



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0031158
(43) 공개일자 2025년03월06일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/51 (2006.01) A61K 31/713 (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
C08G 73/02 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 9/5169 (2013.01)
A61K 31/713 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2024-7043050
- (22) 출원일자(국제) 2023년06월05일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2024년12월26일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2023/064963
- (87) 국제공개번호 WO 2023/233042
국제공개일자 2023년12월07일
- (30) 우선권주장
22177313.8 2022년06월03일
유럽특허청(EPO)(EP)
- (71) 출원인
바이오-트립 비.브이.
네덜란드 5641 에이엠 에인트호번 티 호프커 42
- (72) 발명자
프란션 피터르 미헬러
네덜란드 5283 지제트 복스텔 퀴르켈스트라트 44
안선 헨리퀴스 마리
네덜란드 5625 에이엠 에인트호번 헤노버발란 172
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인코리아나

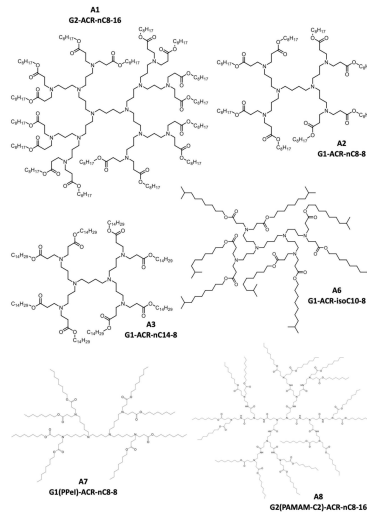
전체 청구항 수 : 총 23 항

(54) 발명의 명칭 **핵산 전달을 위한 다가 분자 기반 지질 나노입자**

(57) 요약

본 발명은 나노입자, 특히 세포로 핵산의 전달에 적합한 나노입자에 관한 것이다. 나노입자는 나노입자 중에서 핵산 분자를 안정화시키기 위한 다가 분자를 포함한다. 특히 다가 분자는 덴드리머 유사 구조를 갖는다. 본 발명은 또한 나노입자의 제조, 및 질환의 치료에서 이러한 나노입자의 용도에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 9/5123 (2013.01)

A61K 9/513 (2013.01)

A61K 9/5146 (2013.01)

A61P 37/02 (2018.01)

A61P 43/00 (2018.01)

C08G 73/0206 (2013.01)

C08G 73/028 (2013.01)

(72) 발명자

판 데르 델 로이

네덜란드 5612 디엑스 에인트호번 쾨베르흐세몰런
97

메이어르 에흐베르트 빌럼

네덜란드 5583 지씨 발러 순마커르슬란 7

필더르 빌럼 얀 메노

네덜란드 5641 에이엠 에인트호번 티 호프커 42

더 발 바실 프랑크 마리아

네덜란드 5282 티제이 복스텔 반더르브라우번란 45

호프스타트 스테인

네덜란드 5614 이디 에인트호번 신트 레오나르뒤스
스트라트 27

명세서

청구범위

청구항 1

코어 및 외부층을 포함하는 나노입자로서, 코어는

- 핵산;

- 다가 분자를 포함하고;

외부층은

- 아포리포단백질, 아포리포단백질 유도체, 아포리포단백질 모방체 및/또는 아포리포단백질 모방체 유도체;

- 인지질;

- 스테롤; 및 임의로

- 충전제 분자를 포함하고,

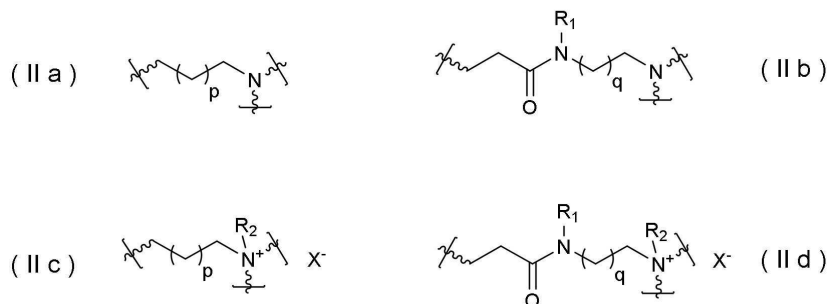
다가 분자는 하기 화학식 (I)을 갖는 것인 나노입자:



[식에서, 코어는 질소이거나 또는 1 내지 15개 질소 헤테로원자를 함유하고 임의로 1 내지 4개 산소 헤테로원자를 함유하는 $\text{C}_1\text{-C}_{18}$ 선형, 분지형, 또는 환형 기이고;

x는 코어로부터 분지 단위 BU (또는 $y = 0$ 일 때, 말단 단위 TU)까지의 연결 개수를 나타내고, x는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 12이고, 이들 연결은 모두 코어의 질소 원자로부터 분지 단위 BU (또는 말단 단위 TU)의 탄소 원자까지 이어지고;

분지 단위 BU는 하기 화학식 (IIa), (IIb), (IIc) 또는 (IId)를 갖고;



(여기서, (IIa)는 CH_2 -말단에서 코어 또는 코어에 더 가까운 BU에 연결되고, N-말단에서 2개 말단 단위 (TU) 또는 TU에 더 가까운 2개 분지 단위 (BU)에 연결되는 n-알킬렌-질소 스페이서를 나타내고, 연결은 물결선 결합으로 제공되고, p는 1, 2, 3 또는 4이고;

(IIb)는 CH_2 -말단에서 코어 또는 코어에 더 가까운 BU에 연결되고, N-말단에서 2개 말단 단위 (TU) 또는 TU에 더 가까운 2개 분지 단위 (BU)에 연결되는 아미드 함유 n-알킬렌-질소 스페이서를 나타내고, 연결은 물결선 결합으로 제공되고, q는 1, 2, 3, 4 또는 5이고, R_1 은 수소, 메틸, 에틸, n-프로필 또는 이소-프로필 기이고;

(IIc) 및 (IId)는 각각 (IIa) 및 (IIb)로서 정의된 바와 같고, R_2 는 메틸, 에틸, n-프로필, 벤질, 아세타미드 ($-\text{CH}_2\text{-C(O)NH}_2$) 또는 2-히드록시-에틸렌 기이고, X^- 는 4차 아민 양이온 모이어티에 대한 반대 음이온임);

y는 다가 분자의 특정하고 개별적인 세대수를 나타내고, 이 수는 내부 코어로부터 외부 TU 기로의 이동으로부터

계산되는, 얼마나 많은 연속적인 BU 층이 다가 분자에 도입되는가를 의미하고, y는 0, 1, 2, 3, 4 또는 5이고;

각각의 별도 세대층에 대해서, BU는 화학식 (IIa), (IIb), (IIc) 또는 (IId)로부터 독립적으로 선택될 수 있고, 즉 제1 세대층 BU를 나타내는, 코어로부터 발산되는 제1 BU는 코어로부터 더 멀리에서 발산되는 제2 BU (제2 세대층 BU를 나타냄)와 상이할 수 있고, 이것은 코어로부터 더 멀리에서 발산되는 제3, 제4 및 제5 BU와 상이할 수도 있으며;

말단 단위 (TU)는 수소 및 0 및 N으로 이루어진 군으로부터 개별적으로 독립적으로 선택되는 1 내지 8개 헤테로 원자를 임의로 함유하는 C₁-C₃₀ 알킬, 아릴, 아릴렌-알킬 또는 알킬렌-아릴 기로부터 개별적으로 독립적으로 선택되고, 단 다가 분자의 모든 TU가 수소는 아니고;

z는 다가 분자에 부착된 TU 기의 총 개수를 나타내고, z는 1 내지 128이고,

화학식 (I)에 따른 다가 분자는 양이온화가능 및/또는 양이온성 기에서 다가이고, 다가 분자 중 양이온화가능 및 양이온성 기의 누적 개수는 2 이상임].

청구항 2

제1항에 있어서, 다가 분자는 하기 화학식 (I)을 갖는 것인 나노입자:



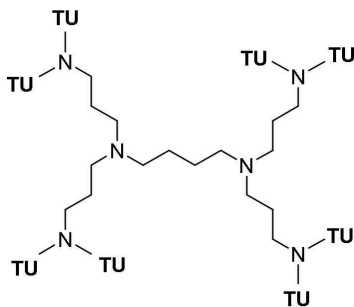
(식에서, y = 0, 1, 2, 또는 3임).

청구항 3

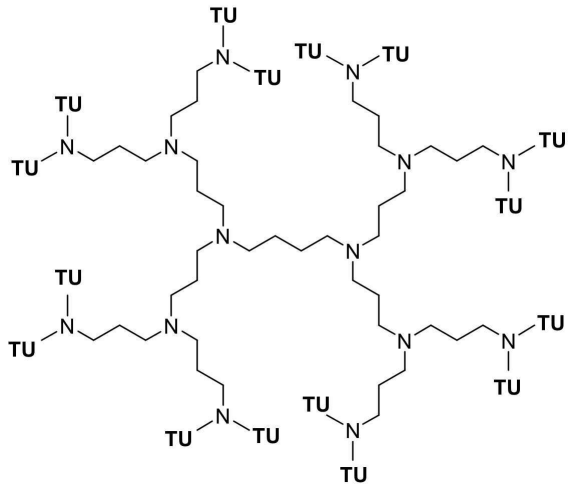
제1항 또는 제2항에 있어서, 다가 분자는 폴리(프로필렌 이민) (PPI) 텐드리머 또는 폴리아미도아민 (PAMAM) 텐드리머, 가장 바람직하게 PPI 텐드리머, 또는 이의 변형으로부터 선택되는 제1, 제2 또는 제3 세대 텐드리머인 나노입자.

청구항 4

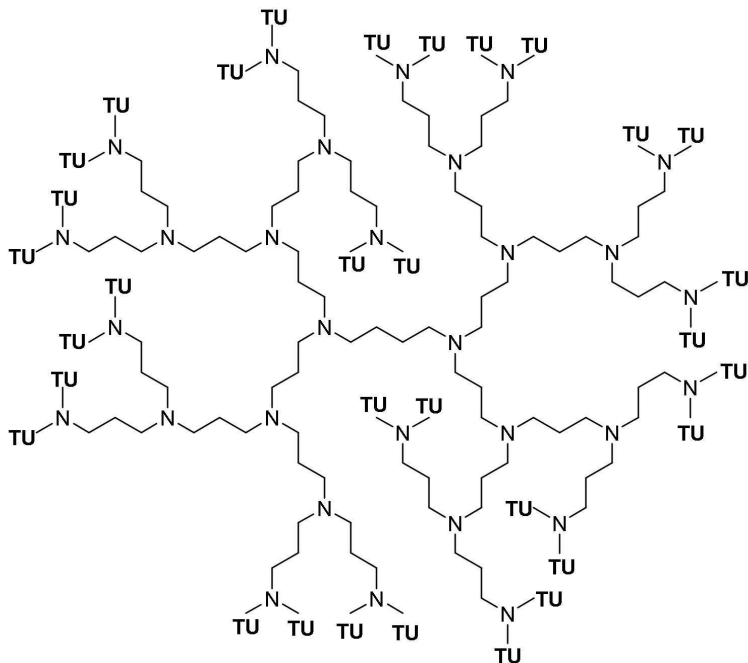
제1항 내지 제3항 중 어느 하나의 항에 있어서, 다가 분자는 하기 화학식으로부터 선택되는 구조를 갖는 것인 나노입자:



또는



또는



(식에서, 말단 단위 (TU)는 수소 및 0 및 N으로 이루어진 군으로부터 개별적으로 독립적으로 선택되는 1 내지 8 개 헤테로원자를 임의로 함유하는 C_1 - C_{30} 알킬, 아릴, 아릴렌-알킬 또는 알킬렌-아릴 기로부터 개별적으로 독립적으로 선택되고, 단 다가 분자의 모든 TU가 수소는 아님).

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 하나의 항에 있어서, 아포리포단백질, 아포리포단백질 유도체, 아포리포단백질 모방체 또는 아포리포단백질 모방체 유도체는 apo A1, apo A1-Milano, apo A2, apo A4, apo A5, apo B48, apo B100, apo C-I, apo C-II, apo C-III, apo C-IV, apo D, apo E, apo F, apo H, apo L 및 apo M 또는 이의 모방체 또는 유도체로부터 선택되고,

바람직하게 apo A1, apo A2, apo A4, apo A5, apo B100, apo C-I, apo C-II, apo C-III, apo C-IV 및 apo E 또는 이의 모방체 또는 유도체로부터 선택되고,

보다 바람직하게 apo A1, apo A4, apo A5, apo B100, apo C-III 및 apo E 또는 이의 모방체 또는 유도체로부터 선택되고,

가장 바람직하게 apo A1, apo B100 및 apo E 또는 이의 모방체 또는 유도체로부터 선택되는 것인 나노입자.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 하나의 항에 있어서, 핵산은 RNA, DNA, 또는 핵산 유사체이고,

바람직하게 RNA는 마이크로RNA (miRNA), 소형 간섭 RNA (siRNA), piwi-상호작용 RNA (piRNA), 소형 핵 RNA (snoRNA), 전달 RNA (tRNA), tRNA-유래 소형 RNA (tsRNA), 소형 조절 RNA (srRNA), 메신저 RNA (mRNA), 변형된 mRNA, 리보솜 RNA (rRNA), 자기-증폭 RNA (saRNA), 원형 RNA (circRNA), 긴 비-코딩 RNA (lncRNA), 또는 가이드 RNA (gRNA) 또는 이의 조합 및/또는 이의 변형이거나; 또는

바람직하게 DNA는 단일 가닥 또는 이중 가닥 DNA이거나; 또는

바람직하게 핵산은 포스포디에스테르 골격 또는 2' 리보스의 변형을 함유하는 뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드 유사체로 이루어지거나 또는 그를 포함하는 단일 가닥 DNA 또는 RNA인 안티센스 올리고뉴클레오티드이고, 보다 바람직하게 뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드 유사체는 잠금 핵산 (LNA), 가교 핵산 (BNA), 모르폴리노 또는 펩티드 핵산 (PNA)으로부터 선택되는 것인 나노입자.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 하나의 항에 있어서, 스테롤은 바람직하게 스테롤, 콜레스테롤, 에르고스테롤, 호파노이드, 히드록시스테로이드, 피이토스테롤, 스테로이드, 주스테롤, 스티그마스테롤, 또는 β -시토스테롤, 또는 이의 조합으로부터 선택되는 것인 나노입자.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 하나의 항에 있어서, 인지질은 포스파티딜콜린, 포스파티딜에탄올아민, 포스파티딜세린 및 포스파티딜글리세롤 또는 이의 조합으로부터 선택되고, 바람직하게 인지질의 아실 기 중 적어도 하나, 보다 바람직하게 둘 모두는 장쇄 지방산으로부터 유래되고, 보다 더 바람직하게 상기 장쇄 지방산은 라우르산, 라우롤레산, 미리스트산, 미리스톨레산, 팔미트산, 팔미톨레산, 스테아르산, 올레산 및 리놀레산, 또는 이의 조합으로부터 선택되는 것인 나노입자.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 하나의 항에 있어서, 충전제 분자를 더 포함하고, 충전제 분자는 글리세리드 분자이고, 보다 바람직하게 충전제 분자는 트리글리세리드, 변형된 트리글리세리드, 및 콜레스테릴 에스테르, 또는 이의 조합으로부터 선택되고, 바람직하게 트리글리세리드는 C6-C18 지방산, 바람직하게 트리카프릴린으로부터 유래되고/되거나, 콜레스테릴 에스테르는 콜레스테릴 아세테이트, 콜레스테릴 카프릴레이트 및/또는 콜레스테릴 올레에이트인 나노입자.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 하나의 항에 있어서, 아포리포단백질, 아포리포단백질 유도체, 아포리포단백질 모방체 또는 아포리포단백질 모방체 유도체의 양은 0.1 내지 90 중량% 범위이고/이거나;

핵산의 양은 0.01 내지 90 중량% 범위이고/이거나;

인지질의 양은 0.1 내지 95 중량% 범위이고/이거나;

스테롤의 양은 0.1 내지 95 중량% 범위이고/이거나;

다가 분자의 양은 0.1 내지 95 중량% 범위이고,

임의로 존재하는 충전제의 양은 0 내지 95 중량% 범위를 포함하고,

중량%는 이들 5종 성분에 임의의 6번째 충전제 성분이 더해진 조합량을 기반으로 하고, 즉 이들 5종 또는 6종 성분이 나노입자의 100 중량%까지 첨가되는 것인 나노입자.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 하나의 항에 따른 나노입자 및 생리학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물로

서, 바람직하게는 조성물은 약학 조성물인 조성물.

청구항 12

의약으로서 사용을 위한 제1항 내지 제10항 중 어느 하나의 항에 따른 나노입자, 또는 제11항에 따른 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서, 사용은 골수 구획 또는 비장으로 핵산의 전달을 포함하는 것인 나노입자 또는 조성물.

청구항 14

선천성 면역 반응의 자극 또는 억제를 통한 질환의 치료에서 사용을 위한 제1항 내지 제10항 중 어느 하나의 항에 따른 나노입자, 또는 제11항에 따른 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 질환은 암, 심혈관 질환, 자가면역 장애 또는 이종이식 거부인 나노입자 또는 조성물.

청구항 16

나노입자를 제조하기 위한 방법으로서,

a) 유기 용매 중 (지질) 성분을 수성 완충액 중 핵산과 혼합, 바람직하게 급속 혼합하여 나노입자를 생산하는 단계로서, (지질) 성분은 인지질, 스테롤, 다가 분자, 및 임의로 충전제 분자를 포함하고, 수성 완충액은 5.5 이하의 pH, 바람직하게 5.0 이하의 pH를 갖는 것인 단계; 및

b) 지질 나노입자를 아포리포단백질, 아포리포단백질 유도체, 아포리포단백질 모방체 및/또는 아포리포단백질 모방체 유도체와 혼합, 바람직하게 급속 혼합하여 5.5와 9.0 사이의 pH, 바람직하게 6.0과 8.0 사이의 pH, 보다 바람직하게 6.5와 8.0 사이의 pH에서 나노입자를 생산하는 단계

를 포함하는 것인 제조 방법.

청구항 17

제1항 내지 제10항 중 어느 하나의 항에 있어서, 나노입자는 제16항의 방법으로 수득가능하거나 또는 수득되는 것인 나노입자.

청구항 18

시험관 내 또는 생체 외에서 세포에 핵산을 도입시키기 위한 방법으로서, 방법은 제1항 내지 제10항 중 어느 하나의 항에 따른 나노입자 또는 제11항에 따른 조성물을 세포와 접촉시키는 단계를 포함하는 것인 도입 방법.

청구항 19

생체 내에서 세포에 핵산을 도입시키기 위한 방법으로서, 방법은 제1항 내지 제10항 중 어느 하나의 항에 따른 나노입자 또는 제11항에 따른 조성물을 세포와 접촉시키는 단계를 포함하는 것인 도입 방법.

청구항 20

대상체에게 핵산의 생체내 전달에서 사용을 위한 제1항 내지 제10항 중 어느 하나의 항에 따른 나노입자 또는 제11항에 따른 조성물.

청구항 21

핵산의 생체 내 전달을 위한 방법으로서, 방법은 제1항 내지 제10항 중 어느 하나의 항에 따른 나노입자 또는 제11항에 따른 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 것인 전달 방법.

청구항 22

선천성 면역 반응의 자극 또는 억제를 통해서 치료를 필요로 하는 대상체에서 질환 또는 장애를 치료하기 위한 방법으로서, 방법은 제1항 내지 제10항 중 어느 하나의 항에 따른 나노입자 또는 제11항에 따른 조성물의 치료

적 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 것인 치료 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, 질환은 암, 심혈관 질환, 자가면역 장애 또는 이종이식 거부로부터 선택되는 것인 치료 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 핵산 치료제 분야에 관한 것으로서, 표적 부위에서 핵산의 세포내 전달을 위한 신규하고 독창적인 나노입자를 제공한다. 그러므로, 본 발명은 핵산을 포함하는 나노입자에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 핵산 치료제 예컨대 소형 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (ASO), 소형 간섭 RNA (siRNA), 메신저 RNA (mRNA) 및 기타 유형은 유전자 발현을 조절하는 잠재성을 갖는 혁신적인 신규 부류의 약물이다. 최근 몇 년간, ASO, N-아세틸갈락토사민 (GalNAc)-siRNA 접합체, siRNA 또는 mRNA를 함유하는 지질 나노입자 (LNP) 및 플라스미드 DNA (pDNA)를 함유하는 다수의 바이러스 벡터를 포함하여, 생체내 적용을 위한 몇몇 핵산-기반 의약품이 승인되었다. 또한, 몇몇 핵산 치료제는 후기 임상 시험 중이다. 더 나아가서, 몇몇 유전자 조작된 생체의 세포 요법 의약품이 승인되었다.

[0003] 비경구 투여 후에 핵산의 치료적 적용은 어려움이 있다. 핵산 유형이 크기 및 물리화학적 성질이 다양하지만, 그들의 공통 특성은 그들의 큰 거대분자 크기 및 음전하를 포함한다. 그 결과로, 전신 투여 시에, 핵산은 신장 여과 및 뉴클레아제 분해로 인해서 순환계로부터 신속하게 제거된다. 또한, 핵산 치료제는 세포내에서 작용하지만 세포막을 빠르게 통과할 수 없다. 마지막으로, 외생성 핵산의 투여는 면역 반응을 유발시킨다. 이것이 유리할 수 있지만 (예를 들어, 백신 개발 경우), 일반적으로 이것은 핵산의 신속한 청소 및 역효과의 원인이 된다.

[0004] 이들 어려움을 극복하기 위해서, 모든 핵산 치료제는 화학적 변형 및/또는 나노기술-기반 전달 시스템에 의존한다. 모든 승인된 핵산 치료제는 이들 세포내 전달을 촉진하고 이어서 비경구 투여 이후에 치료적 효과를 유도하도록 화학적 변형 및/또는 나노기술 플랫폼에 의존한다:

[0005] 1) ASO는 이들 안정성을 증가시키고, 면역자극 효과를 감소시키며, 이들 효능을 증가시키도록 대량으로 화학적으로 변형된다. 그들은 표적 간세포에 피하로 또는 중추 신경계의 표적 세포에 척수강내로 투여된다.

[0006] 2) GalNAc-siRNA 접합체는 ASO와 유사하게 변형되고 피하로 투여된다. GalNAc 모이어티는 간세포에서 아실알로글리코단백질 수용체-매개된 흡수를 보장한다.

[0007] 3) 지질 나노입자 (LNP)는 ~50-100 nm 직경이고, 전신, 피내, 또는 근육내로 투여될 수 있다. 전신 투여 후에, LNP는 간세포에 효율적으로 축적되어서 유전자 침묵화 (siRNA) 또는 단백질 생산 (mRNA)을 위한 기회를 제공한다. 피내 또는 근육내 투여 이후에, LNP는 백신 목적으로 활용될 수 있는 항원 제시 세포와 같은 면역 세포에 의해 흡수된다. LNP는 현재 mRNA 치료제에 대한 황금 표준이고, 또한 생체내에서 유전자 편집 적용을 위한 표준 전달 플랫폼이 될 가능성이 있다. 그러나, LNP는 과민 반응 및 또는 아나필락시스와 연관된 합성 (비-천연) 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)-접합 지질을 함유한다. 또한, 현행 LNP 시스템은 정맥내 투여 이후에 간에서 주로 축적된다.

[0008] 4) 바이러스 전달 시스템 예컨대 아데노바이러스, 렌티바이러스, 또는 아데노-연관 바이러스 (AAV) 벡터는 DNA를 전달하는데 효과적인 비히클이다. 바이러스 벡터는 그들의 제한된 페이로드 용량 및 면역원성을 특징으로 한다. 그러나, 면역 특권 조직 예컨대 눈에서, 바이러스 벡터는 핵산 치료제에 대한 현재의 황금 표준을 구성한다. 바이러스 벡터는 생체의 치료제 (예를 들어, CAR T)로 광범위하게 사용되거나 또는 간의 표적 세포에 정맥내로, 망막의 표적 세포에 유리체내/망막하로 또는 백신 목적을 위해 근육내로 투여된다.

[0009] 바이러스 벡터- 또는 LNP-mRNA-기반 백신을 제외하고, 대부분의 승인된 핵산 치료제는 면역요법보다는 다른 적응증을 위해 개발된다. 그러므로, 골수 구획으로 치료 핵산의 전달은 여전히 어려움이 있다. 더 나아가서, 핵산 분자의 화학적 변형 또는 바이러스 전달은 고유하게 면역계의 원치않는 활성화의 위험성을 가져서, 그 결과로 바람직하지 않은 면역 반응 또는 핵산 치료제의 분해 또는 제거가 야기된다.

- [0010] 예를 들어, 핵산을 운반하는 나노입자는 예를 들어 WO2009127060A1에 기술되어 있는데, 여기서는 비-양이온성 지질 및 핵산과 조합된 양이온성 지질의 사용을 기술한다. 양이온성 지질은 핵산을 중화시켜서, 대상체에서 핵산의 비-표적화 전달에 사용될 수도 있는 나노입자의 형성을 허용한다. 이들 나노입자의 단점은 그들이 골수 구획을 표적화할 수 없다는 것이다.
- [0011] 예를 들어, WO2019103998A2의 다른 시스템은, 골수 구획을 표적화할 수 있는 나노생물제제를 기술하는데, 나노생물제제는 인지질 및 apo A1 및 소형 분자 약물을 포함한다. 이들 나노생물제제의 단점은 이들 소수성 코어로 인해서, 그들이 극성 구조 예컨대 핵산, 예를 들어, DNA 및 RNA의 도입을 허용하지 않는다는 것이다.
- [0012] WO2017048789A1에서는 분자 당 제한된 개수의 이온화가능한 기를 갖고, 생체내 산화 경향이 있는 비-천연 술피드 기를 갖는 덴드리머 물질을 기술한다. 이들 물질의 제조에서, 다중작용성 분자는 이작용성 분자와 반응하여 중간체에 도달하는데, 따라서 이것은 순수한 (비-가교) 형태로 얻어지는 것이 어려울 수도 있다.
- [0013] 그러므로, 치료적 핵산을 위한 골수 구획으로의 개선되고 대안적인 전달 시스템이 필요하다.
- [0014] 상기 문제는 특히 첨부된 청구항에 정의된 바와 같은 본 발명을 통해서 해결된다.

발명의 내용

- [0015] 본 발명은 핵산 치료제 표적화 및/또는 전달, 및 보다 특히 골수 세포 구획으로 핵산 치료제 표적화 및/또는 전달을 위한 나노입자 플랫폼 기술을 구성한다. 본 명세서에 교시된 바와 같은 나노입자는 아포리포단백질 안정화제 (또는 아포리포단백질의 유도체, 또는 아포리포단백질의 모방체 또는 모방체 유도체)에 의해 안정화된 (인)지질-기반 나노입자이다. 순환계에서, 안정화제 및 (인)지질은 핵산 페이로드를 차폐 및/또는 보호하여서, 이를 분해 및 신속한 청소로부터 방지한다. 동시에, 나노입자는 혈중 성분과 원치않는 상호작용을 제한하여서, 예컨대 혈중 성분과 핵산 페이로드의 원치않는 상호작용을 제한하여서 핵산 치료제의 면역자극 관련 역효과를 감소시킨다. 아포리포단백질 안정화제는 또한 나노입자를 골수 세포 구획으로 지정할 수 있으므로 표적화 모이어티로서 작용한다. 따라서, 본 발명은 효과적인 면역요법을 위해서, 림프 기관의 골수 세포 구획, 예컨대 예를 들어 골수 및 비장으로 효율적인 핵산 치료제 전달을 가능하게 한다.
- [0016] 본 명세서에 교시된 바와 같은 나노입자는 또한 다가 분자를 더 포함한다. 다가 분자는 핵산에 효율적으로 결합하여 포획 (또는 복합체 형성)할 수 있는 다수의 양이온화가능하고/하거나 양이온성인 기를 갖는다. 본 발명의 다가 분자는 예를 들어 1가 양친매성 분자에 비해서 핵산에 더 강력하게 결합한다. 따라서, 핵산은 본 명세서에 교시된 바와 같은 나노입자 내에서 더욱 양호하게 결합되고/되거나 유지된다. 또한, 본 발명의 다가 분자는 또한 아포리포단백질 안정화제 (또는 아포리포단백질의 유도체, 또는 아포리포단백질의 모방체 또는 유도체의 모방체에 의함)와 상호작용할 수도 있는데, 이 단백질이 전체 음전하를 갖기 때문이다. 그 결과로서, 아포리포단백질 (또는 아포리포단백질의 유도체, 또는 아포리포단백질의 모방체 또는 유도체의 모방체에 의함)은 본 발명의 나노입자에 더욱 잘 통합된다. 그리하여, 순환계에서, 예를 들어, 대상체의 혈중에서, 본 발명의 나노입자는 나노입자로부터 아포리포단백질 성분을 전혀 또는 거의 방출하지 않게 된다.
- [0017] 본 발명은 특히 다가 분자 예컨대 제한없이 덴드리머를 포함하는 나노입자에 관한 것이다. 더 나아가서, 본 발명은 특히 안정화제 물질, 예컨대, 제한없이, 아포리포단백질, 아포리포단백질 유도체, 아포리포단백질 모방체 또는 아포리포단백질 모방체 유도체를 포함하는 나노입자에 관한 것이다. 본 발명은 또한 나노입자를 사용한 치료 방법, 예를 들어 선천성 면역 반응의 자극 또는 억제를 통한 질환의 치료 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 생체 내에서, 시험관 내에서, 또는 생체 외에서 나노입자를 사용하여 세포에 핵산을 도입하기 위한 방법에 관한 것이다.
- [0018] 따라서, 제1 양태에서, 본 발명은 코어 및 외부층을 포함하는 나노입자에 관한 것으로서, 코어는
- [0019] - 핵산;
- [0020] - 다가 분자를 포함하고;
- [0021] 외부층은
- [0022] - 아포리포단백질, 아포리포단백질 유도체, 아포리포단백질 모방체 및/또는 아포리포단백질 모방체 유도체;
- [0023] - 인지질,
- [0024] - 스테롤; 및 임의로,

[0025] - 충전제 분자를 포함하고,

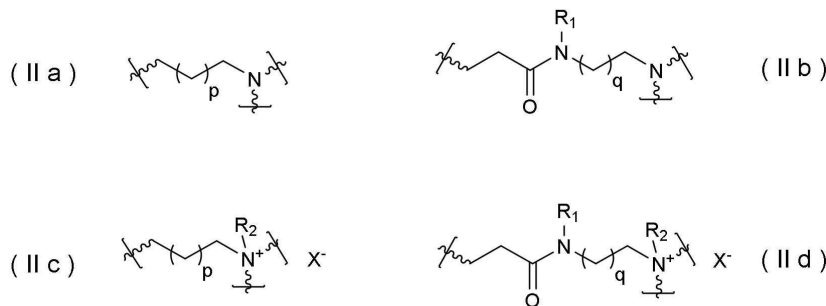
[0026] 다가 분자는 하기 화학식 (I)을 갖는다:

[0027] $[코어]_x - [BU]_y - [TU]_z$ (I)

[0028] 상기 식에서, 코어 (즉, 다가 분자의 코어)는 질소이거나, 또는 1 내지 15개 질소 헤테로원자를 함유하고, 임의로 1 내지 4개 산소 헤테로원자를 함유하는 C_1-C_{18} 선형, 분지형, 또는 환형 기이고;

[0029] x는 코어로부터 분지 단위 BU (또는 $y = 0$ 일 경우, 말단 단위 TU) 까지의 연결개수를 나타내고, x는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 12이고, 이들 연결은 모두 코어의 질소 원자로부터 분지 단위 BU (또는 말단 단위 TU)의 탄소 원자까지 이어지고;

[0030] 분지 단위 BU는 하기 화학식 (IIa), (IIb), (IIc) 또는 (IId)를 갖는다:



[0031]

[0032] (IIa)는 CH_2 -말단에서 코어 또는 코어에 더 가까운 BU에 연결되고, N-말단에서 2개 말단 단위 (TU) 또는 TU에 더 가까운 2개 분지 단위 (BU)에 연결되는 n-알킬렌-질소 스페이서를 나타내고, 연결은 물결선 결합으로 제공되며, p는 1, 2, 3 또는 4이고;

[0033] (IIb)는 CH_2 -말단에서 코어 또는 코어에 더 가까운 BU에 연결되고, N-말단에서 2개 말단 단위 (TU) 또는 TU에 더 가까운 2개 분지 단위 (BU)에 연결되는 아마이드 함유 n-알킬렌-질소 스페이서를 나타내고, 연결은 물결선 결합으로 제공되고, q는 1, 2, 3, 4 또는 5이고, R_1 은 수소, 메틸, 에틸, n-프로필 또는 이소-프로필 기이고;

[0034] (IIc) 및 (IId)는 각각 (IIa) 및 (IIb)로서 정의되고, R_2 는 메틸, 에틸, n-프로필, 벤질, 아세타미드 ($-CH_2-C(=O)NH_2$) 또는 2-히드록시-에틸렌 기이고, X^- 는 4차 아민 양이온 모이어티에 대한 반대 음이온이고;

[0035] y는 다가 분자의 특정하고 개별적인 세대수를 나타내고, 이 수는 내부 코어로부터 외부 TU 기로의 이동으로부터 계산되는, 얼마나 많은 연속적인 BU 층이 다가 분자에 도입되는가를 의미하고, y는 0, 1, 2, 3, 4 또는 5이고;

[0036] 각각의 개별 세대층 경우에, BU는 화학식 (IIa), (IIb), (IIc) 또는 (IId)로부터 독립적으로 선택될 수 있고, 즉 제1 세대층 BU를 나타내는, 코어로부터 발산된 제1 BU는 코어로부터 더 멀리에서 발산된 제2 BU (제2 세대층 BU를 나타냄)와 상이할 수 있고, 이것은 코어로부터 훨씬 더 멀리서 발산되는 제3, 제4 및 제5 BU와 상이할 수도 있고;

[0037] 말단 단위 (TU)는 수소 및 0 및 N으로 이루어진 군으로부터 개별적으로 독립적으로 선택되는 1 내지 8개 헤테로원자를 임의로 함유하는 C_1-C_{30} 알킬, 아릴, 아릴렌-알킬 또는 알킬렌-아릴 기로부터 개별적으로 독립적으로 선택되고, 단 다가 분자의 모든 TU가 수소가 아니고;

[0038] z는 다가 분자에 부착된 TU 기의 총수를 나타내고, z는 1 내지 128이고;

[0039] 화학식 (I)에 따른 다가 분자는 양이온화가능 및/또는 양이온성 기에서 다가이고, 다가 분자에서 양이온화가능 및 양이온성 기의 누적 수는 2 이상이다.

[0040] 제2 양태에서, 본 발명은 본 발명의 제1 양태에 따른 나노입자 및 생리학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물에 관한 것이고, 바람직하게 조성물은 약학 조성물이다.

[0041] 제3 양태에서, 본 발명은 의약으로서 사용을 위한 본 발명의 제1 양태에 따른 나노입자, 또는 본 발명의 제2 양

태에 따른 조성물에 관한 것이다.

- [0042] 제4 양태에서, 본 발명은 선천성 면역 반응의 자극 또는 억제를 통해서 질환의 치료에서 사용을 위한 본 발명의 제1 양태에 따른 나노입자, 또는 본 발명의 제2 양태에 따른 조성물에 관한 것이고, 바람직하게 상기 질환은 암, 심혈관 질환, 자가면역 장애, 또는 이종이식 거부이다.
- [0043] 제5 양태에서, 본 발명은 나노입자를 제조하기 위한 방법에 관한 것으로서,
- [0044] a) 유기 용매 중 (지질) 성분을 수성 완충액 중 핵산과 혼합, 바람직하게 급속 혼합하여 나노입자를 생산하는 단계로서, (지질) 성분은 인지질, 스테롤, 다가 분자, 및 임의로 충전제 물질 (예를 들어, 트리글리세리드)을 포함하고; 수성 완충액은 5.5 이하의 pH, 바람직하게 5.0 이하의 pH를 갖는 것인 단계; 및
- [0045] b) a에서 생산된 지질 나노입자를 아포리포단백질, 아포리포단백질 유도체, 아포리포단백질 모방체 및/또는 아포리포단백질 모방체 유도체와 혼합, 바람직하게 급속 혼합하여, 5.5와 9.0 사이의 pH, 바람직하게 6.0과 8.0 사이의 pH, 보다 바람직하게 6.5와 8.0 사이의 pH에서 본 발명의 나노입자를 생산하는 단계를 포함한다.
- [0046] 제6 양태에서, 본 발명은 시험관 내에서 또는 생체 외에서 세포에 핵산을 도입시키기 위한 방법에 관한 것으로서, 방법은 본 발명의 제1 양태에 따른 나노입자 또는 본 발명의 제2 양태에 따른 조성물을 세포와 접촉시키는 단계를 포함한다.
- [0047] 제7 양태에서, 본 발명은 생체 내에서 세포에서 핵산을 도입시키기 위한 방법에 관한 것으로서, 방법은 본 발명의 제1 양태에 따른 나노입자 또는 본 발명의 제2 양태에 따른 조성물을 세포와 접촉시키는 단계를 포함한다.
- [0048] 제8 양태에서, 본 발명은 핵산의 생체 내 전달을 위한 방법에 관한 것으로서, 방법은 본 발명의 제1 양태에 따른 나노입자 또는 본 발명의 제2 양태에 따른 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0049] 제9 양태에서, 본 발명은 선천성 면역 반응의 자극 또는 억제에 의해서 이를 필요로 하는 대상체에서 질환 또는 장애를 치료하기 위한 방법에 관한 것으로서, 방법은 본 발명의 제1 양태에 따른 나노입자 또는 본 발명의 제2 양태에 따른 조성물의 치료적 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

도면의 간단한 설명

- [0050] 도 1. 그들 개별 코드를 갖는 예시적인 다가 분자 구조.
- 도 2. 그들 개별 코드를 갖는 예시적인 다가 분자 구조.
- 도 3. 그들 개별 코드를 갖는 예시적인 다가 분자 구조.
- 도 4. DLin-MC3-DMA 및 ALC-0315의 기준 분자 구조.
- 도 5. 아포리포단백질 나노입자 (aNP)를 함유하는 예시적인 RNA의 생산 과정에 대한 개략도. 지질 성분은 유기 용매 중에 가용화되고, 낮은 pH (예를 들어, pH 4)에서 완충수 중에 가용화된 RNA (예를 들어, siRNA)와 혼합된다. 형성된 입자는 PBS pH 7.4에서 투석되고 아포리포단백질 (예를 들어, 아포리포단백질 A1)과 혼합된다. 최종적으로, 입자 용액은 여과 및 원심분리된다. 기준 LNP 나노입자는 이온화가능한 양이온성 지질 DLin-MC3-DMA를 함유하고, 트리카프릴린 (TG)이나 아포리포단백질 A1 (LNP 경우에 제2 혼합 단계는 필요하지 않음)을 함유하지 않는다. 기준 aNP (DLin-MC3-DMA 함유), 및 본 발명에 따른 예시적인 aNP (다가 이온화가능 분자)는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)-접합된 지질 (aNP는 아포리포단백질 나노입자임)을 함유하지 않는다. 추가 상세사항은 표 S3을 참조한다.
- 도 6. Ribogreen 어세이로 결정된 제조된 나노입자에 대한 siRNA 체류값. 진회색 컬럼은 기준 나노입자 LNP (이온화가능한 양이온성 지질 DLin-MC3-DMA 함유) 및 aNP (DLin-MC3-DMA 함유)에 대한 데이터를 도시하는 한편, 연회색 컬럼은 본 발명에 따른 예시적인 aNP (다가 이온화가능 물질 A1, A2, A3, A6, A7, A8, A11, A14, B2, D4, G2, G6, G7, G8, G9, H1 또는 F1 포함함)에 대한 데이터를 도시한다. 각각의 원형은 개별 반복 실험에 해당된다.
- 도 7. A2 (A) 및 A1 (B)을 함유하는 siRNA-aNP의 저온-TEM 이미지. 좌측에 입자의 개요 (흰색 기준자는 100 nm임)가 도시된 한편, 우측에는 배율이 제공된다. 구형 입자가 A2 및 A1 둘 모두에 대해 확인된다. A1 경우에, aNP가 (다수) 외부층(들)을 갖는 것으로 보인다.
- 도 8. A6 (C) 및 A14 (D)를 함유하는 siRNA-aNP의 저온-TEM 이미지. 좌측에는 입자의 개요 (흰색 기준자는

100 nm임)가 도시되는 한편, 우측에는 배율이 제공된다. 구형 입자가 A6 및 A14 둘 모두에서 확인된다. A6 및 A14 경우에 aNP는 (다수) 외부층(들)을 갖는 것으로 보인다.

도 9. A6을 함유하는 본 발명에 따른 동일한 예시적인 아포리포단백질 나노입자 (aNP)의 면역-금 염색 TEM 이미지 (B)와 저온-TEM 이미지 (A)의 비교. 양쪽 사진에서, 직경이 약 50 nm인 siRNA-aNP를 볼 수 있다. 면역-금 염색 TEM 이미지화 (IGS-TEM)는 아포리포단백질을 국제화시키도록 구현되었다. 이 방법에서, 1차 항체는 나노입자 상의 아포리포단백질 A1에 이어서, 가교 항체 (IGg) 및 단백질 A-코팅된 금 나노입자 (10 nm 직경)에 결합된다. (B)에서, 10-나노미터 금 나노입자는 검은색 구체로서 보이며, 이들은 대부분이 aNP의 표면에 위치된다.

도 10. 세포독성 측정. 본 명세서에 교시된 바와 같은 siRNA-aNP에 노출시키는, RAW 264.7 세포주에 대한 MTS 어세이. 증가량의 다가 분자 A1, A2 및 A6는 세포독성을 보이지 않는다.

도 11. RAW 264.7 세포주에 대해 수행된 본 명세서에 교시된 바와 같은 siRNA-aNP (A1 또는 A2 이온화가능한 다가 분자 함유) 및 기준 aNP (DLin-MC3-DMA 또는 ALC-0315 이온화가능한 양이온성 지질 함유)에 대한 용량 반응 곡선. 각 점은 일정 농도에 대한 개별 반복을 나타낸다. DLin-MC3-DMA 이온화가능한 양이온성 지질을 갖는 LNP 입자는 약 30 nM의 IC50 값을 보인다 (곡선 미도시). 본 명세서에 교시된 바와 같은 aNP는 1가 이온화가능한 양이온성 지질을 함유하는 LNP 또는 aNP에 비해서 더 높은 역가를 보인다.

도 12. 이중-발광 유전자 침묵화 리포터 어세이. 데이터는 각각 반딧불이 루시페라제 siRNA 및 비특이적 siRNA를 함유하는 나노입자의 침묵화 (회색) 및 침묵화 결여 (흰색)를 나타낸다. 각 점은 개별 반복을 나타낸다 (3개 기술적 반복의 평균). 데이터는 본 명세서에 교시된 바와 같은 예시적인 aNP가 대체로 기준 LNP 및 aNP 입자를 능가한다는 것을 보여준다.

도 13. Ribogreen 어세이로 결정된 본 명세서에 교시된 바와 같은 제조된 A2 aNP에 대한 siRNA 체류값. 트리카프릴린 (TG) 함량, 콜레스테롤 함량, 및 사용된 인지질의 유형에서 변동은 (대부분의 경우에서) 높은 siRNA 체류율을 갖는 나노입자를 야기한다. 각 원형은 개별 반복 실험을 나타낸다. 따라서, aNP는 다양한 조성으로 제조될 수 있다.

도 14. 나노입자에 제제화된 웰 당 100 ng 반딧불이 루시페라제 mRNA로 RAW264.7 마크로파지 세포의 형질감염 이후 측정된 발광 강도. 본 발명에 따른 예시적인 aNP는 다가 물질 A2를 함유한다. 2개 대조군, LNP 및 aNP가 도시되는데, 둘 모두 이온화가능한 양이온성 물질로서 ALC-0315를 함유한다. 데이터는 3개 기술적 반복물을 사용한 1회 실험의 평균 + SD로서 표시된다. 데이터는 본 명세서에 교시된 바와 같은 예시적인 aNP가 기준 LNP 및 aNP 입자를 능가한다는 것을 보여준다.

도 15. 이온화가능한 물질 A2를 함유하는 mRNA-로딩된 aNP의 저온-TEM 이미지. 이들 aNP는 생체 내 실험에 사용되었다. 50 nm의 기준자가 제공된다. 외견상으로 (다수) 외부층(들)을 갖는 구형 입자가 확인된다.

도 16. 다가 물질 A2를 함유하는 aNP에 로딩된 0.5 mg/kg 반딧불이 루시페라제 mRNA (TriLink, CleanCap 5mo U)가 주사된 마우스로부터 제조된 단일 세포 현탁액에서 측정된 발광 강도. 측정은 볼러스 주사 이후 16시간에 수행되었다. 데이터는 2마리 동물의 평균 ± SD로서 표시된다. 데이터는 본 명세서에 교시된 바와 같은 예시적인 aNP가 비장 및 골수 조직을 효율적으로 표적화한다는 것을 보여준다.

도 17. 그들 개별 코드를 갖는 예시적인 다가 분자 구조.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0051] 본 발명의 목적을 위해서, 다음의 용어가 하기에 정의된다.
- [0052] 본 명세서에서 사용되는, 단수형 용어 "한", "일" 및 "그"는 내용에서 달리 명확하게 명시하지 않으면 다수 참조를 포함한다. 따라서, 예를 들어, "한 세포"에 대한 참조는 둘 이상의 세포의 조합 등을 포함한다.
- [0053] 본 명세서에서 사용되는 용어 "및/또는"은 하나 이상의 명시된 경우가 단독으로, 또는 모든 명시된 경우까지 적어도 하나의 명시된 경우와 조합되어 발생될 수도 있는 상황을 의미한다.
- [0054] 본 명세서에서 사용되는 용어 "항원"은 항체의 결합 부분이 결합할 수도 있는 물질을 의미한다. 항원 내 특별한 면역반응성 부위는 "에피토프" (또는 항원성 결정부)로서 알려져 있다. 항체, 또는 이의 항원-결합 부분에 대한 표적은 본 명세서에 정의된 바와 같은, 항원을 포함할 수도 있다.

- [0055] 본 명세서에서 사용되는 용어 "적어도" 특정 값은 그 특정 값 또는 그 이상을 의미한다. 예를 들어, "적어도 2"는 "2 이상", 즉 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15,... 등과 동일한 것으로 이해한다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "최대로" 특정 값은 그 특정값 또는 그 이하를 의미한다. 예를 들어, "최대로 5"는 "5 이하" 즉, 5, 4, 3,...-10, -11 등과 동일한 것으로 이해한다.
- [0056] 본 명세서에서 사용되는, 단어 "포함하다" 또는 "이의 변형, 예컨대 "포함한다" 또는 "포함하는"은 명시된 요소, 정수 또는 단계, 또는 요소, 정수 또는 단계의 그룹을 포함하지만, 임의의 다른 요소, 정수 또는 단계, 또는 요소, 정수 또는 단계의 그룹의 배제는 아니라는 것을 이해할 것이다. 동사 "포함하는"은 동사 "본질적으로 이루어지는" 및 "이루어지는"을 포함한다.
- [0057] 본 명세서에서 사용되는 용어 "통상적 기술"은 본 발명의 방법에서 사용되는 통상적 기술을 수행하는 방법이 당업자에게 자명하게 되는 상황을 의미한다. 분자 생물학, 생화학, 계산 화학, 세포 배양, 재조합 DNA, 생물정보학, 유전체학, 시퀀싱 및 관련 분야의 통상적 기술의 실행은 당업자에게 충분히 공지되어 있고, 예를 들어, 다음의 참조 문헌에 논의되어 있다: Sambrook et al., *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989; Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, 1987 and periodic updates; and the series *Methods in Enzymology*, Academic Press, San Diego.
- [0058] 본 명세서에서 사용되는, 나노입자는 표적, 예를 들어, 대상체의 장기 또는 세포로 페이로드를 전달하는데 사용될 수도 있는, 예를 들어, 10 내지 200 nm 범위의 직경인 소형 입자를 의미한다.
- [0059] 본 명세서에서 사용되는 용어 "동일성"은 뉴클레오티드 서열 또는 아미노산 서열의 동일성의 척도를 의미한다. 일반적으로, 서열은 최고 순서 일치가 얻어지도록 정렬된다. "동일성" 그 자체는 당분야에서 인식되는 의미를 가지며, 공개된 기술을 사용해 계산될 수 있다. 참조: 예를 들어, (*Computational Molecular Biology*, Lesk, A. M., ED., Oxford University Press, New York, 1988; *Biocomputing: Informatics And Genome Projects*, Smith, D. W., ED., Academic Press, New York, 1993; *Computer Analysis Of Sequence Data, Part I*, Griffin, A. M., And Griffin, H. G., EDS., Humana Press, New Jersey, 1994; *Sequence Analysis In Molecular Biology*, Von Heinje, G., Academic Press, 1987; 및 *Sequence Analysis Primer*; Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991). 2개 뉴클레오티드 서열 또는 아미노산 서열 간 동일성을 측정하기 위한 다수의 방법이 존재하지만, 용어 "동일성"은 당업자에게 충분히 공지되어 있다 (Carillo, H., and Lipton, D., *SIAM J. Applied Math* (1988) 48:1073). 2개 서열 간 동일성 또는 유사성을 결정하는데 통상적으로 적용되는 방법은 하기 문헌에 개시된 것들을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다: *Guide To Huge Computers*, Martin J. Bishop, ed., Academic Press, San Diego, 1994, and Carillo, H., and Lipton, D., *Siam J. Applied Math* (1988) 48:1073. 동일성 및 유사성을 결정하기 위한 방법은 컴퓨터 프로그램으로 암호화되어 있다. 2개 서열 간 동일성 및 유사성을 결정하기 위한 바람직한 컴퓨터 프로그램 방법은 GCS 프로그램 패키지 (Devereux, J., et al., *Nucleic Acids Research* (1984) 12(1):387), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, S. F. et al., *J. Molec. Biol.* (1990) 215:403)를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0060] 예시로서, 일정 서열의 폴리펩티드를 코딩하는 기준 뉴클레오티드 서열에 대해서 적어도, 예를 들어, 95% "동일성"을 갖는 뉴클레오티드 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드란, 폴리뉴클레오티드 서열이 기준 아미노산 서열의 각 100개 뉴클레오티드 당 최대 5개 점 돌연변이를 포함할 수도 있다는 것을 제외하고, 폴리뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열이 기준 서열과 동일하다는 것을 의도한다. 다른 말로, 기준 뉴클레오티드 서열과 적어도 95% 동일한 뉴클레오티드 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드를 수득하기 위해서, 기준 서열 중 뉴클레오티드의 최대 5%가 결실될 수도 있고/있거나 다른 뉴클레오티드로 치환될 수도 있고/있거나, 기준 서열 중 전체 뉴클레오티드의 최대 5% 까지 다수의 뉴클레오티드가 기준 서열에 삽입될 수도 있다. 기준 서열의 이들 돌연변이는 기준 뉴클레오티드 서열의 5' 또는 3' 말단 위치에서, 또는 기준 서열 내 뉴클레오티드 중에서 개별적으로 또는 기준 서열 내 하나 이상의 연속적인 그룹에 산재된, 이들 말단 위치 사이 어느 곳에서도 발생될 수도 있다.
- [0061] 유사하게, SEQ ID NO: X의 기준 아미노산 서열과 적어도, 예를 들어, 95% "동일성"을 갖는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드란 아미노산 서열이 SEQ ID NO: X의 기준 아미노산의 각 100개 아미노산 당 최대 5개 아미노산 변형을 포함할 수도 있다는 것을 제외하고, 폴리펩티드의 아미노산 서열이 기준 서열과 동일하다는 것을 의도한다. 다른 말로, 기준 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 수득하기 위해서, 기준 서열 중 아미노산 잔기의 최대 5%는 결실될 수도 있거나 또는 다른 아미노산으로 치환될 수도

있거나, 또는 기준 서열 중 전체 아미노산 잔기의 최대 5% 까지 다수 아미노산이 기준 서열에 삽입될 수도 있다. 기준 서열의 이들 변경은 기준 아미노산 서열의 아미노 또는 카르복시 말단 위치에서, 또는 기준 서열의 잔기 중에서 개별적으로 또는 기준 서열 내 하나 이상의 연속적인 그룹에 산재된, 말단 위치 사이의 어느 곳에서도 발생될 수도 있다.

[0062] 본 명세서에서 사용되는 용어 "시험관 내"는 그들 천연적 조건으로부터 단리된 유기체의 성분을 사용해 수행된 실험 또는 측정을 의미한다.

[0063] 본 명세서에서 사용되는 용어 "생체 외"는 천연 조건의 최소 변경을 갖는 외부 환경에서 유기체 유래 조직 내 또는 조직 상에서 수행된 실험 또는 측정을 의미한다.

[0064] 본 명세서에서 사용되는 용어 "핵산", "핵산 분자" 및 "폴리뉴클레오타이드"는 DNA 분자 및 RNA 분자를 비롯하여, 잠금 핵산 (LNA), 가교 핵산 (BNA), 모노폴리노 또는 펩티드 핵산 (PNA)를 포함하고자 의도된다. 핵산 (분자)은 임의의 핵산 (분자)일 수도 있고, 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수도 있다.

[0065] 뉴클레오타이드, 또는 "핵산 서열", "뉴클레오타이드 서열" 또는 "폴리뉴클레오타이드 서열"을 언급할 때 본 명세서에서 사용되는 용어 "서열"은 핵산 및/또는 폴리뉴클레오타이드 내에서, 또는 그의 뉴클레오타이드의 순서를 의미한다. 본 발명의 문맥 내에서, 제1 핵산 서열은 추가 핵산 서열 내에 포함될 수도 있거나 또는 그와 중복될 수도 있다.

[0066] 본 명세서에서 사용되는 용어 "대상체" 또는 "개체" 또는 "동물" 또는 "환자" 또는 "포유동물"은 상호교환적으로 사용되고, 진단, 예후, 또는 요법을 원하는 임의의 대상체, 특히 포유동물 대상체를 의미한다. 포유동물 대상체는 인간, 가축, 농장 동물, 및 동물원 동물, 스포츠 동물 또는 반려 동물 예컨대 개, 고양이, 기니 피그, 토끼, 래트, 마우스, 말, 소, 암소, 곰 등을 포함한다. 본 명세서에 정의된 바와 같이, 대상체는 살아있을 수도 있거나 또는 죽었을 수도 있다. 샘플은 대상체 사후에, 즉 사망 후에 채취될 수 있고/있거나, 샘플은 살아있는 대상체로부터 채취할 수 있다.

[0067] 본 명세서에서 사용되는, 용어 "치료", "치료하는", "일시적 완화", "경감" 또는 "개선"은 상호교환적으로 사용되고, 치료적 이득을 포함하지만, 이에 제한되지 않는 유리하거나 또는 바람직한 결과를 얻기 위한 접근법을 의미한다. 치료적 이득이란 치료되는 기저 질환의 근절 또는 개선 또는 진행의 감소 (또는 지연)를 의미한다. 또한, 치료적 이득은 환자가 여전히 기저 질환을 앓고 있을 수 있음에도 불구하고, 호전 또는 하락의 둔화 또는 감소가 환자에서 관찰되도록 기저 질환과 연관된 생리적 증상 중 하나 이상의 근절 또는 개선 또는 진행의 감소 (또는 지연)에 의해 획득된다.

[0068] 본 명세서에서 사용되는 용어 "벡터"는 수송할 수 있는 핵산 분자가 연결된 다른 핵산을 수송할 수 있는 핵산 분자를 의미한다. 벡터의 한 유형은 "플라스미드"로서, 추가적인 DNA 절편이 결합될 수도 있는 원형 이중 가닥 DNA 루프를 의미한다. 용어 "벡터"는 또한 관심 핵산을 함유하는 바이러스 입자 (즉, 바이러스 벡터)를 의미할 수도 있다.

[0069] 본 명세서에서 사용될 때, 용어 "페이로드"는 일반적으로 입자에 포함되어 표적 부위로 전달되는 물질을 의미한다. 본 발명의 나노입자를 언급할 때, 용어 "페이로드"는 바람직하게 다가 분자와 조합된 핵산을 의미한다.

[0070] 본 명세서에서 사용할 때, 용어 "표적화"는 세포 (예를 들어, 표적 세포, 예컨대 제한없이 골수성 세포)를 표적화 또는 조직 또는 장기를 표적화한다고 언급하는 경우에, 의도하는 세포, 장기 또는 조직에 근접시키거나, 또는 의도하는 세포, 장기 또는 조직의 근접성을 농후화시키는 것을 의미하는 것으로 이해해야 한다. 이것은 의도하는 세포, 장기 또는 조직을 표적화할 때, 입자의 무작위 또는 자연적 분포를 기반으로 예상할 수 있듯이 평균적으로 더 많은 나노 입자가 의도하는 세포, 장기 또는 조직의 근처에 있다는 것을 암시한다. 본 명세서에서 근접성은 나노입자가 이의 페이로드 (핵산)를 전달하기 위해 세포 (또는 조직 또는 장기)와 상호작용할 수 있다는 것을 의미한다.

[0071] 본 명세서에서 사용되는 용어 골수성 세포는 거핵구, 과립구, 단핵구, 적혈구에 대한 공통 전구체 세포로부터 유래되는 혈액 세포를 의미한다. 골수성 세포는 단핵구, 수지상 세포, 조직 마크로파지 및 과립구를 포함하는 면역계의 주요 세포 구획이다. 본 명세서에서 사용될 때, 용어 골수 구획은 유기체 중의 골수성 세포의 전체를 의미한다.

[0072] 알킬 및 알킬렌 기는 선형, 분지형, 또는 환형일 수도 있다. 알킬 및 알킬렌 기는 1 내지 36개 탄소 원자, 바람직하게 1 내지 18개 탄소를 포함한다. 알킬 및 알킬렌 기는 임의로 하나 이상의 이중 결합 (C=C)을 포

함하고, 이 경우에 이들 기는 불포화된다. 알킬 및 알킬렌 기는 임의로 O, N, P, S 및 F로 이루어진 군으로부터 선택되는 헤테로원자, 바람직하게 O 및 N으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1 - 8개 헤테로원자를 포함한다.

[0073] 아릴 및 아릴렌 기는 6 내지 24개 탄소 원자를 포함하는데 반해서, 알킬렌아릴 및 아릴렌알킬 기는 7 내지 25개 탄소 원자를 포함한다. 아릴, 아릴렌, 알킬렌아릴 및 아릴렌알킬 기는 임의로 O, N, P, S 및 F로 이루어진 군으로부터 선택되는 헤테로원자, 바람직하게 O 및 N으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1 - 8개 헤테로원자를 포함한다.

