

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일

2024년 12월 12일 (12.12.2024) WIPO | PCT



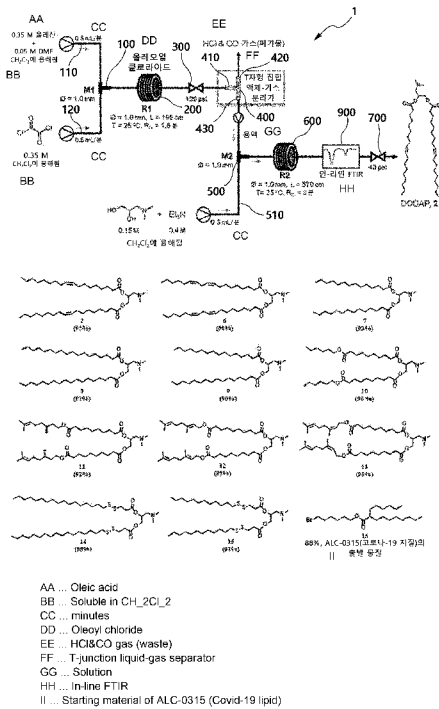
(10) 국제공개번호

WO 2024/253473 A1

- (51) 국제특허분류: C07C 213/06 (2006.01) A61K 9/51 (2006.01)
C07C 219/08 (2006.01) A61K 9/127 (2006.01)
B01J 19/00 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2024/007830
- (22) 국제출원일: 2024년 6월 7일 (07.06.2024)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2023-0073220 2023년 6월 7일 (07.06.2023) KR
- (71) 출원인: 포항공과대학교 산학협력단 (POSTECH RESEARCH AND BUSINESS DEVELOPMENT FOUNDATION) [KR/KR]; 37673 경상북도 포항시 남구 청암로 77, Gyeongsangbuk-do (KR).
- (72) 발명자: 김동표 (KIM, Dong Pyo); 37673 경상북도 포항시 남구 지곡로 155, 4동 903호, Gyeongsangbuk-do (KR). 아슈라오 카왈리산켓 (ASHOKRAO KAWALE, Sanket); 37673 경상북도 포항시 남구 청암로 77, Gyeongsangbuk-do (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 이룸리온 (ERUUM & LEEON INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM); 06575 서울특별시 서초구 사평대로 108, 3층 (반포동), Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM,

(54) Title: SINGLE CONTINUOUS FLOW SYNTHESIS METHOD FOR SYNTHESIZING FUNCTIONAL LIPID LIBRARY USED IN NUCLEIC ACID THERAPEUTIC AGENT

(54) 발명의 명칭: 핵산 치료제에 사용되는 기능성 지질 라이브러리를 합성하기 위한 단일 연속 유동 합성 방법



(57) Abstract: The present invention relates to a single continuous flow synthesis method for synthesizing a functional lipid library used in a nucleic acid therapeutic agent. More specifically, provided are: an ionizable cationic lipid library including ionizable cationic lipids such as 1,2-dioleoyl-3-dimethylammonium-propane; a single continuous flow synthesis method for a cationic lipid library including cationic lipids such as 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane; and a method for preparing lipid nanoparticles or lipid nanoliposomes using said method.

(57) 요약서: 본 발명은 핵산 치료제에 사용되는 기능성 지질 라이브러리를 합성하기 위한 단일 연속 유동 합성 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 1,2-디올레오일-3-디메틸암모늄-프로판과 같은 이온화 가능한 양이온성 지질을 포함하는 이온화 가능한 양이온성 지질 라이브러리 및 1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄-프로판과 같은 양이온성 지질을 포함하는 양이온성 지질 라이브러리의 단일 연속 유동 합성 방법 및 상기 방법을 이용한 지질 나노입자 또는 지질 나노리포솜의 제조방법을 제공한다.

WO 2024/253473 A1

TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

발명의 설명

발명의 명칭: 핵산 치료제에 사용되는 기능성 지질 라이브러리를 합성하기 위한 단일 연속 유동 합성 방법 기술분야

- [1] 본 발명은 핵산 치료제에 사용되는 기능성 지질 라이브러리를 합성하기 위한 단일 연속 유동 합성 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 1,2-디올레오일-3-디메틸암모늄-프로판과 같은 이온화 가능한 양이온성 지질을 포함하는 이온화 가능한 양이온성 지질 라이브러리 및 1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄-프로판과 같은 양이온성 지질을 포함하는 양이온성 지질 라이브러리의 단일 연속 유동 합성 방법 및 상기 방법을 이용한 지질 나노입자 또는 지질 나노리포솜의 제조방법을 제공한다.

배경기술

- [2] 유전자 치료는 일반적으로 원치 않는 면역 반응을 유발하지 않고 표적 세포 내에서 기능하기 위해 DNA 및 RNA와 같은 치료용 뉴클레오티드를 필요로 한다. 그러나, 뉴클레오티드의 큰 크기와 음전하로 인해 세포 침투가 방해되고 뉴클레아제에 취약해진다. 임상적으로 효과적인 지질 나노입자(LNP)는 RNA를 표적 세포에 전달하는 능력을 가지며, 코로나19 백신의 효과로 입증된 바와 같이 생명을 위협하는 일련의 질병을 해결할 수 있는 광범위한 기회를 제공한다. 사용되는 다른 구성 요소 중에서 양이온성 지질은 DNA, RNA 및 기타 음전하를 띤 분자의 리포솜 형질감염에서 중요한 역할을 한다. 구조적으로 양이온성 지질은 일반적으로 링커 그룹을 통해 포화 또는 불포화 소수성 꼬리에 부착된 이온화 또는 양이온 헤드 그룹으로 구성된다. 양이온 지질은 생리학적 pH에서 양전하를 띠는 반면, 이온화 가능한 양이온 지질은 생리학적 pH에서는 중성이지만 RNA의 캡슐화 및 엔도솜 방출을 담당하는 헤드 그룹 없는 아민의 양성자화로 인해 $pK_a(<7)$ 보다 낮은 pH에서 양전하를 띤다. 그 중에서도 에스테르 결합을 통해 소수성 꼬리에 헤드 그룹이 연결된 양이온성 지질은 인체 내에서 생분해성으로 인해 더 많은 임상적 효능을 나타낸다. 1,2-디올레오일-3-디메틸암모늄-프로판(2)(1,2-dioleoyl-3-dimethylammonium-propane, DODAP)는 세포 독성이 낮고 형질감염 효율이 높은 이온화 가능한 양이온성 지질이다. 이는 두 개의 소수성 올레오일 꼬리와 디메틸암모늄 모이어티와 프로판기를 포함하는 친수성 헤드 그룹으로 구성된다. 반면, DODAP(2)의 유도체인, 1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄-프로판(3)(1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane, DOTAP)은 양이온성 트리메틸암모늄 친수성 헤드 그룹을 포함한다 (도 1). DODAP(2) 및 그 유도체는 질병 치료를 위해 mRNA, siRNA 및 플라스미드 DNA를 포함한 생리 활성 분자를 캡슐화하는 데 널리 사용된다.

- [3] DODAP(2)의 합성에는 올레산으로부터 올레오일 클로라이드 합성과 이어서 3-(디메틸아미노)프로판-1,2-디올과의 에스테르화 반응이 포함된다. 그러나, 옥살릴 클로라이드와 같은 필수 염소화제의 독성과 올레오일 클로라이드 형성 중에 생성되는 독성 HCl 및 CO 가스 부산물로 인해 배치 반응기에서의 합성 및 정제는 까다롭다. 특허문헌 1에 따르면, 올레산과 3-(디메틸아미노)프로판-1,2-디올의 커플링 반응을 사용하는 대체 합성 방법은 시간이 많이 걸리고 정제가 어려우며 비교적 비용이 많이 든다. 다양한 문헌을 통해 양이온성 지질 DOTAP(3)의 배치 합성 방법이 보고되었다. 특허문헌 1 및 2는 매우 독성이 강하고 발암성이 있는 메틸화제(클로로메탄, 요오도메탄 등)를 활용하는 양이온성 지질 계열을 준비하기 위한 두 가지 다른 접근법을 보고했는데, 이로 인해 대규모 생산에 적용이 제한된다(도 2의 a 및 b).
- [4] 이 문제를 극복하기 위해, 특허문헌 3 및 특허문헌 2는 DOTAP 브로마이드 합성을 위한 양이온성 헤드 그룹을 도입하기 위해 무독성 트리메틸아민을 활용하였다(도 2의 c). 그러나 원료인 브로모프로판디올을 출발물질로 사용하는 데 드는 비용이 높기 때문에 산업적 적용이 제한되었다. 특허문헌 4의 트리메틸아민 시약과 함께 값싼 출발 물질인 글리세롤을 사용하려는 시도는 시간과 노동력이 많이 소모되고 지질의 품질에 영향을 미치는 다단계 공정을 필요로 한다(도 2의 d). 가장 짧은 경로는 3-클로로프로판-1,2-디올에서 시작하여, 올레산과 2,3-디하이드록시-N,N,N-트리메틸프로판-1-아미늄 클로라이드의 스테글리치(Steglich) 에스테르화 반응을 포함하지만(도 2의 e), 완전한 완료를 위해 16시간이 소요되며 반응 시간과 생산성을 단축하기 위해 유동 화학을 활용하는 것이 매우 바람직하다.
- [5] 최근에는 유기 합성을 위한 연속 유동 공정의 활용이 배치 공정에 비해 더 짧은 시간에 더 높은 수율을 생산할 수 있고, 더 안전하고, 더 깨끗하며, 더 저렴하게 세팅되고 작동될 수 있다는 등의 많은 이점이 있음이 성공적으로 입증되었다. 이는 주로 높은 표면 대 부피 비율, 향상된 열 및 물질 전달, 온도 및 반응 시간과 같은 반응 매개변수를 정밀하게 제어할 수 있는 능력 때문이다. 따라서, 고품질의 이온화 가능한 양이온성 지질에 대한 환경 친화적이고 경제적인 합성 경로를 개발하기 위한 유동 기술의 활용은 유전자 치료 비용을 최소화하기 위해 매우 바람직하다. 새로운 생분해성 지질 후보의 효율적인 스크리닝은 체내 양이온성 지질의 축적으로 인한 장기적인 독성을 최소화하기 위해 요구된다.
- [6] 본 발명에서는 DODAP(2) 및 에스테르 링커 그룹을 포함하는 이의 유도체에 대한 유동 합성 경로가 지질 화합물 라이브러리를 개발하는 것으로 입증되었다. 여기에는 옥살릴 클로라이드를 사용하여 지방산을 산 클로라이드로 전환한 후 알코올 함유 이온화 가능한 아민 헤드 그룹과의 하나의 유동 커플링 반응이 포함되었다. HCl 가스를 제거하기 위해 필요한 염기로부터 형성된 염기.HCl 복합체의 침전으로 인해 관찰된 고체 취급 문제를 극복하기 위해, 맞춤형 중력 기반 액체 가스 분리를 활용하여 독성 HCl 및 CO 가스 부산물을 지속적으로

안전하게 제거하였다. 비특허문헌 3에서는, 염기.HCl 복합체의 침전으로 인한 고체 취급 문제는 더 높은 온도를 요구하는 이온성 액체 형성을 통해 극복되었으며, 유동 시스템에서 염기와 용매 선택에 대한 제한이 있었다. 주요 과제 중 하나는 인라인 FTIR 모니터링을 사용하여 효과적으로 달성한 수분에 민감한 독성 아실 클로라이드의 유동 합성과 이의 후속 반응 매개변수를 최적화하여 시간과 노동력을 효과적으로 절약하는 것이었다. DOTAP 설페이트 (4)의 합성을 위해, 유동 반응기에서 디메틸 설페이트를 사용하여 합성된 DODAP(2)의 신속한 후속 알킬화가 입증되었다. 다르게는, DOTAP 클로라이드 (5)의 직접 유동 합성을 위해 올레산과 2,3-디히드록시-N,N,N-트리메틸프로판-1-아미늄 클로라이드의 스테글리치 에스테르화 반응이 최적화되었다.

- [7] 또한, 이러한 이온화 가능한 양이온성 지질의 규모 확대 생산은 초기 최적화 조건에서 유사한 수율로 더 큰 채널 직경을 사용하는 간단한 규모 확대 접근 방식을 통해 달성되었다. 이러한 고효율 지질 라이브러리의 새로운 합성 플랫폼은 독성 및 표적화 효능 평가를 촉진함으로써 특정 환자에게 지질 기반 나노의약품에 적합한 지질 후보를 제공하는 데 매우 바람직할 것이다.
- [8] [선행기술문헌]
- [9] [특허문헌]
- [10] (특허문헌 1) US5925623A
- [11] (특허문헌 2) US5264618A
- [12] (특허문헌 3) DE4013632A1
- [13] (특허문헌 4) WO2005049549
- [14] [비특허문헌]
- [15] (비특허문헌 1) Synthesis and characterization of novel zwitterionic lipids with pH-responsive biophysical properties, Colin L. Walsh, Juliane Nguyenb, Francis C. Szoka, *Chem. Commun.*, **2012**, 48, 5575-5577.
- [16] (비특허문헌 2) Interactions of Cationic Lipid Vesicles with Negatively Charged Phospholipid Vesicles and Biological Membranes, Leonidas Stamatatos, Rania Leventis, Martin J. Zuckermann, John R. Silvius, *Biochemistry* 1988, 27, 3917-3925.
- [17] (비특허문헌 3) Overcoming solid handling issues in continuous flow substitution reactions through ionic liquid formation, Saeed K. Kashani, Ryan J. Sullivan, Mads Andersen, Stephen G. Newman, *Green Chem.*, **2018**, 20, 1748-1753.

발명의 내용

기술적 과제

- [18] 따라서, 본 발명은 핵산 치료제에 사용되는 기능성 지질에 대한 단일 연속 유동 (one-flow) 합성 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

- [19] 또한, 본 발명은 전술한 기능성 지질에 대한 단일 연속 유동 합성 방법을 이용한 지질 나노입자 또는 지질 나노 리포솜의 제조방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제 해결 수단

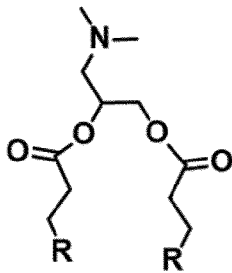
- [20] 상술한 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 다음의 (a) 및 (b)의 단계를 포함하는 이온화 가능한 양이온성 지질의 합성 방법을 제공한다:

- [21] (a) $R-(CH_2)_2C(=O)OH$, 디메틸포름아미드 및 옥살릴 클로라이드를 혼합 및 반응시켜 $R-C(=O)Cl$ 을 형성하는 단계; 및

- [22] (b) $R-C(=O)Cl$ 을 3-(디메틸아미노)프로판-1,2-디올 및 염기성 화합물과 혼합하여 에스테르화 반응을 일으켜 화학식 1의 구조를 갖는 이온화 가능한 양이온성 지질을 생성하는 단계;를 포함하며,

- [23] [화학식 1]

- [24]



- [25] 상기 R은 비치환된 C10 내지 C20의 포화 또는 불포화 지방족 탄화수소 라디칼이거나, 또는 $-C(=O)O-$ 또는 $-S-S-$ 가 사슬에 도입된 C10 내지 C20의 포화 또는 불포화 지방족 탄화수소 라디칼이다.

- [26] 본 발명에 있어서, 상기 (a) 단계 후에 HCl 및 CO 가스를 분리하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

- [27] 본 발명에 있어서, 상기 합성 방법은 단일 연속 유동 공정을 위한 미세유체장치에서 수행될 수 있고, 상기 미세유체장치는: 제1 유로와 제2 유로가 유체적으로 연결되는 제1 미세 혼합기; 상기 제1 미세 혼합기와 유체적으로 연결되는 제1 반응기; 상기 제1 반응기와 유체적으로 연결되는 제1 배압 조절기; 상기 제1 배압 조절기와 유체적으로 연결되어 용액과 가스를 분리하는 T자형 액체-가스 분리기; 상기 T자형 액체-가스 분리기와 제3 유로가 유체적으로 연결되는 제2 미세 혼합기; 상기 제2 미세 혼합기와 유체적으로 연결되는 제2 반응기; 및 상기 제2 반응기와 유체적으로 연결되는 제2 배압 조절기를 포함할 수 있다.

- [28] 본 발명에 있어서, 상기 T자형 액체-가스 분리기는 상기 제1 배압 조절기와 유체적으로 연결되는 제1 공급유로, 분리된 가스가 배출되는 제1 배출유로 및 분리된 용액이 상기 제2 미세 혼합기에 공급되도록 상기 제2 미세 혼합기에 유체적으로 연결되는 제2 공급유로를 포함할 수 있다.

- [29] 본 발명에 있어서, 상기 제1 유로에 $R-(CH_2)_2C(=O)OH$ 및 디메틸포름아미드, 상기 제2 유로에 옥살릴 클로라이드가 주입될 수 있고, 상기 제1 반응기에서 $R-C(=O)Cl$ 이 생성될 수 있고, 상기 T자형 액체-가스 분리기를 통해 HCl 및 CO 가스가 분리될 수 있고, 상기 제3 유로에 3-(디메틸아미노)프로판-1,2-디올 및 염기성 화합물이 주입될 수 있고, 상기 제2 반응기에서 상기 화학식 1의 구조를 갖는 이온화 가능한 양이온성 지질이 생성될 수 있다.
- [30] 본 발명에 있어서, 상기 제1 반응기에서의 체류 시간은 1 내지 2분일 수 있고, 상기 제2 반응기에서의 체류 시간은 2 내지 10분일 수 있고, 상기 제2 반응기에서의 반응 온도는 20 내지 60 °C일 수 있다.
- [31] 본 발명에 있어서, 상기 염기성 화합물은 피리딘, 피리딘과 DMAP의 혼합, DMAP, 디이소프로필에틸아민 및 트리에틸아민으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [32] 본 발명에 있어서, 상기 (a) 단계의 $R-(CH_2)_2C(=O)OH$ 는 올레산, 리놀레산, 미리스트산, 스테아르산, 팔미트산, 10-(헥실옥시)-10-옥소데칸산, (S)-10-((3,7-디메틸옥트-6-엔-1-일)옥시)-10-옥소데칸산, (E)-10-((3,7-디메틸옥타-2,6-디엔-1-일)옥시)-10-옥소데칸산, (Z)-10-((3,7-디메틸옥타-2,6-디엔-1-일)옥시)-10-옥소데칸산, 3-(옥타데실디설파닐)프로판산 및 3-(도데실디설파닐)프로판산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [33] 본 발명에 있어서, 상기 화학식 1의 구조를 갖는 이온화 가능한 양이온성 지질은 다음의 (1) 내지 (11) 중 어느 하나일 수 있다:
- [34] (1) 1,2-디올레오일-3-디메틸암모늄-프로판;
- [35] (2) (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-3-(디메틸아미노)프로판-1,2-디일비스(옥타데카-9,12-디에노에이트);
- [36] (3) 1,2-디미리스토일-3-디메틸암모늄-프로판;
- [37] (4) 1,2-디스테아로일-3-디메틸암모늄-프로판;
- [38] (5) 1,2-디팔미토일-3-디메틸암모늄-프로판;
- [39] (6) O'1,O1-(3-(디메틸아미노)프로판-1,2-디일) 10-디헥실 비스(데칸디오에이트);
- [40] (7) O'1,O1-(3-(디메틸아미노)프로판-1,2-디일) 10-비스((S)-3,7-디메틸옥트-6-엔-1-일) 비스(데칸디오에이트);
- [41] (8) O'1,O1-(3-(디메틸아미노)프로판-1,2-디일) 10-비스((E)-3,7-디메틸옥타-2,6-디엔-1-일) 비스(데칸디오에이트);
- [42] (9) O'1,O1-(3-(디메틸아미노)프로판-1,2-디일) 10-비스((Z)-3,7-디메틸옥타-2,6-디엔-1-일) 비스(데칸디오에이트);
- [43] (10) 3-(디메틸아미노)프로판-1,2-디일 비스(3-(옥타데실디설파닐)프로판노에이트); 및

[44] (11) 3-(디메틸아미노)프로판-1,2-디일 비스(3-(도데실디설파닐)프로파노에이트).

[45] 또한, 본 발명은 다음의 (a) 및 (b) 단계를 포함하는, 이온화 가능한 양이온성 지질인 6-((2-헥실데카노일)옥시)-N-(6-((2-헥실데카노일)옥시)헥실)-N-(4-하이드록시부틸)헥산-1-아미늄의 중간체인 6-브로모헥실 2-헥실데카노에이트의 합성 방법을 제공한다:

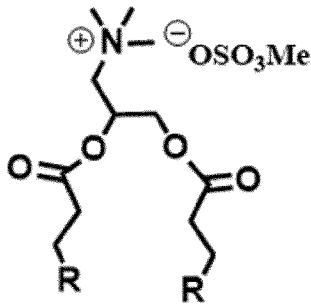
[46] (a) 2-하이드록시데칸산, 디메틸포름아미드 및 옥살릴 클로라이드를 혼합 및 반응시켜 2-하이드록실데카노일 클로라이드를 형성하는 단계; 및

[47] (b) 2-하이드록실데카노일 클로라이드를 3-(디메틸아미노)프로판-1,2-디올 및 6-브로모헥산올과 혼합하여 에스테르화 반응을 일으켜 6-브로모헥실 2-헥실데카노에이트를 생성하는 단계.

[48] 또한, 본 발명은 전술한 합성 방법에 의해 합성된 이온화 가능한 양이온성 지질과 디메틸 설페이트를 혼합 및 반응시켜 화학식 2의 구조를 갖는 양이온성 지질 메틸 설페이트를 생성하는 단계를 포함하며,

[49] [화학식 2]

[50]



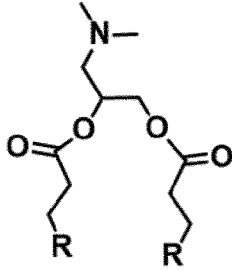
[51] 상기 R은 비치환된 C10 내지 C20의 포화 또는 불포화 지방족 탄화수소 라디칼이거나, 또는 -C(=O)O- 또는 -S-S-가 사슬에 도입된 C10 내지 C20의 포화 또는 불포화 지방족 탄화수소 라디칼인, 양이온성 지질 메틸 설페이트의 합성 방법을 제공한다.

[52] 본 발명에 있어서, 상기 합성 방법은 단일 연속 유동 공정을 위한 미세유체장치에서 수행될 수 있고, 상기 미세유체장치는: 제1 유로와 제2 유로가 유체적으로 연결되는 제1 미세 혼합기; 상기 제1 미세 혼합기와 유체적으로 연결되는 제1 반응기; 및 상기 제1 반응기와 유체적으로 연결되는 제1 배압 조절기를 포함할 수 있다.

[53] 본 발명에 있어서, 상기 제1 유로에 화학식 1의 구조를 갖는 이온화 가능한 양이온성 지질, 상기 제2 유로에 디메틸 설페이트를 주입할 수 있고,

[54] [화학식 1]

[55]



[56] 여기서, 상기 R은 비치환된 C10 내지 C20의 포화 또는 불포화 지방족 탄화수소 라디칼이거나, 또는 -C(=O)O- 또는 -S-S-가 사슬에 도입된 C10 내지 C20의 포화 또는 불포화 지방족 탄화수소 라디칼일 수 있고,

[57] 상기 제1 반응기에서 상기 화학식 2의 구조를 갖는 양이온성 지질 메틸 설페이트가 생성될 수 있다.

[58] 본 발명에 있어서, 상기 화학식 1의 구조를 갖는 이온화 가능한 양이온성 지질 및 상기 디메틸 설페이트는 0.4 내지 2.0ml/분의 유속으로 주입될 수 있고, 상기 제1 반응기에서의 반응 온도는 40 내지 70°C일 수 있고, 상기 제1 반응기에서의 체류 시간은 3 내지 7분일 수 있다.

[59] 본 발명에 있어서, 상기 화학식 2의 구조를 갖는 양이온성 지질 메틸 설페이트는 다음의 다음의 (1) 내지 (7) 중 어느 하나일 수 있다:

[60] (1) 1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄-프로판 메틸 설페이트;

[61] (2) N,N,N-트리메틸-2,3-비스((9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디에노일옥시)프로판-1-아미늄 메틸 설페이트;

[62] (3) 2,3-비스((10-(헥실옥시)-10-옥소데카노일)옥시)-N,N,N-트리메틸프로판-1-아미늄 메틸 설페이트;

[63] (4) 2,3-비스((10-((S)-3,7-디메틸옥트-6-엔-1-일)옥시)-10-옥소데카노일)옥시)-N,N,N-트리메틸프로판-1-아미늄 메틸 설페이트;

[64] (5) 2,3-비스((10-((E)-3,7-디메틸옥타-2,6-디엔-1-일)옥시)-10-옥소데카노일)옥시)-N,N,N-트리메틸프로판-1-아미늄 메틸 설페이트;

[65] (6) 2,3-비스((10-((Z)-3,7-디메틸옥타-2,6-디엔-1-일)옥소)-10-옥소데카노일)옥시)-N,N,N-트리메틸프로판-1-아미늄 메틸 설페이트;

[66] (7) N,N,N-트리메틸-2,3-비스((3-(옥타데실디설파닐)프로파노일)옥시)프로판-1-아미늄 메틸 설페이트.

[67] 본 발명에 있어서, 상기 합성 방법은 용매 증발 및 재결정화 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[68] 본 발명에 있어서, 상기 재결정화는 아세톤 용매에서 수행될 수 있다.

[69] 또한, 본 발명은 올레산, 2,3-디하이드록시-N,N,N-트리메틸프로판-1-아미늄 클로라이드 및 DMAP의 혼합물과 (3-디메틸아미노-프로필)-에틸-카르보디이미드 클로라이드를 혼합 및 반응시켜 스테글리치 에스테르화 반응을 일으켜 양이온성 지질 1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄-프로판(DOTAP)

클로라이드를 생성하는 단계를 포함하는, 양이온성 지질 1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄-프로판(DOTAP) 클로라이드의 합성 방법을 제공한다.

- [70] 본 발명에 있어서, 상기 합성 방법은 단일 연속 유동 공정을 위한 미세유체장치에서 수행될 수 있고, 상기 미세유체장치는: 제1 유로와 제2 유로가 유체적으로 연결되는 제1 미세 혼합기; 상기 제1 미세 혼합기와 유체적으로 연결되는 제1 반응기; 및 상기 제1 반응기와 유체적으로 연결되는 제1 배압 조절기를 포함할 수 있다.
- [71] 본 발명에 있어서, 상기 제1 반응기에서의 반응 온도는 60 내지 80°C일 수 있고, 상기 제1 반응기에서의 체류 시간은 3 내지 7분일 수 있다.
- [72] 본 발명에 있어서, 상기 합성 방법은 용매 증발 및 재결정화 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [73] 본 발명에 있어서, 상기 재결정화는 이소프로판올 및 아세톤 용매에서 수행될 수 있다.
- [74] 추가로, 본 발명은 다음의 (a) 및 (b) 단계를 포함하는 지질 나노입자의 제조방법을 제공한다:
- [75] (a) 전술한 합성 방법으로 이온화 가능한 양이온성 지질을 합성하는 단계; 및
- [76] (b) 상기 합성된 이온화 가능한 양이온성 지질, 헬퍼(helper) 지질, 콜레스테롤 및 폴리에틸렌 글리콜 지질을 포함하는 용액을 완충액과 혼합하여 지질 나노입자를 형성하는 단계.
- [77] 나아가, 본 발명은 다음의 (a) 및 (b) 단계를 포함하는 지질 나노 리포솜의 제조방법을 제공한다:
- [78] (a) 전술한 방법으로 이온화 가능한 양이온성 지질, 양이온성 지질, 또는 DOTAP 클로라이드를 합성하는 단계; 및
- [79] (b) 상기 합성된 이온화 가능한 양이온성 지질, 양이온성 지질 또는 DOTAP와 콜레스테롤을 포함하는 용액을 완충액과 혼합하여 지질 나노 리포솜을 형성하는 단계.

