(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0128984
(43) 공개일자 2024년08월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07C 229/12 (2006.01) *A61K 31/7088* (2006.01)
A61K 47/18 (2017.01) *A61K 9/127* (2006.01)
A61K 9/51 (2006.01) *A61P 25/28* (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07C 229/12 (2013.01)
A61K 31/7088 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-7025244
(22) 출원일자(국제) 2022년12월29일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년07월25일
(86) 국제출원번호 PCT/CN2022/143074
(87) 국제공개번호 WO 2023/125738
국제공개일자 2023년07월06일
(30) 우선권주장
202111638123.4 2021년12월29일 중국(CN)
202210651178.7 2022년06월09일 중국(CN)

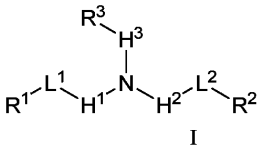
(71) 출원인
지앙수 헨그루이 파마슈티컬스 컴퍼니 리미티드
중국, 지앙수 222047, 리안윈강, 이코노믹 앤드 테크놀로지컬 디벨롭먼트 존, 7 곤륜샨 로드
상하이 센후이 메디슨 컴퍼니 리미티드
중국, 201203 상하이 푸동 뉴 에리어, 프리 트레이드 파일럿 존, 진케 로드 넘버 3728, 빌딩 넘버 14, 플로어 4
상하이 쉥디 파마슈티컬 컴퍼니 리미티드
중국, 201210 상하이 푸동 뉴 디스트릭트, 장지앙 타운, 하이커 로드 넘버 1288
(72) 발명자
주 링지안
중국 상하이 201203 푸동 뉴 에리어 프리 트레이드 파일럿 존 진케 로드 넘버 3728 빌딩 넘버 14 플로어 4
시 지안위
중국 상하이 201203 푸동 뉴 에리어 프리 트레이드 파일럿 존 진케 로드 넘버 3728 빌딩 넘버 14 플로어 4
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
제일특허법인(유)

전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 발명의 명칭 **전달에 사용되는 지질 및 조성물**

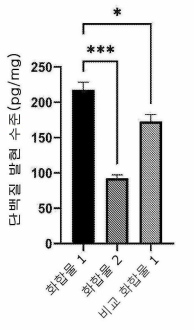
(57) 요 약

본 발명은 전달에 사용된 지질 및 조성물에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 하기 화학식 I의 화합물 또는 이의 염에 관한 것이고, 이때 R^1 내지 R^3, H^1 내지 H^3, L^1, 및 L^2는 명세서에 정의된 바와 같다:



I .

대 표 도



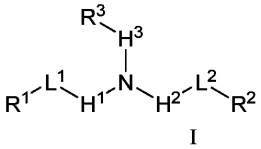
(52) CPC특허분류
A61K 47/183 (2013.01)
A61K 9/127 (2013.01)
A61K 9/5123 (2013.01)
A61P 25/28 (2018.01)
A61P 31/00 (2018.01)
A61P 35/00 (2018.01)
A61P 37/00 (2018.01)
(72) 발명자
리우 종이
중국 상하이 201210 푸동 뉴 디스트릭트 장지앙 타운 하이커 로드 넘버 1288
지앙 쥔
중국 상하이 201210 푸동 뉴 디스트릭트 장지앙 타운 하이커 로드 넘버 1288
후앙 지안
중국 상하이 201203 푸동 뉴 에리어 프리 트레이드 파일럿 존 진케 로드 넘버 3728 빌딩 넘버 14 플로어 4

명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 I의 화합물 또는 이의 염:



I

상기 식에서,

L^1 및 L^2는 각각 독립적으로 -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)-, -OC(O)O-, -O-, $-S(O)_x-$, -S-S-, -C(O)S-, -SC(O)-, $-NR^aC(O)-$, $-C(O)NR^a-$, $-NR^aC(O)NR^a-$, $-NR^aC(O)O-$, $-OC(O)NR^a-$ 및 결합(bond)으로 이루어진 군으로부터 선택되고, R^a는 수소, C_{1-6} 알킬 및 C_{2-6} 알켄일로 이루어진 군으로부터 선택되고;

H^1 및 H^2는 각각 독립적으로 C_{1-12} 헤테로알킬렌, C_{1-12} 알킬렌 및 C_{2-12} 알켄일렌으로 이루어진 군으로부터 선택되고, H^1 및 H^2 중 하나 이상은 C_{1-12} 헤테로알킬렌이고;

H^3은 C_{1-24} 알킬렌, C_{2-24} 알켄일렌, C_{3-8} 사이클로알킬렌 및 C_{3-8} 사이클로알켄일렌으로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R^1 및 R^2는 각각 독립적으로 C_{1-24} 알킬 및 C_{2-24} 알켄일로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R^3은 수소, -CN, $-C(O)OR^4$, $-OC(O)R^4$, $-OR^5$ 및 $-NR^5C(O)R^4$로 이루어진 군으로부터 선택되고; R^4는 C_{1-6} 알킬 및 C_{2-6} 알켄일으로 이루어진 군으로부터 선택되고; R^5는 수소, C_{1-6} 알킬 및 C_{2-6} 알켄일로 이루어진 군으로부터 선택되고;

x는 0, 1 및 2로 이루어진 군으로부터 선택된다.

청구항 2

재1항에 있어서,

H^1이 C_{1-12} 헤테로알킬렌, 바람직하게는 C_{2-9} 헤테로알킬렌으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 화합물 또는 이의 염.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

L^1 및 L^2가 각각 독립적으로 -C(O)O-, -OC(O)- 및 결합으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 화합물 또는 이의 염.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

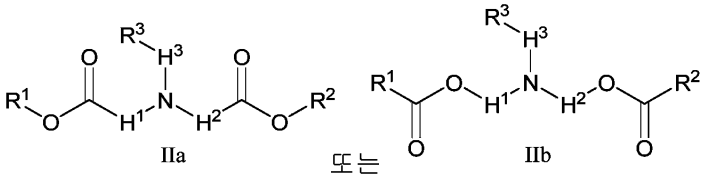
R^1 및 R^2가 각각 독립적으로 C_{2-24} 알킬, 바람직하게는 C_{4-18} 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되거나; R^1 및 R^2가

각각 독립적으로 C_{2-24} 알켄일, 바람직하게는 C_{4-18} 알켄일로 이루어진 군으로부터 선택되는, 화합물 또는 이의 염.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

화학식 I의 화합물이 하기 화학식 IIa 또는 IIb의 화합물인, 화합물 또는 이의 염:



IIa 또는 IIb

상기 식에서,

H^1, H^2, H^3, R^1, R^2 및 R^3은 제1항에 정의된 바와 같다.

청구항 6

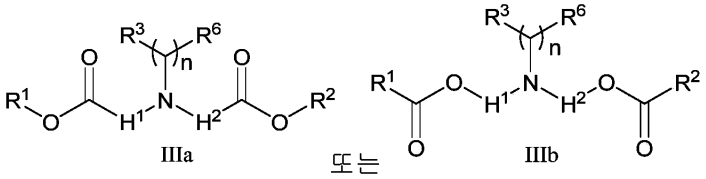
제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

H^3이 C_{2-24} 알켄일렌, C_{3-8} 사이클로알킬렌 및 C_{3-8} 사이클로알켄일렌, 바람직하게는 C_{3-8} 사이클로알킬렌으로 이루어진 군으로부터 선택되거나; H^3이 C_{2-24} 알킬렌으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 화합물 또는 이의 염.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

화학식 I의 화합물이 하기 화학식 IIIa 또는 IIIb의 화합물인, 화합물 또는 이의 염:



IIIa 또는 IIIb

상기 식에서,

각각의 R^6은 독립적으로 수소, 하이드록시, C_{1-6} 알킬 및 C_{2-6} 알켄일로 이루어진 군으로부터 선택되고;

n은 1 내지 12의 정수로 이루어진 군으로부터 선택되고, 예컨대 2, 3, 4, 5 또는 6이고;

H^1, H^2, R^1, R^2 및 R^3은 제1항에 정의된 바와 같다.

청구항 8

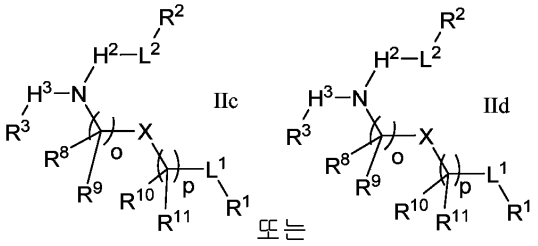
제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

R^3이 -CN 및 하이드록시로 이루어진 군으로부터 선택되거나, R^3이 $-C(O)OR^4$, $-OC(O)R^4$ 및 $-NHC(O)R^4$로 이루어진 군으로부터 선택되고; R^4가 제1항에 정의된 바와 같고, 또한, R^4가 바람직하게는 C_{1-6} 알킬이고, 더욱 바람직하게는 메틸, 에틸 또는 프로필인, 화합물 또는 이의 염.

청구항 9

제1항 또는 제2항에 있어서,

화학식 I의 화합물이 하기 화학식 IIc 또는 IId의 화합물인, 화합물 또는 이의 염:



상기 식에서,

X는 -N(R^7)- 또는 -O-이고;

o는 1 내지 11의 정수로 이루어진 군으로부터 선택되고, p는 1 내지 5의 정수로 이루어진 군으로부터 선택되고, o + p는 12 이하이고;

R^7은 수소, C_{1-6} 알킬 및 C_{2-6} 알켄일로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R^8, R^9, R^{10} 및 R^{11}은 각각 독립적으로 수소, 하이드록시, C_{1-6} 알킬 및 C_{2-6} 알켄일로 이루어진 군으로부터 선택되고;

L^1, L^2, H^2, H^3, R^1, R^2 및 R^3은 제1항에 정의된 바와 같다.

청구항 10

제9항에 있어서,

p가 1 및 2로 이루어진 군으로부터 선택되는, 화합물 또는 이의 염.

청구항 11

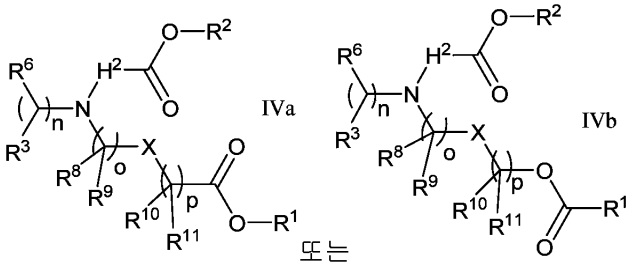
제1항에 있어서,

H^2가 C_{3-7} 알킬렌 및 C_{3-7} 알켄일렌으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 화합물 또는 이의 염.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서,

화학식 I의 화합물이 하기 화학식 IVa 또는 IVb의 화합물인, 화합물 또는 이의 염:



상기 식에서,

H^2, R^1, R^2 및 R^3은 제1항에 정의된 바와 같고;

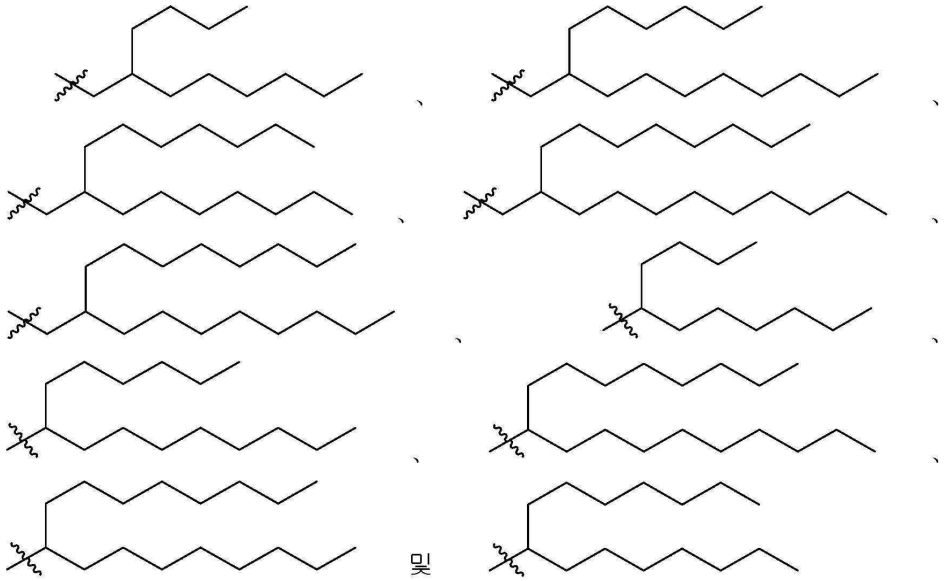
R^6 및 n은 제7항에 정의된 바와 같고;

R^8, R^9, R^{10}, R^{11}, X, o 및 p는 제9항에 정의된 바와 같다,

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서,

R^1이



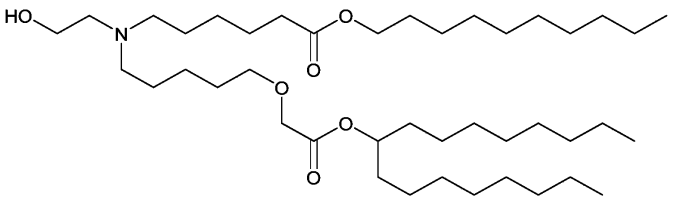
및

로 이루어진 군으로부터 선택되는, 화합물 또는 이의 염.

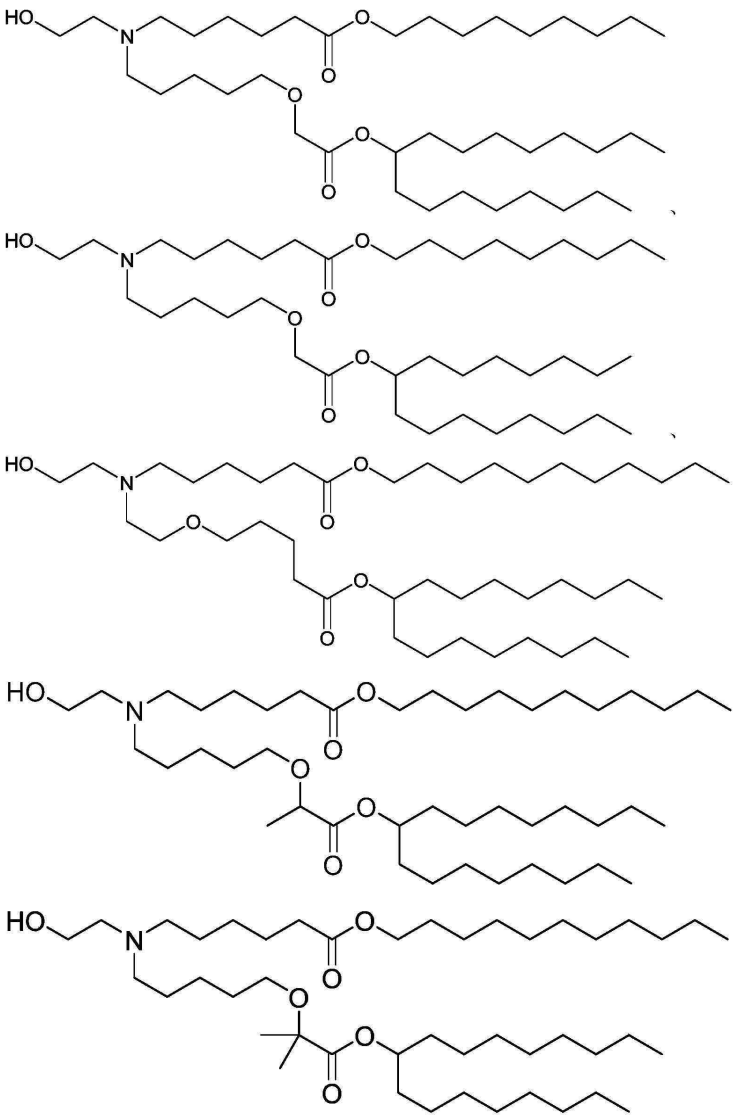
청구항 14

제1항에 있어서,

화학식 I의 화합물이 하기 화합물들로 이루어진 군으로부터 선택되는, 화합물 또는 이의 염:



,



및

.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 따른 화합물의 동위원소 치환된 형태로서, 바람직하게는 중수소 원자로 치환된 형태인 동위원소 치환된 형태.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 따른 화합물 또는 이의 염을 포함하고, 활성제를 추가로 포함하고, 이때 상기 활성제가 바람직하게는 폴리뉴클레오티드 또는 핵산, 예컨대 mRNA인, 지질 입자.

청구항 17

제15항 또는 제16항에 따른 지질 입자; 및

약학적으로 허용되는 부형제

를 포함하는 약학 조성물.

청구항 18

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 따른 화합물 또는 이의 염, 제15항에 따른 동위원소 치환된 형태, 제16항에 따른 지질 입자, 또는 제17항에 따른 약학 조성물의, 암, 감염, 자가면역 질환, 신경퇴행성 질환 또는 염증의 예방 및/또는 치료용 약제의 제조에서의 용도.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 개시내용은 약학 분야에 속하고, 전달을 위한 지질 및 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 메신저 RNA(mRNA), 안티센스 올리고뉴클레오티드, 작은 간섭 RNA(siRNA) 및 플라스미드와 같은 핵산-기반 약물은 적용가능성이 매우 높다. 이 기술의 발전을 방해하는 문제는 이러한 약물을 신체내 표적 기관과 세포에 안전하고 효과적으로 전달하는 방법이다.

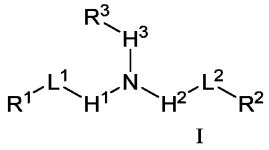
[0003] 현재, 핵산 약물 전달 시스템은 바이러스 벡터 시스템과 비-바이러스 시스템의 두 가지 주요 유형으로 분류된다. 지질 나노입자-매개 핵산 약물 전달은 비-바이러스 시스템의 주요 방법이다.

[0004] 유전자 치료 및 백신 응용 분야에서, 지질 나노입자는 다양한 질병을 치료하기 위한 핵산을 위한 탁월한 벡터인 것으로 나타났다. 양이온성 지질과 콜레스테롤, 인지질, 페길화된(PEGylated) 지질과 같은 기타 보조 지질로 형성된 지질 나노입자는 핵산을 캡슐화하여 분해로부터 보호하고 세포 흡수를 촉진하여 면역 반응을 감소시킨다. 또한, 지질 나노입자는 우수한 표적화, 최소한의 부작용, 우수한 안정성, 효율적인 형질감염 등을 비롯한, 생체활성(bioactive) 성분을 세포로 전달하는 데 다른 이점을 제공한다.

