의 편집 빈도를 나타낸다.

도 19c는 9-상단의 예측된 표적외(off-target) 부위에서 편집 빈도를 나타낸다.

도 20a는 fLuc mRNA와 제형화시키기 전의 306-O12B LNP의 대표적인 TEM 이미지이다. (스케일 바: 500 nm)

도 20b는 fLuc mRNA와 제형화된 후에 306-O12B LNP의 대표적인 TEM 이미지이다. (스케일 바: 500 nm)

도 21은 fLuc mRNA 로딩된 306-O12B LNP 및 MC-3 LNP를 주사한 마우스의 생체내 이미징이다. 주사 후 6시간째에 IVIS 이미징 시스템으로 이미지를 촬영하였다.

도 22는 fLuc mRNA에 대한 306-O12B LNP의 캡슐화 효율을 나타내는 막대 그래프이다.

도 23a는 0.75 mg/kg 용량의 sgLoxP를 캡슐화하는 306-O12B LNP를 투여한 Ai14/Cas9 마우스로부터 수집된 장기의 생체외 이미지이며, tdTomato 형광은 IVIS 이미징 시스템에 의해 검출되었다.

도 23b는 tdTomato 신호가 간 간세포에서 주로 발현됨을 보여주는 간 절편의 공초점 형광 현미경 이미지이다. (스케일 바: 20 μm)

도 24는 Cas9 mRNA/sgAngptl3 공동-로딩된 306-O12B LNP의 크기 분포를 나타내는 동적 광산란 그래프이다.

도 25는 Cas9 mRNA/sgAngptl3 공동로딩된 306-O12B LNP 및 MC-3 LNP를 투여한 후 7일째에 채취한 마우스의 간 샘플의 게놈 DNA로 수행된 T7E1 검정의 겔 전기영동 이미지이다. 화살표는 T7E1 검정으로부터 발생한 절단 생성

물을 보여준다.

도 26은 주사 후 2일째에 측정된 AST, ALT 및 TNF-알파의 혈청 수준을 보여주는 그래프이다. (n = 5).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0034] **상세한 설명**

[0035] 생체외 및 생체내에서 효율적으로 매우 빠른 게놈 편집을 위해 생체환원성 지질 나노입자 내로 동시에 Cas9 mRNA 및 sgRNA를 캡슐화함으로써 CRISPR/Cas9를 전신 전달하기 위한 새로운 접근법이 개시된다. 또한, mRNA 전달 및 CRISPR/Cas9 게놈 편집을 위한 이황화 결합-함유 소수성 테일로 구성된 생체환원성 지질 나노입자가 개시된다(**도 1a** 및 **도 1b**).

[0036] 본 개시내용에서 생체환원성 지질은 스크리닝 및 최적화 접근법을 통해 시험관내 및 생체내 둘 모두에서 리포터 mRNA 및 Cas9 mRNA/sgRNA 복합체를 전달하는 것으로 확인되었다. 생체환원성 지질은 정전기적 상호작용을 통해 mRNA를 캡슐화하여 나노입자를 조립하는 반면, 이황화 결합 교환 메커니즘을 통해 환원성 화학 신호에 반응하여 mRNA를 세포내로 방출할 수 있다(**도 1a**).

[0037] Cas9 mRNA/sgRNA의 동시 전달은 고효율로 인간 배아 신장(HEK) 세포의 GFP 발현을 녹아웃시키며, 효과적인 유전자 녹아웃은 Cas9 mRNA 전달 후에도 심지어 빠르게 관찰되었으며, 이는 시험관내 게놈 편집 효율성 측면에서 Cas9/sgRNA RNP 전달과 비교하여 현저한 향상이다. 생체환원성 지질 나노입자의 정맥내 주사는 비처리된 마우스와 비교하여 매우 낮은 수준으로 마우스 혈청 전구단백질 전환효소 서브틸리신/켁신 타입 9(PCSK9)를 효과적으로 녹다운시켰다. 생체환원성 지질은 지금까지 보고된 가장 효율적인 비-바이러스 CRISPR/Cas9 게놈 편집 전달 중 하나를 나타낸다.

[0038] 일 양태에서, 본 개시내용은 인간 지단백질 대사 장애 또는 심혈관 질환의 치료가 필요한 대상체에 지질, CRISPR/Cas9 mRNA 및 단일 가이드 RNA(sgRNA)를 포함하는 리피도이드 나노입자를 투여하는 것을 포함하는 인간 지단백질 대사 장애 또는 심혈관 질환을 치료하는 방법으로서,

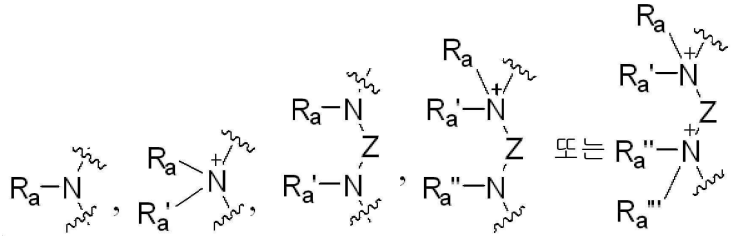
[0039] SgRNA는 단일 가이드 안지오포이에틴-유사 3(sgANGPTL3) 또는 단일 가이드 전구단백질 전환효소 서브틸리신/켁신 타입 9(sgPCSK9)이고;

[0040] 지질은 하기 화학식 I로 표시되는 지질 또는 이의 약학적으로 허용되는 염인, 방법을 제공한다:

[0041] $R^{헤드}$-$R^{지질}$ (I),

[0042] 상기 식에서,

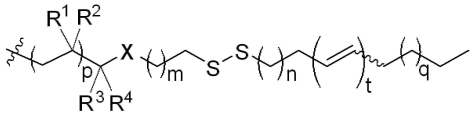
[0043] $R^{헤드}$는

[0044]  이며,

[0045] R^{a}, $R^{a'}$, $R^{a''}$ 및 $R^{a'''}$는 각각 독립적으로 $R^{지질}$, H, C_1-C_{20} 알킬, C_2-C_{20} 알케닐, C_2-C_{20} 알키닐, C_3-C_{20} 사이클로알킬, C_1-C_{20} 헤테로알킬, C_1-C_{20} 헤테로사이클로알킬, 아릴 또는 헤테로아릴이고, 여기서 R^{a} 및 $R^{a'}$ 또는 $R^{a''}$ 및 $R^{a'''}$는 둘 모두 $R^{지질}$이 아니며;

[0046] Z는 C_1-C_{20} 이가 지방족 라디칼, C_1-C_{20} 이가 헤테로지방족 라디칼, 이가 아릴 라디칼, 또는 이가 헤테로아릴 라디칼이고;

[0047] $R^{지질}$ 각각은 독립적으로

[0048]  이며,

[0049] 상기 식에서,

[0050] R^1 및 R^2는 H, OH, NHR^{30} 또는 SH이고;

[0051] R^3 및 R^4는 모두 H이거나; R^3 및 R^4는 함께 취해져 옥소(=O) 기를 형성하고;

[0052] X는 CH_2, O, NR^{30} 또는 S이고;

[0053] R^{30}은 H, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알케닐 또는 C_{1-6} 알키닐이고;

[0054] m은 1-3으로부터 선택되는 정수이고;

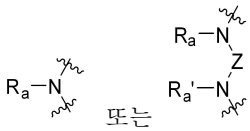
[0055] n은 1-14로부터 선택되는 정수이고;

[0056] p는 0 또는 1이고;

[0057] q는 1-10으로부터 선택되는 정수이고;

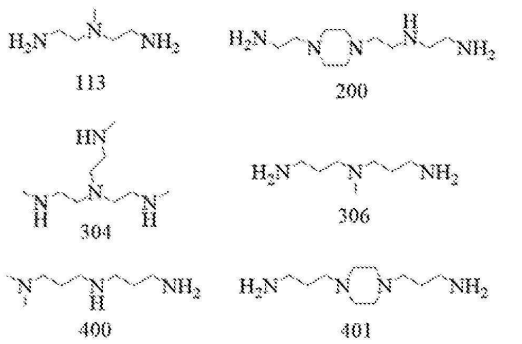
[0058] t는 0, 1 또는 2이다.

[0059] 특정 구현예에서, $R^{헤드}$는

[0060]  또는 이다.

[0061] 특정 구현예에서, R^a 및 $R^{a'}$는 $R^{지질}$, H 또는 C_1-C_{20} 알킬이다.

[0062] 특정 구현예에서, $R^{헤드}$는 하기로 구성된 군으로부터 선택된 화합물로부터 유래된다:

[0063]  .

[0064] 특정 구현예에서, R^1 및 R^2는 H이다. 특정 구현예에서, R^1은 H이고; R^2는 OH이다.

[0065] 특정 구현예에서, R^3 및 R^4는 H이다. 특정 구현예에서, R^3 및 R^4는 함께 취해져 옥소(=O) 기를 형성한다.

[0066] 특정 구현예에서, Z는 CH_2, O 또는 NR^{30}이다. 특정 구현예에서, Z는 CH_2이다. 특정 구현예에서, Z는 O이다. 특정 구현예에서, Z는 NR^{30}이다.

[0067] 특정 구현예에서, m은 1 또는 2이다.

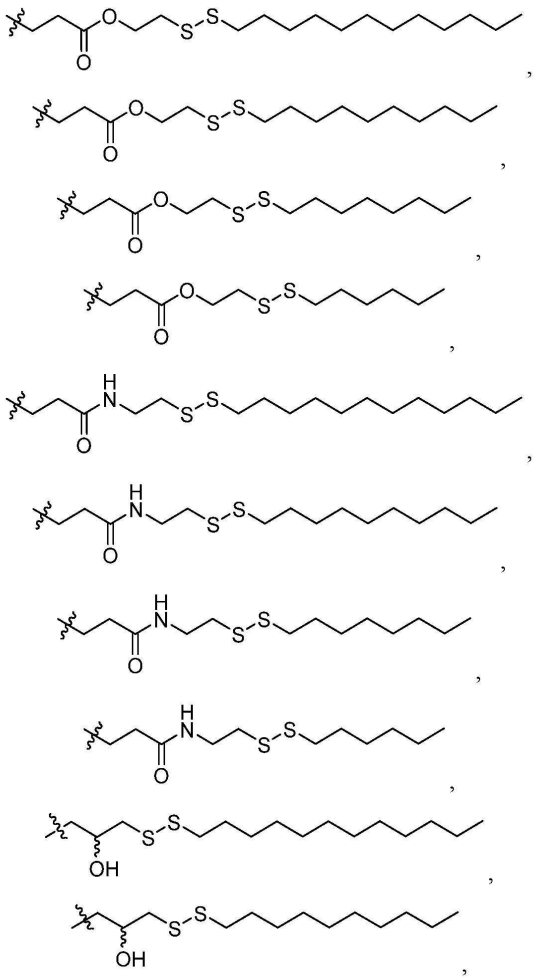
[0068] 특정 구현예에서, n은 4-12로부터 선택된 정수이다. 특정 구현예에서, n은 6-10으로부터 선택된 정수이다.

[0069] 특정 구현예에서, p는 0이다. 특정 구현예에서, p는 1이다.

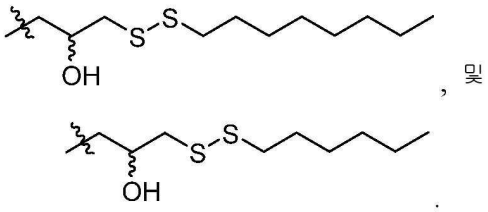
[0070] 특정 구현예에서, q는 2-8로부터 선택된 정수이다. 특정 구현예에서, q는 4-8로부터 선택된 정수이다.

[0071] 특정 구현예에서, t는 0이다. 특정 구현예에서, t는 1이다.

[0072] 특정 구현예에서, $R^{지질}$ 각각은 독립적으로 하기로 구성된 군으로부터 선택된다:

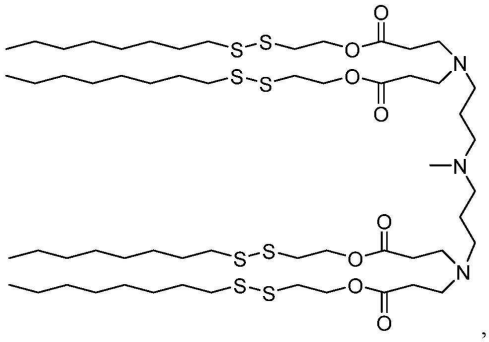


[0073]

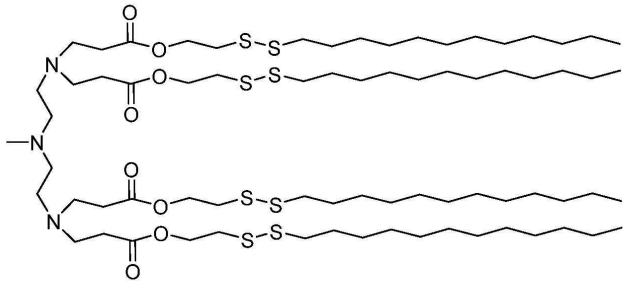


[0074]

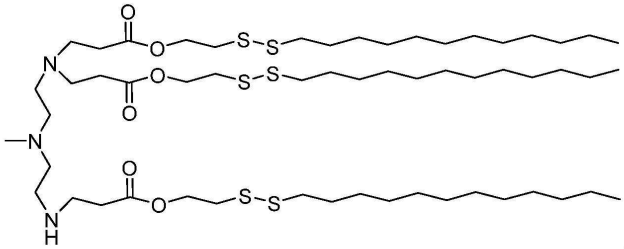
[0075] 특정 구현예에서, 지질은 하기로 구성된 군으로부터 선택된다:



,



, 및



.

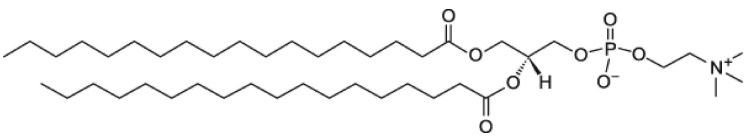
[0076]

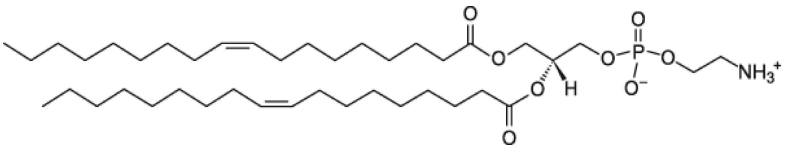
[0077] 특정 구현예에서, 지질 대 CRISPR/Cas9 mRNA의 비는 약 3:1 내지 약 15:1이다. 특정 구현예에서, 지질 대 CRISPR/Cas9 mRNA의 비는 약 7.5:1이다.

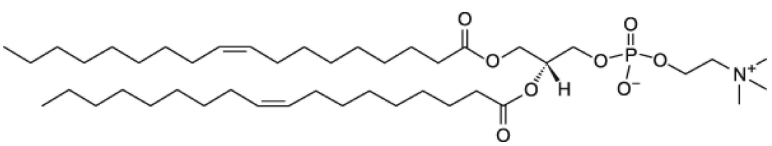
[0078] 특정 구현예에서, 리피도이드 나노입자는 콜레스테롤을 추가로 포함한다.

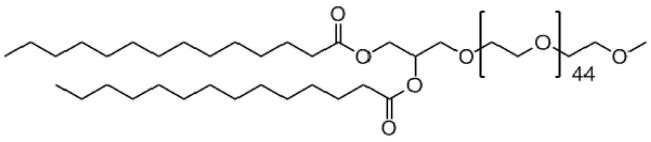
[0079] 특정 구현예에서, 지질 대 콜레스테롤의 비는 약 1:1 내지 약 2:1이다.

[0080] 특정 구현예에서, 리피도이드 나노입자는 DOPE, DSPC, 또는 DOPC, 및 DMG-PEG2K를 추가로 포함하며, 여기서

[0081] DSPC는  의 구조를 가지며:

[0082] DOPE는  의 구조를 가지며:

[0083] DOPC는  의 구조를 가지며:



[0084] DMG-PEG2K는 의 구조를 갖는다.

[0085] 특정 구현예에서, 리피도이드 나노입자는 DOPC 및 DMG-PEG2K를 추가로 포함한다.

[0086] 특정 구현예에서, 지질 대 DOPC의 비는 약 4:1 내지 약 6:1이며; 지질 대 DMG-PEG2K의 비가 약 4:1 내지 약 100:1 내지 약 4:1 내지 약 20:1이다.

[0087] 특정 구현예에서, 리피도이드 나노입자는 약 25 nm 내지 약 1000 nm의 입자 크기를 갖는다. 특정 구현예에서, 리피도이드 나노입자는 약 50 nm 내지 약 500 nm의 입자 크기를 갖는다.

[0088] 특정 구현예에서, 인간 지단백질 대사 장애는 ANGPTL3 유전자의 기능 상실 돌연변이와 연관된다.

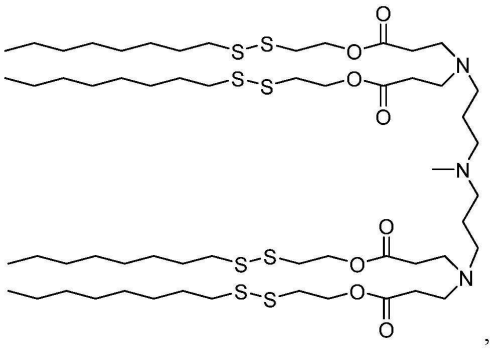
[0089] 특정 구현예에서, 심혈관 질환은 전구단백질 전환효소 서브틸리신/켁신 타입 9 유전자(PCSK9)와 관련된다.

[0090] 특정 구현예에서, 인간 지단백질 대사 장애는 혈장 고밀도 지단백질 콜레스테롤, 혈청 저밀도 지단백질 콜레스테롤, 또는 트리글리세리드 수준의 감소와 관련된다.

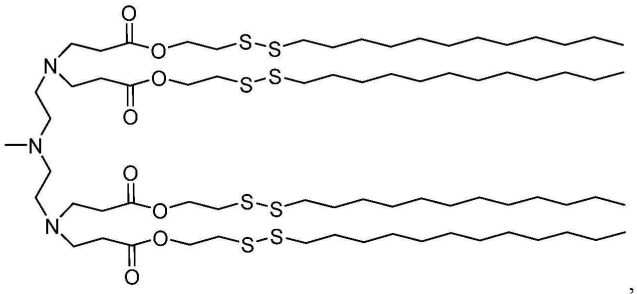
[0091] 특정 구현예에서, 인간 지단백질 대사 장애는 낮은 수준의 혈장 고밀도 지단백질 콜레스테롤, 높은 수준의 혈청 저밀도 지단백질 콜레스테롤 또는 높은 수준의 트리글리세리드와 관련된다.

[0092] 특정 구현예에서, 심혈관 질환은 동형접합 가족성 고콜레스테롤혈증, 및 고콜레스테롤혈증으로 구성된 군으로부터 선택된다.

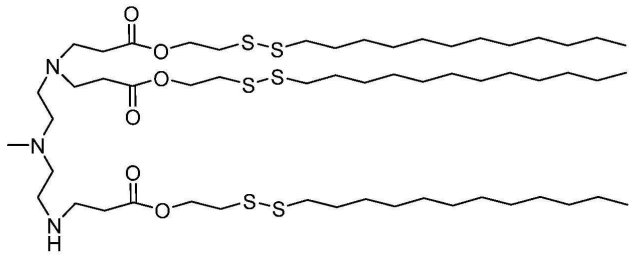
[0093] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 하기로 구성된 군으로부터 선택된 지질을 제공한다:



,



, 및



.

[0094]

[0095] *정의*

[0096] 본원에 달리 정의되지 않는 한, 본 출원에 사용되는 과학 및 기술 용어는 당업자에게 일반적으로 이해되는 의미

를 가질 것이다. 일반적으로, 본원에 기술된 화학, 세포 및 조직 배양, 분자 생물학, 세포 및 암 생물학, 신경생물학, 신경화학, 바이러스학, 면역학, 미생물학, 약리학, 유전학 및 단백질 및 핵산 화학과 관련하여 및 이의 기술에 사용되는 명명법은 당업계에 잘 알려져 있고 일반적으로 사용되는 것들이다.

[0097] 본 개시내용의 방법 및 기술은 달리 지시되지 않는 한, 본 명세서 전체에 걸쳐 인용되고 논의되는 다양한 일반적이고 보다 구체적인 참고문헌에 기재된 바와 같이 당업계에 널리 공지된 통상적인 방법에 따라 일반적으로 수행된다. 예를 들어, 문헌 ["Principles of Neural Science", McGraw-Hill Medical, New York, N.Y. (2000); Motulsky, "Intuitive Biostatistics", Oxford University Press, Inc. (1995); Lodish et al., "Molecular Cell Biology, 4th ed.", W. H. Freeman & Co., New York (2000); Griffiths et al., "Introduction to Genetic Analysis, 7th ed.", W. H. Freeman & Co., N.Y. (1999); and Gilbert et al., "Developmental Biology, 6th ed.", Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA (2000)] 참조. 본원에 달리 정의되지 않는 한 본원에 사용된 바와 같은 용어 화학은 문헌 ["The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms", Parker S., Ed., McGraw-Hill, San Francisco, C.A. (1985)]에 예시된 바와 같이 당업계에 통상적인 용도에 따라 사용된다.

[0098] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "임의적" 또는 "임의적으로"라는 용어는 이후에 설명되는 사건 또는 상황이 발생할 수 있거나 발생하지 않을 수 있음을 의미하며, 설명은 사건 또는 상황이 발생하는 경우와 발생하지 않는 경우를 모두 포함한다. 예를 들어, "임의적으로 치환되는 알킬"은 알킬이 치환될 수 있을 뿐만 아니라 알킬이 치환되지 않을 수 있음을 나타낸다.

[0099] 본 발명의 화합물에 대한 치환기 및 치환 패턴은 당업자에 의해 선택되어 당업계에 공지된 기술 및 하기 제시된 방법에 의해 용이하게 입수가능한 출발 물질로부터 용이하게 합성될 수 있는 화학적으로 안정한 화합물을 발생시킬 수 있는 것으로 이해된다. 치환기 자체가 하나 초과의 기로 치환되는 경우, 이들 다중 기는 안정한 구조가 생성되는 한 동일한 탄소 또는 상이한 탄소 상에 있을 수 있는 것으로 이해된다.

