



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0042018
(43) 공개일자 2023년03월27일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C08G 69/44 (2006.01) A61K 31/7088 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)
C08G 63/60 (2006.01) C08G 63/66 (2006.01)
C08G 63/685 (2006.01) C08G 63/91 (2006.01)
C08G 69/48 (2006.01) C12N 15/88 (2017.01)
- (52) CPC특허분류
C08G 69/44 (2013.01)
A61K 31/7088 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2023-7002394
- (22) 출원일자(국제) 2021년05월27일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2023년01월19일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2021/034462
- (87) 국제공개번호 WO 2021/257262
국제공개일자 2021년12월23일
- (30) 우선권주장
63/041,739 2020년06월19일 미국(US)

- (71) 출원인
예일 유니버시티
미국, 코네티컷 06511, 뉴 헤븐, 투 휘트니 애비뉴
- (72) 발명자
솔츠만 더블유. 마크
미국 코네티컷주 06511 뉴 헤이븐 엠이엑스 413
프로스펙트 스트리트 55 말론 엔지니어링 센터 예일대학교 생의학공학과 내
- 장 위항
미국 21513 수조우 싱후 스트리트 218 비엘-501
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인태평양

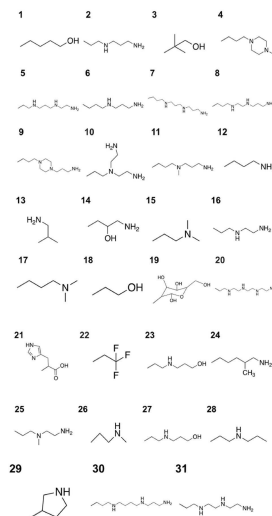
전체 청구항 수 : 총 50 항

(54) 발명의 명칭 변형된 말단기를 갖는 폴리(아민-코-에스테르) 폴리머 및 향상된 폐 운반

(57) 요약

폴리(아민-코-에스테르) 중합체, 이로부터 활성제 로딩된 폴리플렉스 및 입자를 형성하는 방법, 및 최적 흡수량으로 핵산 작용제의 전달을 위해 이를 사용하는 방법이 개발되었다. 실시예에서는 노출된 카복실산 및/또는 히드록실기와 조합에서 임계 분자량, 및 제조 방법을 입증한다. 전형적으로, 조성물은 다른 대조군 형질 주입 시약과 비교하여 독성이 덜하거나, 약물 전달에 보다 효율적이거나, 또는 이들의 조합이다. 일부 실시형태에서, 조성물은 생체내 전달에 적합하며, 질병 또는 병태를 치료하기 위해 대상체에게 전신 투여될 수 있다. PEG화 폴리(아민-코-에스테르) 중합체와의 혼합물에서 말단기를 함유하는 특정 아민 또는 히드록실기를 갖는 폴리(아민-코-에스테르) 중합체에 대해서, 흡입에 의한 폐로의 생체내 전달이 입증되었다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 31/713 (2013.01)

A61K 48/0041 (2013.01)

C08G 63/60 (2013.01)

C08G 63/66 (2013.01)

C08G 63/685 (2013.01)

C08G 63/6856 (2013.01)

C08G 63/91 (2013.01)

C08G 69/48 (2013.01)

C12N 15/88 (2013.01)

(72) 발명자

그룬 물리

미국 코네티컷주 06511 뉴 헤이븐 아파트먼트 6엘
요크 스트리트 129

수베리 알렉산드라

미국 코네티컷주 06510 뉴 헤이븐 #403 오렌지 스트리트 15

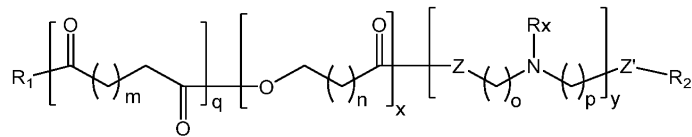
명세서

청구범위

청구항 1

화학식 I의 중합체:

[화학식 I]

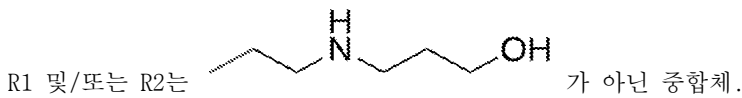


(식 중, n은 1 내지 30의 정수이고, m, o 및 p는 독립적으로 1 내지 20의 정수이고, x, y 및 q는 독립적으로 1 내지 1000의 정수이고, R은 수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 또는 치환 또는 비치환된 아릴, 또는 치환 또는 비치환된 알콕시이고, Z 및 Z'는 독립적으로 O 또는 NR'이고, 여기서 R'는 수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 또는 치환 또는 비치환된 아릴이고,

R₁ 및 R₂는 히드록실 기, 1차 아민 기, 2차 아민 기, 3차 아민 기 또는 이들의 조합을 함유하는 화학적 물질이다).

청구항 2

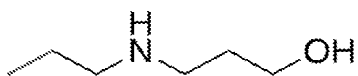
청구항 1에 있어서,



청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 중합체로부터 형성된 폴리플렉스 또는 입자는 R₁ 및/또는 R₂가 다음으로 이루어진 상응하는 폴리플렉스 또는 입자에 비해, mRNA의 개선된 로딩, 개선된 세포 형질 주입, 개선된 세포내 엔도솜 방출, 또는 이들의 조합을 나타내는 중합체:

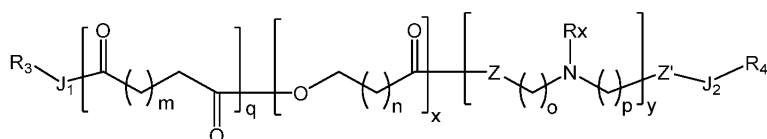


청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 중합체는 화학식 II의 구조를 갖는 중합체:

[화학식 II]



(식 중, J₁ 및 J₂는 독립적으로 연결 모이어티이거나, 부재하고,

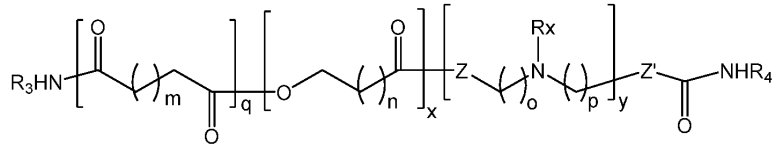
R₃ 및 R₄는 히드록실 기, 1차 아민 기, 2차 아민 기, 3차 아민 기 또는 이들의 조합을 함유하는 치환된 알킬이다).

청구항 5

청구항 1에 있어서,

상기 중합체는 화학식 III의 구조를 갖는 중합체:

[화학식 III]



청구항 6

청구항 1에 있어서,

Z는 Z'와 동일한 중합체.

청구항 7

청구항 1에 있어서,

n은 4, 10, 13 또는 14인 중합체.

청구항 8

청구항 1에 있어서,

m은 5, 6 또는 7인 중합체.

청구항 9

청구항 1에 있어서,

R_x는 치환 또는 비치환된 알킬인 중합체.

청구항 10

청구항 1에 있어서,

좁은 다분산성 폴리스티렌 표준물질을 사용하여 겔 투과 크로마토그래피에 의해 측정될 경우 중량 평균 분자량은 약 2,000 달톤 내지 20,000 달톤, 바람직하게는 약 2,000 달톤 내지 약 10,000 달톤, 가장 바람직하게는 약 2000 달톤 내지 약 7,000 달톤인 중합체.

청구항 11

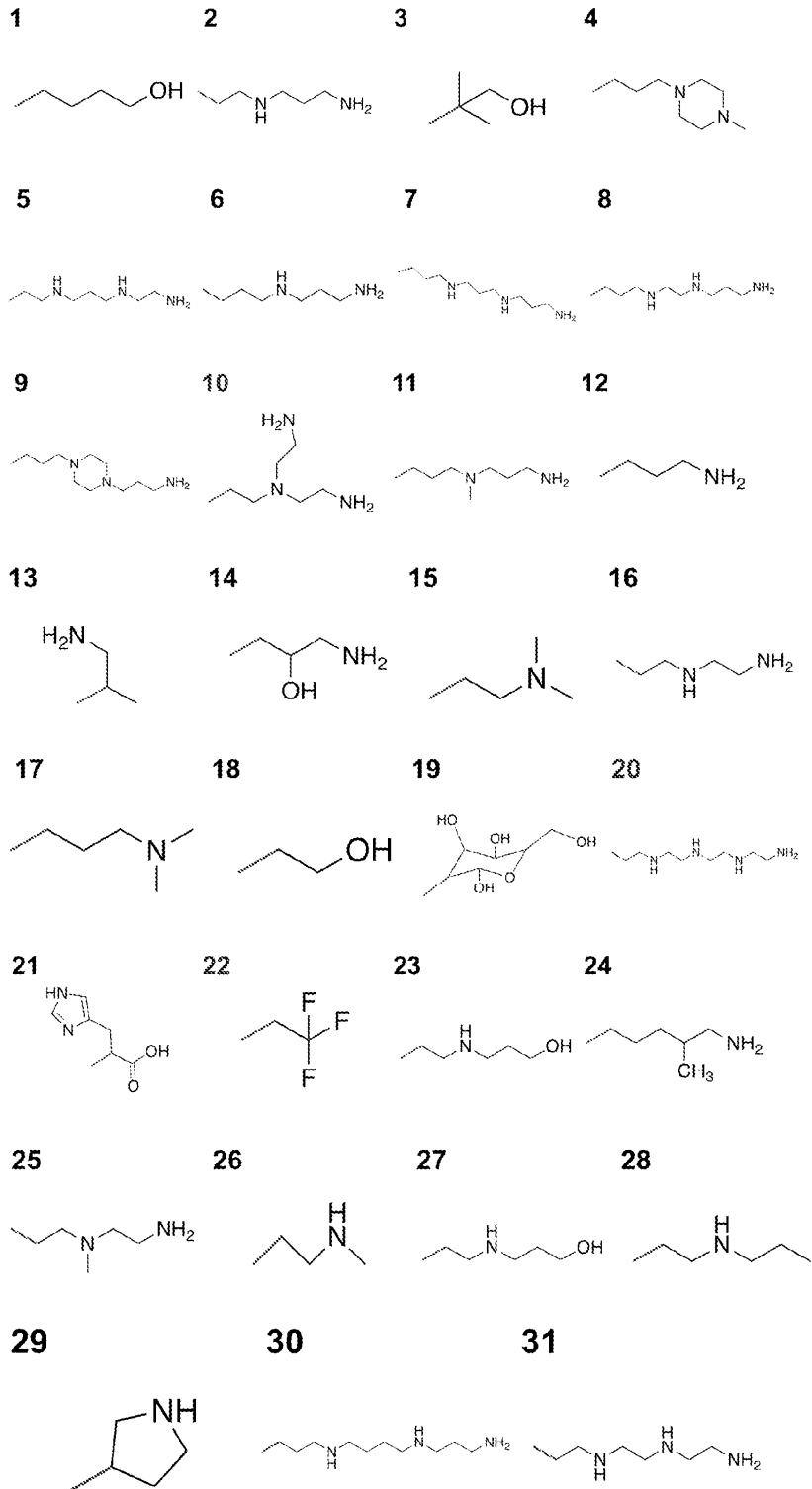
청구항 4에 있어서,

R₃은 R₄와 동일한 중합체.

청구항 12

청구항 4에 있어서,

R3 및/또는 R4는 다음으로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되는 중합체:



청구항 13

청구항 4에 있어서,

J₁은 -O- 또는 -NH-이고, J₂는 -C(O)NH- 또는 -C(O)O- 또는 이들의 조합인 중합체.

청구항 14

청구항 4에 있어서,

R₃, R₄ 또는 둘 모두는 1차 아민 기 및 선택적으로 하나 이상의 2차 또는 3차 아민 기를 함유하는 중합체.

청구항 15

청구항 4에 있어서,

R₃, R₄ 또는 둘 모두는 히드록실 기, 및 선택적으로 하나 이상의 아민 기를 함유하는 중합체.

청구항 16

청구항 4에 있어서,

R₃, R₄ 또는 둘 모두는 히드록실 기를 함유하고, 아민 기를 함유하지 않는 중합체.

청구항 17

청구항 4에 있어서,

R₃ 및 R₄ 중 적어도 하나는 히드록실 기를 함유하지 않는 중합체.

청구항 18

청구항 4에 있어서,

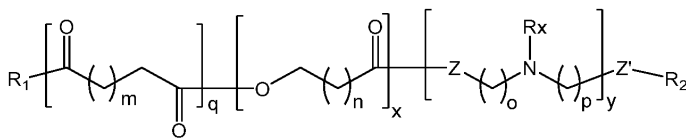
R₃, R₄ 또는 둘 모두는 -비치환된 C₁-C₁₀ 알킬렌-Aq-비치환된 C₁-C₁₀ 알킬렌-Bq, -비치환된 C₁-C₁₀ 알킬렌-Aq-치환된 C₁-C₁₀ 알킬렌-Bq, -치환된 C₁-C₁₀ 알킬렌-Aq-비치환된 C₁-C₁₀ 알킬렌-Bq, 또는 -치환된 C₁-C₁₀ 알킬렌-Aq-치환된 C₁-C₁₀ 알킬렌-Bq이고, 여기서 Aq는 부재하거나, -NR₅-이고, Bq는 히드록실, 1차 아민, 2차 아민 또는 3차 아민이고, R₅는 수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 또는 치환 또는 비치환된 아릴인 중합체.

청구항 19

청구항 1에 있어서,

상기 폴리(아민-코-에스테르) 또는 폴리(아민-코-아미드)는 다음의 구조를 갖는 중합체:

[화학식 I]



(식 중, n은 1 내지 30의 정수이고,

m, o 및 p는 독립적으로 1 내지 20의 정수이고,

x, y 및 q는 독립적으로 1 내지 1000의 정수이고,

R_x는 수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 또는 치환 또는 비치환된 아릴, 또는 치환 또는 비치환된 알콕시이고,

Z 및 Z'는 독립적으로 O 또는 NR'이고, 여기서 R'는 수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 또는 치환 또는 비치환된 아릴이고,

R₁ 및 R₂는 히드록실 기, 1차 아민 기, 2차 아민 기, 3차 아민 기 또는 이들의 조합을 함유하는 화학적 물질이다).

청구항 20

청구항 19에 있어서,

Z는 Z'와 동일한 중합체.

청구항 21

청구항 20에 있어서,

Z는 0이고, Z'는 0이고, Z는 NR'이고, Z'는 NR'인 중합체.

청구항 22

청구항 19에 있어서,

Z는 0이고, Z'는 NR'이거나, Z는 NR'이고, Z'는 0인 중합체.

청구항 23

청구항 19에 있어서,

Z'는 0이고, n은 1 내지 24의 정수, 예컨대 4, 10, 13 또는 14이고, 선택적으로 Z는 또한 0인 중합체.

청구항 24

청구항 23에 있어서,

m은 1 내지 10의 정수, 예컨대 4, 5, 6, 7 또는 8이고, 선택적으로 Z는 또한 0인 중합체.

청구항 25

청구항 19에 있어서,

Z'는 0이고, n은 1 내지 24의 정수, 예컨대 4, 10, 13 또는 14이고, m은 1 내지 10의 정수, 예컨대 4, 5, 6, 7 또는 8이고, o 및 p는 1 내지 6의 동일한 정수, 예컨대 2, 3 또는 4이고, 선택적으로 Z는 또한 0인 중합체.

청구항 26

청구항 19에 있어서,

Z'는 0이고, n은 1 내지 24의 정수, 예컨대 4, 10, 13 또는 14이고, m은 1 내지 10의 정수, 예컨대 4, 5, 6, 7 또는 8이고, R은 알킬, 예컨대 메틸, 에틸, n-프로필, 이소프로필, n-부틸, t-부틸, 이소부틸, sec-부틸, 시클로헥실, (시클로헥실)메틸, 시클로프로필메틸, 또는 이의 동족체 및 이성질체, 예를 들어 n-펜틸, n-헥실, n-헵틸 및 n-옥틸, 또는 아릴, 예컨대 페닐, 나프탈릴, 안트라세닐, 페난트릴, 크리세닐, 피레닐, 톨릴 또는 자일릴 이고, 선택적으로 Z는 또한 0인 중합체.

청구항 27

청구항 19에 있어서,

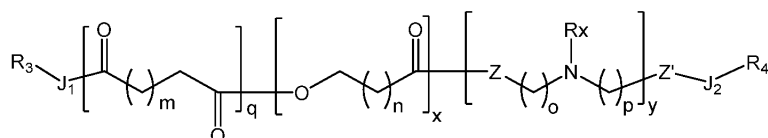
n은 14, 선택적으로 펜타데칼락톤(PDL)이고, m은 7, 선택적으로 세바스산이고, o 및 p는 2, 선택적으로 N-메틸 디에탄올아민(MDEA)인 중합체.

청구항 28

청구항 1에 있어서,

화학식 II의 구조를 갖는 중합체:

[화학식 II]



(식 중, Rx, Z, Z', m, n, o, p, q, x 및 y는 화학식 I에 대해 상기 기재된 바와 같고, J₁ 및 J₂는 독립적으로 부재하거나, 연결 모이어티, 예컨대 -C(O)-, -C(O)NH-, -C(O)O-, -O- 및 -NH-이고, 화학식 II에서 R₃ 및 R₄는 독립적으로 히드록실 기, 1차 아민 기, 2차 아민 기, 3차 아민 기 또는 이들의 조합을 함유하는 치환된 알킬이다).

청구항 29

청구항 28에 있어서,
 J₁은 -O- 또는 -NH-이고,
 J₂는 -C(O)-, -C(O)NH- 또는 -C(O)O-인 중합체.

청구항 30

청구항 28에 있어서,
 R₃은 R₄와 동일하고, 선택적으로 R₃ 및/또는 R₄는 선형인 중합체.

청구항 31

청구항 30에 있어서,
 R₃, R₄ 또는 둘 모두는 히드록실 기를 함유하고, 선택적으로, R₃, R₄ 또는 둘 모두는 히드록실 기 및 하나 이상의 아민 기, 선택적으로 2차 또는 3차 아민 기를 함유하는 중합체.

청구항 32

청구항 28에 있어서,
 R₃, R₄ 또는 둘 모두는 히드록실 기를 함유하고, 아민 기를 함유하지 않는 중합체.

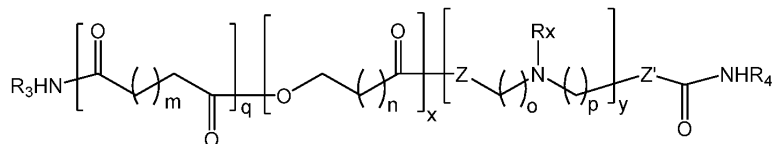
청구항 33

청구항 28에 있어서,
 R₃ 및 R₄ 중 적어도 하나는 히드록실 기를 함유하지 않는 중합체.

청구항 34

청구항 1에 있어서,
 화학식 III의 구조를 갖는 중합체:

[화학식 III]



(식 중, Rx, Z, Z', m, n, o, p, q, x 및 y는 화학식 I에 대해 상기 기재된 바와 같고, J₁ 및 J₂는 독립적으로 부재하거나, 연결 모이어티, 예컨대 -C(O)-, -C(O)NH-, -C(O)O-, -O- 및 -NH-이고, 화학식 II에서 R₃ 및 R₄는 독립적으로 히드록실 기, 1차 아민 기, 2차 아민 기, 3차 아민 기 또는 이들의 조합을 함유하는 치환된 알킬이다).

청구항 35

청구항 34에 있어서,

J_1 은 -O- 또는 -NH-이고,

J_2 는 -C(O)-, -C(O)NH- 또는 -C(O)O-인 중합체.

청구항 36

청구항 34에 있어서,

R_3 은 R_4 와 동일하고, 선택적으로 R_3 및/또는 R_4 는 선형인 중합체.

청구항 37

청구항 34에 있어서,

R_3 , R_4 또는 둘 모두는 히드록실 기를 함유하고, 선택적으로, R_3 , R_4 또는 둘 모두는 히드록실 기 및 하나 이상의 아민 기, 선택적으로 2차 또는 3차 아민 기를 함유하는 중합체.

청구항 38

청구항 34에 있어서,

R_3 , R_4 또는 둘 모두는 히드록실 기를 함유하고, 아민 기를 함유하지 않는 중합체.

청구항 39

청구항 34에 있어서,

R_3 및 R_4 중 적어도 하나는 히드록실 기를 함유하지 않는 중합체.

청구항 40

청구항 19 내지 청구항 39 중 어느 한 항에 있어서,

상기 중합체의 중량 평균 분자량은 20,000 달톤 초과, 15,000 달톤 초과, 10,000 달톤 초과, 5,000 달톤 초과, 또는 2,000 달톤 초과인 중합체.

청구항 41

청구항 40에 있어서,

상기 중합체의 중량 평균 분자량은 약 2,000 달톤 내지 약 20,000 달톤, 보다 바람직하게는 약 5,000 달톤 내지 약 10,000 달톤인 중합체.

청구항 42

청구항 19 내지 청구항 41 중 어느 한 항에 있어서,

하나 이상의 락톤, 하나 이상의 아민-디올(Z 및 $Z' = O$) 또는 트리아민(Z 및 $Z' = NR'$), 및 하나 이상의 이산 또는 디에스테르로부터 제조되며, 둘 이상의 상이한 락톤, 이산 또는 디에스테르, 및/또는 트리아민 또는 아민-디올 단량체가 사용될 경우, n , o , p 및/또는 m 의 값은 동일하거나 상이할 수 있는 중합체.

청구항 43

청구항 19 내지 청구항 42 중 어느 한 항에 있어서,

폴리플렉스 또는 이의 입자로 형성되는 중합체.

청구항 44

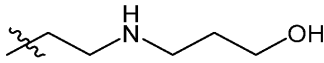
청구항 43에 있어서,

하나 이상의 핵산이 그 안에 캡슐화되어 있는, 폴리플렉스 또는 이의 입자로 형성되는 중합체.

청구항 45

청구항 44에 있어서,

상기 폴리플렉스 또는 입자는 R₁ 및/또는 R₂가 다음으로 이루어지지 않거나, 포함하지 않는 중합체로부터 형성되는 중합체:



청구항 46

청구항 44에 있어서,

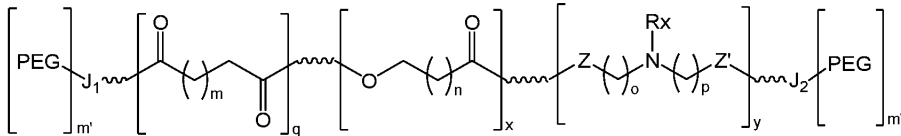
상기 폴리(아민-코-에스테르) 또는 폴리(아민-코-아미드)는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)에 컨쥬게이트된 폴리(아민-코-에스테르) 또는 폴리(아민-코-아미드)를 함유하는 혼합물, 즉 PEG-컨쥬게이트된 폴리(아민-코-에스테르) 또는 폴리(아민-코-아미드)로 존재하는, 폴리플렉스 또는 이의 입자로 형성되는 중합체.

청구항 47

청구항 46에 있어서,

상기 PEG-컨쥬게이트된 폴리(아민-코-에스테르) 또는 폴리(아민-코-아미드)는 다음의 구조를 함유하는 중합체:

[화학식 XI]



(식 중, m' 및 m"는 독립적으로 0 또는 1이되, 단 m' + m"는 1 또는 2이고,

화학식 XI에서 J₁ 및 J₂는 독립적으로 부재하거나, 연결 모이어티, 예컨대 -C(O)-, -C(O)NH-, -C(O)O-, -O- 및 -NH-이고,

화학식 XI의 일부 형태에서, J₁은 -O- 또는 -NH-이고, 화학식 XI의 일부 형태에서, J₂는 -C(O)-, -C(O)NH- 또는 -C(O)O-이다).

청구항 48

청구항 1 내지 청구항 47 중 어느 한 항에 따른 폴리플렉스 또는 입자 형태의 중합체를 이를 필요로 하는 세포 또는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 하나 이상의 치료, 진단 또는 예방 핵산 작용제, 또는 이들의 조합을 생체내 투여하는 방법.

청구항 49

청구항 48에 있어서,

세포를 상기 입자 또는 폴리플렉스와 접촉시켜 세포를 형질 주입하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 50

청구항 48에 있어서,

상기 폴리플렉스 또는 입자를 폐로 투여하는 방법.

발명의 설명

기술분야

[0001] **관련 출원에 관한 상호 참조**

[0002] 본 출원은 2020년 6월 19일자로 출원된 미국 특허 출원 제63/041,739호에 대한 이익 및 우선권을 주장하며, 그 전문은 본원에 참조로 포함된다.

[0003] **연방 지원 연구 또는 개발에 관한 진술**

[0004] 본 발명은 미국 국립 보건원이 수여하는 EB000487에 따라 정부 지원으로 이루어졌다. 정부는 본 발명에 특정 권리를 갖는다.

[0005] **기술분야**

[0006] 본 발명의 기술분야는 일반적으로 진단제, 예방제 및/또는 치료제, 구체적으로는 핵산-기반 작용제의 전달, 특히 페로의 전달을 개선시키기 위한 중합체 조성물 및 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0007] 유전자 전달을 위한 비바이러스 벡터는 제한된 면역원성에 대한 가능성, 큰 크기의 유전자 물질을 수용하고 전달하는 능력, 및 그 표면 구조의 변형에 대한 가능성으로 인해 지난 수십 년 동안 큰 관심을 받아 왔다. 비바이러스 벡터의 주요 범주는 양이온성 지질 및 양이온성 중합체를 포함한다. Felgner와 동료들에 의해 개척된 양이온성 지질-유도된 벡터는 비바이러스 유전자 전달에 대해 가장 광범위하게 조사된 시스템 중 일부를 나타낸다 (문헌[Felgner, *et al.* Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *PNAS*, 84, 7413-7417 (1987)]) (문헌[Templeton, *et al.* Improved DNA: liposome complexes for increased systemic delivery and gene expression. *Nat. Biotechnol.* 15, 647-652 (1997)]) (문헌[Chen, *et al.* Targeted nanoparticles deliver siRNA to melanoma. *J. Invest. Dermatol.* 130, 2790-2798 (2010)]).

[0008] 양이온성 중합체 비바이러스 벡터는 특정 생의학 응용에 대한 합성 및 구조적 변형의 유연성으로 인해 점점 더 관심을 받고 있다. 양이온성 지질 및 양이온성 중합체 시스템 둘 모두는 정전기 상호작용을 통해 음으로 하전된 DNA와 응축된 복합체를 형성함으로써 유전자를 전달하며: 복합체 형성은 DNA를 분해로부터 보호하고 세포 흡수 및 핵으로의 세포내 이동을 촉진한다.

[0009] 양이온성 중합체와 DNA 사이에 형성된 폴리플렉스(polyplex)는 양이온성 지질과 DNA 사이에 형성된 리포플렉스(lipoplex)보다 일반적으로 더 안정하지만, 둘 모두는 종종 혈청 성분 및 염을 함유하는 생리학적 유체에서 불안정하여, 복합체를 분해시키거나 응집시키는 경향이 있다(문헌[Al-Dosari, *et al.* Nonviral gene delivery: principle, limitations, and recent progress. *AAPS J.* 11, 671-681 (2009)]) (Tros de Ilarduya, *et al.* Gene delivery by lipoplexes and polyplexes. *Eur. J. Pharm. Sci.* 40, 159-170 (2010)). 추가적으로, 일부 문헌에서는 음이온성 중합체 또는 심지어 네이키드(naked) DNA가 특정 조건 하에서 일정 수준의 형질 주입을 제공할 수 있을지라도, 지질 및 중합체 둘 모두에 의한 형질 주입은 보통 과도한 전하를 갖는 물질을 필요로 하므로, 표면 상에 순 양 전하를 갖는 폴리플렉스 또는 리포플렉스가 생성되는 것으로 시사하고 있다(문헌[Nicol, *et al.* *Gene Ther.* 9, 1351-1358 (2002)]) (문헌[Schlegel, *et al.* *J. Contr. Rel.* 152, 393-401 (2011)]) (문헌[Liu, *et al.* *AAPS J.* 9, E92-E104 (2007)]) (문헌[Liu, *et al.* *Gene Ther.* 6, 1258-1266 (1999)]). 생체내 순환 시스템으로 주입될 때, 양의 표면 전하는 음으로 하전된 혈청 분자 또는 세포 성분의 막과 함께 복합체 응집물을 빠르게 형성하기 시작하며, 이어서 이는 망상내피 시스템(RES)에 의해 제거된다.

[0010] 보다 중요하게는, 지금까지 개발된 많은 양이온성 벡터는 상당한 독성을 나타내어, 그 임상 적용을 제한하였다 (문헌[Tros de Ilarduya, *et al.* *Eur. J. Pharm. Sci.* 40, 159-170 (2010)]) (문헌[Gao, *et al.* *Biomaterials* 32, 8613-8625 (2011)]) (문헌[Felgner, *et al.* *J. Biol. Chem.* 269, 2550-2561 (1994)]) (문헌[Kafil, *et al.* *BioImpacts* 1, 23-30 (2011)]) (문헌[Lv, *et al.* *J Contr. Rel.* 114, 100-109 (2006)]). 이는 전하에 매우 의존하는 것으로 보이고; 복합체의 표면 상의 과도한 양 전하는 세포 막과 같은 세포 성분과 상호작용하며, 클라트린-매개된 세포내이입, 이온 채널, 막 수용체 및 효소의 활성화 또는 세포 생존 신호전달과 같은 정상적인 세포 과정을 억제할 수 있다(문헌[Gao, *et al.* *Biomaterials* 32, 8613-8625 (2011)]) (문헌[Felgner, *et al.* *J. Biol. Chem.* 269, 2550-2561 (1994)]) (문헌[Kafil, *et al.* *BioImpacts* 1, 23-30 (2011)]).

[0011] 결과적으로, 양이온성 지질은 종종 동물 및 인간에서 급성 염증 반응을 유발하는 반면, PEI와 같은 양이온성 중합체는 적혈구의 혈장 막을 탈안정화시켜 세포 괴사, 세포자멸사 및 자가포식현상을 유도한다(문헌[Tros de

Ilarduya, et al. Eur. J. Pharm. Sci. 40, 159-170 (2010))] (문헌[Gao, et al. Biomaterials 32, 8613-8625 (2011)]) (문헌[Lv, et al. J. Contr. Rel. 114, 100-109 (2006)]). 이러한 바람직하지 않은 효과로 인해, 더 낮은 전하 밀도를 갖는 매우 효율적인 비바이러스 벡터에 대한 필요성이 존재한다.

[0012] 디에스테르의 아미노-치환된 디올과의 효소 공중합을 통해 형성된 생분해성 폴리(아민-코-에스테르)의 패밀리의 합성이 문헌[Liu, et al. J. Biomed. Mater. Res. A 96A, 456-465 (2011)] 및 문헌[Jiang, Z. Biomacromolecules 11, 1089-1093 (2010)]에 논의되어 있다. 다양한 사슬 길이를 갖는 디에스테르(예를 들어, 석시네이트로부터 도데칸디오에이트까지)는 질소 상에서 알킬(메틸, 에틸, n-부틸, t-부틸) 또는 아릴(페닐) 치환체 중 어느 하나를 갖는 디에탄올아민과 공중합된다. 리파아제 촉매의 높은 내약성은 아미노 작용기의 보호 및 탈보호 없이 공중합 반응을 한 단계로 완료하게 한다. 약한 산성 조건에서 양성자화 시에, 이러한 폴리(아민-코-에스테르)는 DNA를 즉시 응축시켜 나노 크기의 폴리플렉스를 형성한다. 스크리닝 연구에 의해 이러한 물질 중 하나인 폴리(N-메틸디에틸렌아민 세바케이트)(PMSC)가 Lipofectamine 2000 및 PEI14와 같은 주된 상업적 제품에 필적하는 효율로 HEK293, U87-MG 및 9L을 포함한 다양한 세포를 형질 주입시킴이 밝혀졌다. PMSC는 유전자 전달을 위해 이미 사용되어 왔지만, 효소적으로 합성된 물질의 전달 효율은 이전에 보고된 어떠한 것보다 대략 다섯 자리 수 더 높았다(문헌[Wang, et al. Biomacromolecules 8, 1028-1037 (2007)]) (문헌[Wang, et al. Biomaterials 28, 5358-5368 (2007)]). 그러나, 이러한 폴리(아민-코-에스테르)는 생체내 핵산의 전신 전달에 효과적이지 않았다. 이는 이러한 중합체 및 유전자 물질에 의해 형성된 폴리플렉스가 (1) 생체내 적용에 대해 충분한 효율을 갖지 않고/않거나 (2) 혈액 내에서 충분히 안정하지 않고 순환 동안 떨어져 나가거나 응집된다는 사실 때문일 수 있다.

[0013] 따라서, 높은 형질 주입 효율 및 낮은 독성으로 핵산을 효율적으로 전신 생체내 또는 시험관내 전달하기에 적합한 비바이러스 벡터에 대한 필요성이 여전히 존재한다.

[0014] 또한, 분자량, 중합체 조성물, 및/또는 말단 기가 용이하게 제어되거나 변형될 수 있는 중합체성 나노담체에 대한 필요성이 존재한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0015] 따라서, 본 발명의 목적은 생체내 또는 시험관내에서 치료제, 진단제 및/또는 예방제, 특히 핵산을 효과적으로 전달할 수 있는 개선된 중합체 및 이의 제조 및 사용 방법을 제공하는 것이다.

[0016] 본 발명의 목적은 시험관내에서 높은 효율로 유전자 물질을 세포로 효과적으로 전달할 수 있고, 핵산의 생체내 전달에 적합한 개선된 중합체, 및 이의 제조 방법을 제공하는 것이다.

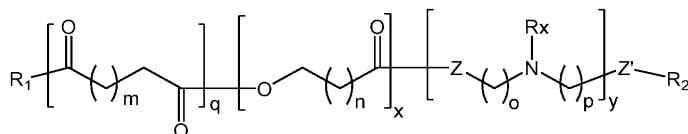
[0017] 또한, 본 발명의 목적은 생체내에서 핵산의 폐 전달을 위해 개선된 중합체를 사용하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0018] 변형된 말단 기를 갖는 폴리(아민-코-에스테르) 중합체는 치료제, 진단제 및/또는 예방제, 특히 핵산-기반 작용제를 전달하는 데 사용되며, 이로부터 폴리플렉스 및 입자가 형성된다. 이는 핵산 카고(cargo), 예컨대 RNA, 보다 특히 mRNA의 개선된 로딩, 개선된 세포 형질 주입, 개선된 세포내 엔도솜 방출, 또는 이들의 조합을 나타낸다. 실시예에서는 노출된 카복실산 및/또는 히드록실 기와의 조합에서 임계 분자량, 및 제조 방법을 입증한다. 변형된 중합체는 또한 주사에 의해 투여될 때 특정 조직에서 우선적 흡수를 나타내고, 폐 시스템으로 투여될 때 높은 수준의 흡수를 나타낸다. 전형적으로, 조성물은 다른 대조군 형질 주입 시약과 비교하여 독성이 덜하거나, 약물 전달에 보다 효율적이거나, 또는 이들의 조합이다.

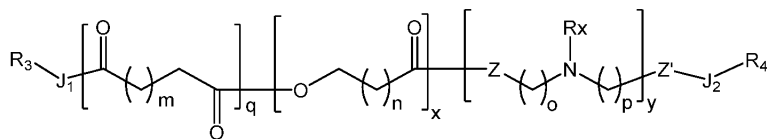
[0019] 화학식 I의 구조를 갖는 중합체가 개시된다.

[0020] [화학식 I]



[0021]

- [0022] 식 중, n은 1 내지 30의 정수이고,
- [0023] m, o 및 p는 독립적으로 1 내지 20의 정수이고,
- [0024] x, y 및 q는 독립적으로 1 내지 1000의 정수이고,
- [0025] R_x는 수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 또는 치환 또는 비치환된 아릴, 또는 치환 또는 비치환된 알콕시이고,
- [0026] Z 및 Z'는 독립적으로 0 또는 NR'이고, 여기서 R'는 수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 또는 치환 또는 비치환된 아릴이고,
- [0027] R₁ 및 R₂는 히드록실 기, 1차 아민 기, 2차 아민 기, 3차 아민 기 또는 이들의 조합을 함유하는 화학적 물질이다.
- [0028] 일부 형태에서, Z는 Z'와 동일하다.
- [0029] 일부 형태에서, Z는 0이고, Z'는 0이다. 일부 형태에서, Z는 NR'이고, Z'는 NR'이다. 일부 형태에서, Z는 0이고, Z'는 NR'이다. 일부 형태에서, Z는 NR'이고, Z'는 0이다.
- [0030] 일부 형태에서, Z'는 0이고, n은 1 내지 24의 정수, 예컨대 4, 10, 13 또는 14이다. 일부 형태에서, Z는 또한 0이다.
- [0031] 일부 형태에서, Z'는 0이고, n은 1 내지 24의 정수, 예컨대 4, 10, 13 또는 14이고, m은 1 내지 10의 정수, 예컨대 4, 5, 6, 7 또는 8이다. 일부 형태에서, Z는 또한 0이다.
- [0032] 일부 형태에서, Z'는 0이고, n은 1 내지 24의 정수, 예컨대 4, 10, 13 또는 14이고, m은 1 내지 10의 정수, 예컨대 4, 5, 6, 7 또는 8이고, o 및 p는 1 내지 6의 동일한 정수, 예컨대 2, 3 또는 4이다. 일부 형태에서, Z는 또한 0이다.
- [0033] 일부 실시형태에서, Z'는 0이고, n은 1 내지 24의 정수, 예컨대 4, 10, 13 또는 14이고, m은 1 내지 10의 정수, 예컨대 4, 5, 6, 7 또는 8이고, R은 알킬, 예컨대 메틸, 에틸, n-프로필, 이소프로필, n-부틸, t-부틸, 이소부틸, sec-부틸, 시클로헥실, (시클로헥실)메틸, 시클로프로필메틸, 및 이의 동족체 및 이성질체, 예를 들어 n-펜틸, n-헥실, n-헵틸 및 n-옥틸, 또는 아릴, 예컨대 페닐, 나프탈릴, 안트라세닐, 페난트릴, 크리세닐, 피레닐, 툴릴 또는 자일릴이다. 일부 형태에서, Z는 또한 0이다.
- [0034] 일부 형태에서, n은 14(예를 들어, 펜타데칼락톤, PDL)이고, m은 7(예를 들어, 세바스산)이고, o 및 p는 2(예를 들어, N-메틸디에탄올아민, MDEA)이다.
- [0035] 일부 실시형태에서, 폴리플렉스 또는 입자는 R₁ 및/또는 R₂가 다음으로 이루어지지 않거나, 포함하지 않는 중합체로부터 형성된다.
- [0036] 일부 형태에서, 중합체는 화학식 II의 구조를 갖는다.
- [0037] [화학식 II]



- [0038]
- [0039] 식 중, J₁ 및 J₂는 독립적으로 연결 모이어티이거나, 부재하고,
- [0040] R₃ 및 R₄는 히드록실 기, 1차 아민 기, 2차 아민 기, 3차 아민 기 또는 이들의 조합을 함유하는 치환된 알킬이다.
- [0041] 일부 형태에서, J₁은 -O- 또는 -NH-이다.
- [0042] 일부 형태에서, J₂는 -C(O)NH- 또는 -C(O)O-이다.
- [0043] 일부 형태에서, R₃은 R₄와 동일하다.

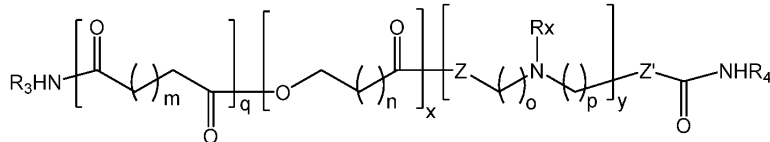
[0044] 바람직하게는, R₃ 및/또는 R₄는 선형이다.

[0045] 일부 형태에서, R₃, R₄ 또는 둘 모두는 히드록실 기를 함유한다. 일부 형태에서, R₃, R₄ 또는 둘 모두는 히드록실 기 및 하나 이상의 아민 기, 바람직하게는 2차 또는 3차 아민 기를 함유한다. 일부 형태에서, R₃, R₄ 또는 둘 모두는 히드록실 기를 함유하고, 아민 기를 함유하지 않는다.

[0046] 일부 형태에서, R₃ 및 R₄ 중 적어도 하나는 히드록실 기를 함유하지 않는다.

[0047] 일부 형태에서, 중합체는 화학식 III의 구조를 갖는다.

[0048] [화학식 III]



[0049]

[0050] 특정 실시형태에서, x, y 및/또는 q의 값은 중합체의 중량 평균 분자량이 20,000 달톤 초과, 15,000 달톤 초과, 10,000 달톤 초과, 5,000 달톤 초과, 2,000 달톤 초과인 값이다. 일부 형태에서, 중합체의 중량 평균 분자량은 약 2,000 달톤 내지 약 20,000 달톤, 보다 바람직하게는 약 5,000 달톤 내지 약 10,000 달톤이다.

[0051] 중합체는 하나 이상의 락톤, 하나 이상의 아민-디올(Z 및 Z' = O) 또는 트리아민(Z 및 Z' = NR'), 및 하나 이상의 이산 또는 디에스테르로부터 제조될 수 있다. 이러한 실시형태에서, 둘 이상의 상이한 락톤, 이산 또는 디에스테르, 및/또는 트리아민 또는 아민-디올 단량체가 사용되는 경우, n, o, p, 및/또는 m의 값은 동일하거나 상이할 수 있다.

[0052] 일부 실시형태에서, 중합체는 약 2 kDa 내지 20 kDa, 또는 약 2 kDa 내지 약 10 kDa, 또는 약 2 kDa 내지 약 5 kDa이다.

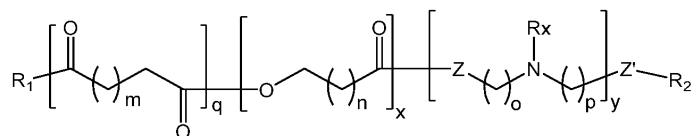
[0053] 중합체는 하나 이상의 치료제, 진단제 및/또는 예방제가 그 안에 캡슐화되어 있는 마이크로입자 및/또는 나노입자를 형성하는 데 사용될 수 있다. 캡슐화되어 전달되는 작용제는 소 분자 작용제(예를 들어, 분자량이 2,000, 1500, 1,000, 750, 또는 500 달톤 미만인 비중합체성 작용제) 또는 거대분자(예를 들어, 올리고머 또는 중합체), 예컨대 단백질, 효소, 펩타이드, 핵산 등일 수 있다. 입자는 *생체내* 및/또는 *시험관내* 작용제 전달을 위해 사용될 수 있다.

[0054] 일부 실시형태에서, 중합체는 *시험관내* 및 *생체내*에서 폴리뉴클레오타이드를 세포로 전달하는 데 효과적인, 본원에서 폴리플렉스로 지칭되는 중합체성 나노미립자 폴리뉴클레오타이드 담체를 형성하는 데 사용될 수 있다.

[0055] 폐로의 전달을 포함한 전달에 대해 개선된 특성을 갖는 폴리(아민-코-에스테르) 또는 폴리(아민-코-아미드)가 개발되었다.

[0056] 폴리(아민-코-에스테르) 또는 폴리(아민-코-아미드)는 다음의 구조를 함유한다.

[0057] [화학식 I]



[0058]

[0059] 식 중, n은 1 내지 30의 정수이고,

[0060] m, o 및 p는 독립적으로 1 내지 20의 정수이고,

[0061] x, y 및 q는 독립적으로 1 내지 1000의 정수이고,

[0062] Rx는 수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 또는 치환 또는 비치환된 아릴, 또는 치환 또는 비치환된 알콕시이고,

[0063] Z 및 Z'는 독립적으로 O 또는 NR'이고, 여기서 R'는 수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 또는 치환 또는 비치환된

아릴이고,

[0064] R_1 및 R_2 는 히드록실 기, 1차 아민 기, 2차 아민 기, 3차 아민 기 또는 이들의 조합을 함유하는 화학적 물질이다.

[0065] 일부 형태에서, Z는 Z'와 동일하다.

[0066] 일부 형태에서, Z는 0이고, Z'는 0이다. 일부 형태에서, Z는 NR'이고, Z'는 NR'이다. 일부 형태에서, Z는 0이고, Z'는 NR'이다. 일부 형태에서, Z는 NR'이고, Z'는 0이다.

[0067] 일부 형태에서, Z'는 0이고, n은 1 내지 24의 정수, 예컨대 4, 10, 13 또는 14이다. 일부 형태에서, Z는 또한 0이다.

[0068] 일부 형태에서, Z'는 0이고, n은 1 내지 24의 정수, 예컨대 4, 10, 13 또는 14이고, m은 1 내지 10의 정수, 예컨대 4, 5, 6, 7 또는 8이다. 일부 형태에서, Z는 또한 0이다.

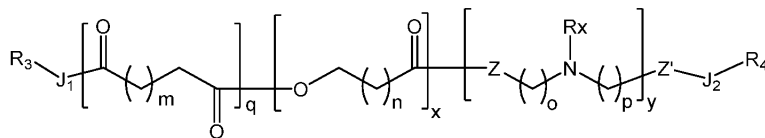
[0069] 일부 형태에서, Z'는 0이고, n은 1 내지 24의 정수, 예컨대 4, 10, 13 또는 14이고, m은 1 내지 10의 정수, 예컨대 4, 5, 6, 7 또는 8이고, o 및 p는 1 내지 6의 동일한 정수, 예컨대 2, 3 또는 4이다. 일부 형태에서, Z는 또한 0이다.

[0070] 일부 실시형태에서, Z'는 0이고, n은 1 내지 24의 정수, 예컨대 4, 10, 13 또는 14이고, m은 1 내지 10의 정수, 예컨대 4, 5, 6, 7 또는 8이고, R은 알킬, 예컨대 메틸, 에틸, n-프로필, 이소프로필, n-부틸, t-부틸, 이소부틸, sec-부틸, 시클로헥실, (시클로헥실)메틸, 시클로프로필메틸, 및 이의 동족체 및 이성질체, 예를 들어 n-펜틸, n-헥실, n-헵틸 및 n-옥틸, 또는 아릴, 예컨대 페닐, 나프탈릴, 안트라세닐, 페난트릴, 크리세닐, 피레닐, 톨릴 또는 자일릴이다. 일부 형태에서, Z는 또한 0이다.

[0071] 일부 형태에서, n은 14(예를 들어, 펜타데칼락톤, PDL)이고, m은 7(예를 들어, 세바스산)이고, o 및 p는 2(예를 들어, N-메틸디에탄올아민, MDEA)이다.

[0072] 일부 형태에서, 중합체는 화학식 II의 구조를 함유한다:

[0073] [화학식 II]



[0074]

[0075] 식 중, Rx, Z, Z', m, n, o, p, q, x 및 y는 화학식 I에 대해 상기 기재된 바와 같고,

[0076] J_1 및 J_2 는 독립적으로 부재하거나, 연결 모이어티, 예컨대 $-C(O)-$, $-C(O)NH-$, $-C(O)O-$, $-O-$ 및 $-NH-$ 이고,

[0077] 화학식 II에서 R_3 및 R_4 는 독립적으로 히드록실 기, 1차 아민 기, 2차 아민 기, 3차 아민 기 또는 이들의 조합을 함유하는 치환된 알킬이다.

[0078] 일부 형태에서, J_1 은 $-O-$ 또는 $-NH-$ 이다.

[0079] 일부 형태에서, J_2 는 $-C(O)-$, $-C(O)NH-$ 또는 $-C(O)O-$ 이다.

[0080] 일부 형태에서, R_3 은 R_4 와 동일하다.

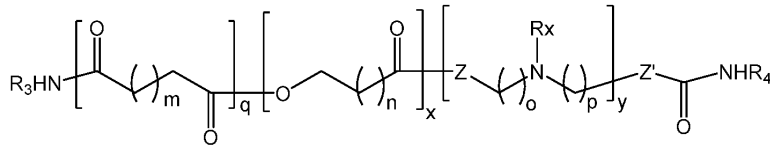
[0081] 바람직하게는, R_3 및/또는 R_4 는 선형이다.

[0082] 일부 형태에서, R_3 , R_4 또는 둘 모두는 히드록실 기를 함유한다. 일부 형태에서, R_3 , R_4 또는 둘 모두는 히드록실 기 및 하나 이상의 아민 기, 바람직하게는 2차 또는 3차 아민 기를 함유한다. 일부 형태에서, R_3 , R_4 또는 둘 모두는 히드록실 기를 함유하고, 아민 기를 함유하지 않는다.

[0083] 일부 형태에서, R_3 및 R_4 중 적어도 하나는 히드록실 기를 함유하지 않는다.

[0084] 일부 형태에서, 중합체는 화학식 III의 구조를 함유한다:

[0085] [화학식 III]



[0086]

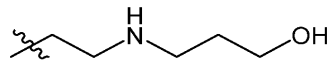
[0087] 식 중, R₃, R₄, Rx, Z, Z', m, n, o, p, q, x 및 y는 화학식 II에 대해 상기 기재된 바와 같다.