발명의 효과

- [80] 본 발명에 따른 핵산 치료제에 사용되는 기능성 지질의 합성 방법은 미세유체반응기에서 연속 유동 합성 방법으로 구현되는 바, 기존의 배치 반응기에서의 합성 방법에 비해 생산성이 현저히 높고, 품질이 우수한 이온화 가능한 양이온성 지질 또는 양이온성 지질을 제공한다. 나아가, 본 발명의 방법으로 합성된 DODAP 및 DOTAP는 질병 치료를 위해 mRNA, siRNA 및 플라스미드 DNA를 포함한 생리 활성 분자를 캡슐화하는 지질 나노입자 및 지질 나노 리포솜으로 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [81] 도 1은 지질 나노입자 또는 리포솜에 사용되는 일반적인 양이온성 지질(1), 1,2-디올레오일-3-디메틸암모늄-프로판(DODAP)(2) 및 1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄-프로판(DOTAP)(3)의 구조를 나타낸 것이다.
- [82] 도 2의 A)는 기존에 공지된 DOTAP(3)의 합성 방법, B)는 본 발명의 2가지 종류의 반대 이온을 사용한 DOTAP 합성을 위한 연속 유동 방법을 보여준다.
- [83] 도 3은 인-라인(in-line) FTIR를 포함하는 모세관 반응기에서 올레오일 클로라이드의 연속 유동 합성을 위한 실험 셋팅을 보여준다.
- [84] 도 4는 인-라인 FTIR 유동 셀의 실험 셋팅 사진이다.
- [85] 도 5는 인-라인 FTIR 모니터링의 실험 결과이다.
- [86] 도 6의 a)는 효과적인 액체-가스 분리기로 사용되는 맞춤형 T자형 접합부를 보여주는 사진이고, b)는 반응기에서 HCl 가스를 제거하지 않으면 고농도의 고체 피리디늄 염산염 염(8 eq.의 염기를 사용해야 함)으로 인해 R2 반응기에서 막힘이 발생한다는 것을 보여주는 사진이고, c)는 인-라인 FTIR 모니터링을 사용하여 올레오일 클로라이드에서 DODAP(2)로의 전환을 모니터링한 결과를 보여준다.
- [87] 도 7은 모세관 반응기에서의 이온화 가능한 양이온성 지질 DODAP(2) 및 이온화 가능한 양이온성 지질 라이브러리의 단일 유동 합성을 보여준다.
- [88] 도 8은 이온화 가능한 양이온성 지질의 단일 유동 합성을 위한 실험 셋팅을 보여준다.
- [89] 도 9는 DODAP의 연속 유동 합성을 위한 실험 셋팅을 보여준다.
- [90] 도 10은 모세관 반응기에서 양이온성 지질인 DOTAP 메틸 설페이트(4), DLinTAP 메틸 설페이트(17) 및 다른 유사체들(18-22)의 연속 유동 합성을 위한 실험 셋팅을 보여준다.
- [91] 도 11은 DOTAP 메틸 설페이트의 연속 유동 합성을 위한 실험 셋팅을 보여준다.
- [92] 도 12는 양이온성 지질 라이브러리의 연속 유동 합성을 위한 실험 셋팅을 보여준다.
- [93] 도 13은 모세관 반응기에서의 DOTAP 클로라이드의 연속 유동 합성을 보여준다.
- [94] 도 14는 크기 증가(size-up) 방법을 사용한 DOTAP 클로라이드의 연속 유동 합성을 위한 실험 셋팅을 보여준다.
- [95] 도 15는 합성된 DODAP 및 DOTAP로부터 생성된 나노입자의 제조 및 특성을 나타낸 것으로, 도 15의 A는 DLS에 의한 나노입자 생성, 투석 및 분석에 대한 일련의 공정을 보여주고, B 내지 E는 각각 투석 공정을 통한 정제 전후에, 제조된 DODAP LNP(B), DODAP 리포솜(C), DOTAP-클로라이드 리포솜(D) 및 DOTAP 메틸 설페이트 리포솜(E)의 정규화된 크기 분포를 보여준다.

- [96] 도 11은 지질 기반 나노입자의 생산 및 분석을 나타낸 것으로, A는 전체 절차의 모식도이고, B는 투석 전후에 생성된 나노입자의 수치적 크기 및 PDI를 보여준다.
- [97] 도 16은 생성된 DODAP LNP(A), DODAP 리포솜(B), DOTAP-클로라이드 리포솜(C) 및 DOTAP 메틸 설페이트 리포솜(D)의 수치적 크기 및 PDI 값을 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [98] 이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.
- [99] 본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다. 또한 본 명세서에는 바람직한 방법이나 시료가 기재되나, 이와 유사하거나 동등한 것들도 본 발명의 범주에 포함된다.
- [100] 상술한 바와 같이 DODAP 및 DOTAP와 같은 기능성 지질의 기존 합성 방법들은 시간과 비용 소모로 인해 비경제적이거나, 정제가 어렵거나, 대규모 생산에 적용이 제한되는 문제점이 있어, 유동 기술을 이용하여 고품질의 이온화 가능한 양이온성 지질을 친환경적이고 경제적으로 합성하는 방법을 개발하기 위한 노력이 계속되고 있다.
- [101] 이에, 본 발명자들은 단일 연속 유동 공정을 이용하여 높은 생산성으로 고품질의 기능성 지질 라이브러리를 합성할 수 있는 신규 합성 경로를 개발함으로써, 상술한 문제의 해결 방안을 모색하였다.
- [102] 구체적으로, 간단한 2단계 방식으로 개발된 이온화 가능한 지질 라이브러리에 대한 손쉬운 단일 유동 합성 방법을 개발하여 크기 증가 접근 방식을 통해 시간당 최대 10g의 확장 가능한 생산성을 달성하였다. 첫 번째 단계에서는 연속 유동 에스테르화를 위한 아실 클로라이드 합성을 성공적으로 탐색했으며, T 접합 액체-가스 분리기를 사용하여 독성 HCl 및 CO 가스를 효과적으로 제거함으로써 막힘을 방지하였다. 인라인 FTIR 모니터링을 사용하여 연속 유동 공정의 신속한 최적화가 달성되었다. 본 발명의 유동 프로토콜을 사용하면 기존 배치 프로토콜에 비해 훨씬 짧은 시간(약 4.5분)에 확립된 상업용 종류와 새로운 이온화 가능 지질을 모두 포함하는 광범위한 지질을 합성할 수 있다. 생분해성 이온화 가능한 지질 라이브러리는 긴 사슬 그룹에 에스테르 또는 이황화물 작용기를 포함하여 설계되었다. 이러한 지질은 손쉬운 모세관 반응기에서 합성되어, 88~92%의 수율로 얻어졌다. 추가로, 이온화 가능한 지질을 양이온성 지질로 전환하기 위해 본 발명에서는 유동 반응기에서 5분 동안 유지하면서 디메틸 설페이트를 사용하여 신속한 알킬화를 달성하였다. 특히, DOTAP 메틸 설페이트는 시간 당 7g의 생산성으로 생산되었다. 나아가, EDC.HCl을 사용한 스테글리치 에스테르화 반응을 통해 88% 수율로 DOTAP 클로라이드를 효과적으로 합성하여, 시간 당 10.2g의 생산성으로 DOTAP

클로라이드를 얻을 수 있었다. 마지막으로, 자체 개발한 미세 혼합기를 사용하여 DODAP를 PDI가 0.07인 64nm의 균일한 크기의 LNP와 PDI가 0.05인 72nm 크기의 리포솜으로 변환하였다. 유사하게, DOTAP는 PDI가 0.08인 55nm 크기의 리포솜을 형성하였다. 지질 라이브러리를 위한 이러한 신규 유동 보조 플랫폼은 유전자 치료를 발전시키고 차세대 나노의학 역할을 할 수 있는 큰 가능성을 가진다.

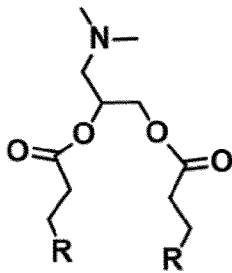
[103] 본 발명은 제1 측면은 다음의 (a) 및 (b)의 단계를 포함하는 이온화 가능한 양이온성 지질의 합성 방법을 제공한다:

[104] (a) $R-(CH_2)_2C(=O)OH$, 디메틸포름아미드 및 옥살릴 클로라이드 혼합 및 반응시켜 $R-C(=O)Cl$ 을 형성하는 단계; 및

[105] (b) $R-C(=O)Cl$ 을 3-(디메틸아미노)프로판-1,2-디올 및 염기성 화합물과 혼합하여 에스테르화 반응을 일으켜 화학식 1의 구조를 갖는 이온화 가능한 양이온성 지질을 생성하는 단계;를 포함하며,

[106] [화학식 1]

[107]



[108] 상기 R은 비치환된 C10 내지 C20의 포화 또는 불포화 지방족 탄화수소 라디칼이거나, 또는 $-C(=O)O-$ 또는 $-S-S-$ 가 사슬에 도입된 C10 내지 C20의 포화 또는 불포화 지방족 탄화수소 라디칼이다.

[109] 본 발명에 있어서, 상기 비치환된 C10 내지 C20의 포화 지방족 탄화수소 라디칼은 10 내지 20개의 탄소 원자를 포함하는 선형 또는 분지형의 포화 지방족 탄화수소 라디칼일 수 있다. 예를 들어, n-데실기, 이소데실기, sec-데실기, tert-데실기, 네오데실기, n-운데실기, 이소운데실기, sec-운데실기, tert-운데실기, 네오운데실기, n-도데실기, 이소도데실기, sec-도데실기, tert-도데실기, n-트리데실기, 이소트리데실기, sec-트리데실기, tert-트리데실기, 네오트리데실기, n-테트라데실기, 이소테트라데실기, sec-테트라데실기, tert-테트라데실기, 네오테트라데실기, n-펜타데실기, 이소펜타데실기, sec-펜타데실기, tert-펜타데실기, 네오펜타데실기, n-헥사데실기, 이소헥사데실기, sec-헥사데실기, tert-헥사데실기, 네오헥사데실기, n-헵타데실기, 이소헵타데실기, sec-헵타데실기, tert-헵타데실기, 네오헵타데실기, n-옥타데실기, 이소옥타데실기, sec-옥타데실기, tert-옥타데실기, 네오옥타데실기, n-노나데실기, 이소노나데실기, sec-노나데실기, tert-노나데실기, 네오노나데실기, n-에이코실기, 이소에이코실기,

sec-에이코실기, tert-에이코실기 또는 네오에이코실기일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [110] 본 발명에 있어서, 상기 비치환된 C10 내지 C20의 불포화 지방족 탄화수소 라디칼은 10 내지 20개의 탄소 원자를 포함하는 선형 또는 분지형의 불포화 지방족 탄화수소 라디칼일 수 있고, 하나 이상의 이중 결합(C=C)을 포함할 수 있다. 예를 들어, 선형 또는 분지형 형태의 데세닐기, 도데세닐기, 트리데세닐기, 테트라데세닐기, 펜타데세닐기, 헥사데세닐기, 헵타데세닐기, 옥타데세닐기, 노나데세닐기 또는 에이코세닐기일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [111] 본 발명에 있어서, 상기 합성 방법의 모든 반응물은 상기 (a) 및 (b) 단계의 반응에 악영향을 미치지 않는 유기용매에 용해된 상태로 사용될 수 있다. 예를 들어, 디메틸포름아미드(DMF), 테트라하이드로퓨란(THF), 디클로로메탄 등의 유기용매를 사용할 수 있으나, 이에 한정되지 않으며, 통상의 기술자는 적절한 유기용매를 선택하여 상기 (a) 및 (b) 단계를 수행할 수 있다.
- [112] 본 발명에 있어서, 상기 (a) 단계 후에는 HCl 및 CO 가스 부산물과 함께 R-C(=O)Cl(아실 클로라이드)가 생성될 수 있다. 생성된 HCl 및 CO 가스는 (b) 단계에서는 불필요한 부산물이므로, (b) 단계를 수행하기 전에 분리 및 제거될 수 있다.
- [113] 본 발명의 합성 방법에 있어서, 상기 (a) 단계의 옥살릴 클로라이드는, 디메틸포름아미드(DMF) 촉매 존재 하에 올레오일 클로라이드를 합성하기 위한 염소화제(chlorinating agent)로 선택되었다. CH₂Cl₂는 형성된 염기.HCl 복합체(base.HCl complex)의 용해도를 고려하여 유동 합성의 일반적인 용매로 간주되었다.
- [114] 본 발명의 합성 방법에 있어서, 상기 3-(디메틸아미노)프로판-1,2-디올은 디메틸아미노기를 포함하는 다른 종류의 디올 화합물로 대체될 수 있다.
- [115] 본 발명에 있어서, 상기 합성 방법은 단일 연속 유동 공정을 위한 미세유체장치 (1)에서 수행될 수 있고, 상기 미세유체장치(1)는: 제1 유로(110)와 제2 유로(120)가 유체적으로 연결되는 제1 미세 혼합기(100); 상기 제1 미세 혼합기(100)와 유체적으로 연결되는 제1 반응기(200); 상기 제1 반응기(200)와 유체적으로 연결되는 제1 배압 조절기(300); 상기 제1 배압 조절기(300)와 유체적으로 연결되어 용액과 가스를 분리하는 T자형 액체-가스 분리기(400); 상기 T자형 액체-가스 분리기(400)와 제3 유로(510)가 유체적으로 연결되는 제2 미세 혼합기(500); 상기 제2 미세 혼합기(500)와 유체적으로 연결되는 제2 반응기(600); 및 상기 제2 반응기(600)와 유체적으로 연결되는 제2 배압 조절기(700)를 포함할 수 있다.
- [116] 본 발명에 있어서, 상기 T자형 액체-가스 분리기(400)는 상기 제1 배압 조절기(300)와 유체적으로 연결되는 제1 공급유로(410), 분리된 가스가 배출되는 제1 배출유로(420) 및 분리된 용액이 상기 제2 미세 혼합기(500)에 공급되도록 상기

- 제2 미세 혼합기(500)에 유체적으로 연결되는 제2 공급유로(430)를 포함할 수 있다.
- [117] 도 7 및 8을 참조하면, 상기 미세유체장치(1)의 제1 유로(110)와 제2 유로(120)는 각각 상기 (a) 단계의 반응물이 주입되는 유로로서, 제1 미세 혼합기(100)와 유체적으로 연결될 수 있다. 구체적으로, 상기 제1 유로(110)에 $R-(CH_2)_2C(=O)OH$ 및 디메틸포름아미드, 상기 제2 유로(120)에 옥살릴 클로라이드가 주입될 수 있다.
- [118] 도 7 및 8을 참조하면, 상기 제1 미세 혼합기(100)에서는 제1 유로(110)와 제2 유로(120)로부터 유입된 반응물들이 혼합되어 혼합물이 생성되며, 생성된 혼합물은 제1 미세 혼합기(100)와 유체적으로 연결되는 제1 반응기(200)로 주입될 수 있다.
- [119] 도 7 및 8을 참조하면, 상기 제1 반응기(200)에서는 (a) 단계의 반응이 일어나며, 반응의 결과물로서 $R-C(=O)Cl$ 이 생성되고, 부산물로 HCl 및 CO 가스가 생성된다. 전술한 바와 같이, 생성된 HCl 및 CO 가스는 (b) 단계에서는 불필요한 부산물이므로, (b) 단계를 수행하기 전에 $R-C(=O)Cl$ 을 포함하는 용액으로부터 분리 및 제거되는 것이 바람직하다. 이러한 부산물 가스는 상기 T자형 액체-가스 분리기(400)를 통해 분리 및 제거될 수 있다. 구체적으로, $R-C(=O)Cl$ 을 포함하는 용액과 HCl 및 CO 가스는 상기 제1 반응기(200)와 유체적으로 연결되는 제1 배압 조절기(300)를 거쳐, 상기 제1 배압 조절기(300)와 유체적으로 연결되는 제1 공급유로(410)를 거쳐 T자형 액체-가스 분리기(400)를 통과하면서 $R-C(=O)Cl$ 을 포함하는 용액과 HCl 및 CO 가스로 분리될 수 있다. 이때, 상기 분리된 HCl 및 CO 가스는 제1 배출유로(420)로 배출되어 제거되고, 상기 분리된 $R-C(=O)Cl$ 을 포함하는 용액은 제2 공급유로(430)를 거쳐 제2 미세 혼합기(500)에 주입될 수 있다.
- [120] 도 7 및 8을 참조하면, 상기 제2 미세 혼합기(500)는 제3 유로(510)와 유체적으로 연결될 수 있다. 상기 제3 유로(510)에는 상기 제2 미세 혼합기(500)에 주입된 $R-C(=O)Cl$ 과 반응하여 최종적으로 상기 화학식 1의 구조를 갖는 이온화 가능한 양이온성 지질을 생성할 수 있는 추가의 반응물이 주입될 수 있다. 구체적으로, 상기 제3 유로(510)에는 3-(디메틸아미노)프로판-1,2-디올 및 염기성 화합물이 주입될 수 있다.
- [121] 도 7 및 8을 참조하면, 상기 제2 미세 혼합기(500)에서는 제2 공급유로(430)와 제3 유로(510)로부터 유입된 반응물들이 혼합되어 혼합물이 생성되며, 생성된 혼합물은 제2 미세 혼합기(500)와 유체적으로 연결되는 제2 반응기(600)로 주입될 수 있다.
- [122] 도 7 및 8을 참조하면, 상기 제2 반응기(600)에서는 (b) 단계의 반응이 일어나며, 반응의 결과물로서 상기 화학식 1의 구조를 갖는 이온화 가능한 양이온성 지질이 생성된다.

- [123] 도 7 및 8을 참조하면, 최종 생성물인 상기 화학식 1의 구조를 갖는 이온화 가능한 양이온성 지질은 상기 제2 반응기(600)와 유체적으로 연결되는 제2 배압 조절기(700)를 통과한 후 배출될 수 있다.
- [124] 도 7 및 8을 참조하면, 상기 제1 반응기(200)와 제1 배압 조절기(300) 사이에는 제1 분광계(800)가 추가로 유체적으로 연결될 수 있고, 상기 제2 반응기(600)와 제2 배압 조절기(700) 사이에는 제2 분광계(900)가 추가로 유체적으로 연결될 수 있다.
- [125] 본 발명에 있어서, 상기 제1 반응기(200)에서의 체류 시간은 1 내지 2분일 수 있다. 구체적으로, 상기 제1 반응기(200)에 유입된 반응물들, 즉 $R-(CH_2)_2C(=O)OH$, 디메틸포름아미드 및 옥살릴 클로라이드가 반응을 일으켜 $R-C(=O)Cl$ 을 생성하기까지 소요되는 시간은 1 내지 2분일 수 있다.
- [126] 본 발명에 있어서, 상기 제1 반응기(200)에서의 반응 온도는 20 내지 30 °C일 수 있다.
- [127] 상기 제1 반응기(200)에서의 체류 시간(즉, 반응 시간) 및 반응 온도 범위로 상기 (a) 단계의 반응을 수행하는 것이 바람직하며, 상기 범위를 벗어나는 경우 $R-C(=O)Cl$ 의 수율이 감소될 수 있다.
- [128] 상기 제1 반응기(200)에서의 체류 시간은 상기 제1 유로에 주입되는 $R-(CH_2)_2C(=O)OH$ 및 디메틸포름아미드를 포함하는 용액과 옥살릴 클로라이드를 포함하는 용액을 0.4 내지 2.0ml/분의 유속으로 제1 미세 혼합기에 주입함으로써 달성될 수 있다.
- [129] 본 발명에 있어서, 상기 제2 반응기(600)에서의 체류 시간은 2 내지 10분일 수 있다. 구체적으로, 상기 제2 반응기(600)에 유입된 반응물들, 즉 $R-C(=O)Cl$, 3-(디메틸아미노)프로판-1,2-디올 및 염기성 화합물이 반응을 일으켜 상기 화학식 1의 구조를 갖는 이온화 가능한 양이온성 지질을 생성하기까지 소요되는 시간은 2 내지 10분일 수 있다.
- [130] 본 발명에 있어서, 상기 제2 반응기(600)에서의 반응 온도는 20 내지 60 °C일 수 있다.
- [131] 상기 제2 반응기(600)에서의 체류 시간(즉, 반응 시간) 및 반응 온도 범위로 상기 (b) 단계의 반응을 수행하는 것이 바람직하며, 상기 범위를 벗어나는 경우 상기 화학식 1의 구조를 갖는 이온화 가능한 양이온성 지질의 수율이 감소될 수 있다.
- [132] 상기 제2 반응기에서의 체류 시간은 상기 제3 유로(510)에 주입되는 3-(디메틸아미노)프로판-1,2-디올 및 염기성 화합물을 포함하는 용액을 각각 0.4 내지 2.0ml/분의 유속으로 제2 미세 혼합기에 주입함으로써 달성될 수 있다.
- [133] 본 발명에 있어서, 상기 (b) 단계의 염기성 화합물은 피리딘, 피리딘과 DMAP의 혼합, DMAP, 디이소프로필에틸아민 및 트리에틸아민으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다. 가장 바람직한 염기성 화합물은 트리에틸아민일 수 있다. 염기성 화합물로 트리에틸아민을 사용하는 경우 상기 제2 반응기

(600)에서 25°C, 3분의 반응으로 최대 92%의 수율로 상기 화학식 1의 구조를 갖는 이온화 가능한 양이온성 지질을 얻을 수 있다.

- [134] 본 발명에 있어서, 상기 (a) 단계의 $R-(CH_2)_2C(=O)OH$ 는 지방산으로서, 예를 들어 올레산, 리놀레산, 미리스트산, 스테아르산, 팔미트산, 10-(헥실옥시)-10-옥소데칸산, (S)-10-((3,7-디메틸옥트-6-엔-1-일)옥시)-10-옥소데칸산, (E)-10-((3,7-디메틸옥타-2,6-디엔-1-일)옥시)-10-옥소데칸산, (Z)-10-((3,7-디메틸옥타-2,6-디엔-1-일)옥시)-10-옥소데칸산, 3-(옥타데실디설파닐)프로판산 및 3-(도데실디설파닐)프로판산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 통상의 기술자는 합성하고자 하는 이온화 가능한 양이온성 지질의 종류에 따라 상기 지방산의 종류를 적절히 선택하여 사용할 수 있다.
- [135] 본 발명에 있어서, 상기 화학식 1의 구조를 갖는 이온화 가능한 양이온성 지질은 다음의 (1) 내지 (11) 중 어느 하나일 수 있다:
- [136] (1) 1,2-디올레오일-3-디메틸암모늄-프로판;
- [137] (2) (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-3-(디메틸아미노)프로판-1,2-디일비스(옥타데카-9,12-디에노에이트);
- [138] (3) 1,2-디미리스토일-3-디메틸암모늄-프로판;
- [139] (4) 1,2-디스테아로일-3-디메틸암모늄-프로판;
- [140] (5) 1,2-디팔미토일-3-디메틸암모늄-프로판;
- [141] (6) O'1,O1-(3-(디메틸아미노)프로판-1,2-디일) 10-디헥실 비스(데칸디오에이트);
- [142] (7) O'1,O1-(3-(디메틸아미노)프로판-1,2-디일) 10-비스((S)-3,7-디메틸옥트-6-엔-1-일) 비스(데칸디오에이트);
- [143] (8) O'1,O1-(3-(디메틸아미노)프로판-1,2-디일) 10-비스((E)-3,7-디메틸옥타-2,6-디엔-1-일) 비스(데칸디오에이트);
- [144] (9) O'1,O1-(3-(디메틸아미노)프로판-1,2-디일) 10-비스((Z)-3,7-디메틸옥타-2,6-디엔-1-일) 비스(데칸디오에이트);
- [145] (10) 3-(디메틸아미노)프로판-1,2-디일 비스(3-(옥타데실디설파닐)프로판노에이트); 및
- [146] (11) 3-(디메틸아미노)프로판-1,2-디일 비스(3-(도데실디설파닐)프로판노에이트).
- [147] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 이온화 가능한 양이온성 지질인 1,2-디올레오일-3-디메틸암모늄-프로판(DODAP)를 합성하기 위해, 상기 (a) 단계를 다음과 같이 수행하였다. CH_2Cl_2 에 용해된 0.35M 옥살릴 클로라이드 용액 및 0.05M DMF과 함께 0.35M 올레산 용액을 불활성 대기 하에서 별도로 제조하고, HPLC 펌프를 사용하여 제1 미세 혼합기($\varnothing = 1.0mm$)를 통해 반응기 R1(L = 225cm, $\varnothing = 1.0mm$)에 주입하였다. 반응은 시약의 유속을 변화시켜 실온(25 °C)에서 다양한 체류 시간으로 최적화되었다. 미세유체 셀을 사용하여 유동

장치를 FTIR 분광계에 연결하였다(도 4). 차례로, IR 분광법은 1780 cm^{-1} 에서 특징적인 CO 스트레칭 밴드를 갖는 산 클로라이드(acid chloride)의 형성과 올레산의 산 작용기의 1708 cm^{-1} 에서 CO 스트레칭의 소멸을 모니터링하였다(도 5). HCl 및 CO 가스와 같은 부산물의 가스 방출을 방지하기 위해 100psi 배압 조절기(BPR)를 FTIR 유동 셀 배출구에 사용하였다. 몇 가지 최적화 후에, 올레오일 클로라이드를 원활하게 형성하기 위해 25°C 의 반응 온도 및 1.5분의 체류 시간에서 올레산의 완전한 소비가 발생함을 확인하였다. 반응기 R1에서의 체류 시간 및 온도가 더 증가하더라도 올레오일 클로라이드의 CO 스트레칭 피크의 강도가 추가로 증가하지는 않았다.

- [148] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 R1에서 올레오일 클로라이드를 합성한 후, 용액에 용해되지 않은 독성 HCl과 CO 가스를 액체-가스 분리기(T-접합)를 사용하여 성공적으로 분리하였다. HCl을 분리하지 않는 경우, (b) 단계에서 과량의 염기가 필요하며, 염기에 난용성 염산염의 농도가 높아 R2에서 막힘 현상이 발생할 수 있다.
- [149] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 이온화 가능한 양이온성 지질인 1,2-디올레오일-3-디메틸암모늄-프로판(DODAP)를 합성하기 위해, 상기 (b) 단계를 다음과 같이 수행하였다. 올레오일 클로라이드를 CH_2Cl_2 에 용해된 3-(디메틸아미노)프로판-1,2-디올(0.15 M) 및 염기인 피리딘(0.4 M)을 포함하는 용액과 혼합기 M2($\text{Ø} = 1.0\text{ mm}$)에서 분당 1.0 mL의 유속으로 혼합하고 반응기 R2($\text{Ø} = 1.0\text{ mm}$)를 통과하여 에스테르화 반응을 발생시켰다. R2에서의 반응은 PTFE 튜브 반응기의 길이를 변경하여 다양한 체류 시간에서 최적화되었다. DODAP(2) 합성 중 에스테르 결합 형성은 인라인 FTIR 분광법을 사용하여 모니터링되었으며, 에스테르기에 대해 1735 cm^{-1} 에서 특징적인 CO 스트레칭 밴드가 형성되었다(도 7).
- [150] 몇 가지 최적화 후에, DODAP(2)의 수율을 최대화하기 위해서는 염기성 화합물로 트리에틸아민을 사용하여, 25°C 의 반응 온도 및 3분의 체류 시간이 가장 바람직함을 확인하였다.
- [151] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 이온화 가능한 양이온성 지질 라이브리리를 합성하기 위해, 올레산 대신 각각 리놀레산, 미리스트산, 스테아르산 및 팔미트산을 사용하여 (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-3-(디메틸아미노)프로판-1,2-디일비스(옥타데카-9,12-디에노에이트), 1,2-디미리스토일-3-디메틸암모늄-프로판, 1,2-디스테아로일-3-디메틸암모늄-프로판 및 1,2-디팔미토일-3-디메틸암모늄-프로판을 합성하였다.
- [152] 본 발명의 구체적인 다른 일 실시예에서는 이온화 가능한 지질의 긴 사슬에 에스테르 또는 이황화물 작용기가 도입된 지방산인 10-(헥실옥시)-10-옥소데칸산, (S)-10-((3,7-디메틸옥트-6-엔-1-일)옥시)-10-옥소데칸산, (E)-10-((3,7-디메틸옥타-2,6-디엔-1-일)옥시)-10-옥소데칸산, (Z)-10-((3,7-디메틸옥타-

2,6-디엔-1-일)옥시)-10-옥소데칸산, 3-(옥타데실디설페닐)프로판산 및 3-(도데실디설페닐)프로판산을 각각 사용하여, O'1,O1-(3-(디메틸아미노)프로판-1,2-디일) 10-디헥실 비스(테칸디오에이트), O'1,O1-(3-(디메틸아미노)프로판-1,2-디일) 10-비스((S)-3,7-디메틸옥트-6-엔-1-일) 비스(테칸디오에이트), O'1,O1-(3-(디메틸아미노)프로판-1,2-디일) 10-비스((E)-3,7-디메틸옥타-2,6-디엔-1-일) 비스(테칸디오에이트), O'1,O1-(3-(디메틸아미노)프로판-1,2-디일) 10-비스((Z)-3,7-디메틸옥타-2,6-디엔-1-일) 비스(테칸디오에이트), 3-(디메틸아미노)프로판-1,2-디일 비스(3-(옥타데실디설페닐)프로판노에이트) 및 3-(디메틸아미노)프로판-1,2-디일 비스(3-(도데실디설페닐)프로판노에이트)를 합성하였다.

[153] 그 결과, 도 7에서 확인되는 바와 같이 상기 10종의 이온화 가능한 양이온성 지질을 88 내지 93% 수율로 얻을 수 있음을 확인하였다.

[154] 본 발명의 구체적인 또 다른 일 실시예에서는 내경을 1.6mm로 증가시킨 제1 반응기(200) 및 제2 반응기(600)를 사용하여 이온화 가능한 양이온성 지질 라이브리리의 생산성을 향상시키고자 하였다. DODAP(2)의 생산성을 향상시키기 위해, 더 높은 농도의 0.5M 올레산 및 옥살릴 클로라이드를 분당 1.5mL의 유속으로 반응기 R1(L = 225cm, t_{R1} = 1.5분)에 주입하였고, 0.22M의 3-(디메틸아미노)프로판-1,2-디올과 0.6M 트리에틸아민을 분당 1.5 mL의 유속으로 반응기 R2(L = 900 cm, t_{R2} = 3분)에 주입하였다. R1에서 용액에 HCl 및 CO 가스를 완전히 용해하려면 250psi 배압 조절기가 필요했다(도 8). 최적화된 조건을 따르면, DODAP(2) 합성 5분당 0.9g으로 생산성이 높아져 1시간 작업에 11g 이상의 규모를 달성하였다.

[155] 본 발명에 있어서, 상기 미세유체장치의 제1 반응기의 튜브 직경은 0.8 내지 2.0mm, 튜브 길이는 200 내지 300cm일 수 있고, 제2 반응기의 튜브 직경은 0.8 내지 2.0mm, 튜브 길이는 500 내지 900cm일 수 있다.

[156] 본 발명의 제2 측면은 다음의 (a) 및 (b) 단계를 포함하는, 이온화 가능한 양이온성 지질인 6-((2-헥실데카노일)옥시)-N-(6-((2-헥실데카노일)옥시)헥실)-N-(4-하이드록시부틸)헥산-1-아미늄의 중간체인 6-브로모헥실 2-헥실데카노에이트의 합성 방법에 관한 것이다.

