



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0071017  
(43) 공개일자 2011년06월27일

(51) Int. Cl.

A61K 9/127 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01) C12N 15/88 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-7011136

(22) 출원일자(국제출원일자) 2009년10월16일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2011년05월16일

(86) 국제출원번호 PCT/US2009/060930

(87) 국제공개번호 WO 2010/045512

국제공개일자 2010년04월22일

(30) 우선권주장

61/106,062 2008년10월16일 미국(US)

61/167,379 2009년04월07일 미국(US)

(71) 출원인

마리나 바이오테크, 인크.

미합중국 워싱턴주 98021-7266, 보텔, 몬테 빌라  
파크웨이 3830

(72) 발명자

폴리스키, 배리, 에이.

미국 80302 콜로라도 볼더 마운틴 뷰 로드 449

아다미, 로저, 씨.

미국 98012 워싱턴 보텔 36번 드라이브 에스이  
18719

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

양영준, 양영환

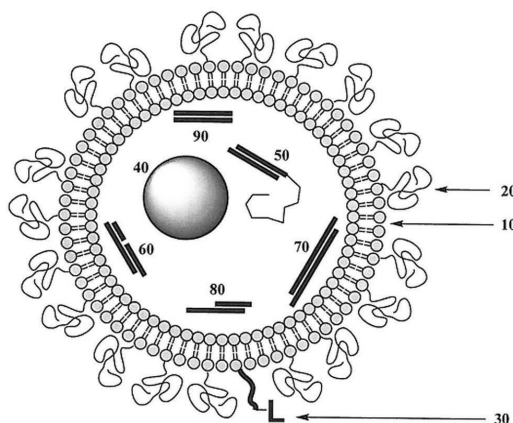
전체 청구항 수 : 총 61 항

(54) 유전자 침묵 치료제의 리포솜에 의한 효율적인 전달을 위한 프로세스 및 조성물

(57) 요약

활성제 수용액을 유기 용매에서 하나 이상의 DILA2 아미노산 화합물 또는 지질을 포함하는 리포솜을 형성하는 성분 용액과 접촉시켜, 충돌 스트림을 만들어서 조제된 치료제의 리포솜 전달 프로세스 및 조성물. 유속, pH, 그리고 항온처리 시간을 포함하는 프로세스를 이용하여 치료 용도에 리포솜 성분의 형성을 조절한다. 충돌 스트림이 수거되고, 항온처리되어 활성제를 포집시킨 리포솜 제제가 조제된다. 조성물은 완충액으로 쿠엔칭될 수 있고, 그리고 점선흐름방식 및 정용여과에 의해 여과되고, 약제학적 조성물로서 마무리를 위한 수단으로 처리된다. 약물 피운반체를 전달하는 효율이 제공된다. 조성물은 하나 이상의 운반체 입자들을 포함하는 리포솜을 포함할 수 있고, 각 운반체 입자는 활성제과 펩티드를 가지며, 이때, 활성제양에 대해 펩티드양과 리포솜 양의 합의 비율은 약 15 미만이 된다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

**템플린, 마이클, 브이.**

미국 98012 워싱턴 보텔 30번 드라이브 에스이  
19112

**하비, 피에로**

미국 98011 워싱턴 보텔 홀 로드 17725 넘버105

**존스, 레이첼, 이.**

미국 98155 워싱턴 쇼어라인 엔이 150번 스트리트  
2503

**지야나니, 자야, 에스.**

미국 98052 워싱턴 레드몬드 엔이 85번 스트리트  
16275 넘버308

**휴스턴, 마이클, 이.**

미국 01720 매사추세츠 액턴 호스슈 드라이브 15

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

- a) 활성제의 수용성 완충액을 포함하는 제 1 스트림을 제공하는 단계;
- b) 유기 용매 중의 하나 이상의 리포솜 형성 화합물의 비-수용성 용액을 포함하는 제 2 스트림을 제공하는 단계;
- c) 제 2 스트림에 제 1 스트림을 충돌시켜, 약 20% 내지 약 50% v/v의 유기 용매 농도와 약 6 내지 약 7.4의 pH를 가지는 충돌 스트림을 형성하는 단계;
- d) 약 20℃ 내지 약 35℃의 온도에서 약 0.5 시간 내지 약 8 시간 동안 충돌 스트림을 수거 용기에서 항온처리시켜, 리포솜을 포함하는 항온처리물을 형성하는 단계를 포함하는, 활성제를 포함하는 조성물의 제조 방법.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 약 20% v/v 미만의 유기 용매 농도를 만드는데 충분한 완충액을 항온처리물에 첨가함으로써 항온처리물을 쿼렌칭(quenching)하는 것을 더 포함하는 방법.

### 청구항 3

제1항에 있어서, 리포솜 형성 화합물이 하나 이상의 DILA2 아미노산 화합물인 방법.

### 청구항 4

제1항에 있어서, 리포솜 형성 화합물 중 하나가 PONA, C18:1-norArg-C16인 방법.

### 청구항 5

제1항에 있어서, 제 1 스트림의 체적유량(volume flow rate)이 제 2 스트림의 체적유량보다 2배 이상인 것을 더 포함하는 방법.

### 청구항 6

제1항에 있어서, 제 1 스트림의 체적유량이 제 2 스트림의 체적유량보다 3배 이상인 것을 더 포함하는 방법.

### 청구항 7

제1항에 있어서, 제 1 스트림의 체적유량이 제 2 스트림의 체적유량보다 5배 이상인 것을 더 포함하는 방법.

### 청구항 8

제1항에 있어서, 충돌 스트림의 pH를 약 3 내지 약 6이 되도록 조정하는 것을 더 포함하는 방법.

### 청구항 9

제1항에 있어서, 약 3 내지 약 6의 pH에서 항온처리하는 것을 더 포함하는 방법.

### 청구항 10

제1항에 있어서, 유기 용매의 농도를 조정하기 위하여 수거 용기에 완충액을 첨가하는 것을 더 포함하는 방법.

### 청구항 11

제1항에 있어서, 활성제가 약 50% 초과로 리포솜에 포집되는 것을 더 포함하는 방법.

### 청구항 12

제1항에 있어서, 활성제가 약 70% 초과로 리포솜에 포집되는 것을 더 포함하는 방법.

### 청구항 13

제1항에 있어서, 활성제가 유전자를 침묵시키는 물질, 유전자를 조절하는 물질, 안티센스 물질, 펩티드 핵산 물질, 리보자임 물질, RNA 물질, 또는 DNA 물질인 방법.

### 청구항 14

제1항에 있어서, 활성제가 UsiRNA인 방법.

### 청구항 15

제1항에 있어서, 활성제가 억제학적 화합물인 방법.

### 청구항 16

제1항에 있어서, 리포솜 조성물이 45℃ 온도에서 7일 동안 유전자를 침묵시키는 활성을 보유하는 것인 방법.

### 청구항 17

제1항에 있어서, 리포솜 조성물이 45℃ 온도에서 7일 동안 활성제의 포집을 유지하는 것인 방법.

### 청구항 18

제1항에 있어서, 점선흐름방식 여과후, 리포솜이 직경이 약 160 nm 미만인 균일한 크기로 이루어진 것인 방법.

### 청구항 19

제1항에 있어서, 점선흐름방식 여과후, 리포솜이 약 40 nm 내지 약 160 nm의 평균 직경을 가진 균일한 크기로 이루어진 것인 방법.

### 청구항 20

제1항에 있어서, 점선흐름방식 여과후, 리포솜이 약 80 nm 내지 약 150 nm의 평균 직경을 가진 균일한 크기로 이루어진 것인 방법.

### 청구항 21

제1항에 있어서, 점선흐름방식 여과 및 정용여과에 의해 항온처리물을 여과하는 것을 더 포함하는 방법.

### 청구항 22

제1항에 있어서, 항온처리물을 살균하는 것을 더 포함하는 방법.

### 청구항 23

제1항에 있어서, 유기 용매를 억제학적으로 허용가능한 상이한 완충액으로 교체하는 것을 더 포함하는 방법.

### 청구항 24

제1항에 있어서, 유기 용매를 제 1 스트림에 약 1% 내지 약 40% v/v의 농도로 첨가하는 것을 더 포함하는 방법.

### 청구항 25

제1항에 있어서, 유기 용매가 주사용 멸균수 중 약 40 내지 약 99% v/v의 농도의 (C1-6)알카놀인 방법.

### 청구항 26

제1항에 있어서, 유기 용매가 주사용 멸균수 중 약 70 내지 약 95% v/v의 농도의 (C1-6)알카놀인 방법.

### 청구항 27

제1항에 있어서, 항온처리 시간은 약 1 시간 내지 약 4 시간인 방법.

#### 청구항 28

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항의 방법에 의해 조제된 약제학적 조성물.

#### 청구항 29

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항의 방법에 따라 조성물을 조제하고 상기 조성물로 세포를 처리하는 것을 포함하는, 치료 핵산을 생물학적 세포로 전달하는 방법.

#### 청구항 30

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항의 방법에 따라 조성물을 조제하고 세포를 상기 조성물로 처리하는 것을 포함하는, 생물학적 세포에서 유전자 발현을 억제시키는 방법.

#### 청구항 31

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항의 방법에 따라 조성물을 조제하고 상기 조성물을 포유동물에 투여하는 것을 포함하는, 포유동물에서 유전자 발현을 억제시키는 방법.

#### 청구항 32

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항의 방법에 따라 조성물을 조제하고 상기 조성물을 인간에게 투여하는 것을 포함하는, 인간에서 암, 방광암, 간암, 간질환, 과콜레스테롤혈증, 염증성 질환, 대사질환, 염증, 관절염, 류마티스성 관절염, 뇌염, 골절, 심장질환 및 바이러스성 질환인 질환을 치료하는 방법.

#### 청구항 33

암, 방광암, 간암, 간질환, 과콜레스테롤혈증, 염증성 질환, 대사질환, 염증, 관절염, 류마티스성 관절염, 뇌염, 골절, 심장질환 및 바이러스성 질환을 포함하는 질환을 치료하기 위하여, 제1항 내지 제27항 중 어느 한 항의 방법에 따라 제조된 조성물의 용도.

#### 청구항 34

암, 방광암, 간암, 간질환, 과콜레스테롤혈증, 염증성 질환, 대사질환, 염증, 관절염, 류마티스성 관절염, 뇌염, 골절, 심장질환, 및 바이러스성 질환을 포함하는 질환을 치료하기 위한 약제의 조제에 있어서 제1항 내지 제27항 중 어느 한 항의 방법에 따라 제조된 조성물의 용도.

#### 청구항 35

하나 이상의 운반체 입자들을 함유하는 리포솜을 포함하고, 각 운반체 입자는 활성 핵산 물질과 펩티드를 포함하며, 핵산 물질 질량에 대한 펩티드 질량과 리포솜 질량의 합의 비율이 약 15 미만인 조성물.

#### 청구항 36

제35항에 있어서, 핵산 물질 질량에 대한 펩티드 질량과 리포솜 질량의 합의 비율이 약 12 미만인 조성물.

#### 청구항 37

제35항에 있어서, 핵산 물질 질량에 대한 펩티드 질량과 리포솜 질량의 합의 비율이 약 10 미만인 조성물.

#### 청구항 38

제35항에 있어서, 핵산 물질 질량에 대한 펩티드 질량과 리포솜 질량의 합의 비율이 약 9 미만인 조성물.

#### 청구항 39

제35항에 있어서, 핵산 물질 질량에 대한 펩티드 질량과 리포솜 질량의 합의 비율이 약 8 미만인 조성물.

#### 청구항 40

제35항에 있어서, 핵산 물질 질량에 대한 펩티드 질량과 리포솜 질량의 합의 비율이 약 5 미만인 조성물.

**청구항 41**

제35항에 있어서, 생체내 ApoB의 유전자 침묵을 위하여 50% 이상의 녹다운 활성을 갖는 조성물.

**청구항 42**

제35항에 있어서, 생체내 ApoB의 유전자 침묵을 위하여 70% 이상의 녹다운 활성을 갖는 조성물.

**청구항 43**

제35항에 있어서, 생체내 ApoB의 유전자 침묵을 위하여 90% 이상의 녹다운 활성을 갖는 조성물.

**청구항 44**

제35항에 있어서, 아미노산 지질을 포함하는 리포솜을 함유하는 조성물.

**청구항 45**

제35항에 있어서, 하전 운반체 입자를 함유하는 조성물.

**청구항 46**

제35항에 있어서, 음하전 운반체 입자를 함유하는 조성물.

**청구항 47**

제35항에 있어서, 양하전 운반체 입자를 함유하는 조성물.

**청구항 48**

제35항에 있어서, 활성 핵산 물질이 RNAi-유도성 물질 또는 안티센스 물질인 조성물.

**청구항 49**

제35항에 있어서, 활성 핵산 물질이 RNAi-유도성 물질 또는 안티센스 물질이며 각 리포솜이 활성제 분자의 카피(copy)를 500개 이상 함유하는 것인 조성물.

**청구항 50**

제35항에 있어서, 활성 핵산 물질이 RNAi-유도성 물질 또는 안티센스 물질이며 각 리포솜이 활성제 분자의 카피를 1,000개 이상 함유하는 것인 조성물.

**청구항 51**

제35항에 있어서, 활성 핵산 물질이 RNAi-유도성 물질 또는 안티센스 물질이며 각 리포솜이 활성제 분자의 카피를 5,000개 이상 함유하는 것인 조성물.

**청구항 52**

제35항에 있어서, 펩티드가 절단가능한 펩티드인 조성물.

**청구항 53**

제35항에 있어서, 펩티드가 교차연결가능한 펩티드인 조성물.

**청구항 54**

제35항에 있어서, 펩티드가 서열 번호 373를 갖는 PN4110인 조성물.

**청구항 55**

제35항에 있어서, 펩티드가 서열 번호 375를 갖는 PN183인 조성물.

#### 청구항 56

제35항 내지 제55항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 조제하고, 상기 조성물로 세포를 처리하는 것을 포함하는, 활성 핵산 물질을 세포로 전달하는 방법.

#### 청구항 57

제35항 내지 제55항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 조제하고 상기 조성물로 세포를 처리하는 것을 포함하는, 세포에서 유전자 발현을 억제시키는 방법.

#### 청구항 58

제35항 내지 제55항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 조제하고 상기 조성물을 포유동물에 투여하는 것을 포함하는, 포유동물에서 유전자 발현을 억제시키는 방법.

#### 청구항 59

제35항 내지 제55항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 조제하고 상기 조성물을 인간에게 투여하는 것을 포함하는, 인간에서 류마티스성 관절염을 포함하는 염증성 질환, 과콜레스테롤혈증을 포함하는 대사질환, 간질환, 뇌염, 골절, 심장질환, 간염 및 독감을 포함하는 바이러스성 질환 및 암에서 선택되는 질환을 치료하는 방법.

#### 청구항 60

류마티스성 관절염을 포함하는 염증성 질환, 과콜레스테롤혈증을 포함하는 대사질환, 간질환, 뇌염, 골절, 심장질환, 간염 및 독감을 포함하는 바이러스성 질환 및 암을 포함하는 질환을 치료하기 위한 약제의 조제에 있어서의 제35항 내지 제55항 중 어느 한 항에 따른 조성물의 용도.

#### 청구항 61

류마티스성 관절염을 포함하는 염증성 질환, 과콜레스테롤혈증을 포함하는 대사질환, 간질환, 뇌염, 골절, 심장질환, 간염 및 독감을 포함하는 바이러스성 질환 및 암에서 선택된 질환을 치료하기 위한, 제35항 내지 제55항 중 어느 한 항에 따른 조성물의 용도.

## 명세서

### 기술분야

[0001] 본 공개내용은 일반적으로 생물학적 활성제 및 약물의 전달을 위한 프로세스, 조성물 및 용도에 관한 것이다. 본 공개내용의 프로세스 및 조성물은 선택된 세포들, 조직들, 기관들 또는 대상체들에게 치료 물질을 전달하는 데 유용하다. 본 발명의 구체예들은 핵산 물질들을 포함하는 조제약 및 치료약의 전달을 구현하고, 약물 전달을 실행하는 물질을 조제하고 사용하는 방법을 구현할 수 있다. 특히, 본 발명은 리포좀 또는 라멜라 소포를 포함하는 프로세스 및 조성물 그리고 다른 형태의 전달 증진 조성물 및 제제, 그리고 이러한 전달 물질의 치료 방법 및 용도에 관한 것이다.

[0002] 서열 목록

[0003] 본 출원은 2009년 10월 14일자로 작성되고, 크기가 99,622 바이트이고 본 출원에 의하여 전체로서 참조하여 통합된 파일명이 MD-08-16PCT.txt 인 ASCII 파일로서 EFS-Web을 통하여 제출된 서열 목록을 포함한다.

### 배경기술

[0004] 대상체로의 치료 화합물의 전달은 표적 세포 또는 조직에 도달하는 화합물의 제한된 능력에 의해, 또는 세포 내에서 화합물의 제한된 진입 또는 왕래에 의해 방해될 수 있다. 치료 물질의 전달은 일반적으로 세포의 막에 의해 제한된다. 이러한 전달 장벽 및 제한으로 인하여 원하는 효과를 얻기 위하여 바람직한 농도보다 훨씬 높은 농도의 화합물을 사용하여야 할 수도 있으며, 이 경우 독성 효과 및 부작용의 위험을 초래한다.

[0005] 특정 치료 화합물의 전달에 있어서 추가 취약점이 있으면 상기 화합물이 운반 프로세스 중에 분해되지 않도록

상기 화합물을 보호하여야 한다. 특히, 혈액 순환을 통한 전신 전달에 의해 화합물은 다양한 단백질, 효소 그리고 면역학적 성분 및 인자에 시달릴 수 있다.

[0006] 전달을 위한 하나의 전략은 자연적 또는 합성 친유성 또는 폴리머 운반체 분자들을 이용하여 세포내로의 화합물의 운반을 개선시키는 것이다. 핵산 및 단백질과 같은 외인성 분자를 배제시키면서, 이들 물질은 세포로의 선택적 진입을 위해 존재하는 기전을 이용할 수 있다. 예를 들면, 양이온 지질은 약물과 상호작용하고, 세포막과의 접촉을 제공할 수 있다. 특정의 자연적 및 합성 친유성 분자는 약물의 운반체로서 리포솜 또는 입자로 기질화될 수도 있다. 나노미터 또는 서브미크론 크기의 리포솜은 세포내이입과 같이 세포내로의 선택적 진입을 위한 기전을 이용할 수 있다. 리포솜 약물 운반체들은 세포에 의한 약물 분자의 흡수를 개선시키면서 약물 분자가 분해되지 않도록 약물 분자를 보호할 수 있다. 또한, 리포솜 약물 운반체는 정전기적 및 다른 상호작용에 의해 특정 화합물을 포집하거나 결합할 수 있고, 막을 통하여 운반을 개시하기 위하여 음하전 세포막과 상호작용할 수 있다.

