



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0013570
(43) 공개일자 2022년02월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C08G 69/48 (2006.01) A61K 31/105 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01) A61K 9/51 (2006.01)
C08G 69/10 (2006.01) C08L 77/04 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C08G 69/48 (2013.01)
A61K 31/105 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-7042746
(22) 출원일자(국제) 2020년05월28일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2021년12월27일
(86) 국제출원번호 PCT/US2020/035007
(87) 국제공개번호 WO 2020/243370
국제공개일자 2020년12월03일
(30) 우선권주장
62/853,658 2019년05월28일 미국(US)
62/907,458 2019년09월27일 미국(US)

(71) 출원인
진에딧 인코포레이티드
미국 캘리포니아 94080 사우스 샌프란시스코 게이
트웨이 블러바드 681 스위트 311/313
(72) 발명자
이근우
미국 캘리포니아 94080 사우스 샌프란시스코 게이
트웨이 블러바드 681 스위트 311/313
마이티 산타누
미국 캘리포니아 94080 사우스 샌프란시스코 게이
트웨이 블러바드 681 스위트 311/313
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
리앤목특허법인

전체 청구항 수 : 총 84 항

(54) 발명의 명칭 생체분자 전달을 위한 다중 관능화된 결사슬을 포함하는 폴리머

(57) 요약

가수분해성 폴리머 백본을 포함하는 폴리머가 제공되며, 상기 폴리머 백본은 (i) 소수성 기를 포함하는 결사슬을 갖는 모노머 유닛; (ii) 올리고아민 또는 폴리아민을 포함하는 결사슬을 갖는 모노머 유닛; 및 (iii) 폴리알킬렌 옥사이드, 폴리글리콜산, 폴리락트산, 또는 이들의 조합을 포함하는 결사슬을 갖는 모노머 유닛을 포함하고, 또한 상기 폴리머를 포함하는 조성물, 및 하나 이상의 생체분자 또는 이의 합성 변이체를 세포에 상기 폴리머 및/또는 조성물을 사용하여 전달하는 방법이 제공된다.

(52) CPC특허분류

A61K 9/0085 (2013.01)

A61K 9/513 (2013.01)

C08G 69/10 (2013.01)

C08L 77/04 (2013.01)

(72) 발명자

두아르테 프랑코

미국 캘리포니아 94080 사우스 샌프란시스코 게이
트웨이 블러바드 681 스위트 311/313

탄 밍치

미국 캘리포니아 94080 사우스 샌프란시스코 게이
트웨이 블러바드 681 스위트 311/313

명세서

청구범위

청구항 1

가수분해성 폴리머 백본 (hydrolysable polymer backbone)을 포함하는 폴리머로서, 상기 폴리머 백본은:

- (i) 소수성 기를 포함하는 결사슬을 갖는 모노머 유닛 (monomer unit);
- (ii) 올리고아민 또는 폴리아민을 포함하는 결사슬을 갖는 모노머 유닛; 및
- (iii) 폴리알킬렌 옥사이드, 폴리글리콜산, 폴리락트산, 또는 이들의 조합을 포함하는 결사슬을 갖는 모노머 유닛을 포함하는 것인 폴리머.

청구항 2

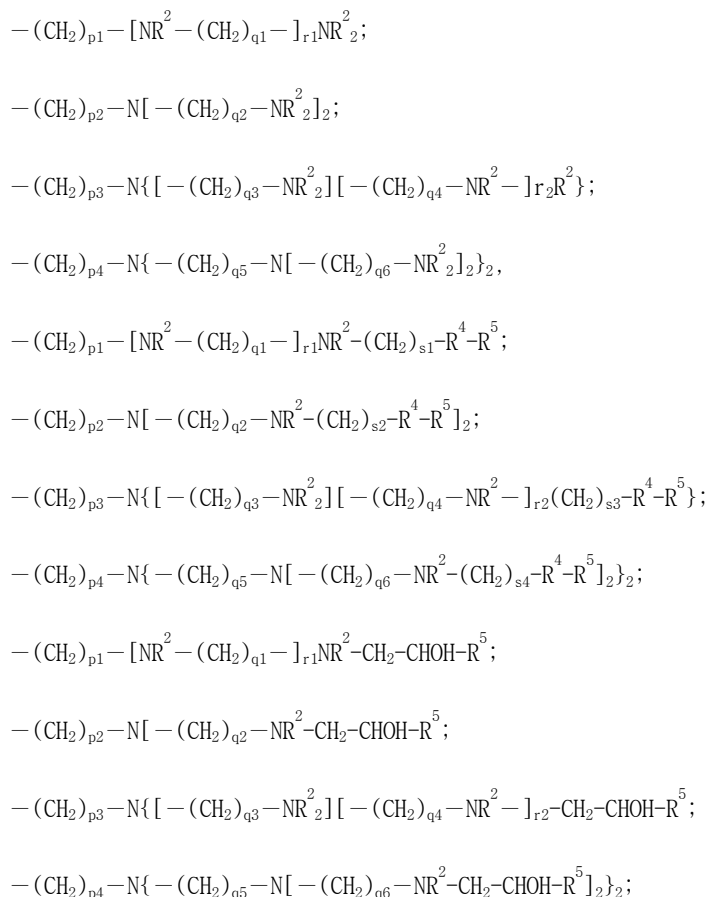
청구항 1에 있어서, 상기 소수성 기는 알킬기, 알케닐기, 사이클로알킬기, 또는 사이클로알케닐기를 포함하고, 이들은 선택적으로 하나 이상의 치환기로 치환되며, 선택적으로 상기 치환기는 하이드록실 또는 할로젠 기인 것인 폴리머.

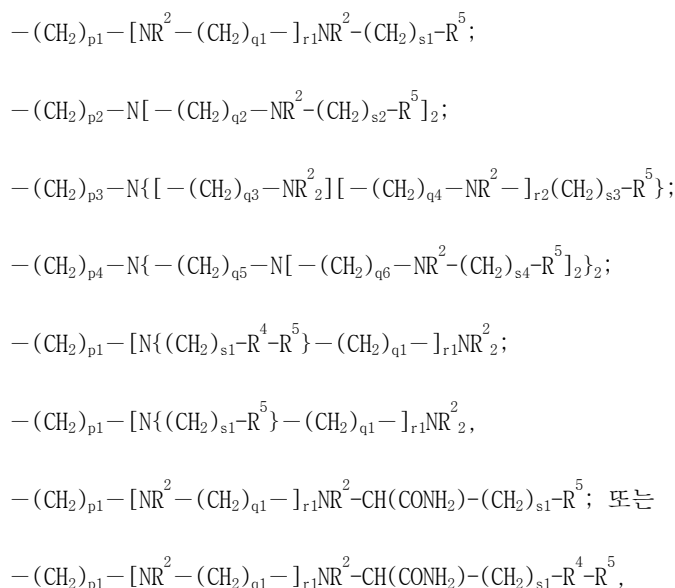
청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 소수성 기는 C₃-C₁₂ 직쇄형 또는 분지쇄형 알킬기, 선택적으로 C₃-C₆ 직쇄형 또는 분지쇄형 알킬기를 포함하고, 이들은 선택적으로 하나 이상의 치환기로 치환되며, 선택적으로 상기 치환기는 하이드록실 또는 할로젠 기인 것인 폴리머.

청구항 4

청구항 1 내지 3 중 어느 항에 있어서, 상기 올리고아민 또는 폴리아민은 하기 화학식의 기이고:





상기에서,

$p1$ 내지 $p4$, $q1$ 내지 $q6$, $r1$ 및 $r2$, 및 $s1$ 내지 $s4$ 는 각각 독립적으로 1 내지 5의 정수이고;

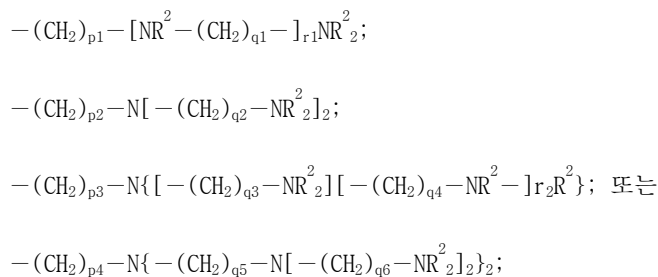
R^2 의 각 경우는 독립적으로 수소 또는 $\text{C}_1\text{-C}_{12}$ 알킬기, $\text{C}_2\text{-C}_{12}$ 알케닐기, $\text{C}_3\text{-C}_{12}$ 사이클로알킬기, 또는 $\text{C}_3\text{-C}_{12}$ 사이클로알케닐기이거나, 또는 R^2 는 제2 R^2 와 조합하여 헤테로사이클릭기를 형성하며;

R^4 의 각 경우는 독립적으로 $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$, $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$, $-\text{O}-\text{C}(\text{O})\text{O}-$, 또는 $-\text{S}(\text{O})(\text{O})-$ 이고;

R^5 의 각 경우는 독립적으로 알킬기, 사이클로알킬기, 알케닐기, 사이클로알케닐기, 아릴기, 헤테로알킬기, 헤테로사이클릭기, 또는 이들의 조합으로, 이들은 선택적으로 2 내지 8개의 3차 아민을 포함하고, 또는 조직-특이적 또는 세포-특이적 표적화 모이어티를 포함하는 치환기인 것인 폴리머.

청구항 5

청구항 1 내지 4 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리아민은 하기를 포함하고:



각 R^2 는 독립적으로 수소 또는 $\text{C}_1\text{-C}_3$ 알킬기인 것인 폴리머.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 폴리아민은



청구항 7

청구항 1 내지 6 중 어느 한 항에 있어서, 상기 가수분해성 폴리머 백본은 소수성 기를 갖는 모노머 유닛을 약 1 내지 약 80 mol%, 올리고아민 또는 폴리아민을 갖는 모노머 유닛을 약 1 내지 약 80 mol%, 및 폴리알킬렌 옥

사이드, 폴리글리콜산, 폴리락트산, 또는 이들의 조합을 갖는 모노머 유닛을 1 내지 약 80 몰% 포함하는 것인 폴리머.

청구항 8

청구항 1 내지 7 중 어느 한 항에 있어서, 상기 가수분해성 폴리머 백본은 폴리아미드, 폴리-N-알킬아미드, 폴리에스테르, 폴리카보네이트, 폴리카바메이트, 또는 이들의 조합을 포함하는 것인 폴리머.

청구항 9

청구항 8에 있어서, 상기 가수분해성 폴리머 백본은 폴리아미드를 포함하는 것인 폴리머.

청구항 10

청구항 1 내지 9 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리머는 2 내지 200개의 에틸렌 글리콜 유닛을 갖는 적어도 하나의 폴리에틸렌 글리콜 기를 포함하는 것인 폴리머.

청구항 11

청구항 1 내지 9 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리머는 2 내지 50개의 에틸렌 글리콜 유닛을 갖는 적어도 하나의 폴리에틸렌 글리콜 기를 포함하는 것인 폴리머.

청구항 12

청구항 1 내지 11 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리머는 2 내지 200개의 폴리글리콜산 유닛을 갖는 적어도 하나의 폴리글리콜산 기를 포함하는 것인 폴리머.

청구항 13

청구항 1 내지 11 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리머는 2 내지 50개의 폴리글리콜산 유닛을 갖는 적어도 하나의 폴리글리콜산 기를 포함하는 것인 폴리머.

청구항 14

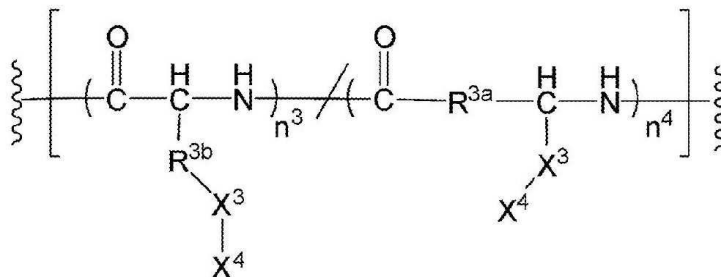
청구항 1 내지 13 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리머는 2 내지 200개의 폴리락트산 유닛을 갖는 적어도 하나의 폴리락트산 기를 포함하는 것인 폴리머.

청구항 15

청구항 1 내지 13 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리머는 2 내지 50개의 폴리락트산 유닛을 갖는 적어도 하나의 폴리락트산 기를 포함하는 것인 폴리머.

청구항 16

청구항 1 내지 15 중 어느 한 항에 있어서, 폴리아실렌 옥사이드, 폴리글리콜산, 폴리락트산, 또는 이들의 조합을 포함하는 겔사슬을 갖는 모노머 유닛은 하기 화학식 1의 구조를 포함하고:



상기에서:

각 n^3 및 n^4 는 0 내지 1000의 정수이고, 단 $n^3 + n^4$ 의 합은 1보다 크며;

기호 "/"는 이에 의해 분리된 유닛들이 무작위로 또는 임의의 순서로 연결되는 것을 나타내고;

R^{3a} 의 각 경우는 독립적으로 메틸렌 또는 에틸렌 기이며;

R^{3b} 의 각 경우는 독립적으로 메틸렌 또는 에틸렌 기이고;

각 X^3 은 독립적으로 $-C(O)O-$, $-C(O)NR^{13}-$, $-C(O)-$, $-S(O)(O)-$, 또는 결합 (bond)이며;

R^{13} 의 각 경우는 독립적으로 수소, 아틸기, 헤테로사이클릭기, C_1-C_{12} 알킬기, C_2-C_{12} 알케닐기, C_3-C_{12} 사이클로알킬기, 또는 C_3-C_{12} 사이클로알케닐기이고, 이들 중 임의의 기는 선택적으로 하나 이상의 치환기로 치환될 수 있으며;

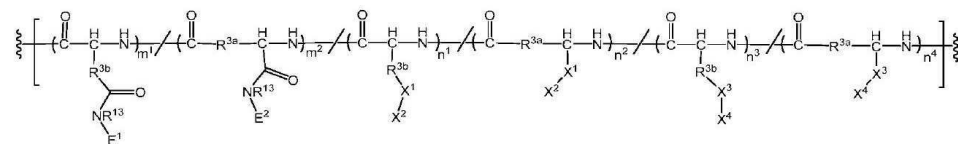
X^4 의 각 경우는 폴리알킬렌 옥사이드, 폴리글리콜산, 폴리락트산, 또는 이들의 조합을 포함하고;

R^{18} 의 각 경우는 독립적으로 수소 또는 메틸이며;

p의 각 경우는 독립적으로 2 내지 200의 정수인 것인 폴리머.

청구항 17

청구항 1 내지 15 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리머는 하기 화학식 2의 구조를 포함하며:



상기에서:

각 m^1 및 m^2 는 0 내지 1000의 정수이고, 단 $m^1 + m^2$ 의 합은 1보다 크며;

각 n^1 및 n^2 는 0 내지 1000의 정수이고, 단 $n^3 + n^4$ 의 합은 1보다 크며;

각 n^3 및 n^4 는 0 내지 1000의 정수이고, 단 $n^3 + n^4$ 의 합은 1보다 크며;

기호 "/"는 이에 의해 분리된 유닛들이 무작위로 또는 임의의 순서로 연결되는 것을 나타내고;

R^{3a} 의 각 경우는 독립적으로 메틸렌 또는 에틸렌 기이며;

R^{3b} 의 각 경우는 독립적으로 메틸렌 또는 에틸렌 기이고;

각 X^1 은 독립적으로 $-C(O)O-$, $-C(O)NR^{13}-$, $-C(O)-$, $-S(O)(O)-$, 또는 결합이며;

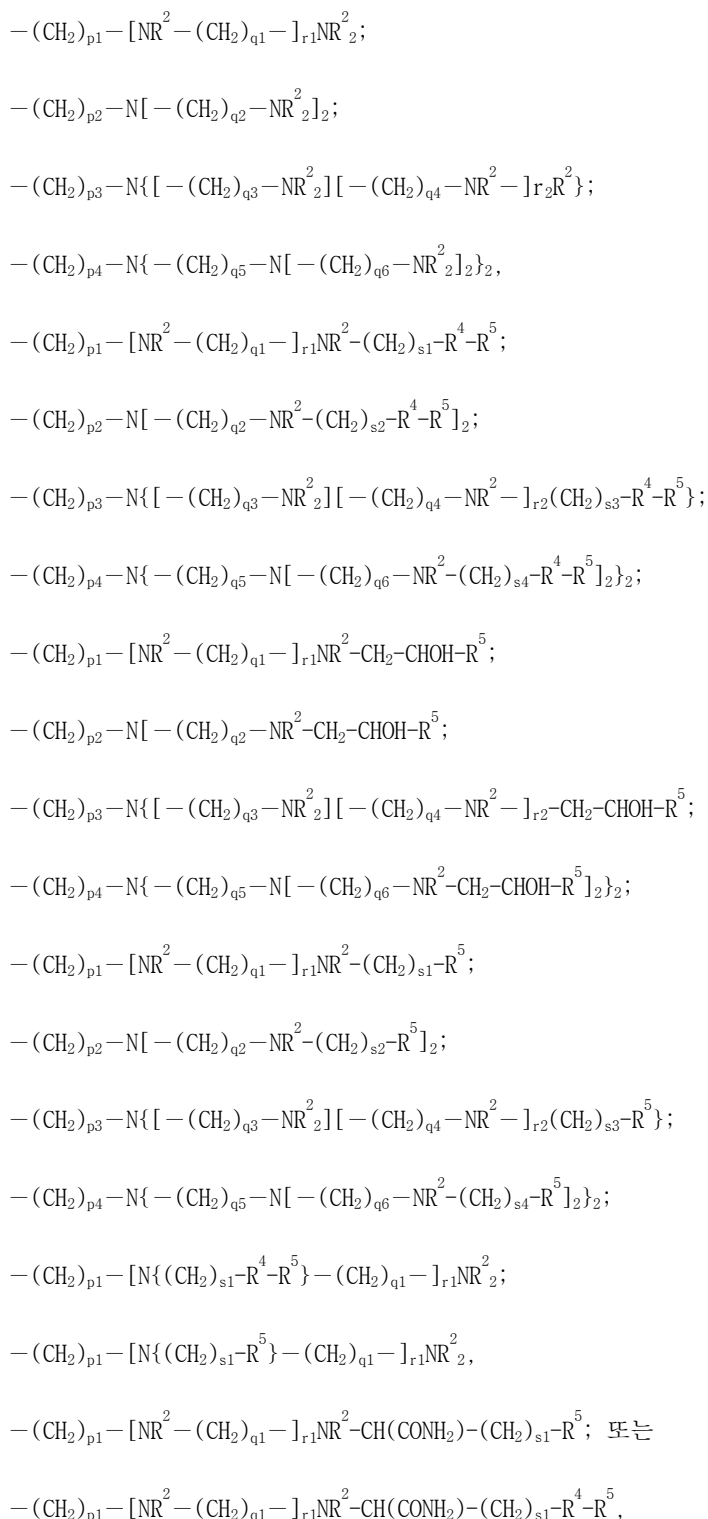
R^{13} 의 각 경우는 독립적으로 수소, 아틸기, 헤테로사이클릭기, C_1-C_{12} 알킬기, C_2-C_{12} 알케닐기, C_3-C_{12} 사이클로알킬기, 또는 C_3-C_{12} 사이클로알케닐기이고, 이들 중 임의의 기는 선택적으로 하나 이상의 치환기로 치환될 수 있으며;

X^2 의 각 경우는 독립적으로 C_1-C_{12} 알킬 또는 헤테로알킬기, C_3-C_{12} 사이클로알킬기, C_2-C_{12} 알케닐기, C_3-C_{12} 사이클로알케닐기, 아틸기, 헤테로사이클릭기, 또는 이들의 조합이고; 이들 중 임의의 기는 선택적으로 하나 이상의 치환기로 치환되며;

각 X^3 은 독립적으로 $-C(O)O-$, $-C(O)NR^{13}-$, $-C(O)-$, $-S(O)(O)-$, 또는 결합이고;

X^4 의 각 경우는 폴리알킬렌 옥사이드, 폴리글리콜산, 폴리락트산, 또는 이들의 조합을 포함하며;

E¹ 및 E²는 각각 독립적으로 하기 화학식의 기이코:



상기에서 p1 내지 p4, q1 내지 q6, r1 및 r2, 및 s1 내지 s4는 각각 독립적으로 1 내지 5의 정수이고;

R²의 각 경우는 독립적으로 수소 또는 C₁-C₁₂ 알킬기, C₂-C₁₂ 알케닐기, C₃-C₁₂ 사이클로알킬기, 또는 C₃-C₁₂ 사이클로알케닐기이거나, 또는 R²는 제2 R²와 조합하여 헤테로사이클릭기를 형성하며;

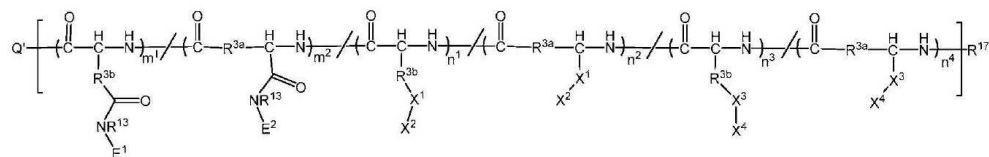
R⁴의 각 경우는 독립적으로 -C(O)O-, -C(O)NH-, -O-C(O)O-, 또는 -S(O)(O)-이고;

R⁵의 각 경우는 독립적으로 알킬기, 사이클로알킬기, 알케닐기, 사이클로알케닐기, 아릴기, 헤테로알킬기, 헤테

로사이클릭기 또는 이들의 조합으로, 이들은 선택적으로 2 내지 8개의 3차 아민을 포함하고, 또는 조직-특이적 또는 세포-특이적 표적화 모이어티를 포함하는 치환기인 것인 폴리머.

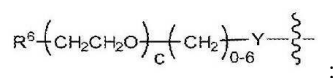
청구항 18

청구항 17에 있어서, 상기 폴리머는 하기 화학식 2A의 구조를 가지며:



상기에서,

Q'는 하기 화학식의 기이고:



c는 0 내지 50의 정수이며;

Y는 선택적으로 존재하고, 절단 가능한 링커이고;

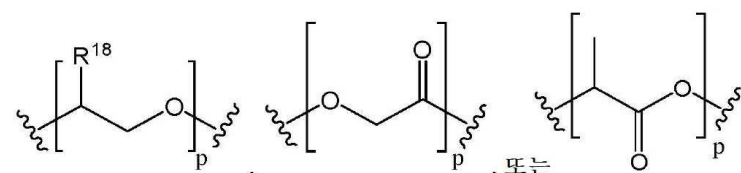
R¹⁷은 수소, 아릴기, 헤테로사이클릭기, C₁-C₁₂ 알킬기, 알케닐기, 사이클로알킬기, 또는 사이클로알케닐기, 또는 하나 이상의 치환기로 선택적으로 치환된 C₁-C₁₂ 직쇄형 또는 분지쇄형 알킬기이며;

R⁶은 수소, 아미노기, 아릴기, 헤테로사이클릭기, C₁-C₁₂ 알킬기, C₁-C₁₂ 헤테로알킬기, 알케닐기, 사이클로알킬기, 또는 사이클로알케닐기, 또는 1개 이상의 아민으로 선택적으로 치환된 C₁-C₁₂ 직쇄형 또는 분지쇄형 알킬기이거나; 또는 조직-특이적 또는 세포-특이적 표적화 모이어티이고;

$m^1, m^2, n^1, n^2, n^3, n^4, R^{3a}, R^{3b}, R^{13}, X^1, X^2, X^3, X^4, E^1$, 및 E^2 는 청구항 17에 정의된 바와 같은 것인 폴리머.

청구항 19

청구항 16 내지 18 중 어느 한 항에 있어서, 상기 X^4 의 각 경우는



또는 이들의 조합을 포함하고,

상기에서

R^{18} 의 각 경우는 독립적으로 수소 또는 메틸이고;

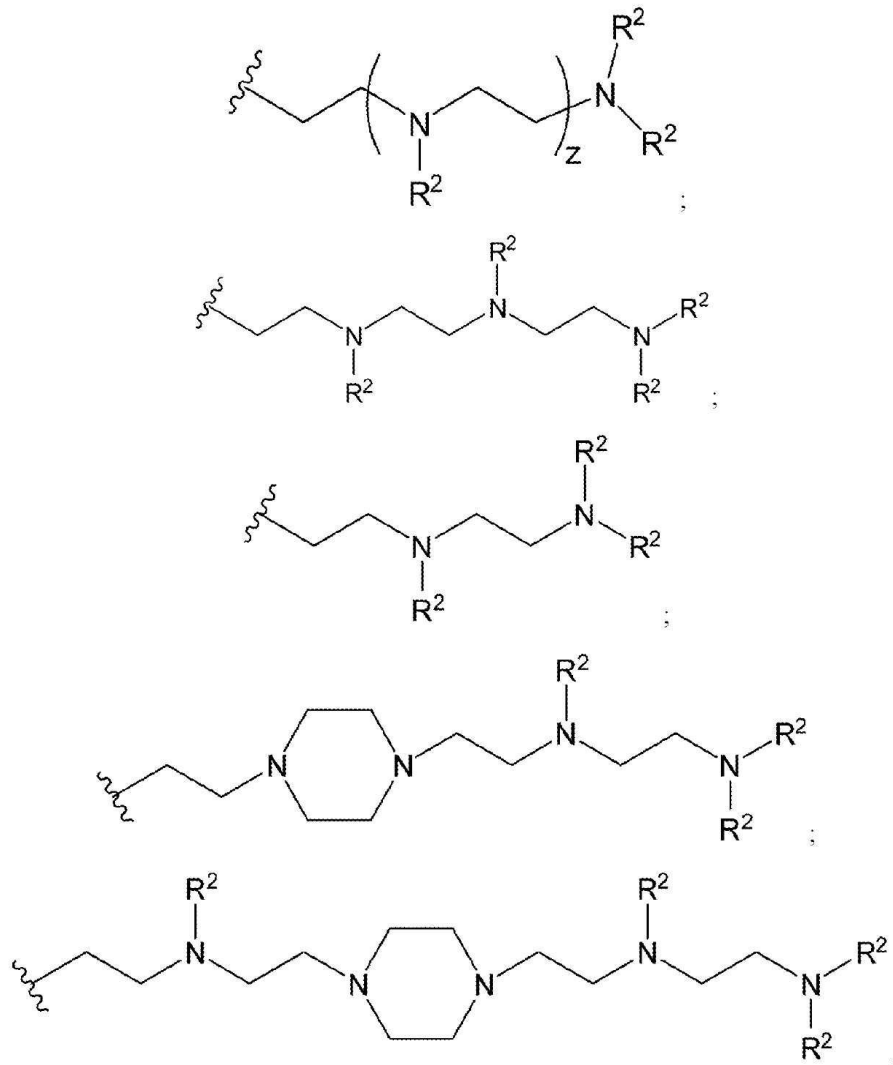
p의 각 경우는 독립적으로 2 내지 200의 정수인 것인 폴리머.

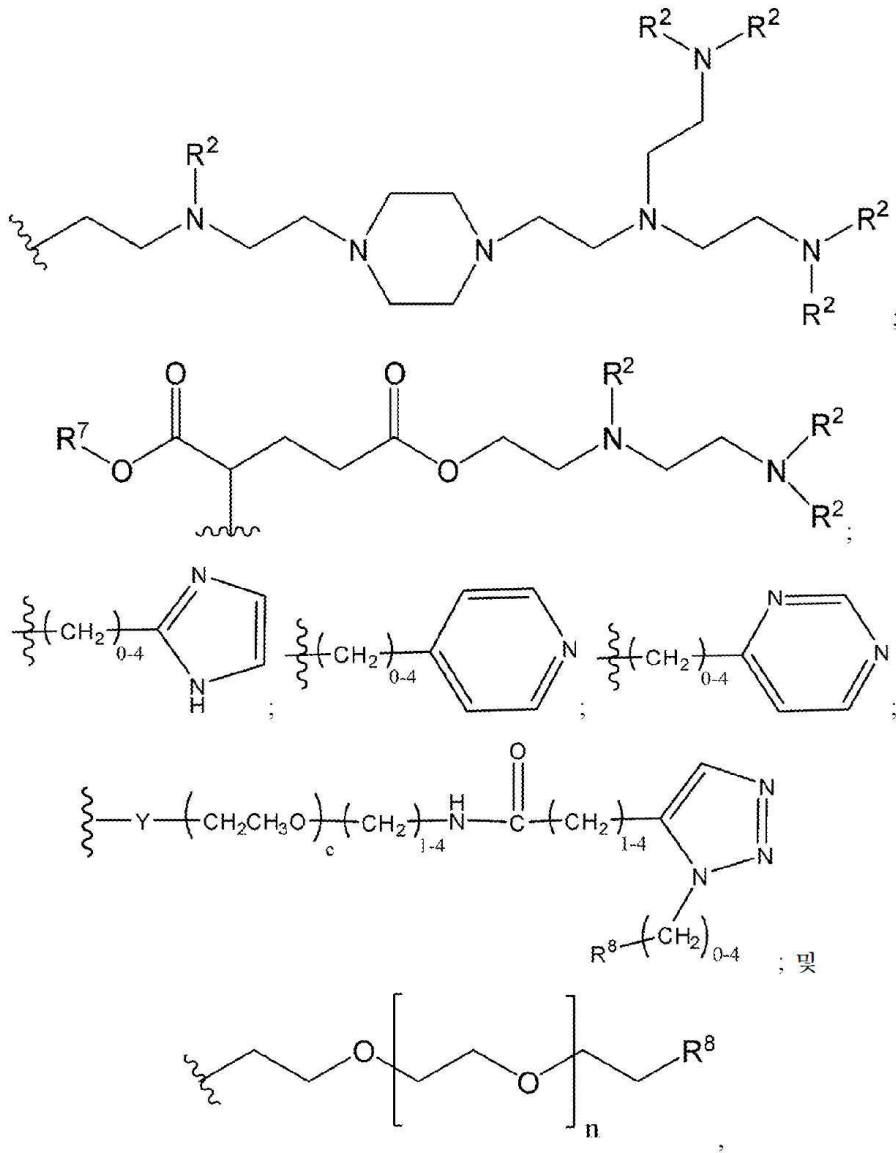
청구항 20

청구항 17 내지 19 중 어느 한 항에 있어서, 각 E¹ 및 E²는 화학식 $-(CH_2)_2-NR^2-(CH_2)_2-NR^2_2$ 또는 $-(CH_2)_2-NR^2-(CH_2)_2-NHR^2$ 이고, 상기 R²는 수소, 메틸 또는 에틸인 것인 폴리머.

청구항 21

청구항 17 내지 19 중 어느 한 항에 있어서, 각 R^2 는 독립적으로 하기 화학식의 기이고:





상기에서

R^2 의 각 경우는 독립적으로 수소 또는 C_1 - C_{12} 알킬기, 알케닐기, 사이클로알킬기 또는 사이클로알케닐기이거나, 또는 R^2 는 제2 R^2 와 조합하여 헤테로사이클릭기를 형성하고;

R^7 은 C_1 - C_{50} 알킬기, 알케닐기, 사이클로알킬기, 또는 사이클로알케닐기로, 선택적으로 1개 이상의 아민으로 치환되며;

z 는 1 내지 5의 정수이고;

c 는 0 내지 50의 정수이며;

Y 는 선택적으로 존재하고, 절단 가능한 링커이고;

n 은 0 내지 50의 정수이며;

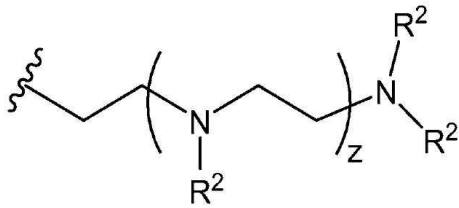
R^8 은 조직-특이적 또는 세포-특이적 표적화 모이어티인 것인 폴리머.

청구항 22

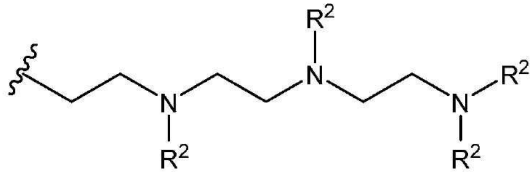
청구항 17 내지 19, 또는 21 중 어느 한 항에 있어서, 상기 R^4 는 $-C(O)-O-$ 인 것인 폴리머.

청구항 23

청구항 17 내지 19, 21, 또는 22 중 어느 한 항에 있어서, 상기 R⁵는



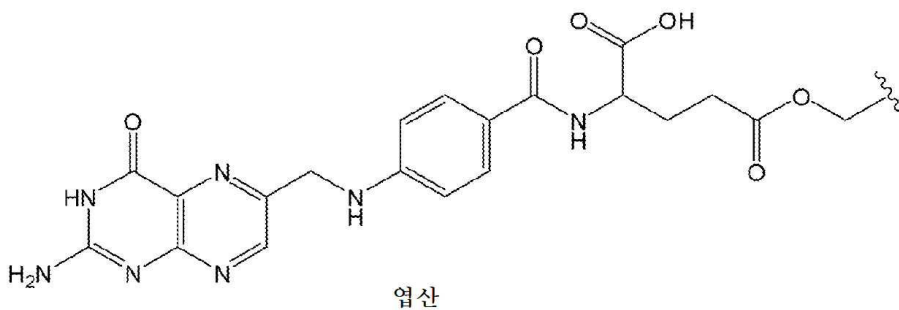
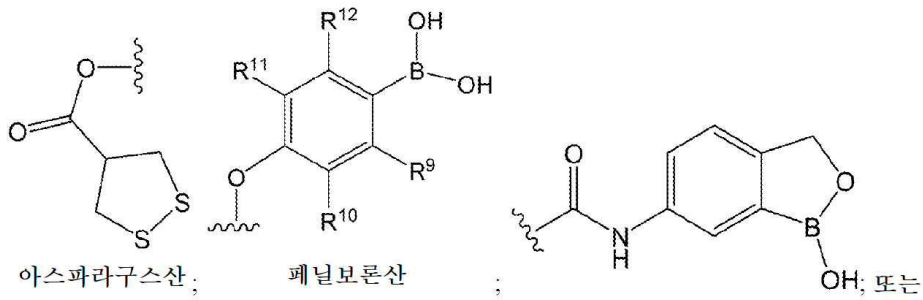
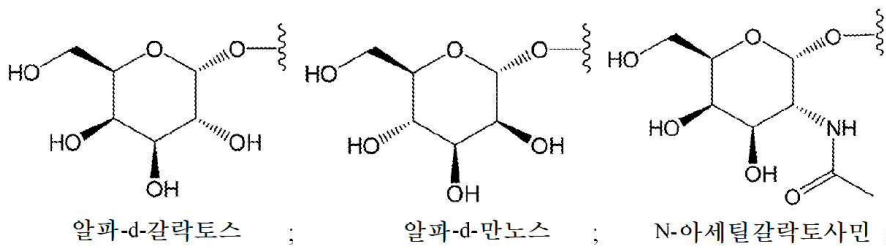
또는



인 것인 폴리머.

청구항 24

청구항 17 내지 19 또는 21 내지 23 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조직-특이적 또는 세포-특이적 표적화 모이어티는 하기이고:



상기에서 각 R⁹, R¹⁰, R¹¹, 및 R¹²는 독립적으로 수소, 할로젠, C₁-C₄ 알킬, 또는 C₁-C₄ 알콕시로, 선택적으로 1개 이상의 아미노기로 치환되는 것인 폴리머.

청구항 25

청구항 17 내지 24 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Q'는 $-NHR^6$ 인 것인 폴리머.

청구항 26

청구항 17 내지 25 중 어느 한 항에 있어서, 상기 R¹⁷은 수소인 것인 폴리머.

청구항 27

청구항 17에 있어서,

각 m^1 및 m^2 는 5 내지 100의 정수이고;

각 n^1 및 n^2 는 5 내지 100의 정수이며;

각 n^3 및 n^4 는 5 내지 100의 정수이고;

R^{3a} 및 R^{3b} 의 각 경우는 메틸렌이며;

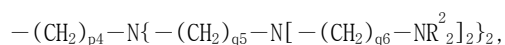
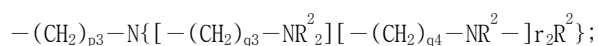
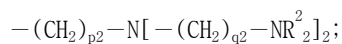
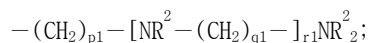
각 X^1 및 X^3 은 독립적으로 $-C(0)0-$, $-C(0)NR^{13}-$, 또는 $-C(0)-$, 또는 결합이고;

R¹³의 각 경우는 수소 또는 C₁-C₃ 알킬이며;

X^2 의 각 경우는 독립적으로 C₃-C₁₂ 직쇄형 또는 분지쇄형 알킬 또는 C₄-C₁₂ 사이클릭 또는 융합된 고리 소수성 기이고, 이들 중 임의의 기는 선택적으로 1개 이상의 하이드록실기 또는 할로젠기로 치환되며;

X^4 의 각 경우는 폴리알킬렌 옥사이드, 폴리글리콜산, 폴리락트산, 또는 이들의 조합이고;

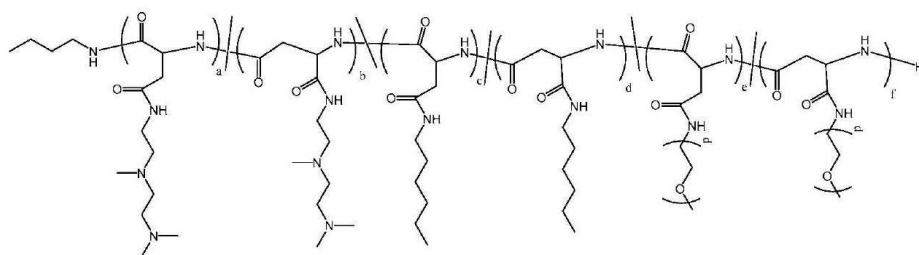
E^1 및 E^2 는 각각 독립적으로 하기 화학식의 기이며:



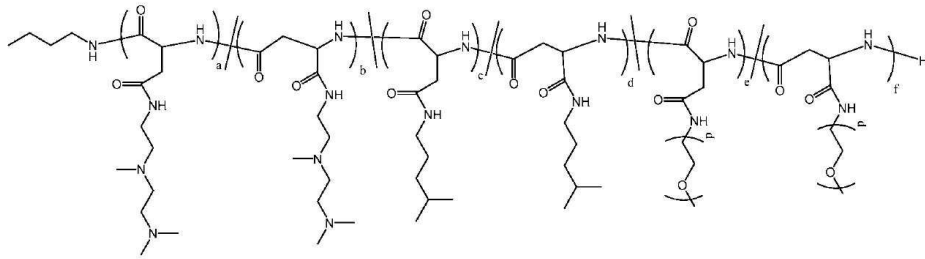
상기에서 p1 내지 p4, q1 내지 q6, 및 r1 및 r2는 각각 독립적으로 1 내지 5의 정수이고; R^2 의 각 경우는 독립적으로 수소 또는 C_1-C_3 알킬기인 것인 폴리머.

청구항 28

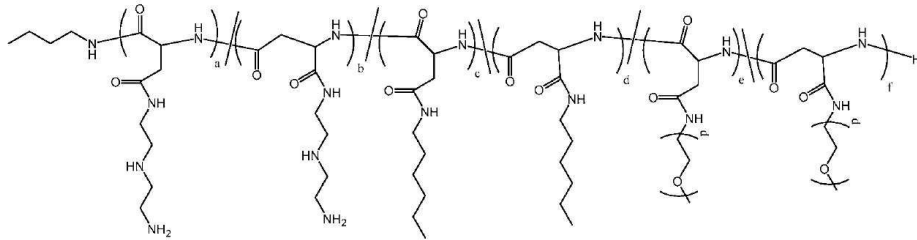
청구항 1에 있어서, 상기 폴리머는 하기 화학식을 갖는 폴리머이고:



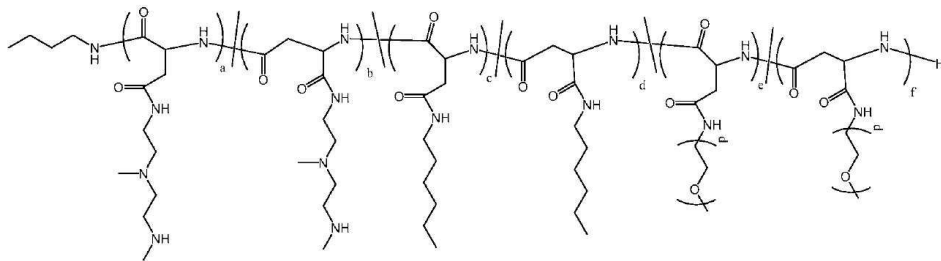
폴리머 72



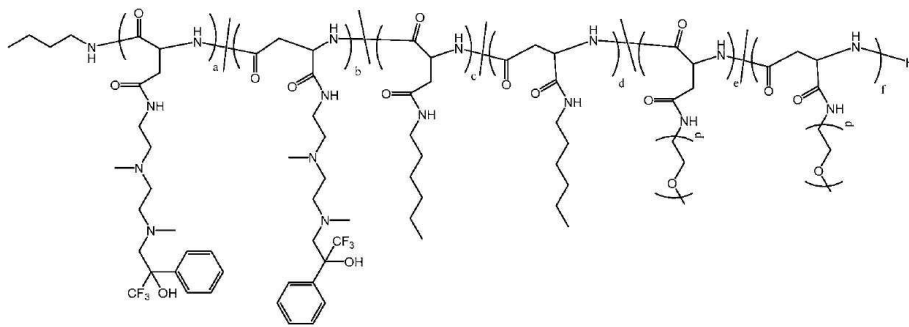
폴리머 73



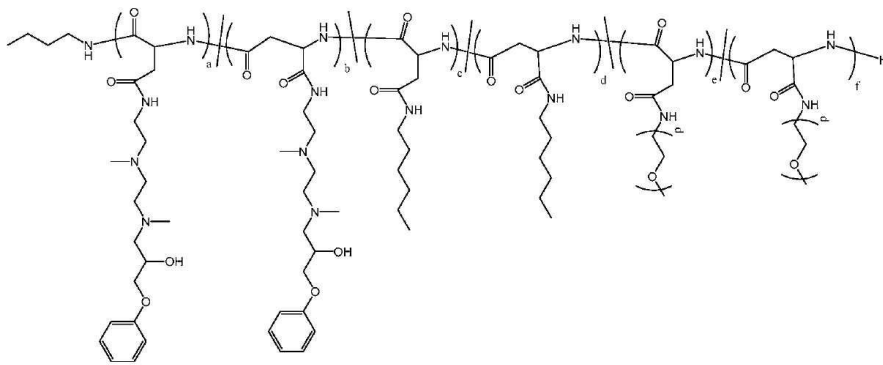
폴리머 74



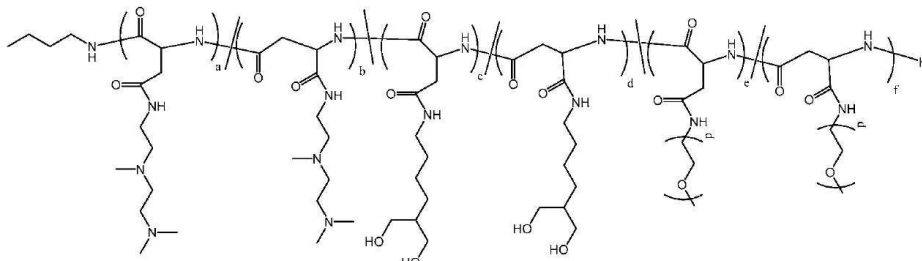
폴리머 75



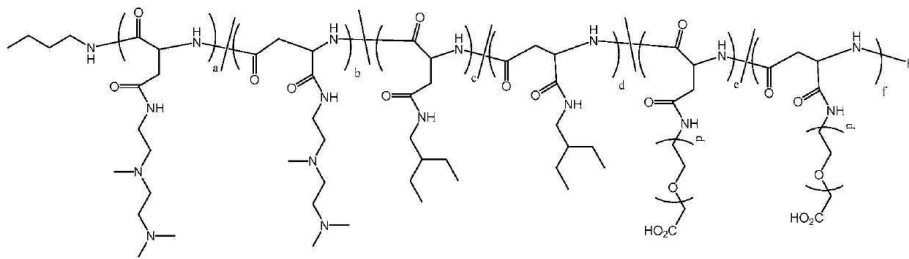
폴리머 76



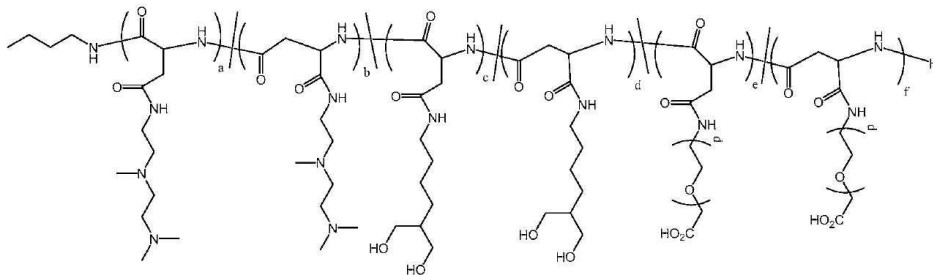
폴리머 77



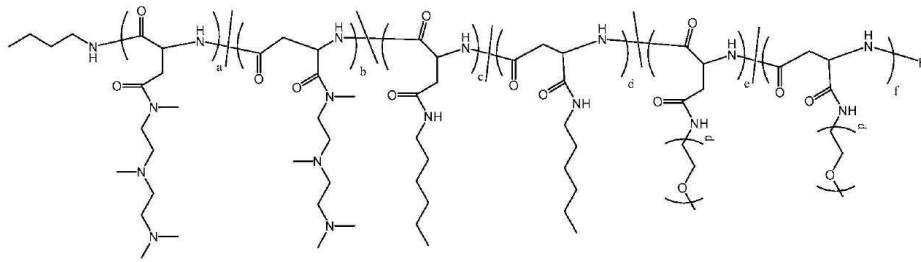
폴리머 78



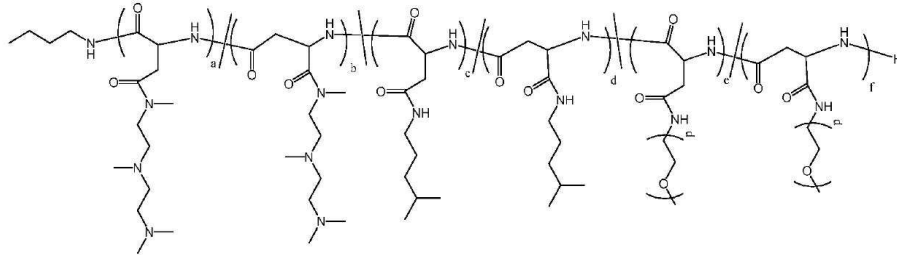
폴리머 79



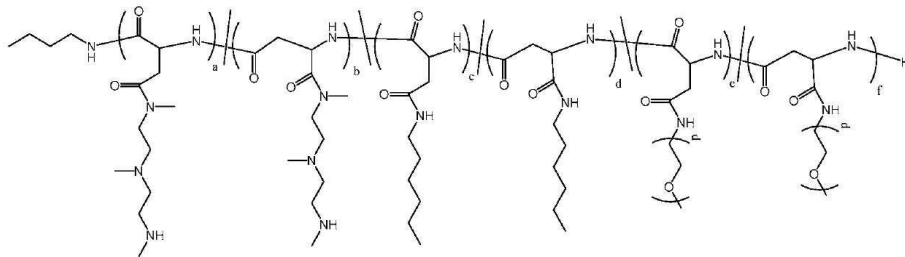
폴리머 80



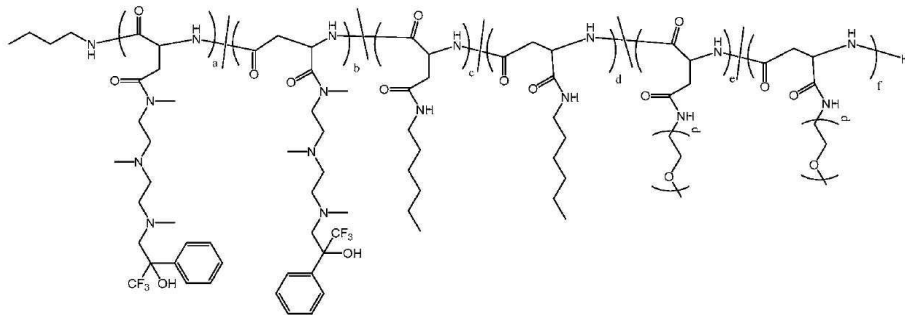
폴리머 81



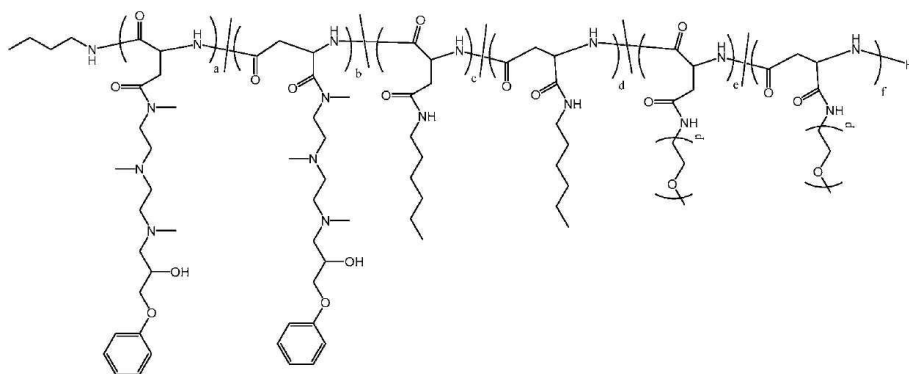
폴리머 82



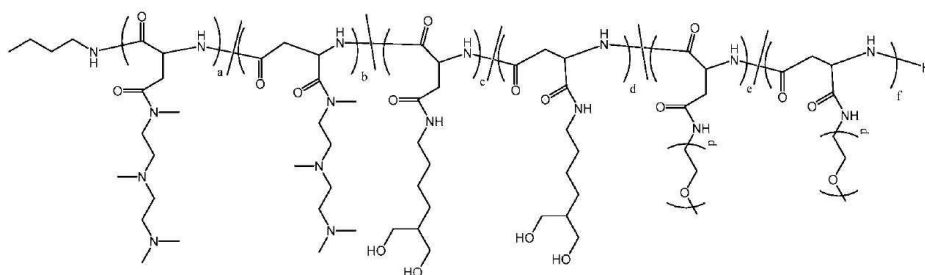
폴리머 83



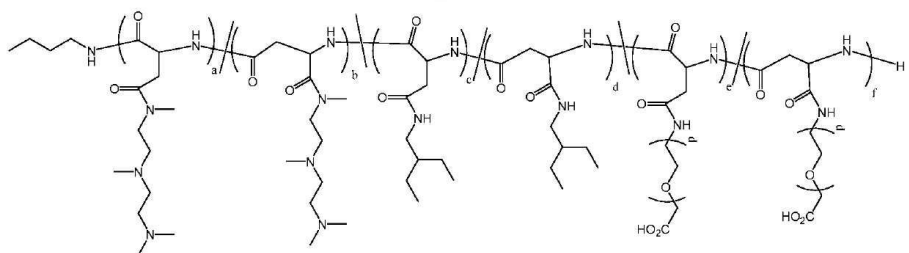
폴리머 84



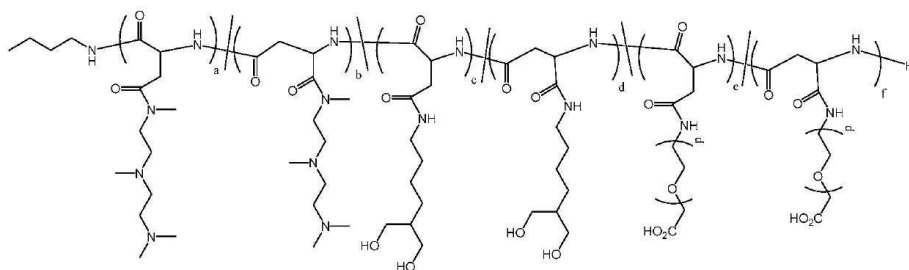
폴리머 85



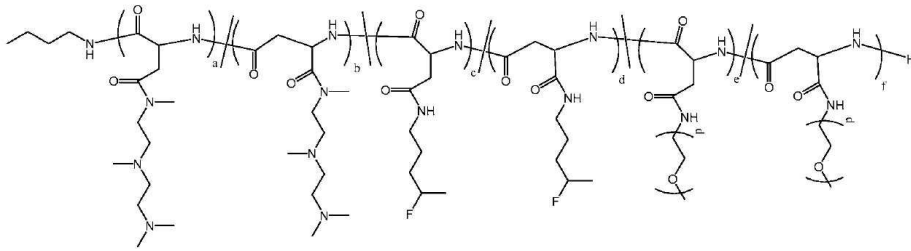
폴리머 86



폴리머 87

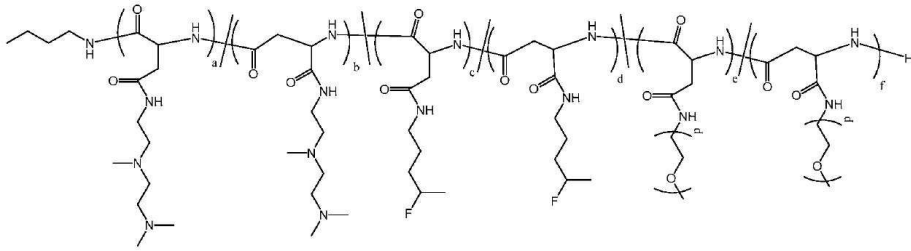


폴리머 88



폴리머 89

, 또는



폴리머 90

상기에서 (a+b)는 약 5 내지 약 65이고, (c+d)는 약 2 내지 약 60이며, (e+f)는 약 2 내지 약 60이고, p의 각 경우는 독립적으로 2 내지 200 또는 6 내지 30의 정수인 것인 폴리머.

청구항 29

청구항 1 내지 28 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리머는 약 5 kDa 내지 약 2,000 kDa의 중량 평균 분자량을 갖는 것인 폴리머.

청구항 30

청구항 29에 있어서, 상기 폴리머는 약 10 kDa 내지 약 500 kDa의 중량 평균 분자량을 갖는 것인 폴리머.

청구항 31

청구항 1 내지 30 중 어느 한 항에 따른 제1 폴리머 및 선택적으로 약학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는 조성물.

청구항 32

청구항 31에 있어서, 상기 조성물은 비-이온성 (non-ionic) 계면활성제 및/또는 양쪽이온성 (zwitterionic) 계면활성제를 포함하는 것인 조성물.

청구항 33

청구항 31 또는 32에 있어서, 상기 조성물은 하나 이상의 생체분자 (biomolecules) 또는 이의 합성 변이체를 추가로 포함하는 것인 조성물.

청구항 34

청구항 33에 있어서, 상기 조성물은 핵산 및/또는 폴리펩티드를 포함하는 것인 조성물.

청구항 35

청구항 34에 있어서, 상기 조성물은 가이드 핵산 (guide nucleic acid) 및/또는 공여체 핵산 (donor nucleic acid)을 포함하는 것인 조성물.

청구항 36

청구항 33 내지 35 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 엔도뉴클레아제를 포함하는 것인 조성물.

청구항 37

청구항 36에 있어서, 상기 조성물은 RNA-가이드 엔도뉴클레아제 또는 이를 코딩하는 핵산을 포함하는 것인 조성물.

청구항 38

청구항 37에 있어서, 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제는 Cas9, Cpf1, 또는 이들의 조합인 것인 조성물.

청구항 39

청구항 33 내지 38 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 DNA 재조합효소를 포함하는 것인 조성물.

청구항 40

청구항 39에 있어서, 상기 DNA 재조합효소는 Cre 재조합효소인 것인 조성물.

청구항 41

청구항 33 내지 40 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 징크 핑거 뉴클레아제 (zinc finger nuclease)를 포함하는 것인 조성물.

청구항 42

청구항 33 내지 41 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 전사 활성인자-유사 이펙터 뉴클레아제 (transcription activator-like effector nuclease)를 포함하는 것인 조성물.

청구항 43

청구항 34 내지 42 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 청구항 1 내지 30 중 어느 항의 폴리머, 및 핵산 또는 폴리펩티드를 포함하는 나노입자를 포함하는 것인 조성물.

청구항 44

청구항 31 내지 43 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 가수분해성 폴리머 백본을 포함하는 제2 폴리머를 추가로 포함하고, 상기 폴리머 백본은:

(i) 소수성 기를 포함하는 결사슬을 갖는 모노머 유닛;

(ii) 올리고아민 또는 폴리아민을 포함하는 결사슬을 갖는 모노머 유닛; 및

선택적으로, (iii) 선택적으로 7 미만의 pKa를 갖는, 이온화 가능한 기 (ionizable group)를 포함하는 결사슬을 갖는 모노머 유닛을 포함하는 것인 조성물.

청구항 45

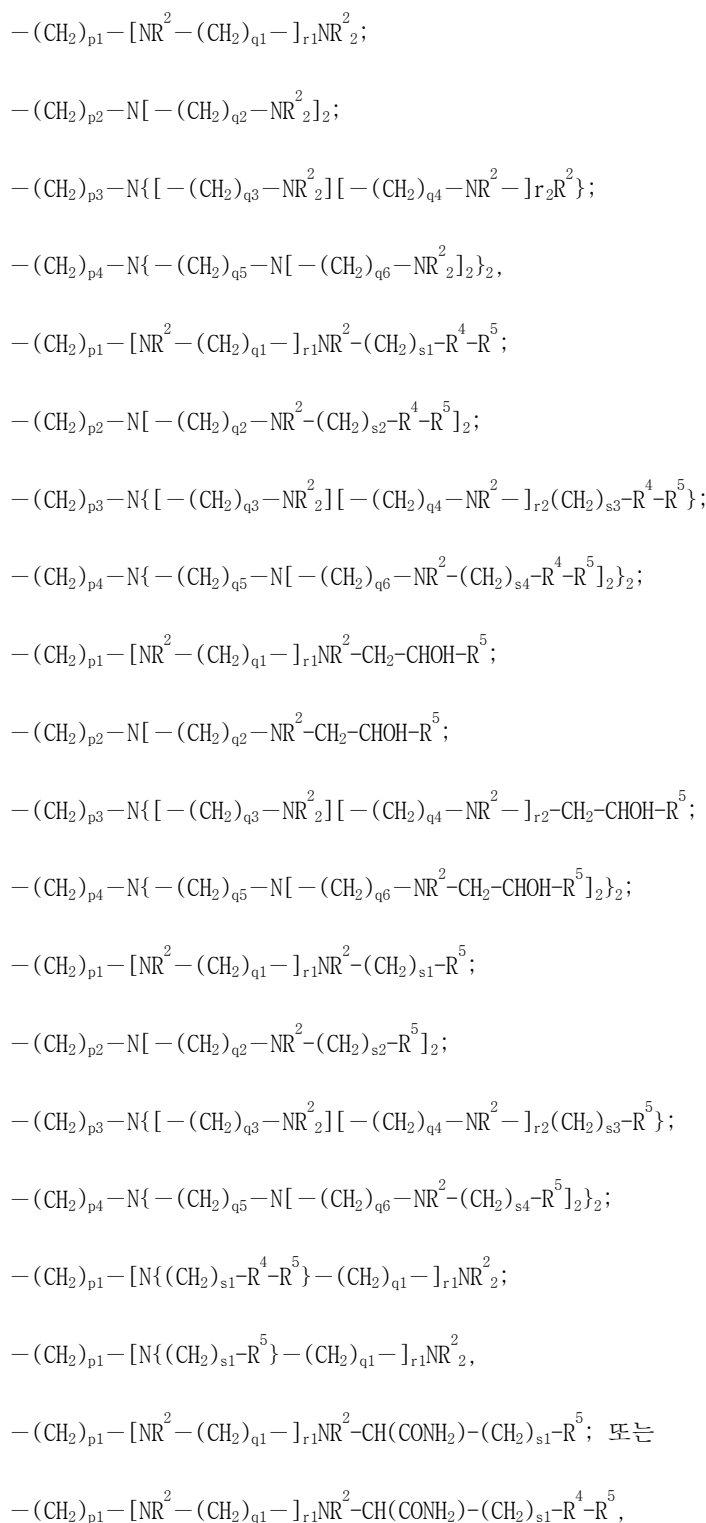
청구항 44에 있어서, 상기 제2 폴리머의 소수성 기는 알킬기, 알케닐기, 사이클로알킬기, 또는 사이클로알케닐기를 포함하는 것인 조성물.

청구항 46

청구항 45에 있어서, 상기 제2 폴리머의 소수성 기는 C₃-C₁₂ 직쇄형 또는 분지쇄형 알킬기, 선택적으로 C₃-C₆ 직쇄형 또는 분지쇄형 알킬기를 포함하는 것인 조성물.

청구항 47

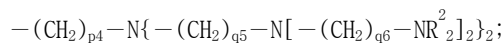
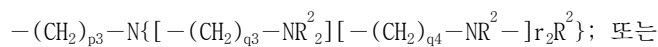
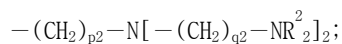
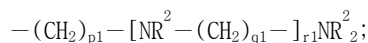
청구항 44 내지 46 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 폴리머의 올리고아민 또는 폴리아민은 하기 화학식의 기를 포함하고:



상기에서 p1 내지 p4, q1 내지 q6, r1 및 r2, 및 s1 내지 s4는 각각 독립적으로 1 내지 5의 정수이고; R²의 각 경우는 독립적으로 수소 또는 C₁-C₁₂ 알킬기, 알케닐기, 사이클로알킬기 또는 사이클로알케닐기이거나, 또는 R²는 제2 R²와 조합하여 헤테로사이클릭기를 형성하며; 각 경우는 독립적으로 -C(O)O-, -C(O)NH-, 또는 -S(O)(O)-이고; R⁵의 각 경우는 독립적으로 알킬기, 사이클로알킬기, 알케닐기, 사이클로알케닐기, 아릴기, 헤테로알킬기, 헤테로사이클릭기, 또는 이들의 조합으로, 이들은 선택적으로 2 내지 8개의 3차 아민을 포함하고, 또는 조직-특이적 또는 세포-특이적 표적화 모이어티를 포함하는 치환기인 것인 조성물.

청구항 48

청구항 44 내지 47 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 폴리머의 폴리아민은 하기를 포함하고:



각 R^2 는 독립적으로 수소 또는 C_1-C_3 알킬기이고;

선택적으로, 상기 폴리아민은



청구항 49

청구항 44 내지 48 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 폴리머의 가수분해성 폴리머 백본은 소수성 기를 갖는 모노머 유닛을 약 1 내지 약 80 mol%, 올리고아민 또는 폴리아민을 갖는 모노머 유닛을 약 1 내지 약 80 mol%, 및 이온화 가능한 기를 갖는 모노머 유닛을 0 내지 약 80 몰% 포함하는 것인 조성물.

청구항 50

청구항 44 내지 49 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 폴리머의 가수분해성 폴리머 백본은 7 미만의 pKa를 갖는 이온화 가능한 기를 포함하는 결사슬을 갖는 모노머 유닛을 포함하는 것인 조성물.

청구항 51

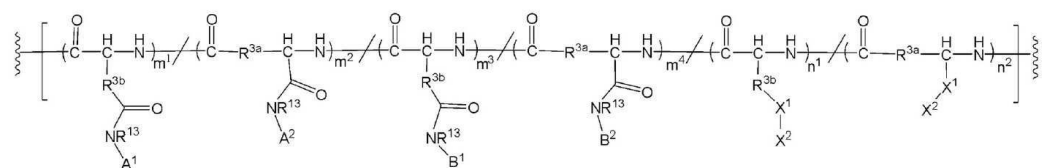
청구항 44 내지 50 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 폴리머의 가수분해성 폴리머 백본은 폴리아미드, 폴리-N-알킬아미드, 폴리에스테르, 폴리카보네이트, 폴리카바메이트, 또는 이들의 조합을 포함하는 것인 조성물.

청구항 52

청구항 51에 있어서, 상기 제2 폴리머의 가수분해성 폴리머 백본은 폴리아미드를 포함하는 것인 조성물.

청구항 53

청구항 44에 있어서, 상기 제2 폴리머는 하기 화학식 3의 구조를 포함하고:



상기에서:

각 m^1 , m^2 , m^3 , 및 m^4 는 0 내지 1000의 정수이고, 단 $m^1 + m^2 + m^3 + m^4$ 의 합은 5보다 크며;

각 n^1 및 n^2 는 0 내지 1000의 정수이고, 단 $n^1 + n^2$ 의 합은 2보다 크며;

기호 "/"는 이에 의해 분리된 유닛들이 무작위로 또는 임의의 순서로 연결되는 것을 나타내고;

R^{3a} 의 각 경우는 독립적으로 메틸렌 또는 에틸렌 기이며;

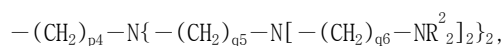
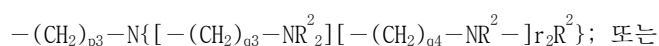
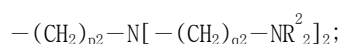
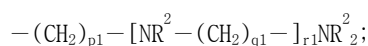
R^{3b} 의 각 경우는 독립적으로 메틸렌 또는 에틸렌 기이고;

각 X^1 은 독립적으로 $-C(O)O-$, $-C(O)NR^{13}-$, $-C(O)-$, $-S(O)(O)-$, 또는 결합이며;

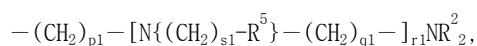
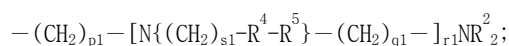
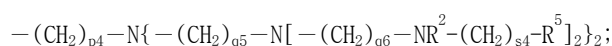
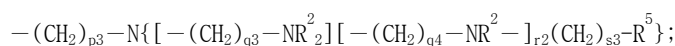
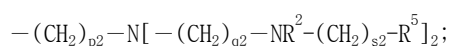
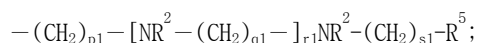
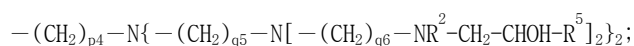
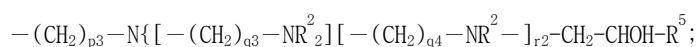
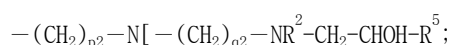
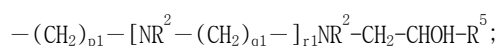
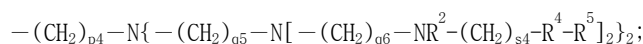
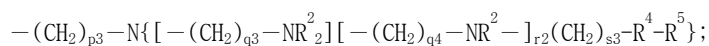
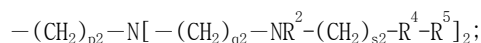
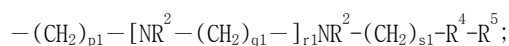
R^{13} 의 각 경우는 독립적으로 수소, 아릴기, 헤테로사이클릭기, C_1-C_{12} 알킬기, C_2-C_{12} 알케닐기, C_3-C_{12} 사이클로알킬기, 또는 C_3-C_{12} 사이클로알케닐기이고, 이들 중 임의의 기는 선택적으로 하나 이상의 치환기로 치환될 수 있으며;

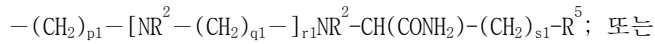
X^2 의 각 경우는 독립적으로 C_1-C_{12} 알킬 또는 헤테로알킬기, C_3-C_{12} 사이클로알킬기, C_2-C_{12} 알케닐기, C_3-C_{12} 사이클로알케닐기, 아릴기, 헤테로사이클릭기, 또는 이들의 조합으로, 선택적으로 1개 이상의 1차, 2차 또는 3차 아민을 포함하며; 이들 중 임의의 기는 선택적으로 하나 이상의 치환기로 치환되며;

A^1 및 A^2 는 각각 독립적으로 하기 화학식의 기이고:



B^1 및 B^2 는 각각 독립적으로 하기 화학식의 기이며:

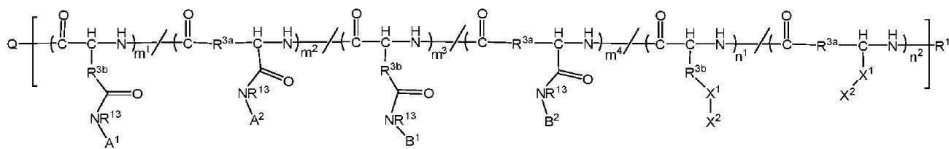




상기에서, p1 내지 p4, q1 내지 q6, r1 및 r2, 및 s1 내지 s4는 각각 독립적으로 1 내지 5의 정수이고; R²의 각 경우는 독립적으로 수소 또는 C₁-C₁₂ 알킬기, C₂-C₁₂ 알케닐기, C₃-C₁₂ 사이클로알킬기, 또는 C₃-C₁₂ 사이클로알케닐기이거나, 또는 R²는 제2 R²와 조합하여 헤테로사이클릭기를 형성하며; R⁴의 각 경우는 독립적으로 -C(O)O-, -C(O)NH-, -O-C(O)O-, 또는 -S(O)(O)-이고; R⁵의 각 경우는 독립적으로 알킬기, 사이클로알킬기, 알케닐기, 사이클로알케닐기, 아릴기, 헤테로알킬기, 헤테로사이클릭기, 또는 이들의 조합으로, 이들은 선택적으로 2 내지 8 개의 3차 아민을 포함하고, 또는 조직-특이적 또는 세포-특이적 표적화 모이어티를 포함하는 치환기인 것인 조성물.

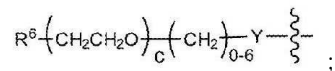
청구항 54

청구항 53에 있어서, 상기 제2 폴리머는 하기 화학식 3A의 구조를 가지며:



상기에서

Q는 하기 화학식의 기이고:



c는 0 내지 50의 정수이고;

Y는 선택적으로 존재하고, 절단 가능한 링커이며;

R¹은 수소, 아릴기, 헤테로사이클릭기, C₁-C₁₂ 알킬기, 알케닐기, 사이클로알킬기, 또는 사이클로알케닐기, 또는 하나 이상의 치환기로 선택적으로 치환된 C₁-C₁₂ 직쇄형 또는 분지쇄형 알킬기이고;

R⁶은 수소, 아미노기, 아릴기, 헤테로사이클릭기, C₁-C₁₂ 알킬기, C₁-C₁₂ 헤테로알킬기, 알케닐기, 사이클로알킬기, 또는 사이클로알케닐기, 1개 이상의 아민으로 선택적으로 치환된 C₁-C₁₂ 직쇄형 또는 분지쇄형 알킬기이거나; 또는 조직-특이적 또는 세포-특이적 표적화 모이어티이고;

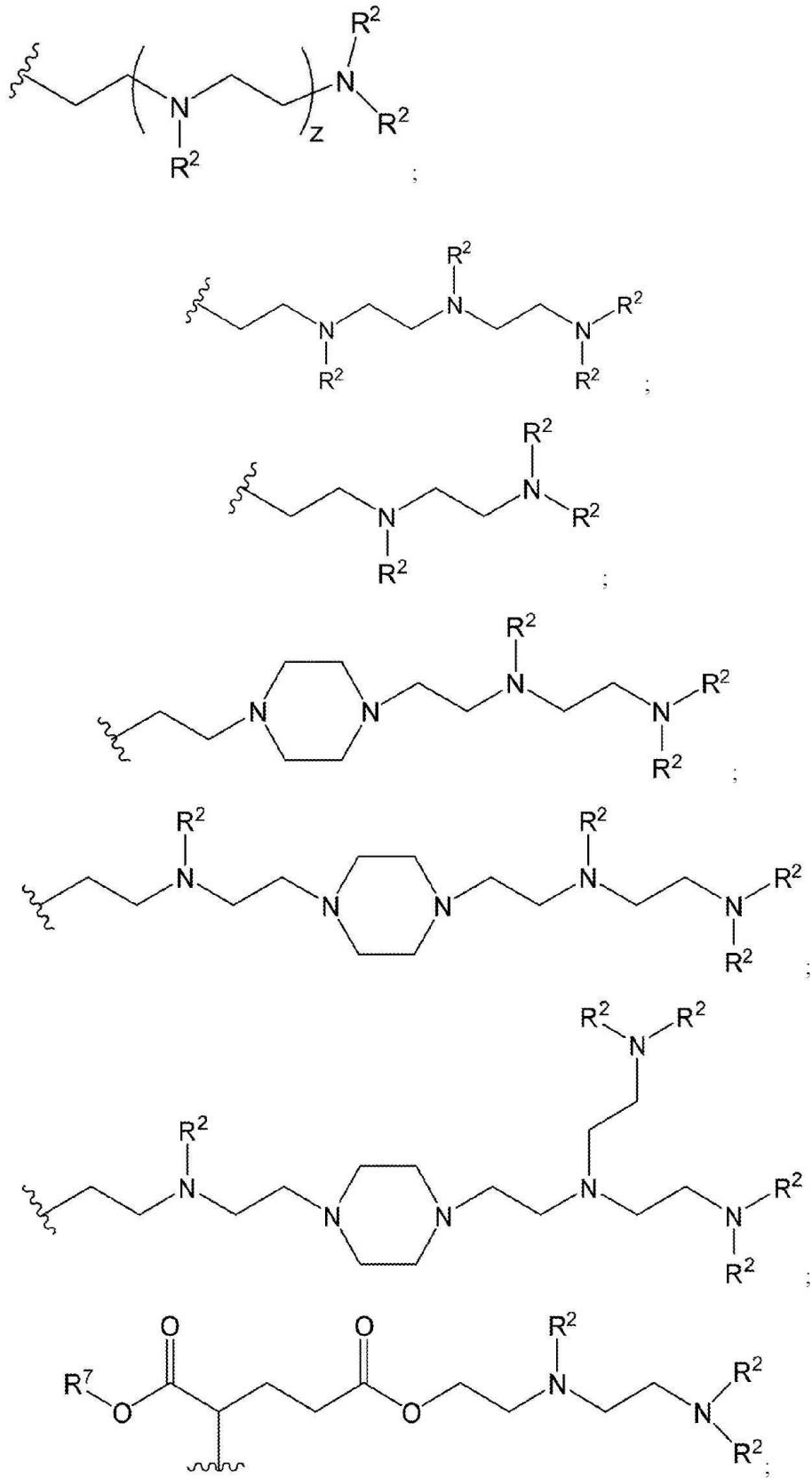
m¹, m², m³, m⁴, n¹, n², R^{3a}, R^{3b}, R¹³, X¹, X², A¹, A², B¹, 및 B²는 청구항 49에 정의된 바와 같은 것인 조성물.

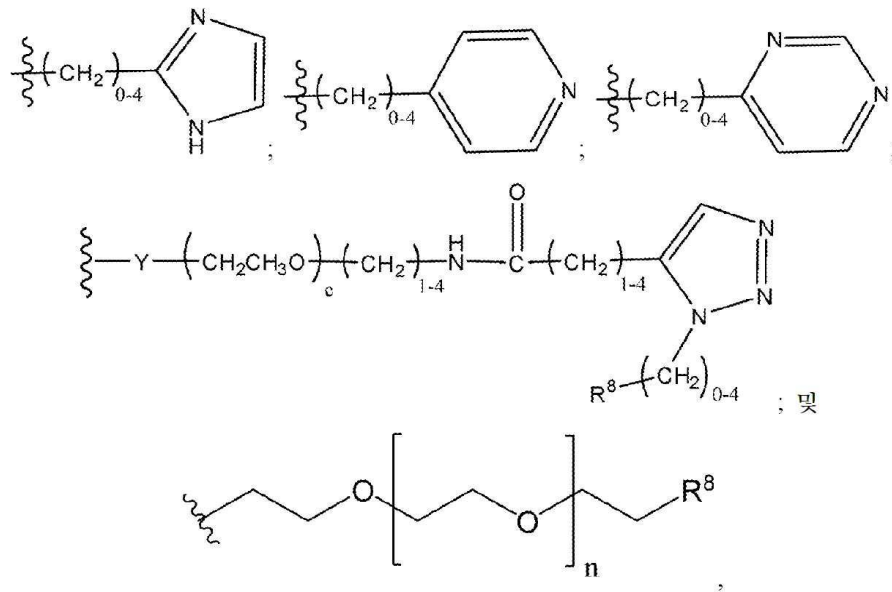
청구항 55

청구항 53 또는 54에 있어서, 상기 제2 폴리머의 B¹ 및 B² 각각은 화학식 -(CH₂)₂-NH-(CH₂)₂-NH-(CH₂)₂-R⁴-R⁵의 기인 것인 조성물.

청구항 56

청구항 53 내지 55 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 폴리머의 R⁵ 각각은 독립적으로 하기이고:





상기에서

R^2 의 각 경우는 독립적으로 수소 또는 C_1 - C_{12} 알킬기, 알케닐기, 사이클로알킬기 또는 사이클로알케닐기이거나, 또는 R^2 는 제2 R^2 와 조합하여 헤테로사이클릭기를 형성하고;

R^7 은 C_1 - C_{50} 알킬기, 알케닐기, 사이클로알킬기, 또는 사이클로알케닐기로, 선택적으로 1개 이상의 아민으로 치환되며;

z 는 1 내지 5의 정수이고;

c 는 0 내지 50의 정수이며;

Y 는 선택적으로 존재하고, 절단 가능한 링커이고;

n 은 0 내지 50의 정수이며;

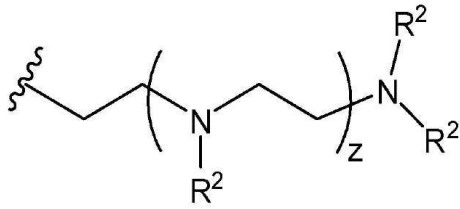
R^8 은 조직-특이적 또는 세포-특이적 표적화 모이어티인 것인 조성물.

청구항 57

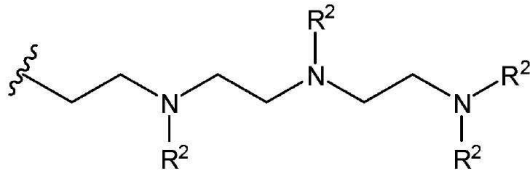
청구항 53 내지 56 중 어느 항에 있어서, 상기 제2 폴리머의 R^4 는 $-C(O)-O-$ 인 것인 조성물.

청구항 58

청구항 53 내지 57 중 어느 항에 있어서, 상기 제2 폴리머의 R^5 는



또는



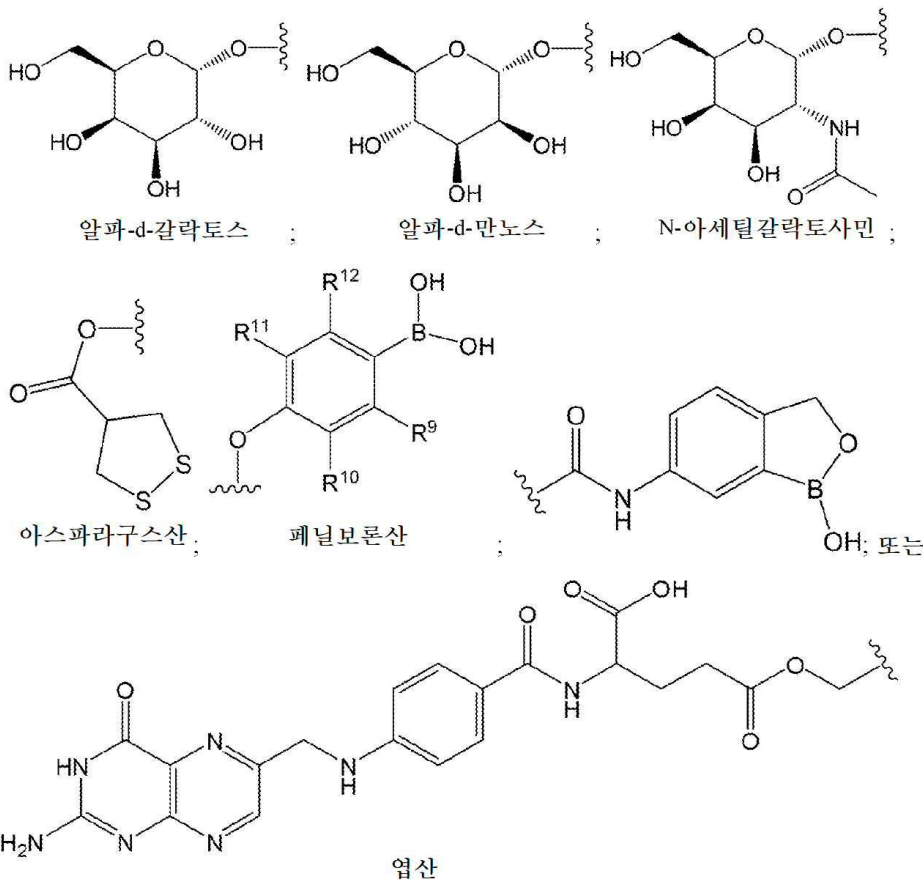
인 것인 조성물.

청구항 59

청구항 53 내지 58 중 어느 항에 있어서, 상기 제2 폴리머의 $(m^1 + m^2 + m^3 + m^4)/(n^1 + n^2)$ 의 비율은 약 25 이하, 선택적으로 약 1 이상인 것인 조성물.

청구항 60

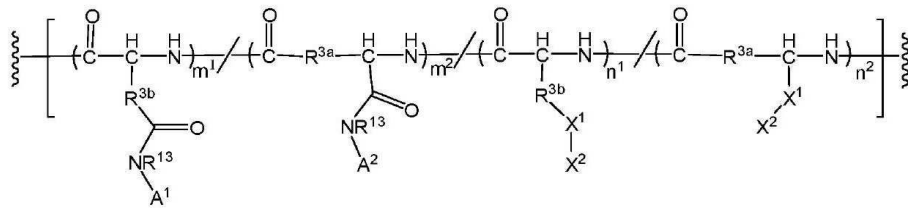
청구항 53 내지 59 중 어느 항에 있어서, 상기 제2 폴리머의 조직-특이적 또는 세포-특이적 표적화 모이어티는 하기이고:



상기에서 각 R^9 , R^{10} , R^{11} , 및 R^{12} 는 독립적으로 수소, 할로젠, C_1 - C_4 알킬, 또는 C_1 - C_4 알콕시로, 선택적으로 1개 이상의 아미노기로 치환되는 것인 조성물.

청구항 61

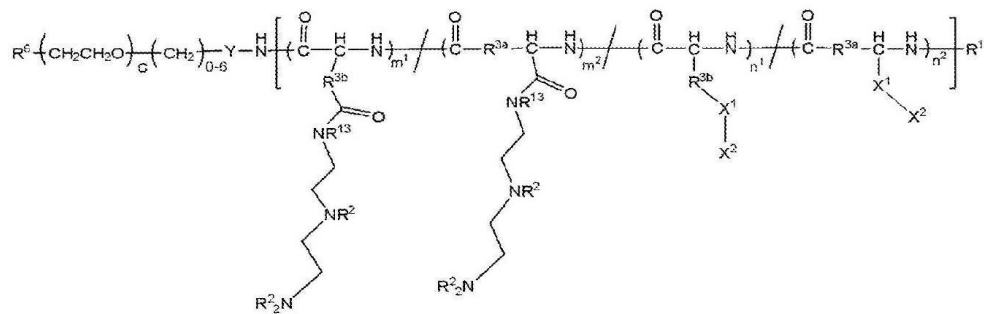
청구항 53에 있어서, 상기 제2 폴리머는 하기 화학식 4의 구조를 가지며:



상기에서 m^1 , m^2 , n^1 , n^2 , R^{3a} , R^{3b} , R^{13} , X^1 , X^2 , A^1 , 및 A^2 는 청구항 49에 정의된 바와 같은 것인 조성물.

청구항 62

청구항 53에 있어서, 상기 제2 폴리머는 하기 화학식 3B의 구조를 가지며:



상기에서

c 는 0 내지 50의 정수이고;

Y 는 선택적으로 존재하고, 절단 가능한 링커이며;

R^1 은 수소, 아틸기, 헤테로사이클릭기, C_1 - C_{12} 알킬기, C_2 - C_{12} 알케닐기, C_3 - C_{12} 사이클로알킬기, 또는 C_3 - C_{12} 사이클로알케닐기이고, 이들 중 임의의 기는 선택적으로 하나 이상의 치환기로 치환되며;

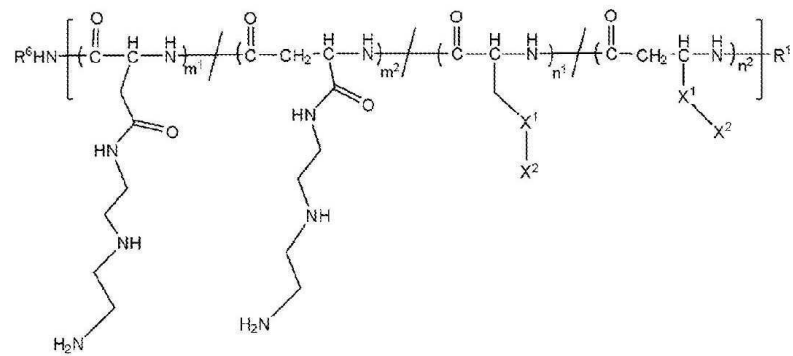
R^2 의 각 경우는 독립적으로 수소 또는 C_1 - C_{12} 알킬기, C_2 - C_{12} 알케닐기, C_3 - C_{12} 사이클로알킬기, 또는 C_3 - C_{12} 사이클로알케닐기이고;

R^6 은 수소, 아미노기, 아틸기, 헤테로사이클릭기, C_1 - C_{12} 알킬기, C_1 - C_{12} 헤테로알킬기, C_2 - C_{12} 알케닐기, C_3 - C_{12} 사이클로알킬기, 또는 C_3 - C_{12} 사이클로알케닐기로, 선택적으로 1개 이상의 아민으로 치환되거나; 또는 조직-특이적 또는 세포-특이적 표적화 모이어티이고;

m^1 , m^2 , n^1 , n^2 , R^{3a} , R^{3b} , R^{13} , X^1 , X^2 , A^1 , 및 A^2 는 청구항 49에 정의된 바와 같은 것인 조성물.

청구항 63

청구항 53에 있어서, 상기 제2 폴리머는 하기 화학식 3C의 구조를 가지며:



상기에서

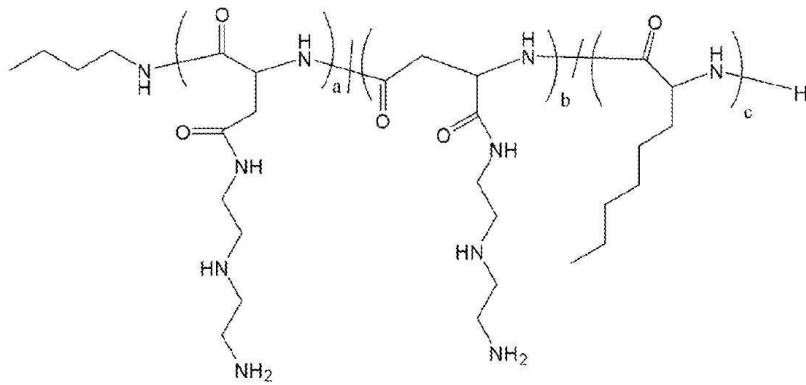
R¹은 수소, 아릴기, 헤테로사이클릭기, C₁-C₁₂ 알킬기, C₂-C₁₂ 알케닐기, C₃-C₁₂ 사이클로알킬기 또는 C₃-C₁₂ 사이클로알케닐기이고, 이들 중 임의의 기는 선택적으로 하나 이상의 치환기로 치환되며;

R⁶은 수소, 아미노기, 아릴기, 헤테로사이클릭기, C₁-C₁₂ 알킬기, C₁-C₁₂ 헤테로알킬기, C₂-C₁₂ 알케닐기, C₃-C₁₂ 사이클로알킬기, 또는 C₃-C₁₂ 사이클로알케닐기이고, 이들 중 임의의 기는 선택적으로 1개 이상의 아민으로 치환되거나; 또는 조직-특이적 또는 세포-특이적 표적화 모이어티이며;

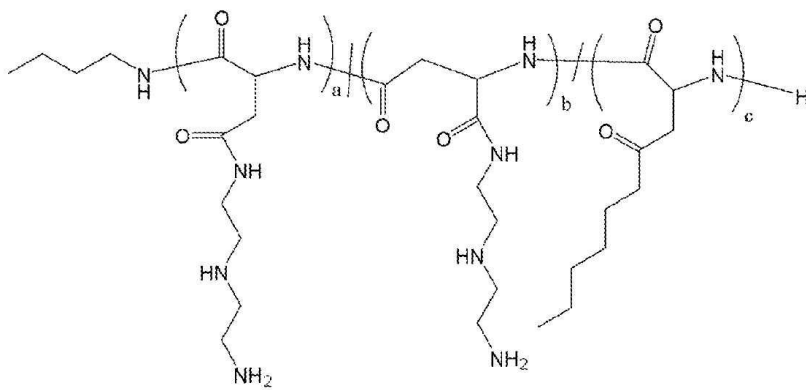
m¹, m², n¹, n², R^{3a}, R^{3b}, R¹³, X¹, X², A¹, 및 A²는 청구항 49에 정의된 바와 같은 것인 조성물.

