(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0089561
(43) 공개일자 2025년06월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/713 (2006.01) *A61K 31/18* (2006.01)
A61K 31/352 (2006.01) *A61K 31/426* (2006.01)
A61K 31/4375 (2006.01) *A61K 31/4422* (2006.01)
A61K 31/4745 (2006.01) *A61K 31/513* (2006.01)
A61K 31/522 (2006.01) *A61K 31/675* (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/713 (2013.01)
A61K 31/18 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2025-7018649(분할)
(22) 출원일자(국제) 2017년01월06일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2018-7022434
원출원일자(국제) 2017년01월06일
심사청구일자 2022년01월05일
(85) 번역문제출일자 2025년06월05일
(86) 국제출원번호 PCT/US2017/012614
(87) 국제공개번호 WO 2017/120527
국제공개일자 2017년07월13일
(30) 우선권주장
62/276,722 2016년01월08일 미국(US)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
아뷰터스 바이오파마 코포레이션
캐나다, 브리티쉬 콜럼비아 브이7와이 1비3, 밴쿠버, 700 웨스트 조지아 스트리트, 25 플로어
(72) 발명자
쿠코나티, 안드레아
캐나다 브이5제이 5제이8 브리티시 컬럼비아 버나비 글렌리온 파크웨이 100-8900
리, 에이미 씨. 에이치.
캐나다 브이5제이 5제이8 브리티시 컬럼비아 버나비 글렌리온 파크웨이 100-8900
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 이상영

전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 **B형 간염을 치료하기 위한 치료 조성물 및 방법**

(57) 요 약

본 발명은 B형 간염을 치료하는데 유용한 치료적 조합 및 치료 방법을 제공한다.

(52) CPC특허분류
A61K 31/352 (2023.05)
A61K 31/426 (2013.01)
A61K 31/4375 (2013.01)
A61K 31/4422 (2013.01)
A61K 31/4745 (2013.01)
A61K 31/513 (2013.01)
A61K 31/522 (2013.01)
A61K 31/675 (2013.01)
A61K 45/06 (2013.01)

(72) 발명자
리즌브랜드, 코넬리스 에이.
캐나다 브이5제이 5제이8 브리티시 컬럼비아 버나비 글렌리온 파크웨이 100-8900
소피아, 마이클 제이.
캐나다 브이5제이 5제이8 브리티시 컬럼비아 버나비 글렌리온 파크웨이 100-8900

(30) 우선권주장
62/343,514 2016년05월31일 미국(US)
62/345,476 2016년06월03일 미국(US)
62/409,180 2016년10월17일 미국(US)
62/420,969 2016년11월11일 미국(US)

명 세 서

청구범위

청구항 1

인간을 치료하기 위한 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련된 출원에 대한 교차 참조**

[0002] 본 특허 출원은 2016년 1월 08일자 제출된 U.S. 출원 일련 번호 62/276,722, 2016년 5월 31일자 제출된 U.S. 출원 일련 번호 62/343,514, 2016년 6월 03일자 제출된 U.S. 출원 일련 번호 62/345,476, 2016년 10월 17일자 제출된 U.S. 출원 일련 번호 62/409,180, 그리고 2016년 11월 11일자 제출된 U.S. 출원 일련 번호 62/420,969에 우선권을 주장하고, 이들 출원은 본원에 참조로서 편입된다.

배 경 기 술

[0003] **배경**

[0004] B형 간염 바이러스 ("HBV"로서 약칭됨)는 헤파드나바이러스 패밀리의 구성원이다. 바이러스 입자 (때때로, 비리온으로서 지칭됨)는 외부 지질 외피 및 단백질로 구성된 정20면체 뉴클레오캡시드 코어를 포함한다. 뉴클레오캡시드는 바이러스 DNA 및 역전사효소 활성을 갖는 DNA 중합효소를 에워싼다. 외부 외피는 감수성 세포, 전형적으로 간 간세포의 바이러스 결합 및 이들 내로 진입에 관련되는 임베디드 단백질을 내포한다. 감염성 바이러스 입자에 더하여, 코어를 결여하는 실모양 및 구형 몸체가 감염된 개체의 혈청에서 발견될 수 있다. 이들 입자는 감염성이 아니고, 그리고 표면 항원 (HBsAg)으로 불리는, 비리온의 표면의 일부를 형성하는 지질 및 단백질로 구성되고, 그리고 상기 바이러스의 생활 주기 동안 과잉으로 생산된다.

[0005] HBV의 유전체는 환상 DNA로 만들어지지만, 상기 DNA가 완전한 이중 가닥이 아니라는 점에서 독특하다. 전장 가닥의 한쪽 단부는 바이러스 DNA 중합효소에 연결된다. 상기 유전체는 3020-3320개 뉴클레오티드 길이 (전장 가닥의 경우) 및 1700-2800개 뉴클레오티드 길이 (더욱 짧은 가닥의 경우)이다. 음성-센스 (비코딩)는 바이러스 mRNA에 상보적이다. 바이러스 DNA는 세포의 감염 직후에 핵에서 발견된다. C, X, P 및 S로 불리는, 상기 유전체에 의해 인코딩된 4개의 공지된 유전자가 있다. 코어 단백질은 유전자 C (HBcAg)에 의해 코딩되고, 그리고 이의 개시 코돈은 상류 인프레임 AUG 개시 코돈이 선행하는데, 이로부터 프리-코어 단백질이 생산된다. HBeAg는 프리-코어 단백질의 단백질분해 처리에 의해 생산된다. DNA 중합효소는 유전자 P에 의해 인코딩된다. 유전자 S는 표면 항원을 코딩하는 유전자이다 (HBsAg). HBsAg 유전자는 하나의 긴 개방 해독틀이지만, 상기 유전자를 3개의 섹션, 프리-S1, 프리-S2 및 S로 분할하는 3개의 인프레임 "개시" (ATG) 코돈을 내포한다. 복수 개시 코돈 때문에, 큰, 중간 및 작은 것으로 불리는 3가지 상이한 크기의 폴리펩티드가 생산된다. 유전자 X에 의해 코딩된 단백질의 기능은 완전히 이해된 것은 아니지만, 이것은 간암의 발달과 연관된다. HBV의 복제는 복잡한 과정이다. 비록 복제가 간에서 발생하긴 하지만, 상기 바이러스는 혈액으로 확산하고, 여기서 바이러스 단백질 및 이들에 대한 항체가 감염된 사람들에서 발견된다. HBV의 구조, 복제 및 생물학은 D. Glebe and C.M.Bremer, Seminars in Liver Disease, Vol. 33, No. 2, pages 103-112 (2013)에서 리뷰된다.

[0006] HBV로 인간의 감염은 간의 감염성 염증성 질병을 유발할 수 있다. 감염된 개체는 여러 해 동안 증상을 전시하지 않을 수도 있다. 만성 보균자인 350 백만 명을 비롯하여, 전 세계 인구의 약 1/3이 그들의 생애 동안 어느 한 시점에서 감염되는 것으로 추정된다.

[0007] 상기 바이러스는 감염성 혈액 또는 체액에 노출에 의해 전파된다. 출생전후 감염 또한 주요 감염 루트일 수 있다. 급성 질병은 간 염증, 구토, 황달 및 아마도 사망을 유발한다. 만성 B형 간염은 간경변 및 간암을 궁극적으로 유발할 수 있다.

[0008] 비록 HBV로 감염된 대부분의 사람들이 그들의 면역계의 작용을 통해 상기 감염을 제거하지만, 일부 감염된 사람들은 감염의 공격적 코스 (전격성 간염)를 겪는다; 반면 다른 사람들은 장기적으로 감염되고, 따라서 간 질환의 기회가 증가한다. 여러 약제가 HBV 감염의 치료를 위해 현재 승인되긴 했지만, 감염된 개체는 이들 약제에 다양

한 정도의 성공률로 반응하고, 그리고 이들 약제 중에서 어느 것도 상기 바이러스를 감염된 개체로부터 깨끗이 제거하지 못한다.

[0009] D형 간염 바이러스 (HDV)는 B형 간염 바이러스 (HBV)의 존재에서만 증식할 수 있는 작은 환상 외피 RNA 바이러스이다. 특히, HDV는 자신을 증식하기 위해 HBV 표면 항원 단백질을 필요로 한다. HBV 및 HDV 둘 모두로 감염은 HBV 단독으로 감염과 비교하여 더욱 심각한 합병증을 유발한다. 이들 합병증은 급성 감염에서 간부전 및 간경화증으로의 신속한 진행을 경험할 더욱 큰 가능성, 그리고 만성 감염에서 간암이 발달할 증가된 기회를 포함한다. B형 간염 바이러스와 합동으로, D형 간염은 모든 간염 감염 중에서 가장 높은 사망률을 갖는다. HDV의 전파 루트는 HBV에 대한 것들과 유사하다. 감염은 HBV 감염의 높은 위험에 처해 있는 개체, 특히 주사 약물 사용자 및 응고 인자 농축물을 제공받는 개체에게 주로 한정된다.

[0010] 따라서, 동물 (가령, 인간)에서 HBV 감염의 치료뿐만 아니라 동물 (가령, 인간)에서 HBV/HDV 감염의 치료를 위한 조성물 및 방법이 계속 요구된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] **요약**

[0012] 본 발명은 바이러스 감염, 예를 들면, HBV를 치료하는데 유용한 치료적 조합 및 치료 방법을 제공한다.

[0013] 본원에서 제시된 실례는 HBV에 대항하여 상이한 작용 기전을 갖는 작용제를 이용한 다양한 조합 (가령, 2-원 조합) 연구의 결과를 개시한다. 본원에서 설명된 바와 같이, 작용제의 여러 조합은 예상치 못한 상승적 상호작용을 보여주었고, 그리고 조합은 일반적으로, 길항작용을 결여하였다.

[0014] 한 구체예에서 본 발명은 동물에서 B형 간염을 치료하기 위한 방법을 제공하고, 상기 방법은 아래와 같이 구성된 군에서 선택되는 최소한 2개의 작용제를 상기 동물에게 투여하는 것을 포함한다:

[0015] a) 역전사효소 저해제;

[0016] b) 캡시드 저해제;

[0017] c) cccDNA 형성 저해제;

[0018] d) sAg 분비 저해제;

[0019] e) B형 간염 유전체에 표적화된 올리고머성 뉴클레오티드; 및

[0020] f) 면역자극제.

[0021] 다른 구체예에서 본 발명은 아래와 같이 구성된 군에서 선택되는 최소한 2개의 작용제를 포함하는 키트를 제공하고:

[0022] a) 역전사효소 저해제;

[0023] b) 캡시드 저해제;

[0024] c) cccDNA 형성 저해제;

[0025] d) sAg 분비 저해제;

[0026] e) B형 간염 유전체에 표적화된 올리고머성 뉴클레오티드; 및

[0027] f) 면역자극제

[0028] 이들 작용제는 바이러스 감염, 예를 들면, B형 간염을 치료하거나 예방하기 위해 조합으로 이용된다.

[0029] 다른 구체예에서 본 발명은 아래와 같이 구성된 군에서 선택되는 최소한 3개의 작용제를 포함하는 키트를 제공하고:

[0030] a) 역전사효소 저해제;

[0031] b) 캡시드 저해제;

[0032] c) cccDNA 형성 저해제;

[0033] d) sAg 분비 저해제;

[0034] e) B형 간염 유전체에 표적화된 올리고머성 뉴클레오티드; 및

[0035] f) 면역자극제

[0036] 이들 작용제는 바이러스 감염, 예를 들면, B형 간염을 치료하거나 예방하기 위해 조합으로 이용된다.

[0037] 다른 구체예에서 본 발명은 제약학적으로 허용되는 담체 및 아래와 같이 구성된 군에서 선택되는 최소한 2개의 작용제를 포함하는 제약학적 조성물을 제공한다:

[0038] a) 역전사효소 저해제;

[0039] b) 캡시드 저해제;

[0040] c) cccDNA 형성 저해제;

[0041] d) sAg 분비 저해제;

[0042] e) B형 간염 유전체에 표적화된 올리고머성 뉴클레오티드; 및

[0043] f) 면역자극제.

[0044] 다른 구체예에서 본 발명은 제약학적으로 허용되는 담체 및 아래와 같이 구성된 군에서 선택되는 최소한 3개의 작용제를 포함하는 제약학적 조성물을 제공한다:

[0045] a) 역전사효소 저해제;

[0046] b) 캡시드 저해제;

[0047] c) cccDNA 형성 저해제;

[0048] d) sAg 분비 저해제;

[0049] e) B형 간염 유전체에 표적화된 올리고머성 뉴클레오티드; 및

[0050] f) 면역자극제.

과제의 해결 수단

[0051] **상세한 설명**

[0052] 제약학적으로 허용되는 산 또는 염기 염으로서 화합물의 투여가 적절할 수 있다. 제약학적으로 허용되는 염의 실례는 생리학적 허용되는 음이온을 형성하는, 산으로 형성된 유기 산 부가염, 예를 들면, 토실레이트, 메탄술폰산염, 아세트산염, 구연산염, 말론산염, 주석산염, 숙신산염, 벤조산염, 아스코르브산염, α-케토글루타르산염 및 α-글리세로포스페이트이다. 염산염, 황산염, 질산염, 중탄산염 및 탄산염 염을 비롯한 적합한 무기 염 또한 형성될 수 있다.

[0053] 제약학적으로 허용되는 염은 당해 분야에서 널리 공지된 표준 절차를 이용하여, 예를 들면, 충분히 염기성 화합물, 예를 들면, 아민을 적합한 산과 반응시켜 생리학적으로 허용되는 음이온을 제공함으로써 획득될 수 있다. 카르복실산의 알칼리 금속 (가령, 나트륨, 칼륨 또는 리튬) 또는 알칼리성 토류 금속 (가령, 칼슘) 염 역시 만들어질 수 있다.

[0054] ***역전사효소 저해제***

[0055] 일정한 구체예에서, 역전사효소 저해제는 뉴클레오시드 유사체이다.

[0056] 일정한 구체예에서, 역전사효소 저해제는 뉴클레오시드 유사체 역전사효소 저해제 (NARTI 또는 NRTI)이다.

[0057] 일정한 구체예에서, 역전사효소 저해제는 뉴클레오티드 유사체 역전사효소 저해제 (NtARTI 또는 NtRTI)이다.

[0058] 용어 역전사효소 저해제는 엔테카비르, 클레부다인, 텔비부딘, 라미부딘, 아데포비르 및 테노포비르, 테노포비르 디소프록실, 테노포비르 알라페나미드, 아데포비르 디포복실, (1R,2R,3R,5R)-3-(6-아미노-9H-9-퓨리닐)-2-플루오르-5-(히드록시메틸)-4-메틸렌시클로펜탄-1-올 (U.S. 특허 번호 8,816,074에서 설명됨), 엠트리시타빈, 아

바카비르, 엘부시타빈, 간시클로비르, 로부카비르, 팜시클로비르, 페니클로비르, 그리고 암독소비르를 포함하지만 이들에 한정되지 않는다.

[0059] 용어 역전사효소 저해제는 엔테카비르, 라미부딘 및 (1R,2R,3R,5R)-3-(6-아미노-9H-9-퓨리닐)-2-플루오르-5-(히드록시메틸)-4-메틸렌시클로펜탄-1-올을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다.

[0060] 용어 역전사효소 저해제는 예로서, U.S. 특허 번호 8,816,074, US 2011/0245484 A1 및 US 2008/0286230A1에서 설명된 바와 같이, 전술한 역전사효소 저해제의 공유 결합된 포스포라미데이트 또는 포스폰아미데이트 모이어티를 포함하지만 이들에 한정되지 않는다.

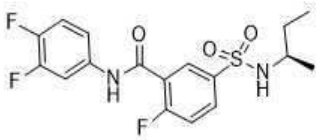
[0061] 용어 역전사효소 저해제는 포스포라미데이트 모이어티를 포함하는 뉴클레오티드 유사체, 예를 들면, 메틸 ((((1R,3R,4R,5R)-3-(6-아미노-9H-퓨린-9-일)-4-플루오르-5-히드록시-2-메틸렌시클로펜틸)메톡시)(페녹시)포스포릴)-(D 또는 L)-알라닌산염 및 메틸 ((((1R,2R,3R,4R)-3-플루오르-2-히드록시-5-메틸렌-4-(6-옥소-1,6-디히드로-9H-퓨린-9-일)시클로펜틸)메톡시)(페녹시)포스포릴)-(D 또는 L)-알라닌산염을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. 가령, 메틸 ((R)-(((1R,3R,4R,5R)-3-(6-아미노-9H-퓨린-9-일)-4-플루오르-5-히드록시-2-메틸렌시클로펜틸)메톡시)(페녹시)포스포릴)-(D 또는 L)-알라닌산염 및 메틸 ((S)-(((1R,3R,4R,5R)-3-(6-아미노-9H-퓨린-9-일)-4-플루오르-5-히드록시-2-메틸렌시클로펜틸)메톡시)(페녹시)포스포릴)-(D 또는 L)-알라닌산염을 포함하는 이들의 개별 부분입체이성질체 역시 포함된다.

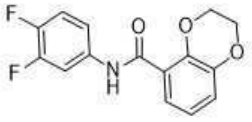
[0062] 용어 역전사효소 저해제는 포스폰아미데이트 모이어티, 예를 들면, 테노포비르 알라페나미드뿐만 아니라 US 2008/0286230 A1에서 설명된 것들을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. 입체선택적 포스포라미데이트 또는 포스폰아미데이트 내포 활성제를 제조하기 위한 방법은 예로서, U.S. 특허 번호 8,816,074뿐만 아니라 US 2011/0245484 A1 및 US 2008/0286230 A1에서 설명된다.

[0063] ***캡시드 저해제***

[0064] 본원에서 설명된 바와 같이, 용어 "캡시드 저해제"는 캡시드 단백질의 발현 및/또는 기능을 직접적으로 또는 간접적으로 저해할 수 있는 화합물을 포함한다. 가령, 캡시드 저해제는 캡시드 조립을 저해하고, 비-캡시드 중합체의 형성을 유도하고, 과잉 캡시드 조립 또는 오도된 캡시드 조립을 증진하고, 캡시드 안정화에 영향을 주고 및/또는 RNA의 캡시드화를 저해하는 임의의 화합물을 포함할 수 있지만 이들에 한정되지 않는다. 캡시드 저해제는 또한, 복제 과정 내에 하류 사건(들) (가령, 바이러스 DNA 합성, 핵 내로 이완형 환상 DNA (rcDNA)의 수송, 공유결합 폐쇄 환상 DNA (cccDNA) 형성, 바이러스 성숙, 발아 및/또는 방출, 기타 등등)에서 캡시드 기능을 저해하는 임의의 화합물을 포함한다. 가령, 일정한 구체예에서, 상기 저해제는 예로서, 본원에서 설명된 검정을 이용하여 계측될 때, 캡시드 단백질의 발현 수준 또는 생물학적 활성을 검출가능하게 저해한다. 일정한 구체예에서, 상기 저해제는 rcDNA 및 바이러스 생활 주기의 하류 산물의 수준을 최소한 5%, 최소한 10%, 최소한 20%, 최소한 50%, 최소한 75%, 또는 최소한 90% 저해한다.

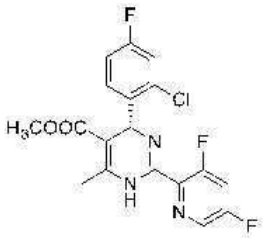
[0065] 용어 캡시드 저해제는 다음의 화합물을 비롯하여, 국제 특허 출원 공개 번호 WO2013006394, WO2014106019 및 WO2014089296에서 설명된 화합물을 포함한다:



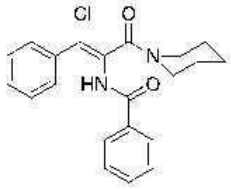
및


[0066] .

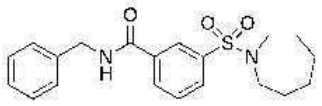
[0067] 용어 캡시드 저해제는 또한, 화합물 **Bay-41-4109** (국제 특허 출원 공개 번호 WO/2013/144129를 참조한다), **AT-61** (국제 특허 출원 공개 번호 WO/1998/33501; 및 King, RW, et al., Antimicrob Agents Chemother., **1998**, *42*, 12, 3179-3186을 참조한다), **DVR-01** 및 **DVR-23** (국제 특허 출원 공개 번호 WO 2013/006394; 및 Campagna, MR, et al., J. of Virology, 2013, 87, 12, 6931을 참조한다), 그리고 이들의 제약학적으로 허용되는 염을 포함한다:



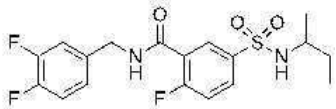
Bay-41-4109



AT-61



DVR-01



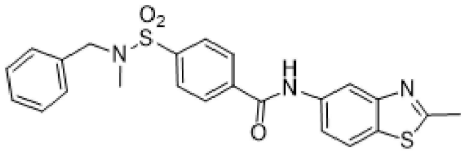
DVR-23

[0068]

[0069] ***cccDNA 형성 저해제***

[0070] 공유결합 폐쇄 환상 DNA (cccDNA)는 바이러스 rcDNA으로부터 세포 핵에서 산출되고, 그리고 바이러스 mRNAs에 대한 전사 주형으로서 역할을 한다. 본원에서 설명된 바와 같이, 용어 "cccDNA 형성 저해제"는 cccDNA의 형성 및/또는 안정성을 직접적으로 또는 간접적으로 저해할 수 있는 화합물을 포함한다. 가령, cccDNA 형성 저해제는 캡시드 분해, 핵 내로 rcDNA 진입 및/또는 rcDNA의 cccDNA로의 전환을 저해하는 임의의 화합물을 포함할 수 있지만 이들에 한정되지 않는다. 가령, 일정한 구체예에서, 상기 저해제는 예로서, 본원에서 설명된 검정을 이용하여 계측될 때, cccDNA의 형성 및/또는 안정성을 검출가능하게 저해한다. 일정한 구체예에서, 상기 저해제는 cccDNA의 형성 및/또는 안정성을 최소한 5%, 최소한 10%, 최소한 20%, 최소한 50%, 최소한 75%, 또는 최소한 90% 저해한다.

[0071] 용어 cccDNA 형성 저해제는 다음의 화합물을 비롯하여, 국제 특허 출원 공개 번호 WO2013130703에서 설명된 화합물을 포함한다:



[0072] .

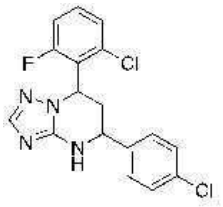
[0073] 용어 cccDNA 형성 저해제는 미국 특허 출원 공개 번호 US 2015/0038515 A1에서 일반적으로 및 특이적으로 설명된 것들을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. 용어 cccDNA 형성 저해제는 1-(페닐술포닐)-N-(피리딘-4-일메틸)-1H-인돌-2-카르복사미드; 1-벤젠술포닐-피롤리딘-2-카르복실산 (피리딘-4-일메틸)-아미드; 2-(2-클로로-N-(2-클로로-5-(트리플루오로메틸)페닐)-4-(트리플루오로메틸)페닐술폰아미도)-N-(피리딘-4-일메틸)아세트아미드; 2-(4-클로로-N-(2-클로로-5-(트리플루오로메틸)페닐)페닐술폰아미도)-N-(피리딘-4-일메틸)아세트아미드; 2-(N-(2-클로로-5-(트리플루오로메틸)페닐)-4-(트리플루오로메틸)페닐술폰아미도)-N-(피리딘-4-일메틸)아세트아미드; 2-(N-(2-클로로-5-(트리플루오로메틸)페닐)-4-메톡시페닐술폰아미도)-N-(피리딘-4-일메틸)아세트아미드; 2-(N-(2-클로로-5-(트리플루오로메틸)페닐)페닐술폰아미도)-N-((1-메틸피페리딘-4-일)메틸)아세트아미드; 2-(N-(2-클로로-5-(트리플루오로메틸)페닐)페닐술폰아미도)-N-(피페리딘-4-일메틸)아세트아미드; 2-(N-(2-클로로-5-(트리플루오로메틸)페닐)페닐술폰아미도)-N-(피리딘-4-일메틸)프로판아미드; 2-(N-(2-클로로-5-(트리플루오로메틸)페닐)페닐술폰아미도)-N-(피리딘-3-일메틸)아세트아미드; 2-(N-(2-클로로-5-(트리플루오로메틸)페닐)페닐술폰아미도)-N-(피리미딘-5-일메틸)아세트아미드; 2-(N-(2-클로로-5-(트리플루오로메틸)페닐)페닐술폰아미도)-N-(피리미딘-4-일메틸)아세트아미드; 2-(N-(5-클로로-2-플루오로페닐)페닐술폰아미도)-N-(피리딘-4-일메틸)아세트아미드; 2-[(2-클로로-5-트리플루오로메틸-페닐)-(4-플루오로-벤젠술포닐)-아미노]-N-피리딘-4-일메틸-아세트아미드; 2-[(2-클로로-5-트리플루오로메틸-페닐)-(톨루엔-4-술포닐)-아미노]-N-피리딘-4-일메틸-아세트아미드; 2-[벤젠술포닐-(2-브로모-5-트리플루오로메틸-페닐)-아미노]-N-피리딘-4-일메틸-아세트아미드; 2-[벤젠술포닐-(2-클로로-5-트리플루오로메틸-페닐)-아미노]-N-(2-메틸-벤조티아졸-5-일)-아세트아미드; 2-[벤젠술포닐-(2-클로로-5-트리플루오로메틸-페닐)-아미노]-N-[4-(4-메틸-피페라진-1-일)-벤질]-아세

트아미드; 2-[벤젠술포닐-(2-클로로-5-트리플루오로메틸-페닐)-아미노]-N-[3-(4-메틸-피페라진-1-일)-벤질]-아세트아미드; 2-[벤젠술포닐-(2-클로로-5-트리플루오로메틸-페닐)-아미노]-N-벤질-아세트아미드; 2-[벤젠술포닐-(2-클로로-5-트리플루오로메틸-페닐)-아미노]-N-피리딘-4-일메틸-아세트아미드; 2-[벤젠술포닐-(2-클로로-5-트리플루오로메틸-페닐)-아미노]-N-피리딘-4-일메틸-프로피온아미드; 2-[벤젠술포닐-(2-플루오로-5-트리플루오로메틸-페닐)-아미노]-N-피리딘-4-일메틸-아세트아미드; 4 (N-(2-클로로-5-(트리플루오로메틸)페닐)페닐술폰아미도)-N-(피리딘-4-일- 메틸)부탄아미드; 4-((2-(N-(2-클로로-5-(트리플루오로메틸)페닐)페닐술폰아미도)-아세트아미도)-메틸)-1,1-디메틸피페리딘-1-이움 염화물; 4-(벤질-메틸-술파모일)-N-(2-클로로-5-트리플루오로메틸-페닐)-벤즈아미드; 4-(벤질-메틸-술파모일)-N-(2-메틸-1H-인돌-5-일)-벤즈아미드; 4-(벤질-메틸-술파모일)-N-(2-메틸-1H-인돌-5-일)-벤즈아미드; 4-(벤질-메틸-술파모일)-N-(2-메틸-벤조티아졸-5-일)-벤즈아미드; 4-(벤질-메틸-술파모일)-N-(2-메틸-벤조티아졸-6-일)-벤즈아미드; 4-(벤질-메틸-술파모일)-N-(2-메틸-벤조티아졸-6-일)-벤즈아미드; 4-(벤질-메틸-술파모일)-N-피리딘-4-일메틸-벤즈아미드; N-(2-아미노에틸)-2-(N-(2-클로로-5-(트리플루오로메틸)페닐)페닐술폰아미도)-아세트아미드; N-(2-클로로-5-(트리플루오로메틸)페닐)-N-(2-(3,4-디히드로-2,6-나프티리딘-2(1H)-일)-2-옥소에틸)벤젠술폰아미드;
N-벤조티아졸-6-일-4-(벤질-메틸-술파모일)-벤즈아미드;
N-벤조티아졸-6-일-4-(벤질-메틸-술파모일)-벤즈아미드; tert-부틸 (2-(2-(N-(2-클로로-5-(트리플루오로메틸)페닐)페닐술폰아미도)아세트아미도)-에틸)카바메이트; 그리고 tert-부틸 4-((2-(N-(2-클로로-5-(트리플루오로메틸)페닐)페닐술폰아미도)- 아세트아미도)-메틸)피페리딘-1-카르복실레이트, 그리고 임의선택적으로, 이들의 조합을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다.

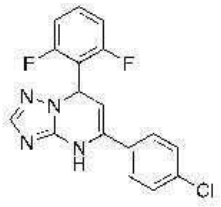
[0074] ***sAg 분비 저해제***

[0075] 본원에서 설명된 바와 같이, 용어 "sAg 분비 저해제"는 HBV-감염된 세포로부터 서브바이러스 입자 및/또는 DNA 내포 바이러스 입자를 보유하는 sAg (S, M 및/또는 L 표면 항원)의 분비를 직접적으로 또는 간접적으로 저해할 수 있는 화합물을 포함한다. 가령, 일정한 구체예에서, 상기 저해제는 예로서, 당해 분야에서 공지된 또는 본원에서 설명된 검정, 예를 들면, ELISA 검정을 이용하거나 또는 웨스턴 블롯에 의해 계측될 때, sAg의 분비를 검출가능하게 저해한다. 일정한 구체예에서, 상기 저해제는 sAg의 분비를 최소한 5%, 최소한 10%, 최소한 20%, 최소한 50%, 최소한 75%, 또는 최소한 90% 저해한다. 일정한 구체예에서, 상기 저해제는 환자에서 sAg의 혈청 수준을 최소한 5%, 최소한 10%, 최소한 20%, 최소한 50%, 최소한 75%, 또는 최소한 90% 감소시킨다.

[0076] 용어 sAg 분비 저해제는 미국 특허 번호 8,921,381에서 설명된 화합물뿐만 아니라 미국 특허 출원 공개 번호 2015/0087659 및 2013/0303552에서 설명된 화합물을 포함한다. 가령, 상기 용어는 화합물 PBHBV-001 및 PBHBV-2-15, 그리고 이들의 제약학적으로 허용되는 염을 포함한다:



PBHBV-001



PBHBV-2-15

[0077] .

[0078] ***면역자극제***

[0079] 용어 "면역자극제"는 면역 반응을 조정할 수 있는 화합물 (가령, 면역 반응을 자극할 수 있는 화합물 (가령, 어쥬번트))을 포함한다. 용어 면역자극제는 폴리이노신산:폴리시티딜산 (폴리 I:C) 및 인터페론을 포함한다.

[0080] 용어 면역자극제는 IFN 유전자의 자극기 (STING)의 효현제 및 인터류킨을 포함한다. 상기 용어는 또한, HBsAg 방출 저해제, TLR-7 효현제 (GS-9620, RG-7795), T-세포 자극기 (GS-4774), RIG-1 저해제 (SB-9200), 그리고 SMAC-모방체 (비리나판트)를 포함한다. 용어 면역자극제는 또한, 항-PD-1 항체 및 이들의 단편을 포함한다.

[0081] ***올리고머성 뉴클레오티드***

[0082] B형 간염 유전체에 표적화된 용어 올리고머성 뉴클레오티드는 애로우헤드-ARC-520을 포함한다 (미국 특허 번호 8,809,293; 및 Wooddell CI, et al., *Molecular Therapy*, **2013**, *21*, 5, 973-985를 참조한다).

[0083] 올리고머성 뉴클레오티드는 HBV 유전체의 하나 또는 그 이상의 유전자 및/또는 전사체를 표적으로 하도록 설계

될 수 있다. 이런 siRNA 분자의 실례는 본원에서 표 A에서 진술된 siRNA 분자이다.

[0084] B형 간염 유전체에 표적화된 용어 올리고머성 뉴클레오티드는 또한, 센스 가닥 및 센스 가닥에 혼성화되는 안티센스 가닥을 각각 포함하는 단리된, 이중 가닥, siRNA 분자를 포함한다. 상기 siRNA는 HBV 유전체의 하나 또는 그 이상의 유전자 및/또는 전사체를 표적으로 한다. siRNA 분자의 실례는 본원에서 표 A에서 진술된 siRNA 분자이다.

[0085] 다른 양상에서, 용어는 본원에서 표 B에서 진술된 단리된 센스 및 안티센스 가닥을 포함한다.

[0086] 용어 "B형 간염 바이러스" (HBV로서 약칭됨)는 오르토헤파드나바이러스속 (Orthohepadnavirus)의 바이러스 종을 지칭하는데, 이것은 바이러스의 헤파드나바이러스과 (Hepadnaviridae)의 일부이고, 그리고 인간에서 간 염증을 유발할 수 있다.

[0087] 용어 "D형 간염 바이러스" (HDV로서 약칭됨)는 델타바이러스속 (Deltaviridae)의 바이러스 종을 지칭하는데, 이것은 인간에서 간 염증을 유발할 수 있다.

[0088] 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "짧은 간섭 RNA" 또는 "siRNA"는 이러한 siRNA가 표적 유전자 또는 서열과 동일한 세포 내에 있을 때, 표적 유전자 또는 서열의 발현을 감소시키거나 또는 저해할 수 있는 (가령, siRNA 서열에 상보적인 mRNAs의 분해를 매개하거나 또는 이들의 번역을 저해함으로써) 이중 가닥 RNA (다시 말하면, 이중나선 RNA)를 지칭한다. siRNA는 표적 유전자 또는 서열과 실제적인 또는 완전한 동일성을 가질 수 있거나, 또는 부정합의 영역 (다시 말하면, 부정합 모티프)을 포함할 수 있다. 일정한 구체예에서, siRNA는 약 19-25개 (이중나선) 뉴클레오티드 길이일 수 있고, 그리고 바람직하게는 약 20-24, 21-22, 또는 21-23개 (이중나선) 뉴클레오티드 길이일 수 있다. siRNA 이중나선은 약 1 내지 약 4개 뉴클레오티드 또는 약 2 내지 약 3개 뉴클레오티드의 3' 오버행 및 5' 인산염 말단을 포함할 수 있다. siRNA의 실례는 제한 없이, 2개의 별개의 가닥 분자로부터 조립된 이중 가닥 폴리뉴클레오티드 분자를 포함하는데, 여기서 한쪽 가닥은 센스 가닥이고 다른 가닥은 상보성 안티센스 가닥이다.

[0089] 바람직하게는, siRNA는 화학적으로 합성된다. siRNA는 또한, 대장균 (*E. coli*) RNA분해효소 III 또는 Dicer로 더욱 긴 dsRNA (가령, 길이에서 약 25개 뉴클레오티드보다 큰 dsRNA)의 개열에 의해 산출될 수 있다. 이들 효소는 dsRNA를 생물학적으로 활성 siRNA로 처리한다 (가령, Yang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 99:9942-9947 (2002); Calegari *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 99:14236 (2002); Byrom *et al.*, *Ambion TechNotes,* 10(1):4-6 (2003); Kawasaki *et al.*, *Nucleic Acids Res.,* 31:981-987 (2003); Knight *et al.*, *Science,* 293:2269-2271 (2001); 및 Robertson *et al.*, *J. Biol. Chem.,* 243:82 (1968))를 참조한다. 바람직하게는, dsRNA는 최소한 50개 뉴클레오티드 내지 약 100, 200, 300, 400, 또는 500개 뉴클레오티드 길이이다. dsRNA는 1000, 1500, 2000, 5000개 뉴클레오티드 길이이거나, 또는 그 이상일 수 있다. dsRNA는 전체 유전자 전사체 또는 부분적인 유전자 전사체를 인코딩할 수 있다. 일정한 사례에서, siRNA는 플라스미드에 의해 인코딩될 수 있다 (가령, 헤어핀 루프를 갖는 이중나선으로 자동적으로 접히는 서열로서 전사될 수 있다).

[0090] 관용구 "표적 유전자의 발현을 저해하는"은 표적 유전자 (가령, HBV 유전체 내에 유전자)의 발현을 침묵시키거나, 감소시키거나 또는 저해하는 siRNA의 능력을 지칭한다. 유전자 침묵의 정도를 조사하기 위해, 시험 표본 (가령, 표적 유전자를 발현하는 관심되는 생물체로부터 생물학적 표본 또는 표적 유전자를 발현하는 배양 중인 세포의 표본)이 표적 유전자의 발현을 침묵시키거나, 감소시키거나 또는 저해하는 siRNA와 접촉된다. 시험 표본에서 표적 유전자의 발현은 siRNA와 접촉되지 않은 대조 표본 (가령, 표적 유전자를 발현하는 관심되는 생물체로부터 생물학적 표본 또는 표적 유전자를 발현하는 배양 중인 세포의 표본)에서 표적 유전자의 발현과 비교된다. 대조 표본 (가령, 표적 유전자를 발현하는 표본)은 100%의 값이 배정될 수 있다. 특정한 구체예에서, 표적 유전자의 발현의 침묵, 저해 또는 감소는 대조 표본 (가령, 완충액 단독, 상이한 유전자를 표적으로 하는 siRNA 서열, 스크램블된 siRNA 서열 등)에 비하여 시험 표본의 값이 약 100%, 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89%, 88%, 87%, 86%, 85%, 84%, 83%, 82%, 81%, 80%, 79%, 78%, 77%, 76%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 또는 0%일 때 달성된다. 적합한 검정은 제한 없이, 당업자에게 공지된 기술, 예를 들면, 예로서 도트 블롯, 노던 블롯, 제자리 혼성화, ELISA, 면역침전, 효소 기능을 이용한 단백질 또는 mRNA 수준의 검사뿐만 아니라 당업자에게 공지된 표현형 검정을 포함한다. 치료적 핵산, 예를 들면, siRNA의 "효과량" 또는 "치료 효과량"은 원하는 효과, 예를 들면, siRNA의 부재에서 검출된 정상적인 발현 수준과 비교하여 표적 서열의 발현의 저해를 달성하는데 충분한 양이다. 특정한 구체예에서, 표적 유전자 또는 표적 서열의 발현의 저해는 대조 (가령, 완충액 단독, 상이한 유전자를 표적으로 하는 siRNA 서열, 스크램블된 siRNA 서열 등)에 비하여 siRNA로 획득된 값이 약 100%, 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%,

92%, 91%, 90%, 89%, 88%, 87%, 86%, 85%, 84%, 83%, 82%, 81%, 80%, 79%, 78%, 77%, 76%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 또는 0%일 때 달성된다. 표적 유전자 또는 표적 서열의 발현을 계측하기 위한 적합한 검정은 당업자에게 공지된 기술, 예를 들면, 예로서 도트 블롯, 노던 블롯, 제자리 혼성화, ELISA, 면역침전, 효소 기능을 이용한 단백질 또는 mRNA 수준의 검사뿐만 아니라 당업자에게 공지된 표현형 검정을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다.

[0091] 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "핵산"은 단일- 또는 이중 가닥 형태에서 최소한 2개의 뉴클레오티드 (다시 말하면, 데옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드)를 내포하는 중합체를 지칭하고, 그리고 DNA 및 RNA를 포함한다. "뉴클레오티드"는 당 데옥시리보오스 (DNA) 또는 리보오스 (RNA), 염기 및 인산염 기를 내포한다. 뉴클레오티드는 인산염 기를 통해 함께 연결된다. "염기"는 퓨린 및 피리미딘을 포함하는데, 이들은 자연 화합물 아데닌, 티민, 구아닌, 시토신, 우라실, 이노신, 그리고 퓨린 및 피리미딘의 자연 유사체 및 합성 유도체를 더욱 포함하고, 이들 유사체 및 유도체는 새로운 반응성 기, 예를 들면, 하지만 제한 없이, 아민, 알코올, 티올, 카르복실산염 및 알킬할라이드를 배치시키는 변형을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. 핵산은 공지된 뉴클레오티드 유사체 또는 변형된 중추 잔기 또는 연쇄를 내포하는 핵산을 포함하는데, 이들은 합성, 자연발생 및 비자연발생이고, 그리고 참고 핵산과 유사한 결합 성질을 갖는다. 이런 유사체 및/또는 변형된 잔기의 실례는 제한 없이, 포스포로티오에이트, 포스포라미데이트, 메틸 포스포네이트, 키랄-메틸 포스포네이트, 2'-O-메틸 리보뉴클레오티드 및 펩티드-핵산 (PNAs)을 포함한다. 추가적으로, 핵산은 하나 또는 그 이상의 UNA 모이어티를 포함할 수 있다.

[0092] 용어 "핵산"은 임의의 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드를 포함하는데, 60개까지의 뉴클레오티드를 내포하는 단편은 일반적으로 올리고뉴클레오티드로 명명되고, 그리고 더욱 긴 단편은 폴리뉴클레오티드로 명명된다. 데옥시리보올리고뉴클레오티드는 5' 및 3' 탄소에서 인산염에 공유 결합되어 교대성, 분지되지 않은 중합체를 형성하는, 데옥시리보오스로 불리는 5-탄소 당으로 구성된다. DNA는 예로서, 안티센스 분자, 플라스미드 DNA, 프리-압축된 DNA, PCR 산물, 벡터, 발현 카세트, 키메라 서열, 염색체 DNA, 또는 이들 군의 유도체 및 조합의 형태일 수 있다. 리보올리고뉴클레오티드는 5-탄소 당이 리보오스인 유사한 반복 구조로 구성된다. RNA는 예로서, 짧은 간섭 RNA (siRNA), Dicer-기질 dsRNA, 작은 헤어핀 RNA (shRNA), 비대칭 간섭 RNA (aiRNA), 마이크로RNA (miRNA), mRNA, tRNA, rRNA, tRNA, 바이러스 RNA (vRNA), 그리고 이들의 조합의 형태일 수 있다. 따라서, 용어 "폴리뉴클레오티드" 및 "올리고뉴클레오티드"는 자연발생 염기, 당 및 당간 (중추) 연쇄로 구성되는 뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드 단위체의 중합체 또는 소중합체를 지칭한다. 용어 "폴리뉴클레오티드" 및 "올리고뉴클레오티드"는 또한, 유사하게 기능하는, 비자연발생 단위체, 또는 이들의 일부를 포함하는 중합체 또는 소중합체를 포함한다. 이런 변형된 또는 치환된 올리고뉴클레오티드는 종종, 예로서, 증강된 세포 흡수, 감소된 면역원성, 그리고 뉴클레아제의 존재에서 증가된 안정성과 같은 성질 때문에, 선천적 형태보다 바람직하다.

[0093] 달리 지시되지 않으면, 특정 핵산 서열은 또한, 명시적으로 지시된 서열뿐만 아니라, 보존성으로 변형된 변이체 (가령, 축중성 코돈 치환), 대립형질, 오르소로그, SNPs 및 상보성 서열을 함축적으로 포괄한다. 구체적으로, 축중성 코돈 치환은 하나 또는 그 이상의 선별된 (또는 모든) 코돈의 세 번째 위치가 혼합된-염기 및/또는 데옥시이노신 잔기로 치환되는 서열을 산출함으로써 달성될 수 있다 (Batzer *et al.*, *Nucleic Acid Res.*, 19:5081 (1991); Ohtsuka *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 260:2605-2608 (1985); Rossolini *et al.*, *Mol. Cell. Probes*, 8:91-98 (1994)).

[0094] "단리된" 또는 "정제된" DNA 분자 또는 RNA 분자는 이의 선천적 환경과는 별개로 존재하는 DNA 분자 또는 RNA 분자이다. 단리된 DNA 분자 또는 RNA 분자는 정제된 형태에서 존재할 수 있거나 또는 비선천적 환경, 예를 들면, 예로서, 유전자도입 숙주 세포에서 존재할 수 있다. 가령, "단리된" 또는 "정제된" 핵산 분자 또는 이의 생물학적으로 활성 부분은 재조합 기술에 의해 생산될 때 다른 세포 물질 또는 배양 배지가 실제적으로 없거나, 또는 화학적으로 합성될 때 화학적 전구체 또는 다른 화학물질이 실제적으로 없다. 한 구체예에서, "단리된" 핵산은 상기 핵산이 유래되는 생물체의 유전체 DNA에서 상기 핵산에 자연적으로 접하는 서열 (다시 말하면, 상기 핵산의 5′ 및 3' 단부에서 위치된 서열)이 없다. 가령, 다양한 구체예에서, 단리된 핵산 분자는 상기 핵산이 유래되는 세포의 유전체 DNA에서 상기 핵산 분자에 자연적으로 접하는 약 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0.5 kb, 또는 0.1 kb보다 적은 뉴클레오티드 서열을 내포할 수 있다.

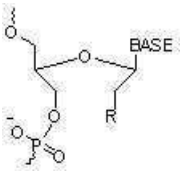
[0095] 용어 "유전자"는 폴리펩티드 또는 전구체 폴리펩티드의 생산에 필요한 부분적인 길이 또는 전체 길이 코딩 서열을 포함하는 핵산 (가령, DNA 또는 RNA) 서열을 지칭한다.

[0096] 본원에서 이용된 바와 같이, "유전자 산물"은 유전자의 산물, 예를 들면, RNA 전사체 또는 폴리펩티드를 지칭한

다.

[0097] 용어 "열린 핵염기 유사체" ("UNA"로서 약칭됨)는 리보오스 고리의 C2' 및 C3' 원자가 공유 연결되지 않는 비환상 핵염기를 지칭한다. 용어 "열린 핵염기 유사체"는 구조 A로서 확인된 다음의 구조를 갖는 핵염기 유사체를 포함한다:

[0098] 구조 A

[0099] 

[0100] 여기서 R은 히드록실이고, 그리고 Base는 임의의 자연 또는 비자연 염기, 예를 들면, 예로서, 아데닌 (A), 시토신 (C), 구아닌 (G) 및 티민 (T)이다. UNA는 U.S. 특허 일련 번호 8,314,227에서 비환상 2'-3'-세코-뉴클레오티드 단위체로서 확인된 분자를 포함한다.

[0101] 용어 "지질"은 지방산의 에스테르를 포함하지만 이들에 한정되지 않고, 그리고 물에서 불용성이지만 많은 유기 용매에서 가용성인 것으로 특징되는 일군의 유기 화합물을 지칭한다. 이들은 통상적으로, 최소한 3가지 부류로 나눠진다: (1) "단순 지질," 이것은 지방 및 오일뿐만 아니라 왁스를 포함한다; (2) "화합물 지질," 이것은 인지질 및 당지질을 포함한다; 그리고 (3) "유도 지질", 예를 들면, 스테로이드.

[0102] 용어 "지질 입자"는 치료적 핵산 (가령, siRNA)을 관심되는 표적 부위 (가령, 세포, 조직, 장기 등)로 전달하는데 이용될 수 있는 지질 제제를 포함한다. 바람직한 구체예에서, 지질 입자는 전형적으로, 양이온성 지질, 비-양이온성 지질, 그리고 임의선택적으로, 입자의 응집을 예방하는 접합된 지질로부터 형성된다. 핵산 분자 (가령, siRNA 분자)를 포함하는 지질 입자는 핵산-지질 입자로서 지칭된다. 전형적으로, 핵산은 지질 입자 내에 완전히 캡슐화되고, 따라서 상기 핵산은 효소적 분해로부터 보호된다.

[0103] 일정한 사례에서, 핵산-지질 입자는 전신 적용에 매우 유용한데, 그 이유는 이들이 정맥내 (i.v.) 주사 이후에 연장된 순환 수명을 전시할 수 있고, 이들이 원위 부위 (가령, 투여 부위로부터 물리적으로 분리된 부위)에서 축적될 수 있고, 그리고 이들이 이들 원위 부위에서 표적 유전자 발현의 침묵을 매개할 수 있기 때문이다. 핵산은 PCT 공개 번호 WO 00/03683에서 진술된 바와 같이 축합제로 복합화되고 지질 입자 내에 캡슐화될 수 있는데, 이것의 개시는 본원에서 모든 점에서 전체적으로 참조로서 편입된다.

[0104] 지질 입자는 전형적으로, 약 30 nm 내지 약 150 nm, 약 40 nm 내지 약 150 nm, 약 50 nm 내지 약 150 nm, 약 60 nm 내지 약 130 nm, 약 70 nm 내지 약 110 nm, 약 70 nm 내지 약 100 nm, 약 80 nm 내지 약 100 nm, 약 90 nm 내지 약 100 nm, 약 70 내지 약 90 nm, 약 80 nm 내지 약 90 nm, 약 70 nm 내지 약 80 nm, 또는 약 30 nm, 35 nm, 40 nm, 45 nm, 50 nm, 55 nm, 60 nm, 65 nm, 70 nm, 75 nm, 80 nm, 85 nm, 90 nm, 95 nm, 100 nm, 105 nm, 110 nm, 115 nm, 120 nm, 125 nm, 130 nm, 135 nm, 140 nm, 145 nm, 또는 150 nm의 평균 직경을 갖고, 그리고 실제적으로 비독성이다. 이에 더하여, 핵산은 지질 입자 내에 존재할 때, 수성 용액에서 뉴클레아제로 분해에 내성이다. 핵산-지질 입자 및 이들의 제조 방법은 예로서, U.S. 특허 공개 번호 20040142025 및 20070042031에서 개시되는데, 이들의 개시는 본원에서 모든 점에서 전체적으로 참조로서 편입된다.

[0105] 본원에서 이용된 바와 같이, "지질 캡슐화된"은 완전 캡슐화, 부분적인 캡슐화, 또는 둘 모두로 치료적 핵산, 예를 들면, siRNA를 제공하는 지질 입자를 지칭할 수 있다. 바람직한 구체예에서, 핵산 (가령, siRNA)은 지질 입자 내에 완전히 캡슐화된다 (가령, 핵산-지질 입자를 형성하기 위해).

[0106] 용어 "지질 접합체"는 지질 입자의 응집을 저해하는 접합된 지질을 지칭한다. 이런 지질 접합체는 PEG-지질 접합체, 예를 들면, 예로서 디알킬옥시프로필에 연계된 PEG (가령, PEG-DAA 접합체), 디아실글리세롤에 연계된 PEG (가령, PEG-DAG 접합체), 콜레스테롤에 연계된 PEG, 포스파티딜에탄올아민에 연계된 PEG 및 세라미드에 접합된 PEG (가령, U.S. 특허 번호 5,885,613을 참조한다), 양이온성 PEG 지질, 폴리옥사졸린 (POZ)-지질 접합체 (가령, POZ-DAA 접합체), 폴리아미드 소중합체 (가령, ATTA-지질 접합체), 그리고 이들의 혼합물을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. POZ-지질 접합체의 추가 실례는 PCT 공개 번호 WO 2010/006282에서 설명된다. PEG 또는 POZ는 지질에 직접적으로 접합될 수 있거나 또는 링커 모이어티를 거쳐 지질에 연결될 수 있다. 가령, 비-에스테르 내포 링커 모이어티 및 에스테르-내포 링커 모이어티를 비롯하여, PEG 또는 POZ를 지질에 연계하는데 적합한 임의의 링커 모이어티가 이용될 수 있다. 일정한 바람직한 구체예에서, 비-에스테르 내포 링커 모이어티,

예를 들면, 아미드 또는 카바메이트가 이용된다.

[0107] 용어 "양친매성 지질"은 부분적으로, 지질 물질의 소수성 부분은 소수성 상으로 배향정위하고, 반면 친수성 부분은 수성 상을 향해 배향정위하는 임의의 적합한 물질을 지칭한다. 친수성 특징은 극성 또는 하전된 기, 예를 들면, 탄수화물, 인산염, 카르복실산, 술파토, 아미노, 술피드릴, 니트로, 히드록실 및 다른 유사 기의 존재에서 유래한다. 소수성은 긴 사슬 포화된 및 불포화된 지방족 탄화수소 기를 포함하지만 이들에 한정되지 않는 무극성 기, 그리고 하나 또는 그 이상의 방향족, 지환족 또는 헤테로환상 기(들)에 의해 치환된 이런 기의 포함에 의해 부여될 수 있다. 양친매성 화합물의 실례는 인지질, 아미노지질 및 스핑고지질을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다.

[0108] 인지질의 대표적인 실례는 포스파티딜콜린, 포스파티딜에탄올아민, 포스파티딜세린, 포스파티딜이노시톨, 포스파티드산, 팔미토일올레오일 포스파티딜콜린, 리소포스파티딜콜린, 리소포스파티딜에탄올아민, 디팔미토일포스파티딜콜린, 디올레오일포스파티딜콜린, 디스테아로일포스파티딜콜린 및 디리놀레오일포스파티딜콜린을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. 인을 결여하는 다른 화합물, 예를 들면, 스핑고지질, 글리코스핑고지질 패밀리, 디아실글리세롤 및 β-아실옥시 산 또한, 양친매성 지질로서 지정된 군 내에 있다. 추가적으로, 앞서 설명된 양친매성 지질은 트리글리세리드 및 스테롤을 비롯한 다른 지질과 혼합될 수 있다.

[0109] 용어 "중성 지질"은 선별된 pH에서 하전되지 않은 또는 중성 쌍성 이온성 형태로 존재하는 다수의 지질 종류 중에서 한 가지를 지칭한다. 생리학적 pH에서, 이런 지질은 예로서, 디아실포스파티딜콜린, 디아실포스파티딜에탄올아민, 세라미드, 스핑고미엘린, 세팔린, 콜레스테롤, 세레브로시드 및 디아실글리세롤을 포함한다.

[0110] 용어 "비-양이온성 지질"은 임의의 양친매성 지질뿐만 아니라 임의의 다른 중성 지질 또는 음이온성 지질을 지칭한다.

[0111] 용어 "음이온성 지질"은 생리학적 pH에서 음성으로 하전되는 임의의 지질을 지칭한다. 이들 지질은 포스파티딜글리세롤, 카디오리핀, 디아실포스파티딜세린, 디아실포스파티드산, N-도데카노일 포스파티딜에탄올아민, N-숙시닐 포스파티딜에탄올아민, N-글루타릴포스파티딜에탄올아민, 리실포스파티딜글리세롤, 팔미토일올레오일포스파티딜글리세롤 (POPG), 그리고 중성 지질에 결합된 다른 음이온성 변형 기를 포함하지만 이들에 한정되지 않는다.

[0112] 용어 "소수성 지질"은 긴 사슬 포화된 및 불포화된 지방족 탄화수소 기를 포함하지만 이들에 한정되지 않는 무극성 기, 그리고 하나 또는 그 이상의 방향족, 지환족 또는 헤테로환상 기(들)에 의해 임의선택적으로 치환된 이런 기를 갖는 화합물을 지칭한다. 적합한 실례는 디아실글리세롤, 디알킬글리세롤, N-N-디알킬아미노, 1,2-디아실옥시-3-아미노프로판 및 1,2-디알킬-3-아미노프로판을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다.

[0113] 용어 "양이온성 지질" 및 "아미노 지질"은 1개, 2개, 3개 또는 그 이상의 지방산 또는 지방 알킬 사슬 및 pH-적정가능한 아미노 헤드 기 (가령, 알킬아미노 또는 디알킬아미노 헤드 기)를 갖는 이들 지질 및 이들의 염을 포함하도록 본원에서 교체가능하게 이용된다. 양이온성 지질은 전형적으로, 양이온성 지질의 pK_a보다 낮은 pH에서 양자화되고 (다시 말하면, 양성으로 하전되고), 그리고 pK_a보다 높은 pH에서 실제적으로 중성이다. 양이온성 지질은 또한, 적정가능한 양이온성 지질로 명명될 수 있다. 일부 구체예에서, 양이온성 지질은 양성자 공여성 삼차 아민 (가령, pH-적정가능한) 헤드 기; C_{18} 알킬 사슬, 여기서 각 알킬 사슬은 독립적으로 0 내지 3개 (가령, 0, 1, 2, 또는 3개)의 이중 결합이고; 그리고 헤드 기 및 알킬 사슬 사이에 에테르, 에스테르 또는 케탈 연쇄를 포함한다. 이런 양이온성 지질은 DSDMA, DODMA, DLinDMA, DLenDMA, γ-DLenDMA, DLin-K-DMA, DLin-K-C2-DMA (DLin-C2K-DMA, XTC2 및 C2K로서 또한 알려져 있음), DLin-K-C3-DMA, DLin-K-C4-DMA, DLen-C2K-DMA, γ-DLen-C2K-DMA, DLin-M-C2-DMA (MC2로서 또한 알려져 있음), 그리고 DLin-M-C3-DMA (MC3으로서 또한 알려져 있음)를 포함하지만 이들에 한정되지 않는다.

[0114] 용어 "염"은 임의의 음이온성 및 양이온성 복합체, 예를 들면, 양이온성 지질 및 하나 또는 그 이상의 음이온 사이에 형성된 복합체를 포함한다. 음이온의 무제한적 실례는 무기 및 유기 음이온, 예를 들면, 수소화물, 플루오르화물, 염화물, 브롬화물, 요오드화물, 옥살산염 (가령, 헤미옥살레이트), 인산염, 포스포네이트, 수소 인산염, 양수소 인산염, 산화물, 탄산염, 중탄산염, 질산염, 아질산염, 차아질산, 중아황산염, 황화물, 아황산염, 중황산염, 황산염, 티오황산염, 수소 황산염, 붕산염, 포름산염, 아세트산염, 벤조산염, 구연산염, 주석산염, 젖산염, 아크릴레이트, 폴리아크릴레이트, 푸마르산염, 말레인산염, 이타콘산염, 글리콜산염, 글루콘산염, 말산염, 만델레이트, 티글레이트, 아스코르브산염, 살리실산염, 폴리메타크릴레이트, 과염소산염, 염소산염, 아염소산염, 차아염소산염, 브롬산염, 하이포아브롬산염, 요오드산염, 알킬술폰산염, 아릴술폰산염, 비산염,

아비산염, 제2크롬산염, 중크롬산염, 시안화물, 시안산염, 티오시안산염, 수산화물, 과산화물, 과망간산염, 그리고 이들의 혼합물을 포함한다. 특정한 구체예에서, 본원에서 개시된 양이온성 지질의 염은 결정성 염이다.

[0115] 용어 "알킬"은 1 내지 24개 탄소 원자를 내포하는 직쇄 또는 분지된, 비환상 또는 환상, 포화된 지방족 탄화수소를 포함한다. 대표적인 포화된 직쇄 알킬은 메틸, 에틸, *n*-프로필, *n*-부틸, *n*-펜틸, *n*-헥실 등을 포함하지만 이들에 한정되지 않고, 반면 포화된 분지된 알킬은 제한 없이, 이소프로필, *sec*-부틸, 이소부틸, *tert*-부틸, 이소펜틸 등을 포함한다. 대표적인 포화된 환상 알킬은 시클로프로필, 시클로부틸, 시클로펜틸, 시클로헥실 등을 포함하지만 이들에 한정되지 않고, 반면 불포화된 환상 알킬은 제한 없이, 시클로펜테닐, 시클로헥세닐 등을 포함한다.

