



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0117084  
(43) 공개일자 2024년07월31일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07C 237/10 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)  
C07C 275/14 (2006.01) C07C 323/41 (2006.01)  
C07C 327/06 (2006.01) C07D 295/13 (2006.01)  
C12N 15/11 (2006.01) C12N 15/88 (2017.01)  
C12N 9/22 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
C07C 237/10 (2013.01)  
A61K 48/0041 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2024-7017124
- (22) 출원일자(국제) 2022년11월29일  
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2024년05월22일
- (86) 국제출원번호 PCT/CA2022/051745
- (87) 국제공개번호 WO 2023/092242  
국제공개일자 2023년06월01일
- (30) 우선권주장  
63/283,588 2021년11월29일 미국(US)  
63/398,936 2022년08월18일 미국(US)

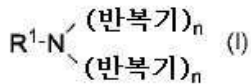
- (71) 출원인  
더 거버닝 카운실 오브 더 유니버시티 오브 토론토  
캐나다, 온타리오 엠5지 1엘5, 토론토, 스위트 413, 칼리지 스트리트 100, 뱅킹 인스티튜트
- (72) 발명자  
칸 오마르 피잘  
캐나다 온타리오주 엠1더블유 2티2 토론토 20에이 리필드 드라이브  
틸스트라 그레이슨  
캐나다 온타리오주 엠6쥐 4비4 토론토 35 에이코 어스 애비뉴  
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
특허법인아주

전체 청구항 수 : 총 78 항

(54) 발명의 명칭 멀티-모티프 텐드론 및 이의 초분자 구조체 그리고 이들의 용도

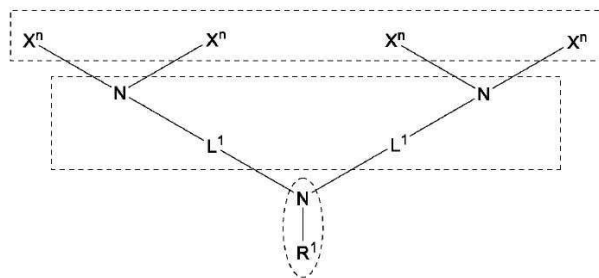
(57) 요약

본 출원은 화학식 I의 텐드론, 상기 텐드론을 포함하는 조성물 및 특히, 작용제, 예컨대, 핵산 약물을 세포 및 대상체에게 전달하기 위한, 이의 용도를 포함한다:



(I)에서 각각의 반복기는 동일하거나 상이하다.

대표도



(52) CPC특허분류

*A61K 48/0075* (2013.01)  
*C07C 275/14* (2013.01)  
*C07C 323/41* (2013.01)  
*C07C 327/06* (2013.01)  
*C07D 295/13* (2013.01)  
*C12N 15/111* (2013.01)  
*C12N 15/113* (2013.01)  
*C12N 15/88* (2013.01)  
*C12N 9/22* (2013.01)

(72) 발명자

**매닝 알라나 마가렛**

캐나다 온타리오주 엘0취 1더블유0 토튼햄  
1497-10번 사이드로드

**라우 엔 핑 앤슨**

캐나다 온타리오주 엠4와이 3에이6 토론토 315-555  
영 스트리트

**쿠튀르-세네칼 줄리앙**

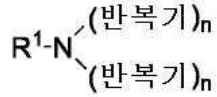
캐나다 온타리오주 엠5티 1지4 토론토 227 베벌리  
스트리트

명세서

청구범위

청구항 1

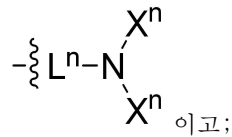
하기 화학식 I의 덴드론(dendron) 또는 이의 염 및/또는 용매화물:



(I)

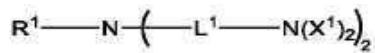
상기 식에서,

각각의 반복기는 동일하거나 상이하고,



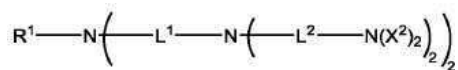
n은 1, 2, 3, 4 또는 5이고, 각각의  $L^n$  및 각각의  $X^n$ 은 동일하거나 상이하고, n에 대한 값에 따라서 하기에 정의된 바와 같고;

n이 1인 경우, 상기 덴드론은 1세대 덴드론이고 상기 화학식 I의 화합물은 하기 구조를 갖고:



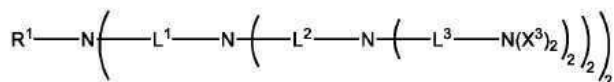
각각의  $X^1$ 은 동일하거나 상이하고, H 또는 말단기이되, 단, 적어도 하나의  $X^1$ 은 말단기이고, 각각의  $L^1$ 은 동일하거나 상이하고, 연결기이며;

n이 2인 경우, 상기 덴드론은 2세대 덴드론이고 상기 화학식 I의 화합물은 하기 구조를 갖고:



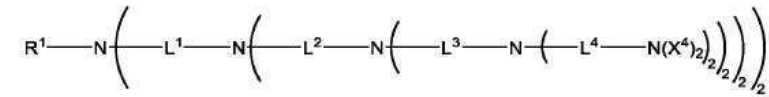
각각의  $X^2$ 는 동일하거나 상이하고, H 또는 말단기이되, 단, 적어도 하나의  $X^2$ 는 말단기이고, 각각의  $L^1$  및 각각의  $L^2$ 는 동일하거나 상이하고, 연결기이며;

n이 3인 경우, 상기 덴드론은 3세대 덴드론이고 상기 화학식 I의 화합물은 하기 구조를 갖고:



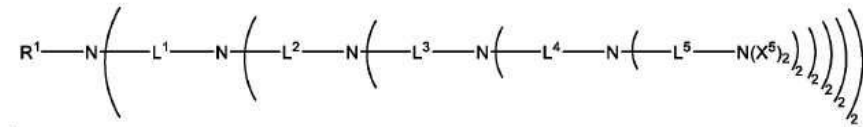
각각의  $X^3$ 는 동일하거나 상이하고, H 또는 말단기이되, 단, 적어도 하나의  $X^3$ 는 말단기이고, 각각의  $L^1$ , 각각의  $L^2$  및 각각의  $L^3$ 는 동일하거나 상이하고, 연결기이며;

n이 4인 경우, 상기 덴드론은 4세대 덴드론이고 상기 화학식 I의 화합물은 하기 구조를 갖고:



각각의  $X^4$ 는 동일하거나 상이하고, H 또는 말단기이되, 단, 적어도 하나의  $X^4$ 는 말단기이고, 각각의  $L^1$ , 각각의  $L^2$ , 각각의  $L^3$  및 각각의  $L^4$ 는 동일하거나 상이하고, 연결기이며;

n이 5인 경우, 상기 덴드론은 5세대 덴드론이고 상기 화학식 I의 화합물은 하기 구조를 갖고:



각각의  $X^5$ 는 동일하거나 상이하고, H 또는 말단기이되, 단, 적어도 하나의  $X^5$ 는 말단기이고, 각각의  $L^1$ , 각각의  $L^2$ , 각각의  $L^3$ , 각각의  $L^4$  및 각각의  $L^5$ 는 동일하거나 상이하고, 연결기이며;

$R^1$ 은  $C_{1-20}$ 알킬,  $C_{2-20}$ 알켄일,  $C_{2-20}$ 알킨일,  $C_{1-20}$ 알킬렌아릴,  $C_{1-20}$ 알킬렌헤테로아릴,  $C_{1-20}$ 알킬렌 $C_{3-8}$ 헤테로사이클로알킬,  $C_{1-20}$ 알킬렌 $C_{3-8}$ 사이클로알킬 및  $C_{1-6}$ 알킬렌-S-S- $C_{1-6}$ 알킬로부터 선택되고, 이들 각각은 비치환되거나 또는 할로, OH,  $OC_{1-20}$ 알킬,  $C(O)OC_{1-20}$ 알킬 및  $NR^2R^{2'}$  중 하나 이상으로 치환되고, 상기 아릴, 헤테로아릴, 헤테로사이클로알킬 및 사이클로알킬기는 추가로 하나 이상의  $C_{1-10}$ 알킬로 선택적으로 치환되고;

$R^2$  및  $R^{2'}$ 는 독립적으로 H 및  $C_{1-10}$ 알킬로부터 선택되며;

링커기는  $C_{1-20}$  알킬렌 또는  $C_{2-20}$  알켄일렌을 포함하되, 이들 각각에는 S, S-S, O, NH,  $N(C_{1-4}$ 알킬), C(O), C(O)O, OC(O), C(O)NH, NHC(O), NHC(NH), NHC( $NC_{1-4}$ 알킬), C(NH)NH 및 C( $NC_{1-4}$ 알킬)NH로부터 선택된 하나 이상의기가 선택적으로 개재되어 있고, 각각의 알킬, 알킬렌 및 알켄일렌은 비치환되거나 할로 및 OH 중 하나 이상으로 치환되고;

말단기는  $C_{1-40}$ 알킬,  $C_{2-40}$ 알켄일,  $C_{1-40}$ 알킬렌아릴 및  $C_{1-40}$ 알켄일렌아릴로부터 선택되고, 각각의 알킬, 알켄일, 알킬렌 및 알켄일렌에는 S-S, C(O), OC(O), C(O)O, OC(O)O,  $NR^3C(O)O$ ,  $OC(O)NR^3$ , C(O)S, SC(O),  $NR^3C(O)$ , C(O)NR<sup>3</sup>,  $NR^3C(O)NR^4$  및 C( $NC_{1-20}$ 알킬)로부터 선택된 하나 이상의기가 선택적으로 개재되며, 상기 알킬, 알켄일, 알킬렌아릴 및 알켄일렌아릴은 할로,  $NR^5R^{5'}$  및 OH 중 하나 이상으로 선택적으로 치환되며; 그리고

$R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$  및  $R^{5'}$ 는 독립적으로 수소 또는  $C_{1-10}$ 알킬이되;

탄소에 결합된 모든 이용 가능한 수소 원자는 플루오린 원자에 의해서 선택적으로 대체되어 있다.

## 청구항 2

제1항에 있어서,  $R^1$ 은  $C_{1-10}$ 알킬,  $C_{2-10}$ 알켄일,  $C_{2-10}$ 알킨일,  $C_{1-10}$ 알킬렌Ph,  $C_{1-10}$ 알킬렌헤테로아릴,  $C_{1-10}$ 알킬렌 $C_{5-6}$ 헤테로사이클로알킬,  $C_{1-10}$ 알킬렌 $C_{5-6}$ 사이클로알킬 및  $C_{1-4}$ 알킬렌-S-S- $C_{1-4}$ 알킬로부터 선택되고, 이들 각각은 비치환되거나 OH,  $OC_{1-15}$ 알킬,  $C(O)OC_{1-15}$ 알킬 및  $NR^2R^{2'}$  중 1개 내지 4개 및/또는 1개 이상의 플루오르로 치환되고, 상기 페닐, 헤테로아릴, 헤테로사이클로알킬 및 사이클로알킬기는 추가로  $C_{1-4}$ 알킬 및  $C_{1-4}$ 플루오로알킬 중 1개 내지 4개로 선택적으로 치환되고,  $R^2$  및  $R^{2'}$ 는 H 및  $C_{1-4}$ 알킬로부터 독립적으로 선택되는, 덴드론.

**청구항 3**

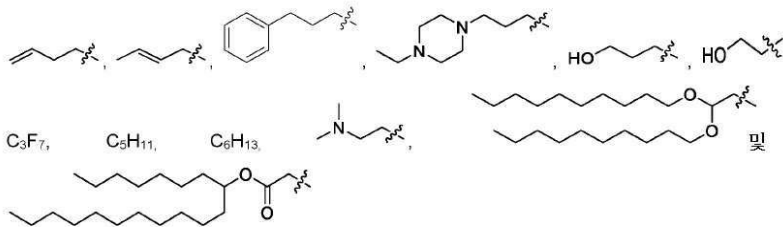
제2항에 있어서,  $R^1$ 은  $C_{1-6}$ 알킬,  $C_{2-6}$ 알켄일,  $C_{2-6}$ 알킨일,  $C_{1-6}$ 알킬렌Ph,  $C_{1-6}$ 알킬렌 $C_6$ 헤테로사이클로알킬 및  $C_{1-4}$ 알킬렌-S-S- $C_{1-4}$ 알킬로부터 선택되고, 이들 각각은 비치환되거나 OH,  $OC_{1-12}$ 알킬,  $C(O)OC_{1-15}$ 알킬 및  $NR^2R^{2'}$  중 1개 또는 2개 및/또는 1개 이상의 플루오로로 치환되고, 상기 페닐 및 헤테로사이클로알킬기는 추가로 1개 또는 2개의  $C_{1-4}$ 알킬 및  $C_{1-4}$ 플루오로알킬로 선택적으로 치환되고,  $R^2$  및  $R^{2'}$ 는 H 및  $C_{1-4}$ 알킬로부터 독립적으로 선택되는, 덴드론.

**청구항 4**

제3항에 있어서,  $R^1$ 은  $C_{1-6}$ 알킬,  $C_{2-6}$ 알켄일 및  $C_{1-6}$ 플루오로알킬로부터 선택되는, 덴드론.

**청구항 5**

제1항에 있어서,  $R^1$ 은 다음으로부터 선택되는, 덴드론:



**청구항 6**

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,  $L^1$ ,  $L^2$ ,  $L^3$ ,  $L^4$  및  $L^5$ 는 독립적으로  $C_{1-10}$ 알킬렌 또는  $C_{2-10}$ 알켄일렌을 포함하는 링커기이고, 이들 각각에는 S, S-S, O, NH,  $N(C_{1-2}$ 알킬),  $C(O)$ ,  $C(O)O$ ,  $OC(O)$ ,  $C(O)NH$ ,  $NHC(O)$ ,  $NHC(NH)$ ,  $NHC(NC_{1-2}$ 알킬),  $C(NH)NH$ ,  $C(NC_{1-2}$ 알킬)NH로부터 독립적으로 선택된 1개 또는 2개의 모이어티가 선택적으로 개재되어 있고, 각각의 알킬, 알킬렌 및 알켄일렌은 비치환되거나 1개 또는 2개의 OH 및/또는 1개 이상의 플루오로로 치환된, 덴드론.

**청구항 7**

제6항에 있어서,  $L^1$ ,  $L^2$ ,  $L^3$ ,  $L^4$  및  $L^5$ 는 독립적으로  $C_{1-10}$ 알킬렌 또는  $C_{2-10}$ 알켄일렌을 포함하는 링커기이고, 이들 각각에는 S, S-S, O,  $C(O)O$ ,  $OC(O)$ ,  $C(O)NH$ ,  $NHC(O)$ 로부터 독립적으로 선택된 1개 또는 2개의 모이어티가 선택적으로 개재되어 있고, 각각의 알킬렌 및 알켄일렌은 비치환되거나 1개 또는 2개의 OH 및/또는 1개 이상의 플루오로로 치환된, 덴드론.

**청구항 8**

제7항에 있어서,  $L^1$ ,  $L^2$ ,  $L^3$ ,  $L^4$  및  $L^5$ 는 독립적으로  $C_{1-6}$ 알킬렌 또는  $C_{2-6}$ 알켄일렌을 포함하는 링커기이고, 이들 각각에는 S-S,  $C(O)NH$  및  $NHC(O)$ 로부터 독립적으로 선택된 1개 또는 2개의 모이어티가 선택적으로 개재되어 있고, 각각의 알킬렌 및 알켄일렌은 비치환되거나 1개 또는 2개의 OH 및/또는 1개 이상의 플루오로로 치환된, 덴드론.

**청구항 9**

제6항에 있어서,  $L^1$ ,  $L^2$ ,  $L^3$ ,  $L^4$  및  $L^5$ 는 다음으로부터 독립적으로 선택되는, 덴드론:



제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 1세대 텐드론에서 각각의  $X^1$ 은 말단기이고, 동일한, 텐드론.

**청구항 15**

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 2세대 텐드론에서 각각의 질소 상의 적어도 하나의  $X^2$ 는 말단기이고, 각각의 말단기는 동일한, 텐드론.

**청구항 16**

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 2세대 텐드론에서  $X^2$  모두는 말단기이고, 동일한, 텐드론.

**청구항 17**

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 3세대 텐드론에서 각각의 질소 상의 적어도 하나의  $X^3$ 는 말단기이고, 각각의 말단기는 동일한, 텐드론.

**청구항 18**

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 3세대 텐드론에서  $X^3$  모두는 말단기이고, 동일한, 텐드론.

**청구항 19**

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 4세대 텐드론에서 각각의 질소 상의 적어도 하나의  $X^4$ 는 말단기이고, 각각의 말단기는 동일한, 텐드론.

**청구항 20**

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 4세대 텐드론에서  $X^4$  모두는 말단기이고, 동일한, 텐드론.

**청구항 21**

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 5세대 텐드론에서 각각의 질소 상의 적어도 하나의  $X^5$ 는 말단기이고, 각각의 말단기는 동일한, 텐드론.

**청구항 22**

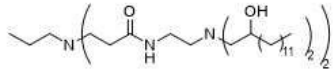
제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 5세대 텐드론에서  $X^5$  모두는 말단기이고, 동일한, 텐드론.

**청구항 23**

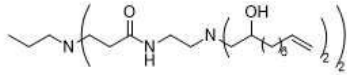
제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, n은 1 또는 2인, 텐드론.

청구항 24

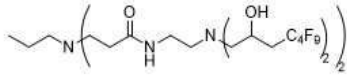
제1항에 있어서, 상기 화학식 I의 텐드론은 다음으로부터 선택되는, 텐드론:



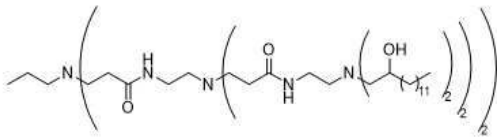
I-1 (G1-nPr-C14E);



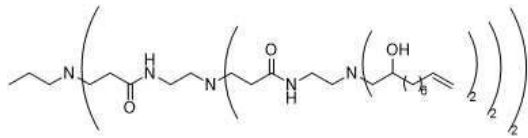
I-2 (G1-nPr-C10O1E);



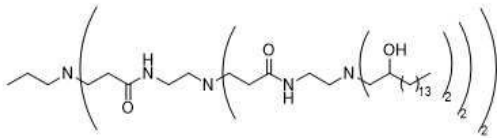
I-3 (G1-nPr-C7RfE);



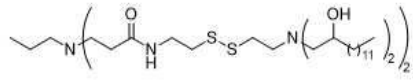
I-4 (G2-nPr-C14E);



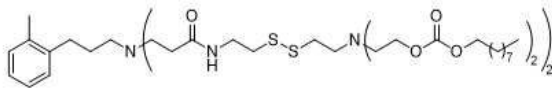
I-5 (G2-nPr-C10O1E);



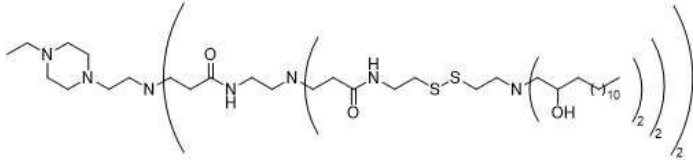
I-6 (G2-nPr-C16E);



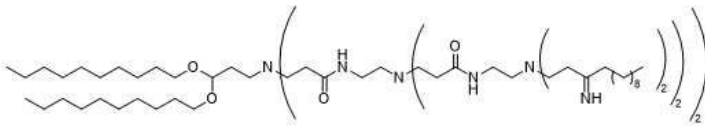
I-7 (G1-nPr-S8-C14E);



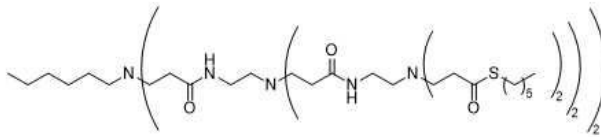
I-8 (G1-벤질-S-1);



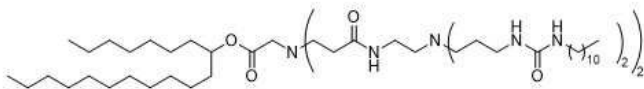
I-9 (G2-아진-S-1);



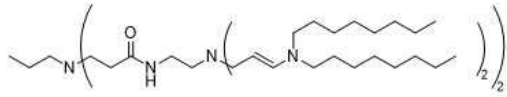
I-10 (G2-c1-아마이드-t1);



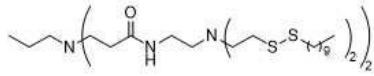
I-11 (G2-c2-아마이드-t2);



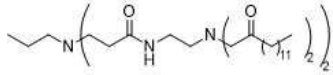
I-12 (G1-c3-아마이드-t3);



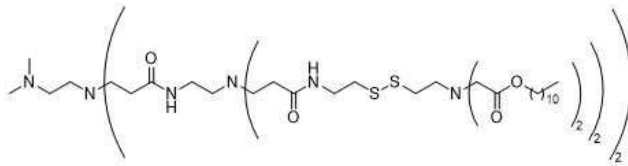
I-13 (G1-nPr-0)아마이드-t4);



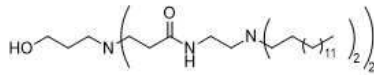
I-14 (G1-nPr-0)아마이드-t5);



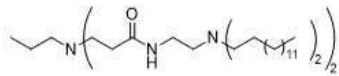
I-15 (G1-nPr-0)아마이드-t6);



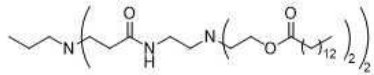
I-16 (G2-c4-0)아마이드-t7);



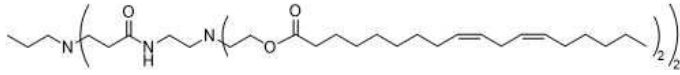
I-17 (G1-c5-0)아마이드-t8);



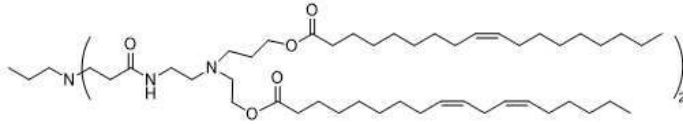
I-18 (G1-nPr-0)아마이드-t9);



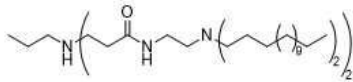
I-19 (G1-nPr-아마이드-t10);



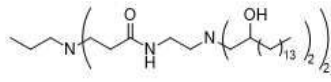
I-20 (G1-nPr-아마이드-t11);



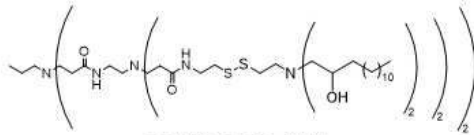
I-21 (G0-nPr-아마이드-t12);



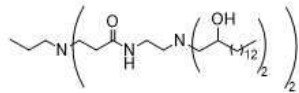
I-22 (G1-nPr-C14);



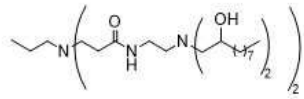
I-23 (G1-nPr-C16E);



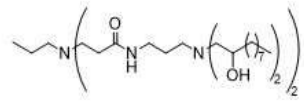
I-24 (G2-nPr-S14-C14E);



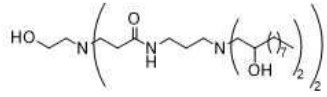
I-25 (G1-C3-K2-E15);



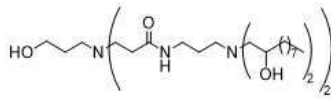
I-26 (G1-C3-K2-E10);



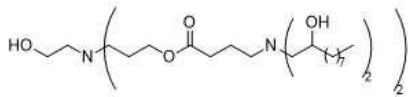
I-27 (G1-C3-K3-E10);



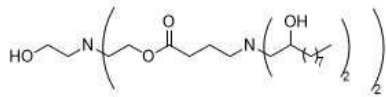
I-28 (G1-OC2-K3-E10);



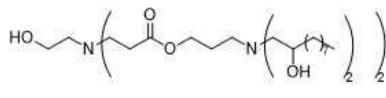
I-29 (G1-OC3-K3-E10);



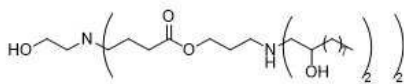
I-30 (DPA-GABA-E10);



I-31 (TPA-GABA-E10);



I-32 (BU2-S3-E10); 및



I-33 (BU3-S3-E10);

또는 이의 염 및/또는 용매화물.

#### 청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항의 하나 이상의 덴드론을 포함하는, 나노입자.

#### 청구항 26

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항의 하나 이상의 덴드론을 포함하는, 콜로이드.

#### 청구항 27

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항의 하나 이상의 덴드론을 포함하는, 초분자 구조체(supramolecular structure).

#### 청구항 28

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항의 하나 이상의 덴드론, 제25항의 하나 이상의 나노입자, 제26항의 하나 이상의 콜로이드 및/또는 제27항의 하나 이상의 초분자 구조체를 포함하는, 조성물.

**청구항 29**

제28항에 있어서, 세포 또는 대상체에게 전달될 1종 이상의 작용제를 추가로 포함하는, 조성물.

**청구항 30**

제29항에 있어서, 세포 또는 대상체에게 전달될 상기 1종 이상의 작용제는 변형되지 않은 또는 변형된 핵산, 미토콘드리온, 플라스미드, PolyIC 및 관련 아주반트, 리보뉴클레오단백질, 단백질, 펩타이드, 세포, 균주, 염료 및 소분자 약물로부터 선택되는, 조성물.

**청구항 31**

제29항 또는 제30항에 있어서, 세포 또는 대상체에게 전달될 상기 1종 이상의 작용제는 전체 음전하를 갖는, 조성물.

**청구항 32**

제30항 또는 제31항에 있어서, 상기 단백질 및 펩타이드는 엔도뉴클레아제, 메가뉴클레아제, 프로테아제 및 키나제로부터 선택되는, 조성물.

**청구항 33**

제29항 또는 제30항에 있어서, 세포 또는 대상체에게 전달될 상기 1종 이상의 작용제는 1종 이상의 핵산인, 조성물.

**청구항 34**

제33항에 있어서, 상기 1종 이상의 핵산은 짧은 간섭 RNA(예를 들어, 작은 간섭 RNA)(siRNA), 원형 RNA, 환식 RNA, 긴 비암호 RNA, 마이크로RNA(miRNA), 프리(pri)-miRNA, 메신저 RNA(mRNA), 클러스터 규칙적인 간격이 있는 짧은 회문 반복부(cluster regularly interspaced short palindromic repeat: CRISPR) 관련 핵산, 단일 가이드 RNA(sgRNA), CRISPR-RNA(crRNA), 트랜스-작용 crRNA(tracrRNA), 플라스미드 DNA(pDNA), 트랜스퍼 RNA(tRNA), 안티센스 올리고뉴클레오타이드(ASO), 가이드 RNA, 이중 가닥 DNA(dsDNA), 단일 가닥 DNA(ssDNA), exDNA, 프로-폼(pro-form) RNA, 단일 가닥 RNA(ssRNA) 또는 이중 가닥 RNA(dsRNA)인, 조성물.

**청구항 35**

제33항에 있어서, 상기 1종 이상의 핵산은 siRNA, tRNA, mRNA 및 핵산으로부터 선택되며, 이것은 CRISPR 과정에 사용되는, 조성물.

**청구항 36**

제33항에 있어서, 상기 핵산은 siRNA인, 조성물.

**청구항 37**

제35항에 있어서, CRISPR 과정에 사용되는 상기 핵산은 클러스터 규칙적인 간격이 있는 짧은 회문 반복부(CRISPR) 관련 핵산, 단일 가이드 RNA(sgRNA), CRISPR-RNA(crRNA) 및/또는 트랜스-작용 crRNA(tracrRNA)인, 조성물.

**청구항 38**

제34항에 있어서, 상기 핵산은 miRNA인, 조성물.

**청구항 39**

제34항에 있어서, 상기 핵산은 mRNA인, 조성물.

**청구항 40**

제34항에 있어서, 상기 핵산은 tRNA인, 조성물.

**청구항 41**

제34항에 있어서, 상기 핵산은 가이드 RNA인, 조성물.

**청구항 42**

제37항에 있어서, 상기 가이드 RNA는 CRISPR 과정에 사용되는, 조성물.

**청구항 43**

제34항에 있어서, 상기 핵산은 pRNA인, 조성물.

**청구항 44**

제28항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 텐드론 및 세포 또는 대상체에게 전달될 상기 1종 이상의 작용제는 약 100:1 내지 약 1:5의 상기 텐드론(들):작용제(들)의 중량비로 존재하는, 조성물.

**청구항 45**

제28항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 1종 이상의 지질을 추가로 포함하는, 조성물.

**청구항 46**

제45항에 있어서, 상기 1종 이상의 지질은 스테로이드, 스테로이드 유도체, PEG-지질 및 인지질 및 이들의 혼합물로부터 선택되는, 조성물.

**청구항 47**

제46항에 있어서, 상기 PEG-지질은 PEG 쇄를 사용하여 링커기에 부착된 1개 이상의 C<sub>6-24</sub>알킬 또는 C<sub>6-24</sub>알켄일기 또는 C<sub>6-24</sub> 지방산기를 함유하는 화합물인, 조성물.

**청구항 48**

제46항에 있어서, 상기 PEG-지질은 PEG-변형된 포스파티딜에탄올아민, PEG-변형된 포스파티드산, PEG-세라미드 접합체, PEG-변형된 다이알킬아민, PEG-변형된 1,2-다이아실옥시프로판-3-아민, PEG-변형된 다이아실글리세롤 및/또는 PEG-변형된 다이알킬글리세롤인, 조성물.

**청구항 49**

제46항에 있어서, 상기 PEG-지질은 PEG-변형된 1,2-다이미리스토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민, PEG-변형된 1,2-다이스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민, PEG-변형된 1,2-다이올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민, PEG-변형된 1,2-다이미리스토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민, PEG-변형된 1,2-다이스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민, PEG-변형된 1,2-다이미리스토일-rac-글리세로-3-메톡시폴리에틸렌 글리콜 및/또는 PEG-변형된 다이스테아로일-rac-글리세롤인, 조성물.

**청구항 50**

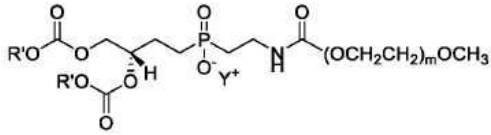
제47항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 PEG는 상기 지질의 PEG 성분의 분자량에 의해서 측정되고, 상기 PEG는 약 100 내지 약 15,000, 약 200 내지 약 10000, 약 400 내지 약 8000, 약 1000 내지 약 6000, 또는 약 2000 내지 약 5000의 분자량을 갖는, 조성물.

**청구항 51**

제46항에 있어서, 상기 PEG-지질은 PEG-인지질 접합체인, 조성물.

**청구항 52**

제51항에 있어서, 상기 PEG-인지질 접합체는 하기 화학식 II의 PEG화된 포스포에탄올 아민 지질인, 조성물:



(II)

상기 식에서,

R 는 1 또는 2개의 이중 결합을 갖는 C<sub>6-24</sub>알킬 또는 C<sub>6-24</sub>알켄일이고;

m은 20 내지 200의 정수이며; 그리고

Y는 임의의 적합한 반대 양이온이다.

#### 청구항 53

제46항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 PEG-지질은 1.5몰%, 3몰%, 10몰%, 15몰%, 20몰% 또는 40몰% 또는 이들 내에서 유도될 수 있는 임의의 범위로 존재하는, 조성물.

#### 청구항 54

제28항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 1종 이상의 PEG-지질, 1종 이상의 인지질, 1종 이상의 스테로이드 및 전달될 1종 이상의 작용제를 포함하는, 조성물.

#### 청구항 55

제54항에 있어서, 상기 1종 이상의 스테로이드는 콜레스테롤인, 조성물.

#### 청구항 56

제54항 또는 제55항에 있어서, 상기 1종 이상의 스테로이드는 총 지질의 최대 50몰%, 또는 이들 내에서 유도될 수 있는 임의의 범위의 양으로 존재하는, 조성물.

#### 청구항 57

제16항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함하는 약제학적 조성물인, 조성물.

#### 청구항 58

제41항에 있어서, 상기 약제학적으로 허용 가능한 담체는 용매 또는 용액인, 조성물.

#### 청구항 59

1종 이상의 작용제를 세포 또는 대상체에게 전달하는 방법으로서, 상기 세포 또는 대상체를 제28항 내지 제58항 중 어느 한 항의 1종 이상의 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하되, 상기 세포 또는 대상체는 상기 작용제가 상기 세포 또는 대상체로 흡수되는 조건 하에서 접촉되어야 하는, 방법.

#### 청구항 60

제59항에 있어서, 상기 세포는 시험관내에서 접촉되는, 방법.

#### 청구항 61

제59항에 있어서, 상기 세포는 생체내에서 접촉되는, 방법.

#### 청구항 62

제59항에 있어서, 상기 세포는 생체외에서 접촉되는, 방법.

**청구항 63**

제59항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접촉시키는 단계는 질환, 장애 또는 병태의 치료 또는 예방을 위한 것인, 방법.

**청구항 64**

제63항에 있어서, 상기 질환, 장애 또는 병태는 감염성 질환, 자가면역 질환, 암, 유전 질환, 만성 질환, 외상성 부상, 상처 치유, 외상성 뇌 손상, 신경근 질환 및 위장병으로부터 선택되는, 방법.

**청구항 65**

제63항 또는 제64항에 있어서, 상기 접촉시키는 단계는 유효량의 1종 이상의 조성물을 이를 필요 하는 세포에게 투여함으로써 이루어지는, 방법.

**청구항 66**

제59항 내지 제63항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 동물 세포, 곤충 세포 또는 식물 세포인, 방법.

**청구항 67**

제59항 내지 제66항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포에게 전달될 1종 이상의 작용제는 1종 이상의 핵산인, 방법.

**청구항 68**

제29항에 있어서, 상기 1종 이상의 작용제는 미용용 작용제인, 방법.

**청구항 69**

제29항에 있어서, 상기 1종 이상의 작용제는 제품이 진짜인지 또는 변조되지 않았는지를 보장하기 위해서 판독될 수 있는 제품 패키징/라벨에 삽입되는 고유한 DNA 또는 RNA 서열(바코드)을 포함하는, 방법.

**청구항 70**

키트로서,

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항의 하나 이상의 텐드론 또는 제28항 내지 제58항 중 어느 한 항의 1종 이상의 조성물을 포함하는, 키트.

**청구항 71**

제70항에 있어서, 성분이 배치되고 선택적으로 분취되는, 적어도 하나의 바이알, 시험관, 플라스크, 병, 주사기 및/또는 기타 용기를 추가로 포함하는, 키트.

**청구항 72**

제70항 또는 제71항에 있어서, 사용 설명서를 추가로 포함하는, 키트.

**청구항 73**

제72항에 있어서, 상기 설명서는 하나 이상의 텐드론 또는 1종 이상의 조성물을 대상체 또는 세포에 전달하기 위한 것인, 키트.

**청구항 74**

제28항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 pKa가 약 4 내지 약 8인, 조성물.

**청구항 75**

제28항에 있어서, 제25항의 하나 이상의 나노입자를 포함하고, 화학적으로 변형된 폴리뉴클레오타이드를 추가로 포함하는, 조성물.

**청구항 76**

제75항에 있어서, 상기 조성물은 pKa가 약 5 내지 약 7인, 조성물.

**청구항 77**

제75항 또는 제76항에 있어서, 상기 나노입자는 평균 직경이 약 50nm 내지 약 200nm인, 조성물.

**청구항 78**

제25항에 있어서, 지질 나노입자(LNP)인, 나노입자.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] **관련 출원에 대한 상호 참조**

[0002] 본 출원은 미국 특허 가출원 제63/398,936(출원일: 2022년 8월 18일) 미국 특허 가출원 제63/283,588호(출원일: 2021년 11월 29일)으로부터의 우선권 이익을 주장하며, 이들 기초 둘 다의 내용은 이들의 전문이 참조에 의해서 본 명세서에 인용된다.

[0003] **기술분야**

[0004] 본 출원은 일반적으로 덴드론 분야에 관한 것이다. 특히, 이것은 덴드론 나노입자 및 이의 조성물에 관한 것이다. 보다 특별하게는, 이것은 작용제, 예컨대, 핵산 및 약물의 전달을 위한 덴드론 나노입자 조성물에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0005] 핵산, 예컨대, 데옥시리보핵산(DNA) 및 리보핵산(RNA), 예컨대, 메신저 리보핵산(mRNA), 작은 간섭 RNA(siRNA), 마이크로RNA(miRNA) 및 긴 비암호 RNA(lncRNA)는 새로운 치료제 및 백신의 개발에 큰 잠재력을 가지고 있다. 핵산의 세포로의 전달은 세포 수준에서 유전자 발현에 영향을 주는 상이한 방식이다. 예를 들어, mRNA는 바이러스 백신 및 게놈 편집을 비롯한 광범위한 응용 분야에서 치료 가능성을 나타내었다[Pardi, N., Hogan, M. J., Porter, F. W. & Weissman, D., mRNA vaccines - a new era in vaccinology, *Nat. Rev. Drug Discov.* 17, 261-279, 2018; Barbier, A. J., Jiang, A. Y., Zhang, P., Wooster, R. & Anderson, D. G., The clinical progress of mRNA vaccines and immunotherapies, *Nat. Biotechnol.* 1-15, 2022]. 2021년에, 최초의 mRNA 백신인 Comirnaty(BNT162b) 및 Spikevax(mRNA-1273)가 COVID-19에 대한 예방을 위해서 승인되었다[Corbett, K. S. et al., Evaluation of the mRNA-1273 Vaccine against SARS-CoV-2 in Nonhuman Primates, *N. Engl. J. Med.* 383, 1544-1555, 2020; Chaudhary, N., Weissman, D. & Whitehead, K. A., mRNA vaccines for infectious diseases: principles, delivery and clinical translation, *Nat. Rev. Drug Discov.* 20, 817-838, 2021]. 그러나 핵산을 격리하고 전달하는 데 사용되는 현재 물질은 제조 및 생물학적 효과 측면 둘 다에서 단점이 있다. 예를 들어, 고분자량 물질은 합성하기 어렵고 전달 물질은 종종 신체에 독성이 있거나 염증성 면역 반응을 유발한다. 더욱이, 전달에 도움이 되는 형태로 상이한 유형의 핵산을 동시에 격리하는 방법은 현재 잘 개발되어 있지 않다. 종합하면, 전달 물질의 이러한 현재 제한은 핵산의 광범위한 사용을 방해한다.