청구항 64

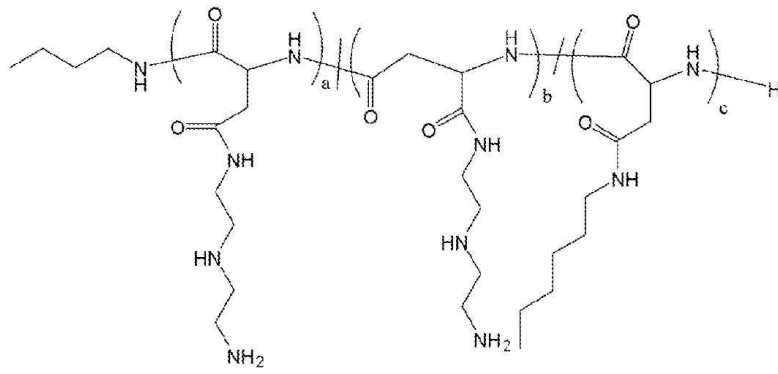
청구항 44에 있어서, 상기 제2 폴리머는 하기 화학식의 폴리머를 가지며:



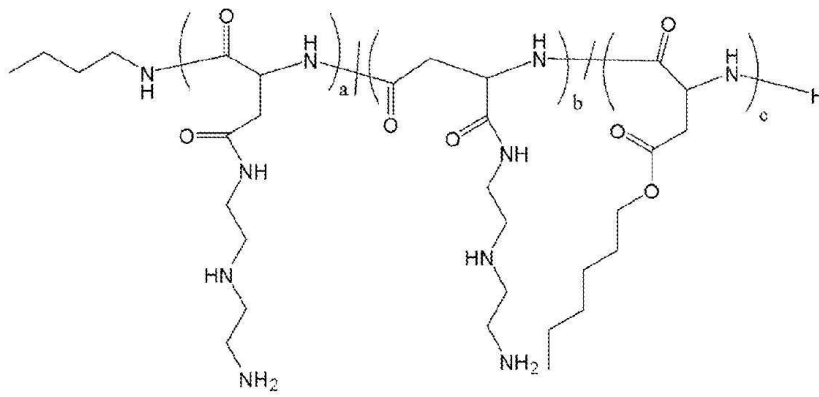
폴리머 1



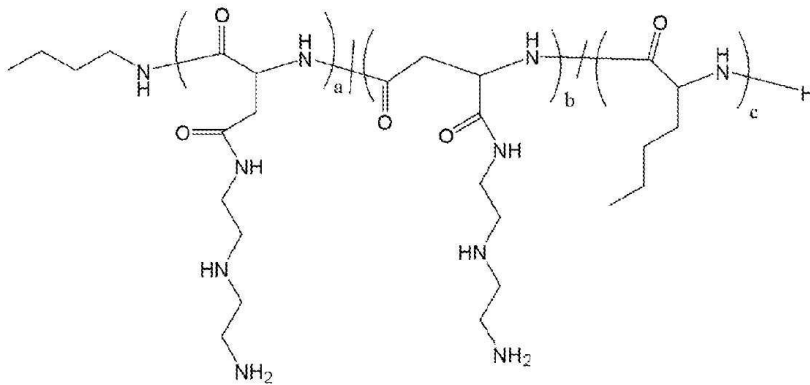
폴리머 2



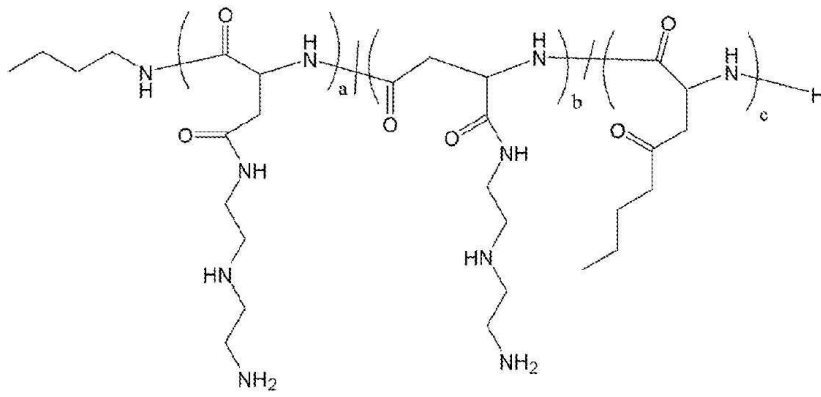
폴리머 3



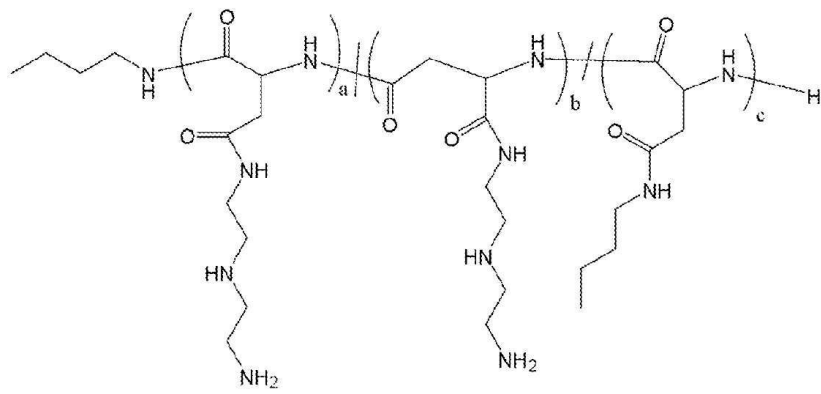
폴리머 4



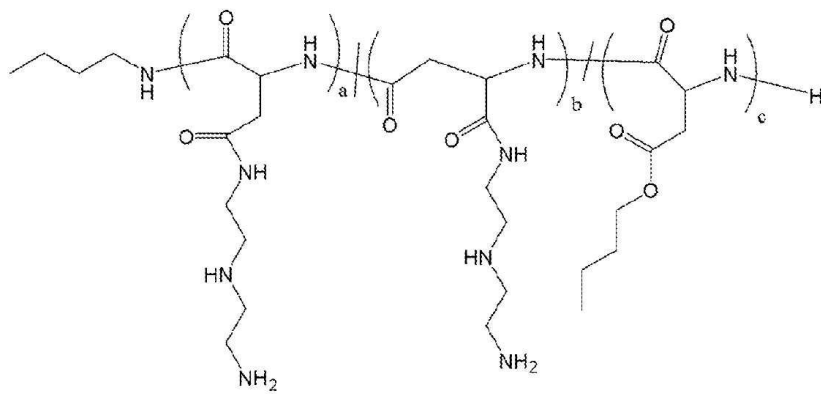
폴리머 5



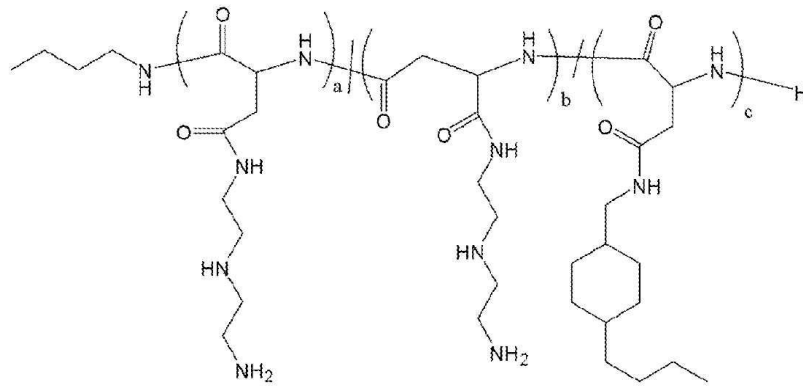
폴리머 6



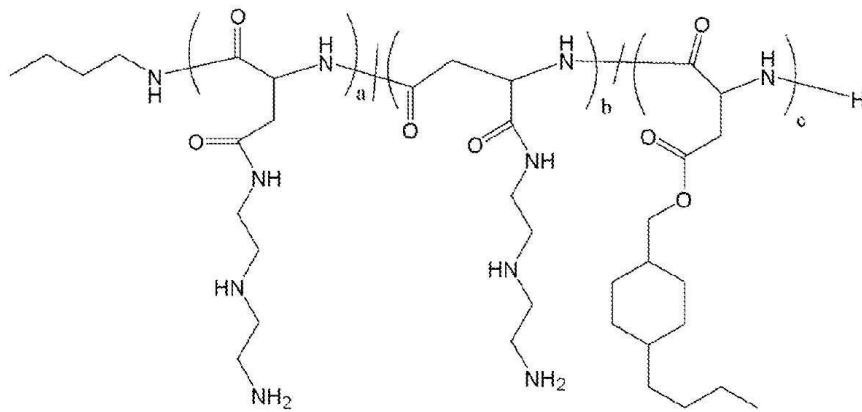
폴리머 7



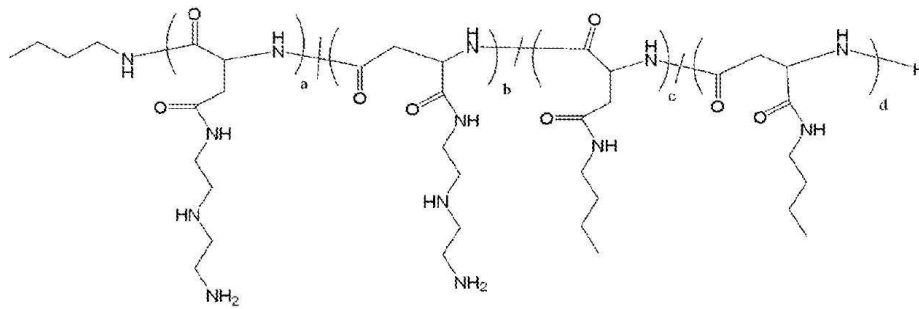
폴리머 8



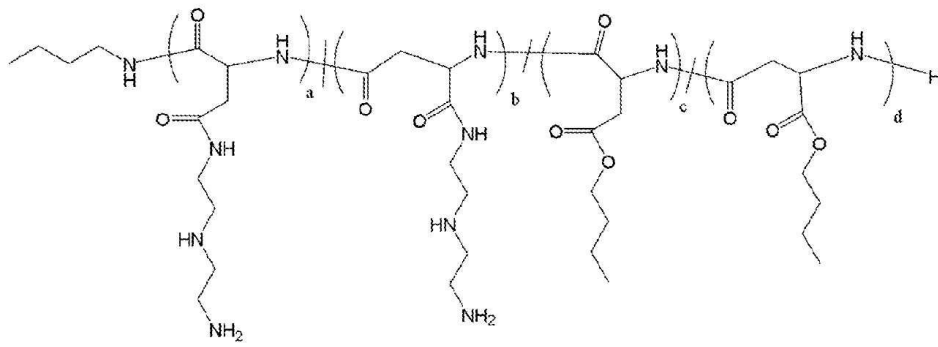
폴리머 9



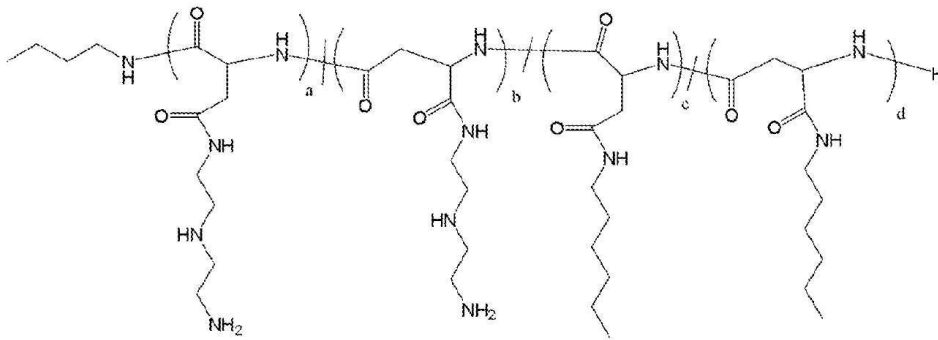
폴리머 10



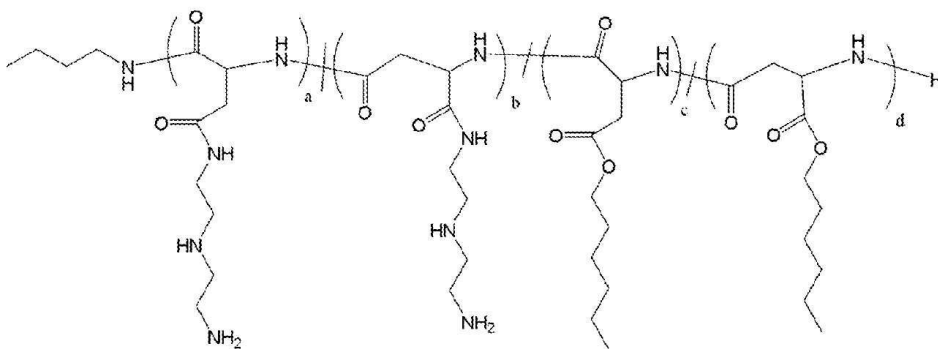
폴리머 11



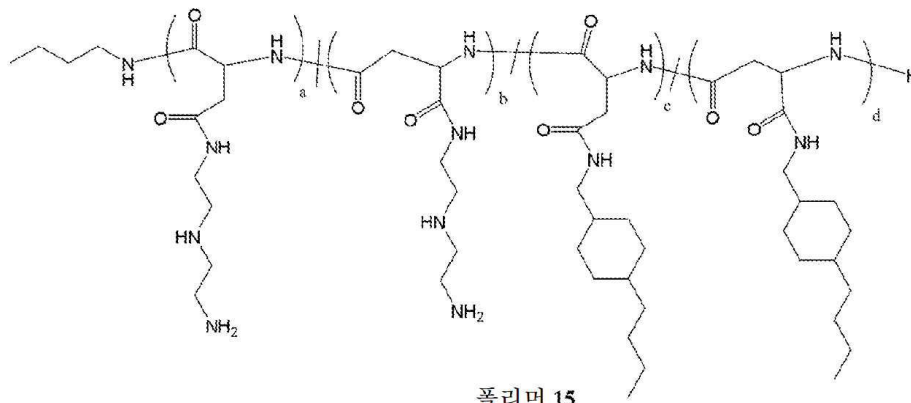
폴리머 12



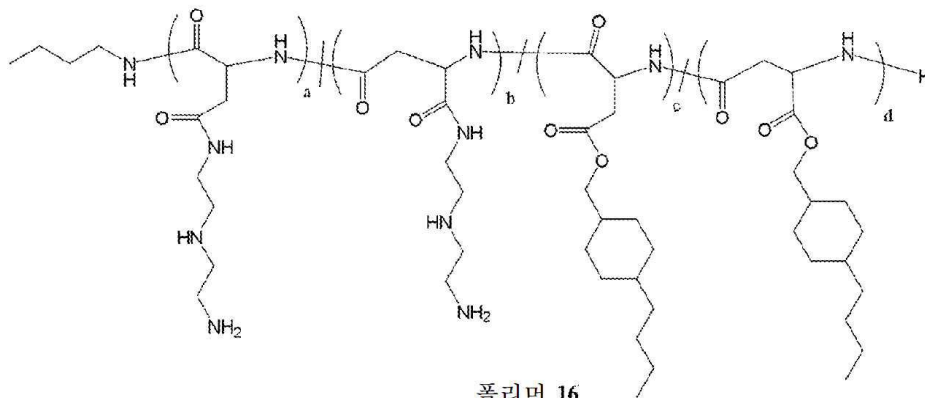
폴리머 13



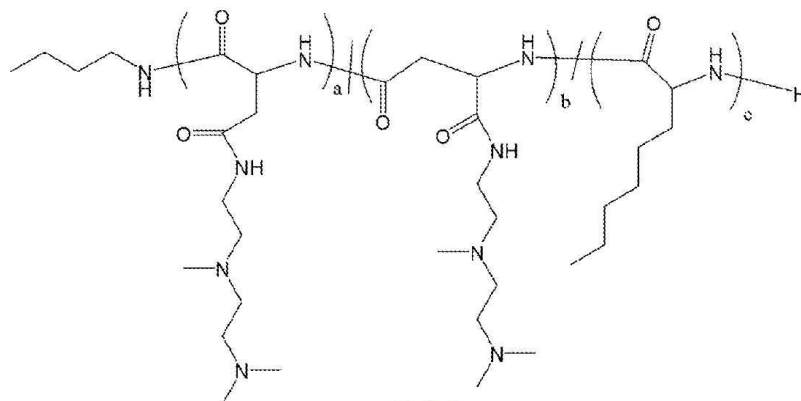
폴리머 14



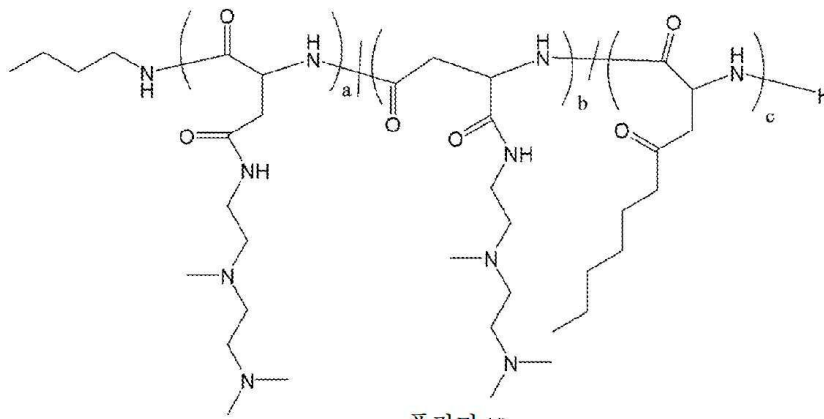
폴리머 15



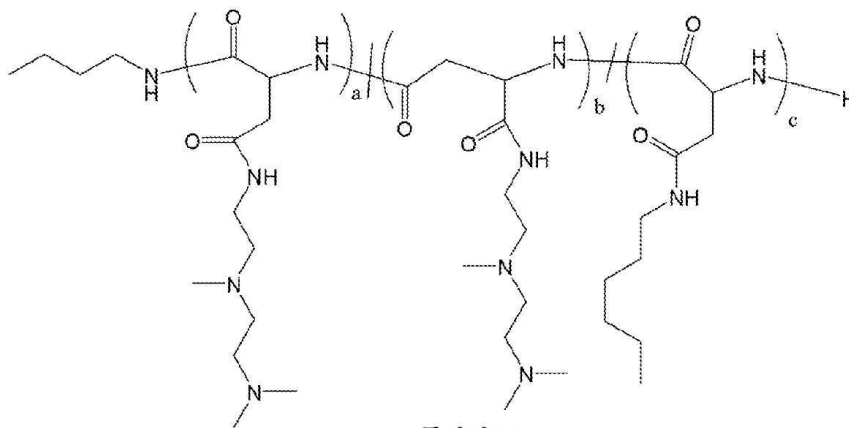
폴리머 16



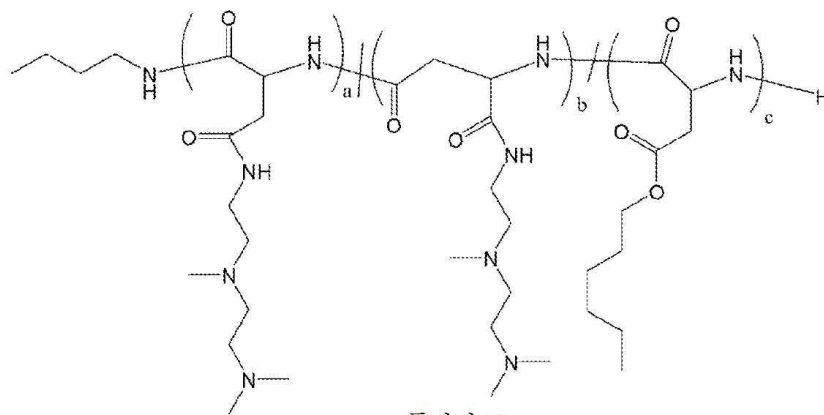
폴리머 17



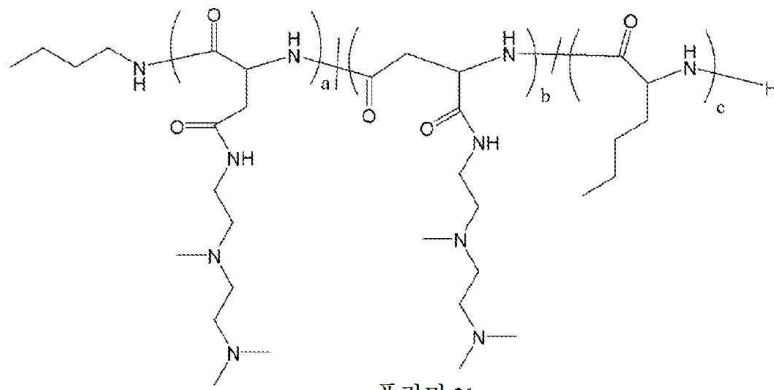
폴리머 18



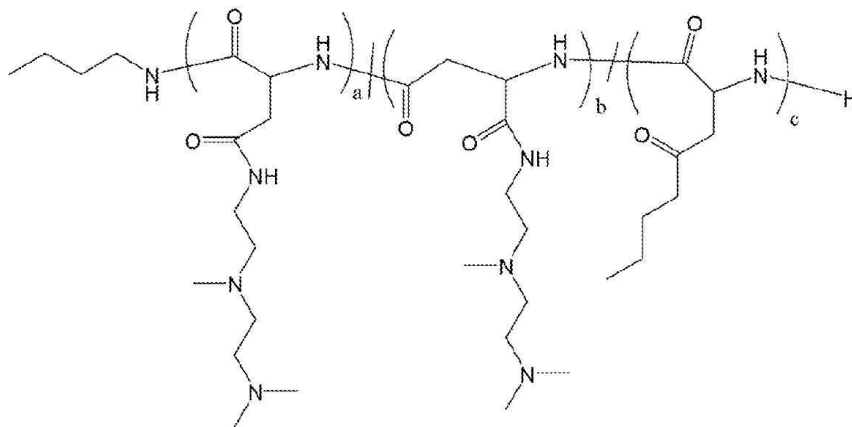
폴리머 19



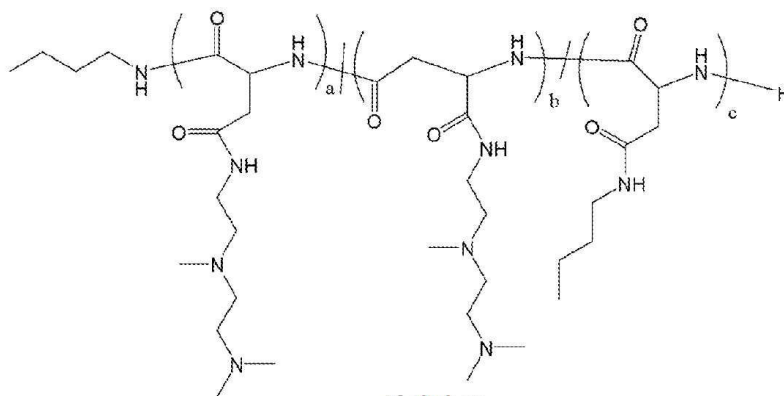
폴리머 20



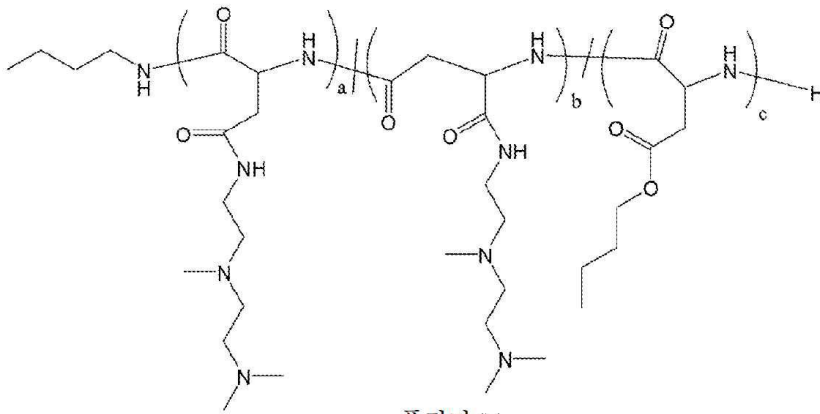
폴리머 21



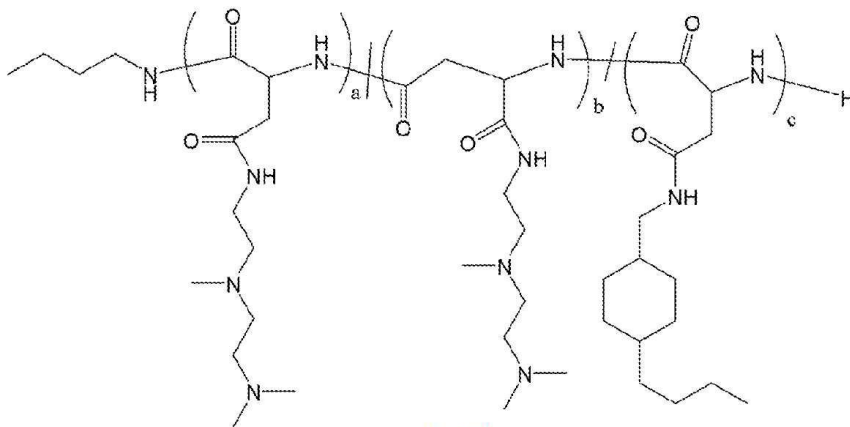
폴리머 22



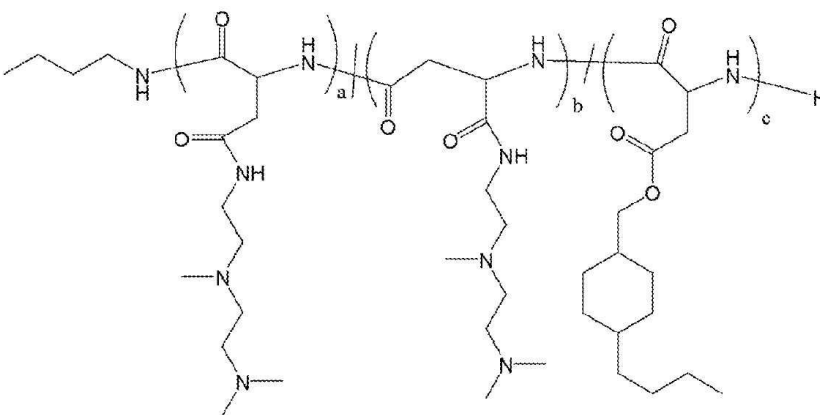
폴리머 23



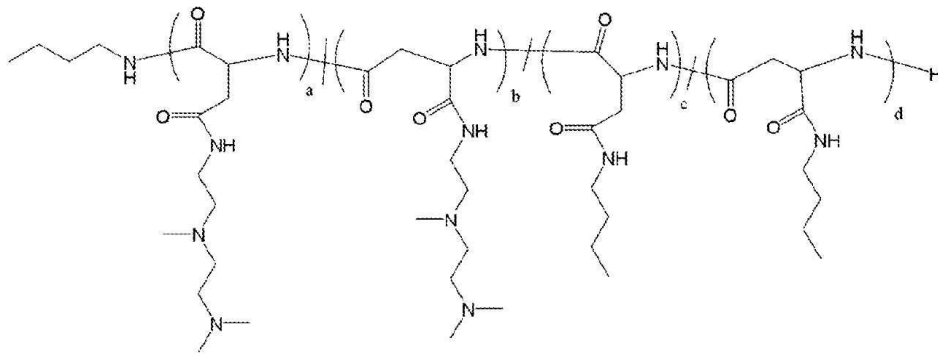
폴리머 24



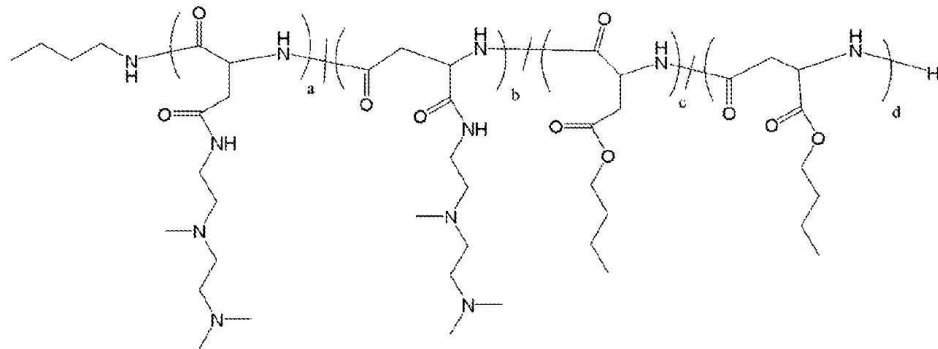
폴리머 25



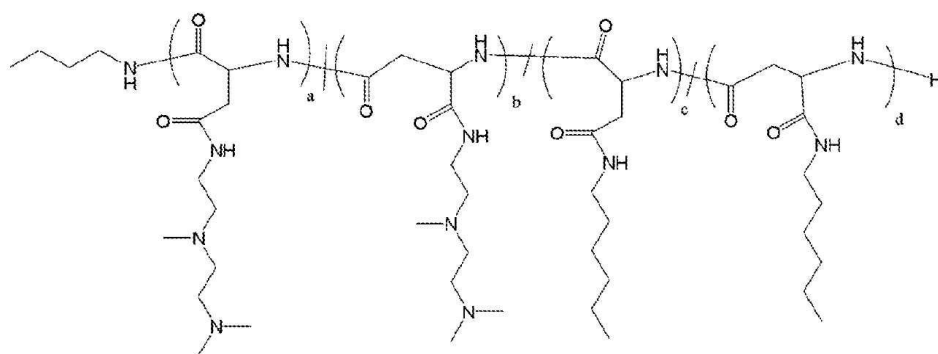
폴리머 26



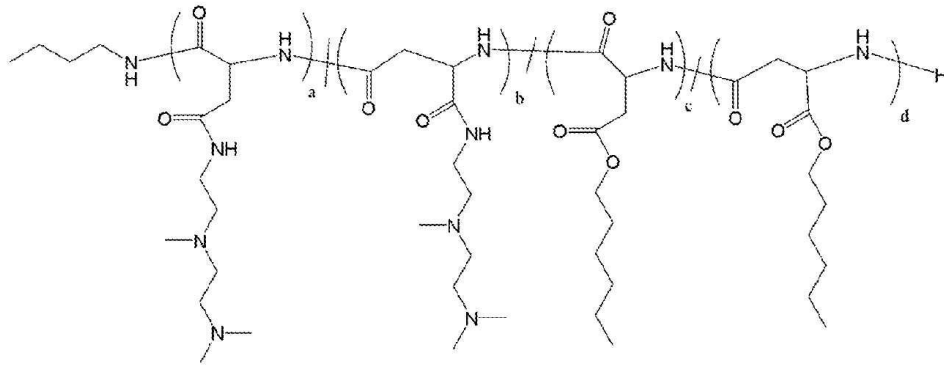
폴리머 27



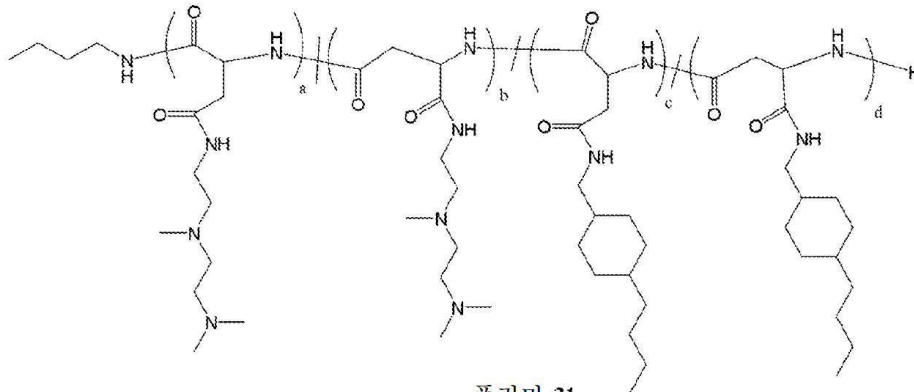
폴리머 28



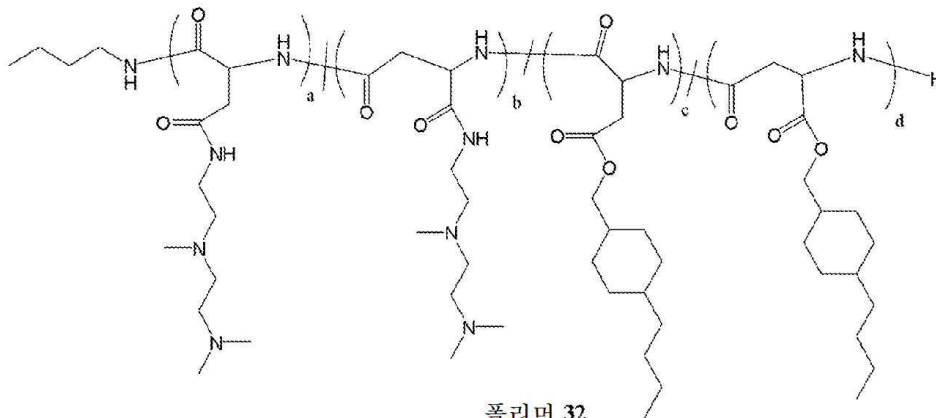
폴리머 29



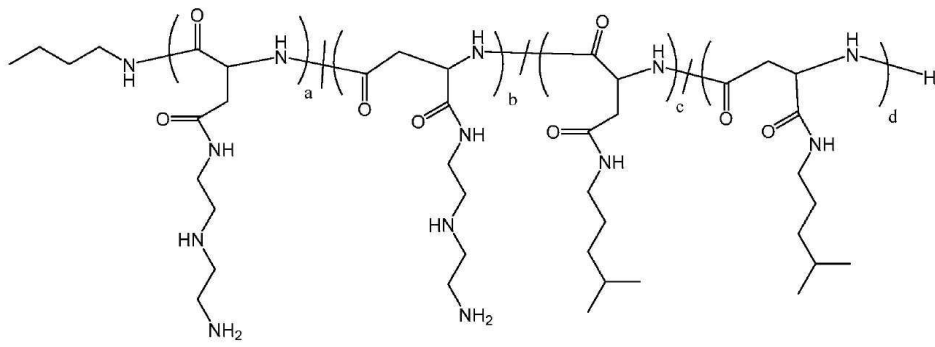
폴리머 30



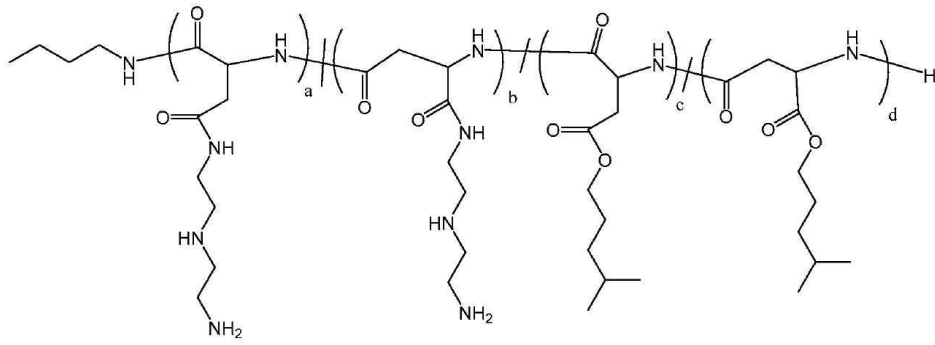
폴리머 31



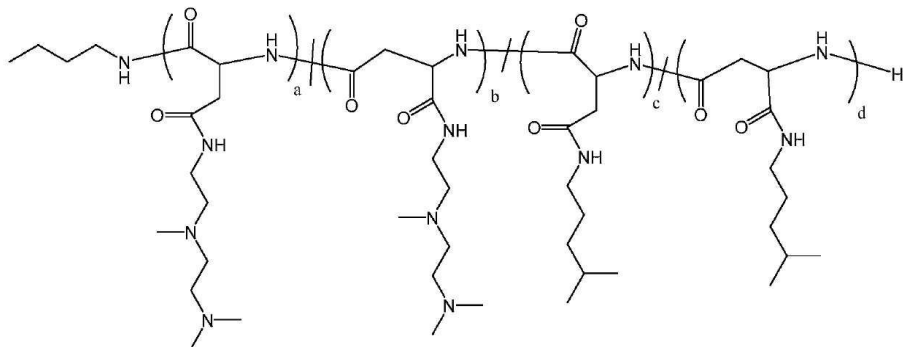
폴리머 32



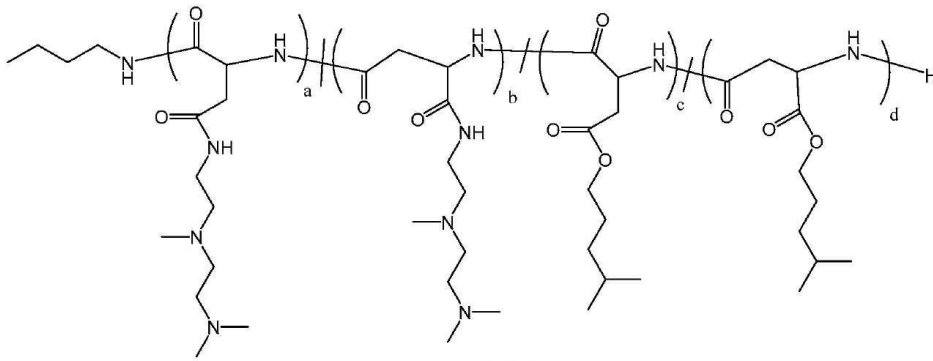
폴리머 33



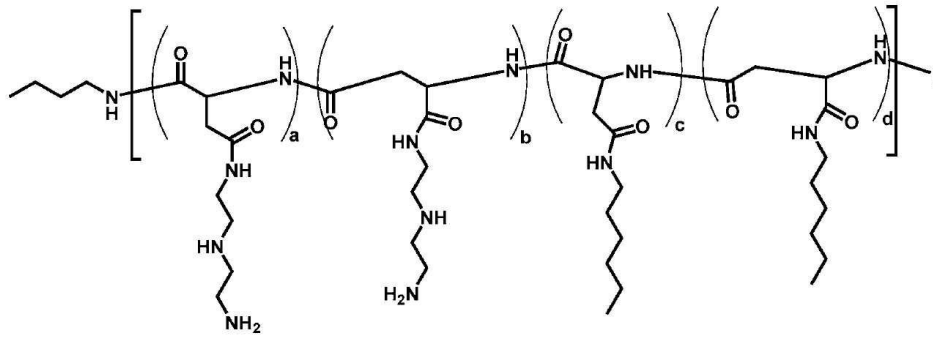
폴리머 34



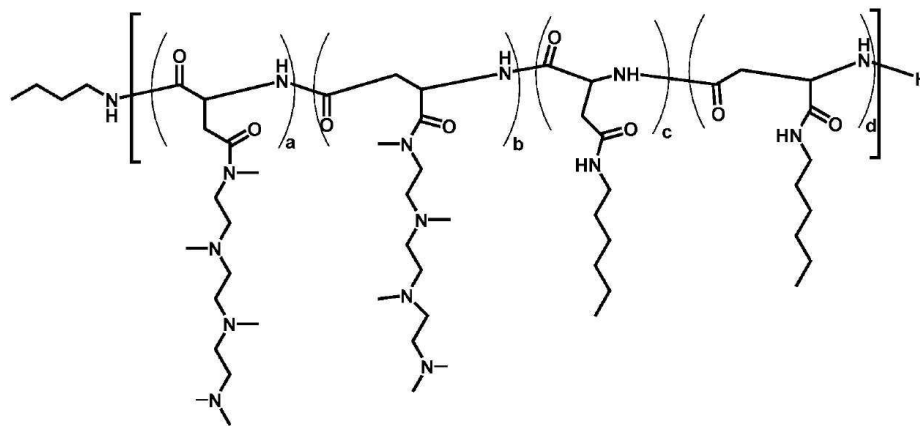
폴리머 35



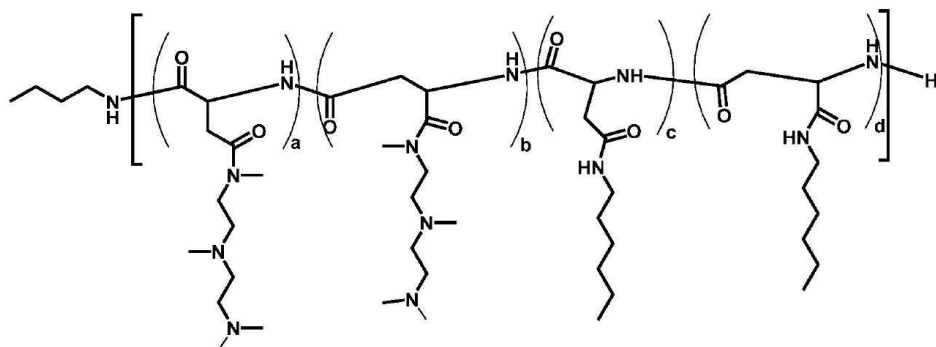
폴리머 36



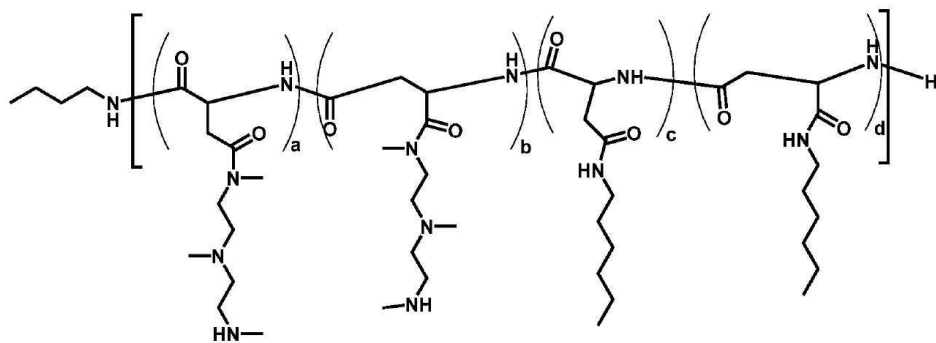
폴리머 37



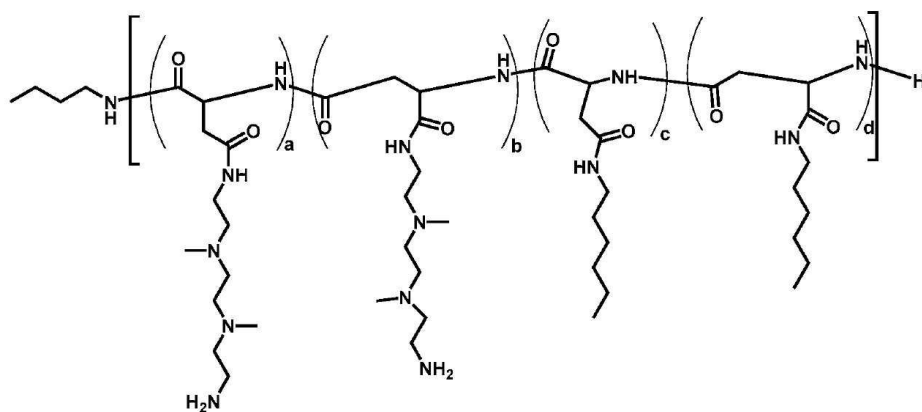
폴리머 38



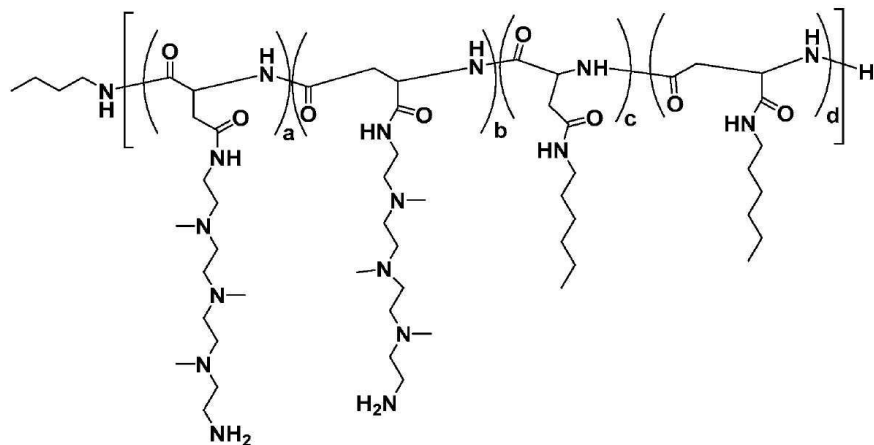
폴리머 39



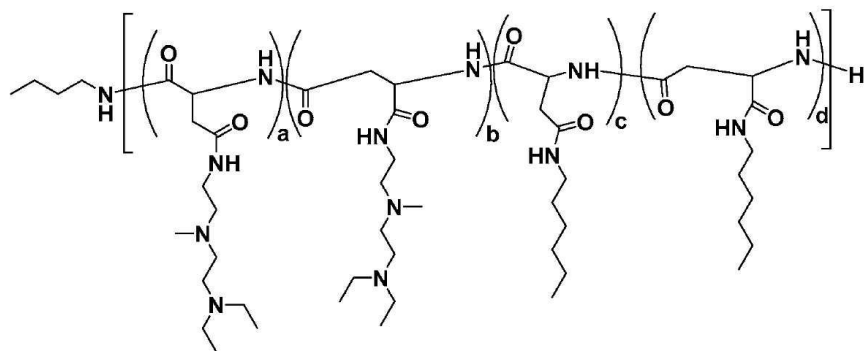
폴리머 40



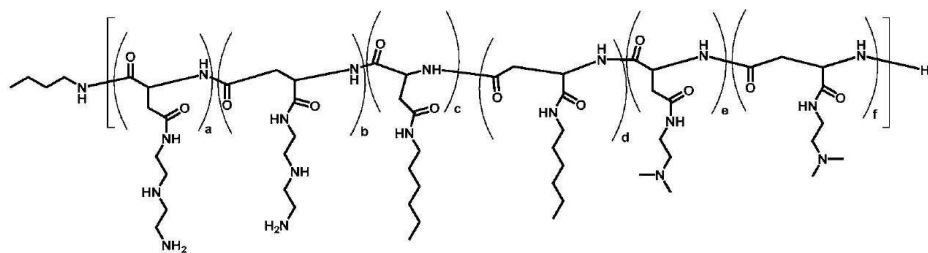
폴리머 41



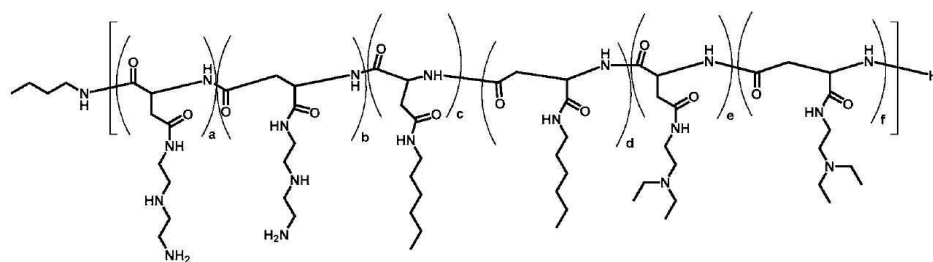
폴리머 42



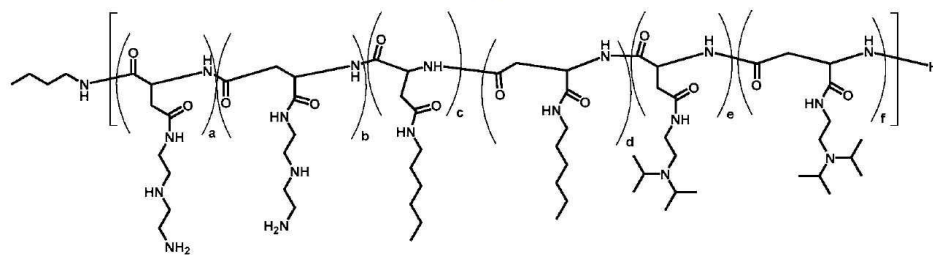
폴리머 43



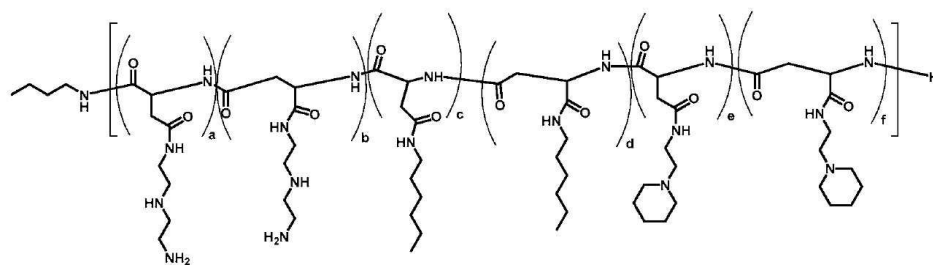
폴리머 44



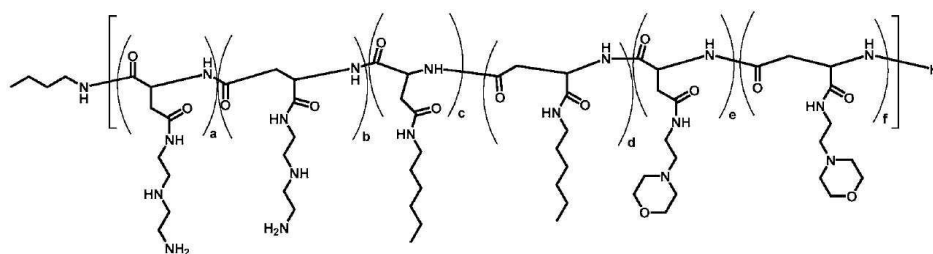
폴리머 45



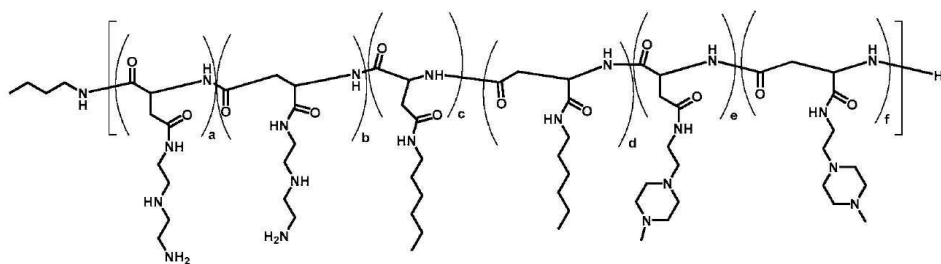
폴리머 46



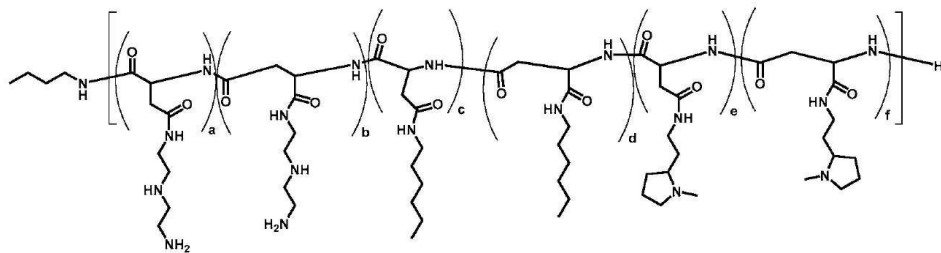
폴리머 47



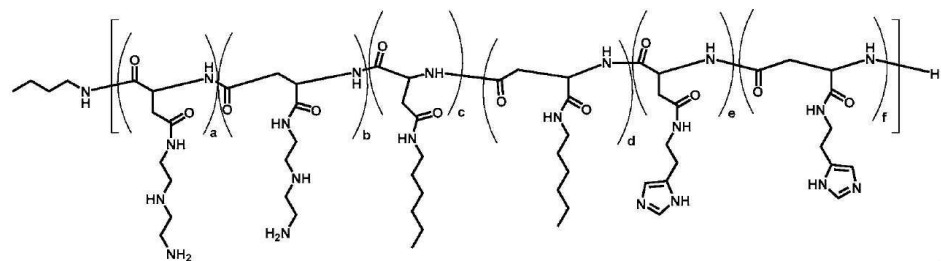
폴리머 48



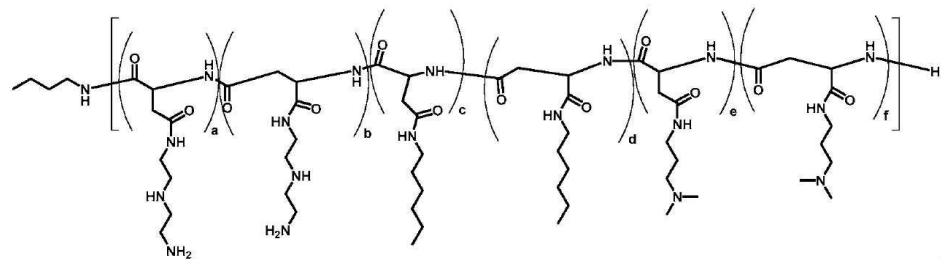
폴리머 49



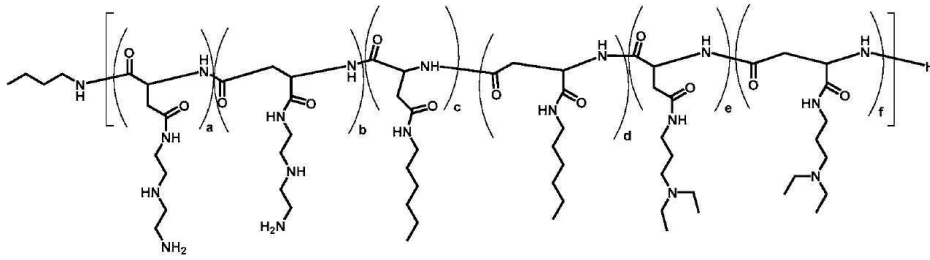
폴리머 50



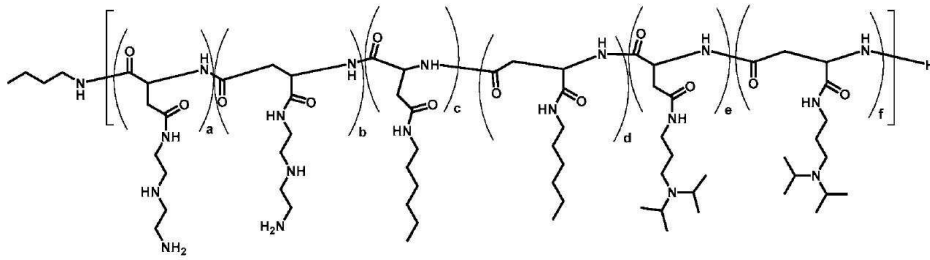
폴리머 51



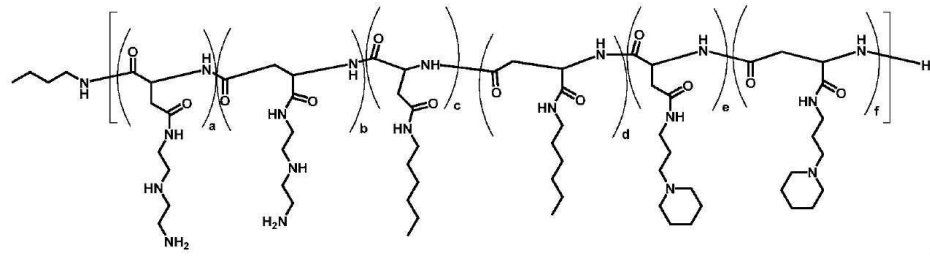
폴리머 52



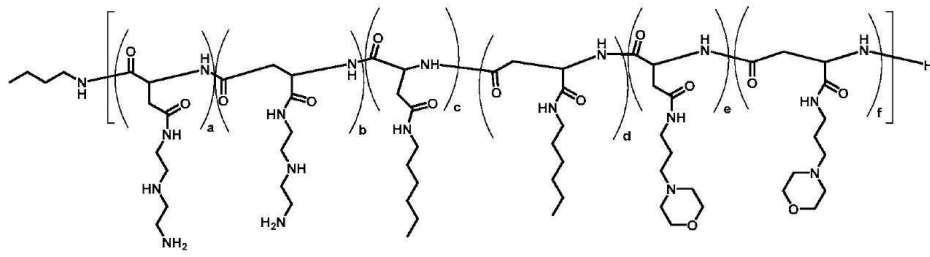
폴리머 53



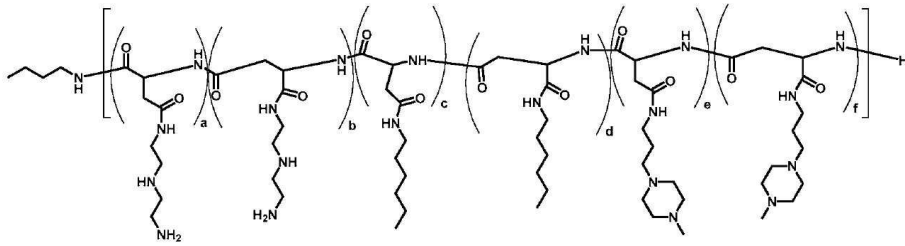
폴리머 54



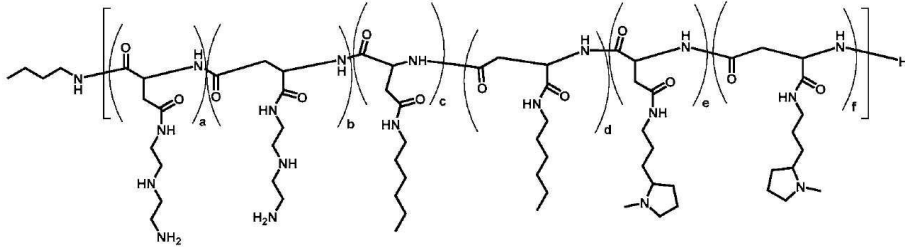
폴리머 55



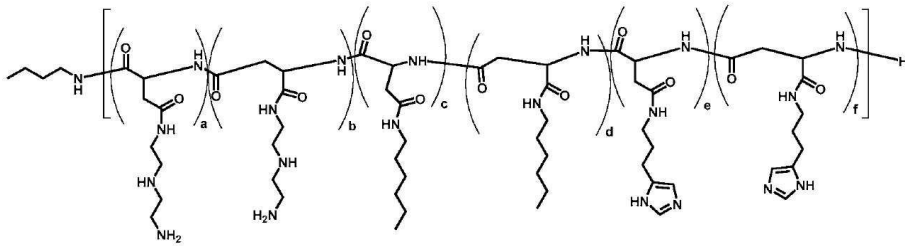
폴리머 56



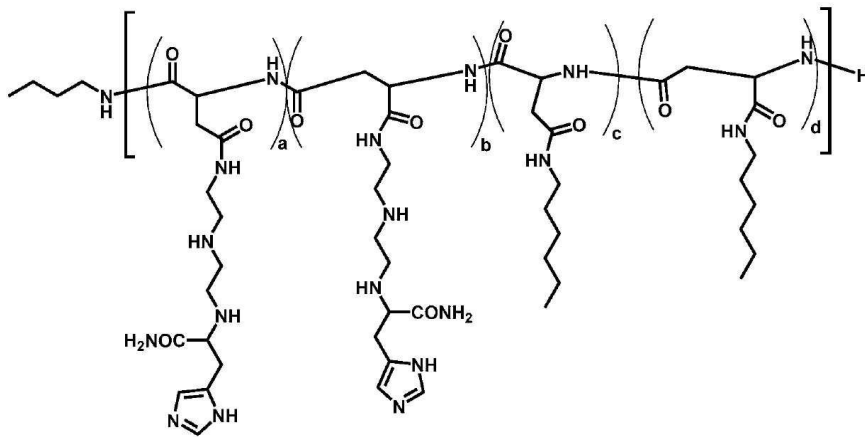
폴리머 57



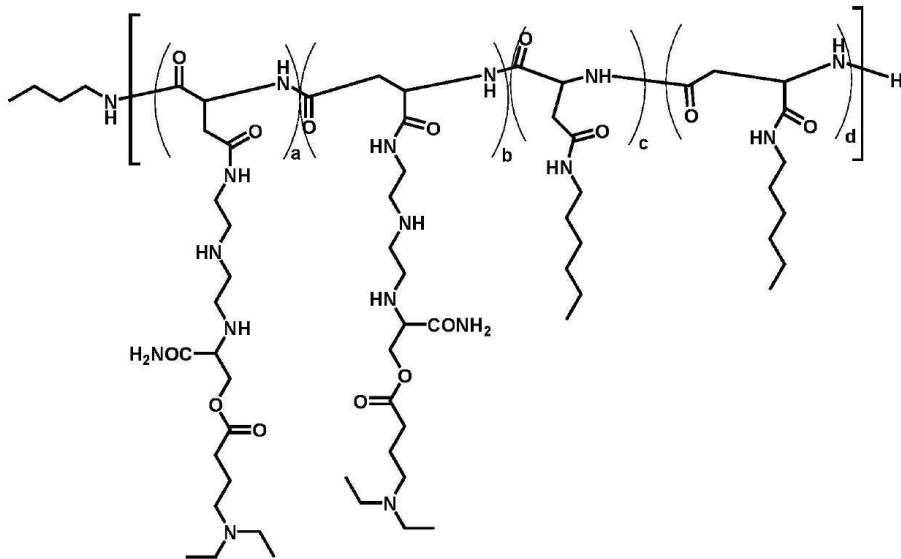
폴리머 58



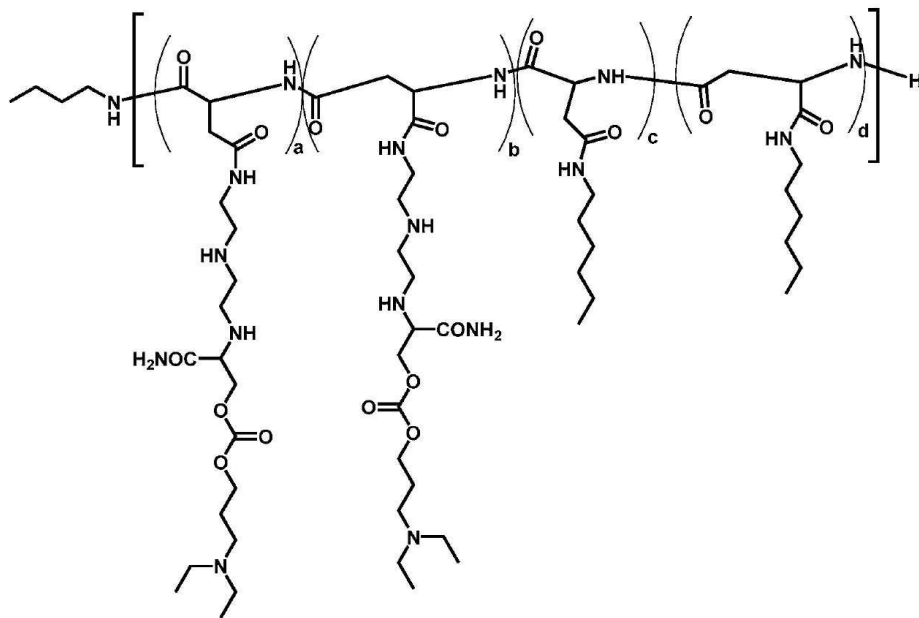
폴리머 59



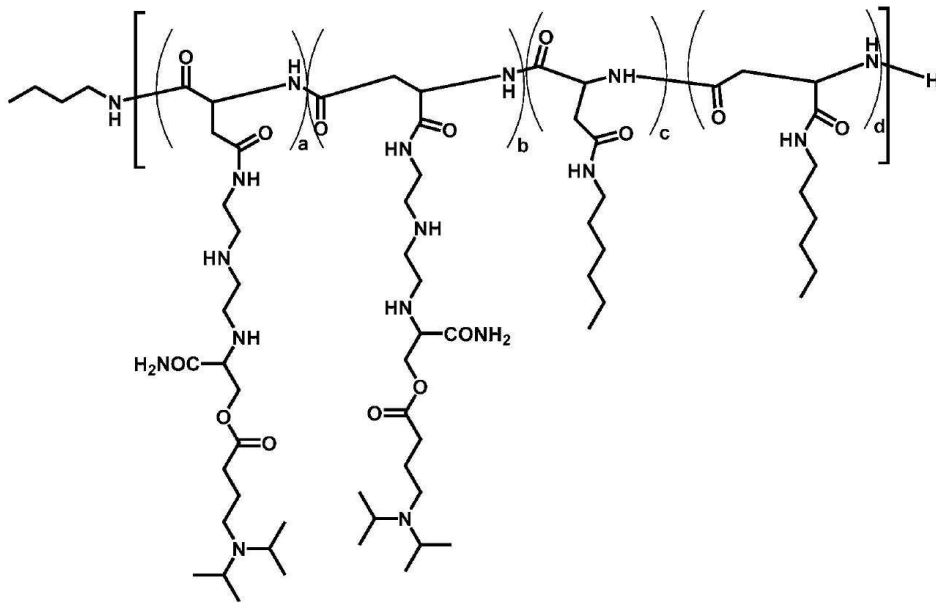
폴리머 60



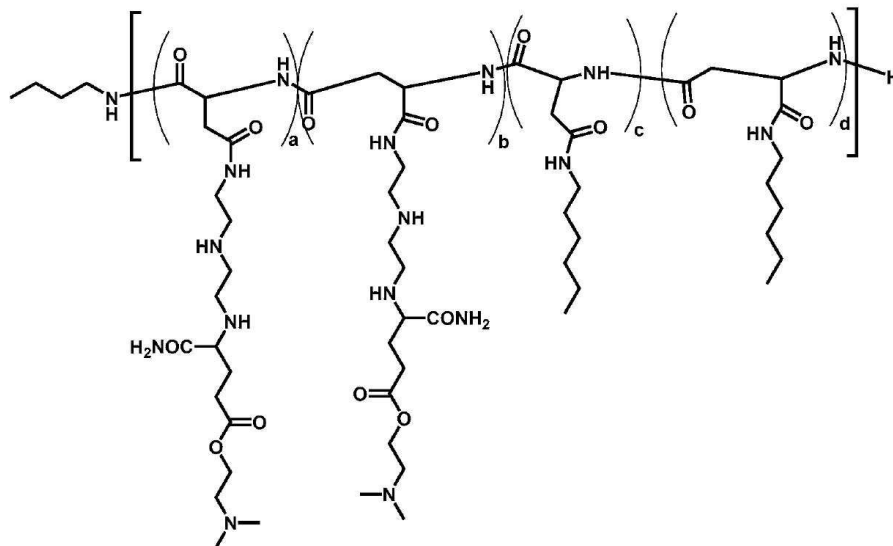
폴리머 61



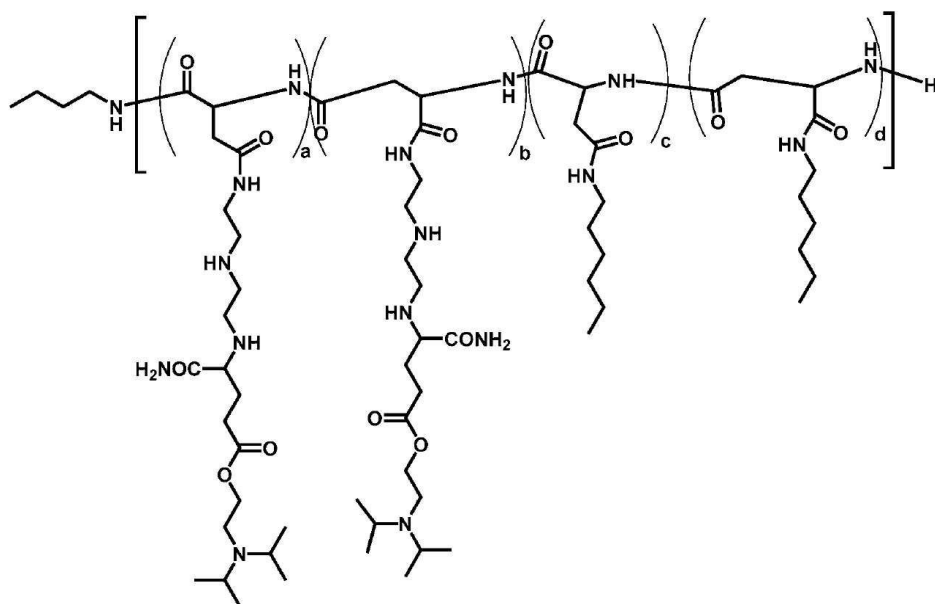
폴리머 62



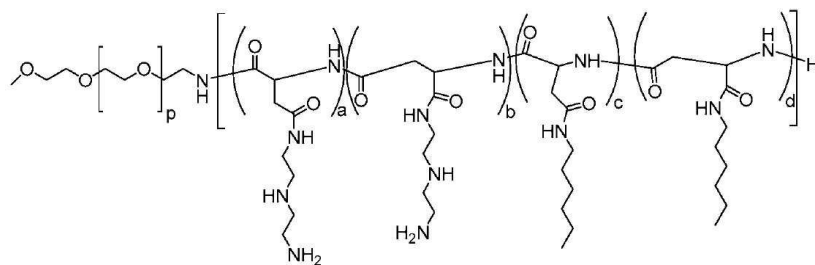
폴리머 65



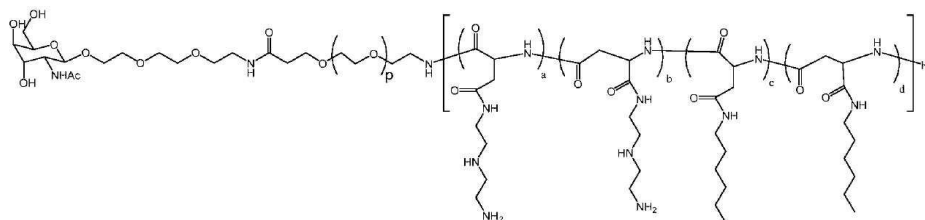
폴리머 66



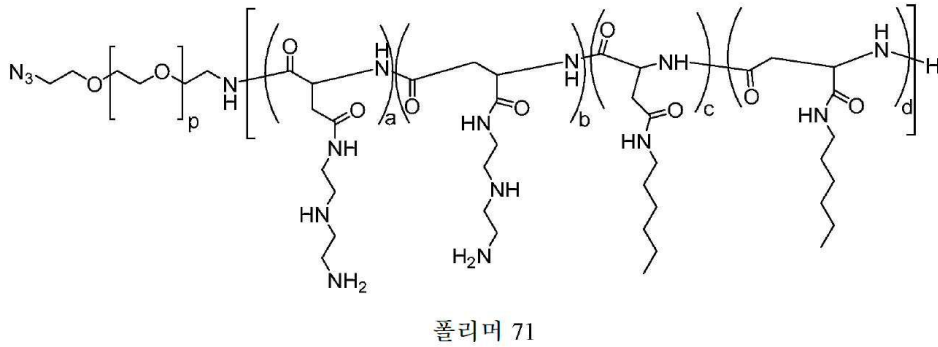
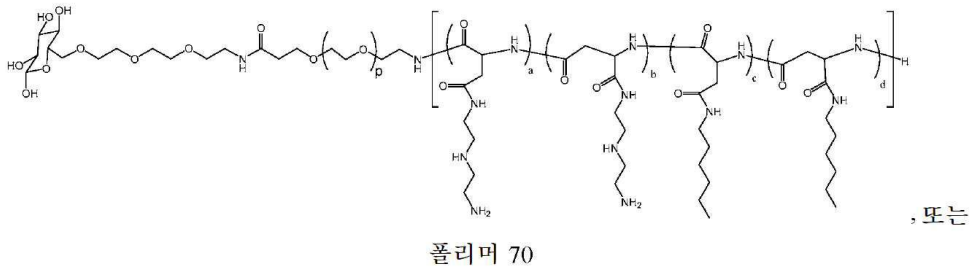
폴리머 67



폴리머 68



폴리머 69



상기에서 (a+b)는 약 5 내지 약 65이고, (c+d)는 약 2 내지 약 60이며, (e+f)는 약 2 내지 약 60인 것인 조성물.

청구항 65

청구항 44 내지 64 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 제1 폴리머 및 제2 폴리머의 중량의 총합을 기준으로 상기 제1 폴리머를 약 1 wt.% 내지 약 60 wt.% 포함하는 것인 조성물.

청구항 66

청구항 65에 있어서, 상기 조성물은 제1 폴리머 및 제2 폴리머의 중량의 총합을 기준으로 상기 제1 폴리머를 약 5 wt.% 내지 약 50 wt.% 포함하는 것인 조성물.

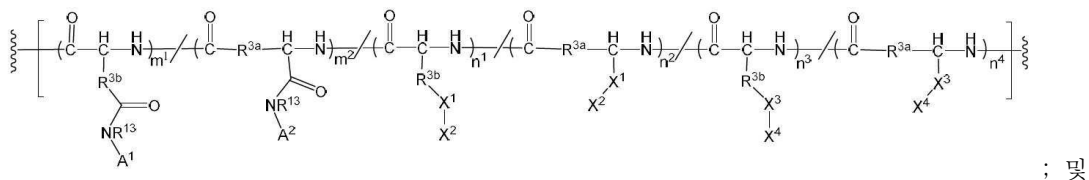
청구항 67

청구항 66에 있어서, 상기 조성물은 제1 폴리머 및 제2 폴리머의 중량의 총합을 기준으로 상기 제1 폴리머를 약 20 wt.% 내지 약 40 wt.% 포함하는 것인 조성물.

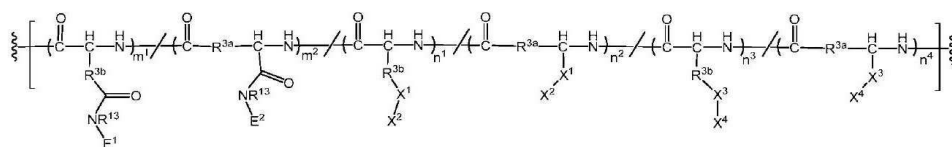
청구항 68

청구항 17에 따른 화학식 2의 구조를 포함하는 폴리머를 제조하는 방법으로서, 상기 방법은:

(a) 화학식 5의 구조를 포함하는 폴리머를 제공하는 단계:

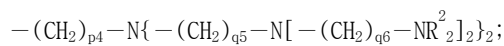
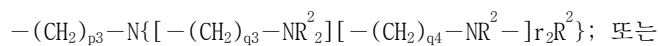
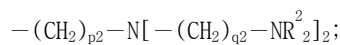
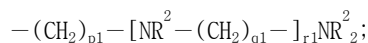


(b) 화학식 5의 구조를 포함하는 폴리머의 A¹ 및/또는 A² 기의 일부를 변형시켜서 화학식 2의 구조를 포함하는 폴리머를 제공하는 단계를 포함하고:

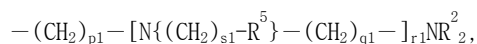
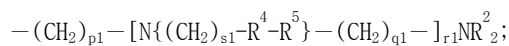
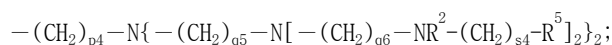
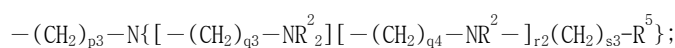
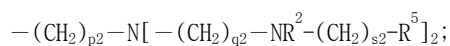
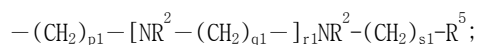
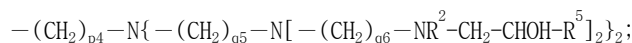
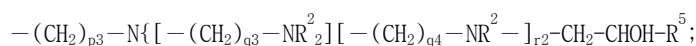
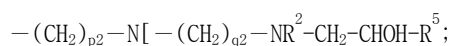
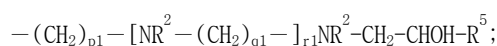
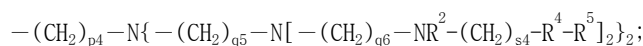
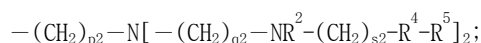
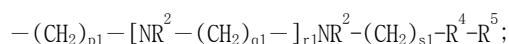
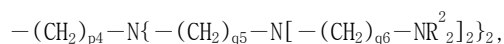
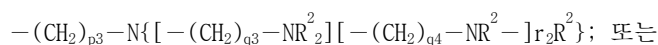
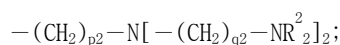
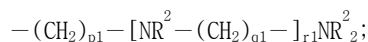


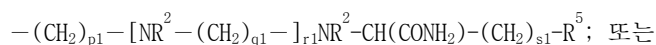
상기에서,

각 A^1 및 A^2 는 각각 독립적으로 하기 화학식의 기이고:

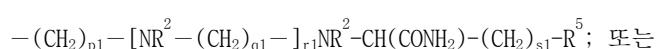
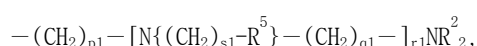
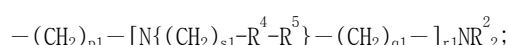
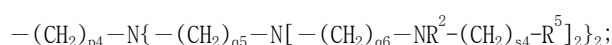
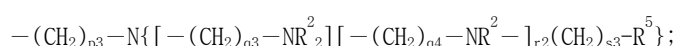
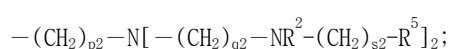
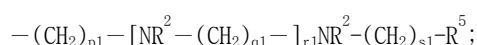
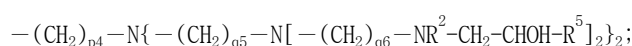
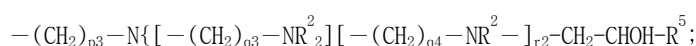
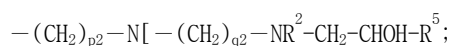
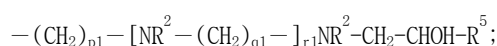
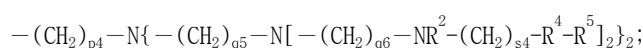
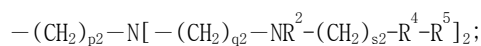
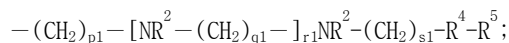


각 E^1 및 E^2 는 각각 독립적으로 하기 화학식의 기이며:





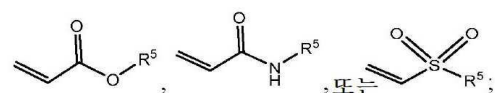
단 E¹ 및/또는 E²의 적어도 일부는 하기로부터 선택되고:



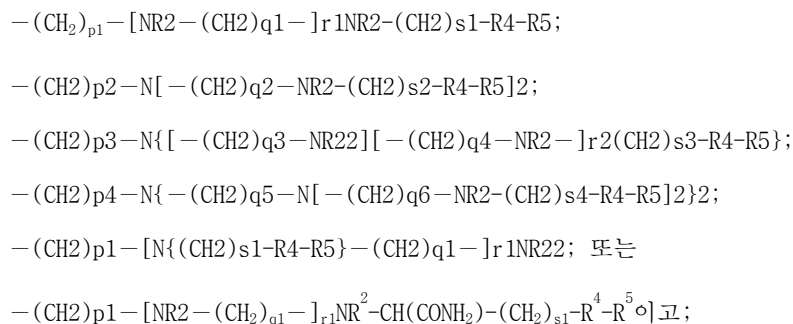
화학식 2 및 5 중 m¹, m², n¹, n², n³, n⁴, R^{3a}, R^{3b}, R¹³, X¹, X², X³, X⁴, E¹, 및 E²는 청구항 17에 정의된 바와 같은 것인 방법.

청구항 69

청구항 68에 있어서, 화학식 5의 구조를 포함하는 폴리머의 A¹ 및/또는 A² 기의 일부를 변형시키는 단계는 기의 일부를 하기 구조를 갖는 화합물과 반응시켜서 화학식 2의 구조를 포함하는 폴리머를 제공하는 단계를 포함하며:

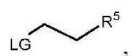


상기 E¹ 및/또는 E² 기의 적어도 일부는:

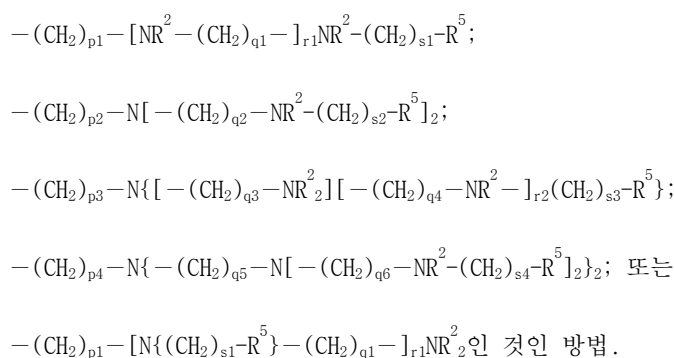


또는

화학식 5의 구조를 포함하는 폴리머의 A¹ 및/또는 A² 기의 일부를 변형시키는 단계는 기의 일부를 하기 구조를 갖는 화합물과 반응시켜서 화학식 2의 구조를 포함하는 폴리머를 제공하는 단계를 포함하며:

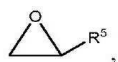


상기 E¹ 및/또는 E² 기의 적어도 일부는:

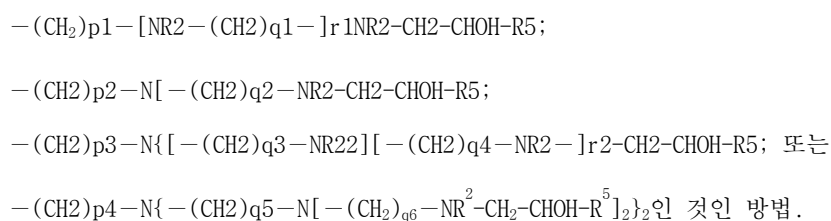


청구항 70

청구항 68에 있어서, 화학식 5의 구조를 포함하는 폴리머의 A¹ 및/또는 A² 기의 일부를 변형시키는 단계는 기의 일부를 하기 구조를 갖는 화합물과 반응시켜서 화학식 2의 구조를 포함하는 폴리머를 제공하는 단계를 포함하며:

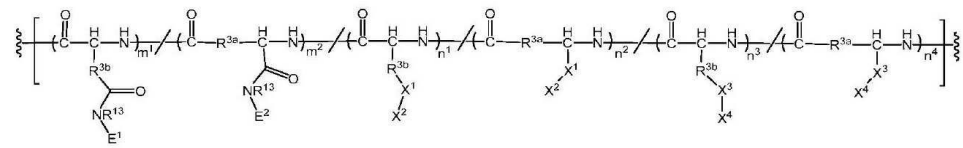


상기 E¹ 및/또는 E² 기의 적어도 일부는



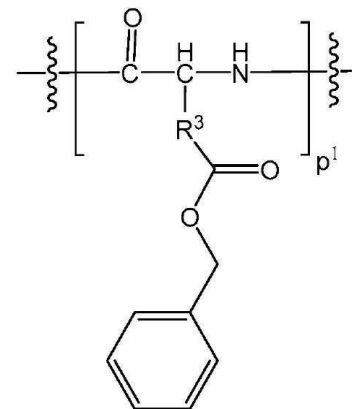
청구항 71

화학식 2의 구조를 포함하는 폴리머를 제조하는 방법으로서:



상기 방법은:

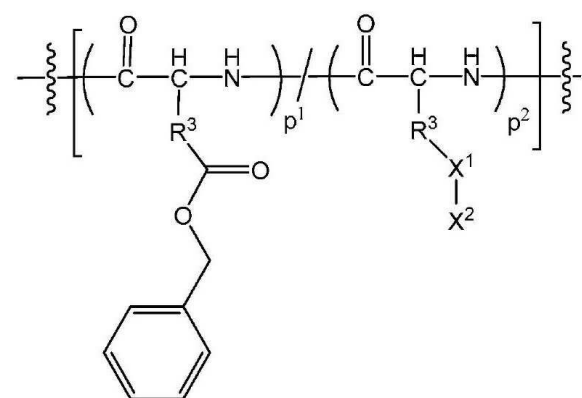
(I) 화학식 6의 구조를 포함하는 폴리머를:



(a) 화학식 $\text{HNR}^{13}\text{E}^1$ 및/또는 $\text{HNR}^{13}\text{E}^2$ 의 화합물; (b) 화학식 H_2NX^4 또는 HOX^4 의 화합물; 및 (c) 화학식 H_2NX^2 또는 HOX^2 의 화합물과, 동시에 또는 임의의 순차적 순서로 반응시키는 단계;

또는

(II) 화학식 7의 구조를 포함하는 폴리머를:



(a) 화학식 $\text{HNR}^{13}\text{E}^1$ 및/또는 $\text{HNR}^{13}\text{E}^2$ 의 화합물, 및 (b) 화학식 H_2NX^4 또는 HOX^4 의 화합물과, 동시에 또는 임의의 순차적 순서로 반응시키는 단계를 포함하며;

상기에서,

p^1 은 1 내지 2000의 정수이고;

p^2 는 1 내지 2000의 정수이며;

각 R^3 은 독립적으로 메틸렌 또는 에틸렌 기이고;

$m^1, m^2, n^1, n^2, n^3, n^4, R^{3a}, R^{3b}, R^{13}, X^1, X^2, X^3, X^4, E^1$, 및 E^2 는 청구항 17에 정의된 바와 같고,

선택적으로, 상기에서,

각 m^1 및 m^2 는 5 내지 100의 정수이고;

각 n^1 및 n^2 는 5 내지 100의 정수이며;

각 n^3 및 n^4 는 5 내지 100의 정수이고;

R^{3a} 및 R^{3b} 의 각 경우는 메틸렌이며;

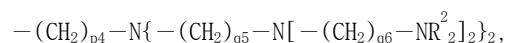
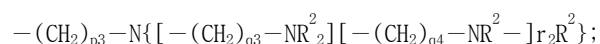
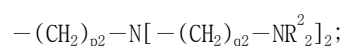
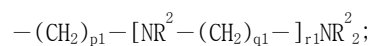
각 X^1 및 X^3 은 독립적으로 $-C(O)O-$, $-C(O)NR^{13}-$, 또는 $-C(O)-$, 또는 결합이고;

R^{13} 의 각 경우는 수소 또는 C_1-C_3 알킬이며;

X^2 의 각 경우는 독립적으로 C_1-C_{12} 직쇄형 또는 분지쇄형 알킬이고;

X^4 의 각 경우는 폴리알킬렌 옥사이드, 폴리글리콜산, 폴리락트산, 또는 이들의 조합이고; 및/또는

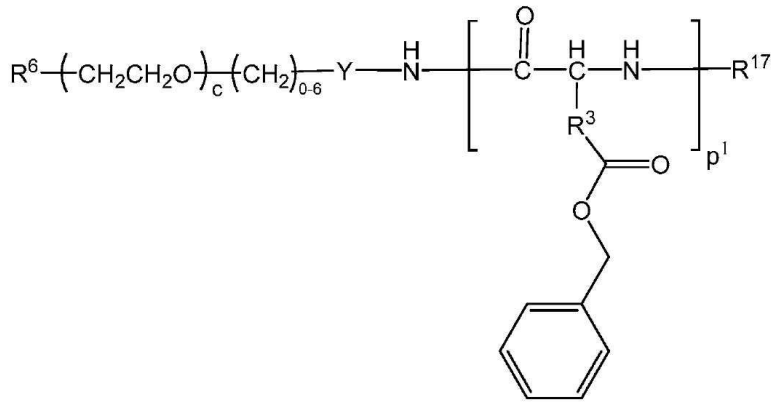
E^1 및 E^2 는 각각 독립적으로 하기 화학식의 기이며:



상기에서 $p1$ 내지 $p4$, $q1$ 내지 $q6$, 및 $r1$ 및 $r2$ 는 각각 독립적으로 1 내지 5의 정수이고; R^2 의 각 경우는 독립적으로 수소 또는 C_1-C_3 알킬기인 것인 방법.

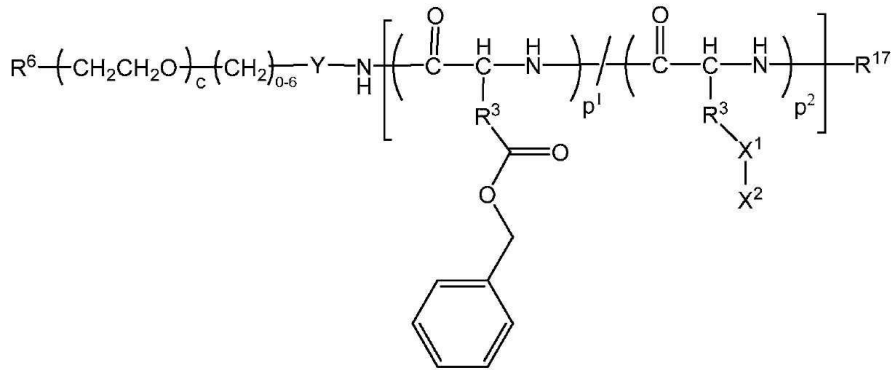
청구항 72

청구항 71에 있어서, 화학식 6 또는 화학식 7의 구조를 포함하는 폴리머는 각각 화학식 6A 또는 화학식 7A의 폴리머이고:



화학식 6A

또는



화학식 7A

상기에서,

p^1 은 1 내지 2000의 정수이고;

p^2 는 1 내지 2000의 정수이며;

각 R^3 은 독립적으로 메틸렌 또는 에틸렌 기이고;

각 X^1 은 독립적으로 $-C(O)O-$, $-C(O)NR^{13}-$, $-C(O)-$, $-S(O)(O)-$, 또는 결합이며;

X^2 의 각 경우는 독립적으로 C_1-C_{12} 알킬 또는 헤테로알킬기, C_3-C_{12} 사이클로알킬기, C_2-C_{12} 알케닐기, C_3-C_{12} 사이클로알케닐기, 아릴기, 헤테로사이클릭기, 또는 이들의 조합이고, 이들 중 임의의 기는 하나 이상의 치환기로 치환될 수 있으며;

c 는 0 내지 50의 정수이고;

Y 는 선택적으로 존재하고, 절단 가능한 링커이며;

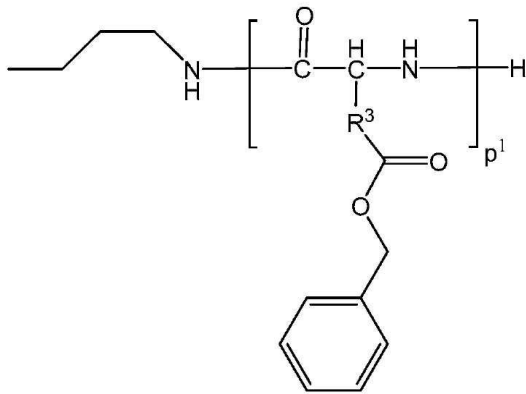
R^{17} 은 수소, 아릴기, 헤테로사이클릭기, C_1-C_{12} 알킬기, 알케닐기, 사이클로알킬기 또는 사이클로알케닐기, 또는 하나 이상의 치환기로 선택적으로 치환된 C_1-C_{12} 직쇄형 또는 분지쇄형 알킬기이고;

R^6 은 수소, 아미노기, 아릴기, 헤테로사이클릭기, C_1-C_{12} 알킬기, C_1-C_{12} 헤테로알킬기, 알케닐기, 사이클로알킬기 또는 사이클로알케닐기, 또는 1개 이상의 아민으로 선택적으로 치환된 C_1-C_{12} 직쇄형 또는 분지쇄형 알킬기이거나; 또는 조직-특이적 또는 세포-특이적 표적화 모이어티인 것인 방법.

청구항 73

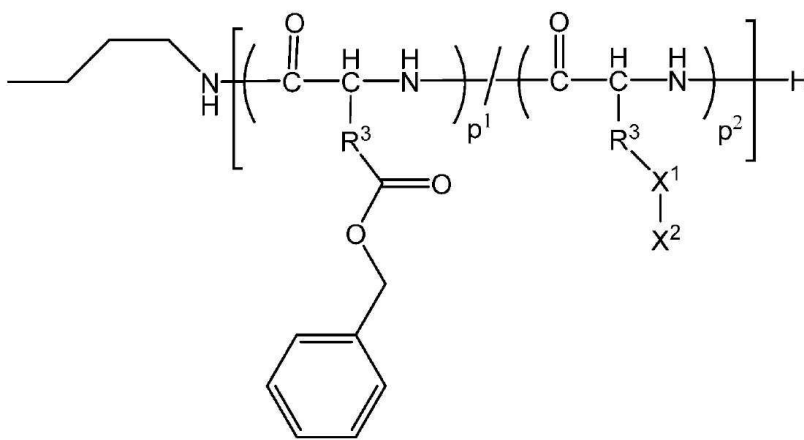
청구항 72에 있어서, 화학식 7 또는 화학식 7의 구조를 포함하는 폴리머는 각각 화학식 6B 또는 화학식 7B의 폴

리머이코:



화학식 6B

또는



화학식 7B

;

상기에서 R^3 , p^1 , p^2 , X^1 , 및 X^2 는 청구항 72에 정의된 바와 같은 것인 방법.

청구항 74

청구항 71에 있어서, 상기 방법은 화학식 6의 구조를 포함하는 폴리머를, (a) 화학식 $HNR^{13.1}E^{13.2}$ 및/또는 $HNR^{13.2}E^{13.1}$ 의 화합물; (b) 화학식 H_2NX^4 또는 HOX^4 의 화합물; 및 (c) 화학식 H_2NX^2 또는 HOX^2 의 화합물과, 동시에 또는 임의의 순차적 순서로 반응시키는 단계를 포함하며, 상기 (a) 및 (c)는 약 1:10 내지 약 1:150, 선택적으로 약 1:40 내지 약 1:150, 또는 약 1:80 내지 약 1:150의 몰비 (molar ratio)로 존재하는 것인 방법.

청구항 75

핵산 및/또는 폴리펩티드를 세포에 전달하는 방법으로서, 상기 방법은 청구항 34 내지 67 중 어느 한 항의 조성물을 상기 세포에 투여하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 76

청구항 75에 있어서, 상기 세포는 대상체에 존재하고, 청구항 34 내지 67 중 어느 한 항의 조성물을 상기 대상체에게 투여하는 것인 방법.

청구항 77

청구항 75 또는 76에 있어서, 상기 제1 폴리머 및/또는 제2 폴리머는, 상기 대상체의 말초신경계, 중추신경계, 간, 근육, 폐, 뼈, 또는 눈의 조직으로 상기 폴리머를 국소화시키는 조직-특이적 표적화 모이어티를 포함하는 것인 방법.

청구항 78

청구항 77에 있어서, 상기 제1 폴리머 및/또는 제2 폴리머는 종양 세포에 우선적으로 결합하는 표적화 모이어티를 포함하는 것인 방법.

청구항 79

청구항 75 내지 78 중 어느 항에 있어서, 상기 조성물은 하나 이상의 RNA 가이드 엔도뉴클레아제 또는 이를 코딩하는 핵산, 가이드 핵산, 및 공여체 핵산을 포함하고, 상기 조성물은 상기 세포에서 표적 유전자의 편집(editing)을 촉진하는 것인 방법.

청구항 80

청구항 75 내지 79 중 어느 항에 있어서, 상기 세포는 숙주, 선택적으로 인간에 존재하고, 상기 조성물을 숙주에게 투여함으로써 상기 조성물이 세포에 전달되는 것인 방법.

청구항 81

핵산 또는 단백질을 세포에 전달하기 위한, 청구항 34 내지 67 중 어느 한 항의 조성물의 용도.

청구항 82

청구항 81에 있어서, 상기 조성물은 청구항 76 내지 80 중 어느 항의 방법에 따라 핵산 또는 단백질을 세포에 전달하기 위한 것인 용도.

청구항 83

청구항 27에 있어서,

X^1 및 X^3 은 모두 $-C(O)NR^{13}-$ 이고, 여기서 R^{13} 은 메틸 또는 수소이며;

X^2 는 C_3-C_8 , 선택적으로 C_3-C_6 , 직쇄형 또는 분지쇄형 알킬기이고;

X^4 는 폴리알킬렌 옥사이드, 폴리글리콜산, 폴리락트산, 또는 이들의 조합을 포함하는 기이고;

E^1 및 E^2 는 $-(CH_2)_{p1}-(NR^2-(CH_2)_{q1}-)_{r1}NR^2_2$ 이고, 여기서 R^2 는 독립적으로 수소 또는 C_1-C_3 알킬 (예: 메틸 또는 에틸)이고, $p1$, $q1$ 및 $r1$ 은 각각 독립적으로 1, 2 또는 3의 정수이고; 선택적으로 상기 E^1 및 E^2 는 $-(CH_2)_2-NR^2_2-(CH_2)_2-NR^2_2$ 또는 $-(CH_2)_2-NR^2_2-(CH_2)_2-NHR^2_2$ 인 것인 폴리머.

청구항 84

청구항 44 내지 67 중 어느 항의 조성물, 또는 청구항 75 내지 82 중 어느 항의 방법에 있어서,

상기 제1 폴리머는 청구항 27의 폴리머이고, 상기 제2 폴리머는 청구항 61의 폴리머이거나; 또는

상기 제1 폴리머는 청구항 82의 폴리머이고, 상기 제2 폴리머는 청구항 62의 폴리머이거나; 또는

상기 제1 폴리머는 청구항 28의 폴리머이고, 상기 제2 폴리머는 청구항 64의 폴리머이거나; 또는

상기 제1 폴리머는 폴리머 72, 73, 74, 또는 75이고, 상기 제2 폴리머는 폴리머 29, 37, 39, 또는 40인 것인 조성물 또는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 특허 출원은 2019년 5월 28일자로 출원된 미국 특허 가출원 제62/853,658호 및 2019년 9월 27일자로 출원된

미국 특허 가출원 제62/907,458호에 대한 우선권을 주장하고, 이들 출원의 전체 개시내용이 참조에 의해 본원에 통합된다.

배경 기술

[0003] 펩티드, 단백질, 및 핵산 기반 기술은 질병을 예방, 치유, 및 치료하기 위한 수많은 응용을 갖는다. 그러나, 큰 분자 (예: 폴리펩티드 및 핵산)의 이들의 표적 조직으로의 안전하고 효과적인 전달은 미결로 남아있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 따라서, 치료 분자들을 전달하는데 유용한 새로운 조성물 및 방법에 대한 요구가 지속적으로 존재한다.

과제의 해결 수단

[0005] 본원에서 가수분해성 폴리머 백본 (hydrolysable polymer backbone)을 포함하는 폴리머가 제공되며, 상기 폴리머 백본은 (a) 소수성 기를 포함하는 결사슬을 갖는 모노머 유닛 (monomer units); (b) 올리고아민 또는 폴리아민을 포함하는 결사슬을 갖는 모노머 유닛; 및 (c) 폴리알킬렌 옥사이드, 폴리글리콜산, 폴리락트산, 또는 이들의 조합을 포함하는 결사슬을 갖는 모노머 유닛을 포함한다.

[0006] 또한, 본원에서 제1 폴리머 (first polymer) 및 제2 폴리머 (second polymer)를 포함하는 조성물이 제공되며, 상기 제1 폴리머는 가수분해성 폴리머 백본을 포함하고, 상기 폴리머 백본은 (a) 소수성 기를 포함하는 결사슬을 갖는 모노머 유닛; (b) 올리고아민 또는 폴리아민을 포함하는 결사슬을 갖는 모노머 유닛; 및 (c) 폴리알킬렌 옥사이드, 폴리글리콜산, 폴리락트산, 또는 이들의 조합을 포함하는 결사슬을 갖는 모노머 유닛을 포함하며; 상기 제2 폴리머는 가수분해성 폴리머 백본을 포함하고, 상기 가수분해성 폴리머 백본은 (a) 소수성 기를 포함하는 결사슬을 갖는 모노머 유닛, (ii) 올리고아민 또는 폴리아민을 포함하는 결사슬을 갖는 모노머 유닛, 및 선택적으로, (iii) 선택적으로 7 미만의 pKa를 갖는, 이온화 가능한 기 (ionizable group)를 포함하는 결사슬을 갖는 모노머 유닛을 포함한다.

[0007] 본 개시내용은 또한 예를 들어 핵산 또는 단백질을 세포에 전달하기 위해 본원에 기재된 조성물을 사용하는 방법을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0008] 도 1은 스트렙토코커스 피오제네 (*Streptococcus pyogene*) 유래의 Cas9의 아미노산 서열 (서열번호: 1)을 제공한다.

도 2는 프란시셀라 툴라렌시스 아종 노비시다 (*Francisella tularensis* subsp. Novicida) U112 유래의 Cpf1의 아미노산 서열 (서열번호: 2)을 제공한다.

도 3은 AsCpf1의 서열 (서열번호: 19)을 제공한다.

도 4는 LbCpf1의 서열 (서열번호: 20)을 제공한다.

도 5A-5C는 실시예 3에 기재된 바와 같이, mCherry mRNA와 제제화된 본 발명의 폴리머로부터 형성된 나노입자의 현미경 이미지를 보여준다.

도 6A 및 6B는 실시예 4에 기재된 바와 같이, mCherry mRNA와 제제화된 본 발명의 폴리머로부터 형성된 나노입자로 형질감염된 Hep3B 세포의 현미경 이미지를 보여준다.

도 7A 및 7B는 실시예 5에 기재된 바와 같이, mCherry mRNA와 제제화된 본 발명의 폴리머로부터 형성된 나노입자로 형질감염된 1차 근근세포 (primary myoblasts)의 현미경 이미지를 보여준다.

도 8은 실시예 6에 기재된 바와 같이, mCherry를 함유하는 폴리머 나노입자의 인간 1차 신경 전구 세포 (neural progenitor cell: NPC)로의 형질감염을 보여주는 그래프이다.

도 9는 실시예 7에 기재된 바와 같이, GFP 녹-아웃 (knock-out)의 함수로서 Cas9 RNP를 함유하는 폴리머 나노입자의 형질감염 효율 (transfection efficiency)을 보여주는 그래프이다.

도 10은 마우스 (mouse) Loxp-루시페라제 리포터 기능의 개략도이다.

도 11A-11C는 실시예 8에 기재된 바와 같이, 조성물로 처리된 루시페라제 발현 마우스의 생물발광 이미징 (bioluminescence imaging)을 보여준다.

도 12A 및 12B는 실시예 10에 기재된 바와 같이, RFP 형광의 함수로서, 인간 신경 전구 세포 (NPC) 및 Hep3B 세포 각각에서 폴리머 나노입자의 형질감염 효율을 보여주는 그래프이다. x-축은 H27N 및 mCherry RNA가 혼합되어 나노입자를 형성하는 폴리머의 명칭이다.

도 13A 및 13B는 실시예 12에 기재된 바와 같이, RFP 형광의 함수로서, 인간 신경 전구 세포 (NPC) 및 Hep3B 세포 각각에서 폴리머 나노입자의 형질감염 효율을 보여주는 그래프이다. x-축은 II-46 및 mCherry RNA가 혼합되어 나노입자를 형성하는 폴리머의 명칭이다.

도 14는 마우스 ai9 리포터 기능의 개략도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

폴리머

본 발명은 가수분해성 폴리머 백본을 포함하는 폴리머를 제공하며, 상기 폴리머 백본은 (a) 소수성 기를 포함하는 결사슬을 갖는 모노머 유닛; (b) 올리고아민 또는 폴리아민을 포함하는 결사슬을 갖는 모노머 유닛; 및 (c) 폴리알킬렌 옥사이드, 폴리글리콜산, 폴리락트산, 또는 이들의 조합을 포함하는 결사슬을 갖는 모노머 유닛을 포함한다.

본원에서 사용된, 문구 가수분해성 폴리머 백본 (hydrolysable polymer backbone)은 생리학적 조건 (예: 생리학적 pH, 생리학적 온도, 또는 주어진 인 비보 조직, 예컨대 혈액, 혈청, 등)하에 천연 인자들 (예: 효소)에 의한 절단에 취약한 결합을 갖는 폴리머 백본을 의미한다. 일반적으로, 상기 가수분해성 폴리머 백본은 폴리아미드, 폴리-N-알킬아미드, 폴리에스테르, 폴리카보네이트, 폴리카바메이트, 또는 이들의 조합을 포함한다. 소정의 구체예에서, 상기 가수분해성 폴리머 백본은 폴리아미드를 포함한다.

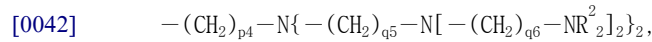
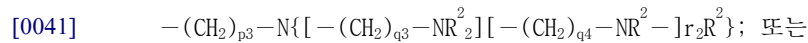
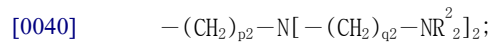
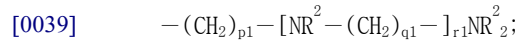
소수성 기를 포함하는 결사슬을 갖는 모노머 유닛은 임의의 소수성 기를 포함할 수 있고, 상기 폴리머 백본에 임의의 적절한 방식으로 예컨대 직접 (directly), 또는 예를 들어 에스테르, 아미드, 또는 에테르 기를 포함하고, 선택적으로 알킬렌 링커 (예: 메틸렌 또는 에틸렌 링커)를 추가로 포함하는 결합 (linkage)을 통해 연결될 수 있다. 소수성 기의 예로는 예를 들어 C₁-C₁₂ (예: C₂-C₁₂, C₂-C₁₀, C₂-C₈, C₂-C₆, C₃-C₁₂, C₃-C₁₀, C₃-C₈, C₃-C₆, C₄-C₁₂, C₄-C₁₀, C₄-C₈, C₄-C₆, C₆-C₁₂, C₆-C₈, C₈-C₁₂, C₈-C₁₀) 알킬기, C₂-C₁₂ (예: C₂-C₆, C₃-C₁₂, C₃-C₁₀, C₃-C₈, C₃-C₆, C₄-C₁₂, C₄-C₁₀, C₄-C₈, C₄-C₆, C₆-C₁₂, C₆-C₈, C₈-C₁₂, C₈-C₁₀) 알케닐기, 또는 C₃-C₁₂ (C₃-C₁₀, C₃-C₈, C₃-C₆, C₄-C₁₂, C₄-C₁₀, C₄-C₈, C₄-C₆, C₆-C₁₂, C₆-C₈, C₈-C₁₂, C₈-C₁₀) 사이클로알킬기 또는 사이클로알케닐기를 포함한다. 소정의 구체예에서, 상기 소수성 기는 C₄-C₁₂ 알킬기, 알케닐기, 사이클로알킬기, 또는 사이클로알케닐기를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 소수성 기는 8개 미만의 탄소 또는 6개 미만의 탄소를 포함한다. 예를 들어, 상기 소수성 기는 C₂-C₈ 또는 C₂-C₆ (예: C₃-C₈ 또는 C₃-C₆) 알킬기를 포함할 수 있다. 상기 알킬 또는 알케닐 기는 분지쇄형 또는 직쇄형일 수 있다. 상기 알킬 또는 알케닐 기는 치환기가 전체 소수성 결사슬의 소수성을 무효화하지 않는다면 (예: 결사슬을 친수성으로 만들지 않는다면) 치환될 수 있다. 예를 들어, 상기 알킬 또는 알케닐 기는 하이드록실기 (예: 1 또는 2개의 하이드록실기) 또는 할로젠기 (예: 1개 이상의 불소, 염소, 브롬 또는 요오드 원자로 치환됨)로 치환될 수 있다. 임의의 전술한 구체예에서, 상기 소수성 기는 상기 폴리머 백본에 직접 연결될 수 있거나, 또는 예를 들어 에스테르, 아미드, 또는 에테르 기를 포함하고, 선택적으로 알킬렌 링커 (예: 메틸렌 또는 에틸렌 링커)를 추가로 포함하는 결합을 통해 연결될 수 있다.

상기 폴리머는 또한 올리고아민 또는 폴리아민을 포함하는 결사슬을 갖는 모노머 유닛을 포함한다. 본원에서 사용된, 용어 "올리고아민 (oligoamine)"은 2개 또는 3개의 아민기를 갖는 임의의 화학적 모이어티 (chemical moiety)를 의미하고, 용어 "폴리아민 (polyamine)"은 4개 이상 (예: 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개 등)의 아민기를 갖는 임의의 화학적 모이어티를 의미한다. 상기 아민기는 1차 아민기, 2차 아민기, 3차 아민기, 또는 이들의 임의의 조합일 수 있다. 소정의 구체예에서, 상기 올리고아민 또는 폴리아민은 하기 화학식을 갖는다:

- [0014] $-(CH_2)_{p1}-[NR^2-(CH_2)_{q1}-]_{r1}NR^2_2$;
- [0015] $-(CH_2)_{p2}-N[-(CH_2)_{q2}-NR^2_2]_2$;
- [0016] $-(CH_2)_{p3}-N\{[-(CH_2)_{q3}-NR^2_2][-(CH_2)_{q4}-NR^2-]_{r2}R^2\}$;
- [0017] $-(CH_2)_{p4}-N\{-(CH_2)_{q5}-N[-(CH_2)_{q6}-NR^2_2]_2\}_2$;
- [0018] $-(CH_2)_{p1}-[NR^2-(CH_2)_{q1}-]_{r1}NR^2-(CH_2)_{s1}-R^4-R^5$;
- [0019] $-(CH_2)_{p2}-N[-(CH_2)_{q2}-NR^2-(CH_2)_{s2}-R^4-R^5]_2$;
- [0020] $-(CH_2)_{p3}-N\{[-(CH_2)_{q3}-NR^2_2][-(CH_2)_{q4}-NR^2-]_{r2}(CH_2)_{s3}-R^4-R^5\}$;
- [0021] $-(CH_2)_{p4}-N\{-(CH_2)_{q5}-N[-(CH_2)_{q6}-NR^2-(CH_2)_{s4}-R^4-R^5]_2\}_2$;
- [0022] $-(CH_2)_{p1}-[NR^2-(CH_2)_{q1}-]_{r1}NR^2-CH_2-CHOH-R^5$;
- [0023] $-(CH_2)_{p2}-N[-(CH_2)_{q2}-NR^2-CH_2-CHOH-R^5]$;
- [0024] $-(CH_2)_{p3}-N\{[-(CH_2)_{q3}-NR^2_2][-(CH_2)_{q4}-NR^2-]_{r2}-CH_2-CHOH-R^5\}$;
- [0025] $-(CH_2)_{p4}-N\{-(CH_2)_{q5}-N[-(CH_2)_{q6}-NR^2-CH_2-CHOH-R^5]_2\}_2$;
- [0026] $-(CH_2)_{p1}-[NR^2-(CH_2)_{q1}-]_{r1}NR^2-(CH_2)_{s1}-R^5$;
- [0027] $-(CH_2)_{p2}-N[-(CH_2)_{q2}-NR^2-(CH_2)_{s2}-R^5]_2$;
- [0028] $-(CH_2)_{p3}-N\{[-(CH_2)_{q3}-NR^2_2][-(CH_2)_{q4}-NR^2-]_{r2}(CH_2)_{s3}-R^5\}$;
- [0029] $-(CH_2)_{p4}-N\{-(CH_2)_{q5}-N[-(CH_2)_{q6}-NR^2-(CH_2)_{s4}-R^5]_2\}_2$;
- [0030] $-(CH_2)_{p1}-[N\{(CH_2)_{s1}-R^4-R^5\}-(CH_2)_{q1}-]_{r1}NR^2_2$;
- [0031] $-(CH_2)_{p1}-[N\{(CH_2)_{s1}-R^5\}-(CH_2)_{q1}-]_{r1}NR^2_2$;
- [0032] $-(CH_2)_{p1}-[NR^2-(CH_2)_{q1}-]_{r1}NR^2-CH(CONH_2)-(CH_2)_{s1}-R^5$; 또는
- [0033] $-(CH_2)_{p1}-[NR^2-(CH_2)_{q1}-]_{r1}NR^2-CH(CONH_2)-(CH_2)_{s1}-R^4-R^5$,
- [0034] 상기에서, p1 내지 p4, q1 내지 q6, r1 및 r2, 및 s1 내지 s4는 각각 독립적으로 1 내지 5의 정수이고;
- [0035] R^2 의 각 경우는 독립적으로 수소, 또는 C₁-C₁₂ 알킬기, C₂-C₁₂ 알케닐기, C₃-C₁₂ 사이클로알킬기, 또는 C₃-C₁₂ 사이클로알케닐기이거나, 또는 R^2 는 제2 R^2 와 조합하여 헤테로사이클릭기를 형성하며;
- [0036] R^4 의 각 경우는 독립적으로 -C(O)O-, -C(O)NH-, -O-C(O)O-, 또는 -S(O)(O)-이고;
- [0037] R^5 의 각 경우는 독립적으로 알킬기, 사이클로알킬기, 알케닐기, 사이클로알케닐기, 아릴기, 헤테로알킬기, 헤테로사이클릭기, 또는 이들의 조합으로, 이들은 선택적으로 2 내지 8개의 3차 아민을 포함하고, 또는 조직-특이적

또는 세포-특이적 표적화 모이어티를 포함하는 치환기이다.