[0100] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "임의적으로 치환된"은 주어진 구조에서 1 내지 6개의 수소 라디칼의 비제한적으로 하이드록실, 하이드록시알킬, 알콕시, 할로겐, 알킬, 니트로, 실릴, 아실, 아실옥시, 아릴, 사이클로알킬, 헤테로사이클릴, 아미노, 아미노알킬, 시아노, 할로알킬, 할로알콕시, $-OCO-CH_2-O$-알킬, $-OP(O)(O$-알킬$)_2$ 또는 $-CH_2-OP(O)(O$-알킬$)_2$을 포함하는 특정화된 치환기의 라디칼로의 대체를 나타낸다. 바람직하게는, "임의적으로 치환되는"은 주어진 구조에서 1 내지 4개의 수소 라디칼의 상기 언급된 치환기로의 대체를 나타낸다. 더욱 바람직하게는, 1 내지 3개의 수소 라디칼은 상기 언급된 바와 같은 치환기로 대체된다. 치환기는 추가로 치환될 수 있는 것으로 이해된다.

[0101] 단수형("a", "an" 및 "the"와 같은) 관사는 상반되게 표시되거나 문맥에서 달리 명백하지 않는 한 하나 초과를 의미할 수 있다. 군의 하나 이상의 구성원 사이에 "또는"이 포함되는 청구항 또는 설명은 문맥상 상반되거나 다른 것으로 명백하지 않는다면 군 구성원 중 하나, 하나 초과 또는 모두가 주어진 생성물 또는 공정에 존재하거나 사용되거나 달리 관련되는 경우 충족된 것으로 간주된다. 본 발명은 군의 정확한 한 구성원이 주어진 생성물 또는 공정에 존재하거나 사용되거나 달리 관련되는 구현예를 포함한다. 본 발명은 군 구성원의 하나 초과 또는 모두가 주어진 생성물 또는 공정에 존재하거나 사용되거나 달리 관련되는 구현예를 포함한다.

[0102] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "알킬"은 C_1-C_{10} 직쇄 알킬 기 또는 C_1-C_{10} 분지쇄 알킬 기를 포함하나 이에 제한되지 않는 포화 지방족 기를 지칭한다. 바람직하게는, "알킬" 기는 C_1-C_6 직쇄 알킬 기 또는 C_1-C_6 분지쇄 알킬 기를 지칭한다. 가장 바람직하게는, "알킬" 기는 C_1-C_4 직쇄 알킬 기 또는 C_1-C_4 분지쇄 알킬 기를 지칭한다. "알킬"의 예는 메틸, 에틸, 1-프로필, 2-프로필, n-부틸, sec-부틸, tert-부틸, 1-펜틸, 2-펜틸, 3-펜틸, 네오-펜틸, 1-헥실, 2-헥실, 3-헥실, 1-헵틸, 2-헵틸, 3-헵틸, 4-헵틸, 1-옥틸, 2-옥틸, 3-옥틸 또는 4-옥틸 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. "알킬" 기는 임의적으로 치환될 수 있다.

[0103] 용어 "아실"은 당업계에 인식되어 있으며, 일반식 하이드로카르빌C(O)-, 바람직하게는 알킬C(O)-로 표시되는 기를 지칭한다.

[0104] 용어 "아실아미노"는 당업계에 인식되어 있으며, 아실 기로 치환된 아미노 기를 지칭하고, 예를 들어 화학식 하이드로카르빌C(O)NH-로 표시될 수 있다.

[0105] 용어 "아실옥시"는 당업계에 인식되어 있으고, 일반식 하이드로카르빌C(O)O-, 바람직하게는 알킬C(O)O-로 표시

되는 기를 지칭한다.

[0106] 용어 "알콕시"는 산소가 부착된 알킬기를 지칭한다. 대표적인 알콕시 기는 메톡시, 에톡시, 프로폭시, 3차-부톡시 등을 포함한다.

[0107] 용어 "알콕시알킬"은 알콕시 기로 치환된 알킬 기를 지칭하며, 일반식 알킬-O-알킬로 표시될 수 있다.

[0108] 용어 "알킬"은 직쇄 알킬 기, 분지쇄 알킬 기, 사이클로알킬(지환족) 기, 알킬-치환된 사이클로알킬 기 및 사이클로알킬-치환된 알킬 기를 포함하는 포화 지방족 기를 지칭한다. 바람직한 구현예에서, 직쇄 또는 분지쇄 알킬은 그의 골격에 30개 이하의 탄소 원자(예를 들어, 직쇄의 경우 C_{1-30}, 분지쇄의 경우 C_{3-30}), 더욱 바람직하게는 20개 이하의 탄소 원자를 갖는다.

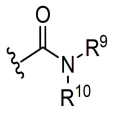
[0109] 더욱이, 명세서, 실시예 및 청구범위 전반에 걸쳐 사용된 용어 "알킬"은 비치환된 및 치환된 알킬 기 둘 모두를 포함하도록 의도되며, 이들 중 후자는 탄화수소 골격의 하나 이상의 탄소 상의 수소를 대체하는 치환기를 갖는 알킬 모이어티를 지칭하며, 트리플루오로메틸 및 2,2,2-트리플루오로에틸 등과 같은 할로알킬기를 포함한다.

[0110] 화학적 모이어티, 예컨대 아실, 아실옥시, 알킬, 알케닐, 알키닐 또는 알콕시와 함께 사용되는 경우 용어 "C_{x-y}"는 사슬에 x 내지 y개의 탄소를 함유하는 기를 포함하는 것을 의미한다. C_0 알킬은 기가 말단에 위치하는 경우 수소, 내부에 있는 경우 결합을 나타낸다. 예를 들어, C_{1-6} 알킬 기는 사슬에 1-6개의 탄소 원자를 함유한다.

[0111] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "알킬아미노"는 적어도 하나의 알킬 기로 치환된 아미노 기를 지칭한다.

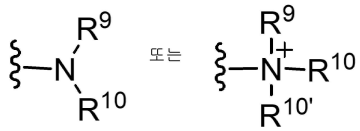
[0112] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "알킬티오"는 알킬 기로 치환되는 티올 기를 지칭하며, 일반식 알킬S-로 나타낼 수 있다.

[0113] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "아미드"는 하기 기를 지칭한다:

[0114] 

[0115] 상기 식에서,R^9 및 R^{10} 각각은 독립적으로 수소 또는 하이드로카르빌 기를 나타내거나, R^9 및 R^{10}은 이들이 부착되는 N 원자와 함께 취해져서 고리 구조에 4 내지 8개의 원자를 갖는 헤테로사이클을 완성한다.

[0116] 용어 "아민" 및 "아미노"는 당업계에 인지되어 있으며, 비치환된 및 치환된 아민 둘 모두 및 이의 염, 예를 들어 하기로 나타낼 수 있는 모이어티를 지칭한다:

[0117] 

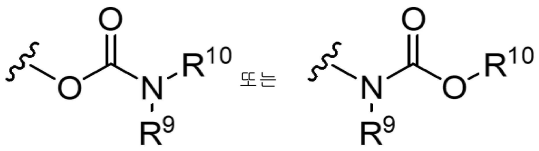
[0118] 상기 식에서, R^9, R^{10} 및 $R^{10'}$ 각각은 독립적으로 수소 또는 하이드로카르빌 기를 나타내거나, R^9 및 R^{10}은 이들이 부착되는 N 원자와 함께 취해져서 고리 구조에 4 내지 8개의 원자를 갖는 헤테로사이클을 완성한다.

[0119] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "아미노알킬"은 아미노 기로 치환된 알킬기를 지칭한다.

[0120] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "아르알킬"은 아릴 기로 치환된 알킬 기를 지칭한다.

[0121] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "아릴"은 고리의 각 원자가 탄소인 치환되거나 비치환된 단일-고리 방향족 기를 포함한다. 바람직하게는, 고리는 5- 내지 7-원 고리, 더욱 바람직하게는 6-원 고리이다. 용어 "아릴"은 또한 2개 이상의 탄소가 2개의 인접한 고리에 공통인 2개 이상의 사이클릭 고리를 갖는 폴리사이클릭 고리 시스템을 포함하며, 여기서 고리 중 적어도 하나는 방향족이고, 예를 들어 다른 사이클릭 고리는 사이클로알킬, 사이클로알케닐, 사이클로알키닐, 아릴, 헤테로아릴 및/또는 헤테로사이클릴일 수 있다. 아릴 기는 벤젠, 나프탈렌, 페난트렌, 페놀, 아닐린 등을 포함한다.

[0122] 용어 "카르바메이트"는 당업계에서 인지되어 있으며, 하기 기를 지칭한다:

[0123] 

[0124] 상기 식에서, R^9 및 R^{10}은 독립적으로 수소 또는 하이드로카르빌 기를 나타낸다.

[0125] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "카르보사이클릴알킬"은 카르보사이클 기로 치환된 알킬 기를 지칭한다.

[0126] 용어 "카르보사이클"은 5-7원 모노사이클릭 및 8-12원 바이사이클릭 고리를 포함한다. 바이사이클릭 카르보사이클의 각 고리는 포화, 불포화 및 방향족 고리로부터 선택될 수 있다. 카르보사이클은 1, 2 또는 3개 이상의 원자가 2개 고리 사이에 공유되는 바이사이클릭 분자를 포함한다. 용어 "융합된 카르보사이클"은 고리 각각이 다른 고리와 2개의 인접한 원자를 공유하는 바이사이클릭 카르보사이클을 지칭한다. 융합된 카르보사이클의 각 고리는 포화, 불포화 및 방향족 고리로부터 선택될 수 있다. 예시적인 구현예에서, 방향족 고리, 예를 들어, 페닐은 포화 또는 불포화 고리, 예를 들어, 사이클로헥산, 사이클로펜탄 또는 사이클로헥센에 융합될 수 있다. 원자가가 허용하는 한 포화, 불포화 및 방향족 바이사이클릭 고리의 임의의 조합이 카르보사이클릭의 정의에 포함된다. 예시적인 "카르보사이클"은 사이클로펜탄, 사이클로헥산, 바이사이클로[2.2.1]헵탄, 1,5-사이클로옥타디엔, 1,2,3,4-테트라하이드로나프탈렌, 바이사클로[4.2.0]옥트-3-엔, 나프탈렌 및 아다만탄을 포함한다. 예시적인 융합된 카르보사이클은 데칼린, 나프탈렌, 1,2,3,4-테트라하이드로나프탈렌, 바이시클로[4.2.0]옥탄, 4,5,6,7-테트라하이드로-1H-인덴 및 바이사이클로[4.1.0]헵트-3-엔을 포함한다. "카르보사이클"은 수소 원자를 보유할 수 있는 임의의 하나 이상의 위치에서 치환될 수 있다.

[0127] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "카르보사이클릴알킬"은 카르보사이클 기로 치환된 알킬 기를 지칭한다.

[0128] 용어 "카르보네이트"는 당업계에서 인지되어 있으며, 기 $-OCO_2-$를 지칭한다.

[0129] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "카르복시"는 화학식 $-CO_2H$로 표시되는 기를 지칭한다.

[0130] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "에스테르"는 R^9가 하이드로카르빌 기를 나타내는 $-C(O)OR^9$ 기를 지칭한다.

[0131] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "에테르"는 산소를 통해 또 다른 하이드로카르빌 기에 연결된 하이드로카르빌 기를 지칭한다. 따라서, 하이드로카르빌 기의 에테르 치환기는 하이드로카르빌-O-일 수 있다. 에테르는 대칭 또는 비대칭일 수 있다. 에테르의 예는 헤테로사이클-O-헤테로사이클 및 아릴-O-헤테로사이클을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 에테르는 일반식 알킬-O-알킬로 표시될 수 있는 "알콕시알킬" 기를 포함한다.

[0132] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "할로" 및 "할로겐"은 할로겐을 의미하며, 클로로, 플루오로, 브로모 및 아이오도를 포함한다.

[0133] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "헤타르알킬" 및 "헤테로아르알킬"은 헤트아릴 기로 치환된 알킬 기를 지칭한다.

[0134] 용어 "헤테로아릴" 및 "헤트아릴"은 치환되거나 비치환된 방향족 단일 고리 구조, 바람직하게는 5- 내지 7-원 고리, 더욱 바람직하게는 5- 내지 6-원 고리를 포함하며, 이의 고리 구조는 적어도 하나의 헤테로원자, 바람직하게는 1 내지 4개의 헤테로원자, 더욱 바람직하게는 1 또는 2개의 헤테로원자를 포함한다. 용어 "헤테로아릴" 및 "헤트아릴"은 또한 2개 이상의 탄소가 2개의 인접한 고리에 공통인 2개 이상의 사이클릭 고리를 갖는 폴리사이클릭 고리 시스템을 포함하며, 여기서 고리 중 적어도 하나는 헤테로방향족이고, 예를 들어 다른 사이클릭 고리는 사이클로알킬, 사이클로알케닐, 사이클로알키닐, 아릴, 헤테로아릴 및/또는 헤테로사이클릴일 수 있다. 헤테로아릴 기는 예를 들어, 피롤, 푸란, 티오펜, 이미다졸, 옥사졸, 티아졸, 피라졸, 피리딘, 피라진, 피리다진 및 피리미딘 등을 포함한다.

[0135] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "헤테로원자"는 탄소 또는 수소 이외의 임의의 원소의 원자를 의미한다. 바람직한 헤테로원자는 질소, 산소 및 황이다.

[0136] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "헤테로사이클릴알킬"은 헤테로사이클 기로 치환된 알킬 기를 지칭한다.

[0137] 용어 "헤테로사이클릴", "헤테로사이클" 및 "헤테로사이클릭"은 치환되거나 비치환된 비방향족 고리 구조, 바람

직하게는 3- 내지 10-원 고리, 더욱 바람직하게는 3- 내지 7-원 고리를 지칭하며, 이의 고리 구조는 적어도 1개의 헤테로원자, 바람직하게는 1 내지 4개의 헤테로원자, 더욱 바람직하게는 1 또는 2개의 헤테로원자를 포함한다. 용어 "헤테로사이클릴" 및 "헤테로사이클릭"은 또한 2개 이상의 탄소가 2개의 인접한 고리에 공통인 2개 이상의 사이클릭 고리를 갖는 폴리사이클릭 고리 시스템을 포함하며, 여기서 고리 중 적어도 하나는 헤테로사이클릭이고, 예를 들어 다른 사이클릭 고리는 사이클로알킬, 사이클로알케닐, 사이클로알키닐, 아릴, 헤테로아릴 및/또는 헤테로사이클릴이다. 헤테로사이클릴 기는 예를 들어,피페리딘, 피페라진, 피롤리딘, 모르폴린, 락톤, 락탐 등을 포함한다.

[0138] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "하이드로카르빌"은 =O 또는 =S 치환기를 갖지 않는 탄소 원자를 통해 결합되는 기를 지칭하고, 전형적으로 적어도 하나의 탄소-수소 결합 및 주로 탄소 골격을 갖지만, 임의적으로 헤테로원자를 포함할 수 있다. 따라서, 메틸, 에톡시에틸, 2-피리딜 및 심지어 트리플루오로메틸과 같은 기는 본 출원의 목적 상 하이드로카르빌로 간주되지만, 아세틸(연결 탄소에 =O 치환기를 가짐) 및 에톡시(이는 탄소가 아닌 산소를 통해 연결됨)와 같은 치환기는 그렇지 않다. 하이드로카르빌 기는 비제한적으로, 아릴, 헤테로아릴, 카르보사이클, 헤테로사이클, 알킬, 알케닐, 알키닐, 및 이들의 조합을 포함한다.

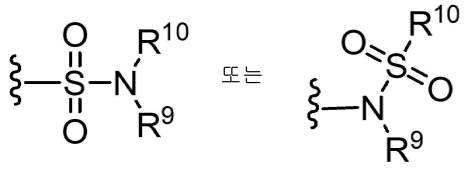
[0139] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "하이드록시알킬"은 하이드록시 기로 치환된 알킬 기를 지칭한다.

[0140] 아실, 아실옥시, 알킬, 알케닐, 알키닐 또는 알콕시와 같은 화학적 모이어티와 함께 사용되는 경우 용어 "저급"은 치환기에 10개 이하, 바람직하게는 6개 이하의 원자가 있는 기를 포함하는 것을 의미한다. 예를 들어, "저급 알킬"은 10개 이하, 바람직하게는 6개 이하의 탄소 원자를 함유하는 알킬 기를 지칭한다. 특정 구현예에서, 본원에 정의된 아실, 아실옥시, 알킬, 알케닐, 알키닐 또는 알콕시 치환기는 단독으로 나타나든 하이드록시알킬 및 아르알킬(이 경우, 예를 들어, 아릴 기 내의 원자는 알킬 치환기의 탄소 원자를 계수할 때 계수되지 않음)에서와 같이 다른 치환기와 조합하여 나타나든 각각 저급 아실, 저급 아실옥시, 저급 알킬, 저급 알케닐, 저급 알키닐 또는 저급 알콕시이다.

[0141] 용어 "폴리사이클릴", "폴리사이클" 및 "폴리사이클릭"은 2개 이상의 원자가 2개의 인접한 고리에 공통인 2개 이상의 고리(예를 들어, 사이클로알킬, 사이클로알케닐, 사이클로알키닐, 아릴, 헤테로아릴 및/또는 헤테로사이클릴)를 지칭하며, 예를 들어, 고리는 "융합된 고리"이다. 폴리사이클의 고리 각각은 치환되거나 치환되지 않을 수 있다. 특정 구현예에서, 폴리사이클의 각 고리는 고리에 3 내지 10개의 원자, 바람직하게는 5 내지 7개의 원자를 함유한다.

[0142] 용어 "설페이트"는 당업계에 인지되어 있으며, $-OSO_3H$ 기 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 지칭한다.

[0143] 용어 "설폰아미드"는 당업계에 인지되어 있으며, 하기 일반식으로 표시되는 기를 지칭한다:

[0144] 

[0145] 상기 식에서, R^9 및 R^{10}은 독립적으로 수소 또는 하이드로카르빌을 나타낸다.

[0146] 용어 "설폭사이드"는 당업계에 인지되어 있으며, -S(O)- 기를 지칭한다.

[0147] 용어 "설포네이트"는 당업계에 인지되어 있으며, SO_3H 기 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 지칭한다.

[0148] 용어 "설폰"은 당업계에 인지되어 있으며, 기 $-S(O)_2-$를 지칭한다.

[0149] 용어 "치환된"은 백본의 하나 이상의 탄소 상의 수소를 대체하는 치환기를 갖는 모이어티를 지칭한다. "치환" 또는 "로 치환된"은 그러한 치환이 치환된 원자 및 치환기의 허용된 원자가에 따르고, 치환이 예를 들어, 재배열, 환형화, 제거 등과 같은 변형을 자발적으로 겪지 않는 안정한 화합물을 발생시킨다는 암시적 단서를 포함하는 것으로 이해될 것이다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "치환된"은 유기 화합물의 모든 허용 가능한 치환기를 포함하는 것으로 고려된다. 광범위한 양태에서, 허용되는 치환기는 유기 화합물의 비고리형 및 고리형, 분지형 및 비분지형, 카르보사이클릭 및 헤테로사이클릭, 방향족 및 비방향족 치환기를 포함한다. 허용되는 치환기는 하나 이상이며, 적절한 유기 화합물에 대해 동일하거나 상이할 수 있다. 본 발명의 목적을 위해, 질소와 같은

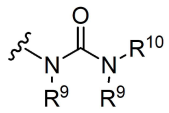
헤테로원자는 수소 치환기 및/또는 헤테로원자의 원자가를 충족시키는 본원에 기재된 유기 화합물의 임의의 허용 가능한 치환기를 가질 수 있다. 치환기는 본원에 기술된 임의의 치환기, 예를 들어 할로겐, 하이드록실, 카르보닐(예컨대, 카르복실, 알콕시카르보닐, 포르밀 또는 아실), 티오카르보닐(예컨대, 티오에스테르, 티오아세테이트 또는 티오포르메이트), 알콕실, 포스포릴, 포스페이트, 포스포네이트, 포스피네이트, 아미노, 아미도, 아미딘, 이민, 시아노, 니트로, 아지도, 설프히드릴, 알킬티오, 설페이트, 설포네이트, 설파모일, 설폰아미도, 설포닐, 헤테로사이클릴, 아르알킬, 또는 방향족 또는 헤테로방향족 모이어티를 포함할 수 있다. 탄화수소 사슬 상에서 치환된 모이어티는 적절한 경우 그 자체로 치환될 수 있음이 당업자에 의해 이해될 것이다.

[0150] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "티오알킬"은 티올 기로 치환된 알킬 기를 지칭한다.

[0151] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "티오에스테르"는 R^9가 하이드로카르빌을 나타내는 $-C(O)SR^9$ 또는 $-SC(O)R^9$ 기를 지칭한다.

[0152] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "티오에테르"는 산소가 황으로 대체된 에테르와 동등하다.

[0153] 용어 "우레아"는 당업계에 인지되어 있으며 하기 일반식으로 나타낼 수 있다:

[0154] 

[0155] 상기 식에서, R^9 및 R^{10}은 독립적으로 수소 또는 하이드로카르빌을 나타낸다.

[0156] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "조절하다"는 기능 또는 활성(예컨대, 세포 증식)의 억제 또는 저지 뿐만 아니라 기능 또는 활성의 향상을 포함한다.

[0157] "약학적으로 허용되는"이라는 문구는 당업계에 인지되어 있다. 특정 구현예에서, 상기 용어는 건전한 의학적 판단의 범위 내에서 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응 또는 기타 문제 또는 합병증 없이 합리적인 이점/위험 비율에 상응하게 인간 및 동물의 조직과 접촉하여 사용하기에 적합한 조성물, 부형제, 애주번트, 폴리머 및 기타 물질 및/또는 투여 형태를 포함한다.

[0158] "염"은 산 부가 염 또는 염기성 부가 염을 지칭하는 것으로 본원에서 사용된다.

[0159] 본 개시내용의 방법 및 조성물에 유용한 많은 화합물은 그 구조에서 적어도 하나의 입체 중심을 갖는다. 이 입체 중심은 R 또는 S 배위로 존재할 수 있으며, 상기 R 및 S 표기법은 문헌 [Pure Appl. Chem. (1976), 45, 11-30]에 기술된 규칙에 따라 사용된다. 본 개시내용은 화합물, 염, 전구약물 또는 이들의 혼합물의 거울상이성질체 및 부분입체이성질체 형태와 같은 모든 입체이성질체 형태(입체이성질체의 모든 가능한 혼합물 포함)를 고려한다. 예를 들어, WO 01/062726 참조.

[0160] 또한, 알케닐 기를 함유하는 특정 화합물은 Z(주잠멘) 또는 E(엔트게겐) 이성질체로 존재할 수 있다. 각각의 경우에, 본 개시내용은 혼합물 및 분리된 개별 이성질체 둘 모두를 포함한다.