[0006] 현재, 지질 나노입자(LNP), 단백질, 변형된 덴드리머 및 양이온성 나노에멀전이 핵산 전달에 사용된다. 예를 들어, LNP는 핵산을 전달하는 데 성공적으로 사용되어 왔다[A. J. Geall, A. Verma, G. R. Otten, et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2012, 109, 14604-14609; A. Hekele, S. Bertholet, J. Archer, et al., *Emerging Microbes and Infections* 2013, 2]. 전형적인 LNP는 4개의 성분, 즉, 이온화 가능한 지질, 인지질, 콜레스테롤 및 지질-접합 폴리에틸렌 글리콜(PEG)을 함유한다. 이온화 가능한 지질은 LNP 제제 동안 핵산에 결합하고, 핵산 발현 및 면역원성의 주요 동인으로 작용한다 [Hassett, K. J. et al., *Optimization of Lipid Nanoparticles for Intramuscular Administration of mRNA Vaccines*, *Mol. Ther. Nucleic Acids* 15, 1-11, 2019; Han, X. et al., An ionizable lipid toolbox for RNA delivery, *Nat. Commun.* 12, 1-6, 2021]. 이러한 지질은 2작용성인데; 한쪽 단부는 음이온성 핵산과 정전기적으로 회합하는 양성자화된 3차 아민을 함유하고, 다른 단부는 나노입자 자가 조립을 위한 지질 꼬리를 갖는다. 그러나 이러한 물질은 전형적으로 더 양호한 핵산 격리를 위해 전하를 부가하기 위해서 DSPC와 같은 헬퍼 지질

의 어레이를 필요로 하는데, 이는 처리 오류로 이어질 수 있는 복잡한 제형을 초래한다. 이온화 가능한 LNP는 영구적인 양이온 입자에서 발생하는 독성을 완화하기 위해 생리 pH에서 중성 전하를 가지며, 세포에 흡수된 후 이온화 가능한 지질이 산성 엔도솜에서 양전하를 획득하여 핵산이 세포질로 방출되는 것을 촉진한다[Heyes, J., Palmer, L., Bremner, K. & MacLachlan, I., Cationic lipid saturation influences intracellular delivery of encapsulated nucleic acids, *J. Controlled Release* 107, 276-287, 2005; Semple, S. C. *et al.*, Rational design of cationic lipids for siRNA delivery, *Nat. Biotechnol.* 28, 172-176, 2010; Heyes, J., Palmer, L., Bremner, K. & MacLachlan, I., Cationic lipid saturation influences intracellular delivery of encapsulated nucleic acids, *J. Controlled Release* 107, 276-287, 2005].

[0007] 문헌의 이온화 가능한 지질은 다음을 포함하는 구조적 특징부의 세트를 공유한다: 1) 낮은 pH에서 RNA에 결합하는 하나 이상의 3차 아민; 2) 소수성 자가 조립을 위한 다중 알킬 꼬리, 및 3) 엔도솜 막을 파괴하는 일반적인 '뿔뿔' 형상[Cullis, P. R., Hope, M. J. & Tilcock, C. P. S., Lipid polymorphism and the roles of lipids in membranes, *Chemistry and Physics of Lipids* 40, 127-144, 1986; Hafez, I. M., Maurer, N. & Cullis, P. R., On the mechanism whereby cationic lipids promote intracellular delivery of polynucleic acids, *Gene Ther.* 8, 1188-1196, 2001; Semple, S. C. *et al.*, Rational design of cationic lipids for siRNA delivery, *Nat. Biotechnol.* 28, 172-176, 2010]. 분자 구조의 작은 변형이 RNA 전달의 효능을 극적으로 변화시킬 수 있으므로, 이온화 가능한 지질 구조를 신중하고 의도적으로 설계하는 것이 바람직하다.

[0008] 가교된 단백질 입자는 핵산을 함유하고 전달하는 데 사용되어 왔지만, 전달 및 형질주입을 향상시키기 위해서는 양이온성 지질과 함께 분해 가능한 가교제가 필요하고[J. Xu, J. C. Luft, X. Yi, *et al.*, *Molecular Pharmaceutics* 2013, 10, 3366-3374], 이것은 또한 지나치게 복잡한 제형 및 다수의 오류-유발 처리 단계로 이어진다.

[0009] 변형된 덴드리머는 스타버스트(starburst) 패턴의 중심점으로부터 대칭적으로 분지화되는 더 큰 분자량의 중합체이다[J. S. Chahal, O. F. Khan, C. L. Cooper, *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 2016, 113, E4133-4142.; O. F. Khan, E. W. Zaia, S. Jhunjunwala, *et al.*, *Nano Lett* 2015, 15, 3008-3016; O. F. Khan, E. W. Zaia, H. Yin, *et al.*, *Angewandte Chemie* 2014, 53, 14397-14401]. 분지화로 인해서, 이것은 양성자화 및 더 양호한 핵산 결합을 위해 더 많은 아민을 함유한다. 이러한 대칭적으로 분지화된 중합체의 주변에는 나노입자가 조립을 위한 비극성 알칸이 혼입되어 있다. 이것은 때로는 전하량을 증가시키기 위해서 추가적인 헬퍼 지질이 필요하지 않지만, 핵산과의 긴밀한 정전기적 회합 및 덴드리머가 나노입자 자가 조립에 혼입되는 것을 방지하는 외부 알칸기로부터의 상당한 입체 장애가 존재한다. 이러한 입체 장애는 나노입자 내의 핵산의 비효율적인 패키징을 초래할 수 있으며, 여기서 더 큰 핵산은 이것이 노출되어 보호되지 않는 나노입자 표면 또는 그 근처에 남아 있다. 2개 이상의 아민이 코어의 동일한 측면에 위치하는 경우 덴드리머를 비대칭으로 성장시키는 것이 가능할 수 있지만, 코어의 하나의 측면에 여러 아민이 존재하면 빠르게 군집이 발생하여 더 높은 세대의 덴드리머의 형성을 차단하는 입체 장애가 증가한다. 추가로, 입체 장애는 또한 말단 알칸을 비대칭 덴드리머에 혼입하는 것을 차단한다. 더 추가로, 변형된 덴드리머는 반응으로 인해 길고 고비용인 정제가 필요한 다양한 치환도 발생하기 때문에 단분자 종으로 합성하기 어렵다. 이러한 다양한 치환도는 또한 성능, 안전성 및 순도에 영향을 미칠 수 있는 다수의 이성질체를 생성한다. 이러한 이성질체는 입체이성질체, 위치 이성질체 및 키랄성을 포함하며, 이들 모두는 예측, 단리 및 제어가 어렵다. 더욱이 변형된 덴드리머는 분자량이 더 높아 신체에서 제거되는 능력에 영향을 줄 수 있다. 덴드리머가 분해 가능한 기를 혼입한 경우 이러한 고분자량 분자로부터의 분해 성분 또한 크기가 커서 신체에서 제거하기 어렵다. 또한, 덴드리머의 아민 수가 많을수록 순상 크로마토그래피 분리 공정을 사용하여 이러한 물질을 정제하는 능력에 부정적인 영향을 미치는데, 그 이유는 다수의 아민이 크로마토그래피 칼럼의 고정상과 상호작용하여 용리가 지연되고 임의의 분리 없이는 여러 이성질체가 유해하게 함께 용리되기 때문이다. 이러한 분리 문제는 개별 이성질체의 효능 및 안전성을 시험할 때 큰 어려움을 야기한다. 덴드리머는 또한 분지 사이에 상당한 양의 공극 공간을 함유한다. 따라서, 덴드리머를 사용하여 나노입자를 형성하는 경우, 나노입자는 핵산 페이로드로 채워질 수 없는 많은 양의 공극 공간을 함유하는데; 이러한 낭비된 공간은 핵산 전달의 전체 효율을 감소시킨다. 더욱이, 덴드리머는 독성이 있는 것으로 알려져 있으며; 말단 변형은 독성을 감소시킬 수 있지만, 분자당 많은 양의 전하로 인한 독성은 여전히 실패로 남아 있다(예를 들어, 문헌[Labieniec-Watala, M. and Watala, C. J. *Pharm. Sci.* 2015, 104(1):2-14 및 Mendes, L.P. *et al.* *Molecules*, 2017, 22(9):1401] 참조).

[0010] 양이온성 나노에멀션은 표면에 핵산이 흡착된 MF59 아주반트로 형성된 나노입자이지만[L. A. Brito, M. Chan, C. A. Shaw, *et al.*, *Molecular Therapy* 2014, 22, 2118-2129; W. M. Bogers, H. Oostermeijer, P. Mooij, *et*

al., Journal of Infectious Diseases 2015, 211, 947-955]; (전달 물질):(핵산) 질량 비율은 지질 나노입자 시스템보다 훨씬 더 높는데, 이는 용량 제한 물질 유도 효과로 이어질 수 있다.

[0011] 변형된 덴드리머를 포함하는 핵산 전달을 위한 나노입자 조성물은 예를 들어, PCT 특허 출원 공개 WO2020/132196에 개시되어 있다.

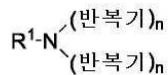
[0012] 따라서, 저분자량, 다량의 핵산 및 다른 작용제를 로딩하는 능력, 낭비되는 내부 공간 공간을 감소시키는 능력 및 다양한 유형의 핵산 및/또는 다른 작용제를 동시에 함유하는 능력을 갖는 새로운 전달 물질에 대한 충족되지 않은 요구가 존재한다.

**발명의 내용**

[0013] 상기에 언급된 한계를 고려할 때, 최적의 전달 시스템에 대한 고려 사항은 하기의 조작된 설계 기준을 포함한다: (1) 전달 분자당 다수의 이온화 가능한 전하  $z$ ; (2)  $F \propto 1/L^2$  관계에 따른 전달 전하와 핵산 사이의 거리  $L$ 을 최소화하여 정전기력  $F$ 를 최대화하는 것; (3) 결합 친화도  $KD$ 를 최대화하여 (전달 분자):(핵산)의 질량 비율을 최소화하는 것; (4) 제형 조건을 통한 전달 물질의 최적화된 분자 패키징; 및 (5) 세포 반응을 조절하는 분자 군을 혼입함.

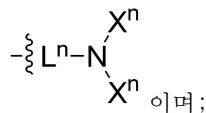
[0014] 이러한 설계 기준에 기초하여, 이상적인 전달 물질(일반적으로 도 1의 도면으로 도시됨)인 새로운 부류의 덴드리론에서 영감을 받은 분지형 분자를 제조하였다. 이러한 전달 물질은 전하 분리 및 자가 조립 군을 허용하여 입체 장애를 줄이고 핵산 접근성을 증가시킨다. 유연한 화학은 전하 밀도, 자가 조립 및 용해도 최적화를 촉진한다. 중요한 것은, 분자 구조가 세포 반응, 분해, 제거 및 다른 기본 특성을 조절하도록 조정 가능하다는 것이다.

[0015] 따라서, 본 출원은 하기 화학식 I의 덴드리론, 또는 이의 염 및/또는 용매화물을 포함한다:



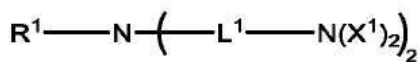
[0016]  
[0017] (I)

[0018] 상기 식에서,  
[0019] 각각의 반복기는 동일하거나 상이하고,



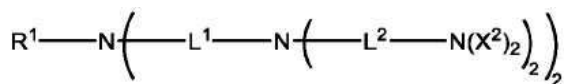
[0020]  
[0021]  $n$ 은 1, 2, 3, 4 또는 5이고, 각각의  $L^n$  및 각각의  $X^n$ 은 동일하거나 상이하고,  $n$ 에 대한 값에 따라서 하기에 정의된 바와 같고;

[0022]  $n$ 이 1인 경우, 상기 덴드리론은 1세대 덴드리론이고 화학식 I의 화합물은 하기 구조를 갖고:



[0023]  
[0024] 각각의  $X^1$ 은 동일하거나 상이하고, H 또는 말단기이되, 단, 적어도 하나의  $X^1$ 은 말단기이고, 각각의  $L^1$ 은 동일하거나 상이하고, 연결기이며;

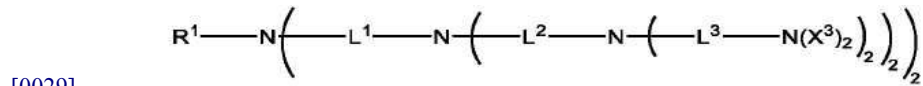
[0025]  $n$ 이 2인 경우, 덴드리론은 2세대 덴드리론이고 화학식 I의 화합물은 하기 구조를 갖고:



[0026]  
[0027] 각각의  $X^2$ 은 동일하거나 상이하고, H 또는 말단기이되, 단, 적어도 하나의  $X^2$ 은 말단기이고, 각각의  $L^1$  및 각각

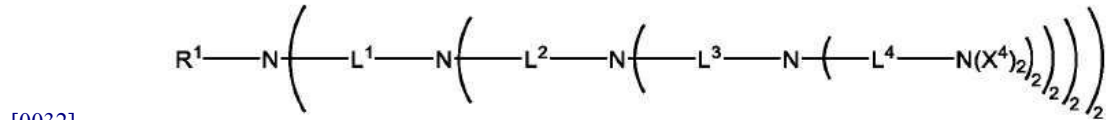
의  $L^2$ 는 동일하거나 상이하고, 연결기이며;

[0028]  $n$ 이 3인 경우, 상기 덴드론은 3세대 덴드론이고 화학식 I의 화합물은 하기 구조를 갖고:



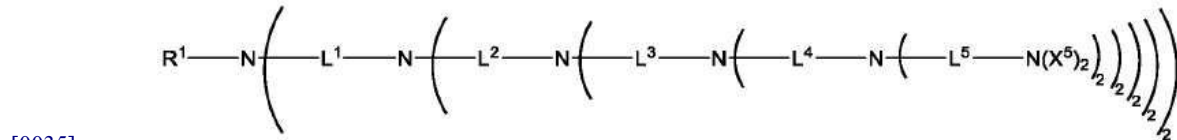
[0030] 각각의  $X^3$ 는 동일하거나 상이하고, H 또는 말단기이되, 단, 적어도 하나의  $X^3$ 는 말단기이고, 각각의  $L^1$ , 각각의  $L^2$  및 각각의  $L^3$ 는 동일하거나 상이하고, 연결기이며;

[0031]  $n$ 이 4인 경우, 상기 덴드론은 4세대 덴드론이고 화학식 I의 화합물은 하기 구조를 갖고:



[0033] 각각의  $X^4$ 는 동일하거나 상이하고, H 또는 말단기이되, 단, 적어도 하나의  $X^4$ 는 말단기이고, 각각의  $L^1$ , 각각의  $L^2$ , 각각의  $L^3$  및 각각의  $L^4$ 는 동일하거나 상이하고, 연결기이며;

[0034]  $n$ 이 5인 경우, 상기 덴드론은 5세대 덴드론이고 화학식 I의 화합물은 하기 구조를 갖고:



[0036] 각각의  $X^5$ 는 동일하거나 상이하고, H 또는 말단기이되, 단, 적어도 하나의  $X^5$ 는 말단기이고, 각각의  $L^1$ , 각각의  $L^2$ , 각각의  $L^3$ , 각각의  $L^4$  및 각각의  $L^5$ 는 동일하거나 상이하고, 연결기이며;

[0037]  $R^1$ 은  $C_{1-20}$ 알킬,  $C_{2-20}$ 알켄일,  $C_{2-20}$ 알킨일,  $C_{1-20}$ 알킬렌아릴,  $C_{1-20}$ 알킬렌헥테로아릴,  $C_{1-20}$ 알킬렌 $C_{3-8}$ 헥테로사이클로알킬,  $C_{1-20}$ 알킬렌 $C_{3-8}$ 사이클로알킬 및  $C_{1-6}$ 알킬렌-S-S- $C_{1-6}$ 알킬로부터 선택되고, 이들 각각은 비치환되거나 또는 할로, OH,  $OC_{1-20}$ 알킬,  $C(O)OC_{1-20}$ 알킬 및  $NR^2R^{2'}$  중 하나 이상으로 치환되고, 상기 아릴, 헥테로아릴, 헥테로사이클로알킬 및 사이클로알킬기는 추가로 하나 이상의  $C_{1-10}$ 알킬로 선택적으로 치환되고;

[0038]  $R^2$  및  $R^{2'}$ 는 독립적으로 H 및  $C_{1-10}$ 알킬로부터 선택되며;

[0039] 링커기는  $C_{1-20}$  알킬렌 또는  $C_{2-20}$  알켄일렌을 포함하되, 이들 각각에는 S, S-S, O, NH,  $N(C_{1-4}$ 알킬),  $C(O)$ ,  $C(O)O$ ,  $OC(O)$ ,  $C(O)NH$ ,  $NHC(O)$ ,  $NHC(NH)$ ,  $NHC(NC_{1-4}$ 알킬),  $C(NH)NH$  및  $C(NC_{1-4}$ 알킬) $NH$ 로부터 선택된 하나 이상의기가 선택적으로 개재되어 있고, 각각의 알킬, 알킬렌 및 알켄일렌은 비치환되거나 할로 및 OH 중 하나 이상으로 치환되고;

[0040] 말단기는  $C_{1-40}$ 알킬,  $C_{2-40}$ 알켄일,  $C_{1-40}$ 알킬렌아릴 및  $C_{1-40}$ 알켄일렌아릴로부터 선택되고, 각각의 알킬, 알켄일, 알킬렌 및 알켄일렌에는 S-S,  $C(O)$ ,  $OC(O)$ ,  $C(O)O$ ,  $OC(O)O$ ,  $NR^3C(O)O$ ,  $OC(O)NR^3$ ,  $C(O)S$ ,  $SC(O)$ ,  $NR^3C(O)$ ,  $C(O)NR^3$ ,  $NR^3C(O)NR^4$  및  $C(NC_{1-20}$ 알킬)로부터 선택된 하나 이상의기가 선택적으로 개재되며, 알킬, 알켄일, 알킬렌아릴 및 알켄일렌아릴은 할로,  $NR^5R^{5'}$  및 OH 중 하나 이상으로 선택적으로 치환되며; 그리고

[0041]  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$  및  $R^{5'}$ 는 독립적으로 수소 또는  $C_{1-10}$ 알킬이되;

[0042] 탄소에 결합된 모든 이용 가능한 수소 원자는 플루오린 원자에 의해서 선택적으로 대체되어 있다.

- [0043] 또한 본 출원에는 본 출원의 하나 이상의 덴드론을 포함하는 나노입자, 본 출원의 하나 이상의 덴드론을 포함하는 콜로이드 또는 본 출원의 하나 이상의 덴드론을 포함하는 초분자 구조체(supramolecular structure)가 포함된다. 일부 실시형태에서, 나노입자는 지질 나노입자(LNP)이다.
- [0044] 본 출원은 또한 본 출원의 하나 이상의 덴드론을 포함하는 조성물뿐만 아니라 하나 이상의 나노입자, 하나 이상의 콜로이드 및/또는 하나 이상의 초분자 구조체를 포함하며, 각각은 본 출원의 하나 이상의 덴드론을 포함한다.
- [0045] 일부 실시형태에서, 본 출원의 조성물은 세포 또는 대상체로 전달될 1종 이상의 작용제를 추가로 포함한다.
- [0046] 일부 실시형태에서, 본 출원의 조성물은 본 출원의 하나 이상의 덴드론, 1종 이상의 PEG-지질, 1종 이상의 인지질, 1종 이상의 스테로이드 및 전달될 1종 이상의 작용제를 포함한다.
- [0047] 또한 본 출원에는 1종 이상의 작용제를 세포 또는 대상체에게 전달하는 방법이 포함되며, 이 방법은 세포 또는 대상체를 본 출원의 1종 이상의 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하되, 세포 또는 대상체는 작용제가 세포 또는 대상체로 흡수되는 조건 하에서 접촉되어야 한다.
- [0048] 본 출원은 또한 본 출원의 하나 이상의 덴드론 또는 본 출원의 1종 이상의 조성물을 포함하는 키트를 포함한다.

**도면의 간단한 설명**

- [0049] 이제 본 출원의 특정 실시형태가 첨부된 도면을 참조하여 더 자세히 설명될 것이며, 여기서
  - 도 1은 본 출원의 예시적인 덴드론의 일반적인 개략도를 나타내며, 여기서 각각의  $L^1$ 은 동일하거나 상이할 수 있는 링커기이고, 각각의  $X^n$ 은 H, 말단기 또는 추가 반복  $L^n(X^n)_2$ 기이며, 이것은 동일하거나 상이할 수 있고 n은 세대 번호, 예를 들어, 1, 2, 3, 4 또는 5이다. 상단의 빗금이 있는 상자는 덴드론의 자가 조립 및 분해 가능 영역을 나타내고, 그 다음 빗금이 있는 상자는 이온화 가능한 전하 영역을 나타내는데, 이것은, 핵산과 같은 결합체를 위한 것이며, 하단의 빗금이 있는 타원형은 초점기(Focal Group)이다.
  - 도 2는 C57BL/6 마우스에서 파이어플라이 루시퍼라제 mRNA의 근육내 전달을 위한 LNP의 함량 및 그 비율 및 LNP의 스크리닝을 나타낸 개략도이다.
  - 도 3a 내지 도 3e는 알킬화 방법의 비교를 나타낸다: **a)** 환원성 아민화(I-18) 또는 에폭사이드-개환(I-1)을 통해서 알킬화된 예시적인 이온화 가능한 지질의 화학 구조; **b)** SM-102(●, 상단 줄), I-1 (▼, 중간 줄) 및 I-18 (▲, 하단 줄)의 주사 후 6, 24, 48 및 96시간에 C57BL/6 마우스의 뒷다리 근육에서의 총 발광 플럭스(평균 ± s.d., n=4 뒷다리, \*\* p<0.01, 언페어드 양측 t 검정(unpaired two-tailed t-test)); **c)** I-1(▼) 및 SM-102(●) 및 I-18(▲)에 대한 6-(p-톨루이디노)-2-나프탈렌설폰산(TNS) 검정으로부터의 결과; **d)** I-1(▼) 및 SM-102(●) 및 I-18(▲)에 대한 강도에 의한 나노입자 크기 분포; 및 **e)** 크기 분포, PDI, EE 및 pKa의 결과를 나타낸 SM-102, I-1 및 I-18에 대한 LNP 특징규명의 요약.
  - 도 4a 내지 도 4e는 알킬 꼬리 길이(기  $X^1$ )의 비교를 나타낸다; **a)** 10개(I-26) 또는 15개(I-25)의 탄소 꼬리를 갖는 에폭사이드-개환을 통해 알킬화된 예시적인 이온화 가능한 지질의 화학 구조; **b)** (왼쪽에서 오른쪽으로) I-1, I-26 및 I-25의 주사 후 6시간에 C57BL/6 마우스의 뒷다리 근육의 총 발광 플럭스(평균 ± s.d., n=4 또는 5 뒷다리); **c)** I-25(▲), I-1(●) 및 I-26(▼)에 대한 TNS 검정 결과; **d)** I-25(▲), I-1(●) 및 I-26(▼)의 나노입자 크기 분포; 및 **e)** 크기 분포, PDI, EE 및 pKa의 결과를 나타낸 I-1, I-26 및 I-25에 대한 LNP 특징규명 요약.
  - 도 5a 내지 도 5e는 링커 길이(기  $L^1$ )의 비교를 나타낸다; **a)** 3-탄소 링커를 갖는 예시적인 이온화 가능한 지질의 화학 구조(I-27); **b)** I-26(●) 및 I-27(▲)의 주사 후 6시간에 C57BL/6 마우스의 뒷다리 근육의 총 발광 플럭스(평균 ± s.d., n=4 또는 6 뒷다리, \*\* p<0.01, 언페어드 양측 t 검정); **c)** I-26(●) 및 I-27(▲)에 대한 TNS 검정 결과; **d)** I-27(▲) 및 I-26(●)에 대한 나노입자 크기 분포; 및 **e)** 크기 분포, PDI, EE 및 pKa의 결과를 나타낸 I-26 및 I-27에 대한 LNP 특징규명의 요약.

도 6a 내지 도 6f는 코어(기 R<sup>1</sup>)에 하이드록실기를 추가한 효과를 나타낸다; **a)** 에탄올아민(I-28) 또는 프로판올아민(I-29) 코어를 갖는 예시적인 이온화 가능 지질의 화학 구조; **b)** (왼쪽에서 오른쪽으로) 비교 화합물 SM-102 및 예시적인 I-27, I-28 및 I-29를 사용하여 비변형 mRNA가 주사된 C57BL/6 마우스의 뒷다리 근육의 총 발광 플럭스(평균±s.d., n=8 또는 10 뒷다리, \*\* p<0.01, \* p<0.05, ns=유의하지 않음, 언페어드 양측 t 검정); **c)** 비교 화합물 SM-102(왼쪽) 및 예시적인 I-28(오른쪽)을 사용하여 변형된 mRNA가 주사된 C57BL/6 마우스의 뒷다리 근육의 총 발광 플럭스(평균±sd, n=4, ns=유의하지 않음, 언페어드 양측 t 검정); **d)** SM-102(●), I-27(▲), I-28(▼) 및 I-29(◆)에 대한 TNS 검정 결과; **e)** SM-102(●), I-27(▲), I-28(▼) 및 I-29에 대한 나노입자 크기 분포; 및 **f)** 크기 분포, PDI, EE 및 pKa의 결과를 나타낸 SM-102, I-27, I-28 및 I-29에 대한 LNP 특징규명의 요약.

도 7a 내지 도 7f는 SM-102 및 예시적인 I-28-LNP의 형태 및 입자당 및 mRNA 카피를 도시한다: **a)** SM-102 LNP의 CryoTEM 영상, 스케일 바=200nm; **b)** 예시적인 I-28 LNP의 CryoTEM 영상, 스케일 바 = 200nm; **c)** 비교 화합물 SM-102(●) 및 예시적인 I-28(▲)의 나노입자 크기 분포; **d)** 비교 화합물 SM-102(왼쪽 열) 및 예시적인 I-28(오른쪽 열)에 대한 총 지질 대 RNA 질량 비율; **e)** 비교 화합물 SM-102(왼쪽 열) 및 예시적인 I-28(오른쪽 열)에 대한 입자당 예측된 mRNA 카피 수(평균); 및 **f)** 비교 화합물 SM-102(왼쪽 열) 및 예시적인 I-28(오른쪽 열)에 대한 입자당 측정된 mRNA 카피 수.

도 8a 내지 도 8c는 트랜스제닉 마우스에서의 근육내 유전자 편집을 도시한다; **a)** tdTomato의 발현을 가능하게 하기 위한 CRISPR-cas9 시스템에 의한 삼중 STOP 카세트의 제거를 설명하는 방법을 도시한 개략도; **b)** IVIS 스펙트럼(535nm/600nm)에 캡처된 Ai9 마우스의 뒷다리 근육의 TdTomato 형광, 왼쪽 다리는 식염수로 처리하고 오른쪽 다리는 예시적인 I-28 LNP로 처리하였음. 그리고 **c)** 식염수(왼쪽) 및 예시적인 I-28 LNP(오른쪽)로 처리된 뒷다리 근육의 TdTomato 형광(535nm/600nm)(평균 ± SD, n=4 뒷다리, \*\* p<0.01, 언페어드 양측 t 검정). **d)** CRISPR-cas9 I-28 LNP로 처리한 후 Ai9 마우스 뒷다리 근육의 조직학적 및 공초점 현미경 분석(하단 행). 인산염 완충 식염수(PBS)는 음성 대조군(상단 행)으로 사용되었다. tdTomato 열(왼쪽)에서 I-28로 처리는 tdTomato 신호(흰색)를 나타내는데, 이는 성공적인 유전자 편집을 확인해 준다. 핵 염색(DAPI, 중간 열)은 핵을 흰색으로 나타낸다. tdTomato 및 DAPI 신호를 오른쪽 열에 병합한다.

도 9는 식염수(오른쪽 막대)와 비교하여 비교 화합물 SM-102(왼쪽 막대) 및 예시적인 I-28-LNP(중간 막대)에 대한 IL-6 반응을 나타낸다: 주사 6시간 후 C57BL/6 마우스의 드레이닝 림프절에서 IL-6 농도(pg/mg 총 단백질)(평균 ± sd, n=3, ns=유의하지 않음, 언페어드 양측 t 검정).

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0050] 정의
- [0051] 달리 제시되지 않는 한, 본 섹션 및 다른 섹션에 기재된 정의 및 실시형태는 당업자가 이해하는 바와 같이 적합한 본 명세서에 기재된 본 출원의 모든 실시형태 및 양상에 적용 가능하도록 의도된다.
- [0052] 청구범위, 요약 및 도면을 포함하여 본 명세서에 개시된 모든 특징부 및 개시된 임의의 방법 또는 공정의 모든 단계는 이러한 특징부 및/또는 단계 중 적어도 일부가 상호 배타적인 조합을 제외하고는 임의의 조합으로 조합될 수 있다. 청구범위, 요약 및 도면을 포함하여 본 명세서에 개시된 각각의 특징은 달리 명시적으로 언급되지 않는 한 동일하거나 동등하거나 유사한 목적을 제공하는 대체 특징으로 대체될 수 있다.
- [0053] 본 출원 및 청구범위(들)에 사용되는 바와 같이, 단어 "포함하는"(및 "포함하다"와 같은 포함하는 임의의 형태), "갖는"(및 "가지다"와 같은 갖는 임의의 형태), "포함하는"(및 "포함하다"와 같은 포함의 임의의 형태) 또는 "함유하는"(및 "함유하다"와 같은 함유하는 모든 형태)는 포괄적이거나 개방적이며, 인용되지 않은 추가 요소 또는 공정 단계를 제외하지 않는다.
- [0054] 본 명세서에서 사용된 바와 같은 용어 "이루어진" 및 이의 파생어는 언급된 특징부, 요소, 성분, 그룹, 정수 및/또는 단계의 존재를 명시하고 또한 언급되지 않은 다른 특징부, 요소, 성분, 그룹, 정수 및/또는 단계의 존재를 또한 배제하는 폐쇄적 용어로 의도된다.
- [0055] 본 명세서에서 사용된 바와 같은 용어 "본질적으로 이루어진"은 언급된 특징부, 요소, 성분, 그룹, 정수 및/또는 단계의 존재뿐만 아니라 이러한 특징부, 요소, 성분, 그룹, 정수 및/또는 단계의 기본적으로 새로운

특징(들)에 실질적으로 영향을 미치지 않는 것을 지정하도록 의도된다.

- [0056] 본 명세서에서 사용된 바와 같은 용어 "약", "대체로" 및 "대략"은 최종 결과가 크게 변경되지 않도록 수식된 용어의 합리적인 정도의 편차를 의미한다. 이러한 정도의 용어는 이러한 편차가 그것이 수식하는 단어의 의미를 부정하지 않거나 문맥이 당업자에게 달리 암시하지 않는 한 수식된 용어의 적어도  $\pm 5\%$ 의 편차를 포함하는 것으로 해석되어야 한다.
- [0057] 본 출원에 사용되는 바와 같이, 단수형은 그 문맥이 달리 명시하지 않는 한 복수형을 포함한다. 예를 들어, "화합물"을 포함하는 실시형태는 하나의 화합물, 또는 둘 이상의 추가 화합물을 갖는 특정 양상을 제시하는 것으로 이해되어야 한다.
- [0058] 추가 또는 제2 화합물과 같은 "추가" 또는 "제2" 성분 또는 효과를 포함하는 실시형태에서, 본 명세서에 사용된 바와 같은 제2 화합물은 다른 화합물 또는 제1 화합물과 상이하다. "제3" 화합물은 나머지, 제1 및 제2 화합물과 상이하며, 추가로 열거된 또는 "추가" 화합물도 유사하게 상이하다.
- [0059] "1개 이상의" 분자 또는 물질이 언급되는 경우(예컨대, 하나 이상의 텐드론), 이는 분자 또는 물질의 "유형" 또는 "아이덴티티"와 관련이 있는 것으로 이해된다. 따라서 "제2" 분자 또는 물질은 하나 또는 제1 분자 또는 물질과 상이하다. 유사하게, "제3" 분자 또는 물질은 하나의, 제1 및 제2 분자 또는 물질과 상이하며, 추가로 열거되거나 "추가" 분자 또는 물질도 유사하게 상이하다.
- [0060] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "및/또는"은 열거된 항목이 개별적으로 또는 조합하여 존재하거나 사용된다는 것을 의미한다. 실제로 이 용어는 열거된 항목 중 "하나 이상" 또는 "하나 이상"이 사용되거나 존재함을 의미한다. 예를 들어, 이의 염 및/또는 용매화물과 관련하여 용어 "및/또는"은 본 출원의 화합물이 개별 염 및 수화물뿐만 아니라 예를 들어, 본 출원의 화합물의 용매화물의 염의 조합으로도 존재함을 의미한다.
- [0061] 본 명세서에서 사용된 바와 같은 용어 "본 출원의 텐드론" 또는 "본 출원의 텐드론" 등은 화학식 I의 텐드론 및 이의 염 및/또는 용매화물을 지칭한다.
- [0062] 본 명세서에서 사용된 바와 같은 용어 "본 출원의 조성물" 또는 "본 출원의 조성물" 등은 본 출원의 하나 이상의 텐드론을 포함하는 조성물을 지칭한다.
- [0063] 본 명세서에 사용된 바와 같은 용어 "적합한"은 특정 화합물 또는 조건의 선택이 수행될 특정 합성 조작, 형질 전환될 분자(들)의 아이덴티티 및/또는 해당 화합물에 대한 특정 용도에 따라 달라질 것임을 의미하지만, 이러한 선택은 당업자의 기술 범위 내에 있을 것이다.
- [0064] 본 설명은 당업자가 사용하는 다수의 화학 용어 및 약어를 언급한다. 그럼에도 불구하고, 명확성 및 일관성을 위해 선택된 용어의 정의가 제공된다.
- [0065] 본 명세서에 사용된 바와 같은 용어 "보호기" 또는 "PG" 등은 분자의 상이한 부분을 조작하거나 반응시키는 동안 분자의 반응성 부분에서의 부반응을 방지하기 위해 분자의 반응성 부분을 보호하거나 차폐하는 화학적 모이 어티를 지칭한다. 조작 또는 반응이 완료된 후, 보호기는 분자의 나머지 부분이 분해되거나 절단되지 않는 조건 하에서 제거된다. 적합한 보호기의 선택은 당업자에 의해 이루어질 수 있다. 예를 들어, 문헌["Protective Groups in Organic Chemistry" McOmie, J.F.W. Ed., Plenum Press, 1973, Greene, T.W. and Wuts, P.G.M., "Protective Groups in Organic Synthesis", John Wiley & Sons, 3<sup>rd</sup> Edition, 1999 및 Kocienski, P. Protecting Groups, 3rd Edition, 2003, Georg Thieme Verlag (The Americas)].
- [0066] 본 명세서에서 사용된 바와 같은 용어 "불활성 유기 용매"는 일반적으로 임의의 주어진 반응에서 함께 조합될 화합물에 존재하는 작용기와 반응하지 않는 것으로 간주되어 목적하는 합성 변형을 방해하거나 저해하지 않는 용매를 지칭한다. 유기 용매는 전형적으로 비극성이며 수용액에 용해되지 않는 화합물을 용해한다.
- [0067] 본 명세서에 사용된 바와 같은 용어 "알킬"은 단독으로 사용되는 또는 다른 기의 일부로 사용되는 직쇄형 또는 분지쇄형, 포화 알킬기를 의미한다. 언급된 알킬기에서 가능한 탄소 원자의 수는 접두사 " $C_{n1-n2}$ "로 표시된다. 예를 들어, 용어  $C_{1-10}$ 알킬은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 탄소 원자를 갖는 알킬기를 의미한다. 달리 명시되지 않는 한, 모든 알킬기는 선택적으로 플루오로 치환된다.
- [0068] 단독으로 사용되거나 또 다른 기의 일부로서 사용되는 용어 "알킬렌"은 직쇄 형태는 분지쇄형, 포화 알킬렌기, 즉, 단부 중 2개에 치환체를 함유하는 포화 탄소 체를 의미한다. 언급된 알킬렌기에서 가능한 탄소 원자의 수는

접두사 " $C_{n_1-n_2}$ "로 표시된다. 예를 들어, 용어  $C_{1-6}$ 알킬은 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 탄소 원자를 갖는 알킬기를 의미한다. 달리 명시되지 않는 한, 모든 알킬렌기는 선택적으로 플루오로 치환된다.

[0069] 본 명세서에 사용된 바와 같은 용어 "알켄일"은 단독으로 사용되는 또는 다른 기의 일부로 사용되든 적어도 하나의 이중 결합을 함유하는 직쇄형 또는 분지쇄형, 불포화 알킬기를 의미한다. 언급된 알킬렌기에서 가능한 탄소 원자의 수는 접두사 " $C_{n_1-n_2}$ "로 표시된다. 예를 들어, 용어  $C_{2-6}$ 알켄일은 2, 3, 4, 5 또는 6개의 탄소 원자 및 적어도 하나의 이중 결합을 갖는 알켄일을 의미한다. 달리 명시되지 않는 한, 모든 알켄일기는 선택적으로 플루오로 치환된다.

[0070] 본 명세서에 사용된 바와 같은 용어 "알킨일"은 단독으로 사용되는 또는 다른 기의 일부로 사용되든 적어도 하나의 삼중 결합을 함유하는 직쇄형 또는 분지쇄형, 불포화 알킨일기를 의미한다. 언급된 알킬기에서 가능한 탄소 원자의 수는 접두사 " $C_{n_1-n_2}$ "로 표시된다. 예를 들어, 용어  $C_{2-6}$ 알킨일은 2, 3, 4, 5 또는 6개의 탄소 원자를 갖는 알킨일기를 의미한다.

[0071] 본 명세서에서 사용된 바와 같은 용어 "아릴"은 단독으로 사용되든 또는 다른 기의 일부로 사용되든 고리 원자가 모두 탄소인 1가 불포화 방향족 기를 지칭한다. 아릴기는 6개 이상의 탄소 원자를 포함할 수 있다. 달리 명시되지 않는 한, 모든 아릴기는 선택적으로 플루오로 치환된다.