[0074] 에스테르, 아마이드, 우레탄, 우레아, 카르보네이트, 카르복실산, 케톤, 알데히드, 에테르 및 알콜 기는 하기에 정의되며, R_x 는 수소 원자 또는 환형, 선형 또는 분지형 알킬 또는 알킬렌 기를 나타낸다. 하나 초과 R_x 성분을 함유하는 기에서, 이들 성분은 독립적으로 선택될 수 있다. 이 문헌에 표시된 바와 같은 에스테르 (작용) 기 또는 모이어티는 화학식: $-C(O)-O-$ 에 따른 기로서 이해되어야 한다. 이 문헌에 표시된 바와 같은 아마이드 (작용) 기 또는 모이어티는 화학식: $-NR_x-C(O)-$ 에 따른 기로서 이해되어야 한다. 이 문헌에 표시된 바와 같은 우레탄 (작용) 기 또는 모이어티는 화학식: $-NR_x-C(O)-O-$ 에 따른 기로서 이해되어야 한다. 이 문헌에 표시된 바와 같은 우레아 (작용) 기 또는 모이어티는 화학식: $-NR_x-C(O)-NR_x-$ 에 따른 기로서 이해되어야 한다. 이 문헌에 표시된 바와 같은 카르보네이트 (작용) 기 또는 모이어티는 화학식: $-O-C(O)-O-$ 에 따른 기로서 이해되어야 한다. 이 문헌에 표시된 바와 같은 카르복실산 (작용) 기 또는 모이어티는 화학식: $-C(O)OH$ 에 따른 모이어티 또는 기로서 이해되어야 한다. 이 문헌에 표시된 바와 같은 케톤 (작용) 기 또는 모이어티는 화학식: $-C(O)-$ 에 따른 기로서 이해되어야 한다. 이 문헌에 표시된 바와 같은 알데히드 (작용) 기 또는 모이어티는 화학식: $-C(O)H$ 에 따른 기로서 이해되어야 한다. 이 문헌에 표시된 바와 같은 에테르 (작용) 기 또는 모이어티는 화학식: $-O-$ 에 따른 기로서 이해되어야 한다. 이 문헌에 표시된 바와 같은 알콜 (또는 히드록시) 작용기 또는 모이어티는 화학식: $-OH$ 에 따른 기로서 이해되어야 한다.

[0075] 본 명세서에서 사용되는 섹션 제목은 단지 구성 목적이며 기술된 대상 주제를 제한하는 것으로 해석되어서는 않 된다.

[0076] 본 발명의 방법, 조성물, 용도 및 다른 양태와 관련된 다양한 용어가 명세서 및 청구항 전반에서 사용된다. 이러한 용어는 달리 표시하지 않으면, 본 발명이 관련된 분야의 그들 통상의 의미를 제공하는 것이다. 다른 특별하게 정의된 용어는 본 명세서에 제공되는 바와 같은 정의와 일관적인 방식으로 해석되어야 한다. 바람직한 재료 및 방법이 본 명세서에서 설명되지만, 본 명세서에 기술된 것과 유사하거나 또는 동등한 임의의 방법 및 재료가 본 발명의 시험을 실시하는데 사용될 수 있다.

[0077] 달리 정의하지 않으면, 본 명세서에서 사용되는 모든 기술 및 과학 용어는 당업자가 통상적으로 이해하는 바와 동일한 의미를 갖는다.

[0078] 본 발명은 골수 세포 구획으로 핵산 치료제 표적화 및/또는 전달을 위한 나노입자 플랫폼 기술을 구성한다. 본 명세서에 기술되는 나노입자는 본 명세서에서 아포리포단백질 안정화제라고도 하는, 아포리포단백질 (또는 아포리포단백질의 유도체, 또는 아포리포단백질의 모방체 또는 유도체의 모방체)에 의해 안정화된 (인)지질-기반 나노입자이다. 순환계에서, 안정화제 및/또는 (인)지질은 핵산 치료제 페이로드를 차폐 및/또는 보호하므로, 이를 분해 및 신속한 청소로부터 방지한다. 동시에, 나노입자는 혈중 성분과의 원치않는 상호작용을 제한하여서, 예컨대, 혈중 성분과 핵산 페이로드의 원치않는 상호작용을 제한하여서, 핵산 치료제의 면역자극-관련 역효과를 감소시킨다. 아포리포단백질 안정화제는 또한 나노입자를 골수 세포 구획으로 지정할 수 있으므로 표적화 모이어티로서 작용한다. 따라서, 본 발명은 효과적인 면역요법을 위해서, 림프계 장기, 예컨대 예를 들어 골수 및 비장으로 효율적인 핵산 치료제 전달을 가능하게 한다. 특정 구현예에서, 본 명세서에 교시된 바와 같은 나노입자는 과립구, 단핵구, 적혈구, 또는 혈소판에 대한 전구체 세포로부터 유래되는 모든 혈액 세포를 포함한, 골수성 세포로 표적화 또는 전달하는데 사용된다. 특정 구현예에서, 본 명세서에 교시된 바와 같은 나노입자는 단핵구, 수지상 세포, 조직 마크로파지 또는 과립구로 표적화 또는 전달하는데 사용된다.

[0079] 본 명세서에 기술된 바와 같은 나노입자는 지질-기반 나노-크기 제제 (입자의 직경 ~10-300 nm)이다. 이론에 국한하지 않고, 본 발명자는 입자가 다가 분자와 상호작용하는 핵산을 포함하는 코어, 및 안정화제 단백질 (들), 바람직하게 아포리포단백질, 아포리포단백질 유도체, 아포리포단백질 모방체 및/또는 아포리포단백질 모방체 유도체가 도입된 외부 표면을 갖는다고 믿는다. 코어는 다가 분자의 소수성 모이어티로 인해서 상대적

으로 소수성이다. 외부 표면은 대체로 안정화제 단백질, 바람직하게 아포리포단백질 안정화제가 도입된 인지질 층으로 이루어지고, 스테롤 예컨대 예를 들어 콜레스테롤을 더 포함한다. 인지질의 친수성 헤드는 외부 수성 환경에 직면하는데 반해서 소수성 꼬리점은 나노입자의 코어를 향해서 내부를 향한다. 가능하게, 나노입자는 다수층을 함유하지만, 임의 경우에 나노입자는 소수성 다가 분자에 의해 결합되고 입자 내부에 매장된 핵산을 가지며, 인지질, 스테롤 및 안정화제 단백질, 바람직하게 아포리포단백질, 아포리포단백질 유도체, 아포리포단백질 모방체 및/또는 아포리포단백질 모방체 유도체를 갖는 외부 보호 표면층을 갖는다. 그러므로, 본 명세서에 기술된 나노입자는 당분야에 기술된 나노입자, 예를 들어, 소포-유사하고, 수성 코어를 둘러싼 지질 이중층을 포함하는 나노입자와 구별된다. 본 발명의 아포리포단백질 장식된 나노입자는 또한 당분야에 기술된 나노입자, 예를 들어 오로지 합성 (비-천연) 친수성 중합체, 예컨대 예를 들어 폴리-에틸렌-글리콜 (PEG) 또는 이의 유도체에 의해서 안정화된 나노입자와 구별된다. 특히, 이전에 보고된 나노입자는 전형적으로 특정한 세포로 핵산 카고를 표적화하도록 허용하지 않는데 반해서, 본 명세서에 교시된 바와 같은 나노입자는 본 명세서의 다른 곳에 기술된 바와 같은, 골수 세포 구획으로 핵산 카고를 표적화하도록 허용한다.

[0080] 그들의 양친매성 특징으로 인해서, 나노입자 제제 중 인지질은 소수성 코어와 수성 용매 사이의 계면에 축적되어서, 지질 단층 (또는 지질 다중층) 표면 장벽을 효과적으로 형성한다. 생물학적 용도 경우에, 그들의 고유한 생체적합성 및 순 중성 전하때문에, 단일 또는 다수 인지질 유형이 사용될 수도 있다. 임의로, 하전된 (인)지질의 몰백분율은 전체 제제에 특정한 전하 특징을 제공하도록 첨가될 수도 있다 (1-95 mol% 이하, 예를 들어 1-20 mol% 또는 1-10 mol% 또는 1-5 mol%, 이들 몰백분율은 적용된 인지질의 총량에 대한 것임).

[0081] 지질 나노입자는 본질적으로 친수성인, 이의 구조 핵산 내에서 복합체형성되도록 조작된다. 따라서, 헬퍼 분자는 핵산을 소수성 나노입자 코어로 유인하는데 필요하다. 이를 위해서, 다가 분자는 나노입자에 포함된다. 다가 분자는 둘 이상의 양이온화가능 및/또는 양이온성 기를 포함한다. 양이온화가능한 기는 양자화를 통해서 낮은 pH에서 양이온성 기가 된다. 양이온성 기는 이온 상호작용을 통해서 핵산 페이로드의 당 포스페이트 골격의 음이온성 포스페이트 기와 결합할 수 있다. 다가 분자의 소수성 부분은 친수성 핵산 분자 주변에서 쉘을 형성한다. 이러한 쉘은 이후에 인지질, 스테롤 및 단백질 안정화제 (예를 들어, 아포리포단백질 안정화제)로 구성된 입자 외부층과 상호작용할 수 있다.

[0082] 1가 양친매성 분자 대신에, 다가의 양이온화가능 및/또는 양이온성 분자를 적용하여서, 핵산과의 결합이 더 강력해 진다. 이의 결과로서, 핵산은 본 명세서에 교시된 바와 같은 나노입자 내에서 더욱 잘 결합되고 유지된다. 또한, 다가 분자는 아포리포단백질 안정화제와 상호작용할 수도 있는데 이러한 단백질은 다음의 문헌에 기술된 바와 같은 전체 음전하를 갖기 때문이다: Sparks DL, Lund-Katz S, Phillips MC. The charge and structural stability of apolipoprotein A-I in discoidal and spherical recombinant high density lipoprotein particles. J Biol Chem. 1992 Dec 25;267(36):25839-47. PMID: 1464598. 결과적으로, 아포리포단백질은 본 발명의 나노입자 내에서 더욱 잘 부착되고 포획된다. 마지막으로, 표적화된 세포로 핵산의 형질감염은 다가 분자의 존재에 의해 도움을 받을 수도 있는데, 이들이 (골수) 세포 장벽에서 다수 인지질과 효율적으로 결합하고 상호작용할 수 있어서, 핵산이 진입하는 껍을 생성하기 때문이다.

[0083] 핵산, 다가 분자, 인지질, 스테롤, 및 안정화제 (임의로 표적화 능력, 예컨대 골수 세포 구획을 표적화하는 능력을 가짐)이외에도, 추가적인 소수성 충전제 분자는 본 명세서에 교시된 바와 같은 나노입자 제제에 포함될 수 있다. 그들의 주요한 적용은 나노입자 물리화학적 성질을 변경시키거나 또는 안정성을 개선시키는 것이다. 충전제 분자는 (주로) 나노입자의 코어에 존재한다. 충전제 분자는 바람직하게 생체적합성이고, 비제한적인 예는 글리세리드 지질 분자 (지질 디글리세리드 또는 트리글리세리드), 스테롤 에스테르 및 지방산의 에스테르를 포함한다.

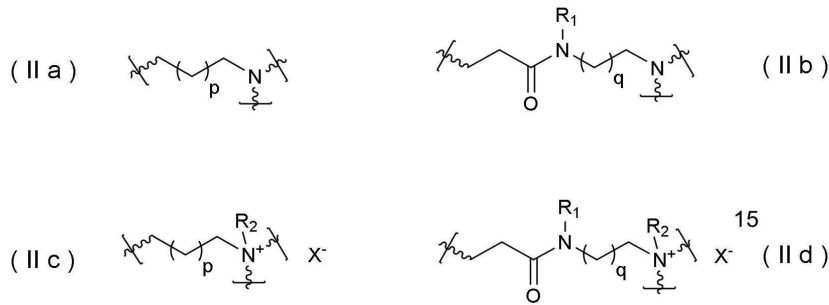
[0084] 치료적 핵산을 함유하는 나노입자는 골수 세포 구획에서 유전자 발현을 정밀하게 조절하여서, 면역 반응을 조절할 것으로 기대된다. 본 명세서에 교시된 바와 같은 나노입자 플랫폼 기술의 주요 장점은 제제의 생물학적 거동 및 상호작용을 변경시키지 않고 핵산 페이로드를 교환하는 가능성이다. 그러므로, 본 명세서에 교시된 바와 같은 치료적 핵산을 함유하는 나노입자는 예를 들어 암 또는 감염성 질환을 치료하기 위해 면역 반응을 촉진시키거나, 또는 예를 들어 자가면역 질환을 치료하거나 또는 장기 이식 동안에 면역 반응을 약화시키는 면역요법으로서 구현될 수 있다.

[0085] 그러므로, 제1 양태에서, 본 발명은

[0086] - 핵산;

- [0087] - 다가 분자;
- [0088] - 안정화제, 바람직하게 아포리포단백질, 아포리포단백질 유도체, 아포리포단백질 모방체 및/또는 아포리포단백질 모방체 유도체로서, 바람직하게 안정화제는 또한 신체 (즉, 골수 구획) 내부의 특정 세포로 나노입자를 지정시킬 수 있으므로 표적화 성분인 것인 안정화제;
- [0089] - 인지질,
- [0090] - 스테롤; 및 임의로,
- [0091] - 충전제 분자
- [0092] 를 포함하거나, 그로 본질적으로 이루어지거나, 또는 그로 이루어지는 나노입자에 관한 것으로서,
- [0093] 다가 분자는 하기 화학식 (I)을 갖는다:
- [0094]
$$[\text{코어}]_x - [\text{BU}]_y - [\text{TU}]_z \quad (\text{I})$$
- [0095] 다가 분자는 (선택적) 분지 단위 (BU) (즉, 최내 BU) 또는 말단 단위 (TU) (예컨대 이 경우에 다가 분자는 임의의 BU를 갖지 않음)에 대한 x-개의 연결에 의해서 부착되는 코어로 구성된 덴드리머(- 유사) 분지형 구조를 갖고,
- [0096] BU는 y-개의 세대층으로 적층되며, y는 0, 1, 2, 3, 4 또는 5이고,
- [0097] 다가 분자는 z개의 말단 단위 (TU), 바람직하게 코어 (y = 0인 경우) 또는 최외 BU 단위 (y = 1, 2, 3, 4 또는 5인 경우)에 연결된 TU를 함유하고,
- [0098] 다가 분자는 양이온화가능 및/또는 양이온성 기에서 다가이고, 다가 분자에서 이들 기의 누적수는 적어도 2이다.
- [0099] 특정 구현예에서, 나노입자는 코어 및 외부층을 포함하고, 코어는
- [0100] - 핵산;
- [0101] - 다가 분자를 포함하거나, 그로 본질적으로 이루어지거나, 또는 그로 이루어지고;
- [0102] 외부층은
- [0103] - 안정화제, 바람직하게 아포리포단백질, 아포리포단백질 유도체, 아포리포단백질 모방체 및/또는 아포리포단백질 모방체 유도체;
- [0104] - 인지질;
- [0105] - 스테롤; 및 임의로
- [0106] - 충전제 분자를 포함하거나, 그로 본질적으로 이루어지거나, 또는 그로 이루어지고,
- [0107] 다가 분자는 하기 화학식 (I)을 갖는다:
- [0108]
$$[\text{코어}]_x - [\text{BU}]_y - [\text{TU}]_z \quad (\text{I})$$
- [0109] 식에서, 코어는 질소이거나 또는 1 내지 15개 질소 헤테로원자를 함유하고 1 내지 4개 산소 헤테로원자를 임의로 함유하는 C₁-C₁₈ 선형, 분지형 또는 환형 기이고;
- [0110] x는 코어로부터 분지 단위 BU (즉, 최내 분지 단위 BU), 또는 말단 단위 TU (y = 0인 경우)까지의 연결 개수를 나타내고, x는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 12이고, 이들 연결은 모두 코어의 질소 원자로부터 분지 단위 BU (즉, 최내 분지 단위 BU) 또는 말단 단위 TU (예컨대 y = 0인 경우)의 탄소 원자까지 이어지고;

[0111] 분지 단위 BU는 하기 화학식 (IIa), (IIb), (IIc) 또는 (IId)를 갖고:



[0112]

[0113] 식에서, (IIa)는 CH_2 -말단에서 코어 또는 코어에 더 가까운 BU에 연결되고, N-말단에서 2개 말단 단위 (TU) 또는 TU에 더 가까운 2개 분지 단위 (BU)에 연결되는 n-알킬렌-질소 스페이서를 나타내고, 연결은 물결선 결합으로 제공되고, p는 1, 2, 3 또는 4이고;

[0114] (IIb)는 CH_2 -말단에서 코어 또는 코어에 더 가까운 BU에 연결되고, N-말단에서 2개 말단 단위 (TU) 또는 TU에 더 가까운 2개 분지 단위 (BU)에 연결되는 아미드 함유 n-알킬렌-질소 스페이서를 나타내고, 연결은 물결선 결합으로 제공되며, q는 1, 2, 3, 4 또는 5이고, R_1 은 수소, 메틸, 에틸, n-프로필 또는 이소-프로필 기이고;

[0115] (IIc) 및 (II d)는 각각 (IIa) 및 (IIb)로서 정의되고, R_2 는 메틸, 에틸, n-프로필, 벤질, 아세타미드 ($-\text{CH}_2\text{---C(=O)NH}_2$) 또는 2-히드록시-에틸렌 기이고, X^- 는 4차 아민 양이온 모이어티에 대한 반대 음이온이고;

[0116] y는 다가 분자의 특정하고 개별적인 세대수를 나타내고, 이 개수는 내부 코어로부터 외부 TU 기로의 이동 (예를 들어, 코어에서 TU 기로의 이동)으로부터 계산되는, 얼마나 많은 연속적인 BU 층이 다가 분자에 도입되는 가를 의미하고, y는 0 또는 1 또는 2 또는 3 또는 4 또는 5이고;

[0117] 각각의 개별 세대층에 대해서, BU는 화학식 (IIa), (IIb), (IIc) 또는 (II d)로부터 독립적으로 선택될 수 있고, 즉 제1 세대층 BU를 나타내는, 코어로부터 발산되는 제1 BU는 코어로부터 더 멀리에서 발산되는 제2 BU (제2 세대층 BU를 나타냄)와 상이할 수 있고, 이것은 코어로부터 더 멀리에서 발산되는 제3, 제4 및 제5 BU와 상이할 수도 있고;

[0118] 말단 단위 (TU)는 수소 및 0 및 N으로 이루어진 군으로부터 개별적으로 독립적으로 선택되는 1 내지 8개 헤테로 원자를 임의로 함유하는 $\text{C}_1\text{---C}_{30}$ 알킬, 아릴, 아릴렌-알킬 또는 알킬렌-아릴 기로부터 개별적으로 독립적으로 선택되고, 단 다가 분자의 모든 TU가 수소는 아니며;

[0119] z는 다가 분자에 부착된 TU 기의 총 개수를 나타내고, z는 1 내지 128이고;

[0120] 화학식 (I)에 따른 다가 분자는 양이온화가능 및/또는 양이온성 기에서 다가이고, 다가 분자에서 양이온화가능 및 양이온성 기의 누적수는 2 이상이다.

[0121] 분지 단위 BU는 2 방향으로 분지되므로, z는 $x * 2^y$ 와 같다. 예를 들어, 코어로부터 4개 연결 ($x = 4$)을 갖는 제2 세대 다가 분자 ($y = 2$)는 $4 * 2^2 = 16$ 말단 단위 TU를 보유하게 된다. 다른 예에서, 코어로부터 4개 연결 ($x = 4$)을 갖는 제3 세대 다가 분자 ($y = 3$)는 $4 * 2^3 = 32$ 말단 단위 TU를 보유하게 된다. 다른 예에서, 코어로부터 5개 연결 ($x = 5$)을 갖는 0세대 다가 분자 ($y = 0$)는 $5 * 2^0 = 5$ 말단 단위 TU를 보유하게 된다.

[0122] 본 명세서에 기술된 나노입자는 주로 안정화제, 인지질 및 스테롤을 포함하는 외부층, 및 다가 분자 및 핵산인 카고 (본 명세서에서 페이라고도 함)를 포함하는 코어를 갖는다. 나노입자는 이의 의도하는 목적지, 예를 들어 세포, 조직 또는 장기로 카고를 전달하는데 사용될 수 있다. 바람직하게, 핵산 카고는 표적 세포, 조직 또는 장기에서 세포내로 전달된다.

[0123] 본 발명은 본 명세서에 기술된 바와 같은 나노입자가 성공적으로 핵산이 로딩될 수 있고, 상기 핵산을 세포내에서, 예를 들어 의도하는 표적 세포에 전달하는데 사용될 수 있다는 인식을 기반으로 한다. 이것은 하기 특

성의 조합을 통해서 달성되었다:

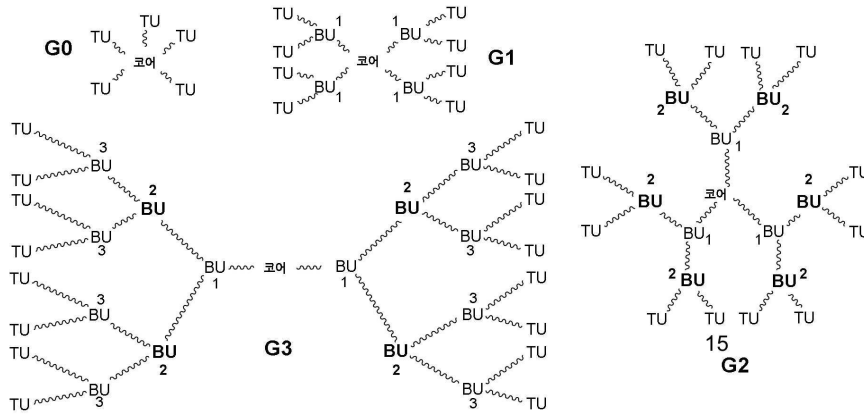
- [0124] - 핵산을 중화시켜서 나노입자의 소수성 코어에 로딩되도록 하기 위해서 다가 분자의 사용;
- [0125] - 나노입자의 구조적 성분 및 그들 상대량의 범위, 예를 들어, 아포리포단백질, 스테롤, 인지질, 다가 분자, 핵산 및 임의로 충전제 분자 (예를 들어, 트리글리세리드)의 양을 규정함.
- [0126] 추가적으로, 발명자는 개별 성분을 단순히 혼합하여 본 명세서에 기술된 바와 같은 나노입자를 수득할 수 없으므로 안정화제-기반 나노입자, 바람직하게 아포리포단백질 (및/또는 아포리포단백질 모방체)-기반 나노입자에 핵산을 성공적으로 도입시키기 위한 방법을 개발하였다. 2-단계 제제화 과정을 수행하는 것이 필수적인 것으로 확인되었는데, 제1 단계에서 핵산을 함유하는 나노입자를 형성시키고, 다음 단계에서 안정화제 (예를 들어, 아포리포단백질, 아포리포단백질 유도체, 아포리포단백질 모방체 및/또는 아포리포단백질 모방체 유도체)를 나노입자에 포함시킨다. 바람직하게, 제1 단계는 낮은 pH에서 수행되고, 제2 단계는 생리학적인 pH에서 수행된다. 이러한 발견은 최초로 본 명세서에 기술된 바와 같은 나노입자에 핵산을 포함시킬 수 있게 하고, 따라서 표적 세포로 상기 핵산의 전달을 가능하게 한다.
- [0127] 그러므로, 본 발명은 소수성 코어를 갖는 나노입자를 의미하는, 본 명세서에 기술된 바와 같은 나노입자에 핵산의 로딩을 허용하는 다가 분자를 제공한다. 소수성 코어-기반 나노입자의 사용은 이전에 [Jayaraman M et al. (Maximizing the potency of siRNA lipid nanoparticles for hepatic gene silencing *in vivo*. Angew Chem Int Ed Engl. 2012 Aug 20;51(34):8529-33)]에서 기술되었는데, 핵산이 양으로 하전된 양친매성 물질 예컨대 Dlin-MC3-DMA를 사용해 코어에 로딩된다. 이러한 분자는 전형적으로 낮은 pH에서 양자화될 수 있는 아민기를 포함한다. 양으로 하전된 양친매성 분자는 이후에 소수성 코어에 로딩을 허용하도록 음으로 하전된 핵산을 "중화"시키는데 사용된다. 이러한 방법이 장점을 갖지만, 적용된 양친매성 물질의 가능한 독성에 관한 일부 우려가 존재한다. 그러므로, 대안적인 해결책이 바람직하다. 본 발명자는 본 명세서에서 본 명세서에 정의된 바와 같은 다가 분자를 이러한 목적에 사용할 수도 있다는 발견을 설명한다. 더 나아가서, 중요하게도, 본 발명자가 놀랍게도 이들 다가 분자를 사용하여, 핵산이 표적 세포로 보다 효율적으로 전달되어 그들 기능을 발휘할 수 있다는 것을 발견하였다. 예를 들어, 도 11 및 12는 이온화가능한 양이온성 지질 Dlin-MC3-DMA를 함유하는 aNP 또는 LNP 대조군 제제처럼, 세포로 특정 siRNA를 전달하여 루시퍼라제 리포터 유전자를 침묵화시키는데서 본 발명에 따른 몇몇 제제가 얼마나 더 효율적인지 설명한다. 또한, 도 14는 이온화가능한 양이온성 지질 ALC-0315를 함유하는 aNP 또는 LNP 대조군 제제와 비교하여, 세포로 특정한 mRNA를 전달하여 루시퍼라제 리포터 유전자를 발현하는데서 본 발명에 따른 제제가 얼마나 더 효율적인가를 설명한다. 도 16은 마우스의 비장 및 골수 조직으로 본 발명에 따른 제제의 효율적인 전달을 설명한다.
- [0128] a. 다가 분자
- [0129] 화학식 (I)에 따른 다가 분자는 덴드리머(-유사) 분자 구조를 갖는 분자이고, 다음의 3개 단위로 구성된다: 코어 단위, 분지 단위 (BU) 및 말단 단위 (TU). 임의로, BU는 생략될 수 있다.
- [0130]
$$[\text{코어}]_x - [\text{BU}]_y - [\text{TU}]_z \quad (I)$$
- [0131] 특히, 내부 코어-단위로부터, 다가 분자는 균일한 방식으로 외부 말단 단위 (TU)로 분지된다. 코어로부터 이동하여, 분자의 모든 분지 단위 (BU)는 2개 방향으로 분할되는데, 이들 방향 둘 모두는 다음 BU 또는 TU에 연결된다.
- [0132] 게다가, 본 명세서에 기술된 다가 분자는 특정한 별개의 세대를 갖는 것으로 정의된다. 0 세대 다가 분자 (G0, $y = 0$)는 BU가 없는 분자로서, 코어가 TU에 직접적으로 부착된다. 제1 세대의 다가 분자 (G1, $y = 1$)는 TU에 연결된 BU의 1개 층에 연결된 코어를 갖는 분자로서 정의되고, 제2 세대의 다가 분자 (G2, $y = 2$)는 BU의 제2 층에 연결된 BU의 제1 층에 연결된 코어를 갖는 분자로 정의되며, 여기서 이들 외부 제2 층 BU는 TU에 연결되며; 제3 세대의 다가 분자 (G3, $y = 3$)는 BU의 제3 층에 연결된 BU의 제2 층에 연결되는 BU의 제1 층에 연결된 코어를 갖는 분자로서 정의되고, 이들 외부 제3 층 BU는 TU에 연결되고, G4 ($y = 4$) 및 G5 ($y = 5$)도 마찬가지이다. 따라서, 글자 y 로 표시되는, 다가 분자의 세대수는 내부 코어로부터 외부 TU 기로의 이동으로 계수하여, 얼마나 많은 연속적인 BU 층이 다가 분자에 도입되는가를 의미한다.
- [0133] 예시 및 설명을 위해, 하기 도식 1은 다가 분자의 비제한적인 개략적인 예를 보여준다:
- [0134] 5-작용성 코어 ($x = 5$) 및 5개 TU 기 ($z = 5$)를 갖는, 세대 0 분자 (G0 물질, 즉, $y = 0$); 및

[0135] 4-작용성 코어 ($x = 4$) 및 8개 TU 기 ($z = 8$)를 갖는, 세대 1 분자 (G1 물질, 즉, $y = 1$); 및

[0136] 3-작용성 코어 ($x = 3$) 및 12개 TU 기 ($z = 12$)를 갖는, 세대 2 분자 (G2 물질, 즉, $y = 2$); 및

[0137] 2-작용성 코어 ($x = 2$) 및 16개 TU 기 ($z = 16$)를 갖는, 세대 3 분자 (G3 물질, 즉, $y = 3$),

[0138] 여기서 x , y 및 z 는 화학식 (I)의 x , y 및 z 를 의미한다. 도식 1에서, 모든 세대층의 분지 단위 BU는 이의 이의 번호로 표시된다.



[0139]

[0140] 도식 1: 본 발명의 수지상 다가 분자 구조의 예. G0, G1, G2 및 G3 분자가 도시된다. 명확함을 위해서, 제2 세대의 BU 층은 제1 또는 제3 세대층의 BU와 대조적으로, 굵게 표시된다 (G2 및 G3 분자 경우).

[0141] 다가 분자는 0 또는 1 또는 2 또는 3 또는 4 또는 5 세대 ($y = 0, 1, 2, 3, 4$ 또는 5)일 수 있다. 특정 구현예에서, 다가 분자는 세대 0 ($y = 0$)이다. 본 발명의 일 구현예에서, 다가 분자는 세대 1 ($y = 1$)이다.

본 발명의 일 구현예에서, 다가 분자는 세대 2 ($y = 2$)이다. 본 발명의 일 구현예에서, 다가 분자는 세대 3 ($y = 3$)이다. 본 발명의 일 구현예에서, 다가 분자는 세대 4 ($y = 4$)이다. 본 발명의 일 구현예에서, 다가 분자는 세대 5 ($y = 5$)이다.

[0142] 본 발명의 일 구현예에서, 다가 분자는 $y = 0$ 이거나 또는 $y = 1$ 이고, 보다 바람직하게 $y = 1$ 인, 하위 세대이다.

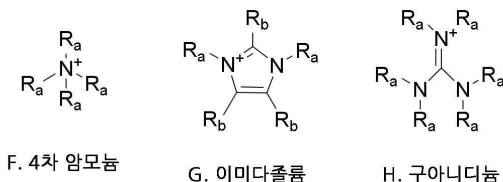
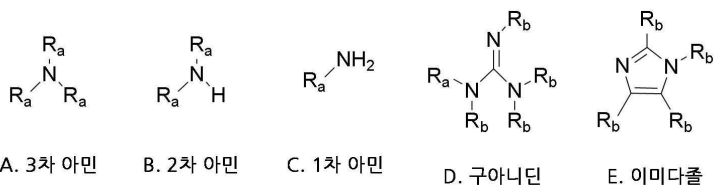
[0143] 본 발명의 일 구현예에서, 다가 분자는 $y = 2, 3, 4$ 또는 5 이고, 바람직하게 $y = 2$ 또는 $y = 3$ 이고, 보다 바람직하게 $y = 2$ 인, 상위 세대이다.

[0144] 양이온화가능한 기 및 양이온성 기

[0145] 다가 분자는 양이온화가능 및/또는 양이온성 기에서 다가이므로, 핵산에 효율적으로 결합하여 포획할 수 있다.

[0146] 양이온화가능한 기는 주변 pH에 따라서 양으로 하전되고, 충분히 낮은 pH에서 양자화될 수 있어서 양으로 하전된다. 양이온화가능한 기는 임의 종류의 아민 기일 수 있다. 아마이드, 에스테르, 에테르, 카르보네이트, 우레탄 및 우레아 기는 양이온화가능한 기가 아님을 유의한다. 특히, 양이온화가능한 기는 3차 아민, 2차 아민, 1차 아민, 구아니딘 및 이미다졸 기로부터 선택된다 (도식 2). 본 명세서에서 바람직한 것은 3차 아민, 1차 아민, 구아니딘 및 이미다졸 기이다. 보다 바람직한 것은 3차 아민 및 구아니딘 기이다. 가장 바람직한 것은 3차 아민 기이다.

[0147] 양이온성 기는 주변의 pH와 무관하게 양으로 하전되고, 이것은 양전하를 탈양자화 (손실)하거나 또는 양자화 (획득)할 수 없다. 양이온성 기는 임의 종류의 양이온성 기일 수 있다. 바람직하게, 양이온성 기는 질소 원자 또는 다수 (최대 3개, 예컨대 2개 또는 3개) 질소 원자를 함유한다. 양이온성 기는 바람직하게 4차 암모늄, 이미다졸륨 및 구아니디늄 기로부터 선택된다 (도식 2). 바람직한 양이온성 기는 4차 암모늄 및 이미다졸륨 기이다. 보다 바람직하게 4차 암모늄 기이다.



[0148]

[0149]

도식 2: 양이온화가능한 기 A 내지 E (본 명세서에서 화학식 A 내지 E라고도 함) 및 양이온성 기 F 내지 H (본 명세서에서 화학식 F 내지 H라고도 함). R_a 는 임의의 기 (O 또는 N 헤테로원자를 임의로 함유하는, 알킬, 알킬렌, 아릴, 아릴렌, 알킬렌아릴, 알킬렌아릴렌, 아릴렌알킬 또는 아릴렌알킬렌)일 수 있고, 수소는 아니다. R_b 는 유사하게 정의되지만, 이것은 수소일 수도 있다 (예를 들어, 화학식 E에서, 모든 4 R_b 기가 수소일 필요는 없다). A 내지 H 기에 바로 부착된 제1 원자는 탄소 또는 수소이고 헤테로원자는 아니다.

[0150]

다가 분자에서 양이온화가능 및/또는 양이온성 기의 누적수는 적어도 2이다. 바람직하게, 다가 분자에서 양이온화가능 및/또는 양이온성 기의 누적수는 3 이상, 4 이상, 5 이상, 6 이상, 8 이상, 10 이상, 12 이상, 또는 14 이상이다. 바람직하게, 다가 분자에서 양이온화가능 및/또는 양이온성 기의 누적수는 다가 분자에 대해 이산 개수이고, 평균값이 아니다.

[0151]

여기서, 바람직하게 이의 이웃하는 양이온화가능 및/또는 양이온성 기에 대해서, 적어도 3개 원자 - 바람직하게 탄소 원자만큼 간격을 둔 양이온화가능 및/또는 양이온성 기만이 계수된다. 예를 들어, 피페라진 고리 중 2개 아민은 계수되지 않는다.

[0152]

일 구현예에서 다가 분자 내의 모든 양이온화가능한 기 및/또는 양이온성 기는 서로 적어도 3개 원자만큼 간격을 두고, 이들 스페이서 원자는 탄소, 질소 및/또는 산소 원자이다.

[0153]

본 발명의 일 구현예에서, 다가 분자는 오직 양이온화가능한 기만을 갖고, 양이온성 기는 없다. 바람직하게, 양이온화가능한 전하는 코어 및 BU에 존재하고, TU에는 없다. 대안적으로, 양이온화가능한 전하는 코어, BU 및 TU에 존재한다. 다른 선택안에서, 양이온화가능한 전하는 코어 및 TU에 존재하지만, BU에는 없다. 마지막으로, 특정 구현예에서, 양이온화가능한 전하는 코어에만 존재한다. 본 발명의 이 구현예에서 양이온화가능한 기는 바람직하게 임의로 1차 아민 및/또는 구아니딘과 조합되는 3차 아민이고, 보다 바람직하게 양이온화가능한 기는 3차 아민이다.

[0154]

본 발명의 일 구현예에서, 다가 분자는 양이온화가능한 기 및 양이온성 기의 조합을 갖는다. 바람직하게, 양이온성 전하는 오직 코어에만 존재하고, BU 또는 TU에는 없다. 대안적으로, 양이온성 전하는 코어, 및 제1 세대 BU-층에 존재하고, 추가 BU나, TU에는 없다. 이들 방식으로, 다가 분자는 차폐된 양이온성기를 외부 양이온화가능한 기와 조합하여 생성된다. 이 구현예에서 양이온성 기는 바람직하게 4차 암모늄 기이고; 양이온화가능한 기는 바람직하게 3차 아민으로서, 임의로 구아니딘과 조합되며, 보다 바람직하게 이들 기는 3차 아민이다.

[0155]

본 발명의 일 구현예에서, 다가 분자는 양이온성 기만을 갖고, 양이온화가능한 기는 없다. 바람직하게, 양이온성 전하는 코어에 존재하지만, BU나 TU에는 없다. 대안적으로, 양이온성 전하가 코어 및 제2 세대 BU층에는 존재하지만, 추가 BU나 TU에는 없다. 이 구현예에서 양이온성 기는 바람직하게 임의로 구아니디늄과 조합되는, 4차 암모늄 기이고, 보다 바람직하게 이들 기는 오직 4차 암모늄 기이다.

[0156]

다중작용성 코어 (즉, 다가 분자의 중심)

[0157]

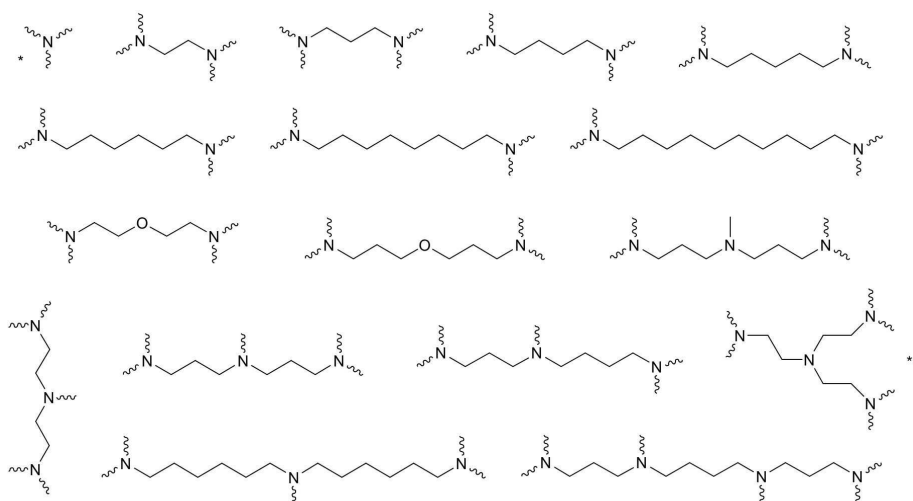
다가 분자는 화학식 (I): $[\text{코어}]_x - [\text{BU}]_y - [\text{TU}]_z$ 을 갖는다.

[0158]

화학식 (I)에서, 코어는 질소이거나, 또는 1 내지 15개 질소 헤테로원자를 함유하고 임의로 1 내지 4개 산소 헤테로원자를 함유한다.

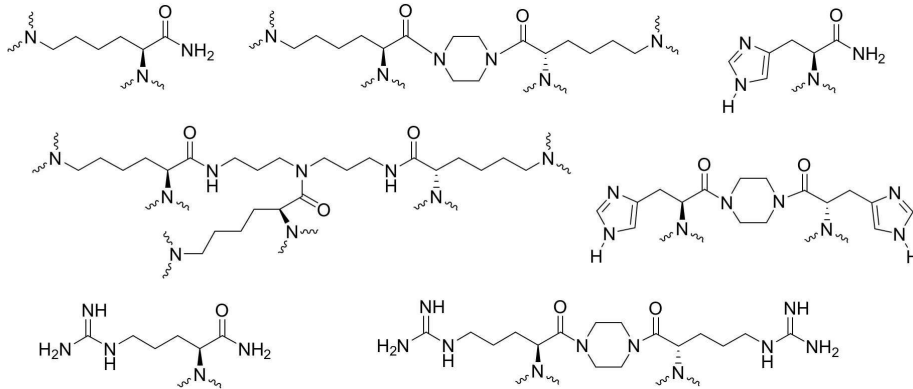
테로원자를 함유하는 C_1 - C_{18} 선형, 분지형 또는 환형 기이다.

- [0159] 다가 분자의 코어는 1 내지 15개 질소 원자, 바람직하게 2 내지 10개 질소 원자, 보다 바람직하게 2 내지 4개 질소 원자, 예컨대 2, 3 내지 4개 질소 원자를 함유한다. 이들 질소 원자는 아마이드, 우레탄 또는 우레아 기의 일부일 수도 있거나, 또는 그들은 다가 분자 내 양이온화가능한 기 또는 양이온성 기의 일부일 수도 있다. 바람직하게, 코어의 적어도 2개 질소 원자는 다가 분자 내 양이온화가능한 기 또는 양이온성 기의 일부이다. 바람직하게, 코어의 모든 질소 원자는 다가 분자 내 양이온화가능한 기 또는 양이온성 기의 일부이거나, 또는 그들은 아마이드 기의 일부이다. 보다 바람직하게, 코어의 모든 질소 원자는 다가 분자 내 양이온화가능한 기 또는 양이온성 기의 일부이다.
- [0160] 다가 분자 내 양이온화가능한 기 또는 양이온성 기의 일부인 코어의 질소 원자는 바람직하게 서로 적어도 3개 원자만큼 간격을 두고, 이들 스페이서 원자는 탄소, 질소 및/또는 산소 원자이고, 바람직하게 오직 탄소 원자이다.
- [0161] 코어는 작용기 예컨대 아마이드, 우레탄, 우레아 또는 에테르 기를 함유할 수도 있다. 이들 작용기로부터, 아마이드 및 에테르가 바람직하다. 아마이드가 보다 바람직하다. 그러나, 가장 바람직하게, 코어는 임의의 이들 작용기를 함유하지 않는다.
- [0162] 코어는 0 (코어가 질소인 경우) 내지 18개 탄소 원자, 바람직하게 2 내지 12개 탄소 원자, 및 보다 바람직하게 4 내지 10개 탄소 원자를 함유할 수도 있다.
- [0163] 코어는 0 내지 4개 산소 원자, 바람직하게 0 내지 2개 산소 원자, 및 보다 바람직하게 코어는 임의의 산소 원자를 갖지 않는다.
- [0164] 코어는 선형, 분지형 또는 환형 기일 수도 있고, 바람직하게 선형 또는 분지형, 보다 바람직하게 선형이다.
- [0165] 코어는 코어로부터 제1 세대 분지 단위 BU (또는 $y = 0$ 일 때, 말단 단위 TU)까지 x 개의 연결을 가지며, x 는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 12이고, 이들 연결은 모두 코어의 질소 원자로부터 분지 단위 BU (또는 말단 단위 TU)의 탄소 원자까지 이어진다.
- [0166] 바람직하게, x 는 2 이상이고, 보다 바람직하게 x 는 3 이상이고, 보다 더 바람직하게 x 는 4 이상이다. 바람직하게, x 는 이산 개수이고, 다수 코어를 설명하기 위해 평균 개수가 아니다. 바람직하게, 코어는 단일 독립체 (즉, 단일 화학적 기)이고, 독립체의 혼합물이 아니다. 예를 들어, 코어는 n -부틸렌-디아민 및 n -프로필렌-디아민 둘 모두가 아닌, n -부틸렌-디아민으로부터 유래된다.
- [0167] 본 발명의 일 구현예에서, 코어 단위의 질소 원자는 다가 분자에서 양이온화가능한 기의 일부이다.
- [0168] 하기 도식 3 및 4는 바람직한 코어 구조를 보여준다. 물결선 결합은 제1 세대 층의 BU, 또는 TU ($y = 0$ 인 경우)에 대한 연결을 의미한다. 따라서, 특정한 코어 단위에 대한 물결선 결합의 개수는 그 코어에 대한 x 값을 나타낸다.



- [0169]
- [0170] 도식 3: 예시적인 코어 구조로서, $x = 3$ (상단 좌측), $x = 4$ (처음 3개 행), $x = 5$ (아래 2개 행; 좌측 및 중

간), 및 $x = 6$ (하단 2개 행; 우측)이다. * (질소 코어) 또는 ** (분지된 코어)로 표시된 것을 제외하고, 모든 이들 코어는 선형이다.



[0171]

[0172] 도식 4: $x = 2, 4, 8$ 또는 12인, 리신, 히스티딘 또는 아르기닌 아미노산 빌딩 블록으로부터 유래되는 비제한적인 예의 코어 구조.

[0173] 코어 단위는 아민 작용성 분자로부터 유래된 것으로 볼 수 있는데, BU (또는 TU)에 대한 코어의 모든 x 연결이 수소 원자로 치환되면, 이들 아민 작용성 분자는 분명해 진다. 바람직하게, 코어 단위는 순수한, 즉 순도가 약 90% 이상, 바람직하게 약 97% 이상, 보다 바람직하게 약 98% 이상, 보다 더 바람직하게 약 99% 이상인 단일 화합물 아민으로부터 유래된다.

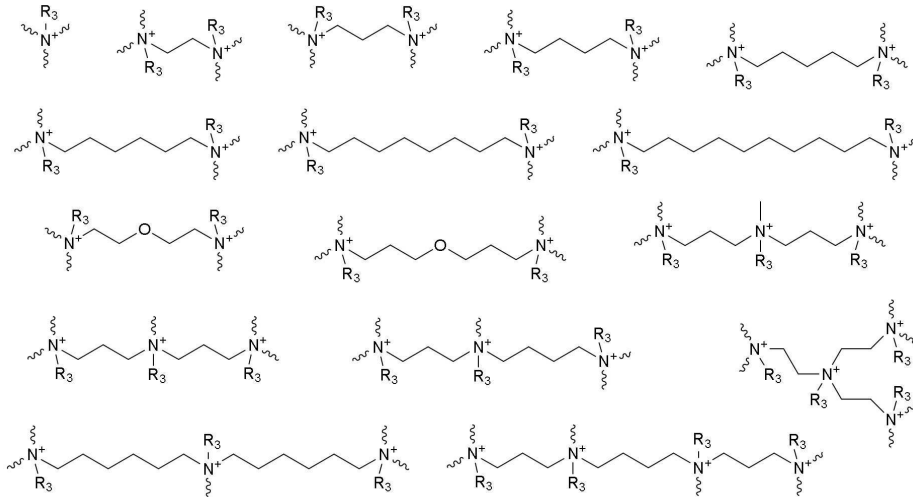
[0174] 따라서, 코어 단위는 바람직하게 암모니아, 1,2-디아미노-에탄, 1,3-디아미노-프로판, 1,4-디아미노-부탄 (또는 푸트레신), 1,5-디아미노-펜탄, 1,6-디아미노-헥산, 1,8-디아미노-옥탄, 1,10-디아미노-데칸, 2-(2-아미노에톡시)에틸아민, 3-(3-아미노프로폭시)프로필아민, 3,3'-디아미노-N-메틸디프로필아민, N-(3-아미노프로필)-1,3-프로판디아민 (또는 노르스페미딘), N-(4-아미노부틸)-1,4-부탄디아민, N-(6-아미노헥실)-1,6-헥산디아민, 스퍼민, 스퍼미딘 또는 N,N-비스(2-아미노에틸)-1,2-에탄디아민으로부터 유래된다. (3-(3-아미노프로폭시)프로필아민 및 3,3'-디아미노-N-메틸디프로필아민은 대안적으로 2개 n-프로필렌-질소 BU가 부착된, 각각 산소 또는 메틸-질소 코어로 볼수도 있음을 유의함). 이러한 그룹에서, 코어 단위는 보다 바람직하게 암모니아, 1,4-디아미노-부탄 (또는 푸트레신), 1,6-디아미노-헥산, 3,3'-디아미노-N-메틸디프로필아민, N-(3-아미노프로필)-1,3-프로판디아민 (또는 노르스페미딘), N-(4-아미노부틸)-1,4-부탄디아민, 스퍼민 또는 스퍼미딘으로부터 유래된다. 본 명세서에서 보다 더 바람직한 것은 암모니아, 1,4-디아미노-부탄 (또는 푸트레신) 또는 N-(3-아미노프로필)-1,3-프로판디아민 (또는 노르스페미딘)이다.

[0175] 더 나아가서, 코어 단위는 바람직하게 그들의 천연 발생 L-입체이성질 형태인, 아미노산 예컨대 리신, 아르기닌 또는 히스티딘으로부터 유래될 수 있다. 비제한적인 예는 이들 아미노산의 이량체 또는 삼량체로부터 유래된 코어 단위이거나, 또는 C-아미드화 아미노산 (암모니아, 또는 1차 또는 2차 아민을 사용함)으로부터 유래된 코어이고, 몇몇 예에 대해 도식 4를 참조한다.

[0176] 본 발명의 일 구현예에서, 코어 단위는 천연 발생 아민 작용성 분자, 예컨대 암모니아, 1,4-디아미노-부탄 (또는 푸트레신), N-(3-아미노프로필)-1,3-프로판디아민 (또는 노르스페미딘), 스퍼민, L-리신아미드 또는 L-아르기닌아미드로부터 유래된다. 본 명세서에서 바람직한 것은 암모니아, 1,4-디아미노-부탄 (또는 푸트레신), N-(3-아미노프로필)-1,3-프로판디아민 (또는 노르스페미딘) 또는 스퍼민이다. 보다 바람직한 것은 1,4-디아미노-부탄 (또는 푸트레신) 또는 N-(3-아미노프로필)-1,3-프로판디아민 (또는 노르스페미딘)이다.

[0177] 본 발명의 일 구현예에서, 코어 단위의 질소 원자는 다가 분자의 양이온성 기의 일부이다. 바람직하게, 이들 질소 원자는 4차 암모늄 기의 일부이다. 하기 도식 5는 이러한 구현예에 바람직한 코어 구조를 보여준다. 물건전 결합은 제1 세대 층의 BU, 또는 TU ($y = 0$ 인 경우)에 대한 연결을 표시한다. 따라서, 특정한 코어 단위에 대한 물건전 결합의 개수는 그 코어에 대한 x 값을 나타낸다. R_3 기는 메틸, 에틸, n-프로필, 벤질, 아세트아미드 ($-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$) 또는 2-히드록시-에틸렌 기이고, 바람직하게 메틸, 에틸, 벤질 또는 아세트아미드 기이고, 보다 바람직하게 메틸 또는 에틸 기이다. 편의상, 양이온을 중화시키는 반대 음이온 X^- 는 도식 5에 표시되지 않았다. 이러한 X^- 반대 음이온은 임의의 음이온일 수 있고, 또한 이중 또는 삼중 전

하 음이온일 수 있다. 바람직하게, X^- 는 클로라이드 Cl^- , 브로마이드 Br^- , 아이오다이드 I^- , 토실레이트 TsO^- , 카르보네이트, 옥살레이트, 술페이트 또는 포스페이트 음이온이다. 보다 바람직하게, X^- 는 클로라이드, 옥살레이트, 포스페이트, 또는 브로마이드이고, 가장 바람직하게 클로라이드 또는 포스페이트 (일수소- 또는 이수소 포스페이트 포함)이다.

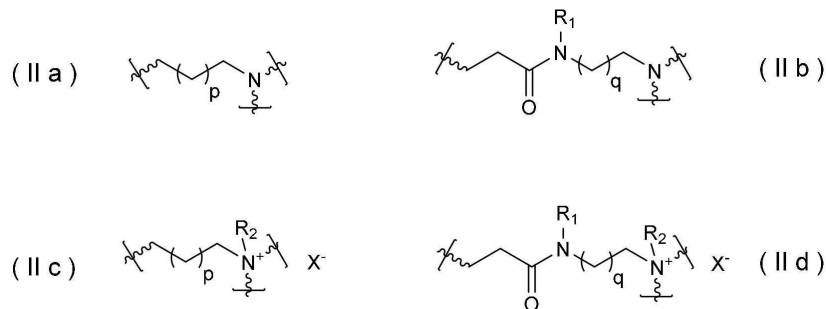


[0178]

[0179] 도식 5: 다가 분자의 일부인 양이온성 기를 갖는 코어 구조의 예. 편의상, 양이온을 중화시키는 반대 음이온 X^- 는 도식 5에 도시된 구조에는 도시되지 않는다.

[0180] 분지 단위 BU

[0181] 분지 단위 BU는 화학식 (IIa), (IIb), (IIc) 또는 (IId)를 갖는다:



[0182]

[0183] 화학식 (IIa)는 CH_2 -말단에서 코어 또는 코어에 더 가까운 BU에 연결되고, N-말단에서 2개 말단 단위 (TU) 또는 TU에 더 가까운 2개 분지 단위 (BU)에 연결되는 n-알킬렌-질소 스페이스를 나타내고, 연결은 물결선 결합으로 제공되고, p는 1, 2, 3 또는 4이다.

[0184] 바람직하게, (IIa)에서 p는 1 또는 2 또는 3이고, 바람직하게 1 또는 2이므로, (IIa)는 n-프로필렌-질소 스페이스, n-부틸렌-질소 또는 n-펜틸렌-질소 스페이스, 바람직하게 n-프로필렌-질소 스페이스, 또는 n-부틸렌-질소를 나타낸다. 보다 바람직하게, p는 1이고, (IIa)는 n-프로필렌-질소 스페이스를 나타낸다.

[0185] 화학식 (IIb)는 CH_2 -말단에서 코어 또는 코어에 더 가까운 BU에 연결되고, N-말단에서 2개 말단 단위 (TU) 또는 TU에 더 가까운 2개 분지 단위 (BU)에 연결되는 아마이드 함유 n-알킬렌-질소 스페이스를 나타내고, 연결은 물결선 결합으로 제공되고, q는 1, 2, 3, 4 또는 5이고, R_1 은 수소, 메틸, 에틸, n-프로필 또는 이소-프로필 기이다.

[0186] 바람직하게, (IIb)에서 q는 1, 2 또는 3이고, 보다 바람직하게 1 또는 2이고, 가장 바람직하게 1이다.

[0187] 바람직하게, (IIb)에서 R_1 은 수소 또는 메틸이고, 보다 바람직하게 R_1 은 수소이다.

[0188] 바람직하게, (IIb)에서 q는 1이고 R_1 은 수소이거나, q는 1이고 R_1 은 메틸이거나, q는 2이고 R_1 은 수소이거나, q

는 2이고 R_1 은 메틸이거나, 또는 q 는 3이고 R_1 은 수소이다. 보다 바람직하게, (IIb)에서 q 는 1이고 R_1 은 수소이거나, q 는 2이고 R_1 은 수소이거나, 또는 q 는 2이고 R_1 은 메틸이다. 보다 더 바람직하게, (IIb)에서 q 는 1이고 R_1 은 수소이다.

[0189] 화학식 (IIc)는 (IIa)에 대해 상기 정의된 것이고, 더욱이 R_2 는 메틸, 에틸, *n*-프로필, 벤질, 아세타미드 ($-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$) 또는 2-히드록시-에틸렌 기이고, X^- 는 4차 아민 양이온 모이어티에 대한 반대 음이온이다.

[0190] 바람직하게, (IIc)에서 R_2 는 메틸, 에틸 또는 벤질이고, 보다 바람직하게 메틸이다.

[0191] (IIc)에서, X^- 반대 음이온은 임의의 음이온일 수 있다. 바람직하게, X^- 는 클로라이드 Cl^- , 브로마이드 Br^- , 아이오다이드 I^- , 토실레이트 TsO^- 또는 이수소-포스페이트이다. 보다 바람직하게, X^- 는 클로라이드 또는 이수소-포스페이트이고, 가장 바람직하게 클로라이드이다.

[0192] (IIc)에서, X^- 반대 음이온은 또한 이중 또는 삼중 전하 음이온, 예컨대 카르보네이트, 옥살레이트, 술페이트, 일수소-포스페이트 또는 포스페이트 음이온일 수 있고, 보다 바람직하게 옥살레이트 또는 일수소-포스페이트 HPO_4^{2-} 음이온일 수 있다. 이들 경우에, 반대 음이온은 다수 분지 단위 (IIc)를 중화시킨다.

[0193] 바람직하게, (IIc)에서 R_2 는 메틸이고 X^- 는 클로라이드이거나, 또는 R_2 는 벤질이고 X^- 는 클로라이드이다.

[0194] 바람직하게, (IIc)에서 p 는 1이고, R_2 는 메틸이고 X^- 는 클로라이드이거나, p 는 1이고, R_2 는 벤질이고 X^- 는 클로라이드이거나, p 는 2이고, R_2 는 메틸이고 X^- 는 클로라이드이거나, 또는 p 는 2이고, R_2 는 벤질이고 X^- 는 클로라이드이다. 보다 바람직하게, p 는 1이고, R_2 는 메틸이고 X^- 는 클로라이드이거나, 또는 p 는 1이고, R_2 는 벤질이고 X^- 는 클로라이드이다.

[0195] 화학식 (IIId)는 상기 (IIb)에 대해 정의된 바와 같고, 더욱이 R_2 는 메틸, 에틸, *n*-프로필, 벤질, 아세타미드 ($-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$) 또는 2-히드록시-에틸렌 기이고, X^- 는 4차 아민 양이온 모이어티에 대한 반대 음이온이다.

[0196] 바람직하게, (IIId)에서 R_2 는 메틸, 에틸 또는 벤질이고, 보다 바람직하게 메틸이다.

[0197] (IIId)에서, X^- 반대 음이온은 임의의 음이온일 수 있다. 바람직하게, X^- 는 클로라이드 Cl^- , 브로마이드 Br^- , 아이오다이드 I^- , 토실레이트 TsO^- 또는 이수소-포스페이트이다. 보다 바람직하게, X^- 는 클로라이드 또는 이수소-포스페이트이고, 가장 바람직하게 클로라이드이다.

[0198] (IIId)에서, X^- 반대 음이온은 또한 이중 또는 삼중 전하 음이온, 예컨대 카르보네이트, 옥살레이트, 술페이트, 일수소-포스페이트 또는 포스페이트 음이온일 수 있고, 보다 바람직하게 옥살레이트 또는 일수소-포스페이트 HPO_4^{2-} 음이온일 수 있다. 이들 경우에, 반대 음이온은 다수 분지 단위 (IIId)를 중화시킨다.

[0199] 바람직하게, (IIId)에서 R_2 는 메틸이고 X^- 는 클로라이드이거나, 또는 R_2 는 벤질이고 X^- 는 클로라이드이다.

[0200] 화학식 (II-a), (II-b), (II-c) 및 (II-d)에 따른 바와 같은 분지 단위에서, 화학식 (II-a), (II-b) 및 (II-c)의 BU가 바람직하다. 보다 바람직한 것은 화학식 (II-a) 및 (II-b)의 BU이고, 가장 바람직한 것은 화학식 (II-a)의 BU이다.

[0201] 다가 분자 내에서, BU는 각각의 개별 세대층에 대해서 화학식 (IIa), (IIb), (IIc) 또는 (IIId)로부터 독립적으로 선택될 수 있고, 즉 제1 세대층 BU를 나타내는, 코어로부터 발산되는 제1 BU는 코어로부터 더 멀리에서 발산된 제2 BU (제2 세대층 BU를 나타냄)와 상이할 수 있고, 이것은 코어로부터 훨씬 더 멀리서 발산되는 제3, 제4 및 제5 BU와 상이할 수도 있다.