[0088] 특정 실시형태에서, x, y 및/또는 q의 값은 중합체의 중량 평균 분자량이 20,000 달톤 초과, 15,000 달톤 초과, 10,000 달톤 초과, 5,000 달톤 초과, 2,000 달톤 초과인 값이다. 일부 형태에서, 중합체의 중량 평균 분자량은 약 2,000 달톤 내지 약 20,000 달톤, 보다 바람직하게는 약 5,000 달톤 내지 약 10,000 달톤이다.

[0089] 중합체는 하나 이상의 락톤, 하나 이상의 아민-디올(Z 및 Z' = O) 또는 트리아민(Z 및 Z' = NR'), 및 하나 이상의 이산 또는 디에스테르로부터 제조될 수 있다. 이러한 실시형태에서, 둘 이상의 상이한 락톤, 이산 또는 디에스테르, 및/또는 트리아민 또는 아민-디올 단량체가 사용되는 경우, n, o, p, 및/또는 m의 값은 동일하거나 상이할 수 있다.

[0090] 일부 실시형태에서, 중합체는 약 2 kDa 내지 20 kDa, 또는 약 2 kDa 내지 약 10 kDa, 또는 약 2 kDa 내지 약 5 kDa이다.

[0091] 폴리(아민-코-에스테르) 또는 폴리(아민-코-아미드)는 하나 이상의 전령 리보핵산이 그 안에 캡슐화되어 있는 폴리플렉스, 마이크로입자 및/또는 나노입자를 형성하는 데 사용될 수 있다. 일부 형태에서, 폴리플렉스 또는 입자는 R₁ 및/또는 R₂가 다음으로 이루어지지 않거나, 포함하지 않는 중합체로부터 형성된다:

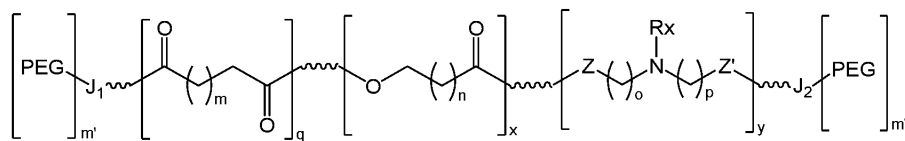


[0092]

[0093] 일부 형태에서, 폴리(아민-코-에스테르) 또는 폴리(아민-코-아미드)는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)에 컨쥬게이트된 폴리(아민-코-에스테르) 또는 폴리(아민-코-아미드)를 함유하는 혼합물, 즉 PEG-컨쥬게이트된 폴리(아민-코-에스테르) 또는 폴리(아민-코-아미드)로 존재한다.

[0094] 일부 형태에서, PEG-컨쥬게이트된 폴리(아민-코-에스테르) 또는 폴리(아민-코-아미드)는 다음의 구조를 함유한다:

[0095] [화학식 XI]



[0096]

[0097] 식 중, m' 및 m''는 독립적으로 0 또는 1이되, 단 m' + m''는 1 또는 2이고,

[0098] 화학식 XI에서 J₁ 및 J₂는 독립적으로 부재하거나, 연결 모이어티, 예컨대 -C(O)-, -C(O)NH-, -C(O)O-, -O- 및 -NH-이다.

[0099] 화학식 XI의 일부 형태에서, J₁은 -O- 또는 -NH-이다. 화학식 XI의 일부 형태에서, J₂는 -C(O)-, -C(O)NH- 또는 -C(O)O-이다.

[0100] 전달은 중합체의 선택, 중합체의 친수성 중합체, 예컨대 폴리알킬렌 글리콜과의 혼합 또는 컨쥬게이팅, 말단 기 및 이들의 혼합물의 제어뿐만 아니라 분자량을 통해 최적화될 수 있다.

[0101] 실시예에서는 전달 향상뿐만 아니라 예컨대 주사에 의한 전신 투여, 또는 폐로의 투여(폐 전달) 후 세포로 직접적으로 투여된 다음, 높은 수준으로 형질 주입됨을 입증한다. 정해진 분자량의 PEG와 혼합되거나 컨쥬게이팅된 PACE는 폐 투여 후 폐 세포에서는 높은 수준으로 형질 주입되고 다른 조직에서는 거의 안되는 mRNA를 함유하는

폴리플렉스를 생성하였다.

도면의 간단한 설명

도 1은 화학식 I에 포함될 수 있는 R₃ 및 R₄ 기를 도시한다.

도 2는 실시예 2에 예시된 방법에 의해 합성되는 5 kDa 또는 10 kDa의 MW를 갖는 PACE-COOH 및 PACE-MAE의 형질 주입 효율을 나타내는 막대 그래프이다. 통계적 유의성은 Student's t-시험에 의해 결정되었다(다음과 같이 나타남: *, P < 0.05; ***, P < 0.001).

도 3a는 10% PDL 함량, 분자량 2 kDa, 5 kDa, 10 kDa 및 20 kDa를 갖는 고전적인 PACE를 사용할 경우 MW의 효과(평균 LUC/단백질 mg)를 나타내는 막대 그래프이다. **도 3b**는 10 kDa 고전적인 PACE 중합체를 사용할 경우 PDL의 함량의 효과(평균 LUC/단백질 mg)를 나타내는 막대 그래프이다. **도 3c**는 10% PDL 함량에서 5 kDa의 MW를 갖는 고전적인 PACE 및 산성 PACE의 형질 주입 효율(평균 LUC/단백질 mg)을 나타내는 막대 그래프이다. 결과는 두 번씩 실행한 3회의 독립적 실험의 평균 ± SD로 제시된다.

도 4는 작동 과정 동안(일 단위의 작동 시간) aPACE 중합체의 중량 평균 MW(Da)의 발달(5 kDa - 하단 선; 10 kDa - 중간 선; 20 kDa - 상단 선)을 나타내는 선 그래프이다.

도 5a는 각각의 MW에 대해 바람직한 작동 시간을 입증하는 작동 시간(일)에 따른 루시페라아제 mRNA 형질 주입 효율(평균 LUC/단백질 mg)을 나타내는 선 그래프이다(선은 0일에 20 kDa - 하단 데이터 포인트; 0일에 10 kDa 중간 데이터 포인트; 0일에 5 kDa - 상단 데이터 포인트로서 확인되었다). **도 5b**는 바람직한 작동 시간(5 kDa 중합체에 대해서는 5일, 10 kDa 중합체에 대해서는 10일, 그리고 20 kDa 중합체에 대해서는 30일, **p < 0.005)에서 상이한 초기 MW의 비작동된 PACE 및 작동된 PACE를 사용할 경우 형질 주입 효율(평균 LUC/단백질 mg)을 나타내는 막대 그래프이다. **도 5c**는 mRNA:TransIT 복합체(하단 선)와 비교할 경우 mRNA:aPACE 폴리플렉스(5 kDa 5D, 10 kDa 10D, 20 kDa 30D(상단 선들의 집합))의 세포독성 프로파일(세포 생존력(%))을 나타내는 선 그래프이다. **도 5d**는 상이한 작동 온도를 사용할 경우 aPACE의 형질 주입 효율(평균 LUC/단백질 mg)에 관한 막대 그래프이다(**p < 0.005). 모든 결과는 두 번씩 실행한 3개의 독립적 실험의 평균 ± SD로 제시된다.

도 6a는 TransIT, 5 kDa 비작동화된 PACE, 5일 동안 작동화된 5 kDa aPACE, 10 kDa 비작동화된 PACE, 또는 10일 동안 작동화된 10 kDa aPACE를 사용할 경우 mRNA(총 20 mg)의 IV 투여 후 6시간에 EPO 혈액 농도를 나타내는 막대 그래프이다. 결과는 N = 3 동물의 평균 ± SD로 제시된다(****p < 0.0001). **도 6b**는 비히클(하단 선), TransIT(중간 선), 10일 동안 작동화된 10 kDa aPACE(상단 선)를 사용할 경우 mRNA(총 20 mg)의 IV 투여 후 EPO 생성의 시간 경과를 나타내는 선 그래프이다. 결과는 N = 3 동물의 평균 ± SD로 제시된다(***p < 0.001 및 *p < 0.05). **도 6c** 내지 **6f**는 아세테이트 완충제, 자유 mRNA 또는 mRNA:aPACE 폴리플렉스의 IV 투여 후 24시간 및 7시간에 혈액 화학(AST(**도 6c**), ALT(**도 6d**), 우레아(**도 6e**), 크레아티닌(**도 6f**)) 분석을 나타내는 막대 그래프이다. 결과는 N = 3 동물의 평균 ± SEM으로 제시된다.

도 7은 PACE 말단 기가 mRNA의 폴리플렉스로의 로딩에 대해 미치는 효과를 나타내는 막대 그래프이다(#은 실시예 5에서 확인된 말단 기에 상응함).

도 8a는 **도 8b** 내지 **8d**에 나타낸 결과를 생성하는 메커니즘의 개략도이다. **도 8b**는 PACE 말단 기가 폴리플렉스의 세포 흡수에 대해 미치는 효과를 나타내는 막대 그래프이다(#은 표 1에서 확인된 말단 기에 상응함). **도 8c**는 PACE 말단 기가 엔도솜 탈출에 대해 미치는 효과를 나타내는 막대 그래프이다(#은 표 1에서 확인된 말단 기에 상응함). **도 8d**는 PACE 말단 기가 형질 주입 효율에 대해 미치는 효과를 나타내는 막대 그래프이다(#은 표 1에서 확인된 말단 기에 상응함).

도 9a 내지 **9c**는 형질 주입 효율(fluc 활성으로서 나타냄)과, mRNA 로딩(**도 9a**), 흡수(**도 9b**) 및 엔도솜 탈출(**도 9c**)을 포함한 형질 주입의 여러 단계의 선형 상관관계를 보여주는 플롯이다.

도 10a 및 **10b**는 mRNA 폴리플렉스의 시험관내 번역 속도가 형질 주입 효율과 상관관계가 없음을 입증하는 그래프이다. mRNA, ddRLuc-Fc 및 PACE를 함유하는 폴리플렉스를 세포에 의해 세포내이입한 후, 루시페라아제 유전자를 암호화하는 mRNA를 방출시켜 번역하였다. **도 10a**는 루시페라아제 배출 양(log) 대 번역 속도(AU)의 그래프이다. **도 10b**는 번역 속도(AU) 대 캡슐화 효율의 그래프이다.

도 11은 표 1의 중합체 2, 4, 14, 15, 16, 17, 20, 25, 27 및 31에 있어서 pH 4.8, 5.0, 5.2, 5.4, 5.6, 5.8 및 6.0에서의 형질 주입 효율(%)에 관한 그래프이다. 결과는 상이한 말단 기를 갖는 PACE 폴리플렉스에 대한 최

적의 아세트산나트륨 완충제 pH를 보여준다.

도 12a는 PEG가 없는 경우(시간 경과에 따른 크기 변화가 없는 0.25% PACE-PEG 또는 1% PACE-PEG 중 어느 하나와 비교하여 시간(분) 경과에 따른 응집이 나타남)과 비교하여, PEG가 폴리플렉스의 크기에 미치는 효과에 관한 그래프이다. 도 12b는 0, 0.05, 0.10, 0.25, 0.50 및 1의 PACE-PEG 함량(%)에 대한 함수로서 표 1의 중합체 14, 15, 16, 17, 25, 27 및 31에 대한 형질 주입 효율(%)에 관한 그래프이다. 도 12c는 동일한 PACE-PEG 혼합물의 EGFP 발현에 관한 그래프로서, PEG가 EGFP 발현을 증가시켰음을 보여준다.

도 13a는 0%, 0.01%, 0.1%, 1% 또는 10% DSPE-PEG가 크기(nm) 및 다분산성에 미치는 효과에 관한 그래프이다. 도 13b는 표 1의 중합체 14, 15, 16, 17, 25, 27 및 31에 있어서 DSPE-PEG 함량이 형질 주입 효율(%)에 미치는 효과에 관한 그래프이다. 도 13c는 DSPE-PEG 농도(0, 0.05, 0.10, 0.25, 0.50, 1.0, 2.5 및 5%)가 EGFP 발현에 미치는 효과에 관한 그래프이다.

도 14a 및 14b는 심장, 폐, 간, 신장, 비장, 창자에 대해 I.P. 주사 후(도 12a) 및 I.V. 주사 후(도 12b) 6시간에 생체발광 분포에 의해 측정되는 폴리플렉스의 생체 분포를 보여주는 IVIS 이미지로부터의 데이터 플롯이다.

도 15는 폐 투여 후 생체발광 분포에 의해 측정되는 폴리플렉스의 생체분포 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0103]

I. 정의

[0104]

본원에서 사용되는 바와 같은 용어 "폴리플렉스"는 전형적으로 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드가 그 안에 캡슐화되어 있고, 그 안에 분산되어 있고/있거나 그 표면과 결합되어 있는 중합체성 마이크로입자 및/또는 나노입자 또는 미셀을 지칭한다.

[0105]

용어 "입자"는 마이크로구, 마이크로캡슐, 마이크로입자, 나노구, 나노캡슐 및 나노입자를 포함한다. 용어 "마이크로입자"는 마이크로구 및 마이크로캡슐을 포함하며, 이들 모두는 치수가 평균 약 1000 마이크로미터 미만이다. 마이크로입자는 구 또는 비구형일 수 있고, 임의의 규칙 또는 불규칙 형상일 수 있다. 구조는 그 직경이 약 1 마이크로미터(1000 nm) 미만인 경우, 대응되는 본 기술분야에 인지되는 용어 "나노구", "나노캡슐" 및 "나노입자"를 이용할 수 있다. 특정 실시형태에서, 나노구, 나노캡슐 및 나노입자의 집단은 평균 직경이 약 500 nm, 200 nm, 100 nm, 50 nm, 10 nm 또는 1 nm이다. 일부 실시형태에서, 입자의 평균 직경은 약 200 nm 내지 약 600 nm, 바람직하게는 약 200 내지 약 500 nm이다. 용어 "직경"은 물리적 직경 또는 수력학적 직경 중 어느 하나를 지칭하는 것으로 본원에서 사용된다. 본질적으로 구형 입자의 직경은 물리적 직경 또는 수력학적 직경을 지칭할 수 있다. 비구형 입자의 직경은 우선적으로 수력학적 직경을 지칭할 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 비구형 입자의 직경은 입자의 표면 상의 두 지점 사이의 가장 큰 선형 거리를 지칭할 수 있다. 여러 입자를 지칭할 때, 입자의 직경은 전형적으로 입자의 평균 직경을 지칭한다. 입자 직경은 동적 광 산란을 포함하지만, 이로 한정되지 않은 본 기술분야의 다양한 기술을 사용하여 측정될 수 있다.

[0106]

본원에서 일반적으로 사용되는 바와 같은 "약제학적으로 허용가능한"은 정통한 의학적 판단 범위 내에서, 타당한 이득/위험 비율에 상응하는 과도한 독성, 자극, 알러지 반응 또는 다른 문제 또는 합병증 없이 인간 및 동물의 조직, 기관 및/또는 체액과 접촉하여 사용하기에 적합한 화합물, 물질, 조성물 및/또는 투약 형태를 지칭한다.

[0107]

본원에서 사용되는 바와 같은 용어 "생체 적합한"은 그 자체로 호스트(예를 들어, 동물 또는 인간)에게 독성이 없거나, 호스트에서 독성 농도의 단량체성 또는 올리고머성 아단위 또는 다른 부산물을 생성하는 속도로 분해되지 않는(물질이 분해되는 경우) 하나 이상의 물질을 지칭한다.

[0108]

본원에서 사용되는 바와 같은 용어 "생분해성"은 물질이 그 성분의 아단위로 분해 또는 붕괴되거나, 예를 들어 생화학적 과정에 의해 물질이 더 작은(예를 들어, 비중합체성) 아단위로 소화되는 것을 의미한다.

[0109]

본원에서 사용되는 바와 같은 "서방성"은 물질의 전체 양이 한꺼번에 생물학적으로 이용가능하게 되는 볼루스(bolus) 유형의 투여와 반대로 연장된 시간에 걸친 물질의 방출을 지칭한다.

[0110]

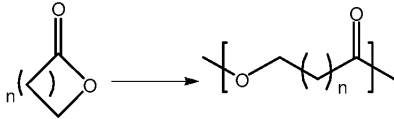
문구 "비경구 투여" 및 "비경구로 투여"는 본 기술분야에 인지되는 용어이며, 여기에는 주사와 같이 장관 및 국소 투여와 다른 투여 방식이 포함되며, 제한 없이 정맥내, 근육내, 흉막내, 혈관내, 심낭내, 동맥내, 수막강내, 낭내, 안와내, 심장내, 진피내, 복강내, 경기관, 피하, 표피하, 관절내, 피막하, 지주막하, 척수내 및 흉골내

주사 및 주입이 포함된다.

- [0111] 본원에서 사용되는 바와 같은 용어 "계면활성제"는 액체의 표면 장력을 저하시키는 작용제를 지칭한다.
- [0112] 본원에서 사용되는 바와 같이, "일시적"은 수시간, 수일 또는 수주 동안의 비통합된 전이 유전자의 발현을 지칭하며, 여기서 발현 기간은 게놈으로 통합되거나 호스트 세포에서 안정한 플라스미드 레플리콘(replicon) 내에 함유되는 경우 유전자의 발현 기간보다 더 짧다.
- [0113] 본원에서 사용되는 바와 같이, "프로모터(promoter) 부위"는 RNA 중합효소, 예컨대 박테리오파지(문헌 [Davanloo, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:2035-39 (1984)]에 기재됨), 또는 다른 근원으로부터 원래 단리된 DNA-의존성 RNA 중합효소가 높은 특이성으로 결합되는(문헌[Chamberlin, *et al.*, *Nature*, 228:227-231 (1970)]에 기재됨) 뉴클레오타이드의 서열이다.
- [0114] 본원에서 사용되는 바와 같이, "폴리(A)"는 폴리아데닐화에 의해 mRNA에 부착되는 일련의 아데노신이다. 일시적 발현을 위한 구성체의 바람직한 실시형태에서, 폴리A는 50 내지 5000, 바람직하게는 64 초과, 보다 바람직하게는 100 초과, 가장 바람직하게는 300 또는 400 초과이다. 폴리(A) 서열은 mRNA 기능, 예컨대 번역의 편재화, 안정성 또는 효율을 조절하도록 화학적으로 또는 효소적으로 변형될 수 있다.
- [0115] 본원에서 사용되는 바와 같이, "오픈 리딩 프레임"(open reading frame) 또는 "ORF"는 잠재적으로 폴리펩타이드 또는 단백질을 암호화할 수 있는 염기 서열을 함유하는 일련의 뉴클레오타이드이다. 오픈 리딩 프레임은 출발-코드 서열(개시 코돈 또는 출발 코돈)과 정지-코돈 서열(종료 코돈) 사이에 위치한다.
- [0116] 용어 "구성체"는 하나 이상의 단리된 폴리뉴클레오타이드 서열을 갖는 재조합 유전 분자를 지칭한다.
- [0117] 용어 "발현 제어 서열"은 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 번역을 제어하고 조절하는 핵산 서열을 지칭한다. 원핵생물에 적합한 제어 서열은, 예를 들어 프로모터, 선택적으로 작동 서열, 리보솜 결합 부위 등을 포함한다. 진핵생물 세포는 프로모터, 폴리아데닐화 신호 및 인핸서(enhancer)를 이용하는 것으로 알려져 있다.
- [0118] 용어 "유전자"는 주형 또는 전령 RNA를 통해 특정 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질의 특징인 아미노산 서열을 암호화하는 DNA 서열을 지칭한다. 용어 "유전자"는 또한 RNA 산물을 암호화하는 DNA 서열을 지칭한다. 게놈 DNA에 대해 본원에서 사용되는 용어 "유전자"는 개재되는, 비코딩 영역뿐만 아니라 조절 영역을 포함하고, 5' 및 3' 말단을 포함할 수 있다.
- [0119] 용어 "폴리펩타이드"는 단백질 및 이의 단편을 포함한다. 폴리펩타이드는 "외인성"일 수 있고, 이는 이들이 "이종유래", 즉 박테리아 세포에 의해 생성되는 인간 폴리펩타이드와 같이 이용되는 호스트 세포에 대해 이종임을 의미한다. 폴리펩타이드는 아미노산으로서 함유된다. 아미노산 서열은 좌측에서 우측 방향으로 아미노로부터 카복시 말단까지 기재되며, 다음에 나타낸 바와 같이 3개의 문자 또는 단일 문자 코드로 표시된다: 알라닌(Ala, A), 아르기닌(Arg, R), 아스파라긴(Asn, N), 아스파르트산(Asp, D), 시스테인(Cys, C), 글루타민(Gln, Q), 글루탐산(Glu, E), 글리신(Gly, G), 히스티딘(His, H), 이소류신(Ile, I), 류신(Leu, L), 리신(Lys, K), 메티오닌(Met, M), 페닐알라닌(Phe, F), 프롤린(Pro, P), 세린(Ser, S), 트레오닌(Thr, T), 트립토판(Trp, W), 티로신(Tyr, Y) 및 발린(Val, V).
- [0120] "변이체"는 참조 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드와 상이하지만, 본질적인 특성은 보유하는 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드를 지칭한다. 폴리펩타이드의 전형적인 변이체는 다른 참조 폴리펩타이드로부터의 아미노산 서열과 상이하다. 일반적으로, 참조 폴리펩타이드 및 변이체의 서열은 전반적으로 매우 유사하고 많은 영역에서 동일하도록 그 차이가 제한된다. 변이체 및 참조 폴리펩타이드는 하나 이상의 변형(예를 들어, 치환, 첨가 및/또는 결실)에 의해 아미노산 서열이 상이할 수 있다. 치환된 또는 삽입된 아미노산 잔기는 유전자 코드에 의해 암호화된 것일 수 있거나 암호화된 것이 아닐 수 있다. 폴리펩타이드의 변이체는 대립 변이체와 같이 자연 발생적일 수 있거나, 자연적으로 발생하는 것으로 알려지지 않은 변이체일 수 있다.
- [0121] 변형 또는 변화는 폴리펩타이드의 특징을 유의적으로 변경시키지 않는 폴리펩타이드의 구조(예를 들어, 보존성 아미노산 치환) 내에서 이루어질 수 있다. 예를 들어, 특정 아미노산은 상당한 활성 손실 없이 서열 내의 다른 아미노산에 대해 치환될 수 있다. 이는 그러한 폴리펩타이드의 생물학적 기능성 활성을 한정하는 폴리펩타이드의 상호작용 능력 및 속성이기 때문에, 특정 아미노산 서열 치환은 폴리펩타이드 서열 내에서 이루어질 수 있지만, 그럼에도 불구하고 유사한 특징을 갖는 폴리펩타이드를 얻을 수 있다. 그러한 변화를 만들 때, 아미노산의 수치(hydrophobic) 지수가 고려될 수 있다. 폴리펩타이드에 대한 상호작용 생물학적 기능을 부여하는 데 있어서 수치 아미노산 지수의 중요성이 일반적으로 본 기술분야에서 이해된다. 특정 아미노산이 유사한 수치 지수 또는

점수를 갖는 다른 아미노산에 대해 치환될 수 있고, 또한 유사한 생물학적 활성을 갖는 폴리펩타이드를 생성할 수 있는 것으로 알려져 있다. 유사한 아미노산의 치환은, 특히 이에 의해 생성된 생물학적 기능이 증가인 폴리펩타이드 또는 펩타이드가 면역학적 실시형태에서 사용되도록 의도되는 경우 또한 친수성을 기준으로 이루어질 수 있다. 아미노산 치환은 일반적으로 아미노산 측쇄 치환체의 상대적 유사성, 예를 들어 그 소수성, 친수성, 전하 및 크기를 기준으로 한다.

[0122] 용어 "락톤" 및 "락톤 단위"는 환형 에스테르를 포함하는 화학적 화합물, 또는 환형 에스테르에서 에스테르 결합의 절단으로부터 생긴 개방 사슬 화학 구조를 기술하기 위해 사용된다. 예를 들어, 락톤은 하기 나타낸 환형 에스테르, 및 상응하는 락톤-유도된 개방 사슬 구조를 기술하기 위해 사용된다:



[0123] (식 중, n은 정수이다). 개방 사슬 구조는 가용매분해, 예컨대 가수분해 및 효소 절단을 포함하지만, 이로 한정되지 않은 본 기술분야에 공지된 방법을 통해 형성된다.

[0125] 용어 "알킬"은 직쇄 알킬 기, 분지쇄 알킬 기, 시클로알킬(지환족) 기, 알킬-치환된 시클로알킬 기 및 시클로알킬-치환된 알킬 기를 포함한 포화 지방족 기의 라디칼을 지칭한다.

[0126] 바람직한 실시형태에서, 직쇄 또는 분지쇄 알킬은 그 백본에서 30개 이하(예를 들어, 직쇄에 대해 C₁-C₃₀, 분지쇄에 대해 C₃-C₃₀), 바람직하게는 20개 이하, 보다 바람직하게는 15개 이하, 가장 바람직하게는 10개 이하의 탄소 원자를 갖는다. 1 내지 30개의 백본 탄소 원자의 개수의 모든 정수 값이 고려되며 직쇄 또는 분지쇄 알킬에 대해 개시된다. 마찬가지로, 바람직한 시클로알킬은 그 고리 구조 내에 3 내지 10개의 탄소 원자를 갖고, 보다 바람직하게는 고리 구조 내에 5, 6 또는 7개의 탄소를 갖는다. 3 내지 10개의 고리 탄소 원자의 개수의 모든 정수 값이 고려되며 시클로알킬에 대해 개시된다.

[0127] 본 명세서, 실시예 및 청구범위 전체에서 사용되는 용어 "알킬"(또는 "저급 알킬")은 "비치환된 알킬" 및 "치환된 알킬" 둘 모두를 포함하도록 의도되며, 여기서 치환된 알킬은 하나 이상의 치환체가 탄화수소 백본의 하나 이상의 탄소 상의 수소를 대체하는 알킬 모이어티를 지칭한다. 그러한 치환체에는 할로젠, 히드록실, 카보닐(예컨대, 카복실, 알콕시카보닐, 포르밀 또는 아실), 티오카보닐(예컨대, 티오에스테르, 티오아세테이트 또는 티오포르메이트), 알콕실, 포스포릴, 포스페이트, 포스포네이트, 포스피네이트, 아미노, 아미도, 아미딘, 이민, 시아노, 니트로, 아지도, 설프히드릴, 알킬티오, 설페이트, 설포네이트, 설파모일, 설펜아미도, 설포닐, 헤테로시클릴, 아르알킬, 또는 방향족 또는 헤테로방향족 모이어티가 포함되지만, 이로 한정되지 않는다.

[0128] 탄소의 개수가 달리 명시되지 않는다면, 본원에서 사용되는 바와 같은 "저급 알킬"은 상기 정의된 바와 같지만, 그 백본 구조 내에 1 내지 10개의 탄소 원자, 보다 바람직하게는 1 내지 6개의 탄소 원자를 갖는 알킬 기를 의미한다. 마찬가지로, "저급 알케닐" 및 "저급 알키닐"은 유사한 사슬 길이를 갖는다. 본 출원 전체를 통해, 바람직한 알킬 기는 저급 알킬이다. 바람직한 실시형태에서, 본원에서 알킬로서 지정되는 치환체는 저급 알킬이다.

[0129] 본 기술분야의 기술자는 탄화수소 사슬 상에 치환된 모이어티가 적절한 경우 그 자체로 치환될 수 있는 것으로 이해할 것이다. 예를 들어, 치환된 알킬의 치환체에는 할로젠, 히드록시, 니트로, 티올, 아미노, 아지도, 이민, 아미도, 포스포릴(포스포네이트 및 포스피네이트 포함), 설포닐(설페이트, 설펜아미도, 설파모일 및 설포네이트 포함) 및 실릴 기뿐만 아니라 에테르, 알킬티오, 카보닐(케톤, 알데하이드, 카복실레이트 및 에스테르 포함), -CF₃, -CN 등이 포함될 수 있다. 시클로알킬은 동일한 방식으로 치환될 수 있다.

[0130] 본원에서 사용되는 바와 같은 "아릴"은 C₅-C₁₀-원 방향족, 헤테로환형, 융합된 방향족, 융합된 헤테로환형, 이방향족, 또는 이헤테로환형 고리 시스템을 지칭한다. 일부 형태에서, 고리 시스템은 3 내지 50개의 탄소 원자를 갖는다. 광범위하게 정의되는 본원에서 사용되는 바와 같은 "아릴"은 0 내지 4개의 헤테로원자를 포함할 수 있는 5-, 6-, 7-, 8-, 9-, 10- 및 24-원 단일 고리 방향족 기를 포함하며, 예를 들어 벤젠, 나프탈렌, 안트라센, 페난트렌, 크리센, 피렌, 코라눌렌, 코로넨, 피롤, 퓨란, 티오펜, 이미다졸, 옥사졸, 티아졸, 트리아졸, 피라졸, 피리딘, 피라진, 피리다진 및 피리미딘 등이 있다. 고리 구조 내에 헤테로원자를 갖는 그러한 아릴 기는 또한 "아릴 헤테로환형" 또는 "헤테로방향족"으로 지칭될 수 있다. 방향족 고리는 하나 이상의 고리 위치에

서 할로젠, 아자이드, 알킬, 아르알킬, 알케닐, 알키닐, 시클로알킬, 히드록실, 알콕실, 아미노(또는 4차화 아미노), 니트로, 설프히드릴, 이미노, 아미도, 포스포네이트, 포스피네이트, 카보닐, 카복실, 실릴, 에테르, 알킬티오, 설프로닐, 설프온아미도, 케톤, 알데하이드, 에스테르, 헤테로시클릴, 방향족 또는 헤테로방향족 모이어티, $-CF_3$, $-CN$; 및 이들의 조합을 포함하지만, 이로 한정되지 않은 하나 이상의 치환체로 치환될 수 있다.

[0131] 용어 "아릴"은 둘 이상의 탄소가 2개의 인접한 고리(즉, "융합된 고리")에 대해 공통인 둘 이상의 환형 고리를 갖고, 여기서 적어도 하나의 고리가 방향족이고, 예를 들어 다른 환형 고리 또는 고리들이 시클로알킬, 시클로알케닐, 시클로알키닐, 아릴 및/또는 헤테로환형일 수 있는 다환형 고리 시스템을 또한 포함한다. 헤테로환형 고리의 예에는 벤즈이미다졸릴, 벤조퓨라닐, 벤조티오퍼라닐, 벤조티오펜닐, 벤즈옥사졸릴, 벤즈옥사졸리닐, 벤즈티아졸릴, 벤즈트리아졸릴, 벤즈테트라졸릴, 벤즈이속사졸릴, 벤즈이소티아졸릴, 벤즈이미다졸리닐, 카바졸릴, 4aH 카바졸릴, 카볼리닐, 크로마닐, 크로메닐, 신놀리닐, 데카히드로퀴놀리닐, 2H,6H-1,5,2-디티아지닐, 디히드로퓨로[2,3-b]테트라히드로퓨란, 퓨라닐, 퓨라자닐, 이미다졸리디닐, 이미다졸리닐, 이미다졸릴, 1H-인다졸릴, 인돌레닐, 인돌리닐, 인돌리지닐, 인돌릴, 3H-인돌릴, 이사티노일, 이소벤조퓨라닐, 이소크로마닐, 이소인다졸릴, 이소인돌리닐, 이소인돌릴, 이소퀴놀리닐, 이소티아졸릴, 이속사졸릴, 메틸렌디옥시페닐, 모르폴리닐, 나프티리디닐, 옥타히드로이소퀴놀리닐, 옥사디아졸릴, 1,2,3-옥사디아졸릴, 1,2,4-옥사디아졸릴, 1,2,5-옥사디아졸릴, 1,3,4-옥사디아졸릴, 옥사졸리디닐, 옥사졸릴, 옥스인돌릴, 피리미디닐, 페난트리디닐, 페난트롤리닐, 페나지닐, 페노티아지닐, 페녹사티닐, 페녹사지닐, 프탈라지닐, 피페라지닐, 피페리디닐, 피페리도닐, 4-피페리도닐, 피페로닐, 프테리디닐, 푸리닐, 피라닐, 피라지닐, 피라졸리디닐, 피라졸리닐, 피라졸릴, 피리다지닐, 피리도옥사졸, 피리도이미다졸, 피리도티아졸, 피리디닐, 피리딜, 피리미디닐, 피롤리디닐, 피롤리닐, 2H-피롤릴, 피롤릴, 퀴나졸리닐, 퀴놀리닐, 4H-퀴놀리지닐, 퀴놀살리닐, 퀴누클리디닐, 테트라히드로퓨라닐, 테트라히드로이소퀴놀리닐, 테트라히드로퀴놀리닐, 테트라졸릴, 6H-1,2,5-티아디아지닐, 1,2,3-티아디아졸릴, 1,2,4-티아디아졸릴, 1,2,5-티아디아졸릴, 1,3,4-티아디아졸릴, 티안트레닐, 티아졸릴, 티에닐, 티에노티아졸릴, 티에노옥사졸릴, 티에노이미다졸릴, 티오펜닐 및 크산테닐이 포함되지만, 이로 한정되지 않는다. 하나 이상의 고리는 "아릴"에 대해 상기 정의된 바와 같이 치환될 수 있다.

[0132] "알콕시"는 지시된 수의 탄소 원자가 산소 가교를 통해 부착되는 상기 정의된 바와 같은 알킬 기를 지칭한다. 알콕시의 예에는 메톡시, 에톡시, n-프로폭시, i-프로폭시, n-부톡시, s-부톡시, n-펜톡시, s-펜톡시 및 이들의 유도체가 포함되지만, 이로 한정되지 않는다.

[0133] 1차 아민은 암모니아 내의 3개의 수소 원자 중 하나가 치환 또는 비치환된 알킬 또는 치환 또는 비치환된 아릴 기로 대체될 때 생성된다. 2차 아민은 2개의 유기 치환체(치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 아릴 또는 이들의 조합)가 하나의 수소와 함께 질소에 결합된다. 3차 아민에서, 질소는 3개의 유기 치환체를 갖는다.

[0134] 본원에서 사용되는 바와 같은 "치환된"은 단량체 상의 하나 이상의 원자 또는 원자들의 기가 대체되는 원자 또는 원자들의 기와 상이한 하나 이상의 원자 또는 원자들의 기로 대체됨을 의미한다. 일부 실시형태에서, 단량체 상의 하나 이상의 수소는 하나 이상의 원자 또는 원자들의 기로 대체된다. 수소를 대체할 수 있는 작용기의 예는 상기 정의에 열거되어 있다. 일부 실시형태에서, 생성된 단량체/중합체의 전하 또는 친수성/소수성 등과 같은 화학적 및/또는 물리적 특성이 다른 하나 이상의 작용기가 첨가될 수 있다. 예시적인 치환체에는 할로젠, 히드록실, 카보닐(예컨대, 카복실, 알콕시카보닐, 포르밀 또는 아실), 티오카보닐(예컨대, 티오에스테르, 티오아세테이트 또는 티오포르메이트), 알콕실, 포스포릴, 포스페이트, 포스포네이트, 포스피네이트, 아미노, 아미도, 아미딘, 이민, 시아노, 니트로, 아지도, 설프히드릴, 알킬티오, 설프에이트, 설프네이트, 설프모일, 설프온아미도, 설프로닐, 니트로, 헤테로시클릴, 아르알킬, 또는 방향족 또는 헤테로방향족 모이어티가 포함되지만, 이로 한정되지 않는다.

[0135] **II. 중합체**

[0136] 폴리(아민-코-에스테르), 폴리(아민-코-아미드), 또는 이들의 조합을 포함하는 중합체, 및 이로부터 형성된 폴리플렉스 및 중실 입자. 폴리(아민-코-에스테르)는 WO 2013/082529, WO 2017/151623, WO 2017/197128, 미국 공개 특허 출원 제2016/0251477호, 미국 공개 특허 출원 제2015/0073041호 및 미국 특허 제9,272,043호에 논의되어 있다.

[0137] 유전자 물질을 전달하는 데 사용될 경우, 중합체의 형질 주입 효율은 중합체 상의 말단 기에 따라 매우 좌우된다. 중합체에서 디에스테르 단량체를 세바스산과 같은 이산으로 치환할 경우, 히드록실과 카복실 말단 기의 혼합을 갖는 중합체가 수득될 수 있다. 이들 말단 기 둘 모두는 1,1'-카보디이미다졸에 의해 활성화될 수 있다.

활성화된 생성물은 아민-함유 분자와 반응하여 새로운 말단 기를 갖는 중합체가 수득될 수 있다.

[0138] 중합체는 추가로 가수분해되어 -OH 및 -COOH와 같은 보다 활성인 말단 기를 방출할 수 있고, 여기서 -OH 및 -COOH 둘 모두는 전형적으로 중합체를, 예를 들어 수일 또는 수주 동안 제어 온도(예를 들어, 37°C 또는 100°C)에서 인큐베이션함으로써 중합체 내의 에스테르 결합의 가수분해(본원에서 "작동"으로도 지칭됨)로부터 기원할 수 있다. 일부 실시형태에서, 중합체는 가수분해되지 않고, 따라서 "비작동됨"으로 지칭될 수 있다.

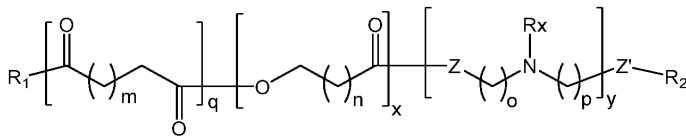
[0139] 일부 실시형태에서, 중합체 내의 소수성 단량체의 함량은 폴리플렉스를 형성하는 데 사용될 경우 동일한 소수성 단량체의 함량에 비해 증가한다. 중합체 내의 소수성 단량체의 함량이 증가하면 RNA를 포함한 핵산의 존재 하에 중실 나노입자를 형성할 수 있는 중합체가 형성된다.

[0140] 폴리플렉스와 달리, 이들 입자는 완충수 또는 혈청에서 인큐베이션하는 동안 또는 동물에 투여(예를 들어, 주사)할 때 장기간 동안 안정하다. 이들은 또한 장기간 활성으로 이어지는(예를 들어, siRNA 매개-녹다운(knockdown)) 핵산(예를 들어, siRNA)의 서방성을 제공한다.

[0141] **A. 중합체 구조**

[0142] 폴리(아민-코-에스테르) 또는 폴리(아민-코-아미드)는 화학식 I에 나타난 구조를 갖는다:

[0143] [화학식 I]



[0144] 식 중, n은 1 내지 30의 정수이고,

[0146] m, o 및 p는 독립적으로 1 내지 20의 정수이고,

[0147] x, y 및 q는 독립적으로 1 내지 1000의 정수이고,

[0148] R_x는 수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 또는 치환 또는 비치환된 아릴, 또는 치환 또는 비치환된 알콕시이고,

[0149] Z 및 Z'는 독립적으로 O 또는 NR'이고, 여기서 R'는 수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 또는 치환 또는 비치환된 아릴이고,

[0150] R₁ 및 R₂는 히드록실 기, 1차 아민 기, 2차 아민 기, 3차 아민 기 또는 이들의 조합을 함유하는 화학적 물질이다.

[0151] R_x 및 R' 기의 예에는 수소, 메틸, 에틸, n-프로필, 이소프로필, n-부틸, t-부틸, 이소부틸, sec-부틸, 시클로헥실, (시클로헥실)메틸, 시클로프로필메틸, 및 이의 동족체 및 이성질체, 예를 들어 n-펜틸, n-헥실, n-헵틸, n-옥틸, 페닐, 나프탈릴, 안트라세닐, 페난트릴, 크리세닐, 피레닐, 톨릴, 자일릴 등이 포함되지만, 이로 한정되지 않는다.

[0152] 특정 실시형태에서, x, y 및/또는 q의 값은 중합체의 중량 평균 분자량이 20,000 달톤 초과, 15,000 달톤 초과, 10,000 달톤 초과, 5,000 달톤 초과, 2,000 달톤 초과인 값이다. 일부 형태에서, 중합체의 중량 평균 분자량은 약 2,000 달톤 내지 약 20,000 달톤, 보다 바람직하게는 약 5,000 달톤 내지 약 10,000 달톤이다.

[0153] 중합체는 하나 이상의 락톤, 하나 이상의 아민-디올(Z 및 Z' = O), 트리아민(Z 및 Z' = NR'), 또는 히드록시-디아민(Z = O 및 Z' = NR', 또는 Z = NR' 및 Z' = O) 및 하나 이상의 이산 또는 디에스테르로부터 제조될 수 있다. 이러한 실시형태에서, 둘 이상의 상이한 락톤, 이산 또는 디에스테르, 및/또는 트리아민, 아민-디올, 또는 히드록시-디아민 단량체가 사용되는 경우, n, o, p, 및/또는 m의 값은 동일하거나 상이할 수 있다.

[0154] 일부 형태에서, 락톤 단위의 조성물%는 락톤 단위 대 (락톤 단위 + 디에스테르/이산)으로 계산될 때 약 10% 내지 약 100%이다. 몰비에 대해 표현할 경우, 락톤 단위 대 (락톤 단위 + 디에스테르/이산) 함량은 약 0.1 내지 약 1이고, 즉 x/(x + q)는 약 0.1 내지 약 1이다. 바람직하게는, 락톤 단위 내의 탄소 원자의 수는 약 10 내지 약 24이고, 보다 바람직하게는 락톤 단위 내의 탄소 원자의 수는 약 12 내지 약 16이다. 가장 바람직하게는, 락톤 단위 내의 탄소 원자의 수는 12(도데칼락톤), 15(펜타데칼락톤), 또는 16(헥사데칼락톤)이다. 일부

형태에서, Z는 Z'와 동일하다.

[0155] 일부 형태에서, Z는 0이고, Z'는 0이다. 일부 형태에서, Z는 NR'이고, Z'는 NR'이다. 일부 형태에서, Z는 0이고, Z'는 NR'이다. 일부 형태에서, Z는 NR'이고, Z'는 0이다.

[0156] 일부 형태에서, Z'는 0이고, n은 1 내지 24의 정수, 예컨대 4, 10, 13 또는 14이다. 일부 형태에서, Z는 또한 0이다.

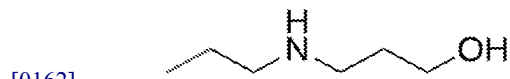
[0157] 일부 형태에서, Z'는 0이고, n은 1 내지 24의 정수, 예컨대 4, 10, 13 또는 14이고, m은 1 내지 10의 정수, 예컨대 4, 5, 6, 7 또는 8이다. 일부 형태에서, Z는 또한 0이다.

[0158] 일부 형태에서, Z'는 0이고, n은 1 내지 24의 정수, 예컨대 4, 10, 13 또는 14이고, m은 1 내지 10의 정수, 예컨대 4, 5, 6, 7 또는 8이고, o 및 p는 1 내지 6의 동일한 정수, 예컨대 2, 3 또는 4이다. 일부 형태에서, Z는 또한 0이다.

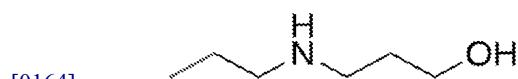
[0159] 일부 실시형태에서, Z'는 0이고, n은 1 내지 24의 정수, 예컨대 4, 10, 13 또는 14이고, m은 1 내지 10의 정수, 예컨대 4, 5, 6, 7 또는 8이고, R은 알킬, 예컨대 메틸, 에틸, n-프로필, 이소프로필, n-부틸, t-부틸, 이소부틸, sec-부틸, 시클로헥실, (시클로헥실)메틸, 시클로프로필메틸, 및 이의 동족체 및 이성질체, 예를 들어 n-펜틸, n-헥실, n-헵틸 및 n-옥틸, 또는 아릴, 예컨대 페닐, 나프탈릴, 안트라세닐, 페난트릴, 크리세닐, 피레닐, 톨릴 또는 자일릴이다. 일부 형태에서, Z는 또한 0이다.

[0160] 일부 형태에서, n은 14(예를 들어, 펜타데칼락톤, PDL)이고, m은 7(예를 들어, 세바스산)이고, o 및 p는 2(예를 들어, N-메틸디에탄올아민, MDEA)이다.

[0161] 일부 실시형태에서, 폴리플렉스 또는 입자는 R1 및/또는 R2가, R1 및/또는 R2가 다음으로 이루어지거나 포함하는 상응하는 폴리플렉스와 관련이 없는 중합체로부터 형성된다:

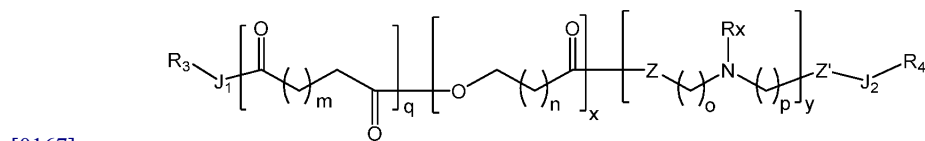


[0163] 일부 실시형태에서, 상기 중합체로부터 형성된 폴리플렉스 또는 입자는 R1 및/또는 R2가 다음으로 이루어지거나 포함하는 상응하는 폴리플렉스에 비해, 핵산 카고, 예컨대 RNA, 보다 특히 mRNA의 개선된 로딩, 개선된 세포 형질 주입, 개선된 세포내 엔도솜 방출 또는 이들의 조합을 나타낸다:



[0165] 일부 형태에서, 중합체는 화학식 II의 구조를 갖는다.

[0166] [화학식 II]



[0168] 식 중, J₁ 및 J₂는 독립적으로 연결 모이어티이거나, 부재하고,

[0169] R₃ 및 R₄는 독립적으로 히드록실 기, 1차 아민 기, 2차 아민 기, 3차 아민 기 또는 이들의 조합을 함유하는 치환된 알킬이다. 일부 형태에서, R₃, R₄ 또는 둘 모두의 분자량은 500 달톤 이하, 200 달톤 이하, 또는 100 달톤 이하이다.

[0170] 일부 형태에서, J₁은 -O- 또는 -NH-이다.

[0171] 일부 형태에서, J₂는 -C(O)NH- 또는 -C(O)O-이다.

[0172] 일부 형태에서, R₃은 R₄와 동일하다.

[0173] 바람직하게는, R₃ 및/또는 R₄는 선형이다.

[0174] 일부 형태에서, R₃, R₄ 또는 둘 모두는 1차 아민 기를 함유한다. 일부 형태에서, R₃, R₄ 또는 둘 모두는 1차 아민 기 및 하나 이상의 2차 또는 3차 아민 기를 함유한다.

[0175] 일부 형태에서, R₃, R₄ 또는 둘 모두는 히드록실 기를 함유한다. 일부 형태에서, R₃, R₄ 또는 둘 모두는 히드록실 기 및 하나 이상의 아민 기, 바람직하게는 2차 또는 3차 아민 기를 함유한다. 일부 형태에서, R₃, R₄ 또는 둘 모두는 히드록실 기를 함유하고, 아민 기를 함유하지 않는다.

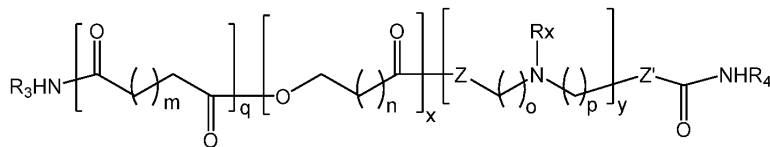
[0176] 일부 형태에서, R₃ 및 R₄ 중 적어도 하나는 히드록실 기를 함유하지 않는다.

[0177] 일부 형태에서, R₃, R₄ 또는 둘 모두는 -비치환된 C₁-C₁₀ 알킬렌-Aq-비치환된 C₁-C₁₀ 알킬렌-Bq, -비치환된 C₁-C₁₀ 알킬렌-Aq-치환된 C₁-C₁₀ 알킬렌-Bq, -치환된 C₁-C₁₀ 알킬렌-Aq-비치환된 C₁-C₁₀ 알킬렌-Bq, 또는 -치환된 C₁-C₁₀ 알킬렌-Aq-치환된 C₁-C₁₀ 알킬렌-Bq이고, 여기서 Aq는 부재하거나, -NR₅-이고, Bq는 히드록실, 1차 아민, 2차 아민 또는 3차 아민이고, R₅는 수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 또는 치환 또는 비치환된 아릴이다.

[0178] 일부 형태에서, R₃, R₄ 또는 둘 모두는 도 1에 나타낸 기로부터 선택된다.

[0179] 일부 형태에서, 중합체는 화학식 III의 구조를 갖는다.

[0180] [화학식 III]



[0181]

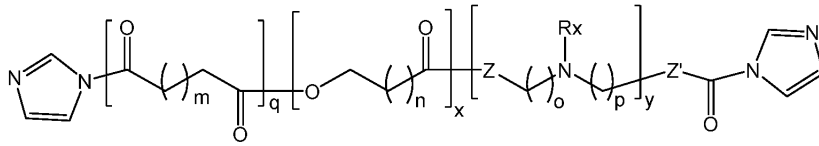
[0182] 단량체 단위는 하나 이상의 위치에서 하나 이상의 치환체로 치환될 수 있다. 예시적인 치환체에는 알킬 기, 환형 알킬 기, 알켄 기, 환형 알켄 기, 알킨, 할로젠, 히드록실, 카보닐(예컨대, 카복실, 알콕시카보닐, 포르밀 또는 아실), 티오카보닐(예컨대, 티오에스테르, 티오아세테이트 또는 티오포르메이트), 알콕실, 포스포릴, 포스페이트, 포스포네이트, 포스피네이트, 아미노, 아미도, 아미딘, 이민, 시아노, 니트로, 아지도, 설프히드릴, 알킬티오, 설페이트, 설포네이트, 설파모일, 설펜아미도, 설포닐, 니트로, 헤테로시클릴, 아르알킬, 또는 방향족 또는 헤테로방향족 모이어티가 포함되지만, 이로 한정되지 않는다.