[0072] 본 명세서에 사용된 바와 같은 용어 "사이클로알킬"은 단독으로 사용되는 또는 다른 기의 일부로 사용되든 하나 이상의 고리를 함유하는 포화 탄소환식기를 의미한다. 언급된 사이클로알킬기에서 가능한 탄소 원자의 수는 수치 접두사 " $C_{n_1-n_2}$ "로 표시된다. 예를 들어, 용어  $C_{3-10}$ 사이클로알킬은 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 탄소 원자를 갖는 사이클로알킬기를 의미한다. 달리 명시되지 않는 한, 모든 사이클로알킬기는 선택적으로 플루오로 치환된다.

[0073] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "헤테로아릴"은 단독으로 사용되든 또는 다른 기의 일부로 사용되든, 원자 중 하나 이상이 O, S 및 N으로부터 선택된 헤테로원자인 적어도 하나의 헤테로방향족 고리를 함유하는 환식 기를 지칭한다. 헤테로아릴기가 접두사  $C_{n_1-n_2}$ 를 함유하는 경우 이 접두사는 고리 원자 중 하나 이상, 적합하게는 1 내지 5개가 상기에 정의된 바와 같은 헤테로원자로 대체된 상응하는 탄소환식기 내의 탄소 원자의 수를 나타낸다. 달리 명시되지 않는 한, 모든 헤테로아릴기는 선택적으로 플루오로 치환된다.

[0074] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "헤테로사이클로알킬"은 단독으로 사용되든 또는 다른 기의 일부로 사용되든, 원자 중 하나 이상이 O, S 및 N으로부터 선택된 헤테로원자인 적어도 하나의 비방향족 고리를 함유하는 환식 기를 지칭한다. 헤테로사이클로알킬기는 포화되거나 불포화된다(즉, 하나 이상의 이중 결합을 함유함). 헤테로사이클로알킬기가 접두사  $C_{n_1-n_2}$ 를 함유하는 경우 이 접두사는 고리 원자 중 하나 이상, 적합하게는 1 내지 5개가 상기에 정의된 바와 같은 헤테로원자로 대체된 상응하는 탄소환식기 내의 탄소 원자의 수를 나타낸다. 달리 명시되지 않는 한, 모든 헤테로사이클로알킬기는 선택적으로 플루오로 치환된다.

[0075] 용어 "플루오로 치환된"은 언급된 기의 이용 가능한 수소 모두를 포함하여 하나 이상의 이용 가능한 수소의 치환을 지칭한다.

[0076] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "할로" 또는 "할로겐"은 단독으로 사용되든 또는 다른 기의 일부로 사용되든, 할로젠 원자를 지칭하며 플루오로, 클로로, 브로모 및 아이오도를 포함한다.

[0077] 결합을 가로질러 수직으로 그릴 때 기호 " $\sim$ "는 기의 부착 지점을 나타낸다.

[0078] "이용 가능한 수소 원자" 또는 "이용 가능한 원자"에서와 같이 용어 "이용 가능한"은 치환체, 예컨대, 플루오린 원자에 의해 대체될 수 있는 것으로 당업자에게 공지된 원자를 지칭한다.

[0079] 본 출원의 화합물 및 이의 모든 실시형태에서 모든 이용 가능한 수소 원자는 달리 명시되지 않는 한 플루오린 원자로 선택적으로 치환된다는 것이 분명하다.

[0080] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "세포"는 단일 세포 또는 복수의 세포를 지칭하며, 세포 배양물 또는 대상체 내의 세포를 포함한다.

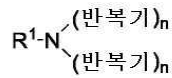
[0081] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "대상체"는 본 출원의 조성물을 사용하여 하나 이상의 작용제를 전달하기 위한 임의의 표적을 지칭한다. 대상체는 동물계와 식물계의 모든 구성원을 포함하는 살아있는 대상체일 수도

있고 무생물일 수도 있다. 따라서, 본 출원의 방법 및 용도는 인간 요법, 수의학 요법, 식물 적용 및 물질 처리에 적용 가능하다.

- [0082] 용어 "약제학적으로 허용 가능한"은 대상체, 예를 들어, 인간의 치료에 적합함을 의미한다.
- [0083] 용어 "약제학적으로 허용 가능한 담체"는 약제학적 조성물, 즉 대상체에게 투여할 수 있는 투여 형태를 형성하기 위해 활성 성분과 혼합되는 무독성 용매, 분산제, 부형제, 아주반트 또는 다른 물질을 의미한다.
- [0084] 용어 "약제학적으로 허용 가능한 염"은 대상체의 치료에 적합하거나 양립 가능한 산 부가염 또는 염기 부가염을 의미한다.
- [0085] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "용매화물"은 적합한 용매의 분자가 결정 격자에 혼입된 화합물 또는 화합물의 염 및/또는 전구약물을 의미한다. 적합한 용매는 투여된 투여량에서 생리학적으로 허용 가능하다.
- [0086] 본 명세서에 사용되고 당업계에서 잘 이해되는 용어 "치료하는" 또는 "치료"는 임상 결과를 포함하여 유익하거나 원하는 결과를 얻기 위한 접근법을 의미한다. 유익하거나 원하는 임상 결과는 검출 가능 여부에 관계 없이 하나 이상의 증상 또는 병태의 완화 또는 개선, 질환 정도의 감소, 질환의 안정화된(즉, 악화되지 않는) 상태, 질환 확산 예방, 질환 진행의 지연 또는 둔화, 질환 상태의 개선 또는 경감, 질환 재발의 감소 및 완화를 포함할 수 있지만 이들로 제한되지 않는다. "치료하는" 및 "치료"는 치료를 받지 않을 경우 예상되는 생존 기간과 비교하여 생존 기간을 연장하는 것을 의미할 수도 있다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 "치료하는" 및 "치료"는 예방적 치료를 또한 포함한다. 예를 들어, 초기 암을 갖는 대상체는 진행을 방지하기 위해 치료될 수 있거나, 대안적으로 차도가 있는 대상체는 재발을 방지하기 위해 본 출원의 화합물 또는 조성물로 치료될 수 있다. 치료 방법은 대상체에게 치료적 유효량의 하나 이상의 본 출원의 화합물 또는 조성물을 투여하는 단계를 포함하고, 선택적으로 단일 투여로 이루어지거나 대안적으로 일련의 투여를 포함한다.
- [0087] 질환 또는 장애를 "경감시키는"은 장애를 치료하지 않는 것과 비교하여 장애 또는 질환 상태의 정도 및/또는 바람직하지 않은 임상 징후가 감소되고/되거나 진행의 시간 경과가 느려지거나 길어지는 것을 의미한다.
- [0088] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "예방" 또는 "예방학" 또는 이와 동의어는 환자가 질환, 장애 또는 병태에 걸릴 위험 또는 확률의 감소를 지칭한다.
- [0089] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "유효량" 또는 "치료적 유효량"은 원하는 결과를 달성하는 데 필요한 투여량에서 그리고 그 기간 동안 효과적인 본 출원의 화합물 또는 하나 이상의 화합물, 또는 본 출원의 조성물 또는 하나 이상의 조성물의 양을 의미한다.
- [0090] "저해, 차단 및/또는 파괴"는 화합물 또는 조성물의 부재를 제외하고는 동일한 조건과 비교하여 화합물 또는 조성물의 존재 하에 임의의 검출 가능한 저해, 차단 및/또는 파괴를 의미한다.
- [0091] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "투여된"은 치료적 유효량의 본 출원의 화합물 또는 하나 이상의 화합물, 또는 본 출원의 조성물 또는 하나 이상의 조성물을 생체내, 시험관내 또는 생체외에서 세포, 조직 또는 기관에 투여하는 것을 의미한다.
- [0092] 용어 "캡슐화 효율"은 나노입자 내부에 갇힌 나노입자와 같은 입자에 캡슐화되는 작용제의 분율을 지칭한다.
- [0093] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "나노입자", "나노입자" 또는 이의 변형은 크기가 나노미터 스케일로 측정되는 입자를 의미하도록 의도된다.
- [0094] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "콜로이드"는 미세하게 분산된 불용성 입자가 다른 물질, 일반적으로 액체 전체에 현탁된 혼합물을 의미한다.
- [0095] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "초분자 구조체"는 비공유 결합에 의해 함께 결합된 분자의 복합체를 지칭한다.
- [0096] 본 출원의 덴드론 및 조성물
- [0097] 폴리(아미도아민)(PAMAM) 덴드론과 같은 다중 아민 구조는 반복되는 아민 및 아마이드 단위를 함유하는 연속 세대로 단방향으로 분지화되는 코어 아민기를 포함하는 생체 적합성 물질이다. 폴리(아미도아민) PAMAM 덴드론과 같은 다중 아민 구조는 기능을 변경하거나 개선하기 위해 화학적으로 변형될 수 있다.
- [0098] 폴리(아미도아민) PAMAM 덴드론과 같은 기본 다중 아민 구조에 대한 다양한 구조적 변형이 가능하다. 이러한 변형은 폴리(아미도아민) PAMAM 덴드론과 같은 다중 아민 구조의 효능을 향상시키고 독성을 줄이는 것을 목표로

한다. 질소를 함유하는 변형된 덴드론은 다작용성이며, 별도의 구조적 모티프가 상이한 역할을 수행하여 전체적인 음전하를 갖는 핵산 및 다른 작용제를 효과적으로 전달한다. 예를 들어, 구조 내의 질소 함유 3차 아민은 낮은 pH에서 양성자화되어 양이온이 된다. 이러한 이온화 가능한 양이온은 예를 들어, 핵산의 당-인산염 골격을 따라 음전하와 상호 작용하여 전달 물질이 이의 카고에 결합하여 나노입자로 자가 조립되도록 한다. 아마이드는 생분해성을 향상시키고 전달 물질의 독성을 감소시킨다. 소수성 꼬리는 전달 물질이 핵산에 결합되면 전달 물질의 자가 조립을 촉진한다. 이황화물, 에스터, 티오에스터, 카바메이트, 유레아, 이민, 엔아민, 케톤 또는 다른 가수분해성기가 선택적으로 포함되어 핵산 카고의 방출을 제어하고 생분해성을 향상시킬 수 있다. 불포화, 플루오린화, 입체 장애형 또는 유연성이 없는기를 포함하면 각각의 나노입자 내에서 자가 조립 및 패키징이 변경된다.

[0099] 따라서, 본 출원은 하기 화학식 I의 덴드론, 또는 이의 염 및/또는 용매화물을 포함한다:



[0100]

(I)

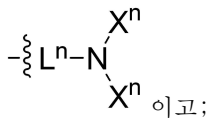
[0101]

상기 식에서,

[0102]

각각의 반복기는 동일하거나 상이하고,

[0103]



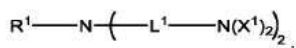
[0104]

n은 1, 2, 3, 4 또는 5이고, 각각의  $L^n$  및 각각의  $X^n$ 은 동일하거나 상이하고, n에 대한 값에 따라서 하기에 정의된 바와 같고;

[0105]

n이 1인 경우, 상기 덴드론은 1세대 덴드론이고 화학식 I의 화합물은 하기 구조를 갖고:

[0106]



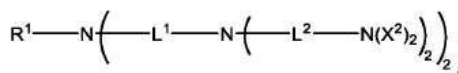
[0107]

각각의  $X^1$ 은 동일하거나 상이하고, H 또는 말단기이되, 단, 적어도 하나의  $X^1$ 은 말단기이고, 각각의  $L^1$ 은 동일하거나 상이하고, 연결기이며;

[0108]

n이 2인 경우, 상기 덴드론은 2세대 덴드론이고 화학식 I의 화합물은 하기 구조를 갖고:

[0109]



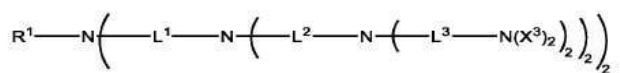
[0110]

각각의  $X^2$ 는 동일하거나 상이하고, H 또는 말단기이되, 단, 적어도 하나의  $X^2$ 는 말단기이고, 각각의  $L^1$  및 각각의  $L^2$ 는 동일하거나 상이하고, 연결기이며;

[0111]

n이 3인 경우, 상기 덴드론은 3세대 덴드론이고 화학식 I의 화합물은 하기 구조를 갖고:

[0112]

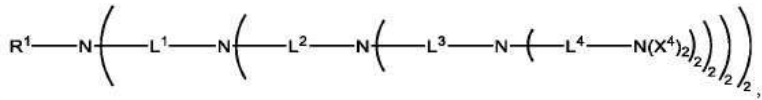


[0113]

각각의  $X^3$ 는 동일하거나 상이하고, H 또는 말단기이되, 단, 적어도 하나의  $X^3$ 는 말단기이고, 각각의  $L^1$ , 각각의  $L^2$  및 각각의  $L^3$ 는 동일하거나 상이하고, 연결기이며;

[0114]

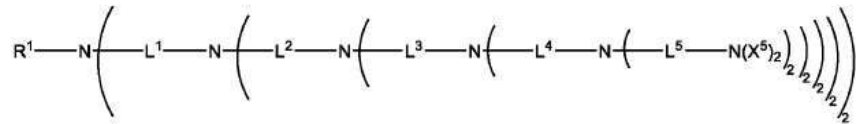
[0115] n이 4인 경우, 상기 덴드론은 4세대 덴드론이고 화학식 I의 화합물은 하기 구조를 갖고:



[0116]

[0117] 각각의  $X^4$ 는 동일하거나 상이하고, H 또는 말단기이되, 단, 적어도 하나의  $X^4$ 는 말단기이고, 각각의  $L^1$ , 각각의  $L^2$ , 각각의  $L^3$  및 각각의  $L^4$ 는 동일하거나 상이하고, 연결기이며;

[0118] n이 5인 경우, 상기 덴드론은 5세대 덴드론이고 화학식 I의 화합물은 하기 구조를 갖고:



[0119]

[0120] 각각의  $X^5$ 는 동일하거나 상이하고, H 또는 말단기이되, 단, 적어도 하나의  $X^5$ 는 말단기이고, 각각의  $L^1$ , 각각의  $L^2$ , 각각의  $L^3$ , 각각의  $L^4$  및 각각의  $L^5$ 는 동일하거나 상이하고, 연결기이며;

[0121]  $R^1$ 은  $C_{1-20}$ 알킬,  $C_{2-20}$ 알켄일,  $C_{2-20}$ 알킨일,  $C_{1-20}$ 알킬렌아릴,  $C_{1-20}$ 알킬렌헤테로아릴,  $C_{1-20}$ 알킬렌 $C_{3-8}$ 헤테로사이클로알킬,  $C_{1-20}$ 알킬렌 $C_{3-8}$ 사이클로알킬 및  $C_{1-6}$ 알킬렌-S-S- $C_{1-6}$ 알킬로부터 선택되고, 이들 각각은 비치환되거나 또는 할로, OH,  $OC_{1-20}$ 알킬,  $C(O)OC_{1-20}$ 알킬 및  $NR^2R^{2'}$  중 하나 이상으로 치환되고, 상기 아릴, 헤테로아릴, 헤테로사이클로알킬 및 사이클로알킬기는 추가로 하나 이상의  $C_{1-10}$ 알킬로 선택적으로 치환되고;

[0122]  $R^2$  및  $R^{2'}$ 는 독립적으로 H 및  $C_{1-10}$ 알킬로부터 선택되며;

[0123] 링커기는  $C_{1-20}$  알킬렌 또는  $C_{2-20}$  알켄일렌을 포함하되, 이들 각각에는 S, S-S, O, NH,  $N(C_{1-4}$ 알킬),  $C(O)$ ,  $C(O)O$ ,  $OC(O)$ ,  $C(O)NH$ ,  $NHC(O)$ ,  $NHC(NH)$ ,  $NHC(NC_{1-4}$ 알킬),  $C(NH)NH$  및  $C(NC_{1-4}$ 알킬)NH로부터 선택된 하나 이상의기가 선택적으로 개재되어 있고, 각각의 알킬, 알킬렌 및 알켄일렌은 비치환되거나 할로 및 OH 중 하나 이상으로 치환되고;

[0124] 말단기는  $C_{1-40}$ 알킬,  $C_{2-40}$ 알켄일,  $C_{1-40}$ 알킬렌아릴 및  $C_{1-40}$ 알켄일렌아릴로부터 선택되고, 각각의 알킬, 알켄일, 알킬렌 및 알켄일렌에는 S-S,  $C(O)$ ,  $OC(O)$ ,  $C(O)O$ ,  $OC(O)O$ ,  $NR^3C(O)O$ ,  $OC(O)NR^3$ ,  $C(O)S$ ,  $SC(O)$ ,  $NR^3C(O)$ ,  $C(O)NR^3$ ,  $NR^3C(O)NR^4$  및  $C(NC_{1-20}$ 알킬)로부터 선택된 하나 이상의기가 선택적으로 개재되며, 알킬, 알켄일, 알킬렌아릴 및 알켄일렌아릴은 할로,  $NR^5R^{5'}$  및 OH 중 하나 이상으로 선택적으로 치환되며; 그리고

[0125]  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$  및  $R^{5'}$ 는 독립적으로 수소 또는  $C_{1-10}$ 알킬이되;

[0126] 탄소에 결합된 모든 이용 가능한 수소 원자는 플루오린 원자에 의해서 선택적으로 대체되어 있다.

[0127] 일부 실시형태에서,  $R^1$ 은  $C_{1-10}$ 알킬,  $C_{2-10}$ 알켄일,  $C_{2-10}$ 알킨일,  $C_{1-10}$ 알킬렌Ph,  $C_{1-10}$ 알킬렌헤테로아릴,  $C_{1-10}$ 알킬렌 $C_{5-6}$ 헤테로사이클로알킬,  $C_{1-10}$ 알킬렌 $C_{5-6}$ 사이클로알킬 및  $C_{1-4}$ 알킬렌-S-S- $C_{1-4}$ 알킬로부터 선택되고, 이들 각각은 비치환되거나 OH,  $OC_{1-15}$ 알킬,  $C(O)OC_{1-15}$ 알킬 및  $NR^2R^{2'}$  중 1개 내지 4개 및/또는 1개 이상의 플루오로로 치환되고, 상기 페닐, 헤테로아릴, 헤테로사이클로알킬 및 사이클로알킬기는 추가로  $C_{1-4}$ 알킬 및  $C_{1-4}$ 플루오로알킬 중 1개 내지 4개로 선택적으로 치환되고,  $R^2$  및  $R^{2'}$ 는 H 및  $C_{1-4}$ 알킬로부터 독립적으로 선택된다.

[0128] 일부 실시형태에서,  $R^1$ 은  $C_{1-6}$ 알킬,  $C_{2-6}$ 알켄일,  $C_{2-6}$ 알킨일,  $C_{1-6}$ 알킬렌Ph,  $C_{1-6}$ 알킬렌 $C_6$ 헤테로사이클로알킬 및  $C_{1-}$

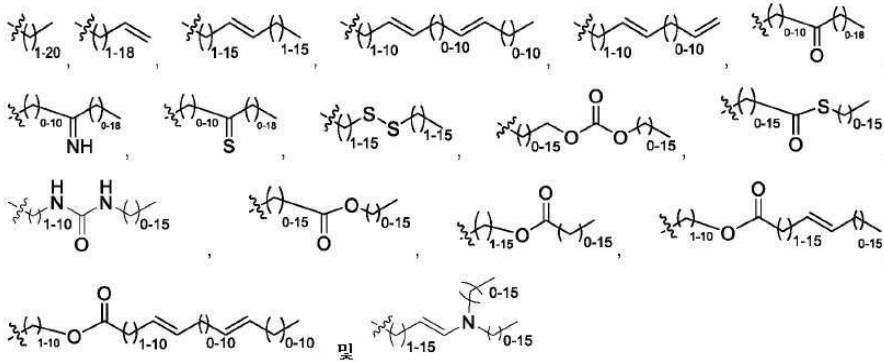


[0139] 일부 실시형태에서, 말단기는 C<sub>1-20</sub>알킬, C<sub>2-20</sub>알켄일, C<sub>1-20</sub>알킬렌아릴 및 C<sub>1-20</sub>알켄일렌아릴로부터 선택되고, 각각의 알킬, 알켄일, 알킬렌 및 알켄일렌에는 S-S, C(O), OC(O), C(O)O, OC(O)O, NR<sup>3</sup>C(O)O, OC(O)NR<sup>3</sup>, C(O)S, SC(O), NR<sup>3</sup>C(O), C(O)NR<sup>3</sup>, NR<sup>3</sup>C(O)NR<sup>4</sup> 및 C(NC<sub>1-10</sub>알킬)로부터 선택된 1개 이상의 기가 선택적으로 개재되어 있고; 상기 알킬, 알켄일, 알킬렌아릴 및 알켄일렌아릴은 1개 내지 4개의 OH 및 NR<sup>5</sup>R<sup>5'</sup>로 선택적으로 치환되고;

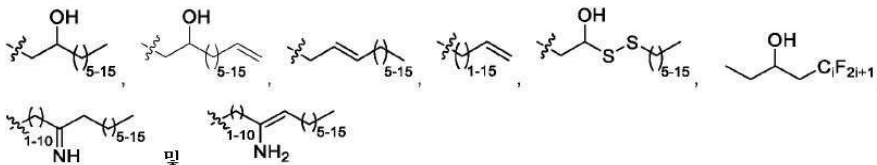
[0140] R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup> 및 R<sup>5'</sup>는 독립적으로 수소 또는 C<sub>1-10</sub>알킬이되;

[0141] 탄소에 결합된 모든 이용 가능한 수소 원자는 플루오린 원자에 의해서 선택적으로 대체되어 있다.

[0142] 일부 실시형태에서, 말단기는 하기로부터 선택된다:



[0144] 이들 각각은 1개 또는 2개의 OH, 1개 또는 2개의 NH<sub>2</sub> 및/또는 1개 이상의 플루오린으로 선택적으로 치환되며, 상기 기 내의 탄소 원자의 총수는 20개 이하이다. 일부 실시형태에서, 말단기는 하기로부터 선택된다:



[0146] 상기 식에서, i는 1 내지 10의 정수이다.

[0147] 일부 실시형태에서, 1세대 텐드론에서 각각의 X<sup>1</sup>은 말단기이고 동일하거나 상이하다. 일부 실시형태에서, 1세대 텐드론에서 각각의 X<sup>1</sup>은 말단기이고 동일하다.

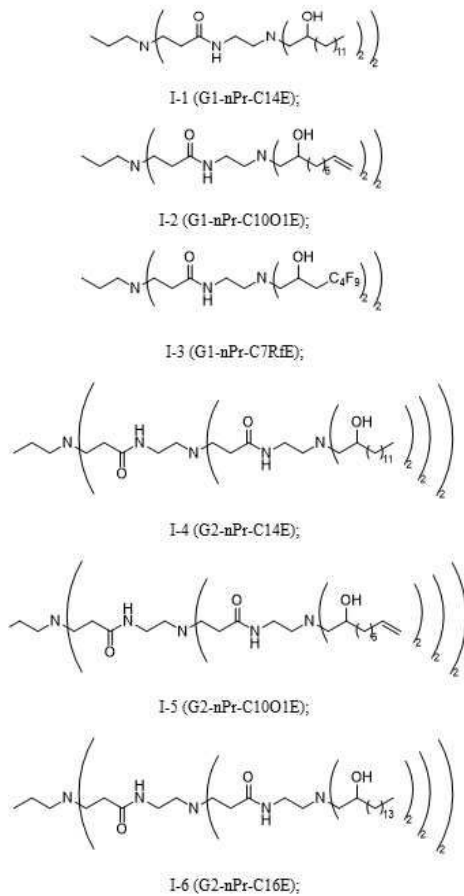
[0148] 일부 실시형태에서, 2세대 텐드론에서 X<sup>2</sup> 중 적어도 2개는 말단기이고 동일하거나 상이하다. 일부 실시형태에서, 2세대 텐드론에서 X<sup>2</sup> 중 적어도 3개는 말단기이고 동일하거나 상이하다. 일부 실시형태에서, 2세대 텐드론에서 X<sup>2</sup> 모두는 말단기이고 동일하거나 상이하다. 일부 실시형태에서, 2세대 텐드론에서 각각의 질소 상의 적어도 하나의 X<sup>2</sup>는 말단기이고, 각각의 말단기는 동일하거나 상이하다. 일부 실시형태에서, 2세대 텐드론에서 각각의 질소 상의 적어도 하나의 X<sup>2</sup>는 말단기이고, 각각의 말단기는 동일하다. 일부 실시형태에서, 2세대 텐드론에서 X<sup>2</sup> 모두는 말단기이고 동일하다.

[0149] 일부 실시형태에서, 3세대 텐드론에서 X<sup>3</sup> 중 적어도 2개는 말단기이고 동일하거나 상이하다. 일부 실시형태에서, 3세대 텐드론에서 X<sup>3</sup> 중 적어도 3개는 말단기이고 동일하거나 상이하다. 일부 실시형태에서, 3세대 텐드론에서 X<sup>3</sup> 중 적어도 4개는 말단기이고 동일하거나 상이하다. 일부 실시형태에서, 3세대 텐드론에서 X<sup>3</sup> 중 적어도 5개는 말단기이고 동일하거나 상이하다. 일부 실시형태에서, 3세대 텐드론에서 X<sup>3</sup> 중 적어도 6개는 말단기이고 동일하거나 상이하다. 일부 실시형태에서, 3세대 텐드론에서 X<sup>3</sup> 중 적어도 7개는 말단기이고 동일하거나 상이하다. 일

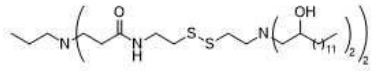


덴드론에서  $X^5$  중 적어도 22개는 말단기이고 동일하거나 상이하다. 일부 실시형태에서, 5세대 덴드론에서  $X^5$  중 적어도 23개는 말단기이고 동일하거나 상이하다. 일부 실시형태에서, 5세대 덴드론에서  $X^5$  중 적어도 24개는 말단기이고 동일하거나 상이하다. 일부 실시형태에서, 5세대 덴드론에서  $X^5$  중 적어도 25개는 말단기이고 동일하거나 상이하다. 일부 실시형태에서, 5세대 덴드론에서  $X^5$  중 적어도 26개는 말단기이고 동일하거나 상이하다. 일부 실시형태에서, 5세대 덴드론에서  $X^5$  중 적어도 27개는 말단기이고 동일하거나 상이하다. 일부 실시형태에서, 5세대 덴드론에서  $X^5$  중 적어도 28개는 말단기이고 동일하거나 상이하다. 일부 실시형태에서, 5세대 덴드론에서  $X^5$  중 적어도 29개는 말단기이고 동일하거나 상이하다. 일부 실시형태에서, 5세대 덴드론에서  $X^5$  중 적어도 30개는 말단기이고 동일하거나 상이하다. 일부 실시형태에서, 5세대 덴드론에서  $X^5$  중 적어도 31개는 말단기이고 동일하거나 상이하다. 일부 실시형태에서, 5세대 덴드론에서  $X^5$  중 적어도 32개는 말단기이고 동일하거나 상이하다. 일부 실시형태에서, 5세대 덴드론에서  $X^5$  중 적어도 33개는 말단기이고 동일하거나 상이하다. 일부 실시형태에서, 5세대 덴드론에서  $X^5$  중 적어도 34개는 말단기이고 동일하거나 상이하다. 일부 실시형태에서, 5세대 덴드론에서  $X^5$  중 적어도 35개는 말단기이고 동일하거나 상이하다. 일부 실시형태에서, 5세대 덴드론에서  $X^5$  모두는 말단기이고 동일하거나 상이하다. 일부 실시형태에서, 5세대 덴드론에서 각각의 질소 상의 적어도 하나의  $X^5$ 는 말단기이고, 각각의 말단은 동일하거나 상이하다. 일부 실시형태에서, 5세대 덴드론에서 각각의 질소 상의 적어도 하나의  $X^5$ 는 말단기이고, 각각의 말단은 동일하다. 일부 실시형태에서, 5세대 덴드론에서  $X^5$  모두는 말단기이고 동일하다.

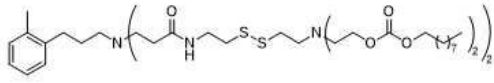
[0152] 일부 실시형태에서, 화학식 I의 덴드론은 하기로부터 선택된다:



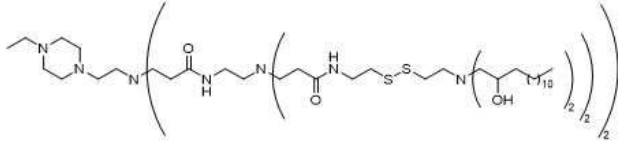
[0153]



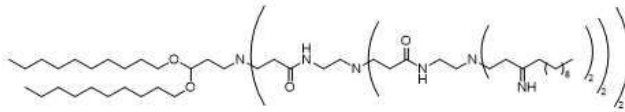
I-7 (G1-αPr-S8-C14E);



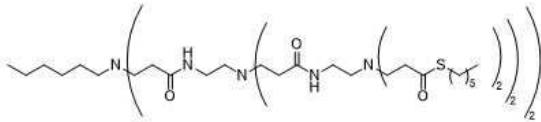
I-8 (G1-벤질-S-1);



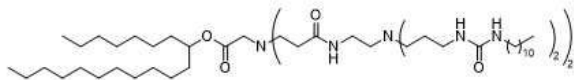
I-9 (G2-아진-S-1);



I-10 (G2-c1-아마이드-t1);

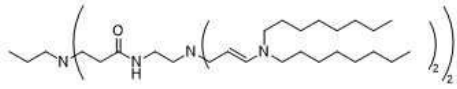


I-11(G2-c2-아마이드-t2);

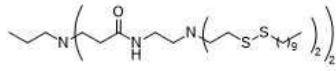


I-12 (G1-c3-아마이드-t3);

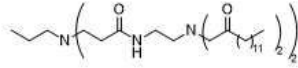
[0154]



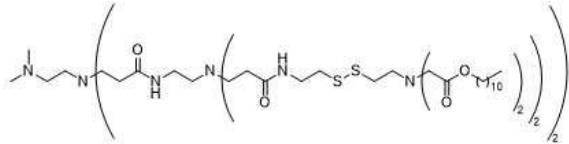
I-13 (G1-nPr-0아마이드-t4);



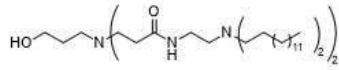
I-14 (G1-nPr-0아마이드-t5);



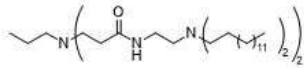
I-15 (G1-nPr-C14K);



I-16 (G2-c4-0아마이드-t7);

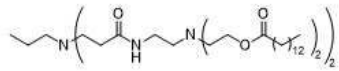


I-17 (G1-c5-0아마이드-t8);

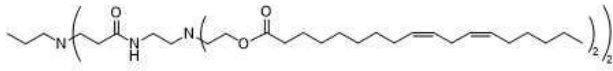


I-18 (G1-nPr-0아마이드-t9);

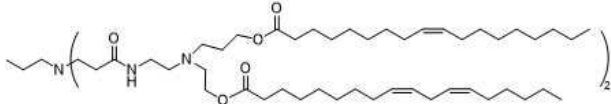
[0155]



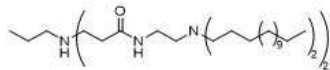
I-19 (G1-nPr-0)아미드-t10);



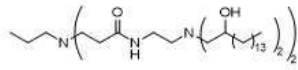
I-20 (G1-nPr-0)아미드-t11);



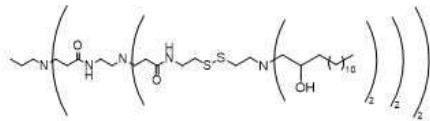
I-21 (G0-nPr-0)아미드-t12);



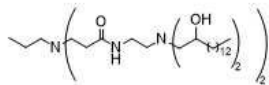
I-22 (G1-nPr-C14);



I-23 (G1-nPr-C16E);

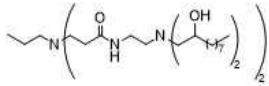


I-24 (G2-nPr-S14-C14E);

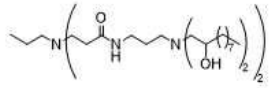


[0156]

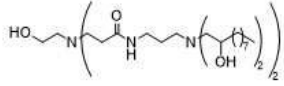
I-25 (G1-C3-K2-E15);



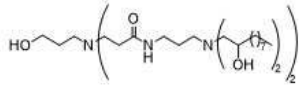
I-26 (G1-C3-K2-E10);



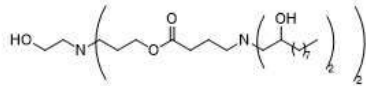
I-27 (G1-C3-K3-E10);



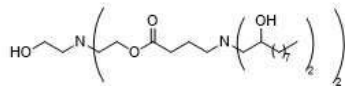
I-28 (G1-OC2-K3-E10);



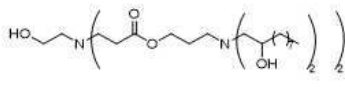
I-29 (G1-OC3-K3-E10);



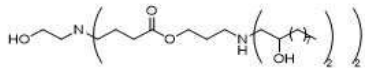
I-30 (DPA-GABA-E10);



I-31 (TPA-GABA-E10);



I-32 (BU2-S3-E10); 및



I-33 (BU3-S3-E10).

[0157]

[0158]

[0159]

[0160]

[0161]

[0162]

또는 이의 염 및/또는 용매화물.

본 출원은 또한 본 출원의 하나 이상의 텐드론을 포함하는 조성물을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 출원의 텐드론은 조성물에 나노입자로 혼입된다. 따라서 본 출원은 또한 본 출원의 하나 이상의 텐드론을 포함하는 나노입자를 포함한다. 본 출원은 또한 이들 나노입자를 포함하는 조성물을 포함한다. 일부 실시형태에서, 나노입자는 하나 이상의 텐드론의 자가 조립에 의해서 형성된다. 일부 실시형태에서, 나노입자는 2개 이상의 본 출원의 텐드론을 포함한다. 일부 실시형태에서, 나노입자는 지질 나노입자(LNP)이다.

일부 실시형태에서, LNP는 1개 이상의 이온화 가능한 지질(1개 이상의 본 출원의 텐드론), 1개 이상의 이중층 형성 지질, 1개 이상의 구조적 지질 및 1종 이상의 지질-접합된 폴리에틸렌 글리콜(PEG-지질)을 포함한다.

일부 실시형태에서, 나노입자는 200nm 이상의 최대 최장 직쇄 치수(예를 들어, 직경)를 갖는다. 일부 실시형태에서, 나노입자는 200nm 이하의 최대 최장 직쇄 치수(예를 들어, 직경)를 갖는다. 일부 실시형태에서, 나노입자는 약 150nm, 약 125nm, 약 100nm, 약 90nm, 약 80nm, 약 70nm, 약 60nm 이하의 평균 직경을 갖는다. 일부 실시형태에서, 나노입자는 50nm 이하의 평균 직경을 갖는다. 일부 실시형태에서, 나노입자는 40nm 이하, 30nm 이하, 20nm 이하, 10nm 이하 또는 5nm 이하의 평균 직경을 갖는다. 따라서, 일부 실시형태에서, 나노입자는 약 1nm 내지 약 50nm, 약 5nm 내지 약 30nm, 약 10nm 내지 약 25nm, 약 10nm 내지 약 20nm, 또는 약 15nm 내지 약 20nm의 평균 직경을 갖는다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 나노입자는 약 150nm, 약 100nm, 약 90nm, 약 80nm, 약 70nm, 약 60nm, 약 50nm, 약 40nm, 약 30nm, 약 20nm, 약 15nm, 약 10nm 또는 약 5nm의 평균 직경을 갖는다. 일부 실시형태에서, 평균 직경은 동적 광 산란 강도를 사용하여 결정된다.