[0005] 핵산 분자-기반 치료법 분야의 급속한 발전으로 인해 핵산 약물 전달에 대한 수요가 증가하였다. 따라서, 효율적이고 안전한 핵산 전달 벡터의 개발이 필요하다.

발명의 내용

[0006] 본 개시내용은 하기 화학식 I의 화합물 또는 이의 염을 제공한다:

[0007] 

I

[0008] 상기 식에서,

[0009] L^1 및 L^2는 각각 독립적으로 -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)-, -OC(O)O-, -O-, $-S(O)_x-$, -S-S-, -C(O)S-, -SC(O)-, $-NR^aC(O)-$, $-C(O)NR^a-$, $-NR^aC(O)NR^a-$, $-NR^aC(O)O-$, $-OC(O)NR^a-$ 및 결합으로 이루어진 군으로부터 선택되고, R^a는 수소, C_{1-6} 알킬 및 C_{2-6} 알켄일로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0010] H^1 및 H^2는 각각 독립적으로 C_{1-12} 헤테로알킬렌, C_{1-12} 알킬렌 및 C_{2-12} 알켄일렌으로 이루어진 군으로부터 선택되고, H^1 및 H^2 중 하나 이상은 C_{1-12} 헤테로알킬렌이고;

[0011] H^3은 C_{1-24} 알킬렌, C_{2-24} 알켄일렌, C_{3-8} 사이클로알킬렌 및 C_{3-8} 사이클로알켄일렌으로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0012] R^1 및 R^2는 각각 독립적으로 C_{1-24} 알킬 및 C_{2-24} 알켄일로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0013] R^3은 수소, -CN, $-C(O)OR^4$, $-OC(O)R^4$, $-OR^5$ 및 $-NR^5C(O)R^4$로 이루어진 군으로부터 선택되고; R^4는 C_{1-6} 알킬 및 C_{2-6} 알켄일로 이루어진 군으로부터 선택되고; R^5는 수소, C_{1-6} 알킬 및 C_{2-6} 알켄일로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0014] x는 0, 1 및 2로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0015] 일부 실시양태에서, 화학식 I의 화합물 또는 이의 염에서 H^1 및 H^2 중 하나 이상은, O, N 및 S로 이루어진 군으

로부터 선택되는 하나 이상의 헤테로원자를 포함하는 헤테로알킬렌이다.

[0016] 일부 실시양태에서, 화학식 I의 화합물 또는 이의 염에서 H^1은 C_{1-12} 헤테로알킬렌, 바람직하게는 C_{2-9} 헤테로알킬렌으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 헤테로알킬렌은, 하나 이상의 산소 원자를 포함하는 헤테로알킬렌이다. 일부 실시양태에서, 헤테로알킬렌은, 2개의 산소 원자를 포함하는 헤테로알킬렌이다. 일부 실시양태에서, 헤테로알킬렌은, 하나 이상의 질소 원자를 포함하는 헤테로알킬렌이다. 일부 실시양태에서, 헤테로알킬렌은, 하나 이상의 산소 원자를 포함하는 헤테로알킬렌이다.

[0017] 일부 실시양태에서, 화학식 I의 화합물 또는 이의 염에서 L^1 및 L^2는 각각 독립적으로 -C(O)O-, -OC(O)- 및 결합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0018] 일부 실시양태에서, 화학식 I의 화합물 또는 이의 염에서 L^1 및 L^2는 각각 독립적으로 -C(O)-, -OC(O)O-, -O- 및 결합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0019] 일부 실시양태에서, 화학식 I의 화합물 또는 이의 염에서 L^1 및 L^2는 각각 독립적으로 $-S(O)_x-$, -S-S-, -C(O)S-, -SC(O)- 및 결합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0020] 일부 실시양태에서, 화학식 I의 화합물 또는 이의 염에서 L^1 및 L^2는 각각 독립적으로 $-NR^aC(O)-$, $-C(O)NR^a-$, $-NR^aC(O)NR^a-$, $-NR^aC(O)O-$ 및 결합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0021] 일부 실시양태에서, 화학식 I의 화합물 또는 이의 염에서 L^1 및 L^2는 각각 독립적으로 $-NR^aC(O)NR^a-$, $-NR^aC(O)O-$, $-OC(O)NR^a-$ 및 결합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0022] 다른 양상에서, 일부 실시양태에서, 화학식 I의 화합물 또는 이의 염에서 R^1 및 R^2는 각각 독립적으로 C_{2-24} 알킬(예컨대, 비제한적으로, C_2 알킬, C_3 알킬, C_4 알킬, C_5 알킬, C_6 알킬, C_7 알킬, C_8 알킬, C_9 알킬, C_{10} 알킬, C_{11} 알킬, C_{12} 알킬, C_{13} 알킬, C_{14} 알킬, C_{15} 알킬, C_{16} 알킬, C_{17} 알킬, C_{18} 알킬, C_{19} 알킬, C_{20} 알킬 및 C_{21} 알킬)로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 다른 실시양태에서, 화학식 I의 화합물 또는 이의 염에서 R^1 및 R^2는 각각 독립적으로 C_{4-18} 알킬로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0023] 일부 실시양태에서, 화학식 I의 화합물 또는 이의 염에서 R^1 및 R^2는 각각 독립적으로 분지쇄 C_{4-18} 알킬로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0024] 일부 실시양태에서, 화학식 I의 화합물 또는 이의 염에서 R^1 및 R^2는 각각 독립적으로 직쇄 C_{4-18} 알킬로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0025] 일부 실시양태에서, 화학식 I의 화합물 또는 이의 염에서 R^1은 직쇄 C_{4-18} 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고, R^2는 분지쇄 C_{4-18} 알킬로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0026] 일부 실시양태에서, 화학식 I의 화합물 또는 이의 염에서 R^1은 분지쇄 C_{4-18} 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고, R^2는 분지쇄 C_{4-18} 알킬로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0027] 일부 실시양태에서 제공된 화학식 I의 화합물 또는 이의 염에서 R^1 및 R^2는 각각 독립적으로 C_{2-24} 알켄일(예컨대, 비제한적으로, C_2 알켄일, C_3 알켄일, C_4 알켄일, C_5 알켄일, C_6 알켄일, C_7 알켄일, C_8 알켄일, C_9 알켄일, C_{10} 알켄일, C_{11} 알켄일, C_{12} 알켄일, C_{13} 알켄일, C_{14} 알켄일, C_{15} 알켄일, C_{16} 알켄일, C_{17} 알켄일, C_{18} 알켄일, C_{19} 알켄일, C_{20} 알켄일 및 C_{21} 알켄일)로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서 제공된 화학식 I의 화합물 또는 이의 염에서 R^1 및 R^2는 각각 독립적으로 C_{4-18} 알켄일로 이루어진 군으로부터 선택된다.

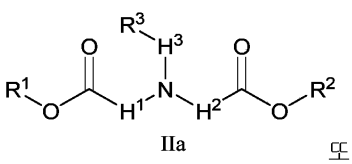
[0028] 일부 실시양태에서, 화학식 I의 화합물 또는 이의 염에서 R^1 및 R^2는 각각 독립적으로 분지쇄 C_{4-18} 알켄일로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0029] 일부 실시양태에서, 화학식 I의 화합물 또는 이의 염에서 R^1 및 R^2는 각각 독립적으로 직쇄 C_{4-18} 알켄일로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0030] 일부 실시양태에서, 화학식 I의 화합물 또는 이의 염에서 R^1은 직쇄 C_{4-18} 알켄일로 이루어진 군으로부터 선택되고, R^2는 분지쇄 C_{4-18} 알켄일로 이루어진 군으로부터 선택된다.

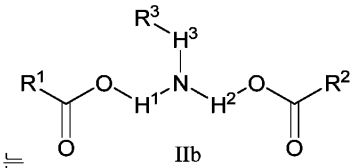
[0031] 일부 실시양태에서, 화학식 I의 화합물 또는 이의 염에서 R^1은 분지쇄 C_{4-18} 알켄일로 이루어진 군으로부터 선택되고, R^2는 분지쇄 C_{4-18} 알켄일로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0032] 또한, 일부 실시양태에서 제공된 화학식 I의 화합물은



IIa

또는



IIb

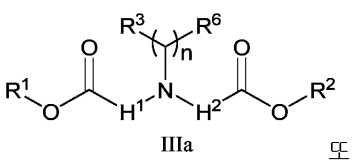
[0033] 이고, 이때 H^1, H^2, H^3, R^1, R^2 및 R^3은 상기 정의된 바와 같다.

[0034] 일부 실시양태에서, 화학식 I, IIa 또는 IIb의 화합물 또는 이의 염에서 H^3은 C_{2-24} 알켄일렌, C_{3-8} 사이클로알킬렌 및 C_{3-8} 사이클로알켄일렌으로 이루어진 군으로부터 선택되거나; H^3은 C_{1-24} 알킬렌으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 다른 실시양태에서, 화학식 I, IIa 또는 IIb의 화합물 또는 이의 염에서 H^3은 C_{3-8} 사이클로알킬렌으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0035] 일부 실시양태에서, C_{2-24} 알켄일렌은, 비제한적으로, C_2 알켄일렌, C_3 알켄일렌, C_4 알켄일렌, C_5 알켄일렌, C_6 알켄일렌, C_7 알켄일렌, C_8 알켄일렌, C_9 알켄일렌, C_{10} 알켄일렌, C_{11} 알켄일렌, C_{12} 알켄일렌, C_{13} 알켄일렌, C_{14} 알켄일렌, C_{15} 알켄일렌, C_{16} 알켄일렌, C_{17} 알켄일렌, C_{18} 알켄일렌, C_{19} 알켄일렌, C_{20} 알켄일렌, C_{21} 알켄일렌, C_{22} 알켄일렌, 또는 C_{23} 알켄일렌을 포함한다.

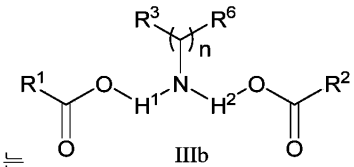
[0036] 일부 실시양태에서, C_{2-24} 알킬렌은, 비제한적으로, C_4 알킬렌, C_5 알킬렌, C_6 알킬렌, C_7 알킬렌, C_8 알킬렌, C_9 알킬렌, C_{10} 알킬렌, C_{11} 알킬렌, C_{12} 알킬렌, C_{13} 알킬렌, C_{14} 알킬렌, C_{15} 알킬렌, C_{16} 알킬렌, C_{17} 알킬렌, C_{18} 알킬렌, C_{19} 알킬렌, C_{20} 알킬렌, C_{21} 알킬렌, C_{22} 알킬렌, 또는 C_{23} 알킬렌을 포함한다.

[0037] 일부 다른 실시양태에서 제공된 화학식 I, IIa 또는 IIb의 화합물은



IIIa

또는



IIIb

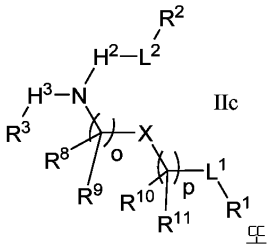
[0038] 이고, 각각의 R^6은 독립적으로 수소, 하이드록시, C_{1-6} 알킬 및 C_{2-6} 알켄일로 이루어진 군으로부터 선택되고; n은 1 내지 12(예컨대, 비제한적으로, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 및 12)로 이루어진 군으로부터 선택되고; H^1, H^2, R^1, R^2, 및 R^3은 화학식 I의 화합물에서 정의된 바와 같다.

[0039] 일부 실시양태에서, 화학식 IIIa 또는 IIIb의 화합물 또는 이의 염에서 n은 2, 3, 4, 5 또는 6이다.

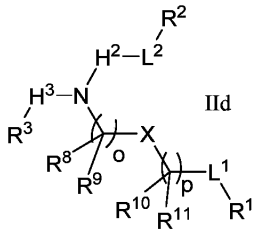
[0040] 일부 실시양태에서, 화학식 I, IIIa 또는 IIIb의 화합물 또는 이의 염에서 R^3은 -CN 및 하이드록시로 이루어진

군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 화학식 I, IIIa 또는 IIIb의 화합물 또는 이의 염에서 R^3은 $-C(O)OR^4$, $-OC(O)R^4$ 및 $-NHC(O)R^4$로 이루어진 군으로부터 선택되고, R^4는 상기 정의된 바와 같다.

[0041] 일부 실시양태에서, 화학식 I의 화합물 또는 이의 염에서 R^4는 C_{1-6} 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고, 예컨대, 비제한적으로, 메틸, 에틸 또는 프로필이다.



또는



[0042] 일부 실시양태에서, 화학식 I의 화합물은 이고, 이때 X는 $-N(R^7)-$ 또는 $-O-$이고; o는 1 내지 11로 이루어진 군으로부터 선택되고, p는 1 내지 5로 이루어진 군으로부터 선택되고, o + p는 12 이하이고; R^7은 수소, C_{1-6} 알킬 및 C_{2-6} 알켄일로 이루어진 군으로부터 선택되고; R^8, R^9, R^{10} 및 R^{11}은 각각 독립적으로 수소, 하이드록시, C_{1-6} 알킬 및 C_{2-6} 알켄일로 이루어진 군으로부터 선택되고; L^1, L^2, H^2, H^3, R^1, R^2, 및 R^3은 화학식 I의 화합물에서 정의된 바와 같다.

[0043] 일부 실시양태에서, 화학식 IIc 또는 IId의 화합물 또는 이의 염에서 p는 1 및 2로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0044] 일부 실시양태에서, 화학식 IIc 또는 IId의 화합물 또는 이의 염에서 o는 4, 5, 6, 7 및 8로 이루어진 군으로부터 선택된다.

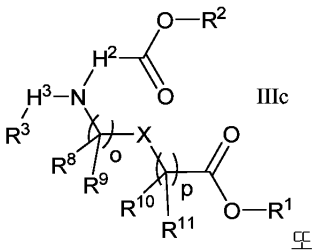
[0045] 일부 실시양태에서, 화학식 IIc 또는 IId의 화합물 또는 이의 염에서 X는 -O-이다.

[0046] 일부 실시양태에서, 화학식 IIc 또는 IId의 화합물 또는 이의 염에서 R^8, R^9, R^{10} 및 R^{11}은 각각 독립적으로 수소로 이루어진 군으로부터 선택된다.

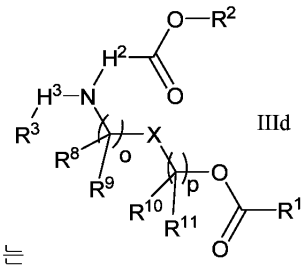
[0047] 일부 실시양태에서, 화학식 IIc 또는 IId의 화합물 또는 이의 염에서 R^{10} 및 R^{11}은 각각 독립적으로 C_{1-6} 알킬로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0048] 일부 실시양태에서, 화학식 IIc 또는 IId의 화합물 또는 이의 염에서 R^3은 하이드록시로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0049] 일부 다른 실시양태에서, 화학식 I의 화합물은



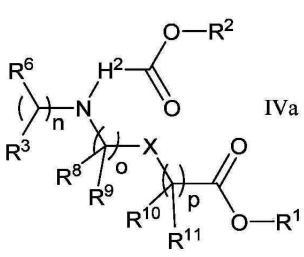
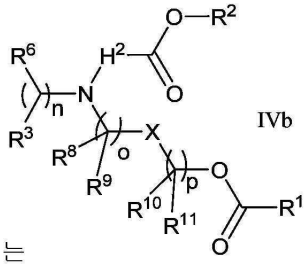
또는



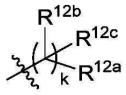
[0050] 이고; 이때 H^2, R^1, R^2, 및 R^3은 화학식 I의 화합물에 정의된 바와 같고; R^8, R^9, R^{10}, R^{11}, X, o 및 p는 화학식 IIc의 화합물에 정의된 바와 같다.

[0051] 일부 실시양태에서, 화학식 I, IIIc 또는 IIId의 화합물 또는 이의 염에서 H^2는 C_{3-7} 알킬렌 및 C_{3-7} 알켄일렌으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0052] 일부 실시양태에서 제공된 화학식 I의 화합물은

[0053]  IVa 또는  IVb 이고, 이때 H^2, R^1, R^2 및 R^3은 화학식 I의 화합물에 정의된 바와 같고; R^8, R^9, R^{10}, R^{11}, X, o 및 p는 화학식 IIc의 화합물에 정의된 바와 같고; R^6 및 n은 상기 정의된 바와 같다.

[0054] 다른 양상에서, 일부 실시양태에서, 화학식 I의 화합물 또는 이의 염에서 R^1 및 R^2는 각각 하기 구조를 갖는다:

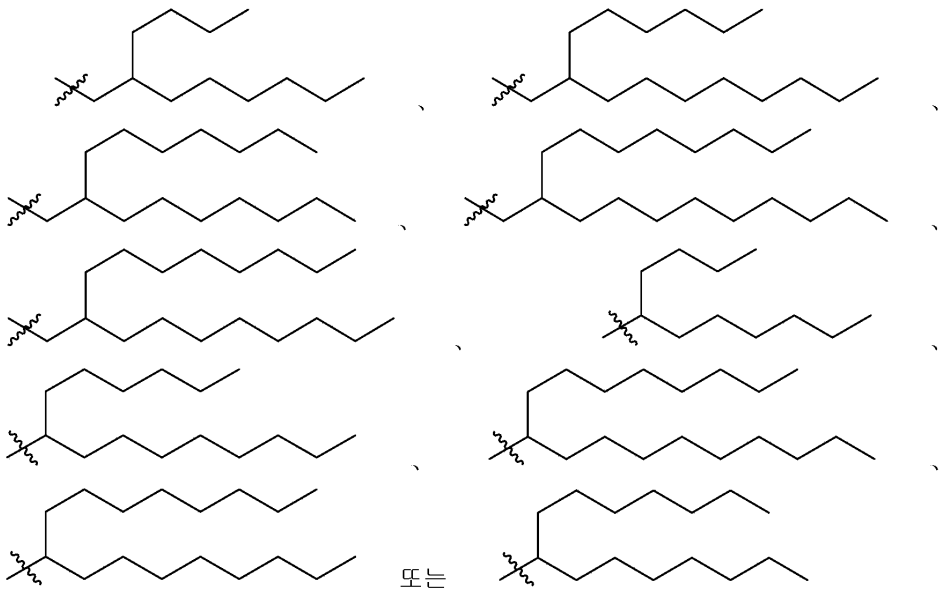
[0055] 

[0056] 상기 식에서,

[0057] R^{12a}, R^{12b} 및 R^{12c}는 각각 독립적으로 수소, C_{1-12} 알킬 및 C_{2-12} 알케닐로 이루어진 군으로부터 선택되고, k는 2 내지 12의 정수이다.