[0038] 일부 구체예에서, 상기 올리고아민 또는 폴리아민은 하기 화학식을 갖는다:



[0043] 상기에서, p1 내지 p4, q1 내지 q6, 및 r1 및 r2는 각각 독립적으로 1 내지 5의 정수 (예: 1, 2, 또는 3)이고;

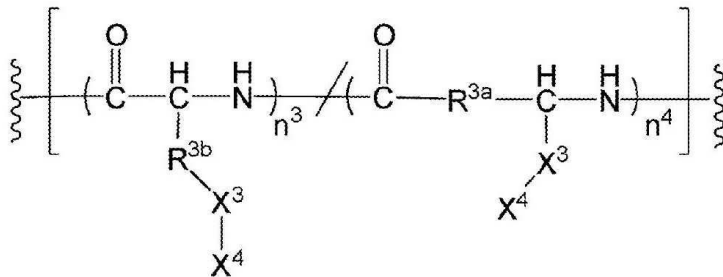
[0044] R^2 의 각 경우는 독립적으로 수소 또는 C_1 - C_{12} (예: C_1 - C_6 , C_1 - C_3 , C_2 , 또는 C_1) 알킬기, 알케닐기, 사이클로알킬기, 또는 사이클로알케닐기이거나, 또는 R^2 는 제2 R^2 와 조합하여 헤테로사이클릭기를 형성한다. 상기 알케닐기는 적어도 2개의 탄소 (예: C_2 - C_{12} , C_2 - C_6 등)를 가져야 하고, 상기 사이클로알킬 및 사이클로알케닐기는 적어도 3개의 탄소 (예: C_3 - C_{12} , C_3 - C_6 등)를 가져야 하는 것으로 이해된다. 일부 구체예에서, 상기 폴리아민은 $-(CH_2)_{p1}-[NR^2-(CH_2)_{q1}-]_{r1}NR^2_2$ 이고, 선택적으로 상기 R^2 는 독립적으로 수소 또는 C_1 - C_3 알킬 (예: 메틸 또는 에틸)이다.

[0045] 올리고아민 또는 폴리아민 결사슬의 특정 비-제한적인 예로는 예를 들어, $-NH-CH_2-CH_2-N(CH_3)-CH_2-CH_2-N(CH_3)_2$; $-N(CH_3)-CH_2-CH_2-N(CH_3)-CH_2-CH_2-N(CH_3)_2$; $-NH-CH_2-CH_2-N(CH_3)-CH_2-CH_2-N(CH_3)-CH_2-CH_2-N(CH_3)_2$; $-N(CH_3)-CH_2-CH_2-N(CH_3)-CH_2-CH_2-N(CH_3)-CH_2-CH_2-N(CH_3)_2$; $-NH-CH_2-CH_2-N(CH_3)-CH_2-CH_2-NH(CH_3)$; $-N(CH_3)-CH_2-CH_2-N(CH_3)-CH_2-CH_2-NH(CH_3)$; $-NH-CH_2-CH_2-N(CH_3)-CH_2-CH_2-N(CH_3)-CH_2-CH_2-NH(CH_3)$; $-N(CH_3)-CH_2-CH_2-N(CH_3)-CH_2-CH_2-N(CH_3)-CH_2-CH_2-NH(CH_3)$ 을 포함한다.

[0046] 상기 폴리머는 또한 폴리알킬렌 옥사이드, 폴리글리콜산, 폴리락트산, 또는 이들의 조합을 포함하는 결사슬을 갖는 모노머 유닛을 포함하고, 상기 폴리머 백본에 임의의 적절한 방식으로 예컨대 직접, 또는 예를 들어 에스테르, 아마이드, 또는 에테르 기를 포함하고, 선택적으로 알킬렌 링커 (예: 메틸렌 또는 에틸렌 링커)를 추가로 포함하는 결합을 통해 연결될 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 결사슬은 2 내지 200개의 에틸렌 옥사이드 유닛 (예: 2 내지 150개의 유닛, 2 내지 100개의 유닛, 2 내지 50개의 유닛, 10 내지 200개의 유닛, 10 내지 150개의 유닛, 10 내지 100개의 유닛, 10 내지 50개의 유닛, 25 내지 200개의 유닛, 25 내지 150개의 유닛, 25 내지 100개의 유닛, 25 내지 50개의 유닛, 50 내지 200개의 유닛, 50 내지 150개의 유닛, 또는 50 내지 100개의 유닛)의 총합을 가진 적어도 하나의 폴리에틸렌 글리콜기 (폴리에틸렌 옥사이드기로 알려짐)를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 결사슬은 2 내지 200개의 프로필렌 옥사이드 유닛 (예: 2 내지 150개의 유닛, 2 내지 100개의 유닛, 2 내지 50개의 유닛, 10 내지 200개의 유닛, 10 내지 150개의 유닛, 10 내지 100개의 유닛, 10 내지 50개의 유닛, 25 내지 200개의 유닛, 25 내지 150개의 유닛, 25 내지 100개의 유닛, 25 내지 50개의 유닛, 50 내지 200개의 유닛, 50 내지 150개의 유닛, 또는 50 내지 100개의 유닛)의 총합을 가진 적어도 하나의 폴리프로필렌 옥사이드기를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 결사슬은 2 내지 200개의 폴리락트산 및/또는 폴리글리콜산 유닛 (예: 2 내지 150개의 유닛, 2 내지 100개의 유닛, 2 내지 50개의 유닛, 10 내지 200개의 유닛, 10 내지 150개의 유닛, 10 내지 100개의 유닛, 10 내지 50개의 유닛, 25 내지 200개의 유닛, 25 내지 150개의 유닛, 25 내지 100개의 유닛, 25 내지 50개의 유닛, 50 내지 200개의 유닛, 50 내지 150개의 유닛, 또는 50 내지 100개의 유닛)의 총합을 가진 적어도 하나의 폴리락트산 및/또는 폴리글리콜산 기를 포함한다. 소정의 구체예에서, 상기 결사슬은 2 내지 200개의 에틸렌 글리콜 및/또는 프로필렌 옥사이드 유닛의 총합을 가진 적어도 하나의 폴리에틸렌 글리콜/폴리프로필렌 옥사이드 기, 및 2 내지 200개의 폴리락트산 및/또는 폴리글리콜산 유닛의 총합을 가진 적어도 하나의 폴리락트산 및/또는 폴리글리콜산 기를 포함한다. 임의의 특정 이론에 국한되지 않으면서, 상기 폴리에틸렌 글리콜/폴리프로필렌 옥사이드 기가 인 비보로 주사되는 경우 생체분포는 증진되고 및/또는 독성은 감소될 수 있으며, 상기 폴리락트산 및/또는 폴리글리콜산 기는 양전하를 띤 나노 입자의 제타 전위 (zeta potential)를 (예: 음전하 또는 중성으로) 조정하는데 도움을 줄 수 있다고 여겨진다. 상기 결사슬이 2 내지

200개의 에틸렌 글리콜 및/또는 프로필렌 옥사이드 유닛의 총합을 가진 적어도 하나의 폴리에틸렌 글리콜/폴리프로필렌 옥사이드 기, 및 2 내지 200개의 폴리락트산 및/또는 폴리글리콜산 유닛의 총합을 가진 적어도 하나의 폴리락트산 및/또는 폴리글리콜산 기를 포함하는 구체예에서, 상기 결사슬은 임의의 적절한 구조적 타입으로 존재할 수 있다. 예를 들어, 상기 결사슬은 상기 에틸렌 글리콜 및/또는 프로필렌 옥사이드 유닛 및 상기 폴리락트산 및/또는 폴리글리콜산 유닛을 교호 폴리머 (alternating polymer), 랜덤 폴리머 (random polymer), 블록 폴리머 (block polymer), 그래프트 폴리머 (graft polymer), 직쇄형 폴리머 (linear polymer), 분지쇄형 폴리머 (branched polymer), 고리형 폴리머 (cyclic polymer), 또는 이들의 조합으로서 포함할 수 있다. 소정의 구체예에서, 상기 결사슬은 폴리알킬렌 옥사이드 유닛 (예: 에틸렌 옥사이드 유닛, 프로필렌 옥사이드 유닛, 또는 둘다)을 포함하고, 선택적으로 폴리락트산 또는 폴리글리콜산 유닛을 추가로 포함한다. 예를 들어, 상기 모노머의 적어도 일부의 결사슬은 Pluronic® F65 또는 Pluronic® F127로부터 유도될 수 있다.

[0047] 예를 들어, 상기 폴리머 (예: 제1 폴리머)는 하기 화학식 1의 구조를 포함하는, 폴리알킬렌 옥사이드, 폴리글리콜산, 폴리락트산, 또는 이들의 조합을 포함하는 겔사슬을 갖는 모노머 유닛을 포함할 수 있다:



[0048]

[0049] 상기에 서:

[0050] 각 n^3 및 n^4 는 0 내지 1000의 정수이고, 단 $n^3 + n^4$ 의 합은 1보다 크며;

[0051] 기호 "/"는 이에 의해 분리된 유닛들이 무작위로 또는 임의의 순서로 연결되는 것을 나타내고;

[0052] R^{3a}의 각 경우는 독립적으로 메틸렌 또는 에틸렌 기이며;

[0053] R^{3b}의 각 경우는 독립적으로 메틸렌 또는 에틸렌 기이고;

[0054] 각 X³은 독립적으로 -C(O)O-, -C(O)NR¹³-, -C(O)-, -S(O)(O)-, 또는 결합 (bond)이며;

[0055] R¹³의 각 경우는 독립적으로 수소, 아릴기, 헤테로사이클릭기, C₁-C₁₂ 알킬기, C₂-C₁₂ 알케닐기, C₃-C₁₂ 사이클로알킬기, 또는 C₃-C₁₂ 사이클로알케닐기이고, 이들 중 임의의 기는 선택적으로 하나 이상의 치환기로 치환될 수 있으며;

[0056] X^4 의 각 경우는 폴리알킬렌 옥사이드, 폴리글리콜산, 폴리락트산, 또는 이들의 조합을 포함하며;

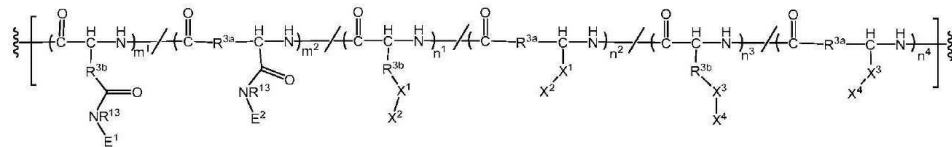
[0057] R¹⁸의 각 경우는 독립적으로 수소 또는 메틸이고;

[0058] p의 각 경우는 독립적으로 2 내지 200의 정수이다.

[0059] 상이한 모노머 유닛이 폴리머 전체에 무작위로 배열된 모노머 또는 모노머의 블록을 포함하여, 임의의 순서로 배열될 수 있다. 또한, 상기 폴리머는 소수성 기를 포함하는 결사슬을 갖는 모노머 유닛, 올리고아민 또는 폴리아민을 포함하는 결사슬을 갖는 모노머 유닛, 및 폴리알킬렌 옥사이드, 폴리글리콜산, 폴리락트산, 또는 이들의 조합을 포함하는 결사슬을 갖는 모노머 유닛의 임의의 적절한 수 또는 양 (예: 중량 또는 수 퍼센트 조성물 (weight or number percent composition))을 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 폴리머는 소수성 기를 갖는 모노머 유닛을 약 1 내지 약 80 mol% (예: 약 5 내지 약 80 mol%, 약 10 내지 약 80 mol%, 약 20 내지 약 80 mol%, 약 40 내지 약 80 mol%, 약 1 내지 약 60 mol%, 약 1 내지 약 40 mol%, 약 1 내지 약 20 mol%, 또는 약 1 내지 약 10 mol%)로 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 폴리머는 올리고아민 또는 폴리아민을 갖는 모노머 유닛을 약 1 내지 약 80 mol% (예: 약 5 내지 약 80 mol%, 약 10 내지 약 80 mol%, 약 20 내지 약 80 mol%, 약 40 내지 약 80 mol%, 약 1 내지 약 60 mol%, 약 1 내지 약 40 mol%, 약 1 내지 약 20 mol%, 또는 약 1 내지 약

10 mol%)로 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 폴리머는 폴리알킬렌 옥사이드, 폴리글리콜산, 폴리락트산, 또는 이들의 조합을 갖는 모노머 유닛을 약 1 내지 약 80 mol% (예: 약 5 내지 약 80 mol%, 약 10 내지 약 80 mol%, 약 20 내지 약 80 mol%, 약 40 내지 약 80 mol%, 약 1 내지 약 60 mol%, 약 1 내지 약 40 mol%, 약 1 내지 약 20 mol%, 또는 약 1 내지 약 10 mol%)로 포함한다.

[0060] 일부 구체예에서, 상기 폴리머는 폴리아미드 백본을 갖는다. 예를 들어, 상기 폴리머는 하기 화학식 2의 구조를 가질 수 있다:



[0061]

상기에서:

[0062]

각 m^1 및 m^2 는 0 내지 1000의 정수이고, 단 $m^1 + m^2$ 의 합은 1보다 크며;

[0063]

각 n^1 및 n^2 는 0 내지 1000의 정수이고, 단 $n^1 + n^2$ 의 합은 1보다 크며;

[0064]

각 n^3 및 n^4 는 0 내지 1000의 정수이고, 단 $n^3 + n^4$ 의 합은 1보다 크며;

[0065]

기호 "/"는 이에 의해 분리된 유닛들이 무작위로 또는 임의의 순서로 연결되는 것을 나타내고;

[0066]

R^{3a} 의 각 경우는 독립적으로 메틸렌 또는 에틸렌 기이며;

[0067]

R^{3b} 의 각 경우는 독립적으로 메틸렌 또는 에틸렌 기이고;

[0068]

각 X^1 은 독립적으로 $-C(O)O-$, $-C(O)NR^{13}-$, $-C(O)-$, $-S(O)(O)-$, 또는 결합이며;

[0069]

R^{13} 의 각 경우는 독립적으로 수소, 아릴기, 헤테로사이클릭기, C_1-C_{12} 알킬기, C_2-C_{12} 알케닐기, C_3-C_{12} 사이클로알킬기, 또는 C_3-C_{12} 사이클로알케닐기이고, 이들 중 임의의 기는 선택적으로 하나 이상의 치환기로 치환될 수 있으며;

[0070]

X^2 의 각 경우는 독립적으로 C_1-C_{12} 알킬 또는 헤테로알킬기, C_3-C_{12} 사이클로알킬기, C_2-C_{12} 알케닐기, C_3-C_{12} 사이클로알케닐기, 아릴기, 헤테로사이클릭기, 또는 이들의 조합이고, 이들 중 임의의 기는 선택적으로 하나 이상의 치환기로 치환되며;

[0071]

각 X^3 은 독립적으로 $-C(O)O-$, $-C(O)NR^{13}-$, $-C(O)-$, $-S(O)(O)-$, 또는 결합이고;

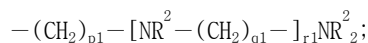
[0072]

X^4 의 각 경우는 폴리알킬렌 옥사이드, 폴리글리콜산, 폴리락트산, 또는 이들의 조합을 포함하며;

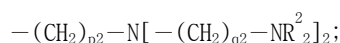
[0073]

각 E^1 및 E^2 는 각각 독립적으로 하기 화학식의 기이고:

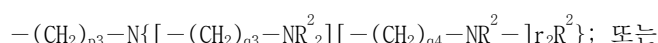
[0074]



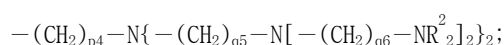
[0075]



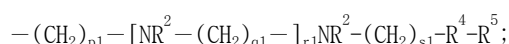
[0076]



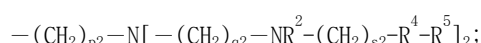
[0077]



[0078]



[0079]



[0080]

[0081] $-(CH_2)_{p3}-N\{[-(CH_2)_{q3}-NR^2_2][-(CH_2)_{q4}-NR^2-r_2(CH_2)_{s3}-R^4-R^5];$

[0082] $-(CH_2)_{p4}-N\{-(CH_2)_{q5}-N[-(CH_2)_{q6}-NR^2-(CH_2)_{s4}-R^4-R^5]_2\}_2;$

[0083] $-(CH_2)_{p1}-[NR^2-(CH_2)_{q1}-]_{r1}NR^2-CH_2-CHOH-R^5;$

[0084] $-(CH_2)_{p2}-N[-(CH_2)_{q2}-NR^2-CH_2-CHOH-R^5];$

[0085] $-(CH_2)_{p3}-N\{[-(CH_2)_{q3}-NR^2_2][-(CH_2)_{q4}-NR^2-r_2-CH_2-CHOH-R^5];$

[0086] $-(CH_2)_{p4}-N\{-(CH_2)_{q5}-N[-(CH_2)_{q6}-NR^2-CH_2-CHOH-R^5]_2\}_2;$

[0087] $-(CH_2)_{p1}-[NR^2-(CH_2)_{q1}-]_{r1}NR^2-(CH_2)_{s1}-R^5;$

[0088] $-(CH_2)_{p2}-N[-(CH_2)_{q2}-NR^2-(CH_2)_{s2}-R^5]_2;$

[0089] $-(CH_2)_{p3}-N\{[-(CH_2)_{q3}-NR^2_2][-(CH_2)_{q4}-NR^2-r_2(CH_2)_{s3}-R^5];$

[0090] $-(CH_2)_{p4}-N\{-(CH_2)_{q5}-N[-(CH_2)_{q6}-NR^2-(CH_2)_{s4}-R^5]_2\}_2;$

[0091] $-(CH_2)_{p1}-[N\{(CH_2)_{s1}-R^4-R^5\}-(CH_2)_{q1}-]_{r1}NR^2_2;$

[0092] $-(CH_2)_{p1}-[N\{(CH_2)_{s1}-R^5\}-(CH_2)_{q1}-]_{r1}NR^2_2;$

[0093] $-(CH_2)_{p1}-[NR^2-(CH_2)_{q1}-]_{r1}NR^2-CH(CONH_2)-(CH_2)_{s1}-R^5;$ 또는

[0094] $-(CH_2)_{p1}-[NR^2-(CH_2)_{q1}-]_{r1}NR^2-CH(CONH_2)-(CH_2)_{s1}-R^4-R^5,$

[0095] 상기에서, p1 내지 p4, q1 내지 q6, r1 및 r2, 및 s1 내지 s4는 각각 독립적으로 1 내지 5의 정수이고;

[0096] R^2 의 각 경우는 독립적으로 수소, 아틸기, 헤테로사이클릭기, C_1-C_{12} 알킬기, C_2-C_{12} 알케닐기, C_3-C_{12} 사이클로알킬기, 또는 C_3-C_{12} 사이클로알케닐기이고, 이들 중 임의의 기는 선택적으로 하나 이상의 치환기로 치환되거나, 또는 R^2 는 제2 R^2 와 조합하여 헤테로사이클릭기를 형성하며;

[0097] R^4 의 각 경우는 독립적으로 $-C(O)O-$, $-C(O)NH-$, $-O-C(O)O-$, 또는 $-S(O)(O)-$ 이고;

[0098] R^5 의 각 경우는 독립적으로 C_1-C_{12} 알킬기, C_2-C_{12} 알케닐기, C_3-C_{12} 사이클로알킬기, 또는 C_3-C_{12} 사이클로알케닐기, 아틸기, C_1-C_{12} 헤테로알킬기, C_3-C_{12} 헤테로사이클릭기 또는 이들의 조합으로, 이들은 선택적으로 2 내지 8개의 3차 아민을 포함하고, 또는 조직-특이적 또는 세포-특이적 표적화 모이어티를 포함하는 치환기이다.

[0099] 본원에서 사용된, "알킬 (alkyl)" 또는 "알킬렌 (alkylene)"은 치환 또는 비치환 탄화수소 사슬을 의미한다. 상기 알킬기는 임의의 수의 탄소 원자 (예: C_1-C_{100} 알킬, C_1-C_{50} 알킬, C_1-C_{12} 알킬, C_1-C_8 알킬, C_1-C_6 알킬, C_1-C_4 알킬, C_1-C_2 알킬 등)를 가질 수 있다. 상기 알킬 또는 알킬렌은 포화될 수 있거나, 또는 불포화될 수 있고 (예: 알케닐 또는 알키닐을 제공), 직쇄형, 분지쇄형, 고리형 (예: 사이클로알킬 또는 사이클로알케닐), 또는 이들의 조합일 수 있다. 고리형 기는 모노사이클릭 (monocyclic)이거나, 융합되어 바이사이클릭 (bicyclic) 기 또는 트리사이클릭 (tricyclic) 기를 형성하거나, 결합에 의해 연결되거나, 또는 스피로사이클릭 (spirocyclic)일 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 알킬 치환기가 1개 이상의 헤테로원자 (예: 산소, 질소, 및 황)에 의해 중단되어, 헤테로알킬, 헤테로알킬렌, 또는 헤테로사이클릭 (즉, 헤테로사이클릭기)을 제공할 수 있다. 일부 구체예에서,

상기 알킬은 하나 이상의 치환기로 치환된다.

[0100] 용어 "아릴 (aryl)"은 임의의 적절한 수의 고리 원자 및 임의의 적절한 수의 고리를 갖는 방향족 고리 시스템 (aromatic ring system)을 의미한다. 아릴기는 예를 들어, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 또는 16개의 고리 원자, 및 6개 내지 10개, 6개 내지 12개, 또는 6개 내지 14개의 고리 구성원 (ring member)을 포함할 수 있다. 아릴기는 모노사이클릭일 수 있거나, 융합되어 바이사이클릭기 또는 트리사이클릭기를 형성할 수 있거나, 또는 결합에 의해 연결되어 바이아릴기 (biaryl group)를 형성할 수 있다. 대표적인 아릴기는 페닐, 나프틸, 및 바이페닐을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 아릴기는 아릴알킬기 (예: 벤질기)를 형성하기 위해 알킬렌 연결기 (linking group)를 포함한다. 일부 아릴기는 6개 내지 12개의 고리 구성원 예컨대 페닐, 나프틸 또는 바이페닐을 갖는다. 기타 아릴기는 6개 내지 10개의 고리 구성원 예컨대 페닐 또는 나프틸을 갖는다. 일부 구체예에서, 상기 아릴 치환기는 1개 이상의 헤테로원자 (예: 산소, 질소, 및 황)에 의해 중단되어, 헤테로사이클릭 (즉, 헤테로사이클릭 또는 헤테로아릴 기)을 제공한다. 일부 구체예에서, 상기 아릴기는 하나 이상의 치환기로 치환된다.

[0101] 용어 "헤테로사이클릭 (heterocyclic)" 또는 "헤테로사이클릭기 (heterocyclic group)"는 사이클릭기, 예컨대 사이클릭기가 1개 이상의 헤테로원자 (예: 산소, 질소, 및 황)를 갖는 방향족 (예: 헤테로아릴) 또는 비-방향족인 사이클릭기를 의미한다. 일부 구체예에서, 상기 헤테로사이클릭 또는 헤테로사이클릭기 (즉, 사이클릭기 (cyclic group), 예컨대 사이클릭기가 1개 이상의 헤테로원자를 갖는 방향족 (예: 헤테로아릴) 또는 비-방향족인 사이클릭기)는 하나 이상의 치환기로 치환된다.

[0102] 본원에서 사용된, 용어 "치환된 (substituted)"은 지정된 원자의 정상 원자가가 초과되지 않는 한 지정된 원자 또는 기 (예: 치환된 알킬기) 상의 1개 이상의 수소가 다른 기로 대체되는 것을 의미할 수 있다. 예를 들어, 치환기가 옥소 (즉, $=O$) 인 경우, 원자에 있는 2개의 수소가 대체된다. 치환기는 1개 이상의 하이드록실, 아미노 (예: 1차, 2차, 또는 3차), 알데하이드, 카복실산, 에스테르, 아미드, 케톤, 니트로, 우레아, 구아니딘, 시아노, 플루오로알킬 (예: 트리플루오로메탄), 할로 (예: 플루오로), 아릴 (예: 페닐), 헤테로사이클릭 또는 헤테로사이클릭기 (즉, 사이클릭기, 예컨대 사이클릭기가 1개 이상의 헤테로원자를 갖는 방향족 (예: 헤테로아릴) 또는 비-방향족 사이클릭기), 옥소, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 치환기들 및/또는 변수들의 조합은 치환이 화합물의 합성 또는 사용에 중대하게 유해한 영향을 미치지 않는 한 허용된다.

[0103] 화학식 2에 따르면, 각 m^1 , m^2 , n^1 , n^2 , n^3 , 및 n^4 는 0 내지 1000 (예: 0 내지 500, 0 내지 200, 0 내지 100, 또는 0 내지 50)의 정수이고, 단 $m^1 + m^2 + n^1 + n^2 + n^3 + n^4$ 의 합은 5 초과, 예컨대 5-5000, 5-2000, 5-1000, 5-500, 5-100, 또는 5-50이다. 일부 구체예에서, 상기 $m^1 + m^2 + n^1 + n^2 + n^3 + n^4$ 의 합은 10 초과 또는 20 초과 (예: 10-5000, 10-2000, 10-1000, 10-500, 10-100, 또는 10-50; 또는 20-5000, 20-2000, 20-1000, 20-500, 20-100, 또는 20-50)이다. 일부 구체예에서, 각 m^1 및 m^2 는 0 내지 1000 (예: 0 내지 500, 0 내지 200, 0 내지 100, 0 내지 50, 또는 0 내지 25)의 정수이고, 단 $m^1 + m^2$ 의 합은 1 초과 (예: 1-2000, 1-1000, 1-500, 1-200, 1-100, 1-50, 또는 1-25)이다. 일부 구체예에서, 상기 $m^1 + m^2$ 의 합은 5 초과 또는 10 초과 (예: 5-2000, 5-1000, 5-500, 5-200, 5-100, 5-50, 또는 5-25; 또는 10-2000, 10-1000, 10-500, 10-200, 10-100, 10-50, 또는 10-25)이다. 소정의 구체예에서, 각 n^1 및 n^2 는 0 내지 1000 (예: 0 내지 500, 0 내지 200, 0 내지 100, 0 내지 50, 또는 0 내지 25)의 정수이고, 단 $n^1 + n^2$ 의 합은 1 초과 (예: 1-2000, 1-1000, 1-500, 1-200, 1-100, 1-50, 또는 1-25)이다. 일부 구체예에서, 상기 $n^1 + n^2$ 의 합은 5 초과 또는 10 초과 (예: 5-2000, 5-1000, 5-500, 5-200, 5-100, 5-50, 또는 5-25; 또는 10-2000, 10-1000, 10-500, 10-200, 10-100, 10-50, 또는 10-25)이다. 일부 구체예에서, 각 n^3 및 n^4 는 0 내지 1000 (예: 0 내지 500, 0 내지 200, 0 내지 100, 0 내지 50, 또는 0 내지 25)의 정수이고, 단 $n^3 + n^4$ 의 합은 1 초과 (예: 1-2000, 1-1000, 1-500, 1-200, 1-100, 1-50, 또는 1-25)이다. 일부 구체예에서, 상기 $n^3 + n^4$ 의 합은 5 초과 또는 10 초과 (예: 5-2000, 5-1000, 5-500, 5-200, 5-100, 5-50, 또는 5-25; 또는 10-2000, 10-1000, 10-500, 10-200, 10-100, 10-50, 또는 10-25)이다.

[0104] 다시 말해서, 상기 폴리머는 적어도 일부의 n^3 및/또는 n^4 모노머 유닛, 즉 폴리알킬렌 옥사이드, 폴리글리콜산, 폴리락트산, 또는 이들의 조합을 포함하는, X^4 기를 포함하는 적어도 일부의 모노머 유닛 (포괄적으로 " X^4 " 모노

머로 지칭됨)을 포함한다. 상기 폴리머는 또한 적어도 일부의 m^1 및/또는 m^2 모노머 유닛, 즉 폴리아민 또는 올리고아민 기를 포함하는, 변수 E^1 또는 E^2 를 포함하는 모노머 유닛 (포괄적으로 "E" 모노머로 지칭됨)을 포함한다. 또한, 상기 폴리머는 기 n^1 및/또는 n^2 모노머 유닛을 포함하는 적어도 일부의 모노머 유닛, 즉 소수성 기를 포함하는, X^2 기를 포함하는 모노머 유닛 (포괄적으로 " X^2 " 모노머로 지칭됨)을 포함한다.

[0105] 상기 폴리머는 E 모노머, X^2 모노머, 및 X^4 모노머를 임의의 적절한 비율로 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 폴리머는 X^2 및 X^4 모노머의 합에 대한 E 모노머의 수 비율 (number ratio) (즉, $(m^1 + m^2)/(n^1 + n^2 + n^3 + n^4)$)을 포함하고, 이는 약 0.5 내지 약 500 (예: 약 0.5 내지 약 250, 약 0.5 내지 약 100, 약 0.5 내지 약 50, 약 0.5 내지 약 10, 약 0.5 내지 약 5, 약 0.5 내지 약 2, 약 0.5 내지 약 1.5, 약 0.5 내지 약 1, 약 1 내지 약 500, 약 5 내지 약 500, 약 10 내지 약 500, 약 50 내지 약 500, 약 100 내지 약 500, 또는 약 250 내지 약 500)일 수 있다. 대안으로서 또는 추가적으로, X^4 모노머 및 E 모노머의 합에 대한 X^2 모노머의 비율 (즉, $(n^1 + n^2)/(m^1 + m^2 + n^3 + n^4)$)은 일부 구체예에서 약 0.002 내지 약 500 (예: 약 0.002 내지 약 250, 약 0.002 내지 약 100, 약 0.002 내지 약 50, 약 0.002 내지 약 10, 약 0.002 내지 약 5, 약 0.002 내지 약 1, 약 0.5 내지 약 250, 약 0.5 내지 약 100, 약 0.5 내지 약 50, 약 0.5 내지 약 10, 약 0.5 내지 약 5, 약 0.5 내지 약 2, 약 0.5 내지 약 1.5, 약 0.5 내지 약 1, 약 1 내지 약 500, 약 5 내지 약 500, 약 10 내지 약 500, 약 50 내지 약 500, 또는 약 250 내지 약 500)일 수 있다.

[0106] 대안으로서 또는 추가적으로, 일부 구체예에서, X^2 및 E 모노머의 합에 대한 X^4 모노머의 비율 (즉, $(n^3 + n^4)/(m^1 + m^2 + n^1 + n^2)$)은 약 0.002 내지 약 500 (예: 약 0.002 내지 약 250, 약 0.002 내지 약 100, 약 0.002 내지 약 50, 약 0.002 내지 약 10, 약 0.002 내지 약 5, 약 0.002 내지 약 1, 약 0.002 내지 약 0.5, 약 0.002 내지 약 0.25), 약 0.01 내지 약 500 (예: 약 0.01 내지 약 250, 약 0.01 내지 약 100, 약 0.01 내지 약 50, 약 0.01 내지 약 10, 약 0.01 내지 약 5, 약 0.01 내지 약 1, 약 0.01 내지 약 0.5, 약 0.01 내지 약 0.25), 약 0.05 내지 약 500 (예: 약 0.05 내지 약 250, 약 0.05 내지 약 100, 약 0.05 내지 약 50, 약 0.05 내지 약 10, 약 0.05 내지 약 5, 약 0.05 내지 약 1, 약 0.05 내지 약 0.5, 약 0.05 내지 약 0.25), 약 0.1 내지 약 500 (예: 약 0.1 내지 약 250, 약 0.1 내지 약 100, 약 0.1 내지 약 50, 약 0.1 내지 약 10, 약 0.1 내지 약 5, 약 0.1 내지 약 1, 약 0.1 내지 약 0.5, 약 0.1 내지 약 0.25), 약 0.5 내지 약 500 (예: 약 0.5 내지 약 250, 약 0.5 내지 약 100, 약 0.5 내지 약 50, 약 0.5 내지 약 10, 약 0.5 내지 약 5, 약 0.5 내지 약 1), 약 1 내지 약 500 (예: 약 1 내지 약 250, 약 1 내지 약 100, 약 1 내지 약 50, 약 1 내지 약 10, 약 1 내지 약 5, 약 1 내지 약 2)일 수 있다. 상기 폴리머는 임의의 적절한 타입의 구조를 가질 수 있다. 예를 들어, 상기 폴리머는 상이한 모노머들이 어떤 순서 또는 패턴에 따라 교대되는 교호 폴리머; 주어진 타입의 다수의 모노머 (예: "E" 모노머, " X^2 " 모노머, 또는 " X^4 " 모노머)가 블록으로 배열된 블록 폴리머; 또는 다양한 모노머 타입 (예: "E" 모노머, " X^2 " 모노머, 또는 " X^4 " 모노머)이 임의의 순서로 배열된 랜덤 또는 그래프트 폴리머일 수 있다. 상기 폴리머는 직쇄형 폴리머, 분지쇄형 폴리머, 고리형 폴리머, 또는 이들의 조합으로 구조화될 수 있다.

[0107] 추가적인 예시로서, 상기 모노머 (이는 참조에 의해 화학식 2에 따른 이들의 E^1 , E^2 , X^2 , 및 X^4 결사슬로 지칭될 수 있음)는 무작위 또는 임의의 순서로 배열될 수 있다. 따라서, m^1 , m^2 , n^1 , n^2 , n^3 , 및 n^4 는 단지 사슬 전체에서 나타나는 각 모노머의 수를 나타내며, 주어진 모노머의 블록 또는 스트레치가 일부 구체예에서 존재할 수 있지만, 이들 모노머의 블록을 기재하거나 또는 암시하지 않는다. 예를 들어, 화학식 2의 구조는 모노머를 $-E^1-E^2-X^2-X^4-$, $-E^2-E^1-X^2-X^4-$, $-E^1-X^2-E^2-X^4-$ 등의 순서로 포함할 수 있다. 또한, 상기 폴리머는 E^1 , E^2 , X^2 , 및/또는 X^4 모노머의 블록을 임의의 순서로 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 E^1 , E^2 , X^2 , 및 X^4 모노머는 상기 폴리머를 통해 무작위로 분포된다. 다른 구체예에서, 상기 폴리머는 E^1 , E^2 , 및 X^2 모노머가 무작위로 분포되어 있는 하나 이상의 세그먼트, 및 X^4 모노머의 블록을 포함하는 세그먼트를 포함한다. 일부 구체예에서, X^4 모노머의 블록을 포함하는 세그먼트는 E^1 , E^2 , 및 X^2 모노머들을 포함하는 세그먼트들 사이에 샌드위치될 수 있다. 다른 구체예에서, X^4 모노머의 블록을 포함하는 세그먼트는 상기 폴리머의 한쪽 단부 또는 양쪽 단부들을 캡핑(capping)한다. 일부 구체예에서, 상기 폴리머 (예: 폴리아스파타미드) 백본의 적어도 일부 (또는 전체)는 알파

/베타 입체형태로 배열된 모노머들을 포함할 것이며, 그 결과 R^{3a} 및 R^{3b} 를 포함하는 모노머 (화학식 2 참조)는 상기 백본을 따라 교대될 것이다.

[0108] 상기 폴리머 구조에서, R^{3a} 및 R^{3b} 는 각각 독립적으로 메틸렌 또는 에틸렌 기이다. 일부 구체예에서, R^{3a} 는 에틸렌기이고, R^{3b} 는 메틸렌기이거나; 또는 R^{3a} 는 메틸렌기이고, R^{3b} 는 에틸렌기이다. 일부 구체예에서, R^{3a} 및 R^{3b} 는 동일하다. 소정의 구체예에서, R^{3a} 및 R^{3b} 는 둘다 에틸렌이다. 일부 구체예에서, R^{3a} 및 R^{3b} 는 둘다 메틸렌이다.

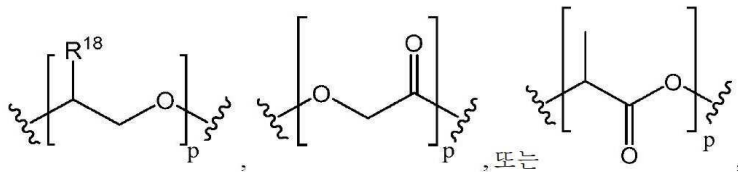
[0109] 본원에 기재된 폴리머에서, 각 X^1 및 X^3 기는 독립적으로 $-C(O)O-$, $-C(O)NR^{13}-$, $-C(O)-$, $-S(O)(O)-$, 또는 결합이다. 각 X^1 및 X^3 기는 동일하거나 또는 서로 상이할 수 있다. 일부 구체예에서, X^1 및 X^3 은 동일하다. 일부 구체예에서, X^1 및 X^3 은 $-C(O)NR^{13}-$ 이다. 일부 구체예에서, X^1 및 X^3 은 $-C(O)O-$ 이다.

[0110] R^{13} 의 각 경우는 독립적으로 수소 또는 C_1-C_{12} (예: C_1-C_8 , C_1-C_6 , 또는 C_1-C_3) 알킬기, C_2-C_{12} (예: C_2-C_8 , C_2-C_6 , 또는 C_2-C_3) 알케닐기, C_3-C_{12} (예: C_3-C_8 , C_3-C_6 , 또는 C_3-C_5) 사이클로알킬기, C_3-C_{12} (예: C_3-C_8 , C_3-C_6 , 또는 C_3-C_5) 사이클로알케닐기, 아릴기, 또는 헤테로사이클릭기 (예: 헤테로원자를 1개, 2개 또는 3개 포함하는 3-12원, 3-10원, 3-8원, 또는 3-6원 헤테로사이클릭기)이고, 이들 중 임의의 기는 하나 이상의 치환기로 치환될 수 있다. 일부 구체예에서, R^{13} 은 직쇄형 또는 분지쇄형일 수 있는, C_1-C_{12} 알킬기 (예: C_1-C_{10} 알킬기; C_1-C_8 알킬기; C_1-C_6 알킬기; C_1-C_4 알킬기, C_1-C_3 알킬기, 또는 C_1 또는 C_2 알킬기)이다. 일부 구체예에서, R^{13} 은 C_1-C_4 알킬기, C_1-C_3 알킬기, 또는 C_1 또는 C_2 알킬기이다. 소정의 구체예에서, 각 R^{13} 은 메틸 또는 수소이다. 일부 구체예에서, R^{13} 은 메틸이고; 다른 구체예에서, R^{13} 은 수소이다. 각 R^{13} 은 독립적으로 선택되고, 동일하거나 또는 상이할 수 있다; 그러나, 일부 구체예에서, 각 R^{13} 은 동일하다 (예: 모두 메틸이거나, 또는 모두 수소이다).

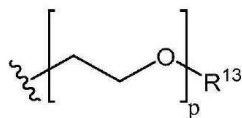
[0111] X^2 의 각 경우는 독립적으로 C_1-C_{12} (예: C_1-C_8 , C_1-C_6 , 또는 C_1-C_3) 알킬기, C_2-C_{12} (예: C_2-C_8 , C_2-C_6 , 또는 C_2-C_3) 알케닐기, C_3-C_{12} (예: C_3-C_8 , C_3-C_6 , 또는 C_3-C_5) 사이클로알킬기, C_3-C_{12} (예: C_3-C_8 , C_3-C_6 , 또는 C_3-C_5) 사이클로알케닐기, 아릴기, 또는 헤테로사이클릭기 (예: 헤테로원자를 1개, 2개 또는 3개 포함하는 3-12원, 3-10원, 3-8원, 또는 3-6원 헤테로사이클릭기) 또는 이들의 조합이고, 이들 중 임의의 기는 하나 이상의 치환기로 치환될 수 있다. 일부 구체예에서, X^2 는 고리형 또는 융합된 고리 소수성 기 (예: 4 내지 12 원 (예: C_4-C_{12})을 가진 사이클로알킬, 사이클로알케닐, 헤테로사이클릴, 또는 아릴기)를 포함한다. 일부 구체예에서, X^2 는 선택적으로 1개 이상의 1차, 2차, 또는 3차 아민을 포함할 수 있다. 다른 구체예에서, 상기 알킬 또는 알케닐 기는 1개 이상의 하이드록실기 (예: 1 또는 2개의 하이드록실기) 또는 할로젠기 (예: 1개 이상의 불소, 염소, 브롬, 또는 요오드 원자로 치환됨)로 치환될 수 있다. 구체예에서, X^2 는 소수성이고, 임의의 치환기는 X^2 기의 소수성을 무효화하지 않아야 한다 (예: 상기 기를 친수성으로 만들지 않아야 한다). 각 X^2 는 독립적으로 선택되고, 그러므로 동일하거나 또는 서로 상이할 수 있다. 일부 구체예에서, 1개 이상의 (또는 모든) X^2 기는 독립적으로 C_2-C_{12} (예: C_3-C_{12} , C_3-C_8 , C_3-C_6 , C_4-C_{12} , C_4-C_6 , C_6-C_{12} , 또는 C_8-C_{12}) 알킬기 또는 알케닐기, 또는 C_3-C_{12} (예: C_3-C_8 , C_3-C_6 , C_4-C_{12} , C_4-C_6 , C_6-C_{12} , 또는 C_8-C_{12}) 사이클로알케닐기일 수 있고, 선택적으로 1개 이상의 하이드록실기 (예: 1 또는 2개의 하이드록실기) 또는 할로젠기 (예: 1개 이상의 불소, 염소, 브롬, 또는 요오드 원자로 치환됨)로 치환된다. 다른 구체예에서, 1개 이상의 (또는 모든) X^2 기는 독립적으로 C_1-C_8 (예: C_1-C_6 , C_1-C_4 , C_1-C_3 , C_2-C_8 , C_2-C_6 , C_3-C_8 , 또는 C_3-C_6) 알킬기일 수 있고, 선택적으로 1개 이상의 하이드록실기 (예: 1 또는 2개의 하이드록실기) 또는 할로젠기 (예: 1개 이상의 불소, 염소, 브롬, 또는 요오드 원자로 치환됨)로 치환된다. 임의의 상기 알킬 또는 알케닐 기는 직쇄형 또는 분지쇄형일 수 있다.

[0112] X^4 의 각 경우는 폴리알킬렌 옥사이드, 폴리글리콜산, 폴리락트산, 또는 이들의 조합이다. 일부 구체예에서, X^4 의 각 경우는 2 내지 200개의 에틸렌 옥사이드 유닛 (예: 2 내지 150개의 유닛, 2 내지 100개의 유닛, 2 내지 50개

의 유닛, 10 내지 200개의 유닛, 10 내지 150개의 유닛, 10 내지 100개의 유닛, 10 내지 50개의 유닛, 25 내지 200개의 유닛, 25 내지 150개의 유닛, 25 내지 100개의 유닛, 25 내지 50개의 유닛, 50 내지 200개의 유닛, 50 내지 150개의 유닛, 또는 50 내지 100개의 유닛)의 총합을 갖는 적어도 하나의 폴리에틸렌 글리콜기 (즉, 폴리 에틸렌 옥사이드기)를 포함한다. 일부 구체예에서, X^4 는 2 내지 200개의 프로필렌 옥사이드 유닛 (예: 2 내지 150개의 유닛, 2 내지 100개의 유닛, 2 내지 50개의 유닛, 10 내지 200개의 유닛, 10 내지 150개의 유닛, 10 내지 100개의 유닛, 10 내지 50개의 유닛, 25 내지 200개의 유닛, 25 내지 150개의 유닛, 25 내지 100개의 유닛, 25 내지 50개의 유닛, 50 내지 200개의 유닛, 50 내지 150개의 유닛, 또는 50 내지 100개의 유닛)의 총합 을 갖는 적어도 하나의 폴리프로필렌 옥사이드기를 포함한다. 일부 구체예에서, X^4 는 2 내지 200개의 폴리락트산 및/또는 폴리글리콜산 유닛 (예: 2 내지 150개의 유닛, 2 내지 100개의 유닛, 2 내지 50개의 유닛, 10 내지 200 개의 유닛, 10 내지 150개의 유닛, 10 내지 100개의 유닛, 10 내지 50개의 유닛, 25 내지 200개의 유닛, 25 내 지 150개의 유닛, 25 내지 100개의 유닛, 25 내지 50개의 유닛, 50 내지 200개의 유닛, 50 내지 150개의 유닛, 또는 50 내지 100개의 유닛)의 총합을 갖는 적어도 하나의 폴리락트산 및/또는 폴리글리콜산 기를 포함한다. 소 정의 구체예에서, X^4 는 2 내지 200개의 에틸렌 글리콜 및/또는 프로필렌 옥사이드 유닛의 총합을 갖는 적어도 하나의 폴리에틸렌 글리콜/폴리프로필렌 옥사이드 기, 및 2 내지 200개의 폴리락트산 및/또는 폴리글리콜산 유 닷의 총합을 갖는 적어도 하나의 폴리락트산 및/또는 폴리글리콜산 기를 포함한다. 일부 구체예에서, X^4 의 각 경 우는 하기 또는 이들의 일부 조합을 포함하고:



상기에서, p 는 독립적으로 2 내지 200 (예: 2 내지 150, 2 내지 100, 2 내지 50, 10 내지 200, 10 내지 150, 10 내지 100, 10 내지 50, 25 내지 200, 25 내지 150, 25 내지 100, 25 내지 50, 50 내지 200, 50 내지 150, 또는 50 내지 100)의 정수이고, R^{18} 의 각 경우는 독립적으로 수소 또는 메틸이다. 상기 X^4 기는 본원에 정의된 R^{13} 기로 추가로 종결될 수 있다. 일부 구체예에서, X^4 는 하기이다:



상기에서, p 및 R^{13} 은 이전에 정의된 바와 같다.

E^1 및 E^2 기에서, 정수 $p1$ 내지 $p4$ (즉, $p1$, $p2$, $p3$, 및 $p4$), $q1$ 내지 $q6$ (즉, $q1$, $q2$, $q3$, $q4$, $q5$, 및 $q6$), $r1$, $r2$, 및 $s1$ 내지 $s4$ (즉, $s1$, $s2$, $s3$, 및 $s4$)는 각각 독립적으로 1 내지 5 (예: 1, 2, 3, 4, 또는 5)의 정 수이다. 일부 구체예에서, $p1$ 내지 $p4$ (즉, $p1$, $p2$, $p3$, 및 $p4$), $q1$ 내지 $q6$ (즉, $q1$, $q2$, $q3$, $q4$, $q5$, 및 $q6$), $r1$, $r2$, 및/또는 $s1$ 내지 $s4$ 는 각각 독립적으로 1 내지 3 (예: 1, 2, 또는 3)의 정수이다. 소정의 구체예 에서, $p1$ 내지 $p4$ (즉, $p1$, $p2$, $p3$, 및 $p4$), $q1$ 내지 $q6$ (즉, $q1$, $q2$, $q3$, $q4$, $q5$, 및 $q6$), 및/또는 $s1$ 내지 $s4$ (즉, $s1$, $s2$, $s3$, 및 $s4$)는 각각 2이다. 일부 구체예에서, $p1$ 내지 $p4$ (즉, $p1$, $p2$, $p3$, 및 $p4$) 및/또는 $q1$ 내지 $q6$ (즉, $q1$, $q2$, $q3$, $q4$, $q5$, 및 $q6$)은 각각 2이고, $r1$, $r2$, 및 $s1$ 내지 $s4$ (즉, $s1$, $s2$, $s3$, 및 $s4$)는 각각 1이다.

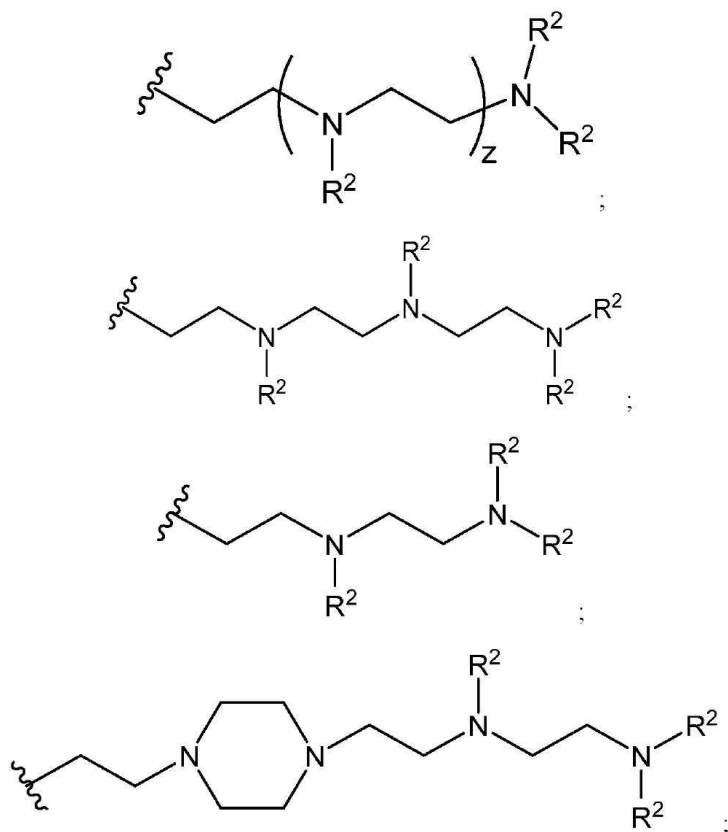
R^2 의 각 경우는 수소 또는 C_1-C_{12} (예: C_1-C_8 , C_1-C_6 , 또는 C_1-C_3) 알킬기, C_2-C_{12} (예: C_2-C_8 , C_2-C_6 , 또는 C_2-C_3) 알케닐기, C_3-C_{12} (예: C_3-C_8 , C_3-C_6 , 또는 C_3-C_5) 사이클로알킬기, C_3-C_{12} (예: C_3-C_8 , C_3-C_6 , 또는 C_3-C_5) 사이클로 알케닐기일 수 있거나, 또는 R^2 는 제 R^2 와 조합하여 헤테로사이클릭기를 형성한다. 일부 구체예에서, R^2 는 수소, 또는 직쇄형 또는 분지쇄형일 수 있는 C_1-C_{12} 알킬 (예: C_1-C_{10} 알킬기; C_1-C_8 알킬기; C_1-C_6 알킬기; C_1-C_4 알킬기, C_1-C_3 알킬기, 또는 C_1 또는 C_2 알킬기)이다. 소정의 구체예에서, R^2 는 메틸이다. 다른 구체예에서, R^2 는

수소일 수 있다. 각 R^2 는 독립적으로 선택되고, 동일하거나 또는 상이할 수 있다. 일부 구체예에서, 해당하는 각 R^2 는 동일하다 (예: 모두 메틸 또는 모두 수소).

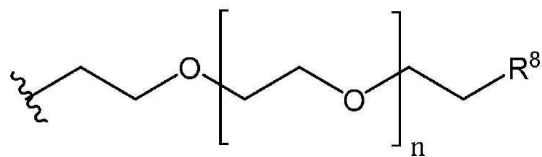
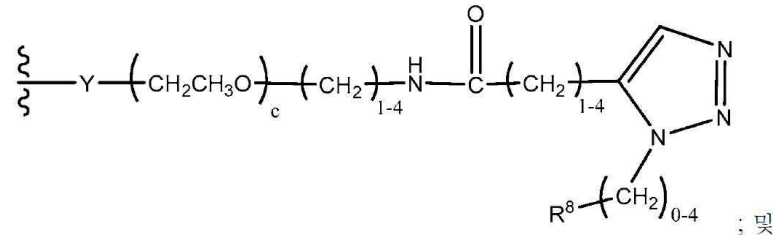
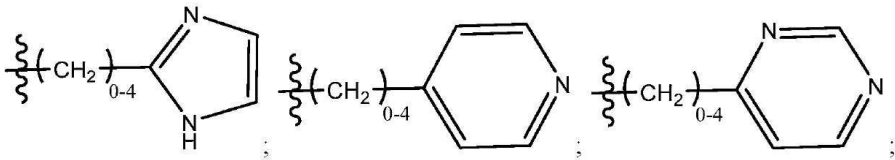
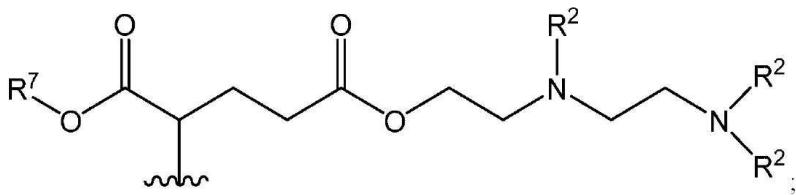
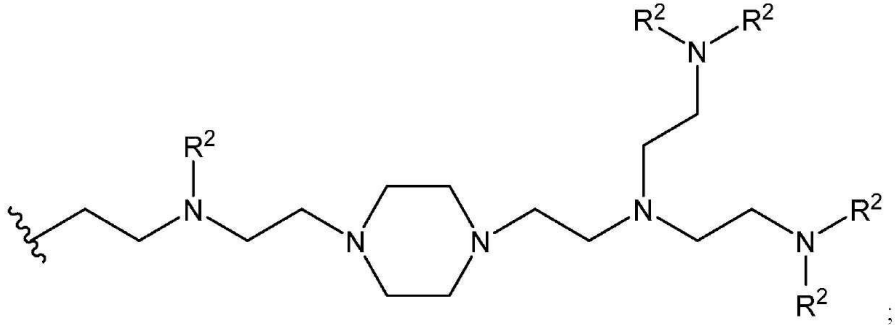
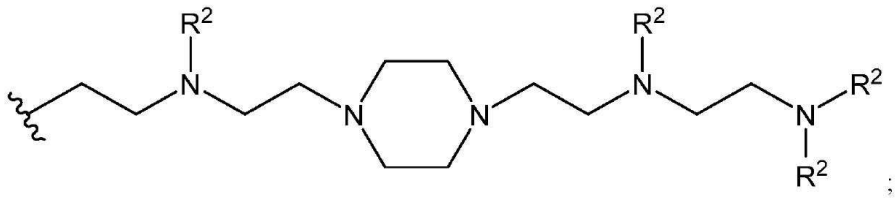
[0119] R^4 의 각 경우는 독립적으로 $-C(O)O-$, $-C(O)NH-$, 또는 $-S(O)(O)-$ 이다. 일부 구체예에서, R^4 의 각 경우는 독립적으로 $-C(O)O-$ 또는 $-C(O)NH-$ 이다. 소정의 구체예에서, R^4 의 각 경우는 $-C(O)O-$ 이다. 소정의 구체예에서, R^4 의 각 경우는 $-C(O)NH-$ 이다.

[0120] R^5 의 각 경우는 독립적으로 알킬기, 사이클로알킬기, 알케닐기, 사이클로알케닐기, 아릴기, 헤테로알킬기, 헤테로사이클릭기, 또는 이들의 조합으로, 이들은 선택적으로 2 내지 8개의 3차 아민을 포함하고, 또는 조직-특이적 또는 세포-특이적 표적화 모이어티를 포함하는 치환기이다. R^5 는 약 2 내지 약 50개의 탄소 원자 (예: 약 2 내지 약 40개의 탄소 원자, 약 2 내지 약 30개의 탄소 원자, 약 2 내지 약 20개의 탄소 원자, 약 2 내지 약 16개의 탄소 원자, 약 2 내지 약 12개의 탄소 원자, 약 2 내지 약 10개의 탄소 원자, 또는 약 2 내지 약 8개의 탄소 원자)를 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, R^5 는 2 내지 8개 (즉, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8개)의 3차 아민을 포함하는 헤테로알킬기이다. 상기 3차 아민은 헤테로알킬 백본 (즉, 헤테로알킬기에서 가장 긴 연속한 원자의 사슬)의 일부, 또는 펜던트 치환기일 수 있다. 따라서, 예를 들어, 상기 3차 아민을 포함하는 헤테로알킬기는 2 내지 8개의 3차 아민을 포함하는, 알킬아미노기, 아미노 알킬기, 알킬아미노알킬기, 아미노알킬아미노기, 또는 유사물을 제공할 수 있다.

[0121] 일부 구체예에서, 각 R^5 는 독립적으로 하기로부터 선택된다:



[0122]



[0123]

[0124] 상기에서,

[0125] R²의 각 경우는 상기에 기재된 바와 같고;

[0126] R⁷은 C₁-C₅₀ 알킬기, 알케닐기, 사이클로알킬기, 또는 사이클로알케닐기로, 선택적으로 1개 이상의 아민으로 치환되며;

[0127] z는 1 내지 5의 정수이고;

[0128] c는 0 내지 50의 정수이며;

[0129] Y는 선택적으로 존재하고, 절단 가능한 링커이며;

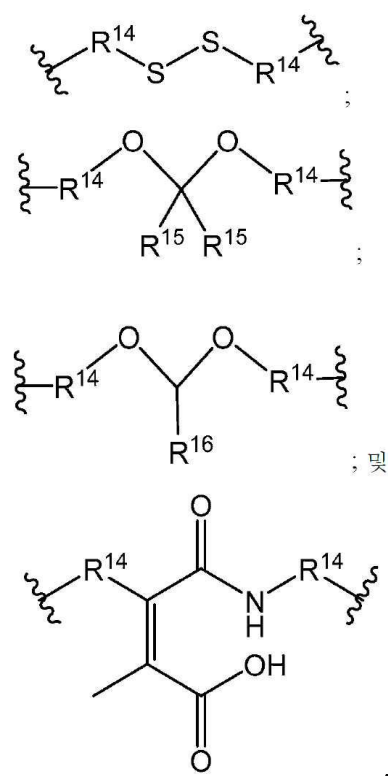
[0130] n은 0 내지 50의 정수이고;

[0131] R⁸은 조직-특이적 또는 세포-특이적 표적화 모이어티이다. C₁-C₁₂ 알킬기, 알케닐기, 사이클로알킬기, 또는 사이

클로알케닐기.

[0132] R^7 은 C_1-C_{50} (예: C_1-C_{40} , C_1-C_{30} , C_1-C_{20} , C_1-C_{10} , C_4-C_{12} , 또는 C_6-C_8) 알킬기, 알케닐기, 사이클로알킬기, 또는 사이클로알케닐기로, 이들은 선택적으로 1개 이상의 아민으로 치환될 수 있다. 일부 구체예에서, R^7 은 C_4-C_{12} , 예컨대 C_6-C_8 알킬기, 알케닐기, 사이클로알킬기, 또는 사이클로알케닐기로, 이들은 선택적으로 1개 이상의 아민으로 치환된다. 일부 구체예에서, R^7 은 1개 이상의 아민으로 치환된다. 소정의 구체예에서, R^7 은 2 내지 8개 (즉, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8개)의 3차 아민으로 치환된다. 상기 3차 아민은 알킬기의 일부 (즉, 알킬기 백본에 포함됨) 또는 펜던트 치환기일 수 있다.

[0133] Y의 각 경우는 선택적으로 존재한다. 본원에서 사용된, 문구 "선택적으로 존재하는 (optionally present)"은 선택적으로 존재하는 것으로 지정된 치환기가 존재하거나 또는 존재하지 않을 수 있으며, 해당 치환기가 존재하지 않는 경우, 인접한 치환기가 서로 직접 결합된다는 것을 의미한다. Y가 존재하는 경우, Y는 절단 가능한 링커이다. 본원에서 사용된, 문구 "절단 가능한 링커 (cleavable linker)"는 2개의 종들을 분리하기 위해 절단될 수 있는, 2개의 종들을 연결하는 임의의 화학적 요소 (chemical element)를 의미한다. 예를 들어, 상기 절단 가능한 링커는 가수분해 공정, 광화학 공정, 라디칼 공정, 효소 공정, 전기화학 공정, 또는 이들의 조합에 의해 절단될 수 있다. 예시되는 절단 가능한 링커는 하기를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다:



[0134]

[0135] 상기에서, R^{14} 의 각 경우는 독립적으로 C_1-C_4 알킬기이고, R^{15} 의 각 경우는 독립적으로 수소, 아틸기, 헤테로사이클릭기 (예: 방향족 또는 비-방향족), C_1-C_{12} 알킬기, 알케닐기, 사이클로알킬기, 또는 사이클로알케닐기이고, R^{16} 은 1개 이상의 $-OCH_3$, $-NHCH_3$, $-N(CH_3)_2$, $-SCH_3$, $-OH$, 또는 이들의 조합으로 선택적으로 치환된, 6-원 방향족 또는 헤테로방향족 기이다.

[0136] 각 E^1 및 E^2 는 이전에 정의된 기들 중 하나일 수 있다. E^1 및 E^2 는 동일하거나 또는 상이할 수 있다. 일부 구체예에서, E^1 및 E^2 는 동일하다. 일부 구체예에서, E^1 및 E^2 는 독립적으로 하기 화학식의 기를 갖는다:

[0137] $-(CH_2)_{p1}-[NR^2-(CH_2)_{q1}-]_{r1}NR^2_2$;

200, 10 내지 150, 10 내지 100, 10 내지 50, 25 내지 200, 25 내지 150, 25 내지 100, 25 내지 50, 50 내지 200, 50 내지 150, 또는 50 내지 100)의 정수이고;

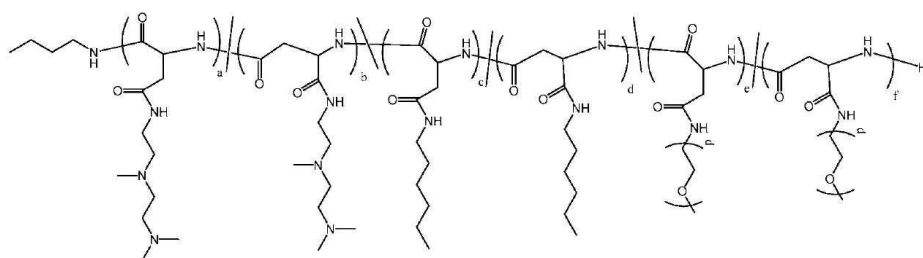
[0149] Y는 선택적으로 존재하고, 절단 가능한 링커이며;

[0150] R^{17} 은 수소, 아릴기, 헤테로사이클릭기, C_1-C_{12} (예: C_1-C_8 , C_1-C_6 , 또는 C_1-C_3) 알킬 또는 헤테로알킬기, C_2-C_{12} (예: C_2-C_8 , C_2-C_6 , 또는 C_2-C_3) 알케닐기, C_3-C_{12} (예: C_3-C_8 , C_3-C_6 , 또는 C_3-C_5) 사이클로알킬기, 또는 C_3-C_{12} (예: C_3-C_8 , C_3-C_6 , 또는 C_3-C_5) 사이클로알케닐기로서, 선택적으로 하나 이상의 치환기로 치환되고;

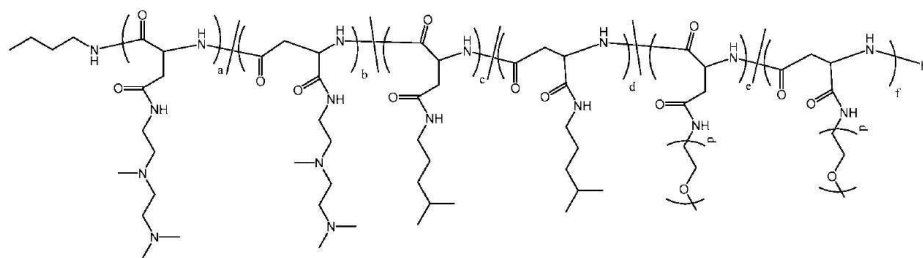
[0151] R^6 은 수소, 아미노기, 아릴기, 헤테로사이클릭기, C_1-C_{12} (예: C_1-C_8 , C_1-C_6 , 또는 C_1-C_3) 알킬 또는 헤테로알킬기, C_2-C_{12} (예: C_2-C_8 , C_2-C_6 , 또는 C_2-C_3) 알케닐기, C_3-C_{12} (예: C_3-C_8 , C_3-C_6 , 또는 C_3-C_5) 사이클로알킬기, 또는 C_3-C_{12} (예: C_3-C_8 , C_3-C_6 , 또는 C_3-C_5) 사이클로알케닐기로, 이들은 선택적으로 1개 이상의 아민으로 치환되고; 또는 조직-특이적 또는 세포-특이적 표적화 모이어티이고;

[0152] 화학식 2A의 모든 다른 변수 및 치환기는 이의 임의의 및 모든 구체예를 포함하는, 화학식 2에 대해 정의된 바와 같다. 일부 구체예에서, R^{17} 및/또는 R^6 은 직쇄형 또는 분지쇄형일 수 있는, C_1-C_{12} 알킬 (예: C_1-C_{10} 알킬기; C_1-C_8 알킬기; C_1-C_6 알킬기; C_1-C_4 알킬기, C_1-C_3 알킬기, 또는 C_1 또는 C_2 알킬기)이고, 이는 선택적으로 하나 이상의 치환기로 치환된다. 소정의 구체예에서, 상기 헤테로알킬 또는 알킬 기는 1개 이상의 아민, 예를 들어 2 내지 8개 (즉, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8개)의 3차 아민을 포함하거나 또는 이로 치환된다. 상기 3차 아민은 헤테로알킬 백본 사슬의 일부 또는 펜던트 치환기일 수 있다.

[0153] 본원에서 제공된 폴리머의 비-제한적인 예로는 예를 들어 하기를 포함한다:

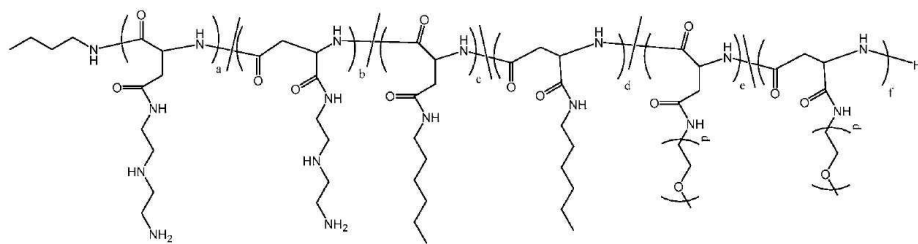


폴리머 72

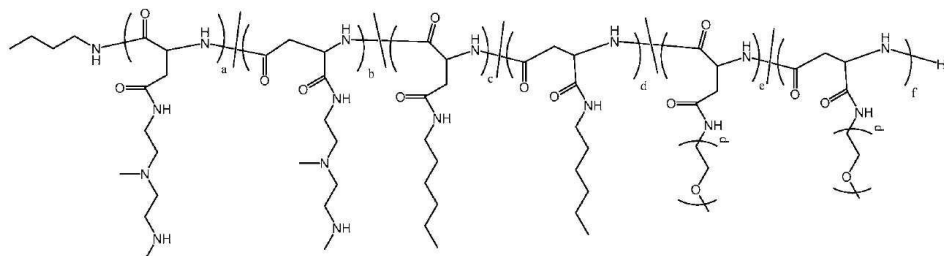


폴리머 73

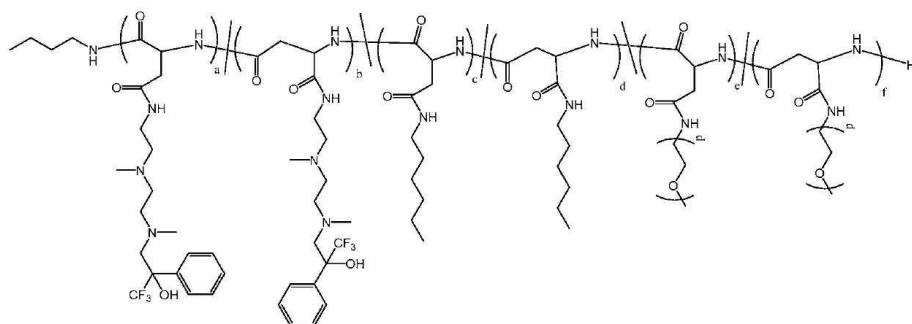
[0154]



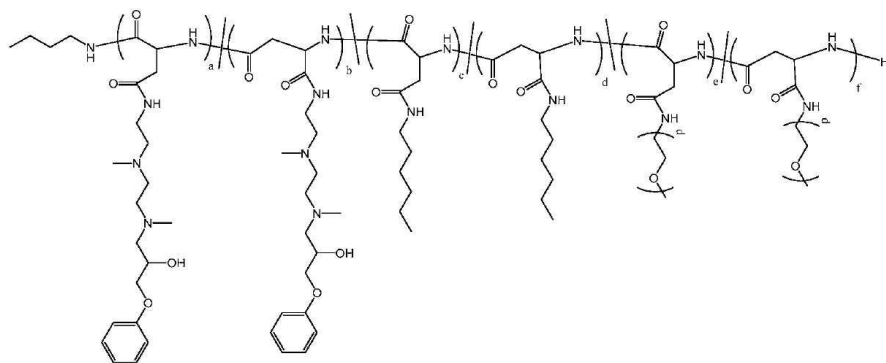
폴리머 74



폴리머 75

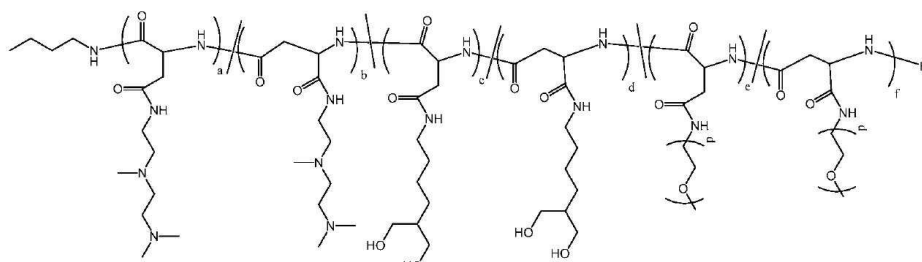


폴리머 76

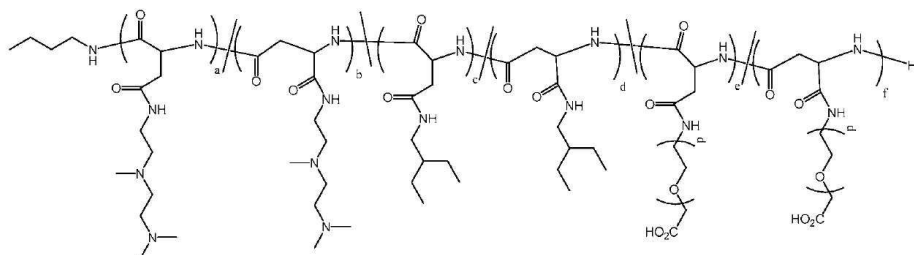


폴리머 77

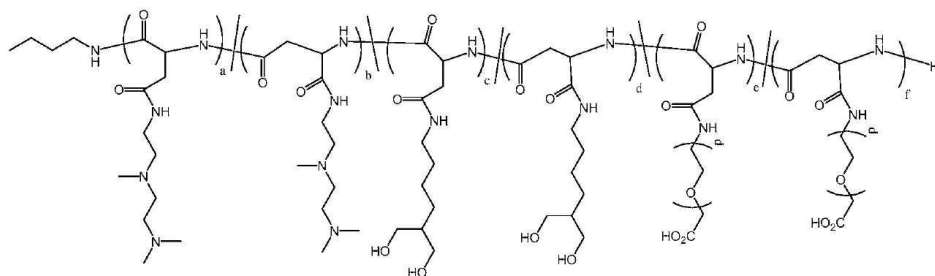
[0155]



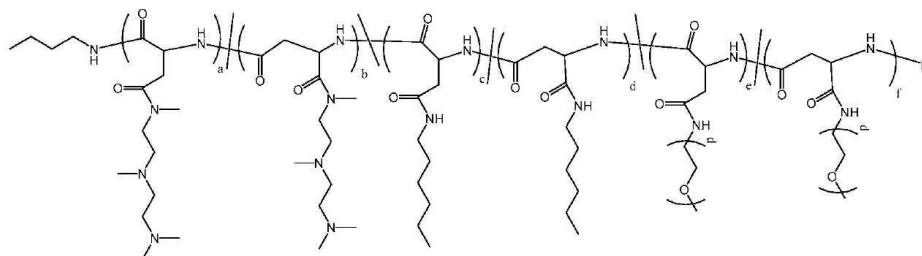
폴리머 78



폴리머 79

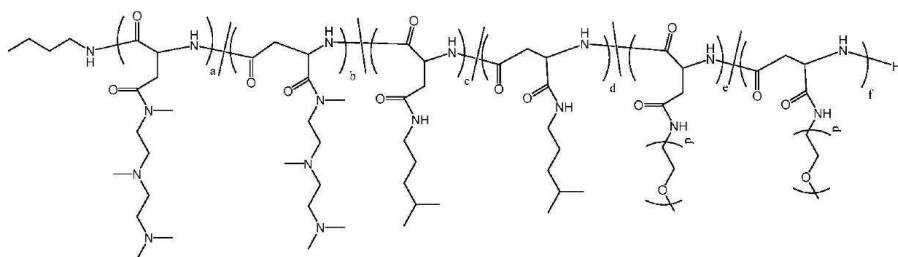


폴리머 80

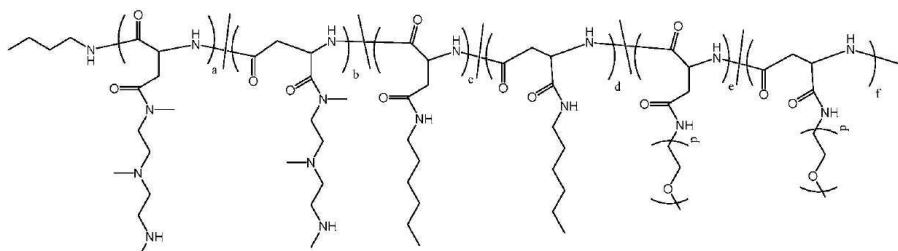


폴리머 81

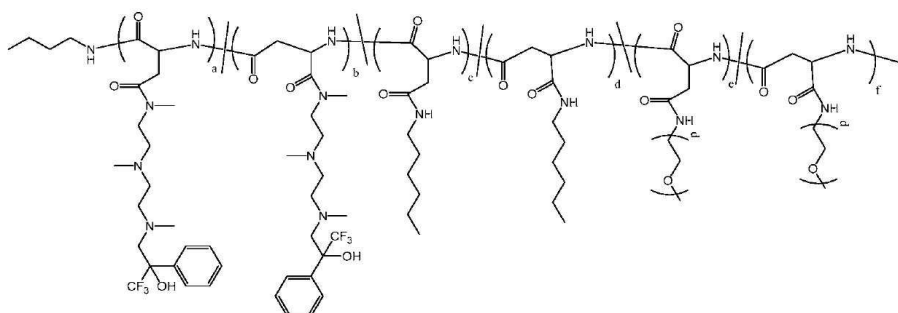
[0156]



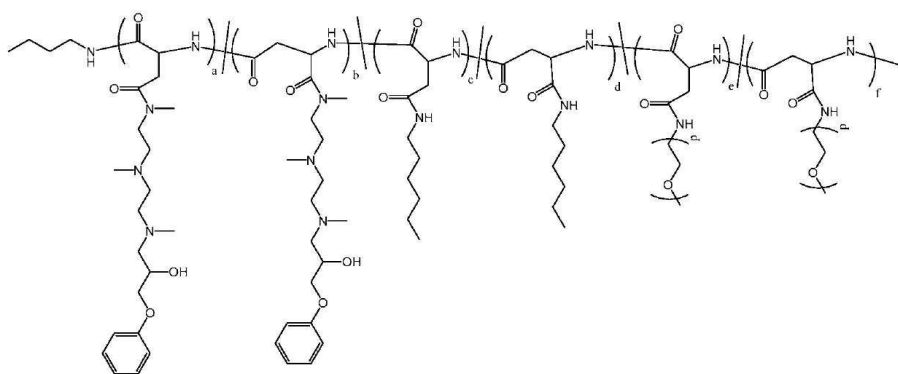
폴리머 82



폴리머 83

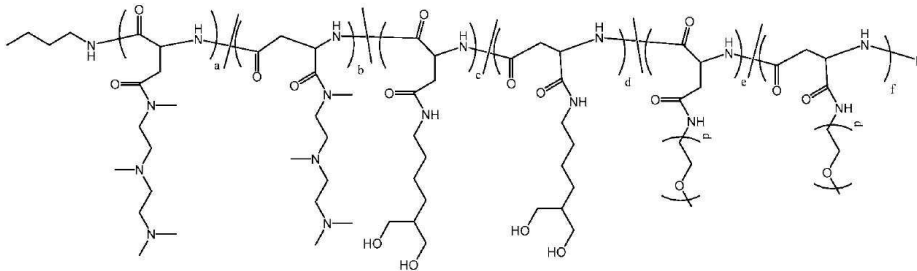


폴리머 84

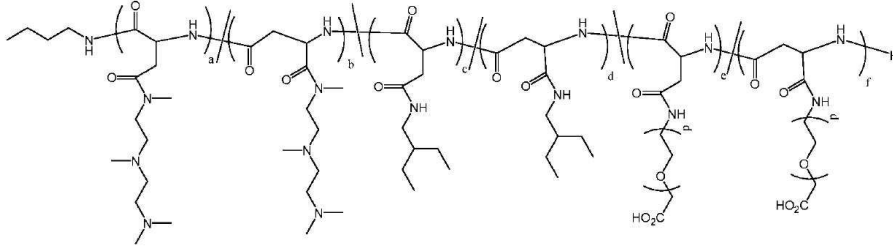


폴리머 85

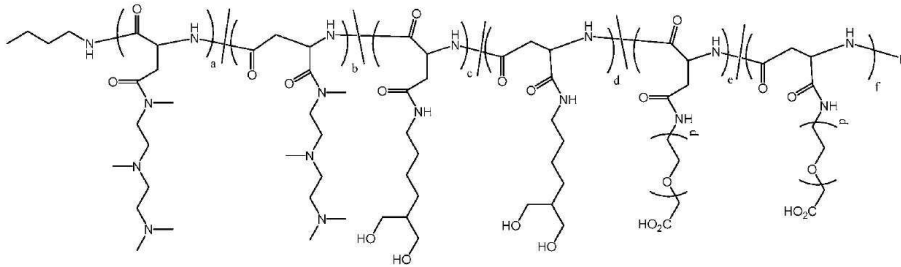
[0157]



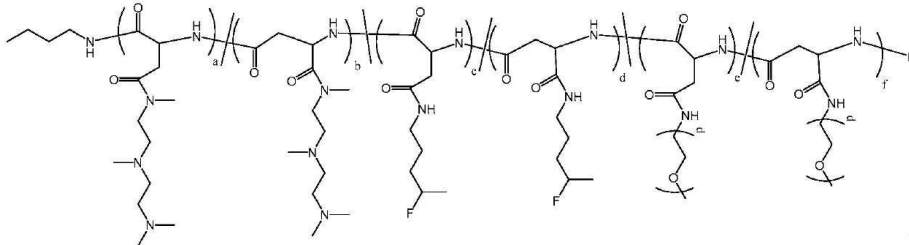
폴리머 86



폴리머 87

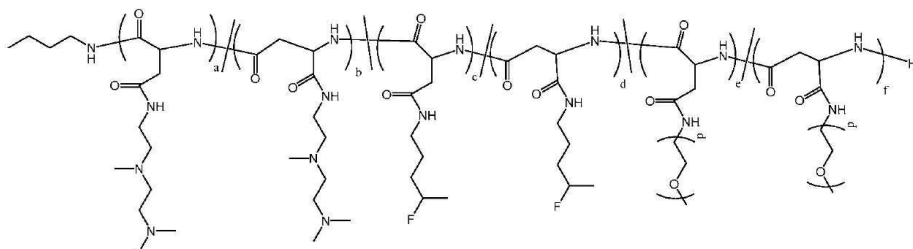


폴리머 88



폴리머 89

또는



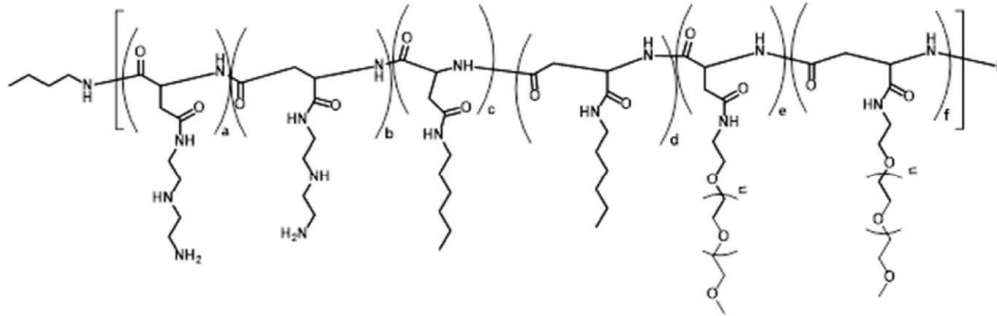
폴리머 90

이들 폴리머의 예에서 유닛의 개수의 표시 ("a", "b", "c", "d", "e", 및 "f")는 블록 코-폴리머 구조를 의미하지 않고; 오히려 이러한 개수는 전체 특정한 모노머 유닛의 개수를 나타내고, 이들 유닛은 폴리머 전체에 무작위로 배열된 모노머들 또는 모노머들의 블록을 포함하여, 임의의 순서로 배열될 수 있다. 일부 경우에, 이는 화학식 중에서 "/" 기호에 의해 추가로 표시되지만; 그러나, "/"의 부재는 폴리머가 특정한 순서로 결합되는 것을 의미하는 것으로 해석되어서는 안된다. 전술한 폴리머들의 일부 구체예에서, 괄호 및 정수 (적용 가능한 경우 "a", "b", "c", "d", "e", 및 "f")로 표시되는 모노머는 무작위로 배열되거나 또는 폴리머 전체에 점재된다.

전술한 폴리머의 일부 구체예에서, (a+b)는 약 5 내지 약 65 (예: 약 5 내지 약 50, 약 5 내지 약 40, 약 5 내

지 약 30, 약 5 내지 약 20, 또는 약 5 내지 약 10)이고, (c+d)는 약 2 내지 약 60 (예: 약 2 내지 약 50, 약 2 내지 약 40, 약 2 내지 약 30, 약 2 내지 약 20, 또는 약 2 내지 약 10)이며, (e+f)는 약 2 내지 약 60 (예: 약 2 내지 약 50, 약 2 내지 약 40, 약 2 내지 약 30, 약 2 내지 약 20, 또는 약 2 내지 약 10)이고, p의 각 경우는 독립적으로 2 내지 200 (예: 2 내지 150, 2 내지 100, 2 내지 50, 6 내지 36, 6 내지 30, 6 내지 24, 6 내지 18, 8 내지 36, 8 내지 30, 8 내지 26, 8 내지 18, 10 내지 200, 10 내지 150, 10 내지 100, 10 내지 50, 25 내지 200, 25 내지 150, 25 내지 100, 25 내지 50, 50 내지 200, 50 내지 150, 또는 50 내지 100)의 정수이다.

[0162] 특정 구체예에서, 상기 폴리머는 폴리머 72, 73, 74 또는 75의 구조를 갖거나, 또는 하기 구조를 갖는다:



[0163]

[0164] 상기에서, n은 6-24, 또는 초과 (예: 24-60 또는 40-50)이고, a, b, c, d, e 및 f는 상기 기재된 바와 같다.

[0165] 본 개시내용에 의해 제공되는 폴리머의 전술된 특정한 예들 중 일부는 특정한 말단기 (예: 알킬아미노, 수소 등)를 갖는 것으로 표시되지만; 그러나 전술된 특정한 구조들은 상이한 말단기를 포함할 수 있다. 예를 들어, 전술된 구조들은 폴리머 백본의 한쪽 말단 또는 양쪽 말단에 본원에 기재된 R¹, R⁶, 또는 Q 기를 포함한다.

[0166] 전형적으로, 상기 폴리머는 양이온성 (즉, pH 7 및 23°C에서 양으로 하전됨)이다. 본원에서 사용된, "양이온성 (cationic)" 폴리머는 폴리머가 양이온성 모노머 유닛만을 포함하거나, 또는 양이온성 모노머 유닛과 비-이온성 또는 음이온성 모노머 유닛의 조합을 포함하는지 여부와 관계 없이, 전체 순 양전하를 갖는 폴리머를 지칭한다.

[0167] 소정의 구체예에서, 본원에 기재된 폴리머는 약 5 kDa 내지 약 2,000 kDa의 중량 평균 분자량을 갖는다. 상기 폴리머는 약 2,000 kDa 이하, 예를 들어 약 1,800 kDa 이하, 약 1,600 kDa 이하, 약 1,400 kDa 이하, 약 1,200 kDa 이하, 약 1,000 kDa 이하, 약 900 kDa 이하, 약 800 kDa 이하, 약 700 kDa 이하, 약 600 kDa 이하, 약 500 kDa 이하, 약 100 kDa 이하, 또는 약 50 kDa 이하의 중량 평균 분자량을 가질 수 있다. 대안으로서, 또는 추가적으로, 상기 폴리머는 약 10 kDa 이상, 예를 들어 약 50 kDa 이상, 약 100 kDa 이상, 약 200 kDa 이상, 약 300 kDa 이상, 또는 약 400 kDa 이상의 중량 평균 분자량을 가질 수 있다. 따라서, 상기 폴리머는 전술한 종점 중 임의의 2개에 의해 한정되는 중량 평균 분자량을 가질 수 있다. 예를 들어, 상기 폴리머는 약 10 kDa 내지 약 50 kDa, 약 10 kDa 내지 약 100 kDa, 약 10 kDa 내지 약 500 kDa, 약 50 kDa 내지 약 500 kDa, 약 100 kDa 내지 약 500 kDa, 약 200 kDa 내지 약 500 kDa, 약 300 kDa 내지 약 500 kDa, 약 400 kDa 내지 약 500 kDa, 약 400 kDa 내지 약 600 kDa, 약 400 kDa 내지 약 700 kDa, 약 400 kDa 내지 약 800 kDa, 약 400 kDa 내지 약 900 kDa, 약 400 kDa 내지 약 1,000 kDa, 약 400 kDa 내지 약 1,200 kDa, 약 400 kDa 내지 약 1,400 kDa, 약 400 kDa 내지 약 1,600 kDa, 약 400 kDa 내지 약 1,800 kDa, 약 400 kDa 내지 약 2,000 kDa, 약 200 kDa 내지 약 2,000 kDa, 약 500 kDa 내지 약 2,000 kDa, 또는 약 800 kDa 내지 약 2,000 kDa의 중량 평균 분자량을 가질 수 있다. 상기 중량 평균 분자량은 임의의 적절한 기법에 의해 결정될 수 있다. 일반적으로, 상기 중량 평균 분자량은 TSKgel Guard, GMPW, GMPW, G1000PW, 및 Waters 2414 (Waters Corporation, Milford, Massachusetts) 굴절률 검출기로부터 선택된, 컬럼이 장착된 크기 배제 크로마토그래피를 사용하여 결정된다. 또한 중량 평균 분자량은 150-875,000 달톤 범위의 폴리에틸렌 옥사이드/폴리에틸렌 글리콜 표준을 사용한 보정 (calibration)으로부터 결정된다.

[0168] 폴리머를 제조하는 방법

[0169] (a) 소수성 기를 포함하는 결사슬을 갖는 모노머 유닛; (b) 올리고아민 또는 폴리아민을 포함하는 결사슬을 갖는 모노머 유닛; 및 (c) 폴리알킬렌 옥사이드, 폴리글리콜산, 폴리락트산, 또는 이들의 조합을 포함하는 결사슬을 갖는 모노머 유닛을 포함하는, 가수분해성 폴리머 백본을 포함하는, 본원에 제공된 폴리머는 임의의 적절한 방법에 의해 제조될 수 있으며, 이들의 예로는 본원에 기재되고, 실시예에서 예시된다. 일 양상에서, 본 개시내

- [0181] $-(CH_2)_{p1}-[NR^2-(CH_2)_{q1}-]_{r1}NR^2_2$;
- [0182] $-(CH_2)_{p2}-N[-(CH_2)_{q2}-NR^2_2]_2$;
- [0183] $-(CH_2)_{p3}-N\{[-(CH_2)_{q3}-NR^2_2][-(CH_2)_{q4}-NR^2-]_{r2}R^2\}$; 또는
- [0184] $-(CH_2)_{p4}-N\{-(CH_2)_{q5}-N[-(CH_2)_{q6}-NR^2_2]_2\}_2$,
- [0185] $-(CH_2)_{p1}-[NR^2-(CH_2)_{q1}-]_{r1}NR^2-(CH_2)_{s1}-R^4-R^5$;
- [0186] $-(CH_2)_{p2}-N[-(CH_2)_{q2}-NR^2-(CH_2)_{s2}-R^4-R^5]_2$;
- [0187] $-(CH_2)_{p3}-N\{[-(CH_2)_{q3}-NR^2_2][-(CH_2)_{q4}-NR^2-]_{r2}(CH_2)_{s3}-R^4-R^5\}$;
- [0188] $-(CH_2)_{p4}-N\{-(CH_2)_{q5}-N[-(CH_2)_{q6}-NR^2-(CH_2)_{s4}-R^4-R^5]_2\}_2$;
- [0189] $-(CH_2)_{p1}-[NR^2-(CH_2)_{q1}-]_{r1}NR^2-CH_2-CHOH-R^5$;
- [0190] $-(CH_2)_{p2}-N[-(CH_2)_{q2}-NR^2-CH_2-CHOH-R^5]$;
- [0191] $-(CH_2)_{p3}-N\{[-(CH_2)_{q3}-NR^2_2][-(CH_2)_{q4}-NR^2-]_{r2}-CH_2-CHOH-R^5\}$;
- [0192] $-(CH_2)_{p4}-N\{-(CH_2)_{q5}-N[-(CH_2)_{q6}-NR^2-CH_2-CHOH-R^5]_2\}_2$;
- [0193] $-(CH_2)_{p1}-[NR^2-(CH_2)_{q1}-]_{r1}NR^2-(CH_2)_{s1}-R^5$;
- [0194] $-(CH_2)_{p2}-N[-(CH_2)_{q2}-NR^2-(CH_2)_{s2}-R^5]_2$;
- [0195] $-(CH_2)_{p3}-N\{[-(CH_2)_{q3}-NR^2_2][-(CH_2)_{q4}-NR^2-]_{r2}(CH_2)_{s3}-R^5\}$;
- [0196] $-(CH_2)_{p4}-N\{-(CH_2)_{q5}-N[-(CH_2)_{q6}-NR^2-(CH_2)_{s4}-R^5]_2\}_2$;
- [0197] $-(CH_2)_{p1}-[N\{(CH_2)_{s1}-R^4-R^5\}-(CH_2)_{q1}-]_{r1}NR^2_2$;
- [0198] $-(CH_2)_{p1}-[N\{(CH_2)_{s1}-R^5\}-(CH_2)_{q1}-]_{r1}NR^2_2$,
- [0199] $-(CH_2)_{p1}-[NR^2-(CH_2)_{q1}-]_{r1}NR^2-CH(CONH_2)-(CH_2)_{s1}-R^5$; 또는
- [0200] $-(CH_2)_{p1}-[NR^2-(CH_2)_{q1}-]_{r1}NR^2-CH(CONH_2)-(CH_2)_{s1}-R^4-R^5$,
- [0201] 상기에서, p1 내지 p4, q1 내지 q6, r1 및 r2, 및 s1 내지 s4는 각각 독립적으로 1 내지 5의 정수이고;
- [0202] R^2 의 각 경우는 독립적으로 수소, 아릴기, 헤테로사이클릭기, C_1 - C_{12} 알킬기, C_2 - C_{12} 알케닐기, C_3 - C_{12} 사이클로알킬기, 또는 C_3 - C_{12} 사이클로알케닐기이고, 이들 중 임의의 기는 선택적으로 하나 이상의 치환기로 치환되거나, 또는 R^2 는 제2 R^2 와 조합하여 헤테로사이클릭기를 형성하며;
- [0203] R^4 의 각 경우는 독립적으로 $-C(O)O-$, $-C(O)NH-$, $-O-C(O)O-$, 또는 $-S(O)(O)-$ 이고;
- [0204] R^5 의 각 경우는 독립적으로 C_1 - C_{12} 알킬기, C_2 - C_{12} 알케닐기, C_3 - C_{12} 사이클로알킬기, 또는 C_3 - C_{12}

사이클로알케닐기, 아릴기, C₁-C₁₂ 헤테로알킬기, C₃-C₁₂ 헤테로사이클릭기, 또는 이들의 조합으로, 이들은 선택적으로 2 내지 8개의 3차 아민을 포함하고, 또는 조직-특이적 또는 세포-특이적 표적화 모이어티를 포함하는 치환기이다.

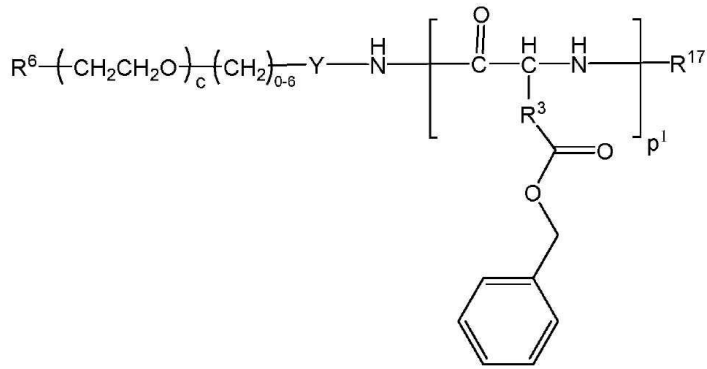
[0205] 화학식 H₂NX² 또는 HOX²의 화합물 중 X² 기는 이의 임의의 및 모든 구체예를 포함하는, 화학식 2 및 2A에 대해 기재된 바와 같다.

[0206] 화학식 2, 6 및 7의 모든 다른 치환기 및 변수는 이의 임의의 및 모든 구체예를 포함하는, 본 발명의 폴리머 (예: 화학식 2 및 2A)에 대해 본원에 기재된 바와 같다.

[0207] 화학식 HNR^{13.1}E¹ 및/또는 HNR^{13.2}E², 화학식 H₂NX² 및/또는 HOX², 및/또는 화학식 H₂NX⁴ 및/또는 HOX⁴의 화합물을 원하는 치환도에 따라 임의의 적절한 방식 및 양으로 화학식 6 또는 7의 화합물에 부가할 수 있다. 일부 구체예에서, 화학식 H₂NX² 또는 HOX²의 화합물의 약 1-400 당량 (예: 약 1-350, 1-300, 1-250, 1-200, 1-150, 1-100, 1-50, 10-400, 10-350, 10-300, 10-250, 10-200, 10-150, 10-100, 10-50, 20-400, 20-350, 20-300, 20-250, 20-200, 20-150, 20-100, 20-50, 30-400, 30-350, 30-300, 30-250, 30-200, 30-150, 30-100, 30-50, 40-400, 40-350, 40-300, 40-250, 40-200, 40-150, 40-100, 40-50, 50-400, 50-350, 50-300, 50-250, 50-200, 50-150, 또는 50-100 당량)을 화학식 6의 구조를 포함하는 폴리머에 부가하였다. 또한, 일부 구체예에서, 화학식 HNR^{13.1}E¹ 또는 HNR^{13.2}E²의 화합물의 약 1-400 당량 (예: 약 1-350, 1-300, 1-250, 1-200, 1-150, 1-100, 1-50, 10-400, 10-350, 10-300, 10-250, 10-200, 10-150, 10-100, 10-50, 20-400, 20-350, 20-300, 20-250, 20-200, 20-150, 20-100, 20-50, 30-400, 30-350, 30-300, 30-250, 30-200, 30-150, 30-100, 30-50, 40-400, 40-350, 40-300, 40-250, 40-200, 40-150, 40-100, 40-50, 50-400, 50-350, 50-300, 50-250, 50-200, 50-150, 또는 50-100 당량)을 화학식 6 또는 화학식 7의 구조를 포함하는 폴리머에 부가한다. 또한, 일부 구체예에서, 화학식 H₂NX⁴ 또는 HOX⁴의 화합물의 약 1-400 당량 (예: 약 1-350, 1-300, 1-250, 1-200, 1-150, 1-100, 1-50, 10-400, 10-350, 10-300, 10-250, 10-200, 10-150, 10-100, 10-50, 20-400, 20-350, 20-300, 20-250, 20-200, 20-150, 20-100, 20-50, 30-400, 30-350, 30-300, 30-250, 30-200, 30-150, 30-100, 30-50, 40-400, 40-350, 40-300, 40-250, 40-200, 40-150, 40-100, 40-50, 50-400, 50-350, 50-300, 50-250, 50-200, 50-150, 또는 50-100 당량)을 화학식 6 또는 화학식 7의 구조를 포함하는 폴리머에 부가한다.

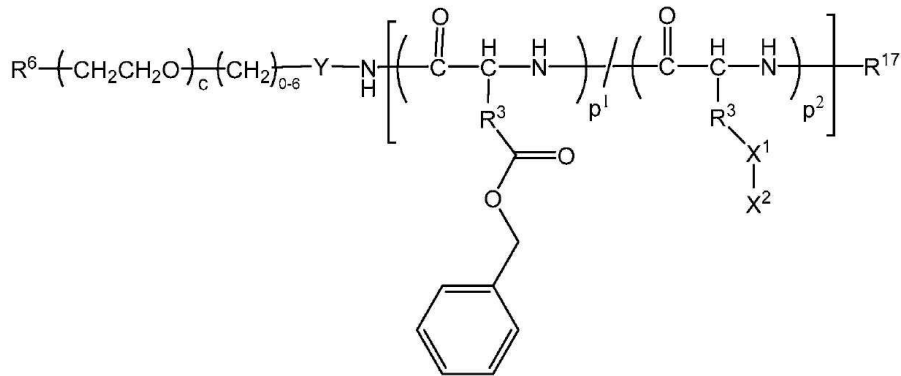
[0208] 상기 방법이 화학식 HNR^{13.1}E¹ 및/또는 HNR^{13.2}E²의 화합물 및 화학식 H₂NX² 또는 HOX²의 화합물을 화학식 6의 폴리머에 부가하는 단계를 포함하는 구체예에서, 화학식 HNR^{13.1}E¹ 및/또는 HNR^{13.2}E²의 화합물 및 화학식 H₂NX² 및/또는 HOX²의 화합물이 상기 반응 혼합물 중에 임의의 적절한 비율로 존재할 수 있다. 예를 들어, 화학식 HNR^{13.1}E¹ 및/또는 HNR^{13.2}E²의 화합물 및 화학식 H₂NX² 또는 HOX²의 화합물은 약 150:1 내지 약 1:150의 몰 비율로 존재할 수 있다. 일부 구체예에서, 약 150:1 내지 약 1:1, 예컨대 약 50:1 내지 약 1:1 (예: 약 25:1 내지 약 1:1, 약 10:1 내지 약 1:1, 약 5:1 내지 약 1:1, 또는 약 2.5:1 내지 약 1:1)의 비율이 사용된다. 다른 구체예에서, 상기 비율은 약 1:150 내지 약 1:1, 예컨대 약 1:50 내지 약 1:1 (예: 약 1:25 내지 약 1:1, 약 1:10 내지 약 1:1, 약 1:5 내지 약 1:1, 또는 약 1:2.5 내지 약 1:1)이다. 또 다른 구체예에서, 상기 비율은 약 1:10 내지 약 1:150, 약 1:40 내지 약 1:150, 또는 약 1:80 내지 약 1:150이다.

