(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0024565
(43) 공개일자 2022년03월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C08G 65/329 (2006.01) *A61K 38/20* (2006.01)
A61K 38/21 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61K 47/34 (2017.01) *A61K 9/107* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C08G 65/333* (2006.01)
C08G 65/334 (2006.01) *C08L 71/02* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C08G 65/329 (2013.01)
A61K 38/2006 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-7001363
(22) 출원일자(국제) 2020년06월22일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2022년01월13일
(86) 국제출원번호 PCT/US2020/038915
(87) 국제공개번호 WO 2020/263733
국제공개일자 2020년12월30일
(30) 우선권주장
62/865,187 2019년06월22일 미국(US)

(71) 출원인
더 보드 오브 리젠츠 오브 더 유니버시티 오브 텍사스 시스템
미국, 텍사스 78701, 오스틴, 210 웨스트 7 스트리트
(72) 발명자
가오 진밍
미국, 텍사스 75390, 달라스, 5323 해리 하인스 블러바드, 씨/오 유티 사우스웨스턴 메디컬 센터
왕 수
미국, 텍사스 75390, 달라스, 5323 해리 하인스 블러바드, 씨/오 유티 사우스웨스턴 메디컬 센터
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인한얼

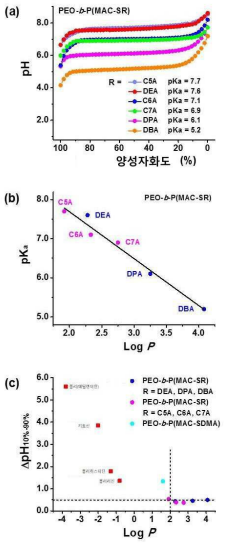
전체 청구항 수 : 총 65 항

(54) 발명의 명칭 **생분해성 초-pH 민감성 중합체**

(57) 요 약

본 개시내용은 pH에 민감한 소수성 및 친수성 세그먼트를 함유하는 분해성 중합체에 관한 것이다. 일부 측면에서, 중합체는 pH에 민감하고 생체내에서 분해될 수 있는 골격을 갖는 미셀을 형성한다. 일부 측면에서, 본 개시내용은 또한 약물의 전달을 위해 이들 분해성 중합체를 사용하는 방법을 제공한다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 38/2013 (2013.01)
A61K 38/208 (2013.01)
A61K 38/2086 (2013.01)
A61K 38/21 (2013.01)
A61K 47/34 (2013.01)
A61K 9/107 (2013.01)
C08G 65/3332 (2013.01)
C08G 65/334 (2013.01)
C08L 71/02 (2013.01)
(72) 발명자
탕 호우리앙
미국, 텍사스 75390, 달라스, 5323 해리 하인스 블러바드, 씨/오 유티 사우스웨스턴 메디컬 센터
리 웨이
미국, 텍사스 75390, 달라스, 5323 해리 하인스 블러바드, 씨/오 유티 사우스웨스턴 메디컬 센터
빌헬름 조나단
미국, 텍사스 75390, 달라스, 5323 해리 하인스 블러바드, 씨/오 유티 사우스웨스턴 메디컬 센터
수머 바란
미국, 텍사스 75390, 달라스, 5323 해리 하인스 블러바드, 씨/오 유티 사우스웨스턴 메디컬 센터

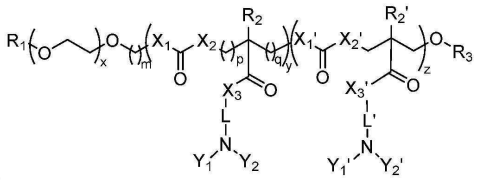
명 세 서

청구범위

청구항 1

화학식 I의 중합체 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염:

화학식 I



상기 화학식 I에서,

R_1은 수소, 알킬$_{(C\leq8)}$, 치환된 알킬$_{(C\leq8)}$ 또는 티올 반응성 그룹이고;

m은 1 내지 8의 정수이고;

p 및 q는 각각 독립적으로 1, 2 또는 3이고;

x는 10 내지 200의 정수이고;

y는 20 내지 200의 정수이고;

z는 0 내지 200의 정수이고;

여기서, y 또는 z 중 어느 하나의 단량체는 중합체 내에 무작위로 분포되어 있고;

X_1, X_2, X_1' 및 X_2'는 각각 독립적으로 O 또는 NR_a이고, 여기서

R_a는 알킬$_{(C\leq6)}$ 또는 치환된 알킬$_{(C\leq6)}$이고;

R_2 및 R_2'는 각각 독립적으로 수소, 알킬$_{(C\leq8)}$ 또는 치환된 알킬$_{(C\leq8)}$이고;

R_3은 수소, 알킬$_{(C\leq8)}$ 또는 치환된 알킬$_{(C\leq8)}$이고;

X_3 및 X_3'는 각각 독립적으로 O 또는 NR_b이고; 여기서,

R_b는 수소, 알킬$_{(C\leq6)}$ 또는 치환된 알킬$_{(C\leq6)}$이고;

L 및 L'는 각각 독립적으로 화학식 $-X_4-S(O)_n-X_5-$의 그룹이고; 여기서,

n은 0, 1 또는 2이고;

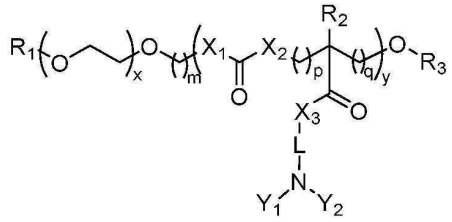
X_4 및 X_5는 각각 독립적으로 알칸디일$_{(C\leq8)}$ 또는 치환된 알칸디일$_{(C\leq8)}$이고;

Y_1, Y_2, Y_1' 및 Y_2'는 각각 독립적으로 알킬$_{(C\leq12)}$, 치환된 알킬$_{(C\leq12)}$, 알케닐$_{(C\leq12)}$ 또는 치환된 알케닐$_{(C\leq12)}$이거나; Y_1과 Y_2 또는 Y_1'와 Y_2'는 함께 취해지고 알칸디일$_{(C\leq12)}$, 알켄디일$_{(C\leq12)}$, 또는 둘 중 어느 하나의 그룹의 치환된 버전(version)이다.

청구항 2

제1항에 있어서, 하기 화학식 II 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염으로서 추가로 정의되는, 중합체:

화학식 II



상기 화학식 II에서,

R_1은 수소, 알킬$_{(C\leq8)}$, 치환된 알킬$_{(C\leq8)}$ 또는 티올 반응성 그룹이고;

m은 1 내지 8의 정수이고;

p 및 q는 각각 독립적으로 1, 2 또는 3이고;

x는 10 내지 200의 정수이고;

y는 20 내지 200의 정수이고;

X_1 및 X_2는 각각 O 또는 NR_a이고; 여기서,

R_a는 수소, 알킬$_{(C\leq6)}$ 또는 치환된 알킬$_{(C\leq6)}$이고;

R_2는 수소, 알킬$_{(C\leq8)}$ 또는 치환된 알킬$_{(C\leq8)}$이고;

R_3은 수소, 알킬$_{(C\leq8)}$ 또는 치환된 알킬$_{(C\leq8)}$이고;

X_3은 O 또는 NR_b이고, 여기서,

R_b는 수소, 알킬$_{(C\leq6)}$ 또는 치환된 알킬$_{(C\leq6)}$이고;

L은 화학식 $-X_4-S(O)_n-X_5-$의 그룹이고; 여기서,

n은 0, 1 또는 2이고;

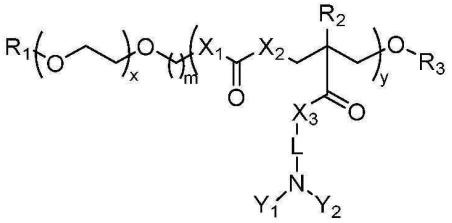
X_4 및 X_5는 각각 독립적으로 알칸디일$_{(C\leq8)}$ 또는 치환된 알칸디일$_{(C\leq8)}$이고;

Y_1 및 Y_2는 각각 독립적으로 알킬$_{(C\leq12)}$, 치환된 알킬$_{(C\leq12)}$, 알케닐$_{(C\leq12)}$ 또는 치환된 알케닐$_{(C\leq12)}$이거나; Y_1과 Y_2는 함께 취해지고 알칸디일$_{(C\leq12)}$, 알켄디일$_{(C\leq12)}$, 또는 둘 중 어느 하나의 그룹의 치환된 버전(version)이다.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 하기 화학식 III 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염으로 추가로 정의되는, 중합체:

화학식 III



상기 화학식 III에서,

R_1은 수소, 알킬$_{(C\leq8)}$, 치환된 알킬$_{(C\leq8)}$ 또는 티올 반응성 그룹이고;

m은 1 내지 8의 정수이고;

x는 10 내지 200의 정수이고;

y는 20 내지 200의 정수이고;

X_1 및 X_2는 각각 O 또는 NR_a이고, 여기서

R_a는 수소, 알킬$_{(C\leq6)}$ 또는 치환된 알킬$_{(C\leq6)}$이고;

R_2는 수소, 알킬$_{(C\leq8)}$ 또는 치환된 알킬$_{(C\leq8)}$이고;

R_3은 수소, 알킬$_{(C\leq8)}$ 또는 치환된 알킬$_{(C\leq8)}$이고;

X_3은 O 또는 NR_b이고, 여기서,

R_b는 수소, 알킬$_{(C\leq6)}$ 또는 치환된 알킬$_{(C\leq6)}$이고;

L은 화학식 $-X_4-S(O)_n-X_5-$의 그룹이고; 여기서,

n은 0, 1 또는 2이고;

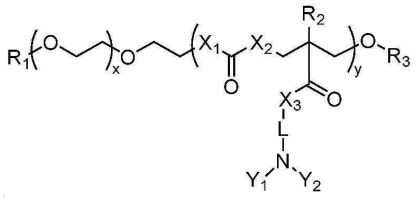
X_4 및 X_5는 각각 독립적으로 알칸디일$_{(C\leq8)}$ 또는 치환된 알칸디일$_{(C\leq8)}$이고;

Y_1 및 Y_2는 각각 독립적으로 알킬$_{(C\leq12)}$, 치환된 알킬$_{(C\leq12)}$, 알케닐$_{(C\leq12)}$ 또는 치환된 알케닐$_{(C\leq12)}$이거나; Y_1과 Y_2는 함께 취해지고 알칸디일$_{(C\leq12)}$, 알켄디일$_{(C\leq12)}$, 또는 둘 중 어느 하나의 그룹의 치환된 버전이다.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 하기 화학식 IV 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염으로 추가로 정의되는, 중합체:

화학식 IV



상기 화학식 IV에서,

R_1은 수소, 알킬$_{(C\leq8)}$, 치환된 알킬$_{(C\leq8)}$ 또는 티올 반응성 그룹이고;

x는 10 내지 200의 정수이고;

y는 20 내지 200의 정수이고;

X_1 및 X_2는 각각 O 또는 NR_a이고, 여기서,

R_a는 수소, 알킬$_{(C\leq6)}$ 또는 치환된 알킬$_{(C\leq6)}$이고;

R_2는 수소, 알킬$_{(C\leq8)}$ 또는 치환된 알킬$_{(C\leq8)}$이고;

R_3은 수소, 알킬$_{(C\leq8)}$ 또는 치환된 알킬$_{(C\leq8)}$이고;

X_3은 O 또는 NR_b이고, 여기서,

R_b는 수소, 알킬$_{(C\leq6)}$ 또는 치환된 알킬$_{(C\leq6)}$이고;

L은 화학식 $-X_4-S(O)_n-X_5-$의 그룹이고; 여기서,

n은 0, 1 또는 2이고;

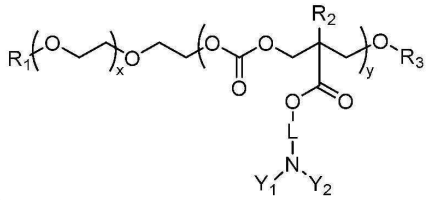
X_4 및 X_5는 각각 독립적으로 알칸디일$_{(C\leq8)}$ 또는 치환된 알칸디일$_{(C\leq8)}$이고;

Y_1 및 Y_2는 각각 독립적으로 알킬$_{(C\leq12)}$, 치환된 알킬$_{(C\leq12)}$, 알케닐$_{(C\leq12)}$ 또는 치환된 알케닐$_{(C\leq12)}$이거나; Y_1과 Y_2는 함께 취해지고 알칸디일$_{(C\leq12)}$, 알켄디일$_{(C\leq12)}$, 또는 둘 중 어느 하나의 그룹의 치환된 버전이다.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 하기 화학식 V 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염으로 추가로 정의되는, 중합체:

화학식 V



상기 화학식 V에서,

R_1은 수소, 알킬$_{(C\leq8)}$, 치환된 알킬$_{(C\leq8)}$ 또는 티올 반응성 그룹이고;

x는 10 내지 200의 정수이고;

y는 20 내지 200의 정수이고;

R_2는 수소, 알킬$_{(C\leq8)}$ 또는 치환된 알킬$_{(C\leq8)}$이고;

R_3은 수소, 알킬$_{(C\leq8)}$ 또는 치환된 알킬$_{(C\leq8)}$이고;

L은 화학식 $-X_4-S(O)_n-X_5-$의 그룹이고; 여기서,

n은 0, 1 또는 2이고;

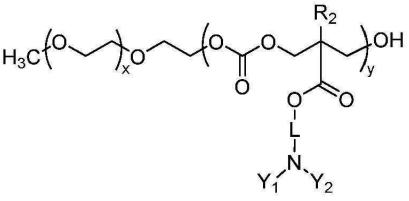
X_4 및 X_5는 각각 독립적으로 알칸디일$_{(C\leq8)}$ 또는 치환된 알칸디일$_{(C\leq8)}$이고;

Y_1 및 Y_2는 각각 독립적으로 알킬$_{(C\leq12)}$, 치환된 알킬$_{(C\leq12)}$, 알케닐$_{(C\leq12)}$ 또는 치환된 알케닐$_{(C\leq12)}$이거나; Y_1과 Y_2는 함께 취해지고 알칸디일$_{(C\leq12)}$, 알켄디일$_{(C\leq12)}$, 또는 둘 중 어느 하나의 그룹의 치환된 버전이다.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 하기 화학식 VI 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염으로 추가로 정의되는, 중합체:

화학식 VI



상기 화학식 VI에서,

x는 10 내지 200의 정수이고;

y는 20 내지 200의 정수이고;

R_2는 수소, 알킬$_{(C\leq8)}$ 또는 치환된 알킬$_{(C\leq8)}$이고;

L은 화학식 $-X_4-S(O)_n-X_5-$의 그룹이고; 여기서,

n은 0, 1 또는 2이고;

X_4 및 X_5는 각각 독립적으로 알칸디일$_{(C\leq8)}$ 또는 치환된 알칸디일$_{(C\leq8)}$이고;

Y_1 및 Y_2는 각각 독립적으로 알킬$_{(C\leq12)}$, 치환된 알킬$_{(C\leq12)}$, 알케닐$_{(C\leq12)}$ 또는 치환된 알케닐$_{(C\leq12)}$이거나; Y_1과 Y_2는 함께 취해지고 알칸디일$_{(C\leq12)}$, 알켄디일$_{(C\leq12)}$, 또는 둘 중 어느 하나의 그룹의 치환 버전이다.

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서, p가 1인, 중합체.

청구항 8

제1항, 제2항 또는 제7항 중 어느 한 항에 있어서, q가 1인, 중합체.

청구항 9

제1항 내지 제3항, 제7항 및 제8항 중 어느 한 항에 있어서, m이 1, 2 또는 3인, 중합체.

청구항 10

제9항에 있어서, m이 2인, 중합체.

청구항 11

제1항 내지 제4항 및 제7항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, X_1이 O인, 중합체.

청구항 12

제1항 내지 제4항 및 제7항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, X_2가 O인, 중합체.

청구항 13

제1항 내지 제4항 및 제7항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, X_3이 O인, 중합체.

청구항 14

제1항 내지 제5항 및 제7항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, R_1이 알킬$_{(C\leq8)}$ 또는 치환된 알킬$_{(C\leq8)}$인, 중합체.

청구항 15

제14항에 있어서, R_1이 알킬$_{(C\leq8)}$인, 중합체.

청구항 16

제15항에 있어서, R_1이 메틸인, 중합체.

청구항 17

제1항 내지 제5항 및 제7항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, R_8이 수소인, 중합체.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, R_2가 알킬$_{(C\leq8)}$ 또는 치환된 알킬$_{(C\leq8)}$인, 중합체.

청구항 19

제18항에 있어서, R_2가 알킬$_{(C\leq8)}$인, 중합체.

청구항 20

제19항에 있어서, R_2가 메틸인, 중합체.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, L의 X_4가 알칸디일$_{(C\leq6)}$ 또는 치환된 알칸디일$_{(C\leq6)}$인, 중합체.

청구항 22

제21항에 있어서, L의 X_4가 알칸디일$_{(C\leq6)}$인, 중합체.

청구항 23

제22항에 있어서, L의 X_4가 $-CH_2CH_2-$인, 중합체.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, L의 X_5가 알칸디일$_{(C\leq6)}$ 또는 치환된 알칸디일$_{(C\leq6)}$인, 중합체.

청구항 25

제24항에 있어서, L의 X_5가 알칸디일$_{(C\leq6)}$인, 중합체.

청구항 26

제25항에 있어서, L의 X_5가 $-CH_2CH_2-$인, 중합체.

청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, n이 0인, 중합체.

청구항 28

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, Y_1이 알킬$_{(C\leq12)}$ 또는 치환된 알킬$_{(C\leq12)}$인, 중합체.

청구항 29

제28항에 있어서, Y_1이 알킬$_{(C2-12)}$ 또는 치환된 알킬$_{(C2-12)}$인, 중합체.

청구항 30

제28항 또는 제29항에 있어서, Y_1이 알킬$_{(C2-12)}$인, 중합체.

청구항 31

제28항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, Y_1이 메틸, 에틸, n-프로필 또는 n-부틸인, 중합체.

청구항 32

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, Y_2가 알킬$_{(C\leq12)}$ 또는 치환된 알킬$_{(C\leq12)}$인, 중합체.

청구항 33

제32항에 있어서, Y_2가 알킬$_{(C2-12)}$ 또는 치환된 알킬$_{(C2-12)}$인, 중합체.

청구항 34

제32항 또는 제33항 중 어느 한 항에 있어서, Y_2가 알킬$_{(C2-12)}$인, 중합체.

청구항 35

제32항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, Y_2가 메틸, 에틸, n-프로필 또는 n-부틸인, 중합체.

청구항 36

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, Y_1 및 Y_2가 함께 취해지고 알칸디일$_{(C\leq12)}$ 또는 치환된 알칸디일$_{(C\leq12)}$인, 중합체.

청구항 37

제36항에 있어서, Y_1 및 Y_2가 함께 취해지고 알칸디일$_{(C\leq8)}$ 또는 치환된 알칸디일$_{(C\leq8)}$인, 중합체.

청구항 38

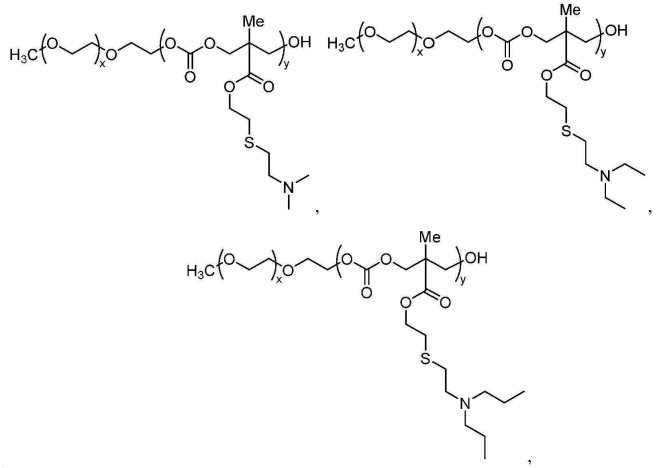
제37항에 있어서, Y_1 및 Y_2가 함께 취해지고 알칸디일$_{(C\leq8)}$인, 중합체.

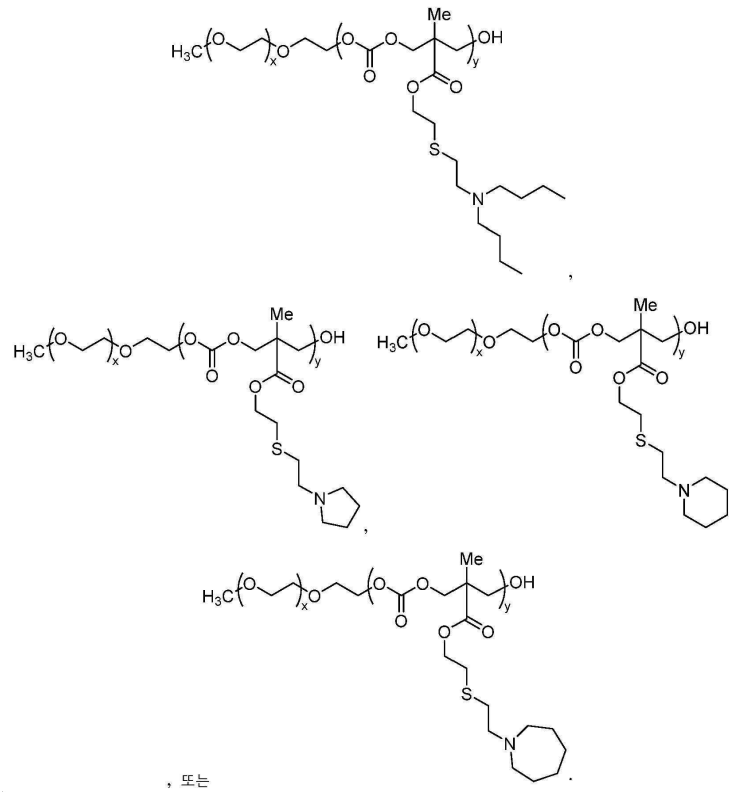
청구항 39

제37항에 있어서, Y_1 및 Y_2가 함께 취해지고 $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$, $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$ 또는 $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$인, 중합체.

청구항 40

제1항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 중합체가 하기 화학식 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염으로 추가로 정의되는, 중합체.





, 또는

청구항 41

제1항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, x가 40 내지 160의 정수인, 중합체.

청구항 42

제41항에 있어서, x가 80 내지 150의 정수인, 중합체.

청구항 43

제1항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, y가 40 내지 180의 정수인, 중합체.

청구항 44

제43항에 있어서, y가 80 내지 150의 정수인, 중합체.

청구항 45

제1항 내지 제44항 중 어느 한 항에 따른 복수의 중합체를 포함하는 미셀(micelle).

청구항 46

(A) 제1항 내지 제44항 중 어느 한 항에 따른 중합체; 및

(B) 치료제

를 포함하는 조성물로서, 상기 중합체가 치료제를 캡슐화(encapsulating)하는, 조성물.

청구항 47

제46항에 있어서, 상기 중합체가 미셀을 형성하는, 조성물.

청구항 48

제46항 또는 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 미셀이 치료제를 완전히 캡슐화하는, 조성물.

청구항 49

제46항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 치료제가 면역계에 영향을 미치는 제제(agent)인, 조성물.

청구항 50

제49항에 있어서, 상기 치료제가 사이토카인 또는 면역계 조절인자(modulator)인, 조성물.

청구항 51

제50항에 있어서, 상기 사이토카인이 IL-1β, IL-2, IL-12 또는 IL-15인, 조성물.

청구항 52

제50항에 있어서, 상기 면역계 조절인자가 cGAMP 또는 1형 인터페론인, 조성물.

청구항 53

제49항에 있어서, 상기 치료제가 항원인, 조성물.

청구항 54

제53항에 있어서, 상기 항원이 항암 항원인, 조성물.

청구항 55

제54항에 있어서, 상기 항암 항원이 E7 펩티드인, 조성물.

청구항 56

제46항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물이 약제학적 조성물로서 제형화되고, 부형제를 추가로 포함하는, 조성물.

청구항 57

제56항에 있어서, 상기 약제학적 조성물이 경구, 지방내, 동맥내, 관절내, 두개내, 피내, 병변내, 근육내, 비강내, 안내, 심막내, 복강내, 흉막내, 전립선내, 직장내, 척추강내, 기관내, 종양내, 탯줄내, 질내, 정맥내, 방광내, 유리체내, 리포솜, 국소, 점막, 비경구, 직장, 결막하, 피하, 설하, 국소, 볼내, 경피, 질, 크림으로(in cremes), 지질 조성물로, 카테터(catheter), 세척, 지속 주입, 주입, 흡입, 주사, 국소 전달 또는 국소 관류를 통한 투여용으로 제형화되는, 조성물.

청구항 58

제57항에 있어서, 상기 약제학적 조성물이 주사를 통한 투여용으로 제형화되는, 조성물.