[0183] 중합체는 생체 적합하다. 다양한 고리 크기를 갖는 쉽게 이용가능한 락톤은 낮은 독성을 갖는 것으로 공지되어 있다: 예를 들어, 작은 락톤, 예컨대 폴리(카프로락톤) 및 폴리(p-디옥산온)으로부터 제조된 폴리에스테르는 임상 응용에서 사용되는 상업적으로 입수가능한 생체 물질이다. 큰(예를 들어, C₁₆-C₂₄) 락톤 및 이들의 폴리에스테르 유도체는 별과 같은 살아있는 유기체에서 확인되는 천연 제품이다. 16 내지 24개의 고리 탄소 원자를 함유하는 락톤이 구체적으로 고려되며 개시된다.

[0184] 일부 형태에서, 중합체는 하나 이상의 활성화된 말단 기(들)를 노출시킴으로써 온도-제어된 가수분해를 통해 추가로 활성화될 수 있다. 하나 이상의 활성화된 말단 기(들)는, 예를 들어 히드록실 또는 카복실산 말단 기일 수 있고, 이들 둘 모두는 중합체 내의 에스테르 결합의 가수분해를 통해 생성될 수 있다. 활성화된 중합체는 약 5 내지 25 kDa, 바람직하게는 약 5 내지 10 kDa의 중량 평균 분자량을 가질 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "약"은 허용가능한 파라미터 내에서의 약간의 변화를 의미한다. 명확성을 위해, "약"은 주어진 값의 ± 10%를 지칭한다. 일부 형태에서, 활성화된 중합체는 한 말단에 R₁ 또는 R₂를 함유하고, 다른 말단에 가수분해를 통해 생성된 히드록실 또는 카복실산 말단 기를 함유한다.

[0185] 일부 형태에서, 중합체는 화학식 IV의 구조를 갖는다.

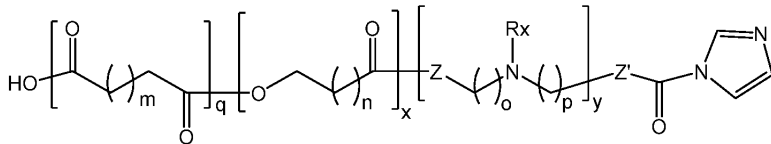
[0186] [화학식 IV]



[0187]

[0188] 일부 형태에서, 중합체는 화학식 V의 구조를 갖는다.

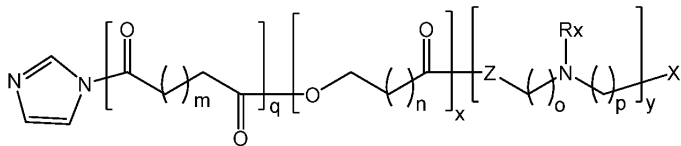
[0189] [화학식 V]



[0190]

[0191] 일부 형태에서, 중합체는 화학식 VI의 구조를 갖는다.

[0192] [화학식 VI]



[0193]

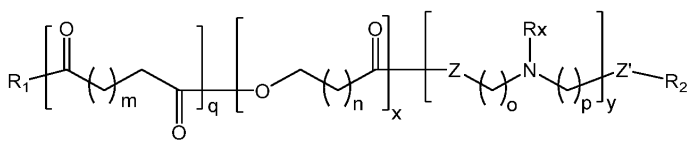
[0194] 식 중, X'는 -OH 또는 -NHR'이다.

[0195] 화학식 VI, V 및 VI은 중간체 생성물의 구조이다. 이들은 화학식 I, II 또는 III의 구조를 갖는 광범위한 중합체를 합성하는 데 사용될 수 있다.

[0196] 폐로의 전달을 포함한 전달에 대해 개선된 특성을 갖는 폴리(아민-코-에스테르) 또는 폴리(아민-코-아미드)가 개발되었다.

[0197] 폴리(아민-코-에스테르) 또는 폴리(아민-코-아미드)는 다음의 구조를 함유한다.

[0198] [화학식 I]



[0199]

[0200] 식 중, n은 1 내지 30의 정수이고,

[0201] m, o 및 p는 독립적으로 1 내지 20의 정수이고,

[0202] x, y 및 q는 독립적으로 1 내지 1000의 정수이고,

[0203] Rx는 수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 또는 치환 또는 비치환된 아릴, 또는 치환 또는 비치환된 알콕시이고,

[0204] Z 및 Z'는 독립적으로 O 또는 NR'이고, 여기서 R'는 수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 또는 치환 또는 비치환된 아릴이고,

[0205] R1 및 R2는 히드록실 기, 1차 아민 기, 2차 아민 기, 3차 아민 기 또는 이들의 조합을 함유하는 화학적 물질이다.

[0206] 일부 형태에서, Z는 Z'와 동일하다.

[0207] 일부 형태에서, Z는 O이고, Z'는 O이다. 일부 형태에서, Z는 NR'이고, Z'는 NR'이다. 일부 형태에서, Z는

0이고, Z'는 NR'이다. 일부 형태에서, Z는 NR'이고, Z'는 0이다.

[0208] 일부 형태에서, Z'는 0이고, n은 1 내지 24의 정수, 예컨대 4, 10, 13 또는 14이다. 일부 형태에서, Z는 또한 0이다.

[0209] 일부 형태에서, Z'는 0이고, n은 1 내지 24의 정수, 예컨대 4, 10, 13 또는 14이고, m은 1 내지 10의 정수, 예컨대 4, 5, 6, 7 또는 8이다. 일부 형태에서, Z는 또한 0이다.

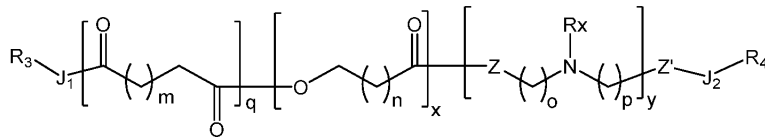
[0210] 일부 형태에서, Z'는 0이고, n은 1 내지 24의 정수, 예컨대 4, 10, 13 또는 14이고, m은 1 내지 10의 정수, 예컨대 4, 5, 6, 7 또는 8이고, o 및 p는 1 내지 6의 동일한 정수, 예컨대 2, 3 또는 4이다. 일부 형태에서, Z는 또한 0이다.

[0211] 일부 실시형태에서, Z'는 0이고, n은 1 내지 24의 정수, 예컨대 4, 10, 13 또는 14이고, m은 1 내지 10의 정수, 예컨대 4, 5, 6, 7 또는 8이고, R은 알킬, 예컨대 메틸, 에틸, n-프로필, 이소프로필, n-부틸, t-부틸, 이소부틸, sec-부틸, 시클로헥실, (시클로헥실)메틸, 시클로프로필메틸, 및 이의 동족체 및 이성질체, 예를 들어 n-펜틸, n-헥실, n-헵틸 및 n-옥틸, 또는 아릴, 예컨대 페닐, 나프탈릴, 안트라세닐, 페난트릴, 크리세닐, 피레닐, 툴릴 또는 자일릴이다. 일부 형태에서, Z는 또한 0이다.

[0212] 일부 형태에서, n은 14(예를 들어, 펜타데칼락톤, PDL)이고, m은 7(예를 들어, 세바스산)이고, o 및 p는 2(예를 들어, N-메틸디에탄올아민, MDEA)이다.

[0213] 일부 형태에서, 중합체는 화학식 II의 구조를 함유한다:

[0214] [화학식 II]



[0215]

식 중, Rx, Z, Z', m, n, o, p, q, x 및 y는 화학식 I에 대해 상기 기재된 바와 같고,

[0217] J1 및 J2는 독립적으로 부재하거나, 연결 모이어티, 예컨대 -C(O)-, -C(O)NH-, -C(O)O-, -O- 및 -NH-이고,

[0218] 화학식 II에서 R3 및 R4는 독립적으로 히드록실 기, 1차 아민 기, 2차 아민 기, 3차 아민 기 또는 이들의 조합을 함유하는 치환된 알킬이다.

[0219] 일부 형태에서, J1은 -O- 또는 -NH-이다.

[0220] 일부 형태에서, J2는 -C(O)-, -C(O)NH- 또는 -C(O)O-이다.

[0221] 일부 형태에서, R3은 R4와 동일하다.

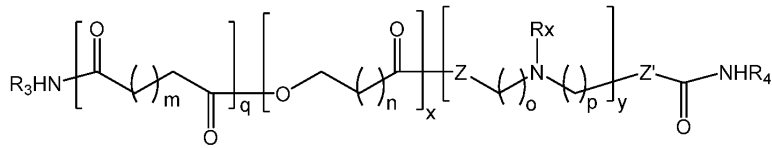
[0222] 바람직하게는, R3 및/또는 R4는 선형이다.

[0223] 일부 형태에서, R3, R4 또는 둘 모두는 히드록실 기를 함유한다. 일부 형태에서, R3, R4 또는 둘 모두는 히드록실 기 및 하나 이상의 아민 기, 바람직하게는 2차 또는 3차 아민 기를 함유한다. 일부 형태에서, R3, R4 또는 둘 모두는 히드록실 기를 함유하고, 아민 기를 함유하지 않는다.

[0224] 일부 형태에서, R3 및 R4 중 적어도 하나는 히드록실 기를 함유하지 않는다.

[0225] 일부 형태에서, 중합체는 화학식 III의 구조를 함유한다:

[0226] [화학식 III]



[0227]

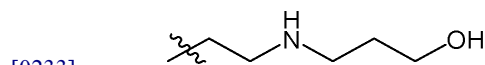
[0228] 식 중, R₃, R₄, Rx, Z, Z', m, n, o, p, q, x 및 y는 화학식 II에 대해 상기 기재된 바와 같다.

[0229] 특정 실시형태에서, x, y 및/또는 q의 값은 중합체의 중량 평균 분자량이 20,000 달톤 초과, 15,000 달톤 초과, 10,000 달톤 초과, 5,000 달톤 초과, 2,000 달톤 초과인 값이다. 일부 형태에서, 중합체의 중량 평균 분자량은 약 2,000 달톤 내지 약 20,000 달톤, 보다 바람직하게는 약 5,000 달톤 내지 약 10,000 달톤이다.

[0230] 중합체는 하나 이상의 락톤, 하나 이상의 아민-디올(Z 및 Z' = O) 또는 트리아민(Z 및 Z' = NR'), 및 하나 이상의 이산 또는 디에스테르로부터 제조될 수 있다. 이러한 실시형태에서, 둘 이상의 상이한 락톤, 이산 또는 디에스테르, 및/또는 트리아민 또는 아민-디올 단량체가 사용되는 경우, n, o, p, 및/또는 m의 값은 동일하거나 상이할 수 있다.

[0231] 일부 실시형태에서, 중합체는 약 2 kDa 내지 20 kDa, 또는 약 2 kDa 내지 약 10 kDa, 또는 약 2 kDa 내지 약 5 kDa이다.

[0232] 폴리(아민-코-에스테르) 또는 폴리(아민-코-아미드)는 하나 이상의 전령 리보핵산이 그 안에 캡슐화되어 있는 폴리플렉스, 마이크로입자 및/또는 나노입자를 형성하는 데 사용될 수 있다. 일부 형태에서, 폴리플렉스 또는 입자는 R₁ 및/또는 R₂가 다음으로 이루어지지 않거나, 포함하지 않는 중합체로부터 형성된다:

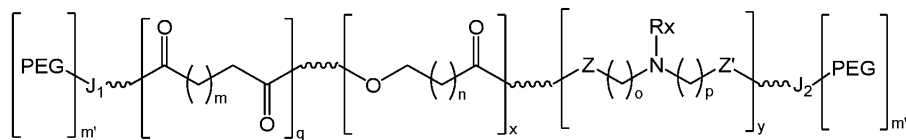


[0233]

[0234] 일부 형태에서, 폴리(아민-코-에스테르) 또는 폴리(아민-코-아미드)는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)에 컨쥬게이트된 폴리(아민-코-에스테르) 또는 폴리(아민-코-아미드)를 함유하는 혼합물, 즉 PEG-컨쥬게이트된 폴리(아민-코-에스테르) 또는 폴리(아민-코-아미드)로 존재한다.

[0235] 일부 형태에서, PEG-컨쥬게이트된 폴리(아민-코-에스테르) 또는 폴리(아민-코-아미드)는 다음의 구조를 함유한다:

[0236] [화학식 XI]



[0237]

[0238] 식 중, m' 및 m"는 독립적으로 0 또는 1이되, 단 m' + m"는 1 또는 2이고,

[0239] 화학식 XI에서 J₁ 및 J₂는 독립적으로 부재하거나, 연결 모이어티, 예컨대 -C(O)-, -C(O)NH-, -C(O)O-, -O- 및 -NH-이다.

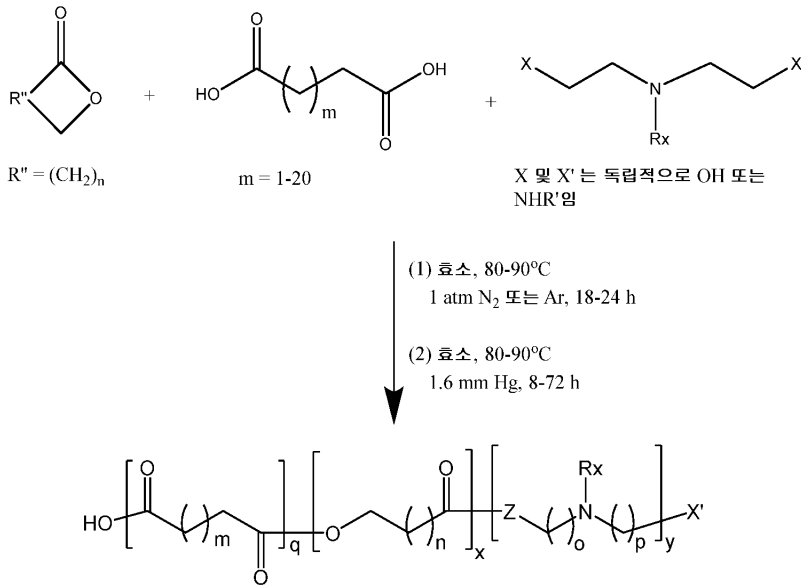
[0240] 화학식 XI의 일부 형태에서, J₁은 -O- 또는 -NH-이다. 화학식 XI의 일부 형태에서, J₂는 -C(O)-, -C(O)NH- 또는 -C(O)O-이다.

[0241] **B. 중합체의 제조 방법**

[0242] 중합체는 일반적으로 합성 중합체로부터 변형된다. 예시적인 합성 중합체에는 락톤, 디알킬산 및 디알킬 아민으로 형성된 폴리(아민-코-에스테르)가 포함된다. 효소 촉매, 예컨대 리파아제를 사용하여 락톤, 디알킬산 및 디알킬 아민으로부터 폴리(아민-코-에스테르)를 합성하는 방법이 또한 제공된다. 예시적인 락톤은 미국 특허 공개 제US20170121454호에 개시되어 있다. 일부 형태에서, 폴리(아민-코-에스테르)는 반응식 1에 나타낸 바와 같이 제조된다:

[0243] [반응식 1]

[0244] 비변형된 폴리(아민-코-에스테르)의 제조



화학식 VII

[0245]

[0246] 단량체의 몰비(예를 들어, 락톤:아미노디올:이산)는, 예를 들어 약 10:90:90 내지 약 90:10:10으로 다양할 수 있다. 일부 실시형태에서, 비는 10:90:90, 20:80:80, 40:60:60, 60:40:40, 또는 80:20:20이다. 좁은 다분산성 폴리스티렌 표준물질을 사용하여 GPC에 의해 결정되는 경우 중량 평균 분자량은, 예를 들어 약 2,000 달톤 내지 약 50,000 달톤, 바람직하게는 약 2,000 달톤 내지 약 20,000 달톤, 보다 바람직하게는 약 5000 달톤 내지 약 20,000 달톤, 가장 바람직하게는 약 5000 달톤 내지 약 10,000 달톤으로 다양할 수 있다.

[0247] 중합체의 소수성은 약 10% 내지 약 100%(계산된 락톤 단위 대 (락톤 단위 + 디에스테르/이산))와 같이 락톤의 비율을 변화시킴으로써 조정될 수 있다. 중합체의 분자량은 약 8 내지 약 72시간과 같이 제2 단계의 반응 시간을 조정함으로써 조정될 수 있다.

[0248] 효소 방법은 다양한 사슬 구조 및 조정가능한 소수성을 갖는 중합체의 합성을 허용한다. 일부 실시형태에서, 소수성은 락톤 단량체의 고리 크기 및/또는 몰량을 변화시킴으로써 달라진다. 넓은 범위의 고리 크기(예를 들어, C₄-C₂₄, 바람직하게는 C₆-C₂₄, 보다 바람직하게는 C₆-C₁₆)를 갖는 락톤이 공단량체로서 사용될 수 있다. 반응은 아미노기(들)의 보호 및 탈보호 없이 단일 단계로 수행될 수 있다. 그러한 아미노-함유 코폴리에스테르는 통상적인 유기금속 촉매를 사용하여 제조하기가 매우 어려운데, 그러한 촉매가 종종 유기 아민에 민감하거나, 그에 의해 탈활성화되기 때문이다. 이러한 촉매는 또한 큰 락톤 고리 단량체를 중합하는 데 비효율적인 것으로 알려져 있다. 효소 촉매는 효소의 높은 활성 및 선택성 및 그 결과 금속-부재인 고 순도의 생성물로 인하여, 생의학 중합체를 생성하는 데 뚜렷한 장점을 갖는다.

[0249] 화학식 IV, V 또는 VI의 구조를 갖는 중합체는 화학식 VII의 비변형된 중합체를 1,1'-카보닐디이미다졸(CDI)과 약 1:10 내지 약 1:60, 바람직하게는 약 1:40의 몰비로 반응시킴으로써 합성될 수 있다.

[0250] 화학식 I 또는 II의 구조를 갖는 중합체는 본 기술분야에 공지된 커플링 반응을 사용하여 화학식 VII의 비변형된 중합체의 말단기를 변형시켜 수득될 수 있다. 예를 들어, 화학식 III의 구조를 갖는 중합체는 (1) 화학식 VII의 비변형된 중합체를 CDI와 반응시켜 화학식 IV의 중합체를 수득하는 단계, 및 (2) 화학식 IV의 중합체를 R₃-NH₂ 및 R₄-NH₂와 반응시키는 단계를 통해 합성될 수 있다. 일부 형태에서, R₃, R₄ 또는 둘 모두는 도 1에 나타난 것으로부터 선택된다. 바람직하게는, R₃ 및 R₄는 동일하다.

[0251] 대안적으로, 화학식 III의 구조를 갖는 중합체는 (1) 화학식 VII의 비변형된 중합체를 CDI와 반응시켜 화학식 V 또는 VI의 중합체를 수득하는 단계, (2) 단계 (1)로부터의 중합체 내의 -COOH 기 또는 -X' 기를 보호하는 단계, (3) 단계 (2)로부터의 보호된 중합체를 R₄-NH₂ 또는 R₃-NH₂와 반응시키는 단계, (4) 단계 (3)으로부터의 중합체

내의 -COOH 기 또는 -X' 기를 탈보호하는 단계, 및 (5) 단계 (4)로부터의 탈보호된 중합체를 R₃-NH₂ 또는 R₄-NH₂ 와 반응시키는 단계를 통해 합성될 수 있다.

- [0252] 화학식 I, II 또는 III의 중합체의 가수분해-매개된 활성화는 30일 이상까지 온도-제어된 방식으로 수행될 수 있다. 가수분해 기간은 활성화되는 중합체의 분자량에 따라 달라질 수 있다. 보다 큰 분자량의 중합체(예를 들어, 약 20 내지 25 kDa)는 보다 긴 기간, 예를 들어 약 30 내지 40일 동안 최적으로 가수분해된다. 보다 작은 분자량의 중합체(예를 들어, 약 5 내지 7 kDa)는 보다 짧은 기간, 예를 들어 약 4 내지 10일 동안 최적으로 가수분해된다.
- [0253] 일부 형태에서, 중합체는 약 30°C 내지 42°C, 또는 약 100°C까지의 범위 내의 임의의 온도에서 가수분해된다. PACE 중합체는 약 35°C 내지 40°C, 예를 들어 약 37°C의 온도에서 가수분해될 수 있다.
- [0254] 일부 형태에서, 중합체는, 예를 들어 약 1 atm에서 가수분해된다. 보다 높은 압력은 상기 방법을 가속화시킨다 (예를 들어, 약 1 내지 약 100 atm의 압력). 제조되는 특정 제형에 대한 상기 방법의 속도는 본 기술분야의 기술자에 의해 결정될 것이다.
- [0255] 생성된 가수분해 생성물의 중량 평균 분자량은 약 5 kDa 내지 약 25 kDa, 바람직하게는 약 5 내지 약 10 kDa로 다양할 수 있다.
- [0256] 바람직하게는, 중합체 내의 하나 이상의 에스테르 결합이 가수분해된다. 가수분해 생성물은 한 말단에 R₁ 또는 R₂를 갖고, 다른 말단에 가수분해를 통해 생성된 카복실 또는 히드록실 기를 가질 수 있다.
- [0257] PEG-컨쥬게이트된 폴리(아민-코-에스테르) 또는 폴리(아민-코-아미드)는 (i) 락톤, (ii) 이산/디에스테르, 및 (iii) 아민 디올 및/또는 트리아민 외에도, 말단 카복실, 히드록실 또는 아민 기를 함유하는 PEG가 반응물에 첨가될 수 있다는 것을 제외하고는, 반응식 1에 기재된 바와 유사한 조건 하에 합성될 수 있다.
- [0258] **III. 중합체로부터 형성된 마이크로입자**
- [0259] 중합체는 하나 이상의 치료제, 진단제 또는 예방제가 그 안에 캡슐화되어 있는 마이크로입자 및/또는 나노입자를 제조하는 데 사용될 수 있다. 상기 작용제는 입자 내에 캡슐화되거나, 입자를 형성하는 중합체 매트릭스 내에 분산되거나, 입자의 표면에 공유 또는 비공유적으로 결합되거나, 또는 이들의 조합일 수 있다.
- [0260] 다른 실시형태에서, 중합체는 생체 적합하고, 생분해성이다. 입자에 의해 캡슐화되고/되거나 입자와 결합되는 핵산(들)은 중합체성 매트릭스의 확산 및 분해를 포함한 여러 메커니즘을 통해 방출될 수 있다. 방출 속도는 중합체의 단량체 조성 및 이에 따른 분해 속도를 변화시킴으로써 제어될 수 있다. 예를 들어, 간단한 가수분해가 분해의 주요 메커니즘인 경우, 중합체의 소수성을 증가시켜 분해 속도를 지연시킬 수 있고, 이에 따라 방출 기간을 증가시킬 수 있다. 모든 경우에, 중합체 조성물은 유효량의 핵산(들)이 방출되어 원하는 목적/결과를 달성하도록 선택된다.
- [0261] 중합체는 임의의 다양한 치료제, 예방제 또는 진단제를 캡슐화하거나, 그와 혼합되거나, 그와 이온적으로 또는 공유적으로 커플링되기 위해 사용될 수 있다. 중합체에 의해 부위로 전달되거나 생체 부착, 세포 부착, 세포 성장 향상, 박테리아 성장 억제 및 응고 형성 방지와 같은 특성을 중합체에 부여하기 위해 광범위한 생물학적 활성 물질이 캡슐화되거나 혼입될 수 있다.
- [0262] 일부 형태에서, 캡슐화되어 전달되는 작용제는 소 분자 작용제(예를 들어, 분자량이 2,000, 1500, 1,000, 750, 또는 500 달톤 미만인 비중합체성 작용제) 또는 거대분자(예를 들어, 올리고머 또는 중합체), 예컨대 단백질, 펩타이드, 핵산 등일 수 있다. 적합한 소 분자 활성화제는 유기, 무기 및/또는 유기금속 화합물을 포함한다. 입자는 작용제의 *생체내* 및/또는 *시험관내* 전달을 위해 사용될 수 있다.
- [0263] 적합한 치료제 및 예방제의 예에는 치료 활성, 예방 활성 또는 진단 활성을 갖는 합성 무기 및 유기 화합물, 단백질 및 펩타이드, 다당류 및 다른 당, 지질, 및 DNA 및 RNA 핵산 서열이 포함된다. 핵산 서열은 유전자, 상보성 DNA에 결합되어 전사를 억제하는 안티센스 분자, 및 리보자임을 포함한다. 예를 들어, 100 내지 500,000 그램/몰 이상의 광범위한 분자량을 갖는 화합물이 캡슐화될 수 있다. 적합한 물질의 예에는 단백질, 예컨대 항체, 수용체 리간드, 및 효소, 펩타이드, 예컨대 부착 펩타이드, 당류 및 다당류, 합성 유기 또는 무기 약물, 및 핵산이 포함된다. 캡슐화될 수 있는 물질의 예에는 효소, 혈액 응고 인자, 억제제 또는 응고 용해제, 예컨대 스트렙토키나아제 및 조직 플라스미노겐 활성화제; 면역화를 위한 항원; 호르몬 및 성장 인자; 헤파린과 같은 다당류; 올리고뉴클레오타이드, 예컨대 안티센스 올리고뉴클레오타이드 및 리보자임 및 유전자 치료에서 사용하기

위한 레트로바이러스 벡터가 포함된다. 중합체는 또한 세포 및 조직을 캡슐화하는 데 사용될 수 있다.

[0264] 입자에 혼입될 수 있는 예시적인 치료제에는 중앙 항원, CD4+ T-세포 에피토프, 사이토카인, 화학치료제, 방사성 핵종, 소 분자 신호 전달 억제제, 광열 안테나, 단클론 항체, 면역학적 위험 신호 전달 분자, 다른 면역치료제, 효소, 항생제, 항바이러스제(특히, 프로테아제 억제제 단독 또는 HIV 또는 B형 또는 C형 간염 치료를 위한 뉴클레오시드와의 조합), 항기생충제(연충, 원충), 성장 인자, 성장 억제제, 호르몬, 호르몬 길항제, 항체 및 이의 생활성 단편(인간화, 단일 사슬 및 키메라 항체 포함), 항원 및 백신 제형(보조제 포함), 펩타이드 약물, 항염증제, 면역조절제(톨(Toll)-유사 수용체에 결합하여 선천성 면역 시스템을 활성화시키는 리간드, 적응 면역 시스템을 동원하고 최적화하는 분자, 세포독성 T 림프구, 자연 살해 세포 및 보조 T 세포의 작용을 활성화하거나 상향 조절하는 분자, 및 저해제 또는 조절 T 세포를 탈활성화하거나 하향 조절하는 분자 포함), 세포로의 입자 흡수를 촉진하는 작용제(수지상 세포 및 다른 항원 제시 세포 포함), 기능성 식품, 예컨대 비타민, 및 올리고뉴클레오타이드 약물(DNA, RNA, 안티센스, 앵타머, 작은 간섭 RNA, 리보자임, 리보뉴클레아제 P에 대한 외부 가이드 서열, 및 트리플렉스(triplex) 형성제 포함)이 포함되지만, 이로 한정되지 않는다.

[0265] 대표적인 항암제에는 알킬화제(예컨대, 시스플라틴, 카보플라틴, 옥살리플라틴, 메클로르에타민, 시클로포스파미드, 클로람부실, 다카바진, 로무스틴, 카무스틴, 프로카바진, 클로람부실 및 이포스파미드), 항대사물질(예컨대, 플루오로우라실(5-FU), 젬시타빈, 메토트렉세이트, 시토신 아라비노사이드, 플루다라빈 및 플록스우리딘), 항유사분열제(탁산, 예컨대 파클리탁셀 및 데세탁셀 및 빈카 알칼로이드, 예컨대 빈크리스틴, 빈블라스틴, 비노렐빈 및 빈데신 포함), 안트라시클린(독소루비신, 다우노루비신, 발루비신, 이다루비신 및 에피루비신뿐만 아니라 악티노마이신, 예컨대 악티노마이신 D 포함), 세포독성 항생제(미토마이신, 플리카마이신 및 블레오마이신 포함), 토포이소머라제 억제제(캄프토테신, 예컨대 캄프토테신, 이리노테칸 및 토포테칸뿐만 아니라 에피도도필로톡신의 유도체, 예컨대 암사크린, 에토포사이드, 에토포사이드 포스페이트 및 테니포사이드 포함), 혈관 내피 성장 인자(VEGF)에 대한 항체, 예컨대 베바시주맙(AVASTIN®), 다른 항-VEGF 화합물; 탈리도마이드(THALOMID®) 및 이의 유도체, 예컨대 레날리도마이드(REVLIMID®); 엔도스타틴; 안지오스타틴; 수용체 티로신 키나아제(RTK) 억제제, 예컨대 수니티닙(SUTENT®); 티로신 키나아제 억제제, 예컨대 소라페닙(Nexavar®), 엘로티닙(Tarceva®), 파조파닙, 악시티닙 및 라파티닙; 형질전환 성장 인자- α 또는 형질전환 성장 인자- β 억제제, 및 표피 성장 인자 수용체에 대한 항체, 예컨대 파니투무맙(VECTIBIX®) 및 세특시맙(ERBITUX®)이 포함되지만, 이로 한정되지 않는다.

[0266] 예시적인 면역조절제에는 사이토카인, 크산틴, 인터류킨, 인터페론, 올리고데옥시뉴클레오타이드, 글루칸, 성장 인자(예를 들어, TNF, CSF, GM-CSF 및 G-CSF), 호르몬, 예컨대 에스트로겐(디에틸stil베스트롤, 에스트라디올), 안드로겐(테스토스테론, HALOTESTIN®(플루옥시메스테론)), 프로게스틴(MEGACE®(메게스트롤 아세테이트), PROVERA®(메드록시프로게스테론 아세테이트)), 및 코르티코스테로이드(프레드니손, 텍사메타손, 히드로코르티손)가 포함된다.

[0267] 입자와 결합될 수 있는 면역 보조제의 예에는 TLR 리간드, C-유형 렉틴 수용체 리간드, NOD-유사 수용체 리간드, RLR 리간드, 및 RAGE 리간드가 포함되지만, 이로 한정되지 않는다. TLR 리간드는 지질다당류(LPS) 및 이의 유도체뿐만 아니라, 모노포스포릴 지질 A(MPL), 글리코피라노실 지질 A, PET-지질 A, 및 3-O-데사실-4'-모노포스포릴 지질 A를 포함하지만, 이로 한정되지 않은, 지질 A 및 이의 유도체를 포함할 수 있다.

[0268] 입자는 또한 항원 및/또는 보조제(즉, 면역 반응 향상 분자)를 포함할 수 있다. 펩타이드, 단백질 및 DNA 기반 백신을 사용하여 다양한 질병 또는 병태에 대한 면역을 유도할 수 있다. 바이러스-감염된 세포를 감지하여 파괴하기 위해 세포-매개된 면역가 필요하다. 가장 전통적인 백신(예를 들어, 단백질 기반 백신)은 오직 체액 면역만을 유도할 수 있다. DNA 기반 백신이 체액 및 세포-매개된 면역 둘 모두를 유도할 수 있기 때문에 DNA 기반 백신은 바이러스 또는 기생충에 대한 백신을 접종하는 독특한 수단을 나타낸다. 또한, DNA 기반 백신은 전통적인 백신보다 잠재적으로 더 안전하다. DNA 백신은 제조 및 저장에 대해 상대적으로 더 안정하고 더 비용 효율적이다. DNA 백신은 2개의 주요 성분, 즉 DNA 담체(또는 전달 비히클) 및 DNA 암호화 항원으로 이루어진다. DNA 담체는 DNA를 분해로부터 보호하고, 효율적인 수준으로 특정 조직 또는 세포로의 DNA 진입 및 발현을 촉진할 수 있다.

[0269] 대표적인 진단제는 x선, 형광, 자기 공명 영상, 방사능, 초음파, 컴퓨터 단층촬영(CT), 및 양전자 방출 단층촬영(PET)에 의해 검출가능한 작용제이다. 초음파 조영제는 전형적으로 가스, 예컨대 공기, 산소 또는 퍼플루오로탄소이다. 예시적인 진단제에는 상자성 분자, 형광 화합물, 자성 분자 및 방사성 핵종, 및 x선 영상화제가 포함된다.

- [0270] 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 방법을 사용하여 생성된 입자는 80 중량% 미만, 75 중량% 미만, 70 중량% 미만, 60 중량% 미만, 50 중량% 미만, 40 중량% 미만, 30 중량% 미만, 20 중량% 미만, 15 중량% 미만, 10 중량% 미만, 5 중량% 미만, 1 중량% 미만, 0.5 중량% 미만, 또는 0.1 중량% 미만의 상기 작용제를 함유한다. 일부 실시형태에서, 작용제는 약제학적 활성제의 혼합물일 수 있다. 로딩%는 캡슐화되는 작용제, 입자를 제조하는 데 사용되는 중합체, 및 입자를 제조하는 데 사용되는 방법을 포함한 다양한 인자에 따라 좌우된다.
- [0271] 입자는 약물의 제어된 방출을 제공할 수 있다. 예를 들어, 변형되지 않은 입자는 입자로부터 약물의 확산 속도 및/또는 중합체의 분해 속도를 기준으로 시간 경과에 따른 유효량의 약물 방출을 제공할 수 있다. 중합체 조성물은 중합체의 분해 거동 및 이에 따라 전달될 작용제의 방출 속도/시간을 조종하도록 달라질 수 있다. 대안적으로, 입자는 전달될 작용제 또는 작용제들의 제어된 방출, 예컨대 서방성 또는 지연 방출을 제공하도록 하나 이상의 물질로 코팅될 수 있다.
- [0272] 서방성 물질 및 지연 방출 물질은 본 기술분야에 널리 알려져 있다. 리파아제에 의해 가수분해되는 지방산의 고체 에스테르는 마이크로입자 또는 약물 입자 상으로 분무 코팅될 수 있다. 제인(zein)은 수불용성 천연 단백질의 예이다. 이는 분무 코팅 또는 습윤 과립화 기술에 의해 약물 함유 마이크로입자 또는 약물 입자 상으로 코팅될 수 있다. 수불용성 천연 물질 외에도, 소화 효소의 일부 기질을 가교 결합 절차에 따라 처리하여 불용성 네트워크를 형성할 수 있다. 화학적 수단 및 물리적 수단 둘 모두에 의해 단백질을 가교 결합하는 많은 방법이 보고되었다. 가교 결합을 얻기 위한 가장 통상적인 방법 중 하나는 화학적 가교결합제의 사용이다. 화학적 가교결합제의 예에는 알데하이드(글루테르알데하이드 및 포르말데하이드), 에폭시 화합물, 카보다이미드 및 게니핀이 포함된다. 이러한 가교결합제 외에도, 산화된 당 및 천연 당이 젤라틴을 가교 결합하는 데 사용되어 왔다. 가교 결합은 또한 효소적 수단을 사용하여 달성될 수 있고; 예를 들어 트랜스글루타미나아제가 해산물을 가교 결합하기 위한 GRAS 물질로서 승인되었다. 마지막으로, 열 처리, UV 조사 및 감마 조사와 같은 물리적 수단에 의해 가교 결합이 개시될 수 있다.
- [0273] 약물 함유 마이크로입자 또는 약물 입자 주변에 가교 결합 단백질의 코팅 층을 생성하기 위해, 수용성 단백질이 마이크로입자 상으로 분무 코팅된 후, 상기 기재된 방법 중 하나에 의해 가교 결합될 수 있다. 대안적으로, 약물 함유 마이크로입자는 코아세르베이션-상 분리(예를 들어, 염 첨가에 의해)에 의해 단백질 내에 마이크로캡슐화된 후 가교 결합될 수 있다. 이러한 목적에 적합한 일부 단백질에는 젤라틴, 알부민, 카제인 및 글루텐이 포함된다.
- [0274] 다당류는 또한 가교 결합되어 수불용성 네트워크를 형성할 수 있다. 많은 다당류의 경우, 이는 칼슘 염 또는 다가 양이온과의 반응에 의해 달성되어, 주요 중합체 사슬을 가교 결합할 수 있다. 다가 양이온의 존재 하에 펙틴, 알기네이트, 텍스트란, 아밀로오스 및 구아 검이 가교 결합된다. 반대되는 전하를 띤 다당류들 간의 복합체가 또한 형성될 수 있고; 예를 들어, 펙틴 및 키토산이 정전기 상호작용을 통해 복합체화될 수 있다.
- [0275] 본 기술분야에 공지된 제어된 방출 중합체에는 아크릴산 및 메타크릴산 공중합체, 메틸 메타크릴레이트, 메틸 메타크릴레이트 공중합체, 에톡시에틸 메타크릴레이트, 시아노에틸 메타크릴레이트, 아미노알킬 메타크릴레이트 공중합체, 폴리(아크릴산), 폴리(메타크릴산), 메타크릴산 알킬아민 공중합체 폴리(메틸 메타크릴레이트), 폴리(메타크릴산)(무수물), 폴리메타크릴레이트, 폴리아크릴아미드, 폴리(메타크릴산 무수물), 및 글리시딜 메타크릴레이트 공중합체가 포함된다.
- [0276] 바람직한 특정 실시형태에서, 아크릴 중합체는 하나 이상의 암모니오 메타크릴레이트 공중합체로 구성된다. 암모니오 메타크릴레이트 공중합체가 본 기술분야에 널리 알려져 있고, 이는 저 함량의 4차 암모늄 기를 갖는 아크릴산과 메타크릴산 에스테르의 완전 중합된 공중합체로서 NF XVII에 기재되어 있다.
- [0277] 하나의 바람직한 실시형태에서, 아크릴 중합체는 상표명 EUDRAGIT®로 Rohm Pharma로부터 상업적으로 입수가 가능한 것과 같은 아크릴 수지 래커(lacquer)이다. 추가의 바람직한 실시형태에서, 아크릴 중합체는 각각 상표명 EUDRAGIT® RL30D 및 EUDRAGIT® RS30D로 Rohm Pharma로부터 상업적으로 입수가 가능한 2개의 아크릴 수지 래커의 혼합물을 포함한다. EUDRAGIT® RL30D 및 EUDRAGIT® RS30D는 저 함량의 4차 암모늄 기를 갖는 아크릴산과 메타크릴산 에스테르의 공중합체로서, 암모늄 기 대 나머지 중성 (메트)아크릴산 에스테르의 몰비는 EUDRAGIT® RL30D에서 1:20이고, EUDRAGIT® RS30D에서 1:40이다. 평균 분자량은 약 150,000이다. EUDRAGIT® S-100 및 EUDRAGIT® L-100이 또한 바람직하다. 코드 명칭 RL(고 침투성) 및 RS(저 침투성)는 이러한 작용제의 침투성을 지칭한다. EUDRAGIT® RL/RS 혼합물은 물 및 소화액에서 불용성이다. 그러나, 이들을 포함하도록 형성된 멀티미립자 시스템은 수용액 및 소화액에서 팽윤될 수 있고 침투될 수 있다.

[0278] EUDRAGIT® RL/RS와 같은 중합체는 궁극적으로 바람직한 용해 프로파일을 갖는 서방성 제형을 수득하기 위해 임의의 원하는 비율로 함께 혼합될 수 있다. 예를 들어, 100% EUDRAGIT®RL, 50% EUDRAGIT®RL과 50% EUDRAGIT®RS, 및 10% EUDRAGIT® RL과 90% EUDRAGIT®RS로부터 바람직한 서방성 멀티미립자 시스템이 수득될 수 있다. 본 기술분야의 기술자는 예를 들어, EUDRAGIT®L과 같은 다른 아크릴 중합체를 또한 사용할 수 있음을 이해할 것이다.

[0279] 다른 제어된 방출 물질에는 메틸 아크릴레이트-메틸 메타크릴레이트, 폴리비닐 클로라이드 및 폴리에틸렌이 포함된다. 친수성 중합체에는 셀룰로오스 중합체, 예컨대 메틸 및 에틸 셀룰로오스, 히드록시알킬셀룰로오스, 예컨대 히드록시프로필-셀룰로오스, 히드록시프로필메틸셀룰로오스, 나트륨 카복시메틸셀룰로오스, 및 Carbopol® 934, 폴리에틸렌 옥사이드 및 이들의 혼합물이 포함되지만, 이로 한정되지 않는다. 지방 화합물에는 카나우바 왁스 및 글리세릴 트리스테아레이트와 같은 다양한 왁스 및 수소화 피마자유 또는 수소화 식물성 오일 또는 이들의 혼합물을 포함한 왁스 유형의 물질이 포함되지만, 이로 한정되지 않는다.

[0280] 지연 방출을 달성하는 데 적합한 코팅 물질에는 셀룰로오스 중합체, 예컨대 히드록시프로필 셀룰로오스, 히드록시에틸 셀룰로오스, 히드록시메틸 셀룰로오스, 히드록시프로필 메틸 셀룰로오스, 히드록시프로필 메틸 셀룰로오스 아세테이트 석시네이트, 히드록시프로필메틸 셀룰로오스 프탈레이트, 메틸셀룰로오스, 에틸 셀룰로오스, 셀룰로오스 아세테이트, 셀룰로오스 아세테이트 프탈레이트, 셀룰로오스 아세테이트 트리멜리테이트 및 카복시메틸셀룰로오스 나트륨; 아크릴산 중합체 및 공중합체, 바람직하게는 아크릴산, 메타크릴산, 메틸 아크릴레이트, 에틸 아크릴레이트, 메틸 메타크릴레이트 및/또는 에틸 메타크릴레이트, 및 EUDRAGIT® L30D-55 및 L100-55(pH 5.5 이상에서 가용성), EUDRAGIT® L-100(pH 6.0 이상에서 가용성), EUDRAGIT® S(높은 등급의 에스테르화 겔 과로서, pH 7.0 이상에서 가용성), 및 EUDRAGITS® NE, RL 및 RS(상이한 등급의 침투성 및 확장성을 갖는 수불용성 중합체)를 포함한, 상표명 EUDRAGIT®(Rohm Pharma; 독일 베스터슈테데 소재)로 상업적으로 입수가능한 다른 메타크릴산 수지로부터 형성된 것; 비닐 중합체 및 공중합체, 예컨대 폴리비닐 피롤리돈, 비닐 아세테이트, 비닐아세테이트 프탈레이트, 비닐아세테이트 크로톤산 공중합체, 및 에틸렌-비닐 아세테이트 공중합체; 효소적으로 분해가능한 중합체, 예컨대 아조 중합체, 펙틴, 키토산, 아밀로오스 및 구아 검; 제인 및 셀락이 포함되지만, 이로 한정되지 않는다.

[0281] **A. 폴리뉴클레오타이드의 형질 주입을 위한 조성물**

[0282] 다가양이온성 중합체의 유전자 전달 능력은 중합체 분자량, 소수성 및 전하 밀도를 포함한 여러 인자에 기인하는 것으로 발견되었다. 많은 합성 다가양이온성 물질이 비바이러스 유전자 전달을 위한 벡터로서 시험되었지만, 거의 모두는 그 낮은 효율 또는 높은 독성으로 인해 비효과적이다. 상기 기재된 대부분의 다가양이온성 벡터는 높은 전하 밀도를 나타내며, 이는 효과적인 DNA 응축을 위한 주요 요건으로 간주되었다. 결과적으로, 이들은 *시험관내*에서 높은 효율로 유전자를 전달할 수 있지만, 과량의 전하 밀도와 관련한 독성으로 인해 *생체내* 응용에 대해서는 제한된다.

[0283] 고 분자량 중합체, 특히 삼원공중합체, 및 락톤의 디알킬 디에스테르 및 아미노 디올과의 효소 촉매된 공중합을 사용하여 이를 제조하는 방법이 개시된다. 이러한 폴리(아민-코-에스테르) 삼원공중합체는 저 전하 밀도를 갖는다. 또한, 이들의 소수성은 특정 고리 크기를 갖는 락톤 공단량체를 선택함으로써 그리고 중합체 내의 락톤 함량을 조정함으로써 달라질 수 있다. 락톤-디에스테르-아미노 디올 삼원공중합체의 고 분자량 및 증가된 소수성은 저 전하 밀도를 보상하여 최소 독성으로 효율적인 유전자 전달을 제공한다.

[0284] 바람직한 실시형태에서, 삼원공중합체는 감소된 독성으로 효율적인 유전자 전달을 나타낸다. 삼원공중합체는 유의적으로 보다 효율적인 상업적으로 입수가능한 비바이러스 벡터일 수 있다. 예를 들어, 삼원공중합체는 루시퍼라아제 발현 분석에 기반하여 PEI 및 LIPOFECTAMINE® 2000과 같은 상업적으로 입수가능한 비바이러스 벡터보다 100x 초과로 더 효율적일 수 있는 한편, 상업적으로 입수가능한 이러한 비바이러스 벡터와 비교하여 0.5 mg/ml 이하의 독성 용량에서 최소 독성을 나타낸다. 바람직하게는, 삼원공중합체는 핵산의 *시험관내* 및 *생체내* 형질 주입 둘 모두에 적합한 농도에서 비독성이다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 삼원공중합체는 세포 형질 주입의 다른 접근과 비교하여 비특이적 세포 사멸을 덜 유발한다.

[0285] 하기에서 보다 상세하게 기재된 바와 같이, 일부 실시형태에서, 삼원공중합체는 20% PDL(삼원공중합체 III-20% PDL로도 지칭됨)을 함유하는 ω-펜타데칼락톤-디에틸 세바케이트-N- 메틸디에탄올아민 삼원공중합체이다.

[0286] **IV. 중합체로부터 형성된 미셀**

[0287] **A. 미셀 특성**

[0288] 1. 미셀 크기

[0289] PEG-블록 함유 중합체와 같은 중합체는 미셀을 제조하는 데 사용될 수 있다. 평균 미셀 크기는 전형적으로 약 100 내지 약 500 nm, 바람직하게는 약 100 내지 약 400 nm, 보다 바람직하게는 약 100 내지 약 300 nm, 보다 바람직하게는 약 150 내지 약 200 nm, 가장 바람직하게는 약 160 내지 약 190 nm의 범위이고, 이는 혈청 단백질의 존재 하에 생리학적 pH 7.4에서 안정하였다. 공중합체는 높은 혈액 적합성을 갖고, 용혈 및 응집을 유도하도록 최소 활성을 나타낸다.

[0290] 2. 표면 전하

[0291] 미셀의 크기 및 제타 전위는 미셀을 수용하는 수성 매질의 pH가 달라질 때 유의적으로 변하는 것으로 발견되었다. 예를 들어, 크기-pH 및 제타-pH 곡선의 추세는 상이한 PDL 함량(11%, 30% 및 51%)을 갖는 3개의 PEG2K-PPMS 공중합체의 미셀에 대해 놀랍도록 유사하다. 미셀 샘플의 평균 크기는 매질 pH가 7.4로부터 5.0으로 감소될 때 점차적으로 증가하여, pH 값이 5.0 미만일 때 거의 일정하게 유지되는 것이 명백하다. 미셀에 대해 관찰되는 이러한 pH-반응성 거동은 pH가 7.4로부터 5.0으로 감소될 때 예상되며, 미셀의 PPMS 코어는 양성자화되고 보다 친수성이며, 따라서 수성 매질로부터 보다 많은 물 분자를 흡수하여 미셀의 팽윤을 유발한다. 미셀 코어는 pH 5.0에서 이미 완전히 양성자화되고, 결과적으로 미셀의 크기는 pH가 5.0으로부터 더욱 감소함에 따라 제법 일정하게 유지된다. PEG2K-PPMS 공중합체 내의 PDL 함량이 pH 7.4 내지 5.0 값에서 미셀 크기 변화 규모에 미치는 효과가 또한 주목할 만하다. 공중합체에서 PDL 함량이 감소하고, 3차 아미노 기 함량이 증가함에 따라, 양성자 및 물 분자를 흡수하는 미셀 코어의 능력이 증가하는 것으로 예상된다. 따라서, pH가 7.4로부터 5.0까지 감소할 때, 평균 미셀 크기 변화는 PEG2K-PPMS-30%PDL(184 nm 내지 214 nm) 및 PEG2K-PPMS-51%PDL(163 nm 내지 182 nm)과 비교할 경우, PEG2K-PPMS-11%PDL(200 nm 내지 234 nm)에 대해 보다 유의적이었다(도 5a).