[0116] 용어 "알케닐"은 인접한 탄소 원자 사이에 최소한 하나의 이중 결합을 내포하는, 상기 규정된 바와 같은 알킬을 포함한다. 알케닐은 *시스* 및 *트랜스* 이성질체 둘 모두를 포함한다. 대표적인 직쇄 및 분지된 알케닐은 에틸레닐, 프로필레닐, 1-부테닐, 2-부테닐, 이소부틸레닐, 1-펜테닐, 2-펜테닐, 3-메틸-1-부테닐, 2-메틸-2-부테닐, 2,3-디메틸-2-부테닐 등을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다.

[0117] 용어 "알키닐"은 인접한 탄소 사이에 최소한 하나의 삼중 결합을 부가적으로 내포하는, 상기 규정된 바와 같은 임의의 알킬 또는 알케닐을 포함한다. 대표적인 직쇄 및 분지된 알키닐은 제한 없이, 아세틸레닐, 프로피닐, 1-부티닐, 2-부티닐, 1-펜티닐, 2-펜티닐, 3-메틸-1 부티닐 등을 포함한다.

[0118] 용어 "아실"은 부착점에서 탄소가 아래에 규정된 바와 같은 옥소 기로 치환되는 임의의 알킬, 알케닐, 또는 알키닐을 포함한다. 다음은 아실 기의 무제한적 실례이다: -C(=O)알킬, -C(=O)알케닐 및 -C(=O)알키닐.

[0119] 용어 "헤테로환"은 포화된, 불포화된, 또는 방향족이고, 그리고 질소, 산소 및 황에서 독립적으로 선택되는 1 또는 2개의 헤테로원자를 내포하는 5- 내지 7-원 단일환상, 또는 7- 내지 10-원 이중환상, 헤테로환상 고리를 포함하고, 그리고 여기서 질소 및 황 헤테로원자는 임의선택적으로 산화될 수 있고, 그리고 질소 헤테로원자는 임의선택적으로 사차화될 수 있는데, 상기 헤테로환 중에서 하나가 벤젠 고리에 융합되는 이중환상 고리가 포함된다. 헤테로환은 임의의 헤테로원자 또는 탄소 원자를 통해 부착될 수 있다. 헤테로환은 아래에 규정된 바와 같은 헤테로아릴뿐만 아니라 모르폴리닐, 피롤리디노닐, 피롤리디닐, 피페리디닐, 피페리지닐, 히단토이닐, 발레로락타밀, 옥시라닐, 옥세타닐, 테트라히드로푸라닐, 테트라히드로피라닐, 테트라히드로피리디닐, 테트라히드로피리미디닐, 테트라히드로티오페닐, 테트라히드로티오피라닐, 테트라히드로피리미디닐, 테트라히드로티오페닐, 테트라히드로티오피라닐 등을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다.

[0120] 용어 "임의선택적으로 치환된 알킬", "임의선택적으로 치환된 알케닐", "임의선택적으로 치환된 알키닐", "임의선택적으로 치환된 아실", 그리고 임의선택적으로 치환된 헤테로환"은 치환될 때, 최소한 하나의 수소 원자가 치환체로 대체된다는 것을 의미한다. 옥소 치환체 (=O)의 경우에, 2개 수소 원자가 대체된다. 이와 관련하여, 치환체는 옥소, 할로겐, 헤테로환, -CN, $-OR^x$, $-NR^xR^y$, $-NR^xC(=O)R^y$, $-NR^xSO_2R^y$, $-C(=O)R^x$, $-C(=O)OR^x$, $-C(=O)NR^xR^y$, $-SO_nR^x$ 및 $-SO_nNR^xR^y$를 포함하지만 이들에 한정되지 않고, 여기서 n은 0, 1, 또는 2이고, R^x 및 R^y는 동일하거나 상이하고 독립적으로 수소, 알킬, 또는 헤테로환이고, 그리고 알킬 및 헤테로환 치환체는 각각 옥소, 할로겐, -OH, -CN, 알킬, $-OR^x$, 헤테로환, $-NR^xR^y$, $-NR^xC(=O)R^y$, $-NR^xSO_2R^y$, $-C(=O)R^x$, $-C(=O)OR^x$, $-C(=O)NR^xR^y$, $-SO_nR^x$ 및 $-SO_nNR^xR^y$ 중에서 하나 또는 그 이상으로 더욱 치환될 수 있다. 용어 "임의선택적으로 치환된"은 치환체의 목록 앞에서 이용될 때, 목록 내에 각 치환체가 본원에서 설명된 바와 같이 임의선택적으로 치환될 수 있다는 것을 의미한다.

[0121] 용어 "할로겐"은 플루오르, 클로로, 브로모 및 요오드를 포함한다.

[0122] 용어 "융해성"은 세포의 막과 융합하는 지질 입자의 능력을 지칭한다. 막은 원형질막, 또는 소기관, 예를 들면, 엔도솜, 핵 등을 둘러싸는 막일 수 있다.

[0123] 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "수성 용액"은 물을 전체적으로 또는 부분적으로 포함하는 조성물을 지칭한다.

[0124] 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "유기 지질 용액"은 지질을 갖는 유기 용매를 전체적으로 또는 부분적으로 포함하는 조성물을 지칭한다.

[0125] 지질 입자를 설명하는데 이용될 때 용어 "전자 밀도 코어"는 동결 투과 전자 현미경검사 ("cyroTEM")를 이용하

여 가시화될 때, 지질 입자의 내측 부분의 어두운 모습을 지칭한다. 일부 지질 입자는 전자 밀도 코어를 갖고 지질 이중층 구조를 결여한다. 일부 지질 입자는 전자 밀도 코어를 갖고, 지질 이중층 구조를 결여하고, 그리고 역 육각형 또는 입방 위상 구조를 갖는다. 이론에 한정됨 없이, 비-이중층 지질 패킹은 내부에 물 및 핵산을 갖는 지질 실린더의 3차원 네트워크, 다시 말하면, 핵산을 내포하는 수성 통로로 관입된 본질적으로 지질 비말을 제공하는 것으로 생각된다.

[0126] 본원에서 이용된 바와 같이, "원위 부위"는 물리적으로 분리된 부위를 지칭하는데, 이것은 인접한 모세혈관상에 한정되지 않고, 생물체 전역에서 광범위하게 분포된 부위를 포함한다.

[0127] 핵산-지질 입자에 관계하여 "혈청-안정된"은 입자가 유리 DNA 또는 RNA를 유의미하게 분해할 혈청 또는 뉴클레아제 검정에 노출 후 유의미하게 분해되지 않는다는 것을 의미한다. 적합한 검정은 예로서, 기준 혈청 검정, DNA분해효소 검정, 또는 RNA분해효소 검정을 포함한다.

[0128] 본원에서 이용된 바와 같이, "전신 전달"은 생물체 내에서 활성제, 예를 들면, siRNA의 광범위한 생체분포를 야기하는 지질 입자의 전달을 지칭한다. 일부 투여 기술은 일정한 작용제의 전신 전달을 야기할 수 있지만, 다른 것들에 대해서는 그러지 못한다. 전신 전달은 유용한 양, 바람직하게는 치료량의 작용제가 대부분의 신체 부위에 노출된다는 것을 의미한다. 광범위한 생체분포를 획득하는 것은 일반적으로, 작용제가 투여 부위에서 원위의 질환 부위에 도달하기 전, 급속히 분해 또는 소실 (가령, 처음 통과 장기 (간, 폐 등)에 의해 또는 신속한, 비특이적 세포 결합에 의해)되지 않도록 하는 혈액 수명을 필요로 한다. 지질 입자의 전신 전달은 예로서, 정맥내, 피하 및 복막내를 비롯한 당해 분야에서 공지된 임의의 수단에 의할 수 있다. 바람직한 구체예에서, 지질 입자의 전신 전달은 정맥내 전달에 의한다.

[0129] 본원에서 이용된 바와 같이, "국부 전달"은 생물체 내에서 표적 부위에 직접적으로 활성제, 예를 들면, siRNA의 전달을 지칭한다. 가령, 작용제는 질환 부위, 다른 표적 부위, 또는 표적 장기, 예를 들면, 간, 심장, 췌장, 신장, 기타 등등 내로 직접적인 주사에 의해 국부 전달될 수 있다.

[0130] 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "바이러스 입자 부하"는 체액, 예를 들면, 혈액에서 존재하는 바이러스 입자 (가령, HBV 및/또는 HDV)의 숫자의 척도를 지칭한다. 가령, 입자 부하는 가령, 혈액의 밀리리터당 바이러스 입자의 숫자로서 표현될 수 있다. 입자 부하 시험은 핵산 증폭 기초된 시험뿐만 아니라 비-핵산-기초된 시험을 이용하여 수행될 수 있다 (가령, Puren et al., The Journal of Infectious Diseases, 201:S27-36 (2010)을 참조한다).

[0131] 용어 "포유동물"은 임의의 포유류 종, 예를 들면, 인간, 생쥐, 쥐, 개, 고양이, 햄스터, 기니 피그, 토끼, 가축, 기타 등등을 지칭한다.

[0132] **[표 A]**

[0133]

명칭	이중나선 서열	IC 50 (nM)
1m	5' A g G u A U g u U G C C C g U u U G U U U 3' (서열 번호:1) 3' U U U C C A u A C A A C G G g C A A A C A U U 5' (서열 번호:2)	1.43
2m	5' G C u c A g U U U A C U A G U G C c A U U 3' (서열 번호:3) 3' U U C g A G U C A A A u G A U C A C G G U U 5' (서열 번호:4)	0.37
3m	5' C C G U g u G C A C U u C G C u u C A U U 3' (서열 번호:5) 3' U U G g C A C A C g U G A A G C G A A G U U 5' (서열 번호:6)	0.06
4m	5' G C u c A g U U U A C U A G U G C c A U U 3' (서열 번호:7) 3' U U C g A G U C A A A u G A U C A C G G U U 5' (서열 번호:8)	0.31

5m	5' C C G U g u G C A C U u C G C u U C A U U 3' (서열 번호:9) 3' U U G g C A C A C g U G A A G C G A A G U 5' (서열 번호:10)	0.06
6m	5' C u g g C U C A G U U U A C u A g U G U U 3' (서열 번호:11) 3' U U G A C C g A g U C A A A U g A U C A C 5' (서열 번호:12)	0.05
7m	5' C C G U g u G C A C U u C G C u U C A U U 3' (서열 번호:13) 3' U U G g C A C A C g U G A A G C G A A G U 5' (서열 번호:14)	0.06
8m	5' G C u C A g U U U A C u A g U G C C A U U 3' (서열 번호:15) 3' U U C G A G u C A A A U G A U C A C G G U 5' (서열 번호:16)	0.24
9m	5' A g G u A U G u U G C C C g U u U G U U U 3' (서열 번호:17) 3' U U u C C A u A C A A C G G g C A A A C A 5' (서열 번호:18)	0.13
10m	5' G C C g A u C C A U A C u g C g g A A U U 3' (서열 번호:19) 3' U U C g G C U A g G U A U g A C G C C U U 5' (서열 번호:20)	0.34
11m	5' G C C g A u C C A U A C u g C g g A A U U 3' (서열 번호:21) 3' U U C g G C U A g G U A U g A C G C C U U 5' (서열 번호:22)	0.31
12m	5' G C C g A u C C A U A C u g C G g A A U U 3' (서열 번호:23) 3' U U C g G C U A g G U A U g A C G C C U U 5' (서열 번호:24)	0.16
13m	5' G C C g A u C C A U A C u g C G g A A U U 3' (서열 번호:25) 3' U U C g G C U A g G U A U g A C G C C U U 5' (서열 번호:26)	0.2
14m	5' G C u C A g U U U A C u A g U G C C A U U 3' (서열 번호:27) 3' U U C G A G u C A A A U G A U C A C G G U 5' (서열 번호:28)	0.16
15m	5' C u g G C u C A G U U u A C U A G U G U U 3' (서열 번호:29) 3' U U G A C C g A G U C A A A U G A U C A C 5' (서열 번호:30)	0.17

소문자 = 2'O-메틸 변형
밑줄 = UNA 모이어티

[0134]

[0135] 올리고뉴클레오티드 (가령, 표 B에서 진술된 센스 및 안티센스 RNA 가닥)는 표적 폴리뉴클레오티드 서열에 특이적으로 혼성화하거나 또는 이것에 상보적이다. 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "특이적으로 혼성화가능한" 및 "상보성"은 안정된 및 특이적 결합이 DNA 또는 RNA 표적 및 올리고뉴클레오티드 사이에 일어나도록 하는 충분한 정도의 상보성을 지시한다. 올리고뉴클레오티드는 특이적으로 혼성화가능하기 위해 표적 핵산 서열에 100% 상보적일 필요는 없는 것으로 이해된다. 바람직한 구체예에서, 올리고뉴클레오티드는 표적 서열에 상기 올리고뉴클레오티드의 결합이 표적 서열의 정상적인 기능을 간섭하여 그것으로부터 유용성 또는 발현의 상실을 유발하고, 그리고 특이적 결합이 요망되는 조건 하에, 다시 말하면, 생체내 검정 또는 치료적 처치의 경우에 생리학적 상태 하에, 또는 시험관내 검정의 경우에 이들 검정이 수행되는 조건 하에 비표적 서열에 상기 올리고뉴클레오티드의 비특이적 결합을 방지하는 충분한 정도의 상보성이 있을 때 특이적으로 혼성화가능하다. 따라서, 올리고뉴클레오티드는 이것이 표적으로 하거나 또는 이것이 특이적으로 혼성화하는 유전자 또는 mRNA 서열의 영역과 비교하여 1, 2, 3개, 또는 그 이상의 염기 치환을 포함할 수 있다.

[0136] [표 B]

명칭	센스 서열 (5'-3')	안티센스 서열 (5' -3')
1m	AgGuAUguUGCCCgUuUGUUU (서열 번호:1)	ACAAACgGGCAACAuACCUUU (서열 번호:2)
2m	GCucAgUUUACUAGUGCcAUU (서열 번호:3)	UGGCACUAGuAAACUGAgCUU (서열 번호:4)
3m	CCGUguGCACUuCGCuuCAUU (서열 번호:5)	UGAAGCGAAGUgCACACgGUU (서열 번호:6)
4m	GCucAgUUUACUAGUGCcAUU (서열 번호:7)	UGGCACUAGuAAACUGAgCUU (서열 번호:8)
5m	CCGUguGCACUuCGCuUCAUU (서열 번호:9)	UGAAGCGAAGUgCACACgGUU (서열 번호:10)
6m	CuggCUCAGUUUACuAgUGUU (서열 번호:11)	CACUAgUAAACUgAgCCAGUU (서열 번호:12)
7m	CCGUguGCACUuCGCuUCAUU (서열 번호:13)	UGAAGCGAAGUgCACACgGUU (서열 번호:14)
8m	GCuCAgUUUACuAgUGCCAUU (서열 번호:15)	UGGCACUAGUAAACuGAGCUU (서열 번호:16)
9m	AgGuAUGuUGCCCgUuUGUUU (서열 번호:17)	ACAAACgGGCAACAuACCuUU (서열 번호:18)
10m	GCCgAuCCAUACugCggAAUU (서열 번호:19)	UUCCGCAgUAUGgAUCGgCUU (서열 번호:20)
11m	GCCgAuCCAUACugCggAAUU (서열 번호:21)	UUCCGCAgUAUGgAUCGgCUU (서열 번호:22)
12m	GCCgAuCCAUACugCGgAAUU (서열 번호:23)	UUCCGCAgUAUGgAUCGgCUU (서열 번호:24)
13m	GCCgAuCCAUACugCGgAAUU (서열 번호:25)	UUCCGCAgUAUGgAUCGgCUU (서열 번호:26)
14m	GCuCAgUUUACuAgUGCCAUU (서열 번호:27)	UGGCACUAGUAAACuGAGCUU (서열 번호:28)
15m	CugGCuCAGUUUuACUAGUGUU (서열 번호:29)	CACUAGUAAACUGAgCCAGUU (서열 번호:30)
소문자 = 2'O-메틸 변형 밑줄 = UNA 모이어티		

[0137]

[0138] **siRNA 분자 산출**

[0139] siRNA는 예로서, 하나 또는 그 이상의 단리된 짧은 간섭 RNA (siRNA) 이중나선, 더욱 긴 이중 가닥 RNA (dsRNA), 또는 DNA 플라스미드에서 전사 카세트로부터 전사된 siRNA 또는 dsRNA를 비롯한 여러 형태에서 제공될 수 있다. 일부 구체예에서, siRNA는 효소적으로 또는 부분적인/전체 유기 합성에 의해 생산될 수 있고, 그리고 변형된 리보뉴클레오티드는 시험관내 효소적 또는 유기 합성에 의해 도입될 수 있다. 일정한 사례에서, 각 가닥은 화학적으로 제조된다. RNA 분자를 합성하는 방법, 예를 들면, Verma 및 Eckstein (1998)에서 설명된 바와 같은 또는 본원에서 설명된 바와 같은 화학적 합성 방법은 당해 분야에서 공지된다.

[0140] RNA를 단리하고, RNA를 합성하고, 핵산을 혼성화하고, cDNA 라이브러리를 만들고 선별검사하고, 그리고 PCR을 수행하기 위한 방법은 당해 분야에서 널리 공지되고 (가령, Gubler and Hoffman, *Gene*, 25:263-269 (1983)를 참조한다; Sambrook *et al.*, *위와 같음*; Ausubel *et al.*, *위와 같음*), PCR 방법 또한 그러하다 (U.S. 특허 번호 4,683,195 및 4,683,202; *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Innis *et al.*, eds, 1990)를 참조한다). 발현 라이브러리 또한, 당업자에게 널리 공지된다. 일반적인 방법을 개시하는 추가 기본 텍스트는 Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (2nd ed. 1989); Kriegler, *Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual* (1990); 및 *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel *et al.*, eds., 1994)를 포함한다. 이들 참고문헌의 개시는 본원에서 모든 점에서 전체적으로 참조로서 편입된다.

[0141] 전형적으로, siRNA는 화학적으로 합성된다. siRNA 분자를 포함하는 올리고뉴클레오티드는 당해 분야에서 공지된 임의의 다양한 기술, 예를 들면, Usman *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 109:7845 (1987); Scaringe *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 18:5433 (1990); Wincott *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 23:2677-2684 (1995); 및 Wincott *et al.*, *Methods Mol. Bio.*, 74:59 (1997)에서 설명된 것들을 이용하여 합성될 수 있다. 올리고뉴클레오티드의 합성은 통상적인 핵산 보호 기 및 연계 기, 예를 들면, 5' 단부에서 디메톡시트리틸 및 3' 단부에서 포스포라미디트를 이용한다. 무제한적 실례로서, 소규모 합성이 0.2 μ몰 규모 프로토콜을 이용하여 Applied Biosystems 합성장치에서 수행될 수 있다. 대안으로, 0.2 μ몰 규모에서 합성은 Protogene (Palo Alto, CA)으로부터 96-웰 평판 합성장치에서 수행될 수 있다. 하지만, 더욱 큰 또는 더욱 작은 규모의 합성 또한 범위 내에 있다. 올리고뉴클레오티드 합성을 위한 적합한 시약, RNA 탈보호를 위한 방법, 그리고 RNA 정제를 위한 방법은 당업자에게 공지되어 있다.

[0142] siRNA 분자는 2개의 상이한 올리고뉴클레오티드로부터 조립될 수 있는데, 여기서 한쪽 올리고뉴클레오티드는 센

스 가닥을 포함하고 다른 올리고뉴클레오티드는 siRNA의 안티센스 가닥을 포함한다. 가령, 각 가닥은 별개로 합성되고, 그리고 합성 및/또는 탈보호 이후에 혼성화 또는 결찰에 의해 함께 연결될 수 있다.

[0143] **치료적 핵산을 내포하는 담체 시스템**

[0144] **지질 입자**

[0145] 지질 입자는 하나 또는 그 이상의 siRNA (가령, 표 A에서 설명된 siRNA 분자), 양이온성 지질, 비-양이온성 지질, 그리고 입자의 응집을 저해하는 접합된 지질을 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, siRNA 분자는 지질 입자에서 siRNA 분자가 수성 용액에서 뉴클레아제 분해에 내성이도록, 지질 입자의 지질 부분 내에 완전히 캡슐화된다. 다른 구체예에서, 본원에서 설명된 지질 입자는 포유동물, 예를 들면, 인간에게 실제적으로 비독성이다. 지질 입자는 전형적으로, 약 30 nm 내지 약 150 nm, 약 40 nm 내지 약 150 nm, 약 50 nm 내지 약 150 nm, 약 60 nm 내지 약 130 nm, 약 70 nm 내지 약 110 nm, 또는 약 70 내지 약 90 nm의 평균 직경을 갖는다. 일정한 구체예에서, 지질 입자는 약 30 nm 내지 약 150 nm의 중앙 직경을 갖는다. 지질 입자는 또한 전형적으로, 약 1:1 내지 약 100:1, 약 1:1 내지 약 50:1, 약 2:1 내지 약 25:1, 약 3:1 내지 약 20:1, 약 5:1 내지 약 15:1, 또는 약 5:1 내지 약 10:1의 지질:핵산 비율 (가령, 지질:siRNA 비율) (질량/질량 비율)을 갖는다. 일정한 구체예에서, 핵산-지질 입자는 약 5:1 내지 약 15:1의 지질:siRNA 질량비를 갖는다.

[0146] 지질 입자는 하나 또는 그 이상의 siRNA 분자 (가령, 표 A에서 설명된 바와 같은 siRNA 분자), 양이온성 지질 (가령, 본원에서 진술된 바와 같은 화학식 I-III의 하나 또는 그 이상의 양이온성 지질 또는 이들의 염), 비-양이온성 지질 (가령, 하나 또는 그 이상의 인지질 및 콜레스테롤의 혼합물), 그리고 입자의 응집을 저해하는 접합된 지질 (가령, 하나 또는 그 이상의 PEG-지질 접합체)을 포함하는 혈청-안정된 핵산-지질 입자를 포함한다. 지질 입자는 본원에서 설명된 유전자 중에서 하나 또는 그 이상을 표적으로 하는 최소한 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개, 또는 그 이상의 siRNA 분자 (가령, 표 A에서 설명된 siRNA 분자)를 포함할 수 있다. 핵산-지질 입자 및 이들의 제조 방법은 예로서, U.S. 특허 번호 5,753,613; 5,785,992; 5,705,385; 5,976,567; 5,981,501; 6,110,745; 및 6,320,017; 그리고 PCT 공개 번호 WO 96/40964에서 설명되는데, 이들의 개시는 각각 본원에서 모든 점에서 전체적으로 참조로서 편입된다.

[0147] 핵산-지질 입자에서, 하나 또는 그 이상의 siRNA 분자 (가령, 표 A에서 설명된 바와 같은 siRNA 분자)는 입자의 지질 부분 내에 완전히 캡슐화되고, 따라서 siRNA는 뉴클레아제 분해로부터 보호될 수 있다. 일정한 사례에서, 핵산-지질 입자에서 siRNA는 37℃에서 최소한 약 20, 30, 45, 또는 60 분 동안 뉴클레아제에 상기 입자의 노출 후 실제적으로 분해되지 않는다. 일정한 다른 사례에서, 핵산-지질 입자에서 siRNA는 37℃에서 최소한 약 30, 45, 또는 60 분 또는 최소한 약 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 또는 36 시간 동안 혈청에서 상기 입자의 배양 후 실제적으로 분해되지 않는다. 다른 구체예에서, siRNA는 입자의 지질 부분과 복합화된다. 이들 제제의 유익성 중에서 한 가지는 핵산-지질 입자 조성물이 포유동물, 예를 들면, 인간에 실제적으로 비독성이라는 점이다.

[0148] 용어 "완전히 캡슐화된"은 핵산-지질 입자에서 siRNA (가령, 표 A에서 설명된 바와 같은 siRNA 분자)가 유리 DNA 또는 RNA를 유의미하게 분해할 혈청 또는 뉴클레아제 검정에 노출 후 유의미하게 분해되지 않는다는 것을 지시한다. 완전히 캡슐화된 시스템에서, 바람직하게는 입자에서 약 25%보다 적은 siRNA가 유리 siRNA의 100%를 정상적으로 분해할 처리에서 분해된다, 더욱 바람직하게는 입자에서 약 10%보다 적은, 그리고 가장 바람직하게는 약 5%보다 적은 siRNA가 분해된다. "완전히 캡슐화된"은 또한, 핵산-지질 입자가 혈청-안정된다는, 다시 말하면, 이들이 생체내 투여 시에 그들의 성분 부분으로 급속히 분해되지 않는다는 것을 지시한다.

[0149] 핵산의 맥락에서, 완전 캡슐화는 막-불투과성 형광 염료 배제 검정을 수행함으로써 결정될 수 있는데, 상기 검정은 핵산과 연관될 때 증강된 형광을 갖는 염료를 이용한다. 특정한 염료, 예를 들면, OliGreen® 및 RiboGreen® (Invitrogen Corp.; Carlsbad, CA)이 플라스미드 DNA, 단일 가닥 데옥시리보뉴클레오티드 및/또는 단일- 또는 이중 가닥 리보뉴클레오티드의 정량적 결정에 가용하다. 캡슐화는 염료를 리포솜 제제에 첨가하고, 결과의 형광을 계측하고, 그리고 이것을 미량의 비이온성 세정제의 첨가 시에 관찰된 형광과 비교함으로써 결정된다. 리포솜 이중층의 세정제-매개된 붕괴는 캡슐화된 핵산을 방출하고, 이것이 막-불투과성 염료와 상호작용하도록 허용한다. 핵산 캡슐화는 $E = (I_o - I)/I_o$로서 계산될 수 있는데, 여기서 I 및 I_o는 세정제의 첨가 전후에 형광 강도를 지칭한다 (Wheeler *et al.*, *Gene Ther.*, 6:271-281 (1999)을 참조한다).

[0150] 일부 경우에, 핵산-지질 입자 조성물은 상기 입자의 지질 부분 내에 완전히 캡슐화되는 siRNA 분자를 포함하고,

따라서 이들 입자의 약 30% 내지 약 100%, 약 40% 내지 약 100%, 약 50% 내지 약 100%, 약 60% 내지 약 100%, 약 70% 내지 약 100%, 약 80% 내지 약 100%, 약 90% 내지 약 100%, 약 30% 내지 약 95%, 약 40% 내지 약 95%, 약 50% 내지 약 95%, 약 60% 내지 약 95%, 약 70% 내지 약 95%, 약 80% 내지 약 95%, 약 85% 내지 약 95%, 약 90% 내지 약 95%, 약 30% 내지 약 90%, 약 40% 내지 약 90%, 약 50% 내지 약 90%, 약 60% 내지 약 90%, 약 70% 내지 약 90%, 약 80% 내지 약 90%, 또는 최소한 약 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% (또는 이들의 임의의 분율 또는 그 안에 범위)는 siRNA가 그 안에 캡슐화된다.

[0151] 다른 경우에, 핵산-지질 입자 조성물은 상기 입자의 지질 부분 내에 완전히 캡슐화되는 siRNA를 포함하고, 따라서 입력 siRNA 중에서 약 30% 내지 약 100%, 약 40% 내지 약 100%, 약 50% 내지 약 100%, 약 60% 내지 약 100%, 약 70% 내지 약 100%, 약 80% 내지 약 100%, 약 90% 내지 약 100%, 약 30% 내지 약 95%, 약 40% 내지 약 95%, 약 50% 내지 약 95%, 약 60% 내지 약 95%, 약 70% 내지 약 95%, 약 80% 내지 약 95%, 약 85% 내지 약 95%, 약 90% 내지 약 95%, 약 30% 내지 약 90%, 약 40% 내지 약 90%, 약 50% 내지 약 90%, 약 60% 내지 약 90%, 약 70% 내지 약 90%, 약 80% 내지 약 90%, 또는 최소한 약 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% (또는 이들의 임의의 분율 또는 그 안에 범위)가 이들 입자 내에 캡슐화된다.

[0152] 지질 입자의 의도된 용도에 따라, 성분의 비율이 변할 수 있고, 그리고 특정 제제의 전달 효율은 예로서, 엔도솜 방출 파라미터 (ERP) 검정을 이용하여 계측될 수 있다.

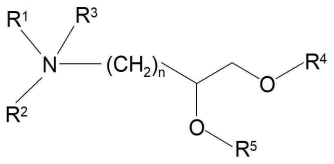
[0153] **양이온성 지질**

[0154] 임의의 다양한 양이온성 지질 또는 이들의 염은 단독으로, 또는 하나 또는 그 이상의 다른 양이온성 지질 종류 또는 비-양이온성 지질 종류와 합동으로 지질 입자에서 이용될 수 있다. 양이온성 지질은 이들의 (R) 및/또는 (S) 거울상이성질체를 포함한다.

[0155] 한 양상에서, 양이온성 지질은 디알킬 지질이다. 가령, 디알킬 지질은 2개의 포화되거나 또는 불포화된 알킬 사슬을 포함하는 지질을 포함할 수 있는데, 여기서 각 알킬 사슬은 치환되거나 또는 치환되지 않을 수 있다. 일정한 구체예에서, 2개의 알킬 사슬은 각각, 예로서 최소한 8개 탄소 원자, 10개 탄소 원자, 12개 탄소 원자, 14개 탄소 원자, 16개 탄소 원자, 18개 탄소 원자, 20개 탄소 원자, 22개 탄소 원자 또는 24개 탄소 원자를 포함한다.

[0156] 한 양상에서, 양이온성 지질은 트리알킬 지질이다. 가령, 트리알킬 지질은 3개의 포화되거나 또는 불포화된 알킬 사슬을 포함하는 지질을 포함할 수 있는데, 여기서 각각의 알킬 사슬은 치환되거나 또는 치환되지 않을 수 있다. 일정한 구체예에서, 3개의 알킬 사슬은 각각, 예로서 최소한 8개 탄소 원자, 10개 탄소 원자, 12개 탄소 원자, 14개 탄소 원자, 16개 탄소 원자, 18개 탄소 원자, 20개 탄소 원자, 22개 탄소 원자 또는 24개 탄소 원자를 포함한다.

[0157] 한 양상에서, 다음의 구조를 갖는 화학식 I의 양이온성 지질:



[0158] (I),

[0159] 또는 이들의 염이 유용하고, 여기서:

[0160] R^1 및 R^2는 동일하거나 상이하고, 그리고 독립적으로 수소 (H) 또는 임의선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬, C_2-C_6 알케닐 또는 C_2-C_6 알키닐이거나, 또는 R^1 및 R^2는 연결되어 4 내지 6개 탄소 원자 및 질소 (N), 산소 (O) 및 이들의 혼합물로 구성된 군에서 선택되는 1 또는 2개 헤테로원자의 임의선택적으로 치환된 헤테로환상 고리를 형성할 수 있고;

[0161] R^3은 부재하거나 또는 수소 (H) 또는 C_1-C_6 알킬이고 사차 아민을 제공하며;

[0162] R^4 및 R^5는 동일하거나 상이하고, 그리고 독립적으로 임의선택적으로 치환된 C_{10}-C_{24} 알킬, C_{10}-C_{24} 알케닐, C_{10}-C_{24} 알키닐 또는 C_{10}-C_{24} 아실이고, 여기서 R^4 및 R^5 중에서 최소한 하나는 최소한 2개의 불포화 부위를 포함하고; 그리고

[0163] n은 0, 1, 2, 3, 또는 4이다.

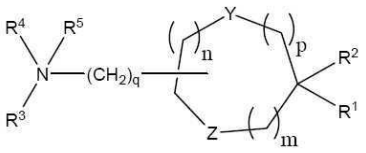
[0164] 일부 구체예에서, R^1 및 R^2는 독립적으로 임의선택적으로 치환된 C_1-C_4 알킬, C_2-C_4 알케닐 또는 C_2-C_4 알키닐이다. 바람직한 구체예에서, R^1 및 R^2는 둘 모두 메틸 기이다. 다른 바람직한 구체예에서, n은 1 또는 2이다. 다른 구체예에서, R^3은 pH가 양이온성 지질의 pK_a보다 높을 때 부재하고, 그리고 R^3은 pH가 양이온성 지질의 pK_a보다 낮을 때 수소이고, 따라서 아미노 헤드 기가 양자화된다. 대안적 구체예에서, R^3은 임의선택적으로 치환된 C_1-C_4 알킬이고 사차 아민을 제공한다. 추가 구체예에서, R^4 및 R^5는 독립적으로 임의선택적으로 치환된 C_{12}-C_{20} 또는 C_{14}-C_{22} 알킬, C_{12}-C_{20} 또는 C_{14}-C_{22} 알케닐, C_{12}-C_{20} 또는 C_{14}-C_{22} 알키닐, 또는 C_{12}-C_{20} 또는 C_{14}-C_{22} 아실이고, 여기서 R^4 및 R^5 중에서 최소한 하나는 최소한 2개의 불포화 부위를 포함한다.

[0165] 일정한 구체예에서, R^4 및 R^5는 도데카디에닐 모이어티, 테트라데카디에닐 모이어티, 헥사데카디에닐 모이어티, 옥타데카디에닐 모이어티, 이코사디에닐 모이어티, 도데카트리에닐 모이어티, 테트라데카트리에닐 모이어티, 헥사데카트리에닐 모이어티, 옥타데카트리에닐 모이어티, 이코사트리에닐 모이어티, 아라키도닐 모이어티 및 도코사헥사에노일 모이어티뿐만 아니라 이들의 아실 유도체 (가령, 리놀레오일, 리놀레노일, ɣ-리놀레노일 등)로 구성된 군에서 독립적으로 선택된다. 일부 경우에, R^4 및 R^5 중에서 하나는 분지된 알킬 기 (가령, 피타닐 모이어티) 또는 이의 아실 유도체 (가령, 피타노일 모이어티)를 포함한다. 일정한 사례에서, 옥타데카디에닐 모이어티는 리놀레일 모이어티이다. 일정한 다른 사례에서, 옥타데카트리에닐 모이어티는 리놀레닐 모이어티 또는 ɣ-리놀레닐 모이어티이다. 일정한 구체예에서, R^4 및 R^5는 둘 모두 리놀레일 모이어티, 리놀레닐 모이어티, 또는 ɣ-리놀레닐 모이어티이다. 특정한 구체예에서, 화학식 I의 양이온성 지질은 1,2-디리놀레일옥시-N,N-디메틸아미노프로판 (DLinDMA), 1,2-디리놀레닐옥시-N,N-디메틸아미노프로판 (DLenDMA), 1,2-디리놀레일옥시-(N,N-디메틸)-부틸-4-아민 (C2-DLinDMA), 1,2-디리놀레오일옥시-(N,N-디메틸)-부틸-4-아민 (C2-DLinDAP), 또는 이들의 혼합물이다.

[0166] 일부 구체예에서, 화학식 I의 양이온성 지질은 하나 또는 그 이상의 음이온과 염 (바람직하게는, 결정성 염)을 형성한다. 특정한 구체예에서, 화학식 I의 양이온성 지질은 이의 옥살산염 (가령, 헤미옥살레이트) 염이고, 이것은 바람직하게는 결정성 염이다.

[0167] 양이온성 지질, 예를 들면, DLinDMA 및 DLenDMA뿐만 아니라 추가 양이온성 지질의 합성은 U.S. 특허 공개 번호 20060083780에서 설명되고, 이것의 개시는 본원에서 모든 점에서 전체적으로 참조로서 편입된다. 양이온성 지질, 예를 들면, C2-DLinDMA 및 C2-DLinDAP뿐만 아니라 추가 양이온성 지질의 합성은 국제 특허 출원 번호 WO2011/000106에서 설명되고, 이것의 개시는 본원에서 모든 점에서 전체적으로 참조로서 편입된다.

[0168] 다른 양상에서, 다음의 구조를 갖는 화학식 II의 양이온성 지질 (또는 이들의 염)이 유용하고:

[0169] 

(II),

[0170] 여기서 R^1 및 R^2는 동일하거나 상이하고, 그리고 독립적으로 임의선택적으로 치환된 C_{12}-C_{24} 알킬, C_{12}-C_{24} 알케닐, C_{12}-C_{24} 알키닐 또는 C_{12}-C_{24} 아실이고; R^3 및 R^4는 동일하거나 상이하고, 그리고 독립적으로 임의선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬, C_2-C_6 알케닐 또는 C_2-C_6 알키닐이거나, 또는 R^3 및 R^4는 연결되어 4 내지 6개 탄소 원자 및 질소

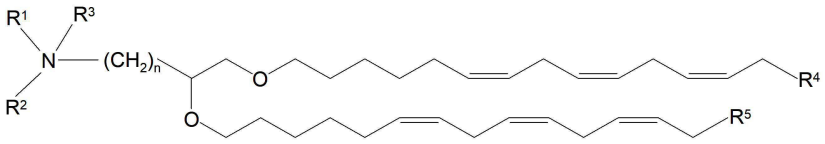
및 산소에서 선택되는 1 또는 2개 헤테로원자의 임의선택적으로 치환된 헤테로환상 고리를 형성할 수 있고; R^5는 부재하거나 또는 수소 (H) 또는 C_1-C_6 알킬이고 사차 아민을 제공하며; m, n 및 p는 동일하거나 상이하고, 그리고 독립적으로 0, 1 또는 2이고, 단서로서 m, n 및 p는 동시에 0이 아니고; q는 0, 1, 2, 3 또는 4이고; 그리고 Y 및 Z는 동일하거나 상이하고, 그리고 독립적으로 O, S 또는 NH이다. 바람직한 구체예에서, q는 2이다.

[0171] 일부 구체예에서, 화학식 II의 양이온성 지질은 2,2-디리놀레일-4-(2-디메틸아미노에틸)-[1,3]-디옥솔란 (DLin-K-C2-DMA; "XTC2" 또는 "C2K"), 2,2-디리놀레일-4-(3-디메틸아미노프로필)-[1,3]-디옥솔란 (DLin-K-C3-DMA; "C3K"), 2,2-디리놀레일-4-(4-디메틸아미노부틸)-[1,3]-디옥솔란 (DLin-K-C4-DMA; "C4K"), 2,2-디리놀레일-5-디메틸아미노메틸-[1,3]-디옥산 (DLin-K6-DMA), 2,2-디리놀레일-4-N-메틸피페라지노-[1,3]-디옥솔란 (DLin-K-MPZ), 2,2-디리놀레일-4-디메틸아미노메틸-[1,3]-디옥솔란 (DLin-K-DMA), 2,2-디올레오일-4-디메틸아미노메틸-[1,3]-디옥솔란 (DO-K-DMA), 2,2-디스테아로일-4-디메틸아미노메틸-[1,3]-디옥솔란 (DS-K-DMA), 2,2-디리놀레일-4-N-모르폴리노-[1,3]-디옥솔란 (DLin-K-MA), 2,2-디리놀레일-4-트리메틸아미노-[1,3]-디옥솔란 염화물 (DLin-K-TMA.Cl), 2,2-디리놀레일-4,5-비스(디메틸아미노메틸)-[1,3]-디옥솔란 (DLin-K^2-DMA), 2,2-디리놀레일-4-메틸피페라진-[1,3]-디옥솔란 (D-Lin-K-N-메틸피페라진), 또는 이들의 혼합물이다. 한 구체예에서 화학식 II의 양이온성 지질은 DLin-K-C2-DMA이다.

[0172] 일부 구체예에서, 화학식 II의 양이온성 지질은 하나 또는 그 이상의 음이온과 염 (바람직하게는, 결정성 염)을 형성한다. 특정한 구체예에서, 화학식 II의 양이온성 지질은 이의 옥살산염 (가령, 헤미옥살레이트) 염이고, 이것은 바람직하게는 결정성 염이다.

[0173] 양이온성 지질, 예를 들면, DLin-K-DMA뿐만 아니라 추가 양이온성 지질의 합성은 PCT 공개 번호 WO 09/086558에서 설명되는데, 이것의 개시는 본원에서 모든 점에서 전체적으로 참조로서 편입된다. 양이온성 지질, 예를 들면, DLin-K-C2-DMA, DLin-K-C3-DMA, DLin-K-C4-DMA, DLin-K6-DMA, DLin-K-MPZ, DO-K-DMA, DS-K-DMA, DLin-K-MA, DLin-K-TMA.Cl, DLin-K^2-DMA 및 D-Lin-K-N-메틸피페라진뿐만 아니라 추가 양이온성 지질의 합성은 2009년 10월 9일자 제출된, "Improved Amino Lipids and Methods for the Delivery of Nucleic Acids"이라는 제목의 PCT 출원 번호 PCT/US2009/060251에서 설명되는데, 이것의 개시는 본원에 모든 점에서 전체적으로 참조로서 편입된다.

[0174] 추가의 양상에서, 다음의 구조를 갖는 화학식 III의 양이온성 지질:

[0175] 

(III)

[0176] 또는 이들의 염이 유용하고, 여기서: R^1 및 R^2는 동일하거나 상이하고, 그리고 독립적으로 임의선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬, C_2-C_6 알케닐 또는 C_2-C_6 알키닐이고, 또는 R^1 및 R^2는 연결되어 4 내지 6개 탄소 원자 및 질소 (N), 산소 (O) 및 이들의 혼합물로 구성된 군에서 선택되는 1 또는 2개 헤테로원자의 임의선택적으로 치환된 헤테로환상 고리를 형성할 수 있고; R^3은 부재하거나 또는 수소 (H) 또는 C_1-C_6 알킬이고 사차 아민을 제공하며; R^4 및 R^5는 부재하거나 또는 존재하고, 그리고 존재할 때 동일하거나 상이하고, 그리고 독립적으로 임의선택적으로 치환된 C_1-C_{10} 알킬 또는 C_2-C_{10} 알케닐이고; 그리고 n은 0, 1, 2, 3, 또는 4이다.

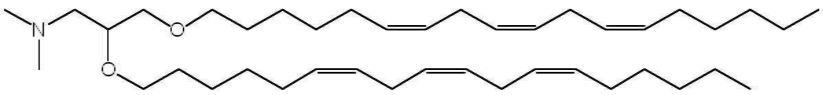
[0177] 일부 구체예에서, R^1 및 R^2는 독립적으로 임의선택적으로 치환된 C_1-C_4 알킬, C_2-C_4 알케닐 또는 C_2-C_4 알키닐이다. 바람직한 구체예에서, R^1 및 R^2는 둘 모두 메틸 기이다. 다른 바람직한 구체예에서, R^4 및 R^5는 둘 모두 부틸 기이다. 또 다른 바람직한 구체예에서, n은 1이다. 다른 구체예에서, R^3은 pH가 양이온성 지질의 pK_a보다 높을 때 부재하고, 그리고 R^3은 pH가 양이온성 지질의 pK_a보다 낮을 때 수소이고, 따라서 아미노 헤드 기가 양자화된다. 대안적 구체예에서, R^3은 임의선택적으로 치환된 C_1-C_4 알킬이고 사차 아민을 제공한다. 추가 구체

예에서, R^4 및 R^5는 독립적으로 임의선택적으로 치환된 C_2-C_6 또는 C_2-C_4 알킬 또는 C_2-C_6 또는 C_2-C_4 알케닐이다.

[0178] 대안적 구체예에서, 화학식 III의 양이온성 지질은 아미노 헤드 기 및 알킬 사슬 중에서 어느 하나 또는 둘 모두 사이에 에스테르 연쇄를 포함한다. 일부 구체예에서, 화학식 III의 양이온성 지질은 하나 또는 그 이상의 음이온과 염 (바람직하게는, 결정성 염)을 형성한다. 특정한 구체예에서, 화학식 III의 양이온성 지질은 이의 옥살산염 (가령, 헤미옥살레이트) 염이고, 이것은 바람직하게는 결정성 염이다.

[0179] 비록 화학식 III에서 각각의 알킬 사슬이 위치 6, 9 및 12에서 *시스* 이중 결합 (다시 말하면, *시스,시스,시스*-$\Delta^6,\Delta^9,\Delta^{12}$)을 내포하긴 하지만, 대안적 구체예에서, 어느 한쪽 또는 양쪽 알킬 사슬에서 이들 이중 결합 중에서 1개, 2개 또는 3개가 *트랜스* 형상일 수 있다.

[0180] 특정한 구체예에서, 화학식 III의 양이온성 지질은 아래의 구조를 갖는다:

[0181] 

[0182] ɣ-DLenDMA (**15**).

[0183] 양이온성 지질, 예를 들면, ɣ-DLenDMA (**15**)뿐만 아니라 추가 양이온성 지질의 합성은 2009년 7월 1일자 제출된, "Improved Cationic Lipids and Methods for the Delivery of Nucleic Acids"라는 제목의 U.S. 가출원 번호 61/222,462에서 설명되는데, 이것의 개시는 본원에서 모든 점에서 전체적으로 참조로서 편입된다.

[0184] 양이온성 지질, 예를 들면, DLin-M-C3-DMA ("MC3")뿐만 아니라 추가 양이온성 지질 (가령, MC3의 일정한 유사체)의 합성은 2009년 6월 10일자 제출된, "Novel Lipids and Compositions for the Delivery of Therapeutics"라는 제목의 U.S. 가출원 번호 61/185,800, 그리고 2009년 12월 18일자 제출된, "Methods and Compositions for Delivery of Nucleic Acids"라는 제목의 U.S. 가출원 번호 61/287,995에서 설명되고, 이들의 개시는 본원에서 모든 점에서 전체적으로 참조로서 편입된다.

[0185] 지질 입자 내에 포함될 수 있는 다른 양이온성 지질 또는 이들의 염의 실례는 양이온성 지질, 예를 들면, WO2011/000106 (이것의 개시는 본원에서 모든 점에서 전체적으로 참조로서 편입된다)에서 설명된 것들뿐만 아니라 양이온성 지질, 예를 들면, N,N-디올레일-N,N-디메틸암모늄 염화물 (DODAC), 1,2-디올레일옥시-N,N-디메틸아미노프로판 (DODMA), 1,2-디스테아릴옥시-N,N-디메틸아미노프로판 (DSDMA), N-(1-(2,3-디올레일옥시)프로필)-N,N,N-트리메틸암모늄 염화물 (DOTMA), N,N-디스테아릴-N,N-디메틸암모늄 브롬화물 (DDAB), N-(1-(2,3-디올레오일옥시)프로필)-N,N,N-트리메틸암모늄 염화물 (DOTAP), 3 -(N-(N',N'-디메틸아미노에탄)-카르바모일)콜레스테롤 (DC-Chol), N-(1,2-디미리스틸옥시프로프-3-일)-N,N-디메틸-N-히드록시에틸 암모늄 브롬화물 (DMRIE), 2,3-디올레일옥시-N-[2(스페르민-카르복사미도)에틸]-N,N-디메틸-1-프로판암모늄트리플루오로아세테이트 (DOSPA), 디옥타데실아미도글리실 스페르민 (DOGS), 3-디메틸아미노-2-(콜레스트-5-엔-3-베타-옥시부탄-4-옥시)-1-(시스,시스-9,12-옥타데카디엔옥시)프로판 (CLinDMA), 2-[5'-(콜레스트-5-엔-3-베타-옥시)-3'-옥사펜톡시)-3-디메틸-1-(시스,시스-9',1-2'-옥타데카디엔옥시)프로판 (CpLinDMA), N,N-디메틸-3,4-디올레일옥시벤질아민 (DMOBA), 1,2-N,N'-디올레일카르바밀-3-디메틸아미노프로판 (DOcarbDAP), 1,2-N,N'-디리놀레일카르바밀-3-디메틸아미노프로판 (DLincarbDAP), 1,2-디리놀레일카르바모일옥시-3-디메틸아미노프로판 (DLin-C-DAP), 1,2-디리놀레일옥시-3-(디메틸아미노)아세톡시프로판 (DLin-DAC), 1,2-디리놀레일옥시-3-모르폴리노프로판 (DLin-MA), 1,2-디리놀레오일-3-디메틸아미노프로판 (DLinDAP), 1,2-디리놀레일티오-3-디메틸아미노프로판 (DLin-S-DMA), 1-리놀레오일-2-리놀레일옥시-3-디메틸아미노프로판 (DLin-2-DMAP), 1,2-디리놀레일옥시-3-트리메틸아미노프로판 염화물 염 (DLin-TMA.Cl), 1,2-디리놀레오일-3-트리메틸아미노프로판 염화물 염 (DLin-TAP.Cl), 1,2-디리놀레일옥시-3-(N-메틸피페라지노)프로판 (DLin-MPZ), 3-(N,N-디리놀레일아미노)-1,2-프로판디올 (DLinAP), 3-(N,N-디올레일아미노)-1,2-프로판디올 (DOAP), 1,2-디리놀레일옥소-3-(2-N,N-디메틸아미노)에톡시프로판 (DLin-EG-DMA), 1,2-디올레일카르바모일옥시-3-디메틸아미노프로판 (DO-C-DAP), 1,2-디미리스토레오일-3-디메틸아미노프로판 (DMDAP), 1,2-디올레오일-3-트리메틸아미노프로판 염화물 (DOTAP.Cl), 디리놀레일메틸-3-디메틸아미노프로피오네이트 (DLin-M-C2-DMA; DLin-M-K-DMA 또는 DLin-M-DMA로서 또한 알려져 있음), 그리고 이들의 혼합물을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. 지질 입자 내에 포함될 수 있는 추가 양이온성 지질 또는 이들의 염은 U.S. 특허 공개 번호 20090023673에서 설명되는데, 이것의 개시는 본원에서 모든 점에서 전체적으로 참조로서 편입된다.

[0186] 양이온성 지질, 예를 들면, CLinDMA뿐만 아니라 추가 양이온성 지질의 합성은 U.S. 특허 공개 번호 20060240554에서 설명되는데, 이것의 개시는 본원에서 모든 점에서 전체적으로 참조로서 편입된다. 양이온성 지질, 예를 들면, DLin-C-DAP, DLinDAC, DLinMA, DLinDAP, DLin-S-DMA, DLin-2-DMAP, DLinTMA.Cl, DLinTAP.Cl, DLinMPZ, DLinAP, DOAP 및 DLin-EG-DMA뿐만 아니라 추가 양이온성 지질의 합성은 PCT 공개 번호 WO 09/086558에서 설명되는데, 이것의 개시는 본원에서 모든 점에서 전체적으로 참조로서 편입된다. 양이온성 지질, 예를 들면, DO-C-DAP, DMDAP, DOTAP.Cl, DLin-M-C2-DMA뿐만 아니라 추가 양이온성 지질의 합성은 2009년 10월 9일자 제출된, "Improved Amino Lipids and Methods for the Delivery of Nucleic Acids"라는 제목의 PCT 출원 번호 PCT/US2009/060251에서 설명되는데, 이것의 개시는 본원에 모든 점에서 전체적으로 참조로서 편입된다. 다수의 다른 양이온성 지질 및 관련된 유사체의 합성은 U.S. 특허 번호 5,208,036; 5,264,618; 5,279,833; 5,283,185; 5,753,613; 및 5,785,992; 그리고 PCT 공개 번호 WO 96/10390에서 설명되었는데, 이들의 개시는 각각 본원에서 모든 점에서 전체적으로 참조로서 편입된다. 추가적으로, 양이온성 지질의 다수의 상업적인 제조물, 예를 들면, 예로서 LIPOFECTIN® (DOTMA 및 DOPE 포함, Invitrogen으로부터 가용); LIPOFECTAMINE® (DOSPA 및 DOPE 포함, Invitrogen으로부터 가용); 및 TRANSFECTAM® (DOGS 포함, Promega Corp.로부터 가용)이 이용될 수 있다.

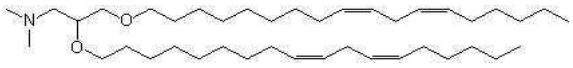
[0187] 일부 구체예에서, 양이온성 지질은 입자 내에 존재하는 전체 지질의 약 50 몰 % 내지 약 90 몰 %, 약 50 몰 % 내지 약 85 몰 %, 약 50 몰 % 내지 약 80 몰 %, 약 50 몰 % 내지 약 75 몰 %, 약 50 몰 % 내지 약 70 몰 %, 약 50 몰 % 내지 약 65 몰 %, 약 50 몰 % 내지 약 60 몰 %, 약 55 몰 % 내지 약 65 몰 %, 또는 약 55 몰 % 내지 약 70 몰 % (또는 이들의 임의의 분율 또는 그 안에 범위)를 구성한다. 특정한 구체예에서, 양이온성 지질은 입자 내에 존재하는 전체 지질의 약 50 몰 %, 51 몰 %, 52 몰 %, 53 몰 %, 54 몰 %, 55 몰 %, 56 몰 %, 57 몰 %, 58 몰 %, 59 몰 %, 60 몰 %, 61 몰 %, 62 몰 %, 63 몰 %, 64 몰 %, 또는 65 몰 % (또는 이들의 임의의 분율)를 구성한다.

[0188] 다른 구체예에서, 양이온성 지질은 입자 내에 존재하는 전체 지질의 약 2 몰 % 내지 약 60 몰 %, 약 5 몰 % 내지 약 50 몰 %, 약 10 몰 % 내지 약 50 몰 %, 약 20 몰 % 내지 약 50 몰 %, 약 20 몰 % 내지 약 40 몰 %, 약 30 몰 % 내지 약 40 몰 %, 또는 약 40 몰 % (또는 이들의 임의의 분율 또는 그 안에 범위)를 구성한다.

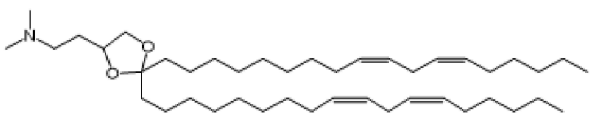
[0189] 지질 입자에서 이용에 적합한 양이온성 지질의 추가 백분율 및 범위는 PCT 공개 번호 WO 09/127060, U.S. 공개된 출원 번호 US 2011/0071208, PCT 공개 번호 WO2011/000106 및 U.S. 공개된 출원 번호 US 2011/0076335에서 설명되고, 이들의 개시는 본원에서 모든 점에서 전체적으로 참조로서 편입된다.

[0190] 지질 입자 내에 존재하는 양이온성 지질의 백분율은 목표량이고, 그리고 제제 내에 존재하는 양이온성 지질의 실제량은 예로서, ± 5 몰 % 변할 수 있는 것으로 이해되어야 한다. 가령, 한 가지 예시적인 지질 입자 제제에서, 양이온성 지질의 목표량은 57.1 몰 %이지만, 양이온성 지질의 실제량은 상기 목표량의 ± 5 몰 %, ± 4 몰 %, ± 3 몰 %, ± 2 몰 %, ± 1 몰 %, ± 0.75 몰 %, ± 0.5 몰 %, ± 0.25 몰 %, 또는 ± 0.1 몰 %일 수 있고, 제제의 나머지는 다른 지질 성분으로 구성된다 (입자 내에 존재하는 전체 지질의 100 몰 %까지 첨가; 하지만, 당업자는 전체 몰 %가 반올림으로 인해 100%로부터 약간 일탈할 수 있다는 것을 이해할 것이다, 예를 들면, 99.9 몰 % 또는 100.1 몰 %.).

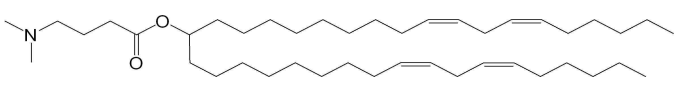
[0191] 지질 입자에서 포함에 유용한 양이온성 지질의 추가 실례는 아래에 도시된다:

[0192] 

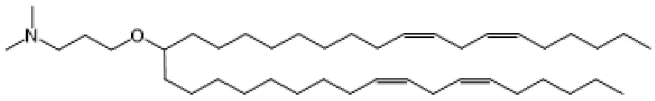
[0193] N,N-디메틸-2,3-비스((9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디에닐옥시)프로판-1-아민 (**5**)

[0194] 

[0195] 2-(2,2-디((9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디에닐)-1,3-디옥솔란-4-일)-N,N-디메틸에탄아민 (**6**)

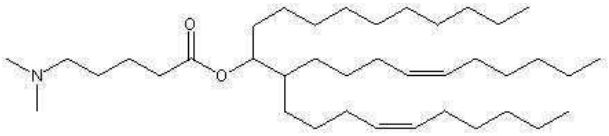
[0196] 

[0197] (6Z,9Z,28Z,31Z)-헵타트리아콘타-6,9,28,31-테트라엔-19-일 4-(디메틸아미노)부타노에이트 (**7**)



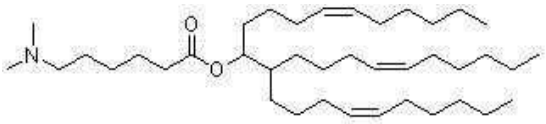
[0198]

[0199] 3-((6Z,9Z,28Z,31Z)-헵타트리아콘타-6,9,28,31-테트라엔-19-일옥시)-N,N-디메틸프로판-1-아민 (**8**)



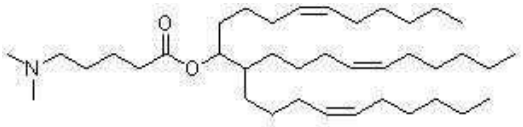
[0200]

[0201] (Z)-12-((Z)-데크-4-에닐)도코스-16-엔-11-일 5-(디메틸아미노)펜타노에이트 (**53**)



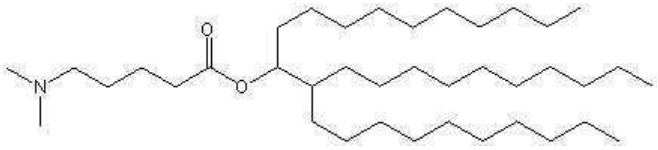
[0202]

[0203] (6Z,16Z)-12-((Z)-데크-4-에닐)도코사-6,16-디엔-11-일 6-(디메틸아미노)헥사노에이트 (**11**)



[0204]

[0205] (6Z,16Z)-12-((Z)-데크-4-에닐)도코사-6,16-디엔-11-일 5-(디메틸아미노)펜타노에이트 (**13**)



[0206]

[0207] 12-데실도코산-11-일 5-(디메틸아미노)펜타노에이트 (**14**).

