(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0050712
(43) 공개일자 2025년04월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*C08G 69/48* (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
*A61K 39/12* (2006.01) *A61K 47/69* (2017.01)
*A61K 48/00* (2006.01) *A61K 9/50* (2006.01)
*C08G 69/08* (2006.01)
(52) CPC특허분류
*C08G 69/48* (2013.01)
*A61K 39/12* (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-0129490
(22) 출원일자 2024년09월25일
심사청구일자 2024년09월25일
(30) 우선권주장
1020230133523 2023년10월06일 대한민국(KR)

(71) 출원인
**인하대학교 산학협력단**
인천광역시 미추홀구 인하로 100(용현동, 인하대학교)
(72) 발명자
**김현진**
인천광역시 미추홀구 독배로251번길 24, 105동 704호
**임성빈**
인천광역시 미추홀구 인하로47번길 53, 304호
**강동현**
인천광역시 미추홀구 한나루로477번길 34, 104호
(74) 대리인
**특허법인주원**

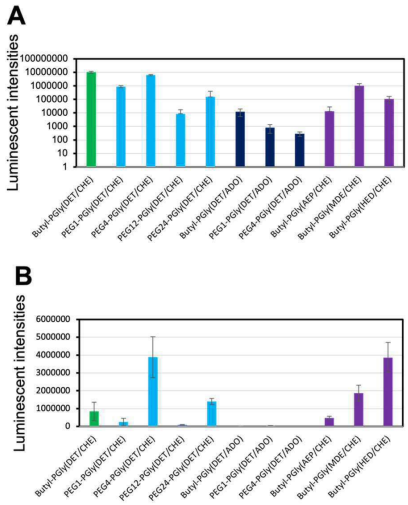
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **신규 고분자 화합물 및 이를 포함하는 핵산 전달용 조성물**

## (57) 요 약

본 발명은 신규 고분자 화합물 및 이를 포함하는 핵산 전달용 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 핵산에 높은 결합력을 가지며, 핵산분해효소로부터 효과적으로 핵산을 보호함으로써 핵산 전달 효과 및 안정성이 향상되는 효과가 있다.

*대 표 도* - 도23



(52) CPC특허분류
***A61K 47/6935*** (2017.08)
***A61K 48/0041*** (2013.01)
***A61K 9/5031*** (2013.01)
***C08G 69/08*** (2013.01)
*A61K 2039/53* (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

| | |
|---|---|
| 과제고유번호 | 1711160180 |
| 과제번호 | 2022M3E5F1017719 |
| 부처명 | 과학기술정보통신부 |
| 과제관리(전문)기관명 | 한국연구재단 |
| 연구사업명 | 감염병차세대백신기초원천핵심기술개발사업 |
| 연구과제명 | mRNA백신 전달을 위한 특허 회피 고분자 재료 개발 및 AI 데이터베이스로의 이용 |
| 과제수행기관명 | 인하대학교 |
| 연구기간 | 2023.01.01 ~ 2023.12.31 |

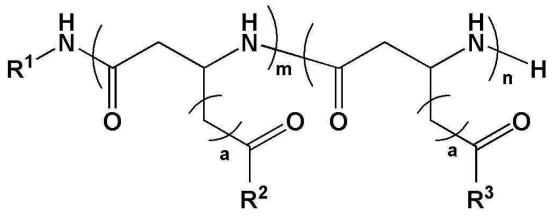
# 명 세 서

## 청구범위

### 청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물

화학식 1



{상기 화학식 1에서,

$R^1$은 $C_1$~$C_{10}$의 알킬기; $-(CH_2)_3-O-CH_3$; 또는 $-(CH_2)_x-[(CH_2)_2-O]_y-CH_3$;이며,

x는 0 또는 1이고, y는 1 내지 45의 정수이며,

단, y가 1인 경우 x는 1이고, y가 2 이상인 경우 x는 0이며,

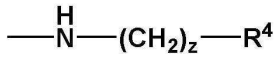
m 및 n은 서로 독립적으로 1 내지 100의 정수이고,

단, m+n≥10이며,

a는 0 내지 2의 정수이고,

$R^2$ 및 $R^3$은 서로 독립적으로 각각 하기 화학식 2로 표시되며,

화학식 2



상기 화학식 2에서,

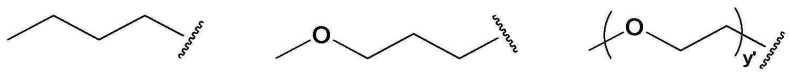
$R^4$는 수소; 아미노기; 히드록시기; $C_1$~$C_{20}$의 알콕시기; $C_3$~$C_{20}$의 지방족고리기; $C_6$~$C_{20}$의 아릴기; $C_1$~$C_{20}$의 헤테로아릴기; $C_1$~$C_{20}$의 헤테로고리기; $-NH-C_1$~$C_{20}$의 알켄일기$-NH_2$; $-NH-C_1$~$C_{20}$의 히드록시알킬기; $-N(C_1$~$C_{20}$의 알킬기)($C_1$~$C_{20}$의 알킬기); $-N(C_1$~$C_{20}$의 알킬기)($C_1$~$C_{20}$의 알켄일기$-NH_2$); $-(OH)(C_1$~$C_{20}$의 알킬기); 및 $-(C_1$~$C_{20}$의 히드록시알킬기)($C_1$~$C_{20}$의 히드록시알킬기);로 이루어진 군에서 선택되며,

z는 0 내지 45의 정수이다.}

### 청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 $R^1$은 하기 화학식 1-1 내지 화학식 1-3 중 어느 하나인 것으로 특징으로 하는 화합물

화학식 1-1 화학식 1-2 화학식 1-3



{상기 화학식 1-1 내지 화학식 1-3에서,

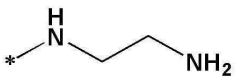
y'은 2 내지 45의 정수이며,

〰 은 결합하는 위치를 나타낸다.}

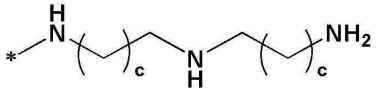
**청구항 3**

제 1항에 있어서, 상기 $R^2$ 또는 $R^3$은 하기 화학식 2-1 내지 화학식 2-20 중 어느 하나인 것으로 특징으로 하는 화합물

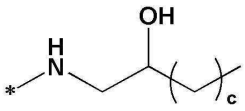
화학식 2-1



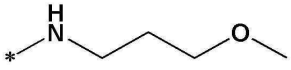
화학식 2-2



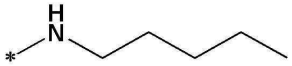
화학식 2-3



화학식 2-4



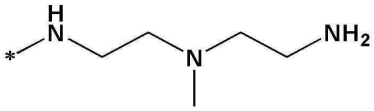
화학식 2-5



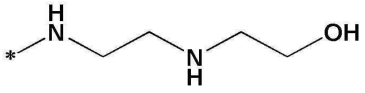
화학식 2-6



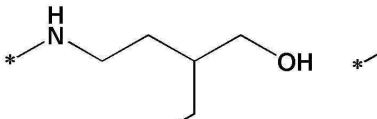
화학식 2-7



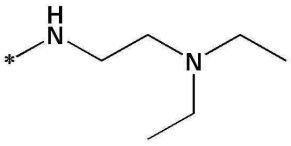
화학식 2-8



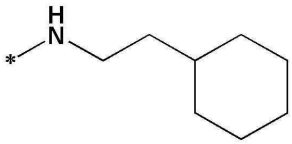
화학식 2-9



화학식 2-10



화학식 2-11



화학식 2-12



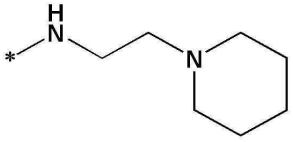
화학식 2-13



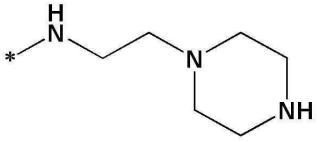
화학식 2-14

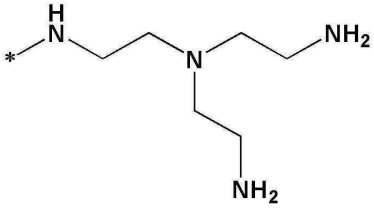


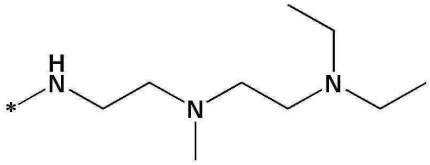
화학식 2-15



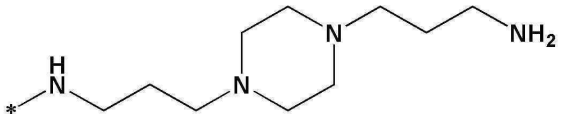
화학식 2-16



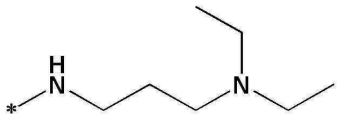




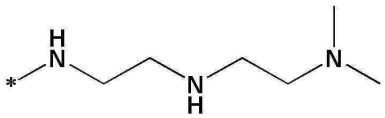
화학식 2-17



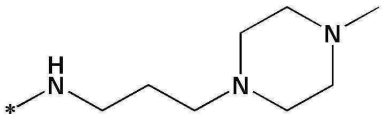
화학식 2-18



화학식 2-19



화학식 2-20



{상기 화학식 2-1 내지 화학식 2-20에서, c는 0 내지 12의 정수이다.}

**청구항 4**

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 따른 화합물을 포함하는 핵산 전달용 조성물

**청구항 5**

제 4항에 있어서, 상기 핵산은 DNA, RNA, PNA, 간섭 RNA (siRNA), 비대칭 간섭 RNA (aiRNA), microRNA (miRNA), 다이서-기질 RNA (dsRNA), 작은 헤어핀 RNA (shRNA), 메신저 RNA (mRNA), 운반 RNA (tRNA), 리보솜 RNA (rRNA), 안티센스 올리고뉴클레오타이드 및 이들의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 핵산 전달용 조성물

**청구항 6**

제 4항에 있어서, 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 약제학적으로 허용 가능한 염을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 핵산 전달용 조성물

**청구항 7**

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 따른 화합물과 핵산이 결합되어 형성된 나노입자

**청구항 8**

제 7항에 있어서, 상기 화합물의 양성자화 가능한(protonable) 질소 / 핵산의 인산 비율(N/P ratio)은 1 내지 30인 것을 특징으로 하는 나노입자

**청구항 9**

제 7항 또는 제 8항에 따른 나노입자를 포함하는 백신 조성물

**청구항 10**

1) 베타-아미노산 N-티오카복시무수물(beta-amino acid N-thiocarboxyanhydrides; beta-NTAs) 단량체를 합성하는 단계;

2) 부틸아민을 개시제로 사용하여 상기 beta-NTAs 단량체를 개환 중합(ring-opening polymerization)에 의해 고분자 전구체를 합성하는 단계; 및

3) 아미놀리시스(aminolysis) 반응을 통해 상기 고분자 전구체의 사이드 체인을 개질시키는 단계;를 포함하는 제 1항의 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법

**청구항 11**

제 1항의 화합물을 이용하여 핵산을 세포 내로 전달하는 방법

**청구항 12**

제 11항에 있어서, 상기 세포 내 장소는 세포질(cytoplasm) 또는 핵(nucleus)인 것을 특징으로 하는 방법

## *발명의 설명*

### *기 술 분 야*

[0001] 본 발명은 양친매성 고분자 화합물 및 이를 포함하는 핵산 전달용 조성물에 관한 것이다.

### *배 경 기 술*

[0002] 차세대 백신으로 주목받고 있는 mRNA 백신은 바이러스의 유전정보가 담긴 mRNA를 인공적으로 합성 및 주사하여 세포가 직접 스파이크 단백질을 생성하도록 하여 면역을 활성화시킨다. mRNA 백신은 바이러스의 유전자를 이용하기 때문에 바이러스의 유전자 구조만 밝혀지면 신속한 개발이 가능하고, 외부에서 항원이나 항체를 배양할 필요가 없어 생산속도가 빠른 이점이 있다. mRNA 백신은 코로나-19 팬데믹 대응을 위해 전 세계적으로 사용되었으며, 현재 감염병뿐만 아니라 암이나 희귀질환 등 각종 질병을 극복하고자 이를 이용한 다양한 연구개발이 이루어지고 있다.

[0003] 한편, mRNA는 인체 내 분해효소에 의해 쉽게 손상될 수 있어, mRNA를 세포까지 안전하게 전달하기 위한 기술로 나노 전달체가 주목받고 있다. 현재 가장 많이 사용되는 나노 전달체는 지질나노입자(Lipid Nano Particle, LNP)로, 최근 화이자와 모더나가 개발한 코로나 백신 또한 LNP 전달체를 사용하고 있다. 그러나 지질나노입자의 경우 지질이 쉽게 산패해 실온에서 보관 및 유통이 어렵고, LNP 자체 독성에 의한 과민반응을 일으키는 등 부작용이 보고되고 있다.

[0004] 이를 극복하고자 합성 고분자 나노 전달체 연구가 활발하게 진행되고 있다. 합성 고분자 나노 전달체는 작은 단위체를 반복적으로 결합해 만든 것으로, 구조와 크기, 이온화 특성, 자극 반응성 약물 방출 등을 자유롭게 설계할 수 있으며, 추후 유전자 편집이 가능한 유전자 치료제에도 활용될 수 있다. 또한, 고분자 나노 전달체에 다른 구성요소를 도입함으로써 고분자의 특성을 유지하면서도 더 많은 이점을 동시에 구현할 수 있으며, 고분자-지질 및 고분자-무기물 하이브리드 전달 나노플랫폼 등 다중 고분자 시스템 및 고분자 기반 하이브리드 시스템으로 구성을 조절할 수 있다.

[0005] mRNA가 로드된 고분자 나노입자는 폴리플렉스, 폴리머 미셀, 폴리머솜, 코어-쉘 구조 폴리머-지질 하이브리드 등 다양한 구조를 갖는다. 이러한 고분자 나노입자 전달체는 낮은 독성과 생분해성 및 생체적합성이 우수하여 독성 및 면역반응을 줄일 수 있으며, LNP로 mRNA 전달이 힘든 차세대 백신 및 의약품 개발의 기초데이터를 제공할 수 있다. 더불어 고분자 기반 mRNA 전달체 기술은 mRNA 백신뿐만 아니라 다른 RNA 약물의 개발에도 사용될 수 있어 다양한 질병의 치료에 활용 가치가 높다.

[0006] 고분자 나노입자 전달체의 일 예로, 양이온성 덴드리머는 에볼라, H1N1 인플루엔자, 지카 등 다양한 바이러스에 대한 비임상시험에 사용되었으나, 가지가 많은 분자 자체의 구조적 특성상 생체 내에서 분해가 어려워 독성이 나타나는 단점이 있어 보완이 필요하다. 고분자 나노입자는 단독으로 사용하거나 지질과 함께 지질-고분자 복합체로 다수의 문헌에 보고된 바 있으나, 연구 성과에 비하여 정확한 물성 분석 및 구조 규명이 어려워 임상 진입 장벽이 다소 높아 아직 상용화되지 못한 실정이다.

## 발명의 내용

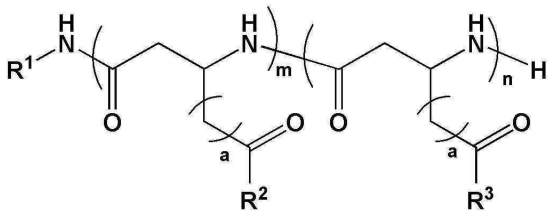
### 해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하고자 안출된 것으로, 고성능을 갖는 고분자 전달체 및 이를 포함하는 핵산 전달용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

### 과제의 해결 수단

[0008] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 제공한다.}

[0009] 화학식 1

[0010] 

[0011] {상기 화학식 1에서,

[0012] $R^1$은 $C_1$~$C_{10}$의 알킬기; $-(CH_2)_3-O-CH_3$; 또는 $-(CH_2)_x-[(CH_2)_2-O]_y-CH_3$;이며,

[0013] x는 0 또는 1이고, y는 1 내지 45의 정수이며,

[0014] 단, y가 1인 경우 x는 1이고, y가 2 이상인 경우 x는 0이며,

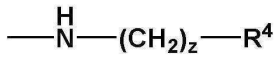
[0015] m 및 n은 서로 독립적으로 1 내지 100의 정수이고,

[0016] 단, $m+n \geq 10$이며,

[0017] a는 0 내지 2의 정수이고,

[0018] $R^2$ 및 $R^3$은 서로 독립적으로 각각 하기 화학식 2로 표시되며,

[0019] 화학식 2

[0020] 

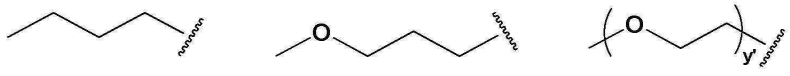
[0021] 상기 화학식 2에서,

[0022] $R^4$는 수소; 아미노기; 히드록시기; $C_1$~$C_{20}$의 알콕시기; $C_3$~$C_{20}$의 지방족고리기; $C_6$~$C_{20}$의 아릴기; $C_1$~$C_{20}$의 헤테로아릴기; $C_1$~$C_{20}$의 헤테로고리기; $-NH-C_1$~$C_{20}$의 알켄일기$-NH_2$; $-NH-C_1$~$C_{20}$의 히드록시알킬기; $-N(C_1$~$C_{20}$의 알킬기$)(C_1$~$C_{20}$의 알킬기); $-N(C_1$~$C_{20}$의 알킬기$)(C_1$~$C_{20}$의 알켄일기$-NH_2$); $-(OH)(C_1$~$C_{20}$의 알킬기); 및 $-(C_1$~$C_{20}$의 히드록시알킬기$)(C_1$~$C_{20}$의 히드록시알킬기);로 이루어진 군에서 선택되며,

[0023] z는 0 내지 45의 정수이다.}

[0024] 상기 $R^1$은 하기 화학식 1-1 내지 화학식 1-3 중 어느 하나로 표시될 수 있다.

[0025] 화학식 1-1 화학식 1-2 화학식 1-3

[0026] 

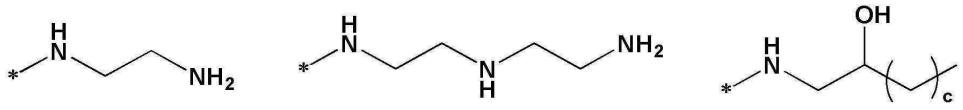
[0027] {상기 화학식 1-1 내지 화학식 1-3에서,

[0028] y'은 2 내지 45의 정수이며,

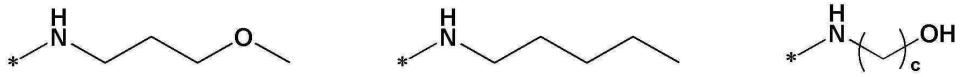
[0029] 〰 은 결합하는 위치를 나타낸다.}

[0030] 상기 $R^2$ 또는 $R^3$은 하기 화학식 2-1 내지 화학식 2-14 중 어느 하나로 표시될 수 있다.