[0202] 본 발명의 일 구현예에서, 다가 분자의 BU는 각 세대 층에 대해 동일하다. 예를 들어, 다가 분자의 모든 BU

는 화학식 (IIa)로서, 예를 들어 $p = 1$ 인 것이다. 다른 예에서, 다가 분자의 모든 BU는 화학식 (IIa)로서, $p = 2$ 인 것이다. 다른 예에서, 다가 분자의 모든 BU는 화학식 (IIa)로서, $p = 3$ 인 것이다. 다른 예에서, 다가 분자의 모든 BU는 화학식 (IIb)로서, 예를 들어 $q = 1$ 이고 $R_1 = H$ 인 것이다.

[0203] 본 발명의 일 구현예에서, 화학식 (IIa) 및 (IIc)의 BU는 다가 분자 내에서 조합된다. 예를 들어, 제1 세대 층의 BU는 화학식 (IIc)에 따른 것인 한편, 다른 세대 층(들)의 BU는 (IIa) 유형의 것이다. 이러한 예에서, 다가 분자는 차폐된 내부 양이온성 기 및 보다 노출된 외부 양이온화가능한 기를 갖는다.

[0204] 본 발명의 일 구현예에서, 화학식 (IIb) 및 (IId)의 BU는 다가 분자 내에서 조합된다. 예를 들어, 제1 세대 층의 BU는 화학식 (IId)에 따른 것인 한편, 다른 세대 층(들)의 BU는 (IIb) 유형의 것이다. 이러한 예에서, 다가 분자는 차폐된 내부 양이온성 기 및 보다 노출된 외부 양이온화가능한 기를 갖는다.

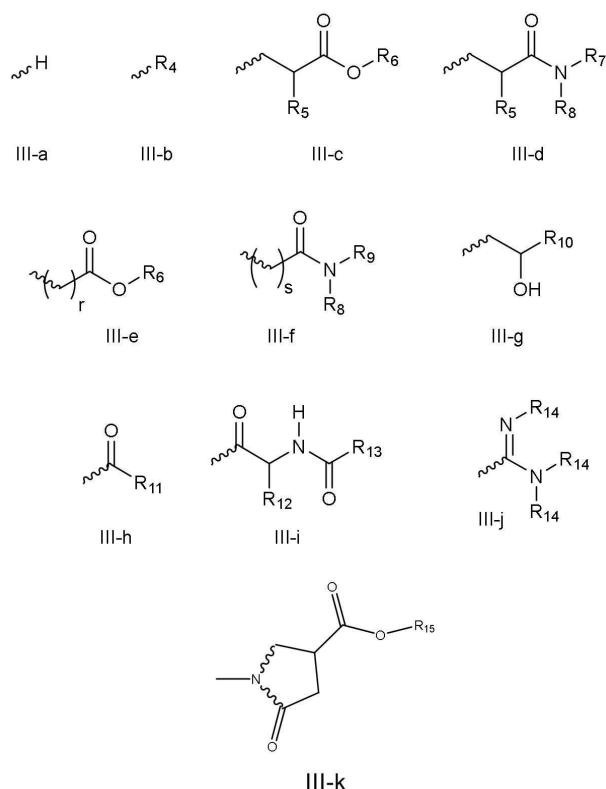
[0205] 본 발명의 일 구현예에서, 다가 분자는 임의의 분지기 BU를 갖지 않고, 그러면 y 는 0이다.

[0206] 말단 단위 TU

[0207] 화학식 (I)에서, 말단 단위 (TU)는 수소, 및 0 및 N으로 이루어진 군으로부터 개별적으로 독립적으로 선택되는 1 내지 8개 헤테로원자를 임의로 함유하는 C_1 - C_{30} 알킬, 아릴, 아릴렌-알킬 또는 알킬렌-아릴 기로부터 개별적으로 독립적으로 선택되고, 단 다가 분자의 모든 TU가 수소는 아니다.

[0208] 말단 단위는 작용기가 없을 수도 있고, 즉 탄소(들) 및 수소(들)만으로 이루어질 수 있다. 대안적으로, 말단 단위는 바람직하게 아미드, 우레탄, 우레아, 에스테르, 히드록시 및 에테르 기로부터 선택되는, 하나 이상의 작용기를 함유할 수도 있다. 이들 작용기 중에서, 아미드, 에스테르 및 히드록시 기가 바람직하다.

[0209] 화학식 (I)에서, TU는 화학식 (III-a) 내지 (III-j)에 따른 바와 같은 임의의 하기 그룹 (도식 6)에서 개별적으로 독립적으로 선택될 수 있다. 이들 모든 화학식에서, 물결선 결합은 외부 BU 또는 코어의 질소 원자에 대한 연결을 의미한다 ($y = 0$ 인 경우).



[0210]

[0211] 도식 6: TU 기에 대한 가능성을 나타내는 화학식 (III-a) 내지 (III-k). 물결선 결합은 BU, 바람직하게 외부 BU, 또는 코어에 대한 연결이다.

[0212] 화학식 (III-a)에서, TU는 수소이다.

[0213] 화학식 (III-b)에서, R₄ 기는 바람직하게 0 및 N으로부터 독립적으로 선택되는 헤테로원자를 임의로 함유하는,

선형 또는 분지형 C_1-C_{18} 알킬 기 또는 (치환된) 벤질 기이다. 보다 바람직하게 R_4 는 C_1-C_{12} 선형 또는 분지형 알킬 기 또는 벤질 기이다. 알킬 기는 포화 또는 불포화될 수 있고, 바람직하게 포화된다. 일부 구현예에서 알킬 기는 포화되거나 또는 1개, 2개 또는 3개 불포화를 갖는다. 임의로, R_4 는 양이온화가능한 기 또는 양이온성 기, 예컨대 3차 아민 또는 4차 암모늄 기를 포함한다.

[0214] 화학식 (III-c)에서, R_5 는 바람직하게 수소 또는 메틸 기이고, 보다 바람직하게 수소이다. 특정 구현예에서, 예컨대 R_5 가 메틸 기인 경우에, (III-c)의 입체-화학은 정의되지 않는다. R_6 기는 바람직하게 0 및 N으로부터 독립적으로 선택되는 헤테로원자를 임의로 함유하는, 선형 또는 분지형 C_1-C_{18} 알킬 기이고; 바람직하게 R_6 은 선형 또는 분지형 포화 또는 불포화 C_1-C_{17} 알킬 기로서, 0 및 N으로부터 독립적으로 선택되는 헤테로원자를 임의로 함유하는 것이다. 보다 바람직하게, R_6 은 선형 또는 분지형 C_2-C_{14} 알킬 기, 보다 더 바람직하게 선형 또는 분지형 C_4-C_{12} 알킬 기이다. 알킬 기는 포화 또는 불포화될 수 있고, 바람직하게 포화된다. 일부 구현예에서 알킬 기는 포화되거나 또는 1개, 2개 또는 3개 불포화를 갖는다.

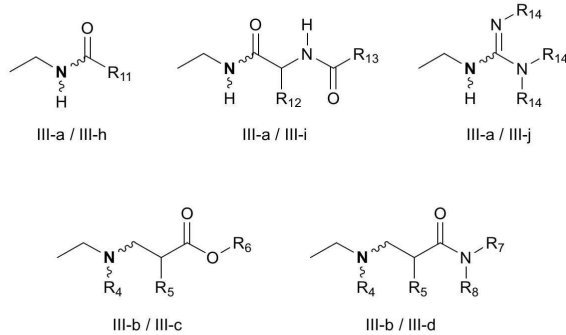
[0215] 화학식 (III-d)에서, R_5 는 바람직하게 수소 또는 메틸 기이고, 보다 바람직하게 수소이다. R_5 가 메틸 기인 경우에, (III-d)의 입체 화학은 정의되지 않는다. R_7 기는 바람직하게 0 및 N로부터 독립적으로 선택되는 헤테로원자를 임의로 함유하는, 선형 또는 분지형 C_1-C_{18} 알킬 기이다. 보다 바람직하게, R_7 은 선형 또는 분지형 C_2-C_{14} 알킬 기이고, 보다 더 바람직하게 선형 또는 분지형 C_4-C_{12} 알킬 기이다. R_8 기는 바람직하게 수소 또는 0 및 N으로부터 독립적으로 선택되는 헤테로원자를 임의로 함유하는, 선형 또는 분지형 C_1-C_{18} 알킬 기이다. 일부 구현예에서 R_8 은 수소이거나 또는 0 및 N으로부터 독립적으로 선택되는 헤테로원자를 임의로 함유하는, 선형 또는 분지형 C_1-C_{12} 알킬 기이다. 바람직하게, R_8 은 수소이거나 또는 산소 헤테로원자를 임의로 함유하는, 선형 또는 분지형 C_1-C_{16} 알킬 기이고; 바람직하게, R_8 은 수소이거나 또는 산소 헤테로원자를 임의로 함유하는, 선형 또는 분지형 C_1-C_{14} 알킬 기이고; 바람직하게, R_8 은 수소이거나 또는 산소 헤테로원자를 임의로 함유하는 선형 또는 분지형 C_1-C_{10} 알킬 기이다. 보다 바람직하게, R_8 은 수소이거나 또는 산소 헤테로원자를 임의로 함유하는 선형 또는 분지형 C_1-C_{12} 알킬 기이다. 보다 더 바람직하게 R_8 은 수소, 메틸, 2-히드록시에틸, 3-히드록시프로필 또는 C_2-C_8 알킬 기이다. R_7 또는 R_8 의 알킬 기는 포화 또는 불포화될 수 있고, 바람직하게 포화된다.

[0216] 화학식 (III-e)에서, $r = 0$ 또는 1이고, 바람직하게 1이거나, 또는 3 내지 10에서 선택된 수이고; r 은 바람직하게 1, 5 또는 10이고; 바람직하게 r 은 0, 1, 5 또는 10이다. 화학식 (III-e)에서, R_6 기는 바람직하게 0 및 N으로부터 독립적으로 선택되는 헤테로원자를 임의로 함유하는, 선형 또는 분지형 C_1-C_{18} 알킬 기이다. 보다 바람직하게, R_6 은 선형 또는 분지형 C_2-C_{14} 알킬 기이고, 보다 더 바람직하게 선형 또는 분지형 C_4-C_{12} 알킬 기이다. 알킬 기는 포화 또는 불포화될 수 있고, 바람직하게 포화된다. 일부 구현예에서 알킬 기는 포화되거나 또는 1개, 2개 또는 3개 불포화를 갖는다.

[0217] 화학식 (III-f)에서, $s = 0$ 또는 1이거나, 바람직하게 1이거나, 또는 3 내지 10에서 선택된 수이고; s 는 바람직하게 1, 5 또는 10이다. R_8 기는 바람직하게 수소이거나 또는 0 및 N으로부터 독립적으로 선택되는 헤테로원자를 임의로 함유하는, 선형 또는 분지형 C_1-C_{18} 알킬 기이다. 바람직하게 R_{10} 은 C_1-C_{16} 선형 또는 분지형 알킬 기이고; 바람직하게 R_{10} 은 C_1-C_{14} 선형 또는 분지형 알킬 기이다. 보다 바람직하게, R_8 은 수소이거나 또는 산소 헤테로원자를 임의로 함유하는 선형 또는 분지형 C_1-C_{12} 알킬 기이다. 보다 더 바람직하게 R_8 은 수소, 메틸, 2-히드록시에틸, 3-히드록시프로필 또는 C_2-C_8 알킬 기이다. R_9 기는 바람직하게 수소이거나 또는 0 및 N으로부터 독립적으로 선택되는 헤테로원자를 임의로 함유하는 선형 또는 분지형 C_1-C_{18} 알킬 기이다. 보다 바람직하게, R_9 는 수소 또는 선형 또는 분지형 C_2-C_{14} 알킬 기이고, 보다 더 바람직하게 수소 또는 선형 또는 분지형 C_4-C_{12} 알킬 기이다. R_8 또는 R_9 에서 알킬 기는 포화 또는 불포화될 수 있고, 바람직하게 포화된다.

- [0218] 화학식 (III-g)에서, R_{10} 기는 바람직하게 0 및 N으로부터 독립적으로 선택되는 헤테로원자를 임의로 함유하는, 선형 또는 분지형 C_1-C_{18} 알킬 기이다. 보다 바람직하게 R_{10} 은 C_4-C_{16} 선형 또는 분지형 알킬 기이다. 알킬 기는 포화 또는 불포화될 수 있고, 바람직하게 포화된다. 특정 구현예에서, (III-g)의 입체 화학은 정의되지 않는데, 히드록시 기가 비정의된 방식 (라세믹)으로 연결되기 때문이다. 임의로, (III-g)의 히드록시 기는 아실화되어서 에스테르 기를 생성한다.
- [0219] 화학식 (III-h)에서, R_{11} 기는 바람직하게 0 및 N으로부터 독립적으로 선택되는 헤테로원자를 임의로 함유하는, 선형 또는 분지형 C_1-C_{29} 알킬 기이다. 바람직하게 R_{11} 은 선형 또는 분지형 C_1-C_{27} 알킬 기이고, 바람직하게 R_{11} 은 선형 또는 분지형 C_1-C_{25} 알킬 기이고; 바람직하게 R_{11} 은 0 및 N으로부터 독립적으로 선택되는 헤테로원자를 임의로 함유하는, 선형 또는 분지형 C_1-C_{17} 알킬 기이다. 바람직하게 R_{11} 은 C_1-C_{15} 선형 또는 분지형 알킬 기이고; 바람직하게 R_{11} 은 C_1-C_{13} 선형 또는 분지형 알킬 기이고, 상기 기의 각각은 0 및 N으로부터 독립적으로 선택되는 헤테로원자를 함유한다. 보다 바람직하게 R_{11} 은 C_1-C_{11} 선형 또는 분지형 알킬 기이다. 알킬 기는 포화 또는 불포화될 수 있고, 바람직하게 포화된다. 일부 구현예에서 알킬 기는 포화되거나 또는 1개, 2개 또는 3개 불포화를 갖는다. 임의로, R_{11} 은 양이온화가능한 기 또는 양이온성 기, 예컨대 3차 아민, 구아니딘 또는 4차 암모늄 기, 바람직하게 3차 아민 또는 구아니딘 기를 포함한다.
- [0220] 화학식 (III-i)에서, R_{13} 기는 바람직하게 0 및 N으로부터 독립적으로 선택되는 헤테로원자를 임의로 함유하는, 선형 또는 분지형 C_1-C_{17} 알킬 기이다. 보다 바람직하게 R_{13} 은 C_1-C_{17} 선형 또는 분지형 알킬 기이다. 알킬 기는 포화 또는 불포화될 수 있고, 바람직하게 불포화된다. R_{12} 기는 바람직하게 아미노산, 보다 바람직하게 리신, 아르기닌 또는 히스티딘 (바람직하게 그들의 천연 발생 L-입체이성질 형태)의 잔기이거나, 또는 이러한 잔기의 유도체이다. 따라서, R_{12} 는 1차 아민, 구아니딘, 또는 이미다졸 기, 또는 이들 기의 임의의 유도체화를 함유할 수도 있으며, 그 결과로 이들 TU는 양이온화가능 또는 양이온성 기를 함유한다.
- [0221] 화학식 (III-j)에서, 말단 단위는 아미딘 기이다. 그러나, 이 기는 이것이 부착되는 코어 단위 또는 BU 단위의 질소 원자와 함께, 구아니딘 기를 형성한다는 것을 유의한다. R_{14} 기는 모든 위치에 대해서 독립적으로 선택될 수 있고, 바람직하게 수소 및 0 및 N으로부터 독립적으로 선택되는 헤테로원자를 임의로 함유하는, 선형 또는 분지형 C_1-C_{18} 알킬 기로부터 선택된다. 보다 바람직하게, R_{14} 기는 수소 및 선형 C_1-C_{12} 알킬 기로부터 선택된다. 알킬 기는 포화 또는 불포화될 수 있고, 바람직하게 포화된다.
- [0222] 화학식 (III-k)에서, R_{15} 는 0 및 N으로부터 독립적으로 선택되는 헤테로원자를 임의로 함유하는, 선형 또는 분지형 C_1-C_{18} 알킬 기이고; 바람직하게 R_{2a} 는 0 및 N으로부터 독립적으로 선택되는 헤테로원자를 임의로 함유하는, 선형 또는 분지형 포화 또는 불포화 C_1-C_{15} 알킬 기이다. 보다 바람직하게, R_{2a} 는 선형 또는 분지형 C_2-C_{13} 알킬 기이고, 보다 더 바람직하게 선형 또는 분지형 C_2-C_{11} 알킬 기이다. 알킬 기는 포화 또는 불포화될 수 있고, 바람직하게 포화된다. 일부 구현예에서 알킬 기는 포화되거나 또는 1개, 2개 또는 3개 불포화를 갖는다.
- [0223] 화학식 (III-a) 내지 (III-k)에 따른 바와 같은 말단 단위 TU 중에서, 화학식 (III-a) 내지 (III-j)의 TU가 바람직하고, 화학식 (III-b), (III-c), (III-d), (III-f), (III-g) 및 (III-j)의 TU가 보다 바람직하다. 보다 더 바람직한 것은 화학식 (III-b), (III-c), (III-d), (III-f) 및 (III-g)의 TU, 또는 화학식 (III-b), (III-c), (III-d) 및 (III-f)의 TU이다. 보다 더 바람직한 것은 화학식 (III-c), (III-d), (III-f) 및 (III-g) 또는 화학식 (III-c), (III-d), 및 (III-f)의 TU이다.
- [0224] 본 발명의 일 구현예에서, 다가 분자의 모든 TU는 동일하거나, 또는 동일한 화학식 (III) 유형이다. 바람직하게, 다가 분자의 모든 TU는 동일하다. 예를 들어, 다가 분자의 모든 TU는 화학식 (III-d)로서, 예를 들어, R_5 는 수소이고, R_8 은 수소이고, R_7 은 모든 TU에 대해 n-테실 기인 것이다. 다른 예에서, 다가 분자의 모든 TU는 화학식 (III-c)로서, 예를 들어, R_5 는 수소이고, R_6 은 모든 TU에 대해 n-옥틸 기인 것이다. 다른 예에서, 다가 분자의 모든 TU는 화학식 (III-g)로서, 예를 들어 R_{10} 은 모든 TU에 대해 n-테실 기이고, 바람직하게 히드록시 기는 모든 TU에 대해 무작위 (라세믹) 방식으로 연결된 것이다.

[0225] 본 발명의 일 구현예에서, 외부 BU 단위의 모든 질소는 화학식 (III)으로부터 선택되는 바와 같은 2개의 특정한 TU에 연결된다. 특정 구현예에서, 외부 BU의 모든 질소는 화학식 (III)으로부터 선택되는 바와 같은 2개의 특정한 TU에 연결되는 것이 바람직하다. 따라서, TU의 (약 또는 정확히) 50%는 첫번째 특정 선택 TU-1이고 (약 또는 정확히 50%), 두번째 특정 선택 TU-2이다. TU-1 및 TU-2의 적합한 조합은 (III-a) 및 (III-h); (III-a) 및 (III-i); (III-a) 및 (III-j); (III-b) 및 (III-c); (III-b) 및 (III-d)의 특정 조합이다. 명확함을 위해서, 이들 예의 하기 도식 7을 참조한다. 다른 조합 예는 (III-c) 및 (III-h); (III-d) 및 (III-h)의 것이다. 또 다른 조합 예는 (III-b), (III-d) 또는 (III-f)와 (III-j)의 것이다.



[0226]

[0227] 도식 7: 외부 분지 단위의 모든 질소 (이 질소는 굵게 표시됨)에서 치환된 TU-1 및 TU-2 조합의 예. 이들 5개 구조에 대한 특정 예는 다음과 같다: R_{11} 은 모든 말단 기에 대해 n -C9 기이고; R_{12} 는 L -리신 잔기이고, R_{13} 은 모든 말단 기에 대해 n -C11 기이고; 모든 R_{14} 기는 모든 말단 기에 대해 n -부틸 기이고; R_4 는 메틸이고, R_5 는 수소이고, R_6 은 모든 말단 기에 대해 n -옥틸 기이고; R_7 는 메틸이고, R_8 는 수소이고, R_9 는 n -옥틸 기이고, R_{10} 은 모든 말단 기에 대해 수소이다.

[0228] 본 발명의 일 구현예에서, 화학식 (III)으로부터 선택되는 바와 같은 2개 이상의 TU, 바람직하게 2, 3 또는 4개 TU, 보다 바람직하게 2개 TU는 다가 분자에 적용된다. 이 구현예에서 TU-1 및 TU-2 (또는 TU-1, TU-2 및 TU-3 등)는 외부 BU 단위의 질소 상에서 무작위적으로 분포될 수 있다. TU-1 및 TU-2는 약 1%-99% 내지 약 99%-1%, 바람직하게 약 10%-90% 내지 약 90%-10%, 보다 바람직하게 약 30%-70% 내지 약 70%-30% 범위인, 상이한 비로 풍부하게 존재할 수도 있다. TU-1 및 TU-2에 대한 적합한 조합은 (III-b) 및 (III-c), (III-d), (III-f), (III-g) 또는 (III-j)의 특정 조합; 또는 (III-h) 및 (III-c) 또는 (III-d)의 특정 조합이다. 바람직하게, 이 구현예에서, 선택된 TU는 특정한 TU이고, 예를 들어, TU-1은 R_4 가 메틸 기인 (III-b)이고, TU-2는 R_5 는 수소이고, R_7 은 n -옥틸 기이고, R_8 은 수소인 (III-d)이다.

[0229] 본 발명의 일 구현예에서 TU의 보다 큰 부분은 수소이다. TU의 총량에 대해서, TU의 10% 이상은 수소이거나, 또는 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 또는 70% 이상은 수소이다.

[0230] 화학식 (I)에서, z 는 다가 분자에 부착된 TU 기의 총 개수를 나타내고, z 는 1 내지 128이다. 바람직하게 z 는 4 이상이고, 보다 바람직하게 z 는 6 이상이고, 보다 더 바람직하게 z 는 8 이상이다. 본 발명의 일 구현예에서, z 는 10 이상이거나, 16 이상이거나, 또는 심지어 20 이상이다. 바람직하게, z 는 129 미만 또는 128 미만, 보다 바람직하게 80 미만, 보다 더 바람직하게 50 미만이다.

[0231] 다가 분자는 대체로 또는 전적으로 TU에 존재하는, 다수의 소수성 기를 포함하여서, 이 분자는 핵산을 캡슐화할 수 있고, 그리하여 다가 분자(들) 및 핵산(들)의 조립체 주변에 소수성 셸 또는 커버를 생성한다.

[0232] 따라서, 다가 분자의 모든 TU의 적어도 일부분 (즉, 일정 백분율)은 본질적으로 소수성이어서, 다가 분자 소수성 또는 양친매성이 되게 한다. 소수성 TU는 바람직하게 C_1 - C_{18} 알킬, 아릴, 아릴렌-알킬 또는 알킬렌-아릴 사슬을 포함한다. 보다 바람직하게, 이들 Tu, 바람직하게 소수성 Tu는 C_4 - C_{18} 지방족 알킬 사슬을 포함하고, 이러한 사슬은 선형 또는 분지형일 수도 있고, 본질적으로 포화 또는 불포화될 수도 있다. 화학식 (I)에서, 바람직하게 말단 기 TU의 적어도 5%는 본질적으로 소수성이거나, 또는 적어도 10%, 또는 적어도 20%, 또는 적어도 30%, 또는 적어도 50%, 또는 적어도 60%, 또는 적어도 70%, 또는 적어도 80%, 또는 적어도 90%는 소수성이다. 본 발명의 일 구현예에서 TU의 전부 - 또는 사실상 전부 (>97%)는 본질적으로 소수성이다.

- [0233] 다가 분자의 측면
- [0234] 본 발명의 일 구현예에서, 다가 분자는 단일 화합물이고, 즉 화합물의 혼합물이 아니다. 달리 말해서, 일 구현예에서, 본 명세서에 교시된 바와 같은 나노입자 내에서 모든 다가 분자는 동일하다. 다가 분자/화합물의 순도는 60% 이상, 바람직하게 85% 이상, 보다 바람직하게 90% 이상, 가장 바람직하게 95% 이상, 예컨대 99% 이상, 예를 들어, 100%이다. 이것은 전형적으로 G0, G1 및 G2 물질 ($y = 0, 1$ 또는 2)에 적용된다. 상위 세대 G3, G4 및 G5 물질 ($y = 3, 4$ 또는 5) 경우에, 다가 분자의 분산도 $D (= Mw/Mn)$ 는 전형적으로 약 1.2 미만, 바람직하게 1.1 미만, 보다 바람직하게 1.03 미만이다. 물질의 분산도 D 는 당분야에 공지된 방법, 예를 들어, GPC 측정 또는 MS-분광법 (참조: 예를 들어, Hummelen et al., Chem.Eur.J. 1997,3, 9, 1489-1493)으로 평가될 수 있다.
- [0235] 본 발명의 일 구현예에서, 다가 분자는 화합물의 혼합물이다. 달리 말해서, 일 구현예에서, 본 명세서에 교시된 나노입자는 상이한 다가 분자의 혼합물을 포함한다. 이들은 다가 분자에서 미정의된 입체-중심의 존재에 기인한 것일 수도 있다. 예는 라세믹 기원인 분지된 알킬 사슬의 다가 분자 내 존재이다. 다른 예는 다가 분자에서 입체 화학적으로 미정의된 (라세믹) 히드록시 기의 형성을 일으키는 에폭시-알킬 반응물의 사용이다. 따라서, 특정 구현예에서, 본 명세서에 교시된 바와 같은 나노입자 내 다가 분자는 순수하지 않을 수도 있지만, 본 명세서에 교시된 바와 같은 나노입자 내 모든 다가 분자 내의 원자의 연결성은 동일하다.
- [0236] 다가 분자는 특정한 코어를 가질 수도 있고, 특정한 세대 ($y = 0$ 또는 1 또는 2 또는 3 또는 4 또는 5 임)일 수도 있어서, 다가 분자는 균일하게 분포된 BU를 갖는 구조를 가질 수도 있다. 바람직하게, 모든 질소 말단기는 (III-a) 내지 (III-k)로부터 선택되는 바와 같은 동일한 특정한 TU가 부착된다 (또는 동일한 2개의 특정한 TU가 부착됨). 따라서, 본 발명의 다가 분자는 바람직하게 분자에 존재할 수도 있는 키랄 중심을 무시할 때, 바람직하게 대칭인 전체 형상을 갖는다.
- [0237] 특정 구현예에서, 본 발명의 다가 분자는 400 달톤 초과, 바람직하게 800 달톤 초과, 보다 바람직하게 1200 달톤 초과, 보다 더 바람직하게 1500 달톤 초과인 분자량을 갖는다. 특정 구현예에서, 본 발명의 다가 분자는 80 kDa 미만, 바람직하게 40 kDa 미만, 보다 바람직하게 20 kDa 미만, 보다 더 바람직하게 12 kDa 미만의 분자량을 갖는다.
- [0238] 분자 중 양이온화가능 및/또는 양이온성 기 ($\#N$)의 총 개수로 나눈 본 발명의 다가 분자의 분자량 (MW) (또는 다른 말로, 분자 중 양이온화가능 및/또는 양이온성 기의 총 개수에 대한 본 발명의 다가 분자의 분자량의 비)은 분자 중 이들 기의 농도를 의미한다. $MW/\#N$ 은 바람직하게 80 초과, 보다 바람직하게 150 초과, 가장 바람직하게 200 초과이다. $MW/\#N$ 은 바람직하게 900 미만, 보다 바람직하게 600 미만, 가장 바람직하게 450 미만이다. 이들 수는 본 발명의 다가 분자 중 핵산에 결합할 수 있는 기의 농도가 상당히 높을 수 있다는 것을 의미한다. 예를 들어, 당분야에서 이전에 사용된 양친매성 분자는 642 (DLin-MC3-DMA, 또는 MC3 경우) 및 766 (ALC-0315 경우)의 $MW/\#N$ 값을 갖는다.
- [0239] 본 발명의 다가 분자는 다가 효과로 인해서, 1가 양친매성 분자에 비해서 핵산에 더 강력하게 결합한다. 따라서, 핵산은 본 발명의 나노입자 내에서 더욱 잘 결합하고 유지된다.
- [0240] 또한, 본 발명의 다가 분자는 아포리포단백질 안정화제 (즉, 아포리포단백질, 아포리포단백질 유도체, 아포리포단백질 모방체 및/또는 아포리포단백질 모방체 유도체)와 상호작용할 수도 있는데, 이 단백질에 전체 음전하를 갖기 때문이다 (예컨대, 다음의 문헌에 기술된 바와 같음: Sparks DL, Lund-Katz S, Phillips MC. The charge and structural stability of apolipoprotein A-I in discoidal and spherical recombinant high density lipoprotein particles. J Biol Chem. 1992 Dec 25;267(36):25839-47. PMID: 1464598). 그 결과, 아포리포단백질, 아포리포단백질 유도체, 아포리포단백질 모방체 및/또는 아포리포단백질 모방체 유도체는 본 발명의 나노입자에 더욱 잘 부착된다. 그러므로, 순환계, 예를 들어, 혈액에서, 나노입자로부터 아포리포단백질 성분 (예를 들어, 아포리포단백질, 아포리포단백질 유도체, 아포리포단백질 모방체 및/또는 아포리포단백질 모방체 유도체)의 방출은 가능성이 적을 수도 있다.
- [0241] 표적화된 세포로 핵산의 형질감염은 본 발명의 다가 분자의 존재에 의해서 매우 잘 도움받을 수 있는데, 이들이 (골수) 세포 장벽에서 다가 인지질과 효율적으로 결합하고 상호작용할 수 있으므로, 핵산이 진입할 껍을 생성시킬 수 있기 때문이다.
- [0242] 본 발명의 다가 분자는 용액으로부터 처리될 수 있다. 따라서, 다가 분자는 바람직하게 극성이 다양한 용매 중에서 가용성이다. 그러므로, 다가 분자는 바람직하게 트리카프릴린, 에탄올 또는 이소-프로판올, 보다 바

람직하게 모든 트리카프틸린, 에탄올 및 이소-프로판올의 전체 3개에 가용성이다. 가용성은 약 20 mg의 다가 분자를 1 그램의 트리카프틸린, 에탄올 또는 이소-프로판올에서 교반하고, 모든 물질이 자발적으로 용해되어서 맑고/투명한 용액 (약 2 w/w% 농도)을 생성시키는지 여부를 평가하여 검토될 수 있다. 시험은 약 20°C (실온) 또는 약 37°C에서 수행될 수 있다. 바람직하게, 본 발명의 다가 분자는 이미 실온에서 가용성이다.

[0243] 본 발명의 일 구현예에서, 다가 분자는 에스테르, 아마이드 및/또는 히드록시 기를 포함한다. 이러한 기는 느린 생체내 분해를 위한 선택안을 제공하고, 다가 분자를 (더) 생체적합하게 만든다. 바람직한 기는 아마이드 및/또는 에스테르이다.

[0244] 본 발명의 다가 분자는 바람직하게 무독성이거나, 또는 그들은 그 자체로, 또는 핵산에 결합되었을 때, 제한된 독성을 갖는다. 독성 세포 시험은 당분야에 공지된 방법, 예컨대, 예를 들어, 세포 생존능 MTT 어세이, 또는 유사하거나 또는 비슷한 시험을 통해 실행될 수 있다.

[0245] **다가 분자의 합성**

[0246] 다가 분자는 임의의 적합한 합성 방법 또는 경로를 사용해 제조될 수 있다. 다중작용성 아민 빌딩 블록을 취하고, 아민에 대해 반응성이고 본질적으로 소수성인 분자로 이를 변형시켜서 편리하게 제조될 수 있다. 대안적으로, 2 이상의 아민-반응성 분자가 적용될 수 있으며, 이 중 적어도 하나는 본질적으로 소수성이다.

[0247] 특히 유용한 빌딩 블록은 (1차) 아민 작용성 덴드리머이다. 다른 유용한 빌딩 블록은 소형 다중작용성 아민 분자 예컨대 1,4-디아미노부탄 (또는 푸트레신), 3,3'-디아미노-N-메틸디프로필아민, N-(3-아미노프로필)-1,3-프로판디아민 (또는 노르스퍼미딘), N-(6-아미노헥실)-1,6-헥산디아민, 스퍼민, 스퍼미딘이다. 또 다른 유용한 빌딩 블록은 아미노산 예컨대 리신, 아르기닌 또는 히스티딘의 유도체, 예를 들어 L-리신, L-히스티딘 또는 L-아르기닌의 이량체 또는 삼량체 (예를 들어, 도식 4 참조), L-리신 또는 L-아르기닌의 이량체 또는 삼량체, 또는 이들 아미노산의 혼합 이량체 또는 삼량체이다.

[0248] 1차 아민 덴드리머의 적합한 예는 폴리(프로필렌 아민) (PPI) 덴드리머 또는 폴리(아미도-아민) (PAMAM) 덴드리머이다. 이들 유형의 덴드리머는 당분야에 공지되어 있다. 다음의 문헌에 PPI 및 PAMAM 덴드리머의 합성 및 분자 구조가 상세하게 기술되어 있다: "Materials science and technology series: Synthesis of polymers. Edited by A Dieter Schlueter, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim 1999; ISBN 3-527-26831-6; Chapter 12, pp 403-458; HM Janssen, EW Meijer, The synthesis and characterization of dendritic molecules".

[0249] 본 발명의 일 구현예에서, PPI-유형의 덴드리머는 다가 분자를 제조하기 위한 빌딩 블록으로서 사용된다.

[0250] 본 발명의 다른 구현예에서, PAMAM-유형의 덴드리머는 다가 분자를 제조하기 위한 빌딩 블록으로서 사용된다.

[0251] 1차 아민 PPI-덴드리머는 n-프로필렌-아민 분자 단위를 갖고, 대체로 1,4-디아미노-부탄으로부터 유래된 코어를 갖는 것에 대해 보고되어 있다. 이들 PPI는 화학식 (I)로 설명될 수 있고, 여기서 BU는 p = 1인 화학식 (II-a)에 따르고, 모든 TU는 수소이다. 표 1에는, G1 내지 G5 (y = 1 내지 5) PPI 빌딩 블록의 특성, 보다 특히 1,4-디아미노-부탄 유래 코어를 갖는 G1 내지 G5 (y = 1 내지 5) PPI 빌딩 블록의 특성이 정리되어 있다.

표 1: 1,4-디아미노부탄 기반 코어를 갖는 아민 종결된 PPI 덴드리머의 상세사항.

항목	PPI-세대	분자식	MW(달톤)	1 차 아민 말단 기 #	3 차 아민 내부 기 #
1	G1	C ₁₆ H ₄₀ N ₆	317	4	2
2	G2	C ₄₀ H ₉₆ N ₁₄	773	8	6
3	G3	C ₈₈ H ₂₀₈ N ₃₀	1687	16	14
4	G4	C ₁₈₄ H ₄₃₂ N ₆₂	3514	32	30
5	G5	C ₃₇₆ H ₈₈₀ N ₁₂₆	7168	64	62

[0252]

[0253] 1,4-디아미노-부탄 기반 코어를 사용하는 대신에, PPI를 생산하기 위해 다른 코어, 예컨대 암모니아 또는 비스(3-아미노프로필)아민으로부터 유래된 코어를 적용할 수도 있다. 표 2는 이들 2개 코어를 갖는 몇몇 PPI 빌

딩 블록의 특성을 강조한다.

표 2: 암모니아 (NH_3) 또는 비스(3-아미노프로필)아민 기반 코어를 갖는 아민 종결된 PPI 덴드리머의 상세사항.

항목	PPI-세대	코어 분자	분자식	MW (달톤)	1 차 아민 말단 기 #	3 차 아민 내부 기 #
1	G1	NH_3	$\text{C}_9 \text{H}_{24} \text{N}_4$	188	3	1
2	G2	NH_3	$\text{C}_{27} \text{H}_{66} \text{N}_{10}$	531	6	4
3	G3	NH_3	$\text{C}_{63} \text{H}_{150} \text{N}_{22}$	1216	12	10
4	G1	$\text{NH}(\text{nC3-NH}_2)_2$	$\text{C}_{21} \text{H}_{52} \text{N}_8$	417	5	3
5	G2	$\text{NH}(\text{nC3-NH}_2)_2$	$\text{C}_{51} \text{H}_{122} \text{N}_{18}$	988	10	8

[0254]

[0255]

1차 아민 PAMAM 덴드리머는 N-(2-아미노에틸)프로피온아미드 분지 단위 (BU)를 갖고, 대체로 1,2-디아미노-에탄 또는 암모니아로부터 유래된 코어를 갖는 것에 대해 보고되어 있다. 이들 PAMAM은 화학식 (I)로 설명될 수 있는데, 여기서 BU는 $q = 1$ 이고 $R_1 = \text{H}$ 인 화학식 (II-b)에 따른 것이고, 여기서 모든 TU는 수소이다. N-(2-아미노에틸)프로피온아미드 BU 및 다양한 코어를 갖는 몇몇 G1 및 G2 PAMAM 빌딩 블록의 특성은 표 3에 정리되어 있다.

표 3: 1,4-디아미노부탄, 비스(3-아미노프로필)아민 또는 1,2-디아미노에탄 코어로부터 유래된 아민 종결된 PAMAM 덴드리머의 특성. 모든 BU는 화학식 (II-b) ($q = 1$ 및 $R_1 = \text{H}$)를 따른다.

항목	PAMAM-세대	코어 분자	분자식	MW (달톤)	1 차 아민 말단 기 #	3 차 아민 내부 기 #
1	G1	$\text{H}_2\text{N-nC4-NH}_2$	$\text{C}_{24} \text{H}_{52} \text{N}_{10} \text{O}_4$	545	4	2
2	G2	$\text{H}_2\text{N-nC4-NH}_2$	$\text{C}_{64} \text{H}_{132} \text{N}_{26} \text{O}_{12}$	1458	8	6
3	G1	$\text{NH}(\text{nC3-NH}_2)_2$	$\text{C}_{31} \text{H}_{67} \text{N}_{13} \text{O}_5$	702	5	3
4	G2	$\text{NH}(\text{nC3-NH}_2)_2$	$\text{C}_{81} \text{H}_{167} \text{N}_{33} \text{O}_{15}$	1843	10	8
5	G1	$\text{H}_2\text{N-nC2-NH}_2$	$\text{C}_{22} \text{H}_{48} \text{N}_{10} \text{O}_4$	517	4	2
6	G2	$\text{H}_2\text{N-nC2-NH}_2$	$\text{C}_{62} \text{H}_{128} \text{N}_{26} \text{O}_{12}$	1430	8	6

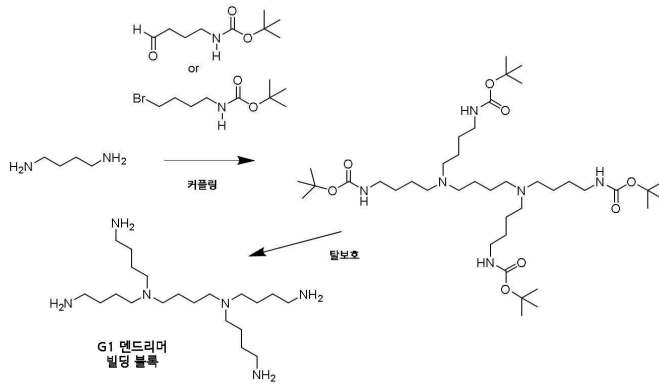
[0256]

[0257]

PPI-덴드리머와 유사한 덴드리머, 예컨대 폴리(부틸렌 이민) (PBuI), 폴리(펜틸렌 이민) (PPeI) 또는 폴리(헥실렌 이민) (PHeI) 덴드리머가 또한 특히 하위 세대 G1 또는 G2의 것에 적용될 수도 있다. 이들 덴드리머는 각각 $p = 2, 3$ 또는 4인 화학식 (II-a)에 따른 BU를 갖는다. 도식 8은 1차 아민 말단 기를 갖는 G1 폴리(부틸렌 이민) 덴드리머의 제조를 위한 예가 도시된다. G1 물질로부터 시작되는 2개 반응의 순서 반복으로 G2 물질이 제공된다. 유사하게, 폴리(펜틸렌 이민) 또는 폴리(헥실렌 이민) 덴드리머가 제조될 수 있다.

[0258]

본 발명의 일 구현예에서 폴리(부틸렌 이민) 덴드리머는 다가 분자를 제조하기 위한 빌딩 블록으로서 사용된다. 다른 구현예에서, 폴리(펜틸렌 이민) 덴드리머는 다가 분자를 제조하기 위한 빌딩 블록으로서 사용된다. 다른 구현예에서, 폴리(헥실렌 이민) 덴드리머는 다가 분자를 제조하기 위한 빌딩 블록으로서 사용된다.

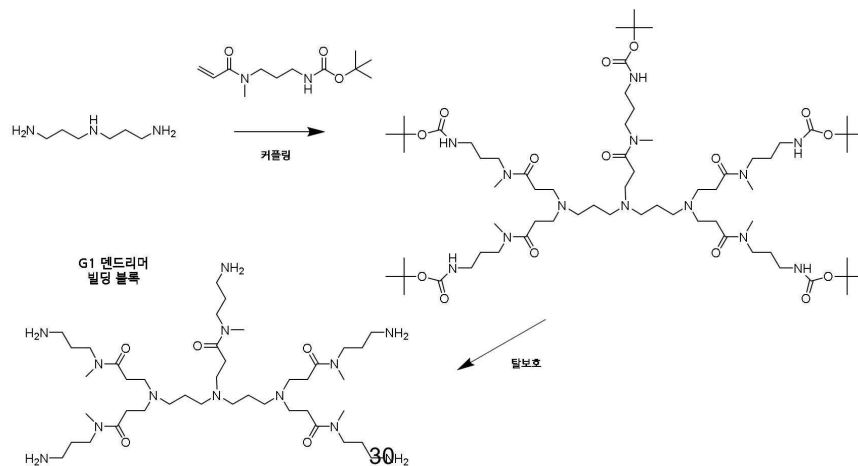


[0259]

[0260]

[0261]

N-(2-아미노에틸)프로피온아미드 BU를 갖는 PAMAM 덴드리머 다음으로, 다른 BU를 갖는 유사한 PAMAM 덴드리머가 특히 하위 세대 G1 또는 G2의 것에 적용될 수도 있다. 도식 9는 BU가 $q = 2$ 이고 $R_1 = \text{Me}$ 인 화학식 (II-b)에 따른 것인 G1 PAMAM 덴드리머의 제조를 위한 예를 도시한다. G1 물질로부터 시작한 2개 반응의 순서 반복으로 G2 물질이 제공된다.



[0262]

[0263]

[0264]

다양한 BU를 갖는 추가 G1 PAMAM 빌딩 블록은 유사한 합성 접근법으로 제조될 수 있고, 일부 예가 표 4 (1,4-디아미노부탄 기반 코어 사용) 및 표 5 (비스(3-아미노프로필)아민 기반 코어 사용)에 강조되어 있다.

표 4: 표시된 분자 단위 BU를 적용한, 1,4-디아미노부탄 코어로부터 유래된 G1 아민 종결된 PAMAM 덴드리머의 특성.

항목	PAMAM 세대	화학식 (II-b)의 BU	분자식	MW (달톤)	1차 아민 말단 기 #	3차 아민 내부 기 #
1	G1	$R_1 = \text{H}, q = 2$	$\text{C}_{28} \text{H}_{60} \text{N}_{10} \text{O}_4$	601	4	2
2	G1	$R_1 = \text{CH}_3, q = 2$	$\text{C}_{32} \text{H}_{68} \text{N}_{10} \text{O}_4$	657	4	2
3	G1	$R_1 = \text{H}, q = 3$	$\text{C}_{32} \text{H}_{68} \text{N}_{10} \text{O}_4$	657	4	2
4	G1	$R_1 = \text{H}, q = 5$	$\text{C}_{40} \text{H}_{84} \text{N}_{10} \text{O}_4$	769	4	2

[0265]

표 5: 표시된 분지 단위 BU 를 적용한, 비스(3-아미노프로필)아민 코어로부터 유래된 G1 아민 종결된 PAMAM 덴드리머의 특성.

항목	PAMA M 세대	화학식 (II-b)의 BU	분자식	MW (달톤)	1 차 아민 말단 기 #	3 차 아민 내부 기 #
1	G1	$R_1 = H, q = 2$	$C_{36} H_{77} N_{13} O_5$	772	5	3
2	G1	$R_1 = CH_3, q = 2$	$C_{41} H_{87} N_{13} O_5$	842	5	3
3	G1	$R_1 = H, q = 3$	$C_{41} H_{87} N_{13} O_5$	842	5	3
4	G1	$R_1 = H, q = 5$	$C_{51} H_{107} N_{13} O_5$	983	5	3

[0266]

[0267]

다가 분자의 제조를 위해서, 하위 세대 덴드리머가 바람직하다. 따라서, G1, G2 또는 G3 덴드리머가 바람직하다. 보다 바람직한 것은 G1 PPI, G1 PBUi, G1 PPEi 또는 G1 PAMAM 덴드리머 및 G2 PPI 또는 G2 PAMAM 덴드리머이다.

[0268]

다가 분자를 제조하기 위한 다른 빌딩 블록은 소형 다중작용성 아민 예컨대 N-(3-아미노프로필)-1,3-프로판디아민 (또는 노르스페르미딘), N-(6-아미노헥실)-1,6-헥산디아민, 스퍼민, 스퍼미딘이다. 이들 분자는 예를 들어, 바람직하게 TU에 직접적으로 연결되는데 사용될 수 있다.

[0269]

다음으로, 다중작용성 아민 빌딩 블록 - 예를 들어, 소형 다중작용성 아민 분자, PPI (또는 PBUi 또는 PPEi 또는 PHEi) 덴드리머, 또는 PAMAM 덴드리머 -은 반응물, 또는 몇몇 반응물과 전환되어서, 다가 분자를 획득한다. 하기 비제한적인 예는 어떻게 이것을 수행하는 가를 예시한다: 또한 화학식 유형 (III)에 대해 표시된 선택안은 도식 6을 참조한다.

[0270]

(III-a) 유형 TU의 도입. 아민 작용성 빌딩 블록은 1차 아민 반응성 기의 (소수) 부분에 대해 미반응인 채로 남겨진 경우, 또는 반응이 불완전한 경우에, $-NH_2$ 또는 $-NHR$ 수소는 본래 그대로 남아있다. 이것은 다가 분자 중 수소 TU를 획득하기 위한 한 방식이다.

[0271]

(III-b), (III-e) 또는 (III-f) 유형 TU의 도입. 아민 작용성 빌딩 블록은 O 및/또는 N 헤테로원자를 임의로 함유하는 알킬-할라이드, 알킬-토실레이트 또는 벤질-할라이드에 의해서 알킬화 또는 알킬렌-아릴화될 수 있다. 대안적으로, 알킬화 또는 알킬렌-아릴화는 알데히드 또는 케톤 작용성 분자 예컨대 예를 들어, 알킬-알데히드 또는 벤질-알데히드를 적용하는 환원적 아미노화 반응에 의해서 획득될 수 있다.

[0272]

(III-c) 유형 TU의 도입. 아민 작용성 빌딩 블록은 마이클 첨가에서 아크릴-에스테르 또는 메타크릴-에스테르, 바람직하게 아크릴-에스테르에 커플링될 수 있다. 전형적으로, 이들 에스테르는 선형 또는 분지형일 수도 있고, 포화 또는 불포화될 수도 있는, 알킬 사슬을 갖는다. 예는 에틸-아크릴레이트, n-부틸-아크릴레이트, n-옥틸-아크릴레이트, 2-에틸헥실-아크릴레이트, n-도데실-아크릴레이트, 이소-데실-아크릴레이트 또는 시트로넬릴-아크릴레이트, 바람직하게 에틸-아크릴레이트, n-부틸-아크릴레이트, n-옥틸-아크릴레이트, n-도데실-아크릴레이트, 이소-데실-아크릴레이트 또는 시트로넬릴-아크릴레이트이다. 바람직한 아크릴-에스테르는 C6-C12 아크릴-에스테르이고, C6-C12 알킬 기는 선형 또는 분지형일 수도 있고, 포화 또는 불포화될 수도 있다.

우리는 아크릴-에스테르가 2차 아민에 비해서 1차 아민과 (상당히) 더 빠르게 반응 (즉, 선택적 반응)한다는 것을 발견하였다. 따라서, 이것은 먼저 1차 아민 분자를 1몰 당량의 아크릴-에스테르와 반응시켜 모든 1차 아민을 2차 아민으로 전환시키는데 적용될 수 있다. 남은 2차 아민은 예를 들어, 아실화, 알킬화, 환원적 아미노화 등에 의해서 전환될 수 있다. 또한 단순히 물과광량의 아크릴-에스테르 반응물을 사용하여, 아크릴-에스테르로 모든 2차 아민을 전환시키는 것도 가능하다. 또한 먼저 제1 아크릴-에스테르에 이어서, 제2의 상이한 것을 도입시키는 것이 또한 가능하다. 바람직하게, 아민 작용성 빌딩 블록은 오직 하나의 아크릴-에스테르와만 반응한다. 이러한 반응은 이러한 특정한 아크릴-에스테르에 의해 1차 및 2차 아민 둘 모두의 완전한 전환을 야기할 수도 있다.

[0273]

(III-d) 유형 TU의 도입. 아민 작용성 빌딩 블록은 마이클 첨가에서 아크릴-아미드 또는 메타크릴-아미드, 바람직하게 아크릴-아미드에 커플링될 수 있다. 전형적으로, 이들 아미드는 선형 또는 분지형일 수도 있고, 포화 또는 불포화될 수도 있는, 알킬 사슬을 갖고, 그들은 알콜과 같은 작용기를 가질 수도 있다. 예에는

n-부틸-아크릴아미드, n-옥틸-아크릴아미드, n-데실-아크릴-아미드, N,N-디에틸아크릴아미드, N,N-디부틸-아크릴아미드, N-메틸-N-헥실-아크릴아미드 및 N-(2-히드록시에틸)-N-메틸 아크릴아미드, 바람직하게 n-부틸-아크릴아미드, n-옥틸-아크릴아미드, n-데실-아크릴-아미드, N,N-디에틸아크릴아미드, N,N-디부틸-아크릴아미드, 및 N-메틸-N-헥실-아크릴아미드가 있다. 아크릴-아미드는 전형적으로 2차 아민에 비해서 1차 아민과 더 빠르게 반응한다. 이러한 선택성은 먼저 1차 아민 분자를 아크릴-아미드와 반응시켜서 모든 1차 아민을 2차 아민으로 전환시키기 위해 적용될 수 있다. 이어서 나머지 2차 아민은 예를 들어, 아실화, 알킬화, 환원적 아미노화 등에 의해 전환될 수 있다.

[0274] 대안적으로, 아민 작용성 빌딩 블록은 먼저 아크릴-에스테르 (또는 메타크릴-에스테르)와 반응되고, 이후에 이들 에스테르는 1차 또는 2차 아민과 반응에 의해 아미드화된다. 에스테르는 또한 가수분해된 다음에 1차 또는 2차 아민으로 아미드화될 수도 있다.

[0275] (III-g) 유형 TU의 도입. 아민 작용성 빌딩 블록은 1,2-에폭시-알칸, 예컨대 예를 들어 1,2-에폭시-헥산, 1,2-에폭시-옥탄, 1,2-에폭시-데칸 또는 1,2-에폭시-도데칸을 사용하여 알킬화될 수 있다. 알칸은 선형 또는 분지형일 수도 있고, 포화 또는 불포화될 수도 있다. 이들 분자와 아민의 반응은 알킬 사슬 및 알콜 기 둘 모두의 도입을 제공한다. 바람직하게, 아민 작용성 빌딩 블록은 오직 하나의 1,2-에폭시-알칸과만 반응하여서, 이러한 특정한 1,2-에폭시알칸으로 1차 및 2차 아민 둘 모두의 완전한 전환을 야기한다. 임의로, 추가 반응 단계에서, 생성된 2차 알콜은 카르복실산, 활성 에스테르 또는 무수물, 예컨대 예를 들어 아세트산 무수물과 반응에 의해 아실화될 수 있다.

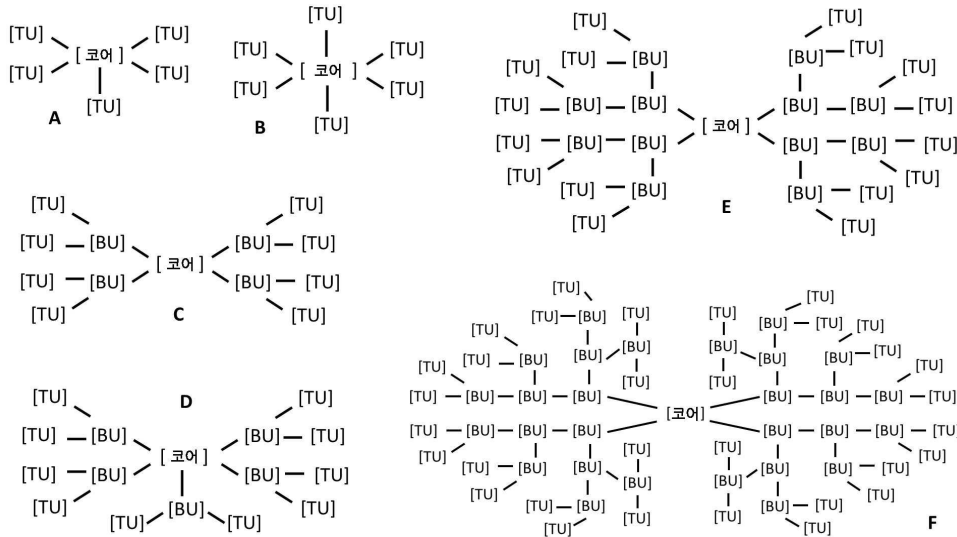
[0276] (III-h), (III-i) 및 (III-a) 유형 TU의 도입. 아민 작용성 빌딩 블록은 예를 들어, 카르복실산, 활성 에스테르 또는 무수물과 반응에 의해 아실화될 수 있다. 이러한 화학을 사용하여, 1차 아민은 아미드로 전환되는데, (III-h) 유형 및 (III-a) 유형의 TU가 동시에 생성된다는 것을 의미한다 (또는 (III-i) 및 (III-a) 유형). 도입된 알칸은 선형 또는 분지형일 수도 있고, 포화 또는 불포화될 수도 있다.

[0277] (III-j) 및 (III-a) 유형 TU의 도입. 아민 작용성 빌딩 블록은 구아니디닐화제와 반응할 수 있다. 이들 작용제는 1차 또는 2차 아민과 반응하여서 구아니딘 기를 제공한다. 이러한 작용제의 예에는 피라졸-유형 구아니디닐화제 예컨대 1-아미디노피라졸 히드로클로라이드, 1-카르바미도일-1,2,4-트리아졸 히드로클로라이드, 1-(N-Boc-아미디노)-피라졸, 1-(N-Cbz-아미디노)-피라졸, 또는 다른 분자 예컨대 N,N'-디-Boc-S-메틸-이소-티오우레아 및 N-Boc-S-메틸-이소-티오우레아가 있다. Boc 또는 Cbz 기의 탈보호는 구아니딘 기를 생성시킨다. 이러한 화학을 사용하여, (III-j) 유형 및 (III-a) 유형의 TU가 모든 1차 아민 말단 기에서 동시에 도입될 수도 있다.

[0278] 상기 전환 방법 중 하나, 또는 상기 방법의 조합은 선택된 다가 분자를 제조하는데 적용될 수 있다.

[0279] 양이온성 기는 3차 아민, 구아니딘 또는 이미다졸을 4차화하여서 다가 분자에 도입될 수 있다. 비제한적인 예에서, PPI (또는 PBuI 또는 PPeI 또는 PHeI) 또는 PAMAM 덴드리머 빌딩 블록에서 모든 1차 아민은 먼저 예를 들어 Boc-기로 보호될 수 있다. 이것은 도식 8 및 9에 도시된 것과 같은 분자를 제공한다. 다음으로, 내부 3차 아민은 알킬화제 예컨대 예를 들어, 메틸-아이오다이드 또는 벤질-할라이드와 반응을 통해서 암모늄 기로 4차화될 수 있다. Boc-기의 탈보호는 내부 4차 암모늄 양이온성 기를 비롯하여 외부 1차 아민을 갖는 PPI (또는 PBuI 또는 PPeI 또는 PHeI) 또는 PAMAM 빌딩 블록을 제공한다. 이들 외부 아민은 이어서 아민-반응성 분자에 의해 전환되어서 다가 분자, 보다 특히 분자의 내부에 양이온성 기를 갖는 다가 분자를 획득할 수 있다.

[0280] 도식 10에서 화학식 (IV-A) 내지 (IV-F)는 다가 분자에 대한 다양한 비제한적인 구현예, 보다 특히 화학식 (I)에 따른 바와 같은 다가 분자를 도시한다. 화학식 (IV-A) 및 (IV-B)는 G0 물질 (즉, BU 없음)을 보여주고, 화학식 (IV-C) 및 (IV-D)는 제1 세대 G1 덴드리머 (즉, 1 BU-층)를 보여주고, 화학식 (IV-E)는 제2 세대 G2 덴드리머 (2 BU-층)를 보여주고, 화학식 (IV-F)는 제3 세대 (G3) 덴드리머 (3 BU-층)를 보여준다.



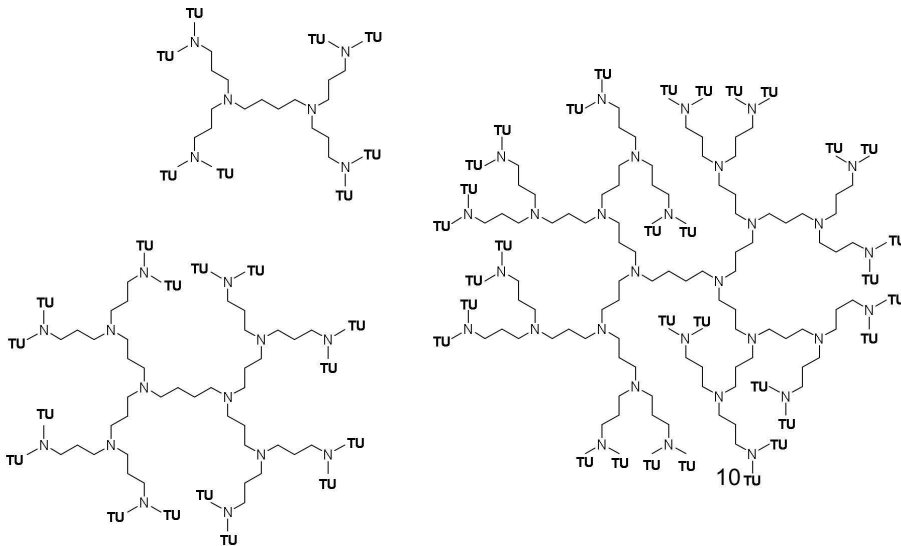
[0281]

[0282]

도식 10: 화학식 (IV-A) 내지 (IV-F)에 따른 바와 같은 다가 분자. (IV-A): $x=5, y=0, z=5$; (IV-B): $x=6, y=0, z=6$; (IV-C): $x=4, y=1, z=8$; (IV-D): $x=5, y=1, z=10$; (IV-E): $x=4, y=2, z=16$; (IV-F): $x=4, y=3, z=32$.