[0208] **비-양이온성 지질**

[0209] 지질 입자에서 이용되는 비-양이온성 지질은 안정된 복합체를 생산할 수 있는 임의의 다양한 중성 하전되지 않은, 쌍성 이온성, 또는 음이온성 지질일 수 있다.

[0210] 비-양이온성 지질의 무제한적 실례는 인지질, 예를 들면, 레시틴, 포스파티딜에탄올아민, 리소레시틴, 리소포스파티딜에탄올아민, 포스파티딜세린, 포스파티딜이노시톨, 스핑고미엘린, 에그 스핑고미엘린 (ESM), 세팔린, 카디오리핀, 포스파티드산, 세레브로시드, 디세틸포스페이트, 디스테아로일포스파티딜콜린 (DSPC), 디올레오일포스파티딜콜린 (DOPC), 디팔미토일포스파티딜콜린 (DPPC), 디올레오일포스파티딜글리세롤 (DOPG), 디팔미토일포스파티딜글리세롤 (DPPG), 디올레오일포스파티딜에탄올아민 (DOPE), 팔미토일올레오일-포스파티딜콜린 (POPC), 팔미토일올레오일-포스파티딜에탄올아민 (POPE), 팔미토일올레오일-포스파티딜글리세롤 (POPG), 디올레오일포스파티딜에탄올아민 4-(N-말레이미도메틸)-시클로헥산-1-카르복실산염 (DOPE-mal), 디팔미토일-포스파티딜에탄올아민 (DPPE), 디미리스토일-포스파티딜에탄올아민 (DMPE), 디스테아로일-포스파티딜에탄올아민 (DSPE), 모노메틸-포스파티딜에탄올아민, 디메틸-포스파티딜에탄올아민, 디엘라이도일-포스파티딜에탄올아민 (DEPE), 스테아로일올레오일-포스파티딜에탄올아민 (SOPE), 리소포스파티딜콜린, 디리놀레오일포스파티딜콜린, 그리고 이들의 혼합물을 포함한다. 다른 디아실포스파티딜콜린 및 디아실포스파티딜에탄올아민 인지질 또한 이용될 수 있다. 이들 지질에서 아실 기는 바람직하게는, C_{10}-C_{24} 탄소 사슬을 갖는 지방산으로부터 유래된 아실 기, 예를 들면, 라우로일, 미리스토일, 팔미토일, 스테아로일 또는 올레오일이다.

[0211] 비-양이온성 지질의 추가 실례는 스테롤, 예를 들면, 콜레스테롤 및 이의 유도체를 포함한다. 콜레스테롤 유도체의 무제한적 실례는 극성 유사체, 예를 들면, 5α-콜레스탄올, 5β-코프로스탄올, 콜레스테릴-(2'-히드록시)-에틸 에테르, 콜레스테릴-(4'-히드록시)-부틸 에테르 및 6-케토콜레스탄올; 비극성 유사체, 예를 들면, 5α-콜

레스탄, 콜레스테논, 5α-콜레스타논, 5β-콜레스타논 및 콜레스테릴 데카노에이트; 그리고 이들의 혼합물을 포함한다. 바람직한 구체예에서, 콜레스테롤 유도체는 극성 유사체, 예를 들면, 콜레스테릴-(4'-히드록시)-부틸 에테르이다. 콜레스테릴-(2'-히드록시)-에틸 에테르의 합성은 PCT 공개 번호 WO 09/127060에서 설명되고, 이것의 개시는 본원에서 모든 점에서 전체적으로 참조로서 편입된다.

[0212] 일부 구체예에서, 지질 입자에서 존재하는 비-양이온성 지질은 하나 또는 그 이상의 인지질 및 콜레스테롤 또는 이의 유도체의 혼합물을 포함하거나 또는 이것으로 구성된다. 다른 구체예에서, 지질 입자에서 존재하는 비-양이온성 지질은 하나 또는 그 이상의 인지질, 예를 들면, 콜레스테롤-없는 지질 입자 제제를 포함하거나 또는 이것으로 구성된다. 또 다른 구체예에서, 지질 입자에서 존재하는 비-양이온성 지질은 콜레스테롤 또는 이의 유도체, 예를 들면, 인지질-없는 지질 입자 제제를 포함하거나 또는 이것으로 구성된다.

[0213] 이용에 적합한 비-양이온성 지질의 다른 실례는 비-인 내포 지질, 예를 들면, 예로서 스테아릴아민, 도데실아민, 헥사데실아민, 아세틸 팔미트산염, 글리세롤리시놀레이트, 헥사데실 스테아르산염, 이소프로필 미리스트산염, 양쪽성 아크릴산 중합체, 트리에탄올아민-라우릴 황산염, 알킬-아릴 황산염 폴리에틸옥실화된 지방산 아미드, 디옥타데실디메틸 암모늄 브롬화물, 세라미드, 스핑고미엘린 등을 포함한다.

[0214] 일부 구체예에서, 비-양이온성 지질은 입자 내에 존재하는 전체 지질의 약 10 몰 % 내지 약 60 몰 %, 약 20 몰 % 내지 약 55 몰 %, 약 20 몰 % 내지 약 45 몰 %, 약 20 몰 % 내지 약 40 몰 %, 약 25 몰 % 내지 약 50 몰 %, 약 25 몰 % 내지 약 45 몰 %, 약 30 몰 % 내지 약 50 몰 %, 약 30 몰 % 내지 약 45 몰 %, 약 30 몰 % 내지 약 40 몰 %, 약 35 몰 % 내지 약 45 몰 %, 약 37 몰 % 내지 약 45 몰 %, 또는 약 35 몰 %, 36 몰 %, 37 몰 %, 38 몰 %, 39 몰 %, 40 몰 %, 41 몰 %, 42 몰 %, 43 몰 %, 44 몰 %, 또는 45 몰 % (또는 이들의 임의의 분율 또는 그 안에 범위)를 구성한다.

[0215] 지질 입자가 인지질 및 콜레스테롤 또는 콜레스테롤 유도체의 혼합물을 내포하는 구체예에서, 상기 혼합물은 입자 내에 존재하는 전체 지질의 약 40 몰 %, 45 몰 %, 50 몰 %, 55 몰 %, 또는 60 몰 %까지를 구성할 수 있다.

[0216] 일부 구체예에서, 혼합물에서 인지질 성분은 입자 내에 존재하는 전체 지질의 약 2 몰 % 내지 약 20 몰 %, 약 2 몰 % 내지 약 15 몰 %, 약 2 몰 % 내지 약 12 몰 %, 약 4 몰 % 내지 약 15 몰 %, 또는 약 4 몰 % 내지 약 10 몰 % (또는 이들의 임의의 분율 또는 그 안에 범위)를 구성할 수 있다. 일정한 구체예에서, 혼합물에서 인지질 성분은 입자 내에 존재하는 전체 지질의 약 5 몰 % 내지 약 17 몰 %, 약 7 몰 % 내지 약 17 몰 %, 약 7 몰 % 내지 약 15 몰 %, 약 8 몰 % 내지 약 15 몰 %, 또는 약 8 몰 %, 9 몰 %, 10 몰 %, 11 몰 %, 12 몰 %, 13 몰 %, 14 몰 %, 또는 15 몰 % (또는 이들의 임의의 분율 또는 그 안에 범위)를 구성한다. 무제한적 실례로서, 인지질 및 콜레스테롤의 혼합물을 포함하는 지질 입자 제제는 예로서, 입자 내에 존재하는 전체 지질의 약 34 몰 % (또는 이의 임의의 분율)에서 콜레스테롤 또는 콜레스테롤 유도체를 포함하는 혼합물에서, 약 7 몰 % (또는 이의 임의의 분율)에서 인지질, 예를 들면, DPPC 또는 DSPC를 포함할 수 있다. 다른 무제한적 실례로서, 인지질 및 콜레스테롤의 혼합물을 포함하는 지질 입자 제제는 예로서, 입자 내에 존재하는 전체 지질의 약 32 몰 % (또는 이의 임의의 분율)에서 콜레스테롤 또는 콜레스테롤 유도체를 포함하는 혼합물에서, 약 7 몰 % (또는 이의 임의의 분율)에서 인지질, 예를 들면, DPPC 또는 DSPC를 포함할 수 있다.

[0217] 추가 실례로서, 유용한 지질 제제는 약 10:1의 지질 대 약물 (가령, siRNA) 비율 (가령, 9.5:1 내지 11:1, 또는 9.9:1 내지 11:1, 또는 10:1 내지 10.9:1의 지질:약물 비율)을 갖는다. 일정한 다른 구체예에서, 유용한 지질 제제는 약 9:1의 지질 대 약물 (가령, siRNA) 비율 (가령, 8.5:1 내지 10:1, 또는 8.9:1 내지 10:1, 또는 9.1:1, 9.2:1, 9.3:1, 9.4:1, 9.5:1, 9.6:1, 9.7:1 및 9.8:1을 포함하는 9:1 내지 9.9:1의 지질:약물 비율)을 갖는다.

[0218] 다른 구체예에서, 혼합물에서 콜레스테롤 성분은 입자 내에 존재하는 전체 지질의 약 25 몰 % 내지 약 45 몰 %, 약 25 몰 % 내지 약 40 몰 %, 약 30 몰 % 내지 약 45 몰 %, 약 30 몰 % 내지 약 40 몰 %, 약 27 몰 % 내지 약 37 몰 %, 약 25 몰 % 내지 약 30 몰 %, 또는 약 35 몰 % 내지 약 40 몰 % (또는 이들의 임의의 분율 또는 그 안에 범위)를 구성할 수 있다. 일정한 바람직한 구체예에서, 혼합물에서 콜레스테롤 성분은 입자 내에 존재하는 전체 지질의 약 25 몰 % 내지 약 35 몰 %, 약 27 몰 % 내지 약 35 몰 %, 약 29 몰 % 내지 약 35 몰 %, 약 30 몰 % 내지 약 35 몰 %, 약 30 몰 % 내지 약 34 몰 %, 약 31 몰 % 내지 약 33 몰 %, 또는 약 30 몰 %, 31 몰 %, 32 몰 %, 33 몰 %, 34 몰 %, 또는 35 몰 % (또는 이들의 임의의 분율 또는 그 안에 범위)를 구성한다.

[0219] 지질 입자가 인지질이 없는 구체예에서, 콜레스테롤 또는 이의 유도체는 입자 내에 존재하는 전체 지질의 약 25 몰 %, 30 몰 %, 35 몰 %, 40 몰 %, 45 몰 %, 50 몰 %, 55 몰 %, 또는 60 몰 %까지를 구성할 수 있다.

[0220] 일부 구체예에서, 인지질-없는 지질 입자 제제에서 콜레스테롤 또는 이의 유도체는 입자 내에 존재하는 전체 지질의 약 25 몰 % 내지 약 45 몰 %, 약 25 몰 % 내지 약 40 몰 %, 약 30 몰 % 내지 약 45 몰 %, 약 30 몰 % 내지 약 40 몰 %, 약 31 몰 % 내지 약 39 몰 %, 약 32 몰 % 내지 약 38 몰 %, 약 33 몰 % 내지 약 37 몰 %, 약 35 몰 % 내지 약 45 몰 %, 약 30 몰 % 내지 약 35 몰 %, 약 35 몰 % 내지 약 40 몰 %, 또는 약 30 몰 %, 31 몰 %, 32 몰 %, 33 몰 %, 34 몰 %, 35 몰 %, 36 몰 %, 37 몰 %, 38 몰 %, 39 몰 %, 또는 40 몰 % (또는 이들의 임의의 분율 또는 그 안에 범위)를 구성할 수 있다. 무제한적 실례로서, 지질 입자 제제는 입자 내에 존재하는 전체 지질의 약 37 몰 % (또는 이의 임의의 분율)에서 콜레스테롤을 포함할 수 있다. 다른 무제한적 실례로서, 지질 입자 제제는 입자 내에 존재하는 전체 지질의 약 35 몰 % (또는 이의 임의의 분율)에서 콜레스테롤을 포함할 수 있다.

[0221] 다른 구체예에서, 비-양이온성 지질은 입자 내에 존재하는 전체 지질의 약 5 몰 % 내지 약 90 몰 %, 약 10 몰 % 내지 약 85 몰 %, 약 20 몰 % 내지 약 80 몰 %, 약 10 몰 % (가령, 인지질 단독), 또는 약 60 몰 % (가령, 인지질 및 콜레스테롤 또는 이의 유도체) (또는 이들의 임의의 분율 또는 그 안에 범위)를 구성한다.

[0222] 지질 입자에서 이용에 적합한 비-양이온성 지질의 추가 백분율 및 범위는 PCT 공개 번호 WO 09/127060, U.S. 공개된 출원 번호 US 2011/0071208, PCT 공개 번호 WO2011/000106 및 U.S. 공개된 출원 번호 US 2011/0076335에서 설명되고, 이들의 개시는 본원에서 모든 점에서 전체적으로 참조로서 편입된다.

[0223] 지질 입자 내에 존재하는 비-양이온성 지질의 백분율은 목표량이고, 그리고 제제 내에 존재하는 비-양이온성 지질의 실제량은 예로서, ± 5 mol %, ± 4 mol %, ± 3 mol %, ± 2 mol %, ± 1 mol %, ± 0.75 mol %, ± 0.5 mol %, ± 0.25 mol %, 또는 ± 0.1 mol % 변할 수 있는 것으로 이해되어야 한다.

[0224] **지질 접합체**

[0225] 양이온성 및 비-양이온성 지질에 더하여, 지질 입자는 지질 접합체를 더욱 포함할 수 있다. 접합된 지질은 입자의 응집을 예방한다는 점에서 유용하다. 적합한 접합된 지질은 PEG-지질 접합체, POZ-지질 접합체, ATTA-지질 접합체, 양이온성-중합체-지질 접합체 (CPLs), 그리고 이들의 혼합물을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. 일정한 구체예에서, 이들 입자는 CPL과 함께 PEG-지질 접합체 또는 ATTA-지질 접합체를 포함한다.

[0226] 바람직한 구체예에서, 지질 접합체는 PEG-지질이다. PEG-지질의 실례는 가령, PCT 공개 번호 WO 05/026372에서 설명된 바와 같이 디알킬옥시프로필에 연계된 PEG (PEG-DAA), 가령, U.S. 특허 공개 번호 20030077829 및 2005008689에서 설명된 바와 같이 디아실글리세롤에 연계된 PEG (PEG-DAG), 인지질, 예를 들면, 포스파티딜에탄올아민에 연계된 PEG (PEG-PE), 가령, U.S. 특허 번호 5,885,613에서 설명된 바와 같이 세라미드에 접합된 PEG, 콜레스테롤 또는 이의 유도체에 접합된 PEG, 그리고 이들의 혼합물을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. 이들 특허 문서의 개시는 본원에서 모든 점에서 전체적으로 참조로서 편입된다.

[0227] 이용에 적합한 추가 PEG-지질은 제한 없이, mPEG2000-1,2-디-O-알킬-*sn*3-카르바모일글리세리드 (PEG-C-DOMG)를 포함한다. PEG-C-DOMG의 합성은 PCT 공개 번호 WO 09/086558에서 설명되는데, 이것의 개시는 본원에서 모든 점에서 전체적으로 참조로서 편입된다. 다른 추가로 적합한 PEG-지질 접합체는 제한 없이, 1-[8'-(1,2-디미리스토일-3-프로파녹시)-카르복사미도-3',6'-디옥사옥타닐]카르바모일-ω-메틸-폴리(에틸렌 글리콜) (2KPEG-DMG)을 포함한다. 2KPEG-DMG의 합성은 U.S. 특허 번호 7,404,969에서 설명되는데, 이것의 개시는 본원에서 모든 점에서 전체적으로 참조로서 편입된다.

[0228] PEG는 2개의 말단 히드록실 기를 갖는 에틸렌 PEG 반복 단위의 선형, 수용성 중합체이다. PEGs는 그들의 분자량에 의해 분류된다; 예로서, PEG 2000은 약 2,000 달톤의 평균 분자량을 갖고, 그리고 PEG 5000은 약 5,000 달톤의 평균 분자량을 갖는다. PEGs는 Sigma Chemical Co. 및 다른 기업으로부터 상업적으로 가용하고, 그리고 다음을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다: 모노메톡시폴리에틸렌 글리콜 (MePEG-OH), 모노메톡시폴리에틸렌 글리콜-숙신산염 (MePEG-S), 모노메톡시폴리에틸렌 글리콜-숙신이미딜 숙신산염 (MePEG-S-NHS), 모노메톡시폴리에틸렌 글리콜-아민 (MePEG-NH_2), 모노메톡시폴리에틸렌 글리콜-트레실레이트 (MePEG-TRES), 모노메톡시폴리에틸렌 글리콜-이미다졸릴-카르보닐 (MePEG-IM)뿐만 아니라 말단 메톡시 기 대신에 말단 히드록실 기를 내포하는 이런 화합물 (가령, HO-PEG-S, HO-PEG-S-NHS, HO-PEG-NH_2 등). 다른 PEGs, 예를 들면, U.S. 특허 번호 6,774,180 및 7,053,150에서 설명된 것들 (가령, mPEG (20 KDa) 아민) 또한, PEG-지질 접합체를 제조하는데 유용하다. 이들 특허의 개시는 본원에서 모든 점에서 전체적으로 참조로서 편입된다. 이에 더하여, 모노메톡시폴리에틸렌글리콜-아세트산 (MePEG-CH_2COOH)이 예로서, PEG-DAA 접합체를 비롯한 PEG-지질 접합체를 제조하는데 특히 유용하다.

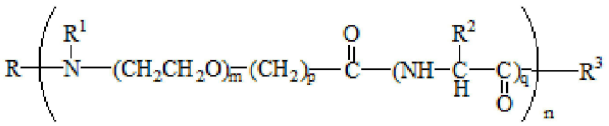
[0229] 본원에서 설명된 PEG-지질 접합체의 PEG 모이어티는 약 550 달톤 내지 약 10,000 달톤의 범위에서 변하는 평균 분자량을 포함할 수 있다. 일정한 사례에서, PEG 모이어티는 약 750 달톤 내지 약 5,000 달톤 (가령, 약 1,000 달톤 내지 약 5,000 달톤, 약 1,500 달톤 내지 약 3,000 달톤, 약 750 달톤 내지 약 3,000 달톤, 약 750 달톤 내지 약 2,000 달톤 등)의 평균 분자량을 갖는다. 바람직한 구체예에서, PEG 모이어티는 약 2,000 달톤 또는 약 750 달톤의 평균 분자량을 갖는다.

[0230] 일정한 사례에서, PEG는 알킬, 알콕시, 아실 또는 아릴 기에 의해 임의선택적으로 치환될 수 있다. PEG는 지질에 직접적으로 접합될 수 있거나 또는 링커 모이어티를 거쳐 지질에 연결될 수 있다. 가령, 비-에스테르 내포 링커 모이어티 및 에스테르-내포 링커 모이어티를 비롯하여, PEG를 지질에 연계하는데 적합한 임의의 링커 모이어티가 이용될 수 있다. 바람직한 구체예에서, 링커 모이어티는 비-에스테르 내포 링커 모이어티이다. 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "비-에스테르 내포 링커 모이어티"는 카르복실산 에스테르 결합 (-OC(O)-)을 내포하지 않는 링커 모이어티를 지칭한다. 적합한 비-에스테르 내포 링커 모이어티는 아미도 (-C(O)NH-), 아미노 (-NR-), 카르보닐 (-C(O)-), 카바메이트 (-NHC(O)O-), 요소 (-NHC(O)NH-), 이황화물 (-S-S-), 에테르 (-O-), 숙시닐 (-(O)CCH$_2$CH$_2$C(O)-), 숙신아미딜 (-NHC(O)CH$_2$CH$_2$C(O)NH-), 에테르, 이황화물뿐만 아니라 이들의 조합 (가령, 카바메이트 링커 모이어티 및 아미도 링커 모이어티 둘 모두를 내포하는 링커)을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. 바람직한 구체예에서, 카바메이트 링커가 PEG를 지질에 연계하는데 이용된다.

[0231] 다른 구체예에서, 에스테르 내포 링커 모이어티가 PEG를 지질에 연계하는데 이용된다. 적합한 에스테르 내포 링커 모이어티는 예로서, 탄산염 (-OC(O)O-), 숙시노일, 인산염 에스테르 (-O-(O)POH-O-), 술폰산염 에스테르, 그리고 이들의 조합을 포함한다.

[0232] 변하는 사슬 길이 및 포화도의 다양한 아실 사슬 기를 갖는 포스파티딜에탄올아민은 PEG에 접합되어 지질 접합체를 형성할 수 있다. 이런 포스파티딜에탄올아민은 상업적으로 가용하거나, 또는 당업자에게 공지된 전통적인 기술을 이용하여 단리되거나 또는 합성될 수 있다. C_{10} 내지 C_{20}의 범위에서 탄소 사슬 길이를 갖는 포화되거나 또는 불포화된 지방산을 내포하는 포스파티딜-에탄올아민이 선호된다. 일가- 또는 이가불포화 지방산 및 포화와 불포화 지방산의 혼합물을 포함하는 포스파티딜에탄올아민이 또한 이용될 수 있다. 적합한 포스파티딜에탄올아민은 디미리스토일-포스파티딜에탄올아민 (DMPE), 디팔미토일-포스파티딜에탄올아민 (DPPE), 디올레오일포스파티딜에탄올아민 (DOPE) 및 디스테아로일-포스파티딜에탄올아민 (DSPE)을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다.

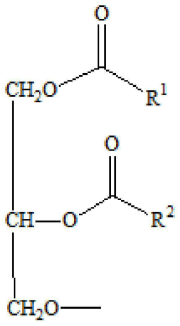
[0233] 용어 "ATTA" 또는 "폴리아미드"는 제한 없이, U.S. 특허 번호 6,320,017 및 6,586,559에서 설명된 화합물을 포함하는데, 이들의 개시는 본원에서 모든 점에서 전체적으로 참조로서 편입된다. 이들 화합물은 아래의 화학식을 갖는 화합물을 포함한다:

[0234]  (IV),

[0235] 여기서 R은 수소, 알킬 및 아실로 구성된 군에서 선택되는 구성원이고; R^1은 수소 및 알킬로 구성된 군에서 선택되는 구성원이거나; 또는 임의선택적으로, R 및 R^1 및 이들이 결합되는 질소는 아지도 모이어티를 형성하고; R^2는 수소, 임의선택적으로 치환된 알킬, 임의선택적으로 치환된 아릴 및 아미노산의 측쇄에서 선택되는 군의 구성원이고; R^3은 수소, 할로겐, 히드록시, 알콕시, 메르캅토, 히드라지노, 아미노 및 NR^4R^5로 구성된 군에서 선택되는 구성원이고, 여기서 R^4 및 R^5는 독립적으로 수소 또는 알킬이고; n은 4 내지 80이고; m은 2 내지 6이고; p는 1 내지 4이고; 그리고 q는 0 또는 1이다. 다른 폴리아미드가 이용될 수 있다는 것은 당업자에게 명백할 것이다.

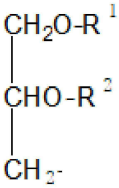
[0236] 용어 "디아실글리세롤" 또는 "DAG"는 2개의 지방 아실 사슬, R^1 및 R^2를 갖는 화합물을 포함하는데, 이들 둘 모두 독립적으로, 에스테르 연쇄에 의해 글리세롤의 1- 및 2-위치에 결합된 2 내지 30개 탄소를 갖는다. 아실 기는 포화되거나 또는 변하는 불포화도를 가질 수 있다. 적합한 아실 기는 라우로일 (C_{12}), 미리스토일 (C_{14}), 팔미토일 (C_{16}), 스테아로일 (C_{18}) 및 이코소일 (C_{20})을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. 바람직한 구체예에서, R^1 및 R^2는 동일하다, 다시 말하면, R^1 및 R^2는 둘 모두 미리스토일 (즉, 디미리스토일)이거나, R^1 및 R^2는 둘 모

두 스테아로일 (즉, 디스테아로일)이거나, 기타 등등이다. 디아실글리세롤은 다음의 일반식을 갖는다:



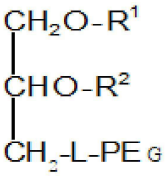
[0237] (V).

[0238] 용어 "디알킬옥시프로필" 또는 "DAA"는 2개의 알킬 사슬, R^1 및 R^2를 갖는 화합물을 포함하는데, 이들 둘 모두 독립적으로 2 내지 30개 탄소를 갖는다. 알킬 기는 포화되거나 또는 변하는 불포화도를 가질 수 있다. 디알킬옥시프로필은 다음의 일반식을 갖는다:



[0239] (VI).

[0240] 바람직한 구체예에서, PEG-지질은 다음의 화학식을 갖는 PEG-DAA 접합체이다:



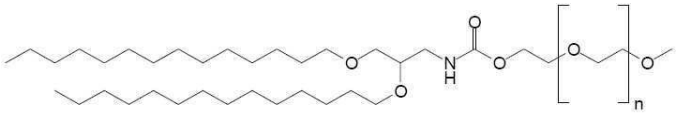
[0241] (VII),

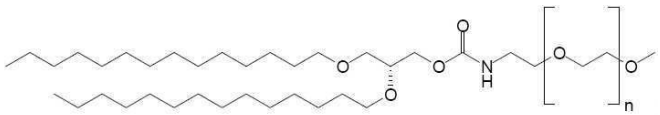
[0242] 여기서 R^1 및 R^2는 독립적으로 선택되고, 그리고 약 10 내지 약 22개 탄소 원자를 갖는 긴 사슬 알킬 기이고; PEG는 폴리에틸렌글리콜이고; 그리고 L은 앞서 설명된 바와 같은 비-에스테르 내포 링커 모이어티 또는 에스테르 내포 링커 모이어티이다. 긴 사슬 알킬 기는 포화되거나 또는 불포화될 수 있다. 적합한 알킬 기는 데실 (C_{10}), 라우릴 (C_{12}), 미리스틸 (C_{14}), 팔미틸 (C_{16}), 스테아릴 (C_{18}) 및 이코실 (C_{20})을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. 바람직한 구체예에서, R^1 및 R^2는 동일하다, 다시 말하면, R^1 및 R^2는 둘 모두 미리스틸 (즉, 디미리스틸)이거나, R^1 및 R^2는 둘 모두 스테아릴 (즉, 디스테아릴)이거나, 기타 등등이다.

[0243] 상기 화학식 VII에서, PEG는 약 550 달톤 내지 약 10,000 달톤의 범위에서 변하는 평균 분자량을 갖는다. 일정한 사례에서, PEG는 약 750 달톤 내지 약 5,000 달톤 (가령, 약 1,000 달톤 내지 약 5,000 달톤, 약 1,500 달톤 내지 약 3,000 달톤, 약 750 달톤 내지 약 3,000 달톤, 약 750 달톤 내지 약 2,000 달톤 등)의 평균 분자량을 갖는다. 바람직한 구체예에서, PEG는 약 2,000 달톤 또는 약 750 달톤의 평균 분자량을 갖는다. PEG는 알킬, 알콕시, 아실 또는 아릴 기로 임의선택적으로 치환될 수 있다. 일정한 구체예에서, 말단 히드록실 기는 메톡시 또는 메틸 기로 치환된다.

[0244] 바람직한 구체예에서, "L"은 비-에스테르 내포 링커 모이어티이다. 적합한 비-에스테르 내포 링커는 아미도 링커 모이어티, 아미노 링커 모이어티, 카르보닐 링커 모이어티, 카바메이트 링커 모이어티, 요소 링커 모이어티, 에테르 링커 모이어티, 이황화물 링커 모이어티, 숙신아미딜 링커 모이어티, 그리고 이들의 조합을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. 바람직한 구체예에서, 비-에스테르 내포 링커 모이어티는 카바메이트 링커 모이어티 (즉, PEG-*C*-DAA 접합체)이다. 다른 바람직한 구체예에서, 비-에스테르 내포 링커 모이어티는 아미도 링커 모이어티 (즉, PEG-*A*-DAA 접합체)이다. 또 다른 바람직한 구체예에서, 비-에스테르 내포 링커 모이어티는 숙신아미딜 링커 모이어티 (즉, PEG-*S*-DAA 접합체)이다.

[0245] 특정한 구체예에서, the PEG-지질 접합체 에서 선택된다:

[0246]  (66) (PEG-C-DMA); 및

[0247]  (67) (PEG-C-DOMG).

[0248] PEG-DAA 접합체는 당업자에게 공지된 표준 기술 및 시약을 이용하여 합성된다. PEG-DAA 접합체는 다양한 아미드, 아민, 에테르, 티오, 카바메이트 및 요소 연쇄를 내포할 것으로 인식될 것이다. 당업자는 이들 결합을 형성하기 위한 방법 및 시약이 널리 알려져 있고 쉽게 가용하다는 것을 인식할 것이다. 가령, March, ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY (Wiley 1992); Larock, COMPREHENSIVE ORGANIC TRANSFORMATIONS (VCH 1989); 및 Furniss, VOGEL'S TEXTBOOK OF PRACTICAL ORGANIC CHEMISTRY, 5th ed. (Longman 1989)를 참조한다. 존재하는 임의의 기능기는 PEG-DAA 접합체의 합성 동안 상이한 포인트에서 보호 및 탈보호를 필요로 할 수 있는 것으로 또한 인지될 것이다. 당업자는 이런 기술이 널리 알려져 있다는 것을 인식할 것이다. 가령, Green and Wuts, PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS (Wiley 1991)를 참조한다.

[0249] 바람직하게는, PEG-DAA 접합체는 PEG-디데실옥시프로필 (C_{10}) 접합체, PEG-디라우릴옥시프로필 (C_{12}) 접합체, PEG-디미리스틸옥시프로필 (C_{14}) 접합체, PEG-디팔미틸옥시프로필 (C_{16}) 접합체, 또는 PEG-디스테아릴옥시프로필 (C_{18}) 접합체이다. 이들 구체예에서, PEG는 바람직하게는, 약 750 또는 약 2,000 달톤의 평균 분자량을 갖는다. 특히 바람직한 구체예에서, PEG-지질 접합체는 PEG2000-C-DMA를 포함하는데, 여기서 "2000"은 PEG의 평균 분자량을 표시하고, "C"는 카바메이트 링커 모이어티를 표시하고, 그리고 "DMA"는 디미리스틸옥시프로필을 표시한다. 다른 특히 바람직한 구체예에서, PEG-지질 접합체는 PEG750-C-DMA를 포함하는데, 여기서 "750"은 PEG의 평균 분자량을 표시하고, "C"는 카바메이트 링커 모이어티를 표시하고, 그리고 "DMA"는 디미리스틸옥시프로필을 표시한다. 특정한 구체예에서, PEG의 말단 히드록실 기는 메틸 기로 치환된다. 당업자는 다른 디알킬옥시프로필이 PEG-DAA 접합체에서 이용될 수 있다는 것을 쉽게 인지할 것이다.

[0250] 전술한 것에 더하여, 다른 친수성 중합체가 PEG 대신에 이용될 수 있다는 것은 당업자에게 쉽게 명확할 것이다. PEG 대신에 이용될 수 있는 적합한 중합체의 실례는 폴리비닐피롤리돈, 폴리메틸옥사졸린, 폴리에틸옥사졸린, 폴리히드록시프로필 메타크릴아미드, 폴리메타크릴아미드 및 폴리디메틸아크릴아미드, 폴리유산, 폴리글리콜산, 그리고 유도체화된 셀룰로오스, 예를 들면, 히드록시메틸셀룰로오스 또는 히드록시에틸셀룰로오스를 포함하지만 이들에 한정되지 않는다.

[0251] 전술한 성분에 더하여, 지질 입자는 양이온성 폴리(에틸렌 글리콜) (PEG) 지질 또는 CPLs를 더욱 포함할 수 있다 (가령, Chen *et al.*, *Bioconj. Chem.*, 11:433-437 (2000); U.S. 특허 번호 6,852,334; PCT 공개 번호 WO 00/62813을 참조하고, 이들의 개시는 본원에서 모든 점에서 전체적으로 참조로서 편입된다).

[0252] 적합한 CPLs는 화학식 VIII의 화합물을 포함한다:

[0253] A-W-Y (VIII),

[0254] 여기서 A, W 및 Y는 아래에 설명된 바와 같다.

[0255] 화학식 VIII에 관하여, "A"는 지질 앵커로서 행동하는 지질 모이어티, 예를 들면, 양친매성 지질, 중성 지질 또는 소수성 지질이다. 적합한 지질 실례는 디아실글리세롤릴, 디알킬글리세롤릴, N-N-디알킬아미노, 1,2-디아실옥시-3-아미노프로판 및 1,2-디알킬-3-아미노프로판을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다.

[0256] "W"는 중합체 또는 소중합체, 예를 들면, 친수성 중합체 또는 소중합체이다. 바람직하게는, 친수성 중합체는 비면역원성이거나 또는 낮은 내재된 면역원성을 소유하는 생체적합성 중합체이다. 대안으로, 친수성 중합체는 적절한 어쥬번트와 함께 이용되면, 약하게 항원성일 수 있다. 적합한 비면역원성 중합체는 PEG, 폴리아미드, 폴리유산, 폴리글리콜산, 폴리유산/폴리글리콜산 공중합체, 그리고 이들의 조합을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. 바람직한 구체예에서, 중합체는 약 250 내지 약 7,000 달톤의 분자량을 갖는다.

[0257] "Y"는 다가양이온성 모이어티이다. 용어 다가양이온성 모이어티는 선별된 pH, 바람직하게는 생리학적 pH에서 양

성 전하, 바람직하게는 최소한 2 양성 전하를 갖는 화합물, 유도체 또는 기능기를 지칭한다. 적합한 다가양이온성 모이어티는 염기성 아미노산 및 이들의 유도체, 예를 들면, 아르기닌, 아스파라긴, 글루타민, 리신 및 히스티딘; 스페르민; 스페르미딘; 양이온성 덴드리머; 폴리아민; 폴리아민 당; 및 아미노 다당류를 포함한다. 다가양이온성 모이어티는 구조에서 선형, 예를 들면, 선형 테트라리신, 분지형 또는 덴드리머일 수 있다. 다가양이온성 모이어티는 선별된 pH 값에서 약 2 내지 약 15 양성 전하, 바람직하게는 약 2 내지 약 12 양성 전하, 그리고 더욱 바람직하게는 약 2 내지 약 8 양성 전하를 갖는다. 어떤 다가양이온성 모이어티를 이용할 지의 선별은 요망되는 입자 적용의 유형에 의해 결정될 수 있다.

[0258] 다가양이온성 모이어티 상에서 전하는 전체 입자 모이어티 주변에 분포될 수 있거나, 또는 대안으로, 이들은 입자 모이어티의 한 특정 구역에서 전하 밀도의 별개의 농도, 예를 들면, 전하 스파이크일 수 있다. 전하 밀도가 입자 상에 분포되면, 전하 밀도는 동등하게 분포되거나 또는 부등하게 분포될 수 있다. 다가양이온성 모이어티의 전하 분포의 모든 변이가 포괄된다.

[0259] 지질 "A" 및 비면역원성 중합체 "W"는 다양한 방법에 의해, 바람직하게는 공유 부착에 의해 부착될 수 있다. 당업자에게 공지된 방법이 "A" 및 "W"의 공유 부착에 이용될 수 있다. 적합한 연쇄는 아미드, 아민, 카르복실, 탄산염, 카바메이트, 에스테르 및 히드라존 연쇄를 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. "A" 및 "W"가 연쇄를 유발하기 위해 상보성 기능기를 가져야 한다는 것은 당업자에게 명백할 것이다. 이들 2개의 기, 지질 상에서 하나의 기 및 중합체 상에서 다른 기의 반응은 원하는 연쇄를 제공할 것이다. 가령, 지질이 디아실글리세롤이고 말단 히드록실이 예로서 NHS 및 DCC로 활성화되어 활성 에스테르를 형성하고, 그리고 이후, 아미노 기를 내포하는 중합체, 예를 들면, 폴리아미드와 반응될 때 (가령, U.S. 특허 번호 6,320,017 및 6,586,559를 참조하고. 이들의 개시는 본원에서 모든 점에서 전체적으로 참조로서 편입된다), 이들 2개의 기 사이에 아미드 결합이 형성될 것이다.

[0260] 일정한 사례에서, 다가양이온성 모이어티는 리간드, 예를 들면, 표적화 리간드 또는 칼슘을 복합화하기 위한 킬레이팅화 모이어티가 부착될 수 있다. 바람직하게는, 리간드가 부착된 후, 양이온성 모이어티는 양성 전하를 유지한다. 일정한 사례에서, 부착되는 리간드는 양성 전하를 갖는다. 적합한 리간드는 반응성 기능기를 갖는 화합물 또는 장치를 포함하지만 이들에 한정되지 않고, 그리고 지질, 양친매성 지질, 담체 화합물, 생체친화성 화합물, 생체재료, 바이오폴리머, 생물의학 장치, 분석적으로 검출가능한 화합물, 치료적으로 활성 화합물, 효소, 펩티드, 단백질, 항체, 면역 자극기, 방사성 표지, 형광발생소, 비오틴, 약물, 합텐, DNA, RNA, 다당류, 리포솜, 비로솜, 미셀, 면역글로불린, 기능기, 다른 표적화 모이어티, 또는 독소를 포함한다.

[0261] 일부 구체예에서, 지질 접합체 (가령, PEG-지질)는 입자 내에 존재하는 전체 지질의 약 0.1 몰 % 내지 약 3 몰 %, 약 0.5 몰 % 내지 약 3 몰 %, 또는 약 0.6 몰 %, 0.7 몰 %, 0.8 몰 %, 0.9 몰 %, 1.0 몰 %, 1.1 몰 %, 1.2 몰 %, 1.3 몰 %, 1.4 몰 %, 1.5 몰 %, 1.6 몰 %, 1.7 몰 %, 1.8 몰 %, 1.9 몰 %, 2.0 몰 %, 2.1 몰 %, 2.2 몰 %, 2.3 몰 %, 2.4 몰 %, 2.5 몰 %, 2.6 몰 %, 2.7 몰 %, 2.8 몰 %, 2.9 몰 % 또는 3 몰 % (또는 이들의 임의의 분율 또는 그 안에 범위)를 구성한다.

[0262] 다른 구체예에서, 지질 접합체 (가령, PEG-지질)는 입자 내에 존재하는 전체 지질의 약 0 몰 % 내지 약 20 몰 %, 약 0.5 몰 % 내지 약 20 몰 %, 약 2 몰 % 내지 약 20 몰 %, 약 1.5 몰 % 내지 약 18 몰 %, 약 2 몰 % 내지 약 15 몰 %, 약 4 몰 % 내지 약 15 몰 %, 약 2 몰 % 내지 약 12 몰 %, 약 5 몰 % 내지 약 12 몰 %, 또는 약 2 몰 % (또는 이들의 임의의 분율 또는 그 안에 범위)를 구성한다.

[0263] 추가 구체예에서, 지질 접합체 (가령, PEG-지질)는 입자 내에 존재하는 전체 지질의 약 4 몰 % 내지 약 10 몰 %, 약 5 몰 % 내지 약 10 몰 %, 약 5 몰 % 내지 약 9 몰 %, 약 5 몰 % 내지 약 8 몰 %, 약 6 몰 % 내지 약 9 몰 %, 약 6 몰 % 내지 약 8 몰 %, 또는 약 5 몰 %, 6 몰 %, 7 몰 %, 8 몰 %, 9 몰 %, 또는 10 몰 % (또는 이들의 임의의 분율 또는 그 안에 범위)를 구성한다.

[0264] 지질 입자 내에 존재하는 지질 접합체의 백분율은 목표량이고, 그리고 제제 내에 존재하는 지질 접합체의 실제량은 예로서, ± 5 몰 %, ± 4 몰 %, ± 3 몰 %, ± 2 몰 %, ± 1 몰 %, ± 0.75 몰 %, ± 0.5 몰 %, ± 0.25 몰 %, 또는 ± 0.1 몰 % 변할 수 있는 것으로 이해되어야 한다.

[0265] 지질 입자에서 이용에 적합한 지질 접합체의 추가 백분율 및 범위는 PCT 공개 번호 WO 09/127060, U.S. 공개된 출원 번호 US 2011/0071208, PCT 공개 번호 WO2011/000106 및 U.S. 공개된 출원 번호 US 2011/0076335에서 설명되고, 이들의 개시는 본원에서 모든 점에서 전체적으로 참조로서 편입된다.

[0266] 당업자는 지질 접합체의 농도가 이용된 지질 접합체 및 지질 입자가 융해성이 되는 비율에 따라 변할 수 있다는

것을 인지할 것이다.

[0267] 지질 접합체의 조성 및 농도를 제어함으로써, 지질 접합체가 지질 입자 밖으로 교체되어 나오는 비율 및 차례로, 지질 입자가 융해성이 되는 비율을 제어할 수 있다. 가령, PEG-DAA 접합체가 지질 접합체로서 이용될 때, 지질 입자가 융해성이 되는 비율은 예로서, 지질 접합체의 농도를 변경함으로써, PEG의 분자량을 변경함으로써, 또는 PEG-DAA 접합체 상에서 알킬 기의 사슬 길이 및 포화도를 변경함으로써 변할 수 있다. 이에 더하여, 예로서 pH, 온도, 이온 강도 등을 비롯한 다른 변수가 지질 입자가 융해성이 되는 비율을 변경하고 및/또는 제어하는데 이용될 수 있다. 지질 입자가 융해성이 되는 비율을 제어하는데 이용될 수 있는 다른 방법은 본 발명을 읽어보면 당업자에게 명백해질 것이다. 또한, 지질 접합체의 조성 및 농도를 제어함으로써, 지질 입자 크기를 제어할 수 있다.

[0268] **추가 담체 시스템**

[0269] 이용에 적합한 추가 지질-기초된 담체 시스템의 무제한적 실례는 리포플렉스 (가령, U.S. 특허 공개 번호 20030203865; 및 Zhang *et al.*, *J. Control Release*, 100:165-180 (2004)를 참조한다), pH-민감성 리포플렉스 (가령, U.S. 특허 공개 번호 20020192275를 참조한다), 가역적으로 차폐된 리포플렉스 (가령, U.S. 특허 공개 번호 20030180950을 참조한다), 양이온성 지질-기초된 조성물 (가령, U.S. 특허 번호 6,756,054; 및 U.S. 특허 공개 번호 20050234232를 참조한다), 양이온성 리포솜 (가령, U.S. 특허 공개 번호 20030229040, 20020160038 및 20020012998; U.S. 특허 번호 5,908,635; 그리고 PCT 공개 번호 WO 01/72283을 참조한다), 음이온성 리포솜 (가령, U.S. 특허 공개 번호 20030026831을 참조한다), pH-민감성 리포솜 (가령, U.S. 특허 공개 번호 20020192274; 및 AU 2003210303을 참조한다), 항체-코팅된 리포솜 (가령, U.S. 특허 공개 번호 20030108597; 및 PCT 공개 번호 WO 00/50008을 참조한다), 세포 유형 특정한 리포솜 (가령, U.S. 특허 공개 번호 20030198664를 참조한다), 핵산 및 펩티드를 내포하는 리포솜 (가령, U.S. 특허 번호 6,207,456을 참조한다), 방출가능한 친수성 중합체로 유도체화된 지질을 내포하는 리포솜 (가령, U.S. 특허 공개 번호 20030031704를 참조한다), 지질-포획된 핵산 (가령, PCT 공개 번호 WO 03/057190 및 WO 03/059322를 참조한다), 지질-캡슐화된 핵산 (가령, U.S. 특허 공개 번호 20030129221; 및 U.S. 특허 번호 5,756,122를 참조한다), 다른 리포솜 조성물 (가령, U.S. 특허 공개 번호 20030035829 및 20030072794; 그리고 U.S. 특허 번호 6,200,599를 참조한다), 리포솜 및 유제의 안정된 혼합물 (가령, EP1304160을 참조한다), 유제 조성물 (가령, U.S. 특허 번호 6,747,014를 참조한다), 그리고 핵산 마이크로유제 (가령, U.S. 특허 공개 번호 20050037086을 참조한다)를 포함한다.

[0270] 이용에 적합한 중합체-기초된 담체 시스템의 실례는 양이온성 중합체-핵산 복합체 (즉, 폴리플렉스)를 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. 폴리플렉스를 형성하기 위해, 핵산 (가령, siRNA 분자, 예를 들면, 표 A에서 설명된 siRNA 분자)은 전형적으로, 상기 핵산을 세포 표면에서 음이온성 프로테오글리칸과 상호작용하고 세포내섭취에 의해 세포로 들어갈 수 있는 양성으로 하전된 입자로 압축하는 선형, 분지형, 별, 또는 수지상 중합성 구조를 갖는 양이온성 중합체와 복합화된다. 일부 구체예에서, 폴리플렉스는 양이온성 중합체, 예를 들면, 폴리에틸렌이민 (PEI) (가령, U.S. 특허 번호 6,013,240을 참조한다; 생체내 jetPEI™, PEI의 선형 형태로서 Qbiogene, Inc. (Carlsbad, CA)로부터 상업적으로 가용), 폴리프로필렌이민 (PPI), 폴리비닐피롤리돈 (PVP), 폴리-L-리신 (PLL), 디에틸아미노에틸 (DEAE)-덱스트란, 폴리(β-아미노 에스테르) (PAE) 중합체 (가령, Lynn *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 123:8155-8156 (2001)을 참조한다), 키토산, 폴리아미도아민 (PAMAM) 덴드리머 (가령, Kukowska-Latallo *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:4897-4902 (1996)를 참조한다), 포르피린 (가령, U.S. 특허 번호 6,620,805를 참조한다), 폴리비닐에테르 (가령, U.S. 특허 공개 번호 20040156909를 참조한다), 다중환상 아미디늄 (가령, U.S. 특허 공개 번호 20030220289를 참조한다), 일차 아민, 이민, 구아니딘 및/또는 이미다졸 기를 포함하는 다른 중합체 (가령, U.S. 특허 번호 6,013,240; PCT 공개 번호 WO/9602655; PCT 공개 번호 WO95/21931; Zhang *et al.*, *J. Control Release*, 100:165-180 (2004); 및 Tiera *et al.*, *Curr. Gene Ther.*, 6:59-71 (2006)을 참조한다), 그리고 이들의 혼합물과 복합화된 핵산 (가령, siRNA 분자, 예를 들면, 표 A에서 설명된 siRNA 분자)을 포함한다. 다른 구체예에서, 폴리플렉스는 U.S. 특허 공개 번호 20060211643, 20050222064, 20030125281 및 20030185890, 그리고 PCT 공개 번호 WO 03/066069에서 설명된 바와 같은 양이온성 중합체-핵산 복합체; U.S. 특허 공개 번호 20040071654에서 설명된 바와 같은 생물분해성 폴리(β-아미노 에스테르) 중합체-핵산 복합체; U.S. 특허 공개 번호 20040142475에서 설명된 바와 같은 중합성 매트릭스를 내포하는 마이크로입자; U.S. 특허 공개 번호 20030157030에서 설명된 바와 같은 다른 마이크로입자 조성물; U.S. 특허 공개 번호 20050123600에서 설명된 바와 같은 압축된 핵산 복합체; 그리고 AU 2002358514 및 PCT 공개 번호 WO 02/096551에서 설명된 바와 같은 나노캡슐 및 마이크로캡슐 조성물을 포함한다.

[0271] 일정한 사례에서, siRNA는 시클로덱스트린 또는 이의 중합체와 복합화될 수 있다. 시클로덱스트린-기초된 담체

시스템의 무제한적 실례는 U.S. 특허 공개 번호 20040087024에서 설명된 시클로덱스트린-변형된 중합체-핵산 복합체; U.S. 특허 번호 6,509,323, 6,884,789 및 7,091,192에서 설명된 선형 시클로덱스트린 공중합체-핵산 복합체; 그리고 U.S. 특허 번호 7,018,609에서 설명된 시클로덱스트린 중합체-복합화 작용제-핵산 복합체를 포함한다. 일정한 다른 사례에서, siRNA는 펩티드 또는 폴리펩티드와 복합화될 수 있다. 단백질-기초된 담체 시스템의 실례는 PCT 공개 번호 WO95/21931에서 설명된 양이온성 올리고펩티드-핵산 복합체를 포함하지만 이들에 한정되지 않는다.

[0272] **지질 입자의 제조**

[0273] 핵산 (가령, 표 A에서 설명된 바와 같은 siRNA)이 입자의 지질 부분 내에 포획되고 분해로부터 보호되는 핵산-지질 입자는 연속적 혼합 방법, 직접적인 희석 과정 및 즉시 희석 과정을 포함하지만 이들에 한정되지 않는 당해 분야에서 공지된 임의의 방법에 의해 형성될 수 있다.

[0274] 특정한 구체예에서, 양이온성 지질은 단독으로 또는 다른 양이온성 지질과 합동으로 화학식 I-III의 지질 또는 이들의 염을 포함할 수 있다. 다른 구체예에서, 비-양이온성 지질은 에그 스핑고미엘린 (ESM), 디스테아로일포스파티딜콜린 (DSPC), 디올레오일포스파티딜콜린 (DOPC), 1-팔미토일-2-올레오일-포스파티딜콜린 (POPC), 디팔미토일-포스파티딜콜린 (DPPC), 모노메틸-포스파티딜에탄올아민, 디메틸-포스파티딜에탄올아민, 14:0 PE (1,2-디미리스토일-포스파티딜에탄올아민 (DMPE)), 16:0 PE (1,2-디팔미토일-포스파티딜에탄올아민 (DPPE)), 18:0 PE (1,2-디스테아로일-포스파티딜에탄올아민 (DSPE)), 18:1 PE (1,2-디올레오일-포스파티딜에탄올아민 (DOPE)), 18:1 트랜스 PE (1,2-디엘라이도일-포스파티딜에탄올아민 (DEPE)), 18:0-18:1 PE (1-스테아로일-2-올레오일-포스파티딜에탄올아민 (SOPE)), 16:0-18:1 PE (1-팔미토일-2-올레오일-포스파티딜에탄올아민 (POPE)), 폴리에틸렌글리콜-기초된 중합체 (가령, PEG 2000, PEG 5000, PEG-변형된 디아실글리세롤, 또는 PEG-변형된 디알킬옥시프로필), 콜레스테롤, 이들의 유도체, 또는 이들의 조합이다.

[0275] 일정한 구체예에서, 핵산-지질 입자는 연속적 혼합 방법, 예를 들면, 첫 번째 저장소에서 siRNA를 포함하는 수성 용액을 제공하고, 두 번째 저장소에서 유기 지질 용액을 제공하고 (여기서 유기 지질 용액에서 존재하는 지질은 유기 용매, 예를 들면, 저급 알칸올, 예를 들면, 에탄올에서 가용화된다), 그리고 siRNA를 지질 소포 내에 캡슐화하는 지질 소포 (가령, 리포솜)를 실제적으로 순간적으로 생산하기 위해 유기 지질 용액이 수성 용액과 혼합되도록 수성 용액을 유기 지질 용액과 혼합하는 것을 포함하는 과정을 통해 생산된다. 이러한 과정 및 이러한 과정을 실행하기 위한 기구는 U.S. 특허 공개 번호 20040142025에서 상세하게 설명되고, 이것의 개시는 본원에서 모든 점에서 전체적으로 참조로서 편입된다.

[0276] 지질 및 완충액을 혼합 환경 내로, 예를 들면, 혼합 챔버에 연속적으로 도입하는 행위는 완충액으로 지질 용액의 연속적 희석을 유발하고, 따라서 혼합 시에 지질 소포를 실제적으로 순간적으로 생산한다. 본원에서 이용된 바와 같이, 관용구 "완충액으로 지질 용액을 연속적으로 희석하는" (및 변이)은 일반적으로, 지질 용액이 소포 산출을 유발하는데 충분한 힘으로 수화 과정에서 충분히 급속하게 희석된다는 것을 의미한다. 핵산을 포함하는 수성 용액을 유기 지질 용액과 혼합함으로써, 유기 지질 용액은 핵산-지질 입자를 생산하기 위해 완충액 (즉, 수성 용액)의 존재에서 연속적 단계별 희석을 겪는다.

[0277] 연속적 혼합 방법을 이용하여 형성된 핵산-지질 입자는 전형적으로, 약 30 nm 내지 약 150 nm, 약 40 nm 내지 약 150 nm, 약 50 nm 내지 약 150 nm, 약 60 nm 내지 약 130 nm, 약 70 nm 내지 약 110 nm, 약 70 nm 내지 약 100 nm, 약 80 nm 내지 약 100 nm, 약 90 nm 내지 약 100 nm, 약 70 내지 약 90 nm, 약 80 nm 내지 약 90 nm, 약 70 nm 내지 약 80 nm, 약 120 nm, 110 nm, 100 nm, 90 nm 또는 80 nm 이하, 또는 약 30 nm, 35 nm, 40 nm, 45 nm, 50 nm, 55 nm, 60 nm, 65 nm, 70 nm, 75 nm, 80 nm, 85 nm, 90 nm, 95 nm, 100 nm, 105 nm, 110 nm, 115 nm, 120 nm, 125 nm, 130 nm, 135 nm, 140 nm, 145 nm, 또는 150 nm (또는 이들의 임의의 분율 또는 그 안에 범위)의 크기를 갖는다. 이렇게 형성된 입자는 응집하지 않고, 그리고 임의선택적으로, 균일한 입자 크기를 달성하도록 크기산정된다.

[0278] 다른 구체예에서, 핵산-지질 입자는 지질 소포 (가령, 리포솜) 용액을 형성하고, 그리고 상기 지질 소포 용액을 제어된 양의 희석 완충액을 내포하는 수집 용기 내로 즉시 및 직접적으로 도입하는 것을 포함하는 직접적인 희석 과정을 통해 생산된다. 바람직한 양상에서, 수집 용기는 희석을 용이하게 하기 위해 수집 용기의 내용물을 교반하도록 설정된 하나 또는 그 이상의 요소를 포함한다. 한 양상에서, 수집 용기에서 존재하는 희석 완충액의 양은 거기에 도입된 지질 소포 용액의 용적과 실제적으로 동등하다. 무제한적 실례로서, 동등한 용적의 희석 완충액을 내포하는 수집 용기 내로 도입될 때 45% 에탄올에서 지질 소포 용액은 더욱 작은 입자를 유리하게 산출할 것이다.

[0279] 또 다른 구체예에서, 핵산-지질 입자는 즉시 희석 과정을 통해 생산되는데, 여기서 희석 완충액을 내포하는 세 번째 저장소가 두 번째 혼합 영역에 유동적으로 연계된다. 이러한 구체예에서, 첫 번째 혼합 영역에서 형성된 지질 소포 (가령, 리포솜) 용액은 두 번째 혼합 영역에서 희석 완충액과 즉시 및 직접적으로 혼합된다. 바람직한 양상에서, 두 번째 혼합 영역은 지질 소포 용액 및 희석 완충액 흐름이 마주보는 180° 흐름으로서 만나도록 배열된 T-연결기를 포함한다; 하지만, 더욱 얕은 각도, 예를 들면, 약 27° 내지 약 180° (가령, 약 90°)를 제공하는 연결기가 이용될 수 있다. 펌프 메커니즘은 제어가능한 흐름의 완충액을 두 번째 혼합 영역에 전달한다. 한 양상에서, 두 번째 혼합 영역에 제공된 희석 완충액의 유속은 첫 번째 혼합 영역으로부터 거기에 도입된 지질 소포 용액의 유속과 실제적으로 동등하도록 제어된다. 이러한 구체예는 유리하게는, 두 번째 혼합 영역에서 지질 소포 용액과 희석 완충액 혼합의 흐름의 더욱 제어, 그리고 이런 이유로, 또한 두 번째 혼합 과정 전역에서 완충액에서 지질 소포 용액의 농축을 허용한다. 희석 완충액 유속의 이런 제어는 유리하게는, 감소된 농도에서 작은 입자 크기 형성을 허용한다.

[0280] 이들 과정 및 이들 직접적인 희석과 즉시 희석 과정을 실행하기 위한 기구는 U.S. 특허 공개 번호 20070042031에서 상세하게 설명되고, 이것의 개시는 본원에서 모든 점에서 전체적으로 참조로서 편입된다.

[0281] 직접적인 희석 및 즉시 희석 과정을 이용하여 형성된 핵산-지질 입자는 전형적으로, 약 30 nm 내지 약 150 nm, 약 40 nm 내지 약 150 nm, 약 50 nm 내지 약 150 nm, 약 60 nm 내지 약 130 nm, 약 70 nm 내지 약 110 nm, 약 70 nm 내지 약 100 nm, 약 80 nm 내지 약 100 nm, 약 90 nm 내지 약 100 nm, 약 70 내지 약 90 nm, 약 80 nm 내지 약 90 nm, 약 70 nm 내지 약 80 nm, 약 120 nm, 110 nm, 100 nm, 90 nm 또는 80 nm 이하, 또는 약 30 nm, 35 nm, 40 nm, 45 nm, 50 nm, 55 nm, 60 nm, 65 nm, 70 nm, 75 nm, 80 nm, 85 nm, 90 nm, 95 nm, 100 nm, 105 nm, 110 nm, 115 nm, 120 nm, 125 nm, 130 nm, 135 nm, 140 nm, 145 nm, 또는 150 nm (또는 이들의 임의의 분율 또는 그 안에 범위)의 크기를 갖는다. 이렇게 형성된 입자는 응집하지 않고, 그리고 임의선택적으로, 균일한 입자 크기를 달성하도록 크기산정된다.

[0282] 지질 입자는 리포솜을 크기산정하는데 가용한 방법 중에서 한 가지에 의해 크기산정될 수 있다. 크기산정은 원하는 크기 범위 및 입자 크기의 상대적으로 좁은 분포를 달성하기 위해 수행될 수 있다.

[0283] 여러 기술이 입자를 원하는 크기로 크기산정하는데 가용하다. 리포솜에 이용되고 현재의 입자에 동등하게 적용가능한 한 가지 크기산정 방법은 U.S. 특허 번호 4,737,323에서 설명되는데, 이것의 개시는 본원에서 모든 점에서 전체적으로 참조로서 편입된다. 입자 현탁액을 배스 또는 프로브 초음파처리에 의해 초음파처리하는 것은 크기에서 약 50 nm보다 적은 입자까지 진행성 크기 감소를 산출한다. 균질화는 더욱 큰 입자를 더욱 작은 입자로 단편화시키기 위해 전단 에너지에 의존하는 다른 방법이다. 전형적인 균질화 절차에서, 입자는 선별된 입자 크기, 전형적으로 약 60 내지 약 80 nm가 관찰될 때까지, 표준 유제 균질기를 통해 재순환된다. 양쪽 방법에서, 입자 크기 분포는 전통적인 레이저-빔 입자 크기 식별, 또는 QELS에 의해 모니터링될 수 있다.