[0292] 수성 매질에서 미셀의 제타 전위는 또한 상당한 pH-의존성을 나타낸다. 생리학적 및 알칼리성 pH(7.4 내지 8.5)에서, 블랭크 PEG2K-PPMS 공중합체 미셀의 표면 전하는 음성이었지만, 이는 매질의 pH가 산성 범위(4.0 내지 6.0)로 감소할 때 양성으로 변화하였다. 예를 들어, PEG2K-PPMS-11%PDL, PEG2K-PPMS-30%PDL, 및 PEG2K-PPMS-51%PDL의 미셀은 pH 7.4에서 각각 -5.8, -7.1, -5.1 mV의 제타 전위 값을 가졌고, 이는 보다 낮은 pH 5.0에서 대응하여 +7.6, +5.8, +4.0 mV로 변화하였다. 상기 논의를 기준으로, pH에 대한 이러한 표면 전하 의존성은 상이한 매질 pH에서 미셀의 PPMS 코어의 양성자화 또는 탈양성자화에 기인할 수 있다. 알칼리성 pH(7.4 내지 8.5)에서, 미셀 내의 아미노 기 대부분은 아마도 양성자화되지 않고, 미셀 입자는 미셀에 의한 PBS 중의 HPO₄²⁻ 및/또는 H₂PO₄⁻ 음이온의 흡수로 인해 여전히 음으로 하전된다. 특히, pH 8.5에서, 제타-전위 값은 PEG2K-PPMS-11%PDL, PEG2K-PPMS-30%PDL, 및 PEG2K-PPMS-51%PDL에 대해 각각 -8.1 mV, -7.9 mV, -9.0 mV이었다. pH가 7.4로부터 5.0으로 감소될 때, 미셀 PPMS 코어 중의 3차 아미노 모이어티는 대부분 양성자화되고, 미셀은 양으로 하전된 입자로 변한다. 일관되게, 3개의 미셀 샘플 중에서, 양성자를 흡수하기에 가장 큰 능력을 갖는 PEG2K-PPMS-11%PDL 미셀은 pH 4.0 내지 5.0에서 가장 큰 제타 전위 값을 나타내었지만, 가장 작은 양성자화 능력을 갖는 PEG2K-PPMS-51%PDL 미셀은 가장 낮은 제타 전위를 나타내었다. 매질 pH에 대한 관찰된 미셀 표면 전하 반응은 생리학적 pH에서 미셀의 음의 표면 전하가 혈액 내의 혈청 단백질과 미셀의 상호작용을 완하시키고, 생체내 순환 시간을 연장시킬 수 있기 때문에 매우 바람직하다. 반면에, 대략 6.5의 중앙 세포의 pH에서 양의 표면 전하로의 반전은 표적 중앙 세포에 의해 이러한 미셀의 흡수를 향상시킬 수 있다.

[0293] 입자/미셀의 표면 전하는 PBS 용액(0.01 M, pH = 7.4)에서 약한 음성이며, 이는 미셀의 생체내 약물 전달 응용에 대해 유익하다. 거의 중성의 표면 전하(제타 전위 -10 내지 +10 mV)를 갖는 나노입자는 망상내피세포 시스템(RES)에 의해 그 흡수를 감소시킬 수 있고 혈액 내에서 그 순환 시간을 연장시킬 수 있는 것으로 알려져 있다. 미셀의 음의 표면 전하는 PEG 셸의 에테르 기 또는 PPMS 코어의 아미노 기와 음이온 간의 수소 결합 상호작용을 통해 미셀 입자에 의한 PBS 중의 HPO₄²⁻ 및/또는 H₂PO₄⁻ 음이온의 흡수로부터 생성될 수 있다. 양친매성 블록 공중합체 미셀의 경우, 미셀의 외부 셸의 친수성 사슬 분절(예를 들어, PEG)이 짧은 사슬 블록보다 제타 전위를 감소시키는 데 더 효과적인 긴 사슬 블록을 갖는 미셀 코어의 전하를 보호할 수 있는 것으로 예상된다. 따라서, PEG2K-PPMS 공중합체 미셀과 비교할 경우 PEG5K-PPMS 공중합체 미셀에 대해 유의적으로 더 낮은 제타 전위 값이 관찰되었다.

[0294] 공중합체 미셀은 pH-반응성이며: 매질 pH가 7.4로부터 5.0으로 감소함에 따라, 미셀의 크기는 미셀 크기를 유의적으로 증가시키는 한편, 미셀의 표면 전하는 음 전하로부터 양 전하로 반전된다. 이에 따라, DTX-캡슐화 공중합체 미셀은 pH 7.4에서 점진적인 서방성 약물을 나타내지만, 5.0의 산성 pH에서 DTX 방출은 현저하게 가속화된다. 이러한 현상은 중앙 미세환경이 산소 관류 불량으로 인한 락트산 축적의 결과로서 전형적으로 약 산성(예를

들어, 5.7 내지 7.0)인 것으로 알려져 있기 때문에 중앙 부위에서 작용제의 방출을 개선시키도록 이용된다. 반면에, 정상 조직 및 혈액의 세포의 pH는 약 염기성이다(pH 7.2 내지 7.4). 따라서, pH-반응성인 항암 약물-로딩 미셀에 대해 항상된 약물 전달 효율이 예상되며, 이는 약물 방출을 가속시키는 산성 pH에 의해 촉발될 수 있다. 더 나아가, 세포내이입 경로를 통해 중앙 세포에 의한 미셀의 흡수 후 엔도솜 및 리소솜에서 보다 더 산성인 조건(pH = 4.0 내지 6.0)과 마주치게 되며, 이는 약물-캡슐화 미셀의 세포 독성을 더욱 증가시킬 수 있다.

[0295] **V. 치료제, 예방제 및 진단제**

[0296] 중합체는 다양한 중합체 조성물로부터 형성될 수 있고, 이들은 다양한 생분해성 의료 장치의 제조를 위해 그리고 약물 전달을 위해 유용하다. PHA 공중합체로부터 제조된 장치는 광범위한 여러 의학 응용에 사용될 수 있다. 그러한 응용의 예에는 치료제, 예방제 또는 진단제의 제어 방출; 약물 전달; 조직 공학 뼈대; 세포 캡슐화; 표적 전달; 생체 적합성 코팅; 생체 적합성 임플란트; 조직 유도 재생술; 상처 드레싱; 정형외과 장치; 보철 및 골 시멘트(접착제 및/또는 구조 충전제 포함); 및 진단법이 포함된다.

[0297] 중합체는 임의의 다양한 치료제, 예방제 또는 진단제를 캡슐화하거나, 그와 혼합되거나, 그와 이온적으로 또는 공유적으로 커플링되기 위해 사용될 수 있다. 중합체에 의해 부위로 전달되거나 생체부착, 세포 부착, 세포 성장 향상, 박테리아 성장 억제 및 응고 형성 방지와 같은 특성을 중합체에 부여하기 위해 광범위한 생물학적 활성 물질이 캡슐화되거나 혼입될 수 있다.

[0298] 적합한 치료제 및 예방제의 예에는 치료 활성, 예방 활성 또는 진단 활성을 갖는 합성 무기 및 유기 화합물, 단백질 및 펩타이드, 다당류 및 다른 당, 지질, 및 DNA 및 RNA 핵산 서열이 포함된다. 핵산 서열은 유전자, 상보성 DNA에 결합되어 전사를 억제하는 안티센스 분자, 및 리보자임을 포함한다. 예를 들어, 100 내지 500,000 그램/몰 이상의 광범위한 분자량을 갖는 화합물이 캡슐화될 수 있다. 적합한 물질의 예에는 단백질, 예컨대 항체, 수용체 리간드, 및 효소, 펩타이드, 예컨대 부착 펩타이드, 당류 및 다당류, 합성 유기 또는 무기 약물, 및 핵산이 포함된다. 캡슐화될 수 있는 물질의 예에는 효소, 혈액 응고 인자, 억제제 또는 응고 용해제, 예컨대 스트렙토키나아제 및 조직 플라스미노겐 활성화제; 면역화를 위한 항원; 호르몬 및 성장 인자; 헤파린과 같은 다당류; 올리고뉴클레오타이드, 예컨대 안티센스 올리고뉴클레오타이드 및 리보자임 및 유전자 치료에서 사용하기 위한 레트로바이러스 벡터가 포함된다. 중합체는 또한 세포 및 조직을 캡슐화하는 데 사용될 수 있다. 대표적인 진단제는 x선, 형광, 자기 공명 영상, 방사능, 초음파, 컴퓨터 단층촬영(CT), 및 양전자 방출 단층촬영(PET)에 의해 검출가능한 작용제이다. 초음파 진단제는 전형적으로 가스, 예컨대 공기, 산소 또는 퍼플루오로탄소이다. 바람직한 실시형태에서, 중합체는 핵산의 전달을 위해 사용된다.

[0299] **A. 폴리뉴클레오타이드**

[0300] 하기에서 보다 상세하게 논의되는 바와 같이, 삼원공중합체는 핵산에 의해 세포를 형질 주입하는 데 사용될 수 있다. 따라서, 삼원공중합체 및 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 폴리플렉스가 또한 개시된다.

[0301] 폴리뉴클레오타이드는 하나 이상의 단백질, 기능성 핵산 또는 이들의 조합을 암호화할 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 모노시스트론성 또는 폴리시스트론성일 수 있다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 다유전자성이다.

[0302] 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 세포로 형질 주입되고, 염색체외에 남아 있다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 호스트 세포로 도입되어 호스트 세포의 게놈으로 통합된다. 하기에서 보다 상세하게 논의되는 바와 같이, 조성물은 유전자 치료 방법에서 사용될 수 있다. 유전자 치료 방법은 세포의 유전형을 변경하는 폴리뉴클레오타이드의 세포로의 도입을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오타이드의 도입은 유전자 재조합을 통해 내인성 유전자를 교정, 대체 또는 다르게는 변경할 수 있다. 방법은 결함 유전자, 이중 유전자 또는 올리고뉴클레오타이드와 같은 작은 핵산 분자의 전체 대체 카피(copy)의 도입을 포함할 수 있다. 예를 들어, 교정 유전자가 호스트의 게놈 내의 비특이적 위치로 도입될 수 있다.

[0303] 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 벡터로 또는 그 일부로 혼입된다. 유전자 서열 및 적절한 전사 및 번역 제어 요소를 함유하는 발현 벡터를 구성하는 방법이 본 기술분야에 널리 알려져 있다. 이러한 방법은 *시험관 내* 재조합 DNA 기술, 합성 기술 및 *생체내* 유전자 재조합을 포함한다. 발현 벡터는 일반적으로 예를 들어 관심 있는 폴리뉴클레오타이드일 수 있는, 삽입된 코딩 서열의 번역 및/또는 전사에 필수적인 요소 및 조절 서열을 함유한다. 코딩 서열은 프로모터 및/또는 인핸서에 작동가능하게 연결되어 원하는 유전자 산물의 발현을 제어하도록 도울 수 있다. 생명 공학에서 사용되는 프로모터는 유전자 발현의 의도된 제어 유형에 따라 상이한 유형을 갖는다. 이들은 일반적으로 구성적 프로모터, 조직 특이적 또는 발달 단계 특이적 프로모터, 유도성 프로모터

및 합성 프로모터로 분류될 수 있다.

- [0304] 예를 들어, 일부 실시형태에서, 관심 있는 폴리뉴클레오타이드는 프로모터 또는 본 기술분야에 공지된 다른 조절 요소에 작동가능하게 연결된다. 따라서, 폴리뉴클레오타이드는 발현 벡터와 같은 벡터일 수 있다. 원핵생물계 또는 진핵생물계에서 발현을 위해 폴리뉴클레오타이드를 조작하는 것은 재조합 발현에서 본 기술분야의 기술자에게 일반적으로 알려진 기술에 의해 수행될 수 있다. 발현 벡터는 전형적으로 하나 이상의 프로모터의 제어 하에서 조성물들 중 하나를 포함한다. 프로모터의 "제어 하에" 코딩 서열을 가져오기 위하여, 리딩 프레임의 번역 개시 부위의 5' 말단을 일반적으로 선택된 프로모터의 약 1 내지 50개의 뉴클레오타이드의 "하류"(즉, 3')에 위치시킨다. "상류" 프로모터는 삽입된 DNA의 전사를 자극시키고, 암호화된 재조합 단백질의 발현을 촉진시킨다. 이것이 본원에서 사용되는 문맥에서 "재조합 발현"의 의미이다.
- [0305] 다양한 호스트-발현 시스템에서 단백질 또는 펩타이드 발현을 달성하기 위하여 적절한 핵산 및 전사/번역 제어 서열을 함유하는 발현 벡터를 구성하는 데 많은 표준 기술이 이용가능하다. 발현에 이용가능한 세포 유형에는 박테리아, 예컨대 재조합 파지 DNA, 플라스미드 DNA 또는 코스미드 DNA 발현 벡터로 형질전환된 이.콜라이(*E. coli*) 및 비. 서브틸리스(*B. subtilis*)가 포함되지만, 이로 한정되지 않는다. 임의의 이들 벡터는 중합체를 사용하여 포장되어 전달될 수 있는 것으로 이해될 것이다.
- [0306] 포유류 세포에서 사용하기 위한 발현 벡터는 보통 복제 기점(필요에 따라), 임의의 필요한 리보솜 결합 부위와 함께 발현될 유전자의 전방에 위치한 프로모터, RNA 스플라이스 부위, 폴리아데닐화 부위 및 전사 종결자 서열을 포함한다. 복제 기점은 SV40 또는 다른 바이러스(예를 들어, 폴리오마(Polyoma), 아데노(Adeno), VSV, BPV) 근원으로부터 유래될 수 있는 것과 같이, 외인성 기점을 포함하도록 벡터의 구성에 의해 제공될 수 있거나, 또는 호스트 세포 염색체 복제 메커니즘에 의해 제공될 수 있다. 벡터가 호스트 세포 염색체에 통합되는 경우, 중종 후자가 충분하다.
- [0307] 프로모터는 포유류 세포의 게놈(예를 들어, 메탈로티오네인 프로모터)으로부터, 또는 포유류 바이러스(예를 들어, 아데노바이러스 후기 프로모터; 우두 바이러스 7.5K 프로모터)로부터 유래될 수 있다. 추가로, 원하는 유전자 서열과 정상적으로 결합된 프로모터 또는 제어 서열을 이용하는 것이 또한 가능하고 바람직할 수 있으나, 단 그러한 제어 서열은 호스트 세포 시스템과 양립될 수 있어야 한다.
- [0308] 다수의 바이러스 기반 발현 시스템이 이용될 수 있고, 예를 들어 흔히 사용되는 프로모터는 폴리오마, 아데노바이러스 2, 거대세포바이러스 및 유인원 바이러스(Simian Virus) 40(SV40)으로부터 유래된다. SV40 바이러스의 조기 및 후기 프로모터는 둘 모두가 SV40 바이러스 복제 기점을 또한 함유하는 단편으로서 바이러스로부터 쉽게 얻을 수 있기 때문에 유용하다. 보다 작거나 보다 큰 SV40 단편이 또한 사용될 수 있되, 단 여기에는 HindIII 부위로부터 바이러스 복제 기점에 위치한 BglI 부위를 향해 연장되는 대략 250 bp 서열이 포함되어야 한다.
- [0309] 아데노바이러스가 발현 벡터로서 사용되는 경우, 코딩 서열은 아데노바이러스 전사/번역 제어 복합체, 예를 들어 후기 프로모터 및 삼부 리더 서열(tripartite leader sequence)에 연결될 수 있다. 이러한 키메라 유전자는 이어서 시험관내 또는 생체내 재조합에 의해 아데노바이러스 게놈에 삽입될 수 있다. 바이러스 게놈의 비필수적 영역(예를 들어, E1 또는 E3 영역) 내의 삽입은 감염된 호스트에서 생존가능하고 단백질을 발현할 수 있는 재조합 바이러스를 생성할 것이다.
- [0310] 또한 조성물의 효율적인 번역을 위해 특정 개시 신호가 요구될 수 있다. 이러한 신호는 ATG 개시 코돈 및 인접한 서열을 포함한다. ATG 개시 코돈을 포함한 외인성 번역 제어 신호가 추가적으로 제공되어야 할 수도 있다. 본 기술분야의 기술자는 이러한 요구를 용이하게 결정하여 필요한 신호를 제공할 수 있을 것이다. 개시 코돈은 전체 삽입물의 번역을 보장하기 위해 원하는 코딩 서열의 리딩 프레임과 인-프레임(in-frame)(또는 동위상)이어야 하는 것으로 널리 알려져 있다. 이러한 외인성 번역 제어 신호 및 개시 코돈은 둘 모두 천연 및 합성인 다양한 기원을 가질 수 있다. 발현 효율은 적절한 전사 인핸서 요소 또는 전사 종결자를 포함시켜 향상될 수 있다.
- [0311] 진핵생물 발현에서, 또한 원래의 클로닝된 분절 내에 함유되지 않은 경우 적절한 폴리아데닐화 부위를 전사 단위로 혼입시키는 것이 전형적으로 바람직할 것이다. 전형적으로, 폴리 A 첨가 부위는 전사 종결 전 위치에서 단백질의 종결 부위의 약 30 내지 2000개의 뉴클레오타이드 "하류"에 위치한다.
- [0312] 재조합 단백질의 장기간 고 수율 생성을 위해서, 안정한 발현이 바람직하다. 예를 들어, 단백질을 암호화하는 구성체를 안정적으로 발현하는 세포주가 조작될 수 있다. 바이러스 복제 기점을 함유하는 발현 벡터를 사용하기 보다는, 적절한 발현 제어 요소(예를 들어, 프로모터, 인핸서, 서열, 전사 종결자, 폴리아데닐화 부위 등) 및 선택가능한 마커(marker)에 의해 제어된 벡터를 사용하여 호스트 세포를 형질전환시킬 수 있다. 이중 DNA를 도

입한 후, 조작된 세포를 강화 배지에서 1 내지 2일 동안 성장시킬 수 있고, 이어서 이를 선택적 배지로 바꾼다. 재조합 플라스미드 내의 선택가능한 마커는 선택에 대한 저항성을 부여하고, 세포가 플라스미드를 그 염색체로 안정적으로 통합하여 성장하게 함으로써 포사이(foci)를 형성하며, 이는 결국 클로닝되어 세포주로 확장될 수 있다.

[0313] 바람직한 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드 카고는 RNA, 예컨대 mRNA이다. mRNA는 관심 있는 폴리펩타이드를 암호화할 수 있다.

[0314] 일부 실시형태에서, mRNA는 세포 내의 리보솜 결합, 번역 개시 및 mRNA의 안정성을 조절할 수 있는 5' 말단 및/또는 3' 폴리(A) 꼬리(tail) 상의 캡을 갖는다.

[0315] **B. 관심 있는 폴리펩타이드**

[0316] 폴리뉴클레오타이드는 관심 있는 하나 이상의 폴리펩타이드를 암호화할 수 있다. 폴리펩타이드는 임의의 폴리펩타이드일 수 있다. 예를 들어, 폴리뉴클레오타이드에 의해 암호화된 폴리펩타이드는 유기체에 치료 또는 예방 효과를 제공하거나, 유기체의 질병 또는 장애를 진단하는 데 사용될 수 있는 폴리펩타이드일 수 있다. 예를 들어, 암, 자가면역 장애, 기생충, 바이러스, 박테리아, 진균 또는 다른 감염을 치료하기 위해, 발현될 폴리뉴클레오타이드(들)는 면역 시스템의 세포에 대한 리간드 또는 수용체로서 작용하거나, 유기체의 면역 시스템을 자극하거나 억제하는 기능을 할 수 있는 폴리펩타이드를 암호화할 수 있다. 하기 실시예에서 논의되는 바와 같이, TNF-관련 세포자멸사-유도 리간드(TRAIL)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 암을 치료하는 방법에서 폴리플렉스를 사용하여 종양 세포로 전달될 수 있다.

[0317] 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 유기체에서 결합이 있는 폴리뉴클레오타이드를 보충하거나 대체한다.

[0318] 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 선택가능한 마커, 예를 들어 약물 내성 선택 마커와 같이 진핵생물 세포에 효과적인 선택가능한 마커를 포함한다. 이러한 선택가능한 마커 유전자는 선택적 배양 배지에서 성장한 형질전환된 호스트 세포의 생존 또는 성장을 위해 필요한 인자를 암호화할 수 있다. 전형적인 선택 유전자는 항생제 또는 다른 독소, 예를 들어 암피실린, 네오마이신, 테트라렉세이드, 카나마이신, 젠타마이신, 제오신(Zeocin) 또는 테트라사이클린에 내성을 부여하거나, 영양요구성 결핍을 보완하거나, 배지로부터 보류된 중요한 영양소를 공급하는 단백질을 암호화한다.

[0319] 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 리포터(reporter) 유전자를 포함한다. 리포터 유전자는 전형적으로 호스트 세포에 존재하지 않거나 발현되지 않는 유전자이다. 리포터 유전자는 전형적으로 일부 표현형 변화 또는 효소 특성을 제공하는 단백질을 암호화한다. 그러한 유전자의 예가 문헌[Weising *et al. Ann. Rev. Genetics*, 22, 421 (1988)]에 제공되어 있다. 바람직한 리포터 유전자는 글루쿠로니다아제(GUS) 유전자 및 GFP 유전자를 포함한다.

[0320] **C. 기능성 핵산**

[0321] 폴리뉴클레오타이드는 기능성 핵산일 수 있거나, 이를 암호화할 수 있다. 기능성 핵산은 표적 분자에 결합하거나 특정 반응을 촉매화하는 것과 같은 특정 기능을 갖는 핵산 분자이다. 기능성 핵산 분자는 다음의 비제한적인 카테고리로 분류될 수 있다: 안티센스 분자, siRNA, miRNA, 앵타머, 리보자임, 트리플렉스 형성 분자, RNAi, 및 외부 가이드 서열. 기능성 핵산 분자는 표적 분자가 갖는 특정 활성의 작동제, 억제제, 조절제 및 자극제로서 작용할 수 있거나, 기능성 핵산 분자는 임의의 다른 분자에 독립적인 신생 활성을 가질 수 있다.

[0322] 기능성 핵산 분자는 DNA, RNA, 폴리펩타이드 또는 탄수화물 사슬과 같은 임의의 거대분자와 상호작용할 수 있다. 따라서, 기능성 핵산은 표적 폴리펩타이드의 mRNA 또는 게놈 DNA와 상호작용할 수 있거나, 이들은 폴리펩타이드 그 자체와 상호작용할 수 있다. 종종 기능성 핵산은 표적 분자와 기능성 핵산 분자 사이의 서열 상동성에 기반하여 다른 핵산과 상호작용하도록 설계된다. 다른 상황에서, 기능성 핵산 분자와 표적 분자 사이의 특정 인식은 기능성 핵산 분자와 표적 분자 사이의 서열 상동성에 기반하지 않고, 오히려 특정 인식이 일어나게 하는 3차 구조의 형성에 기반한다.

[0323] 안티센스 분자는 표준 또는 비표준 염기 쌍 형성을 통해 표적 핵산 분자와 상호작용하도록 설계된다. 안티센스 분자와 표적 분자의 상호작용은, 예를 들어 RNAseH 매개된 RNA-DNA 하이브리드 분해를 통해 표적 분자의 파괴를 촉진하도록 설계된다. 대안적으로, 안티센스 분자는 전사 또는 복제와 같은 표적 분자에서 정상적으로 발생하는 처리 기능을 방해하도록 설계된다. 안티센스 분자는 표적 분자의 서열을 기준으로 설계될 수 있다. 표적 분자의 가장 접근가능한 영역을 발견함으로써 안티센스 효율을 최적화하는 방법이 많이 존재한다. 예시적인 방법에는

시험관내 선택 실험, 및 DMS 및 DEPC를 사용하는 DNA 변형 연구가 포함된다. 안티센스 분자가 10^{-6} , 10^{-8} , 10^{-10} 또는 10^{-12} 이하의 해리 상수(K_d)로 표적 분자에 결합되는 것이 바람직하다.

[0324] 앵타머는, 바람직하게는 특정 방식으로 표적 분자와 상호작용하는 분자이다. 전형적으로, 앵타머는 스템-루프 (stem-loop) 또는 G-4분체와 같이, 정해진 2차 또는 3차 구조로 접히는 15 내지 50개의 염기 길이 범위의 작은 핵산이다. 앵타머는 ATP 및 테오필린과 같은 작은 분자뿐만 아니라 역전사효소 및 트롬빈과 같은 큰 분자에 결합할 수 있다. 앵타머는 표적 분자로부터 10^{-12} M 미만의 K_d 로 매우 긴밀하게 결합될 수 있다. 앵타머는 10^{-6} , 10^{-8} , 10^{-10} 또는 10^{-12} 미만의 K_d 로 표적 분자에 결합하는 것이 바람직하다. 앵타머는 매우 높은 등급의 특이성으로 표적 분자에 결합될 수 있다. 예를 들어, 표적 분자와 다른 분자 사이의 결합 친화도가 10,000배 초과 차이 갖는 앵타머가 단리되었고, 상기 결합 친화도는 분자 상의 오직 단일 위치에서만 상이하다. 앵타머는 백그라운드 결합 분자와의 K_d 보다 적어도 10, 100, 1000, 10,000 또는 100,000배 더 낮은 표적 분자와의 K_d 를 갖는 것이 바람직하다. 폴리펩타이드와 같은 분자에 대해 비교할 경우, 백그라운드 분자는 상이한 폴리펩타이드인 것이 바람직하다.

[0325] 리보자임은 분자내 또는 분자간 화학 반응을 촉매할 수 있는 핵산 분자이다. 리보자임이 분자간 반응을 촉매하는 것이 바람직하다. 망치머리형 리보자임과 같은 자연계에서 발견되는 리보자임에 기반한 뉴클레아제 또는 핵산 중합효소 유형 반응을 촉매하는 여러 유형의 리보자임이 존재한다. 자연계에서 발견되지 않고 신생 특정 반응을 촉매하도록 조작된 다수의 리보자임이 또한 존재한다. 바람직한 리보자임은 RNA 또는 DNA 기질을 절단하고, 보다 바람직하게는 RNA 기질을 절단한다. 리보자임은 전형적으로 후속 절단과 함께 표적 기질의 인식 및 결합을 통해 핵산 기질을 절단시킨다. 이러한 인식은 종종 주로 표준 또는 비표준 염기 쌍 상호작용에 기반한다. 이러한 특징은 표적 기질의 인식이 표적 기질 서열에 기반하기 때문에 리보자임을 핵산의 표적 특이적 절단에 대해 특히 우수한 후보자로 만든다.

[0326] 트리플렉스 형성 가능성 핵산 분자는 이중 가닥 핵산 또는 단일 가닥 핵산과 상호작용할 수 있는 분자이다. 트리플렉스 분자가 표적 영역과 상호작용할 경우, Watson-Crick 및 Hoogsteen 염기 쌍 형성 둘 모두에 의존하여 복합체를 형성하는 3 가닥의 DNA가 있는 트리플렉스로 불리는 구조가 형성된다. 트리플렉스 분자는 높은 친화성 및 특이성으로 표적 영역에 결합할 수 있기 때문에 바람직하다. 트리플렉스 형성 분자는 10^{-6} , 10^{-8} , 10^{-10} 또는 10^{-12} 미만의 K_d 로 표적 분자에 결합하는 것이 바람직하다.

[0327] 외부 가이드 서열(EGS)은 RNase P에 의해 인식된 후 표적 분자를 절단시키는, 표적 핵산 분자 형성 복합체에 결합하는 분자이다. EGS는 선택된 RNA 분자를 특이적으로 표적화하도록 설계될 수 있다. RNase P는 세포 내에서 운반 RNA(tRNA)를 처리하는 데 도움이 된다. 박테리아 RNase P가 모집된 후 표적 RNA:EGS 복합체가 천연 tRNA 기질을 모방하게 하는 EGS를 사용함으로써 사실상 임의의 RNA 서열을 절단할 수 있다. 마찬가지로, RNA의 진행 EGS/RNase P-지향된 절단을 이용하여 진핵생물 세포 내에서 원하는 표적을 절단할 수 있다. 여러 가지 표적 분자의 절단을 촉진하도록 EGS 분자를 제조하고 사용하는 방법의 대표적인 예가 본 기술분야에 알려져 있다.

[0328] 유전자 발현은 또한 RNA 간섭(RNAi)을 통해 매우 특이적인 방식으로 효과적으로 침묵될 수 있다. 이러한 침묵은 원래 이중 가닥 RNA(dsRNA)의 첨가와 함께 관찰되었다(문헌[Fire, *et al.* (1998) *Nature*, 391:806-11; Napoli, *et al.* (1990) *Plant Cell* 2:279-89; Hannon, (2002) *Nature*, 418:244-51]). dsRNA가 세포에 들어가면, 이는 RNase III-유사 효소, 다이스(Dicer)에 의해 3' 말단에 2개의 뉴클레오타이드 돌출부를 함유하는 21 내지 23개의 뉴클레오타이드 길이의 이중 가닥 작은 간섭 RNA(siRNA)로 절단된다(문헌[Elbashir, *et al.* (2001) *Genes Dev.*, 15:188-200; Bernstein, *et al.* (2001) *Nature*, 409:363-6; Hammond, *et al.* (2000) *Nature*, 404:293-6]). ATP 의존성 단계에서, siRNA는 흔히 RNAi 유도된 침묵 복합체(RISC)로서 알려진, 다중-아단위 단백질 복합체로 통합되어, siRNA를 표적 RNA 서열로 가이드한다(문헌[Nykanen, *et al.* (2001) *Cell*, 107:309-21]). 어떤 지점에서, siRNA 듀플렉스는 폴리고, 안티센스 가닥이 RISC에 결합된 채로 유지되고, 엔도와 엑소뉴클레아제의 조합에 의해 상보성 mRNA 서열의 분해를 지시하는 것으로 보인다(문헌[Martinez, *et al.* (2002) *Cell*, 110:563-74]). 그러나, iRNA 또는 siRNA 또는 이의 사용의 효과는 임의의 유형의 메커니즘에 제한되지 않는다.

[0329] 짧은 간섭 RNA(siRNA)는 서열-특이적 전사후 유전자 침묵을 유도함으로써, 유전자 발현을 감소시키거나 심지어 억제할 수 있는 이중 가닥 RNA이다. 일례로, siRNA는 siRNA와 표적 RNA 사이의 서열 동일성 영역 내에서 상동의 RNA 분자, 예컨대 mRNA의 특정 분해를 촉발한다. 예를 들어, WO 02/44321에는 3' 돌출부 말단과 염기 쌍 형성될

경우 표적 mRNA의 서열-특이적 분해될 수 있는 siRNA가 개시되어 있고, 이는 이러한 siRNA의 제조 방법을 위해 본원에서 참조로 포함된다. 서열 특이적 유전자 침묵은 효소 다이스에 의해 생성된 siRNA를 모방하는 합성 짧은 이중 가닥 RNA를 사용하여 포유류 세포에서 달성될 수 있다(문헌[Elbashir, *et al.* (2001) Nature, 411:494-498]) (문헌[Ui-Tei, *et al.* (2000) FEBS Lett 479:79-82]). siRNA는 화학적으로 또는 *시험관내* 합성될 수 있거나, 세포 내부의 siRNA로 처리되는 짧은 이중 가닥 헤어핀-유사 RNA(shRNA)의 결과일 수 있다. 합성 siRNA는 일반적으로 알고리즘 및 통상적인 DNA/RNA 합성기를 사용하여 설계된다. 공급업체에는 Ambion(미국 텍사스주 오스틴 소재), ChemGenes(미국 메사추세츠주 애슬랜드 소재), Dharmacon(미국 콜로라도주 라피엣 소재), Glen Research(미국 버지니아주 스티어링 소재), MWB Biotech(독일 에스베르스버그 소재), ProLigo(미국 콜로라도주 볼더 소재), 및 Qiagen(네덜란드 벤토 소재)이 포함된다. siRNA는 또한 Ambion's SILENCER® siRNA 구성 키트와 같은 키트를 사용하여 *시험관내*에서 합성될 수 있다.

[0330] 벡터로부터 siRNA의 생성은 짧은 헤어핀 RNase(shRNA)의 전사를 통해 보다 일반적으로 수행된다. 예를 들어, Imgenex's GENESUPPRESSOR™ 구성 키트 및 Invitrogen's BLOCK-IT™ 유도성 RNAi 플라스미드 및 렌티바이러스 벡터와 같이, shRNA를 포함하는 벡터의 생성을 위한 키트가 입수가 가능하다.

[0331] **폴리뉴클레오타이드의 조성물**

[0332] 폴리뉴클레오타이드는 전형적으로 헤테로환형 염기(핵산 염기), 헤테로환형 염기에 부착된 당 모이어티, 및 당 모이어티의 히드록실 작용기를 에스테르화하는 포스페이트 모이어티를 포함하는 DNA 또는 RNA 뉴클레오타이드일 수 있다. 주요 자연 발생 뉴클레오타이드는 헤테로환형 염기로서 우라실, 티민, 시토신, 아데닌 및 구아닌, 및 포스포디에스테르 결합에 의해 연결된 리보오스 또는 데옥시리보오스 당을 포함한다.

[0333] 폴리뉴클레오타이드는 DNA 또는 RNA 대응물에 비해 표적 서열에 대한 안정성, 반감기 또는 특이성 또는 친화성을 개선시키도록 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드 유사체로 구성될 수 있다. 화학적 변형은 핵염기, 당 모이어티, 뉴클레오타이드 연결기, 또는 이들의 조합의 화학적 변형을 포함한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "변형된 뉴클레오타이드" 또는 "화학적으로 변형된 뉴클레오타이드"는 헤테로환형 염기, 당 모이어티 또는 포스페이트 모이어티 성분 중 하나 이상의 화학적 변형을 갖는 뉴클레오타이드로 정의된다. 일부 실시형태에서, 변형된 뉴클레오타이드의 전하는 동일한 핵염기 서열의 DNA 또는 RNA 올리고뉴클레오타이드에 비해 감소된다. 예를 들어, 올리고뉴클레오타이드는 낮은 음 전하 또는 양 전하를 가질 수 있거나, 전하가 없을 수 있다. 변형은 올리고뉴클레오타이드가 세포로 들어가 상기 논의된 바와 같은 유전자 발현의 억제와 같은 기능을 수행하는 능력을 방해하지 않고 바람직하게는 향상시켜야 한다.

[0334] 전형적으로, 뉴클레오타이드 유사체는 표준 폴리뉴클레오타이드 염기에 대해 Watson-Crick 염기 쌍 형성에 의해 수소 결합될 수 있는 염기를 지지하며, 여기서 유사체 백본은 올리고뉴클레오타이드 유사체 분자와 표준 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, 단일 가닥 RNA 또는 단일 가닥 DNA)의 염기 사이의 서열 특이적 방식으로 그러한 수소 결합을 허용하는 방식으로 염기를 제공한다. 바람직한 유사체는 실질적으로 하전되지 않은, 인 함유 백본을 갖는 것이다.

[0335] 하기에서 보다 상세하게 논의되는 바와 같이, 하나의 바람직한 실시형태에서, 올리고뉴클레오타이드는 모르폴리노 올리고뉴클레오타이드이다.

[0336] **1. 헤테로환형 염기**

[0337] 주요 자연 발생 뉴클레오타이드는 헤테로환형 염기로서 우라실, 티민, 시토신, 아데닌 및 구아닌을 포함한다. 올리고뉴클레오타이드는 그 핵염기 성분에 대한 화학적 변형을 포함할 수 있다. 헤테로환형 염기 또는 헤테로환형 염기 유사체의 화학적 변형은 표적 서열을 결합하는 데 있어서 결합 친화성 또는 안정성을 증가시키기에 효과적일 수 있다. 화학적으로 변형된 헤테로환형 염기에는 이노신, 5-(1-프로피닐) 우라실(pU), 5-(1-프로피닐) 시토신(pC), 5-메틸시토신, 8-옥소-아데닌, 슈도시토신, 슈도이소시토신, 5 및 2-아미노-5-(2'-데옥시-β-D-리보퓨라노실)피리딘 (2-아미노피리딘), 및 다양한 피롤로- 및 피라졸로피리미딘 유도체가 포함되지만, 이로 한정되지 않는다.

[0338] **2. 당 변형**

[0339] 폴리뉴클레오타이드는 또한 변형된 당 모이어티 또는 당 모이어티 유사체를 갖는 뉴클레오타이드를 함유할 수 있다. 당 모이어티 변형에는 2'-O-아미노에톡시, 2'-O-아모니오에틸(2'-OAE), 2'-O-메톡시, 2'-O-메틸, 2-구아니도에틸(2'-OGE), 2'-O,4'-C-메틸렌(LNA), 2'-O-(메톡시에틸)(2'-OME) 및 2'-O-(N-(메틸)아세트아미도)(2'-OMA)가 포함되지만, 이로 한정되지 않는다. 2'-O-아미노에틸 당 모이어티 치환은 중성 pH에서 양성자화되어, 이

에 따라 TFO와 표적 듀플렉스 사이에 전하 반발을 저해하기 때문에 특히 바람직하다. 이러한 변형은 리보오스 또는 데시리보오스의 C3'-엔도 형태를 안정화시키고, 또한 듀플렉스의 푸린 가닥에서 i-1 포스페이트와 가교를 형성한다.

[0340] 폴리뉴클레오타이드는 모르폴리노 올리고뉴클레오타이드일 수 있다. 모르폴리노 올리고뉴클레오타이드는 전형적으로 염기 특이적 수소 결합에 의해 폴리뉴클레오타이드 내의 염기에 결합하기에 효과적인 푸린 또는 피리미딘 염기 쌍 형성 모이어티를 함유하는 둘 이상의 모르폴리노 단량체로 구성되며, 이들은 1 내지 3개의 원자 길이의 인-함유 연결기에 의해 함께 연결되고, 하나의 단량체의 모르폴리노 질소는 인접한 단량체의 5' 외향고리 탄소로 결합된다. 푸린 또는 피리미딘 염기-쌍 형성 모이어티는 전형적으로 아데닌, 시토신, 구아닌, 우라실 또는 티민이다. 모르폴리노 올리고머의 합성, 구조 및 결합 특징은 미국 특허 제5,698,685호, 제5,217,866호, 제5,142,047호, 제5,034,506호, 제5,166,315호, 제5,521,063호 및 제5,506,337호에 상술되어 있다.

[0341] 모르폴리노 기반 아단위의 중요한 특징에는 전형적으로 다음이 포함된다: 하전되지 않은 안정한 백본 연결기에 의해 올리고머성 형태로 연결되는 능력; 형성된 중합체가 높은 T_m 을 갖는 표적 RNA를 포함한 상보성-염기 표적 핵산, 심지어 10 내지 14개의 염기만큼 짧은 올리고머와 하이브리드될 수 있도록 뉴클레오타이드 염기(예를 들어, 아데닌, 시토신, 구아닌, 티민, 우라실 또는 이노신)를 지지하는 능력; 올리고머가 포유류 세포로 능동적으로 전송되는 능력; 및 올리고머:RNA 헤테로듀플렉스가 RNAse 분해에 저항하는 능력. 일부 실시형태에서, 올리고뉴클레오타이드는 하전되지 않은 연결기에 의해 결합된, 염기 쌍 형성 모이어티를 갖는 모르폴리노-기반 아단위를 사용한다.

[0342] **3. 뉴클레오타이드간 연결기**

[0343] 뉴클레오타이드간 결합은 두 개의 뉴클레오시드 모이어티들 사이의 화학적 연결기를 지칭한다. DNA 또는 RNA 올리고뉴클레오타이드의 포스페이트 백본에 대한 변형은 폴리뉴클레오타이드의 결합 친화성 또는 안정성을 증가시키거나, 폴리뉴클레오타이드의 뉴클레아제 소화에 대한 감수성을 감소시킬 수 있다. 디에틸-에틸렌디아미드(DEED) 또는 디메틸-아미노프로필아민(DMAP)을 포함하지만, 이로 한정되지 않는 양이온성 변형은 올리고뉴클레오타이드와 표적 사이의 정전기 반발 감소로 인해 특히 유용할 수 있다. 포스페이트 백본의 변형은 또한 포스포디에스테르 연결기 내의 비가교 산소 중 하나를 황 원자로 치환하는 것을 포함할 수 있다. 이러한 치환은 포스포디에스테르 연결기 대신에 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결기를 생성한다. 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결기를 함유하는 올리고뉴클레오타이드는 *생체내*에서 보다 안정한 것으로 나타났다.

[0344] 감소된 전하를 갖는 변형된 뉴클레오타이드의 예에는 상기 논의된 바와 같은 변형된 뉴클레오타이드간 연결기, 예컨대 비키탈 및 하전되지 않은 아단위간 연결기를 갖는 포스페이트 유사체(예를 들어, 문헌[Sterchak, *et al.*, *Organic Chem.*, 52:4202, (1987)]), 및 비키탈 아단위간 연결기를 갖는 하전되지 않은 모르폴리노-기반 중합체(예를 들어, 미국 특허 제5,034,506호 참조)가 포함된다. 일부 뉴클레오타이드간 연결기 유사체는 모르폴리데이트, 아세탈 및 폴리아미드-연결 헤테로환형을 포함한다.

[0345] 또 다른 실시형태에서, 올리고뉴클레오타이드는 잠금 핵산으로 구성된다. 잠금 핵산(LNA)은 변형된 RNA 뉴클레오타이드이다(예를 들어, 문헌[Braasch, *et al.*, *Chem. Biol.*, 8(1):1-7 (2001)] 참조). LNA는 DNA와 하이브리드를 형성하고, 이는 DNA/DNA 하이브리드보다 더 안정하며, 펩타이드 핵산(PNA)/DNA 하이브리드와 유사한 특징이다. 따라서, LNA는 PNA 분자처럼 사용될 수 있다. LNA 결합 효율은 일부 실시형태에서 양 전하를 첨가함으로써 증가될 수 있다. LNA를 제조하기 위해 상업적인 핵산 합성기 및 표준 포스포르아미다이트 화학이 사용된다.

[0346] 일부 실시형태에서, 올리고뉴클레오타이드는 펩타이드 핵산으로 구성된다. 펩타이드 핵산(PNA)은 올리고뉴클레오타이드의 포스페이트 백본이 N-(2-아미노에틸)-글리신 단위를 반복시킴으로써 그 전체가 대체되고, 포스포디에스테르 결합이 전형적으로 펩타이드 결합에 의해 대체된 합성 DNA 모방체이다. 다양한 헤테로환형 염기가 메틸렌 카보닐 결합에 의해 백본에 연결된다. PNA는 통상적인 DNA 올리고뉴클레오타이드와 유사한 헤테로환형 염기의 간격을 유지하지만, 비키탈이고, 중성적으로 하전된 분자이다. 펩타이드 핵산은 펩타이드 핵산 단량체로 구성된다.

[0347] 다른 백본 변형은 펩타이드 및 아미노산 변이 및 변형을 포함한다. 따라서, PNA와 같은 올리고뉴클레오타이드의 백본 성분은 펩타이드 연결기일 수 있고, 대안적으로 이들은 비펩타이드 펩타이드 연결기일 수 있다. 예에는 아세탈 캡, 아미노 스페이서, 예컨대 8-아미노-3,6-디옥사옥탄산(본원에서 0-링커로 지칭됨), PNA에 양 전하가 바람직한 경우 특히 유용한 리신과 같은 아미노산 등이 포함된다. PNA의 화학적 조립 방법이 널리 알려져 있다. 예를 들어, 미국 특허 제5,539,082호, 제5,527,675호, 제5,623,049호, 제5,714,331호, 제5,736,336호, 제

5,773,571호 및 제5,786,571호를 참조한다.

[0348] 폴리뉴클레오타이드는 그 표적에 대한 올리고뉴클레오타이드의 안정성 및/또는 친화성을 증가시키도록 한 쪽 말단 또는 양쪽 말단에서 하나 이상의 말단 잔기 또는 변형을 선택적으로 포함한다. 흔히 사용되는 양으로 하전된 모이어티는 아미노산 리신 및 아르기닌을 포함하지만, 다른 양으로 하전된 모이어티가 또한 유용할 수도 있다. 예를 들어, 리신 및 아르기닌 잔기가 비스-PNA 링커에 첨가될 수 있거나, PNA 가닥의 카복시 또는 N-종점에 첨가될 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 3' 프로필아민 기를 사용하여 말단 캡핑되도록 추가로 변형되어 분해를 방지할 수 있다. 3' 또는 5' 캡핑 올리고뉴클레오타이드에 대한 절차가 본 기술분야에 널리 알려져 있다.

[0349] **VI. 폴리플렉스에 대한 코팅제**

[0350] 중합체를 사용하는 폴리뉴클레오타이드 전달 효율은 폴리플렉스 표면 상의 양 전하에 의해 영향을 받을 수 있다. 예를 들어, +8.9 mV의 폴리플렉스의 제타 전위는 순환 동안 혈액 내에서 음으로 하전된 혈장 단백질을 끌어당겨 그와 결합하여, 망상내피세포 시스템(RES)에 의한 빠른 제거를 초래할 수 있다. 효율은 또한 폴리플렉스 나노입자의 불안정성에 의해 영향을 받을 수 있다. 예를 들어, 하기 실시예에 논의되는 바와 같이, 10% 혈청을 함유하는 NaAc 완충액에서 인큐베이션된 폴리플렉스 입자는 15분 이내에 크기가 거의 두 배가 되었고, 75분 후에 10배 초과까지 증가하였다. 이러한 크기 증가로 인해, 커진 폴리플렉스는 간에서 흡수되어 순환으로부터 제거될 수도 있다. 따라서, 일부 실시형태에서, 폴리플렉스는 폴리뉴클레오타이드 전달 효율을 개선하도록 처리되거나 코팅된다. 일부 실시형태에서, 코팅은 대조군에 비해 폴리플렉스의 세포 특이적 표적화를 개선시키거나, 안정성을 개선시키거나(즉, *생체내* 폴리플렉스의 크기를 안정화시킴), *생체내* 폴리플렉스의 반감기를 증가시키거나(즉, 체순환에서), 또는 이들의 조합이다. 일부 실시형태에서, 대조군은 코팅이 없는 폴리플렉스이다.

[0351] 중양 세포를 표적화하기 위한 예시적인 폴리플렉스 코팅은 폴리E-mRGD이다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 폴리E-mRGD는 다음과 같은 3개의 분절을 함유하는 합성 펩타이드를 지칭한다: 생리학적 pH에서 음으로 하전되어, 이에 따라 폴리플렉스의 양으로 하전된 표면에 정전기 결합될 수 있는 폴리글루탐산 (폴리E) 스트레치를 포함하는 제1 분절; 중성 링커로서 작용하는 중성 폴리글리신 스트레치를 포함하는 제2 분절; 및 $\alpha_v\beta_3$ 및 $\alpha_v\beta_5$ 와 RGD의 상호작용을 통해 중양 내피에 결합하는 RGD 서열을 포함하는 제3 분절.

[0352] 하기에서 보다 상세하게 논의되는 바와 같이, 실시예에서 사용되는 폴리E-mRGD는 IIII-20% PDL/pLucDNA 폴리플렉스의 표면 전하를 반전시켰다. 폴리E-mRGD를 5:1 펩타이드/DNA 중량비로 첨가하였을 때, 폴리플렉스의 제타 전위는 + 8.9 mV로부터 - 5.8 mV로 변화하였다. 펩타이드 코팅된 폴리플렉스는 10% 혈청을 함유하는 NaAc 완충액에서 인큐베이션 시 안정하였고, 응집에 대해 저항적이며, 이는 변형된 폴리플렉스가 *생체내* 순환 동안 RES에 의한 제거를 피할 수 있음을 나타낸다.

[0353] 일 실시형태에서, 폴리E-mRGD는 서열 EEEEEEEEEEEEEEGGGGGGRGDK(서열번호: 1), 또는 RGDKGGGGG EEEEEEEEEEEEEEE(서열번호: 2), 또는 서열번호: 1 또는 2와 85%, 90%, 95%, 또는 95% 초과 서열 동일성을 갖는 이의 변이체를 포함한다.

[0354] 중성 전하, 또는 *생체내*에서 그 크기를 유지하는 음으로 하전된 입자를 제조하는 데 사용될 수 있는 다른 예시적인 코팅이 문헌[Harris, *et al.*, *Biomaterials*, 31:998-1006 (2010)]에 기재되어 있고, 비특이적 전신 투여에 대해서 아미노산 서열 GGGGGEEEEEEEEEEEEEE(서열번호: 3, 폴리-E), 또는 비장, 척추, 흉골 및 대퇴골에 대한 표적화를 증가시키는 다가양이온성 서열을 함유하는 아미노산 서열 GdPdLGdVdRG-GGGGG-EEEEEEEEEEEEEE-CONH2(서열번호: 4, 폴리-E-cat)을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 코팅에서 사용되는 폴리펩타이드는 서열번호: 3 또는 4와 85%, 90%, 95%, 또는 95% 초과 서열 동일성을 갖는 변이체, 서열번호 3 또는 4이다.

[0355] *시험관내* 연구에 의해, 면역글로불린 G(IgG) 및 보체 단백질 C3의 나노입자로의 흡착은 Kupffer 세포에 의해 그 흡수를 증가시키고, 혈청에서의 인큐베이션은 간 관류 후 *생체내* 간 흡수를 증가시키는 것으로 나타났다(문헌 [Nagayama, *et al.*, *Int. J. Pharm.*, 342:215-21 (2007)]). 또한, 아시알로글리코단백질 수용체를 통해 간세포로 중합체성 유전자 전달 입자를 가이드하기 위해 갈락토오스가 사용될 수 있는 것으로 보고되었다(문헌 [Zhang, *et al.*, *J. Controlled Release*, 102:749-63 (2005)]).