청구항 59

제57항에 있어서, 상기 약제학적 조성물이 동맥내 투여, 근육내 투여, 복강내 투여, 종양내 투여 또는 정맥내 투여용으로 제형화되는, 조성물.

청구항 60

제56항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 부형제가 비히클(vehicle)인, 조성물.

청구항 61

제60항에 있어서, 상기 비히클이 주사에 적합한 수용액인, 조성물.

청구항 62

이를 필요로 하는 환자에게 제46항 내지 제61항 중 어느 한 항에 따르는 치료학적 유효량의 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 질환 또는 장애를 치료하는 방법으로서, 상기 치료제가 질환 또는 장애를 치료하기에 충분한, 방법.

청구항 63

제62항에 있어서, 상기 질환 또는 장애가 암인, 방법.

청구항 64

제62항 또는 제63항에 있어서, 상기 치료제가 암을 표적화하는 면역계를 조절할 수 있는, 방법.

청구항 65

제62항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 치료제가 하나 이상의 암 세포에 대한 면역 반응을 생성하는, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 출원은 2019년 6월 22일자의 미국 가출원 제62/865,187호의 우선권을 주장하고, 그 전체 내용은 본원에 참고로 포함된다.

[0002] **배경**

[0003] 본 발명은 국립 보건원에 의해 수여된 보조금 번호 R01CA216839 및 U01CA218422 하에서 정부의 지원을 받아 이루어졌다. 정부는 본 발명에서 특정 권리를 갖는다.

[0004] **1. 분야**

[0005] 본 개시내용은 일반적으로 분자 및 세포 생물학, 약물 전달 및 나노기술 분야에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 이는 치료제의 전달에 사용될 수 있는 분해성 중합체에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0006] **2. 관련 기술의 설명**

[0007] 자극-반응성 물질은 최근 광범위한 의료 응용 분야로 급속히 진보하고 있다[참조: Blum et al., 2015; Reineke, 2016; Torchilin, 2014; Yang et al., 2016]. 다양한 pH 민감성 중합체 및 나노입자가 설계되고, 종양 이미징 및 약물 전달 응용을 위해 조사되었다[참조: Moitra et al., 2013; Moitra et al., 2014; Zhang et al., 2015]. 다수의 생물학적 응용의 경우, 초기 엔도솜 대 후기 엔도솜과 같은 상이한 성숙 상태에서 소기관 pH 사이의 차이, 또는 종양 미세환경과 정상 조직 pH 사이의 차이는 1 pH 단위 미만 만큼 작은 pH 차이를 포함하여 작고[참조: Casey et al., 2009; Gerweck and Seetharaman, 1996], 이는 종래의 소분자 또는 중합체 pH 센서가 구별하기 어렵게 만든다. 최근에, 환경 pH에 대한 이원 반응을 갖는 일련의 초-pH 민감성(UPS) 공중합체가 개발되었다. 상이한 소수성 치환기를 갖는 3급 아민과 같은 이온화 가능한 잔기가 폴리(메틸메타크릴레이트)(PMMA) 중합체의 골격에 도입되었다. 소수성 미셀화는 예리한 pH 반응(예: 0.25 pH 단위 내에서 형광 온/오프 활성화)에 기여하는 것으로 이론화되었다. 생성된 트랜지스터-유사 나노입자는 종양 이미징 및 수술[참조: Zhou et al., 2011a; Zhou et al., 2011b; Wang et al., 2013; Zhao et al., 2016], 식작용 소기관 및 리소좀 이화작용의 이미지 및 섭동[참조: Wang et al., 2015; Wang et al., 2017], 및 암 면역요법을 위한 나노백신[참조: Wang et al., 2016; Luo et al., 2017]을 포함하는 복수의 생물학적 응용 분야에서 정밀도의 향상을 나타냈다.

[0008] 상기한 바와 같이, 현재의 UPS 공중합체는 신체로부터 제거되는 이들 중합체의 능력을 방해하는 비분해성 PMMA 중합체 골격을 사용하여 합성된다. 암 수술과 같은 특정 의료 응용 분야의 경우, 사용 빈도(즉, 수술 전의 단일 주사) 및 조영제(예: 인도시아닌 그린)의 낮은 독성으로 인해, PMMA 설계는 인간이 사용하기에 안전하게 한다. 그러나, 약물 또는 유전자 전달과 같은 반복 주사가 필요한 다른 응용 분야에서, PMMA 설계는 신체에 과도한 물질의 축적을 초래할 수 있고, 이러한 UPS 공중합체의 장기간 임상 사용의 안전성을 제한할 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

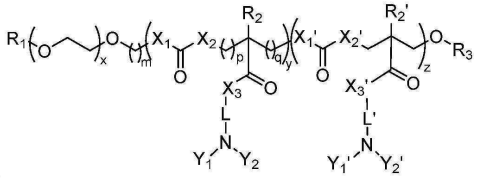
[0009] 따라서, 생체내에서 분해될 수 있는 치료제를 전달하기 위해 사용될 수 있는 중합체 시스템을 개발하고 제조할 필요성이 남아 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 요약

[0011] 일부 측면에서, 본 개시내용은 화학식 I의 중합체 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 제공한다:

[0012] [화학식 I]

[0013] 

[0014] 상기 화학식 I에서,

[0015] R_1은 수소, 알킬$_{(C\leq8)}$, 치환된 알킬$_{(C\leq8)}$ 또는 티올 반응성 그룹이고;

[0016] m은 1 내지 8의 정수이고;

[0017] p 및 q는 각각 독립적으로 1, 2 또는 3이고;

[0018] x는 10 내지 200의 정수이고;

[0019] y는 20 내지 200의 정수이고;

[0020] z는 0 내지 200의 정수이고;

[0021] 여기서, y 또는 z 중 어느 하나의 단량체는 중합체 내에 무작위로 분포되어 있고;

[0022] X_1, X_2, X_1' 및 X_2'는 각각 독립적으로 O 또는 NR_a이고, 여기서

[0023] R_a는 알킬$_{(C\leq6)}$ 또는 치환된 알킬$_{(C\leq6)}$이고;

[0024] R_2 및 R_2'는 각각 독립적으로 수소, 알킬$_{(C\leq8)}$ 또는 치환된 알킬$_{(C\leq8)}$이고;

[0025] R_3은 수소, 알킬$_{(C\leq8)}$ 또는 치환된 알킬$_{(C\leq8)}$이고;

[0026] X_3 및 X_3'는 각각 독립적으로 O 또는 NR_b이고; 여기서,

[0027] R_b는 수소, 알킬$_{(C\leq6)}$ 또는 치환된 알킬$_{(C\leq6)}$이고;

[0028] L 및 L'는 각각 독립적으로 화학식 $-X_4-S(O)_n-X_5-$의 그룹이고; 여기서,

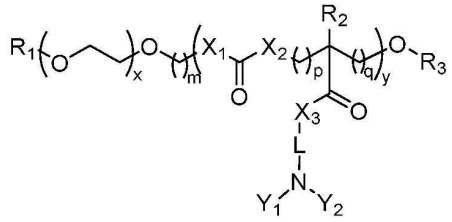
[0029] n은 0, 1 또는 2이고;

[0030] X_4 및 X_5는 각각 독립적으로 알칸디일$_{(C\leq8)}$ 또는 치환된 알칸디일$_{(C\leq8)}$이고;

[0031] Y_1, Y_2, Y_1' 및 Y_2'는 각각 독립적으로 알킬$_{(C\leq12)}$, 치환된 알킬$_{(C\leq12)}$, 알케닐$_{(C\leq12)}$ 또는 치환된 알케닐$_{(C\leq12)}$이거나; Y_1과 Y_2 또는 Y_1'와 Y_2'는 함께 취해지고 알칸디일$_{(C\leq12)}$, 알켄디일$_{(C\leq12)}$, 또는 둘 중 어느 하나의 그룹의 치환된 버전(version)이다.

[0032] 일부 구현예에서, 중합체는 화학식 II 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염으로서 추가로 정의된다:

[0033] [화학식 II]



[0034]

[0035] 상기 화학식 II에서,

[0036] R_1은 수소, 알킬$_{(C\leq8)}$, 치환된 알킬$_{(C\leq8)}$ 또는 티올 반응성 그룹이고;

[0037] m은 1 내지 8의 정수이고;

[0038] p 및 q는 각각 독립적으로 1, 2 또는 3이고;

[0039] x는 10 내지 200의 정수이고;

[0040] y는 20 내지 200의 정수이고;

[0041] X_1 및 X_2는 각각 O 또는 NR_a이고; 여기서,

[0042] R_a는 수소, 알킬$_{(C\leq6)}$ 또는 치환된 알킬$_{(C\leq6)}$이고;

[0043] R_2는 수소, 알킬$_{(C\leq8)}$ 또는 치환된 알킬$_{(C\leq8)}$이고;

[0044] R_3은 수소, 알킬$_{(C\leq8)}$ 또는 치환된 알킬$_{(C\leq8)}$이고;

[0045] X_3은 O 또는 NR_b이고, 여기서,

[0046] R_b는 수소, 알킬$_{(C\leq6)}$ 또는 치환된 알킬$_{(C\leq6)}$이고;

[0047] L은 화학식 $-X_4-S(O)_n-X_5-$의 그룹이고; 여기서,

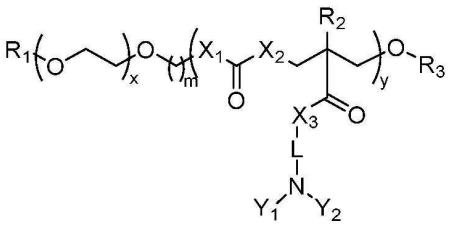
[0048] n은 0, 1 또는 2이고;

[0049] X_4 및 X_5는 각각 독립적으로 알칸디일$_{(C\leq8)}$ 또는 치환된 알칸디일$_{(C\leq8)}$이고;

[0050] Y_1 및 Y_2는 각각 독립적으로 알킬$_{(C\leq12)}$, 치환된 알킬$_{(C\leq12)}$, 알케닐$_{(C\leq12)}$ 또는 치환된 알케닐$_{(C\leq12)}$이거나; Y_1과 Y_2는 함께 취해지고 알칸디일$_{(C\leq12)}$, 알켄디일$_{(C\leq12)}$, 또는 둘 중 어느 하나의 그룹의 치환된 버전이다.

[0051] 일부 구현예에서, 중합체는 하기 화학식 III 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염으로서 추가로 정의된다:

[0052] [화학식 III]



[0053]

[0054] 상기 화학식 III에서,

[0055] R_1은 수소, 알킬$_{(C\leq8)}$, 치환된 알킬$_{(C\leq8)}$ 또는 티올 반응성 그룹이고;

[0056] m은 1 내지 8의 정수이고;

[0057] x는 10 내지 200의 정수이고;

[0058] y는 20 내지 200의 정수이고;

[0059] X_1 및 X_2는 각각 O 또는 NR_a이고, 여기서

[0060] R_a는 수소, 알킬$_{(C\leq6)}$ 또는 치환된 알킬$_{(C\leq6)}$이고;

[0061] R_2는 수소, 알킬$_{(C\leq8)}$ 또는 치환된 알킬$_{(C\leq8)}$이고;

[0062] R_3은 수소, 알킬$_{(C\leq8)}$ 또는 치환된 알킬$_{(C\leq8)}$이고;

[0063] X_3은 O 또는 NR_b이고, 여기서,

[0064] R_b는 수소, 알킬$_{(C\leq6)}$ 또는 치환된 알킬$_{(C\leq6)}$이고;

[0065] L은 화학식 $-X_4-S(O)_n-X_5-$의 그룹이고; 여기서,

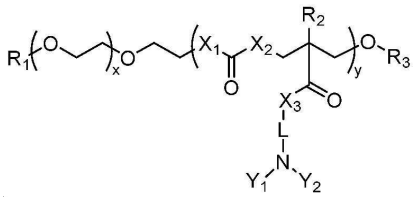
[0066] n은 0, 1 또는 2이고;

[0067] X_4 및 X_5는 각각 독립적으로 알칸디일$_{(C\leq8)}$ 또는 치환된 알칸디일$_{(C\leq8)}$이고;

[0068] Y_1 및 Y_2는 각각 독립적으로 알킬$_{(C\leq12)}$, 치환된 알킬$_{(C\leq12)}$, 알케닐$_{(C\leq12)}$ 또는 치환된 알케닐$_{(C\leq12)}$이거나; Y_1과 Y_2는 함께 취해지고 알칸디일$_{(C\leq12)}$, 알켄디일$_{(C\leq12)}$, 또는 둘 중 어느 하나의 그룹의 치환된 버전이다.

[0069] 일부 구현예에서, 중합체는 하기 화학식 IV 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염으로서 추가로 정의된다:

[0070] [화학식 IV]

[0071] 

[0072] 상기 화학식 IV에서,

[0073] R_1은 수소, 알킬$_{(C\leq8)}$, 치환된 알킬$_{(C\leq8)}$ 또는 티올 반응성 그룹이고;

[0074] x는 10 내지 200의 정수이고;

[0075] y는 20 내지 200의 정수이고;

[0076] X_1 및 X_2는 각각 O 또는 NR_a이고, 여기서,

[0077] R_a는 수소, 알킬$_{(C\leq6)}$ 또는 치환된 알킬$_{(C\leq6)}$이고;

[0078] R_2는 수소, 알킬$_{(C\leq8)}$ 또는 치환된 알킬$_{(C\leq8)}$이고;

[0079] R_3은 수소, 알킬$_{(C\leq8)}$ 또는 치환된 알킬$_{(C\leq8)}$이고;

[0080] X_3은 O 또는 NR_b이고, 여기서,

[0081] R_b는 수소, 알킬$_{(C\leq6)}$ 또는 치환된 알킬$_{(C\leq6)}$이고;

[0082] L은 화학식 $-X_4-S(O)_n-X_5-$의 그룹이고; 여기서,

[0083] n은 0, 1 또는 2이고;

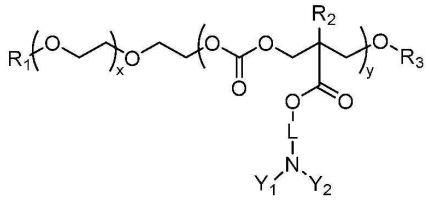
[0084] X_4 및 X_5는 각각 독립적으로 알칸디일$_{(C\leq8)}$ 또는 치환된 알칸디일$_{(C\leq8)}$이고;

[0085] Y_1 및 Y_2는 각각 독립적으로 알킬$_{(C\leq12)}$, 치환된 알킬$_{(C\leq12)}$, 알케닐$_{(C\leq12)}$ 또는 치환된 알케닐$_{(C\leq12)}$이거나; Y_1과 Y_2는

함께 취해지고 알칸디일$_{(C\leq12)}$, 알켄디일$_{(C\leq12)}$, 또는 둘 중 어느 하나의 그룹의 치환된 버전이다.

[0086] 일부 구현예에서, 중합체는 하기 화학식 V 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염으로서 추가로 정의된다:

[0087] [화학식 V]

[0088] 

[0089] 상기 화학식 V에서,

[0090] R_1은 수소, 알킬$_{(C\leq8)}$, 치환된 알킬$_{(C\leq8)}$ 또는 티올 반응성 그룹이고;

[0091] x는 10 내지 200의 정수이고;

[0092] y는 20 내지 200의 정수이고;

[0093] R_2는 수소, 알킬$_{(C\leq8)}$ 또는 치환된 알킬$_{(C\leq8)}$이고;

[0094] R_3은 수소, 알킬$_{(C\leq8)}$ 또는 치환된 알킬$_{(C\leq8)}$이고;

[0095] L은 화학식 $-X_4-S(O)_n-X_5-$의 그룹이고; 여기서,

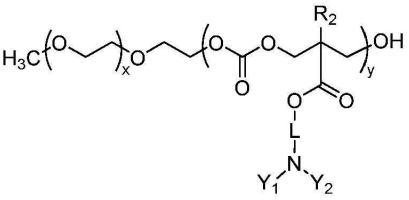
[0096] n은 0, 1 또는 2이고;

[0097] X_4 및 X_5는 각각 독립적으로 알칸디일$_{(C\leq8)}$ 또는 치환된 알칸디일$_{(C\leq8)}$이고;

[0098] Y_1 및 Y_2는 각각 독립적으로 알킬$_{(C\leq12)}$, 치환된 알킬$_{(C\leq12)}$, 알케닐$_{(C\leq12)}$ 또는 치환된 알케닐$_{(C\leq12)}$이거나; Y_1과 Y_2는 함께 취해지고 알칸디일$_{(C\leq12)}$, 알켄디일$_{(C\leq12)}$, 또는 둘 중 어느 하나의 그룹의 치환된 버전이다.

[0099] 일부 구현예에서, 중합체는 하기 화학식 VI 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염으로서 추가로 정의된다:

[0100] [화학식 VI]

[0101] 

[0102] 상기 화학식 VI에서,

[0103] x는 10 내지 200의 정수이고;

[0104] y는 20 내지 200의 정수이고;

[0105] R_2는 수소, 알킬$_{(C\leq8)}$ 또는 치환된 알킬$_{(C\leq8)}$이고;

[0106] L은 화학식 $-X_4-S(O)_n-X_5-$의 그룹이고; 여기서,

[0107] n은 0, 1 또는 2이고;

[0108] X_4 및 X_5는 각각 독립적으로 알칸디일$_{(C\leq8)}$ 또는 치환된 알칸디일$_{(C\leq8)}$이고;

[0109] Y_1 및 Y_2는 각각 독립적으로 알킬$_{(C\leq12)}$, 치환된 알킬$_{(C\leq12)}$, 알케닐$_{(C\leq12)}$ 또는 치환된 알케닐$_{(C\leq12)}$이거나; Y_1과 Y_2는 함께 취해지고 알칸디일$_{(C\leq12)}$, 알켄디일$_{(C\leq12)}$, 또는 둘 중 어느 하나의 그룹의 치환된 버전이다.

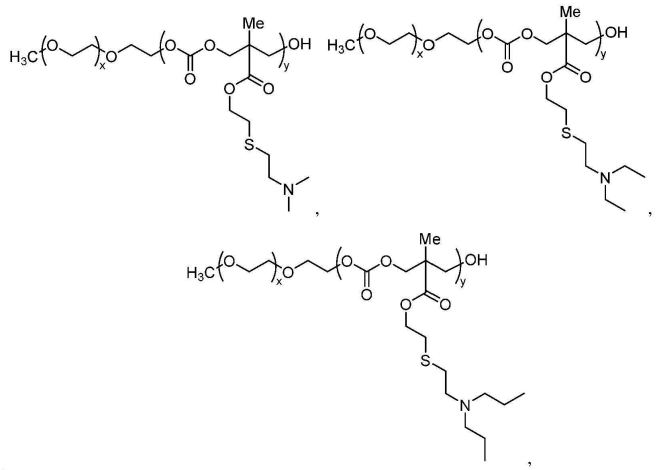
[0110] 일부 구현예에서, p는 1이다. 일부 구현예에서, q는 1이다. 일부 구현예에서, m은 1, 2, 또는 3, 예를 들어, 2이다. 일부 구현예에서, X_1은 O이다. 일부 구현예에서, X_2는 O이다. 일부 구현예에서, X_3은 O이다.

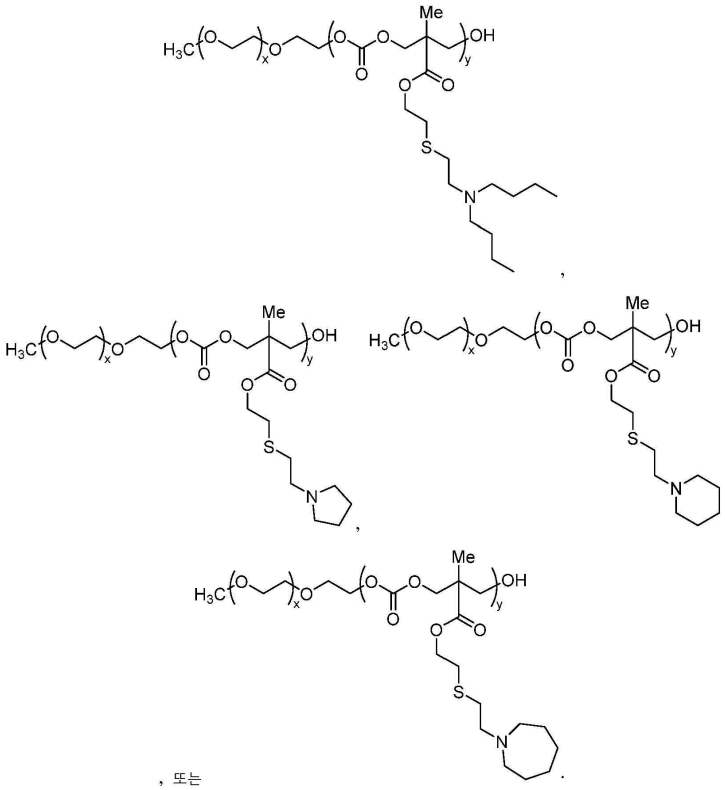
[0111] 일부 구현예에서, R_1은 알킬$_{(C\leq8)}$ 또는 치환된 알킬$_{(C\leq8)}$이다. 일부 구현예에서, R_1은 알킬$_{(C\leq8)}$, 예를 들어, 메틸이다. 일부 구현예에서, R_3은 수소이다. 일부 구현예에서, R_2는 알킬$_{(C\leq8)}$ 또는 치환된 알킬$_{(C\leq8)}$이다. 일부 구현예에서, R_2는 알킬$_{(C\leq8)}$, 예를 들어, 메틸이다.

[0112] 일부 구현예에서, L의 X_4는 알칸디일$_{(C\leq6)}$ 또는 치환된 알칸디일$_{(C\leq6)}$이다. 일부 구현예에서, L의 X_4는 알칸디일$_{(C\leq6)}$, 예를 들어, $-CH_2CH_2-$이다. 일부 구현예에서, L의 X_5는 알칸디일$_{(C\leq6)}$ 또는 치환된 알칸디일$_{(C\leq6)}$이다. 일부 구현예에서, L의 X_5는 알칸디일$_{(C\leq6)}$, 예를 들어, $-CH_2CH_2-$이다. 일부 구현예에서, n은 0이다.

[0113] 일부 구현예에서, Y_1은 알킬$_{(C\leq12)}$ 또는 치환된 알킬$_{(C\leq12)}$이다. 일부 구현예에서, Y_1은 알킬$_{(C2-12)}$ 또는 치환된 알킬$_{(C2-12)}$이다. 일부 구현예에서, Y_1은 알킬$_{(C2-12)}$이다. 일부 구현예에서, Y_1은 메틸, 에틸, n-프로필, 또는 n-부틸이다. 일부 구현예에서, Y_2는 알킬$_{(C\leq12)}$ 또는 치환된 알킬$_{(C\leq12)}$이다. 일부 구현예에서, Y_2는 알킬$_{(C2-12)}$ 또는 치환된 알킬$_{(C2-12)}$이다. 일부 구현예에서, Y_2는 알킬$_{(C2-12)}$이다. 일부 구현예에서, Y_2는 메틸, 에틸, n-프로필, 또는 n-부틸이다. 일부 구현예에서, Y_1 및 Y_2는 함께 취해지고 알칸디일$_{(C\leq12)}$ 또는 치환된 알칸디일$_{(C\leq12)}$이다. 일부 구현예에서, Y_1 및 Y_2는 함께 취해지고 알칸디일$_{(C\leq8)}$ 또는 치환된 알칸디일$_{(C\leq8)}$이다. 일부 구현예에서, Y_1 및 Y_2는 함께 취해지고 알칸디일$_{(C\leq8)}$이고, 예를 들면 Y_1 및 Y_2는 함께 취해지고 $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$, $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$ 또는 $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$이다.

[0114] 일부 구현예에서, 중합체는 하기 화학식 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염으로서 추가로 정의된다:

[0115] 



[0116] , 또는 .

[0117] 일부 구현예에서, x는 40 내지 160의 정수, 예를 들어, 80 내지 150의 정수이다. 일부 구현예에서, y는 40 내지 180의 정수, 예를 들어, 80 내지 150의 정수이다.

[0118] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 본원에 기재된 복수의 중합체를 포함하는 미셀(micelle)을 제공한다.

[0119] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은,

[0120] (A) 본원에 기재된 중합체; 및

[0121] (B) 치료제를 포함하는 조성물로서, 상기 중합체가 치료제를 캡슐화(encapsulating)하는, 조성물을 제공한다.