- [0163] 일부 실시형태에서, 1개 이상의 본 출원의 덴드론은 콜로이드 또는 초분자 구조체를 형성한다. 따라서, 일부 실시형태에서, 본 출원은 또한 1개 이상의 본 출원의 덴드론을 포함하는 콜로이드 또는 1개 이상의 본 출원의 덴드론을 포함하는 초분자 구조체뿐만 아니라 이들 콜로이드 또는 초분자 구조체를 포함하는 조성물을 포함한다.
- [0164] 본 출원은 또한 1개 이상의 본 출원의 덴드론 및 세포 또는 대상체에게 전달될 1종 이상의 작용제를 포함하는 조성물을 포함한다. 일부 실시형태에서, 세포 또는 대상체에게 전달될 1종 이상의 작용제는 변형되지 않은 또는 변형된 핵산, 미토콘드리온, 플라스미드, PolyIC 및 관련 아주반트, 리보뉴클레오타이드, 단백질, 펩타이드, 세포, 균주, 염료, 소분자 약물 및 다른 유기 및 무기 모이어티로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 세포 또는 대상체에게 전달될 1종 이상의 작용제는 폴리뉴클레오타이드, 화학적으로 변형된 폴리뉴클레오타이드, 소분자, 생물학적 제제(biologics) 및 다른 유기 또는 무기 분자로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 세포 또는 대상체에게 전달될 1종 이상의 작용제는 염료 및 방사성표지된 화합물로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 세포 또는 대상체에게 전달될 1종 이상의 작용제는 백신이다. 일부 실시형태에서, 세포 또는 대상체에게 전달될 1종 이상의 작용제는 약물이다. 일부 실시형태에서, 세포 또는 대상체에게 전달될 1종 이상의 작용제는 페이로드라고 불린다.
- [0165] 일부 실시형태에서, 세포 또는 대상체에게 전달될 1종 이상의 작용제는 전체 음전하를 갖는다.
- [0166] 일부 실시형태에서, 세포 또는 대상체에게 전달될 1종 이상의 작용제는 1개 이상의 본 출원의 덴드론을 포함하는 나노입자, 콜로이드 또는 초분자 구조체 내에 위치된다. "내에 위치된"은 1종 이상의 작용제가 나노입자, 콜로이드 또는 초분자 구조체 내에 캡슐화되고/되거나 나노입자, 콜로이드 또는 초분자 구조체를 구성하는 하나 이상의 덴드론의 임의의 부분과 비공유 회합되는 것으로 이해된다.
- [0167] 일부 실시형태에서, 단백질 및 펩타이드는 엔도뉴클레아제, 메가뉴클레아제, 프로테아제 및 키나제로부터 선택된다.
- [0168] 일부 실시형태에서, 세포 또는 대상체에게 전달될 1종 이상의 작용제는 1종 이상의 핵산이다. 일부 실시형태에서, 1종 이상의 핵산은 짧은 간섭 RNA(예를 들어, 작은 간섭 RNA 또는 siRNA), 원형 RNA, 환식 RNA, 긴 비암호 RNA, 마이크로RNA(miRNA), 프리(pri)-miRNA, 메신저 RNA(mRNA), 클러스터 규칙적인 간격이 있는 짧은 회문 반복부(cluster regularly interspaced short palindromic repeat: CRISPR) 관련 핵산, 단일 가이드 RNA(sgRNA), CRISPR-RNA(crRNA), 트랜스-작용 crRNA(tracrRNA), 플라스미드 DNA(pDNA), 트랜스퍼 RNA(tRNA), 안티센스 올리고뉴클레오타이드(ASO), 가이드 RNA, 이중 가닥 DNA(dsDNA), 단일 가닥 DNA(ssDNA), exDNA, 프로-폼(pro-form) RNA, 단일 가닥 RNA(ssRNA) 및 이중 가닥 RNA(dsRNA)로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 1종 이상의 핵산은 siRNA, tRNA 및 핵산으로부터 선택되고, 이것은 CRISPR 과정에 사용된다. 일부 실시형태에서, 핵산은 siRNA이다. 일부 실시형태에서, CRISPR 과정에 사용되는 핵산은 클러스터 규칙적인 간격이 있는 짧은 회문 반복부(CRISPR) 관련 핵산, 단일 가이드 RNA(sgRNA), CRISPR-RNA(crRNA) 및/또는 트랜스-작용 crRNA(tracrRNA)이다. 일부 실시형태에서, 핵산은 miRNA이다. 일부 실시형태에서, 핵산은 mRNA이다. 일부 실시형태에서, 핵산은 tRNA이다. 일부 실시형태에서, 핵산은 가이드 RNA이다. 일부 실시형태에서, 가이드 RNA는 CRISPR 과정에 사용된다. 일부 실시형태에서, 핵산은 pDNA이다.
- [0169] 일부 실시형태에서 본 출원의 조성물은 유전자 편집에 사용하기 위한 것이다. 일부 실시형태에서, 이들 조성물은 cas9 mRNA 및 특정 유전자를 표적화하도록 설계된 1종 이상의 가이드 RNA(gRNA)를 포함한다. 일부 실시형태에서 이들 조성물은 DNA를 추가로 포함하거나 상동 직접 수선(homologous directed repair)을 위해서 DNA의 공동 전달을 위해서 제형화된다.
- [0170] 일부 실시형태에서 본 출원의 조성물은 유전자 침묵에 사용하기 위한 것이다. 일부 실시형태에서, 이들 조성물은 siRNA를 포함한다.
- [0171] 일부 실시형태에서, 본 출원의 조성물은 유전자 조절을 위해서 사용된다. 일부 실시형태에서, 이들 조성물은 비암호 RNA(ncRNA)를 포함한다.
- [0172] 일부 실시형태에서, 본 출원의 조성물은 유전자 발현 상향조절 또는 유전자 발현 하향조절을 위해서 사용된다. 일부 실시형태에서, 이들 조성물은 변형되지 않거나 또는 화학적으로 변형된 메신저 RNA(mRNA)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 화학적으로 변형된 mRNA는 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드를 갖는 뉴클레오타이드의 부분 또는 완전 치환을 지칭한다. 일 실시형태에서, 우리딘은 N1-메틸 슈도우리딘에 의해서 완전히 치환된다.
- [0173] 일부 실시형태에서, 본 출원의 조성물은 항바이러스 치료를 위해서 사용된다. 일부 실시형태에서, 이들 조성물

은 Ca9 단백질을 암호화하는 mRNA 및 1종 이상의 sgRNA를 포함한다. 일부 실시형태에서, 1종 이상의 sgRNA는 결실을 위한 바이러스 유전자를 식별한다.

[0174] 일부 실시형태에서, 하나 이상의 텐드론(들) 및 세포 또는 대상체에게 전달될 1종 이상의 작용제는 약 100:1 내지 약 1:5의 중량비로 존재한다. 일부 실시형태에서, 텐드론(들) 대 세포 또는 대상체에게 전달될 1종 이상의 작용제의 중량비는 약 50:1 내지 약 2:1이다. 일부 실시형태에서, 텐드론(들) 대 세포 또는 대상체에게 전달될 1종 이상의 작용제의 중량비는 25:1이다.

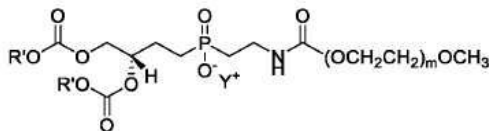
[0175] 일부 실시형태에서, 조성물은 1종 이상의 지질을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 1종 이상의 지질은 스테로이드, 스테로이드 유도체, PEG-지질 및 인지질로부터 선택된다.

[0176] 일부 실시형태에서, PEG-지질은 PEG 쇄를 사용하여 링커기에 부착된 1개 이상의 C<sub>6-24</sub>알킬 또는 C<sub>6-24</sub>알켄일기 또는 C<sub>6-24</sub> 지방산기를 함유하는 화합물이다. PEG-지질의 일부 비제한적인 예는 PEG-변형된 포스파티딜에탄올아민, PEG-변형된 포스파티드산, PEG-세라마이드 접합체, PEG-변형된 다이알킬아민, PEG-변형된 1,2-다이아실옥시프로판-3-아민, PEG-변형된 다이아실글리세롤 및/또는 다이알킬글리세롤을 포함한다.

[0177] 일부 실시형태에서, PEG-지질은 PEG-변형된 1,2-다이미리스토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민, PEG-변형된 1,2-다이스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민, PEG-변형된 1,2-다이올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민, PEG 변형된 1,2-다이미리스토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민, PEG-변형된 1,2-다이스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민, PEG-변형된 1,2-다이미리스토일-rac-글리세로-3-메톡시폴리에틸렌 글리콜 및/또는 PEG-변형된 다이스테아로일-rac-글리세롤이다.

[0178] 일부 실시형태에서, PEG는 지질의 PEG 성분의 분자량에 의해서 측정된다. 일부 실시형태에서, PEG는 약 100 내지 약 15,000의 분자량(g/mol 또는 달톤 단위)을 갖는다. 일부 실시형태에서, 분자량은 약 200 내지 약 10000, 약 400 내지 약 8000, 약 1000 내지 약 6000 또는 약 2000 내지 약 5000이다. 일부 실시형태에서, PEG의 분자량은 약 100, 200, 400, 500, 600, 800, 1,000, 1,250, 1,500, 1,750, 2,000, 2,250, 2,500, 2,750, 3,000, 3,500, 4,000, 4,500, 5,000, 6,000, 7,000, 8,000, 9,000, 10,000, 12,500, 내지 약 15,000이다. 본 발명에 사용될 수 있는 지질의 일부 비제한적인 예는 미국 특허 5,820,873, WO 2010/141069 또는 미국 특허 8,450,298 에 교시되어 있고, 이들은 본 명세서에 참조에 의해 포함된다.

[0179] 일부 실시형태에서 PEG-지질은 PEG-인지질 접합체, 예컨대, 화학식 II의 PEG화된 포스포에탄올 아민 지질이다:



(II)

[0180]

[0181] 상기 식에서,

[0182] R 는 1 또는 2개의 이중 결합을 갖는 C<sub>6-24</sub>알킬 또는 C<sub>6-24</sub>알켄일이고;

[0183] m은 20 내지 200의 정수이며; 그리고

[0184] Y는 임의의 적합한 반대 양이온이다.

[0185] 일부 실시형태에서, R 는 하나의 이중 결합을 갖는 C<sub>12-20</sub>알킬 또는 C<sub>12-20</sub>알켄일이다. 일부 실시형태에서 R 는 C<sub>14</sub>알킬, C<sub>16</sub>알킬 또는 C<sub>18</sub>알킬이거나 또는 R 는 C<sub>14</sub>알켄일, C<sub>16</sub>알켄일 또는 C<sub>18</sub>알켄일이고, 각각의 알켄일기는 하나의 이중 결합을 갖는다.

[0186] 일부 실시형태에서, m은 40 내지 120의 정수이다. 일부 실시형태에서, m은 45(PEG2000) 또는 113(PEG5000)이다.

[0187] 일부 실시형태에서, Y는 암모늄 또는 임의의 다른 적합한 반대 양이온이다.

[0188] 일부 실시형태에서, 조성물은 약 1:1 내지 약 1:400 또는 1:1 내지 약 1:250의 PEG-지질 대 텐드론의 몰비를 포

함한다. 일부 실시형태에서, 물비는 약 1:1, 1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50, 1:60, 1:70, 1:80, 1:90, 1:100, 1:110, 1:120, 1:125, 1:150, 1:175, 1:200, 1:225, 내지 약 1:250 또는 이들 내에서 유도될 수 있는 임의의 범위의 범위이다. 일부 실시형태에서 PEG-지질은 총 지질의 0 내지 50몰% 또는 이들 내에서 유도될 수 있는 임의의 범위로 존재한다. 일부 실시형태에서, PEG-지질은 0몰%, 1.5몰%, 3몰%, 10몰%, 15몰%, 20몰% 또는 40몰% 또는 이들 내에서 유도될 수 있는 임의의 범위로 존재한다.

[0189] 일부 실시형태에서, 구조적 지질은 스테로이드 또는 스테로이드 유도체이다. 일부 실시형태에서, 스테로이드 또는 스테로이드 유도체는 변형되지 않은 또는 변형된 콜레스테롤, 피토스테롤, 콜레칼시페롤, 텍사메타손 또는 이들의 조합이다. 일부 실시형태에서, 변형된 콜레스테롤은 베타-고리 또는 탄화수소 꼬리 구조에서 산화된다. 다른 실시형태에서, 피토스테롤은  $\beta$ -시토스테롤, 스티그마스테롤,  $\beta$ -시토스탄올, 캄페스테롤, 브라시카스테롤, 이들의 염 및 에스터를 포함하지만 이들로 제한되지 않는다. 일부 실시형태에서, 구조적 지질 및 텐드론은 2:1 내지 1:20, 또는 이들 내에서 유도될 수 있는 임의의 범위의 물비로 존재한다. 일부 실시형태에서 구조적 지질은 총 지질의 0 내지 50몰% 또는 이들 내에서 유도될 수 있는 임의의 범위로 존재한다.

[0190] 일부 실시형태에서, 이중층 형성 지질은 자연 발생 지질로 구성되거나 인지질, 스펅고지질 및 당지질을 포함하는 합성 기원이다. 인지질은 1,2-다이스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린(DSPC) 및 1,2-다이올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(DOPE)을 포함하지만 이들로 제한되지 않는다. 일부 실시형태에서, 스펅고지질은 스펅고미엘린이다. 일부 실시형태에서, 이중층 형성 지질 및 텐드론은 2:1 내지 1:20, 또는 이들 내에서 유도될 수 있는 임의의 범위의 물비로 존재한다. 일부 실시형태에서 구조적 지질은 총 지질의 0 내지 50몰% 또는 최대 50몰% 또는 이들 내에서 유도될 수 있는 임의의 범위로 존재한다.

[0191] 일부 실시형태에서, 본 출원은 1개 이상의 본 출원의 텐드론, 1종 이상의 PEG-지질, 1종 이상의 인지질 및 1종 이상의 스테로이드를 포함하는 조성물을 포함한다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 텐드론은 약 45몰% 내지 약 55몰%의 양으로 존재하고, 1종 이상의 인지질은 약 33.5몰% 내지 약 43.5몰%의 양으로 존재하며, 1종 이상의 PEG-지질은 약 0.5몰% 내지 약 2.5몰%의 양으로 존재하고, 1종 이상의 스테로이드는 약 5몰% 내지 약 15몰%의 양으로 존재한다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 텐드론은 약 50몰%의 양으로 존재하고, 1종 이상의 인지질은 약 38.5몰%의 양으로 존재하며, 1종 이상의 PEG-지질은 약 1.5몰%의 양으로 존재하고, 1종 이상의 스테로이드는 약 10몰%의 양으로 존재한다.

[0192] 일부 실시형태에서, 본 출원은 본 출원의 하나 이상의 텐드론, 1개 이상의 PEG-지질, 1개 이상의 인지질, 1개 이상의 스테로이드 및 전달될 1종 이상의 작용제를 포함하는 조성물을 포함한다. 일부 실시형태에서, 스테로이드는 콜레스테롤이다. 일부 실시형태에서, 스테로이드는  $\beta$ -시토스테롤이다.

[0193] 일부 실시형태에서, 전달될 1종 이상의 작용제를 포함하는 조성물에 지질이 존재하는 경우, 세포 또는 대상체에 게 전달될 1종 이상의 작용제는 약 100:1 내지 약 1:5, 약 50:1 내지 약 2:1 또는 약 25:1의 하나 이상의 텐드론 + 지질:작용제(들)의 중량비로 존재한다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 텐드론+지질:작용제(들)의몰% 비율은 약 95몰%:5몰% 내지 약 80몰%:20몰% 범위이다.

[0194] 일부 실시형태에서, 전달될 1종 이상의 작용제가 RNA인 경우, 조성물은 약 5의 지질 질소 대 RNA 인산염 비율(N/P)을 포함한다.

[0195] 본 출원은 또한 본 출원의 조성물 또는 텐드론 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 포함한다.

[0196] 일부 실시형태에서, 약제학적으로 허용 가능한 담체는 용매 또는 용액이다. 일부 실시형태에서, 약제학적 조성물은 경구, 지방내, 동맥내, 관절내, 두개내, 피부내, 병변내, 근육내, 비강내, 안구내, 심낭내, 복강내, 흉막내, 전립선내, 직장내, 척추강내, 기관내, 종양내, 배꼽내, 질내, 정맥내, 혈관내(intravascularly), 유리체강내, 리포솜, 국부, 점막으로, 비경구, 직장, 결막하, 피하, 설하, 국소, 경협(transbuccally), 경피, 질, 크림, 지질 조성물, 카테터를 통한, 세척(lavage)을 통한, 연속 주입을 통한, 주입을 통한, 흡입을 통한, 주사를 통한, 국소 전달을 통한 또는 국소 관류를 통한 투여를 위해 제형화된다 일부 실시형태에서, 약제학적 조성물은 정맥내 또는 동맥내 주사를 위해서 제형화된다. 일부 실시형태에서, 약제학적 조성물은 단위 용량으로서 제형화된다. 일부 실시형태에서, 약제학적 조성물은 근육내 투여를 위해서 제형화된다.

[0197] 일부 실시형태에서, 본 출원의 조성물 및 약제학적 조성물은 약 2 내지 약 8.5의 pH를 갖는다. 일부 실시형태에서, 조성물은 pH 3, 4, 5 또는 6의 10 내지 100 mM 시트레이트 완충액 중에 제형화된다. 본 출원의 조성물의 pH는 제조 및 보관 동안 임의의 적합한 pH일 수 있음이 이해되어야 한다. 그러나, 세포 또는 대상체에 대한 본 출

원의 조성물의 전달을 위해, pH는 약 7의 pH과 같은 생리학적으로 허용 가능하도록 조정된다. 일부 실시형태에서, 본 출원의 조성물 및 억제학적 조성물은 다분산 지수(PDI)가 0.2 미만이다. 일부 실시형태에서, 본 출원의 조성물 및 억제학적 조성물은 약 4 내지 약 8의 pKa를 갖는다. 일부 실시형태에서, 본 출원의 조성물 및 억제학적 조성물은 약 5 내지 약 7의 pKa를 갖는다. 일부 실시형태에서, 본 출원의 조성물 및 억제학적 조성물은 약 5.5의 pKa를 갖는다.

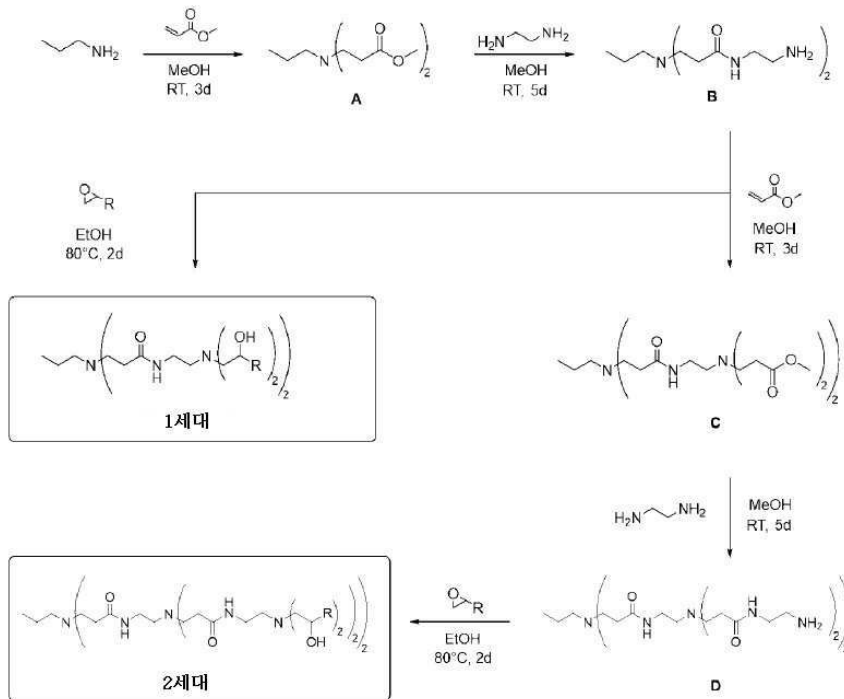
- [0198] 일부 실시형태에서, 본 출원의 조성물 및 억제학적 조성물은 약 90% 초과 캡슐화 효율을 갖는다. 일부 실시형태에서, 캡슐화 효율은 약 93% 초과이다. 일부 실시형태에서, 캡슐화 효율은 약 95% 초과이다.
- [0199] 본 출원은 또한 키트를 포함한다. 본 명세서에 개시된 임의의 성분은 키트 형태로 조합될 수 있다. 일부 실시형태에서, 키트는 상기에 기재된 바와 같은 덴드론 또는 조성물을 포함한다.
- [0200] 키트는 일반적으로 성분이 배치되고 선택적으로 적절하게 분취된 적어도 하나의 바이알, 시험관, 플라스크, 병, 주사기 또는 기타 용기를 포함한다. 키트에 하나 초과 성분은 존재하는 경우, 키트는 일반적으로 추가 성분이 별도로 배치되는 제2, 제3 또는 다른 추가 용기를 포함할 것이다. 그러나, 성분의 다양한 조합이 용기에 포함될 수 있다. 일부 실시형태에서, 모든 전달 성분은 단일 용기에서 조합된다. 다른 실시형태에서, 덴드론 전달 성분의 일부 또는 모두는 별도의 용기에 제공된다.
- [0201] 본 출원의 키트는 또한 전형적으로 상업적 판매를 위해 밀폐된 다양한 용기를 포함하기 위한 패키징을 포함할 것이다. 이러한 패키징은 원하는 용기가 보유되는 판지 또는 사출 또는 취입 성형 플라스틱 패키징을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 키트는 또한 키트 성분을 사용하기 위한 설명서를 포함할 것이다. 설명서는 구현될 수 있는 변형을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 설명서는 하나 이상의 덴드론 또는 1종 이상의 조성물을 대상체 또는 세포에 전달하기 위한 것이다.
- [0202] 본 출원의 방법 및 용도
- [0203] 본 출원은 본 출원의 덴드론 및/또는 조성물을 사용하여 세포 또는 대상체에 1종 이상의 작용제를 전달하는 방법을 포함한다. 따라서, 일부 실시형태에서, 본 출원은 1종 이상의 작용제를 세포에게 전달하는 방법을 포함하며, 이 방법은 세포를 작용제가 세포로 흡수되는 조건 하에서 본 출원의 하나 이상의 덴드론 또는 조성물 또는 억제학적 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 출원은 1종 이상의 작용제를 대상체에게 전달하는 방법을 포함하며, 이 방법은 대상체를 본 출원의 하나 이상의 덴드론 또는 조성물 또는 억제학적 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 세포는 시험관내에서 접촉된다. 일부 실시형태에서, 세포는 생체내에서 접촉된다. 일부 실시형태에서, 세포는 생체외에서 접촉된다. 일부 실시형태에서, 접촉은 질환, 장애 또는 병태를 치료할 목적을 위한 것이다. 일부 실시형태에서, 접촉은 질환, 장애 또는 병태를 진단하기 위한 것이다. 일부 실시형태에서, 접촉은 유효량의 본 출원의 하나 이상의 덴드론 또는 조성물 또는 억제학적 조성물을 이를 필요로 하는 세포 또는 대상체에 투여함으로써 이루어진다.
- [0204] 일부 실시형태에서, 본 출원은 또한 진단적, 예방적 또는 치료적 적용을 위한 본 출원의 하나 이상의 덴드론 또는 조성물 또는 억제학적 조성물의 용도를 포함한다. 일부 실시형태에서, 용도는 조성물에 의해서 전달되는 페이로드와 연결된다. 일부 실시형태에서 페이로드는 폴리뉴클레오타이드, 화학적으로 변형된 폴리뉴클레오타이드, 소분자, 생물학적 제제 또는 다른 유기 또는 무기 모이어티를 포함한다. 진단 적용은 투여 후 검출될 수 있고 질환, 장애 또는 병태를 나타내는 식별 가능한 표지, 예를 들어, 염료 또는 방사성표지의 담체로서의 본 출원의 하나 이상의 덴드론 또는 조성물 또는 억제학적 조성물의 사용을 포함한다. 예방적 적용은 감염성 질환에 대한 백신 또는 대상체의 또 다른 예상되거나 잠재적인 병태에 대한 백신을 포함한 백신으로서의 사용을 포함한다. 치료적 적용은 감염성 질환, 자가면역 질환, 암, 유전 질환, 만성 질환, 외상성 부상, 상처 치유, 외상성 뇌 손상, 근육 질환, 신경근 질환 및 /또는 위장병을 포함하지만 이들로 제한되지 않는 임의의 질환, 장애 또는 병태를 치료하기 위한 사용을 포함한다. 치료적 적용은 생체내일 수 있거나, 세포, 조직 또는 기관이 생체외에서 처리되고 대상체에게 임플란팅(implanting)되거나 이식(transplanting)되는 생체외 요법일 수 있다.
- [0205] 일부 실시형태에서, 본 출원은 또한 시험관내, 생체내 또는 생체외에서 1종 이상의 작용제를 세포로 전달하기 위한 본 출원의 하나 이상의 덴드론 또는 조성물 또는 억제학적 조성물의 용도를 포함한다.
- [0206] 일부 실시형태에서, 세포에게 전달될 1종 이상의 작용제는 1종 이상의 핵산이다. 따라서, 본 출원은 또한 1종 이상의 핵산을 세포에게 전달하는 것을 포함하는 유전자의 발현을 조절하는 방법을 포함하며, 이 방법은 세포를 1종 이상의 핵산이 세포로 흡수되는 조건 하에서 본 출원의 하나 이상의 덴드론 또는 조성물 또는 억제학적 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 세포는 시험관내에서 접촉된다. 일부 실시형태에서,

세포는 생체내에서 접촉된다. 일부 실시형태에서, 세포는 생체외에서 접촉된다. 일부 실시형태에서, 유전자 발현의 조절은 질환, 장애 또는 병태를 치료하는 데 충분하다.

- [0207] 일부 실시형태에서, 질환, 장애 또는 병태는 예를 들어 감염성 질환, 자가면역 질환, 암, 유전 질환, 만성 질환, 외상성 부상, 상처 치유, 외상성 뇌 손상, 신경근 질환 및 /또는 위장병을 포함하지만 이들로 제한되지 않는다.
- [0208] 일부 실시형태에서, 본 출원은 또한 유전자의 발현을 조절하기 위한 본 출원의 하나 이상의 텐드론 또는 조성물 또는 약제학적 조성물의 용도를 포함한다. 일부 실시형태에서 유전자의 발현은 시험관내, 생체내 또는 생체외에서 1종 이상의 핵산을 세포로 전달함으로써 조절된다.
- [0209] 일부 실시형태에서, 본 출원의 조성물 및 약제학적 조성물이 세포 또는 대상체에게 전달될 1종 이상의 작용제로서 siRNA, miRNA 및 mRNA를 포함하는 경우, 이러한 제형화된 전달 조성물은 골수 내피 세포를 표적화하여 만성 염증으로 이어지는 이벤트를 유발하는 유전자를 억제, 조절 또는 유도하도록 설계된다. 현재 자가면역 질환은 만성 염증의 주요 원인이며 대략 200만 명의 캐나다인에게 영향을 미친다. 자가면역 질환은 이의 복잡한 특성으로 인해서 완전히 이해되지 않으므로 치료 옵션을 논의할 때 어려움을 겪는다. 현재 치료법은 면역억제제, 코티코스테로이드 및 통증 관리를 포함한다. 이러한 현재 치료 옵션은 장기적 또는 영구적인 결과를 제공하지 않으므로 최적화가 필요하다. 만성적이고 심각한 염증은 과발현 및 단핵구 및 단핵구 유래 대식세포가 신체를 통해 표적 부위로 이동함으로써 발생한다. 대부분의 단핵구 및 단핵구 유래 대식세포는 골수에서 생산된 후 내피 장벽을 통과하여 혈류를 통해 표적 부위로 이동할 수 있다. 골수가 단핵구 생산의 주요 공급원이기 때문에 대량 생산 영역을 직접 표적으로 하여 단핵구 증식 과정 및 혈류로의 유출을 변경할 수 있다. 나노입자에 포함된 siRNA의 침묵 효과는 단핵구의 증식을 억제할 수 있을 뿐만 아니라 골수를 떠나는 능력을 또한 억제할 수 있다. 자유롭게 이동할 수 있는 능력을 감소시킬 뿐만 아니라 체내 총 수를 줄임으로써 만성 염증을 앓고 있는 사람들에게 해로운 효과로 이어지는 염증 반응을 효과적으로 줄일 수 있다. 따라서, 일부 실시형태에서, 본 출원은 본 출원의 하나 이상의 텐드론, siRNA, miRNA 및 mRNA를 포함하는 유효량의 조성물을 이를 필요로 하는 세포 또는 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 만성 염증을 치료하는 방법을 포함한다. 또한, 만성 염증을 치료하기 위한 본 출원의 하나 이상의 텐드론, siRNA, miRNA 및 mRNA를 포함하는 조성물의 용도가 포함된다. 일부 실시형태에서, siRNA는 단핵구 부착 및 혈액 순환으로의 이동에 필요한 골수 내피 유전자에 대한 siRNA이다.
- [0210] 일부 실시형태에서 본 출원의 조성물은 유전자 편집에 사용하기 위한 것이다. 따라서, 일부 실시형태에서, 본 출원은 세포를 본 출원의 1종 이상의 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는 세포의 게놈을 편집하는 방법을 포함한다. 또한 유전자 편집을 위한 본 출원의 1종 이상의 조성물의 용도가 포함된다. 일부 실시형태에서, 이들 조성물은 cas9 mRNA 및 특정 유전자를 표적화하도록 설계된 1종 이상의 가이드 RNA(gRNA)를 포함하고, 1종 이상의 조성물은 cas9 mRNA 및 1종 이상의 gRNA가 세포 내로 흡수되도록 하는 조건 하에서 세포와 접촉된다. 세포에 흡수되면 cas9 mRNA는 Cas9 단백질로 번역되고 gRNA를 혼입하여 핵 내에서 관심 서열을 표적화한다. DNA는 상동 직접 수선을 위해 공동 전달될 수도 있다.
- [0211] 일부 실시형태에서 본 출원의 조성물은 유전자 침묵에 사용하기 위한 것이다. 따라서, 일부 실시형태에서, 본 출원은 세포를 본 출원의 1종 이상의 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는 세포에서 유전자를 침묵시키는 방법을 포함한다. 또한 유전자 침묵을 위한 본 출원의 1종 이상의 조성물의 용도가 포함된다. 일부 실시형태에서, 이들 조성물은 siRNA를 포함하고, 세포로의 전달 시 siRNA에 상응하는 침묵 유전자를 포함한다. 따라서, 1종 이상의 조성물은 siRNA가 세포 내로 흡수되도록 하는 조건 하에서 세포와 접촉된다.
- [0212] 일부 실시형태에서, 본 출원의 조성물은 유전자 조절을 위해서 사용된다. 일부 실시형태에서, 이들 조성물은 비암호 RNA(ncRNA)를 포함하고, 1종 이상의 조성물은 ncRNA의 세포 내로의 흡수를 유발하고 세포 내로의 흡수 시 ncRNA와 연관된 유전자를 조절하는 조건 하에서 세포와 접촉된다.
- [0213] 일부 실시형태에서, 본 출원의 조성물은 유전자 발현 상향조절 또는 유전자 발현 하향조절을 위해서 사용된다. 따라서, 일부 실시형태에서, 본 출원은 세포를 본 출원의 1종 이상의 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는 세포에서 유전자의 발현을 조절하는 방법을 포함한다. 또한 세포에서 유전자의 발현을 조절하기 위한 본 출원의 1종 이상의 조성물의 용도가 포함된다. 일부 실시형태에서, 이들 조성물은 메신저 RNA(mRNA)를 포함하고, 1종 이상의 조성물은 mRNA의 세포 내로의 흡수를 유발하고 단백질을 발현하는 조건 하에서 세포와 접촉된다.
- [0214] 일부 실시형태에서, 본 출원의 조성물은 감염성 질환, 자가면역 질환, 암, 유전 질환, 만성 질환, 외상성 부상, 상처 치유, 외상성 뇌 손상, 신경근 질환 및/또는 위장병의 치료 또는 예방에 사용될 수 있다.

- [0215] 일부 실시형태에서, 본 출원의 조성물은 항바이러스 치료를 위해서 사용된다. 따라서, 일부 실시형태에서, 본 출원은 본 출원의 1종 이상의 조성물을 이를 필요로 하는 세포 또는 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 바이러스 감염을 치료하는 방법을 포함한다. 또한 바이러스 감염의 치료를 위한 본 출원의 1종 이상의 조성물의 용도가 포함된다. 일부 실시형태에서, 이들 조성물은 Ca9 단백질을 암호화하는 mRNA 및 1종 이상의 sgRNA를 포함한다. 일부 실시형태에서, 1종 이상의 sgRNA는 결실을 위한 바이러스 유전자를 식별한다. 일부 실시형태에서, 바이러스는 DNA 바이러스 또는 RNA 바이러스이다.
- [0216] 일부 실시형태에서, 본 출원의 조성물은 1종 이상의 단백질을 세포에 전달하거나, 1종 이상의 소분자 약물을 세포에 전달하거나, 1종 이상의 DNA 분자를 세포에 전달하는 방법에 사용된다.
- [0217] 일부 실시형태에서, 본 출원의 조성물은 화장품 및/또는 개인 케어 제품에 사용되며, 세포 또는 대상체에게 전달될 1종 이상의 작용제는 임의의 그러한 작용제이다. 일부 실시형태에서, 화장품 및/또는 개인 케어 제품을 위한 1종 이상의 작용제는 모발 보습제, 모발 성장제, 모발 굵슬거림 방지제, 피부 보습제, 노화 방지제 및 임시 생물발광 단백질을 포함하지만 이들로 제한되지 않는다.
- [0218] 일부 실시형태에서, 본 출원의 조성물은 위조를 방지하는 방법, 예를 들어, 제품 또는 포장에 변조되지 않았거나 원본 형태인지 확인하는 데 사용된다. 이러한 실시형태에서, 1종 이상의 작용제는 제품이 진짜인지 또는 변조되지 않았는지, 그리고 본 출원의 조성물이 대상체 상에 또는 대상체 내에 전달되는지를 보장하기 위해서 판독될 수 있는 제품 패키징/라벨에 삽입되는 패키징인 고유한 DNA 또는 RNA 서열(바코드)을 포함할 것이다.
- [0219] 일부 실시형태에서, 방법 및 용도에서 조성물은 상기에 정의된 바와 같은 약제학적 조성물이다.
- [0220] 일부 실시형태에서, 본 출원의 방법 및 용도에서 세포는 시험관내에 있다. 일부 실시형태에서, 본 출원의 방법 및 용도에서 세포는 생체내에 있다. 일부 실시형태에서, 본 출원의 방법 및 용도에서 세포는 생체외에 있다.
- [0221] 일부 실시형태에서, 세포는 동물 세포이다. 일부 실시형태에서, 동물 세포는 포유동물 세포이다. 일부 실시형태에서, 세포는 인간 세포이다. 일부 실시형태에서, 세포는 식물 세포이다.
- [0222] 본 출원의 덴드론 및 조성물의 제조
- [0223] 본 출원의 덴드론은 다양한 합성 공정에 의해 제조될 수 있다. 특정 구조적 특징부 및/또는 치환체의 선택은 또 다른 것보다 하나의 공정의 선택에 영향을 미칠 수 있다. 주어진 화학식 (I)의 덴드론을 제조하기 위한 특정 공정의 선택은 당업자의 권한 내에 있다. 본 출원의 덴드론을 제조하기 위한 일부 출발 물질은 상업적인 화학 공급원으로부터 입수 가능하다. 다른 출발 물질은 당업계에 잘 알려져 있는 간단한 변환을 사용하여 이용 가능한 전구체로부터 쉽게 제조된다.
- [0224] 일부 실시형태에서, 화학식 I의 덴드론은 존재하는 작용기에 따라 특정 순서로 분자의 다양한 부분을 함께 부착함으로써 조립된다. 친핵성 치환, 교차-커플링, 마이클 반응 및/또는 활성화 기 전략을 포함하지만 이에 제한되지 않는 당업계에 공지된 표준 화학을 사용하여 화학식 I의 덴드론을 조립할 수 있다. 덴드론의 많은 부분이 알려져 있거나 알려진 화합물을 기반으로 하기 때문에, 분자의 부분을 함께 연결하는 데 사용할 수 있는 화합물은 상업적인 공급원으로부터 또는 당업계에 알려진 합성 방법을 사용하여 쉽게 입수 가능하다. 예를 들어, 이러한 많은 화합물은 구조 내에 링커기와 공유 결합을 형성할 수 있는 적어도 하나의 작용기를 갖는다. 이의 예는 아민, 티올, 할로, 하이드록실, 알콕시, 카복실, 에스터, 아마이드 및/또는 옥소기를 포함한다.
- [0225] 예시적인 실시형태에서, 1세대(G1) 및 2세대(G2) 폴리-아미도아민(PAMAM) 덴드론 거대분자를 합성하기 위해서 반응식 1에 도시된 바와 같은 하기 단계는 하기와 같다. 예를 들어, n-프로필아민(또는 화학식 R<sup>1</sup>-NH<sub>2</sub>의 임의의 다른 적합한 아민)과 예를 들어, 메틸 아크릴레이트(또는 임의의 다른 적합한 링커기)의 첨가 반응으로 중간체 A를 형성하고, 이어서 예를 들어, 에틸렌디아민과 축합시켜 중간체 B를 형성한다. 그 다음 중간체 B는 예를 들어, 에폭사이드 개환을 통해 알킬화를 거쳐 1세대 덴드론을 형성할 수 있으며, 여기서 R은 말단 기이거나, 또는 첨가와 축합 반응의 제2 세트를 거쳐 각각 중간체 C 및 D를 형성할 수 있다. 예를 들어 에폭사이드 개환을 통한 중간체 D의 알킬화는 2세대 덴드론을 형성하며, 여기서 각각의 R은 말단기이다.

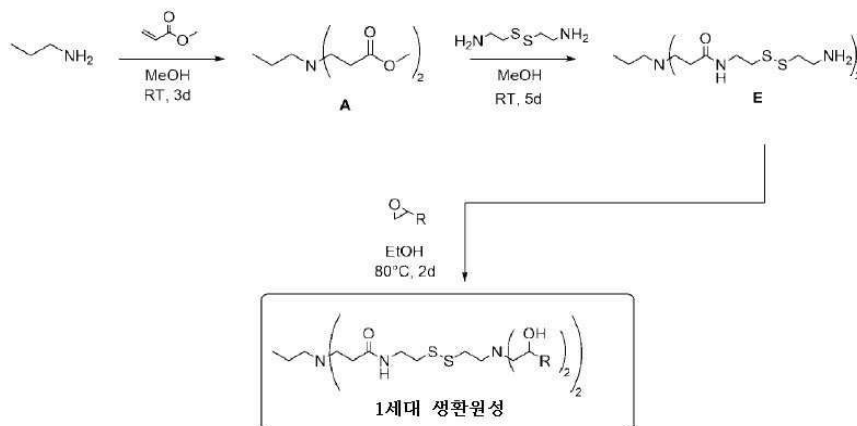
[0226] [반응식 1]



[0227]

[0228] 반응식 2에 도시된 바와 같은 추가의 예시적인 실시형태에서, 생물 환원성 1세대 변형된 덴드론을 합성하기 위해서, 중간체 A는 예를 들어, n-프로필아민(또는 화학식 R<sup>1</sup>-NH<sub>2</sub>의 임의의 다른 적합한 아민) 및 예를 들어, 메틸 아크릴레이트(또는 임의의 다른 적합한 링커기)를 반응시킴으로써 형성된다. 시스타민과의 추가 축합 반응은 중간체 B를 형성하고, 그 다음 이를 에폭사이드 개환을 통해 알킬화시켜 생물 환원성 1세대 덴드론을 형성할 수 있고, 여기서 R은 말단기이다.