[0284] 작은-구멍 폴리카보네이트 막 또는 비대칭 세라믹 막을 통한 입자의 압출 역시 입자 크기를 상대적으로 충분히-규정된 크기 분포로 감소시키기 위한 효과적인 방법이다. 전형적으로, 현탁액은 원하는 입자 크기 분포가 달성될 때까지, 막을 통해 1회 또는 그 이상 순환된다. 입자는 크기에서 점진적인 감소를 달성하기 위해, 연속적으로 더욱 작은-구멍 막을 통해 압출될 수 있다.

[0285] 일부 구체예에서, 입자 (가령, siRNA 분자)에서 존재하는 핵산은 예로서, U.S. 특허 출원 번호 09/744,103에서 설명된 바와 같이 미리 압축되는데, 이것의 개시는 본원에서 모든 점에서 전체적으로 참조로서 편입된다.

[0286] 다른 구체예에서, 이들 방법은 본 발명 조성물을 이용한 세포의 리포펙션을 달성하는데 유용한 비-지질 다가양이온을 첨가하는 것을 더욱 포함할 수 있다. 적합한 비-지질 다가양이온의 실례는 헥사다이메트린 브롬화물 (Aldrich Chemical Co., Milwaukee, Wisconsin, USA로부터 제품명 POLYBRENE® 하에 판매됨) 또는 헥사다이메트린의 다른 염을 포함한다. 다른 적합한 다가양이온은 예로서, 폴리-L-오르니틴, 폴리-L-아르기닌, 폴리-L-리신, 폴리-D-리신, 폴리알릴아민 및 폴리에틸렌이민의 염을 포함한다. 이들 염의 첨가는 바람직하게는, 입자가 형성된 이후이다.

[0287] 일부 구체예에서, 형성된 핵산-지질 입자에서 핵산 (가령, siRNA) 대 지질 비율 (질량/질량 비율)은 약 0.01 내지 약 0.2, 약 0.05 내지 약 0.2, 약 0.02 내지 약 0.1, 약 0.03 내지 약 0.1, 또는 약 0.01 내지 약 0.08의 범위에서 변할 것이다. 시작 물질 (입력)의 비율 역시 이러한 범위에 들어간다. 다른 구체예에서, 입자 제조는 10 mg 전체 지질마다 약 400 μg 핵산, 또는 50 μg의 핵산마다 1.25 mg의 전체 지질에 상응하는 약 0.01 내지 약 0.08 및 더욱 바람직하게는, 약 0.04의 핵산 대 지질 질량비를 이용한다. 다른 바람직한 구체예에서, 입자는

약 0.08의 핵산:지질 질량비를 갖는다.

[0288] 다른 구체예에서, 형성된 핵산-지질 입자에서 지질 대 핵산 (가령, siRNA) 비율 (질량/질량 비율)은 약 1 (1:1) 내지 약 100 (100:1), 약 5 (5:1) 내지 약 100 (100:1), 약 1 (1:1) 내지 약 50 (50:1), 약 2 (2:1) 내지 약 50 (50:1), 약 3 (3:1) 내지 약 50 (50:1), 약 4 (4:1) 내지 약 50 (50:1), 약 5 (5:1) 내지 약 50 (50:1), 약 1 (1:1) 내지 약 25 (25:1), 약 2 (2:1) 내지 약 25 (25:1), 약 3 (3:1) 내지 약 25 (25:1), 약 4 (4:1) 내지 약 25 (25:1), 약 5 (5:1) 내지 약 25 (25:1), 약 5 (5:1) 내지 약 20 (20:1), 약 5 (5:1) 내지 약 15 (15:1), 약 5 (5:1) 내지 약 10 (10:1), 또는 약 5 (5:1), 6 (6:1), 7 (7:1), 8 (8:1), 9 (9:1), 10 (10:1), 11 (11:1), 12 (12:1), 13 (13:1), 14 (14:1), 15 (15:1), 16 (16:1), 17 (17:1), 18 (18:1), 19 (19:1), 20 (20:1), 21 (21:1), 22 (22:1), 23 (23:1), 24 (24:1), 또는 25 (25:1), 또는 이들의 임의의 분율 또는 그 안에 범위에서 변할 것이다. 시작 물질 (입력)의 비율 역시 이러한 범위에 들어간다.

[0289] 앞서 논의된 바와 같이, 접합된 지질은 CPL를 더욱 포함할 수 있다. 지질 입자-CPLs (CPL-내포 지질 입자)를 만들기 위한 다양한 일반적인 방법이 본원에서 논의된다. 2가지 일반적인 기술은 "후삽입" 기술, 다시 말하면, 예로서, 미리 형성된 지질 입자 내로 CPL의 삽입, 그리고 CPL이 예로서, 지질 입자 형성 단계 동안 지질 혼합물 내에 포함되는 "표준" 기술을 포함한다. 후삽입 기술은 주로 지질 입자 이중층 막의 외부면에서 CPLs를 갖는 지질 입자를 유발하고, 반면 표준 기술은 내부면 및 외부면 둘 모두에서 CPLs를 갖는 지질 입자를 제공한다. 상기 방법은 인지질 (이들은 콜레스테롤을 내포할 수 있다)로부터 만들어진 소포 그리고 또한, PEG-지질 (가령, PEG-DAAs 및 PEG-DAGs)을 내포하는 소포에 대해 특히 유용하다. 지질 입자-CPLs를 만드는 방법은 예로서, U.S. 특허 번호 5,705,385; 6,586,410; 5,981,501; 6,534,484; 및 6,852,334; U.S. 특허 공개 번호 20020072121; 그리고 PCT 공개 번호 WO 00/62813에서 교시되고, 이들의 개시는 본원에서 모든 점에서 전체적으로 참조로서 편입된다.

[0290] **지질 입자의 투여**

[0291] 지질 입자 (가령, 핵산 지질 입자)는 이들이 혼합되거나 또는 접촉되는 거의 모든 세포 유형에 흡착될 수 있다. 일단 흡착되면, 입자는 세포의 일부에 의해 세포내섭취되거나, 지질을 세포막과 교환하거나, 또는 세포와 융합할 수 있다. 입자의 siRNA 부분의 전달 또는 통합은 이들 경로 중에서 한 가지를 통해 일어날 수 있다. 특히, 융합이 발생할 때, 입자 막은 세포막 내로 통합되고, 그리고 입자의 내용물은 세포내 체액과 합동된다.

[0292] 지질 입자 (가령, 핵산-지질 입자)는 단독으로, 또는 투여 루트 및 표준 제약학적 실시에 따라서 선별된 제약학적으로 허용되는 담체 (가령, 생리 식염수 또는 인산염 완충액)과의 혼합물로 투여될 수 있다. 일반적으로, 통상적인 완충된 식염수 (가령, 135-150 mM NaCl)가 제약학적으로 허용되는 담체로서 이용될 것이다. 다른 적합한 담체는 증강된 안정성을 위한 당단백질, 예를 들면, 알부민, 지질단백질, 글로불린 등을 비롯하여, 예로서 물, 완충된 물, 0.4% 식염수, 0.3% 글리신 등을 포함한다. 추가 적합한 담체는 예로서, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, Mack Publishing Company, Philadelphia, PA, 17th ed. (1985)에서 설명된다. 본원에서 이용된 바와 같이, "담체"는 임의의 모든 용매, 분산 매체, 운반제, 코팅, 희석제, 항균제 및 항진균제, 등장성 및 흡수 지연 작용제, 완충액, 담체 용액, 현탁액, 콜로이드, 기타 등등을 포함한다. 관용구 "제약학적으로 허용되는"은 인간에게 투여될 때 알레르기성 반응 또는 유사한 부반응을 발생시키지 않는 분자 실체 및 조성물을 지칭한다.

[0293] 제약학적으로 허용되는 담체는 일반적으로, 지질 입자 형성 이후에 첨가된다. 따라서, 지질 입자가 형성된 이후에, 상기 입자는 제약학적으로 허용되는 담체, 예를 들면, 통상적인 완충된 식염수 내로 희석될 수 있다.

[0294] 제약학적 제제에서 입자의 농도는 폭넓게, 다시 말하면, 중량으로 약 0.05% 이하로부터, 통상적으로 약 2 내지 5% 또는 최소한 이것으로부터 많게는 약 10 내지 90%까지 변할 수 있고, 그리고 선별된 특정 투여 방식에 따라서 일차적으로 유체 용적, 점성 등에 의해 선별될 것이다. 가령, 농도는 치료와 연관된 유체 부하를 낮추기 위해 증가될 수 있다. 이것은 죽상경화증-연관된 울혈성 심부전 또는 심각한 고혈압을 앓는 환자에서 특히 바람직할 수 있다. 대안으로, 자극성 지질로 구성된 입자는 투여 부위에서 염증을 줄이기 위해 낮은 농도로 희석될 수 있다.

[0295] 제약학적 조성물은 전통적인, 널리 공지된 살균 기술에 의해 살균될 수 있다. 수성 용액은 이용을 위해 포장되거나 또는 무균 조건 하에 여과되고 동결건조될 수 있는데, 동결건조된 제조물은 투여에 앞서 무균 수성 용액과 합동된다. 조성물은 생리학적 상태를 근사하기 위해 필요에 따라 제약학적으로 허용되는 보조 물질, 예를 들면, pH 조정제 및 완충제, 긴장성 조정제 등, 예를 들면, 아세트산나트륨, 젖산나트륨, 염화나트륨, 염화칼륨 및 염화칼슘을 내포할 수 있다. 추가적으로, 입자 현탁액은 지질을 보관 시에 유리-라디칼 및 지질-과산화 피해로부

터 보호하는 지질-보호제를 포함할 수 있다. 친유성 유리-라디칼 퀀처, 예를 들면, 알파토코페롤, 그리고 수용성 철-특이적 킬레이터, 예를 들면, 페리옥사민이 적합하다.

[0296] **생체내 투여**

[0297] 생체내 요법을 위한 전신 전달, 예를 들면, 본원에서 설명된 siRNA 분자, 예를 들면, 표 A에서 설명된 siRNA의 신체 시스템, 예를 들면, 순환을 통한 원위 표적 세포로의 전달은 핵산-지질 입자, 예를 들면, PCT 공개 번호 WO 05/007196, WO 05/121348, WO 05/120152 및 WO 04/002453에서 설명된 것들을 이용하여 달성되었는데, 이들의 개시는 본원에서 모든 점에서 전체적으로 참조로서 편입된다.

[0298] 생체내 투여의 경우에, 투여는 당해 분야에서 공지된 임의의 방식, 예를 들면, 주사, 경구 투여, 흡입 (가령, 비내 또는 기관내), 경피 적용, 또는 직장 투여일 수 있다. 투여는 단일 또는 분할 용량을 통해 달성될 수 있다. 제약학적 조성물은 비경구, 다시 말하면, 낭내, 정맥내, 복막내, 피하, 또는 근육내 투여될 수 있다. 일부 구체예에서, 제약학적 조성물은 일시 주사에 의해 정맥내 또는 복막내 투여된다 (가령, U.S. 특허 번호 5,286,634를 참조한다). 세포내 핵산 전달은 또한, Straubringer *et al.*, *Methods Enzymol.*, 101:512 (1983); Mannino *et al.*, *Biotechniques*, 6:682 (1988); Nicolau *et al.*, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 6:239 (1989); 및 Behr, *Acc. Chem. Res.*, 26:274 (1993)에서 논의되었다. 지질-기초된 치료제를 투여하는 또 다른 방법은 예로서, U.S. 특허 번호 3,993,754; 4,145,410; 4,235,871; 4,224,179; 4,522,803; 및 4,588,578에서 설명된다. 지질 입자는 질병 부위에서 직접적인 주사에 의해 또는 질병 부위로부터 원위 부위에서 주사에 의해 투여될 수 있다 (가령, Culver, HUMAN GENE THERAPY, MaryAnn Liebert, Inc., Publishers, New York. pp.70-71(1994)을 참조한다). 전술한 참고문헌의 개시는 본원에서 모든 점에서 전체적으로 참조로서 편입된다.

[0299] 지질 입자가 정맥내 투여되는 구체예에서, 이들 입자의 전체 주사된 용량 중에서 최소한 약 5%, 10%, 15%, 20%, 또는 25%가 혈장 내에, 주사 후 약 8, 12, 24, 36, 또는 48 시간에 존재한다. 다른 구체예에서, 지질 입자의 전체 주사된 용량 중에서 약 20%, 30%, 40% 이상 및 많게는 약 60%, 70% 또는 80%가 혈장 내에, 주사 후 약 8, 12, 24, 36, 또는 48 시간에 존재한다. 일정한 사례에서, 복수의 입자 중에서 약 10% 이상이 포유동물의 혈장 내에, 투여 후 약 1 시간에 존재한다. 일정한 다른 사례에서, 지질 입자의 존재는 이들 입자의 투여 후 최소한 약 1 시간에 검출가능하다. 일부 구체예에서, siRNA 분자의 존재는 세포에서, 투여 후 약 8, 12, 24, 36, 48, 60, 72 또는 96 시간에 검출가능하다. 다른 구체예에서, siRNA 분자에 의한 표적 서열, 예를 들면, 바이러스 또는 숙주 서열의 발현의 하향조절이 투여 후 약 8, 12, 24, 36, 48, 60, 72 또는 96 시간에 검출가능하다. 또 다른 구체예에서, siRNA 분자에 의한 표적 서열, 예를 들면, 바이러스 또는 숙주 서열의 발현의 하향조절은 감염된 세포 및/또는 감염될 수 있는 세포에서 우선적으로 발생한다. 추가 구체예에서, 투여 부위의 근위 또는 원위 부위에서 세포에서 siRNA 분자의 존재 또는 효과는 투여 후 약 12, 24, 48, 72, 또는 96 시간에서, 또는 약 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 19, 20, 22, 24, 26, 또는 28 일에서 검출가능하다. 추가 구체예에서, 지질 입자는 비경구 또는 복막내 투여된다.

[0300] 조성물은 단독으로, 또는 다른 적합한 성분과 합동으로, 흡입 (가령, 비내 또는 기관내)을 통해 투여되는 에어로졸 제제로 만들어질 수 있다 (다시 말하면, 이들은 "분무"될 수 있다) (Brigham *et al.*, *Am. J. Sci.*, 298:278 (1989)을 참조한다). 에어로졸 제제는 가압된 허용되는 추진제, 예를 들면, 디클로로디플루오로메탄, 프로판, 질소 등 내로 배치될 수 있다.

[0301] 일정한 구체예에서, 제약학적 조성물은 비내 스프레이, 흡입 및/또는 다른 에어로졸 전달 수송체에 의해 전달될 수 있다. 핵산 조성물을 코 에어로졸 스프레이를 통해 폐에 직접적으로 전달하기 위한 방법은 예로서, U.S. 특허 번호 5,756,353 및 5,804,212에서 설명되었다. 유사하게, 비내 마이크로입자 수지 및 리소포스파티딜-글리세롤 화합물을 이용한 약물의 전달 (U.S. 특허 5,725,871) 역시 약학 분야에서 널리 공지된다. 유사하게, 폴리테트라플루오로에틸렌 지지체 매트릭스의 형태에서 경점막 약물 전달은 U.S. 특허 번호 5,780,045에서 설명된다. 전술한 특허의 개시는 본원에서 모든 점에서 전체적으로 참조로서 편입된다.

[0302] 비경구 투여, 예를 들면, 예로서 낭내 (관절에서), 정맥내, 근육내, 피내, 복막내 및 피하 루트에 의한 투여에 적합한 제제는 수성 및 비수성, 등장성 무균 주사 용액 (이들은 항산화제, 완충액, 세균발육저지제, 그리고 제제를 의도된 수용자의 혈액과 등장성이 되게 만드는 용질을 내포할 수 있다), 그리고 현탁제, 가용화제, 농후제, 안정제 및 보존제를 포함할 수 있는 수성 및 비수성 무균 현탁액을 포함한다.

[0303] 일반적으로, 정맥내 투여될 때, 지질 입자 제제는 적합한 제약학적 담체로 조제된다. 적합한 제제는 예로서, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, Mack Publishing Company, Philadelphia, PA, 17th ed. (1985)에서 발

견된다. 다양한 수성 담체, 예를 들면, 물, 완충된 물, 0.4% 식염수, 0.3% 글리신 등이 이용될 수 있고, 그리고 증강된 안정성을 위한 당단백질, 예를 들면, 알부민, 지질단백질, 글로불린 등을 포함할 수 있다. 일반적으로, 통상적인 완충된 식염수 (135-150 mM NaCl)가 제약학적으로 허용되는 담체로서 이용될 것이지만, 다른 적합한 담체도 충분할 것이다. 이들 조성물은 전통적인 리포솜 살균 기술, 예를 들면, 여과에 의해 살균될 수 있다. 조성물은 생리학적 상태를 근사하기 위해 필요에 따라 제약학적으로 허용되는 보조 물질, 예를 들면, pH 조정제 및 완충제, 긴장성 조정제, 적심제 등, 예를 들면, 아세트산나트륨, 젖산나트륨, 염화나트륨, 염화칼륨, 염화칼슘, 소르비탄 모노라우레이트, 트리에탄올아민 올레산염 등을 내포할 수 있다. 이들 조성물은 위에서 언급된 기술을 이용하여 살균될 수 있거나, 또는 대안으로, 이들은 무균 조건 하에 생산될 수 있다. 결과의 수성 용액은 이용을 위해 포장되거나 또는 무균 조건 하에 여과되고 동결건조될 수 있는데, 동결건조된 제조물은 투여에 앞서 무균 수성 용액과 합동된다.

[0304] 일정한 적용에서, 본원에서 개시된 지질 입자는 경구 투여를 통해 개체에 전달될 수 있다. 입자는 부형제와 통합되고, 그리고 섭취가능한 정제, 협측 정제, 트로키제, 캡슐, 알약, 로젠지, 엘릭시르, 구강 청결제, 현탁액, 경구 스프레이, 시럽, 웨이퍼 등의 형태에서 이용될 수 있다 (가령, U.S. 특허 번호 5,641,515, 5,580,579 및 5,792,451을 참조하는데, 이들의 개시는 본원에서 모든 점에서 전체적으로 참조로서 편입된다). 이들 경구 약형은 또한, 다음을 내포할 수 있다: 결합제, 젤라틴; 부형제, 윤활제 및/또는 풍미제. 단위 약형이 캡슐일 때, 이것은 앞서 설명된 물질에 더하여, 액체 담체를 내포할 수 있다. 다양한 다른 물질이 코팅으로서 또는 만약 그렇지 않으면, 투약 단위의 물리적 형태를 변형하기 위해 존재할 수 있다. 당연히, 임의의 단위 약형을 제조하는데 이용된 임의의 물질은 이용된 양에서 제약학적으로 순수하고 실제적으로 비독성이어야 한다.

[0305] 전형적으로, 이들 경구 제제는 비록 입자의 백분율이 당연히 변할 수 있고, 그리고 편의하게는, 전체 제제의 중량 또는 용적의 약 1% 또는 2% 및 약 60% 또는 70% 또는 그 이상 사이에 있을 수 있긴 하지만, 최소한 약 0.1%의 지질 입자 또는 그 이상을 내포할 수 있다. 자연적으로, 각 치료적으로 유용한 조성물에서 입자의 양은 화합물의 소정의 단위 용량에서 적합한 용량이 획득되는 그와 같은 방식으로 제조될 수 있다. 인자, 예를 들면, 용해도, 생체이용률, 생물학적 반감기, 투여 루트, 산물 저장 수명뿐만 아니라 다른 약리학적 고려 사항이 이런 제약학적 제제를 제조하는 당업자에 의해 예기될 것이고, 그리고 그와 같이, 다양한 용량 및 치료 섭생이 바람직할 수 있다.

[0306] 경구 투여에 적합한 제제는 (a) 액체 용액, 예를 들면, 희석제, 예를 들면, 물, 식염수 또는 PEG 400에서 현탁된 효과량의 포장된 siRNA 분자 (가령, 표 A에서 설명된 siRNA 분자); (b) 미리 결정된 양의 siRNA 분자를 액체, 고체, 과립 또는 젤라틴으로서 각각 내포하는 캡슐, 향주머니 또는 정제; (c) 적절한 액체에서 현탁액; 및 (d) 적합한 유제로 구성될 수 있다. 정제 형태는 락토오스, 수크로오스, 만니톨, 소르비톨, 인산칼슘, 옥수수 전분, 감자 전분, 미정질 셀룰로오스, 젤라틴, 콜로이드성 이산화실리콘, 활석, 스테아르산마그네슘, 스테아르산, 그리고 다른 부형제, 착색제, 충전제, 결합제, 희석제, 완충제, 흡습 작용제, 보존제, 풍미제, 염료, 붕해제, 그리고 제약학적으로 양립성 담체 중에서 하나 또는 그 이상을 포함할 수 있다. 로젠지 형태는 향미제, 예를 들면, 수크로오스에서 siRNA 분자뿐만 아니라 비활성 기부에서 치료적 핵산을 포함하는 사탕형 알약, 예를 들면, siRNA 분자에 더하여 당해 분야에서 공지된 담체를 내포하는 젤라틴 및 글리세린 또는 수크로오스 및 아카시아 유제, 겔 등을 포함할 수 있다.

[0307] 이들의 이용의 다른 실례에서, 지질 입자는 광범위한 범위의 국소 약형 내로 통합될 수 있다. 가령, 핵산-지질 입자를 내포하는 현탁액이 조제되고, 그리고 겔, 오일, 유제, 국소 크림, 페이스트, 연고, 로션, 거품, 무스 등으로서 투여될 수 있다.

[0308] 투여된 입자의 양은 siRNA 분자 대 지질의 비율, 이용된 특정 siRNA, 치료되는 HBV의 계통, 환자의 연령, 체중 및 상태, 그리고 임상의의 판단에 의존할 것이지만, 일반적으로 체중 킬로그램당 약 0.01 및 약 50 mg 사이, 바람직하게는 투여 (가령, 주사)마다 약 0.1 및 약 5 mg/체중 kg, 또는 약 10^{8}-10^{10} 입자 사이일 것이다.

[0309] 다음은 1m 내지 15m으로 명명된 siRNAs의 군에서 선택되는 2개의 상이한 siRNAs의 모든 가능한 "2가지 방식" 조합을 설명한다 (표 A 참조). 용어 "조합"은 합동된 siRNA 분자가 동일한 물질 조성물 내에서 함께 존재한다 (가령, 동일한 용액 내에서 함께 용해되거나; 또는 동일한 지질 입자 내에서 함께 존재하거나; 또는 비록 제약학적 제제 내에 각 지질 입자가 siRNA 조합의 각각 상이한 siRNA를 포함하거나 포함하지 않을 수 있긴 하지만, 지질 입자의 동일한 제약학적 제제 내에서 함께 존재한다)는 것을 의미한다. 합동된 siRNA 분자는 통상적으로, 함께 공유 연결되지 않는다.

[0310] 개별 siRNAs는 각각, 표 A에서 보여 지는 바와 같이 명칭, 1m 내지 15m로 확인된다. 조합 내에 각 siRNA 번호는

대시 (-)로 분리된다; 가령, 표기법 "1m-2m"은 siRNA 번호 1m 및 siRNA 번호 2m의 조합을 나타낸다. 대시는 조합 내에 상이한 siRNA 분자가 서로 공유 연결된다는 것을 의미하지 않는다. 상이한 siRNA 조합은 세미콜론에 의해 분리된다. 조합에서 siRNA 번호의 순서는 중요하지 않다. 가령, 조합 1m-2m은 조합 2m-1m와 동등한데, 그 이유는 이들 표기법 둘 모두 siRNA 번호 1m 및 siRNA 번호 2m의 동일한 조합을 설명하기 때문이다.

[0311] siRNA 2-원 및 3-원 조합이 예로서, 인간에서 HBV 및/또는 HDV 감염을 치료하고, 그리고 HBV 감염 및/또는 HDV 감염과 연관된 최소한 하나의 증상을 개선하는데 유용하다.

[0312] 일정한 구체예에서, siRNA는 핵산 지질 입자를 통해 투여된다.

[0313] 일정한 구체예에서, 지질 입자 내에 캡슐화된 siRNAs의 칵테일의 이용을 포함하는 방법에 대하여, 상이한 siRNA 분자가 동일한 지질 입자 내에 공동캡슐화된다.

[0314] 일정한 구체예에서, 지질 입자 내에 캡슐화된 siRNAs의 칵테일의 이용을 포함하는 방법에 대하여, 상기 칵테일에 존재하는 각 유형의 siRNA 종류는 자체 입자 내에 캡슐화된다.

[0315] 일정한 구체예에서, 지질 입자 내에 캡슐화된 siRNAs의 칵테일의 이용을 포함하는 방법에 대하여, 일부 siRNA 종류는 동일한 입자 내에 공동캡슐화되고, 반면 다른 siRNA 종류는 상이한 입자 내에 캡슐화된다.

[0316] **2개 또는 그 이상 작용제의 제제 및 투여**

[0317] 작용제는 단일 제조물 내에서 함께 조제될 수 있거나, 또는 이들은 별개로 조제되고 그리고 따라서, 별개로, 동시에 또는 순차적으로 투여될 수 있는 것으로 이해될 것이다. 한 구체예에서, 작용제가 순차적으로 (가령, 상이한 시점에서) 투여될 때, 이들 작용제는 그들의 생물학적 효과가 중복되도록 투여될 수 있다 (다시 말하면, 각 작용제는 소정의 단일 시점에서 생물학적 효과를 발생시킨다).

[0318] 작용제는 선별된 작용제에 따른 임의의 허용되는 투여 루트를 이용하여 조제되고 투여될 수 있다. 가령, 적합한 루트는 경구, 설하, 협측, 국소, 경피, 비경구, 피하, 복막내, 폐내 및 비내, 그리고 국소 치료를 위해 원하는 경우에, 병소내 투여를 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. 한 구체예에서, 본원에서 확인된 소형 분자 작용제는 경구 투여될 수 있다. 다른 구체예에서, 올리고머성 뉴클레오티드는 주사에 의해 (가령, 혈관, 예를 들면, 정맥 내로), 또는 피하 투여될 수 있다. 일부 구체예에서, 치료가 필요한 개체는 하나 또는 그 이상의 작용제가 경구 (가령, 알약 형태에서) 투여되고, 그리고 또한, 하나 또는 그 이상의 올리고머성 뉴클레오티드가 주사에 의해 또는 피하 투여된다.

[0319] 전형적으로, B형 간염 유전체에 표적화된 올리고머성 뉴클레오티드는 예로서, 지질 나노입자 제제에 담겨 정맥내 투여된다, 하지만, 본 발명은 올리고머성 뉴클레오티드를 포함하는 정맥내 제제, 또는 올리고머성 뉴클레오티드가 정맥내 투여되는 치료 방법에 한정되지 않는다.

[0320] 작용제는 주위 온도에서 적절한 pH에서 및 원하는 정도의 순도에서, 생리학적으로 허용되는 담체, 다시 말하면, 이용된 용량 및 농도에서 수용자에게 비독성인 담체와 혼합함으로써 개별적으로 조제될 수 있다. 제제의 pH는 화합물의 특정 용도 및 농도에 주로 의존하지만, 전형적으로 약 3으로부터 약 8까지 어딘가의 범위에서 변할 수 있다. 작용제는 비록 동결건조된 제제 또는 수성 용액이 허용되긴 하지만, 통상적으로 고체 조성물로서 보관될 것이다.

[0321] 작용제를 포함하는 조성물은 모범 의료행위 지침과 일치하는 방식으로 조제되고, 복용되고, 그리고 투여될 것이다. 이러한 문맥에서 고려를 위한 인자는 치료되는 특정 장애, 치료되는 특정 포유동물, 개별 환자의 임상적 상태, 장애의 원인, 투여 부위, 투여 방법, 투여의 일정, 그리고 의사에게 공지된 다른 인자를 포함한다.

[0322] 작용제는 임의의 편의한 투여 형태, 예를 들면, 정제, 분말, 캡슐, 용액, 분산액, 현탁액, 시럽, 스프레이, 좌약, 겔, 유제, 패치 등에서 투여될 수 있다. 이런 조성물은 제약학적 제조물에서 전통적인 성분, 예를 들면, 희석제, 담체, pH 조절제, 감미료, 증량제 및 추가 활성제를 내포할 수 있다. 비경구 투여가 요망되면, 조성물은 무균이고, 그리고 주사 또는 주입에 적합한 용액 또는 현탁액 형태일 것이다.

[0323] 적합한 담체 및 부형제는 당업자에게 널리 공지되고, 그리고 예로서, Ansel, Howard C., et al., Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 2004; Gennaro, Alfonso R., et al. Remington: The Science and Practice of Pharmacy. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 2000; 그리고 Rowe, Raymond C. Handbook of Pharmaceutical Excipients. Chicago, Pharmaceutical Press, 2005에서 상세하게 설명된다. 제제는 또한, 하나 또는 그 이상의 완충액, 안

정화제, 계면활성제, 적심제, 윤활제, 유화제, 현탁제, 보존제, 항산화제, 불투명화 작용제, 활택제, 가공 보조제, 착색제, 감미료, 방향제, 풍미제, 희석제, 그리고 약물의 품격 있는 표현을 제공하거나 또는 제약학적 산물(다시 말하면, 약제)의 제조를 보조하는 다른 공지된 첨가제를 포함할 수 있다.

[0324] 작용제는 전형적으로, 최소한 원하는 생물학적 효과에 도달하는 수준에서 투약된다. 따라서, 효과적인 투약 섭생은 최소한 원하는 생물학적 효과에 도달하는 최소량, 또는 생물학적 유효 선량을 투약할 것이지만, 상기 용량은 받아들일 수 없는 부작용으로 생물학적 효과의 유익성을 능가할 만큼 높지 않아야 한다. 이런 이유로, 효과적인 투약 섭생은 최대 내성 용량 ("MTD") 이내를 투약할 것이다. 최대 내성 용량은 용량 제한 독성 ("DLT")의 허용되는 발생을 산출하는 가장 높은 용량으로서 규정된다. 받아들일 수 없는 비율의 DLT를 유발하는 용량은 비-내약성인 것으로 고려된다. 전형적으로, 특정 일정에 대한 MTD는 1 단계 임상 시험에서 확립된다. 이들은 통상적으로, 설치류 (mg/m^2 기초에서) 및 3명의 코호트에서 누적 환자에서 심각한 독성 용량 ("STD10")의 1/10의 안전한 시작 용량에서 시작하고, 더욱 높은 단계적 확대 단계가 더욱 감소하는 상대적 증분 (가령, 100%, 65%, 50%, 40%, 그리고 그 후에 30% 내지 35%의 용량 증가)을 갖는 변형된 피보나치 수열에 따라 용량을 확대함으로써 환자에서 수행된다. 용량 증가는 비-내약성 용량이 도달될 때까지 3명 환자의 코호트에서 지속된다. DLT의 허용되는 비율을 산출하는 그 다음 더욱 낮은 용량 수준은 MTD인 것으로 고려된다.

[0325] 투여되는 작용제의 양은 이용된 특정 작용제, 치료되는 HBV의 계통, 환자의 연령, 체중 및 상태, 그리고 임상의의 판단에 의존할 것이지만, 일반적으로 하루에 약 0.2 내지 2.0 그램 사이일 것이다.

[0326] **키트**

[0327] 한 구체예는 키트를 제공한다. 키트는 상기 조합을 포함하는 용기를 포함할 수 있다. 적합한 용기는 예로서, 병, 바이알, 주입기, 블리스터 팩 등을 포함한다. 용기는 다양한 재료, 예를 들면, 유리 또는 플라스틱으로부터 형성될 수 있다. 용기는 질환을 치료하는데 효과적인 조합을 보유할 수 있고, 그리고 무균 접근 포트를 가질 수 있다 (가령, 용기는 피하 주사 바늘에 의해 관통되는 마개를 갖는 정맥내 용액 백 또는 바이알일 수 있다).

[0328] 키트는 용기 상에 또는 용기와 결부된 표지 또는 포장 삽입물을 더욱 포함할 수 있다. 용어 "포장 삽입물"은 이런 치료적 작용제의 이용과 관련된 징후, 용법, 용량, 투여, 금기 및/또는 주의사항에 관한 정보를 내포하는, 치료적 작용제의 상업적인 포장에 관례적으로 포함되는 사용설명서를 지칭하는데 이용된다. 한 구체예에서, 표지 또는 포장 삽입물은 치료적 작용제가 바이러스 감염, 예를 들면, B형 간염을 치료하는데 이용될 수 있다는 것을 지시한다.

[0329] 일정한 구체예에서, 키트는 치료적 작용제의 고체 경구 형태, 예를 들면, 정제 또는 캡슐의 전달에 적합하다. 이런 키트는 바람직하게는, 다수의 단위 용량을 포함한다. 이런 키트는 그들의 의도된 이용의 순서로 정향된 용량을 갖는 카드를 포함할 수 있다. 이런 키트의 실례는 "블리스터 팩"이다. 블리스터 팩은 포장 업계에서 널리 알려져 있고 제약학적 단위 약형을 포장하는데 폭넓게 이용된다. 원하는 경우에, 메모리 지원이 예로서 숫자, 문자 또는 다른 마킹의 형태에서, 또는 치료 일정에서 용량이 투여될 수 있는 일자를 지정하는 일정표 삽입물로 제공될 수 있다.

[0330] 다른 구체예에 따라서, 키트는 (a) 한 가지 작용제가 그 안에 내포된 첫 번째 용기; 및 (b) 두 번째 작용제가 그 안에 내포된 두 번째 용기를 포함할 수 있다. 대안으로, 또는 부가적으로, 키트는 제약학적으로 허용되는 완충액, 예를 들면, 주사용 정균수 (BWFI), 인산염-완충된 염수, 링거액 및 덱스트로스 용액을 포함하는 세 번째 용기를 더욱 포함할 수도 있다. 이것은 다른 완충액, 희석제, 필터, 바늘 및 주사기를 비롯하여, 상업적 관점 및 이용자 관점으로부터 바람직한 다른 물질을 더욱 포함할 수도 있다.

[0331] 키트는 치료적 작용제의 투여를 위한 사용설명서를 더욱 포함할 수 있다. 가령, 키트는 치료가 필요한 환자에게 치료적 작용제의 동시적, 순차적 또는 별개 투여를 위한 사용설명서를 더욱 포함할 수 있다.

[0332] 일정한 다른 구체예에서, 키트는 별개의 조성물을 내포하기 위한 용기, 예를 들면, 분할된 병 또는 분할된 포일 패킷을 포함할 수 있지만, 별개의 조성물은 또한, 분할되지 않은 단일 용기 내에 내포될 수 있다. 일정한 구체예에서, 키트는 별개의 치료적 작용제의 투여를 위한 사용설명서를 포함한다. 키트 형태는 별개의 치료적 작용제가 바람직하게는 상이한 약형 (가령, 경구 및 비경구)에서 투여될 때, 상이한 용량 간격에서 투여될 때, 또는 조합의 개별 치료적 작용제의 적정이 처방 의사에 의해 요망될 때 특히 유리하다.

[0333] 한 구체예에서 본 발명은 동물에서 B형 간염을 치료하기 위한 방법을 제공하고, 상기 방법은 화합물 **3**, 화합물 **4**, 엔테카비르, 라미부딘 및 **SIRNA-NP**로 구성되는 군에서 선택되는 최소한 2개의 작용제를 상기 동물에게 투여

하는 것을 포함한다.

[0334] 한 구체예에서, 본 발명의 방법은 i) 공유결합 폐쇄 환상 DNA의 형성 저해제 및 ii) 뉴클레오시드 또는 뉴클레오티드 유사체의 상승적으로 효과량을 동물에게 투여하는 것을 포함하는, 동물에서 B형 간염을 치료하기 위한 방법을 배제한다.

[0335] 한 구체예에서, 본 발명의 제약학적 조성물은 단지 활성 B형 간염 치료적 작용제로서만 i) 공유결합 폐쇄 환상 DNA의 형성 저해제 및 ii) 뉴클레오시드 또는 뉴클레오티드 유사체를 포함하는 조성물을 배제한다.

[0336] 한 구체예에서, 본 발명의 키트는 단지 B형 간염 작용제로서만 i) 공유결합 폐쇄 환상 DNA의 형성 저해제 및 ii) 뉴클레오시드 또는 뉴클레오티드 유사체를 포함하는 키트를 배제한다.

[0337] 한 구체예에서, 본 발명의 방법은 i) B형 간염 바이러스를 표적으로 하는 하나 또는 그 이상의 siRNA 및 ii) 역전사효소 저해제를 동물에게 투여하는 것을 포함하는, 동물에서 B형 간염을 치료하기 위한 방법을 배제한다.

[0338] 한 구체예에서, 본 발명의 제약학적 조성물은 단지 활성 B형 간염 치료적 작용제로서만 i) B형 간염 바이러스를 표적으로 하는 하나 또는 그 이상의 siRNA 및 ii) 역전사효소 저해제를 포함하는 조성물을 배제한다.

[0339] 한 구체예에서, 본 발명의 키트는 단지 B형 간염 작용제로서만 i) B형 간염 바이러스를 표적으로 하는 하나 또는 그 이상의 siRNA 및 ii) 역전사효소 저해제를 포함하는 키트를 배제한다.

[0340] 한 구체예에서 본 발명은 동물에서 B형 간염을 치료하기 위한 방법을 제공하고, 상기 방법은 아래와 같이 구성된 군에서 선택되는 최소한 2개의 작용제를 상기 동물에게 투여하는 것을 포함한다:

[0341] a) 역전사효소 저해제;

[0342] b) 캡시드 저해제;

[0343] c) cccDNA 형성 저해제;

[0344] d) sAg 분비 저해제; 및

[0345] e) 면역자극제.

[0346] 한 구체예에서 본 발명은 아래와 같이 구성된 군에서 선택되는 최소한 2개의 작용제를 포함하는 키트를 제공한다:

[0347] a) 역전사효소 저해제;

[0348] b) 캡시드 저해제;

[0349] c) cccDNA 형성 저해제;

[0350] d) sAg 분비 저해제; 및

[0351] e) 면역자극제.

[0352] 한 구체예에서 본 발명은 동물에서 B형 간염을 치료하기 위한 방법을 제공하고, 상기 방법은 B형 간염 유전체에 표적화된 올리고머성 뉴클레오티드 및 아래와 같이 구성된 군에서 선택되는 최소한 하나의 추가 작용제를 동물에게 투여하는 것을 포함한다:

[0353] a) 역전사효소 저해제;

[0354] b) 캡시드 저해제;

[0355] c) cccDNA 형성 저해제;

[0356] d) sAg 분비 저해제; 및

[0357] e) 면역자극제.

[0358] 한 구체예에서 본 발명은 B형 간염 유전체에 표적화된 올리고머성 뉴클레오티드 및 아래와 같이 구성된 군에서 선택되는 최소한 하나의 추가 작용제를 포함하는 제약학적 조성물을 제공한다:

[0359] a) 역전사효소 저해제;

[0360] b) 캡시드 저해제;

[0361] c) cccDNA 형성 저해제;

[0362] d) sAg 분비 저해제; 및

[0363] e) 면역자극제.

[0364] 한 구체예에서 본 발명은 B형 간염 유전체에 표적화된 올리고머성 뉴클레오티드 및 아래와 같이 구성된 군에서 선택되는 최소한 하나의 추가 작용제를 포함하는 키트를 제공한다:

[0365] a) 역전사효소 저해제;

[0366] b) 캡시드 저해제;

[0367] c) cccDNA 형성 저해제;

[0368] d) sAg 분비 저해제; 및

[0369] e) 면역자극제.

[0370] B형 간염을 치료하는 치료적 작용제의 조합의 능력은 당해 분야에 널리 알려져 있는 약리학적 모형을 이용하여 결정될 수 있다.

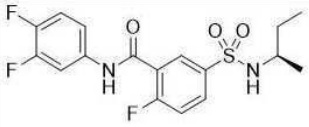
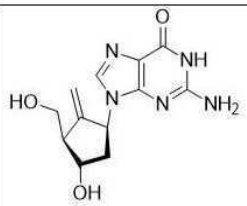
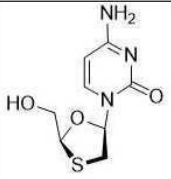
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0371] 본 발명은 다음의 무제한적 실시예에 의해 예시될 것이다.

[0372] **실시예**

[0373] 다음의 화합물이 실시예에서 참조된다. 화합물 **3-4**는 공지된 절차를 이용하여 제조될 수 있다. 국제 특허 출원 공개 번호 WO2014/106019 및 WO2013/006394는 또한, 화합물 **3-4**를 제조하는데 이용될 수 있는 합성 방법을 설명한다.

[0374]

화합물 번호 또는 명칭	구조
3	
4	
엔테카비르	
라미부딘	

[0375] **실시예 1**

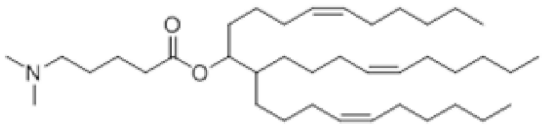
[0376] B형 간염 바이러스 (HBV)의 생쥐 모형이 면역 자극제 및 HBV-표적화 siRNAs (둘 모두 독립된 치료제로서 및 서로 합동으로)의 항-HBV 효과를 사정하는데 이용되었다.

[0377] 다음의 지질 나노입자 (LNP) 제제가 HBV siRNAs를 전달하는데 이용되었다. 표에서 도시된 값은 몰 백분율이다. 약어 DSPC는 디스테아로일포스파티딜콜린을 의미한다.

[0378]

PEG(2000)-C-DMA	양이온성 지질	콜레스테롤	DSPC
1.1	55.0	33.0	11.0

[0379] 양이온성 지질은 다음의 구조 (13)를 가졌다:

[0380] 

[0381] HBV 유전체를 표적으로 하는 3개 siRNAs의 혼합물이 이용되었다. 이들 3개 siRNAs의 서열은 아래에 도시된다.

[0382]

센스 서열 (5'-3')	안티센스 서열 (5' - 3')
CCGUguGCACUuCGCuuCAUU	UGAAGCGAAGUgCACACgGUU
CuggCUCAGUUUACuAgUGUU	CACUAgUAAACUgAgCCAGUU
GCCgAuCCAUACugCGgAAUU	UUCCGCAgUAUGgAUCGgCUU
소문자 = 2'-O-메틸 변형 밑줄 = 열린 핵염기 유사체 (UNA) 모이어티	

[0383] -27 일자에, 10 마이크로그램의 플라스미드 pAAV/HBV1.2 (Dr. Pei-Jer Chen으로부터 획득, Huang, LR et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, 103(47): 17862-17867)에서 최초 설명됨)가 유체역학 주입 (HDI; 꼬리 정맥 내로 신속한 1.3 mL 주사)을 통해 C3H/HeN 생쥐에게 투여되었다. 이러한 플라스미드는 HBV 유전체의 1.2-배 초과길이 사본을 보유하고, 그리고 다른 HBV 산물 사이에서 HBV 표면 항원 (HBsAg)을 발현한다. 생쥐에서 혈청 HBsAg 발현은 효소 면역검정을 이용하여 모니터링되었다. 동물은 a) 모든 동물이 HBsAg를 발현하는 것으로 확증되고, 그리고 b) HBsAg 군 평균이 처리의 개시에 앞서 서로 유사하도록, 혈청 HBsAg 수준에 근거하여 군으로 분류되었다 (무작위화되었다).

[0384] 동물은 아래와 같이 면역 자극제로 처리되었다: 0 일자에, 20 마이크로그램의 고분자량 폴리이노신산: 폴리시티딜산 (폴리(I:C))이 HDI를 통해 투여되었다. 동물은 아래와 같이, 지질 나노입자 (LNP)-캡슐화된 HBV-표적화 siRNAs로 처리되었다: 0, 7 & 14 일자 각각에, 1 mg/kg siRNA와 동등한 양의 시험 물품이 정맥내 투여되었다. 음성 대조 군은 HBsAg 발현 수준이 HBV의 이러한 생쥐 모형에서 완전하게 안정되지는 않기 때문에 포함되었다; 혈청 HBsAg의 절대적 농도는 일반적으로, 개별 동물에서 시간의 추이에서 감퇴한다. 처리-특이적 효과를 증명하기 위해, 처리군은 음성 대조 동물에 대하여 비교되었다.

[0385] 이들 처리의 효과는 0 (처리전), 3, 7, 14 & 21 일자에 미량의 혈액을 수집하고 이것을 혈청 HBsAg 함량에 대해 분석함으로써 결정되었다. 표본은 가능한 경우에 정량의 검정 범위 내에 값을 산출하기 위해 타당하면 희석되었다. 정량의 하한선 (LLOQ)을 하회하는 개별 값은 절반 LLOQ로서 세팅되었다. 표 1은 0 일자에 개별 동물 처리전 기준선 값의 백분율로서 표시된 처리군 평균 (n=4 또는 5; ± 평균의 표준 오차) 혈청 HBsAg 농도를 보여준다.

[0386] 상기 데이터는 HBV siRNA 및 폴리(I:C)의 조합에 대한 응답으로 HBsAg 감소의 정도뿐만 아니라 감소 효과의 지속을 증명한다. 이들 2가지 처리의 조합은 단독으로 처리보다 더욱 큰 효과를 유발하였다.

[0387] **표 1. HBV 감염의 생쥐 모형에서 혈청 HBsAg에 대한 3개 HBV siRNAs 및 면역 자극제 폴리(I:C)의 단일 및 조합 처리 효과**

표 1

[0388]

	0 일자	3 일자	7 일자	14 일자	21 일자
음성 대조	100 ± 0	82 ± 4	65 ± 9	50 ± 10	36 ±11
HBV siRNA	100 ± 0	0.2 ± 0.1	4.1 ± 1.3	1.6 ± 0.6	1.7 ± 0.6
HBV siRNA + 폴리(I:C)	100 ± 0	0.5 ± 0.2	0.4 ± 0.2	0.3 ± 0.2	0.4 ± 0.2
폴리(I:C)	100 ± 0	6.1 ± 1.1	3.5 ± 1.1	3.9 ± 1.4	4.7 ± 2.3

[0389] **실시예 2**

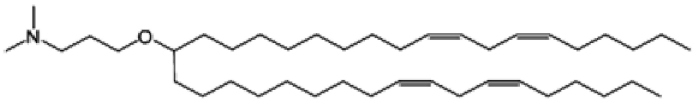
[0390] B형 간염 바이러스 (HBV)의 생쥐 모형이 HBV의 캡시드화의 소형 분자 저해제 (화합물 **3**) 및 HBV-표적화 siRNAs (둘 모두 독립된 치료제로서 및 서로 합동으로)의 항-HBV 효과를 사정하는데 이용되었다.

[0391] 다음의 지질 나노입자 (LNP) 제제가 HBV siRNAs를 전달하는데 이용되었다. 표에서 도시된 값은 몰 백분율이다. 약어 DSPC는 디스테아로일포스파티딜콜린을 의미한다.

[0392]

PEG(2000)-C-DMA	양이온성 지질	콜레스테롤	DSPC
1.6	54.6	32.8	10.9

[0393] 양이온성 지질은 다음의 구조 (**7**)를 가졌다:

[0394] 

[0395] HBV 유전체를 표적으로 하는 3개 siRNAs의 혼합물이 이용되었다. 이들 3개 siRNAs의 서열은 아래에 도시된다.

[0396]

센스 서열 (5'-3')	안티센스 서열 (5' - 3')
CCGUguGCACUuCGCuuCAUU	UGAAGCGAAGUgCACACgGUU
CuggCUCAGUUUACuAgUGUU	CACUAgUAAACUgAgCCAGUU
GCCgAuCCAUACugCGgAAUU	UUCCGCAgUAUGgAUCGgCUU
소문자 = 2'-O-메틸 변형체틸 변형 밑줄 = 열린 핵염기 유사체 (UNA) 모이어티	

[0397] -7 일자에, 10 마이크로그램의 플라스미드 pHBV1.3 (Guidotti, L., et al., *Journal of Virology,* 1995, 69(10): 6158-6169에 따라)이 유체역학 주입 (HDI; 꼬리 정맥 내로 신속한 1.6 mL 주사)을 통해 NOD.CB17-*Prkdc*^{scid}/J 생쥐에게 투여되었다. 이러한 플라스미드는 HBV 유전체의 1.3-배 초과길이 사본을 보유하는데, 이것은 발현될 때, 다른 HBV 산물 사이에서 HBV DNA를 포함하는 B형 간염 바이러스 입자를 산출한다. 다양한 처리의 항-HBV 효과의 판독으로서, 생쥐에서 혈청 HBV DNA 농도가 정량적 PCR 검정 (Tanaka, Y., et al., Journal of Medical Virology, 2004, 72: 223-229로부터 프라이머/프로브 서열)을 이용하여, 전체 추출된 DNA로부터 계측되었다.

[0398] 동물은 아래와 같이 화합물 **3**으로 처리되었다: 0 일자에 시작하여, 50 mg/kg 또는 100 mg/kg 용량의 화합물 **3**이 0 일자 및 7 일자 사이에 총 14회 투약을 위해 하루 2회 빈도에서 동물에 경구 투여되었다. 화합물 **3**은 투여를 위한 보조용매 제제에서 용해되었다. 음성 대조 동물은 보조용매 제제 단독 또는 식염수가 투여되었다. 동물은 아래와 같이, 지질 나노입자 (LNP)-캡슐화된 HBV-표적화 siRNAs로 처리되었다: 0 일자에, 0.1 mg/kg siRNA와 동등한 양의 시험 물품이 정맥내 투여되었다. HBV 발현 수준은 HBV의 이러한 생쥐 모형에서 완전하게 안정되지는 않았다; 처리-특이적 효과를 증명하기 위해, 여기에서 처리군은 음성 대조 동물에 대하여 비교된다.

[0399] 이들 처리의 효과는 0 (처리전), 4 & 7 일자에 혈액을 수집하고 이것을 혈청 HBV DNA 함량에 대해 분석함으로써 결정되었다. 표 2는 0 일자에 개별 동물 처리전 기준선 값의 백분율로서 표시된 처리군 평균 (n=7 또는 8; ±

평균의 표준 오차) 혈청 HBV DNA 농도를 보여준다.

[0400] 상기 데이터는 화합물 **3** 및 HBV siRNA의 조합에 대한 응답으로 혈청 HBV DNA 감소의 정도뿐만 아니라 감소 효과의 지속을 증명한다. 이들 2가지 처리의 조합은 단독으로 처리보다 더욱 큰 효과를 유발하였다.

[0401] **표 2. HBV 감염의 생쥐 모형에서 혈청 HBV DNA에 대한 화합물 3 및 3개 HBV siRNAs의 단일 및 조합 치료 효과**

표 2

[0402]

처리 1 (경구)	처리 2 (IV)	0 일자	4 일자	7 일자
식염수	(없음)	100 ± 0	69 ± 16	70 ± 14
운반제 제제	(없음)	100 ± 0	56 ± 15	47 ± 9
화합물 **3**, 50 mg/kg	(없음)	100 ± 0	13 ± 4	33 ± 9
화합물 **3**, 100 mg/kg	(없음)	100 ± 0	8.6 ± 1.5	12 ± 5
(없음)	HBV siRNA, 0.1 mg/kg	100 ± 0	9.4 ± 5.3	5.6 ± 1.2
화합물 **3**, 50 mg/kg	HBV siRNA, 0.1 mg/kg	100 ± 0	1.9 ± 0.5	1.9 ± 0.4
화합물 **3**, 100 mg/kg	HBV siRNA, 0.1 mg/kg	100 ± 0	0.77 ± 0.15	0.88 ± 0.28

[0403] **실시예 3**

[0404] B형 간염 바이러스 (HBV)의 생쥐 모형이 HBV의 캡시드화의 소형 분자 저해제 (화합물 **3**) (독립된 치료제로서 및 승인된 화합물 엔테카비르 (ETV)와 합동으로)의 항-HBV 효과를 사정하는데 이용되었다.

[0405] -7 일자에, 10 마이크로그램의 플라스미드 pHBV1.3 (Guidotti, L., et al., *Journal of Virology,* 1995, 69(10): 6158-6169에 따라)이 유체역학 주입 (HDI; 꼬리 정맥 내로 신속한 1.6 mL 주사)을 통해 NOD.CB17-*Prkdc*^{scid}/J 생쥐에게 투여되었다. 이러한 플라스미드는 HBV 유전체의 1.3-배 초과길이 사본을 보유하는데, 이것은 발현될 때, 다른 HBV 산물 사이에서 HBV DNA를 포함하는 B형 간염 바이러스 입자를 산출한다. 다양한 처리의 항-HBV 효과의 판독으로서, 생쥐에서 혈청 HBV DNA 농도가 정량적 PCR 검정 (Tanaka, Y., et al., Journal of Medical Virology, 2004, 72: 223-229로부터 프라이머/프로브 서열)을 이용하여, 전체 추출된 DNA로부터 계측되었다.

[0406] 동물은 아래와 같이 화합물 **3**으로 처리되었다: 0 일자에 시작하여, 100 mg/kg 용량의 화합물 **3**이 0 일자 및 7 일자 사이에 총 14회 투약을 위해 하루 2회 빈도에서 동물에 경구 투여되었다. 화합물 **3**은 투여를 위한 보조용매 제제에서 용해되었다. 음성 대조 동물은 보조용매 제제 단독 또는 식염수가 투여되었다. 동물은 아래와 같이 ETV로 처리되었다: 0 일자에 시작하여, 100 ng/kg 또는 300 ng/kg 용량의 ETV가 0 일자 및 6 일자 사이에 총 7회 투약을 위해 하루 1회 빈도에서 동물에 경구 투여되었다. ETV는 DMSO에서 2 mg/mL로 용해되고, 그리고 이후, 투여를 위해 식염수에서 희석되었다. HBV 발현 수준은 HBV의 이러한 생쥐 모형에서 완전하게 안정되지는 않았다; 처리-특이적 효과를 증명하기 위해, 여기에서 처리군은 음성 대조 동물에 대하여 비교된다.

[0407] 이들 처리의 효과는 0 (처리전), 4 & 7 일자에 혈액을 수집하고 이것을 혈청 HBV DNA 함량에 대해 분석함으로써 결정되었다. 정량의 하한선 (LLOQ)을 하회하는 Ct 값을 갖는 표본은 군 평균의 계산을 위해 절반 LLOQ에 세팅되었다. 표 3은 0 일자에 개별 동물 처리전 기준선 값의 백분율로서 표시된 처리군 평균 (n=5-8; ± 평균의 표준 오차) 혈청 HBV DNA 농도를 보여준다.

[0408] 상기 데이터는 화합물 **3** 및 ETV의 조합에 대한 응답으로 혈청 HBV DNA 감소의 정도뿐만 아니라 감소 효과의 지속을 증명한다. 이들 2가지 처리의 조합은 단독으로 처리보다 더욱 큰 효과를 유발하였다.

[0409] **표 3. HBV 감염의 생쥐 모형에서 혈청 HBV DNA에 대한 화합물 3 및 ETV의 단일 및 조합 치료 효과**

표 3

[0410]

처리 1	처리 2	0 일자	4 일자	7 일자
식염수	(없음)	100 ± 0	67 ± 18	22 ± 8
운반제 제제	(없음)	100 ± 0	41 ± 7	14 ± 3

화합물 3, 100 mg/kg	(없음)	100 ± 0	9.3 ± 2.5	1.2 ± 0.3
(없음)	ETV, 100 ng/kg	100 ± 0	21 ± 5	3.5 ± 0.7
(없음)	ETV, 300 ng/kg	100 ± 0	1.6 ± 0.3	0.88 ± 0.31
화합물 3, 100 mg/kg	ETV, 100 ng/kg	100 ± 0	1.4 ± 0.4	0.48 ± 0.18
화합물 3, 100 mg/kg	ETV, 300 ng/kg	100 ± 0	0.70 ± 0.16	0.32 ± 0.07

[0411] **실시예 4-6**

[0412] **시험관내 조합 연구 목적:**

[0413] HBV 캡시드화의 소형 분자 저해제 (화합물 3), 엔테카비르 (ETV), HBV 중합효소의 역전사효소 저해제, 그리고 모든 바이러스 mRNA 전사체 및 바이러스 항원의 강력한 녹다운을 조장하도록 의도된 siRNA인 SIRNA-NP 중에서 2개의 약물 조합이 시험관내에서 부가적, 상승적 또는 길항적인 지를 결정하기 위해, HBV 세포 배양 모형 시스템이 이용된다.

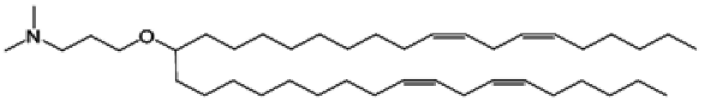
[0414] **SIRNA-NP의 조성물:**

[0415] SIRNA-NP는 HBV 유전체를 표적으로 하는 3개 siRNAs의 혼합물의 지질 나노입자 제제이다. 다음의 지질 나노입자 (LNP) 제제가 본원에서 보고된 실험에서 HBV siRNAs를 전달하는데 이용되었다. 표에서 도시된 값은 몰 백분율이다. 약어 DSPC는 디스테아로일포스파티딜콜린을 의미한다.

PEG(20000)-C-DMA	양이온성 지질	콜레스테롤	DSPC
1.6	54.6	32.8	10.9

[0416]

[0417] 양이온성 지질은 다음의 구조 (7)를 가졌다:

[0418] 

[0419] 이들 3개 siRNAs의 서열은 아래에 도시된다.