[157] (a) 2-하이드록시데칸산, 디메틸포름아미드 및 옥살릴 클로라이드를 혼합 및 반응시켜 2-하이드록실데카노일 클로라이드를 형성하는 단계; 및

[158] (b) 2-하이드록실데카노일 클로라이드를 3-(디메틸아미노)프로판-1,2-디올 및 6-브로모헥산올과 혼합하여 에스테르화 반응을 일으켜 6-브로모헥실 2-헥실데카노에이트를 생성하는 단계.

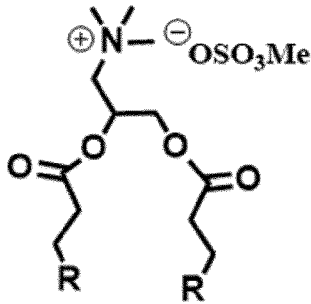
[159] 본 발명의 6-브로모헥실 2-헥실데카노에이트의 합성 방법은 전술한 이온화 가능한 양이온성 지질의 합성 방법에서 올레산 대신 2-하이드록시데칸산을 사용하고, 트리에틸아민 대신 6-브로모헥산올을 사용하는 것 이외에는 이온화 가능한 양이온성 지질의 합성 방법과 동일한 조건 및 동일한 미세유체장치에서 수행될 수 있다. 이때, 제1 반응기에서의 체류 시간은 1 내지 3분, 반응 온도는 20

내지 30 °C일 수 있고, 제2 반응기에서의 체류 시간은 2 내지 7분일 수 있고, 상기 제2 반응기에서의 반응 온도는 20 내지 60 °C일 수 있다.

[160] 본 발명의 제3 측면은 전술한 합성 방법에 의해 합성된 이온화 가능한 양이온성 지질과 디메틸 설페이트를 혼합 및 반응시켜 화학식 2의 구조를 갖는 양이온성 지질 메틸 설페이트를 생성하는 단계를 포함하며,

[161] [화학식 2]

[162]



[163] 상기 R은 비치환된 C10 내지 C20의 포화 또는 불포화 지방족 탄화수소 라디칼이거나, 또는 -C(=O)O- 또는 -S-S-가 사슬에 도입된 C10 내지 C20의 포화 또는 불포화 지방족 탄화수소 라디칼인, 양이온성 지질 메틸 설페이트의 합성 방법에 관한 것이다.

[164] 본 발명에 있어서, 상기 양이온성 지질 메틸 설페이트의 합성 방법은 단일 연속 유동 공정을 위한 미세유체장치(2)에서 수행될 수 있고, 상기 미세유체장치(2)는: 제1 유로(110)와 제2 유로(120)가 유체적으로 연결되는 제1 미세 혼합기(100); 상기 제1 미세 혼합기(100)와 유체적으로 연결되는 제1 반응기(200); 및 상기 제1 반응기(200)와 유체적으로 연결되는 제1 배압 조절기(300)를 포함할 수 있다.

[165] 상기 R은 비치환된 C10 내지 C20의 포화 또는 불포화 지방족 탄화수소 라디칼 및 -C(=O)O- 또는 -S-S-가 사슬에 도입된 C10 내지 C20의 포화 또는 불포화 지방족 탄화수소 라디칼에 대한 설명은 전술한 바와 동일하므로, 그 기재 생략한다.

[166] 본 발명에 있어서, 상기 양이온성 지질 메틸 설페이트의 합성 방법의 모든 반응물은 반응에 악영향을 미치지 않는 유기용매에 용해된 상태로 사용될 수 있다. 예를 들어, 디메틸포름아미드(DMF), 테트라하이드로퓨란(THF), 디클로로메탄 등의 유기용매를 사용할 수 있으나, 이에 한정되지 않으며, 통상의 기술자는 적절한 유기용매를 선택하여 상기 반응 단계를 수행할 수 있다.

[167] 도 10 내지 12를 참조하면, 상기 미세유체장치(2)의 제1 유로(110)와 제2 유로(120)는 각각 반응물이 주입되는 유로로서, 제1 미세 혼합기(100)와 유체적으로 연결될 수 있다. 구체적으로, 상기 제1 유로(110)에는 상기 화학식 1의 구조를 갖는 이온화 가능한 양이온성 지질, 상기 제2 유로(120)에는 디메틸 설페이트가 주입될 수 있다.

- [168] 도 10 내지 12를 참조하면, 상기 제1 미세 혼합기(100)에서는 제1 유로(110)와 제2 유로(120)로부터 유입된 반응물들이 혼합되어 혼합물이 생성되며, 생성된 혼합물은 제1 미세 혼합기(100)와 유체적으로 연결되는 제1 반응기(200)로 주입될 수 있다.
- [169] 도 10 내지 12를 참조하면, 상기 제1 반응기(200)에서는 상기 이온화 가능한 양이온성 지질과 디메틸 설페이트가 반응하여 반응 결과물로서 상기 화학식 2의 구조를 갖는 양이온성 지질 메틸 설페이트가 생성된다.
- [170] 도 10 내지 12를 참조하면, 최종 생성물인 상기 화학식 2의 구조를 갖는 양이온성 지질 메틸 설페이트는 상기 제1 반응기(200)와 유체적으로 연결되는 제1 배압 조절기(300)를 통과한 후 배출될 수 있다.
- [171] 상기 미세유체장치의 제1 반응기(200)와 제1 배압 조절기(300) 사이에는 제1 분광계(800)가 추가로 유체적으로 연결될 수 있다.
- [172] 본 발명에 있어서, 상기 제1 반응기(200)에서의 체류 시간은 3 내지 7분일 수 있다. 구체적으로, 상기 제1 반응기(200)에 유입된 반응물들, 즉 상기 화학식 1의 구조를 갖는 이온화 가능한 양이온성 지질과 디메틸 설페이트가 반응을 일으켜 상기 화학식 2의 구조를 갖는 양이온성 지질 메틸 설페이트를 생성하기까지 소요되는 시간은 3 내지 7분일 수 있다.
- [173] 본 발명에 있어서, 상기 제1 반응기(200)에서의 반응 온도는 40 내지 70°C일 수 있다.
- [174] 상기 제1 반응기(200)에서의 체류 시간(즉, 반응 시간) 및 반응 온도 범위로 상기 단계의 반응을 수행하는 것이 바람직하며, 상기 범위를 벗어나는 경우 상기 화학식 2의 구조를 갖는 양이온성 지질 메틸 설페이트의 수율이 감소될 수 있다.
- [175] 상기 제1 반응기(200)에서의 체류 시간은 상기 제1 유로에 주입되는 상기 화학식 1의 구조를 갖는 이온화 가능한 양이온성 지질을 포함하는 용액과 디메틸 설페이트를 포함하는 용액을 각각 0.4 내지 2.0ml/분의 유속으로 제1 미세 혼합기에 주입함으로써 달성될 수 있다.
- [176] 본 발명에 있어서, 상기 양이온성 지질 메틸 설페이트의 합성 방법은 용매 증발 및 재결정화 단계를 추가로 포함할 수 있다. 이때, 상기 재결정화는 아세톤 용매에서 수행될 수 있으나, 상기 양이온성 지질 메틸 설페이트의 재결정화에 적합한 용매에서 제한 없이 수행될 수 있다.
- [177] 본 발명에 있어서, 상기 화학식 2의 구조를 갖는 양이온성 지질 메틸 설페이트는 다음의 (1) 내지 (7)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다:
- [178] (1) 1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄-프로판 메틸 설페이트;
- [179] (2) N,N,N-트리메틸-2,3-비스((9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디에노일옥시)프로판-1-아미늄 메틸 설페이트;
- [180] (3) 2,3-비스((10-(헥실옥시)-10-옥소데카노일)옥시)-N,N,N-트리메틸프로판-1-아미늄 메틸 설페이트;

- [181] (4) 2,3-비스((10-(((S)-3,7-디메틸옥트-6-엔-1-일)옥시)-10-옥소데카노일)옥시)-N,N,N-트리메틸프로판-1-아미늄 메틸 설페이트;
- [182] (5) 2,3-비스((10-(((E)-3,7-디메틸옥타-2,6-디엔-1-일)옥시)-10-옥소데카노일)옥시)-N,N,N-트리메틸프로판-1-아미늄 메틸 설페이트;
- [183] (6) 2,3-비스((10-(((Z)-3,7-디메틸옥타-2,6-디엔-1-일)옥소)-10-옥소데카노일)옥시)-N,N,N-트리메틸프로판-1-아미늄 메틸 설페이트; 및
- [184] (7) N,N,N-트리메틸-2,3-비스((3-(옥타데실디설파닐)프로파노일)옥시)프로판-1-아미늄 메틸 설페이트.
- [185] 다만, 상기 화학식 1의 구조를 갖는 이온화 가능한 양이온성 지질의 종류에 따라 보다 다양한 양이온성 지질 메틸 설페이트를 합성할 수 있음이 자명하다.
- [186] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 양이온성 지질인 1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄-프로판(DOTAP) 메틸 설페이트를 합성하기 위해, 유동 화학에서 디메틸 설페이트를 사용하여 합성된 DODAP(2)의 알킬화를 선택하였다. 반응은 HPLC 펌프를 사용하여 시약의 유속을 변경함으로써 R1 반응기에서의 다양한 체류 시간에서 최적화되었다. 초기 실험에서는 신속하고 완전한 알킬화가 일어나기 위해서는 더 높은 당량의 디메틸 설페이트가 필수적이라는 사실이 밝혀졌다. 따라서, 0.2M의 DODAP(2) 용액과 CH₂Cl₂에 용해된 2.0M 디메틸 설페이트 용액을 별도로 제조하여 T-혼합기 M1(Ø = 1.0mm)를 통해 미세유체 반응기 R1(Ø = 1.0mm, L = 510cm)에 공급하였다. 몇 가지 최적화 후에, DODAP(2)의 완전한 알킬화는 60 °C에서 10당량의 디메틸 설페이트를 사용하고 R1 반응기에서 5분의 체류 시간을 사용함으로써 달성되었다. 혼합 효율의 본질적인 우수성으로 인한 가속화된 반응 동역학은 알킬화를 완료하는 데 48시간이 걸리는 배치 공정에 비해 매우 유리하다. 최종적으로, 용매 증발 및 아세톤에서의 재결정화 후에 순수한 DOTAP 메틸 설페이트(4)가 90% 수율로 순조롭게 얻어졌다. 특히, 테트라하이드로푸란과 아세토니트릴을 반응 용매로 사용하면 전환율이 좋지 않았다.
- [187] 본 발명의 구체적인 다른 일 실시예에서는 또 다른 이온화 가능한 지질 또는 이온화 가능한 지질의 긴 사슬에 에스테르 또는 이황화물 작용기가 도입된 지방산인 (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-3-(디메틸아미노)프로판-1,2-디일비스(옥타데카-9,12-디에노에이트), O'1,O1-(3-(디메틸아미노)프로판-1,2-디일) 10-디헥실 비스(테칸디오에이트), O'1,O1-(3-(디메틸아미노)프로판-1,2-디일) 10-비스((S)-3,7-디메틸옥트-6-엔-1-일) 비스(테칸디오에이트), O'1,O1-(3-(디메틸아미노)프로판-1,2-디일) 10-비스((E)-3,7-디메틸옥타-2,6-디엔-1-일) 비스(테칸디오에이트), O'1,O1-(3-(디메틸아미노)프로판-1,2-디일) 10-비스((Z)-3,7-디메틸옥타-2,6-디엔-1-일) 비스(테칸디오에이트) 및 3-(디메틸아미노)프로판-1,2-디일 비스(3-(헵타데실디설파닐)프로파노에이트)를 각각 사용하여, N,N,N-트리메틸-2,3-비스((9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디에노일옥시)프로판-1-아미늄 메틸 설페이트(DLinDAP), 2,3-비스((10-(헥실옥시)-10-옥소데카노일)옥시)-N,N,N-

트리메틸프로판-1-아미늄 메틸 설페이트, 2,3-비스((10-(((S)-3,7-디메틸옥트-6-엔-1-일)옥시)-10-옥소데카노일)옥시)-N,N,N-트리메틸프로판-1-아미늄 메틸 설페이트, 2,3-비스((10-(((Z)-3,7-디메틸옥타-2,6-디엔-1-일)옥소)-10-옥소데카노일)옥시)-N,N,N-트리메틸프로판-1-아미늄 메틸 설페이트 및 9 N,N,N-트리메틸-2,3-비스((3-(옥타데실디설파닐)프로파노일)옥시)프로판-1-아미늄 메틸 설페이트를 합성하였다.

- [188] 그 결과, 도 12에서 확인되는 바와 같이 상기 7종의 양이온성 지질을 88 내지 90% 수율로 얻을 수 있음을 확인하였다.
- [189] 본 발명의 구체적인 또 다른 일 실시예에서는 내경을 1.6mm로 증가시킨 제1 반응기(200)를 사용하여 양이온성 지질 메틸 설페이트 라이브러리의 생산성을 향상시키고자 하였다. DOTAP 메틸 설페이트(4)의 생산성을 향상시키기 위해, 2.0mL/분의 혼합 유속으로 내경 1.6mm PTFE 튜브 반응기 R1(L = 500cm)을 사용한 추가 실험에서 5분당 0.67g의 DOTAP 메틸 설페이트(4)가 생성되어 1시간의 작업 시간 동안 거의 8g 규모를 달성하였다.
- [190] 본 발명의 제4 측면은 올레산, 2,3-디하이드록시-N,N,N-트리메틸프로판-1-아미늄 클로라이드 및 DMAP의 혼합물과 (3-디메틸아미노-프로필)-에틸-카르보디이미드 클로라이드를 혼합 및 반응시켜 스테글리치 에스테르화 반응을 일으켜 양이온성 지질 1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄-프로판(DOTAP) 클로라이드를 생성하는 단계를 포함하는, 양이온성 지질 1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄-프로판(DOTAP) 클로라이드의 합성 방법에 관한 것이다.
- [191] DOTAP 메틸 설페이트(4)는 노동력과 비용을 필요로 하는 Amberlite® IRA-400(Cl) 이온 교환 수지로 처리하여 DOTAP 클로라이드(5)로 전환될 수 있다. 알킬화제로서 메틸 클로라이드를 사용하지 않고 DOTAP 클로라이드(5)를 직접 합성하는 것은 DMAP가 염기로 존재하는 상태에서, CH₂Cl₂에 용해된, 시판되고 쉽게 합성 가능한 2,3-디하이드록시-N,N,N-트리메틸프로판-1-아미늄 클로라이드(23)를 사용하여 올레오일 클로라이드를 에스테르화함으로써 배치 반응기에서 달성될 수 있다. 그러나, 디올(23)은 디메틸 설펝사이드(DMSO)를 제외한 일반적인 유기용매에 용해되지 않아 유동 화학을 수행하기 어려우며, 더욱이 DMSO는 아실 클로라이드를 이용한 에스테르화 반응에 적합한 용매가 아니었다.
- [192] 대안적으로, DMSO에서 DMAP의 존재 하에 올레산과 디올(23)의 N-(3-디메틸아미노프로필)-N'-에틸카르보디이미드 하이드로클로라이드(EDC.HCl) 매개 스테글리치 에스테르화 반응을 통해 16시간 동안 DOTAP 클로라이드(5)를 78% 수율로 얻었다. 따라서, DOTAP 클로라이드(5)의 직접 합성을 위해 연속 유동 반응기에서 스테글리치 에스테르화 반응을 탐구할 가치가 있다. 내부 직경이 1.0mm인 PTFE 튜브 반응기를 포함하는 실험 셋팅이 도 14에 나타나 있다. 디올(23)은 3-클로로프로판-1,2-디올과 메탄올 용매에 용해된 트리메틸아민의 에탄올 용액을 환류하여 배치에서 처음 제조되었다.

- [193] 본 발명에 있어서, 상기 DOTAP 클로라이드(5)의 합성 방법의 모든 반응물은 반응에 악영향을 미치지 않는 유기용매에 용해된 상태로 사용될 수 있다. 예를 들어, 디메틸 설펝사이드(DMSO)를 사용할 수 있으나, 이에 한정되지 않으며, 통상의 기술자는 적절한 유기용매를 선택하여 상기 반응 단계를 수행할 수 있다.
- [194] 도 13 및 14를 참조하면, 상기 미세유체장치(2)의 제1 유로(110)와 제2 유로(120)는 각각 반응물이 주입되는 유로로서, 제1 미세 혼합기(100)와 유체적으로 연결될 수 있다. 구체적으로, 상기 제1 유로(110)에는 올레산, 2,3-디하이드록시-N,N,N-트리메틸프로판-1-아미늄 클로라이드 및 DMAP의 혼합물, 상기 제2 유로(120)에는 (3-디메틸아미노-프로필)-에틸-카르보디이미드 클로라이드가 주입될 수 있다.
- [195] 도 13 및 14를 참조하면, 상기 제1 미세 혼합기(100)에서는 제1 유로(110)와 제2 유로(120)로부터 유입된 반응물들이 혼합되어 혼합물이 생성되며, 생성된 혼합물은 제1 미세 혼합기(100)와 유체적으로 연결되는 제1 반응기(200)로 주입될 수 있다.
- [196] 도 13 및 14를 참조하면, 상기 제1 반응기(200)에서는 올레산, 2,3-디하이드록시-N,N,N-트리메틸프로판-1-아미늄 클로라이드 및 DMAP의 혼합물 및 (3-디메틸아미노-프로필)-에틸-카르보디이미드 클로라이드가 반응하여 반응 결과물로서 DOTAP 클로라이드(5)가 생성된다.
- [197] 도 13 및 14를 참조하면, 최종 생성물인 DOTAP 클로라이드(5)는 상기 제1 반응기(200)와 유체적으로 연결되는 제1 배압 조절기(300)를 통과한 후 배출될 수 있다.
- [198] 본 발명에 있어서, 상기 제1 반응기(200)에서의 체류 시간은 3 내지 7분일 수 있다. 구체적으로, 상기 제1 반응기(200)에 유입된 반응물들, 즉 올레산, 2,3-디하이드록시-N,N,N-트리메틸프로판-1-아미늄 클로라이드 및 DMAP의 혼합물 및 (3-디메틸아미노-프로필)-에틸-카르보디이미드 클로라이드가 반응을 일으켜 DOTAP 클로라이드(5)를 생성하기까지 소요되는 시간은 3 내지 7분일 수 있다.
- [199] 본 발명에 있어서, 상기 제1 반응기(200)에서의 반응 온도는 60 내지 80°C일 수 있다.
- [200] 상기 제1 반응기(200)에서의 체류 시간(즉, 반응 시간) 및 반응 온도 범위로 상기 단계의 반응을 수행하는 것이 바람직하며, 상기 범위를 벗어나는 경우 DOTAP 클로라이드(5)의 수율이 감소될 수 있다.
- [201] 상기 제1 반응기(200)에서의 체류 시간은 상기 제1 유로에 주입되는 올레산, 2,3-디하이드록시-N,N,N-트리메틸프로판-1-아미늄 클로라이드 및 DMAP를 포함하는 용액과 (3-디메틸아미노-프로필)-에틸-카르보디이미드 클로라이드를 포함하는 용액을 0.4 내지 1.5ml/분의 유속으로 제1 미세 혼합기에 주입함으로써 달성될 수 있다.

- [202] 본 발명에 있어서, 상기 DOTAP 클로라이드(5)의 합성 방법은 용매 증발 및 재결정화 단계를 추가로 포함할 수 있다. 이때, 상기 재결정화는 이소프로판올 및 아세톤 용매에서 수행될 수 있으나, 상기 DOTAP 클로라이드(5)의 재결정화에 적합한 용매에서 제한 없이 수행될 수 있다.
- [203] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 DMSO에 용해된 0.65 M 올레산, 0.3 M 디올(23) 및 0.1 M DMAP의 혼합물을 DMSO에 용해된 0.65 M EDC.HCl 용액과 T-혼합기($\varnothing = 1.0$ mm)를 이용하여 혼합한 후 에스테르화가 일어나도록 반응기 R1($\varnothing = 1.0$ mm, L = 640 cm)을 통과시켰다. R1에서의 반응은 주사기 펌프를 사용하여 시약의 유속을 변경함으로써 다양한 온도와 다양한 체류 시간에서 최적화되었다. 처음에는 실온에서 15분의 체류 시간으로 디올(23)의 불완전한 디-에스테르화로 인해 DOTAP 클로라이드(5)의 수율이 낮았다. 그러나, 디-에스테르화를 더욱 촉진하기 위해 온도를 70 °C로 올리면, DOTAP 클로라이드(5)는 배치 공정의 16시간 보다 훨씬 짧은 R1에서의 5.0분의 체류 시간만으로 정제 후 88% 수율로 얻어졌다.
- [204] 본 발명의 구체적인 또 다른 일 실시예에서는 내경을 1.6mm로 증가시킨 제 1 반응기(200)를 사용하여 DOTAP 클로라이드(5)의 생산성을 향상시키고자 하였다. DOTAP 클로라이드(5)의 생산성을 향상시키기 위해, 2.0mL/분의 혼합 유속으로 1.6mm PTFE 튜브 반응기(L = 500cm)를 사용하였다. 유동 반응기에서의 이러한 크기 증가 방법은 5분당 0.84g의 생산성을 제공하여 결국 시간당 거의 10.2g 규모를 나타내었다.
- [205] 본 발명의 제5 측면은 다음의 (a) 및 (b) 단계를 포함하는 지질 나노입자의 제조방법에 관한 것이다:
- [206] (a) 전술한 합성 방법으로 이온화 가능한 양이온성 지질을 합성하는 단계; 및
- [207] (b) 상기 합성된 이온화 가능한 양이온성 지질, 헬퍼(helper) 지질, 콜레스테롤 및 폴리에틸렌 글리콜 지질을 포함하는 용액을 완충액과 혼합하여 지질 나노입자를 형성하는 단계.
- [208] 본 발명의 지질 나노입자의 제조방법에 있어서, 상기 (a) 단계에 대한 설명은 전술한 바와 동일하므로, 그 기재 생략한다.
- [209] 본 발명의 지질 나노입자의 제조방법에 있어서, 상기 (b) 단계에서 사용되는 이온화 가능한 양이온성 지질은 전술한 방법에 의해 합성되는 모든 종류의 이온화 가능한 양이온성 지질을 포함할 수 있다.
- [210] 본 발명의 지질 나노입자의 제조방법에 있어서, 상기 (b) 단계에서 사용되는 헬퍼 지질은 DMPC(1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스파티딜콜린), DOPC(1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린), DOPI(1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포-(1'-미오-이노시톨)), DOPE(1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민), DPPC(1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포콜린), DSPC(1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린), DSPI(1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포이노시톨), 및 DLPC(1,2-디리노레오일-sn-글리세로-3-

포스포콜린)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [211] 본 발명에 있어서, 상기 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 지질은 PEG-수식 포스파티딜에탄올아민, PEG-수식 포스파티드산, PEG-수식 세라마이드, PEG-수식 디알킬아민, PEG-수식 디아실글리세롤, 및 PEG-수식 디알킬글리세롤로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 PEG 지질은 100 Da 내지 20 kDa의 크기를 가지는 PEG 부분을 포함하는 것이 바람직하고, 더욱 바람직하게는 DMG-PEG2000(1,2-dimyristoyl-rac-glycero-3-methoxypolyethylene glycol-2000), DSPE-PEG2000(1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[amino(polyethylene glycol)-2000], 및 Ceramide PEG2000(N-palmitoyl-sphingosine-1-{succinyl[methoxy(polyethylene glycol)2000]})로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [212] 본 발명에 있어서, 상기 이온화 가능한 양이온성 지질, 헬퍼(helper) 지질, 콜레스테롤 및 폴리에틸렌 글리콜 지질의 몰비는 40~60 : 5~15 : 30~45 : 1~3일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [213] 본 발명의 지질 나노입자의 제조방법에 있어서, 상기 (b) 단계에 사용되는 완충액은 아세트산 나트륨 완충액, 시트르산 나트륨 완충액, 인산완충식염수(PBS) 또는 시트르산(citrate) 완충액일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [214] 본 발명의 제6 측면은 다음의 (a) 및 (b) 단계를 포함하는 지질 나노 리포솜의 제조방법에 관한 것이다:
- [215] (a) 전술한 방법으로 이온화 가능한 양이온성 지질, 양이온성 지질, 또는 DOTAP 클로라이드를 합성하는 단계; 및
- [216] (b) 상기 합성된 이온화 가능한 양이온성 지질, 양이온성 지질 또는 DOTAP와 콜레스테롤을 포함하는 용액을 완충액과 혼합하여 지질 나노 리포솜을 형성하는 단계.
- [217] 본 발명의 지질 나노 리포솜의 제조방법에 있어서, 상기 (a) 단계에 대한 설명은 전술한 바와 동일하므로, 그 기재 생략한다.
- [218] 본 발명의 지질 나노 리포솜의 제조방법에 있어서, 상기 (b) 단계에서 사용되는 이온화 가능한 양이온성 지질 또는 양이온성 지질은 전술한 방법에 의해 합성되는 모든 종류의 이온화 가능한 양이온성 지질 또는 양이온성 지질을 포함할 수 있다.
- [219] 본 발명에 있어서, 상기 이온화 가능한 양이온성 지질, 양이온성 지질 또는 DOTAP : 콜레스테롤의 몰비는 25 ~ 75 : 25 ~ 75일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [220] 본 발명의 지질 나노 리포솜의 제조방법에 있어서, 상기 (b) 단계에 사용되는 완충액은 아세트산 나트륨 완충액, Tris 완충액, 인산완충식염수(PBS) 또는 시트르산(citrate) 완충액일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [221] DODAP 및 DOTAP 클로라이드는 리포솜 또는 지질 나노입자 형태를 취하는 생체모방 분자로, 강화된 엔도솜 탈출에 의해 유전적 및 다양한 치료제의 효율적인 전달을 가능하게 한다. 치료제를 캡슐화하는 나노입자의 균일한 크기는 세포와의 상호작용에 의한 전달 측면에서 매우 중요하다. 나노입자 담체의 요구에 따른 제조는 혼합기 종류, 공급 속도 및 조성과 같은 복잡한 변수가 나노침전 공정에 관련되어 있기 때문에 어렵다.
- [222] 본 발명의 구체적인 실시예에서는 보고된 것과 유사한 4가지 유형의 성분, 즉 이온화 가능한 지질, 헬퍼 지질, 콜레스테롤 및 PEG-지질을 사용하여 빈-LNP(empty LNP)를 합성하였다. 리포솜의 경우, 주요 지질에 콜레스테롤만을 첨가하였다. 각각의 최종 지질 용액은 자체 제작 미세 혼합기를 통해 완충액과 빠르게 혼합하고 투석을 포함한 정제 공정 전후에 동적 광산란(DLS)을 사용하여 추가 분석하였다(도 15의 A). 약산성 25mM 아세트산 나트륨 완충액(pH 5.5)은 핵산 캡슐화를 위한 DODAP의 잠재력을 입증하는 데 사용되었으며, 이온 강도가 낮은 10mM Tris 완충액(pH 7.2)은 100nm 미만 크기의 균일한 DOTAP 리포솜을 생성하는 데 중요했다.

발명의 실시를 위한 형태

- [223] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.
- [224] [준비에 1]
- [225] 시약 준비
- [226] 디클로로메탄(DCM), 디메틸 설펍사이드(DMSO), 테트라히드로푸란(THF), 아세토니트릴(ACN), 메탄올(MeOH), 디메틸포름아미드(DMF) 및 무수 에탄올(EtOH)은 Sigma-Aldrich에서 구입하였다. 올레산(99%), 리놀레산(99%), 팔미트산(99%), 스테아르산(99%), 미리스트산(99%), 시트로넬롤, 게라니올, 네롤, 세빅산, 6-브로모헥산-1-올, 2-헥실데칸산, (±)-3-클로로-1,2-프로판디올, 3-(디메틸아미노)-1,2-프로판디올, 옥살릴 클로라이드, 및 트리에틸아민은 Sigma-Aldrich에서 구입하였다. 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린(DSPC), 콜레스테롤(Chol) 및 1,2-디미리스토일-rac-글리세로-3-메톡시폴리에틸렌 글리콜-2000(DMG-PEG 2000)은 Avanti Polar Lipids, Inc.에서 구입하였다.
- [227] [준비에 2]
- [228] 분광학적 동정
- [229] 핵자기공명(NMR) 스펙트럼은 Bruker Avance III(¹H NMR의 경우 500MHz, ¹³C NMR의 경우 125MHz)에서 기록되었다. ¹H 및 ¹³C 화학적 이동은 달리 명시되지 않는 한 CDCl₃에서 표준으로 Me₄Si의 다운필드(ppm)로 기록되었다. 다중도(Multiplicity)는 다음 약어를 사용하여 보고되었다: s = 단일선, d = 2중선, t

= 3중선, q = 4중선, quint = 5중선, sext = 6중선, sept = 7중선, m = 다중선, br = 넓은 공명. 별도의 언급이 없는 한, 모든 시판되는 물질은 추가적인 정제 없이 사용하였다. 인라인 FT-IR 스펙트럼은 ZnSe 윈도우(경로 길이 0.1mm)를 기반으로 하는 밀봉된 유동 셀 액세서리(Specac®)가 장착된 일반적인 FT-IR 분광계(Jasco FT/IR-4600)에서 기록되었다. BRUKER MALDI-TOF(matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight) 질량 분석기를 사용하여 지질의 질량을 확인하였다.