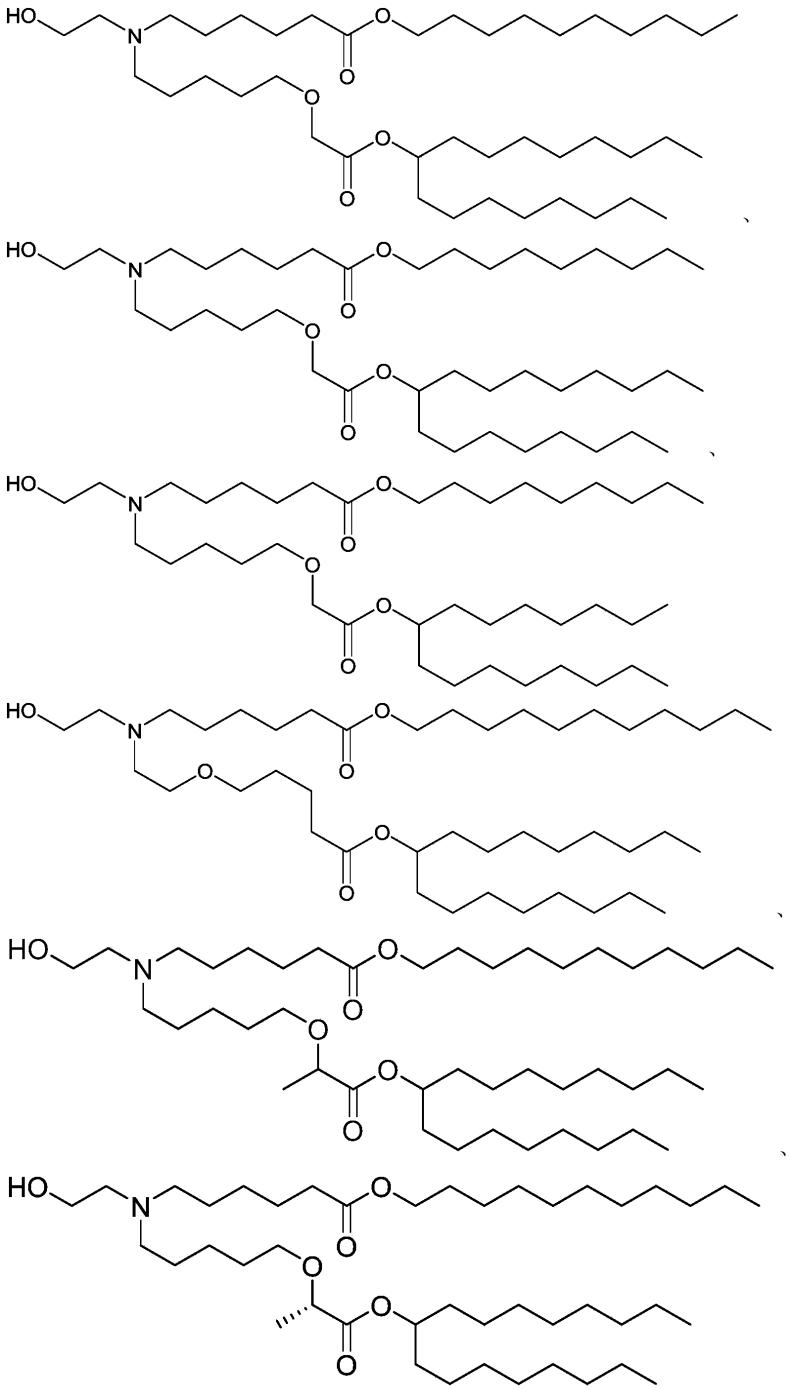
[0058] 일부 실시양태에서, 화학식 I의 화합물 또는 이의 염에서 R^{12c}는 수소로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0059] 일부 실시양태에서, 화학식 I의 화합물 또는 이의 염에서 R^1은

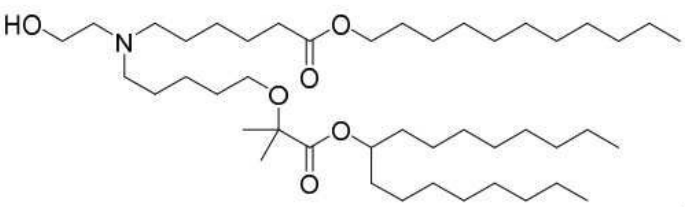
[0060]  또는

[0061] 로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0062] 화학식 I의 전형적인 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 비제한적으로 다음과 같다:



[0063] 또는



[0064]

[0065] 본 개시내용은 또한 전술한 화합물 또는 이의 염의 동위원소 치환된 형태를 제공하고; 바람직하게는, 동위원소 치환된 형태는 중수소 분자로 치환된 형태이다.

[0066] 본 개시내용은 또한 전술한 화합물 또는 이의 염을 포함하는 지질 입자를 제공한다. 또한, 일부 실시양태에서, 지질 입자는 활성제를 추가로 포함한다.

[0067] 일부 실시양태에서, 활성제는 폴리뉴클레오티드 및 핵산(예를 들어, 리보핵산 또는 데옥시리보핵산)으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0068] 일부 실시양태에서, 활성제는 mRNA로 이루어진 군으로부터 선택된다. 본 개시내용은 또한 전술한 지질 입자 및 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 특정 실시양태에서, 약학 조성물은 조성물의 총 중량을 기준으로 0.01% 내지 99.99%의 약학적으로 허용되는 부형제를 포함한다. 특정 실시양태에서, 약학 조성물은 0.1% 내지 99.9%의 약학적으로 허용되는 부형제를 포함한다. 특정 실시양태에서, 약학 조성물은 0.5% 내지 99.5%의 약학적으로 허용되는 부형제를 포함한다. 특정 실시양태에서, 약학 조성물은 1% 내지 99%의 약학적으로 허용되는 부형제를 포함한다. 특정 실시양태에서, 약학 조성물은 2% 내지 98%의 약학적으로 허용되는 부형제를 포함한다.

[0069] 본 개시내용은 또한 전술한 화합물 또는 이의 염, 동위원소 치환된 형태, 전술한 지질 입자, 또는 전술한 약학 조성물의, 대상에서 면역 반응을 유도하는 질병 또는 질환의 예방 및/또는 치료용 약제의 제조에서의 용도를 제공한다.

[0070] 본 개시내용은 또한 전술한 화합물 또는 이의 염, 동위원소 치환된 형태, 전술한 지질 입자, 또는 전술한 약학 조성물의, 폴리펩티드 과다발현과 연관된 질병 또는 질환의 예방 및/또는 치료용 약제의 제조에서의 용도를 제공한다.

[0071] 본 개시내용은 또한 전술한 화합물 또는 이의 염, 동위원소 치환된 형태, 전술한 지질 입자, 또는 전술한 약학 조성물의, 불충분한 폴리펩티드 발현과 연관된 질병 또는 질환의 예방 및/또는 치료용 약제의 제조에서의 용도를 제공한다.

[0072] 일부 실시양태에서, 질병 또는 질환은 비제한적으로 암, 감염, 자가면역 질환, 신경퇴행성 질환, 및 염증을 포함한다.

[0073] 본 개시내용은 또한 전술한 화합물 또는 이의 염, 전술한 지질 입자, 또는 전술한 약학 조성물을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상에서 면역 반응을 유도하는 질병 또는 질환의 예방 및/또는 치료 방법을 제공한다.

[0074] 본 개시내용은 또한 전술한 화합물 또는 이의 염, 전술한 지질 입자, 또는 전술한 약학 조성물을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 폴리펩티드 과다발현과 연관된 질병 또는 질환의 예방 및/또는 치료 방법을 제공한다.

[0075] 본 개시내용은 또한 전술한 화합물 또는 이의 염, 전술한 지질 입자, 또는 전술한 약학 조성물을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 불충분한 폴리펩티드 발현과 연관된 질병 또는 질환의 예방 및/또는 치료 방법을 제공한다.

[0076] 다른 양상에서, 본 개시내용은 또한 대상에서 면역 반응을 유도하는 질병 또는 질환의 예방 및/또는 치료에 사용하기 위한 전술한 화합물 또는 이의 염, 전술한 지질 입자, 또는 전술한 약학 조성물을 제공한다.

[0077] 본 개시내용은 또한 폴리펩티드 과다발현과 연관된 질병 또는 질환의 예방 및/또는 치료에 사용하기 위한 전술한 화합물 또는 이의 염, 전술한 지질 입자, 또는 전술한 약학 조성물을 제공한다.

[0078] 본 개시내용은 또한 불충분한 폴리펩티드 발현과 연관된 질병 또는 질환의 예방 및/또는 치료에 사용하기 위한 전술한 화합물 또는 이의 염, 전술한 지질 입자, 또는 전술한 약학 조성물을 제공한다.

[0079] 본 개시내용은 또한 전술한 화합물 또는 이의 염, 동위원소 치환된 형태, 전술한 지질 입자, 또는 전술한 약학 조성물의, 암, 감염, 자가면역 질환, 신경퇴행성 질환 또는 염증의 예방 및/또는 치료용 약제의 제조에서의 용도를 제공한다.

[0080] 본 개시내용은 또한 전술한 화합물 또는 이의 염, 전술한 지질 입자, 또는 전술한 약학 조성물을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 암, 감염, 자가면역 질환, 신경퇴행성 질환 또는 염증의 예방 및/또는 치료 방법을 제공한다.

[0081] 본 개시내용에 기술된 화합물 염은 "산" 부가 염 및 "염기" 부가 염을 포함한다. 예를 들어, 염기성 기(아미노 기)와의 산-염기 반응에 의해 형성된 염이 포함되고, 산은 유기 산 또는 무기 산을 포함한다. 또한, 화합물 염은 염기성 기(아미노 기)와의 4차화에 의해 형성된 염도 포함하고; 4차화 시약은 직쇄 또는 분지쇄 염소화 탄화수소를 포함한다.

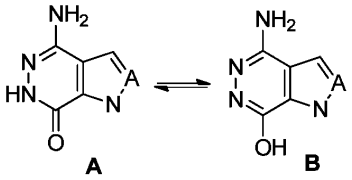
[0082] 본 개시내용의 화합물은 특정 기하학적 또는 입체 이성질체 형태로 존재할 수 있다. 본 개시내용은 시스 및 트

랜스 이성질체, (-)- 및 (+)-거울상 이성질체, (R)- 및 (S)-거울상 이성질체, 부분입체 이성질체, (D)-이성질체, (L)-이성질체 및 라세미 혼합물 및 이들의 다른 혼합물, 예를 들어 거울상 이성체적으로 또는 부분입체 이성체적으로 농축된 혼합물을 비롯한 모든 이러한 화합물을 고려하고, 이들 모두는 본 개시내용의 범주 내에 있다. 추가적인 비대칭 탄소 원자가 알킬 기와 같은 치환기에 존재할 수 있다. 이러한 모든 이성질체 및 이들의 혼합물은 본 개시내용의 범주 내에 포함된다. 비대칭 탄소 원자를 함유하는 본 개시내용의 화합물은 광학 활성 순수 형태 또는 라세미 형태로 분리될 수 있다. 광학 활성 순수 형태는 라세미 혼합물로부터 단리되거나 키랄 출발 물질 또는 키랄 시약을 사용하여 합성될 수 있다.

[0083] 광학 활성 (R)- 및 (S)-거울상 이성질체와 D- 및 L-이성질체는 키랄 합성, 키랄 시약 또는 기타 통상적인 기술을 통해 제조할 수 있다. 본 개시내용의 특정 화합물의 하나의 거울상 이성질체가 요구되는 경우, 이는 비대칭 합성 또는 키랄 보조제를 이용한 유도체화에 의해 제조될 수 있고, 이때 생성된 부분입체 이성질체의 혼합물은 분리되고, 보조 기는 절단되어 순수한 원하는 거울상 이성질체를 제공한다. 대안적으로, 분자가 염기성 작용기(예를 들어, 아미노) 또는 산성 작용기(예를 들어, 카복실)를 함유하는 경우, 부분입체 이성질체의 염은 적절한 광학 활성 산 또는 염기로 형성되고, 이어서 당업계에 공지된 통상적인 방법에 의해 부분입체 이성질체가 분해되고, 순수한 거울상 이성질체가 회수를 통해 수득된다. 또한, 거울상 이성질체 및 부분입체 이성질체의 분리는 일반적으로 키랄 고정 상을 사용하고 임의적으로 화학적 유도체화(예를 들어, 아민으로부터의 카바메이트 형성)와 함께 크로마토그래피에 의해 수행된다.

[0084] 본 개시내용의 화합물의 화학 구조에서, 결합 ""는 불특정 배열을 나타내고; 즉, 화학 구조에 키랄 이성질체가 존재하는 경우, 결합 ""는 "" 또는 ""일 수 있거나 "" 및 ""의 배열을 둘 다 동시에 포함한다. 본 개시내용의 화합물의 화학 구조에서, 결합 ""는 배열로 특정되지 않고; 즉, Z 배열 또는 E 배열로 존재하거나 두 배열을 모두 함유할 수 있다.

[0085] 본 개시내용의 화합물 및 중간체는 또한 상이한 호변 이성질체 형태로 존재할 수 있고, 이러한 모든 형태는 본 개시내용의 범주 내에 포함된다. "호변 이성질체" 또는 "호변 이성질체 형태"라는 용어는 저-에너지 장벽을 통해 상호전환될 수 있는 상이한 에너지의 구조 이성질체를 의미한다. 예를 들어, 양성자 호변 이성질체(양성자 이동 호변 이성질체라고도 함)에는 케토-에놀 및 이민-에나민, 락탐-락팀 이성질체화와 같은 양성자 이동을 통한 상호전환이 포함된다. 락탐-락팀 평형의 예는 아래와 같이 A와 B 사이에 존재한다:

[0086] 

.

[0087] 본 개시내용의 모든 화합물은 형태 A 또는 형태 B로 도출될 수 있다. 모든 호변 이성질체 형태는 본 개시내용의 범주 내에 있다. 화합물의 명칭은 어떠한 호변 이성질체도 제외하지 않는다.

[0088] 본 개시내용은 또한 본원에 언급된 것과 동일하지만 하나 이상의 원자가 자연에서 일반적으로 발견되는 원자 질량 또는 질량수와 다른 원자 질량 또는 질량수를 갖는 원자로 대체된 동위원소 표지된 화합물을 포함한다. 본 개시내용의 화합물에 혼입될 수 있는 동위원소의 예는 수소, 탄소, 질소, 산소, 인, 황, 불소, 요오드 및 염소의 동위원소, 예컨대 ^{2}H, ^{3}H, ^{11}C, ^{13}C, ^{14}C, ^{13}N, ^{15}N, ^{15}O, ^{17}O, ^{18}O, ^{31}P, ^{32}P, ^{35}S, ^{18}F, ^{123}I, ^{125}I, 및 ^{36}Cl을 포함한다.

[0089] 달리 명시하지 않는 한, 위치에 중수소(D)가 구체적으로 지정된 경우, 해당 위치는 자연적 중수소 존재비(abundance)(0.015%)보다 적어도 1,000배 큰 존재비(즉, 10% 이상 중수소 혼입)를 갖는 중수소로 해석되어야 한다. 실시예의 화합물은 자연 존재비의 적어도 1,000배 이상, 자연 존재비의 적어도 2,000배, 자연 존재비의 적어도 3,000배, 자연 존재비의 적어도 4,000배, 자연 존재비의 적어도 5,000배, 자연 존재비의 적어도 6,000배, 또는 자연 존배비보다 더 높은 배수를 갖는 존재비를 갖는 중수소를 포함한다. 본 개시내용은 또한 화학식 I의 화합물의 다양한 중수소화 형태를 포함한다. 탄소 원자에 연결된 각각의 이용가능한 수소 원자는 독립적으로 중수소 원자로 대체될 수 있다. 당업자는 관련 문헌에 따라 화학식 I의 화합물의 중수소화 형태를 합성할 수 있다. 시판 중인 중수소화 출발 물질은 화학식 I의 화합물의 중수소화 형태를 제조하는 데 사용될 수 있거나, 비제한적으로 중수소화 보란, 테트라하이드로푸란 중 삼중수소화 보란, 중수소화 리튬 알루미늄 하이드라이드,

중수소화 요오도에탄, 중수소화 요오도메탄 등을 비롯한 중수소화 시약에 의한 통상적인 기술을 사용하여 합성될 수 있다.

[0090] "임의적으로" 또는 "임의적인"은 이후 설명되는 사건 또는 상황이 반드시 발생하지는 않지만 발생할 수 있음을 의미하고, 이 설명에는 해당 사건 또는 상황이 발생하거나 발생하지 않는 경우가 포함된다. 예를 들어, "할로겐 또는 시아노로 임의적으로 치환된 C_{1-6} 알킬"은 할로겐 또는 시아노가 반드시 존재하지는 않지만 존재할 수 있음을 의미하고, 이 설명에는 알킬이 할로겐 또는 시아노로 치환되는 경우 및 알킬이 할로겐 또는 시아노로 치환되지 않은 경우를 포함한다.

[0091] 용어 및 정의:

[0092] "약학 조성물"은 본원에 기술된 하나 이상의 화합물 또는 생리학적/약학적으로 허용되는 염 또는 전구약물과 기타 화학 성분뿐만 아니라 기타 성분, 예를 들어 생리학적/약학적으로 허용되는 담체 및 부형제를 함유하는 혼합물을 의미한다. 약학 조성물은 유기체에 대한 투여를 촉진하고 활성 성분의 흡수를 촉진하여 생물학적 활성을 발휘할 수 있도록 의도된다.