[0356] **A. 표면 전하를 변경하기 위한 조성물**

[0357] 폴리플렉스의 폴리뉴클레오타이드 전달 효율은 생리학적 pH에서 음으로 하전된 작용제로 입자를 코팅함으로써 개선될 수 있다. 바람직하게는, 음으로 하전된 작용제는 폴리플렉스의 양으로 하전된 표면에 정전기 결합할 수 있다. 음으로 하전된 작용제는 폴리플렉스의 전하를 중성화시키거나, 폴리플렉스의 전하를 반전시킬 수 있다.

따라서, 일부 실시형태에서, 음으로 하전된 작용제는 폴리플렉스에 순 음 전하를 부여한다.

[0358] 일부 실시형태에서, 음으로 하전된 작용제는 음으로 하전된 폴리펩타이드이다. 예를 들어, 폴리펩타이드는 아스파르트산, 글루탐산 또는 이들의 조합을 포함할 수 있고, 폴리펩타이드의 전체 전하는 중성 pH에서 음이다. 일부 실시형태에서, 폴리펩타이드는 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 또는 20개 초과 아스파르트산 잔기로 이루어진 폴리 아스파르트산 폴리펩타이드이다. 일부 실시형태에서, 폴리펩타이드는 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 또는 20개 초과 글루탐산 잔기로 이루어진 폴리 글루탐산 폴리펩타이드이다. 다른 음으로 하전된 분자는 소 분자(즉, 1500, 100, 750 또는 500 달톤 미만의 MW), 예컨대 히알루론산을 포함한다.

[0359] 입자의 표면 상에서 음의 전하를 증가시키면 상기 기재된 음의 상호작용이 감소되거나 방지될 수 있고, 여기서 더 양으로 하전된 입자는 순환 동안 혈액 내의 음으로 하전된 혈장 단백질을 끌어당겨 그와 결합하여, 망상내피 세포 시스템(RES)에 의한 빠른 제거를 초래한다. 일부 실시형태에서, 입자의 제타 전위는 약 -15 mV 내지 약 10 mV, 바람직하게는 약 -15 mV 내지 약 8 mV, 보다 바람직하게는 약 -10 mV 내지 약 8 mV, 보다 바람직하게는 약 -8 mV 내지 약 8 mV이다. 제타 전위는 상기 범위보다 더 음이거나 더 양일 수 있지만, 입자는 안정하고(즉, 응집되지 않음, 등) 혈류로부터 즉시 제거되지 않아야 한다. 제타 전위는 표면 전하를 변화시키는 하나 이상의 모이어티로 입자 표면을 코팅하거나 작용화함으로써 조작될 수 있다. 대안적으로, 단량체 그 자체는 작용화될 수 있고/있거나 추가의 단량체가 중합체로 도입되어 표면 전하가 변할 수 있다.

[0360] **B. 표적화 모이어티**

[0361] 일부 실시형태에서, 폴리플렉스는 세포-유형 또는 세포-상태 특이적 표적화 도메인 또는 표적화 신호를 포함한다. 폴리플렉스에 연결되거나 연결되지 않을 수 있는 모이어티의 예에는, 예를 들어 분자의 특정 세포로의 전달을 제공하는 표적화 모이어티가 포함된다. 표적화 신호 또는 서열은 호스트, 조직, 기관, 세포, 소기관, 비핵 소기관 또는 세포 구획에 대해 특이적일 수 있다. 예를 들어, 본원에서 조성물은 조성물을 간 또는 간 세포로 표적화하도록 갈락토실-말단 거대분자로 변형될 수 있다. 변형된 조성물은 간 세포에만 다량의 높은 친화도로 존재하는 아시알로글리코단백질 수용체와 담체 갈락토오스 잔기의 상호작용 후 선택적으로 간세포에 들어간다. 또한, 본원에서 조성물은 다른 특정 세포간 영역, 구획 또는 세포 유형에 대해 표적화될 수 있다.

[0362] 일 실시형태에서, 표적화 신호는, 예컨대 벡터 및 세포 막이 충분히 서로 밀접하게 되어 벡터의 세포로의 침투를 허용하도록 표적 세포의 표면 상에 위치한 그 리간드 또는 수용체에 결합한다. 본 개시내용의 추가 실시형태는 폴리뉴클레오타이드를 특정 조직 또는 세포 유형으로 특이적으로 전달하는 것에 관한 것으로, 여기서 폴리뉴클레오타이드는 폴리펩타이드를 암호화할 수 있거나, 상이한 폴리뉴클레오타이드의 발현을 간섭할 수 있다. 세포로 전달된 폴리뉴클레오타이드는 세포의 기능을 향상시키거나 그에 기여할 수 있는 폴리펩타이드를 암호화할 수 있다.

[0363] 표적화 모이어티는 항체 또는 그 항원 결합 단편, 항체 도메인, 항원, T-세포 수용체, 세포 표면 수용체, 세포 표면 접착 분자, 주요 조직적합성 유전자와 단백질, 바이러스 외피 단백질, 및 정해진 세포에 특이적으로 결합하는 파지 디스플레이에 의해 선택된 펩타이드일 수 있다.

[0364] 본 기술분야의 기술자는 기재된 폴리플렉스의 향성이 단순히 표적화 신호를 변화시킴으로써 변경될 수 있는 것으로 이해할 것이다. 포유류 유기체의 조직 내의 거의 모든 세포 유형은 일부 독특한 세포 표면 수용체 또는 항원을 갖는 것으로 본 기술분야에 알려져 있다. 따라서, 세포 표면 수용체 또는 항원에 대한 거의 모든 리간드를 표적화 신호로서 혼입하는 것이 가능하다. 예를 들어, 펩티드 호르몬은 그러한 호르몬에 대한 수용체를 갖는 세포로의 전달을 표적화하기 위해 표적화 모이어티를 사용할 수 있다. 마찬가지로, 케모카인 및 사이토카인을 표적화 신호로서 사용하여 복합체의 그 표적 세포로의 전달을 표적화할 수 있다. 특정 세포 또는 세포 상태에서 우선적으로 발현되는 유전자를 확인하기 위해 다양한 기술이 개발되었고, 본 기술분야의 기술자는 그러한 기술을 사용하여 관심 있는 표적 조직에 대해 우선적으로 또는 독특하게 발현되는 표적화 신호를 확인할 수 있다.

[0365] **종양 표적화**

[0366] 일 실시형태에서, 종양 세포를 선택적으로 표적화하기 위해 표적화 신호를 사용한다. 종양 세포는 오직 종양에서 발현되거나 비종양 세포에 존재하지만 종양 세포에서 우선적으로 제공될 수 있는 세포 표면 마커를 발현한다. 그러한 마커는 폴리플렉스의 암 세포로의 전달을 증가시키도록 표적화될 수 있다.

[0367] 예를 들어, 일부 실시형태에서, 표적화 모이어티는 아르기닌-글리신-아스파르트산 서열을 포함하는 폴리펩타이드이다. 예를 들어, 표적화 모이어티는 아르기닌-글리신-아스파르트산-리신(RGDK, mRGD), RGD 서열을 포함하고

$\alpha_v\beta_3$ 및 $\alpha_v\beta_5$ 와 RGD의 상호작용을 통해 종양 내피에 결합할 수 있는 다른 폴리펩타이드일 수 있다. 일부 실시 형태에서, 표적화 모이어티는 폴리펩타이드 서열 R/KxxR/K(여기서, "x"는 임의의 아미노산임)를 포함하며, 이는 뉴로필린-1로의 결합을 허용한다. 인테그린 또는 뉴로필린-1과의 결합은 생체내 종양으로의 종양 표적화 및 조직 침투성 전달을 개선시키기 위한 두 가지 시도이다. 시험관내 리간드-특이적 유전자 전달 및 생체내 간, 비장 및 골수로의 표적화된 유전자 전달을 촉진하기 위한 유사한 시도가 보고되었다.

[0368] 그 밖에, 예시적인 종양 특이적 세포 표면 마커에는 알파-페토단백질(AFP), C-반응성 단백질(CRP), 암 항원-50(CA-50), 난소암과 관련된 암 항원-125(CA-125), 유방암과 관련된 암 항원 15-3(CA15-3), 암 항원-19(CA-19) 및 위장암과 관련된 암 항원-242, 암배아 항원(CEA), 암종 관련 항원(CAA), 크로모그라닌 A, 상피 뮤신 항원(MC5), 인간 상피 특이적 항원(HEA), 루이스(Lewis)(a)항원, 흑색종 항원, 흑색종 관련 항원 100, 25 및 150, 뮤신-유사 암종 관련 항원, 다중약물 내성 관련 단백질(MRP6), 다중약물 내성 관련 단백질(MRP41), Neu 종양유전자 단백질(C-erbB-2), 뉴린 특이적 에놀라아제(NSE), P-글리코단백질(mdr1 유전자 산물), 다중약물 내성 관련 항원, p170, 다중약물 내성 관련 항원, 전립선 특이적 항원(PSA), CD56, NCAM, EGFR, CD44, 및 엽산 수용체가 포함되지만, 이로 한정되지 않는다. 일 실시형태에서, 표적화 신호는 종양 세포 표면 마커에 특이적인 항체로 이루어진다.

[0369] 항체

[0370] 다른 실시형태는 표적화 신호로서 작용하는 폴리플렉스에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다. 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 폴리플렉스가 세포 유형 또는 세포 상태로 향하게 하는 데 유용하다. 일 실시 형태에서, 폴리플렉스는, 예를 들어 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)로부터의 단백질 A 및 단백질 G와 같이 항체에 결합하는 것으로 알려진 단백질로부터의 항체 결합 도메인인 폴리펩타이드로 코팅된다. 항체에 결합하는 것으로 알려진 다른 도메인이 본 기술분야에 알려져 있고, 대체될 수 있다. 항체 결합 도메인은 항체, 또는 이의 항원 결합 단편을 폴리플렉스로 연결한다.

[0371] 특정 실시형태에서, 표적화 신호로서 작용하는 항체는 다클론, 단클론, 선형, 인간화, 키메라 또는 이들의 단편이다. 대표적인 항체 단편은 비바이러스 벡터의 항체 결합 부분에 결합하는 단편이며, 본 기술분야에 공지된 Fab, Fab', F(ab'), Fv 디아바디, 선형 항체, 단일 사슬 항체 및 이중특이적 항체가 포함된다.

[0372] 일부 실시형태에서, 표적화 신호는 폴리플렉스가 원하는 표적 세포 유형 또는 세포 상태로 향하는 항체의 전부 또는 일부를 포함한다. 항체는 단클론 또는 다클론일 수 있지만, 바람직하게는 단클론이다. 인간 유전자 치료 목적을 위해, 항체는 인간 유전자로부터 유도될 수 있고, 세포 표면 마커에 대해 특이적이며, 본 기술분야에 공지된 바와 같이 인간 호스트에 대한 잠재적 면역원성을 감소시키도록 생성된다. 예를 들어, 전체 인간 면역글로불린 유전자 클러스터를 함유하는 유전자 변형 마우스는 이용될 수 있는 "인간" 항체를 생성할 수 있다. 일 실시 형태에서, 그러한 인간 항체의 단편은 표적화 신호로서 사용된다. 바람직한 실시형태에서, 인간 항체에 대해 모델링된 단일 사슬 항체가 원핵생물 배양에서 제조된다.

[0373] 일 실시형태에서, 표적화 신호는 뇌 및 말초 신경계를 포함한 신경계의 세포로 향한다. 뇌의 세포는 몇 가지 유형 및 상태를 포함하고, 그러한 유형에 특이적인 독특한 세포 표면 분자를 갖는다. 더 나아가, 세포 유형 및 상태는 추가로 일반적인 세포 표면 분자의 제시를 특징으로 하고 그에 의해 그룹화될 수 있다.

[0374] 일 실시형태에서, 표적화 신호는 신경계의 세포 표면 상에서 발견되는 특이적 신경전달물질 수용체로 향한다. 신경전달물질 수용체의 분포는 본 기술분야에 널리 알려져 있고, 기술자는 표적화 신호로서 신경전달물질 수용체 특이적 항체를 사용함으로써 기재된 조성물을 지시할 수 있다. 더 나아가, 신경전달물질의 그 수용체에 대한 향성을 고려하여, 일 실시형태에서 표적화 신호는 신경전달물질 수용체에 특이적으로 결합할 수 있는 리간드 또는 신경전달물질로 구성된다.

[0375] 일 실시형태에서, 표적화 신호는 정상세포, 소교세포, 뉴린, 핏지교세포 및 Schwann 세포를 포함할 수 있는 신경계의 세포에 특이적이다. 이러한 세포는 그 기능, 위치, 형태, 신경전달물질 종류 및 병리학적 상태에 따라 더욱 분류될 수 있다. 신경계의 세포는 또한 그 분화 상태에 의해 식별될 수 있다(예를 들어, 줄기 세포). 이러한 세포 유형 및 상태에 대해 특이적인 예시적 마커는 본 기술분야에 널리 알려져 있고, CD133 및 신경구가 포함되지만, 이로 한정되지 않는다.

[0376] 일 실시형태에서, 표적화 신호는 근골격계의 세포로 향한다. 근육 세포는 몇 가지 유형을 포함하고, 그러한 유형 및 상태에 특이적인 독특한 세포 표면 분자를 갖는다. 더 나아가, 세포 유형 및 상태는 추가로 일반적인 세

포 표면 분자의 제시를 특징으로 하고 그에 의해 그룹화될 수 있다.

[0377] 일 실시형태에서, 표적화 신호는 근육 세포의 표면 상에서 발견되는 특이적 신경전달물질 수용체로 향한다. 신경전달물질 수용체의 분포는 본 기술분야에 널리 알려져 있고, 기술자는 표적화 신호로서 신경전달물질 수용체 특이적 항체를 사용함으로써 기재된 조성을 지시할 수 있다. 더 나아가, 신경전달물질의 그 수용체에 대한 향성을 고려하여, 일 실시형태에서 표적화 신호는 신경전달물질로 구성된다. 표적화될 수 있는 근육 세포 상에서 발견되는 예시적인 신경전달물질에는 아세틸콜린 및 노르에피네프린이 포함되지만, 이로 한정되지 않는다.

[0378] 일 실시형태에서, 표적화 신호는 2개의 주요 그룹, 즉 유형 I 및 유형 II로 이루어진 근육 세포에 특이적이다. 이러한 세포는 그 기능, 위치, 형태, 미오글로빈 함량 및 병리학적 상태에 따라 더욱 분류될 수 있다. 근육 세포는 그 분화 상태에 의해 또한 식별될 수 있다(예를 들어, 근육 줄기 세포). 이러한 세포 유형 및 상태에 대해 특이적인 예시적인 마커는 본 기술분야에 널리 알려져 있고, MyoD, Pax7 및 MR4가 포함되지만, 이로 한정되지 않는다.

[0379] **C. 링커**

[0380] 일부 실시형태에서, 폴리플렉스는 음으로 하전된 작용제 및 표적화 모이어티 둘 모두로 코팅될 수 있다. 일부 실시형태에서, 음으로 하전된 작용제 및 표적화 모이어티는 링커에 의해 함께 연결된다. 링커는 폴리펩타이드, 또는 본 기술분야에 알려진 임의의 다른 적합한 링커, 예를 들어 폴리 에틸렌 글리콜(PEG)일 수 있다.

[0381] 일부 실시형태에서, 링커는 생리학적 pH에서 거의 중성 전하를 갖는 폴리펩타이드이다. 일부 실시형태에서, 링커 폴리펩타이드는 폴리글리신이다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 링커는 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 또는 글리신 잔기로 이루어진다. 바람직한 실시형태에서, 링커는 6-잔기 폴리글리신이다.

[0382] 일부 실시형태에서, 음으로 하전된 작용제 단독, 또는 표적화 모이어티와의 조합이 정전기 상호작용에 의해 폴리플렉스에 연결된다. 일부 실시형태에서, 음으로 하전된 작용제, 표적화 모이어티 또는 이들의 조합이 중합체 백본 또는 중합체 백본에 부착된 측쇄로의 공유 컨쥬게이션에 의해 폴리플렉스에 연결된다.

[0383] **D. 폴리플렉스의 크기 및 응집 감소 방법**

[0384] 응집 저항성이 중요할 수 있는데, 그 이유는 작은 입자 크기를 유지하면 간에 의한 제거가 제한되고 폴리플렉스 입자의 표적 세포로의 형질 주입 능력이 유지되기 때문이다. 따라서, 바람직한 실시형태에서, 폴리플렉스는 응집에 저항한다. 바람직하게는, 코팅이 있거나 없는 폴리플렉스는 반경이 약 1 nm 내지 1000 nm, 보다 바람직하게는 반경이 약 1 nm 내지 약 500 nm, 가장 바람직하게는 반경이 약 15 nm 내지 약 250 nm이다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드로 로딩된 코팅된 폴리플렉스는 반경이 약 150 nm 내지 275 nm이다.

[0385] 폴리뉴클레오타이드 중량 대 중합체 중량의 비(폴리뉴클레오타이드:중합체), 폴리플렉스 코팅의 함량 및 양, 또는 이들의 조합을 사용하여 폴리플렉스의 크기를 조정할 수 있다.

[0386] 예를 들어, 하기 실시예는 일부 실시형태에서, 25:1의 중합체 대 DNA 비를 갖는 입자의 형질 주입 효율이 50:1, 100:1, 150:1 및 200:1의 중합체:DNA 비를 갖는 입자의 형질 주입 효율보다 더 낮음을 보여준다. 특정 제형에 대해 가장 바람직한 중합체:폴리뉴클레오타이드 비가 본 기술분야에 알려진 방법, 예컨대 하기 실시예에 기재된 방법을 사용하여 실험적으로 결정될 수 있다. 일반적으로, 중합체:폴리뉴클레오타이드의 중량:중량 비는 바람직하게는 약 10:1 초과, 보다 바람직하게는 약 50:1 초과, 가장 바람직하게는 약 100:1 초과이다. 중합체:폴리뉴클레오타이드의 중량:중량 비는 바람직하게는 약 10:1 내지 500:1, 보다 바람직하게는 약 25:1 내지 250:1, 가장 바람직하게는 약 50:1 내지 150:1이다. 일부 실시형태에서, 중합체:폴리뉴클레오타이드의 중량비는 약 100:1이다. 바람직하게는, 폴리플렉스는 구형 형상을 갖는다.

[0387] 실시예는 또한 일부 실시형태에서, 코팅제 분자 대 폴리뉴클레오타이드 분자(코팅제:폴리뉴클레오타이드)의 비에 따른 입자의 형질 주입 효율을 보여준다. 비는 중량 단위로 표현된다. 특정 제형에 대해 가장 바람직한 코팅제:폴리뉴클레오타이드 비가 본 기술분야에 알려진 방법, 예컨대 하기 실시예에 기재된 방법을 사용하여 실험적으로 결정될 수 있다. 일반적으로, 코팅제:폴리뉴클레오타이드의 비는 0 초과, 바람직하게는 약 50:1 미만, 보다 바람직하게는 약 25:1 미만, 가장 바람직하게는 약 10:1 미만이다. 코팅제:폴리뉴클레오타이드의 비는 바람직하게는 약 1:1 내지 10:1, 보다 바람직하게는 약 2.5:1 내지 7.5:1이다. 일부 실시형태에서, 코팅제:폴리뉴클레오타이드의 비는 약 5:1이다. 10:1, 5:1 및 2.5:1의 코팅제:폴리뉴클레오타이드의 비는 본원에서 또한 각각 10x, 5x 및 2.5x로 지칭된다. 바람직하게는, 폴리플렉스는 구형 형상이다.

[0388] E. PEG-블로킹 함유 중합체

[0389] 중합체는, 예를 들어 원하는 기간에 걸쳐 제어된 방출 방식으로 하나 이상의 치료제, 예방제 및/또는 진단제를 방출할 수 있는 입자, 예컨대 마이크로입자 또는 나노입자, 또는 미셀의 형태로 약물 전달을 위해 사용될 수 있다.

[0390] pH-반응성 미셀 나노담체는 종종 양친매성 블록 공중합체의 자가 조립을 통해 형성되고, 친수성(예를 들어, PEG) 외부 셀 및 매질 pH에 반응할 수 있는 소수성 내부 코어로 이루어진다. 전형적으로, 매질 pH가 중성 또는 약 염기성으로부터 약 산성으로 변할 때, 미셀 코어는 분해가 가속되고, 물에서 완전히 용해될 수 있거나 수성 매질에서 실질적으로 팽윤된다. 결과적으로, 생리학적 pH에서 느린 약물 방출 속도를 갖는 약물 캡슐화된 미셀은 산성 pH에 의해 약물 분자를 신속하게 언로딩하도록 촉발될 수 있다. 이전의 보고서에서 미셀 코어를 구성하는 중합체 분절은 폴리(오르소 에스테르), 폴리(β -아미노 에스테르), 폴리(L-히스티딘) 등을 포함한다. 이전의 미셀 시스템 대부분이 갖는 주요 단점은 공중합체를 제조하기 위해 다단계가 필요하고, 공중합체 합성 동안 중합체 분자량을 제어하고 중합체 조성을 조정하기 곤란하다는 것이다.

[0391] 공중합체는 pH의 함수로서 방출 속도의 변화를 나타냈다. PEG2K-PPMS 공중합체 샘플(PEG2K-PPMS-11%PDL, PEG2K-PPMS-30%PDL, 및 PEG2K-PPMS-51%PDL)의 DTX-캡슐화 미셀의 시험관내 약물 방출 거동을 7.4의 생리학적 pH 및 5.0의 산성 pH 둘 모두에서 PBS 용액 중에 연구하였다. 일반적으로, 모든 미셀 샘플로부터 DTX 방출은 2상 방출 동역학을 따랐고, 현저한 pH-의존성을 나타내었다. DTX-로딩된 PEG2K-PPMS 공중합체 미셀은 처음 12시간 동안 빠르게 25 내지 45% 약물을 방출한 후 이어서 132시간 동안 추가로 25 내지 40% 약물을 보다 점진적으로 방출하였다. 약물 방출 속도에 대한 매질 pH의 영향은 상당하다. 예를 들어, 인큐베이션 기간(144 시간)의 말기에, PEG2K-PPMS-11%PDL, PEG2K-PPMS-30%PDL, 및 PEG2K-PPMS-51%PDL 공중합체의 미셀로부터 방출된 축적된 DTX의 값은 7.4의 생리학적 pH에서 각각 66%, 60% 및 55%이며, 이는 5.0의 산성 pH에서 85%, 81% 및 75%로 상응하여 증가한다. PEG2K-PPMS 공중합체 미셀로부터 DTX 방출의 관찰된 pH-촉발된 가속화는 7.4로부터 5.0으로의 매질 pH의 변화가 미셀 PPMS 코어의 크기 증가 및 양성자화로 인해 미셀의 유의적인 팽윤을 유발한다는 초기 관찰과 일치한다. 이러한 pH-촉발된 미셀 크기 팽창은 포획된 DTX의 미셀 코어로부터 수성 매질로의 확산 및 방출을 틀림없이 촉진할 것이다. 주어진 pH에서, DTX 방출 속도는 아마도 미셀 코어 내의 PPMS 매트릭스와 약물의 상호작용에 의해 제어된다. PDL-풍부 PEG2K-PPMS 공중합체는 그 미셀 내부 코어에서 강한 소수성 도메인을 형성하여 소수성 DTX 분자를 보다 우수하게 포획하고 유지하는 것으로 예상되기 때문에, 그러한 공중합체 미셀로부터의 약물 방출은 보다 점진적이며 지속되어야 한다. 이러한 가설은 pH 7.4 및 5.0 둘 모두에서, 공중합체의 PPMS 사슬 분절 내의 PDL 함량이 증가함에 따라 PEG2K-PPMS 공중합체 미셀로부터의 DTX 방출 속도가 감소한다는 것을 보여주는 실험 결과에 의해 지지된다.

[0392] 종양 세포에 의한 미셀의 흡수 시에, 미셀 입자는 5.5 내지 6.0의 pH 범위에서는 엔도솜에서 그리고 4.5 내지 5.0의 pH 범위에서는 리소솜에서 포획 처리되는 것으로 알려져 있다. 상기 결과에 의해 명백하게 입증되는 바와 같이, 이러한 산성 환경은 PEG2K-PPMS 공중합체 미셀로부터 빠른 DTX 방출을 확실하게 촉발시켜, 이에 따라 약물-로딩된 미셀의 세포독성을 향상시킬 것이다. 공중합체 내의 아미노기는 엔도솜 탈출을 촉진하도록 양성자 스폰지처럼 작용할 것이다. 따라서, PEG2K-PPMS 공중합체 미셀에 의해 나타난 pH-반응성 특성이 매우 바람직하며, 이러한 특성은 이들을 항암 약물의 전달에 뛰어난 담체로 만든다.

[0393] VII. 제형

[0394] 안전하고 효과적인 것으로 간주되고, 바람직하지 않은 생물학적 부작용 또는 원하지 않는 상호작용을 유발하지 않으면서 개체에게 투여될 수 있는 물질로 구성된 약제학적으로 허용가능한 "담체"를 사용하여 제형을 제조한다. "담체"는 활성 성분 또는 성분들 이외의 약제학적 제형에 존재하는 모든 성분이다. 용어 "담체"에는 희석제, 결합제, 윤활제, 붕해제, 충전제 및 코팅 조성물이 포함되지만, 이로 한정되지 않는다.

[0395] 정제 및 지연 방출 투약 형태를 제조하기 위한 물질, 장비 및 방법에 관한 상세한 정보는 문헌[Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, eds. Lieberman et al. (New York: Marcel Dekker, Inc., 1989)] 및 문헌[Ansel et al., Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 6.sup.th Ed. (Media, PA: Williams & Wilkins, 1995)]을 참조한다.

[0396] VIII. 폴리플렉스 제조 방법

[0397] A. 입자 제조 방법

[0398] 입자는 본 기술분야에 공지된 다양한 기술을 사용하여 제조될 수 있다. 사용되는 기술은 나노입자를 형성하는 데 사용되는 중합체, 생성된 입자의 원하는 크기 범위, 및 캡슐화될 물질에 대한 적합성을 포함한 다양한 인자에 따라 좌우될 수 있다.

[0399] 나노입자를 제조하는 데 사용될 수 있는 본 기술분야에 공지된 방법에는 고분자전해질 응축(문헌[Suk *et al.*, *Biomaterials*, 27, 5143-5150 (2006)] 참조); 단일 및 이중 유화; 나노입자 성형, 및 정전기 자가-조립(예를 들어, 폴리에틸렌 이민-DNA 또는 리포솜)이 포함되지만, 이로 한정되지 않는다.

[0400] 일 실시형태에서, 로딩된 입자는 전형적으로 유기 용매 중의 중합체 용액을 관심 있는 폴리뉴클레오타이드와 조합함으로써 제조된다. 중합체 용액은 중합체를 용매에 용해시키거나 현탁시킴으로써 제조된다. 용매는 캡슐화될 핵산에 대해 악영향(예를 들어, 탈안정화 또는 분해)을 끼치지 않도록 선택되어야 한다. 적합한 용매에는 DMSO 및 염화메틸렌이 포함되지만, 이로 한정되지 않는다. 용매 중의 중합체의 농도는 필요에 따라 달라질 수 있다. 일부 실시형태에서, 농도는, 예를 들어 25 mg/ml이다. 중합체 용액은 또한 완충제, 예를 들어 아세트산나트륨 완충제에서 희석될 수 있다.

[0401] 다음으로, 중합체 용액은 폴리뉴클레오타이드와 같이 캡슐화될 작용제와 혼합된다. 작용제는 용매에 용해되어 용액을 형성한 후 중합체 용액과 조합될 수 있다. 일부 실시형태에서, 작용제는 생리학적 완충제에 용해된 후 중합체 용액과 조합된다. 중합체 용액 부피 대 작용제 용액 부피의 비는 1:1일 수 있다. 중합체와 작용제의 조합은 형질 주입과 같은 원하는 목적으로 용액을 사용하기 전에 전형적으로 수분 동안 인큐베이션하여 입자를 형성한다. 예를 들어, 중합체/폴리뉴클레오타이드 용액은 형질 주입용으로 용액을 사용하기 전에 2, 5, 10분 또는 10분 초과 동안 인큐베이션될 수 있다. 인큐베이션은 실온에서 이루어질 수 있다.

[0402] 일부 실시형태에서, 입자는 또한 사용 전에 코팅제를 함유하는 용액과 함께 인큐베이션된다. 입자 용액은 형질 주입용으로 폴리플렉스를 사용하기 전에 2, 5, 10분 또는 10분 초과 동안 코팅제와 함께 인큐베이션될 수 있다. 인큐베이션은 실온에서 이루어질 수 있다.

[0403] 일부 실시형태에서, 작용제가 폴리뉴클레오타이드인 경우, 폴리뉴클레오타이드는 먼저 다가양이온과 복합체화된 후 중합체와 혼합된다. 복합체화는 폴리뉴클레오타이드와 다가양이온을 적절한 몰비로 혼합하여 달성될 수 있다. 폴리아민이 다가양이온 종으로서 사용되는 경우, 폴리아민 질소 대 폴리뉴클레오타이드 포스페이트의 몰비(N/P 비)를 결정하는 것이 유용할 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 억제 RNA 및 폴리아민은 대략 1:1 내지 1:25, 바람직하게는 약 8:1 내지 15:1의 N/P 비로 함께 혼합되어 복합체를 형성한다. 특정 몰비를 달성하기 위해 요구되는 폴리아민 용액의 부피는 다음 식에 따라 결정될 수 있다:

$$V_{NH2} = \frac{C_{inhRNA, 최종} \times M_{w,inhRNA} / C_{inhRNA, 최종} \times M_{w,P} \times \Phi_{N:P} \times \Phi V_{최종}}{C_{NH2} / M_{w,NH2}}$$

[0404] 식 중, $M_{w,inhRNA}$ = 억제 RNA의 분자량이고, $M_{w,P}$ = 억제 RNA의 포스페이트 기의 분자량이고, $\Phi_{N:P}$ = N:P 비(폴리아민의 질소 대 억제 RNA의 포스페이트의 비의 몰비)이고, C_{NH2} , 원액 = 폴리아민 원액의 농도이고, $M_{w,NH2}$ = 폴리아민의 질소당 분자량이다. 폴리뉴클레오타이드를 다가양이온과 혼합하여 폴리뉴클레오타이드를 응축시키는 방법이 본 기술분야에 알려져 있다. 예를 들어, 미국 공개 특허 출원 제2011/0008451호를 참조한다.

[0405] 용어 "다가양이온"은 선택된 pH, 바람직하게는 생리학적 pH에서 양 전하, 바람직하게는 적어도 2의 양 전하를 갖는 화합물을 지칭한다. 다가양이온성 모이어티는 선택된 pH 값에서 약 2 내지 약 15의 양 전하, 바람직하게는 약 2 내지 약 12의 양 전하, 보다 바람직하게는 약 2 내지 약 8의 양 전하를 갖는다. 많은 다가양이온이 본 기술분야에 공지되어 있다. 다가양이온의 적합한 성분에는 염기성 아미노산 및 이의 유도체, 예컨대 아르기닌, 아스파라긴, 글루타민, 리신 및 히스티딘; 양이온성 텐드리머; 및 아미노 다당류가 포함된다. 적합한 다가양이온은 구조가 선형, 예컨대 선형 테트라리신, 분지형 또는 텐드리머일 수 있다.

[0406] 예시적인 다가양이온에는 아크릴아미드 및 2-아크릴아미도-2-메틸프로판트리메틸아민, 폴리(N-에틸-4-비닐피리딘) 또는 유사한 4차화 폴리피리딘, 디에틸아미노에틸 중합체 및 텍스트란 킨쥬게이트, 폴리미신 B 설페이트, 리포폴리아민, 폴리(알릴아민), 예컨대 강한 다가양이온 폴리(디메틸디알릴암모늄 클로라이드), 폴리에틸렌아민, 폴리브렌, 및 폴리펩타이드, 예컨대 프로타민, 히스톤 폴리펩타이드, 폴리리신, 폴리아르기닌 및 폴리오르니틴을 기반으로 한 합성 다가양이온이 포함되지만, 이로 한정되지 않는다.

[0407] 일부 실시형태에서, 다가양이온은 폴리아민이다. 폴리아민은 둘 이상의 1차 아민 기를 갖는 화합물이다. 적합한

자연 발생 폴리아민에는 스페르민, 스페르미딘, 카다베린 및 푸트레신이 포함되지만, 이로 한정되지 않는다. 바람직한 실시형태에서, 폴리아민은 스페르미딘이다.

[0409] 또 다른 실시형태에서, 다가양이온은 환형 폴리아민이다. 환형 폴리아민이 본 기술분야에 공지되어 있고, 예를 들어 미국 특허 제5,698,546호, WO 1993/012096 및 WO 2002/010142에 기재되어 있다. 예시적인 환형 폴리아민에는 시클렌이 포함되지만, 이로 한정되지 않는다.

[0410] 스페르민 및 스페르미딘은 ODC(오르니틴 데카복실라아제)의 작용에 의해 L-오르니틴으로부터 생성되는 푸트레신(1,4-디아미노부탄)의 유도체이다. L-오르니틴은 아르기나아제에 의한 L-아르기닌 분해 산물이다. 스페르미딘은 푸트레신(1,4-디아미노부탄)의 탈카복실화 S-아데노실메티오닌(dcAdoMet) 3-아미노프로필 공여체와의 모노알킬화를 촉매하는 스페르미딘 신타아제(SpdS)에 의해 생성된 트리아민 구조이다. 푸트레신의 아미노기들 모두의 3-아미노프로필 공여체와의 형식적인 알킬화에 의해 대칭적 테트라민 스페르민이 수득된다. 스페르민의 생합성은 dcAdoMet의 존재 하에 스페르민 신타아제(SpmS)의 효과에 의해 스페르미딘으로 진행된다. 3-아미노프로필 공여체(dcAdoMet)는 메티오닌 아데노실트랜스퍼라아제에 의한 L-메티오닌의 순차적 변환 후 AdoMetDC(S-아데노실메티오닌 데카복실라아제)에 의한 탈카복실화에 의해 S-아데노실메티오닌으로부터 유래한다. 따라서, 푸트레신, 스페르미딘 및 스페르민은 아미노산 L-아르기닌(L-오르니틴, 푸테르신) 및 L-메티오닌(dcAdoMet, 아미노프로필 공여체)으로부터 유래된 대사산물이다.

[0411] **IX. 입자/미셀을 사용하는 방법**

[0412] **A. 약물 전달**

[0413] 입자는 유효량의 하나 이상의 치료제, 진단제 및/또는 예방제를 그러한 치료를 필요로 하는 환자에게 전달하기 위해 사용될 수 있다. 투여될 작용제의 양은 처방의에 의해 쉽게 결정될 수 있고, 환자의 연령 및 체중, 및 치료될 질병 또는 장애에 따라 좌우된다.

[0414] 입자는 정맥내, 피하 또는 근육내 주사되거나, 비강 또는 폐 시스템에 투여되거나, 종양 환경으로 주사되거나, 점막 표면(질, 직장, 협측, 설하)에 투여되거나, 구강 전달용으로 캡슐화되는지 여부에 상관 없이 약물 전달(본원에서 사용되는 바와 같이, "약물"은 치료제, 영양제, 진단제 및 예방제를 포함한다)에서 유용하다. 입자는 건조 분말로서, 수성 현탁액(물, 식염수, 완충 식염수 등에서)으로서, 하이드로겔, 유기겔 또는 리포솜으로, 캡슐, 정제, 트로키 또는 다른 표준 약제학적 부형제로 투여될 수 있다.

[0415] **B. 형질 주입**

[0416] 조성물은 폴리뉴클레오타이드의 세포 형질 주입을 위한 것일 수 있다. 하기에서 보다 상세하게 논의되는 바와 같이, 형질 주입은 *시험관내* 또는 *생체내*에서 발생할 수 있으며, 유전자 치료 및 질병 치료를 포함한 응용 분야에 적용될 수 있다. 조성물은 대조군과 비교할 경우 보다 효율적이거나, 덜 독성이거나, 이들의 조합일 수 있다. 일부 실시형태에서, 대조군은 대안의 형질 주입 시약, 예컨대 LIPOFECTAMINE 2000 또는 폴리에틸렌아민(PEI)으로 처리된 세포이다.

[0417] 형질 주입은 세포를 폴리플렉스 함유 용액과 접촉시킴으로써 수행된다. *생체내* 방법의 경우, 접촉은 전형적으로 대상체에게 용액을 투여한 후 *생체내*에서 발생한다. *시험관내* 방법의 경우, 전형적으로 용액을 세포 배양물에 첨가하여 세포가 수분, 수시간 또는 수일 동안 접촉하게 한다. 이어서, 과량의 폴리플렉스가 이동하도록 세포를 세척할 수 있다.

[0418] 폴리플렉스에 의해 전달되는 특정 폴리뉴클레오타이드는 치료될 병태 또는 질병에 따라 본 기술분야의 기술자에 의해 선택될 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는, 예를 들어 관심 있는 유전자 또는 cDNA, mRNA, 기능성 핵산, 예컨대 억제 RNA, tRNA, rRNA, 또는 관심 있는 유전자 또는 cDNA, 기능성 핵산 tRNA 또는 rRNA를 암호화하는 발현 벡터일 수 있다. 일부 실시형태에서, 둘 이상의 폴리뉴클레오타이드가 함께 투여된다.

[0419] 조성물은 폴리뉴클레오타이드를 *시험관내* 세포로 전달하는 방법에서 사용될 수 있다. 예를 들어, 세포의 *시험관내* 형질 주입을 위해 폴리플렉스가 사용될 수 있다. 상기 방법은 전형적으로 폴리뉴클레오타이드를 세포의 세포질로 도입시키기 위해 유효한 양으로 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 폴리플렉스와 세포를 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 세포의 유전형 또는 표현형을 변화시키기 위해 유효한 양으로 세포로 전달된다. 세포는 대상체로부터 단리된 1차 세포, 또는 확립된 세포주의 세포일 수 있다. 세포는 균질한 세포 유형을 가질 수 있거나, 상이한 세포 유형의 이중 혼합물일 수 있다. 예를 들어, 폴리플렉스는 지지 세포(feeder cell) 배양 또는 다양한 분화 상태의 혼합 배양에서와 같이 상이한 유형의 세포를 갖는 이중 세포주로

부터 세포의 세포질로 도입될 수 있다. 세포는 세포 배양에서 무기한 유지될 수 있는 형질전환된 세포주일 수 있다. 중앙 세포주를 포함한 예시적인 세포주는 American Type Culture Collection으로부터 입수가 가능한 것들이다.

[0420] 임의의 진핵생물 세포를 형질 주입시켜 1차 세포뿐만 아니라 확립된 세포주를 포함한, 특정한 핵산, 예를 들어 대사 유전자를 발현하는 세포를 생성할 수 있다. 적합한 유형의 세포에는 줄기 세포, 전능 세포, 만능 세포, 배아 줄기 세포, 내세포 덩어리, 성체 줄기 세포, 골수 세포, 제대혈로부터의 세포, 및 외배엽, 중배엽 또는 내배엽으로부터 유래된 세포를 포함한 미분화 또는 부분 분화 세포가 포함되지만, 이로 한정되지 않는다. 적합한 분화 세포는 체세포, 신경 세포, 골격근, 평활근, 췌장 세포, 간 세포 및 심장 세포를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, siRNA, 안티센스 폴리뉴클레오타이드(siRNA 또는 안티센스 폴리뉴클레오타이드 포함) 또는 억제 RNA는 조성물을 사용하여 세포로 형질 주입될 수 있다.

[0421] 상기 방법은, 예를 들어 결합 유전자를 복구하거나, 세포를 탈분화하거나, 세포를 재프로그래밍하는 개별 맞춤 치료 분야에서 특히 유용하다. 예를 들어, 먼저 표적 세포를 본 기술분야에 알려진 방법을 사용하여 공여체로부터 단리시키고, 폴리뉴클레오타이드를 포함한 폴리플렉스와 접촉시켜 시험관내(생체외)에 변화를 유발하고, 이를 필요로 하는 환자에게 투여한다. 근원 또는 세포는 환자 또는 동종 이식 공여체로부터 직접적으로 수확한 세포를 포함한다. 바람직한 실시형태에서, 대상체에 투여될 표적 세포는, 예를 들어 대상체로부터 유래된 자가조직 또는 선천성일 것이다. 동종이형 세포는 또한 항원적으로 일치하거나 유전적으로 관련이 없는 기증자(국가 등록을 통해 확인됨)로부터, 또는 유전적으로 관련된 형제 자매 또는 부모로부터 얻거나 파생된 표적 세포를 사용함으로써 단리될 수 있다.

[0422] 세포는 양성 및/또는 음성 선택 기술에 의해 선택될 수 있다. 예를 들어, 특정 세포 표면 단백질에 결합하는 항체는 자기 비드에 컨주게이트될 수 있고, 면역원성 절차를 이용하여 원하는 세포 유형을 회복할 수 있다. 일시적 형질 주입 전에 표적 세포를 강화하는 것이 바람직할 수 있다. 특정 표적 세포에 대해 강화된 조성물과 관련하여 본원에서 사용되는 바와 같이, "강화"는 세포의 천연 근원에서 발견되는 것보다 더 높은 바람직한 요소(예를 들어, 표적 세포)의 비율을 지칭한다. 세포의 조성물은 세포의 천연 근원에 비해 적어도 한 자릿수, 바람직하게는 두 자릿수 또는 세 자릿수, 보다 바람직하게는 10, 100, 200 또는 1000 자릿수 만큼 강화될 수 있다. 표적 세포가 단리되면, 이들은 본 기술분야에 알려진 확립된 방법에 따라 적합한 배지에서 성장시킴으로써 증식될 수 있다. 확립된 세포주는 상기 방법에서 또한 유용할 수 있다. 필요한 경우 형질 주입 전에 세포를 동결된 채로 저장할 수 있다.

[0423] 다음으로, 세포를 시험관내에서 조성물과 접촉시켜 세포를 복구, 탈분화, 재분화 및/또는 재프로그래밍한다. 세포를 모니터링하여, 치료 투여를 위해 원하는 세포 유형을 선택할 수 있다.

[0424] 복구, 탈분화 및/또는 재분화 및/또는 재프로그래밍 후에, 세포를 이를 필요로 하는 환자에게 투여한다. 가장 바람직한 실시형태에서, 동일한 환자로부터 세포를 단리하고 다시 그 환자에게 투여한다. 대안의 실시형태에서, 세포를 한 환자로부터 단리하고, 제2 환자에게 투여한다. 이 방법은 또한 나중에 사용하기 위해 장기간 보관할 수 있는 변경된 세포의 동결된 원액을 생성하는 데 사용될 수 있다. 일 실시형태에서, 섬유아세포, 각질형성세포 또는 조혈 줄기 세포를 환자로부터 단리하고 시험관내에서 복구, 탈분화 또는 재프로그래밍하여 환자에게 치료 세포를 제공한다.

[0425] **C. 생체내 방법**

[0426] 조성물은 폴리뉴클레오타이드를 생체내 세포로 전달하는 방법에서 사용될 수 있다. 중합체는 LIPOFECTAMINE 2000, PEI 및 심지어 다른 PMSC를 포함한 대안의 형질 주입 시약보다 폴리뉴클레오타이드의 전신 생체내 형질 주입에 대해 보다 효율적이고/이거나 독성이 덜한 것으로 발견되었다. 따라서, 일부 실시형태에서, 치료 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 세포 특이적 폴리플렉스는 질병, 예를 들어 암을 치료하기 위해 생체내에서 전신 투여된다.

[0427] 일부 생체내 시도에서, 조성물은 치료 유효량으로 대상체에게 투여된다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "유효량" 또는 "치료 유효량"은 치료되는 장애의 하나 이상의 증상을 치료하거나, 억제하거나, 완화하거나, 다르게는 원하는 약리학적 및/또는 생리학적 효과를 제공하기에 충분한 투여량을 의미한다. 정확한 투여량은 대상자 의존성 변수(예를 들어, 연령, 면역 시스템 건강 등), 질병 및 수행되는 치료와 같은 다양한 인자에 따라 달라질 것이다.

[0428] 약제학적 조성물은 비경구(근육내, 복강내, 정맥내(IV) 또는 피하 주사), 경피(수동적으로 또는 이온삼투압 또

는 전기천공법 사용) 또는 경점막(비강, 질, 직장 또는 설하) 투여 경로 또는 생분해성 삽입물을 사용하여 투여될 수 있고, 각각의 투여 경로에 대해 적합한 투약 형태로 제형화될 수 있다.

- [0429] 일부 실시형태에서, 조성물은 조성물의 표적 세포로의 전달에 유효한 양으로, 예를 들어 정맥내 또는 복강내 투여에 의해 전신 투여된다. 가능한 다른 경로에는 경피 또는 구강이 포함된다.
- [0430] 특정 실시형태에서, 조성물은, 예를 들어 치료될 부위로 직접적으로 주사하여 국부 투여된다. 일부 실시형태에서, 조성물은 하나 이상의 종양으로 직접적으로 주사되거나 다르게는 투여된다. 전형적으로, 국부 주사는 전신 투여에 의해 달성될 수 있는 것보다 더 큰 증가된 국부 농도의 조성물을 유발한다. 일부 실시형태에서, 조성물은 카테터 또는 주사기를 사용하여 적절한 세포로 국부 전달된다. 그러한 조성물을 세포로 국부 전달하는 다른 수단에는 주입 펌프 사용(예를 들어, Alza Corporation의 것, 미국 캘리포니아주 팔로 알토 소재) 또는 조성물의 중합체성 임플란트로의 혼입(예를 들어, 문헌[P. Johnson and J. G. Lloyd-Jones, eds., Drug Delivery Systems (Chichester, England: Ellis Horwood Ltd., 1987)] 참조)이 포함되며, 이는 폴리플렉스의 임플란트의 인접 부위로의 지속적인 방출을 달성할 수 있다.
- [0431] 폴리플렉스는 직접적으로, 예컨대 세포와 접촉시킴으로써 또는 간접적으로, 예컨대 임의의 생물학적 과정의 작용을 통해 세포에 제공될 수 있다. 예를 들어, 폴리플렉스는 생리학적으로 허용가능한 담체 또는 비히클에서 제형화되고, 세포 주변의 조직 또는 유체로 주사될 수 있다. 폴리플렉스는 단순 확산, 세포내이입에 의해, 또는 임의의 능동 또는 수동 수송 메커니즘에 의해 세포막을 가로지를 수 있다.
- [0432] 조성물은 유전자 관련 질병 또는 장애의 치료를 위한 유전자 치료 프로토콜에서 사용될 수 있다. 세포 기능부전은 또한 상기 조성물 및 방법을 사용하여 치료되거나 감소될 수 있다. 일부 실시형태에서, 유전자 치료를 받을 수 있는 질병이 특이적으로 표적화된다. 질병은, 소아, 예를 들어 18세 미만, 전형적으로 12세 미만의 개체, 또는 성인, 예를 들어 18세 이상 이상의 개체에서 발생할 수 있다. 따라서, 본 개시내용의 실시형태는 치료 단백질 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함한 폴리플렉스를 질병에 걸린 세포로 형질 주입하여 질병이 있는 것으로 진단된 호스트를 치료하는 것에 관한 것이다. 또 다른 실시형태에서, 억제 RNA는 단백질의 발현을 감소시키거나 제거하여, 이에 따라 치료 효과를 달성하는, 특정 세포 유형 또는 상태에 관한 것이다. 본 개시내용은 유전적 결함 또는 이상에 의해 유발된 질병을 치료하기 위해 유전자를 조작, 증강 또는 대체하는 것을 포함한다.
- [0433] 본원에서의 조성물로 치료될 수 있는 적합한 유전적 기반 질병에는 다음이 포함되지만, 이로 한정되지 않는다:
- [0434] 미토콘드리아 질병: 알페스병; 바르트 증후군; β -산화 결함; 카르니틴-아실-카르니틴 결핍; 카르니틴 결핍; 조효소 Q10 결핍; 복합체 I 결핍; 복합체 II 결핍; 복합체 III 결핍; 복합체 IV 결핍; 복합체 V 결핍; 시토크롬 c 옥시다아제(COX) 결핍, LHON - 레버 유전성 시신경병증(Leber Hereditary Optic Neuropathy); MM - 미토콘드리아 근육병; L IMM - 치명적인 영아 미토콘드리아 근육병; MMC - 모계 근육병 및 심근병증; NARP - 신경성 근쇠약, 운동실조 및 망막 색소변성증; 리병(Leigh Disease); FICP - 치명적인 영아 심근병증 플러스, MELAS 관련 심근병증; MELAS - 젓산 산증 및 뇌졸중 유사 에피소드를 동반한 미토콘드리아 뇌근육병; LDYT - 레버 유전성 시신경병증 및 근긴장이상증; MERRF - 근간대간질 및 불균일 적색 근섬유; MHCM - 모계 유전 비대성 심근병증; CPEO - 만성 진행성 외안근 마비; KSS - 컨스 세이어 증후군(Kearns Sayre Syndrome); DM - 진성 당뇨병; DDMF 진성 당뇨병 + 난청; CIPO - 근육병 및 안근마비를 동반한 만성 장 가성 폐색; DEAF -모계 유전성 난청 또는 아미노글리코사이드-유발 난청; PEM - 진행성 뇌병증; SNHL - 감각신경성 청력 상실; 뇌근육병; 미토콘드리아 세포병증; 확장성 심근병증; GER - 위장관 역류; DEMCHO - 치매 및 무도병; AMDF - 운동실조, 근간대 경련; 운동 불내성; ESOC 간질, 뇌졸중, 시신경 위축 및 인지 저하; FBSN 가족성 양 방향 선조체 괴사; FSGS 국소 분절 사구체 경화증; L IMM 치명적인 영아 미토콘드리아 근육병; MDM 근육병 및 진성 당뇨병; MEPR 근간대성 간질 및 정신운동 퇴행; MERME MERRF/MELAS 중복 질병; MHCM 모계 유전 비대성 심근병증; MICM 모계 유전 심근병증; MILS 모계 유전 리 증후군; 미토콘드리아 뇌심장근육병; 다계통 미토콘드리아 장애(근육병, 뇌병증, 실명, 청력 상실, 말초 신경병증); NAION 비동맥 전방 허혈성 시신경병증; NIDDM 비인슐린 의존성 진성 당뇨병; PEM 진행성 뇌병증; PME 진행성 근간대성 간질; RTT 레트 증후군(Rett Syndrome); SIDS 영아 돌연사 증후군; MIDD 모계 유전 당뇨병 및 난청; 및 MODY 청소년기 성인 발병 당뇨병.
- [0435] 핵 질병: 근이영양증, 엘리스-반 크레벨드 증후군, 마르팡(Marfan) 증후군, 근긴장성 이영양증, 척수성 근위축, 연골무형성증, 근위축성 측삭 경화증, 샤르코-마리-투스(Charcot-Marie-Tooth) 증후군, 코케이인(Cockayne) 증후군, 이영양성 형성이상, 뒤시엔느(Duchenne) 근이영양증, 엘리스-반 크레벨드 증후군, 진행성 골화성 섬유형성 이상, 알츠하이머병, 엔젤만(Angelman) 증후군, 간질, 본태성 진전, 약제 X 증후군, 프레드릭 운동실조

(Friedreich's ataxia), 헌팅톤병(Huntington disease), 니만-피크병(Niemann-Pick disease), 파킨슨병, 프래더-윌리(Prader-Willi) 증후군, 레트 증후군, 척수소뇌실조증, 윌리엄스(Williams) 증후군, 모세혈관확장성 운동실조, 빈혈, 겸상 적혈구, 버킷 림프종(Burkitt lymphoma), 고세병(Gaucher disease), 혈우병, 백혈병, 발작성 야간혈색소 요증, 포르피린증, 지중해빈혈, 크론병, 알파-1-항트립신 결핍증, 낭포성 섬유증, 난청, 펜드리드(Pendred) 증후군, 녹내장, 뇌회형 맥락막 망막 위축, 부신 비대증, 부신백질이영양증, 코케인 증후군, 긴 QT 증후군, 하이퍼-IgM을 동반한 면역결핍, 알포트(Alport) 증후군, 엘리스-반 크레벨드 증후군, 진행성 골화성 섬유형성이상, 바르텐부르크(Waardenburg) 증후군, 베르너(Werner) 증후군.