센스 서열 (5'-3')	안티센스 서열 (5' - 3')
rCrCmGrUmGmUrGrCrArCrUmUrCmGrCmUmUrCrArUrU	rUrGrArAmGrCmGrArArGmUmGrCrAmCrAmCmGrGrUrU
rCmUmGmGrCmUrCrArGmUrUmUrAmCmUrAmGmUmGrUrU	rCrArCrUrAmGmUrArArAmCrUmGrAmGrCmCrArGrUrU
rAmCrCmUrCmUrGmCrCmUrAmArUmCrArUrCrUrCrUrU	rGrArGrArUrGmArUmUrArGrGmCrAmGrAmGrGrUrU
rN = 염기 N의 RNA	
mN = 염기 N의 2'O -메틸 변형	

[0420]

[0421] **시험관내 조합 실험적 프로토콜:**

[0422] 시험관내 조합 연구는 Prichard 및 Shipman의 방법 (Prichard MN, and Shipman C Jr., *Antiviral Research*, 1990, *14*(4-5), 181-205; 및 Prichard MN, et. al., *MacSynergy II*)을 이용하여 수행되었다. AML12-HBV10 세포주는 Campagna et al. (Campagna et. al., *J. Virology*, 2013, *87*(12), 6931-6942)에서 설명된 바와 같이 개발되었다. 이것은 HBV 유전체로 안정되게 형질감염된 생쥐 간세포 세포주이고, 그리고 HBV 전유전체 RNA를 발현하고 HBV rcDNA (이완된 환상 DNA) 합성을 테트라사이클린-조절된 방식으로 뒷받침할 수 있다. AML12-HBV10 세포는 96 웰 조직-배양액 처리된 마이크로역가 평판에서 테트라사이클린 없이 10% 소 태아 혈청 + 1% 페니실린-스트렙토마이신으로 보충된 DMEM/F12 배지에서 도말되고, 그리고 가습된 인큐베이터에서 37℃ 및 5%CO_2에서 하룻밤 동안 배양되었다. 다음 날, 이들 세포는 신선한 배지로 이전되고, 그리고 그들의 개별 EC_{50} 값 인근의 농도

범위에서 저해제 A 및 저해제 B로 처리되고, 그리고 가습된 인큐베이터에서 37℃ 및 5%CO_2에서 48 시간의 지속 기간 동안 배양되었다. 이들 저해제는 100% DMSO (ETV 및 화합물 **3**) 또는 성장 배지 (**SIRNA-NP**)에서 희석되었고, 그리고 검정에서 최종 DMSO 농도는 ≤0.5%이었다. 이들 2개 저해제는 각 농도의 저해제 A가 각 농도의 저해제 B와 합동되어 rcDNA 생산의 저해에 대한 그들의 조합 효과가 결정되도록, 단독으로뿐만 아니라 체커보드 방식에서 조합으로 시험되었다. 48 시간-배양 이후에, 저해제-처리된 웰에서 존재하는 rcDNA의 수준은 HBV 특정한 맞춤 프로브 세트 및 제조업체의 사용설명서를 이용한 bDNA 검정 (Affymetrix)을 이용하여 계측되었다. 각 웰로부터 산출된 RLU 데이터는 처리되지 않은 대조 웰의 저해 %로서 계산되고, 그리고 아래와 같이 Prichard 및 Shipman에 의해 확립된 해석 지침을 이용하여 이들 조합이 상승적, 부가적 또는 길항적인 지를 결정하기 위해 MacSynergy II 프로그램을 이용하여 분석되었다: 95% CI에서 상승작용 용적 <25 $\mu M^2\%$ (로그 용적 <2) = 아마도 무의미한; 25-50 $\mu M^2\%$ (로그 용적 >2 및 < 5) = 작지만 유의미한; 50-100 $\mu M^2\%$ (로그 용적 >5 및 <9) = 중간은 생체내에서 중요할 수 있다; 100 $\mu M^2\%$ 초과 (로그 용적 >9) = 강한 상승작용, 아마도 생체내에서 중요한; 1000 $\mu M^2\%$에 근접하는 용적 (로그 용적 >90) = 대단히 높은, 점검 데이터. 동시에, 세포 생존력에 대한 저해제 조합의 효과가 제조업체의 사용설명서에 따라서 세포-역가 글로 (glo) 시약 (Promega)을 이용하여 세포 생존력의 척도로서 ATP 함량을 결정하는데 이용된 복제 평판을 이용하여 사정되었다.

[0423]

[0424] **실시예 4: 화합물 3 및 엔테카비르의 시험관내 조합:**

[0425] 화합물 **3** (2-배 희석 계열 및 9 포인트 적정에서 2.5 μM 내지 0.01 μM의 농도 범위)은 엔테카비르 (3-배 희석 계열 및 5 포인트 적정에서 0.075 μM 내지 0.001 μM의 농도 범위)와 조합으로 시험되었다. 단독으로 또는 합동으로 화합물 **3** 또는 엔테카비르 처리에서 관찰된 4개 복제물의 rcDNA에서 평균 저해 % 및 표준 편차는 표 1에서 도시된다. 화합물 **3** 및 엔테카비르의 EC_{50} 값은 표 4에서 도시된다. 2개 저해제 조합의 관찰된 값이 상기 농도 범위에 대해 상가 작용 (표 1)으로부터 예상되는 것과 비교될 때, 이들 조합은 MacSynergy II 분석에 따라, 그리고 Prichard 및 Shipman (1992)에 의해 앞서 설명된 해석 규준을 이용하여, 부가적인 것으로 밝혀졌다 (표 4).

[0426] **실시예 5: 화합물 3 및 SIRNA-NP의 시험관내 조합:**

[0427] 화합물 **3** (2-배 희석 계열 및 9 포인트 적정에서 2.5 μM 내지 0.01 μM의 농도 범위)은 **SIRNA-NP** (3-배 희석 계열 및 5 포인트 적정에서 0.5 μg/mL 내지 0.006 μg/mL의 농도 범위)와 조합으로 시험되었다. 단독으로 또는 합동으로 화합물 **3** 또는 **SIRNA-NP** 처리에서 관찰된 4개 복제물의 rcDNA에서 평균 저해 % 및 표준 편차는 표 2에서 도시된다. 화합물 **3** 및 **SIRNA-NP**의 EC_{50} 값은 표 4에서 도시된다. 2개 저해제 조합의 관찰된 값이 상기 농도 범위에 대해 상가 작용 (표 2)으로부터 예상되는 것과 비교될 때, 이들 조합은 MacSynergy II 분석에 따라, 그리고 Prichard 및 Shipman (1992)에 의해 앞서 설명된 해석 규준을 이용하여, 부가적인 것으로 밝혀졌다 (표 4).

[0428] **실시예 6: 엔테카비르 및 SIRNA-NP의 시험관내 조합:**

[0429] 엔테카비르 (3-배 희석 계열 및 5 포인트 적정에서 0.075 μM 내지 0.001 μM의 농도 범위)는 **SIRNA-NP** (2-배 희석 계열 및 9 포인트 적정에서 0.5 μg/mL 내지 0.002 μg/mL의 농도 범위)와 조합으로 시험되었다. 단독으로 또는 합동으로 엔테카비르 또는 **SIRNA-NP** 처리에서 관찰된 4개 복제물의 rcDNA에서 평균 저해 % 및 표준 편차는 표 3에서 도시된다. 엔테카비르 및 **SIRNA-NP**의 EC_{50} 값은 표 4에서 도시된다. 2개 저해제 조합의 관찰된 값이 상기 농도 범위에 대해 상가 작용 (표 3)으로부터 예상되는 것과 비교될 때, 이들 조합은 MacSynergy II 분석에 따라, 그리고 Prichard 및 Shipman (1992)에 의해 앞서 설명된 해석 규준을 이용하여, 부가적인 것으로 밝혀졌다 (표 4).

[0430] **표 1: 엔테카비르 (ETV) 및 화합물 3의 시험관내 조합**

[0431] [표 1]

[약물]	0	0.010	0.020	0.039	0.078	0.156	0.313	0.625	1.250	2.500	rcDNA의 평균 저해 %	화합물 3 (μM)
ETV (μM)												
0.075	74.32	68.07	68.39	75.14	76.89	87.27	88.19	91.48	92.88	92.19		
0.025	63.25	64.7	58.68	63.39	64.91	75.73	86.18	89.9	91.41	93.94		
0.008	48.01	49.89	54.26	52.73	62.62	74.73	82.42	85.21	89.65	90.77		
0.003	18.71	11.06	25.23	22.45	46.04	57.94	77.01	85.49	86.6	90.86		-
0.001	21.63	-4.69	-0.73	9.56	30.07	52.94	74.38	83.54	89.68	91.05		
0	0	-3.19	0.62	7.38	-1.81	35.53	70.96	80.76	86.73	90.47		

[약물]	0	0.010	0.020	0.039	0.078	0.156	0.313	0.625	1.25	2.5	표준 편차 (%)	화합물 3 (μM)
ETV (μM)												
0.075	8.58	8.77	16.02	8.3	7.66	7.17	4.93	3.16	1.57	3.14		
0.025	13.67	10.43	13.89	13.82	12.17	7.61	3.09	2.63	1.7	0.94		
0.008	18.71	22.38	19.17	15.26	9.56	8.73	4.65	1.94	3.91	0.91		
0.003	35.13	24.05	20.09	22.35	16.24	10.98	7.82	4.84	3.77	3.64		-
0.001	26.12	20.67	22.56	24.1	15.68	8.42	2.57	4.25	1.74	2.61		
0	0	42.74	22.32	20.39	23.53	22.08	7.85	2.94	1.46	2.2		

[약물]	0	0.010	0.020	0.039	0.078	0.156	0.3125	0.625	1.25	2.5	누가적 저해	화합물 3 (μM)
ETV (μM)												
0.075	74.32	73.5	74.48	76.22	73.86	83.44	92.54	95.06	96.59	97.55		
0.025	63.25	62.08	63.48	65.96	62.58	76.31	89.33	92.93	95.12	96.5		
0.008	48.01	46.35	48.33	51.85	47.07	66.48	84.9	90	93.1	95.05		
0.003	18.71	16.12	19.21	24.71	17.24	47.59	76.39	84.36	89.21	92.25		-
0.001	21.63	19.13	22.12	27.41	20.21	49.47	77.24	84.92	89.6	92.53		
0	0	-3.19	0.62	7.38	-1.81	35.53	70.96	80.76	86.73	90.47		

[약물]	0	0.010	0.020	0.039	0.078	0.156	0.313	0.625	1.25	2.5	상승작용 플롯 (99.9%) 본래로니 수정	96%
ETV (μM)												
0.075	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	상승작용	0
0.025	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	로그 용적	0
0.008	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1.28519		
0.003	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	길항작용	-1.29
0.001	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	로그 용적	-0.19
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		

[0432]

[0433] **표 2: 화합물 3 및 SIRNA-NP의 시험관내 조합**

[0434] [표 2]

[약물]	0	0.010	0.020	0.039	0.078	0.156	0.313	0.625	1.250	2.5	rcDNA의 평균 저해 %	화합물 3
SIRNA-NP μg/mL												μM
0.5	96.25	95.01	95.45	96.35	95.83	96.38	96.15	97.02	96.88	96.9		
0.167	92.38	90.74	91.26	92.35	90.9	94.41	95.28	95.7	96.58	96.63		
0.056	68.59	66.89	75.99	72.21	81.66	83.57	90.29	92.61	94.84	95.99		
0.019	29.18	30.74	29.09	33.68	43.8	68.05	83.12	87.88	93.48	94.35		-
0.006	14.92	0.31	-4.48	6.12	19.44	49.81	78.77	85.37	90.66	92.09		
0	0	-1.98	-20.54	-16.95	20.07	37.11	59.39	79.86	88.12	89.67		

[약물]	0	0.010	0.020	0.039	0.078	0.156	0.313	0.625	1.25	2.5	표준 편차 (%)	화합물 3
SIRNA-NP μg/mL												μM
0.5	1.42	1.64	1.15	0.66	0.89	1.23	1.26	1.22	1.07	0.87		
0.167	3.23	3.02	1.2	3.25	1.88	1.47	1.05	0.87	0.9	1.16		
0.056	9.74	8.53	3.59	6.15	5.55	3.84	2.37	2.44	1.82	1.48		
0.019	31.44	16.24	17.69	9.21	14.48	11.22	6.35	5.11	1.1	1.48		-
0.006	25.79	18.47	16.92	29.8	15.19	13.5	4.32	0.73	3.01	3.58		
0	0	16.14	29.67	32.34	27.28	28.62	12.94	5.47	5.83	2.5		

[약물]	0	0.010	0.020	0.039	0.078	0.156	0.313	0.625	1.25	2.5	부가적 저해	화합물 3
SIRNA-NP μg/mL												μM
0.5	96.25	96.18	95.48	95.61	97	97.64	98.48	99.24	99.55	99.61		
0.167	92.38	92.23	90.81	91.09	93.91	95.21	96.91	98.47	99.09	99.21		
0.056	68.59	67.97	62.14	63.27	74.89	80.25	87.24	93.67	96.27	96.76		
0.019	29.18	27.78	14.63	17.18	43.39	55.46	71.24	85.74	91.59	92.68		-
0.006	14.92	13.24	-2.56	0.5	32	46.49	65.45	82.86	89.89	91.21		
0	0	-1.98	-20.54	-16.95	20.07	37.11	59.39	79.86	88.12	89.67		

[약물]	0	0.010	0.020	0.039	0.078	0.156	0.313	0.625	1.25	2.5	상승작용 플롯 (99.9%) 본래로니 수정	96%
SIRNA-NP μg/mL												
0.500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	상승작용	2.14
0.167	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	로그 용적	0.31
0.056	0	0	2.03531	0	0	0	0	0	0	0		
0.019	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	길항작용	0
0.006	0	0	0	0	0	0	0	0.10757	0	0	로그 용적	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		

[0435]

[0436] **표 3: 엔테카비르 및 SIRNA-NP의 시험관내 조합**

[0437] [표 3]

[약물]	0	0.002	0.004	0.008	0.016	0.032	0.063	0.125	0.250	0.500	rcDNA의 평균 저해 %	
ETV μM											SIRNA-NP	μg/mL
0.075	74.9	77.52	75.42	79.02	85.16	86.59	92.73	95.09	96.6	96.66		
0.025	64.1	64.59	65.95	68.92	75.31	80.87	90.12	93.84	95.54	96.72		
0.008	37.88	42.67	48.08	54.27	70.87	75.26	85.26	92.63	95.6	96.12		
0.003	37.81	25.05	31.15	33.55	48.32	68.45	81.86	91	94.63	96.08		-
0.001	9.06	11.49	1.57	22.41	33.41	61.88	77.03	90.37	93.93	95.14		
0	0	-8.95	-7.86	20.89	32.43	46.05	72.94	87.4	93.31	95.02		

[약물]	0	0.002	0.004	0.008	0.016	0.032	0.063	0.125	0.25	0.5	표준 편차 (%)	
ETV μM											SIRNA-NP	μg/mL
0.075	5.4	2.5	2.4	3.43	3.56	4.59	1.42	0.92	1.29	1.35		
0.025	8.24	8.69	2.67	5.28	1.81	3.19	0.79	1.39	1.72	1.28		
0.008	5.43	9.21	4.64	3.19	7.48	2.52	0.29	2.33	0.59	0.95		
0.003	8.11	11.06	14.06	2.97	7.32	2.97	1.89	1.3	0.73	0.7		-
0.001	9.35	11.3	8.13	9.32	7.82	3.96	3.32	1.43	0.81	1.16		
0	0	17.52	8.77	13.87	26.87	5.59	5.05	1.56	1.06	1.33		

[약물]	0	0.002	0.004	0.008	0.016	0.032	0.063	0.125	0.25	0.5	부가적 저해	
ETV μM											SIRNA-NP	μg/mL
0.075	74.9	72.65	72.93	80.14	83.04	86.46	93.21	96.84	98.32	98.75		
0.025	64.1	60.89	61.28	71.6	75.74	80.63	90.29	95.48	97.6	98.21		
0.008	37.88	32.32	33	50.86	58.03	66.49	83.19	92.17	95.84	96.91		
0.003	37.81	32.24	32.92	50.8	57.98	66.45	83.17	92.16	95.84	96.9		-
0.001	9.06	0.92	1.91	28.06	38.55	50.94	75.39	88.54	93.92	95.47		
0	0	-8.95	-7.86	20.89	32.43	46.05	72.94	87.4	93.31	95.02		

[약물]	0	0.002	0.004	0.008	0.016	0.032	0.063	0.125	0.25	0.5	상승작용 플롯 (99.9%) 본페로니 수정	96%
ETV μM												
0.075	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	상승작용 로그	1.59
0.025	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	용적	0.23
0.008	0	0	0	0	0	0.476 68	1.115 61	0	0	0		
0.003	0	0	0	-7.47 573	0	0	0	0	0	0	길항작용 로그	-7.48
0.001	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	용적	-1.07
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		

[0438]

[0439] **표 4: bDNA 검정을 이용한 rcDNA 정량으로 AML12-HBV10 세포 배양 시스템에서 시험관내 조합 연구의 결과의 요약:**

표 4

[0440]

저해제 A	저해제 B	저해제 A EC_{50} (μM)	저해제 B EC_{50} (μM 또는 μg/mL)	상승작용 용적 (μM^2%)*	상승작용 로그 용적	길항작용 용적 (μM^2%)*	길항작용 로그 용적	결론
화합물 3	엔테카비르 (ETV)	0.231	0.012	0	0	-1.29	-0.19	부가적
화합물 3	SIRNA-NP**	0.250	0.032	2.14	0.31	0	0	부가적
엔테카비르 (ETV)	SIRNA-NP**	0.012	0.031	1.59	0.23	-7.48	-1.07	부가적

* 99.9% 신뢰 구간에서
** μg/mL

[0441] **실시예 7-9**

[0442] **시험관내 조합 연구 목적:**

[0443] HBV DNA 복제의 과정, cccDNA 형성, 그리고 cccDNA 발현 및 안정성에 대한 2개-화합물 조합으로 조합 치료의 효과를 결정하기 위해. HBV 캡시드화의 2개의 소형 분자 저해제, 화합물 **3** 및 **4**; HBV 중합효소의 2개의 FDA-승인된 역전사효소 저해제인 엔테카비르 (ETV) 및 라미부딘 (3TC); 그리고 바이러스 mRNA 및 바이러스 항원 발현의 지질 나노입자 (LNP)-조제된 siRNA 저해제인 **SIRNA-NP**가 조사되었다. 본 연구는 HBV 세포 배양 모형 시스템을 이용하여, 이들 조합이 시험관내에서 부가적, 상승적 또는 길항적인 지를 결정하는 것을 목표로 하였다.

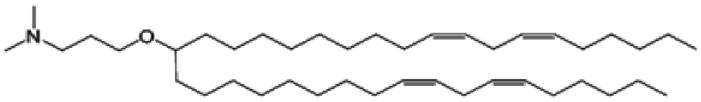
[0444] **LNP 제제:**

[0445] **SIRNA-NP**는 HBV 유전체를 표적으로 하는 3개 siRNAs의 혼합물의 지질 나노입자 제제이다. 다음의 지질 나노입자 (LNP) 제제가 본원에서 보고된 실험에서 HBV siRNAs를 전달하는데 이용되었다. 표에서 도시된 값은 몰 백분율이다. 약어 DSPC는 디스테아로일포스파티딜콜린을 의미한다.

[0446]

PEG(2000)-C-DMA	양이온성 지질	콜레스테롤	DSPC
1.6	54.6	32.8	10.9

[0447] 양이온성 지질은 다음의 구조 (**7**)를 가졌다:

[0448] 

[0449] **SiRNA**

[0450] 이들 3개 siRNAs의 서열은 아래에 도시된다.

[0451]

센스 서열 (5'-3')	안티센스 서열 (5' - 3')
rCrCmGrUmGmUrGrCrArCrUmUrCmGrCmUmUrCrArUrU	rUrGrArAmGrCmGrArArGmUmGrCrAmCrAmCmGrGrUrU
rCmUmGmGrCmUrCrArGmUrUmUrAmCmUrAmGmUmGrUrU	rCrArCrUrAmGmUrArArAmCrUmGrAmGrCmCrArGrUrU
rAmCrCmUrCmUrGmCrCmUrAmArUmCrArUrCrUrCrUrU	rGrArGrArUrGmArUmUrArGrGmCrAmGrAmGrGrUrUrU
rN = 염기 N의 RNA	
mN = 염기 N의 2'O-메틸 변형	

[0452] **시험관내 조합 실험적 프로토콜:**

[0453] 시험관내 조합 연구는 Cai et al (Antimicrobial Agents Chemotherapy, 2012. Vol 56(8):4277-88)에서 설명된 검정 시스템의 변형을 이용하여 수행되었다. 이전에 개발된 HepDE19 세포 배양 시스템 (Guo et al. J. Virology (2007) 81(22): 12472-12484)은 HBV DNA 복제 및 cccDNA 형성을 테트라사이클린 (Tet)-조절된 방식으로 뒷받침하고, 그리고 cccDNA의 생산 및 유지에 의존하는 검출가능한 리포터 분자를 생산한다.

[0454] HepDE19 세포 배양 시스템에서, 이들 리포터는 프리코어 RNA 및 이의 동계 단백질 산물, 분비된 HBV "e 항원" (HBeAg)이다. HepDE19 세포에서, 프리코어 RNA 및 HBeAg는 단지 cccDNA 환상 주형으로부터만 생산되는데, 그 이유는 HBeAg의 ORF 및 이의 5' RNA 리더가 통합된 바이러스 유전체의 정반대 양 끝 사이에서 분리되고, 그리고 단지 cccDNA의 형성 시에만 인접하게 되기 때문이다. 비록 HepDE19 세포 배양 시스템에 근거된 검정이 활성을 결정하는데 효과적이긴 하지만, 고처리량 선별검사의 결과는 복합적일 수 있는데, 그 이유는 HBeAg ELISA가

HepDE19 세포에서 주로 cccDNA-독립된 방식으로 발현되는 핵심 항원 (HBcAg)인 바이러스 HBeAg 동족체와 교차반응하기 때문이다. 이러한 문제를 극복하기 위해, HBV 복제, cccDNA 전사 및 HBeAg 분비에 결정적인 임의의 시스-요소를 교란하지 않으면서, DESHAe82 세포의 도입유전자에서 HBeAg의 N 말단 코딩 서열에서 인프레임 HA 에피토프 태그를 포함하는 대안적 세포 배양 시스템 (본원에서 DESHAe82 세포 배양 시스템으로서 지정되고 PCT/EP/2015/06838에서 설명됨)이 개발되었다.

[0455] 포획 항체로서 역할하는 HA 항체 및 검출 항체로서 역할하는 HBeAg로 HA-태깅된 HBeAg의 검출을 위한 화학발광 ELISA 검정 (CLIA)이 개발되어, HBcAg로부터 오염 신호가 제거되었다. HA-HBeAg CLIA 검정과 연계된 DESHAe82 세포주는 높은 수준의 cccDNA 합성 및 HA-HBeAg 생산과 분비, 그리고 낮은 잡음에서 높은 특정한 판독 신호를 전시한다. 이에 더하여, DE19 또는 DESHAe82 세포에서 프리코어 RNA의 검출에 특이적인 정량적 역전사 및 중합효소 연쇄 반응 (qRT-PCR)을 위한 프로토콜이 개발되었고, 그리고 번역되면 HBeAg 또는 HA-HBeAg를 생산하는 cccDNA-의존성 mRNA (프리코어 RNA)의 검출에도 이용되었다.

[0456] 이들 화합물 조합을 시험하기 위해, DESHAe82 또는 DE19 세포 (실시예에서 지시된 바와 같이)는 96 웰 조직-배양액 처리된 마이크로역가 평판에서 Tet와 함께 10% 소 태아 혈청 + 1% 페니실린-스트렙토마이신으로 보충된 DMEM/F12 배지에서 도말되고, 그리고 가습된 인큐베이터에서 37℃ 및 5% CO_2에서 하룻밤 동안 배양되었다. 다음 날, 이들 세포는 Tet가 없는 신선한 배지로 이전되고, 그리고 그들의 개별 EC_{50} 값 인근의 농도 범위에서 저해제 A 및 저해제 B로 처리되고, 그리고 가습된 인큐베이터에서 37℃ 및 5% CO_2에서 48 시간의 지속 기간 동안 배양되었다. 이들 저해제는 100% DMSO (ETV, 3TC, 화합물 **3** 및 화합물 **4**) 또는 성장 배지 (**SIRNA-NP**)에서 희석되었고, 그리고 검정에서 최종 DMSO 농도는 0.5%이었다. 이들 2개 저해제는 각 시험 농도의 저해제 A가 각 시험 농도의 저해제 B와 합동되어 cccDNA 형성 및 발현의 저해에 대한 그들의 조합 효과가 결정되도록, 단독으로뿐만 아니라 체커보드 방식에서 조합으로 시험되었다. 처리되지 않은 음성 대조 표본 (0.5% DMSO 또는 배지 단지)이 각 평판 상에 복수 웰에서 포함되었다. 9 일-배양 이후에, 배지가 제거되었고, 그리고 cccDNA-의존성 프리코어 mRNA 수준을 계측하기 위해 세포가 RNA 추출에 종속되었다. 전체 세포 RNAs는 제조업체의 지시 (진공 다양체 처리, 완충액 RA4의 2회 추가 세척)를 추종함으로써, 96-웰 형식 전체 RNA 단리 키트 (MACHEREY-NAGEL, Cat. 740466.4)를 이용하여 추출되었다. RNA 표본은 RNAase-없는 물에서 용리되었다. 정량적 실시간 RT-PCR은 cccDNA-의존성 프리코어 RNA의 특정한 검출을 위한 프라이머 및 조건을 이용하여, Roche LightCycler480 및 RNA 마스터 가수분해 프로브 (카탈로그 번호 04991885001, Roche)로 수행되었다. GAPDH mRNA 수준 역시 표준 방법에 의해 검출되고, 그리고 프리코어 RNA 수준을 정규화하는데 이용되었다. 프리코어 RNA 수준의 저해, 그리고 이런 이유로, cccDNA 발현은 처리되지 않은 대조 웰의 저해 %로서 계산되고, 그리고 아래와 같이 Prichard 및 Shipman에 의해 확립된 해석 지침을 이용하여 이들 조합이 상승적, 부가적 또는 길항적인 지를 결정하기 위해, MacSynergyII 프로그램 (Prichard MN, Shipman C Jr. Antiviral Research, 1990. Vol 14(4-5):181-205; Prichard MN, Aseltine KR, and Shipman, C. MacSynergy II. University of Michigan 1992)을 이용한 Prichard-Shipman 조합 모형을 이용하여 분석되었다: 95% CI에서 상승작용 용적 <25 μM^2% (로그 용적 <2) = 아마도 무의미한; 25-50 (로그 용적 >2 및 < 5) = 작지만 유의미한; 50-100 (로그 용적 >5 및 <9) = 중간은 생체내에서 중요할 수 있다; 100 초과 (로그 용적 >9) = 강한 상승작용, 아마도 생체내에서 중요한; 1000에 근접하는 용적 (로그 용적 >90) = 대단히 높은, 점검 데이터.

[0457] 동시에, 세포 생존력 및 증식에 대한 저해제 조합의 효과가 2가지 방식으로 사정되었다: 1) 시험 웰의 직접적인 현미경적 관찰, 그리고 2) 10-20 % 세포 밀도에서 파종된 복제 평판 이용, 이들은 4 일 후, 제조업체의 사용설명서에 따라서 세포-역가 Glo 시약 (Promega)을 이용하여 세포내 ATP 함량에 대해 검정되었다. 세포 생존력 및 밀도는 처리되지 않은 음성 대조 웰의 백분율로서 계산되었다.

[0458] **실시예 7: 화합물 3 및 엔테카비르의 시험관내 조합:**

[0459] 화합물 3 (절반-로그 희석 계열 및 6 포인트 적정에서 10 μM 내지 0.0316 μM의 농도 범위)은 엔테카비르 (절반-로그, 3.16-배 희석 계열 및 6 포인트 적정에서 0.010 μM 내지 0.00003 μM의 농도 범위)와 조합으로 시험되었다. 이러한 조합의 항바이러스성 활성은 표 7a에서 도시된다; 상승작용 및 길항작용 용적은 표 7b에서 도시된다. Prichard 및 Shipman에 따른 상승작용 및 길항작용 용적의 계측의 2회 반복 검증으로부터 조합 결과, 그리고 해석은 표 9d에서 도시된다. 이러한 검정 시스템에서, 이러한 조합은 프리코어 RNA 발현의 상승적 저해를 유발한다. 세포 생존력 또는 증식의 어떤 유의미한 저해도 현미경검사에 의해 관찰되지 않았다.

[0460] **표 7a. 화합물 3 및 엔테카비르 조합의 항바이러스성 활성:**

[0461] **음성 대조와 대비하여 평균 저해 퍼센트 (데이터 포인트마다 n=2 표본)**

[0462] [표 7a]

ETV, μM	*0.01*	86.940	97.010	97.490	95.900	97.120	98.240	99.220
	0.0032	81.510	61.730	69.510	62.570	98.550	97.820	97.690
	0.001	73.320	77.600	86.990	66.700	94.490	89.590	91.710
	0.0003	69.090	78.290	58.730	55.160	92.360	91.290	93.110
	0.0001	-8.990	39.460	55.700	44.430	45.680	73.420	91.580
	3E-05	-133.220	-313.960	20.870	49.930	8.740	68.590	72.590
	0	0.000	-26.280	-86.920	36.240	67.120	90.600	84.340
		0	*0.032*	*0.100*	*0.317*	*1.001*	*3.165*	*10*
화합물		*화합물 3, μM*						

[0463]

[0464] **표 7b. 화합물 3 및 엔테카비르 조합의 MacSynergy 용적 계산:**

[0465] **99.99% 신뢰 수준에서 "부가적보다 높은" 저해 수준**

[0466] [표 7b]

ETV, μM	*0.01*	0	3.75864	13.8041	1.86048	0	0	0.74344
	0.0032	0	0	0	0	0.87826	0	0
	0.001	0	9.05212	27.6452	0	0	0	0
	0.0003	0	0.40426	6.01171	0	0	0	0
	0.0001	0	75.9052	125.983	0	0	0	0
	3E-05	0	0	322.705	90.4025	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0
		0	*0.032*	*0.100*	*0.317*	*1.001*	*3.165*	*10*
화합물		*화합물 3, μM*						

[0467]

[0468] **실시예 8: 화합물 4 및 엔테카비르의 시험관내 조합:**

[0469] 화합물 4 (절반-로그 희석 계열 및 6 포인트 적정에서 10 μM 내지 0.0316 μM의 농도 범위)는 엔테카비르 (절반-로그, 3.16-배 희석 계열 및 6 포인트 적정에서 0.010 μM 내지 0.00003 μM의 농도 범위)와 조합으로 시험되었다. 이러한 조합의 항바이러스성 활성은 표 8a에서 도시된다; 상승작용 및 길항작용 용적은 표 8b에서 도시된다. Prichard 및 Shipman에 따른 상승작용 및 길항작용 용적의 계측의 2회 반복 검증으로부터 조합 결과, 그리고 해석은 표 9d에서 도시된다. 이러한 검정 시스템에서, 이러한 조합은 프리코어 RNA 발현의 상승적 저해를 유발한다. 세포 생존력 또는 증식의 어떤 유의미한 저해도 현미경검사에 의해 관찰되지 않았다.

[0470] **표 8a. 화합물 4 및 엔테카비르 조합의 항바이러스성 활성:**

[0471] **음성 대조와 대비하여 평균 저해 퍼센트 (데이터 포인트마다 n=2 표본)**

[0472] [표 8a]

ETV, μM	*0.01*	96	92.03	89.04	98.02	97.16	97.18	96.46
	0.0032	95.31	93.96	93.11	89.34	91.81	97.7	97.74
	0.001	80.83	94.74	94.25	95.49	98.64	98.14	98.7
	0.0003	39.01	95.61	92.25	97.73	97.85	97.68	95.26
	0.0001	64.23	78.08	98.62	96.63	89.34	98.87	95.3
	3E-05	-32.56	-53.69	58.53	97.04	97.7	96.9	95.1
	0	0	-49.48	66.78	94.67	93.92	97.88	97.53
		0	*0.032*	*0.100*	*0.317*	*1.001*	*3.165*	*10*
화합물	*화합물 4, μM*							

[0473]

[0474] **표 8b. 화합물 4 및 엔테카비르 조합의 MacSynergy 용적 계산:**

[0475] **99.99% 신뢰 구간에서 "부가적보다 높은" 저해 수준**

[0476] [표 8b]

ETV, μM	*0.01*	0	-1.99	-9.63	-1.77	-2.6	-2.74	-3.44
	0.0032	0	0.97	-5.33	-10.41	-7.9	-2.2	-2.14
	0.001	0	23.4	0.62	-3.49	-0.19	-1.45	-0.83
	0.0003	0	86.78	12.51	0.98	1.56	-1.03	-3.23
	0.0001	0	31.55	10.5	-1.46	-8.49	-0.37	-3.82
	3E-05	0	44.46	2.57	4.11	5.76	-0.29	-1.63
	0	0	0	0	0	0	0	0
		0	*0.032*	*0.100*	*0.317*	*1.001*	*3.165*	*10*
화합물	*화합물 4, μM*							

[0477]

[0478] **실시예 9: 화합물 3 및 SIRNA-NP의 시험관내 조합:**

[0479] 화합물 3 (절반-로그 희석 계열 및 6 포인트 적정에서 10 μM 내지 0.0316 μM의 농도 범위)은 **SIRNA-NP** (절반-로그, 3.16-배 희석 계열 및 6 포인트 적정에서 0.10 μM 내지 0.000 μg/ml의 농도 범위)와 조합으로 시험되었다. 이러한 조합의 항바이러스성 활성은 표 9a에서 도시된다; 상승작용 및 길항작용 용적은 표 9b에서 도시된다. Prichard 및 Shipman에 따른 상승작용 및 길항작용 용적의 계측의 4회 반복 검증으로부터 조합 결과, 그리고 해석은 표 9d에서 도시된다. 이러한 검정 시스템에서, 이러한 조합은 프리코어 RNA 발현의 상승적 저해를 유발한다. 세포 생존력 또는 증식의 어떤 유의미한 저해도 현미경검사 또는 세포-역가 Glo 검정에 의해 관찰되지 않았다 (표 9c).

[0480] **표 9a. 화합물 3 및 SIRNA-NP 조합의 항바이러스성 활성:**

[0481] **음성 대조와 대비하여 평균 저해 퍼센트 (데이터 포인트마다 n=4 표본)**

[0482] [표 9a]

화합물 3, μM	*10.000*	76.180	76.580	93.330	97.170	94.670	97.120	98.640
	3.165	73.120	93.950	95.500	97.730	98.120	99.160	98.620
	1.001	88.510	95.740	97.340	97.880	98.620	99.410	98.150
	0.317	77.070	96.440	93.720	98.340	98.390	99.260	97.820
	0.100	71.330	87.960	91.490	87.110	97.700	97.790	95.920
	0.032	35.570	-56.280	64.870	86.080	90.920	86.330	89.560
	0	0.000	3.930	-46.460	35.730	87.370	72.720	99.230
		0	*0.0003*	*0.001*	*0.003*	*0.010*	*0.032*	*0.100*
화합물	*SIRNA-NP (μg/mL)*							

[0483]

[0484] **표 9b. 화합물 3 및 SIRNA-NP 조합의 MacSynergy 용적 계산:**

[0485] **99.99% 신뢰 수준에서 "부가적보다 높은" 저해 수준**

[0486] [표 9b]

화합물 3, μM	*10.000*	0.000	0.000	13.805	4.977	0.000	0.000	-0.061
	3.165	0.000	2.558	28.321	9.580	0.000	4.779	0.000
	1.001	0.000	1.416	10.254	1.969	0.000	0.697	0.000
	0.317	0.000	11.954	12.984	9.921	0.000	3.677	0.000
	0.100	0.000	0.000	1.985	0.000	0.000	3.438	0.000
	0.032	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		0	*0.0003*	*0.001*	*0.003*	*0.010*	*0.032*	*0.100*
화합물	*SIRNA-NP (μg/mL)*							

[0487]

[0488] **표 9c. 화합물 3 및 SIRNA-NP 조합의 세포독성: 대조와 대비하여 세포 생존력의 평균 퍼센트**

[0489] [표 9c]

화합물 3, μM	*10.000*	110.5	112.6	120.6	124.0	115.0	89.1
	3.165	105.9	116.1	119.5	120.6	117.3	95.1
	1.001	109.0	118.6	115.9	114.9	116.3	91.5
	0.317	110.0	111.8	119.7	117.2	109.7	90.3
	0.100	99.3	107.2	115.1	119.5	119.9	93.5
	0.032	99.3	107.7	122.6	127.1	123.0	85.9
화합물		*0.0003*	*0.001*	*0.003*	*0.010*	*0.032*	*0.100*

[0490]

[0491] **표 9d. qRT-PCR에 의한 cccDNA-유래된 프리코어 RNA 정량으로 DESHAe82 세포 배양 시스템에서 시험관내 조합 연구의 결과의 요약**

[0492] [표 9d]

저해제 A (화합물 번호)	저해제 B	상승작용 용적 (μM%)	상승작용 로그 용적	길항작용 (μM%)	길항작용 로그 용적	해석
3	엔테카비르 (ETV)	679.15	169.58	0	0	상승작용
4	엔테카비르 (ETV)	225.77	56.44	-76.43	-19.11	상승작용
3	SIRNA-NP	122.31	30.54	-0.06	-0.01	상승작용

[0493]

[0494] **실시예 10**

[0495] 본 실시예의 목적은 HBV 캡시드화의 소형 분자 저해제인 화합물 3 및 HBV-표적화 siRNAs를 캡슐화하는 지질 나노입자 제제인 SIRNA-NP뿐만 아니라 확립된 HBV 관리 기준 치료제: HBV DNA 중합효소 활성을 저해하는 뉴클레오시(티)드 유사체인 엔테카비르 (ETV) (de Man RA *et al.*, *Hepatology*, *34(3)*, 578-82 (2001)) 및 유형 1 인터페론 수용체 활성화를 통해 바이러스 살포를 제한하는 페길화된 인터페론 알파-2a (pegINF α-2a) (Marcellin *et al.*, *N Engl J Med.*, *51(12)*, 1206-17 (2004))를 비롯한 다양한 조합 치료제의 항-HBV 활성을 비교하는 것이었다. 이들 조합의 효능은 화합물 3, SIRNA-NP 및 ETV 단독으로 단일요법 치료뿐만 아니라 화합물 3에 대한 운반제로 음성 대조 치료 조건과 비교되었다.

[0496] 이러한 작업은 만성 B형 간염 바이러스 (HBV) 감염의 충분히 확립된 인간화 간 키메라 생쥐 모형에서 수행되었다 (Tsuge *et al.*, *Hepatology*, *42(5)*, 1046-54 (2005)). 지속 수준의 HBV 감염이 0 일자에 시작된 치료기에 앞서 동물에서 확립되었다. 시험 물품 용량은 다음과 같았다: 화합물 3, 경구 100 mg/kg 하루 2회; SIRNA-NP, 정맥내 3 mg/kg 2 주마다; ETV, 경구 1.2 μg/kg 매일; pegIFN α-2a, 피하 30 μg/kg 주 2회.

[0497] 항-HBV 효과는 제조업체의 사용설명서에 따라서, Bio-Rad Laboratories로부터 GS HBsAg EIA 3.0 효소 연결된 면역 흡착 검정 키트를 이용한 혈청 HBsAg 수준; 그리고 정량적 PCR 검정 (Tanaka *et al.*, *Journal of Medical Virology*, *72*, 223-229 (2004)로부터 프라이머/프로브 서열)을 이용하여, 전체 추출된 DNA로부터 계측된 혈청 HBV DNA 수준에 근거하여 사정되었다.

[0498] 이중 및 삼중 조합 치료는 조사된 단일요법 치료에 비하여, 혈청 HBV DNA 수준에서 더욱 강한 감소에 의해 구현된 바와 같이, 더욱 강한 항바이러스성 활성을 유발하였다. 특히, 28 일자에, 혈청 HBV DNA 수준은 ETV 또는 화합물 3 또는 SIRNA-LNP의 단일요법 치료에서 관찰된 1.0 내지 1.5 로그10 감소와 비교하여, 화합물 3 및 SIRNA-LNP 또는 화합물 3 및 pegIFN α-2a의 조합으로 치료 시에 2.5 로그10 초과, 그리고 화합물 3 및 ETV의 조합으로 치료 시에 2 로그10 감소되었다. 화합물 3 및 SIRNA-NP 및 ETV 또는 화합물 3 및 SIRNA-NP 및 pegINF α-2a로 삼중 조합 치료는 28 일까지, 이중 조합 치료에 비하여 HBV DNA 수준에 대한 약간 향상된 효과를 보였다. 혈청 HBsAg 수준에 의해 구현된 바와 같이, B형 간염 단백질 (항원) 생산을 저해하는 SIRNA-NP의 능력은 유지되었다 (다른 항바이러스성 치료제와 합동으로 공동투여될 때).

[0499] 표 10a: 혈청 HBV DNA 수준에 대한 조합 및 단일요법 치료의 효과

[0500] [표 10a]

군 번호	처리	혈청 HBV DNA (사본/mL ± SEM)				
		0 일자	7 일자	14 일자	21 일자	28 일자
1	화합물 3에 대한 운반체 대조	1.50E+08 ± 1.82E+07	1.65E+08 ± 2.78E+07	1.45E+08 ± 1.50E+07	2.13E+08 ± 3.01E+07	2.13E+08 ± 2.63E+07
2	화합물 3	1.70E+08 ± 2.16E+07	1.33E+07 ± 1.85E+06	1.28E+07 ± 1.78E+06	1.02E+07 ± 4.24E+06	1.17E+07 ± 5.20E+06
3	SIRNA-NP	1.88E+08 ± 4.52E+07	5.18E+06 ± 1.50E+06	6.40E+06 ± 9.67E+05	2.24E+06 ± 5.51E+05	6.86E+06 ± 2.26E+06
4	화합물 3 + SIRNA-NP	1.56E+08 ± 2.25E+07	8.64E+06 ± 2.48E+06	2.02E+06 ± 5.08E+05	4.36E+05 ± 1.18E+05	3.64E+05 ± 1.00E+05
5	화합물 3 + SIRNA-NP + ETV	1.66E+08 ± 1.33E+07	6.82E+06 ± 1.64E+06	1.57E+06 ± 2.19E+05	3.70E+05 ± 8.96E+04	1.68E+05 ± 4.00E+04
6	화합물 3 + SIRNA-NP + pegIFN α-2a	2.42E+08 ± 5.70E+07	7.75E+06 ± 2.03E+06	1.79E+06 ± 4.53E+05	5.48E+05 ± 1.12E+05	2.90E+05 ± 2.52E+04
7	화합물 3 + ETV	1.96E+08 ± 2.46E+07	1.70E+07 ± 4.13E+06	5.22E+06 ± 1.06E+06	2.34E+06 ± 4.06E+05	1.80E+06 ± 3.67E+05
8	화합물 3 + pegIFN α-2a	1.67E+08 ± 2.54E+07	8.50E+06 ± 1.64E+06	1.39E+06 ± 3.71E+05	4.98E+05 ± 1.25E+05	3.01E+05 ± 8.11E+04
9	ETV	1.48E+08 ± 1.18E+07	2.35E+07 ± 2.47E+06	1.38E+07 ± 1.65E+06	1.35E+07 ± 6.45E+05	9.33E+06 ± 3.20E+05

[0501]

[0502] 표 10b: 혈청 HBsAg 수준에 대한 조합 및 단일요법 치료의 효과

[0503] [표 10b]

군 번호	처리	혈청 HBsAg (IU/mL ± SEM)	
		0 일자	21 일자
1	화합물 3에 대한 운반체 대조	2761 ± 388	4065 ± 338
2	화합물 3	2965 ± 616	4158 ± 355
3	SIRNA-NP	3352 ± 812	44 ± 11
4	화합물 3 + SIRNA-NP	3436 ± 498	58 ± 8
5	화합물 3 + SIRNA-NP + ETV	2795 ± 309	96 ± 24
6	화합물 3 + SIRNA-NP + pegIFN α-2a	3965 ± 734	37 ± 4
7	화합물 3 + ETV	3965 ± 779	5822 ± 1490
8	화합물 3 + pegIFN α-2a	3154 ± 521	3621 ± 683
9	ETV	2649 ± 282	2975 ± 629

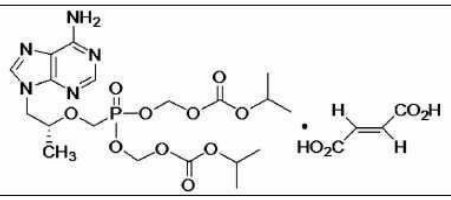
[0504]

[0505] **실시예 11**

[0506] 시험관내 조합 연구 목적:

[0507] HBV 캡시드화의 소형 분자 저해제 (화합물 3), 그리고 HBV 중합효소의 뉴클레오시드 유사체 저해제인 테노포비르 (TDF)의 2개의 약물 조합이 시험관내에서 부가적, 상승적 또는 길항적인 지를 결정하기 위해, HBV 세포 배양 모형 시스템이 이용된다.

[0508]

테노포비르 디소프록실 푸마르산염 (TDF)	

[0509] 시험관내 조합 실험적 프로토콜:

[0510] 시험관내 조합 연구는 Prichard 및 Shipman의 방법 (Prichard MN, and Shipman C Jr., *Antiviral Research*, 1990, *14*(4-5), 181-205; 및 Prichard MN, et. al., *MacSynergy II*)을 이용하여 수행되었다. HepDE19 세포 배양 시스템은 HBV DNA 복제 및 cccDNA 형성을 테트라사이클린 (Tet)-조절된 방식으로 뒷받침하고, 그리고 HBV rcDNA 및 cccDNA의 생산과 유지에 의존하는 검출가능한 리포터 분자를 생산하는 HepG2 (인간 간암종) 유래된 세포주이다 (Guo et al 2007. J. Virol 81:12472-12484). HepDE19 (50,000개 세포/웰)는 96 웰 콜라겐-코팅된 조직-배양액 처리된 마이크로역가 평판에서 10% 소 태아 혈청, 1% 페니실린-스트렙토마이신 및 1 μg/ml 테트라사이클린으로 보충된 DMEM/F12 배지에서 도말되고, 그리고 가습된 인큐베이터에서 37℃ 및 5%CO_2에서 하룻밤 동안 배양되었다. 다음 날, 이들 세포는 테트라사이클린이 없는 신선한 배지로 이전되고 37℃ 및 5%CO_2에서 4 시간 동안 배양되었다. 이들 세포는 이후, 테트라사이클린이 없는 신선한 배지로 이전되고, 그리고 그들의 개별 EC_{50} 값 인근의 농도 범위에서 저해제 A 및 저해제 B로 처리되고, 그리고 가습된 인큐베이터에서 37℃ 및 5%CO_2에서 7 일의 지속 기간 동안 배양되었다. 저해제 테노포비르 (TDF) 및 화합물 3은 100% DMSO에서 희석되었고, 그리고

검정에서 최종 DMSO 농도는 ≤0.5%이었다. 이들 2개 저해제는 각 농도의 저해제 A가 각 농도의 저해제 B와 합동되어 rcDNA 생산의 저해에 대한 그들의 조합 효과가 결정되도록, 단독으로뿐만 아니라 체커보드 방식에서 조합으로 시험되었다. 화합물 조합과 함께 세포의 7 일-배양 이후에, 저해제-처리된 웰에서 존재하는 rcDNA의 수준은 HBV 특정한 맞춤 프로브 세트 및 제조업체의 사용설명서가 있는 Quantigene 2.0 bDNA 검정 키트 (Affymetrix, Santa Clara, CA)를 이용하여 계측되었다. 평판은 Victor 발광 평판판독기 (PerkinElmer 모형 1420 Multilabel 계수기)를 이용하여 판독되었고, 그리고 각 웰로부터 산출된 상대적 발광 단위 (RLU) 데이터는 처리되지 않은 대조 웰의 저해 %로서 계산되고, 그리고 아래와 같이 Prichard 및 Shipman에 의해 확립된 해석 지침을 이용하여 이들 조합이 상승적, 부가적 또는 길항적인 지를 결정하기 위해 MacSynergy II 프로그램을 이용하여 분석되었다: 95% CI에서 상승작용 용적 <25 μM^2% (로그 용적 <2) = 아마도 무의미한; 25-50 μM^2% (로그 용적 >2 및 < 5) = 작지만 유의미한; 50-100 μM^2% (로그 용적 >5 및 <9) = 중간은 생체내에서 중요할 수 있다; 100 μM^2% 초과 (로그 용적 >9) = 강한 상승작용, 아마도 생체내에서 중요한; 1000 μM^2%에 근접하는 용적 (로그 용적 >90) = 대단히 높은, 점검 데이터. 단일 화합물 처리된 세포로부터 RLU 데이터는 4-파라미터 곡선 적합 알고리즘을 이용하여 EC_{50} 값을 결정하기 위해, Microsoft Excel에서 XL-적합 모듈을 이용하여 분석되었다. 동시에, 세포 생존력에 대한 화합물의 효과가 제조업체의 사용설명서에 따라서 세포-역가 글로 (glo) 시약 (CTG; Promega Corporation, Madison, WI)을 이용하여 세포 생존력의 척도로서 ATP 함량을 결정하기 위해, 5,000개 세포/웰의 밀도에서 도말되고 4 일 동안 배양된 복제 평판을 이용하여 사정되었다.

[0511] 화합물 3 및 테노포비르 (TDF)의 시험관내 조합:

[0512] 화합물 3 (3-배 희석 계열 및 5 포인트 적정에서 3 μM 내지 0.037 μM의 농도 범위)은 테노포비르 (2-배 희석 계열 및 9 포인트 적정에서 1 μM 내지 0.004 μM의 농도 범위)와 조합으로 시험되었다. 단독으로 또는 합동으로 화합물 3 또는 TDF 처리에서 관찰된 4개 복제물의 rcDNA에서 평균 저해 % 및 표준 편차는 표 11a에서 도시된다. 이러한 실험에서 결정된 화합물 3 및 TDF의 EC_{50} 값은 표 11b에서 도시된다. 2개 저해제 조합의 관찰된 값이 각 화합물의 개별 기여에 근거하여 상기 농도 범위에 대해 상가 작용 (표 11b)으로부터 예상되는 것과 비교될 때, 이들 조합은 MacSynergy II 분석에 따라, 그리고 앞서 설명된 바와 같은 Prichard 및 Shipman (1992)의 해석 규준을 이용하여, 부가적인 것으로 밝혀졌다 (표 11a 및 b).

[0513] 표 11a. bDNA 검정을 이용한 rcDNA 정량으로 HepDE19 세포 배양 모형에서 화합물 3 및 TDF 조합의 항바이러스성 활성: 음성 대조와 대비하여 평균 저해 퍼센트 (데이터 포인트마다 n=4 표본)

[0514] [표 11a]

[약물]	0	0.004	0.008	0.016	0.031	0.063	0.125	0.250	0.500	1.000	RCDNA의 평균 저해 %	TDF MM
화합물 3 MM												
3	92.69	93.87	96.01	94.57	94.17	94.9	91.84	94.52	97.28	97.37		
1	83.1	87.98	90.45	91.88	89.45	89.19	94.59	98.01	95.27	97.85		
0.333	34.59	47.53	50.34	45.48	64.69	70.4	83.95	92.17	94.85	96.43		
0.111	-50.41	-47.53	-31.05	-44.75	13.61	50.62	62.26	82.59	92.55	97.17		
0.037	-63.72	-41.93	-56.49	-41.81	-0.16	29.03	56.86	82.15	90.11	95.65		
0	0	-47.04	-39.77	-25.59	36.74	37.05	65.03	84.2	91.21	95.51		

[약물]	0	0.004	0.008	0.016	0.031	0.063	0.125	0.250	0.500	1.000	표준 편차 (%)	TDF MM
화합물 3 MM												
3	4.43	3.98	1.83	2.37	3.8	1.33	5.51	4.26	1.13	1.29		
1	8.73	5.43	2.73	1.92	4.32	5.01	2.65	0.84	4.58	1.21		
0.333	40.25	28.76	24.89	31.4	20.3	18.56	11.45	4.78	1.74	3.48		
0.111	96.02	90.94	47.03	93.37	79.11	18.14	25.2	8.38	5.39	1.34		
0.037	93	74.31	74.12	109.98	55.89	47.04	33.37	11.7	8.7	2.09		
0	0	100.83	88.61	115.48	19.81	57.3	23.34	11.86	7	3.21		

[약물]	0	0.004	0.008	0.016	0.031	0.063	0.125	0.250	0.500	1.000	부가적 저해	TDF MM
화합물 3 MM												
3	92.69	89.25	89.78	90.82	95.38	95.4	97.44	98.85	99.36	99.67		
1	83.1	75.15	76.38	78.78	89.31	89.36	94.09	97.33	98.51	99.24		
0.333	34.59	3.82	8.58	17.85	58.62	58.82	77.13	89.67	94.25	97.06		
0.111	-50.41	-121.16	-110.23	-88.9	4.85	5.32	47.4	76.24	86.78	93.25		
0.037	-63.72	-140.73	-128.83	-105.62	-3.57	-3.06	42.75	74.13	85.61	92.65		
0	0	-47.04	-39.77	-25.59	36.74	37.05	65.03	84.2	91.21	95.51		

[0515]

[약물]	0	0.004	0.008	0.016	0.031	0.063	0.125	0.250	0.500	1.000	상승작용 플롯 (99.9%)	TDF MM
화합물 3 MM											본페로니 수정	96%
3	0	0	0.20747	0	0	0	0	0	0	0	상승작용	12.07
1	0	0	5.08557	6.78128	0	0	0	0	0	0	로그 용적	1.73
0.333	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
0.111	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	길항작용	0
0.037	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	로그 용적	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		

[0516]

[0517] 표 11b: bDNA 검정을 이용한 rcDNA 정량으로 HepDE19 세포 배양 시스템에서 시험관내 조합 연구의 결과의 요약:

[0518] [표 11b]

저해제 A	저해제 B	저해제 A EC_{50} (MM)	저해제 B EC_{50} (MM)	상승작용 용적 (μM²%)*	상승작용 로그 용적	길항작용 용적 (μM²%)*	길항작용 로그 용적	결론
CMPD 3	TDF	0.454	0.088	12.07	1.73	0	0	부가적

*99.9% 신뢰 구간에서

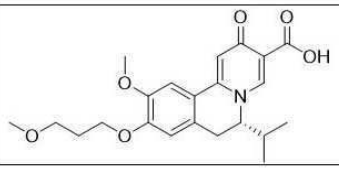
[0519]

[0520] *실시예 12*

[0521] **시험관내 조합 연구 목적:**

[0522] 조합 치료에서 2개의 화합물이 B형 간염 바이러스 (HBV) 형질감염된 세포 배양액에서 상승적, 길항적 또는 부가적 효과를 유발할 것인지를 결정하기 위해. 대상 화합물, 화합물 5는 B형 간염 표면 항원 (HBsAg) 분비의 소형 분자 저해제이고, 그리고 SIRNA-NP는 바이러스 mRNA 및 바이러스 항원 발현을 표적으로 하는 지질 나노입자 (LNP) 캡슐화된 RNAi 저해제이다. HBV 세포 배양 시스템이 이러한 시험관내 연구에서 조합 치료의 효과를 결정하는데 이용되었다.

[0523] **소형 분자 화학 구조:**

화합물 5	

[0524]

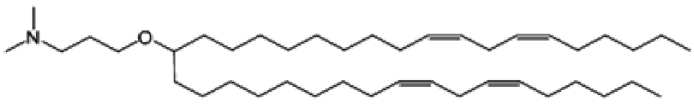
[0525] **LNP 제제:**

[0526] SIRNA-NP는 HBV 유전체를 표적으로 하는 3개 siRNAs의 혼합물의 지질 나노입자 제제이다. 다음의 지질 나노입자 (LNP) 산물이 본원에서 보고된 실험에서 HBV siRNAs를 전달하는데 이용되었다. 표에서 도시된 값은 몰 백분율이다. 디스테아로일포스파티딜콜린은 DSPC로서 약칭된다.

PEG(2000)-C-DMA	양이온성 지질	콜레스테롤	DSPC
1.6	54.6	32.8	10.9

[0527]

[0528] 양이온성 지질은 다음의 구조를 가졌다:

[0529]  .

[0530] **siRNA**

[0531] 이들 3개 siRNAs의 서열은 아래에 도시된다.

	센스 서열 (5'-3')	안티센스 서열 (5' - 3')
	rCrCmGrUmGmUrGrCrArCrUmUrCmGrCmUmUrCrArUrU	rUrGrArAmGrCmGrArArGmUmGrCrAmCrAmCmGrGrUrU
	rCmUmGmGrCmUrCrArGmUrUmUrAmCmUrAmGmUmGrUrU	rCrArCrUrAmGmUrArArAmCrUmGrAmGrCmCrArGrUrU
	rAmCrCmUrCmUrGmCrCmUrAmArUmCrArUrCrUrCrUrU	rGrArGrArUrGmArUmUrArGrGmCrAmGrAmGrGrUrUrU
rN = 염기 N의 RNA		
mN = 염기 N의 2'O-메틸 변형		

[0532]

[0533] **시험관내 조합 실험적 프로토콜:**

[0534] 시험관내 조합 연구는 Prichard 및 Shipman의 방법 (Prichard MN, and Shipman C Jr., *Antiviral Research*, 1990, *14*(4-5), 181-205; 및 Prichard MN, et. al., *MacSynergy II*)을 이용하여 수행되었다. HepG2.2.15 세포 배양 시스템은 Sells et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, 1987. Vol 84:1005-1009)에서 이미 설명된 바와 같이 adw2- 아형 HBV 유전체로 안정되게 형질감염된 인간 간모세포종 HepG2 세포로부터 유래된 세포주이다. HepG2.2.15 세포는 Dane-유사 바이러스 입자를 분비하고, HBV DNA를 생산하고, 그리고 또한, 바이러스 단백질, B형 간염 e 항원 (HBeAg) 및 B형 간염 표면 항원 (HBsAg)을 생산한다.

[0535] 화합물 조합을 시험하기 위해, HepG2.2.15 (30,000개 세포/웰)는 96 웰 조직-배양액 처리된 마이크로역가 평판에서 1% 페니실린-스트렙토마이신, 20 μg/mL 제네티신 (G418), 10% 소 태아 혈청으로 보충된 RPMI + L-글루타

민 배지에서 도말되고, 그리고 가습된 인큐베이터에서 37 ℃ 및 5% CO_2에서 하룻밤 동안 배양되었다. 다음 날, 이들 세포는 신선한 배지로 보충되고, 그 이후에 100% DMSO에서 0.1 μM 내지 0.000015 μM의 농도 범위에서 용해된 화합물 5가 첨가되었다. SIRNA-NP는 100% RPMI 배지에서 용해되고 2.5 nM 내지 0.025 nM의 농도 범위에서 세포에 첨가되었다. 마이크로역가 세포 평판은 가습된 인큐베이터에서 37 ℃ 및 5% CO_2에서 6 일의 지속 기간 동안 배양되었다. 연속 희석액은 각 화합물의 EC_{50} 값에 개별적인 농도 범위에 걸쳤는데, 검정의 최종 DMSO 농도는 0.5%이었다. 체커보드 방식에서 이들 화합물의 조합 시험에 더하여, 화합물 5 및 SIRNA-NP 둘 모두 단독으로 또한 시험되었다.