[0161] 일부 화합물은 또한 호변이성질체 형태로 존재할 수 있다. 이러한 형태는 본원에 기재된 화학식으로 명시적으로 나타내지는 않았지만, 본 개시내용의 범위 내에 포함되도록 의도된다.

[0162] "약학적으로 허용되는"은 연방 또는 주 정부의 규제 기관 또는 미국 이외의 국가의 해당 기관에서 승인하거나 승인 가능하거나 동물 및 더욱 특히, 인간에 사용하기 위해 미국 약전 또는 기타 일반적으로 인정되는 약전에 나열됨을 의미한다.

[0163] "약학적으로 허용되는 염"은 약학적으로 허용되며, 모 화합물의 원하는 약리학적 활성을 보유하는 본 발명의 화합물의 염을 지칭한다. 특히, 이러한 염은 비독성이며, 무기 또는 유기 산 부가염 및 염기 부가염일 수 있다. 구체적으로, 이러한 염은 (1) 염산, 브롬화수소산, 황산, 질산, 인산 등과 같은 무기산으로 형성되거나; 아세트산, 프로피온산, 헥사노산, 사이클로펜탄프로피온산, 글리콜산, 피루브산, 락트산, 말론산, 숙신산, 말산, 말레산, 푸마르산, 타르타르산, 시트르산, 벤조산, 3-(4-하이드록시벤조일)벤조산, 신남산, 만델산, 메탄설폰산, 에탄설폰산, 1,2-에탄-디설폰산, 2-하이드록시에탄설폰산, 벤젠설폰산, 클로로벤젠설폰산, 2-나프탈렌설폰산, 4-톨루엔설폰산, 캄포설폰산, 4-메틸바이사이클로[2.2.2]-옥트-2-엔-1-카르복실산, 글루코헵톤산, 3-페닐프로피온산, 트리메틸아세트산, 3차 부틸아세트산, 라우릴 황산, 글루콘산, 글루탐산, 하이드록시나프토산, 살리실산, 스테아르산, 뮤콘산 등과 같은 유기산으로 형성된 산부가염; 또는 (2) 모 화합물에 존재하는 산성 양성자가 금

속 이온, 예를 들어 알칼리 금속 이온, 알칼리 토류 이온 또는 알루미늄 이온으로 대체되거나 에탄올아민, 디에탄올아민, 트리에탄올아민, N-메틸글루카민 등과 같은 유기 염기와 배위결합될 때 형성된 염을 포함한다. 염은 추가로 단지 예로서 나트륨, 칼륨, 칼슘, 마그네슘, 암모늄, 테트라알킬암모늄 등을 포함하고; 화합물이 염기성 작용기를 함유하는 경우, 하이드로클로라이드, 하이드로브로마이드, 타르트레이트, 메실레이트, 아세테이트, 말레에이트, 옥살레이트 등과 같은 비독성의 유기산 또는 무기산의 염을 포함한다.

[0164] 용어 "약학적으로 허용되는 양이온"은 산성 작용기의 허용가능한 양이온 반대이온을 지칭한다. 이러한 양이온은 나트륨, 칼륨, 칼슘, 마그네슘, 암모늄, 테트라알킬암모늄 양이온 등으로 예시된다(예를 들어, 문헌[Berge, et al., J. Pharm. Sci. 66(1):1-79(January 77)] 참조).

[0165] "약학적으로 허용되는 비히클"은 본 발명의 화합물과 함께 투여되는 희석제, 애주번트, 부형제 또는 담체를 지칭한다.

[0166] "약학적으로 허용되는 대사적으로 절단가능한 기"는 생체내에서 절단되어 본원에 표시된 구조식의 모 분자를 생성하는 기를 지칭한다. 대사적으로 절단가능한 기의 예는 -COR, -COOR, -CONRR 및 $-CH_2OR$ 라디칼을 포함하며, 여기서 R은 각각의 경우에 알킬, 트리알킬실릴, 카르보사이클릭 아릴, 또는 알킬, 할로겐, 하이드록시 또는 알콕시 중 하나 이상으로 치환되는 카르보사이클릭 아릴로부터 독립적으로 선택된다. 대표적인 대사적으로 절단가능한 기의 특정 예는 아세틸, 메톡시카르보닐, 벤조일, 메톡시메틸 및 트리메틸실릴 기를 포함한다.

[0167] "프로드러그"는 본 발명의 화합물의 유도체를 포함하는 화합물을 지칭하며, 이는 절단가능한 기를 가지며, 가용매분해에 의해 또는 생리학적 조건 하에서 생체내에서 약학적으로 활성인 본 발명의 화합물이 된다. 이러한 예는 비제한적으로, 콜린 에스테르 유도체 등, N-알킬모르폴린 에스테르 등을 포함한다. 본 발명의 화합물의 다른 유도체는 이들의 산 및 산 유도체 형태 둘 모두에서 활성을 가지지만, 산 민감성 형태는 종종 포유동물 유기체에서 용해도, 조직 적합성 또는 지연 방출의 이점을 제공한다(문헌 [Bundgard, H., Design of Prodrugs, pp. 7-9, 21-24, Elsevier, Amsterdam 1985] 참조). 프로드러그는 예를 들어, 모산과 적합한 알콜의 반응에 의해 제조된 에스테르, 또는 모 산 화합물과 치환되거나 비치환된 아민, 또는 산 무수물, 또는 혼합된 무수물의 반응에 의해 제조된 아미드와 같은 당업자에게 잘 알려진 산 유도체를 포함한다. 본 발명의 화합물에 매달린 산성 기로부터 유도된 단순 지방족 또는 방향족 에스테르, 아미드 및 무수물은 특정 프로드러그이다. 일부 경우에, (아실옥시)알킬에스테르 또는 (알콕시카르보닐)옥시)알킬에스테르와 같은 이중 에스테르 유형 프로드러그를 제조하는 것이 바람직하다. 특히, 본 발명의 화합물의 C_1-C_8 알킬, C_2-C_8 알케닐, C_2-C_8 알키닐, 아릴, C_7-C_{12} 치환된 아릴, 및 C_7-C_{12} 아릴알킬 에스테르.

[0168] "용매화물"은 일반적으로 가용매분해 반응에 의해 용매 또는 물과 회합된 화합물 형태를 지칭한다(또한, "수화물"로도 지칭된다). 이러한 물리적 회합은 수소 결합을 포함한다. 통상적인 용매는 물, 에탄올, 아세트산 등을 포함한다. 본 발명의 화합물은 예를 들어, 결정질 형태로 제조될 수 있으며, 용매화되거나 수화될 수 있다. 적합한 용매화물은 수화물과 같은 약학적으로 허용되는 용매화물을 포함하고, 화학량론적 용매화물 및 비화학량론적 용매화물 둘 모두를 추가로 포함한다. 특정 예에서, 용매화물은 예를 들어, 하나 이상의 용매 분자가 결정질 고형물의 결정 격자에 혼입될 때 분리될 수 있을 것이다. "용매화물"은 용액상 및 분리가능한 용매화물 둘 모두를 포함한다. 대표적인 용매화물은 수화물, 에탄올레이트 및 메탄올레이트를 포함한다.

[0169] 투여가 고려되는 "대상체"는 비제한적으로 인간(즉, 모든 연령 군의 남성 또는 여성, 예를 들어, 소아 대상체(예를 들어, 영아, 유아, 청소년) 또는 성인 대상체(예를 들어, 젊은 성년, 중년 성인 또는 노인) 및/또는 인간 외 동물, 예를 들어, 포유동물 예컨대 영장류(예를 들어, 시아노몰구스 원숭이, 붉은털 원숭이), 소, 돼지, 말, 양, 염소, 설치류, 고양이 및/또는 개를 포함한다. 특정 구현예에서, 대상체는 인간이다. 특정 구현예에서, 대상체는 인간외 동물이다. 용어 "인간", "환자" 및 "대상체"는 본원에서 상호교환가능하게 사용된다.

[0170] "유효량"은 질병을 치료 또는 예방하기 위해 대상체에게 투여될 때 그러한 치료 또는 예방을 수행하기에 충분한 화합물의 양을 의미한다. "유효량"은 화합물, 질병 및 이의 중증도 및 치료될 대상체의 연령, 체중 등에 따라 달라질 수 있다. "치료적 유효량"은 치료적 치료를 위한 유효량을 지칭한다. "예방학적 유효량"은 예방학적 치료를 위한 유효량을 지칭한다.

[0171] "예방하는" 또는 "예방" 또는 "예방학적 치료"는 질병 또는 장애를 얻거나 발병할 위험의 감소를 나타낸다(즉, 질병 유발 제제에 아직 노출되지 않거나 질병 발병 이전에 질병에 걸리기 쉬운 경향이 있는 대상체에서 질병의 임상 증상 중 적어도 하나가 발병하지 않도록 야기함).

[0172] 용어 "예방(prophylaxis)"은 "예방(prevention)"과 관련이 있으며, 질병을 치료하거나 치유하기 보다는 예방하는 것을 목적으로 하는 조치 또는 절차를 나타낸다. 예방 조치의 비제한적 예에는 백신 투여가 포함될 수 있다; 예를 들어, 부동화로 인해 혈전증의 위험이 있는 입원 환자에게 저분자량 헤파린 투여, 및 말라리아가 풍토병이거나 말라리아에 걸릴 위험이 높은 지리학적 지역을 방문하기 전에 클로로퀸과 같은 항말라리아제 투여.

[0173] 임의의 질병 또는 장애의 "치료하는" 또는 "치료" 또는 "치료적 치료"는 일 구현예에서 질병 또는 장애를 개선하는 것(즉, 질병을 저지하거나 이의 임상 증상 중 적어도 하나의 징후, 정도 또는 중증도를 감소시키는 것)을 나타낸다. 또 다른 구현예에서 "치료하는" 또는 "치료"는 대상체에 의해 식별가능하지 않을 수 있는 적어도 하나의 물리적 파라미터를 개선하는 것을 나타낸다. 추가의 또 다른 구현예에서, '치료하다' 또는 '치료'는 질병 또는 장애를 물리적으로(예를 들어, 식별가능한 증상의 안정화), 생리학적으로(예를 들어, 물리적 파라미터의 안정화) 또는 이 둘 모두로 조절하는 것을 나타낸다. 추가 구현예에서, "치료하는" 또는 "치료"는 질병의 진행을 늦추는 것과 관련된다.

[0174] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "동위원소 변이체"는 그러한 화합물을 구성하는 원자 중 하나 이상에서 비천연 비율의 동위원소를 함유하는 화합물을 지칭한다. 예를 들어, 화합물의 "동위원소 변이체"는 예를 들어, 중수소(^{2}H 또는 D), 탄소-13(^{13}C), 질소-15(^{15}N) 등과 같은 하나 이상의 비방사성 동위원소를 함유할 수 있다. 이러한 동위원소 치환이 이루어진 화합물에서, 존재하는 경우 다음 원자는 다양할 수 있으므로, 예를 들어 임의의 수소는 "^{2}H/D, 임의의 탄소는 ^{13}C일 수 있거나, 임의의 질소는 ^{15}N일 수 있으며, 이러한 원자의 존재 및 배치는 당업계의 기술 내에서 결정될 수 있는 것으로 이해될 것이다. 마찬가지로, 본 발명은 예를 들어, 생성된 화합물이 약물 및/또는 기질 조직 분포 연구에 사용될 수 있는 경우에 방사성 동위원소를 갖는 동위원소 변이체의 제조를 포함할 수 있다. 방사성 동위원소인 삼중수소, 즉 ^{3}H 및 탄소-14, 즉 ^{14}C는 혼입의 용이성과 용이한 검출 수단의 관점에서 이러한 목적에 특히 유용하다. 또한, ^{11}C, ^{18}F, ^{15}O 및 ^{13}N과 같은 양전자 방출 동위원소로 치환되는 화합물이 제조될 수 있으며, 기질 수용체 점유를 검사하기 위한 양전자 방출 지형(PET) 연구에 유용할 것이다. 방사성이든 아니든, 본원에 제공된 화합물의 모든 동위원소 변이체는 본 발명의 범위 내에 포함되는 것으로 의도된다.

[0175] 동일한 분자식을 갖지만 원자 결합의 성질 또는 순서 또는 공간에서의 원자 배열이 상이한 화합물을 "이성질체"라 칭하는 것으로 또한 이해되어야한다. 공간에서 원자의 배열이 다른 이성질체를 "입체이성질체"라고 한다.

[0176] 서로 거울상이 아닌 입체이성질체는 "부분입체이성질체"라고 하며, 서로의 거울상이 겹치지 않는 것은 "거울상이성질체"라고 한다. 화합물이 비대칭 중심을 갖는 경우, 예를 들어, 4개의 상이한 기를 갖는 경우, 한 쌍의 거울상이성질체가 가능하다. 거울상이성질체는 비대칭 중심의 절대 구성을 특징으로 할 수 있으며, Cahn과 Prelog의 R- 및 S- 배열순서 규칙에 의해 설명되거나, 분자가 편광면을 회전시키는 방식으로 설명되고, 우회전 또는 좌회전(즉, 각각 (+)- 또는 (-)- 이성질체)으로 지정된다. 키랄 화합물은 개별 거울상이성질체 또는 이들의 혼합물로서 존재할 수 있다. 동일한 비율의 거울상이성질체를 함유하는 혼합물은 "라세미체 혼합물"로 불린다.

[0177] "호변이성질체"는 특정 화합물 구조의 상호교환가능한 형태이며, 수소 원자 및 전자의 변위가 다양한 화합물을 지칭한다. 따라서, 두 구조는 전자와 원자(일반적으로 H)의 이동을 통해 평형 상태에 있을 수 있다. 예를 들어, 에놀 및 케톤은 산 또는 염기 처리에 의해 빠르게 상호전환되기 때문에 호변이성질체이다. 호변이성질체의 또 다른 예는 산 또는 염기로 처리하여 마찬가지로 형성되는 페닐니트로메탄의 산- 및 니트로-형태이다. 호변이성질체 형태는 관심 화합물의 최적의 화학 반응성 및 생물학적 활성의 달성과 관련될 수 있다.

[0178] 본원에 사용된 바와 같은 순수한 거울상이성질체 화합물은 화합물의 다른 거울상이성질체 또는 입체이성질체가 실질적으로 존재하지 않는다(즉, 거울상이성질체 과잉). 다시 말해서, 화합물의 "S" 형태는 화합물의 "R" 형태가 실질적으로 없고, 따라서 "R" 형태의 거울상 이성질체 과잉이다. 용어 "거울상이성질체적으로 순수한" 또는 "순수한 거울상이성질체"는 화합물이 95 중량% 초과, 96 중량% 초과, 97 중량% 초과, 98 중량% 초과, 98.5 중량% 초과, 99 중량% 초과, 99.2 중량% 초과, 99.5 중량% 초과, 99.6 중량% 초과, 99.7 중량% 초과, 99.8 중량% 초과 또는 99.9 중량% 초과의 거울상 이성질체를 포함함을 의미한다. 특정 구현예에서, 중량은 화합물의 모든 거울상이성질체 또는 입체이성질체의 총 중량을 기준으로 한다.

[0179] 본원에 사용된 바와 같이, 그리고 달리 나타내지 않는 한, 용어 "거울상이성질체적으로 순수한 R-화합물"은 적어도 약 95 중량%의 R-화합물 및 최대 약 5 중량%의 S-화합물, 적어도 약 99 중량%의 R-화합물 및 최대 약 1 중량%의 S-화합물, 또는 적어도 약 99.9 중량%의 R-화합물 및 최대 약 0.1 중량%의 S-화합물을 나타낸다. 특정 구

현예에서, 중량은 화합물의 총 중량을 기준으로 한다.

[0180] 본원에 사용된 바와 같이, 그리고 달리 나타내지 않는 한, 용어 "거울상이성질체적으로 순수한 S-화합물" 또는 "S-화합물"은 적어도 약 95 중량%의 S-화합물 및 최대 약 5 중량%의 R-화합물, 적어도 약 99 중량%의 S-화합물 및 최대 약 1 중량%의 R-화합물, 또는 적어도 약 99.9 중량%의 S-화합물 및 최대 약 0.1 중량%의 R-화합물을 나타낸다. 특정 구현예에서, 중량은 화합물의 총 중량을 기준으로 한다.

[0181] 본원에 제공된 조성물에서, 거울상이성질체적으로 순수한 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 용매화물, 수화물 또는 프로드러그는 다른 활성 또는 불활성 성분과 함께 존재할 수 있다. 예를 들어, 거울상이성질체적으로 순수한 R-화합물을 포함하는 약학적 조성물은 예를 들어, 약 90%의 부형제 및 약 10%의 거울상이성질체적으로 순수한 R-화합물을 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 이러한 조성물의 거울상이성질체적으로 순수한 R-화합물은 예를 들어, 화합물의 총 중량을 기준으로 하여 적어도 약 95 중량%의 R-화합물 및 최대 약 5 중량%의 S-화합물을 포함할 수 있다. 예를 들어, 거울상이성질체적으로 순수한 S-화합물을 포함하는 약학적 조성물은 예를 들어, 약 90%의 부형제 및 약 10%의 거울상이성질체적으로 순수한 S-화합물을 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 이러한 조성물의 거울상이성질체적으로 순수한 S-화합물은 예를 들어, 화합물의 총 중량을 기준으로 하여 적어도 약 95 중량%의 S-화합물 및 최대 약 5 중량%의 R-화합물을 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 활성 성분은 부형제 또는 담체를 거의 또는 전혀 사용하지 않고 제형화될 수 있다.

[0182] 본 발명의 화합물은 하나 이상의 비대칭 중심을 가질 수 있으며; 따라서 이러한 화합물은 개별 (R)- 또는 (S)-입체이성질체 또는 이들의 혼합물로서 생성될 수 있다.

[0183] 달리 명시되지 않는 한, 명세서 및 청구범위에서 특정 화합물의 설명 또는 명명은 개별 거울상이성질체 및 이들의 혼합물, 라세미체 또는 기타 모두를 포함하도록 의도된다. 입체화학의 측정 및 입체이성체의 분리 방법은 당업계에 잘 알려져 있다.

[0184] 유기 합성 분야의 통상의 기술자는 방향족이든 비방향족이든 안정하고 화학적으로 실현 가능한 헤테로사이클릭 고리에서 헤테로원자의 최대 수는 고리의 크기, 불포화도 및 헤테로 원자의 원자가에 의해 결정됨을 인지할 것이다. 일반적으로, 헤테로사이클릭 고리는 헤테로원자 고리가 화학적으로 실현가능하고 안정한 한 1 내지 4개의 헤테로원자를 가질 수 있다.

[0185] **실시예**

[0186] 본원에 기재된 발명이 보다 완전하게 이해될 수 있도록, 하기 실시예가 제시된다. 본 출원에 기재된 실시예는 본원에 제공된 화합물, 조성물, 재료, 장치 및 방법을 예시하기 위해 제공되며, 어떠한 방식으로도 이들의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다.

[0187] **I. 생체환원성 지질 및 메신저 RNA 나노입자로 가능해진 생체내 CRISPR/Cas9 게놈 편집**

[0188] *재료 및 방법*

[0189] 지질 합성에 사용된 모든 화학 물질은 Aladdin, TCI 또는 Sigma-Aldrich에서 구입하여 받은 대로 사용하였다. 반딧불이 루시페라제(L-7602) 및 Cas9 메신저 RNA(mRNA)(L-7606)는 Tri-Link Biotechnologies에서 구입하였다. 마우스 혈청 PCSK9는 PCSK9 ELISA 키트(Sino Biological, China)를 사용하여 결정하였다. 세포 생존율은 Alamar Blue 검정 또는 SRB 세포 증식 및 세포 독성 검정 키트(Yeasen Biotech Co., Ltd. China)를 사용하여 결정하였다. Cy3-RNA(43 nt)는 Biosyntech(Suzhou, Chian)에서 구입하였다. GFP를 표적으로 하는 gRNA는 본 발명자들의 이전 보고서에 따라 제조하였으며, 보고된 방법에 따라 시험관내 전사를 사용하여 마우스 PCSK9 및 인간 HPV18을 표적으로 하는 sgRNA를 제조하였다. RFP-인코딩 mRNA는 RiboMAX™ Large Scale RNA Production System(Promega, USA)을 사용하여 주형으로서 pcDNA3.1-RFP(Yingrun, Changsha, China)를 사용하여 시험관내 전사 방법을 사용하여 준비하였다. 유세포 분석은 Beckman Coulter CytoFLEX에서 수행하였다. HeLa, A375 및 HEK-GFP 세포는 10% FBS(Sigma-Aldrich) 및 1% 페니실린-스트렙토마이신(Life Technologies)이 보충된 DMEM(Sigma-Aldrich)에서 유지하였다. 모든 동물 관리 및 실험 절차는 NCNTC(National Center for Nanoscience and Technology of China)의 IUCAC(Institutional Animal Care and Use Committees)의 승인을 받았다.

[0190] **표 1.** sgRNA 서열 정보

SgRNA	서열 (5'-3')
sgGFP	GGGCACGGGCAGCUUGCCGG
sgScr	GAUAAAUAACGCGCCCAACAC
sgHPV18	GGGCGCUUUGAGGAUCCAACA
sgPCSK9	CCCAUGUGGAGUACAUUGGUU

[0191]

[0192] *지질 나노입자 제형*

[0193] 지질은 본 발명자들의 이전 보고서(9)에 따라 설명된 방법을 사용하여 아민과 아크릴레이트 또는 아크릴아미드를 가열하여 합성하고, 실리카 겔 상에서 플래쉬 크로마토그래피를 사용하여 정제하였다. mRNA 전달을 위한 지질 나노입자를 만들기 위해, 정제된 지질을 2 mL 바이알에서 클로로포름 중 16:8:4:1의 중량/중량 비율로 콜레스테롤, DOPE 및 DSPE-PEG2000과 혼합하고, 유기 용매를 진공하에 증발시키고, 생성된 혼합물을 밤새 추가 건조하여 박막을 형성하였다. 지질 막을 에탄올/소듐 아세테이트 완충액(200 mM, pH = 5.2)의 혼합 용액으로 수화시키고, DSPE-PEG2000 수용액에 적가하였다. 생성된 나노입자를 인산염 완충된 식염수(PBS)에 대해 투석하여 과량의 에탄올을 제거하였다.