[0031] 화학식 2-1 화학식 2-2 화학식 2-3

[0032] 

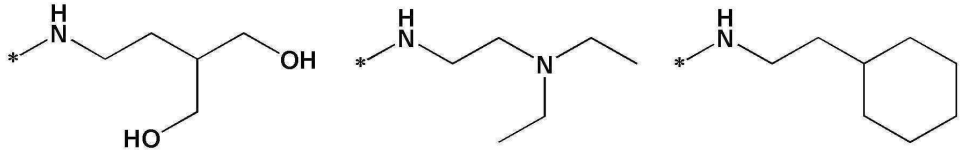
[0033] 화학식 2-4 화학식 2-5 화학식 2-6

[0034] 

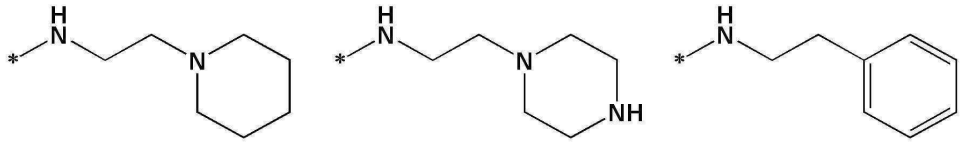
[0035] 화학식 2-7 화학식 2-8

[0036] 

[0037] 화학식 2-9 화학식 2-10 화학식 2-11

[0038] 

[0039] 화학식 2-12 화학식 2-13 화학식 2-14

[0040] 

[0041] {상기 화학식 2-1 내지 화학식 2-14에서, c는 0 내지 12의 정수이다.}

[0042] 또한, 다른 측면에서 본 발명은 상기 화합물을 포함하는 핵산 전달용 조성물을 제공한다.

[0043] 상기 핵산은 DNA, RNA, PNA, 간섭 RNA (siRNA), 비대칭 간섭 RNA (aiRNA), microRNA (miRNA), 다이서-기질 RNA (dsRNA), 작은 헤어핀 RNA (shRNA), 메신저 RNA (mRNA), 운반 RNA (tRNA), 리보솜 RNA (rRNA), 안티센스 올리고뉴클레오타이드 및 이들의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다.

[0044] 또한, 상기 핵산 전달용 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 약제학적으로 허용 가능한 염을 더 포함할 수 있다.

[0045] 또한, 다른 측면에서 본 발명은 상기 화합물과 핵산이 결합되어 형성된 나노입자를 제공한다.

[0046] 상기 화합물의 질소 및 핵산의 인산 비율(N/P ratio)은 1:1 내지 30:1이다.

[0047] 또한, 다른 측면에서 본 발명은 상기 화합물을 포함하는 백신 조성물을 제공한다.

[0048] 또한, 다른 측면에서 본 발명은 1) 베타-아미노산 N-티오카복시무수물(beta-amino acid N-thiocarboxyanhydrides; beta-NTAs) 단량체를 합성하는 단계; 2) 부틸아민을 개시제로 사용하여 상기 beta-NTAs 단량체를 개환 중합(ring-opening polymerization)에 의해 고분자 전구체를 합성하는 단계; 및 3) 아미놀리시스(aminolysis) 반응을 통해 상기 고분자 전구체의 사이드 체인을 개질시키는 단계;를 포함하는 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법을 제공한다.

[0049] 또한, 다른 측면에서 본 발명은 상기 화합물을 이용하여 핵산을 세포 내로 전달하는 방법을 제공한다.

[0050] 상기 세포 내 장소는 세포질(cytoplasm) 또는 핵(nucleus)이다.

## 발명의 효과

[0051] 본 발명에 따른 양친매성 고분자 화합물은 간결한 반응으로 쉽게 제조할 수 있으며, RNA약물 등 치료 핵산에 높은 결합능을 나타내고, 핵산분해효소로부터 핵산을 효과적으로 보호하여 핵산 전달체로서 혈액 내 안정성 및 전달력을 향상시킬 수 있다.

## 도면의 간단한 설명

[0052] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 Benzyl-$\beta^3$-LCHG 단량체의 $^1$H NMR 스펙트럼이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 Benzyl-$\beta^3$-LCHA 단량체의 $^1$H NMR 스펙트럼이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 단량체(a=2)의 $^1$H NMR 스펙트럼이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 butyl-poly(benzyl-$\beta^3$-LCHG) 전구체 고분자의 (A) SEC 차트와 (B) $^1$H NMR 스펙트럼 (5 mg/mL, DMSO-$d_6$, 400 MHz, rt)이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 $PEG_1$-poly(benzyl-$\beta^3$-LCHG) 전구체 고분자의 (A) SEC 차트와 (B) $^1$H NMR 스펙트럼 (5 mg/mL, DMSO-$d_6$, 400 MHz, rt)이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 $PEG_4$-poly(benzyl-$\beta^3$-LCHG) 전구체 고분자의 (A) SEC 차트와 (B) $^1$H NMR 스펙트럼 (5 mg/mL, DMSO-$d_6$, 400 MHz, rt)이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 $PEG_{12}$-poly(benzyl-$\beta^3$-LCHG) 전구체 고분자의 (A) SEC 차트와 (B) $^1$H NMR 스펙트럼 (5 mg/mL, DMSO-$d_6$, 400 MHz, rt)이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 $PEG_{24}$-poly(benzyl-$\beta^3$-LCHG) 전구체 고분자의 (A) SEC 차트와 (B) $^1$H NMR 스펙트럼 (5 mg/mL, DMSO-$d_6$, 400 MHz, rt)이다.

도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른 butyl-poly(benzyl-$\beta^3$-LCHA) 전구체 고분자의 (A) SEC 차트와 (B) $^1$H NMR 스펙트럼 (5 mg/mL, DMSO-$d_6$, 400 MHz, rt)이다.

도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른 butyl-PGly(DET/CHE) 변환체의 $^1$H NMR 스펙트럼 (5 mg/mL, $D_2O$, 400 MHz, rt)이다.

도 11은 본 발명의 일 실시예에 따른 $PEG_1$-PGly(DET/CHE) 변환체의 $^1$H NMR 스펙트럼 (5 mg/mL, $D_2O$, 400 MHz, rt)이다.

도 12는 본 발명의 일 실시예에 따른 $PEG_4$-PGly(DET/CHE) 변환체의 $^1$H NMR 스펙트럼 (5 mg/mL, $D_2O$, 400 MHz, rt)이다.

도 13은 본 발명의 일 실시예에 따른 $PEG_{12}$-PGly(DET/CHE) 변환체의 $^1$H NMR 스펙트럼 (5 mg/mL, $D_2O$, 400 MHz, rt)이다.

도 14는 본 발명의 일 실시예에 따른 $PEG_{24}$-PGly(DET/CHE) 변환체의 $^1$H NMR 스펙트럼 (5 mg/mL, $D_2O$, 400 MHz, rt)이다.

도 15는 본 발명의 일 실시예에 따른 Butyl-PGly(DET/ADO) 변환체의 $^1$H NMR 스펙트럼 (5 mg/mL, $D_2O$, 400 MHz,

rt)이다.

도 16은 본 발명의 일 실시예에 따른 $PEG_1$-PGly(DET/ADO) 변환체의 $^1H$ NMR 스펙트럼 (5 mg/mL, $D_2O$, 400 MHz, rt)이다.

도 17은 본 발명의 일 실시예에 따른 $PEG_4$-PGly(DET/ADO) 변환체의 $^1H$ NMR 스펙트럼 (5 mg/mL, $D_2O$, 400 MHz, rt)이다.

도 18은 본 발명의 일 실시예에 따른 Butyl-PGly(AEP/ADO) 변환체의 $^1H$ NMR 스펙트럼 (5 mg/mL, $D_2O$, 400 MHz, rt)이다.

도 19는 본 발명의 일 실시예에 따른 Butyl-PGly(HED/ADO) 변환체의 $^1H$ NMR 스펙트럼 (5 mg/mL, $D_2O$, 400 MHz, rt)이다.

도 20은 본 발명의 일 실시예에 따른 Butyl-PGly(MDE/ADO) 변환체의 $^1H$ NMR 스펙트럼 (5 mg/mL, $D_2O$, 400 MHz, rt)이다.

도 21은 본 발명의 일 실시예에 따른 poly(benzyl-$b^3$-LCHG) 변환체와 mRNA의 고분자 나노입자의 크기 및 표면전하 측정 결과를 나타낸 것이다.

도 22는 고분자 나노입자의 TEM 이미지(A~C)와 크기 분포 히스토그램(E~G)을 나타낸다. (A,E)butyl-PGly(DET/CHE), (B,F)$PEG_4$-PGly(DET/CHE), 그리고(C,G)$PEG_{24}$-PGly(DET/CHE).

도 23은 본 발명의 일 실시예에 따른 C2C12세포에서 고분자 나노입자의 luciferase mRNA 발현양 측정 결과를 나타낸 것으로, (A) FBS를 넣은 상태, (B) FBS를 넣지 않은 상태를 나타낸다.

도 24의 A는 고분자 나노입자의 C2C12 세포에서의 세포내 섭취 효율을 나타내며, 도 24의 B는 고분자 나노입자의 안정성 분석 결과를 나타낸다.

도 25는 C2C12 세포에서의 $PEG_n$-PGly(DET/CHE) 고분자 나노입자에 대한 세포 생존력 분석 결과를 나타낸다.

도 26의 A는 HEK293-loxP-GFP-RFP 세포의 형광 발현 디자인 모식도를 나타내며, 도 26의 B는 고분자 나노입자를 처리한 다음 세포에서의 형광 발현량을 Image J 소프트웨어로 분석한 결과를 나타낸다.

도 27은 Cre mRNA함유한 각종 샘플을 HEK293-loxP-GFP-RFP 세포에 트랜스펙션한 뒤 48시간 뒤에 관찰한 CLSM 이미지를 나타낸다.

## *발명을 실시하기 위한 구체적인 내용*

[0053] 이하, 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다.

[0054] 본 명세서에서 용어 “양친매성”은 하나의 분자 구조 안에서 수용성 영역과 소수성 영역을 동시에 가지는 성질을 의미한다.

[0055] 본 발명에서 용어 “알킬” 또는 “알킬기”는 지방족 탄화수소 라디칼을 의미하며, 직쇄 알킬기, 분지쇄 알킬기, 사이클로알킬(지환족)기, 알킬-치환된 사이클로알킬기, 사이클로알킬-치환된 알킬기를 비롯한 포화 지방족 작용기의 라디칼을 의미한다. 예를 들어 $C_1$~$C_6$의 알킬은 1 내지 6개의 탄소원자를 갖는 지방족 탄화수소로서, 메틸, 에틸, 프로필, n-부틸, n-펜틸, n-헥실, 아이소프로필, 아이소부틸, sec-부틸, tert-부틸, 네오펜틸, 아이소펜틸 등을 모두 포함한다.

[0056] 본 발명에 사용된 용어 “알켄일기” 또는 “알킨일기”는 적어도 두 개의 탄소원자가 적어도 하나의 탄소-탄소 이중 결합 또는 적어도 두 개의 탄소원자가 적어도 하나의 탄소-탄소 삼중 결합으로 이루어진 그룹을 의미하며, 직쇄형 또는 측쇄형 사슬기를 포함하며, 여기에 제한되는 것은 아니다.

[0057] 본 발명에 사용된 용어 “알콕실기” 또는 “알콕시기”는 별도로 정의되지 않는 한 히드록시기의 수소 원자가 알킬로 치환된 라디칼을 의미하며, 예를 들어 $C_1$~$C_6$의 알콕시는 메톡시, 에톡시, 프로폭시, n-부톡시, n-펜틸옥

시, 아이소프로폭시, sec-부톡시, tert-부톡시, 네오펜틸옥시, 아이소펜틸옥시 등을 모두 포함한다.

[0058] 본 발명에 사용된 용어 “헤테로고리” 또는 “헤테로고리기”는 다른 설명이 없는 한 하나 이상의 헤테로원자 또는 $SO_2$와 같은 헤테로원자단을 포함하는 화합물을 포함하고, 단일 고리 및 다중 고리 중 적어도 하나를 포함하며, 헤테로지방족 고리 및 헤테로방향족 고리를 포함한다. 이웃한 작용기가 결합하여 형성될 수도 있다.

[0059] 본 발명에 사용된 용어 “아릴기” 또는 “아릴렌기”는 단일 고리 또는 다중 고리의 방향족을 의미하며, 이웃한 치환기가 결합 또는 반응에 참여하여 형성된 방향족 고리를 포함한다. 예컨대, 아릴기는 페닐기, 비페닐기, 플루오렌기, 스파이로플루오렌기일 수 있다.

[0060] 본 발명에 사용된 용어 “지방족고리”는 지방족 탄화수소 고리를 의미한다.

[0061] 본 발명에 사용된 용어 “방향족고리”는 하나 이상의 고리를 포함하는 탄화수소로 이루어진 방향족 시스템을 의미하며, 일 예로, 벤젠, 나프탈렌 등이 있다.

[0062] 또한, 본 발명에서 기재된 정의는 화학적으로 관련된 조합, 예컨대 “아릴알킬”, “알킬카르보닐”, “아릴카르보닐” 등을 형성하기 위해 부가될 수 있다. “알킬"이란 용어가 하기의 또 다른 용어, “페닐알킬” 또는 “하이드록시알킬”에서와 같이 접미사로서 사용되었을 때, 이는 또 다른 명확하게 이름지어진 기로부터 선택된 치환기로 치환된 알킬기를 의미한다. 따라서, 예컨대, “페닐알킬”은 페닐 치환기를 가진 알킬기를 의미하고, 따라서 벤질, 페닐에틸 및 바이페닐을 포함한다. “알킬아미노알킬”은 알킬아미노 치환기를 가진 알킬기를 의미한다.

[0064] 핵산 전달용 고성능 고분자 나노입자 제조를 위한 필수 요소로는 고분자의 $pK_a$, 소수성, 나노입자 표면에서의 PEG의 길이 및 밀도, 고분자 분해성, 나노입자 크기가 있다.

[0065] 고분자의 $pK_a$, 즉 아미노 그룹(amino group)의 $pK_a$ 값은 RNA와의 binding 또는 association을 담당하는 것으로, 나노입자의 엔도좀 탈출 능력과 표면전하를 결정한다. 고분자의 $pK_a$ 값이 5-7 값을 가질 때 세포내로 들어가면 엔도좀(pH 5.5) 내에서는 높은 전하로 하전되어 함유한 핵산의 엔도좀 탈출을 용이하게 하여 생체 내 핵산 전달 효율이 우수하다. 또한, 표면전하가 높은 (+) 또는 중성 범위일 때 안전성 및 핵산 전달률을 향상시킬 수 있다.

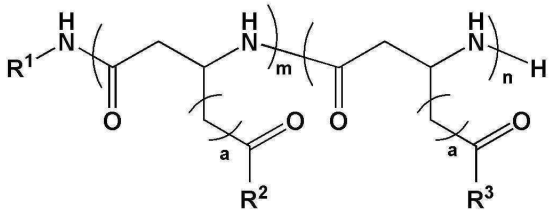
[0066] 고분자의 소수성은 친수성 용매에 있는 나노입자의 안정성을 조절할 수 있으며, PEG 길이 및 밀도를 조절하여 나노입자의 표면전하를 중성으로 조절할 수 있다.

[0067] 본 발명은 mRNA, small interfering RNA (siRNA), antisense oligonucleotide (ASO)를 포함한 RNA 약물을 세포에 전달할 수 있는 양이온 양친매성 고분자인 poly(beta-amino acids) 변환체 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

[0068] 먼저, Benzyl-$\beta^3$-LCHG 단량체와 Benzyl-$\beta^3$-LCHA 단량체를 합성하고, 그 다음 전구체 고분자인 poly-($\beta^3$-benzyl-L-carboxyhomoglycine) [이하, poly(benzyl-$\beta^3$-LCHG)]과 poly-($\beta^3$-benzyl-L-carboxyhomoalanine) [이하, Butyl-poly(benzy-$\beta^3$-LCHA)]을 합성한 후, 다양한 $pK_a$와 소수성을 갖는 화합물로 2차 변환을 거쳐 다양한 구조의 poly(beta-amino acids) 변환체를 제조하였다. 합성된 고분자를 이용하여 mRNA와의 나노입자를 제조하고, *in vitro* transfection을 통해 mRNA 전달력을 평가하였다.

[0069] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 제공한다.

[0070] 화학식 1




[0071]

[0072] {상기 화학식 1에서,

[0073] $R^1$은 $C_1$~$C_{10}$의 알킬기; $-(CH_2)_3-O-CH_3$; 또는 $-(CH_2)_x-[(CH_2)_2-O]_y-CH_3$;이며,

[0074] x는 0 또는 1이고, y는 1 내지 45의 정수이며,

[0075] 단, y가 1인 경우 x는 1이고, y가 2 이상인 경우 x는 0이며,

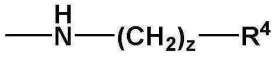
[0076] m 및 n은 서로 독립적으로 1 내지 100의 정수이고,

[0077] 단, $m+n \geq 10$이며,

[0078] a는 0 내지 2의 정수이고,

[0079] $R^2$ 및 $R^3$은 서로 독립적으로 각각 하기 화학식 2로 표시되며,

[0080] 화학식 2

[0081] 

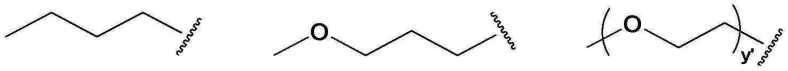
[0082] 상기 화학식 2에서,

[0083] $R^4$는 수소; 아미노기; 히드록시기; $C_1$~$C_{20}$의 알콕시기; $C_3$~$C_{20}$의 지방족고리기; $C_6$~$C_{20}$의 아릴기; $C_1$~$C_{20}$의 헤테로아릴기; $C_1$~$C_{20}$의 헤테로고리기; $-NH-C_1$~$C_{20}$의 알켄일기-$NH_2$; $-NH-C_1$~$C_{20}$의 히드록시알킬기; $-N(C_1$~$C_{20}$의 알킬기)($C_1$~$C_{20}$의 알킬기); $-N(C_1$~$C_{20}$의 알킬기)($C_1$~$C_{20}$의 알켄일기-$NH_2$); $-(OH)(C_1$~$C_{20}$의 알킬기); 및 $-(C_1$~$C_{20}$의 히드록시알킬기)($C_1$~$C_{20}$의 히드록시알킬기);로 이루어진 군에서 선택되며,

[0084] z는 0 내지 45의 정수이다.}

[0086] 또한, 본 발명은 상기 $R^1$은 하기 화학식 1-1 내지 화학식 1-3 중 어느 하나로 표시되는 화합물을 제공한다.