[230] [준비에 3]

[231] 반응기 시스템용 부품

[232] T형 미세 혼합기($\text{\O} = 1.0\text{mm}$)는 Sanko Seiki Co.에서 구입하였다. 고순도 PTFE 튜브($\text{\O} = 0.1\text{ cm}$, IDEX HEALTH & SCIENCE)와 배압 조절기(40, 100, 250 psi, IDEX HEALTH & SCIENCE)는 미세 튜브 반응기로 적절한 길이로 절단하여 사용하였다.

[233] [실시에 1]

[234] **DODAP**의 단일 유동 합성

[235] 1-1. 인라인 FTIR 모니터링을 통한 올레오일 클로라이드의 연속 유동 합성

[236] DODAP(2)는 단일-유동 이온화 가능한 지질 라이브러리 합성을 위한 모분자로 간주되었다. 따라서, 고품질 합성 DODAP(2)를 달성하기 위해 연속 유동 시스템에서 올레오일 클로라이드를 합성하기로 첫 번째로 결정되었다. 상업적으로 이용 가능한 올레오일 클로라이드의 순도는 85%에 불과하다. 유동 화학에서 올레오일 클로라이드 합성 최적화를 위한 실험 셋팅은 도 3에 나타내었다.

[237] 반응은 내경 1.0mm PTFE 튜브로 구성된 유동 시스템에서 최적화되었다. 구체적으로, 유동 시스템은 T자형 미세 혼합기(M1, $\text{\O} = 1.0\text{ mm}$), 미세 튜브 반응기 R1(PTFE 튜브, $\text{\O} = 1.0\text{ mm}$, $L = 225\text{ cm}$) 및 100psi 및 40psi 배압 조절기로 구성된다.

[238] CH_2Cl_2 에 용해된 올레산(0.35M) 및 DMF(0.05M) 용액과 CH_2Cl_2 에 용해된 옥살릴 클로라이드(0.35M) 용액을 HPLC 펌프를 사용하여 T자형 믹서 M1($\text{\O} = 1.0\text{mm}$)을 통해 반응기 R1에 주입하였다. 그런 다음, 용액을 반응기 R1에 연결된 FT-IR 샘플 셀에 통과시켰다. 100psi 배압 조절기는 FTIR 유동 셀의 배출구에 연결되었다. HPLC 펌프를 사용하여 시약의 유속을 변경함으로써 반응기 R1에서의 체류 시간을 변경하였다. 정상 상태(steady state)에 도달한 후, 인라인(in-line) FTIR 모니터링을 사용하여 생성된 용액을 모니터링하였다(도 4).

[239] IR 분광법은 1780 cm^{-1} 에서 특징적인 CO 스트레칭 밴드를 갖는 산 클로라이드의 형성과 올레산의 산 작용기의 1708 cm^{-1} 에서 CO 스트레칭의 소멸을 모니터링하였다. 몇 가지 최적화 후에, 올레오일 클로라이드를 형성하기

위한 각 시약의 유속이 0.6ml/분인 반응기 R1에서 1.5분의 체류 시간 내에
올레산의 완전한 소비가 관찰되었다(도 5).

[240] 1-2. 모세관 반응기에서의 DODAP(2) 단일 유동 합성

[241] 유동 시스템은 T자형 미세 혼합기(M1 & M2, $\text{Ø} = 1.0 \text{ mm}$), 2개의 미세 튜브
반응기 R1(PTFE 튜브, $\text{Ø} = 1.0 \text{ mm}$, $L = 195 \text{ cm}$)과 R2(PTFE 튜브, $\text{Ø} = 1.0 \text{ mm}$),
및 100psi 및 40psi 배압 조절기로 구성된다. FTIR 샘플 셀은 인라인 FTIR
모니터링을 위해 반응기 R2에 연결되었다. CH_2Cl_2 에 용해된 올레산(0.35M)
및 DMF(0.05M) 용액과 CH_2Cl_2 에 용해된 옥살릴 클로라이드(0.35M) 용액을
HPLC 펌프를 사용하여 0.5mL/분 유속으로 M1($\text{Ø} = 1.0 \text{ mm}$)에 주입하여 반응기
R1($\text{Ø} = 1.0 \text{ mm}$)에서 1.5분의 체류 시간을 달성하였다. 생성된 용액을, HCl 및
CO 기체 부산물을 동반하는 올레오일 클로라이드의 합성을 위해 반응기 R1을
통과시켰다. 100psi 배압 조절기는 HCl 및 CO 가스의 가스 방출을 방지하기
위해 R1 끝에 연결되었다. 원치 않는 독성 HCl 및 CO 가스는 배압 조절기의
바깥쪽에 연결하여 맞춤형 T 접합(직경 = 1.6mm)을 사용하여 제거되었다(도 6).
그런 다음, 용액을 HPLC 펌프를 사용하여 혼합기 M2($\text{Ø} = 1.0 \text{ mm}$)에서 CH_2
 Cl_2 에 용해된 3-(디메틸아미노)프로판-1,2-디올(0.15M) 및 염기(0.4M) 용액과
혼합하고 반응기 R2($\text{Ø} = 1.0 \text{ mm}$)를 통과한 다음 FT-IR 샘플 셀을 통과하였다.
40psi 배압 조절기는 FTIR 유동 셀의 배출구에 연결되었다. 반응기 R2의 길이
(254 cm, 570 cm, 760 cm, 1020 cm, 2040 cm 등)를 변경하여 R2에서의 체류 시간을
변경하였다. 정상 상태에 도달한 후, 인라인 FTIR 모니터링을 사용하여 생성된
용액을 모니터링하였다. IR 분광학은 1735 cm^{-1} 에서 에스테르의 특징적인
CO 스트레칭 밴드를 갖는 DODAP(2)의 형성과 올레오일 클로라이드의 산
클로라이드 작용기의 1780 cm^{-1} 에서 CO 스트레칭의 소멸을 모니터링하였다.

[242] R1에서 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 의 인-라인 FTIR을 사용하여 반응을 몇 가지 최적화한 후,
1.5분의 체류 시간에 올레산의 완전한 소비가 발생하여 올레오일 클로라이드를
원활하게 형성하였다. R1에서의 체류 시간 및 온도가 더 증가함에 따라,
올레오일 클로라이드의 CO 스트레칭 피크 강도의 추가 증가는 관찰되지 않았다.
배치(batch) 공정에서는 염소화제로 옥살릴 클로라이드를 사용하여 올레산을
올레오일 클로라이드로 완전히 전환하는 데 3 시간의 반응 시간이 소요되었다.

[243] R1에서 올레오일 클로라이드를 합성한 후, 용해되지 않은 독성 HCl과 CO
가스를 분리하기로 결정하였다. HCl 가스를 분리하지 않으면 2단계에서 과량의
염기가 필요한데, 이는 염기 내 난용성 염산염의 높은 농도로 인해 R2에서
막힘이 발생하는 것으로 나타났다(도 6의 b)). 용액에서 용해되지 않은 HCl 및
CO 가스를 안전하고 효율적으로 제거하는 것은 맞춤형 가스-액체 분리기(T
접합, 직경 $\text{Ø} = 1.6 \text{ mm}$)를 사용하여 성공적으로 달성되었으며, 이는 T-접합의
배출구에서 포화 NaOH 용액을 사용하여 켄칭되었다(도 6의 a)). 끝에서 두
번째 단계에서는 반응기 R2에서 고체 형성이 관찰되지 않았으며, 이는 중력

기반 액체-가스 분리기의 T자형을 통해 용해되지 않은 HCl 가스가 성공적으로 제거되었음을 확인시켜 준다.

[244] 다음으로, R1($\varnothing = 1.0$ mm, L = 195 cm, 각 시약 유속 = 0.5 mL/분)에서 연속적으로 형성된 올레오일 클로라이드를 CH_2Cl_2 에 용해된 3-(디메틸아미노)프로판-1,2-디올(0.15 M) 및 염기인 피리딘(0.4 M)을 포함하는 용액과 혼합기 M2($\varnothing = 1.0$ mm)에서 분당 1.0 mL의 유속으로 혼합하고 반응기 R2($\varnothing = 1.0$ mm)를 통과하여 에스테르화 반응을 발생시켰다. R2에서의 반응은 PTFE 튜브 반응기의 길이를 변경하여 다양한 체류 시간에서 최적화되었다. DODAP(2) 합성 중 에스테르 결합 형성은 인라인 FTIR 분광법을 사용하여 모니터링되었으며, 에스테르기에 대해 1735cm^{-1} 에서 특징적인 CO 스트레칭 밴드가 형성되었다(도 7).

[245] 처음에 25°C 에서 피리딘을 염기로 사용하면 R2에서 8분의 체류 시간 후에도 3-(디메틸아미노)프로판-1,2-디올이 DODAP(2)로의 불완전한 전환이 관찰되었으며, 수율은 50%에 불과하였다. 반응기 R2의 온도를 50°C 로 증가시키면 DODAP(2)의 수율이 크게 향상되지는 않았다. 낮은 수율은 피리딘의 낮은 염기도에 기인한다. 따라서, 다른 염기를 선별하기로 결정하였다(표 1).

[246] [표1]

상기한 염기의 사용에 따른 DODAP(2)의 합성 최적화

염기	R2에서의 온도 ($^\circ\text{C}$)	R2에서의 체 류시간 (분)	수율 (%) ^a
피리딘	25	8	50
	50	8	61
피리딘 + DMAP	25	8	51
	50	8	67
DMAP	25	8	70
	50	8	74
디이소피로 필에틸아민	25	8	67
	50	8	71
트리에틸아민	25	3	94 (92)^b
	50	3	90

[247] a) 수율은 인-라인 RTIR 분석을 이용하여 계산됨.

[248] b) 분리된 수율은 괄호 안에 표시됨.

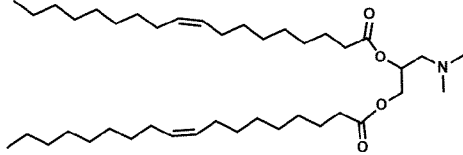
[249] 몇 가지 최적화 후에, 트리에틸아민이 적합한 염기인 것으로 밝혀졌으며, 25°C 의 R2에서 3분의 체류 시간으로 분리된 수율의 92%에 달하는 가장 높은

DODAP(2) 수율을 제공하였다. 배치 공정의 경우, 완전한 변환이 발생하는 데 약 8시간이 걸렸다.

[250] 합성된 최종 산물의 분광학적 동정 결과를 통해 하기 화합물 2의 구조식을 갖는 DODAP가 성공적으로 합성되었음을 확인하였다.

[251] [화합물 2]

[252]



[253] 수율: 92%, 무색의 액체.

[254] $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ = 5.38 - 5.28 (m, 4 H), 5.25 - 5.15 (m, 1 H), 4.33 (dd, J = 3.2, 11.9 Hz, 1 H), 4.05 (dd, J = 6.2, 12.0 Hz, 1 H), 2.61 - 2.52 (m, 1 H), 2.49 - 2.43 (m, 1 H), 2.33 - 2.20 (m, 10 H), 2.04 - 1.95 (m, 8 H), 1.59 (m, 4 H), 1.35 - 1.23 (m, 40 H), 0.87 (t, J = 6.9 Hz, 6 H).

[255] $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ = 173.4, 173.1, 130.0, 130.0, 129.7, 129.7, 68.7, 63.8, 59.0, 45.4, 34.3, 34.1, 31.9, 29.8, 29.7, 29.5, 29.3, 29.22, 29.20, 29.18, 29.11, 29.09, 29.07, 27.20, 27.16, 24.9, 22.7, 14.1.

[256] MALDI-MS: 648.75 m/z

[257] [실시예 2]

[258] 이온화 가능한 양이온 지질 라이브러리의 단일 유동 합성

[259] DODAP(2)의 성공적인 합성을 이용하여 긴 사슬 산(long chain acid)을 변경하여 이온화 가능한 양이온성 지질 라이브러리의 합성을 위한 다양한 경로를 개발하도록 확장되었다(도 8). 지질 라이브러리 개발은 독성을 최소화하면서 치료 성분을 효과적으로 캡슐화하여 표적 부위에 전달할 수 있는 지질을 식별하는 것을 목표로 하는 제약 연구의 중요한 측면이다. 이에 따라, 올레산 대신 리놀레산, 미리스트산, 스테아르산, 팔미트산과 같은 시판되는 지방산을 공합하여 이온화 가능한 양이온 지질 라이브러리를 합성하고자 하였다.

[260] 이온화 가능한 양이온성 지질의 연속 유동 합성을 위한 실험 셋팅은 도 8에 나타내었다. 유동 시스템은 2개의 T자형 미세 혼합기(M1 & M2, $\text{Ø} = 1.0 \text{ mm}$), 2개의 미세 튜브 반응기 R1(PTFE 튜브, $\text{Ø} = 1.0 \text{ mm}$, $L = 195 \text{ cm}$)와 R2(PTFE 튜브, $\text{Ø} = 1.0 \text{ mm}$, $L = 570 \text{ cm}$)로 구성된다. CH_2Cl_2 에 용해된 지방산(0.35M) 및 DMF(0.05M) 용액과 CH_2Cl_2 에 용해된 옥살릴 클로라이드(0.35M) 용액을 HPLC 펌프를 사용하여 0.5mL/분 유속으로 M1($\text{Ø} = 1.0 \text{ mm}$)에 주입하여 반응기 R1에서 1.5분의 체류 시간을 달성하였다. 생성된 용액을 HCl 및 CO 기체 부산물을 동반하는 아실 클로라이드의 합성을 위해 반응기 R1을 통과시켰다. 100 psi 배압 조절기는 HCl 및 CO 가스의 가스 방출을 방지하기 위해 R1 배출구에 연결되었다. 원치 않는 독성 HCl 및 CO 가스는 배압 조절기의 배출구에

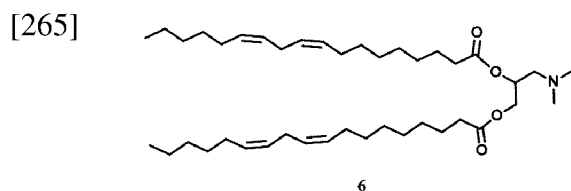
연결하여 맞춤형 T 접합(직경 = 1.6mm)을 사용하여 제거되었다(도 6). 그런 다음, 용액을 HPLC 펌프를 사용하여 혼합기 M2($\varnothing = 1.0\text{mm}$)에서 CH_2Cl_2 에 용해된 알코올(0.15M) 및 트리에틸아민(0.4M) 용액과 혼합하고 반응기 R2($\varnothing = 1.0\text{mm}$, $L = 570\text{cm}$)를 3분의 체류 시간 동안 통과하였다. 정상 상태에 도달한 후, 생성된 용액을 포화 NaHCO_3 수용액으로 킨칭하면서 반응기 R2의 말단에서 5분 동안 수집하였다. 유기층을 분리하고 수용성층을 CH_2Cl_2 로 두 번 추출했습니다. 합한 유기층을 건조 및 증발시키고, 헥산(hexane)에 용해된 30% 에틸 아세테이트를 포함하는 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피를 사용하여 정제하여 순수한 이온화 가능한 양이온성 지질을 얻었다.

[261] 올레산 대신 리놀레산, 미리스트산, 스테아르산, 팔미트산과 같은 시판되는 지방산을 공급함에 따라 동일한 조건에서 해당 이온화 지질(즉, 화합물 6 내지 9)가 만족스러운 수율로 얻어짐을 확인하였다(도 7). 화합물 10에서 15까지의 이온화 가능한 지질의 긴 사슬에 에스테르 또는 이황화물 작용기를 도입하면 인체에 존재하는 에스테라제 및 글루타티온 효소의 작용으로 인해 지질이 더욱 생분해된다. 특히, 지질 11(β -시트로넬롤에서 유래), 12(제라니올에서 유래) 및 13(네롤에서 유래)과 같은 이온화 가능한 지질에 항염증, 항산화, 항암, 항당뇨병, 항진균 활성 등 많은 건강상의 이점을 갖는 모노테르페노이드를 사용한다는 점은 주목할만한 가치가 있다. 또한, 코로나19 백신에 사용되는 이온화 가능한 지질 ALC-0315의 합성을 위한 핵심 중간체인 6-브로모헥실-2-헥실데카노에이트(6-bromohexyl-2-hexyldecanoate)(16)도 2-헥사데칸산과 6-브로모헥산-1-올을 출발 물질로 사용하여 88% 수율로 합성되었다($t_{R1} = 2.5\text{분}$, $t_{R2} = 4\text{분}$, 50°C).

[262] 합성된 최종 산물의 분광학적 동정 결과를 통해 하기 화합물 6 내지 16의 구조식을 갖는 이온화 가능한 양이온 지질 라이브러리가 성공적으로 합성되었음을 확인하였다. 화합물 10 내지 16의 합성은 하기에 상세하게 나타내었다.

[263] [화합물 6]

[264] (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-3-(디메틸아미노)프로판-1,2-디일비스(옥타데카-9,12-디에노에이트) (DLinDAP), 리놀레산을 사용하여 합성됨



[266] 수율: 90%, 무색 액체.

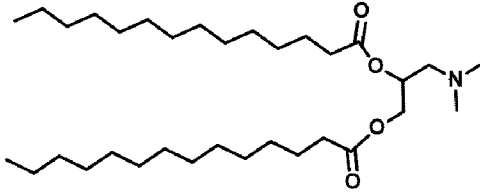
[267] $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) $\delta = 5.43 - 5.30$ (m, 8 H), 4.35 (dd, $J = 3.5, 11.9$ Hz, 1 H), 4.08 (dd, $J = 6.0, 12.0$ Hz, 1 H), 2.77 (t, $J = 6.6$ Hz, 4 H), 2.68 (br. s., 1 H), 2.60 (br. s., 1 H), 2.37 (s, 6 H), 2.36 - 2.29 (m, 4 H), 2.3 (q, $J = 6.9$ Hz, 8 H), 1.65 - 1.60 (m, 4 H), 1.39 - 1.25 (m, 28 H), 0.89 (t, $J = 6.9$ Hz, 6 H).

[268] ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) $\delta = 173.3, 173.1, 130.2, 130.02, 129.97, 128.04, 128.00, 127.89, 127.86, 66.3, 63.7, 58.8, 45.2, 34.3, 34.0, 31.5, 29.6, 29.3, 29.19, 29.17, 29.10, 29.07, 29.05, 27.2, 25.6, 24.9, 24.8, 22.5, 14.0$.

[269] [화합물 7]

[270] 1,2-디미리스토일-3-디메틸암모늄-프로판, 미리스트산을 사용하여 합성됨

[271]



7

[272] 수율: 93%, 무색 액체.

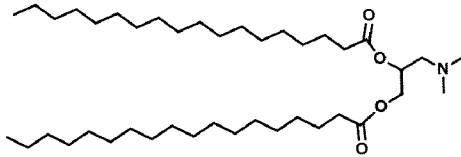
[273] ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) $\delta = 5.20$ (dd, $J = 3.1, 6.5$ Hz, 1 H), 4.36 (dd, $J = 3.2, 11.9$ Hz, 1 H), 4.09 (dd, $J = 6.4, 11.9$ Hz, 1 H), $2.51 - 2.40$ (m, 2 H), 2.31 (dt, $J = 3.4, 7.5$ Hz, 4 H), 2.27 (s, 6 H), $1.65 - 1.58$ (m, 4 H), 1.26 (s, 40 H), 0.89 (t, $J = 6.9$ Hz, 6 H).

[274] ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) $\delta = 173.5, 173.2, 69.2, 63.9, 59.4, 46.0, 34.4, 34.2, 31.9, 29.7, 29.64, 29.62, 29.5, 29.35, 29.29, 29.13, 29.09, 25.0, 24.95, 24.91, 22.7, 14.1$.

[275] [화합물 8]

[276] 1,2-디스테아로일-3-디메틸암모늄-프로판, 스테아르산을 사용하여 합성됨

[277]



8

[278] 수율: 90%, 무색 액체.

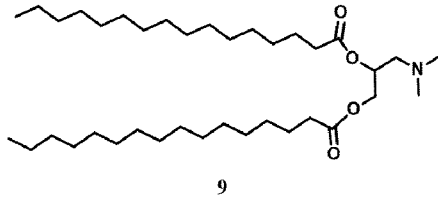
[279] ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) $\delta = 5.20$ (m, 1 H), 4.36 (dd, $J = 3.2, 11.9$ Hz, 1 H), 4.08 (dd, $J = 6.5, 12.0$ Hz, 1 H), $2.50 - 2.38$ (m, 2 H), 2.30 (m, 4 H), 2.26 (s, 6 H), $1.66 - 1.55$ (m, 4 H), $1.29 - 1.23$ (m, 56 H), 0.88 (t, $J = 6.9$ Hz, 6 H).

[280] ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) $\delta = 173.5, 173.2, 69.1, 63.9, 59.3, 45.9, 34.4, 34.1, 31.9, 29.7, 29.5, 29.35, 29.29, 29.12, 29.08, 24.93, 24.89, 22.7, 14.1$.

[281] [화합물 9]

[282] 1,2-디팔미토일-3-디메틸암모늄-프로판, 팔미트산을 사용하여 합성됨

[283]



[284] 수율: 90%, 무색 액체.

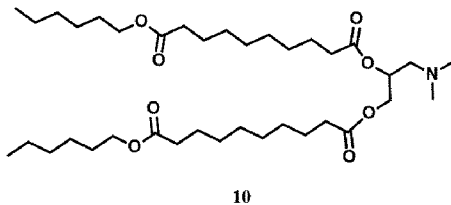
[285] $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ = 5.23 - 5.15 (m, 1 H), 4.36 (dd, J = 3.2, 11.9 Hz, 1 H), 4.08 (dd, J = 6.4, 11.9 Hz, 1 H), 2.51 - 2.36 (m, 2 H), 2.29 (dt, J = 3.4, 7.5 Hz, 4 H), 2.25 (s, 6 H), 1.66 - 1.53 (m, 4 H), 1.31 - 1.18 (m, 44 H), 0.87 (t, J = 6.9 Hz, 6 H).

[286] $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ = 173.4, 173.1, 69.1, 63.9, 59.3, 45.9, 34.4, 34.1, 31.9, 29.66, 29.63, 29.59, 29.5, 29.33, 29.26, 29.1, 29.0, 24.90, 24.87, 22.6, 14.1.

[287] [화합물 10]

[288] O'1,O1-(3-(디메틸아미노)프로판-1,2-디일) 10-디헥실 비스(데칸디오에이트), 10-(헥실옥시)-10-옥소데칸산을 사용하여 합성됨

[289]



[290] 수율: 90%, 무색 오일

[291] $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 5.17 - 5.08 (m, 1H), 4.32-4.02 (m, 1H), 3.99 (t, J = 6.7 Hz, 4H), 2.42 - 2.32 (m, 2H), 2.31 - 2.12 (m, 14H), 1.57 - 1.52 (m, 12H), 1.24 (s, 28H), 0.83 (t, J = 6.9 Hz, 6H).

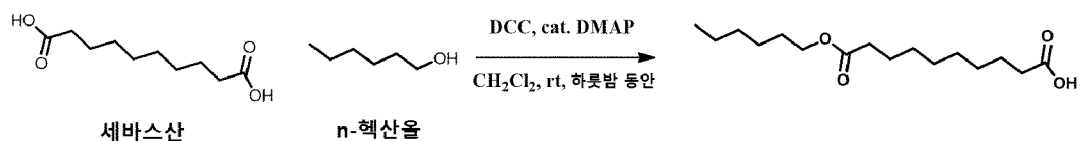
[292] $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ 173.72 (d, J = 3.3 Hz), 173.25, 172.96, 69.19, 64.25, 63.82, 59.31, 45.96, 34.24 (d, J = 2.8 Hz), 34.00, 32.61, 31.34, 30.79, 29.47 - 28.82 (m), 28.54, 26.25, 25.59 - 25.18 (m), 24.78 (dd, J = 15.1, 9.4 Hz), 22.44, 13.89.

[293] MALDI-MS: 656.78 m/z

[294] 화합물 10의 합성 방법은 다음과 같다. 첫 번째로, 하기 반응식 1과 같이 10-(헥실옥시)-10-옥소데칸산이 배치 반응기에서 제조되었다.

[295] [반응식 1]

[296]

[297] CH_2Cl_2 에 용해된 세바스산 2.0g(1.0eq.)의 용액에

디사이클로헥실카르보다이미드(DCC) 2.45g(1.2eq.)을 첨가한 다음, DMAP 120.0mg(0.1eq.) 및 n-헥산올 0.9g(0.9eq.)을 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다. 반응 혼합물을 여과하고, 생성된 여과물을 회전 증발기에서 감압

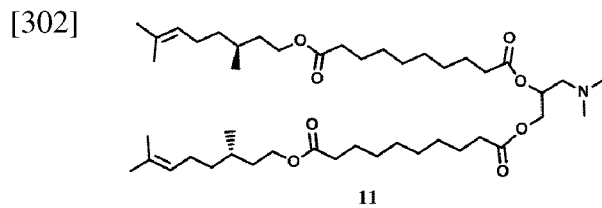
하에 농축시켰다. 얻은 잔류물을 플래쉬 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(*n*-헥산:EtOAc = 50:50)를 이용하여 정제하여 10-(헥실옥시)-10-옥소데칸산 1.56g을 55% 수율로 무색의 고체로 얻었다.

[298] $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ = 7.96 (br. s., 1 H), 4.02 - 3.88 (m, 2 H), 2.32 - 2.12 (m, 4 H), 1.53 (br. s., 6 H), 1.22 (br. s., 14 H), 0.80 (br. s., 3 H)

[299] $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ = 178.4, 173.9, 64.2, 64.1, 34.1, 33.6, 31.2, 28.8, 28.81, 28.77, 28.4, 25.4, 24.7, 24.5, 22.3, 13.7.

[300] [화합물 11]

[301] O'1,O1-(3-(디메틸아미노)프로판-1,2-디일) 10-비스((*S*)-3,7-디메틸옥트-6-엔-1-일) 비스(데칸디오에이트), (*S*)-10-((3,7-디메틸옥트-6-엔-1-일)옥시)-10-옥소데칸산을 사용하여 합성됨



[303] 수율: 92%, 무색 고체.

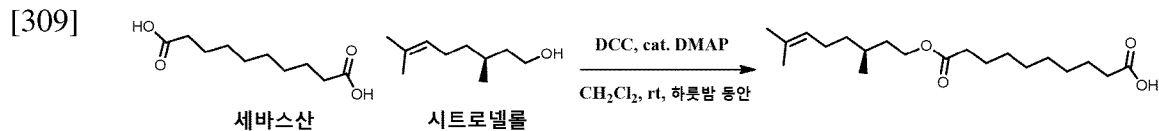
[304] $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 5.10 (dd, J = 31.1, 28.5 Hz, 2H), 4.29 (d, J = 11.8 Hz, 1H), 4.08 - 3.95 (m, 4H), 2.43 - 2.30 (m, 2H), 2.27 - 2.08 (m, 12H), 1.85 (dd, J = 51.6, 43.5 Hz, 6H), 1.59 (d, J = 10.5 Hz, 7H), 1.56 - 1.43 (m, 16H), 1.36 (dd, J = 13.0, 6.4 Hz, 2H), 1.23 (s, 19H), 1.12 (dd, J = 16.0, 10.5 Hz, 4H), 0.84 (d, J = 6.1 Hz, 6H).

[305] $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ 173.74, 173.28, 173.01, 154.09, 131.14, 124.53, 69.13, 63.84, 62.66, 59.28, 45.91, 36.90, 35.42, 34.28, 34.02, 32.65, 30.81, 29.41, 29.12, 29.03, 28.98, 28.93, 26.29, 25.64, 25.47, 25.32, 24.89, 24.82, 24.78, 24.70, 19.36, 17.57.

[306] **MALDI-MS:** 764.88 m/z

[307] 화합물 11의 합성 방법은 다음과 같다. 첫 번째로, 하기 반응식 2와 같이 (*S*)-10-((3,7-디메틸옥트-6-엔-1-일)옥시)-10-옥소데칸산이 배치 반응기에서 제조되었다.

[308] [반응식 2]



[310] CH_2Cl_2 에 용해된 세바스산 2.0g(1.0eq.)의 용액에 DCC 2.45g(1.2eq.)을 첨가한 다음 DMAP 120.0mg(0.1eq.) 및 시트로넬롤 1.4g(0.9eq.)을 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다. 반응 혼합물을 여과하고, 생성된 여과물을 회전 증발기에서 감압 하에 농축시켰다. 얻은 잔류물을 플래쉬 실리카겔 컬럼

크로마토그래피(n-헥산:EtOAc = 50:50)로 정제하여 (S)-10-((3,7-디메틸옥타-6-엔-1-일)옥시)-10-옥소데칸산을 무색 고체로 2.0g(60%) 얻었다.

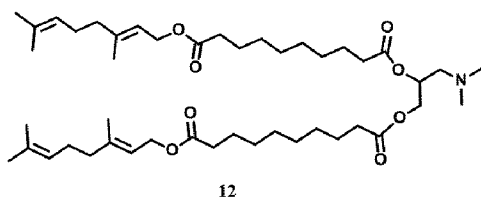
[311] $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ = 5.11 - 5.02 (m, 1 H), 4.18 - 4.02 (m, 2 H), 2.33 (t, J = 7.6 Hz, 2 H), 2.27 (t, J = 7.5 Hz, 2 H), 2.03 - 1.89 (m, 2 H), 1.67 (d, J = 0.6 Hz, 3 H), 1.65 - 1.56 (m, 8 H), 1.56 - 1.49 (m, 1 H), 1.45 - 1.38 (m, 1 H), 1.34 - 1.26 (m, 9 H), 1.21 - 1.13 (m, 1 H), 0.90 (d, J = 6.7 Hz, 3 H).