[0536] 처리되지 않은 양성 대조 표본 (배지에서 0.5% DMSO)이 각 평판 상에 복수 웰에서 포함되었다. 6 일-배양 이후에, 배지는 HBsAg 화학발광 면역검정 (CLIA) (Autobio Diagnostics, 카탈로그 번호 CL0310-2)에서 이용을 위해, 처리된 세포로부터 제거되었다. HBsAg 정량의 수준이 검정의 검출 한계 내에 있다는 것을 실증하기 위한 HBsAg 표준 곡선이 산출되었다. 나머지 저해제-처리된 세포는 제조업체의 사용설명서에 따라서 세포-역가 Glo 시약 (Promega)을 이용한 세포내 아데노신 삼인산염 (ATP)의 결정에 의해, 그리고 저해제 처리의 지속 기간 내내 이들 세포의 현미경적 분석에 의해 세포독성에 대해 사정되었다. 세포 생존력은 처리되지 않은 양성 대조 웰의 백분율로서 계산되었다.

[0537] 평판은 EnVision 다중모드 평판판독기 (PerkinElmer 모형 2104)를 이용하여 판독되었다. 각 웰로부터 산출된 상대적 발광 단위 (RLU) 데이터는 처리되지 않은 양성 대조 웰의 저해 퍼센트로서 HBsAg 수준을 계산하는데 이용되고, 그리고 아래와 같이 Prichard 및 Shipman에 의해 확립된 해석 지침을 이용하여 이들 조합이 상승적, 부가적 또는 길항적인 지를 결정하기 위해, MacSynergyII 프로그램 (Prichard MN, Shipman C Jr. Antiviral Research, 1990. Vol 14(4-5):181-205; Prichard MN, Aseltine KR, and Shipman, C. MacSynergy II. University of Michigan 1992)을 이용한 Prichard-Shipman 조합 모형을 이용하여 분석되었다: 95% CI에서 상승작용 용적 <25 μM^2% (로그 용적 <2) = 아마도 무의미한; 25-50 (로그 용적 >2 및 < 5) = 작지만 유의미한; 50-100 (로그 용적 >5 및 <9) = 중간은 생체내에서 중요할 수 있다; 100 초과 (로그 용적 >9) = 강한 상승작용, 아마도 생체내에서 중요한; 1000에 근접하는 용적 (로그 용적 >90) = 대단히 높은, 점검 데이터. 단일 화합물 처리된 세포로부터 RLU 데이터는 4-파라미터 곡선 적합 알고리즘을 이용하여 EC_{50} 값을 결정하기 위해, Microsoft Excel에서 XL-적합 모듈을 이용하여 분석되었다.

[0538] 화합물 5 (절반-로그, 3.16-배 희석 계열 및 8 포인트 적정에서 0.1 μM 내지 0.000015 μM의 농도 범위)는 SIRNA-NP (절반-로그, 3.16-배 희석 계열 및 6 포인트 적정에서 2.5 nM 내지 0.025 nM의 농도 범위)와 조합으로 시험되었다. 조합 결과는 4번의 기술적인 반복으로 구성되는 각 검정에서 삼중으로 완결되었다. Prichard 및 Shipman에 따른 상승작용 및 길항작용 용적의 계측, 그리고 해석은 표 12e에서 도시된다. 이러한 조합의 항바이러스성 활성은 표 12a1, 12a2 및 12a3에서 도시된다; 상승작용 및 길항작용 용적은 표 12b1, 12b2 및 12b3에서 도시된다. 이러한 조합의 부가적 저해 활성은 표 12d1, 12d2 및 12d3에서 도시된다. 이러한 검정 시스템에서, 상기 조합은 HBsAg 분비의 부가적 저해를 유발한다. 세포 생존력 또는 증식의 어떤 유의미한 저해도 현미경검사 또는 세포-역가 Glo 검정에 의해 관찰되지 않았다 (표 12c1, 12c2 및 12c3).

[0539] ***시험 1***

[0540] **표 12a1. 화합물 5 및 SIRNA-NP 조합의 항바이러스성 활성:**

[0541] 음성 대조와 대비하여 평균 저해 퍼센트 (데이터 포인트마다 n=4 표본)

[0542] [표 12a1]

SIRNA-NP, μM	0.0025										
		86.52	85.69	87.32	88.31	89.63	90.42	90.86	89.67	91.42	86.52
평균 저해 %	0.00079	77.54	77.93	78.77	80.65	85.38	87.61	88.97	89.29	90.33	77.54
	0.00025	58.33	51.65	58.01	66.99	71.54	78.68	82.99	85.31	85.23	58.33
	7.9E-05	32.28	31.08	41.8	56.24	67.66	74.98	81.22	85.88	85	32.28
	2.5E-05	23.11	23.81	29.3	46.54	60.92	70.18	78.45	80.94	82.53	23.11
	0	10.26	15.09	25.37	37.06	55.53	66.43	75.94	80.86	79.69	10.26
		0	1.00E-06	3.16E-06	1.0E-05	3.17E-05	0.0001	0.00031	0.001	0.00316	0.1
화합물	화합물 5, μM										

[0543]

[0544] **표 12b1. 화합물 5 및 SIRNA-NP 조합의 MacSynergy 용적 계산:** 99.99% 신뢰 구간 (본페로니 수정 96%)

[0545] [표 12b1]

SIRNA-NP, μM	0.0025										
		0	0	0	0	0	0	-0.47	-0.92	0	0
상승작용 0 로그 용적 0	0.00079	0	0	0	0	0	0	-1.51	0	0	-0.79
	0.00025	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
길항작용 -3.69 로그 용적 -0.92	7.9E-05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2.5E-05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		0	1.00E-06	3.16E-06	1.0E-05	3.17E-05	0.0001	0.00031	0.001	0.00316	0.1
화합물	화합물 5, μM										

[0546]

[0547] **표 12c1. 화합물 5 및 SIRNA-NP 조합의 세포독성:**

[0548] 대조와 대비하여 세포 생존력의 평균 퍼센트

[0549] [표 12c1]

SIRNA-NP, μM	0.0025										
		103	97	102	102	100	101	105	109	107	123
평균 세포 생존력 %	0.00079	103	92	99	96	105	106	101	109	101	98
	0.00025	101	47	122	107	59	109	100	115	104	104
	7.9E-05	104	128	120	109	152	107	109	106	95	101
	2.5E-05	95	100	111	107	95	96	100	102	98	115
	0	100	113	109	99	100	92	111	112	110	136
		0	1.00E-06	3.16E-06	1.0E-05	3.17E-05	0.0001	0.00031	0.001	0.00316	0.1
화합물	화합물 5, μM										

[0550]

[0551] **표 12d1. 화합물 5 및 SIRNA-NP 조합의 항바이러스성 활성:**

[0552] 음성 대조와 대비하여 부가적 저해 퍼센트 (데이터 포인트마다 n=4 표본)

[0553] [표 12d1]

SIRNA-NP, μM	0.0025	83.86	85.52	86.3	87.95	89.84	92.82	94.58	96.12	96.91	96.72
부가적 저해 %	0.00079	73.95	76.62	77.88	80.56	83.6	88.42	91.26	93.73	95.01	94.71
	0.00025	49.38	54.57	57.02	62.22	68.14	77.49	83.01	87.82	90.31	89.72
	7.9E-05	23.95	31.75	35.43	43.24	52.13	66.18	74.47	81.7	85.44	84.55
	2.5E-05	12.12	21.14	25.38	34.42	44.69	60.92	70.5	78.86	83.18	82.15
	0	0	10.26	15.09	25.37	37.06	55.53	66.43	75.94	80.86	79.69
		0	1.00E-06	3.16E-06	1.0E-05	3.17E-05	0.0001	0.00316	0.001	0.00316	0.1
화합물		화합물 5, μM									

[0554]

[0555] *시험 2*

[0556] **표 12a2. 화합물 5 및 SIRNA-NP 조합의 항바이러스성 활성:**

[0557] 음성 대조와 대비하여 평균 저해 퍼센트 (데이터 포인트마다 n=4 표본)

[0558] [표 12a2]

SIRNA-NP, μM	0.0025	77.7	81.95	80.51	81.58	84.83	83.97	84.26	87.08	86.03	84.01
평균 저해 %	0.00079	69.06	70.21	58.33	75.38	79.52	83.66	85.31	87.4	86.12	86.83
	0.00025	43.84	47.41	58.38	58.03	67.92	76.4	79.69	82.57	84.39	86.46
	7.9E-05	25.14	44.78	40.61	46.87	58.4	70.57	73.31	84.9	88.29	87.05
	2.5E-05	14.38	27.11	38.49	45.73	55.88	65.5	77.37	78.71	83.62	86.14
	0	0	6.2	22.15	31.5	43.61	50.19	69.21	79.59	83.32	82.36
		0	1.00E-06	3.16E-06	1.0E-05	3.17E-05	0.0001	0.00316	0.001	0.00316	0.1
화합물		화합물 5, μM									

[0559]

[0560] **표 12b2. 화합물 5 및 SIRNA-NP 조합의 MacSynergy 용적 계산:** 99.9% 신뢰 구간 (본페로니 수정 96%)

[0561] [표 12b2]

SIRNA-NP, μM	0.0025	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
상승작용 0	0.00079	0	0	0	0	0	0	0	0	-3.6	0
로그 용적 0	0.00025	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
길항작용 -3.62	7.9E-05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
로그 용적 -0.9	2.5E-05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		0	1.00E-06	3.16E-06	1.0E-05	3.17E-05	0.0001	0.00316	0.001	0.00316	0.1
화합물		화합물 5, μM									

[0562]

[0563] **표 12c2. 화합물 5 및 SIRNA-NP 조합의 세포독성:**

[0564] 대조와 대비하여 세포 생존력의 평균 퍼센트

[0565] [표 12c2]

SIRNA-NP, μM	0.0025	88	90	74	76	82	77	74	75	90	108
	0.00079	77	72	67	68	65	67	68	65	71	110
평균 세포 생존력 %	0.00025	79	75	66	73	71	67	64	63	74	114
	7.9E-05	88	75	73	76	55	68	68	64	79	116
	2.5E-05	90	84	68	74	69	71	66	66	80	110
	0	100	94	92	113	90	98	109	108	112	133
		0	1.00E-06	3.16E-06	1.0E-05	3.17E-05	0.0001	0.00316	0.001	0.00316	0.1
화합물	화합물 5, μM										

[0566]

[0567] **표 12d2. 화합물 5 및 SIRNA-NP 조합의 항바이러스성 활성:**

[0568] 음성 대조와 대비하여 부가적 저해 퍼센트 (데이터 포인트마다 n=4 표본)

[0569] [표 12d2]

SIRNA-NP, μM	0.0025	77.7	79.08	82.64	84.72	87.43	88.89	93.13	95.45	96.28	96.07
	0.00079	69.06	70.98	75.91	78.81	82.55	84.59	90.47	93.69	94.84	94.54
부가적 저해 %	0.00025	43.84	47.32	56.28	61.53	68.33	72.03	82.71	88.54	90.63	90.09
	7.9E-05	9.82	15.41	29.79	38.23	49.15	55.08	72.23	81.59	84.96	84.09
	2.5E-05	23.02	27.79	40.07	47.27	56.59	61.66	76.3	84.29	87.16	86.42
	0	0	6.2	22.15	31.5	43.61	50.19	69.21	79.59	83.32	82.36
		0	1.00E-06	3.16E-06	1.0E-05	3.17E-05	0.0001	0.00316	0.001	0.00316	0.1
화합물	화합물 5, μM										

[0570]

[0571] *시험 3*

[0572] **표 12a3. 화합물 5 및 SIRNA-NP 조합의 항바이러스성 활성:**

[0573] 음성 대조와 대비하여 평균 저해 퍼센트 (데이터 포인트마다 n=4 표본)

[0574] [표 12a3]

SIRNA-NP, μM	0.0025	89.74	92.07	93.25	94.5	95.52	96.92	98.19	98.87	99	98.59
	0.00079	76.48	81.81	84.52	87.38	89.73	92.94	95.86	97.42	97.71	96.77
평균 저해 %	0.00025	52.46	63.24	68.71	74.5	79.24	85.73	91.63	94.78	95.37	93.47
	7.9E-05	33.52	48.6	56.24	64.34	70.97	80.05	88.29	92.69	93.52	90.87
	2.5E-05	19.26	37.57	46.86	56.69	64.75	75.77	85.78	91.13	92.14	88.91
	0	0	22.68	34.18	46.36	56.34	69.99	82.39	89.01	90.26	86.26
		0	1.00E-06	3.16E-06	1.0E-05	3.17E-05	0.0001	0.00316	0.001	0.00316	0.1
화합물	화합물 5, μM										

[0575]

[0576] **표 12b3. 화합물 5 및 SIRNA-NP 조합의 MacSynergy 용적 계산:** 99.99% 신뢰 구간 (본페로니 수정 96%)

[0577] [표 12b3]

SIRNA-NP, μM	0.0025										
		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.00079	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
상승작용 0 로그 용적 0	0.00025	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	7.9E-05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
길항작용 0 로그 용적 0	2.5E-05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		0	1.00E-06	3.16E-06	1.0E-05	3.17E-05	0.0001	0.00031 6	0.001	0.00316	0.1
화합물	화합물 5, μM										

[0578]

[0579] **표 12c3. 화합물 5 및 SIRNA-NP 조합의 세포독성:**

[0580] 대조와 대비하여 세포 생존력의 평균 퍼센트

[0581] [표 12c3]

SIRNA-NP, μM	0.0025										
		97	116	112	124	112	126	124	122	122	95
	0.00079	103	115	112	123	109	118	125	127	126	124
평균 세포 생존력 %	0.00025	115	135	129	140	119	135	129	148	136	122
	7.9E-05	113	129	131	133	130	139	131	138	146	130
	2.5E-05	113	153	140	140	131	134	137	147	143	124
	0	100	131	127	140	131	128	131	141	127	99
		0	1.00E-06	3.16E-06	1.0E-05	3.17E-05	0.0001	0.00031 6	0.001	0.00316	0.1
화합물	화합물 5, μM										

[0582]

[0583] **표 12d3. 화합물 5 및 SIRNA-NP 조합의 항바이러스성 활성:**

[0584] 음성 대조와 대비하여 부가적 저해 퍼센트 (데이터 포인트마다 n=4 표본)

[0585] [표 12d3]

SIRNA-NP, μM	0.0025										
		89.74	92.07	93.25	94.5	95.52	96.92	98.19	98.87	99	98.59
	0.00079	76.48	81.81	84.52	87.38	89.73	92.94	95.86	97.42	97.71	96.77
부가적 저해 %	0.00025	52.46	63.24	68.71	74.5	79.24	85.73	91.63	94.78	95.37	93.47
	7.9E-05	33.52	48.6	56.24	64.34	70.97	80.05	88.29	92.69	93.52	90.87
	2.5E-05	19.26	37.57	46.86	56.69	64.75	75.77	85.78	91.13	92.14	88.91
	0	0	22.68	34.18	46.36	56.34	69.99	82.39	89.01	90.26	86.26
		0	1.00E-06	3.16E-06	1.0E-05	3.17E-05	0.0001	0.00031 6	0.001	0.00316	0.1
화합물	화합물 5, μM										

[0586]

[0587] **표 12e. CLIA에 의한 HBsAg 정량으로 HepG2.2.15 세포 배양 시스템에서 시험관내 조합 연구의 결과의 요약**

[0588] [표 12e]

시험 1	화합물 5 EC_{50} (μM)	SIRNA-NP EC_{50} (nM)	상승작용 용적 (μM²%)	상승작용 로그 용적	길항작용 (μM²%)	길항작용 로그 용적	해석
1	0.002	0.00026	0	0	-3.69	-0.92	부가적
2	0.005	0.00035	0	0	-3.62	-0.9	부가적
3	0.002	0.00020	0	0	0	0	부가적

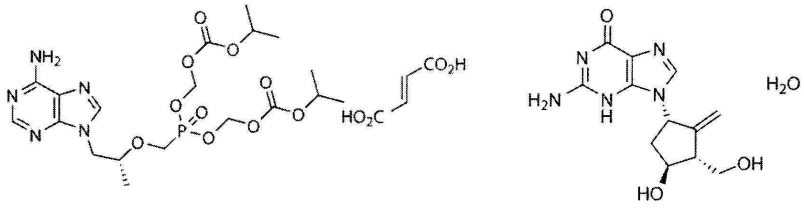
[0589] *99.9% 신뢰 구간에서

[0590] **실시예 13**

[0591] **시험관내 조합 연구 목적:**

[0592] 본 연구의 목적은 테노포비르 (전구약물 테노포비르 디소프록실 푸마르산염, 또는 HBV 중합효소의 뉴클레오티드 유사체 저해제인 TDF의 형태에서), 또는 엔테카비르 (엔테카비르 수화물, 또는 HBV 중합효소의 뉴클레오시드 유사체 저해제인 ETV의 형태에서), 그리고 모든 바이러스 mRNA 전사체 및 바이러스 항원의 강력한 녹다운을 조장하도록 의도된 siRNA인 SIRNA-NP 중에서 2개의 약물 조합이 HBV 세포 배양 모형 시스템을 이용하여 시험관내에서 부가적, 상승적 또는 길항적인 지를 결정하는 것이었다.

[0593] **테노포비르 및 엔테카비르의 화학 구조:**

[0594] 

[0595] **테노포비르 디소프록실 푸마르산염 (TDF)엔테카비르 (ETV) 수화물**

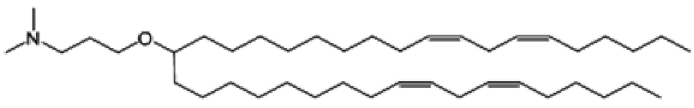
[0596] **SIRNA-NP의 조성물:**

[0597] SIRNA-NP는 HBV 유전체를 표적으로 하는 3개 siRNAs의 혼합물의 지질 나노입자 제제이다. 다음의 지질 나노입자 (LNP) 제제가 HBV siRNAs를 전달하는데 이용되었다. 표에서 도시된 값은 몰 백분율이다. 약어 DSPC는 디스테아로일포스파티딜콜린을 의미하고, 그리고 PEG는 PEG 2000이었다.

[0598]

PEG(2000)-C-DMA	양이온성 지질	콜레스테롤	DSPC
1.6	54.6	32.8	10.9

[0599] 양이온성 지질은 다음의 구조를 가졌다:

[0600] 

[0601] 이들 3개 siRNAs의 서열은 아래에 도시된다.

	센스 서열 (5'-3')	안티센스 서열 (5' - 3')
	rCrCmGrUmGmUrGrCrArCrUmUrCmGrCmUmUrCrArUrU	rUrGrArAmGrCmGrArArGmUmGrCrAmCrAmCmGrGrUrU
	rCmUmGmGrCmUrCrArGmUrUmUrAmCmUrAmGmUmGrUrU	rCrArCrUrAmGmUrArArAmCrUmGrAmGrCmCrArGrUrU
	rAmCrCmUrCmUrGmCrCmUrAmArUmCrArUrCrUrCrUrU	rGrArGrArUrGmArUmUrArGrGmCrAmGrAmGrGrUrU
	rN = 염기 N의 RNA	
	mN = 염기 N의 2'O-메틸 변형	

[0602]

[0603] **시험관내 조합 실험적 프로토콜:**

[0604] 시험관내 조합 연구는 Prichard 및 Shipman의 방법 (Prichard MN, Shipman C, Jr., *Antiviral Res*, *14*, 181-205 (1990))을 이용하여 수행되었다. HepDE19 세포주는 Guo *et al*. (Guo *et al*., *J Virol*, *81*, 12472-12484 (2007))에서 설명된 바와 같이 개발되었다. 이것은 HBV 유전체로 안정되게 형질감염된 인간 간암 세포주이고, 그리고 HBV 전유전체 RNA를 발현하고 HBV rcDNA (이완된 환상 DNA) 합성을 테트라사이클린-조절된 방식으로 뒷받침할 수 있다. HepDE19 세포는 96 웰 조직-배양액 처리된 마이크로역가 평판에서 테트라사이클린 없이 10% 소 태아 혈청 + 1% 페니실린-스트렙토마이신으로 보충된 DMEM/F12 배지에서 도말되고, 그리고 가습된 인큐베이터에서 37℃ 및 5%CO_2에서 하룻밤 동안 배양되었다. 다음 날, 이들 세포는 신선한 배지로 이전되고, 그리고 그들의 개별 EC_{50} 값 인근의 농도 범위에서 저해제 A 및 저해제 B로 처리되고, 그리고 가습된 인큐베이터에서 37℃ 및 5% CO_2에서 7 일의 지속 기간 동안 배양되었다. 이들 저해제는 100% DMSO (ETV 및 TDF) 또는 성장 배지 (SIRNA-NP)에서 희석되었고, 그리고 검정에서 최종 DMSO 농도는 ≤0.5%이었다. 이들 2개 저해제는 각 농도의 저해제 A가 각 농도의 저해제 B와 합동되어 rcDNA 생산의 저해에 대한 그들의 조합 효과가 결정되도록, 단독으로뿐만 아니라 체커보드 방식에서 조합으로 시험되었다. 48 시간-배양 이후에, 저해제-처리된 웰에서 존재하는 rcDNA의 수준은 HBV 특정한 맞춤 프로브 세트 및 제조업체의 사용설명서를 이용한 bDNA 검정 (Affymetrix)을 이용하여 계측되었다. 각 웰로부터 산출된 RLU 데이터는 처리되지 않은 대조 웰의 저해 %로서 계산되고, 그리고 아래와 같이 Prichard 및 Shipman에 의해 확립된 해석 지침을 이용하여 이들 조합이 상승적, 부가적 또는 길항적인 지를 결정하기 위해 MacSynergy II 프로그램을 이용하여 분석되었다: 95% CI에서 상승작용 용적 <25 μM^2% (로그 용적 <2) = 아마도 무의미한; 25-50 μM^2% (로그 용적 >2 및 < 5) = 작지만 유의미한; 50-100 μM^2% (로그 용적 >5 및 <9) = 중간은 생체내에서 중요할 수 있다; 100 μM^2% 초과 (로그 용적 >9) = 강한 상승작용, 아마도 생체내에서 중요한; 1000 μM^2%에 근접하는 용적 (로그 용적 >90) = 대단히 높은, 점검 데이터. 동시에, 세포 생존력에 대한 저해제 조합의 효과가 제조업체의 사용설명서에 따라서 세포-역가 Glo 시약 (Promega)을 이용하여 세포 생존력의 척도로서 ATP 함량을 결정하는데 이용된 복제 평판을 이용하여 사정되었다.

[0605] **결과 및 결론:**

[0606] **TDF 및 SIRNA-NP의 시험관내 조합:**

[0607] TDF (2-배 희석 계열 및 10 포인트 적정에서 1.0 μM 내지 0.004 μM의 농도 범위)는 SIRNA-NP (3-배 희석 계열 및 5 포인트 적정에서 25 ng/mL 내지 0.309 ng/mL의 농도 범위)와 조합으로 시험되었다. 단독으로 또는 합동으로 TDF 또는 SIRNA-NP 처리에서 관찰된 4개 복제물의 rcDNA에서 평균 저해 % 및 표준 편차는 표 13a에서 도시된다. TDF 및 SIRNA-NP의 EC_{50} 값은 표 13c에서 도시된다. 2개 저해제 조합의 관찰된 값이 상기 농도 범위에 대해 상가 작용 (표 13a)으로부터 예상되는 것과 비교될 때, 이들 조합은 MacSynergy II 분석에 따라, 그리고 Prichard 및 Shipman (Prichard MN. 1992. MacSynergy II, University of Michigan)에 의해 앞서 설명된 해석 규준을 이용하여, 부가적인 것으로 밝혀졌다 (표 13c).

[0608] **엔테카비르 및 SIRNA-NP의 시험관내 조합:**

[0609] 엔테카비르 (2-배 희석 계열 및 10 포인트 적정에서 4.0 nM 내지 0.004 μM의 농도 범위)는 SIRNA-NP (3-배 희

석 계열 및 5 포인트 적정에서 25 ng/mL 내지 0.309 μg/mL의 농도 범위)와 조합으로 시험되었다. 단독으로 또는 합동으로 ETV 또는 SIRNA-NP 처리에서 관찰된 4개 복제물의 rcDNA에서 평균 저해 % 및 표준 편차는 표 13b에서 도시된다. ETV 및 SIRNA-NP의 EC_{50} 값은 표 13c에서 도시된다. 이들 2개 저해제가 상기 농도 범위에서 조합될 때, 이들 농도 조합은 MacSynergy II 분석에 따라, 그리고 Prichard 및 Shipman (1992)에 의해 앞서 설명된 해석 규준을 이용하여, 부가적인 것으로 밝혀졌다.

[0610] **표 13a: 테노포비르 디포복실 푸마르산염 및 SIRNA-NP의 시험관내 조합**

[0611] [표 13a]

[약물]	0	0.004	0.008	0.016	0.031	0.063	0.125	0.250	0.500	1.000	평균 저해 %
SIRNA-NP											TDF (μM)
ng/mL											
25	93.58	90.91	94.48	93.31	93.59	95.77	92.36	95.99	94.11	94.97	
8.333	88.63	88.81	88.05	92.79	92.07	92.97	95.69	95.77	94.62	97.07	
2.778	80.61	72.21	73.62	74.95	84.77	86.4	91.21	93.53	95.62	97.56	
0.926	44.48	36.07	41.83	44.94	60.31	76.81	82.62	91.36	95	97.09	
0.309	26.53	13.83	9.48	26.5	32.64	53.59	73.58	82.75	90.84	96.66	
0	0	-5.27	0.67	2.82	6.57	41.67	66.08	81.53	90.85	94.55	

[약물]	0	0.00390 6	0.0078 1	0.0156 3	0.0312 5	0.062 5	0.125	0.25	0.5	1	표준 편차 (%)
SIRNA-NP											TDF (μM)
ng/mL											
25	8.23	5.78	2.1	5.36	4.44	2.77	5.57	2.31	3.88	1.7	
8.333	5.38	4.15	6.01	5.32	3.97	1.82	2.89	3.61	3.13	2.02	
2.778	13.12	12	6.21	14.12	12.42	5.29	3.1	1.92	1.12	1.34	
0.926	16.91	9.73	29.33	16.45	21.14	5.83	6.39	2.16	2.29	1.2	
0.309	12.04	43.02	33.58	19.89	52.19	25.65	17.47	6.61	5.58	1.79	
0	0	23.5	44.96	26.95	54.17	21.72	15.9	12.86	1.64	0.99	

[약물]	0	0.00390 6	0.0078 1	0.0156 3	0.0312 5	0.062 5	0.125	0.25	0.5	1	부가적 저해
SIRNA-NP											TDF (μM)
ng/mL											
25	93.58	93.24	93.62	93.76	94	96.26	97.82	98.82	99.41	99.65	
8.333	88.63	88.03	88.71	88.95	89.38	93.37	96.14	97.96	98.96	99.38	
2.778	80.61	79.58	80.73	81.15	81.87	88.68	93.42	96.42	98.22	98.94	
0.926	44.48	41.55	44.85	46.05	48.13	67.62	81.17	89.76	94.92	96.97	
0.309	26.53	22.66	27.02	28.6	31.36	57.14	75.08	86.44	93.28	96	
0	0	-5.27	0.67	2.82	6.57	41.67	66.08	81.53	90.85	94.55	

[약물]	0	0.00	0.01	0.02	0.03	0.06	0.13	0.25	0.5	1	상승작용 플롯 (99.9%)
SIRNA-NP											본페로니 수정 96%
ng/mL											
25.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	상승작용 0
8.333	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	로그 용적 0
2.778	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
0.926	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	길항작용 0
0.309	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	로그 용적 0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

[0612]

[0613] **표 13b: 엔테카비르 및 SIRNA-NP의 시험관내 조합**

[0614] [표 13b]

[약물]	0	0.016	0.031	0.063	0.125	0.250	0.500	1.000	2.000	4.000	평균 저해 %
SIRNA-NP											ETV (nM)
ng/mL											
25	94.31	92.38	93.86	94.7	93.85	95.21	92.88	95.49	94.28	95.63	
8.333	90.41	91.44	91.71	89.9	90.91	92.34	94.03	94.33	95.37	95.21	
2.778	76.74	74.61	62.81	75.26	79.3	82.04	86.38	90.76	92.08	91.18	
0.926	46.84	39.16	41.37	58.29	48.88	49.94	62.39	72.82	82.81	86.42	
0.309	28.68	27.78	12.18	5.93	8.2	19.18	27.55	56.01	73.11	79.23	
0	0	-43.72	-50.07	-30.26	-23.47	-21.25	-10.24	41.71	58.35	69.99	

[약물]	0	0.015625	0.03125	0.0625	0.125	0.25	0.5	1	2	4	표준 편차 (%)
SIRNA-NP											ETV (nM)
ng/mL											
25	1.67	6.18	2.63	3.7	2.4	3.83	4.89	3.65	3.15	1.22	
8.333	2.86	5.03	5.65	8.63	2.5	1.68	2.18	3.07	1.44	2.47	
2.778	12.28	9.55	32.22	11.86	9.31	4.95	4.87	2.25	2.64	6.79	
0.926	17.81	22.17	35.16	8.83	25.87	17.46	17.53	7.78	4.36	5.46	
0.309	12.26	11.58	26.87	28.27	30.31	21.45	38.93	12.99	12.27	6.89	
0	0	47.73	38.3	41.27	25.17	56.81	65.13	33.53	17.75	11.48	

[약물]	0	0.015625	0.03125	0.0625	0.125	0.25	0.5	1	2	4	부가적 저해
SIRNA-NP											ETV (nM)
ng/mL											
25	94.31	91.82	91.46	92.59	92.97	93.1	93.73	96.68	97.63	98.29	
8.333	90.41	86.22	85.61	87.51	88.16	88.37	89.43	94.41	96.01	97.12	
2.778	76.74	66.57	65.09	69.7	71.28	71.8	74.36	86.44	90.31	93.02	
0.926	46.84	23.6	20.22	30.75	34.36	35.54	41.4	69.01	77.86	84.05	
0.309	28.68	-2.5	-7.03	7.1	11.94	13.52	21.38	58.43	70.3	78.6	
0	0	-43.72	-50.07	-30.26	-23.47	-21.25	-10.24	41.71	58.35	69.99	

[약물]	0	0.02	0.03	0.06	0.13	0.25	0.50	1	2	4	상승작용 플롯 (99.9%)	
SIRNA-NP											본페로니 수정	96%
ng/mL												
25.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	상승작용	0
8.333	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	로그 용적	0
2.778	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
0.926	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	길항작용	0
0.309	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	로그 용적	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		

[0615]

[0616] **표 13c: bDNA 검정을 이용한 rcDNA 정량으로 AML12-HBV10 세포 배양 시스템에서 시험관내 조합 연구의 결과의 요약:**

[0617] [표 13c]

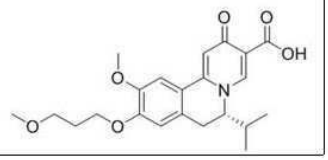
저해제 A	저해제 B	저해제 A EC_{50} (ng/mL)	저해제 B EC_{50}	상승작용 용적 ($\mu M^2\%$)*	상승작용 로그 용적	길항작용 용적 ($\mu M^2\%$)*	길항작용 로그 용적	결론
SIRNA-NP	테노포비르 (TDF, μM)	0.947	0.089	0	0	0	0	부가적
SIRNA-NP	엔테카비르 (ETV, nM)	0.906	1.780	5.37	0.77	0	0	부가적

*99.9% 신뢰 구간에서

[0618]

[0619] **실시예 14**

[0620] 다음의 화합물이 실시예에서 참조된다. 화합물 20은 공지된 절차를 이용하여 제조될 수 있다. 가령, 화합물 20은 국제 특허 출원 공개 번호 WO2015113990에서 설명된 바와 같이 제조될 수 있다.

화합물 번호 또는 명칭	구조
20	

[0621]

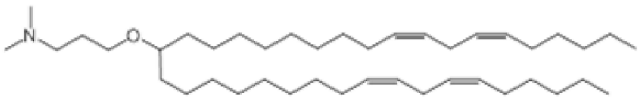
[0622] B형 간염 바이러스 (HBV)의 생쥐 모형이 sAg 생산의 소형 분자 저해제 및 HBV-표적화 siRNAs (**SIRNA-NP**) (둘 모두 독립된 치료제로서 및 서로 합동으로)의 항-HBV 효과를 사정하는데 이용되었다.

[0623] 다음의 지질 나노입자 (LNP) 제제가 HBV siRNAs를 전달하는데 이용되었다. 표에서 도시된 값은 몰 백분율이다. 약어 DSPC는 디스테아로일포스파티딜콜린을 의미한다.

PEG(2000)-C-DMA	양이온성 지질	콜레스테롤	DSPC
1.6	54.6	32.8	9

[0624]

[0625] 양이온성 지질은 다음의 구조를 가졌다:



[0626]

[0627] AAV1.2의 1E11 바이러스 유전체 (Huang, LR et al. *Gastroenterology*, 2012, 142(7):1447-50에서 설명됨)가 꼬리 정맥 주사를 통해 C57/B16 생쥐에게 투여되었다. 이러한 바이러스 벡터는 HBV 유전체의 1.2-배 초과길이 사본을 보유하고, 그리고 다른 HBV 산물 사이에서 HBV 표면 항원 (HBsAg)을 발현한다. 생쥐에서 혈청 HBsAg 발현은 효소 면역검정을 이용하여 모니터링되었다. 동물은 a) 모든 동물이 HBsAg를 발현하는 것으로 확증되고, 그리고 b) HBsAg 군 평균이 처리의 개시에 앞서 서로 유사하도록, 혈청 HBsAg 수준에 근거하여 군으로 분류되었다 (무작위화되었다).

[0628] 동물은 아래와 같이 화합물 **20**으로 처리되었다: 0 일자에 시작하여, 3.0 mg/kg 용량의 화합물 **20**이 0 일자 및 28 일자 사이에 총 56회 투약을 위해 하루 2회 빈도에서 동물에 경구 투여되었다. 화합물 **20**은 투여를 위한 보조용매 제제에서 용해되었다. 음성 대조 동물은 보조용매 제제 단독이 투여되거나, 또는 임의의 시험 물품으로 처리되지 않았다. 동물은 아래와 같이, 지질 나노입자 (LNP)-캡슐화된 HBV-표적화 siRNAs로 처리되었다: 0 일자에, 0.3 mg/kg siRNA와 동등한 양의 시험 물품이 정맥내 투여되었다. 각 처리에 대한 HBsAg 발현 수준은 상기 군에 대한 0 일자 (투약전) 값에 대하여 비교되었다.

[0629] 이들 처리의 효과는 0 (처리전), 7, 14 및 28 일자에 혈액을 수집하고 이것을 혈청 HBsAg 함량에 대해 분석함으로써 결정되었다. 표 14는 0 일자에 개별 동물 처리전 기준선 값의 백분율로서 표시된 처리군 평균 (n=5 (siHBV 및 운반제 조합 처리의 경우 n=4); ± 평균의 표준 오차) 혈청 HBsAg 농도를 보여준다.

[0630] 상기 데이터는 화합물 **20** 및 HBV siRNA (둘 모두 단독으로 및 합동으로)의 조합에 대한 응답으로 혈청 HBsAg 감소의 정도를 증명한다. 시험된 모든 시점에서, 화합물 **20** 및 HBV siRNA 치료의 조합은 개별 단일요법 치료 중에서 한 가지만큼 우수하거나 또는 이것보다 훨씬 우수한, 혈청 HBsAg의 감소를 산출하였다.

[0631] **표 14. HBV 감염의 생쥐 모형에서 혈청 HBV sAg에 대한 화합물 20 및 3개 HBV siRNAs의 단일 및 조합 치료 효과**

[0632] [표 14]

처리 1 (경구)	처리 2 (IV)	D0	D7	D14	D21	D28
없음	없음	100 ± 0	80 ± 12	100 ± 18	72 ± 15	72 ± 16
운반제	없음	100 ± 0	37 ± 8	62 ± 9	112 ± 66	127 ± 67
화합물 20	없음	100 ± 0	7 ± 1	8 ± 2	7 ± 2	8 ± 2
운반제	HBV siRNA	100 ± 0	1 ± 0	3 ± 2	19 ± 9	45 ± 25
화합물 20	HBV siRNA	100 ± 0	1 ± 0	2 ± 1	5 ± 2	8 ± 2

[0633]

[0634] *실시예 15-24*

[0635] **일차 인간 간세포에서 연구를 위한 재료와 방법**

[0636] **동물**

[0637] FRG 생쥐는 Yecuris (Tualatin, OR, USA)로부터 구입되었다. 이들 생쥐에 관한 상세한 정보는 아래의 표에서 도시된다. 본 연구는 WuXi IACUC (Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC 프로토콜 R20160314-생쥐)에 의해 승인되었다. 생쥐는 7 일 동안 새로운 환경에 순화하도록 허용된다. 이들 생쥐는 전반적인 건강, 그리고 생리학적 기형 및 행동 기형의 임의의 징후에 대해 매일 모니터링되었다.

[0638] **FRG 생쥐 기술 데이터**

케이지 ID	생쥐 ID	공여자 ID	출생 일자	이식 일자	알부민 (μg/ml) 선전적	성별	BW (g) -선전적
1	37094	HHM30017	12/15/2015	01/28/2016	4887	수컷	24.9
2	37211	HHM27018	01/03/2016	02/24/2016	4284	수컷	23.5
3	37258	HHM27018	01/06/2016	02/24/2016	4282	수컷	29.4
4	37611	HHM30017	02/22/2016	04/06/2016	6627	수컷	25.3
5	37955	HHM27018	03/31/2016	05/19/2016	5990	수컷	25.5
6	37900	HHM27018	03/23/2016	05/04/2016	4802	수컷	27.1
7	37976	HHM27018	03/20/2016	05/04/2016	4520	수컷	24.7

[0639]

[0640] **시험 물품**

[0641] 화합물 **3**, **22**, **23**, **24** 및 **25**는 Arbutus Biopharma에 의해 제공되었다. 페그-인터페론 알파-2a (Roche, 180 μg/0.5ml)는 WuXi에 의해 제공되었다. TAF, 엔테카비르, 테노포비르, 라미부딘 및 TDF는 WuXi에 의해, DMSO 용액에 담겨 제공되었다. 이들 화합물에 관한 정보는 아래의 표에서 도시된다.

[0642] **시험 물품에 관한 정보**

화합물 명칭	바이알 ID	분자량	크기	판매자
25	031NH	401.19	3.1 mg	Arbutus
3	031NR	386.4	3.8 mg	Arbutus
22	031NP	398.4	2.9 mg	Arbutus
23	031NT	379.3	2.9 mg	Arbutus
24	031NV	396.8	2.6 mg	Arbutus
화합물 명칭	판매자	카탈로그 번호	원액 농도.	
페그인터페론 알파-2a	Roche		180 μg/0.5ml (5040000 IU/ml)	WuXi에 의해 제공됨
TAF	SelleckChem	S7856	10 mM	WuXi에 의해 제공됨
TDF	Shanghai Sphchem Co., Ltd.		20 mM	WuXi에 의해 제공됨

[0643]

[0644] **바이러스**

[0645] D 유형 HBV는 HepG2.2.15 배양 상층액으로부터 농축되었다. 이들 바이러스에 관한 정보는 아래의 표에서 도시된다.

[0646] **HBV에 관한 정보**

바이러스 ID	로트#	혈청에서 HBV 역가 (GE*/ml)	유전자형	공급원
HBV_ 2.2.15	HBV20160407	2.00E+09 GE/ml	D (Genebank ID: U95551)	HepG2.2.15 상층액
HBV_ 2.2.15	B161011	1.9E+09 GE/ml	D (Genebank ID: U95551)	HepG2.2.15 상층액
HBV_ 2.2.15	B161129	1.5E+09 GE/ml	D (Genebank ID: U95551)	HepG2.2.15 상층액

[0647]

[0648] *GE, HBV 유전체 당량.

[0649] **시약**

[0650] 본 연구에서 이용된 주요 시약은 QIAamp 96 DNA 혈액 키트 (QIAGEN # 51161), FastStart Universal 프로브 마스터 (Roche # 04914058001), 세포 계수 키트-8 (CCK-8) (Biolite # 35004), HBeAg ELISA 키트 (Antu # CL 0312) 및 HBsAg ELISA 키트 (Antu # CL 0310)이었다.

[0651] **기기**

[0652] 본 연구에서 이용된 주요 기기는 BioTek Synergy 2, SpectraMax (Molecular Devices), 7900HT 빠른 실시간 PCR 시스템 (ABI) 및 Quantistudio 6 실시간 PCR 시스템 (ABI)이었다.

[0653] **일차 인간 간세포 (PHH)의 수확**

[0654] PHHs를 단리하기 위해 생쥐 간 관류가 적용되었다. 단리된 간세포는 Percoll에 의해 더욱 정제되었다. 이들 세포는 배양 배지로 재현탁되고 96-웰 평판 ($6x10^4$ 세포/웰) 또는 48-웰 평판 ($1.2x10^5$ 세포/웰) 내로 파종되었다. 이들 PHHs는 파종후 1 일 (1 일자)에 D 유형 HBV로 감염되었다.

[0655] **PHHs의 배양 및 처리.**

[0656] 2 일자에, 시험 화합물이 희석되고 세포 배양 평판 내로 첨가되었다. 이들 화합물을 내포하는 배양 배지가 2 일마다 다시 채워졌다. 세포 배양 상층액이 HBV DNA 및 항원 결정을 위해 8 일자에 수집되었다.

[0657] **EC_{50} 값의 결정.**

[0658] 화합물은 7가지 농도, 3-배 희석에서 삼중으로 시험되었다.

[0659] **이중 조합 연구.**

[0660] 2개 화합물이 삼중 평판에서 5x5 매트릭스에서 시험되었다.

[0661] **8 일자에 세포 계수 키트-8에 의한 세포독성에 대한 검정**

[0662] 배양 배지가 세포 배양 평판으로부터 제거되었고, 그리고 이후, CCK8 (Biolite # 35004) 작업 용액이 세포에 첨가되었다. 평판이 37 ℃에서 배양되었고, 그리고 SpectraMax에 의해, 흡광도가 450nm 파장에서 계측되었고 참고 흡광도가 650nm 파장에서 계측되었다.

[0663] **배양 상층액에서 qPCR에 의한 HBV DNA의 정량**

[0664] 8 일자에 수확된 배양 상층액에서 DNA는 QIAamp 96 DNA 혈액 키트 (Qiagen-51161)로 단리되었다. 각 표본에 대해, 100 μl의 배양 상층액이 DNA를 추출하는데 이용되었다. DNA는 100μl, 150μl 또는 180 μl의 AE로 용리되었다. 배양 상층액에서 HBV DNA는 qPCR에 의해 정량되었다. 조합 효과는 MacSynergy 소프트웨어에 의해 분석되었다. 프라이머는 아래에 설명된다.

[0665] **프라이머 정보**

[0666]

프라이머 R	GACAAACGGGCAACATACCTT
프라이머 F	GTGTCTGCGGCGTTTTATCA
프로브	5' FAM CCTCTKCATCCTGCTGCTATGCCTCATC 3' TAMRA

[0667] **배양 상층액에서 ELISA에 의한 HBsAg 및 HBeAg의 계측**

[0668] 8 일자에 수확된 배양 상층액에서 HBsAg / HBeAg는 매뉴얼에 따라, HBsAg / HBeAg ELISA 키트 (Autobio)에 의해 계측되었다. 표본은 표준 곡선의 범위에서 신호를 획득하기 위해 PBS로 희석되었다. 저해 비율은 아래의 공식으로 계산되었다. 조합 효과는 MacSynergy 소프트웨어에 의해 분석되었다.

[0669] 저해 % HBsAg = [1 - 표본의 HBsAg 양 / DMSO 대조의 HBV 양]x100.

[0670] 저해 % HBeAg = [1 - 표본의 HBeAg 양 / DMSO 대조의 HBV 양]x100.

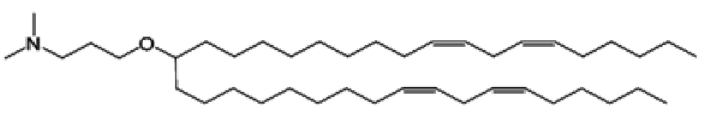
[0671] SIRNA-NP

[0672] SIRNA-NP는 HBV 유전체를 표적으로 하는 3개 siRNAs의 혼합물의 지질 나노입자 제제이다. 다음의 지질 나노입자 (LNP) 제제가 HBV siRNAs를 전달하는데 이용되었다. 표에서 도시된 값은 몰 백분율이다. 약어 DSPC는 디스테아로일포스파티딜콜린을 의미한다.

[0673]

PEG-C-DMA	양이온성 지질	콜레스테롤	DSPC
1.6	54.6	32.8	10.9

[0674] 양이온성 지질은 다음의 구조를 가졌다:

[0675] 

.

[0676] 이들 3개 siRNAs의 서열은 아래에 도시된다.

	센스 서열 (5'-3')	안티센스 서열 (5' - 3')
	rCrCmGrUmGmUrGrCrArCrUmUrCmGrCmUmUrCrArUrU	rUrGrArAmGrCmGrArArGmUmGrCrAmCrAmCmGrGrUrU
	rCmUmGmGrCmUrCrArGmUrUmUrAmCmUrAmGmUmGrUrU	rCrArCrUrAmGmUrArArAmCrUmGrAmGrCmCrArGrUrU
	rAmCrCmUrCmUrGmCrCmUrAmArUmCrArUrCrUrCrUrU	rGrArGrArUrGmArUmUrArGrGmCrAmGrAmGrGrUrUrU
	rN = 염기 N의 RNA	
	mN = 염기 N의 2'O-메틸 변형	

[0677]

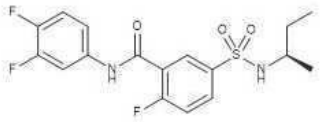
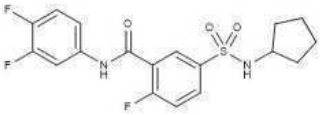
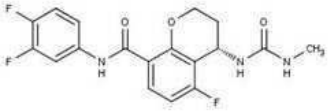
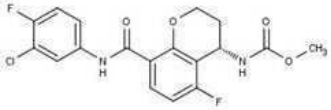
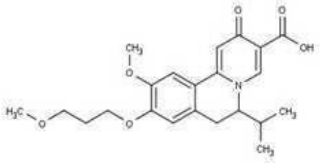
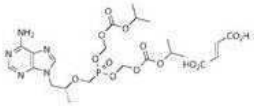
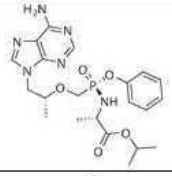
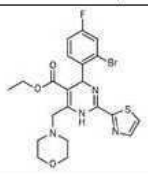
[0678] **페길화된 인터페론 알파 2a (IFNα2a)의 조성:**

[0679] 이러한 작용제는 상업적인 공급원으로부터 구입되었다:

[0680]

표본 ID	판매자	크기	로트 번호	원액 농도
페그인터페론 알파-2a	Roche	180 ug/0.5ml	B1370	5040000 IU/mL

[0681] 다음의 화합물이 또한 이용되었다.

화합물 명칭 또는 ID 번호	구조
3	
22	
23	
24	
25	
테노포비르 디소프록실 푸마르산염 (TDF)	
테노포비르 알라페나미드 (TAF)	
GLS4 (HAP)	

[0682]

[0683] **실시예 15**

[0684] **화합물 24 및 TDF의 시험관내 조합**

[0685] **연구 목적**

[0686] 화합물 **24** (아미노 크로만 화학적 부류에 속하는, HBV 캡시드화의 소형 분자 저해제) 및 테노포비르 (전구약물 테노포비르 디소프록실 푸마르산염, 또는 HBV 중합효소의 뉴클레오티드 유사체 저해제인 TDF의 형태에서)의 2개-약물 조합이 세포 배양 모형 시스템에서 HBV-감염된 인간 일차 간세포를 이용하여, 시험관내에서 부가적, 상승적 또는 길항적인 지를 결정하기 위해.

[0687] **결과 및 결론**

[0688] TDF (3-배 희석 계열 및 5 포인트 적정에서 10.0 nM 내지 0.12 nM의 농도 범위)는 **24** (3-배 희석 계열 및 5 포인트 적정에서 1000 nM 내지 12.36 nM의 농도 범위)와 조합으로 시험되었다. 단독으로 또는 합동으로 **24** 또는 TDF 처리에서 관찰된 3개 복제물의 HBV DNA, HBsAg 및 HBeAg에서 평균 저해 % 및 표준 편차는 아래에 지시된 바와 같이 표 15a, 15b 및 15c에서 도시된다. TDF 및 **24**의 EC_{50} 값은 앞선 실험에서 결정되었고 표 15d에서 도시된다; 일부 변동이 상이한 로트의 PHH 세포로부터 관찰되었다.

[0689] 2개 저해제 조합의 관찰된 값이 상기 농도 범위에 대해 상가 작용으로부터 예상되는 것과 비교될 때, 이들 조합은 MacSynergy II 분석에 따라, 그리고 Prichard 및 Shipman (1992)에 의해 앞서 설명된 해석 규준을 이용하여, 길항작용이 없이 상승적 또는 부가적인 것으로 밝혀졌다 (표 15d). 세포 생존력 또는 증식의 어떤 유의미한 저해도 현미경검사 또는 CCK8 검정에 의해 관찰되지 않았다.

[0690] **표 15a: 화합물 24 및 TDF의 시험관내 조합에서 HBV DNA에 대한 효과**

[0691] [표 15a]

[약물]	0.00	12.35	37.04	111.11	333.33	1000.00	평균 저해 %
TDF (nM)							화합물 24 (nM)
10.00	-15.4	16.23	29.76	33.41	71.99	82.62	
3.33	3.15	24.17	30.1	39.55	71.87	87.48	
1.11	2.49	24.8	24.74	33.45	73.25	86.58	
0.37	-6.24	17.61	35.35	37.05	68.52	87.29	
0.12	-1.16	25.72	25.72	33.54	75.06	86.83	
0.00	0	-37.82	-31.86	-4.54	59.29	81.07	

[약물]	0.00	12.35	37.04	111.11	333.33	1000.00	표준 편차 (%)
TDF (nM)							화합물 24 (nM)
10.00	20.95	6.25	5.54	19.51	4.45	1.41	
3.33	2.99	2.31	4.58	5.73	2.67	0.32	
1.11	16.52	2.03	9.07	11.11	3.67	1.02	
0.37	19.46	1.06	13.17	2.12	3.62	0.7	
0.12	21.38	7.78	1.65	6.37	1.38	1.46	
0.00	15.8	17.16	15.42	5.85	4.36	3.8	

[약물]	0.00	12.35	37.04	111.11	333.33	1000.00	부가적 저해
TDF (nM)							화합물 24 (nM)
10.00	-15.4	-59.04	-52.17	-20.64	53.02	78.15	
3.33	3.15	-33.48	-27.71	-1.25	60.57	81.67	
1.11	2.49	-34.39	-28.58	-1.94	60.3	81.54	
0.37	-6.24	-46.42	-40.09	-11.06	56.75	79.89	
0.12	-1.16	-39.42	-33.39	-5.75	58.82	80.85	
0.00	0	-37.82	-31.86	-4.54	59.29	81.07	

[약물]	0	12.346	37.037	111.11	333.33	1000	상승작용 플롯 (99.9%)
TDF (nM)							본페로니 수정 98%
10.00	0	54.7013	63.6979	0	4.32505	0	상승작용 586.54
3.33	0	50.0478	42.7372	21.9426	2.51303	4.75688	로그 용적 133.52
1.11	0	52.5093	23.4706	0	0.87203	1.68318	
0.37	0	60.5415	32.0975	41.1331	0	5.09635	길항작용 0
0.12	0	39.536	53.6799	18.3263	11.6984	1.17514	로그 용적 0
0.00	0	0	0	0	0	0	

[0692]

[0693] **표 15b: 화합물 24 및 TDF의 시험관내 조합에서 HBsAg에 대한 효과**

[0694] [표 15b]

[약물]	0.00	12.35	37.04	111.11	333.33	1000.00	평균 저해 %
TDF (nM)							화합물 24
10.00	-6.65	-16.37	-4.65	-5.16	-9.32	22.45	
3.33	-1.28	15.87	17.06	10.42	10.42	34.58	
1.11	-3.54	11.17	11.06	14.54	15.54	33.45	
0.37	-3.32	1.98	7.61	5.28	8.04	35.4	
0.12	-3.31	8.08	-0.03	-1.09	-3.03	29.86	
0.00	0	-17.92	-21.67	-27.16	-25.87	12.01	

[약물]	0.00	12.35	37.04	111.11	333.33	1000.00	표준 편차 (%)
TDF (nM)							화합물 24
10.00	8.24	26.3	12.4	23.19	9.78	5.74	
3.33	8.1	15.58	17.2	4.68	3.18	4.67	
1.11	15.01	5.34	11.05	6.21	3.77	6.92	
0.37	11.33	16.35	16.52	12.36	17.13	6.72	
0.12	14.19	5.14	4.68	11.32	17.36	5.67	
0.00	11.69	23.43	8.53	22.25	22.43	14.73	

[약물]	0.00	12.35	37.04	111.11	333.33	1000.00	부가적 저해
TDF (nM)							화합물 24
10.00	-6.65	-25.76	-29.76	-35.62	-34.24	6.16	
3.33	-1.28	-19.43	-23.23	-28.79	-27.48	10.88	
1.11	-3.54	-22.09	-25.98	-31.66	-30.33	8.9	
0.37	-3.32	-21.83	-25.71	-31.38	-30.05	9.09	
0.12	-3.31	-21.82	-25.7	-31.37	-30.04	9.1	
0.00	0	-17.92	-21.67	-27.16	-25.87	12.01	

[약물]	0	12.346	37.037	111.11	333.33	1000	상승작용 플롯 (99.9%) 보베르니 수정	98%
TDF (nM)								
10.00	0	0	0	0	0	0	상승작용	166.48
3.33	0	0	0	23.808 1	27.434 6	8.3310 3	로그 용적	37.9
1.11	0	15.686 1	0.6744 5	25.762 9	33.462 9	1.7762 8		
0.37	0	0	0	0	0	4.1944 8	길항작용	0
0.12	0	12.984 3	10.268 1	0	0	2.1000 3	로그 용적	0
0.00	0	0	0	0	0	0		

[0695]

[0696] **표 15c: 화합물 24 및 TDF의 시험관내 조합에서 HBeAg에 대한 효과**

[0697] [표 15c]

[약물]	0.00	12.35	37.04	111.11	333.33	1000.00	평균 저해 %
TDF (nM)							화합물 24 (nM)
10.00	6.07	-1.44	0.13	0.82	-2.83	22.98	
3.33	11.61	19.99	11.19	11.4	7.62	30.62	
1.11	12.04	7.84	11.45	7.21	14.03	29.45	
0.37	6.23	1.33	7.42	10.84	16.24	27.43	
0.12	7.02	7.72	1.74	10.06	7.19	22.39	
0.00	0	-2.71	-12.8	-12.74	-14.74	13.04	

[약물]	0.00	12.35	37.04	111.11	333.33	1000.00	표준 편차 (%)
TDF (nM)							화합물 24 (nM)
10.00	9.14	8.12	21.17	12.08	22.45	15.84	
3.33	23.08	21.21	19.61	18.06	17.88	17.08	
1.11	15.35	5.04	7.68	10.99	16.1	14.46	
0.37	14.75	11.05	13.95	12.33	18.21	15.12	
0.12	19.96	7.42	4.94	17.01	19.91	14.21	
0.00	19.34	6.37	3.32	18.69	25.64	18.52	

[약물]	0.00	12.35	37.04	111.11	333.33	1000.00	부가적 저해
TDF (nM)							화합물 24 (nM)
10.00	6.07	3.52	-5.95	-5.9	-7.78	18.32	
3.33	11.61	9.21	0.3	0.35	-1.42	23.14	
1.11	12.04	9.66	0.78	0.83	-0.93	23.51	
0.37	6.23	3.69	-5.77	-5.72	-7.59	18.46	
0.12	7.02	4.5	-4.88	-4.83	-6.69	19.14	
0.00	0	-2.71	-12.8	-12.74	-14.74	13.04	

[약물]	0	12.346	37.037	111.11	333.33	1000	상승작용 플롯 (99.9%) 신뢰구간
TDF (nM)							추정 98%
10.00	0	0	0	0	0	0	상승작용 0
3.33	0	0	0	0	0	0	로그 용적 0
1.11	0	0	0	0	0	0	
0.37	0	0	0	0	0	0	길항작용 0
0.12	0	0	0	0	0	0	로그 용적 0
0.00	0	0	0	0	0	0	

[0698]

[0699] **표 15d: PHH 세포 배양 시스템에서 화합물 24 및 TDF의 시험관내 조합 연구의 결과의 요약:**

[0700] [표 15d]

HBV 검정 종결점	저해제 A	저해제 B	저해제 A EC_{50} (nM)#	저해제 B EC_{50} (nM)#	상승작용 용적 ($\mu M^2\%$)*	상승작용 로그 용적	길항작용 용적 ($\mu M^2\%$)*	길항작용 로그 용적	결론
HBV DNA	TDF	24	5.16	181.6	586.54	133.52	0	0	상승작용
HBsAg	TDF	24	>100	~1104	166.48	37.9	0	0	상승작용
HBeAg	TDF	24	>100	1087	0	0	0	0	부가적

*99.9% 신뢰 구간에서
#앞선 별개의 실험에서 결정됨

[0701]

[0702] **실시예 16**

[0703] **화합물 23 및 TDF의 시험관내 조합**

[0704] **연구 목적**

[0705] 화합물 **23** (아미노 크로만 화학적 부류에 속하는, HBV 캡시드화의 소형 분자 저해제) 및 테노포비르 (전구약물 테노포비르 디소프록실 푸마르산염, 또는 HBV 중합효소의 뉴클레오티드 유사체 저해제인 TDF의 형태에서)의 2개-약물 조합이 세포 배양 모형 시스템에서 HBV-감염된 인간 일차 간세포를 이용하여, 시험관내에서 부가적, 상승

적 또는 길항적인 지를 결정하기 위해.