[0122] 일부 구현예에서, 중합체는 미셀을 형성한다. 일부 구현예에서, 미셀은 치료제를 완전히 캡슐화한다. 일부 구현예에서, 치료제는 면역계에 영향을 미치는 제제(agent), 예를 들어, 사이토카인 또는 면역계 조절인자(modulator)이다. 일부 구현예에서, 사이토카인은 IL-1β, IL-2, IL-12 또는 IL-15이다. 다른 구현예에서, 면역계 조절인자는 cGAMP 또는 1형 인터페론이다. 다른 구현예에서, 치료제는 항원, 예를 들어, 항암 항원이다. 일부 구현예에서, 항암 항원은 E7 펩티드이다.

[0123] 일부 구현예에서, 조성물은 약제학적 조성물로서 제형화되고, 부형제를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 경구, 지방내, 동맥내, 관절내, 두개내, 피내, 병변내, 근육내, 비강내, 안내, 심막내, 복강내, 흉막내, 전립선내, 직장내, 척추강내, 기관내, 종양내, 탯줄내, 질내, 정맥내, 방광내, 유리체내, 리포솜, 국소, 점막, 비경구, 직장, 결막하, 피하, 설하, 국소, 볼내, 경피, 질, 크림으로(in cremes), 지질 조성물로서, 카테터(catheter), 세척, 지속 주입, 주입, 흡입, 주사, 국소 전달 또는 국소 관류를 통한 투여용으로 제형화된다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 주사를 통한 투여용으로, 예를 들어, 동맥내 투여, 근육내 투여, 복강내 투여, 종양내 투여 또는 정맥내 투여용으로 제형화된다. 일부 구현예에서, 부형제는 비히클(vehicle), 예를 들어, 주사에 적합한 수용액이다.

[0124] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 이를 필요로 하는 환자에게 본원에 기재된 치료적 유효량의 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 질환 또는 장애를 치료하는 방법을 제공하고, 여기서 상기 치료제는 질환 또는 장애를 치료하기에 충분하다. 일부 구현예에서, 질환 또는 장애는 암이다. 일부 구현예에서, 치료제는 암을 표적화하는 면역계를 조절할 수 있다. 일부 구현예에서, 치료제는 하나 이상의 암 세포에 대한 면역 반응을 생성한다.

[0125] 본원에서 사용되는 바와 같이, "pH 반응성 미셀", "pH 민감성 미셀", "pH 활성화 가능한 미셀" 및 "pH 활성화 가능한 미셀(pHAM) 나노입자"는 본원에서 상호교환 가능하게 사용되어 하나 이상의 블록 공중합체를 포함하는 미셀을 나타내고, 이는 pH(예: 특정 pH 이상 또는 이하)에 따라 해리된다. 비제한적인 예로서, 특정 pH에서,

블록 공중합체는 실질적으로 미셀 형태이다. pH가 변화함에 따라(예: 감소됨에 따라), 미셀은 해리되기 시작하고, pH가 추가로 변화함에 따라(예: 추가로 감소됨에 따라), 블록 공중합체는 실질적으로 해리된(비-미셀) 형태로 존재한다.

[0126] 본원에서 사용되는 바와 같이, "pH 전이 범위"는 미셀이 해리되는 pH 범위를 나타낸다.

[0127] 본원에서 사용되는 바와 같이, "pH 전이 값"(pH_t)은 미셀의 절반이 해리되는 pH를 나타낸다.

[0128] 본원에 기재된 임의의 방법 또는 조성물은 본원에 기재된 임의의 다른 방법 또는 조성물과 관련하여 구현될 수 있는 것으로 고려된다.

[0129] 용어 "포함하다(comprise)"(및 포함하는의 임의 형태, 예를 들어, "포함한다(comprises)" 또는 "포함하는(comprising)"), "가지다(have)"(및 가지다의 임의 형태, 예를 들어, "갖는다(has)" 또는 "갖는(having)"), "함유하다(contain)"(및 함유하다의 임의 형태, 예를 들어, "함유한다(contains)" 및 "함유하는(containing)"), 및 "포함하다(include)"(및 포함하다의 임의 형태, 예를 들어, "포함한다(includes)" 및 "포함하는(including)")은 개방형 연결 동사이다. 결과적으로, 하나 이상의 인용된 단계 또는 요소를 "포함하는", "갖는", "함유하는", 또는 "포함하는" 방법, 조성물, 키트, 또는 시스템은 이들 인용된 단계 또는 요소를 포함하지만, 이들 단계 또는 요소만을 포함하는 것으로 제한되지 않고; 인용되지 않은 요소 또는 단계를 포함(즉, 커버)할 수 있다. 마찬가지로, 하나 이상의 인용된 특징을 "포함하는", "갖는", "함유하는", 또는 "포함하는" 방법, 조성물, 키트 또는 시스템의 요소는 이들 특징만을 포함하는 것으로 제한되지 않고, 인용되지 않은 특징을 포함할 수 있다.

[0130] 임의의 본 방법, 조성물, 키트, 및 시스템 중 임의의 구현예는 기재된 단계 및/또는 특징을 포함하고(comprise)/포함하고(include)/함유하고(contain)/갖기(have) 보다는 이들로 이루어지거나, 본질적으로 이들로 이루어질 수 있다. 따라서, 청구항 중 어느 하나에 있어서, "~로 이루어지는" 또는 "본질적으로 ~로 이루어지는"이라는 용어는 상기 인용된 임의의 개방형 연결 동사를 치환하여 소정의 청구항의 범위를 그렇지 않으면 개방형 연결 동사를 사용하는 것으로부터 변경할 수 있다.

[0131] 청구범위에서 용어 "또는"의 사용은, 본 개시내용이 대체물 및 "및/또는"만을 지칭하는 정의를 지지하지만, 대체물만을 지칭하도록 명시적으로 표시되지 않는 한 또는 대체물이 상호 배타적인 경우를 제외하고는, "및/또는"을 의미하는 것으로 사용된다.

[0132] 본 출원 전반에 걸쳐, 용어 "약"은, 값이 값을 결정하기 위해 사용되는 장치 또는 방법의 오차의 표준 편차를 포함하는 것을 나타내기 위해 사용된다.

[0133] 수년간의 특허법에 따라, 청구범위 또는 명세서에서 단어 "포함하는"과 함께 사용되는 경우, 단어 "a" 및 "an"은, 구체적으로 명시되지 않는 한, 하나 이상을 나타낸다.

[0134] 본 개시내용의 다른 목적, 특징 및 이점은 이하의 상세한 설명으로부터 명백해질 것이다. 그러나, 본 개시내용의 정신 및 범위 내의 다양한 변화 및 변형이 상세한 설명으로부터 당업자에게 명백해질 것이기 때문에, 상세한 설명 및 특정 실시예는 본 개시내용의 특정 구현예를 나타내면서, 단지 예시로서만 제공된다는 것을 이해해야 한다.

도면의 간단한 설명

[0135] 이하의 도면은 본 명세서의 일부를 형성하고, 본 개시내용의 특정 측면을 추가로 입증하기 위해 포함된다. 본 개시내용은 본원에 제시된 특정 구현예의 상세한 설명과 조합하여 이들 도면 중 하나 이상을 참조하여 더 잘 이해될 수 있다.

도 1a-1c는 생분해성 UPS 공중합체의 초-pH 민감성 반응의 특성을 나타낸다. (**도 1a**) 상이한 3급 아민 치환기를 갖는 PEO-b-P(MAC-SR) 공중합체의 양성자화도의 함수로서의 pH 변화. PEO_{123}-b-$P(MAC-SDMA)_{135}$의 데이터는 도 4에 개별적으로 제시된다. (**도 1b**) pK_a 값은 P(MAC-SR) 세그먼트의 반복 단위의 log P와 역상관된다(중성/탈양성자 상태). 청색 및 핑크색 점은 각각 측쇄 그룹으로서 선형 및 환형 디알킬 3급 아민을 포함하는 공중합체를 나타낸다. (**도 1c**) PEO-b-P(MAC-SR) 블록 공중합체의 log P의 함수로서 pH 전이 선명도($\Delta pH_{10\%-90\%}$). 비교를 위해, 일반적으로 사용되는 폴리염기(폴리(에틸렌이민), 키토산, 폴리히스티딘, 폴리리신)를 나타낸다[참조: Li et al., 2016].

도 2a 및 2b는 가용성 단일체 상태로부터 미셀 상태로의 상전이가 공중합체의 초-pH 민감성 반응을 유도함을 나타낸다. (**도 2a**) PEO_{123}-b-P(MAC-SC7A)$_{135}$ 공중합체의 pH 적정 동안 양성자화도의 함수로서 수-가중 유체역학적 직경 및 광산란 계수율. (**도 2b**) 임계 미셀화 양성자화도의 상하에서 95% 및 85% 양성자 화도에서의 PEO_{123}-b-P(MAC-SC7A)$_{135}$의 TEM 이미지 및 수-가중 유체역학적 직경 분포.

도 3a-3e는 pH 6.5 및 7.4에서 중수소화 완충액 중의 PEO_{123}-b-P(MAC-SC7A)$_{135}$ 공중합체의 분해 연구를 나타낸다. (**도 3a**) 공중합체 및 이의 분해 생성물의 화학 구조. 시간 경과에 따른 (**도 3b**) pH 6.5 및 (**도 3c**) pH 7.4 중수소화 완충액 중의 PEO_{123}-b-P(MAC-SC7A)$_{135}$ 공중합체의 ^{1}H NMR 스펙트럼. 명확성을 위해, 스펙트럼의 선택된 영역만이 제시된다. 완전한 스펙트럼은 **도 6** 및 **7**에 제시되어 있다. (**도 3d**) pH 6.5의 중수소화 완충액에서 PEO 세그먼트의 정규화된 양성자 신호에 대한 피크(d1+d2) 및 피크(d3+d4)의 적분비. (**도 3e**) pH 6.5 및 7.4 중수소화 완충액에서 PEO 세그먼트의 정규화된 양성자 신호에 대한 피크(d3+d4)의 적분비.

도 4는 PEO_{123}-b-P(MAC-SDMA)$_{135}$ 및 PEO_{123}-b-P(MAC-SC7A)$_{135}$의 양성자화도의 함수로서 pH 변화를 나타낸다.

도 5a 및 5b는, (**도 5a**) PEO_{123}-b-P(MAC-SDMA)$_{135}$ 공중합체의 pH 적정 동안 양성자화도의 함수로서 수-가중 유체역학적 직경 및 광 산란 계수율을 나타낸다. (**도 5b**) CMPD 상하(약 50%)에서, 55% 및 45%의 양성자화도에서의 PEO_{123}-b-P(MAC-SDMA)$_{135}$의 TEM 이미지 및 수-가중 유체역학적 직경 분포. 스케일 바: 50nm.

도 6은 55일 동안 pH 6.5 중수소화 완충액 중의 PEO_{123}-b-P(MAC-SC7A)$_{135}$ 공중합체의 완전한 ^{1}H NMR 스펙트럼을 나타낸다.

도 7은 55일 동안 pH 7.4 중수소화 완충액 중의 PEO_{123}-b-P(MAC-SC7A)$_{135}$ 공중합체의 완전한 ^{1}H NMR 스펙트럼을 나타낸다.

도 8은 HEK-Blue™ IL-2 리포터 세포에 의해 시험관내에서 평가된 정규화된 IL-2 기능을 나타낸다. IL-2 농도: 200, 50, 10, 2, 0.5, 0.2, 0.05, 0.01ng/mL; PEG-b-P(MAC-SDPA) 농도: 40, 10, 2, 0.4, 0.1, 0.04, 0.01, 0.002μg/mL.

도 9는 IL-2 요법에 의한 상이한 치료하에 B16F10 종양 성장 곡선을 나타낸다. 유리 IL-2 또는 PEG-b-P(MAC-SDPA)-IL-2를 1일 및 5일째에 종양내 또는 정맥내 주사했다(IL-2: 주사당 1μg; PEG-b-P(MAC-SDPA): 주사당 200 μg).

도 10은 11일 이내의 체중 변화 곡선을 나타낸다. 유리 IL-2 또는 PEG-b-P(MAC-SDPA)@IL-2를 1일 및 5일째에 종양내 또는 정맥내 주사했다(IL-2: 주사당 1μg; PEG-b-P(MAC-SDPA): 주사당 200μg).

도 11은 1.0mg/mL 생분해성 PEG-b-P(MAC-SC7A) 미셀 나노입자에서 cGAMP의 로딩 효율을 나타낸다.

도 12a-12c는 dUPS 중합체의 STING 결합 및 활성화를 나타낸다. **도 12a** 등온 적정 열량계(ITC)는 PSC7A 공중합체가 PSDEA보다 STING에 대해 훨씬 더 높은 결합 친화력을 가짐을 나타낸다. K_d: 겉보기 해리 상수. **도 12b** ITC 실험으로부터 STING에 대한 상이한 dUPS 중합체의 K_b 값(결합 친화도, K_d의 역수)의 요약. **도 12c** dUPS 공중합체(48시간 동안 0.5μM)와 배양된 THP1-ISG 세포의 인터페론(IFN) 유도 수준은 STING 결합 친화도와 상관관계가 있다. 통계적 유의성은 t-테스트에 의해 계산되었다: ***P<0.001, **P<0.01, *P<0.05.

도 13a 및 13b는 PSC7A 나노백신이 종양 성장을 억제하고 종양 보유 마우스의 생존을 연장시킬 수 있음을 나타낸다. 2×10^5개의 **도 13a** TC-1 또는 **도 13b** B16-F10 흑색종 세포로 접종된 C57BL/6 마우스(그룹당 n=9)는 상기 지시된 특정 시점에서, PBS, 종양 항원 펩티드 단독, PSC7A NP, 저용량 PSC7A 백신(Vax.low), 또는 고용량 PSC7A 백신(Vax.high)으로 처리했다. 백신접종은 강력한 종양 성장 억제를 유도하고, 이러한 마우스의 생존을 연장시켰다. 종양 성장 연구의 경우, 데이터는 평균±s.e.m으로 제시되고, 통계적 유의성은 t-테스트에 의해 계산되었다: ***P<0.001, **P<0.01, *P<0.05.

도 14a 및 14b는 PSC7A 나노백신이 2개의 동물 종양 모델에서 종양 성장을 억제함을 나타낸다. 비교를 위해, 비분해성 PC7A 나노백신을 사용했다. 2×10^5개의 **도 14a** TC-1 또는 **도 14b** B16-F10 흑색종 세포로 접종된

C57BL/6 마우스(그룹당 n=9)는, 특정 시점에서 PBS, 종양 항원 펩티드, PSC7A 백신 또는 PC7A 백신으로 처리했다. 데이터는 평균±s.e.m으로 제시되고, 통계적 유의성은 t-테스트에 의해 계산되었다: ***P<0.001, **P<0.01, *P<0.05.

도 15a-15c는 분해성 PSC7A NP 및 비분해성 PC7A NP의 단기간 안전성 평가를 나타낸다. **도 15a** C57BL/6 마우스(그룹당 n=4)는 PBS, 300㎍ PSC7A NP, 또는 300㎍ PC7A NP를 우측 옆구리에 피하 주사했다. **도 15b** 알라닌 아미노트랜스퍼라제(ALT), 아스파르테이트 아미노트랜스퍼라제(AST), 우레아 및 크레아티닌 수준의 혈청 농도는 주사 24시간 후에 Abcam™ 검정 키트에 의해 정량적으로 측정되었다. **도 15c** 인터류킨-6(IL-6), 인터류킨-10(IL-10), 단핵구 화학 유인물질 단백질-1(MCP-1), 인터페론-γ(IFN-γ), 종양 괴사 인자(TNF), 및 인터류킨-12p70(IL-12p70) 단백질 수준의 혈청 농도는 주사 24시간 후에 BD™ CBA 마우스 염증 키트에 의해 정량적으로 측정되었다. 통계적 유의성은 t-테스트에 의해 계산되었다: ***P<0.001, **P<0.01, *P<0.05.

도 16은 PSC7A NP의 단기간 안전성 평가를 위한 중추 기관의 조직학적 분석을 나타낸다. PBS, 300㎍의 PSC7A NP, 또는 300㎍의 PC7A NP를 우측 옆구리에 피하 주사한 후, C57BL/6 마우스의 기관의 대표적인 H&E 섹션. 마우스를 희생시키고, 투여 24시간 후에 기관을 수집했다. 심장, 간, 비장 및 신장 조직학은 PBS와 비교하여 어느 하나의 중합체에 의한 치료 후에 눈에 띄지 않았다. 각 기관 그룹에 대해 스케일 바: 5㎜(상부) 및 250㎛(하부).

도 17a-17d는 분해성 PSC7A NP 및 비분해성 PC7A NP의 장기간 안전성 평가를 나타낸다. **도 17a** C57BL/6 마우스는 PBS, 300㎍의 PSC7A NP, 또는 300㎍의 PC7ANP를 우측 옆구리에 피하 주사했다. 염증성 결절은 PSC7A NP 및 PC7A NP 그룹의 주사 부위에 형성된다. 결절의 표면적은 타원형 모델에 기초하여 계산되었다. **도 17b** 시간 경과에 따른 결절 표면적의 변화. **도 17c** 좌측: 60일째에 주사 부위로부터 상부에서 하부로 촬영된 피부 조직의 사진은 PC7A NP, PSC7A NP 및 PBS로 처리된 마우스이다. 우측: PSC7A 및 PC7A 그룹의 피부 조직의 확대도. **도 17c** 좌측: 상부에서 하부로 60일째에 포르말린 고정된 파라핀-매립 피부 조직(주사 부위)의 H&E 염색은 PC7A NP, PSC7A NP 및 PBS로 처리된 마우스이다. 스케일 바: 2.5㎜. 중앙: PC7A 그룹의 육아종성 염증으로 둘러싸인 결절의 확대도. 스케일 바: 250㎛. 삽입도: 정사각형으로 표시된 영역의 확대. 기저부 좌측, 상부 우측 및 우측 화살표는 각각 마크로파지, 림프구 및 호중구를 나타낸다. 스케일 바: 50㎛. 우측: PSC7A 그룹의 피부 조직 확대도. 스케일 바: 250㎛.

도 18은 PSC7A NP의 장기간 안전성 평가를 위한 피부 조직(주사 부위)의 조직학적 분석을 나타낸다. PBS, 300㎍의 PSC7A NP, 또는 300㎍의 PC7A NP를 우측 옆구리에 피하 주사한 후, C57BL/6 마우스의 피부 조직(주사 부위)의 대표적인 H&E 섹션. 마우스를 희생시키고, 투여 후 1일, 15일 및 30일째에 피부 조직을 수집했다. 삽입도: 정사각형으로 표시된 영역의 확대도. 암회색, 연회색 및 중회색 화살표는 각각 마크로파지, 림프구 및 호중구를 나타낸다. 스케일 바: 2.5㎜(상부), 1㎜(중앙 및 하부), 50㎛(삽입도).

도 19는 dUPS 중합체의 log P의 함수로서 pH 전이 선명도($\Delta pH_{10\%-90\%}$)를 나타낸다. 비교를 위해, 일반적으로 사용되는 폴리염기(폴리(에틸렌이민), 키토산, 폴리히스티딘, 폴리리신)를 나타낸다.

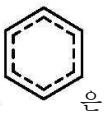
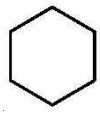
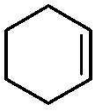
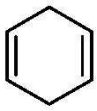
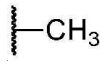
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

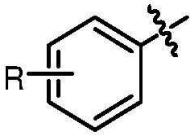
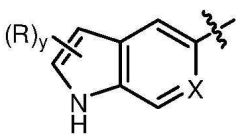
[0136] 일부 측면에서, 본 개시내용은 특정 전이 pH를 초과하여 분해되고 분해성 골격을 함유하는 pH 반응성 나노입자를 형성할 수 있는 중합체를 제공한다. 일부 구현예에서, 이들 중합체는 예리한 pH 전이 값을 갖고, 중합체의 클리어런스를 가속화하는 하나 이상의 분해성 그룹을 함유한다. 이들 중합체는 특정 조직으로 약물 화합물을 전달하는 것과 같은 광범위한 적용을 허용하는 광범위한 pH 전이점을 가질 수 있다. 일부 측면에서, 본 개시내용은 암을 치료하기 위해 사용될 수 있는 면역계 조절인자와 같은 치료제를 포함하는 신체로의 치료제의 전달과 같은 전술한 바와 같은 pH 반응 시스템에서 이들 중합체를 사용하는 방법을 제공한다.

[0137] **A. 화학적 정의**

[0138] 화학 그룹의 맥락에서 사용되는 경우, "수소"는 -H를 의미하고; "하이드록시"는 -OH를 의미하고; "옥소"는 =O를 의미하고; "카보닐"은 -C(=O)-를 의미하고; "카복시"는 -C(=O)OH(-COOH 또는 $-CO_2H$로서 표기되기도 함)를 의미하고; "할로"는 독립적으로 -F, -Cl, -Br 또는 -I을 의미하고; "아미노"는 $-NH_2$를 의미하고; "하이드록시아미노"는 -NHOH를 의미하고; "니트로"는 $-NO_2$를 의미하고; 이미노는 =NH를 의미하고; "시아노"는

-CN을 의미하고; "이소시아닐"은 -N=C=O를 의미하고; "아지도"는 $-N_3$을 의미하고; 1가 맥락에서, "인산염"은 $-OP(O)(OH)_2$ 또는 이의 탈양성자화된 형태를 의미하고; 2가 맥락에서, "인산염"은 -OP(O)(OH)O- 또는 이의 탈양성자화된 형태를 의미하고; "머캅토"는 -SH를 의미하고; "티오"는 =S를 의미하고; "티오카보닐"은 -C(=S)-를 의미하고; "설포닐"은 $-S(O)_2-$를 의미하고; "설피닐"은 -S(O)-를 의미한다.

[0139] 화학식의 맥락에서, 기호 "-"는 단일 결합을 의미하고, "="는 이중 결합을 의미하고, "≡"는 삼중 결합을 의미한다. 기호 "----"는 임의 결합을 나타내고, 이는, 존재하는 경우, 단일 또는 이중 결합이다. 기호 "=" "는 단일 결합 또는 이중 결합을 나타낸다. 따라서, 화학식  은, 예를 들어,  ,  ,  ,  및  을 포함한다. 그리고, 이러한 환 원자는 하나 이상의 이중 결합의 일부를 형성하지 않는 것으로 이해된다. 또한, 공유 결합 기호 "-"는, 1 또는 2개의 입체 중심 원자를 연결하는 경우, 임의의 바람직한 입체 화학을 나타내지 않는다는 점에 유의한다. 대신에, 그것은 모든 입체 이성체와 이의 혼합물을 포괄한다. 기호 "  "는, 결합을 가로질러 수직으로 묘사되는 경우(예: 메틸의 경우 ), 그룹의 부착점을 나타낸다. 부착점은 전형적으로, 독자가 부착점을 명확하게 식별하는 것을 지원하기 위해, 더 큰 그룹에 대해서만 이 방식으로 식별된다는 점에 유의한다. 기호 "  "는 웻지(wedge)의 두꺼운 말단에 부착된 그룹이 "페이지 외부"에 있는 단일 결합을 의미한다. 기호 "  "는, 웻지의 두꺼운 말단에 부착된 그룹이 "페이지 내부"에 있는 단일 결합을 의미한다. 기호 "  "는 이중 결합 주위의 기하학(예: E 또는 Z)이 정의되지 않은 단일 결합을 의미한다. 따라서, 두 옵션 및 이의 조합이 의도된다. 본 출원에 도시된 구조의 임의의 원자의 정의되지 않은 원자가는 그 원자에 결합된 수소 원자를 암묵적으로 나타낸다. 탄소 원자 상의 볼드체 점은 그 탄소에 부착된 수소가 페이퍼 평면의 외부로 배향된다는 것을 나타낸다.

[0140] 변수가 환 시스템에서 "플로팅 그룹", 예를 들어, 화학식  에서 그룹 "R"로 묘사되는 경우, 변수는, 안정한 구조가 형성되는 한, 도시된, 암시된 또는 명시적으로 정의된 수소를 포함하여, 임의의 환 원자에 부착된 임의의 수소 원자를 치환할 수 있다. 변수가 융합 환 시스템에서 "플로팅 그룹", 예를 들어, 화학식  에서 그룹 "R"로 묘사되는 경우, 변수는, 달리 구체화되지 않는 한, 융합 환 중 어느 하나의 임의의 환 원자에 부착된 수소를 치환할 수 있다. 치환 가능한 수소는 도시된 수소(예: 상기 화학식에서 질소에 결합된 수소), 암시된 수소(예: 표시되지 않았지만 존재하는 것으로 이해되는 상기 화학식의 수소), 명시적으로 정의된 수소 및, 안정한 구조가 형성되는 한, 이의 존재가 환 원자의 동일성에 의존하는 임의의 수소(예: X가 -CH-와 등가인 경우, 그룹 X에 결합된 수소)를 포함한다. 도시된 예에서, R은 융합 환 시스템의 5원 환 또는 6원 환 중 어느 하나에 존재할 수 있다. 상기 화학식에서, 괄호에 포함된 R 직후의 하첨자 "y"는 수치 변수를 나타낸다. 달리 명시하지 않는 한, 이 변수는 0, 1, 2 또는 2보다 큰 임의의 정수일 수 있으며, 환 또는 환 시스템의 치환 가능한 수소 원자의 최대 수에 의해서만 제한된다.