[312] $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ = 180.0, 173.9, 131.2, 124.5, 62.8, 36.9, 35.4, 34.3, 34.0, 29.4, 29.0, 28.9, 25.6, 25.3, 24.9, 24.6, 19.3, 17.6.

[313] [화합물 12]

[314] O'1,O1-(3-(디메틸아미노)프로판-1,2-디일) 10-비스((E)-3,7-디메틸옥타-2,6-디엔-1-일) 비스(데칸디오에이트), (E)-10-((3,7-디메틸옥타-2,6-디엔-1-일)옥시)-10-옥소데칸산

[315]



[316] 수율: 92%, 무색 고체

[317] $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ = 5.33 (dt, J = 1.1, 7.1 Hz, 2 H), 5.21 - 5.16 (m, 1 H), 5.11 - 5.05 (m, 2 H), 4.58 (d, J = 7.0 Hz, 4 H), 4.35 (dd, J = 3.1, 12.0 Hz, 1 H), 4.08 (dd, J = 6.3, 12.0 Hz, 1 H), 2.48 - 2.38 (m, 2 H), 2.32 - 2.26 (m, 8 H), 2.25 (s, 6 H), 2.13 - 2.01 (m, 8 H), 1.70 (s, 6 H), 1.68 (s, 6 H), 1.60 (s, 14 H), 1.29 (br. s., 16 H).

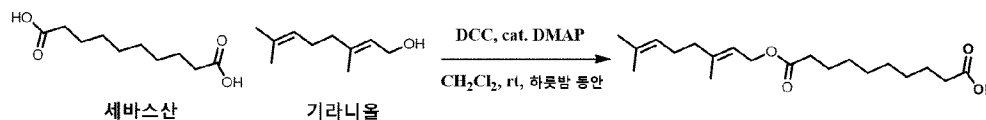
[318] $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ = 173.8, 173.4, 173.1, 142.0, 131.7, 123.7, 118.4, 69.2, 63.9, 61.1, 59.4, 46.0, 39.5, 34.33, 34.30, 34.1, 33.9, 29.1, 29.0, 28.97, 26.3, 25.6, 24.92, 24.86, 24.81, 17.6, 16.4.

[319] **MALDI-MS**: 760.60 m/z

[320] 화합물 12의 합성 방법은 다음과 같다. 첫 번째로, 하기 반응식 3과 같이 (E)-10-((3,7-디메틸옥타-2,6-디엔-1-일)옥시)-10-옥소데칸산이 배치 반응기에서 제조되었다.

[321] [반응식 3]

[322]



[323] CH_2Cl_2 에 용해된 세바스산 2.0g(1.0eq.)의 용액에 DCC 2.45g(1.2eq.)을 첨가한 다음 DMAP 120.0mg(0.1eq.) 및 기라니올 1.4g(0.9eq.)을 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다. 반응 혼합물을 여과하고, 생성된 여과물을 회전 증발기에서 감압 하에 농축시켰다. 얻은 잔류물을 플래시 실리카겔 컬럼

크로마토그래피(n-헥산:EtOAc = 50:50)로 정제하여 (E)-10-((3,7-디메틸옥타-2,6-디엔-1-일)옥시)-10-옥소데칸산 1.9g(58%)을 무색 고체로 얻었다.

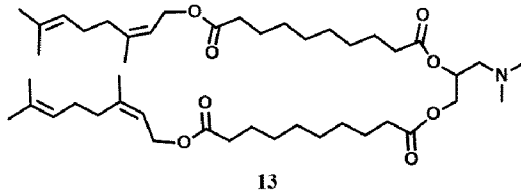
[324] $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ = 5.34 (dt, J = 1.1, 7.1 Hz, 1 H), 5.12 - 5.03 (m, 1 H), 4.59 (d, J = 7.2 Hz, 2 H), 2.34 (t, J = 7.6 Hz, 2 H), 2.30 (t, J = 7.6 Hz, 2 H), 2.14 - 2.07 (m, 2 H), 2.07 - 2.01 (m, 2 H), 1.70 (s, 3 H), 1.68 (s, 3 H), 1.65 - 1.58 (m, 7 H), 1.30 (br. s., 8 H).

[325] $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ = 180.0, 173.9, 142.1, 131.7, 123.7, 118.4, 61.2, 39.5, 34.3, 34.0, 29.0, 28.9, 26.3, 25.6, 24.9, 24.6, 17.6, 16.4.

[326] [화합물 13]

[327] O'1,O1-(3-(디메틸아미노)프로판-1,2-디일) 10-비스((Z)-3,7-디메틸옥타-2,6-디엔-1-일) 비스(데칸디오에이트), (Z)-10-((3,7-디메틸옥타-2,6-디엔-1-일)옥시)-10-옥소데칸산을 사용하여 합성됨

[328]



[329] 수율: 90%, 무색 고체

[330] $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ = 5.34 (t, J = 7.0 Hz, 2 H), 5.18 - 5.16 (m, 1 H), 5.09 - 5.07 (m, 2 H), 4.54 (d, J = 7.2 Hz, 4 H), 4.34 (dd, J = 3.1, 12.0 Hz, 1 H), 4.07 (dd, J = 6.4, 11.9 Hz, 1 H), 2.48 - 2.36 (m, 2 H), 2.31 - 2.26 (m, 8 H), 2.24 (s, 6 H), 2.13 - 2.01 (m, 8 H), 1.75 (s, 6 H), 1.67 (s, 6 H), 1.59 (s, 14 H), 1.28 (br. s., 16 H).

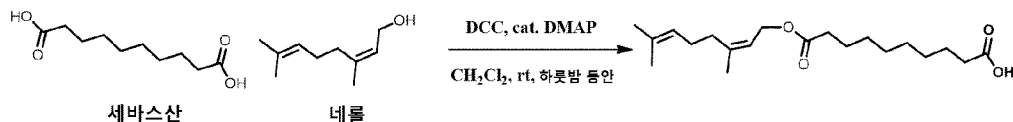
[331] $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ = 173.7, 154.1, 142.3, 139.7, 132.0, 123.5, 119.2, 60.8, 55.7, 49.6, 35.8, 34.8, 34.3, 33.9, 32.7, 32.1, 30.8, 29.1, 29.0, 26.6, 26.3, 25.6, 25.44, 25.38, 25.33, 25.26, 24.9, 24.65, 24.60, 23.4, 17.6.

[332] MALDI-MS: 760.62 m/z

[333] 화합물 13의 합성 방법은 다음과 같다. 첫 번째로, 하기 반응식 4와 같이 (Z)-10-((3,7-디메틸옥타-2,6-디엔-1-일)옥시)-10-옥소데칸산이 배치 반응기에서 제조되었다.

[334] [반응식 4]

[335]



[336] CH_2Cl_2 에 용해된 세바스산 2.0g(1.0eq.)의 용액에 DCC 2.45g(1.2eq.)을 첨가한 다음 DMAP 120.0mg(0.1eq.) 및 네롤 1.4g(0.9eq.)을 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다. 반응 혼합물을 여과하고, 생성된 여과물을 회전 증발기에서 감압 하에 농축시켰다. 얻은 잔류물을 플래쉬 실리카겔 컬럼

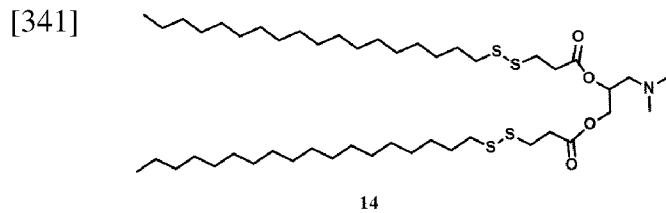
크로마토그래피(n-헥산:EtOAc = 50:50)로 정제하여 (Z)-10-((3,7-디메틸옥타-2,6-디엔-1-일)옥시)-10-옥소데칸산 1.84g(55%)을 무색 고체로 얻었다.

[337] $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ = 5.33 (t, J = 7.2 Hz, 1 H), 5.12 - 5.03 (m, 1 H), 4.54 (d, J = 7.2 Hz, 2 H), 2.32 (t, J = 7.5 Hz, 2 H), 2.27 (t, J = 7.6 Hz, 2 H), 2.11 - 2.03 (m, 4 H), 1.74 (s, 3 H), 1.66 (s, 3 H), 1.62 - 1.57 (m, 7 H), 1.29 (br. s., 8 H).

[338] $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ = 179.8, 173.8, 142.4, 132.0, 123.5, 119.2, 60.9, 34.3, 34.0, 32.1, 28.94, 28.89, 26.6, 25.6, 24.8, 24.6, 23.4, 17.5.

[339] [화합물 14]

[340] 3-(디메틸아미노)프로판-1,2-디일 비스(3-(옥타데실디설파닐)프로파노에이트), 3-(옥타데실디설파닐)프로판산을 사용하여 합성됨



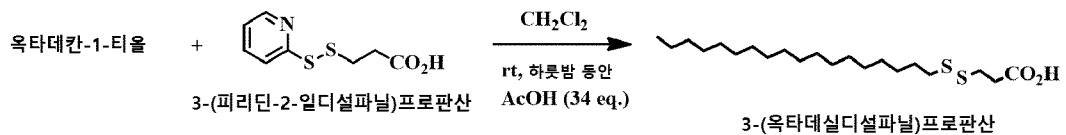
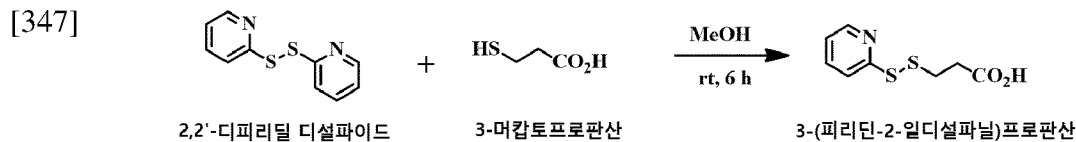
[342] 수율: 88%, 무색 고체

[343] $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ = 5.22 (br. s., 1 H), 4.43 - 4.41 (m, 1 H), 4.16 - 4.13 (m, 1 H), 2.91 (br. s., 4 H), 2.77 (t, J = 6.7 Hz, 4 H), 2.69 (t, J = 6.9 Hz, 4 H), 2.52 - 2.41 (m, 2 H), 2.26 (s, 6 H), 1.73 - 1.61 (m, 4 H), 1.37 (br. s., 4 H), 1.26 (br. s., 56 H), 0.88 (t, J = 6.2 Hz, 6 H).

[344] $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ = 171.5, 171.2, 69.8, 64.2, 59.2, 46.0, 39.05, 39.00, 34.3, 34.0, 33.9, 33.1, 31.9, 29.7, 29.64, 29.59, 29.5, 29.3, 29.23, 29.18, 28.5, 24.9, 22.7, 14.1.

[345] 화합물 14의 합성 방법은 다음과 같다. 첫 번째로, 하기 반응식 5와 같이 3-(옥타데실디설파닐)프로판산이 배치 반응기에서 제조되었다.

[346] [반응식 5]



[348] 메탄올(10 mL)에 용해된 3-머캅토프로판산(1.5 g, 1 eq.) 용액에 2,2'-디피리딜 디설파이드(6.2 g, 2 eq.)를 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 6시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 회전증발기를 이용하여 농축하고, 얻은 잔류물을

플래쉬 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(n-헥산:EtOAc = 70:30)로 정제하여 3-(피리딘-2-일디설파닐)프로판산 2.62g(86%)을 흰색 고체로 얻었다.

[349] $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ = 10.53 (s, 1H), 8.50 (s, 1H), 7.70 (s, 2H), 7.16 (s, 1H), 3.07 (s, 2H), 2.82 (s, 2H). $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, CDCl_3) δ 176.00, 159.36, 149.35, 137.47, 121.16, 120.42, 33.95, 33.65.

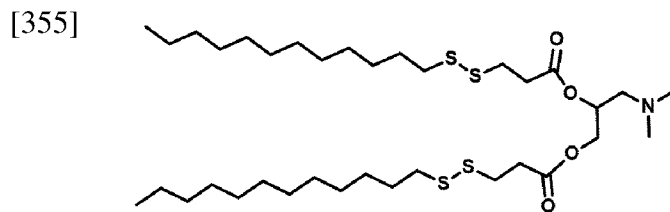
[350] CH_2Cl_2 에 용해된 3-(피리딘-2-일디설파닐)프로판산 1.0g(1.0eq.)의 용액에 1-옥타도다칸티올 1.5g(1.1eq.) 및 AcOH(34eq.)를 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다. 반응 혼합물을 회전증발기를 이용하여 농축하고, 얻은 잔류물을 플래쉬 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(n-헥산:EtOAc = 50:50)로 정제하여 3-(도데실디설파닐)프로판산 1.5g(82%)을 무색 액체로 얻었다.

[351] $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ = 2.95 - 2.89 (m, 2 H), 2.84 - 2.79 (m, 2 H), 2.72 - 2.69 (m, 2 H), 1.72 - 1.64 (m, 2 H), 1.39 - 1.35 (m, 2 H), 1.27 (s, 28 H), 0.89 (t, J = 6.8 Hz, 3 H).

[352] $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ = 177.4, 39.1, 33.9, 32.7, 31.9, 29.69, 29.65, 29.6, 29.5, 29.3, 29.21, 29.18, 28.5, 22.7, 14.1.

[353] [화합물 15]

[354] 3-(디메틸아미노)프로판-1,2-디일 비스(3-(도데실디설파닐)프로판노에이트), 3-(도데실디설파닐)프로판산을 사용하여 합성됨



15

[356] 수율: 92%, 무색 고체.

[357] $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ = 5.23 - 5.19 (dd, J = 2.9, 6.4 Hz, 1 H), 4.42 (dd, J = 2.8, 12.0 Hz, 1 H), 4.14 (dd, J = 6.5, 12.0 Hz, 1 H), 2.94 - 2.85 (m, 4 H), 2.76 (t, J = 7.2 Hz, 4 H), 2.68 (t, J = 6.9 Hz, 4 H), 2.50 - 2.39 (m, 2 H), 2.25 (s, 6 H), 1.70 - 1.62 (m, 4 H), 1.40 - 1.35 (m, 4 H), 1.26 (br. s., 32 H), 0.88 (t, J = 6.9 Hz, 6 H).

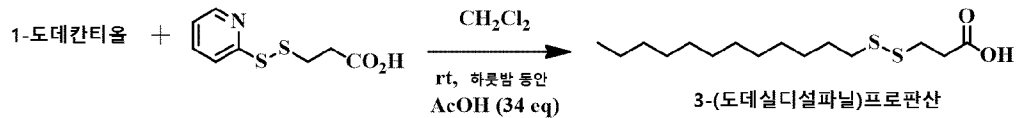
[358] $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ = 171.4, 171.2, 69.7, 64.2, 59.2, 46.0, 39.01, 38.98, 34.2, 34.0, 33.11, 33.00, 31.9, 29.60, 29.58, 29.54, 29.47, 29.3, 29.2, 29.1, 28.5, 22.6, 14.1.

[359] **MALDI-MS**: 696.61 m/z

[360] 화합물 15의 합성 방법은 다음과 같다. 첫 번째로, 하기 반응식 6과 같이 3-(도데실디설파닐)프로판산이 배치 반응기에서 제조되었다.

[361] [반응식 6]

[362]



[363] CH_2Cl_2 에 용해된 3-(피리딘-2-일디설파닐)프로판산 1.0g(1.0eq.)의 용액에 1-도데칸티올 1.0g(1.1eq.) 및 AcOH(34eq.)를 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다. 반응 혼합물을 감압 농축하고, 얻은 잔류물을 플래쉬 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(n-헥산:EtOAc = 50:50)로 정제하여 3-(도데실디설파닐)프로판산 1.1g(80%)을 무색 액체로 얻었다.

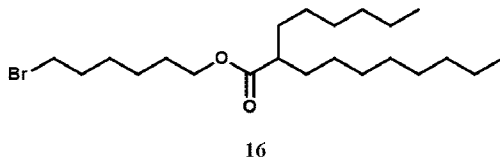
[364] $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ = 2.93 - 2.89 (m, 2 H), 2.84 - 2.79 (m, 2 H), 2.72 - 2.68 (m, 2 H), 1.71 - 1.63 (m, 2 H), 1.42 - 1.34 (m, 2 H), 1.32 - 1.23 (m, 16 H), 0.89 (m, 3 H).

[365] $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ = 177.9, 39.1, 33.9, 32.7, 31.9, 29.61, 29.57, 29.5, 29.3, 29.20, 29.16, 28.5, 22.7, 14.1.

[366] [화합물 16]

[367] 6-브로모헥실 2-헥실테카노에이트, 2-하이드록시데칸산 및 6-브로모헥산올을 사용하여 합성됨

[368]



[369] 수율: 92%, 무색 액체, **R1** = 2.5분, 25 °C, **R2** = 4분, 50 °C

[370] $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ = 4.07 (t, J = 6.6 Hz, 2 H), 3.40 (t, J = 6.8 Hz, 2 H), 2.31 (ddd, J = 3.8, 5.2, 9.0 Hz, 1 H), 1.87 (quin, J = 7.1 Hz, 2 H), 1.68 - 1.53 (m, 4 H), 1.53 - 1.34 (m, 6 H), 1.30 - 1.22 (m, 20 H), 0.88 (t, J = 6.8 Hz, 6 H).

[371] $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ = 176.7, 63.8, 45.8, 33.6, 32.6, 32.5, 31.8, 31.7, 29.5, 29.4, 29.23, 29.20, 28.5, 27.8, 27.5, 27.4, 25.2, 22.64, 22.57, 14.1, 14.0.

[372] [실시예 3]

[373] **DODAP**의 확장 가능한 단일 유동 합성을 위한 크기 증가 방법

[374] 튜빙 크기 증가 방법을 사용하여 생산성 향상을 위해, 내경이 1.6mm로 더 큰 PTFE 튜빙 반응기를 사용하여 별도의 실험을 수행하였다. 1.6mm PTFE 튜브 반응기를 사용하는 DODAP의 연속 유동 합성을 위한 실험 셋팅은 도 9에 나타내었다. 유동 시스템은 2개의 T자형 미세 혼합기(M1 & M2, Ø = 1.0 mm), 2개의 미세 튜브 반응기 R1(PTFE 튜브, Ø = 1.6 mm, L = 225 cm)과 R2(PTFE 튜브, Ø = 1.6mm, L = 900cm)로 구성된다.

[375] CH_2Cl_2 에 용해된 올레산(0.5M) 및 DMF(0.05M) 용액과 CH_2Cl_2 에 용해된 옥살릴 클로라이드(0.5M) 용액을 HPLC 펌프를 사용하여 1.5mL/분의 유속으로 M1(Ø = 1.0mm)에 주입하여 반응기 R1에서 1.5분의 체류 시간을 달성하였다. 생성된

용액을, HCl 및 CO 기체 부산물을 동반하는 올레오일 클로라이드의 합성을 위해 반응기 R1에 통과시켰다. 250psi 배압 조절기는 R1 배출구에 연결되었다. HCl 및 CO 가스는 배압 조절기의 바깥쪽에 연결하여 맞춤형 T 접합(직경 $\varnothing = 1.6\text{mm}$)(도 6의 a))을 사용하여 제거되었다. 이 용액을 CH_2Cl_2 에 용해된 3-(디메틸아미노)프로판-1,2-디올(0.22 M) 및 염기(0.6 M)의 용액을 HPLC 펌프를 사용하여 1.5 mL/분의 유속으로 믹서 M2($\varnothing = 1.0\text{ mm}$)에서 혼합하였다. 정상 상태에 도달한 후, 생성된 용액을 포화 NaHCO_3 수용액으로 퀀칭하면서 반응기 R2의 말단에서 5분 동안 수집하였다. 유기층을 분리하고 수용성층을 CH_2Cl_2 로 두 번 추출하였다. 합한 유기층을 건조 및 증발시키고, 헥산에 용해된 30% 에틸 아세테이트를 포함하는 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 사용하여 정제하여 순수한 DODAP 2(0.9g)를 85% 수율로 무색 액체로 생성하였다.

[376] [실시에 4]

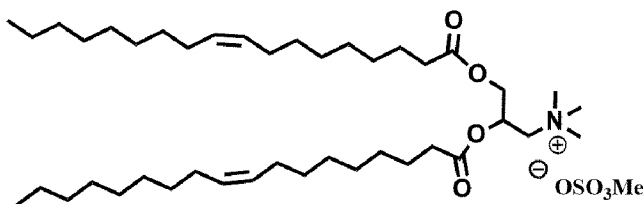
[377] **DOTAP 메틸 설페이트의 연속 유동 합성**

[378] DODAP(2)에서 시작하는 DOTAP 메틸 설페이트(4)의 유동 합성을 위한 실험 셋팅은 도 10에 나타내었다. 유동 시스템은 하나의 T자형 미세 혼합기(M1, $\varnothing = 1.0\text{ mm}$), 미세 튜브 반응기 R1(PTFE 튜브, $\varnothing = 1.0\text{mm}$, $L = 510\text{cm}$) 및 100psi 배압 조절기로 구성된다. CH_2Cl_2 에 용해된 DODAP(0.2M) 및 디메틸 설페이트(2.0M) 용액을 별도로 제조하고 HPLC 펌프를 사용하여 미세 혼합기 M1($\varnothing = 1.0\text{mm}$)에 주입하였다. 다음으로, 생성된 용액을 DOTAP 메틸 설페이트의 합성을 위해 반응기 R1에 통과시켰다. 100psi 배압 조절기는 R1 배출구에 연결되었다. HPLC 펌프를 사용하여 반응물의 유속을 변경함으로써 다양한 체류 시간에서 박층 크로마토그래피를 사용하여 R1에서 반응을 모니터링하였다. 몇 가지 최적화 후에, DODAP(2)가 DOTAP 메틸 설페이트(4)로의 완전한 전환이 다음의 조건에서 달성되었다: 각 반응물의 유속 0.40 mL/분, 60°C, R1에서 5.0분의 체류 시간. 정상 상태에 도달한 후, 생성된 용액을 반응기 R1의 끝에서 5분 동안 수집하였다. 유기 용액을 회전 증발기에서 증발시켜 DOTAP 메틸 설페이트(4)를 얻었고, 이를 아세톤에서 결정화를 사용하여 정제하여 투명 결정질 화합물로서 90% 수율(0.27g)로 생성하였다.

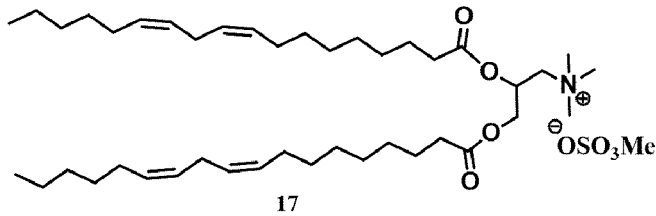
[379] 합성된 최종 산물의 분광학적 동정 결과를 통해 하기 화합물 4의 구조식을 갖는 DOTAP 메틸 설페이트가 성공적으로 합성되었음을 확인하였다.

[380] [화합물 4]

[381]



- [382] ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ = 5.59 (br. s., 1 H), 5.41 - 5.29 (m, 4 H), 4.50 (dd, J = 3.5, 12.2 Hz, 1 H), 4.10 - 4.07 (m, 2 H), 3.75 - 3.73 (m, 1 H), 3.71 (s, 3 H), 3.35 (m, 9 H), 2.37 - 2.30 (m, 4 H), 2.06 - 1.96 (m, 8 H), 1.65 - 1.55 (m, 4 H), 1.35 - 1.22 (m, 40 H).
- [383] ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ = 173.1, 172.7, 130.0, 130.0, 129.6, 129.6, 65.9, 65.8, 63.1, 54.4, 54.1, 34.1, 33.8, 31.9, 29.73, 29.71, 29.69, 29.5, 29.3, 29.22, 29.17, 29.13, 29.09, 29.07, 29.05, 27.20, 27.16, 27.1, 24.7, 24.6, 22.6, 14.1.
- [384] **MALDI-MS:** 662.77 m/z.
- [385] [실시예 5]
- [386] **DOTAP** 메틸 설페이트의 확장 가능한 단일 유동 합성을 위한 크기 증가 방법
- [387] DODAP(2)에서 시작하는 DOTAP 메틸 설페이트(4)의 유동 합성을 위한 실험 셋팅을 도 11에 나타내었다. 유동 시스템은 T자형 미세 혼합기(M1, Ø = 1.0mm) 1개, 미세 튜브 반응기 R1(PTFE 튜브, Ø = 1.6mm, L = 500cm) 및 250psi 배압 조절기로 구성된다. CH_2Cl_2 에 용해된 DODAP(0.2M) 및 디메틸 설페이트(2.0M) 용액을 별도로 제조하고, 각각 1.0mL/분의 유속으로 HPLC 펌프를 사용하여 미세 혼합기 M1(Ø = 1.0mm)에 주입하였다. 이어서, 생성된 용액을 DOTAP 메틸 설페이트의 합성을 위해 반응기 R1에 통과시켰다. 250psi 배압 조절기는 R1 배출구에 연결되었다. 정상 상태에 도달한 후, 생성된 용액을 반응기 R1의 끝에서 5분 동안 수집하였다. 유기 용액을 회전 증발기에서 증발시켜 DOTAP 메틸 설페이트(4)를 얻었고, 이를 아세톤에서의 결정화를 사용하여 정제하여 투명 결정질 화합물로서 86% 수율(0.67g)을 얻었다.
- [388] [실시예 6]
- [389] 양이온 지질 라이브러리의 연속 유동 합성
- [390] 개발된 유동 경로는 유사한 생산성을 갖는 널리 사용되는 또 다른 양이온 지질인 DLinTAP(17)의 합성을 위해 확장되었다. 또한, 각각 효소적으로 절단 가능한 에스테르 결합과 이황화 결합을 포함하는 추가의 새로운 양이온성 지질(즉, 화합물 18 내지 22)도 개발된 유동 조건을 사용하여 합성하였다(도 12).
- [391] DOTAP 메틸 설페이트(4)의 합성과 동일한 조건 하에서, 각각의 이온화 가능한 지질로부터 시작하는 양이온성 지질(화합물 17 내지 22)의 라이브러리를 제조하였다.
- [392] 합성된 최종 산물의 분광학적 동정 결과를 통해 하기 화합물 17 내지 22의 구조식을 갖는 양이온 지질 라이브러리가 성공적으로 합성되었음을 확인하였다.
- [393] [화합물 17]
- [394] N,N,N-트리메틸-2,3-비스((9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디에노일옥시)프로판-1-아미늄 메틸 설페이트(DLinDAP)
- [395]



[396] 수율: 88%, 무색 고체

[397] $^1\text{H NMR}$ (500MHz, CDCl_3) δ = 5.58 (br. s., 1 H), 5.43 - 5.27 (m, 8 H), 4.48 (dd, J = 3.3, 12.1 Hz, 1 H), 4.11 - 4.01 (m, 2 H), 3.75 - 3.71 (m, 1 H), 3.70 (s, 3 H), 3.33 (s, 9 H), 2.76 (t, J = 6.6 Hz, 4 H), 2.37 - 2.29 (m, 4 H), 2.04 (q, J = 6.9 Hz, 8 H), 1.66 - 1.55 (m, 4 H), 1.36 - 1.27 (m, 28 H), 0.88 (t, J = 6.8 Hz, 6 H).

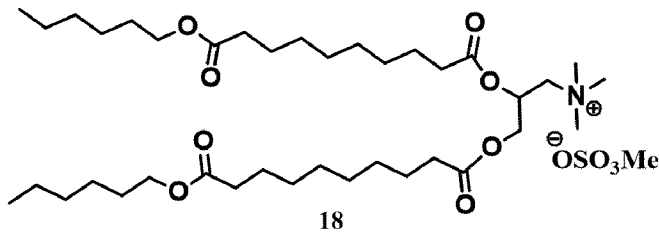
[398] $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ = 173.1, 172.7, 130.2, 129.92, 129.89, 128.1, 128.0, 127.8, 65.9, 65.8, 63.1, 54.5, 54.1, 34.1, 33.8, 31.5, 29.60, 29.58, 29.3, 29.20, 29.16, 29.12, 29.08, 29.06, 29.03, 27.2, 25.6, 24.7, 24.6, 22.5, 14.0.

[399] **MALDI-MS**: 658.80 m/z.

[400] [화합물 18]

[401] 2,3-비스((10-(헥실옥시)-10-옥소데카노일)옥시)-N,N,N-트리메틸프로판-1-아미늄 메틸 설페이트

[402]



[403] 수율: 88%, 무색 고체

[404] $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ = 5.56 (br. s., 1 H), 4.46 (dd, J = 2.7, 12.1 Hz, 1 H), 4.08 - 3.96 (m, 6 H), 3.74 - 3.69 (m, 1 H), 3.67 (s, 3 H), 3.30 (s, 9 H), 2.34 - 2.23 (m, 8 H), 1.58 - 1.1.56 (m, 12 H), 1.33 - 1.24 (m, 28 H), 0.86 (t, J = 6.5 Hz, 6 H).

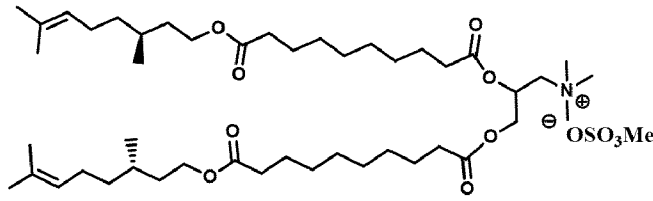
[405] $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ = 173.8, 173.0, 172.6, 65.9, 65.7, 64.3, 63.1, 54.4, 54.0, 34.24, 34.22, 34.0, 33.7, 31.3, 29.0, 28.97, 28.96, 28.94, 28.92, 28.5, 25.5, 24.9, 24.8, 24.6, 24.5, 22.4, 13.9.