[0007] 리포솜의 단점은 치료 리포솜 제제의 생물학적 활성이 일반적으로 리포솜 내부로의 활성제의 부하 수준에 따라 달라지는 것이다. 일반적으로, 높은 수준의 부하가 높은 치료 활성을 제공하는데 바람직하다. 더욱이, 리포솜의 부하는 제제내에 남아있을 추가 운반체 분자를 요구할 수 있다.

[0008] 약물 전달을 위한 리포솜의 또 다른 취약점은 이를 이용하면 전달 제제에 질량을 부가하는 것이다. 치료 제제의 생물학적 활성 및 이의 상대적 독성은 제제를 조제하는데 이용되는 친유성 분자 및 운반체와 같은 추가 성분의 성질 및 부피에 영향을 받을 수 있다. 활성제 전달을 위한 통상적인 지질-기반의 리포솜 제제는 활성제 질량에 대해 10 내지 15배 이상의 지질 분자 질량의 비율을 가질 수 있다. 일반적으로, 활성제에 대해 지질 또는 운반체의 비율이 낮을수록 더 효율적이며 바람직하다. 핵산 물질들을 위한 이와 같은 리포솜 제제는 리포솜당 핵산 물질 분자의 불과 수백 개의 카피를 포함할 수 있다.

[0009] 조절 RNA의 이해 및 RNA 간섭 (RNAi)의 발생, RNAi 치료, RNA 약물, 안티센스 치료, 그리고 유전자 치료의 이해로 인하여 세포내로 활성 핵산 물질들을 도입시키는 효과적인 수단의 필요성이 증가되었다. 일반적으로, 핵산은 세포 또는 세포들 또는 원형질내에서 제한된 시간 동안만 안정적이다. 그러나, 핵산-기반의 물질들은 조성물 및 제제에서 안정화될 수 있으며, 세포 전달을 위해 분산될 수 있다.

[0010] 필요한 것은 약물 및 생물학적 활성 분자의 전신 또는 국소 전달을 위한 프로세스, 조성물 및 용도이다. 그 중에서, 생물학적 활성 및 치료 분자의 전달 효과를 증가시킬, 리포솜 형태를 포함하는 전달 구조 및 운반체를 만드는 프로세스가 필요하다. 특히, 리포솜 제제, 유전자 침묵 치료, 및 기타 물질들을 위한 것으로서, 감소된 양의 운반체 물질을 이용하여 높은 생물학적 활성과 함께 효율적인 전달을 하는 것이 바람직하다.

[0011] **요약**

[0012] 본 공개내용은 궁극적으로 치료제로 사용되는 약물의 세포내, 그리고 생체내 전달을 위한 새로운 프로세스, 조성물 및 제제를 제공하며, 이들은 일반적으로 세포보호를 유지하며, 상대적으로 낮은 독성을 유지한다. 본 공개내용의 방법 및 조성물은 선택된 세포들, 조직들, 그리고 기관들에게 약물을 전달하는데 유용하다.

[0013] 일부 측면에서, 본 공개내용은 활성 핵산 물질들 또는 분자를 세포들에게 전달하는 프로세스, 조성물 및 방법을 제공한다. 활성제는 약제학적 작용을 통하여, 또는 RNA 간섭의 반응, 또는 안티센스 또는 리보자임 효과를 생성시켜서 치료 또는 약리 효과를 제공할 수 있다. 본 공개내용의 활성제는 게놈 발현의 조절, 또는 유전자 치료에 유용할 것이다.

[0014] 본 발명의 구체예들은 하나 이상의 활성제를 포함하는 리포솜 조성물을 포함하는 조성물을 만드는 프로세스를 제공하는데, 이 프로세스는 활성제의 수용성 완충 용액을 포함하는 제 1 스트림을 제공하고, 하나 이상의 리포솜을 형성하는 화합물의 비-수용액을 포함하는 제 2 스트림을 제공하고, 제 1 스트림을 제 2 스트림에 충돌시켜, 이에 의해 약 20% 내지 약 50% v/v의 유기 용매 농도를 가진 충돌 스트림을 형성시키는 것을 포함한다. 충돌 스트림은 약 6 내지 약 7.4의 pH를 가질 수 있다. 충돌 스트림은 약 20℃ 내지 약 35℃의 온도 범위에서 약 0.5 시간 내지 약 8 시간 기간 동안 수거 용기내에서 항온처리되어, 리포솜을 포함하는 항온처리물 (incubate)이 형성된다.

[0015] 특정 구체예들에서, 하나 이상의 활성제를 함유하는 조성물을 만드는 프로세스는 약 20% v/v 미만의 유기 용매 농도를 만드는데 충분하도록 완충액을 항온처리물에 추가시켜 항온처리물을 쿠엔칭하는 것을 포함할 수 있다.

[0016] 일부 측면에서, 본 발명의 리포솜을 형성하는 화합물은 하나 이상의 DILA2 아미노산 화합물일 수 있다. DILA2



아미노산 화합물은 리포솜을 형성할 수 있는 아미노산 기를 포함하는 합성 유기 화합물이다. DILA2 아미노산 화합물은 아미노산 기의 N-말단 또는 C-말단 또는 양단에서 전달을 증진시키는 또는 친유성 꼬리를 포함할 수 있다.

- [0017] 일부 변이에서, 하나 이상의 활성제를 포함하는 조성물을 만드는 프로세스는 활성제를 포함하는 제 1 스트림의 체적유량(volume flow rate)이 리포솜을 형성하는 분자를 포함하는 제 2 스트림의 체적유량의 2배 이상인 것을 더 포함할 수 있다. 특정 변이에서, 제 1 스트림의 체적유량은 제 2 스트림의 체적유량의 3배 이상이며, 또는 제 2 스트림의 5배 이상이다.
- [0018] 본 공개내용의 활성제는 UsiRNA, 핵산을 함유하는 물질, 유전자를 침묵시키는 물질, 유전자를 조절하는 물질, 안티센스 물질, 펩티드 핵산 물질, 리보자임 물질, RNA 물질, 또는 DNA 물질일 수 있다. 일부 구체예들에서, 활성제는 약제학적 화합물, 소(small) 분자 약제일 수 있다.
- [0019] 하나 이상의 활성제를 포함하는 리포솜 조성물을 만드는 프로세스는 유기 용매의 농도를 조정하기 위하여 수거 용기에 완충액을 첨가하는 단계를 더 포함할 수 있다. 충돌 스트림의 pH는 약 3 내지 약 6으로 조정될 수 있다. 항온처리(incubating) 단계는 약 3 내지 약 6 범위의 pH에서 실행될 수 있다.
- [0020] 특정 측면들에서, 활성제는 리포솜에 약 50% 이상 수준, 또는 약 70% 이상의 수준으로 포집될 수 있다.
- [0021] 일부 측면에서, 본 발명은 45°C에서 7일간 유전자를 침묵시키는 활성을 보유하는 리포솜 조성물을 제공할 수 있다. 특정 측면들에서, 리포솜 조성물은 45°C 온도에서 7일간 활성제의 포집을 유지시킬 수 있다.
- [0022] 본 발명의 프로세스는 접선흐름방식(tangential flow) 여과 및 정용여과(diafiltration)에 의해 항온처리물을 여과시키는 것을 포함할 수 있다. 접선흐름방식 여과 후에, 리포솜은 직경이 약 160 nm 미만의 균일한 크기로 이루어질 수 있고, 약 40 nm 내지 약 160 nm, 또는 약 80 nm 내지 약 150 nm의 직경을 가질 수 있다. 추가 구체예에서, 항온처리물을 살균할 수 있으며, 유기 용매는 약제학적으로 수용가능한 상이한 완충액으로 교체될 수 있다.
- [0023] 본 공개내용의 일부 프로세스에서, 항온처리물은 접선흐름방식 여과 및 정용여과에 의해 여과될 수 있다. 특정 구체예들에서, 항온처리물은 살균될 수 있다.
- [0024] 본 발명의 프로세스는 약 1% 내지 약 40% v/v 범위의 농도에서 제 1 스트림에의 유기 용매의 첨가를 포함할 수 있다.
- [0025] 유기 용매는 주사용 멸균수에 함유된 약 40 내지 약 99% v/v 의 농도 또는 약 70 내지 약 95% 농도의 (C1-6) 알카놀일 수 있다.
- [0026] 본 공개내용의 프로세스의 항온처리 시간은 약 1 시간 내지 약 4 시간일 수 있다.
- [0027] 본 발명은 공개된 프로세스의 임의의 변이에 의해 만들어진 약제학적 조성물을 추가 고려한다.
- [0028] 일반적으로, 본 공개내용은 치료 핵산을 생물학적 세포로 전달하는 방법을 포함한다.
- [0029] 일부 구체예들에서, 본 공개내용은 생물학적 세포에서 유전자의 발현을 저해시키는 방법을 제공하는데, 이 방법은 본 발명의 프로세스에 따른 조성물을 조제하고, 세포를 이 조성물로 치료하는 것이다.
- [0030] 여기에서 설명된 포유동물에서 유전자의 발현을 저해시키는 방법은 본 발명의 프로세스에 따른 조성물을 조제하고, 이 조성물을 포유동물에게 투여하는 것이다.
- [0031] 본 발명의 구체예들은 본 발명의 프로세스에 따른 조성물을 조제하고, 이 조성물을 인간에게 투여함으로써 인간에서 질환을 치료하는 방법을 더 제공할 수 있는데, 여기서 질환은 암, 방광암, 간암, 간 질환, 과콜레스테롤혈증, 염증성 질환, 대사 질환, 염증, 관절염, 류마티스성 관절염, 뇌염, 뼈 골절, 심장 질환, 그리고 바이러스성 질환이다.
- [0032] 본 공개내용은 질환을 치료하기 위한 조성물의 용도, 그리고 질환의 치료를 위한 약물 조제에 조성물의 용도를 더 고려한다.
- [0033] 본 발명은 생물학적 물질을 세포로 전달하기 위한 조성물 및 제제를 제공한다. 더 상세하게는, 특정 측면들에서, 본 공개내용은 나노미터 크기 규모의 리포솜 제제 및 운반체 입자를 제공한다. 운반체 입자들은 리포솜 내로 부하될 수 있고, 전달에서 증가된 안정성을 나타낼 수 있으며, 그리고 유전자 발현 또는 활성을 조절

하기 위하여 약물을 효율적으로 전달할 수 있다.

- [0034] 본 공개내용은 약물 및 생물학적 활성 분자의 전신 및 국소 전달을 개선시키기 위한 조성물, 방법 및 용도를 제공한다. 그중에서, 본 출원은 세포 안으로 활성제를 증가된 전달 효율을 가지고 전달될 수 있는 전달 구조 및 운반체를 만들고, 그리고 이용하는 새로운 조성물 및 방법을 제공한다.
- [0035] 일부 구체예들에서, 본 공개내용은 하나 이상의 운반체 입자들을 포함하는 리포솜을 포함하는 조성물을 제공하는데, 각 운반체 입자는 활성 핵산 물질 및 펩티드로 구성되며, 이때, 핵산 물질의 양에 대해 펩티드 양과 리포솜 양의 비율은 약 15 미만, 또는 약 12 미만, 또는 약 10 미만, 또는 약 9 미만, 또는 약 8 미만, 또는 약 5 미만이 된다.
- [0036] 특정 구체예들에서, 본 발명은 생체내에서 ApoB의 유전자 침묵의 50% 또는 그 이상의, 또는 70% 또는 그 이상의, 또는 90% 또는 그 이상의 녹다운(knockdown)시키는 활성을 가지는 조성물을 제공한다.
- [0037] 일부 변이에서, 본 공개내용의 조성물은 아미노산 지질을 포함하는 리포솜을 포함할 수 있다.
- [0038] 특정 측면들에서, 본 공개내용의 조성물은 하전 운반체 입자, 음하전 운반체 입자, 또는 양하전 운반체 입자를 포함할 수 있다.
- [0039] 특정 변이에서, 활성 핵산 물질은 RNAi-유도성 물질 또는 안티센스 물질이다. 각 리포솜은 활성제 분자의 500개 이상의 카피, 또는 1000개 이상의 카피, 또는 5000 개 이상의 카피를 포함할 수 있다.
- [0040] 일부 변이에서, 운반체 입자로 이용된 펩티드는 절단가능한(cleavable) 펩티드 또는 교차연결가능한(crosslinkable) 펩티드다. 일부 구체예들에서, 펩티드는 PN4110 또는 PN183이다.
- [0041] 본 공개내용은 리포솜 조성물을 조제하고, 세포를 이 조성물로 치료하는 것을 포함하는, 세포로 활성 핵산 물질을 전달하는 방법을 제공한다.
- [0042] 특정 측면들에서, 본 공개내용은 리포솜 조성물을 조제하고, 세포를 이 조성물로 치료하는 것을 포함하는, 세포의 유전자의 발현을 억제시키는 방법을 제공한다.
- [0043] 일부 측면에서, 본 공개내용은 리포솜 조성물을 조제하고, 이 조성물을 포유동물에게 투여하는 것을 포함하는, 포유동물의 유전자 발현을 억제시키는 방법을 제공한다.
- [0044] 일부 구체예들에서, 본 공개내용은 리포솜 조성물을 조제하고, 이 조성물을 인간에게 투여하는 것을 포함하는, 인간의 류마티스성 관절염을 포함하는 염증성 질환, 과콜레스테롤혈증을 포함하는 대사질환, 간질환, 뇌염, 뼈 골절, 심장질환, 간염 및 인플루엔자를 포함하는 바이러스성 질환 그리고 암에서 선택된 질환을 치료하는 방법을 제공한다.
- [0045] 특정 구체예들에서, 본 공개내용은 류마티스성 관절염을 포함하는 염증성 질환, 과콜레스테롤혈증을 포함하는 대사질환, 간질환, 뇌염, 뼈 골절, 심장질환, 간염 및 인플루엔자를 포함하는 바이러스성 질환 그리고 암을 포함하는 질환을 치료하는 약물 조제에 있어 리포솜 조성물의 용도를 제공한다.
- [0046] 일부 변이에서, 본 공개내용은 류마티스성 관절염을 포함하는 염증성 질환, 과콜레스테롤혈증을 포함하는 대사질환, 간질환, 뇌염, 뼈 골절, 심장질환, 간염 및 인플루엔자를 포함하는 바이러스성 질환 그리고 암에서 선택된 질환을 치료하는 리포솜 조성물의 용도를 제공한다.
- [0047] 이 요약은 본 발명의 상세한 설명, 도면, 첨부된 실시예 및 청구범위와 함께 전체로서, 본 발명의 공개내용을 포함한다.

### 도면의 간단한 설명

- [0048] 도 1: 본 발명의 리포솜 구체예의 개략도를 나타내며, 이때 특정 리포솜을 형성하는 화합물은 이중층 소포(10)를 형성한다. 이 구체예에서, 리포솜의 바깥 층은 리포솜을 형성하는 분자 중 하나의 머리 기에 부착된 폴리테트라에틸렌글리콜 쇄(20)에 의해 보호된다. 리포솜의 바깥 층은 또한 세포 또는 조직을 특이적으로 표적하는 리간드(30)를 제공한다. 이 구체예에서, 리포솜 소포는 응축된 RNA 나노입자 (40), 이중-가닥 RNA 듀플렉스 펩티드 콘쥬게이트 (50), 삼중-가닥 mRNA (60), 다이스 효소(Dicer enzyme) 기질 RNA (70), 긴 오버행이 있는 dsRNA (80), 그리고 둔단(blunt end)가 있는 siRNA (90)을 포함하는 활성 간섭 RNA 성분을 포함하는 피운반체를 포함하며, 이들은 본 구체예에 모여있다.

도 2: 본 공개내용의 리포좀 조성물을 조제하는 특정 구체예의 순서도다. 활성제 용액, 완충용액, 그리고 하나 이상의 리포좀을 형성하는 화합물의 용액을 포함하는 반응 물질 용액을 별도 조제하고, 저장용기(200)에 제공된다. 활성제 용액 및 리포좀을 형성하는 화합물의 용액은 충돌 스트립(210)에서 접촉된다. 충돌 스트립은 수거용기(220)에 수거된다. 수거된 물질은 항온처리 프로세스 (230) 용 저장용기에 유지되며, 이 단계후, 물질은 쿨링(quenching)(240)에 의해 안정화된다. 쿨링된 물질은 여과 프로세스(250)로 간다. 출고되는 여과물(260)은 최종 프로세스로 진행된다.

도 3: 본 공개내용의 리포좀 조성물을 마무리하기 위한 특정 구체예의 순서도다. 리포좀 조성물의 제조부터 출고되는 여과물이 될 수 있는 리포좀 조성물은 살균된다(300). 살균된 조성물을 운반하는 용기를 채우고(310) 그리고 마무리하고(320), 이 단계 이후 살균 조성물은 저장(340)을 위하여 냉동된다(330). 최종 조성물은 사용을 위해 운반된다(350).

도 4: 본 공개내용의 리포좀 조성물을 조제하는 특정 구체예의 프로세스 도표이다. 활성제 용액은 저장용기(400)에 유지된다. 리포좀을 형성하는 성분, 가령, DILA2 화합물 또는 지질을 포함하는 용액은 별도 저장용기(410)에 유지된다. 완충용액은 또 다른 저장용기(420)에 유지된다. 용액은 별도의 튜브연동식 액체 펌프(peristaltic pumps)(430)를 이용하여 선택된 독립적인 유속으로 펌프된다. 용액이 저장용기에 채워지기 전에 선택적으로 인-라인 필터를 통과하거나, 또는 여과될 수 있다. 충돌 프로세스에서, 활성제 용액은 점점(434)에서 리포좀을 형성하는 성분을 포함하는 용액과 접촉된다. 충돌 스트립은 하나 이상의 혼합 튜브(436)를 통하여 선택적으로 통과할 수 있다. 충돌 스트립은 항온처리 프로세스용 수거 용기(440)로 들어간다. 쿨링 프로세스 완충용액은 선택적으로 별도 저장용기(450)에 유지될 수 있다. 리포좀 조성물(460)은 수거 용기(440)를 나와서 여과 프로세스로 들어간다.