[0436] **감염성 질병:** 바이러스 - AIDS, AIDS 관련 복합체, 수두(Chickenpox, Varicella), 일반 감기, 거대세포바이러스 감염, 콜로라도 진드기열, 뎅기열, 에볼라 출혈열, 유행성 이하선염, 독감, 수족구병, 간염 - 단순 포진, 대상 포진, HPV, 인플루엔자, 라사열(Lassa fever), 홍역, 마버그(Marburg) 출혈열, 감염성 단핵구증, 볼거리, 소아마비, 진행성 다발 백질두증, 광견병, 풍진, SARS, 천연두(두창), 바이러스성 뇌염, 바이러스성 위장염, 바이러스성 수막염, 바이러스성 폐렴, 웨스트 나일병 - 황열병; 박테리아 - 탄저병, 박테리아 수막염, 브루셀라병, 선페스트, 캄필로박테리아증, 모소병, 콜레라, 디프테리아, 발진 티푸스, 임질, 한센병, 레지오넬라증, 나병, 렘토스피라증, 리스테리아증, 라임병, 펠리오이드증, MRSA 감염, 노카르디아증, 백일해, 폐렴구균성 폐렴, 앵무새병, Q열, 로키산 홍반열 또는 RMSF, 살모넬라증, 성홍열, 시겔라증, 매독, 파상풍, 트라코마, 결핵, 야토병, 장티푸스, 발진티푸스, 백일해; 기생충 - 아프리카 트리파노소마증, 아메바증, 회충증, 바베시아증, 샤가스병, 간흡충증, 크립토스포리디움증, 낭미충증, 열두조충증, 드래컨쿨러스증, 포충증, 요충증, 간질증, 비대흡충증, 사상충증, 자유 생활 아메바성 감염, 지아디아증, 약구충증, 왜소조충증, 이소스포라증, 칼라-아자르(Kala-azar), 리슈만편모충증, 말라리아, 요코가와흡충증(Metagonimiasis), 구더기증, 회선사상충증, 이감염증, 요충 감염, 옴, 주혈흡충증, 조충증, 톡소카라증, 톡소플라스마증, 선모충증(Trichinellosis, Trichinosis), 편충증, 트리파노소마증.

[0437] **압:** 유방암 및 난소암, 버킷 림프종, 만성 골수성 백혈병, 대장암, 폐암, 악성 흑색종, 다발성 내분비 종양, 신경섬유종증, p53 리프라우메니(LieFrauMeni), 췌장암, 전립선암, 망막모세포종, 본 히펠-린다우(von Hippel-Lindau) 증후군, 다낭성 신장 질환, 결절성 경화증.

[0438] **대사 장애:** 부신백질이영양증, 죽상동맥경화증, 베스트병, 고세병, 포도당 갈락토오스 흡수장애, 뇌회형 위축, 소아 발병 당뇨, 비만, 발작성 야간혈색소 요증, 페닐케톤뇨증, 레프섬병(Refsum disease), 탄지에르병(Tangier disease), 테이삭스병(Tay-Sachs disease), 부신백질이영양증, 유형 2 당뇨병, 고세병, 유전성 혈색소침착증, 레쉬-니한(Lesch-Nyhan) 증후군, 단풍시럽뇨병, 멘케스(Menkes) 증후군, 니만-피크병, 췌장암, 프래더-윌리 증후군, 포르피린증, 레프섬병, 탄지에르병, 윌슨병, 젤위거(Zellweger) 증후군, 조로증, SCID.

[0439] **자가면역 장애:** 자가면역 다선성 증후군, 루푸스, 유형 I 당뇨병, 경피증, 다발성 경화증, 크론병, 만성 활동성 간염, 류마티스 관절염, 그레이브스병(Graves' disease), 중증 근무력증, 근염, 항인지질 증후군(APS), 포도막염, 다발성 근염, 레이노(Raynaud's) 현상, 및 탈수초성 신경병증, 및 희귀 장애, 예컨대 류마티스성 다발성 근육통, 측두 동맥염, 쇼그렌 증후군, 베체트병, 처그-스트라우스(Churg-Strauss) 증후군 및 타카야수(Takayasu's) 동맥염.

[0440] **염증성 장애:** 탈모증, 이영양성 형성이상, 엘리스-반 크레벨드 증후군, 천식, 골관절염, 류마티스 관절염 및 척추관절염을 포함한 관절염.

[0441] **연령 관련 장애:** 알츠하이머병, 파킨슨병, 죽상동맥경화증, 연령 관련 황반 변성, 연령 관련 골다공증.

[0442] 상기 방법 및 조성물은 또한 인간 또는 비인간 동물에 대한 조직 재생/재생 의학, 줄기 세포 이식, 가역적 유전적 변형 유도, 억제 RNA 발현, 인지 향상, 성능 향상 및 미용 변경에서 노화와 관련된 증상을 치료, 관리 또는 감소시키는 데 사용될 수 있다.

[0443] **D. 유전자 변형 비인간 동물**

[0444] 상기 조성물 및 방법은 또한 유전자 변형 비인간 동물을 만드는 데 사용될 수 있다. 특히, 배아 줄기(ES) 세포 사이브리드의 접합체 미세주입, 핵 이식, 할구 전기융합 및 포배 주입은 각각 유전자 변형 동물을 만들기 위한 실행 가능한 전략을 제공하였다. 일 실시형태에서, 키메라 마우스를 생성하는 수단으로서 배아 줄기(ES) 세포를 형질 주입시켜 포유류 배아의 포배에 주입한다. 또 다른 실시형태에서, 배아 줄기(ES) 세포를 먼저 준비한 후 배아로 포배 주입한다. 특정 유전자 및 관심 있는 변형을 운반하는 세포의 사용은 형질 주입된 DNA의 결과를 생성하고 연구하게 한다. 이론상, 이러한 기술은 임의의 폴리뉴클레오타이드를 전체 유기체로 전이시킬 가능성을

제공한다. 예를 들어, 상기 방법 및 조성물은 특정 세포 유형 또는 세포 상태로 전달된 폴리뉴클레오타이드를 갖는 마우스를 생성하는 데 사용될 수 있다.

[0445] 단일 또는 다세포 비인간 유기체, 바람직하게는 비인간 포유류, 보다 바람직하게는 마우스는 본 개시내용의 조성물을 비인간 유기체에 투여함으로써 조성물로 형질 주입될 수 있다. 일 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 에피솜으로 남아 있고, 호스트 유기체의 계능에 안정적으로 통합되지 않는다. 또 다른 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 관심 있는 유전자의 발현을 방지한다. 따라서, 호스트의 특정 세포에서 폴리뉴클레오타이드의 발현은 호스트에 투여되는 폴리뉴클레오타이드의 양에 의해 제어될 수 있다.

[0446] 형질 주입된 비인간 유기체는 전통적인 유전자 변형 유기체에 비해 몇 가지 장점을 갖는다. 예를 들어, 본원의 형질 주입된 유기체는 유성 생식이 없는 전통적인 유전자 변형 유기체보다 짧은 시간에 생성될 수 있다. 또한, 호스트에서 관심 있는 폴리뉴클레오타이드의 발현은 호스트에 투여되는 관심 있는 폴리뉴클레오타이드의 양에 의해 직접적으로 조절될 수 있다. 관심 있는 폴리뉴클레오타이드의 투여량 제어된 발현은 형질 주입된 동물에서 관찰된 표현형 및 변화와 연관될 수 있다. 추가로, 유도성 발현 및/또는 복제 제어 요소가 관심 있는 폴리뉴클레오타이드에 포함되어 유도성 및 투여량 의존성 발현 및/또는 복제를 제공할 수 있다. 적합한 유도성 발현 및/또는 복제 제어 요소가 본 기술분야에 알려져 있다. 더 나아가, 특정 세포 유형 및 상태에서 유전자 및 유전자 변형의 효과는 동물의 세포 전체에 영향을 미치지 않으면서 연구될 수 있다.

[0447] **X. 키트**

[0448] 진핵생물 또는 원핵생물 유기체의 형질 주입, 특히 특정 세포 유형 또는 세포 상태의 형질 주입을 수행하는 데 필요한 요소를 공급하는 키트 또는 팩이 또한 개시된다. 일 실시형태에 따라, 중합체, 및 선택적으로 폴리플렉스 코팅, 예를 들어 표적 특이적 코팅을 포함하는 키트가 제공된다. 중합체는 사용자가 선택한 폴리뉴클레오타이드와 조합되어 호스트 또는 호스트 세포를 형질 주입시키는 데 사용될 수 있는 복합체를 형성할 수 있다. 폴리플렉스는 코팅과 추가로 혼합되어 세포 유형 또는 세포 상태 특이적 향성을 제공할 수 있다.

[0449] 키트의 개별 성분은 다양한 용기, 예를 들어 바이알, 튜브, 마이크로타이퍼 웰 플레이트, 병 등에 포장될 수 있다. 다른 시약, 예를 들어, 양성 대조군 샘플, 음성 대조군 샘플, 완충제, 세포 배양 배지 등이 별도의 용기에 포함되어 키트와 함께 제공될 수 있다. 바람직하게는, 키트는 또한 사용 설명서를 포함할 것이다.

[0450] **실시에**

[0451] 본 발명은 하기 비제한적인 실시예를 참조로 하여 더욱 이해될 것이다.

[0452] 해결하려는 과제: 단백질 치료제는 다양한 질병에 대해 매우 효과적인 의학적 치료로서 사용될 수 있다(문헌[Harris et al., *Pharmacol. Biochem. Behav.* 150e151 48e56 (2016), Jiang et al., *J. Control Release* 213 36e44 (2015), Natarajan et al., *Transl. Res.* 188 10e26 (2017), Efremenko et al., *J. Control Release* 247 175e181 (2017), Jiang et al., *Funct. Mater.* 28 (6) 1703982 (2018), Jiang et al., *J. Control Release* 231 38e49 (2016)]). 그러나, 이러한 치료제의 임상적 사용은 그 단가 및 전신 투여 후 불안정성으로 인해 제한되어 왔고, 지속되고, 효율적이며, 안전한 전달을 보증하는 새로운 접근법에 대한 필요성이 밝혀졌다(문헌[Carter, *Exp. Cell Res.* 317 (9) 1261e1269 (2011)]). 유전자 치료는 낮은 투여 빈도로 단백질 분비를 지속시키는 가능성으로 인해 매력적이다(문헌[Weissman, *Expert Rev. Vaccines* 14 (2) 265e281 (2015)]).

[0453] 바이러스를 이용하는 DNA-기반 치료는 장기간 단백질 발현 가능성을 제공하지만, 이들은 또한 특히 삽입 돌연변이 유발 위험성, 심각한 면역 반응 유도, 및 단백질 발현 수준 제어의 곤란성과 관련하여 수 많은 안전상 우려를 제기한다. DNA와 반대로, mRNA는 핵으로 들어가지 않고 암호화된 단백질의 발현을 유도하므로, 따라서 삽입 돌연변이 유발 위험성을 감소시키면서 비분열된 세포를 형질 주입하는 데 더 높은 효율을 입증하였다. mRNA 치료는 투여량이 확장가능하고, 치료가 일시적으로 세포질의 mRNA 안정성과 연관된다는 추가의 이점을 갖는다.

[0454] 과제의 해결 수단: 중합체성 물질의 라이브러리를 합성하기 위한 "하향식" 접근이 본원에 제공된다. 폴리(아민 코- 에스테르)(PACE)가 유전자 전달을 위해 사용되었다. PACE:pDNA 폴리플렉스는 가장 효율적이고 독성이 적은 비바이러스 벡터 중 하나이다(문헌[Zhou et al., *Nat. Mater.* 11 (1) 82e90 (2012)]). PACE 중합체는 몇 가지 주요 특징을 갖도록 설계되었다: (1) 중합체의 주요 사슬 내의 에스테르 연결기에 의해 제공되는 생체분해성; (2) 고도의 양이온성 중합체와 관련된 독성을 방지하면서 핵산과의 정전기 복합체화를 허용하는 낮은 양이온성 전하 밀도; 및 (3) 폴리플렉스를 안정화하는 락톤 기에 의해 제공되는 소수성. 리파아제 화학물질의 내약성은 높은 화학 다양성을 제공하여, 단량체 선택을 통한 중합체 구조의 조절을 허용하여 여러 물질의 패밀리가 용이

하게 수득된다. 그러한 다양성은 mRNA 전달을 위한 PACE 기술을 번역하는 데 유망하다.

[0455] 작용제의 폐 시스템으로의 전달에 효과적인 것으로 나타난 전달 시스템 및 화학물질에 대해 추가의 변형이 이루어졌다.

[0456] **실시예 1: PACE 중합체는 mRNA를 전달할 수 있다**

[0457] 물질 및 방법

[0458] 물질

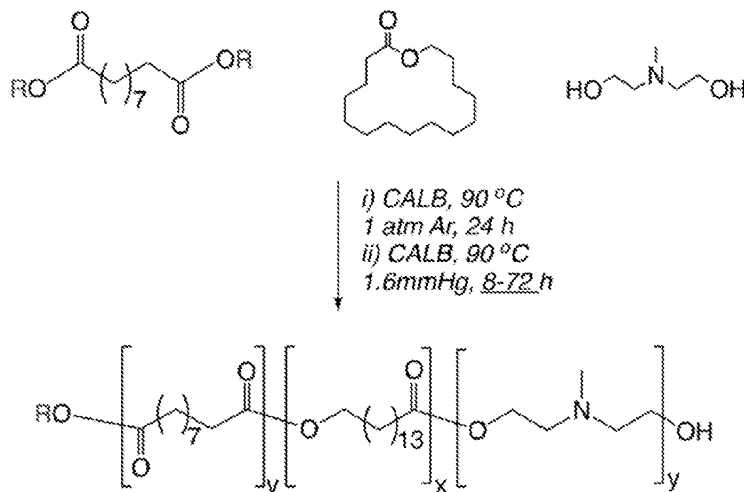
[0459] Sigma Aldrich(미국 미조리주 세인트 루이스 소재)로부터 ω -펜타데칼락톤(PDL), 디에틸 세바케이트(DES), 세바스산, N-메틸디에탄올아민(MDEA), 클로로포름, 디클로로메탄, 헥산, 클로로포름-d, 크롬(III) 아세틸아세토네이트, 에틸렌 디아민, 에탄올 아민, 글리신, 및 1,10-카보닐디이미다졸(CDI)을 구매하여 받은 그대로 사용하였다. ChemBridge Corporation(미국 캘리포니아주 샌 디에고 소재)으로부터 2-[(2-아미노에틸)(메틸)아미노]에탄올(AEMAE)을 구매하였다. Sigma Aldrich로부터 또한 아크릴 수지(Novozym 435) 상에 지지된 고정된 칸디다 안타르 크티카 리파아제(*Candida antarctica* lipase) B(CALB)를 입수하여 사용 전 20시간 동안 2.0 mmHg 하에 50°C에서 건조시켰다. Mirus Bio LLC(미국 위스콘신주 매디슨 소재)로부터 TransIT-mRNA 형질 주입 키트를 구매하였다. TriLink Biotechnologies(미국 캘리포니아주 샌 디에고 소재)로부터 루시페라아제에 대해 암호화되는 변형된 Fluc mRNA 및 에리트로포이에틴(EPO)에 대해 암호화되는 뮤린 EPO mRNA를 구매하였다. ATCC(미국 버지니아주 매너서스 소재)로부터 HEK293 세포, Daoy 세포, 및 SH-SY5Y 세포를 구매하였다.

[0460] 중합체 합성

[0461] 몇 가지 변형을 포함한, PACE 합성을 문헌[Zhou et al., *Nat. Mater.* 11 (1) 82-90 (2012)]에 기재된 바와 같이 수행하여 여러 구조를 갖는 중합체를 생성하였다. 요약하면, (1) 고전적인 또는 산성 PACE를 수득하기 위해, 디에틸 세바케이트 또는 세바스산을 중합을 위해 사용하고; (2) 고전적인 PACE의 소수성을 변화시키기 위해, 상이한 비율의 PDL(10% 또는 20%)을 시약에 첨가하고, (3) 10% PDL을 함유하는 고전적인 PACE의 분자량(MW)을 변화시키기 위해, 제2 단계 반응 시간을 8 내지 72시간으로 변화시켜 2 kDa 내지 20 kDa의 MW를 갖는 중합체를 수득하였다.

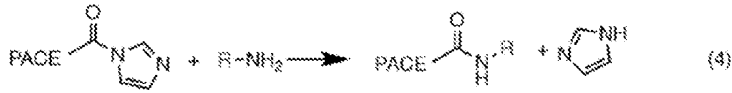
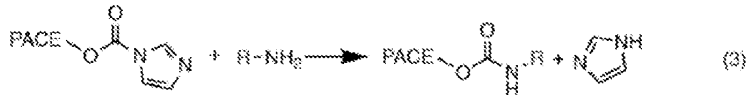
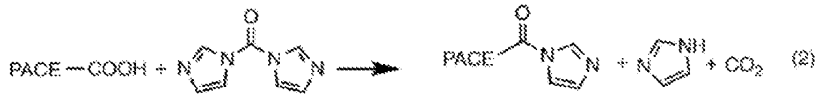
[0462] 결과

[0463] PACE는 디에스테르/이산의 아미노-치환된 디올 및 락톤과의 효소 공중합을 통해 형성된 삼원공중합체의 패밀리이다. PACE는 pDNA(문헌[Zhou et al., *Nat. Mater.* 11 (1) 82e90 (2012)]), 마이크로RNA(문헌[Adams et al., *Cancer Res.* 76 (4) 927e939 (2016)]), 및 siRNA(문헌[Cui et al., *Nat. Commun.* 8 (1) 191 (2017)])를 효율적으로 전달할 수 있다. 그러나, mRNA와 이러한 다른 핵산의 구조적 차이를 고려하여(문헌[Kauffman et al., *Nano Lett.* 15 (11) 7300e7306 (2015)]), 기존 PACE 구조의 변형 및/또는 새로운 PACE 변이체의 개발이 전달을 개선시키는 수단으로서 고려되었다. 리파아제 촉매의 높은 내약성은 특히 소수성 및 MW와 관련하여 구조의 다양성을 제공한다. DNA의 전달 및 형질 주입을 위해 가장 효율적인 PACE 조성물 중 하나(고전적인 PACE)로부터 출발하여, MW 및 락톤 함량이 다른 상이한 중합체를 합성하여 mRNA 전달 및 형질 주입을 특이적으로 개선시켰다.



[0464]

- [0465] PACE 합성을 최종 중합체의 여러 파라미터가 달라지도록 변형시켰다. 디에틸 세바케이트(R =CH₂CH₃), 또는 세바스산(R = H)을 사용하여 각각 고전적인(에스테르/OH) 말단 또는 산성(COOH/OH) 말단 PACE를 제조하였다. 고전적인 PACE의 경우, 합성의 제2 단계의 기간을 8 내지 72시간으로 변화시켜 MW를 변화시켰다. PDL 함량(10% 또는 20%)을 변화시켜 중합체 소수성을 변형하였다.
- [0466] 겔 투과 크로마토그래피(GPC)를 사용하여 중합체 MW를 결정하였다. 모든 PACE 중합체는 mRNA를 복합체화할 수 있고, 중성 또는 음의 표면 전하를 갖는 나노크기의 폴리플렉스가 형성되었다.
- [0467] RIBOGREEN® 분석을 사용하여 평가할 경우, 모든 중합체는 55 내지 76% 범위의 효율로 mRNA를 캡슐화할 수 있었다. HEK-293 세포 내에서 루시페라아제(LUC) 발현 mRNA를 형질 주입하는 상이한 PACE 중합체의 능력을 사용하여 시험관내 형질 주입 성능을 스크리닝하였다. 상이한 구조적 변형을 나타내는 이러한 PACE 중합체 중 어느 것도 양성 대조군으로서 사용되는 상업적 작용제 TRANSIT®에 필적하는 형질 주입 수준을 제공하지 않았다(도 1a 내지 1c). 그러나, 중합체의 MW에 따른 형질 주입 수준의 명확한 추세가 관찰되었다. 중합체 MW가 20 kDa로부터 5 kDa로 감소함에 따라, 형질 주입 효율이 두 자릿수 증가한 것으로 관찰되었다(각각 1.1×10^5 RLU/mg 및 4.4×10^7 RLU/mg). 그러나, 이러한 추세는 5 kDa에서 안정기인 것으로 보이는데, 그 이유는 형질 주입 수준이 2 kDa의 PACE MW를 사용할 때 급격하게 감소하였고, 이는 자유 mRNA에 의해 얻은 수준에 필적하기 때문이다. 종래의 연구는 다가양이온과 다가음이온의 정전기 복합체화의 강도 및 안정성이 다가양이온의 길이에 따라 기하급수적으로 증가하는 것으로 보고하였다(문헌[Akinc et al., *Bioconj. Chem.* 14 (5) 979e988 (2003), Tsuchida & Osada, *Makromol. Chem.* 175 (2) 593e601 (1974), Choosakoonkriang et al., *J. Pharmaceut. Sci.* 92 (8) 1710e1722 (2003), Schaffer et al., *Biotechnol. Bioeng.* 67 (5) 598e606 (2000)]).
- [0468] 이러한 결과는 매우 짧은 중합체(2 kDa)가 아마도 mRNA의 열등한 복합체화로 인해 형질 주입에 대해 비효율적임을 나타낸다. 2 kDa 문턱값보다 높은, 보다 짧은 중합체(5 kDa)는 보다 높은 MW 중합체(10 kDa 또는 20 kDa)보다 mRNA 전달에 보다 효율적인데, 아마도 세포 내부의 높은 MW PACE 폴리플렉스로부터 mRNA는 비효율적으로 방출되기 때문이다. 높은 MW PACE 사슬은 많은 수의 양 전하 및 소수성 도메인을 함유하며, 이는 열역학적으로 안정한 mRNA와의 결합을 유도하여 폴리플렉스로부터의 방출을 방지한다. 상기 결과는 효율적인 mRNA 전달이 중합체의 MW: 중합체 사슬 길이의 미세한 균형으로부터 비롯됨을 나타내며, 중합체 사슬 길이는 mRNA의 복합체화 및 폴리플렉스의 안정화를 보장하기에 충분히 길지만 세포 내부의 mRNA 방출을 위해 충분히 짧을 필요가 있다. 반면에, 10 kDa PACE 중합체의 PDL 함량의 10%로부터 20%로의 증가는 형질 주입 효율에 유의적으로 영향을 끼치지 않았고(도 1b), 이는 pDNA에 의해 관찰된 것과 반대이며, 중합체 구조는 각각의 유전적 물질에 대한 조절로부터 이득이 있음이 확인된다.
- [0469] 이는 2 kDa 초과 및 10 kDa 미만, 보다 바람직하게는 3 kDa 내지 8 kDa의 범위, 가장 바람직하게는 5 kDa의 분자량을 갖는 중합체가 가장 효과적일 것임을 보여준다.
- [0470] **실시예 2: PACE 형질 주입 효율은 말단 기 구성에 따라 매우 좌우된다.**
- [0471] 물질 및 방법
- [0472] 중합체 말단 기의 변형
- [0473] 상이한 말단 기를 갖는 PACE를 제조하기 위해, 모 중합체를 디에틸 세바케이트 대신에 세바스산으로 합성하여, 히드록실과 카복실 말단 기의 혼합을 갖는 PACE를 수득하였다. 이어서, 말단 기 모두를 실온에서 밤새 무수 디클로로메탄에서 교반함으로써 1:40의 물비로 CDI에 의해 활성화시켰다. 혼합물을 탈이온수로 3회 세척한 후 진공 하에 DCM을 증발시켜 시약, PACE-CDI를 수득하였다(하기 반응식 참조).
- [0474] PACE-CDI를 아민-함유 분자와 반응시켜 새로운 말단 기를 갖는 PACE를 수득하였다. 구체적으로, 글리신 및 AEMAE를 사용하여 각각 PACE-COOH 및 PACE-MAE를 생성하였다. 컨주게이션을 위해, 5 mM의 글리신 또는 AEMAE를 일정하게 교반하면서 실온에서 40시간 동안 DMSO 중 0.5 mM의 PACE-CDI와 반응시켰다. 반응 후에, 혼합물을 10 배 부피의 탈이온수로 세척하고, DCM으로 추출한 후 진공 하에 DCM을 증발시켜 PACE-COOH 및 PACE-MAE를 수득하였다. 10 kDa 산성 PACE를 합성하기 위해 이러한 프로토콜을 채택할 경우, 5 kDa PACE-CDI 및 에틸렌디아민을 2:1의 정확한 물비로 첨가하였다.



[0475]

[0476]

상기 예시된 바와 같이, -COOH 또는 -MAE 말단 기를 갖는 PACE를 수득하기 위해, 산성 PACE를 CDI 활성화(1, 2)한 후 아민-함유 분자(3,4; R = 글리신, 또는 AEMAE)와 친핵성 치환하였다.

[0477]

중합체 특성화

[0478]

Bruker AVANCE 500 분광계 상에서 ¹H 및 ¹³C NMR 스펙트럼을 기록하였다. 역 게이트 ¹³C NMR을 위해, 샘플을 클로로폼-d 중 50 mg/ml의 중합체로 제조하고, 크롬(III) 아세틸아세토네이트(Cr(acac)₃)를 완충제로서 5 mg/ml의 농도로 첨가하였다. 10초의 T1 완화 시간을 사용하여 신호를 기록하였다. 마이크로STYRAGEL 컬럼(혼합 상; 공극 크기 100 Å 내지 10⁶ Å)을 구비한 Waters HPLC 시스템을 사용하여 겔 투과 크로마토그래피(GPC)에 의해 중합체의 분자량(MW)을 측정하였다. 0.2 중량%의 트리에틸아민을 함유하는 클로로폼을 1 ml/min의 유량에서 용리제로서 사용하였다. 2 mg/ml의 샘플 농도 및 100 μl의 주입 부피를 사용하였다. Sigma Aldrich(미국 미조리주 세인트 루이스 소재)로부터의 좁은 다분산성 폴리스티렌 표준물질에 의해 생성된 통상적인 보정 곡선을 기준으로 중합체 MW를 결정하였다. Empower II GPC 소프트웨어를 사용하여 GPC 기구를 실행하고 MW 계산을 수행하였다.

[0479]

폴리플렉스 제조 및 특성화

[0480]

명시되지 않는 한, 중합체:mRNA 폴리플렉스를 25 mM의 아세트산나트륨 완충제(pH 5.8)에서 100:1의 중합체:mRNA 중량비로 제조하였다. 시험관내 실험을 위해, 10 μg mRNA/ml의 용액을 제조하였다: 먼저, 1 μl의 중합체 용액(DMSO 중 100 mg/ml)을 50 μl의 아세트산나트륨 완충제에 희석시켰다. 짧은 와동 후, 중합체 용액을 50 ml 아세트산나트륨 완충제에 희석된 1 μg의 mRNA와 혼합하고, 다시 와동시켰다. 중합체:mRNA 혼합물을 사용 전 10분 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 생체내 실험을 위해, 아세트산나트륨 완충제 중 100 μg mRNA/ml의 용액을 동일한 방법으로 제조하였다.

[0481]

2 μg/ml의 mRNA 농도로 탈이온수에 폴리플렉스를 희석한 후 Malvern Nano-ZS(영국 소재의 Malvern Instruments)를 사용하여 동적 광 산란(DLS)에 의해 폴리플렉스의 수력학적 직경을 측정하였다. 제타 전위를 측정하기 위해, 동일한 용액을 일회용 모세관 셀로 로딩하여 Malvern Nano-ZS 상에서 분석하였다.

[0482]

제조자의 설명서에 따라 Quant-IT RiboGreen RNA 키트(Invitrogen, #R11491)를 사용하여 폴리플렉스에서 mRNA의 캡슐화 효율(EE)을 측정하였다. RiboGreen 분석에 의해 용액 중의 자유 mRNA의 양을 측정할 경우, 이 양을 폴리플렉스를 형성하기 위해 더해진 초기 양에서 차감하여 폴리플렉스 내에서 복합체화된 mRNA의 양을 얻었다.

[0483]

세포 배양

[0484]

37°C 및 5% CO₂에서 10% FBS 및 1% 페니실린/스트렙토마이신이 보충된 4.5 g/L의 글루코스 DMEM 배지(Gibco #11965)에서 HEK293 세포 및 SH-SY5Y 세포를 배양하였다. 37°C 및 5% CO₂에서 10% FBS 및 1% 페니실린/스트렙토마이신이 보충된 2 mM의 L-글루타민, 1 mM의 피루브산나트륨, 및 1500 mg/L 탄산수소나트륨 EMEM 배지(ATCC #30-2003)에서 Daoy 세포를 배양하였다.

- [0485] 시험관내 형질 주입
- [0486] Fluc mRNA의 시험관내 형질 주입을 위해, 500 μ l의 배지에서 75,000 세포/웰의 밀도로 24-웰 플레이트에 세포를 시딩하고, 밤새 인큐베이션하여 부착을 보장하였다. 배지를 400 μ l의 형질 주입 배지(10% FBS를 함유하지만, 페니실린/스트렙토마이신이 없는 배양 배지)로 교체하고, 100 μ l의 폴리플렉스(총 1 μ g의 mRNA)를 각각의 웰에 첨가하였다. 자유 mRNA 대조군을 위해, 1 μ g의 mRNA를 100 μ l의 아세트이트 완충제에 희석하고, 웰에 첨가하였다. 상업적인 mRNA 형질 주입 키트 TransIT를 대조군으로서 사용하였다. 요약하면, 1 μ g의 mRNA를 100 μ l의 OPTIMEM 배지(Gibco #11058021)에서 0.7 μ l의 Boost 시약 및 1.1 μ l의 TransIT 시약과 혼합하였다. 형질 주입 후 24시간에, 루시페라아제 발현을 측정하였다. 세포를 세척하고, 200 μ l의 1x 용해 완충제(Promega, #E397A) 및 -80°C 에서 1회의 동결-해동 주기를 사용하여 용해시켰다. 이어서, 20 μ l의 용해물을 100 μ l의 루시페라아제 리포터 시약(Promega, #E1483)과 혼합하였고, Glomax 광도계(Promega) 상에서 발광을 관독하였다. Pierce BCA 단백질 분석 키트(ThermoFisher, #23225)를 사용하여 용해물 단백질 함량을 측정하였다. 모든 실험은 3회의 독립적 실험을 두 번씩 실행하였다.
- [0487] 결과
- [0488] 도 2는 실시예 2에 예시된 방법에 의해 합성되는 5 kDa 또는 10 kDa의 MW를 갖는 PACE-COOH 및 PACE-MAE의 형질 주입 효율을 나타내는 막대 그래프이다. 통계적 유의성은 Student's t-시험에 의해 결정되었다(다음과 같이 나타남: *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$).
- [0489] 디에틸 세바케이트, PDL과 MDEA의 삼원공중합에 의해 합성된 PACE는 메틸(디에틸 세바케이트로부터의 것)과 히드록실(MDEA로부터의 것) 말단 기의 혼합을 함유한다. 산성 PACE를 형성하기 위한 PACE 합성을 위해 단량체 디에틸 세바케이트가 세바스산으로 대체된 경우, 그 mRNA 형질 주입 효율은 두 배가 되었다(도 2). 동일한 중합체 상의 상이한 말단 기는 pDNA의 형질 주입 효율에 큰 영향을 끼칠 수 있다(문헌[Sunshine et al., *Biomacromolecules* 12 (10) 3592e3600 (2011), Sunshine et al., *Mol. Pharm.* 9 (11) 3375e3383 (2012)]). 말단 기 조성이 mRNA 형질 주입에 또한 영향을 끼칠 수 있는지, 보다 특히 PACE 상의 변형된 말단 기가 mRNA 전달을 개선시킬 수 있는지를 결정하기 위한 실험을 설계하였다.
- [0490] 대략 5 kDa의 분자량을 갖는 카복실과 히드록실 말단 기의 혼합을 함유하는 산성 PACE를 출발 물질로서 사용하였다. 이러한 두 개의 말단 기 모두는 1,10-카보닐디이미다졸(CDI)로 활성화시킬 수 있고, 이는 글리신 또는 AEMAE를 포함하는 아민-함유 분자로 추가로 치환하여 각각 카복실(eCOOH) 말단 기(PACE-COOH) 또는 (메틸아미노)에탄올(-MAE) 말단 기(PACE-MAE)를 형성하였다.
- [0491] -COOH 또는 -MAE 말단 기를 갖는 PACE, 즉 산성 PACE를 CDI 활성화에 의해 수득한 후 아민-함유 분자(3,4; R = 글리신, 또는 AEMAE)와 친핵성 치환하였다.
- [0492] 산성 PACE에서 발견되는 말단 기의 자연 발생 혼합물을 모방하도록 이러한 2개의 단량체를 선택하여, 보다 높은 형질 주입 효율을 갖는 말단 기를 확인하였다. 반응 메커니즘은 NMR 분광학에 의해 확인되는 바와 같이 말단 기 둘 모두에 대해 90% 초과 전환율을 보장하였다.
- [0493] 다음으로, 이러한 중합체가 시험관내에서 mRNA를 형질 주입시키는 능력을 평가하였다. 도 3a는 10% PDL 함량, 분자량 2 kDa, 5 kDa, 10 kDa 및 20 kDa를 갖는 고전적인 PACE를 사용할 경우 MW의 효과(평균 LUC/단백질 mg)를 나타내는 막대 그래프이다. 도 3b는 10 kDa 고전적인 PACE 중합체의 10 또는 20% PDL을 사용할 경우 PDL의 함량의 효과(평균 LUC/단백질 mg)를 나타내는 막대 그래프이다. 도 3c는 10% PDL 함량에서 5 kDa의 MW를 갖는 고전적인 PACE 및 산성 PACE의 형질 주입 효율(평균 LUC/단백질 mg)을 나타내는 막대 그래프이다. 결과는 두 번씩 실행한 3회의 독립적 실험의 평균 \pm SD로 제시된다.
- [0494] 상이한 말단 기를 갖는 PACE 간에 형질 주입 효율의 유의적 차이가 관찰되었고, 5 kDa PACE-MAE 중합체는 동일한 MW의 PACE-COOH보다 두 자릿수 더 높은 형질 주입 효율을 나타내었다(도 3c) 이러한 효과는 이러한 2개의 중합체의 EE 차이에 의해 설명될 수 있는데, PACE-MAE는 98%의 총 mRNA를 캡슐화하였고, PACE-COOH는 겨우 18% 캡슐화할 수 있었다. 5 kDa 초과 분자량의 산성 PACE는 기술적 어려움(중합체 사슬이 더 길게 성장하기 때문에 물 부산물을 제거하기 어려움)으로 인해 직접적으로 합성되지 않았지만, 10 kDa 산성 PACE는 5 kDa 중합체의 CDI 활성화 후에 에틸렌 디아민 분자와 2개의 중합체 사슬을 가교결합하여 수득될 수 있다. 10 kDa 산성 PACE를 카복실 또는 히드록실 말단 기로 변형시킬 경우, 그 형질 주입 효율은 5 kDa 대응물과 비교하여 유의적으로 개선되었고(도 3a), 이는 PACE-COOH 및 PACE-MAE 중합체에 대해서 형질 주입 효율이 MW 증가에 따라 증가함을 의미한다.

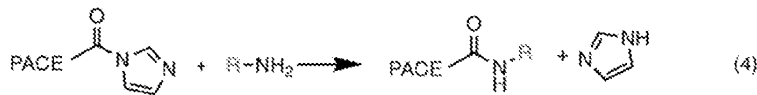
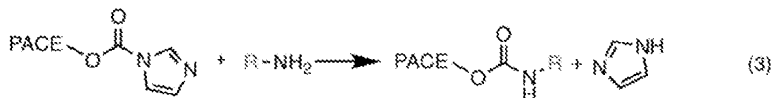
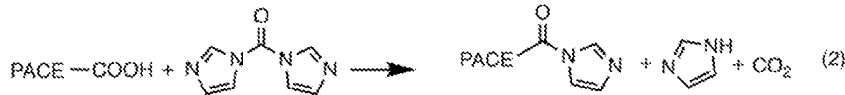
- [0495] 이러한 거동은 형질 주입 효율이 MW 증가에 따라 감소하는 고전적인 PACE와 매우 상이하며, 형질 주입 효율에 있어서 말단 기의 중요성이 더욱 입증된다. PACE-COOH의 EE는 그 MW가 5 kDa로부터 10 kDa로 증가할 때 18%로부터 45%로 증가하지만, PACE-MAE의 EE는 실제로 많이 변하지 않았고(5 kDa에서 98% 대 10 kDa에서 95%), 이는 EE의 증가가 형질 주입 효율 개선에 대한 유일한 설명이 아님을 나타낸다.
- [0496] 이러한 데이터는 PACE 말단 기 및 MW가 첨가제보다 더 기여함을 보여준다. PACE 말단 기의 속성은 mRNA와의 복합체화 능력에 기여하는 것으로 보이지만, MW 또한 복합체화에 있어서 중요한 역할을 하며, 엔도솜 탈출 및/또는 세포질 내의 mRNA의 방출과 같은 하류 생물학적 단계에 관여할 수 있다.
- [0497] **실시예 3: mRNA 전달 작동화된 PACE 중합체를 위한 PACE의 "하향식" 작동**
- [0498] 물질 및 방법
- [0499] 중합체의 작동
- [0500] 상이한 출발 MW를 갖는 중합체(20 내지 30 mg)를 유리 바이알의 내면에 고르게 도포하여, 효율적인 공기 침투를 보장하는 막막을 형성하였다. 이어서, 바이알을 상이한 시간 동안 흐르는 습윤 공기에 노출시켜 제어된 온도(전형적으로, 37°C)에서 인큐베이션하였다.
- [0501] 시험관내 독성
- [0502] PACE 중합체 및 TransIT의 세포독성을 평가하기 위해, 100 μ l의 배지에서 10,000 세포/웰의 밀도로 96-웰 플레이트에 HEK293 세포를 시딩하고, 밤새 인큐베이션하여 부착을 보장하였다. 중합체:mRNA 폴리플렉스 또는 TransIT/ mRNA 복합체를 형질 주입 실험과 동일한 w:w 비를 사용하여 형성하고, 여러 농도에서 형질 주입 배지에 희석시켰다. 100 μ l의 폴리플렉스 함유 배지를 웰에 첨가하여 0.01 내지 20 μ g/ml 범위의 mRNA의 최종 농도를 달성하였다. 24시간 인큐베이션 후, MTT 분석을 사용하여 세포 생존력을 측정하였다. 모든 실험은 3회의 독립적 시험을 두 번씩 실행하였다.
- [0503] 폴리플렉스의 동결 건조
- [0504] 아세트산나트륨 완충제를 사용하여 PACE:mRNA 폴리플렉스를 제조하였고, 여러 농도의 트레할로스 용액(25 mM 아세트산나트륨 완충제 중 30 mg/ml 또는 60 mg/ml, pH = 5.8)을 1:1 부피비로 폴리플렉스 현탁액에 첨가하여 0, 15 또는 30 mg/ml의 최종 트레할로스 농도를 획득하였다. 이어서, 혼합물을 액체 질소에서 급속 동결시켰고, 2일 동안 동결 건조시켰다. 동결 건조 종료 시에, 폴리플렉스를 아세트산나트륨 완충제에 재현탁시키고, HEK293 세포에서 형질 주입 효율을 평가하였다. 상기 기재된 방법을 사용하여 유전자 발현의 형질 주입 및 특성화를 수행하였다.
- [0505] 결과
- [0506] PACE의 라이브러리의 "상향식" 합성으로 초기 스크리닝한 후, 중합체 MW 및 말단 기 조성은 mRNA에 대한 이러한 물질의 형질 주입 효율을 결정하는 두 가지 중요한 파라미터로서 확인되었다. MW의 효과는 5 kDa 내지 10 kDa의 좁은 범위 내에서 형질 주입 효율에 유의적으로 영향을 미치는 것으로 나타났다. "하향식" 접근은 높은 MW 중합체의 제어된 가수분해를 통해 PACE MW 및 말단 기를 동시에 변화시키도록 개조되었다. 이렇게 함으로써, 보다 높은 형질 주입 효율을 갖는 PACE 말단 기 및 MW가 조절되고 확인되었다.
- [0507] 이 방법은 작동된 PACE(aPACE)로 불리는 물질의 새로운 패밀리를 생성하였다. 이러한 생분해성 aPACE 중합체는 무시할 정도의 독성과 함께 시험관내 및 생체내 둘 모두에서 높은 형질 주입 수준을 산출하였다.
- [0508] aPACE를 에스테르 백본의 제어된 가수분해에 의해 생성하였다. 적절한 온도 하에 공기로의 노출은 PACE의 가수분해에 대한 온화한 조건을 제공하여, 그 MW를 감소시키고, 히드록실 및 카복실 말단 기를 노출시킨다.
- [0509] 이를 확인하기 위해, aPACE를 NMR 분광학 및 GPC에 의해 특징지었다. aPACE의 NMR 분석은 히드록실 기 피크 아래의 면적 증가(aPACE 및 고전적인 PACE에 대해 각각 58.2 및 58.9) 및 고전적인 비작동된 PACE에 비해 aPACE에서 178 ppm에서의 명백한 카복실 피크의 출현이 관찰되었으므로, 상기 작동 방법으로 히드록실 및 카복실 말단 기가 노출되었음을 입증하였다. GPC는 작동 방법이 모든 PACE 중합체의 MW를 감소시켰음을 보여주었다(도 4).
- [0510] 폴리에스테르의 가수분해는 널리 알려져 있다. 이러한 반응은 보통 고온, 고압에서 그리고/또는 촉매의 존재 하에 진행될 수 있다. 작동은 37°C에 비해 100°C에서 수행될 때 가속될 수 있는 것으로 관찰되었다. 그러나, 보다 온화한 온도의 사용은 원하는 분자량의 aPACE를 생성하는 보다 재현가능한 방법을 제공하였다.

- [0511] mRNA에 대한 PACE 형질 주입 효율에 대해 작동 프로토콜이 미치는 영향을 분석하기 위해, 상이한 작동 기간으로 상이한 출발 MW로부터 생성된 aPACE를 시험하였다. aPACE 및 mRNA로부터 생성된 자가 조립된 폴리플렉스는 HEK293 세포의 형질 주입에 매우 효과적이며, 양성 대조군, TransIT에 필적하는 루시퍼라아제 발현 수준을 초래한다(도 5a 및 5b). 형질 주입 효율은 각각의 초기 MW에 대한 최적의 작동 시간(도 5a: 5 kDa 중합체에 대해서는 5일, 10 kDa 중합체에 대해서는 10일, 그리고 20 kDa 중합체에 대해서는 30일)으로, 작동 시간, 및 작동된 중합체의 초기 MW에 따라 좌우되는 것으로 보였다. 이러한 개선된 작동 시간에 대해서, 모든 aPACE 중합체는 TransIT와 필적하는 수준의 형질 주입을 제공하였고, 그 비작동된 대응물에 비해 유의적으로 더 높은 형질 주입 수준을 제공하였다(도 2, $p < 0.005$).
- [0512] 여러 농도에서 세포독성에 대해 시험할 경우, TransIT는 상당한 세포 사멸을 유도하였지만, 유사한 양의 전달된 mRNA에 대해서, 모든 aPACE 제형은 비세포독성이었다(도 5c).
- [0513] 20 kDa 중합체를 100°C에서 6시간 동안 작동하는 가속화된 작동 방법에 의해 37°C에서 30일 동안 작동된 20 kDa 중합체와 유사한 형질 주입 수준이 생성되었다(도 5d). 가속화된 작동 방법에도 불구하고, 37°C에 비해 100°C에서 작동을 수행할 경우 유사한 동적 프로파일이 관찰되었다. 두 방법 모두 형질 주입 효율이 최적으로 증가한 후 활성이 감소한 것으로 나타났다. 이러한 관찰은 유사한 시간-의존적 방법이 두 온도에서 발생하고 있음을 나타낸다.
- [0514] 이러한 aPACE의 MW는 서로 유사하며, 6 kDa 내지 8 kDa의 범위이다. 형질 주입 효율 차이를 고려할 때, 데이터는 좁은 범위의 aPACE MW 내에서 형질 주입 효율의 급속한 변화를 나타내고, 이는 스크리닝에 대한 "하향식" 작동 접근의 사용 가치를 강조한다. 전달 비효율은 다양한 유전적 물질의 운반을 위해 조절되어야 하므로, 제어된 "하향식" 작동 방법은 각각의 유전적 물질에 대한 MW와 말단 기의 조합을 최적화하는 간단하고 강력한 방식을 구성한다. 이 방법의 장점은 MW와 같은 핵심 요소를 미세 조정하는 데 있어서 정확성뿐만 아니라 동일한 출발 물질의 작동 단계에서 중합체의 개별 라이브러리를 합성하는 단순성을 포함한다. 종합하면, 상기 결과에 의해 이 접근이 mRNA 전달 및 형질 주입을 위해 맞춤형 MW와 말단 기의 최적 조합을 제공한 것으로 확인되었다.
- [0515] aPACE의 넓은 효능을 보장하기 위해, 이러한 중합체를 또한 Daoy 세포, 인간 수모세포종 세포주에서, 그리고 SH-SY5Y 세포, 인간 신경모세포종 세포주에서 형질 주입에 대해 시험하였다. HEK293 세포에서 관찰된 바와 같이, 작동 방법은 두 개의 세포주에서 PACE 형질 주입 효율을 유의적으로 증가시켰다.
- [0516] aPACE:mRNA 폴리플렉스에 대한 동결 건조 효과를 또한 시험하였다. 트레할로스를 동결보호제로서 사용하였고, 폴리플렉스의 재구성 후 HEK293 세포에서 형질 주입 효율을 평가하였다. aPACE로 제조된 동결 건조된 폴리플렉스는 심지어 동결보호제 부재 하에서도 신선한 폴리플렉스만큼 효율적인 한편, 높은 농도(6%)의 트레할로스의 첨가는 형질 주입 효율을 약간 증가시켰다.
- [0517] **실시예 4: aPACE는 mRNA 생체내 전달에 효과적이다**
- [0518] 물질 및 방법
- [0519] 생체내 연구
- [0520] Yale 동물 자원 센터(YARC) 및 기관 동물 관리 및 사용 위원회(IACUC) 가이드라인에 따라 Yale University에서 모든 동물 작업을 완료하였다. 실험을 위해 암컷 BALB/c 마우스(20 g, Charles River, 미국 코네티컷주 윌리먼틱 소재)를 사용하였다.
- [0521] PACE:mRNA 폴리플렉스(mRNA에서 0.1 mg/ml, N = 3), aPACE:mRNA 폴리플렉스(mRNA에서 0.1 mg/ml, N = 3), TransIT: mRNA 복합체(mRNA에서 0.1 mg/ml, N = 3), 아세트산나트륨 완충제에 희석된 자유 mRNA(mRNA에서 0.1 mg/ml, N = 3) 또는 아세트산나트륨 완충제(25 mM, pH 5.8, N = 3)를 200 μ l의 부피로 꼬리 정맥을 통해 정맥내 투여하였다.
- [0522] 입자 투여 전, 및 주사 후 6시간, 24시간, 48시간, 72시간 및 7일에 안와후 채혈(50 μ l)을 수행하였다. 채혈 직후, 혈장을 원심분리(3000 g, 10분)에 의해 분리하고 추가로 분석할 때까지 -80°C에서 동결시켰다. ELISA 키트(R&D Systems)를 사용하여 혈장 내의 EPO 농도를 측정하였다. 주사 후 24시간 및 7일에, 간, 신장 및 비장을 수집하고, H&E 염색을 위해 처리하고, 외부 병리학자에 의해 임의의 비정상적인 세포 형태에 대해 점수를 매겼다. 도식화 및 통계적 분석을 위해 미국 캘리포니아주 라 호이아 소재의 GraphPad Software(www.graphpad.com/)를 사용하였다. 통계적 유의성은 95%의 신뢰 수준으로 양측 독립변수 student's t-시험을 사용하여 시험하였다.