[406] **MALDI-MS**: 670.49 m/z.

[407] [화합물 19]

[408] 2,3-비스((10-(((S)-3,7-디메틸옥트-6-엔-1-일)옥시)-10-옥소데카노일)옥시)-N,N,N-트리메틸프로판-1-아미늄 메틸 설페이트

[409]



19

[410] 수율: 88%, 무색 고체

[411] $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ = 5.60 - 5.52 (m, 1 H), 5.07 - 5.04 (m, 2 H), 4.46 (dd, J = 3.4, 12.1 Hz, 1 H), 4.14 - 3.99 (m, 6 H), 3.75 - 3.69 (m, 1 H), 3.67 (s, 3 H), 2.35 - 2.22 (m, 8 H), 2.03 - 1.87 (m, 4 H), 1.65 (s, 6 H), 1.62 - 1.55 (m, 14 H), 1.55 - 1.47 (m, 3 H), 1.44 - 1.37 (m, 2 H), 1.36 - 1.23 (m, 19 H), 1.20 - 1.11 (m, 2 H), 0.89 (s, 3 H), 0.88 (s, 3 H).

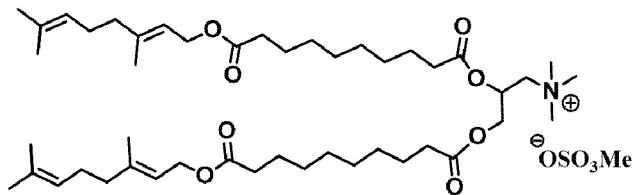
[412] $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ = 173.8, 173.0, 172.6, 131.2, 124.5, 65.8, 65.7, 63.1, 62.7, 54.4, 54.0, 36.9, 35.4, 34.2, 34.0, 33.7, 29.4, 29.0, 28.98, 28.96, 28.92, 25.6, 25.3, 24.84, 24.83, 24.6, 24.4, 19.3, 17.5.

[413] **MALDI-MS**: 778.89 m/z.

[414] [화합물 20]

[415] 2,3-비스((10-(((E)-3,7-디메틸옥타-2,6-디엔-1-일)옥시)-10-옥소테카노일)옥시)-N,N,N-트리메틸프로판-1-아미늄 메틸 설페이트

[416]



20

[417] 수율: 90%, 무색 고체

[418] $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ = 5.57 (br. s., 1 H), 5.37 - 5.28 (m, 3 H), 5.07 (t, J = 6.3 Hz, 2 H), 4.57 (d, J = 7.0 Hz, 4 H), 4.48 (dd, J = 3.4, 12.2 Hz, 1 H), 4.10 - 4.00 (m, 2 H), 3.75 - 3.70 (m, 1 H), 3.69 (s, 3 H), 3.32 (s, 9 H), 2.38 - 2.25 (m, 8 H), 2.13 - 1.99 (m, 8 H), 1.69 (s, 6 H), 1.67 (s, 6 H), 1.59 (s, 14 H), 1.28 (br. s., 16 H).

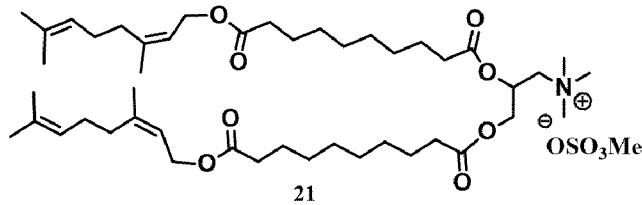
[419] $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ = 173.8, 173.1, 172.6, 142.0, 131.7, 123.7, 118.3, 65.9, 65.8, 63.1, 61.1, 54.5, 54.1, 39.5, 34.3, 34.1, 33.7, 29.04, 29.02, 28.98, 28.95, 26.2, 25.6, 24.88, 24.86, 24.6, 24.5, 17.6, 16.4.

[420] **MALDI-MS**: 774.59 m/z.

[421] [화합물 21]

[422] 2,3-비스((10-(((Z)-3,7-디메틸옥타-2,6-디엔-1-일)옥소)-10-옥소테카노일)옥시)-N,N,N-트리메틸프로판-1-아미늄 메틸 설페이트

[423]



[424] 수율: 90%, 무색 고체

[425] $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ = 5.63 - 5.51 (m, 1 H), 5.33 (t, J = 7.1 Hz, 2 H), 5.08 (t, J = 6.2 Hz, 2 H), 4.54 (d, J = 7.3 Hz, 4 H), 4.48 (dd, J = 3.5, 12.2 Hz, 1 H), 4.10 - 4.03 (m, 2 H), 3.76 - 3.70 (m, 1 H), 3.69 (s, 3 H), 3.33 (s, 9 H), 2.36 - 2.24 (m, 8 H), 2.15 - 2.02 (m, 8 H), 1.79 (m, 6 H), 1.67 (s, 7 H), 1.59 (s, 14 H), 1.28 (br. s., 16 H).

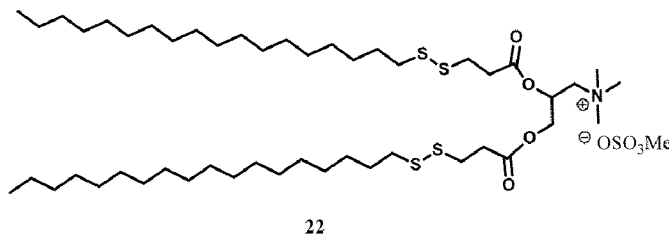
[426] $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ = 173.72, 173.70, 173.0, 172.6, 142.4, 132.0, 123.5, 119.2, 65.9, 65.8, 63.1, 60.8, 54.4, 54.1, 34.27, 34.25, 34.0, 33.7, 32.1, 29.03, 29.00, 28.97, 28.94, 26.6, 25.6, 24.9, 24.8, 24.6, 24.5, 23.4, 17.6.

[427] **MALDI-MS**: 774.79 m/z.

[428] [화합물 22]

[429] N,N,N-트리메틸-2,3-비스((3-(옥타데실디설파닐)프로파노일)옥시)프로판-1-아미늄 메틸 설페이트

[430]



[431] 수율: 90% 무색 고체

[432] $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ = 5.66 - 5.59 (m, 1 H), 4.60 (dd, J = 3.4, 12.3 Hz, 1 H), 4.23 - 4.13 (m, 2 H), 3.81 (dd, J = 9.1, 14.3 Hz, 1 H), 3.72 (s, 3 H), 3.35 (s, 9 H), 2.95 - 2.88 (m, 4 H), 2.88 - 2.79 (m, 4 H), 2.73 - 2.65 (m, 4 H), 1.67 (dd, J = 5.2, 6.9 Hz, 4 H), 1.38 (br. s., 4 H), 1.26 (s, 56 H), 0.88 (t, J = 6.8 Hz, 6 H).

[433] $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ = 171.3, 171.0, 66.7, 65.6, 63.2, 54.5, 54.4, 38.9, 38.7, 33.9, 33.6, 32.9, 32.4, 31.9, 29.7, 29.6, 29.5, 29.35, 29.26, 29.21, 29.15, 28.58, 28.55, 22.7, 14.1.

[434] **MALDI-MS**: 878.92 m/z.

[435] [실시예 7]

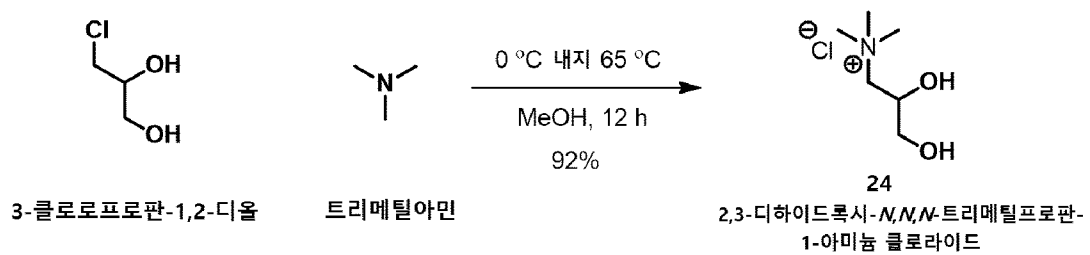
[436] **DOTAP** 클로라이드의 연속 유동 합성

[437] 7-1. 2,3-디하이드록시-N,N,N-트리메틸프로판-1-아미늄 클로라이드의 배치 합성

[438] 2,3-디하이드록시-N,N,N-트리메틸프로판-1-아미늄 클로라이드를 하기 반응식 7과 같이 배치에서 합성하였다.

[439] [반응식 7]

[440]

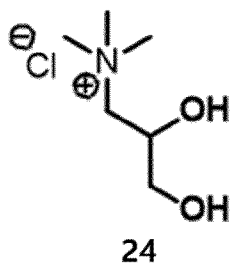


[441] 농축기(condenser), 자석 교반기 및 적하 깔때기(dropping funnel)가 장착된 2구 250ml 둥근 바닥 플라스크에 트리메틸아민(190mmol)의 에탄올 용액과 메탄올 30ml를 첨가하였다. 불활성 가스 환경에서 플라스크를 닫고 얼음 배스(bath)에서 내용물을 0 °C로 냉각하였다. 반응 플라스크에 3-클로로프로판-1,2-디올(126.5mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 65~68 °C에서 10시간 동안 교반하고 용매를 증발시켰다. 반응이 완료된 후, 유기 용매를 회전 증발기에서 증발시키고, 생성된 미가공 물질(crude)을 디에틸 에테르(50 mL)로 5회, 아세톤(50 mL)으로 7회 세척하고, 생성된 고체를 진공 하에 건조시켜 2,3-디하이드록시-N,N,N-트리메틸프로판-1-아미늄 클로라이드(24)를 92% 수율로 투명한 결정질 고체로 얻었다.

[442] 합성된 최종 산물의 분광학적 동정 결과를 통해 하기 화합물 24의 구조식을 갖는 2,3-디하이드록시-N,N,N-트리메틸프로판-1-아미늄 클로라이드가 성공적으로 합성되었음을 확인하였다.

[443] [화합물 24]

[444]



[445] $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ = 5.71 (d, J = 5.5 Hz, 1 H), 5.16 (t, J = 5.7 Hz, 1 H), 4.04 (br. s., 1 H), 3.47 (d, J = 13.4 Hz, 1 H), 3.43 - 3.39 (m, 1 H), 3.29 (dd, J = 9.6, 13.4 Hz, 1 H), 3.26 - 3.20 (m, 1 H), 3.17 - 3.12 (s, 9 H).

[446] 7-2. DOTAP 클로라이드의 연속 유동 합성

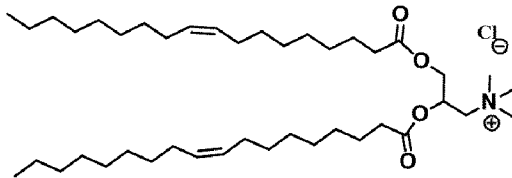
[447] DOTAP 클로라이드(5)의 유동 합성을 위한 실험 셋팅은 도 13에 나타내었다. 유동 시스템은 T자형 미세 혼합기(M1, Ø = 1.0mm), 미세 튜브 반응기 R1(PTFE 튜브, Ø = 1.0mm, L = 640cm)로 구성된다. DMSO에 용해된 올레산(0.65M), 2,3-디하이드록시-N,N,N-트리메틸프로판-1-아미늄 클로라이드(23)(0.3M) 및 DMAP(0.3M) 용액을 DMSO에 주사기 펌프를 사용하여 미세 혼합기 M1 (Ø = 1.0 mm)을 통해 DMSO에 용해된 EDC.HCl(0.65 M) 용액과 혼합하고 반응기 R1에 통과시켰다. 40psi 배압 조절기는 R1 배출구에 연결되었다. 주사기

펌프를 사용하여 반응물의 유속을 변경함으로써 다양한 체류 시간에서 박층 크로마토그래피를 사용하여 R1에서 반응을 모니터링하였다. 몇 가지 최적화 후에, 2,3-디하이드록시-N,N,N-트리메틸프로판-1-아미늄 클로라이드(23)에서 DOTAP 클로라이드(5)로의 완전한 전환이 다음과 같은 조건에서 관찰됨을 확인하였다: 70°C, R1에서 5분의 체류 시간. 정상 상태에 도달한 후, 생성된 용액을 반응기 R1의 끝에서 5분 동안 수집하였다. 용액을 1 N HCl(10.0 mL)을 사용하여 천천히 퀘칭하였고, 생성된 수용성층을 디클로로메탄(50.0 mL X 3)을 사용하여 3회 세척하였다. 합한 유기층을 Na₂SO₄로 건조시키고, 여과한 다음 회전 증발기에서 농축하여 미가공 물질을 얻었고, 이는 -20 °C의 이소프로판올 및 아세톤 용매 시스템에서 결정화를 사용하여 정제하여 무정형 분말로 DOTAP 클로라이드(5)를 생성하였다. 대안적으로, 미가공 DOTAP 클로라이드(5)를 CH₂Cl₂ 용매 시스템에 용해된 30% MeOH를 포함하는 플래시 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 사용하여 정제하여 DOTAP 클로라이드(5)(0.45g)를 88% 수율로 얻었다.

[448] 합성된 최종 산물의 분광학적 동정 결과를 통해 하기 화합물 5의 구조식을 갖는 DOTAP 클로라이드가 성공적으로 합성되었음을 확인하였다.

[449] [화합물 5]

[450]



[451] ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ = 5.58 (br. s., 1 H), 5.31 (br. s., 4 H), 4.59 - 4.46 (m, 2 H), 4.11 - 4.02 (m, 1 H), 3.81 - 3.70 (m, 1 H), 3.50 (s, 12 H), 2.35 - 2.22 (m, 4 H), 1.97 (br. s., 8 H), 1.56 (br. s., 4 H), 1.26 - 1.23 (m, 40 H), 0.88 - 0.83 (m, 6 H).

[452] ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ = 173.0, 172.6, 130.0, 129.9, 129.6, 129.5, 65.8, 65.8, 63.1, 54.2, 34.1, 33.8, 31.8, 29.7, 29.64, 29.61, 29.4, 29.23, 29.21, 29.14, 29.08, 29.06, 29.00, 28.97, 27.13, 27.09, 27.07, 24.7, 24.5, 22.6, 14.0.

[453] MALDI-MS: 662.76 m/z

[454] [실시예 8]

[455] DOTAP 클로라이드의 확장 가능한 단일 유동 합성을 위한 크기 증가 방법

[456] 크기 증가 방법을 이용한 DOTAP 클로라이드(5)의 유동 합성을 위한 실험 셋팅을 도 14에 나타내었다. 유동 시스템은 하나의 T자형 미세 혼합기(M1, Ø = 1.0mm), 미세 튜브 반응기 R1(PTFE 튜브, Ø = 1.6mm, L = 500cm) 및 100psi 배압 조절기로 구성된다. DMSO에 용해된 올레산(0.65M), 2,3-디하이드록시-N,N,N-트리메틸프로판-1-아미늄 클로라이드(23)(0.3M) 및 DMAP(0.3M) 용액을 HPLC 펌프를 사용하여 각 1.0 ml/분의 유속으로 미세 혼합기 M1 (Ø = 1.0 mm)을 사용하여 DMSO에 용해된 EDC.HCl 용액(0.65 M)과 혼합하였다. 100psi 배압

조절기는 R1 배출구에 연결되었다. 정상 상태에 도달한 후, 생성된 용액을 반응기 R1의 말단에서 5분 동안 수집하였다. 용액을 1.0 N HCl(20.0 mL)을 사용하여 천천히 켄칭하고, 생성된 수용성층을 디클로로메탄(50.0 mL X 3)을 사용하여 3회 세척하였다. 합한 유기층을 Na₂SO₄로 건조시키고, 여과한 다음 회전 증발기에서 농축하여 미가공 물질을 얻었고, 이를 CH₂Cl₂ 용매 시스템에 용해된 30% MeOH를 포함하는 플래시 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 사용하여 정제하여 82% 수율로 DOTAP 클로라이드(5)(0.84g)을 얻었다.

[457] [실시에 9]

[458] 나노입자 담체의 전구체로서 합성된 지질의 평가

[459] 9-1. 자체 제작 미세 혼합기의 설계 및 제작

[460] 리포솜 또는 지질나노입자의 합성을 위해, 3D 프린팅을 이용하여 자체 제작한 미세 혼합기를 제작하였다. 믹서는 반구형 배플로 구성되어 주입된 유체 간의 빠른 혼합이 가능하다. 누수 없는 정확한 주입을 위해, 각 주입구와 배출구를 5mm 나사산(1/16"의 경우 1/4-28 평평한 바닥)으로 수정하여 XP-235(DEX Health & Science) 피팅과 연결이 가능하도록 하였다. CAD(Computer Aided Design)를 통해 제작된 가상 모델은 DLP 기반 3D 프린터(Pico 2 HD, Asiga)를 사용하여 상용 레진(PlasCLEAR)으로 제작되었으며, 광경화를 통해 각 층을 적층하고 이소프로판올을 사용하여 레진을 제거하였다. 마지막으로, 세척된 장치는 완전한 중합을 위해 UV 챔버에서 후경화되었다.

[461] 9-2. 지질 기반 나노입자의 제조 및 특성화

[462] 지질 기반 나노입자는 지질 용액과 완충액을 빠르게 혼합하여 생성되었다. 각 지질 용액은 총 농도 10mg/mL로 고정되었다. LNP 제제의 경우, DODAP/DSPC/Chol/DMG-PEG 2000을 에탄올에 50/10/38.5/1.5의 몰비로 용해시켰다. 3M 아세트산 나트륨 용액을 탈이온수로 희석하여 25mM의 농도를 달성하였다. 100mM 아세트산 용액을 사용하여 아세트산 나트륨 용액의 pH를 5.5로 조정하였다. 리포솜의 경우, DODAP(DOTAP)와 콜레스테롤을 동일한 총 농도와 50:50의 몰비로 용해시켰다. 25 mM 아세트산 나트륨 완충액(pH 5.5) 및 10 mM Tris 완충액(pH 7.2)을 각각 이온화 가능한 리포솜과 양이온성 리포솜에 대한 반응매로 사용하였다. 주입하기 전에, 지질 용액과 완충액을 0.22µm 주사기 필터에 통과시켰다. 용액을 주사기 펌프를 사용하여 미세 혼합기를 통해 혼합하였다. LNP 및 리포솜 샘플을 투석 주머니(MWCO 12,000 Da, Sigma-Aldrich)를 사용하여 완충액(DODAP의 경우 10mM PBS, pH 7.4; DOTAP의 경우 10mM Tris 완충액, pH 7.2)의 1,000배에 대해 밤새 투석하여 잔류 에탄올을 제거하였다. 합성된 나노입자의 강도에 따른 크기 분포를 확인하기 위해 Zetasizer Nano ZS 장비(Malvern Instruments, Ltd.)를 사용하여 DLS 분석을 수행하였다.

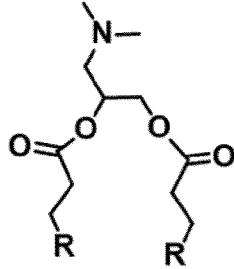
[463] 생산 후, DODAP LNP 및 리포솜은 평균 크기가 64 nm 및 72 nm였으며, 다분산 지수(PDI)는 각각 0.07 및 0.05였다(도 15의 B, C 및 도 16의 A 및 B). 서로 다른

반대 이온을 갖는 DOTAP 리포솜의 경우, 두 경우 모두 약 55nm의 크기와 0.08의 PDI가 생성되었다(도 15의 D, E 및 도 16의 C, D). 매우 균일한 나노입자의 생성, 특히 서로 다른 반대 이온을 갖는 양이온성 리포솜의 동일한 특성은 부분적으로 각 주요 지질 성분의 높은 순도에 기인한다. 투석을 통해 정제한 후, DODAP LNP와 리포솜은 PDI가 각각 0.12와 0.10인 40nm와 45nm로 크기가 감소한 반면, DOTAP 리포솜은 PDI가 0.11인 약 39nm의 크기에 도달했다(도 15의 B 내지 E 및 도 16의 A 내지 D). 모든 경우에, 평균 입자 크기가 감소하고 입자 분포가 약간 넓어지는 것이 관찰되었다. 이 시점에서, 에탄올과의 공존으로 인해 막 융합이 발생한 반면, 에탄올을 제거하면 안정성이 향상되었다는 점은 주목할 가치가 있다. 유동 합성된 DODAP 및 DOTAP 지질은 약 50nm 정도의 크기와 약 0.10 정도의 PDI를 나타냈다. 이는 정제 후에도 자가 조립 후 효과적인 약물 전달 가능성을 보여준다. 특히, 100 nm 미만의 나노입자 담체는 혈액 순환을 연장하고 효과적인 엔도솜 탈출을 가능하게 하며, 좁은 크기 분포는 원하지 않는 기관에 축적되는 것을 방지하여 최적의 치료 전달을 촉진한다.

- [464] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.
- [465] 1, 2: 미세유체장치 100: 제1 미세 혼합기
- [466] 110: 제1 유로 120: 제2 유로
- [467] 200: 제1 반응기 300: 제1 배압 조절기
- [468] 400: T자형 액체-가스 분리기 410: 제1 공급유로
- [469] 420: 제1 배출유로 430: 제2 공급유로
- [470] 500: 제2 미세 혼합기 510: 제3 유로
- [471] 600: 제2 반응기 700: 제2 배압 조절기
- [472] 800: 제1 분광계 900: 제2 분광계
- [473] 본 특허출원은 2024년도 대한민국 정부(다부처)의 재원으로 한국연구재단의 지원(1711180482, 지능형 미세유체 기반 정밀의약 합성공정 및 응용연구)을 받아 수행된 연구이다.

청구범위

- [청구항 1] (a) R-(CH₂)₂C(=O)OH, 디메틸포름아미드 및 옥살릴 클로라이드를 혼합 및 반응시켜 R-C(=O)Cl을 형성하는 단계; 및
 (b) R-C(=O)Cl을 3-(디메틸아미노)프로판-1,2-디올 및 염기성 화합물과 혼합하여 에스테르화 반응을 일으켜 화학식 1의 구조를 갖는 이온화 가능한 양이온성 지질을 생성하는 단계;를 포함하며,
 [화학식 1]



상기 R은 비치환된 C₁₀ 내지 C₂₀의 포화 또는 불포화 지방족 탄화수소 라디칼이거나, 또는 -C(=O)O- 또는 -S-S-가 사슬에 도입된 C₁₀ 내지 C₂₀의 포화 또는 불포화 지방족 탄화수소 라디칼인, 이온화 가능한 양이온성 지질의 합성 방법.

- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 (a) 단계 후에 HCl 및 CO 가스를 분리하는 단계를 추가로 포함하는, 이온화 가능한 양이온성 지질의 합성 방법.

- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 합성 방법은 단일 연속 유동 공정을 위한 미세유체장치에서 수행되고,
 상기 미세유체장치는
 제1 유로와 제2 유로가 유체적으로 연결되는 제1 미세 혼합기;
 상기 제1 미세 혼합기와 유체적으로 연결되는 제1 반응기;
 상기 제1 반응기와 유체적으로 연결되는 제1 배압 조절기;
 상기 제1 배압 조절기와 유체적으로 연결되어 용액과 가스를 분리하는 T자형 액체-가스 분리기;
 상기 T자형 액체-가스 분리기와 제3 유로가 유체적으로 연결되는 제2 미세 혼합기;
 상기 제2 미세 혼합기와 유체적으로 연결되는 제2 반응기; 및
 상기 제2 반응기와 유체적으로 연결되는 제2 배압 조절기를 포함하는, 이온화 가능한 양이온성 지질의 합성 방법.

- [청구항 4] 제3항에 있어서, 상기 T자형 액체-가스 분리기는 상기 제1 배압 조절기와 유체적으로 연결되는 제1 공급유로, 분리된 가스가 배출되는 제1 배출유로 및 분리된 용액이 상기 제2 미세 혼합기에 공급되도록 상기 제2 미세 혼합기에 유체적으로 연결되는 제2 공급유로를 포함하는, 이온화 가능한 양이온성 지질의 합성 방법.

- [청구항 5] 제3항에 있어서, 상기 제1 유로에 R-(CH₂)₂C(=O)OH 및 디메틸포름아미드, 상기 제2 유로에 옥살릴 클로라이드가 주입되고, 상기 제1 반응기에서 R-C(=O)Cl이 생성되고, 상기 T자형 액체-가스 분리기를 통해 HCl 및 CO 가스가 분리되고, 상기 제3 유로에 3-(디메틸아미노)프로판-1,2-디올 및 염기성 화합물이 주입되고, 상기 제2 반응기에서 상기 화학식 1의 구조를 갖는 이온화 가능한 양이온성 지질이 생성되는, 이온화 가능한 양이온성 지질의 합성 방법.
- [청구항 6] 제3항에 있어서, 상기 제1 반응기에서의 체류 시간은 1 내지 2분이고, 상기 제2 반응기에서의 체류 시간은 2 내지 10분이고, 상기 제2 반응기에서의 반응 온도는 20 내지 60 °C인, 이온화 가능한 양이온성 지질의 합성 방법.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 염기성 화합물은 피리딘, 피리딘과 DMAP의 혼합, DMAP, 디이소프로필에틸아민 및 트리에틸아민으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인, 이온화 가능한 양이온성 지질의 합성 방법.
- [청구항 8] 제1항에 있어서, 상기 (a) 단계의 R-(CH₂)₂C(=O)OH는 올레산, 리놀레산, 미리스트산, 스테아르산, 팔미트산, 10-(헥실옥시)-10-옥소데칸산, (S)-10-((3,7-디메틸옥트-6-엔-1-일)옥시)-10-옥소데칸산, (E)-10-((3,7-디메틸옥타-2,6-디엔-1-일)옥시)-10-옥소데칸산, (Z)-10-((3,7-디메틸옥타-2,6-디엔-1-일)옥시)-10-옥소데칸산, 3-(옥타데실디설파닐)프로판산, 및 3-(도데실디설파닐)프로판산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 지방산인, 이온화 가능한 양이온성 지질의 합성 방법.
- [청구항 9] 제1항에 있어서, 상기 화학식 1의 구조를 갖는 이온화 가능한 양이온성 지질은 다음의 (1) 내지 (11) 중 어느 하나인, 이온화 가능한 양이온성 지질의 합성 방법:
- (1) 1,2-디올레오일-3-디메틸암모늄-프로판;
 - (2) (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-3-(디메틸아미노)프로판-1,2-디일비스(옥타데카-9,12-디에노에이트);
 - (3) 1,2-디미리스토일-3-디메틸암모늄-프로판;
 - (4) 1,2-디스테아로일-3-디메틸암모늄-프로판;
 - (5) 1,2-디팔미토일-3-디메틸암모늄-프로판;
 - (6) O'1,O1-(3-(디메틸아미노)프로판-1,2-디일) 10-디헥실 비스(데칸디오에이트);
 - (7) O'1,O1-(3-(디메틸아미노)프로판-1,2-디일) 10-비스((S)-3,7-디메틸옥트-6-엔-1-일) 비스(데칸디오에이트);
 - (8) O'1,O1-(3-(디메틸아미노)프로판-1,2-디일) 10-비스((E)-3,7-디메틸옥타-2,6-디엔-1-일) 비스(데칸디오에이트);

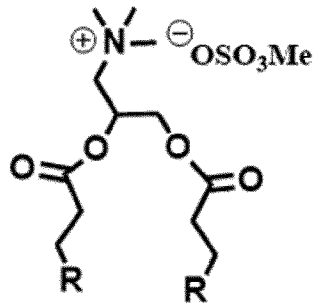
(9) O'1,O1-(3-(디메틸아미노)프로판-1,2-디일) 10-비스((Z)-3,7-디메틸옥타-2,6-디엔-1-일) 비스(테칸디오에이트);

(10) 3-(디메틸아미노)프로판-1,2-디일 비스(3-(옥타데실디설펜)프로파노에이트); 및

(11) 3-(디메틸아미노)프로판-1,2-디일 비스(3-(도데실디설펜)프로파노에이트).

[청구항 10] (a) 2-하이드록시테칸산, 디메틸포름아미드 및 옥살릴 클로라이드를 혼합 및 반응시켜 2-하이드록실테카노일 클로라이드를 형성하는 단계; 및
(b) 2-하이드록실테카노일 클로라이드를 3-(디메틸아미노)프로판-1,2-디올 및 6-브로모헥산올과 혼합하여 에스테르화 반응을 일으켜 6-브로모헥실 2-헥실테카노에이트를 생성하는 단계;를 포함하는, 이온화 가능한 양이온성 지질인 6-((2-헥실테카노일)옥시)-N-(6-((2-헥실테카노일)옥시)헥실)-N-(4-하이드록시부틸)헥산-1-아미늄의 중간체인 6-브로모헥실 2-헥실테카노에이트의 합성 방법.

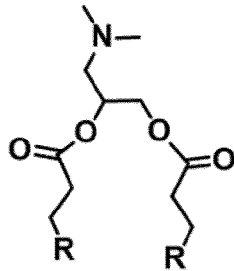
[청구항 11] 제1항의 합성 방법에 의해 합성된 이온화 가능한 양이온성 지질과 디메틸 설펜에이트를 혼합 및 반응시켜 화학식 2의 구조를 갖는 양이온성 지질 메틸 설펜에이트를 생성하는 단계를 포함하며,
[화학식 2]



상기 R은 비치환된 C10 내지 C20의 포화 또는 불포화 지방족 탄화수소 라디칼이거나, 또는 -C(=O)O- 또는 -S-S-가 사슬에 도입된 C10 내지 C20의 포화 또는 불포화 지방족 탄화수소 라디칼인, 양이온성 지질 메틸 설펜에이트의 합성 방법.