[0087] 화학식 1-1 화학식 1-2 화학식 1-3

[0088] 

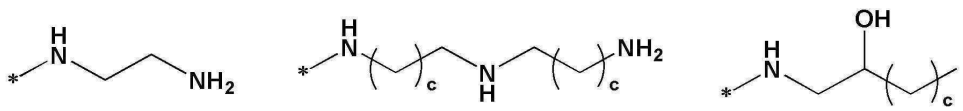
[0089] {상기 화학식 1-1 내지 화학식 1-3에서,

[0090] y'은 2 내지 45의 정수이며, 바람직하게는 y'은 2 내지 25의 정수이고,

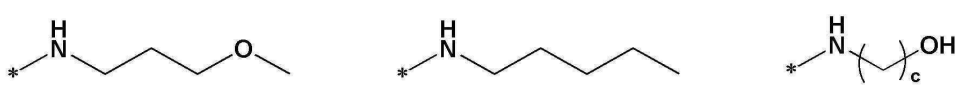
[0091] 〰 은 결합하는 위치를 나타낸다.}

[0093] 또한, 본 발명은 상기 $R^2$ 또는 $R^3$은 하기 화학식 2-1 내지 화학식 2-20 중 어느 하나로 표시되는 화합물을 제공한다.

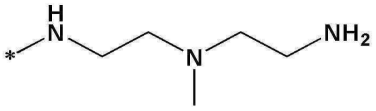
[0094] 화학식 2-1 화학식 2-2 화학식 2-3

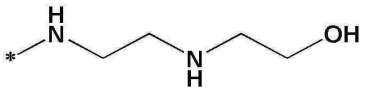
[0095] 

[0096] 화학식 2-4 화학식 2-5 화학식 2-6

[0097] 

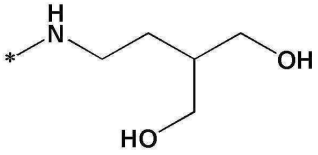
[0098] 화학식 2-7 화학식 2-8

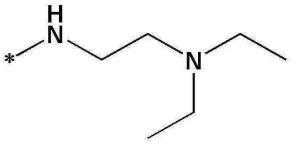


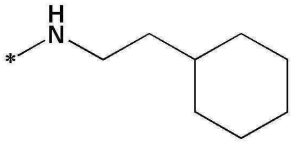


[0099]

[0100] 화학식 2-9 화학식 2-10 화학식 2-11

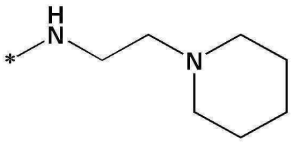


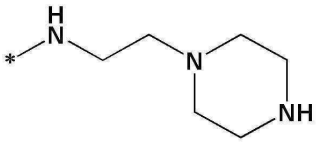


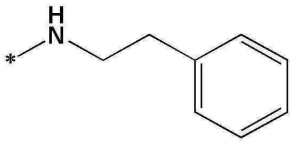


[0101]

[0102] 화학식 2-12 화학식 2-13 화학식 2-14

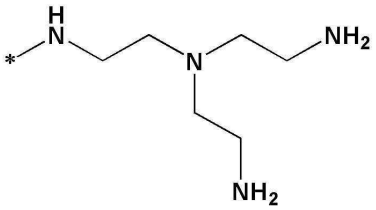


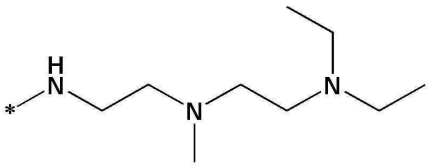




[0103]

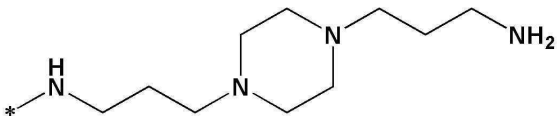
[0104] 화학식 2-15 화학식 2-16

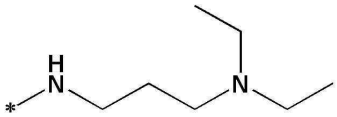




[0105]

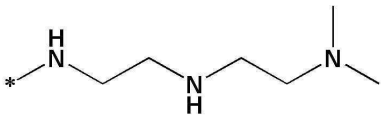
[0106] 화학식 2-17 화학식 2-18

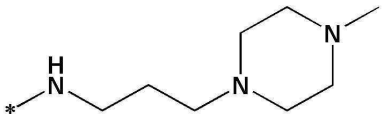




[0107]

[0108] 화학식 2-19 화학식 2-20



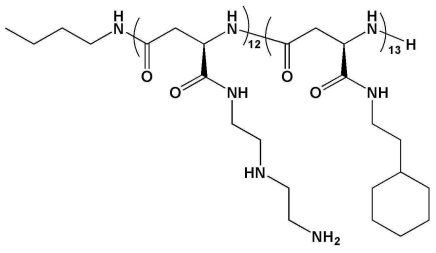


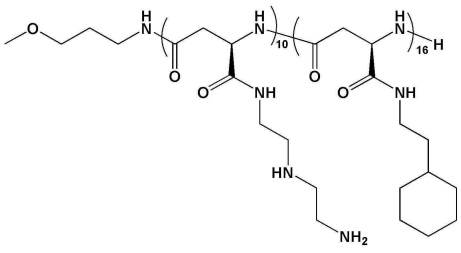
[0109]

[0110] {상기 화학식 2-1 내지 화학식 2-20에서, c는 0 내지 12의 정수이다.}

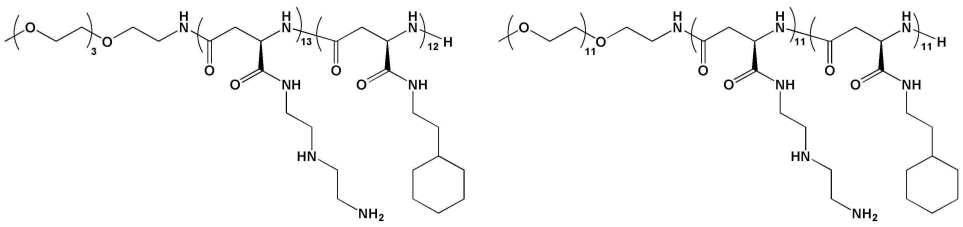
[0111] 상기 $R^2$는 고분자의 $pK_a$를 조절하기 위한 작용기이며, 상기 $R^3$은 고분자의 소수성을 조절하기 위한 작용기이다.

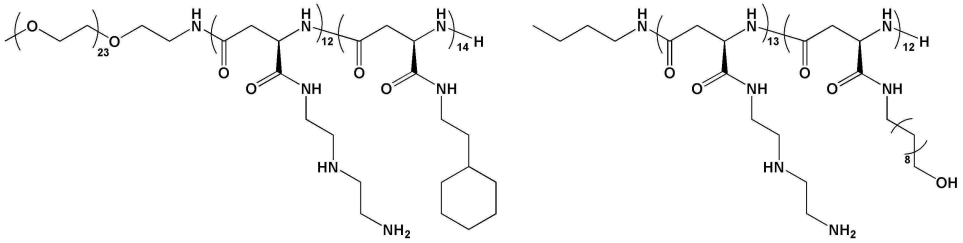
[0113] 구체적으로, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 하기 화합물들 중 어느 하나로 표시될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

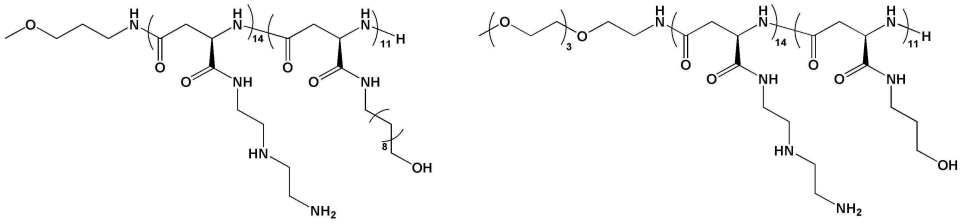


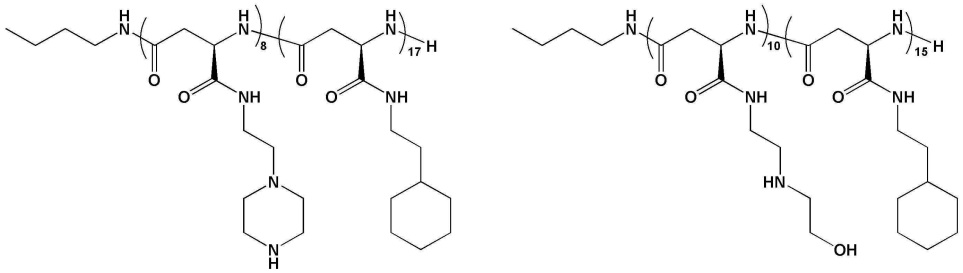


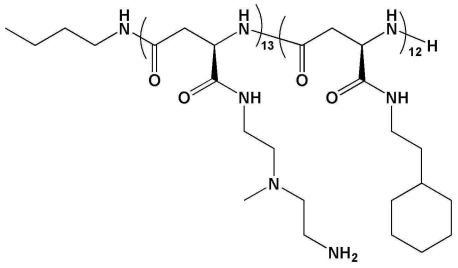
[0114]

[0115] 

[0116] 

[0117] 

[0118] 

[0119] 

[0121] 또한, 다른 측면에서 본 발명은 상기 화합물을 포함하는 핵산 전달용 조성물을 제공한다.

[0122] 상기 핵산은 DNA, RNA, PNA, 간섭 RNA (siRNA), 비대칭 간섭 RNA (aiRNA), microRNA (miRNA), 다이서-기질 RNA (dsRNA), 작은 헤어핀 RNA (shRNA), 메신저 RNA (mRNA), 운반 RNA (tRNA), 리보솜 RNA (rRNA), 안티센스 올리고뉴클레오타이드(ASO) 및 이들의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 바람직하게는 mRNA, siRNA 또는 ASO일 수 있다.

[0123] 상기 화합물은 핵산과 결합하여 고분자 나노입자를 형성할 수 있다. 상기 화합물은 양이온 양친매성 고분자로서, 핵산과 결합이 잘 이루어지므로, 혈액 환경의 변화 등에 있어서 결합이 깨지지 않아 목적하는 부위에 유전자를 효과적으로 전달할 수 있다.

[0124] 상기 핵산 전달용 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 약제학적으로 허용 가능한 염을 더 포함할 수 있다.

[0125] 또한, 다른 측면에서 본 발명은 상기 화합물과 핵산이 결합되어 형성된 나노입자를 제공한다.

[0126] 상기 나노 입자에서, 상기 화합물의 양성자화 가능한(protonable) 질소 / 핵산의 인산 비율(N/P ratio)은 1 내지 30일 수 있으며, 바람직하게는 3 내지 10일 수 있고, 더욱 바람직하게는 5 내지 10일 수 있다.

[0127] 또한, 다른 측면에서 본 발명은 상기 화합물을 포함하는 백신 조성물을 제공한다.

[0128] 또한, 다른 측면에서 본 발명은 1) 베타-아미노산 N-티오카복시무수물(beta-amino acid N-thiocarboxyanhydrides; beta-NTAs) 단량체를 합성하는 단계; 2) 부틸아민을 개시제로 사용하여 상기 beta-NTAs 단량체를 개환 중합(ring-opening polymerization)에 의해 고분자 전구체를 합성하는 단계; 및 3) 아미놀리시스(aminolysis) 반응을 통해 상기 고분자 전구체의 사이드 체인을 개질시키는 단계;를 포함하는 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법을 제공한다.

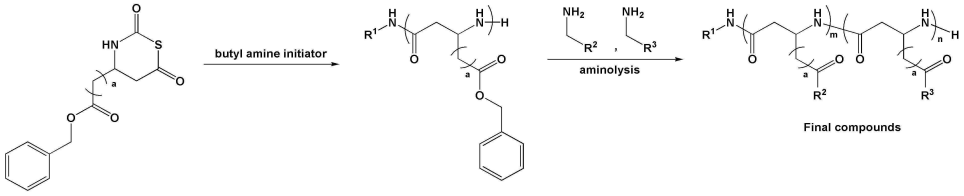
[0129] 또 다른 측면에서, 본 발명은 상기 화합물을 이용하여 핵산을 세포 내로 전달하는 방법을 제공한다. 이때, 상기 세포 내 장소는 세포질(cytoplasm) 또는 핵(nucleus)일 수 있다.

[0131] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 다만, 하기의 실시예는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐, 본 발명이 하기의 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0132] **[합성예]**

[0133] 본 발명의 화학식 1(Final compounds)는 하기 반응식 1과 같이 반응하여 제조될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0134] <반응식 1>

[0135] 


[0137] **실시예 1. Poly(beta-amino acids) 변환체의 합성예**

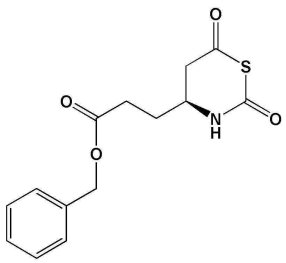
[0138] 1-1. Benzyl-β[3]-LCHG 단량체 합성

[0139] Benzyl-β[3]-LCHG 단량체는 선행연구(M. Zhou Angew. Chem. Int. Ed. 2020, 59, 7240-7244)를 기반으로 동일한 방법으로 합성하였다. 합성이 완료된 단량체는 $^{1}$H-NMR (Avance III, 400 MHz, Bruker, Billerica, MA, USA)을 통해 합성 여부를 확인하였다(도 1).

[0140] 1-2. Benzyl-β[3]-LCHA 단량체 합성

[0141] Benzyl-β[3]-LCHA 단량체는 선행연구(M. Zhou Angew. Chem. Int. Ed. 2020, 59, 7240-7244)를 기반으로 합성하였다. 합성이 완료된 단량체는 $^{1}$H-NMR (Avance III, 400 MHz, Bruker, Billerica, MA, USA)을 통해 합성 여부를 확인하였다(도 2).

[0142] 1-3. 단량체(a=2) 합성

[0143] 

[0144] 상기 화학식으로 표시되는 단량체(a=2)는 선행연구(M. Zhou Angew. Chem. Int. Ed. 2020, 59, 7240-7244)를 기반으로 합성하였다. 합성이 완료된 단량체는 $^{1}$H-NMR (Avance III, 400 MHz, Bruker, Billerica, MA, USA)을 통해 합성 여부를 확인하였다(도 4).

[0145] 1-4. poly(benzyl-β$^{3}$-LCHG) 전구체 고분자 합성

[0146] 전구체 고분자는 선행연구(M. Zhou Angew. Chem. Int. Ed. 2020, 59, 7240-7244)를 기반으로 하기와 같이 합성하였다.

[0147] benzyl-β$^{3}$-LCHG 단량체(100 mg)를 DCM (2 mL)에 녹인 후, 아세트산(3.45 μL)을 첨가하였다(D. Siefker ACS Macro Lett. 2018, 7, 1272-1277). DCM에 녹인 개시제 n-butylamines (1.1 mg)을 단량체 용액에 넣고, 35℃에서 72시간 동안 교반 반응시켰다. 반응이 끝난 용액은 hexane/ethyl acetate (6:4 v/v)에 침전시킨 후, 필터링을 진행하고, 감압상태에서 건조시켰다.

[0148] 합성된 Butyl-poly(benzyl-β$^{3}$-LCHG) 전구체 고분자는 두 개의 TSK 컬럼(G3000HHR과 G4000HHR)을 장착한 gel permeation chromatography (HLC-8420, Tosoh corporation)에서 10 mM lithium chloride가 함유된 DMF 용액으로 분석하여 molecular weight distribution ($M_w/M_n$)을 계산하였다. 또한 degree of polymerization (DP)은 $^{1}$H-NMR로 분석하였다. 그 결과, Butyl-poly(benzyl-β$^{3}$-LCHG) 전구체 고분자의 $M_w/M_n$와 DP는 1.041과 25로 확인되었다(도 4).

[0149] 상기와 동일한 방법으로 개시제를 $PEG_1$-amine, $PEG_4$-amine, $PEG_{12}$-amine, $PEG_{24}$-amine으로 변경하여 PEG 길이가 다른 각각의 전구체 고분자를 제조하였으며(도 5 내지 7), 각각의 poly(benzyl-β$^{3}$-LCHG) 전구체 고분자의 $M_w/M_n$와 DP를 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

[0150]

| 전구체 고분자 | 개시제 | DP | $M_w/M_n$ | 수득률(%) |
|---|---|---|---|---|
| butyl-poly(benzyl-β$^{3}$-LCHG) | butylamine | 25 | 1.041 | 94.4 |
| $PEG_1$-poly(benzyl-β$^{3}$-LCHG) | $PEG_1$-amine | 25 | 1.031 | 85.6 |
| $PEG_4$-poly(benzyl-β$^{3}$-LCHG) | $PEG_4$-amine | 25 | 1.032 | 86.0 |
| $PEG_{12}$-poly(benzyl-β$^{3}$-LCHG) | $PEG_{12}$-amine | 22 | 1.041 | 90.0 |
| $PEG_{24}$-poly(benzyl-β$^{3}$-LCHG) | $PEG_{24}$-amine | 26 | 1.029 | 65.4 |

[0151] 1-5. Butyl-poly(benzy-β$^{3}$-LCHA) 전구체 고분자 합성상기 butyl-poly(benzyl-β$^{3}$-LCHG) 전구체 고분자와 동일한 방법으로 Butyl-poly(benzyl-β$^{3}$-LCHA) 전구체 고분자를 합성하였다.

[0152] Benzyl-β$^{3}$-LCHA 단량체(100 mg)을 DCM (2 mL)에 녹인 후, 아세트산(3.28 μL을 첨가하였다. DCM에 녹인 개시제 n-butylamines (1.047 mg)을 단량체 용액에 넣고, 35℃에서 72시간 동안 교반반응시켰다. 반응이 끝난 용액은 hexane/ethyl acetate (6:4 v/v)에 침전시킨 후, 필터링을 진행하고, 감압상태에서 건조시켰다. Butyl-poly(benzyl-β$^{3}$-LCHA) 전구체 고분자의 $M_w/M_n$와 DP는 1.030과 16로 확인되었다(도 9).