도 5: 본 발명의 리포좀 조성물을 조제하는 특정 구체예의 프로세스 도표이다. 안정화된 리포좀 조성물은 수거용기의 출고(460)로부터 저장용기(500)에 제공된다. 정용여과 완충 용액은 별도 저장용기(520)에 유지된다. 튜브연동식 액체 펌프(502)는 저장용기(500)로부터 중공 섬유막(504)을 포함하는 튜브를 통하여 안정화된 리포좀 조성물을 순환시킨다. 집선흐름방식 여과는 이 순환을 통하여 발생되어, 여과물(530)의 제거에 의해 안정화된 리포좀 조성물이 농축된다. 저장용기(520)로부터 교체 완충액이 추가되어 고정된 또는 가변 용적에서 정용여과가 허용된다. 선택적으로, 안정화된 리포좀 조성물의 투석은 저장용기(540)로부터 투석 완충용액을 몰아내는 튜브연동식 액체 펌프(506)를 이용하여 실행될 수 있다. 특정 농도에서 안정화된 리포좀 조성물은 마무리 프로세스로 배출(550)된다.

도 6: dsRNA에 폴리아르기닌 결합 부위의 결합은 폴리아르기닌 결합 부분의 길이와 함께 증가되었다는 것을 보여준다. 도 6에서, 가장 강력한 결합(SYBR-Gold 염료를 이체시키는 최고의 능력)은 PN3499에서 관찰되었으며, 이것은 총 10개 아르기닌을 포함하는 이량체 펩티드다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0049] 본 발명의 구체예들은 핵산 물질들을 포함하는 약제 및 치료제의 전달 및 약물을 효율적으로 운반하는 물질을 만드는 방법 및 이용하는 방법들을 제공한다.
- [0050] 본 발명은 추가로 다양한 분자 및 구조를 세포로 전달하는데 유용한 새로운 약물 전달 증진 프로세스 및 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 프로세스, 화합물, 조성물, 제제, 그리고 궁극적으로 약물 전달에 이용되는 용도, 치료제 및 대상체에서의 유전자 발현 또는 활성의 조절에 반응하는 것들을 포함한 질환 및 증세의 진단 및 치료를 제공한다. 좀더 구체적으로, 본 발명은 리포좀 또는 라멜라 소포를 포함하는 프로세스 및 조성물과 다른 형태의 전달 증진 조성물 및 제제, 그리고 이러한 전달 물질들의 치료 방법 및 용도에 관한 것이다.
- [0051] 본 발명의 프로세스 및 조성물은 핵산 물질들, 폴리뉴클레오타이드, 펩티드, 단백질, 그리고 소분자 화합물 및 약물과 같은 치료, 예방 및 진단 물질들을 전달하는데 더 이용될 수 있다.
- [0052] 본 발명의 조성물 및 방법은 리포좀 또는 라멜라 소포 내에 포집되는 것과 같은 형태의 치료제의 전달에 유용하다. 이와 같은 형태들은 다양한 직경의 나노입자들을 포함할 수 있다.
- [0053] 조절 RNA의 이해 및 RNA 간섭 (RNAi 또는 iRNA)의 발생, RNAi 치료, RNA 약물, 안티센스 또는 리보자임 치료, 그리고 DNA 유전자 치료의 이해로 인하여 세포내로 활성 핵산 물질들을 인입시키는 효과적인 수단의 필요성이 증가되었다. 일반적으로, 핵산은 세포 또는 혈액으로 인입되었을 때, 제한된 시간 동안만 안정적이다. 그러나, 핵산-기반 물질들은 조성물 및 제제에서 안정화될 수 있으며, 세포 전달을 위해 투여 및 분산될 수 있다.

- [0054] 핵산 물질들은 유전자를 침묵시키는 물질들, 유전자를 조절하는 물질들, 안티센스 물질들, 펩티드 핵산 물질들, 리보자임 물질들, RNA 물질들, 및 DNA 물질들과 같은 임의의 핵산을 함유하는 모이어티를 포함한다.
- [0055] 일부 구체예들에서, 본 공개내용의 조성물 및 방법들은 리포솜에 포집된 치료 물질의 전달에 유용하다. 이들 구체예에서, 치료 물질은 피운반체(cargo)로 지칭될 수 있다.
- [0056] 예를 들면, 도 1은 본 발명의 리포솜 구체예의 개략도를 나타내며, 이때 특정 리포솜을 형성하는 화합물은 이중 층 소포(10)를 형성한다. 이 구체예에서, 리포솜의 바깥 층은 리포솜을 형성하는 분자 중 하나의 머리 기에 부착된 폴리에틸렌글리콜 쇄(20)에 의해 보호된다. 리포솜의 바깥 층은 또한 세포 또는 조직을 특이적으로 표적하는 리간드(30)를 제공한다. 이 구체예에서, 리포솜 소포는 응축된 RNA 나노입자(40), 이중-가닥 RNA 듀플렉스 펩티드 콘주게이트(50), 삼중-가닥 mdRNA(60), 다이스 효소 기질 RNA(70), 긴 오버행이 있는 dsRNA(80), 그리고 둔단이 있는 siRNA(90)을 포함하는 활성 간접 RNA 성분의 피운반체를 포함하며, 이들은 본 구체예에 모여있다. 다른 형태의 치료 피운반체는 microRNA, 헤어핀 RNA, DNA 또는 리보자임 형태를 포함할 수 있다.
- [0057] 일반적으로, 본 공개내용의 프로세스 및 조성물에서 임의의 활성제가 피운반체로 이용될 수 있다. 일부 구체예들에서, 피운반체는 작은 유기 분자 약제 물질이 될 수 있다. 특정 구체예들에서, 피운반체는 음하전 또는 중성 치료 물질이 될 수 있다.
- [0058] 본 공개내용의 일부 측면에서 제공되는 프로세스 및 조성물은 방출가능한 형태 또는 조성물로 치료 물질을 전달할 수 있다. 방출가능한 형태 및 조성물은 활성제에 결합하고, 방출시키는 분자; 활성제에 결합하고, 물질의 방출을 지원하는 모이어티를 방출시키는 분자; 활성제에 결합하고, 생물학적 격실내에서 물질의 방출을 지원하는 형태로 조절되는 분자; 그리고 방출 중개 화합물과 혼합된 활성제에 결합하는 분자를 포함하는 조성물을 포함한다.
- [0059] 특정 측면들에서, 본 공개내용은 치료제의 전달에 적합한 리포솜 조성물을 만드는 방법 및 장치를 제공한다. 특정 구체예들에서, 본 공개내용의 활성제는 UsiRNA이다. 본 공개내용의 방법은 이중-가닥 또는 삼중-가닥 RNA 구조, RNA 펩티드 콘주게이트, 응축된 RNA 나노입자들, 다이스(dicer) 기질 RNAs, dsRNAs, siRNAs, microRNAs, 헤어핀 RNAs, 및 기타 활성 RNA 형태와 같은 핵산 물질들의 리포솜 조성물을 제공할 수 있다.
- [0060] 본 공개내용의 활성제는 활성 RNA 물질의 펩티드 응축물일 수 있다. 예를 들면, 펩티드 또는 다른 생체 분자와 활성 RNA 물질을 응축시켜 형성된 나노입자들 또는 RNA와 폴리머 종의 응축물은 본 발명의 리포솜 조성물에 피운반체로서 부하될 수 있다. 나노입자들이 교차연결될 수 있다.
- [0061] 추가 구체예에서, 본 공개내용의 활성제는 펩티드, 단백질, 프로테아제, 항체, 단클론 항체, 항체-기반 약물, 백신 물질, 또는 소분자 약물일 수 있다.
- [0062] 활성제를 포함하는 조성물은 수용성 용액일 수 있다.
- [0063] 여기에서 사용된 것과 같이, 수용성 용액은 수용액, 멸균 수용액 또는 용매의 대부분이 물이 되는 임의의 용액을 말한다. 수용성 용액은 예를 들면, 일부 유기 용매를 포함할 수 있다.
- [0064] 수용성 용매의 예는 물, 주사용 멸균 수, Ringer 용액 그리고 등장성 염화나트륨 용액을 포함한다.
- [0065] 리포솜을 형성하는 분자 또는 친유성 분자를 포함하는 조성물은 비-수용성 용액일 수 있다.
- [0066] 여기에서 사용된 것과 같이, 비-수용성 용액은 용매의 대부분이 물이 아닌 임의의 용액을 말한다. 비-수용성 용액이 일부 물을 포함할 수 있다.
- [0067] 비-수용성 용매의 예는 물과 혼합가능한 유기 용매, 알카놀, (C1-6)알카놀, 에탄올, 이소프로판올, 이소부탄올, sec-부탄올, t-부탄올, 알카놀-물, 에탄올-물, 아세토니트릴, 아세톤, 케톤, 디메틸술폭시드, 디메틸포름아미드, 계면활성제 용액, 세정제 용액, 그리고 이의 혼합물을 포함한다.
- [0068] 리포솜 조성물의 프로세스
- [0069] 본 발명의 구체예들은 활성제를 포함하는 리포솜을 함유하는 조성물을 만드는 프로세스, 그리고 약물 전달 방법을 제공할 수 있다.
- [0070] 일부 측면에서, 리포솜 조성물은 두 개 조성물, 예를 들면, 하나 이상의 활성제를 포함하는 조성물, 그리고 하나 이상의 리포솜을 형성하는 분자를 포함하는 별도 조성물을 충돌시켜 만들 수 있다.



- [0071] 일반적으로, 본 발명의 리포좀 구조는 조제 프로세스의 모든 단계가 완료될 때까지 완전한 활성 형태로 만들어 지지 않는다. 본 발명의 프로세스에서 각 단계는 특정 시간을 필요로 한다. 리포좀 조성물의 형성물은 예를 들면, 유속, 온도, pH 및 각 성분의 농도와 같은 많은 변수의 조합의 예측불가한 영향에 따라 일반적으로 달라질 것이다. 일부 구체예들에서, 항온처리 시간을 이용하여 형성 프로세스를 조절한다.
- [0072] 도 2는 본 공개내용의 리포좀 조성물을 조제하는 특정 구체예의 순서도다. 도 2를 참고하면, 활성제 용액, 완충 용액, 그리고 하나 이상의 리포좀을 형성하는 화합물의 용액을 포함하는 반응 물질 용액을 별도 조제하고, 저장 용기(200)에 제공한다. 활성제 용액 및 리포좀을 형성하는 화합물의 용액은 충돌 프로세스 (210)에서 접촉된다. 충돌 스트림은 수거 용기(220)에 수거된다. 수거된 물질은 항온처리 프로세스(230)용 저장용기에 유지되며, 이 단계후, 물질은 쿨링(quenching)(240)에 의해 안정화된다. 쿨링된 물질은 여과 프로세스(250)로 보내진다. 출고되는 여과물(260)은 최종 프로세스로 진행된다.
- [0073] 본 발명은 충돌 프로세스를 포함하는 리포좀 조성물을 만드는 프로세스의 구체예들을 포함한다. 충돌 프로세스는 활성제를 포함하는 조성물을 리포좀 형성 분자를 포함하는 조성물에 충돌시켜 충돌 스트림을 만드는 하나 이상의 단계를 가질 수 있다.
- [0074] 일부 측면에서, 활성제의 리포좀 조성물을 만드는 본 공개내용의 프로세스는 하나 이상의 항온처리 단계 프로세스를 가질 수 있다. 항온처리 프로세스는 항온처리 시간 동안 저장용기에 충돌 스트림의 수거 및 유지를 포함할 수 있다.
- [0075] 본 발명의 구체예들은 항온처리 조성물이 쿨링되는, 리포좀 조성물을 만드는 프로세스를 더 포함할 수 있다. 쿨링은 용매, 완충액 또는 희석액을 항온처리 조성물의 혼합물 또는 스트림으로 첨가하여 실시될 수 있다. 쿨링은 유기 용매 또는 분산제와 같은 특정 성분의 농도를 미리 정한 수준 아래로 희석시킬 수 있다. 일반적으로, 항온처리 조성물의 쿨링은 추가 프로세스 또는 마무리 단계와 관련하여 안정적인 조성물을 만들 수 있다. 쿨링 단계는 리포좀 구조를 포함할 수 있는 항온처리 조성물을 안정화시키기 위하여 실시할 수 있다.
- [0076] 다른 프로세스 단계와 함께, 수거 용기에서의 충돌 스트림의 항온처리는 리포좀에 의해 많은 활성제가 포집되는 리포좀 제제를 제공할 수 있다. 예를 들면, 특정 구체예들에서, 본 공개내용의 리포좀 조성물의 형성 및 구조는 충돌, 혼합, 희석, 수거, 항온처리, pH 조정, 쿨링 및 여과 중 임의의 단계를 필요로 할 수 있다.
- [0077] 본 공개내용의 리포좀 조성물을 만드는 프로세스는 하나 이상의 여과 단계를 더 포함할 수 있다. 여과 단계를 이용하여 예를 들면, 성분의 농도를 조절 또는 변경시키거나, 또는 입자 크기 또는 분산도를 변경시키는 것과 같은 다양한 프로세스 매개변수를 변화시키고, 뿐만 아니라 다른 물리적 용액 매개변수를 변화시킬 수 있다.
- [0078] 도 3은 본 공개내용의 리포좀 조성물을 마무리하기 위한 특정 구체예의 순서도를 보여준다. 도 3을 참고하면, 리포좀 조성물의 조제에서 비롯된 여과물이 될 수 있는 리포좀 조성물은 살균된다(300). 살균된 조성물을 운반하는 용기를 채우고(310), 마무리하고(320), 이 단계후 살균 조성물은 저장(340)을 위하여 냉동된다(330). 최종 조성물은 사용을 위해 운반된다(350).
- [0079] 물질을 살균하고, 용기에 채우고 마무리하는 것과 관련된 본 공개내용의 프로세스는 *Remington's Pharmaceutical Sciences (18th ed. 1990)*에서 설명된 것과 같은 당업계에 공지된 단계들 및 방법들을 이용할 수 있다.
- [0080] 리포좀의 포집화, 일정 크기로 만들기(sizing) 및 일반 조제를 평가하는 몇 가지 방법들은 예를 들면, W02001005374, 미국특허 공개번호 20040142025 및 20070252295, 그리고 미국특허 번호 6,843,942에 제공되어 있다.
- [0081] 충돌 및 혼합
- [0082] 특정 측면들에서, 본 발명은 활성제의 리포좀 조성물을 조제하는 방법 및 프로세스 조건을 제공한다.
- [0083] 도 4는 본 공개내용의 리포좀 조성물을 조제하는 특정 구체예의 프로세스 도표이다. 도 4를 참고하면, 활성제 용액은 저장용기(400)에 유지된다. 리포좀을 형성하는 성분, 가령, DILA2 아미노산 화합물 또는 지질을 포함하는 용액은 별도 저장용기(410)에 유지된다. 완충 용액은 또 다른 저장용기(420)에 유지된다. 용액은 별도의 튜브연동식 액체 펌프(peristaltic pumps)(430)를 이용하여 이동 튜브(402)를 통하여 선택된 독립적인 유속에서 펌프된다. 용액은 저장용기에 채워지기 전에 선택적으로 인-라인 필터를 통과하거나, 또는 여과될 수 있다. 충돌 프로세스에서, 활성제 용액은 접촉점(434)에서 리포좀을 형성하는 성분을 포함하는 용액과 접촉된다. 접촉점은 임의의 모양, 각, 방향 또는 크기가 될 수 있다. 충돌 스트림은 하나 이상의 난류 혼합 튜브(436)를 선택적

으로 통과할 수 있다. 충돌 스트립은 수거 용기(440)로 들어간다. 완충 용액은 저장용기(420)로부터 수거 저장 용기(440)로 펌프될 수 있다. 수거 저장용기(440)에 수거된 혼합물은 항온처리 프로세스에서 일정 시간 동안 유지될 수 있다. 쿠엔칭된 리포좀 조성물(460)은 수거 용기(440)를 나와서 여과 프로세스로 들어간다.

[0084] 특정 구체예들에서, 저장용기(450)의 완충 용액은 충돌 스트립을 희석시키기 위해 선택적으로 이용될 수 있으며, 그리고 수거 용기 또는 임의의 혼합 튜브 전에 충돌 스트립과 접촉될 수 있다.

[0085] 상기에서 논의된 것과 같이, 리포좀 조성물을 만들기 위하여, 본 공개내용의 특정 프로세스는 이동 튜브, 그리고 선택적으로 난류 혼합 튜브에서 혼합되고, 용기 또는 저장용기에 수거되고, 항온처리 프로세스, 및 쿠엔칭되는 충돌 스트립을 제공한다. 쿠엔칭된 물질은 여과 및 마무리를 위해 출고된다.

[0086] 충돌 스트립은 활성제의 조성물을 리포좀을 형성하는 분자를 포함하는 조성물과 접촉시켜 만들어지는 것이 일반적이다. 충돌 스트립은 단일 스트립을 만들기 위하여 조성물을 접촉시키는 기능만을 할 수 있다. 충돌 스트립은 일반적으로 조성물의 완전한 내부분산 또는 내부혼합을 제공하지 않을 수 있다. 선택적 단계에서 충돌 스트립은 난류 혼합 상태를 겪을 수 있다.

[0087] 충돌 스트립의 pH는 약 3 내지 약 9 범위에서 조절될 수 있다. 일부 구체예들에서, 충돌 스트립의 pH는 약 5 내지 약 8, 또는 약 6 내지 약 7, 또는 약 7.4이다. 특정 변이에서, 충돌 스트립의 pH는 약 3 내지 약 6이다. 충돌 스트립의 pH는 이동 튜브를 통하여 충돌 스트립이 이동하는 동안, 또는 혼합 튜브, 또는 수거 용기에서 조절될 수 있다. 특정 구체예들에서, 충돌 스트립의 최초 pH는 약 5 내지 약 8, 또는 약 6 내지 약 7.4이며, 그리고 pH는 초기 충돌 후 약 3 내지 약 6 범위로 조정된다. 특정 구체예들에서, 충돌 스트립의 pH는 항상 약 7.4이다.

[0088] 충돌 스트립을 만드는데 이용되는 조성물은 충돌 전 선택적으로 여과될 수 있다. 본 공개내용의 하나 이상의 활성제를 포함하는 조성물은 약 200 나노미터(nm) 보다 큰, 또는 약 300 nm 이상, 또는 약 500 nm 이상의 바람직하지 않은 입자들 또는 상을 제거하기 위하여 유동형 여과(flow filtration) 기술과 같은 것에 의해 여과될 수 있다. 리포좀을 형성하는 다양한 분자를 포함하는 조성물은 약 200 나노미터(nm) 보다 큰, 또는 약 300 nm 이상, 또는 약 500 nm 이상의 바람직하지 않은 입자들 또는 상을 제거하기 위하여 유동형 여과 기술과 같은 것에 의해 여과될 수 있다.