[청구항 12] 제11항에 있어서, 상기 합성 방법은 단일 연속 유동 공정을 위한 미세유체장치에서 수행되고,
상기 미세유체장치는
제1 유로와 제2 유로가 유체적으로 연결되는 제1 미세 혼합기;
상기 제1 미세 혼합기와 유체적으로 연결되는 제1 반응기; 및
상기 제1 반응기와 유체적으로 연결되는 제1 배압 조절기를 포함하는, 양이온성 지질 메틸 설펜에이트의 합성 방법.

- [청구항 13] 제12항에 있어서, 상기 제1 유로에 화학식 1의 구조를 갖는 이온화 가능한 양이온성 지질, 상기 제2 유로에 디메틸 설페이트를 주입하고,
[화학식 1]



여기서, 상기 R은 비치환된 C10 내지 C20의 포화 또는 불포화 지방족 탄화수소 라디칼이거나, 또는 -C(=O)O- 또는 -S-S-가 사슬에 도입된 C10 내지 C20의 포화 또는 불포화 지방족 탄화수소 라디칼이고, 상기 제1 반응기에서 상기 화학식 2의 구조를 갖는 양이온성 지질 메틸 설페이트가 생성되는, 양이온성 지질의 합성 방법.

- [청구항 14] 제13항에 있어서, 상기 화학식 1의 구조를 갖는 이온화 가능한 양이온성 지질 및 상기 디메틸 설페이트는 0.4 내지 2.0ml/분의 유속으로 주입되고, 상기 제1 반응기에서의 반응 온도는 40 내지 70°C이고, 상기 제1 반응기에서의 체류 시간은 3 내지 7분인, 양이온성 지질 메틸 설페이트의 합성 방법.

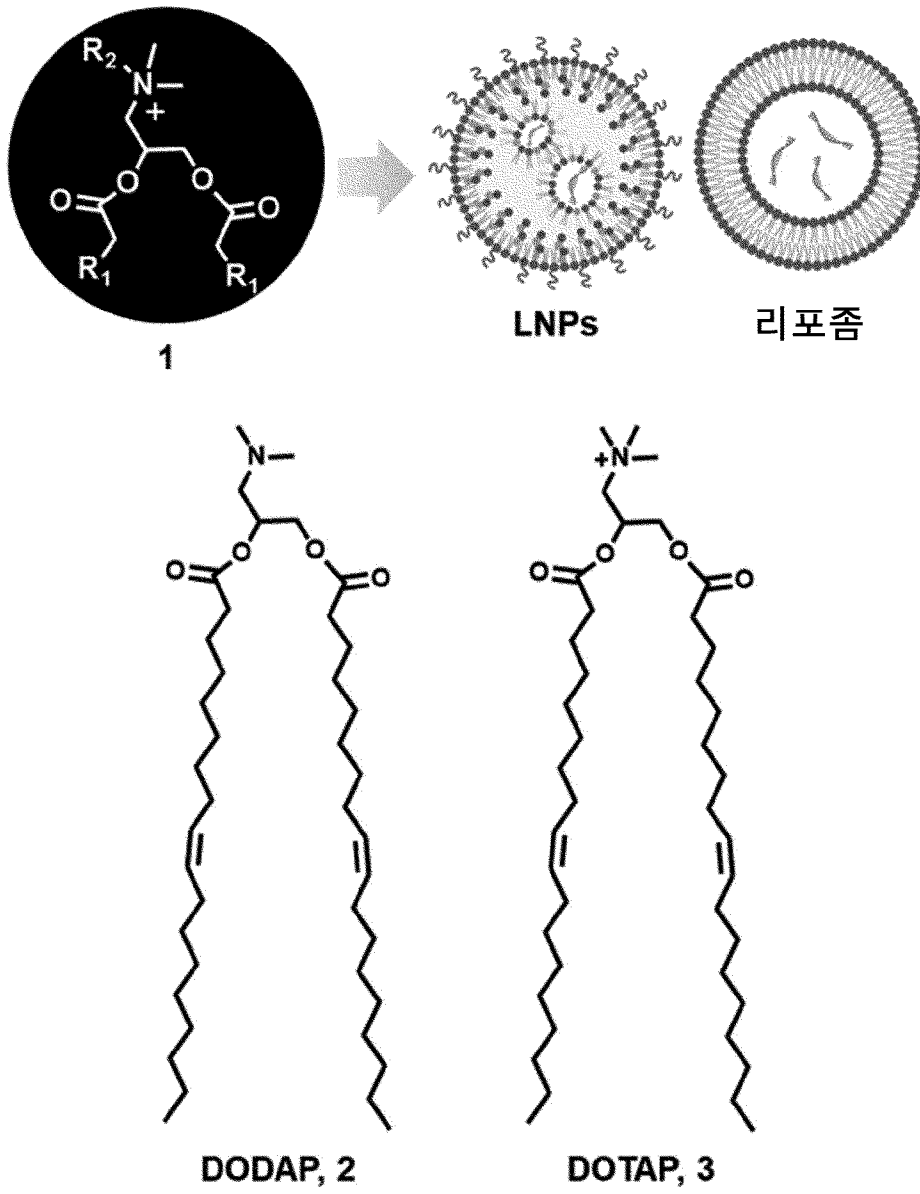
- [청구항 15] 제11항에 있어서, 상기 화학식 2의 구조를 갖는 양이온성 지질 메틸 설페이트는 다음의 (1) 내지 (7) 중 선택되는 어느 하나인, 양이온성 지질 메틸 설페이트의 합성 방법:

- (1) 1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄-프로판 메틸 설페이트;
- (2) N,N,N-트리메틸-2,3-비스((9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디에노일옥시)프로판-1-아미늄 메틸 설페이트;
- (3) 2,3-비스((10-(헥실옥시)-10-옥소데카노일)옥시)-N,N,N-트리메틸프로판-1-아미늄 메틸 설페이트;
- (4) 2,3-비스((10-((S)-3,7-디메틸옥트-6-엔-1-일)옥시)-10-옥소데카노일)옥시)-N,N,N-트리메틸프로판-1-아미늄 메틸 설페이트;
- (5) 2,3-비스((10-((E)-3,7-디메틸옥타-2,6-디엔-1-일)옥시)-10-옥소데카노일)옥시)-N,N,N-트리메틸프로판-1-아미늄 메틸 설페이트;
- (6) 2,3-비스((10-((Z)-3,7-디메틸옥타-2,6-디엔-1-일)옥소)-10-옥소데카노일)옥시)-N,N,N-트리메틸프로판-1-아미늄 메틸 설페이트; 및
- (7) N,N,N-트리메틸-2,3-비스((3-(옥타데실디설파닐)프로파노일)옥시)프로판-1-아미늄 메틸 설페이트.

- [청구항 16] 제11항에 있어서, 용매 증발 및 재결정화 단계를 추가로 포함하는, 양이온성 지질 메틸 설페이트의 합성 방법.

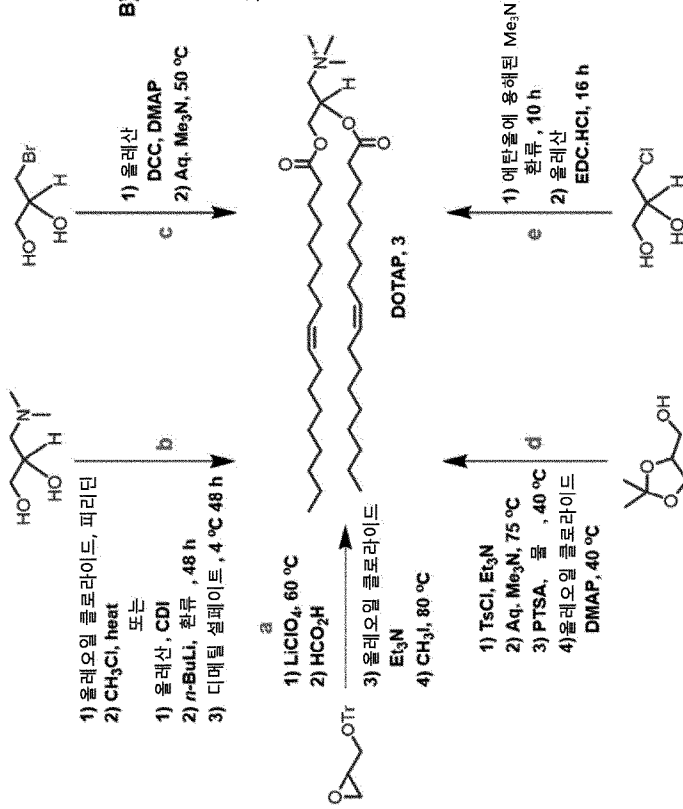
- [청구항 17] 제11항에 있어서, 상기 재결정화는 아세톤 용매에서 수행되는, 양이온성 지질 메틸 설페이트의 합성 방법.
- [청구항 18] 올레산, 2,3-디하이드록시-N,N,N-트리메틸프로판-1-아미늄 클로라이드 및 DMAP의 혼합물과 (3-디메틸아미노-프로필)-에틸-카르보다이미드 클로라이드를 혼합 및 반응시켜 스테글리치(Steglich) 에스테르화 반응을 일으켜 양이온성 지질 1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄-프로판(DOTAP) 클로라이드를 생성하는 단계를 포함하는, 양이온성 지질 1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄-프로판(DOTAP) 클로라이드의 합성 방법.
- [청구항 19] 제18항에 있어서, 상기 합성 방법은 단일 연속 유동 공정을 위한 미세유체장치에서 수행되며,
상기 미세유체장치는
제1 유로와 제2 유로가 유체적으로 연결되는 제1 미세 혼합기;
상기 제1 미세 혼합기와 유체적으로 연결되는 제1 반응기; 및
상기 제1 반응기와 유체적으로 연결되는 제1 배압 조절기를 포함하는,
양이온성 지질 DOTAP 클로라이드의 합성 방법.
- [청구항 20] 제19항에 있어서, 상기 제1 반응기에서의 반응 온도는 60 내지 80°C이고,
상기 제1 반응기에서의 체류 시간은 3 내지 7분인, 양이온성 지질 DOTAP 클로라이드의 합성 방법.
- [청구항 21] 제18항에 있어서, 용매 증발 및 재결정화 단계를 추가로 포함하는,
양이온성 지질 DOTAP 클로라이드의 합성 방법.
- [청구항 22] 제21항에 있어서, 상기 재결정화는 이소프로판올 및 아세톤 용매에서 수행되는, 양이온성 지질 DOTAP 클로라이드의 합성 방법.
- [청구항 23] (a) 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 방법으로 이온화 가능한 양이온성 지질을 합성하는 단계; 및
(b) 상기 합성된 이온화 가능한 양이온성 지질, 헬퍼(helper) 지질, 콜레스테롤 및 폴리에틸렌 글리콘 지질을 포함하는 용액을 완충액과 혼합하여 지질 나노입자를 형성하는 단계;를 포함하는 지질 나노입자의 제조방법.
- [청구항 24] 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 방법으로 이온화 가능한 양이온성 지질을 합성하거나, 제11항 내지 제17항 중 어느 한 항에 따른 방법으로 양이온성 지질 메틸 설페이트를 합성하거나, 또는 제18항 내지 제22항의 방법으로 DOTAP 클로라이드를 합성하는 단계; 및
(b) 상기 합성된 이온화 가능한 양이온성 지질, 양이온성 지질 메틸 설페이트 또는 DOTAP 클로라이드와 콜레스테롤을 포함하는 용액을 완충액과 혼합하여 지질 나노 리포솜을 형성하는 단계;를 포함하는 지질 나노 리포솜의 제조방법.

[도1]

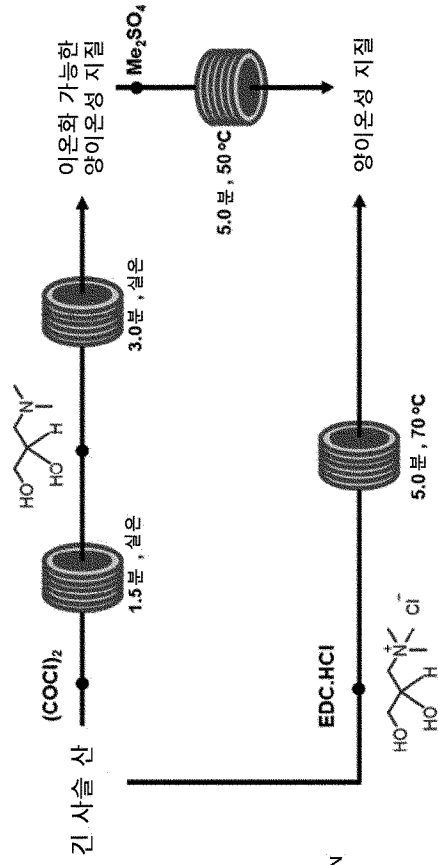


[도2]

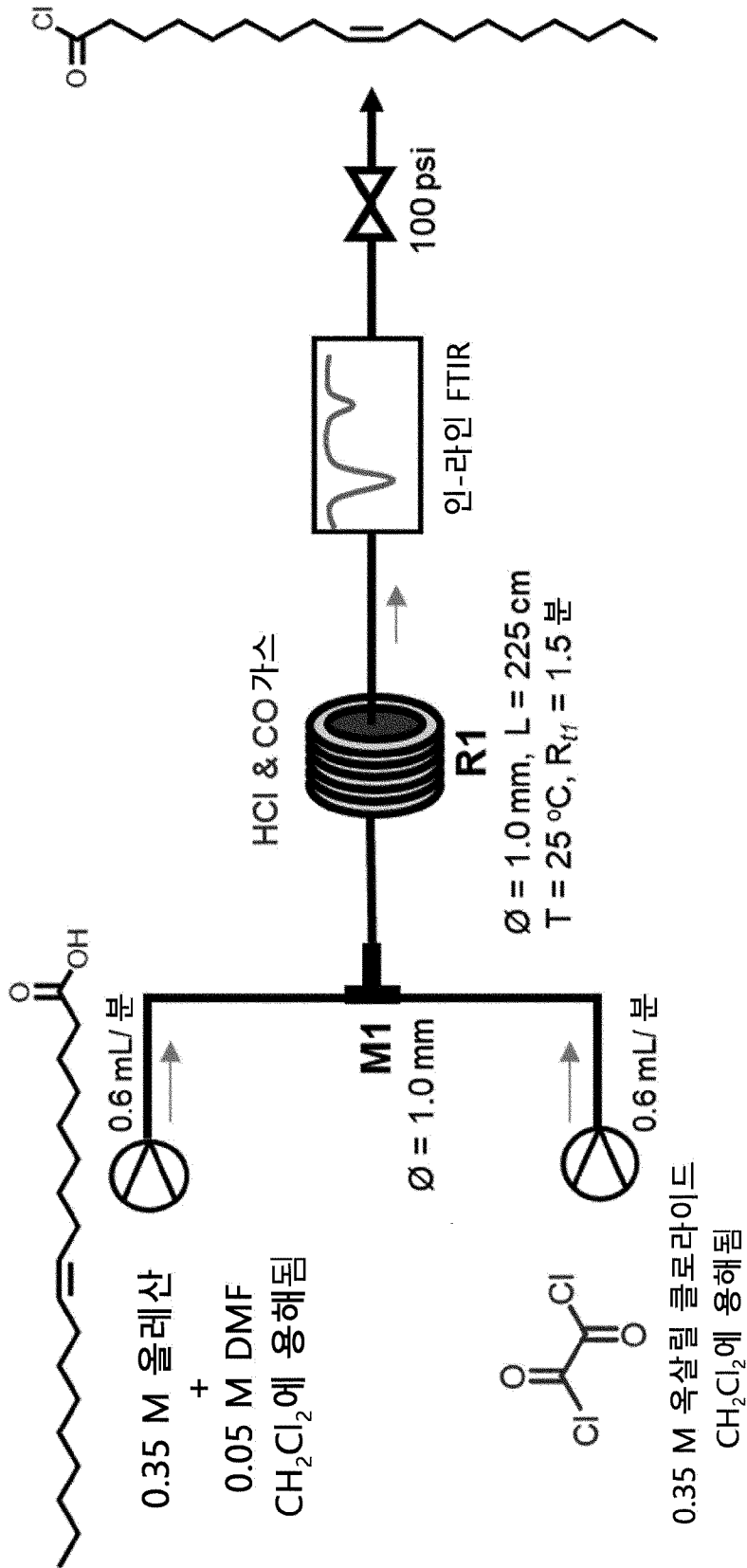
A)이전 문헌



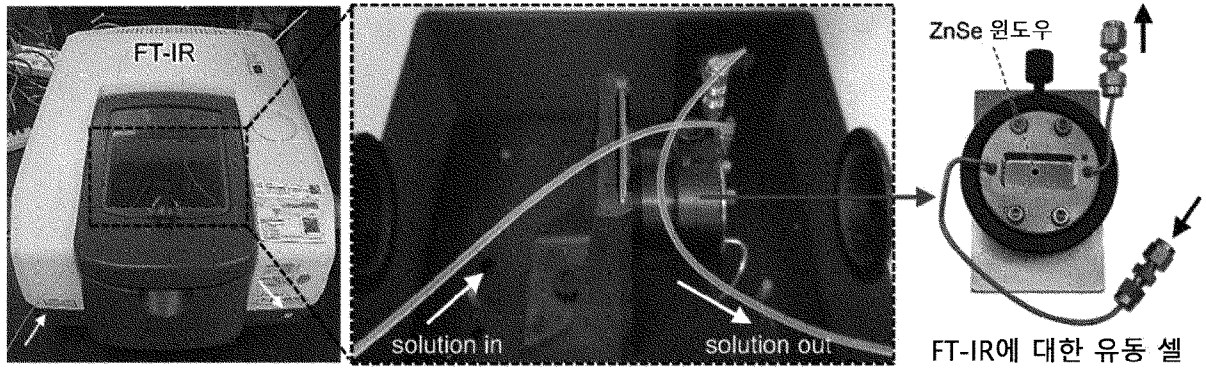
B) 현재 연구: 유전자 치료제에 사용되는 이온화 가능한 양이온성 지질의 유동 합성



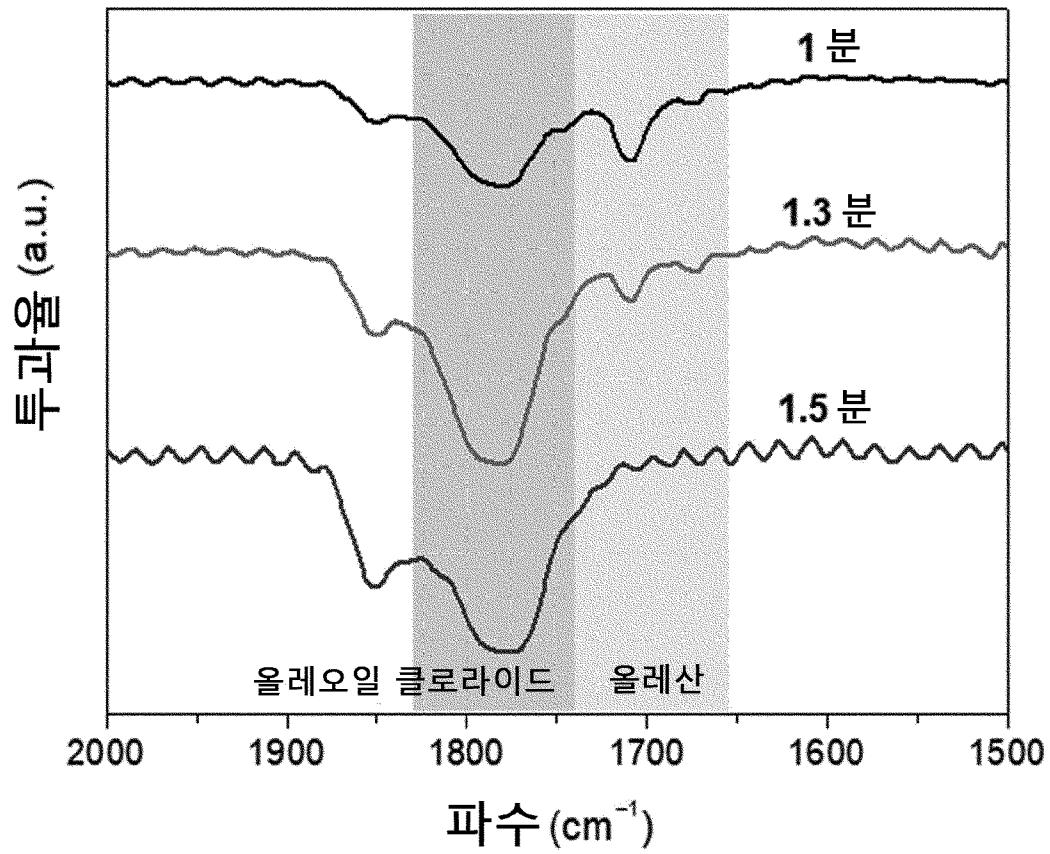
[도3]



[도4]

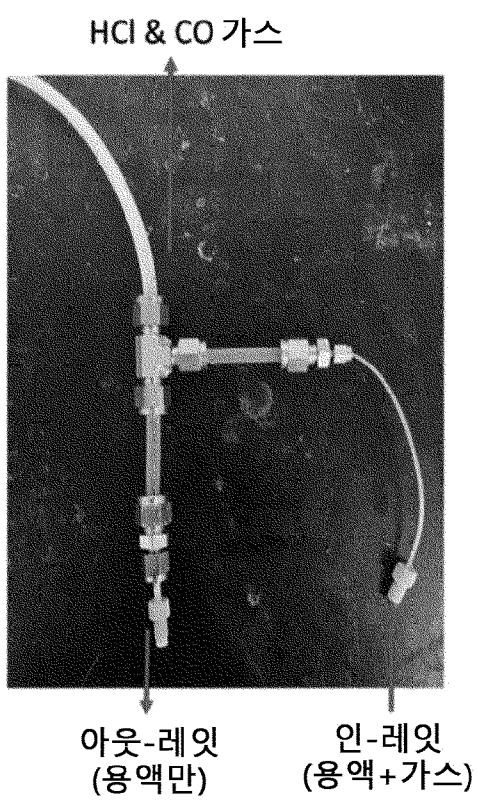


[도5]

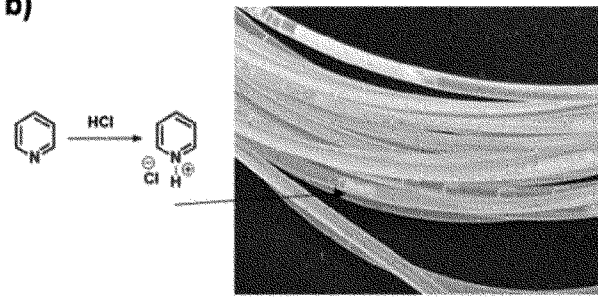


[도6]

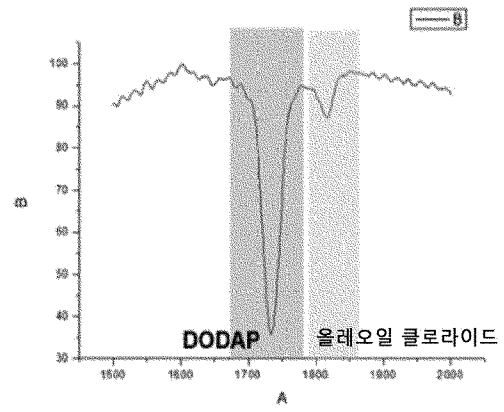
a)



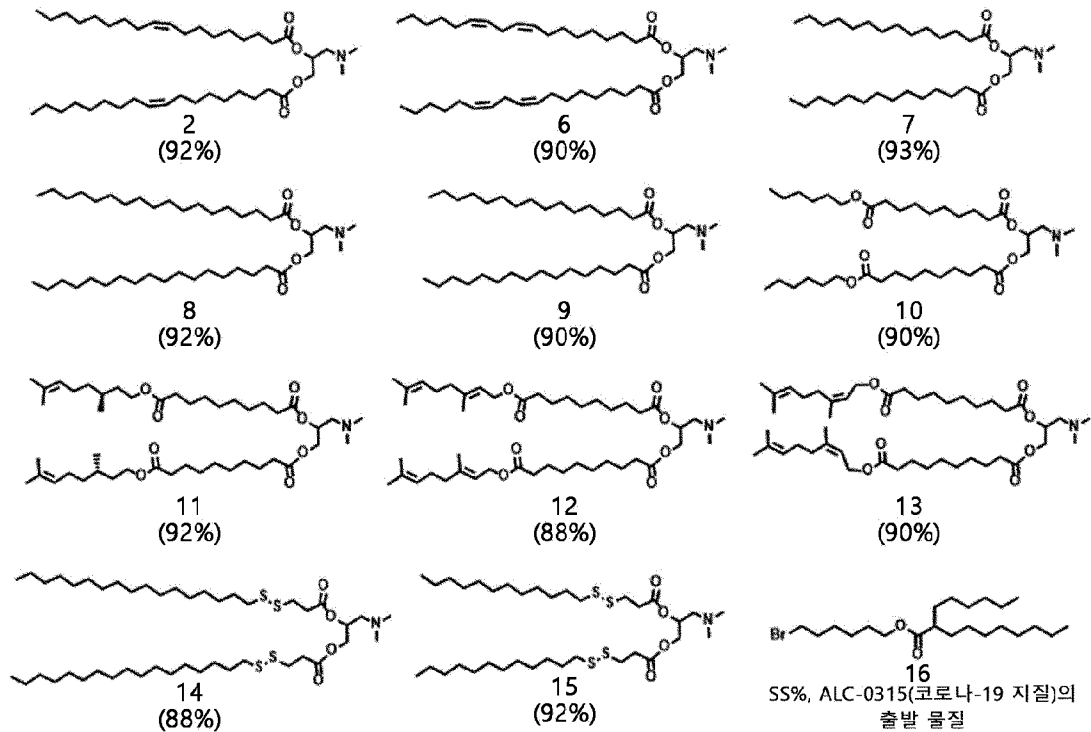
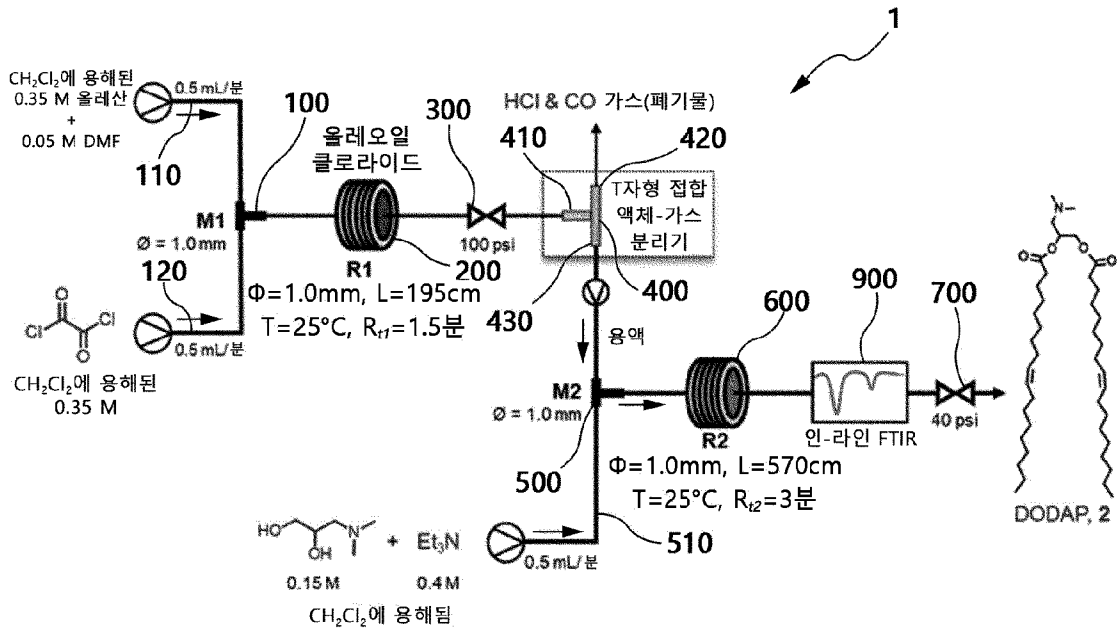
b)