[0141] 화학 그룹 및 화합물 부류의 경우, 그룹 또는 부류에서의 탄소 원자 수는 다음과 같이 표시된다: "Cn" 또는 "C=n"은 그룹/부류에서 탄소 원자의 정확한 수(n)를 정의한다. "C≤n"은 그룹/부류에 존재할 수 있는 탄소 원자의 최대 수(n)를 정의하고, 최소 수는 문제의 그룹/부류에 대해 가능한 한 적다. 예를 들어, 그룹 "알킬$_{(C≤8)}$", "사이클로알칸디일$_{(C≤8)}$", "헤테로아릴$_{(C≤8)}$" 및 "아실$_{(C≤8)}$"의 최소 탄소 원자 수는 1이고, 그룹 "알케닐$_{(C≤8)}$", "알키닐$_{(C≤8)}$", "헤테로사이클로알킬$_{(C≤8)}$"의 최소 탄소 원자 수는 2이고, 그룹 "사이클로알킬$_{(C≤8)}$"의 최소 탄소 원자 수는 3이고, 그룹 "아릴$_{(C≤8)}$" 및 "아렌디일$_{(C≤8)}$"의 최소 탄소 원자 수는 6이다. "Cn-n'"는 그룹 내의 탄소 원자의 최소 수(n)와 최대 수(n')를 모두 정의한다. 따라서, "알킬$_{(C2-10)}$"은 2 내지 10개의 탄소 원자를 갖는 이들 알킬 그룹을 지칭한다. 이러한 탄소수 지시제는 변경할 화학 그룹 또는 부류에 선행하거나 뒤따를 수 있고, 의미의 임의의 변경을 나타내지 않고서 괄호에 포함되거나 포함되지 않을 수 있다. 따라서, 용어 "C5 올레핀", "C5-올레핀", "올레핀$_{(C5)}$" 및 "올레핀$_{C5}$"는 모두 동의어이다. 하기에 명시된 경우를 제외하고, 모든 탄소 원자를 계수하여, 그룹 또는 화합물이 지정된 탄소 원자 수에 해당하는지의 여부를 결정한다. 예를 들어, 디헥실아미노 그룹은 디알킬아미노$_{(C=12)}$ 그룹의 예지만; 그것은 디알킬아미노$_{(C=6)}$ 그룹의 예는 아니다. 유사하게, 페닐에틸은 아르알킬$_{(C=8)}$ 그룹의 예이다. 본원에 정의된 화학 그룹 또는 화합물 부류 중 어느 하나가 용어 "치환된"에 의해 변형되는 경우, 수소 원자를 치환하는 모이어티의 임의의 탄소 원자는 계수되지 않는다. 따라서, 총 7개의 탄소 원자를 갖는 메톡시헥실은 치환된 알킬$_{(C1-6)}$의 예이다. 달리 명시되지 않는 한, 탄소 원자 제한이 없는 청구항 세트에 나열된 임의의 화학 그룹 또는 화합물 부류의 탄소 원자 제한은 12 이하이다.

[0142] 화합물 또는 화학 그룹을 변형하는데 사용되는 용어 "포화된"은 이하에 기재된 경우를 제외하고, 화합물 또는 화학 그룹이 탄소-탄소 이중 결합 및 탄소-탄소 삼중 결합을 갖지 않음을 의미한다. 이 용어가 원자를 변형하는데 사용되는 경우, 이는 원자가 임의의 이중 결합 또는 삼중 결합의 일부가 아님을 의미한다. 포화된 그룹의 치환된 버전의 경우, 하나 이상의 탄소 산소 이중 결합 또는 탄소 질소 이중 결합이 존재할 수 있다. 그리고, 이러한 결합이 존재하는 경우, 케토-에놀 호변이성 또는 이민/엔아민 호변이성의 일부로서 발생할 수 있는 탄소-탄소 이중 결합은 배제되지 않는다. 용어 "포화된"이 물질의 용액을 변형시키는데 사용되는 경우, 이는 그 물질 이상의 어떤 것도 그 용액에 용해될 수 없음을 의미한다.

[0143] 용어 "지방족"은 그렇게 변형된 화합물 또는 화학 그룹이 비사이클릭 또는 사이클릭이지만, 비방향족 화합물 또는 그룹임을 의미한다. 지방족 화합물/그룹에서, 탄소 원자는 직쇄, 분지쇄 또는 비방향족 환(지환식)으로 함께 결합할 수 있다. 지방족 화합물/그룹은 포화될 수 있고, 즉 단일 탄소-탄소 결합(알칸/알킬)으로 결합되거나, 하나 이상의 탄소-탄소 이중 결합(알켄/알케닐) 또는 하나 이상의 탄소-탄소 삼중 결합(알킨/알키닐)을 포함하여 불포화될 수 있다.

[0144] 용어 "알킬"은 부착점으로서 탄소 원자를 갖고, 선형 또는 분지형 비환식 구조를 가지며, 탄소 및 수소 이외의 원자를 갖지 않는 1가 포화 지방족 그룹을 지칭한다. 그룹 $-CH_3$(Me), $-CH_2CH_3$(Et), $-CH_2CH_2CH_3$(n-Pr 또는 프로필), $-CH(CH_3)_2$(i-Pr, ^{i}Pr 또는 이소프로필), $-CH_2CH_2CH_2CH_3$(n-Bu), $-CH(CH_3)CH_2CH_3$(2급-부틸), $-CH_2CH(CH_3)_2$(이소부틸), $-C(CH_3)_3$(3급-부틸, t-부틸, t-Bu 또는 ^{t}Bu) 및 $-CH_2C(CH_3)_3$(네오펜틸)은 알킬 그룹의 비제한적인 예이다. 용어 "알칸디일"은 부착점(들)으로서 1개 또는 2개의 포화 탄소 원자(들)를 갖고, 선형 또는 분지된 비환식 구조를 가지며, 탄소-탄소 이중 결합 또는 삼중 결합이 없고, 탄소 및 수소 이외의 원자가를 갖지 않는 2가 포화 지방족 그룹을 지칭한다. 그룹 $-CH_2-$(메틸렌), $-CH_2CH_2-$, $-CH_2C(CH_3)_2CH_2-$, 및 $-CH_2CH_2CH_2-$는 알칸디일 그룹의 비제한적인 예이다. 용어 "알킬리덴"은, R 및 R'가 독립적으로 수소 또는 알킬인 2가 그룹 = CRR'를 지칭한다. 알킬리덴 그룹의 비제한적인 예는 $=CH_2$, $=CH(CH_2CH_3)$, 및 $=C(CH_3)_2$를 포함한다. "알칸"은 화학식 H-R을 갖는 화합물 부류를 지칭하고, 여기서 R은 이 용어가 상기 정의된 바와 같은 알킬이다.

[0145] 용어 "알케닐"은 부착점으로서의 탄소 원자, 선형 또는 분지형 비환식 구조, 적어도 하나의 비방향족 탄소-탄소 이중 결합을 갖고, 탄소-탄소 삼중 결합을 갖지 않으며, 탄소와 수소 이외의 원자를 갖지 않는 1가의 불포화 지방족 그룹을 지칭한다. 비제한적인 예로는 $-CH=CH_2$(비닐), $-CH=CHCH_3$, $-CH=CHCH_2CH_3$, $-CH_2CH=CH_2$(알릴), $-CH_2CH=CHCH_3$, 및 $-CH=CHCH=CH_2$를 포함한다. 용어 "알켄디일"은 부착점으로서의 2개의 탄소 원자, 선형 또는 분지형 비환식 구조, 적어도 하나의 비방향족 탄소-탄소 이중 결합을 갖고, 탄소-탄소 삼중 결합을 갖지 않으며, 탄소와 수소 이외의 다른 원자를 갖지 않는, 2가의 불포화 지방족 그룹을 지칭한다. 그룹 -CH=CH-,

-CH=C(CH_3)CH_2-, -CH=CHCH_2- 및 -CH_2CH=CHCH_2-는 알켄디일 그룹의 비제한적인 예이다. 알켄디일 그룹은 지방족이지만, 양 말단에서 결합하면, 이 그룹은 방향족 구조의 일부를 형성하는 것을 방해받지 않는다는 점에 유의해야 한다. 용어 "알켄" 및 "올레핀"은 동의어이고, 화학식 H-R을 갖는 화합물 부류를 지칭하며, 여기서 R은 이 용어가 상기 정의된 바와 같은 알케닐이다. 유사하게, 용어 "말단 알켄" 및 "α-올레핀"은 동의어이고, 탄소-탄소 이중 결합을 하나만 갖는 알켄을 지칭하며, 여기서 그 결합은 분자의 말단에서 비닐 그룹의 일부이다.

[0146] 화학 그룹을 "치환된" 변형제와 함께 사용하는 경우, 하나 이상의 수소 원자가 각각의 경우에 독립적으로 -OH, -F, -Cl, -Br, -I, -NH_2, -NO_2, -CO_2H, -CO_2CH_3, -$CO_2CH_2CH_3$, -CN, -SH, -OCH_3, -OCH_2CH_3, -C(O)CH_3, -NHCH_3, -NHCH_2CH_3, -N(CH_3)$_2$, -C(O)NH_2, -C(O)NHCH_3, -C(O)N(CH_3)$_2$, -OC(O)CH_3, -NHC(O)CH_3, -S(O)$_2$OH, 또는 -S(O)$_2$$NH_2$에 의해 치환된다. 예를 들어, 하기 그룹은 치환된 알킬 그룹의 비제한적인 예이다: -CH_2OH, -CH_2Cl, -CF_3, -CH_2CN, -CH_2C(O)OH, -CH_2C(O)OCH_3, -CH_2C(O)NH_2, -CH_2C(O)CH_3, -CH_2OCH_3, -CH_2OC(O)CH_3, -CH_2NH_2, -CH_2N(CH_3)$_2$, 및 -CH_2CH_2Cl. 용어 "할로알킬"은 치환된 알킬의 서브세트이고, 여기서 수소 원자의 치환은 탄소, 수소 및 할로겐 이외의 다른 원자가 존재하지 않도록 할로(즉, -F, -Cl, -Br, 또는 -I)로 제한된다. 그룹 -CH_2Cl은 할로알킬의 비제한적인 예이다. 용어 "플루오로알킬"은 치환된 알킬의 서브세트이고, 수소 원자의 치환은 탄소, 수소 및 불소 이외의 다른 원자가 존재하지 않도록 플루오로로 제한된다. 그룹 -CH_2F, -CF_3 및 -CH_2CF_3은 플루오로알킬 그룹의 비제한적인 예이다.

[0147] 용어 "티올 반응성 그룹"은 머캅토 그룹(-SH)과 반응하여 공유 결합을 형성할 수 있는 작용기이다. 이러한 그룹은 문헌에 익히 공지되어 있다. 2개의 원형 그룹은 요오도아세트아미드와 같은 할로아세트아미드 및 말레이미드를 포함한다. 이들 그룹은 시스테인 잔기의 머캅토 그룹과 반응하여 황 원자와의 공유 결합을 형성하는데 사용될 수 있다.

[0148] **B. 블록 공중합체**

[0149] 본원에 개시된 pH 반응성 미셀 및 나노입자는 블록 공중합체를 포함한다. 블록 공중합체는 친수성 중합체 세그먼트 및 소수성 중합체 세그먼트를 포함한다. 소수성 중합체 세그먼트는 pH 민감성이다. 예를 들어, 소수성 중합체 세그먼트는 pH 민감성을 제공하기 위해 이온화 가능한 아민 그룹을 포함할 수 있다. 블록 공중합체는 이들 이온화 가능한 블록 공중합체의 초분자 자기조립화에 기초하여, pH 활성화 가능한 미셀(pHAM) 나노입자를 형성한다. 높은 pH에서, 블록 공중합체는 미셀로 조립되지만, 낮은 pH에서는 소수성 중합체 세그먼트의 아민 그룹의 이온화에 의해 미셀이 해리된다. 이온화 가능한 그룹은 상이한 pH 값에서 조절가능한 친수성/소수성 블록으로서 기능할 수 있고, 이는 미셀의 동적 자기조립화에 직접 영향을 미칠 수 있다.

[0150] 일부 구현예에서, 본 발명의 중합체는 폴리카보네이트 또는 폴리우레아와 같은 분해성 중합체 기제를 사용하여 구축되는 하나 이상의 블록을 포함한다. 이들 성분은 소수성 중합체 세그먼트를 구축하는데 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 이들 중합체 세그먼트는 단독중합체를 형성하기 위해 하나의 단량체 단위를 함유한다. 다른 구현예에서, 중합체 세그먼트는 중합체 세그먼트를 형성하기 위해 2개 이상의 단량체 단위를 함유할 수 있다. 중합체 세그먼트가 2개 이상의 단량체 단위를 함유하는 경우, 단량체 단위는 하나의 단위의 단일 블록 다음에 추가 단량체 단위 각각에 대해 별개의 블록이 뒤따를 수 있거나, 또는 상이한 단량체 단위가 전체 중합체 블록에 무작위로 분산될 수 있다.

[0151] 본 명세서에 기재된 중합체는, 예를 들어, 상기, 요약 섹션, 및 이하의 특허청구범위에 제시된다. 그들은 실시예 섹션에서 개요된 합성 방법을 사용하여 제조할 수 있다. 이들 방법은 당업자에 의해 적용되는 유기 화학의 원리 및 기술을 사용하여 추가로 변경 및 최적화될 수 있다. 이러한 원리와 기술은, 예를 들어, 문헌[참조: Smith, March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure, (2013)]에 교시되어 있고, 이는 본원에 참조로 포함된다. 또한, 합성 방법은 당업자에 의해 적용되는 공정 화학의 원리 및 기술을 사용하여 배치식 또는 연속식으로 예비, 파일럿 또는 대규모 생산을 위해 추가로 변경 및 최적화될 수 있다. 이러한 원리 및 기술은, 예를 들어, 문헌[참조: Anderson, Practical Process Research & Development - A Guide for Organic Chemists (2012)]에 교시되어 있고, 이는 본원에 참조로 포함된다.

[0152] 본 명세서에 기재된 중합체는 하나 이상의 비대칭 치환 탄소 또는 질소 원자를 함유할 수 있고, 광학 활성 또는 라세미 형태로 단리될 수 있다. 따라서, 특정 입체화학 또는 이성체 형태가 구체적으로 표시되지 않는 한, 화학식의 모든 키랄, 부분입체이성체, 라세미 형태, 에피머 형태 및 모든 기하 이성체 형태가 의도된다. 중합체는 라세미체 및 라세미 혼합물, 단일 거울상이성체, 부분입체이성체 혼합물, 및 개별 부분입체이성체로서 발생

할 수 있다. 일부 구현예에서, 단일 부분입체이성체가 수득된다. 중합체의 키랄 중심은 S 또는 R 배열을 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 본 중합체는 정의된 입체화학적 배향을 갖는 2개 이상의 원자를 함유할 수 있다.

[0153] 본원에 기재된 중합체를 나타내는데 사용되는 화학식은 전형적으로 아마도 몇몇 상이한 호변이성체 중 하나만을 나타낼 것이다. 예를 들어, 다수 종류의 케톤 그룹은 상응하는 에놀 그룹과 평형 상태로 존재하는 것으로 공지되어 있다. 유사하게, 다수 종류의 이민 그룹이 엔아민 그룹과 평형 상태로 존재한다. 소정의 화합물에 대해 어떤 호변이성체가 도시되는지에 관계없이, 그리고 어느 것이 가장 널리 퍼져 있는지에 관계없이, 소정의 화학식의 모든 호변이성체가 의도된다.

[0154] 또한, 본원에 기재된 중합체를 구성하는 원자는 이러한 원자의 모든 동위원소 형태를 포함하는 것으로 의도된다. 본원에 사용되는 동위원소는 동일한 원자 번호이지만 상이한 질량 수를 갖는 원자를 포함한다. 일반적인 예로서, 제한 없이, 수소의 동위원소는 삼중수소 및 중수소를 포함하고, 탄소의 동위원소는 ^{13}C 및 ^{14}C를 포함한다.

[0155] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 중합체는 염 또는 비염 형태로 존재한다. 염 형태(들)와 관련하여, 일부 구현예에서, 염이 전체적으로 약리학적으로 허용되는 한, 본원에 제공된 중합체의 임의의 염 형태의 일부를 형성하는 특정 음이온 또는 양이온은 중요하지 않다. 약제학적으로 허용되는 염 및 이들의 제조 및 사용 방법의 추가의 예는 본원에 참조로 포함되는 문헌[참조: Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, and Use (2002)]에 제시되어 있다.

[0156] **C. 미셀 시스템 및 조성물**

[0157] 본원에 개시된 시스템 및 조성물은 상이한 pH 수준으로 조정된 단일 미셀 또는 일련의 미셀을 이용한다. 추가로, 미셀은 협소한 pH 전이 범위를 갖는다. 일부 구현예에서, 미셀은 약 1 pH 단위 미만의 pH 전이 범위를 갖는다. 다양한 구현예에서, 미셀은 약 0.9 미만, 약 0.8 미만, 약 0.7 미만, 약 0.6 미만, 약 0.5 미만, 약 0.4 미만, 약 0.3 미만, 약 0.25 미만, 약 0.2 미만, 또는 약 0.1 pH 단위 미만의 pH 전이 범위를 갖는다. 협소한 pH 전이 범위는 유리하게는 pH의 미묘한 변화를 수반하는 형광단의 완전한 턴온을 초래할 수 있는 보다 예리한 pH 반응을 제공한다.

[0158] 미셀의 크기는 전형적으로 나노미터 스케일(즉, 직경 약 1nm 내지 1μm)일 것이다. 일부 구현예에서, 미셀은 약 10 내지 약 200nm의 크기를 갖는다. 일부 구현예에서, 미셀은 약 20 내지 약 100nm의 크기를 갖는다. 일부 구현예에서, 미셀은 약 30 내지 약 50nm의 크기를 갖는다.

[0159] **D. 표적화 모이어티**

[0160] 미셀 및 나노입자는 표적화 모이어티를 추가로 포함할 수 있다. 표적화 모이어티는 나노입자 또는 미셀을, 예를 들어, 특정 세포 표면 수용체, 세포 표면 마커, 또는 세포 소기관(예: 핵, 미토콘드리아, 소포체, 엽록체, 아포플라스트, 또는 퍼옥시좀)으로 표적화하기 위해 사용될 수 있다. 이러한 표적화 모이어티는 수용체 재활용, 마커 재활용, 세포내 pH 조절, 세포내이입 트래피킹의 연구에서 유리할 것이다.

[0161] 표적화 모이어티는, 예를 들어, 항체 또는 항체 단편(예: Fab' 단편), 단백질, 펩티드(예: 신호 펩티드), 앱타머, 또는 소분자(예: 엽산)일 수 있다. 표적화 모이어티는 당해 기술 분야에 공지된 방법에 의해 블록 공중합체에 접합될 수 있다(예를 들어, 친수성 중합체 세그먼트에 접합될 수 있다). 표적화 모이어티의 선택은 특정 표적에 의존한다. 예를 들어, 항체, 항체 단편, 소분자 또는 결합 파트너는 세포 표면 수용체 및 세포 표면 마커를 표적화하는데 더 적합할 수 있는 반면, 펩티드, 특히 신호 펩티드는 세포 소기관을 표적화하는데 더 적합할 수 있다.

[0162] **E. 항원**

[0163] 일부 측면에서, 본 개시내용은 조성물에 하나 이상의 항원성 성분을 제공한다. 항원은 물질에 대해 항체가 특이적으로 생성되도록 면역 반응을 촉진하는 물질이다. 일부 물질은 더 면역원성이므로, 면역계는 적절한 면역 반응을 용이하게 발생시키지만, 다른 물질은 항원에 대한 항체를 생성하기에 충분한 면역 반응을 생성하기 위해 지원을 필요로 한다. 대부분의 암은 항원에 대한 항체의 생성을 증강시키기 위해 추가의 활성화를 필요로 할 수 있다. 항원의 일부 비제한적인 예는 암 특이적 표면 단백질 또는 암 세포에 의해 과발현되는 표면 단백질의 단백질 또는 이의 단편을 포함한다.

[0164] **i. 암**

[0165] 다양한 상이한 펩티드, 단백질 단편, 또는 단백질이 본 조성물에서 항원으로서 사용될 수 있다. 일부 비제한적인 예는 5T4, 707-AP(707 알라닌 프롤린), 9D7, AFP(α-페토프로테인), AlbZIP HPG1, α5β1-인테그린, α5β6-인테그린, α-메틸아실-코엔자임 A 라세마제, ART-4(T 세포 4에 의해 인식되는 선암 항원), B7H4, BAGE-1(B 항원), BCL-2, BING-4, CA 15-3/CA 27-29, CA 19-9, CA 72-4, CA125, 칼레티쿨린, CAMEL(흑색종 상의 CTL-인식 항원), CASP-8(카스파제-8), 카텝신 B, 카텝신 L, CD19, CD20, CD22, CD25, CD30, CD33, CD40, CD52, CD55, CD56, CD80, CEA(암배아성 항원), CLCA2(칼슘-활성화 클로라이드 채널-2), CML28, 코액토신-유사 단백질, 콜라겐 XXIII, COX-2, CT-9/BRD6(브로모도메인 고환-특이적 단백질), Cten(C-말단 텐신-유사 단백질), 사이클린 B1, 사이클린 D1, cyp-B(사이클로필린 B), CYPB1(사이토크롬 P450 1B1), DAM-10/MAGE-B1(분화 항원 흑색종 10), DAM-6/MAGE-B2(분화 항원 흑색종 6), EGFR/Her1, EMMPRIN(종양 세포-관련 세포외 매트릭스 메탈로프로테이나제 유도제), EpCam(상피 세포 부착 분자), EphA2(에프린 A형 수용체 2), EphA3(에프린 A형 수용체 3), ErbB3, EZH2(Zeste 상동체 2의 인핸서), FGF-5(섬유아세포 성장 인자-5), FN(피브로넥틴), Fra-1(Fos-관련 항원-1), G250/CAIX(당단백질 250), GAGE-1(G 항원 1), GAGE-2(G 항원 2), GAGE-3(G 항원 3), GAGE-4(G 항원 4), GAGE-5(G 항원 5), GAGE-6(G 항원 6), GAGE-7b(G 항원 7b), GAGE-8(G 항원 8), GDEP(전립선에서 차등적으로 발현되는 유전자), GnT-V(N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라제 V), gp100(당단백질 100kDa), GPC3(글리피칸 3), HAGE(헬리카제 항원), HAST-2(인간 시그넷 환 종양-2), 헵신, Her2/neu/ErbB2(인간 표피 수용체-2/신경학적), HERV-K-MEL, HNE(인간 호중구 엘라스타제), 호메오박스 NKX 3.1, HOM-TES-14/SCP-1, HOM-TES-85, HPV-E6, HPV-E7, HST-2, hTERT(인간 텔로머라제 역전사효소), iCE(장내 카복실 에스테라제), IGF-1R, IL-13Ra2(인터류킨 13 수용체 α2 쇄), IL-2R, IL-5, 미성숙 라미닌 수용체, 칼리크레인 2, 칼리크레인 4, Ki67, KIAA0205, KK-LC-1(키타-큐슈(Kita-kyushu) 폐암 항원 1), KM-HN-1, LAGE-1(L 항원), 리빈, MAGE-A1(흑색종 항원-A1), MAGE-A10(흑색종 항원-A10), MAGE-A12(흑색종 항원-A12), MAGE-A2(흑색종 항원-A2), MAGE-A3(흑색종 항원-A3), MAGE-A4(흑색종 항원-A4), MAGE-A6(흑색종 항원-A6), MAGE-A9(흑색종-항원-A9), MAGE-B1(흑색종-항원-B 1), MAGE-B 10(흑색종-항원-B 10), MAGE-B16(흑색종-항원-B16), MAGE-B17(흑색종-항원-B17), MAGE-B2(흑색종-항원-B2), MAGE-B3(흑색종-항원-B3), MAGE-B4(흑색종-항원-B4), MAGE-B5(흑색종-항원-B5), MAGE-B6(흑색종-항원-B6), MAGE-C1(흑색종-항원-C1), MAGE-C2(흑색종-항원-C2), MAGE-C3(흑색종-항원-C3), MAGE-D1(흑색종-항원-D1), MAGE-D2(흑색종-항원-D2), MAGE-D4(흑색종-항원-D4), MAGE-E1(흑색종-항원-E1), MAGE-E2(흑색종-항원-E2), MAGE-F1(흑색종-항원-F1), MAGE-H1(흑색종-항원-H1), MAGEL2(MAGE-유사 2), 맘마글로빈 A, MART-1/멜란-A(T 세포-1에 의해 인식되는 흑색종 항원/흑색종 항원 A), MART-2(T 세포-2에 의해 인식된 흑색종 항원), 매트릭스 단백질 22, MC1R(멜라노코르틴 1 수용체), M-CSF(마크로파지 콜로니-자극 인자 유전자), 메소텔린, MG50/PXDN, MMP 11(M-상 포스포단백질 11), MN/CA IX-항원, MRP-3(다중약물 내성-관련 단백질 3), MUC1(뮤신 1), MUC2(뮤신 2), NA88-A(환자 M88의 NA cDNA 클론), N-아세틸글루코스-아미닐트랜스퍼라제-V, 네오-PAP(네오-폴리(A) 폴리머라제), NGEP, NMP22, NPM/ALK(뉴클레오포스민/역형성 림프종 키나제 융합 단백질), NSE(뉴런특이적 에놀라제), NY-ESO-1(뉴욕 식도 1), NY-ESO-B, OA1(안 백피증 1형 단백질), OFA-iLRP(종양태아성 항원-미성숙 라미닌 수용체), OGT(O-연결된 N-아세틸글루코사민 트랜스퍼라제 유전자), OS-9, 오스테오칼신, 오스테오폰틴, p15(단백질 15), p15, p190 마이너 bcr-abl, p53, PAGE-4(전립선 GAGE-유사 단백질-4), PAI-1(플라스미노겐 활성제 억제제 1), PAI-2(플라스미노겐 활성제 억제제 2), PAP(전립선산 포스파타제), PART-1, PATE, PDEF, Pim-1-키나제, Pin1(프로필 이소머라제), POTE, PRAME(흑색종의 우선적으로 발현되는 항원), 프로스테인, 프로테이나제-3, PSA(전립선-특이적 항원), PSCA, PSGR, PSM, PSMA(전립선-특이적 막 항원), RAGE-1(신장 항원), RHAMM/CD168(히알루론산 매개 운동성을 위한 수용체), RU1(신장 유비쿼터스 1), RU2(신 유비쿼터스 1), S-100, SAGE(육종 항원), SART-1(편평 상피 항원 거부 종양 1), SART-2(편평 상피 항원 거부 종양 1), SART-3(편평 상피 항원 거부 종양 1), SCC(편평 상피 세포 암종 항원), Sp17(정자 단백질 17), SSX-1(활액성 육종 X 중단점 1), SSX-2/HOM-MEL-40(활액성 육종 X 중단점), SSX-4(활액성 육종 X 중단점 4), STAMP-1, STEAP(6회 막관통 상피 항원 전립선), 생존, 서바이빈-2B(인트론 2-보유 서바이빈), TA-90, TAG-72, TARP, TGFb(TGF베타), TGFbRII(TGF베타수용체 II), TGM-4(전립선-특이적 트랜스글루타미나제), TRAG-3(탁솔 내성 관련 단백질 3), TRG(테스틴-관련 유전자), TRP-1(티로신 관련 단백질 1), TRP-2/6b(TRP-2/신규 엑손 6b), TRP-2/INT2(TRP-2/인트론 2), Trp-p8, 티로시나제, UPA(우로키나제-유형 플라스미노겐 활성제), VEGF(혈관 내피 성장 인자), VEGFR-2/FLK-1(혈관 내피 성장 인자 수용체-2), WT1(빌름 종양 유전자)를 포함하거나, 예를 들어, 이들로 제한되지 않고, α-액티닌-4/m, ARTC1/m, bcr/abl(중단점 클러스터 영역-아벨슨 융합 단백질), β-카테닌/m(β-카테닌), BRCA1/m, BRCA2/m, CASP-5/m, CASP-8/m, CDC27/m(세포-분열-사이클 27), CDK4/m(사이클린-의존성 키나제 4), CDKN2A/m, CML66, COA-1/m, DEK-CAN(융합 단백질), EFTUD2/m, ELF2/m(신장 인자 2), ETV6-AML1(Ets 변이체 유전자6/급성 골수성 백혈병 1 유전자 융합 단백질), FN1/m(피브로넥틴 1), GPNMB/m, HLA-A*0201-R170I(HLA-A2 유전자에서 α2 도메인의 α-나선의 잔기 170에서 아르기닌 대 이소류신 교환), HLA-A11/m, HLA-A2/m, HSP70-