[0093] "약학적으로 허용되는 부형제"는 비제한적으로 미국 식품의약국(FDA)에서 사람이나 가축 동물에 사용하도록 승인한 임의의 보조제, 담체, 부형제, 활택제, 감미제, 희석제, 보존제, 염료/착색제, 향미제, 계면활성제, 습윤제, 분산제, 현탁화제, 안정화제, 등장화제, 용매 또는 유화제를 포함한다.

[0094] 본 개시내용에 기재된 "효과량" 또는 "치료 효과량"은 의학적 장애의 증상 또는 장애를 개선하거나 예방하기에 충분한 양을 포함한다. 효과량은 또한 진단을 허용하거나 촉진하기에 충분한 양을 의미한다. 특정 환자 또는 수의학적 대상에 대한 효과량은 치료할 장애, 환자의 일반적인 건강 상태, 투여 방법, 경로 및 용량, 및 부작용의 중증도와 같은 인자에 따라 달라질 수 있다. 효과량은 유의한 부작용이나 독성 효과를 피하기 위한 최대 용량 또는 투여 요법일 수 있다.

[0095] "핵산"이라는 용어는 데옥시리보뉴클레오티드(DNA) 또는 리보뉴클레오티드(RNA)와 같은 뉴클레오티드로 구성된 중합체이다.

[0096] "올리고뉴클레오티드"라는 용어는 길이가 2 내지 100개의 뉴클레오티드인 단일- 또는 이중-가닥 뉴클레오티드 중합체를 의미한다. "폴리뉴클레오티드"는 뉴클레오티드 단량체로 구성된 단일- 또는 이중-가닥 중합체를 의미한다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 100개 이상의 뉴클레오티드로 구성된다.

[0097] 일부 다른 실시양태에서, 예시적인 폴리뉴클레오티드는 비제한적으로 데옥시리보뉴클레오티드(DNA), 리보핵산(RNA, 메신저 RNA 포함), RNAi-유도제, shRNA, siRNA, miRNA, 안티센스 RNA 및 유사체를 포함한다.

[0098] 용어 "폴리펩티드", "펩티드" 및 "단백질"은 아미노산 잔기의 중합체를 지칭하기 위해 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 이 용어는 하나 이상의 아미노산 잔기가 상응하는 자연 발생 아미노산의 인공 화학적 유사체인 아미노산 중합체뿐만 아니라 자연 발생 아미노산 중합체에도 적용된다.

[0099] "백혈구"라는 용어는 골수에 있는 다능성 조혈 줄기 세포로부터 생산되고 유래된 백혈구(WBC)에 관한 것이다. 백혈구는 핵을 가지고 있고, 기능적 또는 물리적 특성에 따라 호중구, 호산구, 호염기구, 림프구, 단핵구를 비롯한 5가지 주요 유형으로 분류할 수 있다.

[0100] "알킬"은 직쇄 및 분지쇄 알킬 기를 비롯한 포화 지방족 탄화수소 기를 의미한다. 일부 실시양태에서, 알킬 기는 1 내지 4개의 탄소 원자를 갖고 C_{1-4} 알킬로도 공지된다. 일부 실시양태에서, 알킬 기는 10 내지 22개의 탄소 원자를 갖고 C_{10-22} 알킬로도 공지된다. 일부 실시양태에서, 알킬 기는 4 내지 22개의 탄소 원자를 갖고 C_{4-22} 알킬로도 공지된다.

[0101] 알킬 기는 할로겐, 하이드록시, 아미노, 옥소, 알킬, 알케닐, 알콕시카보닐, 아미도, 알킬아미도, 다이알킬아미도, 니트로, 아미노, 알킬아미노, 다이알킬아미노, 카복실, 티오, 및 티오알킬로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 기로 치환되거나 비치환된다.

[0102] "헤테로알킬"은 쇄 내에 바람직하게는 1 내지 14개의 탄소 원자, 더욱 바람직하게는 2 내지 10개의 탄소 원자를 갖는 직쇄 또는 분지쇄 알킬 기를 지칭하고, 이때 하나 이상의 탄소 원자는 S, O 및 N으로 이루어진 군으로부터 선택되는 헤테로원자로 치환된다. 예시적인 헤테로알킬 기는 알킬 에터, 2차 및 3차 알킬 아민, 아미드, 알킬 설파이드 등을 포함한다.

[0103] 헤테로알킬 기는 할로겐, 하이드록시, 알킬, 아미노, 옥소, 알케닐, 알콕시카보닐, 아미도, 알킬아미도, 다이알킬아미도, 니트로, 아미노, 알킬아미노, 다이알킬아미노, 카복실, 티오 및 티오알킬로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 기로 치환되거나 비치환된다.

[0104] "알케닐"은 직쇄 및 분지쇄 알케닐 기를 비롯한 불포화 지방족 탄화수소 기를 의미한다. 일부 실시양태에서, 알케닐 기는 1 내지 4개의 탄소 원자를 갖고 C_{1-4} 알케닐로도 공지된다. 일부 실시양태에서, 알케닐 기는 10 내지 22개의 탄소 원자를 갖고 C_{10-22} 알케닐로도 공지된다. 일부 실시양태에서, 알케닐 기는 4 내지 22개의 탄소 원자를 갖고 C_{4-22} 알케닐로도 공지된다. 예시적인 알케닐 기는 에테닐, 프로페닐, n-부테닐, 이소부테닐, 3-메틸부트-2-에닐, n-펜테닐, 헵테닐, 옥테닐, 사이클로헥실-부테닐 및 데세닐을 포함한다.

[0105] 알케닐 기는 할로겐, 하이드록시, 아미노, 옥소, 알킬, 알케닐, 알콕시카보닐, 아미도, 알킬아미도, 다이알킬아미도, 니트로, 아미노, 알킬아미노, 다이알킬아미노, 카복실, 티오 및 티오알킬로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 기로 치환되거나 비치환된다.

[0106] "1가 기"는 화합물로부터 1가 원자 또는 기를 "형태적으로(formally)" 제거하여 형성된 기를 의미한다. "-일렌"은 화합물에서 2개의 1가 원자 또는 원자단 또는 1개의 2가 원자 또는 원자단을 "형태적으로" 제거하여 형성된 기를 의미한다.

[0107] "알킬렌"이라는 용어는 2개의 수소 원자가 제거된 후의 알칸 분자의 나머지 부분을 의미하고: 일부 실시양태에서, 알킬렌 기는 1 내지 4개의 탄소 원자를 갖고 C_{1-4} 알킬렌으로도 공지된다. 일부 실시양태에서, 알킬 기는 10 내지 22개의 탄소 원자를 갖고 C_{10-22} 알킬렌으로도 공지된다. 일부 실시양태에서, 알킬 기는 4 내지 22개의 탄소 원자를 갖고 C_{4-22} 알킬렌으로도 공지된다.

[0108] 마찬가지로, "알킬렌옥시", "알케닐렌", "알케닐렌옥시", "사이클로알킬렌" 및 "헤테로사이클로알킬렌"의 정의는 "알킬렌"의 정의와 유사하다.

[0109] "하이드록시"라는 용어는 -OH 기를 의미한다.

[0110] "할로겐"이라는 용어는 불소, 염소, 브롬 또는 요오드를 의미한다.

[0111] "시아노"라는 용어는 $-NH_2$를 의미한다.

[0112] "옥소"라는 용어는 =O 치환기를 의미한다.

[0113] "치환된"은 기 내에 하나 이상, 바람직하게는 5개 이하, 더욱 바람직하게는 1 내지 3개의 수소 원자가 상응하는 수의 치환기로 독립적으로 치환되는 것을 의미한다. 치환기가 가능한 화학적 위치에만 있다는 것은 말할 필요도 없고, 당업자는 과도한 노력 없이 (실험적으로 또는 이론적으로) 가능하거나 불가능한 치환을 결정할 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0114] 도 1: 간세포 성장인자 mRNA 지질 나노입자를 근육내 주사한 마우스의 단백질 발현 수준.

도 2: 꼬리 정맥을 통해 루시퍼라제 mRNA 지질 나노입자를 주사한 마우스의 형광 강도 측정.

도 3: 꼬리 정맥을 통해 mRNA 지질 나노입자를 주사한 마우스의 간의 양이온성 지질 농도.

도 4: 꼬리 정맥을 통해 mRNA 지질 나노입자를 주사한 마우스의 비장내 양이온성 지질 농도.

도 5: 꼬리 정맥을 통해 mRNA 지질 나노입자를 주사한 마우스의 혈장내 양이온성 지질 농도.

도 6: 꼬리 정맥을 통해 mRNA 지질 나노입자를 주사한 마우스의 혈청내 인터루킨-6(IL-6) 농도 측정.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0115] 본 개시내용은 실시예를 사용하여 아래에서 추가로 설명된다. 그러나, 이들 실시예는 본 개시내용의 범주를 제한하지 않는다.

[0116] 본 개시내용의 실시예에 명시된 조건이 없는 실험 방법은 일반적으로 통상적인 조건 하에서 수행되거나, 출발 물질 또는 시판 제품의 제조사가 권장하는 조건 하에서 수행되었다. 특정 출처가 명시되지 않은 시약은 시판 중

인 통상적인 시약이다.

[0117] 화합물의 구조는 핵 자기 공명(NMR) 분광학 또는/및 질량 분석법(MS)에 의해 결정되었다. NMR 이동(δ)은 10^{-6}(ppm)으로 표시된다. NMR 분석은 용매로서 다이메틸 설폭사이드-D6(DMSO-d_6), 클로로포름-D($CDCl_3$) 및 메탄올-D4(메탄올-d_4)와 내부 표준으로서 테트라메틸실란(TMS)을 사용하여 Bruker AVANCE-400 핵 자기 공명 기기에서 수행되었다.

[0118] HPLC 분석은 Agilent1100 고압 액체 크로마토그래프, GAS15B DAD 자외선 검출기 및 Water Vbridge C18 150 x 4.6 mm 5 μm 크로마토그래피 컬럼을 사용하여 수행되었다.

[0119] MS 분석은 Agilent6120 삼중 사중극자 질량 분석기, G1315D DAD 검출기 및 Waters Xbridge C18 4.6 x 50 mm, 5 μm 크로마토그래피 컬럼을 사용하여 수행되었고, 스캐닝은 80 내지 1,200 mm 범위의 양성/음성 이온 모드에서 수행되었다.

[0120] 사용된 박층 크로마토그래피 실리카 겔 플레이트는 Yantai Huanghai HSGF254 실리카 겔 플레이트였다. 박층 크로마토그래피(TLC) 분석에 사용된 실리카 겔 플레이트는 층 두께가 0.2 mm ± 0.03 mm였고, 박층 크로마토그래피 분리 및 정제에 사용된 실리카 겔 플레이트는 층 두께가 0.4 mm 내지 0.5 mm였다.

[0121] 사용된 플래시 컬럼 정제 시스템은 Combiflash Rf150(TELEDYNE ISCO) 또는 Isolara one(Biotage)이었다.

[0122] 순상(normal-phase) 컬럼 크로마토그래피 단계에서, 일반적으로 200 내지 300 메쉬 또는 300 내지 400 메쉬 Yantai Huanghai 실리카 겔을 담체로 사용하거나 Changzhou Santai 사전-충전 초순수(pre-fill ultrapure) 순상 실리카 겔 컬럼(40 내지 63 μm, 60 g, 24 g, 40 g, 120 g 또는 기타 규격)을 사용하였다.

[0123] 본 개시내용에 공지된 출발 물질은 당업계에 공지된 방법을 사용하거나 그에 따라 합성할 수 있거나, 특히 Shanghai Titan Scientific, ABCR GmbH & Co. KG, Acros Organics, Aldrich Chemical Company, Accela ChemBio Inc. 및 Bide Pharmatech로부터 구입할 수 있다.

[0124] 실시예에서, 반응은 달리 명시하지 않는 한 모두 질소 분위기에서 수행될 수 있다.

[0125] 질소 분위기는 반응 플라스크가 약 1 L의 질소 가스를 함유하는 풍선(balloon)에 연결되어 있음을 의미한다.

[0126] 수소 분위기는 반응 플라스크가 약 1 L의 수소 가스를 함유하는 풍선에 연결되어 있음을 의미한다.

[0127] 수소 가스는 Shanghai Quan Pu Scientific Instruments Inc.의 QPH-1L 수소 발생기로 제조되었다.

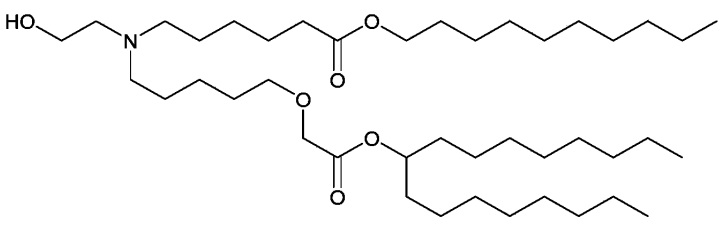
[0128] 질소 분위기 또는 수소화 분위기는 일반적으로 3 사이클의 진공화 및 질소 또는 수소 충전에 의해 형성되었다.

[0129] 실시예에서, 용액은 달리 명시하지 않는 한 수용액을 의미한다.

[0130] 실시예에서, 반응 온도는 달리 명시하지 않는 한 실온, 즉 20℃ 내지 30℃였다.

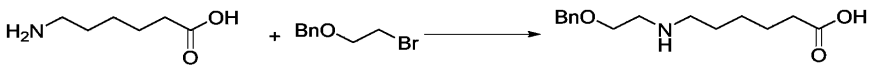
[0131] 실시예에서의 반응 진행 모니터링은 박층 크로마토그래피(TLC)를 사용하여 수행하였다. 반응에 사용되는 전개 용매, 컬럼 크로마토그래피 정제에 사용되는 용리액 시스템, 및 박층 크로마토그래피 분석에 사용되는 전개 용매 시스템의 경우, 용매의 부피 비는 화합물의 극성에 따라, 또는 트라이에틸아민 및 아세트산과 같은 소량의 염기성 또는 산성 시약을 첨가함으로써 조정되었다.

[0132] **실시예 1**

[0133] 

(화합물 1)

[0134] 단계 1)

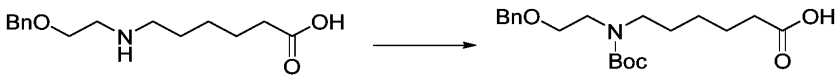
[0135] 

[0136] 6-아미노카프로산(21.5 g, 100 mmol)을 에탄올 및 물의 혼합 용액(EtOH/H_2O, v/v = 2:1, 200 mL)에 용해시켰다. $CsOH \cdot H_2O$(4.0 g, 100 mmol)를 첨가하고, 벤질옥시브로모에탄(13.1 g, 100 mmol)을 첨가하였다. 혼합물을 방치하여 실온에서 40시간 동안 반응시켰다. 반응 혼합물을 농축하여 대부분의 에탄올을 제거하고, 잔사를 역상(reversed-phase) 컬럼 크로마토그래피(아세토니트릴/물/0.1% 트라이플루오로아세트산)로 직접 정제하였다. 용리액을 감압 하에 직접 농축 건조하여 백색 고체(5.6 g, 수율: 21%)를 수득하였다.

[0137] MS: 266.2$[M+H]^+$.

[0138] ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 7.36 (s, 5H), 4.53 (s, 2H), 3.72 - 3.67 (m, 2H), 3.20 - 3.14 (m, 2H), 2.95 - 2.88 (m, 2H), 2.10 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.57 (dd, *J* = 15.3, 7.7 Hz, 2H), 1.47 (dd, *J* = 15.0, 7.5 Hz, 2H), 1.30 - 1.22 (m, 2H).

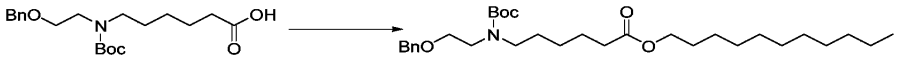
[0139] 단계 2)

[0140] 

[0141] 6-((2-(벤질옥시)에틸)아미노)헥산산(5.6 g, 21.1 mmol)을 반응 플라스크에 칭량하여 넣었다. 1,4-다이옥산(80 mL) 및 나트륨 하이드록사이드 수용액(42.2 mL, 1.0 M)을 첨가하고, Boc_2O(5.5 g, 25.2 mmol)를 적가하였다. 혼합물을 방치하여 실온에서 1시간 동안 반응시키고, LC-MS 분석은 반응이 완료되었음을 나타냈다. 반응 혼합물을 농축하여 다이옥산을 제거하였다. 수성 상의 pH를 묽은 염산에 의해 약 5로 조정하고, 에틸 아세테이트(50 mL x 3)로 추출하였다. 유기 상을 조합하고, 건조하고, 농축하여 거의 무색의 검(7.2 g, 수율: 93%)을 수득하였다. 생성물을 후속 단계에 직접 사용하였다.

[0142] MS: 366.2$[M+H]^+$.

[0143] 단계 3)

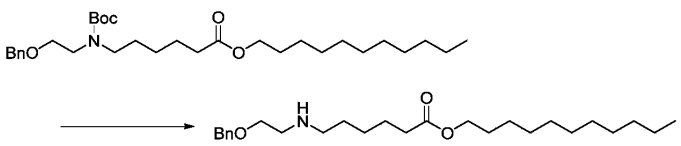
[0144] 

[0145] 6-((2-(벤질옥시)에틸)(tert-부톡시카보닐)아미노)헥산산(6.1 g, 16.7 mmol)을 반응 플라스크에 칭량하여 넣고, 다이클로로메탄(150 mL)을 첨가하였다. 빙 욕 하에, 운데칸올(2.73 g, 15.9 mmol), DMAP(408 mg, 3.34 mmol), 및 DIPEA(4.3 g, 33.4 mmol)를 순차적으로 첨가하고, EDCI(3.84 g, 20.0 mmol)를 첨가하였다. 10분의 교반 후, 빙 욕을 제거하였다. 혼합물을 밤새 실온에서 방치하여 반응시키고, TLC 모니터링은 반응이 완료되었음을 나타냈다. 물(100 mL)을 반응 혼합물에 첨가하였다. 유기 상을 분리하고, 묽은 염산, 물, 및 나트륨 바이카본에이트로 순차적으로 세척하고, 건조하고, 농축하고, 컬럼 크로마토그래피(PE:EtOAc = 20:1-10:1)로 정제하여 거의 무색의 검(6.8 g, 수율: 82%)을 수득하였다.