[0706] **결과 및 결론**

[0707] TDF (3-배 희석 계열 및 5 포인트 적정에서 10.0 nM 내지 0.12 nM의 농도 범위)는 화합물 **23** (3-배 희석 계열 및 5 포인트 적정에서 2000 nM 내지 24.69 nM의 농도 범위)와 조합으로 시험되었다. 단독으로 또는 합동으로 화합물 **23** 또는 TDF 처리에서 관찰된 3개 복제물의 HBV DNA, HBsAg 및 HBeAg에서 평균 저해 % 및 표준 편차는 아래에 지시된 바와 같이 표 16a, 16b 및 16c에서 도시된다. TDF 및 화합물 **23**의 EC_{50} 값은 앞선 실험에서 결정되었고 표 16d에서 도시된다; 일부 변동이 상이한 로트의 PHH 세포로부터 관찰되었다.

[0708] 2개 저해제 조합의 관찰된 값이 상기 농도 범위에 대해 상가 작용으로부터 예상되는 것과 비교될 때, 이들 조합은 MacSynergy II 분석에 따라, 그리고 Prichard 및 Shipman (1992)에 의해 앞서 설명된 해석 규준을 이용하여, 길항작용이 없이 상승적 또는 부가적인 것으로 밝혀졌다 (표 16d). 세포 생존력 또는 증식의 어떤 유의미한 저해도 현미경검사 또는 CCK8 검정에 의해 관찰되지 않았다.

[0709] **표 16a: 화합물 23 및 TDF의 시험관내 조합에서 HBV DNA에 대한 효과**

[0710] [표 16a]

[약물]	0.00	24.69	74.07	222.22	666.67	2000.00	평균 저해 %
TDF (nM)							화합물 23 (nM)
10.00	22.03	15.63	21.53	50.31	68.1	83.45	
3.33	24.89	11.9	25.62	42.03	71.16	83.1	
1.11	24.36	27.41	25.29	49.82	71.34	85.27	
0.37	-4.64	15.87	10.9	25.68	66.73	79.5	
0.12	-19.34	14.57	16.57	17.02	55.55	74.8	
0.00	0	-15.33	-36.58	0.78	30.45	69.97	

[약물]	0.00	24.69	74.07	222.22	666.67	2000.00	표준 편차 (%)
TDF (nM)							화합물 23 (nM)
10.00	19.88	12.93	22.36	13.69	10.17	4.55	
3.33	25.42	13.82	12.76	20.92	9.9	3.38	
1.11	26.88	5.72	8.4	18.61	10.85	1	
0.37	22.45	24.04	16.71	27.51	6.72	2.89	
0.12	30.56	14.7	14.28	32.63	13.67	7.16	
0.00	28.21	25.59	43.45	19.95	15.55	7.23	

[약물]	0.00	24.69	74.07	222.22	666.67	2000.00	부가적 저해
TDF (nM)							화합물 23 (nM)
10.00	22.03	10.08	-6.49	22.64	45.77	76.59	
3.33	24.89	13.38	-2.59	25.48	47.76	77.44	
1.11	24.36	12.76	-3.31	24.95	47.39	77.29	
0.37	-4.64	-20.68	-42.92	-3.82	27.22	68.58	
0.12	-19.34	-37.63	-62.99	-18.41	17	64.16	
0.00	0	-15.33	-36.58	0.78	30.45	69.97	

[약물]	0	24.691	74.074	222.22	666.67	2000	상승작용 플롯 (99.9%)
TDF (nM)							본페로니 수정 98%
10.00	0	0	0	0	0	0	상승작용 60.83
3.33	0	0	0	0	0	0	로그 용적 13.85
1.11	0	0	0.9556	0	0	4.689	
0.37	0	0	0	0	17.3945	1.4090	길항작용 0
0.12	0	3.8223	32.5645	0	0	0	로그 용적 0
0.00	0	0	0	0	0	0	

[0711]

[0712] **표 16b: 화합물 23 및 TDF의 시험관내 조합에서 HBsAg에 대한 효과**

[0713] [표 16b]

[약물]	0.00	24.69	74.07	222.22	666.67	2000.00	평균 저해 %
TDF (nM)							화합물 23 (nM)
10.00	-5.9	-11.76	-17.98	-10.56	-12.07	-5.13	
3.33	-0.9	-8.32	2.74	5.75	3.08	8.14	
1.11	0.79	6.63	9.86	9.96	9.87	13.55	
0.37	-0.3	10.94	6.53	9.48	6.86	12.89	
0.12	3.39	8.13	3.59	3.99	1.92	13.78	
0.00	0	-13.89	-10.9	-11.64	-4.45	0.48	

[약물]	0.00	24.69	74.07	222.22	666.67	2000.00	표준 편차 (%)
TDF (nM)							화합물 23 (nM)
10.00	11.44	13.32	9.26	9.99	12.92	6.2	
3.33	16.11	12.81	5.08	1.71	3.38	5.79	
1.11	19.99	5.11	10.31	10.32	3.11	4.85	
0.37	21.73	2.38	8.21	5.77	9.18	7.38	
0.12	9.05	3.32	4.82	11.75	7.08	9.54	
0.00	14.56	6.27	5.47	14.27	11.74	9.35	

[약물]	0.00	24.69	74.07	222.22	666.67	2000.00	부가적 저해
TDF (nM)							화합물 23 (nM)
10.00	-5.9	-20.61	-17.44	-18.23	-10.61	-5.39	
3.33	-0.9	-14.92	-11.9	-12.64	-5.39	-0.42	
1.11	0.79	-12.99	-10.02	-10.76	-3.62	1.27	
0.37	-0.3	-14.23	-11.23	-11.97	-4.76	0.18	
0.12	3.39	-10.03	-7.14	-7.86	-0.91	3.85	
0.00	0	-13.89	-10.9	-11.64	-4.45	0.48	

[약물]	0	24.691	74.074	222.22	666.67	2000	상승작용 플롯 (99.9%)	
TDF (nM)							본페로니 수정	98%
10.00	0	0	0	0	0	0	상승작용	45.85
3.33	0	0	0	12.7624	0	0	로그 용적	10.44
1.11	0	2.8029	0	0	3.2549	0		
0.37	0	17.3374	0	2.4609	0	0	길항작용	0
0.12	0	7.2338	0	0	0	0	로그 용적	0
0.00	0	0	0	0	0	0		

[0714]

[0715] **표 16c: 화합물 23 및 TDF의 시험관내 조합에서 HBeAg에 대한 효과**

[0716] [표 16c]

[약물]	0.00	24.69	74.07	222.22	666.67	2000.00
TDF (nM)						
10.00	0.72	-10.51	-5.28	-10.54	-11.8	-5.49
3.33	9.05	-5.09	3.12	2.98	4.06	4.28
1.11	12.78	7.59	9.52	0.77	7	7.24
0.37	6.74	4.37	2.31	6.35	6.4	10.51
0.12	4.4	8.09	5.22	-0.68	6.5	7.62
0.00	0	-8.82	-6.36	-12.71	-7.94	-1.09

평균 저해 %

화합물 23 (nM)

[약물]	0.00	24.69	74.07	222.22	666.67	2000.00
TDF (nM)						
10.00	10.78	17.81	6.61	8.4	11.1	15.98
3.33	9.99	19.89	13.21	11.51	7.78	17.13
1.11	8.33	4.36	8.23	7.06	4.64	6.33
0.37	12.35	9.41	8.19	15.07	13.35	17.74
0.12	5.94	2.55	2.72	11.85	7.25	9.82
0.00	16.27	1.94	6.49	8.83	9.47	7.31

표준 편차 (%)

화합물 23 (nM)

[약물]	0.00	24.69	74.07	222.22	666.67	2000.00
TDF (nM)						
10.00	0.72	-8.04	-5.59	-11.9	-7.16	-0.36
3.33	9.05	1.03	3.27	-2.51	1.83	8.06
1.11	12.78	5.09	7.23	1.69	5.85	11.83
0.37	6.74	-1.49	0.81	-5.11	-0.66	5.72
0.12	4.4	-4.03	-1.68	-7.75	-3.19	3.36
0.00	0	-8.82	-6.36	-12.71	-7.94	-1.09

부가적 저해

화합물 23 (nM)

[약물]	0	24.691	74.074	222.22	666.67	2000
TDF (nM)						
10.00	0	0	0	0	0	0
3.33	0	0	0	0	0	0
1.11	0	0	0	0	0	0
0.37	0	0	0	0	0	0
0.12	0	3.72795	0	0	0	0
0.00	0	0	0	0	0	0

상승작용 플롯 (99.9%)

본페로니 수정	98%
상승작용	3.73
로그 용적	0.85
길항작용	0
로그 용적	0

[0717]

[0718] **표 16d: PHH 세포 배양 시스템에서 화합물 23 및 TDF의 시험관내 조합 연구의 결과의 요약:**

[0719] [표 16d]

HBV 검정 종결점	저해제 A	저해제 B	저해제 A EC_{50} (nM)#	저해제 B EC_{50} (nM)#	상승작용 용적 ($\mu M^2\%$)*	상승작용 로그 용적	길항작용 용적 ($\mu M^2\%$)*	길항작용 로그 용적	결론
HBV DNA	TDF	화합물 23	5.62	229.6	60.83	13.85	0	0	상승작용
HBsAg	TDF	화합물 23	>100	4.36	45.85	10.44	0	0	상승작용
HBeAg	TDF	화합물 23	>100	4.53	3.73	0.85	0	0	부가적

*99.9% 신뢰 구간에서
#앞선 별개의 실험에서 결정됨

[0720]

[0721] **실시예 17**

[0722] **화합물 23 및 TAF의 시험관내 조합**

[0723] **시험관내 조합 연구 목적:**

[0724] 화합물 **23** (아미노 크로만 화학적 부류에 속하는, HBV 캡시드화의 소형 분자 저해제) 및 테노포비르 (전구약물

테노포비르 알라페나미드, 또는 HBV 중합효소의 뉴클레오티드 유사체 저해제인 TAF의 형태에서)의 2개-약물 조합이 세포 배양 모형 시스템에서 HBV-감염된 인간 일차 간세포를 이용하여, 시험관내에서 부가적, 상승적 또는 길항적인 지를 결정하기 위해.

[0725] **결과 및 결론**

[0726] TAF (3-배 희석 계열 및 5 포인트 적정에서 10.0 nM 내지 0.12 nM의 농도 범위)는 화합물 **23** (3-배 희석 계열 및 5 포인트 적정에서 2000 nM 내지 24.69 nM의 농도 범위)와 조합으로 시험되었다. 단독으로 또는 합동으로 화합물 **23** 또는 TAF 처리에서 관찰된 3개 복제물의 HBV DNA 및 HBsAg에서 평균 저해 % 및 표준 편차는 아래에 지시된 바와 같이 표 17a 및 17b에서 도시된다. TAF 및 화합물 **23**의 EC_{50} 값은 앞선 실험에서 결정되었고 표 17c에서 도시된다; 일부 변동이 상이한 로트의 PHH 세포로부터 관찰되었다.

[0727] 2개 저해제 조합의 관찰된 값이 상기 농도 범위에 대해 상가 작용으로부터 예상되는 것과 비교될 때, 이들 조합은 MacSynergy II 분석에 따라, 그리고 Prichard 및 Shipman (1992)에 의해 앞서 설명된 해석 규준을 이용하여, 길항작용이 없이 부가적인 것으로 밝혀졌다 (표 17c). 세포 생존력 또는 증식의 어떤 유의미한 저해도 현미경검사 또는 CCK8 검정에 의해 관찰되지 않았다.

[0728] **표 17a: 화합물 23 및 TAF의 시험관내 조합에서 HBV DNA에 대한 효과**

[0729] [표 17a]

[약물]	0	24.69	74.07	222.22	666.67	2000	평균 저해 %
TAF (nM)							화합물 23 (nM)
0.00							
10.00	43.33	52.66	53.67	61.85	59.03	65.33	
3.33	42.6	41.59	42.58	42.01	55.87	53.47	
1.11	2.73	26	24.84	30.46	45.15	52.57	
0.37	11.59	10.66	15.11	15.55	38.82	64.27	
0.12	6.36	12.62	-10.64	15.2	36.81	52.56	
0.00	0	-4.57	-2.49	11.13	30.46	58.13	

[약물]	0	24.69	74.07	222.22	666.67	2000	표준 편차 (%)
TAF (nM)							화합물 23 (nM)
10.00	19.23	6.09	16.14	6.57	11.43	9.3	
3.33	5.15	11.48	8.01	13.55	8.93	4.21	
1.11	16.85	19.39	8.78	4.56	12.22	8.28	
0.37	14.07	2.95	9.65	20.83	4.73	0.79	
0.12	4.65	9.48	19.93	6.28	0.72	12.12	
0.00	0.02	8.18	25.79	14.9	9.52	3.29	

[약물]	0	24.69	74.07	222.22	666.67	2000	부가적 저해
TAF (nM)							화합물 23 (nM)
10.00	43.33	40.74	41.92	49.64	60.59	76.27	
3.33	42.6	39.98	41.17	48.99	60.08	75.97	
1.11	2.73	-1.72	0.31	13.56	32.36	59.27	
0.37	11.59	7.55	9.39	21.43	38.52	62.98	
0.12	6.36	2.08	4.03	16.78	34.88	60.79	
0.00	0	-4.57	-2.49	11.13	30.46	58.13	

[약물]	0	24.69	74.07	222.22	666.67	2000	상승작용 플롯 (99.9%)	
TAF (nM)							본페로니 수정	98%
10.00	0	0	0	0	0	0	상승작용	1.89
3.33	0	0	0	0	0	-8.6449	로그 용적	0.43
1.11	0	0	0	1.89304	0	0		
0.37	0	0	0	0	0	0	길항작용	-8.64
0.12	0	0	0	0	0	0	로그 용적	-1.97
0.00	0	0	0	0	0	0		

[0730]

[0731] **표 17b: 화합물 23 및 TAF의 시험관내 조합에서 HBsAg에 대한 효과**

[0732] [표 17b]

[약물]	0	24.69 1	74.07 4	222.2 2	666.6 7	2000	평균 저해 %
TAF (nM)							화합물 23 (nM)
0.00							
10.00	6.38	6.2	3.4	-8.69	5.26	23.51	
3.33	16.12	9.58	9.56	0.37	11.57	28.58	
1.11	29.66	18.05	20.47	9.86	18.31	33.24	
0.37	7.04	11.13	3.66	-2.3	-2.92	22.22	-
0.12	22.99	21.29	19.81	16.79	8.85	28.41	
0.00	0	0.77	-5.27	4.83	1.95	22.77	

[약물]	0	24.69 1	74.07 4	222.2 2	666.6 7	2000	표준 편차 (%)
TAF (nM)							화합물 23 (nM)
10.00	3.03	12.27	11.65	6.93	7.08	10.25	
3.33	3.66	2.28	2.6	17.49	9.97	8.2	
1.11	9.01	17.67	8.37	8.64	8.88	5.26	
0.37	9.67	9.77	10.47	17.15	5.76	1.93	-
0.12	3.68	9.92	15.76	11.59	9.9	13.42	
0.00	1.83	21.63	8.58	26.08	6.99	7.12	

[약물]	0	24.69 1	74.07 4	222.2 2	666.6 7	2000	부가적 저해
TAF (nM)							화합물 23 (nM)
10.00	6.38	7.1	1.45	10.9	8.21	27.7	
3.33	16.12	16.77	11.7	20.17	17.76	35.22	
1.11	29.66	30.2	25.95	33.06	31.03	45.68	
0.37	7.04	7.76	2.14	11.53	8.85	28.21	-
0.12	22.99	23.58	18.93	26.71	24.49	40.53	
0.00	0	0.77	-5.27	4.83	1.95	22.77	

[약물]	0	24.69 1	74.07 4	222.2 2	666.6 7	2000	상승작용 플롯 (99.9%)
TAF (nM)							쉬베로니 수정 98%
10.00	0	0	0	0	0	0	상승작용 0
3.33	0	0	0	0	0	0	로그 용적 0
1.11	0	0	0	0	0	0	
0.37	0	0	0	0	0	0	길항작용 0
0.12	0	0	0	0	0	0	로그 용적 0
0.00	0	0	0	0	0	0	

[0733]

[0734] **표 17c: PHH 세포 배양 시스템에서 화합물 23 및 TAF의 시험관내 조합 연구의 결과의 요약:**

[0735] [표 17c]

HBV 검정 종결점	저해제 A	저해제 B	저해제 A EC_{50} (nM)#	저해제 B EC_{50} (nM)#	상승작용 용적 ($\mu M^2\%$)*	상승작용 로그 용적	길항작용 용적 ($\mu M^2\%$)*	길항작용 로그 용적	결론
HBV DNA	TAF	화합물 23	0.405	229.6	1.89	0.43	-8.64	-1.97	부가적
HBsAg	TAF	화합물 23	>100	4.36	0	0	0	0	부가적

*99.9% 신뢰 구간에서
#앞선 별개의 실험에서 결정됨

[0736]

[0737] **실시예 18**

[0738] **IFNα2a 및 화합물 25의 시험관내 조합**

[0739] **연구 목적**

[0740] 화합물 **25** (디히드로퀴놀리지논 화학적 부류에 속하는, HBV DNA, HBsAg 및 HBeAg의 소형 분자 저해제) 및 페길화된 인터페론 알파 2a (IFNα2a, 간세포에서 선천성 면역 경로를 활성화시키는 항바이러스성 사이토킨)의 2개-약물 조합이 세포 배양 모형 시스템에서 HBV-감염된 인간 일차 간세포를 이용하여, 시험관내에서 부가적, 상승적 또는 길항적인 지를 결정하기 위해.

[0741] **결과 및 결론**

[0742] IFNα2a (3-배 희석 계열 및 5 포인트 적정에서 10.0 IU/mL 내지 0.123 IU/mL의 농도 범위)는 화합물 **25** (3-배 희석 계열 및 5 포인트 적정에서 10.0 nM 내지 0.12 nM의 농도 범위)와 조합으로 시험되었다. 단독으로 또는 합동으로 IFNa2a 또는 화합물 **25** 처리에서 관찰된 3개 복제물의 HBV DNA, HBsAg 및 HBeAg에서 평균 저해 % 및 표준 편차는 아래에 지시된 바와 같이 표 18a, 18b 및 18c에서 도시된다. IFNα2a 및 화합물 **25**의 EC_{50} 값은 앞선 실험에서 결정되었고 표 18d에서 도시된다; 일부 변동이 상이한 로트의 PHH 세포로부터 관찰되었다.

[0743] 2개 저해제 조합의 관찰된 값이 상기 농도 범위에 대해 상가 작용으로부터 예상되는 것과 비교될 때, 이들 조합은 MacSynergy II 분석에 따라, 그리고 Prichard 및 Shipman (1992)에 의해 앞서 설명된 해석 규준을 이용하여, 길항작용이 없이 상승적인 것으로 밝혀졌다 (표 18d). 세포 생존력 또는 증식의 어떤 유의미한 저해도 현미경검사 또는 CCK8 검정에 의해 관찰되지 않았다.

[0744] **표 18a: IFNα2a 및 화합물 25의 시험관내 조합에서 HBV DNA에 대한 효과**

[0745] [표 18a]

[약물]	0.00	0.12	0.37	1.11	3.33	10.00	평균 저해 % 화합물 25 (μM)
IFNα2a IU/mL							
10.00	58.66	72.01	77.55	74.4	74.57	75.72	
3.33	46.92	70.84	75.67	71.52	79.37	81.47	
1.11	32.66	60.24	64.08	65.29	76.55	76.76	
0.37	22.81	48.83	55.68	55.85	71.09	75.44	
0.12	-19.84	40.19	39.08	36.54	65.34	64.9	
0.00	0	-14.4	-9.87	4.3	32.64	53.78	

[약물]	0.00	0.12	0.37	1.11	3.33	10.00	표준 편차 (%) 화합물 25 (μM)
IFNα2a IU/mL							
10.00	8.37	0.96	1.44	5.16	6.13	9.02	
3.33	6.8	2.16	3.21	1.91	3.01	4.5	
1.11	7.03	10.58	6.34	2.57	2.47	2.79	
0.37	6.72	4.66	7.04	12.83	7.17	1.6	
0.12	15.09	10.34	11.46	15.82	5.84	3.79	
0.00	26.83	27.99	12.43	13.96	21.25	5.81	

[약물]	0.00	0.12	0.37	1.11	3.33	10.00	부가적 저해 화합물 25 (μM)
IFNα2a IU/mL							
10.00	58.66	52.71	54.58	60.44	72.15	80.89	
3.33	46.92	39.28	41.68	49.2	64.25	75.47	
1.11	32.66	22.96	26.01	35.56	54.64	68.88	
0.37	22.81	11.69	15.19	26.13	48	64.32	
0.12	-19.84	-37.1	-31.67	-14.69	19.28	44.61	
0.00	0	-14.4	-9.87	4.3	32.64	53.78	

[약물]	0	0.1235	0.3704	1.1111	3.3333	10	상승작용 플롯 (99.9%)	
IFNα2a IU/mL							본페로니 수정	98%
10.00	0	16.1406	18.231	0	0	0	상승작용	314.15
3.33	0	24.4514	23.4259	16.0342	5.21409	0	로그 용적	71.51
1.11	0	2.46122	17.2051	21.2721	13.7812	0		
0.37	0	21.8039	17.3214	0	0	5.8544	길항작용	0
0.12	0	43.2611	33.0351	0	26.8406	7.81711	로그 용적	0
0.00	0	0	0	0	0	0		

[0746]

[0747] **표 18b: IFNα2a 및 화합물 25의 시험관내 조합에서 HBsAg에 대한 효과**

[0748] [표 18b]

[약물]	0.00	0.12	0.37	1.11	3.33	10.00	평균 저해 %
IFN α 2a							화합물 25 (μM)
IU/mL							
10.00	22.77	27.23	22.41	30.25	37.23	63.56	
3.33	18.32	28.86	27.09	35.53	43.71	66.88	
1.11	10.57	27	31.57	31.22	38.7	66.37	
0.37	2.74	18.78	15.98	25.14	34.24	60.44	-
0.12	-4.08	11.87	10.92	14.5	34.52	56.65	
0.00	0	-5.64	-7.52	-7.33	8.81	42.49	

[약물]	0.00	0.12	0.37	1.11	3.33	10.00	표준 편차 (%)
IFN α 2a							화합물 25 (μM)
IU/mL							
10.00	8.68	6.97	2.29	4.73	7.98	4.01	
3.33	9.52	6.19	6.14	6.04	6.94	4.47	
1.11	2.72	4.07	4.71	1.23	4.72	0.28	
0.37	8.08	2.56	1.27	2.26	2.05	4.7	-
0.12	6.17	2.65	2.53	0.54	1.95	2.99	
0.00	7	8.29	12.25	8.62	8.49	4.98	

[약물]	0.00	0.12	0.37	1.11	3.33	10.00	부가적 저해
IFN α 2a							화합물 25 (μM)
IU/mL							
10.00	22.77	18.41	16.96	17.11	29.57	55.59	
3.33	18.32	13.71	12.18	12.33	25.52	53.03	
1.11	10.57	5.53	3.84	4.01	18.45	48.57	
0.37	2.74	-2.75	-4.57	-4.39	11.31	44.07	-
0.12	-4.08	-9.95	-11.91	-11.71	5.09	40.14	
0.00	0	-5.64	-7.52	-7.33	8.81	42.49	

[약물]	0	0.1235	0.3704	1.1111	3.3333	10	상승작용 플롯 (99.9%)
IFN α 2a							본페로니 수정 98%
IU/mL							
10.00	0	0	0	0	0	0	상승작용 218.76
3.33	0	0	0	3.32236	0	0	로그 용적 49.8
1.11	0	8.07563	12.2294	23.1621	4.71648	16.8785	
0.37	0	13.105	16.3704	22.0923	16.1835	0.9023	길항작용 0
0.12	0	13.0989	14.5038	24.4329	23.0126	6.6699	로그 용적 0
0.00	0	0	0	0	0	0	

[0749]

[0750] **표 18c: IFNα2a 및 화합물 25의 시험관내 조합에서 HBeAg에 대한 효과**

[0751] [표 18c]

[약물]	0.00	0.12	0.37	1.11	3.33	10.00	평균 저해 % 화합물 25 (μM)
10.00	17.32	33.64	22.73	25.58	32.72	51.97	
3.33	6.47	24.71	20.71	19.06	27.19	49	
1.11	-1.13	21.52	18.25	15.99	19.2	47.55	
0.37	-12.17	10.2	8.56	12.48	14.45	40.46	-
0.12	-21.05	1.9	3.84	0.95	15.57	36.99	
0.00	0	-11.25	-13.81	-16.8	-7.31	22.04	

[약물]	0.00	0.12	0.37	1.11	3.33	10.00	표준 편차 (%) 화합물 25 (μM)
IFN α 2a IU/mL							
10.00	11.74	4.4	2.35	5.73	3.68	4.09	
3.33	19.07	8.01	1.6	5.75	14.7	8.73	
1.11	17.14	4.93	2.29	7.45	9.68	6.75	
0.37	26.1	2.4	6.51	8.28	5.47	9	-
0.12	25.35	7.46	12.09	14.46	9.05	10.23	
0.00	19.06	11.33	16.27	24	19.27	14.29	

[약물]	0.00	0.12	0.37	1.11	3.33	10.00	부가적 저해 화합물 25 (μM)
IFN α 2a IU/mL							
10.00	17.32	8.02	5.9	3.43	11.28	35.54	
3.33	6.47	-4.05	-6.45	-9.24	-0.37	27.08	
1.11	-1.13	-12.51	-15.1	-18.12	-8.52	21.16	
0.37	-12.17	-24.79	-27.66	-31.01	-20.37	12.55	-
0.12	-21.05	-34.67	-37.77	-41.39	-29.9	5.63	
0.00	0	-11.25	-13.81	-16.8	-7.31	22.04	

[약물]	0	0.1235	0.3704	1.1111	3.3333	10	상승작용 플롯 (99.9%)	
IFN α 2a IU/mL							본페로니 수정	98%
10.00	0	11.1396	9.096155	3.29257	9.32912	2.96981	상승작용	231.36
3.33	0	2.39909	21.89446	9.37675	0	0	로그 용적	52.67
1.11	0	17.8054	25.81366	9.59205	0	4.17575		
0.37	0	27.0916	14.79566	16.2405	16.81822	0	길항작용	0
0.12	0	12.0191	1.821811	0	15.68655	0	로그 용적	0
0.00	0	0	0	0	0	0		

[0752]

[0753] **표 18d: PHH 세포 배양 시스템에서 IFN α 2a 및 화합물 25의 시험관내 조합 연구의 결과의 요약:**

[0754] [표 18d]

HBV 검정 종결점	저해제 A	저해제 B	저해제 A EC_{50} (IU/mL) #	저해제 B EC_{50} (nM)#	상승작용 용적 ($\mu M^2\%$)*	상승작용 로그 용적	길항작용 용적 ($\mu M^2\%$)*	길항작용 로그 용적	결론
HBV DNA	IFN α 2a	화합물 25	2.154	0.654	314.15	71.51	0	0	상승작용
HBsAg	IFN α 2a	화합물 25	13.8	4.503	218.76	49.8	0	0	상승작용
HBeAg	IFN α 2a	화합물 25	10.24	5.75	231.36	52.67	0	0	상승작용

*99.9% 신뢰 구간에서
#앞선 별개의 실험에서 결정됨

[0755]

[0756] **실시예 19**

[0757] **화합물 25 및 화합물 3의 시험관내 조합**

[0758] **연구 목적**

[0759] 화합물 **3** (술파모일 벤즈아미드 화학적 부류에 속하는, HBV 캡시드화의 소형 분자 저해제) 및 화합물 **25** (디히드로퀴놀리지논 화학적 부류에 속하는, HBV DNA, HBsAg 및 HBeAg의 소형 분자 저해제)의 2개-약물 조합이 세포

배양 모형 시스템에서 HBV-감염된 인간 일차 간세포를 이용하여, 시험관내에서 부가적, 상승적 또는 길항적인지를 결정하기 위해.

[0760] **결과 및 결론**

[0761] 화합물 **25** (3-배 희석 계열 및 5 포인트 적정에서 10.0 nM 내지 0.12 nM의 농도 범위)는 화합물 **3** (3-배 희석 계열 및 5 포인트 적정에서 5000 nM 내지 61.73 nM의 농도 범위)와 조합으로 시험되었다. 단독으로 또는 합동으로 화합물 **25** 또는 화합물 **3** 처리에서 관찰된 3개 복제물의 HBV DNA, HBsAg 및 HBeAg에서 평균 저해 % 및 표준 편차는 아래에 지시된 바와 같이 표 19a, 19b 및 19c에서 도시된다. 화합물 **25** 및 화합물 **3**의 EC_{50} 값은 앞선 실험에서 결정되었고 표 19d에서 도시된다; 일부 변동이 상이한 로트의 PHH 세포로부터 관찰되었다.

[0762] 2개 저해제 조합의 관찰된 값이 상기 농도 범위에 대해 상가 작용으로부터 예상되는 것과 비교될 때, 이들 조합은 MacSynergy II 분석에 따라, 그리고 Prichard 및 Shipman (1992)에 의해 앞서 설명된 해석 규준을 이용하여, 길항작용이 없이 상승적인 것으로 밝혀졌다 (표 19d). 세포 생존력 또는 증식의 어떤 유의미한 저해도 분석된 표본에서 현미경검사 또는 CCK8 검정에 의해 관찰되지 않았다.

[0763] **표 19a: 화합물 25 및 화합물 3의 시험관내 조합에서 HBV DNA에 대한 효과**

[0764] [표 19a]

[약물]	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	평균 저해 % 화합물 3 (nM)
화합물 25 nM							
10.00	28	53.83	59.64	61.48	75.31	83.32	
3.33	15.24	52.77	48.78	55.49	77.84	86.19	
1.11	5.69	32.55	40.25	48.87	68.73	85.52	
0.37	-51.8	21.47	28.54	33.37	64.04	83.77	
0.12	-20.98	17.18	18.75	27.78	58.12	84.2	
0.00	0	-28.13	-25.93	-3.32	25.94	74.78	

[약물]	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	표준 편차 (%) 화합물 3 (nM)
화합물 25 nM							
10.00	13.66	6.65	4.22	12.05	4.52	3.89	
3.33	15.64	6.92	3.55	5.98	2.73	2.62	
1.11	2.13	7.36	12.67	3.75	8.6	1.07	
0.37	7.11	11.02	11.57	16.68	4.9	3.83	
0.12	6.37	6.92	8.03	5.44	6.89	1.72	
0.00	37.96	6.82	12.75	12.54	6.98	2.18	

[약물]	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	부가적 저해 화합물 3 (nM)
화합물 25 nM							
10.00	28	7.75	9.33	25.61	46.68	81.84	
3.33	15.24	-8.6	-6.74	12.43	37.23	78.62	
1.11	5.69	-20.84	-18.76	2.56	30.15	76.22	
0.37	-51.8	-94.5	-91.16	-56.84	-12.42	61.72	
0.12	-20.98	-55.01	-52.35	-25	10.4	69.49	
0.00	0	-28.13	-25.93	-3.32	25.94	74.78	

[약물]	0	61.728	185.19	555.56	1666.7	5000	상승작용 플롯 (99.9%) 분제로니 수정	98%
화합물 25 nM								
10.00	0	24.1949	36.422	0	13.7547	0	상승작용	737.8
3.33	0	38.5963	43.837	23.3798	31.6256	0	로그 용적	167.96
1.11	0	29.1682	17.3138	33.9688	10.2774	5.77863		
0.37	0	79.7032	81.6231	35.3161	60.3341	9.44547	길항작용	0
0.12	0	49.4163	44.673	34.877	25.045	9.04948	로그 용적	0
0.00	0	0	0	0	0	0		

[0765]

[0766] **표 19b: 화합물 25 및 화합물 3의 시험관내 조합에서 HBsAg에 대한 효과**

[0767] [표 19b]

[약물]	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	평균 저해 % 화합물 3 (nM)
화합물 25 nM							
10.00	32.99	40.09	41.48	45.13	52.34	64.84	
3.33	13.12	26.32	28.85	30.97	34.56	54.59	
1.11	-3.18	21.32	20.73	21.99	32.47	56.21	
0.37	-5.09	13.81	9.92	8.14	27.4	51.59	
0.12	3.68	7.53	8.59	12.88	22.46	48.46	
0.00	0	-20.02	-17.32	-13.99	1.44	28.25	

[약물]	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	표준 편차 (%) 화합물 3 (nM)
화합물 25 nM							
10.00	11.76	5.21	4.72	1.8	3.51	4.34	
3.33	6.7	5	8.24	5.49	2.08	2.72	
1.11	2.66	0.74	5.4	3.5	4.64	4.3	
0.37	3.17	7.51	16.06	12.02	5.09	4.62	
0.12	2.76	6.34	8.52	9.71	4.5	5.28	
0.00	26.63	3.49	15.37	12.95	14.94	14.17	

[약물]	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	부가적 저해 화합물 3 (nM)
화합물 25 nM							
10.00	32.99	19.57	21.38	23.62	33.95	51.92	
3.33	13.12	-4.27	-1.93	0.97	14.37	37.66	
1.11	-3.18	-23.84	-21.05	-17.61	-1.69	25.97	
0.37	-5.09	-26.13	-23.29	-19.79	-3.58	24.6	
0.12	3.68	-15.6	-13	-9.8	5.07	30.89	
0.00	0	-20.02	-17.32	-13.99	1.44	28.25	

[약물]	0	61.728	185.19	555.56	1666.7	5000	상승작용 플롯 (99.9%) 본래로니 구청 98%
화합물 25 nM							
10.00	0	3.37389	4.56648	15.5862	6.83859	0	상승작용 257.49
3.33	0	14.1356	3.66216	11.9324	13.3447	7.97848	로그 용적 58.62
1.11	0	42.7247	24.0086	28.0815	18.8898	16.0887	
0.37	0	15.2246	0	0	14.2288	11.7856	길항작용 0
0.12	0	2.26506	0	0	2.58058	0.19352	로그 용적 0
0.00	0	0	0	0	0	0	

[0768]

[0769] **표 19c: 화합물 25 및 화합물 3의 시험관내 조합에서 HBeAg에 대한 효과**

[0770] [표 19c]

[약물]	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	평균 저해 %
화합물 25 nM							화합물 3 (nM)
10.00	33.17	29.55	32.13	35.12	45.53	56.72	
3.33	8.74	17.06	14.55	17.58	28.19	41.81	
1.11	4.51	14.84	10.85	17.54	27.32	48.49	
0.37	-0.51	7.18	2.63	7.03	20.64	40.75	-
0.12	5.33	4.76	-1.23	8.26	17.34	42.34	
0.00	0	-11.35	-16	-5.39	2.34	27.3	

[약물]	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	표준 편차 (%)
화합물 25 nM							화합물 3 (nM)
10.00	19.04	7.64	7.38	3.04	5.15	8.44	
3.33	17.53	4.42	4.02	3.71	1.17	3.68	
1.11	11.69	1.61	6.69	4.6	2.82	2.79	
0.37	17.52	6.16	9.21	11.25	2.17	4.33	-
0.12	17.42	6.48	8.81	8.1	1.87	4.94	
0.00	27.36	3.5	5.88	8.38	7.46	13.79	

[약물]	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	부가적 저해
화합물 25 nM							화합물 3 (nM)
10.00	33.17	25.58	22.48	29.57	34.73	51.41	
3.33	8.74	-1.62	-5.86	3.82	10.88	33.65	
1.11	4.51	-6.33	-10.77	-0.64	6.74	30.58	
0.37	-0.51	-11.92	-16.59	-5.93	1.84	26.93	-
0.12	5.33	-5.42	-9.82	0.23	7.55	31.17	
0.00	0	-11.35	-16	-5.39	2.34	27.3	

[약물]	0	61.728	185.19	555.56	1666.7	5000	상승작용 플롯 (99.9%) 본페로니 수정	98%
화합물 25 nM								
10.00	0	0	0	0	0	0	상승작용	80.56
3.33	0	4.1337	7.1801	1.5503	13.459	0	로그 용적	18.34
1.11	0	15.8715	0	3.0414	11.2994	8.7281		
0.37	0	0	0	0	11.6585	0	길항작용	0
0.12	0	0	0	0	3.6358	0	로그 용적	0
0.00	0	0	0	0	0	0		

[0771]

[0772] **표 19d: PHH 세포 배양 시스템에서 화합물 25 및 화합물 3의 시험관내 조합 연구의 결과의 요약:**

[0773] [표 19d]

HBV 검정 종결점	저해제 A	저해제 B	저해제 A EC_{50} (nM)#	저해제 B EC_{50} (nM)#	상승작용 용적 ($\mu M^2\%$)*	상승작용 로그 용적	길항작용 용적 ($\mu M^2\%$)*	길항작용 로그 용적	결론
HBV DNA	화합물 25	화합물 3	0.654	876.5	737.8	167.96	0	0	상승작용
HBsAg	화합물 25	화합물 3	4.503	7793	257.49	58.62	0	0	상승작용
HBeAg	화합물 25	화합물 3	5.75	8850	80.56	18.34	0	0	상승작용

*99.9% 신뢰 구간에서
#앞선 별개의 실험에서 결정됨

[0774]

[0775] **실시예 20**

[0776] **화합물 3 및 TAF의 시험관내 조합:**

[0777] **연구 목적**

[0778] 화합물 **3** (술파모일 벤즈아미드 화학적 부류에 속하는, HBV 캡시드화의 소형 분자 저해제) 및 테노포비르 (전구약물 테노포비르 알라페나미드, 또는 HBV 중합효소의 뉴클레오티드 유사체 저해제인 TAF의 형태에서)의 2개-약물 조합이 세포 배양 모형 시스템에서 HBV-감염된 인간 일차 간세포를 이용하여, 시험관내에서 부가적, 상승적 또는 길항적인 지를 결정하기 위해.

[0779] **결과 및 결론**

[0780] TAF (3-배 희석 계열 및 5 포인트 적정에서 10.0 nM 내지 0.12 nM의 농도 범위)는 화합물 **3** (3-배 희석 계열 및 5 포인트 적정에서 5560 nM 내지 68.64 nM의 농도 범위)와 조합으로 시험되었다. 단독으로 또는 합동으로 TAF 또는 화합물 **3** 처리에서 관찰된 3개 복제물의 HBV DNA, HBsAg 및 HBeAg에서 평균 저해 % 및 표준 편차는 아래에 지시된 바와 같이 표 20a, 20b 및 20c에서 도시된다. TAF 및 화합물 **3**의 EC_{50} 값은 앞선 실험에서 결정되었고 표 20d에서 도시된다; 일부 변동이 상이한 로트의 PHH 세포로부터 관찰되었다.

[0781] 2개 저해제 조합의 관찰된 값이 상기 농도 범위에 대해 상가 작용으로부터 예상되는 것과 비교될 때, 이들 조합은 MacSynergy II 분석에 따라, 그리고 Prichard 및 Shipman (1992)에 의해 앞서 설명된 해석 규준을 이용하여, 길항작용이 없이 부가적 또는 상승적인 것으로 밝혀졌다 (표 20d). 세포 생존력 또는 증식의 어떤 유의미한 저해도 분석된 표본에서 현미경검사 또는 CCK8 검정에 의해 관찰되지 않았다.

[0782] **표 20a: TAF 및 화합물 3의 시험관내 조합에서 HBV DNA에 대한 효과**

[0783] [표 20a]

[약물]	0.00	68.64	205.93	617.78	1853.33	5560.00	평균 저해 %
TAF (nM)							화합물 3 (nM)
3.70	78.31	76.66	75.83	84	83	87.22	
1.23	63.39	66.71	65.36	76.33	81.98	88.21	
0.41	28.78	50.25	43.6	56.51	77.12	86.4	
0.14	3.84	22.99	19.73	44.15	74.08	86.53	-
0.05	-8.77	15.84	18.49	40.03	71.93	83.56	
0.00	0	-2.79	-5.02	34.78	66.43	85.32	

[약물]	0.00	68.64	205.93	617.78	1853.33	5560.00	표준 편차 (%)
TAF (nM)							화합물 3 (nM)
3.70	4.13	5.74	5.65	2.86	6.34	3.87	
1.23	6.26	4	1.75	3.36	2.15	1.61	
0.41	15.82	4.83	4.35	8.44	2.31	0.77	
0.14	5.2	10.08	12.17	5.9	2.81	1.93	-
0.05	11.46	2.67	13.74	8.32	4	6.05	
0.00	19.74	24.58	16.02	21.37	3.11	3.19	

[약물]	0.00	68.64	205.93	617.78	1853.33	5560.00	부가적 저해
TAF (nM)							화합물 3 (nM)
3.70	78.31	77.7	77.22	85.85	92.72	96.82	
1.23	63.39	62.37	61.55	76.12	87.71	94.63	
0.41	28.78	26.79	25.2	53.55	76.09	89.54	
0.14	3.84	1.16	-0.99	37.28	67.72	85.88	-
0.05	-8.77	-11.8	-14.23	29.06	63.49	84.03	
0.00	0	-2.79	-5.02	34.78	66.43	85.32	

[약물]	0	68.642	205.93	617.78	1853.3	5560	상승작용 플롯 (99.9%)
TAF (nM)							본페로니 수정 98%
3.70	0	0	0	0	0	0	상승작용 30.5
1.23	0	0	0	0	0	-1.1215	로그 용적 6.94
0.41	0	7.5644 7	4.0841 5	0	0	-0.6059	
0.14	0	0	0	0	0	0	길항작용 -1.73
0.05	0	18.853	0	0	0	0	로그 용적 -0.39
0.00	0	0	0	0	0	0	

[0784]

[0785] **표 20b: TAF 및 화합물 3의 시험관내 조합에서 HBsAg에 대한 효과**

[0786] [표 20b]

[약물]	0.00	68.64	205.93	617.78	1853.33	5560.00
TAF (nM)						
3.70	-6.72	6.49	7.67	0.89	29.25	52.65
1.23	10.97	13.51	15.13	15.13	27.31	58.97
0.41	11.29	12.8	10.81	11.93	27.47	49.79
0.14	12.83	3.2	5.03	3.13	16.78	48.23
0.05	-7.35	-0.27	0.03	7.65	24.53	50.59
0.00	0	-16.35	-21.58	-5.12	14.6	43.83

평균 저해 %
화합물 3 (nM)

[약물]	0.00	68.64	205.93	617.78	1853.33	5560.00
TAF (nM)						
3.70	3.91	5.1	5.03	8.91	7.06	8.33
1.23	3.52	5.17	5.31	13	7.04	5.03
0.41	8.18	13.14	3.12	11.46	12.56	2.98
0.14	10.96	14.74	11.52	2.55	6.84	7.2
0.05	11.13	9.98	4.72	15.21	8.94	3.8
0.00	22.17	16.06	23.58	14.67	9.83	6.94

표준 편차 (%)
화합물 3 (nM)

[약물]	0.00	68.64	205.93	617.78	1853.33	5560.00
TAF (nM)						
3.70	-6.72	-24.17	-29.75	-12.18	8.86	40.06
1.23	10.97	-3.59	-8.24	6.41	23.97	49.99
0.41	11.29	-3.21	-7.85	6.75	24.24	50.17
0.14	12.83	-1.42	-5.98	8.37	25.56	51.04
0.05	-7.35	-24.9	-30.52	-12.85	8.32	39.7
0.00	0	-16.35	-21.58	-5.12	14.6	43.83

부가적 저해
화합물 3 (nM)

[약물]	0.00	68.64	205.93	617.78	1853.33	5560.00
TAF (nM)						
3.70	0	13.8759	20.8663	0	0	0
1.23	0	0.08553	5.89479	0	0	0
0.41	0	0	8.39208	0	0	0
0.14	0	0	0	0	0	0
0.05	0	0	15.0165	0	0	0
0.00	0	0	0	0	0	0

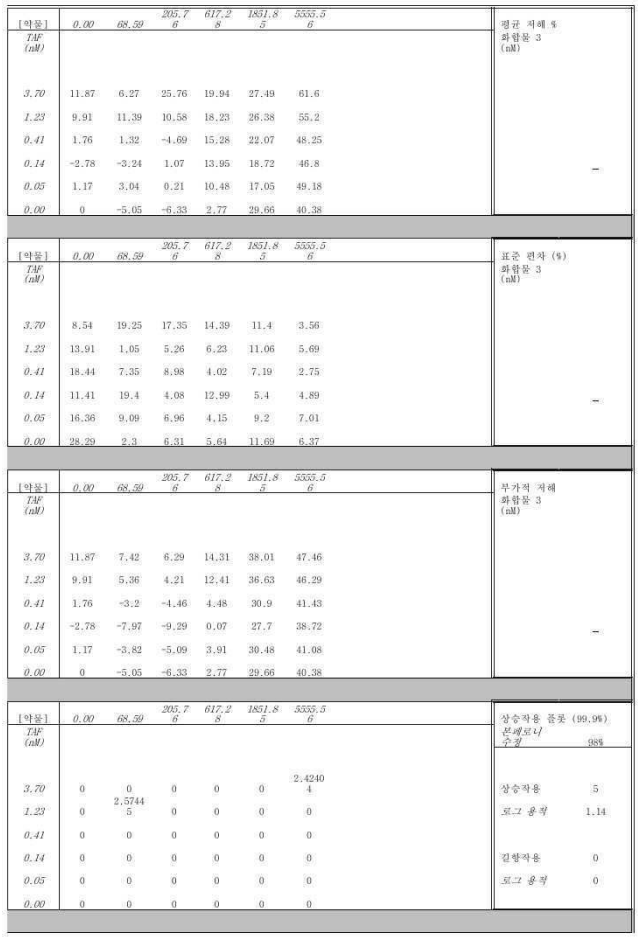
상승작용 플롯 (99.9%)
보베로니 수정 98%

상승작용	64.13
로그 용적	14.6
길항작용	0
로그 용적	0

[0787]

[0788] **표 20c: TAF 및 화합물 3의 시험관내 조합에서 HBeAg에 대한 효과**

[0789] [표 20c]



[약물]	0.00	68.59	205.76	617.28	1851.83	5555.56
TAF (nM)						
3.70	11.87	6.27	25.76	19.94	27.49	61.6
1.23	9.91	11.39	10.58	18.23	26.38	55.2
0.41	1.76	1.32	-4.69	15.28	22.07	48.25
0.14	-2.78	-3.24	1.07	13.95	18.72	46.8
0.05	1.17	3.04	0.21	10.48	17.05	49.18
0.00	0	-5.05	-6.33	2.77	29.66	40.38

평균 저해 % 화합물 3 (nM)

[약물]	0.00	68.59	205.76	617.28	1851.83	5555.56
TAF (nM)						
3.70	8.54	19.25	17.35	14.39	11.4	3.56
1.23	13.91	1.05	5.26	6.23	11.06	5.69
0.41	18.44	7.35	8.98	4.02	7.19	2.75
0.14	11.41	19.4	4.08	12.99	5.4	4.89
0.05	16.36	9.09	6.96	4.15	9.2	7.01
0.00	28.29	2.3	6.31	5.64	11.69	6.37

표준 편차 (%) 화합물 3 (nM)

[약물]	0.00	68.59	205.76	617.28	1851.83	5555.56
TAF (nM)						
3.70	11.87	7.42	6.29	14.31	38.01	47.46
1.23	9.91	5.36	4.21	12.41	36.63	46.29
0.41	1.76	-3.2	-4.46	4.48	30.9	41.43
0.14	-2.78	-7.97	-9.29	0.07	27.7	38.72
0.05	1.17	-3.82	-5.09	3.91	30.48	41.08
0.00	0	-5.05	-6.33	2.77	29.66	40.38

부가적 저해 화합물 3 (nM)

[약물]	0.00	68.59	205.76	617.28	1851.83	5555.56
TAF (nM)						
3.70	0	0	0	0	0	2.4240 4
1.23	0	2.5744 5	0	0	0	0
0.41	0	0	0	0	0	0
0.14	0	0	0	0	0	0
0.05	0	0	0	0	0	0
0.00	0	0	0	0	0	0

상승작용 플롯 (99.9%) 본페로니 수정 988

상승작용	5
로그 용적	1.14
길항작용	0
로그 용적	0

[0790]

[0791] **표 20d: PHH 세포 배양 시스템에서 TAF 및 화합물 3의 시험관내 조합 연구의 결과의 요약:**

[0792] [표 20d]

HBV 검정 종결점	저해제 A	저해제 B	저해제 A EC_{50} (nM)#	저해제 B EC_{50} (nM)#	상승작용 용적 (μM^2%)*	상승작용 로그 용적	길항작용 용적 (μM^2%)*	길항작용 로그 용적	결론
HBV DNA	TAF	화합물 3	0.405	876.5	30.5	6.94	-1.73	-0.39	상승작용
HBsAg	TAF	화합물 3	>100	7793	64.13	14.6	0	0	상승작용
HBeAg	TAF	화합물 3	>100	8850	5.0	1.14	0	0	부가적

*99.9% 신뢰 구간에서

#앞선 별개의 실험에서 결정됨

[0793]

[0794] **실시예 21**

[0795] **IFNα2a 및 화합물 22의 시험관내 조합**

[0796] **연구 목적**

[0797] 화합물 **22** (술파모일 벤즈아미드 화학적 부류에 속하는, HBV 캡시드화의 소형 분자 저해제) 및 페길화된 인터페론 알파 2a (IFNα2a, 간세포에서 선천성 면역 경로를 활성화시키는 항바이러스성 사이토킨)의 2개-약물 조합이 세포 배양 모형 시스템에서 HBV-감염된 인간 일차 간세포를 이용하여, 시험관내에서 부가적, 상승적 또는 길항적인 지를 결정하기 위해.

[0798] **결과 및 결론**

[0799] IFNα2a (3-배 희석 계열 및 5 포인트 적정에서 10.0 IU/mL 내지 0.123 IU/mL의 농도 범위)는 화합물 **22** (3-배

희석 계열 및 5 포인트 적정에서 5000 nM 내지 61.721 nM의 농도 범위)와 조합으로 시험되었다. 단독으로 또는 합동으로 IFNa2a 또는 화합물 **22** 처리에서 관찰된 3개 복제물의 HBV DNA, HBsAg 및 HBeAg에서 평균 저해 % 및 표준 편차는 아래에 지시된 바와 같이 표 21a, 21b 및 21c에서 도시된다. IFNα2a 및 화합물 **22**의 EC_{50} 값은 앞선 실험에서 결정되었고 표 21d에서 도시된다; 일부 변동이 상이한 로트의 PHH 세포로부터 관찰되었다.

[0800] 2개 저해제 조합의 관찰된 값이 상기 농도 범위에 대해 상가 작용으로부터 예상되는 것과 비교될 때, 이들 조합은 MacSynergy II 분석에 따라, 그리고 Prichard 및 Shipman (1992)에 의해 앞서 설명된 해석 규준을 이용하여, 길항작용이 없이 부가적 내지 상승적인 것으로 밝혀졌다 (표 21d). 세포 생존력 또는 증식의 어떤 유의미한 저해도 분석된 표본에서 현미경검사 또는 CCK8 검정에 의해 관찰되지 않았다.

[0801] **표 21a: IFNα2a 및 화합물 22의 시험관내 조합에서 HBV DNA에 대한 효과**

[0802] [표 21a]

[약물]	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	평균 저해 %
IFNα2a							화합물 22 (μM)
IU/mL							
10.00	59	70.58	67.36	66.34	75.72	83.3	
3.33	52.39	69.79	71.36	68.3	72.01	84.76	
1.11	28.08	59.77	59.61	55.17	63.22	80.59	
0.37	6.59	44.09	42.48	42.82	61.33	75.33	
0.12	-18.56	29.97	23.99	27.7	45.63	78.65	
0.00	0	-9.02	-33.53	-13.72	22.31	69.19	

[약물]	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	표준 편차 (%)
IFNα2a							화합물 22 (μM)
IU/mL							
10.00	7.24	3.95	0.56	10.17	3.06	4.6	
3.33	11.43	3.1	4.52	7.4	11.11	4.42	
1.11	16.44	2.71	2.78	22.26	6.66	1.34	
0.37	33.49	11.81	2.73	7.7	14.25	1.86	
0.12	23.97	16.1	11.97	10.1	9.2	2.49	
0.00	35.38	12.95	29.16	24.96	22.77	2.75	

[약물]	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	부가적 저해
IFNα2a							화합물 22 (μM)
IU/mL							
10.00	59	55.3	45.25	53.37	68.15	87.37	
3.33	52.39	48.1	36.43	45.86	63.01	85.33	
1.11	28.08	21.59	3.97	18.21	44.13	77.84	
0.37	6.59	-1.84	-24.73	-6.23	27.43	71.22	
0.12	-18.56	-29.25	-58.31	-34.83	7.89	63.47	
0.00	0	-9.02	-33.53	-13.72	22.31	69.19	

[약물]	0	61.728	185.19	555.56	1666.7	5000	상승작용 플롯 (99.9%)
IFNα2a							본래로니 수정 98%
IU/mL							
10.00	0	2.28055	20.267	0	0	0	상승작용 311.72
3.33	0	11.4879	20.0547	0	0	0	로그 용적 70.96
1.11	0	29.2614	46.491	0	0	0	
0.37	0	7.06329	58.2256	23.7093	0	0	길항작용 0
0.12	0	6.2349	42.9067	29.2909	7.4628	6.98541	로그 용적 0
0.00	0	0	0	0	0	0	

[0803]

[0804] **표 21b: IFNα2a 및 화합물 22의 시험관내 조합에서 HBsAg에 대한 효과**

[0805] [표 21b]

[약물]	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	평균 저해 % 화합물 22 (μM)
IFNα2a							
IU/mL							
10.00	20.1	23.86	18.44	23.51	32.47	46.3	
3.33	10.2	21.09	18.86	23.8	32.72	40.92	
1.11	8.8	17.52	19.02	18.44	29.23	41.77	
0.37	4.6	10.38	12.89	12.73	19.64	32.99	-
0.12	-1.67	10.33	10.48	16.18	20.01	33.22	
0.00	0	-13.83	-10.58	-5.08	10.34	23.09	

[약물]	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	표준 편차 (%) 화합물 22 (μM)
IFNα2a							
IU/mL							
10.00	13.1	8.15	6.53	2.24	6.55	3.24	
3.33	11.12	8.23	8.23	3.93	10.55	10.22	
1.11	14.56	12.01	8.75	8.2	12.13	11.6	
0.37	9.75	7.48	17.42	8.47	12.45	15.01	-
0.12	20.23	10.68	5.97	9.82	12.81	14.29	
0.00	18.63	16.23	12.6	17.72	16.11	15.81	

[약물]	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	부가적 저해 화합물 22 (μM)
IFNα2a							
IU/mL							
10.00	20.1	9.05	11.65	16.04	28.36	38.55	
3.33	10.2	-2.22	0.7	5.64	19.49	30.93	
1.11	8.8	-3.81	-0.85	4.17	18.23	29.86	
0.37	4.6	-8.59	-5.49	-0.25	14.46	26.63	-
0.12	-1.67	-15.73	-12.43	-6.83	8.84	21.81	
0.00	0	-13.83	-10.58	-5.08	10.34	23.09	

[약물]	0	61.728	185.19	555.56	1666.7	5000	상승작용 플롯 (99.9%) 본페로니 수정	98%
IFNα2a								
IU/mL								
10.00	0	0	0	0.09816	0	0	상승작용	8.59
3.33	0	0	0	5.22637	0	0	로그 용적	1.96
1.11	0	0	0	0	0	0		
0.37	0	0	0	0	0	0	길항작용	0
0.12	0	0	3.26273	0	0	0	로그 용적	0
0.00	0	0	0	0	0	0		

[0806]

[0807] 표 21c: IFNα2a 및 화합물 22의 시험관내 조합에서 HBeAg에 대한 효과

[0808] [표 21c]

[약물]	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	평균 저해 % 화합물 22 (μM)
IFN α 2a IU/mL							
10.00	30.13	29.1	26.43	26.51	34.37	48.55	
3.33	17.16	17.85	18	19.33	29.38	39.7	
1.11	15.27	14.17	15.76	10.98	26.67	41.95	
0.37	1.78	2.04	2.11	-0.99	10.34	27.11	
0.12	7.42	11.7	10.2	8.06	14.8	34.39	
0.00	0	-7.2	-9.57	-8.17	5.92	20.93	

[약물]	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	표준 편차 (%) 화합물 22 (μM)
IFN α 2a IU/mL							
10.00	0.33	8.25	5.02	1.12	4.12	3.3	
3.33	5.51	6.25	6.16	6.03	3.41	4.79	
1.11	2.91	12.64	3.52	11.08	6.97	8.93	
0.37	3.5	12.74	8.62	13.47	7.91	4.93	
0.12	6.9	9.72	7.43	4.72	11.46	7.25	
0.00	7.86	5.83	6.88	13.23	8.51	9.89	

[약물]	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	부가적 저해 화합물 22 (μM)
IFN α 2a IU/mL							
10.00	30.13	25.1	23.44	24.42	34.27	44.75	
3.33	17.16	11.2	9.23	10.39	22.06	34.5	
1.11	15.27	9.17	7.16	8.35	20.29	33	
0.37	1.78	-5.29	-7.62	-6.24	7.59	22.34	
0.12	7.42	0.75	-1.44	-0.14	12.9	26.8	
0.00	0	-7.2	-9.57	-8.17	5.92	20.93	

[약물]	0	61.728	185.19	555.56	1666.7	5000	상승작용 플롯 (99.9%) 본페로니 수정 98%
IFN α 2a IU/mL							
10.00	0	0	0	0	0	0	상승작용 0
3.33	0	0	0	0	0	0	로그 용적 0
1.11	0	0	0	0	0	0	
0.37	0	0	0	0	0	0	길항작용 0
0.12	0	0	0	0	0	0	로그 용적 0
0.00	0	0	0	0	0	0	

[0809]

[0810] **표 21d: PHH 세포 배양 시스템에서 IFNα2a 및 화합물 22의 시험관내 조합 연구의 결과의 요약:**

[0811] [표 21d]

HBV 검정 종결점	저해제 A	저해제 B	저해제 A EC_{50} (IU/mL) #	저해제 B EC_{50} (nM)#	상승작용 용적 ($\mu M^2\%$)*	상승작용 로그 용적	길항작용 용적 ($\mu M^2\%$)*	길항작용 로그 용적	결론
HBV DNA	IFNα2a	화합물 22	2.154	1020	311.72	70.96	0	0	상승작용
HBsAg	IFNα2a	화합물 22	13.8	12,800	8.59	1.96	0	0	부가적
HBeAg	IFNα2a	화합물 22	10.24	10,740	0	0	0	0	부가적

*99.9% 신뢰 구간에서
#앞선 별개의 실험에서 결정됨

[0812]

[0813] **실시예 22**

[0814] **화합물 22 및 TAF의 시험관내 조합**

[0815] **연구 목적**

[0816] 화합물 22 (술파모일 벤즈아미드 화학적 부류에 속하는, HBV 캡시드화의 소형 분자 저해제) 및 테노포비르 (전구약물 테노포비르 알라페나미드, 또는 HBV 중합효소의 뉴클레오티드 유사체 저해제인 TAF의 형태에서)의 2개-

약물 조합이 세포 배양 모형 시스템에서 HBV-감염된 인간 일차 간세포를 이용하여, 시험관내에서 부가적, 상승적 또는 길항적인 지를 결정하기 위해.