2M(열 충격 단백질 70-2 돌연변이됨), KIAA0205/m, K-Ras/m, LDLR-FUT(LDR-푸코실트랜스퍼라제 융합 단백질), MART2/m, ME1/m, MUM-1/m(흑색종 유비퀴터스 돌연변이된 1), MUM-2/m(흑색종 유비퀴터스 돌연변이된 2), MUM-3/m(흑색종 유비퀴터스 돌연변이된 3), 미오신 부류 I/m, 네오-PAP/m, NFYC/m, N-Ras/m, OGT/m, OS-9/m, p53/m, Pml/RARα(전골수구성 백혈병/레티노산 수용체 α), PRDX5/m, PTPRK/m(수용체-유형 단백질 티로신 포스파타제 κ), RBAF600/m, SIRT2/m, SYT-SSX-1(시냅토태그민 I/활액성 육종 X 융합 단백질), SYT-SSX-2(시냅토태그민 I/활액성 육종 X 융합 단백질), TEL-AML1(전좌 Ets-패밀리 백혈병/급성 골수성 백혈병 1 융합 단백질), TGFβRII(TGFβ 수용체 II), TPI/m(트리오세포스페이트 이소머라제)를 포함하는 그룹으로부터 선택된 암 질환에서 발현되는 돌연변이체 항원을 포함할 수 있다.

[0166] **F. 키트**

[0167] 본 개시내용은 또한 키트를 제공한다. 본원에 개시된 임의의 구성요소가 키트에 조합될 수 있다. 특정 구현예에서, 키트는 상기한 바와 같은 pH 반응성 시스템 또는 조성물을 포함한다.

[0168] 키트는 일반적으로 구성요소가 배치되고, 바람직하게는 적절하게 등분될 수 있는 적어도 하나의 바이알, 시험관, 플라스크, 병, 주사기, 또는 다른 용기를 포함할 것이다. 키트에 하나 이상의 구성요소가 존재하는 경우, 키트는 또한 일반적으로 추가 구성요소가 개별적으로 배치될 수 있는 제2, 제3 또는 기타 추가 용기를 함유할 것이다. 그러나, 구성요소의 다양한 조합이 용기에 포함될 수 있다. 일부 구현예에서, 일련의 모든 미셀 집단은 단일 용기에 조합된다. 다른 구현예에서, 일련의 미셀 집단의 일부 또는 전부는 별도의 용기에 제공된다.

[0169] 본 개시내용의 키트는 또한 전형적으로 상업적 판매를 위해 다양한 용기를 밀폐하여 함유하기 위한 패키징을 포함할 것이다. 이러한 패키징은 목적하는 용기가 유지되는 골판지 또는 사출 또는 취입 성형 플라스틱 패키징을 포함할 수 있다. 키트는 또한 키트의 구성요소를 사용하기 위한 지침서를 포함할 수 있다. 지침서는 구현될 수 있는 변형을 포함할 수 있다.

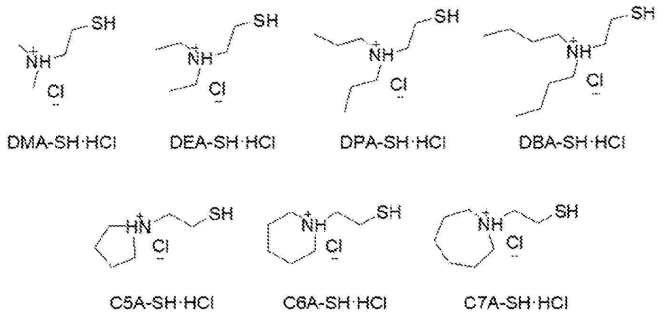
[0170] **G. 실시예**

[0171] 하기 실시예는 본 개시내용의 바람직한 구현예를 입증하기 위해 포함된다. 하기 실시예에 개시된 기술은 본 개시내용의 실시에서 양호하게 기능하기 위해 발명자에 의해 발견된 기술을 나타내고, 따라서 그의 실시를 위한 바람직한 방식을 구성하는 것으로 간주될 수 있음을 당업자는 이해해야 한다. 그러나, 당업자는 본 개시내용에 비추어 개시된 특정 구현예에서 다수의 변화가 수행될 수 있고, 본 개시내용의 정신 및 범위를 벗어나지 않고 같거나 유사한 결과를 수득할 수 있다는 것을 이해해야 한다.

[0172] **실시예 1: 합성적 특성화, 재료 및 방법**

[0173] **1. 재료**

[0174] 모든 시약은 상업적 공급원으로부터 구입하거나, 구체화되지 않는 한, 합성하여 추가 정제 없이 사용했다. 그들은 폴리(에틸렌글리콜)메틸 에테르(mPEG$_{5k}$-OH, M_n=5.4×10^{3}g/mol, ^{1}H NMR로 측정), 1-(3,5-비스-트리플루오로메틸-페닐)-3-사이클로헥실티오우레아(TU, 합성됨)[참조: Natarajan et al., 2005], 1,8-디아자비사이클로[5.4.0]운데크-7-엔(DBU, ≥99%, Sigma-Aldrich), 디프로필아민(DPA, 99%, Sigma-Aldrich), 디부틸아민(DBA, ≥99.5%. Sigma-Aldrich), 피롤리딘(C5A, ≥99%, Sigma-Aldrich), 피페리딘(C6A, ≥99.5%), 헥사메틸렌이민(C7A, 99%, Sigma-Aldrich), 에틸렌 설파이드(98%, Sigma-Aldrich), 2,2-디메톡시-2-페닐아세토페논(DMPA, 99%, Sigma-Aldrich)이었다. 2-디메틸아미노에탄티올 하이드로클로라이드(DMA-SH·HCl, 95%) 및 2-디에틸아미노에탄티올 하이드로클로라이드(DEA-SH·HCl, 95%)는 Sigma-Aldrich로부터 구입했다. 다른 아미노티올 하이드로클로라이드 분자(하기에 제시됨)는 보고된 바와 같이 합성되었다[참조: Hao et al., 2015].



[0175]

[0176] **PEO-b-PMAC 공중합체의 합성**

[0177] 먼저, 5-메틸-5-알릴옥시카보닐-1,3-디옥산-2-온(MAC) 단량체는 보고된 바와 같이 합성되었다[참조: Hu et al., 2007]. PEO-b-PMAC 공중합체는 개시제로서 mPEG5k-OH를 사용하는 개환 중합(ROP)에 의해 합성되었다([단량체]/[개시제]=200). 전형적으로, 슈렌크 반응 플라스크에는 정제된 아르곤이 충전된 글로브 박스 내에 0.4g의 $mPEG_{5k}$-OH, 3.2g의 MAC 단량체 및 16.0mL의 디클로로메탄(DCM)을 충전시켰다. 3회의 동결-펌프-해동 사이클 후, 0.6g의 TU와 0.16mL의 DBU를 도입하여 중합을 개시했다. 반응물을 30℃의 오일 욕에 15시간 동안 배치한 다음, 벤조산을 첨가하여 급냉시켰다. DCM 용매를 증발로 제거하고, 농축된 잔류물을 과량의 차가운 에테르에 침전시켰다. 정제 공정을 2회 반복하여 임의의 미반응된 출발 물질 및 불순물을 제거했다. 생성된 PEO-b-PMAC 공중합체는 400MHz ^{1}H NMR, 겔 투과 크로마토그래피(GPC, Viscotech GPCmax, Polymer Labs에 의한 PLgel 5μm MIXED-D 컬럼 1% v/v TEA를 포함하는 THF가 1.0mL/분으로 용출액으로 사용되었다)에 의해 특성화되었다. PEG_{123}-*b*-$PMAC_{125}$의 경우, ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, 25℃): δ 5.92-5.84 (m, 1H, -C*H*=CH_2), 5.33-5.23 (m, 2H, -CH=C*H*$_2$), 4.63 (br, 2H, -OC*H*$_2$CH=CH_2), 4.38-4.22 (m, 4H, -OC*H*$_2$-C-C*H*$_2$O-), 3.64 (s, 2H, -OC*H*$_2$$CH_2$), 3.38 (s, 3H, -OC*H*$_3$), 1.28 (s, 3H, C*H*$_3$), 1.22 (s, 3H, C(C*H*$_3$)$CH_2$OH). GPC (THF, IR): M_n = 2.58 X 10^4 g/mol, M_w = 3.47 X 10^4 g/mol, M_w/M_n = 1.35).

[0178] **PEO-b-P(MAC-SR·HCl) 공중합체의 합성**

[0179] PEO-b-P(MAC-SR·HCl) 공중합체는 알릴 함유 PEO-b-PMAC 및 아미노티올 하이드로클로라이드 사이의 티올-엔 반응에 의해 합성되었다. 이하에서, 본 발명자들은 예로서 PEO-b-P(MAC-SDEA·HCl)의 합성을 선택했다. 먼저, 0.1g의 PEO_{123}-b-$PMAC_{125}$(0.419mmol)를 석영 플라스크 내의 15mL의 DMF에 용해시키고, 질소하에서 10 내지 20분 동안 교반했다. 이어서, 1.06g의 DEA-SH·HCl(6.29mmol) 및 21.5mg의 DMPA(0.084mmol)를 플라스크에 첨가했다. 추가 20분 동안 질소 퍼징 후, 플라스크를 UV 광(365nm)하에 위치시켜 반응을 개시했다. 12시간 후, 반응 혼합물을 증류수 중에서 투석하고, 동결건조하여 백색 분말을 수득했다. 일련의 PEO-b-P(MAC-SR·HCl) 공중합체는 ^{1}H NMR 및 GPC에 의해 검증되었다. 결과는 표 1에 요약되어 있다.

[0180] [표 1]

PEO-*b*-P(MAC-SR·HCl) 공중합체의 특성화

공중합체	$M_{n,HNMR}$ ($g \cdot mol^{-1}$)	P(MAC-SR·HCl)의 반복 단위의 수	$M_{w,GPC}$ ($g \cdot mol^{-1}$)[c]	$M_{n,GPC}$ ($g \cdot mol^{-1}$)[c]	PDI[c]
PEO_{123}-*b*-P(MAC-SDMA·HCl)$_{135}$	5.2×10^4	135[a]	3.8×10^4	2.4×10^4	1.58
PEO_{123}-*b*-P(MAC-SDEA·HCl)$_{115}$	4.8×10^4	115[b]	3.2×10^4	2.0×10^4	1.56
PEO_{123}-*b*-P(MAC-SDPA·HCl)$_{115}$	5.1×10^4	115[b]	3.7×10^4	2.4×10^4	1.52
PEO_{123}-*b*-P(MAC-SDBA·HCl)$_{105}$	5.5×10^4	105[b]	3.3×10^4	2.0×10^4	1.65
PEO_{123}-*b*-P(MAC-SC5A·HCl)$_{110}$	4.6×10^4	110[b]	3.0×10^4	1.9×10^4	1.58

[0181]

PEO_{123}-*b*-P(MAC-SC6A·HCl)$_{115}$	5.5×10^4	115[b]	3.2×10^4	2.2×10^4	1.49
PEO_{123}-*b*-P(MAC-SC7A·HCl)$_{135}$	5.9×10^4	135[a]	3.9×10^4	2.7×10^4	1.45

[a]PEO-*b*-PMAC 공중합체 전구체의 반복 단위의 수는 140이다.
[b]PEO-*b*-PMAC 공중합체 전구체의 반복 단위의 수는 125이다.
[c]$M_{w,GPC}$, $M_{n,GPC}$ 및 PDI ($M_{w,GPC}/M_{n,GPC}$)는 표준으로서 폴리스티렌을, GPC 중 용출 용매로서 THF (1% *v*/*v* TEA)를 사용하여 수득되었다.

[0182]

PEO_{123}-*b*-P(MAC-SDMA·HCl)$_{135}$ (PSDMA) ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, 25 ℃): δ 4.29 (s, 4H, -OCH_2-C-CH_2O-), 4.25 (t, 2H, -OCH_2CH$_2$-), 3.64 (s, 2H, -OCH_2CH$_2$), 3.38 (s, 3H, -OCH_3), 3.35-3.31 (t, 2H, -SCH$_2$CH_2N-), 3.02-2.98 (m, 2H, -SCH_2CH$_2$N-), 2.92 (s, 6H, -N(CH_3)$_2$), 2.66 (t, 2H, -OCH$_2$CH$_2$CH_2S-), 2.00-1.95 (m, 2H, -OCH$_2$CH_2CH$_2$S-), 1.28 (s, 3H, -CH_3).

[0183]

PEO_{123}-*b*-P(MAC-SDEA·HCl)$_{115}$ (PSDEA) ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, 25 ℃): δ 4.29 (s, 4H, -OCH_2-C-CH_2O-), 4.25 (t, 2H, -OCH_2CH$_2$-), 3.64 (s, 2H, -OCH_2CH$_2$), 3.38 (s, 3H, -OCH_3), 3.20-3.14 (m, 6H, -SCH$_2$CH_2N(CH_2CH$_3$)$_2$-), 3.03-3.00 (m, 2H, -SCH_2CH$_2$N-), 2.66 (t, 2H, -OCH$_2$CH$_2$CH_2S-), 2.00-1.95 (m, 2H, -OCH$_2$CH_2CH$_2$S-), 1.38 (t, 6H, -N(CH$_2$CH_3)$_2$), 1.28 (s, 3H, -CH_3).

[0184]

PEO_{123}-*b*-P(MAC-SDPA·HCl)$_{115}$ (PSDPA) ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, 25 ℃): δ 4.29 (s, 4H, -OCH_2-C-CH_2O-), 4.25 (t, 2H, -OCH_2CH$_2$-), 3.64 (s, 2H, -OCH_2CH$_2$), 3.38 (s, 3H, -OCH_3), 3.19 (s, 2H, -SCH$_2$CH_2N-), 3.04-2.98 (m, 2H, -SCH_2CH$_2$N- and -N(CH_2CH$_2$CH$_3$)$_2$), 2.66 (t, 2H, -OCH$_2$CH$_2$CH_2S-), 2.00-1.95 (m, 2H, -OCH$_2$CH_2CH$_2$S-), 1.85-1.81 (m, 4H, -N(CH$_2$CH_2CH$_3$)$_2$), 1.28 (s, 3H, -CH_3), 1.01 (t, 6H, -N(CH$_2$CH$_2$CH_3)$_2$).

[0185]

[0186] **PEO_{123}-*b*-P(MAC-SDBA·HCl)$_{105}$ (PSDBA)** ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, 25 ℃): δ 5.92-5.84 (m, 1H, -C*H*=CH_2), 5.33-5.23 (m, 2H, -CH=C*H*$_2$), 4.64-4.63 (d, 2H, -O*CH*$_2$CH=CH_2), 4.34-4.28 (m, 4H, -O*CH*$_2$-C-*CH*$_2$O-), 4.24 (t, 2H, -O*CH*$_2$$CH_2$-), 3.64 (s, 2H, -O*CH*$_2$$CH_2$), 3.38 (s, 3H, -O*CH*$_3$), 2.92 (m, 2H, -S*CH*$_2$$CH_2$N-), 2.82 (m, 2H, -S$CH_2$*CH*$_2$N-), 2.75 (m, 4H, -N(*CH*$_2$$CH_2$$CH_2$$CH_3$)$_2$), 2.62 (t, 2H, -$OCH_2CH_2$*CH*$_2$S-), 1.98-1.93 (m, 2H, -$OCH_2$*CH*$_2$$CH_2$S-), 1.60 (s, 4H, -N($CH_2$*CH*$_2$$CH_2$$CH_3$)$_2$), 1.39-1.33 (m, 4H, -N($CH_2$$CH_2$*CH*$_2$$CH_3$)$_2$), 1.29-1.29 (m, 6H, -*CH*$_3$), 0.95 (t, 6H, -N($CH_2$$CH_2$$CH_2$*CH*$_3$)$_2$).

[0187] PMAC 상의 알릴 그룹의 작은 백분율은 디부틸 그룹의 입체 장애로 인해 DBA-SH · HCl과 완전히 반응하지 않았다.

[0188] **PEO_{123}-*b*-P(MAC-SC5A·HCl)$_{110}$ (PSC5A)** ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, 25 ℃): δ 4.29 (s, 4H, -O*CH*$_2$-C-*CH*$_2$O-), 4.25 (t, 2H, -O*CH*$_2$$CH_2$-), 3.64 (s, 2H, -O*CH*$_2$$CH_2$), 3.38 (s, 3H, -O*CH*$_3$), 3.55-3.29 (m, 6H, -S$CH_2$*CH*$_2$N(*CH*$_2$$CH_2$)$_2$), 3.01 (m, 2H, -S*CH*$_2$$CH_2$N-), 2.66 (t, 2H, -$OCH_2CH_2$*CH*$_2$S-), 2.11 (s, 4H, -N($CH_2$*CH*$_2$)$_2$), 2.00-1.95 (m, 2H, -$OCH_2$*CH*$_2$$CH_2$S-), 1.28 (s, 3H, -*CH*$_3$).

[0189] **PEO_{123}-*b*-P(MAC-SC6A·HCl)$_{115}$ (PSC6A)** ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, 25 ℃): δ 4.29 (s, 4H, -O*CH*$_2$-C-*CH*$_2$O-), 4.25 (t, 2H, -O*CH*$_2$$CH_2$-), 3.64 (s, 2H, -O*CH*$_2$$CH_2$), 3.38 (s, 3H, -O*CH*$_3$), 3.21 (br, 6H, -S$CH_2$*CH*$_2$N(*CH*$_2$$CH_2$)$_2$$CH_2$), 3.07 (s, 2H, -S*CH*$_2$$CH_2$N-), 2.66 (t, 2H, -$OCH_2CH_2$*CH*$_2$S-), 2.00 (m, 6H, -$OCH_2$*CH*$_2$$CH_2$S- 및 -N($CH_2$*CH*$_2$)$_2$$CH_2$), 1.68 (m, 2H, -N($CH_2$$CH_2$)$_2$*CH*$_2$), 1.28 (s, 3H, -*CH*$_3$).

[0190] **PEO_{123}-*b*-P(MAC-SC7A·HCl)$_{135}$ (PSC7A)** ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, 25 ℃): δ 4.29 (s, 4H, -O*CH*$_2$-C-*CH*$_2$O-), 4.25 (t, 2H, -O*CH*$_2$$CH_2$-), 3.64 (s, 2H, -O*CH*$_2$$CH_2$), 3.38 (s, 3H, -O*CH*$_3$), 3.26 (s, 2H, -S$CH_2$*CH*$_2$N-), 3.23-3.21 (m, 4H, -N(*CH*$_2$$CH_2$$CH_2$)$_2$), 2.66 (t, 2H, -$OCH_2CH_2$*CH*$_2$S-), 2.00-1.95 (m, 6H, -$OCH_2$*CH*$_2$$CH_2$S- 및 -N($CH_2$*CH*$_2$$CH_2$)$_2$), 1.74 (s, 2H, -N($CH_2$$CH_2$*CH*$_2$)$_2$), 1.28 (s, 3H, -*CH*$_3$).

[0191] **미셀 나노입자의 제조**

[0192] 예로서 PEO-b-P(MAC-SC7A)가 사용된다. 전형적인 절차에서, 10mg의 PEO_{123}-b-P(MAC-SC7A · HCl)$_{135}$ 공중합체를 150mM NaCl과 함께 증류수에 용해시켰다. NaOH 용액을 첨가하여 최종 pH 값을 8.0 이상으로 조정하였다. 과량의 NaOH 및 염은 3000Da의 분자량 컷오프 원심분리 튜브를 사용하여 3사이클의 초원심분리에 의해 제거했다. 증류수를 미셀 용액에 첨가하여 중합체 농도를 1.0mg/mL로 조정했다.

[0193] **pH 적정 실험**

[0194] 예로서 PEO-b-P(MAC-SC7A)를 사용한다. 전형적인 실험에서, 10mg의 PEO_{123}-b-P(MAC-SC7A · HCl)$_{135}$ 공중합체를 먼저 10mL의 증류수에 용해시켜 중합체 농도를 1.0mg/mL로 되게 했다. NaCl을 첨가하여 염 농도를 150mM로 조정했다. 이어서, NaOH 용액을 첨가하여 PEO_{123}-b-P(MAC-SC7A · HCl)$_{135}$ 공중합체를 완전히 탈양성자화했다. 교반하면서 작은 용적(증분으로 1μL)의 0.5M HCl 용액을 첨가하여 pH 적정을 수행했다. pH 값은 미세 전극을 구비한 메틀러 톨레도(Mettler Toledo) pH 미터로 측정했다. 전체 범위에서 pH 감소는 전체 첨가된 HCl 용적의 함수로서 모니터링되었다. 완전한 양성자화 상태(100% 양성자화도) 및 탈양성자화 상태(0% 양성자화도)는 pH 적정 곡선의 1차 유도의 2개의 극치점에 의해 결정되었다. 선택된 양성자화도에서, 동적 광산란 측정을 위해 100μL의 중합체 용액을 채취했다(DLS, Malvern Nano-ZS 모델, He-Ne 레이저, λ=633nm). 다른 PEO-b-P(MAC-SR) 공중합체는 유사한 적정 절차를 따랐다.