[0194] *루시페라제 및 RFP mRNA의 세포내 전달*

[0195] 루시페라제 mRNA 전달을 위한 효과적인 지질 나노입자를 스크리닝하기 위해, A375 세포를 웰당 50 K의 밀도로 실험 하루 전에 24-웰 플레이트에 시딩하였다. 실험 당일, 160 ng/mL 루시페라제 mRNA를 소듐 아세테이트 완충액(25 mM, pH = 5.2) 중 3 μg/mL의 다른 지질 나노입자(모든 농도는 세포에 첨가된 최종 RNA 및 지질 농도를 나타냄)와 혼합한 후 실온에서 15분 동안 인큐베이션하였다. 그 후, 생성된 mRNA 리포플렉스를 세포에 첨가하고, 세포 배양 배지를 신선하게 하기 전에 추가로 6시간 동안 세포와 인큐베이션하였다. 루시페라제 활성은 제조사(Promega, USA)의 지시에 따라 반딧불이 루시페라제 활성 검정 키트를 사용하여 검정하였다.

[0196] BAMEA-O16B/루시페라제 mRNA 나노입자의 세포독성 검정을 위해 HEK 세포를 160 ng/mL의 루시페라제 mRNA 나노입자 또는 다른 지질 나노입자로 게놈 편집 효율 연구의 것과 유사하게 처리하였다. 세포 생존율은 전달 24시간 후 Alamar Blue 또는 SRB 세포 증식 및 세포독성 검정을 이용하여 결정하였다.

[0197] RFP mRNA 전달을 위해 48-웰 플레이트(웰당 25 K 세포)에 시딩된 HeLa 세포를 신선한 세포 배양 배지를 교체하기 전에 최적화된 조건에서 8시간 동안 BAMEA-O16B/RFP mRNA 나노입자로 처리하였다. RFP 발현 프로파일은 Olympus FV-IX81 공초점 시스템에서 CLSM을 사용하여 이미지화되거나 mRNA 전달 24시간 후 Beckman Coulter CytoFLEX에서 유세포 분석에 의해 정량화되었다.

[0198] *BAMEA-O16B/RNA 나노입자의 세포 흡수 및 엔도솜 탈출 연구*

[0199] 환원성 세포내 환경에 반응하여 RNA 방출을 촉진하는 생체환원성 나노입자 설계의 효과를 확인하기 위해 BAMEA-O16B 또는 BAMEA-O16을 소듐 아세테이트 완충액(25 mM, pH = 5.2) 중 15:1 중량비로 RFP mRNA와 복합시킨 후 실온에서 15분 동안 인큐베이션하였다. 생성된 나노복합체를 아가로스 겔 전기영동 전에 37℃에서 4시간 동안 5 mM GSH로 처리하고, GSH 처리 없이 mRNA 나노복합체와 비교하였다.

[0200] RNA 나노입자의 세포 흡수 연구를 위해 Cy3로 표지된 43-뉴클레오티드 RNA를 BAMEA-O16B 또는 BAMEA-O16 나노입자와 30:1의 중량비로 혼합한 후 HeLa 세포에 첨가하였다. CLSM 이미징 연구를 위해 HeLa 세포를 Cy3-RNA 나노입자로 8시간 동안 처리하고, 엔도솜은 LysoTracker Green(ThermoFisher Scientific, USA)을 사용하여 공동 염색하였다. BAMEA-O16B 또는 BAMEA-O16/RNA 나노입자의 세포 흡수 효율의 비교를 위해, 다양한 농도의 상기 RNA 나노입자로 처리한 세포를 유세포 분석을 사용하여 분석하고 Cy3-양성 세포를 정량화하였다.

[0201] *시험관내 Cas9 mRNA/sgRNA 전달 및 게놈 편집*

[0202] GFP가 안정적으로 발현된 HEK 세포를 48-웰 플레이트에 실험 하루 전에 웰당 25K의 밀도로 시딩하였다. 실험 당일에 13 nM GFP-표적화 sgRNA를 소듐 아세테이트 완충액(25 mM, pH = 5.2) 중에서 다양한 용량의 Cas9 mRNA 및 5 μg/mL BAMEA-O16B(모든 농도는 세포에 첨가된 최종 RNA 및 지질 농도를 나타냄)와 혼합한 후 실온에서 15분 동안 인큐베이션하였다. 그 후, BAMEA-O16B/Cas9 mRNA/sgGFP 나노입자를 세포에 첨가하고, 신선한 세포 배양 배

지를 교체하기 전에 10시간 동안 인큐베이션하였다. GFP 발현 프로파일은 CLSM을 사용하여 이미지화하거나 Cas9 mRNA 전달 후 다양한 시점에서 유세포 분석을 사용하여 정량화하였으며, Cas9 mRNA/sgGFP 전달 없이 세포에 정규화시켜 게놈 편집 효율을 결정하였다. Cas9 mRNA/sgGFP 전달의 서열-특이적 게놈 편집을 추가로 확인하기 위해 sgGFP를 스크램블 sgRNA로 대체하고 Cas9 mRNA/sgGFP 전달의 것과 유사하게 HEK-GFP 세포에 전달하였다.

[0203] BAMEA-O16B/Cas9 mRNA/sgGFP 나노입자의 세포독성 검정을 위해, HEK 세포를 다른 농도의 Cas9 mRNA 나노입자로 게놈 편집 효율 연구의 것과 유사하게 처리하였다. 세포 생존율은 Cas9 mRNA 전달 후 48시간째 Alamar Blue를 사용하여 결정되었다.

[0204] BAMEA-O16B/Cas9 mRNA 전달 효과를 확인하여 잠재적인 유전자 요법을 위한 내인성 유전자를 편집하기 위해, 48-웰 플레이트에 시딩된 HeLa 세포를 GFP 녹아웃 연구의 것과 유사한 스크램블 RNA 서열 또는 sgHPV18과 함께 BAMEA-O16B/Cas9 mRNA 단독으로 처리하고, 세포 생존율은 Cas9 mRNA 전달 후 48시간째 Alamar Blue 검정을 사용하여 결정하였다.

[0205] *생체내 Cas9 mRNA/sgRNA 전달 및 게놈 편집*

[0206] 생체내 루시페라제 mRNA 전달을 위해, 암컷 흉선 누드 마우스에 0.6 mg/kg의 mRNA 용량 또는 동일한 용량의 자유 mRNA로 BAMEA-O16B/Luci-mRNA 나노입자를 꼬리 정맥을 통해 주사하였다. 나노입자 또는 자유 mRNA 주사 후 24시간째에, IVIS 스펙트럼 In Vivo 이미징 시스템(Perkin Elmer, USA)에서 생체발광 이미징을 위해 마우스를 희생시켜 다양한 조직을 수확하였다. 간세포로의 mRNA 전달을 연구하기 위해 BAMEA-O16B/RFP mRNA 나노입자를 루시페라제 mRNA 전달과 유사하게 C57BL/6 마우스에 주입하였다. 나노입자 전달 후 24시간째에, 형광 이미징 연구를 위해 마우스를 희생하여 간을 수확하였다.

[0207] 생체내 Cas9 mRNA/Cy3-RNA 전달을 위해 암컷 흉선 누드 마우스에 9 mg/kg BAMEA-O16B, 0.6 mg/kg Cas9 mRNA 및 0.8 mg/kg Cy3-RNA의 용량의 BAMEA-O16B/Cas9 mRNA/Cy3-RNA 나노입자 또는 동일한 용량의 자유 mRNA를 꼬리 정맥을 통해 주사하였다. 나노입자 또는 자유 mRNA 주사 후 6시간째에, IVIS 스펙트럼 In Vivo 이미징 시스템(Perkin Elmer, USA)에서 생체발광 이미징을 위해 마우스를 희생시켜 다양한 조직을 수확하였다.

[0208] 생체내 Cas9 mRNA 전달 및 PCSK9 유전자 편집을 위해 C57BL/6 마우스에 9 mg/kg BAMEA-O16B, 0.6 mg/kg Cas9 mRNA 및 0.8 mg/kg sgRNA 용량으로 스크램블 sgRNA 서열과 BAMEA-O16B/Cas9 mRNA/sgRNA 또는 BAMEA-O16B/Cas9 mRNA/sgPCSK9를 꼬리 정맥을 통해 주사하였다. 나노입자 주사 후 2일째, PCSK9 및 간 독성 검정을 위해 마우스 혈청을 회수하기 위해 마우스를 희생시켰다. 한편, 나노입자 주사의 가능한 간 손상을 연구하기 위해 H&E 염색을 위해 간 조직을 수집하였다.

[0209] **실시예 1. mRNA 전달을 위한 효과적인 지질의 합성 및 스크리닝**

[0210] 도 2a 내지 도 2c는 루시페라제 및 RFP mRNA의 세포내 전달을 나타내는 그래프 및 이미지이다.

[0211] 생체환원성 지질은 본 발명자들의 이전 보고서에 따라 이황화 결합을 특징으로 하는 아민 및 아크릴레이트 또는 아크릴아미드를 가열하여 합성하였다(**도 1a**). 지질은 각각 아크릴레이트 또는 아크릴아미드의 사용을 구별하기 위해 아민 번호 또는 명칭 다음에 O16B 또는 N16B로 명명하였다(**도 1b**). 정제된 지질은 이 연구의 모든 세포 전달 실험에 대해 콜레스테롤, 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(DOPE) 및 DSPE-PEG_{2000}로 제형화시켰다(자세한 내용은 재료 및 방법 참조). mRNA 전달을 위한 효과적인 지질의 스크리닝을 용이하게 하기 위해, 루시페라제-인코딩 mRNA를 1:15의 중량비로 다양한 지질과 어셈블링시켜 A375 인간 흑색종 세포를 형질감염시켰다. 형질감염된 A375 세포의 루시페라제 발현을 측정하고, 루시페라제 mRNA 단독 또는 시중의 형질감염 지질인 Lipofectamine 2000(LPF2K)과 복합된 루시페라제 mRNA로 처리한 세포와 비교하였다. **도 2a**에 도시된 바와 같이, mRNA 단독으로 처리된 세포는 검출가능한 루시페라제 발현을 나타내지 않았으며, 이는 mRNA 단독으로는 세포에 진입할 수 없음을 나타내는 반면, mRNA와 지질의 복합체로 처리된 세포는 지질의 아민 및 테일 구조에 따라 다양한 루시페라제 발현을 보여주었음을 나타낸다. BAMEA-O16B(아민 11) 및 PPPDA-N16B(아민 13)의 두 가지 생체환원성 지질은 LPF2K의 것과 유사한 효율로 루시페라제 mRNA를 전달하였다. 2가지 지질의 생체적합성에 대한 추가 연구는 BAMEA-O16B 및 PPPDA-N16B의 mRNA 지질복합체가 LPF2K보다 낮은 세포독성을 나타내었으며(**도 6a** 및 **도 6b**), 이는 mRNA 전달을 위한 효율적이면서 생체적합성인 나노담체를 발견하기 위한 조합 지질 나노입자 설계의 이점 및 필요성을 강조한다. 대표적인 지질인 BAMEA-O16B를 상세한 mRNA 전달 및 CRISPR/Cas9 게놈 편집 연구를 위해 선택하였다.

[0212] 대표적인 지질 BAMEA-O16B는 HeLa 세포에 적색 형광 단백질(RFP)-인코딩 mRNA를 전달하는 이의 능력과 고효율로

입증된 바와 같이 mRNA 전달을 위한 일반적인 나노운반체이다. 인간 자궁경부암 세포(HeLa)를 BAMEA-O16B/RFP mRNA 나노입자로 처리하면 효율적인 RFP 발현이 발생하였다(**도 2b**). 유세포 분석(**도 2c**)은 RFP-양성 세포가 mRNA 용량에 의존적이며, 160 ng/mL의 RFP mRNA가 HeLa 세포에 전달되었을 때 형질감염 효율이 90% 만큼 높을 수 있음을 나타내었다. 종합적으로 루시페라제와 RFP mRNA 전달 둘 모두는 효율적이면서도 안전한 mRNA 전달을 위한 BAMEA-O16B 나노입자의 효과를 입증하였다.

[0213] **실시예 2. BAMEA-O16B 또는 BAMEA-O16을 사용한 mRNA 전달**

[0214] **도 3a-3d**는 BAMEA-O16B/RNA 나노입자의 세포 흡수 및 엔도솜 탈출 연구를 나타내는 그래프 및 이미지이다.

[0215] **도 4a- 4d** 배양된 세포에서 CRISPR/Cas9 mRNA 전달 및 게놈 편집.

[0216] BAMEA-O16B로의 이황화 결합의 통합이 세포내 mRNA 방출을 촉진하여 mRNA 형질감염 효율을 향상시킨다는 것을 추가로 더 상세히 설명하기 위해, 본 발명자들은 BAMEA-O16으로 명명된 이황화 결합이 없는 반면 BAMEA-O16B와 유사한 화학 구조를 가진 대조군 지질을 합성하였다(**도 3a**). 아가로스 겔 전기영동 연구는 BAMEA-O16B와 BAMEA-O16이 유사한 mRNA 캡슐화 효율을 보였음을 나타내었다(**도 7**). 흥미롭게도, 글루타티온(GSH) 처리(5 mM)는 BAMEA-O16B/mRNA 복합체에서 mRNA의 효율적인 방출을 발생시켰으나, BAMEA-O16/mRNA 복합체에서는 그렇지 않았다. 동적 광산란(DLS) 분석에 의해 밝혀진 바와 같이, 유사한 mRNA 캡슐화 능력은 두 mRNA 복합체의 유사한 크기 및 제타 전위에 의해 추가로 확인되었다(**표 2**).

[0217] **표 2.** 대표적인 지질 및 지질/mRNA 나노입자의 크기 및 제타 전위

샘플	크기 (nm)	제타 전위 (mV)
BAMEA-O16	93.3 ± 2.3	26.4 ± 1.3
BAMEA-O16/RFP mRNA	138.5 ± 1.0	18.7 ± 0.8
BAMEA-O16B	108.7 ± 0.5	25.3 ± 0.9
BAMEA-O16B/RFP mRNA	154.4 ± 0.3	18.9 ± 3.8
BAMEA-O16B/Cas9 mRNA/sgRNA	233.6 ± 2.3	10.4 ± 0.6

[0218]

[0219] 또한 BAMEA-O16B 또는 BAMEA-O16이 유사한 RNA 전달 효율을 보였다는 점이 주목된다. BAMEA-O16B 또는 BAMEA-O16의 형광 표지된 RNA 복합체(10 nM)로 HeLa 세포를 처리한 결과 모든 다양한 지질 및 RNA 비율에서 RNA 내재화 효율이 90%를 넘었다(**도 3b**). 그러나, HeLa 세포의 공초점 레이저 스캐닝 현미경(CLSM) 이미징은 BAMEA-O16B/RNA 처리된 세포가 BAMEA-O16/RNA 처리의 것보다 더 높은 엔도솜 탈출 효율을 보임을 나타내었으며(**도 3c**), 이는 주로 환원성 세포내 환경에 반응하여 RNA의 방출을 보다 효율적으로 촉진하는 BAMEA-O16B의 생체환원성 특성으로 인한 것이다. 더욱이, BAMEA-O16B 나노입자를 사용한 RFP mRNA 전달은 BAMEA-O16 촉진된 mRNA 전달의 것보다 HeLa 세포에서 더 높은 RFP 발현을 발생시켰다. 예를 들어, BAMEA-O16B를 사용한 160 ng/mL RFP mRNA의 전달은 BAMEA-O16 나노입자를 사용한 것보다 RFP 발현의 4배 향상을 발생시켰다(**도 3d**).

[0220] 리포터 mRNA 전달을 위해 BAMEA-O16B를 사용하는 효과를 입증한 후, 게놈 편집을 위한 Cas9 mRNA와 sgRNA를 동시에 전달하는 BAMEA-O16B의 능력을 다음으로 조사하였다. Cas9 mRNA는 크기가 약 4500개 뉴클레오티드이며, 루시페라제 또는 RFP mRNA(~1000 nt)보다 훨씬 길기 때문에 세포내 전달이 훨씬 더 어렵다. Cas9 mRNA 전달 및 게놈 편집을 위한 생체환원성 라이브러리의 효능을 더욱 자세히 설명하기 위해, GFP가 안정적으로 발현된 HEK 세포를 Cas9 mRNA 및 GFP-표적화 sgRNA를 캡슐화하는 지질 나노입자로 처리하고, mRNA 전달 전후의 GFP 발현 변화를 모니터링하였다. 표적에 맞는 GFP 게놈 편집은 GFP 유전자의 리딩 프레임의 이동을 유도하여 GFP 발현을 방지할 수 있다. **도 8**에 도시된 바와 같이, 32개의 지질 중 7개는 Cas9 mRNA 및 sgRNA를 효율적으로 전달하여 HEK 세포의 GFP 발현을 녹다운할 수 있으며, 그 중 지질 BAMEA-O16B가 가장 높은 게놈 편집 및 GFP 녹아웃 효율을 보여주었다. BAMEA-O16B와 Cas9 mRNA/sgRNA의 정전기적 상호작용은 약 230 nm 크기의 잘 분산된 나노입자를 조립하는 것으로 밝혀졌다(**표 2**, **도 9**). 한편, BAMEA-O16B/Cas9 mRNA 나노복합체는 게놈 편집 전달을 위한 생체적합성이 매우 높다. 다양한 농도의 BAMEA-O16B/Cas9 mRNA 나노복합체로 처리한 HEK 세포는 모두 90% 초과의 생존율을 유지하였으며, 이는 또한 LPF2K/Cas9 mRNA/sgRNA 나노복합체를 처리한 HEK 세포보다 높은 수준이다(**도 10**).

[0221] CLSM 이미징은 BAMEA-O16B/Cas9 mRNA/sgGFP 나노입자 처리가 HEK-GFP 세포의 GFP 형광의 완전한 손실을 초래한 반면, 자유 Cas9 mRNA 및 sgRNA 처리는 유사한 GFP 녹아웃 효과를 보이지 않았음을 나타내었다(**도 4a**). HEK-GFP 세포의 GFP 발현에 대한 정량 분석은 세포에 전달된 Cas9 mRNA의 농도가 20 ng/mL에서 160 ng/mL로 증가함에 따라 GFP 녹아웃 효율이 그에 따라 35%에서 90% 초과로 증가함을 보여주었다(**도 4b**). 한편, sgGFP를 스크램블 sgRNA로 대체한 경우, 효과적인 게놈 편집 및 세포 GFP 소실은 관찰되지 않았다(**도 4c**). BAMEA-O16B/Cas9 mRNA/sgRNA 처리는 단백질 수준에서 GFP 발현을 매우 빠르게 녹아웃시킴이 주목할만하다(**도 4b**). 40% GFP 녹아웃은 Cas9 mRNA 전달 후 24시간만큼 일찍 관찰되었으며, 이 비율은 Cas9 mRNA 전달 후 36시간째 최대 90%까지 증가하였지만 전달 시간을 추가로 연장해도 게놈 편집 효율은 증가하지 않았다.

[0222] **실시예 3. BAMEA-O16B 매개된 Cas9 mRNA 전달은 내인성 유전자 발현을 조절할 수 있다**

[0223] **도 5a-도 5c**는 생체내 Cas9 mRNA/sgRNA 전달 및 게놈 편집을 나타내는 그래프 및 이미지이다.

[0224] 또한, BAMEA-O16B 매개된 Cas9 mRNA 전달은 내인성 유전자 발현을 조절할 수 있으며, 따라서 새로운 유전자 요법을 개발할 가능성이 큼을 보여준다. 인유두종바이러스 타입 18(HPV18)은 사람의 자궁경부암 진행을 촉진하는 필수 유전자로서 연구 대상으로 선택되었다. BAMEA-O16B를 사용하여 HPV18을 표적으로 하는 sgRNA를 Cas9 mRNA와 함께 HeLa 세포에 전달하고, 처리 후 HeLa 세포의 생존율을 측정하고 스크램블 sgRNA 및 Cas9 mRNA 처리와 비교하였다. **도 4d**에 도시된 바와 같이, BAMEA-O16B/Cas9 mRNA/sgHPV18 처리는 스크램블 sgRNA 및 Cas9 mRNA 전달의 것과 비교하여 HeLa 성장을 유의하게 억제하였다(**도 4d**). 예를 들어, 320 ng/mL Cas9 mRNA 및 26nM sgHPV18의 전달은 HeLa 세포 생존율을 30%까지 감소시켰지만, sgHPV18을 스크램블 sgRNA로 교체하는 것은 HeLa 세포 성장 억제에 대한 유사한 효과를 나타내지 않았다.

[0225] 생체내 mRNA 전달 및 CRISPR/Cas9 게놈 편집을 위한 BAMEA-O16B 나노입자의 가능성을 추가로 입증하기 위해, 간세포에서 분비되고 콜레스테롤 항상성에 관여하는 효소인 전구단백질 전환효소 서브틸리신/켁신 타입 9(PCSK9)를 연구 대상으로 선택하였다. PCSK9는 간에서 저밀도 지단백질 콜레스테롤 수용체(LDL-R)의 밀도를 조절하여 지질 대사에 중요한 역할을 하며, 유전 연구에 따르면 PCSK9의 손실은 심혈관 질환의 위험 감소와 관련이 있음이 밝혀졌다.

[0226] 생체내 mRNA 전달을 위한 BAMEA-O16B 나노 입자의 생체분포가 먼저 연구되었다. 이를 위해 BAMEA-O16B/루시페라제 mRNA 나노입자 또는 형광 표지된 BAMEA-O16B/Cas9 mRNA/Cy3-RNA 나노입자를 제형화하고 0.6 mg/kg 또는 0.8 mg/kg sgRNA의 mRNA 용량으로 꼬리 정맥을 통해 마우스에 정맥 주사한 후, 나노입자의 생체분포를 연구하기 위해 조직 기관의 생체발광 또는 형광 이미징을 수행하였다. **도 11** 및 **도 5a**에 도시된 바와 같이, BAMEA-O16B/루시페라제 mRNA 나노입자 주사는 마우스 간에서 효과적인 루시페라제 발현을 발생시킨 반면, BAMEA-O16B/Cas9 mRNA/Cy3-RNA 나노입자 투여는 마우스 간에서 형광 신호의 효과적인 축적을 보였다. BAMEA-O16B/RFP mRNA 나노입자 전달에 의한 상세한 세포 국소화 연구는 BAMEA-O16B/RFP mRNA 나노입자가 대부분 간세포에 축적되어 있는 것으로 밝혀졌으며(**도 5b**), 이는 하기 논의된 바와 같이 간세포에서 PCSK9 게놈 편집에 사용될 수 있다.