[0209] 상기 화학식 6 또는 7의 폴리머는 수득된 화학식 2 또는 2A의 폴리머에서 원하는 임의의 적절한 말단기를 가질 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 폴리머는 하기를 포함하고:



화학식 6A

또는

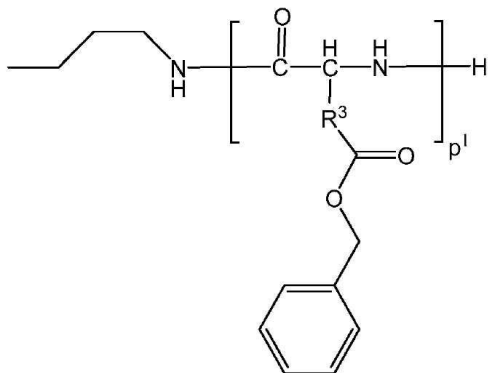


화학식 7A

[0210]

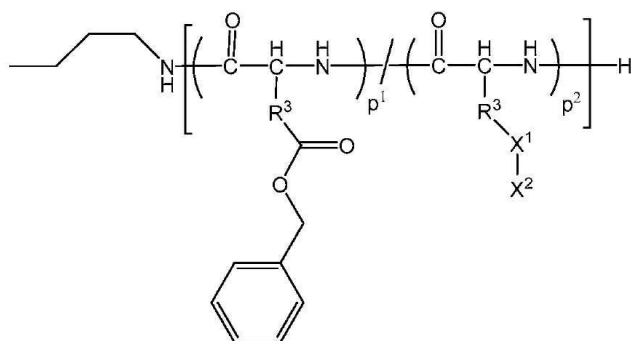
[0211]

상기에서, c, Y, R¹⁷, 및 R⁶은 이의 임의의 및 모든 구체예를 포함하는, 화학식 2A의 폴리머에 대해 전술한 바와 같고; p¹, p², R³, X¹, 및 X²는 상기 화학식 6 및 7에 대해 상기 기재된 바와 같다. 소정의 구체예에서, c는 0이고, Y는 존재하지 않으며, R⁶ 및 R¹⁷은 모두 H이다. 예를 들어, 상기 화학식 6 또는 7의 폴리머는 각각 화학식 6B 또는 화학식 7B의 폴리머일 수 있다:



화학식 6B

또는

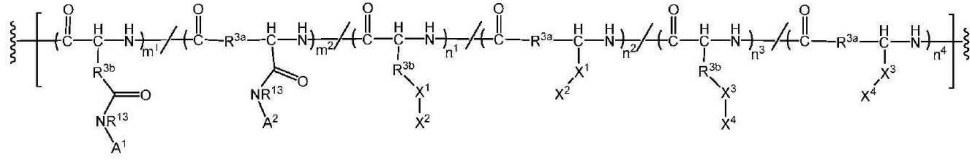


화학식 7B

[0212]

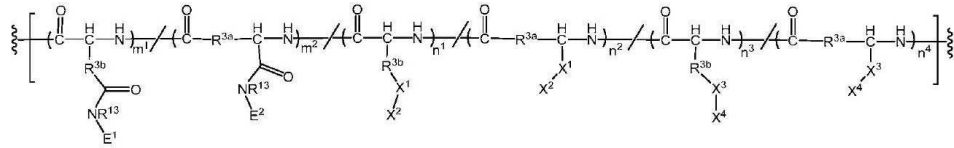
[0213] 상기에서, p^1 , p^2 , R^3 , X^1 , 및 X^2 는 상기 화학식 6, 6A, 7 및 7A에 대해 전술한 바와 같다.

[0214] 일부 구체예에서, 상기 방법은 또한 화학식 2의 구조를 포함하는 폴리머 (예: 화학식 2A의 폴리머)를 제조하는 방법을 제공하며, 여기서 E^1 및 E^2 의 적어도 일부는 R^5 기를 갖는다. 상기 방법은 화학식 5의 구조를 포함하는 폴리머 중 A^1 및/또는 A^2 기의 적어도 일부를 변형시켜서:



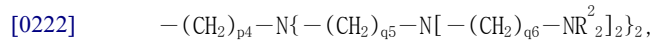
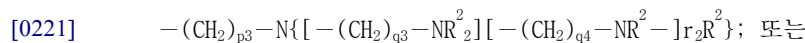
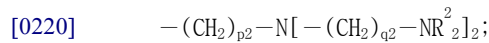
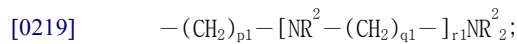
[0215]

[0216] 화학식 2의 구조를 포함하는 폴리머를 제조하는 단계를 포함한다:

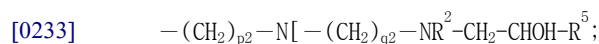
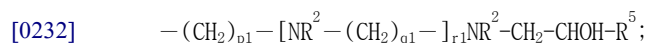
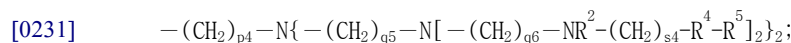
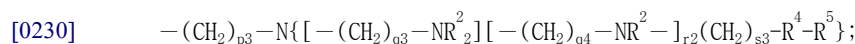
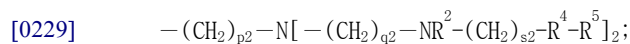
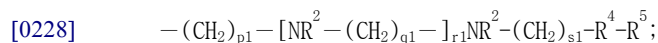
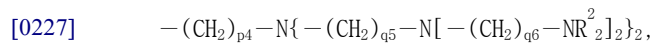
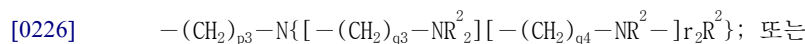
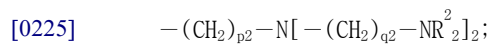
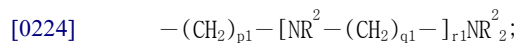


[0217]

[0218] 상기에서, 각 A^1 및 A^2 는 각각 독립적으로 하기 화학식의 기이고:



[0223] 각 E^1 및 E^2 는 각각 독립적으로 하기 화학식의 기이고:



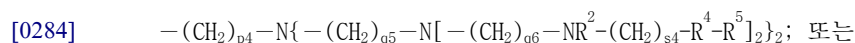
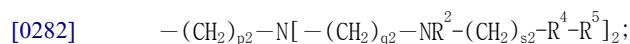
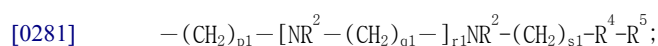
- [0234] $-(CH_2)_{p3}-N\{[-(CH_2)_{q3}-NR_2^2][-(CH_2)_{q4}-NR^2-]_{r2}-CH_2-CHOH-R^5;$
- [0235] $-(CH_2)_{p4}-N\{-(CH_2)_{q5}-N[-(CH_2)_{q6}-NR^2-CH_2-CHOH-R^5]_2\}_2;$
- [0236] $-(CH_2)_{p1}-[NR^2-(CH_2)_{q1}-]_{r1}NR^2-(CH_2)_{s1}-R^5;$
- [0237] $-(CH_2)_{p2}-N[-(CH_2)_{q2}-NR^2-(CH_2)_{s2}-R^5]_2;$
- [0238] $-(CH_2)_{p3}-N\{[-(CH_2)_{q3}-NR_2^2][-(CH_2)_{q4}-NR^2-]_{r2}(CH_2)_{s3}-R^5\};$
- [0239] $-(CH_2)_{p4}-N\{-(CH_2)_{q5}-N[-(CH_2)_{q6}-NR^2-(CH_2)_{s4}-R^5]_2\}_2;$
- [0240] $-(CH_2)_{p1}-[N\{(CH_2)_{s1}-R^4-R^5\}-(CH_2)_{q1}-]_{r1}NR_2^2;$
- [0241] $-(CH_2)_{p1}-[N\{(CH_2)_{s1}-R^5\}-(CH_2)_{q1}-]_{r1}NR_2^2,$
- [0242] $-(CH_2)_{p1}-[NR^2-(CH_2)_{q1}-]_{r1}NR^2-CH(CONH_2)-(CH_2)_{s1}-R^5;$ 또는
- [0243] $-(CH_2)_{p1}-[NR^2-(CH_2)_{q1}-]_{r1}NR^2-CH(CONH_2)-(CH_2)_{s1}-R^4-R^5,$
- [0244] 단 E¹ 및/또는 E²의 적어도 일부는 하기로부터 선택되고:
- [0245] $-(CH_2)_{p1}-[NR^2-(CH_2)_{q1}-]_{r1}NR^2-(CH_2)_{s1}-R^4-R^5;$
- [0246] $-(CH_2)_{p2}-N[-(CH_2)_{q2}-NR^2-(CH_2)_{s2}-R^4-R^5]_2;$
- [0247] $-(CH_2)_{p3}-N\{[-(CH_2)_{q3}-NR_2^2][-(CH_2)_{q4}-NR^2-]_{r2}(CH_2)_{s3}-R^4-R^5\};$
- [0248] $-(CH_2)_{p4}-N\{-(CH_2)_{q5}-N[-(CH_2)_{q6}-NR^2-(CH_2)_{s4}-R^4-R^5]_2\}_2;$
- [0249] $-(CH_2)_{p1}-[NR^2-(CH_2)_{q1}-]_{r1}NR^2-CH_2-CHOH-R^5;$
- [0250] $-(CH_2)_{p2}-N[-(CH_2)_{q2}-NR^2-CH_2-CHOH-R^5];$
- [0251] $-(CH_2)_{p3}-N\{[-(CH_2)_{q3}-NR_2^2][-(CH_2)_{q4}-NR^2-]_{r2}-CH_2-CHOH-R^5;$
- [0252] $-(CH_2)_{p4}-N\{-(CH_2)_{q5}-N[-(CH_2)_{q6}-NR^2-CH_2-CHOH-R^5]_2\}_2;$
- [0253] $-(CH_2)_{p1}-[NR^2-(CH_2)_{q1}-]_{r1}NR^2-(CH_2)_{s1}-R^5;$
- [0254] $-(CH_2)_{p2}-N[-(CH_2)_{q2}-NR^2-(CH_2)_{s2}-R^5]_2;$
- [0255] $-(CH_2)_{p3}-N\{[-(CH_2)_{q3}-NR_2^2][-(CH_2)_{q4}-NR^2-]_{r2}(CH_2)_{s3}-R^5\};$
- [0256] $-(CH_2)_{p4}-N\{-(CH_2)_{q5}-N[-(CH_2)_{q6}-NR^2-(CH_2)_{s4}-R^5]_2\}_2;$
- [0257] $-(CH_2)_{p1}-[N\{(CH_2)_{s1}-R^4-R^5\}-(CH_2)_{q1}-]_{r1}NR_2^2;$
- [0258] $-(CH_2)_{p1}-[N\{(CH_2)_{s1}-R^5\}-(CH_2)_{q1}-]_{r1}NR_2^2,$

- [0259] $-(CH_2)_{p1}-[NR^2-(CH_2)_{q1}-]_{r1}NR^2-CH(CONH_2)-(CH_2)_{s1}-R^5$; 또는
- [0260] $-(CH_2)_{p1}-[NR^2-(CH_2)_{q1}-]_{r1}NR^2-CH(CONH_2)-(CH_2)_{s1}-R^4-R^5$,
- [0261] $p1$ 내지 $p4$, $q1$ 내지 $q6$, $r1$ 및 $r2$, 및 $s1$ 내지 $s4$ 는 각각 독립적으로 1 내지 5의 정수이고;
- [0262] R^2 의 각 경우는 독립적으로 수소, 아릴기, 헤테로사이클릭기, C_1-C_{12} 알킬기, C_2-C_{12} 알케닐기, C_3-C_{12} 사이클로알킬기, 또는 C_3-C_{12} 사이클로알케닐기이고, 이들 중 임의의 기는 선택적으로 하나 이상의 치환기로 치환되거나, 또는 R^2 는 제2 R^2 와 조합하여 헤테로사이클릭기를 형성하며;
- [0263] R^4 의 각 경우는 독립적으로 $-C(O)O-$, $-C(O)NH-$, $-O-C(O)O-$, 또는 $-S(O)(O)-$ 이고;
- [0264] R^5 의 각 경우는 독립적으로 C_1-C_{12} 알킬기, C_2-C_{12} 알케닐기, C_3-C_{12} 사이클로알킬기, 또는 C_3-C_{12} 사이클로알케닐기, 아릴기, C_1-C_{12} 헤테로알킬기, C_3-C_{12} 헤테로사이클릭기, 또는 이들의 조합으로, 이들은 선택적으로 2 내지 8개의 3차 아민을 포함하고, 또는 조직-특이적 또는 세포-특이적 표적화 모이어티를 포함하는 치환기이다.
- [0265] 화학식 2 및 5의 모든 다른 치환기 및 변수는 본원에 진술된 화학식 2 및 2A의 구조의 임의의 및 모든 구체예를 포함하는, 본 개시내용의 다른 양상에 대해 본원에 기재된 바와 같다. 따라서 예를 들면:
- [0266] 각 m^1 및 m^2 는 0 내지 1000의 정수이고, 단 $m^1 + m^2$ 의 합은 1보다 크며;
- [0267] 각 n^1 및 n^2 는 0 내지 1000의 정수이고;
- [0268] 각 n^3 및 n^4 는 0 내지 1000의 정수이고, 단 $n^3 + n^4$ 의 합은 1보다 크며;
- [0269] 기호 "/"는 이에 의해 분리된 유닛이 무작위로 또는 임의의 순서로 연결되는 것을 나타내고;
- [0270] R^{3a} 의 각 경우는 독립적으로 메틸렌 또는 에틸렌 기이고;
- [0271] R^{3b} 의 각 경우는 독립적으로 메틸렌 또는 에틸렌 기이고;
- [0272] 각 X^1 은 독립적으로 $-C(O)O-$, $-C(O)NR^{13}-$, $-C(O)-$, $-S(O)(O)-$, 또는 결합이고;
- [0273] R^{13} 의 각 경우는 독립적으로 수소, 아릴기, 헤테로사이클릭기, C_1-C_{12} 알킬기, C_2-C_{12} 알케닐기, C_3-C_{12} 사이클로알킬기, 또는 C_3-C_{12} 사이클로알케닐기이고, 이들 중 임의의 기는 선택적으로 하나 이상의 치환기로 치환될 수 있으며;
- [0274] X^2 의 각 경우는 독립적으로 C_1-C_{12} 알킬 또는 헤테로알킬기, C_3-C_{12} 사이클로알킬기, C_2-C_{12} 알케닐기, C_3-C_{12} 사이클로알케닐기, 아릴기, 헤테로사이클릭기, 또는 이들의 조합이고, 이들 중 임의의 기는 선택적으로 하나 이상의 치환기로 치환되며;
- [0275] 각 X^3 은 독립적으로 $-C(O)O-$, $-C(O)NR^{13}-$, $-C(O)-$, $-S(O)(O)-$, 또는 결합이고;
- [0276] X^4 의 각 경우는 폴리알킬렌 옥사이드, 폴리글리콜산, 폴리락트산, 또는 이들의 조합이다.
- [0277] 화학식 5의 폴리머 중 A^1 및/또는 A^2 로 지정된 기는 임의의 적절한 수단에 의해 변형될 수 있다. 예를 들어, A^1 및/또는 A^2 로 지정된 기는 Michael 부가 반응 (Michael addition reaction), 에폭사이드 개환 (epoxide opening), 또는 치환 반응 (displacement reaction)에 의해 변형될 수 있다. 바람직한 구체예에서, A^1 및/또는 A^2 로 지정된 기는 Michael 부가 반응에 의해 변형된다.
- [0278] 일 구체예에서, 화학식 5의 구조를 포함하는 폴리머 중 A^1 및/또는 A^2 기는 화학식 5의 구조를 포함하는 폴리머

와 α, β -불포화 카보닐 화합물 간의 Michael 부가 반응에 의해 변형된다. 본원에서 사용된, 용어 "Michael 부가 (Michael addition)"는 α, β -불포화 카보닐 화합물에 폴리머의 친핵체 (nucleophile) (예: 탄소 음이온 (carbanion), 산소 음이온, 질소 음이온, 산소 원자, 질소 원자, 또는 이들의 조합)를 부가하는 친핵성 부가 (nucleophilic addition)를 의미한다. 따라서, 상기 Michael 부가 반응은 화학식 5의 구조를 포함하는 폴리머와 α, β -불포화 카보닐 화합물 간의 반응이다. 일부 구체예에서, 상기 폴리머의 친핵체는 질소 음이온, 질소 원자, 또는 이들의 조합이다.

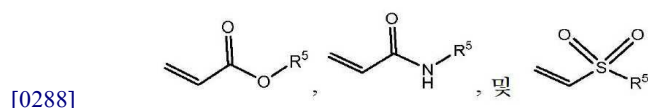
[0279] 상기 α, β -불포화 카보닐 화합물은 친핵체로부터 Michael 부가를 수용할 수 있는 임의의 α, β -불포화 카보닐 화합물일 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 α, β -불포화 카보닐 화합물은 아크릴레이트, 아크릴아미드, 비닐 설펜, 또는 이들의 조합이다. 따라서, 상기 Michael 부가 반응은 화학식 5의 구조를 포함하는 폴리머와, 아크릴레이트, 아크릴아미드, 비닐 설펜 또는 이들의 조합 간의 반응일 수 있다. 따라서, 일부 구체예에서, 상기 방법은 화학식 5의 구조를 포함하는 폴리머와 아크릴레이트를 접촉시키는 단계; 상기 화학식 5의 구조를 포함하는 폴리머와 아크릴아미드를 접촉시키는 단계; 또는 화학식 5의 구조를 포함하는 폴리머와 비닐 설펜을 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0280] A^1 및/또는 A^2 로 지정된 기가 Michael 부가 반응에 의해 변형되는 구체예에서, 이들은 하기 화학식을 갖는 E^1 및/또는 E^2 기를 생성한다:



[0286] 상기에서, $p1$ 내지 $p4$, $q1$ 내지 $q6$, $r1$ 및 $r2$, 및 $s1$ 내지 $s4$, R^2 , R^4 및 R^5 는 이전에 정의된 바와 같다.

[0287] 사용하기에 적합한 아크릴레이트, 아크릴아미드, 및 비닐 설펜의 예로는 하기 화학식의 아크릴레이트를 포함한다:



[0289] 상기에서, R^5 는 화학식 2 또는 2A에 대해 기재된 바와 같다.

[0290] 일부 구체예에서, 상기 Michael 부가 반응은 산 및/또는 염기에 의해 촉진된다. 상기 산 및/또는 염기는 임의의 적절한 pK_a 를 갖는 임의의 적절한 산 및/또는 염기일 수 있다. 상기 산 및/또는 염기는 유기 산 (예: *p*-톨루엔설폰산), 유기 염기 (예: 트리에틸아민), 무기산 (예: 사염화 티타늄), 무기 염기 (예: 탄산칼륨), 또는 이들의 조합일 수 있다.

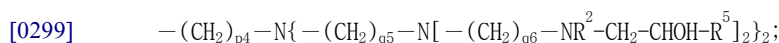
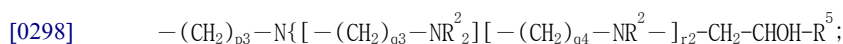
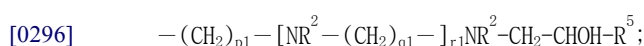
[0291] 일부 구체예에서, 상기 Michael 부가 반응은 산에 의해 촉진된다. 상기 산은 브뢴스테드 산 (Brønsted acid) 또는 루이스 산 (Lewis acid)일 수 있다. 산이 브뢴스테드 산인 구체예에서, 상기 산은 약산 (즉, 약 4 내지 약 7의 pK_a) 또는 강산 (즉, 약 -2 내지 약 4의 pK_a)일 수 있다. 전형적으로, 상기 산은 약산이다. 소정의 구체예에서, 상기 산은 루이스 산이다. 예를 들어, 상기 산은 비스(트리플루오로메탄설폰)이미드 또는 *p*-톨루엔설폰산일 수 있다.

[0292] 일부 구체예에서, 상기 Michael 부가 반응은 염기에 의해 촉진된다. 상기 염기는 약염기 (즉, 약 7 내지 약 12의 pK_a) 또는 강염기 (즉, 약 12 내지 약 50의 pK_a)일 수 있다. 전형적으로, 상기 염기는 약염기이다. 예를 들어, 상기 염기는 트리에틸아민, 디이소프로필에틸아민, 피리딘, *N*-메틸 모르폴린, 또는 *N,N*-디메틸-피페라진, 또는 이의 유도체일 수 있다.

[0293] 일부 구체예에서, 상기 Michael 부가 반응은 용매에서 수행된다. 상기 용매는 반응할 α, β -불포화 카보닐 화합물 및 폴리머를 가용화시킬 수 있는, 임의의 적절한 용매, 또는 용매들의 혼합물일 수 있다. 예를 들어, 상기 용매는 물, 양성자성 유기 용매, 및/또는 비양성자성 유기 용매를 포함할 수 있다. 용매의 예시되는 목록은 물, 디클로로메탄, 디에틸 에테르, 디메틸 설펍사이드, 아세토니트릴, 메탄올, 및 에탄올을 포함한다.

[0294] 일 구체예에서, 상기 폴리머 중 A^1 및/또는 A^2 기는 상기 폴리머와 에폭사이드 화합물 간의 에폭사이드 개환 반응에 의해 변형된다. 본원에서 사용된, 용어 "에폭사이드 개환 (epoxide opening)"은 폴리머의 친핵체 (예: 탄소 음이온, 산소 음이온, 질소 음이온, 산소 원자, 질소 원자, 또는 이들의 조합)를 에폭사이드 화합물에 부가하여, 상기 에폭사이드를 개환시키는 친핵성 부가를 의미한다. 따라서, 상기 에폭사이드 개환 반응은 상기 폴리머와 에폭사이드 화합물 간에 일어난다. 일부 구체예에서, 상기 폴리머의 친핵체는 질소 음이온, 질소 원자, 또는 이들의 조합이다.

[0295] A^1 및/또는 A^2 로 지정된 기가 에폭사이드 개환 반응에 의해 변형되는 구체예에서, 이들은 하기 화학식의 E^1 및/또는 E^2 기를 생성한다:



[0300] 상기에서, $p1$ 내지 $p4$, $q1$ 내지 $q6$, $r1$, $r2$, R^2 및 R^5 는 이전에 정의된 바와 같다.

[0301] 사용하기에 적합한 에폭사이드의 예로는 하기 화학식의 에폭사이드를 포함한다:



[0303] 상기에서, R^5 은 화학식 2 또는 2A에 대해 기재된 바와 같다.

[0304] 일부 구체예에서, 상기 에폭사이드 개환 반응은 산 및/또는 염기에 의해 촉진된다. 상기 산 및/또는 염기는 임의의 적절한 pK_a 를 갖는 임의의 적절한 산 및/또는 염기일 수 있다. 상기 산 및/또는 염기는 유기 산 (예: *p*-톨루엔설폰산), 유기 염기 (예: 트리에틸아민), 무기산 (예: 사염화 티타늄), 무기 염기 (예: 탄산칼륨), 또는 이들의 조합일 수 있다.

[0305] 일부 구체예에서, 상기 에폭사이드 개환 반응은 산에 의해 촉진된다. 상기 산은 브뢴스테드 산 또는 루이스 산일 수 있다. 산이 브뢴스테드 산인 구체예에서, 상기 산은 약산 (즉, 약 4 내지 약 7의 pK_a) 또는 강산 (즉, 약 -2 내지 약 4의 pK_a)일 수 있다. 전형적으로, 상기 산은 약산이다. 소정의 구체예에서, 상기 산은 루이스 산이다. 예를 들어, 상기 산은 비스(트리플루오로메탄설포)이미드 또는 *p*-톨루엔설폰산일 수 있다.

[0306] 일부 구체예에서, 상기 에폭사이드 개환 반응은 염기에 의해 촉진된다. 상기 염기는 약염기 (즉, 약 7 내지 약 12의 pK_a) 또는 강염기 (즉, 약 12 내지 약 50의 pK_a)일 수 있다. 전형적으로, 상기 염기는 약염기이다. 예를 들어, 상기 염기는 트리에틸아민, 디이소프로필에틸아민, 피리딘, *N*-메틸 모르폴린, 또는 *N,N*-디메틸-피페라진, 또는 이들의 유도체일 수 있다.

[0307] 일부 구체예에서, 상기 에폭사이드 개환 반응은 용매에서 수행된다. 상기 용매는 반응할 에폭사이드 화합물 및 폴리머를 가용화시킬 수 있는, 임의의 적절한 용매 또는 용매들의 혼합물일 수 있다. 예를 들어, 상기 용매는 물, 양성자성 유기 용매 및/또는 비양성자성 유기 용매를 포함할 수 있다. 용매의 예시되는 목록에는 물, 디클로로메탄, 디에틸 에테르, 디메틸 설펍사이드, 아세토니트릴, 메탄올, 및 에탄올을 포함한다.

[0308] 일 구체예에서, 상기 폴리머 중 A^1 및/또는 A^2 기는 폴리머와 이탈기 (예: 클로라이드 원자, 브로마이드 원자, 요오다이드 원자, 토실레이트, 트리플레이트, 메실레이트 등)를 포함하는 화합물 간의 치환 반응에 의해 변형된

다. 본원에서 사용된, 용어 "치환 (displacement)"은 폴리머의 친핵체 (예: 탄소 음이온, 산소 음이온, 질소 음이온, 산소 원자, 질소 원자 또는 이들의 조합)를 이탈기를 포함하는 화합물에 부가하는 친핵성 부가를 의미한다. 따라서, 상기 치환 반응은 폴리머와 이탈기를 포함하는 화합물 간에 일어난다. 일부 구체예에서, 상기 폴리머의 친핵체는 질소 음이온, 질소 원자, 또는 이들의 조합이다.

[0309] A^1 및/또는 A^2 로 지정된 기가 치환 반응에 의해 변형되는 구체예에서, 이들은 하기 화학식의 E^1 및/또는 E^2 로 지정된 기를 생성한다:

[0310] $-(CH_2)_{p1}-[NR^2-(CH_2)_{q1}-]_{r1}NR^2-(CH_2)_{s1}-R^5$;

[0311] $-(CH_2)_{p2}-N[-(CH_2)_{q2}-NR^2-(CH_2)_{s2}-R^5]_2$;

[0312] $-(CH_2)_{p3}-N\{[-(CH_2)_{q3}-NR^2]_2[-(CH_2)_{r2}-NR^2-(CH_2)_{s3}-R^5]\}$;

[0313] $-(CH_2)_{p4}-N\{-(CH_2)_{q5}-N[-(CH_2)_{q6}-NR^2-(CH_2)_{s4}-R^5]_2\}_2$; 또는

[0314] $-(CH_2)_{p1}-[N\{(CH_2)_{s1}-R^5\}-(CH_2)_{q1}-]_{r1}NR^2$,

[0315] 상기에서, $p1$ 내지 $p4$, $q1$ 내지 $q6$, $r1$, $r2$, $s1$ 내지 $s4$, R^2 및 R^5 는 이전에 정의된 바와 같다.

[0316] 사용하기에 적합한 이탈기를 함유하는 화합물의 예로는 하기 화학식의 화합물을 포함한다:



[0318] 상기에서, LG는 이탈기 (예: 클로라이드 원자, 브로마이드 원자, 요오다이드 원자, 토실레이트, 트리플레이트, 메실레이트 등)이고, R^5 는 화학식 2 또는 2A에 대해 기재된 바와 같다.

[0319] 일부 구체예에서, 상기 치환 반응은 산 및/또는 염기에 의해 촉진된다. 상기 산 및/또는 염기는 임의의 적절한 pK_a 를 갖는 임의의 적절한 산 및/또는 염기일 수 있다. 상기 산 및/또는 염기는 유기 산 (예: *p*-톨루엔설폰산), 유기 염기 (예: 트리에틸아민), 무기산 (예: 사염화 티타늄), 무기 염기 (예: 탄산칼륨), 또는 이들의 조합일 수 있다.

[0320] 일부 구체예에서, 상기 치환 반응은 산에 의해 촉진된다. 상기 산은 브뢴스테드 산 또는 루이스 산일 수 있다. 산이 브뢴스테드 산인 구체예에서, 상기 산은 약산 (즉, 약 4 내지 약 7의 pK_a) 또는 강산 (즉, 약 -2 내지 약 4의 pK_a)일 수 있다. 전형적으로, 상기 산은 약산이다. 소정의 구체예에서, 상기 산은 루이스 산이다. 예를 들어, 상기 산은 비스(트리플루오로메탄설폰)이미드 또는 *p*-톨루엔설폰산일 수 있다.

[0321] 일부 구체예에서, 상기 치환 반응은 염기에 의해 촉진된다. 상기 염기는 약염기 (즉, 약 7 내지 약 12의 pK_a) 또는 강염기 (즉, 약 12 내지 약 50의 pK_a)일 수 있다. 전형적으로, 상기 염기는 약염기이다. 예를 들어, 상기 염기는 트리에틸아민, 디이소프로필에틸아민, 피리딘, N-메틸 모르폴린, 또는 N,N-디메틸-피페라진, 또는 이들의 유도체일 수 있다.

[0322] 일부 구체예에서, 상기 치환 반응은 용매에서 수행된다. 상기 용매는 반응할 이탈기를 포함하는 화합물 및 폴리머를 가용화시킬 수 있는, 임의의 적절한 용매 또는 용매들의 혼합물일 수 있다. 예를 들어, 상기 용매는 물, 양성자성 유기 용매 및/또는 비양성자성 유기 용매를 포함할 수 있다. 용매의 예시되는 목록에는 물, 디클로로메탄, 디에틸 에테르, 디메틸 설펝사이드, 아세토니트릴, 메탄올, 및 에탄올을 포함한다.

[0323] 일부 구체예에서, 상기 방법은 화학식 2의 구조를 포함하는 폴리머를 분리하는 단계를 추가로 포함한다. 상기 화학식 2의 구조를 포함하는 폴리머는 임의의 적절한 수단에 의해 분리될 수 있다. 예를 들어, 상기 화학식 2의 구조를 포함하는 폴리머는 추출, 투석, 결정화, 재결정화, 컬럼 크로마토그래피, 여과, 또는 이들의 임의의 조합에 의해 분리될 수 있다.

[0324] **폴리머 조성물**

[0325] 본원에서 제공되는 폴리머는 임의의 목적을 위해 사용될 수 있다. 그러나, 상기 폴리머는 하나 이상의 생체분자 또는 이의 합성 변이체, 예를 들어 핵산 및/또는 폴리펩티드 (예: 단백질)를 세포에 전달하는데 특히 유용한 것

으로 여겨진다. 따라서, 본원에서 (a) 가수분해성 폴리머 백본을 포함하는 본원에 기재된 폴리머로서, 상기 가수분해성 폴리머 백본은 (i) 폴리아민 또는 올리고아민을 포함하는 결사슬을 갖는 모노머 유닛; (ii) 소수성 기를 포함하는 결사슬을 갖는 모노머 유닛; 및 (iii) 폴리알킬렌 옥사이드, 폴리락트산, 폴리글리콜산, 또는 이들의 조합을 포함하는 결사슬을 갖는 모노머 유닛을 포함하는 것인 폴리머; 및 (b) 숙주 또는 세포로 전달될 화합물, 예컨대 하나 이상의 생체분자 또는 이의 합성 변이체를 포함하는 조성물이 제공된다. 예시되는 생체분자 또는 이의 합성 변이체는 본원에 제공된 개시내용으로부터 용이하게 명백할 것이다.

[0326] 일부 구체예에서, 상기 조성물은 핵산을 포함한다. 임의의 핵산이 사용될 수 있다. 핵산의 예시되는 목록은 CRISPR 시스템의 가이드 및/또는 공여체 핵산, siRNA, microRNA, 간섭 RNA 또는 RNAi, dsRNA, mRNA, DNA 벡터, 리보자임, 안티센스 폴리뉴클레오타이드, 및 siRNA, microRNA, dsRNA, 리보자임 또는 안티센스 핵산을 코딩하는 DNA 발현 카세트를 포함한다. siRNA는 전형적으로 15-50개의 염기쌍, 바람직하게는 19-25개의 염기쌍을 포함하고, 세포내에서 발현된 표적 유전자 또는 RNA와 동일하거나 또는 거의 동일한 뉴클레오타이드 서열을 갖는 이중가닥 구조를 포함한다. siRNA는 2개의 어닐링된 폴리뉴클레오타이드 또는 헤어핀 구조를 형성하는 단일 폴리뉴클레오타이드로 이루어질 수 있다. MicroRNA (miRNA)는 mRNA 표적의 파괴 또는 번역 억제를 지시하는, 약 22개 뉴클레오타이드 길이의 작은 비-코딩 폴리뉴클레오타이드이다. 안티센스 폴리뉴클레오타이드는 유전자 또는 mRNA에 상보적인 서열을 포함한다. 안티센스 폴리뉴클레오타이드는 모르폴리노 (morpholinos), 2'-O-메틸 폴리뉴클레오타이드, DNA, RNA 등을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 폴리뉴클레오타이드-기반 발현 억제제는 인 비트로에서 중합되고, 재조합될 수 있으며, 키메라 서열, 또는 이들의 유도체를 함유할 수 있다. 상기 폴리뉴클레오타이드-기반 발현 억제제는 표적 RNA 및/또는 유전자가 억제되도록 하는 리보뉴클레오타이드, 데옥시리보뉴클레오타이드, 합성 뉴클레오타이드, 또는 임의의 적절한 조합을 함유할 수 있다.

[0327] 상기 조성물은 또한 핵산에 추가하거나 또는 핵산에 대신하여, 전달을 위한 임의의 단백질을 포함할 수 있다. 상기 폴리펩티드는 임의의 적절한 폴리펩티드일 수 있다. 예를 들어, 상기 폴리펩티드는 징크 핑거 뉴클레아제 (ZFN), 전사 활성화인자-유사 이펙터 뉴클레아제 ("TALEN"), 재조합효소 (recombinase), 데아미나제 (deaminase), 엔도뉴클레아제, 또는 이들의 조합일 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 폴리펩티드는 RNA-가이드 엔도뉴클레아제 (예: Cas9 폴리펩티드, Cpf1 폴리펩티드, 또는 이의 변이체) 또는 DNA 재조합효소 (예: Cre 폴리펩티드)이다.

[0328] 본원에서 제공되는 조성물은 CRISPR 시스템의 하나 이상의 성분을 전달하는데 특히 유용한 것으로 여겨진다. 따라서, 일부 구체예에서, 상기 조성물은 가이드 RNA, RNA-가이드 엔도뉴클레아제 (RNA-guided endonuclease) 또는 이를 코딩하는 핵산, 및/또는 공여체 핵산을 포함한다. 상기 조성물은 본원에 기재된 폴리머와 함께 1개, 2개 또는 모두 3개의 성분을 포함할 수 있다. 또한, 상기 조성물은 복수의 가이드 RNA, RNA-가이드 엔도뉴클레아제 또는 이를 코딩하는 핵산, 및/또는 공여체 핵산을 포함할 수 있다. 예를 들어, 상이한 표적 부위에 대한 다수의 상이한 가이드 RNA는, 선택적으로 다수의 상이한 공여체 핵산 및 심지어 다수의 상이한 RNA 가이드 엔도뉴클레아제 또는 이를 코딩하는 핵산과 함께 포함될 수 있다.

[0329] 또한, 상기 CRISPR 시스템의 성분은 (다수의 성분이 존재하는 경우) 상호간에 및 폴리머와 임의의 특정 방식 또는 순서로 조합될 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 가이드 RNA는 폴리머와 조합되기 전에 RNA 엔도뉴클레아제와 복합체화된다. 추가로 또는 대신에, 상기 가이드 RNA는 폴리머와 조합되기 전에 공여체 핵산에 (공유적으로 또는 비-공유적으로) 연결될 수 있다.

[0330] 상기 조성물은 임의의 특정 CRISPR 시스템 (즉, 임의의 특정 가이드 RNA, RNA-가이드 엔도뉴클레아제, 또는 공여체 핵산)과 관련하여 제한되지 않으며, 이들 중 다수가 알려져 있다. 그럼에도 불구하고, 추가적인 예시를 위해, 일부 이러한 시스템의 성분들이 하기에 기재된다.

[0331] 본원에 제공된 폴리머는 추가 폴리머와 함께 사용될 수 있다. 일 구체예에서, 제1 폴리머 및 제2 폴리머를 포함하는 조성물이 제공된다. 가수분해성 폴리머 백본을 포함하는 제1 폴리머가 본원에 기재되며, 상기 폴리머 백본은 (a) 소수성 기를 포함하는 결사슬을 갖는 모노머 유닛; (b) 올리고아민 또는 폴리아민을 포함하는 결사슬을 갖는 모노머 유닛; 및 (c) 폴리알킬렌 옥사이드, 폴리글리콜산, 폴리락트산, 또는 이들의 조합을 포함하는 결사슬을 갖는 모노머 유닛을 포함한다. 상기 조성물의 제1 폴리머의 모든 양상 및 구체예는 상기 기재된 바와 같다. 상기 조성물의 제2 폴리머는 가수분해성 폴리머 백본을 포함하고, 상기 가수분해성 폴리머 백본은 (a) 소수성 기를 포함하는 결사슬을 갖는 모노머 유닛; (ii) 올리고아민 또는 폴리아민을 포함하는 결사슬을 갖는 모노머 유닛; 및 선택적으로, (iii) 선택적으로 7 미만의 pKa를 갖는, 이온화 가능한 기를 포함하는 결사슬을 갖는 모노머 유닛을 포함한다.

- [0332] 상기 조성물은 상기 제1 폴리머 및 제2 폴리머를 임의의 적절한 양으로 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 조성물은 상기 제1 폴리머 대 제2 폴리머의 비율 (중량 기준)을 약 1:99 내지 99:1로 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 조성물은 제1 폴리머 대 제2 폴리머의 비율을 중량 기준으로 약 1:1 내지 약 1:20 (예: 약 1:1 내지 약 1:15, 또는 약 1:1 내지 약 1:10)으로 포함한다. 상대 양 (relative amounts)은 또한 조성물의 중량 퍼센트로 표시될 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 조성물은 조합되는 제1 및 제2 폴리머들의 총 중량을 기준으로, 상기 제1 폴리머를 약 1 wt.% 이상 (예: 약 5 wt.% 이상, 약 10 wt.% 이상, 약 20 wt.% 이상, 약 30 wt.% 이상, 또는 약 40 wt.% 이상)으로 포함한다. 또한, 일부 구체예에서, 상기 조성물은 조합되는 제1 및 제2 폴리머들의 총 중량을 기준으로, 상기 제1 폴리머를 약 60 wt.% 이하 (예: 약 50 wt.% 이하)로 포함한다. 전술한 퍼센트의 조성물은 또한 범위로서 언급될 수 있다. 따라서, 예를 들어, 일부 구체예에서, 상기 조성물은 제1 폴리머 및 제2 폴리머의 중량의 총합을 기준으로, 상기 제1 폴리머를 약 1 wt.% 내지 약 60 wt.% (예: 약 5 wt.% 내지 약 60 wt.%, 약 10 wt.% 내지 약 60 wt.%, 약 5 wt.% 내지 약 50 wt.%, 약 10 wt.% 내지 약 50 wt.% 등)로 포함한다.
- [0333] 상기 제1 및 선택적으로 제2 폴리머를 포함하는 조성물은 세포 또는 숙주, 예컨대 포유동물 또는 인간에게 투여하기에 적합한 임의의 담체, 전형적으로 수성 담체를 추가로 포함할 수 있다. 상기 담체 중 폴리머(들)는 존재하는 경우 전달될 화합물을 부분적으로 또는 전부 캡슐화하는 나노입자를 형성한다.
- [0334] 제2 폴리머, 핵산, 및 폴리펩티드 화합물의 예를 포함하는, 폴리머 조성물의 다양한 요소들이 하기에 더 상세히 기재되어 있다.
- [0335] 제2 폴리머
- [0336] 상기 조성물의 제2 폴리머는 가수분해성 폴리머 백본을 포함하고, 상기 가수분해성 폴리머 백본은 (a) 소수성기를 포함하는 결사슬을 갖는 모노머 유닛; (ii) 올리고아민 또는 폴리아민을 포함하는 결사슬을 갖는 모노머 유닛; 및 선택적으로, (iii) 선택적으로 7 미만의 pKa를 갖는, 이온화 가능한 결사슬을 갖는 모노머 유닛을 포함한다.
- [0337] 앞서 논의한 바와 같이, 가수분해성 폴리머 백본은 생리학적 조건 (예: 생리학적 pH, 생리학적 온도, 또는 주어진 인 비보 조직, 예컨대 혈액, 혈청, 등) 하에 천연 인자들 (예: 효소)에 의한 절단에 취약한 결합을 갖는 폴리머 백본을 의미한다. 일반적으로, 상기 가수분해성 폴리머 백본은 폴리아미드, 폴리-N-알킬아미드, 폴리에스테르, 폴리카보네이트, 폴리카바메이트, 또는 이들의 조합을 포함한다. 소정의 구체예에서, 상기 가수분해성 폴리머 백본은 폴리아미드를 포함한다.
- [0338] 상기 소수성기를 포함하는 결사슬을 갖는 모노머 유닛은 임의의 소수성기를 포함할 수 있다. 소수성기의 예로는 예를 들어 C₁-C₁₂ (예: C₂-C₁₂, C₂-C₁₀, C₂-C₈, C₂-C₆, C₃-C₁₂, C₃-C₁₀, C₃-C₈, C₃-C₆, C₄-C₁₂, C₄-C₁₀, C₄-C₈, C₄-C₆, C₆-C₁₂, C₆-C₈, C₈-C₁₂, C₈-C₁₀) 알킬기, C₂-C₁₂ (예: C₂-C₆, C₃-C₁₂, C₃-C₁₀, C₃-C₈, C₃-C₆, C₄-C₁₂, C₄-C₁₀, C₄-C₈, C₄-C₆, C₆-C₁₂, C₆-C₈, C₈-C₁₂, C₈-C₁₀) 알케닐기, 또는 C₃-C₁₂ (C₃-C₁₀, C₃-C₈, C₃-C₆, C₄-C₁₂, C₄-C₁₀, C₄-C₈, C₄-C₆, C₆-C₁₂, C₆-C₈, C₈-C₁₂, C₈-C₁₀) 사이클로알킬기 또는 사이클로알케닐기를 포함한다. 소정의 구체예에서, 상기 소수성기는 C₄-C₁₂ 알킬기, 알케닐기, 사이클로알킬기, 또는 사이클로알케닐기를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 소수성기는 8개 미만의 탄소 또는 6개 미만의 탄소를 포함한다. 예를 들어, 상기 소수성기는 C₂-C₈ 또는 C₂-C₆ (예: C₃-C₈ 또는 C₃-C₆) 알킬기를 포함할 수 있다. 상기 알킬 또는 알케닐기는 분지쇄형 또는 직쇄형일 수 있다. 상기 임의의 구체예에서, 상기 소수성기는 상기 폴리머 백본에, 직접 또는 예를 들어 에스테르, 아미드 또는 에테르기를 포함하고, 선택적으로 알킬렌 링커 (예: 메틸렌 또는 에틸렌 링커)를 추가로 포함하는 결합을 통해 연결될 수 있다.
- [0339] 상기 제2 폴리머는 또한 올리고아민 또는 폴리아민을 포함하는 결사슬을 갖는 모노머 유닛을 포함한다. 본원에서 사용된, 용어 "올리고아민"은 2개 또는 3개의 아민기를 갖는 임의의 화학적 모이어티를 지칭하고, 용어 "폴리아민"은 4개 이상 (예: 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개 등)의 아민기를 갖는 임의의 화학적 모이어티를 지칭한다. 상기 아민기는 1차 아민기, 2차 아민기, 3차 아민기, 또는 이들의 임의의 조합일 수 있다. 소정의 구체예에서, 상기 올리고아민 또는 폴리아민은 하기 화학식의기를 갖는다:

- [0340] $-(CH_2)_{p1}-[NR^2-(CH_2)_{q1}-]_{r1}NR^2_2$;
- [0341] $-(CH_2)_{p2}-N[-(CH_2)_{q2}-NR^2_2]_2$;
- [0342] $-(CH_2)_{p3}-N\{[-(CH_2)_{q3}-NR^2_2][-(CH_2)_{q4}-NR^2-]_{r2}R^2\}$;
- [0343] $-(CH_2)_{p4}-N\{-(CH_2)_{q5}-N[-(CH_2)_{q6}-NR^2_2]_2\}_2$,
- [0344] $-(CH_2)_{p1}-[NR^2-(CH_2)_{q1}-]_{r1}NR^2-(CH_2)_{s1}-R^4-R^5$;
- [0345] $-(CH_2)_{p2}-N[-(CH_2)_{q2}-NR^2-(CH_2)_{s2}-R^4-R^5]_2$;
- [0346] $-(CH_2)_{p3}-N\{[-(CH_2)_{q3}-NR^2_2][-(CH_2)_{q4}-NR^2-]_{r2}(CH_2)_{s3}-R^4-R^5\}$;
- [0347] $-(CH_2)_{p4}-N\{-(CH_2)_{q5}-N[-(CH_2)_{q6}-NR^2-(CH_2)_{s4}-R^4-R^5]_2\}_2$;
- [0348] $-(CH_2)_{p1}-[NR^2-(CH_2)_{q1}-]_{r1}NR^2-CH_2-CHOH-R^5$;
- [0349] $-(CH_2)_{p2}-N[-(CH_2)_{q2}-NR^2-CH_2-CHOH-R^5]$;
- [0350] $-(CH_2)_{p3}-N\{[-(CH_2)_{q3}-NR^2_2][-(CH_2)_{q4}-NR^2-]_{r2}-CH_2-CHOH-R^5\}$;
- [0351] $-(CH_2)_{p4}-N\{-(CH_2)_{q5}-N[-(CH_2)_{q6}-NR^2-CH_2-CHOH-R^5]_2\}_2$;
- [0352] $-(CH_2)_{p1}-[NR^2-(CH_2)_{q1}-]_{r1}NR^2-(CH_2)_{s1}-R^5$;
- [0353] $-(CH_2)_{p2}-N[-(CH_2)_{q2}-NR^2-(CH_2)_{s2}-R^5]_2$;
- [0354] $-(CH_2)_{p3}-N\{[-(CH_2)_{q3}-NR^2_2][-(CH_2)_{q4}-NR^2-]_{r2}(CH_2)_{s3}-R^5\}$;
- [0355] $-(CH_2)_{p4}-N\{-(CH_2)_{q5}-N[-(CH_2)_{q6}-NR^2-(CH_2)_{s4}-R^5]_2\}_2$;
- [0356] $-(CH_2)_{p1}-[N\{(CH_2)_{s1}-R^4-R^5\}-(CH_2)_{q1}-]_{r1}NR^2_2$;
- [0357] $-(CH_2)_{p1}-[N\{(CH_2)_{s1}-R^5\}-(CH_2)_{q1}-]_{r1}NR^2_2$,
- [0358] $-(CH_2)_{p1}-[NR^2-(CH_2)_{q1}-]_{r1}NR^2-CH(CONH_2)-(CH_2)_{s1}-R^5$; 또는
- [0359] $-(CH_2)_{p1}-[NR^2-(CH_2)_{q1}-]_{r1}NR^2-CH(CONH_2)-(CH_2)_{s1}-R^4-R^5$,
- [0360] 상기에서, p1 내지 p4, q1 내지 q6, r1 및 r2, 및 s1 내지 s4는 각각 독립적으로 1 내지 5의 정수이고; R^2 의 각 경우는 독립적으로 수소 또는 C₁-C₁₂ 알킬기, 알케닐기, 사이클로알킬기 또는 사이클로알케닐기이거나, 또는 R^2 는 제2 R^2 와 조합하여 헤테로사이클릭기를 형성하며; R^4 의 각 경우는 독립적으로 -C(O)O-, -C(O)NH-, -O-, -C-O-C(O)-C-O-, 또는 -S(O)(O)-이고; R^5 의 각 경우는 독립적으로 알킬기, 사이클로알킬기, 알케닐기, 사이클로알케닐기, 아릴기, 헤테로알킬기, 헤테로사이클릭기, 또는 이들의 조합으로, 이들은 선택적으로 2 내지 8개의 3차 아민을 포함하고, 또는 조직-특이적 또는 세포-특이적 표적화 모이어티를 포함하는 치환기이다.
- [0361] 일부 구체예에서, 상기 올리고아민 또는 폴리아민은 하기 화학식의 기를 갖는다:

[0362] $-(CH_2)_{p1}-[NR^2-(CH_2)_{q1}-]_{r1}NR^2_2$;

[0363] $-(CH_2)_{p2}-N[-(CH_2)_{q2}-NR^2_2]_2$;

[0364] $-(CH_2)_{p3}-N\{[-(CH_2)_{q3}-NR^2_2][-(CH_2)_{q4}-NR^2-r_2R^2]\}$; 또는

[0365] $-(CH_2)_{p4}-N\{-(CH_2)_{q5}-N[-(CH_2)_{q6}-NR^2_2]_2\}_2$,

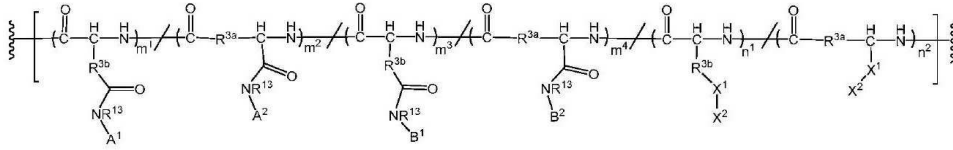
[0366] 상기에서, p1 내지 p4, q1 내지 q6, 및 r1 및 r2는 각각 독립적으로 1 내지 5의 정수 (예: 1, 2 또는 3)이고; R^2 의 각 경우는 독립적으로 수소 또는 C_1-C_{12} (예: C_1-C_6 , C_1-C_3 , C_2 , 또는 C_1) 알킬기, 알케닐기, 사이클로알킬기 또는 사이클로알케닐기이거나, 또는 R^2 는 제2 R^2 와 조합하여 헤테로사이클릭기를 형성한다. 상기 알케닐기는 적어도 2개의 탄소 (예: C_2-C_{12} , C_2-C_6 등)를 가져야 하고, 상기 사이클로알킬 및 사이클로알케닐기는 적어도 3개의 탄소 (예: C_3-C_{12} , C_3-C_6 등)를 가져야 한다. 일부 구체예에서, 상기 폴리아민은 $-(CH_2)_{p1}-[NR^2-(CH_2)_{q1}-]_{r1}NR^2_2$ 이고, 선택적으로 상기 R^2 는 독립적으로 수소 또는 C_1-C_3 알킬 (예: 메틸 또는 에틸)이다.

[0367] 일부 구체예에서, 상기 제2 폴리머는 이온화 가능한 기를 포함하는 결사슬을 갖는 모노머 유닛을 추가로 포함한다. 본원에서 사용된, 문구 "이온화 가능한 기"는 하전된 종으로 용이하게 전환될 수 있는 치환기를 갖는 임의의 화학적 모이어티를 의미한다. 예를 들어, 상기 이온화 가능한 기는 양성자-공여체 또는 양성자-수용체인 기일 수 있다. 상기 기는 생리학적 조건하에 양성자화 또는 탈양성자화될 수 있다. 소정의 구체예에서, 상기 이온화 가능한 기는 pKa 7 미만 (25°C 수중)을 갖는다. 예를 들어, 본원에 기재된 이온화 가능한 기는 pKa 6 미만, pKa 5 미만, pKa 4 미만, pKa 3 미만, pKa 2 미만, 또는 pKa 1 미만을 가질 수 있다. 대안으로서, 또는 추가적으로, 본원에 기재된 이온화 가능한 기는 pKa -2 초과, pKa -1 초과, pKa 0 초과, pKa 1 초과, pKa 2 초과, pKa 3 초과, pKa 4 초과, pKa 5 초과, 또는 pKa 6 초과를 가질 수 있다. 따라서, 본원에 기재된 이온화 가능한 기는 pKa -2 내지 7, 예를 들어, pKa -1 내지 7, pKa 0 내지 7, pKa 1 내지 7, pKa 2 내지 7, pKa 3 내지 7, pKa 4 내지 7, pKa 5 내지 7, pKa 6 내지 7, pKa 0 내지 6, pKa 2 내지 6, pKa 4 내지 6, pKa 0 내지 5, pKa 2 내지 5, 또는 pKa 4 내지 5를 가질 수 있다. 이온화 가능한 기의 예로는 예를 들어 설푼산, 설푼아미드, 카복실산, 티올, 페놀, 아민 염, 이미드 및 아미드 기를 포함한다.

[0368] 일부 구체예에서, 상기 제2 폴리머는 전체 pKa 7 미만 (25°C의 수중)을 갖는다. 예를 들어, 본원에 기재된 제2 폴리머는 pKa 6 미만, pKa 5 미만, pKa 4 미만, pKa 3 미만, pKa 2 미만, 또는 pKa 1 미만을 가질 수 있다. 대안으로서, 또는 추가적으로, 본원에 기재된 제2 폴리머는 pKa -2 초과, pKa -1 초과, pKa 0 초과, pKa 1 초과, pKa 2 초과, pKa 3 초과, pKa 4 초과, pKa 5 초과, 또는 pKa 6 초과를 가질 수 있다. 따라서, 본원에 기재된 제2 폴리머는 pKa -2 내지 7, 예를 들어, pKa -1 내지 7, pKa 0 내지 7, pKa 1 내지 7, pKa 2 내지 7, pKa 3 내지 7, pKa 4 내지 7, pKa 5 내지 7, pKa 6 내지 7, pKa 0 내지 6, pKa 2 내지 6, pKa 4 내지 6, pKa 0 내지 5, pKa 2 내지 5, 또는 pKa 4 내지 5를 가질 수 있다.

[0369] 상기 제2 폴리머는 소수성 기를 포함하는 결사슬을 갖는 모노머 유닛, 올리고아민 또는 폴리아민을 포함하는 결사슬을 갖는 모노머 유닛, 및 존재하는 경우, 이온화 가능한 기를 포함하는 결사슬을 갖는 모노머 유닛을 임의의 적절한 수 또는 양 (예: 조성물의 중량 또는 수 퍼센트)으로 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 제2 폴리머는 약 1 내지 약 80 mol% (예: 약 5 내지 약 80 mol%, 약 10 내지 약 80 mol%, 약 20 내지 약 80 mol%, 약 40 내지 약 80 mol%, 약 1 내지 약 60 mol%, 약 1 내지 약 40 mol%, 약 1 내지 약 20 mol%, 또는 약 1 내지 약 10 mol%)의 소수성 기를 갖는 모노머 유닛, 약 1 내지 약 80 mol% (예: 약 5 내지 약 80 mol%, 약 10 내지 약 80 mol%, 약 20 내지 약 80 mol%, 약 40 내지 약 80 mol%, 약 1 내지 약 60 mol%, 약 1 내지 약 40 mol%, 약 1 내지 약 20 mol%, 또는 약 1 내지 약 10 mol%)의 올리고아민 또는 폴리아민을 갖는 모노머 유닛, 및 0 내지 약 80 mol% (예: 약 5 내지 약 80 mol%, 약 10 내지 약 80 mol%, 약 20 내지 약 80 mol%, 약 40 내지 약 80 mol%, 약 1 내지 약 60 mol%, 약 1 내지 약 40 mol%, 약 1 내지 약 20 mol%, 또는 약 1 내지 약 10 mol %)의 이온화 가능한 기를 갖는 모노머 유닛을 포함한다.

[0370] 상기 제2 폴리머는 하기 화학식 3의 구조를 포함할 수 있다:



[0371]

[0372] 상기에서:

[0373] 각 m^1 , m^2 , m^3 , 및 m^4 는 0 내지 1000의 정수이고, 단 $m^1 + m^2 + m^3 + m^4$ 의 합은 5보다 크며;

[0374] 각 n^1 및 n^2 는 0 내지 1000의 정수이고, 단 $n^1 + n^2$ 의 합은 2보다 크며;

[0375] 기호 "/"는 이에 의해 분리된 유닛들이 무작위로 또는 임의의 순서로 연결되는 것을 나타내고;

[0376] R^{3a} 의 각 경우는 독립적으로 메틸렌 또는 에틸렌 기이고;

[0377] R^{3b} 의 각 경우는 독립적으로 메틸렌 또는 에틸렌 기이고;

[0378] 각 X^1 은 독립적으로 $-C(O)O-$, $-C(O)NR^{13}-$, $-C(O)-$, $-S(O)(O)-$, 또는 결합이며;

[0379] R^{13} 의 각 경우는 독립적으로 수소, 아릴기, 헤테로사이클릭기, C_1 - C_{12} 알킬기, C_2 - C_{12} 알케닐기, C_3 - C_{12} 사이클로알킬기, 또는 C_3 - C_{12} 사이클로알케닐기이고, 이들 중 임의의 기는 선택적으로 하나 이상의 치환기로 치환될 수 있으며;

[0380] X^2 의 각 경우는 독립적으로 C_1 - C_{12} 알킬 또는 헤테로알킬기, C_3 - C_{12} 사이클로알킬기, C_2 - C_{12} 알케닐기, C_3 - C_{12} 사이클로알케닐기, 아릴기, 헤테로사이클릭기, 또는 이들의 조합으로, 이들은 선택적으로 1개 이상의 1차, 2차 또는 3차 아민을 포함하며; 이들 중 임의의 기는 선택적으로 하나 이상의 치환기로 치환되며;

[0381] A^1 및 A^2 는 각각 독립적으로 하기 화학식의 기이고:

[0382] $-(CH_2)_{p1}-[NR^2-(CH_2)_{q1}-]_{r1}NR^2_2$;

[0383] $-(CH_2)_{p2}-N[-(CH_2)_{q2}-NR^2_2]_2$;

[0384] $-(CH_2)_{p3}-N\{[-(CH_2)_{q3}-NR^2_2][-(CH_2)_{q4}-NR^2_2-r_2R^2]\}$; 또는

[0385] $-(CH_2)_{p4}-N\{-(CH_2)_{q5}-N[-(CH_2)_{q6}-NR^2_2]_2\}_2$;

[0386] B^1 및 B^2 는 각각 독립적으로 하기 기이고:

[0387] $-(CH_2)_{p1}-[NR^2-(CH_2)_{q1}-]_{r1}NR^2-(CH_2)_{s1}-R^4-R^5$;

[0388] $-(CH_2)_{p2}-N[-(CH_2)_{q2}-NR^2-(CH_2)_{s2}-R^4-R^5]_2$;

[0389] $-(CH_2)_{p3}-N\{[-(CH_2)_{q3}-NR^2_2][-(CH_2)_{q4}-NR^2_2-r_2(CH_2)_{s3}-R^4-R^5]\}$;

[0390] $-(CH_2)_{p4}-N\{-(CH_2)_{q5}-N[-(CH_2)_{q6}-NR^2-(CH_2)_{s4}-R^4-R^5]_2\}_2$;

[0391] $-(CH_2)_{p1}-[NR^2-(CH_2)_{q1}-]_{r1}NR^2-CH_2-CHOH-R^5$;

[0392] $-(CH_2)_{p2}-N[-(CH_2)_{q2}-NR^2-CH_2-CHOH-R^5]_2$;

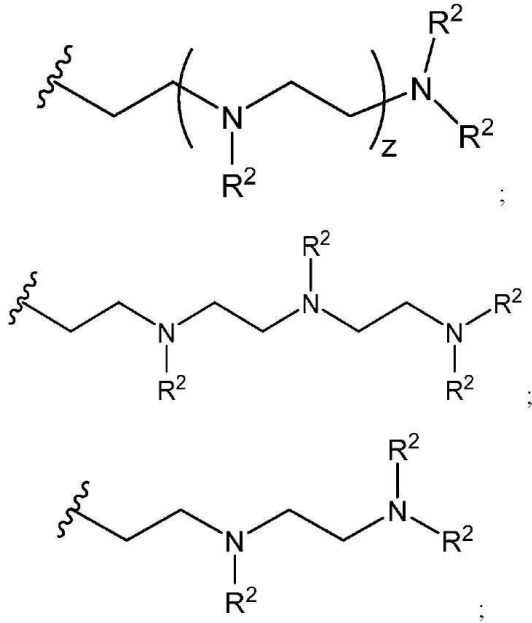
- [0393] $-(CH_2)_{p3}-N\{[-(CH_2)_{q3}-NR^2_2][-(CH_2)_{q4}-NR^2-r_2-CH_2-CHOH-R^5];$
- [0394] $-(CH_2)_{p4}-N\{-(CH_2)_{q5}-N[-(CH_2)_{q6}-NR^2-CH_2-CHOH-R^5]_2\}_2;$
- [0395] $-(CH_2)_{p1}-[NR^2-(CH_2)_{q1}-]_{r1}NR^2-(CH_2)_{s1}-R^5;$
- [0396] $-(CH_2)_{p2}-N[-(CH_2)_{q2}-NR^2-(CH_2)_{s2}-R^5]_2;$
- [0397] $-(CH_2)_{p3}-N\{[-(CH_2)_{q3}-NR^2_2][-(CH_2)_{q4}-NR^2-r_2(CH_2)_{s3}-R^5\};$
- [0398] $-(CH_2)_{p4}-N\{-(CH_2)_{q5}-N[-(CH_2)_{q6}-NR^2-(CH_2)_{s4}-R^5]_2\}_2;$
- [0399] $-(CH_2)_{p1}-[N\{(CH_2)_{s1}-R^4-R^5\}-(CH_2)_{q1}-]_{r1}NR^2_2;$
- [0400] $-(CH_2)_{p1}-[N\{(CH_2)_{s1}-R^5\}-(CH_2)_{q1}-]_{r1}NR^2_2,$
- [0401] $-(CH_2)_{p1}-[NR^2-(CH_2)_{q1}-]_{r1}NR^2-CH(CONH_2)-(CH_2)_{s1}-R^5;$ 또는
- [0402] $-(CH_2)_{p1}-[NR^2-(CH_2)_{q1}-]_{r1}NR^2-CH(CONH_2)-(CH_2)_{s1}-R^4-R^5,$
- [0403] 상기에서, p1 내지 p4, q1 내지 q6, r1 및 r2, 및 s1 내지 s4는 각각 독립적으로 1 내지 5의 정수이고; R²의 각 경우는 독립적으로 수소 또는 C₁-C₁₂ 알킬기, 알케닐기, 사이클로알킬기 또는 사이클로알케닐기이거나, 또는 R²는 제2 R²와 조합하여 헤테로사이클릭기를 형성하며; R⁴의 각 경우는 독립적으로 -C(O)O-, -C(O)NH-, -O-, -C-O-C(O)-C-O-, 또는 S(O)(O)-이고; R⁵의 각 경우는 독립적으로 알킬기, 사이클로알킬기, 알케닐기, 사이클로알케닐기, 아릴기, 헤테로알킬기, 헤테로사이클릭기, 또는 이들의 조합으로, 이들은 선택적으로 2 내지 8개의 3차 아민을 포함하고, 또는 조직-특이적 또는 세포-특이적 표적화 모이어티를 포함하는 치환기이다.
- [0404] 화학식 3에 따르면, 각 m¹, m², m³, 및 m⁴는 0 내지 1000 (예: 0 내지 500, 0 내지 200, 0 내지 100, 또는 0 내지 50)의 정수이며, 단 m¹ + m² + m³ + m⁴의 합은 5 초과 예컨대 5-5000, 5-2000, 5-1000, 5-500, 5-100 또는 5-50이다. 일부 구체예에서, m¹ + m² + m³ + m⁴의 합은 10 초과 또는 20 초과 (예: 10-5000, 10-2000, 10-1000, 10-500, 10-100, 또는 10-50; 또는 20-5000, 20-2000, 20-1000, 20-500, 20-100, 또는 20-50)이다. 또한, 각 n¹ 및 n²는 0 내지 1000 (예: 0 내지 500, 0 내지 200, 0 내지 100, 0 내지 50, 또는 0 내지 25)의 정수이고, 단 n¹ + n²의 합은 2 초과 (예: 2-2000, 2-1000, 2-500, 2-200, 2-100, 2-50, 또는 2-25)이다. 일부 구체예에서, n¹ + n²의 합은 5 초과 또는 10 초과 (예: 5-2000, 5-1000, 5-500, 5-200, 5-100, 5-50, 또는 5-25; 또는 10-2000, 10-1000, 10-500, 10-200, 10-100, 10-50, 또는 10-25)이다. 다시 말해서, 상기 제2 폴리머는 본원에서 각각 "A 모노머" 및 "B 모노머"로 집합적으로 지칭되는, A¹, A², B¹, 및/또는 B² 기를 포함하는 적어도 일부의 모노머 유닛을 포함한다. 유사하게, 상기 제2 폴리머는 본원에서 "X 모노머"로 집합적으로 지칭되는, X¹ 및/또는 X² 기를 포함하는 적어도 일부의 모노머 유닛을 포함한다. 일부 구체예에서, m¹ 및 m²가 0이면, 제2 폴리머는 A¹ 또는 A² 기를 포함하지 않는다. 일부 구체예에서, m³ 및 m⁴가 0이면, 제2 폴리머는 B¹ 또는 B² 기를 포함하지 않는다.
- [0405] 상기 제2 폴리머는 A 및 B 모노머 대 X 모노머의 임의의 적합한 비율을 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 제2 폴리머는 A 및 B 모노머 대 X 모노머의 비율 (예: (m¹+m²+m³+m⁴)/(n¹+n²))의 비율을 약 25 이하, 선택적으로 약 1 이상으로 포함한다. 예를 들어, A 및 B 모노머 대 X 모노머의 비율은 약 1 내지 약 25, 약 1 내지 약 20, 약 1 내지 약 10, 약 1 내지 약 5, 약 5 내지 약 25, 약 10 내지 약 25, 또는 약 15 내지 약 25일 수 있다.

- [0406] 상기 제2 폴리머가 A 모노머 및 B 모노머 모두를 포함하는 구체예에서, 상기 제2 폴리머는 A 모노머 대 B 모노머의 임의의 적절한 비율을 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, A 모노머 대 B 모노머의 비율 (예: $(m^1+m^2)/(m^3+m^4)$)은 약 20 이하 (예: 약 10 이하, 약 5 이하, 약 2 이하, 또는 심지어 약 1 이하)일 수 있다. 일부 구체예에서, $(m^1+m^2)/(m^3+m^4)$ 의 비율은 약 0.2 이상, 예컨대 약 0.5 이상이다.
- [0407] 상기 제2 폴리머는 임의의 적절한 구조 타입으로 존재할 수 있다. 예를 들어, 상기 제2 폴리머는 교호 폴리머, 랜덤 폴리머, 블록 폴리머, 그래프트 폴리머, 직쇄형 폴리머, 분지쇄형 폴리머, 고리형 폴리머, 또는 이들의 조합으로 존재할 수 있다. 소정의 구체예에서, 상기 제2 폴리머는 랜덤 폴리머, 블록 폴리머, 그래프트 폴리머, 또는 이들의 조합이다.
- [0408] 따라서, 화학식 3의 구조에서, 모노머 (이들 각각의 결합술에 의해 A^1 , A^2 , B^1 , B^2 , X^1 , 및 X^2 로 지칭될 수 있음)는 무작위로 또는 임의의 순서로 배열될 수 있다. 정수 m^1 , m^2 , m^3 , m^4 , n^1 , 및 n^2 는 단지 사슬 전체에 나타나는 각 모노머의 수를 나타내고, 이러한 모노머들의 임의의 특정 순서 또는 블록을 반드시 암시 또는 표시하는 것은 아니며, 주어진 모노머의 블록 (blocks) 또는 스트레치 (stretches)가 일부 구체예에서 존재할 수 있다. 예를 들어, 화학식 3의 구조는 상기 모노머를 $-A^1-A^2-B^1-B^2-$, $-A^2-A^1-B^2-B^1-$, $-A^1-B^1-A^2-B^2-$ 등의 순서로 포함할 수 있다. 또한, 상기 제2 폴리머는 A 및/또는 B 폴리머의 블록 (예: 임의의 순서의 $[A \text{ 모노머}]_{m^1+m^2}-[B \text{ 모노머}]_{m^3+m^4}$)을 포함할 수 있다. 상기 제2 폴리머는 A 및 B 모노머가 산재된 개별 X 모노머 (예: $-A-X-B-$, $-A-B-X-$, $-B-X-A$, 등)를 포함할 수 있거나, 또는 상기 제2 폴리머는 하나 이상의 X 모노머 (예: X 모노머들의 블록)로 상기 폴리머의 한쪽 또는 양쪽 말단에서 "캡핑"될 수 있다. 유사하게, 상기 제2 폴리머가 A 및/또는 B 모노머들의 블록을 포함하는 경우, 상기 제2 폴리머는 A 및/또는 B 모노머들의 블록들 간에 산재된 X 모노머들의 블록을 포함할 수 있거나, 또는 상기 제2 폴리머는 하나 이상의 X 모노머 (예: X 모노머들의 블록)로 상기 폴리머의 한쪽 또는 양쪽 말단에서 캡핑될 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 폴리펩티드 (예: 폴리아스파타미드) 백본은 "1" 및 "2" 개의 모노머가 교대되도록 알파/베타 구성으로 배열될 것이며 (예: $-A^1-A^2-B^1-B^2-$, $-A^2-A^1-B^2-B^1-$, $-A^1-B^2-B^1-A^2-$, $-A^2-B^1-B^2-A^1-$, $-B^1-A^2-B^1-A^2-$, 등), 상기 제2 폴리머는 X 모노머로 캡핑되거나, 또는 X 모노머들이 전체적으로 산재되어 있다. 그러나 "A" 및 "B" 결합술 (예: A^1/A^2 및 B^1/B^2)은 폴리머 백본 전체에 무작위로 산재될 수 있다.
- [0409] 상기 폴리머 구조에서, R^{3a} 및 R^{3b} 는 각각 독립적으로 메틸렌 또는 에틸렌 기이다. 일부 구체예에서, R^{3a} 는 에틸렌기이고, R^{3b} 는 메틸렌기이거나; 또는 R^{3a} 는 메틸렌기이고, R^{3b} 는 에틸렌기이다. 소정의 구체예에서, R^{3a} 및 R^{3b} 는 각각 에틸렌기이다. 일부 구체예에서, R^{3a} 및 R^{3b} 는 각각 메틸렌기이다.
- [0410] 본원에 기재된 폴리머에서, 각 X^1 기는 독립적으로 $-C(O)O-$, $-C(O)NR^{13}-$, $-C(O)-$, $-S(O)(O)-$, 또는 결합이다. 각 X^1 기는 동일하거나 또는 서로 상이할 수 있다. 일부 구체예에서, X^1 은 $-C(O)NR^{13}-$ 이다. 일부 구체예에서, X^1 은 $-C(O)O-$ 이다.
- [0411] R^{13} 의 각 경우는 독립적으로 수소 또는 C_1-C_{12} (예: C_1-C_8 , C_1-C_6 , 또는 C_1-C_3) 알킬기, C_2-C_{12} (예: C_2-C_8 , C_2-C_6 , 또는 C_2-C_3) 알케닐기, C_3-C_{12} (예: C_3-C_8 , C_3-C_6 , 또는 C_3-C_5) 사이클로알킬기, C_3-C_{12} (예: C_3-C_8 , C_3-C_6 , 또는 C_3-C_5) 사이클로알케닐기, 아릴기, 또는 헤테로사이클릭기 (예: 헤테로원자를 1개, 2개 또는 3개 포함하는 3-12원, 3-10원, 3-8원, 또는 3-6원 헤테로사이클릭기)이고, 이들 중 임의의 기는 하나 이상의 치환기로 치환될 수 있다. 일부 구체예에서, R^{13} 은 C_1-C_{12} 알킬기 (예: C_1-C_{10} 알킬기; C_1-C_8 알킬기; C_1-C_6 알킬기; C_1-C_4 알킬기, C_1-C_3 알킬기, 또는 C_1 또는 C_2 알킬기)이고, 이는 직쇄형 또는 분지쇄형일 수 있다. 소정의 구체예에서, 각 R^{13} 은 메틸 또는 수소이다. 일부 구체예에서, R^{13} 은 메틸이고; 다른 구체예에서, R^{13} 은 수소이다. 각 R^{13} 은 독립적으로 선택되고, 동일하거나 또는 상이할 수 있으며; 그러나 일부 구체예에서, 각 R^{13} 은 동일하다 (예: 모두 메틸 또는 모두 수소).

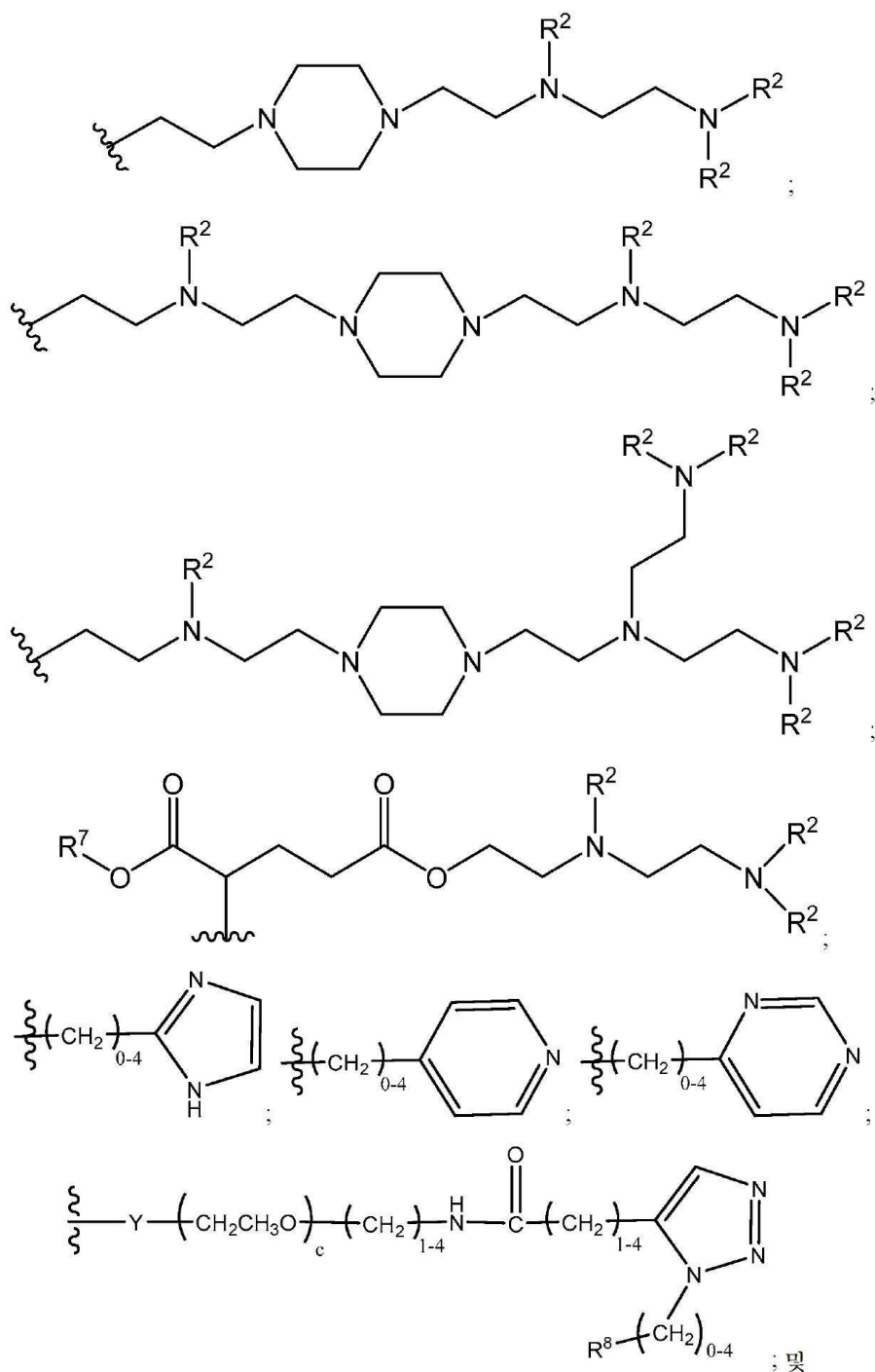
- [0412] X^2 의 각 경우는 독립적으로 C_1-C_{12} (예: C_1-C_8 , C_1-C_6 , 또는 C_1-C_3) 알킬기, C_2-C_{12} (예: C_2-C_8 , C_2-C_6 , 또는 C_2-C_3) 알케닐기, C_3-C_{12} (예: C_3-C_8 , C_3-C_6 , 또는 C_3-C_5) 사이클로알킬기, C_3-C_{12} (예: C_3-C_8 , C_3-C_6 , 또는 C_3-C_5) 사이클로알케닐기, 아릴기, 또는 헤테로사이클릭기 (예: 헤테로원자를 1개, 2개 또는 3개 포함하는 3-12, 3-10, 3-8, 또는 3-6원 헤테로사이클릭기)이고, 이들 중 임의의 기는 하나 이상의 치환기로 치환될 수 있다. 일부 구체예에서, X^2 는 선택적으로 1개 이상의 1차, 2차, 또는 3차 아민을 포함할 수 있다. 따라서, 각 X^2 는 독립적으로 선택되고, 그러므로 동일하거나 또는 서로 상이할 수 있다. 소정의 구체예에서, X^2 의 각 경우는 독립적으로 C_1-C_{12} (예: C_1-C_8 , C_1-C_6 , 또는 C_1-C_3) 알킬기, C_2-C_{12} (예: C_2-C_8 , C_2-C_6 , 또는 C_2-C_3) 알케닐기, C_3-C_{12} (예: C_3-C_8 , C_3-C_6 , 또는 C_3-C_5) 사이클로알킬기, C_3-C_{12} (예: C_3-C_8 , C_3-C_6 , 또는 C_3-C_5) 사이클로알케닐기, 또는 이들의 조합으로, 이들은 선택적으로 1개 이상의 1차, 2차, 또는 3차 아민을 포함한다. 일부 구체예에서, 하나 이상 (또는 모든)의 X^2 기는 독립적으로 C_2-C_{12} (예: C_3-C_{12} , C_3-C_8 , C_3-C_6 , C_4-C_{12} , C_4-C_6 , C_6-C_{12} , 또는 C_8-C_{12}) 알킬기 또는 알케닐기, 또는 C_3-C_{12} (예: C_3-C_8 , C_3-C_6 , C_4-C_{12} , C_4-C_6 , C_6-C_{12} , 또는 C_8-C_{12}) 사이클로알케닐기일 수 있다. 다른 구체예에서, 하나 이상 (또는 모든)의 X^2 기는 독립적으로 C_1-C_8 (예: C_1-C_6 , C_1-C_4 , C_1-C_3 , C_2-C_8 , 또는 C_2-C_6) 알킬기일 수 있다. 상기 알킬기 또는 알케닐기는 직쇄형 또는 분지쇄형일 수 있다.
- [0413] A^1 및 A^2 기는 독립적으로 선택되고, 그러므로 동일하거나 또는 서로 상이할 수 있다. 유사하게, B^1 및 B^2 기는 독립적으로 선택되고, 동일하거나 또는 서로 상이할 수 있다. 그러나, 일부 구체예에서, A^1 및 A^2 는 동일하고 및/또는 B^1 및 B^2 는 동일하다.
- [0414] A^1 , A^2 , B^1 , 및 B^2 기에서, p1 내지 p4 (즉, p1, p2, p3, 및 p4), q1 내지 q6 (즉, q1, q2, q3, q4, q5, 및 q6), r1, r2, 및 s1 내지 s4 (즉, s1, s2, s3, 및 s4)의 정수는 각각 독립적으로 1 내지 5 (예: 1, 2, 3, 4, 또는 5)의 정수이다. 일부 구체예에서, p1 내지 p4 (즉, p1, p2, p3, 및 p4), q1 내지 q6 (즉, q1, q2, q3, q4, q5, 및 q6), r1, r2, 및/또는 s1 내지 s4는 각각 독립적으로 1 내지 3 (예: 1, 2, 또는 3)의 정수이다. 소정의 구체예에서, p1 내지 p4 (즉, p1, p2, p3, 및 p4), q1 내지 q6 (즉, q1, q2, q3, q4, q5, 및 q6), 및/또는 s1 내지 s4 (즉, s1, s2, s3, 및 s4)는 각각 2이다. 일부 구체예에서, p1 내지 p4 (즉, p1, p2, p3, 및 p4) 및/또는 q1 내지 q6 (즉, q1, q2, q3, q4, q5, 및 q6)은 각각 2이고, r1, r2, 및 s1 내지 s4 (즉, s1, s2, s3, 및 s4)는 각각 1이다.
- [0415] R^2 의 각 경우는 수소 또는 C_1-C_{12} (예: C_1-C_8 , C_1-C_6 , 또는 C_1-C_3) 알킬기, C_2-C_{12} (예: C_2-C_8 , C_2-C_6 , 또는 C_2-C_3) 알케닐기, C_3-C_{12} (예: C_3-C_8 , C_3-C_6 , 또는 C_3-C_5) 사이클로알킬기, C_3-C_{12} (예: C_3-C_8 , C_3-C_6 , 또는 C_3-C_5) 사이클로알케닐기일 수 있거나, 또는 R^2 는 제2 R^2 와 조합하여 헤테로사이클릭기를 형성한다. 일부 구체예에서, R^2 는 수소 또는 C_1-C_{12} 알킬기 (예: C_1-C_{10} 알킬기; C_1-C_8 알킬기; C_1-C_6 알킬기; C_1-C_4 알킬기, C_1-C_3 알킬기, 또는 C_1 또는 C_2 알킬기)이고, 이는 직쇄형 또는 분지쇄형일 수 있다. 소정의 구체예에서, R^2 는 메틸이다. 다른 구체예에서, R^2 는 수소일 수 있다. 각 R^2 는 독립적으로 선택되고, 동일하거나 또는 상이할 수 있다. 일부 구체예에서, 주어진 각 R^2 는 동일하다 (예: 모두 메틸 또는 모두 수소).
- [0416] R^4 의 각 경우는 독립적으로 $-C(O)O-$, $-C(O)NH-$, 또는 $-S(O)(O)-$ 이다. 일부 구체예에서, R^4 의 각 경우는 독립적으로 $-C(O)O-$ 또는 $-C(O)NH-$ 이다. 소정의 구체예에서, R^4 의 각 경우는 $-C(O)O-$ 이다. 소정의 구체예에서, R^4 의 각 경우는 $-C(O)NH-$ 이다.
- [0417] R^5 의 각 경우는 독립적으로 알킬기, 사이클로알킬기, 알케닐기, 사이클로알케닐기, 아릴기, 헤테로알킬기, 헤테로사이클릭기, 또는 이들의 조합으로, 이들은 선택적으로 2 내지 8개의 3차 아민을 포함하고, 또는 조직-특이적 및 세포-특이적 표적화 모이어티를 포함하는 치환기이다. R^5 는 약 2 내지 약 50개의 탄소 원자 (예: 약 2 내지 약 40개의 탄소 원자, 약 2 내지 약 30개의 탄소 원자, 약 2 내지 약 20개의 탄소 원자, 약 2 내지 약 16개의

탄소 원자, 약 2 내지 약 12개의 탄소 원자, 약 2 내지 약 10개의 탄소 원자, 또는 약 2 내지 약 8개의 탄소 원자)를 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, R^5 는 2 내지 8개 (즉, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8개)의 3차 아민을 포함하는 헤테로알킬기이다. 상기 3차 아민은 헤테로알킬 백본 (즉, 헤테로알킬기에서 가장 긴 연속한 원자의 사슬)의 일부, 또는 펜던트 치환기일 수 있다. 따라서, 예를 들어, 3차 아민을 포함하는 헤테로알킬기는 2 내지 8개의 3차 아민을 포함하는, 알킬아미노기, 아미노 알킬기, 알킬아미노알킬기, 아미노알킬아미노기 등을 제공할 수 있다.

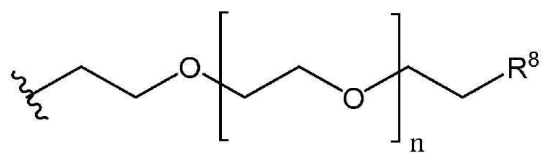
[0418] 일부 구체예에서, 각 R^5 는 독립적으로 하기로부터 선택된다:



[0419]



[0420]



[0421]

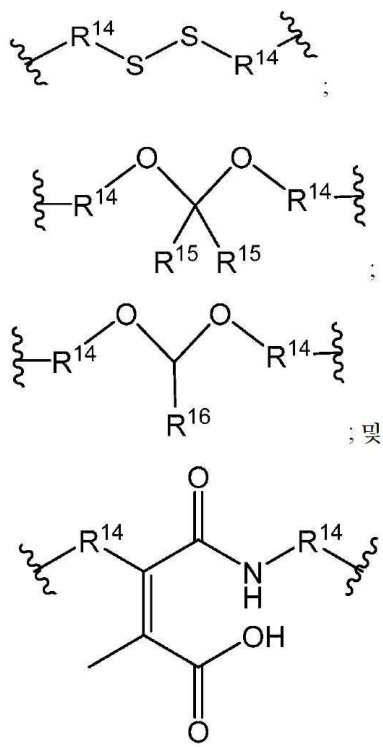
[0422] 상기에서

[0423] $\mathbb{R}^2$ 의 각 경우는 상기에 기재된 바와 같고;

[0424] R⁷은 C₁-C₅₀ 알킬기, 알케닐기, 사이클로알킬기, 또는 사이클로알케닐기로, 선택적으로 1개 이상의 아민으로 치환되고;

- [0425] z 는 1 내지 5의 정수이고;
- [0426] c 는 0 내지 50의 정수이고;
- [0427] Y 는 선택적으로 존재하고, 절단 가능한 링커이며;
- [0428] n 은 0 내지 50의 정수이고;
- [0429] R^8 은 조직-특이적 또는 세포-특이적 표적화 모이어티이다. C_1 - C_{12} 알킬기, 알케닐기, 사이클로알킬기, 또는 사이클로알케닐기.
- [0430] R^7 은 C_1 - C_{50} (예: C_1 - C_{40} , C_1 - C_{30} , C_1 - C_{20} , C_1 - C_{10} , C_4 - C_{12} , 또는 C_6 - C_8) 알킬기, 알케닐기, 사이클로알킬기, 또는 사이클로알케닐기일 수 있고, 선택적으로 1개 이상의 아민으로 치환된다. 일부 구체예에서, R^7 은 C_4 - C_{12} 예컨대 C_6 - C_8 , 알킬기, 알케닐기, 사이클로알킬기, 또는 사이클로알케닐기로, 선택적으로 1개 이상의 아민으로 치환된다. 일부 구체예에서, R^7 은 1개 이상의 아민으로 치환된다. 소정의 구체예에서, R^7 은 2 내지 8개 (즉, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8개)의 3차 아민으로 치환된다. 상기 3차 아민은 알킬기의 일부 (즉, 알킬기 백본에 포함됨) 또는 펜던트 치환기일 수 있다.
- [0431] Y 의 각 경우는 선택적으로 존재한다. 본원에서 사용된, 문구 "선택적으로 존재하는"은 선택적으로 존재하는 것으로 지정된 치환기가 존재하거나 또는 존재하지 않을 수 있으며, 해당 치환기가 존재하지 않는 경우, 인접한 치환기가 서로 직접 결합된다는 것을 의미한다. Y 가 존재하는 경우, Y 는 절단 가능한 링커이다. 본원에서 사용된, 문구 "절단 가능한 링커"는 2개의 종들을 분리하기 위해 절단될 수 있는, 2개의 종들을 연결하는 임의의 화학적 요소를 의미한다. 예를 들어, 상기 절단 가능한 링커는 가수분해 공정, 광화학 공정, 라디칼 공정, 효소 공정, 전기화학 공정, 또는 이들의 조합에 의해 절단될 수 있다. 예시되는 절단 가능한 링커는 하기를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다:

[0432]



[0433]

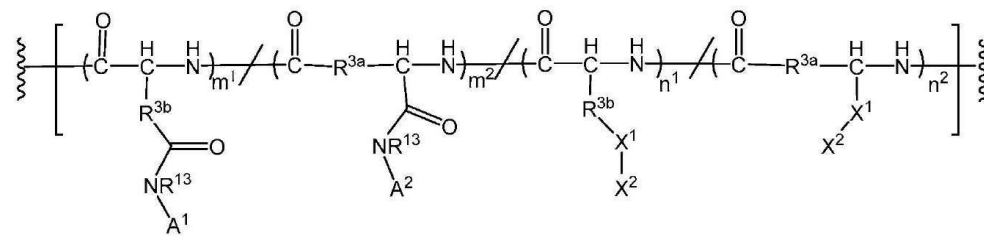
- [0434] 상기에서, R^{14} 의 각 경우는 독립적으로 C_1 - C_4 알킬기이고, R^{15} 의 각 경우는 독립적으로 수소, 아틸기, 헤테로사이클릭기 (예: 방향족 또는 비-방향족), C_1 - C_{12} 알킬기, 알케닐기, 사이클로알킬기, 또는 사이클로알케닐기이고, R^{16} 은 하나 이상의 $-OCH_3$, $-NHCH_3$, $-N(CH_3)_2$, $-SCH_3$, $-OH$, 또는 이들의 조합으로 선택적으로 치환된, 6-원 방향족

또는 헤테로방향족 기이다.

[0435] 일부 구체예에서, 각 A^1 및 A^2 는 독립적으로 화학식 $-(CH_2)_{p1}-[NH-(CH_2)_{q1}]_{r1}NH_2$ 또는 $-(CH_2)_{p1}-[NH-(CH_2)_{q1}]_{r1}NHCH_3$ 기, 또는 $-(CH_2)_2-NH-(CH_2)_2-NH_2$ 또는 $-(CH_2)_2-NH-(CH_2)_2-NHCH_3$ 또는 $-(CH_2)_2-NH-(CH_2)_2-NH_2$ 기이다. 일부 구체예에서, 각 A^1 및 A^2 는 독립적으로 화학식 $-(CH_2)_{p1}-[N(R^2)]-(CH_2)_{q1}]_{r1}N(R^2)_2$ 또는 $-(CH_2)_{p1}-[N(R^2)]-(CH_2)_{q1}]_{r1}NH(R^2)$ 기 (여기서, R^2 는 메틸 또는 에틸임); 또는 $-(CH_2)_2-N(CH_3)-(CH_2)_2-NH_2$, 또는 $-(CH_2)_2-N(CH_3)-(CH_2)_2-NHCH_3$, 또는 $-(CH_2)_2-N(CH_3)-(CH_2)_2-N(CH_3)_2$ 기이다.

[0436] 추가적으로, 또는 대안으로서, 각 B^1 및 B^2 는 화학식 $-(CH_2)_{p1}-[NH-(CH_2)_{q1}]_{r1}NH-(CH_2)_2-R^4-R^5$ 기, 예컨대 $-(CH_2)_2-NH-(CH_2)_2-NH-(CH_2)_2-R^4-R^5$ 기, 또는 $-(CH_2)_2-NH-(CH_2)_2-NH-(CH_2)_2-C(O)-O-R^5$ 기이고, 여기서 R^4 및 R^5 는 상기에 기재된 바와 같다.

[0437] 일부 구체예에서, 화학식 3의 구조를 포함하는 폴리머는 임의의 B 모노머 (예: m^3 및 m^4 는 모두 0임)를 갖지 않는다. 따라서, 상기 제2 폴리머는 하기 화학식 4의 구조를 포함할 수 있다:



화학식 4

[0438]

상기에서:

[0439]

[0440] 각 m^1 및 m^2 는 0 내지 1000 (예: 0 내지 500, 0 내지 200, 0 내지 100, 0 내지 50)의 정수이고, 단 $m^1 + m^2$ 의 합은 5 초과 (예: 5-2000, 5-1000, 5-500, 5-100, 또는 5-50)이다. 일부 구체예에서, 상기 $m^1 + m^2$ 의 합은 10 초과 또는 20 초과 (예: 10-5000, 10-2000, 10-1000, 10-500, 10-100, 또는 10-50; 또는 20-5000, 20-2000, 20-1000, 20-500, 20-100, 또는 20-50)이다. 또한, 각 n^1 및 n^2 는 0 내지 1000 (예: 0 내지 500, 0 내지 200, 0 내지 100, 0 내지 50, 또는 0 내지 25)의 정수이고, 단 $n^1 + n^2$ 의 합은 2 초과 (예: 2-2000, 2-1000, 2-500, 2-200, 2-100, 2-50, 또는 2-25)이다. 일부 구체예에서, 상기 $n^1 + n^2$ 의 합은 5 초과 또는 10 초과 (예: 5-2000, 5-1000, 5-500, 5-200, 5-100, 5-50, 또는 5-25; 또는 10-2000, 10-1000, 10-500, 10-200, 10-100, 10-50, 또는 10-25)이다.

[0441] 화학식 4의 구조를 포함하는 폴리머의 일부 구체예에서, A^1 및 A^2 는 각각 독립적으로 하기 화학식의 기이다:

[0442] $-(CH_2)_{p1}-[NR^2-(CH_2)_{q1}]_{r1}NR^2_2$;

[0443] $-(CH_2)_{p2}-N[-(CH_2)_{q2}-NR^2_2]_2$;

[0444] $-(CH_2)_{p3}-N\{[-(CH_2)_{q3}-NR^2_2]_{r1}[-(CH_2)_{q4}-NR^2_2]_{r2}\}$; 또는

[0445] $-(CH_2)_{p4}-N\{-(CH_2)_{q5}-N[-(CH_2)_{q6}-NR^2_2]_2\}_2$,

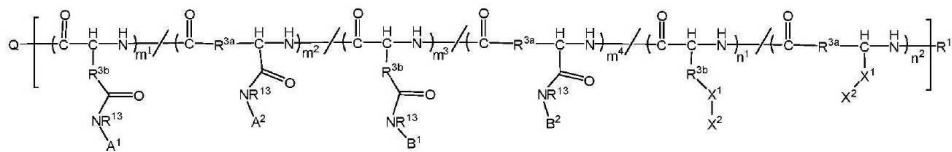
[0446] 상기에서, $p1$ 내지 $p4$, $q1$ 내지 $q6$, 및 $r1$ 및 $r2$ 는 각각 독립적으로 1 내지 5의 정수 (예: 1 내지 3의 정수)이고; R^2 의 각 경우는 독립적으로 수소 또는 C_1-C_{12} (예: C_1-C_8 , C_1-C_6 , 또는 C_1-C_3) 알킬기, C_2-C_{12} (예: C_2-C_8 , C_2-C_6 , 또는 C_2-C_3) 알케닐기, C_3-C_{12} (예: C_3-C_8 , C_3-C_6 , 또는 C_3-C_5) 사이클로알킬기, C_3-C_{12} (예: C_3-C_8 , C_3-C_6 , 또는

C₃-C₅) 사이클로알케닐기이다. 일부 구체예에서, R² 치환기를 함유하는 A¹ 및 A² 기에서 각 질소는 3차 아민이고, 단 예외적으로 말단 아민은 1차, 2차 또는 3차 아민, 또는 일부 구체예에서 2차 또는 3차 아민일 수 있다. 추가 예시로서, 각 A¹ 및 A²는 -(CH₂)₂-NR²-(CH₂)₂-NR²일 수 있고, 여기서 R²의 각 경우는 독립적으로 상기 기재된 수소, 알킬기, 알케닐기, 사이클로알킬기 또는 사이클로알케닐기, 구체적으로 알킬 에컨대 메틸 또는 에틸이며, 선택적으로 각 아민은 3차 아민이고, 예외적으로 말단 아민은 2차 또는 3차 아민이다.

[0447] A¹ 및 A² 기의 특정 비-제한적인 예로는 예를 들어, -NH-CH₂-CH₂-N(CH₃)-CH₂-CH₂-N(CH₃)₂; -N(CH₃)-CH₂-CH₂-N(CH₃)-CH₂-CH₂-N(CH₃)₂; -NH-CH₂-CH₂-N(CH₃)-CH₂-CH₂-N(CH₃)-CH₂-CH₂-N(CH₃)₂; -N(CH₃)-CH₂-CH₂-N(CH₃)-CH₂-CH₂-N(CH₃)-CH₂-CH₂-N(CH₃)₂; -NH-CH₂-CH₂-N(CH₃)-CH₂-CH₂-NH(CH₃); -N(CH₃)-CH₂-CH₂-N(CH₃)-CH₂-CH₂-NH(CH₃); -NH-CH₂-CH₂-N(CH₃)-CH₂-CH₂-N(CH₃)-CH₂-CH₂-NH(CH₃); -N(CH₃)-CH₂-CH₂-N(CH₃)-CH₂-CH₂-N(CH₃)-CH₂-CH₂-NH(CH₃)을 포함한다.

[0448] 화학식 4의 구조를 포함하는 폴리머의 모든 다른 양상은 화학식 4의 치환기와 관련된 이의 모든 구체예를 포함하는, 화학식 3에 대해 기재된 바와 같다. 그러므로, 예를 들어, 화학식 4의 일부 구체예에서, R¹³의 각 경우는 화학식 3에 대해 기재된 임의의 기일 수 있고, R¹³이 수소 또는 메틸인 특정 구체예를 포함하며, R^{3a} 및 R^{3b}의 각 경우는 화학식 3에 대해 기재된 임의의 기일 수 있고, R^{3a} 및 R^{3b}이 메틸렌 또는 에틸렌인 구체예를 포함한다. 유사하게, X¹ 및 X²는 화학식 3에 대해 기재된 임의의 기일 수 있고, X¹이 -C(O)NR¹³- 또는 -C(O)O-이고 및/또는 하나 이상의 (또는 모든) X² 기는 독립적으로 C₁-C₈ (예: C₁-C₆, C₁-C₄, C₁-C₃, C₂-C₈, 또는 C₂-C₆) 알킬기일 수 있는 구체예를 포함한다.

[0449] 일부 구체예에서, 상기 제2 폴리머는 화학식 3A의 구조를 갖는다:

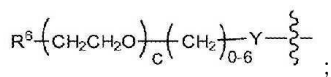


[0450]

[0451] 상기에서

[0452] Q는 하기 화학식의 기이고:

[0453]



[0454]

c는 0 내지 50의 정수이고;

[0455]

Y는 선택적으로 존재하고, 절단 가능한 링커이며;

[0456]

각 m¹, m², m³, 및 m⁴는 0 내지 1000의 정수이고, 단 m¹ + m² + m³ + m⁴의 합은 5보다 크며;

[0457]

각 n¹ 및 n²는 0 내지 1000의 정수이고, 단 n¹ + n²의 합은 2보다 크며;

[0458]

기호 "/"는 이에 의해 분리된 유닛들이 무작위로 또는 임의의 순서로 연결되는 것을 나타내고;

[0459]

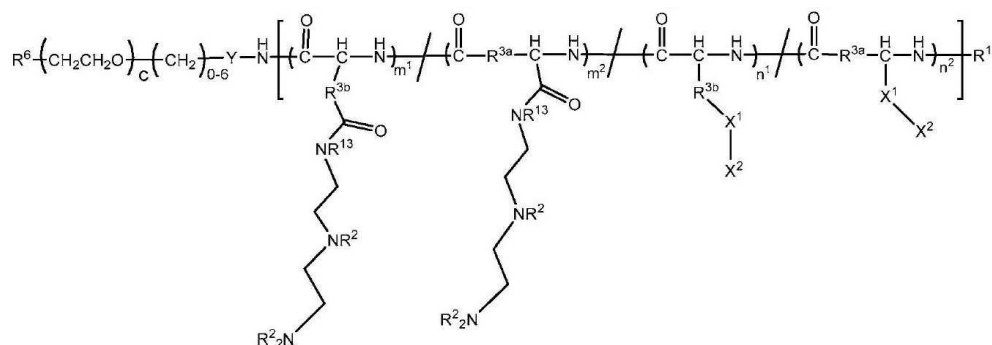
R¹은 수소, 아릴기, 헤테로사이클릭기, C₁-C₁₂ (예: C₁-C₈, C₁-C₆, 또는 C₁-C₃) 알킬 또는 헤테로알킬 기, C₂-C₁₂ (예: C₂-C₈, C₂-C₆, 또는 C₂-C₃) 알케닐기, C₃-C₁₂ (예: C₃-C₈, C₃-C₆, 또는 C₃-C₅) 사이클로알킬기, 또는 C₃-C₁₂ (예: C₃-C₈, C₃-C₆, 또는 C₃-C₅) 사이클로알케닐기로, 이들은 선택적으로 하나 이상의 치환기로 치환되며;

[0460]

R⁶은 수소, 아미노기, 아릴기, 헤테로사이클릭기, C₁-C₁₂ (예: C₁-C₈, C₁-C₆, 또는 C₁-C₃) 알킬 또는 헤테로알킬 기, C₂-C₁₂ (예: C₂-C₈, C₂-C₆, 또는 C₂-C₃) 알케닐기, C₃-C₁₂ (예: C₃-C₈, C₃-C₆, 또는 C₃-C₅) 사이클로알킬기, 또는 C₃-C₁₂ (예: C₃-C₈, C₃-C₆, 또는 C₃-C₅) 사이클로알케닐기로, 이들은 선택적으로 1개 이상의 아민으로 치환되며;

또는 조직-특이적 또는 세포-특이적 표적화 모이어티이다. 화학식 3A의 모든 다른 양상은 이의 임의의 및 모든 구체예를 포함하는, 상기 화학식 3에 대해 기재된 바와 같다.