[0283]

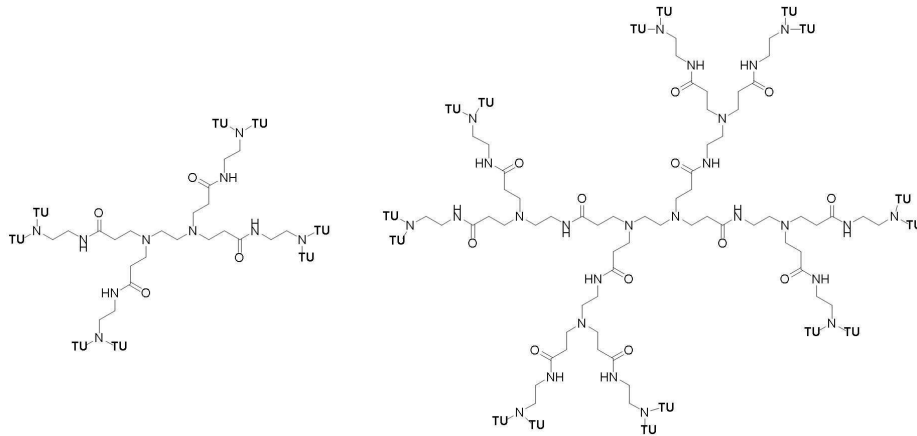
추가 구현예에서, 화학식 (IV-C) 내지 (IV-F)에 따른 다가 분자는 폴리(프로필렌 이민) (PPI) 덴드리머 및 PAMAM 덴드리머, 또는 이의 변형으로부터 선택된다. 도식 11은 1,4-디아미노부탄으로부터 유래되는 코어를 갖는 제1 G1, 제2 G2 및 제3 G3 세대의 PPI 덴드리머의 예를 보여준다. 도식 12는 1,2-디아미노에탄으로부터 유래되는 코어를 갖는 제1 G1 및 제2 G2 세대의 PAMAM 덴드리머의 예를 보여준다. 폴리(부틸렌 이민) (PBI) 덴드리머, 폴리(헥실렌 이민) (PHeI) 덴드리머, 폴리(옥틸렌 이민) (POI) 덴드리머, 폴리(데실렌 이민) (PDeI) 덴드리머, 폴리(도데실렌 이민) (PDdI) 덴드리머, 폴리(헥사데실렌 이민) (PHdI) 덴드리머가 또한 적용될 수도 있다. 도식 13은 1,4-디아미노부탄으로부터 유래되는 PBI, PHeI 및 PDeI 덴드리머의 G1 예를 보여준다.



[0284]

[0285]

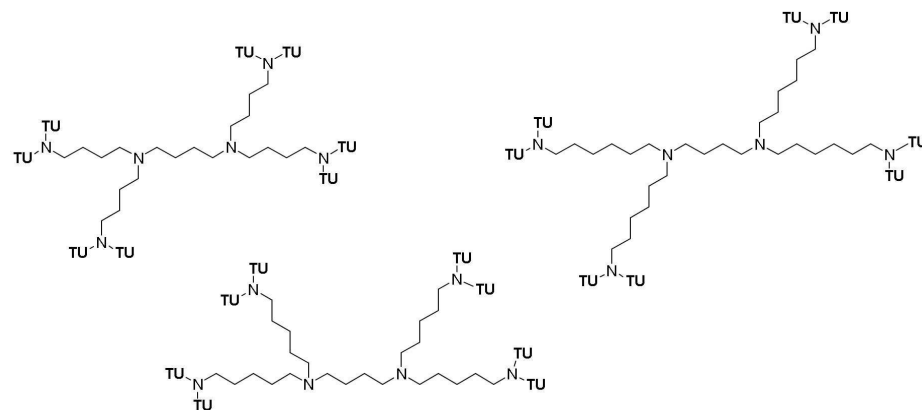
도식 11: n -부틸렌-디아민 유래된 코어를 갖는 G1, G2 및 G3 PPI 덴드리머 (상단 좌측부터 시계 반대 방향으로) (화학식 IIa에서 $p=1$).



[0286]

[0287]

도식 12: n -에틸렌-디아민 유래된 코어를 갖는 G1 및 G2 PAMAM 덴드리머 (화학식 IIb에서 $q = 1$ 및 $R_1 = H$).



[0288]

[0289]

도식 13: n -부틸렌-디아민 유래된 코어를 갖는 G1 PBI, G1 PPEI 및 G1 PHEI 덴드리머 (화학식 Ia에서 각각 $p = 2, 3$ 및 4).

[0290]

b. 안정화제

[0291]

안정화제는 나노입자를 안정화시키는 기능을 갖고, 예를 들어 나노입자의 붕괴를 방지하거나 또는 응집을 방지하기 위한 작용체로서 제공될 수 있다. 안정화제는 단백질, 다당류 또는 다른 (거대)분자, 또는 예를 들어 나노입자의 성분 (예를 들어, 인지질 또는 지질에 접합됨)과 단백질, 다당류 또는 다른 (거대)분자의 접합체일 수도 있다. 안정화제는 또한 나노입자의 크기를 제어하고 이의 저장 수명을 증가시키는데 사용될 수도 있다. 적합한 안정화제의 비제한적인 예는 아포리포단백질, 아포리포단백질 유도체, 아포리포단백질 모방체 및/또는 아포리포단백질 모방체 유도체이다. 안정화제의 다른 비제한적인 예는 친수성 중합체 또는 친수성 중합체 변형된 분자, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 또는 폴리에틸렌 글리콜 변형된 분자; 다당류 또는 다당류 변형된 분자; 폴리사르코신 또는 폴리사르코신 변형된 분자; 또는 폴리(2-옥사졸린) 또는 폴리(2-옥사졸린) 변형된 분자이다.

[0292]

원칙적으로 안정화제는 입자의 외부층에 주로 존재한다. 그러나, 안정화제는 예를 들어 PEG 및 (인)지질의 접합체일 수도 있다는 것을 이해하며, 이 경우에 PEG는 나노입자 바로 주변의 수층에 주로 존재하는 한편, 접합된 지질은 아마도 PEG로 변형되지 않은 다른 (인)지질 옆에서, 나노입자의 외부층에 주로 존재한다.

[0293]

안정화제가 비-천연 합성 기, 예컨대 예를 들어 상기 언급된 폴리에틸렌 글리콜, 폴리사르코신 또는 폴리(2-옥사졸린) 중합체 사슬 중 하나를 함유하는 경우에, 이것은 덜 바람직할 수 있는데, 이러한 기가 (빈번하게) 반복된 투여 시에 면역 반응을 유발시킬 수도 있기 때문이다. 더 나아가서, 이러한 중합체 기는 일반적으로 비부착성 특징을 갖는데, 이러한 기를 노출하는 나노입자는 세포와 상호작용할 때 장벽을 경험할 수도 있다는 것을 의미한다. 따라서, 단백질 또는 펩티드-기반 안정화제가 바람직하다.

[0294]

특정 구현예에서, 안정화제는 아포리포단백질, 아포리포단백질 유도체, 아포리포단백질 모방체 및/또는 아포리포단백질 모방체 유도체이다. 아포리포단백질은 그들의 구조 및 양친매성 특징으로 인해서 (인)지질 층에

대한 고유한 친화성을 갖는 천연 나선형 단백질이지만, 이들 물질은 전통적인 친수성 머리부/소수성 꼬리부 양친매성 물질이 아니다. 몇개 부류의 아포리포단백질이 존재하고, 모두 나노입자 체제에 대한 구조적 성분으로서 사용될 수 있다. 아포리포단백질 통합은 구조적 안정성을 제공하여 나노입자의 물리화학적 성질 및 저장 수명에 영향을 미친다. 더 나아가서, 아포리포단백질의 존재는 나노입자의 생물학적 거동을 조절한다.

예를 들어, 아포리포단백질 A1은 스캐빈저 수용체 클래스 B 유형 1 (SRB1) 및 ATP-결합 카세트 수용체 ABCA1을 통해서 세포와 상호작용한다. 이것은 림프 기관의 골수 세포와 나노입자의 상호작용을 증가시킨다.

[0295] 아포리포단백질, 예를 들어 apo A1을 사용하여, 나노입자는 특정한 세포, 조직 또는 장기에 성공적으로 표적화될 수 있지만, 예를 들어 골수 구획에 제한되지 않는다는 것을 발견하였다. 이것은 대상체의 특정한 세포가 반응을 자극하거나 또는 억제하기 위해 약물에 의해 표적화될 수 있다는 장점을 갖는다. 예를 들어, 면역 세포는 면역 반응을 자극 또는 억제하기 위해 표적화될 수 있다. 이러한 사용이 유리할 것으로 여겨지는 몇몇 치료적 적용 분야, 예컨대 암, 심혈관 질환, 자가면역 장애, 및 이종이식 거부 등이 있지만, 이에 제한되지 않는다.

[0296] 특정 구현예에서, 아포리포단백질, 아포리포단백질 유도체, 아포리포단백질 모방체 및/또는 아포리포단백질 모방체 유도체는 골수 세포 구획을 표적화하는 아포리포단백질, 아포리포단백질 유도체, 아포리포단백질 모방체 및/또는 아포리포단백질 모방체 유도체, 바람직하게 apoA1 또는 이의 모방체 또는 유도체이다.

[0297] 본 명세서에 기술된 나노입자가 안정화제로서 아포리포단백질을 사용하는 경우에, HDL 입자와 동일한 외부를 갖기 때문에, 나노입자는 이의 의도하는 표적, 예를 들어 골수 구획에 도달하기 전에 면역계에 의한 나노입자의 조기 분해 또는 청소를 일으킬 수도 있는 면역 반응을 촉발시키지 않는다.

[0298] 본 명세서에서 사용할 때 용어 아포리포단백질은 지질과 함께 리포단백질을 형성하는 단백질, 즉 지질 및 단백질의 조립체를 의미한다. 아포리포단백질은 전형적으로 혈중에서 지질 및 지용성 물질을 수송하는 기능을 한다. 아포리포단백질이 기술되어 있고, apo A1, apo A1-Milano, apo A2, apo A4, apo A5, apo B48, apo B100, apo C-I, apo C-II, apo C-III, apo C-IV, apo D, apo E, apo F, apo H, apo L 및 apo M을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 특정 구현예에서, 아포리포단백질 안정화제 또는 성분은 아포리포단백질 유도체일 수도 있다. 아포리포단백질 유도체는 예를 들어, 단백질로부터 1-단계 전환에서 생성되는, 아포리포단백질의 단순 변형일 수도 있다. 본 명세서에서 사용되는 경우에, 용어 아포리포단백질은 또한 아포리포단백질 모방체를 의미할 수도 있다. 아포리포단백질 모방체는 아포리포단백질의 성질을 모방하는 짧은 펩티드이다. apo A1 모방체 펩티드의 예는 일반적으로, **18A**라고 하는데, 이것은 DWLKAF YDKVAE KLKEAF (SEQ ID NO: 1)이고, 비작용화된 N-말단 및 C-말단을 갖는다. 다른 보고된, 보다 편리하고, 또한 더 활성이 있는 모방체는 **2F**로서, 아세타미드 캡핑된 N-말단 및 아미드 C-말단을 갖는 **18A** (SEQ ID NO: 1)이다. 다음의 문헌에 apo A1 펩티드 모방체의 더 많은 예가 특히 표 2 및 표 3에 보고되어 있다: Leman, L.J. et al., J. Med. Chem. 2014, 57, 2169-2196 (10.1021/jm4005847). Apo A1 펩티드 모방체 유도체, 예컨대 이량체, 삼량체 및 사량체 펩티드는 다음의 문헌에 예시된다: Zhou et al., J. Am. Chem. Soc. 2013, 135, 13414-13424 (dx.doi.org/10.1021/ja404714a). 바람직한 apo A1 펩티드 모방체 또는 펩티드 모방체 유도체는 **18A**, **2F** 및 **4F**, 및 이들 펩티드의 임의의 이량체이다. 바람직한 apoA1 펩티드 모방체는 **18A**, **2F** 및 **4F**, 및 이들 펩티드의 임의의 이량체이다. 보다 바람직한 것은 **2F** 및 이 펩티드의 임의의 이량체 또는 삼량체이다.

[0299] 아포리포단백질은 지질에 결합하여 리포단백질을 형성하는 단백질이다. 그들은 혈액, 뇌척수액 및 림프에서 지질 및 지용성 비타민을 수송한다. 리포단백질의 지질 성분은 수불용성이다. 그러나, 그들의 양친매성 성질때문에, 아포리포단백질, 및 다른 양친매성 분자 예컨대 인지질은 지질을 둘러싸서, 그 자체로 수용성인 리포단백질 입자를 생성하고, 따라서 물-기반 순환 (즉, 혈액, 세포의 유체, 림프)을 통해서 운반될 수 있다. 리포단백질 구조를 안정화시키고 지질 성분을 가용화시키는 것 이외에도, 아포리포단백질은 리포단백질 수용체 및 지질 수송 단백질과 상호작용하여서, 리포단백질 흡수 및 청소에 관여한다. 그들은 또한 리포단백질의 물질대사에 관여되는 특정한 효소에 대한 효소 보조인자로서 제공된다.

[0300] 아포리포단백질 A1은 인간에서 APOA1 유전자에 의해 코딩되는 단백질이다. HDL 입자의 주요 성분으로서, 지질 물질대사에서 특별한 역할을 갖는다. HDL 입자의 성분으로서 단백질은 LDL 입자 또는 배출을 위해 간으로 돌아가는 것을 포함하여, 다른 곳으로 (세포 밖 물에서) 수송을 위해 세포 (산화된 LDL 입자로부터 섭취된 지방에 의해 과부화된 동맥벽 내 마크로파지를 포함함) 내에서 부터 지방을 수용하여 지방 분자의 유출을 가능하게 한다.

[0301] 임의의 아포리포단백질이 나노입자에서 사용될 수도 있다고 여겨진다. 그러므로, 일 구현예에서 아포리포단

백질은 apo A1, apo A1-Milano, apo A2, apo A4, apo A5, apo B48, apo B100, apo C-I, apo C-II, apo C-III, apo C-IV, apo D, apo E, apo F, apo H, apo L 및 apo M, 및 이의 조합으로부터 선택되고, 바람직하게 apo A1, apo A2, apo A4, apo A5, apo B100, apo C-I, apo C-II, apo C-III, apo C-IV 및 apo E로부터 선택되고, 보다 바람직하게 apo A1, apo A4, apo A5, apo B100, apo C-III 및 apo E로부터 선택되고, 보다 더 바람직하게 apo A1, apo B100 및 apo E로부터 선택된다. 특히 바람직한 구현예에서, 아포리포단백질은 apo A1인데 이것이 골수 구획으로 나노입자의 표적화를 허용하기 때문이다. 대안적인 바람직한 구현예에서, 아포리포단백질은 apo E이고 이것이 수지상 세포로 나노입자의 표적화를 허용하기 때문이다.

- [0302] 아포리포단백질은 당분야에 공지된 방법, 예컨대 이. 콜라이 박테리아, 또는 다른 유기체로부터 재조합 단백질 발현에 이어서, apo A1을 충분히 순수한 형태로 분리하는데 필요한 단계를 통해서 생산되고 정제될 수 있다.
- [0303] 표적 부위로 핵산을 전달하기 위해 나노입자에서 아포리포단백질을 사용하는 것과 연관된 몇몇 장점이 존재한다는 것을 본 발명자가 발견하였다. 우선, 아포리포단백질은 제조 및 저장 동안 응집을 방지하여서 나노입자를 안정화시킨다. 나노입자를 안정한 에멀션으로 유지시키기 위해서, 나노입자가 응집 또는 융합되지 않는 것이 필수적인데, 응집 또는 융합되면 입자의 침전을 야기할 수도 있다. 아포리포단백질은 입자를 안정화시키고 응집을 방지하는데 도움을 준다. 또한, 아포리포단백질은 나노입자의 생체내 안정성을 보장한다. 아포리포단백질은 혈류에서 순환하는 지질 입자, 예컨대 LDL 및 HDL에 천연적으로 존재하기 때문에, 그들은 면역계에 의해서 비-자기로서 인식되지 않으므로, 안정성을 개선시키기 위한 화학적 변형 또는 다른 비천연 방법과 대조적으로 자연적인 은폐성을 보장한다. 마지막으로, 아포리포단백질의 사용은 핵산 카고를 전달하기 위해서 예를 들어 골수 구획의 면역 세포와 바람직한 상호작용을 촉진한다.
- [0304] 그러므로, 본 발명의 일 구현예에서 나노입자에서, 안정화제, 예를 들어, 아포리포단백질 성분 예컨대 아포리포단백질, 아포리포단백질 유도체, 아포리포단백질 모방체 및/또는 아포리포단백질 모방체 유도체는 다음과 같은 이유로 사용된다:
- [0305] - 제조 및 저장 시 응집 방지;
- [0306] - 생체내 안정성 개선;
- [0307] - 자연적 은폐성 제공; 및/또는
- [0308] - 면역 세포로의 표적화 및/또는 그와의 상호작용 촉진.
- [0309] 일 구현예에서, 본 명세서에 기술된 바와 같은 안정화제는
- [0310] - 아포리포단백질, 아포리포단백질 유도체, 아포리포단백질 모방체 및/또는 아포리포단백질 모방체 유도체;
- [0311] - 폴리에틸렌 글리콜 또는 폴리에틸렌 글리콜 변형된 분자;
- [0312] - 친수성 중합체 또는 친수성 중합체 변형된 분자;
- [0313] - 다당류 또는 다당류 변형된 분자;
- [0314] - 폴리사르코신 또는 폴리사르코신 변형된 분자; 또는
- [0315] - 폴리(2-옥사졸린) 또는 폴리(2-옥사졸린) 변형된 분자,
- [0316] 또는 이의 조합으로부터 선택된다.
- [0317] 바람직하게, 안정화제는 아포리포단백질, 아포리포단백질 유도체, 아포리포단백질 모방체 및/또는 아포리포단백질 모방체 유도체, 또는 폴리에틸렌 글리콜 변형된 분자, 또는 이의 조합이다. 보다 바람직하게, 안정화제는 아포리포단백질, 아포리포단백질 유도체, 아포리포단백질 모방체 및/또는 아포리포단백질 모방체 유도체이다. 가장 바람직하게, 안정화제는 아포리포단백질이다.
- [0318] 특정 구현예에서, 아포리포단백질, 아포리포단백질 유도체, 아포리포단백질 모방체 및/또는 아포리포단백질 모방체 유도체는 나노입자의 외부층의 외부 표면에 위치된다.
- [0319] 특정 구현예에서, 본 명세서의 다른 곳에 기술된 바와 같은 아포리포단백질 안정화제는 아포리포단백질 안정화제가 표적화 바디에 융합되지 않았을 때 결합되는 것과 상이한 표적 (또는 달리 말해서, 선천적으로 결합되는 것과 상이한 표적)에 대한 본 명세서에 교시된 바와 같은 나노입자의 표적화, 및/또는 더 높은 친화성으로 이의 의도되는 표적에 결합하도록 허용하는 표적화 바디에 융합될 수도 있고, 그 결과로 표적-이탈 효과를 감소시킬

수도 있다. 예를 들어, 표적화 바디는 나노입자가 비-골수 세포, 예컨대 림프구, 예컨대 T 세포, B 세포 또는 자연 살해 (NK) 세포, 또는 내피 세포, 또는 골수 세포에 보다 높은 친화성으로 결합하도록 허용할 수도 있다.

[0320] 표적화 바디는 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 재결로화 펩티드 또는 재결로화 단백질, 예컨대 수용체 결합 펩티드, 리간드 모방 펩티드, 수용체 리간드, 수용체, 또는 상호작용 단백질일 수도 있다. 임의 유형의 항원 결합 분자가 원칙적으로 표적화 바디로서 사용될 수 있다고 여겨진다. 표적화 바디의 비제한적인 예는 프로그램된 세포 사멸 단백질 1 (PD1), 신호-조절 단백질 알파 (SIRPa), CD40L, GP120, CD8에 (특이적으로) 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편 (예를 들어, VHHC8), 인자 VIII와 같은 인자 VIII-관련 항원에 결합할 수 있는 표적화 바디, CD31과 같은 CD31/PECAM-1에 결합할 수 있는 표적화 바디, 안지오텐신과 같은 안지오텐신-전환 효소 (ACE/CD143)에 결합할 수 있는 표적화 바디, L-셀렉틴과 같은 CD34에 결합할 수 있는 표적화 바디 또는 엔도글린 (CD105)에 결합할 수 있는 표적화 바디를 포함한다.

[0321] 안정화제가 친수성 중합체, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 다당류, 폴리사르코신 또는 폴리(2-옥사졸린)으로부터 유래되는 구현예에서, 이들 중합체는 소수성 모이어티에 의해 변형된 것이다. 이들은 예를 들어 소수성 중합체, 소수성 C12-18 알킬 사슬 또는 C14, C16 또는 C18 지방산에서 유래된 사슬을 갖는 인지질일 수 있다. 디미리스토일 포스파티딜에탄올아민 (DMPE), 디팔미토일 포스파티딜에탄올아민 (DPPE) 및 디스테아로일 포스파티딜에탄올아민 (DSPE) 인지질이 이러한 목적에 특히 유용한데, 그들이 1차 아민 작용성이어서, PEG, 다당류, 폴리사르코신 또는 폴리(2-옥사졸린)의 올리고머 또는 중합체 단위에 연결될 수 있기 때문이다. 올리고머 또는 중합체의 분자량은 약 200 달톤 이상, 약 500 달톤 이상, 약 1000 달톤 이상, 또는 약 2000 달톤 이상일 수 있다. 낮은 분자량에서, 올리고머가 분리될 수도 있다. 예를 들어, DPPE 또는 DSPE는 4, 6, 12 또는 24 에틸렌 글리콜 단위를 갖는 올리고-에틸렌 글리콜에 연결될 수도 있다. 전형적으로, 올리고-글리콜 또는 PEG는 메톡시 또는 히드록시 기로 캡핑된다.

[0322] c. 핵산

[0323] 본 명세서에 기술된 나노입자의 목적은 세포에 핵산을 전달하는 것이다. 핵산은 예를 들어, 세포에서 발현 시키려는 관심 펩티드 또는 단백질을 코딩하는 mRNA일 수도 있거나, 또는 유전자 발현을 간섭 (예를 들어, 유전자 침묵화)하도록 의도되는 짧은 핵산 예컨대 siRNA, shRNA를 포함할 수도 있거나, 또는 세포의 계층에 돌연변이를 유도하기 위한 CRISPR-Cas 또는 관련 시스템의 성분을 포함할 수도 있다. 그러므로, 일반적으로, 핵산 (나노입자의 페이로드)의 작용 방식은 핵 내에 있다. 그러므로, 나노입자는 바람직하게 적어도 하기 성질을 갖는다:

[0324] 1) 의도하는 표적 세포의 표적화를 허용한다, 그리고

[0325] 2) 이의 작용을 발휘할 수 있는 곳 (따라서, 대부분의 경우에 표적 세포의 핵)으로 페이로드의 전달을 허용한다.

[0326] 이론에 국한하고 싶지 않지만, 본 명세서에 기술된 다가 분자는 나노입자가 표적 세포에 의해 흡수되면 페이로드의 엔도솜 탈출에서 역할을 하고, 따라서 핵산 페이로드의 핵 전달을 허용한다고 여겨진다.

[0327] 많은 상이한 유형의 RNA, DNA 또는 합성 올리고뉴클레오타이드가 핵산 치료제로서 사용되어 왔다. 본 발명은 본 발명이 나노입자 중에 다가 분자를 사용해 로딩할 수 있는 임의의 유형을 사용해 작업하도록 고안되었기 때문에 특정 유형의 핵산에 제한되지 않는다. 그러므로, 일 구현예에서, 핵산은 RNA, DNA, 또는 핵산 유사체이고,

[0328] 바람직하게 RNA는 마이크로RNA (miRNA), 소형 간섭 RNA (siRNA), piwi-상호작용 RNA (piRNA), 소형 핵 RNA (snoRNA), 전달 RNA (tRNA), tRNA-유래 소형 RNA (tsRNA), 소형 조절 RNA (srRNA), 메신저 RNA (mRNA), 변형된 mRNA, 리보솜 RNA (rRNA), 긴 비-코딩 RNA (lncRNA) 또는 가이드 RNA (gRNA) 또는 이의 조합 및/또는 이의 변형이거나; 또는

[0329] 바람직하게 DNA는 단일 가닥 또는 이중 가닥 DNA이거나; 또는

[0330] 바람직하게 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 포스포디에스테르 골격 또는 2' 리보스의 변형을 함유하는 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드 유사체로 이루어지는 단일 가닥 DNA 또는 RNA이고, 보다 바람직하게 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드 유사체는 잠금 핵산 (LNA), 가교 핵산 (BNA), 모르폴리노 또는 펩티드 핵산 (PNA)으로부터 선택된다.

- [0331] d. 스테롤
- [0332] 본 명세서에서 사용되는 용어 스테롤은 수소 원자의 일부를 다른 화학적 기로 치환하거나, 또는 고리의 결합을 변형시켜서 스테롤 (2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-헥사데카히드로-1H-시클로펜타[a]펜안트렌-3-올)으로부터 유래되는 화합물을 의미한다. 스테롤 및 관련 화합물은 진핵생물 유기체의 생리학에서 필수 역할을 한다. 예를 들어, 콜레스테롤은 동물의 세포막의 일부를 형성하고, 여기에서 세포막의 유동성에 영향을 미치고 발생 신호전달에서 2차 메신저로서 작용한다.
- [0333] 본 명세서에서 사용되는 스테롤은 예를 들어 콜레스테롤, 에르고스테롤, 호파노이드, 히드록시스테로이드, 파이토스테롤, 스테로이드, 수소화 콜레스테롤, 또는 주스테롤을 의미할 수도 있다. 나노입자에서, 스테롤은 막 (즉, 인지질 단층 표면 장벽)에서 유동성을 유지하거나 또는 조절한다.
- [0334] 일 구현예에서 스테롤은 콜레스테롤, 스티그마스테롤, 또는 β -시토스테롤, 또는 이의 조합으로부터 선택된다. 일 구현예에서 스테롤은 콜레스테롤, 에르고스테롤, 호파노이드, 히드록시스테로이드, 파이토스테롤, 스테로이드, 주스테롤, 스티그마스테롤, 또는 β -시토스테롤, 또는 이의 조합으로부터 선택된다. 바람직한 구현예에서, 스테롤은 콜레스테롤을 포함하거나 또는 콜레스테롤이다.
- [0335] e. 인지질
- [0336] 포스파티드로도 알려진, 인지질은 그 분자가 글리세롤 분자에 의해 연결된, 포스페이트 기를 함유하는 친수성 머리부 및 지방산으로부터 유래된 2개 소수성 꼬리부를 갖는 지질 부류이다. 해양 인지질은 전형적으로 인지질 분자의 일부로서 통합된 오메가-3 지방산 EPA 및 DHA를 갖는다. 포스페이트 기는 단순 유기 분자 예컨대 콜린, 에탄올아민, 또는 세린에 의해 변형될 수 있다.
- [0337] 인지질은 모든 세포막의 핵심 성분이다. 그들은 그들의 양친매성 특징때문에 지질 이중층을 형성할 수 있다. 진핵생물에서, 세포막은 또한 인지질 중에 산재된, 다른 부류의 지질인 스테롤을 함유한다. 이 조합은 파열에 대한 기계적 강도와 조합하여 2차원의 유동성을 제공한다.
- [0338] 그러므로, 일 구현예에서 인지질은 포스파티딜콜린, 포스파티딜에탄올아민, 포스파티딜세린 및 포스파티딜글리세롤, 또는 이의 조합으로부터 선택된다.
- [0339] 인지질의 아실 기는 개별적으로, 중간쇄 또는 장쇄 지방산으로부터 유래될 수도 있다. 일 구현예에서 인지질의 아실 기 중 적어도 하나, 바람직하게 둘 모두는 장쇄 지방산으로부터 유래되고, 바람직하게 상기 장쇄 지방산은 C14, C16 또는 C18 사슬, 즉 미리스트산, 미리스톨레산, 팔미트산, 팔미톨레산, 스테아르산, 올레산 및 리놀레산, 또는 이의 조합으로부터 선택된다.
- [0340] 리소-인지질은 아실 기 중 하나가 가수분해에 의해 제거되어서 알콜 기가 남은 인지질이다. 그러므로, 이들 분자는 2개 지방산 사슬 대신에 하나를 갖는다. 이들 인지질은 또한 예를 들어, 나노입자의 외부층의 형상, 기능, 및 유동성을 조절하는데 적용될 수도 있다.
- [0341] 특히 바람직한 구현예에서, 인지질은 중성 인지질인데, 이것이 생리적 pH (순 중성 전하를 가짐)에서 양쪽성임을 의미한다. 그러므로, 바람직한 구현예에서, 인지질은 포스파티딜콜린 (PC) 또는 포스파티딜에탄올아민 (PE)이다.
- [0342] 따라서, 사용될 수 있는 인지질의 예는 디라우로일포스파티딜콜린 (DLPC), 디미리스토일포스파티딜콜린 (DMPC), 디팔미토일포스파티딜콜린 (DPPC), 디스테아로일포스파티딜콜린 (DSPC), 디올레오일포스파티딜콜린 (DOPC), 디라우로일포스파티딜글리세롤 (DLPG), 디미리스토일포스파티딜글리세롤 (DMPG), 디팔미토일포스파티딜글리세롤 (DPPG), 디스테아로일포스파티딜글리세롤 (DSPG), 디올레오일포스파티딜글리세롤 (DOPG), 디라우로일 포스파티딜에탄올아민 (DLPE), 디미리스토일 포스파티딜에탄올아민 (DMPE), 디팔미토일 포스파티딜에탄올아민 (DPPE), 디스테아로일 포스파티딜에탄올아민 (DSPE), 디라우로일 포스파티딜세린 (DLPS), 디미리스토일 포스파티딜세린 (DMPS), 디팔미토일 포스파티딜세린 (DPPS), 디스테아로일 포스파티딜세린 (DSPS), 1-팔미토일-2-올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (POPC), 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 (DOPE)을 비롯하여, 이의 혼합물이다.
- [0343] 리소인지질로서, 1-미리스토일-2-히드록시-sn-글리세로-3-포스포콜린 (MHPC), 1-팔미토일-2-히드록시-sn-글리세로-3-포스포콜린 (PHPC) 및 1-스테아로일-2-히드록시-sn-글리세로-3-포스포콜린 (SHPC), 또는 이의 혼합물이 적

용될 수 있다.

[0344] f. 충전제 분자

[0345] 본 명세서에 기술된 바와 같은 나노입자는 또한, 임의로 충전제 분자를 포함할 수도 있다. 충전제 분자는 생체적합성 분자 예컨대 (임의 종류의) 에스테르 또는 아미드이다. 에스테르가 바람직하고, 특히 지방산 또는 콜레스테롤로부터 유래되는 것이고, 지방산은 포화 또는 불포화 사슬을 가질 수도 있다. 충전제 분자는 본질적으로 소수성이고 예를 들어, 지질, 예컨대 트리글리세리드 지질일 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.

그러므로, 일 구현예에서 나노입자는 트리글리세리드, 디글리세리드, 지방산에서 유래된 에스테르, 및 콜레스테릴 에스테르, 또는 이의 조합으로부터 선택되는 충전제 분자를 더 포함한다.

[0346] 본 명세서에 기술된 바와 같은 나노입자는 각각 충전제 분자의 부재 또는 존재에 따라서, 나노원반 또는 나노구체를 형성할 수도 있다. 충전제는 예를 들어 페이로드 (핵산) 및 다가 분자와 함께 입자의 코어에 포함되는 트리글리세리드일 수도 있다. 이론에 국한하지 않고, 더 많은 충전제를 포함하면 나노입자가 더 커져서, 입자가 불안정하게 될 수도 있는 일정 정도까지 커지게 된다는 것을 이해한다. 이론에 국한하지 않고, 일정량의 충전제의 포함은 나노입자를 안정화시키는데 기여할 수도 있거나, 또는 페이로드의 포함을 안정화시킬 수도 있거나, 또는 세포에 핵산의 전달을 조절 또는 증강시킬 수도 있다.

[0347] 그러므로, 일 구현예에서 본 명세서에 기술된 바와 같은 나노입자는 충전제 분자를 더 포함하고, 바람직하게 충전제 분자는 글리세리드 분자, 또는 콜레스테릴 에스테르이고, 보다 바람직하게 충전제 분자는 트리글리세리드 및 콜레스테릴 에스테르, 또는 이의 조합으로부터 선택된다. 바람직하게, 트리글리세리드는 C6-C18 지방산, 바람직하게 C6-C12 지방산으로부터 선택된다. 콜레스테릴 에스테르의 예는 콜레스테릴 아세테이트, 콜레스테릴 카프릴레이트 및 콜레스테릴 올레에이트이다. 바람직한 충전제 분자는 트리카프릴린, 콜레스테릴 아세테이트, 콜레스테릴 카프릴레이트 및 콜레스테릴 올레에이트이고, 보다 바람직하게 트리카프릴린이다.

[0348] 나노입자 특성

[0349] 본 발명의 나노입자는 핵산, 다가 분자, 인지질, 스테롤, 안정화제, 및 임의로 충전제 분자를 포함하고,

[0350] 안정화제, 특히 아포리포단백질, 아포리포단백질 유도체, 아포리포단백질 모방체 또는 아포리포단백질 모방체 유도체의 양은 0.1 내지 90 중량% 범위이고/이거나;

[0351] 핵산의 양은 0.01 내지 90 중량% 범위이고/이거나;

[0352] 인지질의 양은 0.1 내지 95 중량% 범위이고/이거나;

[0353] 스테롤은 0.1 내지 95 중량% 범위이고/이거나;

[0354] 다가 분자의 양은 0.1 내지 95 중량% 범위이고,

[0355] 임의로 존재하는 충전제의 양은 0 내지 95 중량% 범위를 포함하고,

[0356] 이들 중량 백분율은 이들 5종 성분에 선택적 6번째 충전제 성분이 더해진 조합량을 기반으로 하며, 즉 이들 5종 또는 6종 성분은 나노입자의 100 중량%까지 첨가된다.

[0357] 일 구현예에서, 안정화제, 바람직하게 아포리포단백질, 아포리포단백질 유도체, 아포리포단백질 모방체 또는 아포리포단백질 모방체 유도체의 양은 0.2 내지 50 중량%, 보다 바람직하게 0.5 내지 30 중량%, 보다 바람직하게 1 내지 20 중량%, 보다 더 바람직하게 5 내지 20 중량%, 예컨대 5 내지 15 중량% 범위이다.

[0358] 일 구현예에서, 핵산의 양은 0.02 내지 30 중량%, 보다 바람직하게 0.05 내지 20 중량%, 보다 바람직하게 0.1 내지 15 중량%, 보다 더 바람직하게 0.5 내지 10 중량%, 예컨대 0.5 내지 5 중량%, 1 내지 5 중량%, 또는 0.5 내지 4 중량%, 예컨대 1.2 내지 3 중량% 범위이다.

[0359] 일 구현예에서, 인지질의 양은 0.2 내지 60 중량%, 예컨대 0.2 내지 50 중량%, 5 내지 50 중량%, 10 내지 50 중량%, 0.2 내지 45 중량%, 5 내지 45 중량%, 10 내지 45 중량%, 보다 바람직하게 1 내지 40 중량%, 보다 바람직하게 3 내지 40 중량%, 5 내지 40 중량%, 10 내지 40 중량% 또는 3 내지 30 중량%, 가장 바람직하게 10 내지 45 중량%, 예컨대 15 내지 40 중량% 범위이다.

[0360] 일 구현예에서, 스테롤은 0.2 내지 90 중량%, 보다 바람직하게 0.5 내지 70 중량%, 보다 바람직하게 1 내지 50 중량%, 보다 더 바람직하게 3 내지 30 중량% 또는 5 내지 25 중량%, 예컨대 8 내지 20 중량% 범위이다.

- [0361] 일 구현예에서, 다가 분자의 양은 0.2 내지 90 중량%, 보다 바람직하게 0.5 내지 80 중량%, 보다 바람직하게 1 내지 70 중량%, 보다 더 바람직하게 1 내지 30 중량%, 예컨대 5 내지 30 중량%, 5 내지 20 중량%, 10 내지 20 중량%, 5 내지 10 중량% 또는 15 내지 25 중량% 범위이다.
- [0362] 일 구현예에서, 선택적 충전제 분자의 양은 0 내지 90 중량%, 보다 바람직하게 0 내지 80 중량%, 보다 바람직하게 0 내지 70 중량%, 보다 더 바람직하게 0 내지 60 중량% 범위이다.
- [0363] 상기 성분의 상대량은 다양한 성분의 회수율이 일반적으로 매우 높으므로, 그들이 나노입자 제조 프로토콜에서 적용되고 혼합되는 비에 의해 제어된다. 당분야에 공지된 방법을 적용하여서, 나노입자의 다양한 성분의 혼입 수준은 입자 제조가 완료된 이후에 평가될 수 있다. 따라서, 나노입자 중에 성분의 상기 혼입 범위는 성분의 적용된 혼합량을 평가하거나, 또는 제조된 나노입자의 제제 중 성분의 값을 측정하여, 평가될 수 있다. 예를 들어, 어세이 키트는 나노입자 샘플 중 인지질, 콜레스테롤, 또는 apo A1 수준을 평가하기 위해 상업적으로 입수가능하다. 더 나아가서, 나노입자 내부에 로딩되고 유지되는 siRNA의 양은 RiboGreen 어세이를 사용하여 평가될 수 있다.
- [0364] 나노입자의 외부층은 인지질, 안정화제 (예를 들어, 아포리포단백질) 및 스테롤로 구성된다. 안정한 나노입자를 조립하기 위해서, 바람직하게 중량을 기반으로 하는 안정화제 (예를 들어, 아포리포단백질) 대 인지질의 비는 2:1과 1:10 사이이다. 그러므로, 일 구현예에서, 중량을 기반으로 하는 적용된 아포리포단백질 대 인지질의 비는 2:1과 1:10 사이, 보다 바람직하게 1:1과 1:5 사이, 보다 더 바람직하게 15:1과 1:4 사이 또는 2:3과 1:4 사이, 예컨대 4:10이다.
- [0365] 나노입자 내에서, 다가 분자는 핵산에 결합한다. 다가 분자는 양이온화가능 및/또는 양이온성 기에서 다가 (#N)인 한편, 핵산은 다수의 포스페이트 기 (P)를 보유한다. N-기의 수 (#N)와 P-기의 수 (#N:P) 간 비는 본 발명의 나노입자에 대해 다양할 수 있다. N-기 (#N): P-기 (P) 비 (#N:P 비)는 100:1과 1:10 사이에서 다양할 수 있다. 그러나, 등몰량 또는 과량의 #N-기가 바람직하고, #N:P 비는 약 50:1 내지 약 1:1로 다양하다. 보다 바람직하게 약 20:1과 약 1:1 사이의 #N:P 비이다. 보다 더 바람직하게 약 15:1과 약 1:1 사이의 #N:P 비이다.
- [0366] 본 발명에 따른 나노입자는 상대적으로 정의되고 일정한 크기를 갖는 것으로 확인되었다. 평균 크기는 대체로 코어 성분, 즉 핵산의 양 및 유형, 다가 분자의 양 및 스테롤 및 충전제 분자의 양에 의해 결정된다. 충전제는 선택적이고, 입자 크기는 충전제의 증가량을 포함하여 증가될 수 있다는 것을 이해한다. 일 구현예에서 본 발명에 따른 나노입자는 약 10 내지 약 300 nm, 바람직하게 약 20 내지 약 200 nm, 보다 바람직하게 약 30 내지 약 100 nm의 평균 직경을 갖는다.
- [0367] 본 발명의 나노입자의 크기는 당분야에 공지된 방법으로 평가될 수 있다. 예를 들어, 동적 광산란 (DLS)을 적용하여 나노입자의 직경을 측정할 수 있다. 저온-TEM 측정은 또한 이러한 목적에 적용될 수 있다. 양쪽 기술은 또한 제조된 나노입자 제제의 직경 분포를 평가하는데 사용될 수도 있다. 저온-TEM 측정은 더 나아가서 나노입자의 형상 (둥근 구체, 또는 다른 형상)을 평가하는데 사용될 수 있다. 또한 나노입자의 추가 특성 (예를 들어, 외부층 또는 외부층들의 존재; 아포리포단백질의 존재; 나노입자 외관의 균일성)을 평가할 수 있다.
- [0368] 본 발명의 나노입자는 (약간) 음성, (약간) 양성 또는 본질적으로 중성일 수도 있는 일정 표면 전하를 가질 수도 있다. 당분야에 공지된 제타 전위 분석 또는 다른 방법이 본 발명의 나노입자의 전하 상태를 평가하는데 적용될 수도 있다.
- [0369] 본 발명의 siRNA를 함유하는 나노입자의 시험관 내 활성은 반딧불이 루시페라제 및 레닐라 루시페라제 유전자 발현 서열을 함유하는 Pmir-Glo 플라스미드를 형질감염시킨 이중-리포터 세포 (예를 들어, RAW264.7 마크로파지)를 사용하여 평가될 수 있다. 침묵화 실험에서, 마크로파지는 반딧불이 루시페라제 siRNA가 로딩된 나노입자 또는 비특이적 siRNA가 로딩된 나노입자에 노출된다. 다음으로, 이들 나노입자 중 하나에 의한 루시페라제 활성의 녹다움을 평가하고 비교할 수 있다. 용량 의존적 유전자 녹다운 연구에서, 반딧불이 루시페라제 siRNA의 사용된 농도 함수로서 반딧불이 루시페라제의 활성을 평가할 수 있다. 이러한 어세이는 적용된 나노입자 제제의 역할을 보고한다.
- [0370] 본 명세서에 정의된 바와 같은 나노입자는 (도입된 인지질 및 안정화제 성분의 결과로서) 소수성 코어 및 친수성 표면을 포함하고, 그러므로 염수 용액 또는 완충액과 같은 물 또는 수성 용액에 용해될 수도 있다. 본 발명에 의해 정의된 바와 같은 나노입자의 성분에서 비롯되는 고유한 성질은 수 개월 동안 현탁액 중에서 안정

한 나노입자를 생성한다. 적합한 수성 완충액은 당분야에 공지되어 있고, 예컨대 포스페이트 완충 염수 (PBS), Tris 완충 염수 (TBS)가 있다. 적합한 염수 용액이 공지되어 있고, 비제한적인 예는 NaCl 또는 KCl 의 수성 용액을 포함한다. 나노입자를 대상체에게 투여하고자 의도되는 경우에, 나노입자는 그 목적을 위해 생리학적으로 허용가능한 담체에 현탁되어야 한다. 예를 들어, 나노입자가 정맥내 전달에 의도되는 경우에, 생리학적으로 허용가능한 담체는 전형적으로 혈액과 등장성인 유체이다. 예를 들어, 0.9% w/v 농도의 소듐 클로라이드 용액, 5% w/v 텍스트로스 용액, 링거액, 링거 락테이트 또는 링거 아세테이트가 사용될 수도 있지만, 다른 적합한 담체가 공지되어 있다.

[0371] 그러므로, 일 양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 나노입자 및 생리학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물에 관한 것이다. 일 구현예에서 조성물은 약학 조성물이다. 조성물은 추가적인 성분, 예컨대 제한없이 약학적 약물 또는 생물약학적 약물을 더 포함할 수도 있다는 것을 이해한다. 이것은 핵산 (나노입자에 포함됨) 및 약물의 병용 요법을 위한 매력적인 선택안일 수도 있다. 약물은 소형 화합물, 항체 또는 항원 결합 단편, 추가 나노입자 등일 수도 있다.

[0372] 본 명세서에 기술된 바와 같은 나노입자는 대상체에게 핵산 요법을 전달하는데 사용된다는 것을 또한 고려한다. 그러므로, 일 양태에서, 본 발명은 의약으로서 사용을 위한 본 발명에 따른 나노입자 또는 본 발명에 따른 조성물에 관한 것이다.

[0373] 나노입자를 포함하는 핵산 요법은 이를 필요로 하는 대상체에게 투여될 수 있다는 것을 이해한다. 표적 세포 또는 조직에 의존하여, 투여는 비경구, 예를 들어, 정맥내, 근육내 또는 피하일 수도 있다. 투여는 또한 경구, 설하, 국소, 직장, 비강 (흡입) 또는 질일 수도 있다. 또한 표적 조직 또는 세포의 표적화는 아포리포단백질의 적절한 선택을 통해 결정된다. 일 구현예에서, 본 발명에 따른 나노입자 또는 조성물의 사용은 골수 구획 또는 비장으로 핵산의 전달을 포함한다. 이것은 예를 들어 정맥내 비경구 투여를 통해서 획득될 수도 있다. 바람직하게 아포리포단백질은 바람직하게 골수 구획 표적화 아포리포단백질 예컨대 apo A1이다.

[0374] 추가 양태는 면역요법에서 사용을 위한 본 명세서에 교시된 바와 같은 나노입자 또는 본 명세서에 교시된 바와 같은 조성물을 제공한다.

[0375] 일 양태에서, 본 발명은 선천성 면역 반응을 자극 또는 억제하여 질환의 치료에서 사용을 위한 본 발명에 따른 나노입자, 또는 본 발명에 따른 조성물에 관한 것이고, 바람직하게 상기 질환은 대상체에서 선천성 면역 반응의 자극 또는 억제로 이득을 얻게 되는 질환, 예컨대 결합성 선천성 면역 반응을 특징으로 하는 질환이고, 보다 바람직하게 치료하려는 상기 질환은 암, 심혈관 질환, 자가면역 장애 또는 이종이식 거부이다. 그러므로, 본 발명에 따른 나노입자는 면역계와 관련된 임의의 질환 예컨대 임의의 면역 장애의 치료, 또는 면역 반응의 조절이 실행가능한 치료 선택안이라고 여겨지는 임의의 질환 또는 장애의 치료에서 사용될 수도 있다. 골수 구획을 표적화하여서, 핵산 요법은 혈액 및 조직에 존재하는 이미 분화된 세포, 예컨대 T 세포 및 마크로파지와 대조적으로, 상이한 혈액 세포 유형의 전구체 세포로 성공적으로 전달될 수 있다. 그렇게 하여서, 선천성 면역 반응은 바람직한 결과에 따라서, 핵산 요법에 의해서, 조절, 예를 들어 자극 또는 억제될 수도 있다. 예를 들어, 자가면역 장애, 심혈관 질환 또는 이종이식 거부에서, 자가면역 반응의 억제 (예방)가 바람직하지만, 암에서는 표적 암 세포에 대한 면역 반응의 자극이 바람직하다.

[0376] 추가 양태에서, 본 발명은 핵산의 생체내 전달을 위한 방법에 관한 것으로서, 방법은 본 발명에 따른 나노입자 또는 본 발명에 따른 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0377] 추가 양태에서, 본 발명은 선천성 면역 반응의 자극 또는 억제를 통해서 이를 필요로 하는 대상체에서 질환 또는 장애를 치료하기 위한 방법에 관한 것으로서, 방법은 본 발명에 따른 나노입자 또는 본 발명에 따른 조성물의 치료적 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 특정 구현예에서, 질환 또는 장애는 결합성 선천성 면역 반응을 특징으로 하는 질환 또는 장애이다. 일 구현예에서, 질환 또는 장애는 암, 심혈관 질환, 자가면역 장애 또는 이종이식 거부로부터 선택된다.

[0378] 본 발명은 핵산을 갖는 아포리포단백질-기반 나노입자 (aNP)를 제공한다. 지금까지, 이러한 입자의 코어가 소수성이고 따라서 그들의 친수성 성질로 인해 핵산의 도입에 적합하지 않으므로 이러한 나노입자에 핵산을 포함시키는 것이 가능하지 않았다. 핵산과 함께 일부 다가 분자의 사용이 핵산의 세포내 전달을 위한 도구로서 설명되었지만, 다른 지질 성분과 다가 분자 및 핵산의 단순 조합은 본 명세서에 기술된 바와 같은 지질 나노입자의 형성을 야기하지 않는다. 본 발명은 본 명세서에 기술된 다가 분자의 사용에 의해서, 그리고 2-단계 나노입자 제조 방법을 사용하여서, 핵산을 나노입자에 도입시킬 수 있다는 인식을 중심으로 이루어진다.

- [0379] 그러므로, 일 양태에서, 본 발명은 나노입자를 제조하기 위한 방법에 관한 것으로서,
- [0380] a) 유기 용매 중 (지질) 성분을 수성 완충액 중 핵산과 혼합, 바람직하게 급속 혼합하여 나노입자를 생산하는 단계로서, (지질) 성분은 인지질, 스테롤, 다가 분자, 및 임의로 충전제 분자 (예를 들어, 글리세리드, 예를 들어 트리글리세리드)를 포함하고, 수성 완충액은 5.5 이하의 pH, 바람직하게 5.0 이하의 pH를 갖는 것인 단계; 및
- [0381] b) 지질 나노입자를 안정화제, 바람직하게 아포리포단백질, 아포리포단백질 유도체, 아포리포단백질 모방체 및/또는 아포리포단백질 모방체 유도체와 혼합, 바람직하게 급속 혼합하여, 5.5와 9.0 사이의 pH, 바람직하게 6.0과 8.0 사이의 pH, 보다 바람직하게 6.5와 8.0 사이의 pH에서 나노입자를 생산하는 단계를 포함한다.
- [0382] 급속 혼합은 당분야에 공지되어 있고, 예를 들어, 다음의 문헌에 기술되어 있다: Hirota et al. BIOTECHNIQUES VOL. 27, NO. 2, p286-289; Jeffs et al., Pharm Res 22, 362-372 (2005); Kulkarni et al., ACS Nano 2018, 12, 5, 4787-4795.
- [0383] 단계 a)의 수성 완충액은 다가 분자가 양으로 하전되도록 보장하기 위해 낮은 pH를 가져서, 입자 내에서 핵산 및 다가 분자의 결합을 허용한다. 예를 들어, 완충액은 5.5 이하, 예컨대 5.4, 5.3, 5.2, 5.1의 pH를 가질 수도 있거나, 또는 완충액은 5.0 이하, 예컨대 4.9, 4.8, 4.7, 4.6, 4.5, 4.4, 4.3, 4.2, 4.1, 4.0, 3.9, 3.8, 3.7, 3.6, 3.5 이하의 pH를 가질 수도 있다. 수성 완충액은 핵산을 손상시키지 않는 임의의 완충액일 수도 있다. 예시적인 완충액은 pH 4.0의 소듐 아세테이트이다. 다음으로, 나노입자는 대략 6 내지 8, 바람직하게 7 내지 8 보다 바람직하게 대략 7.4의 pH를 갖는 수성 완충액 중에 둔다. 이것은 예를 들어 표시된 pH 범위의 수성 완충액을 사용한 투석에 의해 획득될 수도 있다. 이 단계에 적합한 수성 완충액의 비제한적인 예는 pH 7.4의 150 mM PBS이지만, 핵산을 손상시키지 않는 임의의 완충액이 사용될 수도 있다는 것을 이해한다.
- [0384] 단계 b)에서, 6과 8 사이, 바람직하게 7 내지 8의 pH의 수성 완충액 중 나노입자는 6과 8 사이, 바람직하게 7 내지 8의 pH의 수성 완충액 중 아포리포단백질과 급속하게 혼합되어서, 본 발명에 따른 나노입자가 수득된다.
- [0385] 일 양태에서, 본 발명은 나노입자, 예컨대 본 명세서에 교시된 바와 같은 나노입자를 제조하기 위한 방법으로 수득되거나 또는 수득가능한, 본 발명에 따른 나노입자에 관한 것이다.
- [0386] 본 발명에 따른 나노입자는 표적 세포 또는 조직으로 핵산을 전달할 수 있다는 것을 이해한다. 표적 세포 또는 조직은 대상체에 있을 수도 있거나, 또는 시험관 내 또는 생체외일 수도 있다. 그러므로, 일 양태에서, 본 발명은 생체내, 시험관내 또는 생체외에서, 세포에 핵산을 도입시키기 위한 방법에 관한 것으로서, 방법은 본 발명에 따른 나노입자 또는 본 발명에 따른 조성물을 세포와 접촉시키는 단계를 포함한다. 일 구현예에서 방법은 시험관내 또는 생체외 방법이다. 특정 구현예에서, 세포는 골수 구획의 세포 또는 골수성 세포이다.
- [0387] 추가 양태에서, 본 발명은 핵산의 생체내 전달을 위한 방법에 관한 것으로서, 방법은 본 발명에 따른 나노입자 또는 본 발명에 따른 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0388] 추가 양태에서, 본 발명은 선천성 면역 반응의 자극 또는 억제를 통해서 이를 필요로 하는 대상체에서 질환 또는 장애를 치료하기 위한 방법에 관한 것으로서, 방법은 본 발명에 따른 나노입자 또는 본 발명에 따른 조성물의 치료적 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 일 구현예에서, 질환은 암, 심혈관 질환, 자가 면역 장애 또는 이종이식 거부로부터 선택된다.
- [0389] 본 출원은 또한 하기 진술에 기재된 바와 같은 양태 및 구현예를 또한 제공한다:
- [0390] 진술 1. 코어 및 외부층을 포함하는 나노입자로서, 코어는
- [0391] - 핵산;
- [0392] - 다가 분자를 포함하고;
- [0393] 외부층은
- [0394] - 안정화제;
- [0395] - 인지질;
- [0396] - 스테롤; 및 임의로

[0397] - 충전제 분자를 포함하고,

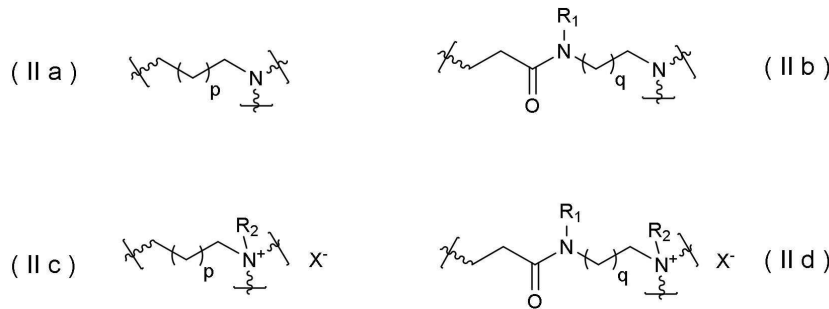
[0398] 다가 분자는 하기 화학식 (I)을 갖는다:

[0399] $[코어]_x - [BU]_y - [TU]_z$ (I)

[0400] 코어는 질소이거나 또는 1 내지 15개 질소 헤테로원자를 함유하고 임의로 1 내지 4개 산소 헤테로원자를 함유하는 C₁-C₁₈ 선형, 분지형 또는 환형 기이고;

[0401] x는 코어로부터 분지 단위 BU (또는 y = 0일 때, 말단 단위 TU) 까지의 연결 개수를 나타내고, x는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 12이고, 이들 연결은 모두 코어의 질소 원자로부터 분지 단위 BU (또는 말단 단위 TU)의 탄소 원자까지 이어지고;

[0402] 분지 단위 BU는 하기 화학식 (IIa), (IIb), (IIc) 또는 (IId)를 갖고:



[0403]

[0404] (IIa)는 CH₂-말단에서 코어 또는 코어에 더 가까운 BU에 연결되고, N-말단에서 2개 말단 단위 (TU) 또는 TU에 더 가까운 2개 분지 단위 (BU)에 연결되는 n-알킬렌-질소 스페이서를 나타내고, 연결은 물결선 결합으로 제공되고, p는 1, 2, 3 또는 4이고;

[0405] (IIb)는 CH₂-말단에서 코어 또는 코어에 더 가까운 BU에 연결되고, N-말단에서 2개 말단 단위 (TU) 또는 TU에 더 가까운 2개 분지 단위 (BU)에 연결되는 아미드 함유 n-알킬렌-질소 스페이서를 나타내고, 연결은 물결선 결합으로 제공되고, q는 1, 2, 3, 4 또는 5이고, R₁은 수소, 메틸, 에틸, n-프로필 또는 이소-프로필 기이고;

[0406] (IIc) 및 (IId)는 각각 (IIa) 및 (IIb)로 정의된 바와 같고, R₂는 메틸, 에틸, n-프로필, 벤질, 아세타미드 (-CH₂-C(O)NH₂) 또는 2-히드록시-에틸렌 기이고, X⁻는 4차 아민 양이온 모이어티에 대한 반대 음이온이고;

[0407] y는 다가 분자의 특징하고 개별적인 세대 개수를 나타내고, 이러한 개수는 내부 코어로부터 외부 TU 기까지의 이동으로 계수되는, 얼마나 많은 연속적인 BU 층이 다가 분자에 도입되는 가를 의미하고, y는 0, 1, 2, 3, 4 또는 5이고;

[0408] 각각의 개별 세대층 경우에, BU는 화학식 (IIa), (IIb), (IIc) 또는 (IId)로부터 독립적으로 선택될 수 있고, 즉 제1 세대층 BU를 나타내는, 코어로부터 발산되는 제1 BU는 코어로부터 더 멀리에서 발산되는 제2 BU (제2 세대층 BU를 나타냄)와 상이할 수 있고, 이것은 코어로부터 훨씬 더 멀리서 발산되는 제3, 제4 및 제5 BU와 상이할 수도 있고;

[0409] 말단 단위 (TU)는 수소 및 0 및 N으로 이루어진 군으로부터 개별적으로 독립적으로 선택되는 1 내지 8개 헤테로원자를 임의로 함유하는 C₁-C₃₀ 알킬, 아릴, 아릴렌-알킬 또는 알킬렌-아릴 기로부터 개별적으로 독립적으로 선택되고, 단 다가 분자의 모든 TU가 수소는 아니고;

[0410] z는 다가 분자에 부착된 TU 기의 총 개수를 나타내고, z는 1 내지 128이고;

[0411] 화학식 (I)에 따른 다가 분자는 양이온화가능 및/또는 양이온성 기에서 다가이고, N은 다가 분자의 양이온화가능 및 양이온성 기의 누적 개수이고, N은 2 이상이다.