[0089] 충돌 스트립의 온도는 약 15°C 내지 약 37°C 범위로 조절될 수 있다.

[0090] 본 발명의 측면들은 충돌되는 조성물의 유속을 이용하여 충돌 스트립의 조성물이 조절될 수 있다는 것을 더 제공한다. 일반적으로, 각 조성물은 선택된 직경의 튜브를 통하여 유동될 것이며, 따라서, 충돌 스트립에서 복합되는 스트립의 상대적 체적유량은 충돌 스트립에서 다양한 성분들의 농도를 제공한다.

[0091] 예를 들면, 충돌 스트립이 동일한 직경의 튜브를 통하여 유동되는 두 개의 별도 스트립의 충돌에 의해 형성될 때, 별도 스트립의 유속은 원래 스트립에서 성분 농도와 비교하였을 때, 충돌 스트립에서 성분 농도를 결정할 것이다. 따라서, 특정 성질을 가진 리포좀 조성물을 만들기 위하여, 충돌 스트립에서 원하는 조성물을 위한 유속이 제공될 수 있다.

[0092] 특정 구체예들에서, 스트립의 유속은 리포좀을 형성하는 분자에 대한 활성제의 농도를 조절하고, 뿐만 아니라 용매 또는 염의 농도, 뿐만 아니라 혼합 및 전단력(shear forces)을 포함하는 다른 매개변수들을 조절하기 위하여 이용될 수 있다. 본 발명의 구체예들은 리포좀 제제를 만드는 프로세스를 포함하는데, 이때 활성제의 포집화 및 리포좀 입자 크기는 프로세스 장치의 유속을 조작하여 유익하게 증대될 수 있다.

[0093] 특정 측면들에서, 본 발명의 프로세스는 친유성 분자를 포함하는 조성물의 스트립 상에 활성제 조성물의 스트립을 충돌시키기 위하여 동일한 직경의 튜브를 이용할 수 있다. 특정 변이에서, 조성물의 유속은 동등하거나 동등하지 않을 수 있다. 특정 구체예들에서, 활성제를 포함하는 조성물의 유속은 친유성 분자를 포함하는 조성물의 유속과 동등하지 않을 수 있다. 예를 들면, 특정 구체예들에서, 활성제를 포함하는 조성물의 유속은 친유성 분자를 포함하는 조성물의 유속의 2배일 수 있다. 다른 변이에서, 활성제를 포함하는 조성물의 유속은 친유성 분자를 포함하는 조성물의 유속의 2배 이상일 수 있고, 또는 일부 구체예들에서 친유성 분자를 포함하는 조성물의 유속의 3배 이상일 수 있고, 또는 친유성 분자를 포함하는 조성물의 유속의 5배 이상일 수 있다.

[0094] 일반적으로, 장치의 튜브들은 임의의 직경을 가질 수 있다. 특정 구체예들에서, 본 발명의 프로세스는 리포좀을 형성하는 분자를 포함하는 조성물의 스트립 상에 활성제 조성물의 스트립을 충돌시키기 위하여 상이한 직경의 튜브를 이용할 수 있다. 특정 변이에서, 튜브의 직경은 동일하거나 또는 동일하지 않을 수 있다. 예를 들면, 특정 구체예들에서, 활성제 용액을 포함하는 튜브의 직경은 친유성 분자 용액을 포함하는 튜브 직경의  $\frac{1}{4}$ 일 수 있

다. 다른 변이에서, 활성제 용액을 포함하는 튜브의 직경은 친유성 분자 용액을 포함하는 튜브 직경의 절반일 수 있다. 다른 변이에서, 활성제 용액을 포함하는 튜브의 직경은 친유성 분자 용액을 포함하는 튜브 직경보다 더 클 수 있다. .

- [0095] 일부 구체예들에서, 충돌 스트림은 유량 통과(flow-through) 혼합을 위한 특정 수단을 이용하여 추가 혼합될 수 있다. 유량-통과 혼합을 위한 수단은 유동 방향을 변경시키기 위하여 배열된 하나 이상의 채널, 모세관, 또는 경로를 가지는 믹서를 포함하는데, 이때, 채널, 모세관, 또는 경로들은 난류 혼합을 제공하기 위하여 1회 이상 분기되고, 재-연결될 수 있다. 유량-통과 혼합 수단은 기계적 교반기, 셰이커 또는 휘젓는 막대, 블레이드, 패들, 플레이트 또는 바람개비를 선택적으로 포함할 수 있다.
- [0096] 난류 혼합용 레이놀즈수(Reynolds number)는 2000 이상 또는 2400이상일 수 있다.
- [0097] 난류 믹서에서 혼합물 스트림의 잔류 시간은 충돌 스트림의 유속을 조정함으로써 조절될 수 있다. 일부 변이에서, 난류 믹서에서 충돌 스트림의 유속 및 잔류 시간을 이용하여 리포좀 입자들의 크기를 조절할 수 있다.
- [0098] 유량-통과 혼합을 위한 난류 혼합 튜브 수단의 예는 Cole-Parmer 인-라인 고정식 믹서 K0466952, 316 스테인레스강 튜브 믹서; 3/16" 튜브 OD, 21 요소다.
- [0099] 본 공개내용의 프로세스에 이용된 장치의 용기, 튜브, 및 기타 유동 성분들은 이용되는 반응물질, 용매에 비활성이며, 온도 pH와 반응 조건들에 적합한 임의의 물질로 만들 수 있다. 이러한 물질의 예는 폴리머, 금속, 스테인레스 강, 유리 및 세라믹을 포함한다. 용기, 튜브, 및 기타 유동 성분들은 비활성제로 또한 피복될 수 있다.
- [0100] 용기, 튜브, 및 기타 유동 성분들은 각 단계에서 용액 및 혼합물의 유속을 조절할 수 있는 하나 이상의 조절가능한 펌프와 일반적으로 유체 소통된다. 장치는 유동을 제어하기 위하여 체크 밸브와 같은 다양한 밸브를 포함할 수 있다. 용기, 튜브, 및 기타 유동 성분들은 페룰(ferrules) 또는 O-링을 포함할 수 있는 다양한 파스너(fastener)에 부착될 수 있다. 장치는 유동 경로내 다양한 지점에 온도 센서를 포함할 수 있다.
- [0101] 본 공개내용의 방법 및 장치들은 배치(batch) 또는 연속 프로세스에 이용될 수 있다.
- [0102] 수거 용기, 향온처리 프로세스, 및 쿠엔칭 프로세스
- [0103] 도 4를 참고하면, 일부 구체예들에서, 충돌 스트림은 수거 용기(440)로 유입된다. 수거 용기(440)에 수거된 충돌 스트림은 향온처리 프로세스에 처하게 된다.
- [0104] 향온처리 프로세스는 수거된 물질을 혼합하는 하나 이상의 단계, 희석 완충액으로 희석시키는 하나 이상의 희석 단계, 수거 용기에서 pH를 조절하는 하나 이상의 단계, 그리고 특정 온도에서, 향온 처리 기간 동안 수거된 물질을 유지시키는 하나 이상의 단계를 포함할 수 있다.
- [0105] 수거된 물질은 예를 들면, 기계적인 교반기(agitator), 로커(rocker), 또는 휘젓는 막대, 블레이드, 패들, 플레이트 또는 바람개비를 이용하여 수거 용기에서 혼합될 수 있다.
- [0106] 일부 변이에서, 충돌 스트림은 활성제의 조성물을 리포좀 형성 화합물을 포함하는 조성물에 접촉시키고, 그리고 충돌 스트림에 완충액, 용매 또는 희석액을 첨가시켜 만들 수 있다. 완충액, 용매 또는 희석액의 첨가는 충돌 스트림의 혼합 또는 수거 전에 일어날 수 있으며, 또는 향온처리 프로세스의 일부분으로 수거 용기에서 실시될 수 있다. 완충액, 용매 또는 희석액의 추가는 활성제, 리포좀을 형성하는 분자, 그리고 수거 용기 안에 있는 또 다른 용매와 같은 다른 성분들의 농도를 감소시킨다.
- [0107] 일부 구체예들에서, 이동 튜브, 또는 혼합 튜브, 또는 수거 용기 내에서 충돌 스트림에 완충액, 용매 또는 희석액을 첨가시키면, 유기 용매의 농도를 약 50% (v/v) 이하, 또는 약 40% (v/v) 이하, 또는 약 35% (v/v) 이하, 또는 약 33% (v/v) 이하, 또는 약 30% (v/v) 이하, 또는 약 25% (v/v) 이하, 또는 약 22% (v/v) 이하, 또는 약 20% (v/v) 이하의 농도로 희석시킬 수 있다.
- [0108] 수거 용기에 수거된 혼합물 또는 조성물의 pH는 약 3 내지 약 9 범위로 조절될 수 있다. 일부 구체예들에서, 수거된 충돌 스트림의 pH는 약 5 내지 약 8으로, 또는 약 6 내지 약 7.4로 조정된다. 특정 구체예들에서, 수거된 혼합물의 pH는 약 5 내지 약 8이 되며, 그리고 초기 충돌 후 pH는 약 3 내지 약 6의 범위로 조정된다. 일부 변이에서, 수거된 충돌 스트림의 pH는 약 7.4에서 유지된다. 본 공개내용의 리포좀 조성물은 각 단계에서 pH가 7.4가 되는 프로세스에서 형성될 수 있다.

- [0109] 일부 측면에서, 수거 용기에 수거된 혼합물 또는 조성물은 향온처리 유지 시간을 거친다. 수거 용기내 향온처리 물의 유지 시간은 몇 분에서부터 몇 시간까지의 범위가 될 수 있으며, 또는 약 15 분 내지 약 8 시간, 또는 약 0.5 시간 내지 약 8 시간, 또는 약 0.5 시간 내지 약 4 시간, 또는 약 1 시간 내지 약 4 시간, 또는 약 1 시간 내지 약 2 시간의 범위가 될 수 있다.
- [0110] 프로세스의 일부 변이에서, 난류 혼합은 충돌 스트림을 완충액, 용매 또는 희석액으로 희석시킨 후에 일어나며, 그리고 향온처리물의 유지 시간은 약 0.5 시간 내지 약 8 시간, 또는 약 1 시간 내지 약 4 시간, 또는 약 1 시간 내지 약 2 시간의 범위가 될 수 있다.
- [0111] 특정 변이에서, 난류 혼합은 충돌 스트림을 완충액, 용매 또는 희석액으로 희석시키기 전에 일어나며, 그리고 향온처리물의 유지 시간은 몇 분 내지 몇 시간 범위가 되거나, 또는 약 15분 내지 약 8시간, 또는 약 0.5 시간 내지 약 8 시간, 또는 약 0.5 시간 내지 약 4 시간 또는 약 1 시간 내지 약 4 시간, 또는 약 1 시간 내지 약 2 시간의 범위가 될 수 있다.
- [0112] 향온처리 프로세스를 위한 향온처리 시간은 충돌 스트림의 유속, 뿐만 아니라 온도 및 pH와 같은 다른 프로세스 매개변수에 따라 일반적으로 달라질 수 있다.
- [0113] 유지 기간 동안 수거 용기 안에 수거된 조성물의 온도는 약 15℃ 내지 약 37℃, 또는 약 22℃ 내지 약 35℃의 범위에서 조절될 수 있다.
- [0114] 일부 측면에서, 향온처리 프로세스는 완충액, 용매 또는 희석액의 신속한 첨가에 의해 향온처리물을 쿨엔칭함으로써 종료될 수 있다. 쿨엔칭 단계는 유기 용매의 농도를 약 20% (v/v) 이하, 또는 약 15% (v/v) 이하, 또는 약 10% (v/v) 이하, 또는 약 5% (v/v) 이하로 감소시킬 수 있다.
- [0115] 일부 구체예들에서, 쿨엔칭 프로세스는 활성제를 포집시키는 리포솜을 포함하는 안정화된 리포솜을 더 제공할 수 있다.
- [0116] 여과 및 마무리
- [0117] 위에서 논의된 것과 같이, 일부 구체예들에서, 충돌 스트림은 혼합, 수거, 향온처리 프로세스, 및 쿨엔칭 프로세스를 거친다. 쿨엔칭된 물질은 여과 및 마무리를 위해 배출되는 안정화된 리포솜 조성물일 수 있다.
- [0118] 도 5는 본 발명의 리포솜 조성물을 조제하는 특정 구체예의 프로세스 도표를 보여준다. 도 5를 참고하면, 쿨엔칭된 리포솜 조성물(460)과 같은 안정화된 리포솜 조성물은 저장용기(500)로 채워진다. 정용여과 완충 용액은 별도 저장용기 (520)에 유지된다. 튜브연동식 액체 펌프(502)는 저장용기(500)로부터 중공 섬유 막(504)을 포함하는 튜브를 통하여 안정화된 리포솜 조성물의 순환을 제공한다. 점선흐름방식 여과는 안정화된 리포솜 조성물을 농축시키기 위하여 이 순환을 통하여 발생되고, 여과물(530)은 중공 섬유막(504)을 포함하는 튜브로부터 제거된다. 저장용기(520)로부터 교체 완충액을 순환에 추가하여 고정된 또는 가변 용적에서 정용여과가 허용된다. 안정화된 리포솜 조성물은 제제내 활성제의 최종 농도를 달성하기 위해 완충액을 추가시킴으로써 또한 희석될 수 있다. 선택적으로, 안정화된 리포솜 조성물의 투석은 저장용기(540)로부터 투석 완충용액을 몰아내는 튜브연동식 액체 펌프(506)를 이용하여 실행될 수 있다. 특정 농도에서 안정화된 리포솜 조성물은 마무리 프로세스로 배출(550)된다.
- [0119] 일반적으로, 여과물(530)은 유기 용매 및 비포집 활성제를 포함할 수 있다. 따라서, 여과물의 제거는 안정화된 리포솜 조성물 안에 유기 용매를 제거하고, 유기 용매의 농도를 줄일 수 있을 뿐만 아니라, 비포집 활성제도 제거할 수 있다.
- [0120] 일반적으로, 쿨엔칭된 향온처리물은 약제학적 조성물을 조제하는데 바람직한 범위 아래 농도의 활성제를 가질 수 있다. 일부 구체예들에서, 쿨엔칭된 향온처리물은 약제학적 조성물을 조제하기엔 너무 높은 농도의 비-수용성 용매를 가질 수 있다. 이러한 농도들은 위에서 논의된 것과 같이, 점선흐름방식 여과 및 정용여과에 의해 조정될 수 있다.
- [0121] 일부 구체예들에서, 쿨엔칭된 향온처리물은 중공 섬유 점선흐름방식 여과 장치, 또는 카트릿지 또는 카세트 점선흐름방식 여과 장치로 순환된다. 완충액 또는 용매 첨가 또는 첨가 없이 순환될 때, 점선흐름방식 여과는 감소된 용적의 완충액 및 용매에 리포솜 조성물을 유지시키고, 따라서 조성물의 농도가 증가된다.
- [0122] 비-수용성 용매를 제거하고, 그리고 정용여과 완충액으로 대체시키기 위하여 정용여과 방식에 유사한 장치가 이용될 수 있다. 정용여과 방식에서, 순환되는 보유액(retentate)의 용적은 정용여과 완충액을 추가시킴으로써 기



본적으로 일정하게 유지된다. 따라서, 유기 용매의 농도는 침투물(permeate)로 유입되고, 제거될 때 감소된다.

- [0123] 활성제의 농도는 원하는 최종 농도를 얻기 위해, 정용여과 단계의 보유액에 완충액을 첨가시켜 조정될 수 있다. 농도-조정된 보유액은 그 다음 멸균 단위로 제공될 수 있으며, 이때 직접적인 유동을 이용하여 보유액 생성물 용액을 멸균시킨다. 살균된 산물은 살균-바이알-충전 프로세스에 이용될 수 있으며, 그리고 생성물 바이알은 낮은 온도에서 보관된다. 급속 냉동, 동결건조 및 저온 동결 건조 및 기타 수단들을 이용하여 생성물을 조제하고, 그리고 보관할 수 있다.
- [0124] 특정 구체예들에서, 원하는 활성제 농도를 얻기 위해, 쿨엔칭된 항온처리물은 접선흡음방식 여과에 의해 우선 농축되고, 이어서 정용여과에 의해 유기 용매를 제거하고, 그 다음 추가 접선흡음방식 여과와, 그리고 완충액, 용매 또는 희석액으로 최종적으로 희석될 수 있다.
- [0125] 여과를 위한 방법 및 물질들의 예는 Mark C. Porter, Handbook of Industrial Membrane Technology (Noyes 1990), pp. 186-87에서 제공된다. 여과의 일부 측면들은 Munir Cheryan, Ultrafiltration 및 Microfiltration Handbook (1998)에서 제공된다.
- [0126] 활성제의 포집(Encapsulation)
- [0127] 리포솜 입자들에 의한 활성제의 포집도는 많은 프로세스 매개변수들에 의해 일반적으로 영향을 받는다.
- [0128] 일부 구체예들에서, 항온처리 프로세스 후, 리포솜 입자들에 의한 활성제의 포집도는 50% 이상, 또는 60% 이상, 또는 70% 이상, 또는 80% 이상, 또는 90% 이상, 또는 95% 이상, 또는 96% 이상, 또는 97% 이상, 또는 98% 이상, 또는 99% 이상, 또는 기본적으로 100%다.
- [0129] 본 공개내용의 활성제 리포솜 조성물은 균일한 크기의 리포솜 입자들을 포함한다. 리포솜 입자 크기는 직경이 약 300 nm 이하, 또는 약 250 nm 이하, 또는 약 200 nm 이하, 또는 약 180 nm 이하, 또는 약 160 nm 이하, 또는 약 150 nm 이하, 또는 약 140 nm 이하, 또는 약 130 nm 이하, 또는 약 120 nm 이하, 또는 약 110 nm 이하, 또는 약 100 nm 이하, 또는 약 90 nm 이하, 또는 약 80 nm 이하, 또는 약 70 nm 이하일 수 있다.
- [0130] 리포솜 입자 크기는 약 50 nm 내지 약 500 nm, 또는 약 60 nm 내지 약 400 nm, 또는 약 70 nm 내지 약 300 nm, 또는 약 70 nm 내지 약 200 nm, 또는 약 70 nm 내지 약 160 nm, 또는 약 80 nm 내지 약 160 nm의 범위일 수 있다.
- [0131] 일부 변이에서, 안정화된 리포솜 조성물은 리포솜 입자들 외부에 있는 그리고 비포집 활성제가 약 10% 미만, 또는 비포집 활성제가 약 8% 미만, 또는 비포집 활성제가 약 5% 미만, 또는 비포집 활성제가 약 4% 미만, 또는 비포집 활성제가 약 3% 미만, 또는 비포집 활성제가 약 2% 미만, 또는 비포집 활성제가 약 1% 미만 포함될 수 있다.
- [0132] 안정화된 리포솜 조성물안에 활성제의 포집 수준은 약 70% 내지 약 99%, 또는 약 80% 내지 약 99%, 또는 약 90% 내지 약 99%, 또는 약 95% 내지 약 99%의 범위일 수 있다. 안정화된 리포솜 조성물에 활성제의 포집 수준은 기본적으로 100%일 수 있다.
- [0133] 유전자 침묵 치료제의 효율적인 전달
- [0134] 본 공개내용은 일반적으로 생물학적 활성제 및 약물 전달을 위한 새로운 화합물 및 조성물 그리고 이의 방법 및 용도에 관한 것이다. 본 공개내용의 화합물 및 조성물은 선택된 세포들, 조직들, 기관들 또는 대상체들에 치료제를 전달하는데 유용하다. 더 상세하게는, 본 공개내용은 핵산 물질들을 포함하는 치료제의 전달, 그리고 생물학적 활성제 및 약물의 전달을 실행하는 펩티드를 포함하는 물질을 만드는 방법 및 이용하는 방법에 관한 것이다.
- [0135] 본 공개내용은 약물 및 생물학적 활성 분자의 효율적인 전신 및 국소 전달을 위한 화합물, 조성물, 방법 및 용도를 제공한다. 효율적인 전달은 펩티드를 포함하는 다양한 운반체 분자를 이용하여 리포솜 안으로 활성제를 고도로 부하시켜 제공될 수 있다. 본 공개내용의 화합물 및 조성물은 고효율의 활성제 전달을 달성할 수 있다.
- [0136] 전달 효율의 한 가지 척도는 전달 효율비이다. 여기에서 사용된 것과 같이, 전달 효율비는 활성제의 질량에 대한 운반체 분자의 총질량 비율이다. 전달 효율비가 낮을수록, 활성제에 비하여 운반체 물질의 질량이 더 적고, 그리고 원치않는 독성 및 부작용의 잠재성이 더 적다. 여기에서 사용된 것과 같이, 더 낮은 전달 효율비가 더 유익하고 바람직하다.