[0146] MS: 520.4$[M+H]^+$.

[0147] ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.30 - 7.20 (m, 5H), 4.44 (s, 2H), 3.98 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 3.51 (d, *J* = 18.6 Hz, 2H), 3.32 (d, *J* = 21.5 Hz, 2H), 3.16 (s, 2H), 2.21 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 1.55 (tt, *J* = 13.3, 6.8 Hz, 6H), 1.36 (d, *J* = 8.4 Hz, 9H), 1.21 (d, *J* = 15.5 Hz, 18H), 0.81 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H).

[0148] 단계 4)

[0149] 

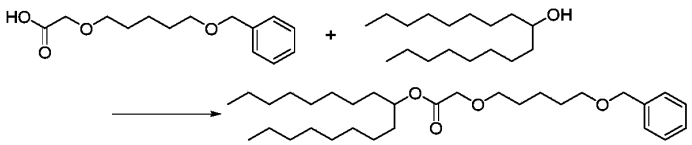
[0150] 운데실 6-((2-(벤질옥시)에틸)(tert-부톡시카보닐)아미노)헥사노에이트(7.6 g, 14.6 mmol)를 칭량하여 나누고, 다이클로로메탄에 용해시키고, TFA(20 mL)를 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 2시간 동안 방치하여 반응시키고, 반응 혼합물을 직접 농축하였다. 잔사를 다이클로로메탄(100 mL)에 용해시키고, 포화 나트륨 바이카본에이트

(100 mL)를 첨가하였다. 유기 상을 분리하고, 건조하고, 농축하여 검을 수득하였다. 이어서, 검을 다이클로로메탄에 용해시키고, HCl/다이옥산(4.0 M, 4 mL)을 첨가하였다. 혼합물을 직접 농축하여 백색 고체(5.0 g, 수율: 81%)를 수득하였다.

[0151] MS: 420.3$[M+H]^+$.

[0152] ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9.51 (s, 2H), 7.39 - 7.28 (m, 5H), 4.57 (s, 2H), 4.03 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 3.88 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H), 3.18 (s, 2H), 3.03 (d, *J* = 3.4 Hz, 2H), 2.28 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.02 (s, 1H), 1.93 - 1.84 (m, 2H), 1.61 (dd, *J* = 13.8, 6.7 Hz, 4H), 1.42 - 1.17 (m, 18H), 0.88 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H).

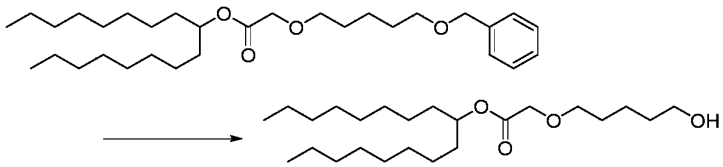
[0153] 단계 5)

[0154] 

[0155] 2-((5-(벤질옥시)펜틸)옥시)아세트산(문헌[Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 1992, vol. 40, #3, p. 617-623]을 참고하여 제조됨)(7.6 g, 30.12 mmol)을 반응 플라스크에 칭량하여 넣고, 다이클로로메탄(150 mL)을 첨가하였다. 빙 욕 하에, 헵타데칸-9-올(WO 2020/219876을 참고하여 제조됨)(6.18 g, 24.1 mmol) 및 DMAP(3.68 g, 30.12 mmol)를 순차적으로 첨가하고, EDCI(6.93 g, 36.14 mmol)를 첨가하였다. 10분의 교반 후, 빙 욕을 제거하였다. 혼합물을 밤새 실온에서 방치하여 반응시키고, TLC 모니터링은 반응이 완료되었음을 나타냈다. 물(100 mL)을 반응 혼합물에 첨가하였다. 유기 상을 분리하고, 묽은 염산, 물, 및 나트륨 바이카본에이트로 순차적으로 세척하고, 건조하고, 농축하고, 컬럼 크로마토그래피(PE:EtOAc = 50:1-10:1)로 정제하여 거의 무색의 검(10.9 g, 수율: 92%)을 수득하였다.

[0156] ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.36 - 7.31 (m, 4H), 7.30 - 7.26 (m, 1H), 4.96 (p, *J* = 6.3 Hz, 1H), 4.50 (s, 2H), 4.04 (s, 2H), 3.52 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 3.47 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 1.69 - 1.61 (m, 4H), 1.56 (d, *J* = 16.5 Hz, 6H), 1.25 (s, 24H), 0.88 (t, *J* = 6.8 Hz, 6H).

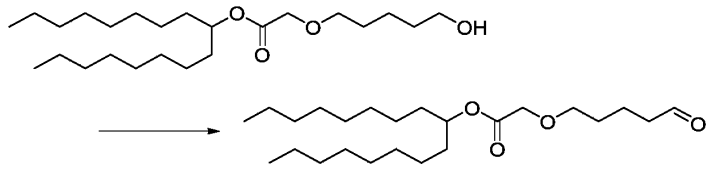
[0157] 단계 6)

[0158] 

[0159] 헵타데칸-9-일 2-((5-(벤질옥시)펜틸)옥시)아세테이트(4.0 g, 8.15 mmol)를 칭량하여 나누고, THF(100 mL)에 용해시켰다. $Pd(OH)_2/C$(400 mg, 20%)를 첨가하고, 수소 가스를 시스템에 도입하였다. 혼합물을 실온에서 2시간 동안 방치하여 반응시키고, TLC 모니터링은 반응이 완료되었음을 나타냈다. 반응 혼합물을 여과하고, 여액을 농축하여 무색 검(3.2 g, 수율: 98%)을 수득하였다. 생성물을 후속 단계에 직접 사용하였다.

[0160] ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 4.97 (dd, *J* = 12.4, 6.1 Hz, 1H), 4.04 (s, 2H), 3.66 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 3.54 (t, *J* =6.5 Hz, 2H), 1.71 - 1.57 (m, 4H), 1.56 - 1.42 (m, 6H), 1.25 (s, 24H), 0.88 (t, *J* = 6.8 Hz, 6H).

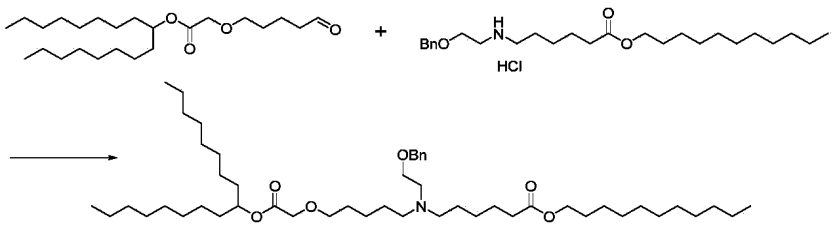
[0161] 단계 7)

[0162] 

[0163] 헵타데칸-9-일 2-((5-하이드록시펜틸)옥시)아세테이트(2.4 g, 6.0 mmol)를 칭량하여 나누고, 다이클로로메탄(100 mL)에 용해시켰다. 빙 욕 하에, DMP(3.82 g, 9.0 mmol)를 첨가하고, 혼합물을 실온에서 1.5시간 동안 방치하여 반응시켰다. 포화 나트륨 티오설페이트 수용액(100 mL)을 첨가하고, 혼합물을 30분 동안 교반하였다. 유기 상을 분리하고, 포화 나트륨 바이카본에이트 수용액(100 mL x 2)으로 세척하고, 건조하고, 농축하여 연황색 검(2.5 g)을 수득하였다. 생성물을 후속 단계에 직접 사용하였다.

[0164] ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9.78 (s, 1H), 4.96 (p, *J* = 6.3 Hz, 1H), 4.04 (s, 2H), 3.55 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 2.49 (td, *J* = 7.2, 1.5 Hz, 2H), 1.81 - 1.72 (m, 2H), 1.68 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 1.60 - 1.48 (m, 4H), 1.26 (s, 24H), 0.88 (t, *J* = 6.8 Hz, 6H).

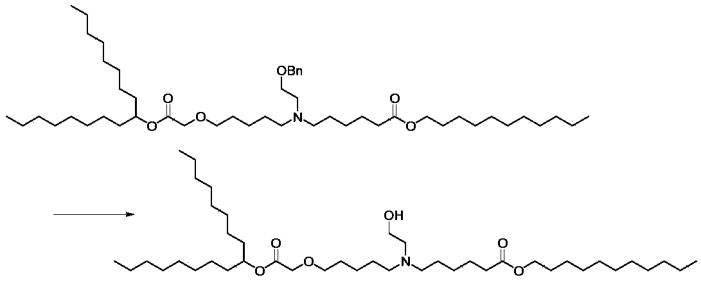
[0165] 단계 8)

[0166] 

[0167] 헵타데칸-9-일 2-((5-옥소펜틸)옥시)아세테이트(2.4 g, 6 mmol)를 칭량하여 나누고, 다이클로로메탄(50 mL)에 용해시켰다. 운데실 6-((2-(벤질옥시)에틸)아미노)헥사노에이트 하이드로클로라이드(2.46 g, 5.4 mmol)를 첨가하고, DIPEA(1.16 g, 9.0 mmol) 및 아세트산(1.08 g, 18.0 mmol)을 첨가하였다. 혼합물을 완전한 용해가 달성될 때까지 교반하였다. 빙 욕 하에, $NaBH(OAc)_3$(3.18 g, 15.0 mmol)을 첨가하였다. 혼합물을 밤새 실온에서 방치하여 반응시키고, TLC 모니터링은 반응이 완료되었음을 나타냈다. 물(100 mL)을 첨가하였다. 유기 상을 분리하고, 포화 나트륨 바이카본에이트 수용액(50 mL x 1)으로 세척하고, 건조하고, 농축하고, 컬럼 크로마토그래피(PE:EtOAc = 5:1-2:1)로 정제하여 무색 액체(4.1 g, 수율: 85%)를 수득하였다.

[0168] ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.33 (d, *J* = 4.5 Hz, 4H), 7.30 - 7.26 (m, 1H), 4.99 - 4.91 (m, 1H), 4.52 (s, 2H), 4.08 - 4.02 (m, 4H), 3.57 - 3.47 (m, 4H), 2.68 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H), 2.45 (s, 4H), 2.28 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 1.67 - 1.57 (m, 6H), 1.48 (dd, *J* = 37.5, 6.0 Hz, 6H), 1.38 - 1.18 (m, 46H), 0.88 (t, *J* = 6.8 Hz, 9H).

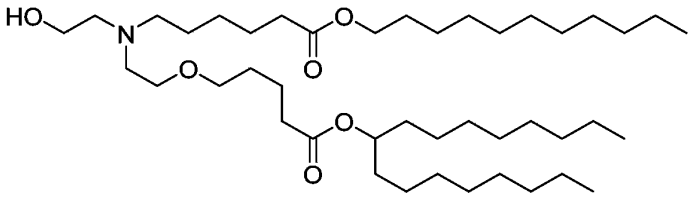
[0169] 단계 9)

[0170] 

[0171] 운데실 6-((2-(벤질옥시)에틸)(5-(2-(헵타데칸-9-일옥시)-2-옥소에톡시)펜틸)아미노)헥사노에이트(1 g, 1.25 mmol)를 반응 플라스크에 칭량하여 넣고, 에탄올에 용해시켰다. $Pd(OH)_2/C$(500 mg, 20%)를 첨가하고, 수소 가스를 시스템에 도입하였다. 혼합물을 밤새 실온에서 방치하여 반응시키고, TLC 모니터링은 반응이 완료되었음을 나타냈다. 반응 혼합물을 여과하고, 여액을 농축하여 무색 검을 수득하였다. 컬럼 크로마토그래피 정제(CH_2Cl_2:MeOH = 10:1)를 수행하여 무색 검(450 mg, 수율: 51%)을 수득하였다.

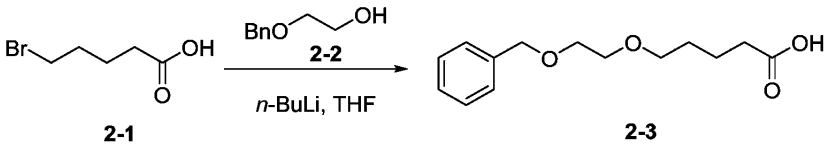
[0172] ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 5.00 - 4.89 (m, 1H), 4.09 - 4.01 (m, 4H), 3.61 (s, 2H), 3.52 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 2.68 (s, 2H), 2.57 (s, 4H), 2.30 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.70 - 1.59 (m, 6H), 1.53 (s, 8H), 1.43 - 1.18 (m, 44H), 0.88 (t, *J* = 6.7 Hz, 9H).

[0173] 실시예 2

[0174] 

(화합물 2)

[0175] 단계 1)

[0176] 

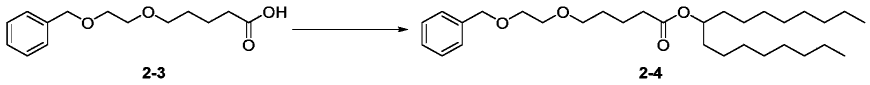
2-1 2-3

[0177] 화합물 **2-2**(50.4 g, 331 mmol)를 칭량하여 나누고, THF(400 mL)에 용해시키고, *n*-BuLi(206 mL, 1.6 M)를 드라이 아이스 에탄올 욕 하에 천천히 적가하였다. 혼합물을 동일한 온도에서 1시간 동안 교반하였다. 화합물 **2-1**(20.0 g, 110 mmol)을 THF(100 mL)에 용해시키고, 용액을 반응 시스템에 드라이 아이스 에탄올 욕 하에 천천히 적가하였다. 혼합물을 동일한 온도에서 1시간 동안 교반하고, 이어서 밤새 실온에서 교반하였다. 샘플을 취하고, LC-MS로 분석하고, 결과는 출발 물질이 완전히 소비되었음을 나타냈다. 1 L의 물을 첨가하고, 추출을 에틸 아세테이트(1 L x 3)로 수행하였다. 유기 상을 포화 염수로 세척하고, 이어서 무수 나트륨 설페이트 상에서 건조하고, 여과하였다. 여액을 감압 하에 농축하고, 순상 컬럼 크로마토그래피(PE:EA = 5:1)로 정제하여 황색 오일(9.00 g, 수율: 32.3%)을 수득하였다.

[0178] MS: 253.1$[M+H]^+$.

[0179] ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.40-7.24 (m, 5H), 4.57 (s, 2H), 3.65-3.57 (m, 4H), 3.49 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 2.39 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 1.77-1.61 (m, 4H).

[0180] 단계 2)

[0181] 

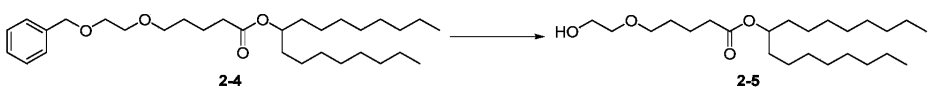
2-3 2-4

[0182] 화합물 **2-3**(1.00 g, 3.96 mmol)을 DCM(20 mL)에 용해시키고, 헵탄-9-올(914 mg, 3.56 mmol), DMAP(96.0 mg, 786 μmol), DIEA(2.04 g, 15.8 mmol), 및 EDCI(1.14 g, 9.95 mmol)를 순차적으로 빙 욕 하에 첨가하였다. 혼합물을 밤새 40℃에서 교반하였다. 샘플을 취하고, LCMS 및 TLC(PE:EA = 10:1)로 분석하고, 결과는 출발 물질이 완전히 소비되었음을 나타냈다. 100 mL의 물을 첨가하고, 추출을 에틸 아세테이트(100 mL x 3)로 수행하였다. 유기 상을 포화 염수로 세척하고, 이어서 무수 나트륨 설페이트 상에서 건조하고, 여과하였다. 여액을 감압 하에 농축하고, 순상 컬럼 크로마토그래피(PE:EA = 20:1)로 정제하여 무색 오일(1.50 g, 수율: 77.1%)을 수득하였다.

[0183] MS: 513.3$[M+Na]^+$.

[0184] ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.38-7.24 (m, 5H), 4.90-4.82 (m, 1H), 4.57 (s, 2H), 3.64-3.58 (m, 4H), 3.48 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 2.31 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 1.75-1.59 (m, 4H), 1.55-1.45 (m, 4H), 1.34-1.19 (m, 24H), 0.87 (t, J = 6.8 Hz, 6H).

[0185] 단계 3)

[0186] 

2-4 2-5

[0187] 화합물 **2-4**(1.50 g, 3.06 mmol)를 칭량하여 나누고, THF(30 mL)에 용해시키고, $Pd(OH)_2/C$(300 mg, 20 중량%)를

첨가하였다. 시스템을 수소 가스로 퍼징하고, 혼합물을 밤새 실온에서 교반하였다. 샘플을 취하고, TLC(PE:EA = 20:1)로 분석하고, 결과는 출발 물질이 완전히 소비되었음을 나타냈다. 반응 혼합물을 여과하고, 여액을 농축하고, 순상 컬럼 크로마토그래피(PE:EA = 20:1)로 정제하여 무색 오일(1.10 g, 수율: 89.8%)을 수득하였다.

[0188] MS: 423.3[M+Na]$^{+}$.

[0189] ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 4.91-4.82 (m, 1H), 3.76-3.69 (m, 2H), 3.55-3.46 (m, 4H), 2.32 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 1.95 (s, 1H), 1.76-1.58 (m, 4H), 1.57-1.44 (m, 4H), 1.36-1.18 (m, 24H), 0.87 (t, J = 6.8 Hz, 6H).

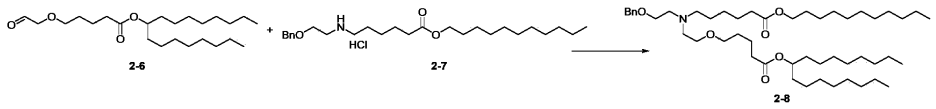
[0190] 단계 4)

[0191] 

[0192] 화합물 **2-5**(120 mg, 300 μmol)를 DCM(4 mL)에 용해시키고, DMP(190 mg, 448 μmol)를 빙 욕 하에 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. 샘플을 취하고, TLC(PE:EA = 5:1)로 분석하고, 결과는 출발 물질이 완전히 소비되었음을 나타냈다. 1 mL의 포화 나트륨 티오설페이트 수용액 및 20 mL의 포화 나트륨 바이카본에이트 수용액을 반응 혼합물에 첨가하고, 추출을 에틸 아세테이트(20 mL x 3)로 수행하였다. 유기 상을 포화 염수로 세척하고, 이어서 무수 나트륨 설페이트 상에서 건조하고, 여과하였다. 여액을 감압 하에 농축하여 연황색 오일(80 mg)을 수득하였다. 생성물을 정제 없이 후속 단계에 직접 사용하였다.