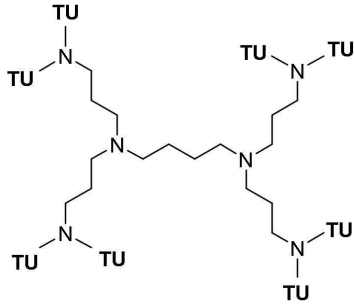
[0412] 진술 2. 진술 1에 따른 나노입자로서, 다가 분자는 하기 화학식 (I)을 갖는다:

[0413] $[코어]_x - [BU]_y - [TU]_z$ (I)

[0414] (식에서, $y = 0, 1, 2$, 또는 3임).

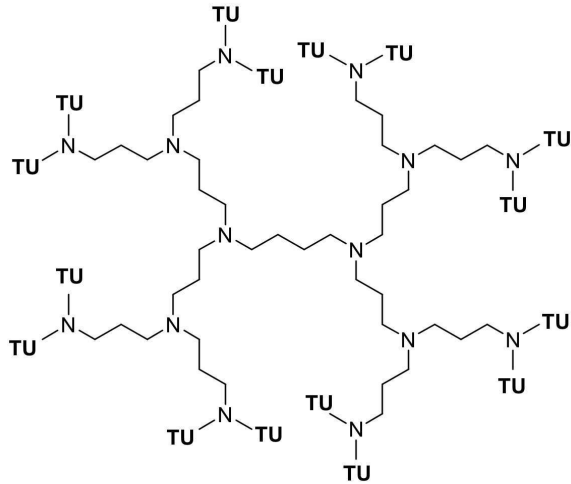
[0415] 진술 3. 진술한 진술 중 어느 하나에 따른 나노입자에 있어서, 다가 분자는 폴리(프로필렌 이민) (PPI) 덴드리머 또는 폴리아미도아민 (PAMAM) 덴드리머, 가장 바람직하게 PPI 덴드리머, 또는 이의 변형으로부터 선택되는 제1, 제2 또는 제3 세대 덴드리머이다.

[0416] 진술 4. 진술한 진술 중 어느 하나에 따른 나노입자에 있어서, 다가 분자는 하기 화학식으로부터 선택되는 구조를 갖는다:



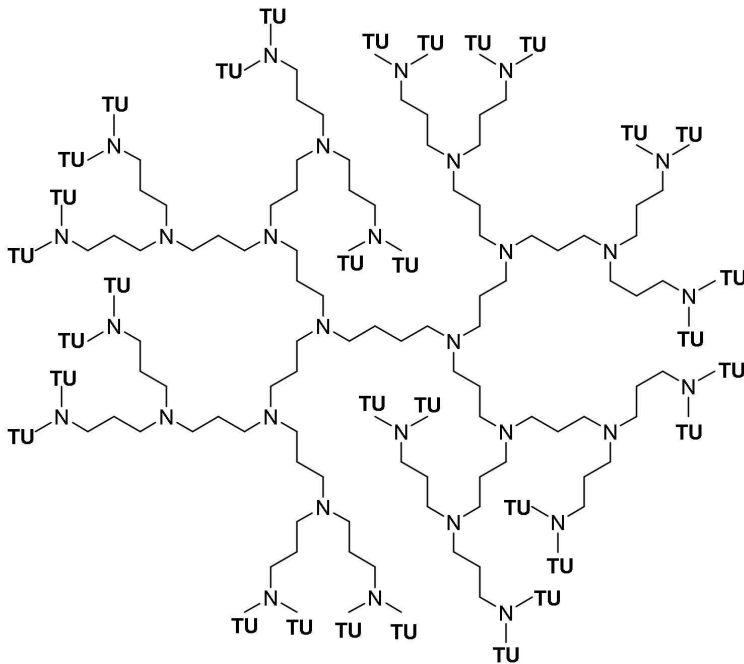
[0417]

[0418] 또는



[0419]

[0420] 또는



[0421]

[0422] (식에서, 말단 단위 (TU)는 수소 및 0 및 N으로 이루어진 군으로부터 개별적으로 독립적으로 선택되는 1 내지 8 개 헤테로원자를 임의로 함유하는 $C_{1-C_{30}}$ 알킬, 아릴, 아릴렌-알킬 또는 알킬렌-아릴 기로부터 개별적으로 독립적으로 선택되고, 단 다가 분자의 모든 TU가 수소는 아니다.

[0423] 진술 5. 전술한 진술 중 어느 하나에 따른 나노입자에 있어서, 안정화제는

[0424] - 아포리포단백질, 아포리포단백질 유도체, 아포리포단백질 모방체 및/또는 아포리포단백질 모방체 유도체;

[0425] - 폴리에틸렌 글리콜 또는 폴리에틸렌 글리콜 변형된 분자;

[0426] - 친수성 중합체;

[0427] - 다당류 또는 다당류 변형된 분자; 또는

[0428] - 폴리사르코신 또는 폴리사르코신 변형된 분자이다.

[0429] 진술 6. 전술한 진술 중 어느 하나에 따른 나노입자에 있어서, 아포리포단백질, 아포리포단백질 유도체, 아포리포단백질 모방체 또는 아포리포단백질 모방체 유도체는 apo A1, apo A1-Milano, apo A2, apo A4, apo A5, apo B48, apo B100, apo C-I, apo C-II, apo C-III, apo C-IV, apo D, apo E, apo F, apo H, apo L 및 apo M 또는 이의 모방체 또는 유도체로부터 선택되고,

[0430] 바람직하게 apo A1, apo A2, apo A4, apo A5, apo B100, apo C-I, apo C-II, apo C-III, apo C-IV 및 apo E 또는 이의 모방체 또는 유도체로부터 선택되고,

[0431] 보다 바람직하게 apo A1, apo A4, apo A5, apo B100, apo C-III 및 apo E 또는 이의 모방체 또는 유도체로부터 선택되고,

[0432] 가장 바람직하게 apo A1, apo B100 및 apo E 또는 이의 모방체 또는 유도체로부터 선택된다.

[0433] 진술 7. 전술한 진술 중 어느 하나에 따른 나노입자에 있어서, 핵산은 RNA, DNA 또는 핵산 유사체이고,

[0434] 바람직하게 RNA는 마이크로RNA (miRNA), 소형 간섭 RNA (siRNA), piwi-상호작용 RNA (piRNA), 소형 핵 RNA (snoRNA), 전달 RNA (tRNA), tRNA-유래 소형 RNA (tsRNA), 소형 조절 RNA (srRNA), 메신저 RNA (mRNA), 변형된 mRNA, 리보솜 RNA (rRNA), 자기-증폭 RNA (saRNA), 원형 RNA (circRNA), 긴 비-코딩 RNA (lncRNA), 또는 가이드 RNA (gRNA) 또는 이의 조합 및/또는 이의 변형이거나; 또는

[0435] 바람직하게 DNA는 단일 가닥 또는 이중 가닥 DNA이거나; 또는

- [0436] 바람직하게 핵산은 포스포디에스테르 골격 또는 2' 리보스의 변형을 함유하는 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오시드 유사체로 이루어지거나 또는 그를 포함하는 단일 가닥 DNA 또는 RNA인 안티센스 올리고뉴클레오타이드이고, 보다 바람직하게 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오시드 유사체는 잠금 핵산 (LNA), 가교 핵산 (BNA), 모르폴리노 또는 펩티드 핵산 (PNA)으로부터 선택된다.
- [0437] 진술 8. 전술한 진술 중 어느 하나에 따른 나노입자에 있어서, 스테롤은 바람직하게 스테롤, 콜레스테롤, 에르고스테롤, 호파노이드, 히드록시스테로이드, 파이토스테롤, 스테로이드, 주스테롤, 스티그마스테롤, 또는 β -토스테롤, 또는 이의 조합으로부터 선택된다.
- [0438] 진술 9. 전술한 진술 중 어느 하나에 따른 나노입자에 있어서, 인지질은 포스파티딜콜린, 포스파티딜에탄올아민, 포스파티딜세린 및 포스파티딜글리세롤 또는 이의 조합으로부터 선택되고, 바람직하게 인지질의 아실 기 중 적어도 하나, 보다 바람직하게 둘 모두는 장쇄 지방산으로부터 유래되고, 보다 더 바람직하게 상기 장쇄 지방산은 라우르산, 라우롤레산, 미리스트산, 미리스톨레산, 팔미트산, 팔미톨레산, 스테아르산, 올레산 및 리놀레산, 또는 이의 조합으로부터 선택된다.
- [0439] 진술 10. 전술한 진술 중 어느 하나에 따른 나노입자로서, 충전제 분자를 더 포함하고, 바람직하게 충전제 분자는 글리세리드 분자이고, 보다 바람직하게 충전제 분자는 트리글리세리드, 변형된 트리글리세리드, 및 콜레스테릴 에스테르, 또는 이의 조합으로부터 선택되고, 바람직하게 트리글리세리드는 C6-C18 지방산, 바람직하게 트리카프릴린으로부터 유래되고/되거나, 콜레스테릴 에스테르는 콜레스테릴 아세테이트, 콜레스테릴 카프릴레이트 및/또는 콜레스테릴 올레에이트이다.
- [0440] 진술 11. 전술한 진술 중 어느 하나에 따른 나노입자에 있어서, 아포리포단백질, 아포리포단백질 유도체, 아포리포단백질 모방체 또는 아포리포단백질 모방체 유도체의 양은 0.1 내지 90 중량% 범위이고/이거나;
- [0441] 핵산의 양 0.01 내지 90 중량% 범위이고/이거나;
- [0442] 인지질의 양은 0.1 내지 95 중량% 범위이고/이거나;
- [0443] 스테롤은 0.1 내지 95 중량% 범위이고/이거나;
- [0444] 다가 분자의 양은 0.1 내지 95 중량% 범위이고,
- [0445] 임의로 존재하는 충전제의 양은 0 내지 95 중량%의 범위를 포함하고,
- [0446] 중량%는 이들 5종 성분에 선택적인 제6 충전제 성분이 더해진 조합량을 기반으로 하고, 즉 이들 5종 또는 6종 성분은 나노입자의 100 중량%까지 첨가된다.
- [0447] 진술 12. 전술한 진술 중 어느 하나에 따른 나노입자 및 생리학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물로서, 바람직하게 조성물은 약학 조성물이다.
- [0448] 진술 13. 의약으로서 사용을 위한 진술 1 내지 11 중 어느 하나에 따른 나노입자, 또는 진술 12에 따른 조성물.
- [0449] 진술 14. 진술 13에 따른 나노입자 또는 조성물에 있어서, 사용은 골수 구획 또는 비장으로 핵산의 전달을 포함한다.
- [0450] 진술 15. 나노입자를 제조하는 방법으로서,
- [0451] a) 유기 용매 중 (지질) 성분과 수성 완충액 중 핵산을 혼합, 바람직하게 급속 혼합하여 나노입자를 생산하는 단계로서, (지질) 성분은 인지질, 스테롤, 다가 분자, 및 임의로 충전제 분자를 포함하고, 수성 완충액은 5.5 이하의 pH, 바람직하게 5.0 이하의 pH를 갖는 것인 단계; 및
- [0452] b) 지질 나노입자를 안정화제, 바람직하게 아포리포단백질, 아포리포단백질 유도체, 아포리포단백질 모방체 및/또는 아포리포단백질 모방체 유도체와 혼합, 바람직하게 급속 혼합하여, 5.5와 9.0 사이의 pH, 바람직하게 6.0과 8.0 사이의 pH, 보다 바람직하게 6.5와 8.0 사이의 pH에서 나노입자를 생산하는 단계를 포함한다.
- [0453] 모든 인용된 참조 문헌은 그들 전체로 참조하여 본 명세서에 편입된다.
- [0454] 실시예
- [0455] 실시예 1 - 다가 분자의 설계 및 합성.
- [0456] 표 S1 및 S2에서, 제조된 다가 분자의 특성 개요가 제공된다. 도 1, 2, 및 3은 일련의 다가 분자의 분자 구

조를 제공한다.

표 S1. 다가 분자 특성.

항목	다가 물질	MW (달톤)	#N (-)	MW / #N (달톤)	BU	x	y	z
1	A1	3722	14	266	Ila	4	2	16
2	A2	1791	6	298	Ila	4	1	8
3	A3	2464	6	411	Ila	4	1	8
4	A4	1342	6	224	Ila	4	1	8
5	A5	5068	14	362	Ila	4	2	16
6	A6	2015	6	336	Ila	4	1	8
7	A7	1903	6	317	Ila (p = 3)	4	1	8
8	A8	4378	14	313	Ilb	4	2	16
9	A9	1053	3	351	없음	5	0	5
10	A10	1025	3	342	없음	5	0	5
11	A11	882	3	294	없음	4	0	4
12	A12	1053	3	351	없음	5	0	5
13	A13	1791	6	298	Ila	4	1	8
14	A14	1847	6	308	Ila (p = 2)	4	1	8
15	A15	1990	6	332	Ilb	4	1	8
16	B1	1326	2	663	Ila	4	1	8
17	B2	1559	2	779	Ila	4	1	8
18	B3	2792	6	465	Ila	4	2	16
19	B4	3257	6	543	Ila	4	2	16
20	C1	7359	30	245	Ila	4	3	32
21	C2	1735	6	289	Ila	4	1	8
22	D1	717	2	359	Ila	4	1	8
23	D2	818	2	409	Ilc (MeCl)	4	1	8
24	D3	418	6	70	Ilc (MeCl)	4	1	8
25	D4	2565	6	428	Ilc (MeCl)	4	1	8
26	D5	1574	6	262	Ila	4	2	16
27	D6	1877	6	313	Ilc (MeCl)	4	2	16
28	D7	1368	14	98	Ilc (MeCl)	4	2	16

MW = 분자량; #N = 물질 중 이온화가능 및/또는 양이온성 기의 수; BU = 화학식 (II)로 정의된 분자 단위; x, y 및 z 는 화학식 (I)에 따름. 모든 (Ila)는 표시된 경우를 제외하고 p = 1 임. 모든 (Ilb) 및 (Ilc)는 각각 q = 1 및 p = 1 임. (Ilc)는 MeCl 또는 MeI 로 표시된 바와 같이 클로라이드 또는 아이오다이드 반대 음이온을 갖는 메틸화된 덴드리머임.

[0457]

표 S2. 다가 분자 특성.

항목	다가 물질	MW (달톤)	#N (-)	MW / #N (달톤)	BU	X	Y	z
29	E1	1350	6	225	IIa	4	1	8
30	E2	1115	3	372	없음	4	0	4
31	E3	1343	3	448	없음	5	0	5
32	E4	1072	3	357	없음	5	0	5
33	E5	1057	2	529	없음	4	0	4
34	F1	1907	6	318	IIa	4	1	8
35	G1	1567	6	261	IIa	4	1	8
36	G2	1791	6	299	IIa	4	1	8
37	G3	3722	14	266	IIa	4	2	16
38	G4	7585	30	253	IIa	4	3	32
39	G5	1903	6	317	IIa (p = 3)	4	1	8
40	G6	3930	14	281	IIb	4	2	16
41	G7	913	3	304	없음	5	0	5
42	G8	885	3	295	없음	5	0	5
43	G9	770	3	257	없음	4	0	4
44	H1	1446	6	241	IIa	4	1	8
45	J1	1270	2	635	IIa	4	1	8
46	J2	1554	2	777	IIc (MeI)	4	1	8
47	J3	1270	2	635	IIc (MeCl)	4	1	8
48	J4	5502	14	393	IIa	4	3	32
49	J5	7489	14	535	IIc (MeI)	4	3	32
50	J6	6209	14	443	IIc (MeCl)	4	3	32
51	J7	821	2	411	IIa	4	1	8
52	J8	1022	2	511	IIb	4	1	8
53	J9	1887	6	315	IIa	4	1	8
54	J10	1887	6	315	IIa	4	1	8
55	J11	1999	6	333	IIa	4	1	8

MW = 분자량; #N = 물질 중 이온화가능 및/또는 양이온성 기의 개; BU = 화학식 (II)로 정의된 바와 같은 분자 단위; x, y 및 z 는 화학식 (I)에 따름. 모든 (IIa)는 표시된 경우를 제외하고 p = 1 임. 모든 (IIb) 및 (IIc)는 각각 q =1 및 p = 1 임. (IIc)는 MeCl 또는 MeI 로 표시된 바와 같이 클로라이드 또는 아이오다이드 반대 음이온을 갖는 메틸화된 덴드리머임.

[0458]

[0459]

재료 및 방법

[0460]

모든 시약, 화학물, 물질 및 용매는 상업적 출처에서 수득하였고 받은 대로 사용하였다. 모든 용매는 AR 품 질이었다. DCM = 디클로로메탄; CHCl₃ = 클로로포름; MeCN = 아세토니트릴; MeOH = 메탄올; EtOH = 에탄올; IPA = 이소-프로판올; DMSO = 디메틸-설폭시드; THF = 테트라히드로퓨란; 1,1,1,3,3,3-헥사플루오로이소프로판 올 = HFIP; DMF = 디메틸포름아미드. 합성 절차에서, 당량 (eq)은 몰 당량이다.

[0461]

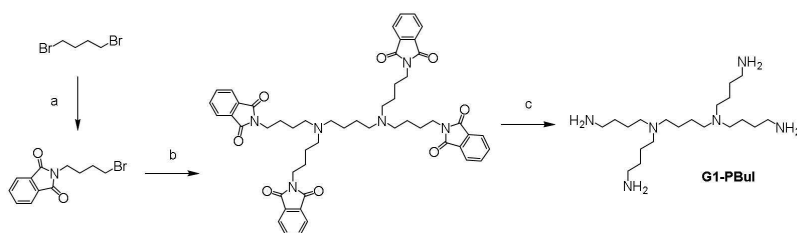
NMR 스펙트럼은 Bruker Avance III HD 분광계에서 298 K (각각 ¹H-NMR 및 ¹³C-NMR에 대해 400 MHz 및 100 MHz) 에서 기록되었다. 화학적 이동은 실온에서 TMS로부터 ppm 다운필드로 보고된다. 분할 패턴에 사용된 약 어는 다음과 같다: s = 단일항, t = 삼중항, q = 사중항, m = 다중항, 및 br = 광폭.

[0462]

HPLC-PDA/ESI-MS는 광다이오드 어레이 검출기에 결합된 Shimadzu LC-10 AD VP 시리즈 HPLC (Finnigan Surveyor PDA Plus detector, Thermo Electron Corporation) 및 전기분무 이온화 (ESI)를 적용하는 이온-트랩 질량 분광 계 (LCQ Fleet, Thermo Scientific)를 사용해 수행되었다. HPLC-분석은 1-4 μL의 주입 부피, 0.2 mL min⁻¹의 유속 및 전형적으로 H₂O 중 MeCN (둘 모두는 0.1 % 포름산을 함유함)의 구배 (10분 간 5% 내지 100%, 추가 3분 동안 100%에서 유지)를 298 K에서 사용하여 Alltech Alltima HP C18 3μ 컬럼을 사용해 수행되었다.

[0463] MALDI-TOF-MS는 α -시아노-4-히드록시신남산 (CHCA), 2,5-디히드록시벤조산 (DHB) 또는 trans-2-[3-(4-tert-부틸페닐)-2-메틸-2-프로페닐리덴]말로노니트릴 (DCTB) 매트릭스를 사용하여 Autoflex Speed (Bruker) 분광계에서 측정되었다.

[0464] **빌딩 블록**



[0465]

[0466] G1 폴리(부틸렌 이민) 텐드러머의 합성. (a) 포타슘 프탈리미드, DMF, 48시간, rt; (b) 1,4-디아미노부탄, K_2CO_3 , MeCN, 40시간, 환류; (c) $N_2H_4 \cdot H_2O$, EtOH, 16시간, 환류.

[0467] **N-(4-브로모부틸)프탈리미드**

[0468] 1,4-디브로모부탄 (86.4 g, 0.4 mol, 4 eq) 및 포타슘 프탈리미드 (18.5 g, 0.1 mol, 1 eq)를 DMF (75 mL)에 용해시켰다 (포타슘 프탈리미드는 완전하게 용해되지 않았다). 반응 혼합물은 48시간 동안 실온에서 교반하였다. 다음으로 반응 혼합물을 물 (600 mL)에 부었고, 추출 깔대기로 옮기고 디에틸 에테르 (2 x 50 mL)로 추출하였다. 배합된 에테르 층을 포화된 KCl-용액 (2 x 25 mL)으로 세척하였다. 에테르 층은 Na_2SO_4 를 사용해 건조시켰고, 현탁액을 여과하고, 여과물을 진공 농축하였다. 생산물은 헵탄/DCM의 혼합물 (0-100% DCM)을 사용한 실리카 컬럼 크로마토그래피를 사용해 정제하여서 백색 고체를 산출하였다. 마지막 불순물은 n-헵탄 중에서 고체를 16시간 동안 실온에서 교반하고, 여과, 세척, 및 잔류물의 진공 건조를 통해 제거하여 생산물을 산출하였다 (14.9 g 52.7 mmol, 53%). 대안적으로 미정제 생산물은 n-헵탄으로부터 재결정화를 통해서 정제할 수 있다.

[0469] ^1H NMR (400 MHz, 클로로포름-d) δ 7.85 (m, 2H), 7.72 (m, 2H), 3.73 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 3.45 (t, J = 6.3 Hz, 2H), 1.97 - 1.80 (m, 4H).

[0470] **N,N,N',N'-테트라(4-프탈리미도부틸)-1,4-디아미노부탄**

[0471] N-(4-브로모부틸)프탈리미드 (1.41 g, 5 mmol, 5 eq), 1,4-디아미노부탄 (88 mg, 1 mmol, 1 eq) 및 K_2CO_3 (691 mg, 5 mmol, 5 eq)를 함께 MeCN (5 mL) 중에서 혼합하였고, 40시간 동안 환류에서 교반하였다. 반응 혼합물을 냉각시키고, 현탁액을 여과하였으며, 여과물을 진공 농축하였다. 생산물은 MeOH/ $CHCl_3$ (0-10% MeOH)의 혼합물로 용리하는 실리카 컬럼 크로마토그래피를 사용하여 정제하여서 호박색 점성 오일로서 생산물을 얻었다 (222 mg, 0.25 mmol, 25%).

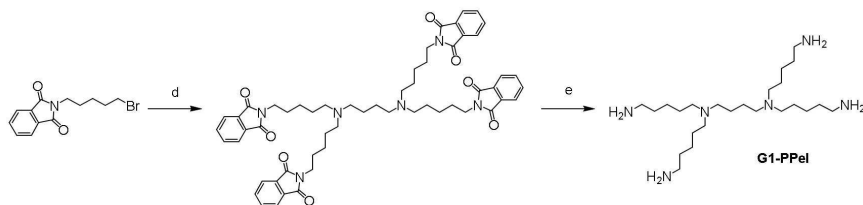
[0472] ^1H NMR (399 MHz, 클로로포름-d) δ 7.86 - 7.77 (m, 7H), 7.75 - 7.64 (m, 8H), 3.68 (t, J = 7.0 Hz, 8H), 2.69 (sb, 4H), 2.39 (s, 8H), 1.68 (s, 13H), 1.40 (d, J = 45.6 Hz, 10H). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 168.19, 133.73, 132.03, 123.00, 53.77, 53.25, 37.73, 26.42, 24.74, 24.25. ESI-MS: $C_{52}H_{56}N_6O_8$ 에 대해 계산된 m/z 892.42; Obs. 893.58 $[M+H]^+$ 447.42, $[M+H]^{2+}$.

[0473] **N,N,N',N'-테트라(4-아미노부틸)-1,4-디아미노부탄 (G1-PBuI)**

[0474] 히드라진 수화물 (0.96 mL, 19.8 mmol, 20 eq)은 EtOH (30 mL) 중 N,N,N',N'-테트라(4-프탈리미도부틸)-1,4-디아미노부탄 (884 mg, 0.99 mmol, 1 eq)의 교반 현탁액에 첨가되었다. 반응 혼합물은 16시간 동안 환류까지 가열하여 백색 현탁액을 얻었다. 현탁액을 유리 분말 깔대기에서 여과시키고 잔류물을 에탄올로 세척하였다. 여과물은 진공 농축하여 생산물 및 2,3-디히드로프탈라진-1,4-디온의 혼합물인 백색의 끈적한 물질 (100 mg, 0.27 mmol, 27%)을 얻었다.

[0475] ^1H NMR (399 MHz, 클로로포름-d) δ 2.75 - 2.65 (m, 8H), 2.46 - 2.34 (m, 12H), 2.24 (s br, 8H), 1.56 -

1.42 (m, J = 4.4 Hz, 16H), 1.42 - 1.32 (m, 4H). ESI-MS: C₂₀H₄₈N₆에 대해 계산된 m/z 372.39; Obs. 373.50 [M+H]⁺.



[0476]

[0477] G1 폴리(펜틸렌 이민) 텐드리머의 합성. (d) 1,4-디아미노부탄, K₂CO₃, MeCN, 40시간, 환류; (e) N₂H₄·H₂O, EtOH, 16시간, 환류; (f) 프로판-2-올, 60℃, 112시간.

[0478] N,N,N',N'-테트라(5-프탈리미도펜틸)-1,4-디아미노부탄

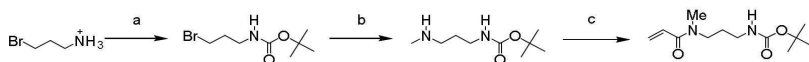
[0479] N-(5-브로모펜틸)프탈리미드 (14.8 g, 50 mmol, 5 eq), 1,4-디아미노부탄 (882 mg, 10 mmol, 1 eq) 및 K₂CO₃ (12 mg, 80 mmol, 8 eq)를 MeCN (50 mL)에 혼합하였고 40시간 동안 환류에서 교반하였다. 반응 혼합물을 냉각시켰고, 현탁액을 여과하고, 여과물을 진공 농축하였다. 생산물은 MeOH/CHCl₃ (0-10% MeOH)의 혼합물로 용리하는 실리카 컬럼 크로마토그래피를 사용해 정제하여 호박색의 매우 점성인 유성 생산물을 얻었다 (3.12 g, 3.28 mmol, 33%).

[0480] ¹H NMR (400 MHz, 클로로포름-d) δ 7.82 (dd, J = 5.4, 3.0 Hz, 8H), 7.74 - 7.65 (m, 8H), 3.67 (t, J = 7.2 Hz, 8H), 2.41 (m, 12H), 1.68 (p, J = 7.4 Hz, 8H), 1.48 (m, 8H), 1.39 (m, 4H), 1.37 - 1.20 (m, 8H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 168.29, 133.81, 132.07, 123.07, 53.62, 53.50, 37.77, 28.36, 25.89, 24.62, 24.24. ESI-MS: C₅₆H₆₄N₆O₈에 대해 계산된 m/z 948.48; Obs. 949.58 [M+H]⁺ 475.50, [M+H]²⁺.

[0481] N,N,N',N'-테트라(5-아미노펜틸)-1,4-디아미노부탄 (G1-PPeI)

[0482] 히드라진 수화물 (3.08 g, 61.5 mmol, 20 eq)을 EtOH (50 mL) 중 N,N,N',N'-테트라(5-프탈리미도펜틸)-1,4-디아미노부탄 (2.92 g, 3.07 mmol, 1 eq)의 교반 현탁액에 첨가하였다. 반응 혼합물을 16시간 동안 환류까지 가열하여서 흰색 현탁액을 얻었다. 현탁액은 유리 분말 깔대기에서 여과하였고 에탄올로 세척하였다. 여과물을 진공 농축하였고, 클로로포름에 재용해하여 현탁액을 얻었다. 현탁액을 여과하였고, 여과물을 진공 농축하였다. 마지막 미량의 2,3-디히드로프탈라진-1,4-디온을 제거하기 위해서, 잔류물을 n-펜탄/클로로포름 1:1의 혼합물에 재용해시켰고, 여과하여, 여과물을 진공 농축하고 생산물을 연노란색 점성 오일로서 얻었다 (950 mg, 2.22 mmol, 72%).

[0483] ¹H NMR (400 MHz, 클로로포름-d) δ 2.69 (t, J = 7.0 Hz, 8H), 2.39 (m, 12H), 1.67 (s br, 8H), 1.45 (m, 20H), 1.37 - 1.26 (m, 8H). ESI-MS: C₂₄H₅₆N₆에 대해 계산된 m/z 428.46; Obs. 429.58 [M+H]⁺.



[0484]

[0485] tert-부틸 (3-(N-메틸아크릴아미도)프로필)카바메이트의 합성. (a) (Boc)₂O, DCM, 0℃ 내지 r.t., 72시간, 95%; (b) MeOH, KI, EtOH 중 33 w/w% 메틸아민, 50℃, 20시간, 63%; (c) 아크릴로일 클로라이드, TEA, DCM, 0℃ 내지 r.t., 16시간, 68%.

[0486] tert-부틸 (3-브로모프로필)카바메이트

[0487] MeOH (40 mL) 중 3-브로모프로필아민 히드로브로마이드 염 (8.6 g, 39.3, 1 eq)의 빙냉 용액에 트리에틸아민 (4.2 g, 41.3 mmol, 1.05 eq)을 첨가하였다. 다음으로 di-tert-부틸 카르보네이트는 반응 혼합물에 분할된 양으로 첨가하였다. 반응 혼합물의 온도를 실온까지 서서히 상승시켰고 추가 16시간 동안 교반하였다. 이어서 혼합물을 진공 농축하였고, 디클로로메탄 및 물의 혼합물에 재용해시켰고, 분리 깔대기로 옮기고 수층을 디클로로메탄 (3x)으로 추출하였다. 수집된 디클로로메탄층은 0.5 M 시트르산 용액 (1 x 25 mL), 및 염수

(1 x 25 mL)로 세척하였다. 디클로로메탄 층은 Na_2SO_4 를 사용해 건조시켰고 현탁액을 여과하였다. 용매의 진공 증발로 생산물을 무색 오일로서 산출하였다 (8.86 g, 37.2 mmol, 95%).

[0488] **tert-부틸 (3-(메틸아미노)프로필)카바메이트**

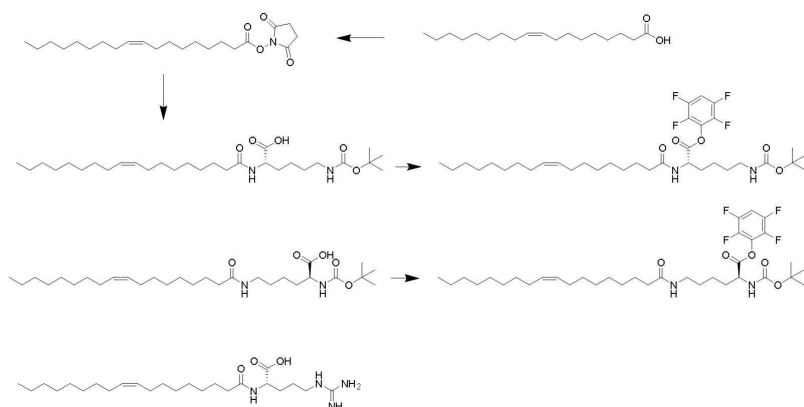
[0489] 에탄올 (30 mL) 중 tert-부틸 (3-브로모프로필)카바메이트 (8.86 g, 37.2 mmol, 1 eq)의 교반 용액에 MeOH (45 mL, 446 mmol, 10 eq) 및 KI (0.74 g, 4.46 mmol, 0.1 eq) 중 메틸아민의 40% w/w 용액을 첨가하였고, 온도는 50°C 까지 상승시켰다. 50°C에서 20시간 이후에, 반응 혼합물을 진공 농축하였다. 잔류물을 DCM 및 물에 재용해시켰고 수층은 DCM (3 x 25 mL)으로 추출하였다. 수집된 DCM-층은 Na_2SO_4 를 사용해 건조시켰고, 현탁액을 여과하고 여과물을 진공 농축하여 무색 유성 부산물을 얻었다. 수층은 6 M NaOH-용액을 사용해 pH > 10으로 염기성화시켰고 CHCl_3 (3 x 50 mL)로 추출하였다. 수집된 CHCl_3 -층은 Na_2SO_4 를 사용해 건조시켰고 현탁액을 여과하였다. 여과물을 진공 농축하여 무색 오일을 산출하였다 (4.84 g, 25.7 mmol, 58%).

[0490] ^1H NMR (399 MHz, 클로로포름-*d*) δ 5.06 (s, 1H), 3.20 (q, J = 6.3 Hz, 2H), 2.63 (t, J = 6.7 Hz, 2H), 2.42 (s, 3H), 1.65 (p, J = 6.7 Hz, 2H), 1.44 (s, 11H), 1.34 (s, 2H). ESI-MS: $\text{C}_9\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2$ 에 대해 계산된 m/z 188.15. 측정 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 189.17.

[0491] **tert-부틸 (3-(N-메틸아크릴아미도)프로필)카바메이트**

[0492] DCM (10 mL) 중 아크릴로일 클로라이드 (2.36 g, 26.1 mmol, 1.1 eq)의 용액을 DCM (50 mL) 중 tert-부틸 (3-(메틸아미노)프로필)카바메이트 (4.43 g, 23.5 mmol, 1 eq) 및 트리에틸아민 (3.9 mL, 28.2 mmol, 1.2 eq)의 빙냉 용액에 점적하였다. 첨가 후에, 반응 온도는 실온으로 상승되도록 하였다. 반응 혼합물은 20시간 동안 실온에서 교반하였다. 반응 혼합물을 추출 깔대기로 옮겼고 DCM-층을 물 (1 x 25 mL), 1 M KHSO_4 -용액 (1 x 25 mL), 물 (1 x 25 mL), 1 M NaHCO_3 -용액 및 물 (1 x 25 mL)로 세척하였다. DCM-층은 Na_2SO_4 를 사용해 건조시켰고, 현탁액을 여과하고 여과물을 진공 농축하여 미정제 생산물을 노란색 오일로서 산출하였다. 아크릴-아미드 생산물은 MeOH 및 DCM의 혼합물 (DCM 중 0 내지 5% MeOH)로 용리하는 컬럼 크로마토그래피를 사용해 더 정제하여 연노란색 오일을 산출하였다 (3.85 g, 15.9 mmol, 68%).

[0493] ^1H NMR (399 MHz, 클로로포름-*d*) δ 6.57 (m, 1H), 6.32 (dd, J = 16.7, 2.0 Hz, 1H), 5.70 (m, 1H), 5.42 (s, .74H), 4.63 (s, .26H), 3.51 (t, J = 6.4 Hz, 1.42H), 3.41 (t, J = 7.7 Hz, .65H), 3.11 (m, 4H), 3.06 (s, 2.33H), 3.00 (s, .87H), 1.80 (p, J = 7.2 Hz, .57H), 1.71 (p, J = 6.3 Hz, 1.47H), 1.44 (s, 9H). ESI-MS: $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_3$ 에 대해 계산된 m/z 242.16. 측정 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 265.17.



[0494]

[0495] 올레일-아미노-산 빌딩 블록의 합성.

[0496] **2,5-디옥소피롤리딘-1-일 올레이트 (올레일-NHS 에스테르)**

[0497] N-히드록시-숙신이미드 (3.37 g, 29.3 mmol, 1.14 eq) 및 DIPEA (8.0 mL)를 질소 분위기에서 THF (60 mL)에 용해시켰다. THF (50 mL) 중 올레오일 클로라이드 (7.74 g, 25.7 mmol, 1 eq)의 용액을 0°C에서 점적하였다. 실온에서 20시간 후에, 반응 혼합물을 건조까지 증발시켰다. 미정제 생산물을 클로로포름 (200 mL)에 용해시켰고, 수성 0.2M NaOH (500 mL)로 세척하였다. 수층을 클로로포름 (100 mL)으로 추출하였다. 배합

된 클로로포름 분획을 염수 (200 mL)로 세척하였다. 실리카 상에서 컬럼 크로마토그래피에 의한 정제 (클로로포름 : 에틸 아세테이트 80:20으로 용리). 수율: 6.0 g (61%)의 백색 고체.

[0498] $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, 클로로포름- d) δ 5.72-4.84 (m, 2H), 2.83 (s, 4H), 2.60 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 2.16-1.89 (m, 4H), 1.75 (m, J = 7.4 Hz, 2H), 1.69-1.51 (m, 2H), 1.51-1.10 (m, 18H), 0.99-0.45 (m, 3H, J = 6.8 Hz). MALDI-TOF-MS (CHCA 매트릭스, 양성 반사기 방식): Obs. m/z = (M+H)⁺ 380.28. 계산: $\text{C}_{22}\text{H}_{37}\text{NO}_4$ (관측 질량 379.27; 분자량 379.54).

[0499] N^6 -(tert-부톡시카르보닐)- N^2 -올레오일-L-리신

[0500] N-엡실론-t-부틸옥시카르보닐-L-리신 (551 mg, 2.23 mmol, 1.0 eq)을 질소의 불활성 분위기에서 DCM (17 mL)에 용해시켰다. 2,5-디옥소피롤리딘-1-일 올레에이트 (851 mg, 2.21 mmol, 0.99 eq) 및 트리에틸아민 (0.70 mL; 2 eq)을 첨가하였고 교반은 19시간 동안 계속하였다. DCM (50 mL)을 첨가하였고 유기층을 수성 1 M KHSO_4 (3 x 50 mL), 물 (3 x 50 mL), 및 염수 (100 mL)로 세척하였다. 건조까지 증발 이후에, 미정제 생산물은 클로로포름:메탄올:아세트산 (10:10:1) 용리액을 사용한 실리카 상 컬럼 크로마토그래피를 통해 정제하였다. 수율: 813 mg (71%)의 백색 고체.

[0501] $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, 클로로포름- d) δ 6.60-6.40 (m, 1H), 5.47-5.22 (m, 2H), 4.67 (s, 1H), 4.51 (s, 1H), 3.13 (m, 2H), 2.3-1.5 (m, 12H), 1.44 (s, 9H), 1.5-1.2 (m, 22H), 0.88 (t, J = 6.9 Hz, 3H). MALDI-TOF-MS (CHCA 매트릭스, 양성 반사기 방식): Obs. m/z = (M+Na)⁺ 533.39. 계산: $\text{C}_{29}\text{H}_{54}\text{N}_2\text{O}_5$ (관측 질량 510.40; 분자량 510.74).

[0502] 2,3,5,6-테트라플루오로페닐 N^6 -(tert-부톡시카르보닐)- N^2 -올레오일-L-리시네이트

[0503] N^6 -(tert-부톡시카르보닐)- N^2 -올레오일-L-리신 (623 mg, 1.21 mmol, 1.00 eq) 및 2,3,5,6-테트라플루오로페놀 (302 mg, 1.82 mmol, 1.50 eq)을 DCM (10 mL)에 용해시켰고 질소 분위기에서 교반시켰다. 맑은 용액을 얼음/물 수조에서 냉각시켰고 EDC.HCl (302 mg, 1.57 mmol, 1.3 eq)을 첨가하였다. 클로로포름 (75 mL)을 18 시간 후에 첨가하였고, 용액을 물 (4 x 50 mL), 포화 소듐 바이카보네이트 용액 (50 mL)에 이어서, 물 (50 mL) 및 염수 (50 mL)로 세척하였다. 실리카 상에서 컬럼 크로마토그래피의 정제, 9:1 클로로포름:에틸 아세테이트로 용리. 수율: 470 mg (59%)의 백색 고체.

[0504] $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, 클로로포름- d) δ 7.02 (m, 1H), 6.41-5.98 (m, 1H), 5.34 (m, 2H), 4.93 (m, 1H), 4.61 (m, 1H), 3.15 (m, 2H), 2.26 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 2.00 (m, 4H), 1.95 (m, 2H), 1.65 (m, 2H), 1.52 (m, 4H), 1.44 (s, 9H), 1.35-1.22 (m, 22H), 0.88 (t, J = 6.9 Hz, 3H). $^{19}\text{F-NMR}$ (클로로포름- d) δ -138.6 (m, 2F), -152.4 (m, 2F).

[0505] N^2 -(tert-부톡시카르보닐)- N^6 -올레오일-L-리신

[0506] (tert-부톡시카르보닐)-L-리신 (245 mg, 0.99 mmol)을 질소 분위기에서 무수 DCM (6 mL)과 교반하였다. 2,5-디옥소피롤리딘-1-일 올레에이트 (380 mg, 1.0 mmol)에 이어서 트리에틸아민 (202 mg, 2.0 mmol)을 첨가하였고, 밤새 교반 동안 탁한 혼합물이 맑아졌다. 클로로포름 (50 mL)을 첨가하였고, 혼합물을 수성 1M KHSO_4 (20 mL), 물 (20 mL), 염수 (50 mL)로 세척하고, 마그네슘 술페이트에서 건조하였다. 용리액으로서 클로로포름:메탄올 20:1을 사용하여, 실리카 상에서 컬럼 크로마토그래피를 통해 정제하였다. 수율: 342 mg (67%)의 오일.

[0507] $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, 클로로포름- d) δ 5.70 (t, 1H), 5.45-5.17 (m, 2H), 5.25 (m, 1H), 4.30-4.10 (m, 2 s, 1H), 3.25 (m, 2H), 2.17 (t, J = 9.7 Hz, 2H), 1.99 (m, 4H), 1.86 (m, 1H), 1.73 (m, 1H), 1.65-1.15 (m, 31H), 0.87 (t, J = 6.9 Hz, 3H).

[0508] 2,3,5,6-테트라플루오로페닐 N^2 -(tert-부톡시카르보닐)- N^6 -올레오일-L-리시네이트

[0509] DCM (15 mL) 중 N^2 -(tert-부톡시카르보닐)- N^6 -올레오일-L-리신 (349 mg, 0.67 mmol) 및 2,3,5,6-테트라플루오로페놀 (205 mg, 1.23 mmol, 1.85 eq)의 용액에 질소 분위기에서 EDC.HCl (169 mg, 0.94 mmol, 1.41 eq)을 첨가

하였다. 21시간 후에, DCM (50 mL)을 첨가하였고, 유기층을 수성 포화 소듐 바이카보네이트 (3 x 50 mL)에 이어서 염수 (50 mL)로 세척하였다. 용액을 건조까지 증발시켰고, 미정제 생산물은 10:1 내지 20:7의 클로로포름:에틸 아세테이트 구배를 사용해 실리카 상에서 컬럼 크로마토그래피를 통해 정제하였다. 수율: 295 mg (67%)의 백색 분말.

[0510] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.02 (m, 1H), 5.49 (t, 1H), 5.40-5.25 (m, 2H), 5.17 (m, 1H), 4.62 and 4.44 (2 s, 1H), 3.29 (m, 2H), 2.16 (t, J = 9.7 Hz, 2H), 2.00 (m, 4H), 1.89 (m, 2H), 1.65-1.15 (m, 31H), 0.88 (t, J = 6.9 Hz, 3H).

[0511] **올레오일-L-아르기닌**

[0512] THF (32 mL)가 물 (32 mL) 중 아르기닌 (1.09 g, 6.26 mmol, 1.00 eq)의 용액에 격렬하게 교반하면서 첨가되었다. 소듐 바이카보네이트 (896 mg, 10.6 mmol, 1.69 eq)를 첨가하였고 15분 후에 맑은 용액을 수득하였다.

THF (32 mL) 중 2,5-디옥소피롤리딘-1-일 올레레이트 (2.64 g, 6.95 mmol, 1.11 eq)의 용액을 2시간 동안 점적하였다. 23시간 동안 교반을 계속하여서 맑은 용액이 생성되었다. THF를 회전식 증발기에서 제거하여, 얻어진 수층을 분별 깔대기로 옮겼다. 물 중 KHSO_4 (260 mL 중 1.49 g)의 용액을 첨가하였고, 클로로포름 (590 mL)과 함께 진탕되었다. 수층 pH = 3. 클로로포름 층은 염수 (300 mL)와 함께 진탕되었다. 회전식 증발기 상에서 클로로포름의 제거로 미정제 혼합물 (3.05 g)이 생성되었다. 클로로포름:메탄올 1:1로 용리하는, Buchi 80g HP 컬럼이 구비된 Grace Reveleris X2 플래시 크로마토그래피 시스템 (ELSD detection)에서 컬럼 크로마토그래피를 통해 정제되었다. 잔류 메탄올을 제거하기 위해서 (HCl 처리 전에 필요함) 생산물을 THF에 용해시켰고 농축하였다 (2배: 120 mL, 및 80 mL THF). 수율: 2.0 g (TLC, NMR, 및 MALDI-TOF를 통해 생산물이 순수한 것을 확인함). HCl 염의 제조: 생산물을 아르곤 분위기에서 DCM (90 mL) 및 THF (20 mL)으로 교반하면서 용해시킨 다음에 얼음/물 배스에서 냉각시켰다. 에테르 (4.5 mL) 중 2 M HCl의 용액을 5분 동안 점적하여서 맑은 용액을 생성시켰다. 용매를 회전식 증발기에서 제거하였고 잔류물을 진공 건조하였다. 수율: 2.09 g의 백색 발포체.

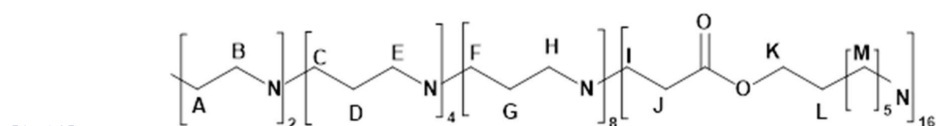
[0513] ^1H NMR (400 MHz, 클로로포름-d + TFA) δ 7.13 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 6.54 (s, 1H), 6.13 (s, 4H), 5.42-5.29 (m, 2H), 4.69 (m, 1H), 3.31 (m, 2H), 2.1-1.55 (m, 12H), 1.48-1.08 (m, 20H), 0.87 (t, J = 6.9Hz, 3H). MALDI-TOF-MS (CHCA 매트릭스, 양성 반사기 방식): Obs. m/z = ($M+H$) + 439.36. 계산: $\text{C}_{24}\text{H}_{46}\text{N}_4\text{O}_3$ (관측 질량: 438.36; HCl 염의 분자량: 475.10).

[0514] A. 아크릴레이트-에스테르에 의한 작용화 (마이클 첨가)

[0515] **일반 실시예 A1. G2-ACR-nC8-16**

[0516] 이 일반예는 16개 옥틸-에스테르 기로 완전하게 작용화된 PPI-덴드리머를 야기하는, n-옥틸 아크릴레이트와 G2-PPI-(NH_2)₈ 덴드리머의 마이클-첨가 반응을 기술한다.

[0517] G2 PPI 덴드리머 (n-부틸렌 코어; 0.20 g; 0.258 mmol; 2.06 mmol 1차 아민 기)를 이소-프로판올 (1 mL)에 용해시켰다. 과량의 n-옥틸 아크릴레이트 (1.73 mL, 1.53 g, 8.27 mmol; 32 moleqs)를 첨가하였고, 반응 혼합물을 질소의 불활성 분위기 하에 55°C에서 밀봉된 바이알 중에서 교반하였다. 반응의 진행은 ^1H -NMR로 모니터링하였다. 혼합물을 4일 동안 교반하였고, 그 이후에 전환이 완료되었다. 혼합물을 건조되도록 진공 증발시켰고, 잔류물은 MeCN (15 mL) 중에 4°C에서 교반하였다. 3-4시간 후에, 상청액을 디켄팅 (또는 피펫팅)하여 과량의 아크릴레이트를 제거하였다. MeCN 세척을 4°C에서 2회 더 반복하였고, 최종 1회는 -20°C에서 수행하였다 (장쇄 아크릴레이트 경우에 이것은 아크릴레이트의 침전을 야기할 수 있음). 생산물을 진공 건조하여서 연노란빛 오일을 산출하였다. 수율: 515 mg (54%). ^1H -NMR 스펙트럼은 바람직한 구조와 일치하였다.



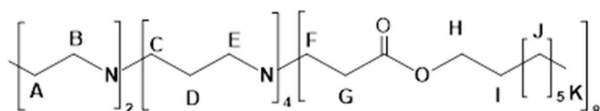
[0519] ^1H -NMR (400 MHz, 클로로포름-d) δ 4.04 (t, J = 6.8 Hz, 32H, K), 2.77 (t, J = 7.3 Hz, 32H, I), 2.54 -

2.27 (m, 84H, B, C, E, F, H, J), 1.58 (dt, J = 22.2, 6.9 Hz, 60H, A, D, G, L), 1.30 (dd, J = 14.0, 7.7 Hz, 160H, M), 1.08 - 0.64 (m, 48H, N).

[0520] MALDI-TOF-MS (CHCA 매트릭스, 양성 반사기 방식): Obs. $m/z = (M+H)^+$ 3722.19. 계산: $C_{216}H_{416}N_{14}O_{32}$ (관측 질량 3719.14; 분자량 3721.77).

[0521] **실시예 A2. G1-ACR-nC8-8**

[0522] G1-PPI-(NH₂)₄ (n-부틸렌 코어) 및 n-옥틸 아크릴레이트 간 반응은 실시예 A1에 대해 수행된 바와 유사한 방식으로 수행되었다. 수율: 758 mg (67%). ¹H-NMR 스펙트럼은 바람직한 구조와 일치되었다.



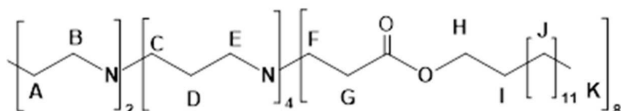
[0523]

[0524] ¹H NMR (400 MHz, 클로로포름-d) δ 4.05 (t, J = 6.8 Hz, 16H, H), 2.77 (t, J = 7.4 Hz, 16H, F), 2.40 (dt, J = 23.2, 7.5 Hz, 36H, B, C, E, G), 1.58 (dt, J = 23.6, 6.7 Hz, 28H, A, D, I), 1.47 - 1.07 (m, 80H, J), 1.07 - 0.57 (m, 24H, K).

[0525] MALDI-TOF-MS (CHCA 매트릭스, 양성 반사기 방식): Obs. $m/z = (M+H)^+$ 1791.52, $(M+Na)^+$ 1813.52, $(M+K)^+$ 1829.49. 계산: $C_{104}H_{200}N_6O_{16}$ (관측 질량 1789.50; 분자량 1790.77).

[0526] **실시예 A3. G1-ACR-nC14-8**

[0527] G1-PPI-(NH₂)₄ (n-부틸렌 코어) 및 n-테트라데실 아크릴레이트 간 반응은 실시예 A1에 대해 수행된 것과 유사한 방식으로 수행되었다. 그러나, HFIP는 용매로서 사용되었다. 작업: 50℃에서 HFIP의 진공 증발 이후에, 반응 혼합물은 50℃에서 3회 톨루엔과 함께 공-증발되었다. 잔류물은 실시예 1에 기술된 바와 유사한 방식으로 MeCN 처리를 통해 정제되었다. 수율: 615 mg (75 %). ¹H-NMR은 바람직한 구조와 일치되었다.



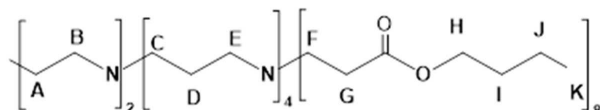
[0528]

[0529] ¹H NMR (399 MHz, 클로로포름-d) δ 4.04 (t, J = 6.9 Hz, 16H, H), 2.91 - 2.70 (m, 16H, F), 2.43 (t, J = 7.3 Hz, 36H, B, C, E, G), 1.61 (t, J = 7.0 Hz, 28H, A, D, I), 1.26 (m, 176H, J), 0.99 - 0.74 (m, 24H, K).

[0530] MALDI-TOF-MS (CHCA 매트릭스, 양성 반사기 방식): Obs. $m/z = (M+H)^+$ 2464.31, $(M+Na)^+$ 2489.30. 계산: $C_{152}H_{296}N_6O_{16}$ (관측 질량 2462.25; 분자량 2464.07).

[0531] **실시예 A4. G1-ACR-nC4-8**

[0532] G1-PPI-(NH₂)₄ (n-부틸렌 코어) 및 n-부틸 아크릴레이트 간 반응은 실시예 A1에 대해 수행된 것과 유사한 방식으로 수행되었다. 작업: 아크릴레이트 과량을 진공 하에서 증발을 통해 제거하였다. 아크릴레이트는 또한 아민-작용화된 실리카 스캐빈저와 함께 반응 혼합물을 교반하여 제거될 수 있다 (과량의 부틸 아크릴레이트는 실리카-결합된 아민 기와 반응을 통해 고정됨). 수율: 450 mg (53%). ¹H-NMR은 바람직한 구조와 일치되었다.



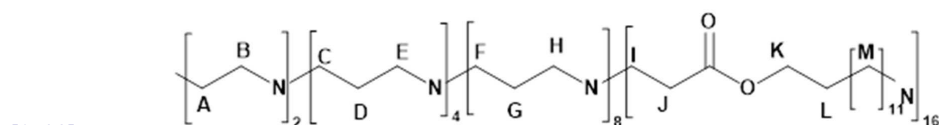
[0533]

[0534] ^1H NMR (399 MHz, 클로로포름- d) δ 4.06 (t, J = 6.7 Hz, 16H, H), 2.77 (t, J = 7.3 Hz, 16H, F), 2.55 - 2.14 (m, 36H, B, C, E, G), 1.87 - 1.46 (m, 28H, A, D, I), 1.46 - 1.29 (m, 16H, J), 0.93 (t, J = 7.4 Hz, 24H, K).

[0535] MALDI-TOF-MS (CHCA 매트릭스, 양성 반사기 방식): Obs. m/z = $(\text{M}+\text{H})^+$ 1342.02, $(\text{M}+\text{Na})^+$ 1364.02. 계산: $\text{C}_{72}\text{H}_{136}\text{N}_6\text{O}_{16}$ (관측 질량 1341.00; 분자량 1341.91).

[0536] **실시예 A5. G2-ACR-nC14-16**

[0537] G2-PPI-(NH_2)₈ (n-부틸렌 코어) 및 n-테트라데실 아크릴레이트 간 반응은 실시예 A3에 대해 수행된 바와 유사한 방식으로 수행되었다. 수율: 580 mg (60 %). ^1H -NMR은 바람직한 구조와 일치되었다.

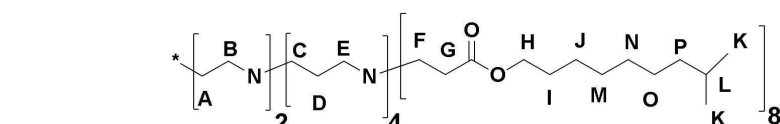


[0539] ^1H NMR (399 MHz, 클로로포름- d) δ 4.04 (s, 32H, K), 2.76 (t, J = 7.4 Hz, 32H, I), 2.41 (h, J = 8.0, 7.3 Hz, 84H, B, C, E, F, H, J), 1.60 (q, J = 7.0 Hz, 60H, A, D, G, L), 1.26 (s, 352H, M), 0.88 (s, 48H, N).

[0540] MALDI-TOF-MS (CHCA 매트릭스, 양성 반사기 방식): Obs. m/z = $(\text{M}+\text{H})^+$ 5068.95. 계산: $\text{C}_{312}\text{H}_{608}\text{N}_{14}\text{O}_{32}$ (관측 질량 5064.64; 분자량 5068.36).

[0541] **실시예 A6. G1-ACR-isoC10-8**

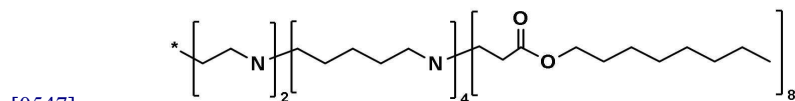
[0542] G1-PPI (DAB-Am-4) 및 이소-데실 아크릴레이트 간 반응은 실시예 A1에 대해 수행된 것과 유사한 방식으로 수행되었다. 수율: 0.85 g (67%). ^1H -NMR 스펙트럼은 바람직한 구조와 일치되었다.



[0544] ^1H NMR (399 MHz, 클로로포름- d) δ 4.23 - 3.74 (m, 16H, H), 2.77 (t, J = 7.3 Hz, 16H, F), 2.63 (s, 1H), 2.53 - 2.28 (m, 35H, G, C, E, B), 2.06 - 1.73 (m, 2H), 1.73 - 0.97 (m, 90H, A, D, I, J, M, O, L), 0.97 - 0.54 (m, 75H, K, N, P). MALDI-TOF-MS (CHCA 매트릭스, 양성 반사기 방식): Obs. m/z = $(\text{M}+\text{H})^+$ 2015.17. 소형 피크로서 m/z = $\text{M}+\text{H}^+$, 2029.76 (추가 CH_2). 계산: $\text{C}_{120}\text{H}_{232}\text{N}_6\text{O}_{16}$ (관측 질량 2013.75; 분자량 2015.20).

[0545] **실시예 A7. G1(PPeI)-ACR-C8-8**

[0546] N,N,N',N'-테트라(5-아미노펜틸)-1,4-디아미노부탄 (G1-PPeI, 상기 참조: 200 mg, 0.47 mmol, 1 eq) 및 n-옥틸 아크릴레이트 (1.6 mL, 1.4 g, 7.6 mmol, 16 eq)를 프로판-2-올 (IPA; 1 mL)에 용해시켰다. 혼합물을 60°C 까지 112시간 동안 가열하였고, 반응은 ^1H -NMR을 사용해 모니터링하였다. 혼합물을 냉각시키고 진공 농축하였다. 점성 오일을 MeCN에서 교반하였고, -20°C로 냉각하였고, 오일은 플라스크 바닥에 침강되도록 하였다. 상청액을 디켄팅하고, 절차를 3회 반복하여 유성 G1(PPeI)-ACR-C8-8 생산물을 얻었다.

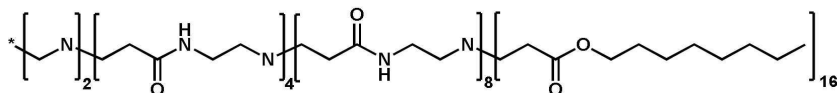


[0548] ^1H NMR (400 MHz, 클로로포름- d) δ 4.05 (t, J = 6.8 Hz, 16H), 2.76 (t, J = 7.3 Hz, 16H), 2.41 (q, J =

8.6, 8.1 Hz, 36H), 1.61 (p, $J = 6.9$ Hz, 16H), 1.43 (p, $J = 7.5$ Hz, 20H), 1.37-1.15 (m, 88H), 0.92-0.84 (t, $J = 6.8$ Hz, 24H). MALDI-TOF-MS (CHCA 매트릭스, 양성 반사기 방식): Obs. $m/z = (M+H)^+$ 1903.63, $(M+Na)^+$ 1925.60 계산: $C_{112}H_{216}N_6O_{16}$ (관측 질량 1901.63; 분자량 1902.99).