- [0137] 본 발명은 핵산 전달을 위한 운반체 및 제제 분야에 관한 것이다. 핵산을 위한 운반체는 교차연결가능한 그리고 절단가능한 펩티드 구조를 포함하는 펩티드 성분들로 형성된 화합물 및 조성물을 포함한다. 더 상세하게는, 본 발명은 핵산에 결합하여 복합체 또는 응축물 조성물을 형성하는 교차연결가능한 펩티드 구조 및 절단가능한 펩티드 구조를 제공한다.
- [0138] 일부 구체예들에서, 본 공개내용은 펩티드 및 핵산으로부터 형성된 복합체를 제공한다. 이와 같은 복합체들은 펩티드 및 핵산의 복합체를 가지고, 다양한 층의 펩티드 및 핵산을 가지는 코어 구조를 포함한다. 핵산과 함께 본 발명의 복합체를 형성하는데 적합한 펩티드들은 임의의 양이온 펩티드를 포함한다.
- [0139] 일부 측면에서, 펩티드 및 핵산의 복합체, 응축물, 또는 나노입자를 리포솜 제제에 적하할 수 있다. 본 공개내용의 리포솜 제제는 생물학적 활성제 및 약물, 특히, 핵산 물질들을 위한 안정적인 전달 시스템을 제공할 수 있다.
- [0140] 일부 측면들에서, 본 공개내용의 조성물 및 제제는 감소된 독성을 가진 생물학적 활성을 제공할 수 있다.
- [0141] 유전자 발현 또는 활성을 변형시키는데 있어서, 본 공개내용의 운반체, 펩티드, 펩티드와 핵산 구조체 또는 복합체, 및 제제, 그리고 세포-표적화 성분 및 기타 약제학적 제제 성분과 선택적으로 복합시킨 것들을 이용하는 방법이 제공된다.
- [0142] 본 발명은 생물학적 활성제를 세포로 전달하기 위한 운반체 조성물을 제공한다. 더 상세하게는, 본 공개내용은 작은 입자들로 응축된 핵산 물질을 가지는 나노미터 크기의 운반체 구조를 제공한다. 운반체 입자들은 전달에 있어서 증진된 안정성을 가지며, 그리고 활성제를 효율적으로 전달할 수 있다. 리포솜에 적하된 운반체 입자들의 제제는 증진된 안정성 및 전달 효율을 제공할 수 있다.
- [0143] 본 공개내용의 신규한 화합물 및 조성물은 유익한 전달 효율을 얻을 수 있다. 일부 구체예들에서, 본 발명의 조성물은 15 미만의 또는 10 미만의 RNAi-유도성 물질의 전달 효율비를 제공한다.
- [0144] 본 공개내용의 조성물 및 방법은 핵산, 폴리뉴클레오타이드, 펩티드, 단백질, 및 소분자 화합물 그리고 약물과 같은 치료, 예방적, 및 진단적 물질들의 전달에 유용할 것이다. 이들 조성물은 다양한 직경의 나노입자들을 포함할 수 있다.
- [0145] 본 공개내용은 궁극적으로 치료제로 이용되는 활성제를 세포내 또는 생체내로 전달하기 위한 신규한 화합물, 조성물 및 제제를 제공하며, 일반적으로 세포보호를 유지시키고, 상대적으로 독성이 낮다. 본 공개내용의 화합물 및 조성물은 질환 상태 또는 표현형을 변경시키기 위하여 선택된 세포들, 조직들, 기관들 또는 격일로 활성제를 전달하는데 유용하다.
- [0146] 일부 측면에서, 본 공개내용은 RNA 간섭 반응, 안티센스 효과, 또는 게놈 발현의 조절 또는 조정할 수 있도록 세포들에게 RNA 구조체를 전달하기 위한 화합물, 조성물 및 방법을 제공한다.
- [0147] 일부 변이에서, 본 공개내용은 세포들에 DNA 구조 또는 DNA를 함유하는 물질을 전달하기 위한 화합물, 조성물 및 방법을 제공한다.
- [0148] 여기에서 사용된 것과 같이, “펩티드 핵산 복합체”는 핵산에 결합된 또는 복합된 펩티드를 말한다.
- [0149] RNAi-유도성 및 안티센스 물질들의 효율적인 전달
- [0150] 일부 측면에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 고농도 또는 고밀도의 활성제 분자를 가지는 운반체 입자들을 제공함으로써 활성제의 효과적인 전달을 제공한다. 약제학적 제제로 고농도의 또는 고밀도의 활성제 분자를 제공하기 위하여 운반체 입자들을 리포솜에 적하할 수 있다.
- [0151] 특정 측면들에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 전달 효율 범위를 가지는 RNAi-유도성 물질 또는 안티센스 물질 제제를 제공한다. 본 발명의 RNAi-유도성 물질 또는 안티센스 물질용 제제는 15 미만, 또는 12 미만, 또는 10 미만 또는 9 미만 또는 8 미만 또는 5 미만의 유리한 전달 효율비를 가질 수 있다.
- [0152] 특정 구체예들에서, 효과적인 전달은 양이온 펩티드로 응축된 핵산 물질로 구성된 운반체 입자를 이용하여 수득될 수 있다. 예를 들면, RNAi-유도성 물질 또는 안티센스 물질과 같은 핵산 물질과 복합된 양이온 펩티드 전달에 근거하여, 운반체 입자는 6개 이상의 펩티드 결합 부분이 활성 RNA 물질에 결합될 수 있는 구조를 포함할 수 있다.
- [0153] 일부 변이에서, 리포솜에 RNAi-유도성 물질 또는 안티센스 물질과 같은 핵산 물질이 적하된 구성의 운반체 입자

들을 포함하는 제제에서, 리포솜은 RNAi-유도성 물질 또는 안티센스 물질 분자의 카피를 입자당 500개 이상, 또는 1,000개 이상, 또는 5,000개 이상, 또는 6,000개 이상 또는 7,000개 이상 또는 8,000개 이상 또는 9,000개 이상 또는 10,000개 이상 가질 수 있다.

[0154] 예를 들면, 일부 측면에서, N:P가 2, 밀도가 1 g/cc, 입자 용적이  $1.26 \times 10^6 \text{ nm}^3$ 이며, MW 3781.2 (순 7개 양이온 전하)를 가지는 펩티드와 MW 13,500 (순 40개 음이온 전하)를 가지는 듀플렉스 RNA로 구성된 구형 입자들의 경우, 입자의 질량은  $1.26 \times 10^{-9}$  micrograms이며, 입자는 듀플렉스 RNA 당 11.4개 펩티드를 가진다. 이 실시예에서, 전달 효율비는 RNA의 양에 대한 펩티드 양의 비율로서 3.2이다. RNA에 의해 제시되는 입자량의 분취물은 0.24이며, 입자에서 듀플렉스 RNA 분자의 수는 13,369이며, 그리고 입자당 펩티드 분자의 수는  $1.53 \times 10^5$ 이다. 환언하면, 이와 같은 운반체 입자들을 포함하고, 그리고 추가 운반체 분자가 없는 제제는 3.2의 전달 효율비를 가질 것이며, 입자들에 근거하여 24%의 RNAi-물질 분취량을 가질 것이다.

[0155] 리포솜 제제

[0156] 일부 측면에서, 본 발명의 운반체 입자들은 리포솜 제제에 적하되거나 또는 포집될 수 있다. 예를 들면, 일부 구체예들에서, 운반체 입자들은 미국 특허 출원번호 12/114,284에서 설명된 것과 같이 리포솜 제제에 포집되어 전달될 수 있다.

[0157] 특정 구체예들에서, 리포솜 제제에 포집되어 전달되는 본 발명의 운반체 입자들의 약제학적 제제는 본 발명의 펩티드 운반체 입자 조성물이 없는 RNA 리포솜 제제와 비교하였을 때, 약 20배 정도 듀플렉스 RNA 탑재량을 증가시킬 수 있다.

[0158] 예를 들면, 일부 구체예들에서, 리포솜 제제에 포집되어 전달되는 본 발명의 운반체 입자들의 약제학적 제제는 본 발명의 펩티드 운반체 입자 조성물이 없는 RNA 리포솜 제제와 비교하였을 때, 45% 정도 운반체의 질량을 감소시킬 수 있다.

[0159] 일부 구체예들에서, RNA 물질을 위한 운반체 입자들의 약제학적 제제는 핵산을 전달하는데 펩티드를 이용하는, 펩티드를 함유하는 전달 시스템을 포함한다. 이와 같은 시스템은 리포솜 제제에 결합될 수 있는 RNA 물질의 탑재량을 증가시킬 수 있다. 펩티드를 함유하는 나노입자를 이용하여, 전달 효과가 증진될 수 있을 뿐만 아니라, 전달 시스템의 조직 분포 패턴도 개선시킬 수 있다. 일부 구체예들에서, 전달 시스템은 리포솜 입자 당 최대 20 배까지 RNA 탑재량의 증가시키고, 동시에 운반체 부형제의 전체량을 약 45% 감소시킬 수 있음을 논증할 것이다. 일부 변이에서, 시스템은 ApoB의 생체내 녹다운에 의해 측정하였을 때, 펩티드 없는 리포솜 제제와 비교하였을 때, 마우스 간 및 마우스 공장(jejunum)에 85% 녹다운을 유지시키면서, RNA 물질 투여량을 30% 감소시킬 수 있을 것이다. 따라서, 본 발명의 운반체 입자들의 약제학적 제제는 siRNA, mdRNA, 또는 안티센스 물질과 같은 RNA 물질의 전달 효율을 상당히 개선시킬 수 있을 것이다.

[0160] 운반체 나노입자들

[0161] 일부 구체예들에서, 본 발명의 운반체 입자들은 2008년 10월 16일에 제출된 미국 특허 출원 61/106,062에서 설명된 것과 같이 조제될 수 있다.

[0162] 본 발명의 운반체 입자들은 일반적으로 균일한 입자 크기를 가진다. 운반체 입자 크기는 직경이 약 300 nm 이하, 또는 약 250 nm 이하, 또는 약 200 nm 이하, 또는 약 180 nm 이하, 또는 약 160 nm 이하, 또는 약 150 nm 이하, 또는 약 140 nm 이하, 또는 약 130 nm 이하, 또는 약 120 nm 이하, 또는 약 110 nm 이하, 또는 약 100 nm 이하, 또는 약 90 nm 이하, 또는 약 80 nm 이하, 또는 약 70 nm 이하일 수 있다.

[0163] 본 발명의 활성제 운반체 입자들은 입자 크기의 범위가 예를 들면, 약 50 nm 내지 약 500 nm, 또는 약 60 nm 내지 약 400 nm, 또는 약 70 nm 내지 약 300 nm, 또는 약 70 nm 내지 약 200 nm, 또는 약 70 nm 내지 약 160 nm, 또는 약 80 nm 내지 약 160 nm일 수 있다.

[0164] 일부 구체예들에서, 본 발명의 활성제 운반체 입자들은 음하전될 수 있다. 예를 들면, RNAi-물질 및 양이온 펩티드로 구성된 운반체 입자들은 응축되어, 입자들은 음전하를 유지한다.

[0165] 일부 구체예들에서, 본 발명의 활성제 운반체 입자들은 양하전될 수 있다. 예를 들면, RNAi-물질 및 양이온 펩티드로 구성된 운반체 입자들은 응축되어, 입자들은 양전하를 유지한다.

[0166] 운반체 및 펩티드 결합 부분

- [0167] 일부 측면에서, 본 발명의 운반체화합물 및 조성물은 펩티드 성분이 핵산에 결합하여, 나노미터 크기의 입자들을 형성함으로써 생물학적 활성 핵산 성분과 응축되는 펩티드 성분으로 형성될 수 있다.
- [0168] 일부 구체예들에서, 본 발명의 운반체 조성물에 적합한 펩티드들은 2008년 11월 19일에 제출된 미국 특허 출원 61/116,258에서 설명되고 있다.
- [0169] 하나 이상의 결합 부분을 가진 한 가지 펩티드가 핵산에 결합할 때 운반체가 형성될 수 있다.
- [0170] 특정 변이에서, 펩티드의 하나 이상의 양이온 결합 부분은 동일한 또는 상이한 핵산 분자에 결합할 수 있다.
- [0171] 본 발명의 교차연결가능한 그리고 절단가능한 펩티드는 하나 이상의 결합 부분에 있는 펩티드 쇄와 함께 분포되는 다수의 양이온 잔기를 유리하게 가질 수 있다. 양이온 잔기들의 수 및 분포의 변이를 이용하여 활성제에 대한 펩티드의 결합 강도를 다양하게 할 수 있다.
- [0172] 본 발명의 펩티드는 핵산 및 하나 이상의 링커기에 결합되는 충분한 양전하를 가진 결합 부분을 보유하는 양이온 펩티드를 포함한다. 본 발명의 펩티드의 결합 부분은 핵산에 결합하기 위하여 충분한 양전하를 보유할 수 있다. 링커기는 단일 분자에 두 개 이상의 펩티드가 교차 연결되도록 서로 연결될 수 있다.
- [0173] 본 공개내용의 운반체 입자를 형성하기 위하여 활성 핵산 물질과 응축될 수 있는 펩티드는 결합된 핵산을 포함하는 자가-교차 연결된 구조체를 만들기 위하여 핵산 및 충분한 링커기에 결합되는 충분한 양전하를 보유할 수 있다.
- [0174] 본 공개내용은 핵산에 결합하기 위한 충분한 양하전 잔기들을 보유하고, 그리고 교차연결된 펩티드를 형성할 수 있는 펩티드를 제공한다.
- [0175] 일부 구체예들에서, 생물학적 활성제는 양이온 펩티드에 결합할 수 있는 핵산 물질이다. 핵산 물질은 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 또는 6개 펩티드 또는 그 이상에 결합하여 복합체를 형성할 수 있다. 응축물 입자는 핵산-펩티드 복합체의 응집 및 결합에 의해 형성될 수 있다.
- [0176] 일부 구체예들에서, 핵산 물질은 하나 이상의 펩티드 부분에 결합하여, 펩티드가 하나 이상의 핵산 물질에 부착된다.
- [0177] 본 발명의 교차연결가능한 또는 절단가능한 펩티드와 펩티드가 결합하는 생물학적 활성제를 혼합하여 운반체 구조 또는 구조체가 형성될 수 있다. 이 물질에 펩티드의 결합은 펩티드의 교차연결이 되는 것과 동시에 또는 펩티드가 교차연결되기 전 또는 후에 일어날 수 있다.
- [0178] 일부 측면에서, 운반체는 펩티드 및 핵산의 응축물이 될 수 있는 교차연결된 펩티드 구조체다. 응축물은 핵산과 같은 생물학적 활성제를 결합시키는 나노미터 크기의 운반체 입자를 형성할 수 있다.
- [0179] 교차연결가능한 펩티드
- [0180] 일부 구체예들에서, 본 발명의 교차연결가능한 펩티드는 교차연결가능한 말단 잔기 또는 기를 포함할 수 있다.
- [0181] 예를 들면, 교차연결가능한 펩티드는 펩티드간 이황화 결합을 형성함으로써 교차연결되어, 펩티드 이량체를 형성하게 되는 단일 말단 시스테인 잔기를 가질 수 있다.
- [0182] 일부 변이에서, 펩티드들은 하나 이상의 설폰히드릴기를 포함하여, 교차연결되어 다중 펩티드 구조체를 형성하고, 생물학적 활성제에 대한 운반체가 될 수 있다.
- [0183] 일부 구체예들에서, 교차연결가능한 기는 절단가능한 교차연결을 형성하여, 낮은 pH에서 절단될 수 있거나 또는 단백질 또는 효소의 작용에 의해 절단될 수 있다. 절단가능한 교차연결의 예는 화학적으로 절단가능한 산에 불안정한 교차연결 및 효소-절단가능한 교차연결을 포함한다.
- [0184] 교차연결가능한 기의 예는 최대 1000개 원자를 가진 유기 기, 이기능 링커, 그리고 이종이기능성(heterobifunctional) 링커를 포함한다. 교차연결가능한 기는 펩티드 잔기의 치환체가 될 수 있거나, 또는 펩티드의 말단에 부착될 수 있다.
- [0185] 특정 구체예들에서, 교차연결가능한 펩티드 구조는 각 말단에서 교차연결가능한 기들을 가지는 펩티드를 포함한다. 일부 변이에서, 교차연결가능한 펩티드 구조는 각 말단에 교차연결가능한 기들을 가지는 펩티드의 이량체, 삼량체 및 다량체를 포함한다.