[0153] 1-6. Poly(benzyl-β$^{3}$-LCHG) 변환체 합성

[0154] 합성된 전구체 고분자를 다양한 $pK_a$와 소수성을 갖는 화합물과 aminolysis 반응을 통해 다양한 poly(beta amino acids) 변환체로 변환하였다.

[0155] butyl-PGly(DET/CHE) 합성예

[0156] butyl-poly(benzyl-β$^{3}$-LCHG) 전구체 고분자 (20 mg)를 N-Methyl-2-pyrrolidone (NMP, 1 mL)에 35℃에서 녹인

후, 4℃로 냉각시켰다. Diethylenetriamine (DET, 0.26 mL)와 cyclohexylethylamine (CHE, 0.93 mL)에 NMP (1 mL)을 넣은 용액을 10℃로 유지시켜주면서 전구체 고분자 용액을 아르곤 기체상태에서 천천히 넣어주었다. 반응 용액을 10℃로 24시간 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 반응용액을 ethyl ether에 침전시킨 후, 파우더를 얻었다. 이 파우더를 차가운 0.01 M HCl에 녹인 후, 0.01 M HCl을 사용해서 투석을 이틀 동안 4℃에서 진행하였다. 마지막에는 물로만 투석을 1-2시간 해준 후 용액을 freezing drying시켜 파우더의 최종산물을 얻었다. 제조된 변환체는 $^{1}$H-NMR을 사용해서 DET와 CHE의 도입량을 계산하였다.

[0157] PEG 길이가 다른 각 변환체의 합성반응 조건은 하기 표 2에서 제시하였으며, 제조된 변환체의 도입량은 하기 표 3에 나타내었다.

표 2

[0158]

| 전구체 고분자 | 전구체 고분자 반응양 (mg) | 몰 비율($pK_a$ 분자 : 소수성 분자) | $pK_a$ 분자 및 투입량 | 소수성 분자 및 투입량 | 수득량 (mg) |
|---|---|---|---|---|---|
| butyl-poly(benzyl-β$^{3}$-LCHG) | 20 | 25:65 | DET, 263.5 ㎕ | CHE, 927.4 ㎕ | 14 |
| $PEG_1$-poly(benzyl-β$^{3}$-LCHG) | 20 | 25:65 | DET, 263.5 ㎕ | CHE, 927.4 ㎕ | 17 |
| $PEG_4$-poly(benzyl-β$^{3}$-LCHG) | 20 | 25:65 | DET, 263.5 ㎕ | CHE, 927.4 ㎕ | 17 |
| $PEG_{12}$-poly(benzyl-β$^{3}$-LCHG) | 18.8 | 25:70 | DET, 221.4 ㎕ | CHE, 839.2 ㎕ | 13 |
| $PEG_{24}$-poly(benzyl-β$^{3}$-LCHG) | 20.2 | 25:70 | DET, 223.7 ㎕ | CHE, 847.94 ㎕ | 7 |
| butyl-poly(benzyl-β$^{3}$-LCHG) | 20 | 25:80 | DET, 263.5 ㎕ | ADO, 1.35 g | 15 |
| $PEG_1$-poly(benzyl-β$^{3}$-LCHG) | 20 | 25:65 | DET, 263.5 ㎕ | ADO, 1.1 g | 15 |
| $PEG_4$-poly(benzyl-β$^{3}$-LCHG) | 12 | 25:80 | DET, 158.1 ㎕ | ADO, 0.81 g | 10 |
| butyl-poly(benzyl-β$^{3}$-LCHG) | 20 | 100:160 | AEP, 1281 ㎕ | CHE, 2283 ㎕ | 9 |
| butyl-poly(benzyl-β$^{3}$-LCHG) | 20 | 25:65 | HED, 493 ㎕ | CHE, 927.4 ㎕ | 8 |
| butyl-poly(benzyl-β$^{3}$-LCHG) | 20 | 25:65 | MDE, 314.1 ㎕ | CHE, 927.4 ㎕ | 17 |

표 3

[0159]

| 고분자 | Ethylene glycol repeating number | 도입양 | |
|---|---|---|---|
| | | DET moiety | CHE moiety |
| Butyl-PGly(DET/CHE) | 0 | 12 | 13 |
| $PEG_1$-PGly(DET/CHE) | 1 | 10 | 16 |
| $PEG_4$-PGly(DET/CHE) | 4 | 13 | 12 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| $PEG_{12}$-PGly(DET/CHE) | 12 | 11 | 11 |
| $PEG_{24}$-PGly(DET/CHE) | 24 | 12 | 14 |

[0160] $pK_a$와 소수성을 추가적으로 변환시킨 Poly(beta-amino acids) 변환체를 상기 합성방법과 동일하게 합성을 진행하였으며, 각각의 $pK_a$와 소수성 그룹의 화학변환은 하기 표 4에 나타내었다.

표 4

[0161]

| | 고분자 | $pK_a$ 화학 그룹 | | 소수성 화학 그룹 | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 화학 그룹 | 도입량 | 화학 그룹 | 도입량 |
| 소수성 조절 | Butyl-PGly(DET/ADO) | diethylenetriamine (DET) | 13 | 10-amino-1-decanol (ADO) | 12 |
| | $PEG_1$-PGly(DET/ADO) | diethylenetriamine (DET) | 14 | 10-amino-1-decanol (ADO) | 11 |
| | $PEG_4$-PGly(DET/ADO) | diethylenetriamine (DET) | 14 | 10-amino-1-decanol (ADO) | 11 |
| pKa 조절 | Butyl-PGly(AEP/CHE) | 2-aminoethylpiperazine (AEP) | 8 | cyclohexylethylamine (CHE) | 17 |
| | Butyl-PGly(HED/CHE) | (2-hydroxyethyl)ethylenediamine (HED) | 10 | cyclohexylethylamine (CHE) | 15 |
| | Butyl-PGly(MDE/CHE) | 2,2'-diamino-N-methyldiethylamine (MDE) | 13 | cyclohexylethylamine (CHE) | 12 |

[0162] 실시예 2. Poly(benzyl-$\beta^3$-LCHG) 변환체와 mRNA 결합 측정

[0163] 각각의 변환체는 10 mM Hepes (pH 7.3) 버퍼에 2 mg/mL로 녹인 후 다시 protonable amino group의 몰농도가 0.624 mM에 되도록 10 mM Hepes (pH 7.3) 버퍼에 다시 희석하였다. Luciferase mRNA (L-7202, TriLink Biotechnologies, San Diego, CA, USA) (100 ng/μL)로 준비된 용액과 protonable amino group 몰농도 / phohsphate group 몰농도 (N/P ratio) = 1~5가 되도록 혼합한 후 room temperature에서 1시간 정도 incubation 하였다. 그 후 1.0% 아가로즈 젤을 준비한 후, 고분자 나노입자 (10 μL)와 글라이세롤 용액 (50% v/v) (2 μL)을 혼합한 후 전기영동 (135V, 20분)을 실행하였다. 전기영동이 끝난 아가로즈 젤을 젤 이미져를 통해 관찰하였다(도 21). 그 결과, 본 발명의 고분자 변환체와 mRNA의 결합력이 우수한 것을 확인하였다.

[0165] 실시예 3. poly(benzyl-$\beta^3$-LCHG) 변환체와 mRNA의 고분자 나노입자의 크기 및 표면전하 측정

[0166] 상기 방법으로 luciferase mRNA을 함유한 고분자 나노입자를 N/P=5에서 제조한 후, 나노입자의 크기($D_H$), polydispersity index (PDI), 표면전하(ξ-potential)를 Zetasizer Pro (RED) (Malvern Instruments, Worcestershire, UK)을 사용하여 측정하였으며, 측정값은 하기 표 5에 나타내었다.

표 5

[0167]

| | 고분자 | N/P ratio | $D_H$ (nm) | PDI | ξ-potential (mV) |
|---|---|---|---|---|---|
| - | Butyl-PGly(DET/CHE) | 5 | 119±7 | 0.12±0.01 | 22.16 |
| PEG 길이 조절 | $PEG_1$-PGly(DET/CHE) | 5 | 106±5 | 0.16±0.03 | 28.65 |
| | $PEG_4$-PGly(DET/CHE) | 5 | 120±12 | 0.14±0.03 | 27 |
| | $PEG_{12}$-PGly(DET/CHE) | 5 | 202±19 | 0.22±0.01 | 16.95 |
| | $PEG_{24}$-PGly(DET/CHE) | 5 | 130±12 | 0.17±0.04 | 26.13 |
| 소수성 조절 | Butyl-PGly(DET/ADO) | 5 | 171±10 | 0.10±0.01 | 29.21 |
| | $PEG_1$-PGly(DET/ADO) | 5 | 187±6 | 0.09±0.01 | 25.4 |
| | $PEG_4$-PGly(DET/ADO) | 5 | 316±19 | 0.20±0.01 | 20.54 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| pKa 조절 | Butyl-PGly(AEP/CHE) | 5 | 191±25 | 0.26±0.09 | 36.74 |
| | Butyl-PGly(HED/CHE) | 5 | 145±4 | 0.13±0.03 | 44.08 |
| | Butyl-PGly(MDE/CHE) | 5 | 176±17 | 0.21±0.04 | 43.83 |

[0168] <고분자 나노입자의 hydrodynamic diameter ($D_H$), PDI, 표면전하 (N/P=5)>또한, 마찬가지로 luciferase mRNA를 함유한 고분자 나노입자를 N/P=7에서 만든 후, 나노입자의 크기, polydispersity index (PDI), 표면전하 (ζ-potential)을 Zetasizer Pro (RED)를 사용하여 측정하였고, 측정값은 하기 표 6에 나타내었다.

표 6

[0169]

| | 고분자 | N/P ratio | $D_H$ (nm) | PDI | ζ-potential (mV) |
|---|---|---|---|---|---|
| - | Butyl-PGly(DET/CHE) | 7 | 87±4 | 0.13±0.02 | 28.7 |
| PEG 길이 조절 | $PEG_1$-PGly(DET/CHE) | 7 | 129±3 | 0.12±0.04 | 36.4 |
| | $PEG_4$-PGly(DET/CHE) | 7 | 77±9 | 0.13±0.01 | 27.1 |
| | $PEG_{12}$-PGly(DET/CHE) | 7 | 89±6 | 0.16±0.02 | 18.7 |
| | $PEG_{24}$-PGly(DET/CHE) | 7 | 87±19 | 0.15±0.05 | 21.7 |

[0170] <고분자 나노입자의 hydrodynamic diameter ($D_H$), PDI, 표면전하 (N/P=7)>실시예 4. Transmission Electron Microscope (TEM) 측정

[0171] Luciferase mRNA와 각기 다른 길이를 갖는 고분자 (butyl-PGly(DET/CHE), $PEG_4$-PGly(DET/CHE), $PEG_{24}$-PGly(DET/CHE))들을 통해 고분자 나노입자 (N/P=5)를 제조하였다. 제조된 고분자 나노입자를 400 mesh copper grids (Electron Microscopy Sciences, Pennsylvania, USA)에 올린 후 UranyLess EM Stain solution (Electron Microscopy Sciences)로 염색하여 field emission transmission electron microscope (FE-TEM, JEM2100F, JEOL Ltd., Tokyo, Japan) 측정하였다 (도 22의 A 내지 C). 측정된 이미지는 ImageJ 소트프웨어를 이용하여, 나노입자의 평균 직경을 측정하였다(도 22의 D 내지 F). butyl-PGly(DET/CHE), $PEG_4$-PGly(DET/CHE), $PEG_{24}$-PGly(DET/CHE) 고분자 나노입자의 평균 직경은 각각 50 ± 9, 45 ± 10, 52 ± 13 nm 으로 측정되었다(n = 70).

[0173] 실시예 5. C2C12세포에서 고분자 나노입자의 luciferase mRNA 발현양 측정

[0174] Luciferase mRNA 함유한 고분자 나노입자를 mouse myoblast cell인 C2C12세포에 트랜스펙션하여 luiciferaseluciferase mRNA 전달력을 측정하였다. C2C12세포는 10% FBS가 첨가된 DMEM배지를 사용하여 준비하였다. C2C12세포를 96웰 플레이트에-well plate에 8000 cells/well로 시딩을시딩(seeding)을 한후, $CO_2$챔버에서 하루동안 배양하였다. 고분자나노입자 (N/P=5)을 50 ng mRNA concentration/well의 농도로 트렌스펙션한 후 24시간 후에 세포를 lysis한 후, cell lysate을 사용하여 Luciferase Assay System (Promega, Madison, WI, USA)을 사용하여 luminescence intensity을 luminescence microplate reader (Mithras LB940, Berthold technologies, Bad Wildbad, Germany)을 사용하여 측정하였다. 고분자 나노입자의 트렌스펙션은 10% FBS에 함유한 상태(도 23의 A)와 10%FBS가 함유되지 않는 상태(그림23의 B)로 나누어서 측정하여 PEG효과를 더 자세히 알아보았다. Butyl-, $PEG_1$-, $PEG_4$-PGly(DET/CHE)고분자가 높은 luciferase mRNA 발현양을 보임을 확인하였다.

[0176] 실시예 6. C2C12 세포에 대한 고분자 나노입자의 세포내 섭취 (Cellular uptake) 및 안정성 (Serum stability) 분석

[0177] $PEG_n$-PGly(DET/CHE)고분자의 PEG길이 효과를 더 자세히 알아보기 위해서 C2C12세포에 대한 고분자 나노입자 세포내 섭취양을 분석하였다. Label IT Cy5 labeling kit (Mirus Bio Corporation, Madison, WI, USA)을 이용하여Cy5가 라벨링된luciferase mRNA을 kit에서 제공한 프로토콜대로 반응하여 준비하였다(Cy5-mRNA). Cy5-mRNA를 함유한 고분자 나노입자 (N/P=5, 125ng mRNA/well)를 48-well plate에 시딩된 (50,000 cells/well) C2C12 세포

에 트랜스펙션 하였다. 4시간 incubation 후에, trypsin-EDTA를 이용하여 세포를 떼주고 flow cytometry (Attune CytPix, ThermoFisher Scientific)를 이용하여 형광 발현량을 비교하여 고분자 나노입자의 세포내 섭취를 비교하였다 (도 24의 A). 이를 통해 PEG길이가 0-4인 고분자의 경우 상당량의 Cy5-mRNA가 C2C12세포로 섭취됨을 확인하였다. 이에 반해, PEG길이가 12,24인 고분자의 경우 세포내 섭취가 거의 일어나지 않는다는 것을 확인하였다.

[0178] 고분자 나노입자에 세포 섭취량의 PEG길이 효과를 좀더 자세히 살펴보기 위해서 동일한 고분자 나노입자의 serum albumin에 대한 입자 안정성을 fetal bovine albumin (FBS)을 이용하여 측정하였다. 고분자 나노입자 (N/P=5, 100 ng mRNA, 10 uL)를 10%FBS가 첨가된PBS 용액 (PBS/FBS, 90 uL)와 섞어서 37℃에 1시간 반응시켜 줌. 1시간 뒤에, RNeasy Mini kit (Qiagen)를 이용하여 mRNA를 정제해주었다. 아가로즈 젤 전기영동(1 wt% agarose gel, 0.5X TAE buffer, 135V, 15min)을 해준 뒤, 젤 이미져 (WSE-5300 Printgraph CMOS I)로 밴드를 관찰함 (도 24의 B). Butyl-, $PEG_1$-, $PEG_4$-PGly(DET/CHE) 고분자 나노입자의 경우, FBS에 용액에 대해서 intact mRNA의 밴드가 보임. 이는 고분자 나노입자가 FBS에 안정성을 보인다는 결과이다. 반면 $PEG_{12}$-, $PEG_{24}$-PGly(DET/CHE) 고분자 나노입자의 경우 intact mRNA의 밴드가 보이지 않았다. 이는 두 고분자 나노입자가 세포 배양을 흉내낸 PBS/FBS에서 1시간안에 분해된다는 것을 의미한다. 본 결과를 통해 PGly(DET/CHE)고분자의 경우, PEG길이가 12이상일 경우, 나노입자가 세포 배양에 환경에서 불안정하여, 금방 분해, 세포안으로 mRNA을 전달할 수 없다는 것을 확인였다.

[0180] 실시예 7. C2C12 세포에 대한 생존력 분석 (Viability assay)

[0181] C2C12 세포를 96-well plate에 시딩하고 (8,000 cells/well), 다음 날 luciferase mRNA를 함유한 $PEG_n$-PGly(DET/CHE)고분자 나노입자 (N/P=5, 50 ng/well)를 트랜스펙션 하였다. 24시간 incubation 후에, CCK-8 solution을 각 well 당 10 uL씩 처리해준 뒤 1.5시간 뒤에 microplate reader (Spark, Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland)로 450nm에서의 흡광도를 측정하였다. (도 25). 본 실험환경에서는 $PEG_n$-PGly(DET/CHE)고분자 나노입자가 C2C12에 대한 심각한 세포독성을 보이지 않았다.