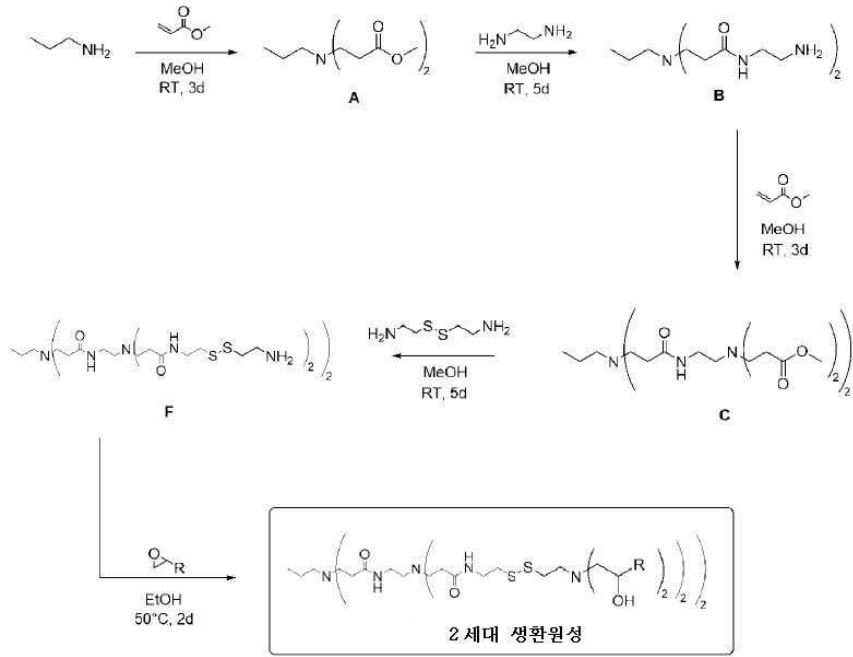
[0229] [반응식 2]



[0230]

[0231] 반응식 3에 도시된 바와 같은 추가의 예시적인 실시형태에서, 생물 환원성 2세대 변형된 덴드론을 합성하기 위해서, 중간체 C는 반응식 1에 기재된 바와 같이 형성된다. 시스타민과의 추가 축합 반응은 중간체 F를 형성하고, 그 다음 이를 에폭사이드 개환을 통해 알킬화시켜 생물 환원성 2세대 덴드론을 형성할 수 있고, 여기서 R은 말단기이다.

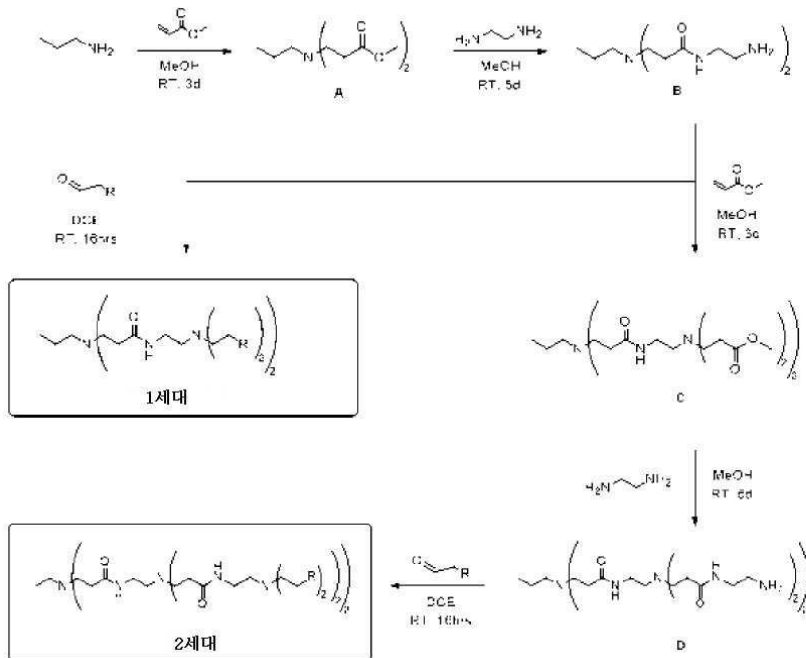
[0232] [반응식 3]



[0233]

[0234] 반응식 4에 도시된 추가의 예시적인 실시형태에서, 대안적으로 환원제, 예컨대, 소듐 트리아세톡시보로하이드라이드의 존재 하에서 알데하이드 또는 케톤의 환원성 아민화를 통해서 반응식 1로부터의 중간체 B 또는 D의 알킬화를 수행한다.

[0235] [반응식 4]



[0236]

[0237] 공정 전반에 걸쳐, 적절한 경우, 당업자가 쉽게 이해할 수 있는 방식으로 다양한 반응물 및 중간체에 적합한 보호기가 첨가되고 이어서 제거될 것이라는 것이 이해될 것이다. 이러한 보호기를 사용하기 위한 통상적인 절차 및 적합한 보호기의 예는 예를 들어, 문헌["*Protective Groups in Organic Synthesis*", T.W. Green, P.G.M. Wuts, Wiley-Interscience, New York, (1999)]에 기재되어 있다. 또한, 화학적 조작에 의해 기 또는 치환체를 다른 기 또는 치환체로 변환하는 것이 최종 생성물을 향한 합성 경로의 중간체 또는 최종 생성물에서 수행될 수 있으며, 여기서 변환의 가능한 유형은 변환에 사용되는 조건 또는 시약에 대해 해당 단계에서 분자에 의해 수행되는 다른 작용기의 고유한 비호환성에 의해서만 제한되어 있음을 이해할 것이다. 이러한 고유한 비호환성 및

적절한 변환 및 적절한 순서로 합성 단계를 수행하여 이를 회피하는 방법은 당업자에게 쉽게 이해될 것이다. 변환의 예가 본 명세서에 제공되며, 기재된 변환은 변환이 예시되는 일반적인 기 또는 치환체에만 제한되는 것은 아니라는 것을 이해할 것이다. 다른 적합한 변환에 대한 참조 및 설명은 문헌["Comprehensive Organic Transformations - A Guide to Functional Group 제조" R.C. Larock, VHC Publishers, Inc. (1989)]에 제공되어 있다. 다른 적합한 반응의 참조 및 설명은 유기 화학 교과서, 예를 들어, 문헌["Advanced Organic Chemistry", March, 4th ed. McGraw Hill (1992) 또는 "Organic Synthesis", Smith, McGraw Hill, (1994)]에 기재되어 있다.

[0238] 중간체 및 최종 생성물의 정제 기술은 예를 들어, 칼럼 또는 회전 플레이트에서의 순상 및 역상 크로마토그래피, 재결정화, 증류 및 액체-액체 또는 고체-액체 추출을 포함하며, 이것은 당업자가 쉽게 이해할 것이다.

[0239] 본 출원의 덴드론의 염은 일반적으로 중성 화합물을 불활성 유기 용매에 용해시키고, 원하는 산 또는 염기를 첨가하고, 생성된 염을 여과 또는 다른 공지된 수단에 의해 단리시킴으로써 형성된다.

[0240] 본 출원의 덴드론의 용매화물 형성은 화합물 및 용매화물에 따라 달라질 것이다. 일반적으로, 용매화물은 화합물을 적절한 용매에 용해시키고 냉각시키거나 항용매를 사용하여 용매화물을 단리시킴으로써 형성된다. 용매화물은 전형적으로 주위 조건 하에서 건조되거나 공비된다. 특정 용매화물을 형성하기 위한 적합한 조건의 선택은 당업자에 의해 이루어질 수 있다. 적합한 용매의 예는 에탄올, 물 등이다. 물이 용매인 경우, 분자를 "수화물"이라고 지칭한다. 다음의 비제한적인 실시예는 본 출원을 예시한다.

[0241] 본 출원의 조성물은 전달될 1종 이상의 작용제를 적합하게 포함하는, 나노입자, 콜로이드 및/또는 초분자 구조체를 형성하기 위한 조건 하에서 본 출원의 덴드론 및 선택적인 부형제를 조합함으로써 제조된다. 일부 실시형태에서, 나노입자, 콜로이드 및/또는 초분자 구조체를 형성하기 위한 조건은 먼저 하나 이상의 덴드론 및 1종 이상의 PEG-지질, 1종 이상의 인지질 및/또는 1종 이상의 스테로이드를 포함하는 임의의 선택적인 부형제를 적합한 용매, 예컨대, 조합하는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 초음파 처리 및/또는 가운을 사용하여 임의의 침전물을 제거한다. 별도로, 전달될 1종 이상의 작용제를 적합한 용매, 예컨대, 수성 완충액, 예컨대, 수성 시트레이트 완충액에서 제조한다. 그 다음 두 용액을 나노입자, 콜로이드 및/또는 초분자 구조체를 형성하는 조건 하에서 배합한다. 일부 실시형태에서, 두 용액을 예를 들어, 미세유체를 사용하여 연속 흐름 조건 하에서 배합한다. 일부 실시형태에서 생성된 나노입자, 콜로이드 및/또는 초분자 구조체를 투석을 사용하여 처리하여 pH를 조정한다. 일부 실시형태에서, 입자는 어떠한 눈에 띄는 변화 없이 적어도 48시간 동안 실온 또는 -20°C에서 저장된다.

[0242] **실시예**

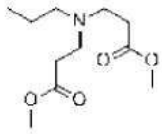
[0243] **일반 방법**

[0244] 몇몇 변형된 1세대(G1) 및 2세대(G2) 폴리-아미도아민(PAMAM) 덴드론 거대분자를 합성한다. 이러한 거대분자를 에탄올(EtOH) 상에서 지질-폴리에틸렌 글리콜(PEG-지질) 부형제와 조합하여 핵산을 격리하기 위한 전달 물질을 생성한다. 그런 다음 다양한 pH 수준의 시트레이트 완충액에서 전달 물질을 다양한 핵산과 조합하여 RNA 나노입자를 형성한다.

[0245] **실시예 1: 멀티-모티프 PAMAM 덴드론 거대분자의 합성**

[0246] PAMAM 거대분자와 관련하여, 달리 제시되지 않는 한 용매로서 중수소화 클로로폼에서 테트라메틸실란(TMS) 또는 잔류 용매 신호를 내부 기준으로 사용하고, <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C 및 <sup>19</sup>F NMR 스펙트럼을 <sup>1</sup>H NMR의 경우 500MHz, <sup>13</sup>C NMR의 경우 126MHz, 400MHz 또는 500MHz, <sup>19</sup>F NMR의 경우 400MHz에서 작동하는 기계에서 기록하였다. 기록된 모든 화학적 이동은 델타 스케일의 ppm 단위이며, 기록치에 나타나는 신호의 미세한 분할은 일반적으로 예를 들어, br = 넓은, s = 단일선, d = 이중선, t = 삼중선, q = 사중선, p = 오중선, m, 다중선; Hz 단위의 커플링 상수로 제시된다. <sup>1</sup>H 및 <sup>13</sup>C NMR은 직접 저온프로브(126MHz)를 갖는 Agilent DD2 500MHz 또는 Agilent VnmrS 400MHz에서 기록하였고 7.26ppm(<sup>1</sup>H) 및 77.16ppm(<sup>13</sup>C)의 CDCl<sub>3</sub>를 기준으로 한다. 매트릭스 보조 레이저 탈착 이온화 비행 시간 질량 스펙트럼(MALDI-TOF MS) 스펙트럼을 다이트란올 매트릭스를 사용하여 Bruker AutoFlex Speed에 기록하였고, 실시간 질량 스펙트럼(DART MS)의 직접 분석을 JEOL AccuTOF Plus 4G에 기록하였고, 전기분무 이온화 질량 스펙트럼(ESI MS)을 Agilent 6538 UHD에 기록하였다.

[0247] **중간체 A**



[0248]

[0249] 제조 1:

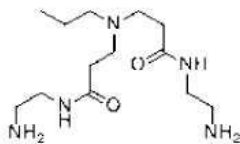
[0250] 메탄올 중의 n-프로필아민(2.5g, 42.3mmol, 1당량)의 용액을 메탄올 중 메틸 아크릴레이트(35.31g, 422.9mmol, 10당량)의 용액에 적가하였다. 혼합물을 72시간 동안 실온에서 교반하였다. 용매 및 과량의 메틸 아크릴레이트를 감압 하에서 제거하였다. 100% 다이클로로메탄(DCM)에서 7% MeOH/DCM로의 구배를 사용하는 플래시 크로마토그래피에 의해서 추가 정제(필요한 경우)를 수행하였다. **중간체 A**를 밝은 황색의 투명한 오일(8.47g, 86%)로서 단리시켰다.

[0251]  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  3.61 (s, 6H), 2.71 (t,  $J = 7.2$  Hz, 4H), 2.39 (t,  $J = 7.2$  Hz, 4H), 2.32 (t, 2H,  $J = 7.3\text{Hz}$ ), 1.38 (육중선,  $J = 7.3$  Hz, 2H), 0.80 (t,  $J = 7.3$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  173.04, 77.40, 77.08, 76.76, 55.72, 51.43, 49.31, 32.59, 20.32, 11.65.

[0252] 제조 2:

[0253] 메틸 아크릴레이트(7.28g, 84.6mmol, 5당량)를 메탄올(10ml) 중에서 n-프로필아민(1.0g, 16.9mmol, 1당량)과 함께 첨가하였다. 혼합물을 질소로 퍼징하고, 포일로 피복하고, 72시간 동안 실온에서 교반하였다. 박막 크로마토그래피(TLC)(10% MeOH/다이클로로메탄(DCM))에 의해서 n-프로필아민의 소모를 모니터링하였다. 용매 및 과량의 메틸 아크릴레이트를 감압 하에서 제거하였다. **중간체 A**를 소량의 메틸 아크릴레이트 불순물과 함께 투명한 무색 오일로서 단리시켰다(4.08g, 17.6mmol, 104%).

[0254] **중간체 B**



[0255]

[0256] 제조 1:

[0257] 메탄올 중 에틸렌다이민(20.79g, 345.9mmol, 40당량)의 용액을 메탄올 중 **중간체 A**(2.00g, 8.65mmol, 1당량)의 용액에 적가하였다. 혼합물을 실온에서 1주 동안 교반하였다. 용매 및 과량의 에틸렌다이민을 감압 하에서 제거하여 **중간체 B**(2.88g, 116%)를 잔류하는 에틸렌다이민과 함께 황색 점성 오일로서 수득하였다.

[0258]  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.49 (t,  $J = 5.7$  Hz, 2H), 3.27 (q,  $J = 5.7$  Hz, 4H), 2.81 (t,  $J = 6.0\text{Hz}$ , 4H), 2.71 (t, 4H), 2.41 - 2.30 (m, 6H), 1.45 (육중선,  $J = 7.4\text{Hz}$ , 2H), 0.85 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  172.86, 55.67, 50.23, 42.04, 41.53, 34.13, 19.99, 12.02.

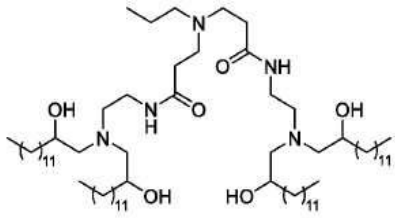
[0259] 제조 2:

[0260] 에틸렌다이민(15.6g, 259mmol, 20당량) 및 **중간체 A**(3.0g, 13mmol, 1당량)를 메탄올(10ml)에 함께 첨가하였다. 혼합물을 질소로 퍼징하고, 포일로 피복하고, 5일 동안 실온에서 교반하였다. **중간체 A**의 소모를 TLC(15% MeOH/DCM)로 모니터링하고, 용매 및 과량의 에틸렌다이민을 감압 하에서 제거하였다. 다이에틸 에터(5×30ml)로의 연속 세척에 의해서 잔류하는 에틸렌다이민을 제거하였다. 잔류 에터를 진공 하에서 제거하여 **중간체 B**를 투명한 무색 점성 오일(1.604g, 5.58mmol, 43%)로서 수득하였다.

[0261]  $^1\text{H}$ NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.71 (t,  $J = 5.7$  Hz, 2H), 2.98 (q,  $J = 5.9$  Hz, 4H), 2.52 (t,  $J = 6.0$  Hz, 4H), 2.46 (t,  $J = 6.3$  Hz, 4H), 2.17 - 2.03 (m, 6H), 1.35 (s, 8H), 1.19 (육중선,  $J = 7.4$  Hz, 1H), 0.59 (t,  $J$

= 7.3 Hz, 3H). <sup>13</sup>CNMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 172.44, 55.01, 49.55, 48.88, 41.80, 41.12, 33.33, 19.46, 11.46.

[0262] **I-1 (G1-nPr-C14E)**



[0263]

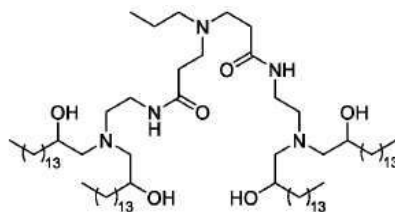
[0264] 제조 1:

[0265] EtOH 중 1,2-에폭시테트라데칸(1.03g, 4.4당량)의 용액을 밀봉 압력 용기에서 EtOH 중 **중간체 B**(0.3g, 1당량)의 용액에 첨가하였다. 혼합물을 80℃에서 72시간 동안 교반하였다. 용매를 감압 하에서 제거하였다. 조 오일을 DCM 중 20%에서 100% ULTRA 용매로의 구배를 사용하여 플래시 크로마토그래피로 정제시켰다. 목적하는 분획을 합하고, 감압 하에서 농축시켜 밝은 황색 점성 오일(0.76g, 64%)을 수득하였다. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.78 (br s, <2H), 3.28 (br s, <1H), 3.0-2.2 (m, 20H), 1.6-1.1 (m, 105H), 0.87 (m, 15H). <sup>13</sup>C NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 172.69, 70.68, 68.10, 64.74, 61.08, 50.02, 31.92, 29.66, 25.75, 22.68, 14.10, 11.82. MS (MALDI-TOF pos) m/z: C<sub>69</sub>H<sub>141</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>에 대한 [M+H]<sup>+</sup> 계산치, 1137.09; 실측치, 1137.16.

[0266] 제조 2:

[0267] 1,2-에폭시테트라데칸(1.17g, 5.51mmol, 4.4당량) 및 **중간체 B**(0.36g, 1.25mmol, 1당량)의 혼합물을 8-드랩 스크류-캡 바이알에 함께 첨가하였다. 바이알을 포일로 감싸고, 90℃에서 밤새 교반하였다. **중간체 B**의 소모를 TLC(35% ULTRA/DCM)로 모니터링하였다. 조 오일을 50g 실리카 카트리지 및 10% ULTRA/DCM에서 20% ULTRA/DCM으로의 용매 구배를 사용하여 플래시 크로마토그래피로 정제시켰다. 목적하는 분획을 합하고, 진공 하에서 연한 황색의 투명한 점성 오일(0.39g, 0.34mmol, 28%)로 농축시켰다. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.96 - 7.86 (m, 2H), 3.57 - 3.45 (m, 5H), 3.19 (q, J = 4.7 Hz, 1H), 2.71 - 2.63 (m, 4H), 2.62 - 2.53 (m, 3H), 2.53 - 2.45 (m, 2H), 2.41 - 2.20 (m, 10H), 1.53 - 1.04 (m, 105H), 0.91 - 0.66 (m, 15H). <sup>13</sup>C NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 70.46, 70.36, 70.27, 68.09, 67.92, 64.87, 64.74, 64.63, 61.50, 61.43, 56.77, 55.71, 55.19, 49.77, 49.72, 49.68, 38.51, 37.35, 35.26, 35.16, 35.01, 34.94, 33.68, 33.54, 31.89, 29.84, 29.68, 29.64, 29.34, 25.78, 25.74, 22.64, 19.58, 14.06, 11.81. MS (ESI+) m/z: C<sub>69</sub>H<sub>141</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>에 대한 [M+H]<sup>+</sup> 계산치, 1137.92; 실측치, 1137.09.

[0268] **I-23 (G1-nPr-C16E)**

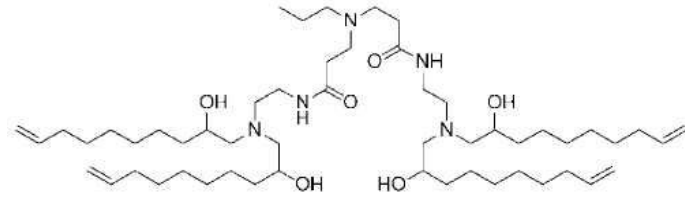


[0269]

[0270] EtOH 중 1,2-에폭시헥사데칸(1.3g, 4당량)의 용액을 밀봉 압력 용기에서 EtOH 중 **중간체 B**(0.3g, 1당량)의 용액에 첨가하였다. 혼합물을 80℃에서 72시간 동안 교반하였다. 용매를 감압 하에서 제거하였다. 조 오일을 DCM 중 20%에서 100% ULTRA 용매로의 구배를 사용하여 플래시 크로마토그래피로 정제시켰다. 목적하는 분획을 합하고, 감압 하에서 농축시켜 밝은 황색 점성 오일(0.42g, 32%)을 수득하였다. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.95-7.80

(m, 1H), 3.25 (br s, 1H), 2.80-2.20 (m, 20H), 1.6-1.1 (m, 125H), 0.84 (t,  $J = 6.9$  Hz, 15H).  $^{13}\text{C}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  172.98, 70.55, 68.08, 64.73, 61.25, 58.02, 53.37, 31.90, 29.69, 22.65, 14.07. MS (DART pos)  $m/z$ :  $\text{C}_{69}\text{H}_{140}\text{N}_5\text{O}_5$ 에 대한  $[\text{M}-\text{OH}]^+$  계산치, 1232.21; 실측치, 1232.66.

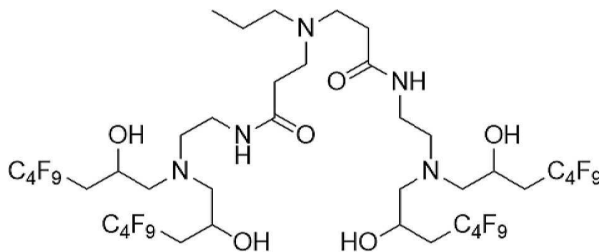
[0271] **I-2 (G1-nPr-C1001E)**



[0272]

[0273] EtOH 중 1,2-에폭시-9-데센(0.49g, 4당량)의 용액을 밀봉 압력 용기에서 EtOH 중 **중간체 B** (0.23g, 1당량)의 용액에 첨가하였다. 혼합물을 80°C에서 72시간 동안 교반하였다. 용매를 감압 하에서 제거하였다. 조 오일을 DCM 중 20%에서 100% ULTRA 용매로의 구배를 사용하여 플래시 크로마토그래피로 정제시켰다. 목적하는 분획을 합하고, 감압 하에서 농축시켜 밝은 황색 점성 오일(0.21g, 33%)을 수득하였다.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.30-7.3 (m, 대부분의 불순물은 2H br s를 포함함), 5.80-5.70 (m, 4H), 4.90 (dd, 8H), 3.23 (br s, 2H), 2.80-2.20 (m, 22H), 1.98 (q,  $J = 6.7\text{Hz}$ , 8H), 1.50-1.20 (m, 46H), 0.81 (t,  $J = 7.3\text{Hz}$ , 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  172.74, 139.00, 133.91, 131.53, 128.44, 128.42, 127.23, 127.20, 114.15, 70.24, 67.97, 64.54, 61.38, 57.95, 33.70, 29.60, 29.01, 28.80, 25.63, 25.61, 18.25. MS (DART pos)  $m/z$ :  $\text{C}_{53}\text{H}_{101}\text{N}_5\text{O}_6$ 에 대한  $[\text{M}+\text{H}]^+$  계산치, 904.78; 실측치, 904.81.

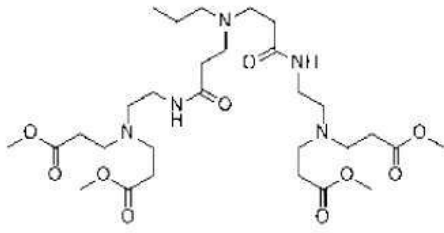
[0274] **I-3 (G1-nPr-C7RfE)**



[0275]

[0276] EtOH 중 2,2,3,3,4,4,5,5-노나플루오로헵틸옥시란(15g, 4당량)의 용액을 밀봉 압력 용기에서 EtOH 중 **중간체 B** (0.4g, 1당량)의 용액에 첨가하였다. 혼합물을 80°C에서 72시간 동안 교반하였다. 용매를 감압 하에서 제거하였다. 조 오일을 DCM 중 20%에서 100% ULTRA 용매로의 구배를 사용하여 플래시 크로마토그래피로 정제시켰다. 목적하는 분획을 합하고, 감압 하에서 농축시켜 밝은 황색 점성 오일(0.25g, 13%)을 수득하였다.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.90-7.35 (m, 대부분의 불순물은 2H br s를 포함함), 4.35 (p,  $J = 5.5\text{Hz}$ , <1H), 3.34-3.26 (m, 2H), 2.85-2.00 (m, 55H), 1.55-1.40 (m, 2H), 0.88-0.81 (m, 3H).  $^{19}\text{F}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  -81.49 (3F), -112.87 (1.4F), -113.26 (0.4F), -124.87 (2F), 126.26 (2F). MS (MALDI-TOF pos)  $m/z$ :  $\text{C}_{41}\text{H}_{49}\text{F}_{36}\text{N}_5\text{O}_6$ 에 대한  $[\text{M}+\text{H}]^+$  계산치, 1392.31; 실측치, 1392.3.

[0277] **중간체 C**



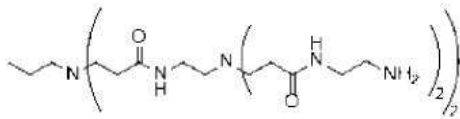
[0278]

[0279]

메탄올 중 **중간체 B**(2.74g, 9.53mmol, 1당량)의 용액을 메탄올 중 메틸 아크릴레이트(16.4g, 190.7mmol, 20당량)의 용액에 적가하였다. 혼합물을 72시간 동안 실온에서 교반하였다. 용매 및 과량의 메틸 아크릴레이트를 감압 하에서 제거하였다. DCM 중 10%에서 50% ULTRA로의 구배를 사용하여 플래시 크로마토그래피에 의해서 추가 정제를 수행하였다. **중간체 C**를 밝은 황색의 투명한 오일(1.46g, 24%)로서 단리시켰다.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.13 (t,  $J = 5.5\text{Hz}$ , 2H), 3.15 (q,  $J = 5.6\text{ Hz}$ , 4H), 2.63 (t,  $J = 6.8\text{ Hz}$ , 12H), 2.41 (t,  $J = 6.4\text{Hz}$ , 4H), 2.30 (t,  $J = 6.8\text{ Hz}$ , 10H), 2.23 (t,  $J = 6.8\text{Hz}$ , 4H), 1.33 (육중선,  $J = 7.4\text{ Hz}$ , 2H), 0.73 (t,  $J = 7.3\text{ Hz}$ , 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  172.86, 172.18, 55.02, 52.86, 51.46, 49.60, 49.12, 36.93, 33.32, 32.56, 19.83, 11.75. MS (DART pos)  $m/z$ :  $\text{C}_{29}\text{H}_{53}\text{N}_5\text{O}_{10}$ 에 대한  $[\text{M}+\text{H}]^+$  계산치, 632.38; 실측치 632.28.

[0280]

**중간체 D**



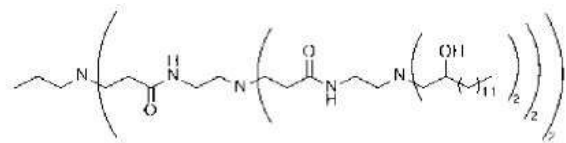
[0281]

[0282]

메탄올 중 에틸렌다이민(10.6g, 110.8mmol, 80당량)의 용액을 메탄올 중 **중간체 C**(1.4g, 2.22mmol, 1당량)의 용액에 적가하였다. 혼합물을 실온에서 1주 동안 교반하였다. 용매 및 과량의 에틸렌다이민을 감압 하에서 제거하여 **중간체 D**(1.88g, 114%)를 잔류하는 에틸렌다이민과 함께 황색 점성 오일로서 수득하였다.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.01 (t,  $J = 5.7\text{ Hz}$ , 1H), 7.65 (t,  $J = 5.7\text{ Hz}$ , 2H), 3.25 (q,  $J = 5.8\text{ Hz}$ , 4H), 3.20 (q,  $J = 6.1\text{ Hz}$ , 2H), 2.79 (t,  $J = 5.7\text{ Hz}$ , 3H), 2.74-2.65 (m) 2.50 (t,  $J = 6.2\text{ Hz}$ , 2H), 2.40-2.28 (m, 14H) 1.42 (h,  $J = 7.3\text{ Hz}$ , 1H), 0.83 (t,  $J = 7.3\text{ Hz}$ , 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  173.07, 172.88, 55.22, 52.86, 50.60, 50.22, 49.73, 45.78, 44.77, 42.07, 41.42, 37.88, 34.37, 33.60, 19.63, 11.91.

[0283]

**I-4 (G2-nPr-C14E)**

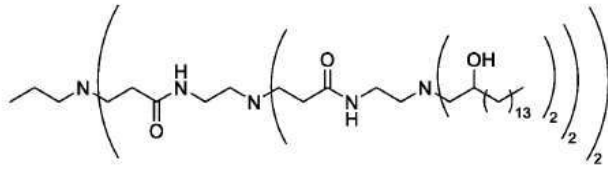


[0284]

[0285]

EtOH 중 1,2-에폭시테트라데칸(1.14g, 5.38mmol, 8당량)의 용액을 밀봉 압력 용기에서 EtOH 중 **중간체 D**(0.5g, 0.672mmol, 1당량)의 용액에 첨가하였다. 혼합물을 80°C에서 72시간 동안 교반하였다. 용매를 감압 하에서 제거하였다. 조 오일을 DCM 중 20%에서 50% ULTRA로의 구배를 사용하여 플래시 크로마토그래피로 정제시켰다. 목적하는 분획을 합하고, 무수 염 상에서 건조시키고, 감압 하에서 농축시켜 희백색 비정질 고체(0.19g, 12%)로서 수득하였다.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.05-7.80 (m, 2H), 3.30-3.00 (m, 3H), 2.90-2.10 (m, 36H), 1.50-1.00 (m, 198H), 0.82 (t,  $J = 7.0\text{ Hz}$ , 27H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{cdCl}_3$ )  $\delta$  174.94, 173.15, 70.35, 70.32, 69.33, 67.73, 64.62, 64.23, 61.63, 57.81, 56.17, 55.11, 55.06, 47.85, 31.88, 29.88, 29.84, 29.80, 29.75, 29.73, 29.68, 29.67, 29.64, 29.63, 29.57, 29.33, 29.31, 25.79, 25.76, 25.73, 22.64, 18.28, 14.05. MS (ESI pos)  $m/z$ :  $\text{C}_{145}\text{H}_{293}\text{N}_{13}\text{O}_{14}$ 에 대한  $[\text{M}+\text{H}]^+$  계산치, 2442.26; 실측치, 2442.26.

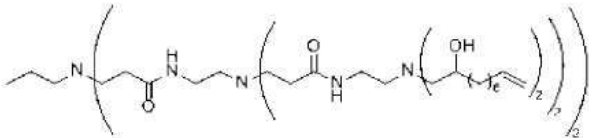
[0286] I-6 (G2-nPr-C16E)



[0287]

[0288] EtOH 중 1,2-에폭시헥사데칸(2.71g, 11.3mmol, 10당량)의 용액을 밀봉 압력 용기에서 EtOH 중 **중간체 D**(0.84g, 1.13mmol, 1당량)의 용액에 첨가하였다. 혼합물을 80°C에서 72시간 동안 교반하고, 그 다음 다이클로로메탄 및 물로 추출하였다. 유기 분획을 수집하고, 용매를 감압 하에서 제거하여 조생성물(1.52g, 50%)을 제공하였다. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.98 (br s, 3.7H), 3.42 (br s, 3H), 3.35-3.20 (m, 4.2H), 3.00-2.00 (m, 53H), 1.60-1.00 (m, 209H), 0.87 (t, J = 7.0Hz, 27H). <sup>13</sup>C NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 172.90, 70.38, 67.73, 64.21, 61.99, 52.63, 52.62, 31.91, 29.71, 29.35, 25.78, 22.67, 14.09. MS (ESI pos) m/z: C<sub>161</sub>H<sub>325</sub>N<sub>14</sub>O<sub>14</sub>에 대한 [M+H]<sup>+</sup> 계산치, 2666.51; 실측치 2666.51.

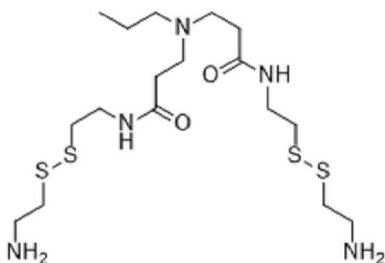
[0289] I-5 (G2-nPr-C100IE)



[0290]

[0291] EtOH 중 1,2-에폭시-9-데센(1.2g, 12당량)의 용액을 밀봉 압력 용기에서 EtOH 중 **중간체 D**(0.5g, 1당량)의 용액에 첨가하였다. 혼합물을 80°C에서 72시간 동안 교반하였다. 용매를 감압 하에서 제거하였다. 조 오일을 DCM 중 20%에서 50% ULTRA로의 구배를 사용하여 플래시 크로마토그래피로 정제시켰다. 목적하는 분획을 합하고, 무수 염 상에서 건조시키고, 감압 하에서 농축시켜 황색 점성 오일(0.75g, 56%)로서 수득하였다. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.10-7.75 (m, 6H), 5.80-5.70 (m, 8H), 4.98-4.86 (m, 16H), 3.56 (br s, 9H), 3.30-3.15 (m, 8H), 2.80-2.20 (m, 53H), 1.99 (q, J = 6.7 Hz, 16H), 1.50-1.15 (m, 90H), 0.83 (t, J = 7.3 Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 173.23, 173.17, 139.03, 114.17, 114.16, 70.16, 70.10, 67.96, 67.90, 64.55, 61.84, 56.88, 54.89, 52.55, 50.31, 50.30, 50.20, 49.65, 38.67, 37.49, 35.13, 34.88, 34.85, 33.73, 29.66, 29.64, 29.61, 29.05, 29.04, 29.02, 28.83, 28.81, 25.67, 25.65, 25.63, 19.25, 11.89. MS (ESI pos) m/z: C<sub>133</sub>H<sub>213</sub>N<sub>13</sub>O<sub>14</sub>에 대한 [M+H]<sup>+</sup> 계산치, 1977.64; 실측치, 1977.64.

[0292] **중간체 E**

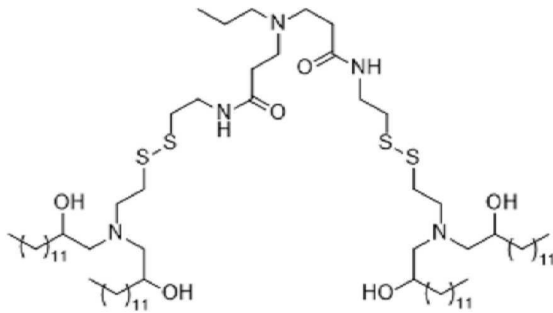


[0293]

[0294] 메탄올 중 유리 염기 시스타민(20.79g, 136mmol, 15당량)의 용액을 메탄올 중 **중간체 A**(2.00g, 8.65mmol, 1당량)의 용액에 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 1주 동안 교반하였다. 용매를 감압 하에서 제거하여 조 오일을 수득하였다. 조 오일을 70:26:4 비의 DCM:MeOH:NH<sub>4</sub>OH의 용리액을 사용하여 플래시 크로마토그래피로 정제시켰다.

목적하는 분획을 수집하고, 무수 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 상에서 건조시키고, 맑은 황색 점성 오일(0.55g, 13%)로 농축시켰다. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.56 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H), 3.52 (q, *J* = 6.1 Hz, 4H), 2.99 (t, *J* = 6.2 Hz, 4H), 2.82 - 2.73 (m, 8H), 2.71 (t, *J* = 6.5 Hz, 4H), 2.42 - 2.29 (m, 6H), 1.87 (s, 6H), 1.45 (h, *J* = 7.3 Hz, 2H), 0.85 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 172.54, 57.55, 55.04, 49.58, 42.17, 41.98, 40.41, 40.39, 37.96, 37.75, 33.28, 19.69, 18.42, 11.92. MS (DART pos) *m/z*: C<sub>17</sub>H<sub>37</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>S<sub>4</sub>에 대한 [M+H]<sup>+</sup> 계산치, 472.18; 실측치, 472.19.

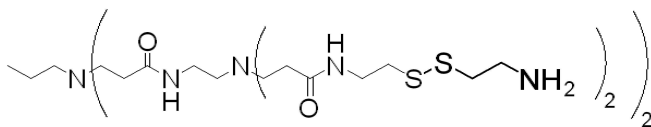
[0295] **I-7 (G1-nPr-S8-C14E)**



[0296]

[0297] EtOH 중 1,2-에폭시테트라데칸(0.67g, 3.14mmol, 4당량)의 용액을 밀봉 압력 용기에서 EtOH 중 **중간체 E**(0.37g, 0.78mmol, 1당량)의 용액에 첨가하였다. 혼합물을 70°C에서 72시간 동안 교반하였다. 용매를 감압 하에서 제거하였다. 조 오일을 DCM 중 20%에서 40% ULTRA 용매로의 구배를 사용하여 플래시 크로마토그래피로 정제시켰다. 목적하는 분획을 합하고, 감압 하에서 농축시켜 황색 점성 오일(0.15g, 14.6%)을 수득하였다. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.64-7.54 (m, 2H), 3.53 (q, *J* = 6.2Hz, 4H), 3.00-2.25 (m, 30H), 1.52-1.15 (m, 90H), 0.86 (t, *J* = 0.69Hz, 15H). MS (MALDI-TOF pos) *m/z*: C<sub>73</sub>H<sub>149</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>S<sub>4</sub>에 대한 [M+H]<sup>+</sup> 계산치, 1321.04; 실측치, 1321.2.

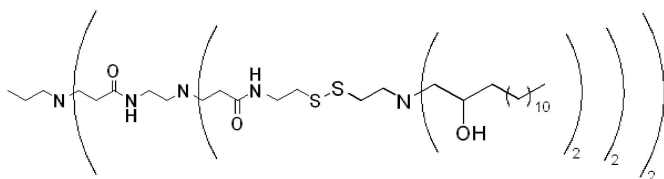
[0298] **중간체 F**



[0299]

[0300] 메탄올 중 유리 염기 시스타민(13.2g, 87mmol, 39당량)의 용액을 메탄올 중 **중간체 C**(1.41g, 2.23mmol, 1당량)의 용액에 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 1주 동안 교반하였다. 용매를 감압 하에서 제거하여 조 오일을 수득하였다. 조 오일을 MeOH/다이에틸 에터에서의 침전에 의해서 정제시켜 점성 황색 오일(0.86g, 0.35%)을 수득하였다. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.77 (m, 2H), 7.65 (t, *J* = 5.8 Hz, 4H), 3.53 (q, *J* = 6.5 Hz, 8H), 3.24 (m, 4H) 3.05 - 2.95 (m, 16H), 2.85 - 2.65 (m, 30H), 2.60 - 2.25 (m, 15H), 1.65 (br s, 38H), 1.45-1.40 (m, 2H), 0.86 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H). MS (ESI pos) *m/z*: C<sub>41</sub>H<sub>85</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>S<sub>8</sub>에 대한 [M+H]<sup>+</sup> 계산치, 1112.45; 실측치, 1112.46.