[0549] **실시예 A8. G2(PAMAM-C2)-ACR-C8-16**

[0550] 프로판-2-올 (IPA; 1 mL) 중 G2-PAMAM-C2 (에틸렌-디아민 코어; 8개 아민 말단 기; 200 mg, 0.14 mmol)의 교반 용액이 존재하는 반응 튜브에 n-옥틸-아크릴레이트 (825 mg, 4.48 mmol, 32 eq)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 60℃까지 304시간 동안 가열하였다. 반응 혼합물을 진공 농축하였다. 잔류물을 MeCN에서 교반하였고, -20℃ 까지 냉각시켜서, 생산물이 플라스크 바닥에 침강되도록 하였다. 상청액을 디켄팅하고 절차를 4회 반복하여 노란색 점성 오일을 산출하였다 (301 mg, 68.8 μ mol, 49%).

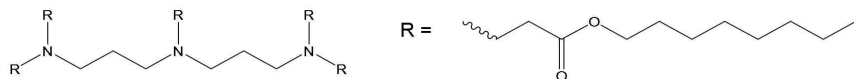


[0551]

[0552] ^1H NMR (400 MHz, 클로로포름- d) δ 7.72 (s, 12H), 4.04 (t, $J = 6.8$ Hz, 32H), 3.27 (q, $J = 5.8$ Hz, 24H), 2.79 (dt, $J = 13.8, 6.8$ Hz, 56H), 2.57 (dt, $J = 12.1, 5.9$ Hz, 28H), 2.42 (t, $J = 6.9$ Hz, 32H), 2.35 (d, $J = 6.7$ Hz, 24H), 1.62 (p, $J = 6.8$ Hz, 32H), 1.41 - 1.18 (m, 160H), 0.95 - 0.82 (m, 48H). MALDI-TOF-MS (DCBT 매트릭스, 양성 반사기 방식): Obs. $m/z = (M+H)^+$ 4378.32 계산: $C_{238}H_{448}N_{26}O_{44}$ (관측 질량 4375.36; 분자량 4378.34).

[0553] **실시예 A9. 비스(3-아미노프로필)아민-ACR-C8-5**

[0554] n-옥틸-아크릴레이트 (1.84 g, 10 mmol, 10 eq)를 이소-프로판올 (1 mL) 중 비스(3-아미노프로필)아민 (131 mg, 1 mmol)의 교반 용액에 첨가하였다. 반응 혼합물을 60℃까지 136시간 동안 가열하였고, 이후에 진공 농축하였다. 잔류물을 MeCN에서 교반하였고 -20℃로 냉각하여 생산물이 MeCN 층으로부터 상분리되도록 하였다. 상청액은 피펫을 사용해 조심스럽게 제거하였고, 절차를 5회 반복하였다. 잔류물을 진공 건조하여 맑은 무색 오일을 산출하였다 (769 mg, 0.73 mmol, 73%).

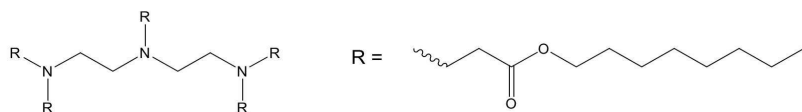


[0555]

[0556] ^1H NMR (400 MHz, 클로로포름- d) δ 4.05 (t, $J = 6.8$ Hz, 10H), 2.76 (td, $J = 7.4, 3.8$ Hz, 10H), 2.41 (dt, $J = 10.7, 6.8$ Hz, 18H), 1.74 - 1.48 (m, 14H), 1.42 - 1.16 (m, 50H), 0.95 - 0.80 (m, 15H). ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 172.9, 172.7, 64.6, 64.6, 51.8, 51.8, 49.3, 49.2, 32.6, 32.3, 31.8, 29.3, 29.2, 28.7, 28.7, 25.9, 24.8, 22.7, 14.1. MALDI-TOF-MS (CHCA 매트릭스, 양성 반사기 방식): Obs. $m/z = (M+H)^+$ 1052.85, $(M+Na)^+$ 1074.84, $(M+K)^+$ 1090.80. 계산: $C_{61}H_{117}N_3O_{10}$ (관측 질량 1051.87; 분자량 1052.62).

[0557] **실시예 A10. 비스(2-아미노에틸)아민-ACR-C8-5**

[0558] n-옥틸-아크릴레이트 (1.84 g, 10 mmol, 10 eq) 및 비스(2-아미노에틸)아민 (103 mg, 1 mmol)은 실시예 A9에 기술된 바와 유사한 방식으로 이소-프로판올에서 반응시켰다. 수율: 674 mg (0.66 mmol, 66%).



[0559]

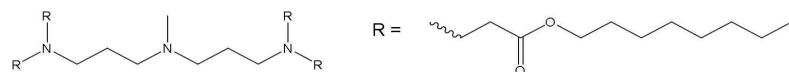
[0560] ^1H NMR (399 MHz, 클로로포름- d) δ 4.05 (t, $J = 6.8$ Hz, 10H), 2.78 (t, $J = 7.2$ Hz, 10H), 2.51 (s, 8H), 2.43 (t, $J = 7.3$ Hz, 10H), 1.62 (p, $J = 7.0$ Hz, 10H), 1.39 - 1.19 (m, 50H), 1.00 - 0.76 (m, 15H). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 172.7, 172.6, 64.6, 52.9, 52.3, 50.5, 49.8, 32.7, 32.7, 31.8, 29.3, 29.2,

28.7, 28.7, 25.9, 22.7, 14.1. MALDI-TOF-MS (CHCA 매트릭스, 양성 반사기 방식): Obs. $m/z = (M+H)^+$ 1024.82, $(M+Na)^+$ 1046.80, $(M+K)^+$ 1082.78. 계산: $C_{59}H_{113}N_3O_{10}$ (관측 질량 1023.84; 분자량 1024.56).

[0561] **실시예 A11. 비스-(3-아미노프로필)메틸아민-ACR-C8-4**

[0562] n-옥틸-아크릴레이트 (1.47 g, 8 mmol, 8 eq) 및 비스-N,N-(3-아미노프로필)메틸아민 (145 mg, 1 mmol)은 실시예 A9에 기술된 바와 유사한 방식으로 이소-프로판올에서 반응시켰다. 수율: 552 mg (0.63 mmol, 63%).

[0563]



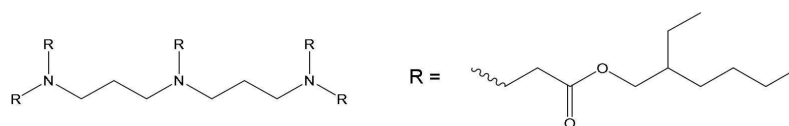
[0564]

^1H NMR (400 MHz, 클로로포름-*d*) δ 4.05 (t, $J = 6.8$ Hz, 8H), 2.77 (t, $J = 7.3$ Hz, 8H), 2.43 (td, $J = 7.2, 2.8$ Hz, 12H), 2.29 (t, $J = 7.3$ Hz, 4H), 2.18 (s, 3H), 1.61 (q, 6.7 Hz, 12H), 1.30 (m, 40H), 0.99 - 0.77 (m, 12H). ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 172.7, 64.6, 55.8, 51.9, 49.3, 42.1, 32.7, 31.8, 29.3, 29.2, 28.7, 25.9, 25.1, 22.7, 14.1. MALDI-TOF-MS (CHCA 매트릭스, 양성 반사기 방식): Obs. $m/z = (M+H)^+$ 882.71, $(M+Na)^+$ 904.72. 계산: $C_{51}H_{99}N_3O_8$ (관측 질량 881.74; 분자량 882.37).

[0565] **실시예 A12. 비스(3-아미노프로필)아민-ACR-(2-에틸-헥실)-5**

[0566] 2-에틸-헥실-아크릴레이트 (1.4 g, 7.5 mmol, 10 eq)는 이소-프로판올 (2 mL) 중 비스(3-아미노프로필)아민 (100 mg, 0.75 mmol)의 교반 용액에 첨가되었다. 성분은 실시예 A9에 대해 기술된 바와 유사한 방식으로 반응시켰다. 작업 후 수율: 278 mg (0.26 mmol, 35 %).

[0567]



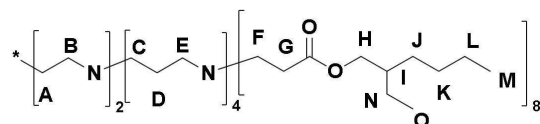
[0568]

^1H NMR (399 MHz, 클로로포름-*d*) δ 4.19-3.78 (m, 10H), 2.77 (t, $J = 7.3$ Hz, 10H), 2.56-2.25 (m, 17H), 2.01 (s, 3H), 1.67 (s, 1H), 1.64-1.48 (m, 9H), 1.48-1.11 (m, 40H), 0.89 (td, $J = 7.1, 2.8$ Hz, 30H). MALDI-TOF-MS (CHCA 매트릭스, 양성 반사기 방식): Obs. $m/z = (M+H)^+$ 1052.88, $(M+Na)^+$ 1074.86. 계산: $C_{59}H_{113}N_3O_{10}$ (관측 질량 1051.87; 분자량 1052.62).

[0569] **실시예 A13. G1-ACR-(2-에틸-헥실)-8**

[0570] G1-PPI (DAB-Am-4) 및 2-에틸-헥실 아크릴레이트 간 반응은 실시예 A1에 대해 수행된 것과 유사한 방식으로 수행되었다. 수율: 0.71 g (0.4 mmol, 73%). ^1H -NMR 스펙트럼은 바람직한 구조와 일치되었다.

[0571]



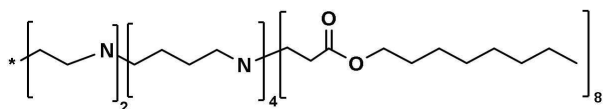
[0572]

^1H NMR (399 MHz, 클로로포름-*d*) δ 4.36-3.57 (m, 16H, H), 2.78 (t, $J = 7.4$ Hz, 16H, F), 2.41 (dt, $J = 25.0, 7.5$ Hz, 35H, G, C, E, B), 1.69-1.48 (m, 16H), 1.48-1.11 (m, 68H), 0.89 (td, $J = 7.1, 2.8$ Hz, 48H, M, O). MALDI-TOF-MS (CHCA 매트릭스, 양성 반사기 방식): Obs. $m/z = (M+H)^+$ 1791.55, $(M+Na)^+$ 1813.53. 계산: $C_{120}H_{232}N_6O_{16}$ (관측 질량 1789.50; 분자량 1790.77).

[0573] **실시예 A14. G1(PBuI)-ACR-C8-8**

[0574] N,N,N',N'-테트라(4-아미노부틸)-1,4-디아미노부탄 (G1-PBuI) 및 n-옥틸 아크릴레이트를 프로판-2-올 (IPA; 1 mL)에 용해시켰다. 반응 및 작업은 실시예 A7에 기술된 바와 유사하게 수행하여서 유성 G1(PBuI)-ACR-C8-8

생산물을 제공하였다.

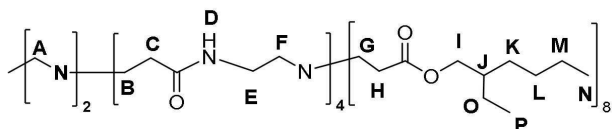


[0575]

[0576] ^1H NMR (400 MHz, 클로로포름- d) δ 4.05 (t, 16H), 2.76 (t, 16H), 2.41 (q, 36H), 1.61 (p, 16H), 1.43 (p, 20H), 1.37-1.15 (m, 80H), 0.92-0.84 (t, 24H). MALDI-TOF-MS (CHCA 매트릭스, 양성 반사기 방식): Obs. m/z = $(\text{M}+\text{H})^+$ 1847, $(\text{M}+\text{Na})^+$ 1869. 계산: $\text{C}_{108}\text{H}_{208}\text{N}_6\text{O}_{16}$ (관측 질량 1846; 분자량 1846).

[0577]

실시예 A15. G1(PAMAM-C2)-ACR-(2-에틸-헥실)-8



[0578]

[0579] 프로판-2-올 (IPA; 2 mL) 중 G1-PAMAM-C2 (에틸렌-디아민 코어; 4개 아민 말단 기; 165 mg, 0.32 mmol)의 교반 용액이 존재하는 반응 튜브에 2-에틸-헥실아크릴레이트 (589 mg, 3.2 mmol, 10 eq)를 첨가하였다. 더 많은 2-에틸-헥실아크릴레이트를 이후에 첨가하였다 (600 mg, 3.3 mmol, 10 eq). 반응 혼합물은 60°C 까지 408 시간 동안 가열하였다. 반응 혼합물을 진공 농축하였다. 잔류물은 오일 펌프를 사용해 추가로 증발시켜서 과량의 2-에틸-헥실아크릴레이트를 제거하였다 (90°C 및 0 mbar). 미정제 생산물은 여전히 소량의 아크릴레이트를 함유하였고, 이것은 짧은 실리카 컬럼 (2% MeOH/ CHCl_3 에서 출발하여 10% MeOH/ CHCl_3 까지)을 사용해 더 제거되어서 노란색 점성 오일을 산출하였다 (270 mg, 0.13 mol, 41%).

[0580]

^1H NMR (400 MHz, 클로로포름- d) δ 7.20 (t, J = 5.5 Hz, 3H), 4.19-3.78 (m, 16H, I), 3.27 (q, J = 6.0 Hz, 8H, B), 2.78 (dt, J = 15.0, 6.9 Hz, 22H, F, G), 2.57 (t, J = 6.4 Hz, 9H, C), 2.52 (s, 3H, A), 2.44 (t, J = 7.1 Hz, 15H, H), 2.34 (t, J = 6.4 Hz, 7H, E), 1.63-1.47 (m, 8H, J), 1.44-1.12 (m, 64H, K, L, M, O), 0.89 (td, J = 7.5, 7.0, 3.0 Hz, 48H, N, P). MALDI-TOF-MS (CHCA 매트릭스, 양성 반사기 방식): Obs. m/z = $(\text{M}+\text{H})^+$ 1991.56, $(\text{M}+\text{Na})^+$ 2013.53. 계산: $\text{C}_{110}\text{H}_{208}\text{N}_{10}\text{O}_{20}$ (관측 질량 1989.56; 분자량 1990.92).

[0581]

B. 아크릴레이트-에스테르에 의한 1차 아민의 선택적 작용화 (마이클 첨가)에 이어서 나머지 2차 아민의 아실화.

[0582]

하기 물질에 대한 기반은 아크릴레이트와 1차 아민 덴드리머의 반응이 형성된 2차 아민 덴드리머와의 반응에 비해서 훨씬 더 빠르게 진행되었다는 관찰을 통해 발견되었다. 따라서, 이러한 선택성은 형성된 2차 아민 중간체를 아실화를 통해 캡핑하는데 사용될 수 있었다.

[0583]

일반 실시예 B1. G1-ACR-시트로-4/Ac-4

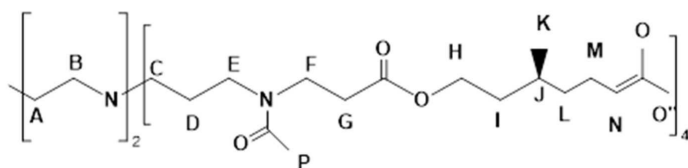
[0584]

이러한 일반 실시예에는 G1-PPI-(NH_2)₄ 덴드리머와 (S)-3,7-디메틸옥트-6-엔-1-일 아크릴레이트의 마이클-첨가 반응에 이어서, 아세트산 무수물과 반응으로, 4개 (S)-시트로넬릴 에스테르 기 및 4개 아실-아미드 기를 갖는 G1 PPI-덴드리머를 생성시키는 것을 기술한다.

[0585]

G1 PPI 덴드리머 (n-부틸렌 코어; 0.20 g; 0.631 mmol)를 이소-프로판올 (1 mL)에 용해시켰고, (S)-3,7-디메틸옥트-6-엔-1-일 아크릴레이트 (0.513 g; 2.44 mmol)를 첨가하였다. 혼합물은 질소의 불활성 분위기 하에 55°C에서 밀봉된 바이알 중에 밤새 교반하여서 아크릴레이트의 완전한 전환을 일으켰다. ^1H -NMR에 따라서, 아크릴레이트는 1차 아민과 훨씬 더 빠르게 반응하므로, 1차 아민의 각각의 (거의) 독점적인 단일-작용화를 야기하였다. 혼합물을 건조 증발시켰고 잔류물을 디클로로메탄 (DCM; 1 mL)에 용해시켰다. 후속하여서, 트리에틸아민 (0.36 mL, 0.268 g; 2.65 mmol)과, 이어서 아세트산 무수물 (0.271 g; 2.65 mmol)을 첨가하였다. 혼합물을 20°C에서 4시간 동안 질소 분위기 하에 밀봉된 바이알 중에서 교반하였고, 이어서 DCM으로 희석하였고, 후속하여 NaHCO_3 (aq.) 및 염수로 세척하였다. 유기층을 Na_2SO_4 에서 건조시키고, 여과하고, 여과물을 건조 증발시켰다. DCM과 공-증발을 수행하여서 미량의 아세트산 무수물 및 아세트산을 제거하였다. 수율:

623 mg (74%). $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼은 바람직한 구조와 일치되었다.



[0586]

[0587] $^1\text{H NMR}$ (399 MHz, 클로로포름-d) δ 5.08 (t, J = 7.0, 1.4 Hz, 4H, N), 4.31 – 3.87 (m, 8H, H), 3.58 (dt, J = 10.9, 7.2 Hz, 8H, F), 3.31 (q, J = 8.9, 8.3 Hz, 8H, E), 2.70 – 2.50 (m, 8H, C), 2.42 (d, J = 7.3 Hz, 12H, B, G), 2.18 – 2.07 (m, 12H, P), 2.07 – 1.92 (m, 8H, M), 1.89 – 1.63 (m, 24H, O, O'), 1.63 – 1.08 (m, 32H, A, D, I, J, L), 0.91 (dd, J = 6.6, 4.4 Hz, 12H, K).

[0588] MALDI-TOF-MS (CHCA 매트릭스, 양성 반사기 방식): Obs. m/z = $(\text{M}+\text{H})^+$ 1326.02, $(\text{M}+\text{Na})^+$ 1348.00. 계산: $\text{C}_{76}\text{H}_{136}\text{N}_6\text{O}_{12}$ (관측 질량 1325.01; 분자량 1325.95).

[0589] 실시예 B2. G1-ACR-nC14-4/Ac-4

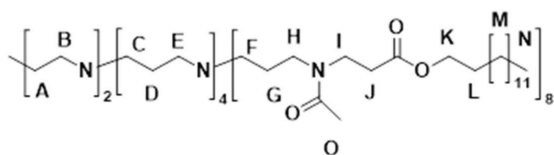
[0590] G1-PPI-(NH₂)₄ (n-부틸렌 코어) 및 n-테트라데실 아크릴레이트 및 아세트산 무수물 간 반응은 실시예 B1에 대해 수행된 것과 유사한 방식으로 수행되었다. 수율: 689 mg (70%). $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼은 바람직한 구조와 일치되었다. MALDI-TOF-MS (CHCA 매트릭스, 양성 반사기 방식): Obs. m/z = $(\text{M}+\text{H})^+$ 1558.34, $(\text{M}+\text{Na})^+$ 1580.33 (우세한 피크). 계산: $\text{C}_{92}\text{H}_{176}\text{N}_6\text{O}_{12}$ (관측 질량 1557.33; 분자량 1558.45). 또한 다음이 관찰됨: 소형 피크로서 m/z = 1786.33 (5개 테트라데실 꼬리부 및 3개 아세틸 기).

[0591] 실시예 B3. G2-ACR-시트로-8/Ac-8

[0592] G2-PPI-(NH₂)₈ (n-부틸렌 코어) 및 (S)-3,7-디메틸옥트-6-엔-1-일 아크릴레이트 및 아세트산 무수물 간 반응은 실시예 B1에 대해 수행된 바와 유사한 방식으로 수행되었다. 수율: 520 mg (72%). $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼은 바람직한 구조와 일치되었다. MALDI-TOF-MS (CHCA 매트릭스, 양성 반사기 방식): Obs. m/z = $(\text{M}+\text{H})^+$ 2792.18, $(\text{M}+\text{Na})^+$ 2814.16. 계산: $\text{C}_{160}\text{H}_{288}\text{N}_{14}\text{O}_{24}$ (관측 질량 2790.17; 분자량 2792.14).

[0593] 실시예 B4. G2-ACR-nC14-8/Ac-8

[0594] G2-PPI-(NH₂)₈ (n-부틸렌 코어) 및 n-테트라데실 아크릴레이트 및 아세트산 무수물 간 반응은 실시예 B1에 대해 수행된 바와 유사한 방식으로 수행되었다. 수율: 631 mg (75%). $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼은 바람직한 구조와 일치되었다.



[0595]

[0596] $^1\text{H NMR}$ (399 MHz, 클로로포름-d) δ 4.06 (dt, J = 13.5, 6.8 Hz, 16H, K), 3.58 (dt, J = 13.9, 6.7 Hz, 16H, I), 3.31 (q, J = 9.5, 9.0 Hz, 16H, H), 2.60 (ddd, J = 10.4, 6.1, 2.4 Hz, 16H, J), 2.40 (p, J = 9.9, 8.5 Hz, 36H, B, C, E, F), 2.10 (d, J = 10.7 Hz, 24H, O), 1.86 – 1.46 (m, 44H, A, D, G, L), 1.46 – 1.07 (m, 176H, M), 1.07 – 0.58 (m, 24H, N).

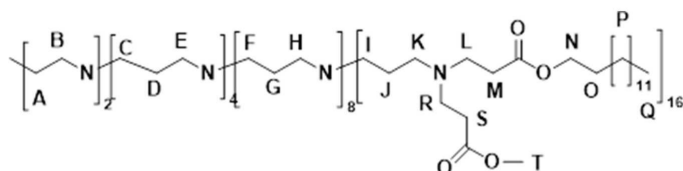
[0597] MALDI-TOF-MS (CHCA 매트릭스, 양성 반사기 방식): Obs. m/z = $(\text{M}+\text{H})^+$ 3257.80, $(\text{M}+\text{Na})^+$ 3279.79. 계산: $\text{C}_{192}\text{H}_{368}\text{N}_{14}\text{O}_{24}$ (관측 질량 3254.80; 분자량 3257.13). 또한 다음이 관찰됨: 소형 피크로서 m/z = 3484.01 (9개 테트라데실 꼬리부 및 7개 아세틸 기).

[0598] C. 제1 아크릴레이트-에스테르 및 이어서 다른 제2 아크릴레이트-에스테르에 의한 1차 아민의 작용화 (마이클 첨가)

[0599] 일반 실시예 C1. G3-ACR-nC14-16/C1-16

[0600] 이 일반 실시예는 G3-PPI-(NH₂)₁₆ 덴드리머와 n-테트라데실 아크릴레이트의 마이클 첨가 반응에 이어서, 메틸 아크릴레이트와의 반응으로, 16개 n-테트라데실-에스테르 기 및 16개 메틸 에스테르 기를 갖는 PPI-덴드리머를 야기하는 것을 설명한다.

[0601] G3 PPI 덴드리머 (0.20 g, 0.119 mmol)를 이소프로판올 (1 mL)에 용해시키고 테트라데실 아크릴레이트 (0.513 g, 1.91 mmol, 16 moleqs)를 첨가하였다. 혼합물은 질소의 불활성 분위기 하에 55°C에서 밀봉된 바이알 중에서 교반하여서, 1차 아민의 완전한 전환을 야기하였다 (소량의 아크릴레이트가 여전히 존재함). ¹H-NMR에 따라서, 아크릴레이트는 1차 아민과 훨씬 더 빠르게 반응하므로, 1차 아민 기의 각각의 거의 독점적인 단일작용화를 야기하였다. 후속하여, 메틸 아크릴레이트를 첨가하였고 (0.27 mL, 0.244 g, 2.83 mmol, 24 moleqs), 혼합물을 55°C에서 교반하였다. 반응의 진행은 ¹H-NMR로 모니터링하였다. 1일 후에, 추가량의 메틸 아크릴레이트 (0.14 mL, 0.122 g, 1.42 mmol, 12 eq.)를 첨가하였다. 총 4일 동안 55°C에서 교반 후에, 반응이 완료되었고, 혼합물을 건조 증발시켰다. 미정제 생산물을 MeCN에서 교반하였고, 수 시간 동안 0°C에 두어서 완전한 상분리를 유도하였다. 후속하여서, 상청액을 디켄팅하였다. 이러한 절차를 3회 반복하여 임의의 미반응 아크릴레이트 단량체를 제거하였다. 수율: 575 mg (66%). ¹H-NMR 스펙트럼은 바람직한 구조와 일치되었다.

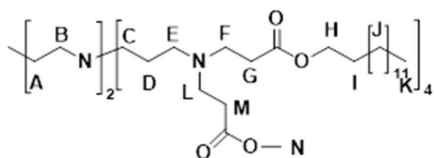


[0602]

[0603] ¹H NMR (400 MHz, 클로로포름-d) δ 4.04 (t, J = 6.9 Hz, 32H, N), 3.65 (s, 48H, T), 2.76 (t, J = 7.3 Hz, 64H, L, R), 2.63 - 2.18 (m, 180H, B, C, E, F, H, I, K, M, S), 1.80 - 1.44 (m, 92H, A, D, G, J, O), 1.26 (s, 352H, P), 0.88 (t, J = 6.7 Hz, 48H, Q). MALDI-TOF-MS: 측정하기 너무 높은 MW. 계산: C₄₂₄H₈₁₆N₃₀O₆₄ (관측 질량 7354.15; 분자량 7359.34).

[0604] 실시예 C2. G1-ACR-nC14-4/C1-4

[0605] G1-PPI-(NH₂)₄ (n-부틸렌 코어) 및 n-테트라데실 아크릴레이트 및 메틸 아크릴레이트 간 반응은 실시예 C1과 유사한 방식으로 수행되었다. 수율: 464 mg (84%). ¹H-NMR 스펙트럼은 바람직한 구조와 일치되었다.



[0606]

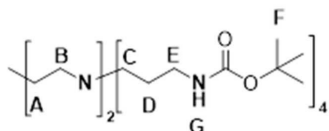
[0607] ¹H NMR (399 MHz, 클로로포름-d) δ 4.05 (t, J = 6.8 Hz, 8H, H), 3.66 (s, 12H, N), 2.77 (t, J = 7.3 Hz, 16H, F, L), 2.41 (ddt, J = 22.6, 14.6, 7.0 Hz, 32H, C, E, G, M), 1.90-1.50 (m, 20H, A, D, I), 1.50 - 1.20 (m, 96H, J, K), 1.03 - 0.72 (m, 12H, K).

[0608] MALDI-TOF-MS (CHCA 매트릭스, 양성 반사기 방식): Obs. m/z = (M+H)⁺ 1735.44. 소형 피크로서 m/z = M+H)⁺ 1917.63 (5개 C14-사슬 및 3개 C1 사슬). 계산: C₁₀₀H₁₉₂N₆O₁₆ (관측 질량 1733.44; 분자량 1734.66).

[0609] D. 아크릴레이트-에스테르 (마이클 첨가)에 의한 아민-말단 PPI-덴드리머의 작용화와 내부 아민의 4차화

[0610] 실시예 D1. G1-Boc-4

[0611] G1 PPI 텐드리머 (0.513 g, 1.62 mmol)를 DCM (20 mL)에 용해시켰고 용액을 -10℃의 얼음-염 배스에서 냉각시켰다. Boc-무수물 (1.48 g, 6.79 mmol)을 첨가하였다. 침전물이 거의 즉시 형성되었다. 혼합물은 4시간 동안 실온에서 교반하였고 이후에 반응이 완료되었다. 혼합물을 여과하였고 여과물은 아민-작용화된 실리카 스캐빈저와 밤새 교반하여서 과량의 Boc-무수물을 제거하였다. 여과 후에, 여과물을 건조 증발하여 생산물을 산출하였다. 수율: 1.16 그램 (81%). ¹H-NMR 스펙트럼은 바람직한 구조와 일치되었다.

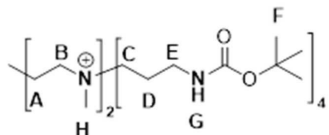


[0612]

[0613] ¹H NMR (400 MHz, 클로로포름-d) δ 5.59 - 4.89 (m, 4H, G), 3.13 (q, J = 6.4 Hz, 8H, E), 2.40 (dt, J = 22.0, 6.6 Hz, 12H, B, C), 1.61 (p, J = 6.7 Hz, 8H, D), 1.40 (s, 40H, A, F).

[0614] **실시예 D2. G1-Boc-4 (2 MeCl)**

[0615] Boc-보호된 G1 PPI 텐드리머 G1-Boc-4 (0.75 g, 1.04 mmol)를 DCM (3 mL)에 용해시켰고, 메틸 아이오다이드 (1.78 g, 0.78 mL, 12.55 mmol)를 첨가하였다. 혼합물을 45℃에서 밤새 교반한 다음에 건조 증발시켜서 발포체를 산출하고 CHCl₃에 용해시키고 펜탄에 침전시켰다. 상청액을 디켄팅하였고 잔류물을 다시 펜탄과 교반하고 디켄팅하였다. 생산물은 반대 음이온으로서 아이오다이드를 함유하였고, 이들은 용리액으로서 메탄올을 적용하는, 이온 교환 컬럼 (Lewatit monoplus M600 수지 1.3 meq/mL)을 사용해 클로라이드로 교환되었다. 생산물은 약 5 mg을 순수 (1 mL)에 용해시키고 35% H₂O₂ (aq) 몇 방울을 첨가하여서 아이오다이드의 존재에 대해 검토되었다. 요오드 I₂ 형성을 의미하는 노란색이 관찰되지 않았고, 이 혼합물에 신선한 전분 용액 (1 mL)을 첨가하였고, 파란색 변색도 관찰되지 않았다. 수율: 715 mg (84%). ¹H-NMR 스펙트럼은 바람직한 구조와 일치되었다.

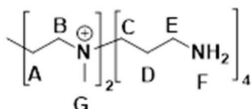


[0616]

[0617] ¹H NMR (399 MHz, 클로로포름-d) δ 5.51 (s, 4H, G), 3.67 (s, 4H, B), 3.39 (s, 8H, C), 3.27 (s, 8H, E), 3.16 (s, 6H, H), 2.10 (d, J = 14.2 Hz, 12H, A, D), 1.44 (s, 36H, F).

[0618] **실시예 D3. G1-NH₂-4 (2 MeCl)**

[0619] G1-Boc-4 (2 MeCl), 약 800 mg을 디옥산 (약 5 mL) 중 4 M HCl와 혼합하였고, 침전물이 생성되었다. 가용성을 증가시키기 위해서, 메탄올 중 3 M HCl을 첨가하였다 (약 5 mL). 반응 혼합물을 밤새 실온에서 교반하였다. ¹H-NMR은 완전한 탈보호를 의미하였다. 혼합물을 건조 증발하였고, 잔류물을 이소-프로판올과 공동증발시켜서 흡습성 고체를 산출하였다 (이 화합물은 이소-프로판올 중에서 불량한 가용성을 가짐). 수율: 500 mg (122%), HCl 및/또는 물의 포함에 기인함. ¹H-NMR 스펙트럼은 바람직한 구조와 일치되었다.



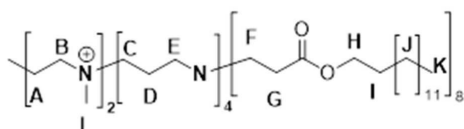
[0620]

[0621] ¹H NMR (400 MHz, 메탄올-d₄) δ 3.86 - 3.63 (b, F), 3.63 - 3.44 (m, 12H, B, C), 3.19 (s, 6H, G), 3.10 (t, J = 7.3 Hz, 8H, E), 2.26 (d, J = 10.7 Hz, 8H, D), 1.97 (s, 4H, A).

[0622] **실시예 D4: G1-ACR-nC14-8 (2 MeCl)**

[0623] 실시예 D3 (300 mg, 1.77*10⁻⁵ mol)의 G1-NH₂ (2 MeCl)을 HFIP (2 mL)에 용해시켰고 n-테트라데실 아크릴레이트

(2.04 mL, 1차 아민 당 2 eq.)를 첨가하였다. 반응 혼합물은 맑은 용액이었다. 혼합물을 55℃에서 1시간 동안 교반하였지만, 반응은 일어나지 않았다. 트리에틸아민 (1.6 mL)을 염기로서 첨가하였고 혼합물을 24시간 동안 교반하였다. 반응은 $^1\text{H-NMR}$ 에 따라 완료되었다. 반응 혼합물을 건조 증발시켰다. 잔류물은 MeCN에서 교반하였고, 0℃에 두고, 상청액을 디켄팅하였다. 이러한 절차는 3회 수행되었다. 이어서 잔류물을 1/1 EtOAc/헥산에서 교반하였다. 침전물을 여과하였고, 이것은 여전히 1%의 테트라데실 아크릴레이트를 함유하므로, EtOAc에서 교반 및 여과를 통해 제거하였다. 다음으로 잔류물을 잔류 아이오다이드를 클로라이드로 교환하기 위해 이온 교환 수지에 두었다 (용리액으로서 1/1 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$). 수율: 468 mg (102%). $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼은 바람직한 구조와 일치되었다.

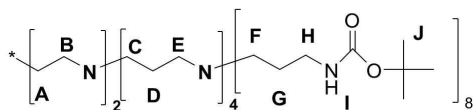


[0624]

$^1\text{H NMR}$ (399 MHz, 클로로포름- d) δ 4.02 (t, J = 6.8 Hz, 16H, H), 3.84 (d, J = 7.5 Hz, 4H, B), 3.38 (dd, J = 10.4, 6.2 Hz, 8H, C), 3.19 (s, 6H, L), 2.71 (td, J = 6.7, 2.5 Hz, 16H, F), 2.57 (t, J = 6.0 Hz, 8H, E), 2.40 (t, J = 6.6 Hz, 16H, G), 2.19 (d, J = 7.7 Hz, 4H, A), 2.02 (dt, J = 13.2, 6.4 Hz, 8H, D), 1.62 (q, J = 6.9 Hz, 16H, I), 1.52 – 1.02 (m, 176H, J), 0.88 (t, J = 6.7 Hz, 24H, K).

[0626] 실시예 D5. G2-Boc-8

G2 PPI-덴드리머 (DAB-Am-8) 및 Boc-무수물 간 반응은 실시예 D1에 표시된 바와 유사한 방식으로 수행되었다. 수율: 796 mg (99%). $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼은 바람직한 구조와 일치되었다.

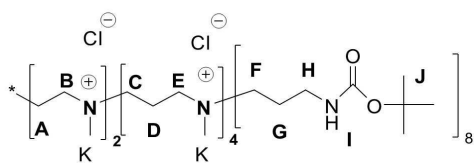


[0628]

$^1\text{H NMR}$ (399 MHz, 메탄올- d_4) δ 7.90 (s, 4H, I), 3.07 (t, J = 6.8 Hz, 16H, H), 2.46 (p, J = 8.5, 7.6 Hz, 35H, B, E, F), 1.63 (p, J = 6.8 Hz, 24H, D, G), 1.43 (s, 77H, A, J).

[0630] 실시예 D6. G2-Boc-8 (6 MeCl)

후속 음이온 교환과 G2-Boc-8 및 메틸 아이오다이드 간 반응은 실시예 D2에 표시된 바와 유사한 방식으로 수행되었다. 수율: 699 mg (73%). $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼은 바람직한 구조와 일치되었다.

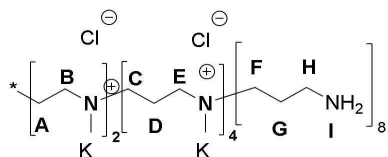


[0632]

$^1\text{H NMR}$ (399 MHz, 메탄올- d_4) δ 3.71 (d, J = 8.4 Hz, 4H, I), 3.66 – 3.38 (m, 34H, B, C, E, F), 3.29–3.04 (m, 43H, K, H, G), 2.43 (q, J = 8.2 Hz, 8H, D), 1.99 (h, J = 8.5, 6.9 Hz, 21H, A, G), 1.44 (s, 79H, J).

[0634] 실시예 D7. G2-NH₂-8 (6 MeCl)

G2-Boc-8 (6 MeCl) 및 HCl 간 반응은 실시예 D3에 표시된 바와 유사한 방식으로 수행되었다. 수율: 478 mg (93%). $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼은 바람직한 구조와 일치되었다. 생산물은 아크릴-에스테르, 또는 아크릴-아미드 또는 에폭시드 등과 반응시키는데 사용될 수 있다.



[0636]

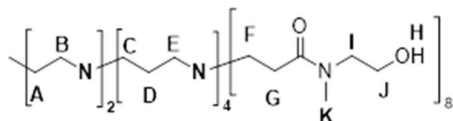
[0637] ^1H NMR (399 MHz, 듀테륨 옥시드) δ 3.58 (t, J = 8.9 Hz, 36H, B, C, E, F), 3.25 (d, J = 4.4 Hz, 18H) I, J, 3.15 (t, J = 7.7 Hz, 16H, H), 2.42 (s, 8H, D), 2.23 (dd, J = 14.2, 5.5 Hz, 16H, G), 1.98 (s, 4H, A).

[0638] E. 아크릴-아미드로 아민의 작용화 (마이클-첨가)

[0639] 일반 실시예 E1. G1-ACRAMA1c-8

[0640] 이 일반 실시예는 G1-PPI-(NH₂)₄ 덴드리머와 N-(2-히드록시에틸)-N-메틸 아크릴아미드의 마이클 첨가 반응으로, 8개 N-(2-히드록시에틸)-N-메틸 아미드 기를 갖는 완전하게 작용화된 PPI-덴드리머를 야기하는 것을 기술한다.

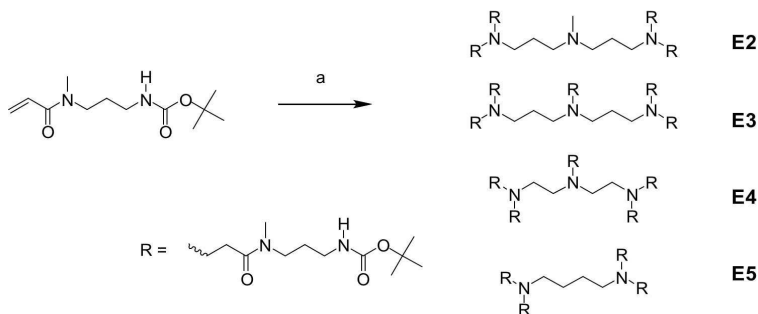
[0641] N-(2-히드록시에틸)-N-메틸 아크릴아미드는 [Moszner, Macromol. Chem. Phys 2007, 208, 529-540 DOI:10.1002/MACP.200600513]에 따라 제조되었다. G1 PPI 덴드리머 (0.10 g, 0.315 mmol)를 이소-프로판올 (1 mL)에 용해시켰고, 과량의 N-(2-히드록시에틸)-N-메틸아크릴아미드 (0.515 g, 3.98 mmol, 1차 아민 당 3 moles)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 55°C의 온도에서 2일 동안 밀봉 바이알 중에 질소 분위기 하에서 교반하였고, 전환은 ^1H -NMR로 모니터링하였다. 혼합물을 건조 증발시켰고, 잔류물을 MeCN에서 교반하였고, 혼합물을 4°C에 몇시간 동안 두었다. 상청액을 디켄팅하여서 과량의 아크릴아미드 반응물을 제거하였다. MeCN을 사용한 이러한 세척은 4°C에서 2회 및 -20°C에서 1회 반복하였다. 생산물은 진공 건조하여서 약간 노란빛 오일을 얻었다. 수율: 367 mg (86%). ^1H -NMR 스펙트럼은 바람직한 구조와 일치되었다.



[0642]

[0643] ^1H NMR (399 MHz, 클로로포름-d) δ 4.89 (s, 8H, H), 3.71 (t, J = 5.4 Hz, 16H, J), 3.50 (dt, J = 10.3, 5.1 Hz, 16H, I), 3.12 (s, 12H, K), 2.93 (s, 12H, K), 2.79 (d, J = 7.0 Hz, 16H, F), 2.63 - 2.54 (m, 8H, E), 2.49 (d, J = 7.5 Hz, 24H, B, C, G), 1.79 (s, 8H, D), 1.46 (s, 4H, A).

[0644] MALDI-TOF-MS (CHCA 매트릭스, 양성 반사기 방식): Obs. m/z = (M+H)⁺ 1349.98, (M+Na)⁺ 1371.96. 계산: C₆₄H₁₂₈N₁₄O₁₆ (관측 질량 1348.96; 분자량 1349.81).



[0645]

[0646] E2 내지 E5의 합성. (a) 이소프로판올/HFIP 또는 이소프로판올, 가열, 64-480시간.

[0647] 실시예 E2

[0648] HFIP (252 mg, 1.5 mmol, 3 eq)는 프로판-2-올 중 N,N-비스(3-아미노프로필)메틸아민 (65.6 mg, 0.5 mmol, 1 eq) 및 tert-부틸 (3-(N-메틸-아크릴-아미도)프로필)카바메이트 (1.21 g, 5 mmol, 10 eq)의 교반 용액에 첨가되었다. 반응 혼합물을 60°C까지 64시간 동안 가열하였다. 다음으로 혼합물을 냉각하였고, 진공 농축하

였다. 미정제 점성 오일을 MeOH/CHCl₃ (0-20%)의 혼합물로 용리하는 실리카 컬럼 크로마토그래피를 사용해 정제하여서 점성 오일로서 E2를 산출하였다.

[0649] HPLC-ESI-MS: C₅₅H₁₀₇N₁₁O₁₂에 대해 계산된 m/z 1113.81. 측정 $[M+H]^+$ 1114.83, $[M+H]^{2+}$ 558.08, $[M+H]^{2+}$ -Boc 508.00 $[M+H]^{2+}$ -2 x Boc 458.00, $[M+H]^{2+}$ -3 x Boc 408.00, $[M+H]^{2+}$ -4 x Boc 357.92.

[0650] 실시예 E3

[0651] 디-n-프로필렌-트리아민 (65.6 mg, 0.5 mmol, 1 eq) 및 tert-부틸 (3-(N-메틸아크릴아미도)프로필)카바메이트 (1.21 g, 5 mmol, 10 eq)를 프로판-2-올 및 HFIP (1 mL)에 용해시켰다. 반응 혼합물을 60℃ 까지 480시간 동안 가열하였다. 반응이 480시간 이후에 완료되지 않았지만, 반응 혼합물을 냉각하고 진공 농축하였다. 미정제 점성 오일은 MeOH/CHCl₃ (0-20%)의 혼합물로 용리하는 실리카 컬럼 크로마토그래피를 사용해 정제하여서 점성 오일로서 E3를 산출하였다.

[0652] ESI-MS: C₆₆H₁₂₇N₁₃O₁₅에 대해 계산된 m/z 1341.96. 측정 $[M+H]^+$ 1343.00, $[M+Na]^+$ 1364.92, $[M+H]^{2+}$ 672.08, $[M+H]^{2+}$ -Boc 622.08 $[M+H]^{2+}$ -2 x Boc 572.08, $[M+H]^{2+}$ -3 x Boc 522.08, $[M+H]^{2+}$ -4 x Boc 472.00, $[M+H]^{2+}$ -5 x Boc 472.00.

[0653] 실시예 E4

[0654] 디에틸렌트리아민 (103 mg, 1 mmol, 1 eq) 및 tert-부틸 (3-(N-메틸아크릴아미도)프로필)카바메이트 (2.42 g, 10 mmol, 10 eq)를 프로판-2-올에 용해시켰고 환류까지 가열하였다. 환류에서 305시간 후에 반응이 여전히 완료되지 않았지만, 이 시점에 반응을 중지시켰다. 반응 혼합물을 진공 농축하여 점성 호박색 오일을 얻었다. 미정제 생산물 E4는 MeOH/CHCl₃ (0-20%)의 혼합물을 사용한 실리카 컬럼 크로마토그래피를 사용해 정제되었다.

[0655] 실시예 E5

[0656] 5 mL의 플라스크에서, 1,4-디아미노부탄 (88 mg, 1 mmol, 1 eq) 및 tert-부틸 (3-(N-메틸아크릴아미도)프로필)카바메이트 (1.21 g, 5 mmol, 5 eq)를 프로판-2-올 (2 mL)에 용해시켰다. 반응 혼합물을 55℃ 까지 가열하였다. 350시간 후에, 반응이 거의 완료되었다. 반응 혼합물은 진공 농축되었다. 미정제 생산물은 CHCl₃/MeOH (0-20%)의 혼합물로 용리하는, 실리카 컬럼 크로마토그래피를 사용해 정제되어서 호박색 점성 오일로서 E5를 수득하였다 (756 mg, 0.72 mmol, 72%).

[0657] ¹H NMR (400 MHz, 클로로포름-d) δ 5.81 - 5.20 (m, 4H), 3.43 (t, J = 6.4 Hz, 6H), 3.36 (t, J = 7.8 Hz, 2H), 3.16 (q, J = 6.4 Hz, 2H), 3.06 (q, J = 6.3 Hz, 6H), 3.02 (s, 9H), 2.91 (s, 3H), 2.81 (t, J = 7.3 Hz, 8H), 2.48 (m, 12H), 1.80 (p, J = 6.9 Hz, 2H), 1.66 (p, J = 6.4 Hz, 6H), 1.43 (m, 40H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 172.4, 171.6, 156.2, 156.1, 79.0, 78.8, 77.5, 77.4, 77.2, 76.8, 54.1, 49.5, 49.4, 47.6, 44.6, 44.5, 38.0, 36.9, 35.4, 35.3, 33.3, 30.9, 30.4, 29.1, 28.4, 28.4, 27.2, 24.8. ESI-MS: C₅₂H₁₀₀N₁₀O₁₂에 대해 계산된 m/z 1056.75. 측정 $[M+H]^+$ 1057.92, $[M+Na]^+$ 1079.92, $[M+H]^{2+}$ 529.58, $[M+H]^{2+}$ -Boc 479.50 $[M+H]^{2+}$ -2 x Boc 429.50, $[M+H]^{2+}$ -3 x Boc 379.50.

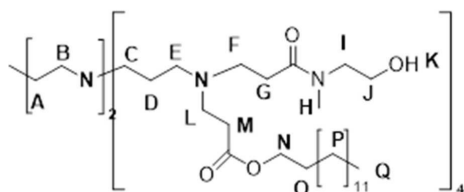
[0658] F. 아크릴레이트-에스테르에 의한 1차 아민의 작용화에 이어서, 아크릴-아미드에 의한 나머지 2차 아민의 작용화 (마이클-첨가). 아미드가 먼저 반응되고, 에스테르가 두번째로 반응될 수 있다.

[0659] 일반 실시예 F1: G1-ACR-nC14-4/AmA1c-4

[0660] 이러한 일반 실시예는 G1-PPI-(NH₂)₄ 덴드리머와 n-테트라데실 아크릴레이트 및 N-(2-히드록시에틸)-N-메틸 아크릴아미드의 후속 마이클-첨가 반응으로, 4개 n-테트라데실-에스테르 및 4개 N-(2-히드록시에틸)-N-메틸 아미드기를 갖는 PPI-덴드리머를 야기하는 것을 기술한다.

[0661] PPI 덴드리머 G1 (0.10 g, 0.315 mmol)을 이소-프로판올 (1 mL)에 용해시켰고, 테트라데실 아크릴레이트 (0.339 g, 덴드리머 당 4 moleqs)를 첨가하였다. 혼합물을 55℃ 온도의 오일조에서 24시간 동안 교반하여서

1차 아민의 완전한 전환을 일으켰다. 약간 과량의 아크릴레이트 반응물이 여전히 존재하였다. $^1\text{H-NMR}$ 에 따라서, 아크릴레이트는 1차 아민과 선택적으로 반응하여서, 모든 1차 아민 기의 단일 작용화를 일으킨다. 다음으로, N-(2-히드록시에틸)-N-메틸 아크릴아미드 (0.204 g, 1.57 mmol, 5 moleqs)를 첨가하였다. 혼합물을 55°C 에서 총 6일 동안 교반하였다. 이어서 미반응 아크릴레이트 또는 아크릴아미드를 아민-작용화된 실리카 스캐빈저와 반응 혼합물을 교반하여 제거하였다. 혼합물을 여과하였고 실리카 스캐빈저를 클로로포름/MeOH (5%)로 세척하였다. 여과물을 건조 증발시켜서, 임의의 아크릴레이트 또는 아크릴아미드를 더 이상 함유하지 않는 오일 생산물을 얻었다. 수율: 344 mg (50%; 이렇게 낮은 수율은 실리카 스캐빈저에 부분적으로 달라붙은 덴드리머에 기인할 수 있음). $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼은 바람직한 구조와 일치되었다.



[0662]

[0663]

$^1\text{H NMR}$ (399 MHz, 클로로포름-d) δ 4.05 (t, J = 6.8 Hz, 8H, N), 3.72 (q, J = 5.8 Hz, 8H, J), 3.49 (dt, J = 17.9, 4.7 Hz, 8H, I), 3.12-2.94 (단일항, 12H, H), 2.86 (t, J = 3.2 Hz, 1H), 2.78 (q, J = 7.5 Hz, 16H, F, L), 2.68 - 2.26 (m, 36H, B, C, E, G, M), 1.60 (td, J = 13.7, 7.0 Hz, 16H, D, O), 1.26 (s, 92H, A, P), 0.88 (t, J = 6.8 Hz, 12H, K).

[0664]

MALDI-TOF-MS (CHCA 매트릭스, 양성 반사기 방식): Obs. m/z = $(\text{M}+\text{H})^+$ 1907.62, $(\text{M}+\text{Na})^+$ 1929.6. 계산: $\text{C}_{108}\text{H}_{212}\text{N}_{10}\text{O}_{16}$ (관측 질량 1905.61; 분자량 1906.94). 소형 피크가 또한 m/z = 2046.78 (5개 테트라테실 아크릴레이트 및 3개 아크릴아미드 기)에서 관찰되었다.

[0665]

G. 에폭시드로 아민의 작용화

[0666]

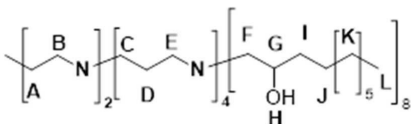
일반 실시예 G1: G1-EPX-nC8-8

[0667]

이 일반 실시예는 G1-PPI-(NH₂)₄ 덴드리머와 (1,2-에폭시)-n-데칸의 반응으로 2-히드록시 C10 기를 갖는 PPI-덴드리머가 야기되는 것을 기술한다.

[0668]

PPI 덴드리머 G1 (0.10 그램, 0.315 mmol)을 이소-프로판올 (1 mL)에 용해시켰고 1,2 에폭시-데칸 (0.43 g, 8.8 moleqs)을 첨가하였다. 반응 혼합물은 밀봉된 바이알 중에 90°C 에서 질소의 불활성 분위기 하에서 교반되었고, 이어서 건조 증발되었다. 잔류물은 MeCN에서 교반하였고, 현탁액을 몇 시간 동안 -20°C 에 두었다. 상청액을 디켄팅하였다. 이러한 절차는 2회 반복되었고, 이후에 잔류물은 임의의 남은 1,2-에폭시데칸이 더 이상 함유하지 않았다. 잔류물을 진공 건조하여서, 생산물을 얻었다. 수율: 390 mg (80%). $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼은 바람직한 구조와 일치되었다.



[0669]

[0670]

$^1\text{H NMR}$ (399 MHz, 메탄올-d₄) δ 3.62 (tt, J = 7.2, 3.8 Hz, 8H, G), 2.68 - 2.29 (m, 36H, B, C, E, F), 1.63 (p, J = 7.1 Hz, 8H, D), 1.59 - 1.12 (m, 112H, I, J, K), 1.11 - 0.67 (m, 24H, L).

[0671]

MALDI-TOF-MS (CHCA 매트릭스, 양성 반사기 방식): Obs. m/z = $(\text{M}+\text{H})^+$ 1567.57, $(\text{M}+\text{Na})^+$ 1589.56, $(\text{M}+\text{K})^+$ 1605.53. 계산: $\text{C}_{96}\text{H}_{200}\text{N}_6\text{O}_8$ (관측 질량 1565.54; 분자량 1566.69).

[0672]

실시예 G2. G1-EPX-nC10-8

[0673]

G1-PPI-(NH₂)₄ (n-부틸렌 코어) 및 1,2-에폭시-도데칸 간 반응은 실시예 G1과 유사한 방식으로 수행되었다. 수율: 447 mg (79%). $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼은 바람직한 구조와 일치되었다. MALDI-TOF-MS (CHCA 매트릭스,

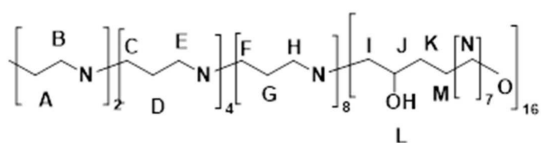
양성 반사기 방식): Obs. $m/z = (M+H)^+ 1791.83, (M+Na)^+ 1813.82, (M+K)^+ 1829.79$. 계산: $C_{112}H_{232}N_6O_8$ (관측 질량 1789.79; 분자량 1791.12).

[0674] 실시예 G3. G2-EPX-nC10-16

G2-PPI-(NH₂)₈ (n-부틸렌 코어) 및 1,2-에폭시-도데칸 간 반응은 실시예 G1과 유사한 방식으로 수행되었다. 수율: 697 mg (84%). ¹H-NMR 스펙트럼은 바람직한 구조와 일치되었다. MALDI-TOF-MS (CHCA 매트릭스, 양성 반사기 방식): Obs. $m/z = (M+H)^+ 3722.78, (M+Na)^+ 3744.75, (M+K)^+ 3760.74$. 계산: $C_{232}H_{480}N_{14}O_{16}$ (관측 질량 3719.72; 분자량 3722.47).

[0676] 실시예 G4. G3-EPX-nC10-32

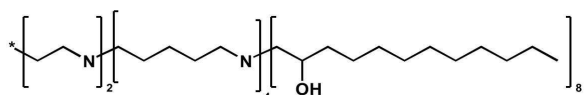
G3-PPI-(NH₂)₁₆ (n-부틸렌 코어) 및 1,2-에폭시-도데칸 간 반응은 실시예 G1과 유사한 방식으로 수행되었다. 수율: 413 mg (88%). ¹H-NMR은 바람직한 구조와 일치되었다.



¹H NMR (399 MHz, 클로로포름-d) δ 4.97 - 4.07 (m, 16H, L), 3.59 (s, 16H, J), 2.90 - 2.20 (m, 84H, B, C, E, F, H, I), 1.79 - 1.08 (m, 316H, A, D, G, K, M, N), 0.88 (t, J = 6.8 Hz, 48H, O).

[0680] 실시예 G5. G1(PPeI)-EPX-nC10-8

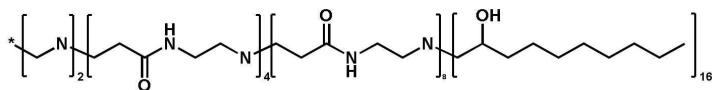
G1-PPI (100 mg, 0.23 mmol, 1 eq) 및 1,2-에폭시도데칸 (0.81 mL, 684 mg, 3.72 mmol, 16 eq)을 프로판-2-올 (IPA; 1 mL)에 용해시켰다. 혼합물을 60℃ 까지 16시간 동안 가열하였다 (¹H-NMR로 모니터링함). 혼합물을 냉각시켰고 진공 농축하였다. 점성 오일은 MeCN에서 교반하였고, -20℃로 냉각하고, 플라스크의 바닥에 침강되도록 두었다. 상청액을 디켄팅하였고, 절차를 3회 반복하여 점성 오일로서 생산물을 얻었다 (344 mg, 0.20 mol, 88%).



¹H NMR (399 MHz, 클로로포름-d) δ 3.60 (m, 8H), 3.19 (m, 8H), 2.64 - 2.47 (m, 10H), 2.38 (p, J = 7.8, 6.9 Hz, 26H), 1.65 - 1.16 (m, 172H), 0.88 (t, J = 6.7 Hz, 24H). MALDI-TOF-MS (CHCA 매트릭스, 양성 반사기 방식): Obs. $m/z = 1903.99 (M+H)^+, 1925.92 (M+Na)^+$ 계산: $C_{120}H_{248}N_6O_8$ (관측 질량 1901.92; 분자량 1903.34).

[0684] 실시예 G6. G2(PAMAM-C2)-EPX-nC8-16

1,2-에폭시도데칸 (700 mg, 4.38 mmol, 32 eq)을 프로판-2-올 (1 mL) 중 G2-PAMAM-C2 (에틸렌 디아민 코어, 8개 아민 말단 기; 200 mg, 0.14 mmol)의 교반 용액에 첨가하였다. 반응 혼합물을 60℃까지 88시간 동안 가열한 다음에 진공 농축하였다. 잔류물을 MeCN에서 교반하였고, -20℃로 냉각시켜서, 플라스크의 바닥에 침강되도록 두었다. 상청액을 디켄팅하고 이러한 분쇄 절차를 3회 반복하여 노란색 점성 오일을 산출하였다 (422 mg, 107 μmol, 77 %).



¹H NMR (399 MHz, 클로로포름-d) δ 7.92 (s, 12H), 4.60 (d, J = 29.0 Hz, 16H), 3.59 (s, 16H), 3.31 (t, J

= 41.3 Hz, 24H), 2.99 - 2.09 (m, 108H), 1.62 - 1.06 (m, 224H), 0.88 (t, $J = 6.7$ Hz, 48H). MALDI-TOF-MS (DCBT 매트릭스, 양성 반사기 방식): Obs. $m/z = (M+H)^+$ 3930.44. 계산: $C_{222}H_{448}N_{26}O_{28}$ (관측 질량 3927.44; 분자량 3930.18).

[0688] **실시예 G7. 비스(3-아미노프로필)아민-EPX-C8-5**

[0689] 1,2-에폭시데칸 (1.56 g, 약 10 mmol, 10 eq)을 IPA (1 mL) 중 비스(3-아미노프로필)아민 (131 mg, 1 mmol)의 교반 용액에 첨가하였다. 반응 혼합물을 60°C 까지 40시간 동안 가열한 다음에, 진공 농축하였다. 잔류물을 MeCN에서 교반하고 -20°C로 냉각시켜서, 생산물이 MeCN 용매로부터 상분리되도록 두었다. 상청액은 피펫을 사용해 조심스럽게 제거하였고, 분쇄 절차를 3회 반복하였다. 잔류물을 진공 건조하여 맑은 무색 오일을 산출하였다 (950 mg).