[0195] **상이한 공중합체의 TEM 이미지**

[0196] PEO_{123}-b-P(MAC-SC7A · HCl)$_{135}$를 먼저 증류수에 용해시켜 중합체 농도를 1.0mg/mL로 되게 했다. NaCl을 첨가하여 염 농도를 150mM로 조정했다. 상응하는 용적의 0.5M NaOH를 첨가하여 적정 좌표에 기초하여 양성자화도를 95% 및 85%로 조정했다. 중합체 용액을 0.2mg/mL로 희석하고 구리 그리드에 적가했다. 그리드를 건조시킨 후, 증

류수를 사용하여 그리드를 수 초 동안 세정하여 NaCl을 제거한 후, 음성 염색을 위해 포스포텅스텐산(PTA)을 첨가했다. 유사하게, 양성자화도가 55% 및 45%인 PEO_{123}-b-P(MAC-SDMA)$_{135}$ 공중합체를 TEM으로 이미징했다.

[0197] **pH 6.5 및 7.4 완충액에서 PEO_{123}-b-P(MAC-SC7A)$_{135}$의 분해 연구**

[0198] pH 6.5 및 7.4의 중수소화된 인산염 완충액은 D_2O(50mM) 중의 Na_2HPO_4 및 NaH_2PO_4에 의해 제조되었다. NaCl을 첨가하여 150mM의 최종 농도에 도달시켰다. pH 6.5 용액에서 5.0mg PEO_{123}-b-P(MAC-SC7A · HCl)$_{135}$ 공중합체를 1.0mL의 중수소화된 인산염 완충액에 용해시켜 중합체 농도를 5.0mg/mL로 되게 했다. 중합체 용액의 pH는 농축된 NaOD 및 DCl 용액에 의해 추가로 6.5로 조정되었다. 이어서, 튜브를 밀봉하고, 150rpm의 속도로 37℃의 진탕기에 넣었다. 특정 시점에, 중합체 용액을 ^{1}H NMR 측정을 위해 NMR 튜브로 옮겼다. 중합체 용액의 pH를 격일로 조정했다. pH 7.4의 용액 연구는 유사한 절차에 따랐다.

[0199] **등온 적정 열량계(ITC)**

[0200] ITC를 사용하여 Marvin ITC200 마이크로열량계를 사용하여 STING 이량체와 dUPS 공중합체 사이의 결합 친화도를 측정하였다. 적정은 25mM HEPES(pH 6.5)를 함유하는 완충액에서 20℃에서 수행했다. 적정 추적은 NITPIC에 의해 통합되었고, 곡선은 SEDFIT에 의해 적합화했다. 도면은 GUSSI(biophysics.swmed.edu/MBR/software.html)를 사용하여 제조되었다.

[0201] **STING 리포터 실험**

[0202] THP1-ISG 세포(5×10^5 세포/mL)를 완전 배지(RPMI-1640, 10% 태아 소 혈청, 100U/mL 페니실린 G 나트륨 및 100 μg/mL 스트렙토마이신) 중의 포르볼 12-미리스테이트 13-아세테이트(PMA)와 함께 37℃, 5% CO_2 및 정상 O_2 수준에서 48시간 동안 배양하고, 신선한 배지를 추가 24시간 보충했다. 이어서, 세포를 상이한 dUPS 공중합체(0.5 μM)를 포함하는 신선한 배지와 함께 48시간 동안 배양했다. 세포 배양 상청액 중의 IRF 유도 Lusia 루시퍼라제의 수준은 루시퍼라제 검출 시약인 QUANTI-Luc™를 사용하여 평가했다.

[0203] **PSC7A 백신 및 종양 요법 실험**

[0204] 나노백신은 종양 특이적 항원 펩티드와 PSC7A 나노입자를 물리적으로 혼합함으로써 제조되었다. 비교를 위해 비분해성 PC7A 기반 나노백신을 사용했다. 6 내지 8주령의 C57BL/6 마우스에 2×10^5개의 TC-1 세포 또는 B16F10 흑색종 세포를 우측 대퇴에 피하 접종했다. TC-1 종양 모델에서, 마우스는 꼬리 기부에 PBS, E7p 단독(0.5μg), PSC7A NP 단독(30μg), 저용량 PSC7A 나노백신(6μg PSC7 ANP 중의 0.1μg E7p), 고용량 PSC7A 나노백신(30μg PSC7A NP 중의 0.5μg E7p) 및 고용량 PC7A 나노백신(30μg PC7A NP 중의 0.5μg E7p)을 접종후 8, 14, 24일째에 피하 주사했다. B16F10 종양 모델에서, 마우스를 PBS의 꼬리 기부에 Trp1,2 단독(0.5μg$Trp1_{214-237}$ 및 0.5μg $Trp2_{173-196}$), PSC7A NP 단독(30μg), 저용량 PSC7A 나노백신(6μg PSC7A NP 중의 0.1μg Trp1 및 0.1μg Trp2), 고용량 PSC7A 나노백신(30μg PSC7A NP 중의 0.5μg Trp1 및 0.5μg Trp2) 및 고용량 PC7A 나노백신(30μg PC7A NP 중의 0.5μg Trp1 및 0.5μg Trp2)을 접종후 5, 10, 15일째에 피하 주사했다. 이어서, 디지털 캘리퍼스를 사용하여 종양 성장을 측정하고, 0.5×길이×폭^{2}으로 계산했다. 종양 용적이 2000mm^{3}에 도달했을 때에 마우스를 희생시켰다.

[0205] **통계 분석**

[0206] 통계 분석은 Origin 및 Graphpad Prism을 사용하여 수행되었다. 데이터는 평균±s.e.m으로 표현된다. 데이터는 t-테스트에 의해 분석되었고, $P<0.05$($^{***}P<0.001$, $^{**}P<0.01$, $^{*}P<0.05$)의 경우에 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다.

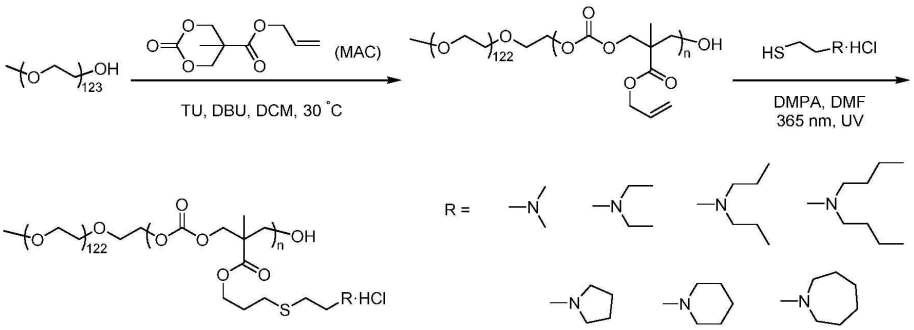
[0207] **실시예 2: pH 반응성 생분해성 중합체의 라이브러리 합성 및 특성화**

[0208] 반응식 1은 개환 중합(ROP)을 사용하는 생분해성 UPS 공중합체의 합성을 나타낸다[참조: Chen et al., 1997; Brannigan and Dove, 2017; Feng et al., 2012]. 먼저, 알릴 작용화 블록 공중합체, 폴리(에틸렌 옥사이드)-b-폴리(5-메틸-5-알릴옥시카보닐-1,3-디옥산-2-온)(PEO-b-PMAC)는 매크로개시제로서 메톡시 말단화 폴리에틸렌 글리콜(PEO)(mPEG_{5k}-OH, ^{1}H NMR로 측정된 $M_n=5.4\times10^3$g/mol)을 사용하고, 디클로로메탄(DCM) 중 사이클릭 단량체로

서 5-메틸-5-알릴옥시카보닐-1,3-디옥산-2-온(MAC)을 사용하여 합성했다. 1-(3,5-비스-트리플루오로메틸-페닐)-3-사이클로헥실티오우레아(TU) 및 1,8-디아자비사이클로[5.4.0]운데크-7-엔(DBU)의 유기 공촉매를 사용했다. 반응 혼합물을 30℃에서 15시간 동안 가열하여 ^{1}H NMR에 의해 측정된 PMAC 세그먼트 중의 125-140개의 반복 단위를 갖는 PEO-b-PMAC 공중합체를 생성했다. pH 감도를 제공하기 위해, PEO-b-PMAC는 UV 광(365nm, 반응식 1)하에서 티올-엔 반응에 의해 일련의 양성자화된 3급 아민(R?HCl)과 추가로 반응시켰다. 그 결과, 생분해성의 초-pH 민감성 공중합체 PEO-b-P(MAC-SR · HCl)의 라이브러리가 양성자화 상태에서 합성되었다(표 1). PSR은 아래에서 블록 공중합체 PEO-b-P(MAC-SR · HCl) 및 이의 탈양성자화 상태를 지칭하는데 사용되었다.

[0209] [반응식 1]

[0210] 개환 중합 및 티올-엔 반응에 의한 PEO-b-P(MAC-SR · HCl)의 합성. 최종 공중합체는 친수성 PEO 세그먼트, 생분해성 폴리카보네이트 골격 및 pH 민감성을 제공하는 이온화가능한 3급 아민으로 구성된다.



[0211]

[0212] 생리적 염 농도를 모방하기 위해, 새롭게 합성된 일련의 dUPS 공중합체(1.0mg/mL)의 pH 적정을 150mM NaCl의 존재하에 수행했다. 데이터는 공중합체 상의 3급 아민 잔기의 양성자화도에 대한 pH로 제시된다. 양성자화도는 양성자화된 형태의 전체 아민의 몰%로서 계산되었다. 각 공중합체의 겉보기 pK_a는 양성자화도가 50%인 pH로서 측정되었다. pH 전이의 예리함을 평가하기 위해, 10% 내지 90%의 양성자화도 사이의 pH 범위인 $\Delta pH_{10\%-90\%}$를 각 공중합체에 대해 측정했다.

[0213] 결과는, PEO_{123}-b-P(MAC-SDMA)$_{135}$(디메틸 아민 측쇄를 갖는 공중합체)(PSDMA)를 제외하고, 다른 모든 공중합체가 pH 적정 좌표의 대부분에서 초-pH 민감성 거동을 나타냈음을 보여준다(**도 1a**). 초민감성 pH 반응은 광범위한 양성자화도, 특히 10% 내지 90%에 걸친 현저한 pH 안정기에 의해 표현되며, 협소한 pH 범위 내에서 강력한 pH 완충 효과를 나타낸다. 흥미롭게도, PEO_{123}-b-P(MAC-SDMA)$_{135}$는 50% 이상 양성자화도의 넓은 반응과 50% 미만의 협소한 반응을 갖는 2개 세그먼트화 pH 반응을 나타냈다(**도 4** 참조). 이들 공중합체의 $\Delta pH_{10\%-90\%}$의 값은 0.5 이하였다. 디메틸아민 측쇄를 갖는 PSDMA의 경우, 더 높은 $\Delta pH_{10\%-90\%}$ 값(1.2)이 관찰되었다. 일반적으로 사용되는 폴리염기(예: 폴리(에틸렌이민), 키토산, 폴리히스티딘, 폴리리신)는 $\Delta pH_{10\%-90\%} > 2$의 넓은 pH 반응을 나타낸다(**도 19**)[참조: Li et al., 2016]. 추가로, 디메틸아민 측쇄를 갖는 비분해성 PMMA 공중합체는 전체 pH 적정 좌표에 걸쳐 광범위한 pH 반응을 나타냈다[참조: Li et al., 2016].

[0214] PEO-b-P(MAC-SR · HCl) 공중합체의 겉보기 pK_a 값은 3급 아민 치환기의 소수성과 역상관관계를 나타냈다(**도 1b**). P(MAC-SR) 세그먼트(중성/탈양성자화 상태)의 반복 단위의 옥탄올-물 분배 계수(log P)를 사용하여 분자 소수성을 정량화했다. 데이터는 환상 아민 또는 선형 아민 중 어느 하나를 포함하는 공중합체의 log P의 함수로서 겉보기 pK_a의 수렴된 선형 상관관계를 나타낸다. 보다 소수성 측쇄는 더 낮은 pK_a 값을 초래했다. 이들 공중합체의 pK_a 값은 7.7 내지 5.2의 광범위한 생리학적 pH를 포함했다.

[0215] log P의 함수로서 $\Delta pH_{10\%-90\%}$의 플롯은 초-pH 민감성 반응의 소수성 역치의 존재를 설명한다(**도 1c**). log P>2의 공중합체의 경우, $\Delta pH_{10\%-90\%}$ 값은 0.5 이하였다. log P<2인 PEO_{123}-b-P(MAC-SDMA)$_{135}$의 경우, 더 높은 $\Delta pH_{10\%-90\%}$ 값(1.2)이 관찰되었다. 비교를 위해, 가장 일반적으로 사용되는 폴리염기(예: 폴리(에틸렌이민), 키토산, 폴리히스티딘, 폴리리신)는 log P <2와 함께 친수성이고, 광범위한 pH 반응을 나타낸다. 폴리(에틸렌이민)은 강력한 친수성(log P= -3.8)과 양성자화 과정에서 음의 협동성으로 인해 최고 $\Delta pH_{10\%-90\%}$ 값(5.6)을 나타냈다. 이러한 결과는 비분해성 PMMA 중합체와 일치하고, 분자의 소수성이 양 시스템에서 초-pH 감도의 공통 구동자임을 시

사한다[참조: Li et al., 2016].

[0216] 소수성 구동 상 전이(즉, 미셀화)와 2개의 공중합체 PEO_{123}-b-P(MAC-SC7A)$_{135}$(PSC7A) 및 PEO_{123}-b-P(MAC-SDMA)$_{135}$(PSDMA)의 pH 감도에 대한 영향을 소수성 역치의 상하 log P 값으로 조사했다. PEO_{123}-b-P(MAC-SC7A)$_{135}$의 경우, pH 적정 동안 동적 광 산란(DLS) 결과(**도 2a**)는, 양성자화도가 90%를 초과하면, 중합체 쇄가 유체역학적 직경이 10nm 미만인 단일체로 존재함을 나타낸다. 산란 계수율의 증가에 의해 나타난 바와 같이, 양성자화도가 90% 이하로 감소되면, 미셀이 형성되기 시작했다. 임계 미셀화 양성자화도(CMPD)는 중합체 쇄가 자기조립을 시작하는 양성자화도 미만으로서 정의되었다. PEO_{123}-b-P(MAC-SC7A)$_{135}$의 경우, CMPD 값은 90%이다. 투과 전자 현미경(TEM) 이미지 및 95% 및 85%의 양성자화도에서 PEO_{123}-b-P(MAC-SC7A)$_{135}$의 수-가중 유체역학적 직경 분포(**도 2b**)는 CMPD에 걸쳐 상 전이를 추가로 확증했다. 미셀 직경은 90% 미만의 양성자화도와 함께 약 45nm로 유지되었다.

[0217] 미셀화 유도 초-pH 감도는 PEO_{123}-b-P(MAC-SDMA)$_{135}$(PSDMA)로 더 잘 설명된다. 중합체는 50% 이상 양성자화도의 넓은 반응과 50% 미만의 협소한 반응을 갖는 2개 세그먼트화 pH 반응을 나타낸다(**도 5**). 50% 이상의 양성자화도에서, PEO_{123}-b-P(MAC-SDMA)$_{135}$는 단일체로 잔류했고, 광범위한 pH 반응을 나타냈다. 50% 미만의 양성자화에서는 극적으로 예리한 pH 반응이 관찰되었다. 초-pH 민감성 반응은 CMPD 에 걸쳐 미셀의 형성과 일치하여 상 전이 유도된 초-pH 민감성 반응의 직접적인 증거를 허용했다. 흥미롭게도, 디메틸 아민 측쇄를 갖는 비분해성 PMMA 중합체는 pH 적정의 전체 과정 동안 임의의 상 전이 거동을 나타내지 않았다. 이러한 결과는 폴리카보네이트 골격 PMAC가 PMMA보다 더 소수성이고, 미셀의 형성에도 기여한다는 것을 시사한다.

[0218] PEO_{123}-b-P(MAC-SC7A)$_{135}$는 대표적인 생분해성 공중합체로서 선택되고, 정상 생리학적 pH 및 초기 엔도솜 pH 환경을 각각 모방하는 pH 7.4 및 6.5에서의 분해 특성을 조사했다. PEO_{123}-b-P(MAC-SC7A)$_{135}$의 겉보기 pK_a는 6.9이기 때문에, 공중합체는 pH 7.4 및 6.5에서 각각 미셀 또는 양성자화 단일체 상태로 존재한다. 공중합체를 NaCl(150mM)을 포함하는 중수소화 인산염 완충액(50mM)으로 5.0mg/mL로 제조했다. NaOD 또는 DCl 용액을 첨가하여 pH를 6.5 또는 7.4로 조정했다. **도 3a**는 PEO_{123}-b-P(MAC-SC7A)$_{135}$ 공중합체 및 그의 분해 생성물의 구조를 나타낸다. 분해 공정에서, 공중합체는 모두 폴리카보네이트 에스테르 골격의 가수분해 절단(**도 3a**의 좌측 구조 상의 원) 때문에, 올리고머, 단량체, PEO 세그먼트, 이산화탄소로 분해될 수 있다. 측쇄 상의 에스테르 그룹(**도 3a**의 우측 구조 상의 원)의 추가 가수분해는 추가 분해 생성물인 2,2-비스(하이드록시메틸)프로피온산(비스-HPA) 및 3-(2-아제판-1-일-에틸 설파닐)-프로판올로 이어질 수 있다. ^{1}H NMR을 사용하여 양 pH 용액 모두에서 55일에 걸쳐 분해 생성물의 형성을 모니터링했다. PEO 세그먼트의 양성자 신호는 시간이 지남에 따라 변화하지 않았고, 그의 피크 적분은 정량화를 위한 다른 양성자 피크에 대한 내부 참조로서 사용되었다.

[0219] **도 3b**는 시간 경과에 따른 pH 6.5에서 PEO_{123}-b-P(MAC-SC7A)$_{135}$의 분해 프로파일을 나타낸다. 공중합체는 용액 중에 양성자화된 단일체로서 존재하기 때문에, 모든 양성자 피크는 시간 0에서 가시화되었다(예: c1, d1 및 e1에 상응하는 양성자 신호). 처음 수일 이내에, 새로운 피크(c3, c4, d2 및 d3)가 형성되었고, 그들의 강도는 시간이 경과함에 따라 증가되었다. 25일째에, 공중합체의 대부분이 단량체 구조(**도 3a**의 황색 패널) 및 PEO로 분해된 것으로 나타났다. 25일 내지 55일의 추가 가수분해는 비스-HPA(d4)의 추가 분해 생성물의 작은 백분율을 나타낸다. 분해 동역학의 정량화는 d1과 d2의 피크 강도의 감소(각각 중합체 및 올리고머 상태로부터) 또는 d3 및 d4(단량체 및 비스-HPA)의 증가를 분석함으로써 수행되었다. 데이터는 12일째에 상대 피크 강도의 50%에서 2개 세트의 곡선의 동시 교차를 나타낸다(**도 3d**). 본원에 사용되는 $t_{1/2}$는 50% 공중합체가 단량체로 전환되는 반감기로서 정의된다.

[0220] 미셀의 형성으로 인해 pH 7.4에서의 분해 프로파일은 더욱 복잡해진다. 시간 0에서, P(MAC-SC7A) 세그먼트의 미셀 형성은 양성자 신호의 고속 횡단 완화에 기인하여 신호 억제를 초래했기 때문에, ^{1}H NMR에 의해 PEO 피크만이 가시화되었다(**도 3c**). 시간이 지남에 따라, 분해된 단량체 및 비스-HPA로부터의 양성자 신호가 관찰되었지만, 형성 동역학은 더 느렸다. 흥미롭게도, 55일째에, 더 높은 비율의 비스-HPA 대 MAC 단량체가 발견되었다. 단량체 및 비스-HPA 피크(d3+d4)의 정량적 분석은 보다 높은 pH 환경에서 27일의 $t_{1/2}$를 나타냈다(**도 3e**). 6.5 초과의 pH 7.4에서의 더 느린 분해 속도는 소수성 미셀 코어로 인해 제한된 물의 침투 및 PMAC에 대한 접근, 또는 pH 7.4에서의 탄산염 결합의 산 촉매 가수분해의 감소를 포함한 여러 요인으로 인한 것일 수

있다.

[0221] 폴리카보네이트 골격은 가수분해적으로 활성이어서 중합체가 수성 환경에서 생체적합성 PEO 세그먼트 및 소분자로 자발적으로 분해되도록 한다. 분해 동역학은 아마도 PSC7A 세그먼트의 미셀화가 pH 7.4에서 탄산염 그룹에 대한 물의 접근을 제한하기 때문에 6.5보다 pH 7.4에서 가수분해가 더 느린 속도로 일어난다($t_{1/2}$는 각각 27일 및 12일이다)는 것을 나타낸다.

[0222] **실시예 3: IL-2 로딩된 미셀의 캡슐화**

[0223] PEG-b-P(MAC-SDPA)(pK_a=6.1) 미셀은 T 세포 성장 인자인 IL-2를 종양 미세환경으로 전달하기 위해 개발되었다. 전형적인 절차에서, 0.2mg PEG-b-P(MAC-SDPA)를 0.05mL 메탄올에 용해시킨 다음, 0.5mL PBS(pH 7.4)에 적가하여 중공 미셀을 형성했다. 한외여과(2회 동안 100kDa, 5000rpm/15분)에 의해 메탄올을 제거했다. 미셀을 PBS에 재현탁시킨 다음, 상이한 양의 인간 재조합 IL-2 단백질과 혼합했다.

[0224] IL-2 로딩 효율은 20㎍(10%), 10㎍(5%), 또는 1㎍(0.5%)의 IL-2를 PEG-b-P(MAC-SDPA) 미셀과 혼합하여 평가했다. 한외여과(2회 동안 100kDa, 5000rpm/15분)에 의해 IL-2 로딩된 PEG-b-P(MAC-SDPA) 미셀로부터 유리 IL-2를 제거했다. 여액을 수집하여 HPLC에 의해 IL-2 농도를 결정했다. 모든 경우에, 90% 이상의 IL-2 단백질이 PEG-b-P(MAC-SDPA) 미셀 내에 로딩된 것으로 밝혀졌다. PEG-b-P(MAC-SDPA) 미셀의 IL-2 함량은 각각 8.26%, 4.31%, 0.45%로 계산되었다. IL-2-PEG-b-P(MAC-SDPA)의 입자 크기는 동적 광 산란 분석으로 결정된 바와 같이 약 55nm였다.

[0225] **A. 시험관내 IL-2 효과의 평가**

[0226] IL-2 기능은 IL-2에 의해 유도된 JAK-STAT 경로의 활성화를 모니터링하도록 설계된 HEK-Blue™ IL-2 리포터 세포를 사용하여 조사되었다. 간단히 설명하면, 세포를 예열된 PBS로 세정하고, 플라스크로부터 분리하여 약 280,000 세포/mL의 세포 현탁액을 제조했다. 이어서, 20μL의 유리 IL-2 또는 IL-2 로딩된 PEG-b-P(MAC-SDPA)를 평저 96-웰 플레이트에 첨가했다. 샘플을 CO_2 인큐베이터에서 37℃에서 웰당 180μL의 세포 현탁액과 함께 배양했다(IL-2 농도: 200, 50, 10, 2, 0.5, 0.2, 0.05, 0.01ng/mL; PEG-b-P(MAC-SDPA) 농도: 40, 10, 2, 0.4, 0.1, 0.04, 0.01, 0.002㎍/mL). 24시간 후, 웰당 20μL의 유도된 HEK-Blue™ IL-2 세포 상청액을 별도의 96-웰 플레이트에 첨가하고, 100μL의 QUANTI-Blue™ 검출 용액과 혼합했다. 플레이트를 37℃의 인큐베이터에서 1시간 동안 배양한 후, 630nm 분광광도계를 사용하여 SEAP 수준을 결정했다.

[0227] 데이터는 PEG-b-P(MAC-SDPA) 캡슐화된 IL-2의 생물학적 효과가 유리 IL-2보다 극적으로 증강되었음을 나타낸다(**도 8**). PEG-b-P(MAC-SDPA) 캡슐화된 IL-2 및 유리 IL-2의 EC_{50}은 각각 0.8ng/mL 및 15ng/mL이었다. 미셀 전달된 IL-2는 유리 IL-2보다 약 20배 더 높은 효능을 나타냈다.