[0193] ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9.73 (s, 1H), 4.91-4.81 (m, 1H), 4.09 (s, 1H), 4.06 (s, 1H), 3.65-3.44 (m, 2H), 2.33 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 1.79-1.59 (m, 4H), 1.57-1.43 (m, 4H), 1.36-1.16 (m, 24H), 0.87 (t, J = 6.8 Hz, 6H).

[0194] 단계 5)

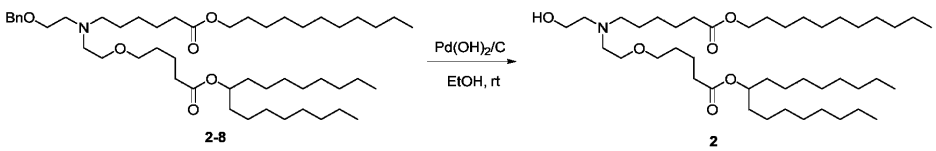
[0195] 

[0196] 화합물 **2-6**(1.09 g, 2.73 mmol)을 DCM(20 mL)에 용해시키고, **2-7**(1.12 g, 2.46 mmol), DIEA(530 mg, 4.10 mmol), 및 AcOH(492 mg, 8.19 mmol)를 순차적으로 첨가하였다. 10분의 교반 후, $NaBH(OAc)_3$(1.45 g, 6.84 mmol)을 첨가하고, 혼합물을 밤새 실온에서 교반하였다. 샘플을 취하고, TLC(순수한 EA)로 분석하고, 결과는 출발 물질이 완전히 소비되었음을 나타냈다. 100 mL의 포화 나트륨 바이카본에이트 수용액을 반응 혼합물에 첨가하고, 추출을 에틸 아세테이트(100 mL x 3)로 수행하였다. 유기 상을 포화 염수로 세척하고, 이어서 무수 나트륨 설페이트 상에서 건조하고, 여과하였다. 여액을 감압 하에 농축하고, 순상 컬럼 크로마토그래피(PE:EA = 2:1)로 정제하여 연황색 오일(290 mg, 수율: 13.2%)을 수득하였다.

[0197] MS: 802.4[M+H]$^{+}$.

[0198] ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.39-7.26 (m, 5H), 4.89-4.82 (m, 1H), 4.51 (s, 2H), 4.05 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 3.67-3.44 (m, 4H), 3.41 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 2.87-2.37 (m, 6H), 2.33-2.24 (m, 4H), 1.79-1.55 (m, 8H), 1.55-1.43 (m, 6H), 1.38-1.15 (m, 42H), 0.87 (t, J = 6.8 Hz, 9H).

[0199] 단계 6)

[0200] 

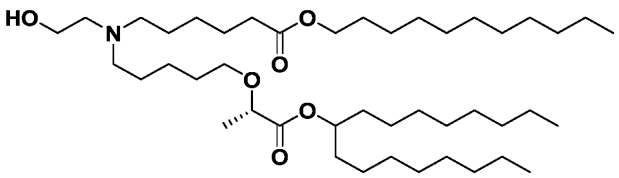
[0201] 화합물 **2-8**(390 mg, 486 μmol)을 칭량하여 나누고, EtOH(15 mL)에 용해시키고, $Pd(OH)_2/C$(390 mg, 20 중량%)를 첨가하였다. 시스템을 수소 가스로 퍼징하고, 혼합물을 밤새 실온에서 교반하였다. 샘플을 취하고,

TLC(DCM:MeOH = 10:1)로 분석하고, 결과는 출발 물질이 완전히 소비되었음을 나타냈다. 반응 혼합물을 여과하고, 여액을 농축하고, 순상 컬럼 크로마토그래피(DCM:MeOH = 20:1)로 정제하여 무색 오일(110 mg, 수율: 31.8%)을 수득하였다.

[0202] MS: 712.2[M+H]$^+$.

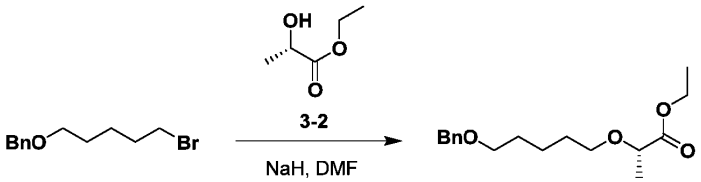
[0203] ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 4.89-4.81 (m, 1H), 4.05 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 3.55 (t, J = 5.2 Hz, 2H), 3.48 (t, J = 5.6 Hz, 2H), 3.43 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 2.71 (t, J = 5.6 Hz, 2H), 2.67 (t, J = 5.2 Hz, 2H), 2.59-2.52 (m, 2H), 2.34-2.26 (m, 4H), 1.72-1.56 (m, 8H), 1.53-1.44 (m, 6H), 1.36-1.21 (m, 42H), 0.89-0.85 (m, 9H).

[0204] **실시예 3**

[0205] 

(화합물 3)

[0206] 단계 1)

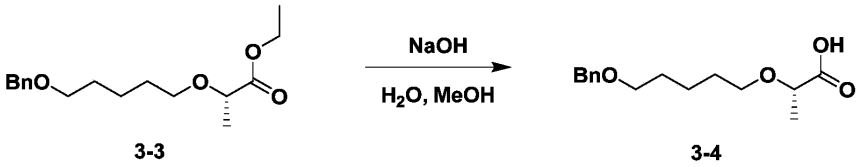
[0207] 

[0208] **3-2**(5.90 g, 50.0 mmol)를 칭량하여 나누고, DMF(250 mL)에 용해시키고, NaH(2.4 g, 60 mmol)를 분할식으로 빙욕 하에 첨가하였다. 혼합물을 동일한 온도에서 1시간 동안 교반하였다. **3-1**(12.9 g, 50.0 mmol)을 분할식으로 반응 시스템에 빙 욕 하에 첨가하고, 혼합물을 밤새 실온에서 교반하였다. 300 mL의 물을 첨가하고, 추출을 에틸 아세테이트(300 mL x 2)로 수행하였다. 유기 상을 포화 염수로 세척하고, 이어서 무수 나트륨 설페이트 상에서 건조하고, 여과하였다. 여액을 감압 하에 농축하고, 순상 컬럼 크로마토그래피(PE:EA = 10:1)로 정제하여 흐린 황색 오일(6.20 g, 수율: 42.2%)을 수득하였다.

[0209] MS: 295.2[M+H].

[0210] ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.34-7.31 (m, 4H), 7.30-7.26 (m, 1H), 4.50 (s, 2H), 4.25-4.15 (m, 2H), 3.92 (q, J = 6.8 Hz, 1H), 3.59-3.53 (m, 1H), 3.47 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 3.39-3.33 (m, 1H), 1.68-1.59 (m, 4H), 1.49-1.42 (m, 2H), 1.39 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 1.28 (t, J = 6.4 Hz, 3H).

[0211] 단계 2)

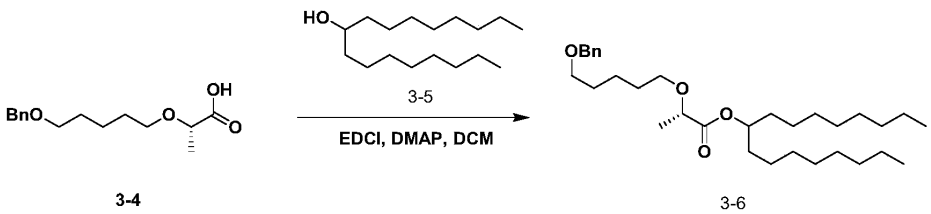
[0212] 

[0213] 화합물 **3-3**(7.40 g, 25.0 mmol)을 MeOH(150 mL)에 용해시키고, H_2O(40 mL) 중 NaOH(4.00 g, 100 mmol)의 용액을 빙 욕 하에 천천히 첨가하였다. 혼합물을 밤새 실온에서 교반하였다. 반응 혼합물을 빙수 욕에서 냉각하고, pH를 농축 염산으로 약 3으로 조정하였다. 추출을 DCM(200 mL x 3)으로 수행하였다. 유기 상을 포화 염수로 세척하고, 이어서 무수 나트륨 설페이트 상에서 건조하고, 여과하였다. 여액을 감압 하에 농축하여 흐린 황색 오일(5.50 g, 수율: 82.6%)을 수득하였다.

[0214] MS: 267.2[M+H].

[0215] ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.37-7.33 (m, 4H), 7.31-7.26 (m, 1H), 4.51 (s, 2H), 3.99 (q, J = 6.8 Hz, 1H), 3.60-3.40 (m, 4H), 1.69-1.61 (m, 4H), 1.50-1.44 (m, 5H).

[0216] 단계 3)



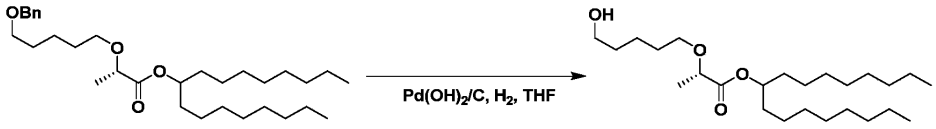
3-4 3-6

[0217]

[0218] **3-4**(5.30 g, 20.0 mmol) 및 **3-5**(5.10 g, 20.0 mmol)를 칭량하여 나누고, DCM(160 mL)에 용해시키고, **DMAP**(4.90 g, 40.0 mmol) 및 **EDCI**(4.60 g, 24.0 mmol)를 칭량하여 나누고, 순차적으로 반응 혼합물에 첨가하였다. 시스템을 수소 가스로 퍼징하고, 혼합물을 밤새 실온에서 교반하였다. 반응 혼합물을 순상 컬럼 크로마토그래피(PE:EA = 10:1)로 정제하여 흐린 황색 오일(8.60 g, 85.9%)을 수득하였다.

[0219] ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.34-7.31 (m, 4H), 7.31-7.27 (m, 1H), 4.96-4.91 (m, 1H), 4.50 (s, 2H), 3.91 (q, J = 6.8 Hz, 1H), 3.59-3.53 (m, 1H), 3.47 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 3.38-3.32 (m, 1H), 1.68-1.60 (m, 4H), 1.54-1.52 (m, 4H), 1.49-1.43 (m, 2H), 1.39 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 1.35-1.18 (m, 24H), 0.87 (t, J = 6.8 Hz, 6H).

[0220] 단계 4)



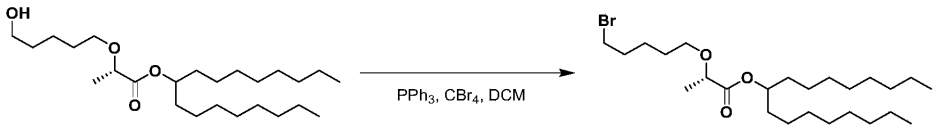
3-6 3-7

[0221]

[0222] 화합물 **3-6**(5.00 g, 9.90 mmol)을 THF(100 mL)에 용해시키고, $Pd(OH)_2$/C(500 mg)를 질소 분위기 하에 첨가하였다. 시스템을 수소 가스로 퍼징하고, 혼합물을 밤새 실온에서 수소화하는 동안 교반하였다. $Pd(OH)_2$/C를 여과에 의해 제거하고, 회수하였다. 여액을 감압 하에 회전 증발에 의해 농축 건조하고, 순상 컬럼 크로마토그래피(PE:EA = 5:1)로 정제하여 무색 오일(4.00 g, 수율: 96.4%)을 수득하였다.

[0223] ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 4.96-4.92 (m, 1H), 3.91 (q, J = 6.8 Hz, 1H), 3.65 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 3.59-3.53 (m, 1H), 3.40-3.36 (m, 1H), 1.68-1.56 (m, 4H), 1.54-1.52 (m, 4H), 1.49-1.41 (m, 2H), 1.39 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 1.35-1.19 (m, 24H), 0.87 (t, J = 6.8 Hz, 6H).

[0224] 단계 5)



3-7 3-8

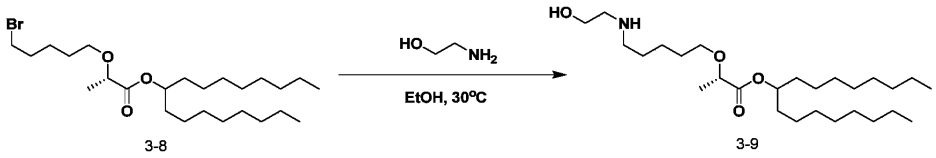
[0225]

[0226] 화합물 **3-7**(4.10 g, 10.0 mmol)을 DCM(80 mL)에 용해시키고, 용액을 빙수 욕에서 냉각하였다. CBr_4(5.00 g, 15 mmol) 및 PPh_3(3.90 g, 15.0 mmol)을 순차적으로 질소 분위기 하에 첨가하였다. 일정한 온도에서 30분의 교반 후, 혼합물을 밤새 실온에서 교반하였다. 샘플을 취하고, TLC(PE:EA = 5:1)로 분석하고, 결과는 출발 물질이 완전히 소비되었음을 나타냈다. 반응 혼합물을 순상 컬럼 크로마토그래피(PE:EA = 10:1)로 정제하여 연황색 오일(4.30 g, 90.0%)을 수득하였다.

[0227] ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 4.97-4.90 (m, 1H), 3.91 (q, J = 6.8 Hz, 1H), 3.59-3.53 (m, 1H), 3.43-3.33

(m, 3H), 1.93-1.85 (m, 2H), 1.67-1.59 (m, 2H), 1.57-1.48 (m, 6H), 1.39 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 1.35-1.19 (m, 24H), 0.87 (t, J = 6.8 Hz, 6H).

[0228] 단계 6)

[0229] 

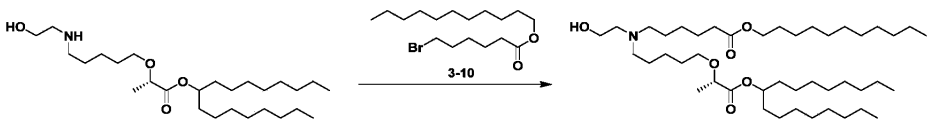
3-8 3-9

[0230] **3-8**(4.30 g, 9.00 mmol)을 칭량하여 나누고, 절대 EtOH(85 mL)에 용해시키고, 에탄올아민(16.5 g, 270 mmol)을 질소 분위기 하에 첨가하였다. 혼합물을 밤새 30℃에서 교반하였다. 샘플을 취하고, LC-MS로 분석하고, 결과는 출발 물질이 완전히 소비되었음을 나타냈다. 용매를 회전 증발에 의해 감압 하에 제거하고, EA(200 mL)를 잔사에 첨가하였다. 용액을 물로 2회 세척하고(50 mL x 2), 포화 염수로 2회 세척하고(50 mL x 2), 이어서 무수 나트륨 설페이트 상에서 건조하고, 여과하였다. 여액을 감압 하에 농축하고, 순상 컬럼 크로마토그래피(DCM:MeOH = 10:1)로 정제하여 무색 오일(3.30 g, 수율: 80.1%)을 수득하였다.

[0231] MS: 458.4[M+H].

[0232] ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 4.96-4.88 (m, 1H), 3.90 (q, J = 6.8 Hz, 1H), 3.64 (t, J = 5.2 Hz, 2H), 3.57-3.51 (m, 1H), 3.38-3.31 (m, 1H), 2.77 (t, J = 4.8 Hz, 2H), 2.63 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 1.65-1.57 (m, 2H), 1.56-1.48 (m, 6H), 1.44-1.27 (m, 5H), 1.26-1.19 (m, 24H), 0.86 (t, J = 6.8 Hz, 6H).

[0233] 단계 7)

[0234] 

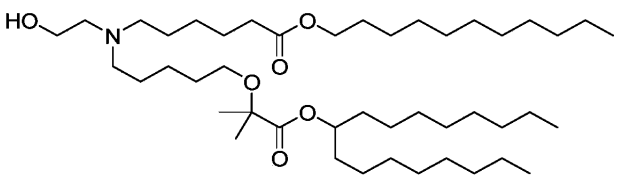
3-9 3

[0235] **3-9**(2.30 g, 5.00 mmol)를 칭량하여 나누고, 절대 EtOH(46 mL)에 용해시키고, DIEA(1.90 g, 15.0 mmol) 및 **3-10**(3.50 g, 10 mmol)을 질소 분위기 하에 첨가하였다. 혼합물을 밤새 80℃에서 교반하였다. 샘플을 취하고, LC-MS로 분석하고, 결과는 대부분의 출발 물질이 소비되었음을 나타냈다. 용매를 회전 증발에 의해 감압 하에 제거하고, EA(100 mL)를 잔사에 첨가하였다. 용액을 물로 2회 세척하고(50 mL x 2), 포화 염수로 2회 세척하고(50 mL x 2), 이어서 무수 나트륨 설페이트 상에서 건조하고, 여과하였다. 여액을 감압 하에 농축하고, 순상 컬럼 크로마토그래피(DCM:MeOH = 15:1)로 정제하여 무색 오일(2.10 g, 수율: 57.9%)을 수득하였다.

[0236] MS: 726.6[M+H].

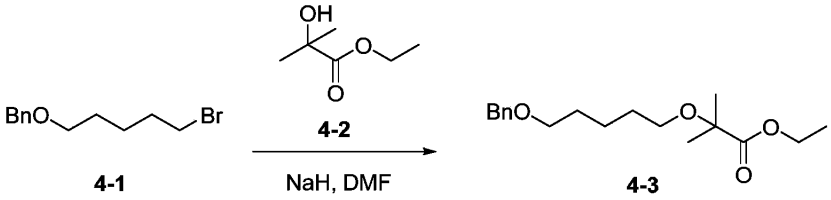
[0237] ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 4.94-4.88 (m, 1H), 4.05 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 3.90 (q, J = 6.8 Hz, 1H), 3.69-3.65 (m, 2H), 3.57-3.50 (m, 1H), 3.39-3.33 (m, 1H), 2.80-2.70 (m, 2H), 2.70-2.60 (m, 4H), 2.30 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 1.65-1.20 (m, 61H), 0.89-0.85 (m, 9H).