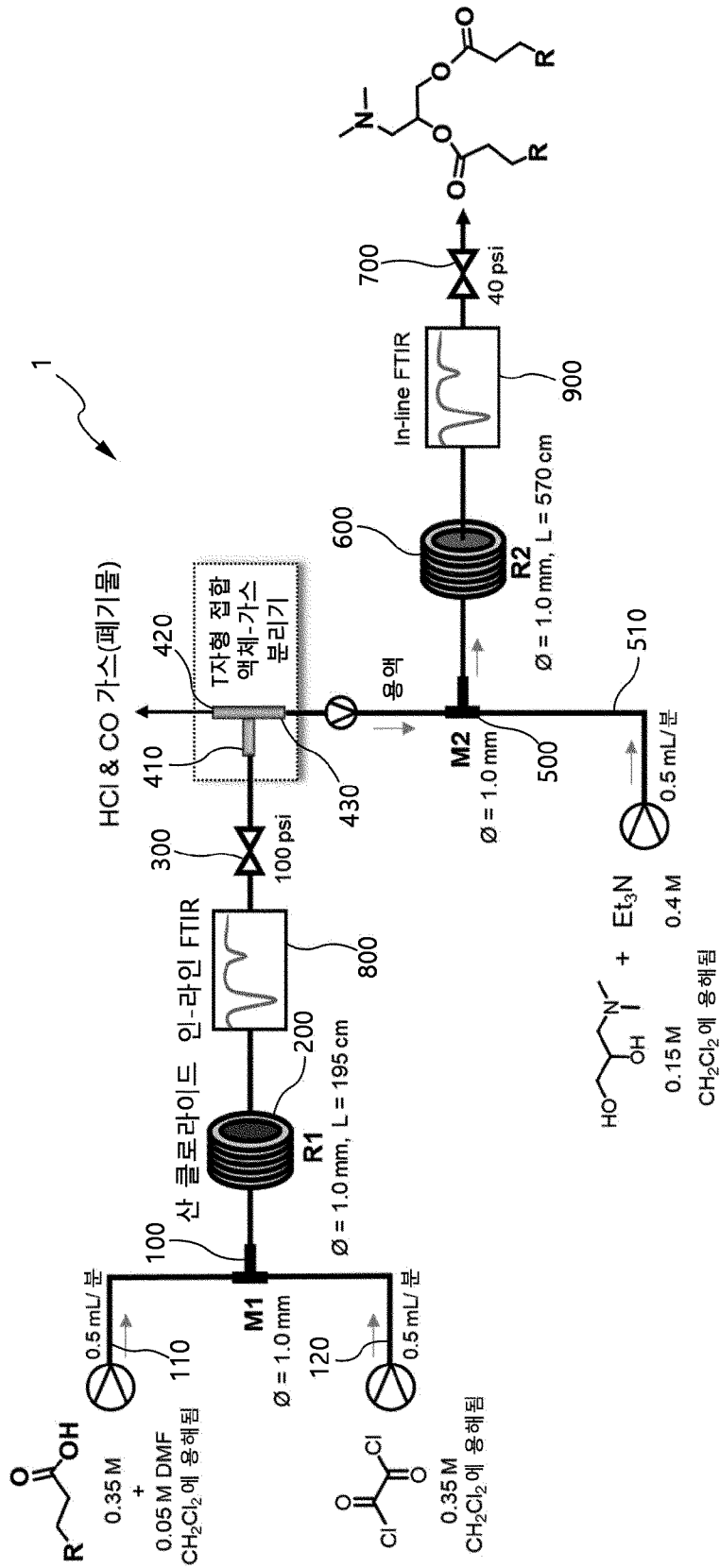
c)



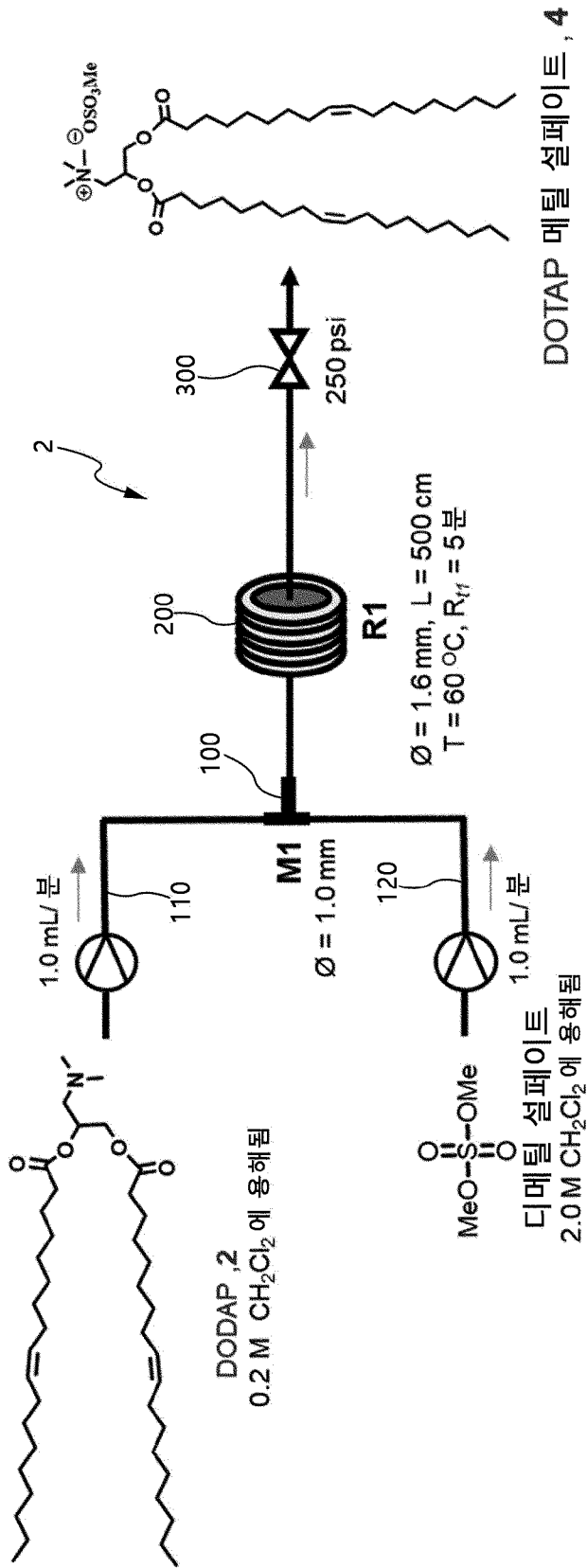
[도7]

규칙 91,
16.08.2024

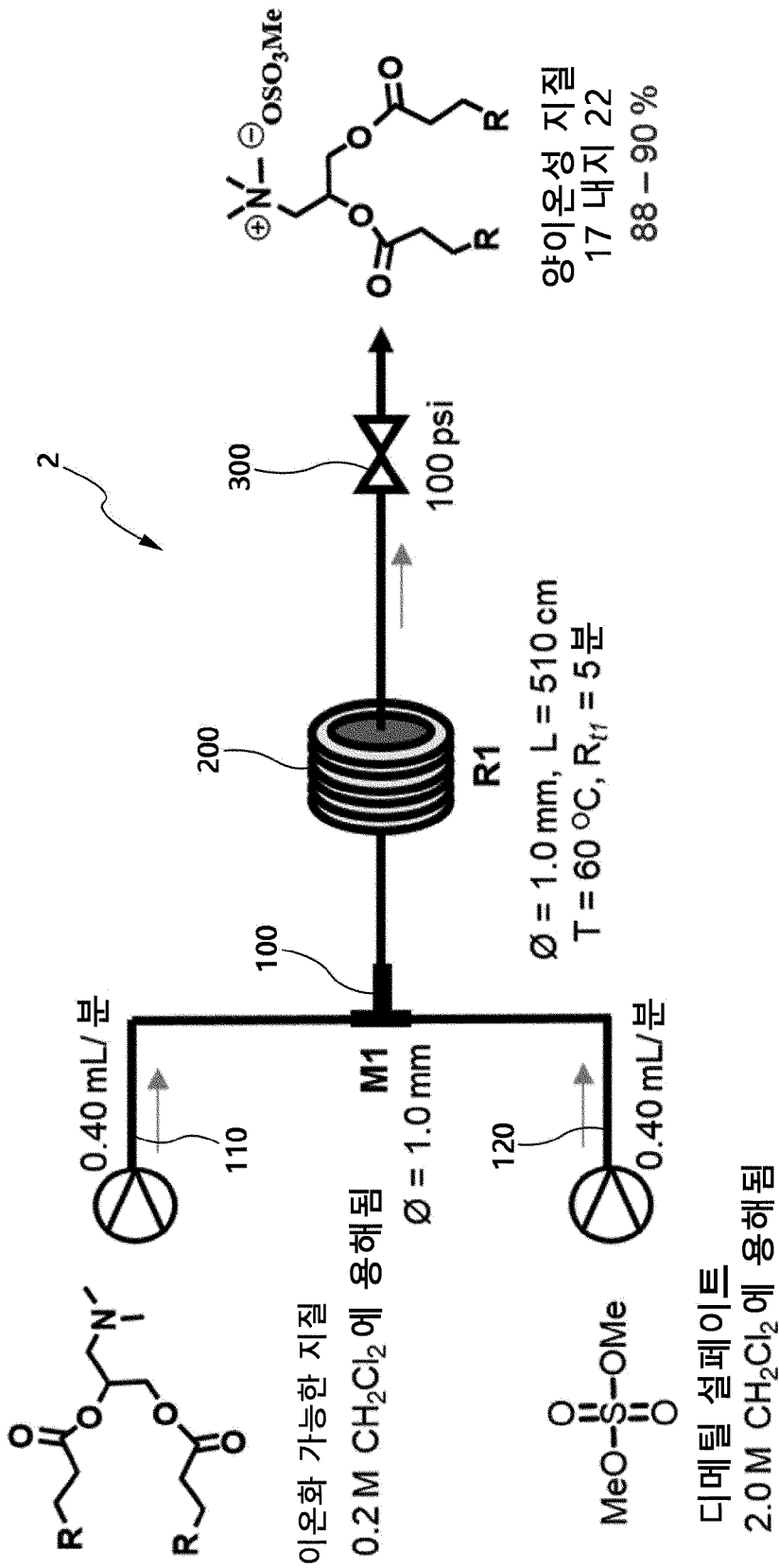
[도8]



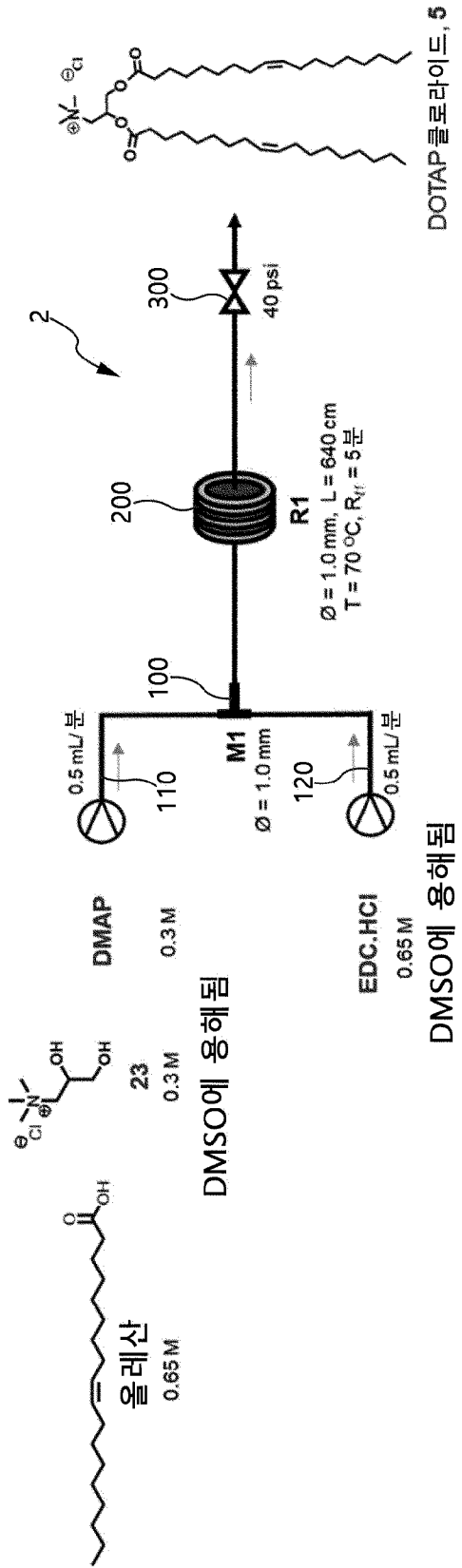
[도11]



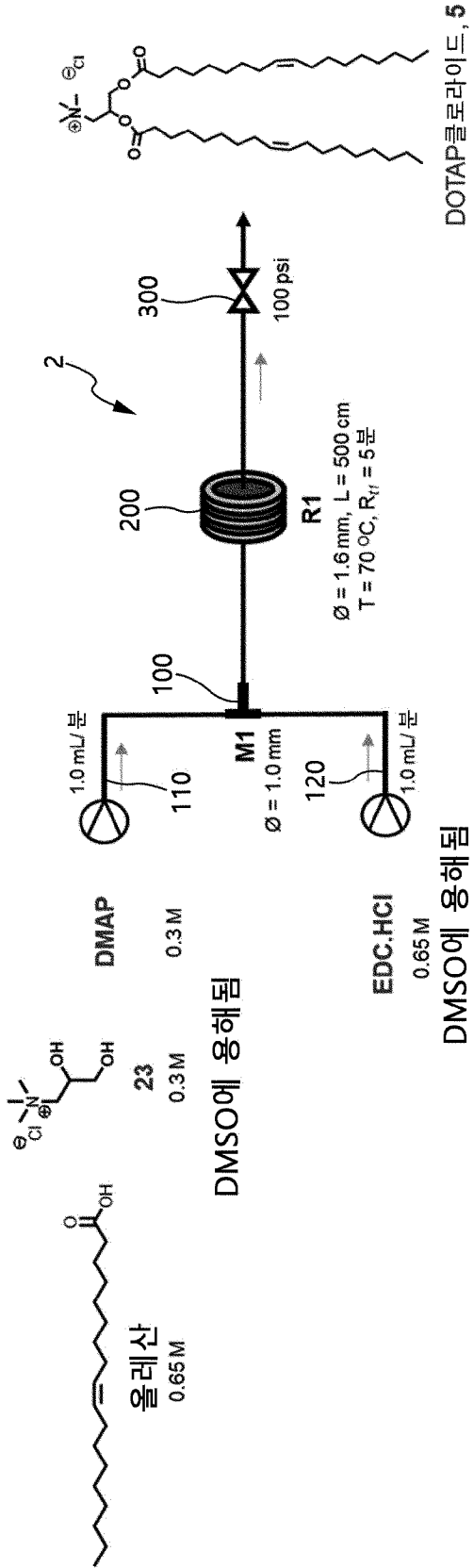
[도 12]



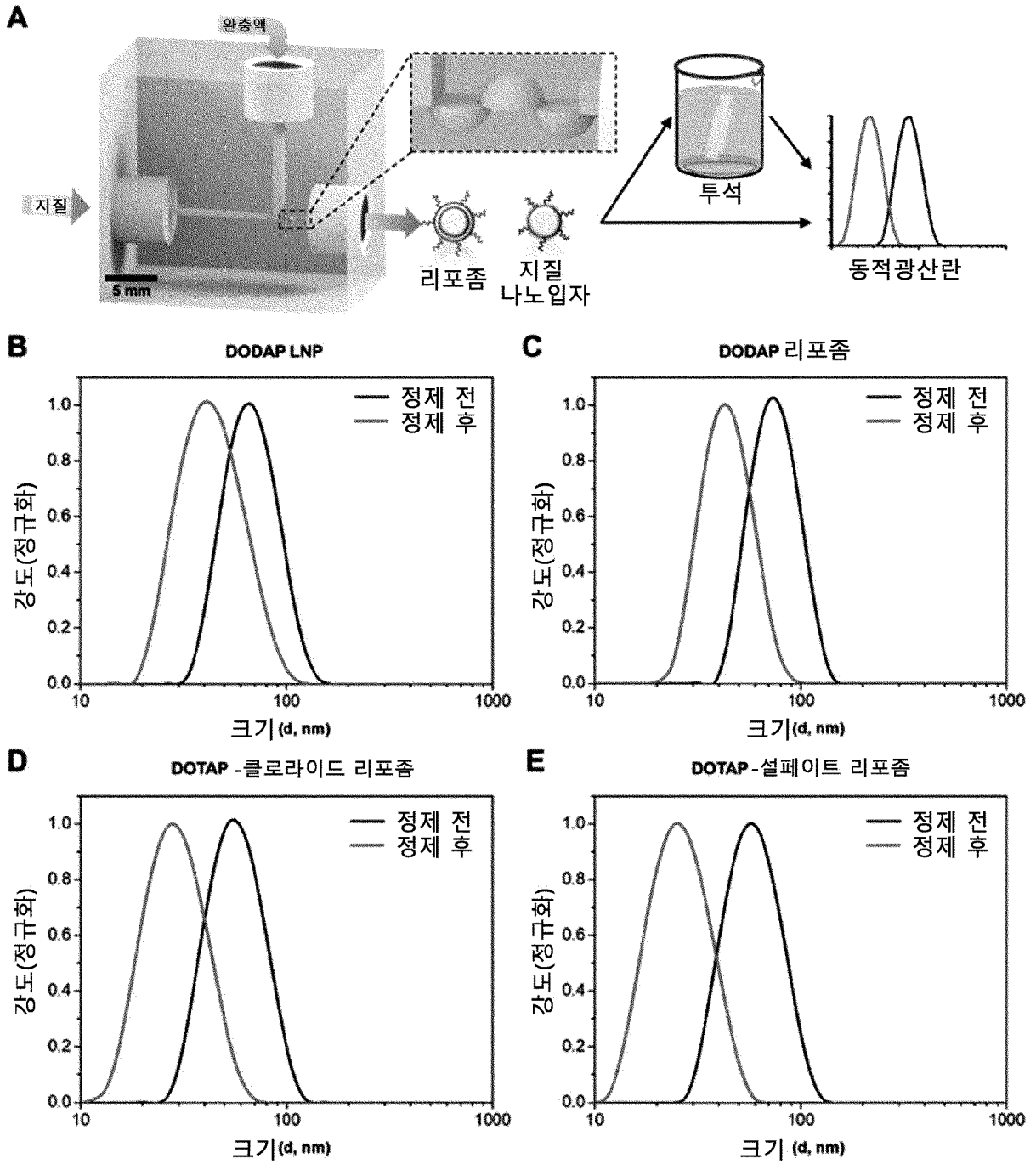
[도 13]



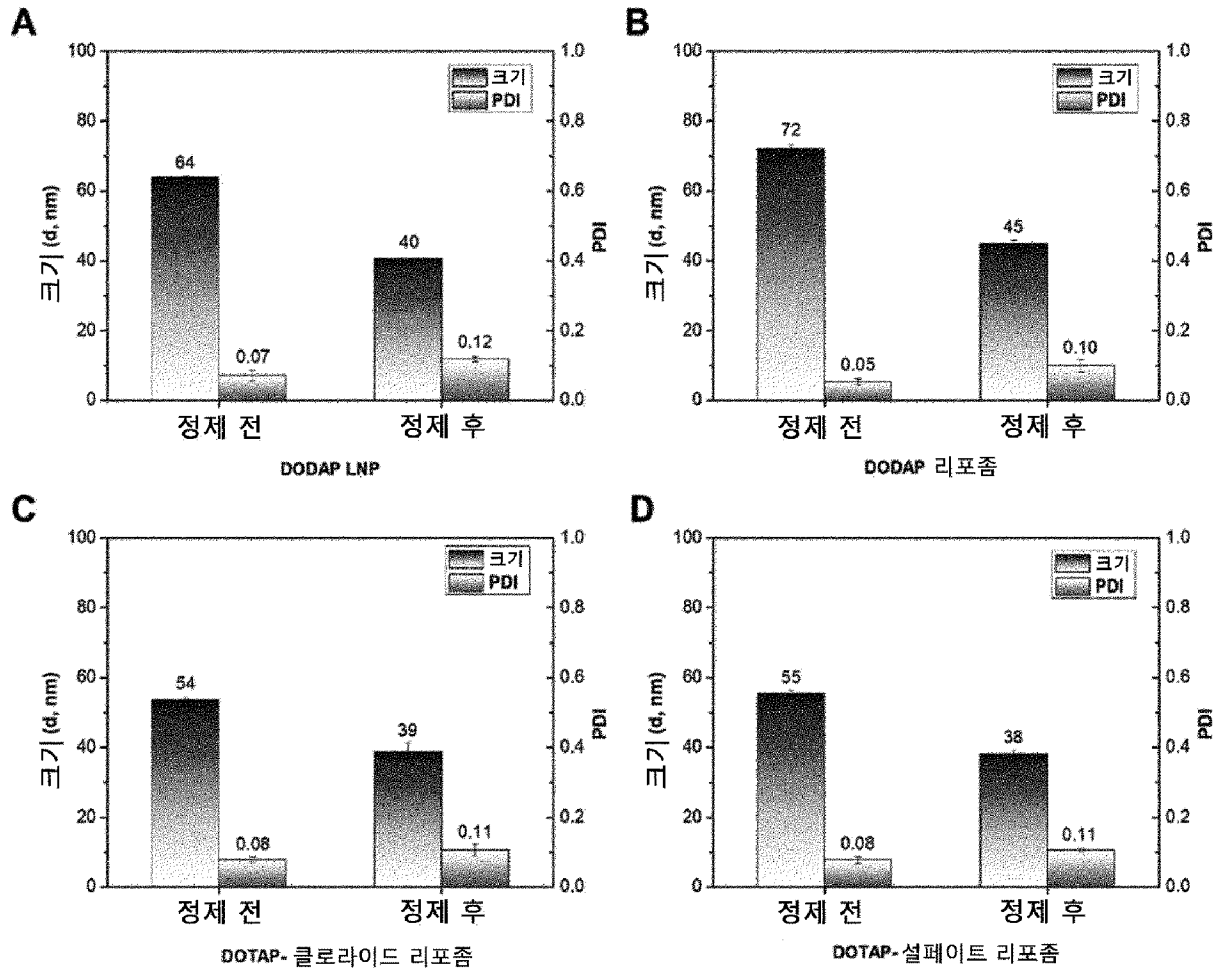
[도14]



[도 15]



[도16]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/007830

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C07C 213/06(2006.01)i; C07C 219/08(2006.01)i; B01J 19/00(2006.01)i; A61K 9/51(2006.01)i; A61K 9/127(2006.01)i; A61K 48/00(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07C 213/06(2006.01); A61K 31/7088(2006.01); A61K 9/127(2006.01); C07C 219/08(2006.01); C07C 333/04(2006.01)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models: IPC as above Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal), STN (Registry, Casreact, Caplus) & keywords: 단일 연속 유동 합성(one-flow synthesis), 양이온성 지질(cationic lipid), 옥살릴 클로라이드(oxalyl chloride), 올레산(oleic acid)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2009-086558 A1 (TEKMIRA PHARMACEUTICALS CORPORATION et al.) 09 July 2009 (2009-07-09) See claims 1 and 2; pages 108, 119, 120 and 126; and examples 11 and 15.	1,2,7-9
Y		3-6,11-17,23,24
A		10,18-22
Y	YIM, S. J. et al. One-flow multi-step synthesis of a monomer as a precursor of thermal-conductive semiconductor packaging polymer via multi-phasic separation. Journal of industrial and engineering chemistry. [electronic publication] 03 April 2023, vol. 123, pp. 41-50. See abstract; pages 45 and 47; and figures 2 and 3.	3-6,12-14,19,20
Y	ZHEN, Y. et al. Paclitaxel loading in cationic liposome vectors is enhanced by replacement of oleoyl with linoleoyl tails with distinct lipid shapes. Scientific reports. 2021, vol. 11, article no. 7311, pp. 1-14. See page 1; and figure 2.	11-17
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 25 September 2024		Date of mailing of the international search report 26 September 2024
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/007830

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2023-086514 A1 (ARCTURUS THERAPEUTICS, INC.) 19 May 2023 (2023-05-19) See claims 118, 128, 130, 131 and 134; and paragraphs [0216], [0225] and [0228].	23,24
X	CN 108129338 A (ASTATECH (CHENGDU) PHARM. CO., LTD.) 08 June 2018 (2018-06-08) See example 1.	18,21,22
Y		19,20
A	BOLDYREV, I. A. et al. A Route to Synthesize Ionizable Lipid ALC-0315, a Key Component of the mRNA Vaccine Lipid Matrix. Russian journal of bioorganic chemistry. [electronic publication] 19 May 2023, vol. 49, no. 2, pp. 412-415. See page 413; and figure 1.	1-24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2024/007830

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)				
WO	2009-086558	A1	09 July 2009	AU	2008-347250	A1	16 July 2009				
				AU	2008-347251	A1	16 July 2009				
				CA	2709875	A1	09 July 2009				
				CA	2709875	C	16 July 2019				
				CA	2711236	A1	16 July 2009				
				CA	2711240	A1	16 July 2009				
				CA	2711240	C	26 October 2021				
				CA	3044134	A1	09 July 2009				
				EP	2224912	A1	08 September 2010				
				EP	2224912	A4	04 January 2012				
				EP	2224912	B1	11 May 2016				
				EP	3100718	A1	07 December 2016				
				EP	3100718	B1	27 November 2019				
				JP	2011-509258	A	24 March 2011				
				JP	2014-132014	A	17 July 2014				
				JP	5749494	B2	15 July 2015				
				US	2011-0045473	A1	24 February 2011				
				US	2011-0097720	A1	28 April 2011				
				US	2011-0117125	A1	19 May 2011				
				US	2012-0225434	A1	06 September 2012				
				US	2014-0295449	A1	02 October 2014				
				US	2016-0274089	A1	22 September 2016				
				US	2018-0209963	A1	26 July 2018				
				US	2020-0225215	A1	16 July 2020				
				US	2022-0074925	A1	10 March 2022				
				WO	2009-088891	A1	16 July 2009				
				WO	2009-088891	A8	11 September 2009				
				WO	2009-088892	A1	16 July 2009				
				WO	2023-086514	A1	19 May 2023	AR	127659	A1	14 February 2024
								AU	2022-387111	A1	27 June 2024
CA	3237904	A1	19 May 2023								
CN	118451059	A	06 August 2024								
IL	312732	A	01 July 2024								
KR	10-2024-0128677	A	26 August 2024								
TW	202337498	A	01 October 2023								
US	2023-0295081	A1	21 September 2023								
CN	108129338	A	08 June 2018	None							

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C07C 213/06(2006.01)i; C07C 219/08(2006.01)i; B01J 19/00(2006.01)i; A61K 9/51(2006.01)i; A61K 9/127(2006.01)i; A61K 48/00(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C07C 213/06(2006.01); A61K 31/7088(2006.01); A61K 9/127(2006.01); C07C 219/08(2006.01); C07C 333/04(2006.01)		
조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC		
국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템), STN(Registry, Casreact, Caplus) & 키워드: 단일 연속 유동 합성(one-flow synthesis), 양이온성 지질(cationic lipid), 옥살릴 클로라이드(oxalyl chloride), 올레산(oleic acid)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	WO 2009-086558 A1 (TEKMIRA PHARMACEUTICALS CORPORATION 등) 2009.07.09 청구항 1, 2; 페이지 108, 119, 120, 126; 실시예 11, 15	1,2,7-9
Y		3-6,11-17,23,24
A		10,18-22
Y	YIM, S. J. 등, "One-flow multi-step synthesis of a monomer as a precursor of thermal-conductive semiconductor packaging polymer via multi-phasic separation", Journal of industrial and engineering chemistry, [전자공개] 2023.04.03, 제123권, 페이지 41-50 초록; 페이지 45, 47; 도면 2, 3	3-6,12-14,19,20
Y	ZHEN, Y. 등, "Paclitaxel loading in cationic liposome vectors is enhanced by replacement of oleoyl with linoleoyl tails with distinct lipid shapes", Scientific reports, 2021, 제11권, 아티클 넘버 7311, 페이지 1-14 페이지 1; 도면 2	11-17
Y	WO 2023-086514 A1 (ARCTURUS THERAPEUTICS, INC.) 2023.05.19 청구항 118, 128, 130, 131, 134; 단락 [0216], [0225], [0228]	23,24
<input checked="" type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일	
2024년09월25일 (25.09.2024)	2024년09월26일 (26.09.2024)	
ISA/KR의 명칭 및 우편주소	심사관	
대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)	허주형	
팩스 번호 +82-42-481-8578	전화번호 +82-42-481-5373	

C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	CN 108129338 A (ASTATECH (CHENGDU) PHARM. CO., LTD.) 2018.06.08 실시에 1	18,21,22
Y		19,20
A	BOLDYREV, I. A. 등, "A Route to Synthesize Ionizable Lipid ALC-0315, a Key Component of the mRNA Vaccine Lipid Matrix", Russian journal of bioorganic chemistry, [전자 공개] 2023.05.19, 제 49권, 제2호, 페이지 412-415 페이지 413; 도면 1	1-24

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2009-086558 A1	2009/07/09	AU 2008-347250 A1	2009/07/16
		AU 2008-347251 A1	2009/07/16
		CA 2709875 A1	2009/07/09
		CA 2709875 C	2019/07/16
		CA 2711236 A1	2009/07/16
		CA 2711240 A1	2009/07/16
		CA 2711240 C	2021/10/26
		CA 3044134 A1	2009/07/09
		EP 2224912 A1	2010/09/08
		EP 2224912 A4	2012/01/04
		EP 2224912 B1	2016/05/11
		EP 3100718 A1	2016/12/07
		EP 3100718 B1	2019/11/27
		JP 2011-509258 A	2011/03/24
		JP 2014-132014 A	2014/07/17
		JP 5749494 B2	2015/07/15
		US 2011-0045473 A1	2011/02/24
		US 2011-0097720 A1	2011/04/28
		US 2011-0117125 A1	2011/05/19
		US 2012-0225434 A1	2012/09/06
		US 2014-0295449 A1	2014/10/02
		US 2016-0274089 A1	2016/09/22
		US 2018-0209963 A1	2018/07/26
US 2020-0225215 A1	2020/07/16		
US 2022-0074925 A1	2022/03/10		
WO 2009-088891 A1	2009/07/16		
WO 2009-088891 A8	2009/09/11		
WO 2009-088892 A1	2009/07/16		
WO 2023-086514 A1	2023/05/19	AR 127659 A1	2024/02/14
		AU 2022-387111 A1	2024/06/27
		CA 3237904 A1	2023/05/19
		CN 118451059 A	2024/08/06
		IL 312732 A	2024/07/01
		KR 10-2024-0128677 A	2024/08/26
		TW 202337498 A	2023/10/01
		US 2023-0295081 A1	2023/09/21
CN 108129338 A	2018/06/08	없음	