[0228] **B. 생체내 항종양 효능의 평가**

[0229] B16F10 흑색종 종양 모델에서 유리 IL-2 및 PEG-b-P(MAC-SDPA)-IL-2의 종양 성장 억제 효과를 평가했다. C57bl/6j 마우스에게 먼저 B16F10 세포(100μL PBS 중의 2.5×10^5 세포)를 접종했다. 종양이 크기 50-80mm^3으로 성장되면, 마우스를 무작위로 5개 그룹으로 분할했다. 유리 IL-2 또는 PEG-b-P(MAC-SDPA)-IL-2를 1일째 및 5일째에 종양내 또는 정맥내 주사했다(IL-2: 주사당 1㎍; PEG-b-P(MAC-SDPA): 주사당 200㎍).

[0230] **도 9**에 도시된 바와 같이, i.v. 주사 후의 PEG-b-P(MAC-SDPA)-IL-2는 동일한 투여량에서 유리 IL-2의 정맥내 주사보다 개선된 종양 성장 억제를 나타냈다. i.t 주사 후의 IL-2의 항종양 효과는 또한 유리 IL-2보다 PEG-b-P(MAC-SDPA) 미셀에 로딩된 후에 증강되었다. 모든 치료 그룹은 PBS 대조군에 비해 종양 성장 억제를 나타냈다.

[0231] PBS 및 유리 IL-2 i.t 그룹의 마우스 체중은 아마 종양 성장으로 인해 1주일 후에 약간 증가했다. PEG-b-P(MAC-SDPA)-IL-2 그룹(i.v 및 i.t 둘 다)의 경우, 치료 동안 명백한 체중 감소는 발견되지 않았다. 그러나, i.v. 주사 후, 유리 IL-2는 마우스에서 약간의 일시적 손실을 유발했고(**도 10**), 이는 유리 IL-2의 전신 투여로부터 잠재적 부작용을 나타낸다.

[0232] **실시예 4: cGAMP 미셀의 캡슐화**

[0233] cGAMP는 STING 경로를 통해 I형 IFN 생산을 유발하는 내인성 2차 메신저 및 고친화성 리간드이다. 이는 음이온성이고 매우 수용성 분자이며, 여기서 이의 활성과 치료 효능은 이의 낮은 생체이용률과 빈약한 약물-유사 특성

에 의해 제한된다. 나노입자는 cGAMP의 효율적인 세포질 전달을 위해 본 생분해성 PEG-b-P(MAC-SC7A) 미셀을 기반으로 개발되었다.

[0234] 전형적인 제형화 공정에서, PEG-b-P(MAC-SC7A·HCl)를 먼저 5% 글루코스 수용액에 용해시켜 중합체 농도를 1.0mg/mL로 되게 했다. 이어서, 작은 용적의 HCl을 첨가한 후, 상이한 양의 cGAMP(2%, 5% 및 10% 중합체, w/w)를 첨가했다. 용액에 특정 용적의 NaOH를 첨가하여 최종 pH를 약 7.4로 조정했다. 한외여과(10kDa) 후, 여액을 수집하고, 로딩되지 않은 cGAMP의 양을 HPLC로 측정했다. cGAMP의 상응하는 로딩 효율은 다음과 같이 계산되었다:

[0235] 로딩 효율(%)=(로딩된 cGAMP 중량/총 cGAMP 중량)×100%.

[0236] 결과를 **도 11**에 나타낸다. PEG-b-P(MAC-SC7A) 나노입자에서 cGAMP의 로딩 효율은 최대 90%에 달할 수 있다(1.0mg/mL PSC7A에서 2% cGAMP). 다른 2개 제형의 로딩 효율도 80% 이상에 도달한다. 이것은 cGAMP 로딩 나노입자 제형의 경우에 매우 높다. 한편, 제형은 매우 안정적이다. 로딩 효율은 24시간 후에도 크게 변하지 않는다.

[0237] **실시예 5: 암의 STING 활성화, 항원 전달 및 T 세포 요법**

[0238] 인터페론 유전자의 자극인자(STING)는 선천적 면역에서 중요한 역할을 하는 소포체(ER) 결합 동종이량체 단백질이다[참조: Barber, 2015; Ishikawa and Barber, 2008]. STING 활성화는 I형 인터페론(IFN)의 상향조절을 유도하고, 이는 암에 대한 $CD8^+$ T 세포의 반응을 증강시킨다[참조: Baccala et al., 2007; Fuertes et al., 2013; Zitvogel et al., 2015]. 이전에, 종양 항원의 효율적인 캡슐화 및 림프절 상주 수지상 세포로의 세포질 전달을 허용하는 비분해성 중합체 나노입자인 PC7A NP가 보고되었다. 중합체는 또한 STING에 결합하여 활성화하고, 항원-특이적 T 세포의 생성을 위한 공자극 경로(CD80/CD86)를 켠다[참조: Luo et al., 2017].

[0239] 본 연구에서, 일련의 dUPS 공중합체(PSC7A, PSC6A, PSC5A 및 PSDEA)의 결합 친화도를 먼저 STING의 C-말단 도메인(139-397 AA)에 대해 평가했다. 모든 공중합체가 용액에서 양이온성 단일체로서 잔류하는 결합 연구를 위해 pH 6.5가 선택되었다. 등온 열량측정법(ITC) 결과는 PSC7A 공중합체가 26nM에서 해리 상수(K_d)와 함께 STING에 대해 가장 높은 결합 친화도를 가졌음을 나타낸다(**도 12a**). 환상 3급 아민을 포함하는 다른 2개의 공중합체 PSC6A 및 PSC5A는 각각 43 및 84nM의 K_d 값과 더 적은 결합을 가졌다. 선형 3급 아민을 갖는 공중합체 PSEDA는 STING에 대해 무시할 만한 결합을 가졌다. 비분해성 PC7A의 STING으로의 K_d 값은 72nM이고, PSC7A보다 높다. THP1-ISG 세포를 사용하여 상이한 공중합체(0.5μM)로 48시간 동안 처리한 후의 STING 활성화를 평가했다(**도 12c**). THP1-ISG 세포는 인터페론 조절 인자-유도성 프로모터의 제어하에 루시퍼라제 리포터 유전자에 의해 형질감염시켰다. STING 활성화시, I형 IFN의 분비는 발광 검출을 위한 루시퍼라제 발현을 활성화한다. 결과는 IFN 유도가 선형 유사체에 비해 환형 3급 아민을 포함하는 dUPS 공중합체에서 상승되었음을 나타낸다. 특히, PSC7A 공중합체는 IFN 유도의 최대 14배 증가를 초래했고, 이는 ITC 측정에 의한 STING에 대한 최고의 결합 친화도와 상관관계가 있었다.

[0240] STING 결합 및 활성화 검정에 기초하여, PSC7A 공중합체가 후속 T 세포 백신 연구를 위해 선택되었다(**도 13**). PSC7A 나노입자가 먼저 생성된 후, 종양 특이적 항원 펩티드와 혼합되었다. 인간 유두종 바이러스(HPV) E6/E7-형질감염된 TC-1 및 마우스 B16-F10 흑색종 종양 모델을 사용했다. 6 내지 8주령 C57BL/6 마우스에게 먼저 우측 대퇴에 종양 세포(2×10^5)를 접종했다. TC-1 모델에서는 E7 펩티드 항원(E7p, GQAEPDRAHYNIVTFCCKCD(서열번호 1))을 사용했다. 종양 접종 후 8일, 16일 및 24일째에 상이한 그룹을 꼬리 기부에 피하 주사했다(**도 13a**에 표시됨). PBS, E7p 및 PSC7A NP 단독 그룹을 대조군으로서 사용했다. 결과는 E7p 및 PSC7A NP 단독 그룹이 PBS 대조군에 비해 한계 종양 성장 억제 반응을 가졌음을 나타낸다. 대부분의 동물은 종양 접종 후 30일 이내에 손실되었다. 대조적으로, E7p-PSC7A NP 그룹은 극적으로 개선된 종양 성장 억제 및 연장된 생존을 초래했다. 저용량 PSC7A 백신 그룹(6μg PSC7A NP 중 0.1μg E7p)은 종양 접종 후 50일에서 >50%의 동물 생존을 초래한 반면, 고용량 백신 그룹(30μg PSC7A NP 중 0.5μg E7p)은 완전한 생존 결과를 나타냈다(**도 13a**). B16-F10 흑색종 종양 모델의 경우, 종양 관련 항원($Trp1_{214-237}$ 및 $Trp2_{173-196}$)의 조합이 PSC7A NP에 로딩되었다. 펩티드-PSC7A NP 그룹은 또한 PBS 대조군 및 펩티드 또는 PSC7A NP 단독 그룹에 비해 유의하게 개선된 종양 성장 억제 및 연장된 생존을 나타냈다(**도 13b**). 이러한 2개 모델에서, PSC7A 나노백신은 동일한 투여량의 PC7A 나노백신과 비교하여 TC-1 모델에서 약간 개선된 종양 억제 및 B16F10 모델에서 유사한 반응을 나타냈다(**도 14**).

[0241] 결과는 환형 아민을 포함하는 dUPS 중합체가 디알킬 아민을 포함하는 중합체보다 강력한 STING 결합 친화도 및

인터페론 유도를 나타내며, 그 중에서 PSC7A가 최적임을 보여준다. 2개 마우스 종양 모델에서 생체내 연구는 항원-로딩된 PSC7A NP가 상당히 개선된 종양 성장 억제 및 동물 생존과 함께 효과적으로 항종양 면역을 생성할 수 있음을 나타낸다.

[0242] **실시예 6: 단기간 및 장기간에 걸친 나노입자의 안전성 평가**

[0243] 특히, STING 경로를 통해 선천적 면역계에 적극적으로 관여하는 중합체의 경우, 치료 중 반복 투여에 대한 안전성 표시가 가장 중요하다. 본 연구에서, 백신접종 연구에 사용된 dUPS PSC7A 중합체를 이의 비분해성 PMMA 기반 선행물질인 PC7A와 직접 비교했다(**도 15a**). 6 내지 8주령 C57BL/6 마우스의 우측 옆구리에 고용량의 PSC7A NP 또는 PC7A NP(300㎍, 백신 투여량의 10배)를 피하 주사했다. 주사 24시간 후에 혈청을 수집하고, 전신 염증성 사이토카인 농도를 결정했다. 어느 하나의 중합체에 의한 치료 24시간 후에도 명백한 급성 신장 또는 간 독성은 관찰되지 않았다(**도 15b**). 일반적으로, 전신 사이토카인 발현은 PSC7A NP보다 PC7A NP에 의해 보다 고도로 유도되었고(**도 15c**), 이는 PSC7A NP에 대한 전신 염증성 반응이 적다는 것을 나타낸다. 중추 기관(심장, 간, 비장 및 신장)의 조직학적 분석은 PBS와 비교하여 어느 하나의 중합체에 의한 치료 후 현저하지 않다(**도 16**).

[0244] 비분해성 PC7A에 대한 생분해성 PSC7A의 이점은 장기간 안전성 연구에서 더욱 현저하다. 이 검정에서, 마우스에게 PBS, 300㎍의 PSC7A NP, 또는 300㎍의 PC7A NP를 피하 주사하고, 60일에 걸쳐 관찰했다(**도 17a**). 생성된 피하 결절의 표면적은 진행을 모니터링하기 위한 타원 모델에 기초하여 계산되었다(**도 17b**). 투여 후 1일 이내에, PC7A 및 PSC7A 양쪽 주사 부위에서, 아마도 선천적 면역 자극으로 인해, 큰 급성 염증성 반응이 관찰되었다. 조직학적으로, 주사 24시간 후에 풍부한 호중구 침윤 및 괴사성 파편이 관찰되었다(1일째 시점, **도 18**). 이 최초 급성 염증성 반응에 이어서, 피하 결절은 크기가 감소되고, 마크로파지 및 림프구의 더 많은 침윤과 함께 만성 육아종성 염증 반응으로 점진적으로 이행되었다(15일째 및 30일째 시점, **도 18**). PSC7A-유도된 결절은 PC7A에 의해 유도된 것보다 빠른 속도로 크기가 감소되고, 이는 PSC7A 중합체가 분해되고 주사 부위로부터 배설되어 조직의 최종 치유를 가능하게 했음을 나타낸다. PSC7A 결절 크기 감소의 반감기는 약 13일이고, 분해 동역학에 대한 상기 화학적 데이터를 뒷받침한다. 대조적으로, PC7A에 의해 유도된 결절은 투여 후 45일까지 시간 경과에 따라 크기가 감소된 후, 결절의 크기와 외관은 일정하게 유지되었다. 60일째에, 잔류하는 모든 마우스의 주사 부위의 피부 조직을 조직학적 분석을 위해 수집했다(**도 17c**). 전체적으로, PC7A 그룹의 6/6 피부 샘플은 작고 단단한 황색 결절을 함유한다. 대조적으로, PSC7A 그룹(0/6)은 결절을 함유하지 않고, 외관은 PBS 처리 그룹과 유사하다. 60일째의 H&E 염색은 육아종성 염증으로 둘러싸인 결절을 나타내고, PC7A로 처리된 마우스에서 "코어/벽"의 외관을 갖는다(**도 17d**). 여기서, "벽"은 주로 급성 및 만성 선천적 자극과 이물질 반응의 결과로서 발생하는 산재된 림프구와 호중구와 함께 마크로파지로 구성된다. "코어"는 본질적으로 괴사성이고, 주로 일부 침윤성 마크로파지, 호중구 및 림프구와 함께 죽어가는 세포의 단백질성 파편으로 구성된다. 대조적으로, PSC7A로 처리된 마우스의 피부 조직은 PBS로 처리된 것과 비교하여, 임의의 결절의 완전한 소실과 건강한 상태로의 회복을 입증한다.

[0245] 생체내 안전성 연구는 PSC7A와 PC7A가 모두 PC7A NP보다 PSC7A NP의 낮은 전신 사이토카인 수준과 함께 단기간에 급속한 선천적 염증 반응을 유도한다는 것을 나타낸다. 장기간 PSC7A 분해는 주사 부위의 완전한 치유를 허용하는 반면, 육아종성 염증으로 둘러싸인 결절은 PC7A 부위에 지속된다. 함께, 이러한 데이터는 PSC7A의 시간 경과에 따라 완전한 열화 및, PC7A와 비교하여 현저히 개선된 안전성 프로파일을 지원한다.

[0246] *

[0247] 본원에 개시되고 청구되는 모든 조성물 및 방법은 본 개시내용에 비추어 과도한 실험 없이 제조 및 수행될 수 있다. 본 개시내용의 조성물 및 방법은 특정 구현예와 관련하여 기재되었지만, 본 개시내용의 개념, 정신 및 범위를 벗어나지 않고 본원에 기재된 조성물 및 방법, 및 방법의 단계 또는 단계의 순서에 변형을 적용할 수 있음이 당업자에게 명백할 것이다. 보다 구체적으로, 화학적 및 생리학적으로 관련된 특정 제제를 본원에 기재된 제제 대신 사용하여 동일한 또는 유사한 결과가 수득된다는 것이 명백할 것이다. 당업자에게 명백한 이러한 유사한 대체물 및 변경은 모두 첨부된 청구범위에 의해 정의되는 개시내용의 정신, 범위 및 개념의 범위 내에 있는 것으로 간주된다.

[0248] **참고문헌**

[0249] 하기 참고문헌은 그들이 본원에 기재된 것들을 보충하는 예시적인 절차 또는 기타 상세를 제공하는 정도로 구체적으로 본원에 참고로 포함된다.

Baccala *et al.*, *Nat. Med.*, 13:543-551, 2007.

Barber, *Nat. Rev. Immunol.*, 15:760-770, 2015.

Blum *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 137:2140-2154, 2015.

Casey *et al.*, *Nat. Rev. Mol. Cell Bio.*, 11:50, 2009.

Fuertes *et al.*, *Trends Immunol.*, 34:67-73, 2013.

Gerweck and Seetharaman, *Cancer Res.*, 56:1194, 1996.

Hao *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 137:9206, 2015.

Hu *et al.*, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, 45:5518, 2007.

Huang *et al.*, *Nat. Biomed. Eng.*, 2019.

Ishikawa and Barber, *Nature*, 455:674-678, 2008.

Luo *et al.*, *Nat. Nanotech.*, 12:648, 2017.

Li *et al.*, *Nat. Commun.*, 7:13214, 2016.

Moitra *et al.*, *Angew. Chem.*, 126:1131-1135, 2013.

Moitra *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 53:1113-1117, 2014.

Natarajan *et al.*, *J. Org. Chem.*, 70:6362, 2005.

Reineke, *ACS Macro Lett.*, 5:14-18, 2016.

Torchilin, *Nat. Rev. Drug Discovery*, 13:813, 2014.

Wang *et al.*, *Nat. Mater.*, 13:204, 2013.

Wang *et al.*, *Nat. Commun.*, 6:8524, 2015.

Wang *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 56:1319-1323, 2016.

Wang *et al.*, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 113:87-96, 2017.

Yang *et al.*, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 105:228-241, 2016.

Zhang *et al.*, *ACS Macro Lett.*, 4:620-623, 2015.

Zhao *et al.*, *Nat. Biomed. Eng.*, 1:0006, 2016.

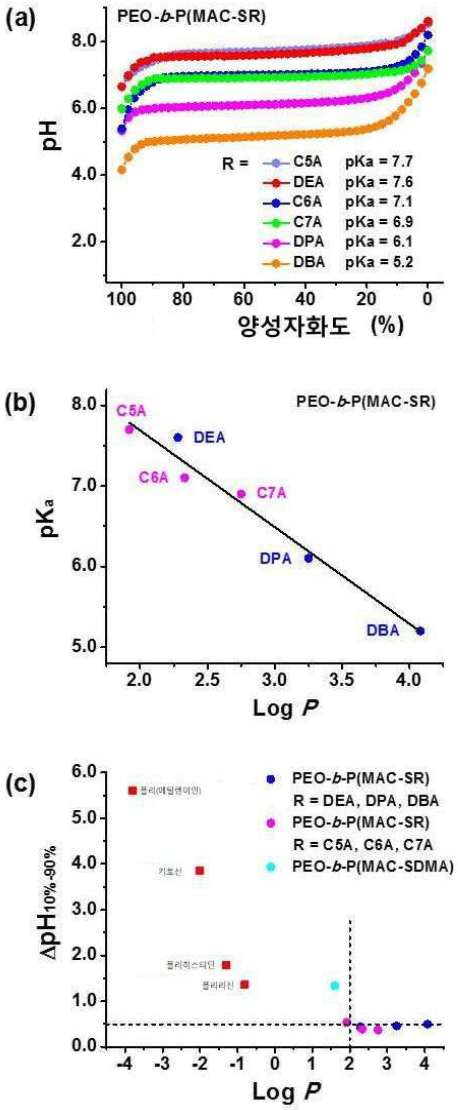
Zhou *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 50:6109-6114, 2011a

Zhou *et al.*, *Angew. Chem.*, 123:6233-6238, 2011b

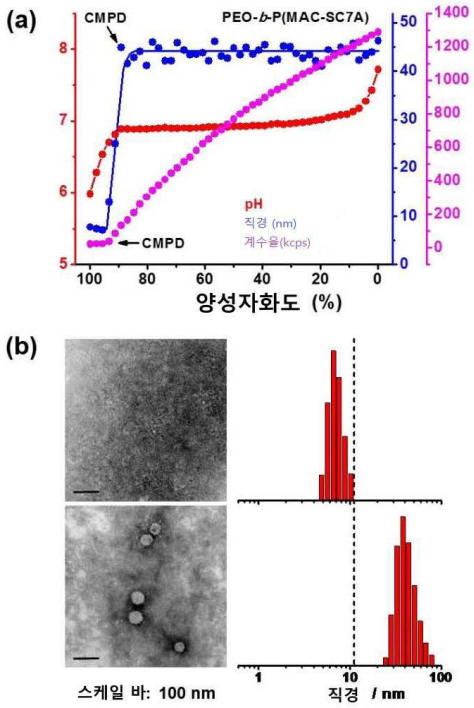
[0250] Zitvogel *et al.*, *Nat. Rev. Immunol.*, 15:405-414, 2015.

도면

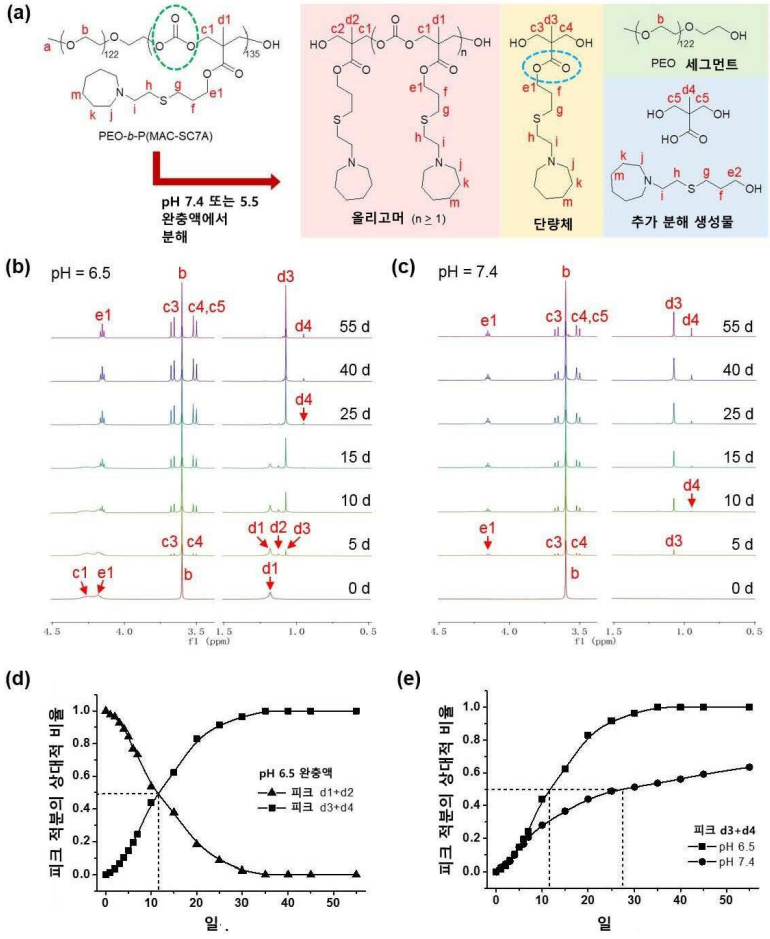
도면1


(a)
PEO-b-P(MAC-SR)
pH
양성자화도 (%)
R = C5A pKa = 7.7
DEA pKa = 7.6
C6A pKa = 7.1
C7A pKa = 6.9
DPA pKa = 6.1
DBA pKa = 5.2
(b)
PEO-b-P(MAC-SR)
pKa
Log P
C5A
DEA
C6A
C7A
DPA
DBA
(c)
ΔpH10%-90%
Log P
PEO-b-P(MAC-SR)
R = DEA, DPA, DBA
PEO-b-P(MAC-SR)
R = C5A, C6A, C7A
PEO-b-P(MAC-SDMA)

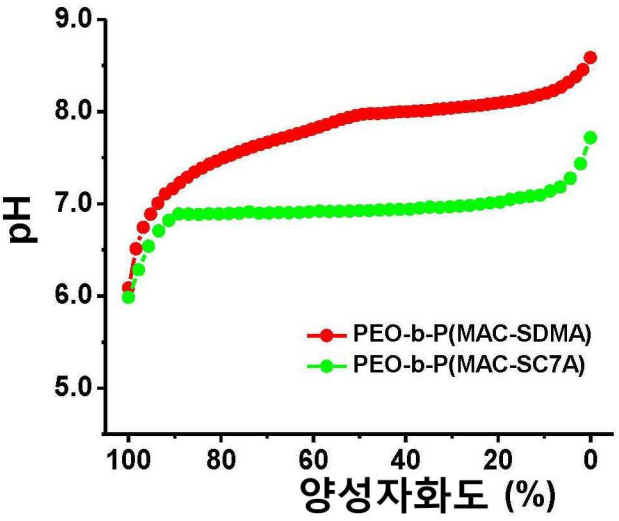
도면2


(a)
CMPD
PEO-b-P(MAC-SC7A)
pH
직경 (nm)
계수율(kcps)
CMPD
양성자화도 (%)
(b)
스케일 바: 100 nm
직경 / nm