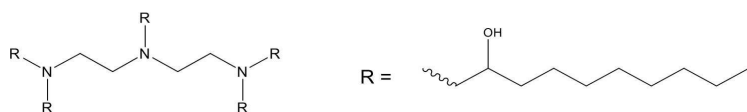


[0690]

[0691] ^1H NMR (399 MHz, 메탄올- d_4) δ 7.89 (s, 1H), 3.63 (qd, $J = 7.2, 4.5, 3.6$ Hz, 5H), 2.74 - 2.26 (m, 17H), 1.64 (q, $J = 7.3$ Hz, 4H), 1.56 - 1.21 (m, 70H), 1.00 - 0.79 (m, 15H). MALDI-TOF-MS (ODCB 매트릭스, 양성 반사기 방식): Obs. $m/z = (M+H)^+$ 912.87. 계산: $C_{56}H_{117}N_3O_5$ (관측 질량 911.90; 분자량 912.57).

[0692] **실시예 G8. 비스(2-아미노-에틸)아민-EPX-C8-5**

[0693] 비스(2-아미노에틸)아민 (103 mg, 1 mmol) 및 1,2-에폭시데칸 (1.56 g, 약 10 mmol, 10 eq)을 IPA (1 mL)에서 반응시켰다. 실시예 G7 물질에 대해 기술된 바와 유사한 절차를 적용하였다. 수율: 958 mg 1.08 mmol.

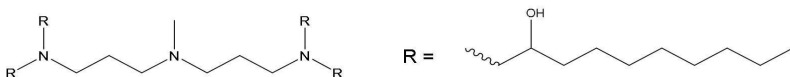


[0694]

[0695] ^1H NMR (399 MHz, 메탄올- d_4) δ 3.83 - 3.55 (m, 5H), 2.91 - 2.29 (m, 18H), 1.61 - 1.10 (m, 70H), 1.02 - 0.79 (m, 15H). MALDI-TOF-MS (DCTB 매트릭스, 양성 반사기 방식): Obs. $m/z = (M+H)^+$ 884.84, $[M+Na]^+$ 906.82. 계산: $C_{54}H_{113}N_3O_5$ (관측 질량 883.87; 분자량 884.51).

[0696] **실시예 G9. 비스(3-아미노프로필)메틸아민-EPX-C8-4**

[0697] 1,2-에폭시데칸 (269 mg, 1.68 mmol, 약 6 eq)을 IPA (1 mL) 중 N,N-비스(3-아미노프로필)메틸아민 (42 mg, 0.29 mmol)의 교반 용액에 첨가하였다. 반응 혼합물을 60°C 까지 16시간 동안 가열한 다음에, 진공 농축하였다. 잔류물을 MeCN에서 교반시키고 -20°C로 냉각시켜서, 생산물이 MeCN 용매로부터 상분리되도록 두었다. 상청액은 피펫을 사용해 조심스럽게 제거하였고, 분쇄 절차를 3회 반복하였다. 잔류물을 진공 건조하여 맑은 무색 오일을 산출하였다 (170 mg, 0.22 mmol, 77%).



[0698]

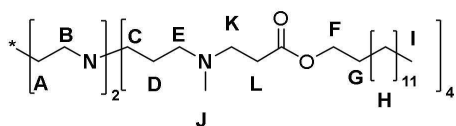
[0699] ^1H NMR (400 MHz, 클로로포름- d) δ 4.93 - 3.84 (m, 3H), 3.84 - 3.52 (m, 4H), 3.46 (s, 2H), 2.89 - 2.53 (m, 4H), 2.53 - 2.20 (m, 11H), 2.20 - 2.10 (m, 2H), 1.62 (dt, $J = 12.7, 6.4$ Hz, 4H), 1.53 - 1.16 (m, 56H), 0.88 (t, $J = 6.7$ Hz, 12H). MALDI-TOF-MS (CHCA 매트릭스, 양성 반사기 방식): Obs. $m/z = (M+H)^+$ 770.73, 계산: $C_{47}H_{99}N_3O_4$ (관측 질량 769.76; 분자량 770.33).

[0700] H. 아크릴레이트-에스테르에 의한 1차 아민의 작용화에 이어서, 나머지 2차 아민의 알킬화.

[0701] **실시예 H1. G1-ACR-nC14-4/CH₃-4**

[0702] 이 일반 실시예는 G1-PPI-(NH₂)₄ 덴드리머와 n-테트라데실 아크릴레이트의 마이클-첨가 반응에 이어서, 파라포름알데히드와 반응하여, 4개 n-테트라데실-에스테르 기 및 4개 메틸 기를 갖는 PPI-덴드리머를 야기하는 것을 기술한다.

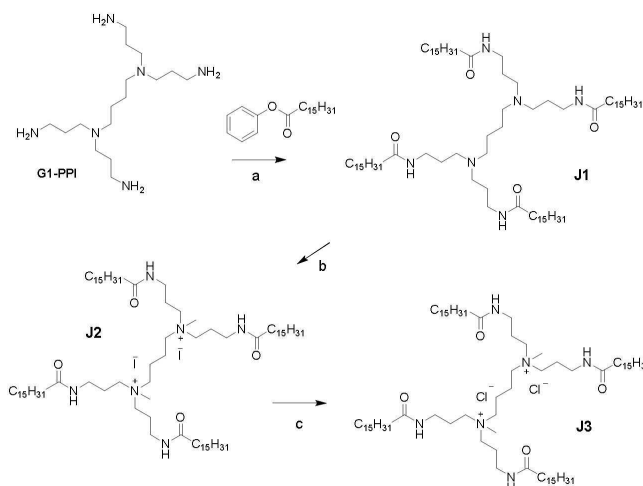
[0703] G1 PPI 덴드리머 DAB-Am-4 (0.21 g, 0.671 mmol)를 이소프로판올 (1 mL)에 용해시켰고, 테트라데실 아크릴레이트 (0.72 g, 2.68 mmol, 4 moleqs)를 첨가하였다. 혼합물을 밀봉된 바이알 중에 55°C에서 질소의 불활성 분위기 하에 24시간 동안 교반하여서, 1차 아민의 완전한 전환을 일으켰다. 1차 아민 기 각각의 거의 독점적인 단일-작용화가 관찰되었다. 반응 혼합물을 증발시켜서 이소프로판올을 제거하였고 잔류물을 클로로포름과 3회 공증발시켰다. 잔류물을 포름산 (2 mL)에 용해시켰다. 파라-포름알데히드 (121 mg, 4.0 mmol, 6 moleqs)를 비롯하여 가용성을 위한 THF (1 mL)를 첨가하였다. 혼합물을 60°C에서 교반하였다. 반응의 진행은 ¹H-NMR로 모니터링하였다. 3.5시간 후에, 반응이 완료되었고, 혼합물을 건조 증발시켰으며 클로로포름과 2회 공-증발시켰다. 미정제 혼합물을 클로로포름에 용해시켰고, 0.1 M NaOH (aq)에 이어서 포화 NaCl (aq)로 세척하였고, Na₂SO₄로 건조하였다. 미정제 생산물을 MeCN에서 교반하였고, 0°C에 수시간 동안 두어서 완전한 상분리를 유도하였다. 후속하여, 상청액을 디켄팅하였다. 이러한 절차를 2회 반복하였다. 잔류물은 5% MeOH/ 클로로포름으로 시작하는 실리카 컬럼 상에 두어서 불순물을 제거하였다. 생산물은 최종적으로 용리액을 5% MeOH 및 1% TEA/클로로포름으로 바꾸어서 컬럼으로부터 용리된다. 수율: 560 mg (58%). ¹H-NMR 스펙트럼은 바람직한 구조와 일치되었다.



[0704]

[0705] ¹H NMR (399 MHz, 클로로포름-*d*) δ 4.06 (td, *J* = 6.8, 1.3 Hz, 8H, F), 2.69 (t, *J* = 7.3 Hz, 8H, K), 2.62 - 2.29 (m, 25H, B, C, E, L), 2.23 (d, *J* = 1.3 Hz, 12H, J), 1.81 - 1.55 (m, 14H, D, G), 1.55 - 1.01 (m, 90H, H), 0.99 - 0.73 (m, 12H, I). MALDI-TOF-MS (CHCA 매트릭스, 양성 반사기 방식): Obs. *m/z* = (*M*+H)⁺ 1446.37, 소형 피크로서 *m/z* = (*M*+H)⁺, 1701.59 (5개 C14-사슬 및 3개 CH₃). 계산: C₈₈H₁₇₆N₆O₈ (관측 질량 1445.35; 분자량 1446.41).

[0706] *J*. 아민의 아미드화에 이어서, 임의로 내부 3차 아민의 알킬화.



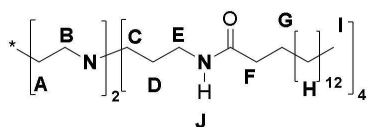
[0707]

[0708] 내부 4차화와 함께, G1 PPI 덴드리머 아미드의 합성. (a) 톨루엔, TEA, 90°C, 6시간; (b) MeI, 클로로포름/MeOH, 50°C; (c) Amberlite IRA 400 (Cl⁻).

[0709] 실시예 J1. G1-아미드-nC16-4

[0710] *N,N,N,N*-((부탄-1,4-디일비스(아자네트리일))테트라키스(프로판-3,1-디일))테트라팔미타미드.

[0711] N,N'-(부탄-1,4-디일)비스(N1-(3-아미노프로필)프로판-1,3-디아민) (PPI-G1, 1 g)은 충분한 양의 톨루엔과 2회 공중발시켰다. 그 다음으로, 톨루엔 (4 mL)에 용해시켰고, 톨루엔 (16 mL) 중 페닐 팔미테이트 (6.3 g)에 첨가하였다. 트리에틸아민 (9 mL)을 첨가하였고 혼합물을 90℃에서 6시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 진공 농축하였고, 최종 왁스질 고체를 아세트니트릴 (80 mL)에서 3시간 동안 분쇄하였다. 여과하고 아세트니트릴로 세척 후에, 잔류물을 건조하고 헥산에서 분쇄하였다. 잔류물을 여과하고, 헥산으로 세척하고 건조하여 3.3 g (82%)의 순수한 생성물을 희백색 고체로서 산출하였다. $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼은 바람직한 구조와 일치되었다.

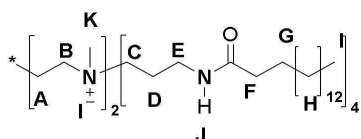


[0712]

[0713] ^1H NMR (399 MHz, 클로로포름-*d*) δ 6.48 (t, J = 5.7 Hz, 3H, J), 3.29 (q, J = 6.5 Hz, 8H, E), 2.52 - 2.26 (m, 12H, B, C), 2.16 (t, J = 7.7 Hz, 8H, F), 1.61 (dd, J = 15.4, 8.6 Hz, 22H, A, D, G), 1.25 (s, 95H, H), 0.88 (t, J = 6.7 Hz, 12H, I). MALDI-TOF-MS (CHCA 매트릭스, 양성 반사기 방식): Obs. m/z = (M+H) $^+$ 1270.31. 소형 피크로서 m/z = M+Na $^+$, 1292.23. 계산: C₈₀H₁₆₀N₆O₄ (관측 질량 1269.25; 분자량 1270.20).

[0714] 실시예 J2. G1-아미드-nC16-4 (2 MeI)

[0715] N,N,N,N-((부탄-1,4-디일비스(아자네트리일))테트라키스(프로판-3,1-디일))테트라팔미타미드 (2 MeI 암모늄 부가물). 실시예 J1 (4 g)을 1:1 클로로포름/메탄올 혼합물 (80 mL)에서 45℃에서 교반하였다. 이러한 탁한 혼합물에 메틸 아이오다이드 (3.14 mL)를 첨가하였다. 오일 베스 온도를 50℃까지 상승시키고 25 mL의 클로로포름을 첨가하여 맑은 혼합물을 생성시키고 16시간 동안 교반하였다. 추가량의 메틸 아이오다이드 (1 mL)를 첨가한 후에 교반을 4시간 동안 계속하였다. 이어서 혼합물을 진공 농축하고 메탄올과 2회 및 클로로포름과 1회 공-중발시켰다. 완전한 메틸화를 얻기 위해서, 생산물을 다시 클로로포름/메탄올에 용해시키고 10당량의 메틸 아이오다이드를 넣고 1시간 동안 90℃에서 뚜껑있는 바이알 중에 마이크로웨이브 조사 하에 교반하였다. 혼합물을 진공 농축하고 클로로포름과 공-중발시켜서 정량적으로 희백색 생산물을 수득하였다. $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼은 바람직한 구조와 일치되었다.



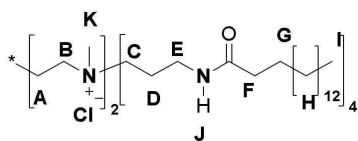
[0716]

[0717] ^1H NMR (400 MHz, 클로로포름-*d*) δ 7.41 (t, J = 6.1 Hz, 2H), 7.35 (s, 4H), 3.53 (s, 3H), 3.37 (p, J = 1.6 Hz, 2H), 3.31 (p, J = 5.7 Hz, 15H, C, E), 3.12 (s, 9H), 3.04 (s, 6H, K), 2.23 (t, J = 7.6 Hz, 8H, F), 2.14 - 1.81 (m, 12H, A, D), 1.61 (p, J = 7.2 Hz, 8H, G), 1.26 (s, 99H, H), 0.88 (t, J = 6.7 Hz, 13H, I).

[0718] 실시예 J3. G1-아미드-nC16-4 (2 MeCl)

[0719] N,N,N,N-((부탄-1,4-디일비스(아자네트리일))테트라키스(프로판-3,1-디일))테트라팔미타미드 (2 MeCl 암모늄 부가물). 실시예 J2 (3 g)를 150 mL의 클로로포름/메탄올 혼합물 (2:1)에 용해시켜서 맑은 용액을 얻었다. 이온 교환 수지 (50 그램) Amberlite IRA 400 (Cl $^-$)을 물에서 교반하였고 1 cm 직경 컬럼 상에 부어주었다. 컬럼은 물 및 이후 메탄올로 플러싱하였다. 플러싱 용리액 중 클로로포름의 양을 서서히 66% 까지 상승시켰다. 수지 비드가 부유되는 것을 피하기 위해서, 충전 플러그를 수지 상단에 배치시켰다. J2의 용액은 클로로포름/메탄올 혼합물 (2:1)을 사용해 수지 상에서 용리되었다. 모든 수집된 용리액을 농축하여 바람직한 생산물을 얻었다 (2.4 g). $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼은 바람직한 구조와 일치되었다. 모든 아이오다이드 이온이 치환되었다는 것을 확인하기 위해서, 생산물의 유기 용액을 1 M NaBr 용액을 사용해 추출하였다. 이어서 수성층을 전분 시험에 사용하여서 착색이 없다는 것을 보여주어 아이오다이드 음이온의 완전한 교환을 증명하였

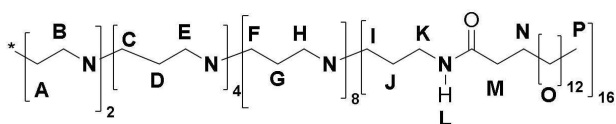
다. 기준 벤치마크로서, 아이오다이드 함유 덴드리머 용액을 또한 시험하였다. 이들 용액은 파란색이 되었다.



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 3.45 (m, 12H, B, C), 3.37 (t, 8H, E), 3.06 (s, 6H, K), 2.41 (t, 8H, F), 2.15 (m, 8H, D), 1.96 (m, 4H, A), 1.62 (m, 8H, G), 1.25 (m, 96H, H), 0.88 (t, 12H, I).

[0722] 실시예 J4. G3-아미드-nC16-16

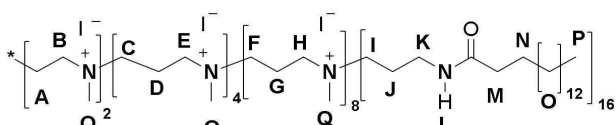
[0723] 이 물질 J4는 PPI-덴드리머 G3 (DAB-Am-16)을 페닐 팔미테이트를 반응시켜서 수득되었고, 실시예 J1에 대해 수행된 바와 유사한 방식으로 수행되었다. 수율: 5.88 g (90 %). ¹H-NMR 스펙트럼은 바람직한 구조와 일치되었다.



¹H NMR (400 MHz, 클로로포름-*d*) δ 11.04 (d, *J* = 207.4 Hz, 8H, NH), 7.60 - 7.16 (m, 9H), 4.06 - 2.63 (m, 113H, B, C, E, F, H, I, K), 2.46 - 2.08 (m, 54H, D, G, M), 2.08 - 1.70 (m, 36H, A, J), 1.57 (p, *J* = 7.2, 6.7 Hz, 33H, N), 1.26 (d, *J* = 9.1 Hz, 387H, O), 0.88 (t, *J* = 6.7 Hz, 48H, P). MALDI-TOF-MS (DCTB 매트릭스, 양성 반사기 방식): Obs. *m/z* = (M+H)⁺ 5503.04. 계산: C₃₄₄H₆₈₈N₃₀O₁₆ (관측 질량 5497.39; 분자량 5501.48).

[0726] 실시예 J5. G3-아미드-nC16-16 (14 MeI)

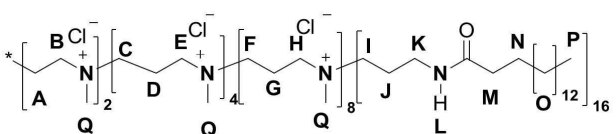
[0727] 이 물질 J5는 J4를 MeI와 반응시켜서 수득되었고, 실시예 J2에 대해 수행된 것과 유사한 방식으로 수행되었다. 수율: 1.32 g (97 %). The ¹H-NMR 스펙트럼은 바람직한 구조와 일치되었다.



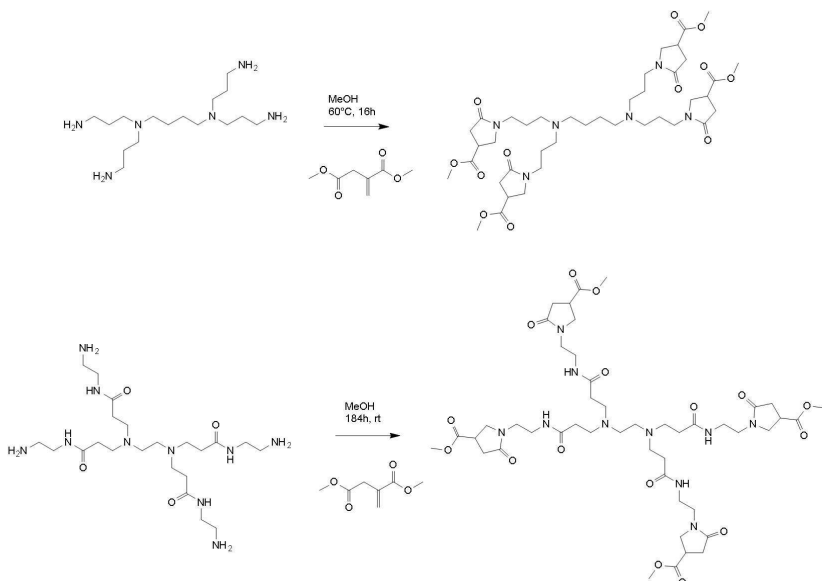
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃/CD₃OD) δ 7.54 (d, *J* = 16.5 Hz, 1H), 7.30 (s, 9H), 3.84 (d, *J* = 61.2 Hz, 48H), 3.55 (d, *J* = 35.9 Hz, 41H), 3.44 (s, 5H), 3.43 - 3.12 (m, 60H), 2.59 (s, 23H), 2.40 (s, 35H), 2.25 (t, *J* = 7.8 Hz, 35H), 2.06 (d, *J* = 10.4 Hz, 33H, M), 1.60 (p, *J* = 7.2 Hz, 33H, N), 1.51 - 1.00 (m, 387H, O), 1.00 - 0.76 (m, 48H, P).

[0730] 실시예 J6. G3-아미드-nC16-16 (14 MeCl)

[0731] 이 물질 J6은 J5를 이온 교환 컬럼 상에서 용리하여 수득되었고, 실시예 J3에 대해 수행된 바와 유사한 방식으로 수행되었다. 수율: 2.55 g (99 %). ¹H-NMR 스펙트럼은 바람직한 구조와 일치되었다.



[0733] ^1H NMR (400 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) δ 7.87 (s, 12H), 7.30 (t, J = 7.4 Hz, 11H), 4.16 – 2.94 (m, 145H), 2.94 – 2.61 (m, 52H), 2.46 (s, 22H), 2.20 (dq, J = 17.3, 8.2 Hz, 30H), 1.96 (s, 33H), 1.60 (s, 28H), 1.25 (dt, J = 20.6, 9.1 Hz, 354H, O), 0.88 (dt, J = 16.5, 7.5 Hz, 48H, p).



[0734]

[0735] 텐드리머 G1-디메틸이타코네이트-4 및 G1(PAMAM-C2)-디메틸이타코네이트-4의 합성. 4개 메틸-에스테르 말단 기의 트랜스-에스테르화 (장쇄 알콜에 의함) 또는 아마이드화 (장쇄 1차 또는 2차 아민에 의함)는 더 많은 무극성 구조를 제공하게 된다.

[0736] 실시예 J7. G1-디메틸이타코네이트-4

[0737] 디메틸 이타코네이트 (0.66 g, 4.2 mmol, 4.2 eq)를 IPA (2 mL) 중 G1-PPI-(NH_2)₄ (316 mg, 1 mmol)의 교반 용액에 첨가하였다. 반응 혼합물을 60°C 까지 16시간 동안 가열하였고, 이어서 물 (15 mL)에 부었다. 수층을 디에틸 에테르 (4 x 5 mL)로 세척하였다. 미량의 용매는 실온에서 진공 하에 제거되었다. 수층을 동결건조하여 호박색 오일을 얻었다. 생산물은 MeOH/ CHCl_3 (20-30% MeOH) 용리액을 사용한 실리카 컬럼 크로마토그래피를 통해 정제되었다. 수율: 무색 오일 (414 mg, 0.50 mmol, 50%).

[0738] ^1H NMR (400 MHz, 클로로포름- d) δ 3.74 (s, 12H), 3.70 – 3.53 (m, 8H), 3.39 – 3.17 (m, 12H), 2.77 – 2.60 (m, 8H), 2.53 – 2.27 (m, 12H), 1.66 (m, 8H), 1.39 (m, 4H). ESI-MS: $\text{C}_{40}\text{H}_{64}\text{N}_6\text{O}_{12}$ 에 대해 계산된 m/z 820.46; Obs. $[\text{M}+\text{H}]^{2+}$ 411.50, $[\text{M}+\text{H}]^+$ 820.50, $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 853.50.

[0739] 실시예 J8. G1(PAMAM-C2)-디메틸이타코네이트-4

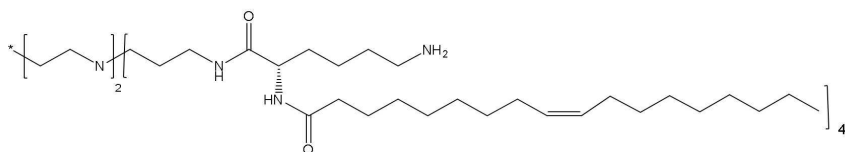
[0740] 디메틸이타코네이트 (514 mg, 3.25 mmol, 4.9 eq)를 MeOH (2 mL) 중 G1-PAMAM-C2 (에틸렌 디아민 코어, 4 아민 말단 기; 약 340 mg, 0.66 mmol)의 용액에 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 교반하였고, 반응 진행은 HPLC-MS를 사용해 모니터링하였다. 184시간 후에 반응이 완료되었다. 혼합물을 물 (15 mL)에 부었고, 수층을 디에틸 에테르 (4 x 5 mL)로 세척하였다. 미량의 용매를 진공 하에 제거하였고 수층을 동결건조하여 여전히 일부 에테르를 함유하는 반고체 무색 왁스를 산출하였다 (834 mg).

[0741] ^1H NMR (400 MHz, 클로로포름- d) δ 7.71 (t, J = 5.3 Hz, 4H), 3.74 (s, 16H), 3.66 (dd, J = 9.9, 5.9 Hz, 4H), 3.55 – 3.39 (m, 10H), 3.39 – 3.17 (m, 12H), 2.74 – 2.55 (m, 16H), 2.52 (s, 4H), 2.32 (t, J = 6.5 Hz, 8H). ESI-MS: $\text{C}_{46}\text{H}_{72}\text{N}_{10}\text{O}_{16}$ 에 대해 계산된 m/z 1021.14; Obs. $[\text{M}+\text{H}]^{2+}$ 511.58, $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1021.50, $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 1043.50.

[0742] 실시예 J9. G1-리신- N^2 -올레에이트-4

[0743] G1 PPI 텐드리머 (35 mg; 0.11 mmol; 0.44 mmol 1차 아민 기) 및 트리에틸아민 (200 μL)을 DCM (9 mL)에 용해

시켰고 실온에서 질소 분위기에서 교반하였다. 2,3,5,6-테트라플루오로페닐 N⁶-(tert-부톡시-카르보닐)-N²-올레오일-L-리시네이트 (292 mg, 0.44 mmol, 4.00 eq)를 첨가하였고, 용액을 24시간 동안 교반하였다. 클로로포름 (50 mL)을 첨가하였고, 유기층을 수성 1 N NaOH (20 mL)에 이어서, 물 (20 mL) 및 염수 (20 mL)로 세척하였다. 용액을 클로로포름 (3 x 20 mL)과 공-증발시켜서 트리에틸아민을 제거하였다. 수율: 209 mg의 무색 오일. 오일을 DCM (10 mL) 및 TFA (1 mL)에 용해시켰고, 용액을 20시간 동안 실온에 질소 분위기에서 교반하였다. 혼합물을 건조까지 증발시키고, 잔류물을 CHCl₃ (70 mL)에 용해시켰다. 용액을 수성 1 N NaOH (20 mL)에 이어서, 염수 (20 mL)로 세척하였다. 용액을 건조까지 증발시켰고, 백색 왁스 생산물을 얻었다. 수율: 180 mg (86%).



[0744]

[0745]

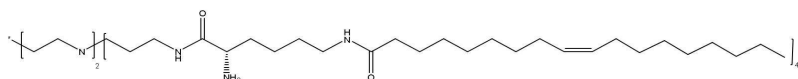
¹H NMR (400 MHz, 클로로포름-d) δ 7.98 (s, 4H), 7.25-7.00 (s, 4H), 5.38-5.28 (m, 8H), 4.45 (s, 4H), 3.50-2.60 (m, 32H), 2.48 (s, 8H), 2.19 (s, 8H), 2.00 (m, 16H), 1.85-1.20 (m, 120H), 0.88 (t, J = 6.9 Hz, 12H). FTIR (cm⁻¹) 3282 (m), 2924 (s), 2854 (m), 1692 (m), 1637 (vs), 1534 (m), 1455 (m), 1365 (m), 1248 (m), 1171 (s). MALDI-TOF-MS (CHCA 매트릭스, 양성 반사기 방식): Obs. m/z = (M+Na)⁺ 1909.66 (2nd 동위원소 피크). 계산: C₁₁₂H₂₁₆N₁₄O₈ (관측 질량 1885.69; 분자량 1887.00).

[0746]

실시예 J10. G1-리신-N⁶-올레에이트-4

[0747]

질소 분위기에서 DCM (1 mL) 중 G1 PPI 덴드리머 (31.0 mg, 0.098 mmol; 0.39 mmol 1차 아민 기)의 용액을 DCM (3 mL) 중 2,3,5,6-테트라플루오로페닐 N²-(tert-부톡시-카르보닐)-N⁶-올레오일-L-리시네이트 (282 mg, 0.43 mmol) 및 트리에틸아민 (100 μL)의 용액에 첨가하였다. 30시간 후에, ¹H-NMR 분석은 완전한 전환을 보여주었다. 과량의 TFP-에스테르를 제거하기 위해서, Biotage MP-Trisamin 수지 (125 mg)를 첨가하였고, 30시간 동안 교반을 계속하였다. DCM (50 mL)을 첨가하였고, 혼합물을 여과하였다. 여과물을 1 N NaOH (20 mL), 물 (20 mL) 및 염수 (20 mL)로 세척하였다. 용매의 제거 후에, 덴드리머를 백색 고체로서 수득하였다. 수율: 198 mg. 덴드리머 (195 mg)를 질소 분위기에서 DCM (4 mL)에 용해시켰고, TFA (1 mL)를 첨가하였다. 23시간 후에, 반응 혼합물을 회전식 증발기에서 농축시켰다. 생산물은 톨루엔과 3회 공-증발하여서 과량의 TFA를 제거하였고, 이어서 클로로포름 (50 mL)에 용해시키고 1 N NaOH (2 mL)에 이어서 염수 (10 mL)로 진탕하였다. 용매의 제거는 무색 오일을 산출하였다. 수율: 180 mg (97%). ¹H-NMR 스펙트럼은 바람직한 구조와 일치되었다.



[0748]

[0749]

¹H NMR (400 MHz, 클로로포름-d) δ 7.63 (s, 4H), 6.16 (t, 4H), 5.38-5.29 (m, 8H), 4.16 (s, 4H), 3.35-3.20 (m, 16H), 2.41 (t, 4H), 2.36 (t, 4H), 2.15 (t, J = 9.7 Hz, 8H), 2.0 (m, 16H), 1.9-1.0 (m, 136H), 0.87 (t, J = 6.9 Hz, 12H). FTIR (cm⁻¹) 3309 (s), 2923 (vs), 2854 (s), 1639 (vs), 1549 (s), 1466 (w). MALDI-TOF-MS (CHCA 매트릭스, 양성 반사기 방식): Obs. m/z = (M+Na)⁺ 1909.68 (제2 동위원소 질량). 계산: C₁₁₂H₂₁₆N₁₄O₈ (관측 질량: 1885.69; 분자량 1887.00).

[0750]

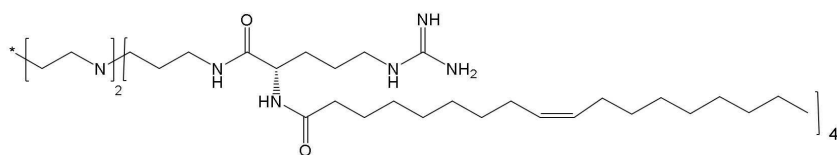
실시예 J11. G1-아르기닌-올레에이트-4

[0751]

THF (2 mL) 중 G1 PPI 덴드리머 (69 mg, 0.22 mmol, 0.87 mmol 1차 아민 기)의 용액을 올레오일-L-아르기닌 (463 mg, 0.97 mmol)에 첨가한 후에, 클로로포름 (2 mL)을 첨가하였다. 몇분 동안 교반 후에, 겔-유사 혼합물이 형성되었다. HFIP (100 μL)를 첨가하였고, 교반을 40°C에서 계속하여서 맑은 용액을 형성하였다. 실온까지 냉각 후에, DCC (399 mg, 1.93 mmol)를 첨가하였다. 최종적인 맑은 용액을 40°C 까지

가열하였고, 이것은 탁한 백색 (DCU 형성에 의함)으로 바뀌었다. 반응 진행은 샘플의 MALDI-TOF-MS 분석을 통해서 모니터링하였다. 반응 6일 후에, 더 많은 올레오일-L-아르기닌 (220 mg, 0.46 mmol) 및 DCC (156 mg, 0.76 mmol)를 첨가하였다. 3일 후에 MALDI-TOF-MS는 덴드리머의 완전한 전환을 나타내었고, 반응을 중단하였다. 물 (0.38 mL) 및 아세트산 (0.20 mL)을 첨가하였다. 회전식 증발기에서 농축으로 1.10 g의 미정제 생산물이 생성되었다.

[0752] 물 (10 mL)을 미정제 생산물의 일부분 (500 mg)에 첨가하였고, 혼합물을 30분 동안 초음파처리하였다. 밤새 정치 후에, 거의 맑은 물 용액을 백색 침전물 (주로 DCU)로부터 분리하였고, 투석 배관 (CE 500 - 1000 달톤)으로 옮겼다. 용액을 아세트산 (2 mL)을 함유하는 물 (1 L)에 이어서, 아세트산 (1 mL)이 존재하는 물 (1 L), 이어서 1 N NaOH (2 mL)가 존재하는 물 (1 L), 및 최종적으로 물 (1 L)에 대해 투석되었다. 동결건조 이후에, 백색 솜털 유사 분말이 수득되었다. 수율: 188 mg. $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼은 바람직한 구조와 일치되었다.



[0753]

[0754] ^1H NMR (400 MHz, 클로로포름- d) δ 8.20 (s, 4H), 7.60-7.00 (광폭 피크, 20H), 5.38-5.28 (m, 8H), 4.40-4.10 (m, 4H), 3.30-3.10 (m, 16H), 2.50-1.10 (m, 152H), 0.88 (t, J = 6.8 Hz, 12H). FTIR (cm^{-1}) 3280 (m), 3184 (m), 2984 (vs), 2854 (vs), 1644 (vs), 1549 (vs), 1456 (m), 1403 (m). MALDI-TOF-MS (CHCA 매트릭스, 양성 반사기 방식): Obs. m/z = (M+H) $^+$ 1999.73 (제2 동위원소 피크). 계산된 $\text{C}_{112}\text{H}_{216}\text{N}_{22}\text{O}_8$ (제2 동위원소 피크 경우 1998.72); 분자량 1999.06.

[0755] K. 아크릴-에스테르로 1차 아민의 작용화에 이어서 나머지 2차 아민의 아실화 (여기서, 생산물은 다가 분자의 혼합물임)

[0756] **실시예 K1. n-옥틸-아크릴레이트 및 아세트산 무수물에 의해 변형된 G1 PPI 덴드리머**

[0757] n-옥틸-아크릴레이트 (175 mg, 0.95 mmol, 3 eq)를 IPA (1 mL) 중 G1-PPI-(NH $_2$) $_4$ 덴드리머 (100 mg, 0.32 mmol)의 교반 용액에 첨가하였다. 반응을 16시간 동안 60°C에서 가열하였고, 이어서 진공 농축하고 건조하였다. 잔류물을 DCM (1 mL) 및 트리에틸아민 (185 μL , 134 mg, 1.33 mmol, 4.2 eq)에 재용해하였고, 아세트산 무수물 (125 μL , 135 mg, 1.33 mmol, 4.2 eq)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 2시간 동안 실온에서 교반하였고, 이어서 클로로포름으로 희석하였다. 클로로포름 층을 포화 NaHCO $_3$ -용액 (1 x 25 mL) 및 염수 (1 x 25 mL)로 세척하였고, Na $_2$ SO $_4$ 를 사용하여 건조하고, 진공 농축하여 생산물을 산출하였다 (365 mg, 0.35 mmol). 종결 단위 기는 n-옥틸-아크릴레이트 및 아세틸 기의 혼합물이다.

[0758] ^1H NMR (400 MHz, 클로로포름- d) δ 6.63 (m, 1H), 4.07 (dtd, J = 13.4, 6.8, 2.7 Hz, 6H), 3.58 (dt, J = 14.3, 5.7 Hz, 6H), 3.30 (p, J = 7.4 Hz, 7H), 2.76 (t, J = 7.3 Hz, 1H), 2.67 - 2.52 (m, 6H), 2.52 - 2.29 (m, 12H), 2.17 - 2.03 (m, 9H), 1.96 (d, J = 4.8 Hz, 3H), 1.63 (p, J = 6.9 Hz, 14H), 1.30 (dd, J = 14.1, 7.6 Hz, 34H), 0.88 (t, J = 6.7 Hz, 9H). MALDI-TOF-MS (CHCA 매트릭스, 양성 반사기 방식): 3 x n-옥틸-아크릴레이트 Obs. m/z = (M+H) $^+$ 1037.80, (M+Na) $^+$ 1059.77. 계산: $\text{C}_{57}\text{H}_{108}\text{N}_6\text{O}_{10}$ (관측 질량 1036.81; 분자량 1037.52). 4 x 옥틸-아크릴레이트 Obs. m/z = (M+H) $^+$ 1221.95, (M+Na) $^+$ 1243.93. 계산: $\text{C}_{68}\text{H}_{128}\text{N}_6\text{O}_{12}$ (관측 질량 1220.96; 분자량 1221.80).

[0759] **실시예 K2. n-옥틸-아크릴레이트 및 아세트산 무수물에 의해 변형된 G2 PPI 덴드리머**

[0760] 실시예 K1과 유사하게 G2-PPI-(NH $_2$) $_8$ (102 mg, 0.13 mmol)를 단계 1에서 IPA (1 mL) 중 n-옥틸-아크릴레이트 (169 mg, 0.92 mmol, 6.95 eq)와, 그리고 단계 2에서 DCM (1 mL) 중 DIPEA (231 μL , 172 mg, 1.33 mmol, 10 eq)를 사용해 아세트산 무수물 (125 μL , 136 mg, 1.33 mmol, 10 eq)과 반응시켰다. 종결 단위 기는 n-옥틸-아크릴레이트 및 아세틸 기의 혼합물이다.

- [0761] ^1H NMR (400 MHz, 클로로포름-*d*) δ 4.06 (dt, J = 13.5, 6.8 Hz, 14H), 3.58 (dt, J = 13.5, 7.5 Hz, 14H), 3.31 (q, J = 9.4, 8.6 Hz, 15H), 2.76 (t, J = 7.3 Hz, 1H), 2.70 - 2.52 (m, 14H), 2.40 (m, 36H), 2.10 (d, J = 11.6 Hz, 21H), 1.96 (s, 3H), 1.85 - 1.44 (m, 38H), 1.45 - 1.10 (m, 74H), 0.88 (t, J = 6.7 Hz, 21H). MALDI-TOF-MS (CHCA 매트릭스, 양성 반사기 방식): 6 x *n*-옥틸-아크릴레이트 Obs. m/z = (M+H) $^+$ 2215.75, (M+Na) $^+$ 2237.73. 계산: $\text{C}_{122}\text{H}_{232}\text{N}_{14}\text{O}_{20}$ (관측 질량 2213.76; 분자량 2215.28). 7 x 옥틸-아크릴레이트 Obs. m/z = (M+H) $^+$ 2399.90, (M+Na) $^+$ 2421.88. 계산: $\text{C}_{133}\text{H}_{252}\text{N}_{14}\text{O}_{22}$ (관측 질량 2397.90; 분자량 2399.56).
- [0762] *L. 아크릴-아미드로 1차 아민의 작용화에 이어서 나머지 2차 아민의 에폭시화 (여기서, 생산물은 다가 분자의 혼합물임)*
- [0763] **실시예 L1. *n*-옥틸-아크릴-아미드 및 1,2-에폭시도데칸에 의해 변형된 G1 PPI 덴드리머**
- [0764] *n*-옥틸-아크릴아미드 (174 mg, 0.95 mmol, 3 eq)를 IPA (1 mL) 중 G1-PPI-(NH₂)₄ (100 mg, 0.32 mmol)의 교반 용액에 첨가하였다. 반응 혼합물을 60℃에서 160시간 동안 교반하여 제1 단계를 완료하였다. 다음으로, 1,2-에폭시도데칸 (582 mg, 3.16 mmol, 10 eq) 및 IPA (0.5 mL)를 첨가하였고, 반응 혼합물을 다른 16시간 동안 60℃에서 교반하였다. 혼합물을 냉각시켰고, 진공 농축하였다. 잔류물을 MeCN에서 교반하였고, -20℃로 냉각하여 생산물이 MeCN 용매로부터 상분리되도록 두었다. 상청액을 피펫을 사용해 조심스럽게 제거하였고, 분쇄 절차를 2회 반복하여 호박색 오일을 얻었다 (495 mg, 0.28 mmol, 76%). 종결 단위 기는 *n*-옥틸-아크릴아미드 및 에폭시드-유래 기의 혼합물이다.
- [0765] ^1H NMR (400 MHz, 클로로포름-*d*) δ 6.79 (s, 3H), 3.76 (m, 5H), 3.62 (m, 5H), 3.20 (q, J = 7.7, 6H), 3.01 - 2.77 (m, 3H), 2.77 - 2.12 (m, 37H), 1.68 - 1.06 (m, 138H), 0.88 (t, J = 6.8 Hz, 24H). MALDI-TOF-MS (DCTB 매트릭스, 양성 반사기 방식): Obs. m/z = (M+H) $^+$ 1788.71, 계산: $\text{C}_{109}\text{H}_{223}\text{N}_9\text{O}_8$ (관측 질량 1786.73; 분자량 1788.04).
- [0766] **실시예 L2. *n*-옥틸-아크릴-아미드 및 1,2-에폭시도데칸에 의해 변형된 G2 PPI 덴드리머**
- [0767] 실시예 L1과 유사하게 G2-PPI-(NH₂)₈ (100 mg, 0.13 mmol)은 단계 1에서 IPA (1 mL) 중 *n*-옥틸-아크릴-아미드 (142 mg, 0.78 mmol, 6 eq)와, 그리고 단계 2에서 1,2-에폭시도데칸 (477 mg, 2.59 mmol, 20 eq)과 반응되었다. 수율: 호박색 점성 오일 (463 mg, 96%). 종결 단위 기는 *n*-옥틸-아크릴아미드 및 에폭시드-유래 기의 혼합물이다.
- [0768] ^1H NMR (400 MHz, 클로로포름-*d*) δ 6.96 (s, 6H), 3.84 (d, J = 8.1 Hz, 10H), 3.61 (s, 10H), 3.18 (t, J = 7.0 Hz, 12H), 2.99 - 2.77 (m, 6H), 2.77 - 2.09 (m, 90H), 1.27 (d, J = 5.6 Hz, 280H), 0.88 (t, J = 6.7 Hz, 48H). MALDI-TOF-MS (DCTB 매트릭스, 양성 반사기 방식): Obs. m/z = (M+H) $^+$ 3717.55, 계산: $\text{C}_{226}\text{H}_{462}\text{N}_{20}\text{O}_{16}$ (관측 질량 3713.60; 분자량 3716.31).
- [0769] **실시예 2 - 다가 분자의 가용성**
- [0770] 다양한 다가 분자의 가용성을 에탄올, 이소-프로판올 및 트리카프릴린에서, 용매 그램 당 20 mg 물질의 농도로 시험되었다. 실온에서 교반 시 자발적 용해로 맑은 용액을 제공하는 것이 가용성에 대한 표시이다. 실시예 A1, A2, A4, A6, A7, A8, A9, A10, A11, B1, B2, B3, B4, C2, E1, F1, G1, G2, G3, G5, G7, G8, H1, J10 및 J11의 다가 분자는 실온에서 모든 3개 용매에서 가용성인 것으로 확인되었다. 실시예 C1은 이소프로판올 및 트리카프릴린에서 가용성이었다. 실시예 D4는 37℃ 까지 가열 시 3개 용매에서 가용성이었다. 제조된 모든 물질이 시험된 것은 아님을 유의한다.
- [0771] 이들 데이터는 다가 분자가 예를 들어, 에탄올 또는 이소-프로판올에서 처리를 위해 충분히 가용성이라는 것을 보여준다. 데이터는 또한 트리카프릴린에서의 가용성을 보여주는데, 분자가 아마도 본 발명의 나노입자의 소수성 내부에 대해 친화성을 갖는다는 것을 의미한다.
- [0772] **실시예 3 - 나노입자를 포함하는 다가 분자의 구축**
- [0773] 나노입자 제제는 이온성 및 소수성 상호작용을 기반으로 자가 조립된다. 성분은 그들 개별 유기 용매 (지질

및 다른 구조적 성분) 또는 수성 완충액 (핵산 페이로드) 중에서 바람직한 농도로 제조된다. 그 다음에 용액은 미세유체 또는 T-접합 혼합을 포괄하는 급속 혼합 기술을 통해서 함께하게 된다. 과량의 수성 완충액이 형성 과정에서 필수적이다. 본 명세서에서 사용될 때, 과량의 수성 완충액은 적어도 2:1 이상, 예를 들어, 2.2:1, 2.5:1, 2.8:1 또는 3:1 이상의 (수성 완충액):(유기 용매) (부피 기반)의 비를 의미한다. 초기 혼합 이후에, 유기 용매의 작은 분획을 예를 들어 투석 또는 원심분리 여과를 사용해 제거한다. 이들 단계는 급속 혼합 기술 예컨대 미세유체 또는 T-접합 혼합을 통해서 또는 예를 들어 점적 방법을 사용하여 아포리포단백질 (안정화제)이 첨가되는 지질 나노입자를 산출한다. 아포리포단백질 첨가 후에, 잔류 단백질은 투석 또는 원심분리 여과를 통해서 제거될 필요가 있다. 마지막으로, 샘플을 바람직한 농도까지 농축한다.

[0774] 따라서 생산된 핵산 나노입자는

[0775] (a) 다가 분자;

[0776] (b) 아포리포단백질 안정화제;

[0777] (c) 핵산;

[0778] (d) 스테롤;

[0779] (e) 인지질; 및

[0780] (f) 임의로 지질을 포함한다.

[0781] 따라서, 표시된 다가 분자를 사용하여 표 S3, 표 S7 및 표 S8에 기술된 바와 같은 상이한 조성물이 제조되었고, 하기 대조군 조제물과 배합되었다:

[0782] LNP 대조군은 다음의 문헌에 기술된 바와 같은 임상적으로 승인된 LNP-siRNA 제제에 대해 사용되는 "표준 LNP"이다: Akinc A, et al. The Onpattro story and the clinical translation of nanomedicines containing nucleic acid-based drugs. Nat Nanotechnol. 2019 Dec;14(12):1084-1087. doi: 10.1038/s41565-019-0591-y).

조성 (mol%)은 그리하여 핵산의 존재를 무시한다:

[0783] - DLin-MC3-DMA 50%

[0784] - DSPC 10%

[0785] - 콜레스테롤 38.5%

[0786] - PEG-DMG 1.5%

[0787] MC3-기반 aNP 대조군은 본 명세서에 기술된 바와 같은 다가 분자 대신에, DLin-MC3-DMA를 사용해 핵산과 복합체 형성되는 것인 아포리포단백질 나노입자이다. 조성은 표 S3 및 표 S8에 열거되어 있다.

표 S3. siRNA-함유 나노입자의 제제 중에 적용된 성분의 양. 기준 나노입자는 이온화가능한 양이온성 지질 DLin-MC3-DMA 를 함유하는 LNP 및 aNP (아포리포단백질 나노입자)이다. 본 발명의 aNP 는 siRNA 와 복합체형성을 위한 다가 이온화가능한 물질을 갖는다.

	LNP (MC3)	aNP (MC3)	aNP (본 발명에 따른 예시적인 aNP)
N/P 비	6	6	6
이온화가능한 양이온성 지질 유형	DLin-MC3-DMA (또는 MC3)	DLin-MC3-DMA (또는 MC3)	다가 물질
이온화가능한 양이온성 지질	2.42 mg	2.42 mg	0.91 – 1.67 mg (특정 물질에 따름)
DSPC	0.60 mg	—	—
DMPC	—	2.50 mg	2.50 mg
DMG-PEG2000	0.28 mg	—	—
콜레스테롤	1.12 mg	1.35 mg	1.35 mg
트리카프릴린 (TG)	—	10 mg	10 mg
Apo A1	—	1.0 mg	1.0 mg
siRNA	0.20 mg	0.20 mg	0.20 mg

[0788]

[0789]

본 발명의 aNP는 1.00 (for A1), 1.13 (A2), 1.60 (A3), 1.27 (A6), 1.20 (A7), 1.18 (A8), 1.11 (A11), 1.16 (A14), 0.98 (B2), 1.67 (D4), 1.20 (F1), 1.16 (G2), 1.48 (G6), 1.15 (G7), 1.11 (G8), 0.97 (G9) 또는 0.91 (H1) mg의 다가 물질과 조합하여, 상기 표에 제공된 바와 같은 양을 사용해 제조되었다. DMG-PEG 2000 은 합성 지질이고, PEG화된 미리스토일 디글리세리드이다. 트리카프릴린은 글리세릴 트리-n-옥타노에이트이고, 트리글리세리드 (TG)이다.

표 S7. 다가 이온화가능한 분자 A2 를 함유하는 본 발명의 siRNA-aNP 의 DLS 데이터. 적용된 aNP 의 제제 조성은 처음 2 개 컬럼에 제공되는 단일 돌연변이외에는, 표 S3 에 따른다. 모든 경우에서, 200 nm 미만의 직경을 갖는 나노입자가 형성된다.

aNP 조성의 변동		DLS 유체역학적 직경 (nm)	DLS PDI (-)
N/P = 3	-	173	0.79
N/P = 9	-	62	0.24
N/P = 6	트리글리세리드 없음	122	0.16
	저 트리글리세리드 (5 mg)	60	0.08
	저 콜레스테롤 (0.54 mg)	95	0.07
	고 콜레스테롤 (3.37 mg)	103	0.24
	DMPC	91	0.18
	DSPC	60	0.07
	DPPC	61	0.08
	POPC	123	0.08

[0790]

표 S8. mRNA-로딩된 나노입자 제제 중에 적용된 성분의 양. 기준 나노입자는 이온화가능한 양이온성 지질 ALC-0315 를 함유하는 LNP 및 aNP (아포리포단백질 나노입자)이다. 본 발명의 aNP 는 다가 이온화가능한 물질 A2 를 함유한다.

시험관 내 실험			
	LNP (ALC-0315)	aNP (ALC-0315)	aNP (본 발명에 따른 예시적인 aNP)
N/P 비	6	6	6
이온화가능한 양이온성 지질 유형	ALC-0315	ALC-0315	다가 물질 A2
이온화가능한 양이온성 지질	1.43 mg	1.43 mg	0.55 mg
DSPC	0.30 mg	—	—
DMPC	—	1.19 mg	1.19 mg
PEG-DMG	0.14 mg	—	—
콜레스테롤	0.56 mg	0.65 mg	0.65 mg
트리카프릴린 (TG)	—	2.39 mg	2.39 mg
Apo A1	—	0.48 mg	0.48 mg
mRNA (RIBOPRO Fluc mRNA)	0.10 mg	0.10 mg	0.10 mg

[0791]

생체 내 실험	
	aNP (본 발명에 따른 예시적인 aNP)
N/P 비	6
이온화가능한 양이온성 지질 유형	다가 물질 A2
이온화가능한 양이온성 지질	0.65 mg
DSPC	—
DMPC	1.40 mg
PEG-DMG	—
콜레스테롤	0.76 mg
트리카프릴린 (TG)	2.80 mg
Apo A1	0.58 mg
mRNA (TriLink CleanCap® Fluc mRNA (5moU))	0.10 mg

[0792]

[0793]

실시예 4 - 나노입자의 제조

[0794]

재료. 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (DMPC), 1,2-디미리스토일-rac-글리세로-3-메톡시폴리에틸렌 글리콜-2000 (DMG-PEG), 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (DSPC)은 Avanti Polar Lipids New Jersey, US에서 구매하였다. 콜레스테롤 및 트리카프릴린은 Sigma Aldrich에서 구매하였다. D-Lin-MC3-DMA (MC3)는 University of British Columbia, Centre for Organic Chemistry, Vancouver, Canada에서 수득하였다. ALC-0315는 사내에서 합성하였다. 재조합 apo A1은 사내의 ClearColi BL21(DE3) 세포에서 발현 및 정제되었다. 반딧불이 루시퍼라제 및 음성 대조군 Dicer-기질 siRNA는 Integrated DNA Technologies (IDT), Iowa, US. 10에서 입수하였다.

[0795]

siRNA-로딩된 나노입자의 제조

[0796]

제제 과정의 도식이 도 5에서 확인된다. 본 발명의 aNP의 특정한 제제 조성물, aNP 대조군 입자 및 LNP 대조군 입자는 표 S3에서 확인할 수 있다. 조성물의 변동이 또한 평가되었고, 표 S7을 참조한다.

[0797]

siRNA-로딩된 aNP는 T-접합 장치를 사용한 급속 혼합을 통해서 제제화되었다. 지질 분자 (aNP 경우 인지질, 콜레스테롤, 트리글리세리드 및 이온화가능한 물질; LNP 경우 인지질, 콜레스테롤, 이온화가능한 물질 및 PEG-지질)를 에탄올에 용해시켰고, 200 µg 항-반딧불이 루시퍼라제 siRNA 또는 스크램블된 siRNA를 함유하는 소듐 아세테이트 완충액 (25 mM, pH 4)과 급속 혼합하였다. 유기층 및 수성층을 혼합하였고 12-14 kDa MWCO 투석 막 (Spectra/Por™)에서 직접 수집되었다. 나노입자 제제는 1x PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ 및 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.4)에 대해서 밤새 4°C에서 투석되었고 150 rpm으로 교반되었다. PBS는 대략 4시간 후에 새롭게 보충되었다. 다음 날에, 제제 샘플은 투석백으로부터 수집하였고 부피를 결정하였다. 대조군 LNP 입자가 제제화되는 경우에, 아포리포단백질 첨가 단계는 생략되었다. aNP 입자 경우에, 아포리포단백질 A1을 PBS에 용해하였고, 급속 T-접합-기반 혼합을 통해서 제제에 첨가되었다.

[0798]

최종 샘플은 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. siRNA-aNP를 0.2 µm 필터를 통해서 여과하였고, 100,000 MWCO 필터에서 1100 G로 원심분리 여과를 통해 농축하였다. 샘플을 1.5 mL로 농축하였고, 추가 사용까지 4°C에서 저장하였다. 세포에 대해 사용을 위해서, 샘플은 0.2 µm 여과 단계 이후에 멸균을 유지하

였다.

[0799] mRNA-로딩된 나노입자의 제조

[0800] 제제 과정의 도식은 도 5에서 확인된다. 본 발명의 aNP의 특정한 제제 조성물, aNP 대조군 입자 및 LNP 대조군 입자는 표 S8에서 확인할 수 있다.

[0801] mRNA-로딩된 aNP는 RNase 무함유 배양 후드에서 급속 T-접합 혼합을 통해 제제화되었다. 지질 분자 (aNP 경우 인지질, 콜레스테롤, 트리글리세리드 및 이온화가능한 물질; LNP 경우 인지질, 콜레스테롤, 이온화가능한 물질 및 PEG-지질)를 에탄올에 용해시켰고, 100 µg mCherry mRNA (TriLink, CleanCap, 5moU)를 함유하는 소듐 아세테이트 완충액 (25 mM, pH 4)과 급속 혼합하였다. 유기층 및 수성층을 혼합하였고 12-14 kDa MWCO 투석막 (Spectra/Por™)에 직접 수집하였다. 나노입자 제제는 1x PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na2HPO4 및 1.8 mM KH2PO4, pH 7.4)에 대해서 밤새 4℃에서 투석하였고, 150 rpm에서 교반하였다. PBS는 대략 4시간 후에 신선하게 보충되었다. 다음 날에, 제제 샘플을 투석 백으로부터 수집하고 부피를 결정하였다. 대조군 LNP 입자를 제제화하는 경우에, 아포리포단백질 첨가 단계는 생략되었다. aNP 입자 경우에, 아포리포단백질 A1을 PBS에 용해시켰고, 급속 T-접합 혼합을 통해서 제제에 첨가하였다.

[0802] 최종 샘플을 실온에서 15분 동안 인큐베이션하였다. mRNA-aNP를 0.2 µm 필터를 통해 여과하였고, 100,000 MWCO 필터에서 1100 G로 원심분리 여과를 통해 농축하였다. 샘플을 0.5 mL로 농축하였고, 추가 사용까지 4℃에서 저장하였다. 세포에서 사용을 위해, 샘플은 0.2 µm 여과 단계 이후에 멸균을 유지하였다.

[0803] 실시예 5 - 나노입자의 특징규명

[0804] siRNA 캡슐화 효율의 결정

[0805] Quant-iT RiboGreen 어세이 (Thermo Fisher)를 사용하여 제제화된 입자의 내부에 로딩된 siRNA의 양을 정량하였다. 어세이는 검은색 96-웰 플레이트를 사용해 수행되었다. 133.3 µg/mL의 이론적 siRNA 농도를 갖는 제제 샘플을 검은색 96-웰 플레이트에서, 100 µl의 총 부피까지, 200배로 TE 완충액 (DEPC-처리수 중 10 mM Tris-HCl, 1 mM, EDTA, pH 7.5), 및 2% Triton™ X-100을 함유하는 TE 완충액에 희석하였다. Triton 제제는 지질-기반 나노입자를 파괴하게 되므로, 모든 siRNA (체류와 미체류)는 Quant-iT RiboGreen 시약에 접근가능하게 된다. 기지 농도 (28.6 µg/mL)의 siRNA의 대조군을 96-웰 플레이트에서 100 µl의 총 부피까지 TE 완충액 및 2% Triton을 함유하는 TE 완충액에 53.3배로 희석하였다. 다음으로, RiboGreen 시약은 TE 완충액 및 Triton을 함유하는 TE 완충액으로 200배 희석되었다. 100 µl의 이 희석물을 플레이트의 총 부피가 200 µl가 될 때까지 샘플 또는 대조군을 함유하는 각 웰에 첨가하였다. 이후에, 샘플의 형광은 Tecan Spark® 마이크로플레이트 판독기에서 480 nm의 여기 파장 및 520 nm의 방출 파장에서 측정되었다.

[0806] siRNA의 회수율은 다음의 식으로 결정되었다:

$$\frac{(\text{체류+미체류})_{\text{siRNA의 양}}}{(\text{제제에 사용된})_{\text{siRNA의 총량}}} \times 100\%$$

[0808] 그리고 siRNA의 포착은 다음의 식으로 정의된다:

$$(1 - \frac{\text{미체류}_{\text{siRNA의 양}}}{(\text{체류+미체류})_{\text{siRNA의 양}}}) \times 100\%$$

[0810] siRNA 체류율 = 회수율 x 포착율. 결과는 도 6 및 도 13에 보고된다.

[0811] mRNA 캡슐화 효율의 결정

[0812] 이것은 siRNA 캡슐화 효율의 결정에 기술된 바와 유사한 방식으로 수행되었다. 결과는 표 S9에 보고된다.

표 S9. 표시된 다가 물질로부터 제조되고 Ribogreen 어세이를 통해 결정된 aNP 중 mRNA의 회수율, 포착율, 및 체류율.

항목	실험	다가 물질	회수율 (%)	포착율 (%)	체류율 (%)
1	시험관	A2	27%	87%	23%
2	생체	A2	57%	88%	50%

[0813]

[0814] 인지질 및 콜레스테롤 회수의 결정

[0815] 제조된 나노입자에서 인지질 및 콜레스테롤의 회수는 효소적 비색 시험인, 인지질 FS 및 콜레스테롤 FS 어세이 (DiaSYS)를 수행하여 정량된다. 색상 시약을 함유하는 완충액 (190 μ l)을 투명한 96-웰 플레이트 중 10 μ l의 나노입자 샘플에 첨가하였고, 37°C에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 흡광도는 600 nm에서 Tecan Spark® 플레이트 판독기를 사용해 측정되었다. 결과는 표 S4에 보고된다.