[0461] 일부 구체예에서, 상기 제2 폴리머는 화학식 3B의 구조를 갖는다:



[0462]

상기에서

[0463]

c는 0 내지 50의 정수이고;

[0464]

Y는 선택적으로 존재하고, 절단 가능한 링커이며;

[0465]

각 m^1 및 m^2 는 0 내지 1000의 정수이고, 단 $m^1 + m^2$ 의 합은 5보다 크며;

[0466]

각 n^1 및 n^2 는 0 내지 1000의 정수이고, 단 $n^1 + n^2$ 의 합은 2보다 크며;

[0467]

기호 "/"는 이에 의해 분리된 유닛들이 무작위로 또는 임의의 순서로 연결되는 것을 나타내고;

[0468]

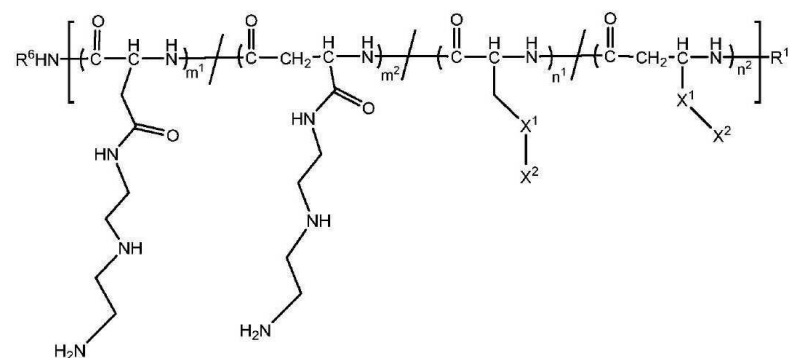
R^1 은 수소, 아릴기, 헤테로사이클릭기, C_1 - C_{12} (예: C_1 - C_8 , C_1 - C_6 , 또는 C_1 - C_3) 알킬 또는 헤테로알킬 기, C_2 - C_{12} (예: C_2 - C_8 , C_2 - C_6 , 또는 C_2 - C_3) 알케닐기, C_3 - C_{12} (예: C_3 - C_8 , C_3 - C_6 , 또는 C_3 - C_5) 사이클로알킬기, 또는 C_3 - C_{12} (예: C_3 - C_8 , C_3 - C_6 , 또는 C_3 - C_5) 사이클로알케닐기로, 이들은 선택적으로 하나 이상의 치환기로 치환되며;

[0469]

R^6 은 수소, 아미노기, 아릴기, 헤테로사이클릭기, C_1 - C_{12} (예: C_1 - C_8 , C_1 - C_6 , 또는 C_1 - C_3) 알킬 또는 헤테로알킬 기, C_2 - C_{12} (예: C_2 - C_8 , C_2 - C_6 , 또는 C_2 - C_3) 알케닐기, C_3 - C_{12} (예: C_3 - C_8 , C_3 - C_6 , 또는 C_3 - C_5) 사이클로알킬기, 또는 C_3 - C_{12} (예: C_3 - C_8 , C_3 - C_6 , 또는 C_3 - C_5) 사이클로알케닐기로, 이들은 선택적으로 1개 이상의 아민으로 치환되고; 또는 조직-특이적 또는 세포-특이적 표적화 모이어티이다. 화학식 3B의 모든 다른 양상은 이의 임의의 및 모든 구체예를 포함하는, 상기 화학식 3 및 화학식 4에 대해 기재된 바와 같다.

[0470]

일부 구체예에서, 상기 제2 폴리머는 화학식 3C의 구조를 갖는다:



[0472]

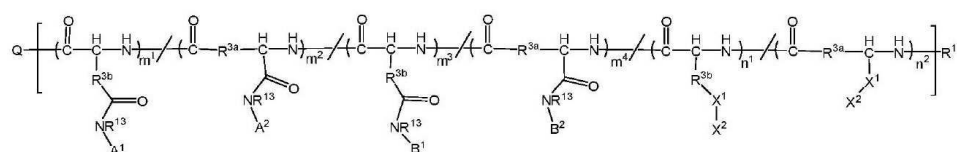
상기에서

[0473]

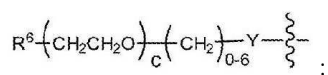
각 m^1 및 m^2 는 0 내지 1000의 정수이고, 단 $m^1 + m^2$ 의 합은 5보다 크며;

[0474]

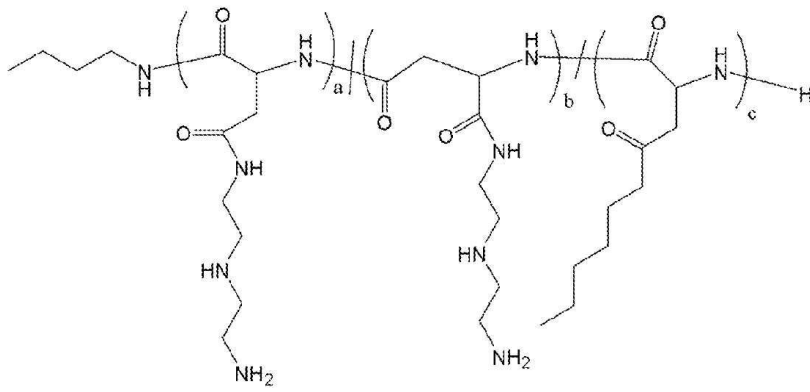
- [0475] 각 n^1 및 n^2 는 0 내지 1000의 정수이고, 단 $n^1 + n^2$ 의 합은 2보다 크며;
- [0476] 기호 "/"는 이에 의해 분리된 유닛들이 무작위로 또는 임의의 순서로 연결되는 것을 나타내고;
- [0477] R^1 은 수소, 아틸기, 헤테로사이클릭기, C_1 - C_{12} (예: C_1 - C_8 , C_1 - C_6 , 또는 C_1 - C_3) 알킬 또는 헤테로알킬 기, C_2 - C_{12} (예: C_2 - C_8 , C_2 - C_6 , 또는 C_2 - C_3) 알케닐기, C_3 - C_{12} (예: C_3 - C_8 , C_3 - C_6 , 또는 C_3 - C_5) 사이클로알킬기, 또는 C_3 - C_{12} (예: C_3 - C_8 , C_3 - C_6 , 또는 C_3 - C_5) 사이클로알케닐기로, 이들은 선택적으로 하나 이상의 치환기로 치환되며;
- [0478] R^6 은 수소, 아미노기, 아틸기, 헤테로사이클릭기, C_1 - C_{12} (예: C_1 - C_8 , C_1 - C_6 , 또는 C_1 - C_3) 알킬 또는 헤테로알킬 기, C_2 - C_{12} (예: C_2 - C_8 , C_2 - C_6 , 또는 C_2 - C_3) 알케닐기, C_3 - C_{12} (예: C_3 - C_8 , C_3 - C_6 , 또는 C_3 - C_5) 사이클로알킬기, 또는 C_3 - C_{12} (예: C_3 - C_8 , C_3 - C_6 , 또는 C_3 - C_5) 사이클로알케닐기로, 이들은 선택적으로 1개 이상의 아민으로 치환되며; 또는 조직-특이적 또는 세포-특이적 표적화 모이어티이다. 화학식 3C의 모든 다른 양상은 이의 임의의 및 모든 구체예를 포함하는, 상기 화학식 3 및 화학식 4에 대해 기재된 바와 같다.
- [0479] 일부 구체예에서, R^1 및/또는 R^6 은 C_1 - C_{12} 알킬 (예: C_1 - C_{10} 알킬기; C_1 - C_8 알킬기; C_1 - C_6 알킬기; C_1 - C_4 알킬기, C_1 - C_3 알킬기, 또는 C_1 또는 C_2 알킬기)이고, 이는 직쇄형 또는 분지쇄형일 수 있으며, 선택적으로 하나 이상의 치환기로 치환된다. 소정의 구체예에서, 상기 헤테로알킬 또는 알킬 기는 1개 이상의 아민, 예를 들어 2 내지 8 개 (즉, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8개)의 3차 아민을 포함하거나 또는 이로 치환된다. 상기 3차 아민은 헤테로알킬 백본 사슬의 일부 또는 펜던트 치환기일 수 있다.
- [0480] 상기 제2 폴리머는 임의의 적절한 폴리머일 수 있고, 단 상기 폴리머는 전술한 폴리머 구조를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 제2 폴리머는 화학식 3의 구조를 갖는 폴리머 블록 및 하나 이상의 다른 폴리머 블록, 예컨대 폴리알킬렌 옥사이드, 폴리락트산 또는 폴리글리콜산 블록을 포함하는 블록 코폴리머이다. 그러나, 상기 조성물의 제2 폴리머는 이러한 추가 폴리머 블록을 포함할 필요는 없다. 일부 구체예에서, 상기 제2 폴리머는 폴리머의 결사슬에 폴리알킬렌 옥사이드, 폴리락트산, 또는 폴리글리콜산을 포함하지 않는다. 일부 구체예에서, 상기 제2 폴리머는 폴리머의 백본내에 또는 이의 각 말단에 폴리알킬렌 옥사이드, 폴리락트산, 또는 폴리글리콜산을 포함하지 않는다. 일부 구체예에서, 상기 제2 폴리머는 폴리알킬렌 옥사이드, 폴리락트산, 또는 폴리글리콜산을 모두 포함하지 않는다. 또 다른 구체예에서, 상기 제2 폴리머는 화학식 3의 구조로 표시된 것 이외에 임의의 추가의 폴리머 유닛을 포함하지 않으며, 이는 임의의 적절한 말단기를 포함할 수 있다. 소정의 구체예에서, 상기 폴리머는 조직-특이적 또는 세포-특이적 표적화 모이어티를 포함하는 치환기를 추가로 포함한다.
- [0481] 일부 구체예에서, 상기 제2 폴리머는 화학식 3A'의 구조를 갖는다:



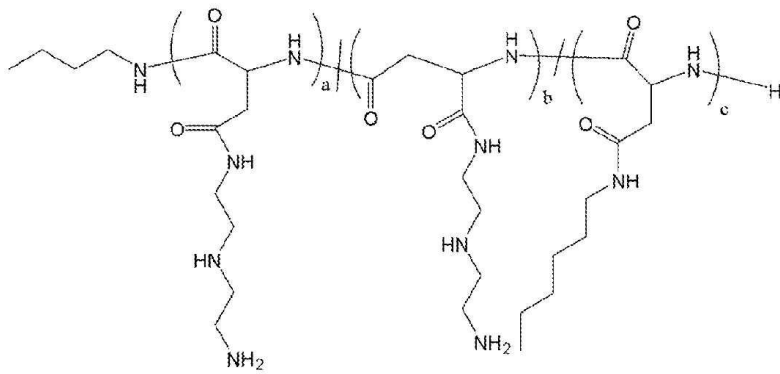
- [0482]
- [0483] 상기에서
- [0484] Q는 하기 화학식의 기이고:



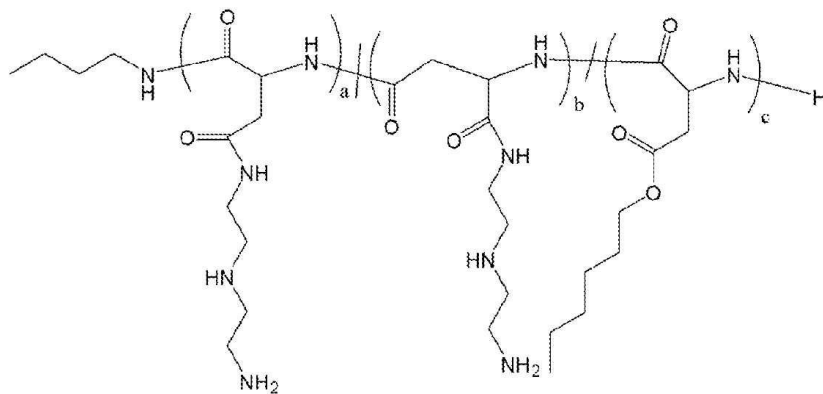
- [0485]
- [0486] c 는 2 내지 200 (예: 2 내지 150, 2 내지 100, 2 내지 50, 10 내지 200, 10 내지 150, 10 내지 100, 10 내지 50, 25 내지 200, 25 내지 150, 25 내지 100, 25 내지 50, 50 내지 200, 50 내지 150, 또는 50 내지 100)의 정수이고;
- [0487] Y는 선택적으로 존재하고, 절단 가능한 링커이며;
- [0488] 모든 다른 치환기는 이의 임의의 및 모든 구체예를 포함하는, 상기 화학식 3 및 화학식 4에 대해 기재된 바와 같다.



폴리머 2

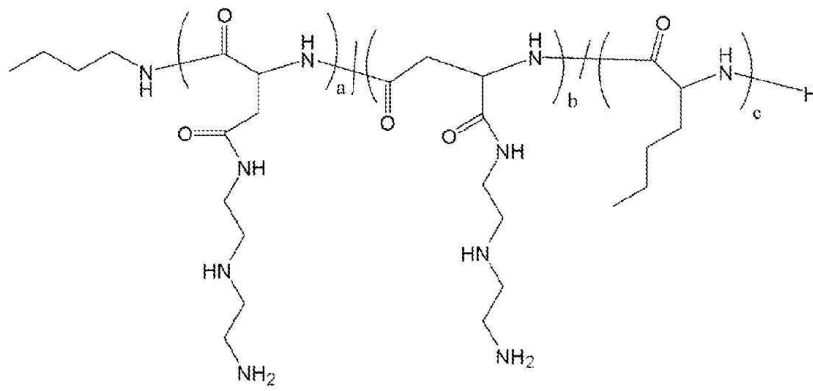


폴리머 3

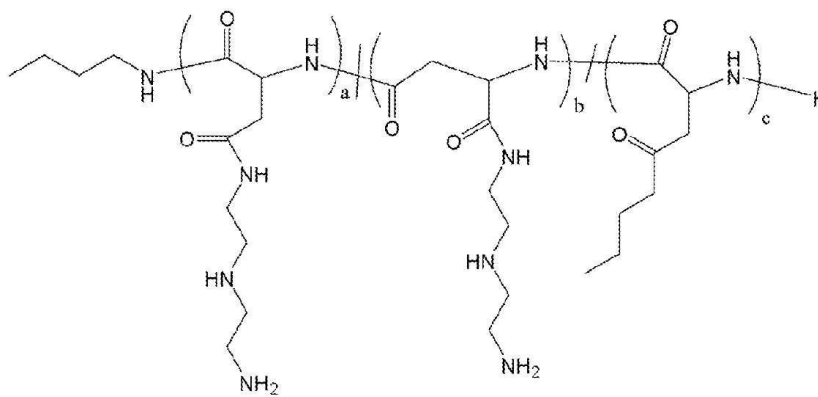


폴리머 4

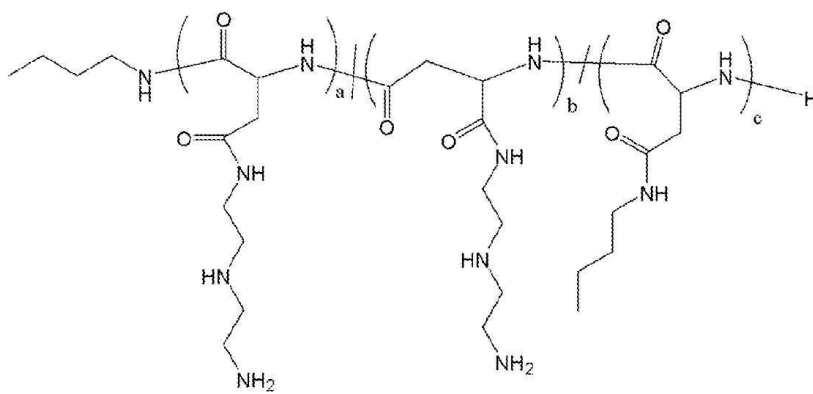
[0497]



폴리머 5

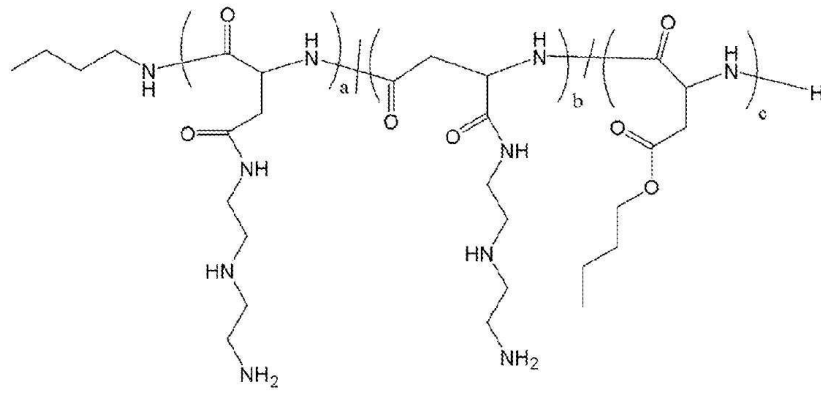


폴리머 6

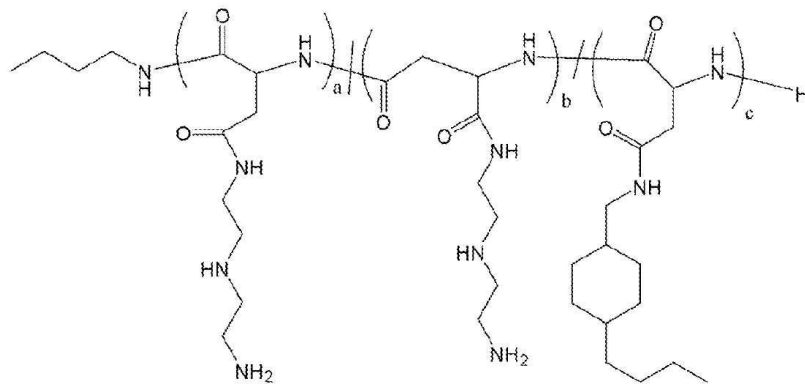


폴리머 7

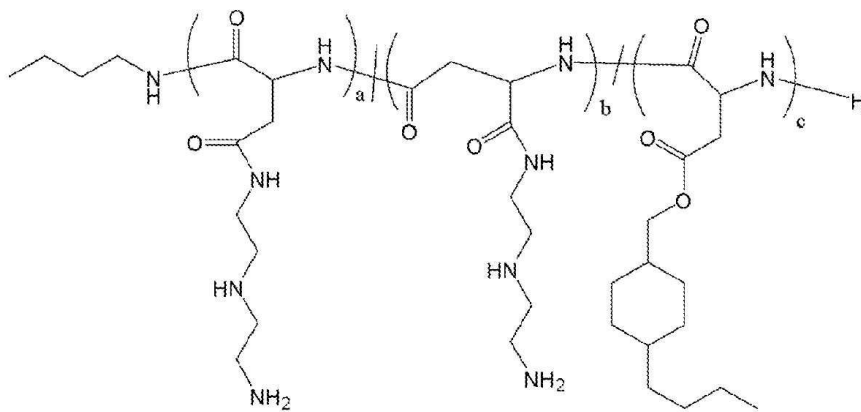
[0498]



폴리머 8

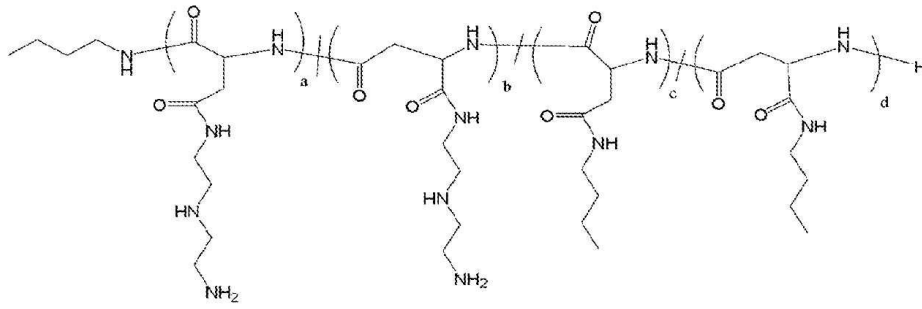


폴리머 9

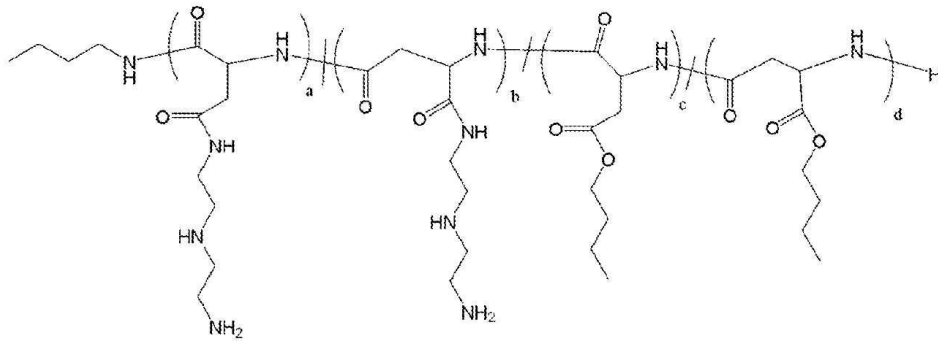


폴리머 10

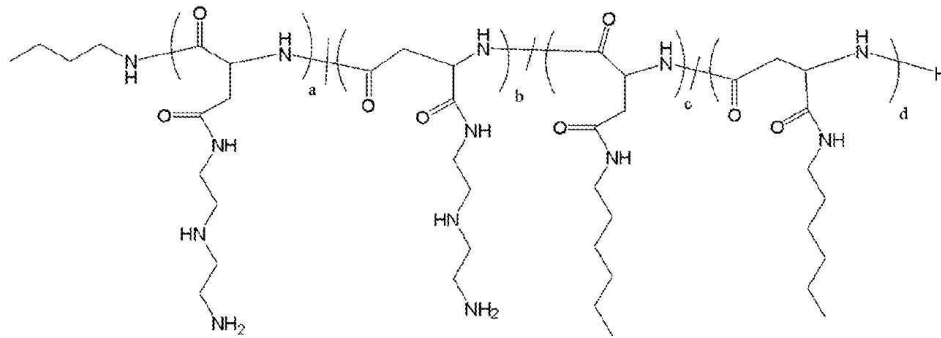
[0499]



폴리머 11

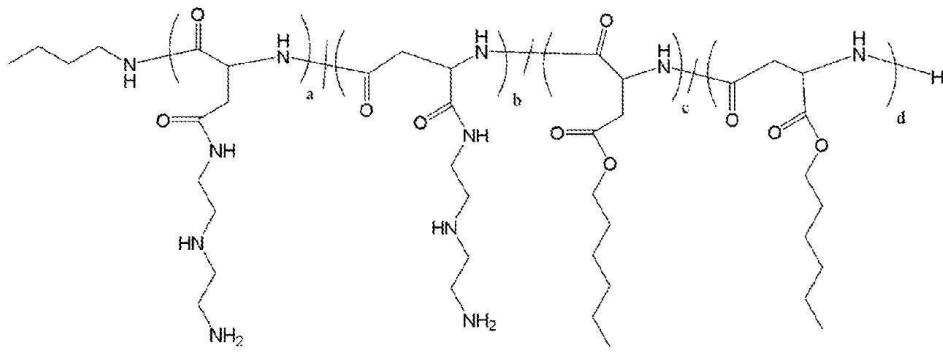


폴리머 12

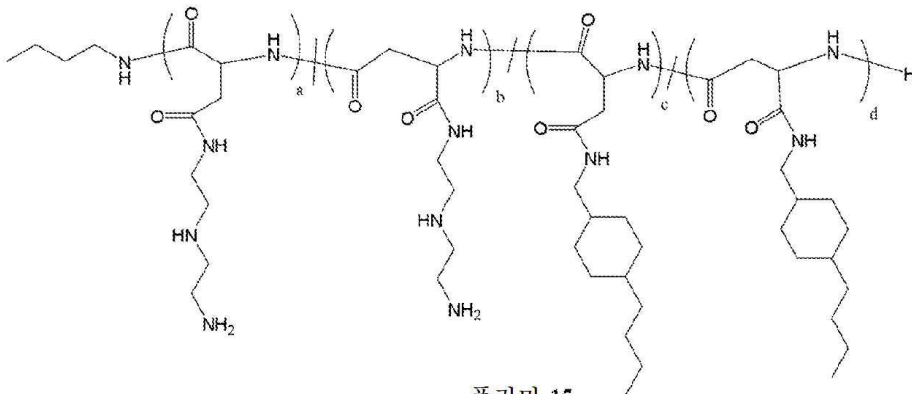


폴리머 13

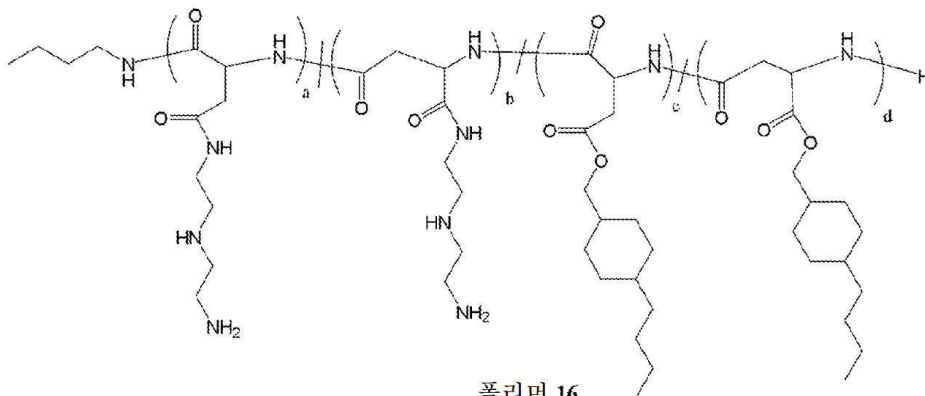
[0500]



폴리머 14

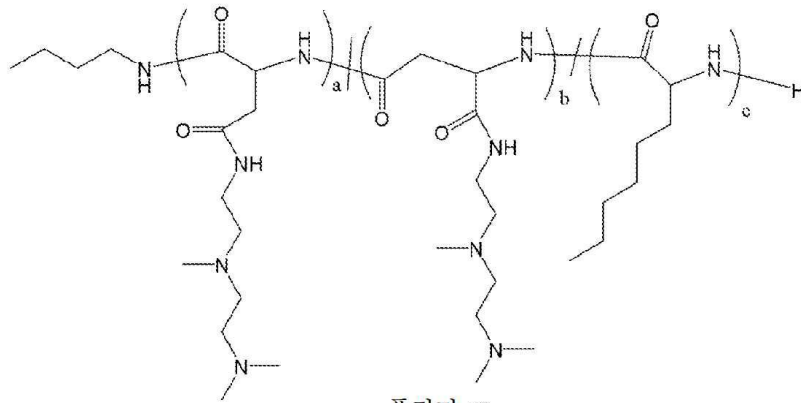


폴리머 15

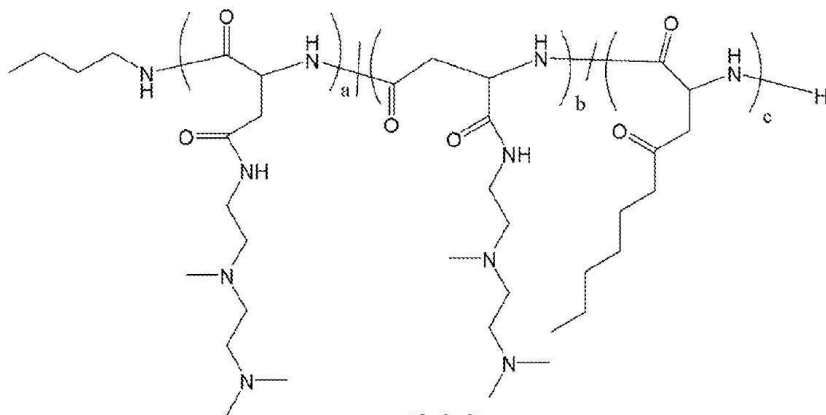


폴리머 16

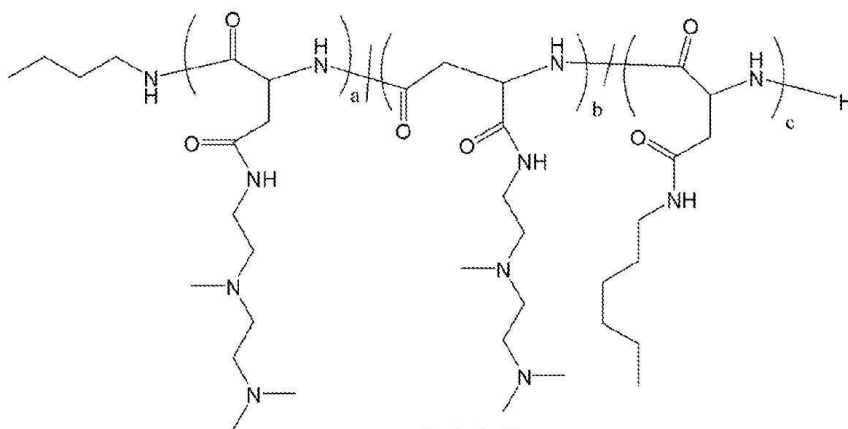
[0501]



폴리머 17

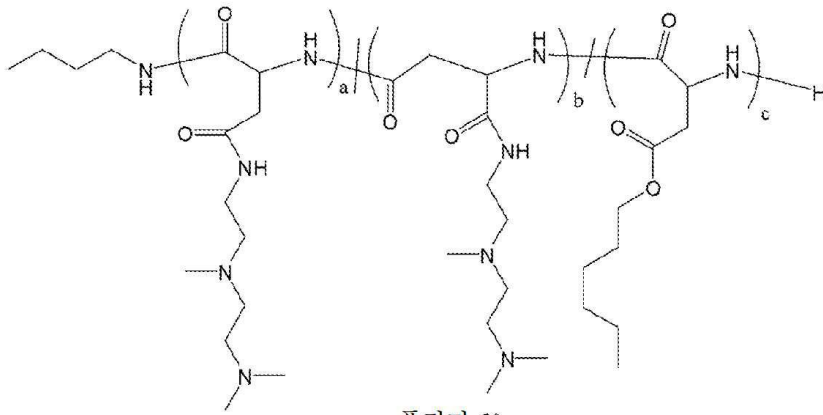


폴리머 18

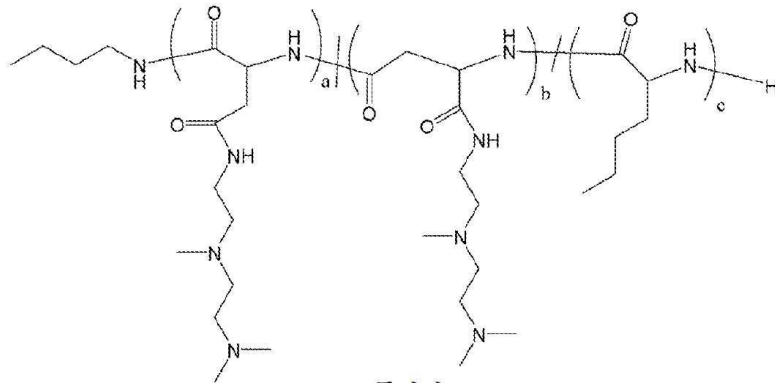


폴리머 19

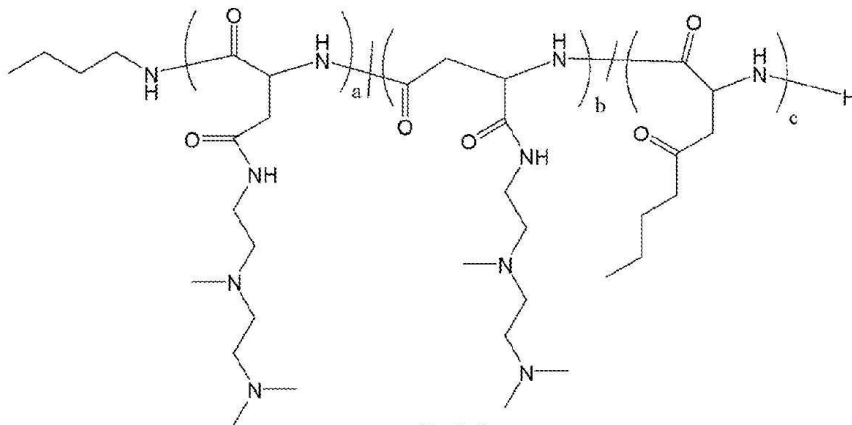
[0502]



폴리머 20

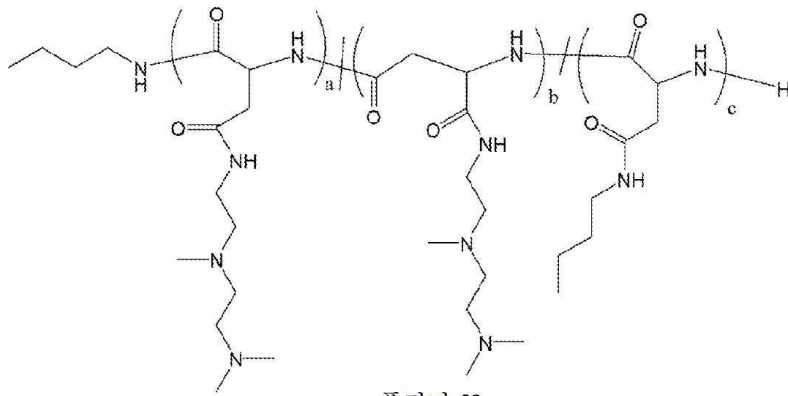


폴리머 21

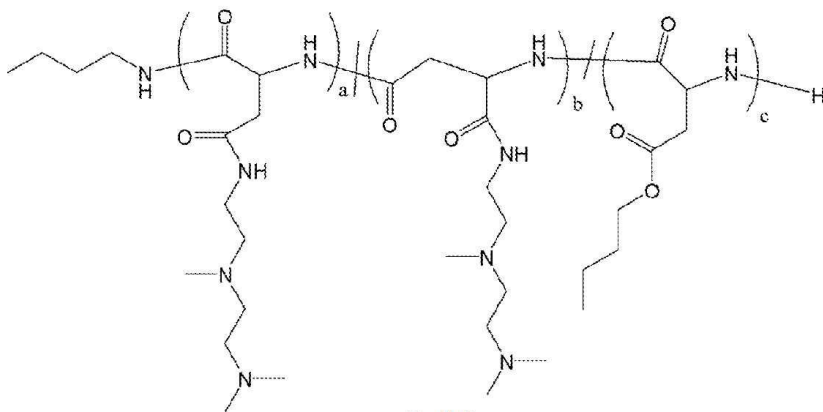


폴리머 22

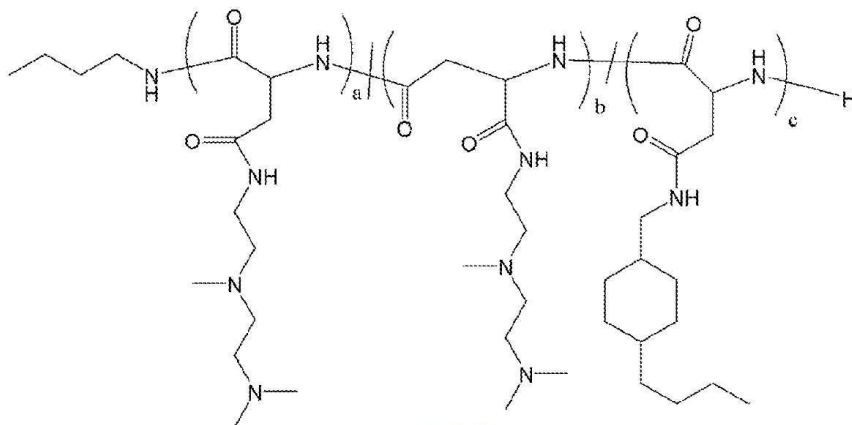
[0503]



폴리머 23

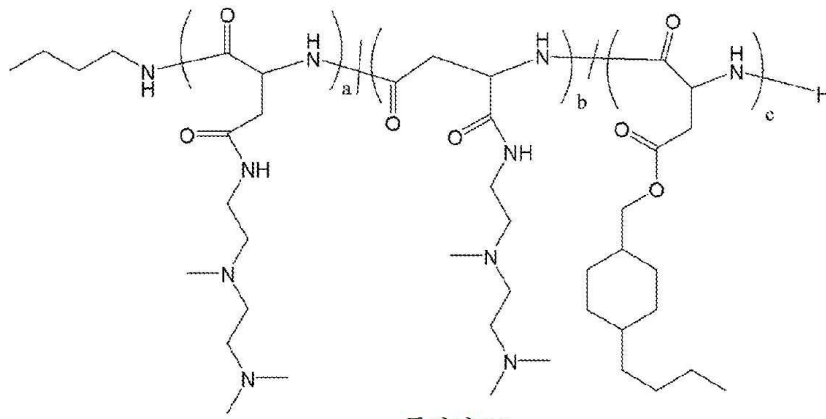


폴리머 24

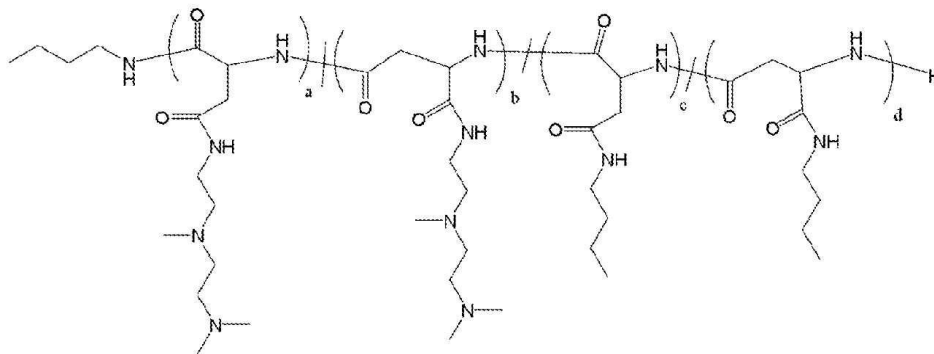


폴리머 25

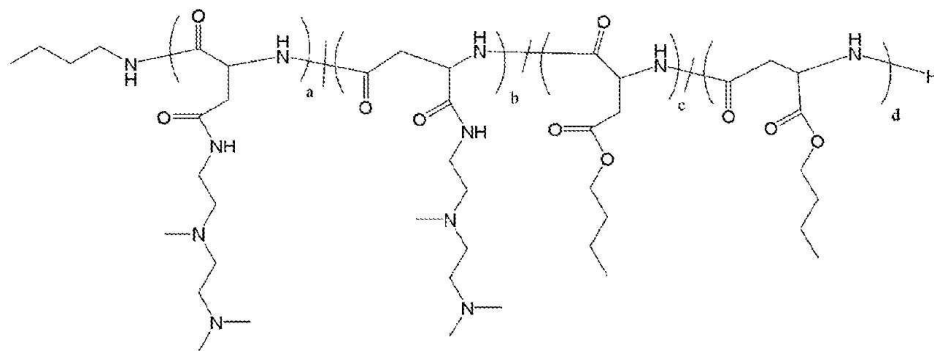
[0504]



폴리머 26

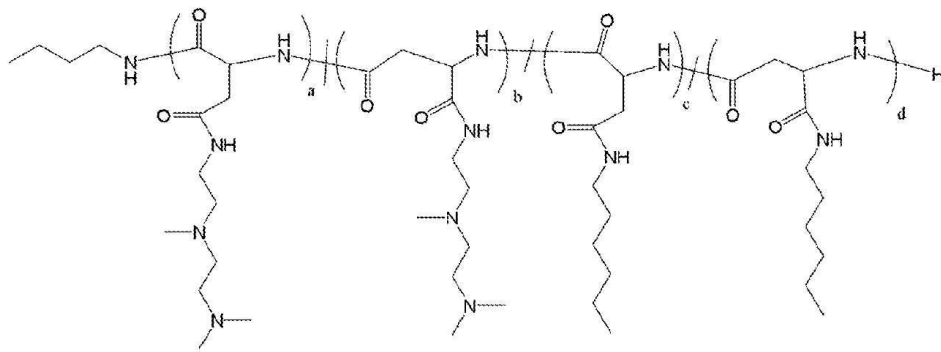


폴리머 27

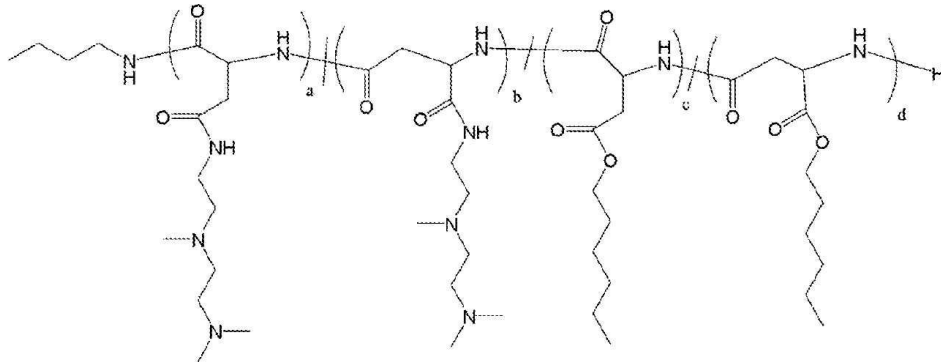


폴리머 28

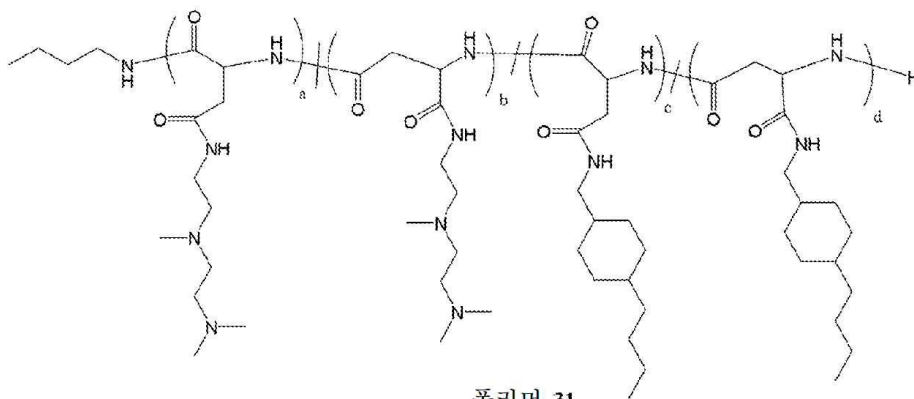
[0505]



폴리머 29

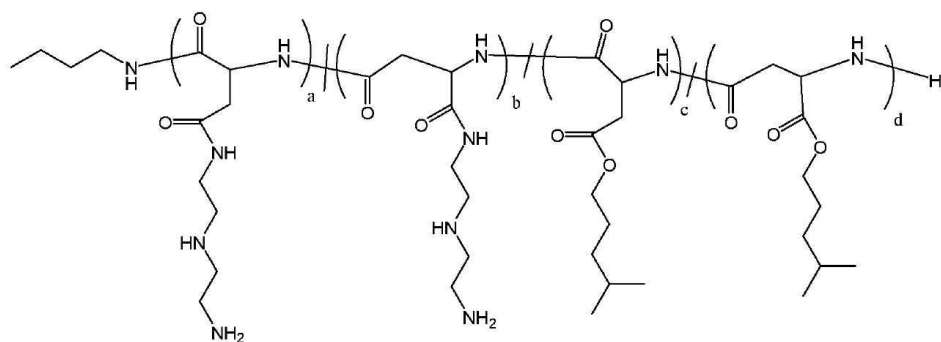
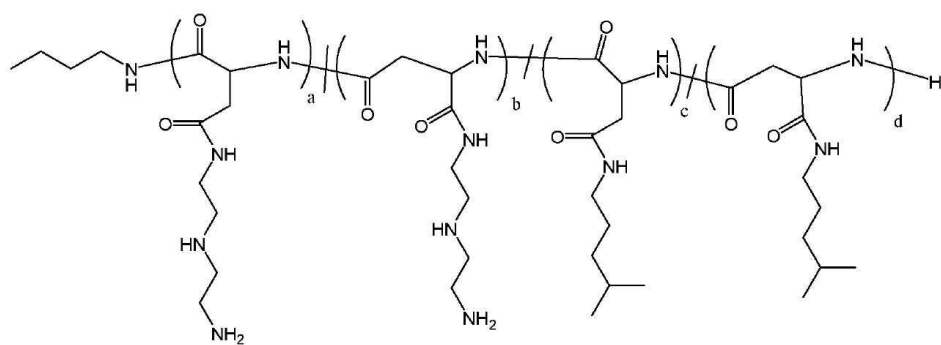
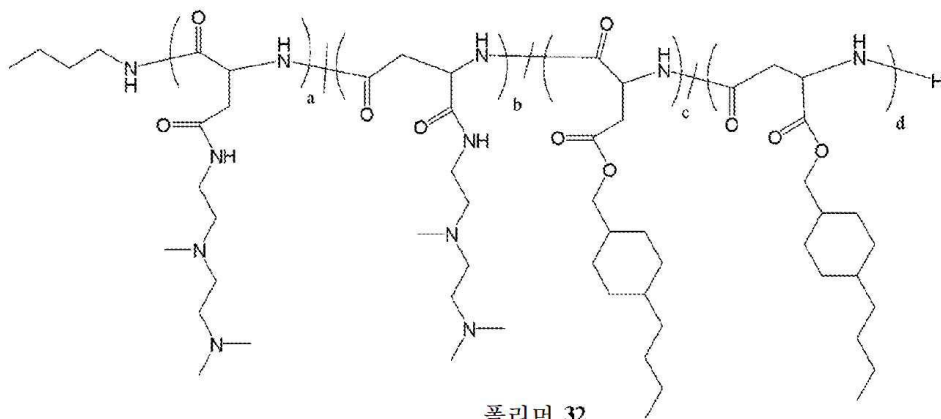


폴리머 30

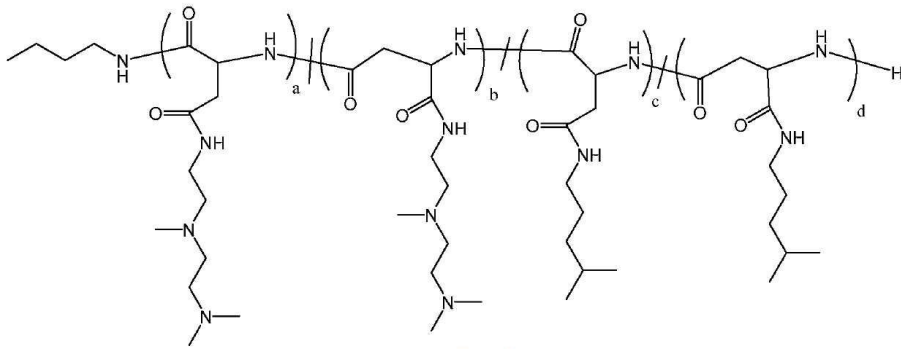


폴리머 31

[0506]

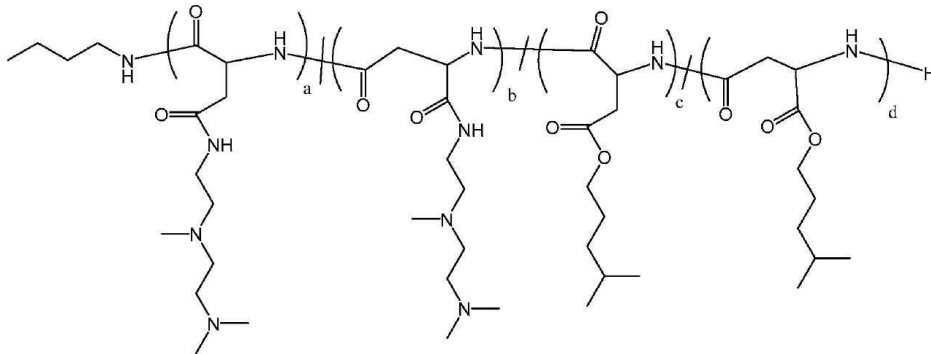


[0507]



폴리머 35

, 또는



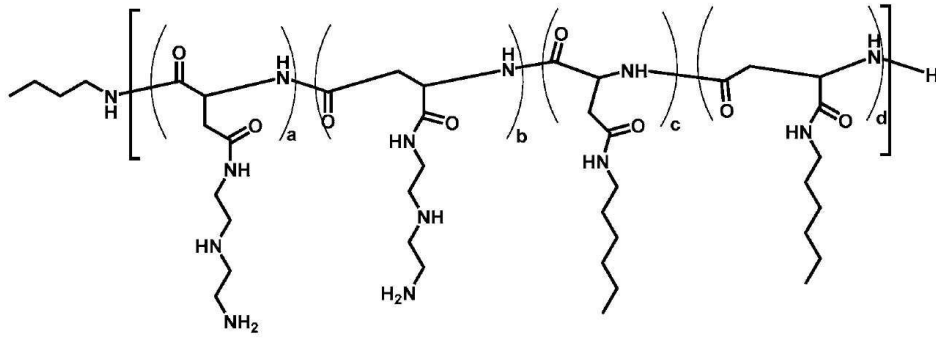
폴리머 36

[0508]

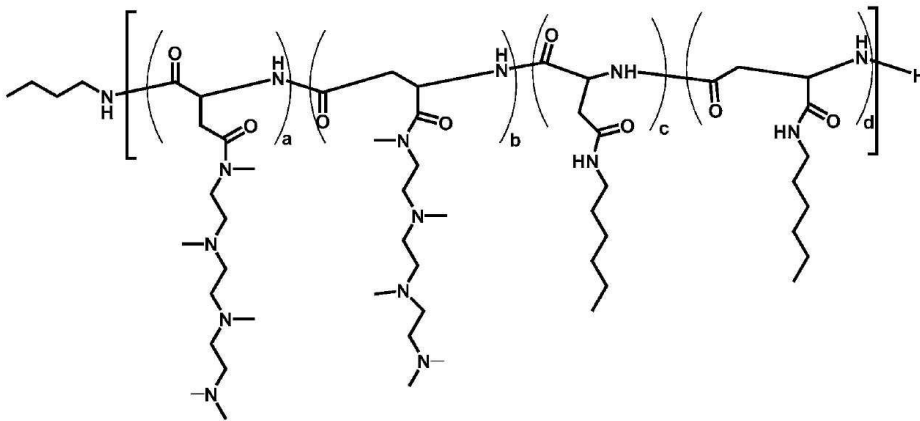
[0509]

상기에서, (a+b)는 약 5 내지 약 65 (예: 약 5 내지 약 50, 약 5 내지 약 40, 약 5 내지 약 30, 약 5 내지 약 20, 또는 약 5 내지 약 10)이고, (c+d)는 약 2 내지 약 60 (예: 약 2 내지 약 50, 약 2 내지 약 40, 약 2 내지 약 30, 약 2 내지 약 20, 또는 약 2 내지 약 10)이다. 다른 구체예에서, (a+b)는 약 45이고, (c+d)는 약 20이다. 다시, 이들 예시되는 폴리머에서 유닛의 개수의 표시 ("a", "b", "c" 및 "d")는 블록 코폴리머 구조를 의미하지는 않으며; 오히려 이러한 개수는 전체 유닛의 개수를 나타내며, 상기 유닛은 화학식에서 기호 "/"로 표시된 바와 같이 무작위로 배열될 수 있다.

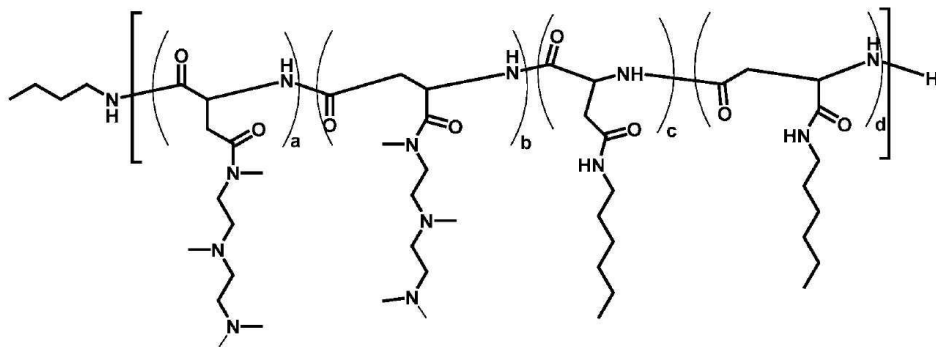
[0510] 본 개시내용에 의해 제공되는 제2 폴리머의 추가적인 특징한 예는 하기를 추가로 포함한다:



폴리머 37

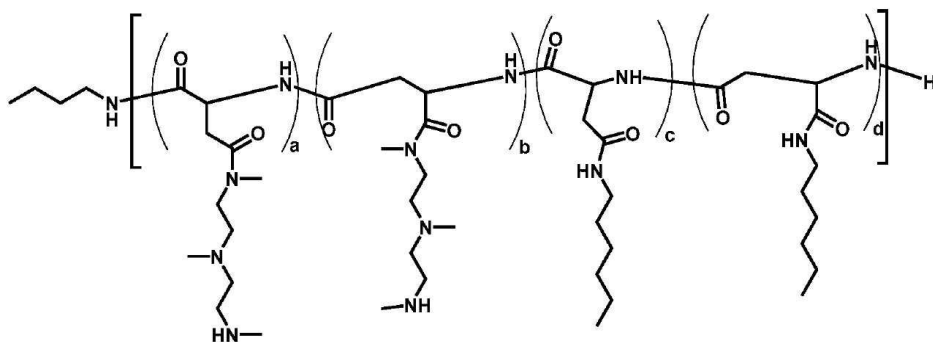


폴리머 38

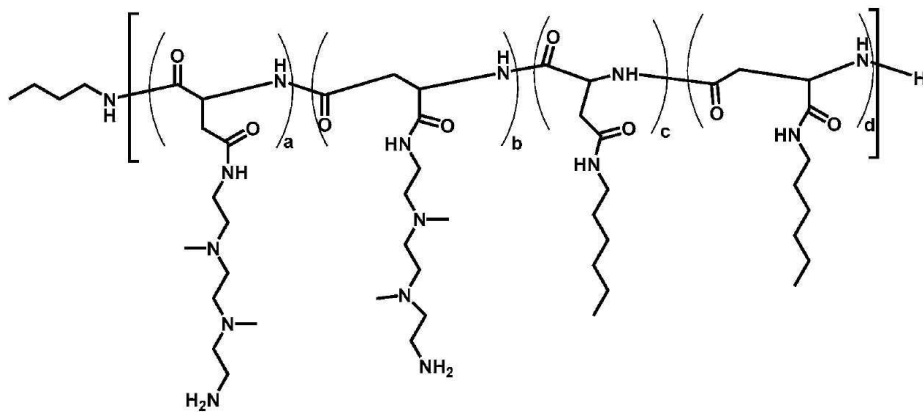


폴리머 39

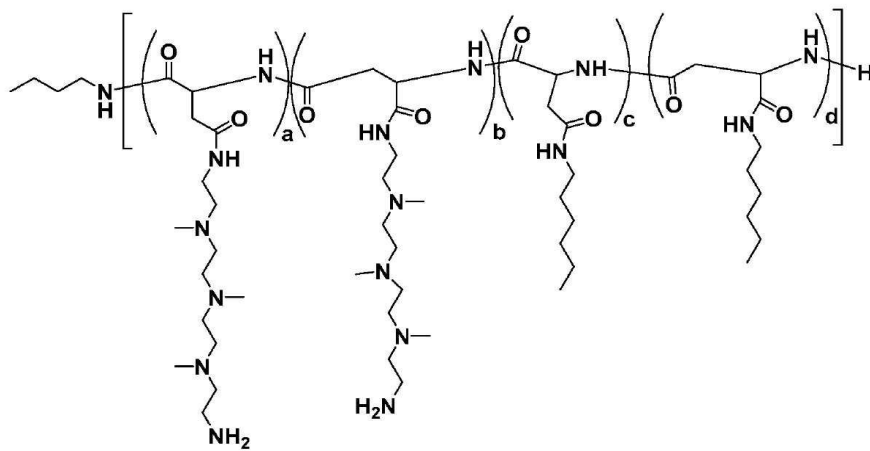
[0511]



폴리머 40

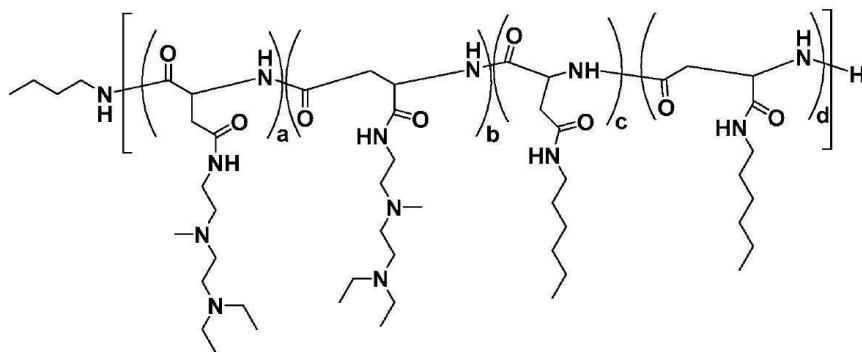


폴리머 41

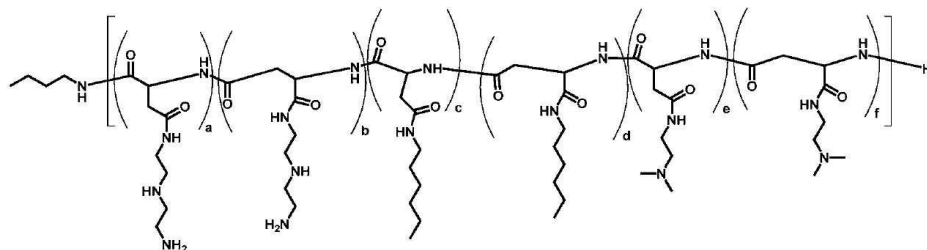


폴리머 42

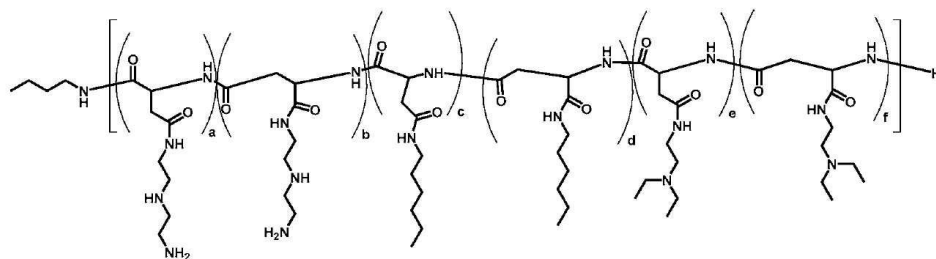
[0512]



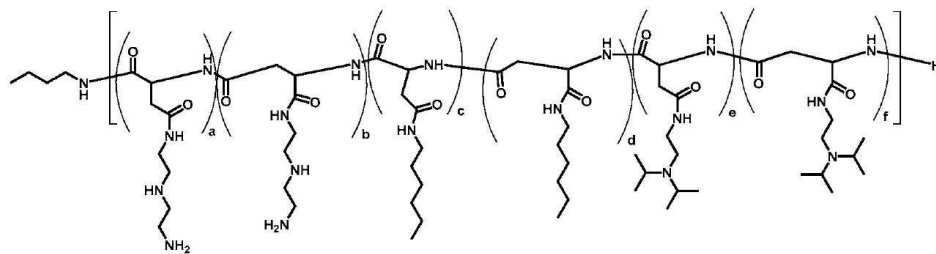
폴리머 43



폴리머 44

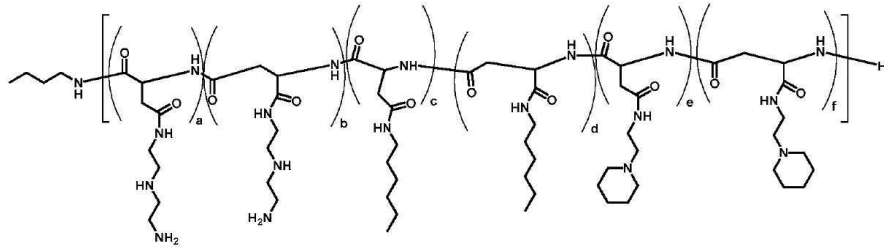


폴리머 45

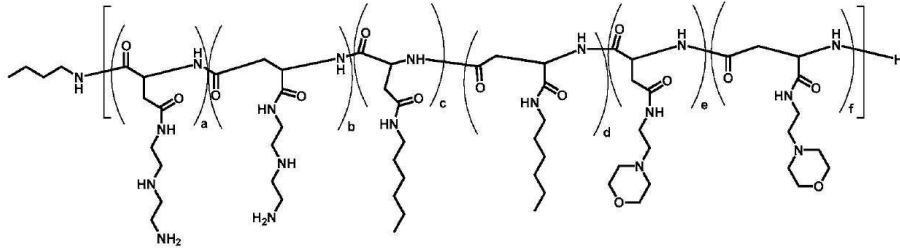


폴리머 46

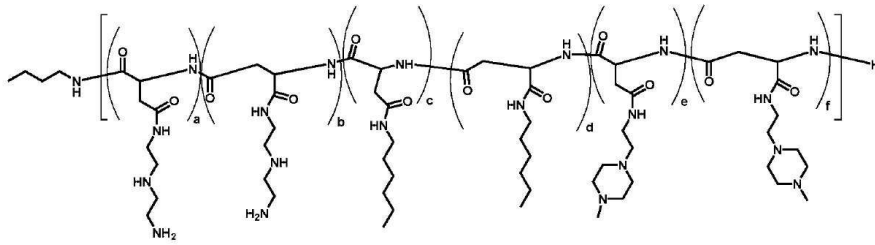
[0513]



폴리머 47

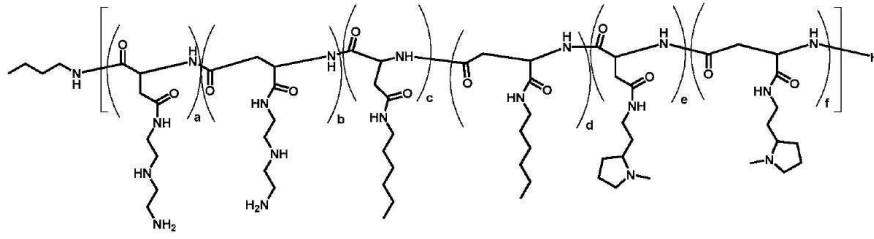


폴리머 48

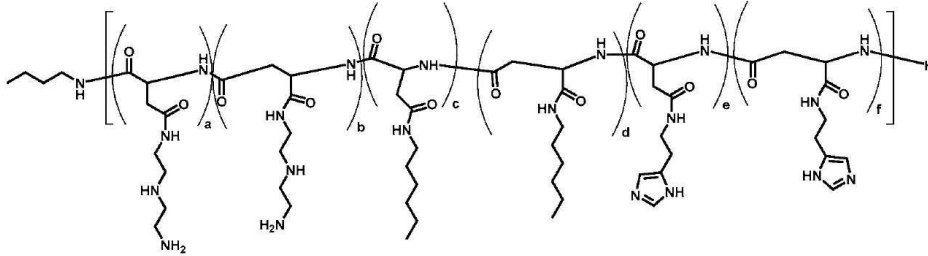


폴리머 49

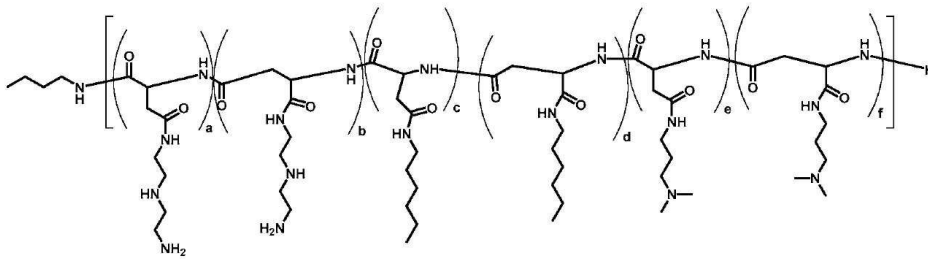
[0514]



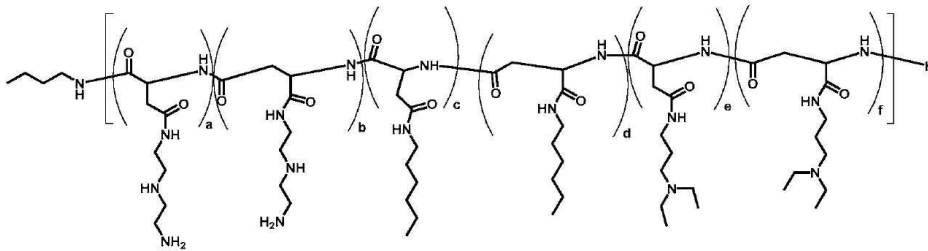
폴리머 50



폴리머 51

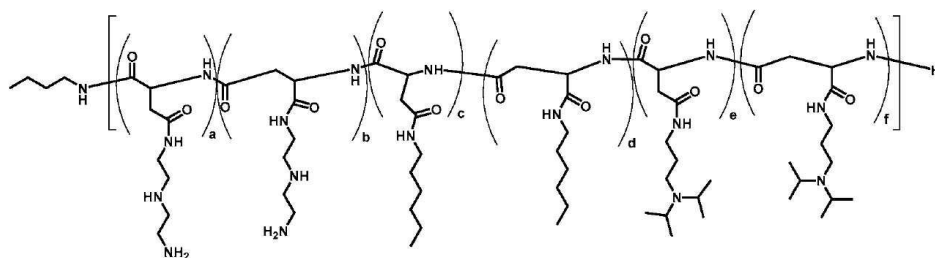


폴리머 52

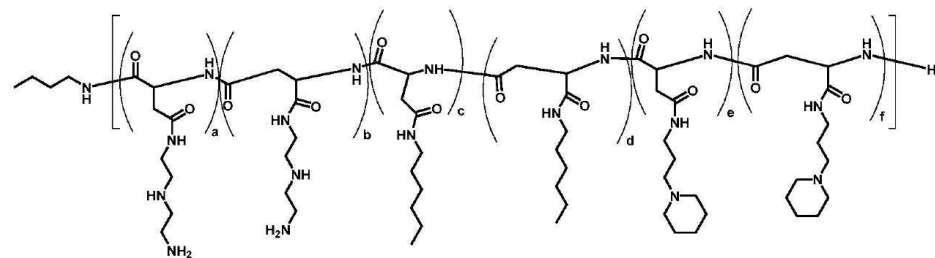


폴리머 53

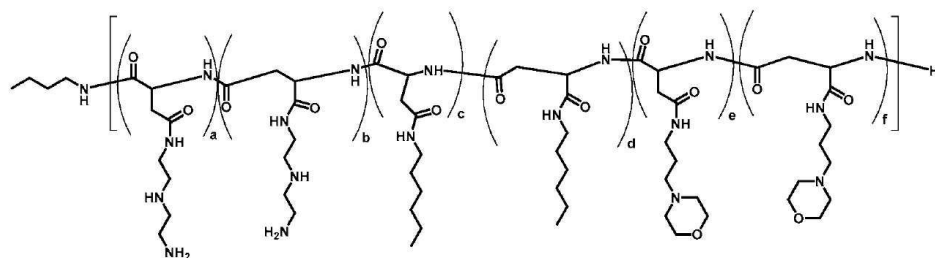
[0515]



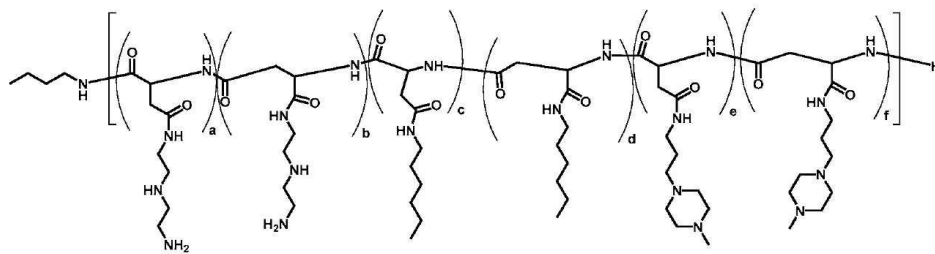
폴리머 54



폴리머 55

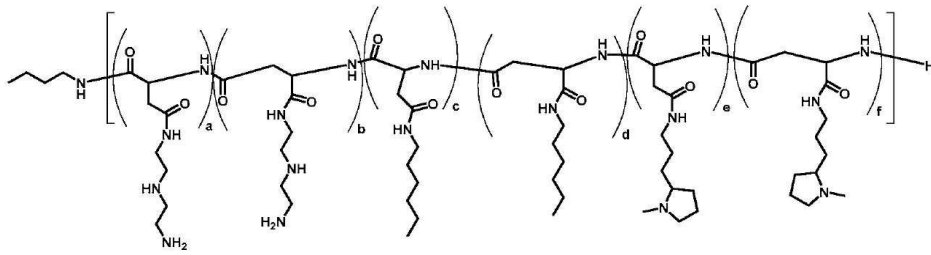


폴리머 56

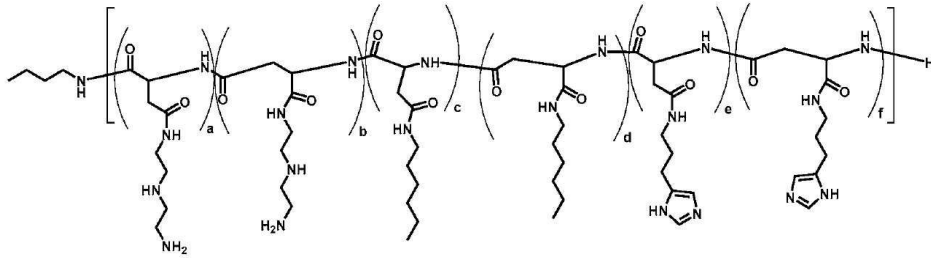


폴리머 57

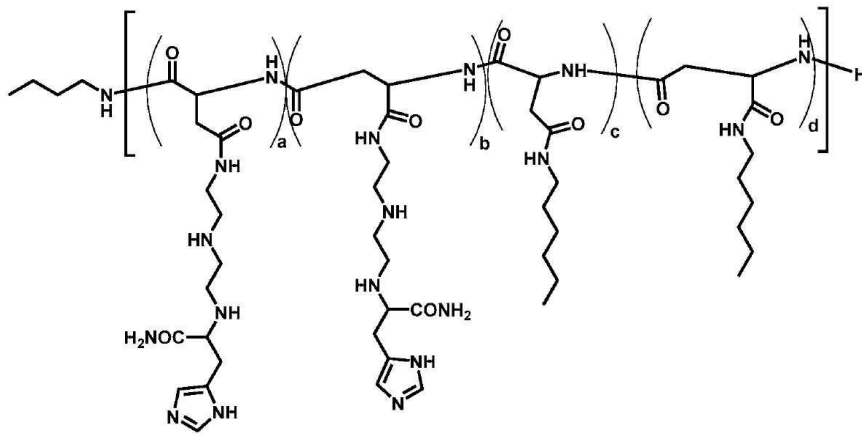
[0516]



폴리머 58

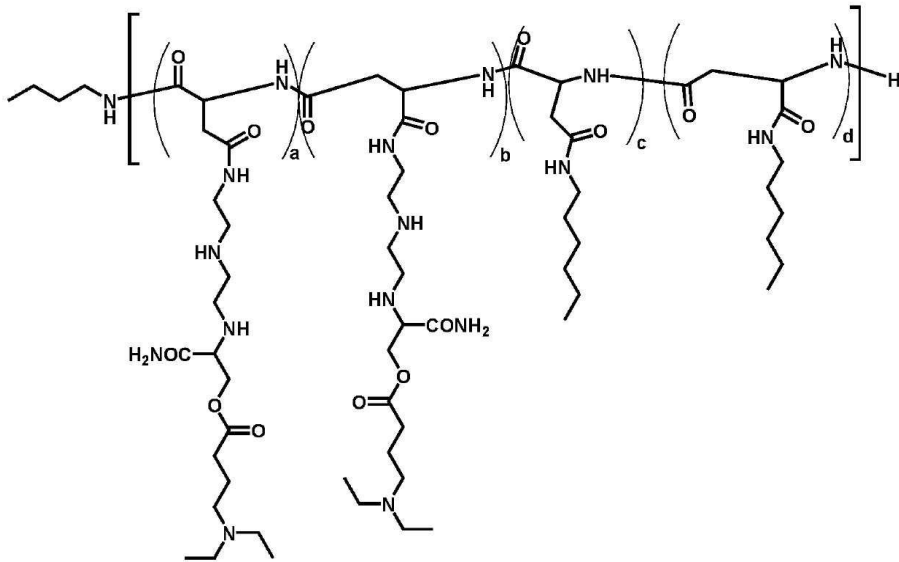


폴리머 59

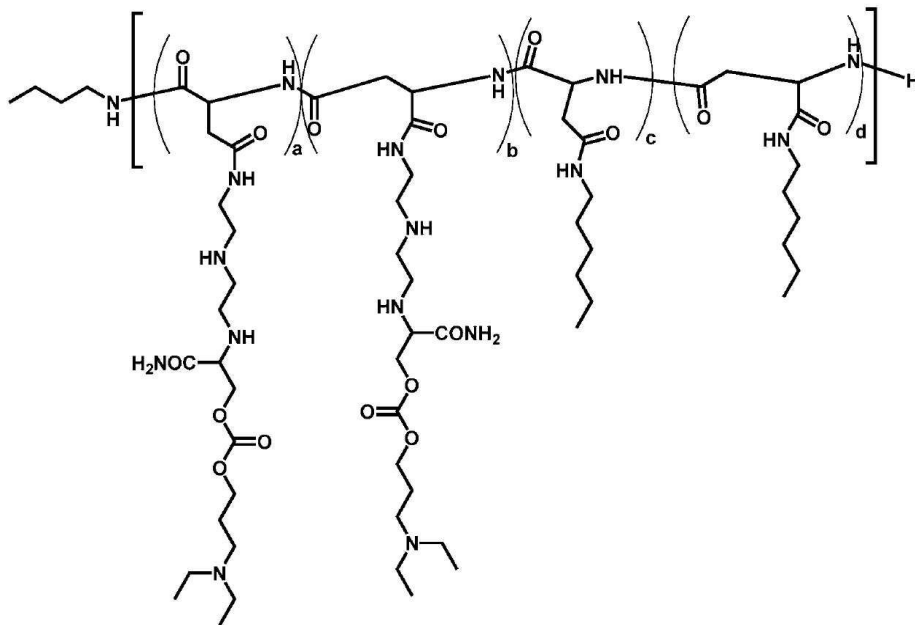


폴리머 60

[0517]

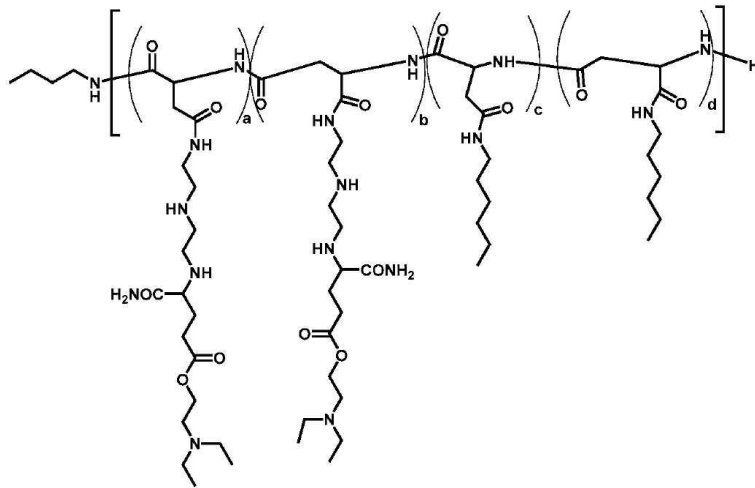


폴리머 61

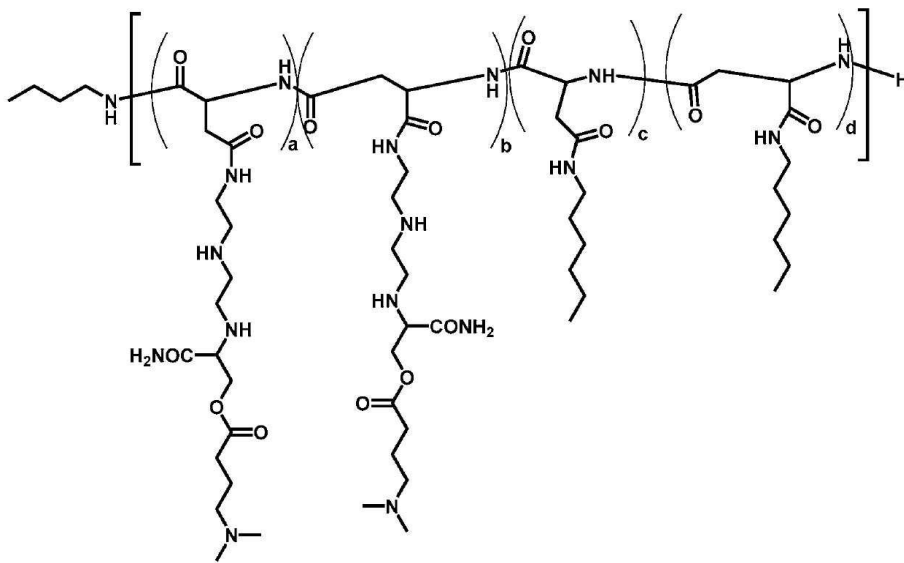


폴리머 62

[0518]

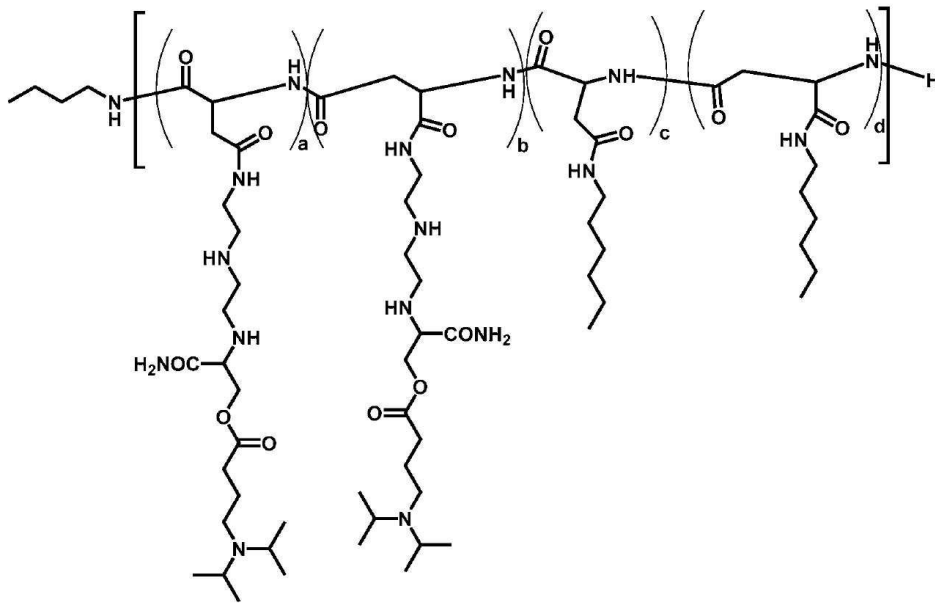


폴리머 63

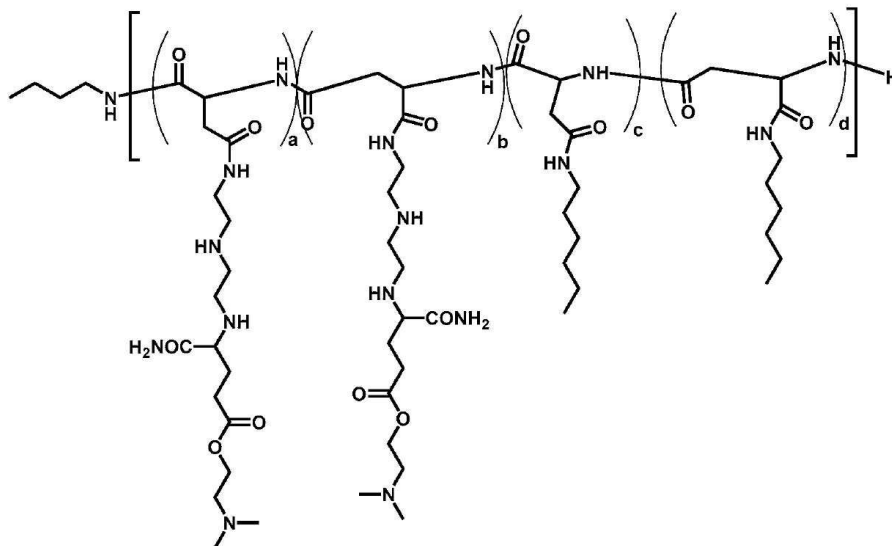


폴리머 64

[0519]

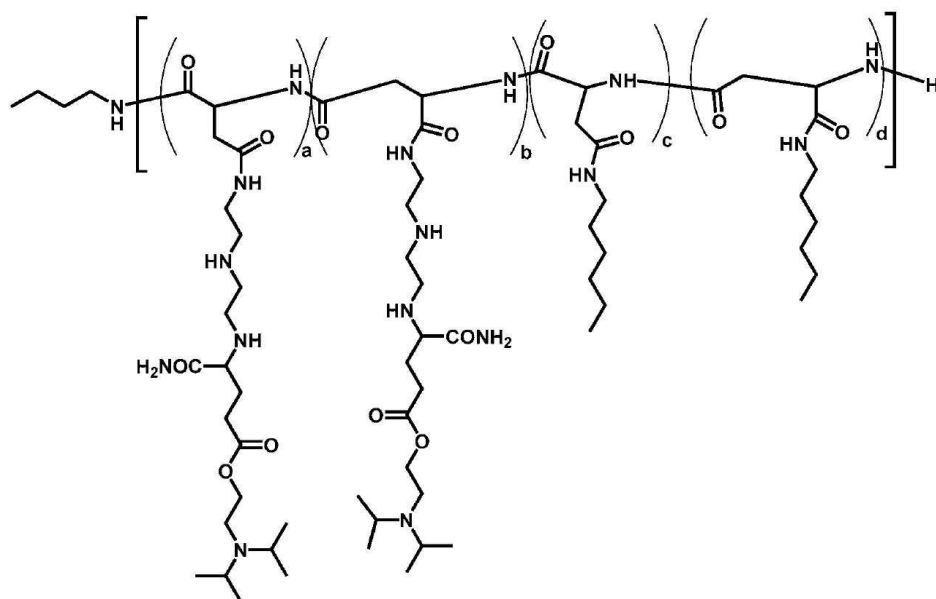


폴리머 65



폴리머 66

, 또는

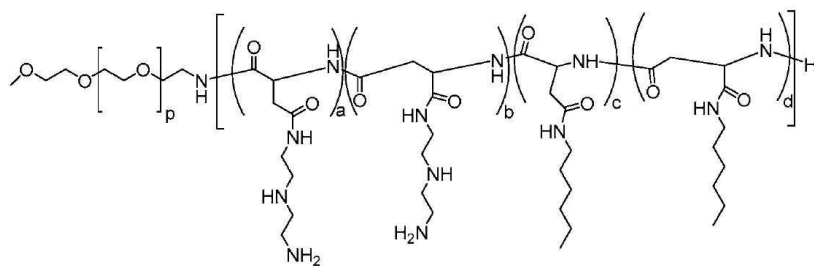


폴리머 67

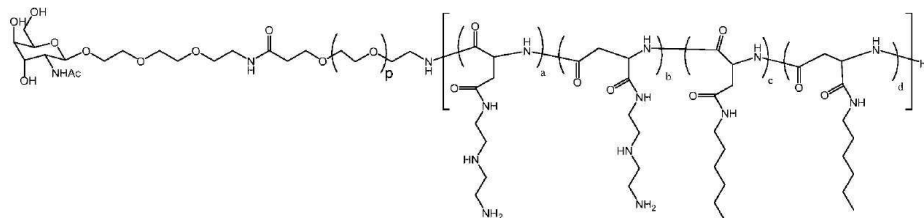
[0521]

[0522]

PEG 말단기를 포함하는 본원에 제공된 폴리머의 추가 예로는 하기와 같다:

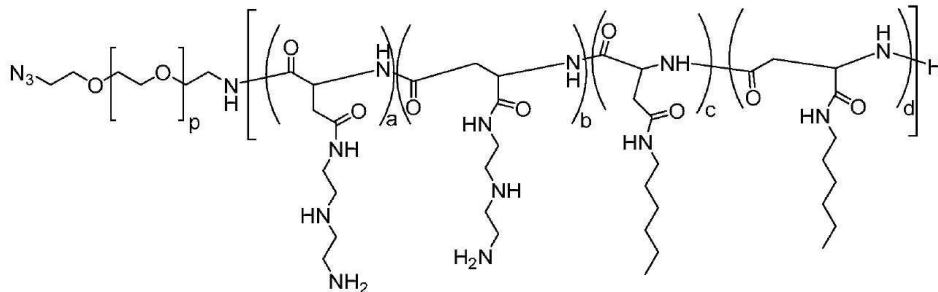
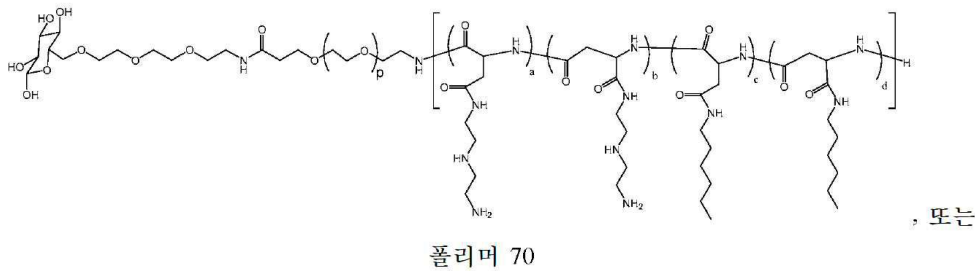


폴리머 68



폴리머 69

[0523]



[0524]

[0525]

이들 예시되는 폴리머에서 유닛의 개수의 표시 ("a", "b", "c", 및 "d")는 블록 코-폴리머 구조를 의미하지 않으며; 오히려 이러한 개수는 전체 특정한 모노머 유닛의 개수를 나타내고, 이들 유닛은 폴리머 전체에 무작위로 배열된 모노머들 또는 모노머들의 블록을 포함하여, 임의의 순서로 배열될 수 있다. 전부는 아니지만, 일부 경우에, 이는 화학식 중에서 "/" 기호에 의해 추가로 표시되지만; 그러나, "/"의 부재는 폴리머가 특정한 순서로 결합되는 것을 의미하는 것으로 해석되어서는 안된다. 전술된 폴리머 1 내지 69의 일부 구체예에서, 괄호 및 정수 ("a", "b", "c", 또는 "d")로 지정된 모노머는 무작위로 배열되거나 또는 폴리머 전체에 점재된다.

[0526]

전술된 제2 폴리머에서, (a+b)는 약 5 내지 약 65 (예: 약 5 내지 약 50, 약 5 내지 약 40, 약 5 내지 약 30, 약 5 내지 약 20, 또는 약 5 내지 약 10)이고, (c+d)는 약 2 내지 약 60 (예: 약 2 내지 약 50, 약 2 내지 약 40, 약 2 내지 약 30, 약 2 내지 약 20, 또는 약 2 내지 약 10)이다. 소정의 구체예에서, (a+b)는 약 55이고, (c+d)는 약 10이다. 다른 구체예에서, (a+b)는 약 45이고, (c+d)는 약 20이다. 소정의 구체예에서, (a+b+c+d)는 약 10-500, 예컨대 약 10-400, 약 10-200, 또는 약 10-100 (예: 약 25-100 또는 약 50-75)이다.

[0527]

상기 제2 폴리머는 (a+b) 대 (c+d)의 임의의 적절한 비율을 포함할 수 있다. 다른 구체예에서, (a+b)는 폴리머 유닛의 총 개수 (a+b+c+d)의 10-95% (예: 10-75%, 10-65%, 10-50%, 20-95%, 20-75%, 20-65%, 20-50%, 30-95%, 30-75%, 30-65%, 또는 30-50%)의 범위이다. 다른 구체예에서, (c+d)는 폴리머 유닛의 총 개수 (a+b+c+d)의 5-90% (예: 5-75%, 5-65%, 5-50%, 5-40%, 5-30%, 10-90%, 10-75%, 10-65%, 10-50%, 10-40%, 또는 10-30%)의 범위이다. 또 다른 구체예에서, (a+b):(c+d)의 비율은 약 1 내지 약 25, 약 1 내지 약 20, 약 1 내지 약 10, 약 1 내지 약 5, 약 5 내지 약 25, 약 10 내지 약 25, 또는 약 15 내지 약 25일 수 있다.

[0528]

소정의 상기 제2 폴리머는 이온화 가능한 결사슬을 갖는 모노머 "e" 및 "f"를 포함하고, 이 경우에 a, b, c, 및 d는 상기 기재된 바와 같고, (e+f)는 약 2 내지 약 60 (예: 약 2 내지 약 50, 약 2 내지 약 40, 약 2 내지 약 30, 약 2 내지 약 20, 또는 약 2 내지 약 10)이다. 또한, p의 각 경우는 독립적으로 2 내지 200 (예: 2 내지 150, 2 내지 100, 2 내지 50, 6 내지 36, 6 내지 30, 6 내지 24, 6 내지 18, 10 내지 200, 10 내지 150, 10 내지 100, 10 내지 50, 25 내지 200, 25 내지 150, 25 내지 100, 25 내지 50, 50 내지 200, 50 내지 150, 또는 50 내지 100)의 정수이다. 또한, (a+b+c+d+e+f)는 약 10-500, 예를 들어 약 10-400, 약 10-200, 또는 약 10-100 (예: 약 25-100 또는 약 50-75)이다. 다시, 이들 예시되는 제2 폴리머에서 유닛의 개수의 표시 ("a", "b", "c", "d," "e," 및 "f")는 블록 코-폴리머 구조를 의미하지 않고; 오히려 이러한 개수는 전체 유닛의 개수를 나타내고, 상기 유닛은 무작위로 배열될 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 제2 폴리머는 상기 폴리머 29, 37, 39, 또는 40의 구조를 가지며, 여기서 a, b, c, 및 d는 본원에 기재된 바와 같다.

[0529]

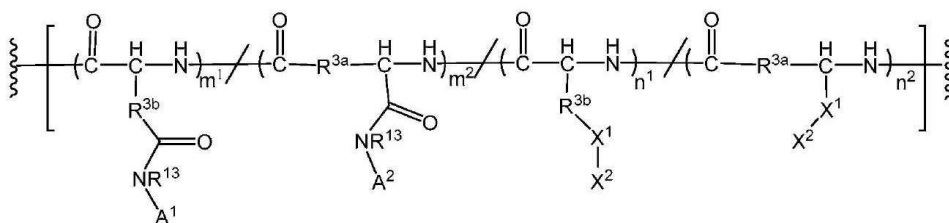
본 개시내용에 의해 제공되는 제2 폴리머의 상기 특정한 예들 중 일부는 특정한 말단기 (예: 알킬아미노, 수소, 또는 PEG)를 갖는 것으로 표시되지만; 그러나, 전술된 특정한 구조들은 상이한 말단기를 포함할 수 있다. 예를 들면, 전술된 구조들은 폴리머 백본의 한쪽 말단 또는 양쪽 말단에 본원에 기재된 R¹, R⁶, 또는 Q 기를 포함한다.

[0530] 전형적으로, 상기 제2 폴리머는 양이온성 (즉, pH 7 및 23°C에서 양으로 하전됨)이다. 본원에서 사용된, "양이온성" 폴리머는 폴리머가 양이온성 모노머 유닛만을 포함하거나, 또는 양이온성 모노머 유닛과 비-이온성 또는 음이온성 모노머 유닛의 조합을 포함하는지 여부에 관계 없이, 전체 순 양전하를 갖는 폴리머를 지칭한다.

[0531] 소정의 구체예에서, 상기 제2 폴리머는 약 5 kDa 내지 약 2000 kDa의 중량 평균 분자량을 갖는다. 상기 제2 폴리머는 약 2,000 kDa 이하, 예를 들어 약 1,800 kDa 이하, 약 1,600 kDa 이하, 약 1,400 kDa 이하, 약 1,200 kDa 이하, 약 1,000 kDa 이하, 약 900 kDa 이하, 약 800 kDa 이하, 약 700 kDa 이하, 약 600 kDa 이하, 약 500 kDa 이하, 약 100 kDa 이하, 또는 약 50 kDa 이하의 중량 평균 분자량을 갖는다. 대안으로서, 또는 추가적으로, 상기 제2 폴리머는 약 10 kDa 이상, 예를 들어 약 50 kDa 이상, 약 100 kDa 이상, 약 200 kDa 이상, 약 300 kDa 이상, 또는 약 400 kDa 이상의 중량 평균 분자량을 가질 수 있다. 따라서, 상기 제2 폴리머는 전술한 종점 중 임의의 2개에 의해 한정되는 중량 평균 분자량을 가질 수 있다. 예를 들어, 상기 제2 폴리머는 약 10 kDa 내지 약 50 kDa, 약 10 kDa 내지 약 100 kDa, 약 10 kDa 내지 약 500 kDa, 약 50 kDa 내지 약 500 kDa, 약 100 kDa 내지 약 500 kDa, 약 200 kDa 내지 약 500 kDa, 약 300 kDa 내지 약 500 kDa, 약 400 kDa 내지 약 500 kDa, 약 400 kDa 내지 약 600 kDa, 약 400 kDa 내지 약 700 kDa, 약 400 kDa 내지 약 800 kDa, 약 400 kDa 내지 약 900 kDa, 약 400 kDa 내지 약 1,000 kDa, 약 400 kDa 내지 약 1,200 kDa, 약 400 kDa 내지 약 1,400 kDa, 약 400 kDa 내지 약 1,600 kDa, 약 400 kDa 내지 약 1,800 kDa, 약 400 kDa 내지 약 2,000 kDa, 약 200 kDa 내지 약 2,000 kDa, 약 500 kDa 내지 약 2,000 kDa, 또는 약 800 kDa 내지 약 2,000 kDa의 중량 평균 분자량을 가질 수 있다. 상기 중량 평균 분자량은 임의의 적절한 기법에 의해 결정될 수 있다. 일반적으로, 상기 중량 평균 분자량은 TSKgel Guard, GMPW, GMPW, G1000PW, 및 Waters 2414 (Waters Corporation, Milford, Massachusetts) 굴절을 검출기로부터 선택된, 컬럼이 장착된 크기 배제 크로마토그래피를 사용하여 결정된다. 또한 중량 평균 분자량은 150-875,000 달톤 범위의 폴리에틸렌 옥사이드/폴리에틸렌 글리콜 표준을 사용한 보정으로부터 결정된다.

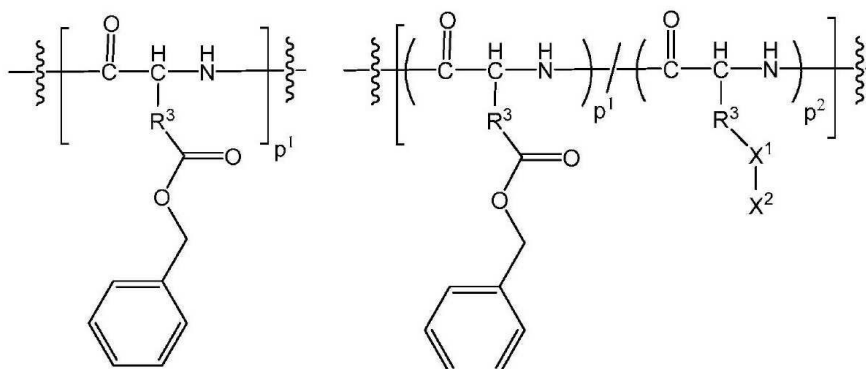
[0532] 제2 폴리머를 제조하는 방법

[0533] 상기 제2 폴리머는 임의의 적절한 방법에 의해 제공될 수 있다. 이러한 방법의 일례가 본원에 제공되고 실시예에서 예시된다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 하기 화학식 8 또는 화학식 9의 구조를 포함하는 폴리머로부터 본원에 기재된 바와 같이 하기 화학식 4의 폴리머를 제조하는 단계를 포함한다:



화학식 4

[0534]



화학식 8

또는

화학식 9

[0535]

[0536] 상기에서,

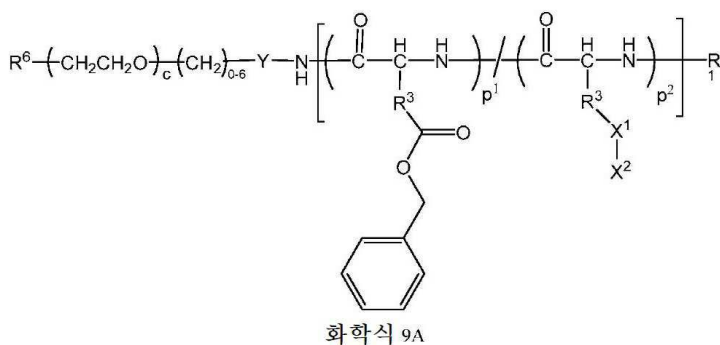
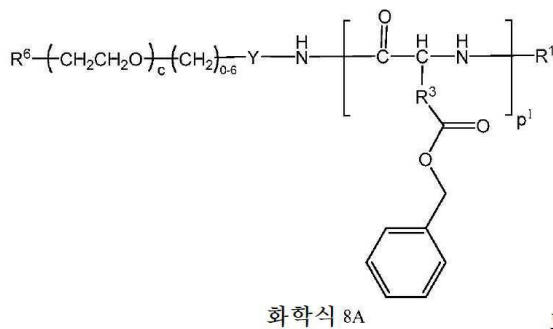
[0537] p^1 은 1 내지 2000 (예: 1 내지 1000, 1 내지 500, 1 내지 200, 1 내지 100, 5 내지 2000, 5 내지 1000, 5 내지 500, 5 내지 200, 또는 5 내지 100)의 정수이고;

- [0538] p^2 는 1 내지 2000 (예: 1 내지 1000, 1 내지 500, 1 내지 200, 1 내지 100, 2 내지 2000, 2 내지 1000, 2 내지 500, 2 내지 200, 또는 2 내지 100)의 정수이며;
- [0539] 각 R^3 은 독립적으로 메틸렌 또는 에틸렌 기이고;
- [0540] X^1 및 X^2 는 화학식 3, 3A-3C, 및 4에 대해 전술된 바와 같다. 따라서, 예를 들어, 각 X^1 은 독립적으로 $-C(O)O-$, $-C(O)NR^{13}-$, $-C(O)-$, $-S(O)(O)-$, 또는 결합이고; X^2 의 각 경우는 독립적으로 C_1-C_{12} 알킬 또는 헤테로알킬 기, C_3-C_{12} 사이클로알킬기, C_2-C_{12} 알케닐기, C_3-C_{12} 사이클로알케닐기, 아릴기, 헤테로사이클릭기, 또는 이들의 조합으로, 이들은 선택적으로 하나 이상의 치환기로 치환된다. 화학식 3, 3A-3C, 및 4에 대해 전술된 바와 같은 X^1 및 X^2 의 모든 다른 구체예가 또한 화학식 8 및 9의 X^1 및 X^2 에 적용된다.
- [0541] 상기 방법은 화학식 8 또는 화학식 9의 구조를 화학식 $HNR^{13}A^1$ 및/또는 $HNR^{13}A^2$ 의 화합물, 및 선택적으로 화학식 H_2NX^2 또는 HOX^2 의 화합물과 조합시키는 단계를 포함한다. 보다 구체적으로, 상기 화학식 8의 구조를 (a) 화학식 $HNR^{13}A^1$ 및/또는 $HNR^{13}A^2$ 의 화합물, 및 (b) 화학식 H_2NX^2 또는 HOX^2 의 화합물과, 동시에 또는 임의의 순서로 순차적으로 조합 (반응)하여, 화학식 4의 화합물을 제공할 수 있다. 유사하게, X^2 기를 이미 포함하는 화학식 9의 화합물을 화학식 $HNR^{13}A^1$ 및/또는 $HNR^{13}A^2$ 의 화합물과 조합 (반응)하여, 상기 화학식 4의 화합물을 제공할 수 있다.
- [0542] $HNR^{13}A^1$ 및/또는 $HNR^{13}A^2$ 의 화합물에서, R^{13} 의 각 경우는 이의 임의의 및 모든 구체예를 포함하는, 화학식 3, 3A-3C, 및 4의 폴리머에 대해 전술된 바와 같다. 따라서, 예를 들어, R^{13} 의 각 경우는 독립적으로 수소, 아릴기, 헤테로사이클릭기, 알킬기, 알케닐기, 사이클로알킬기, 또는 사이클로알케닐기일 수 있고, 이들의 임의의 기는 선택적으로 하나 이상의 치환기로 치환될 수 있다.
- [0543] 유사하게, A^1 및 A^2 는 화학식 3, 3A-3C, 및 4의 폴리머에 대해 전술된 바와 같다. 따라서, 예를 들어, A^1 및 A^2 는 각각 독립적으로 하기 화학식의 기이다:
- [0544] $-(CH_2)_{p1}-[NR^2-(CH_2)_{q1}-]_{r1}NR^2_2$;
- [0545] $-(CH_2)_{p2}-N[-(CH_2)_{q2}-NR^2_2]_2$;
- [0546] $-(CH_2)_{p3}-N\{[-(CH_2)_{q3}-NR^2_2][-(CH_2)_{q4}-NR^2_2-r_2R^2]\}$; 또는
- [0547] $-(CH_2)_{p4}-N\{-(CH_2)_{q5}-N[-(CH_2)_{q6}-NR^2_2]_2\}_2$,
- [0548] 상기에서, $p1$ 내지 $p4$, $q1$ 내지 $q6$, $r1$ 및 $r2$ 는 각각 독립적으로 1 내지 5의 정수이고; R^2 의 각 경우는 독립적으로 수소, 아릴기, 헤테로사이클릭기, C_1-C_{12} 알킬기, 알케닐기, 사이클로알킬기, 또는 사이클로알케닐기, 또는 하나 이상의 치환기로 선택적으로 치환된 C_1-C_{12} 직쇄형 또는 분지쇄형 알킬기이거나, 또는 R^2 는 제2 R^2 와 조합하여 헤테로사이클릭기를 형성한다. 일부 구체예에서, A^1 및 A^2 는 동일하다.
- [0549] 화학식 H_2NX^2 또는 HOX^2 의 화합물 중 X^2 기는 이의 임의의 및 모든 구체예를 포함하는, 화학식 3, 3A-3C, 및 4에 대해 기재된 것과 같다.
- [0550] 화학식 8, 9, 및 4의 모든 다른 치환기 및 양상은 이의 임의의 및 모든 구체예를 포함하는, 본 발명의 폴리머 (예: 화학식 3, 3A, 3B, 3C, 및 4)에 대해 본원에 기재된 것과 같다.
- [0551] $HNR^{13}A^1$ 및/또는 $HNR^{13}A^2$ 및 화학식 H_2NX^2 또는 HOX^2 의 화합물을 원하는 치환도에 따라 임의의 적절한 방식 및 양으로 화학식 8 또는 9의 화합물에 부가할 수 있다. 일부 구체예에서, 약 1-400 당량 (예: 약 1-350, 1-300, 1-250, 1-200, 1-150, 1-100, 1-50, 10-400, 10-350, 10-300, 10-250, 10-200, 10-150, 10-100, 10-50, 20-400,

20-350, 20-300, 20-250, 20-200, 20-150, 20-100, 20-50, 30-400, 30-350, 30-300, 30-250, 30-200, 30-150, 30-100, 30-50, 40-400, 40-350, 40-300, 40-250, 40-200, 40-150, 40-100, 40-50, 50-400, 50-350, 50-300, 50-250, 50-200, 50-150, 또는 50-100 당량)의 화학식 H_2NX^2 또는 HOX^2 의 화합물을 화학식 8의 폴리머에 부가한다. 또한, 일부 구체예에서, 약 1-400 당량 (예: 약 1-350, 1-300, 1-250, 1-200, 1-150, 1-100, 1-50, 10-400, 10-350, 10-300, 10-250, 10-200, 10-150, 10-100, 10-50, 20-400, 20-350, 20-300, 20-250, 20-200, 20-150, 20-100, 20-50, 30-400, 30-350, 30-300, 30-250, 30-200, 30-150, 30-100, 30-50, 40-400, 40-350, 40-300, 40-250, 40-200, 40-150, 40-100, 40-50, 50-400, 50-350, 50-300, 50-250, 50-200, 50-150, 또는 50-100 당량)의 화학식 $HNR^{13}A^1$ 및/또는 $HNR^{13}A^2$ 의 화합물을 화학식 8 또는 화학식 9의 폴리머에 부가한다.