[0227] BAMEA-O16B/Cas9 mRNA/sgPCSK9 나노입자를 C57BL/6 마우스에 주사하여 생체내 게놈 편집을 위한 BAMEA-O16B 나노입자의 잠재력과 효능을 연구한 후 혈청 PCSK9 수준 정량화를 통해 생체내 게놈 편집 효능을 평가하였다. **도 5c**에 도시된 바와 같이, BAMEA-O16B/Cas9 mRNA/sgPCSK9 나노입자의 정맥내 주사는 마우스 혈청 PCSK9를 DPBS 주사 또는 BAMEA-O16B/Cas9 mRNA/스크램블 sgRNA 나노입자 주사의 경우의 20%로 감소시켰다(**도 5c**). 한편, 헤마톡실린 및 에오신(H&E) 염색을 이용한 BAMEA-O16B/Cas9 mRNA/sgRNA 나노입자 처리 후 마우스 간의 조직학적 검사에서는 염증의 징후가 보이지 않았다(**도 12**). 더욱이, 나노입자 주사는 모든 주사의 마우스의 혈청 아스파르테이트 트랜스아미나제(AST), 알라닌 아미노트랜스퍼라제(ALT) 및 총 빌리루빈의 최소 변화에 의해 밝혀진 바와 같이 명백한 간세포 손상을 유도하지 않았다(**도 13**). 종합하면, 위의 결과는 생체내 게놈 편집을 위한 BAMEA-O16B 나노입자의 높은 효능 및 생체적합성을 명확하게 입증하였다.

[0228] **II. ANGPTL3의 생체내 게놈 편집을 위한 CRISPR/Cas9 mRNA의 지질 나노입자 매개된 전달**

[0229] *재료 및 방법*

[0230] *LNP 제형*

[0231] 리피도이드는 이전 보고서에 따라 합성하였다. LNP는 NanoAssemblr 미세 유체 시스템(Precision Nanosystems)을 사용하여 준비하였다. 간단히 말해서, 리피도이드, 콜레스테롤(Sigma), 인지질(DSPC, DOPE 및 DOPC, Avanti Polar Lipids) 및 DMG-PEG(Avanti Polar Lipids)를 50/38.5/10/1.5의 몰비로 100% 에탄올에 10 mg/mL의 최종

리피도이드 농도로 용해시켰다. Cas9 mRNA 및 gRNA(sgANGPTL3 또는 sgLoxP)를 소듐 아세테이트 완충액(25 mM, pH 5.2)에서 적절한 중량비로 혼합하였다. mRNA 용액과 지질 용액을 각각 3:1의 비율로 NanoAssemblr 미세유체 장치에 주입하고, 장치는 두 성분의 빠른 혼합을 통해 LNP의 자가-어셈블리를 발생시켰다. 제형을 4℃에서 밤새 투석 카세트에서 PBS(10 mM, pH 7.4)에 대해 추가로 투석하였다. 제형의 입자 크기는 ZetaPALS DLS 기계(Brookhaven Instruments)를 사용하여 동적 광산란(DLS)에 의해 측정하였다. RNA 캡슐화 효율은 Ribogreen 검정에 의해 특성 규명하였다.

[0232] *생체내 LNP 전달*

[0233] 동물 실험을 위한 모든 절차는 Tufts University Institutional Animal Care and Use Committee(IACUC)의 승인을 받았으며 실험 동물의 관리 및 사용에 대한 NIH(National Institutes of Health) 지침에 따라 수행하였다. 모든 동물은 Charles River에서 주문하였다. 암컷 Balb/c 마우스(6-8주)를 생체내 반딧불이 루시페라제 mRNA(fLuc mRNA, TriLink Biotechnologies) 캡슐화된 LNP 스크리닝 및 제형 최적화에 사용하였다. 간단히 말해서, fLuc mRNA LNP를 0.5 mg/kg mRNA의 용량으로 마우스에 정맥내 주사하였다. 소정의 시점에서 마우스에 100 μL의 D-루시페린 포타슘 염(Goldbio) 용액(PBS 중 15 mg/mL)을 주사하고, 이소플루란 마취하에 마취시키고, IVIS 이미징 시스템(Caliper Life Sciences)으로 측정하였다.

[0234] *생체내 Cas9 mRNA/sgLoxP 전달*

[0235] Cas9 mRNA(TriLink Biotechnologies) 및 LoxP-표적 단일 가이드 RNA(sgLoxP, 서열: 5'-AAGTAAAACCTCTACAAATG, Synthego)를 306-O12B LNP에 공동로딩하고, 1.65 mg/kg 총 RNA의 용량으로 암컷 Ai14 마우스에 정맥 주사하였다. 주사 후 7일에 마우스 장기를 수집하고 tdTomato 발현을 검출하기 위해 IVIS로 이미지화하였다. 간 조직을 추가로 절편화하였다.

[0236] *면역염색*

[0237] 조직 샘플을 OCT로 포매하고, 액체 질소에서 완전히 동결하고, 절편 준비가 될 때까지 -80℃에서 보관하였다. 동결된 조직 블록을 크리오톰(cryotome)을 사용하여 원하는 두께(10 μm)로 절편화하고, 면역형광 염색에 적합한 유리 슬라이드에 놓았다. 조직 절편은 10분 동안 사전 냉각된 아세톤(-20℃)으로 고정시키고, PBS로 2회 각각 5분 세척하였다. 고정된 조직 절편은 1시간 동안 실온(r.t.)에서 10% BSA 차단 완충액에서 인큐베이션한 다음 PBS로 세척하였다. 간세포 특이적 일차 항체(1% BSA 완충액에 1:100 희석됨, 항-간세포 특이적 항원(HepPar1), Novus)를 슬라이드 상의 절편에 가하고, 4℃에서 밤새 가습 챔버에서 인큐베이션하였다. 슬라이드를 PBS로 2회 각각 5분씩 린스한 후, eFlour660 컨주게이션된 F(ab')2-염소 항-마우스 2차 항체 (1:50, Invitrogen)로 염색하고 빛으로부터 보호된 가습 챔버에서 1시간 동안 인큐베이션한 후, PBS로 3회 세척하였다. DAPI(Sigma)를 함유하는 형광 마운팅 매질을 사용하여 슬라이드를 커버슬립하였다. 절편은 Leica SP8 공초점 현미경을 사용하여 분석하였다.

[0238] *ANGPTL3의 생체내 게놈 편집*

[0239] ANGPTL3 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA 서열은 Benchling 소프트웨어를 사용하여 설계하였다. 암컷 야생형 C57BL/6 마우스에 Cas9 mRNA 및 ANGPTL3-표적화된 단일 가이드 RNA(sgAngptl3, 서열: 5'-AGCCCTTCAACACAAGGTCA, Synthego) 공동-로딩된 306-O12B LNP를 총 RNA 중 1.0, 2.0 및 3.0 mg/kg의 용량으로 정맥내 투여하였다. PBS 투여된 마우스를 음성 대조군으로 처리하였다. 주사 후 7일째에, 마우스를 희생시키고, ELISA에 의한 순환 ANGPTL3 단백질 및 혈액 지질 정량화를 위해 수집하고, DNA 추출 및 차세대 서열(NGS) 분석을 위해 중앙 및 좌측 측엽으로부터 간 조직을 수집하였다. 또한, 생체내 독성 및 면역 반응을 평가하기 위해, 주사 후 2일째에 마우스로부터 혈액을 수집하고 혈청으로 진행시켰다. 아스파르테이트 아미노트랜스페라제(AST) 및 알라닌 아미노트랜스페라제(ALT) 및 종양 괴사 인자 알파(TNF-알파)는 제조업체의 프로토콜에 따라 AST(G-Biosciences), ALT(G-Biosciences) 및 TNF-알파(R&D Systems)에 대한 검정 키트를 사용하여 측정하였다.

[0240] *NGS 시퀀싱 분석*

[0241] DNA는 시중의 추출 키트(Qiagen DNEasy Blood & Tissue)를 사용하여 간의 중앙 및 좌측 측엽으로부터 추출하였다. PCR 프라이머는 Angptl3 유전자의 표적 부위 주변의 영역 또는 예측된 표적외 부위 주변의 영역을 증폭하도록 설계되었다(**표 S1**). 표적외 부위는 Cas Off Finder 소프트웨어(rgenome.net/cas-offinder/)를 사용하여 예측되었다. Illumina MiSeq(Tufts Genomics Core Facility)에서 시퀀싱을 위해 PCR 앰플리콘을 준비하였다. 시퀀싱 데이터는 OutKnocker 2 소프트웨어(outknocker.org/outknocker2.htm)를 사용하여 분석하였다.

[0242] *혈청 ANGPTL3 단백질, 저밀도 지단백질 콜레스테롤(LDL-C) 및 트리글리세리드(TG) 분석*

[0243] 항응고제를 사용하지 않고 마우스 혈액을 수집하고, 실온에서 2시간 동안 응고되도록 하고, 실온에서 2000 x g에서 15-20분 동안 원심분리하여 마우스 혈청을 수집하였다. ANGPTL3 단백질, LDL-C 및 TG의 혈청 수준은 제조업체의 프로토콜에 따라 각각 마우스 안지오포이에틴-유사 3 Quantikine ELISA 키트(R&D 시스템), 마우스 LDL-콜레스테롤 키트(Crystal Chem) 및 트리글리세리드 비색 검정 키트(Cayman Chemical)를 사용하여 결정하였다.

[0244] *T7E1 절단 검정*

[0245] 표적에 맞는 부위에 측접하는 게놈 영역은 추출된 게놈 DNA 주형, Platinum SuperFi Green DNA 중합효소(Invitrogen) 및 특정 프라이머를 사용하여 증폭하였다(**표 3**).

[0246] **표 3**: 이 실험에 사용된 PCR 프라이머

ID	순방향	역방향
Angptl3 NGS	CTCCAAAGCCCTGACCTTGT	TCTGCACCTTCAGAGCCAAA
Angptl3 T7E1	TTCTGCACCTTCAGAGCCAA	GCAAAGCAAACCCTGAACTGA
Off1	ACCTTGGTTAGGATGCCTGC	TTGCATTCCTGTCAGAGTGAT
Off2	ACATAGCCATCCCCCAACAA	GCTGCAACTTGGTGCTACCT
Off3	TGACATGACTCATTGCCACCA	GTGAACCATATCTTAATAGCACCAT
Off4	TCTAAATGCCAGGGTTCTGACT	CATGCCATGTGGGGTGATACAA
Off5	TACCCAGCCATATTGTGCAG	AGAAGACCAGATAGAAGTCAGGATG
Off6	CGGATGTTTGCATGAGGGGA	GGTTAGCTGCTGGACACTGA
Off7	GGTGTCCACTTGTTAAATGTCA	ACAACAACATGGAAAACTCTA
Off8	GCCAGCCACAGTTTTCATCG	GGGAGTCACAGTCATGGGTC
Off9	GCAGTCATCAGACAGGAGGG	GCAGCTCTCCAATCCAGACA

[0247]

[0248] 다음 주기를 실행하였다: 98℃에서 30초 후, 98℃에서 10초, 65℃에서 15초, 72℃에서 30초, 이어서 72℃에서 10분의 33주기. PCR 생성물은 GeneJET PCR 정제 키트(Thermo Scientific)를 사용하여 정제하였다. 400 ng의 정제된 PCR 생성물을 AppliedBiosystems PCR 시스템(Thermo Fisher Scientific)에서 5분 동안 95℃로 가열하고, 이어서 2℃/초로 85℃로 램프 다운시키고, 0.1℃/초로 25℃까지 램프 다운시킴으로써 NEBuffer 2(New England Biolabs)에서 혼성화시켰다. 어닐링된 샘플을 37℃에서 15분 동안 T7 엔도뉴클레아제 I(New England Biolabs)으로 분해한 후, 65℃에서 5분 동안 인큐베이션하여 반응을 중지하였다. 생성물을 추가로 정제하고, 4-20% Novex TBE 겔(Invitrogen)에서 작동시켰다.

[0249] *통계 분석*

[0250] 데이터는 평균 ± SD로 표현하였다. 모든 데이터는 Graphpad Prism 소프트웨어를 사용하여 분석하였다. $*p < 0.05$는 유의한 것으로 간주하였고, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$은 매우 유의한 것으로 간주하였다.

[0251] **실시예 4. mRNA 전달을 위한 지질 나노입자의 생체내 스크리닝**

[0252] **도 15a-15c**는 리피도이드 나노입자의 합성을 나타낸다.

[0253] 테일 분지형 생체환원성 리피도이드는 이황화 결합이 혼입된 아크릴레이트 지질 테일과 아민 함유 헤드 사이의 조합적 용매 비함유 마이클 부가 반응을 통해 제조하였다. (**도 15a**). 이러한 지질의 생체내 mRNA 전달 효능은 먼저 반딧불이 루시페라제 mRNA(fLuc mRNA)를 LNP 내에 캡슐화하고 이러한 LNP를 암컷 야생형 Balb/c 마우스에 정맥내로 전달함으로써 평가하였다. 이러한 LNP는 콜레스테롤, DSPC 및 DMG-PEG 부형제 화합물과 함께 본 발명자들의 합성 이온화 지질로 제형화하였다. 블랭크(무부하) 및 fLuc mRNA-로딩된 LNP의 대표적인 투과 전자 현미경 이미지를 **도 20a** 및 **도 20b**에 도시하였다. 최적 표준(gold standard) MC-3 LNP를 양성 대조군으로서 포함시켰다. mRNA 전달 후 6시간째에 마우스에 루시페린 기질을 복강내 주사하고, IVIS 생체내 이미징 시스템(PerkinElmer)을 사용하여 전신 fLuc 활성을 측정하였다. **도 15b**에 도시된 바와 같이, 306-O12B, 113-O12B 및 306-O10B LNP를 사용한 mRNA 전달은 MC-3 LNP 전달과 비교하여 유사하거나 심지어 더 높은 루시페라제 생체발광 강도를 발생시켰다. 마우스의 생체내 이미지는 루시페라제 단백질이 주로 간에서 발현됨을 명확하게 보여주었다 (**도 21**). 306-O12B는 추가 실험을 위한 대표적인 지질로 사용되었다. fLuc mRNA는 ~98%의 캡슐화 효율로 306-

O12B LNP에 효율적으로 캡슐화될 수 있었다(**도 22**). fLuc mRNA의 캡슐화 후, 306-O12B LNP는 112 nm의 평균 직경을 가졌다(**도 15c**).

[0254] **실시예 5. 306-O12B LNP의 제형화 최적화.**

[0255] **도 16a - 16f**는 fLuc mRNA 306-O12B LNP 제형의 최적화를 나타낸다.

[0256] 생체내에서 루시페라제 발현을 추가로 증가시키기 위해, 본 발명자들은 부형제 인지질 실체, LNP 제형의 4개 성분의 몰 조성비, 및 fLuc mRNA 캡슐화된 306-O12B LNP의 지질/mRNA 중량비를 포함하여 이러한 LNP의 어셈블리에 사용되는 다양한 제형화 파라미터를 최적화하였다.

[0257] 먼저, 생체내 루시페라제 발현 효능에 대한 인지질 부형제의 효과를 평가하기 위해 유사한 구조를 갖지만 원래 DSPC 인지질과 비교하여 헤드 기 및 테일 포화도가 다른 2개의 추가 인지질 DOPE 및 DOPC(**도 16a**)를 선택하였다. DOPC와 DOPE는 각각 탄소 테일에 1도의 불포화도를 함유하는 반면 DSPC는 완전히 포화된다. 또한, DSPC 및 DOPE 각각은 4차 아민 헤드기를 함유하는 반면, DOPE는 일차 아민 헤드기를 함유한다. 이들 특징 각각은 문헌에서 LNP 전달 효율에 영향을 미치는 것으로 보고되었다. 4차화된 아민 헤드기는 1차 아민 헤드보다 더 강한 양성자 스폰지 효과를 보이는 것으로 보고되었으며, 이는 cargo mRNA의 세포질로의 엔도솜 탈출을 촉진하여 mRNA의 단백질로의 번역을 증가시킬 수 있다. 또한, 지질 테일의 포화도는 막 유동성에 영향을 미치는 것으로 나타났으며, 이는 또한 엔도솜 탈출에도 영향을 미칠 수 있다. 불포화된 지질 테일은 더 높은 막 유동성을 발생시킬 수 있으며, 이는 또한 LNP와 막의 융합시 엔도솜 막의 탈안정화를 통해 엔도솜 탈출을 개선하는데 도움이 될 수 있다. 종합하면, 본 발명자들은 4차 아민 및 불포화된 테일을 함유하는 DOPC로 형성된 LNP가 가장 효율적인 fLuc 전달을 보일 것으로 가정한다. **도 16b** 및 **도 16c**에 도시된 바와 같이, DOPC로 제형화된 fLuc mRNA LNP는 실제로 DOPE 및 원래 DSPC 인지질을 갖는 제형의 것보다 간에서 현저하게 더 높은 루시페라제 발현을 발생시켰다. DOPC-함유 LNP와 함께 전달된 fLuc mRNA는 원래 DSPC-함유 LNP와 비교하여 약 4배 더 높은 발광 신호를 발생시켰다.

[0258] 초기 스크리닝에서 활성 지질 및 부형제 성분은 [50:38.5:10:1.5]의 [지질:콜레스테롤: DSPC: DMG-PEG]의 몰비로 제형화하였다. DOPC로서의 최적의 인지질을 확인하고 이에 따라 제형을 조정한 후, 다양한 몰비로 제형화된 LNP를 테스트하여 최적의 파라미터를 확인하였다(**도 16d**). **도 16e**에 도시된 바와 같이, 원래의 제형 O(306-O12B: 콜레스테롤: DOPC: DMG-PEG, 50:38.5:10:1.5의 몰비)는 가장 높은 루시페라제 생체발광 강도를 나타내었고; 새로운 제형 파라미터 중 어느 것도 원래의 것을 능가할 수 없었다.

[0259] 생체내 효능을 추가로 증가시키기 위한 노력으로, 4가지 성분의 최적 비율을 갖는 LNP는 5:1 내지 25:1 범위의 활성 지질 306-O12B:mRNA의 다양한 중량비로 제형화하였다. 흥미롭게도 중량비가 7.5:1일 때 가장 높은 효능을 달성한 것으로 밝혀졌다. 이 지점을 넘어 지질의 양을 증가시키는 것은 생체내 전달 효능에 이점이 없는 것처럼 보인다(**도 16f**). 종합적으로, 이러한 결과는 306-O12B LNP의 최적화된 제형이 50% 306-O12B, 38.5% 콜레스테롤, 10% DOPC 및 1.5% DMG-PEG 몰 조성을 갖고 306-O12B/mRNA의 중량비가 7.5/1임을 나타내었다.

[0260] **실시예 6. 생체내 간세포에서 mRNA-최적화된 LNP로의 sgRNA 및 Cas9 mRNA의 특이적 공동전달.**

[0261] **도 17a-17c**는 Ai14 마우스에서 Cas9/sgLoxP-매개된 게놈 편집을 가능하게 하는 306-O12B LNP를 나타낸다.

[0262] **도 23a - 23b**는 Ai14/Cas9 교차 마우스에서 sgLoxP-매개된 게놈 편집을 가능하게 하는 306-O12B LNP를 나타낸 이미지이다.

[0263] Cas9 mRNA/sgRNA LNP에 의해 편집되는 특정 세포 유형의 식별은 CRISPR 전달 시스템의 잠재적 적용을 예측하는 데 매우 중요하다. tdTomato 발현을 제어하는 LoxP-Flanked STOP 카세트로 유전자 조작된 Ai14 리포터 마우스 라인을 사용하였다. 이 마우스 라인은 Cre 리콤비나제와 함께 자주 사용되지만, LoxP-측접된 정지 코돈의 성공적인 CRISPR-매개된 절제가 또한 tdTomato의 발현을 유도할 것이다. tdTomato 발현이 있는 세포를 조사함으로써, 본 발명자들의 LNP 전달 시스템이 성공적으로 표적화할 수 있는 세포 유형을 결정할 수 있다.

[0264] 이 접근 방식을 검증하기 위해, 본 발명자들은 먼저 306-O12B LNP를 사용하여 Ai14 작제물과 항시적으로 발현된 Cas9 작제물(Ai14+/Cas9+ 마우스 모델)을 모두 발현하도록 조작된 마우스에 LoxP 표적화된 sgRNA(sgLoxP)를 전달하였다. **도 23a** 및 **도 23b**에 도시된 바와 같이, 본 발명자들의 LNP 시스템을 사용한 sgLoxP의 전달은 간에서 특이적으로 검출된 적색 형광을 발생시켰다. 흥미롭게도, 추가의 조직학적 분석은 tdTomato 신호가 주로 간 간세포에서 관찰되었으며, 이는 306-O12B LNP가 또한 이러한 치료적으로 관련된 세포 유형에 sgRNA를 특이적으로 전달할 수 있음을 나타내는 것으로 드러났다.

[0265] 다음으로, Cas9 mRNA 및 sgLoxP를 하나의 단일 LNP 내로 공동-제형화하고 1.65 mg/kg 총 RNA 용량으로 꼬리 정맥을 통해 Ai14 마우스에 주사하였다(**도 17a**). 전달 후 7일째에, 장기를 수확하고 IVIS 시스템을 사용하여 생체외에서 이미지화하였다. IVIS 시스템에 의해 분석된 마우스 기관의 생체외 이미지는 이러한 시스템이 실제로 적색 형광을 유도할 수 있으며, 이는 mRNA 및 sgRNA 성분 둘 모두의 성공적인 기능적 공동전달을 나타내며, tdTomato 신호는 간에서 우세하게 검출되었음을 보여주었다(**도 17b**). 간세포 특이적 바이오마커를 사용한 면역형광 염색을 추가로 수행하고, 공초점 이미지는 대부분의 tdTomato 단백질이 간세포에서 발현되었음을 입증하였다(**도 17c**). 이러한 발견은 306-O12B LNP가 CRISPR 머시너리를 간 간세포에 특이적으로 수송할 수 있음을 강력하게 나타내었다.

[0266] **실시예 7. ANGPTL3의 생체내 게놈 편집**

[0267] **도 18a-18b**는 야생형 C57BL/6 마우스에서 ANGPTL3의 생체내 게놈 편집의 306-O12B LNP 매개된 유의미한 수준을 나타낸다.

[0268] **도 19a-19c**는 306-O12B LNP가 CRISPR/Cas9-기반 게놈 편집을 통해 ANGPTL3에서 기능 상실 돌연변이를 유도하는데 MC-3 LNP보다 더 효율적임을 보여준다.