- [0186] 절단가능한 펩티드
- [0187] 일부 측면에서, 본 공개내용은 펩티드 서열 부분들 사이에 위치한 내부 절단가능한 링커기를 포함하는 절단가능한 펩티드를 제공한다.
- [0188] 일부 구체예들에서, 절단가능한 펩티드는 절단가능한 기에 의해 서로 연결된 두 개의 양이온 결합 부분을 보유할 수 있다. 절단가능한 기는 서로 펩티드의 다양한 결합 부분들을 분리시키도록 절단될 수 있다.
- [0189] 양이온 결합 부분들은 핵산과 같은 생물학적 활성제에 결합될 수 있다.
- [0190] 일부 변이에서, 결합 부분들을 분리시키기 위하여 펩티드의 링커기를 절단하면, 절단되지 않는 펩티드와 비교하였을 때, 생물학적 활성제로부터 펩티드를 더욱 신속하게 분리시킬 수 있다.
- [0191] 세포안에서 절단가능한 링커는 세포내 환경에서 화학적 환원에 의해 또는 다양한 단백질 또는 효소의 작용에 의해 절단될 수 있다.
- [0192] 응축 입자들 및 방출가능한 형태
- [0193] 본 발명의 화합물 및 조성물은 하나 이상의 펩티드 성분 및 하나 이상의 활성제로 구성된 응축 입자들 또는 운반체를 포함한다.
- [0194] 일반적으로, 펩티드 및 활성제로 형성된 응축 입자들은 음이온, 중성, 또는 양이온이 될 수 있다. 생체내에서 운반체 입자들의 전달을 위하여, 중성 또는 양이온 형태가 바람직할 수 있다. 응축 입자는 코어 입자로 불릴 수도 있다.
- [0195] 일부 구체예들에서, 응축 입자는 교차연결가능한 펩티드와 활성제의 제 1 부분에 의해 형성될 수 있다. 동일한 또는 상이한 교차연결가능한 펩티드의 하나 이상의 추가 층이 입자에 추가될 수 있다.
- [0196] 일부 변이에서, 응축 입자는 절단가능한 펩티드와 활성제의 제 1 부분에 의해 형성될 수 있다. 동일한 또는 상이한 절단가능한 펩티드의 하나 이상의 추가 층이 입자에 추가될 수 있다.
- [0197] 특정 구체예들에서, 응축 입자는 절단가능한 펩티드와 활성제의 제 1 부분에 의해 형성될 수 있다. 동일한 또는 상이한 교차연결가능한 펩티드의 하나 이상의 추가 층이 입자에 추가될 수 있다.
- [0198] 일부 변이에서, 응축 입자는 교차연결가능한 펩티드와 활성제의 제 1 부분에 의해 형성될 수 있다. 동일한 또는 상이한 절단가능한 펩티드의 하나 이상의 추가 층이 입자에 추가될 수 있다.
- [0199] 일부 구체예들에서, 음이온인 응축 입자는 교차연결가능한 또는 절단가능한 펩티드의 제 1 부분과 활성 핵산 물질로 형성될 수 있다. 양이온 교차연결가능한 또는 절단가능한 펩티드의 추가 층(또는 층들)이 음이온 입자에 추가되어 중성 또는 양이온 운반체 입자를 형성할 수 있다.
- [0200] 특정 변이에서, 음이온인 응축 입자는 교차연결가능한 또는 절단가능한 펩티드의 제 1 부분과 활성 핵산 물질로 형성될 수 있다. 양이온 교차연결가능한 또는 절단가능한 펩티드의 추가 층(또는 층들)이 음이온 입자에 추가되어 중성 또는 양이온 운반체 입자를 형성할 수 있다. 음이온 엔도솜붕괴 화합물의 추가 층 또는 층들이 중성 또는 양이온 운반체 입자에 추가되어 층을 이룬 중성 또는 양이온 운반체 입자를 형성할 수 있다.
- [0201] 일부 측면에서, 활성제는 하나 이상의 약물 화합물, 하나 이상의 안티센스 물질들, 하나 이상의 RNAi-유도성 물질들, 또는 하나 이상의 DNA를 함유하는 물질들이 될 수 있다.
- [0202] 일부 구체예들에서, 본 공개내용의 조성물 또는 제제는 응축물 입자들을 양이온 리포솜에 적하하거나 또는 운반체 입자들을 양이온 리포솜에 적층하여 조제될 수 있다.
- [0203] 일부 구체예들에서, 본 발명의 조성물 및 방법들은 방출가능한 형태 또는 조성물로 치료제를 전달할 수 있다. 방출가능한 형태 및 조성물은 활성제에 결합하여 방출시키는 분자; 활성제에 결합하여 물질의 방출을 지원하는 모이어티를 방출시키는 분자; 활성제에 결합하여 후속적으로 생물학적 격실내에서 물질의 방출을 지원하는 형태로 조절되는 분자; 그리고 조성물 방출 중개 화합물과 혼합된 활성제에 결합하는 분자를 포함하는 조성물을 포함한다.
- [0204] 여기에서 사용된 것과 같이, 방출가능한 형태는 본 공개내용의 교차연결가능한 또는 절단가능한 펩티드를 포함하는 것들, 또는 엔도솜 붕괴성 화합물 또는 물질을 포함하는 형태를 포함한다.
- [0205] 응축물 또는 운반체 입자는 절단가능한 펩티드 구조 또는 매트릭스를 포함할 수 있다. 펩티드 구조의 절단은 펩

티드 교차연결을 절단할 수 있는 화합물을 포함하는 생물학적 환경 또는 격실안으로 운반체의 진입과 같은 특정 이벤트에 의해 촉발될 수 있다. 펩티드 링커기의 절단은 시토플라زم 세포내에서 발생되거나 또는 다양한 세포성 또는 세포의 격실에서 발생할 수 있다.

- [0206] 이황화물 펩티드 링커기의 절단은 예를 들면, 트리스(2-카르복시에틸) 포스핀 하이드로클로라이드 (TCEP), 디티오트레톨 (DTT), 또는 멀캅토에탄올에 의한 이황화물의 환원에 의해 화학적으로 실행될 수 있다.
- [0207] 특정 구체예들에서, 이황화물 환원효소를 이용하여 펩티드 이황화물 결합을 절단시킬 수 있다.
- [0208] 세포내에서, 이황화물 교차연결이 환원되고, 이로써 효과적인 전달을 위한 활성제가 방출된다. 엔도솜의 환경은 이황화물을 환원시키고, 이황화물의 환원을 중개하고, 활성제를 방출시키는 것으로 본다.
- [0209] 세포내에서 방출은 펩티드 교차연결의 파괴 또는 절단에 의해 발생할 수 있고, 뿐만 아니라 펩티드로부터 생물학적 활성제의 분리에 의해 일어날 수 있다.
- [0210] 본 발명의 펩티드 및 펩티드 구조체는 하나 이상의 양하전 아미노산 잔기들을 가지는 1개, 2개 또는 그 이상의 결합 부분을 유리하게 포함할 수 있다. 결합 부분은 체인에 부착될 수 있는데, 여기서 하나의 양하전 결합 부분은 절단가능한 교차연결에 의해 그 다음 결합 부분에 절단가능하게 연결된다.
- [0211] 양이온 부분은 핵산 물질과 같은 활성제의 결합 부분으로 작용할 수 있으며, 몇 가지 양이온 부분은 동일한 활성제에 결합하여 활성제에 펩티드가 공조적으로 부착된다.
- [0212] 특정 구체예들에서, 본 발명의 방출가능한 형태는 펩티드 및 핵산의 응축물 입자를 포함하는데, 이때 펩티드 성분은 핵산을 방출시키기 위하여 절단될 수 있는 교차연결을 포함한다. 펩티드의 링커기 절단은 세포외 도메인으로부터 세포내 도메인으로 운반 또는 엔도사이토시스 동안 또는 세포에 의한 엔도솜의 흡수 및 전달 동안과 같은 펩티드의 환경 변화에 의해 촉발될 수 있다.
- [0213] 펩티드용 절단가능한 링커들의 예는 세포내이입 동안 또는 리포솜과 세포내 상호작용을 통하여 절단될 수 있는 하이드라진과 같은 산-절단가능한 기를 포함한다.
- [0214] 일부 구체예들에서, 산에 불안정한 링커에 의해 활성제의 방출이 제공될 수 있다.
- [0215] 산에 불안정한 링커들의 예는 오르소에스테르 기, 하이드라존, cis-아세토닐, 아세탈, 케탈, 실일 에테르, 실라잔, 이민, 시트라코닌 무수물, 말레인 무수물, 크라운 에테르, 아자크라운 에테르, 티아크라운 에테르, 디티오벤질 기, cis-아코니틴산, cis-카르복실 알카트리엔, 메타아크릴산 및 이의 혼합물을 포함하는 링커들이 포함된다.
- [0216] 산에 불안정한 기 및 링커들의 예는 미국 특허 7,098,032; 6,897,196; 6,426,086; 7,138,382; 5,563,250; 및 5,505,931에서 제시된다.
- [0217] 펩티드용 절단가능한 링커들의 예는 세포내 카텝신에 의해 절단될 수 있는 Val-Cit과 같은 카텝신-절단가능한 링커들을 포함한다. 카텝신 B, D, 및 L의 기질 서열의 예는 표 1, 2, 3에서 차례로 제공된다. 절단가능한 링커들은 카텝신 B, D, 및 L 기질의 2-, 3-, 4-가 펩티드 소단위를 포함한다(P2-P2').
- [0218] [표 1]

[0219] 카텝신 B 기질

SEQ ID NO:	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'	P4'
1	-	Abz	Phe	Arg	Ala	Lyd	-	-
2	-	Abz	Phe	Arg	Lyd	Trp	-	-
3	-	Abz	Phe	Arg	Nph	Phe	-	-
4	-	Abz	Phe	Arg	Phe	Lyd	-	-
5	Asn	Phe	Phe	Gly	Val	Gly	Gly	Glu
6	Cys	Pro	Val	Thr	Tyr	Gly	Gln	Cys
7	Gln	Ala	Ser	Arg	Ser	Phe	Asn	Gln
8	Ser	Arg	Ser	Phe	Asn	Gln	Gly	Arg
9	Ala	Ser	Arg	Ser	Phe	Asn	Gln	Gly
10	Boc	Gly	Arg	Arg	AMC	-	-	-
11	-	-	Bz	Arg	NH2	-	-	-
12	-	-	Bz	Gly	Arg	-	-	-
13	Tyr	Leu	Lys	Arg	Leu	Cys	Gly	Thr

[0220]

SEQ ID NO:	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'	P4'
14	Lys	Arg	Leu	Cys	Gly	Thr	Phe	Leu
15	Phe	Val	Asn	Gln	His	Leu	Cya	Gly
16	Leu	Cya	Gly	Ser	His	Leu	Val	Glu
17	His	Leu	Val	Glu	Ala	Leu	Tyr	Leu
18	Val	Glu	Ala	Leu	Tyr	Leu	Val	Cya
19	Glu	Ala	Leu	Tyr	Leu	Val	Cya	Gly
20	Leu	Tyr	Leu	Val	Cya	Gly	Glu	Arg
21	Val	Cya	Gly	Glu	Arg	Gly	Phe	Phe
22	Gly	Glu	Arg	Gly	Phe	Phe	Tyr	Thr
23	Gly	Phe	Phe	Tyr	Thr	Pro	Lys	Ala
24	Leu	Lys	Pro	Ala	Lys	Ser	Ala	Arg
25	Ala	Pro	Leu	Lys	Pro	Ala	Lys	Ser
26	Lys	Pro	Ala	Lys	Ser	Ala	Arg	Ser
27	Lys	Leu	Ser	Gly	Phe	Ser	Phe	Lys
28	Lys	Ser	Phe	Lys	Leu	Ser	Gly	Phe
29	Ala	Tyr	Arg	Arg	Phe	Tyr	Gly	Pro
30	Gln	Trp	Leu	Gly	Ala	Pro	Val	Pro
31	Met	Lys	Leu	Thr	Leu	Lys	Gly	Gly
32	Lys	Lys	Leu	Thr	Val	Asn	Pro	Gly
33	Leu	Ser	Lys	Lys	Val	Lys	Asn	Met
34	Thr	Phe	Leu	Arg	Leu	Ala	Ala	Leu
35	Ser	Leu	Asn	His	Tyr	Ala	Gly	Tyr
36	Leu	Leu	Val	Tyr	AMC	-	-	-
37	Arg	Glu	Ala	Ala	Ser	Gly	Asn	Phe
38	Pro	Thr	Val	Gly	Ser	Phe	Gly	Phe
39	Glu	Val	Asp	Leu	Leu	Ile	Gly	Ser
40	Pro	Arg	Phe	Lys	Ile	Ile	Gly	Gly
41	-	Z	Arg	Arg	AMC	-	-	-
42	-	Z	Arg	Arg	NAN	-	-	-
43	-	Z	Leu	Arg	AMC	-	-	-
44	-	Z	Phe	Arg	AMC	-	-	-
45	-	Z	Phe	Arg	AMC	-	-	-
46	-	Z	Phe	Arg	NAN	-	-	-

[0221]

[0222] [표 2]

[0223] 카텝신 D 기질

SEQ ID NO:	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'	P4'
47	Abz	Ile	Glu	Phe	Nph	Arg	Leu	NH2
48	Leu	Leu	Ser	Ala	Leu	Val	Glu	Thr
49	Ile	Thr	Leu	Leu	Ser	Ala	Leu	Val
50	Leu	Ser	Ala	Leu	Val	Glu	Thr	Arg
51	Val	Val	Ile	Ala	Thr	Val	Ile	Val
52	Ile	Ile	Gly	Leu	Met	Val	Gly	Gly
53	Val	Ile	Thr	Leu	Val	Met	Leu	Lys
54	Lys	Leu	Val	Phe	Phe	Ala	Glu	Asp
55	Leu	Val	Phe	Phe	Ala	Glu	Asp	Val
56	Thr	Tyr	Lys	Phe	Phe	Glu	Gln	Met
57	Val	Ile	Ala	Thr	Val	Ile	Val	Ile
58	Ile	Val	Ile	Thr	Leu	Val	Met	Leu
59	Leu	Gly	Asp	Phe	Phe	Arg	Lys	Ser
60	Ile	Lys	Asp	Phe	Leu	Arg	Asn	Leu
61	Gly	Tyr	Asp	Leu	Ser	Phe	Leu	Pro
62	Ala	Pro	Gly	Phe	Leu	Gly	Leu	Pro
63	Thr	Met	Thr	Leu	Ser	Lys	Ser	Thr
64	Asn	Tyr	Phe	Leu	Asp	Val	Glu	Leu
65	Ala	Leu	Asp	Phe	Ala	Val	Gly	Glu
66	Phe	Gln	Ile	Tyr	Ala	Val	Pro	Trp
67	Lys	Asp	Val	Leu	Asp	Ser	Val	Leu
68	Val	Glu	Asp	Leu	Glu	Ser	Val	Gly
69	Gly	Asn	Phe	Lys	Ser	Gln	Leu	Gln
70	Trp	Gly	Thr	Phe	Glu	Glu	Val	Ser
71	Leu	Gly	Glu	Phe	Val	Ser	Glu	Thr
72	Ser	His	Cys	Leu	Leu	Val	Thr	Leu
73	Leu	Val	Thr	Leu	Ala	Ala	His	Leu
74	Ser	Thr	Val	Leu	Thr	Ser	Lys	Tyr
75	Ala	Glu	Ala	Leu	Glu	Arg	Met	Phe
76	Leu	Glu	Arg	Met	Phe	Leu	Ser	Phe
77	Leu	Asp	Lys	Phe	Leu	Ala	Ser	Val
78	Glu	Arg	Met	Phe	Leu	Ser	Phe	Pro

[0224]



SEQ ID NO:	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'	P4'
79	Phe	Leu	Ser	Phe	Pro	Thr	Thr	Lys
80	Ala	Asn	Val	Ser	Thr	Val	Leu	Thr
81	Ala	Ser	Val	Ser	Thr	Val	Leu	Thr
82	Leu	Leu	Val	Thr	Leu	Ala	Ser	His
83	Leu	Leu	Val	Thr	Leu	Ala	Ala	His
84	Ala	Ala	Glu	Tyr	Gly	Ala	Glu	Ala
85	-	-	-	Val	Leu	Ser	Ala	Ala
86	Val	Gln	Ala	Ala	Tyr	Gln	Lys	Val
87	Thr	Ala	Glu	Glu	Lys	Ala	Ala	Val
88	Val	Thr	Ala	Leu	Trp	Gly	Lys	Val
89	-	Val	His	Leu	Thr	Pro	Glu	Glu
90	Leu	Gly	Arg	Leu	Leu	Val	Val	Tyr
91	Leu	Gly	Arg	Leu	Leu	Val	Val	Tyr
92	Gly	Arg	Leu	Leu	Val	Val	Tyr	Pro
93	Gly	Arg	Leu	Leu	Val	Val	Tyr	Pro
94	Val	Thr	Ala	Phe	Trp	Gly	Lys	Val
95	Thr	Gln	Arg	Phe	Phe	Glu	Ser	Phe
96	Thr	Gln	Arg	Phe	Phe	Glu	Ser	Phe
97	Phe	Glu	Ser	Phe	Gly	Asp	Leu	Ser
98	Phe	Glu	Ser	Phe	Gly	Asp	Leu	Ser
99	Lys	Gly	Thr	Phe	Ala	Thr	Leu	Ser
100	Thr	Ala	Leu	Trp	Gly	Lys	Val	Asn
101	Ala	Asp	Ala	Val	Met	Asn	Asn	Pro
102	Val	Glu	Ala	Leu	Tyr	Leu	Val	Cya
103	Ala	Leu	Tyr	Leu	Val	Cya	Gly	Glu
104	Glu	Arg	Gly	Phe	Phe	Tyr	Thr	Pro
105	Arg	Leu	Arg	Ala	Tyr	Leu	Leu	Pro
106	Leu	Lys	Phe	Leu	Asn	Val	Leu	Ser
107	Ser	Gln	Arg	Tyr	Lys	Val	Asp	Tyr
108	Lys	Val	Asp	Tyr	Glu	Ser	Gln	Ser
109	Ser	Gly	Gly	Lys	Met	Lys	Val	Asn
110	Arg	Pro	Phe	Leu	Val	Val	Ile	Phe
111	Ala	Ile	Lys	Phe	Phe	Ser	Ala	Gln
112	Ile	Lys	Phe	Phe	Ser	Ala	Gln	Thr