[0552] 상기 방법이 화학식 $HNR^{13}A^1$ 및/또는 $HNR^{13}A^2$ 의 화합물 및 화학식 H_2NX^2 또는 HOX^2 의 화합물을 화학식 8의 폴리머에 부가하는 단계를 포함하는 구체예에서, 화학식 $HNR^{13}A^1$ 및/또는 $HNR^{13}A^2$ 의 화합물 및 화학식 H_2NX^2 또는 HOX^2 의 화합물이 임의의 적절한 비율로 반응 혼합물에 존재할 수 있다. 예를 들어, 화학식 $HNR^{13}A^1$ 및/또는 $HNR^{13}A^2$ 의 화합물 및 화학식 H_2NX^2 또는 HOX^2 의 화합물은 약 150:1 내지 약 1:150의 몰비로 존재할 수 있다. 일부 구체예에서, 약 150:1 내지 약 1:1, 예를 들어, 약 50:1 내지 약 1:1 (예: 약 25:1 내지 약 1:1, 약 10:1 내지 약 1:1, 약 5:1 내지 약 1:1, 또는 약 2.5:1 내지 약 1:1)의 비율이 사용된다. 다른 구체예에서, 상기 비율은 약 1:150 내지 약 1:1 예컨대 약 1:50 내지 약 1:1 (예: 약 1:25 내지 약 1:1, 약 1:10 내지 약 1:1, 약 1:5 내지 약 1:1, 또는 약 1:2.5 내지 약 1:1)이다. 또 다른 구체예에서, 상기 비율은 약 1:10 내지 약 1:150, 약 1:40 내지 약 1:150, 또는 약 1:80 내지 약 1:150이다.

[0553] 일부 구체예에서, 화학식 8 또는 화학식 9의 구조를 포함하는 폴리머는 각각 하기 화학식 8A 또는 화학식 9A의 폴리머이고:



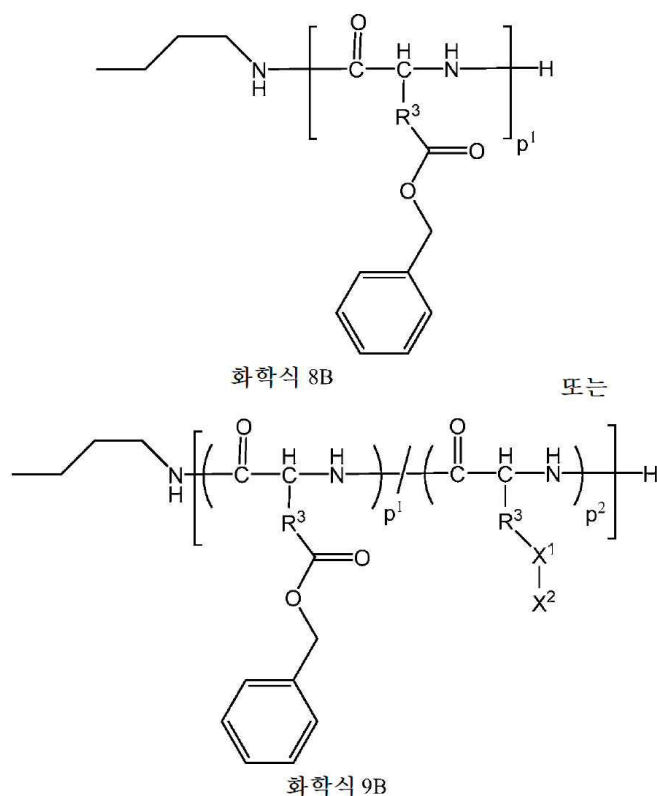
[0555] ;

[0556] 상기에서, c, Y, R^1 , 및 R^6 은 이의 임의의 및 모든 구체예를 포함하는, 화학식 3A 및 3B의 폴리머에 대해 기술된 바와 같고; p^1 , p^2 , R^3 , X^1 , 및 X^2 는 화학식 8 및 9에 대해 상기 기재된 바와 같다. 따라서, 예를 들어:

[0557] p^1 은 1 내지 2000의 정수이고;

[0558] p^2 는 1 내지 2000의 정수이며;

- [0559] 각 R^3 은 독립적으로 메틸렌 또는 에틸렌 기이고;
- [0560] 각 X^1 은 독립적으로 $-C(O)O-$, $-C(O)NR^{13}-$, $-C(O)-$, $-S(O)(O)-$, 또는 결합이고;
- [0561] X^2 의 각 경우는 독립적으로 C_1-C_{12} 알킬 또는 헤테로알킬기, C_3-C_{12} 사이클로알킬기, C_2-C_{12} 알케닐기, C_3-C_{12} 사이클로알케닐기, 아릴기, 헤테로사이클릭기, 또는 이들의 조합으로, 이들은 선택적으로 하나 이상의 치환기로 치환되고, 또는 X^1 및 X^2 의 임의의 다른 구체에는 화학식 3, 3A-3C, 4, 8, 및 9에 대해 전술된 바와 같고;
- [0562] 기호 "/"는 이에 의해 분리된 유닛들이 무작위로 또는 임의의 순서로 연결되는 것을 나타내고;
- [0563] c 는 0 내지 50의 정수이며;
- [0564] Y 는 선택적으로 존재하고, 절단 가능한 링커이며;
- [0565] R^1 은 수소, 아릴기, 헤테로사이클릭기, C_1-C_{12} 알킬기, 알케닐기, 사이클로알킬기, 또는 사이클로알케닐기, 또는 하나 이상의 치환기로 선택적으로 치환된 C_1-C_{12} 직쇄형 또는 분지쇄형 알킬기이며;
- [0566] R^6 은 수소, 아미노기, 아릴기, 헤테로사이클릭기, C_1-C_{12} 알킬기, C_1-C_{12} 헤테로알킬기, 알케닐기, 사이클로알킬기, 또는 사이클로알케닐기, 1개 이상의 아민으로 선택적으로 치환된 C_1-C_{12} 직쇄형 또는 분지쇄형 알킬기; 또는 조직-특이적 또는 세포-특이적 표적화 모이어티이다. 화학식 8A 및 9A의 모든 양상은 그 외에 본 발명의 폴리머 (예: 화학식 3, 3A, 3B, 3C, 4, 8, 및 9)에 대해 본원에 기재된 바와 같다.
- [0567] 소정의 구체예에서, 화학식 8 또는 화학식 9의 구조를 포함하는 폴리머는 각각 하기 화학식 8B 또는 화학식 9B의 폴리머이고:



- [0568]
- [0569] 상기에서, p^1 , p^2 , R^3 , X^1 , 및 X^2 는 화학식 8, 8A, 9, 및 9A에 대해 기재된 바와 같다. 따라서, 예를 들어,
- [0570] p^1 은 1 내지 2000의 정수이고;
- [0571] p^2 는 1 내지 2000의 정수이며;

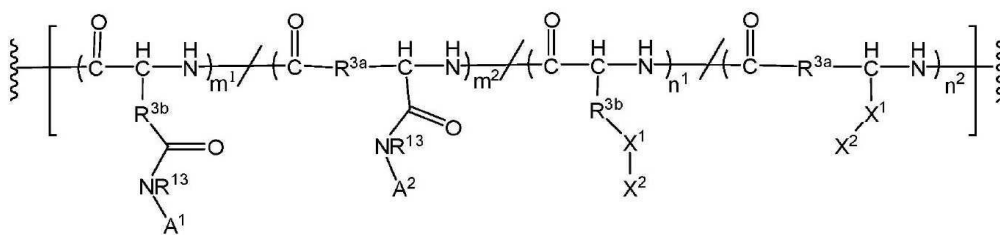
[0572] 각 R^3 은 독립적으로 메틸렌 또는 에틸렌 기이고;

[0573] 각 X^1 은 독립적으로 $-C(O)O-$, $-C(O)NR^{13}-$, $-C(O)-$, $-S(O)(O)-$, 또는 결합이고;

[0574] X^2 의 각 경우는 독립적으로 C_1-C_{12} 알킬 또는 헤테로알킬기, C_3-C_{12} 사이클로알킬기, C_2-C_{12} 알케닐기, C_3-C_{12} 사이클로알케닐기, 아릴기, 헤테로사이클릭기, 또는 이들의 조합으로, 선택적으로 하나 이상의 치환기로 치환되고, 또는 X^1 및 X^2 의 임의의 다른 구체에는 화학식 3, 3A-3C, 4, 8, 및 9에 대해 전술된 바와 같으며;

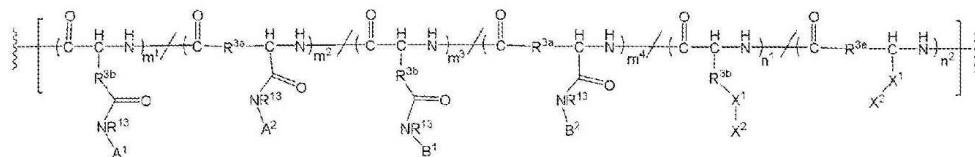
[0575] 기호 "/"는 이에 의해 분리된 유닛들이 무작위로 또는 임의의 순서로 연결되는 것을 나타낸다. 화학식 8B 및 9B의 모든 양상은 그 외에 본 발명의 폴리머 (예: 화학식 3A-3C, 4, 8, 8A, 9 및 9A)에 대해 본원에 기재된 바와 같다.

[0576] 일부 구체예에서, 상기 방법은 또한 화학식 3의 구조를 포함하는 제2 폴리머를 제조하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 하기 화학식 4의 구조를 포함하는 폴리머의 A^1 및/또는 A^2 기의 적어도 일부를 변형시켜서:



화학식 4

[0577] 화학식 3의 구조를 포함하는 폴리머를 제조하는 단계를 포함한다:



[0579] 화학식 3 및 4의 폴리머의 모든 양상은 본원에 전술된 바와 같다. 따라서, 예를 들어:

[0581] 각 m^1 , m^2 , m^3 , 및 m^4 는 0 내지 1000의 정수이고, 단 $m^1 + m^2 + m^3 + m^4$ 의 합은 5보다 크며;

[0582] 각 n^1 및 n^2 는 0 내지 1000의 정수이고, 단 $n^1 + n^2$ 의 합은 2보다 크며;

[0583] 기호 "/"는 이에 의해 분리된 유닛들이 무작위로 또는 임의의 순서로 연결되는 것을 나타내고;

[0584] R^{3a} 의 각 경우는 독립적으로 메틸렌 또는 에틸렌 기이고;

[0585] R^{3b} 의 각 경우는 독립적으로 메틸렌 또는 에틸렌 기이며;

[0586] 각 X^1 은 독립적으로 $-C(O)O-$, $-C(O)NR^{13}-$, $-C(O)-$, $-S(O)(O)-$, 또는 결합이고;

[0587] R^{13} 의 각 경우는 독립적으로 수소, 아릴기, 헤테로사이클릭기, C_1-C_{12} 알킬기, C_2-C_{12} 알케닐기, C_3-C_{12} 사이클로알킬기, 또는 C_3-C_{12} 사이클로알케닐기이고, 이들 중 임의의 기는 선택적으로 하나 이상의 치환기로 치환될 수 있으며;

[0588] X^2 의 각 경우는 독립적으로 C_1-C_{12} 알킬기 또는 헤테로알킬기, C_3-C_{12} 사이클로알킬기, C_2-C_{12} 알케닐기, C_3-C_{12} 사이클로알케닐기, 아릴기, 헤테로사이클릭기, 또는 이들의 조합으로, 이들은 선택적으로 1개 이상의 1차, 2차, 또는 3차 아민을 포함하며; 이들 중 임의의 기는 선택적으로 하나 이상의 치환기로 치환되며;

[0589] A^1 및 A^2 는 각각 독립적으로 하기 화학식의 기이고:

- [0590] $-(CH_2)_{p1}-[NR^2-(CH_2)_{q1}-]_{r1}NR^2_2$;
- [0591] $-(CH_2)_{p2}-N[-(CH_2)_{q2}-NR^2_2]_2$;
- [0592] $-(CH_2)_{p3}-N\{[-(CH_2)_{q3}-NR^2_2][-(CH_2)_{q4}-NR^2-r_2R^2]\}$; 또는
- [0593] $-(CH_2)_{p4}-N\{-(CH_2)_{q5}-N[-(CH_2)_{q6}-NR^2_2]_2\}_2$,
- [0594] B¹ 및 B²는 각각 독립적으로 하기 화학식의 기이며:
- [0595] $-(CH_2)_{p1}-[NR^2-(CH_2)_{q1}-]_{r1}NR^2-(CH_2)_{s1}-R^4-R^5$;
- [0596] $-(CH_2)_{p2}-N[-(CH_2)_{q2}-NR^2-(CH_2)_{s2}-R^4-R^5]_2$;
- [0597] $-(CH_2)_{p3}-N\{[-(CH_2)_{q3}-NR^2_2][-(CH_2)_{q4}-NR^2-r_2(CH_2)_{s3}-R^4-R^5]\}$;
- [0598] $-(CH_2)_{p4}-N\{-(CH_2)_{q5}-N[-(CH_2)_{q6}-NR^2-(CH_2)_{s4}-R^4-R^5]_2\}_2$;
- [0599] $-(CH_2)_{p1}-[NR^2-(CH_2)_{q1}-]_{r1}NR^2-CH_2-CHOH-R^5$;
- [0600] $-(CH_2)_{p2}-N[-(CH_2)_{q2}-NR^2-CH_2-CHOH-R^5]$;
- [0601] $-(CH_2)_{p3}-N\{[-(CH_2)_{q3}-NR^2_2][-(CH_2)_{q4}-NR^2-r_2-CH_2-CHOH-R^5]\}$;
- [0602] $-(CH_2)_{p4}-N\{-(CH_2)_{q5}-N[-(CH_2)_{q6}-NR^2-CH_2-CHOH-R^5]_2\}_2$;
- [0603] $-(CH_2)_{p1}-[NR^2-(CH_2)_{q1}-]_{r1}NR^2-(CH_2)_{s1}-R^5$;
- [0604] $-(CH_2)_{p2}-N[-(CH_2)_{q2}-NR^2-(CH_2)_{s2}-R^5]_2$;
- [0605] $-(CH_2)_{p3}-N\{[-(CH_2)_{q3}-NR^2_2][-(CH_2)_{q4}-NR^2-r_2(CH_2)_{s3}-R^5]\}$;
- [0606] $-(CH_2)_{p4}-N\{-(CH_2)_{q5}-N[-(CH_2)_{q6}-NR^2-(CH_2)_{s4}-R^5]_2\}_2$;
- [0607] $-(CH_2)_{p1}-[N\{(CH_2)_{s1}-R^4-R^5\}-(CH_2)_{q1}-]_{r1}NR^2_2$;
- [0608] $-(CH_2)_{p1}-[N\{(CH_2)_{s1}-R^5\}-(CH_2)_{q1}-]_{r1}NR^2_2$,
- [0609] $-(CH_2)_{p1}-[NR^2-(CH_2)_{q1}-]_{r1}NR^2-CH(CONH_2)-(CH_2)_{s1}-R^5$; 또는
- [0610] $-(CH_2)_{p1}-[NR^2-(CH_2)_{q1}-]_{r1}NR^2-CH(CONH_2)-(CH_2)_{s1}-R^4-R^5$,

[0611] 상기에서, p1 내지 p4, q1 내지 q6, r1 및 r2, 및 s1 내지 s4는 각각 독립적으로 1 내지 5의 정수이고; R²의 각 경우는 독립적으로 수소, 또는 C₁-C₁₂ 알킬기, 알케닐기, 사이클로알킬기, 또는 사이클로알케닐기이거나, 또는 R²는 제2 R²와 조합하여 헤테로사이클릭기를 형성하고; R⁴의 각 경우는 독립적으로 -C(O)O-, -C(O)NH-, -O-C(O)O-, 또는 -S(O)(O)-이며; R⁵의 각 경우는 독립적으로 알킬기, 사이클로알킬기, 알케닐기, 사이클로알케닐기, 아릴기, 헤테로알킬기, 헤테로사이클릭기, 또는 이들의 조합으로, 이들은 선택적으로 2 내지 8개의 3차 아민을 포함하고, 또는 조직-특이적 또는 세포-특이적 표적화 모이어티를 포함하는 치환기이다. 화학식 3, 3A-3C, 및 4의

모든 양상은 달리 본원에 기재된 화학식 3, 3A-3C, 및 4의 구조의 임의의 및 모든 구체예를 포함하는, 본 발명의 폴리머에 대해 본원에 기재된 바와 같다.

[0612] 화학식 3 또는 화학식 4의 구조를 포함하는 폴리머는 본 발명의 제2 폴리머에 대해 기재된 임의의 및 모든 구체예 뿐만 아니라 화학식 3A, 3B, 및 3C를 포함하는, 본원에 기재된 임의의 제2 폴리머일 수 있다.

[0613] 화학식 4의 폴리머 중 A^1 및/또는 A^2 로 지정된 기는 B^1 및/또는 B^2 로 지정된 기를 생성하기 위해 임의의 적절한 수단에 의해 변형될 수 있다. 예를 들어, A^1 및/또는 A^2 로 지정된 기는 Michael 부가 반응, 에폭사이드 개환 반응, 또는 치환 반응에 의해 변형될 수 있다. 바람직한 구체예에서, A^1 및/또는 A^2 로 지정된 기는 Michael 부가 반응에 의해 변형된다.

[0614] 일 구체예에서, 화학식 4의 구조를 포함하는 폴리머 중 A^1 및/또는 A^2 기는 화학식 4의 구조를 포함하는 폴리머와 α, β -불포화 카보닐 화합물 간의 Michael 부가 반응에 의해 변형된다. 본원에서 사용된, "Michael 부가"는 폴리머의 친핵체 (예: 탄소 음이온, 산소 음이온, 질소 음이온, 산소 원자, 질소 원자, 또는 이들의 조합)의 α, β -불포화 카보닐 화합물과의 친핵성 부가를 의미한다. 따라서, 상기 Michael 부가 반응은 화학식 4의 구조를 포함하는 폴리머와 α, β -불포화 카보닐 화합물 간의 반응이다. 일부 구체예에서, 상기 폴리머의 친핵체는 질소 음이온, 질소 원자, 또는 이들의 조합이다.

[0615] 상기 α, β -불포화 카보닐 화합물은 친핵체로부터 Michael 부가를 수용할 수 있는 임의의 α, β -불포화 카보닐 화합물일 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 α, β -불포화 카보닐 화합물은 아크릴레이트, 아크릴아미드, 비닐 설펜, 또는 이들의 조합이다. 따라서, 상기 Michael 부가 반응은 화학식 4의 구조를 포함하는 폴리머와, 아크릴레이트, 아크릴아미드, 비닐 설펜 또는 이들의 조합 간의 반응일 수 있다. 따라서, 일부 구체예에서, 상기 방법은 화학식 4의 구조를 포함하는 폴리머와 아크릴레이트를 접촉시키는 단계; 화학식 4의 구조를 포함하는 폴리머와 아크릴아미드를 접촉시키는 단계; 또는 화학식 4의 구조를 포함하는 폴리머와 비닐 설펜을 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0616] A^1 및/또는 A^2 로 지정된 기가 Michael 부가 반응에 의해 변형되는 구체예에서, 이들은 하기 화학식의 B^1 및/또는 B^2 로 지정된 기를 생성한다:

[0617] $-(CH_2)_{p1}-[NR^2-(CH_2)_{q1}-]_{r1}NR^2-(CH_2)_{s1}-R^4-R^5$;

[0618] $-(CH_2)_{p2}-N[-(CH_2)_{q2}-NR^2-(CH_2)_{s2}-R^4-R^5]_2$;

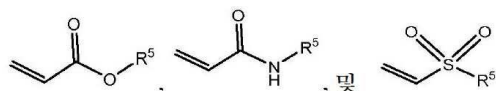
[0619] $-(CH_2)_{p3}-N\{[-(CH_2)_{q3}-NR^2]_2[-(CH_2)_{q4}-NR^2-]_{r2}(CH_2)_{s3}-R^4-R^5\}$;

[0620] $-(CH_2)_{p4}-N\{-(CH_2)_{q5}-N[-(CH_2)_{q6}-NR^2-(CH_2)_{s4}-R^4-R^5]_2\}_2$; 또는

[0621] $-(CH_2)_{p1}-[N\{(CH_2)_{s1}-R^4-R^5\}-(CH_2)_{q1}-]_{r1}NR^2$;

[0622] 상기에서, $p1$ 내지 $p4$, $q1$ 내지 $q6$, $r1$ 및 $r2$, 및 $s1$ 내지 $s4$ 는 각각 독립적으로 1 내지 5의 정수이고; R^2 의 각 경우는 독립적으로 수소, 아릴기, 헤테로사이클릭기, C_1 - C_{12} 알킬기, 알케닐기, 사이클로알킬기, 또는 사이클로알케닐기, 또는 하나 이상의 치환기로 선택적으로 치환된 C_1 - C_{12} 직쇄형 또는 분지쇄형 알킬기이거나, 또는 R^2 는 제2 R^2 와 조합하여 헤테로사이클릭기를 형성하고; R^4 의 각 경우는 독립적으로 $-C(O)O-$, $-C(O)NH-$, $-O-C(O)O-$, 또는 $-S(O)(O)-$ 이며; R^5 의 각 경우는 독립적으로 알킬기, 사이클로알킬기, 알케닐기, 사이클로알케닐기, 아릴기, 헤테로알킬기, 헤테로사이클릭기, 또는 이들의 조합으로, 이들은 선택적으로 2 내지 8개의 3차 아민을 포함하고, 또는 조직-특이적 또는 세포-특이적 표적화 모이어티를 포함하는 치환기이다.

[0623] 사용하기에 적합한 아크릴레이트, 아크릴아미드, 및 비닐 설펜의 예로는 하기 화학식의 아크릴레이트를 포함한다:



[0624]

[0625] 상기에서, R^5 는 화학식 3, 3A, 3B, 또는 3C에 대해 기재된 바와 같다.

[0626] 일부 구체예에서, 상기 Michael 부가 반응은 산 및/또는 염기에 의해 촉진된다. 상기 산 및/또는 염기는 임의의 적절한 pKa를 갖는 임의의 적절한 산 및/또는 염기일 수 있다. 상기 산 및/또는 염기는 유기 산 (예: *p*-톨루엔설폰산), 유기 염기 (예: 트리에틸아민), 무기산 (예: 사염화 티타늄), 무기 염기 (예: 탄산칼륨), 또는 이들의 조합일 수 있다.

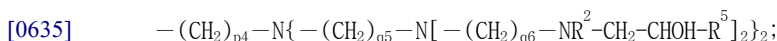
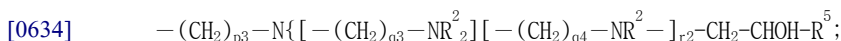
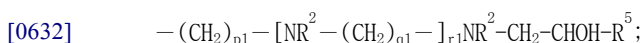
[0627] 일부 구체예에서, 상기 Michael 부가 반응은 산에 의해 촉진된다. 상기 산은 브뢴스테드 산 또는 루이스 산일 수 있다. 상기 산이 브뢴스테드 산인 구체예에서, 상기 산은 약산 (즉, 약 4 내지 약 7의 pKa) 또는 강산 (즉, 약 -2 내지 약 4의 pKa)일 수 있다. 전형적으로, 상기 산은 약산이다. 소정의 구체예에서, 상기 산은 루이스 산이다. 예를 들어, 상기 산은 비스(트리플루오로메탄설폰)이미드 또는 *p*-톨루엔설폰산일 수 있다.

[0628] 일부 구체예에서, 상기 Michael 부가 반응은 염기에 의해 촉진된다. 상기 염기는 약염기 (즉, 약 7 내지 약 12의 pKa) 또는 강염기 (즉, 약 12 내지 약 50의 pKa)일 수 있다. 전형적으로, 상기 염기는 약염기이다. 예를 들어, 상기 염기는 트리에틸아민, 디소프로필에틸아민, 피리딘, *N*-메틸 모르폴린, 또는 *N,N*-디메틸-피페라진, 또는 이들의 유도체일 수 있다.

[0629] 일부 구체예에서, 상기 Michael 부가 반응은 용매에서 수행된다. 상기 용매는 반응할 α, β -불포화 카보닐 화합물 및 폴리머를 가용화시킬 수 있는, 임의의 적절한 용매, 또는 용매들의 혼합물일 수 있다. 예를 들어, 상기 용매는 물, 양성자성 유기 용매, 및/또는 비양성자성 유기 용매를 포함할 수 있다. 용매의 예시되는 목록은 물, 디클로로메탄, 디에틸 에테르, 디메틸 설펝사이드, 아세토니트릴, 메탄올, 및 에탄올을 포함한다.

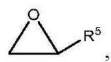
[0630] 일 구체예에서, 상기 폴리머 중 A^1 및/또는 A^2 기는 상기 폴리머와 에폭사이드 화합물 간의 에폭사이드 개환 반응에 의해 변형된다. 본원에서 사용된, 용어 "에폭사이드 개환"은 폴리머의 친핵체 (예: 탄소 음이온, 산소 음이온, 질소 음이온, 산소 원자, 질소 원자, 또는 이들의 조합)를 에폭사이드 화합물에 부가하여, 상기 에폭사이드를 개환시키는 친핵성 부가를 의미한다. 따라서, 상기 에폭사이드 개환 반응은 상기 폴리머와 에폭사이드 화합물 간에 일어난다. 일부 구체예에서, 상기 폴리머의 친핵체는 질소 음이온, 질소 원자, 또는 이들의 조합이다.

[0631] A^1 및/또는 A^2 로 지정된 기가 에폭사이드 개환 반응에 의해 변형되는 구체예에서, 이들은 하기 화학식의 B^1 및/또는 B^2 로 지정된 기를 생성한다:



[0636] 상기에서, $p1$ 내지 $p4$, $q1$ 내지 $q6$, 및 $r1$ 및 $r2$ 는 각각 독립적으로 1 내지 5의 정수이고; R^2 의 각 경우는 독립적으로 수소, 아릴기, 헤테로사이클릭기, C_1 - C_{12} 알킬기, 알케닐기, 사이클로알킬기, 또는 사이클로알케닐기, 또는 하나 이상의 치환기로 선택적으로 치환된 C_1 - C_{12} 직쇄형 또는 분지쇄형 알킬기이거나, 또는 R^2 는 제2 R^2 와 조합하여 헤테로사이클릭기를 형성하고; R^5 의 각 경우는 독립적으로 알킬기, 사이클로알킬기, 알케닐기, 사이클로알케닐기, 아릴기, 헤테로알킬기, 헤테로사이클릭기, 또는 이들의 조합으로, 이들은 선택적으로 2 내지 8개의 3차 아민을 포함하고, 또는 조직-특이적 또는 세포-특이적 표적화 모이어티를 포함하는 치환기이다.

[0637] 사용하기에 적합한 에폭사이드의 예로는 하기 화학식의 에폭사이드를 포함한다:



[0638]

[0639] 상기에서, R^5 는 화학식 3, 3A, 3B, 또는 3C에 대해 기재된 바와 같다.

[0640] 일부 구체예에서, 상기 에폭사이드 개환 반응은 산 및/또는 염기에 의해 촉진된다. 상기 산 및/또는 염기는 임의의 적절한 pKa를 갖는 임의의 적절한 산 및/또는 염기일 수 있다. 상기 산 및/또는 염기는 유기 산 (예: p-톨루엔설폰산), 유기 염기 (예: 트리에틸아민), 무기산 (예: 사염화 티타늄), 무기 염기 (예: 탄산칼륨), 또는 이들의 조합일 수 있다.

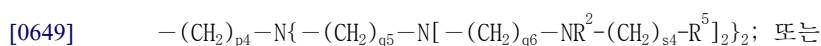
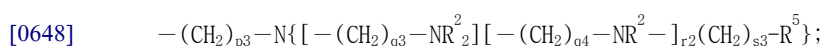
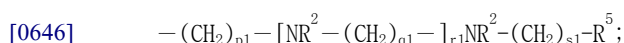
[0641] 일부 구체예에서, 상기 에폭사이드 개환 반응은 산에 의해 촉진된다. 상기 산은 브뢴스테드 산 또는 루이스 산일 수 있다. 상기 산이 브뢴스테드 산인 구체예에서, 상기 산은 약산 (즉, 약 4 내지 약 7의 pKa) 또는 강산 (즉, 약 -2 내지 약 4의 pKa)일 수 있다. 전형적으로, 상기 산은 약산이다. 소정의 구체예에서, 상기 산은 루이스 산이다. 예를 들어, 상기 산은 비스(트리플루오로메탄설폰)이미드 또는 p-톨루엔설폰산일 수 있다.

[0642] 일부 구체예에서, 상기 에폭사이드 개환 반응은 염기에 의해 촉진된다. 상기 염기는 약염기 (즉, 약 7 내지 약 12의 pKa) 또는 강염기 (즉, 약 12 내지 약 50의 pKa)일 수 있다. 전형적으로, 상기 염기는 약염기이다. 예를 들어, 상기 염기는 트리에틸아민, 디이소프로필에틸아민, 피리딘, N-메틸 모르폴린, 또는 N,N-디메틸-피페라진, 또는 이들의 유도체일 수 있다.

[0643] 일부 구체예에서, 상기 에폭사이드 개환 반응은 용매에서 수행된다. 상기 용매는 반응할 에폭사이드 화합물 및 폴리머를 가용화시킬 수 있는, 임의의 적절한 용매 또는 용매들의 혼합물일 수 있다. 예를 들어, 상기 용매는 물, 양성자성 유기 용매 및/또는 비양성자성 유기 용매를 포함할 수 있다. 용매의 예시되는 목록에는 물, 디클로로메탄, 디에틸 에테르, 디메틸 설폭사이드, 아세토니트릴, 메탄올, 및 에탄올을 포함한다.

[0644] 일 구체예에서, 상기 폴리머의 A^1 및/또는 A^2 기는 폴리머와 이탈기 (예: 클로라이드 원자, 브로마이드 원자, 요오다이드 원자, 토실레이트, 트리플레이트, 메실레이트 등)를 포함하는 화합물 간의 치환 반응에 의해 변형된다. 본원에서 사용된, 용어 "치환"은 폴리머의 친핵체 (예: 탄소 음이온, 산소 음이온, 질소 음이온, 산소 원자, 질소 원자 또는 이들의 조합)를 이탈기를 포함하는 화합물에 부가하는 친핵성 부가를 의미한다. 따라서, 상기 치환 반응은 폴리머와 이탈기를 포함하는 화합물 간에 일어난다. 일부 구체예에서, 상기 폴리머의 친핵체는 질소 음이온, 질소 원자, 또는 이들의 조합이다.

[0645] A^1 및/또는 A^2 로 지정된 기가 치환 반응에 의해 변형되는 구체예에서, 이들은 하기 화학식의 B^1 및/또는 B^2 로 지정된 기를 생성한다:



[0651] 상기에서, $p1$ 내지 $p4$, $q1$ 내지 $q6$, $r1$ 및 $r2$, 및 $s1$ 내지 $s4$ 는 각각 독립적으로 1 내지 5의 정수이고; R^2 의 각 경우는 독립적으로 수소, 아릴기, 헤테로사이클릭기, C_1 - C_{12} 알킬기, 알케닐기, 사이클로알킬기, 또는 사이클로알케닐기, 또는 하나 이상의 치환기로 선택적으로 치환된 C_1 - C_{12} 직쇄형 또는 분지쇄형 알킬기이거나, 또는 R^2 는 제2 R^2 와 조합하여 헤테로사이클릭기를 형성하고; R^5 의 각 경우는 독립적으로 알킬기, 사이클로알킬기, 알케닐기, 사이클로알케닐기, 아릴기, 헤테로알킬기, 헤테로사이클릭기, 또는 이들의 조합으로, 이들은 선택적으로 2 내지 8개의 3차 아민을 포함하고, 또는 조직-특이적 또는 세포-특이적 표적화 모이어티를 포함하는 치환

기이다.

[0652] 사용하기에 적합한 이탈기를 함유하는 화합물의 예로는 하기 화학식의 화합물을 포함한다:



[0654] 상기에서, LG는 이탈기 (예: 클로라이드 원자, 브로마이드 원자, 요오다이드 원자, 토실레이트, 트리플레이트, 메실레이트 등)이고, R^5 는 화학식 3, 3A, 3B, 또는 3C에 대해 기재된 바와 같다.

[0655] 일부 구체예에서, 상기 치환 반응은 산 및/또는 염기에 의해 촉진된다. 상기 산 및/또는 염기는 임의의 적절한 pKa를 갖는 임의의 적절한 산 및/또는 염기일 수 있다. 상기 산 및/또는 염기는 유기 산 (예: *p*-톨루엔설폰산), 유기 염기 (예: 트리에틸아민), 무기산 (예: 사염화 티타늄), 무기 염기 (예: 탄산칼륨), 또는 이들의 조합일 수 있다.

[0656] 일부 구체예에서, 상기 치환 반응은 산에 의해 촉진된다. 상기 산은 브뢴스테드 산 또는 루이스 산일 수 있다. 상기 산이 브뢴스테드 산인 구체예에서, 상기 산은 약산 (즉, 약 4 내지 약 7의 pKa) 또는 강산 (즉, 약 -2 내지 약 4의 pKa)일 수 있다. 전형적으로, 상기 산은 약산이다. 소정의 구체예에서, 상기 산은 루이스 산이다. 예를 들어, 상기 산은 비스(트리플루오로메탄설폰)이미드 또는 *p*-톨루엔설폰산일 수 있다.

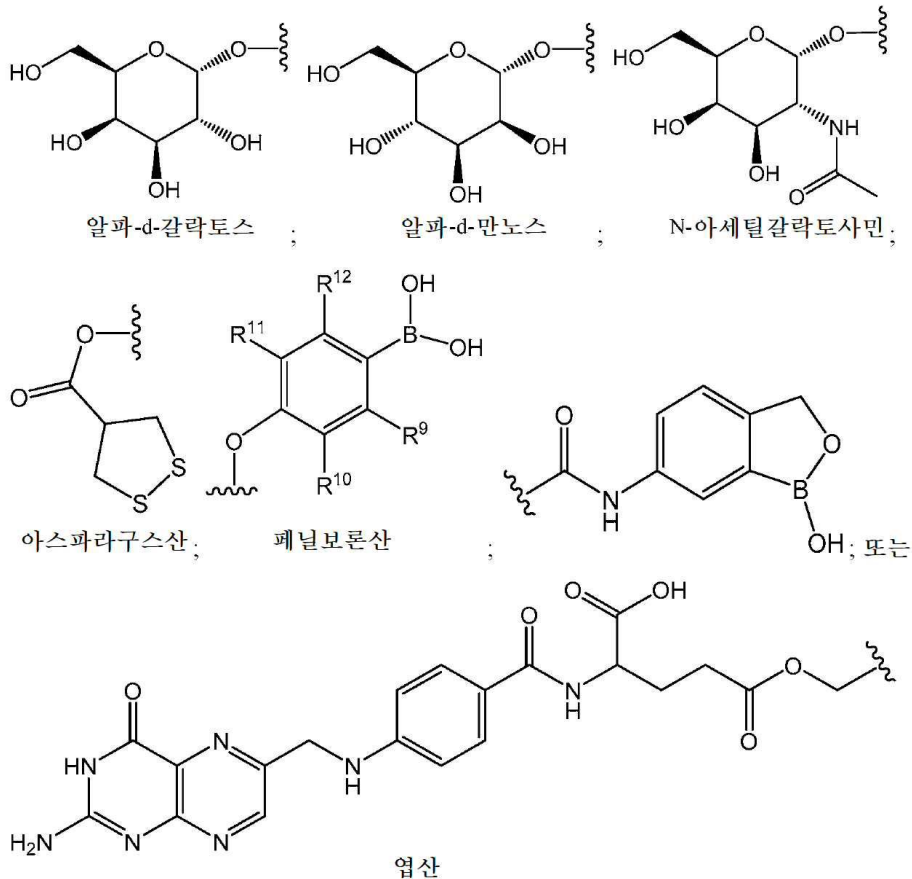
[0657] 일부 구체예에서, 상기 치환 반응은 염기에 의해 촉진된다. 상기 염기는 약염기 (즉, 약 7 내지 약 12의 pKa) 또는 강염기 (즉, 약 12 내지 약 50의 pKa)일 수 있다. 전형적으로, 상기 염기는 약염기이다. 예를 들어, 상기 염기는 트리에틸아민, 디이소프로필에틸아민, 피리딘, N-메틸 모르폴린, 또는 N,N-디메틸-피페라진, 또는 이들의 유도체일 수 있다.

[0658] 일부 구체예에서, 상기 치환 반응은 용매에서 수행된다. 상기 용매는 반응할 이탈기를 포함하는 화합물 및 폴리머를 가용화시킬 수 있는, 임의의 적절한 용매 또는 용매들의 혼합물일 수 있다. 예를 들어, 상기 용매는 물, 양성자성 유기 용매 및/또는 비양성자성 유기 용매를 포함할 수 있다. 용매의 예시되는 목록에는 물, 디클로로메탄, 디에틸 에테르, 디메틸 설펝사이드, 아세토니트릴, 메탄올, 및 에탄올을 포함한다.

[0659] 일부 구체예에서, 상기 방법은 화학식 3의 구조를 포함하는 폴리머를 단리하는 단계를 추가로 포함한다. 상기 화학식 3의 구조를 포함하는 폴리머는 임의의 적절한 수단에 의해 단리될 수 있다. 예를 들어, 상기 화학식 3의 구조를 포함하는 폴리머는 추출, 투석, 결정화, 재결정화, 컬럼 크로마토그래피, 여과, 또는 이들의 임의의 조합에 의해 단리될 수 있다. 전술된 제1 또는 제2 폴리머는 기재된 화학식에 표시된 위치에 조직-특이적 또는 세포-특이적 표적화 모이어티를 포함할 수 있거나, 또는 상기 폴리머는 조직-특이적 또는 세포-특이적 표적화 모이어티를 포함하도록 변형될 수 있다. 예를 들어, 상기 모이어티가 폴리머의 말단에 부가되거나, 또는 E^1 , E^2 , A^1 , A^2 , B^1 , 및/또는 B^2 기의 말단 아민은 조직-특이적 또는 세포-특이적 표적화 모이어티를 부착하기 위해 (예: Michael 부가 반응, 에폭사이드 개환, 치환 반응, 또는 임의의 다른 적절한 기법에 의해) 변형될 수 있다. 상기 조직-특이적 또는 세포-특이적 표적화 모이어티는 임의의 소분자, 단백질 (예: 항체 또는 항원), 아미노산 서열, 당, 올리고뉴클레오타이드, 금속-기반 나노입자, 또는 이들의 조합일 수 있으며, 주어진 표적 조직 또는 세포를 인식할 (예: 특이적으로 결합할) 수 있다 (예: 표적 조직 또는 세포와 다른 비-표적 조직 또는 세포를 표적화 모이어티가 구별할 수 있게 하는 특정 리간드, 수용체, 또는 다른 단백질 또는 분자에 특이적으로 결합할 수 있다). 일부 구체예에서, 상기 조직-특이적 또는 세포-특이적 표적화 모이어티는 리간드에 대한 수용체이다. 일부 구체예에서, 상기 조직-특이적 또는 세포-특이적 표적화 모이어티는 수용체에 대한 리간드이다.

[0660] 상기 조직-특이적 또는 세포-특이적 표적화 모이어티는 임의의 원하는 조직 또는 세포 타입을 표적화하기 위해 사용될 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 조직-특이적 또는 세포-특이적 표적화 모이어티는 상기 폴리머를 대상체의 말초 신경계, 중추 신경계, 간, 근육 (예: 심장 근육), 폐, 뼈 (예: 조혈 세포), 또는 눈의 조직에 국소화시킨다. 소정의 구체예에서, 상기 조직-특이적 또는 세포-특이적 표적화 모이어티는 폴리머를 종양 세포에 국소화시킨다. 예를 들어, 상기 조직-특이적 또는 세포-특이적 표적화 모이어티는 특정 조직 또는 세포의 수용체에 결합하는 당 (sugar)일 수 있다.

[0661] 일부 구체예에서, 상기 조직-특이적 또는 세포-특이적 표적화 모이어티는 하기이다:



[0662]

[0663] 상기에서, 각 R^9 , R^{10} , R^{11} , 및 R^{12} 는 독립적으로 수소, 할로젠, C_1 - C_4 알킬, 또는 C_1 - C_4 알콕시로, 이들은 선택적으로 1개 이상의 아미노기로 치환된다. 특정 조직-특이적 또는 세포-특이적 표적화 모이어티는 본원에 기재된 조직에 상기 폴리머를 국소화시키기 위해 선택될 수 있다. 예를 들어, 알파-d-만노스는 상기 폴리머를 말초신경계, 중추신경계 또는 면역 세포로 국소화시키기 위해 사용될 수 있고, 알파-d-갈락토스 및 N-아세틸갈락토사민은 상기 폴리머를 간의 간세포에 국소화시키는데 사용될 수 있으며, 엽산은 상기 폴리머를 종양 세포에 국소화시키는데 사용될 수 있다.

[0664]

공여체 핵산 (Donor Nucleic Acid)

[0665]

공여체 핵산 (또는 "공여체 서열" 또는 "공여체 폴리뉴클레오타이드" 또는 "공여체 DNA")은 RNA-지향 엔도뉴클레아제 (예: Cas9 폴리펩티드 또는 Cpf1 폴리펩티드)에 의해 유도된 절단 부위에 삽입되는 핵산 서열이다. 공여체 폴리뉴클레오타이드는 이와 상동성을 갖는 게놈 서열 간의 상동성-지향 복구를 지원하기 위해, 절단 부위에서 표적 게놈 서열, 예를 들어, 절단 부위를 플랭킹 (flanking)하는 뉴클레오타이드 서열, 예컨대 절단 부위의 약 50개 이하의 염기, 예를 들어 약 30개 이하의 염기, 약 15개 이하의 염기, 약 10개 이하의 염기, 약 5개 이하의 염기, 또는 절단 부위 바로 옆에 있는 뉴클레오타이드 서열과 충분한 상동성, 예를 들어 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100%의 상동성을 포함할 것이다. 공여체와 게놈 서열 간의 서열 상동성은 약 25개, 50개, 100개, 또는 200개의 뉴클레오타이드, 또는 200개 초과 (또는 10개 내지 200개 이상의 뉴클레오타이드 간의 임의의 적분값)의 뉴클레오타이드가 상동성-지향 복구를 지원할 것이다. 공여체 서열은 임의의 길이, 예를 들어 10개 이상의 뉴클레오타이드, 50개 이상의 뉴클레오타이드, 100개 이상의 뉴클레오타이드, 250개 이상의 뉴클레오타이드, 500개 이상의 뉴클레오타이드, 1000개 이상의 뉴클레오타이드, 5000개 이상의 뉴클레오타이드 등일 수 있다.

[0666]

상기 공여체 서열은 전형적으로 이를 대체하는 게놈 서열과 동일하지 않다. 오히려, 상기 공여체 서열은 상동성-지향 복구를 지원하기에 충분한 상동성이 존재하는 한 게놈 서열에 대해 하나 이상의 단일 염기 변경, 삽입, 결실, 역전 또는 재배열을 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 공여체 서열은 표적 DNA 영역과 2개의 플랭킹 서열 사이의 상동성-지향 복구가 표적 영역에서 비-상동성 서열의 삽입을 초래하도록 2개의 상동성 영역을 플랭킹하는 비-상동성 서열을 포함한다. 공여체 서열은 또한 관심 DNA 영역과 상동성이 없고 관심 DNA 영역으로

의 삽입을 의도하지 않는 서열을 포함하는 벡터 백본을 포함할 수 있다. 일반적으로, 공여체 서열의 상동성 영역(들)은 재조합이 요구되는 게놈 서열에 적어도 50%의 서열 동일성을 가질 것이다. 소정의 구체예에서, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, 또는 99.9%의 서열 동일성이 존재한다. 상기 공여체 폴리뉴클레오타이드의 길이에 따라, 1% 내지 100%의 서열 동일성 사이의 임의의 값이 존재할 수 있다.

[0667] 상기 공여체 서열은 게놈 서열과 비교하여 소정의 서열 차이, 예컨대 제한 부위 (restriction site), 뉴클레오타이드 다형성, 선택성 마커 (예: 약물 내성 유전자, 형광 단백질, 효소 등) 등을 포함할 수 있으며, 이는 절단 부위에 공여체 서열의 삽입이 성공적인지 여부를 평가하는데 사용될 수 있거나, 또는 일부 구체예에서 다른 목적을 위해 (예: 표적화된 게놈 유전자좌에서의 발현을 나타내기 위해) 사용될 수 있다. 일부 구체예에서, 코딩 영역에 위치하는 경우, 이러한 뉴클레오타이드 서열 차이는 아미노산 서열을 변경하지 않거나, 또는 침묵 아미노산의 변경 (즉, 단백질의 구조 또는 기능에 영향을 미치지 않는 변경)을 초래할 것이다. 대안으로서, 이러한 서열 차이는 마커 서열의 제거를 위해 나중에 활성화될 수 있는 플랭킹 재조합 서열 예컨대 FLP, loxP 서열 또는 유사 서열을 포함할 수 있다.

[0668] 상기 공여체 서열은 단일가닥 DNA, 단일가닥 RNA, 이중가닥 DNA, 또는 이중가닥 RNA로서 세포에 제공될 수 있다. 이는 선형 또는 원형 형태로 세포에 도입될 수 있다. 선형 형태로 도입되는 경우, 상기 공여체 서열의 말단은 통상의 기술자에게 알려진 방법에 의해 (예: 핵산말단분해에 의한 분해 (exonucleolytic degradation)로부터) 보호될 수 있다. 예를 들어, 하나 이상의 디데옥시뉴클레오타이드 (didexy nucleotide) 잔기가 선형 분자의 3' 말단에 부가되고 및/또는 자기-상보성 올리고뉴클레오타이드가 한쪽 말단 또는 양쪽 말단에 결합된다. 예를 들어, Chang et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:4959-4963; Nehls et al. (1996) Science 272:886-889를 참조한다. 증폭 절차 예컨대 RCA (rolling circle amplification)는 또한 본원에서 예시된 바와 같이 유리하게 사용될 수 있다. 외인성 폴리뉴클레오타이드를 분해로부터 보호하기 위한 추가적인 방법은 말단 아미노기(들)의 부가 및 개질된 뉴클레오타이드간 연결 (internucleotide linkage), 예를 들어 포스포로티오에이트, 포스포라미데이트, 및 0-메틸 리보스 또는 데옥시리보스 잔기의 사용을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0669] 선형 공여체 서열의 말단을 보호하기 위한 대안으로서, 재조합에 영향을 주지 않으면서, 분해될 수 있는 상동성 영역 외부에 추가적인 길이의 서열이 포함될 수 있다. 공여체 서열은 예를 들어 복제 기원, 프로모터 및 항생제 내성을 코딩하는 유전자와 같은 추가의 서열을 갖는 벡터 분자의 일부로서 세포내로 도입될 수 있다. 또한, Cas9 가이드 RNA 및/또는 Cas9 융합 폴리펩티드 및/또는 공여체 폴리뉴클레오타이드를 코딩하는 핵산에 대해 본원에 기재된 바와 같이, 공여체 서열은 네이키드 (naked) 핵산으로서, 리포솜 또는 폴리머와 같은 제제와 복합된 핵산으로서 도입될 수 있거나, 또는 바이러스 (예: 아데노바이러스, AAV)에 의해 전달될 수 있다.

[0670] 가이드 핵산 (Guide Nucleic Acid)

[0671] 일부 구체예에서, 상기 조성물은 가이드 핵산을 포함한다. 본 개시내용의 조성물에 포함시키기에 적합한 가이드 핵산은 단일-분자 가이드 RNA ("단일-가이드 (single-guide) RNA"/"sgRNA") 및 이중-분자 가이드 핵산 ("이중-가이드 (dual-guide) RNA"/"dgRNA")을 포함한다.

[0672] 본 개시내용의 복합체에 포함시키기에 적합한 가이드 핵산 (예: 가이드 RNA)은 RNA-가이드 엔도뉴클레아제 (예: Cas9 또는 Cpf1 폴리펩티드)의 활성을 표적 핵산 내의 특정 표적 서열로 유도한다. 가이드 핵산 (예: 가이드 RNA)은 하기를 포함한다: 제1 세그먼트 (본원에서 "핵산 표적화 세그먼트" 또는 간단히 "표적화 세그먼트 (targeting segment)"라고도 지칭됨); 및 제2 세그먼트 (본원에서 "단백질-결합 세그먼트 (protein-binding segment)"라고도 함). 용어 "제1 (first)" 및 "제2 (second)"는 가이드 RNA에서 세그먼트가 나타나는 순서를 의미하지 않는다. 요소들의 서로에 대한 순서는 사용되는 특정 RNA-가이드 폴리펩티드에 따라 다르다. 예를 들어, Cas9에 대한 가이드 RNA는 전형적으로 상기 표적화 세그먼트의 3'에 위치한 단백질-결합 세그먼트를 갖는 반면, Cpf1에 대한 가이드 RNA는 전형적으로 상기 표적화 세그먼트의 5'에 위치한 단백질-결합 세그먼트를 갖는다.

[0673] 상기 가이드 RNA는 선형 또는 원형 형태로 세포에 도입될 수 있다. 선형 형태로 도입되는 경우, 상기 가이드 RNA의 말단은 통상의 기술자에게 알려진 방법에 의해 (예: 핵산말단분해에 의한 분해로부터) 보호될 수 있다. 증폭 절차 예컨대 RCA가 또한 본원에 예시된 바와 같이 유리하게 사용될 수 있다.

[0674] 제1 세그먼트: 표적화 세그먼트

[0675] 가이드 핵산 (예: 가이드 RNA)의 제1 세그먼트는 표적 핵산의 서열 (표적 부위)에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 즉, 가이드 핵산 (예: 가이드 RNA)의 표적화 세그먼트는 혼성화 (즉, 염기쌍 형성)를 통해 서열-

특이적 방식으로 표적 핵산 (예: RNA, DNA, 이중가닥 DNA)과 상호작용할 수 있다. 따라서, 상기 표적화 세그먼트의 뉴클레오타이드 서열은 가변할 수 있고, 가이드 핵산 (예: 가이드 RNA) 및 표적 핵산이 상호 작용할 표적 핵산 내의 위치를 결정할 수 있다. 가이드 핵산 (예: 가이드 RNA)의 표적화 세그먼트는 표적 핵산내 임의의 원하는 서열 (표적 부위)에 혼성화되도록 (예: 유전 공학에 의해) 변형될 수 있다.

[0676] 상기 표적화 세그먼트는 12개의 뉴클레오타이드 내지 100개의 뉴클레오타이드의 길이를 가질 수 있다. 상기 표적 핵산의 뉴클레오타이드 서열 (표적 부위)에 상보적인 표적화 세그먼트의 뉴클레오타이드 서열 (표적화 서열, 또한 가이드 서열이라고도 함)은 12 nt 이상의 길이를 가질 수 있다. 예를 들어, 상기 표적 핵산의 표적 부위에 상보적인 표적화 세그먼트의 표적화 서열은 12 nt 이상, 15 nt 이상, 17 nt 이상, 18 nt 이상, 19 nt 이상, 20 nt 이상, 25 nt 이상, 30 nt 이상, 35 nt 이상 또는 40 nt의 길이를 가질 수 있다.

[0677] 상기 표적화 세그먼트의 표적화 서열 (즉, 가이드 서열)과 표적 핵산의 표적 부위 간의 상보성 퍼센트 (percent complementarity)는 60% 이상 (예: 65% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상, 또는 100%)일 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 표적화 세그먼트의 표적화 서열과 표적 핵산의 표적 부위 간의 상보성 퍼센트는 표적 핵산의 표적 부위의 5'에 가장 인접한 7개의 연속 뉴클레오타이드에 대해 100%이다. 일부 구체예에서, 상기 표적화 세그먼트의 표적화 서열과 표적 핵산의 표적 부위 간의 상보성 퍼센트는 20개의 연속 뉴클레오타이드에 대해 60% 이상이다. 일부 구체예에서, 상기 표적화 세그먼트의 표적화 서열과 표적 핵산의 표적 부위 간의 상보성 퍼센트는 표적 핵산의 표적 부위의 5'에 가장 인접한 17개, 18개, 19개 또는 20개의 연속 뉴클레오타이드에 대해 100%이며, 나머지에 대해서는 0%까지 낮다. 이러한 경우, 상기 표적화 서열은 각각 길이가 17, 18, 19 또는 20개의 뉴클레오타이드인 것으로 간주될 수 있다.

[0678] 제2 세그먼트: 단백질-결합 세그먼트

[0679] 가이드 핵산 (예: 가이드 RNA)의 단백질-결합 세그먼트는 RNA-가이드 엔도뉴클레아제와 상호작용 (결합)한다. 상기 가이드 핵산 (예: 가이드 RNA)은 결합된 엔도뉴클레아제를, 전달된 표적화 세그먼트/표적화 서열/가이드 서열을 통해 표적 핵산 (표적 부위) 내의 특정 뉴클레오타이드 서열로 가이드한다. 가이드 핵산 (예: 가이드 RNA)의 단백질-결합 세그먼트는 서로 상보적인 뉴클레오타이드의 2개의 스트레치 (stretches)를 포함한다. 상기 단백질-결합 세그먼트의 상보적인 뉴클레오타이드는 혼성화되어 이중가닥 RNA 듀플렉스 (dsRNA)를 형성한다.

[0680] 단일 및 이중 가이드 핵산

[0681] 이중 가이드 핵산 (예: 가이드 RNA)은 2개의 개별 핵산 분자를 포함한다. 대상 이중 가이드 핵산 (예: 가이드 RNA)의 2개의 분자 각각은 상기 2개의 분자의 상보적인 뉴클레오타이드가 혼성화되어 단백질-결합 세그먼트의 이중가닥 RNA 듀플렉스를 형성하도록 서로 상보적인 뉴클레오타이드의 스트레치를 포함한다.

[0682] 일부 구체예에서, 활성화인자 (activator)의 듀플렉스-형성 세그먼트는 국제 특허 출원 번호 PCT/US2016/052690 및 PCT/US2017/062617에 기재된 활성화인자 (tracrRNA) 분자들 중 하나 또는 이의 상보체 (complement)와, 8개 이상의 연속 뉴클레오타이드 (예: 8개 이상의 연속 뉴클레오타이드, 10개 이상의 연속 뉴클레오타이드, 12개 이상의 연속 뉴클레오타이드, 15개 이상의 연속 뉴클레오타이드, 또는 20개 이상의 연속 뉴클레오타이드)의 스트레치에 대해 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% 이상 동일하거나, 또는 100% 동일하다.

[0683] 일부 구체예에서, 표적인자 (targeter)의 듀플렉스-형성 세그먼트는 국제 특허 출원 번호 PCT/US2016/052690 및 PCT/US2017/062617에 기재된 표적인자 (crRNA) 서열들 중 하나 또는 이의 상보체와, 8개 이상의 연속 뉴클레오타이드 (예: 8개 이상의 연속 뉴클레오타이드, 10개 이상의 연속 뉴클레오타이드, 12개 이상의 연속 뉴클레오타이드, 15개 이상의 연속 뉴클레오타이드, 또는 20개 이상의 연속 뉴클레오타이드)의 스트레치에 대해 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% 이상 동일하거나, 또는 100% 동일하다.

[0684] 이중 가이드 핵산 (예: 가이드 RNA)은 표적인자의 활성화인자와의 제어된 (즉, 조건부) 결합을 가능하게 하도록 디자인될 수 있다. 이중 가이드 핵산 (예: 가이드 RNA)은 활성화인자 및 표적인자가 모두 Cas9와의 기능적 복합체로 결합되지 않는 한 기능적이지 않기 때문에, 활성화인자와 표적인자 간의 결합을 유도할 수 있도록 하는 것에 의해, 이중 가이드 핵산 (예: 가이드 RNA)은 유도성 (예: 약물 유도성)일 수 있다. 하나의 비-제한적인 예로서, RNA 압타머가 활성화인자의 표적인자와의 결합을 조절 (즉, 제어)하기 위해 사용될 수 있다. 따라서, 상기 활성화인자 및/또는 표적인자는 RNA 압타머 서열을 포함할 수 있다.

[0685] 압타머 (예: RNA 압타머)는 당해 분야에 알려져 있으며, 일반적으로 리보스위치 (riboswitch)의 합성 버전이다. 용어 "RNA 압타머 (RNA aptamer)" 및 "리보스위치 (riboswitch)"는 그 일부인 핵산 분자 (예: RNA, DNA/RNA 혼성체 등)의 구조의 유도성 조절 (및 따라서 특이적 서열의 이용 가능성)을 제공하는 합성 및 천연 핵산 서열을

모두 포함하는 것으로 본원에서 상호교환 가능하게 사용된다. RNA 압타머는 통상 특정 약물 (예: 소분자)에 특이적으로 결합하는 특정 구조 (예: 헤어핀)로 폴딩되는 서열을 포함한다. 상기 약물의 결합은 RNA의 폴딩에 구조적 변화를 일으켜서, 압타머가 일부인 핵산의 특성을 변화시킨다. 비-제한적인 예로서: (i) 압타머를 갖는 활성인자는 상기 압타머가 적절한 약물에 의해 결합되지 않는 한 동족 (cognate) 표적인자에 결합할 수 없고; (ii) 압타머를 갖는 표적인자는 상기 압타머가 적절한 약물에 의해 결합되지 않는 한 동족 활성인자에 결합할 수 없으며, 및 (iii) 상이한 약물에 결합하는 상이한 압타머를 각각 포함하는, 표적인자 및 활성인자는 두 약물들이 모두 존재하지 않는 한 서로 결합할 수 없다. 이들 예에 의해 예시되는 바와 같이, 이중 가이드 핵산 (예: 가이드 RNA)은 유도성으로 디자인될 수 있다.

[0686] 압타머 및 리보스위치의 예로는 예를 들어 Nakamura et al., Genes Cells. 2012 May;17(5):344-64; Vavalle et al., Future Cardiol. 2012 May;8(3):371-82; Citartan et al., Biosens Bioelectron. 2012 Apr 15;34(1):1-11; 및 Liberman et al., Wiley Interdiscip Rev RNA. 2012 May-Jun;3(3):369-84에서 찾을 수 있고; 이들 모두는 그 전체가 본원에 참조에 의해 포함된다.

[0687] 이중 가이드 핵산 (예: 가이드 RNA)에 포함될 수 있는 뉴클레오타이드 서열, 또는 단백질 결합 세그먼트를 형성하도록 혼성화할 수 있는 이의 상보체의 비-제한적인 예가 국제 특허 출원 번호 PCT/US2016/052690 및 PCT/US2017/062617에 포함되어 있다.

[0688] 대상 단일 가이드 핵산 (예: 가이드 RNA)은 서로 상보적이고, 혼성화되어 단백질-결합 세그먼트의 이중가닥 RNA 듀플렉스 (dsRNA 듀플렉스)를 형성하고 (따라서 스템-루프 (stem-loop) 구조를 생성하고), 개재 (intervening) 뉴클레오타이드 ("링커" 또는 "링커 뉴클레오타이드")에 의해 공유적으로 연결되는, 뉴클레오타이드의 2개의 스트레치 (이중 가이드 핵산의 "표적인자" 및 "활성인자"와 매우 유사함)를 포함한다. 따라서, 대상 단일 가이드 핵산 (예: 단일 가이드 RNA)은 표적인자 및 활성인자를 포함할 수 있으며, 이들 각각은 듀플렉스-형성 세그먼트를 가지며, 여기서 표적인자 및 활성인자의 듀플렉스-형성 세그먼트는 서로 혼성화되어 dsRNA 듀플렉스를 형성한다. 상기 표적인자 및 활성인자는 상기 표적인자의 3' 말단 및 상기 활성인자의 5' 말단을 통해 공유결합에 의해 연결될 수 있다. 대안으로서, 표적인자 및 활성인자는 상기 표적인자의 5' 말단 및 상기 활성인자의 3' 말단을 통해 공유결합에 의해 연결될 수 있다.

[0689] 단일 가이드 핵산의 링커는 3개의 뉴클레오타이드 내지 100개의 뉴클레오타이드의 길이를 가질 수 있다. 일부 구체예에서, 단일 가이드 핵산 (예: 가이드 RNA)의 링커는 4 nt이다.

[0690] 예시되는 단일 가이드 핵산 (예: 가이드 RNA)은 dsRNA 듀플렉스를 형성하기 위해 혼성화되는 뉴클레오타이드의 2개의 상보적 스트레치를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 단일 가이드 핵산 (예: 가이드 RNA)의 뉴클레오타이드의 2개의 상보적인 스트레치들 중 하나 (또는 상기 스트레치를 코딩하는 DNA)는 국제 특허 출원 번호 PCT/US2016/052690 및 PCT/US2017/062617에 기재된 활성인자 (tracrRNA) 분자들 중 하나 또는 이의 상보체와, 8개 이상의 연속 뉴클레오타이드 (예: 8개 이상의 연속 뉴클레오타이드, 10개 이상의 연속 뉴클레오타이드, 12개 이상의 연속 뉴클레오타이드, 15개 이상의 연속 뉴클레오타이드, 또는 20개 이상의 연속 뉴클레오타이드)에 대해 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% 이상 동일하거나 또는 100% 동일하다.

[0691] 일부 구체예에서, 상기 단일 가이드 핵산 (예: 가이드 RNA)의 뉴클레오타이드의 2개의 상보적인 스트레치들 중 하나 (또는 상기 스트레치를 코딩하는 DNA)는 국제 특허 출원 번호 PCT/US2016/052690 및 PCT/US2017/062617에 기재된 표적인자 (crRNA) 서열들 중 하나 또는 이의 상보체와, 8개 이상의 연속 뉴클레오타이드 (예: 8개 이상의 연속 뉴클레오타이드, 10개 이상의 연속 뉴클레오타이드, 12개 이상의 연속 뉴클레오타이드, 15개 이상의 연속 뉴클레오타이드, 또는 20개 이상의 연속 뉴클레오타이드)에 대해 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% 이상 동일하거나 또는 100% 동일하다.

[0692] 일부 구체예에서, 상기 단일 가이드 핵산 (예: 가이드 RNA)의 뉴클레오타이드의 2개의 상보적인 스트레치들 중 하나 (또는 상기 스트레치를 코딩하는 DNA)는 국제 특허 출원 번호 PCT/US2016/052690 및 PCT/US2017/062617에 기재된 표적인자 (crRNA) 서열 또는 활성인자 (tracrRNA) 서열들 중 하나 또는 이들의 상보체와, 8개 이상의 연속 뉴클레오타이드 (예: 8개 이상의 연속 뉴클레오타이드, 10개 이상의 연속 뉴클레오타이드, 12개 이상의 연속 뉴클레오타이드, 15개 이상의 연속 뉴클레오타이드, 또는 20개 이상의 연속 뉴클레오타이드)에 대해 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% 이상 동일하거나 또는 100% 동일하다.

[0693] 표적인자 및 활성인자의 적절한 동족 쌍 (cognate pairs)은 종명 (species name) 및 염기쌍 형성 (단백질-결합 도메인의 dsRNA 듀플렉스의 경우)을 고려하여 통상적으로 결정될 수 있다. 임의의 활성인자/표적인자 쌍이 이중

가이드 핵산 (예: 가이드 RNA)의 일부로서 또는 단일 가이드 핵산 (예: 가이드 RNA)의 일부로서 사용될 수 있다.

[0694] 일부 구체예에서, 이중 가이드 핵산 (예: 가이드 RNA) (예: 이중 가이드 RNA) 또는 단일 가이드 핵산 (예: 가이드 핵산) (예: 단일 가이드 RNA)의 활성인자 (예: trRNA, trRNA-유사 분자 등)는 국제 특허 출원 번호 PCT/US2016/052690 및 PCT/US2017/062617에 기재된 활성인자 (tracrRNA) 분자, 또는 이의 상보체와, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% 이상, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오타이드의 스트레치를 포함한다.

[0695] 일부 구체예에서, 이중 가이드 핵산 (예: 이중 가이드 RNA) 또는 단일 가이드 핵산 (예: 단일 가이드 RNA)의 활성인자 (예: trRNA, trRNA-유사 분자 등)는 30개 이상의 뉴클레오타이드 (nt) (예: 40개 이상, 50개 이상, 60개 이상, 70개 이상, 75개 이상의 nt)를 포함한다. 일부 구체예에서, 이중 가이드 핵산 (예: 이중 가이드 RNA) 또는 단일 가이드 핵산 (예: 단일 가이드 RNA)의 활성인자 (예: trRNA, trRNA-유사 분자 등)는 30 내지 200개의 뉴클레오타이드 (nt) 범위의 길이를 갖는다.

[0696] 상기 단백질-결합 세그먼트는 10개의 뉴클레오타이드 내지 100개의 뉴클레오타이드의 길이를 가질 수 있다.

[0697] 또한, 대상 단일 가이드 핵산 (예: 단일 가이드 RNA) 및 대상 이중 가이드 핵산 (예: 이중 가이드 RNA) 모두와 관련하여, 상기 단백질-결합 세그먼트의 dsRNA 듀플렉스는 6개의 염기쌍 (base pair: bp) 내지 50 bp의 길이를 가질 수 있다. 단백질-결합 세그먼트의 dsRNA 듀플렉스를 형성하기 위해 혼성화되는 뉴클레오타이드 서열들 간의 상보성 퍼센트는 60% 이상일 수 있다. 예를 들어, 상기 단백질-결합 세그먼트의 dsRNA 듀플렉스를 형성하기 위해 혼성화되는 뉴클레오타이드 서열들 간의 상보성 퍼센트는 65% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 98% 이상 또는 99% 이상일 수 있으며, 예를 들어, 일부 구체예에서, 혼성화되지 않고 따라서 dsRNA 듀플렉스 내에 돌출부 (bulge)를 형성하는 일부 뉴클레오타이드가 있다. 일부 구체예에서, 상기 단백질-결합 세그먼트의 dsRNA 듀플렉스를 형성하기 위해 혼성화되는 뉴클레오타이드 서열들 간의 상보성 퍼센트는 100%이다.

[0698] 혼성 가이드 핵산 (Hybrid guide nucleic acids)

[0699] 일부 구체예에서, 가이드 핵산은 2개의 RNA 분자 (이중 가이드 RNA)이다. 일부 구체예에서, 가이드 핵산은 1개의 RNA 분자 (단일 가이드 RNA)이다. 일부 구체예에서, 가이드 핵산은 DNA/RNA 혼성 분자이다. 이러한 구체예에서, 상기 가이드 핵산의 단백질-결합 세그먼트는 RNA이고, RNA 듀플렉스를 형성한다. 따라서 상기 활성인자와 표적인자의 듀플렉스-형성 세그먼트는 RNA이다. 그러나 가이드 핵산의 표적화 세그먼트는 DNA일 수 있다. 따라서, DNA/RNA 혼성 가이드 핵산이 이중 가이드 핵산인 경우, 상기 "표적인자" 분자는 혼성 분자일 수 있다 (예: 표적화 세그먼트는 DNA일 수 있고, 듀플렉스-형성 세그먼트는 RNA일 수 있음). 이러한 구체예에서, (예를 들어, 표적인자 분자의 듀플렉스-형성 세그먼트를 갖는 RNA-듀플렉스를 형성하기 위해) "활성인자" 분자의 듀플렉스-형성 세그먼트는 RNA일 수 있는 반면에, 듀플렉스-형성 세그먼트의 외부에 있는 "활성인자" 분자의 뉴클레오타이드는 DNA (활성인자 분자가 혼성 DNA/RNA 분자인 경우)일 수 있거나, 또는 RNA (활성인자 분자가 RNA인 경우)일 수 있다. DNA/RNA 혼성 가이드 핵산이 단일 가이드 핵산인 경우, 상기 표적화 세그먼트는 DNA일 수 있고, 듀플렉스-형성 세그먼트 (단일 가이드 핵산의 단백질-결합 세그먼트를 구성함)는 RNA일 수 있으며, 상기 표적화 및 듀플렉스-형성 세그먼트 외부의 뉴클레오타이드는 RNA 또는 DNA일 수 있다.

[0700] DNA/RNA 혼성 가이드 핵산은 일부 구체예에서, 예를 들어 표적 핵산이 RNA인 경우, 유용할 수 있다. Cas9는 통상 표적 DNA와 혼성화되는 가이드 RNA와 회합하여, 표적 부위에서 DNA-RNA 듀플렉스를 형성한다. 그러므로, 상기 표적 핵산이 RNA 인 경우, RNA 대신 DNA인 (가이드 핵산의) 표적화 세그먼트를 이용하여 표적 부위에서 DNA-RNA 듀플렉스를 재현시키는 (recapitulate) 것이 때때로 유리하다. 그러나, 가이드 핵산의 단백질-결합 세그먼트는 RNA-듀플렉스이기 때문에, 표적인자 분자는 표적화 세그먼트에서는 DNA이고, 듀플렉스-형성 세그먼트에서는 RNA이다. 혼성 가이드 핵산은 이중가닥 표적 핵산에 비해 단일가닥 표적 핵산에 Cas9 결합을 편향시킬 수 있다.

[0701] 예시되는 가이드 핵산

[0702] 임의의 가이드 핵산이 사용될 수 있다. 다수의 상이한 타입의 가이드 핵산이 당해 분야에서 알려져 있다. 선택된 가이드 핵산은 사용되는 특정 CRISPR 시스템 (예: 특정한 RNA 가이드 엔도뉴클레아제가 사용됨)과 적절하게 페어링 (pairing)될 것이다. 따라서, 상기 가이드 핵산은 예를 들어 본원에 기재되거나 또는 당해 분야에서 알려져 있는 임의의 RNA 가이드 엔도뉴클레아제에 상응하는 가이드 핵산일 수 있다. 가이드 핵산 및 RNA 가이드

엔도뉴클레아제는 예를 들어 국제 특허 출원 번호 PCT/US2016/052690 및 PCT/US2017/062617에 기재되어 있다.

- [0703] 일부 구체예에서, 적절한 가이드 핵산은 2개의 개별 RNA 폴리뉴클레오티드 분자를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 2개의 개별 RNA 폴리뉴클레오티드 분자들 중 제1 분자 (활성인자)는 국제 특허 출원 번호 PCT/US2016/052690 및 PCT/US2017/062617에 기재된 뉴클레오티드 서열들 중 어느 하나 또는 이의 상보체와, 8개 이상의 연속 뉴클레오티드 (예: 8개 이상의 연속 뉴클레오티드, 10개 이상의 연속 뉴클레오티드, 12개 이상의 연속 뉴클레오티드, 15개 이상의 연속 뉴클레오티드, 또는 20개 이상의 연속 뉴클레오티드)의 스트레치에 대해, 60% 이상 (예: 65% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 98% 이상, 99% 이상, 또는 100%)의 뉴클레오티드 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 2개의 개별 RNA 폴리뉴클레오티드 분자들 중 제2 분자 (표적인자)는 국제 특허 출원 번호 PCT/US2016/052690 및 PCT/US2017/062617에 기재된 뉴클레오티드 서열들 중 어느 하나 또는 이의 상보체와, 8개 이상의 연속 뉴클레오티드 (예: 8개 이상의 연속 뉴클레오티드, 10개 이상의 연속 뉴클레오티드, 12개 이상의 연속 뉴클레오티드, 15개 이상의 연속 뉴클레오티드, 또는 20개 이상의 연속 뉴클레오티드)의 스트레치에 대해, 60% 이상 (예: 65% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 98% 이상, 99% 이상, 또는 100%)의 뉴클레오티드 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.
- [0704] 일부 구체예에서, 적절한 가이드 핵산은 단일 RNA 폴리뉴클레오티드이고, 국제 특허 출원 번호 PCT/US2016/052690 및 PCT/US2017/062617에 기재된 뉴클레오티드 서열들 중 어느 하나 또는 이의 상보체와, 8개 이상의 연속 뉴클레오티드 (예: 8개 이상의 연속 뉴클레오티드, 10개 이상의 연속 뉴클레오티드, 12개 이상의 연속 뉴클레오티드, 15개 이상의 연속 뉴클레오티드, 또는 20개 이상의 연속 뉴클레오티드)의 스트레치에 대해 60% 이상 (예: 65% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 98% 이상, 99% 이상, 또는 100%)의 뉴클레오티드 서열 동일성을 갖는 제1 및 제2 뉴클레오티드 서열을 포함한다.
- [0705] 일부 구체예에서, 상기 가이드 RNA는 Cpf1 및/또는 Cas9 가이드 RNA이다. Cpf1 및/또는 Cas9 가이드 RNA는 30개의 뉴클레오티드 (nt) 내지 100 nt 예컨대 30 nt 내지 40 nt, 40 nt 내지 45 nt, 45 nt 내지 50 nt, 50 nt 내지 60 nt, 60 nt 내지 70 nt, 70 nt 내지 80 nt, 80 nt 내지 90 nt, 또는 90 nt 내지 100 nt의 총 길이를 가질 수 있다. 일부 구체예에서, Cpf1 및/또는 Cas9 가이드 RNA는 35 nt, 36 nt, 37 nt, 38 nt, 39 nt, 40 nt, 41 nt, 42 nt, 43 nt, 44 nt, 45 nt, 46 nt, 47 nt, 48 nt, 49 nt, 또는 50 nt의 총 길이를 갖는다. Cpf1 및/또는 Cas9 가이드 RNA는 표적 핵산-결합 세그먼트 및 듀플렉스-형성 세그먼트를 포함할 수 있다.
- [0706] Cpf1 및/또는 Cas9 가이드 RNA의 표적 핵산-결합 세그먼트는 15 nt 내지 30 nt 예컨대 15 nt, 16 nt, 17 nt, 18 nt, 19 nt, 20 nt, 21 nt, 22 nt, 23 nt, 24 nt, 25 nt, 26 nt, 27 nt, 28 nt, 29 nt, 또는 30 nt의 길이를 가질 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 표적 핵산-결합 세그먼트는 23 nt의 길이를 갖는다. 일부 구체예에서, 상기 표적 핵산-결합 세그먼트는 24 nt의 길이를 갖는다. 일부 구체예에서, 상기 표적 핵산-결합 세그먼트는 25 nt의 길이를 갖는다.
- [0707] Cpf1 및/또는 Cas9 가이드 RNA의 표적 핵산-결합 세그먼트는 표적 핵산 서열의 상응하는 길이와 100% 상보성을 가질 수 있다. 상기 표적화 세그먼트는 표적 핵산 서열의 상응하는 길이와 100% 미만의 상보성을 가질 수 있다. 예를 들어, Cpf1 및/또는 Cas9 가이드 RNA의 표적 핵산 결합 세그먼트는 표적 핵산 서열에 상보적이 지 않은 1, 2, 3, 4, 또는 5개의 뉴클레오티드를 가질 수 있다. 예를 들어, 일부 구체예에서, 표적 핵산-결합 세그먼트가 25개의 뉴클레오티드 길이를 갖는 경우, 표적 핵산 서열이 25개의 뉴클레오티드 길이를 가지며, 일부 구체예에서, 표적 핵산-결합 세그먼트는 표적 핵산 서열에 100% 상보성을 갖는다. 또 다른 예로서, 일부 구체예에서, 표적 핵산-결합 세그먼트가 25개의 뉴클레오티드의 길이를 갖는 경우, 표적 핵산 서열이 25개의 뉴클레오티드의 길이를 가지며, 일부 구체예에서, 표적 핵산-결합 세그먼트는 표적 핵산 서열과 1개의 비-상보적 뉴클레오티드 및 24개의 상보적 뉴클레오티드를 갖는다.
- [0708] Cpf1 및/또는 Cas9 가이드 RNA의 듀플렉스-형성 세그먼트는 15 nt 내지 25 nt 예컨대 15 nt, 16 nt, 17 nt, 18 nt, 19 nt, 20 nt, 21 nt, 22 nt, 23 nt, 24 nt, 또는 25 nt의 길이를 가질 수 있다.
- [0709] 일부 구체예에서, Cpf1 가이드 RNA의 듀플렉스-형성 세그먼트는 뉴클레오티드 서열 5'-AAUUCUACUGUUGUAGAU-3'를 포함할 수 있다.
- [0710] 추가적인 요소
- [0711] 일부 구체예에서, 가이드 핵산 (예: 가이드 RNA)은 추가적인 하나의 세그먼트 또는 세그먼트들 (일부 구체예에서는 5' 말단, 일부 구체예에서는 3' 말단, 일부 구체예에서는 5' 또는 3' 말단, 일부 구체예에서는 서열 내에

매립 (embedded) (즉, 5' 및/또는 3' 말단이 아님), 일부 구체예에서는 5' 말단과 3' 말단 모두, 일부 구체예에서는 매립되고, 5' 말단 및/또는 3' 말단에 존재함)을 포함한다. 예를 들어, 적절한 추가적인 세그먼트는 5' 캡 (cap) (예: 7-메틸구아닐레이트 캡 (m^7G)); 3' 폴리아데닐화 테일 (tail) (즉, 3' 폴리(A) 테일); 리보자임 서열 (예: 가이드 핵산 또는 가이드 핵산의 성분 예컨대 표적인자, 활성인자 등의 자가-절단을 허용하기 위해); 리보스위치 서열 (예: 단백질 및 단백질 복합체에 의한 조절된 안정성 및/또는 조절된 접근성을 허용하기 위해); dsRNA 듀플렉스를 형성하는 서열 (즉, 헤어핀); RNA를 세포하 (subcellular) 위치 (예: 핵, 미토콘드리아, 엽록체 등)로 표적화하는 서열; 주적을 제공하는 변형 또는 서열 (예: 표지 예컨대 형광 분자 (즉, 형광 염료), 형광 검출을 용이하게 하는 서열 또는 기타 모이어티); 단백질 (예: 전사 활성인자, 전사 억제인자, DNA 메틸트랜스퍼라제, DNA 데메틸라제, 히스톤 아세틸트랜스퍼라제, 히스톤 데아세틸라제, RNA에 결합하는 단백질 (예: RNA 압타머), 표지된 단백질, 형광표지된 단백질 등을 포함하는, DNA에 작용하는 단백질)에 결합 부위를 제공하는 서열 또는 기타 변형; 증가된, 감소된 및/또는 제어 가능한 안정성을 제공하는 변형 또는 서열; 및 이들의 조합을 포함할 수 있다.

[0712] RNA-가이드 엔도뉴클레아제 (RNA-Guided Endonuclease)

[0713] 가이드 핵산에 추가하여 또는 이에 대신하여, 상기 조성물은 RNA-가이드 엔도뉴클레아제 단백질 또는 이를 코딩하는 핵산 (예: mRNA 또는 벡터)을 포함할 수 있다. 임의의 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 사용할 수 있다. 사용되는 RNA-가이드 엔도뉴클레아제의 선택은 사용되는 CRISPR 시스템의 의도된 최종 용도에 적어도 부분적으로 좌우될 것이다.

[0714] 일부 구체예에서, 상기 폴리펩티드는 Cas 9 폴리펩티드이다. 본 개시내용의 조성물 중에 포함시키기에 적합한 Cas9 폴리펩티드는 천연 (naturally-occurring) Cas9 폴리펩티드 (예: 박테리아 및/또는 고세균 세포에서 자연적으로 발생함), 또는 하기에 기재된 바와 같은 비-천연 Cas9 폴리펩티드 (예: Cas9 폴리펩티드는 변이체 Cas9 폴리펩티드, 하기에 논의되는 키메라 폴리펩티드 등)를 포함한다. 일부 구체예에서, 통상의 기술자는 본원에 개시된 Cas9 폴리펩티드가 임의의 출처로부터 유래되거나 또는 단리된 임의의 변이체일 수 있음을 이해할 수 있다. 다른 구체예에서, 본 개시내용의 Cas9 펩티드는 문헌에 기재된 하나 이상의 돌연변이를 포함할 수 있고, 하기에 문헌에 기재된 기능적 돌연변이를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다: Fonfara et al. Nucleic Acids Res. 2014 Feb;42(4):2577-90; Nishimasu H. et al. Cell. 2014 Feb 27;156(5):935-49; Jinek M. et al. Science. 2012 337:816-21; 및 Jinek M. et al. Science. 2014 Mar 14;343(6176); 또한 미국특허 출원 제13/842,859호 (2013년 3월 15일자 출원)를 참조하고, 이는 본원에 참조로 통합됨; 또한 미국특허 번호 8,697,359; 8,771,945; 8,795,965; 8,865,406; 8,871,445; 8,889,356; 8,895,308; 8,906,616; 8,932,814; 8,945,839; 8,993,233; 및 8,999,641을 참조하고, 이들 모두는 본원에 참조로 통합된다. 따라서, 일부 구체예에서, 본원에 개시된 시스템 및 방법은 이중가닥 뉴클레아제 활성을 갖는 야생형 Cas9 단백질, 단일가닥 Nickase (nickases)로서 작용하는 Cas9 돌연변이체, 또는 변형된 뉴클레아제 활성을 갖는 다른 돌연변이체와 함께 사용될 수 있다. 이와 같이, 본 개시내용의 조성물 중에 포함시키기에 적합한 Cas9 폴리펩티드는 효소적으로 활성인 Cas9 폴리펩티드일 수 있으며, 예를 들어 표적 핵산에서 단일가닥 또는 이중가닥 절단물 (breaks)을 만들 수 있거나, 또는 대안으로서 야생형 Cas9 폴리펩티드에 비해 감소된 효소 활성을 가질 수 있다.

[0715] 천연 Cas9 폴리펩티드는 가이드 핵산에 결합하여, 표적 핵산 (표적 부위) 내의 특이적 서열로 유도되고, 표적 핵산을 절단한다 (예: 이중가닥 절단물 생성을 위한 dsDNA 절단, ssDNA 절단, ssRNA 절단 등). 대상 Cas9 폴리펩티드는 RNA-결합 부분 및 활성 부분의 두 부분을 포함한다. 상기 RNA-결합 부분은 대상 가이드 핵산과 상호 작용하고, 활성 부분은 부위-지정 (site-directed) 효소 활성 (예: 뉴클레아제 활성, DNA 및/또는 RNA 메틸화 활성, DNA 및/또는 RNA 절단 활성, 히스톤 아세틸화 활성, 히스톤 메틸화 활성, RNA 변형 활성, RNA-결합 활성, RNA 스플라이싱 활성 등)을 나타낸다. 일부 구체예에서, 상기 활성 부분은 야생형 Cas9 폴리펩티드의 상응하는 부분에 비해 감소된 뉴클레아제 활성을 나타낸다. 일부 구체예에서, 상기 활성 부분은 효소적으로 불활성이다.

[0716] 단백질이 대상 가이드 핵산과 상호 작용하는 RNA-결합 부분을 갖는지 여부를 결정하는 분석은 단백질과 핵산 간의 결합을 테스트하는 임의의 편리한 결합 분석일 수 있다. 예시되는 결합 분석은 가이드 핵산 및 Cas9 폴리펩티드를 표적 핵산에 부가하는 단계를 포함하는 결합 분석 (예: 겔 이동 분석 (gel shift assays))을 포함한다.

[0717] 단백질이 활성 부분을 갖는지 여부를 결정하기 위한 (예: 폴리펩티드가 표적 핵산을 절단하는 뉴클레아제 활성을 갖는지를 결정하기 위한) 분석은 핵산 절단을 테스트하는 임의의 편리한 핵산 절단 분석일 수 있다. 예시되는 절단 분석은 가이드 핵산 및 Cas9 폴리펩티드를 표적 핵산에 부가하는 단계를 포함한다.

[0718] 일부 구체예에서, 본 개시내용의 조성물 중에 포함시키기에 적합한 Cas9 폴리펩티드는 표적 핵산을 변형시키는

효소 활성 (예: 뉴클레아제 활성, 메틸트랜스퍼라제 활성, 데메틸라제 활성, DNA 복구 활성, DNA 손상 활성, 탈아미노화 활성, 디스뮤타제 활성, 알킬화 활성, 탈퓨린화 (depurination) 활성, 산화 활성, 피리미딘 이량체 형성 활성, 인테그라제 활성, 트랜스포사제 활성, 재조합효소 활성, 폴리머라제 활성, 리가제 활성, 헬리카제 활성, 광분해 효소 (photolyase) 활성 또는 글리코실라제 활성)을 갖는다.

[0719] 다른 구체예에서, 본 개시내용의 조성물 중에 포함시키기에 적합한 Cas9 폴리펩티드는 표적 핵산과 관련된 폴리펩티드 (예: 히스톤)를 변형시키는 효소 활성 (예: 메틸트랜스퍼라제 활성, 데메틸라제 활성, 아세틸트랜스퍼라제 활성, 데아세틸라제 활성, 키나제 활성, 포스파타제 활성, 유비퀴틴 리가제 활성, 탈유비퀴틴화 (deubiquitinating) 활성, 아데닐화 활성, 탈아데닐화 활성, SUMO일화 (SUMOylating) 활성, 탈SUMO일화 (deSUMOylating) 활성, 리보실화 활성, 탈리보실화 활성, 미리스토일화 활성 또는 탈미리스토일화 활성)을 갖는다.

[0720] 다양한 종으로부터 유래된 다수의 Cas9 오르톨로그 (orthologue)가 확인되었으며, 일부 구체예에서 단백질은 단지 수 개의 동일한 아미노산을 공유한다. 확인된 모든 Cas9 오르톨로그는 중앙 HNH 엔도뉴클레아제 도메인 및 분할 (split) RuvC/RNaseH 도메인이 있는 동일한 도메인 아키텍처 (architecture)를 가지고 있다. Cas9 단백질은 보존된 아키텍처와 4개의 주요 모티프를 공유한다. 모티프 1, 2 및 4는 RuvC 유사 모티프이고, 모티프 3은 HNH-모티프이다.

[0721] 일부 구체예에서, 적절한 Cas9 폴리펩티드는 4개의 모티프를 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 각 모티프 1-4는 도 1에 도시된 Cas9 아미노산 서열 (서열번호: 1); 또는 대안으로서 하기 표 1에 도시된 Cas9 아미노산 서열의 모티프 1-4; 또는 대안으로서 도 1에 도시된 Cas9 아미노산 서열 (서열번호: 1)의 아미노산 7-166 또는 731-1003에 대해 60% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 99% 이상, 또는 100%의 아미노산 서열 동일성을 갖는다.

[0722] 일부 구체예에서, Cas9 폴리펩티드는 도 1에 도시되고 서열번호: 1에 제시된 아미노산 서열에 대해 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 또는 98%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고; 서열번호: 1에 제시된 아미노산 서열에 대해 N497, R661, Q695, 및 Q926의 아미노산 치환을 포함하거나; 또는 서열번호: 1에 제시된 아미노산 서열에 대해 K855의 아미노산 치환을 포함하거나; 또는 서열번호: 1에 제시된 아미노산 서열에 대해 K810, K1003, 및 R1060의 아미노산 치환을 포함하거나; 또는 서열번호: 1에 제시된 아미노산 서열에 대해 K848, K1003, 및 R1060의 아미노산 치환을 포함한다.

[0723] 본원에서 사용된, 용어 "Cas9 폴리펩티드"는 용어 "변이체 Cas9 폴리펩티드"를 포함하고; 용어 "변이체 Cas9 폴리펩티드"는 용어 "키메라 Cas9 폴리펩티드"를 포함한다.

[0724] 변이체 Cas9 폴리펩티드

[0725] 본 개시내용의 조성물 중에 포함시키기에 적합한 Cas9 폴리펩티드는 변이체 Cas9 폴리펩티드를 포함한다. 변이체 Cas9 폴리펩티드는 야생형 Cas9 폴리펩티드 (예: 전술된 바와 같은, 천연 Cas9 폴리펩티드)의 아미노산 서열과 비교할 때 하나의 아미노산이 상이한 (예: 결실, 삽입, 치환, 융합을 가짐) 아미노산 서열을 갖는다 (즉, 적어도 하나의 아미노산이 상이하다). 일부 경우에, 상기 변이체 Cas9 폴리펩티드는 Cas9 폴리펩티드의 뉴클레아제 활성을 감소시키는 아미노산 변화 (예: 결실, 삽입, 또는 치환)를 갖는다. 예를 들어, 일부 경우에, 상기 변이체 Cas9 폴리펩티드는 상응하는 야생형 Cas9 폴리펩티드의 뉴클레아제 활성의 50% 미만, 40% 미만, 30% 미만, 20% 미만, 10% 미만, 5% 미만, 또는 1% 미만을 갖는다. 일부 구체예에서, 상기 변이체 Cas9 폴리펩티드는 실질적인 뉴클레아제 활성을 갖지 않는다. Cas9 폴리펩티드가 실질적인 뉴클레아제 활성을 갖지 않는 변이체 Cas9 폴리펩티드인 경우, 이를 "dCas9"로 지칭할 수 있다.

[0726] 일부 구체예에서, 변이체 Cas9 폴리펩티드는 감소된 뉴클레아제 활성을 갖는다. 예를 들어, 본 개시내용의 결합 방법에 사용하기에 적합한 변이체 Cas9 폴리펩티드는 야생형 Cas9 폴리펩티드 예컨대 도 1에 도시된 아미노산 서열 (서열번호: 1)을 포함하는 야생형 Cas9 폴리펩티드의 엔도뉴클레아제 활성의 약 20% 미만, 약 15% 미만, 약 10% 미만, 약 5% 미만, 약 1% 미만, 또는 약 0.1% 미만을 나타낸다.

[0727] 일부 구체예에서, 변이체 Cas9 폴리펩티드는 표적 핵산의 상보적 가닥을 절단할 수 있지만, 이중가닥 표적 핵산의 비-상보적 가닥을 절단하는 능력이 감소한다. 예를 들어, 상기 변이체 Cas9 폴리펩티드는 RuvC 도메인 (예: 도 1의 "도메인 1")의 기능을 감소시키는 돌연변이 (아미노산 치환)를 가질 수 있다. 비-제한적인 예로서, 일부 구체예에서, 변이체 Cas9 폴리펩티드는 D10A 돌연변이 (예: 서열번호: 1의 위치 10에 상응하는 아미노산 위치에서 아스파테이트의 알라닌으로의 돌연변이)를 갖고, 그러므로 이중가닥 표적 핵산의 상보적 가닥을 절단할 수

있지만, 이중가닥 표적 핵산의 비-상보적 가닥을 절단하는 능력이 감소한다 (따라서, 변이체 Cas9 폴리펩티드가 이중가닥 표적 핵산을 절단하는 경우 이중가닥 절단물 (DSB) 대신에 단일가닥 절단물 (SSB)을 생성함)(예를 들어, Jinek et al., Science. 2012 Aug 17;337(6096):816-21 참조).

- [0728] 일부 구체예에서, 변이체 Cas9 폴리펩티드는 이중가닥 표적 핵산의 비-상보적 가닥을 절단할 수 있지만, 표적 핵산의 상보적 가닥을 절단하는 능력이 감소한다. 예를 들어, 상기 변이체 Cas9 폴리펩티드는 HNH 도메인 (RuvC/HNH/RuvC 도메인 모티프, 도 1의 "도메인 2")의 기능을 감소시키는 돌연변이 (아미노산 치환)를 가질 수 있다. 비-제한적인 예로서, 일부 구체예에서, 상기 변이체 Cas9 폴리펩티드는 H840A 돌연변이 (예: 서열번호: 1의 위치 840에 상응하는 아미노산 위치에서 히스티딘의 알라닌으로의 돌연변이) (도 1)를 가질 수 있으며, 그러므로 표적 핵산의 비-상보적 가닥을 절단하지만, 표적 핵산의 상보적 가닥을 절단하는 능력이 감소하였다 (따라서 상기 변이체 Cas9 폴리펩티드가 이중가닥 표적 핵산을 절단하는 경우 DSB 대신에 SSB를 생성함). 이러한 Cas9 폴리펩티드는 표적 핵산 (예: 단일가닥 표적 핵산)을 절단하는 능력은 감소되었지만, 표적 핵산 (예: 단일가닥 또는 이중가닥 표적 핵산)에 결합하는 능력은 유지된다.
- [0729] 일부 구체예에서, 변이체 Cas9 폴리펩티드는 이중가닥 표적 핵산의 상보적 및 비-상보적 가닥들 모두를 절단하는 능력이 감소하였다. 비-제한적인 예로서, 일부 구체예에서, 상기 변이체 Cas9 폴리펩티드는 D10A 및 H840A 돌연변이 모두 (예: RuvC 도메인 및 HNH 도메인 모두에서의 돌연변이)를 보유하여, 상기 폴리펩티드는 이중가닥 표적 핵산의 상보적 및 비-상보적 가닥 모두를 절단하는 능력이 감소하였다. 이러한 Cas9 폴리펩티드는 표적 핵산 (예: 단일가닥 표적 핵산 또는 이중가닥 표적 핵산)을 절단하는 능력은 감소되지만, 표적 핵산 (예: 단일가닥 표적 핵산 또는 이중가닥 표적 핵산)에 결합하는 능력은 유지된다.
- [0730] 다른 비-제한적인 예로서, 일부 구체예에서, 상기 변이체 Cas9 폴리펩티드는 W476A 및 W1126A 돌연변이를 가져서, 상기 폴리펩티드가 표적 핵산을 절단하는 능력이 감소하였다. 이러한 Cas9 폴리펩티드는 표적 핵산을 절단하는 능력은 감소되지만, 표적 핵산에 결합하는 능력은 유지된다.
- [0731] 다른 비-제한적인 예로서, 일부 구체예에서, 상기 변이체 Cas9 폴리펩티드는 P475A, W476A, N477A, D1125A, W1126A, 및 D1127A 돌연변이를 가져서, 상기 폴리펩티드는 표적 핵산을 절단하는 능력이 감소하였다. 이러한 Cas9 폴리펩티드는 표적 핵산을 절단하는 능력은 감소되지만, 표적 핵산에 결합하는 능력은 유지된다.
- [0732] 다른 비-제한적인 예로서, 일부 구체예에서, 상기 변이체 Cas9 폴리펩티드는 H840A, W476A 및 W1126A 돌연변이를 가져서, 상기 폴리펩티드는 표적 핵산을 절단하는 능력이 감소하였다. 이러한 Cas9 폴리펩티드는 표적 핵산을 절단하는 능력은 감소되지만, 표적 핵산에 결합하는 능력은 유지된다.
- [0733] 다른 비-제한적인 예로서, 일부 구체예에서, 상기 변이체 Cas9 폴리펩티드는 H840A, D10A, W476A, 및 W1126A 돌연변이를 가져서, 상기 폴리펩티드는 표적 핵산을 절단하는 능력이 감소하였다. 이러한 Cas9 폴리펩티드는 표적 핵산을 절단하는 능력은 감소되지만, 표적 핵산에 결합하는 능력은 유지된다.
- [0734] 다른 비-제한적인 예로서, 일부 구체예에서, 상기 변이체 Cas9 폴리펩티드는 H840A, P475A, W476A, N477A, D1125A, W1126A, 및 D1127A 돌연변이를 가져서 상기 폴리펩티드는 표적 핵산을 절단하는 능력이 감소하였다. 이러한 Cas9 폴리펩티드는 표적 핵산을 절단하는 능력은 감소되지만, 표적 핵산에 결합하는 능력은 유지된다.
- [0735] 다른 비-제한적인 예로서, 일부 구체예에서, 상기 변이체 Cas9 폴리펩티드는 D10A, H840A, P475A, W476A, N477A, D1125A, W1126A, 및 D1127A 돌연변이를 가져서, 상기 폴리펩티드는 표적 핵산을 절단하는 능력이 감소하였다. 이러한 Cas9 폴리펩티드는 표적 핵산을 절단하는 능력은 감소되지만, 표적 핵산에 결합하는 능력은 유지된다.
- [0736] 전술된 효과 (즉, 하나 또는 나머지 뉴클레아제 부분을 비활성화시키는 효과)를 달성하기 위해 다른 잔기가 돌연변이될 수 있다. 비-제한적인 예로서, 잔기 D10, G12, G17, E762, H840, N854, N863, H982, H983, A984, D986, 및/또는 A987이 변경 (즉, 치환)될 수 있다 (Cas9 아미노산 잔기의 보존에 관한 추가적인 정보에 대해 하기 표 1 참조). 또한, 알라닌 치환 이외의 돌연변이가 적합하다.
- [0737] 일부 구체예에서, 감소된 촉매 활성을 갖는 변이체 Cas9 폴리펩티드 (예: Cas9 단백질이 D10, G12, G17, E762, H840, N854, N863, H982, H983, A984, D986, 및/또는 A987 돌연변이 예컨대 D10A, G12A, G17A, E762A, H840A, N854A, N863A, H982A, H983A, A984A, 및/또는 D986A를 갖는 경우), 상기 변이체 Cas9 폴리펩티드는 가이드 핵산과 상호 작용할 수 있는 능력을 유지하는 한 부위-특이적 방식으로 표적 핵산에 여전히 결합할 수 있다 (이는 가이드 핵산에 의해 표적 핵산 서열로 여전히 가이드되기 때문임).