[0269] 다음으로, 기능적 내인성 유전자의 발현을 조작하기 위해 CRISPR/Cas9 mRNA를 전달하는 306-O12B LNP의 능력을 검증하였다. 지단백질 리파제와 내피 리파제 활성 모두를 억제하는 지단백질 대사의 중심 조절인자인 안지오포이에틴-유사 3(ANGPTL3)을 인코딩하는 ANGPTL3 유전자가 연구 대상으로 선택되었다. 야생형 C57BL/6 마우스를 사용하여 ANGPTL3의 비바이러스성 Cas9 mRNA/sgAngptl3 LNP-매개된 생체내 게놈 편집을 연구하였다. Cas9 mRNA와 sgAngptl3을 동시에 306-O12B LNP 내에 캡슐화하였다. CRISPR/Cas9 시스템이 두 요소 Cas9 mRNA 및 sgRNA를 함유한다는 점을 감안할 때, 이 두 성분의 비율은 생체내 게놈 편집 효능에 영향을 미칠 수 있다. 이를 위해 마우스에 3.0 mg/kg의 총 RNA 용량에서 2:1, 1:1.2 및 1:2의 다양한 Cas9 mRNA 대 sgAngptl3 질량비로 공동-제형화된 306-O12B LNP를 주사하였다. 주사 후 7일째에 혈청 ANGPTL3 단백질 수준의 ELISA 분석을 위해 혈청을 수집하고, 표적화된 Cas9-매개된 게놈 편집을 결정하기 위해 DNA 추출 및 NGS 시퀀싱을 위한 간 조직 샘플을 수집하였다. 모든 Cas9 mRNA/sgAngptl3 비율에서 혈청 ANGPTL3 단백질 수준의 감소 및 마우스 간에서 게놈 편집이 관찰되었지만, 이들 군 간에는 유의한 차이가 관찰되지 않았다(**도 18a** 및 **도 18b**). 1:1.2 Cas9 mRNA/sgAngptl3 비율은 다음 실험에 사용되었다. Cas9 mRNA/sgAngptl3 캡슐화된 306-O12B LNP는 평균 크기가 110 nm인 fLuc mRNA LNP와 유사한 특징을 가졌다(**도 24**).

[0270] 상당한 수준의 편집을 감안할 경우, 보다 자세한 생체내 편집 실험을 설계하고 수행하였다. 최적 표준으로, 본 발명자들은 RNA 구성요소를 캡슐화하는 본 발명자들의 306-O12B LNP를 정확히 동일한 RNA 구성요소를 캡슐화하는 FDA 승인된 간-전달 지질 MC-3으로 구성된 LNP(MC3-LNP)와 비교하였다. 동일한 비율의 부형제 지질이 306-O12B LNP 및 MC3-LNP 둘 모두에 사용되었으며, 이러한 특정 부형제 제형은 MC3-LNP와 함께 사용하기 위해 이전에 공개되었음을 주목해야 한다. 마우스에 3.0 mg/kg의 총 RNA 용량으로 306-O12B LNP 또는 MC-3-LNP를 투여하였다. 투여 후 7일째에 T7E1 검정을 이용하여 간내 원하는 부위의 편집이 관찰되었다(**도 25**). 간 샘플에서 ANGPTL3 표적 부위의 차세대 시퀀싱(NGS)은 306-O12B-LNP-매개된 전달이 38.5%의 중위소 편집 비율을 발생시켰으며, 이는 MC-3-매개된 전달의 것(14.6%)보다 현저하게 더 높음을 추가로 입증하였다(**도 19a**). 더욱 중요하게는, 혈청 분석은 306-O12B LNP 처리군(각각 65.2%, 56.8%, 29.4% 감소)에서 혈청 ANGPTL3 단백질, LDL-C 및 TG 수준이 MC-3 LNP 처리된 마우스의 것(각각 25%, 15.7%, 16.3% 감소)보다 현저하게 낮아졌음을 드러내었다(**도 19a**). NGS 시퀀싱 결과의 상세한 분석은 가장 빈번한 편집 이벤트가 예측된 Cas9 절단 부위에서 정확하게 1-nt 결실이었고, 이어서 동일한 위치에서 1-nt 삽입이었다는 것이 밝혀졌다(**도 19b**). 예상대로 MC3 LNP 및 306-O12B LNP-처리된 간 둘 모두에서 동일한 편집 이벤트가 관찰되었으며 주요 차이점은 이러한 이벤트의 빈도였다. 이는 관찰된 혈청 구성요소 감소가 실제로 Cas9-매개된 게놈 편집의 결과임을 나타내며, 두 지질 사이에서 관찰된 결과의 차이가 Cas9 mRNA의 타고난 활성의 일부 변화보다는 순전히 전달 효율의 결과임을 의미한다.

[0271] 임의의 CRISPR 전달 시스템으로 표적외 편집 사건 또는 전달-유도된 독성을 피하기 위해 주의를 기울여야 한다. 가장 가능성이 높은 9개의 표적외 게놈 돌연변이유발 부위가 컴퓨터로 예측되었으며, 이들 유전자좌는 간에서 추출된 DNA의 NGS 시퀀싱을 통해 조사되었다. 9개 상위의 예측된 표적외 돌연변이유발 중 어느 것에서도 편집의 증거가 관찰되지 않았다(**도 19c**). 생체내 독성 및 잠재적인 면역염증 반응을 평가하기 위해, 간 기능 마커인 아스파르테이트 아미노트랜스퍼라제(AST) 및 알라닌 아미노트랜스퍼라제(ALT), 및 염증유도 사이토킨 종양 괴사 인자-알파(TNF-알파)의 혈청 수준을 측정하였다(**도 26**). CRISPR/Cas9 LNP로 처리한 후 이러한 파라미터의 유의미한 변화는 감지되지 않았으며, 이는 무시할 수 있는 전신 독성을 추가로 입증한다.

[0272] 인용된 참고문헌

1. P. D. Hsu, E. S. Lander, F. Zhang, *Cell* **2014**, *157*, 1262.
2. M. Jinek, K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, J. A. Doudna, E. Charpentier, *Science* **2012**, *337*, 816.
3. L. Cong, F. A. Ran, D. Cox, S. Lin, R. Barretto, N. Habib, P. D. Hsu, X. Wu, W. Jiang, L. A. Marraffini, F. Zhang, *Science* **2013**, *339*, 819.
4. G. J. Knott, J. A. Doudna, *Science* **2018**, *361*, 866.
5. H. X. Wang, M. Li, C. M. Lee, S. Chakraborty, H. W. Kim, G. Bao, K. W. Leong, *Chem. Rev.* **2017**,*117*, 9874.
6. H. Yin, K. J. Kauffman, D. G. Anderson, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2017**, *16*, 387.
7. Z. Glass, M. Lee, Y. Li, Q. Xu, *Trends in Biotechnol.* **2018**, *36*, 173.
8. H. Yin, C. Q. Song, J. R. Dorkin, L. J. Zhu, Y. Li, Q. Wu, A. Park, J. Yang, S. Suresh, A. Bizhanova, A. Gupta, M. F. Bolukbasi, S. Walsh, R. L. Bogorad, G. Gao, Z. Weng, Y. Dong, V. Koteliansky, S. A. Wolfe, R. Langer, W. Xue, D. G. Anderson, *Nat. Biotechnol.* **2016**, *34*, 328.
9. M. Wang, J. A. Zuris, F. Meng, H. Rees, S. Sun, P. Deng, Y. Han, X. Gao, D. Pouli, Q. Wu, I. Georgakoudi, D. R. Liu, Q. Xu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, 2868.
10. L. Li, L. Song, X. Liu, X. Yang, X. Li, T. He, N. Wang, S. Yang, C. Yu, T. Yin, Y. Wen, Z. He, X. Wei, W. Su, Q. Wu, S. Yao, C. Gong, Y. Wei, *ACS Nano* **2017**, *11*, 95.
11. W. Sun, W. Ji, J. M. Hall, Q. Hu, C. Wang, C. L. Beisel, Z. Gu, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2015**, *54*, 12029.
12. Q. Liu, K. Zhao, C. Wang, Z. Zhang, C. Zheng, Y. Zhao, Y. Zheng, C. Liu, Y. An, L. Shi, C. Kang, Y. Liu, *Adv. Sci.* **2019**, *6*, 1801423.
13. W. Zhou, H. Cui, L. Ying, X. F. Yu, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2018**, *57*, 10268.

[0273]

14. P. Wang, L. Zhang, W. Zheng, L. Cong, Z. Guo, Y. Xie, L. Wang, R. Tang, Q. Feng, Y. Hamada, K. Gonda, Z. Hu, X. Wu, X. Jiang, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2018**, *57*, 1491.

15. K. Lee, M. Conboy, H. M. Park, F. Jiang, H. J. Kim, M. A. Dewitt, V. A. Mackley, K. Chang, A. Rao, C. Skinner, T. Shobha, M. Mehdipour, H. Liu, W. Huang, F. Lan, N. L. Bray, S. Li, J. E. Corn, K. Kataoka, J. A. Doudna, I. Conboy, N. Murthy, *Nat. Biomed. Eng.* **2017**, *1*, 889.

16. C. D. Sago, M. P. Lokugamage, K. Paunovska, D. A. Vanover, C. M. Monaco, N. N. Shah, M. G. Castro, S. E. Anderson, T. G. Rudoltz, G. N. Lando, P. M. Tiwari, J. L. Kirschman, N. Willett, Y. C. Jang, P. J. Santangelo, A. V. Bryksin, J. E. Dahlman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, E9944.

17. C. Xu, Z. Lu, Y. Luo, Y. Liu, Z. Cao, S. Shen, H. Li, J. Liu, K. Chen, Z. Chen, X. Yang, Z. Gu, J. Wang, *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 1.

18. U. Sahin, K. Kariko, O. Tureci, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2014**, *13*, 759.

19. X. Liang, J. Potter, S. Kumar, Y. Zou, R. Quintanilla, M. Sridharan, J. Carte, W. Chen, N. Roark, S. Ranganathan, N. Ravinder, J. D. Chesnut, *J. Biotechnol.* **2015**, *208*, 44.

20. C. J. McKinlay, J. R. Vargas, T. R. Blake, J. W. Hardy, M. Kanada, C. H. Contag, P. A. Wender, R. M. Waymouth, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, E448.

21. C. J. McKinlay, N. L. Benner, O. A. Haabeth, R. M. Waymouth, P. A. Wender, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, E5859.

22. Y. Li, J. Bolinger, Y. Yu, Z. Glass, N. Shi, L. Yang, M. Wang, Q. Xu, *Biomater. Sci.* **2019**, *7*, 596.

22. X. Yang, Q. Tang, Y. Jiang, M. Zhang, M. Wang, L. Mao, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 3782.

23. M. Wang, K. Alberti, S. Sun, C. L. Arellano, Q. Xu, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2014**, *53*, 2893.

24. M. Wang, S. Sun, C. I. Neufeld, B. Perez-Ramirez, Q. Xu, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2014**, *53*, 13444.

25. M. Wang, J. A. Zuris, F. Meng, H. Rees, S. Sun, P. Deng, Y. Han, X. Gao, D. Pouli, Q. Wu, I. Georgakoudi, D. R. Liu, Q. Xu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, 2868.

26. J. Chang, X. Chen, Z. Glass, F. Gao, L. Mao, M. Wang, Q. Xu, *Acc. Chem. Res.* **2019**, *52*, 665.

[0274]

27. J. B. Miller, S. Zhang, P. Kos, H. Xiong, K. Zhou, S. S. Perelman, H. Zhu, D. J. Siegwart, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2017**, *56*, 1059.

28. E. M. Kennedy, A. V. Kornepati, M. Goldstein, H. P. Bogerd, B. C. Poling, A. W. Whisnant, M. B. Kastan, B. R. Cullen, *J. Virol.* **2014**, *88*, 11965.

29. C. Jiang, M. Mei, B. Li, X. Zhu, W. Zu, Y. Tian, Q. Wang, Y. Guo, Y. Dong, X. Tan, *Cell Res.* **2017**, *27*, 440.

30. M. Abifadel, M. Varret, J. Rabes, D. Allard, K. Ouguerram, M. Devillers, C. Cruaud, S. Benjannet, L. Wickham, D. Erilich, A. Derre, L. Villeger, M. Farnier, I. Beucler, E. Bruckert, J. Chambaz, B. Chanu, J. M. Lecerf, G. Luc, P. Moulin, J. Weissenbach, A. Part, M. Krempf, C. Junien, N. G. Seidah, C. Boileau, *Nat. Genet.* **2003**, *34*, 154.

31. F. A. Ran, L. Cong, W. X. Yan, D. A. Scott, J. S. Gootenberg, A. J. Kriz, B. Zetsche, O. Shalem, X. W u, K. S. Makarova, E. V. Koonin, P. A. Sharp, F. Zhang, *Nature* **2015**, *520*, 186.

32. Raal, F. J. *et al.* Inclisiran for the Treatment of Heterozygous Familial Hypercholesterolemia. *N. Engl. J. Med.* **382**, 1520-1530, (2020).

33. Ray, K. K. *et al.* Two Phase 3 Trials of Inclisiran in Patients with Elevated LDL Cholesterol. *N. Engl. J. Med.* **382**, 1507-1519, (2020).

34. Koishi, R. *et al.* Angptl3 regulates lipid metabolism in mice. *Nature Genet.* **30**, 151-157, (2002).

35. Romeo, S. *et al.* Rare loss-of-function mutations in ANGPTL family members contribute to plasma triglyceride levels in humans. *J. Clin. Invest.* **119**, 70-79, (2009).

36. Tarugi, P., Bertolini, S. & Calandra, S. Angiopoietin-like protein 3 (ANGPTL3) deficiency and familial combined hypolipidemia. *J. Biomed. Res.* **33**, 73-81, (2019).

37. Stitziel, N. O. *et al.* ANGPTL3 Deficiency and Protection Against Coronary Artery Disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* **69**, 2054-2063, (2017).

38. Musunuru, K. & Kathiresan, S. CARDIOVASCULAR ENDOCRINOLOGY Is ANGPTL3 the next PCSK9? *Nat. Rev. Endocrinol.* **13**, 502-503, (2017).

39. Dewey, F. E. *et al.* Genetic and Pharmacologic Inactivation of ANGPTL3 and Cardiovascular Disease. *N. Engl. J. Med.* **377**, 211-221, (2017).

40. Ahmad, Z. *et al.* Inhibition of Angiopoietin-Like Protein 3 With a Monoclonal Antibody Reduces Triglycerides in Hypertriglyceridemia. *Circulation* **140**, 470-486, (2019).

[0275]

41. Graham, M. J. *et al.* Cardiovascular and Metabolic Effects of ANGPTL3 Antisense Oligonucleotides. *N. Engl. J. Med.* **377**, 222-232, (2017).

42. Hsu, P. D., Lander, E. S. & Zhang, F. Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. *Cell* **157**, 1262-1278, (2014).

43. Doudna, J. A. & Charpentier, E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* **346**, 1077-+, (2014).

44. Chen, X. & Goncalves, M. Engineered Viruses as Genome Editing Devices. *Mol. Ther.* **24**, 447-457, (2016).

45. Yin, H., Kauffman, K. J. & Anderson, D. G. Delivery technologies for genome editing. *Nat. Rev. Drug Discov.* **16**, 387-399, (2017).

46. Glass, Z., Lee, M., Li, Y. M. & Xu, Q. B. Engineering the Delivery System for CRISPR-Based Genome Editing. *Trends Biotechnol.* **36**, 173-185, (2018).

47. Yin, H. *et al.* Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nat. Rev. Genet.* **15**, 541-555, (2014).

48. Wang, M., Glass, Z. A. & Xu, Q. Non-viral delivery of genome-editing nucleases for gene therapy. *Gene Ther.* **24**, 144-150, (2017).

49. Qiu, M., Glass, Z. & Xu, Q. B. Nonviral Nanoparticles for CRISPR-Based Genome Editing: Is It Just a Simple Adaption of What Have Been Developed for Nucleic Acid Delivery? *Biomacromolecules* **20**, 3333-3339, (2019).

50. Wang, M. *et al.* Efficient delivery of genome-editing proteins using bioreducible lipid nanoparticles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, 2868-2873, (2016).

51. Finn, J. D. *et al.* A Single Administration of CRISPR/Cas9 Lipid Nanoparticles Achieves Robust and Persistent In Vivo Genome Editing. *Cell Reports* **22**, 2227-2235, (2018).

52. Miller, J. B. *et al.* Non-Viral CRISPR/Cas Gene Editing In Vitro and In Vivo Enabled by Synthetic Nanoparticle Co-Delivery of Cas9 mRNA and sgRNA. *Angew. Chem.-Int. Edit.* **56**, 1059-1063, (2017).

53. Jiang, C. *et al.* A non-viral CRISPR/Cas9 delivery system for therapeutically targeting HBV DNA and pcsk9 in vivo. *Cell Res.* **27**, 440-443, (2017).

54. Liu, J. *et al.* Fast and Efficient CRISPR/Cas9 Genome Editing In Vivo Enabled by Bioreducible Lipid and Messenger RNA Nanoparticles. *Adv. Mater.* **31**, 7, (2019).

[0276]

55. Chadwick, A. C., Evitt, N. H., Lv, W. J. & Musunuru, K. Reduced Blood Lipid Levels With In Vivo CRISPR-Cas9 Base Editing of ANGPTL3. *Circulation* **137**, 975-977, (2018).

56. Akinc, A. *et al.* The Onpattro story and the clinical translation of nanomedicines containing nucleic acid-based drugs. *Nat. Nanotechnol.* **14**, 1084-1087, (2019).

57. Wang, M. *et al.* Enhanced Intracellular siRNA Delivery using Bioreducible Lipid-Like Nanoparticles. *Adv. Healthc. Mater.* **3**, 1398-1403, (2014).

58. Zhi, D. F. *et al.* Transfection Efficiency of Cationic Lipids with Different Hydrophobic Domains in Gene Delivery. *Bioconjugate Chem.* **21**, 563-577, (2010).

59. Wang, M., Sun, S., Alberti, K. A. & Xu, Q. B. A Combinatorial Library of Unsaturated Lipidoids for Efficient Intracellular Gene Delivery. *ACS Synth. Biol.* **1**, 403-407, (2012).

60. Kauffman, K. J. *et al.* Optimization of Lipid Nanoparticle Formulations for mRNA Delivery in Vivo with Fractional Factorial and Definitive Screening Designs. *Nano Lett.* **15**, 7300-7306, (2015).

61. Sedic, M. *et al.* Safety Evaluation of Lipid Nanoparticle-Formulated Modified mRNA in the Sprague-Dawley Rat and Cynomolgus Monkey. *Vet. Pathol.* **55**, 341-354, (2018).

62. Madisen, L. *et al.* A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nat. Neurosci.* **13**, 133-U311, (2010).

63. Tabebordbar, M. *et al.* In vivo gene editing in dystrophic mouse muscle and muscle stem cells. *Science* **351**, 407-411, (2016).

64. Platt, R. J. *et al.* CRISPR-Cas9 Knockin Mice for Genome Editing and Cancer Modeling. *Cell* **159**, 440-455, (2014).

65. Mout, R., Ray, M., Lee, Y. W., Scaletti, F. & Rotello, V. M. In Vivo Delivery of CRISPR/Cas9 for Therapeutic Gene Editing: Progress and Challenges. *Bioconjugate Chem.* **28**, 880-884, (2017).

66. Tong, S., Moyo, B., Lee, C. M., Leong, K. & Bao, G. Engineered materials for in vivo delivery of genome-editing machinery. *Nat. Rev. Mater.* **4**, 726-737, (2019).

67. Komor, A. C., Badran, A. H. & Liu, D. R. CRISPR-Based Technologies for the Manipulation of Eukaryotic Genomes. *Cell* **168**, 20-36, (2017).

68. Liang, X. Q. *et al.* Rapid and highly efficient mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection. *J. Biotechnol.* **208**, 44-53, (2015).

[0277]

69. Ramaswamy, S. *et al.* Systemic delivery of factor IX messenger RNA for protein replacement therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, E1941-E1950, (2017).

70. Sabnis, S. *et al.* A Novel Amino Lipid Series for mRNA Delivery: Improved Endosomal Escape and Sustained Pharmacology and Safety in Non-human Primates. *Mol. Ther.* **26**, 1509-1519, (2018).

71. Hou, X. C. *et al.* Vitamin lipid nanoparticles enable adoptive macrophage transfer for the treatment of multidrug-resistant bacterial sepsis. *Nat. Nanotechnol.* **15**, 41-+, (2020).

72. Fenton, O. S. *et al.* Bioinspired Alkenyl Amino Alcohol Ionizable Lipid Materials for Highly Potent In Vivo mRNA Delivery. *Adv. Mater.* **28**, 2939-2943, (2016).

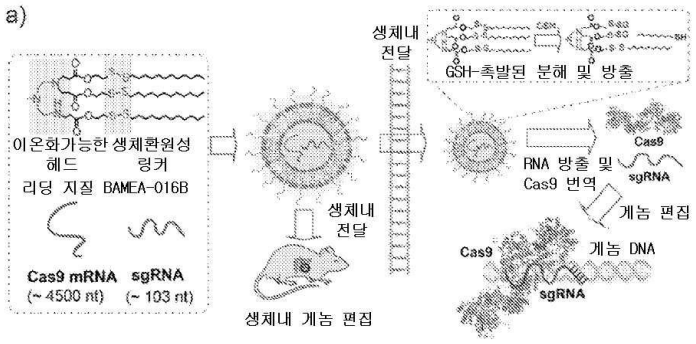
73. Bae, S., Park, J. & Kim, J. S. Cas-OFFinder: a fast and versatile algorithm that searches for potential off-target sites of Cas9 RNA-guided endonucleases. *Bioinformatics* **30**, 1473-1475, (2014).

74. Schmid-Burgk, J. L. *et al.* Out Knocker: a web tool for rapid and simple genotyping of designer nuclease edited cell lines. *Genome Res.* **24**, 1719-1723, (2014).