[0225]

SEQ ID NO:	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'	P4'
113	Ile	Thr	Lys	Leu	Asn	Ala	Glu	Asn
114	Ala	Gly	Lys	Lys	Tyr	Phe	Ile	Asp
115	Phe	Ile	Asp	Phe	Val	Ala	Arg	Glu
116	Pro	Tyr	Ile	Leu	Lys	Arg	Gly	Ser
117	Phe	Gln	Glu	Ala	Tyr	Arg	Arg	Phe
118	Leu	Leu	Lys	Glu	Ala	Gln	Leu	Pro
119	Val	Val	Leu	Leu	Pro	Asp	Val	Glu
120	Asp	Val	Val	Leu	Phe	Glu	Lys	Lys
121	Gly	Met	Glu	Leu	Ile	Val	Ser	Gln
122	Tyr	Pro	Val	Trp	Ser	Gly	Leu	Pro
123	Asn	Glu	Ile	Tyr	Pro	Val	Trp	Ser
124	Phe	Ile	Val	Gly	Phe	Thr	Arg	Gln
125	Ala	Asn	Pro	Lys	Gln	Thr	Trp	Val
126	His	Pro	Lys	Phe	Ile	Val	Gly	Phe
127	Lys	Gln	Thr	Trp	Val	Lys	Tyr	Ile
128	Trp	Val	Lys	Tyr	Ile	Val	Arg	Leu
129	Pro	Lys	Glu	Leu	Trp	Val	Gln	Gln
130	Leu	Arg	Tyr	Asp	Thr	Glu	Tyr	Tyr
131	Lys	Ile	Leu	Gly	Cys	Asp	Trp	Tyr
132	Asp	Val	Gln	Leu	Lys	Asn	Ile	Thr
133	Phe	Asn	Asn	Leu	Asp	Arg	Ile	Leu
134	Gln	Leu	Lys	Leu	Tyr	Asp	Asp	Lys
135	Ser	Leu	Gly	Leu	Val	Gly	Thr	His
136	Arg	Asp	Ile	Leu	Ile	Ala	Ser	Asn
137	Thr	Asp	Tyr	Met	Tyr	Leu	Thr	Asn
138	Ser	Ile	Thr	Phe	Leu	Arg	Asp	Phe
139	Gly	Leu	Lys	Phe	Ile	Ile	Lys	Arg
140	Ile	Asp	Ser	Phe	Val	Lys	Ser	Gly
141	Glu	Ile	Asp	Ser	Phe	Val	Lys	Ser
142	Lys	Thr	Tyr	Ser	Val	Gln	Leu	Lys
143	Ala	Ser	Asn	Trp	Tyr	Phe	Asn	His
144	Gly	Cys	Asp	Trp	Tyr	Phe	Val	Pro
145	Asp	Thr	Glu	Tyr	Tyr	Leu	Ile	Pro
146	Ile	Thr	Asp	Tyr	Met	Tyr	Leu	Thr

[0226]

SEQ ID NO:	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'	P4'
147	Asp	Tyr	Met	Tyr	Leu	Thr	Asn	Ala
148	Leu	Asn	Ile	Tyr	Tyr	Arg	Arg	Leu
149	Ile	Pro	Leu	Tyr	Lys	Lys	Met	Glu
150	Lys	Phe	Leu	Ala	Ser	Leu	Leu	Glu
151	Thr	Thr	Glu	Leu	Phe	Ser	Pro	Val
152	Asp	Gly	His	Phe	Leu	Arg	Glu	Pro
153	Phe	Ser	His	Phe	Ile	Arg	Ser	Gly

[0227]

[0228]

[표 3]

[0229] 카텝신 L 기질

SEQ ID NO:	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'	P4'
154	-	Abz	Phe	Arg	Ala	Lyd	NH2	-
155	Met	Phe	Leu	Glu	Ala	Ile	Pro	Met
156	Ala	Ile	Pro	Met	Ser	Ile	Pro	Pro
157	Cys	Pro	Val	Thr	Tyr	Gly	Gln	Cys
158	Gln	Ala	Ser	Arg	Ser	Phe	Asn	Gln
159	Lys	Val	Phe	Gln	Glu	Pro	Leu	Phe
160	Leu	Phe	Tyr	Glu	Ala	Pro	Arg	Ser
161	Ala	Thr	Leu	Thr	Phe	Asp	His	Ser
162	Pro	Leu	Phe	Tyr	Glu	Ala	Pro	Arg
163	Gln	Gly	Phe	Gln	Gly	Pro	Hyp	Gly
164	Gly	Pro	Arg	Gly	Leu	Hyp	Gly	Pro
165	Gly	Pro	Hyp	Gly	Ala	Hyp	Gly	Pro
166	Arg	Leu	Val	Gly	Gly	Pro	Met	Asp
167	Thr	Gly	Leu	Arg	Asp	Pro	Phe	Asn
168	Lys	Ile	Leu	His	Leu	Pro	Thr	Ser
169	Ala	His	Leu	Lys	Asn	Ser	Gln	Glu
170	Ile	Gln	Gln	Lys	Ile	Leu	His	Leu
171	Ala	Pro	Leu	Thr	Ala	Glu	Ile	Gln
172	Ile	Met	Phe	Thr	Ser	Leu	Pro	Leu
173	-	Cap	Leu	CyB	AMC	-	-	-
174	-	Cap	Leu	Phe	AMC	-	-	-
175	-	Cap	Leu	ThB	AMC	-	-	-

[0230]

SEQ ID NO:	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'	P4'
176	Glu	His	Tyr	Gln	Lys	Lys	Phe	Lys
177	-	Phe	Val	Asn	Gln	His	Leu	Cya
178	His	Leu	Val	Glu	Ala	Leu	Tyr	Leu
179	Ala	Leu	Tyr	Leu	Val	Cya	Gly	Glu
180	Arg	Gly	Phe	Phe	Tyr	Thr	Pro	Lys
181	Gly	Phe	Phe	Tyr	Thr	Pro	Lys	Ala
182	His	Ser	Lys	Ile	Ile	Ile	Ile	Lys
183	Val	Leu	Pro	Arg	Ser	Ala	Lys	Glu
184	Glu	Ala	Tyr	Arg	Arg	Phe	Tyr	Gly
185	Gln	Trp	Leu	Gly	Ala	Pro	Val	Pro
186	Leu	Ser	Leu	Ala	His	Thr	His	Gln
187	Lys	Leu	Leu	Ala	Val	Ser	Gly	Pro
188	Gln	Leu	Phe	Arg	Arg	Ala	Val	Leu
189	Glu	Phe	Ser	Arg	Lys	Val	Pro	Thr
190	Leu	Leu	Ile	Gly	Ser	Ser	Gln	Asp
191	Pro	Arg	Phe	Lys	Ile	Ile	Gly	Gly
192	-	Z	Leu	Arg	AMC	-	-	-
193	-	Z	Phe	Arg	AMC	-	-	-
194	-	-	Tyr	Gly	Gly	Phe	Met	-

[0231]

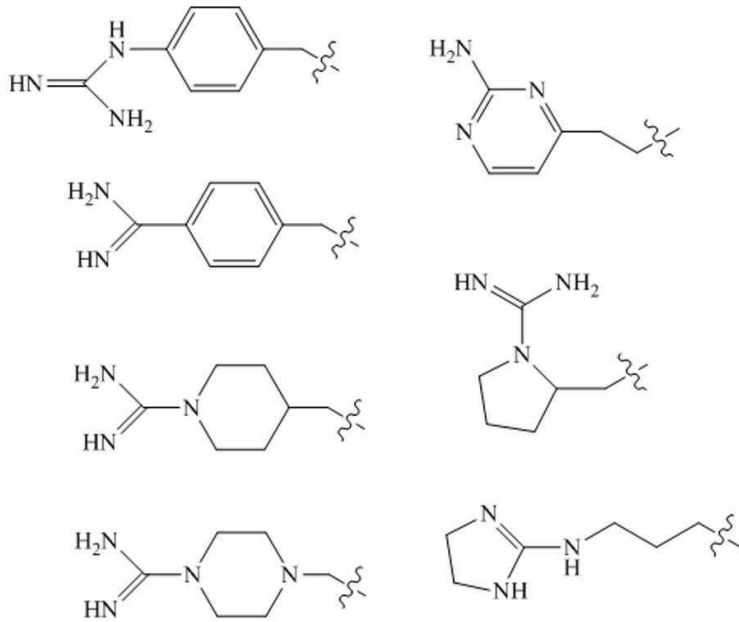
[0232] 일부 변이에서, 본 공개내용의 방출가능한 형태는 펩티드 및 핵산의 응축 입자 그리고 엔도솜 붕괴성 화합물을 포함한다. 이들 변이에서, 엔도솜 붕괴성 화합물은 코어 입자 및 활성제가 엔도솜으로부터 세포로의 방출을 지원할 수 있고, 펩티드 성분은 방출의 실행 및 세포내에서 코어 응축물 입자로부터 핵산의 분리를 실행하기 위하여 절단될 수 있는 교차 연결을 포함한다.

- [0233] 엔도솜 붕괴성 화합물의 예는 클로로퀸, 4-아미노퀴놀린, 아미노퀴놀린, 아모디아퀸(Amodiaquine), 세포 침투성 펩티드, 트랜스포르탄(Transportan), 페네트라틴(Penetratin), 인플루엔자 바이러스로부터 헤마글루티닌 융합 펩티드(예를 들면, Han 등, *Nat. Struct. Biol. Vol. 8, 715-720, 2001* 참고), 및 인플루엔자-기반 펩티드 diINF7을 포함한다.
- [0234] 특정 구체예들에서, 운반체 입자들 또는 구조체는 세포성 또는 준-세포성 전달을 위한 표적화 물질과 함께 제조될 수 있다. 일부 변이에서, 운반체 입자는 혈액 성분과 비-특이적 효과 또는 상호작용을 감소시키기 위하여 폴리에틸렌 글리콜(PEG)과 같은 합성 폴리머와 복합될 수 있다. 적절한 합성 폴리머는 폴리에틸렌 글리콜 쇜(PEG), 또는 PEG-폴리우레탄 또는 PEG-폴리프로필렌과 같은 PEG 코폴리머를 포함한다. *J. Milton Harris, Poly(ethylene glycol) chemistry: biotechnical 및 biomedical applications (1992)*참고
- [0235] 사용 방법
- [0236] 본 공개내용은 세포로 치료 핵산을 전달하는 방법을 포함하는데, 이 방법은 핵산 물질을 포함하는 운반체 입자를 포함하는 조성물을 조제하고, 세포를 이 조성물로 치료하는 것을 포함한다.
- [0237] 본 공개내용은 세포에서 유전자의 발현을 억제시키는 방법을 포함하는데, 이 방법은 핵산 물질을 포함하는 운반체 입자를 포함하는 조성물을 조제하고, 세포를 이 조성물로 치료하는 것을 포함한다.
- [0238] 본 공개내용은 포유동물에서 유전자의 발현을 억제시키는 방법을 포함하는데, 이 방법은 핵산 물질을 포함하는 운반체 입자를 포함하는 조성물을 조제하고, 이 조성물을 포유동물에 투여하는 것을 포함한다.
- [0239] 본 공개내용은 인간에서 질환을 치료하는 방법을 포함하는데, 이때 질환은 류마티스성 관절염을 포함하는 염증성 질환, 과콜레스테롤혈증을 포함하는 대사 질환, 간 질환, 뇌염, 뼈 골절, 심장 질환, 간염 및 인플루엔자를 포함하는 바이러스성 질환 그리고 암에서 선택되며, 이 방법은 리포솜 조성물을 조제하고, 이 조성물을 인간에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0240] 활성제
- [0241] 일부 측면에서, 본 공개내용은 치료제의 전달에 적합한 조성물을 만드는 방법을 제공한다. 본 공개내용의 방법은 응축된 RNA 나노입자들, 이중- 또는 삼중-가닥 RNA 구조, RNA펩티드 콘주게이트, 다이스 기질 RNAs, dsRNAs, siRNAs, microRNAs, 헤어핀 RNAs, 기타 활성 및 조절 RNA 형태, 안티센스 RNA 및 DNA를 포함하는 안티센스 치료 형태, 그리고 DNA 및 DNA를 함유하는 형태와 같은 핵산 물질들의 조성물을 제공할 수 있다.
- [0242] 본 공개내용의 활성제는 단일-가닥의 또는 이중-가닥의 핵산일 수 있다. 본 공개내용의 활성제는 항원성 또는 면역원성 단백질 또는 폴리펩티드일 수 있다.
- [0243] 본 공개내용의 활성제는 활성제의 펩티드 응축물일 수 있다. 예를 들면, 활성제는 활성제를 펩티드 또는 기타 바이오분자로 응축시켜 형성된 나노입자들로 구성되거나, 또는 활성제과 펩티드, 바이오분자, 또는 폴리머 분자의 응축물 또는 복합물로 구성될 수 있다. 나노입자들 또는 응축물은 교차연결될 수 있다. 나노입자들 또는 응축물은 리포솜 조성물에 피운반체로서 적하될 수 있다.
- [0244] 본 공개내용의 활성제는 다양한 상호작용에 의해 표적 서열의 전사 또는 해독을 차단시키기 위하여 표적 핵산 서열에 결합하는 안티센스 또는 센스, DNA 또는 RNA 올리고뉴클레오티드, 또는 변형된 DNA 또는 RNA 올리고뉴클레오티드가 될 수 있다. 안티센스 또는 센스 물질은 뉴클레오티드 이중 헬릭스와 함께 삼중 헬릭스를 형성할 수 있거나, 또는 리보자임이거나, 또는 프로모터 서열 또는 인핸서 서열을 포함하는 전사 또는 해독 조절 서열을 인코딩할 수 있다. 안티센스 또는 센스 올리고뉴클레오티드를 이용하여 단백질의 발현을 차단시킬 수 있고, 그리고 변형된 핵염기 또는 당기 또는 다른 기를 가질 수 있거나 또는 증진된 안정성 또는 활성을 위한 바이오분자, 펩티드 또는 단백질과 콘주게이트될 수 있다. 안티센스 또는 센스 올리고뉴클레오티드는 여기에서 설명된 조성물 및 방법에 의해 이의 표적 핵산을 포함하는 세포로 전달될 수 있다. 안티센스 또는 센스 올리고뉴클레오티드는 여기에서 설명된 올리고뉴클레오티드-운반체 복합체 또는 리포솜 제제를 이용하여 이의 표적 핵산을 포함하는 세포로 전달될 수 있다.
- [0245] 교차연결가능한 및 절단가능한 펩티드
- [0246] 본 발명의 교차연결가능한 펩티드는 구조식 I에 나타난 구조를 가지는 것들이다:
- [0247] [구조식 I]



- [0248] A-B
- [0249] 여기서 A는 양이온 결합 부분을 포함하는 2개 내지 16개 아미노산 잔기로 된 펩티드이며, B는 교차연결가능한 기이고, A는 pH 7에서 하나 이상의 양 전하를 띤 잔기들을 포함한다.
- [0250] B의 예로는 시스테인을 포함한다.
- [0251] B의 또 다른 예로는 최대 1000개 원자를 가진 유기 기, 이기능성 링커, 및 이중이기능성 링커, 카르바메이트, 및 에스테르를 포함한다.
- [0252] A의 예로는 양이온 펩티드를 포함한다.
- [0253] A의 예로는 구조식 II에 나타난 구조를 가지는 양이온 펩티드를 포함한다:
- [0254] [구조식 II]
- [0255]  $(Xaa^1)_m(Xaa^2)_n(Xaa^3)_o(Xaa^4)_p$
- [0256] 이때, Xaa는 아미노산 잔기이며,  $Xaa^1$ ,  $Xaa^2$ ,  $Xaa^3$ ,  $Xaa^4$ 는 각각 독립적으로 선택된 아미노산 잔기들로, 동일하거나 또는 상이할 수 있으며, 및 m, n, o, 및 p의 합이 2 또는 그 이상인 경우, m, n, o, 및 p는 0부터 4까지이며, 하나 이상의  $Xaa^1$ ,  $Xaa^2$ ,  $Xaa^3$ ,  $Xaa^4$ 는 pH 7에서 양 전하를 띤 잔기가 된다.
- [0257] 양이온 펩티드는 A 잔기가 예를 들면, 염기성 측쇄를 가지도록 준비될 수 있다. 염기성 측쇄를 가지는 아미노산의 예로는 아르기닌(Arg), 호모아르기닌 (homoArg)(측쇄-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH(C=NH)NH<sub>2</sub>), 노르아르기닌 (norArg) (측쇄-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH(C=NH)NH<sub>2</sub>), 노르-노르아르기닌 (nornorArg) (측쇄 (CH<sub>2</sub>)NH(C=NH)NH<sub>2</sub>), 오르니틴, 리신, 호모리신, 히스티딘, 1-메틸히스티딘, 피리딜알라닌 (Pal), 아스파라진, N-에틸아스파라진, 글루타민, 및 4-아미노페닐알라닌, 및 이의 측쇄 변형된 유도체들을 포함한다.
- [0258] 여기에서 사용된 것과 같이, 아미노산을 지칭할 때 용어 “호모(homo)”는 측쇄에 추가적인 탄소가 첨가된다는 것을 의미하고, 아미노산을 지칭할 때, 용어 “노르(nor)”는 측쇄로부터 탄소를 뺀다는 것을 의미한다. 따라서, 호모리신은 측쇄-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>NH<sub>2</sub>을 말한다.
- [0259] 양이온 펩티드는 잔기의 측쇄에 이온화가능한 기 또는 치환체를 포함하도록 준비될 수 있다.
- [0260] 일부 구체예들에서, 양이온 잔기는 N<sup>G</sup>-메틸아르기닌, 대칭 또는 비대칭, N<sup>G</sup>-디메틸아르기닌, N<sup>G</sup>-메틸-호모아르기닌, 대칭 또는 비대칭 N<sup>G</sup>,N<sup>G</sup>-디메틸-호모아르기닌, N<sup>G</sup>-메틸-노르아르기닌, 대칭 또는 비대칭 N<sup>G</sup>,N<sup>G</sup>-디메틸-노르아르기닌, 또는 N<sup>G</sup>-메틸-노르-노르아르기닌, 대칭 또는 비대칭 N<sup>G</sup>,N<sup>G</sup>-디메틸-노르-노르아르기닌이다.
- [0261] 일부 구체예들에서, 양이온 잔기는 N<sup>G</sup>-에틸아르기닌, 대칭 또는 비대칭 N<sup>G</sup>,N<sup>G</sup>-디에틸아르기닌, N<sup>G</sup>-에틸-호모아르기닌, 대칭 또는 비대칭 N<sup>G</sup>,N<sup>G</sup>-디에틸-호모아르기닌, N<sup>G</sup>-에틸-노르아르기닌, 대칭 또는 비대칭 N<sup>G</sup>,N<sup>G</sup>-디에틸-노르아르기닌, 또는 N<sup>G</sup>-에틸-노르-노르아르기닌, 대칭 또는 비대칭 N<sup>G</sup>,N<sup>G</sup>-디에틸-노르-노르아르기닌이다.
- [0262] 특정 구체예들에서, 양이온 잔기는 N<sup>G</sup>-알킬아르기닌, 대칭 또는 비대칭 N<sup>G</sup>,N<sup>G</sup>-디알킬아르기닌, N<sup>G</sup>-알킬-호모아르기닌, 대칭 또는 비대칭 N<sup>G</sup>,N<sup>G</sup>-디알킬-호모아르기닌, N<sup>G</sup>-알킬-노르아르기닌, 대칭 또는 비대칭 N<sup>G</sup>,N<sup>G</sup>-디알킬-노르아르기닌, 또는 N<sup>G</sup>-알킬-노르-노르아르기닌, 대칭 또는 비대칭 N<sup>G</sup>,N<sup>G</sup>-디알킬-노르-노르아르기닌이다.
- [0263] 일부 구체예들에서, 양이온 잔기는 구아니딘- 또는 아미딘을 포함하는 측쇄를 가진 아미노산이다. 예를 들면, Xaa 잔기의 측쇄는 구아니도, 아미디노, 디하이드로이미다졸, 4-구아니도-페닐, 4-아미디노-페닐, N-아미디노-피페리딘, N-아미디노-피페라진, 4,5-디하이드로이미다졸, 2-(N-아미디노)피롤리딘, 또는 4-[(2-아미노피리미디닐)]에틸과 같은 기를 포함할 수 있다.