표 1

[0738] 표 1은 다양한 종 유래의 Cas9 서열에 존재하는 4개의 모티프를 열거한다. 본원에 열거된 아미노산은 *S. pyogenes*의 Cas9 (서열번호: 1)로부터 유래한다.

모티프	모티프	아미노산 (잔기 번호)	고도로 보존된 잔기
1	RuvC	IGLDIGTNSVGWAVI (7-21) (서열번호: 3)	D10, G12, G17
2	RuvC	IVIMARE (759-766) (서열번호: 4)	E762
3	HNH-모티프	DVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLRSDKN (837-863) (서열번호: 5)	H840, N854, N863
4	RuvC	HHAHDAYL (982-989) (서열번호: 6)	H982, H983, A984, D986, A987

[0739] 전술된 것에 추가하여, 변이체 Cas9 단백질은 Cas9 폴리펩티드에 대해 전술된 바와 같이 서열 동일성에 대해 동일한 파라미터를 가질 수 있다. 따라서, 일부 구체예에서, 적절한 변이체 Cas9 폴리펩티드는 4개의 모티프를 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 각 모티프 1-4는 도 1에 도시된 Cas9 아미노산 서열 (서열번호: 1), 또는 대안으로서 모티프 1-4 (서열번호: 1의 모티프 1-4는 표 1에 나타난 바와 같이 각각 서열번호: 3-6임); 또는 대안으로서 도 1에 도시된 Cas9 아미노산 서열 (서열번호: 1)의 아미노산 7-166 또는 731-1003에 대해 60% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 99% 이상 또는 100%의 아미노산 서열 동일성을 갖는다. 상기에 정의된 임의의 Cas9 단백질은 본 개시내용의 조성물에서 Cas9 폴리펩티드로서, 또는 키메라 Cas9 폴리펩티드의 일부로서 사용될 수 있고, 국제 특허 출원 번호 PCT/US2016/052690 및 PCT/US2017/062617에 특별히 언급된 것을 포함한다.

[0740] 일부 구체예에서, 적절한 변이체 Cas9 폴리펩티드는 도 1에 도시된 Cas9 아미노산 서열 (서열번호: 1)에 대해 60% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 99% 이상, 또는 100%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 상기 정의된 임의의 Cas9 단백질은 본 개시내용의 조성물에서 변이체 Cas9 폴리펩티드로서, 또는 키메라 변이체 Cas9 폴리펩티드의 일부로서 사용될 수 있고, 국제 특허 출원 번호 PCT/US2016/052690 및 PCT/US2017/062617에 특별히 언급된 것을 포함한다.

[0741] 키메라 폴리펩티드 (융합 폴리펩티드)

[0742] 일부 구체예에서, 변이체 Cas9 폴리펩티드는 키메라 Cas9 폴리펩티드 (본원에서 융합 폴리펩티드 예컨대 "Cas9 융합 폴리펩티드"라고도 함)이다. Cas9 융합 폴리펩티드는 표적 핵산 (예: 절단, 메틸화, 탈메틸화 등) 및/또는 표적 핵산과 관련된 폴리펩티드 (예: 히스톤 테일의 메틸화, 아세틸화 등)에 결합하고 및/또는 이를 변형시킬 수 있다.

[0743] Cas9 융합 폴리펩티드는 야생형 Cas9 폴리펩티드 (예: 천연 Cas9 폴리펩티드)와 서열이 상이하다는 점에서 변이체 Cas9 폴리펩티드이다. Cas9 융합 폴리펩티드는 이중 폴리펩티드 (또한, "융합 파트너 (fusion partner)"로 언급됨)에 공유결합에 의해 융합된 Cas9 폴리펩티드 (예: 야생형 Cas9 폴리펩티드, 변이체 Cas9 폴리펩티드, (전술된 바와 같은) 뉴클레아제 활성이 감소된 변이체 Cas9 폴리펩티드 등)이다. 일부 구체예에서, Cas9 융합 폴리펩티드는 이중 폴리펩티드에 공유결합에 의해 융합된 감소된 뉴클레아제 활성을 갖는 변이체 Cas9 폴리펩티드 (예: dCas9)이다. 일부 구체예에서, 상기 이중 폴리펩티드는 Cas9 융합 폴리펩티드에 의해 또한 나타날 활성 (예: 효소 활성) (예: 메틸트랜스퍼라제 활성, 아세틸트랜스퍼라제 활성, 키나제 활성, 유비퀴틴화 활성 등)을 나타낸다 (따라서 제공한다). 이러한 일부 구체예에서, 예를 들어 상기 Cas9 폴리펩티드가 표적 핵산을 변형시키는 활성 (예: 효소 활성)을 갖는 융합 파트너를 갖는 (즉, 이중 폴리펩티드를 갖는) 변이체 Cas9 폴리펩티드인 것인 결합하는 방법에 있어서, 상기 방법은 또한 표적 핵산을 변형시키는 방법으로도 간주될 수 있다. 일부 구체예에서, 표적 핵산 (예: 단일가닥 표적 핵산)에 결합하는 방법은 표적 핵산의 변형을 초래할 수 있다. 따라서, 일부 구체예에서, 표적 핵산 (예: 단일가닥 표적 핵산)에 결합하는 방법은 표적 핵산을 변형시키는 방법일 수 있다.

[0744] 일부 구체예에서, 상기 이중 서열은 세포하 국소화 (subcellular localization)를 제공하고, 즉 상기 이중 서열은 세포하 국소화 서열 (예: 핵으로의 표적화를 위한 핵 국소화 신호 (NLS), 융합 단백질을 핵의 외부에 유지하기 위한 서열 예컨대 핵 방출 서열 (NES: nuclear export sequence), 융합 단백질을 세포질에 유지하기 위한 서열, 미토콘드리아로의 표적화를 위한 미토콘드리아 국소화 신호, 엽록체로의 표적화를 위한 엽록체 국소화 신호, 소포체 (ER) 유지 신호 등)이다. 일부 구체예에서, 변이체 Cas9는 NLS를 포함하지 않으므로 상기 단백질

은 핵에 표적화되지 않는다 (예를 들어, 상기 표적 핵산이 세포질에 존재하는 RNA인 경우 유리할 수 있음). 일부 구체예에서, 상기 이중 서열은 추적 및/또는 정제의 용이성을 위한 태그 (즉, 이중 서열이 검출 가능한 표지 임)를 제공할 수 있다(예: 형광 단백질 예컨대 녹색 형광 단백질 (GFP), YFP, RFP, CFP, mCherry, tdTomato 및 유사물; 히스티딘 태그 예컨대 6XHis 태그; 헤마글루티닌 (HA) 태그; FLAG 태그; Myc 태그; 및 유사물). 일부 구체예에서, 상기 이중 서열은 안정성의 증가 또는 감소를 제공할 수 있다 (즉, 상기 이중 서열은 안정성 제어 펩티드 예컨대 일부 구체예에서 제어 가능한 데그론 (degron) (예: 온도 민감성 또는 약물 제어 가능한 데그론 서열, 하기 참조)이다). 일부 구체예에서, 상기 이중 서열은 표적 핵산으로부터 전사의 증가 또는 감소를 제공할 수 있다 (즉, 상기 이중 서열은 전사 조절 서열 예컨대 전사 인자/활성인자 또는 이의 단편, 전사 인자/활성 인자를 동원하는 단백질 또는 이의 단편, 전사 억제인자 또는 이의 단편, 전사 억제인자를 동원하는 단백질 또는 이의 단편, 소분자/약물-반응성 전사 조절인자 등이다). 일부 구체예에서, 상기 이중 서열은 결합 도메인을 제공할 수 있다 (즉, 상기 이중 서열은 단백질 결합 서열로, 예를 들어 Cas9 융합 폴리펩티드가 다른 관심 단백질 예컨대 DNA 또는 히스톤 변형 단백질, 전사 인자 또는 전사 억제인자, 동원 단백질, RNA 변형 효소, RNA-결합 단백질, 번역 개시 인자, RNA 스플라이싱 인자 등에 결합하는 능력을 제공하는 단백질 결합 서열임). 이중 핵산 서열은 (예: 유전 공학에 의해) 다른 핵산 서열에 연결되어, 키메라 폴리펩티드를 코딩하는 키메라 뉴클레오타이드 서열을 생성할 수 있다.

[0745] 대상 Cas9 융합 폴리펩티드 (Cas9 융합 단백질)는 전술된 임의의 조합으로 다수 (1개 이상, 2개 이상, 3개 이상 등)의 융합 파트너를 가질 수 있다. 예시되는 예로서, Cas9 융합 단백질은 활성 (예: 전사 조절, 표적 변형, 표적 핵산과 관련된 단백질의 변형 등을 위한 활성)을 제공하는 이중 서열을 가질 수 있고, 또한 세포하 국소화 서열을 가질 수 있다. 일부 구체예에서, 이러한 Cas9 융합 단백질은 또한 추적 및/또는 정제의 용이성을 위한 태그 (예: 녹색 형광 단백질 (GFP), YFP, RFP, CFP, mCherry, tdTomato 및 유사물; 히스티딘 태그 예컨대 6XHis 태그; 헤마글루티닌 (HA) 태그; FLAG 태그; Myc 태그; 및 유사물)를 가질 수 있다. 다른 예시되는 예로서, Cas9 단백질은 1개 이상의 NLS (예: 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상, 1, 2, 3, 4 또는 5개의 NLS)를 가질 수 있다. 일부 구체예에서, 융합 파트너 (또는 다수의 융합 파트너) (예: NLS, 태그, 활성을 제공하는 융합 파트너 등)는 Cas9의 C-말단에 또는 그 부근에 위치한다. 일부 구체예에서, 융합 파트너 (또는 다수의 융합 파트너) (예: NLS, 태그, 활성을 제공하는 융합 파트너 등)는 Cas9의 N-말단에 위치한다. 일부 구체예에서, Cas9는 N-말단 및 C-말단 모두에 융합 파트너 (또는 다수의 융합 파트너) (예: NLS, 태그, 활성을 제공하는 융합 파트너 등)를 갖는다.

[0746] 안정성의 증가 또는 감소를 제공하는 적합한 융합 파트너는 데그론 서열을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 데그론은 이의 일부를 구성하는 단백질의 안정성을 조절하는 아미노산 서열인 것으로 통상의 기술자에 의해 쉽게 이해된다. 예를 들어, 데그론 서열을 포함하는 단백질의 안정성은 데그론 서열에 의해 부분적으로 제어된다. 일부 구체예에서, 적합한 데그론은 상기 데그론이 실험 대조군과 무관하게 단백질 안정성에 영향을 미치는 항시적 (constitutive)이다 (즉, 상기 데그론은 약물 유도성, 온도 유도성 등이 아님). 일부 구체예에서, 상기 데그론은 변이체 Cas9 폴리펩티드에 조절가능한 안정성을 제공하여, 상기 변이체 Cas9 폴리펩티드는 원하는 조건에 따라 "작동 (on)" (즉, 안정) 또는 "무작동 (off)" (즉, 불안정, 분해)될 수 있다. 예를 들어, 상기 데그론이 온도 민감성 데그론인 경우, 상기 변이체 Cas9 폴리펩티드는 역치 온도 이하 (예: 42°C, 41°C, 40°C, 39°C, 38°C, 37°C, 36°C, 35°C, 34°C, 33°C, 32°C, 31°C, 30°C 등)에서 기능적 (즉, "작동 (on)", 안정)이지만, 역치 온도 초과에서는 비-기능적 (즉, "무작동 (off)", 분해)될 수 있다. 다른 예로서, 상기 데그론이 약물 유도성 데그론인 경우, 약물의 존재 또는 부재는 단백질을 "비작동 (off)" (즉, 불안정) 상태에서 "작동 (on)" (즉, 안정) 상태로 또는 그 반대로 전환시킬 수 있다. 예시되는 약물 유도성 데그론은 FKBP12 단백질로부터 유래한다. 상기 데그론의 안정성은 상기 데그론에 결합하는 소분자의 존재 또는 부재에 의해 제어된다.

[0747] 적합한 데그론의 예로는 Shield-1, DHFR, 옥신 및/또는 온도에 의해 제어되는 데그론을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 적합한 데그론의 비-제한적인 예가 당해 분야에 알려져 있다 (예: Dohmen et al., Science, 1994. 263(5151): p. 1273-1276: Heat-inducible degron: a method for constructing temperature-sensitive mutants; Schoeber et al., Am J Physiol Renal Physiol. 2009 Jan;296(1):F204-11 : Conditional fast expression and function of multimeric TRPV5 channels using Shield-1 ; Chu et al., Bioorg Med Chem Lett. 2008 Nov 15;18(22):5941-4: Recent progress with FKBP-derived destabilizing domains; Kanemaki, Pflugers Arch. 2012 Dec 28: Frontiers of protein expression control with conditional degrons; Yang et al., Mol Cell. 2012 Nov 30;48(4):487-8: Titivated for destruction: the methyl degron; Barbour et al., Biosci Rep. 2013 Jan 18;33(1):. Characterization of the bipartite degron that regulates ubiquitin-independent degradation of thymidylate synthase; and Greussing et al., J Vis Exp. 2012 Nov 10;(69):

Monitoring of ubiquitin-proteasome activity in living cells using a Degron (dgn)-destabilized green fluorescent protein (GFP)-based reporter protein; 이들 모두는 그 전체가 참조로 본원에 통합된다).

- [0748] 예시되는 데그론 서열은 세포와 동물 모두에서 잘 규명되고 테스트되었다. 따라서, Cas9 (예: 야생형 Cas9; 변이체 Cas9; 뉴클레아제 활성이 감소된 변이체 Cas9 예컨대 dCas9; 및 유사물)를 데그론 서열에 융합하면 "조정 가능한 (tunable)" 및 "유도 가능한 (inducible)" Cas9 폴리펩티드가 생성된다. 본원에 기재된 임의의 융합 파트너가 임의의 바람직한 조합으로 사용될 수 있다. 이러한 관점을 설명하기 위한 비-제한적인 예로서, Cas9 융합 단백질 (즉, 키메라 Cas9 폴리펩티드)은 검출을 위한 YFP 서열, 안정성을 위한 데그론 서열, 및 표적 핵산의 전사를 증가시키기 위한 전사 활성인자 서열을 포함할 수 있다. Cas9 폴리펩티드 (예: 야생형 Cas9, 변이체 Cas9, 뉴클레아제 기능이 감소된 변이체 Cas9 등)에 대한 융합 파트너로서 사용하기에 적합한 리포터 단백질은 하기의 예시되는 단백질 (또는 이들의 기능적 단편)을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다: his3, β -갈락토시다제, 형광 단백질 (예: GFP, RFP, YFP, cherry, tomato 등, 및 이들의 다양한 유도체), 루시페라제, β -글루쿠로니다제, 및 알칼리성 포스파타제. 또한 Cas9 융합 단백질에서 사용될 수 있는 융합 파트너의 개수는 무제한이다. 일부 구체예에서, Cas9 융합 단백질은 1개 이상 (예: 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상 또는 5개 이상)의 이중 서열을 포함한다.
- [0749] 적합한 융합 파트너는 메틸트랜스퍼라제 활성, 데메틸라제 활성, 아세틸트랜스퍼라제 활성, 데아세틸라제 활성, 키나제 활성, 포스파타제 활성, 유비퀴틴 리가제 활성, 탈유비퀴틴화 활성, 아데닐화 활성, 탈아데닐화 활성, SUMO일화 활성, 탈SUMO일화 활성, 리보실화 활성, 탈리보실화 활성, 미리스토일화 활성, 또는 탈미리스토일화 활성을 제공하는 폴리펩티드를 포함하지만, 이에 한정되지 않으며, 이는 핵산을 직접 변형시키거나 (예: DNA 또는 RNA의 메틸화), 또는 핵산-관련 폴리펩티드 (예: 히스톤, DNA 결합 단백질 및 RNA 결합 단백질, 및 유사물)를 변형시킬 수 있다. 더욱 적합한 융합 파트너는 경계 요소 (boundary elements) (예: CTCF), 주변 동원 (periphery recruitment)을 제공하는 단백질 및 이의 단편 (예: Lamin A, Lamin B, 등) 및 단백질 도킹 요소 (protein docking element) (예: FKBP/FRB, Pil1/Aby1 등)를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0750] 대상 변이체 Cas9 폴리펩티드에 대한 다양한 추가의 적합한 융합 파트너 (또는 이의 단편)의 예로는 그 전체가 본원에 참조로 통합된, PCT 특허 출원: W02010/075303, W02012/068627, 및 W02013/155555에 기재된 것을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0751] 적합한 융합 파트너는 표적 핵산 또는 표적 핵산과 관련된 폴리펩티드 (예: 히스톤, DNA-결합 단백질, RNA-결합 단백질, RNA 편집 단백질 등)에 직접 작용하여 전사를 간접적으로 증가시키는 활성을 제공하는 폴리펩티드를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 적합한 융합 파트너는 메틸트랜스퍼라제 활성, 데메틸라제 활성, 아세틸트랜스퍼라제 활성, 데아세틸라제 활성, 키나제 활성, 포스파타제 활성, 유비퀴틴 리가제 활성, 탈유비퀴틴화 활성, 아데닐화 활성, 탈아데닐화 활성, SUMO일화 활성, 탈SUMO일화 활성, 리보실화 활성, 탈리보실화 활성, 미리스토일화 활성, 또는 탈미리스토일화 활성을 제공하는 폴리펩티드를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0752] 추가의 적합한 융합 파트너는 표적 핵산의 전사 및/또는 번역의 증가를 직접 제공하는 폴리펩티드 (예: 전사 활성인자 또는 이의 단편, 전사 활성인자를 동원하는 단백질 또는 이의 단편, 소분자/약물-반응성 전사 및/또는 번역 조절인자, 번역-조절 단백질 등)를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0753] 전사의 증가 또는 감소를 달성하기 위한 융합 파트너의 비-제한적인 예로는 전사 활성인자 및 전사 억제인자 도메인 (예: Krueppel 연관 박스 (KRAB 또는 SKD); Mad mSIN3 상호작용 도메인 (SID); ERF 억제인자 도메인 (ERD) 등)을 포함한다. 일부 이러한 구체예에서, Cas9 융합 단백질은 가이드 핵산에 의해 표적 핵산의 특정 위치 (즉, 서열)로 표적화되고, RNA 폴리머라제의 프로모터에 대한 결합 차단 (전사 활성인자 기능을 선택적으로 억제함) 및/또는 국소 크로마틴 상태의 변형 (예: 표적 핵산을 변형시키거나 또는 표적 핵산과 관련된 폴리펩티드를 변형시키는 융합 서열이 사용되는 경우)과 같은 유전자좌-특이적 조절을 발휘한다. 일부 구체예에서, 상기 변화는 일시적이다 (예: 전사 억제 또는 활성화). 일부 구체예에서, 상기 변화는 유전성 (inheritable)이다 (예: 표적 핵산 또는 표적 핵산과 연관된 단백질, 예를 들어 뉴클레오솜 히스톤에 후성적 변형 (epigenetic modifications)이 일어나는 경우).
- [0754] ssRNA 표적 핵산을 표적화하는 경우에 사용하기 위한 융합 파트너의 비-제한적인 예로는 하기를 포함한다 (다만 이에 한정되지 않음): 스플라이싱 인자 (예: RS 도메인); 단백질 번역 성분 (예: 번역 개시, 신장 및/또는 방출 인자; 예컨대 eIF4G); RNA 메틸라제; RNA 편집 효소 (예: RNA 데아미나제 예컨대 RNA에 작용하는 아데노신 데아미나제 (ADAR), A에서 I 및/또는 C에서 U로의 편집 효소 포함); heliobodiments; RNA-결합 단백질; 및 유사물. 융합 파트너는 전체 단백질을 포함할 수 있거나, 또는 일부 구체예에서 단백질의 단편 (예: 기능적 도

메인)을 포함할 수 있는 것으로 이해된다.

[0755] 일부 구체예에서, 상기 이중 서열은 Cas9 폴리펩티드의 C-말단에 융합될 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 이중 서열은 Cas9 폴리펩티드의 N-말단에 융합될 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 이중 서열은 Cas9 폴리펩티드의 내부 부분 (즉, N- 또는 C-말단 이외의 부분)에 융합될 수 있다.

[0756] 또한, 키메라 Cas9 폴리펩티드의 융합 파트너는 일시적이거나 또는 비가역적이거나, 직접적이거나 또는 간접적인지 여부에 관계 없이, ssRNA와 상호작용할 수 있는 임의의 도메인일 수 있고 (이는 본 개시내용의 목적을 위해, 분자내 및/또는 분자간 2차 구조 예컨대 이중가닥 RNA 듀플렉스 예컨대 헤어핀, 스템-루프 등을 포함함), 하기를 포함하는 그룹으로부터 선택된 이펙터 (effector) 도메인을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다: 엔도뉴클레아제 (예: RNase I, CRR22 DYW 도메인, Dicer, 및 SMG5 및 SMG6과 같은 단백질의 PIN (Pi1T N-말단) 도메인); RNA 절단을 자극하는 단백질 및 단백질 도메인 (예: CPSF, CstF, CFIm 및 CFIIIm); 엑소뉴클레아제 (예: XRN-1 또는 엑소뉴클레아제 T); 데아데닐라제 (예: HNT3); 넌센스 매개 RNA 붕괴 (nonsense mediated RNA decay)를 담당하는 단백질 및 단백질 도메인 (예: UPF1, UPF2, UPF3, UPF3b, RNP S1, Y14, DEK, REF2, 및 SRm160); RNA 안정화를 담당하는 단백질 및 단백질 도메인 (예: PABP); 번역 억제를 담당하는 단백질 및 단백질 도메인 (예: Ago2 및 Ago4); 번역 자극을 담당하는 단백질 및 단백질 도메인 (예: Staufen); 번역을 조절하는 (예: 조절할 수 있는) 단백질 및 단백질 도메인 (예: 번역 인자 예컨대 개시 인자, 신장 인자, 방출 인자 등, 예를 들어 eIF4G); RNA의 폴리아데닐화를 담당하는 단백질 및 단백질 도메인 (예: PAP1, GLD-2 및 Star-PAP); RNA의 폴리우리디닐화 (polyuridylation)를 담당하는 단백질 및 단백질 도메인 (예: CI D1 및 말단 유리딜레이트 트랜스퍼제); RNA 국소화를 담당하는 단백질 및 단백질 도메인 (예: IMP1, ZBP1, She2p, She3p, 및 Bicaudal-D); RNA의 핵 유지 (nuclear retention)를 담당하는 단백질 및 단백질 도메인 (예: Rrp6); RNA의 핵 방출 (nuclear export)을 담당하는 단백질 및 단백질 도메인 (예: TAP, NXF1, THO, TREX, REF, 및 Aly); RNA 스플라이싱 억제를 담당하는 단백질 및 단백질 도메인 (예: PTB, Sam68 및 hnRNP A1); RNA 스플라이싱의 자극을 담당하는 단백질 및 단백질 도메인 (예: 세린/아르기닌-풍부 (SR) 도메인); 전사 효율의 감소를 담당하는 단백질 및 단백질 도메인 (예: FUS (TLS)); 및 전사 자극을 담당하는 단백질 및 단백질 도메인 (예: CDK7 및 HIV Tat). 대안으로서, 상기 이펙터 도메인은 하기를 포함하는 그룹으로부터 선택될 수 있다: 엔도뉴클레아제; RNA 절단을 자극할 수 있는 단백질 및 단백질 도메인; 엑소뉴클레아제; 데아데닐라제; 넌센스 매개 RNA 붕괴 활성을 갖는 단백질 및 단백질 도메인; RNA를 안정화시킬 수 있는 단백질 및 단백질 도메인; 번역을 억제할 수 있는 단백질 및 단백질 도메인; 번역을 자극할 수 있는 단백질 및 단백질 도메인; 번역을 조절할 수 있는 단백질 및 단백질 도메인 (예: 번역 인자 예컨대 개시 인자, 신장 인자, 방출 인자 등, 예를 들어 eIF4G); RNA의 폴리아데닐화를 수행할 수 있는 단백질 및 단백질 도메인; RNA의 폴리우리디닐화를 수행할 수 있는 단백질 및 단백질 도메인; RNA 국소화 활성을 갖는 단백질 및 단백질 도메인; RNA의 핵 유지를 수행할 수 있는 단백질 및 단백질 도메인; RNA 핵 방출 활성을 갖는 단백질 및 단백질 도메인; RNA 스플라이싱을 억제할 수 있는 단백질 및 단백질 도메인; RNA 스플라이싱을 자극할 수 있는 단백질 및 단백질 도메인; 전사 효율을 감소시킬 수 있는 단백질 및 단백질 도메인; 및 전사를 자극할 수 있는 단백질 및 단백질 도메인. 다른 적합한 융합 파트너는 PUF RNA-결합 도메인이고, 이는 WO2012068627에 보다 상세하게 기재되어 있다.

[0757] Cas9 폴리펩티드에 대한 융합 파트너로서 (전체 또는 이의 단편으로) 사용될 수 있는 일부 RNA 스플라이싱 인자는 별개의 서열-특이적 RNA 결합 모듈 및 스플라이싱 이펙터 도메인과 함께, 모듈 구조 (modular organization)를 갖는다. 예를 들어, 세린/아르기닌-풍부 (SR) 단백질 패밀리의 구성원은 엑손 내포 (exon inclusion)를 촉진하는 C-말단 RS 도메인 및 pre-mRNA에서 ESE (exonic splicing enhancers)에 결합하는 N-말단 RNA 인식 모티프 (RRMs)를 포함한다. 다른 예로서, 상기 hnRNP 단백질 hnRNP A1은 이의 RRM 도메인을 통해 ESS (exon splicing silencers)에 결합하고, C-말단 글리신-풍부 도메인을 통해 엑손 내포를 억제한다. 일부 스플라이싱 인자는 2개의 대체 부위들 간의 조절 서열에 결합하여 스플라이스 부위 (splice site: ss)의 대체 사용을 조절할 수 있다. 예를 들어, ASF/SF2는 ESE를 인식하고, 인트론 근위 부위 (intron proximal site)의 사용을 촉진할 수 있으며, hnRNP A1은 ESS에 결합하고, 스플라이싱을 인트론 원위 부위 (intron distal site)의 사용으로 이동시킬 수 있다. 이러한 인자에 대한 한 가지 응용은 내인성 유전자, 특히 질병 관련 유전자의 대체 스플라이싱을 조절하는 ESF를 생성하는 것이다. 예를 들어, Bcl-x pre-mRNA는 반대 기능의 단백질을 코딩하기 위해 2개의 대체 5' 스플라이스 부위를 가진 2개의 스플라이싱 이소형 (isoform)을 생성한다. 긴 스플라이싱 이소형 Bcl-xL은 수명이 긴 유사분열후 세포 (postmitotic cells)에서 발현되는 강력한 아포토시스 억제제이며, 많은 암세포에서 상향-조절되어 아포토시스 신호로부터 세포를 보호한다. 짧은 이소형 Bcl-xS는 아포토시스-촉진 이소형 (pro-apoptosis isoform)이며, 높은 전환율 (turnover rate)을 가진 세포 (예: 발생 림프구)에서 높은 수준으로 발현된다. 2개의 Bcl-x 스플라이싱 이소형의 비율은 코어 엑손 영역 또는 엑손 확장 영역 (즉, 2개의 대

체 5' 스플라이스 부위들 사이)에 위치한 다수의 cω'- 요소에 의해 조절된다. 더 많은 예는 W02010075303을 참조한다.

[0758] 일부 구체예에서, Cas9 폴리펩티드 (예: 야생형 Cas9, 변이체 Cas9, 뉴클레아제 활성이 감소된 변이체 Cas9 등)는 펩티드 스페이서를 통해 융합 파트너에 연결될 수 있다.

[0759] 일부 구체예에서, Cas9 폴리펩티드는 "단백질 전달 도메인 (Protein Transduction Domain)" 또는 PTD (CPP-세포 투과성 펩티드 (cell penetrating peptide)로도 알려져 있음)를 포함하며, 이는 지질 이중층, 미셀, 세포막, 소기관 막, 또는 세포 막을 통과하는 것을 촉진하는 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드, 탄수화물, 또는 유기 또는 무기 화합물을 지칭할 수 있다. 작은 극성 분자로부터 큰 거대 분자 및/또는 나노입자의 범위일 수 있는, 다른 분자에 부착된 PTD는 예를 들어 세포외 공간으로부터 세포내 공간으로 이동하거나, 또는 세포질로부터 세포 소기관 내로 이동하는 것과 같이 분자가 막을 통과하는 것을 촉진한다. 일부 구체예에서, 다른 분자에 부착된 PTD는 분자의 핵으로의 진입을 촉진한다 (예: 일부 구체예에서, PTD는 핵 국소화 신호 (NLS)를 포함한다). 일부 구체예에서, Cas9 폴리펩티드는 2개 이상의 NLS, 예를 들어 2개 이상의 NLS를 나란히 (in tandem) 포함한다. 일부 구체예에서, PTD는 Cas9 폴리펩티드의 아미노 말단에 공유결합에 의해 연결된다. 일부 구체예에서, PTD는 Cas9 폴리펩티드의 카복실 말단에 공유결합에 의해 연결된다. 일부 구체예에서, PTD는 Cas9 폴리펩티드의 아미노 말단 및 카복실 말단에 공유결합에 의해 연결된다. 일부 구체예에서, PTD는 핵산 (예: 가이드 핵산, 가이드 핵산을 코딩하는 폴리뉴클레오티드, Cas9 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 등)에 공유결합에 의해 연결된다. 예시되는 PTD는 하기를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다: 최소 운데카펩티드 단백질 전달 도메인 (minimal undecapeptide protein transduction domain) (YGRKKRRQRRR (서열번호: 7)을 포함하는 HIV-1 TAT의 잔기 47-57에 상응함); 세포로의 진입을 지시하기에 충분한 수의 아르기닌을 포함하는 폴리아르기닌 서열 (예: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 또는 10-50개의 아르기닌); VP22 도메인 (Zender et al. (2002) *Cancer Gene Ther.* 9(6):489-96); 드로소필라 안테나페디아 단백질 전달 도메인 (Drosophila Antennapedia protein transduction domain) (Noguchi et al. (2003) *Diabetes* 52(7):1732-1737); 절단된 인간 칼시토닌 펩티드 (Trehin et al. (2004) *Pharm. Research* 21:1248-1256); 폴리리신 (Wender et al. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:13003-13008); RRQRRTSKLMKR (서열번호: 8); 트랜스포탄 (Transportan) GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL (서열번호: 9); KALAWAKLAKALAKALAKHLAKALAKALKCEA (서열번호: 10); 및 RQIKIWFQNRRMKWKK (서열번호: 11). 예시되는 PTD는 하기를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다: YGRKKRRQRRR (서열번호: 12), RKKRRQRRR (서열번호: 13); 3개의 아르기닌 잔기 내지 50개의 아르기닌 잔기의 아르기닌 호모폴리머; 예시되는 PTD 도메인 아미노산 서열은 하기를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다: YGRKKRRQRRR (서열번호: 14); RKKRRQRR (서열번호: 15); YARAAARQARA (서열번호: 16); THRLPRRRRRR (서열번호: 17); 및 GRRRARRRRRR (서열번호: 18). 일부 구체예에서, PTD는 활성화 가능한 (activatable) CPP (ACPP)이다 (Aguilera et al. (2009) *Integr Biol (Camb)* June; 1(5-6): 371-381). ACPP는 절단 가능한 링커를 통해 매칭되는 다가 음이온 (예: Glu9 또는 "E9")에 연결된 다가 양이온성 CPP (예: Arg9 또는 "R9")를 포함하고, 이는 순전하를 거의 0으로 감소시켜서 세포로의 부착 및 흡수를 억제한다. 링커가 절단되면, 다가 음이온이 방출되어, 폴리아르기닌과 그 고유의 접착성을 국소적으로 노출시키고, 따라서 막을 관통하도록 ACPP를 "활성화"한다.

[0760] 일부 구체예에서, 상기 조성물은 Cpf1 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 포함할 수 있으며, 그 예로는 도 2, 3, 또는 4에 제공된다. Cpf1 RNA-가이드 엔도뉴클레아제의 다른 명칭은 Cas12a이다. 본 개시내용의 Cpf1 CRISPR 시스템은 i) 단일 엔도뉴클레아제 단백질, 및 ii) crRNA를 포함하고, 여기서 crRNA의 3' 말단의 부분은 표적 핵산에 상보적인 가이드 서열을 함유한다. 이러한 시스템에서, 상기 Cpf1 뉴클레아제가 crRNA에 의해 표적 DNA에 직접 동원된다. 일부 구체예에서, Cpf1에 대한 가이드 서열은 검출 가능한 DNA 절단을 달성하기 위해 적어도 12nt, 13nt, 14nt, 15nt 또는 16nt이어야 하고, 효율적인 DNA 절단을 달성하기 위해 최소 14nt, 15nt, 16nt, 17nt, 또는 18nt이어야 한다.

[0761] 본 개시내용의 Cpf1 시스템은 다양한 방식으로 Cas9와 상이하다. 첫째, Cas9와 달리, Cpf1은 절단을 위해 별도의 tracrRNA를 필요로 하지 않는다. 일부 구체예에서, Cpf1 crRNA는 약 42-44개의 염기 길이만큼 짧을 수 있으며, 이 중 23-25 nt는 가이드 서열이고, 19 nt는 항시성 직접 반복 서열이다. 대조적으로, 조합된 Cas9 tracrRNA 및 crRNA 합성 서열은 약 100개의 염기 길이일 수 있다.

[0762] 둘째, Cpf1은 이의 표적의 5' 상류에 위치한 "TTN" PAM 모티프를 선호한다. 이는 Cas9 시스템에 대한 표적 DNA의 3'에 위치한 "NGG" PAM 모티프와 대조적이다. 일부 구체예에서, 상기 가이드 서열 바로 앞의 유라실 염기는 치환될 수 없다 (Zetsche, B. et al. 2015. "Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2

CRISPR-Cas System" Cell 163, 759-771, 이는 모든 목적을 위해 그 전체가 본원에 참조로 통합됨).

- [0763] 셋째, Cpf1를 위한 절단 부위는 약 3-5개의 염기가 엇갈리게 되어 (staggered), "점착성 말단 (sticky ends)"을 형성한다 (Kim et al., 2016. "Genome-wide analysis reveals specificities of Cpf1 endonucleases in human cells" published online June 06, 2016). 3-5 bp 오버행 (overhang)을 갖는 이러한 점착성 말단은 NHEJ-매개-결찰을 촉진하고, 매칭되는 말단을 갖는 DNA 단편의 유전자 편집을 개선하는 것으로 사료된다. 절단 부위는 PAM이 있는 5' 말단에서 원위에 있는, 표적 DNA의 3' 말단에 있다. 절단 위치는 통상적으로 비-혼성화된 가닥의 18번째 염기 및 crRNA에 혼성화된 상보적 가닥의 상응하는 23번째 염기 다음이다.
- [0764] 넷째, Cpf1 복합체에서, "시드 (seed)" 영역은 가이드 서열의 최초 5nt 내에 위치한다. Cpf1 crRNA 시드 영역은 돌연변이에 매우 민감하며, 이 영역의 단일 염기 치환조차도 절단 활성을 크게 감소시킬 수 있다 (Zetsche B. et al. 2015 "Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System" Cell 163, 759-771 참조). 중요하게, Cas9 CRISPR 표적과 달리, Cpf1 시스템의 시드 영역 및 절단 부위는 중첩되지 않는다. 올리고 (oligos)를 표적화하는 Cpf1 crRNA 디자인에 대한 추가 지침은 (Zetsche B. et al. 2015. "Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System" Cell 163, 759-771)에서 이용 가능하다.
- [0765] 통상의 기술자는 본원에 개시된 Cpf1이 임의의 출처로부터 유래되거나 또는 단리된 임의의 변이체일 수 있다는 것을 이해할 것이며, 이들 중 다수는 당해 분야에 알려져 있다. 예를 들어, 일부 구체예에서, 본 개시내용의 Cpf1 펩티드는 도 2에 제시된 FnCPF1 (예: 서열번호 2), AsCpf1 (예: 도 3), LbCpf1 (예: 도 4), 또는 다양한 다른 미생물 종 유래의 다수의 알려져 있는 Cpf1 단백질, 및 이들의 합성 변이체를 포함할 수 있다.
- [0766] 일부 구체예에서, 상기 조성물은 Cpf1 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 Cpf1 폴리펩티드는 효소적으로 활성이고, 예를 들어 Cpf1 폴리펩티드가 가이드 RNA에 결합되는 경우, 이는 표적 핵산을 절단한다. 일부 구체예에서, 상기 Cpf1 폴리펩티드는 야생형 Cpf1 폴리펩티드 (예: 도 2, 3, 또는 4에 도시된 아미노산 서열을 포함하는 Cpf1 폴리펩티드)에 비해 감소된 효소 활성을 나타내고, DNA 결합 활성을 유지한다.
- [0767] 일부 구체예에서, Cpf1 폴리펩티드는 도 2, 3, 또는 4에 도시된 아미노산 서열에 대해 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 90%, 또는 100%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, Cpf1 폴리펩티드는 도 2, 3, 또는 4에 도시된 아미노산 서열의 100개의 아미노산 내지 200개의 아미노산 (aa), 200 aa 내지 400 aa, 400 aa 내지 600 aa, 600 aa 내지 800 aa, 800 aa 내지 1000 aa, 1000 aa 내지 1100 aa, 1100 aa 내지 1200 aa, 또는 1200 aa 내지 1300 aa의 연속 스트레치에 대해 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 90%, 또는 100%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0768] 일부 구체예에서, Cpf1 폴리펩티드는 도 2, 3, 또는 4에 도시된 아미노산 서열의 Cpf1 폴리펩티드의 RuvCI 도메인에 대해 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 90%, 또는 100%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, Cpf1 폴리펩티드는 도 2, 3, 또는 4에 도시된 아미노산 서열의 Cpf1 폴리펩티드의 RuvCII 도메인에 대해 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 90%, 또는 100%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, Cpf1 폴리펩티드는 도 2, 3, 또는 4에 도시된 아미노산 서열의 Cpf1 폴리펩티드의 RuvCIII 도메인에 대해 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 90%, 또는 100%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0769] 일부 구체예에서, 상기 Cpf1 폴리펩티드는 야생형 Cpf1 폴리펩티드에 비해 (예: 도 2, 3 또는 4에 도시된 아미노산 서열을 포함하는 Cpf1 폴리펩티드에 비해) 감소된 효소 활성을 나타내고, DNA 결합 활성을 유지한다. 일부 구체예에서, Cpf1 폴리펩티드는 도 2, 3, 또는 4에 도시된 아미노산 서열에 대해 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 90%, 또는 100%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고; 도 2, 3, 또는 4에 도시된 아미노산 서열의 917번 아미노산에 상응하는 아미노산 잔기에서 하나의 아미노산 치환 (예: D → A 치환)을 포함한다. 일부 구체예에서, Cpf1 폴리펩티드는 도 2, 3, 또는 4에 도시된 아

미노산 서열에 대해 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 90%, 또는 100%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고; 도 2, 3, 또는 4에 도시된 아미노산 서열의 1006번 아미노산에 상응하는 아미노산 잔기에서 하나의 아미노산 치환 (예: E → A 치환)을 포함한다. 일부 구체예에서, Cpf1 폴리펩티드는 도 2, 3, 또는 4에 도시된 아미노산 서열에 대해 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 90%, 또는 100%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고; 도 2, 3, 또는 4에 도시된 아미노산 서열의 1255번 아미노산에 상응하는 아미노산 잔기에서 하나의 아미노산 치환 (예: D → A 치환)을 포함한다.

[0770] 일부 구체예에서, 상기 Cpf1 폴리펩티드는 융합 폴리펩티드이며, 예를 들어 Cpf1 융합 폴리펩티드는 a) Cpf1 폴리펩티드; 및 b) 이중 융합 파트너를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 이중 융합 파트너는 Cpf1 폴리펩티드의 N-말단에 융합된다. 일부 구체예에서, 상기 이중 융합 파트너는 Cpf1 폴리펩티드의 C-말단에 융합된다. 일부 구체예에서, 상기 이중 융합 파트너는 Cpf1 폴리펩티드의 N-말단 및 C-말단 모두에 융합된다. 일부 구체예에서, 상기 이중 융합 파트너는 Cpf1 폴리펩티드 내에 내부적으로 삽입된다.

[0771] 적합한 이중 융합 파트너는 NLS, 에피토프 태그, 형광 폴리펩티드, 및 유사물을 포함한다.

[0772] 연결된 가이드 RNA 및 공여체 핵산

[0773] 일 양상에서, 본 발명은 RNA-가이드 엔도뉴클레아제 (예: Cas9 또는 Cpf1 폴리펩티드), 가이드 RNA 및 공여체 폴리뉴클레오티드를 포함하는 CRISPR 시스템을 포함하는 복합체를 제공하며, 상기 가이드 RNA 및 상기 공여체 폴리뉴클레오티드는 연결된다. 본원에서 예시되는 바와 같이, 상기 가이드 RNA 및 공여체 폴리뉴클레오티드는 공유 또는 비-공유적으로 연결될 수 있다. 일 구체예에서, 상기 가이드 RNA 및 공여체 폴리뉴클레오티드는 화학적으로 결합된다. 다른 구체예에서, 상기 가이드 RNA 및 공여체 폴리뉴클레오티드는 효소적으로 결합된다. 일 구체예에서, 상기 가이드 RNA 및 공여체 폴리뉴클레오티드는 서로 혼성화된다. 다른 구체예에서, 상기 가이드 RNA 및 공여체 폴리뉴클레오티드는 모두 브릿지 서열 (bridge sequence)에 혼성화된다. 이러한 혼성화 방식이 얼마든지 가능하다.

[0774] 데아미나제 (Deaminase)

[0775] 일부 구체예에서, 상기 복합체 또는 조성물은 데아미나제 (예: 아데닌 염기 에디터 (adenine base editor))를 추가로 포함한다. 본원에서 사용된, 용어 "데아미나제 (deaminase)" 또는 "데아미나제 도메인 (deaminase domain)"은 분자로부터 아민기의 제거 또는 탈아민화 (deamination)를 촉매하는 효소를 의미한다. 일부 구체예에서, 상기 데아미나제는 시티딘 데아미나제이며, 시티딘 또는 테옥시시티딘의 각각 유리딘 또는 테옥시유리딘으로의 가수분해적 탈아민화를 촉매한다. 일부 구체예에서, 상기 데아미나제는 시토신 데아미나제이며, 시토신의 (예: RNA에서) 유라실 또는 (예: DNA에서) 티민으로의 가수분해적 탈아민화를 촉매한다.

[0776] 일부 구체예에서, 상기 데아미나제는 아데노신 데아미나제이며, 아데닌 또는 아데노신의 가수분해적 탈아민화를 촉매한다. 일부 구체예에서, 상기 데아미나제 또는 데아미나제 도메인은 아데노신 데아미나제이며, 아데노신 또는 테옥시아데노신의 각각 이노신 또는 테옥시이노신으로의 가수분해적 탈아민화를 촉매한다. 일부 구체예에서, 상기 아데노신 데아미나제는 테옥시리보핵산 (DNA)에서 아데닌 또는 아데노신의 가수분해적 탈아민화를 촉매한다. 본원에서 제공되는 아데노신 데아미나제 (예: 조작된 아데노신 데아미나제, 진화된 아데노신 데아미나제)는 박테리아와 같은 임의의 유기체로부터 유래될 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 데아미나제 또는 데아미나제 도메인은 인간, 침팬지, 고릴라, 원숭이, 소, 개, 래트 (rat) 또는 마우스 (mouse)와 같은 유기체로부터의 천연 데아미나제의 변이체이다.

[0777] 일부 구체예에서, 상기 데아미나제 또는 데아미나제 도메인은 자연에서 발생하지 않는다. 예를 들어, 일부 구체예에서, 상기 데아미나제 또는 데아미나제 도메인은 천연 데아미나제에 대해 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 적어도 99.5% 동일하다. 일부 구체예에서, 상기 아데노신 데아미나제는 박테리아, 예컨대 대장균 (*E. coli*), *S. 아우레우스* (*S. aureus*), *S. 티파이* (*S. typhi*), *S. 푸트레파시엔스* (*S. putrefaciens*), *H. 인플루엔자* (*H. influenzae*), 또는 *C. 크레스켄투스* (*C. crescentus*)로부터 유래한다. 일부 구체예에서, 상기 아데노신 데아미나제는 TadA 데아미나제이다. 일부 구체예에서, 상기 TadA 데아미나제는 대장균 TadA 데아미나제 (ecTadA)이다. 일부 구체예에서, 상기 TadA 데아미나제는 절단된 대장균 TadA 데아미나

제이다. 예를 들어, 상기 절단된 ecTadA는 전장 ecTadA에 비해 1개 이상의 N-말단 아미노산이 소실될 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 절단된 ecTadA는 전장 ecTadA에 비해 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 6, 17, 18, 19, 또는 20개의 N-말단 아미노산 잔기가 소실될 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 절단된 ecTadA는 전장 ecTadA에 비해 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 6, 17, 18, 19, 또는 20개의 C-말단 아미노산 잔기가 소실될 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 ecTadA 테아미나제는 N-말단 메티오닌을 포함하지 않는다. 일부 구체예에서, 상기 테아미나제는 APOBEC1 또는 이의 변이체이다.

[0778] 상기 테아미나제는 본원에 기재된 임의의 다른 CRISPR 요소와 함께 사용될 수 있거나 (즉, 조성물로서), 또는 상기 테아미나제는 본원에 기재된 임의의 다른 CRISPR 요소 (예: Cas9 또는 Cpf1)에 융합될 수 있다 (즉, 복합체로서). 소정의 구체예에서, 상기 테아미나제는 Cas9, Cpf1, 또는 이의 변이체에 융합된다.

[0779] 기타 성분

[0780] 상기 조성물은 핵산 또는 단백질 전달 제제에서 전형적으로 사용되는 임의의 다른 성분을 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 조성물은 지질, 지질단백질 (예: 콜레스테롤 및 유도체), 인지질, 폴리머, 또는 리포솜 또는 미셀 전달 비히클의 기타 성분을 추가로 포함할 수 있다. 상기 조성물은 또한 세포 또는 숙주 예컨대 포유동물 또는 인간에 투여하기에 적합한 용매 또는 담체를 포함할 수 있다.

[0781] 일부 구체예에서, 상기 조성물은 하나 이상의 계면활성제 및 동결보호제 (cryoprotectants)를 추가로 포함한다. 상기 계면활성제는 비-이온성 계면활성제 및/또는 양쪽이온성 계면활성제일 수 있다. 예시되는 계면활성제의 목록은 하기를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다: 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르 계면활성제 (통상 Tweens으로 지칭됨), 특히 폴리소르베이트 20 및 폴리소르베이트 80; DOWFAX™ 상표명으로 판매되는, 에틸렌 옥사이드 (EO), 프로필렌 옥사이드 (PO) 및/또는 부틸렌 옥사이드 (BO)의 코폴리머, 예컨대 직쇄형 EO/PO 블록 코폴리머; 반복되는 에톡시(옥시-1,2-에탄디일) 기의 개수가 다양할 수 있는 옥톡시놀, 특히 주목되는 옥톡시놀-9 (Triton X-100, 또는 t-옥틸페녹시폴리에톡시에탄올); (옥틸페녹시)폴리에톡시에탄올 (IGEPAL CA-6301NP-40); 인지질 예컨대 포스파티딜콜린 (레시틴); 라우릴, 세틸, 스테아릴 및 올레일 알코올로부터 유래된 폴리옥시에틸렌 지방 에테르 (Brij 계면활성제로 알려짐), 예컨대 트리에틸렌글리콜 모노라우릴 에테르 (Brij 30); 폴리옥시에틸렌-9-라우릴 에테르, 및 소르비탄 에스테르 (통상 Spans으로 알려짐), 예컨대 소르비탄 트리올레이트 (Span 85) 및 소르비탄 모노라우레이트. 일부 구체예에서, 상기 계면활성제는 항응고제 (예: 헤파린 또는 유사물)이다. 일부 구체예에서, 상기 조성물은 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 담체 (예: 수성 담체, 예컨대 물) 및/또는 부형제를 추가로 포함하고, 버퍼, 산화방지제, pH 조정제, 킬레이트화제, 삼투조절제, 동결보호제 또는 동결건조 보호제 (lyoprotectants) 및 유사물을 포함한다.

[0782] 일부 경우에, 성분 (예: 핵산 성분 (예: 가이드 핵산 등); 단백질 성분 (예: Cas9 또는 Cpf1 폴리펩티드, 변이체 Cas9 또는 Cpf1 폴리펩티드); 및 유사물)은 표지 모이어티를 포함한다. 본원에서 사용된 용어 "표지 (label)", "검출 가능한 표지 (detectable label)" 또는 "표지 모이어티 (label moiety)"는 신호 검출을 제공하는 임의의 모이어티를 의미하고, 분석의 구체적 특성에 따라 크게 좌우될 수 있다. 관심 표지 모이어티는 직접적으로 검출 가능한 표지 (직접 표지) (예: 형광 표지) 및 간접적으로 검출 가능한 표지 (간접 표지) (예: 결합 쌍 구성원 (binding pair member))를 모두 포함한다. 형광 표지는 임의의 형광 표지 (예: 형광 염료 (예: 플루오레세인, Texas 레드, 로다민, ALEXAFLUOR® 표지, 및 유사물)), 형광 단백질 (예: 녹색 형광 단백질 (GFP), 강화 GFP (EGFP), 황색 형광 단백질 (YFP), 적색 형광 단백질 (RFP), 시안 형광 단백질 (CFP), cherry, tomato, tangerine, 및 이의 임의의 형광 유도체 등)일 수 있다. 상기 방법에 사용하기에 적합한 (직접적으로 또는 간접적으로) 검출 가능한 표지 모이어티는 분광, 광화학, 생화학, 면역화학, 전기, 광학, 화학, 또는 기타 수단에 의해 검출될 수 있는 임의의 모이어티를 포함한다. 예를 들어, 적절한 간접 표지는 바이오틴 (결합쌍 구성원)을 포함하고, 이는 스트렙타비딘에 의해 결합될 수 있다 (그 자체가 직접적으로 또는 간접적으로 표지될 수 있다). 표지는 또한 하기를 포함할 수 있다: 방사성 표지 (직접 표지) (예: ³H, ¹²⁵I, ³⁵S, ¹⁴C 또는 ³²P); 효소 (간접 표지) (예: 퍼옥시다제, 알칼리성 포스파타제, 갈락토시다제, 루시페라제, 글루코스 옥시다제, 및 유사물); 형광 단백질 (직접 표지) (예: 녹색 형광 단백질, 적색 형광 단백질, 황색 형광 단백질, 및 이의 임의의 변형된 유도체); 금속 표지 (직접 표지); 비색 (colorimetric) 표지; 결합쌍 구성원; 및 유사물. "결합쌍의 파트너 (partner of a binding pair)" 또는 "결합쌍 구성원 (binding pair member)"은 제1 및 제2 모이어티 중 하나를 의미하며, 여기서 제1 및 제2 모이어티는 서로에 대한 특이적 결합 친화도를 갖는다. 적합한 결합쌍은 하기를 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다: 항원/항체 (예: 디곡시게닌/항-디곡시게닌, 디니트로페닐 (DNP)/항-DNP, 단실 (dansyl)-X-항-단실, 플루오레세인/항-플루오레세인, 루시퍼 엘로우/항-루시퍼 엘로우, 및 로다민

항-로다민), 바이오틴/아비딘 (또는 바이오틴/스트렙타비딘) 및 칼모둘린 결합 단백질 (CBP)/칼모둘린. 임의의 결합쌍 구성원이 간접적으로 검출 가능한 표지 모이어티로서 사용하기에 적합할 수 있다.

[0783] 임의의 주어진 성분, 또는 성분들의 조합은 표지되지 않거나, 또는 표지 모이어티로 검출 가능하게 표지될 수 있다. 일부 구체예에서, 2개 이상의 성분이 표지되는 경우, 이들은 서로 구별될 수 있는 표지 모이어티로 표지될 수 있다.

[0784] 캡슐화 (encapsulation) 및 나노입자

[0785] 상기 조성물의 일부 구체예에서, 하나 이상의 폴리머 (예: 본원에 기재된 조성물의 제1 폴리머 및 선택적으로 제2 폴리머)는 담체 용액 (예: 수성 용액 예컨대 물)에서 나노입자를 형성한다. 또한, 전달용 체제가 폴리머(들)와 함께 존재하는 경우, 상기 폴리머(들)를 전달될 체제 (예: 핵산 및/또는 폴리펩티드)와 조합하고, 전달될 체제를 부분적으로 또는 완전히 캡슐화한다. 따라서, 상기 조성물은 하나 이상의 폴리머 및 핵산 및/또는 폴리펩티드를 포함하는 나노입자를 제공할 수 있다.

[0786] 상기 나노입자는 임의의 적절한 크기를 가질 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 나노입자는 약 20 nm 내지 약 800 nm (예: 약 40 nm 내지 약 800 nm, 약 100 nm 내지 약 800 nm, 약 200 nm 내지 약 800 nm, 약 20 nm 내지 약 400 nm, 약 40 nm 내지 약 400 nm, 약 100 nm 내지 약 400 nm, 약 200 nm 내지 약 400 nm, 약 100 nm 내지 약 800 nm, 약 100 nm 내지 약 400 nm, 또는 약 100 nm 내지 약 200 nm)의 입자 직경을 갖는다.

[0787] 상기 나노입자는 임의의 적절한 표면 전하를 가질 수 있다. 예를 들어, 상기 나노입자의 제타 전위 (zeta potential)는 약 -5 mV 내지 약 +40 mV (예: 약 -5 mV 내지 약 +30 mV, 약 -5 mV 내지 약 +20 mV, 약 -5 mV 내지 약 +10 mV, 약 -5 mV 내지 약 +5 mV, 약 0 mV 내지 약 +40 mV, 약 0 mV 내지 약 +30 mV, 약 0 mV 내지 약 +20 mV, 약 0 mV 내지 약 +10 mV, 또는 약 0 mV 내지 약 +5 mV)일 수 있다.

[0788] 일부 구체예에서, 상기 조성물은 본원에 기재된 하나 이상의 폴리머 및 핵산 또는 폴리펩티드에 추가하여 코어 나노입자를 포함할 수 있다. 금속 (예: 금) 나노입자 또는 폴리머 나노입자를 포함하는, 임의의 적절한 나노입자가 사용될 수 있다. 그러나, 코어 나노입자는 필요로 하지 않으며, 일부 구체예에서, 상기 조성물은 코어 나노입자가 부재한다.

[0789] 본원에 기재된 하나 이상의 폴리머 및 핵산 (예: 가이드 RNA, 공여체 폴리뉴클레오티드, 또는 둘다) 또는 폴리펩티드는 원하는 경우 코어 나노입자의 표면에 직접 또는 간접적으로 접합될 수 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 하나 이상의 폴리머 및 핵산 (예: 가이드 RNA, 공여체 폴리뉴클레오티드, 또는 둘다) 또는 폴리펩티드는 나노입자의 표면에 직접적으로 접합될 수 있거나, 또는 개재 링커를 통해 간접적으로 접합될 수 있다.

[0790] 임의의 타입의 분자가 링커로서 사용될 수 있다. 예를 들어, 링커는 적어도 2개의 탄소 원자 (예: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 이상의 탄소 원자)를 포함하는 지방족 사슬일 수 있으며, 케톤, 에테르, 에스테르, 아미드, 알코올, 아민, 우레아, 티오우레아, 설폰사이드, 설폰, 설폰아미드, 및 이황화 관능기를 포함하는 하나 이상의 관능기로 치환될 수 있다. 상기 나노입자가 금속을 포함하는 구체예에서, 링커는 임의의 티올-함유 분자일 수 있다. 티올기와 금속의 반응은 공유 설파이드 (-S-) 결합을 생성한다. 링커 디자인 및 합성은 당해 분야에서 잘 알려져 있다.

[0791] 일부 구체예에서, 상기 나노입자에 접합된 핵산은 본원에 기재된 하나 이상의 요소 (예: Cas9 폴리펩티드, 및 가이드 RNA, 공여체 폴리뉴클레오티드, 및 Cpf1 폴리펩티드)를 비공유 결합에 의해 나노입자-핵산 접합체에 결합시키는 작용을 하는 링커 핵산이다. 예를 들어, 상기 링커 핵산은 가이드 RNA 또는 공여체 폴리뉴클레오티드에 혼성화되는 서열을 가질 수 있다.

[0792] 상기 나노입자에 접합된 핵산은 임의의 적절한 길이를 가질 수 있다. 상기 핵산이 가이드 RNA 또는 공여체 폴리뉴클레오티드인 경우, 이러한 분자에 대해 그 길이는 본원에서 논의되고 당해 분야에서 알려져 있는 바와 같이 적절할 것이다. 상기 핵산이 링커 핵산인 경우, 이는 링커에 적합한 임의의 길이, 예를 들어 10 nt (nucleotide) 내지 1000 nt 예컨대 약 1 nt 내지 약 25 nt, 약 25 nt 내지 약 50 nt, 약 50 nt 내지 약 100 nt, 약 100 nt 내지 약 250 nt, 약 250 nt 내지 약 500 nt, 또는 약 500 nt 내지 약 1000 nt의 길이를 가질 수 있다. 일부 경우에, 상기 나노입자 (예: 콜로이드성 금속 (예: 금) 나노입자; 생체 적합성 폴리머를 포함하는 나노입자)에 접합된 핵산은 1000 nt보다 긴 길이를 가질 수 있다.

[0793] 나노입자에 연결된 (예: 공유결합에 의해 연결된; 비-공유결합에 의해 연결된) 핵산이 본 개시내용의 복합체에 존재하는 가이드 RNA 또는 공여체 폴리뉴클레오티드의 적어도 일부에 혼성화되는 뉴클레오티드 서열을 포함하는

경우, 상기 핵산은 혼성화를 촉진하기 위해 충분한 가이드 RNA 또는 공여체 폴리뉴클레오티드 서열의 상보체 (complement)의 영역에 대해 서열 동일성을 갖는 영역을 갖는다. 일부 구체예에서, 본 개시내용의 복합체에서 나노입자에 연결된 핵산은 상기 복합체 내에 존재하는 가이드 RNA 또는 공여체 폴리뉴클레오티드의 10 내지 50 개의 뉴클레오티드 (예: 10 nt (nucleotides) 내지 15 nt, 15 nt 내지 20 nt, 20 nt 내지 25 nt, 25 nt 내지 30 nt, 30 nt 내지 40 nt, 또는 40 nt 내지 50 nt)의 상보체에 대해 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100%의 뉴클레오티드 서열 동일성을 갖는다.

[0794] 일부 구체예에서, 나노입자에 연결된 (예: 공유결합에 의해 연결된; 비-공유결합에 의해 연결된) 핵산은 공여체 폴리뉴클레오티드이거나, 또는 공여체 폴리뉴클레오티드와 동일하거나 또는 실질적으로 동일한 뉴클레오티드 서열을 갖는다. 일부 구체예에서, 나노입자에 연결된 (예: 공유결합에 의해 연결된; 비-공유결합에 의해 연결된) 핵산은 공여체 DNA 주형에 상보적인 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0795] 사용 방법

[0796] 또한 본원에서 핵산 및/또는 폴리펩티드를 세포에 전달하는 방법이 제공되며, 여기서 상기 세포는 인 비트로 (*in vitro*) 또는 인 비보 (*in vivo*)일 수 있다. 상기 방법은 제1 폴리머 및 선택적으로 제2 폴리머를 전달할 제제 (예: 핵산 및/또는 폴리펩티드)와 함께 포함하는 본원에 기재된 조성물을 세포 또는 세포를 포함하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 상기 방법은 임의의 타입의 세포 또는 대상체에 대해 이용될 수 있지만, 특히 포유동물 세포 (예: 인간 세포)에 유용하다. 일부 구체예에서, 상기 하나 이상의 폴리머는 핵산 및/또는 폴리펩티드가 표적 세포 또는 조직 (예: 말초 신경계, 중추 신경계, 대상체의 눈, 간, 근육, 폐, 뼈 (예: 조혈 세포)의 세포 또는 조직, 또는 종양 세포 또는 조직)에 주로 또는 전적으로 전달되도록 하는, 표적화제 (targeting agent)를 포함한다.

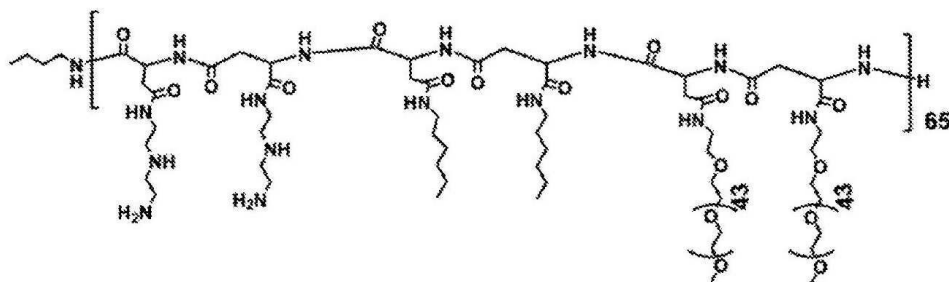
[0797] 단백질 또는 핵산을 대상체의 세포에 (즉, 인 비보) 전달하는데 사용되는 경우, 상기 폴리머(들)가 혈청에서 안정한 것이 바람직하다. 혈청 중 안정성은 상기 폴리머가 혈청 중 세포에 단백질 또는 핵산 페이로드 (payload)를 (예: 인 비트로 또는 인 비보) 전달하는 효율성의 함수로서 평가될 수 있다. 따라서, 일부 구체예에서, 상기 폴리머(들)는 동일한 조건하에 pAsp[DET]보다 더 높은 효율로 혈청 중 세포에 주어진 단백질을 또는 핵산을 전달한다.

[0798] CRISPR 시스템의 하나 이상의 성분들을 포함하는 조성물과 함께 사용되는 경우, 상기 방법은 표적 핵산 또는 유전자를 편집하기 위해 사용될 수 있다. 일부 구체예에서, 표적 핵산을 변형시키는 방법은 HDR (homology-directed repair)를 포함한다. 일부 구체예에서, HDR을 수행하기 위해 본 개시내용의 복합체의 사용은 적어도 1%, 적어도 2%, 적어도 3%, 적어도 4%, 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 또는 25% 초과 HDR의 효율을 제공한다. 일부 구체예에서, 표적 핵산을 변형시키는 방법은 NHEJ (non-homologous end joining)를 포함한다. 일부 구체예에서, HDR을 수행하기 위해 본 개시내용의 복합체의 사용은 적어도 1%, 적어도 2%, 적어도 3%, 적어도 4%, 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 또는 25% 초과 NHEJ의 효율을 제공한다.

[0799] 하기 실시예는 본 발명을 추가로 예시하며, 물론 본 발명의 범위를 한정하는 것으로 해석되어서는 안된다.

[0800] 실시예 1

[0801] 폴리머 P2K25를 제조하였고, 본원에 제공된 실시예 3-8, 10, 12, 15, 및 16에서 사용하였다:

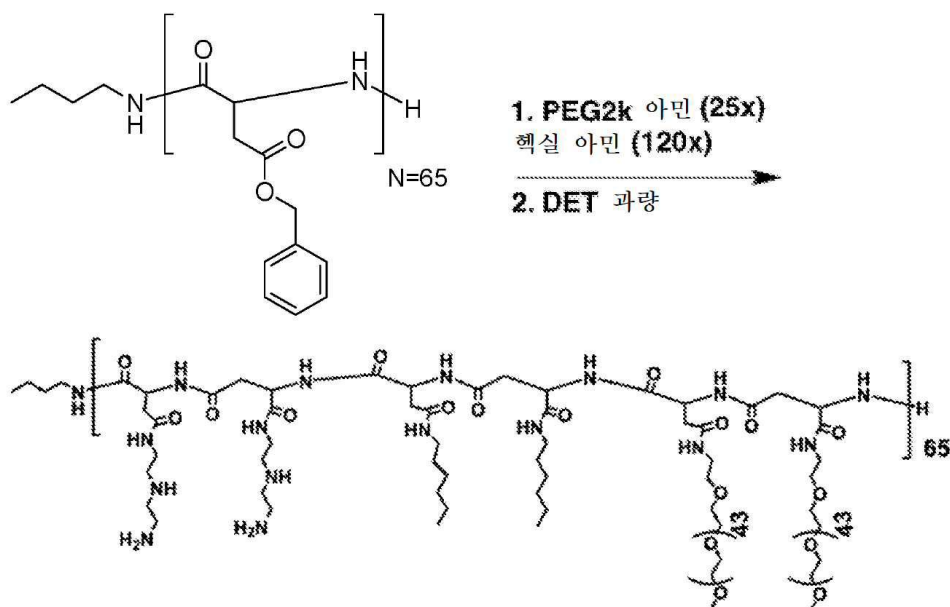


(P2K25)

[0802]

[0803] P2K25는 반응식 1에서와 같이, PBLA를 PEG화 아민 (PEGylated amine), 핵심 아민 및 *N*-(2-아미노에틸)에탄-1,2-디아민 ("DET")으로 변형시켜서 제조하였다.

반응식 1.



[0804]

[0805]

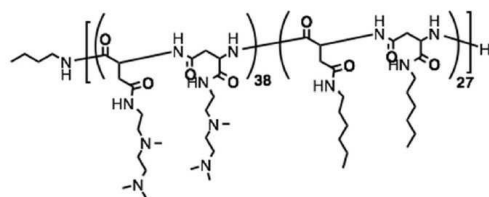
보다 구체적으로, 동결건조된 PBLA (50 mg, 0.0037 mMol; 중합도 ("DP") 65)를 플라스크에 넣고, 테트라하이드로푸란/N-메틸-2-피롤리딘 (각각 1 mL) 중에 용해시켰다. 투명한 용액에, n-헥실아민 (58.8 μ L, 0.44 mMol, 120 당량) 및 PEG화 아민 (PEG2K 아민; 중량 평균 MW = 2000; 에틸렌 옥사이드 유닛의 수 (n) = 43-46 (대략)) (25 당량)을 부가하였고, 투명한 반응 혼합물을 실온에서 24시간 동안 교반하였다. 대략 24시간 후에, 디에틸렌 트리아민 (PBLA 세그먼트의 벤질기에 대해 과량의 당량, 1.0 g)을 온화한 무수 조건 하에 투명한 혼합물에 부가하였다. 실온에서 대략 18시간 후에, 상기 반응 혼합물을 디에틸 에테르 (10 - 12X 부피, 35 mL)로 침전시켰다. 그 다음에 상기 침전물을 원심분리하고, 디에틸 에테르로 2회 세척하였다. 상기 폴리머를 1M HCl (3 mL) 중에 용해시키고, 3.5 - 5 KD 커트-오프 (cut-off) 막에서 과량의 탈이온수로 투석하였다. 상기 용액의 pH가 5 내지 6인 경우, 투석을 중단하였고, 상기 용액을 동결건조시켜서, 폴리머 생성물을 수득하였다.

[0806]

실시예 2

[0807]

폴리머 H27N을 제조하였고, 본원에 제공된 실시예 3-8, 10, 및 14-20에서 사용하였다:



[0808]

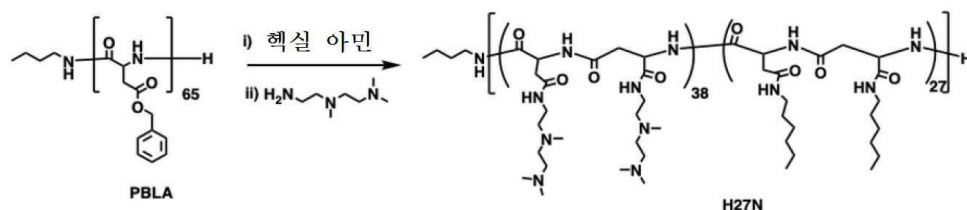
[0809]

(H27N: 괄호는 블록 코폴리머 구조를 의미하지 않음)

[0810]

H27N은 반응식 2에 도시된 바와 같이, PBLA를 N^1 -(2-아미노에틸)- N^1,N^2,N^2 -트리메틸에탄-1,2-디아민 및 헥실아민으로 변형시켜서 제조하였다.

반응식 2.



[0811]

[0812]

동결건조된 PBLA (50 mg, 0.0037 mmol; 중합도 ("DP") 65)를 플라스크에 넣고, 테트라하이드로푸란/N-메틸-

2-피롤리딘 (각각 1 mL) 중에 용해시켰다. 투명한 용액에, n-헥실아민 (160 당량)을 부가하였고, 투명한 반응 혼합물을 실온에서 24시간 동안 교반하였다. 대략 24시간 후에, N^1 -(2-아미노에틸)- N^1, N^2, N^2 -트리메틸에탄-1,2-디아민 (PBLA 세그먼트의 벤질기에 대해 50 당량)을 온화한 무수 조건 하에 투명한 혼합물에 부가하였다. 실온에서 대략 18시간 후에, 상기 반응 혼합물을 디에틸 에테르 (10 - 12X 부피, 35 mL)로 침전시켰다. 그 다음에 상기 침전물을 원심분리하고, 디에틸 에테르로 2회 세척하였다. 상기 폴리머를 1M HCl (3 mL) 중에 용해시키고, 3.5 - 5 KD 컷-오프 막에서 과량의 탈이온수로 투석하였다. 상기 용액의 pH가 5 내지 6인 경우, 투석을 중단하였고, 상기 용액을 동결건조시켜서, 폴리머 생성물을 수득하였다.

[0813] 실시예 3

[0814] 하기 실시예는 나노입자의 응집도 (degree of aggregation)에 의해 입증된 바와 같이 본원에 제공된 폴리머 조성물의 안정성을 보여준다.

[0815] 하기를 함유하는 3개의 조성물을 제조하였다: (i) 60:40 비율의 H27N:P2K25 및 mCherry mRNA 없음 ("폴리머 단독" 대조군), (ii) 60:40 비율의 H27N:P2K25 및 mCherry mRNA, 및 (iii) 100:0 비율의 H27N:P2K25 (즉, H27N 폴리머 단독) 및 mCherry mRNA (모든 비율은 중량에 기반함). 생성된 나노입자를 인공 뇌척수액 (aCSF)에서 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. aCSF는 나노입자가 척수강내 (intrathecal: IT) 주사 후에 CNS에 도달하기 위해 이동하는 경로인 CSF와 유사한 이온 농도를 갖기 때문에, CSF에서의 안정성을 측정하는 유용한 수단일 수 있다. 1시간 후에, 현미경을 이용하여 응집도를 관찰하였다. 현미경 이미지는 도 5A-5C에 제시되어 있다.

[0816] 상기 현미경 이미지 분석은 P2K25 없이 H27N 폴리머 및 mCherry mRNA 만을 함유하는 조성물 (iii)의 나노입자가 60:40 비율의 H27N:P2K25 폴리머 및 mCherry mRNA를 함유하는 조성물 (ii)보다 유의미하게 더 많은 응집을 초래하였음을 나타내었다. 유사하게, 대조군인 "폴리머 단독" 샘플은 최소 응집이 관찰되었다. 이러한 결과는 H27N 및 P2K25 폴리머의 혼합물이 나노입자의 안정성을 증가시킨다는 것을 보여준다.

[0817] 실시예 4

[0818] 하기 실시예는 폴리머 나노입자를 사용하여 mCherry를 Hep3B 세포로 전달하는 것을 예시한다.

[0819] P2K25 (실시예 1)를 H27N (실시예 2)과 40:60의 중량비로 조합하였고, 생성된 혼합물을 mCherry mRNA와 조합하여 나노입자를 형성하였다. Hep3B 세포를 생성된 나노입자로 형질감염시켰다. 48시간 후에, mCherry 발현의 존재를 현미경을 사용하여 관찰하였다. 현미경 이미지는 도 6A (정상 시야 (Normal Field) 및 명시야 (Bright Field)에서 음성 대조군) 및 6B (정상 시야 및 명시야에서 mRNA 나노입자)에 제시되어 있다.

[0820] 상기 현미경 분석은 P2K25 및 H27N을 함유하는 나노입자가 mCherry mRNA를 Hep3B 세포에 효과적으로 전달하였음을 보여주었다. 상기 결과는 P2K25 및 H27N을 함유하는 나노입자는 안정적이고 페이로드를 전달하는데 효과적임을 나타낸다.

[0821] 실시예 5

[0822] 하기 실시예는 폴리머 나노입자를 사용하여 mCherry를 1차 근모세포 (primary myoblasts)로 전달하는 것을 예시한다.

[0823] P2K25 (실시예 1에 개시된 바와 같음)를 H27N (실시예 2에 개시된 바와 같음)과 40:60 (P2K25:H27N)의 중량비로 조합하였고, 생성된 혼합물을 (i) mCherry mRNA와 조합하여 나노입자를 형성하고, 또한 헤파린을 조합하였고, 또한 생성된 혼합물을 (ii) mCherry mRNA와 조합하여 나노입자를 형성하였다 (헤파린 없음). 마우스 1차 근모세포를 생성된 혼합물 (즉, (i) 및 (ii))로 형질감염시켰다. 형질감염시키고 48시간 후에, mCherry 발현의 존재를 현미경을 사용하여 관찰하였다. 현미경 이미지는 도 7A (정상 시야 및 명시야에서 헤파린이 포함된 mRNA 나노입자) 및 7B (정상 시야 및 명시야에서 mRNA 나노입자)에 제시되어 있다.

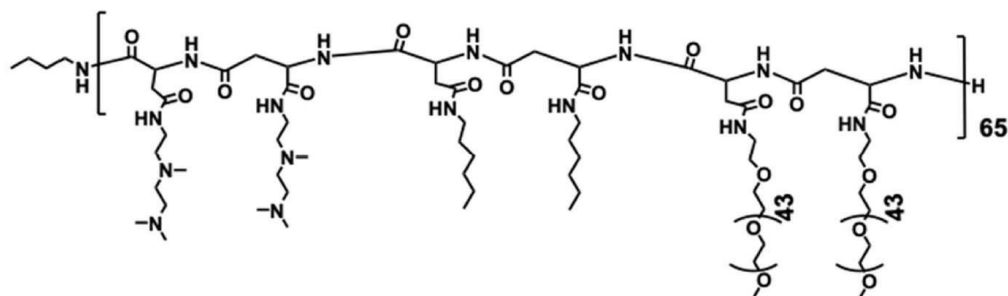
[0824] 상기 현미경 분석은 헤파린 없이 P2K25 및 H27N을 함유하는 나노입자가 mCherry mRNA를 마우스 1차 근모세포에 효과적으로 전달하였음을 보여주었다. 예상한 바와 같이, 헤파린이 포함된 mRNA 나노입자는 mCherry mRNA를 마우스 1차 근모세포에 효과적으로 전달할 수 없었고, 이는 헤파린이 나노입자를 해리시켜서 형질감염을 관찰할 수 없기 때문이다.

[0825] 실시예 6

[0826] 하기 실시예는 폴리머 나노입자를 사용하여 mCherry를 인간 1차 신경 전구 세포 (NPC)로 전달하는 것을 예시한

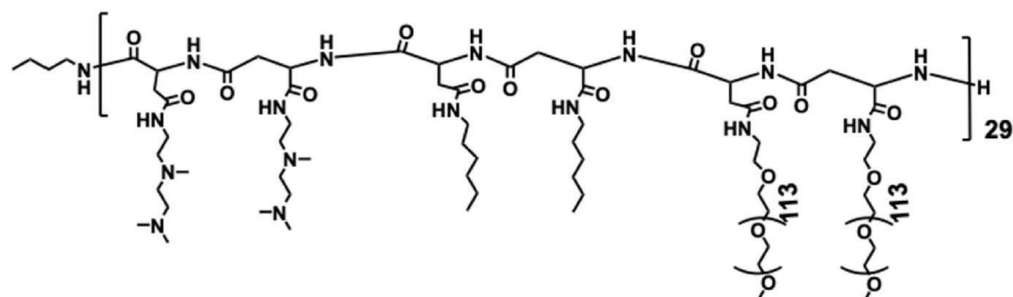
다.

- [0827] P2K25 (실시예 1에 개시된 바와 같음)를 H27N (실시예 2에 개시된 바와 같음)과, 10:90, 20:80, 및 40:60 (P2K25:H27N)의 중량비로 조합하였고, 생성된 혼합물을 mCherry mRNA와 조합하여 나노입자를 형성하였다. 생성된 나노입자를 37 °C에서 인공 뇌척수액 (aCSF)에서 30분 동안 인큐베이션한 후에, 정의된 성장 인자를 포함하지만 혈청이 없는 배양 배지 중 NPC에 부가하였다. 유세포 분석을 형질감염 2일 후에 수행하였고, mCherry+ 세포의 퍼센트를 측정하였다. 상기 결과를 도 8에 플롯팅하였다.
- [0828] 상기 결과는 P2K25 및 H27N을 함유하는 나노입자가 aCSF에서 인큐베이션된 후에도 mCherry mRNA를 효과적으로 전달하였음을 보여주었다. 이러한 결과는 P2K25 및 H27N을 함유하는 나노입자는 안정적이고 페이로드를 전달하는데 효과적임을 나타낸다.
- [0829] 실시예 7
- [0830] 하기 실시예는 폴리머 나노입자를 사용하여 Cas9 RNP를 GFP 발현 HEK293T 세포 (GFP-HEK 세포)로 전달하는 것을 예시한다.
- [0831] P2K25 (실시예 1에 개시된 바와 같음)를 H27N (실시예 2에 개시된 바와 같음)과 50:50의 중량비로 조합하였고, 생성된 혼합물을 Cas9 RNP와 조합하여 나노입자를 형성하였고, 여기서 Cas9 RNP의 더 낮은 로딩 수준 (a) 및 더 높은 로딩 수준 (b)은 1:1 또는 2:1 몰비의 gRNA 대 Cas9로 제조되었다. 생성된 나노입자를 10% FBS 함유 DMEM 배양 배지에서 GFP-HEK 세포와 함께 인큐베이션하였다. GFP를 녹아웃 (knock out)시키는 나노입자의 능력을 측정하였고, 그 결과를 도 9에 플로팅하였다.
- [0832] 도 9는 P2K25 및 H27N을 함유하는 나노입자가 Cas9 RNP를 GFP-HEK 세포에 효과적으로 전달하였고, 효율적인 유전자 편집을 유도할 수 있음을 보여주었다.
- [0833] 실시예 8
- [0834] 하기 실시예는 본 발명의 폴리머를 사용하여 Loxp-루시퍼라제 마우스에 의해 나타내는 바와 같이, Cre mRNA를 마우스에게 전달하는 것을 예시한다.
- [0835] 도 10에 제시된 리포터 서열을 갖는 Loxp-루시퍼라제 마우스를 하기 2개의 나노입자 조성물들 중 하나로 처리하였다: (i) 100:0 비율의 H27N:P2K25 및 Cre mRNA로 제제화된 나노입자 ("mRNA + 1st 폴리머"), 또는 (ii) 50:50 중량비의 H27N:P2K25 및 Cre mRNA로 제제화된 나노입자 ("mRNA + 2nd 세대 폴리머"). 대조군은 미처리 마우스를 나타낸다. 투여는 척수강내 (IT) 주사를 통해 수행하였다. 생물발광을 통해 Cre mRNA 전달을 평가하였고, 수득된 이미지는 도 11A-11C에 제시되어 있다.
- [0836] (ii) 50:50 중량비의 H27N:P2K25 및 Cre mRNA를 함유하는 나노입자 조성물 ("mRNA + 2nd 세대 폴리머")로 처리된 마우스는 N27N 폴리머 및 Cre mRNA 만을 함유하는 나노입자로 처리된 마우스와 비교하여, Cre mRNA의 뇌로의 전달에 있어서 상당히 더 많은 전달을 보여주었다. H27N:P2K25 및 Cre mRNA ("mRNA + 2nd 세대 폴리머")로 처리된 뇌의 추가 단면 분석에서 뇌 전체에 걸쳐 Cre mRNA의 분포를 보여주었다. 독성 또는 염증 징후는 관찰되지 않았다.
- [0837] 실시예 9
- [0838] 폴리머 II-41-3R, II-43-6, II-43-9, 및 II-43-10을 제조하였고, 본원에 제공된 실시예 10 및 12에서 사용하였다:



(II-41-3R)

[0839]



(II-43-6)

(II-43-9)

(II-43-10)

[0840]

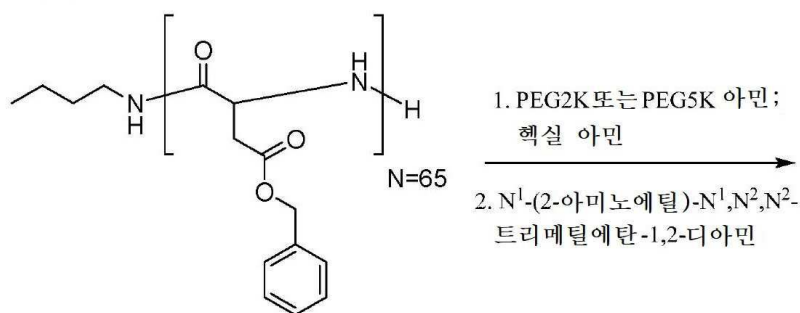
[0841]

상기 구조에서, 괄호 밖의 숫자 "65" 및 "29"는 폴리아미드 백본의 전체 중합도를 나타내며, 괄호 안의 영역이 반복 유닛임을 나타내는 것은 아니다. II-43-6, II-43-9 및 II-43-10은 동일한 폴리머 구조를 갖지만, 결사슬 변형 정도 (즉, 상대적인 양)가 다르다.

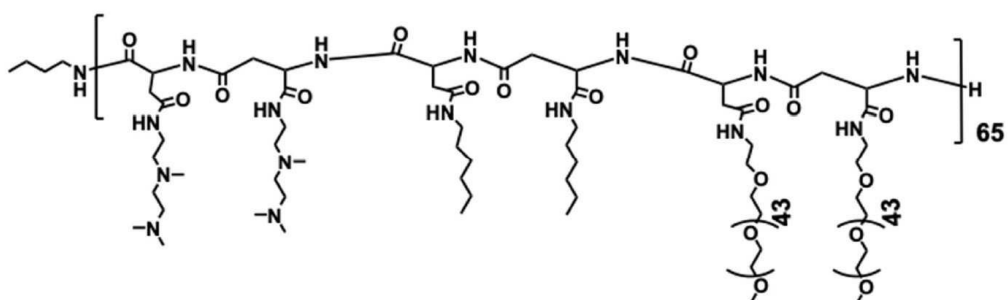
[0842]

II-41-3R, II-43-6, II-43-9, 및 II-43-10은 반응식 3에 도시된 바와 같이, PBLA를 PEG화 아민, 헥실 아민 및 N^1 -(2-아미노에틸)- N^1, N^2, N^2 -트리메틸에탄-1,2-디아민으로 변형시켜서 제조하였다.

반응식 3



[0843]



[0844]

[0845]

상기에서 "65"는 폴리아미드 백본에서 전체 중합도를 나타내고, 괄호 안의 영역이 반복 유닛임을 나타내는 것은 아니다. PEG2K 및 PEG5K는 에틸렌 옥사이드 유닛을 각각 대략 43개 및 113개 갖는, 중량-평균 분자량이 각각

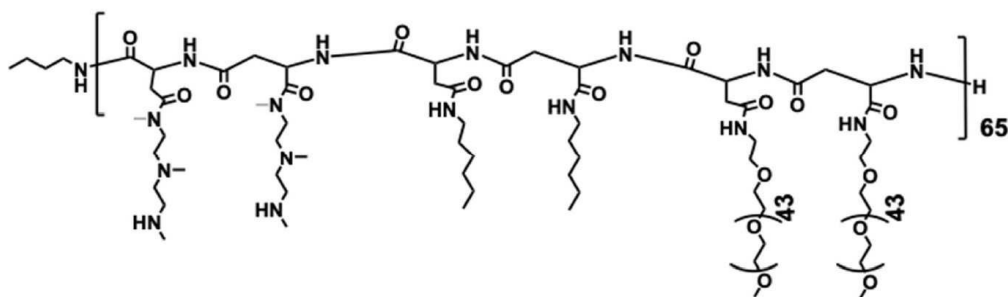
2000 및 5000 달톤인 PEG 폴리머를 나타낸다.

[0846]

예시되는 절차는 하기와 같다. 동결건조된 PBLA (50 mg, 0.0037 mMol)를 플라스크에 넣고, 테트라하이드로푸란 /N-메틸-2-피롤리딘 (각각 1 mL) 중에 용해시켰다. 투명한 용액에 n-헥실아민 (58.8 μ L, 0.44 mMol, 120 당량) 및 PEG2K 아민 (25 당량)을 부가하였고, 상기 투명한 반응 혼합물을 실온에서 24시간 동안 교반하였다. 대략 24 시간 후에, N^1 -(2-아미노에틸)- N^1, N^2, N^2 -트리메틸에탄-1,2-디아민 (PBLA 세그먼트의 벤질기에 대해 과량의 당량)을 온화한 무수 조건 하에 상기 투명한 혼합물에 부가하였다. 실온에서 대략 18시간 후에, 상기 반응 혼합물을 디에틸 에테르 (10 - 12X 부피, 35 mL)로 침전시켰다. 그 다음에 상기 침전물을 원심분리하고, 디에틸 에테르로 2회 세척하였다. 상기 폴리머를 1M HCl (3 mL) 중에 용해시키고, 3.5 - 5 KD 커트-오프 막에서 과량의 탈이온수로 투석하였다. 상기 용액의 pH가 5 내지 6인 경우, 투석을 중단하였고, 상기 용액을 동결건조하여 폴리머 생성물을 수득하였다.

[0847]

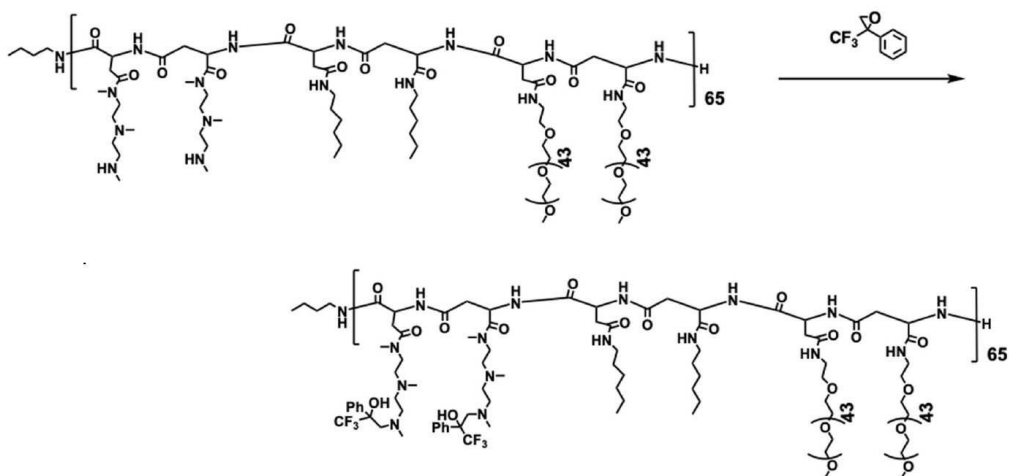
유사한 합성 프로토콜을 사용하여, 폴리머 P2K-TD, P2K-B3, 및 P2K-B12를 제조하였고, 본원에 제공된 실시예 10 및 12에서 사용하였다:



(P2K-TD)

[0848]

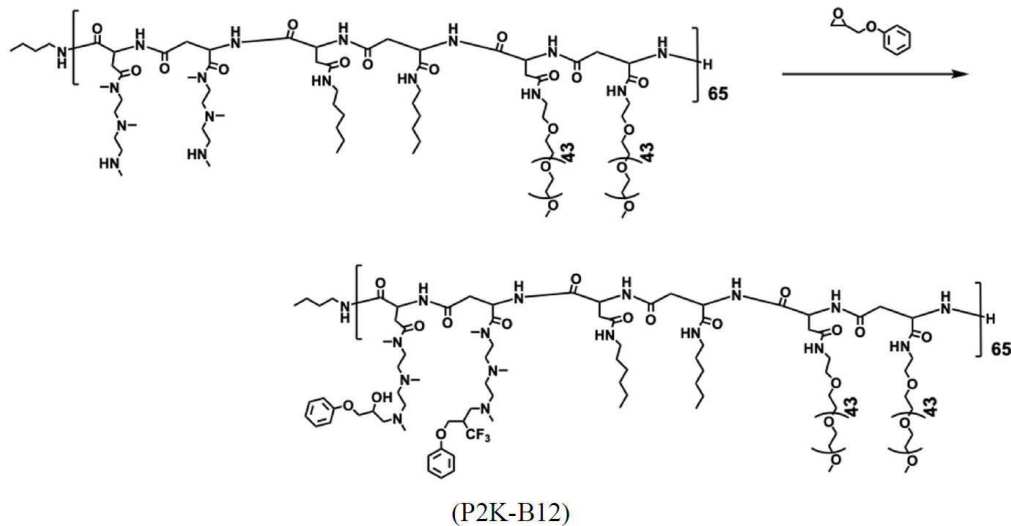
반응식 3A:



(P2K-B3)

[0849]

반응식 3B:



[0850]

[0851]

폴리머 P2K-TD는 P2K25의 유사한 합성 절차에 따라 제조하였다 (예: PBLA를 PEG화 아민, 헥실 아민 및 N^1, N^2 -디메틸- N^1 -(2-(메틸아미노)에틸)에탄-1,2-디아민으로 변형시킴). P2K-B3 및 P2K-B12는 적절한 에폭사이드 단편을 사용하여 P2KTD를 변형시켜서 제조하였다.

[0852]

실시예 10

[0853]

하기 실시예는 폴리머 나노입자를 사용하여 mCherry를 인간 1차 신경 전구 세포 (NPC) 및 Hep3B 세포로 전달하는 것을 예시한다.

[0854]

P2K25, II-41-3R, II-43-6, II-43-9, II-43-10, P2K-TD, P2K-B3, 및 P2K-B12 (실시예 1 및 9에 개시된 바와 같음)를 H27N (실시예 2에 개시된 바와 같음)과, 10:90 (도면에서 검정 막대), 20:80 (도면에서 자색 막대), 및 40:60 (도면에서 청색 막대)의 중량비 (모든 중량비는 폴리머 X:H27N으로 표시되며, 여기서 폴리머 X는 P2K25, II-41-3R, II-43-6, II-43-9, II-43-10, P2K-TD, P2K-B3, 또는 P2K-B12임)로 조합하였고, 생성된 혼합물을 mCherry mRNA와 조합하여 나노입자를 형성하였다. 생성된 나노입자를, 정의된 성장 인자를 포함하지만 혈청이 없는 배양 배지 중 Hep3B 세포 및 NPC에 부가하였다. 유세포 분석을 형질감염 2일 후에 수행하였고, mCherry+ 세포의 퍼센트를 측정하였다. 상기 결과를 도 12A (NPC) 및 12B (Hep3B)에 플로팅하였고, 여기서 x-축은 H27N 및 mCherry RNA가 혼합되어 나노입자를 형성하는 폴리머를 명명한다.

[0855]

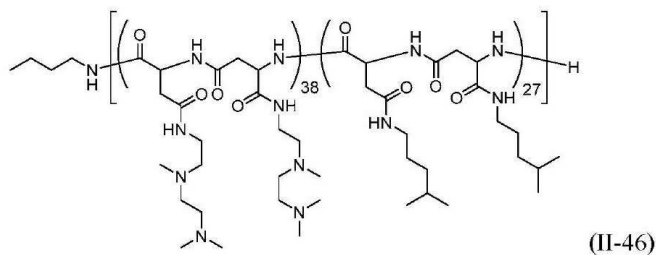
상기 결과는 P2K25, II-41-3R, II-43-6, II-43-9, II-43-10, P2K-TD, P2K-B3, 또는 P2K-B12 및 H27N을 함유하는 나노입자가 mCherry mRNA를 Hep3B 세포 및 NPC에 효과적으로 전달되었음을 보여주었다. 이러한 결과는 P2K25, II-41-3R, II-43-6, II-43-9, II-43-10, P2K-TD, P2K-B3, 또는 P2K-B12 및 H27N을 함유하는 나노입자는 안정적이고 페이로드를 전달하는데 효과적임을 나타낸다.

[0856]

실시예 11

[0857]

폴리머 II-46을 제조하였고, 본원에 제공된 실시예 12에서 사용하였다:

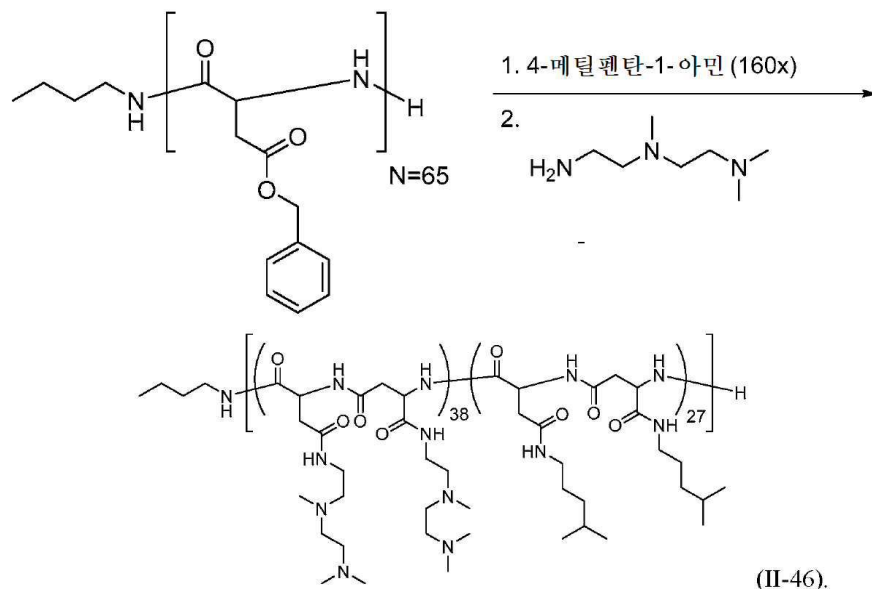


[0858]

[0859]

II-46은 PBLA를 N^1 -(2-아미노에틸)- N^1, N^2, N^2 -트리메틸에탄-1,2-디아민 및 4-메틸펜탄-1-아민으로 변형시켜서 제조하였다. 예시되는 절차는 반응식 4에 제공된다.

반응식 4



[0860]

[0861]

동결건조된 PBLA (50 mg, 0.0037 mMol)를 플라스크에 넣고, 테트라하이드로푸란/N-메틸-2-피롤리딘 (각각 1 mL) 중에 용해시켰다. 투명한 용액에 n-4-메틸펜탄-1-아민 (160 당량)을 부가하고, 상기 투명한 반응 혼합물을 실온에서 24시간 동안 교반하였다. 대략 24시간 후에, N¹-(2-아미노에틸)-N¹,N²,N²-트리메틸에탄-1,2-디아민 (PBLA 세그먼트의 벤질기에 대해 50 당량)을 온화한 무수 조건 하에 상기 투명한 혼합물에 부가하였다. 실온에서 대략 18시간 후에, 상기 반응 혼합물을 디에틸 에테르 (10 - 12X 부피, 35 mL)로 침전시켰다. 그 다음에 상기 침전물을 원심분리하고, 디에틸 에테르로 2회 세척하였다. 상기 폴리머를 1M HCl (3 mL) 중에 용해시키고, 3.5 - 5 KD 커트-오프 막에서 과량의 탈이온수로 투석하였다. 상기 용액의 pH가 5 내지 6인 경우, 투석을 중단하였고, 상기 용액을 동결건조하여 폴리머 생성물을 수득하였다.

[0862]

실시예 12

[0863]

하기 실시예는 폴리머 나노입자를 사용하여 mCherry를 인간 1차 신경 전구 세포 (NPC) 및 Hep3B 세포로 전달하는 것을 예시한다.

[0864]

P2K25, II-41-3R, II-43-6, II-43-9, II-43-10, P2K-TD, P2K-B3, 및 P2K-B12 (실시예 1 및 9에 개시된 바와 같음)를 II-46 (실시예 11에 개시된 바와 같음)과 조합하였고, 생성된 혼합물을 mCherry mRNA와 조합하여 나노입자를 형성하였다. 생성된 나노입자를, 정의된 성장 인자를 포함하지만 혈청이 없는 배양 배지 중 Hep3B 세포 및 NPC에 부가하였다. 유세포 분석을 형질감염 2일 후에 수행하였고, mCherry+ 세포의 퍼센트를 측정하였다. 상기 결과를 도 13A (NPC) 및 13B (Hep3B)에 플로팅하였고, 여기서 x-축은 II-46 및 mCherry RNA가 혼합되어 나노입자를 형성하는 폴리머를 명명한다.

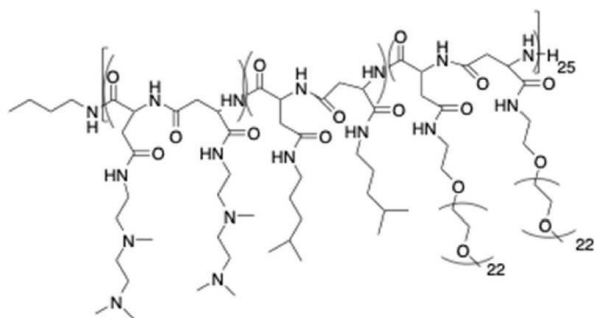
[0865]

상기 결과는 P2K25, II-41-3R, II-43-6, II-43-9, II-43-10, P2K-TD, P2K-B3, 또는 P2K-B12 및 II-46을 함유하는 나노입자가 mCherry mRNA를 Hep3B 세포 및 NPC에 효과적으로 전달하였음을 보여주었다. 이러한 결과는 P2K25, II-41-3R, II-43-6, II-43-9, II-43-10, P2K-TD, P2K-B3, 또는 P2K-B12 및 II-46을 함유하는 나노입자는 안정적이고 페이로드를 전달하는데 효과적임을 나타낸다.