[0183] 실시예 8. HEK293-loxP-GFP-RFP 세포에서의 $PEG_n$-PGly(DET/CHE) 고분자의 유전자 편집 효과 확인

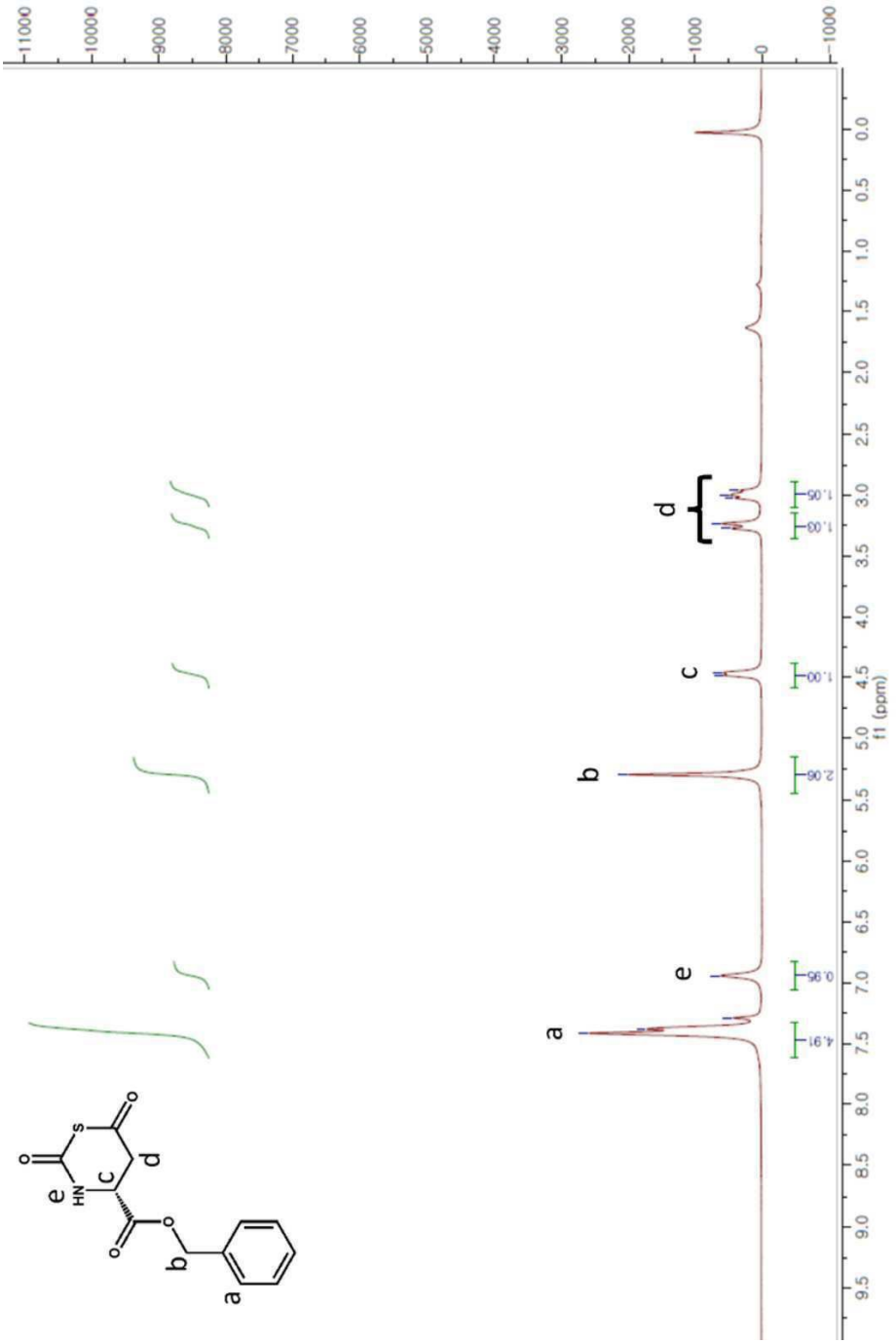
[0184] HEK293-loxP-GFP-RFP 세포(GenTarget Inc, SC018-Neo, San Diego, CA, USA)는 loxP-GFP-stop-loxP-RFP 카세트가 CMV-protomer 뒤에 있는 구조이며 평소에는 강한 녹색 형광을 띄지만, CRE recombinase에 의해 loxP가 절단되면 빨간 형광을 띄게 된다(도 26의 A). 이를 통해 Cre mRNA (L-7211, TriLink Biotechnologies)를 함유하고 있는 고분자 나노입자가 세포 내로 Cre mRNA를 얼마나 잘 전달하여 유전자 편집 효율을 내는지를 측정하였다. 96-well optical bottom plate에 세포를 시딩하고 (8,000 cells/well), $PEG_n$-PGly(DET/CHE) 고분자 나노입자 (N/P=5, 100 ng/uL)를 트랜스펙션 하였다. 48시간 incubation 후에 confocal laser scanning microscope (CLSM) (ZEISS LSM 980, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)로 녹색 (GFP) 및 빨간색 (RFP) 형광을 측정(도 27)한 후, 각 형광세기를 Image J 소프트웨어로 분석, 정량화하였다(도 26의 B). Butyl-, $PEG_1$-, $PEG_4$-PGly(DET/CHE) 고분자나노입자를 처리한 세포에서 높은 RFP형광이 나오는 것을 통해 세 고분자의 높은 Cre mRNA 전달력을 확인하였다. 특히 $PEG_1$-PGly(DET/CHE) 고분자나노입자가 가장 높은 유전자 편집 효과가 나타남을 확인하였다.

[0186] 종합해 보면, 본 발명에서는 종래 RNA약물 전달에 사용한 적이 없는 신규한 폴리 베타 펩타이드 전구체 고분자를 합성하고, 추가적인 aminolysis 변환을 통해 다양한 $pK_a$, 소수성, PEG 길이를 가즌 변환체 고분자를 합성하였다. 또한, 합성된 고분자를 mRNA와 성공적으로 결합시키고, 100-300 nm 크기를 가지는 나노입자를 제조하였다. 또한, 상기 결과로부터 본 발명의 나노입자가 luciferase mRNA을 *in vitro* C2C12세포에 성공적으로 전달함을 확인하였고, Cre mRNA를 HEK293-loxP-GFP-RFP 세포에 전달함으로써 유전자 편집 효율을 비교 분석함으로써 폴리 베타 펩타이드 고분자의 RNA약물 전달의 가능성을 확인하였다.

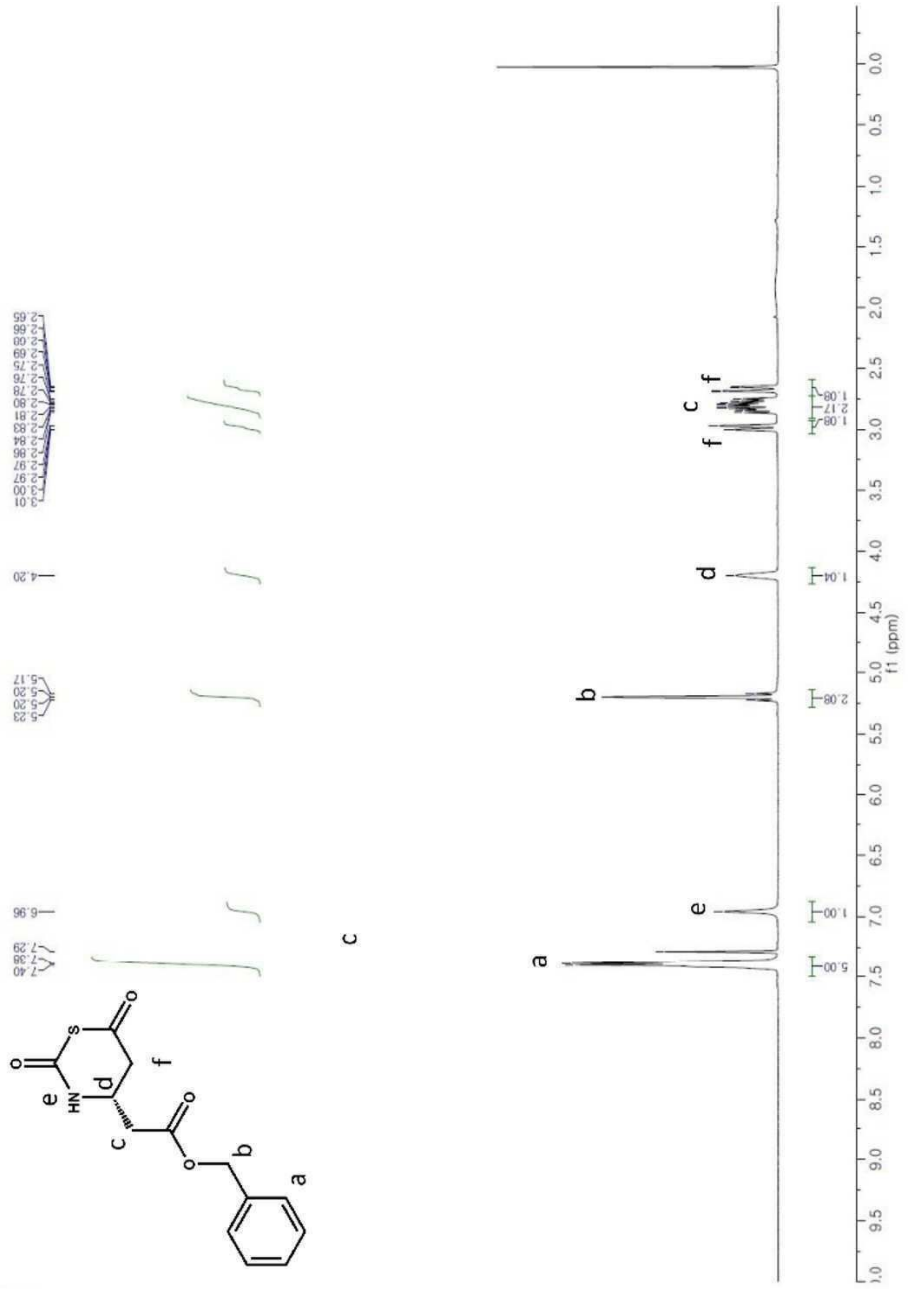
[0188] 이상의 설명은 본 발명을 예시적으로 설명한 것에 불과한 것으로, 본 발명에 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가지는 자라면 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 다양한 변형이 가능할 것이다. 따라서, 본 명세서에 개시된 실시예들은 본 발명을 한정하기 위한 것이 아니라 설명하기 위한 것이고, 이러한 실시예에 의하여 본 발명의 사상과 범위가 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 보호범위는 아래의 청구범위에 의하여 해석되어야 하며, 그와 동등한 범위 내에 모든 기술은 본 발명의 권리범위에 포함하는 것으로 해석되어야 할 것이다.

## 도면

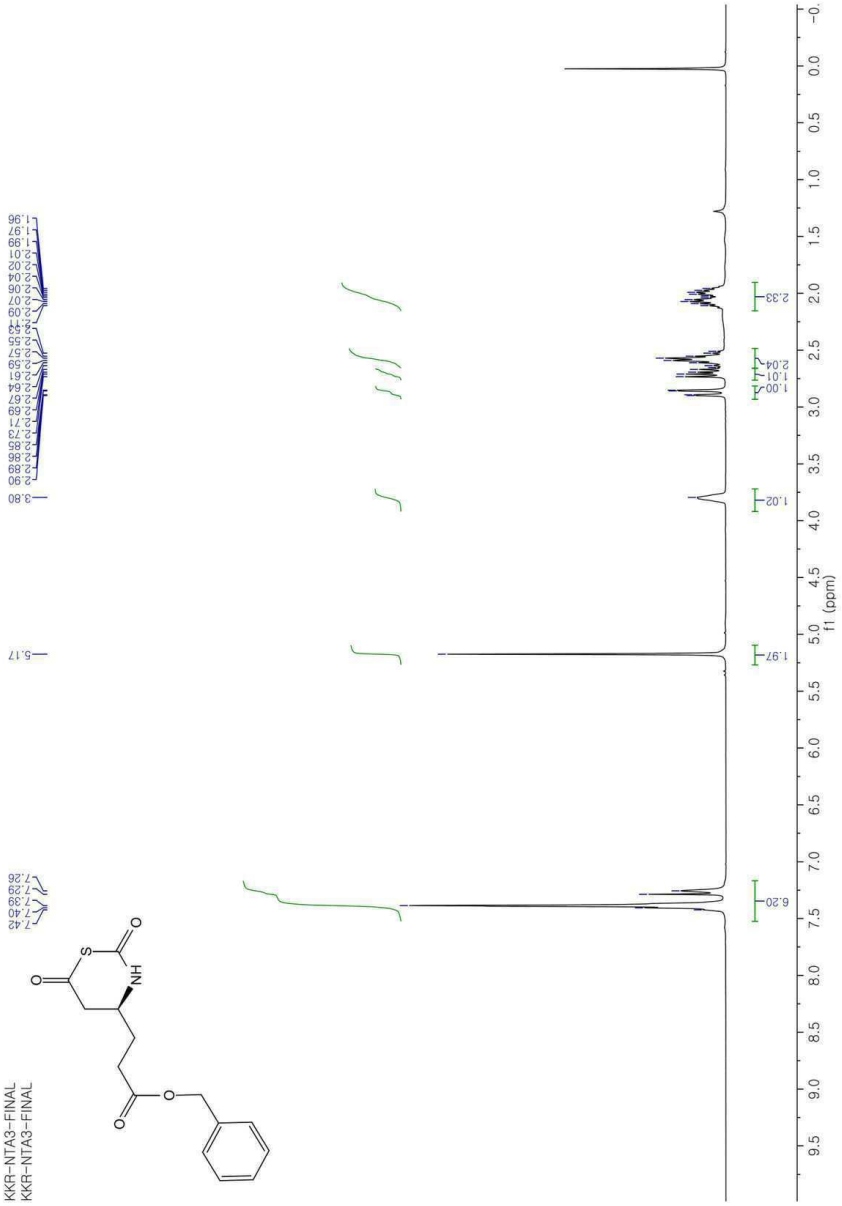
### 도면1



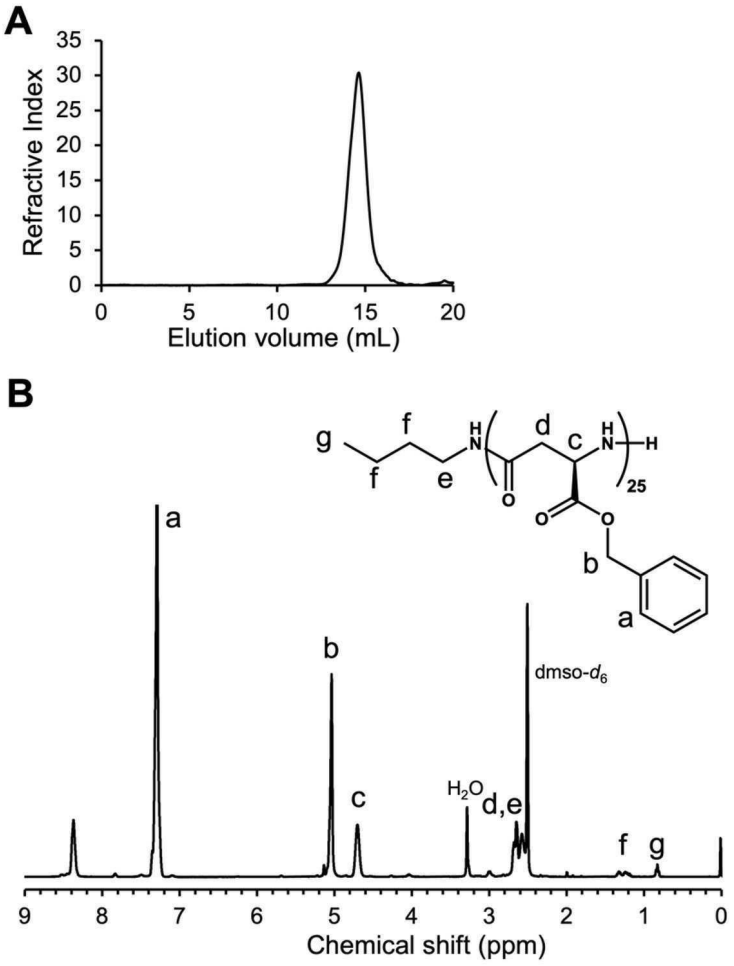
도면2



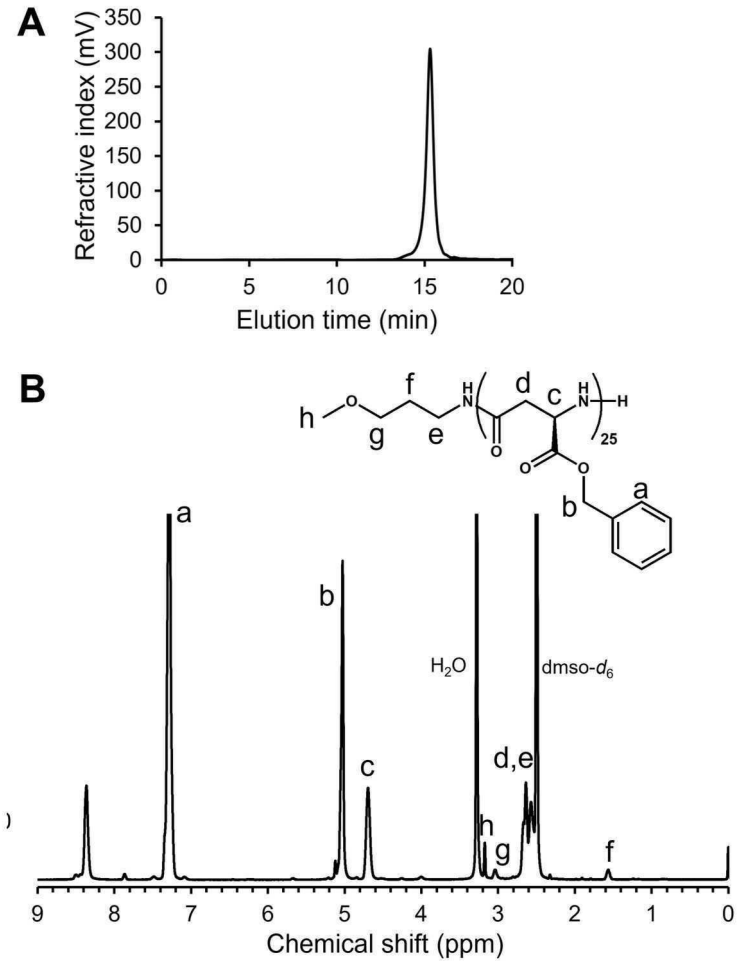
도면3



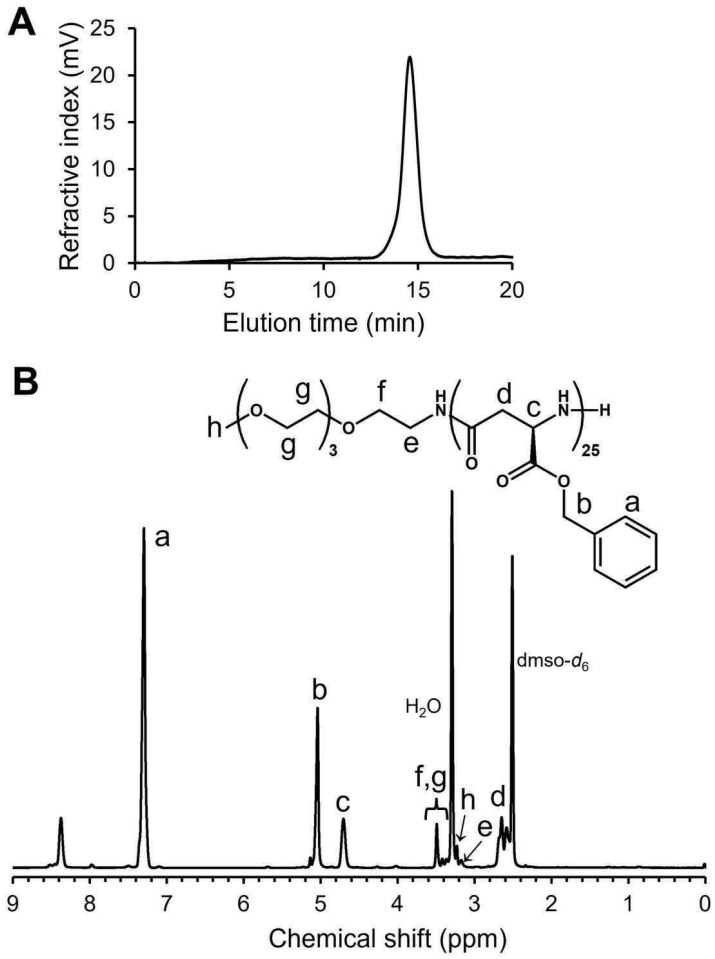
도면4


A
Refractive Index
35
30
25
20
15
10
5
0
0
5
10
15
20
Elution volume (mL)
B
g
f
f
e
H
N
d
c
H
N
H
O
O
O
25
b
a
a
b
c
H2O
d,e
dmso-d6
f
g
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
Chemical shift (ppm)