[0301] **I-24 (G2-nPr-S14-C14E)**

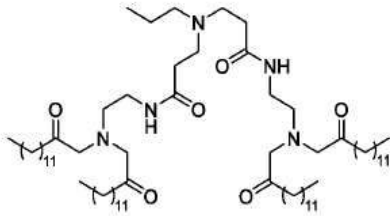


[0302]

[0303] EtOH 중 1,2-에폭시테트라데칸(1.97g, 9.27mmol, 12당량)의 용액을 밀봉 압력 용기에서 EtOH 중 **중간체**

F(0.86g, 0.77mmol, 1당량)의 용액에 첨가하였다. 혼합물을 50℃에서 72시간 동안 교반하였다. 용매를 감압 하에서 제거하였다. 조 오일을 DCM 중 30%에서 50% ULTRA 용매로의 구배를 사용하여 플래시 크로마토그래피로 정제시켰다. 목적하는 분획을 합하고, 감압 하에서 농축시켜 황색 점성 오일(0.36g, 17%)을 수득하였다. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.83 (br s, 2H), 7.71 (br s, 4H) 3.63 (m, 8H), 3.51 (m, 8H), 3.24 (m, 4H), 3.10 - 2.20 (m, 70H), 1.60-1.00 (m, 187H), 0.87 (t, J = 7.1 Hz, 1H).

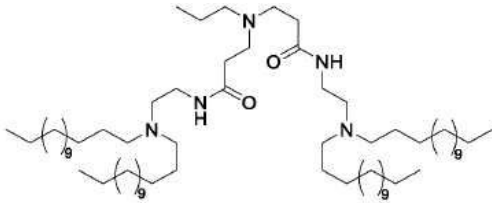
[0304] **I-15 (G1-nPr-C14K)**



[0305]

[0306] 에폭사이드 개환 반응을 사용하여 제조된 임의의 화합물을 사용하여, -OH기를 산화 반응을 통해서 케톤으로 환원시킨다. 산화제의 예는 테스-마틴 피라이오디난이다.

[0307] **I-22 (G1-nPr-C14)**

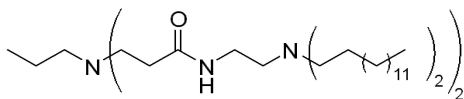


[0308]

[0309] 테스-마틴 피라이오디난(2.545g, 1.5당량)을 DCM(30ml) 중 1-테트라데칸올 (0.858g, 1당량)의 용액에 첨가하였다. 혼합물을 질소 분위기 하에서 16시간 동안 실온에서 교반하였다. 포화 수성 중탄산나트륨과 티오황산나트륨의 1:1 혼합물(100ml)을 첨가하여 반응을 반응정지시켰다. 그 다음 유기상을 다이에틸 에터(3×40ml)로 3회 추출하였다. 합한 추출물을 물(3×30ml) 및 염수(90ml)로 세척하고 황산나트륨 상에서 건조시키고, 여과하고 감압 하에서 농축시켰다. 헥산 중의 0에서 10% 에틸 아세테이트로의 구배를 사용하여 플래시 크로마토그래피로 조물질을 정제시켰다. 목적하는 분획을 합하고, 감압 하에서 농축시켜 테트라데칸알을 백색 왁스 같은 고체로서 수득하였다(0.48g, 57%).

[0310] 다이클로로에탄(DCE)(5ml) 중 **중간체 B**(0.108g, 1당량)의 용액을 얼음 위에서 테트라데칸알(0.48g, 6당량)에 첨가하였다. DCE(5ml) 중 소듐 트리아세톡시보로하이드라이드(0.48g, 6당량) 및 빙초산(0.136g, 6당량)의 용액을 혼합물에 첨가하고, 반응이 실온으로 복귀하게 하였다. 혼합물을 질소 분위기 하에서 16시간 동안 실온에서 교반하였다. 포화 수성 중탄산나트륨(50ml)을 서서히 첨가함으로써 반응을 반응정지시켰다. 유기상을 다이에틸 에터(4×40ml)로 4회 추출하였다. 합한 추출물을 염수(50ml)로 세척하고 황산나트륨 상에서 건조시키고, 여과하고 감압 하에서 농축시켰다. DCM 중의 0에서 20% ULTRA 용매로의 구배를 사용하여 플래시 크로마토그래피로 조물질을 정제시켰다. 목적하는 분획을 합하고, 감압 하에서 농축시켜 I-22(G1-nPr-C14)을 무색 오일로서 수득하였다(0.17g, 45%). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 6.98 (t, J = 5.2 Hz, 2H), 3.24 (q, J = 6.0 Hz, 3H), 2.71 (t, J = 6.6 Hz, 3H), 2.50 (t, J = 6.3 Hz, 3H), 2.42 - 2.33 (m, 9H), 2.29 (t, J = 6.6 Hz, 4H), 1.47 - 1.33 (m, 10H), 1.23 (s, 92H), 0.84 (td, J = 7.1, 5.5 Hz, 15H). MS (ESI pos) m/z: C<sub>69</sub>H<sub>141</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>에 대한 [M+H]<sup>+</sup> 계산치, 1073.11; 실측치, 1073.11.

[0311] **I-18 (G1-nPr-아마이드-t9)**



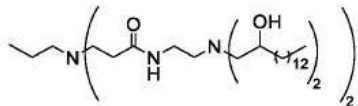
[0312]

[0313] 테스-마틴 피라이오디난(2.545g, 1.5당량)을 DCM(30ml) 중 1-테트라데칸올 (0.858g, 1당량)의 용액에 첨가하였

다. 혼합물을 질소 분위기 하에서 16시간 동안 실온에서 교반하였다. 포화 수성 중탄산나트륨과 티오황산나트륨의 1:1 혼합물(100ml)을 첨가하여 반응을 반응정지시켰다. 그 다음 유기상을 다이에틸 에터(3 × 40ml)로 추출하였다. 합한 추출물을 물(3×30ml) 및 염수(90ml)로 세척하고 황산나트륨 상에서 건조시키고, 여과하고 감압 하에서 농축시켰다. 0에서 10% 에틸 아세테이트/헥산으로의 구배를 사용하여 플래시 크로마토그래피로 조물질을 정제시켰다. 목적하는 분획을 합하고, 감압 하에서 농축시켜 테트라데칸알을 백색 왁스 같은 고체로서 수득하였다(0.48g, 57%).

[0314] 다이클로로에탄을 사용 전에 분자체(Sigma-Aldrich, 3Å, 8 내지 12메시) 상에서 1주 동안 건조시켰다. 0°C에서 다이클로로에탄(5ml) 중 **중간체 B**(0.108g, 0.376mmol, 1당량)의 용액을 테트라데칸알(0.48g, 2.3mmol, 6당량)에 첨가하였다. 다이클로로에탄(5ml) 중 소듐 트리아세톡시보로하이드라이드(STAB)(0.48g, 2.3 mmol, 6당량) 및 빙초산(0.136g, 2.26mmol, 6당량)의 용액을 혼합물에 첨가하고, 반응을 실온으로 복귀시켰다. 혼합물을 질소로 퍼징하고, 포일로 피복하고, 16시간 동안 교반하였다. 포화 수성 중탄산나트륨(50ml)을 서서히 첨가함으로써 반응을 반응정지시켰다. 유기상을 다이에틸 에터(4×40ml)로 추출하였다. 합한 추출물을 염수(50ml)로 세척하고 황산나트륨 상에서 건조시키고, 여과하고 감압 하에서 농축시켰다. 0에서 20% ULTRA/DCM으로의 구배를 사용하여 플래시 크로마토그래피로 조물질을 정제시켰다. 목적하는 분획을 합하고, 감압 하에서 농축시켜 투명한 무색 점성 오일을 수득하였다(0.17g, 45%). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6.98 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H), 3.24 (q, *J* = 6.0 Hz, 4H), 2.71 (t, *J* = 6.6 Hz, 4H), 2.50 (t, *J* = 6.3 Hz, 4H), 2.42 - 2.33 (m, 9H), 2.29 (t, *J* = 6.6 Hz, 4H), 1.47 - 1.33 (m, 10H), 1.23 (s, 92H), 0.84 (t, *J* = 7.1Hz, 15H). MS (MALDI-TOF+) *m/z*: C<sub>69</sub>H<sub>141</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>에 대한 [M+H]<sup>+</sup> 계산치, 1073.11; 실측치, 1073.11.

[0315] **I-25 (G1-C3-K2-E15)**

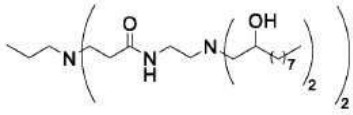


[0316]

[0317] 1-펜타데칸(0.5g, 2.37mmol, 1당량)을 다이클로로메탄(10ml)에 용해시키고, 다이클로로메탄(10ml) 중에 용해된 *m*-클로로퍼옥시벤조산(1.17g, 4.75mmol, 2당량)을 함유하는 플라스크에 적가하였다. 반응을 18시간 동안 교반하고, 그 다음 교반하면서 포화 아황산나트륨(40ml)으로 반응정지시켰다. 혼합물을 분별 깔때기로 옮기고, 다이클로로메탄(3×30ml)으로 추출하였다. 유기 분획을 수집하고, 1M 수산화나트륨(3×30ml), 염수(1×50ml)으로 세척하고, 그 다음 무수 염 상에서 건조시켰다. 유기 분획을 진공 하에서 농축시켜 1,2-에폭시펜탄을 소량의 벤조산 불순물과 함께 투명한 무색 오일로서 수득하였다(0.49g, 2.16mmol, 91%). 에폭사이드를 추가로 정제시키지 않고 사용하였다. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 2.86 (tdd, *J* = 5.5, 4.0, 2.7 Hz, 1H), 2.70 (dd, *J* = 5.1, 3.9 Hz, 1H), 2.42 (dd, *J* = 5.1, 2.7 Hz, 1H), 1.52 - 1.17 (m, 26H), 0.85 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 52.37, 47.07, 32.57, 32.00, 29.76, 29.74, 29.73, 29.71, 29.63, 29.52, 29.43, 26.04, 22.75, 14.14.

[0318] 1,2-에폭시테트라데칸 대신 1,2-에폭시펜타데칸을 사용하여 **I-1**(G1-nPr-C14E)과 유사하게 **I-25**(G1-C3-K2-E15)를 합성하였다. 정제된 화합물은 연한 황색의 투명한 점성 오일(73.9mg, 0.062mmol, 11%)이었다. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.99 - 7.90 (m, 1H), 7.87 (t, *J* = 5.6 Hz, 0.5H), 3.63 - 3.47 (m, 4H), 3.24 (q, *J* = 5.5 Hz, 1H), 2.71 (q, *J* = 6.7 Hz, 5H), 2.66 - 2.58 (m, 2H), 2.58 - 2.50 (m, 2H), 2.45 - 2.23 (m, 9H), 1.52 - 1.09 (m, 104H), 0.82 (dt, *J* = 11.9, 7.0 Hz, 15H). <sup>13</sup>C NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 172.91, 172.87, 172.77, 172.50, 70.49, 68.09, 64.77, 61.43, 55.48, 53.36, 49.83, 35.15, 35.02, 34.91, 33.86, 31.88, 29.89, 29.84, 29.81, 29.80, 29.68, 29.63, 29.33, 25.81, 25.72, 22.64, 14.06, 11.82. MS (MALDI-TOF+) *m/z*: C<sub>73</sub>H<sub>149</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>에 대한 [M+H]<sup>+</sup> 계산치, 1193.15; 실측치, 1193.2.

[0319] **I-26 (G1-C3-K2-E10)**



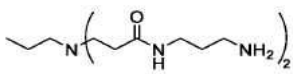
[0320]

[0321]

1,2-에폭시테트라데칸 대신 1,2-에폭시데칸을 사용하여 **I-1**(G1-nPr-C14E)과 유사하게 **I-26**(G1-C3-K2-E10)을 합성하였다. 정제된 화합물은 연한 황색의 투명한 점성 오일(0.5961g, 0.6533mmol, 38%)이었다.  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.99 - 7.75 (m, 2H), 3.69 - 3.51 (m, 4H), 3.28 (q,  $J = 5.6$  Hz, 2H), 2.82 - 2.73 (m, 4H), 2.73 - 2.55 (m, 5H), 2.53 - 2.26 (m, 13H), 1.57 - 1.11 (m, 60H), 0.86 (q,  $J = 6.9$  Hz, 15H).  $^{13}\text{C NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  70.81, 68.27, 64.87, 50.16, 35.33, 35.15, 32.02, 29.96, 29.73, 29.44, 25.88, 22.80, 14.23, 11.97. MS (MALDI-TOF+)  $m/z$ :  $\text{C}_{53}\text{H}_{109}\text{N}_5\text{O}_6$ 에 대한  $[\text{M}]^+$  계산치, 912.5; 실측치, 912.8.

[0322]

**중간체 B'**



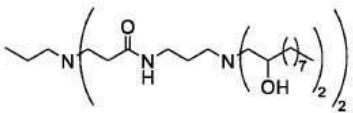
[0323]

[0324]

1,3-다이아미노프로판(9.62g, 129.7mmol, 15당량)을 메탄올(10ml)에서 **중간체 A**(2.0g, 8.6mmol, 1당량)와 합하였다. 혼합물을 질소로 퍼징하고, 포일로 피복하고, 5일 동안 실온에서 교반하였다. **중간체 A**의 소모를 TLC(15% MeOH/DCM)로 모니터링하였다. 용매를 감압 하에서 제거하였다. 다이에틸 에터 중 5% 메탄올(5×30ml)로의 연속 세척에 의해서 남아있는 프로판다이민을 제거하였다. 잔류 용매를 진공 하에서 제거하여 **중간체 B'**(0.558g, 20%)를 투명한 무색 점성 오일로서 수득하였다.  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.72 (t,  $J = 5.8$  Hz, 2H), 3.09 (q,  $J = 6.4$  Hz, 4H), 2.54 (td,  $J = 6.6, 2.5$  Hz, 8H), 2.39 (s, 7H), 2.24 - 2.18 (m, 1H), 2.14 (t,  $J = 6.5$  Hz, 3H), 1.44 (p,  $J = 6.7$  Hz, 4H), 1.28 (육중선,  $J = 7.3$  Hz, 1H), 0.69 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  172.38, 54.89, 49.50, 49.24, 39.08, 36.41, 33.15, 32.38, 19.51, 11.57. MS (DART+)  $m/z$ :  $\text{C}_{15}\text{H}_{33}\text{N}_5\text{O}_2$ 에 대한  $[\text{M}+\text{H}]^+$  계산치, 316.26; 실측치, 316.27.

[0325]

**I-27 (G1-C3-K3-E10)**



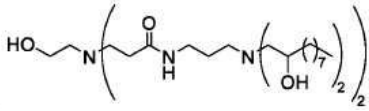
[0326]

[0327]

1,2-에폭시데칸(0.300g, 1.92mmol, 5당량) 및 **중간체 B'**(0.121g, 0.38mmol, 1당량)의 혼합물을 8-드램 스크류-캡 바이알에 함께 첨가하였다. 혼합물을 포일로 감싸고, 90°C에서 밤새 교반하였다. **중간체 B**의 소모를 TLC(35% ULTRA/DCM)로 모니터링하였다. 조 오일을 50g 실리카 카트리지 및 20% ULTRA/DCM에서 40% ULTRA/DCM으로의 용매 구배를 사용하여 플래시 크로마토그래피로 정제시켰다. 목적하는 분획을 합하고, 진공 하에서 연한 황색의 투명한 점성 오일(0.12g, 34%)로 농축시켰다.  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.96 - 7.84 (m, 2H), 3.71 - 3.58 (m, 4H), 3.30 (q,  $J = 5.2$  Hz, 2H), 3.22 - 3.10 (m, 1H), 2.77 (q,  $J = 6.8$  Hz, 3H), 2.68 - 2.58 (m, 3H), 2.57 - 2.16 (m, 13H), 1.63 (p,  $J = 6.3$  Hz, 4H), 1.54 - 1.11 (m, 58H), 0.85 (td,  $J = 7.0, 3.1$  Hz, 15H).  $^{13}\text{C NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  172.34, 70.24, 68.00, 63.19, 60.76, 49.94, 35.43, 35.24, 33.82, 31.94, 29.92, 29.66, 29.36, 25.82, 25.74, 22.72, 14.15, 11.88. MS (ESI+)  $m/z$ :  $\text{C}_{55}\text{H}_{113}\text{N}_5\text{O}_6$ 에 대한  $[\text{M}+\text{H}]^+$  계산치, 940.87; 실측치, 940.87.

[0328]

**I-28 (G1-OC2-K3-E10)**



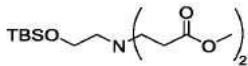
[0329]

[0330]

2-아미노-1-에탄올(0.916, 15mmol, 1당량)을 다이클로로메탄(50ml) 중 이미다졸(2.042g, 30mmol, 2당량)과 tert-부틸다이메틸실릴 클로라이드(2.487g, 16.5mmol, 1.1당량)의 혼합물에 첨가하고, 3시간 동안 실온에서 교반하였다. 그 다음 혼합물을 물(60ml)로 희석시키고, 다이클로로메탄(3×30ml)으로 추출하였다. 유기 분획을 염수(1×50ml)로 세척하고, 그 다음 무수 염 상에서 건조시켰다. 유기 분획을 진공 하에서 농축시켜 2-((tert-부틸다이메틸실릴)옥시)에탄-1-아민(2.96g, 112%)을 제조하였고, 이것을 추가로 정제시키지 않고 사용하였다. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 3.58 (t, J = 5.3 Hz, 2H), 2.73 (t, 2H), 0.86 (s, 9H), 0.02 (s, 6H).

[0331]

중간체 TBS-A'



[0332]

[0333]

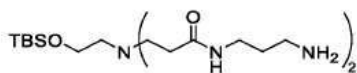
2-아미노-1-에탄올(0.916, 15mmol, 1당량)을 다이클로로메탄(50ml) 중 이미다졸(2.042g, 30mmol, 2당량)과 tert-부틸다이메틸실릴 클로라이드(2.487g, 16.5mmol, 1.1당량)의 혼합물에 첨가하고, 3시간 동안 실온에서 교반하였다. 그 다음 혼합물을 물(60ml)로 희석시키고, 다이클로로메탄(3×30ml)으로 추출하였다. 유기 분획을 염수(1×50ml)로 세척하고, 그 다음 무수 염 상에서 건조시켰다. 유기 분획을 진공 하에서 농축시켜 2-((tert-부틸다이메틸실릴)옥시)에탄-1-아민(2.96g, 112%)을 제조하였고, 이것을 추가로 정제시키지 않고 사용하였다. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 3.58 (t, J = 5.3 Hz, 2H), 2.73 (t, 2H), 0.86 (s, 9H), 0.02 (s, 6H).

[0334]

2-((tert-부틸다이메틸실릴)옥시)에탄-1-아민(2.96g, 16.9mmol, 1당량)을 메탄올(10ml)에서 메틸 아크릴레이트(3.87g, 45mmol, 3당량)와 합하였다. 혼합물을 질소로 피징하고, 포일로 피복하고, 3일 동안 실온에서 교반하였다. TBS-A'의 소모를 TLC(20% MeOH/DCM)로 모니터링하였다. 용매 및 과량의 메틸 아크릴레이트를 진공 하에서 제거하여 TBS-A'를 투명한 무색 오일(3.72g, 71%)로서 제조하였다. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 3.59 (s, 7H), 2.76 (t, J = 7.2 Hz, 4H), 2.53 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 2.38 (d, J = 14.3 Hz, 2H), 0.82 (s, 9H), -0.02 (s, 6H).

[0335]

중간체 TBS-B''



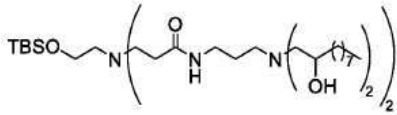
[0336]

[0337]

1,3-다이아미노프로판(6.35g, 85.6mmol, 8당량)을 메탄올(10ml)에 용해된 TBS-A'(3.72g, 10.7mmol, 1당량)를 함유하는 플라스크에 첨가하였다. 플라스크를 질소로 피징하고, 포일로 피복하고, 5일 동안 교반하였다. TBS-A'의 소모를 TLC(15% MeOH/DCM)로 모니터링하였다. 용매를 감압 하에서 제거하고, 헥산 중 15% 에틸 아세테이트(5×20ml)로의 연속 세척에 의해서 대부분의 1,3-다이아미노프로판을 제거하였다. 잔류 용매를 진공 하에서 제거하여 TBS-B''를 잔류하는 1,3-다이아미노프로판 불순물과 함께 투명한 무색 점성 오일(1.59g, 3.68mmol, 34%)로서 수득하였다. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.62 (t, J = 5.7 Hz, 2H), 3.42 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 3.02 (q, J = 6.6 Hz, 4H), 2.59 - 2.44 (m, 18H, 1,3-다이아미노프로판 불순물), 2.37 (t, J = 6.1 Hz, 2H), 2.12 - 2.02 (m, 6H), 1.75 (br s, 16H, 물), 1.41 - 1.30 (m, 9H), 0.63 (s, 7H), 0.62 (s, 2H), -0.20 (s, 4H), -0.20 (s, 2H). <sup>13</sup>C NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 172.02, 60.67, 59.88, 54.93, 50.08, 48.86, 39.37, 39.02, 36.52, 36.26, 33.33, 32.44, 25.45, 20.55, 17.79, 13.71, -5.79.

[0338]

중간체 TBS-I-28 (G1-OC2-K3-E10)



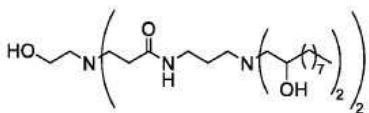
[0339]

[0340]

1,2-에폭시데칸(2.3g, 14.7mmol, 12당량) 및 중간체 TBS-B''(0.53g, 1.23mmol, 1당량)의 혼합물을 8-드랩 스크류-캡 바이알에 함께 첨가하였다. 플래시 크로마토그래피 동안 분리될 수 있는 잔류하는 1,3-다이아미노프로판을 알킬화시키기 위해서 더 많은 당량의 1,2-에폭시데칸이 필요하였다. 혼합물을 포일로 감싸고, 90℃에서 밤새 교반하였다. 조 오일을 50g 실리카 카트리지 및 20% ULTRA/DCM에서 40% ULTRA/DCM으로의 용매 구배를 사용하여 플래시 크로마토그래피로 정제시켰다. 목적하는 분획을 합하고, 진공 하에서 TBS-I-28의 연한 황색의 투명한 점성 오일(0.83g, 0.79mmol, 64%)로 농축시켰다. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.76 - 7.67 (m, 2H), 3.75 - 3.57 (m, 6H), 3.33 - 3.25 (m, 2H), 3.23 - 3.11 (m, 2H), 2.82 - 2.74 (m, 4H), 2.66 - 2.58 (m, 4H), 2.51 (dd, J = 13.4, 3.1 Hz, 2H), 2.45 - 2.37 (m, 6H), 2.31 (t, J = 6.5 Hz, 4H), 2.23 (dd, J = 13.0, 2.3 Hz, 2H), 1.69 - 1.57 (m, 4H), 1.48 - 1.18 (m, 66H), 0.86 (t, J = 6.9 Hz, 24H), 0.04 (s, 6H). <sup>13</sup>C NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 172.60, 172.56, 70.28, 68.00, 63.17, 60.86, 60.83, 60.78, 55.96, 55.16, 55.09, 53.75, 53.47, 50.65, 50.61, 50.59, 50.56, 38.05, 37.89, 37.85, 35.40, 35.20, 34.35, 34.32, 34.16, 31.95, 29.92, 29.66, 29.37, 27.17, 26.58, 25.99, 25.83, 25.77, 22.73, 18.33, 14.16, -5.24. MS (DART+) m/z: C<sub>60</sub>H<sub>125</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>Si 에 대한 [M+H]<sup>+</sup> 계산치, 1056.93; 실측치, 1056.95.

[0341]

**I-28 (G1-OC2-K3-E10)**



[0342]

[0343]

그 다음, TBS-I-28(0.830g, 0.785mmol, 1당량)을 다이에틸 에터(50ml)에 용해시키고 0℃까지 냉각시키고, 테트라-n-부틸암모늄 플루오라이드(TBAF)(3.14ml, 3.14mmol, 4당량)의 용액을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온으로 만들고, 포일로 덮고, 18시간 동안 교반하였다. TBS 보호 물질의 소모를 TLC(35% ULTRA/DCM)로 모니터링하였다. 유기 분획을 포화 염화암모늄(5× 15ml) 중 20% 1M 수산화나트륨 및 염수(1×50ml)로 세척하고, 그 다음 무수 염 상에서 건조시켰다. 유기 분획을 조 오일로 농축시키고, 50g 실리카 카트리지 및 20% ULTRA/DCM에서 50% ULTRA/DCM으로의 용매 구배를 사용하여 플래시 크로마토그래피로 정제시켰다. 목적하는 분획을 수집하고, 진공 하에서 농축시켜 16의 투명한 무색 점성 오일(0.20g, 0.21mmol, 27%)을 수득하였다. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.97 - 7.85 (m, 2H), 4.46 (s, 6H), 3.69 - 3.50 (m, 9H), 3.35 - 3.24 (m, 3H), 3.08 - 2.93 (m, 1H), 2.74 - 2.13 (m, 20H), 1.71 - 1.54 (m, 4H), 1.45 - 1.17 (m, 73H), 0.85 (t, J = 6.8 Hz, 15H). <sup>13</sup>C NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 172.96, 172.76, 172.72, 70.58, 70.47, 68.13, 68.06, 63.18, 60.66, 58.51, 56.22, 55.98, 55.61, 55.37, 53.62, 49.62, 49.49, 49.44, 39.24, 38.95, 38.53, 38.26, 35.39, 35.22, 34.57, 34.35, 31.91, 29.86, 29.61, 29.32, 26.94, 26.86, 26.08, 25.77, 25.70, 22.69, 20.71, 14.14. MS (ESI+) m/z: C<sub>54</sub>H<sub>111</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>에 대한 [M+H]<sup>+</sup> 계산치, 942.85; 실측치, 942.85.

[0344]

**중간체 TBS-A**



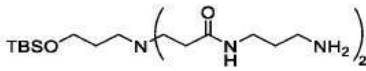
[0345]

[0346]

2-아미노-1-에탄올 대신 3-아미노-1-프로판올을 사용하여 중간체 TBS-A를 중간체 TBS-A'와 유사하게 합성하였다. 화합물은 투명한 무색 오일(2.38g, 6.58mmol, 80%)이었다. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 3.61 (s, 6H), 2.71 (t, J = 7.2 Hz, 5H), 2.45 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 2.40 (t, J = 7.2 Hz, 4H), 1.58 (p, J = 6.3 Hz, 2H), 0.84 (s, 9H), -0.01 (s, 6H). <sup>13</sup>C NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 173.11, 61.02, 51.53, 50.28, 49.37,

32.58, 30.33, 25.98, 18.32, -3.52, -5.30.

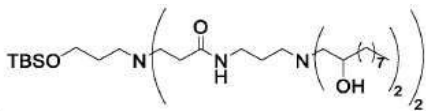
[0347] **중간체 TBS-B**



[0348]

[0349] 중간체 TBS-B를 중간체 TBS-A'와 유사하게 합성하였다. 화합물은 잔류하는 1,3-다이아미노프로판 불순물을 갖는 투명한 무색 점성 오일(0.52g, 1.16mmol, 38%)이었다.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.36 (t,  $J = 5.7$  Hz, 2H), 3.58 (t,  $J = 5.9$  Hz, 2H), 3.26 (q,  $J = 6.4$  Hz, 4H), 2.72 (q,  $J = 6.8$  Hz, 8H), 2.66 (t,  $J = 6.4$  Hz, 4H), 2.48 (t,  $J = 6.9$  Hz, 2H), 2.27 (t,  $J = 6.3$  Hz, 4H), 1.57 (p,  $J = 6.7$  Hz, 6H), 0.85 (s, 9H), 0.01 (s, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  172.46, 60.71, 50.12, 49.46, 39.94, 39.80, 37.31, 37.15, 34.06, 32.79, 29.79, 25.92, 18.22, -5.22.

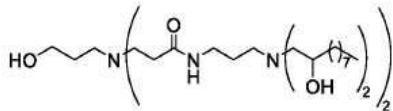
[0350] **중간체 TBS-I-29**



[0351]

[0352] 중간체 TBS-I-29를 중간체 TBS-I-28과 유사하게 합성하였다. 정제된 화합물은 연한 황색의 투명한 점성 오일 (0.25g, 0.23mmol, 40%)이었다.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.70 - 7.58 (m, 2H), 3.66 - 3.54 (m, 7H), 3.26 (q,  $J = 6.1$  Hz, 2H), 2.72 - 2.55 (m, 7H), 2.53 - 2.45 (m, 6H), 2.44 - 2.35 (m, 6H), 2.31 - 2.24 (m, 5H), 2.21 (dt,  $J = 13.0, 2.6$  Hz, 2H), 1.69 - 1.51 (m, 8H), 1.47 - 1.14 (m, 64H), 0.87 - 0.82 (m, 2H), 0.01 (t,  $J = 1.0$  Hz, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  172.62, 70.15, 67.87, 63.10, 60.80, 53.39, 49.97, 35.31, 35.09, 31.86, 29.84, 29.58, 29.28, 25.90, 25.75, 25.68, 22.63, 18.18, 14.06, -5.23.

[0353] **I-29 (G1-OC3-K3-E10)**



[0354]

[0355] 중간체 TBS-I-29를 중간체 TBS-I-29와 유사하게 탈보호시켜 I-29를 수득하였다. 정제된 화합물은 투명한 무색 점성 오일이었다(0.080g, 0.084mmol, 35%).  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.94 - 7.74 (m, 2H), 4.49 (br s, 7H), 3.72 - 3.62 (m, 7H), 3.57 - 3.45 (m, 1H), 3.38 - 3.24 (m, 2H), 3.16 - 3.04 (m, 1H), 2.79 - 2.66 (m, 4H), 2.62 (t,  $J = 6.0$  Hz, 2H), 2.58 - 2.42 (m, 6H), 2.41 - 2.30 (m, 4H), 2.25 (dt,  $J = 13.0, 2.6$  Hz, 2H), 1.74 - 1.60 (m, 8H), 1.47 - 1.18 (m, 75H), 0.86 (t,  $J = 6.9$  Hz, 12H).  $^{13}\text{C}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  172.28, 70.22, 70.09, 67.96, 62.99, 60.70, 55.82, 55.69, 54.52, 53.58, 50.55, 38.69, 38.60, 38.19, 38.08, 35.47, 35.25, 34.51, 34.40, 34.26, 31.95, 29.90, 29.65, 29.37, 28.05, 26.70, 26.20, 25.78, 25.72, 22.73, 20.38, 14.17, 13.74. MS (DART+)  $m/z$ :  $\text{C}_{55}\text{H}_{113}\text{N}_5\text{O}_7$ 에 대한  $[\text{M}+\text{H}]^+$  계산치, 956.86; 실측치, 956.88.

[0356] **실시예 2: 멀티플렉싱 RNA 나노입자의 합성**

[0357] RNA 나노입자의 제형 전에, 표면을 멸균하였다. 유리제품 및 교반 막대는 250°C에서 2 내지 24시간 동안 엔도톡신 베이킹을 거친 후 10N NaOH로 NaOH를 행구는 과정을 거친다. 그런 다음 유리제품을 호일로 덮어 사용하기 전에 멸균 상태를 보장하였다. 제형 물질 손실을 고려하여 25%를 초과하는 적절한 양의 물질을 준비할 수 있다. 투석 카세트를 물질을 첨가하기 전에 1× 인산염 완충 식염수(PBS)에 미리 담가 두었다.

[0358] PEG-지질과 같은 물질을 EtOH와 함께 용액에 넣고 사용 전에 와류시켰다. 공식 시트에 따라 적절한 양의 EtOH,

PAMAM 덴드론 거대분자, PEG-지질 및 임의의 추가 부형제를 1.5ml Eppendorf 튜브에 순서대로 첨가하였다. 전달 물질을 간단한 초음파 처리하고 필요한 경우 침전물을 제거하기 위해 약간 가운시켰다. 마찬가지로, 생물안전성 캐비닛(BSC)에서 적절한 부피의 시트레이트 완충액, 초순수(ultrapure water) 및 선택된 RNA를 1.5ml Eppendorf 튜브에 순서대로 첨가하였다.

- [0359] 입구가 10cm이고 출구가 10cm인 Zeus 튜브가 있는 멸균 기밀 유리 주사기를 로딩 전에 70% 에탄올로 행구었다. RNA 물질을 담도록 지정된 주사기는 추가 시트레이트 완충액 세척을 거쳤다. 전달 물질 및 RNA 물질을 각각의 주사기에 로딩하였다. 기포가 없고 튜브가 프라이밍되었는지 확인한 후 2개의 주사기를 주사기 펌프에 로딩하고 모든 튜브를 미세유체 칩에 부착하였다.
- [0360] 또한, 출구 배관을 투석 장치에 부착하였다. 주사기 펌프에 적절한 설정을 설정하였고, 주사기 펌프를 동시에 시작하였다. 중지되면 투석 장치에서 배관을 제거하고 합한 물질을 1XPBS 완충액에서 투석되도록 방지하여 나노 입자를 중성 pH 7.4로 되돌렸다. 적절한 시간 후에 주사기와 바늘을 사용하여 투석 장치에서 나노입자를 제거하고 에페도르 튜브에 첨가하고 주위 온도에서 저장하였다. 입자는 어떠한 눈에 띄는 변화 없이 실온 또는 -20C에서 적어도 48시간 동안 안전하게 저장될 수 있다.
- [0361] 제형을 10mM 내지 95mM 시트레이트 완충액 pH 3.0, 5.0 또는 6.0에서 완성하였다. 핵산 및 전달 물질 스트림의 총 부피 유량은 수성 상 부피 대 유기 상 부피의 비율이 1:1, 2.5:1 및 5:1로 유동하는 대략 1ml/분 내지 7.5ml/분 범위였다. 최종 RNA 나노입자를 5:1 내지 25:1의 덴드론-대-RNA의 질량비로 제형화하였다.
- [0362] 이러한 나노입자를 성공적인 제형을 입증하기 위해 동적 광 산란(DLS)으로 특징규명하였다.
- [0363] 하기 표 1의 다음 나노입자를 유사한 방식으로 제조하였다. ID는 나노입자 제형의 식별 번호를 나타낸다. siRNA는 작은 간섭 RNA이다. LNC RNA는 긴 비암호 RNA이다. Fip-mKate2 플라스미드는 DNA 플라스미드이다. Rluc IVT RNA는 5' 캡과 폴리-A 꼬리가 없는 mRNA이다. 14:0 PEG2000 PE는 1,2-다이미리스토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[메톡시(폴리에틸렌 글리콜)-2000]이고, 여기서 14:0은 18:0에 의해서 대체될 수 있고, 2000은 5000에 의해서 대체될 수 있다. 18:1 PEG2000 PE는 1,2-다이올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[메톡시(폴리에틸렌 글리콜)-2000]이고 여기서 2000은 5000에 의해서 대체될 수 있다. DMG-PEG2000은 1,2-다이미리스토일-rac-글리세로-3-메톡시폴리에틸렌 글리콜-2000이다. DSG-PEG2000은 다이스테아로일-rac-글리세롤-PEG2K이고, DSPC는 1,2-다이스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린이다. Cas9 IVT는 5' 캡과 폴리-A 꼬리가 없는 mRNA이다. Rluc 및 Fluc는 각각 레닐라(Renilla) 루시퍼라제 mRNA 및 파이어플라이 루시퍼라제 mRNA이다.