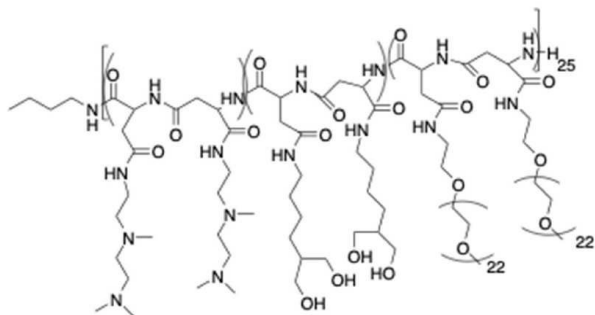
[0866]

실시예 13

[0867] 폴리머 II-66, II-67, II-68, II-72, 및 II-75를 제조하였고, 본원에 제공된 실시예 14에서 사용하였다:

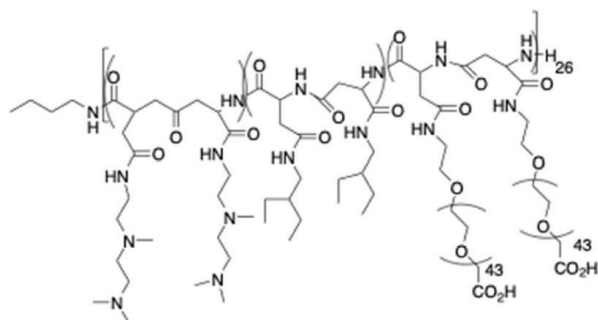


II-66-2, II-66-3, 및 II-66-4

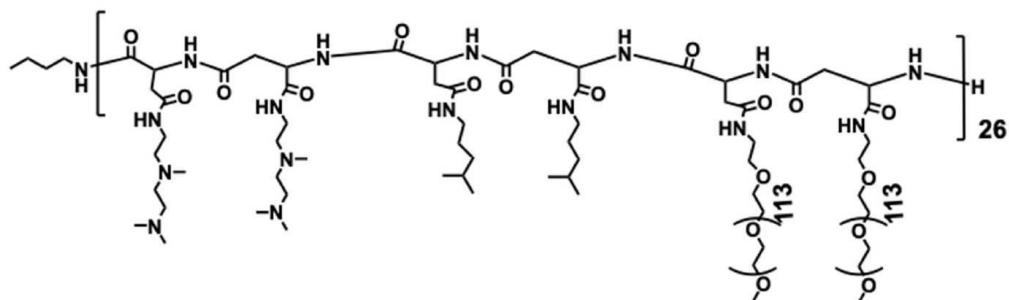


II-67-1, II-67-2, 및 II-67-3

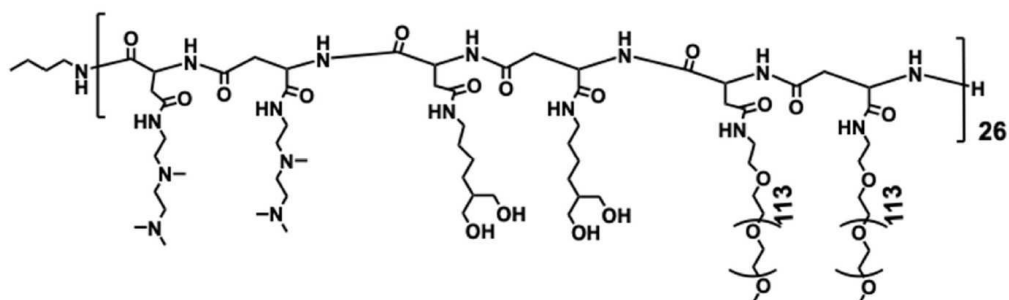
[0868]



II-68-1, II-68-2, II-68-3, II-68-4, II-68-5, II-68-6, 및 II-68-7



II-72-1, II-72-2, II-72-5, 및 II-72-6



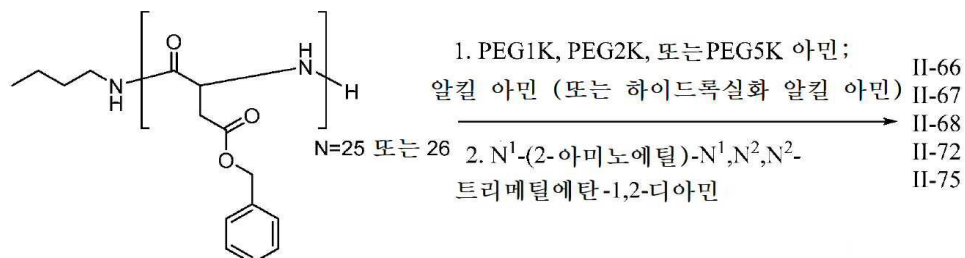
II-75-2

[0869]

[0870]

폴리머 II-66, II-67, II-68, II-72, 및 II-75는 PBLA를 PEG화 아민, 알킬 아민 (또는 하이드록실화 알킬 아민), 및 N^1 -(2-아미노에틸)- N^1, N^2, N^2 -트리메틸에탄-1,2-디아민으로 변형시켜서 제조하였다. 예시되는 절차는 반응식 5에 제공된다.

반응식 5



[0871]

[0872]

예시되는 절차는 하기와 같다: 동결건조된 PBLA (50 mg, 0.0037 mmol; 중합도 ("DP") 25)를 플라스크에 넣고, 테트라하이드로푸란/ N -메틸-2-피롤리딘 (각각 1 mL) 중에 용해시켰다. 투명한 용액에 4-메틸펜탄-1-아민 (0.44 mmol, 120 당량) 및 PEG1K 아민 (25 당량)을 부가하고, 상기 투명한 반응 혼합물을 실온에서 24시간 동안 교반 하였다. 대략 24시간 후에, N^1 -(2-아미노에틸)- N^1, N^2, N^2 -트리메틸에탄-1,2-디아민 (PBLA 세그먼트의 벤질기에 대

해 과량의 당량)을 온화한 무수 조건 하에 상기 투명한 혼합물에 추가하였다. 실온에서 대략 18시간 후에, 상기 반응 혼합물을 디에틸 에테르 (10 - 12X 부피, 35 mL)로 침전시켰다. 그 다음에 상기 침전물을 원심분리하고, 디에틸 에테르로 2회 세척하였다. 상기 폴리머를 1M HCl (3 mL) 중에 용해시키고, 3.5 - 5 KD 컷트-오프 막에서 과량의 탈이온수로 투석하였다. 상기 용액의 pH가 5 내지 6인 경우, 투석을 중단하였고, 상기 용액을 동결건조하여 폴리머 생성물을 수득하였다. 동일한 절차를 표 2에 요약된 바와 같은 상이한 양의 PEG1K 아민, PEG2K 아민, 및 PEG5K 아민에 사용하였다. 각 폴리머에 대한 생성된 결사슬 변형 정도를 핵 자기 공명 (NMR) 분광법에 의해 정량화하였고, 표 2에 요약하였다.

표 2

[0873] 표 2는 각 폴리머 II-66, II-67, II-68, II-72, 및 II-75에 대한 출발 폴리머의 중합도, 결사슬 변형을 위한 반응 조건, 및 변형 후에 생성된 결사슬 비율을 열거하였다.

PBLA DP	폴리머	PEG	트리아민	(하이드록시) 알킬 아민 블록	반응 조건
25	II-66-2	3	21	1	10x P1K-아민
25	II-66-3	3	20	2	15x P1K-아민
25	II-66-4	3	21	1	125x P1K-아민
25	II-67-1	2	13	10	10x P1K-아민
25	II-67-2	3	12	10	15x P1K-아민
25	II-67-3	3	13	9	125x P1K-아민
26	II-68-1	4	10	12	5x P2K-아민
26	II-68-2	8	9	9	10x P2K-아민
26	II-68-3	11	9	6	15x P2K-아민
26	II-68-4	14	8	4	25x P2K-아민
26	II-68-5	7	13	6	10x P2K-아민
26	II-68-6	8	16	2	10x P2K-아민
26	II-68-7	10	15	1	10x P2K-아민
26	II-72-1	5	8	13	5x P5K-아민
26	II-72-2	10	8	8	10x P5K-아민
26	II-72-5	10	8	8	10x P5K-아민
26	II-72-6	12	10	4	10x P5K-아민
26	II-75-2	7	14	5	10x P5K-아민

[0874] 실시예 14

[0875] 하기 실시예는 폴리머 II-66 및 II-67이 Cas9 RNP를 Hep3B 세포 및 HEK293T 세포에 전달하는 능력을 예시한다.

[0876] Hep3B 세포를 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 및 10% 우태아 혈청 (FBS)으로 이루어진 배양 배지 중에 50,000개 세포/웰로 시딩하여, 40 pmol Cas9 RNP를 형성하였다. SERPINA1 유전자를 표적으로 하는 sgRNA를 제조하였고, Cas9 단백질을 천천히 부가하고, 피펫팅으로 완전히 혼합하였다. 별도로, 폴리머 II-66 및 II-67을 함유하는 조성물을 제조하였다. 생성된 조성물을 sgRNA와 혼합하여 나노입자를 형성하였다. 생성된 나노입자를 Hep3B 세포에서 처리하고, 형질감염 24시간 후에 유세포 분석을 사용하여 RFP+ 세포를 정량화하였다.

[0877] 유사하게, II-66 및 II-67 조성물을 RFP mRNA와 혼합하여 나노입자를 형성하였고, 생성된 나노입자를 HEK293T 세포에서 처리하고, 형질감염 24시간 후에 유세포 분석을 사용하여 RFP+ 세포를 정량화하였다. 결과는 표 3에 제시되어 있다.

표 3

[0878]

폴리머	HEP3B RFP+ (%)	HEK293T RFP+ (%)
II-66-2	0	1.4
II-66-3	0.5	2
II-66-4	0.7	1.5
II-67-1	0.8	4.1
II-67-2	29.4	12.9
II-67-3	34.3	12.3
H27N	32	12.3

대조군	0.4	1.7
-----	-----	-----

[0879] 결과가 보여주는 바와 같이, 말단 디올 모이어티를 함유하는 폴리머 II-67은 HEP3B 세포의 경우 H27N 양성 대조군 폴리머에 필적하는 RFP 활성을 가졌다 (II-67의 경우 RFP = ~29 대 H27N의 경우 RFP = ~32). 또한, 폴리머 II-67은 HEK293T 세포의 경우 H27N 양성 대조군 폴리머에 필적하는 RFP 활성을 가졌다 (II-67의 경우 RFP = ~12 대 H27N의 경우 RFP = ~12).

[0880] 실시예 15

[0881] 하기 실시예는 본 발명의 폴리머를 사용하여 ai9 마우스에 의해 나타내는 바와 같이, Cre mRNA를 마우스에게 전달하는 것을 예시한다.

[0882] 도 14에 제시된 리포터 서열을 갖는 ai9 마우스를, 50:50 중량비의 H27N:P2K25 및 Cre mRNA로 제제화된 나노입자 ("H27N + 50% P2K25")로 처리하였다. 미처리 마우스를 대조군으로 제공하였다. 나노입자의 특성은 표 4에 요약하였다.

표 4

[0883]

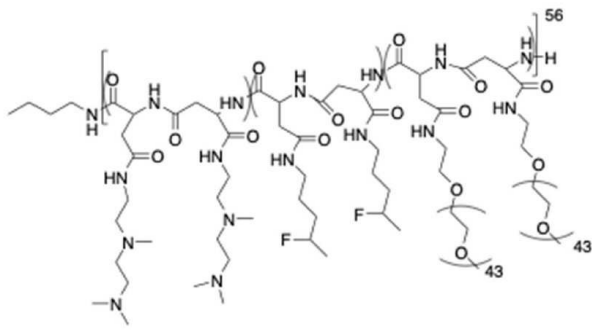
입자	동결건조 전			동결건조 후		
	직경 (nm)	제타-전위	PDI	직경 (nm)	제타-전위	PDI
H27N + 50% P2K25	70 nm	~ +5 mV	0.39	69 nm	~ +2 mV	0.33

[0884] 생성된 나노입자 제제를 마우스에게 척수강내 (IT) 주사를 통해 투여하였다. 처리 10일 후에, 상기 마우스를 CO₂ 질식을 통해 희생시키고, 1% 헤파린 식염수 (heparinized saline) 그 다음에 PBS로 좌심실을 통해 관류하여 혈액을 제거하였다. 그 다음에 뇌 및 척수를 채취하였다. 상기 마우스의 뇌를 관상면 (coronal plane)에서 100 μ m 두께로 절단하고, 모든 다른 단면을 수집하고, 이미지화하였다.

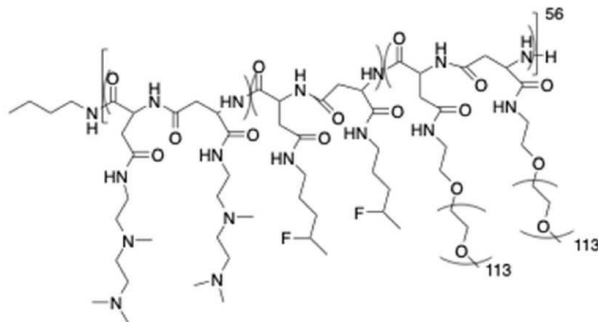
[0885] 생물발광을 통해 뇌의 앞쪽 (rostral) 및 뒤쪽 (caudal) 부분에 대해 인 비보 Cre mRNA 전달을 평가하였다. 생물발광 분석으로 상기 나노입자 조성물이 Cre mRNA를 뇌간 및 소뇌의 뒤쪽 부분 (즉, 뇌척수액 (CSF)에 의해 둘러싸인 뇌 영역)으로 전달하였음을 보여주었다.

[0886] 실시예 16

[0887] 2K-PEG-플루오로-폴리머 및 5K-PEG-플루오로 폴리머를, 본 실시예에 기재된 절차를 사용하여 제조하였다.



2K-PEG-플루오로-폴리머

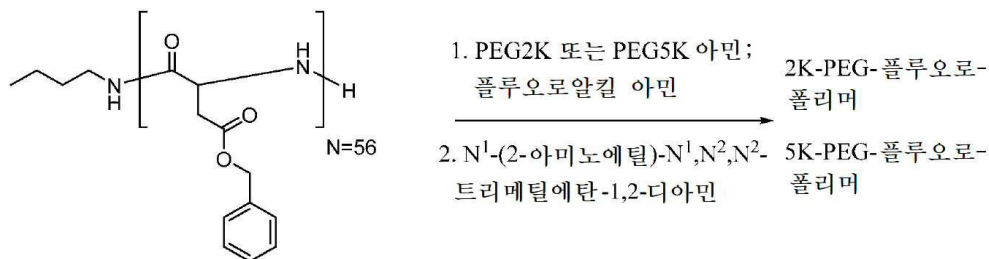


5K-PEG-플루오로-폴리머

[0888]

[0889] 2K-PEG-플루오로-폴리머 및 5K-PEG-플루오로 폴리머는, PBLA를 PEG화 아민, 플루오로알킬 아민 및 N^1 -(2-아미노에틸)- N^1, N^2, N^2 -트리메틸에탄-1,2-디아민으로 변형시켜서 제조하였다. 예시되는 절차는 반응식 6에 제공된다.

반응식 6



[0890]

[0891] 예시되는 절차는 하기와 같다. 동결건조된 PBLA (50 mg, 0.0037 mmol; 중합도 ("DP") 56)를 플라스크에 넣고, 테트라하이드로푸란/ N -메틸-2-피롤리딘 (각각 1 mL) 중에 용해시켰다. 투명한 용액에 4-플루오로펜탄-1-아민 (0.44 mmol, 120 당량) 및 PEG2K 아민 (25 당량)을 부가하고, 상기 투명한 반응 혼합물을 실온에서 24시간 동안 교반하였다. 대략 24시간 후에, N^1 -(2-아미노에틸)- N^1, N^2, N^2 -트리메틸에탄-1,2-디아민 (PBLA 세그먼트의 벤질기에 대해 과량의 당량)을 온화한 무수 조건 하에 상기 투명한 혼합물에 부가하였다. 실온에서 대략 18시간 후에, 상기 반응 혼합물을 디에틸 에테르 (10 - 12X 부피, 35 mL)로 침전시켰다. 그 다음에 상기 침전물을 원심분리하고, 디에틸 에테르로 2회 세척하였다. 상기 폴리머를 1M HCl (3 mL) 중에 용해시키고, 3.5 - 5 KD 커트-오프 막에서 과량의 탈이온수로 투석하였다. 상기 용액의 pH가 5 내지 6인 경우, 투석을 중단하였고, 상기 용액을 동결건조하여 폴리머 생성물을 수득하였다. 5K-PEG-플루오로 폴리머를 제조하기 위해, PEG5K 아민을 사용하여 동일한 절차를 수행하였다.

[0892]

본 발명을 수행하기 위해 본 발명자들에게 알려진 최상의 방식을 포함하여, 본 발명의 바람직한 구체예가 본원에 서술된다. 이러한 바람직한 구체예의 변형은 전술한 설명을 읽은 후 통상의 기술자에게 자명해질 수 있다. 본 발명자들은 숙련된 기술자가 이러한 변형을 적절하게 채택할 것으로 기대하고, 본 발명자들은 본 발명이 본원에 구체적으로 설명된 것과 다르게 실시될 수 있다는 것을 의도한다. 따라서, 본 발명은 적용가능한 법률에 의해 허용되는 바와 같이 본원에 첨부된 청구범위에 기재된 주제의 모든 변형 및 균등물을 포함한다. 또한, 이

의 모든 가능한 변형에서 전술한 요소의 임의의 조합은 본원에서 달리 지시되거나, 또는 문맥에 의해 달리 명백히 모순되지 않는 한 본 발명에 포함된다.

[0893] 값의 범위가 제공되는 경우, 문맥이 명확하게 달리 명시하지 않는 한, 해당 범위의 상한과 하한 사이에 있는, 각각의 개재 값 (intervening value), 하한 단위의 10분의 1까지, 및 기재된 범위 내에 있는 기타 기재된 값 또는 개재 값이 본 발명에 포함되는 것으로 이해된다. 이들 더 작은 범위의 상한 및 하한은 독립적으로 더 작은 범위에 포함될 수 있으며, 또한 기재된 범위에서 명시적으로 제외된 한계를 고려하여, 본 발명에 포함된다. 기재된 범위가 한계들 중 하나 또는 둘 다를 포함하는 경우, 포함된 한계들 중 하나 또는 둘 다를 제외한 범위도 본 발명에 포함된다.

[0894] 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용되는 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기재된 것과 유사하거나 또는 균등한 임의의 방법 및 물질이 본 발명의 실시 또는 테스트에 사용될 수 있으나, 바람직한 방법 및 물질이 본원에 기재되어 있다. 본원에 언급된 모든 간행물은 본원에 간행물이 인용된 것과 관련된 방법 및/또는 물질을 개시하고 설명하기 위해 참조에 의해 본원에 통합된다.

[0895] 본원 및 첨부된 청구범위에서 사용된, 단수 형태 ("a", "an" 및 "the")는 문맥이 명백하게 달리 지시하지 않는 한 복수 지시 대상을 포함한다는 점에 유의해야 한다. 따라서, 예를 들어, "복합체 (a complex)"에 대한 언급은 이러한 다수의 복합체를 포함하고 "Cas9 폴리펩티드 (the Cas9 polypeptide)"에 대한 언급은 하나 이상의 Cas9 폴리펩티드 및 통상의 기술자에게 알려진 이의 균등물에 대한 언급을 포함한다. 청구항은 임의의 선택적 (optional) 요소를 배제하도록 작성될 수 있다는 것에 유의한다. 따라서, 이러한 진술은 청구항 구성요소의 기재와 관련하여, "단독으로 (solely)", "단지 (only)" 등과 같은 배타적 용어의 사용, 또는 "부정적" 한정어의 사용에 대한 선행적 근거 (antecedent basis)로 제공되는 것으로 의도된다.

[0896] 명확성을 위해 별개의 구체예의 맥락에서 기재된 본 발명의 소정의 특징들은 또한 단일 구체예에서 조합되어 제공될 수 있는 것으로 이해된다. 반대로, 간결성을 위해 단일 구체예의 맥락에서 기재된 본 발명의 다양한 특징은 또한 개별적으로 또는 임의의 적절한 하위-조합으로 제공될 수 있다. 본 발명에 속하는 구체예들의 모든 조합은 본 발명에 의해 구체적으로 포함되며, 각각의 모든 조합이 개별적으로 및 명시적으로 개시된 것처럼 본원에 개시된다. 또한, 다양한 구체예들 및 이의 요소의 모든 하위-조합이 또한 본 발명에 의해 구체적으로 포함되며, 각각의 모든 하위-조합이 개별적으로 및 명시적으로 본원에 개시된 것처럼 본원에 개시된다.

[0897] 본원에서 논의된 간행물은 본 출원의 출원일 이전에 이들의 개시내용에 대해서만 제공된다. 본 명세서의 어떠한 것도 본 발명이 선행 발명이라는 이유로 그러한 간행물보다 선행할 자격이 없다는 것을 인정하는 것으로 해석되어서는 안된다. 또한, 제공된 발행일은 개별적으로 확인이 필요할 수 있는 실제 발행일과 상이할 수 있다.

스트렙토코커스 피오케네스 Cas9
GenBank AKP81606

1	mdkky ¹ sgld	igt ² svg ³ wav	jt ⁴ ddykvpsk	kfk ¹ vgntdr	hs ² lkn ³ l ⁴ ga	ll ¹ fdsgetae
61	atr ¹ lkr ² tarr	ry ³ trknric	yl ⁴ geifsnem	ak ¹ vddsf ² fhr	lees ³ flveed	kk ⁴ her ¹ pi ² fg
121	nivdevayhe	ky ³ pti ⁴ yh ¹ lrk	kl ² vdstdkad	lr ¹ li ³ yalah	mik ⁴ r ¹ gh ² fli	egd ³ l ⁴ np ¹ dn ² sd
181	vd ¹ klfiqlvg	ty ² nglfeep	ina ³ sgvdaka	ils ⁴ arlsksr	rlen ¹ liaglp	gek ² ks ³ lfgn
241	lialslglt ¹ p	n ² fksnfdlae	dak ³ lqlskdt	y ⁴ dddl ¹ dnlla	q ² lgdya ³ adlf	laa ⁴ knlsdai
301	llsdilrvnt	eit ² kaplas	mik ³ rydenhq	dl ⁴ tlkalvr	q ¹ lp ² eky ³ kei	ff ⁴ dqskngya
361	gyidg ¹ g ² asge	ef ³ ykfikpil	ek ⁴ mdgteell	vk ¹ lnredllr	kg ² rtfdngsi	ph ³ qihlgelh
421	ailrrgedfy	p ² flkdnreki	ek ³ iltfripy	y ⁴ v ¹ gplargns	rf ² awmtrkse	eti ³ tpwnfee
481	vvdkgasags	fier ² mtnfdk	nl ³ pnekvlpk	hsl ⁴ lyeyftv	yn ¹ eltkvkyv	teg ² mrkpafl
541	sgeqkkaivd	ll ² fctnrkvt	vk ³ qlkedyfk	kic ⁴ efdsvei	sg ¹ vedrfnas	lgt ² yhdl ³ lki
601	ikdkdfldne	ene ² dilediv	lt ³ tlfedre	mie ⁴ erlktya	hl ¹ fadkwmkg	lkr ² rrytgw
661	rlsrklingi	rd ² qsgktil	df ³ lksdgfan	rn ⁴ fmqlihdd	slt ¹ fkediqk	aq ² vsgqgsdl
721	hehianlags	pa ² ikgilt	vk ³ vdelvkv	m ⁴ gr ¹ h ² ken ³ lv	iem ⁴ arehgtt	qk ¹ gqknsrer
781	m ¹ krieegike	l ² sgqilkenp	ven ³ tqlgnek	ly ⁴ lylqng ¹ r	d ² myvdqeldi	nr ³ lsdy ⁴ hvdh
841	lvpgsflkd ¹ d	sid ² nkvltrs	dk ³ nr ⁴ gksdnv	p ¹ seevv ² kkmk	ny ³ wrqlnak	lit ⁴ qrkfdnl
901	lkaerggise	l ² akagfikrq	lve ³ trqitkh	va ⁴ qildsrnm	tk ¹ yden ² nkli	rev ³ kvitiks
961	klvsdf ¹ rkd ² f	q ³ fykvrein	y ⁴ h ¹ ahdaylh	av ² g ³ talikk	yp ⁴ kl ¹ esefvy	gd ² ykvydv ³ rk
1021	miaksegeig	kat ² akyffys	nim ³ ffktei	tl ⁴ angeirkr	pl ¹ ietngetg	ei ² wdkgrdf
1081	atvrkvlsm ¹ p	q ² vnivk ³ ktev	qt ⁴ g ¹ gfskesi	lp ² krnsdkli	ark ³ kdwpk	yg ⁴ g ¹ fsptva
1141	ysvlv ¹ vake	kg ² ksklksv	kel ³ lgitime	rss ⁴ feknpid	flea ¹ kykev	kk ² dliiklpk
1201	yslfele ¹ ng ² r	kr ³ mlasagel	qk ⁴ gnelalps	ky ¹ vnflylas	hye ² lkspe	dne ³ qqlfve
1261	qhkhy ¹ ldei	egi ² sefskrv	ila ³ danldkv	lsay ⁴ nkhrdk	pire ¹ qaenii	hl ² ftlnlga
1321	paafky ¹ fdtt	id ² kryststk	ev ³ latling	sit ⁴ glyetri	dl ¹ sqlggd	

Motif 1

Domain 1

Motif 2

Motif 3

Domain 2

Motif 4

도면
도면1

프린시플라 톨라렌시스 아종 노비시타 U112 Cpf1

1 msiyqefvnk yslsktlrfe lipqkltlen ikarglildd ekrakdykka kqildkyhgf
61 fieceilssvc isedllqnyv dvyfklkksd ddnlqkdffs akdtikkgis eyikdsefk
121 nlfngnlida kkgesdlil wlkgskdngi elfkansdit didaalelik sfkgwttyfk
181 gfhenrkvy ssndiptsii yriyddnlpk flenkakyes lkdapeain yegikkdlae
241 eltfdidyt sevngrvfsl devfeianfn nylngsgitk fntiigkf v ngentkrkgyi
301 neyinlysqg indktlkkyk msvlffqils dtesksfvid kledsdsvt tmsfyeqla
361 afktveeksi ketlsilfd lkaqlidlsk iyfkndksit dlsqvfddy svigtavley
421 itqgiapkn dnpkskeqel iaktekaky lsletiklal eefnhrdid kqcrfeela
481 nfaaipmfd eiagnkdnla qisikyngqg kkdllgasae ddvkaikdl dqtntlhkl
541 kifhigsed kanildkdeh fylvfeecyf elanivplyn kirnyitqkp ysdekfklnf
601 enstlangwd knkepdntai lfikdkyyl gymnkknki fddkaikenk gegykkivk
661 lllpgankmlp kvfsaksik fynpsedilr irnhsthtkn gspqkyekf efniedcrkf
721 idfykgsisk hpewkdfgr fsdtgrynsi defyrevenq gykltfenis esyidsvng
781 gklylfiqyn kdfsayskgr pulhtlywka lfdernlqdv vyklngaeal fyrrksipkk
841 ithpakeaia nknkdnpkke svfeydlidk krftedkfff hcpitlnfks sgankfnde
901 nlllkekand vhlisidrg rhlaytltvd gkgnikqgt fnligndrmk tnyhdklaai
961 ekdrdsarkd wkinnikem kegylsqvvh eiaklvieyn aivvedlnf gfkrgfkve
1021 kvvyqklekm lieklnylv kdnefdktg vlrayqltap fetfkmqg tgiyyvpag
1081 ftskipvgt fvnqlypkye svksqeffs kfdki cynld kyfefsfdy knfgdkaakg
1141 kwtiastgr linfrnsdkn hmwtdrevvp tkelekilkd ysieyghgec ikaaicgesd
1201 kkffakltsv lntilgmns ktgteldyli spvadvnngnf fdsrqapkm pqdadangay
1261 hlgkglml griknqegk klnlviknee yfefvgnrn

도면2

도면3

AsCpfl

```

1 mtqfegftnl yqvsktlrfe lipqgktlkh iqeggfieed karndhykel kpiidriykt
61 yadqclqlvq ldwenlsaai dsyrkektee trnalieeqa tyrnaihdyf igrtdnltda
121 inkraeiyk glfkaelfng kvlkqlgtvt ttehenallr sfdkfttyfs gfyenrknvf
181 saedistaip hrivqdnfnp fkenchiftr litavpslre hfenvkkaig ifvstsieev
241 fsfpfynqll tqtqidlynq llggisreag tekikglnev lnlaiknde tahiaslph
301 rfiplfkqil sdrntlsfil eefksdeevi qsfckyktll rnenvletae alfnelnsid
361 lthifishkk letissalcd hwdtlrnaly erriseltgk itksakekvq rslkhedinl
421 geiisaagke lseafkqkts eilshahaal dqplpttlkk geekeilksq ldsllglyhl
481 ldwfavdesn evdpefsarl tgiklemeps lsfnkarny atkpkysvek fklnfqmpnl
541 asgwdvnkek nngailfvkn glyylgimpk qkgrykalsf eptektsegef dkmyydyfnd
601 aakmipkcst qlkavtahfq thttpillsn nfiepleitk eiylndnpek epkktqtaya
661 kktgdqkggyr ealckwidft rdflskytkt tsidlsslrp ssqykdlgey yaenplylh
721 isfriaeake imdavetgkl ylfqiynkdf akghhgkpnl htlywtglfs penlaksik
781 lnggaelfyr pksrmkrmah rlgekmlnkk lkdqktpipd tlyqelydyv nhrshdlsd
841 earallpnvi tkevsheik drrftsdkff fhvptltnyq aanspskfnq rvnaylkehp
901 etpiigidrg ernliyitvi dstgkileqr slntiqqfdy qkldnreke rvaarqawsv
961 vgtikdlkqg ylsqviheiv dlmihyqavv vlenlnfgfk skrtgiaeka vyqqfekmli
1021 dklncnlvldk ypaekvggv npyqltdqft sfakmgtqsg flfyvpapyt skidpltgfv
1081 dpfvwktikn hesrkhfleg fdfllhydvkt gdfilhfkmn rnlsfgrglp gfm pawdivf
1141 eknetqfdak gtpfiagkri vpvienhrft gryrdlypan elialleekg ivfrdgsnl
1201 pkllenddsh aidtmvalir svlqmrnsna atgedyinsp vrldngvcfd srfqnpewpwm
1261 dadangayhi alkqglllnh lkeskdldkq ngisnqdwla yigelnr

```

도면4

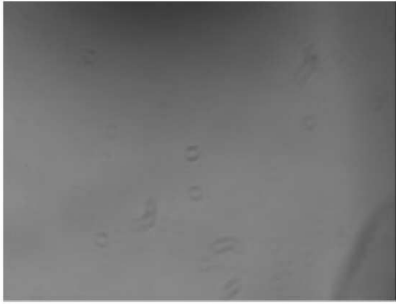
LbCpfl

```

AASKLEKFTNCYSLSKTLRFKAIPVGKTQENIDNKRLLEVEDEKRAEDYKGVKKLLDRYYL
SFINDVLHSIKLKNLNNYISLFRKKTRTEKENKELENLEINLRKEIAKAFKGAAGYKSLF
KKDIIETILPEAADDKDEIALVNSFNGFTTAFTGFFDNRENMFSEEAKSTSIAFRCINEN
LTRYISNMDFEYKVDIAFDKHEVQEIKEKILNSDYDVEDFFEGEFFNFVLTQEGIDVYNA
IIGGFVTESGEKIKGLNEYINLYNAKTKQALPKFKPLYKQVLSRESLSFYGEGYTSDEE
VLEVFRNTLNKNSEIFSSIKKLEKLFKNFDEYSSAGIFVKNGPAISTISKDIFGEWNLIR
DKWNAEYDDIHLKKKAVVTEKYEDDRRSFKKIGSFSLEQLQEYADADLSVVEKLKEIII
QKVDEIYKVYGSSEKLFDAFVLEKSLKKNDAVVAIMKDLLDSVKSFENYIKAFFGEGKE
TNRDESFYGDFVLAYDILLKVDHIYDAIRNYVTQKPYSKDKFKLYFQNPQFMGGWDKDKE
TDYRATILRYGSKYYLAIMDKKYAKCLQKIDKDDVNGNYEKINYKLLPGPNKMLPKVFFS
KKWMAYYNPSEDIQKIYKNGTFKKGDMFNLNDCHKLIDFFKDSISRYPKWSNAYDFNFSE
TEKYKDIAGFYREVEEQGYKVSFESASKKEVDKLVEEGKLYMFQIYNKDFSDKSHGTPNL
HTMYFKLLFDENNHGQIRLSGGAELFMRRASLKKEELVHPANSPIANKNPDNPKKTTTL
SYDVYKDKRFSEDQYELHIPAIANKCPKNIFKINTEVRVLLKHDDNPYVIGIDRGERNLL
YIVVVDGKGNIVEQYSLNEIINNFGIRIKTDYHSLLDKKEKERFEARQNWTSIENIKEL
KAGYISQVVKICELVEKYDAVIALEDLNSGFKNRSRVKVEKQVYQKFEKMLIDKLNMYVD
KKSNPCATGGALKGYQITNKFESFKSMSTQNGFIFYIPAWLTSKIDPSTGFVNLLKTKYT
SIADSKKFISSEFDRIMYVPEEDLFEFALDYKNFSRTDADYIKKWKLYSYGNRIRIFAAK
KNNVFAWEVCLTSAYKELFNKYGINYQQGDIRALLCEQSDKAFYSSFMALMSLMLQMRN
SITGRTDVDFLISPVKNSDGIFYDSRNYEAQENAILPKNADANGAYNIARKVLWAIQGFK
KAEDEKLDKVKIAISNKEWLEYAQTSVK

```

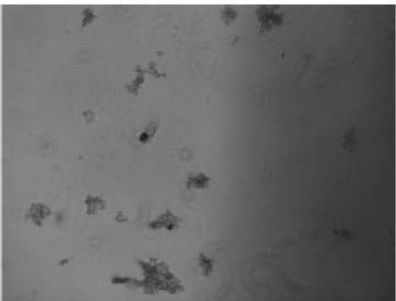
도면5



폴리머 단독
도 5A

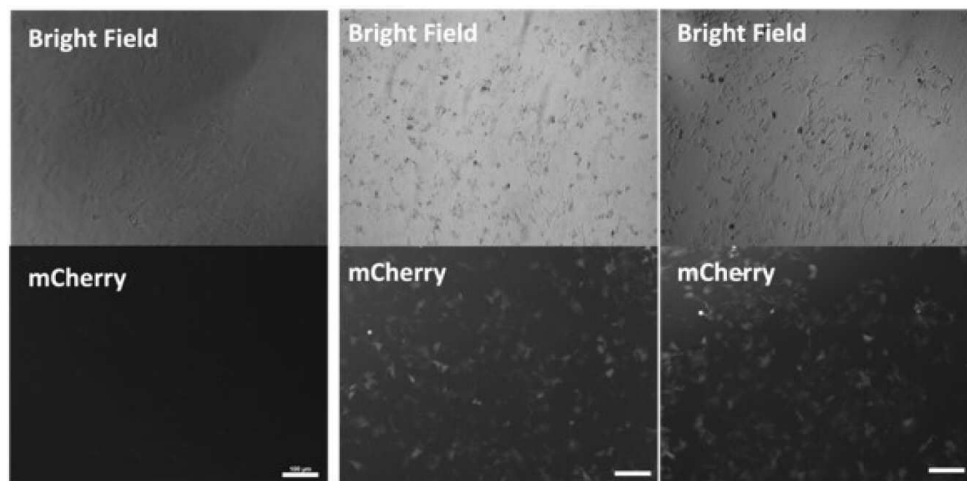


H27N + 40% P2K25
도 5B



H27N
도 5C

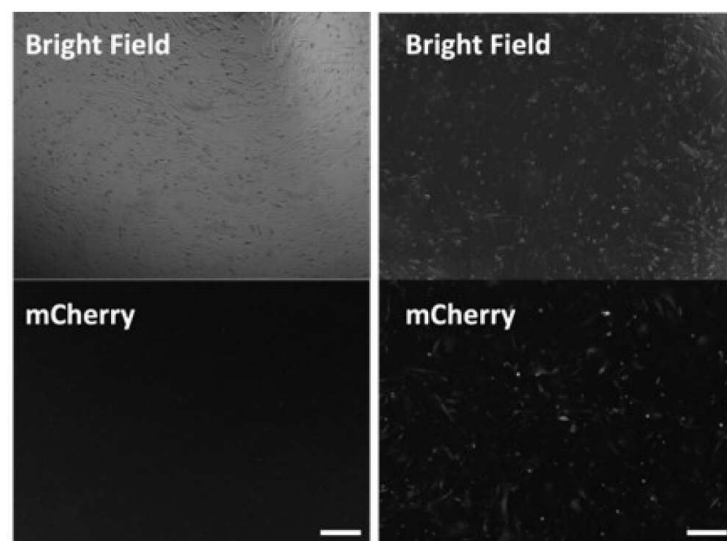
도면6



도 6A

도 6B

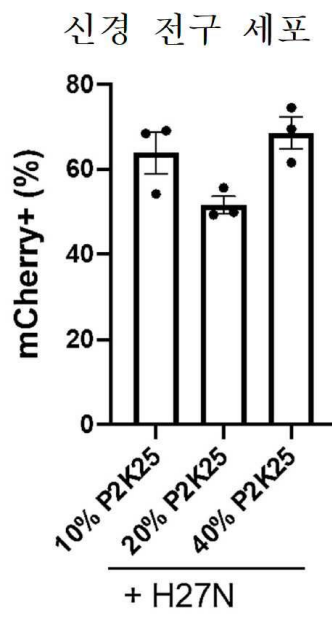
도면7



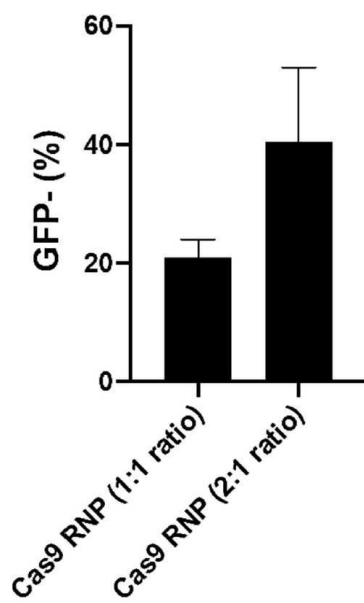
도 7A

도 7B

도면8



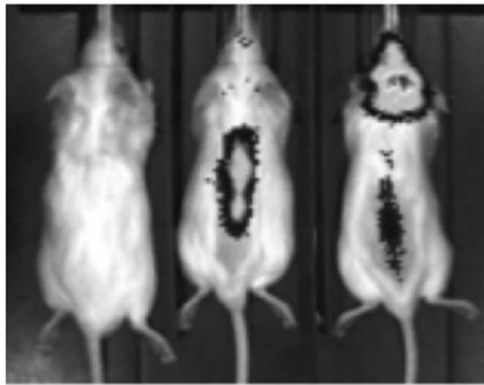
도면9



도면10

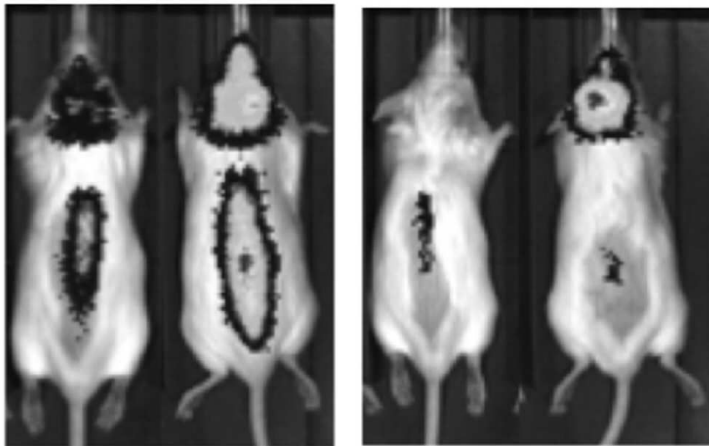


도면11



대조군 mRNA + 1st 폴리머 mRNA + 2nd 세대 폴리머

도 11A



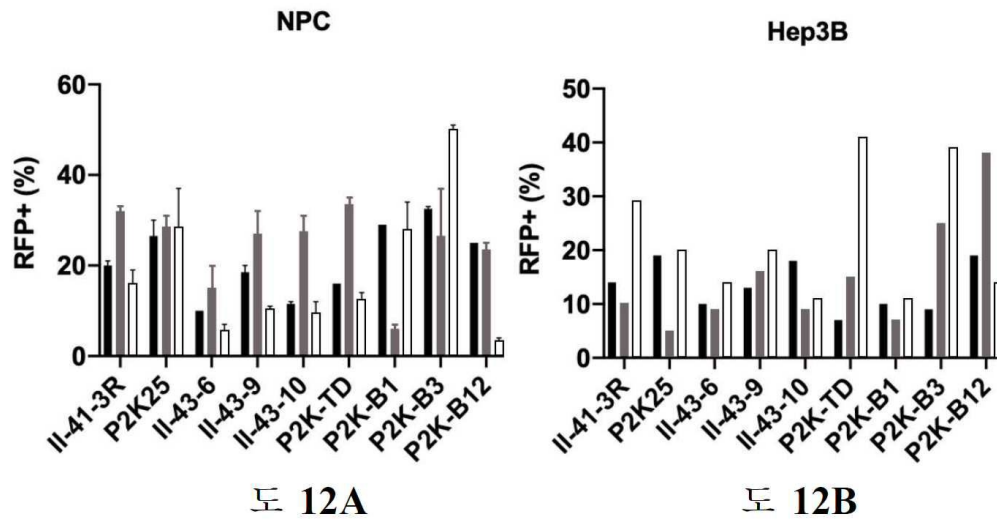
mRNA + 1st 폴리머 mRNA + 2nd 세대 폴리머

도 11B

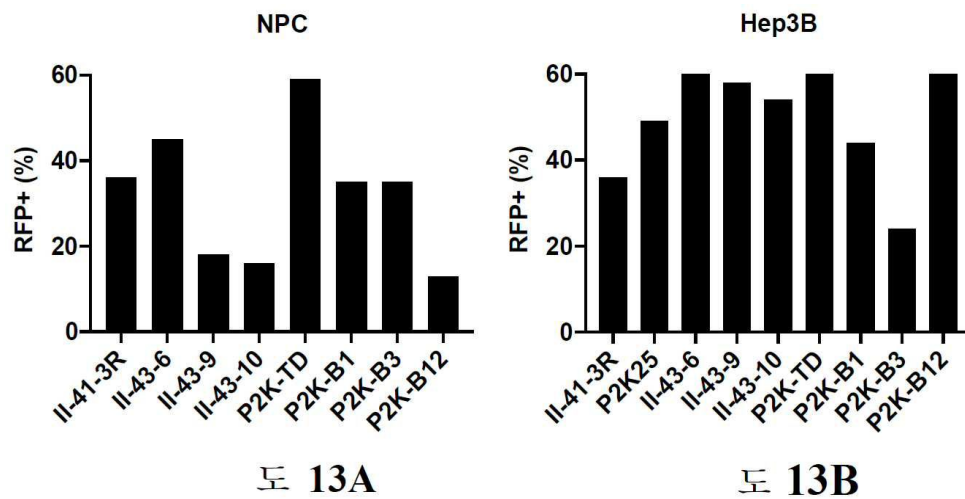
mRNA + 1st 폴리머 mRNA + 2nd 세대 폴리머

도 11C

도면12



도면13



도면14



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> GenEdit Inc.

<120> POLYMER COMPRISING MULTIPLE FUNCTIONALIZED SIDECHAINS FOR BIOMOLECULE DELIVERY

<130> 512980

<150> 62853658

<151> 2019-05-28

<150> 62907458
 <151> 2019-09-27
 <160> 20
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 1368
 <212> PRT
 <213> Streptococcus pyogenes
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(20)
 <223> AKP81606.1
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1368)
 <223> AKP81606.1
 <400> 1

Met Asp Lys Lys Tyr Ser Ile Gly Leu Asp Ile Gly Thr Asn Ser Val

1	5	10	15
Gly Trp Ala Val	Ile Thr Asp Asp Tyr Lys Val	Pro Ser Lys Lys Phe	
20	25	30	
Lys Val Leu Gly Asn Thr Asp Arg His Ser	Ile Lys Lys Asn Leu Ile		
35	40	45	
Gly Ala Leu Leu Phe Asp Ser Gly Glu Thr Ala Glu Ala Thr Arg Leu			
50	55	60	
Lys Arg Thr Ala Arg Arg Arg Tyr Thr Arg Arg Lys Asn Arg Ile Cys			

65	70	75	80
Tyr Leu Gln Glu Ile Phe Ser Asn Glu Met Ala Lys Val Asp Asp Ser			
85	90	95	
Phe Phe His Arg Leu Glu Glu Ser Phe Leu Val Glu Glu Asp Lys Lys			
100	105	110	
His Glu Arg His Pro Ile Phe Gly Asn Ile Val Asp Glu Val Ala Tyr			
115	120	125	
His Glu Lys Tyr Pro Thr Ile Tyr His Leu Arg Lys Lys Leu Val Asp			

130 135 140
 Ser Thr Asp Lys Ala Asp Leu Arg Leu Ile Tyr Leu Ala Leu Ala His
 145 150 155 160
 Met Ile Lys Phe Arg Gly His Phe Leu Ile Glu Gly Asp Leu Asn Pro
 165 170 175
 Asp Asn Ser Asp Val Asp Lys Leu Phe Ile Gln Leu Val Gln Thr Tyr
 180 185 190
 Asn Gln Leu Phe Glu Glu Asn Pro Ile Asn Ala Ser Gly Val Asp Ala

 195 200 205
 Lys Ala Ile Leu Ser Ala Arg Leu Ser Lys Ser Arg Arg Leu Glu Asn
 210 215 220
 Leu Ile Ala Gln Leu Pro Gly Glu Lys Lys Asn Ser Leu Phe Gly Asn
 225 230 235 240
 Leu Ile Ala Leu Ser Leu Gly Leu Thr Pro Asn Phe Lys Ser Asn Phe
 245 250 255
 Asp Leu Ala Glu Asp Ala Lys Leu Gln Leu Ser Lys Asp Thr Tyr Asp

 260 265 270
 Asp Asp Leu Asp Asn Leu Leu Ala Gln Ile Gly Asp Gln Tyr Ala Asp
 275 280 285
 Leu Phe Leu Ala Ala Lys Asn Leu Ser Asp Ala Ile Leu Leu Ser Asp
 290 295 300
 Ile Leu Arg Val Asn Thr Glu Ile Thr Lys Ala Pro Leu Ser Ala Ser
 305 310 315 320
 Met Ile Lys Arg Tyr Asp Glu His His Gln Asp Leu Thr Leu Leu Lys

 325 330 335
 Ala Leu Val Arg Gln Gln Leu Pro Glu Lys Tyr Lys Glu Ile Phe Phe
 340 345 350
 Asp Gln Ser Lys Asn Gly Tyr Ala Gly Tyr Ile Asp Gly Gly Ala Ser
 355 360 365
 Gln Glu Glu Phe Tyr Lys Phe Ile Lys Pro Ile Leu Glu Lys Met Asp
 370 375 380

Gly Thr Glu Glu Leu Leu Val Lys Leu Asn Arg Glu Asp Leu Leu Arg

385 390 395 400

Lys Gln Arg Thr Phe Asp Asn Gly Ser Ile Pro His Gln Ile His Leu

405 410 415

Gly Glu Leu His Ala Ile Leu Arg Arg Gln Glu Asp Phe Tyr Pro Phe

420 425 430

Leu Lys Asp Asn Arg Glu Lys Ile Glu Lys Ile Leu Thr Phe Arg Ile

435 440 445

Pro Tyr Tyr Val Gly Pro Leu Ala Arg Gly Asn Ser Arg Phe Ala Trp

450 455 460

Met Thr Arg Lys Ser Glu Glu Thr Ile Thr Pro Trp Asn Phe Glu Glu

465 470 475 480

Val Val Asp Lys Gly Ala Ser Ala Gln Ser Phe Ile Glu Arg Met Thr

485 490 495

Asn Phe Asp Lys Asn Leu Pro Asn Glu Lys Val Leu Pro Lys His Ser

500 505 510

Leu Leu Tyr Glu Tyr Phe Thr Val Tyr Asn Glu Leu Thr Lys Val Lys

515 520 525

Tyr Val Thr Glu Gly Met Arg Lys Pro Ala Phe Leu Ser Gly Glu Gln

530 535 540

Lys Lys Ala Ile Val Asp Leu Leu Phe Lys Thr Asn Arg Lys Val Thr

545 550 555 560

Val Lys Gln Leu Lys Glu Asp Tyr Phe Lys Lys Ile Glu Cys Phe Asp

565 570 575

Ser Val Glu Ile Ser Gly Val Glu Asp Arg Phe Asn Ala Ser Leu Gly

580 585 590

Thr Tyr His Asp Leu Leu Lys Ile Ile Lys Asp Lys Asp Phe Leu Asp

595 600 605

Asn Glu Glu Asn Glu Asp Ile Leu Glu Asp Ile Val Leu Thr Leu Thr

610 615 620

Leu Phe Glu Asp Arg Glu Met Ile Glu Glu Arg Leu Lys Thr Tyr Ala

625 630 635 640
 His Leu Phe Asp Asp Lys Val Met Lys Gln Leu Lys Arg Arg Arg Tyr

 645 650 655
 Thr Gly Trp Gly Arg Leu Ser Arg Lys Leu Ile Asn Gly Ile Arg Asp
 660 665 670
 Lys Gln Ser Gly Lys Thr Ile Leu Asp Phe Leu Lys Ser Asp Gly Phe
 675 680 685
 Ala Asn Arg Asn Phe Met Gln Leu Ile His Asp Asp Ser Leu Thr Phe
 690 695 700
 Lys Glu Asp Ile Gln Lys Ala Gln Val Ser Gly Gln Gly Asp Ser Leu

 705 710 715 720
 His Glu His Ile Ala Asn Leu Ala Gly Ser Pro Ala Ile Lys Lys Gly
 725 730 735
 Ile Leu Gln Thr Val Lys Val Val Asp Glu Leu Val Lys Val Met Gly
 740 745 750
 Arg His Lys Pro Glu Asn Ile Val Ile Glu Met Ala Arg Glu Asn Gln
 755 760 765
 Thr Thr Gln Lys Gly Gln Lys Asn Ser Arg Glu Arg Met Lys Arg Ile

 770 775 780
 Glu Glu Gly Ile Lys Glu Leu Gly Ser Gln Ile Leu Lys Glu His Pro
 785 790 795 800
 Val Glu Asn Thr Gln Leu Gln Asn Glu Lys Leu Tyr Leu Tyr Tyr Leu
 805 810 815
 Gln Asn Gly Arg Asp Met Tyr Val Asp Gln Glu Leu Asp Ile Asn Arg
 820 825 830
 Leu Ser Asp Tyr Asp Val Asp His Ile Val Pro Gln Ser Phe Leu Lys

 835 840 845
 Asp Asp Ser Ile Asp Asn Lys Val Leu Thr Arg Ser Asp Lys Asn Arg
 850 855 860
 Gly Lys Ser Asp Asn Val Pro Ser Glu Glu Val Val Lys Lys Met Lys
 865 870 875 880

Asn Tyr Trp Arg Gln Leu Leu Asn Ala Lys Leu Ile Thr Gln Arg Lys
 885 890 895
 Phe Asp Asn Leu Thr Lys Ala Glu Arg Gly Gly Leu Ser Glu Leu Asp
 900 905 910
 Lys Ala Gly Phe Ile Lys Arg Gln Leu Val Glu Thr Arg Gln Ile Thr
 915 920 925
 Lys His Val Ala Gln Ile Leu Asp Ser Arg Met Asn Thr Lys Tyr Asp
 930 935 940
 Glu Asn Asp Lys Leu Ile Arg Glu Val Lys Val Ile Thr Leu Lys Ser
 945 950 955 960
 Lys Leu Val Ser Asp Phe Arg Lys Asp Phe Gln Phe Tyr Lys Val Arg
 965 970 975
 Glu Ile Asn Asn Tyr His His Ala His Asp Ala Tyr Leu Asn Ala Val
 980 985 990
 Val Gly Thr Ala Leu Ile Lys Lys Tyr Pro Lys Leu Glu Ser Glu Phe
 995 1000 1005
 Val Tyr Gly Asp Tyr Lys Val Tyr Asp Val Arg Lys Met Ile Ala
 1010 1015 1020
 Lys Ser Glu Gln Glu Ile Gly Lys Ala Thr Ala Lys Tyr Phe Phe
 1025 1030 1035
 Tyr Ser Asn Ile Met Asn Phe Phe Lys Thr Glu Ile Thr Leu Ala
 1040 1045 1050
 Asn Gly Glu Ile Arg Lys Arg Pro Leu Ile Glu Thr Asn Gly Glu
 1055 1060 1065
 Thr Gly Glu Ile Val Trp Asp Lys Gly Arg Asp Phe Ala Thr Val
 1070 1075 1080
 Arg Lys Val Leu Ser Met Pro Gln Val Asn Ile Val Lys Lys Thr
 1085 1090 1095
 Glu Val Gln Thr Gly Gly Phe Ser Lys Glu Ser Ile Leu Pro Lys
 1100 1105 1110
 Arg Asn Ser Asp Lys Leu Ile Ala Arg Lys Lys Asp Trp Asp Pro

1115 1120 1125
 Lys Lys Tyr Gly Gly Phe Asp Ser Pro Thr Val Ala Tyr Ser Val
 1130 1135 1140
 Leu Val Val Ala Lys Val Glu Lys Gly Lys Ser Lys Lys Leu Lys

1145 1150 1155
 Ser Val Lys Glu Leu Leu Gly Ile Thr Ile Met Glu Arg Ser Ser
 1160 1165 1170
 Phe Glu Lys Asn Pro Ile Asp Phe Leu Glu Ala Lys Gly Tyr Lys
 1175 1180 1185
 Glu Val Lys Lys Asp Leu Ile Ile Lys Leu Pro Lys Tyr Ser Leu
 1190 1195 1200
 Phe Glu Leu Glu Asn Gly Arg Lys Arg Met Leu Ala Ser Ala Gly

1205 1210 1215
 Glu Leu Gln Lys Gly Asn Glu Leu Ala Leu Pro Ser Lys Tyr Val
 1220 1225 1230
 Asn Phe Leu Tyr Leu Ala Ser His Tyr Glu Lys Leu Lys Gly Ser
 1235 1240 1245
 Pro Glu Asp Asn Glu Gln Lys Gln Leu Phe Val Glu Gln His Lys
 1250 1255 1260
 His Tyr Leu Asp Glu Ile Ile Glu Gln Ile Ser Glu Phe Ser Lys

1265 1270 1275
 Arg Val Ile Leu Ala Asp Ala Asn Leu Asp Lys Val Leu Ser Ala
 1280 1285 1290
 Tyr Asn Lys His Arg Asp Lys Pro Ile Arg Glu Gln Ala Glu Asn
 1295 1300 1305
 Ile Ile His Leu Phe Thr Leu Thr Asn Leu Gly Ala Pro Ala Ala
 1310 1315 1320
 Phe Lys Tyr Phe Asp Thr Thr Ile Asp Arg Lys Arg Tyr Thr Ser

1325 1330 1335
 Thr Lys Glu Val Leu Asp Ala Thr Leu Ile His Gln Ser Ile Thr
 1340 1345 1350

Gly Leu Tyr Glu Thr Arg Ile Asp Leu Ser Gln Leu Gly Gly Asp

1355

1360

1365

<210> 2

<211> 2560

<212> PRT

<213> Francisella tularensis

<400> 2

Met Asp Lys Lys Tyr Ser Ile Gly Leu Asp Ile Gly Thr Asn Ser Val

1

5

10

15

Gly Trp Ala Val Ile Thr Asp Asp Tyr Lys Val Pro Ser Lys Lys Phe

20

25

30

Lys Val Leu Gly Asn Thr Asp Arg His Ser Ile Lys Lys Asn Leu Ile

35

40

45

Gly Ala Leu Leu Phe Asp Ser Gly Glu Thr Ala Glu Ala Thr Arg Leu

50

55

60

Lys Arg Thr Ala Arg Arg Arg Tyr Thr Arg Arg Lys Asn Arg Ile Cys

65

70

75

80

Tyr Leu Gln Glu Ile Phe Ser Asn Glu Met Ala Lys Val Asp Asp Ser

85

90

95

Phe Phe His Arg Leu Glu Glu Ser Phe Leu Val Glu Glu Asp Lys Lys

100

105

110

His Glu Arg His Pro Ile Phe Gly Asn Ile Val Asp Glu Val Ala Tyr

115

120

125

His Glu Lys Tyr Pro Thr Ile Tyr His Leu Arg Lys Lys Leu Val Asp

130

135

140

Ser Thr Asp Lys Ala Asp Leu Arg Leu Ile Tyr Leu Ala Leu Ala His

145

150

155

160

Met Ile Lys Phe Arg Gly His Phe Leu Ile Glu Gly Asp Leu Asn Pro

165

170

175

Asp Asn Ser Asp Val Asp Lys Leu Phe Ile Gln Leu Val Gln Thr Tyr

180

185

190

Asn Gln Leu Phe Glu Glu Asn Pro Ile Asn Ala Ser Gly Val Asp Ala

195 200 205
 Lys Ala Ile Leu Ser Ala Arg Leu Ser Lys Ser Arg Arg Leu Glu Asn
 210 215 220
 Leu Ile Ala Gln Leu Pro Gly Glu Lys Lys Asn Ser Leu Phe Gly Asn
 225 230 235 240
 Leu Ile Ala Leu Ser Leu Gly Leu Thr Pro Asn Phe Lys Ser Asn Phe
 245 250 255
 Asp Leu Ala Glu Asp Ala Lys Leu Gln Leu Ser Lys Asp Thr Tyr Asp
 260 265 270

 Asp Asp Leu Asp Asn Leu Leu Ala Gln Ile Gly Asp Gln Tyr Ala Asp
 275 280 285
 Leu Phe Leu Ala Ala Lys Asn Leu Ser Asp Ala Ile Leu Leu Ser Asp
 290 295 300
 Ile Leu Arg Val Asn Thr Glu Ile Thr Lys Ala Pro Leu Ser Ala Ser
 305 310 315 320
 Met Ile Lys Arg Tyr Asp Glu His His Gln Asp Leu Thr Leu Leu Lys
 325 330 335

 Ala Leu Val Arg Gln Gln Leu Pro Glu Lys Tyr Lys Glu Ile Phe Phe
 340 345 350
 Asp Gln Ser Lys Asn Gly Tyr Ala Gly Tyr Ile Asp Gly Gly Ala Ser
 355 360 365
 Gln Glu Glu Phe Tyr Lys Phe Ile Lys Pro Ile Leu Glu Lys Met Asp
 370 375 380
 Gly Thr Glu Glu Leu Leu Val Lys Leu Asn Arg Glu Asp Leu Leu Arg
 385 390 395 400

 Lys Gln Arg Thr Phe Asp Asn Gly Ser Ile Pro His Gln Ile His Leu
 405 410 415
 Gly Glu Leu His Ala Ile Leu Arg Arg Gln Glu Asp Phe Tyr Pro Phe
 420 425 430
 Leu Lys Asp Asn Arg Glu Lys Ile Glu Lys Ile Leu Thr Phe Arg Ile
 435 440 445

Pro Tyr Tyr Val Gly Pro Leu Ala Arg Gly Asn Ser Arg Phe Ala Trp
450 455 460

Met Thr Arg Lys Ser Glu Glu Thr Ile Thr Pro Trp Asn Phe Glu Glu
465 470 475 480

Val Val Asp Lys Gly Ala Ser Ala Gln Ser Phe Ile Glu Arg Met Thr
485 490 495

Asn Phe Asp Lys Asn Leu Pro Asn Glu Lys Val Leu Pro Lys His Ser
500 505 510

Leu Leu Tyr Glu Tyr Phe Thr Val Tyr Asn Glu Leu Thr Lys Val Lys
515 520 525

Tyr Val Thr Glu Gly Met Arg Lys Pro Ala Phe Leu Ser Gly Glu Gln
530 535 540

Lys Lys Ala Ile Val Asp Leu Leu Phe Lys Thr Asn Arg Lys Val Thr
545 550 555 560

Val Lys Gln Leu Lys Glu Asp Tyr Phe Lys Lys Ile Glu Cys Phe Asp
565 570 575

Ser Val Glu Ile Ser Gly Val Glu Asp Arg Phe Asn Ala Ser Leu Gly
580 585 590

Thr Tyr His Asp Leu Leu Lys Ile Ile Lys Asp Lys Asp Phe Leu Asp
595 600 605

Asn Glu Glu Asn Glu Asp Ile Leu Glu Asp Ile Val Leu Thr Leu Thr
610 615 620

Leu Phe Glu Asp Arg Glu Met Ile Glu Glu Arg Leu Lys Thr Tyr Ala
625 630 635 640

His Leu Phe Asp Asp Lys Val Met Lys Gln Leu Lys Arg Arg Arg Tyr
645 650 655

Thr Gly Trp Gly Arg Leu Ser Arg Lys Leu Ile Asn Gly Ile Arg Asp
660 665 670

Lys Gln Ser Gly Lys Thr Ile Leu Asp Phe Leu Lys Ser Asp Gly Phe
675 680 685

Ala Asn Arg Asn Phe Met Gln Leu Ile His Asp Asp Ser Leu Thr Phe

690					695					700									
Lys	Glu	Asp	Ile	Gln	Lys	Ala	Gln	Val	Ser	Gly	Gln	Gly	Asp	Ser	Leu				
705					710					715					720				
His	Glu	His	Ile	Ala	Asn	Leu	Ala	Gly	Ser	Pro	Ala	Ile	Lys	Lys	Gly				
725					730					735									
Ile	Leu	Gln	Thr	Val	Lys	Val	Val	Asp	Glu	Leu	Val	Lys	Val	Met	Gly				
740					745					750									
Arg	His	Lys	Pro	Glu	Asn	Ile	Val	Ile	Glu	Met	Ala	Arg	Glu	Asn	Gln				
755					760					765									
Thr	Thr	Gln	Lys	Gly	Gln	Lys	Asn	Ser	Arg	Glu	Arg	Met	Lys	Arg	Ile				
770					775					780									
Glu	Glu	Gly	Ile	Lys	Glu	Leu	Gly	Ser	Gln	Ile	Leu	Lys	Glu	His	Pro				
785					790					795					800				
Val	Glu	Asn	Thr	Gln	Leu	Gln	Asn	Glu	Lys	Leu	Tyr	Leu	Tyr	Tyr	Leu				
805					810					815									
Gln	Asn	Gly	Arg	Asp	Met	Tyr	Val	Asp	Gln	Glu	Leu	Asp	Ile	Asn	Arg				
820					825					830									
Leu	Ser	Asp	Tyr	Asp	Val	Asp	His	Ile	Val	Pro	Gln	Ser	Phe	Leu	Lys				
835					840					845									
Asp	Asp	Ser	Ile	Asp	Asn	Lys	Val	Leu	Thr	Arg	Ser	Asp	Lys	Asn	Arg				
850					855					860									
Gly	Lys	Ser	Asp	Asn	Val	Pro	Ser	Glu	Glu	Val	Val	Lys	Lys	Met	Lys				
865					870					875					880				
Asn	Tyr	Trp	Arg	Gln	Leu	Leu	Asn	Ala	Lys	Leu	Ile	Thr	Gln	Arg	Lys				
885					890					895									
Phe	Asp	Asn	Leu	Thr	Lys	Ala	Glu	Arg	Gly	Gly	Leu	Ser	Glu	Leu	Asp				
900					905					910									
Lys	Ala	Gly	Phe	Ile	Lys	Arg	Gln	Leu	Val	Glu	Thr	Arg	Gln	Ile	Thr				
915					920					925									
Lys	His	Val	Ala	Gln	Ile	Leu	Asp	Ser	Arg	Met	Asn	Thr	Lys	Tyr	Asp				
930					935					940									

Glu Asn Asp Lys Leu Ile Arg Glu Val Lys Val Ile Thr Leu Lys Ser
 945 950 955 960
 Lys Leu Val Ser Asp Phe Arg Lys Asp Phe Gln Phe Tyr Lys Val Arg
 965 970 975

Glu Ile Asn Asn Tyr His His Ala His Asp Ala Tyr Leu Asn Ala Val
 980 985 990
 Val Gly Thr Ala Leu Ile Lys Lys Tyr Pro Lys Leu Glu Ser Glu Phe
 995 1000 1005
 Val Tyr Gly Asp Tyr Lys Val Tyr Asp Val Arg Lys Met Ile Ala
 1010 1015 1020
 Lys Ser Glu Gln Glu Ile Gly Lys Ala Thr Ala Lys Tyr Phe Phe
 1025 1030 1035

Tyr Ser Asn Ile Met Asn Phe Phe Lys Thr Glu Ile Thr Leu Ala
 1040 1045 1050
 Asn Gly Glu Ile Arg Lys Arg Pro Leu Ile Glu Thr Asn Gly Glu
 1055 1060 1065
 Thr Gly Glu Ile Val Trp Asp Lys Gly Arg Asp Phe Ala Thr Val
 1070 1075 1080
 Arg Lys Val Leu Ser Met Pro Gln Val Asn Ile Val Lys Lys Thr
 1085 1090 1095

Glu Val Gln Thr Gly Gly Phe Ser Lys Glu Ser Ile Leu Pro Lys
 1100 1105 1110
 Arg Asn Ser Asp Lys Leu Ile Ala Arg Lys Lys Asp Trp Asp Pro
 1115 1120 1125
 Lys Lys Tyr Gly Gly Phe Asp Ser Pro Thr Val Ala Tyr Ser Val
 1130 1135 1140
 Leu Val Val Ala Lys Val Glu Lys Gly Lys Ser Lys Lys Leu Lys
 1145 1150 1155

Ser Val Lys Glu Leu Leu Gly Ile Thr Ile Met Glu Arg Ser Ser
 1160 1165 1170
 Phe Glu Lys Asn Pro Ile Asp Phe Leu Glu Ala Lys Gly Tyr Lys

1175	1180	1185
Glu Val Lys Lys Asp Leu Ile	Ile Lys Leu Pro Lys	Tyr Ser Leu
1190	1195	1200
Phe Glu Leu Glu Asn Gly Arg	Lys Arg Met Leu Ala	Ser Ala Gly
1205	1210	1215
Glu Leu Gln Lys Gly Asn Glu	Leu Ala Leu Pro Ser	Lys Tyr Val
1220	1225	1230
Asn Phe Leu Tyr Leu Ala Ser	His Tyr Glu Lys Leu	Lys Gly Ser
1235	1240	1245
Pro Glu Asp Asn Glu Gln Lys	Gln Leu Phe Val Glu	Met Ser Ile
1250	1255	1260
Tyr Gln Glu Phe Val Asn Lys	Tyr Ser Leu Ser Lys	Thr Leu Arg
1265	1270	1275
Phe Glu Leu Ile Pro Gln Gly	Lys Thr Leu Glu Asn	Ile Lys Ala
1280	1285	1290
Arg Gly Leu Ile Leu Asp Asp	Glu Lys Arg Ala Lys	Asp Tyr Lys
1295	1300	1305
Lys Ala Lys Gln Ile Ile Asp	Lys Tyr His Gln Phe	Phe Ile Glu
1310	1315	1320
Glu Ile Leu Ser Ser Val Cys	Ile Ser Glu Asp Leu	Leu Gln Asn
1325	1330	1335
Tyr Ser Asp Val Tyr Phe Lys	Leu Lys Lys Ser Asp	Asp Asp Asn
1340	1345	1350
Leu Gln Lys Asp Phe Lys Ser	Ala Lys Asp Thr Ile	Lys Lys Gln
1355	1360	1365
Ile Ser Glu Tyr Ile Lys Asp	Ser Glu Lys Phe Lys	Asn Leu Phe
1370	1375	1380
Asn Gln Asn Leu Ile Asp Ala	Lys Lys Gly Gln Glu	Ser Asp Leu
1385	1390	1395
Ile Leu Trp Leu Lys Gln Ser	Lys Asp Asn Gly Ile	Glu Leu Phe
1400	1405	1410

Lys Ala Asn Ser Asp Ile Thr	Asp Ile Asp Glu Ala	Leu Glu Ile
1415	1420	1425
Ile Lys Ser Phe Lys Gly Trp	Thr Thr Tyr Phe Lys	Gly Phe His
1430	1435	1440
Glu Asn Arg Lys Asn Val Tyr	Ser Ser Asn Asp Ile	Pro Thr Ser
1445	1450	1455
Ile Ile Tyr Arg Ile Val Asp	Asp Asn Leu Pro Lys	Phe Leu Glu
1460	1465	1470
Asn Lys Ala Lys Tyr Glu Ser	Leu Lys Asp Lys Ala	Pro Glu Ala
1475	1480	1485
Ile Asn Tyr Glu Gln Ile Lys	Lys Asp Leu Ala Glu	Glu Leu Thr
1490	1495	1500
Phe Asp Ile Asp Tyr Lys Thr	Ser Glu Val Asn Gln	Arg Val Phe
1505	1510	1515
Ser Leu Asp Glu Val Phe Glu	Ile Ala Asn Phe Asn	Asn Tyr Leu
1520	1525	1530
Asn Gln Ser Gly Ile Thr Lys	Phe Asn Thr Ile Ile	Gly Gly Lys
1535	1540	1545
Phe Val Asn Gly Glu Asn Thr	Lys Arg Lys Gly Ile	Asn Glu Tyr
1550	1555	1560
Ile Asn Leu Tyr Ser Gln Gln	Ile Asn Asp Lys Thr	Leu Lys Lys
1565	1570	1575
Tyr Lys Met Ser Val Leu Phe	Lys Gln Ile Leu Ser	Asp Thr Glu
1580	1585	1590
Ser Lys Ser Phe Val Ile Asp	Lys Leu Glu Asp Asp	Ser Asp Val
1595	1600	1605
Val Thr Thr Met Gln Ser Phe	Tyr Glu Gln Ile Ala	Ala Phe Lys
1610	1615	1620
Thr Val Glu Glu Lys Ser Ile	Lys Glu Thr Leu Ser	Leu Leu Phe
1625	1630	1635
Asp Asp Leu Lys Ala Gln Lys	Leu Asp Leu Ser Lys	Ile Tyr Phe

1640	1645	1650
Lys Asn Asp Lys Ser Leu Thr	Asp Leu Ser Gln Gln	Val Phe Asp
1655	1660	1665
Asp Tyr Ser Val Ile Gly Thr	Ala Val Leu Glu Tyr	Ile Thr Gln
1670	1675	1680
Gln Ile Ala Pro Lys Asn Leu	Asp Asn Pro Ser Lys	Lys Glu Gln
1685	1690	1695
Glu Leu Ile Ala Lys Lys Thr	Glu Lys Ala Lys Tyr	Leu Ser Leu
1700	1705	1710
Glu Thr Ile Lys Leu Ala Leu	Glu Glu Phe Asn Lys	His Arg Asp
1715	1720	1725
Ile Asp Lys Gln Cys Arg Phe	Glu Glu Ile Leu Ala	Asn Phe Ala
1730	1735	1740
Ala Ile Pro Met Ile Phe Asp	Glu Ile Ala Gln Asn	Lys Asp Asn
1745	1750	1755
Leu Ala Gln Ile Ser Ile Lys	Tyr Gln Asn Gln Gly	Lys Lys Asp
1760	1765	1770
Leu Leu Gln Ala Ser Ala Glu	Asp Asp Val Lys Ala	Ile Lys Asp
1775	1780	1785
Leu Leu Asp Gln Thr Asn Asn	Leu Leu His Lys Leu	Lys Ile Phe
1790	1795	1800
His Ile Ser Gln Ser Glu Asp	Lys Ala Asn Ile Leu	Asp Lys Asp
1805	1810	1815
Glu His Phe Tyr Leu Val Phe	Glu Glu Cys Tyr Phe	Glu Leu Ala
1820	1825	1830
Asn Ile Val Pro Leu Tyr Asn	Lys Ile Arg Asn Tyr	Ile Thr Gln
1835	1840	1845
Lys Pro Tyr Ser Asp Glu Lys	Phe Lys Leu Asn Phe	Glu Asn Ser
1850	1855	1860
Thr Leu Ala Asn Gly Trp Asp	Lys Asn Lys Glu Pro	Asp Asn Thr
1865	1870	1875

Ala Ile	Leu Phe Ile Lys Asp	Asp Lys Tyr Tyr Leu	Gly Val Met
1880	1885	1890	
Asn Lys	Lys Asn Asn Lys Ile	Phe Asp Asp Lys Ala	Ile Lys Glu
1895	1900	1905	
Asn Lys	Gly Glu Gly Tyr Lys	Lys Ile Val Tyr Lys	Leu Leu Pro
1910	1915	1920	
Gly Ala	Asn Lys Met Leu Pro	Lys Val Phe Phe Ser	Ala Lys Ser
1925	1930	1935	
Ile Lys	Phe Tyr Asn Pro Ser	Glu Asp Ile Leu Arg	Ile Arg Asn
1940	1945	1950	
His Ser	Thr His Thr Lys Asn	Gly Ser Pro Gln Lys	Gly Tyr Glu
1955	1960	1965	
Lys Phe	Glu Phe Asn Ile Glu	Asp Cys Arg Lys Phe	Ile Asp Phe
1970	1975	1980	
Tyr Lys	Gln Ser Ile Ser Lys	His Pro Glu Trp Lys	Asp Phe Gly
1985	1990	1995	
Phe Arg	Phe Ser Asp Thr Gln	Arg Tyr Asn Ser Ile	Asp Glu Phe
2000	2005	2010	
Tyr Arg	Glu Val Glu Asn Gln	Gly Tyr Lys Leu Thr	Phe Glu Asn
2015	2020	2025	
Ile Ser	Glu Ser Tyr Ile Asp	Ser Val Val Asn Gln	Gly Lys Leu
2030	2035	2040	
Tyr Leu	Phe Gln Ile Tyr Asn	Lys Asp Phe Ser Ala	Tyr Ser Lys
2045	2050	2055	
Gly Arg	Pro Asn Leu His Thr	Leu Tyr Trp Lys Ala	Leu Phe Asp
2060	2065	2070	
Glu Arg	Asn Leu Gln Asp Val	Val Tyr Lys Leu Asn	Gly Glu Ala
2075	2080	2085	
Glu Leu	Phe Tyr Arg Lys Gln	Ser Ile Pro Lys Lys	Ile Thr His
2090	2095	2100	
Pro Ala	Lys Glu Ala Ile Ala	Asn Lys Asn Lys Asp	Asn Pro Lys

2105	2110	2115
Lys Glu Ser Val Phe Glu Tyr	Asp Leu Ile Lys Asp	Lys Arg Phe
2120	2125	2130
Thr Glu Asp Lys Phe Phe Phe	His Cys Pro Ile Thr	Ile Asn Phe
2135	2140	2145
Lys Ser Ser Gly Ala Asn Lys	Phe Asn Asp Glu Ile	Asn Leu Leu
2150	2155	2160
Leu Lys Glu Lys Ala Asn Asp	Val His Ile Leu Ser	Ile Asp Arg
2165	2170	2175
Gly Glu Arg His Leu Ala Tyr	Tyr Thr Leu Val Asp	Gly Lys Gly
2180	2185	2190
Asn Ile Ile Lys Gln Asp Thr	Phe Asn Ile Ile Gly	Asn Asp Arg
2195	2200	2205
Met Lys Thr Asn Tyr His Asp	Lys Leu Ala Ala Ile	Glu Lys Asp
2210	2215	2220
Arg Asp Ser Ala Arg Lys Asp	Trp Lys Lys Ile Asn	Asn Ile Lys
2225	2230	2235
Glu Met Lys Glu Gly Tyr Leu	Ser Gln Val Val His	Glu Ile Ala
2240	2245	2250
Lys Leu Val Ile Glu Tyr Asn	Ala Ile Val Val Phe	Glu Asp Leu
2255	2260	2265
Asn Phe Gly Phe Lys Arg Gly	Arg Phe Lys Val Glu	Lys Gln Val
2270	2275	2280
Tyr Gln Lys Leu Glu Lys Met	Leu Ile Glu Lys Leu	Asn Tyr Leu
2285	2290	2295
Val Phe Lys Asp Asn Glu Phe	Asp Lys Thr Gly Gly	Val Leu Arg
2300	2305	2310
Ala Tyr Gln Leu Thr Ala Pro	Phe Glu Thr Phe Lys	Lys Met Gly
2315	2320	2325
Lys Gln Thr Gly Ile Ile Tyr	Tyr Val Pro Ala Gly	Phe Thr Ser
2330	2335	2340

Lys Ile Cys Pro Val Thr Gly Phe Val Asn Gln Leu Tyr Pro Lys
2345 2350 2355

Tyr Glu Ser Val Ser Lys Ser Gln Glu Phe Phe Ser Lys Phe Asp
2360 2365 2370

Lys Ile Cys Tyr Asn Leu Asp Lys Gly Tyr Phe Glu Phe Ser Phe
2375 2380 2385

Asp Tyr Lys Asn Phe Gly Asp Lys Ala Ala Lys Gly Lys Trp Thr
2390 2395 2400

Ile Ala Ser Phe Gly Ser Arg Leu Ile Asn Phe Arg Asn Ser Asp
2405 2410 2415

Lys Asn His Asn Trp Asp Thr Arg Glu Val Tyr Pro Thr Lys Glu
2420 2425 2430

Leu Glu Lys Leu Leu Lys Asp Tyr Ser Ile Glu Tyr Gly His Gly
2435 2440 2445

Glu Cys Ile Lys Ala Ala Ile Cys Gly Glu Ser Asp Lys Lys Phe
2450 2455 2460

Phe Ala Lys Leu Thr Ser Val Leu Asn Thr Ile Leu Gln Met Arg
2465 2470 2475

Asn Ser Lys Thr Gly Thr Glu Leu Asp Tyr Leu Ile Ser Pro Val
2480 2485 2490

Ala Asp Val Asn Gly Asn Phe Phe Asp Ser Arg Gln Ala Pro Lys
2495 2500 2505

Asn Met Pro Gln Asp Ala Asp Ala Asn Gly Ala Tyr His Ile Gly
2510 2515 2520

Leu Lys Gly Leu Met Leu Leu Gly Arg Ile Lys Asn Asn Gln Glu
2525 2530 2535

Gly Lys Lys Leu Asn Leu Val Ile Lys Asn Glu Glu Tyr Phe Glu
2540 2545 2550

Phe Val Gln Asn Arg Asn Asn
2555 2560

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 3

Ile Gly Leu Asp Ile Gly Thr Asn Ser Val Gly Trp Ala Val Ile

1 5 10 15

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Sequence

<400> 4

Ile Val Ile Glu Met Ala Arg Glu

1 5

<210> 5

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Sequence

<400> 5

Asp Val Asp His Ile Val Pro Gln Ser Phe Leu Lys Asp Asp Ser Ile

1 5 10 15

Asp Asn Lys Val Leu Thr Arg Ser Asp Lys Asn

20 25

<210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Sequence

<

<400> 6

His His Ala His Asp Ala Tyr Leu

1 5

<210> 7

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Sequence

<400> 7

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 8

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Sequence

<400> 8

Arg Arg Gln Arg Arg Thr Ser Lys Leu Met Lys Arg

1 5 10

<210> 9

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Sequence

<400> 9

Gly Trp Thr Leu Asn Ser Ala Gly Tyr Leu Leu Gly Lys Ile Asn Leu

1 5 10 15

Lys Ala Leu Ala Ala Leu Ala Lys Lys Ile Leu

20 25

<210> 10

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Sequence

<400> 10

Lys Ala Leu Ala Trp Glu Ala Lys Leu Ala Lys Ala Leu Ala Lys Ala

1 5 10 15

Leu Ala Lys His Leu Ala Lys Ala Leu Ala Lys Ala Leu Lys Cys Glu

20 25 30

Ala

<210> 11

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Sequence

<400> 11

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys

1 5 10 15

<210> 12

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Sequence

<400> 12

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Sequence

<400> 13

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5

<210> 14

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Sequence

<400> 14

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 15

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

Synthetic Sequence

<400> 15

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg

1 5

<210> 16

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Sequence

<400> 16

Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala

1 5 10

<210> 17

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Sequence

<400> 17

Thr His Arg Leu Pro Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1 5 10

<

210> 18

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Sequence

<400> 18

Gly Gly Arg Arg Ala Arg Arg Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 19

<211> 1307

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Sequence

<400> 19

Met Thr Gln Phe Glu Gly Phe Thr Asn Leu Tyr Gln Val Ser Lys Thr

1 5 10 15

Leu Arg Phe Glu Leu Ile Pro Gln Gly Lys Thr Leu Lys His Ile Gln

20 25 30

Glu Gln Gly Phe Ile Glu Glu Asp Lys Ala Arg Asn Asp His Tyr Lys

35 40 45

Glu Leu Lys Pro Ile Ile Asp Arg Ile Tyr Lys Thr Tyr Ala Asp Gln

50 55 60

Cys Leu Gln Leu Val Gln Leu Asp Trp Glu Asn Leu Ser Ala Ala Ile

65 70 75 80

Asp Ser Tyr Arg Lys Glu Lys Thr Glu Glu Thr Arg Asn Ala Leu Ile

85 90 95

Glu Glu Gln Ala Thr Tyr Arg Asn Ala Ile His Asp Tyr Phe Ile Gly

100 105 110

Arg Thr Asp Asn Leu Thr Asp Ala Ile Asn Lys Arg His Ala Glu Ile

115 120 125

Tyr Lys Gly Leu Phe Lys Ala Glu Leu Phe Asn Gly Lys Val Leu Lys

130 135 140

Gln Leu Gly Thr Val Thr Thr Thr Glu His Glu Asn Ala Leu Leu Arg

145 150 155 160

Ser Phe Asp Lys Phe Thr Thr Tyr Phe Ser Gly Phe Tyr Glu Asn Arg

165 170 175

Lys Asn Val Phe Ser Ala Glu Asp Ile Ser Thr Ala Ile Pro His Arg

180 185 190
Ile Val Gln Asp Asn Phe Pro Lys Phe Lys Glu Asn Cys His Ile Phe

195 200 205
Thr Arg Leu Ile Thr Ala Val Pro Ser Leu Arg Glu His Phe Glu Asn

210 215 220
Val Lys Lys Ala Ile Gly Ile Phe Val Ser Thr Ser Ile Glu Glu Val

225 230 235 240
Phe Ser Phe Pro Phe Tyr Asn Gln Leu Leu Thr Gln Thr Gln Ile Asp

245 250 255
Leu Tyr Asn Gln Leu Leu Gly Gly Ile Ser Arg Glu Ala Gly Thr Glu

260 265 270
Lys Ile Lys Gly Leu Asn Glu Val Leu Asn Leu Ala Ile Gln Lys Asn

275 280 285
Asp Glu Thr Ala His Ile Ile Ala Ser Leu Pro His Arg Phe Ile Pro

290 295 300
Leu Phe Lys Gln Ile Leu Ser Asp Arg Asn Thr Leu Ser Phe Ile Leu

305 310 315 320
Glu Glu Phe Lys Ser Asp Glu Glu Val Ile Gln Ser Phe Cys Lys Tyr

325 330 335
Lys Thr Leu Leu Arg Asn Glu Asn Val Leu Glu Thr Ala Glu Ala Leu

340 345 350
Phe Asn Glu Leu Asn Ser Ile Asp Leu Thr His Ile Phe Ile Ser His

355 360 365
Lys Lys Leu Glu Thr Ile Ser Ser Ala Leu Cys Asp His Trp Asp Thr

370 375 380
Leu Arg Asn Ala Leu Tyr Glu Arg Arg Ile Ser Glu Leu Thr Gly Lys

385 390 395 400
Ile Thr Lys Ser Ala Lys Glu Lys Val Gln Arg Ser Leu Lys His Glu

405 410 415
Asp Ile Asn Leu Gln Glu Ile Ile Ser Ala Ala Gly Lys Glu Leu Ser

420 425 430

Glu Ala Phe Lys Gln Lys Thr Ser Glu Ile Leu Ser His Ala His Ala
 435 440 445
 Ala Leu Asp Gln Pro Leu Pro Thr Thr Leu Lys Lys Gln Glu Glu Lys
 450 455 460
 Glu Ile Leu Lys Ser Gln Leu Asp Ser Leu Leu Gly Leu Tyr His Leu

 465 470 475 480
 Leu Asp Trp Phe Ala Val Asp Glu Ser Asn Glu Val Asp Pro Glu Phe
 485 490 495
 Ser Ala Arg Leu Thr Gly Ile Lys Leu Glu Met Glu Pro Ser Leu Ser
 500 505 510
 Phe Tyr Asn Lys Ala Arg Asn Tyr Ala Thr Lys Lys Pro Tyr Ser Val
 515 520 525
 Glu Lys Phe Lys Leu Asn Phe Gln Met Pro Thr Leu Ala Ser Gly Trp

 530 535 540
 Asp Val Asn Lys Glu Lys Asn Asn Gly Ala Ile Leu Phe Val Lys Asn
 545 550 555 560
 Gly Leu Tyr Tyr Leu Gly Ile Met Pro Lys Gln Lys Gly Arg Tyr Lys
 565 570 575
 Ala Leu Ser Phe Glu Pro Thr Glu Lys Thr Ser Glu Gly Phe Asp Lys
 580 585 590
 Met Tyr Tyr Asp Tyr Phe Pro Asp Ala Ala Lys Met Ile Pro Lys Cys

 595 600 605
 Ser Thr Gln Leu Lys Ala Val Thr Ala His Phe Gln Thr His Thr Thr
 610 615 620
 Pro Ile Leu Leu Ser Asn Asn Phe Ile Glu Pro Leu Glu Ile Thr Lys
 625 630 635 640
 Glu Ile Tyr Asp Leu Asn Asn Pro Glu Lys Glu Pro Lys Lys Phe Gln
 645 650 655
 Thr Ala Tyr Ala Lys Lys Thr Gly Asp Gln Lys Gly Tyr Arg Glu Ala

 660 665 670
 Leu Cys Lys Trp Ile Asp Phe Thr Arg Asp Phe Leu Ser Lys Tyr Thr

675 680 685
 Lys Thr Thr Ser Ile Asp Leu Ser Ser Leu Arg Pro Ser Ser Gln Tyr
 690 695 700
 Lys Asp Leu Gly Glu Tyr Tyr Ala Glu Leu Asn Pro Leu Leu Tyr His
 705 710 715 720
 Ile Ser Phe Gln Arg Ile Ala Glu Lys Glu Ile Met Asp Ala Val Glu

 725 730 735
 Thr Gly Lys Leu Tyr Leu Phe Gln Ile Tyr Asn Lys Asp Phe Ala Lys
 740 745 750
 Gly His His Gly Lys Pro Asn Leu His Thr Leu Tyr Trp Thr Gly Leu
 755 760 765
 Phe Ser Pro Glu Asn Leu Ala Lys Thr Ser Ile Lys Leu Asn Gly Gln
 770 775 780
 Ala Glu Leu Phe Tyr Arg Pro Lys Ser Arg Met Lys Arg Met Ala His

 785 790 795 800
 Arg Leu Gly Glu Lys Met Leu Asn Lys Lys Leu Lys Asp Gln Lys Thr
 805 810 815
 Pro Ile Pro Asp Thr Leu Tyr Gln Glu Leu Tyr Asp Tyr Val Asn His
 820 825 830
 Arg Leu Ser His Asp Leu Ser Asp Glu Ala Arg Ala Leu Leu Pro Asn
 835 840 845
 Val Ile Thr Lys Glu Val Ser His Glu Ile Ile Lys Asp Arg Arg Phe

 850 855 860
 Thr Ser Asp Lys Phe Phe Phe His Val Pro Ile Thr Leu Asn Tyr Gln
 865 870 875 880
 Ala Ala Asn Ser Pro Ser Lys Phe Asn Gln Arg Val Asn Ala Tyr Leu
 885 890 895
 Lys Glu His Pro Glu Thr Pro Ile Ile Gly Ile Asp Arg Gly Glu Arg
 900 905 910
 Asn Leu Ile Tyr Ile Thr Val Ile Asp Ser Thr Gly Lys Ile Leu Glu

 915 920 925

Gln Arg Ser Leu Asn Thr Ile Gln Gln Phe Asp Tyr Gln Lys Lys Leu
930 935 940

Asp Asn Arg Glu Lys Glu Arg Val Ala Ala Arg Gln Ala Trp Ser Val
945 950 955 960

Val Gly Thr Ile Lys Asp Leu Lys Gln Gly Tyr Leu Ser Gln Val Ile
965 970 975

His Glu Ile Val Asp Leu Met Ile His Tyr Gln Ala Val Val Val Leu

980 985 990

Glu Asn Leu Asn Phe Gly Phe Lys Ser Lys Arg Thr Gly Ile Ala Glu
995 1000 1005

Lys Ala Val Tyr Gln Gln Phe Glu Lys Met Leu Ile Asp Lys Leu
1010 1015 1020

Asn Cys Leu Val Leu Lys Asp Tyr Pro Ala Glu Lys Val Gly Gly
1025 1030 1035

Val Leu Asn Pro Tyr Gln Leu Thr Asp Gln Phe Thr Ser Phe Ala

1040 1045 1050

Lys Met Gly Thr Gln Ser Gly Phe Leu Phe Tyr Val Pro Ala Pro
1055 1060 1065

Tyr Thr Ser Lys Ile Asp Pro Leu Thr Gly Phe Val Asp Pro Phe
1070 1075 1080

Val Trp Lys Thr Ile Lys Asn His Glu Ser Arg Lys His Phe Leu
1085 1090 1095

Glu Gly Phe Asp Phe Leu His Tyr Asp Val Lys Thr Gly Asp Phe

1100 1105 1110

Ile Leu His Phe Lys Met Asn Arg Asn Leu Ser Phe Gln Arg Gly
1115 1120 1125

Leu Pro Gly Phe Met Pro Ala Trp Asp Ile Val Phe Glu Lys Asn
1130 1135 1140

Glu Thr Gln Phe Asp Ala Lys Gly Thr Pro Phe Ile Ala Gly Lys
1145 1150 1155

Arg Ile Val Pro Val Ile Glu Asn His Arg Phe Thr Gly Arg Tyr

1160 1165 1170
 Arg Asp Leu Tyr Pro Ala Asn Glu Leu Ile Ala Leu Leu Glu Glu
 1175 1180 1185
 Lys Gly Ile Val Phe Arg Asp Gly Ser Asn Ile Leu Pro Lys Leu
 1190 1195 1200
 Leu Glu Asn Asp Asp Ser His Ala Ile Asp Thr Met Val Ala Leu
 1205 1210 1215
 Ile Arg Ser Val Leu Gln Met Arg Asn Ser Asn Ala Ala Thr Gly

1220 1225 1230
 Glu Asp Tyr Ile Asn Ser Pro Val Arg Asp Leu Asn Gly Val Cys
 1235 1240 1245
 Phe Asp Ser Arg Phe Gln Asn Pro Glu Trp Pro Met Asp Ala Asp
 1250 1255 1260
 Ala Asn Gly Ala Tyr His Ile Ala Leu Lys Gly Gln Leu Leu Leu
 1265 1270 1275
 Asn His Leu Lys Glu Ser Lys Asp Leu Lys Leu Gln Asn Gly Ile

1280 1285 1290
 Ser Asn Gln Asp Trp Leu Ala Tyr Ile Gln Glu Leu Arg Asn
 1295 1300 1305

<210> 20

<211> 1228

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 20

Ala Ala Ser Lys Leu Glu Lys Phe Thr Asn Cys Tyr Ser Leu Ser Lys

1 5 10 15

Thr Leu Arg Phe Lys Ala Ile Pro Val Gly Lys Thr Gln Glu Asn Ile

20 25 30

Asp Asn Lys Arg Leu Leu Val Glu Asp Glu Lys Arg Ala Glu Asp Tyr

35 40 45

Lys Gly Val Lys Lys Leu Leu Asp Arg Tyr Tyr Leu Ser Phe Ile Asn

50					55					60									
Asp	Val	Leu	His	Ser	Ile	Lys	Leu	Lys	Asn	Leu	Asn	Asn	Tyr	Ile	Ser				
65					70					75					80				
Leu	Phe	Arg	Lys	Lys	Thr	Arg	Thr	Glu	Lys	Glu	Asn	Lys	Glu	Leu	Glu				
					85					90					95				
Asn	Leu	Glu	Ile	Asn	Leu	Arg	Lys	Glu	Ile	Ala	Lys	Ala	Phe	Lys	Gly				
100					105					110									
Ala	Ala	Gly	Tyr	Lys	Ser	Leu	Phe	Lys	Lys	Asp	Ile	Ile	Glu	Thr	Ile				
115					120					125									
Leu	Pro	Glu	Ala	Ala	Asp	Asp	Lys	Asp	Glu	Ile	Ala	Leu	Val	Asn	Ser				
130					135					140									
Phe	Asn	Gly	Phe	Thr	Thr	Ala	Phe	Thr	Gly	Phe	Phe	Asp	Asn	Arg	Glu				
145					150					155					160				
Asn	Met	Phe	Ser	Glu	Glu	Ala	Lys	Ser	Thr	Ser	Ile	Ala	Phe	Arg	Cys				
165					170					175									
Ile	Asn	Glu	Asn	Leu	Thr	Arg	Tyr	Ile	Ser	Asn	Met	Asp	Ile	Phe	Glu				
180					185					190									
Lys	Val	Asp	Ala	Ile	Phe	Asp	Lys	His	Glu	Val	Gln	Glu	Ile	Lys	Glu				
195					200					205									
Lys	Ile	Leu	Asn	Ser	Asp	Tyr	Asp	Val	Glu	Asp	Phe	Phe	Glu	Gly	Glu				
210					215					220									
Phe	Phe	Asn	Phe	Val	Leu	Thr	Gln	Glu	Gly	Ile	Asp	Val	Tyr	Asn	Ala				
225					230					235					240				
Ile	Ile	Gly	Gly	Phe	Val	Thr	Glu	Ser	Gly	Glu	Lys	Ile	Lys	Gly	Leu				
245					250					255									
Asn	Glu	Tyr	Ile	Asn	Leu	Tyr	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Gln	Ala	Leu	Pro				
260					265					270									
Lys	Phe	Lys	Pro	Leu	Tyr	Lys	Gln	Val	Leu	Ser	Asp	Arg	Glu	Ser	Leu				
275					280					285									
Ser	Phe	Tyr	Gly	Glu	Gly	Tyr	Thr	Ser	Asp	Glu	Glu	Val	Leu	Glu	Val				
290					295					300									

Phe Arg Asn Thr Leu Asn Lys Asn Ser Glu Ile Phe Ser Ser Ile Lys
 305 310 315 320
 Lys Leu Glu Lys Leu Phe Lys Asn Phe Asp Glu Tyr Ser Ser Ala Gly
 325 330 335
 Ile Phe Val Lys Asn Gly Pro Ala Ile Ser Thr Ile Ser Lys Asp Ile
 340 345 350

 Phe Gly Glu Trp Asn Leu Ile Arg Asp Lys Trp Asn Ala Glu Tyr Asp
 355 360 365
 Asp Ile His Leu Lys Lys Lys Ala Val Val Thr Glu Lys Tyr Glu Asp
 370 375 380
 Asp Arg Arg Lys Ser Phe Lys Lys Ile Gly Ser Phe Ser Leu Glu Gln
 385 390 395 400
 Leu Gln Glu Tyr Ala Asp Ala Asp Leu Ser Val Val Glu Lys Leu Lys
 405 410 415

 Glu Ile Ile Ile Gln Lys Val Asp Glu Ile Tyr Lys Val Tyr Gly Ser
 420 425 430
 Ser Glu Lys Leu Phe Asp Ala Asp Phe Val Leu Glu Lys Ser Leu Lys
 435 440 445
 Lys Asn Asp Ala Val Val Ala Ile Met Lys Asp Leu Leu Asp Ser Val
 450 455 460
 Lys Ser Phe Glu Asn Tyr Ile Lys Ala Phe Phe Gly Glu Gly Lys Glu
 465 470 475 480

 Thr Asn Arg Asp Glu Ser Phe Tyr Gly Asp Phe Val Leu Ala Tyr Asp
 485 490 495
 Ile Leu Leu Lys Val Asp His Ile Tyr Asp Ala Ile Arg Asn Tyr Val
 500 505 510
 Thr Gln Lys Pro Tyr Ser Lys Asp Lys Phe Lys Leu Tyr Phe Gln Asn
 515 520 525
 Pro Gln Phe Met Gly Gly Trp Asp Lys Asp Lys Glu Thr Asp Tyr Arg
 530 535 540

 Ala Thr Ile Leu Arg Tyr Gly Ser Lys Tyr Tyr Leu Ala Ile Met Asp

545 550 555 560
 Lys Lys Tyr Ala Lys Cys Leu Gln Lys Ile Asp Lys Asp Asp Val Asn
 565 570 575
 Gly Asn Tyr Glu Lys Ile Asn Tyr Lys Leu Leu Pro Gly Pro Asn Lys
 580 585 590
 Met Leu Pro Lys Val Phe Phe Ser Lys Lys Trp Met Ala Tyr Tyr Asn
 595 600 605

 Pro Ser Glu Asp Ile Gln Lys Ile Tyr Lys Asn Gly Thr Phe Lys Lys
 610 615 620
 Gly Asp Met Phe Asn Leu Asn Asp Cys His Lys Leu Ile Asp Phe Phe
 625 630 635 640
 Lys Asp Ser Ile Ser Arg Tyr Pro Lys Trp Ser Asn Ala Tyr Asp Phe
 645 650 655
 Asn Phe Ser Glu Thr Glu Lys Tyr Lys Asp Ile Ala Gly Phe Tyr Arg
 660 665 670

 Glu Val Glu Glu Gln Gly Tyr Lys Val Ser Phe Glu Ser Ala Ser Lys
 675 680 685
 Lys Glu Val Asp Lys Leu Val Glu Glu Gly Lys Leu Tyr Met Phe Gln
 690 695 700
 Ile Tyr Asn Lys Asp Phe Ser Asp Lys Ser His Gly Thr Pro Asn Leu
 705 710 715 720
 His Thr Met Tyr Phe Lys Leu Leu Phe Asp Glu Asn Asn His Gly Gln
 725 730 735

 Ile Arg Leu Ser Gly Gly Ala Glu Leu Phe Met Arg Arg Ala Ser Leu
 740 745 750
 Lys Lys Glu Glu Leu Val Val His Pro Ala Asn Ser Pro Ile Ala Asn
 755 760 765
 Lys Asn Pro Asp Asn Pro Lys Lys Thr Thr Thr Leu Ser Tyr Asp Val
 770 775 780
 Tyr Lys Asp Lys Arg Phe Ser Glu Asp Gln Tyr Glu Leu His Ile Pro
 785 790 795 800

Ile Ala Ile Asn Lys Cys Pro Lys Asn Ile Phe Lys Ile Asn Thr Glu
805 810 815
Val Arg Val Leu Leu Lys His Asp Asp Asn Pro Tyr Val Ile Gly Ile
820 825 830
Asp Arg Gly Glu Arg Asn Leu Leu Tyr Ile Val Val Val Asp Gly Lys
835 840 845
Gly Asn Ile Val Glu Gln Tyr Ser Leu Asn Glu Ile Ile Asn Asn Phe
850 855 860

Asn Gly Ile Arg Ile Lys Thr Asp Tyr His Ser Leu Leu Asp Lys Lys
865 870 875 880
Glu Lys Glu Arg Phe Glu Ala Arg Gln Asn Trp Thr Ser Ile Glu Asn
885 890 895
Ile Lys Glu Leu Lys Ala Gly Tyr Ile Ser Gln Val Val His Lys Ile
900 905 910
Cys Glu Leu Val Glu Lys Tyr Asp Ala Val Ile Ala Leu Glu Asp Leu
915 920 925

Asn Ser Gly Phe Lys Asn Ser Arg Val Lys Val Glu Lys Gln Val Tyr
930 935 940
Gln Lys Phe Glu Lys Met Leu Ile Asp Lys Leu Asn Tyr Met Val Asp
945 950 955 960
Lys Lys Ser Asn Pro Cys Ala Thr Gly Gly Ala Leu Lys Gly Tyr Gln
965 970 975
Ile Thr Asn Lys Phe Glu Ser Phe Lys Ser Met Ser Thr Gln Asn Gly
980 985 990

Phe Ile Phe Tyr Ile Pro Ala Trp Leu Thr Ser Lys Ile Asp Pro Ser
995 1000 1005
Thr Gly Phe Val Asn Leu Leu Lys Thr Lys Tyr Thr Ser Ile Ala
1010 1015 1020
Asp Ser Lys Lys Phe Ile Ser Ser Phe Asp Arg Ile Met Tyr Val
1025 1030 1035
Pro Glu Glu Asp Leu Phe Glu Phe Ala Leu Asp Tyr Lys Asn Phe

1040	1045	1050
Ser Arg Thr Asp Ala Asp Tyr Ile Lys Lys Trp Lys Leu Tyr Ser		
1055	1060	1065
Tyr Gly Asn Arg Ile Arg Ile Phe Ala Ala Ala Lys Lys Asn Asn		
1070	1075	1080
Val Phe Ala Trp Glu Glu Val Cys Leu Thr Ser Ala Tyr Lys Glu		
1085	1090	1095
Leu Phe Asn Lys Tyr Gly Ile Asn Tyr Gln Gln Gly Asp Ile Arg		
1100	1105	1110
Ala Leu Leu Cys Glu Gln Ser Asp Lys Ala Phe Tyr Ser Ser Phe		
1115	1120	1125
Met Ala Leu Met Ser Leu Met Leu Gln Met Arg Asn Ser Ile Thr		
1130	1135	1140
Gly Arg Thr Asp Val Asp Phe Leu Ile Ser Pro Val Lys Asn Ser		
1145	1150	1155
Asp Gly Ile Phe Tyr Asp Ser Arg Asn Tyr Glu Ala Gln Glu Asn		
1160	1165	1170
Ala Ile Leu Pro Lys Asn Ala Asp Ala Asn Gly Ala Tyr Asn Ile		
1175	1180	1185
Ala Arg Lys Val Leu Trp Ala Ile Gly Gln Phe Lys Lys Ala Glu		
1190	1195	1200
Asp Glu Lys Leu Asp Lys Val Lys Ile Ala Ile Ser Asn Lys Glu		
1205	1210	1215
Trp Leu Glu Tyr Ala Gln Thr Ser Val Lys		
1220	1225	