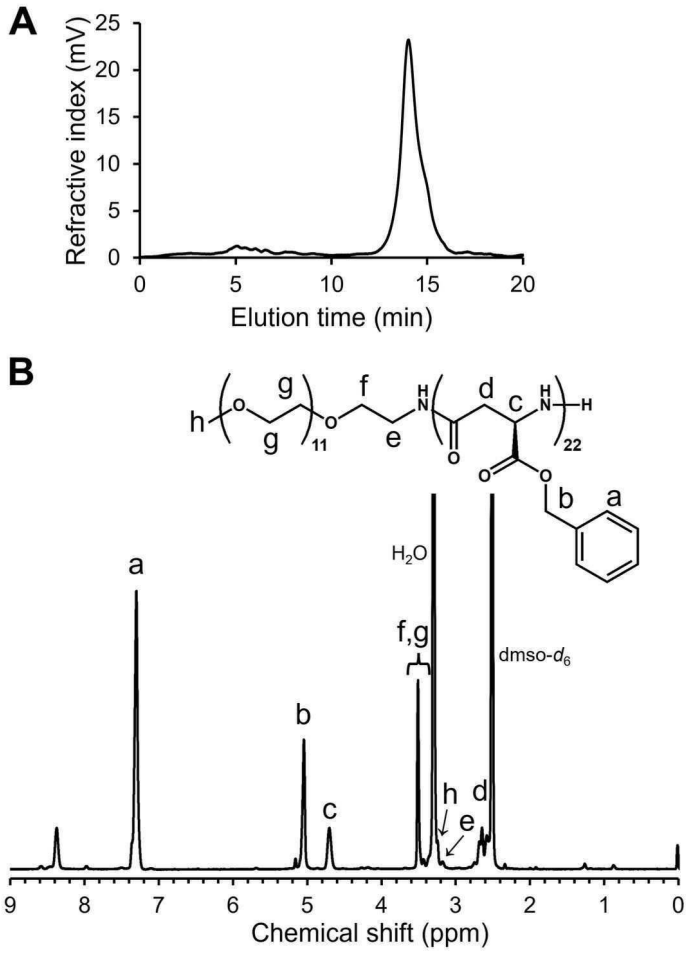
도면5


A
Refractive index (mV)
350
300
250
200
150
100
50
0
0
5
10
15
20
Elution time (min)
B
h
o
g
f
e
H
N
o
d
c
H
N
H
25
o
o
b
a
a
b
H2O
dmso-d6
c
d,e
h
g
f
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
Chemical shift (ppm)

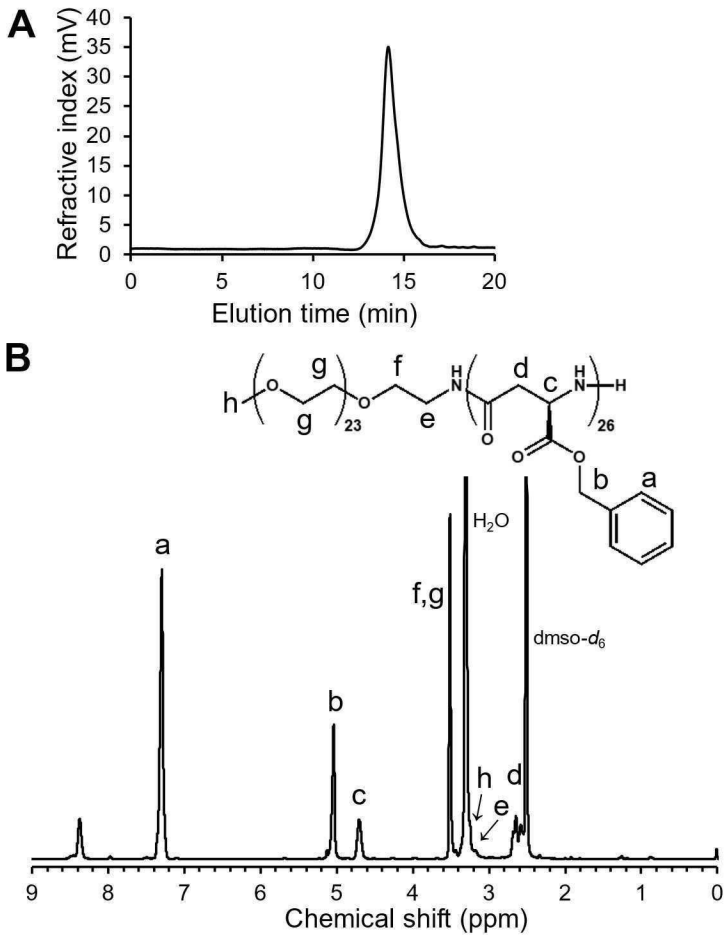
도면6


A
Refractive index (mV)
25
20
15
10
5
0
0
5
10
15
20
Elution time (min)
B
h
g
g
3
o
o
f
e
H
N
O
d
c
H
N
H
25
O
O
b
a
a
b
c
H2O
f,g
h
e
d
dmso-d6
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
Chemical shift (ppm)

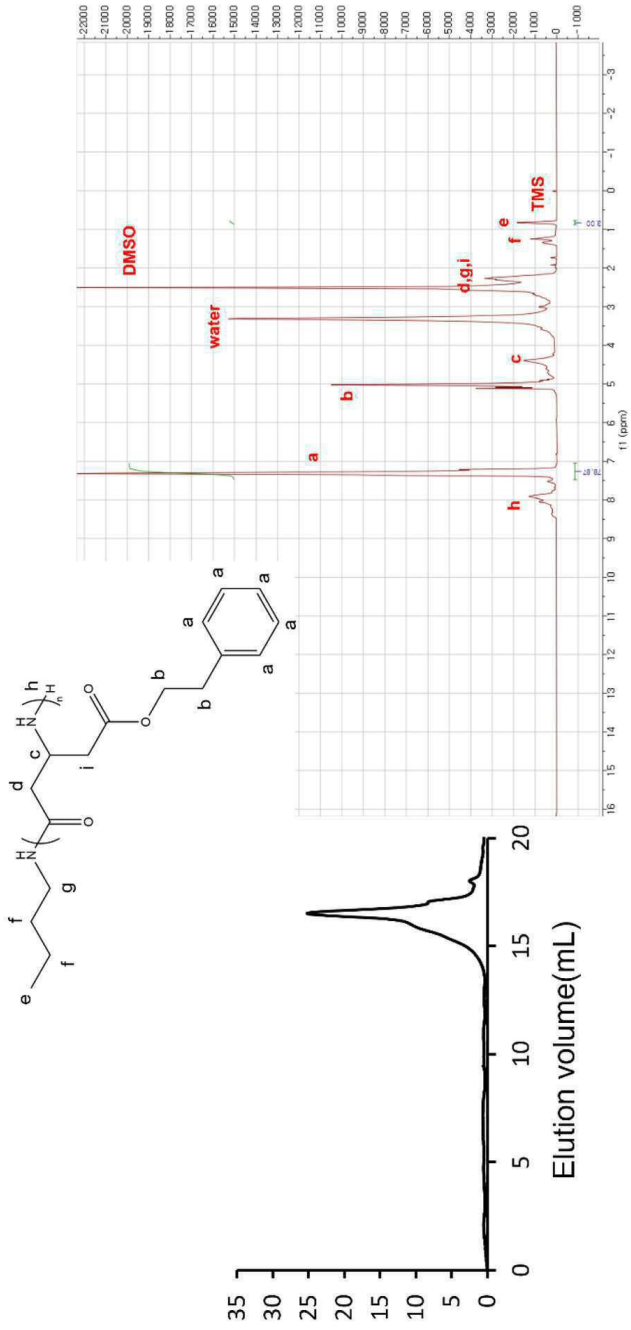
도면7


A
Refractive index (mV)
25
20
15
10
5
0
0
5
10
15
20
Elution time (min)
B
h
g
g
11
o
o
f
e
N
H
d
c
N
H
H
22
o
o
o
b
a
a
H2O
f,g
dmso-d6
b
c
h
e
d
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
Chemical shift (ppm)

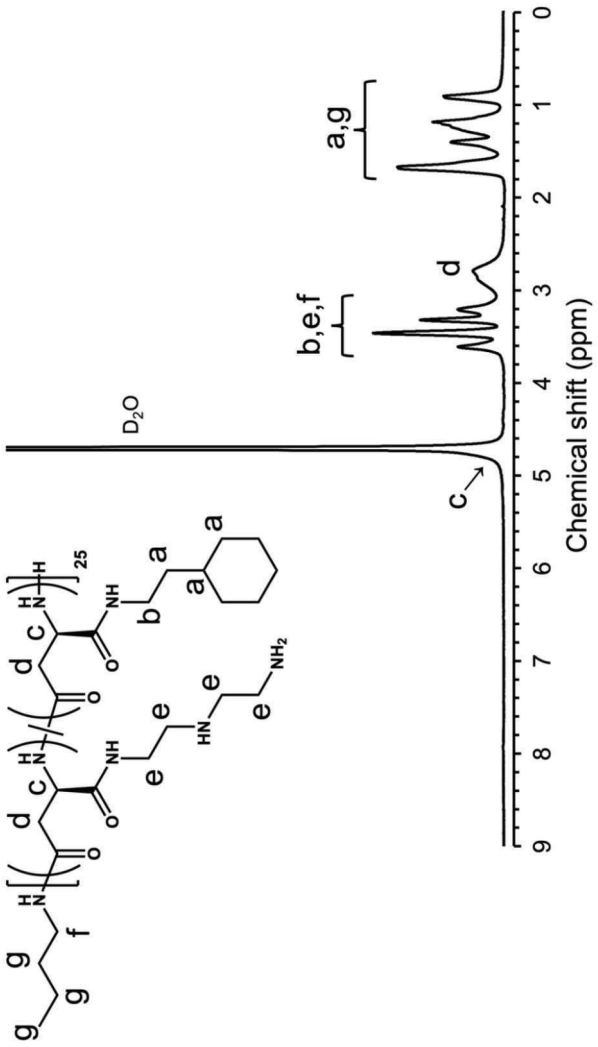
도면8


A
Refractive index (mV)
40
35
30
25
20
15
10
5
0
0
5
10
15
20
Elution time (min)
B
h
g
g
23
f
e
d
c
26
b
a
a
f,g
H2O
dmso-d6
b
c
h
d
e
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
Chemical shift (ppm)