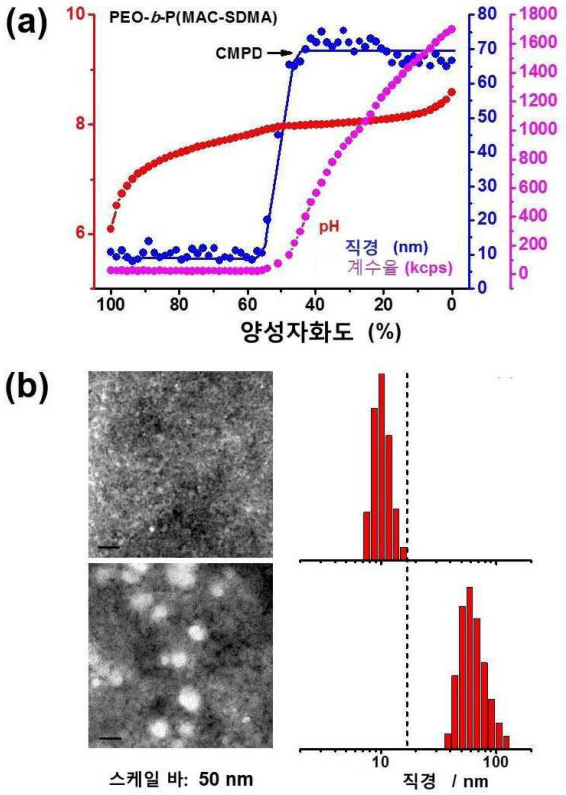
도면3


(a)
PEO-b-P(MAC-SC7A)
pH 7.4 또는 5.5
완충액에서
분해
올리고머 (n ≥ 1)
단량체
PEO 세그먼트
추가 분해 생성물
(b)
pH = 6.5
55 d
40 d
25 d
15 d
10 d
5 d
0 d
(c)
pH = 7.4
55 d
40 d
25 d
15 d
10 d
5 d
0 d
f1 (ppm)
(d)
피크 적분의 상대적 비율
pH 6.5 완충액
피크 d1+d2
피크 d3+d4
일
(e)
피크 적분의 상대적 비율
피크 d3+d4
pH 6.5
pH 7.4
일

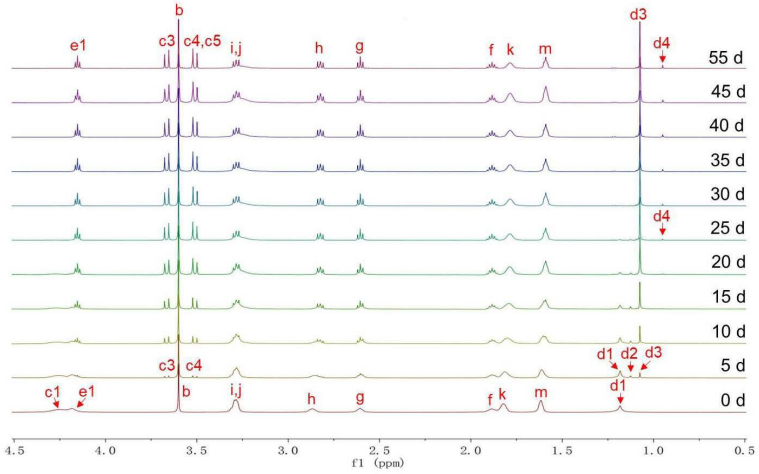
도면4


pH
양성자화도 (%)
PEO-b-P(MAC-SDMA)
PEO-b-P(MAC-SC7A)

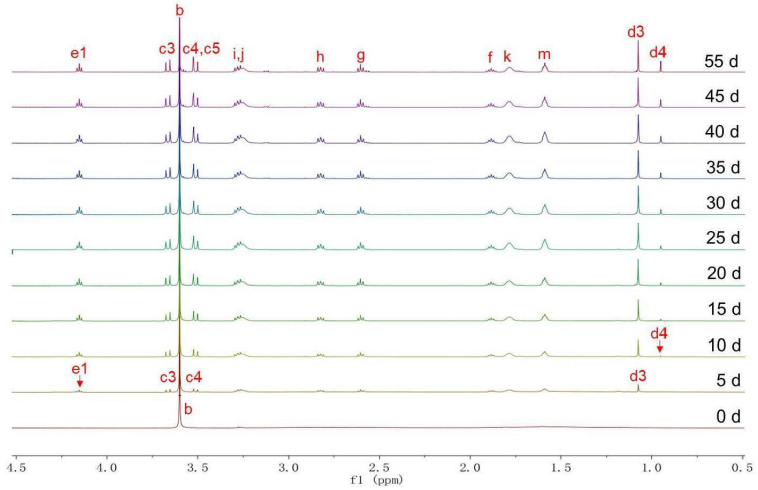
도면5


(a)
PEO-b-P(MAC-SDMA)
CMPD
pH
직경 (nm)
계수율 (kcps)
양성자화도 (%)
(b)
스케일 바: 50 nm
직경 / nm

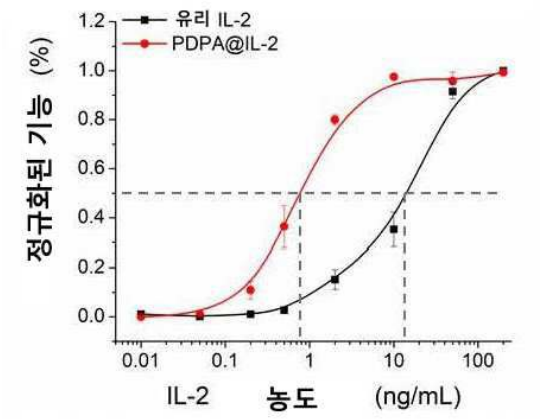
도면6


55 d
45 d
40 d
35 d
30 d
25 d
20 d
15 d
10 d
5 d
0 d
f1 (ppm)

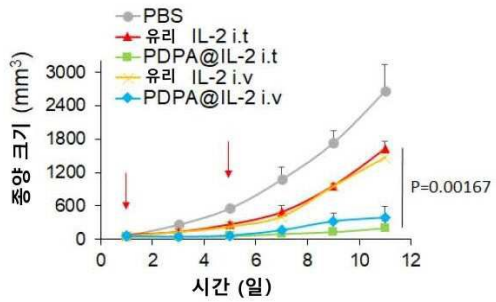
도면7


b
e1
c3
c4,c5
i,j
h
g
f
k
m
d3
d4
55 d
45 d
40 d
35 d
30 d
25 d
20 d
15 d
10 d
5 d
0 d
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
f1 (ppm)

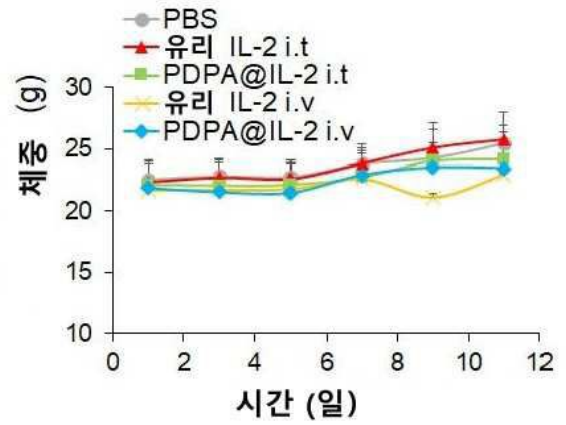
도면8


유리 IL-2
PDPA@IL-2
정규화된 기능 (%)
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0.01
0.1
1
10
100
IL-2 농도 (ng/mL)

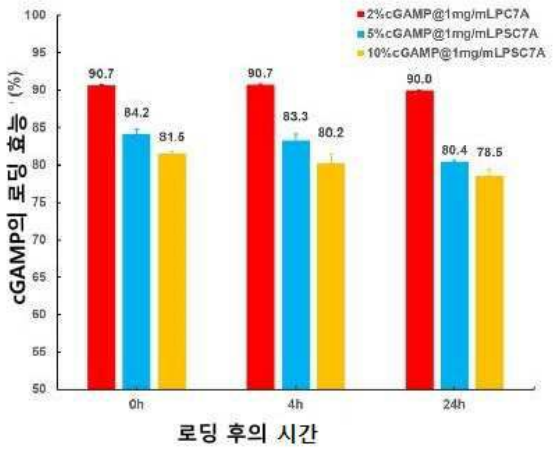
도면9


PBS
유리 IL-2 i.t
PDPA@IL-2 i.t
유리 IL-2 i.v
PDPA@IL-2 i.v
종양 크기 (mm3)
3000
2400
1800
1200
600
0
P=0.00167
0
2
4
6
8
10
12
시간 (일)

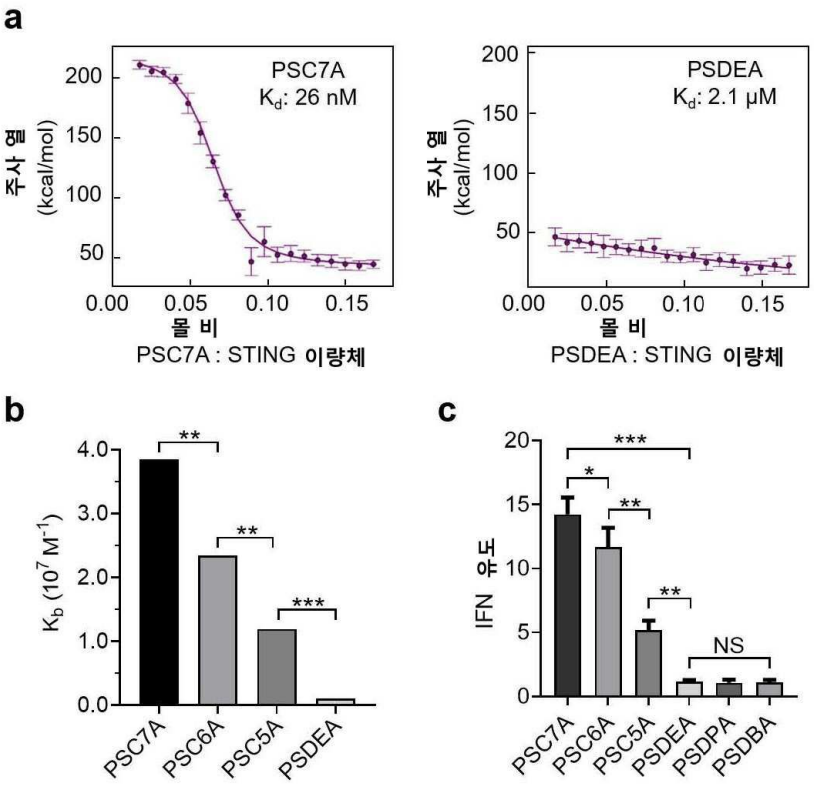
도면10


PBS
유리 IL-2 i.t
PDPA@IL-2 i.t
유리 IL-2 i.v
PDPA@IL-2 i.v
체중 (g)
30
25
20
15
10
0
2
4
6
8
10
12
시간 (일)

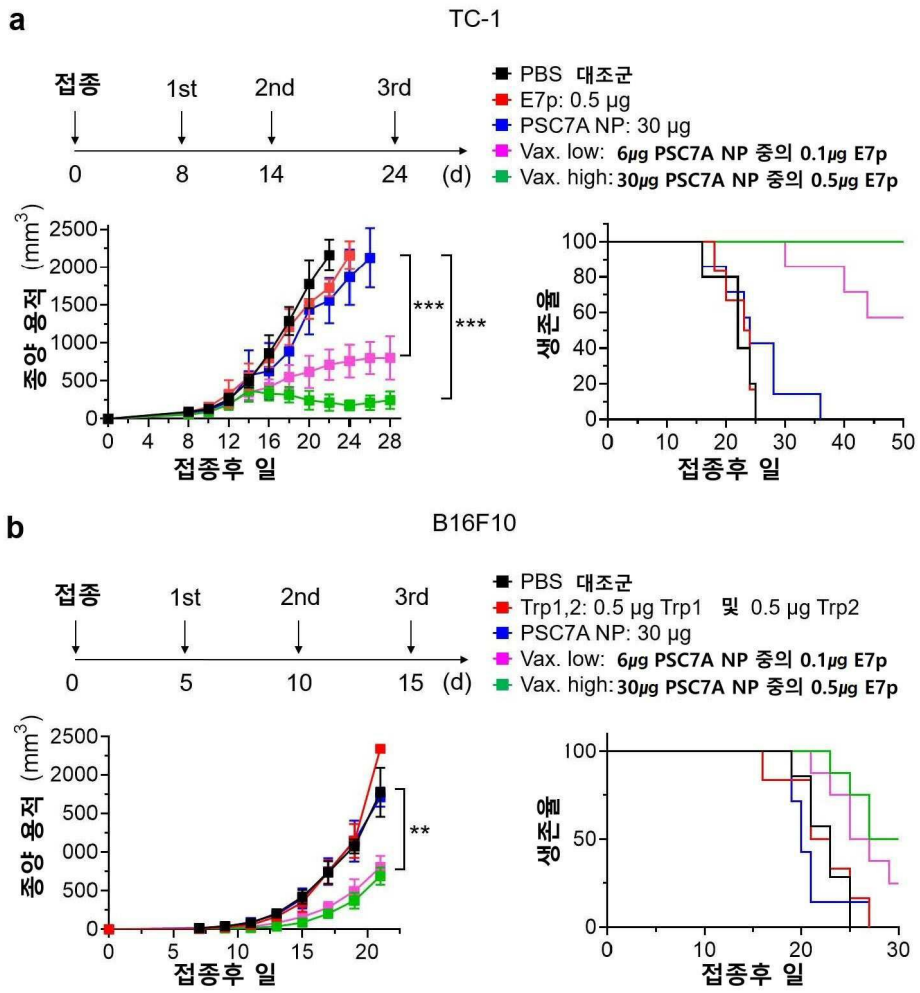
도면11


2%cGAMP@1mg/mLPC7A
5%cGAMP@1mg/mLPSC7A
10%cGAMP@1mg/mLPSC7A
cGAMP의 로딩 효능 (%)
100
95
90
85
80
75
70
65
60
55
50
90.7
84.2
81.6
90.7
83.3
80.2
90.0
80.4
78.5
0h
4h
24h
로딩 후의 시간

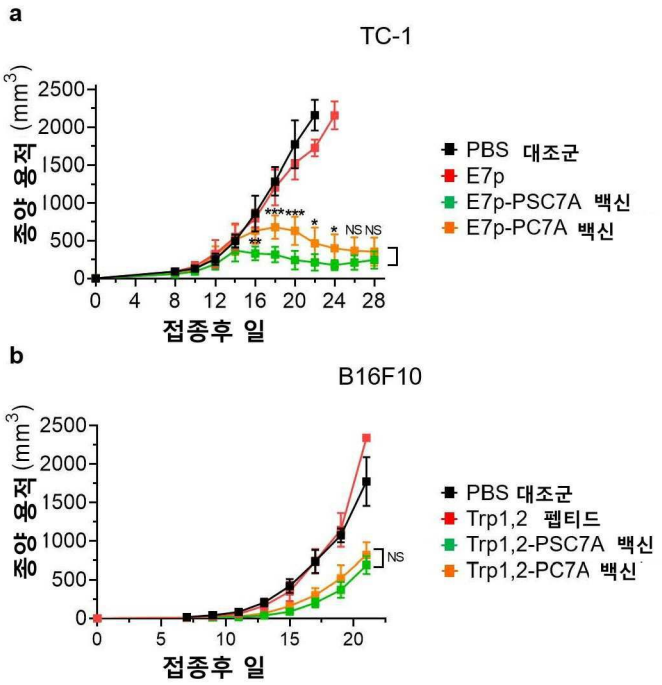
도면12


a
PSC7A
K_d: 26 nM
PSDEA
K_d: 2.1 μM
주사 열 (kcal/mol)
몰 비
PSC7A : STING 이량체
PSDEA : STING 이량체
b
K_b (10^7 M^{-1})
c
IFN 유도
NS
PSC7A
PSC6A
PSC5A
PSDEA
PSDPA
PSDBA

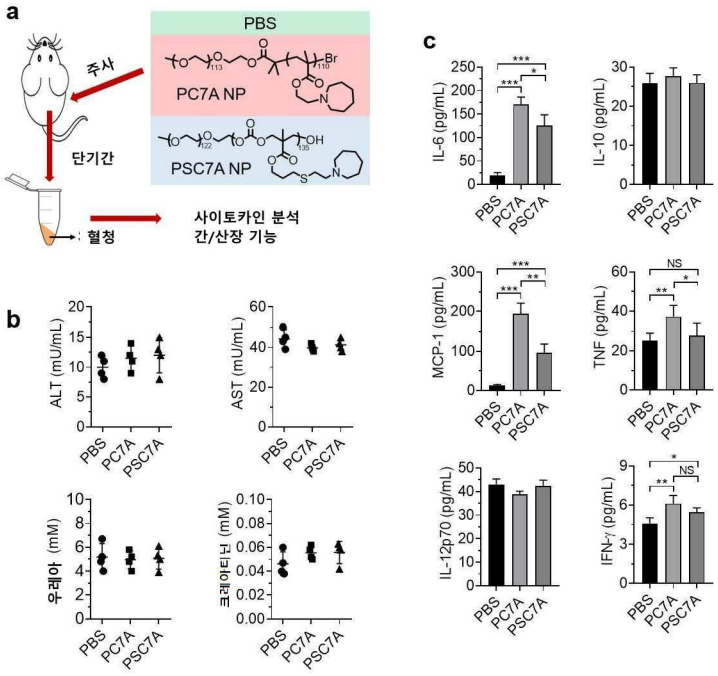
도면13


a
TC-1
접종
1st
2nd
3rd
0
8
14
24
(d)
PBS 대조군
E7p: 0.5 μg
PSC7A NP: 30 μg
Vax. low: 6μg PSC7A NP 중의 0.1μg E7p
Vax. high: 30μg PSC7A NP 중의 0.5μg E7p
종양 용적 (mm3)
2500
2000
1500
1000
500
0
***
***
0 4 8 12 16 20 24 28
접종후 일
생존율
100
80
60
40
20
0
0 10 20 30 40 50
접종후 일
b
B16F10
접종
1st
2nd
3rd
0
5
10
15
(d)
PBS 대조군
Trp1,2: 0.5 μg Trp1 및 0.5 μg Trp2
PSC7A NP: 30 μg
Vax. low: 6μg PSC7A NP 중의 0.1μg E7p
Vax. high: 30μg PSC7A NP 중의 0.5μg E7p
종양 용적 (mm3)
2500
2000
500
000
500
0
**
0 5 10 15 20
접종후 일
생존율
100
50
0
0 10 20 30
접종후 일

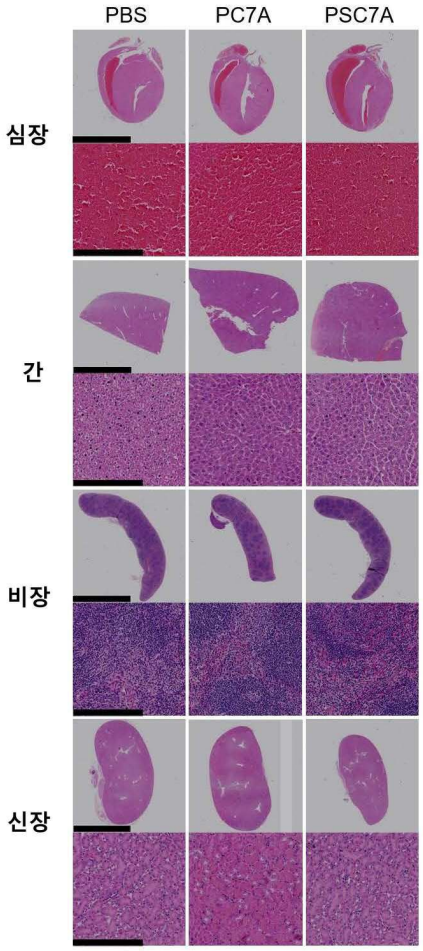
도면14


a
TC-1
종양 용적 (mm3)
2500
2000
1500
1000
500
0
0 4 8 12 16 20 24 28
접종후 일
PBS 대조군
E7p
E7p-PSC7A 백신
E7p-PC7A 백신
b
B16F10
종양 용적 (mm3)
0 5 10 15 20
접종후 일
PBS 대조군
Trp1,2 펩티드
Trp1,2-PSC7A 백신
Trp1,2-PC7A 백신

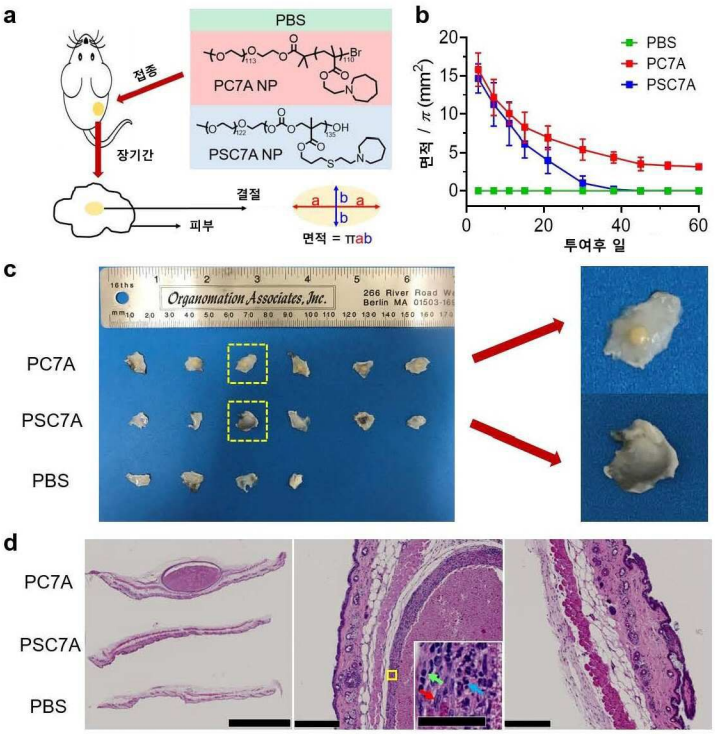
도면15


a
PBS
PC7A NP
PSC7A NP
주사
단기간
혈청
사이토카인 분석
간/산장 기능
b
ALT (mU/mL)
AST (mU/mL)
우레아 (mM)
크레아티닌 (mM)
PBS
PC7A
PSC7A
c
IL-6 (pg/mL)
IL-10 (pg/mL)
MCP-1 (pg/mL)
TNF (pg/mL)
IL-12p70 (pg/mL)
IFN-γ (pg/mL)
NS

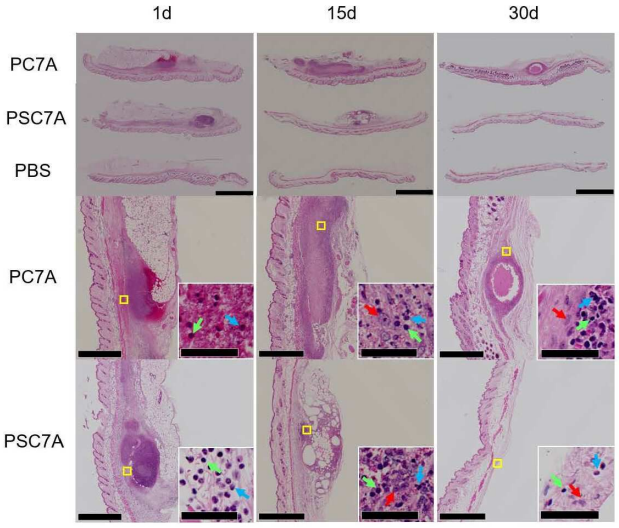
도면16



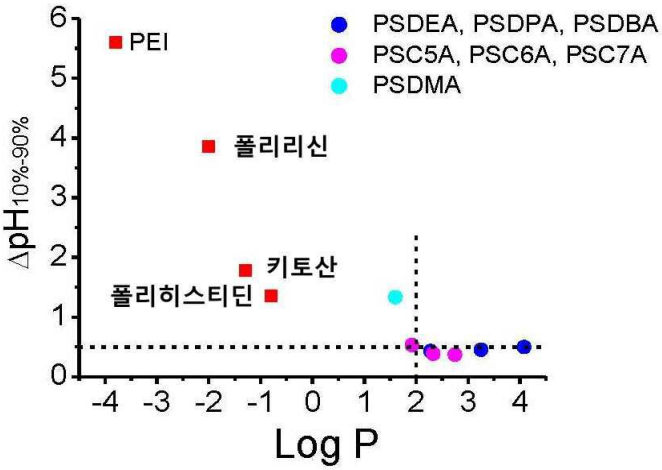
도면17


a
PBS
PC7A NP
PSC7A NP
접종
장기간
결절
피부
면적 = πab
b
PBS
PC7A
PSC7A
면적 / π (mm²)
투여후 일
c
Organomation Associates, Inc.
PC7A
PSC7A
PBS
d
PC7A
PSC7A
PBS

도면18


1d
15d
30d
PC7A
PSC7A
PBS
PC7A
PSC7A

도면19



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> THE BOARD OF REGENTS OF THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM

<120> BIODEGRADABLE ULTRA-PH SENSITIVE POLYMERS

<130> UTFD.P3433WO

<140> Unknown

<141> 2020-06-22

<150> US 62/865,187

<151> 2019-06-22

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 1

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

1 5 10 15

Cys Lys Cys Asp

20