- [0523] 결과
- [0524] 치료적으로 적절한 mRNA의 전달에 대한 aPACE 중합체를 평가하기 위해, 마우스에서 EPO-발현 mRNA 전달 능력을 평가하였다. 2개의 aPACE 중합체(5일 동안 작동된 PACE 5 kDa 및 10일 동안 작동된 PACE 10 kDa)를 시험하고, 생체내 mRNA 전달에 대해 입증된 효과로 인해 선택된 양성 대조군 TransIT와 비교하였다(문헌[Kariko et al., *Mol. Ther.* 20 (5) 948e953 (2012)]). 30일 동안 작동된 PACE 20 kDa는 시험하지 않았는데, 형성된 폴리플렉스가 생체내 투여에 필요한 고 농도에서 크기에 대해 충분히 안정하지 않았기 때문이다.
- [0525] EPO mRNA:aPACE 폴리플렉스를 야생형 마우스에 정맥내 투여하여 총 20 mg의 투여량의 mRNA를 전달하고, 주사 후 상이한 시점에서 채혈하여 ELISA에 의해 EPO 수준을 측정하였다. 최적화된 aPACE 중합체를 사용하는 mRNA 폴리플렉스는 후속 EPO 생성에서 반영되는 바와 같이 EPO mRNA의 전달에서 높은 효능을 나타내었다.
- [0526] 주사 후 6시간에, 비작동된 중합체 중 최고인, 비작동된 PACE 5 kDa가 양성 대조군 TRANSIT®(170 ng/ml)보다 더 높은, 높은 수준의 EPO(530 ng/ml)를 생성하였다. 10 kDa 비작동된 PACE는 6시간에 보다 낮은 EPO 수준(14 ng/ml)을 생성하였고, 이는 5 kDa 초과 MW를 갖는 중합체로부터 형성된 폴리플렉스가 더 낮은 형질 주입 효율을 제공하는 것으로, 비작동된 중합체에 대해 시험관내에서 관찰된 추세를 확인하였다.
- [0527] 도 5a는 각각의 MW에 대해 바람직한 작동 시간을 입증하는 작동 시간(일)에 따른 루시페라아제 mRNA 형질 주입 효율(평균 LUC/단백질 mg)을 나타내는 선 그래프이다(선은 0일에 20 kDa - 하단 데이터 포인트; 0일에 10 kDa 중간 데이터 포인트; 0일에 5 kDa - 상단 데이터 포인트로서 확인되었다). 작동된 5 kDa PACE는 비작동된 형태와 비교하여 EPO 생성을 유의적으로 증가시키지 않았지만, 37°C에서 10일 동안 10 kDa의 작동은 EPO 수준을 1100 ng/ml까지 유의적으로 증가시켰다(도 5a, $p < 0.0001$).
- [0528] 도 5b는 바람직한 작동 시간(5 kDa 중합체에 대해서는 5일, 10 kDa 중합체에 대해서는 10일, 그리고 20 kDa 중합체에 대해서는 30일, $**p < 0.005$)에서 상이한 초기 MW의 비작동된 PACE 및 작동된 PACE를 사용할 경우 형질 주입 효율(평균 LUC/단백질 mg)을 나타내는 막대 그래프이다. 도 5c는 mRNA:TransIT 복합체(하단 선)와 비교할 경우 mRNA:aPACE 폴리플렉스(5 kDa 5D, 10 kDa 10D, 20 kDa 30D(상단 선들의 집합))의 세포독성 프로파일(세포 생존력(%))을 나타내는 선 그래프이다. 혈액 화학 및 조직학 분석에 의해 aPACE가 투여 후 24시간 또는 7일에 전신 독성을 유도하지 않았음이 입증되었다. 도 5d는 상이한 작동 온도를 사용할 경우 aPACE의 형질 주입 효율(평균 LUC/단백질 mg)의 막대 그래프이다($**p < 0.005$).
- [0529] 도 6a는 TRANSIT®, 5 kDa 비작동화된 PACE, 5일 동안 작동화된 5 kDa aPACE, 10 kDa 비작동화된 PACE, 또는 10일 동안 작동화된 10 kDa aPACE를 사용할 경우 mRNA(총 20 mg)의 IV 투여 후 6시간에 EPO 혈액 농도를 나타내는 막대 그래프이다. 결과는 $N = 3$ 동물의 평균 \pm SD로 제시된다($****p < 0.0001$). 도 6b는 비히클(하단 선), TransIT(중간 선), 10일 동안 작동화된 10 kDa aPACE(상단 선)를 사용할 경우 mRNA(총 20 mg)의 IV 투여 후 EPO 생성의 시간 경과를 나타내는 선 그래프이다. 결과는 $N = 3$ 동물의 평균 \pm SD로 제시된다($***p < 0.001$ 및 $*p < 0.05$). 도 6c 내지 6f는 아세테이트 완충제, 자유 mRNA 또는 mRNA:aPACE 폴리플렉스의 IV 투여 후 24시간 및 7시간에 혈액 화학(AST(도 6c), ALT(도 6d), 우레아(도 6e), 크레아티닌(도 6f)) 분석을 나타내는 막대 그래프이다. 결과는 $N = 3$ 동물의 평균 \pm SEM으로 제시된다.
- [0530] TRANSIT® 및 aPACE 폴리플렉스 둘 모두에 대해, EPO 생성은 주입-후 6시간에 최고점에 도달하였다. 아세테이트 완충제(비히클)의 주입 후 반복된 출혈은 시간 경과에 따라 EPO 혈액 수준의 약한 증가를 유도하였지만, 10 kDa 작동화된 PACE 폴리플렉스의 투여 후 EPO 수준은 최대 48시간 동안 TRANSIT®의 투여 후 수득된 수준에 비해 유의적으로 더 높았다(6시간에 $p < 0.001$ 및 24시간 및 48시간에 $p < 0.05$).
- [0531] 최상의 aPACE 중합체(10일 동안 작동된 10 kDa)를 사용할 경우, 최대 48시간 동안 상당량의 EPO 생성이 수득되었고, 이는 자유 EPO의 혈액 반감기(대략 2시간)보다 유의적으로 더 길다.
- [0532] 이러한 결과는 PACE의 말단 기 및 MW가 그 mRNA 형질 주입에 영향을 미침을 입증한다. 작동화된 중합체에서 MW와 말단 기의 조합은 시험관내 및 생체내 효율적인 mRNA 복합체화 및 형질 주입을 가능하게 하는 한편, PACE의 낮은 양이온 밀도는 낮은 독성 프로파일을 보장한다.
- [0533] **실시예 5: PACE 말단 기는 전령 RNA의 폴리플렉스로의 로딩에 영향을 미친다**
- [0534] 물질 및 방법
- [0535] 말단 기 변형된 PACE 중합체 및 폴리플렉스의 합성

[0536] 양이온성 디올, 디에틸 세바케이트 및 락톤으로부터 제조된 PACE 백본은 히드록실과 메틸 말단 기의 혼합을 갖는다(문헌[Zhou, et al., *Nature Materials*, 11:82-90 (2012). [PMCID: PMC4180913]).

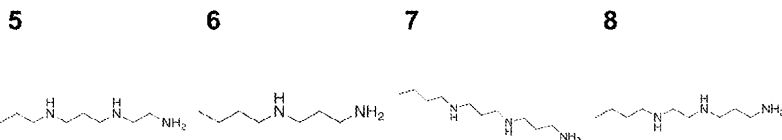
[0537] 상이한 말단 기를 갖는 PACE를 변형시키기 위해, 모 중합체를 디에틸 세바케이트 대신에 세바스산으로 합성하여, 히드록실과 카복실 말단 기의 혼합을 갖는 PACE를 수득하였다. 2개의 말단 기 모두를 실온에서 밤새 무수 디클로로메탄(DCM)에서 교반함으로써 1:40의 몰비로 카보다이미다졸(CDI)에 의해 활성화시켰다. 혼합물을 탈이온수로 3회 세척한 후 진공 하에 DCM을 증발시켜 시약, PACE-CDI를 수득하였다: 하기 및 실시예 1 내지 4에서 예시된 바와 같이, CDI 활성화(1, 2)한 후 아민-함유 분자(3,4)로 친핵성 치환하였다.



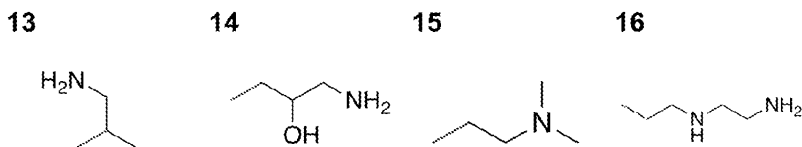
[0538]

[0539] 친주게이션을 위해, 5 mM의 아민-함유 분자를 일정하게 교반하면서 실온에서 40시간 동안 DMSO 중 0.5 mM의 PACE-CDI와 반응시켰다. 반응 후에, 혼합물을 10배 부피의 탈이온수로 세척하고, DCM으로 추출한 후 진공 하에 DCM을 증발시켜 새로운 말단 기를 갖는 PACE를 수득하였다.

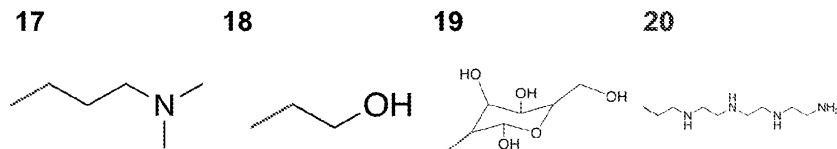
[0540] 말단 기의 화학 구조가 하기에 예시되어 있다:



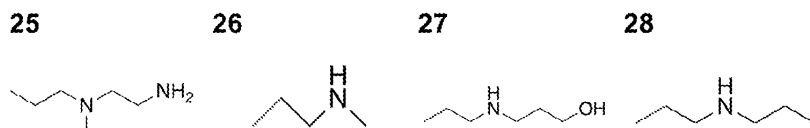
[0541]



[0542]



[0543]

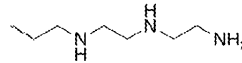
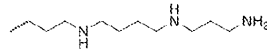
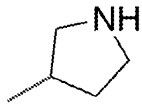


[0544]

29

30

31



[0545]

[0546]

Ribogreen mRNA 로딩 분석

[0547]

Ribogreen은 전령 RNA에 결합한 후 형광을 방출하는 작은 염료이다. PACE와의 복합체화 후, 전령 RNA는 염료에 접근할 수 없게 되고, 형광 신호가 덜 관찰될 것이다. mRNA, 폴리플렉스, 및 ribogreen을 혼합하고, 형광을 모니터링하였다.

[0548]

Cy5 mRNA/폴리플렉스 흡수 분석

[0549]

ddRLuc-Fc 단백질 및 FLuc를 암호화하는 mRNA를 먼저 PACE 중합체에 의해 공동캡슐화한 후 프로테아좀 억제제, 에폭소마이신(Epoxomicin)의 존재 하에 7시간 동안 Expi293F 세포로 공급하였다. 이어서, 이중-루시퍼라아제 분석에 의해 세포를 점검하여 RLuc 활성을 밝혔다(n =4). 데이터를 TRANSIT®로 정규화하였다(1로 설정).

[0550]

Cy5-표지된 mRNA는 상이한 말단 기를 갖는 PACE와 폴리플렉스를 형성하였고, 이를 HEK293 세포에 공급하였다. 세포를 형광에 대해 모니터링하였다.

[0551]

엔도솜 탈출 분석

[0552]

상이한 말단 기를 갖는 PACE를 사용하여 fLuc mRNA로 제조된 폴리플렉스의 엔도솜 탈출을 ddRLuc 시스템으로 정량화하였다.

[0553]

결과

[0554]

PACE 말단 기는 전령 RNA의 폴리플렉스로의 로딩에 영향을 미친다. ribogreen 분석 결과가 도 7에 예시되어 있고, 이는 상응하는 겔 지연 분석과 매우 일치한다.

[0555]

PACE 말단 기는 폴리플렉스의 세포 흡수에 영향을 미친다. 세포 흡수 분석의 결과가 도 8a 내지 8d에 예시되어 있다. 도 8a는 mRNA 캡슐화, 흡수 및 엔도솜 탈출의 효율, 및 형질 주입 효율을 나타내는 도 8b, 8c 및 8d에서의 결과를 산출하기 위해 발생하고 있는 것의 개략도를 나타낸다. mRNA 캡슐화의 효율을 Ribogreen 분석에 의해 정량화하였다(n= 4). Cy5-표지된 mRNA를 캡슐화하는 중합체를 Expi293F 세포에 이어서 FACS에 공급하여 흡수 수준을 정량화하였다(n = 3)(도 8b). mRNA 그룹이 있는 각각의 중합체 간의 통계적 차이는 독립변수 Student's t 시험에 의해 분석하였다; *은 $p < 0.05$ 를 나타내고, **은 $p < 0.01$ 을 나타내고, ***은 $p < 0.001$ 을 나타내고, ****은 $p < 0.0001$ 을 나타내고, n.s.는 유의적 차이가 없음을 나타낸다.

[0556]

상이한 말단 기를 갖는 PACE는 세포에 의해 흡수되는 상이한 능력을 입증하였다. PACE 말단 기는 mRNA의 엔도솜 탈출에 영향을 미친다. fLuc mRNA 및 상이한 말단 기를 갖는 PACE를 사용할 경우의 엔도솜 탈출 분석 결과가 도 8c에 예시되어 있다.

[0557]

PACE 말단 기 화학은 중합체성 전달 시스템의 형질 주입 효율에 영향을 미친다. HEK293 세포에 의해 생성된 fLuc 활성에 의해 PACE의 형질 주입 효율을 측정하였다. 결과가 도 8d에 예시되어 있다.

[0558]

도 9a 내지 9c는 형질 주입 효율(fLuc 활성으로서 나타냄)과, mRNA 로딩(도 9a), 흡수(도 9b) 및 엔도솜 탈출(도 9c)을 포함한 형질 주입의 여러 단계의 선형 상관관계를 나타낸다. 생물학적 단계가 단백질 생성에 가까워짐에 따라, 선형 상관관계의 R2 값은 더 높아지고, 이는 예측력이 더 좋아짐을 나타낸다.

[0559]

실시예 6: mRNA 전달에 대한 중합체의 라이브러리의 엔도솜 탈출의 정량화

[0560]

물질 및 방법

[0561]

중합체 합성

[0562]

상이한 말단 기를 갖는 PACE 중합체를 생성하기 위해 몇 가지 변형을 포함한 PACE 합성을 상기 기재된 바와 같이 수행하였다. 모 중합체를 세바스산으로 합성하였고, 히드록실과 카복실 말단 기의 혼합을 갖는 PACE가 수득되었다. 2개의 말단 기 모두를 실온에서 밤새 무수 디클로로메탄에서 교반함으로써 1:40의 몰비로 CDI에 의해 활성화시켰다. 혼합물을 탈이온수로 3회 세척한 후 진공 하에 DCM을 증발시켜 시약, PACE-CDI를 수득하였다.

- [0563] 이어서, PACE-CDI를 아민-함유 화합물(표 1)과 반응시켜 새로운 말단 기를 갖는 PACE를 획득하였다. 컨쥬게이션을 위해, 5 mM의 각각의 화합물을 일정하게 교반하면서 실온에서 40시간 동안 DMSO 중 0.5 mM의 PACE-CDI와 반응시켰다. 반응 후에, 혼합물을 10배 부피의 탈이온수로 세척하고, DCM으로 추출한 후 진공 하에 DCM을 증발시켜 P1 내지 P31로 표기된 새로운 중합체를 획득하였다(표 1).
- [0564] 중합체 특성화
- [0565] Agilent DD2 400 MHz NMR 분광계 상에서 ^1H NMR 스펙트럼을 기록하였다. 10초의 T_1 완화 시간을 사용하여 신호를 기록하였다. 마이크로STYRAGEL 컬럼(혼합 상; 공극 크기 100 Å 내지 106 Å)을 구비한 Waters HPLC 시스템을 사용하여 겔 투과 크로마토그래피(GPC)에 의해 중합체의 분자량(MW)을 측정하였다. 0.2 중량%의 트리에틸아민을 함유하는 클로로폼을 1 ml/min의 유량에서 용리제로서 사용하였다. 2 mg/ml의 샘플 농도 및 100 μl 의 주입 부피를 사용하였다. Sigma Aldrich(미국 미조리주 세인트 루이스 소재)로부터의 좁은 다분산성 폴리스티렌 표준 물질에 의해 생성된 통상적인 보정 곡선을 기준으로 중합체 MW를 결정하였다. Empower II GPC 소프트웨어를 사용하여 GPC 기구를 실행하고 MW 계산을 수행하였다.
- [0566] NMR 스펙트럼을 사용하여 PACE 말단 기 변형의 반응을 모니터링하였다. PACE의 특징적인 피크는 1 내지 4.5 ppm 영역에 분포되었다. MDEA 단량체가 말단 기인 경우, 그 말단부 상의 수소는 각각 4.2 (g)로부터 3.6 (g') ppm으로, 그리고 2.7 (e)로부터 2.6 (e') ppm으로 이동하였다. CDI 활성화는 2개의 상이한 PACE-CDI 컨쥬게이션의 형성으로 인해 7 내지 8.5 ppm 영역에서 분열 피크를 형성시켰다(도 S2). MDEA 단량체의 말단부 상의 수소는 각각 3.6 (g')로부터 4.4 (g'') ppm으로, 그리고 2.6 (e')으로부터 2.8 (e'') ppm으로 이동하였고; 세바스산 단량체의 말단부 상의 수소는 각각 2.3 (c)로부터 2.4 (c'') ppm으로, 그리고 1.5 (b)로부터 1.7 (b'') ppm으로 이동하였다. 이어서, 7 내지 8.5 ppm 영역에서 분열 피크의 소멸뿐만 아니라 g'', e'', c'' 및 b'' 피크의 이동에 의해 31개의 소 분자들의 컨쥬게이션 반응이 확인되었다.

[0567] [표 1]

PACE 말단 기 및 상이한 말단 기를 갖는 PACE 중합체와 함께 FLuc mRNA를 사용하여 제조된 폴리플렉스의 동적 광 산란 특성화의 목록

#	명칭	CAS #	GPC		Dh (nm)		PDI		제타 전위 (mV)	
			Mw	PDI	평균	sem	평균	sem	평균	sem
1	4-아미노부탄올	13325-10-5	9.4x10 ³	2.2	319.9	17.3	0.418	0.066	-24.4	2.0
2	N-(2-아미노에틸)-1,3-프로판디아민	13531-52-7	6.1 x10 ³	1.4	199.4	5.1	0.189	0.012	-10.0	0.4
3	2-아미노-2-메틸-1-프로판올	124-68-5	1.2 x10 ⁴	2.8	210.4	4.9	0.200	0.017	39.7	0.8
4	3-(N-메틸피페라지노)프로필아민	4572-03-6	5.5 x10 ³	2.3	236.2	9.0	0.248	0.006	-7.5	2.2
5	N,N'-비스(2-아미노에틸)-1,3-프로판디아민	4741-99-5	6.2 x10 ³	1.6	171.4	5.2	0.298	0.025	60.7	0.4
6	비스 (3-아미노프로필)아민	56-18-8	6.3 x10 ³	1.7	216.1	3.3	0.351	0.007	35.7	2.3
7	N,N'-비스(3-아미노프로필)-1,3-프로판디아민	4605-14-5	9.3 x10 ³	2.3	166.7	2.9	0.240	0.006	69.8	1.3
8	N,N'-비스(3-아미노프로필)-1,2-디아민	10563-26-5	6.2 x10 ³	1.7	169.8	8.4	0.295	0.018	56.9	1.5
9	1,4-비스(3-아미노프로필)피페라진	7209-38-3	6.0 x10 ³	1.6	170.7	6.2	0.291	0.019	24.8	1.7
10	2,2',2''-트리아미노트리에틸아민	4097-89-6	1.0 x10 ⁴	2.5	179.2	3.7	0.182	0.014	-51.4	2.9
11	3,3-디아미노-N-메틸디프로필아민	105-83-9	6.1 x10 ³	1.6	212.9	15.3	0.116	0.009	-42.2	1.2
12	1,3-디아미노프로판	109-76-2	9.6 x10 ³	2.2	149.9	4.3	0.184	0.022	-53.8	1.0
13	1,2-디아미노프로판	78-90-0	1.6 x10 ⁴	2.1	170.8	6.4	0.225	0.054	-7.5	0.9
14	1,3-디아미노-2-히드록시프로판	616-29-5	6.7 x10 ³	1.5	332.9	73.8	0.429	0.018	16.9	17.6
15	N,N-디메틸에틸렌디아민	108-00-9	5.0 x10 ³	2.7	157.2	1.7	0.178	0.010	61.2	4.4
16	디에틸렌트리아민	111-40-0	6.4 x10 ³	1.5	161.0	2.9	0.180	0.026	-32.3	1.3
17	1-아미노-3-(디메틸아미노)프로판	109-55-7	4.3 x10 ³	2.9	132.8	4.2	0.260	0.020	69.5	1.4
18	에탄올아민	141-43-5	1.0 x10 ⁴	2.3	265.3	23.0	0.360	0.027	-33.3	4.8
19	D-(+)-글루코사민	66-84-2	6.5 x10 ³	1.8	328.9	88.5	0.436	0.043	-39.9	3.6
20	테트라에틸렌헥타민	112-57-2	5.7 x10 ³	1.5	152.0	4.7	0.207	0.014	64.8	2.8
21	L-히스티딘	5934-29-2	5.0 x10 ³	1.8	194.8	3.7	0.194	0.010	-28.4	4.0
22	2,2,2-트리플루오로에틸아민	373-88-6	4.9 x10 ³	1.7	343.6	3.7	0.309	0.021	-2.67	0.7
23	N-(3-히드록시프로필)-에틸렌디아민	56344-32-2	6.1 x10 ³	1.9	220.1	14.3	0.180	0.014	-23.8	2.3
24	2-메틸카다베린	15520-10-2	5.3 x10 ³	1.8	198.1	22.5	0.359	0.039	-19.5	2.1
25	N-메틸-2,2'-디아미노디에틸아민	4097-88-5	4.7 x10 ³	1.8	229.5	45.1	0.326	0.062	3.1	7.3
26	N-메틸-에탄-1,2-디아민	109-81-9	5.5 x10 ³	1.5	141.4	5.4	0.214	0.016	66.0	1.7
27	2-(2-아미노에틸아미노)에탄올	111-41-1	6.0 x10 ³	2.1	135.3	4.8	0.272	0.011	67.0	1.9
28	N-프로필에탄-1,2-디아민	111-39-7	4.7 x10 ³	1.7	222.8	13.7	0.268	0.024	48.0	2.9
29	피롤리딘-3-아민	79286-79-6	4.9 x10 ³	1.7	201.1	13.1	0.224	0.011	-10.4	1.3
30	스케르민	71-44-3	4.7 x10 ³	1.7	318.9	85.4	0.374	0.068	11.9	4.1
31	트리에틸헥테트라민	112-24-3	5.8 x10 ³	1.4	214.3	18.4	0.227	0.001	-0.2	1.7

[0568]

[0569] 폴리플렉스 제조 및 특성화

[0570]

명시되지 않는 한, 중합체:mRNA 폴리플렉스를 25 mM의 아세트산나트륨 완충제 (pH 5.8)에서 100:1의 중합체:mRNA 중량비로 제조하였다. 시험관내 실험을 위해, 10 µg mRNA/ml의 용액을 제조하였다: 먼저, 1 µl의 중합체 용액 (DMSO 중 100 mg/ml)을 50 µl의 아세트산나트륨 완충제에 희석시켰다. 짧은 와동 후, 중합체 용액을 50 ml 아세트산나트륨 완충제에 희석된 1 µg의 mRNA와 혼합하고, 다시 와동시켰다. 중합체:mRNA 혼합물을 사용 전 10분 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 생체내 실험을 위해, 아세트산나트륨 완충제 중 100 µg mRNA/ml의 용액을 동일한 방법으로 제조하였다.

[0571]

2 µg/ml의 mRNA 농도로 탈이온수에 폴리플렉스를 희석한 후 Malvern Nano-ZS(영국 소재의 Malvern Instruments)를 사용하여 동적 광 산란(DLS)에 의해 폴리플렉스의 수력학적 직경을 측정하였다. 제타 전위를 측정하기 위해, 동일한 용액을 일회용 모세관 셀로 로딩하여 Malvern Nano-ZS 상에서 분석하였다.

[0572]

투과 전자 현미경법(TEM)

[0573]

2 µl의 나노입자를 TEM 그리드(전자 현미경 과학, Cat #CF400-Cu-TH)에 적용하였다. 1분 후에, 액체를 조심스럽게 제거하였다. 이어서, 염색 용액(Nanoprobes, NANO-W) 한 방울을 그리드 상단에 첨가하였다. 1분 후에, 액체를 제거하였다. 그리드를 공기 건조하였다. TEM(FEI Tecnai Osiris 200kV TEM)을 사용하여 이미지를 촬영하였다.

[0574]

세포 배양

- [0575] Expi293F™ 세포(Thermo Fisher, Cat# A14527)를 마이크로플레이트 진탕기(VWR, Cat# 89032-092) 상에서 일정하게 진탕시키면서 Expi293™ 발현 배지(Thermo Fisher, Cat# A1435102)에서 37℃ 및 8% CO₂ 로 유지시켰다.
- [0576] *ddRLuc-Fc 정제*
- [0577] 선형 폴리에틸렌이민(Polysciences Inc, Cat# 23966)을 사용하여 ddRLuc-Fc를 암호화하는 플라스미드를 Expi293F 세포로 형질 주입하였다. 형질 주입 후 60시간에, 세포를 수확하고, ddRLuc-Fc를 세포 용해물로부터 정제하였다. 1시간 동안 4℃에서 세포를 0.5 내지 1% Triton X-100(AmericanBio, Cat# AB02025) 및 EDTA-자유 프로테아제 억제제 콕테일(Roche, Cat# 11873580001)이 보충된 TBS(10 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.5)에서 용해시켰다. 이어서, 세포 용해물을 4℃에서 1시간 동안 Optima L-100K 초원심분리기(Beckman Coulter)에서 110,000 × g으로 원심분리한 후 0.22 μm의 필터(EMD Millipore, Cat# SCGPT01RE)를 통해 여과하여 제거하였다. 여과된 세포 용해물에 단백질 A-SEPHAROSE® 비드(GE healthcare, Cat# 17-0780-01)를 첨가하고 단백질 결합을 위해 회전시키면서 3시간 동안 4℃에서 인큐베이션하였다. 비드를 TBS에서 세척하고, 단백질을 10 mM의 글리신(pH 3.3)에서 용리시켰다. 이어서, 용리액을 중화시키고, 농축하고, 완충제를 PBS로 교환하였다.
- [0578] *PACE 중합체에 의한 FLuc mRNA 및 ddRLuc-Fc의 공동-캡슐화*
- [0579] FLuc를 암호화하는 mRNA 및 ddRLuc-Fc 탐침의 공동-캡슐화 효율을 점검하기 위해 아가로스 겔 지연 분석을 수행하였다. 자유 mRNA 및 단백질은 겔로 이동할 수 있었지만, 캡슐화된 것은 로딩 웰에 유지되었다.
- [0580] *수평 아가로스 겔 전기영동*
- [0581] 5 μg의 ddRLuc-Fc 및 1 μg의 FLuc를 암호화하는 mRNA를 총 18 μl의 부피로 100 μg의 중합체와 함께 혼합하고, 10분 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 2 μl의 10X DNA 로딩 완충제를 폴리플렉스에 첨가한 후 1% 아가로스 겔을 로딩하였다. UV 광을 사용하여 mRNA 이동을 검출하였고, Coomassie 청색 염색(Bio-rad, Cat# 161-0786)에 의해 단백질 이동을 검출하였다.
- [0582] *루시페라아제 분석*
- [0583] 먼저, Expi293F 세포를 37℃에서 30분 동안 200 nM의 엑소마이신(ApexBio Technology, Cat# A2606)에서 처리한 후, 웰당 200,000개의 세포로 자유 mRNA(음성 대조군), TRANSIT®(Mirus, Cat# MIR2250, 양성 대조군) 또는 ddRLuc-Fc 및 FLuc mRNA를 공동-캡슐화하는 중합체를 함유하는 96-V 바닥 플레이트에 첨가하였다. 형질 주입 후 7시간에, 세포를 PBS로 3회 세척하고, 20분 동안 실온에서 20 μM의 z-VAD(OMe)-FMK(Abcam, Cat# ab120487)가 보충된 50 μl의 패시브 용해 완충제(passive lysis buffer)(Promega, Cat# E1910)에 용해시켰다. Centro XS³ LB 960 고감도 마이크로플레이트 광도계(Berthold, Cat# 46970)에 의해 용해물을 분석하였다. 천연-코엘렌테레인즈(Nanolight Technology, Cat# 303)를 사용하여 1초 동안 RLuc 발광을 측정하였고, 루시페라아제 분석 시스템(Promega, Cat# E1501)을 사용하여 3초 동안 FLuc 발광을 측정하였다. 모든 독립적 실험을 세 번씩 실행하였다.
- [0584] *시험관내 번역(IVT)*
- [0585] 제조자의 설명서에 따라 토끼 망상적혈구 용해물 시스템(Promega, Cat# L4960)을 사용하여 mRNA-로딩된 폴리플렉스의 IVT를 수행하였다. 1 μg의 FLuc를 암호화하는 mRNA가 로딩된 폴리플렉스를 75분 동안 37℃에서 50 μl의 용리물 혼합물에서 인큐베이션하였다. 매 15분마다 반응 혼합물로부터 2 μl의 샘플을 채취하고, 바로 드라이 아이스 상에서 동결시켰다. 샘플을 수집한 후, 루시페라아제 분석 시스템(Promega, Cat# E1501)을 사용하여 모든 샘플에서 FLuc 활성을 측정하였다. 특정 폴리플렉스에 대한 IVT의 속도를 FLuc 활성과 샘플링 시간 사이의 선형 회귀 기울기로서 평가하였다.
- [0586] *캡슐화 효율 측정*
- [0587] 제조자의 설명서에 따라 Quant-IT RiboGreen RNA 키트(Invitrogen, #R11491)를 사용하여 폴리플렉스에서 mRNA의 캡슐화 효율을 측정하였다. RIBOGREEN® 분석에 의해 용액 중의 자유 mRNA의 양을 측정할 경우, 이 양을 폴리플렉스를 형성하기 위해 더해진 초기 양에서 차감하여 폴리플렉스 내에서 복합체화된 mRNA의 양을 얻었다.
- [0588] *형광-활성화된 세포 분류(FACS)*
- [0589] Expi293F 세포를 5,000 세포/웰의 농도에서 24-웰 플레이트에 시딩하였다. 12시간 후, Cy5 mRNA를 캡슐화하는

나노입자를 각각의 웰에 첨가하였다. 1시간 후, FACS 분석(Life technologies, Attune NxT)을 위해 세포를 수집하였다.

[0590] 결과

[0591] 결과가 도 10a 내지 10b에 나타나 있다. 시간당 FLuc 활성의 생성에 의해 모든 폴리플렉스의 IVT 속도를 측정하였다. 정량화 데이터 및 정규화 데이터를 사용하여 FLuc mRNA 형질 주입 결과와 IVT 속도, 및 IVT 속도와 캡슐화 효율 간의 단순한 선형 회귀를 수행하였다. 각각의 데이터 포인트는 독특한 말단 기를 지닌 PACE 중합체를 나타낸다. 직선은 최적 적합을 나타낸다. R^2 값이 표시되어 있다.

[0592] 중합체 말단 기 및 투여 경로 효과

[0593] mRNA 폴리플렉스의 시험관내 번역 속도는 형질 주입 효율과 상관관계가 없다. 도 10a 및 10b는 mRNA 폴리플렉스의 시험관내 번역 속도가 형질 주입 효율과 상관관계가 없음을 입증하는 그래프이다. 시간당 FLuc 활성의 생성에 의해 모든 폴리플렉스의 IVT 속도를 측정하였다. 정량화 데이터 및 정규화 데이터를 사용하여 FLuc mRNA 형질 주입 결과와 IVT 속도(도 10a), 및 IVT 속도와 캡슐화 효율(도 10b) 간의 단순한 선형 회귀를 수행하였다. 각각의 데이터 포인트는 독특한 말단 기를 지닌 PACE 중합체를 나타낸다. 직선은 최적 적합을 나타낸다. R^2 값이 표시되어 있다.

[0594] 실시예 7: PACE-PEG 블렌딩된 폴리플렉스의 제조 및 PACS-폴리플렉스 제형의 폐 전달

[0595] mRNA에 기반한 백신은 SARS-CoV-2와 같은 신종 바이러스 균주에 쉽게 적응할 수 있는 유망한 전략이지만, 최적 mRNA 백신 제형을 개발하기 위해 전달 전략에 대한 더 많은 연구가 필요하다. 상이한 말단 기를 갖는, 양이온성 폴리(아민-코-에스테르), 또는 PACE의 라이브러리는 효율적이고 안전한 mRNA 전달 비히클인 것으로 입증되었다.

[0596] COVID-19와 같은 질병 및 그 결과 폐 질환이 있는 최근의 사례는 폐 전달에 있어서 개선된 제형이 중요하다는 것을 분명하게 하였다. 다음은 PACE 폴리플렉스가 mRNA의 폐로의 흡입 전달에 대해 유망한 제형임을 확인하기 위해 시험관내 스크리닝한 연구이다. 상기 연구는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)이 mRNA 형질 주입 효율에 미치는 영향 및 나노입자를 안정화하는 데 있어서의 역할을 검토하였다. 추가의 연구는 폴리플렉스의 폐 전달 후 폐에서의 높은 수준의 형질 주입을 입증하였다.

[0597] 물질 및 방법

[0598] 상기 실시예 및 표 1에 기재된 바와 같이 상이한 말단 기를 갖는 PACE 중합체의 라이브러리를 A459 인간 폐 세포에서 EGFP mRNA의 크기, 안정성 및 형질 주입 효율에 대해 스크리닝하였다. 제형을 최적화하기 위해, 4.8 내지 6의 pH 범위를 갖는 완충제 용액에서 폴리플렉스를 제조하였고, 작은 부피의 PEG-컨쥬게이트된 PACE(PACE-PEG)를 혼입하여 폴리플렉스 안정성을 개선시켰다.

[0599] 중합체 합성

[0600] PACE 중합체를 상기 기재된 바와 같이 합성하였다.

[0601] 폴리플렉스 제형

[0602] 1:100의 PACE 대 mRNA의 중량비로 모든 PACE 폴리플렉스를 형성하였다. 중합체를 진탕시키면서 37°C에서 밤새 DMSO(100 mg/ml)에 용해시켰다. 폴리플렉스를 형성하기 위해, mRNA를 25 mM의 아세트산나트륨 완충제(pH 4.8 내지 6.0)에 희석하여 20 내지 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 만들었다. 별도의 관에서, 용해된 PACE를 25 mM의 아세트산나트륨 완충제(pH 4.8 내지 6.0)로 희석하여 2 내지 20 mg/ml의 농도로 만들고 15초 동안 와동시켰다. 이어서, 희석된 mRNA 및 희석된 PACE를 조합하고, 25초 동안 와동시켰다. 용액을 사용 전 실온에서 10분 동안 방치시켜 폴리플렉스가 형성되게 하였다. 동적 광 산란(DLS, Zetasizer Pro, Malvern Analytical)에 의해 폴리플렉스 크기 및 제타 전위를 특성화하였다.

[0603] PACE-PEG-블렌딩된 폴리플렉스를 제형화하기 위해, PACE-PEG 및 PACE를 100 mg/ml의 농도로 DMSO에 개별적으로 용해시켰다. 용해된 PACE-PEG를 용해된 PACE에 희석하여(필요에 따라 중간 희석하면서) 원하는 PACE-PEG 농도의 블렌딩된 중합체 용액을 생성하였다. 이어서, 폴리플렉스를 상기 기재된 바와 같이 제조하였다.

[0604] DMSO에 DSPE-PEG(10 mg/ml)를 용해시킴으로써 폴리플렉스로 코팅된 DSPE-PEG(PEG2k, Nano OCS)를 형성하였다. 이어서, 용해된 DSPE-PEG를 1:10의 부피비로 DMSO 중의 PACE(100 mg/ml)와 조합하였다. 필요에 따라 DMSO 중의 DSPE-PEG를 중간 희석하여 DSPE-PEG 대 PACE의 원하는 최종 비를 달성하였다. 이어서, DMSO 중의 PACE를 DMSO

중의 DSPE-PEG/PACE 블렌드로 대체함으로써 상기 기재된 바와 같이 폴리플렉스를 형성시켰다.

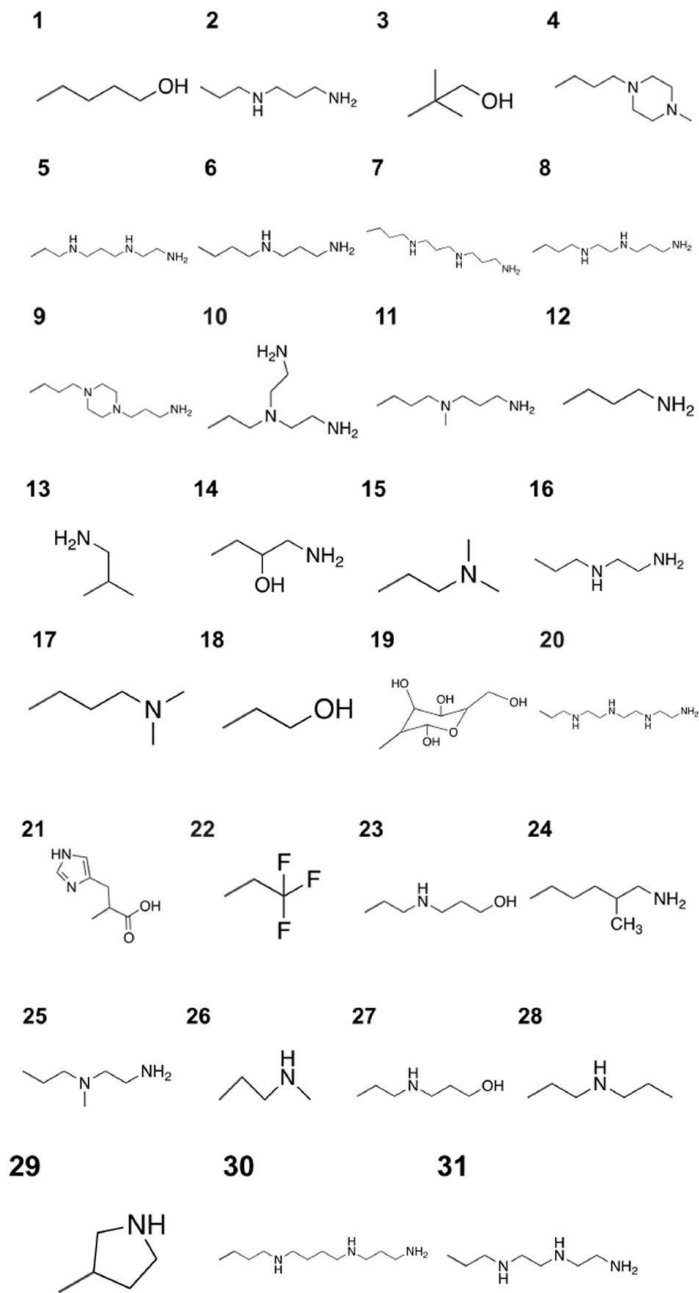
- [0605] 폴리플렉스 안정성 연구
- [0606] 폴리플렉스 안정성을 평가하기 위해, 상기 기재된 바와 같이 폴리플렉스를 아세트산나트륨 완충제 중에 1 mg/ml의 최종 농도로 제형화하였다. 20 μ l의 폴리플렉스 용액을 1 ml의 포스페이트 완충 식염수(PBS)가 있는 관에 주입한 후, 샘플을 진탕 인큐베이터(300 rpm, 37°C)에 놓고, DLS에 의한 크기 조정을 위해 여러 시점에서 꺼내었다. 문헌[Jiang Y, Lu Q, Wang Y, et al. Quantitating Endosomal Escape of a Library of Polymers for mRNA Delivery. *Nano Lett.* 2020;20(2):1117-1123. doi:10.1021/acs.nanolett.9b04426].
- [0607] 시험관내 스크리닝
- [0608] 모든 시험관내 스크리닝 실험에 대해서 A549 인간 폐 세포주(ATCC)를 사용하였다. 10% 우 태아 혈청(FBS, Atlanta Biologicals) 및 50 μ g/ml의 겐타마이신으로 강화된 1:1의 DMEM:F12의 용액(GE Healthcare)에서 세포를 성장시키고, 5% CO₂ 하에 37°C 인큐베이터에서 저장하였다. 폴리플렉스 전달 전 24시간에, 세포를 24-웰 플레이트에서 웰당 50,000 세포로 시딩하였다. 폴리플렉스 전달 직전에, 세포 배지를 새로 공급하고, PACE 폴리플렉스를 사용하여 세포를 0.5 μ g의 EGFP mRNA(Trilink Biotechnologies)로 처리하였다. 처리 후 24시간에, 세포를 PBS로 세정하고, 15분 동안 TrypLE 발현 효소(Thermo Fisher Scientific)로 해리시킨 후 96-웰 둥근 바닥 플레이트로 옮겼다. 세포를 PBS 중의 2% 소 혈청 알부민(BSA)으로 1회 세척한 후 제조사의 설명서에 따라 Zombie Live/Dead Fixable Near IR(Biolegend)로 염색하였다. 염색 후, 세포를 PBS 중의 2% BSA로 1회 이상 세척한 후 유세포 분석(Attune NxT)에 의해 분석하였다. 결과를 FlowJo 버전 10.6.2에서 분석하였다.
- [0609] 생체내 분석
- [0610] Yale 동물 자원 센터(YARC) 및 기관 동물 관리 및 사용 위원회(IACUC) 가이드라인에 따라 Yale University에서 모든 동물 작업을 완료하였다. 실험을 위해 수컷 BALB/c 마우스(20 g, Charles River, 미국 코네티컷주 윌리엄스톤 소재)를 사용하였다. 아세트산나트륨 완충제에 희석된 PACE:mRNA 폴리플렉스(0.1 mg/ml mRNA, N = 3)를 200 μ l의 부피에 걸쳐 정맥내 또는 복강내 투여하였다. 주입 후 6시간에 IVIS 스펙트럼(PerkinElmer)에 의해 생체내 생체발광(광자/초/cm²/sr)을 검출하여 정량화하였다.
- [0611] 흡입 전달
- [0612] 10 내지 30주령의 C57BL/6 마우스(EGFP mRNA 전달) 및 BALB/c 마우스(FLuc mRNA 전달)에서 생체내 실험을 수행하였다. 폴리플렉스 용액(10 mg/ml 중합체)을 투여 직전에 제조하였다. 흡입 전달을 위해, 마우스를 이소플루란으로 마취하고 앞니로 매달았다. 핀셋으로 혀를 집어넣고, PACE 폴리플렉스 중의 5 μ g의 mRNA를 입 안쪽으로 투여하였다. 혀는 10회의 호흡 기간 동안 집어넣은 위치에 유지시켰고, 그 동안 폴리플렉스가 흡입되었다.
- [0613] 유세포 분석에 의한 EGFP 발현 분석을 위해, 24시간 후에 마우스를 안락사시켰다. 10 ml의 PBS에 이어서 1 ml의 디스파아제(50 U/ml, Corning Life Sciences)로 폐를 관류시켰다. 이어서, 끝이 무딘 바늘로 기관 삼관하고, 폐를 1 ml의 디스파아제(50 U/ml)로 팽창시키고, 기관을 따라 봉합하여 묶었다. 폐를 꺼내어 추가로 처리할 때까지 빙냉 PBS에 두었다. 유세포 분석을 위한 단일 세포 현탁액을 제조하기 위하여, 폐 조직을 가위를 사용하여 2 내지 3 mm의 조각으로 잘게 자르고, PBS 중의 5 ml의 DNase 1(1 mg/ml, Roche Diagnostics) 및 콜라게나아제 1(5 mg/ml, Worthington Biochemical)이 있는 15 ml의 관으로 옮기고, 30분 동안 인큐베이션하였다(37°C, 진탕). 이어서, 18 게이지 바늘을 3 내지 5회 사용하여 5 ml 주사기로 조직 조각을 채취하였다. 최종 흡인 시, 미리 습윤된 70 μ m 필터로 유체를 배출시켰다. 주사기 플런저를 사용하여 필터에 남아 있는 조직을 부드럽게 파괴하고, 2 ml의 PBS 중 0.5% BSA로 필터를 세정하고, 생성된 세포 현탁액을 1,200 rpm으로 5분 동안 원심분리하였다. 남아 있는 적혈구를 용해시키기 위해, 세포를 2 ml의 암모늄-클로라이드-칼륨(ACK) 용해 완충제에서 재현탁하고, 실온에서 4분 인큐베이션하였다. 이어서, 완충제를 4 ml의 PBS 중 10% FBS로 중화시키고, 세포를 70 μ m의 필터를 통해 다시 여과한 후, 1,200 rpm으로 5분 동안 원심분리하였다. 세포를 PBS 중의 2% BSA에서 재현탁하고, 96-웰 둥근 바닥 플레이트로 옮기고 PBS 중의 2% BSA로 1회 이상 세척하였다. 제조사의 설명서에 따라 세포를 Zombie Live/Dead Fixable Near IR(Biolegend)로 염색하였다. 세포를 PBS 중의 2% BSA로 1회 이상 세척한 후 유세포 분석에 의해 분석하였다. 결과를 FlowJo 버전 10.6.2에서 분석하였다.
- [0614] 생체내 이미징 시스템(IVIS, PerkinElmer) 및 추출된 폐 단백질의 직접적 측정에 의해 폐에서의 루시페라아제 발현을 분석하였다. mRNA 전달 후 6분에, 마우스에게 150 mg/kg의 D-루시페린을 복강내 주사하고, 이소플루란으로 마취하고, 32분 후 IVIS에 의해 발광 신호를 검출하였다. 24시간 후에, 마우스에게 D-루시페린(150 mg/kg)을

다시 주사하고, 15분 후에 이미징하였다. 폐, 비장, 간, 신장 및 심장을 꺼내고, 최초의 주사 후 30분에 IVIS에 의해 생체외 기관 발광을 검출하였다. 이어서, 폐 및 비장 조직을 잘게 잘라 1 ml의 Glo 용해 완충제(Promega)가 있는 Precellys 용해 관(Bertin Instruments)에 넣고, 30초 동안 6500 rpm으로 2회 균질화하였다. 용해물을 Eppendorf 관으로 옮기고, 10분 동안 21,000 x g으로 원심분리하여 세포 파편을 제거하였다. 20 μ l의 용해물을 100 μ l의 D-루시페린(Promega)과 조합하고, 광도계 상에서 10초 동안 발광을 측정하였다. 발광 값을 전체 단백질 농도로 정규화하였고, 이를 제조자의 설명서에 따라 Pierce BCA 단백질 분석(Thermo Fisher Scientific)에 의해 측정하였다.