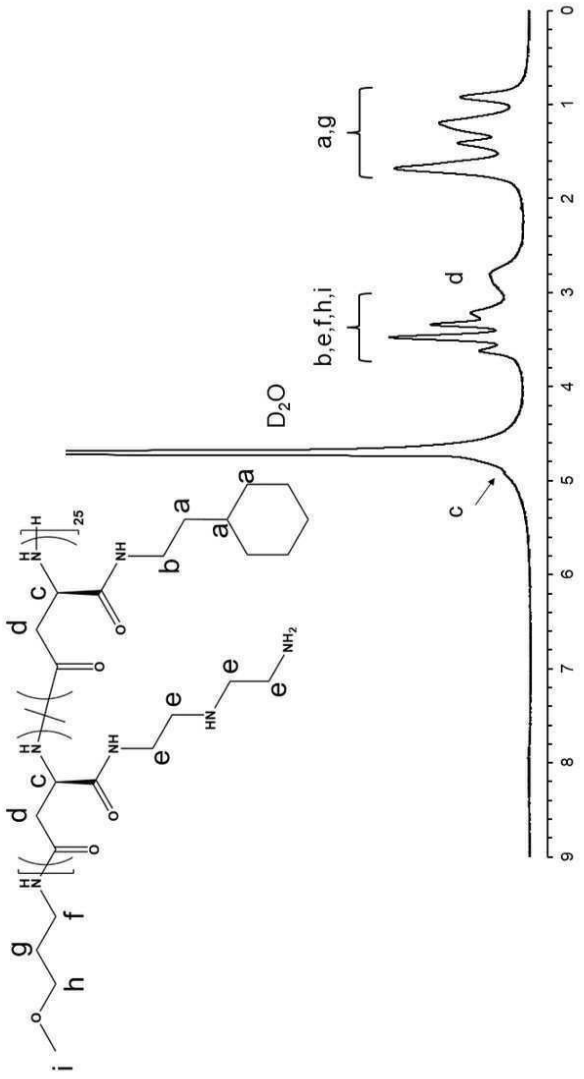
도면9



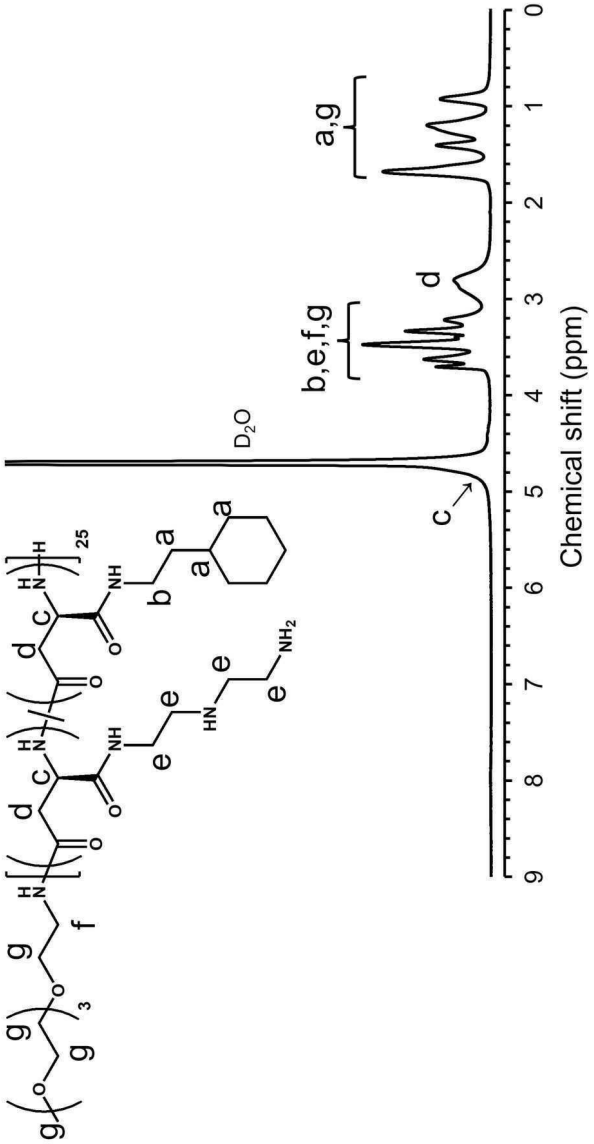
도면10



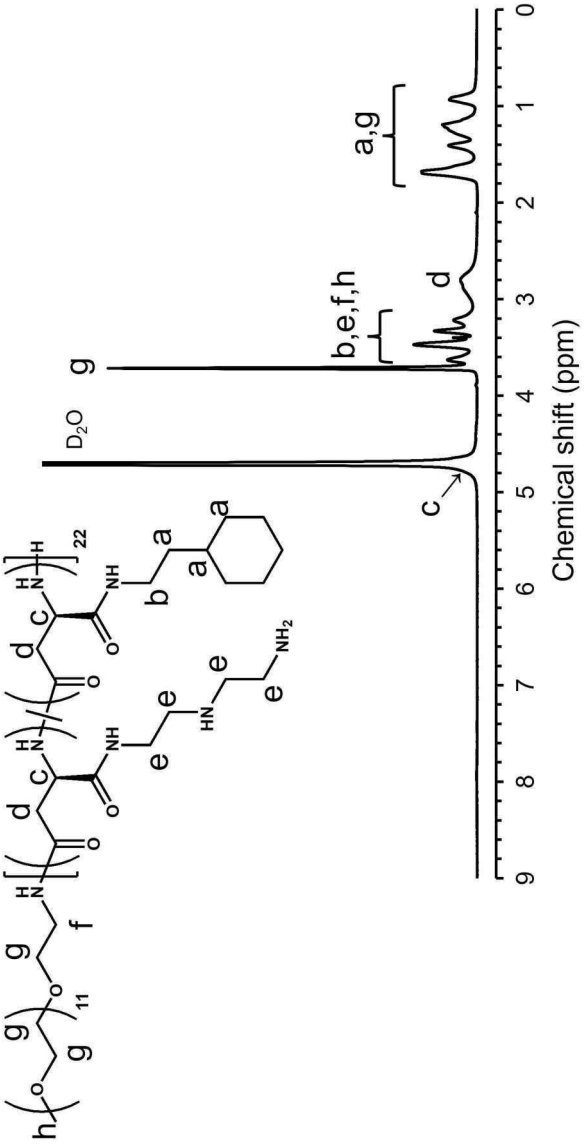
도면11



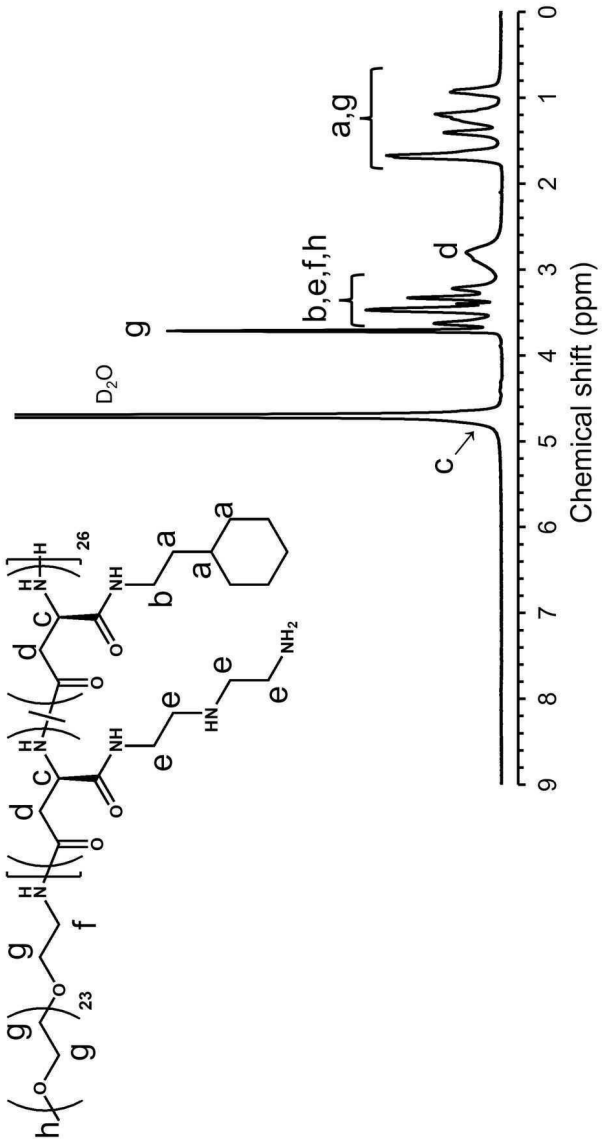
도면12



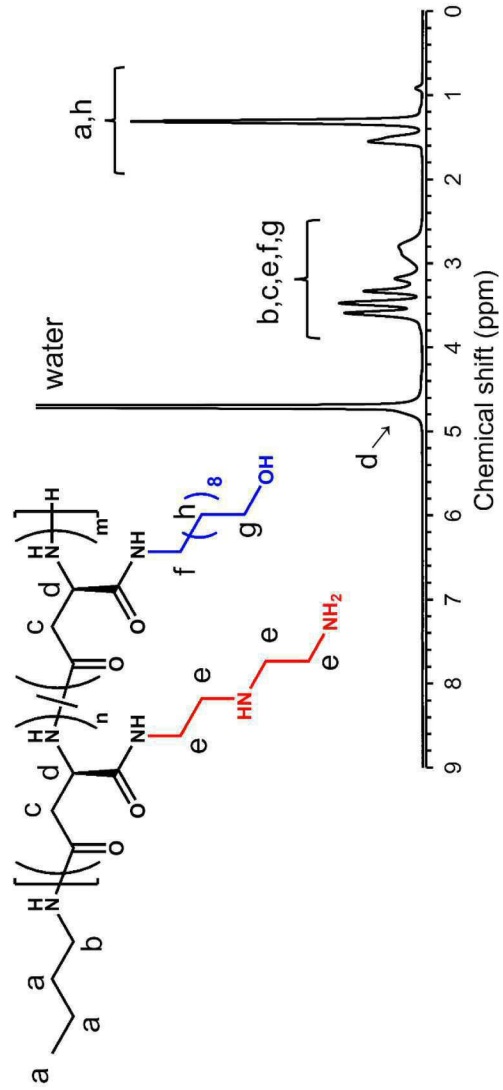
도면13



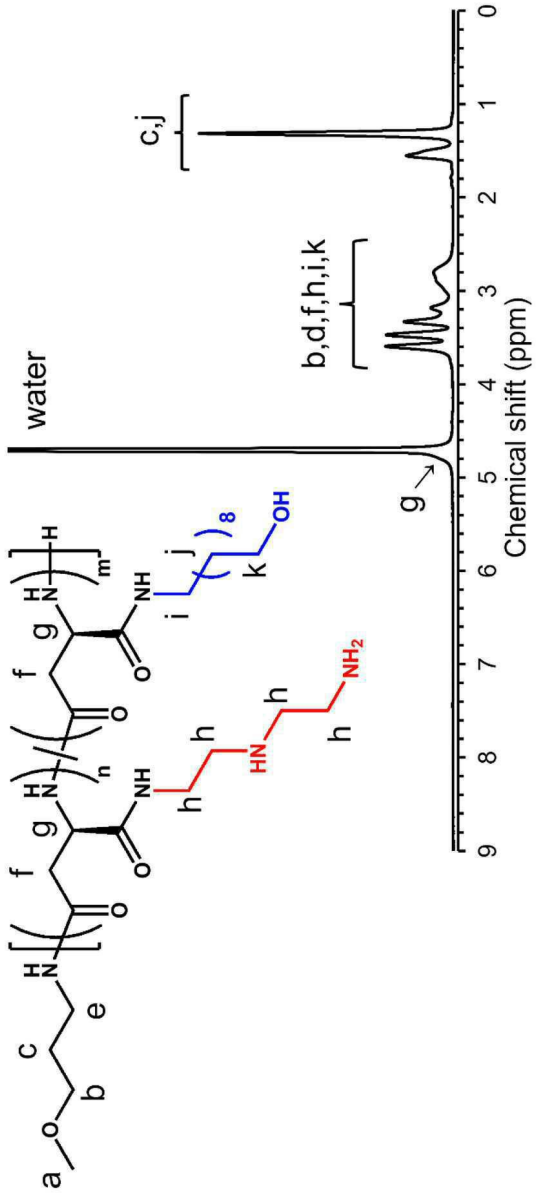
도면14


D2O
g
b,e,f,h
d
a,g
c
Chemical shift (ppm)
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
NH2
NH
HN
O
26
23