표 1

ID #	성분				특징규명					
	나노물질	핵산 레이오 드 (몰비)	지질-PEG (N:M PEG Y N = 지질 탄소 길이; M = 지질 부분 내의 불포화 결합 위치; Y = 반복 단위의 수)	부형제	제 형 중 pH	나노 입자 크기 분포 평균 직경 (nm)	다분 산도 지수	캡슐 화 효율 (%)	전달 성분 대 핵산 의 질량 비	모든 전달 성분의 몰비(나노물질/ 폴리사테롤/DS PC/지질-PEG) (몰%)
AM01	I-1 (G1-nPr-C14E)	siRNA + LNC RNA (1:1)	14:0 PEG2000 PE	N/A	3	190	0.046		5:1	96.6/0/0/3.4
AM02	I-1 (G1-nPr-C14E)	siRNA + LNC RNA (1:1)	18:0 PEG2000 PE	N/A	3	160.4	0.066		5:1	96.5/0/0/3.5
AM03	I-1 (G1-nPr-C14E)	LNC RNA	18:0 PEG2000 PE	N/A	6	254.5	0.094		5:1	97/0/0/3
AM04	I-1 (G1-nPr-C14E)	siRNA + LNC RNA (1:1)	18:1 PEG2000 PE	N/A	3	154.1	0.194		5:1	92/0/0/8
AM06	I-1 (G1-nPr-C14E)	siRNA	14:0 PEG2000 PE	N/A	3	152	0.065	83	5:1	96.5/0/0/3.5
AM08	I-1 (G1-nPr-C14E)	siRNA	18:0 PEG2000 PE	N/A	3	146	0.102	69	5:1	96.5/0/0/3.5
AM10	I-1 (G1-nPr-C14E)	siRNA	18:1 PEG2000 PE	N/A	5	272.9	0.03	68	10:1	96.5/0/0/3.5
AM15	I-3 (G1-nPr-C7RfE)	siRNA	18:0 PEG2000 PE	N/A	5	104.4	0.275		5:1	96%/0/0/4
AM16	I-3 (G1-nPr-C7RfE)	siRNA	18:1 PEG2000 PE	N/A	5	131.4	0.276		5:1	96/0/0/4
AM17	I-3 (G1-nPr-C7RfE)	핵산 없음	18:0 PEG2000 PE	N/A	5	171.6	0.154		5:1	96/0/0/4
AM21	I-1 (G1-nPr-C14E)	siRNA	14:0 PEG2000 PE	N/A	5	190	0.002	89	5:1	96.5/0/0/3.5
AM23	I-2 (G1-nPr-	siRNA	14:0 PEG2000	N/A	5	257.7	0.05		5:1	97.5/0/0/2.5

[0364]

	C1001E)		PE							
AM25	I-7 (G1-nPr-S8-C14E)	siRNA	14:0 PEG2000 PE	N/A	3	124.9	0.0687		5:1	96.0/0/4
AM31	I-5 (G2-nPr-C1001E)	siRNA	14:0 PEG2000 PE	N/A	3	217	0.103		5:1	94.0/0/6
AM33	I-1 (G1-nPr-C14E)	Fip-mKate2 플라스미드	14:0 PEG2000 PE	N/A	4	141.9	0.093		10:1	96.5/0/3.5
AM38	I-5 (G2-nPr-C1001E)	siRNA	18:0 PEG5000 PE	N/A	3	103.1	0.13		5:1	98.5/0/0/1.5
AM39	I-5 (G2-nPr-C1001E)	siRNA	18:1 PEG5000 PE	N/A	3	78.7	0.14		5:1	98.5/0/0/1.5
AM40	I-5 (G2-nPr-C1001E)	siRNA	14:0 PEG2000 PE	N/A	3	117.3	0.058		5:1	98.5/0/0/1.5
AM44	I-4 (G2-nPr-C14E)	siRNA	14:0 PEG2000 PE	N/A	3	128	0.033	97	5:1	98.5/0/0/1.5
AM51	I-1 (G1-nPr-C14E) + I-4 (G2-nPr-C14E)	Rluc IVT RNA	14:0 PEG2000 PE	N/A	3	95.93	0.108	97	10:1	98.5/0/0/1.5
AM52	I-1 (G1-nPr-C14E) + I-4 (G2-nPr-C14E)	Rluc IVT RNA + sgRNA (1:1)	14:0 PEG2000 PE	N/A	3	144.3	0.168	98	10:1	98.5/0/0/1.5
GT01	I-5 (G2-nPr-C1001E)	siRNA	14:0 PEG2000 PE	N/A	3	138	0.062	98	5:1	98.5/0/0/1.5
JCS13	I-1 (G1-nPr-C14E)	Rluc RNA	DSG-PEG2000	콜레스테롤 + DSPC	3	147.5	0.125	88	14.5:1	50/38.5/10/1.5
JCS16	I-1 (G1-nPr-C14E)	Fluc mRNA	DMG-PEG2000	콜레스테롤 + DSPC	3	165	0.015	93	19:1	50/38.5/10/1.5
AL10	I-1 (G1-nPr-C14E) + I-4 (G2-nPr-C14E)	Cas9 IVT RNA + sgRNA (19.37:80.63)	14:0 PEG2000 PE	N/A	3	118.33	0.080	97	16.5	98.5/1.5
AL13	I-1 (G1-nPr-	Cas9 IVT	DMG-PEG2000	콜레스테롤 +	3	140.93	0.192	94	19:1	50/38.5/10/1.5

[0365]

	C14E0	RNA + sgRNA (19.37:80.63)		DSPC						
AM62	I-23 (G1-nPr-C16E)	siRNA	14:0 PEG2000 PE	N/A	3	158	0.064	83	5:1	98.5/0/0/1.5
AM64	I-2 (G1-nPr-C1001E)	siRNA	14:0 PEG2000 PE	N/A	3	144.8	0.081	81	5:1	98.5/0/0/1.5
AM65	I-7 (G1-nPr-S8-C14E)	siRNA	14:0 PEG2000 PE	N/A	3	188.5	0.16	81	5:1	98.5/0/0/1.5

[0366]

[0367]

[0368]

**실시예 3: RNA 캡슐화 효율 검정**

3종의 상이한 나노입자를 I-1(G1-nPr-C14E), 25bp siRNA 및 PEG-지질 부형제와 함께 pH 3.0에서 제형화하였다. PEG-지질 부형제는 14:0 PEG2000 PE, 18:0 PEG2000 PE 또는 18:1 PEG2000 PE 중 하나였다. 나노물질 대 RNA 질량비는 5:1이었고 나노물질 대 PEG 몰비는 96.5:3.5였다. 이 검정을 96웰 플레이트에서 삼중으로 수행하였다. 간략하면, 입자를 TE 완충액 또는 물에 희석시키고(1:25), 37°C에서 10분 동안 1% TritonX로 처리하여 자가 조립을 방해하였다. 농도를 보간하기 위해 siRNA 표준 곡선을 작성하였다. RiboGreen 시약을 첨가한 직후 Tecan Infinite M200 플레이트 판독기로 형광 강도를 측정하였다(여기 = 480nm, 방출 = 525nm, 적분 시간 = 40 μs).

[0369]

본 출원의 I-1(G1-nPr-C14E) 나노입자의 RNA 농도 및 RNA 캡슐화 효율을 변형된 Quant-iT RiboGreen 검정을 사

용하여 정량화하였다(Walsh C et al., Microfluidic-based manufacture of siRNA-lipid nanoparticles for therapeutic applications. Methods Mol Biol. 2014; 1141:109-20).

[0370] **실시예 4: 시험관내에서 세포로의 siRNA의 기능성 전달**

[0371] GFP siRNA를 전달하는 I-1(G1-nPr-C14E) 나노입자는 HEK293-GFP 세포에서 GFP 발현을 감소시킴.

[0372] 나노입자를 I-1(G1-nPr-C14E), PEG-지질 및 녹색 형광 단백질(GFP)에 대한 siRNA와 함께 10mM 시트레이트 완충액 pH 3에서 제형화하였다. 나노물질 대 RNA 질량비는 5:1이었다. 나노물질 대 PEG 물비는 96.5:3.5였다. 녹색 형광 단백질(GFP)-양성 인간 배아 신장 세포(HEK293-GFP & RFP, GenTarget Inc.)를 처리하여 세포로의 siRNA의 시험관내 전달을 평가하였다.

[0373] 세포를 검정색 96웰 플레이트에 웰당 대략 14000개 세포의 밀도로 플레이팅하고 37℃ 및 5% CO<sub>2</sub>에서 밤새 인큐베이션시켰다. 이어서, GFP siRNA(Invitrogen)가 있거나 없이 14:0 PEG2000 PE 또는 18:0 PEG2000 PE로 제형화된 I-1(G1-nPr-C14E)을 PBS 대조군과 함께 세포에 첨가하였다. 48시간 후 Hoechst 염색을 96웰 플레이트의 처리된 세포에 15분 동안 첨가하였다. 그런 다음 96웰 플레이트를 잠시 원심분리시켰다. Hoechst 함유 배지를 제거하고, 세포를 PBS에 재현탁시켰다. GFP 및 Hoechst 형광 강도를 플레이트 판독기를 사용하여 정량화한다.

[0374] GFP siRNA를 운반하는 I-1(G1-nPr-C14E) 및 14:0 PEG2000 PE 나노입자, 및 GFP siRNA를 운반하는 I-1(G1-nPr-C14E) 및 18:0 PEG2000 PE 나노입자 둘 다는 siRNA가 없는 각각의 나노입자 및 PBS에 비해서 48시간 후에 GFP 수준을 감소시켰다. 평균 형광 강도(MFI)를 Hoechst 및 PBS 처리 대조군(n=3)에 대해 표준화하였다.

**표 2**

처리	핵산	표준화된 MFI	표준 편차
PBS (음성 대조군)	없음	1.00	0.25
I-1 (G1-nPr-C14E)/14:0 PEG2000 PE	없음	1.14	0.24
I-1 (G1-nPr-C14E)/14:0 PEG2000 PE	GFP siRNA	0.47	0.34
I-1 (G1-nPr-C14E)/18:0 PEG2000 PE	없음	0.89	0.12
I-1 (G1-nPr-C14E)/18:0 PEG2000 PE	GFP siRNA	0.67	0.07

[0375]

[0376] **실시예 5: 시험관내에서 세포로의 mRNA의 기능성 전달**

[0377] LNP를 I-1(G1-nPr-C14E), 콜레스테롤, DSPC, DSG-PEG 2000(50/38.5/10/1.5몰%) 및 레닐라 루시페라제(RLuc) mRNA와 함께 제형화하였다. 간략하면, 300,000개의 인간 배아 신장 세포(HEK293)에 1µg의 mRNA를 24웰 플레이트에서 형질주입시켰다. 형질주입 24시간 후, 세포를 용해시키고 Renilla Luciferase Assay System(Promega)에 따라 처리하였다. 상대 발광 단위(RLU)를 TECAN Infinite M200 플레이트 판독기로 결정하였다(n=3).

[0378] I-1(G1-nPr-C14E)/콜레스테롤/DSPC/DSG-PEG 2000 나노입자는 상업적으로 입수 가능한 형질주입 시약인 Lipofectamine MessengerMax(Invitrogen)와 비교하여 HEK293 세포에서 RLuc 발현을 유의하게 증가시켰다.

**표 3**

처리	평균 RLU	표준 편차
PBS (음성 대조군)	199	24
Lipofectamine MessengerMax	47139	2975
I-1 (G1-nPr-C14E)/콜레스테롤/DSPC/DSG-PEG2000	2525798	85658

[0379]

[0380] 또 다른 실험에서, 세포를 I-1(G1-nPr-C14E), 14:0 PEG2000 PE(96.5/3.5몰%) 및 RLuc mRNA와 함께 제형화된 나노입자를 사용하여 유사한 방식으로 처리하였다.

[0381] I-1(G1-nPr-C14E)/14:0 PEG2000 PE 나노입자는 PBS 처리된 세포와 비교하여 상대 발광 단위(RLU)를 상당히 증

가시켰다. 이는 I-1(G1-nPr-C14E)/14:0 PEG2000 PE 입자를 헬퍼 지질 없이도 세포에 형질주입할 수 있음을 시사한다. 하기 표 4는 형질주입 후 24시간의 RLuc 발현을 나타낸다.

**표 4**

처리	평균 RLU	표준 편차
PBS (음성 대조군)	104	10
I-1 (G1-nPr-C14E)/14:0 PEG2000 PE	123892	5603

[0382]

[0383]

**실시예 6: RNA 방출에 대한 제형 pH 효과**

[0384]

I-1(G1-nP4-C14E) 및 14:0 PEG2000 PE를 함유하는 나노입자의 제형 pH는 기본 조건에서 입자의 안정성에 영향을 미친다. Ribogreen Assay(ThermoFisher)는 LNP의 캡슐화 효율을 결정하는 데 사용되는 일반적인 방법이다. 이러한 검정은 전형적으로 TE 완충액(pH 8.0)에서 수행되며 1% TritonX를 첨가하면 입자가 파괴되어 RNA 포착을 결정한다. 10mM 시트레이트 완충액 pH 5.0에 제형화된 입자의 캡슐화 효율은 TritonX가 없으면 입자가 파괴되기 때문에 TE 완충액에서는 결정할 수 없다. 물은 입자를 파괴하지 않기 때문에 캡슐화 효율을 정확하게 결정하기 위해 TE 완충액 대신 물을 사용할 수 있다는 것을 발견하였다. 흥미롭게도, 10mM 시트레이트 완충액 pH 3.0과 함께 제형화된 나노입자는 TE 완충액 및 물 둘 다에서 검정될 수 있다.

**표 5**

	pH 3		pH 5	
	EE	표준 편차	EE	표준 편차
TE 완충액	0.70996	0.080723	0.119281	0.012121
물	0.831935	0.053595	0.885682	0.069516

[0385]

[0386]

**실시예 7: 파이어플라이 루시퍼라제 mRNA의 생체내 발현**

[0387]

LNP를 I-1(G1-nPr-C14E), 콜레스테롤, DSPC, DMG-PEG 2000(50/38.5/10/1.5몰%) 및 Trilink Biotechnologies로부터의 Firefly Luciferase(FLuc) (L-7202)(RLuc) mRNA와 함께 제형화하였다.

[0388]

한 실험에서, 9 내지 10주령 C57BL/6 마우스(n=3)에게 0.4mg/kg의 LNP를 정맥 주사하였다. 총 플럭스는 초당 광자(p/s)이고 음성 대조군은 인산염 완충 식염수(PBS)이다.

**표 6**

	총 플럭스 (p/s)	
	I-1 (G1-nPr-C14E)/콜레스테롤/DSPC/DMG-PEG2000	PBS (음성 대조군)
간	1.16E+09	4.74E+03
비장	6.81E+07	1.79E+03
신장	1.36E+06	8.23E+02
폐	7.62E+06	4.39E+03
뒷다리	2.21E+06	1.21E+04
심장	3.89E+05	3.65E-01

[0389]

[0390]

또 다른 실험에서, 10주령 C57BL/6 마우스(n=1)에게 동일한 LNP를 0.01mg/kg으로 근육내 주사하였다. 총 플럭스는 초당 광자(p/s)이고 음성 대조군은 인산염 완충 식염수(PBS)이다.

표 7

		총 플럭스(p/s)
	I-1 (G1-nPr-C14E) 콜레스테롤/DSPC/D MG-PEG2000	PBS (음성 대조군)
근육	5.37E+06	1.77E+04

[0391]

[0392]

주사 6시간 후에, 모든 마우스에게 D-루시페린(150mg/kg, 복강내)을 주사하였다. 파이어플라이 루시페라제는 기질의 존재 하에서 생물발광을 방출한다. 장기를 10 내지 15분 내에 수거하고 IVIS Lumina 시스템(Perkin Elmer)을 사용하여 발광을 검출하였다.

[0393]

정맥 주사된 마우스는 간, 비장, 폐, 신장, 심장 및 뼈에서 루시페라제를 발현하였다. 근육내 주사된 마우스는 주사 부위 및 트레이닝 림프절에서 루시페라제를 발현하였다.

[0394]

**실시예 8: 이온화 가능한 지질 구조체(LNP)**

[0395]

**물질 및 방법**

[0396]

**일반적인 지질 합성**

[0397]

모든 화학물질과 용매는 상업적으로 구입하였으며 달리 명시하지 않는 한 제공받은 그대로 사용하였다. 정제는 재사용 가능한 카트리지(Biotage Sfar DLV)에 수동으로 패킹한 순상 실리카겔(실리카 겔, 230 내지 400메시, 등급 60, Fisher Chemical) 칼럼에서 플래시 크로마토그래피(Buchi Pure C-815 플래시 크로마토그래피 시스템, ELSD 검출기)로 수행하였다. 플래시 크로마토그래피는 ULTRA를 극성 용매(75:22:3 부피비의 DCM:MeOH:NH<sub>4</sub>OH(H<sub>2</sub>O 중 30%)의 혼합물)로 사용하였다. 반응을 박층 크로마토그래피(Supelco TLC Silica Gel 60 F<sub>254</sub>)로 모니터링하고, 실리카 상의 아이오딘 염색을 사용하여 시각화하였다.

[0398]

모든 이온화 가능한 지질을 반응식 1에 제시된 바와 같은 방법에 의해서 합성하였다. 자세한 합성 방법 및 분자 특징규명 분석은 실시예 1에 설명되어 있다.

[0399]

**파이어플라이 루시페라제 mRNA 합성**

[0400]

T7 프로모터, 최소 5' 미번역 영역 및 마우스 알파 글로빈 서열에서 유래된 3' 미번역 영역을 함유하는 파이어플라이 루시페라제 DNA 주형을 Integrated DNA Technologies에서 맞춤형 유전자로 주문하였다(표 8)[Trepotec, Z. et al., Maximizing the Translational Yield of mRNA Therapeutics by Minimizing 5'-UTRs, Tissue Eng. Part A 25, 69-79, 2019]. DNA 주형의 시험관내 전사는 HiScribe T7 키트(NEB)를 사용하여 수행하였다. 우리딘을 N<sup>1</sup>-메틸-슈도우리딘-5'-트라이포스페이트(Trilink Biotechnologies)로 완전히 대체하여 변형된 mRNA를 생성시켰다. 백시니아 시스템 및 2'-O-메틸트랜스퍼라제(NEB)를 사용하여 RNA를 cap-1 구조로 캡핑하고 약 100개의 뉴클레오타이드(nt) poly(A) 꼬리를 효소적으로 추가하였다(NEB). 생성된 mRNA를 실리카 컬럼 크로마토그래피로 정제시켰다. Nanodrop을 사용하여 농도를 측정하고 겔 전기 영동으로 순도를 결정하였다.

표 8

파이어 루시퍼라제 DNA 주형에 대한 올리고뉴클레오타이드

명칭	DNA 서열 (5'에서 3'로)
파이어 루시퍼라제 DNA 주형	TAGAAACTGGGCTTGTGCGAGACTAATACGACTCACTATAGGGAGACTG CCACCATGGAAGACGCGAAGAATATCAAGAAGGGACCTGCACCCCTCT ATCCACTGGAAGACGGCACTGCTGGAGAGCAGCTCCATAAAGGCCATGA AGAGATACGCACTGGTGCCTGGTACAATCGCATTACCAGCAGCTCATAI TGAGGTCGATATTACATACGCCGAATATTTCGAGATGTCGGTGAGACTC GCTGAGGCAATGAAGCGGTACGGGCTGAATACTAACCACAGGATCGTC GTGTGTTTCAGAGAACAGCCTGCAGTCTTCATGCCTGTGCTGGGTGCTC TGTTCAATGGGGTTGCCGTTGCTCCAGCAAACGACATTATAACGAGAG GGAACCTGCTTAATAGCATGGCAATTAGCCAGCCGACAGTGGTITTTGTG AGTAAGAAAGGACTCCAAAAAATTCTGAACGTCAGAAAAAATTACCT ATCATTCAGAAGATCATCATCGGATAGCAAGACAGACTACCAGGGC TTTCAGAGCATGTATACCTTTGTGACCAGCCACCTGCCGCCAGGGTTTA ACGAGTATGATTTTCGTACCCGAAAGCTTCGACCGGGACAAAACCATCG CATTGATCATGAATTCCTCTGGGTCAACCGGCTCCCTAAAGGGGTAGC ACTGCCACACCGAACTGCGTGCCTGCGCTTACCCACGCGAGGGATCC AATTTTGGAAATCAGATTATCCCGATACCGCCATACTGTCAAGTAGTG CCATTCACACCGGTTTGGTATGTTCCACACACTTGGGTATCTAATCT GTGGATTTCAGAGTCGCTTATGTACCGCTTTGAAGAGGAATTGTTTCT TCGATCCCTCCAGGACTACAAAATCCAATCCGCTTATTGGTGCCTACT CTGTTCCTTTTTTCGCCAAGAGCAGCTGATCGACAAAATATGACCTGA GTAACCTCCATGAGATTGCTAGCGGTGGCGCCCCCTGAGCAAAGAGG TGGGCGAGGCAGTTGCTAAGCGCTTCCATCTCCCTGGAATAAGACAGG GATACGGCCTAACAGAGACTACAAGTGCATTTAATTACCCCGAAG GCGATGACAAGCCCGCGCTGTGGGAAAGTTGTACCTTTTTTTGAAGC CAAAGTGGTTCGACCTCGATACTGGCAAACGCTAGGCGTCAACCAGCG CGGTGAGCTATGCGTTAGGGGCCCTATGATCATGAGTGGTTACGTGAAC AACCCGAAAGCCACGAATGCGCTGATCGACAAGGATGGATGGTTGCAT TCGGGAGATATCGCTTATTGGGACGAAGACGAGCACTTCTCATAAGTAG ACCGACTGAAGACCTGATCAAGTACAAGGATACCAGGTGGCTCCCG CCGAGCTTGAGTCCATCCTCTTGCAACACCCGAATATTTTCGATGCCGG GGTGGCTGGGCTGCCAGACGATGATGCCGGCAACTTCCAGCTGCCGT

[0401]

CGTAGTGCTCGAGCACGGGAAGACAATGACCGAAAAAGGAGATCGTTGA  
 CTACGTGGCCTCACAAAGTGACCACTGCCAAAAAGCTTCGGGGAGGGGT  
 GGTCTTCGTCGATGAGGTCCCAAAAGGCTTGACCGTAAGCTCGATGCA  
 CGGAAGATACGTGAAATTTCTGATAAAGGCCAAAAAGGCGGTAAGATA  
 GCCGTTTGATAAGCTGCTTCTGCGGGCTTGCCCTTGGCCATGCCCTT  
 CTTCTCCTTGCACCTGTACCTTTGGTCTTTGAATAAAGCCTGAGTA  
 GGAAGAGTACT-[서열번호 1]

정방향 프라이머 TAGAAACTGGGCTTGTGCGAGAC[서열번호 2]

역방향 프라이머 CTCCTACTCAGGCTTTATTCAAAGAC[서열번호 3]

[0402]

[0403]

LNP 제형

[0404]

비교 LNP로 사용된 SM-102는 Cayman Chemicals에서 구입하였다. 콜레스테롤 및 1,2-다이스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린(DSPC)은 VWR에서 구입하였다. 1,2-다이미리스토일-rac-글리세로-3-메톡시폴리에틸렌 글리콜-2000(PEG-DMG)은 Avanti Polar Lipids에서 구입하였다. 엇갈린 헤링본 미세유체 혼합기(staggered herringbone microfluidic mixer)를 이전에 보고된 바와 같이 소프트 리소그래피에 의해 제조하였다[Chen, D. et al., Rapid discovery of potent siRNA-containing lipid nanoparticles enabled by controlled microfluidic formulation, J. Am. Chem. Soc. 134, 6948-6951, 2012]. 지질 성분(50% 이온화 가능 지질, 38.5% 콜레스테롤, 10% DSPC, 1.5% PEG-DMG)을 에탄올에 용해시키고, RNA를 75mM 시트르산나트륨(pH 3.0)에 용해시켰다. LNP는 미세유체 칩의 유기상과 수성상을 총 유량 7ml/분(수성:유성 유량 비율 2.5:1)으로 혼합하여 제조하였다. 제형화된 LNP를 Slide-A-Lyzer™ 투석 카세트 10K MWC(ThermoScientific, 87729)에 수집하고 1× 인산염 완충 식염수

(PBS)(pH 7.4)에 대해 1:1000에서 2시간 동안 2회 투석하였다. LNP를 투석 장치에서 제거하고 0.2 μm 폴리에터 실론 주사기 필터(Whatman, Uniflo 13)를 사용하여 멸균 여과한 후 사용 전에 최대 1주 동안 4°C에서 저장하였다.

[0405] LNP 크기 분포

[0406] LNP를 실온에서 평형화하고 RNase가 없는 증류수 1ml에 1:100으로 희석하였다. 크기 분포 측정은 633nm의 He-Ne 이온 레이저를 사용하는 Zetasizer Nano(Malvern, Ltd. 영국 맥버른 소재)를 사용하여 수행하였다.

[0407] mRNA 농도 및 캡슐화 효율

[0408] LNP의 RNA 농도 및 캡슐화 효율은 변형된 Quant-iT RiboGreen 검정(ThermoFisher)을 사용하여 결정하였다. 검정색 불투명 96웰 플레이트에서 검정을 3회 수행하였다. 간단히 말하면, LNP를 RNase가 없는 증류수 또는 2% TritonX에서 1:50으로 희석하였다. 해당 RNA를 사용한 표준 곡선을 2% TritonX에서 생성하였다. 플레이트를 37°C에서 10분 동안 인큐베이션시켜 LNP를 파괴하였다. 그런 다음 RiboGreen 시약을 각 웰에 첨가하고 Tecan Infinite M200 플레이트 리더(480 nm/525 nm)를 사용하여 형광 강도를 측정하였다. 원시 형광 값을 배경 형광에서 차감하고 표준 곡선의 선형 보간에 의해서 LNP 제형의 총 RNA 농도를 결정하였다. 캡슐화 효율을 이전에 보고된 바와 같이 미처리 웰과 처리된 웰의 비율로부터 계산하였다[Walsh, C. *et al.*, Microfluidic-Based Manufacture of siRNA-Lipid Nanoparticles for Therapeutic Applications, *Drug Delivery System* (ed. Jain, K. K.) vol. 1141 109-120 (Springer New York, 2014)].

[0409] 겔보기 pKa

[0410] LNP의 겔보기 pKa의 결정은 이전에 기재된 프로토콜을 사용하여 수행하였다[Heyes, J., Palmer, L., Bremner, K. & MacLachlan, I., Cationic lipid saturation influences intracellular delivery of encapsulated nucleic acids, *J. Controlled Release* 107, 276-287, 2005; Zhang, J., Fan, H., Leverage, D. A. & Crocker, L. S., Ionization Behavior of Amino Lipids for siRNA Delivery: Determination of Ionization Constants, SAR, and the Impact of Lipid pKa on Cationic Lipid *Langmuir* 27, 1907-1914, 2011]. 간단히 말하면, 10mM 시트레이트, 10mM 포스페이트, 10mM 보레이트 및 150mM NaCl을 함유한 용액을 1.0M HCl로 적정하여 3.0에서 8.5 사이에서 0.5만큼 변화하는 pH 값을 갖는 일련의 완충액을 제조하고 검은색 96웰에 분취하였다. LNP 및 6-(p-톨루이디노)-2-나프탈렌설폰산(TNS, Sigma Aldrich)을 각각 최종 농도 25 및 5.45 μM로 이러한 완충액에 희석하였다. 플레이트를 실온에서 20분 동안 평형화시켰다. Tecan Infinite M200 플레이트 판독기(325 nm/435nm)를 사용하여 형광 강도를 결정하였다. 원시 형광 값을 0과 1 사이에서 정규화하고 그래프 소프트웨어를 사용하여 피팅하여 50% 이온화의 pH 값에 해당하는 pKa를 결정하였다.

[0411] 극저온 투과 전자 현미경(CryoTEM)

[0412] CryoTEM 샘플은 Vitrobot Mark IV 시스템(ThermoScientific)을 사용하여 준비하였다. CryoTEM 그리드를 준비하기 위해 4 μl의 샘플을 Quantifoil R2/2 300 메시 그리드(Electron Microscopy Sciences, Q325CR2)에 적용하였다. 다음 매개변수를 사용하였다: 온도=4°C, 습도=100%, 대기 시간= 5초, 블롯 시간 =2초, 블롯 힘=2, 드레인 시간 = 0초, 블롯 수 = 1. 이미지가 촬영하였다. Talos L120 C에서 가속 전압 120kV 및 배율 57'000X에서 영상을 찍었다.

[0413] 근육내 파이어플라이 루시페라제 mRNA 발현

[0414] C57BL/6 마우스(암컷, 8 내지 9주령, 19 내지 21g, Charles River)에게 500ng의 Firefly Luciferase mRNA의 LNP(50 μl/사두근)를 근육내 주사하였다. 6시간 후, 마우스에게 D-루시페린(ThermoScientific) 3mg을 복강내(200 μl) 주사하고, 다리를 채취하여 IVIS Spectrum(PerkinElmer)을 사용하여 10분 이내에 생물발광(오픈 필터, 높이=1cm)에 대한 영상을 촬영하였다. 근육의 총 발광 플럭스(광자/초)은 자동 관심 영역 도구를 사용하여 결정하였다.

[0415] 생체내 유전자 편집

[0416] 변형된 Cas9 mRNA는 우리딘을 N<sup>1</sup>-메틸-슈도우리딘-5'-트라이포스페이트로 완전히 치환한 Cas9 DNA 주형(Sigma-Aldrich, CAS9P)의 IVT에 의해 생성하였다(표 9). 포스포로티오에이트 결합을 갖는 변형된 sgRNA는 Synthego에서 구입하였다(표 13). LNP는 지질 질소 대 RNA 인산염 비율(N/P) 10에서 Cas9 mRNA 및 sgTOM(3/1, wt/wt)으로

제형화하였다. 암컷 B6.Cg-Gt(ROSA)26Sor<sup>tm9(CAG-tdTomato)Hze</sup>/J (Ai9) 마우스(The Jackson Laboratory, 8 내지 9주령, n=2)에게 제0일 및 제2일에 사두근 중 하나에 총 RNA 2mg/kg을 근육내 주사하였다(50 $\mu$ l). 다른 사두근은 50 $\mu$ l의 1 $\times$  PBS를 동시에 주사하였다. 제5일에 뒷다리 근육을 수거하고 IVIS Spectrum(PerkinElmer)을 사용하여 형광(535nm/600nm)을 검출하였다.

표 9

Cas9 mRNA 암호 서열.

명칭	DNA 서열 (5'에서 3'로)
Cas9 mRNA 암호 서열	ATGGACAAGAAGTACAGCATCGCCTGGACATCGGCACCAACTCTGTG GGCTGGGCCGTGATACCGACGAGTACAAGGTGCCAGCAAGAAATTC AAGGTGCTGGCAACACCGACCGCACAGCATCAAGAAGAACCTGATC GCGCCCTGCTGTTCGACAGCGGAGAAAACAGCCGAGGCCACCCGGCTG AAGAGAACCGCCAGAAGAAGATACACCAGACGGAAGAACCGGATCTG CTATCTGCAAGAGATTTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTGACGACAG CTCTCTCCACAGACTGGAAGAGTCTCTCTGGTGGAAAGAGATAAGAA GCACGAGCGGCACCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTA CCACGAGAAGTACCCACCATCTACCCTGAGAAAGAACTGGTGGGA CAGCACCGACAAGGCGACCTGCGGCTGATCTATCTGGCCCTGGCCAC ATGATCAAGTTCGGGGCCACTTCTGATCGAGGGCGACCTGAAACCCG ACAACAGCGACGTGGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTGCAGACCTACA ACCAGCTGTTTCGAGGAAAACCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCCA AGGCCATCCTGTCTGCCAGACTGAGCAAGAGCAGACGGCTGGAAAATC TGATCGCCAGCTGCCCGGCGAGAAGAAGAAATGGCCTGTTTCGGCAACC TGATTGCCCTGAGCCTGGCCTGACCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGA CCTGGCCGAGGATGCCAAACTGCAGCTGAGCAAGGACACCTACGACGA CGACCTGGACAACCTGCTGGCCAGATCGGCACCCAGTACGCCGACCT GTTTCGGCCGCCAAGAACCTGTCGACGCCATCCTGCTGAGCGACATC CTGAGAGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCTGAGCGCCTCTATG ATCAAGAGATACGACGAGCACCACCAGGACCTGACCCCTGCTGAAAGCT CTCGTGCGGCAGCAGCTGCCTGAGAAGTACAAAGAAATCTTCTTCGACC AGAGCAAGAACGGCTACGCCGGCTACATCGATGGCGGAGCCAGCCAGG AAGAGTTCTACAAGTTCATCAAGCCATCCTGGAAGATGGACGGCA CCGAGGAAGTCTCGTGAAGCTGAACAGAGAGGACCTGCTGCGGAAGC AGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCACCAGATCCACCTGGGAG AGCTGCACGCCATTCTGCGCGGCAGGAAGATTTTACCATTCTGAA GGACAACCGGGAAAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCCGCATCCCTTA CTACGTGGGCCCTCTGGCCAGGGGAAACAGCAGATTCGCCTGGATGAC CAGAAAGAGCGAGGAAACCATCACCCCTGGAACCTCGAGGAAGTGGT GGACAAGGGCGCCAGCGCCAGAGCTTTCATCGAGCGGATGACCAACTT

[0417]

CGATAAGAACCTGCCCAACGAGAAGGTGCTGCCCAAGCACAGCCTGCT  
 GTACGAGTACTTCAACCGTGTACAACGAGCTGACCAAAGTGAAATACGT  
 GACCGAGGGAATGAGAAAGCCCGCTTCTGAGCGGCGAGCAGAAAA  
 AGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGAAAAGTGACCGTGA  
 AGCAGCTGAAAGAGGACTACTTCAAGAAAATCGAGTGTTCGACTCCG  
 TGGAAATCTCCGCGGTGGAAGATCGGTTCAACGCCTCCTGGGACATA  
 CCACGACCTGCTGAAGATTATCAAGGACAAGGACTTCTGGACAATGA  
 GGAAAACGAGGACATTCTGGAAGATATCGTGTGACCTGACACTGTTI  
 GAGGACAGAGAGATGATCGAGGAACGGCTGAAAACCTATGCCACCTG  
 TTCGACGACAAAGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGCGGAGATACACCGGC  
 TGGGGCAGGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAG  
 TCCGGCAAGACAATCCTGGATTCTGAAAGTCCGACGGCTTCGCCAACA  
 GAAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCTGACCTTAAAGAGG  
 ACATCCAGAAAGCCAGGTGTCGGCCAGGGCGATAGCCTGCACGAGC  
 ACATTGCCAATCTGGCCGATCCCCGCCATTAAGAAGGCATCCTGCA  
 GACAGTGAAGATTGTGGACGAGCTCGTGAAGTGATGGGCCACAAGCC  
 CGAGAACATCGTGTGATGAAATGGCCAGAGAGAACCAGACCCAGAA  
 GGGACAGAAGAACAGCCGAGAGAAATGAAGCGGATCGAAGAGGGCA  
 TCAAAGAGCTGGGACGCCAGATCCTGAAAAGAACCCCGTGGAAAACA  
 CCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAAATGGGC  
 GGGATATGTACGTGGACCAGGAAGTGGACATCAACCGGCTGTCCGACT  
 ACGATGTGGACCACATTGTGCCCCAGTCTTCAATCAAGGACGACTCCAT  
 CGATAACAAAGTGTGACTCGGAGCGACAAGAACCAGGGCAAGAGCG  
 ACAACGTGCCCTCCGAGAGGTGCTGAAGAAGATGAAGAAGTACTGGC  
 GCCAGCTGTGAATGCCAAGCTGATTACCCAGAGGAAGTTCGACAATC  
 TGACCAAGGCCGAGAGAGGGCGCCTGAGCGAAGTGGATAAGGCCGGCT  
 TCATTAAGCGGCAGCTGTGTGAAACCGGCAGATCAAAAGCAGTGG  
 CACAGATCCTGACTCCCGGATGAACACTAAGTACGACGAGAACGACA  
 AACTGATCCGGGAAGTGAAGTGATCACCTGAAAGTCCAAAGCTGGTGT  
 CCGACTTCAGAAAGGATTTCCAGTTTTACAAGTGGCGGAGATCAACA  
 ACTACCACCAGCCACGACGCTACCTGAAACGCGCTGTTGGGAACCG  
 CCTGATCAAAAAGTACCCTAAGCTGAAAGCGAGTTCGTGTACGGCG  
 ATTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGAGCGAGCAGG  
 AAATCGGCAAGGCTACCGCAAGTACTTCTTACAGCAACATCATGAA  
 CTTTTCAAGACCGAGATCACACTGGCCAACGGCGAGATCAGAAAGCG  
 GCCTGTGATCGAGACAAACGGCGAAACCGGGGAGATCGTGTGGGATAA

[0418]

GGGCCGGGATTTGCCACAGTGCAGGAAAGTGTCCATGCCCAAGT  
 GAATATCGTGA AAAAGACCGAGGTGCAGACCGCGGCTTACGAAAGA  
 GTCTATCTGCCAAGAGGAACTCCGACAAGCTGATCGCCAGAAAGAA  
 GGATTGGGACCTAAGAAGTACGGCGGCTTTGACAGCCCAACCGTGGC  
 TACTCTGTGCTGGTGGTGCCAAAGTGGAAAAGGGCAAGTCCAAGAA  
 ACTGAAGAGTGTGAAAGAGCTGCTGGGATCACCATCATGGAAGAAG  
 CAGCTTCGAGAAGAATCCATCGACTTTCGGAAGCCAAAGGCTACAA  
 AGAAGTGA AAAAGACCTGATCATCAAGCTGCTAAGTACTCCCTGTTC  
 GAGCTGGAAAAAGCGCCGGAAGCGGATGTGGCTTCTGCGCGGAACTG  
 CAGAAGGGAAAAGAGCTGCGCTGCCCTCCAAATATGTGAACTTCTGT  
 ACCTGGCCAGCCACTATGAGAAGCTGAAGGGCTCCCGAGGATAATG  
 AGCAGAAAACAGCTGTTTGTGGAACAGCACAAGCACTACTGGACGAGA  
 TCATCGAGCAGATTAGCGAGTCTCCAAGCGGTGATCTGGCCGATGC  
 CAACCTGGACAAGGTGCTGAGCGCTACAACAAGCACCGGGATAAGCC  
 CATCAGAGAGCAGGCCGAGAATATCATCACTGTTTACCTGACCAAC  
 CTGGGAGCCCTGCGCCTTCAAGTACTTTGACACCACCATCGACCGGA  
 AGAGGTACACCAGCACAAGAGGTGCTGGACGCCACCTGATCCACC  
 AGAGCATCACCGGCTGTACGAGACAGGATCGACCTGTCTCAGTGG  
 GAGGCGACCCCAAGAAAAAGCGCAAAGTGTGA [서열번호 4]

[0419]

[0420]

화학적 매개변수 예측

[0421]

이온화 가능한 지질의 예측된 LogD 및 pKa는 MarvinSketch 21.18을 사용하여 결정하였다. 입자당 mRNA 카피 수를 예측하는 데 사용된 SM-102 및 I-28의 분자 부피는 반 데르 발스 부피를 계산하는 InstantJChem 21.20.0의 부피() 함수를 사용하여 근사화하였다.