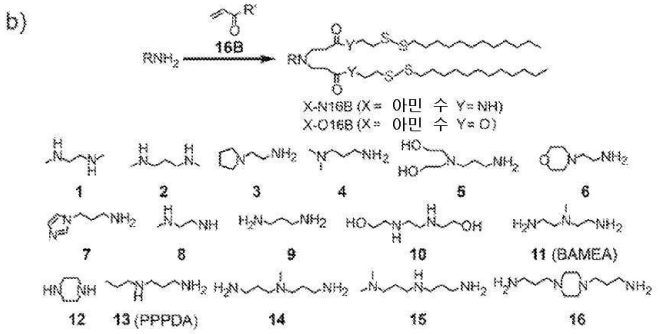
[0278]

도면

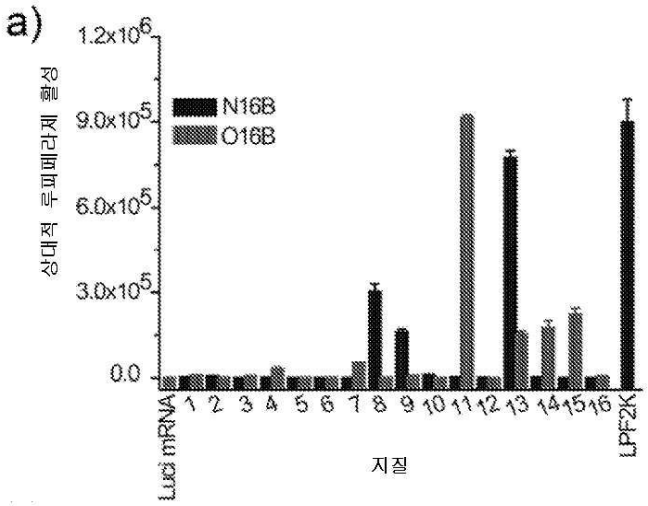
도면1a



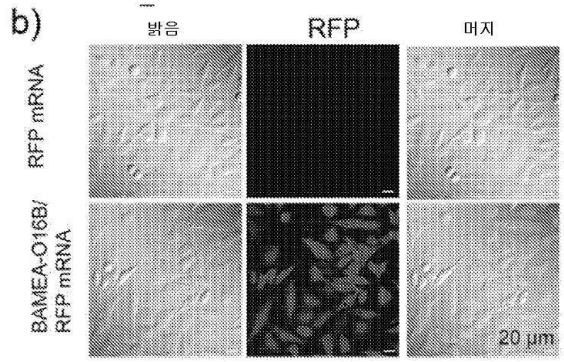
도면1b



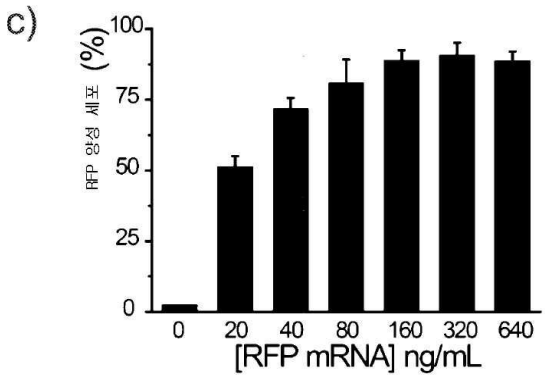
도면2a



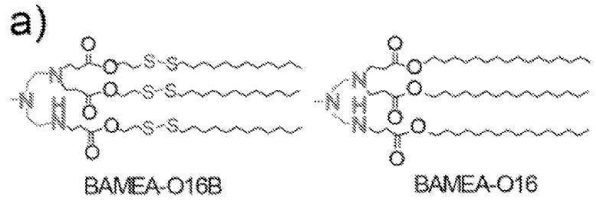
도면2b



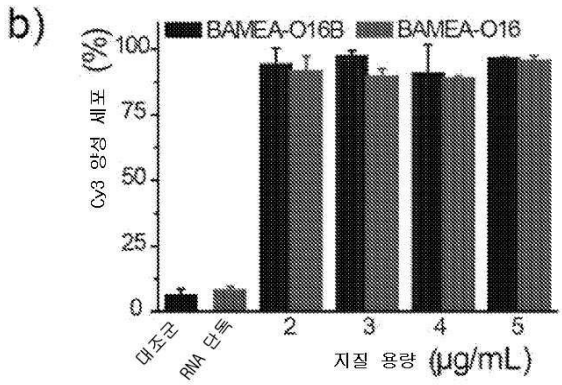
도면2c



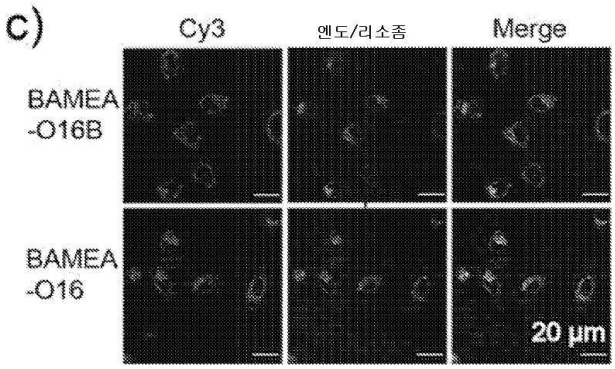
도면3a



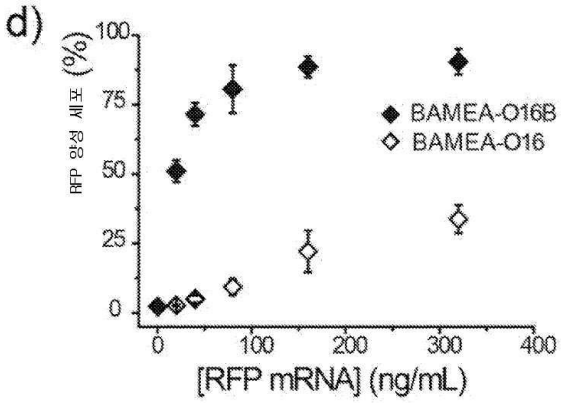
도면3b



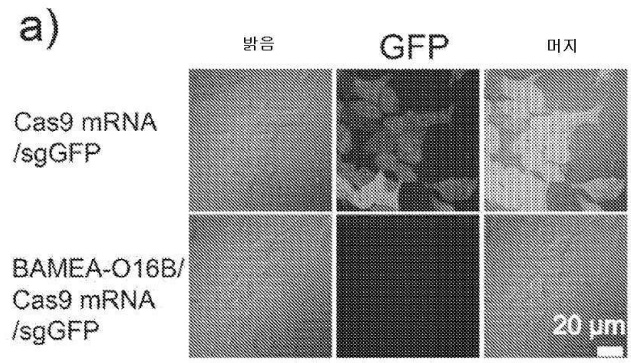
도면3c



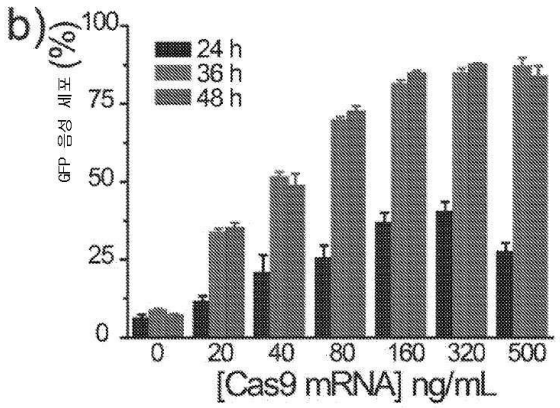
도면3d



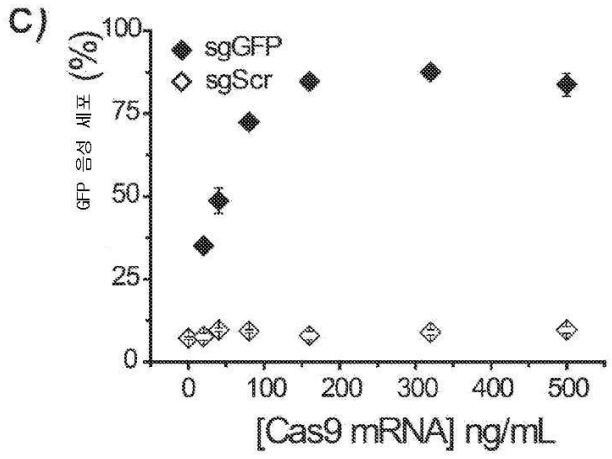
도면4a



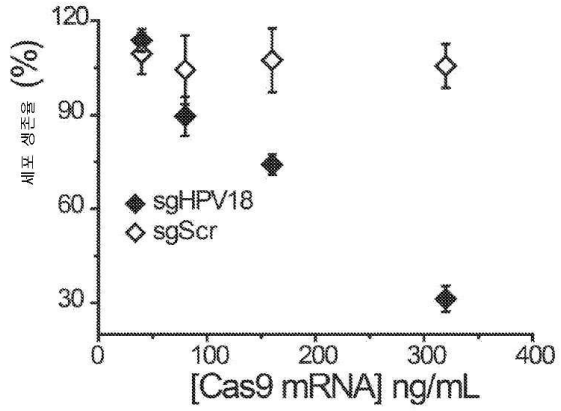
도면4b



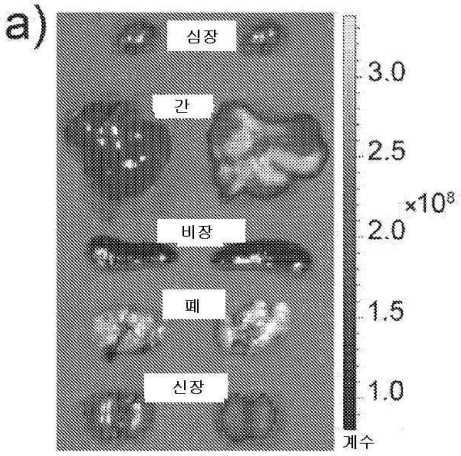
도면4c



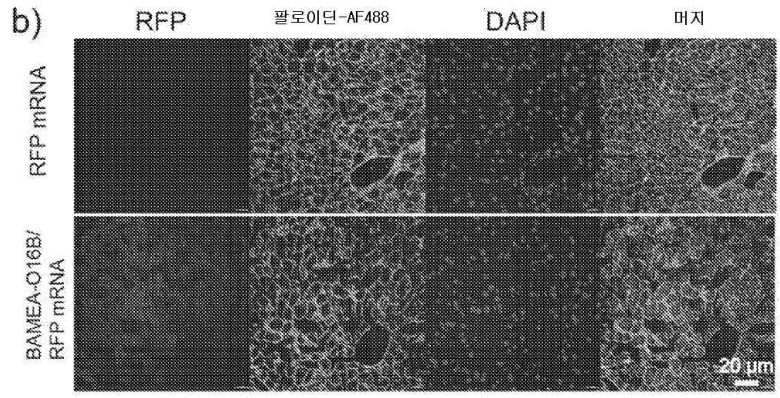
도면4d



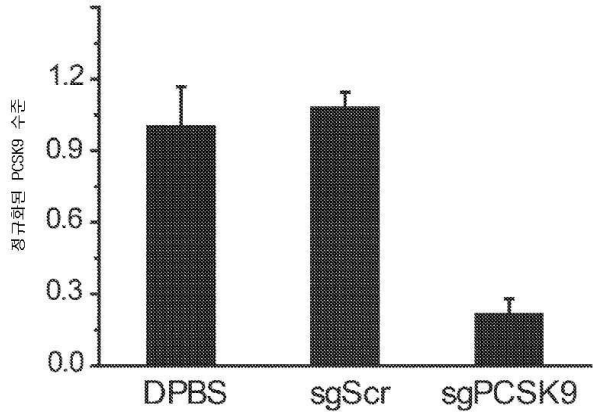
도면5a



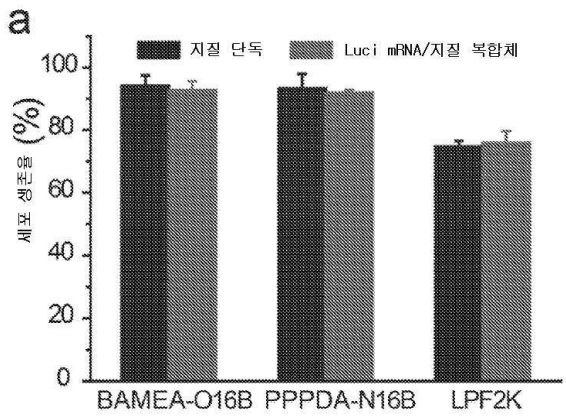
도면5b



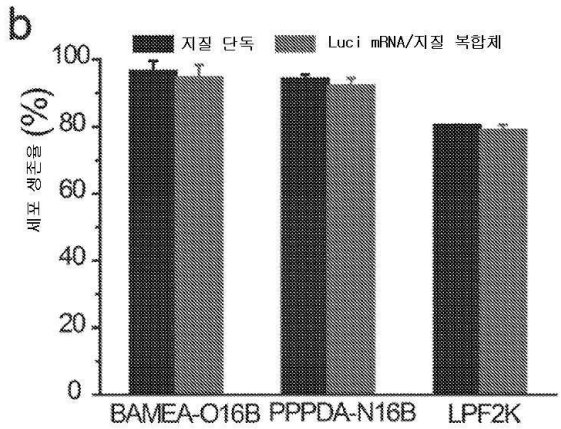
도면5c



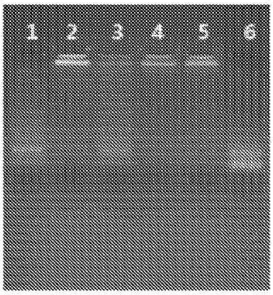
도면6a



도면6b

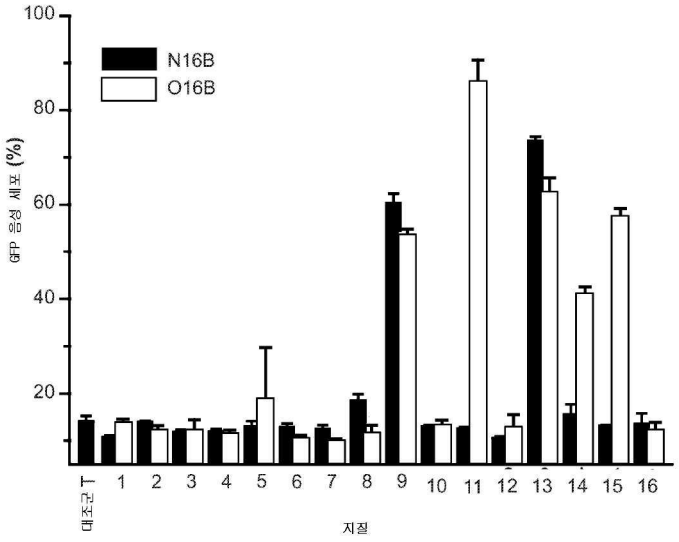


도면7

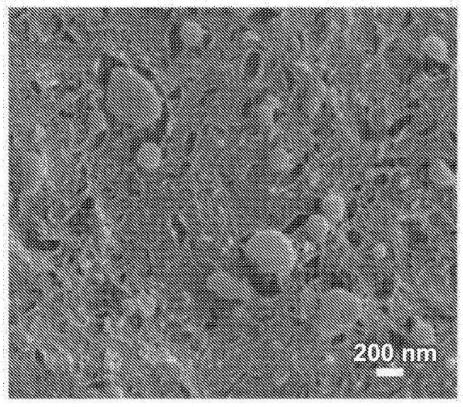


레인 1: RFP mRNA
레인 2: RFP mRNA + BAMEA-O16B
레인 3: RFP mRNA + BAMEA-O16B + GSH
레인 4: RFP mRNA + BAMEA-O16
레인 5: RFP mRNA + BAMEA-O16 + GSH
레인 6: RFP mRNA + GSH

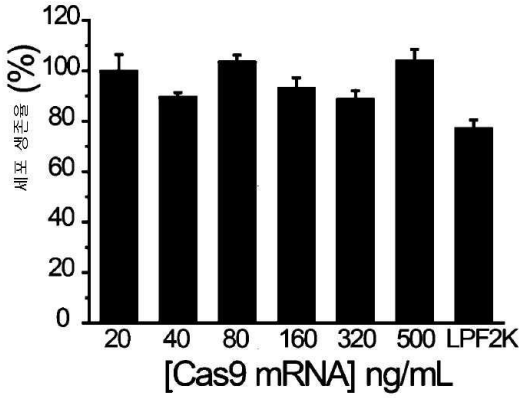
도면8



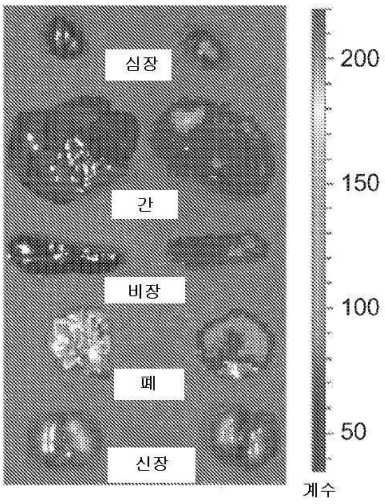
도면9



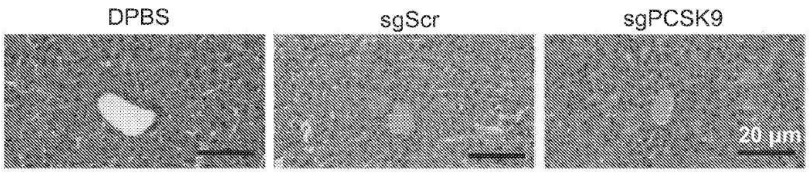
도면10



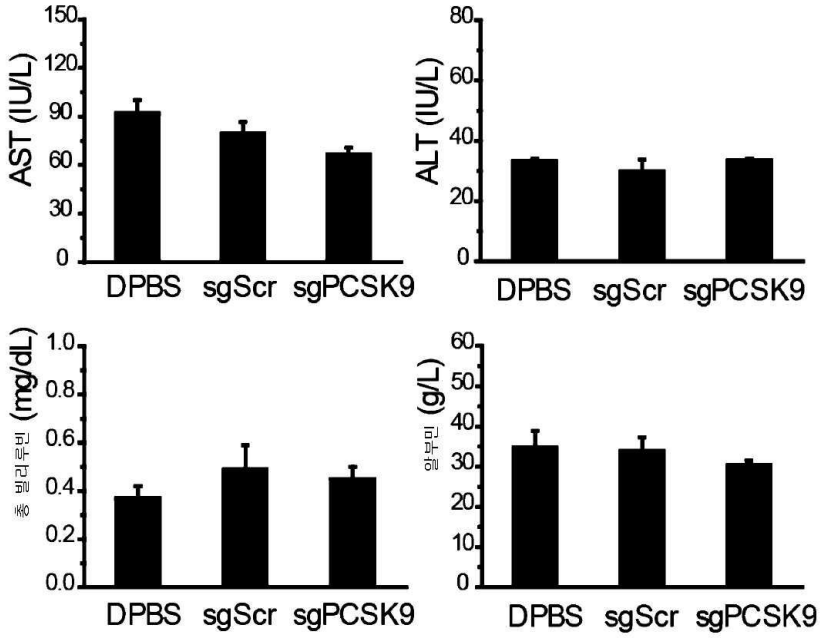
도면11



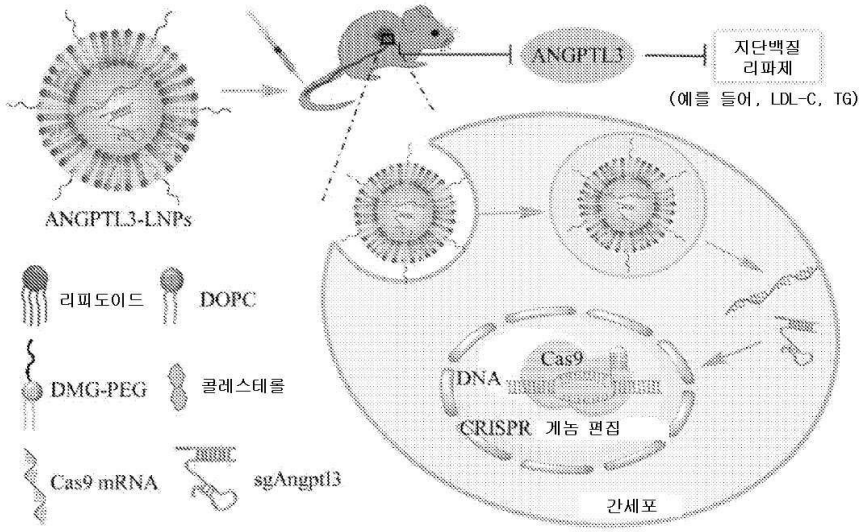
도면12



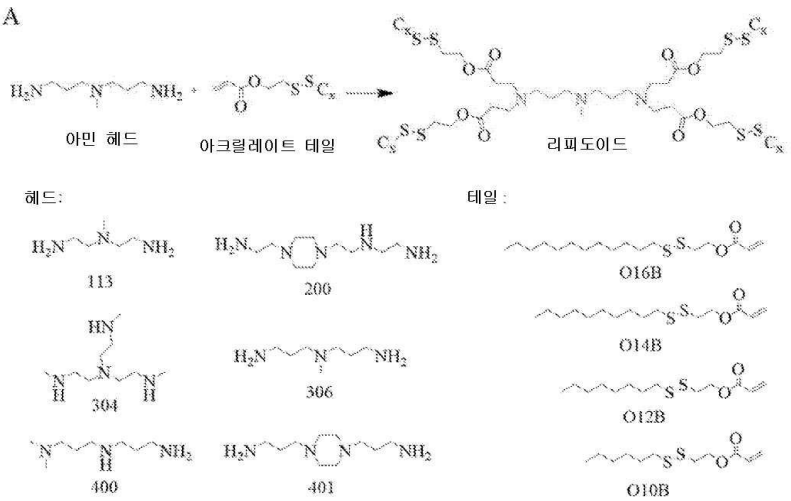
도면13


AST (IU/L)
150
120
90
60
30
0
DPBS sgScr sgPCSK9
ALT (IU/L)
80
60
40
20
0
DPBS sgScr sgPCSK9
총 빌리루빈 (mg/dL)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
DPBS sgScr sgPCSK9
알부민 (g/L)
60
50
40
30
20
10
0
DPBS sgScr sgPCSK9

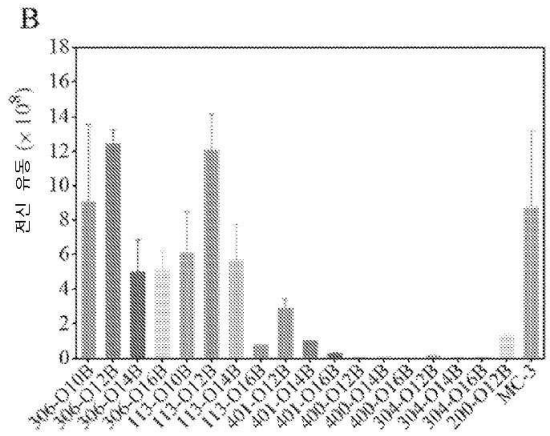
도면14


ANGPTL3
지단백질
리파제
(예를 들어, LDL-C, TG)
ANGPTL3-LNPs
리피도이드
DOPC
DMG-PEG
콜레스테롤
Cas9 mRNA
sgAngptl3
Cas9
DNA
CRISPR 게놈 편집
간세포