표 S4. siRNA-aNP 중 콜레스테롤, 인지질, 및 apo-A1 회수. 숫자 n은 각 제제의 개별 반복 횟수에 해당된다 (**A1** n = 8은 **A1**이 8번 상이한 횟수로 제제화된 것을 의미하고, 회수값의 평균이 결정됨). 모든 입자는 초기 안정성을 보인다. *는 4°C의 냉장고에서 저장 2일 후 상분리를 표시한다.

항목	다가 물질	콜레스테롤 (회수율%)	인지질 (회수율%)	Apo A1 (회수율%)
1	A1	81% $\pm$ 12 (n = 8)	89% $\pm$ 13 (n = 10)	44% $\pm$ 17 (n = 8)
2	A2	87% $\pm$ 8 (n = 8)	96% $\pm$ 13 (n = 8)	61% $\pm$ 16 (n = 8)
3	A3	87% $\pm$ 6 (n = 2)	77% $\pm$ 2 (n = 2)	35% $\pm$ 13 (n = 2)
4	A6	—	93% $\pm$ 4 (n = 2)	—
5	A8	—	48% $\pm$ 6 (n=2)	34% (n=1)
6	A11	—	50% $\pm$ 11 (n=2)	27% (n=1)
7	A14 *	—	66% $\pm$ 24 (n = 2)	—
8	B2 *	—	116% $\pm$ 40 (n = 2)	—
9	D4	83% $\pm$ 6 (n = 2)	78% $\pm$ 1 (n = 2)	18% $\pm$ 8 (n = 2)
10	G2	99% $\pm$ 1 (n = 2)	90% $\pm$ 16 (n = 3)	37% $\pm$ 8 (n = 3)
11	G6	—	63% $\pm$ 3 (n=2)	26% (n=1)
12	G7	—	75% $\pm$ 4 (n=2)	31% (n=1)
13	G8	—	63% $\pm$ 5 (n=2)	26% (n=1)
14	G9	—	65% $\pm$ 6 (n=2)	33% (n=1)
15	H1 *	—	84% (n = 2)	—

[0816]

[0817] 아포리포단백질 A1 (apo A1) 회수의 결정

[0818] 나노입자 제제 중 아포리포단백질 A1의 양은 아포리포단백질 A1 FS 어세이 (DiaSYS)®를 사용해 결정되었다.

이것은 항-apo A1 항체 및 샘플에 존재하는 apo A1 간 상호작용을 기반으로 하는 면역탁도 시험이다. TRIS 완충액 (200 μ l)을 투명한 96-웰 플레이트 중 10 μ l의 나노입자 샘플에 첨가하였다. 플레이트를 37°C에서 5분 동안 인큐베이션한 이후에, 흡광도는 Tecan Spark® 마이크로플레이트 판독기를 사용하여 580 nm의

파장에서 측정되었다. 아포리포단백질 A1 항체를 함유하는 TRIS (40 μ l)를 동일한 96-웰 플레이트에 첨가하였고, 동일한 설정에서 흡광도를 측정하기 전에 용액을 37°C에서 5분 동안 인큐베이션하였다. 결과는 표 S4에 보고된다.

[0819] 동적 광산란 (DLS)

[0820] 제제화된 입자의 유체역학적 직경은 Malvern Zetasizer NanoSampler (Malvern Instruments, Worcestershire, UK)와 조합된 Zetasizer Nano ZS를 사용하여 동적 광산란 (DLS)를 통해 제공되는 수-가중 평균 직경을 통해 결정되었다. 크기 분산도는 다분산성 지수 (PDI)로서 측정되었다. DLS 측정을 위해서, 100 μ l의 제제화된 나노입자를 700 μ l의 PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ 및 1.8 mM KH₂PO₄)에 희석하였고, 분석 전에 실온에서 평형화되었다. 각 샘플은 감쇠기 및 측정 위치의 고정없이, 633 nm 파장에서, 각 10초씩 10회 실행으로, 5회 측정되었다. 결과는 표 S5, 표 S7 및 표 S10에 보고된다.

표 S5. siRNA-aNP 의 DLS (동적 광산란) 분석. 아포리포단백질 나노입자 (aNP)의 유체역학적 직경 (수평균) 및 PDI (다분산성 지수)가 제공된다. *는 4°C의 냉장고에서 저장 2 일 후 상분리를 표시하고, ** 는 밤새 투석 후 상분리를 표시한다. 동일 제제의 복제물 수 (개별 반복)를 고려한 표준 편차를 측정하였다.

항목	다가 물질	DLS 유체역학적 직경 (nm)	DLS PDI (-)
1	A1	93 $\pm$ 15 (n = 10)	0.10 $\pm$ 0.03 (n = 10)
2	A2	57 $\pm$ 6 (n = 10)	0.16 $\pm$ 0.03 (n = 10)
3	A3	55 $\pm$ 0.7 (n = 2)	0.14 $\pm$ 0.01 (n = 2)
4	A6	48 $\pm$ 1 (n = 3)	0.14 $\pm$ 0.02 (n = 3)
5	A7 **	115 (n = 1)	0.18 (n = 1)
6	A8	84 (n = 1)	0.15 (n = 1)
7	A11	136 $\pm$ 45 (n = 2)	0.14 $\pm$ 0.04 (n = 2)
8	A14 *	100 (n = 3)	0.10 (n = 3)
9	B2 *	67 (n = 1)	0.09 (n = 1)
10	D4	56 (n = 2)	0.16 (n = 2)
11	F1 **	32 (n = 1)	1 (n = 1)
12	G2	55 $\pm$ 4 (n = 2)	0.10 $\pm$ 0.01 (n = 2)
13	G6	83 $\pm$ 4 (n = 2)	0.13 $\pm$ 0.08 (n = 2)
14	G7	54 $\pm$ 1 (n = 2)	0.2 $\pm$ 0.06 (n = 2)
15	G8	84 $\pm$ 45 (n = 2)	0.2 $\pm$ 0.05 (n = 2)
16	G9	73 $\pm$ 10 (n = 2)	0.18 $\pm$ 0.08 (n = 2)
17	H1 *	66 $\pm$ 7 (n = 3)	0.45 $\pm$ 0.43 (n = 3)

표 S10. mRNA-aNP 의 DLS (동적 광산란). 나노입자의 유체역학적 직경 (수평균) 및 PDI (다분산성 지수)가 제공된다.

항목	실험	다가 물질	DLS 유체역학적 직경 (nm)	DLS PDI (-)
1	시험관	A1	88	0.18
2	시험관	A2	53	0.27
3	생체	A2	63	0.08

[0822] 저온 투과 전자 현미경 (저온-TEM)

[0824] 나노입자의 크기 및 형상은 또한 저온-투과 전자 현미경 (저온-TEM)으로 평가되었다. 200-메쉬 레이스 탄소 지지된 구리 그리드 (Electron Microscopy Sciences)의 표면은 탄소 코터 (Cressington 208)를 사용해 40초 동안 플라즈마 충전되었다. 이후에, 3 μ l의 나노입자 샘플 (~1 mg 단백질/mL)을 그리드에 피펫팅하였고, 액상 에탄 중에 플러지 유리화를 통해 얇은 필름으로 유리화하였다. 이러한 단계는 자동화 로봇 (FEI

Vitrobot Mark IV)을 사용해 수행되었다. 저온-TEM 이미징화는 전계 방출 총 (FEG), 포스트-컬럼 Gatan 이미징 필터 (모델002) 및 포스트-GIF 2k ×2k Gatan CCD 카메라 (모델 794)가 장착된 저온-투과 전자 현미경 TITAN (Thermo Fisher)에서 획득하였다. 이미징화는 24,000X 배율 (11.8 e-/Å²·s의 선량률), 및 1초 획득 시간에 제로-손실 에너지 필터링과 명시적 TEM 방식으로 300 kV 가속 전압에서 수행되었다. 사진 및 결과는 표 S6, 도 7, 도 8, 도 9 (A), 도 15에 보고된다.

표 S6. 저온-TEM 으로 기록된 siRNA-aNP 의 나노입자 직경. *는 4°C 의 냉장고에서 저장 2 일 후 상분리를 표시한다. 개별 입자의 수는 표준 편차를 측정하는데 고려되었다.

항목	다가 물질	저온-TEM 직경 (nm)	저온-TEM PDI (-)
1	A1	98 ± 24 (n = 20)	0.06 (n = 20)
2	A2	55 ± 11 (n = 20)	0.04 (n = 20)
3	A6	53 ± 11 (n = 20)	0.02 (n = 20)
4	A14 *	174 ± 33 (n = 8)	0.04 (n = 8)

면역-금 염색과 조합된 주사 전자 현미경

사진 및 결과는 도 9 (B)에 보고된다.

아포리포단백질 나노입자 (aNP)에 대한 세포독성 측정

본 발명의 다수 아포리포단백질 나노입자 (aNP)에 대해서 MTS 어세이가 수행되었다. 이들 어세이는 당분야에 공지된 프로토콜에 따라서 실행되었다. 결과는 도 10에 보고된다.

시험관내 침묵화 (용량-반응 곡선)

시험관내 침묵화 실험은 pmirGLO 플라스미드 (레닐라 루시페라제 및 반딧불이 루시페라제 발현 유전자 서열 함유)로 형질감염된 RAW264.7 세포주에서 수행되었다. 세포는 T75 세포 배양 플라스크에서 80% 합류점까지 배양되었다. 세포를 탈착시키고, 계수하고, 10000 세포/웰로 96-웰 플레이트에 파종하였다. 밤새 휴지 후에, 세포는 항 반딧불이 루시페라제 siRNA를 농도 범위로 함유하는 나노입자로 형질감염되었다. 48시간 인큐베이션 후에, 오래된 배지를 1x PBS로 세척하였다. 용해물 포스포이트 완충액 (Dual-Luciferase® Reporter Assay System, Promega)을 첨가하여 세포를 용해시켰다. 10 µl의 세포 용해물을 흰색 96-웰 편평-바닥 플레이트로 옮겼다. 후속하여, 40 µl의 ONE-Glo™ 시약 (Dual-Luciferase® Reporter Assay System, Promega)을 첨가하였고, 발광도는 Tecan Spark® 마이크로플레이트 판독기를 사용하여 500 ms의 통합 시간, 및 1000 ms의 정착 시간에 측정하였다. 발광 피크가 550 - 570 nm의 범위여야 하므로, 파장을 확인하기 위해 발광 스캔을 수행하였다. 다음으로, 40 µl의 중지 및 Glo 시약 (Dual-Luciferase® Reporter Assay System, Promega)을 각 웰에 첨가하였고, 발광도는 다시 동일한 방식으로 측정되었다. 상대적인 잔존 반딧불이 루시페라제 발광도를 계산하였다. 먼저, 반딧불이 발광도는 레닐라 발광도로 정규화되었다. 후속하여, 정규화된 샘플 신호는 미처리 샘플 신호의 백분율로서 표시되었다. 이를 통해 다음의 화학식이 산출된다:

$$\frac{\left(\frac{\text{반딧불이발광도}}{\text{레닐라발광도}}\right)\text{샘플}}{\left(\frac{\text{반딧불이발광도}}{\text{레닐라발광도}}\right)\text{미처리}} \times 100\%$$

결과는 도 11에 보고된다.

시험관내 침묵화 (스크램블된 siRNA 대 항 반딧불이 siRNA)

시험관내 침묵화 실험은 pmirGLO 플라스미드 (레닐라 루시페라제 및 반딧불이 루시페라제 발현 유전자 서열을

함유함)가 형질감염된 RAW264.7 세포주에서 수행되었다. 세포는 T75 세포 배양 플라스크에서 80% 합류점까지 배양되었다. 세포를 탈착하고, 계수하고, 10000 세포/웰로 96-웰 플레이트에 파종되었다. 밤새 휴지 후에, 세포는 스크램블된 비특이적 siRNA 또는 항 반딧불이 루시페라제 siRNA를 100 nM로 함유하는 나노입자가 형질감염되었다. 48시간 인큐베이션 후에, 오래된 배지를 1x PBS로 세척하였다. 용해물 포스포에이트 완충액 (Dual-Luciferase® Reporter Assay System, Promega)을 첨가하여 세포를 용해하였다. 10 µl의 세포 용해물은 흰색 96-웰 편평-바닥 플레이트로 옮겼다. 후속하여, 40 µl의 ONE-Glo™ 시약 (Dual-Luciferase® Reporter Assay System, Promega)을 첨가하였고, 발광도는 Tecan Spark® 마이크로플레이트 판독기를 사용해 500 ms의 통합 시간, 및 1000 ms의 정착 시간에 측정하였다. 발광 피크가 550 - 570 nm 범위여야 하므로, 발광 스캔을 수행하였다. 다음으로, 40 µl의 중지 및 Glo 시약 (Dual-Luciferase® Reporter Assay System, Promega)을 각 웰에 첨가하였고 발광도를 다시 동일한 방식으로 측정하였다. 상대적 잔존 반딧불이 루시페라제 발광도를 계산하였다. 먼저, 모든 샘플에 대해서 반딧불이 발광도를 레닐라 발광도로 정규화하였다. 후속하여, 정규화된 샘플 신호는 미처리된 샘플 신호의 백분율로 표시되었다. 이를 통해 다음의 화학식이 산출된다:

$$\frac{\left(\frac{\text{반딧불이발광도}}{\text{레닐라발광도}}\right)\text{샘플}}{\left(\frac{\text{반딧불이발광도}}{\text{레닐라발광도}}\right)\text{미처리}} \times 100\%$$

[0836]

결과는 도 12에 보고된다.

[0837]

시험관내 반딧불이 루시페라제 발현

[0838]

시험관내에서 반딧불이 루시페라제 발현의 검출을 위해서, ONE-Glo™ Luciferase Assay System (Promega)을 사용하였다. RAW264.7 세포는 웰 당 35k 세포의 밀도로 96-웰 플레이트에 100 µL를 파종하였다. 대략 6 시간 후에, RAW264.7 세포는 웰 당 100 ng mRNA의 용량으로 aNP 또는 LNP를 사용하여 10 µL 반딧불이 루시페라제 mRNA (RIBOPRO)로 형질감염되었다. 형질감염 후 24시간에, 세포 생존능은 CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation assay (MTS) (Promega) 어세이를 통해 결정되었다. 10 µL 시약을 세포에 첨가하였고, 흡광도는 1시간의 인큐베이션 (37°C, 5% CO2) 후에 495 nm에서 측정되었다. 후속하여, 세포는 1x PBS로 3회 세척하였고, 40 µL의 ONE-Glo™ Luciferase Assay 시약을 각 웰에 첨가하였다. 세포의 완전한 용해 후에, 세포 용해물을 백색 편평 바닥 96-웰 플레이트로 옮겼다. 발광도는 Tecan Spark 플레이트 판독기를 사용해 측정하였다. 루시페라제 발현은 세포 생존능에 대해 정규화하고 배경 신호를 차감한 후에 루시페라제 강도로서 표시되었다. 결과는 도 14에 보고된다.

[0839]

[0840]

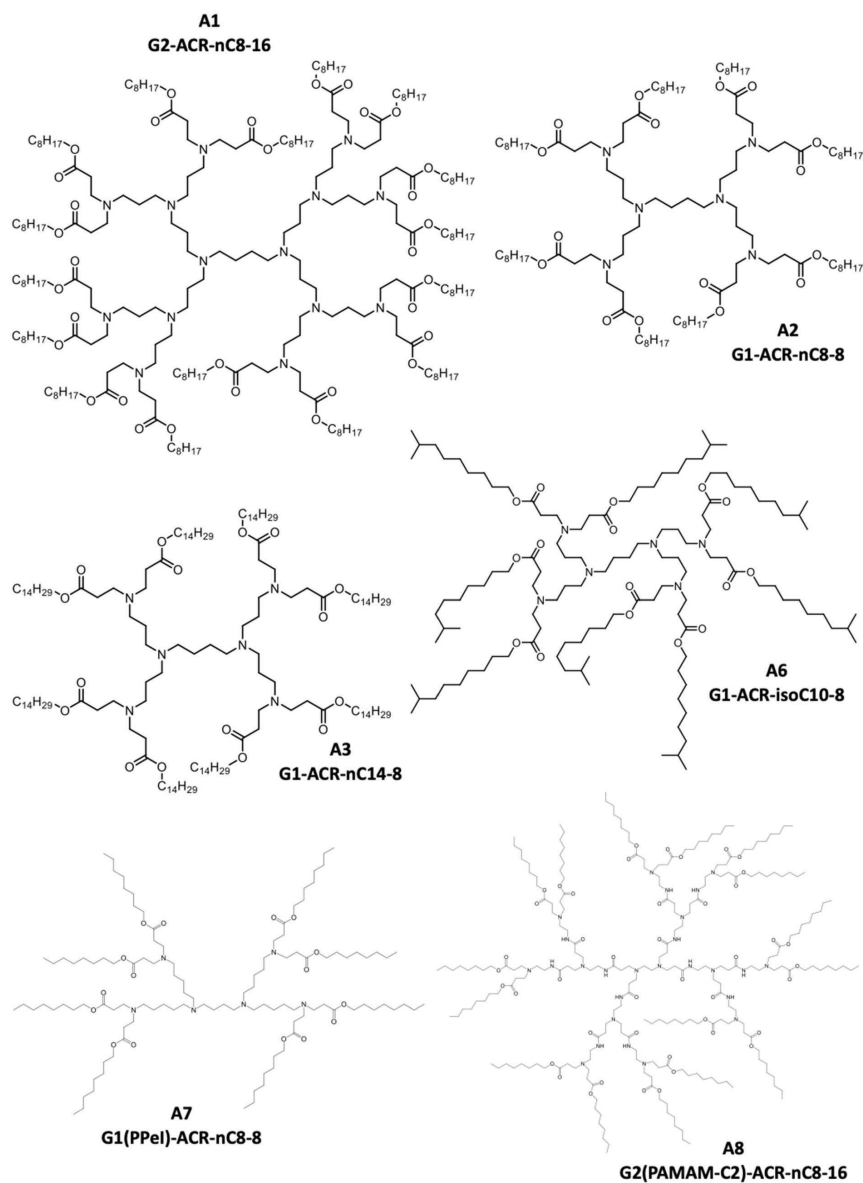
생체내 반딧불이 루시페라제 발현

[0841]

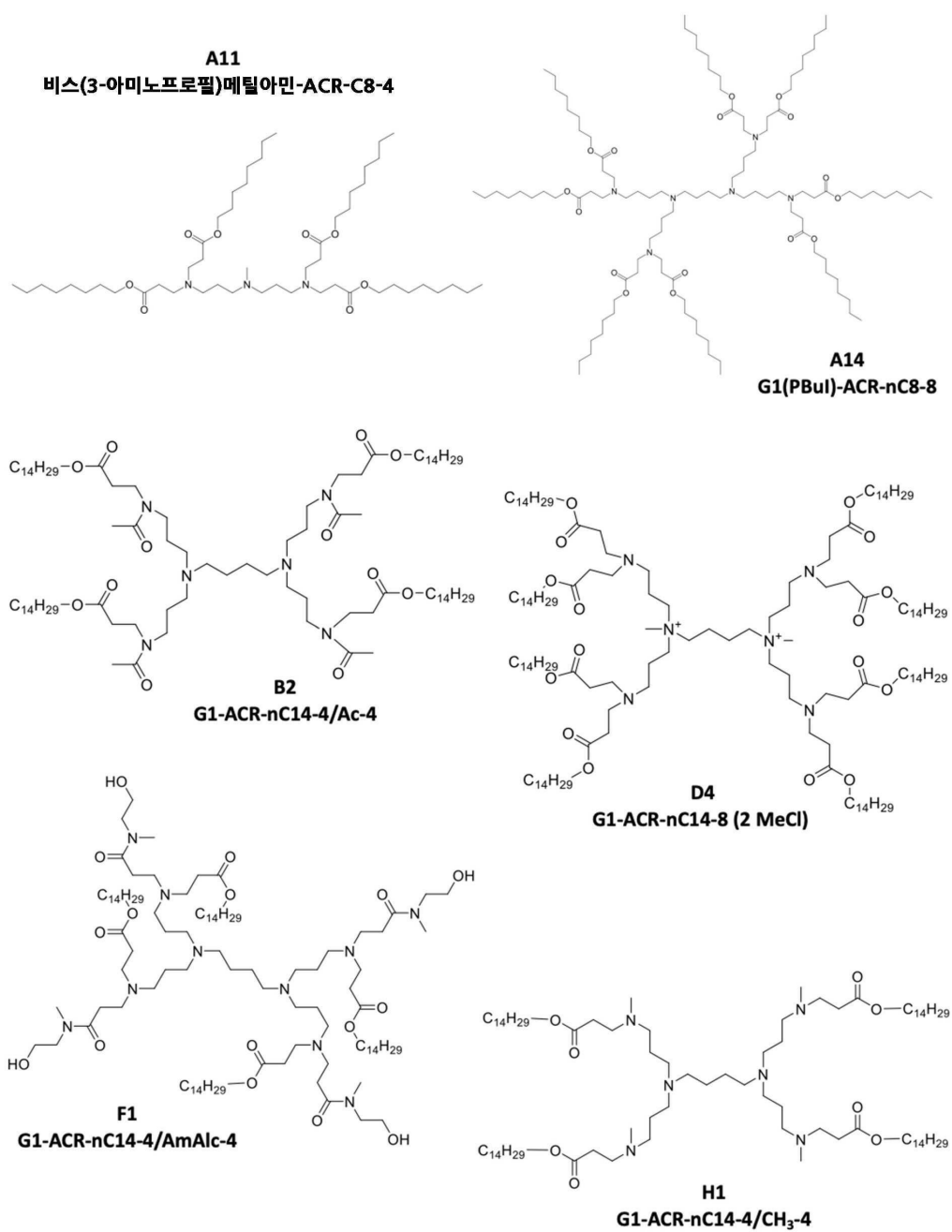
생체내에서 반딧불이 루시페라제 발현의 검출을 위해서, C57BL/6 마우스 (Jackson laboratories Germany)는 다 가 분자 A2 mRNA 결합제를 함유하는 aNP에 로딩되는, 0.5 mg/kg 반딧불이 루시페라제 mRNA (TriLink, CleanCap, 5moU)가 주사되었다. 16시간 후에, 동물들을 희생시켰고, 간, 비장 및 대퇴골을 수집하였다. 장기를 처리하여서 단일 세포 현탁액을 산출하였다. 간의 1/10을 작은 조각으로 자르고, 15분 동안, 37°C, 50 RPM에서 5 mL 리버라제 용액과 인큐베이션되었다. 다음으로, 분해된 간을 70 µm 스트레이너에 넣고, 50 mL 팔콘 튜브에 수집하였다. 1X PBS로 세척 후에, 세포를 15 mL 1X PBS에 재현탁하였다. 비장의 1/10을 작은 조각으로 자르고 70 µm 스트레이너에 넣고, 50 mL 팔콘 튜브에 수집하였다. 1X PBS로 세척 후에, 1 mL의 용해 완충액 (BD Pharm Lyse™, cat# 555899, diH2O에 10배 희석됨)을 첨가하였고, 4분 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 세포를 1X PBS로 세척하였고, 15 mL 1X PBS에 재현탁하였다. 대퇴부의 양쪽 말단을 차단하였다. 골수 세포는 뼈의 내부로부터 10 mL 1X PBS를 사용하여 70 µm 스트레이너를 통해서 플러싱하고, 50 mL 팔콘 튜브에 수집하였다. 세포를 원심분리하였고, 1 mL 용해 완충액 (BD Pharm Lyse™, cat# 555899, diH2O에 10배 희석됨)을 펠렛에 첨가하였고 1분 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 세포를 1X PBS로 세척하였고, 5 mL 1X PBS에 재현탁하였다. 모든 세포 현탁액을 계수하였고, 500000 세포를 V-바닥 플레이트에 파종하였다. 플레이트를 원심분리하고, 상청액을 제거하였다. 40 µL의 ONE-Glo 시약 (Promega)을 첨가하였고 5분 동안 인큐베이션하였다 (432 RPM). 40 µL를 백색 96-웰 플레이트로 옮겼고, 발광도는 다음의 설정을 사용해 측정되었다: 정착 시간: 1000 ms; 통합 시간: 500 ms; 개방 필터. 결과는 도 16에 보고된다. 시험관내 시험관내

도면

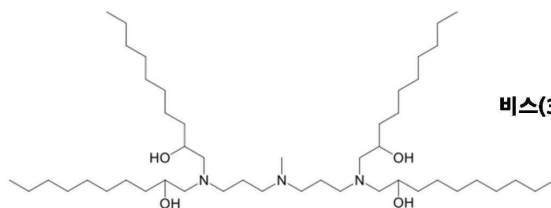
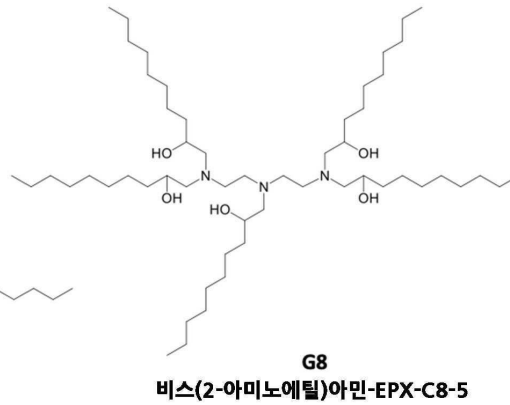
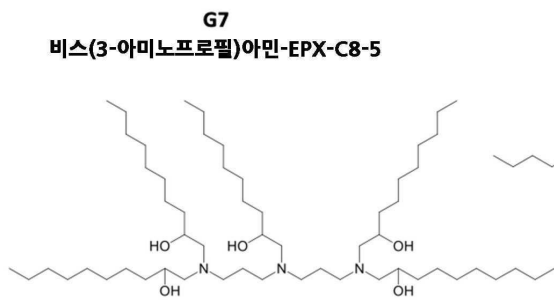
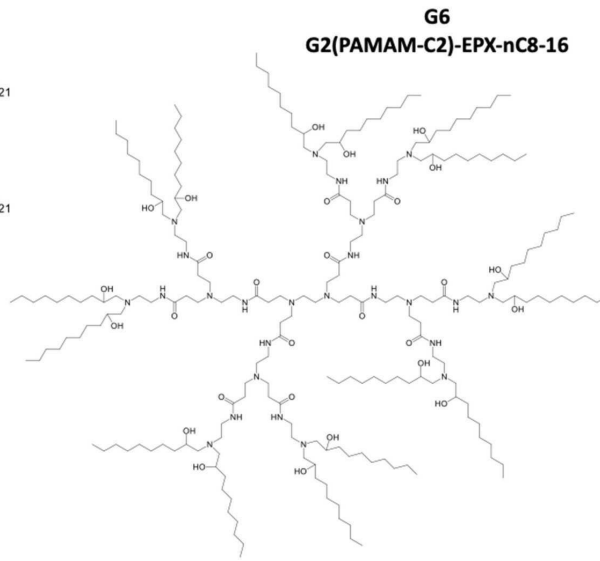
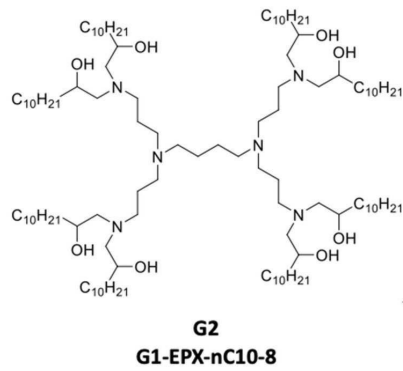
도면1



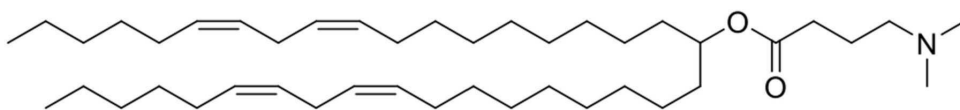
도면2



도면3



도면4

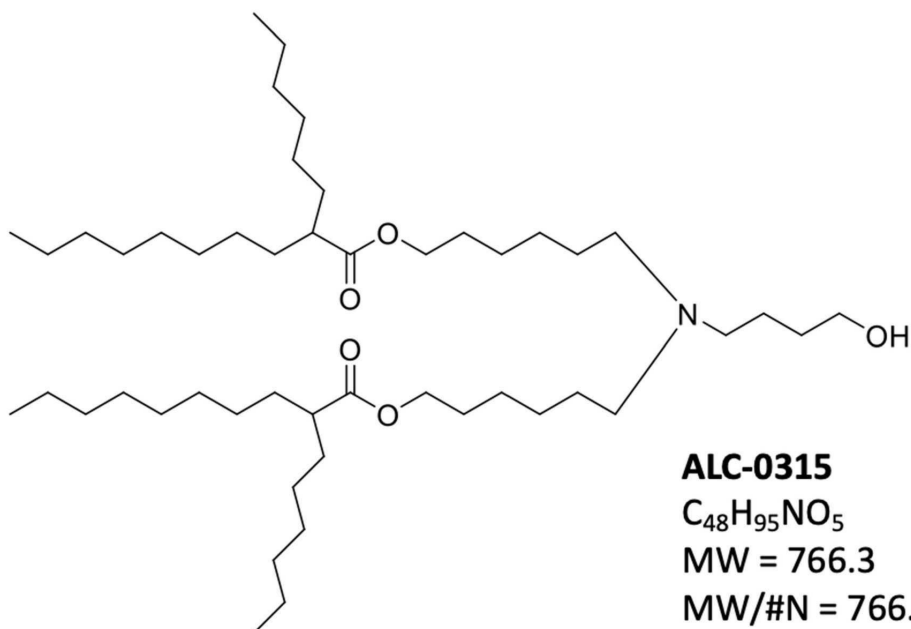


DLin-MC3-DMA (또는 MC3)

$C_{43}H_{79}NO_2$

MW = 642.1

MW/#N = 642.1



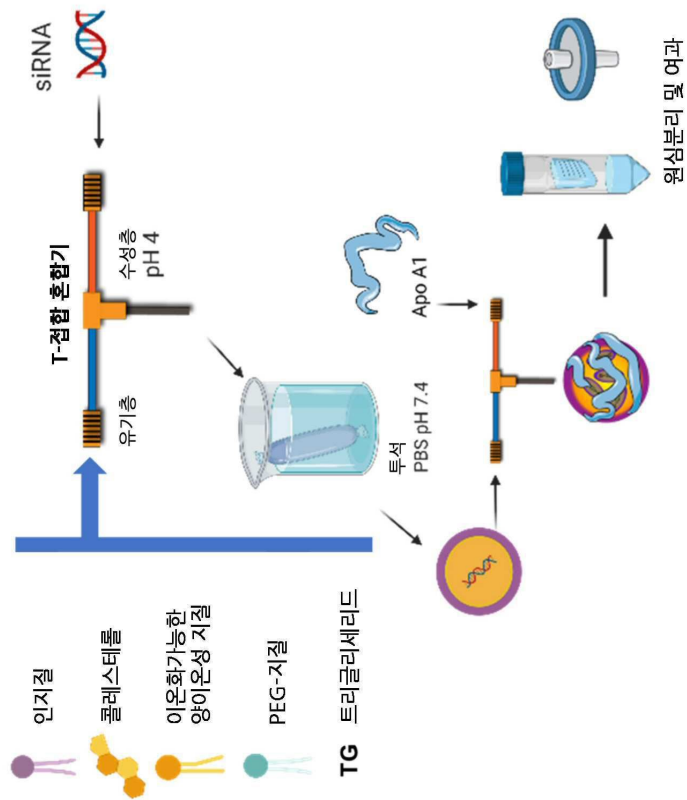
ALC-0315

$C_{48}H_{95}NO_5$

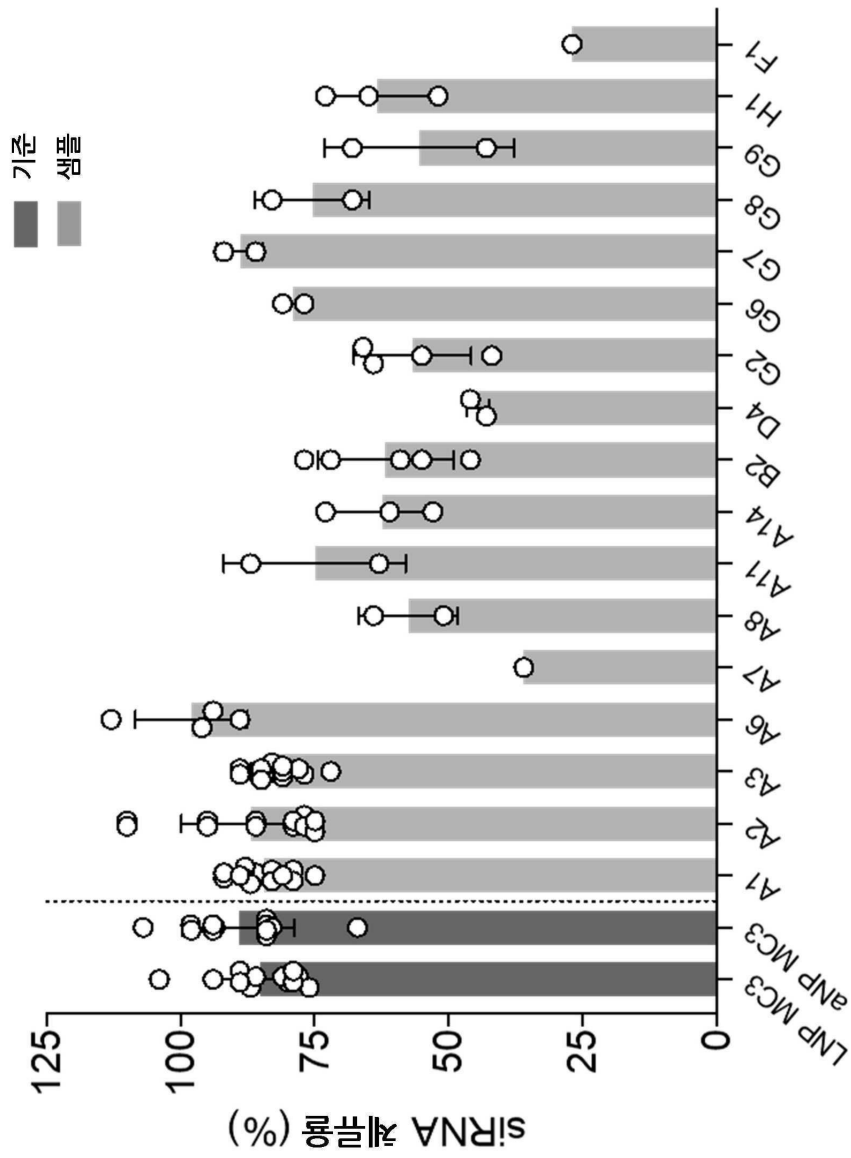
MW = 766.3

MW/#N = 766.3

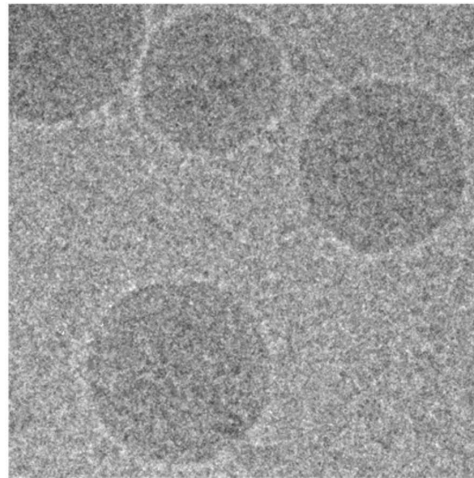
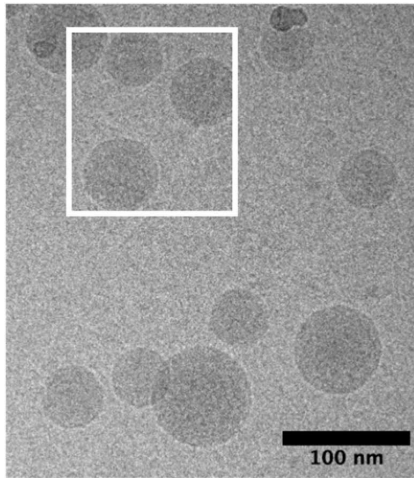
도면5



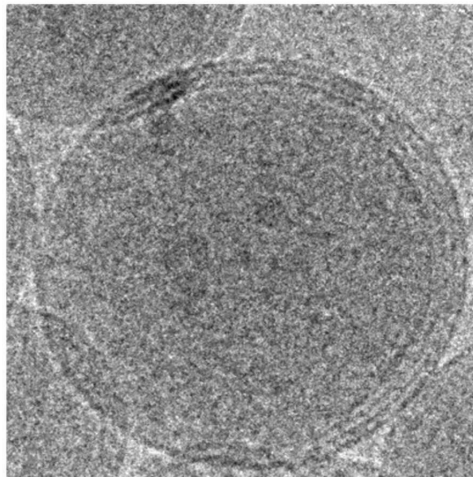
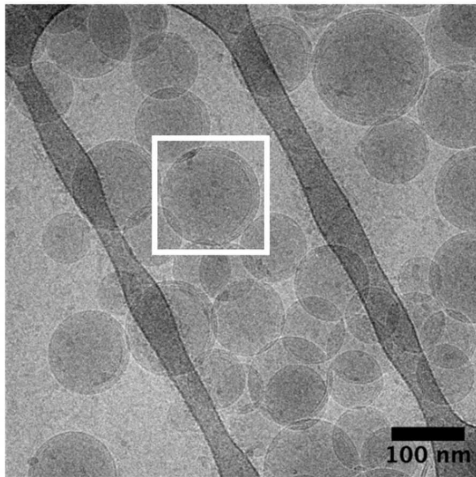
도면6



도면7

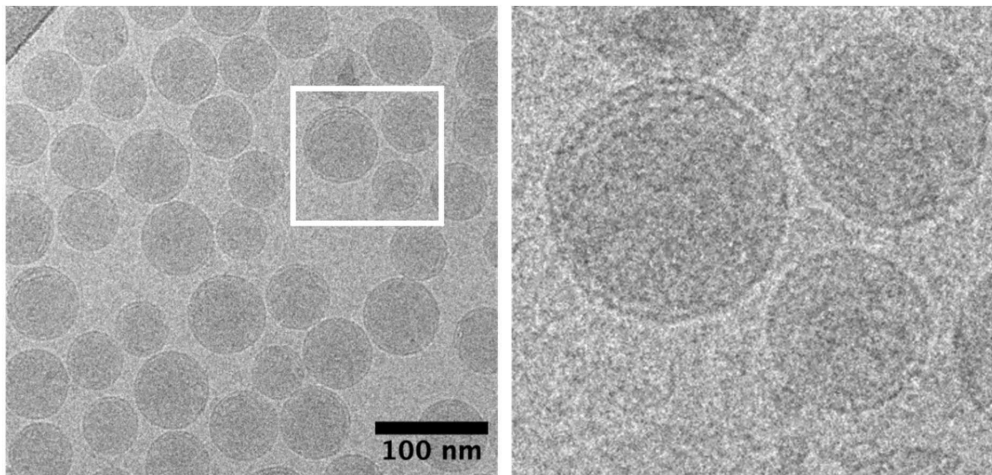


A

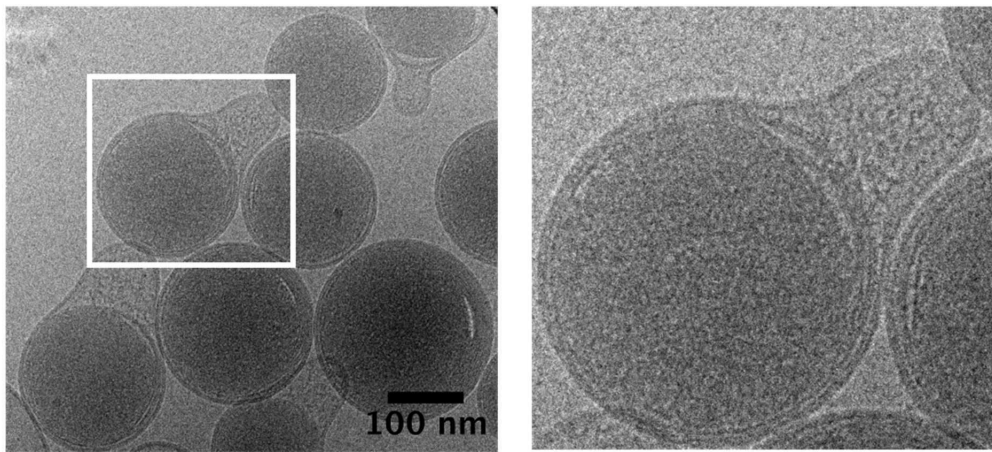


B

도면8

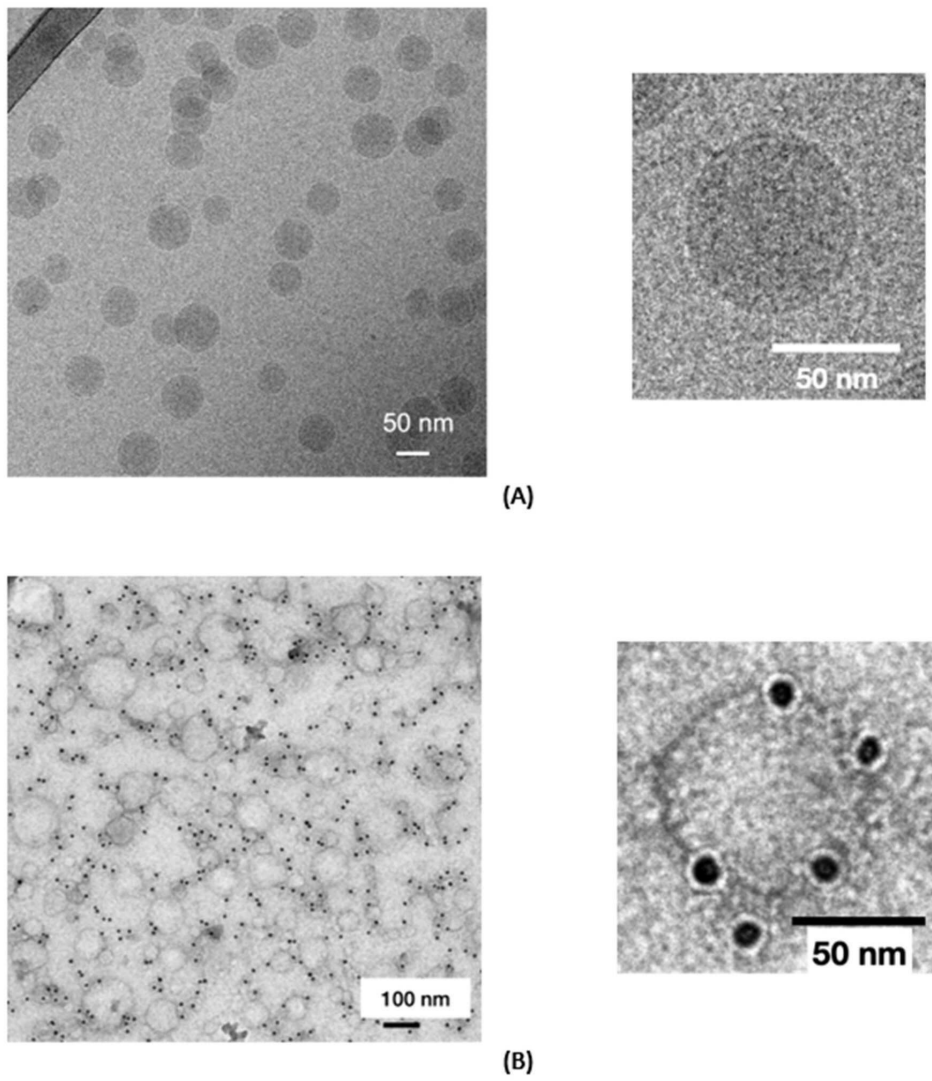


C

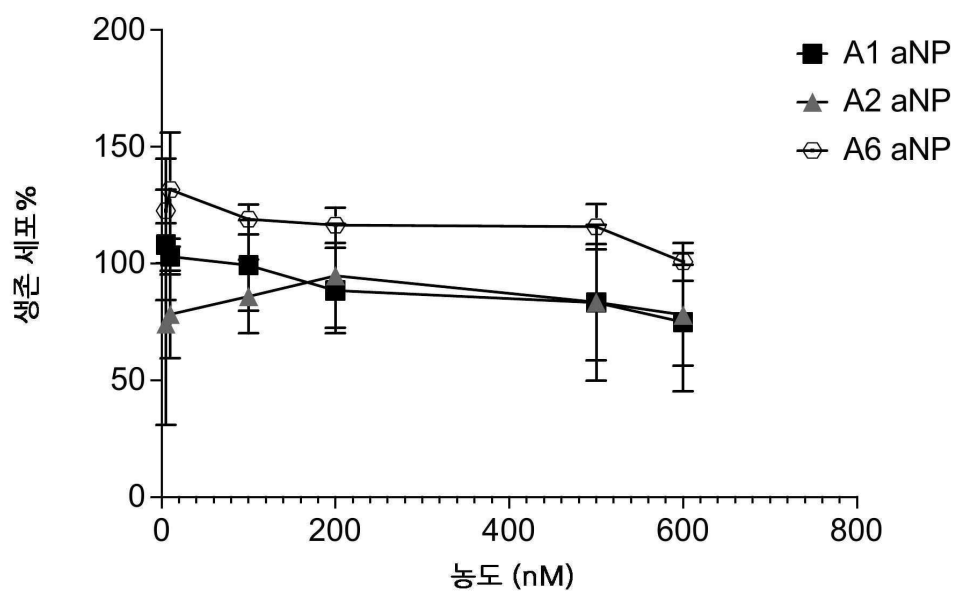


D

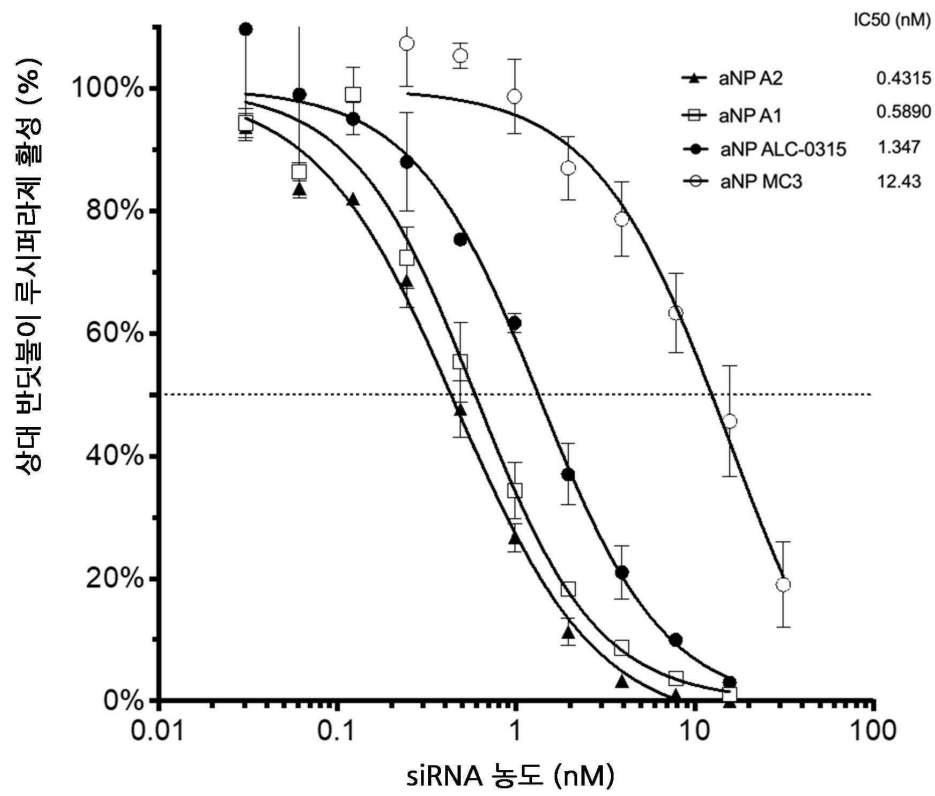
도면9



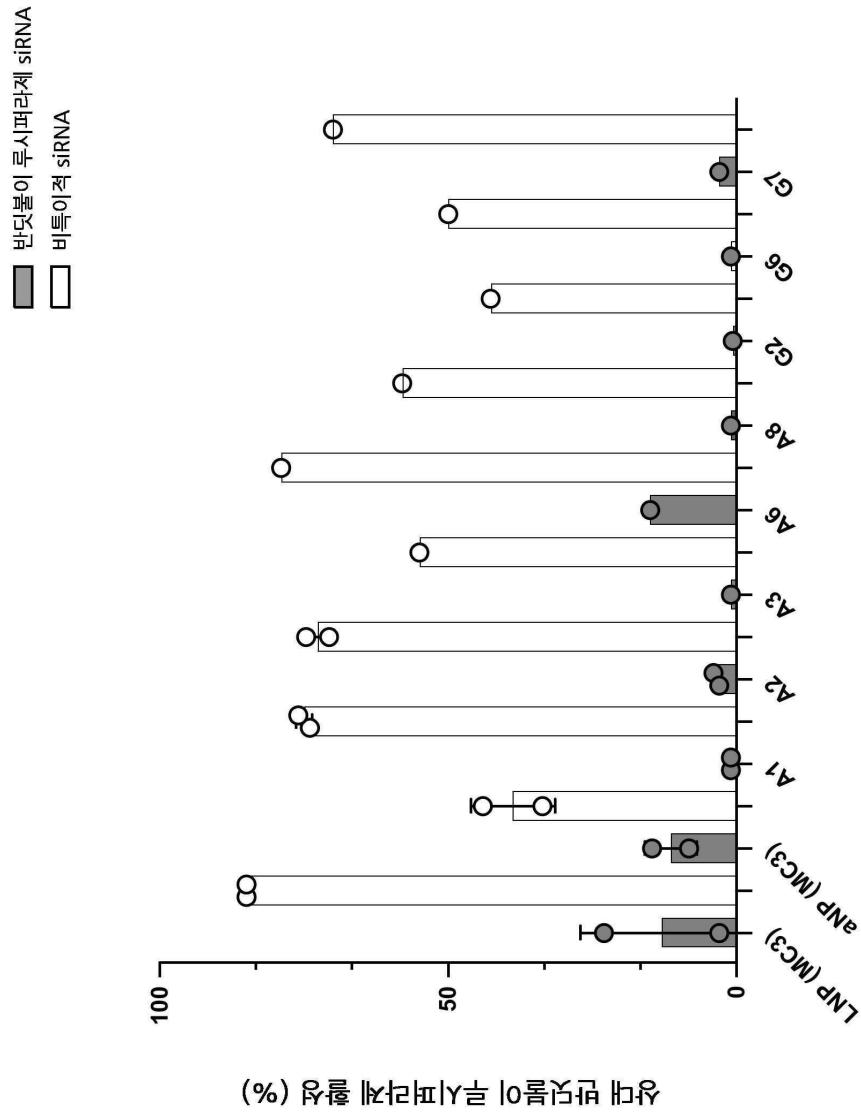
도면10



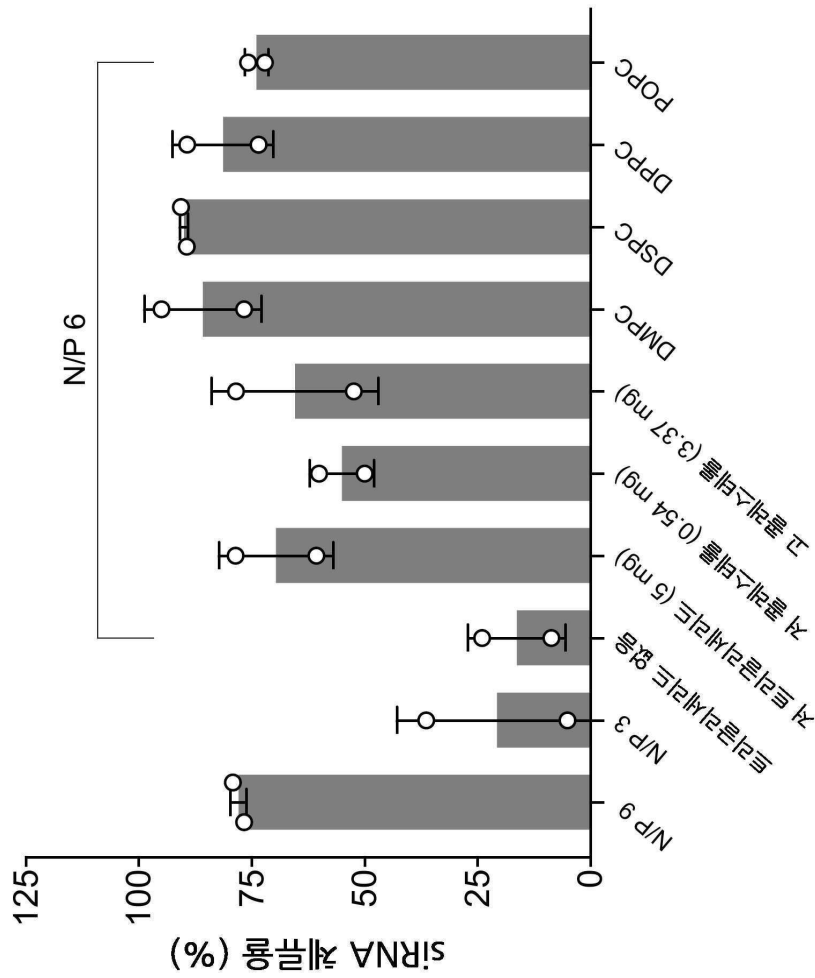
도면11



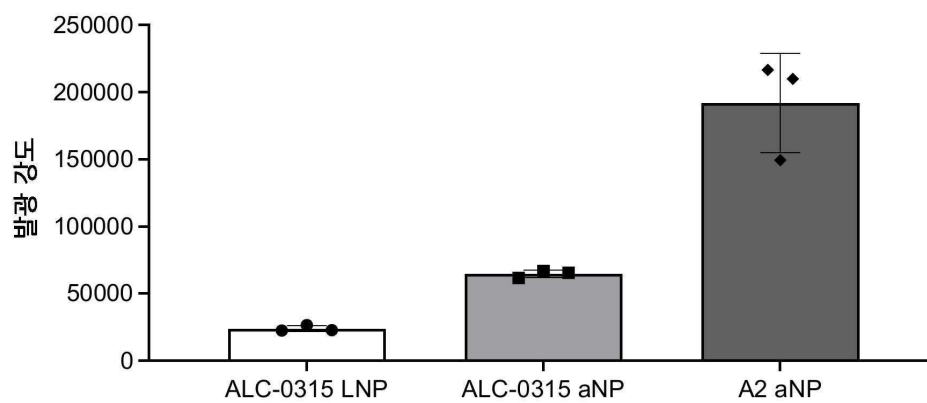
도면12



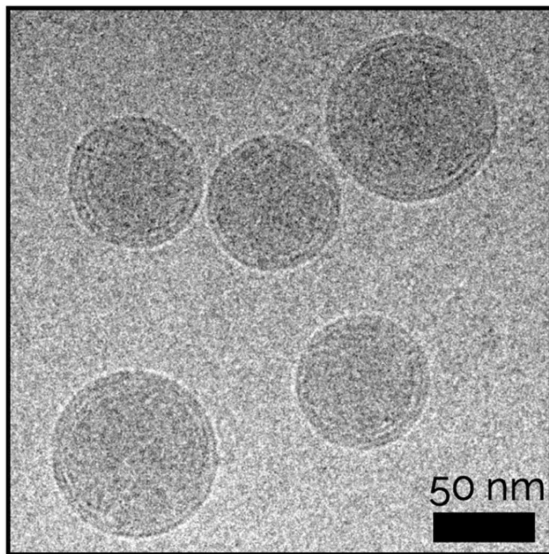
도면13



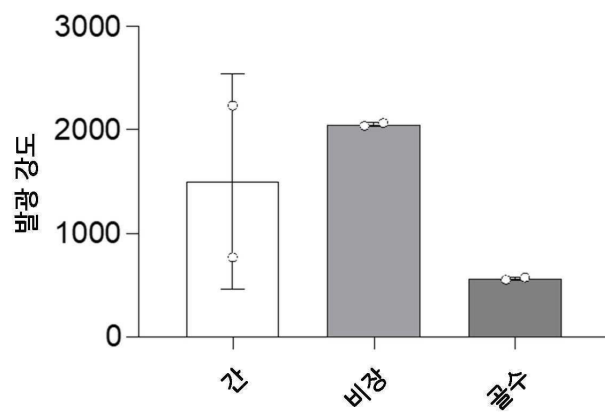
도면14



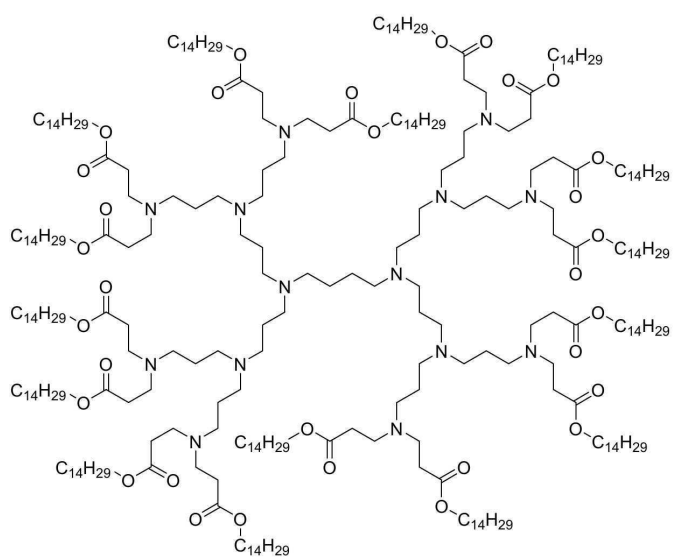
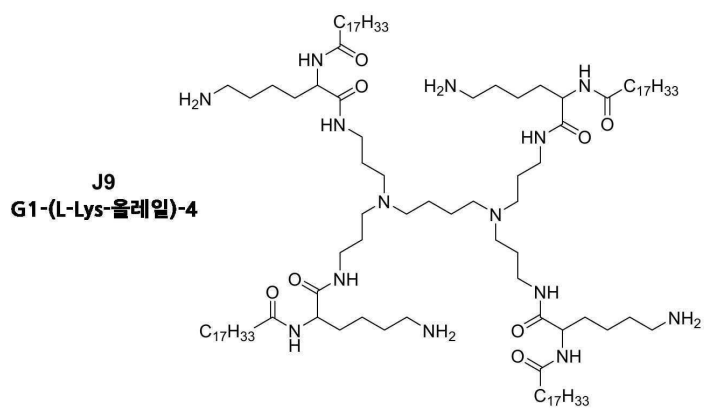
도면15



도면16



도면17



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.