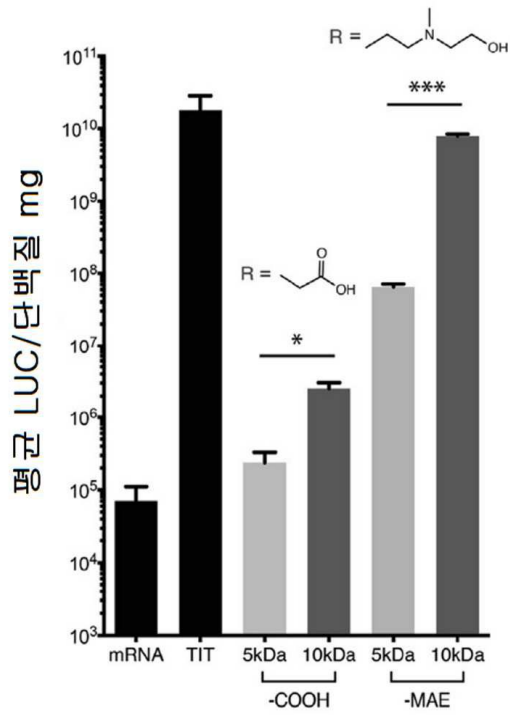
- [0615] 결과
- [0616] *pH*
- [0617] 도 11은 표 1의 중합체 2, 4, 14, 15, 16, 17, 20, 25, 27 및 31에 있어서 pH 4.8, 5.0, 5.2, 5.4, 5.6, 5.8 및 6.0에서의 형질 주입 효율(%)에 관한 그래프이다. 결과는 상이한 말단 기를 갖는 PACE 폴리플렉스에 대한 최적의 아세트산나트륨 완충제 pH를 보여준다.
- [0618] PACE 형질 주입 효율은 완충제 pH에 따라 매우 좌우되고, 최적의 pH는 중합체 말단 기에 따라 변한다.
- [0619] *PEG 농도*
- [0620] 도 12a에 의해 나타낸 바와 같이, PACE-PEG의 존재는 폴리플렉스 안정성을 증가시켰다.
- [0621] 도 12b는 0, 0.05, 0.10, 0.25, 0.50 및 1의 PACE-PEG 함량(%)에 대한 함수로서 표 1의 중합체 14, 15, 16, 17, 25, 27 및 31에 대한 형질 주입 효율(%)에 관한 그래프이다. 도 12c는 동일한 PACE-PEG 혼합물의 EGFP 발현 그래프로서, PEG가 EGFP 발현을 증가시켰음을 보여준다. 0.05 중량%만큼 낮은 PACE-PEG 농도가 시험관내에서 대부분의 중합체의 mRNA 형질 주입 효율을 저하시켰지만, 중합체(P14)는 다양한 PEG 농도에 걸쳐 높은 형질 주입 효율을 유지하였다.
- [0622] 흡입 전달을 위한 mRNA 기반 백신 제형의 개발은, 특히 높은 형질 주입 능력을 유지하면서 점액 장벽을 극복하는 데 있어서 독특한 과제를 제기한다. PEG 코팅은 종종 점막을 통한 침투를 증가시키기 위해 사용되지만, PEG 범위는 형질 주입 효율이 손실되지 않도록 최적화되어야 한다.
- [0623] DMSO에 DSPE-PEG(10 mg/ml)를 용해시킴으로써 폴리플렉스로 코팅된 DSPE-PEG(PEG2k, Nano OCS)를 형성하였다. 이어서, 용해된 DSPE-PEG를 1:10의 부피비로 DMSO 중의 PACE(100 mg/ml)와 조합하였다. 필요에 따라 DMSO 중의 DSPE-PEG를 중간 희석하여 DSPE-PEG 대 PACE의 원하는 최종 비를 달성하였다. 이어서, DMSO 중의 PACE를 DMSO 중의 DSPE-PEG/PACE 블렌드로 대체함으로써 상기 기재된 바와 같이 폴리플렉스를 형성시켰다.
- [0624] PEG가 형질 주입 효율 및 유전자 발현에 미치는 효과가 도 13a 내지 13c에 나타나 있다. 도 13a는 0%, 0.01%, 0.1%, 1% 또는 10% DSPE-PEG가 크기(nm) 및 다분산성에 미치는 효과에 관한 그래프이다. 도 13b는 표 1의 중합체 14, 15, 16, 17, 25, 27 및 31에 있어서 DSPE-PEG 함량이 형질 주입 효율(%)에 미치는 효과에 관한 그래프이다. 도 13c는 DSPE-PEG 농도(0, 0.05, 0.10, 0.25, 0.50, 1.0, 2.5 및 5%)가 EGFP 발현에 미치는 효과에 관한 그래프이다.
- [0625] *투여 경로는 조직 분포에 영향을 미친다*
- [0626] 도 14a 및 14b에 나타낸 바와 같이, 절개 전 I.V. 주사 및 I.P. 주사 후 6시간에 생체발광 분포는 폴리플렉스가 처음에는 주로 비장에 분포되며, 이어서 주사될 경우 비장, 간 및 창자에 분포됨을 보여준다.
- [0627] 반면에, 도 15에 나타낸 바와 같이, 폐로의 투여는 다른 조직에서는 거의 발현되지 않고 놀랍게도 높은 폐 농도를 나타낸다.
- [0628] 이에 의해 이러한 제형이 폐로 투여되는 mRNA와 같은 핵산의 폐로의 전달을 위한 효과적이고 매우 엄선된 수단임이 확립되었다.

도면

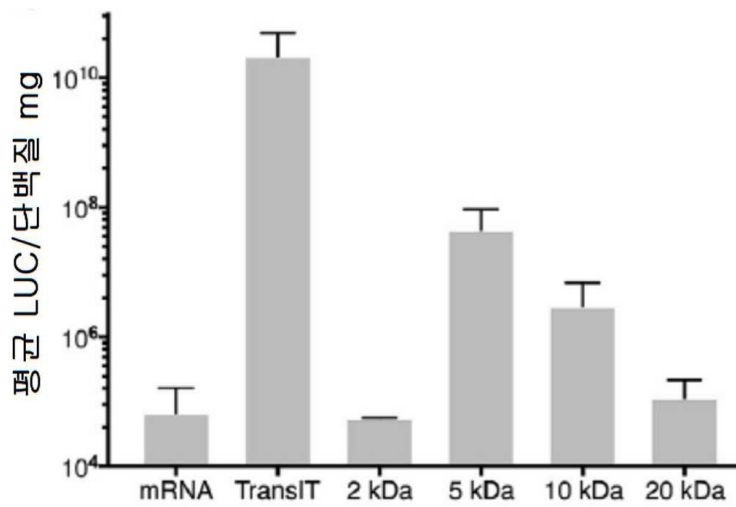
도면1



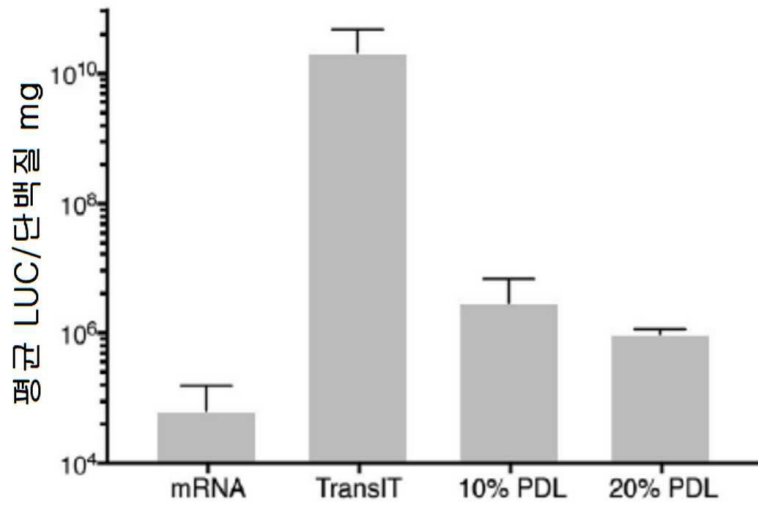
도면2



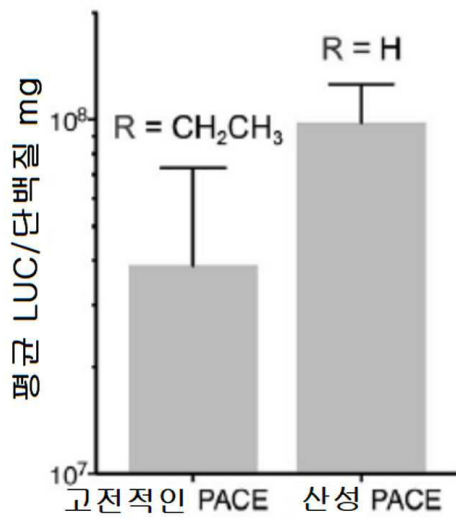
도면3a



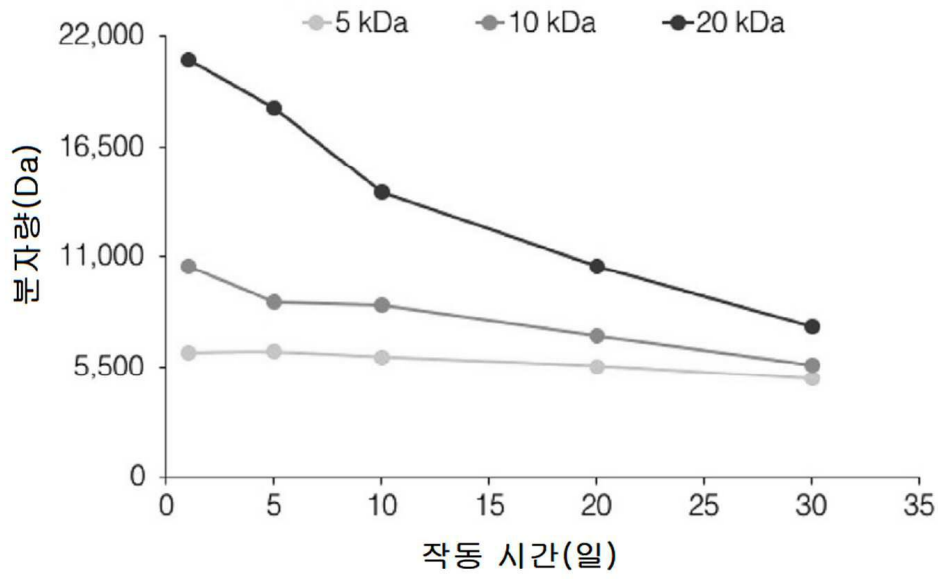
도면3b



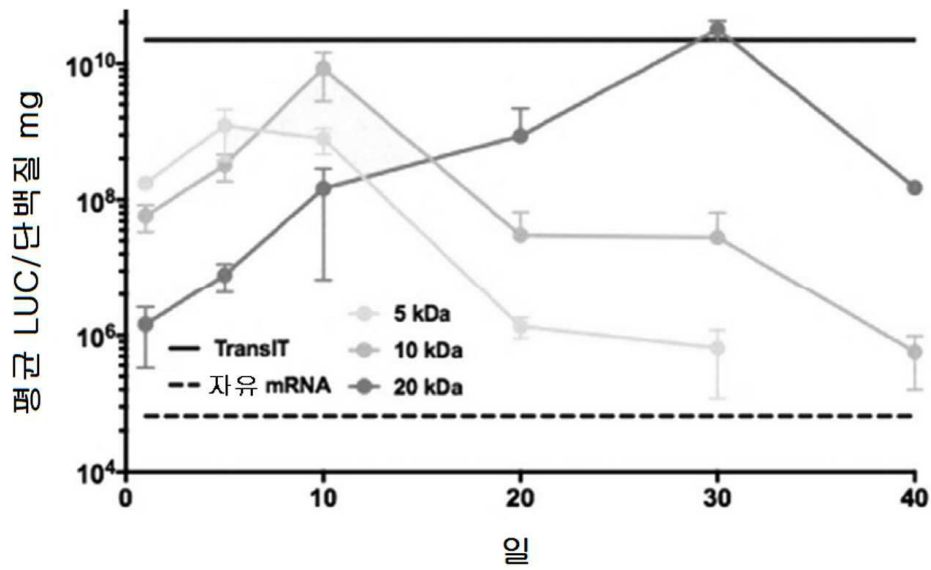
도면3c



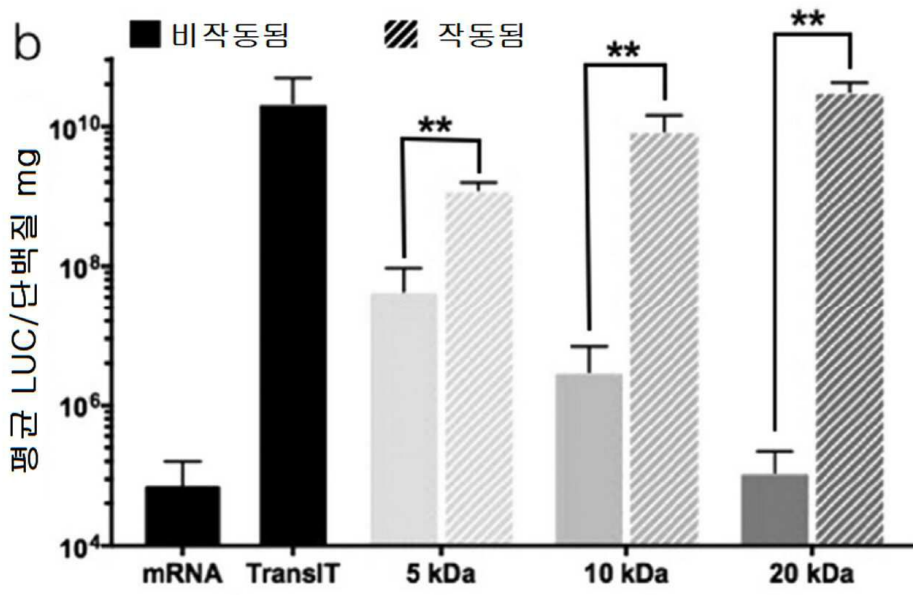
도면4



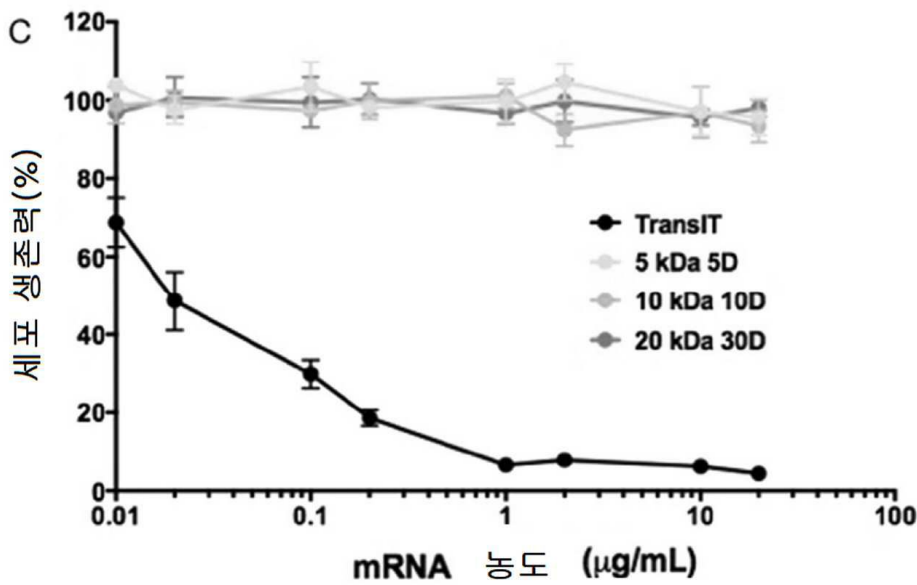
도면5a



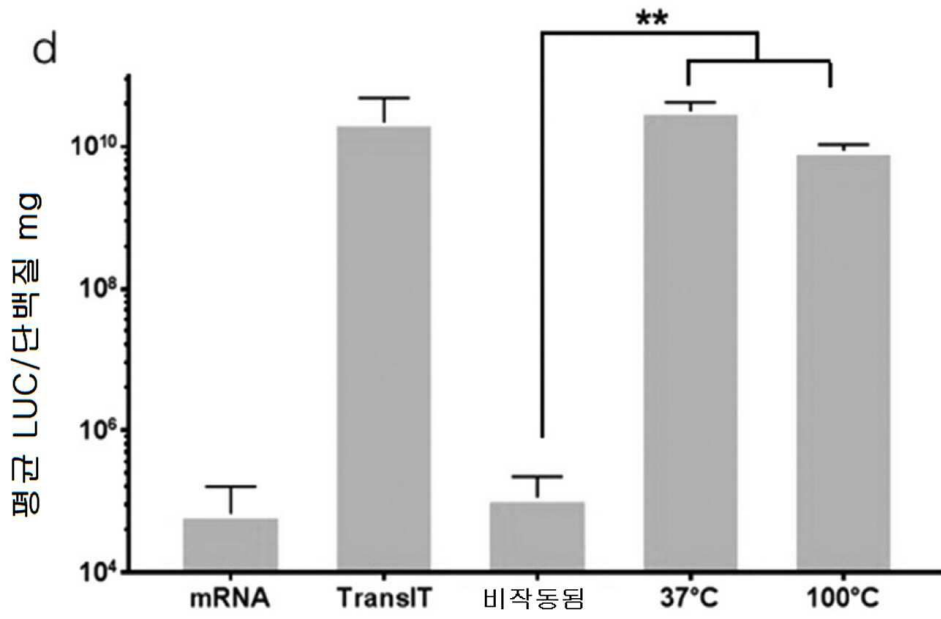
도면5b



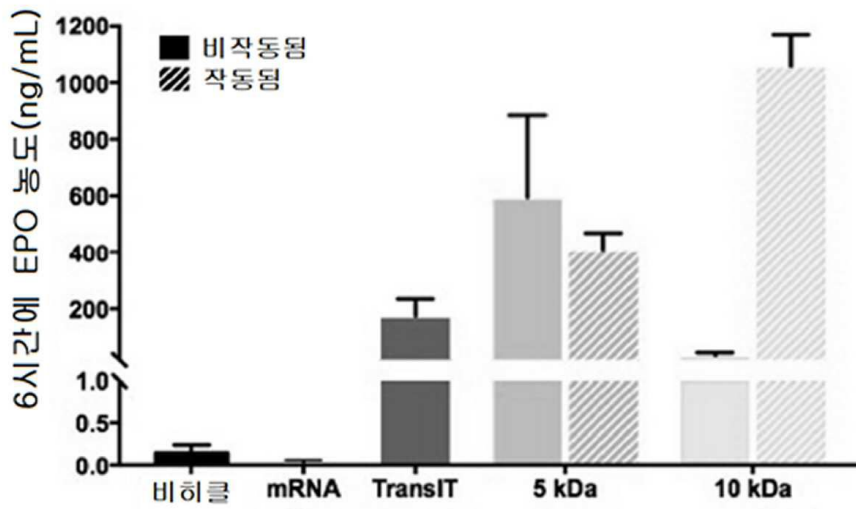
도면5c



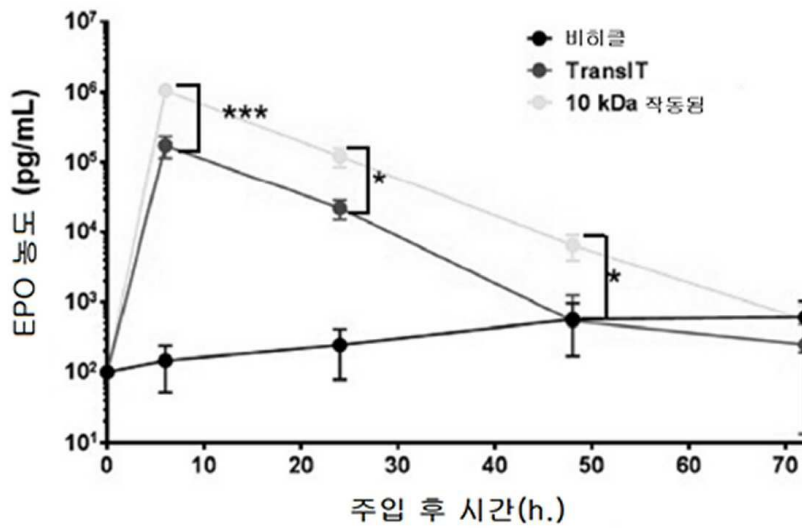
도면5d



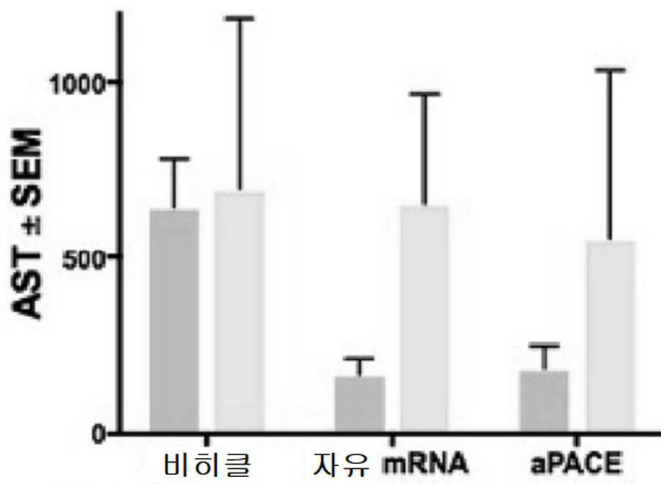
도면6a



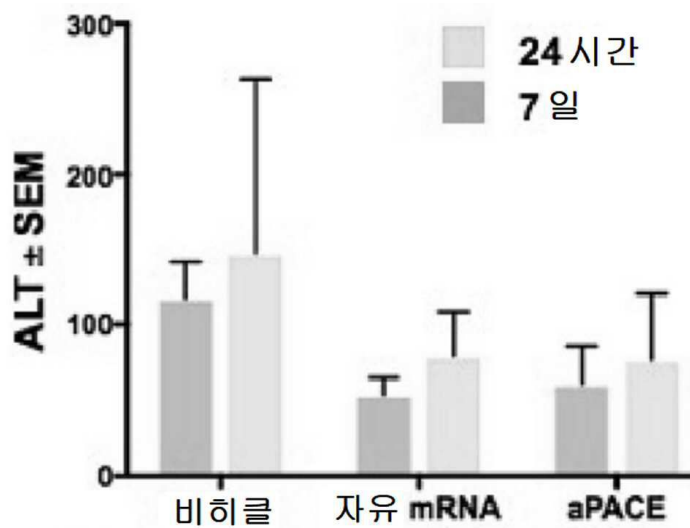
도면6b



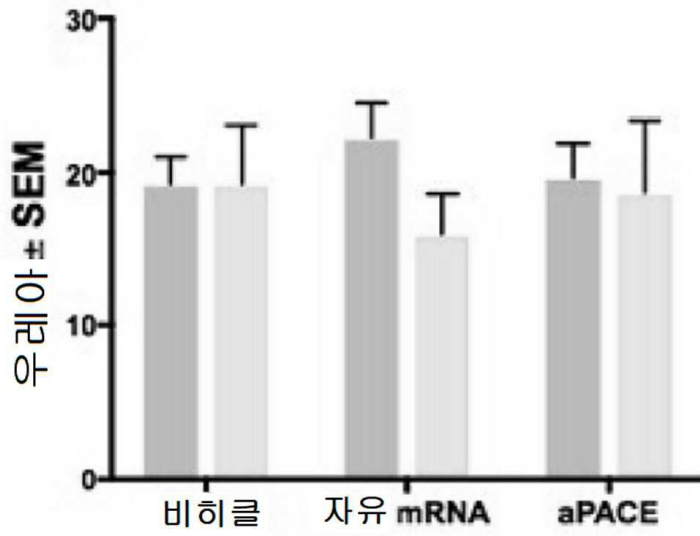
도면6c



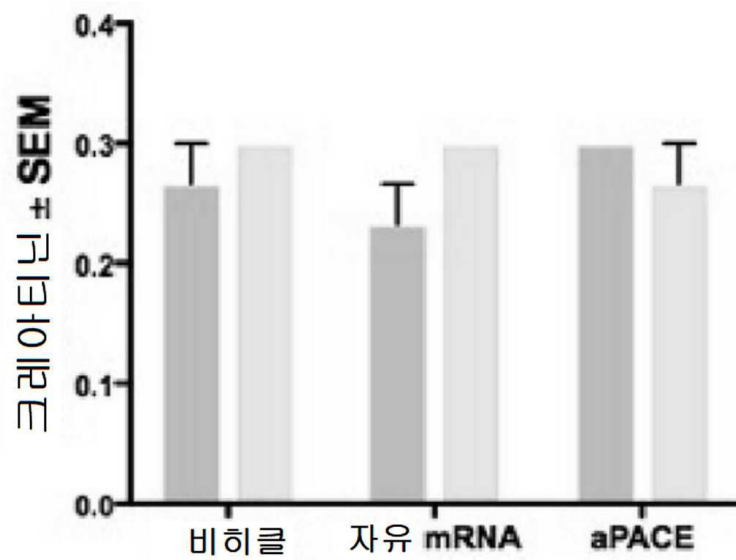
도면6d



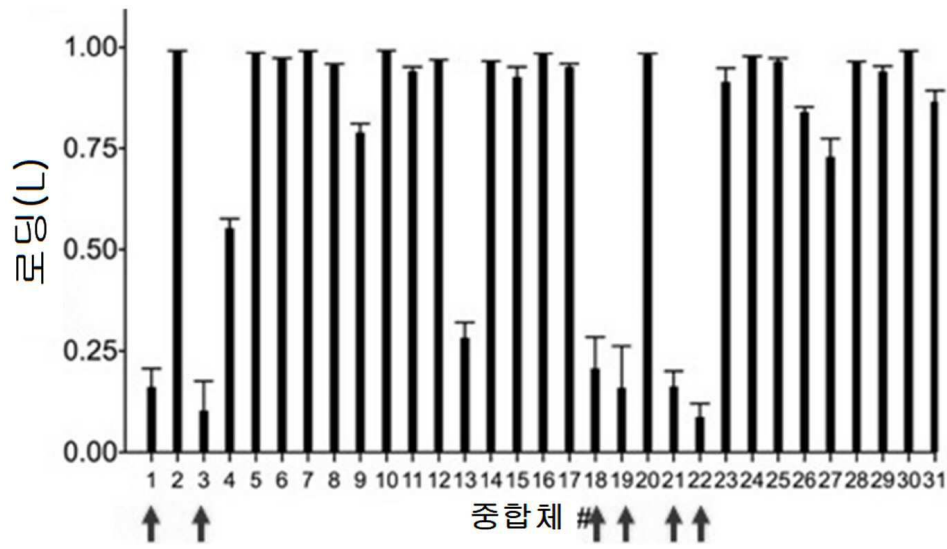
도면6e



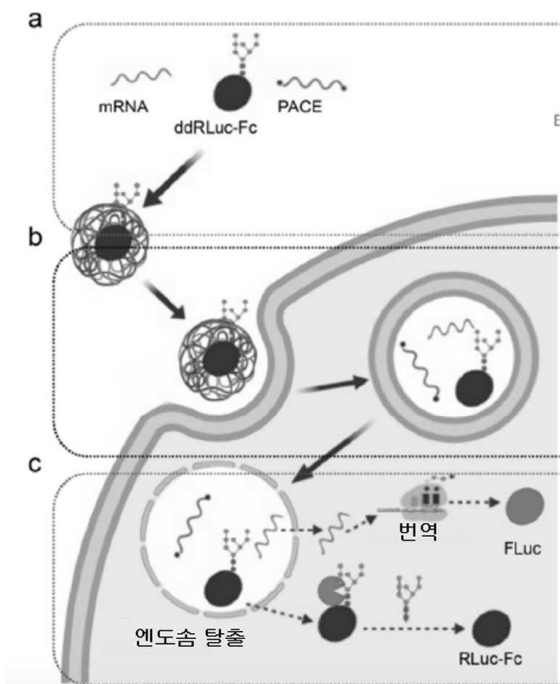
도면6f



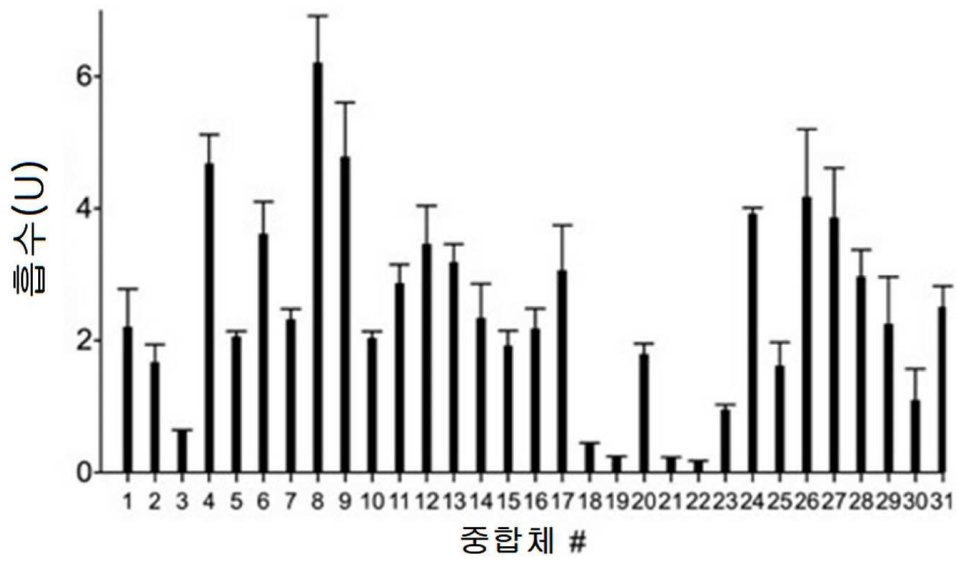
도면7



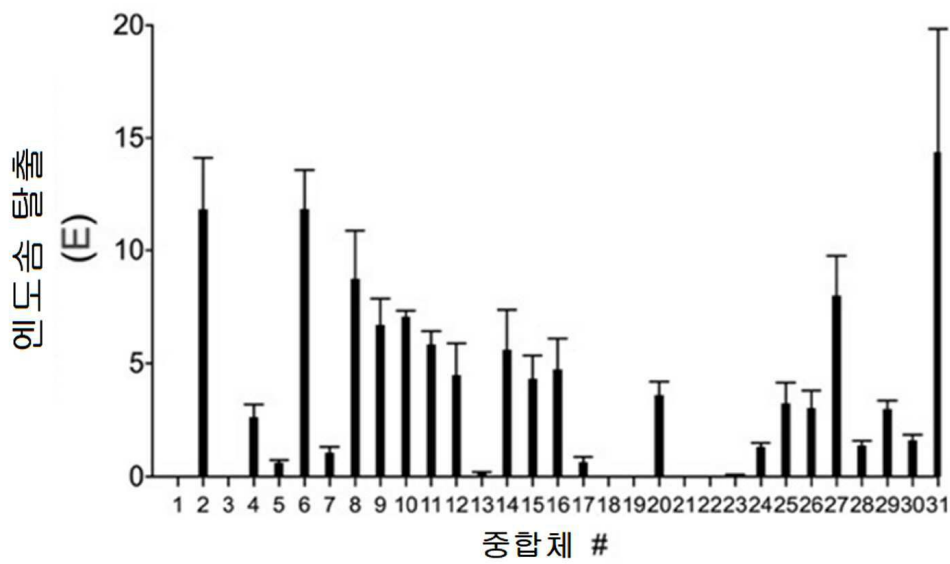
도면8a



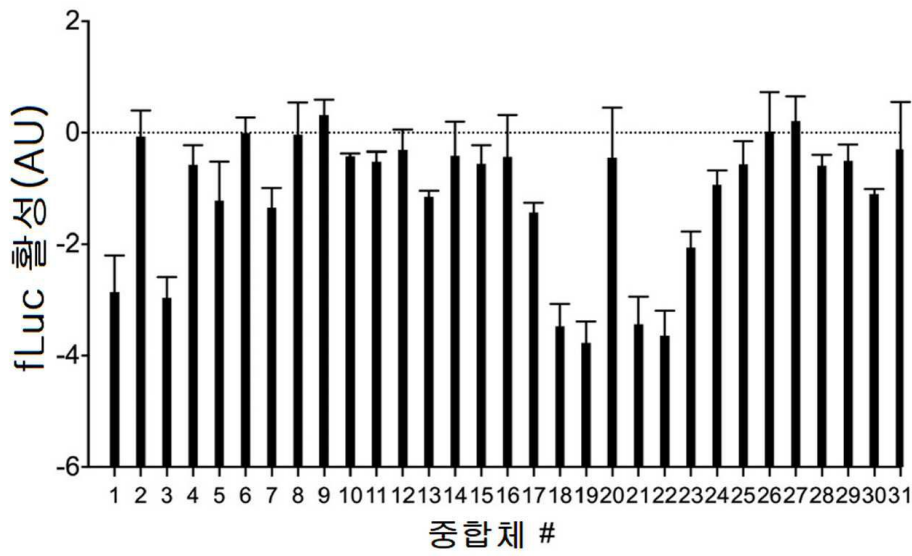
도면 8b



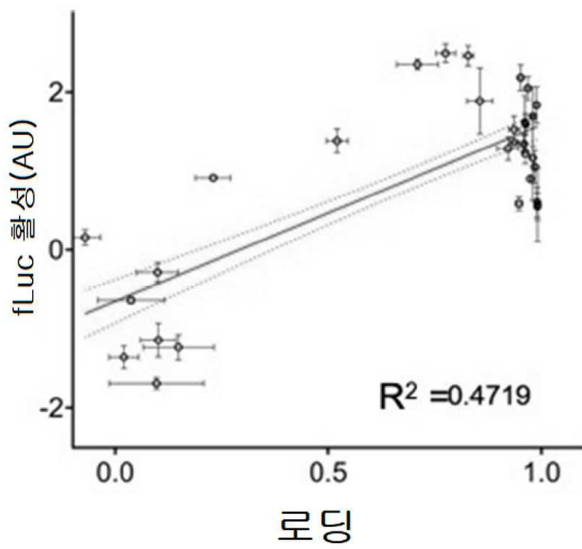
도면 8c



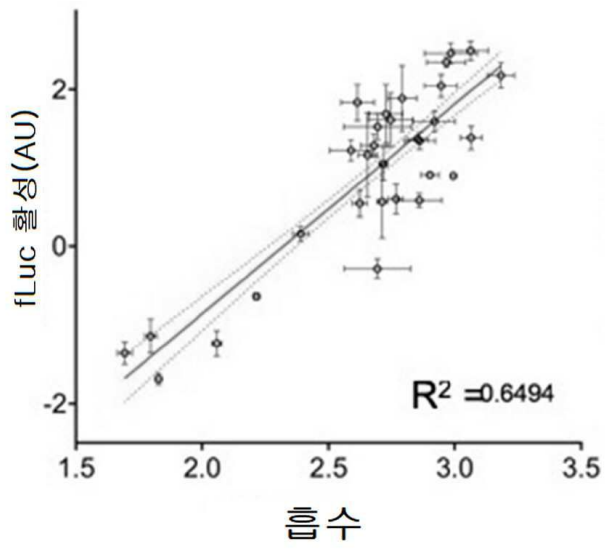
도면8d



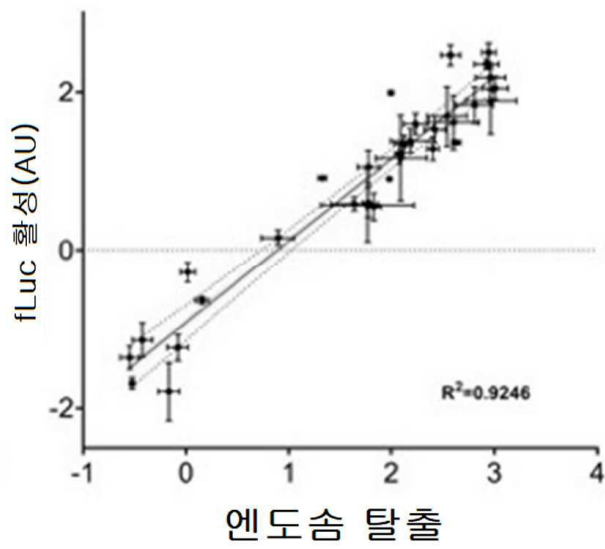
도면9a



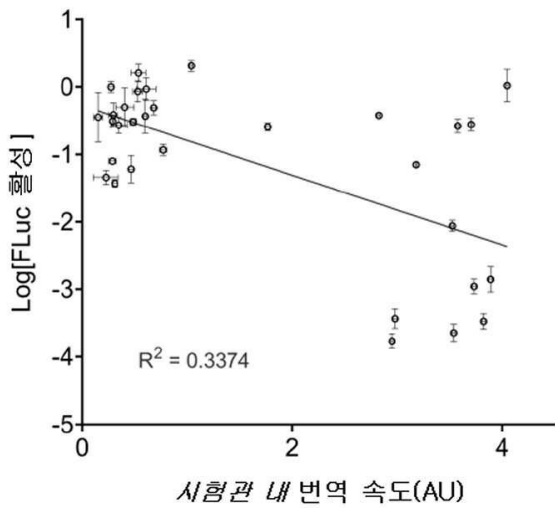
도면9b



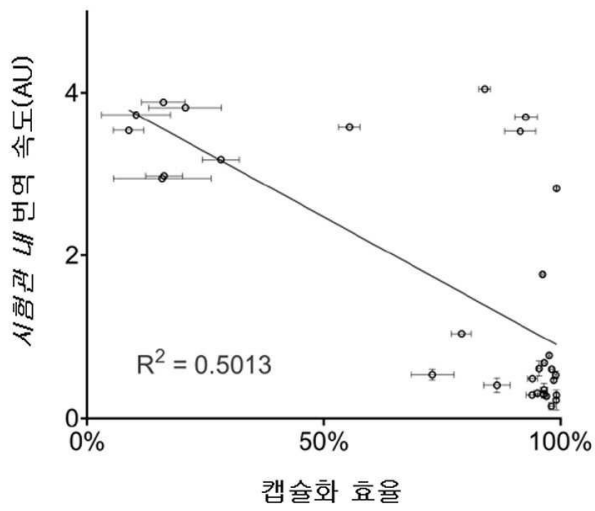
도면9c



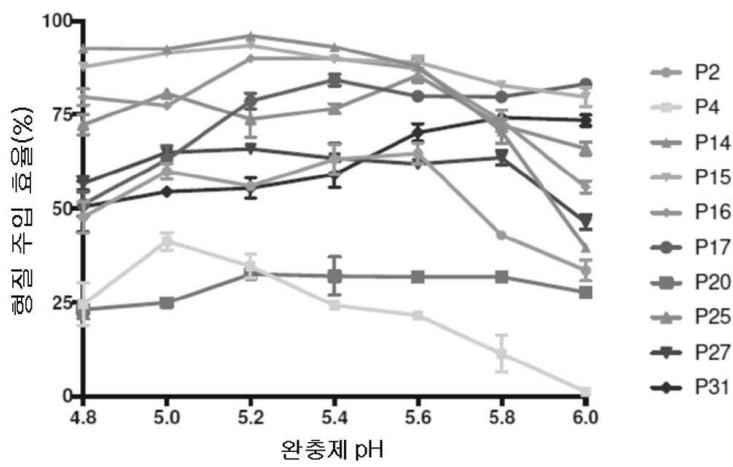
도면10a



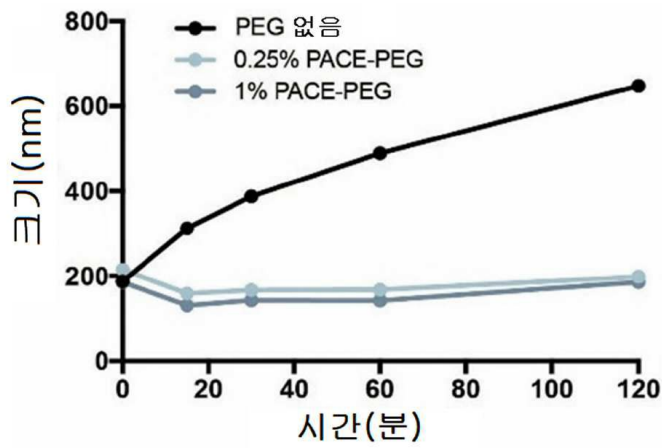
도면10b



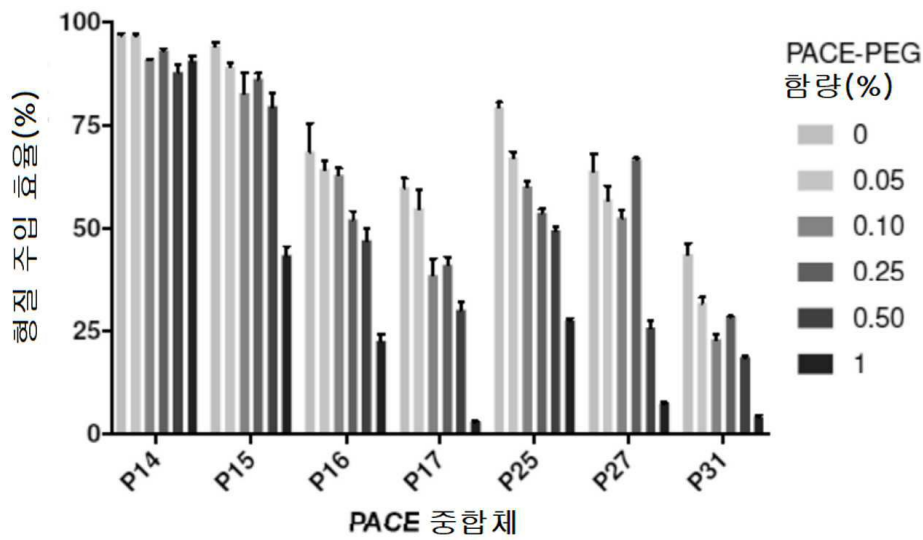
도면11



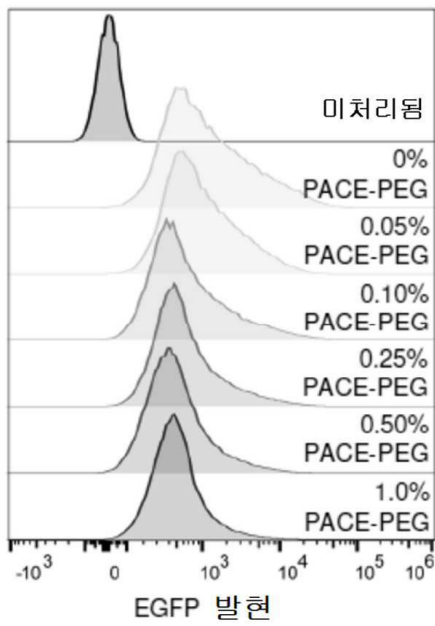
도면12a



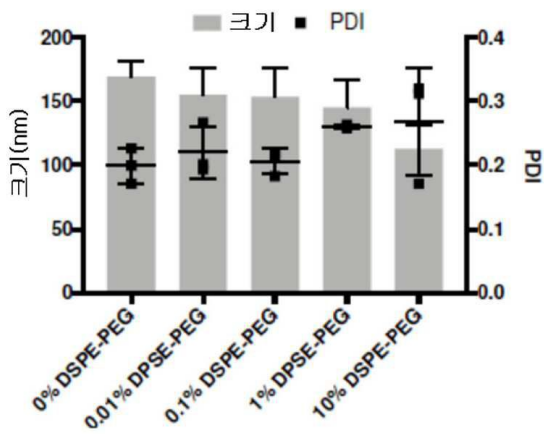
도면12b



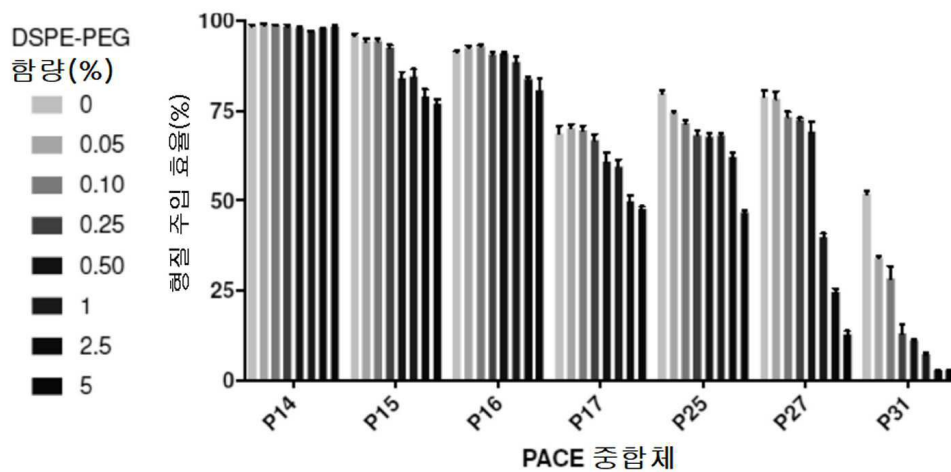
도면12c



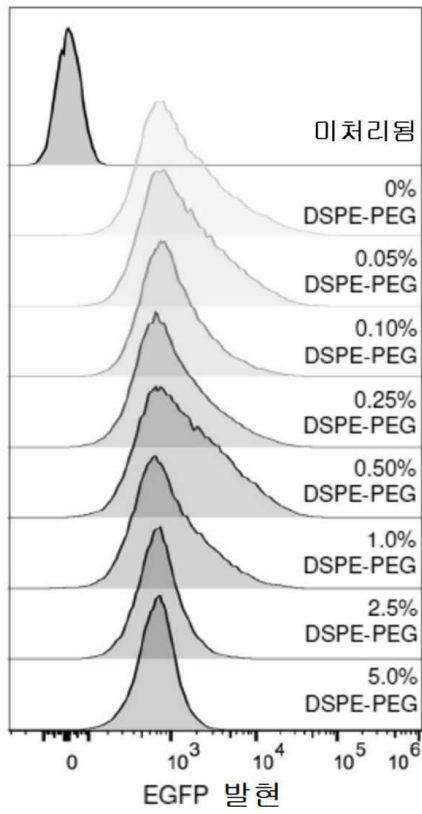
도면13a



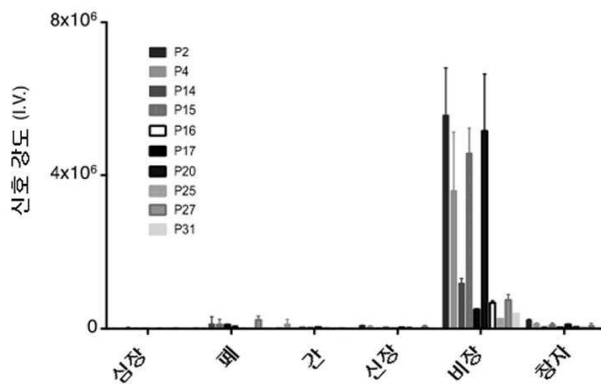
도면13b



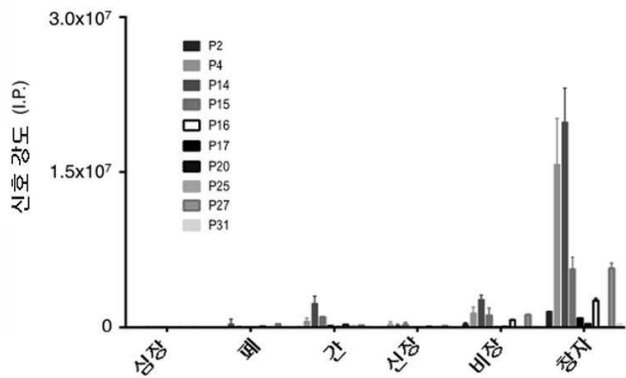
도면13c



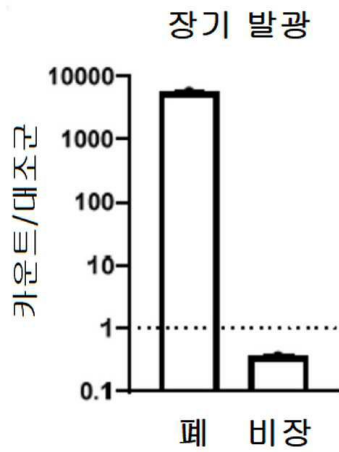
도면14a



도면14b



도면15



서열 목록

- <110> Yale Univertisty
- <120> POLY(AMINE-CO-ESTER) POLYMERS WITH MODIFIED END GROUPS AND ENHANCED PULMONARY DELIVERY
- <130> 2022-FPA-1879
- <150> 63/041,739
- <151> 2020-06-19
- <160> 4
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 26
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Synthetic peptide
- <400> 1

Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu
 1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Arg Gly Asp Lys

20 25

<210> 2

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 2

Arg Gly Asp Lys Gly Gly Gly Gly Gly Gly Glu Glu Glu Glu Glu Glu

1 5 10 15

Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu

20 25

<210> 3

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 3

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu

1 5 10 15

Glu Glu Glu Glu Glu Glu

20

<210> 4

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 4

Gly Asp Pro Asp Leu Gly Asp Val Asp Arg Gly Gly Gly Gly Gly Gly

1 5 10 15

Gly Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu

20

25

30

Glu