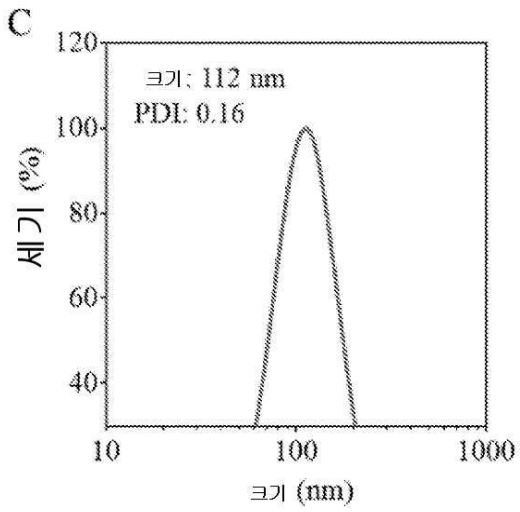
도면15a



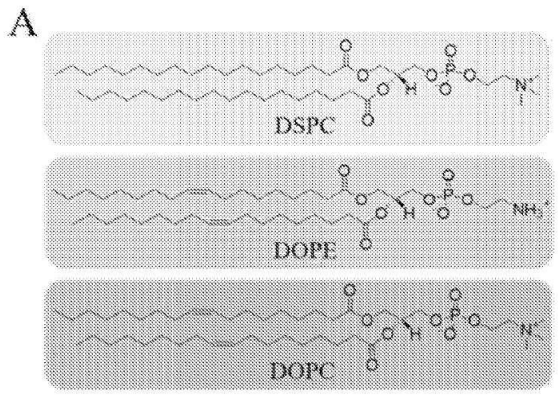
도면15b



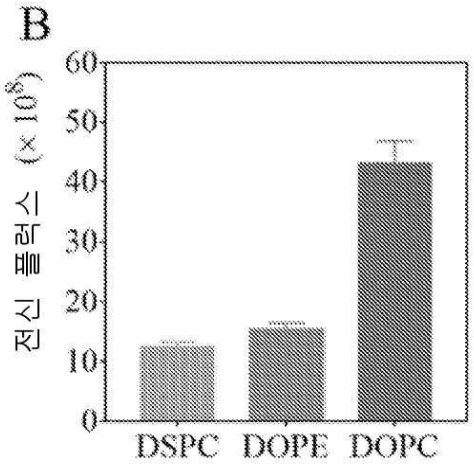
도면15c



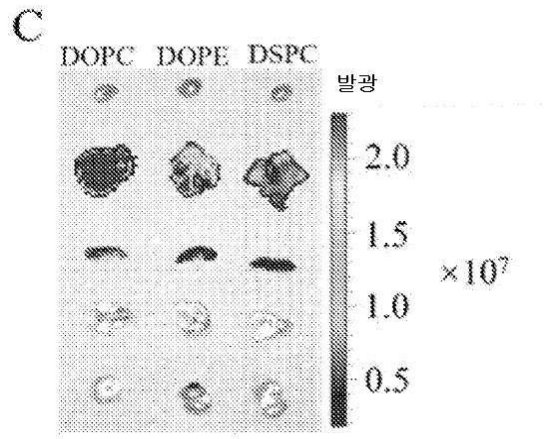
도면16a



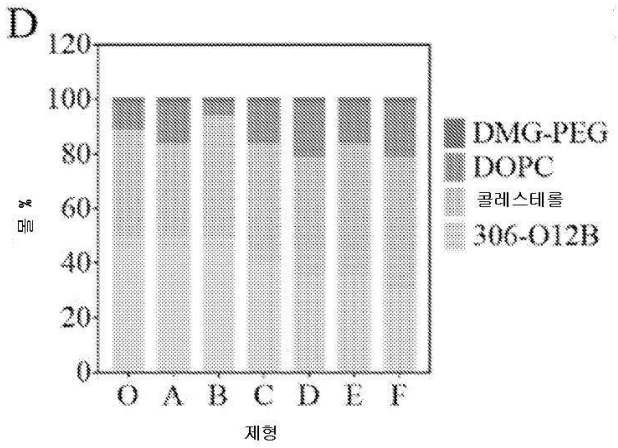
도면16b



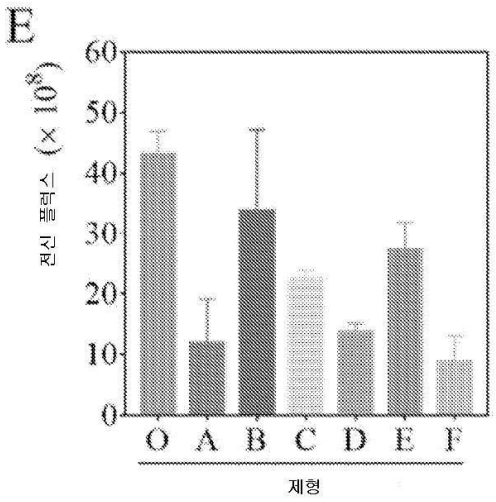
도면16c



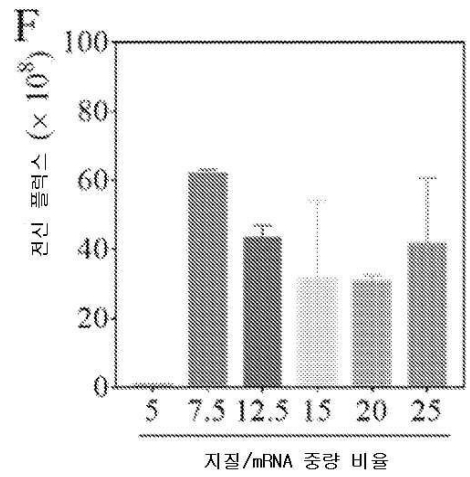
도면16d



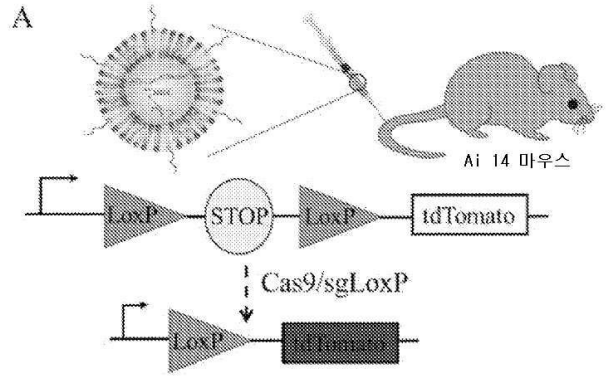
도면16e



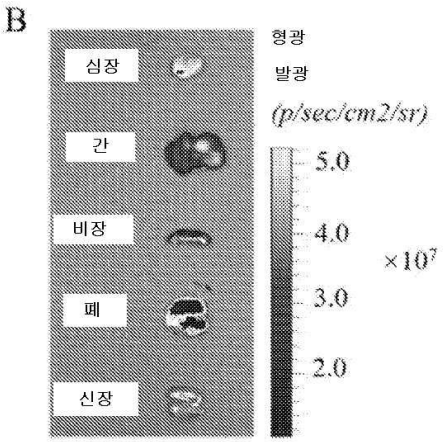
도면16f



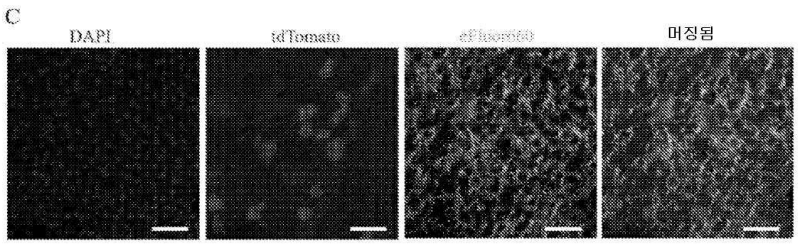
도면17a



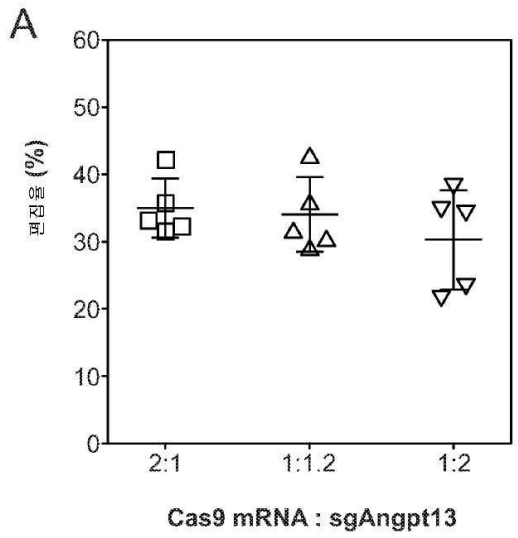
도면17b



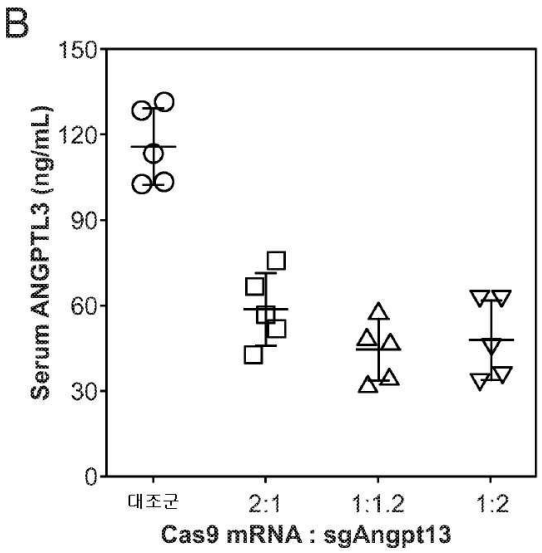
도면17c



도면18a

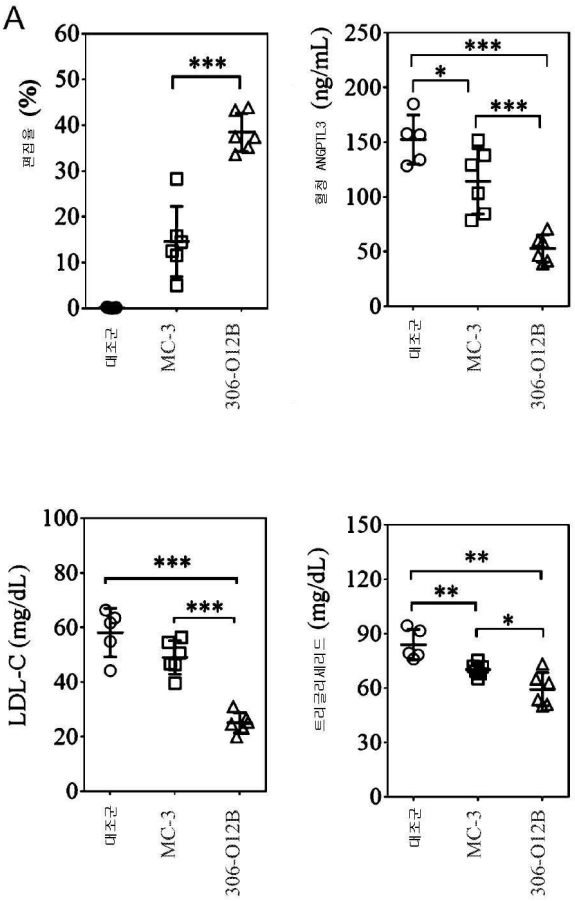

A
60
50
40
30
20
10
0
편집율 (%)
2:1
1:1.2
1:2
Cas9 mRNA : sgAngpt13

도면18b


B
150
120
90
60
30
0
Serum ANGPTL3 (ng/mL)
대조군
2:1
1:1.2
1:2
Cas9 mRNA : sgAngpt13

도면19a

A



도면19b

B

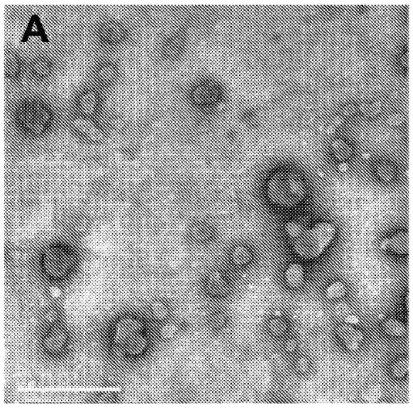
편집된 ANGPTL3 서열	돌연변이 유형	최고의 306-012B 마우스에서의 빈도 (%)	최고의 MC-3 마우스에서의 빈도 (%)	대조군 마우스에서의 빈도 (%)
CGTTTTTAACTTGTAGTGTA	야생형			
CGTTTT_AACTTGTAGTGTA	1nt 결실	31.0	20.0	0.19
CGTTTTT|AACTTGTAGTGTA T	1nt 삽입	12.0	8.0	0
CGTTT__AACTTGTAGTGTA	2nt 결실	2.0	1.0	0
다른 편집		3.4	0.9	0.11
총 편집된 대립유전자		48.4	29.9	0.3

도면19c

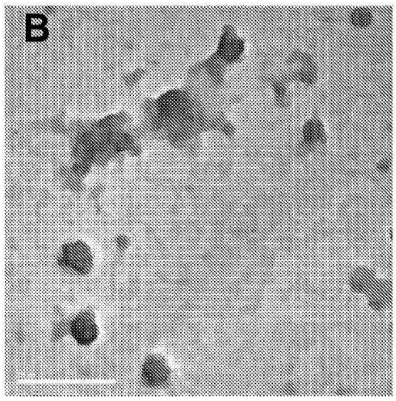
C

잠재적인 표적 외 부위	위치	최고의 306-012B 마우스에서의 빈도 (%)	최고의 MC-3 마우스에서의 빈도 (%)	대조군 마우스에서의 빈도 (%)
aACACTACAA-TTAAAAACGTGG	chr17: 67139471	0.06	0.04	0.06
TACACTAaAA-TTAAAAACGTGG	chr10: 96372376	0.03	0.05	0.05
TtCACTACAAGTTAGAAAACaGGG	chr3: 96010269	0.03	0.03	0.03
TACACTACGAAaTTAAAAcCGAGG	chr14: 113652925	0.04	0.04	0.02
TACACTACAAGTTCAAAtACaTGG	chr9: 20240345	0.02	0.04	0.02
TACACTA-AAGaTAAAAACaTGG	chr8: 57778609	0.04	0.04	0.04
TACAgT-CAAGTTAAAAACcAGG	chr12: 53110237	0.09	0.09	0.09
T-CACTACtAGaTAAAAACGTGG	chr3: 65249939	0.04	0.04	0.03
cACACTACAAG-TAAAAACaGGG	chr3: 38440103	0.04	0.05	0.04

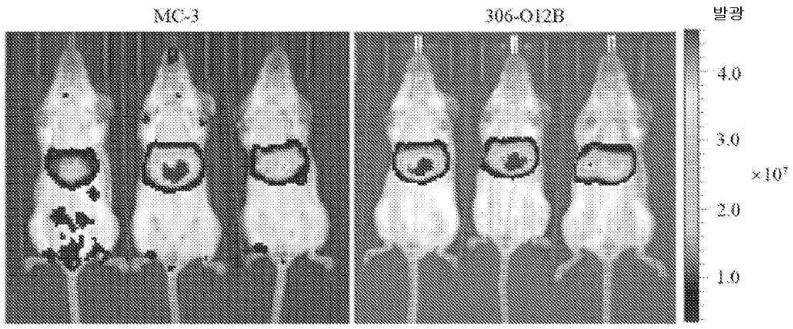
도면20a



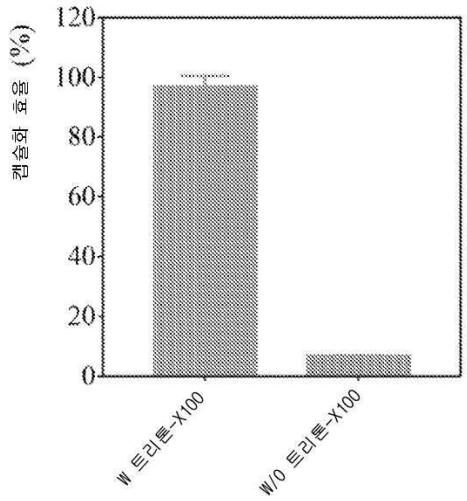
도면20b



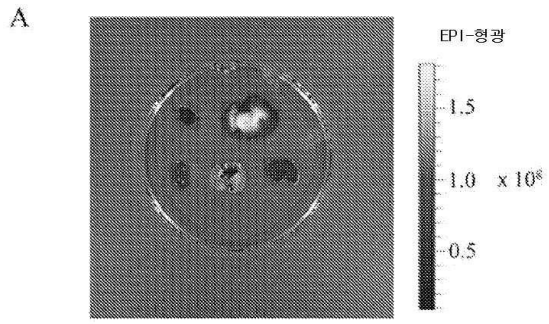
도면21



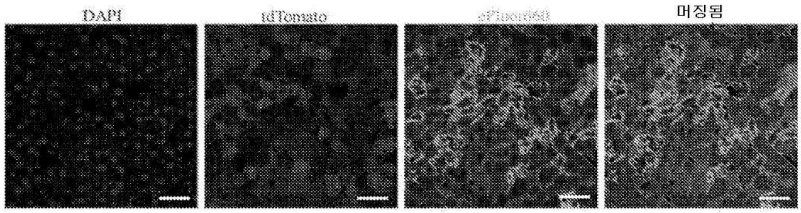
도면22



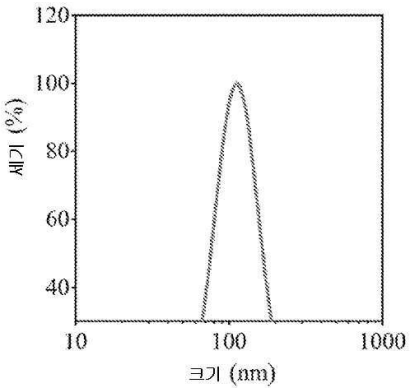
도면23a



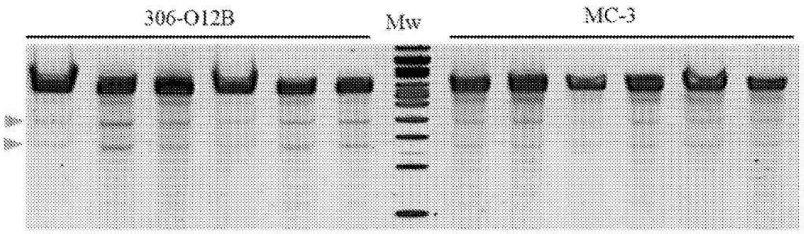
도면23b



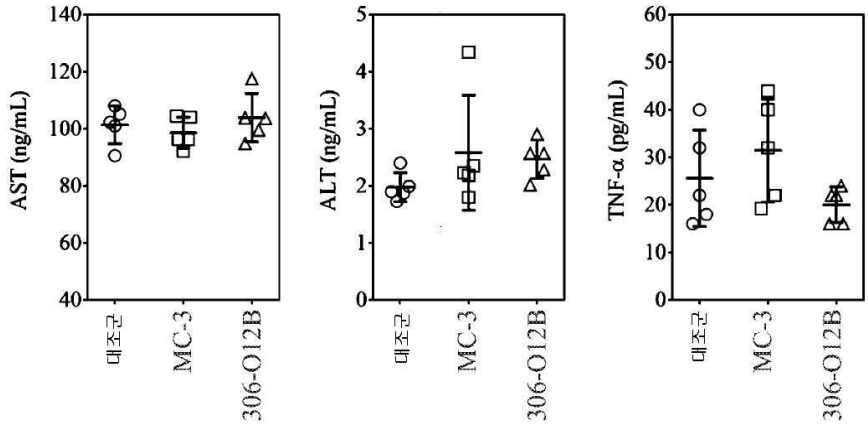
도면24



도면25



도면26



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> TRUSTEES OF TUFTS COLLEGE

<120> SYNTHETIC LIPIDS FOR MRNA DELIVERY

<130> TUV-13925

<140> PCT/US2020/036085

<141> 2020-06-04

<150> 62/857,111

<151> 2019-06-04

<160> 41

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 1

gggcacgggc agcuugccgg 20

<210> 2

<211> 21

<212> RNA

<213

> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 2

gauaaauaac gcgcccaaca c 21

<210> 3

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 3

gggcgcuuug aggauccaac a 21

<210> 4

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 4

cccaugugga guacauuggu u 21

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 5

aagtaaaacc tctacaaatg 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 6

agcccttcaa cacaaggtca 20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 7

ctccaaagcc ctgaccttgt 20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 8

ttctgcacct tcagagccaa 20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223

> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 9

accttggtta ggatgcctgc 20

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 10

acatagccat cccccaacaa 20

<210> 11

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<

400> 11

tgacatgact cattgccacc a 21

<210> 12

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 12

tctaaatgcc agggttctga ct 22

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 13

tacccagcca tattgtgcag 20

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 14

cggatgtttg catgagggga 20

<210> 15

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 15

ggtgtccact tgttaaatgt ca 22

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 16

gccagccaca gttttcatcg 20

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 17

gcagtcatca gacaggaggg 20

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 18

tctgcacctt cagagccaaa 20

<210> 19

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 19

gcaaagcaaa ccctgaactg a 21

<210> 20

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 20

ttgcattcct gtcagagtga t 21

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 21

gctgcaactt ggtgctacct 20

<210> 22

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer

<400> 22

gtgaaccata tcttaatagc accat 25

<210> 23

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220
><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer

<400> 23

catgccatgt ggggtgatac aa 22

<210> 24

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer

<400> 24

agaagaccag atagaagtca ggatg 25

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer

<400> 25

ggttagctgc tggacactga 20

<210> 26

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 26

acaacaacat ggaaaactct a 21

<210> 27

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 27

gggagtcaca gtcatgggtc 20

<210> 28

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 28

gcagctctcc aatccagaca 20

<210> 29

<211> 20

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 29

cgtttttaac ttgtagtgta 20

<210> 30

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 30

cgttttaact tgtagtgta 19

<210> 31

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 31

cgttttttaa cttgtagtgt a 21

<210> 32

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 32

cgtttaactt gtagtgta 18

<210> 33

<211> 22

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 33

aacactacaa ttaaaaacgt gg 22

<210> 34

<211> 22

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 34

tacactaaaa ttaaaaacgt gg 22

<210> 35

<211> 24

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 35

ttcactacaa gttagaaaac aggg 24

<210> 36

<211> 24

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 36

tacactacga aattaaaacc gagg 24

<210> 37

<211> 24

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 37

tacactacaa gttcaaatac atgg 24

<210> 38

<211> 22

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 38

tacactaaag ataaaaacat gg 22

<210> 39

<211> 22

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 39

tacagtcaag ttaaaaacca gg 22

<210> 40

<211> 22

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 40

tcactactag ataaaaacgt gg 22

<210> 41

<211> 22

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 41

cacactacaa gtaaaaacag gg 22