[0238] **실시예 4**

[0239] 

(화합물 4)

[0240] 단계 1)

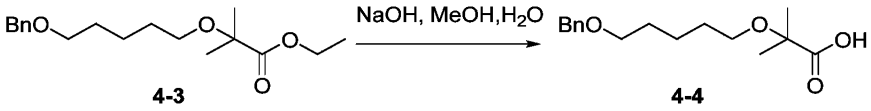
[0241] 

[0242] NaH(3.63 g, 0.091 mol)를 칭량하여 나누고, DMF(200 mL)에 용해시키고, 용액을 아르곤 분위기 하에 0℃까지 냉각하였다. **4-2**(10 g, 0.076 mol)를 분할식으로 시스템에 첨가하고, 혼합물을 실온에서 교반하였다. **4-1**(19.5 g, 0.076 mol)을 반응에 첨가하고, 혼합물을 밤새 실온에서 교반하였다. 100 mL의 물을 첨가하고, 추출을 에틸 아세테이트(0.5 L x 2)로 수행하였다. 유기 상을 포화 염수로 세척하고, 이어서 무수 나트륨 설페이트 상에서 건조하고, 여과하였다. 여액을 감압 하에 농축하고, 순상 컬럼 크로마토그래피(PE:EA = 6:1)로 정제하여 무색 오일(5.30 g, 수율: 22.3%)을 수득하였다.

[0243] MS: 309.2[M+H].

[0244] ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.40-7.25 (m, 5H), 4.50 (s, 2H), 4.18 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 3.47 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 3.36 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 1.69-1.55 (m, 4H), 1.48-1.40 (m, 2H), 1.41 (s, 6H), 1.27 (t, J = 6.8 Hz, 3H).

[0245] 단계 2)

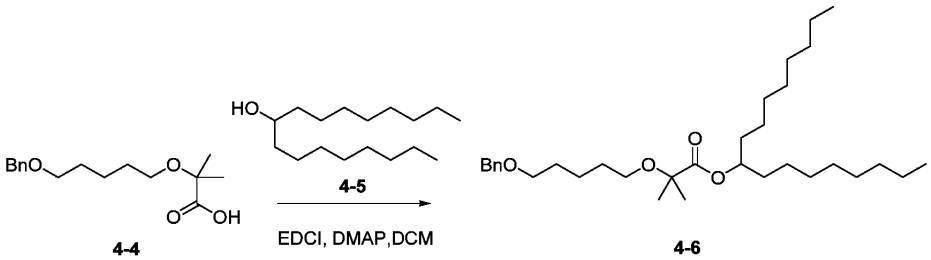
[0246] 

[0247] 화합물 **4-3**(5.20 g, 0.017 mol)을 MeOH(50 mL)에 용해시키고, 물(10 mL) 중 NaOH(2.69 g, 0.067 mol)의 용액을 빙 욕 하에 첨가하였다. 혼합물을 밤새 실온에서 교반하였다. 메탄올을 감압 하에 증발시키고, 100 mL의 물을 첨가하고, pH를 1 N 염산으로 3 내지 4로 조정하였다. 추출을 에틸 아세테이트(400 mL x 2)로 수행하였다. 유기 상을 포화 염수로 세척하고, 이어서 무수 나트륨 설페이트 상에서 건조하고, 여과하였다. 여액을 감압 하에 농축하여 무색 오일(4.80 g, 수율: 100%)을 수득하였다.

[0248] MS: 281.2[M+H].

[0249] ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.35-7.25 (m, 5H), 4.51 (s, 2H), 3.50-3.42 (m, 4H), 1.70-1.50 (m, 4H), 1.50-1.40 (m, 8H).

[0250] 단계 3)

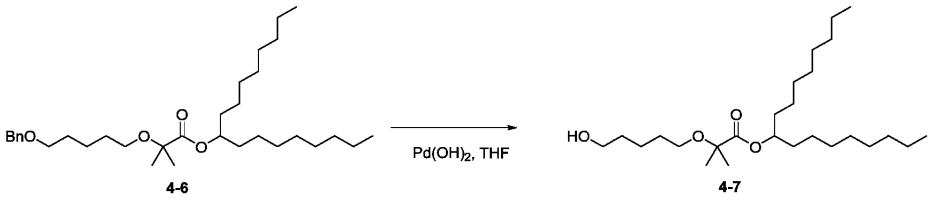
[0251] 

[0252] **4-4**(3.29 g, 0.012 mol)를 칭량하여 나누고, DCM(100 mL)에 용해시키고, **4-5**(2.70 g, 0.011 mol), EDCI(2.70 g, 0.014 mol), 및 DMAP(2.86 g, 0.023 mol)를 첨가하였다. 시스템을 아르곤 가스로 퍼징하고, 혼합물을 밤새 실온에서 교반하였다. 반응 혼합물을 감압 하에 농축 건조하고, 조질 생성물을 순상 컬럼 크로마토그래피(PE:EA = 50:1)로 정제하여 무색 오일(4.70 g, 수율: 85.7%)을 수득하였다.

[0253] ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.36-7.20 (m, 5H), 4.93-4.80 (m, 1H), 4.50 (s, 2H), 3.47 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 3.37 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 1.70-1.50 (m, 8H), 1.47-1.39 (m, 8H), 1.30-1.15 (m, 24H), 0.87 (t, J =

6.8 Hz, 6H).

[0254] 단계 4)

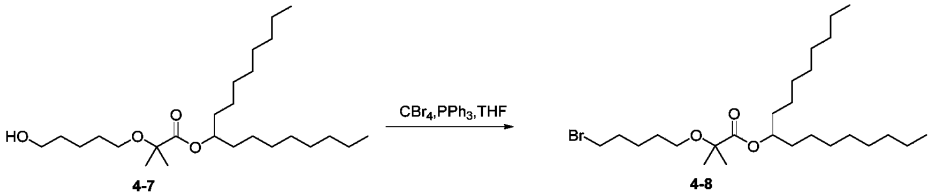
[0255] 

4-6 4-7

[0256] 화합물 **4-6**(4.50 g, 8.67 mmol)을 THF(90 mL)에 용해시키고, $Pd(OH)_2/C$(0.90 g, 20 중량%)를 첨가하였다. 시스템을 수소 풍선으로 퍼징하고, 혼합물을 실온에서 5시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 감압 하에 농축 건조하고, 조질 생성물을 순상 컬럼 크로마토그래피(PE:EA = 10:1)로 정제하여 무색 오일(3.19 g, 수율: 85.7%)을 수득하였다.

[0257] ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 4.93-4.86 (m, 1H), 3.65 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 3.38 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 1.70-1.50 (m, 8H), 1.48-1.40 (m, 8H), 1.32-1.25 (m, 24H), 0.87 (t, J = 6.8 Hz, 6H).

[0258] 단계 5)

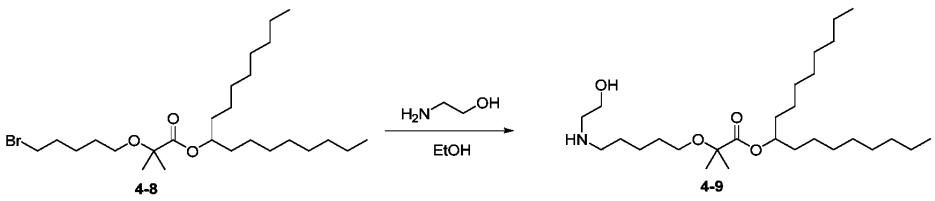
[0259] 

4-7 4-8

[0260] 화합물 **4-7**(1.50 g, 3.49 mmol)을 THF(30 mL)에 용해시키고, CBr_4(1.16 g, 3.49 mmol) 및 PPh_3(0.92 g, 3.49 mmol)을 순차적으로 첨가하였다. 혼합물을 밤새 실온에서 아르곤 분위기 하에 교반하였다. 샘플을 취하고, TLC(PE:EA = 6:1)로 분석하고, 결과는 출발 물질이 완전히 소비되었음을 나타냈다. 여과를 수행하였다. 반응 혼합물을 감압 하에 농축 건조하고, 조질 생성물을 순상 컬럼 크로마토그래피(PE:EA = 50:1)로 정제하여 무색 오일(1.50 g, 수율: 87.2%)을 수득하였다.

[0261] ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 4.92-4.80 (m, 1H), 3.43-3.35 (m, 4H), 1.93-1.80 (m, 2H), 1.65-1.50 (m, 8H), 1.41 (s, 6H), 1.36-1.24 (m, 24H), 0.87 (t, J = 6.8 Hz, 6H).

[0262] 단계 6)

[0263] 

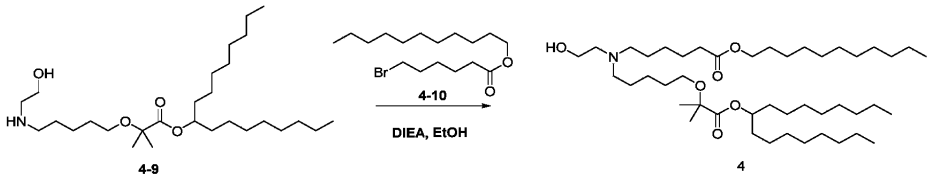
4-8 4-9

[0264] **4-8**(1.25 g, 2.55 mmol)을 칭량하여 나누고, EtOH(15 mL)에 용해시키고, 에탄올아민(4.67 g, 76.5 mmol)을 첨가하였다. 혼합물을 밤새 25℃에서 아르곤 분위기 하에 교반하였다. 에틸 아세테이트(200 mL)를 첨가하였다. 혼합물을 포화 나트륨 클로라이드 용액(100 mL x 2)으로 세척하고, 나트륨 설페이트 상에서 건조하고, 여과하였다. 여액을 농축하고, 순상 컬럼 크로마토그래피(DCM:MeOH = 10:1)로 정제하여 무색 오일(0.84 g, 수율: 71.3%)을 수득하였다.

[0265] MS 계산치: 471.4, 측정치: 472.4[M+H].

[0266] ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 4.91-4.80 (m, 1H), 3.68 (t, J = 4.8 Hz, 2H), 3.37 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 2.83 (t, J = 5.2 Hz, 2H), 2.69 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 1.62-1.52 (m, 8H), 1.45-1.36 (m, 8H), 1.55-1.24 (m, 24H), 0.87 (t, J = 6.8 Hz, 6H).

[0267] 단계 7)

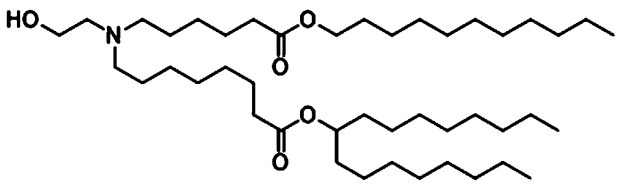
[0268] 

[0269] **4-9**(0.84 g, 1.78 mmol)를 칭량하여 나누고, EtOH(15 mL)에 용해시키고, **4-10**(0.81 g, 2.32 mmol) 및 DIPEA(0.46 g, 3.56 mmol)를 첨가하였다. 혼합물을 밤새 80℃에서 아르곤 분위기 하에 교반하였다. 반응 혼합물을 감압 하에 농축하고, 순상 컬럼 크로마토그래피(DCM:MeOH = 20:1)로 정제하여 무색 오일(0.61 g, 수율: 46.2%)을 수득하였다.

[0270] MS: 740.7[M+H].

[0271] ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 4.90-4.86 (m, 1H), 4.05 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 3.77 (s, 2H), 3.38 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 2.90-2.70 (m, 6H), 2.31 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 1.70-1.20 (m, 64H), 0.90-0.85 (m, 9H).

[0272] **비교 실시예 1**

[0273] 

비교 화합물 1

[0274] WO 2017/049245의 방법에 의해 수득됨

[0275] 시험 실시예 1: 지질 입자 조성물의 전달능

[0276] 1.1. 제조 방법

[0277] 화합물 1, 화합물 2 및 비교 화합물 1을 각각 에탄올 용액에 용해시킨 후, 생성된 용액을 50:10:38.5:1.5의 몰비의 에탄올 중 DSPC, 콜레스테롤, 및 DMG-PEG의 용액과 혼합하여 에탄올 지질 용액을 제조하였다. 인간 성장 인자를 암호화하는 mRNA를 시트레이트 완충액에 용해시켜 mRNA 수용액을 제조하였다. 리포솜은 총 지질 대 mRNA의 중량비가 약 20:1인 미세유체에 의해 에탄올 지질 용액과 mRNA 수용액을 혼합하여 제조하였다. PBS 용액에 대한 투석에 의해 에탄올을 제거하여 mRNA-캡슐화 리포솜 나노입자 조성물을 수득하였다.

[0278] 1.2. 지질 입자 조성물 특성화

[0279] 특성화 방법

[0280] 리포솜 나노입자의 크기 및 다분산 지수(PDI)는 동적 광 산란을 통해 173° 후방 산란 검출 모드(backscatter detection mode)에서 Malvern Zetasizer Nano ZS를 사용하여 결정되었다.

[0281] 리포솜 캡슐화 효율은 Quant-iT RiboGreen RNA 어세이 키트를 사용하여 결정되었다.

[0282] 리포솜 나노입자내 양이온의 pKa는 6-(p-톨루이디노)-2-나프탈렌설폰산 나트륨 염(TNS)을 기반으로 한 형광 분석을 사용하여 결정되었다. 150 mM NaCl, 10 mM 나트륨 포스페이트, 10 mM 나트륨 시트레이트, 10 mM 나트륨 보레이트, 및 3 내지 11.5 범위의 다양한 pH 수준의 완충액을 제조하였다. 300 μM TNS 용액을 제조하고 완충액에 첨가하였다. 지질 나노입자를 상이한 pH 수준의 완충액에 첨가하고, 완전히 혼합하였다. 이어서, 형광 마이크로플레이트 판독기를 사용하여 실온에서 여기 파장 325 nm 및 방출 파장 435 nm에서의 형광 강도를 측정하였다. pKa가, 절반-최대 형광 강도가 생성되는 pH 값인 형광 데이터의 정합 분석(fitting analysis)을 수행하였다. 관련 데이터는 표 1에 제시된다.

[0283] [표 1]

번호	크기 (nm)	PDI	캡슐화 효능 (%)	pKa
화합물 1	87.8	0.08	94.6	6.65
화합물 2	116.5	0.07	97.3	6.38
화합물 3	79.6	0.09	96.7	6.49
화합물 4	74.8	0.07	97.3	6.30
비교 화합물 1	96.6	0.12	93.2	6.73

[0284]

[0285] 1.3. 지질 입자 조성물의 생체내 전달능을 평가하기 위한 단백질 발현 수준 측정

[0286] 생체내 mRNA 전달 및 상응하는 암호화된 단백질의 발현을 평가하기 위해, 간세포 성장 인자 발현용 mRNA가 캡슐화되어 있는 리포솜 나노입자를 6 내지 8주령 암컷 BALB/c 마우스의 허벅지 근육에 0.05 mg/kg의 용량으로 주사하였다. 24시간 후, 주사 부위의 근육 조직을 수집하고, 분쇄하고, 용해시켰다. 이어서, ELISA 키트를 이용하여 간세포 성장 인자 단백질의 발현 수준(pg/mg), 즉 단위 근육 조직 총 단백질 양에 해당하는 간세포 성장 인자 단백질 양을 측정하였다. 각 화합물에 해당하는 지질 나노입자에 대해, 3개 이상의 복제물을 사용하였고, 평균 단백질 농도를 계산하였다.

[0287] 비교 화합물 1에 해당하는 리포솜 나노입자를 대조군으로 하여, 화합물 1 및 2에 해당하는 리포솜 나노입자의 생체내 mRNA 전달 효율을 측정하였다. 관련 데이터는 도 1과 표 2에 제시된다.

[0288] 도 1에서, *는 통계적 0.01 < P < 0.05를 나타내고, 이는 군 사이의 통계적으로 유의미한 차이를 나타내고: **는 통계적 P < 0.01을 나타내고; ***는 통계적 P < 0.001을 나타내고, 이는 매우 유의미한 차이를 나타낸다.

[0289] [표 2]

번호	평균 단백질 발현 수준 (pg/mg)
화합물 1	217.3
화합물 2	92.5
비교 화합물 1	173.1

[0290]

[0291] 결론: 표 2 및 도 1에 제시된 단백질 발현 수준에 따르면, 화합물 1에 해당하는 지질 나노입자는 근육내 주사를 통해 생체 내에서 mRNA를 전달하는 데 있어서 비교 화합물 1에 해당하는 것보다 유의미하게 뛰어난 성능을 보였다. 화합물 1은 또한 화합물 2보다 성능이 훨씬 뛰어났다. 이는 화합물 1에 해당하는 지질 나노입자가 근육 부위에서 mRNA를 보다 효율적으로 전달하고 단백질 발현을 가능하게 할 수 있음을 나타낸다.

[0292] 시험 실시예 2: 지질 입자 조성물의 생체내 꼬리 정맥 주사 mRNA 전달 효율 평가

[0293] 생체내 mRNA 전달 및 상응하는 암호화된 단백질의 발현을 평가하기 위해, 루시퍼라제 발현용 mRNA가 캡슐화되어 있는 리포솜 나노입자를 6 내지 8주령 암컷 BALB/c 마우스의 꼬리 정맥에 0.5 mg/kg의 용량으로 주사하였다. 6시간 후, 루시퍼라제 기질을 각 마우스의 복강 내로 주사하였다. IVIS 소형 동물 광학 생체내 이미징 시스템(PerkinElmer)을 사용하여 마우스의 형광 이미지를 캡처하고, 마우스의 전신 형광 강도를 기록하였다. 형광 강도의 수준은 루시퍼라제 단백질의 발현 수준, 즉 리포솜 나노입자의 생체내 mRNA 전달 효율을 반영한다. 각 화합물에 해당하는 지질 나노입자에 대해, 3개 이상의 생물학적 복제물을 사용하였고, 평균 형광 강도를 계산하였다. 데이터는 표 3 및 도 2에 제시된다. 도 2에서, 형광 강도는 IVIS 소형 동물 광학 생체내 이미징 시스템을 사용하여 기록된 마우스의 전신 형광 강도를 의미한다. 형광 강도의 수준은 루시퍼라제 단백질의 발현 수준, 즉 지질 나노입자의 생체내 mRNA 전달 효율을 반영한다.