[0817] **결과 및 결론**

[0818] TAF (3-배 희석 계열 및 5 포인트 적정에서 10.0 nM 내지 0.12 nM의 농도 범위)는 화합물 **22** (3-배 희석 계열 및 5 포인트 적정에서 5000 nM 내지 61.721 nM의 농도 범위)와 조합으로 시험되었다. 단독으로 또는 합동으로 화합물 **22** 또는 TAF 처리에서 관찰된 3개 복제물의 HBV DNA, HBsAg 및 HBeAg에서 평균 저해 % 및 표준 편차는 아래에 지시된 바와 같이 표 22a, 22b 및 22c에서 도시된다. TAF 및 화합물 **22**의 EC_{50} 값은 앞선 실험에서 결정되었고 표 22d에서 도시된다; 일부 변동이 상이한 로트의 PHH 세포로부터 관찰되었다.

[0819] 2개 저해제 조합의 관찰된 값이 상기 농도 범위에 대해 상가 작용으로부터 예상되는 것과 비교될 때, 이들 조합은 MacSynergy II 분석에 따라, 그리고 Prichard 및 Shipman (1992)에 의해 앞서 설명된 해석 규준을 이용하여, 길항작용이 없이 부가적인 것으로 밝혀졌다 (표 22d). 세포 생존력 또는 증식의 어떤 유의미한 저해도 분석된 표본에서 현미경검사 또는 CCK8 검정에 의해 관찰되지 않았다.

[0820] **표 22a: 화합물 22 및 TAF의 시험관내 조합에서 HBV DNA에 대한 효과**

[0821] [표 22a]

[약물]	0	61.728	185.19	555.56	1666.7	5000	평균 저해 % 화합물 22 (nM)
TAF (nM)							
10.00	50.21	60.62	59.41	66.66	65.77	71.26	
3.33	40.16	51.09	48.53	60.14	55.25	70.85	
1.11	4.95	25.5	30.09	25.21	42.82	62.1	
0.37	-1.92	5.92	11.85	14.68	29.37	54.24	
0.12	-2.6	-5.22	5.12	11.67	36.5	52.5	
0.00	0	2.38	-3.33	8.01	27.98	54.66	

[약물]	0	61.728	185.19	555.56	1666.7	5000	표준 편차 (%) 화합물 22 (nM)
TAF (nM)							
10.00	1.32	8.36	3.9	10.1	3.39	11.57	
3.33	12.34	15.26	5.42	4.38	13.68	7.66	
1.11	25.38	8.61	20.31	18.26	6.64	11.33	
0.37	8.11	10.64	16.41	12.37	11.31	8.93	
0.12	3.28	6.41	13.44	11.64	0.94	10.76	
0.00	0.19	7.49	13.42	18.44	0.83	17.12	

[약물]	0	61.728	185.19	555.56	1666.7	5000	부가적 저해 화합물 22 (nM)
TAF (nM)							
10.00	50.21	51.4	48.55	54.2	64.14	77.43	
3.33	40.16	41.58	38.17	44.95	56.9	72.87	
1.11	4.95	7.21	1.78	12.56	31.54	56.9	
0.37	-1.92	0.51	-5.31	6.24	26.6	53.79	
0.12	-2.6	-0.16	-6.02	5.62	26.11	53.48	
0.00	0	2.38	-3.33	8.01	27.98	54.66	

[약물]	0	61.728	185.19	555.56	1666.7	5000	상승작용 플롯 (99.9%) 본페로니 수정 98%
TAF (nM)							
10.00	0	0	0	0	0	0	상승작용 로그 용적 8.07
3.33	0	0	0	0.77542	0	0	1.84
1.11	0	0	0	0	0	0	
0.37	0	0	0	0	0	0	길항작용 로그 용적 0
0.12	0	0	0	0	7.29646	0	0
0.00	0	0	0	0	0	0	

[0822]

[0823] **표 22b: 화합물 22 및 TAF의 시험관내 조합에서 HBsAg에 대한 효과**

[0824] [표 22b]

[약물]	0	61.728	185.19	555.56	1666.7	5000	평균 저해 %
TAF (nM)							화합물 22 (nM)
10	7.97	3.97	21.33	7.89	24.84	38.54	
3.333333							
3	9.06	-6.48	16.7	16.53	24.27	44.07	
1.111111	20.8						
1	1	13.85	21.8	20.98	27.18	46.11	
0.370370	10.7						
4	8	-3.62	10.04	10.32	23.21	45.05	
0.123456	29.8						
8	2	19.99	14.56	21.8	21.67	48.57	
0	0	-0.32	2.37	-2.17	17.68	20.73	

[약물]	0	61.728	185.19	555.56	1666.7	5000	표준 편차 (%)
TAF (nM)							화합물 22 (nM)
10	5.77	2.84	10.6	6.45	2.33	6.64	
3.333333	13.7						
3	8	10.12	9.21	7.53	7.28	4.26	
1.111111							
1	5.53	6.36	15.1	9.66	4.2	2.72	
0.370370							
4	4.42	15.44	4.26	7.98	7.62	2.68	
0.123456							
8	3.67	4.25	4.49	3.91	8.82	1.51	
0	0.59	19.01	7.88	14.89	15.32	16.75	

[약물]	0	61.728	185.19	555.56	1666.7	5000	부가적 저해
TAF (nM)							화합물 22 (nM)
10	7.97	7.68	10.15	5.97	24.24	27.05	
3.333333							
3	9.06	8.77	11.22	7.09	25.14	27.91	
1.111111	20.8						
1	1	20.56	22.69	19.09	34.81	37.23	
0.370370	10.7						
4	8	10.49	12.89	8.84	26.55	29.28	
0.123456	29.8						
8	2	29.6	31.48	28.3	42.23	44.37	
0	0	-0.32	2.37	-2.17	17.68	20.73	

[약물]	0	61.728	185.19	555.56	1666.7	5000	상승작용 플롯 (99.9%)
TAF (nM)							본페로니 수정 98%
0							
10	0	0	0	0	0	0	상승작용 9.09
3.333333						2.1403	
3	0	0	0	0	0	4	로그 용적 2.07
1.111111							
1	0	0	0	0	0	0	
0.370370						6.9501	
4	0	0	0	0	0	2	길항작용 -2.14
0.123456			-2.14				
8	0	0	34	0	0	0	로그 용적 -0.49
0	0	0	0	0	0	0	

[0825]

[0826] **표 22c: 화합물 22 및 TAF의 시험관내 조합에서 HBeAg에 대한 효과**

[0827] [표 22c]

[약물]	0	61.728	185.19	555.56	1666.7	5000	평균 저해 %
TAF (nM)							화합물 22 (nM)
10.00	22.85	-0.79	17.72	8.41	23.95	42.03	
3.33	19.69	-14.8	8.11	3.2	24.12	36.2	
1.11	22.56	1.31	15.81	20.43	22.71	49.56	
0.37	9.9	-14.54	-2.63	10.7	21.6	42.03	
0.12	26.61	17.84	15.03	21.04	26.27	50.3	
0.00	0	-6.71	-12.41	-5.06	10.1	29.74	

[약물]	0	61.728	185.19	555.56	1666.7	5000	표준 편차 (%)
TAF (nM)							화합물 22 (nM)
10.00	19.83	13.7	2.25	17.67	11.95	8.64	
3.33	9.59	13.32	15.74	3.59	14.71	9.54	
1.11	8.99	14.21	16.19	10.78	1.53	2.78	
0.37	5.26	34.36	16.86	12.05	12.45	7.4	
0.12	4.71	14.39	8.61	5.08	4.18	4.19	
0.00	0.63	20.55	10.69	17.17	20.78	11.65	

[약물]	0	61.728	185.19	555.56	1666.7	5000	부가적 저해
TAF (nM)							화합물 22 (nM)
10.00	22.85	17.67	13.28	18.95	30.64	45.79	
3.33	19.69	14.3	9.72	15.63	27.8	43.57	
1.11	22.56	17.36	12.95	18.64	30.38	45.59	
0.37	9.9	3.85	-1.28	5.34	19	36.7	
0.12	26.61	21.69	17.5	22.9	34.02	48.44	
0.00	0	-6.71	-12.41	-5.06	10.1	29.74	

[약물]	0	61.728	185.19	555.56	1666.7	5000	상승작용 플롯 (99.9%) 본래로서 수정	98%
TAF (nM)								
10.00	0	0	0	0	0	0	상승작용	0
3.33	0	0	0	-0.6153	0	0	로그 용적	0
1.11	0	0	0	0	-2.6348	0		
0.37	0	0	0	0	0	0	길항작용	-3.25
0.12	0	0	0	0	0	0	로그 용적	-0.74
0.00	0	0	0	0	0	0		

[0828]

[0829] **표 22d: PHH 세포 배양 시스템에서 화합물 22 및 TAF의 시험관내 조합 연구의 결과의 요약:**

[0830] [표 22d]

HBV 검정 종결점	저해제 A	저해제 B	저해제 A EC_{50} (nM)#	저해제 B EC_{50} (nM)#	상승작용 용적 ($\mu M^2\%$)*	상승작용 로그 용적	길항작용 용적 ($\mu M^2\%$)*	길항작용 로그 용적	결론
HBV DNA	TAF	화합물 22	0.405	1020	8.07	1.84	0	0	부가적
HBsAg	TAF	화합물 22	>100	12,800	9.09	2.07	-2.14	-0.49	부가적
HBeAg	TAF	화합물 22	>100	10,740	0	0	-3.25	-0.74	부가적

*99.9% 신뢰 구간에서

[0831] #앞선 별개의 실험에서 결정됨

[0832] **실시예 23**

[0833] **화합물 22 및 화합물 25의 시험관내 조합**

[0834] **연구 목적**

[0835] 화합물 22 (술파모일 벤즈아미드 화학적 부류에 속하는, HBV 캡시드화의 소형 분자 저해제) 및 화합물 25 (디히드로퀴놀리지논 화학적 부류에 속하는, HBV DNA, HBsAg 및 HBeAg의 소형 분자 저해제)의 2개-약물 조합이 세포 배양 모형 시스템에서 HBV-감염된 인간 일차 간세포를 이용하여, 시험관내에서 부가적, 상승적 또는 길항적인지를 결정하기 위해.

[0836] **결과 및 결론**

[0837] 화합물 **25** (3-배 희석 계열 및 5 포인트 적정에서 10.0 nM 내지 0.12 nM의 농도 범위)는 화합물 **22** (3-배 희석 계열 및 5 포인트 적정에서 5000 nM 내지 61.73 nM의 농도 범위)와 조합으로 시험되었다. 단독으로 또는 합동으로 화합물 **25** 또는 화합물 **22** 처리에서 관찰된 3개 복제물의 HBV DNA, HBsAg 및 HBeAg에서 평균 저해 % 및 표준 편차는 아래에 지시된 바와 같이 표 23a, 23b 및 23c에서 도시된다. 화합물 **25** 및 화합물 **22**의 EC_{50} 값은 앞선 실험에서 결정되었고 표 23d에서 도시된다; 일부 변동이 상이한 로트의 PHH 세포로부터 관찰되었다.

[0838] 2개 저해제 조합의 관찰된 값이 상기 농도 범위에 대해 상가 작용으로부터 예상되는 것과 비교될 때, 이들 조합은 MacSynergy II 분석에 따라, 그리고 Prichard 및 Shipman (1992)에 의해 앞서 설명된 해석 규준을 이용하여, 길항작용이 없이 상승적 또는 부가적인 것으로 밝혀졌다 (표 23d). 세포 생존력 또는 증식의 어떤 유의미한 저해도 분석된 표본에서 현미경검사 또는 CCK8 검정에 의해 관찰되지 않았다.

[0839] **표 23a: 화합물 22 및 화합물 25의 시험관내 조합에서 HBV DNA에 대한 효과**

[0840] [표 23a]

[약물]	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	평균 저해 % 화합물 22 (nM)
화합물 25 (nM)							
10.00	37.39	54.71	52.49	63.54	67.1	85.44	
3.33	16.41	50.43	52.25	53.21	62.83	82.08	
1.11	-19.21	32.08	42.5	41.58	57.56	80.93	
0.37	-46.48	30.71	23.72	21.3	52.22	73.23	
0.12	-42.82	26.46	16.46	27.69	42.07	74.04	
0.00	0	-11.75	-9.12	-12.7	17.94	63.06	

[약물]	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	표준 편차 (%) 화합물 22 (nM)
화합물 25 (nM)							
10.00	7.33	4.11	2.57	4.94	5.09	1.95	
3.33	6.98	4.36	7.16	4.68	3.23	3.21	
1.11	35.51	7.87	0.68	13.48	7.26	1.34	
0.37	51.6	6.46	0.9	21	7.5	1.71	
0.12	21.05	7.83	6	5.3	0.16	2.16	
0.00	40.03	5.71	4.36	11.48	8.67	2.92	

[약물]	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	부가적 저해 화합물 22 (nM)
화합물 25 (nM)							
10.00	37.39	30.03	31.68	29.44	48.62	76.87	
3.33	16.41	6.59	8.79	5.79	31.41	69.12	
1.11	-19.21	-33.22	-30.08	-34.35	2.18	55.96	
0.37	-46.48	-63.69	-59.84	-65.08	-20.2	45.89	
0.12	-42.82	-59.6	-55.85	-60.96	-17.2	47.24	
0.00	0	-11.75	-9.12	-12.7	17.94	63.06	

[약물]	0	61.728	185.19	555.56	1666.7	5000	상승작용 플롯 (99.9%) 본페로니 수정	98%
화합물 25 (nM)								
10.00	0	11.154	12.3521	17.8425	1.72881	2.15255	상승작용	846.13
3.33	0	29.4912	19.8964	32.0181	20.7901	2.39589	로그 용적	192.62
1.11	0	39.3998	70.3421	31.5673	31.4873	20.5601		
0.37	0	73.1401	80.5981	17.269	47.7375	21.7124	길항작용	0
0.12	0	60.2915	52.564	71.2077	58.7434	19.6914	로그 용적	0
0.00	0	0	0	0	0	0		

[0841]

[0842] **표 23b: 화합물 22 및 화합물 25의 시험관내 조합에서 HBsAg에 대한 효과**

[0843] [표 23b]

[약물]	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	평균 저해 % 화합물 22 (nM)
10.00	42.95	47.96	44.95	47.05	56.23	64.25	
3.33	20.81	33.92	29.53	31.58	44.61	49.94	
1.11	26.4	29.53	17.24	26.62	40.43	49.49	
0.37	12.93	20.99	10.45	16.99	34.42	42.55	-
0.12	9.32	13.24	11.87	15.52	33.87	42.69	
0.00	0	-9.16	-10.21	-3.82	20.61	30.96	

[약물]	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	표준 편차 (%) 화합물 22 (nM)
화합물 25 (nM)							
10.00	6.31	7.49	10.92	7.96	3.9	3.54	
3.33	6.77	3.56	12.39	9.02	3.89	7.17	
1.11	6.88	5.71	15.84	10.95	8.57	9.32	
0.37	1.49	4.56	17.71	9.5	7.06	8.21	-
0.12	7.25	4.15	9.26	8.38	9.2	6.29	
0.00	14.86	17.38	15.2	14.87	11.14	12.14	

[약물]	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	부가적 저해 화합물 22 (nM)
화합물 25 (nM)							
10.00	42.95	37.72	37.13	40.77	54.71	60.61	
3.33	20.81	13.56	12.72	17.78	37.13	45.33	
1.11	26.4	19.66	18.89	23.59	41.57	49.19	
0.37	12.93	4.95	4.04	9.6	30.88	39.89	-
0.12	9.32	1.01	0.06	5.86	28.01	37.39	
0.00	0	-9.16	-10.21	-3.82	20.61	30.96	

[약물]	0	61.728	185.19	555.56	1666.7	5000	상승작용 플롯 (99.9%) 본페로니 수정	98%
화합물 25 (nM)								
10.00	0	0	0	0	0	0	상승작용 로그 용적	9.68
3.33	0	8.64404	0	0	0	0		2.2
1.11	0	0	0	0	0	0		
0.37	0	1.03304	0	0	0	0	길항작용 로그 용적	0
0.12	0	0	0	0	0	0		0
0.00	0	0	0	0	0	0		

[0844]

[0845] **표 23c: 화합물 22 및 화합물 25의 시험관내 조합에서 HBeAg에 대한 효과**

[0846] [표 23c]

[약물]	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	평균 저해 % 화합물 22 (nM)
10.00	28.42	45.7	39.35	42.74	42.65	52.75	
3.33	13.94	29.09	24.19	23.42	24.67	39.67	
1.11	14.98	23.14	18.39	20.55	25.39	36.15	
0.37	2.9	7.24	7.64	4.51	17.83	27.05	-
0.12	4.8	7.81	10.06	9.31	20.68	33.46	
0.00	0	-16.81	-14.59	-7.23	8.5	21.68	

[약물]	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	표준 편차 (%) 화합물 22 (nM)
화합물 25 (nM)							
10.00	3.97	4.42	6.62	8.31	4.59	2.23	
3.33	9.3	1.4	6.29	15.17	11.71	2.03	
1.11	6.16	7.56	9.8	11.54	8.18	9.71	
0.37	10.44	7.8	10.09	14.23	7.82	10.34	-
0.12	14.29	8.35	1.66	17.07	9.08	4.79	
0.00	10.71	11.88	5.84	11.39	4.94	6.86	

[약물]	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	부가적 저해 화합물 22 (nM)
화합물 25 (nM)							
10.00	28.42	16.39	17.98	23.24	34.5	43.94	
3.33	13.94	-0.53	1.38	7.72	21.26	32.6	
1.11	14.98	0.69	2.58	8.83	22.21	33.41	
0.37	2.9	-13.42	-11.27	-4.12	11.15	23.95	
0.12	4.8	-11.2	-9.09	-2.08	12.89	25.44	
0.00	0	-16.81	-14.59	-7.23	8.5	21.68	

[약물]	0	61.728	185.19	555.56	1666.7	5000	상승작용 플롯 (99.9%) 본페로니 수정	98%
화합물 25 (nM)								
10.00	0	14.7638	0	0	0	1.47107	상승작용 로그 용적	57.43
3.33	0	25.0126	2.10961	0	0	0.38927		13.07
1.11	0	0	0	0	0	0		
0.37	0	0	0	0	0	0	길항작용 로그 용적	0
0.12	0	0	13.6869	0	0	0		0
0.00	0	0	0	0	0	0		

[0847]

[0848] **표 23d: PHH 세포 배양 시스템에서 화합물 22 및 화합물 25의 시험관내 조합 연구의 결과의 요약:**

[0849] [표 23d]

HBV 검정 종결점	저해제 A	저해제 B	저해제 A EC_{50} (nM)#	저해제 B EC_{50} (nM)#	상승작용 용적 ($\mu M^2\%$)*	상승작용 로그 용적	길항작용 용적 ($\mu M^2\%$)*	길항작용 로그 용적	결론
HBV DNA	화합물 25	화합물 22	0.6535	1020	846.13	19.62	0	0	상승작용
HBsAg	화합물 25	화합물 22	4.503	12,800	9.68	2.2	0	0	부가적
HBeAg	화합물 25	화합물 22	5.75	10,740	57.43	13.07	0	0	상승작용

*99.9% 신뢰 구간에서
#앞선 별개의 실험에서 결정됨

[0850]

[0851] **실시예 24**

[0852] **IFNα2a 및 화합물 3의 시험관내 조합**

[0853] **연구 목적**

[0854] 화합물 **3** 및 페길화된 인터페론 알파 2a (IFNα2a, 간세포에서 선천성 면역 경로를 활성화시키는 항바이러스성 사이토킨)의 2개-약물 조합이 세포 배양 모형 시스템에서 HBV-감염된 인간 일차 간세포를 이용하여, 시험관내에서 부가적, 상승적 또는 길항적인 지를 결정하기 위해.

[0855] **결과 및 결론**

[0856] FNα2a (3-배 희석 계열 및 5 포인트 적정에서 10.0 IU/mL 내지 0.123 IU/mL의 농도 범위)는 화합물 **3** (3-배 희석 계열 및 5 포인트 적정에서 5000 nM 내지 61.73 nM의 농도 범위)와 조합으로 시험되었다. 단독으로 또는 합동으로 IFNa2a 또는 화합물 **3** 처리에서 관찰된 3개 복제물의 HBV DNA, HBsAg 및 HBeAg에서 평균 저해 % 및 표준 편차는 아래에 지시된 바와 같이 표 24a, 24b 및 24c에서 도시된다. IFNα2a 및 화합물 **3**의 EC_{50} 값은 앞선 실험에서 결정되었고 표 24d에서 도시된다; 일부 변동이 상이한 로트의 PHH 세포로부터 관찰되었다.

[0857] 2개 저해제 조합의 관찰된 값이 상기 농도 범위에 대해 상가 작용으로부터 예상되는 것과 비교될 때, 이들 조합은 MacSynergy II 분석에 따라, 그리고 Prichard 및 Shipman (1992)에 의해 앞서 설명된 해석 규준을 이용하여, 길항작용이 없이 상승적인 것으로 밝혀졌다 (표 24d). 세포 생존력 또는 증식의 어떤 유의미한 저해도 분석된 표본에서 현미경검사 또는 CCK8 검정에 의해 관찰되지 않았다.

[0858] **표 24a: IFNα2a 및 화합물 3의 시험관내 조합에서 HBV DNA에 대한 효과**

[0859] [표 24a]

[약물]	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	평균 저해 % 화합물 3 (μM)
IFNα2a IU/mL							
10.00	61.87	71.15	80.53	79.65	80.46	83.13	
3.33	59.88	65.87	74.49	76.8	84.91	87.1	
1.11	43.03	53.87	58.69	73.59	83.9	86.29	
0.37	38.46	40.68	50.62	61.26	79.98	87.96	
0.12	8.4	28.63	36.65	50.15	78.43	86.51	
0.00	0	-11.71	4.14	26.47	69.39	84.26	

[약물]	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	표준 편차 (%) 화합물 3 (μM)
IFNα2a IU/mL							
10.00	5.9	5.47	5.52	2.67	4.37	2.84	
3.33	5.53	2.04	2.64	4.62	3.33	1.29	
1.11	6.9	8.86	6.4	0.85	1.88	1.74	
0.37	4.9	5.86	4.86	5.2	2.07	0.96	
0.12	10.36	7.77	6.24	3.95	6.78	1.78	
0.00	15.33	3.13	10.75	14.76	3.99	2.26	

[약물]	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	부가적 저해 화합물 3 (μM)
IFNα2a IU/mL							
10.00	61.87	57.4	63.45	71.96	88.33	94	
3.33	59.88	55.18	61.54	70.5	87.72	93.69	
1.11	43.03	36.36	45.39	58.11	82.56	91.03	
0.37	38.46	31.25	41.01	54.75	81.16	90.31	
0.12	8.4	-2.33	12.19	32.65	71.96	85.58	
0.00	0	-11.71	4.14	26.47	69.39	84.26	

[약물]	0	61.728	185.19	555.56	1666.7	5000	상승작용 플롯 (99.9%)
IFNα2a IU/mL							본래로니 수정 98%
10.00	0	0	0	0	0	-1.5236	상승작용 34.73
3.33	0	3.97636	4.26176	0	0	-2.3446	로그 용적 7.91
1.11	0	0	0	12.6827	0	0	
0.37	0	0	0	0	0	0	길항작용 -3.87
0.12	0	5.38893	3.92416	4.50055	0	0	로그 용적 -0.88
0.00	0	0	0	0	0	0	

[0860]

[0861] **표 24b: IFNα2a 및 화합물 3의 시험관내 조합에서 HBsAg에 대한 효과**

[0862] [표 24b]

[약물]	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	평균 저해 % 화합물 3 (μM)
IFN α 2a IU/mL							
10.00	24.94	33.38	33.93	39.7	49.84	67.18	
3.33	12.8	24.89	29.71	34.46	45.53	64.96	
1.11	14.91	22.82	26.09	36.42	44.97	67.18	
0.37	6.9	9.75	17.87	27.62	42.09	61.42	-
0.12	1.56	10.13	19.07	22.18	42.08	62.05	
0.00	0	-5.49	-1.46	4.63	22.4	51.86	

[약물]	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	표준 편차 (%) 화합물 3 (μM)
IFN α 2a IU/mL							
10.00	24.86	7.76	9.93	15.02	12.81	9.59	
3.33	18.96	8.14	7.22	2.01	3.5	5.21	
1.11	20.01	4.74	6.41	3.05	5.38	4.26	
0.37	15.28	4.3	7.35	8.74	6.16	2.9	-
0.12	16.47	3.75	5.07	7.78	7.65	6.59	
0.00	20.27	8.81	11.41	18.39	12.21	10.78	

[약물]	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	부가적 저해 화합물 3 (μM)
IFN α 2a IU/mL							
10.00	24.94	20.82	23.84	28.42	41.75	63.87	
3.33	12.8	8.01	11.53	16.84	32.33	58.02	
1.11	14.91	10.24	13.67	18.85	33.97	59.04	
0.37	6.9	1.79	5.54	11.21	27.75	55.18	-
0.12	1.56	-3.84	0.12	6.12	23.61	52.61	
0.00	0	-5.49	-1.46	4.63	22.4	51.86	

[약물]	0	61.728	185.19	555.56	1666.7	5000	상승작용 플롯 (99.9%) 본래보니 수정	98%
IFN α 2a IU/mL								
10.00	0	0	0	0	0	0	상승작용 로그 용적	24.11
3.33	0	0	0	11.0051	1.6815	0		5.49
1.11	0	0	0	7.53245	0	0		
0.37	0	0	0	0	0	0	길항작용 로그 용적	0
0.12	0	1.62875	2.26463	0	0	0		0
0.00	0	0	0	0	0	0		

[0863]

[0864] **표 24c: IFNα2a 및 화합물 3의 시험관내 조합에서 HBeAg에 대한 효과**

[0865] [표 24c]

[약물]	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	평균 저해 % 화합물 3 (μM)
10.00	32.8	31.53	34.56	37.16	47.83	64.68	
3.33	14.38	25.43	28.01	30.3	39.42	61.88	
1.11	19.32	21.29	25.66	31.93	40.01	62.09	
0.37	-2.24	6.43	9.53	18.94	28.32	53.12	
0.12	-9.5	6.23	12.46	18.03	30.27	54.05	
0.00	0	-11.14	-4.9	-1.02	12.42	42.06	

[약물]	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	표준 편차 (%) 화합물 3 (μM)
IFNα2a IU/mL							
10.00	6.87	6.73	5.55	4.84	7.1	3.14	
3.33	4.07	5.37	7.42	9.41	7.15	1.79	
1.11	7.88	5.45	5.22	7.63	7.94	3.23	
0.37	1.9	2.87	4.47	11.64	7.71	1.12	
0.12	15.48	5.14	3.22	4.52	1.47	2.18	
0.00	8.69	17.68	3.21	3.3	4.7	7	

[약물]	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	부가적 저해 화합물 3 (μM)
IFNα2a IU/mL							
10.00	32.8	25.31	29.51	32.11	41.15	61.06	
3.33	14.38	4.84	10.18	13.51	25.01	50.39	
1.11	19.32	10.33	15.37	18.5	29.34	53.25	
0.37	-2.24	-13.63	-7.25	-3.28	10.46	40.76	
0.12	-9.5	-21.7	-14.87	-10.62	4.1	36.56	
0.00	0	-11.14	-4.9	-1.02	12.42	42.06	

[약물]	0	61.728	185.19	555.56	1666.7	5000	상승작용 플롯 (99.9%) 본래로니 수정	98%
IFNα2a IU/mL								
10.00	0	0	0	0	0	0	상승작용 로그 용적	103.04
3.33	0	2.91733	0	0	0	5.59911		23.46
1.11	0	0	0	0	0	0		
0.37	0	10.6148	2.06923	0	0	8.67408	길항작용 로그 용적	0
0.12	0	11.0143	16.733	13.7747	21.3322	10.3156		0
0.00	0	0	0	0	0	0		

[0866]

[0867] **표 24d: PHH 세포 배양 시스템에서 IFNα2a 및 화합물 3의 시험관내 조합 연구의 결과의 요약:**

[0868] [표 24d]

HBV 검정 종결점	저해제 A	저해제 B	저해제 A EC_{50} (IU/mL) #	저해제 B EC_{50} (nM)#	상승작용 용적 ($\mu M^2\%$)*	상승작용 로그 용적	길항작용 용적 ($\mu M^2\%$)*	길항작용 로그 용적	결론
HBV DNA	IFNα2a	화합물 3	2.154	876.5	34.73	7.91	-3.87	-0.88	상승작용
HBsAg	IFNα2a	화합물 3	13.8	7793	24.11	5.49	0	0	상승작용
HBeAg	IFNα2a	화합물 3	10.24	8580	103.04	23.46	0	0	상승작용

*99.9% 신뢰 구간에서
#앞선 별개의 실험에서 결정됨

[0869]

[0870] **실시예 25**

[0871] **TAF 및 SIRNA-NP의 시험관내 조합:**

[0872] **연구 목적**

[0873] 테노포비르 (전구약물 테노포비르 알라페나미드, 또는 HBV 중합효소의 뉴클레오티드 유사체 저해제인 TAF의 형태에서) 및 모든 바이러스 mRNA 전사체 및 바이러스 항원의 강력한 녹다운을 조장하도록 의도된 siRNA인 SIRNA-

NP의 2개의 약물 조합이 HBV 세포 배양 모형 시스템을 이용하여 시험관내에서 부가적, 상승적 또는 길항적인 지를 결정하기 위해.

[0874] **HepDE19 실험적 프로토콜에서 시험관내 조합**

[0875] 시험관내 조합 연구는 Prichard 및 Shipman (1990)의 방법 (Prichard MN, Shipman C, Jr. 1990. A three-dimensional model to analyze drug-drug interactions. Antiviral Res 14:181-205 AND Prichard MN. 1992. MacSynergy II, University of Michigan)을 이용하여 수행되었다. HepDE19 세포주는 Guo *et al*. (2007)(Guo H, Jiang D, Zhou T, Cuconati A, Block TM, Guo JT. 2007. Characterization of the intracellular deproteinized relaxed circular DNA of hepatitis B virus: an intermediate of covalently closed circular DNA formation. J Virol 81:12472-12484)에서 설명된 바와 같이 개발되었다. 이것은 HBV 유전체로 안정되게 형질감염된 인간 간암 세포주이고, 그리고 HBV 전유전체 RNA를 발현하고 HBV rcDNA (이완된 환상 DNA) 합성을 테트라사이클린-조절된 방식으로 뒷받침할 수 있다. HepDE19 세포는 96 웰 조직-배양액 처리된 마이크로역가 평판에서 테트라사이클린 없이 10% 소 태아 혈청 + 1% 페니실린-스트렙토마이신으로 보충된 DMEM/F12 배지에서 도말되고, 그리고 가습된 인큐베이터에서 37℃ 및 5%CO_2에서 하룻밤 동안 배양되었다. 다음 날, 이들 세포는 신선한 배지로 이전되고, 그리고 그들의 개별 EC_{50} 값 인근의 농도 범위에서 저해제 A 및 저해제 B로 처리되고, 그리고 가습된 인큐베이터에서 37℃ 및 5% CO_2에서 7 일의 지속 기간 동안 배양되었다. 이들 저해제는 100% DMSO (TAF) 또는 성장 배지 (SIRNA-NP)에서 희석되었고, 그리고 검정에서 최종 DMSO 농도는 ≤0.5%이었다. 이들 2개 저해제는 각 농도의 저해제 A가 각 농도의 저해제 B와 합동되어 rcDNA 생산의 저해에 대한 그들의 조합 효과가 결정되도록, 단독으로뿐만 아니라 체커보드 방식에서 조합으로 시험되었다. 48 시간-배양 이후에, 저해제-처리된 웰에서 존재하는 rcDNA의 수준은 HBV 특정한 맞춤 프로브 세트 및 제조업체의 사용설명서를 이용한 bDNA 검정 (Affymetrix)을 이용하여 계측되었다. 각 웰로부터 산출된 RLU 데이터는 처리되지 않은 대조 웰의 저해 %로서 계산되고, 그리고 아래와 같이 Prichard 및 Shipman에 의해 확립된 해석 지침을 이용하여 이들 조합이 상승적, 부가적 또는 길항적인 지를 결정하기 위해 MacSynergy II 프로그램을 이용하여 분석되었다: 95% CI에서 상승작용 용적 <25 μM^2% (로그 용적 <2) = 아마도 무의미한; 25-50 μM^2% (로그 용적 >2 및 < 5) = 작지만 유의미한; 50-100 μM^2% (로그 용적 >5 및 <9) = 중간은 생체내에서 중요할 수 있다; 100 μM^2% 초과 (로그 용적 >9) = 강한 상승작용, 아마도 생체내에서 중요한; 1000 μM^2%에 근접하는 용적 (로그 용적 >90) = 대단히 높은, 점검 데이터. 동시에, 세포 생존력에 대한 저해제 조합의 효과가 제조업체의 사용설명서에 따라서 세포-역가 Glo 시약 (Promega)을 이용하여 세포 생존력의 척도로서 ATP 함량을 결정하는데 이용된 복제 평판을 이용하여 사정되었다.

[0876] **결과 및 결론**

[0877] TAF (2-배 희석 계열 및 9 포인트 적정에서 200.0 nM 내지 0.781 nM의 농도 범위)는 SIRNA-NP (3-배 희석 계열 및 5 포인트 적정에서 60 ng/mL 내지 0.741 ng/mL의 농도 범위)와 조합으로 시험되었다. 단독으로 또는 합동으로 TAF 또는 SIRNA-NP 처리에서 관찰된 4개 복제물의 rcDNA에서 평균 저해 % 및 표준 편차는 표 25A에서 도시된다. TAF 및 SIRNA-NP의 EC_{50} 값은 표 25B에서 도시된다. 2개 저해제 조합의 관찰된 값이 상기 농도 범위에 대해 상가 작용 (표 25A)으로부터 예상되는 것과 비교될 때, 이들 조합은 MacSynergy II 분석에 따라, 그리고 Prichard 및 Shipman (1992)에 의해 앞서 설명된 해석 규준을 이용하여, 길항작용이 없이 부가적인 것으로 밝혀졌다 (표 25B). 세포 생존력 또는 증식의 어떤 유의미한 저해도 분석된 표본에서 현미경검사 또는 세포-역가 Glo 검정에 의해 관찰되지 않았다.

[0878] **표 25A: 테노포비르 알라페나미드 및 SIRNA-NP의 시험관내 조합**

[0879] [표 25A]

[약물]	0	0.781	1.563	3.125	6.250	12.500	25.000	50.000	100.000	200.000	평균 저해 %
SIRNA-NP (ng/mL)											TAF (nM)
60	98.19	98.66	98.73	98.87	99.33	99.41	99.4	99.5	99.58	99.59	
20.000	96.42	95.42	96.67	97.25	98.09	98.71	98.41	98.86	99.28	99.49	
6.667	88.02	88.65	91.24	91.67	94.4	95.11	95.04	95.97	98.26	98.98	
2.222	80.18	72.86	78.16	81.28	82.7	87.98	87.09	91.03	95.81	98.08	
0.741	53.05	55.46	55.43	62.01	63.65	78.75	72.62	82.47	90.47	96.24	
0	0	-4.76	3.49	0.6	10.59	28.61	20.04	53.2	77.59	89.93	

[약물]	0	0.7813	1.5625	3.125	6.25	12.5	25	50	100	200	표준 편차 (%)
SIRNA-NP (ng/mL)											TAF (nM)
60	0.64	0.46	0.63	0.55	0.17	0.23	0.1	0.06	0.04	0.1	
20.000	1.07	2.02	1.82	1.42	0.82	0.32	0.56	0.14	0.1	0.06	
6.667	2.35	3.56	4.19	5.97	1.68	0.94	1.45	0.87	0.51	0.12	
2.222	3.54	7.95	10.29	9.62	3.94	3.27	3.67	1.49	0.57	0.48	
0.741	12.82	16.97	11.3	11.62	9.42	10.02	1.77	3.4	0.5	0.83	
0	0	15.54	15.63	12.12	19.07	9.89	8.58	4.92	2.79	2.12	

[약물]	0	0.7813	1.5625	3.125	6.25	12.5	25	50	100	200	부가적 저해
SIRNA-NP (ng/mL)											TAF (nM)
60	98.19	98.1	98.25	98.2	98.38	98.71	98.55	99.15	99.59	99.82	
20.000	96.42	96.25	96.54	96.44	96.8	97.44	97.14	98.32	99.2	99.64	
6.667	88.02	87.45	88.44	88.09	89.29	91.45	90.42	94.39	97.32	98.79	
2.222	80.18	79.24	80.87	80.3	82.28	85.85	84.15	90.72	95.56	98	
0.741	53.05	50.82	54.69	53.33	58.02	66.48	62.46	78.03	89.48	95.27	
0	0	-4.76	3.49	0.6	10.59	28.61	20.04	53.2	77.59	89.93	

[약물]	0	0.78	1.56	3.13	6.25	12.50	25.00	50	100	200	상승작용 플롯 (99.9%) 본래도니 수정	96%
SIRNA-NP (ng/mL)												
60.0	0	0	0	0	0.390	0	0.520	0.152	0	0	상승작용	6.26
20.000	0	0	0	0	0	0.216	0	0.079	0	0	로그 용적	0.9
6.667	0	0	0	0	0	0.566	0	0	0	0		
2.222	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	길항작용	0
0.741	0	0	0	0	0	0	4.334	0	0	0	로그 용적	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		

[0880]

[0881] **표 25B: bDNA 검정을 이용한 rcDNA 정량으로 DE19 세포 배양 시스템에서 시험관내 조합 연구의 결과의 요약:**

[0882] [표 25B]

저해제 A	저해제 B	저해제 A EC_{50} (ng/mL)	저해제 B EC_{50} (nM)	상승작용 용적 (μM²%)*	상승작용 로그 용적	길항작용 용적 (μM²%)*	길항작용 로그 용적	결론
SIRNA-NP	TAF	0.624	44.52	6.26	0.9	0	0	부가적

*99.9% 신뢰 구간에서

[0883]

[0884] **실시예 26**

[0885] **화합물 3 및 GLS4의 시험관내 조합:**

[0886] **연구 목적**

[0887] 화합물 **3** (술파모일 벤즈아미드 화학적 부류에 속하는, HBV 캡시드화의 소형 분자 저해제) 및 GLS4 (헤테로아릴 디히드로피리미딘 또는 HAP 화학적 부류에 속하는, HBV 캡시드화의 소형 분자 저해제)의 2개-약물 조합이 HBV 세포 배양 모형 시스템을 이용하여, 시험관내에서 부가적, 상승적 또는 길항적인 지를 결정하기 위해.

[0888] **HepDE19 실험적 프로토콜에서 시험관내 조합**

[0889] 시험관내 조합 연구는 Prichard 및 Shipman (1990)의 방법을 이용하여 수행되었다. HepDE19 세포주는 Guo *et al*. (2007)에서 설명된 바와 같이 개발되었다. 이것은 HBV 유전체로 안정되게 형질감염된 인간 간암 세포주이고, 그리고 HBV 전유전체 RNA를 발현하고 HBV rcDNA (이완된 환상 DNA) 합성을 테트라사이클린-조절된 방식으로 뒷받침할 수 있다. HepDE19 세포는 96 웰 조직-배양액 처리된 마이크로역가 평판에서 테트라사이클린 없이 10% 소 태아 혈청 + 1% 페니실린-스트렙토마이신으로 보충된 DMEM/F12 배지에서 도말되고, 그리고 가습된 인큐베이터에서 37℃ 및 5%CO_2에서 하룻밤 동안 배양되었다. 다음 날, 이들 세포는 신선한 배지로 이전되고, 그리고 그들의 개별 EC_{50} 값 인근의 농도 범위에서 저해제 A 및 저해제 B로 처리되고, 그리고 가습된 인큐베이터에서 37℃ 및 5% CO_2에서 7 일의 지속 기간 동안 배양되었다. 양쪽 저해제는 100% DMSO에서 희석되었고, 그리고 검정에서 최종 DMSO 농도는 ≤0.5%이었다. 이들 2개 저해제는 각 농도의 저해제 A가 각 농도의 저해제 B와 합동되어 rcDNA 생산의 저해에 대한 그들의 조합 효과가 결정되도록, 단독으로뿐만 아니라 체커보드 방식에서 조합으로 시험되었다. 48 시간-배양 이후에, 저해제-처리된 웰에서 존재하는 rcDNA의 수준은 HBV 특정한 맞춤 프로브 세트 및 제조업체의 사용설명서를 이용한 bDNA 검정 (Affymetrix)을 이용하여 계측되었다. 각 웰로부터 산출된 RLU 데이터는 처리되지 않은 대조 웰의 저해 %로서 계산되고, 그리고 아래와 같이 Prichard 및 Shipman에 의해 확립된 해석 지침을 이용하여 이들 조합이 상승적, 부가적 또는 길항적인 지를 결정하기 위해 MacSynergy II 프로그램을 이용하여 분석되었다: 95% CI에서 상승작용 용적 <25 μM^2% (로그 용적 <2) = 아마도 무의미한; 25-50 μM^2% (로그 용적 >2 및 < 5) = 작지만 유의미한; 50-100 μM^2% (로그 용적 >5 및 <9) = 중간은 생체내에서 중요할 수 있다; 100 μM^2% 초과 (로그 용적 >9) = 강한 상승작용, 아마도 생체내에서 중요한; 1000 μM^2%에 근접하는 용적 (로그 용적 >90) = 대단히 높은, 점검 데이터. 동시에, 세포 생존력에 대한 저해제 조합의 효과가 제조업체의 사용설명서에 따라서 세포-역가 Glo 시약 (Promega)을 이용하여 세포 생존력의 척도로서 ATP 함량을 결정하는데 이용된 복제 평판을 이용하여 사정되었다.

[0890] **결과 및 결론**

[0891] 화합물 **3** (3-배 희석 계열 및 5 포인트 적정에서 3.0 μM 내지 0.04 μM의 농도 범위)은 GLS4 (2-배 희석 계열 및 9 포인트 적정에서 2.0 μM 내지 0.008 μM의 농도 범위)와 조합으로 시험되었다. 단독으로 또는 합동으로 화합물 **3** 또는 GLS4 처리에서 관찰된 4개 복제물의 rcDNA에서 평균 저해 % 및 표준 편차는 표 26a에서 도시된다. 화합물 **3** 및 GLS4의 EC_{50} 값은 표 26b에서 도시된다. 2개 저해제 조합의 관찰된 값이 상기 농도 범위에 대해 상가 작용 (표 26a)으로부터 예상되는 것과 비교될 때, 이들 조합은 MacSynergy II 분석에 따라, 그리고 Prichard 및 Shipman (1992)에 의해 앞서 설명된 해석 규준을 이용하여, 주로 부가적이고, 그리고 아주 약간 길항적인 것으로 밝혀졌는데 (표 26b), 길항작용의 정도는 경미하지만 유의미하였다. 세포 생존력 또는 증식의 어떤 유의미한 저해도 분석된 표본에서 현미경검사 또는 세포-역가 Glo 검정에 의해 관찰되지 않았다.

[0892] **표 26a: 화합물 3 및 GLS4의 시험관내 조합**

[0893] [표 26a]

[약물]	0	0.008	0.016	0.031	0.063	0.125	0.250	0.50 0	1.00 0	2.00 0	평균 저해 %
화합물 3											GLS-4 (μM)
μM											
3.000	94.49	94.6	93.75	93.69	93.74	93.46	91.72	96.86	97	98.08	
1.000	86.87	85.25	87.63	86.08	84.96	87.22	92.9	96.99	97.4	97.01	
0.330	56.68	56.86	55.08	58.52	73.47	81.88	93.03	97.63	97.58	95.96	
0.110	19.99	13.03	18.43	23.81	53.91	74.43	95.32	97.65	97.52	98.12	
0.040	11.14	-4.48	-1.03	14.94	28.97	73.14	93.01	97.99	97.76	97.47	
0.000	0	-1.17	-5.82	7.03	38.95	77.82	94.65	97.48	98.51	98.22	

[약물]	0	0.00781 3	0.0156 3	0.0312 5	0.062 5	0.125	0.25	0.5	1	2	표준 편차 (%)
화합물 3											GLS-4 (μM)
μM											
3	1.29	1.34	1.38	0.33	0.71	0.37	1.37	0.57	0.95	1.25	
1.000	3.95	5.47	1.98	1.54	3.07	2.38	0.89	0.56	0.8	1.43	
0.330	6.93	11.7	7.92	5.09	4.36	5.69	1.6	0.73	1.02	2.33	
0.110	15.95	12.76	10.23	4.24	14.05	5.6	1.61	0.83	0.72	0.31	
0.040	22.92	26.91	6.36	31.59	16.09	5.54	1.82	0.68	0.72	0.31	
0	0	17.17	15.42	15.34	10.95	6.65	1.39	1.47	0.59	0.35	

[약물]	0	0.00781 3	0.0156 3	0.0312 5	0.062 5	0.125	0.25	0.5	1	2	부가적 저해
화합물 3											GLS-4 (μM)
μM											
3	94.49	94.43	94.17	94.88	96.64	98.78	99.71	99.86	99.92	99.99	
1.000	86.87	86.72	86.11	87.79	91.98	97.09	99.3	99.67	99.87	99.77	
0.330	56.68	56.17	54.16	59.73	73.55	90.39	97.68	98.91	99.35	99.23	
0.110	19.99	19.05	15.33	25.61	51.15	82.25	95.72	97.98	98.81	98.58	
0.040	11.14	10.1	5.97	17.39	45.75	80.29	95.25	97.76	98.58	98.42	
0	0	-1.17	-5.82	7.03	38.95	77.82	94.65	97.48	98.51	98.22	

[약물]	0	0.00781 3	0.0156 3	0.0312 5	0.062 5	0.125	0.25	0.5	1	2	상승작용 플롯 (95%)
화합물 3											본래로 니 수정 -
μM											
3	0	0	0	-0.543	-1.508	-4.594	-5.304	-1.882	-1.058	0	상승작용 0
1.000	0	0	0	0	-1.002	-5.205	-4.655	-1.582	-0.752	0	로그 용적 0
0.330	0	0	0	0	0	0	-1.514	0	0	0	
0.110	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	길항작용 -29.95
0.040	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-0.342	로그 용적 -4.13
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

[약물]	0	0.01	0.02	0.03	0.06	0.13	0.25	0.5	1	2	상승작용 플롯 (99.9%)
화합물 3											본래로 니 수정 96%
μM											
3.0	0	0	0	-0.103	-0.563	-4.102	-3.481	-1.124	0	0	상승작용 0
1.000	0	0	0	0	0	-2.037	-3.471	-0.837	0	0	로그 용적 0
0.330	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
0.110	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	길항작용 -15.72
0.040	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	로그 용적 -2.17
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

[0894]

[0895] **표 26b: bDNA 검정을 이용한 rcDNA 정량으로 DE19 세포 배양 시스템에서 시험관내 조합 연구의 결과의 요약:**

[0896] [표 26b]

저해제 A	저해제 B	저해제 A EC_{50} (μM)	저해제 B EC_{50} (μM)	상승작용 용적 (μM^2%)*	상승작용 로그 용적	길항작용 용적 (μM^2%)*	길항작용 로그 용적	결론
화합물 3	GLS4	0.272	0.077	0	0	-15.72	-2.17	부가적*
화합물 3	GLS4	0.272	0.077	0	0	-29.95	-4.13	경미한 길항작용#

*99.9% 신뢰 구간에서

[0897] #95% 신뢰 구간에서

[0898] 모든 간행물, 특허 및 특허 문서는 마치 개별적으로 참조로서 편입되는 것처럼 본원에 참조로서 편입된다. 본 발명은 다양한 특정하고 바람직한 구체예 및 기술에 관하여 설명되었다. 하지만, 발명의 사상과 범위를 벗어나지 않으면서, 많은 변이 및 변형이 만들어질 수 있는 것으로 이해되어야 한다.

서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> PROTIVA BIOTHERAPEUTICS, INC.

<120> THERAPEUTIC COMPOSITIONS AND METHODS FOR TREATING HEPATITIS B

<130> 08155.054WO1

<140> PCT/US2017/012614

<141> 2017-01-06

<150> 62/420,969

<151> 2016-11-11

<150> 62/409,180

<151> 2016-10-17

<150> 62/345,476

<151> 2016-06-03

<150> 62/343,514

<151> 2016-05-31

<150> 62/276,722

<151> 2016-01-08

<160> 39

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> Unlocked nucleobase analogue (UNA)

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (4)..(4)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (7)..(8)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (14)..(14)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (16)..(16)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221

> modified_base

<222> (20)..(21)

<223> Unlocked nucleobase analogue (UNA)

<400> 1

agguauguug cccguuuguu u 21

<210> 2

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (7)..(7)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (15)..(15)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (20)..(21)

<223> Unlocked nucleobase analogue (UNA)

<400> 2

acaaacgggc aacauaccuu u 21

<210> 3

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> Unlocked nucleobase analogue (UNA)

<220><221> modified_base

<222> (3)..(4)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (6)..(6)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (18)..(18)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (21)..(21)

<223> Unlocked nucleobase analogue (UNA)

<400> 3

gcucaguuua cuagugccau u 21

<210> 4

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (10)..(10)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (18)..(18)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<400> 4

uggcacuagu aaacugagcu u 21

<210> 5

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> Unlocked nucleobase analogue (UNA)

<220><221> modified_base

<222> (5)..(6)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (12)..(12)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220
><221> modified_base

<222> (16)..(17)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (20)..(21)

<223> Unlocked nucleobase analogue (UNA)

<400> 5

ccgugugcac uucgcuucau u 21

<210> 6

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (12)..(12)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (18)..(18)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (20)..(21)

<223> Unlocked nucleobase analogue (UNA)

<400> 6

ugaagcgaag ugcacacggu u 21

<210> 7

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> Unlocked nucleobase analogue (UNA)

<220><221> modified_base

<222> (3)..(4)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (6)..(6)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (18)..(18)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (20)..(21)

<223> Unlocked nucleobase analogue (UNA)

<400> 7

gcucaguuua cuagugccau u 21

<210> 8

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (10)..(10)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (18)..(18)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (20)..(21)

<223> Unlocked nucleobase analogue (UNA)

<400> 8

uggcacuagu aaacugagcu u 21

<210> 9

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> Unlocked nucleobase analogue (UNA)

<220><221> modified_base

<222> (5)..(6)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (12)..(12)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (16)..(16)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (21)..(21)

<223> Unlocked nucleobase analogue (UNA)

<400> 9

ccgugugcac uucgcuucau u 21

<210> 10

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (12)..(12)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (18)..(18)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<400> 10

ugaagcgaag ugcacacggu u 21

<210> 11

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> Unlocked nucleobase analogue (UNA)

<220><221

> modified_base

<222> (2)..(4)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (15)..(15)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (17)..(17)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (21)..(21)

<223> Unlocked nucleobase analogue (UNA)

<400> 11

cuggcucagu uuacuagugu u 21

<210> 12

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (6)..(6)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (13)..(13)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (15)..(15)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<400> 12

cacuaguaaa cugagccagu u 21

<210> 13

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> Unlocked nucleobase analogue (UNA)

<220><221> modified_base

<222> (5)..(6)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (12)..(12)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (16)..(16)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (20)..(21)

<223> Unlocked nucleobase analogue (UNA)

<400> 13

ccgugugcac uucgcuucau u 21

<210> 14

<211> 21

<212> RNA

<213

> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (12)..(12)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (18)..(18)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (20)..(21)

<223> Unlocked nucleobase analogue (UNA)

<400> 14

ugaagcgaag ugcacacggu u 21

<210> 15

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223

> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> Unlocked nucleobase analogue (UNA)

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (6)..(6)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (12)..(12)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (14)..(14)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (20)..(21)

<223> Unlocked nucleobase analogue (UNA)

<400> 15

gcucaguuua cuagugccau u 21

<210> 16

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (15)..(15)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (20)..(21)

<223> Unlocked nucleobase analogue (UNA)

<400> 16

uggcacuagu aaacugagcu u 21

<210> 17

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> Unlocked nucleobase analogue (UNA)

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (4)..(4)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (8)..(8)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (14)..(14)

<

223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (16)..(16)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (20)..(21)

<223> Unlocked nucleobase analogue (UNA)

<400> 17

agguauguug cccguuuguu u 21

<210> 18

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (7)..(7)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (15)..(15)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (19)..(19)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (20)..(21)

<223> Unlocked nucleobase analogue (UNA)

<400> 18

acaaacgggc aacauaccuu u 21

<210> 19

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222

> (1)..(1)

<223> Unlocked nucleobase analogue (UNA)

<220><221> modified_base

<222> (4)..(4)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (6)..(6)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (13)..(14)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (16)..(17)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (20)..(21)

<223> Unlocked nucleobase analogue (UNA)

<400> 19

gccgauccau acugcggaau u 21

<210> 20

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (8)..(8)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (13)..(13)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (18)..(18)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (20)..(21)

<223> Unlocked nucleobase analogue (UNA)

<400> 20

uuccgcagua uggaucggcu u 21

<210> 21

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> Unlocked nucleobase analogue (UNA)

<220><221> modified_base

<222> (4)..(4)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (6)..(6)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (13)..(14)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (16)..(17)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (21)..(21)

<223> Unlocked nucleobase analogue (UNA)

<400> 21

gccgauccau acugcggaau u 21

<210> 22

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (8)..(8)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (13)..(13)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (18)..(18)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<400> 22

uuccgcagua uggaucggcu u 21

<210> 23

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> Unlocked nucleobase analogue (UNA)

<220><221> modified_base

<222> (4)..(4)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (6)..(6)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (13)..(14)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (17)..(17)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (21)..(21)

<223> Unlocked nucleobase analogue (UNA)

<400> 23

gccgauccau acugcggaau u 21

<210> 24

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (8)..(8)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (13)..(13)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (18)..(18)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<400> 24

uuccgcagua uggaucggcu u 21

<210> 25

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> Unlocked nucleobase analogue (UNA)

<220><221> modified_base

<222> (4)..(4)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (6)..(6)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (13)..(14)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (17)..(17)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (20)..(21)

<223> Unlocked nucleobase analogue (UNA)

<400> 25

gccgauccau acugcggaau u 21

<210> 26

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (8)..(8)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (13)..(13)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (18)..(18)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (20)..(21)

<223> Unlocked nucleobase analogue (UNA)

<400> 26

uuccgcagua uggaucggcu u 21

<210> 27

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> Unlocked nucleobase analogue (UNA)

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (6)..(6)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (12)..(12)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (14)..(14)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (21)..(21)

<223> Unlocked nucleobase analogue (UNA)

<400> 27

gcucaguuua cuagugccau u 21

<210> 28

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (15)..(15)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<400> 28

uggcacuagu aaacugagcu u 21

<210> 29

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> Unlocked nucleobase analogue (UNA)

<220><221> modified_base

<222> (2)..(3)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (6)..(6)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (12)..(12)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (20)..(21)

<223> Unlocked nucleobase analogue (UNA)

<400> 29

cuggcucagu uuacuagugu u 21

<210> 30

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (15)..(15)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (20)..(21)

<223> Unlocked nucleobase analogue (UNA)

<400> 30

cacuaguaaa cugagccagu u 21

<210> 31

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (5)..(6)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (12)..(12)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (14)..(14)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (16)..(17)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<400> 31

ccgugugcac uucgcuucau u 21

<210> 32

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (2)..(4)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (6)..(6)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (10)..(10)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (12)..(12)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (14)..(15)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (17)..(19)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<400> 32

cuggcucagu uuacuagugu u 21

<210> 33

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221

> modified_base

<222> (4)..(4)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (6)..(6)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (8)..(8)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (10)..(10)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (12)..(12)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (14)..(14)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<400> 33

accucugccu aaucaucucu u 21

<210> 34

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (5)..(5)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (7)..(7)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (11)..(12)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (15)..(15)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (17)..(18)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<400> 34

ugaagcgaag ugcacacggu u 21

<210> 35

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (6)..(7)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (11)..(11)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (13)..(13)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (15)..(15)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (17)..(17)

<223> 2'OMe modified nucleotide

<400> 35

cacuaguaaa cugagccagu u 21

<210> 36

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
<220><221> modified_base
<222> (7)..(7)
<223> 2'OMe modified nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (9)..(9)
<223> 2'OMe modified nucleotide
<220><221>
modified_base
<222> (13)..(13)
<223> 2'OMe modified nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (15)..(15)
<223> 2'OMe modified nucleotide
<220><221> modified_base
<222> (17)..(17)
<223> 2'OMe modified nucleotide
<400> 36
gagaugauua ggcagagguu u 21
<210> 37
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer
<400> 37
gacaaacggg caacatacct t 21

<210> 38
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer

<400> 38

gtgtctgcgg cgttttatca 20

<210> 39

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

probe

<400> 39

cctctkcatc ctgctgctat gcctcatc 28