- [0422] 입자당 mRNA 카피 수
- [0423] 입자당 예측된 mRNA 카피 수는 이전에 보고된 방법[Carrasco, M. J. *et al.*, Ionization and structural properties of mRNA lipid nanoparticles influence expression in intramuscular and intravascular administration, *Commun. Biol.* 4, 1-15, 2021]에 기초하여 계산하였다. 예측된 수치는 분자 부피 대신 이온화 가능한 지질의 반 데르 발스 부피를 활용하기 때문에 과대평가된 것이다. 입자당 mRNA 카피의 실제 수는 캡슐화된 mRNA 카피의 농도(mRNA 농도 및 캡슐화 효율의 측정에서 얻음)를 나노입자 농도로 나누어 계산하였다. 나노입자 농도는 물에 1:100으로 희석된 Nanoparticle Tracking Analysis(NanoSight NS300)로 측정하였다.
- [0424] 드레이닝 림프절에서 IL-6 검출
- [0425] I-28 LNP 및 SM-102 LNP를 변형된 파이어플라이 루시퍼라제 mRNA를 사용하여 제형화하였다. C57BL/6 마우스(암컷, 8 내지 9주령, 19 내지 21g, Charles River)에게 7.5 µg의 mRNA의 LNP(50µl/사두근) 및 식염수를 근육내 주사하였다. 주사 후 6시간에 드레이닝 림프절을 채취하였다. Halt™ 프로테아제 저해제 각꼬리(ThermoScientific)의 존재 하에서 T-Per™ 용해 완충액(ThermoScientific)을 함유한 Powerbead Tubes(Qiagen)에서 슬와 및 서혜부 림프절을 조합하였다. 샘플을 아이소프로판올과 드라이아이스의 혼합물에서 급속 냉동하고 -80°C에 저장하였다. 냉동 샘플을 얼음 위에서 해동하고 비드밀 균질기를 사용하여 균질화하였다. 원심분리로 용해물을 제거하고 새로운 튜브로 옮기고 사용할 때까지 -80°C에서 저장하였다. 희석되지 않은 샘플은 Pierce™ BCA 단백질 검정 키트(ThermoScientific)를 사용하여 총 단백질 함량을 정량화하는 데 사용하였다. IL-6 농도는 효소 결합 면역흡착 검정(RnD Systems)에 의해 결정하였다. 각각의 샘플을 희석하지 않고 검정하였고 용해 완충액에 1:1로 희석하였다. 흡광도 측정은 Biotek Synergy H1 플레이트 판독기에서 수행하였다. IL-6 농도는 IL-6 농도를 총 단백질 함량으로 나누어 샘플당 기준으로 정규화하였다. 희석되지 않은 샘플과 희석된 샘플의 정규화된 IL-6 농도를 플로팅하기 전에 평균 내었다.
- [0426] 통계학
- [0427] GraphPad Prism 8을 사용하여 통계 분석을 수행하였다. 양측 언페이드 t-검정을 사용하여 2개의 독립적인 샘플의 평균을 서로 비교하였다. 양측 페어드 t-검정을 사용하여 측정값 쌍 간의 평균 차이를 비교하였다. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001, \*\*\*\*P < 0.0001은 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.
- [0428] 결과
- [0429] 모듈형 이온화 가능한 지질 구조의 설계 및 합성
- [0430] 상업적인 시약을 사용하여 쉽게 변형될 수 있는 3개의 분자 영역, 즉, 아민 코어(R<sup>1</sup>), 링커 길이(L<sup>1</sup>) 및 알킬 꼬리(X<sup>1</sup>)를 갖는 화학식 I의 폴리(아미도아민) 이온화 가능한 지질을 생성하기 위해 일반적인 합성 전략을 고안하였다.
- [0431] 근육내 mRNA 전달을 위한 LNP의 반복 스크리닝 전략
- [0432] 각각 50:38.5:10:1.5몰% 비율의 이온화 가능한 지질, 콜레스테롤, 1,2-다이스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린(DSPC) 및 1,2-다이미리스토일-rac-글리세로-3-메톡시폴리에틸렌 글리콜-2000(PEG-DMG)으로 이루어진 Spikevax의 조성물을 기반으로 하는 LNP로 이온화 가능한 지질을 제형화하였다(도 2). 모든 LNP는 Spikevax 제형(Spikevax Full Prescribing Information, US FDA)과 일치하도록 5의 고정된 N/P 비율을 가졌다. 최종 목표는 mRNA 발현에 대해 SM-102보다 열등하지 않은 화학적으로 구별되는 새로운 이온화 가능한 지질을 구축하는 것이었다.
- [0433] 특정 목표 기준을 갖는 설계 매개변수를 사용하여 최적화 공정을 안내하였다(표 10). LNP의 평균 크기는 멸균 여과를 허용하기 위해 200nm 미만이어야 하며, 재현 가능하고 안정적인 제형을 만들기 위해서는 다분산 지수(PDI)가 0.2보다 작아야 한다. 캡슐화 효율은 제형 내 캡슐화된 mRNA의 분율을 나타낸다. 90% 초과 캡슐화 효율은 세포로의 mRNA 전달을 최대화하고 유리 전사체에 의해 유도된 면역 활성화를 감소시킨다 [Karikó, K., Buckstein, M., Ni, H. & Weissman, D., Suppression of RNA Recognition by Toll-like Receptors: The Impact of Nucleoside Modification and the Evolutionary Origin of RNA, *Immunity* 23, 165-175, 2005]. LNP의 겔보기 pKa는 현재 치료 효능을 결정하기 위한 관련 매개변수로 간주된다. 겔보기 pKa는 LNP가 생리 조건에서 대체로 중성이지만 산성 엔도솜에서 그리고 낮은 pH에서의 제형화 동안 양성자화되고 양이온성이 되도록 6

내지 7 사이여야 한다. 전신 전달의 경우, 6.2 내지 6.5의 pKa 범위가 간 발현에 최적인 반면[Jayaraman, M. *et al.*, Maximizing the Potency of siRNA Lipid Nanoparticles for Hepatic Gene Silencing In Vivo, *Angew. Chem.* 124, 8657-8661, 2012], 근육내 전달의 경우 6.6 내지 6.9의 약간 더 높은 범위가 한 연구에 의해서 보고되었다[Hassett, K. J. *et al.*, Optimization of Lipid Nanoparticles for Intramuscular Administration of mRNA Vaccines, *Mol. Ther. Nucleic Acids* 15, 1-11, 2019]

표 10

LNP 특징규명 및 성능에 대한 설계 기준

매개변수	방법	목표 기준	근거
크기 분포	동적 광 산란	Z 평균 < 200 nm PDI < 0.2	200nm보다 작은 입자를 수용에 약영향을 미치지 않으면서 멸균 여과할 수 있다. 낮은 PDI는 제형성 및 규제 준수를 보장한다.
캡슐화 효율	RiboGreen 검정	EE > 90%	더 높은 캡슐화 효율은 mRNA 전달을 개선하고 전천성 면역 활성화를 감소시킨다.
겉보기 pKa	TNS 검정	6 < pKa < 7	6 내지 7의 겉보기 pKa는 엔도솜 방출을 개선하고 생리 pH에서 중성 표면 전하를 부여한다 (Jayaraman, 2012).
총 발광 플럭스	IVIS	SM-102보다 덜등하지 않음	SM-102는 근육내 mRNA 전달을 위한 최적화된 지질이다 (Hassett, 2019).

[0434]

[0435]

이온화 가능한 지질의 큰 조합 라이브러리를 합성하는 대신, 지질 구조를 최적화하기 위해 표 10의 설계 기준에 따라 정보를 얻은 반복 접근법을 선택하였다. 간략하게, LNP를 변형되지 않은 피어플라이 루시퍼라제 mRNA로 제형화하고, 특징규명하고, C57BL/6 마우스의 두 사두근에 주사하였다. 뒷다리를 수거하고 근육의 총 발광 플럭스를 측정하여 mRNA 발현을 결정하였다(도 2). 물리적 매개변수에 가장 큰 영향을 미칠 것이라는 가정에 기초하여 알킬 꼬리를 최적화하는 것부터 시작하기로 결정하였다. 그런 다음 링커 길이 및 아민 코어를 조사하였다.

[0436]

이온화 가능한 알킬화 방법

[0437]

1차에서 3차로 아민을 알킬화하는 데 일반적으로 사용되는 두 가지 방법, 즉 에폭사이드 개환 및 환원성 아민화를 비교하였다. 동일한 코어 및 링커 길이를 갖는 지질을 두 방법 중 하나를 사용하여 대칭적인 14개 탄소 꼬리로 알킬화하였다(에폭사이드 고환은 반응식 1에 표시됨). 에폭사이드 개환 반응은 3차 아민(I-1) 옆의 베타 위치에 하이드록실기를 도입하는 반면, 환원성 아민화는 완전히 포화된 꼬리(I-18)를 생성한다. 강도별 LNP 크기 분포는 약간의 차이를 나타내었다(도 3d). I-1-LNP의 겉보기 pKa는 I-18-LNP보다 0.7포인트 낮았다(도 3c 및 도 3e). I-1의 하이드록실기는 유도 효과를 통해 이웃 아민으로부터 전자 밀도를 끌어당겨 I-18에 비해 pKa를 낮추고, 이는 제형화된 LNP로 전달된다.

[0438]

마우스에서 이들 제형을 스크리닝하기 전에, I-18-LNP는 더 높은 캡슐화 효율 및 6 내지 7 이내의 겉보기 pKa를 기반으로 I-1-LNP보다 더 높은 mRNA 발현을 가질 것으로 예상되었다(도 3e). 반대로, I-1-LNP는 모든 시점에서 I-18-LNP보다 더 높은 발광 플럭스를 갖는 것을 발견하였다(도 3b). I-1 지질과 I-18 지질의 유일한 구조적 차이는 하이드록실기의 존재이므로, 핵염기와 수소 결합을 형성하는 이온화 가능한 지질의 능력이 mRNA 전달을 개선시킨다는 것을 알 수 있다[Cornebise, M. *et al.*, Discovery of a Novel Amino Lipid That Improves Lipid Nanoparticle Performance through Specific Interactions with mRNA, *Adv. Funct. Mater.* 32, 2106727, 2022]. 이러한 결과는 mRNA 결합 및 전달을 위한 수소 결합의 중요한 역할을 강조한다. 앞으로는 에폭사이드 개환을 최적의 알킬화 방법으로 선택하였다.

[0439]

SM-102는 벤치마크 역할을 하기 위해 첫 번째 실험 세트에 포함되었으며, 이는 설계 기준을 충족하기 위해 캡슐화 효율, 겉보기 pKa 및 mRNA 전달을 개선할 필요성을 강조하였다. 또한 주사 후 6시간에 가장 높은 발광 플럭스가 검출되었으며 그 다음 모든 LNP에 대해 96시간에 걸쳐 꾸준히 감소하였다(도 3b). 따라서 mRNA 발현을 정량화하기 위해 다음 실험에서 6시간 시점을 선택하였다.

[0440]

알킬 꼬리 길이의 감소는 LNP pKa 및 mRNA 캡슐화 효율을 증가시킨다.

[0441]

동일한 C<sub>3</sub>알킬 코어(기 R<sub>1</sub>) 및 C<sub>2</sub>알킬 링커(기 L<sup>1</sup>)를 유지하면서 더 짧은 10-탄소 꼬리와 더 긴 15-탄소 꼬리(기

$X^1$ )를 갖는 지질을 알킬화하기 위해 에폭사이드 개환을 사용하였다(도 4a). 탄소수 15개보다 긴 꼬리 길이는 용해도 문제로 인해 성공적으로 제형화될 수 없다. 처음에 더 긴 꼬리를 갖는 이온화 가능한 지질은 SM-102의 예측된 LogD에 가까운 더 높은 친유성으로 인해 세포막과 더 유리하게 상호작용할 것으로 예상되었고, 대신 mRNA 발현에는 유의미한 차이가 발견되지 않았다(도 4b). 겉보기  $pK_a$ 는 역관계에 따라 꼬리 길이에 크게 의존한다(도 4c). 이론에 의해 제한하고자 함은 아니지만, 10개 탄소 꼬리는 더 긴 꼬리에 비해 LNP의 전체 소수성 특성을 감소시킬 수 있다. 이는 주변 수성상으로부터 입자의 지질상으로의 양성자의 더 큰 분배를 허용하여 더 높은 pH 값에서 3차 아민의 이온화를 증가시킬 수 있다[Carrasco, M. J. *et al.*, Ionization and structural properties of mRNA lipid nanoparticles influence expression in intramuscular and intravascular administration, *Commun. Biol.* 4, 1-15, 2021]. **I-26**은 가장 높은  $pK_a$ (6.3)와 캡슐화 효율(93%)을 갖는 LNP를 만들었으며 둘 다 설계 기준을 충족하였다(도 4e). 따라서 다음 구조 반복을 위해 10개 탄소 꼬리가 선택하였다.

[0442] 링커 길이의 증가는 겉보기  $pK_a$  및 mRNA 발현을 증가시켰다.

[0443] 겉보기  $pK_a$ 를 추가로 최적화하기 위해, 3개 탄소 링커(기  $L^1$ )가 있는 지질을 합성하고 **I-26**과 비교하였다(도 5a). 아마이드 결합과 3차 아민 사이의 거리를 증가시키면 결합 통과 유도 효과를 제한하여  $pK_a$ 를 증가시킬 것으로 예측되었다. 예측된 바와 같이, 링커에 하나의 탄소 원자를 추가하면 겉보기  $pK_a$ 가 한 단위 증가하였다(도 5c 및 도 5e). **I-27-LNP**는 **I-26-LNP**보다 mRNA 발현이 상당히 높았으며(도 5b), 높은 캡슐화 효율과 바람직한 크기 분포를 유지하였다(도 5d 및 5e). 이 결과는 mRNA 전달을 위한 겉보기  $pK_a$  최적화를 뒷받침하며 pH 7 근처의 겉보기  $pK_a$ 가 근육내 투여에 더 유리하다는 것을 나타낸다. 결과적으로, 아민 코어의 후속 최적화를 위해 **I-27** 구조를 선택하였다.

[0444] 아민 코어에 하이드록실기를 추가하면 SM-102의 성능과 일치한다.

[0445] 알킬 꼬리에 하이드록실을 포함시킴으로써 달성된 mRNA 발현의 개선을 고려해 볼 때, 코어 3차 아민으로부터 탄소 2개(**I-28**) 또는 탄소 3개(**I-29**) 떨어진 하이드록실기를 갖는 **I-27** 지질을 합성하였다(도 6a). 모든 LNP는, 특징규명 기준(도 6d, 도 6e, 도 6f)을 충족하였고, 하이드록실 코어를 추가하면 mRNA 발현이 크게 개선되었다(도 6b). 특히 **I-28**은 SM-102보다 열등하지 않은 전체 발광 플럭스를 달성하였다. LNP의 효능은 mRNA 화학적 변형에 의존하는 것으로 나타났기 때문에  $n^1$ -메틸-슈도우리딘 변형된 mRNA를 전달하는 LNP를 사용한 실험을 반복하여 동일한 결과를 얻었다(도 6c)[Melamed, J. R. *et al.*, Lipid nanoparticle chemistry determines how nucleoside base modifications alter mRNA delivery, *J. Controlled Release* 341, 206-214, 2022]. 따라서 **I-28**을 근육내 mRNA 전달을 위해 선택하였다.

[0446] **I-28**은 SM-102보다 지질이 2.5배 적은 LNP를 제조하였고(도 7d) 더 큰 입자를 형성하였다(도 7a 내지 도 7c). **I-28**이 SM-102보다 입자당 더 많은 mRNA 카피를 캡슐화한다는 것이 예측되었고 이를 경험적으로 확인하였다(도 7e, 도 7f 및 표 11). 따라서 **I-28**이 멀티-RNA 페이로드에 적합한 전달 물질인지 시험하기로 결정하였다.

**표 11**

상이한제형에 대한 mRNA 카피/LNP를 계산하는 데 사용되는 매개변수

제형 ID	이온화 가능한 지질	분자 부피 (nm <sup>3</sup> )	Z 평균 (nm)	EE (%)	mRNA 카피/LNP
1	SM-102	0.804	84	99	15
9	SM-102	0.804	86	96	16
11	I-28	1.04	102	97	64
13	SM-102	0.804	76	98	11
14	I-28	1.04	109	95	79

[0447]

[0448] 근육내 CRISPR-Cas9 유전자 편집

[0449] Cas9 mRNA 및 sgRNA의 공동 전달을 통해 근육내 유전자 편집을 수행하는 **I-28-LNP**의 능력을 평가하였다. LoxP

측접 정지 카세트 제거 시 tdTomato 형광 단백질을 발현하는 유전자 조작 마우스를 활용하였다. CRISPR-Cas9 시스템에 의해 정지 카세트가 결실되면 유전자 편집 세포는 형광성이 되고 영상화 시스템으로 검출될 수 있다(도 8a). I-28-LNP를 Cas9 mRNA 및 sgTOM(4/1 mRNA/sgRNA)으로 제형화하였다(표 12 및 표 13). 설계 기준을 충족하는 캡슐화 효율(97% 초과)을 달성하기 위해 N/P 비율을 5에서 10으로 늘렸다. 제0일 및 제2일에 마우스에게 총 RNA 2mg/kg을 근육내 주사하고 제5일에 영상화하였다(도 8b). 이러한 투여 요법은 높은 수준의 배경 조직 형광을 극복하기 위한 이전 보고서에 기초하여 선택하였다[Cheng, Q. *et al.*, Selective organ targeting (SORT) nanoparticles for tissue-specific mRNA delivery and CRISPR-Cas gene editing, *Nat. Nanotechnol.* 15, 313-320, 2020; Wei, T., Cheng, Q., Min, Y.-L., Olson, E. N. & Siegwart, D. J., Systemic nanoparticle delivery of CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins for effective tissue specific genome editing, *Nat. Commun.* 11, 3232, 2020]. 미처리 다리와 비교하여 LNP 처리된 다리에서 통계적으로 유의한 tdTomato 형광이 검출되었는데, 이는 I-28-LNP가 근육내 유전자 편집을 수행하고 보다 일반적으로 대규모 멀티-RNA 페이로드를 전달하는 데 사용될 수 있음을 나타낸다(도 8c). 성공적인 유전자 편집은 또한 근육 조직을 tdTomato의 존재에 대해서 조직학 및 공초점 현미경으로 분석하는 직교 기술을 통해 확인하였다(도 8d).

표 12

본 연구에서 제형화된 LNP의 특징규명 요약

제형 ID	이온화 가능한 지질	RNA 유형	N/P	총 지질 s/RNA (wt/wt)	Z 평균 (nm)	PDI	EE (%)	pK <sub>a</sub>
1	SM-102	변형되지 않은 Fluc mRNA	5	19.24	84	0.11	99	6.81
2	I-18	변형되지 않은 Fluc mRNA	5	8.29	116	0.12	95	6.25
3	I-1	변형되지 않은 Fluc mRNA	5	8.62	86	0.18	83	5.49
4	I-1	변형되지 않은 Fluc mRNA	5	8.62	148	0.08	83	5.23
5	I-25	변형되지 않은 Fluc mRNA	5	8.91	152	0.09	86	4.37
6	I-26	변형되지 않은 Fluc mRNA	5	7.46	173	0.12	93	6.26
7	I-26	변형되지 않은 Fluc mRNA	5	7.46	124	0.11	97	6.21
8	I-27	변형되지 않은 Fluc mRNA	5	7.60	95	0.15	96	7.16
9	SM-102	변형되지 않은 Fluc mRNA	5	19.24	86	0.17	96	6.61
10	I-27	변형되지 않은 Fluc mRNA	5	7.60	119	0.13	96	6.87
11	I-28	변형되지 않은 Fluc mRNA	5	7.61	102	0.12	97	6.76
12	I-29	변형되지 않은 Fluc mRNA	5	7.69	102	0.04	96	6.82
13	SM-102	변형된 Fluc mRNA	5	19.24	76	0.08	98	6.72
14	I-28	변형된 Fluc mRNA	5	7.61	109	0.04	95	6.88
15	I-28	변형된 Cas9 mRNA/sgTOM	10	15.20	179	0.04	97	N/A
16	I-28	변형된 Cas9 mRNA/sgTOM	10	15.20	191	0.07	99	N/A

[0450]

표 13

정지 카세트를 표적화하는 sgRNA

명칭	DNA 서열 (5'에서 3'로)
sgTOM	AAGTAAAACCTCTACAAATG [서열번호 5]
PAM	TGG [서열번호 6]

[0451]

[0452] 논의

[0453] LNP 특성의 미세 조정을 가능하게 하는 3개의 가변 영역을 포함하는 이온화 가능한 지질 구조를 고안하였다. 가능한 각 구조에 대해 크고 자원 집약적인 스크리닝을 수행하는 대신, 강력한 이온화 가능 지질의 발견을 안내하는 반복 설계 전략인 **I-28**을 사용하였다. **I-28**-LNP는 약 100nm의 크기, 0.12 미만의 PDI, 95% 초과 캡슐화 효율을 가지며 SM-102와 동등한 근육내 mRNA 발현을 달성하기 때문에 설정된 설계 기준을 충족한다. 3개의 결과로서, **I-28**은 동일한 N/P 비율에서 SM-102보다 2.5배 적은 지질을 사용하고 입자당 더 많은 mRNA 카피를 캡슐화한다. 그런 다음 **I-28**-LNP가 대규모 조합 RNA 페이로드를 전달할 수 있는지 시험하였다. 개념 증명으로서, 비록 높은 용량이라는 하지만 Cas9 mRNA 및 sgRNA를 리포터 마우스에 공동 전달하여 근육내 유전자 편집을 성공적으로 수행하였다.

[0454] 이온화 가능한 지질의 꼬리, 링커 및 코어 영역을 독립적으로 최적화함으로써, LNP 성능에 대한 구조적 특징의 효과에 관한 몇 가지 발견이 가능하였다. 첫째, 코어 및 꼬리 둘 다에서 3차 아민 옆에 하이드록실기를 혼입하면 mRNA 발현이 크게 향상되었다(도 3 및 도 6). 이론에 얽매이고자 함은 아니지만, 이는 수소 결합이 지질-mRNA 상호작용을 증가시키기 때문일 수 있지만 세포 흡수 및 엔도솜 방출에서의 역할은 아직 알려지지 않았다. 둘째, 2- 또는 3-탄소 링커가 있는 지질에 대한 연구에서는 pK<sub>a</sub>가 pH 7에 가까울수록 근육내 mRNA 발현을 개선시킨다는 것을 발견하였다(도 5). 흥미롭게도, **I-28** 및 SM-102 LNP는 모두 6.6 내지 6.9 범위의 겉보기 pK<sub>a</sub>를 가지며, 이는 근육내 mRNA 전달을 위한 설계 매개변수로서의 관련성을 강화한다(표 12)[[Hassett, K. J. et al., Optimization of Lipid Nanoparticles for Intramuscular Administration of mRNA Vaccines, *Mol. Ther. Nucleic Acids* 15, 1-11, 2019]. 셋째, 이온화 가능한 지질의 친유성(pH 7.4에서 예측된 LogD를 기반으로 함)은 pK<sub>a</sub> 및 캡슐화 효율과 같은 LNP 물리적 매개변수를 변경하지만 mRNA 발현에는 크게 영향을 미치지 않는다(도 4). 가장 높은 캡슐화 효율을 달성한 이온화 가능한 지질은 3.5 내지 6.5의 상대적으로 낮은 LogD를 갖는 반면, 또 다른 연구에서는 전신 전달을 위한 최적의 LogD 범위가 10 내지 14라고 보고하였다(표 13)[[Rajappan, K. et al., Property-Driven Design and Development of Lipids for Efficient Delivery of siRNA, *J. Med. Chem.* 63, 12992-13012, 2020]. 따라서 LogD는 수소결합 또는 pK<sub>a</sub>만큼 크게 근육내 mRNA 발현에 영향을 미치지 않는 매개변수이다.

[0455] [표 13]

예시적인 이온화 가능한 지질 예측 pK<sub>a</sub> 및 logD 값

	I-18	I-1	I-25	I-26	I-27	I-28	I-29
예측된 pK <sub>a</sub>	8.993	8.163	8.163	8.163	8.881	8.629	8.798
pH 7.4에서 예측된 logD	15.87	13.39	15.17	6.28	4.83	3.98	3.65

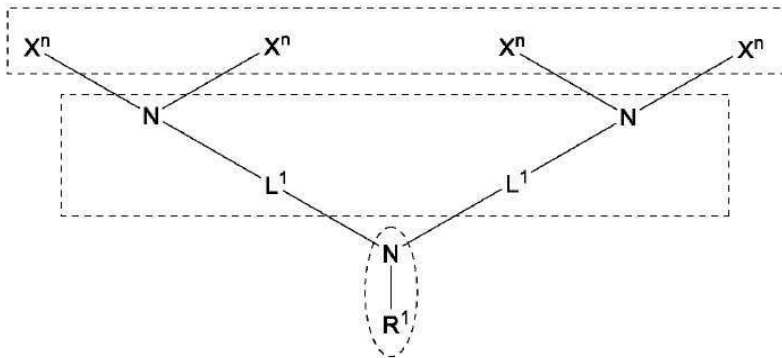
[0456]

[0457] I-28의 높은 효력을 발견한 후, IL-6 반응에 대한 예비 작업을 수행하였다. IL-6은 백신 성능을 향상시킬 수 있는 급성 염증성 사이토카인이다[Alameh, M.-G. et al., Lipid nanoparticles enhance the efficacy of mRNA and protein subunit vaccines by inducing robust T follicular helper cell and humoral responses, *Immunity* 54, 2877-2892.e7, 2021]. 백신에 사용된 SM-102 제형과 비교하여 I-28 제형은 유사한 IL-6 반응을 나타내었다(도 9).

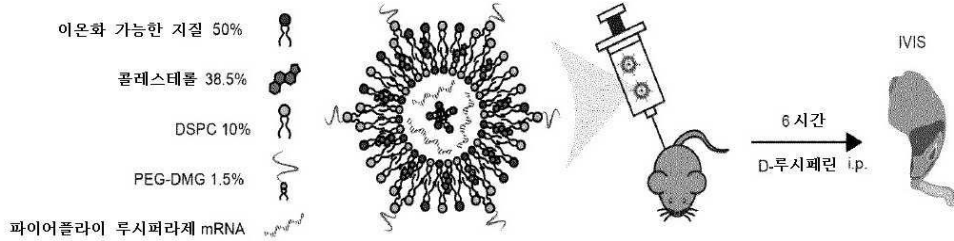
[0458] 요약하면, 새로운 이온화 가능한 지질 계열이 설계되었으며 저용량 지질에서 mRNA의 효율적인 근육내 전달을 위해 최적화된 이온화 가능 지질 **I-28**이 확인되었다. 본 연구는 근육내 mRNA 전달을 위한 LNP 설계의 견고한 토대를 마련하는 수소 결합, 이온화 거동 및 친유성에 관한 구조-기능 연구 결과를 보고하였다. 유사한 반복 설계 전략을 사용하여 이온화 가능한 지질 구조가 LNP 안정성, 생체내 제거, 내약성 및 면역원성에 미치는 영향을 조사하여 차세대 mRNA 백신 및 요법을 가능하게 할 수 있다.

도면

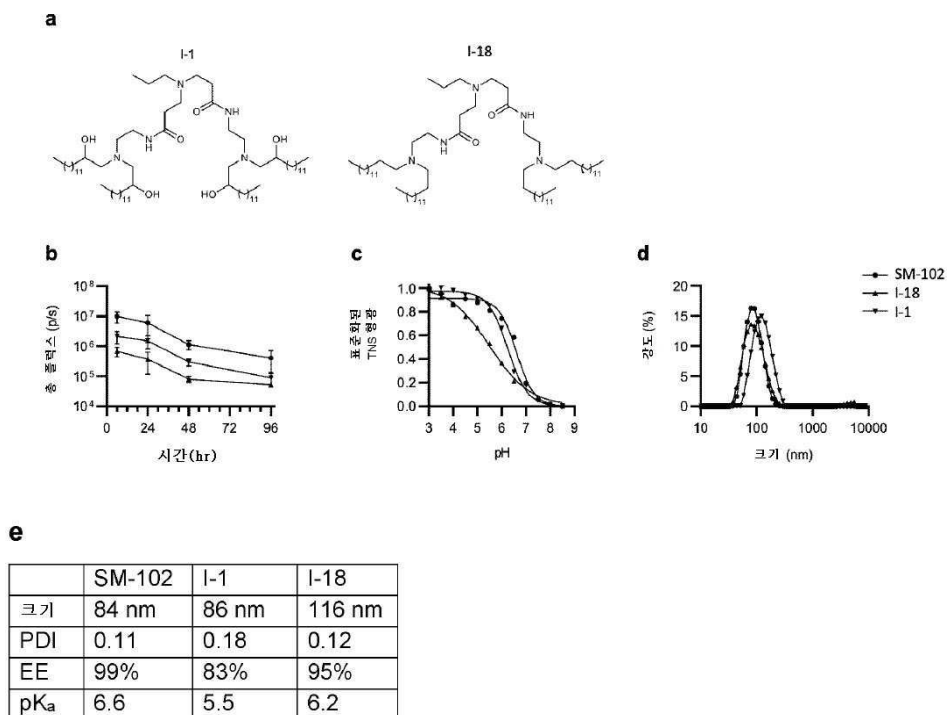
도면1



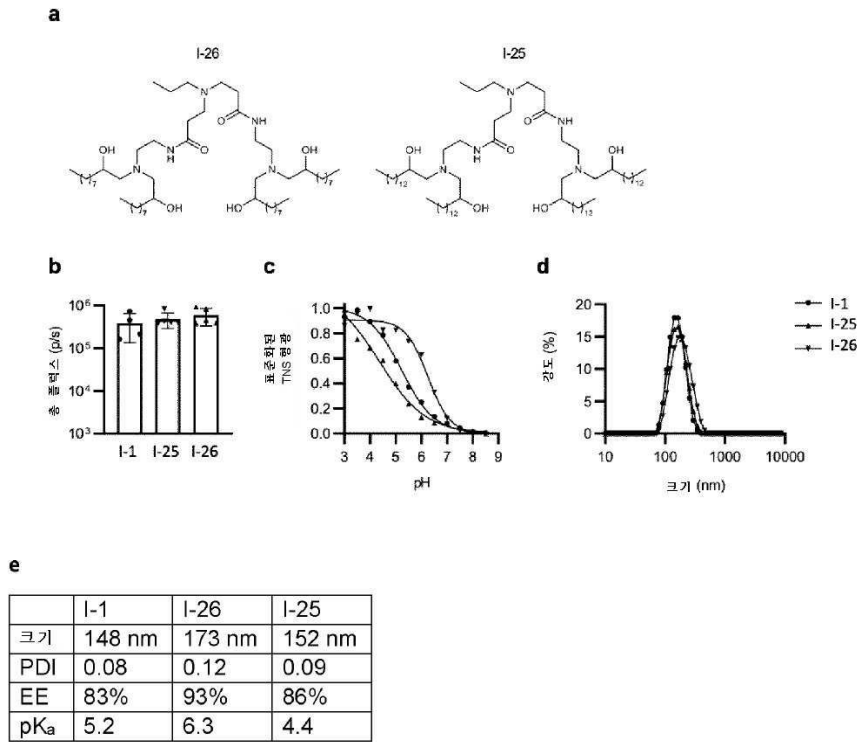
도면2



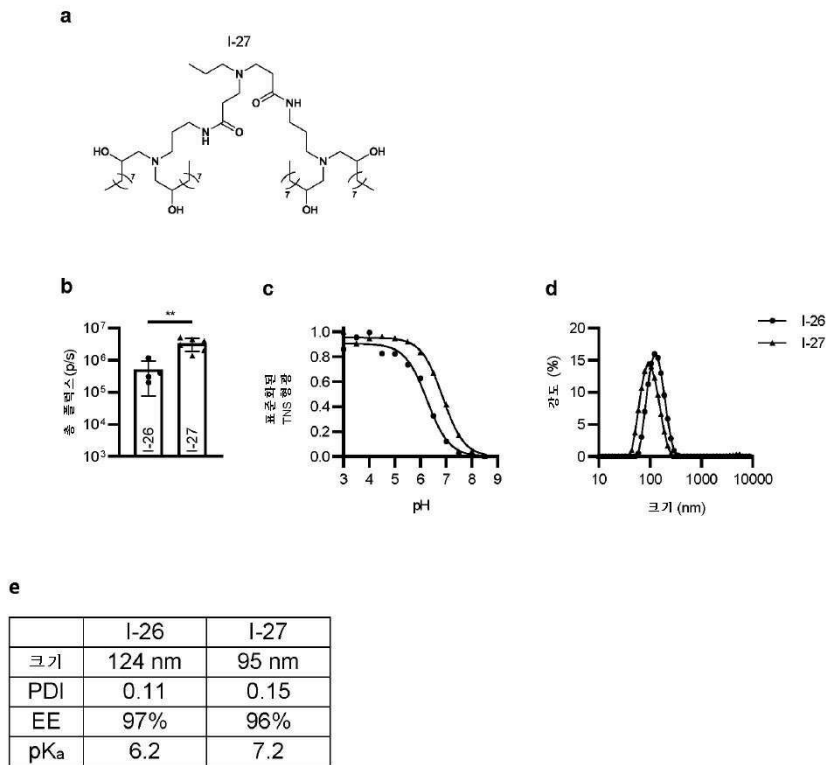
도면3



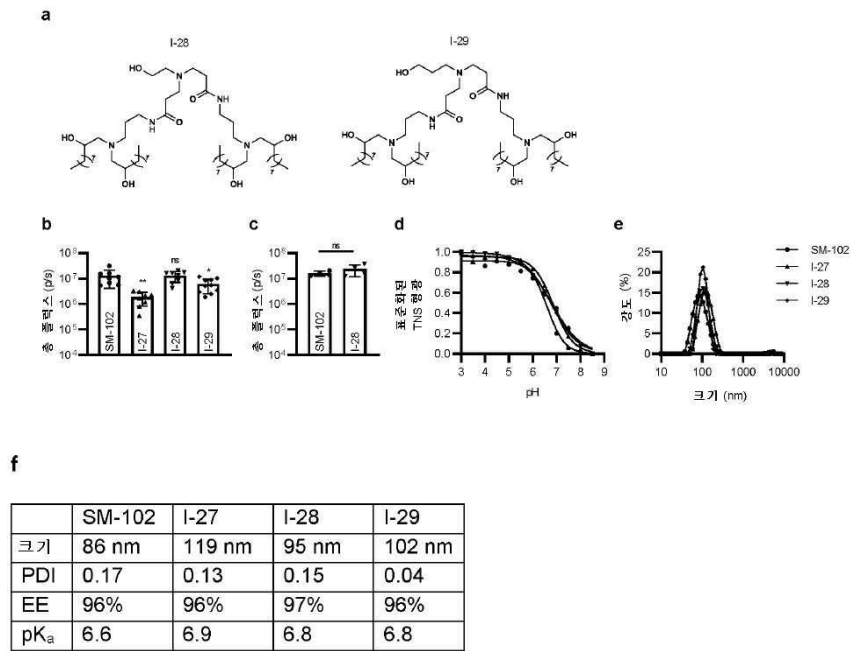
도면4



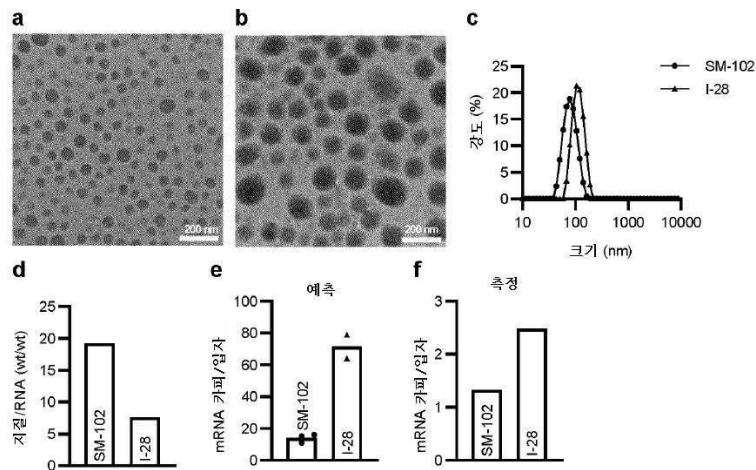
도면5



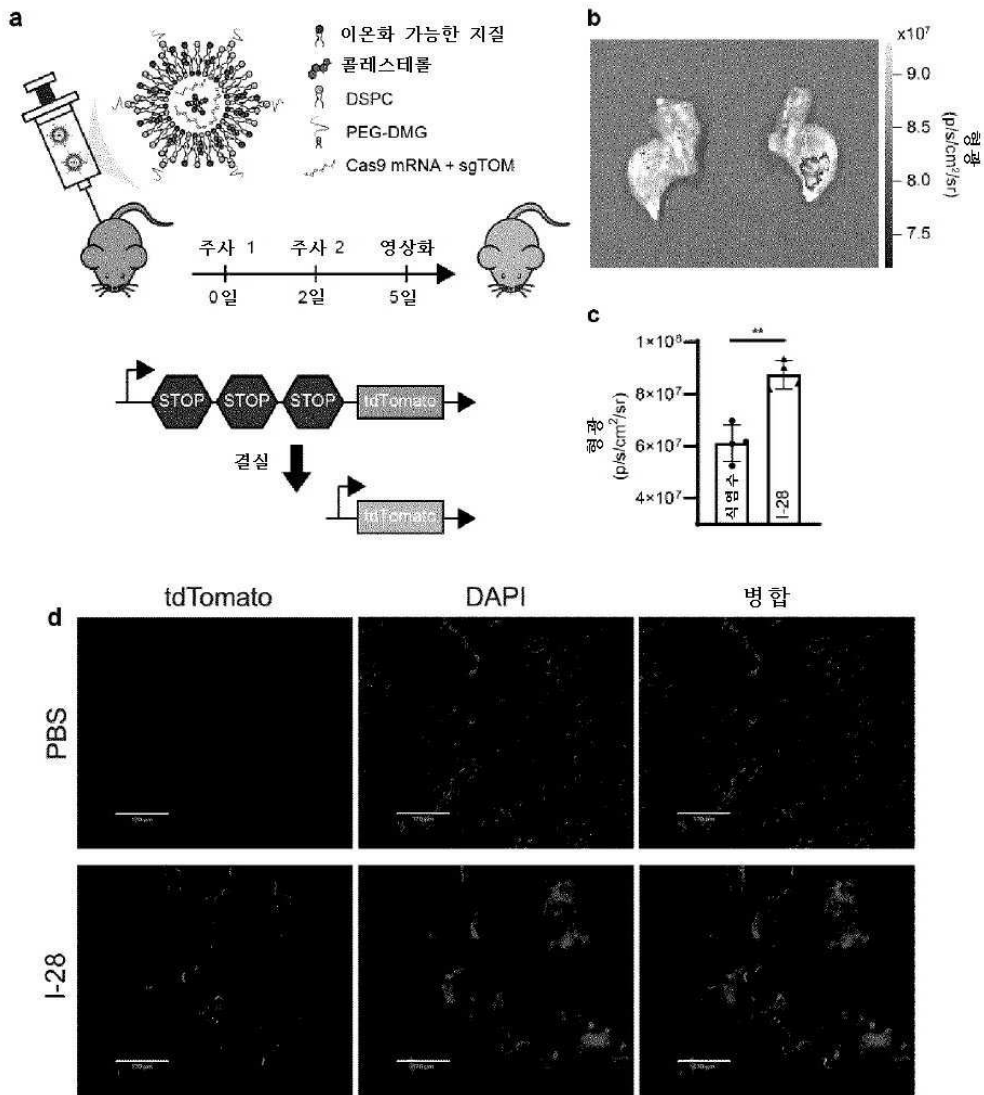
도면6



도면7



도면8



도면9