[0294] 비교 화합물 1에 해당하는 리포솜 나노입자를 대조군으로 하여, 화합물 1, 화합물 3 및 화합물 4에 해당하는 리포솜 나노입자의 마우스 꼬리 정맥 생체내 mRNA 전달 효율을 측정하였다.

[0295] 도 2에서, *는 통계적 0.01 < P < 0.05를 나타내고, 이는 군 사이의 통계적으로 유의미한 차이를 나타내고; **

는 통계적 P < 0.01을 나타내고; ***는 통계적 P < 0.001을 나타내고, 이는 매우 유의미한 차이를 나타낸다.

[0296] [표 3]

[0297]

번호	형광 강도 수준 (p/s)
화합물 1	1.05E+09
화합물 3	4.28E+06
화합물 4	6.78E+08
비교 화합물 1	4.92E+08

[0298] 결론: 표 3 및 도 2에 나타낸 형광 강도에 따르면, 화합물 1에 해당하는 지질 나노입자는 비교 화합물 1에 해당하는 것보다 꼬리 정맥 주사 생체내 mRNA 전달 효율이 유의미하게 우수함을 나타냈다: 화합물 1에 해당하는 지질 나노입자의 단백질 발현 수준은 비교 화합물 1에 해당하는 지질 나노입자의 2.1배였다. 한편, 화합물 1에 해당하는 지질 나노입자는 비교 화합물 3에 해당하는 지질 나노입자보다 성능이 유의하게 뛰어났고, 화합물 4에 해당하는 지질 나노입자는 비교 화합물 1에 해당하는 지질 나노입자보다 성능이 유의하게 뛰어났다.

[0299] 시험 실시예 3: 지질 나노입자의 생체내 전달에서의 조직 표적화 평가

[0300] 리포솜 나노입자의 생체내 전달에서의 표적화를 평가하기 위해, 간세포 성장 인자 발현을 위한 mRNA가 캡슐화되어 있는 리포솜 나노입자를 6 내지 8주령 암컷 BALB/c 마우스의 꼬리 정맥에 0.5 mg/kg의 용량으로 주사하였다. 지질 나노입자의 주사 후 1시간, 2시간, 4시간, 6시간, 24시간 및 48시간에 조직 샘플을 수집하였고, 해당 시점의 간 및 비장내 양이온성 지질 분자의 농도를 상이한 조직에서 지질 나노입자의 분포를 평가하기 위한 LC-MS 질량 분석법에 의해 측정하였다. 각 화합물에 해당하는 지질 나노입자에 대해, 3개 이상의 생물학적 복제물을 사용하였고, 조직내 평균 양이온성 지질 농도를 계산하였다.

[0301] 결론: 도 3에 도시된 바와 같이, 다양한 시점의 간에서 채취한 샘플에서, 화합물 1의 농도가 비교 화합물 1의 농도보다 유의하게 높았다. 도 4에 도시된 바와 같이, 비장에서, 화합물 1의 농도가 비교 화합물 1에 비해 유의하게 낮았다. 이는 화합물 1에 해당하는 지질 나노입자가 간에 더 많이 분포하고 비장에는 덜 분포되어 있음을 의미한다.

[0302] 약동학적 매개변수를 기반으로, 투여 후 48시간 동안 조직내 총 양이온성 지질 농도를 계산하여 간 및 비장내 지질 나노입자의 분포를 평가하였다. 표는 여러 측정에서 계산된 평균을 나타낸다. 표 4에 제시된 바와 같이, 간에서는 화합물 1의 농도가 비교 화합물 1에 비해 유의하게 높았고, 비장에서는 비교 화합물 1에 비해 유의하게 낮았다.

[0303] 따라서, 화합물 1에 해당하는 지질 나노입자는 핵산 전달 시 비교 화합물 1에 해당하는 지질 나노입자보다 간 조직을 더 효과적으로 표적화할 수 있다.

[0304] 도 3 및 도 4에서, *는 통계적 0.01 < P < 0.05를 나타내고, 이는 군 사이의 통계적으로 유의미한 차이를 나타내고; **는 통계적 P < 0.01을 나타내고; ***는 통계적 P < 0.001을 나타내고, 이는 매우 유의미한 차이를 나타낸다.

[0305] [표 4]

[0306]

AUC_{48h} (h*μg/mL)	간	비장
화합물 1	539.6	492.6
비교 화합물 1	259.5	681.0

[0307] 시험 실시예 4: 지질 나노입자의 생체내 약동학 평가

[0308] 리포솜 나노입자의 생체내 전달에서의 표적화를 평가하기 위해, 간세포 성장 인자 발현을 위한 mRNA가 캡슐화되어 있는 리포솜 나노입자를 6 내지 8주령 암컷 BALB/c 마우스의 꼬리 정맥에 0.5 mg/kg의 용량으로 주사하였다. 지질 나노입자 주사 후 1시간, 2시간, 4시간, 6시간, 24시간 및 48시간에 혈장, 간 및 비장 샘플을 채취하였고, 해당 시점의 혈장 샘플내 양이온성 지질 분자의 농도를 LC-MS 질량 분석법으로 측정하여, 지질 나노입자의 대사

및 생체내 제거율(clearance rate)을 평가하였다. 각 화합물에 해당하는 지질 나노입자에 대해, 3개 이상의 생물학적 복제물을 사용하였고, 조직내 평균 양이온성 지질 농도를 계산하였다.

[0309] 결론: 도 5에 도시된 바와 같이, 1시간 혈장 샘플내 화합물 1의 농도는 비교 화합물 1에 비해 유의하게 낮았다: 화합물 1의 농도는 1,163 ng/mL이고, 비교 화합물 1의 농도는 6,170 ng/mL였고; 비교 화합물 1의 잔류 농도는 화합물 1의 5.3배였고, 이는 화합물 1에 해당하는 지질 나노입자가 표적 조직에 빠르게 분포되어 혈액계내 체류가 감소함을 의미한다. 화합물 1은 4시간에 완전히 제거된 반면, 6시간에는 여전히 검출가능한 농도의 비교 화합물 1이 존재하였다. 이는 화합물 1이 혈액계에서 더 빠르게 제거되고, 신체 내에서 더 잘 대사된다는 것을 나타낸다.

[0310] 약동학적 매개변수에 기초하여, 조직내 양이온성 지질의 반감기를 계산하였다. 간에서의 화합물 1의 평균 반감기는 34.2시간이고, 비교 화합물 1의 반감기인 61.1시간에 비해 유의하게 낮았다. 화합물 1의 비장 반감기는 31.9시간이고, 비교 화합물 1의 37.9시간에 비해 유의하게 낮았다. 이는 화합물 1이 조직에서 더 잘 분해되고 대사되었음을 나타낸다. 염증 등을 비롯한, 인체내 지질 나노입자로 인한 부작용은 주로 양이온성 지질에 기인한다. 화합물 1은 더 빠르게 대사되고 분해되므로, 비교 화합물 1보다 생물학적으로 안전하다.

[0311] 도 5에서, *는 통계적 $0.01 < P < 0.05$를 나타내고, 이는 군 사이의 통계적으로 유의미한 차이를 나타내고; **는 통계적 $P < 0.01$을 나타내고; ***는 통계적 $P < 0.001$을 나타내고, 이는 매우 유의미한 차이를 나타낸다.

[0312] [표 5]

반감기 (시간)	간	비장
화합물 1	34.2	31.9
비교 화합물 1	61.1	37.9

[0313]

[0314] 시험 실시예 5: 지질 나노입자의 생체내 면역원성 평가

[0315] 외인성 물질이 포유동물의 신체에 들어가면, 선천성 면역 반응을 유도하여 사이토카인 생성을 촉진한다. 이러한 외인성 물질은 신체 내에 유입된 후 염증 반응을 일으킬 수 있고, 이로 인해 신체 내에 열 및 부종과 같은 이상 반응이 쉽게 나타나게 된다. 따라서, 지질 나노입자를 주사한 마우스의 혈액내 인터루킨 6(IL-6)과 같은 사이토카인의 농도를 평가함으로써, 신체내 지질 나노입자의 면역원성을 평가하였다. 사이토카인 농도가 낮다는 것은 지질 나노입자의 면역원성이 낮다는 것을 의미하고, 이는 생물학적으로 더 안전하다는 것을 의미한다.

[0316] 루시퍼라제 리포터 유전자의 발현을 위한 mRNA가 캡슐화되어 있는 리포솜 나노입자를 6 내지 8주령 암컷 BALB/c 마우스의 꼬리 정맥에 0.5 mg/kg의 용량으로 주사하였다. 6시간 후, 혈액을 채취하여 혈청을 단리하였다. 혈청내 IL-6 농도는 마우스 IL-6 ELISA 키트를 사용하여 측정되었다. 각 화합물에 해당하는 지질 나노입자에 대해. 3개 이상의 생물학적 복제물을 사용하였고, 혈청내 평균 IL-6 농도를 계산하였다.

[0317] 결론: 표 6 및 도 6에 도시된 바와 같이, 화합물 1과 화합물 4에 해당하는 지질 나노입자를 주사한 마우스의 혈청내 IL-6 농도는 비교 화합물 1에 비해 유의하게 낮았다. 이는 화합물 1과 4에 해당하는 지질 나노입자가 비교 화합물 1에 해당하는 것보다 신체 내에서 면역원성이 있고 생물학적으로 안전하다는 것을 나타낸다.

[0318] 도 6에서, *는 통계적 $0.01 < P < 0.05$를 나타내고, 이는 군 사이의 통계적으로 유의미한 차이를 나타내고; **는 통계적 $P < 0.01$을 나타내고; ***는 통계적 $P < 0.001$을 나타내고, 이는 매우 유의미한 차이를 나타낸다.

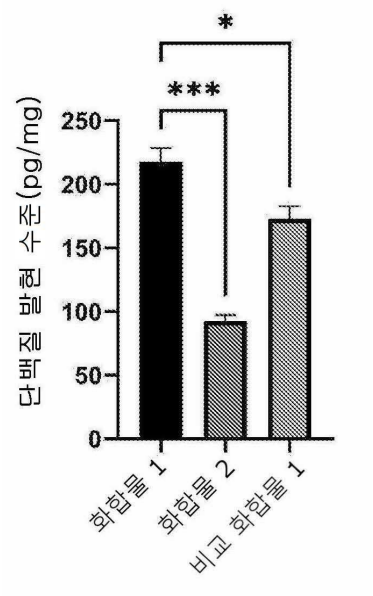
[0319] [표 6]

번호	혈청 IL-6 농도 (pg/mL)
화합물 1	531.7
화합물 4	412.8
비교 화합물 1	1105.6

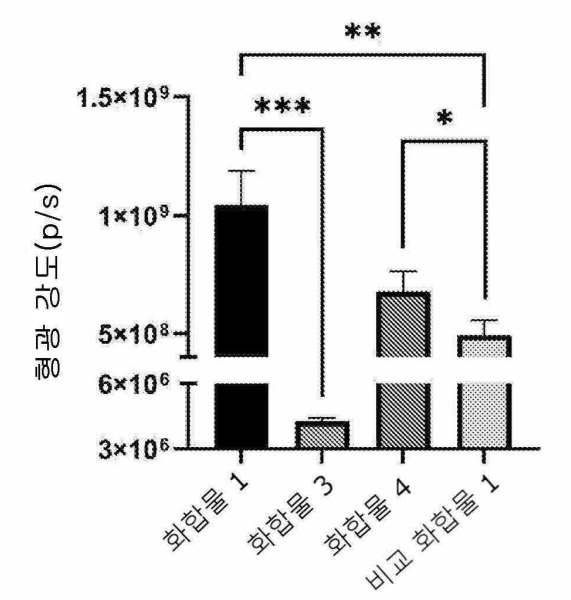
[0320]

도면

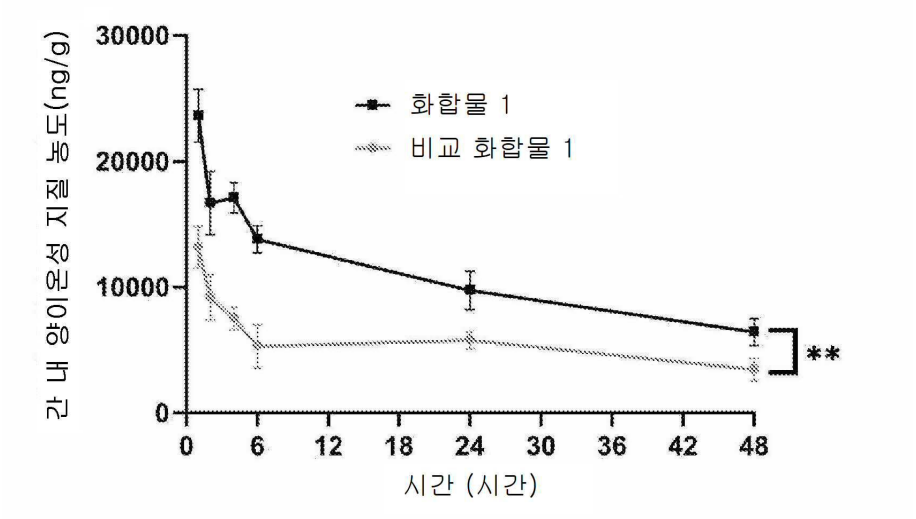
도면1


*
***
250
200
150
100
50
0
단백질 발현 수준(pg/mg)
화합물 1
화합물 2
비교 화합물 1

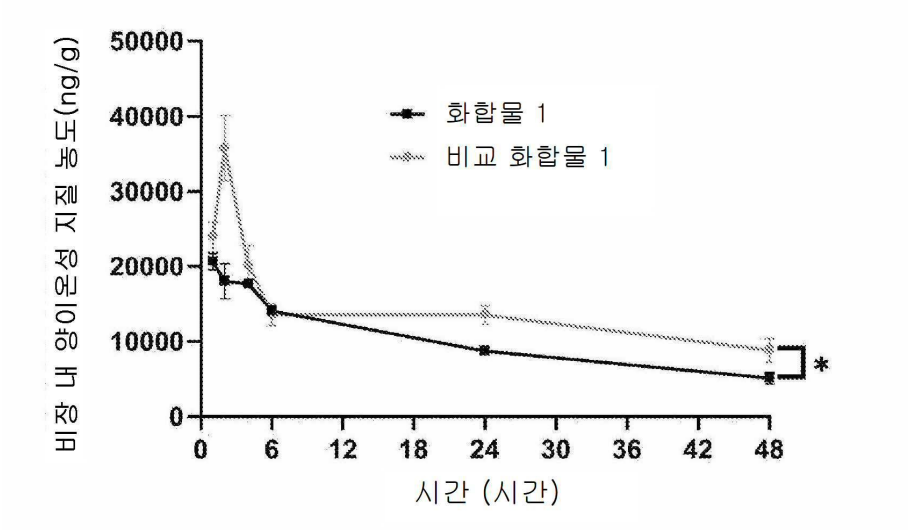
도면2


**
***
*
1.5×10⁹
1×10⁹
5×10⁸
6×10⁶
3×10⁶
형광 강도(p/s)
화합물 1
화합물 3
화합물 4
비교 화합물 1

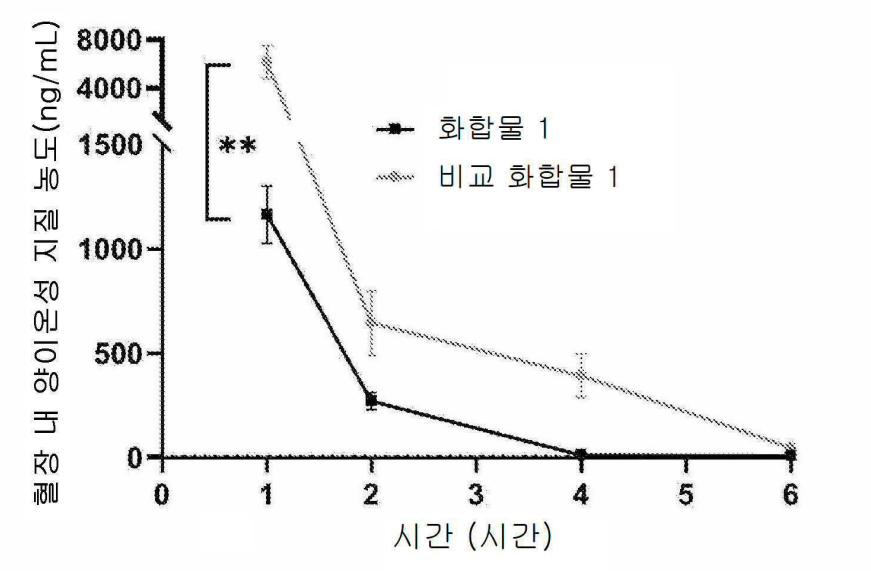
도면3


간 내 양이온성 지질 농도(ng/g)
30000
20000
10000
0
0
6
12
18
24
30
36
42
48
시간 (시간)
화합물 1
비교 화합물 1
**

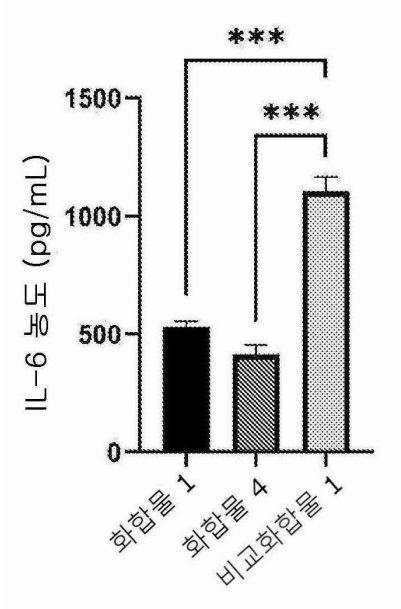
도면4


비장 내 양이온성 지질 농도(ng/g)
50000
40000
30000
20000
10000
0
0
6
12
18
24
30
36
42
48
시간 (시간)
화합물 1
비교 화합물 1
*

도면5


혈장 내 양이온성 지질 농도(ng/mL)
8000
4000
1500
1000
500
0
**
화합물 1
비교 화합물 1
0
1
2
3
4
5
6
시간 (시간)

도면6


***
***
1500
1000
500
0
IL-6 농도 (pg/mL)
화합물 1
화합물 4
비교화합물 1