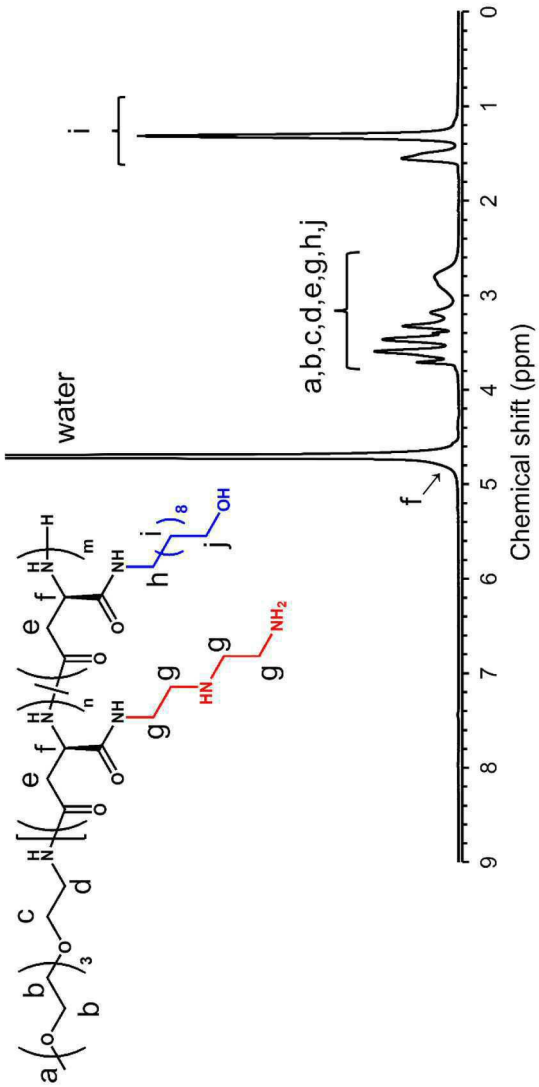
도면15



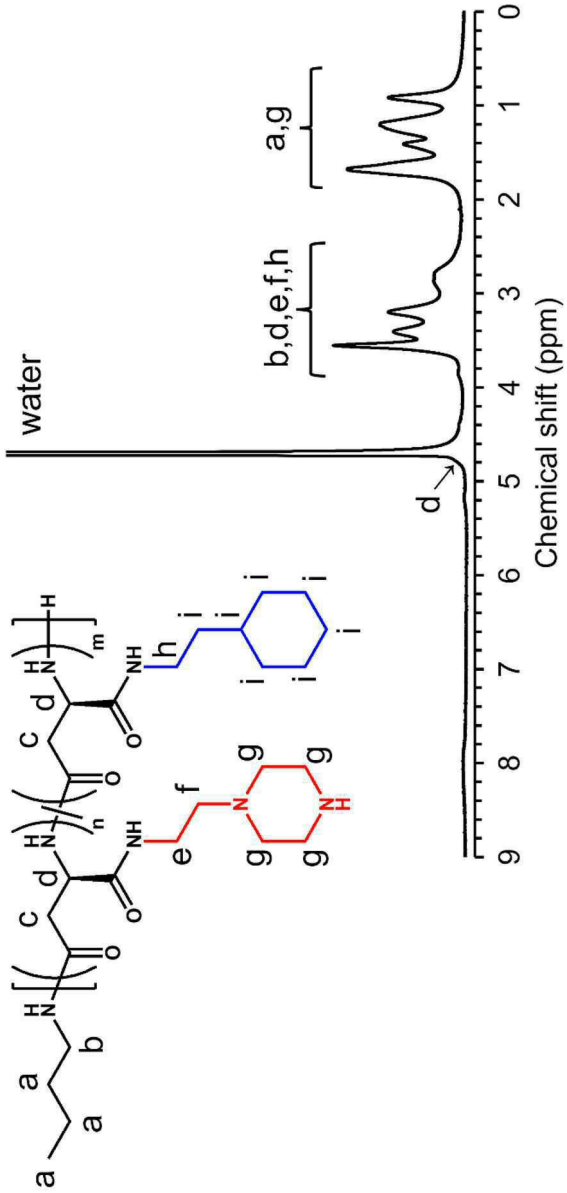
도면16



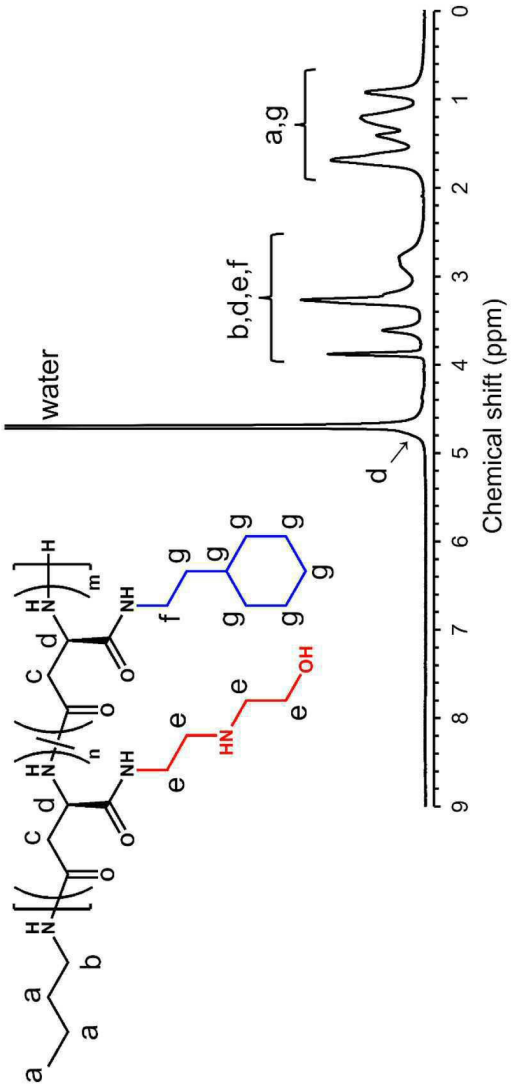
도면17



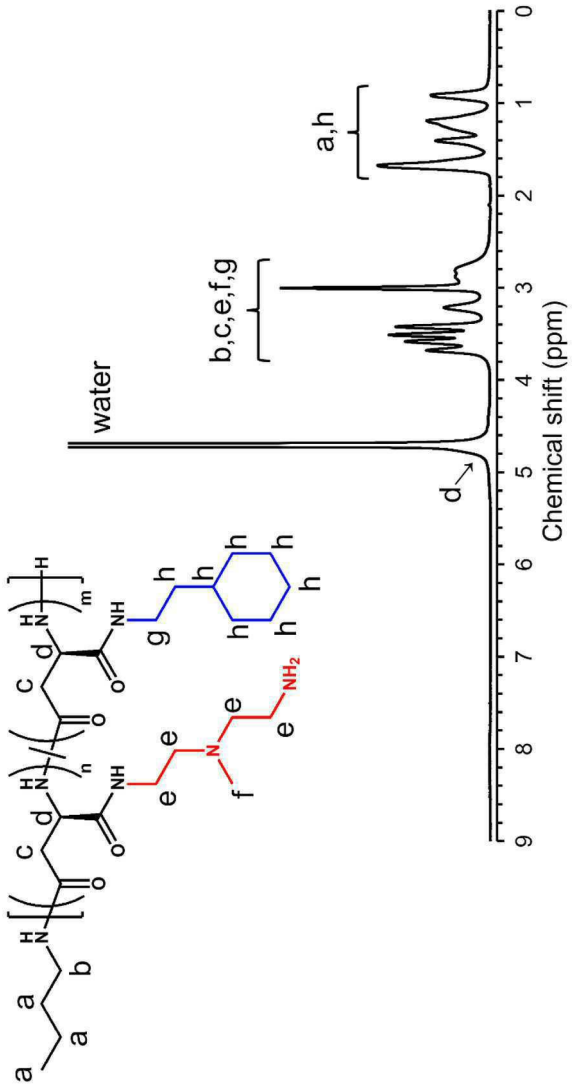
도면18



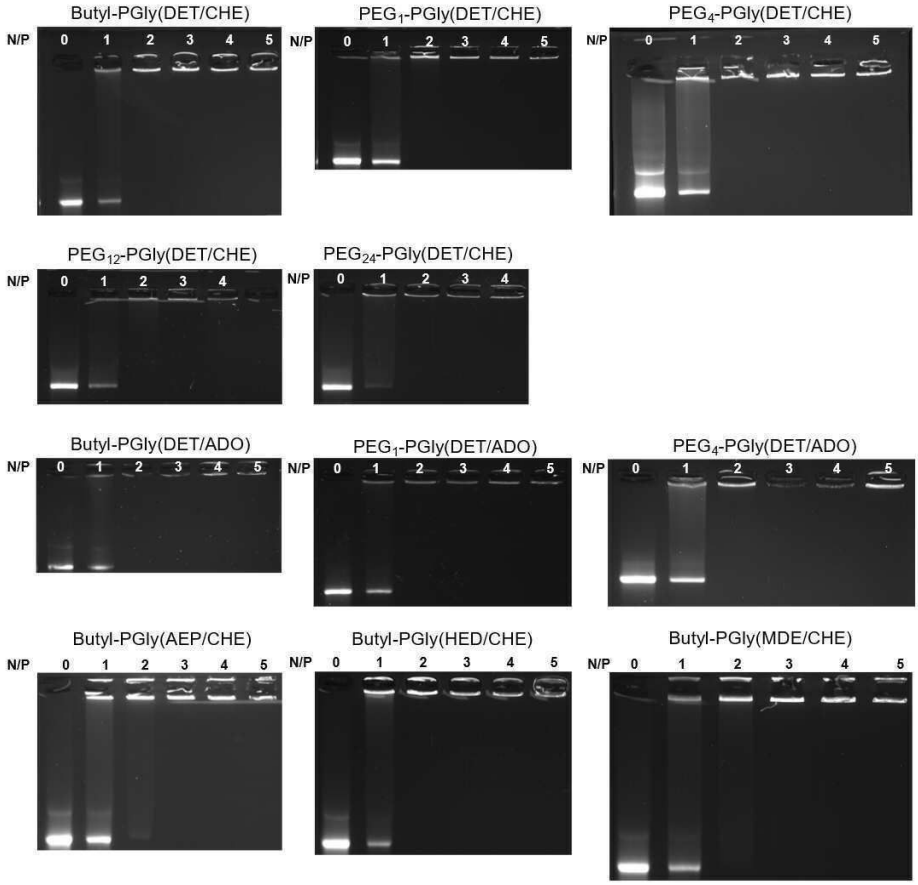
도면19



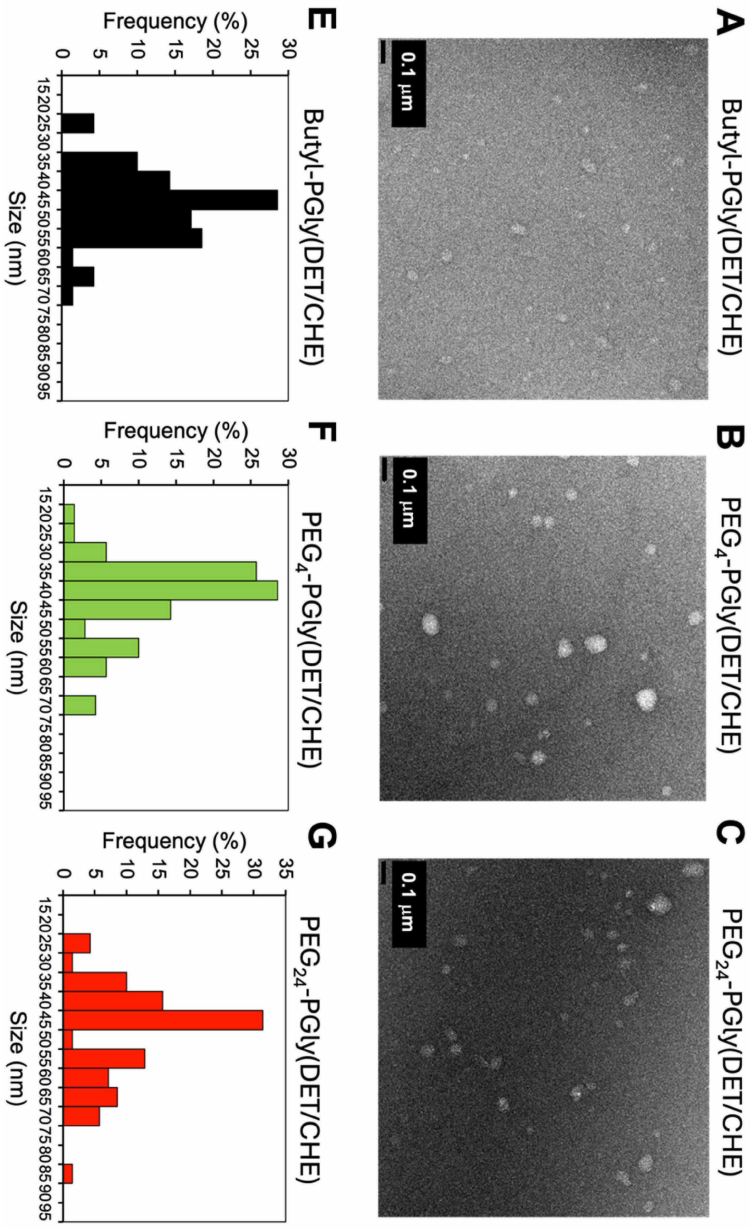
도면20



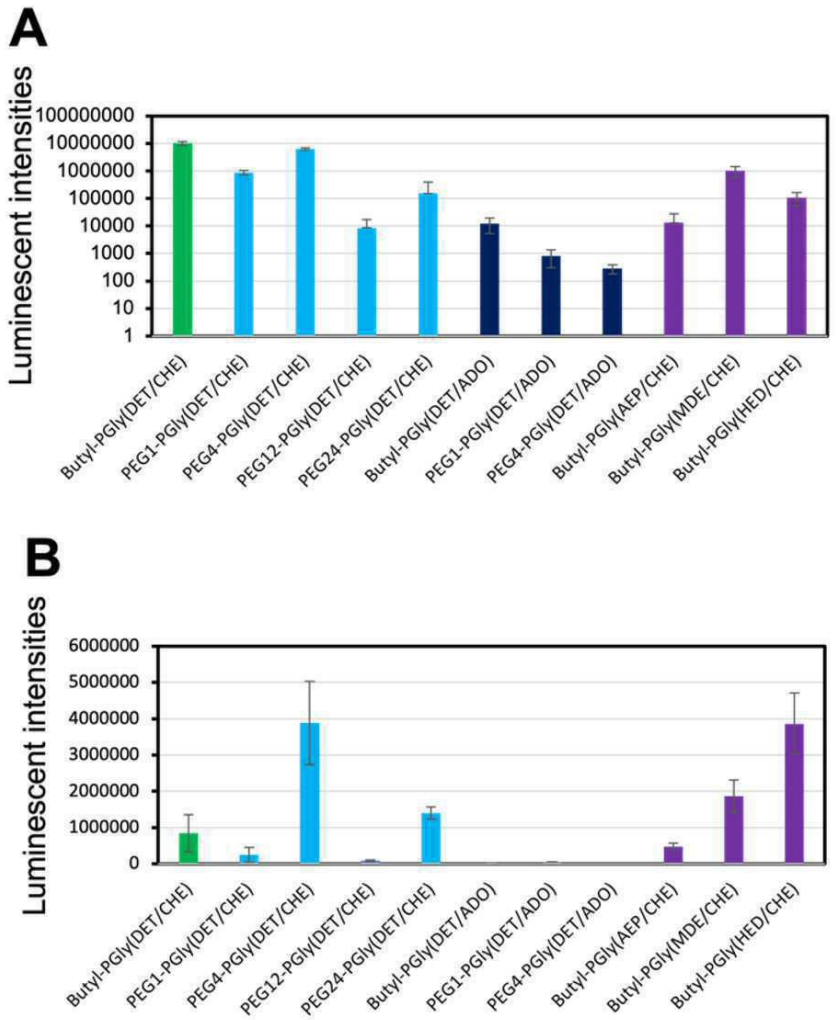
도면21


Butyl-PGly(DET/CHE)
N/P 0 1 2 3 4 5
PEG1-PGly(DET/CHE)
N/P 0 1 2 3 4 5
PEG4-PGly(DET/CHE)
N/P 0 1 2 3 4 5
PEG12-PGly(DET/CHE)
N/P 0 1 2 3 4
PEG24-PGly(DET/CHE)
N/P 0 1 2 3 4
Butyl-PGly(DET/ADO)
N/P 0 1 2 3 4 5
PEG1-PGly(DET/ADO)
N/P 0 1 2 3 4 5
PEG4-PGly(DET/ADO)
N/P 0 1 2 3 4 5
Butyl-PGly(AEP/CHE)
N/P 0 1 2 3 4 5
Butyl-PGly(HED/CHE)
N/P 0 1 2 3 4 5
Butyl-PGly(MDE/CHE)
N/P 0 1 2 3 4 5

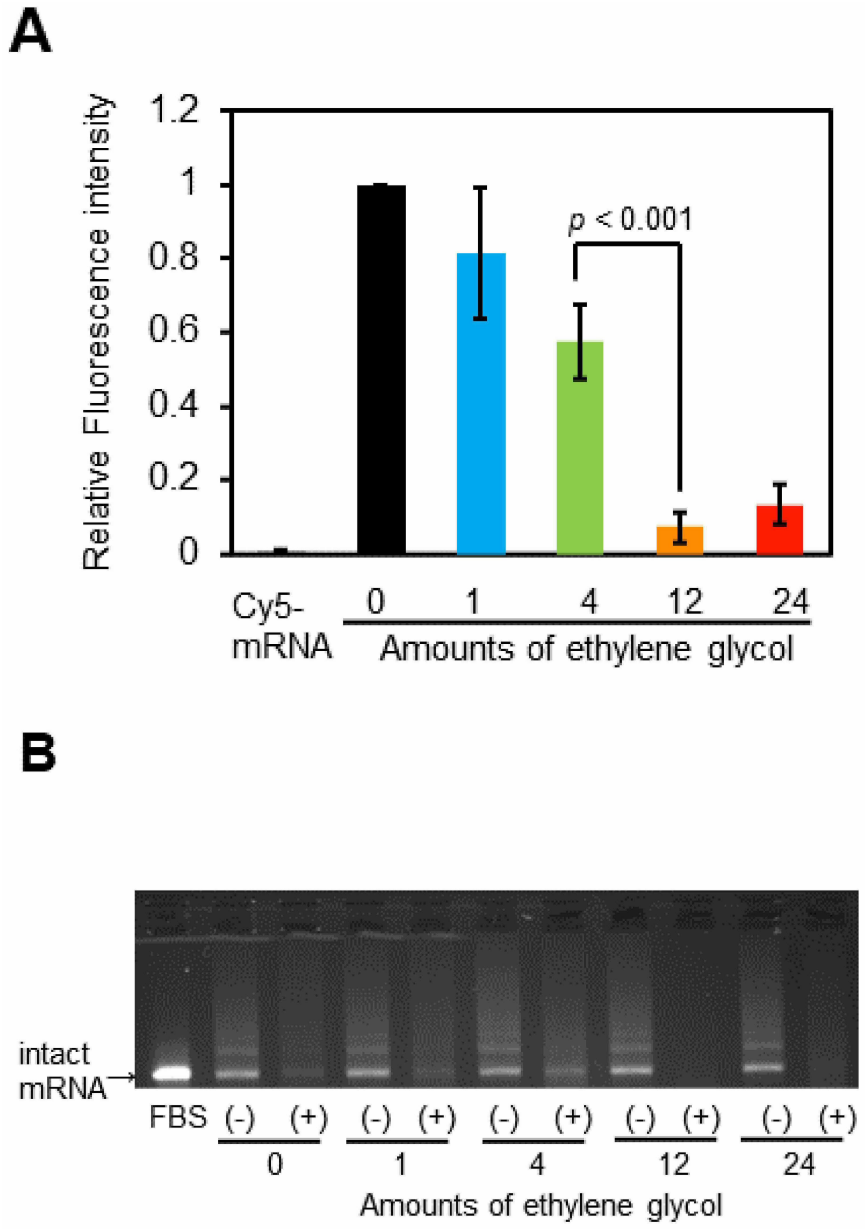
도면22


A
Butyl-PGly(DET/CHE)
0.1 μm
B
PEG4-PGly(DET/CHE)
0.1 μm
C
PEG24-PGly(DET/CHE)
0.1 μm
E
Butyl-PGly(DET/CHE)
Frequency (%)
Size (nm)
F
PEG4-PGly(DET/CHE)
Frequency (%)
Size (nm)
G
PEG24-PGly(DET/CHE)
Frequency (%)
Size (nm)

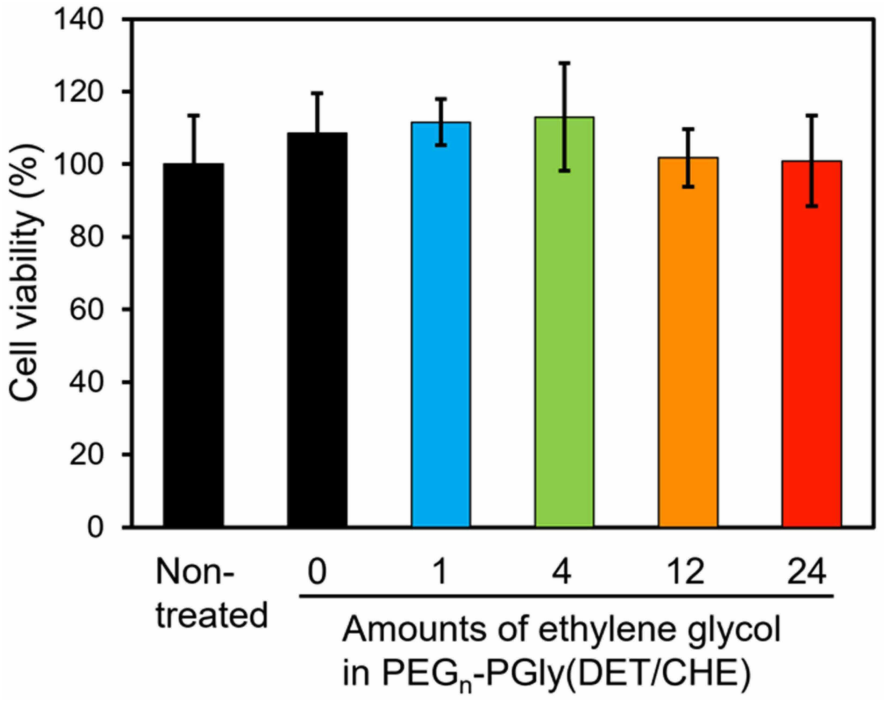
도면23


A
Luminescent intensities
100000000
10000000
1000000
100000
10000
1000
100
10
1
Butyl-PGly(DET/CHE)
PEG1-PGly(DET/CHE)
PEG4-PGly(DET/CHE)
PEG12-PGly(DET/CHE)
PEG24-PGly(DET/CHE)
Butyl-PGly(DET/ADO)
PEG1-PGly(DET/ADO)
PEG4-PGly(DET/ADO)
Butyl-PGly(AEP/CHE)
Butyl-PGly(MDE/CHE)
Butyl-PGly(HED/CHE)
B
Luminescent intensities
6000000
5000000
4000000
3000000
2000000
1000000
0
Butyl-PGly(DET/CHE)
PEG1-PGly(DET/CHE)
PEG4-PGly(DET/CHE)
PEG12-PGly(DET/CHE)
PEG24-PGly(DET/CHE)
Butyl-PGly(DET/ADO)
PEG1-PGly(DET/ADO)
PEG4-PGly(DET/ADO)
Butyl-PGly(AEP/CHE)
Butyl-PGly(MDE/CHE)
Butyl-PGly(HED/CHE)

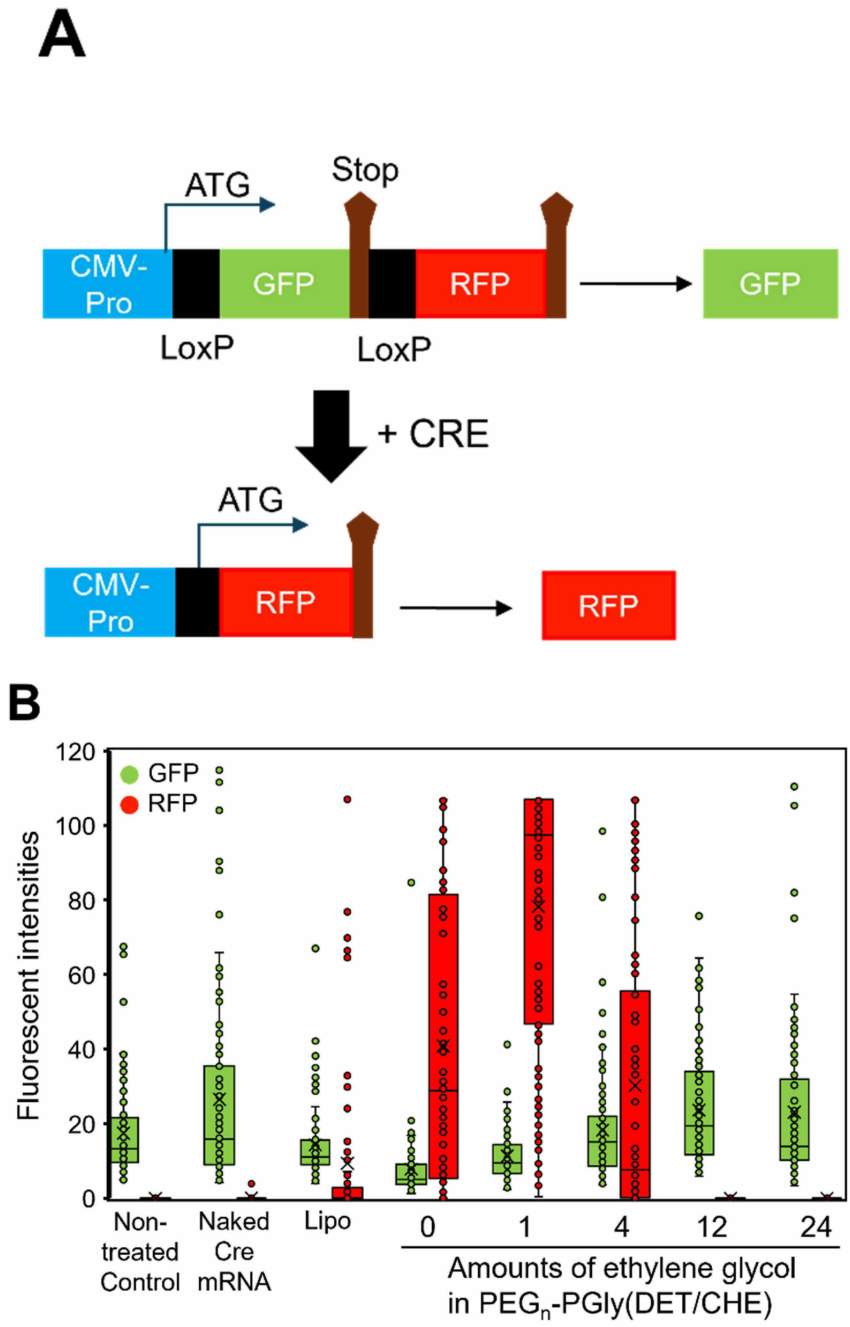
도면24


A
Relative Fluorescence intensity
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
p < 0.001
Cy5-mRNA
0
1
4
12
24
Amounts of ethylene glycol
B
intact mRNA
FBS (-) (+) (-) (+) (-) (+) (-) (+) (-) (+)
0
1
4
12
24
Amounts of ethylene glycol

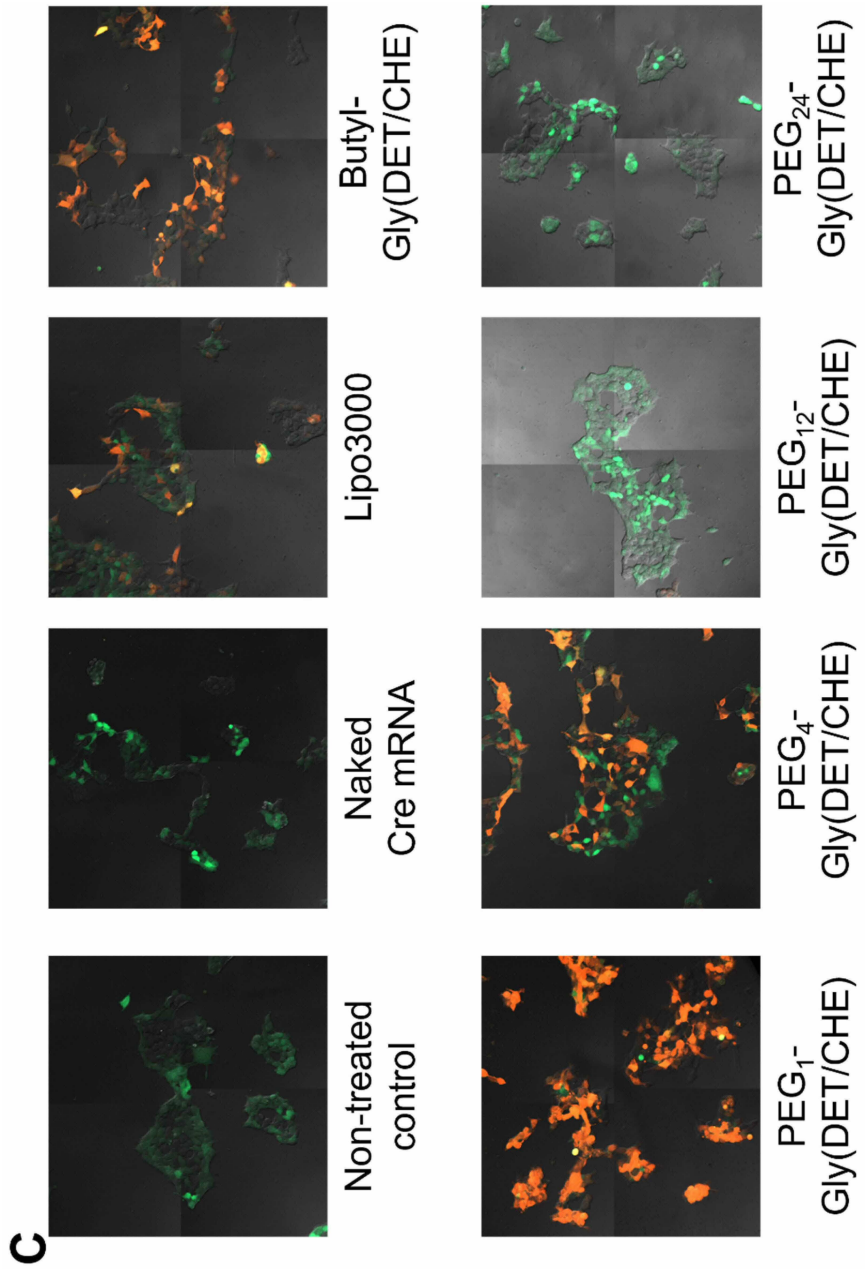
도면25


140
120
100
80
60
40
20
0
Cell viability (%)
Non-
treated
0
1
4
12
24
Amounts of ethylene glycol
in PEGn-PGly(DET/CHE)

도면26


A
ATG
Stop
CMV-Pro
GFP
RFP
GFP
LoxP
LoxP
+ CRE
ATG
CMV-Pro
RFP
RFP
B
GFP
RFP
Fluorescent intensities
120
100
80
60
40
20
0
Non-treated Control
Naked Cre mRNA
Lipo
0
1
4
12
24
Amounts of ethylene glycol in PEGn-PGly(DET/CHE)

도면27


C
Non-treated control
Naked Cre mRNA
Lipo3000
Butyl-Gly(DET/CHE)
PEG1-Gly(DET/CHE)
PEG4-Gly(DET/CHE)
PEG12-Gly(DET/CHE)
PEG24-Gly(DET/CHE)