[0264] 양이온 잔기들의 예들은 다음의 구조, 뿐만 아니라 이의 염 형태를 포함하는 측쇄를 가질 수 있다:



[0265]

[0266] 본 발명의 절단가능한 펩티드들은 구조식 I에 나타난 구조의 이량체를 포함하는데, 예를 들면, 이량체 A-B-B-A, 이때 링키지 B는 서로 연결시킬 수 있고, 링키지 -B-B-는 절단될 수 있다.

[0267] 예를 들면, 이량체 A-B-B-A는 A-B-(S-S)-B-A 이며, 여기서 (S-S)는 이황화물 링키지다.

[0268] 링키지(linkage) -B-B-의 또 다른 예들은 최대 1000개 원자를 가진 유기 기, 이기능성 링커와 함께 형성된 링키지, 및 이중이기능성 링커와 함께 형성된 링키지, 하이드라존 링커, 카르바메이트 링키지, 및 에스테르 링키지를 포함한다.

[0269] 본 발명의 교차연결가능한 펩티드는 구조식 II에 나타난 구조를 가지는 것들을 포함한다:

[0270] [구조식 II]

[0271] B-A-B

[0272] 여기서 A는 2개 내지 16개 아미노산 잔기로 된 펩티드이며, 및 상기에서 정의된 것과 같은 B는 교차연결가능한 기이고, 이때 A는 pH 7에서 하나 이상의 양 전하를 띤 잔기들을 포함한다.

[0273] B의 예로는 시스테인을 포함한다.

[0274] A의 예로는 양이온 펩티드를 포함한다.

[0275] 본 발명의 절단가능한 펩티드는 구조식 II에 나타난 구조의 이량체, 삼량체 또는 다량체인 것들을 포함하는데, 예를 들면, 이량체 B-A-B-B-A-B, 및 다량체 -(B-A-B)<sub>n</sub>-, 여기서 링커 B는 서로 연결시킬 수 있고, 링키지 -B-B-는 절단될 수 있다. 이와 같은 일부 절단가능한 펩티드는 각 말단에서 교차연결가능한 기를 보유하기 때문에 교차연결된 상태로 유지된다.

[0276] 본 내용의 펩티드를 준비하는데 적합한 양이온 결합 부분의 예들은 표 4에 나타낸다. 본 내용의 교차연결가능한 펩티드는 표 4에 나타난 펩티드의 C-말단 또는 N-말단에 부착된 시스테인과 함께, 표 4에 나타난 결합 부분을 가질 수 있다. 본 내용의 교차연결가능한 펩티드는 이량체를 형성할 수 있다.

[0277] [표 4]

[0278] 캡티드 준비를 위한 결합 부분들

SEQ ID NO:	결합 영역
195	GRKKRRQRRRPPQ
196	KKKRKV
197	KKKRKVKKKRKV
198	GRKKRR
199	RRRPPQ
200	WKKKK
201	RRRPPQH
202	KKRRQH
203	RRR

[0279]

SEQ ID NO:	결합영역
204	RRRR
205	RRRRR
206	KKK
207	RRRWW
208	RRRWW
209	RRWW
210	KKWW
211	KKKWW
212	WHHRKK
213	RRKKHHWW
214	KKREW
215	KKRRHW
216	KKRRHHW
217	KKRRQ
218	KKRRQ
219	GRKKRRQ
220	QGRKKRR
221	RRH
222	RRRH
223	RRRRH
224	RRRRRH
225	KKH
226	KKKH
227	HWKKRR
228	HWKKRR
229	PPHRRR
230	PPHRRR
231	GRKKRRVRRRPPQ
232	WWHHKKRRGGRRKKHHWW
233	WWHHKKRR
234	YYHHKKRR

[0280]

SEQ ID NO:	결합 영역
235	RRKKHHYY
236	VQAAIDYING
237	WRRRHH
238	HRRRWW
239	YYRRHH
240	HRRYY
241	WRRR
242	RRRW
243	YYRR
244	RRYY
245	WRRRHH
246	HRRRWW
247	YYRRHH
248	HRRYY
249	WRRR
250	RRRW
251	YYRR
252	RRYY
253	WRRRHH
254	HRRRWW
255	YYRRHH
256	HRRYY
257	WWHH-Orn-Orn-RR
258	WWHHRRR
259	WWHHRRR
260	WWHHHHRRR
261	WWWKKRRR
262	KKKWRRW
263	WRRRWRR
264	WWHHKKRR
265	WWCHHKCRR

[0281]

SEQ ID NO:	결합 영역
266	WWHHRRR
267	WWHCCKRR
268	WWHHKCCR
269	RRWWKHH
270	WWHHKKK
271	WWHHRRR
272	RRRRHH
273	HHKKK
274	HRRRR
275	YYRRRHH
276	YYKKKHH

[0282]



[0283] 본 내용의 절단가능한 펩티드의 예를 표 5에 나타낸다.

[0284] [표 5]

[0285] 절단가능한 펩티드들

SEQ ID NO:	펩타이드
277	GRKKRRV-Cit-RRRPPQ
278	GRKKRRV-Cit-RRKKRG
279	RRRPPQV-Cit-PPRRR
280	RRKKRGV-Cit-GRKKRR
281	QPFRRRV-Cit-RRRPPQ
282	WKKKKV-Cit-KKKKW
283	KKKKWV-Cit-WKKKK
284	HQPFRRRV-Cit-RRRPPQH
285	QPFRRRV-Cit-RRRPPQ
286	HQRRKKV-Cit-KKRRQH
287	RRV-Cit-RR
288	RRRV-Cit-RRR
289	RRRV-Cit-RRRR
290	RRRRV-Cit-RRRRR

[0286]

SEQ ID NO:	펩타이드
291	KKV-Cit-KK
292	KKKV-Cit-KKK
293	KKKKV-Cit-KKKK
294	KKKKKV-Cit-KKKKK
295	WRRRRV-Cit-RRRRWW
296	WRRRV-Cit-RRRW
297	WRRV-Cit-RRW
298	WWKKV-Cit-KKWW
299	WWKKKV-Cit-KKKWW
300	WWKKKV-Cit-KKKKWW
301	KKRRHHV-Cit-WHRRKK
302	WWHHKRRV-Cit-RRKKHHW
303	WRRKKV-Cit-KKRW
304	WRRKKV-Cit-KKRRHW
305	WHRRKKV-Cit-KKRRHW
306	QRRKV-Cit-KKRRQ
307	KKRRQV-Cit-QRRK
308	RRKKRGV-Cit-GRKKRR
309	GRKKRV-Cit-RRKKRG
310	QRRKKRGV-Cit-GRKKRRQ
311	QGRKKRV-Cit-RRKKRGQ
312	HRRV-Cit-RRH
313	HRRV-Cit-RRH
314	HRRRV-Cit-RRRH
315	HRRRRV-Cit-RRRRH
316	HKKV-Cit-KKH
317	HKKV-Cit-KKH
318	HKKKV-Cit-KKKH
319	HKKKKV-Cit-KKKKH
320	HWKKRV-Cit-RRKKWH
321	RRKKWHV-Cit-HWKKRR

[0287]

SEQ ID NO:	펩타이드
322	PPHRRRV-Cit-RRRHPP
323	RRRHPPV-Cit-PPHRRR
324	YYHHKKRRC-disulfide-CRRKKHHYY
325	YYHHKKRRV-Cit-RRKKHHYY
326	WWRRRC-disulfide-CRRWW
327	WWRRV-Cit-RRWW
328	YYRRC-disulfide-CRRYY
329	YYRRV-Cit-RRYY
330	WWRRHHC-disulfide-CHHRRWW
331	WWRRHHV-Cit-HHRRWW
332	YYRRHHC-disulfide-CRRHHYY
333	YYRRHHV-Cit-RRHHYY
334	WWRRRC-disulfide-CRRRW
335	WWRRV-Cit-RRRW
336	YYRRRC-disulfide-CRRYY
337	YYRRV-Cit-RRYY
338	WWRRHHC-disulfide-CHHRRWW
339	WWRRHHV-Cit-HHRRWW
340	YYRRHHC-disulfide-CRRHHYY
341	YYRRHHV-Cit-RRHHYY
342	WWRRRC-disulfide-CRRRW
343	WWRRV-Cit-RRRW
344	YYRRRC-disulfide-CRRYY
345	YYRRV-Cit-RRYY
346	WWRRRHC-disulfide-CHHRRWW
347	WWRRRHV-Cit-HHRRWW
348	YYRRRHC-disulfide-CRRHHYY
349	YYRRRHV-Cit-RRHHYY
350	WWHHKKRRV-Cit-WRRKKHHW
351	WWHH-Orn-Orn-RRV-Cit-RR-Orn-Orn-HHW
352	WWHHC-disulfide-CKKRR

[0288]

[0289]

여기에서 사용된 것과 같이, 아미노산 이름과 명칭은 대응하는 아미노산의 임의의 입체이성질체를 참고한다.

[0290]

표 5에서, 펩티드 서열의 내부에 있는 기는 절단 부위를 제공할 수 있다. 예를 들면, 내부 절단 부위는 이황화물 결합 또는 Val-Cit 링키지가 될 수 있다.

[0291]

절단가능한 링키지의 예로는 미국 특허 공개 번호. 20080166363에서 설명된 것과 같은 Phe-Lys, Val-Cit, Ala-Leu, Leu-Ala-Leu, 및 Ala-Leu-Ala-Leu (서열 번호: 376)을 포함한다.

[0292]

투여 경로

[0293]

본 공개내용의 활성제 조성물을 약제학적 조성물에 이용할 수 있다. 대상체으로 본 공개내용의 리포솜 제제를 장관외, 경구, 흡입, 국소, 점막, 직장 또는 볼로 투여될 수 있다. 장관외 용도는 피하, 피내, 정맥내, 근육내, 관절내, 활액내, 줄기내, 수막강내, 병소내 그리고 두개내 주사 또는 주입 기술을 포함한다.

[0294]

유효량

[0295]

특정 질환을 치료하기 위한 본 공개내용의 활성제 조성물의 유효량은 질환의 증상을 개선 또는 감소시키는데 일 반적으로 충분한 양을 말한다. 본 공개내용의 활성제 조성물의 유효량은 물질에 있는 생물학적 효과를 발생시키는데 충분한 양이 될 수 있다. 조성물은 단일 투약으로 투여되거나 또는 반복된 투약에 의해 투여될 수 있다.

- [0296] DILA2 아미노산 리포솜을 형성하는 화합물
- [0297] 본 내용의 리포솜 조성물은 US 2008-0317839 A1에서 공개된 하나 이상의 DILA2 아미노산 화합물을 포함할 수 있다.
- [0298] DILA2 아미노산 화합물은 특정 조건하에서 리포솜 구조를 형성할 수 있는 합성 유기 화합물이다. DILA2 아미노산 화합물은 아미노산의 N-말단 또는 C-말단 또는 양단에서 전달을 강화시키는 또는 친유성 꼬리를 대체시켜 만들어질 수 있다. 일부 구체예들에서, 아미노산 코어는 하나 이상의 아미노산을 포함하거나, 또는 2-20개 아미노산 잔기들로 된 펩티드가 될 수도 있다.
- [0299] DILA2 아미노산 화합물은 양이온 또는 비-양이온일 수 있고, 이때 비-양이온은 중성 및 음이온을 포함한다. 여기에서 사용된 것과 같이, 다른 언급이 없는 한, 종의 물리적 상태 또는 이온성(ionicity)은 pH 약 7의 환경을 말한다.
- [0300] 일부 측면에서, DILA2 아미노산 화합물은 방출가능한 형태의 치료요법 물질의 전달을 제공한다. 치료요법적 효과를 제공하기 위하여 세포에 의해 물질이 충분히 취입될 수 있도록 방출가능한 형태 및 조성물을 기궤한다.
- [0301] 방출가능한 형태는 활성제에 결합하여, 이 물질을 방출시키는 DILA2 아미노산 화합물을 포함한다. 일부 구체예들에서, 활성제의 방출은 산에 불안정한 링커에 의해 제공될 수 있다.
- [0302] 산에 불안정한 링커들의 예로는 오르소에스테르 기, 하이드라존, cis-아세토닐, 아세탈, 케탈, 실일 에테르, 실라잔, 이민, 시트라코닌 무수물, 말레인 무수물, 크라운 에테르, 아자크라운 에테르, 티아크라운 에테르, 디티오벤질 기, cis-아코니틴산, cis-카르복실 알카트리엔, 메타아크릴산 및 이의 혼합물을 포함하는 링커들이 포함된다.
- [0303] 산에 불안정한 기 및 링커들의 예는 미국 특허 7,098,032; 6,897,196; 6,426,086; 7,138,382; 5,563,250; 및 5,505,931에서 제시된다.
- [0304] 본 내용의 화합물 및 조성물의 방출가능한 형태는 활성제에 결합하여 물질의 방출을 지원하는 모이어티를 방출시키는 분자를 포함한다. 일부 구체예들에서, DILA2 아미노산 화합물은 세포로 물질의 전달을 지원하는 에탄올과 같은 소분자를 방출시키는 기를 포함할 수 있다. DILA2 아미노산 화합물은 활성제에 결합하여, 이후, 세포와 접촉되고, 또는 생리학적 pH보다 더 낮은 국소 pH를 가지는 생물학적 격실내로 운반되고, 산성 환경에서 가수분해되어, 물질의 전달을 지원하는 에탄올을 방출시킨다. 일부 구체예들에서, 물질의 전달을 지원하는 에탄올과 같은 소분자는 친유성 성분에 결합될 수 있다.
- [0305] 일부 구체예들에서, DILA2 아미노산 화합물은 세포로 물질의 전달을 지원하는 에탄올과 같은 소분자를 방출시키는 화합물과 혼합될 수 있다.
- [0306] 본 내용의 화합물 및 조성물의 방출가능한 형태는 활성제에 결합하고, 세포와 접촉된 후, 또는 생리학적 pH보다 더 낮은 국소 pH를 가지는 생물학적 격실내로 전달된 후, 산성 환경에서 물질의 전달을 지원하는 양이온 형태로 조절될 수 있는 DILA2 아미노산 화합물을 포함한다.
- [0307] 일부 구체예들에서, DILA2 아미노산 화합물은 활성제에 결합할 수 있고, 및 산성 환경에서 활성제의 방출을 지원하기 위하여 양이온 형으로 조절될 수 있는 화합물과 혼합될 수 있다.
- [0308] 가수분해가능한 그리고 조절가능한 기의 예들은 미국 특허 번호 6,849,272; 6,200,599에서 제공되며; 뿐만 아니라 Z. H. Huang 및 F. C. Szoka, "Bioresponsive liposomes 및 their use for macromolecular delivery," in: G. Gregoriadis (ed.), Liposome Technology, 3rd ed. (CRC Press 2006)에서도 제공된다.
- [0309] 일부 구체예들에서, 본 내용의 화합물 및 조성물의 방출가능한 형태는 활성제에 결합하는 DILA2 아미노산 화합물을 포함하고, 및 산성 환경에서 물질의 전달을 지원하는 중성 형태로 조절될 수 있는 지질 또는 화합물과 혼합될 수 있다. 산성 환경은 세포와 접촉후 또는 생리학적 pH보다 낮은 국소 pH를 가지는 생물학적 격실내로 전달후 시작될 수 있다.
- [0310] 양이온에서 중성 형태로 조절되는 화합물의 예로는 미국 특허 6,897,196; 6,426,086; 및 7,108,863에서 설명된 것과 같은 콜레스테릴 헤미숙시네이트(CHEMS)를 포함한다. 일부 실시예에서, CHEMS는 *Cullis, 1463 Biochimica et Biophysica Acta 107-14 (2000)*에서 설명된 것과 같은 pH 감응성 다형 현상을 나타낸다.
- [0311] 일부 구체예들에서, 본 내용의 화합물 및 조성물의 방출가능한 형태는 활성제에 결합되고, 및 pH-감응성 폴리머

물질과 혼합될 수 있는 DILA2 아미노산 화합물을 포함한다.

- [0312] pH-감응성 폴리머 물질의 예들은 미국 특허 6,835,393에서 제공된다.
- [0313] 일부 구체예들에서, 활성제의 방출은 효소에 의해 절단가능한 펩티드에 의해 제공될 수 있다.
- [0314] 일부 측면에서, 본 명세서는 하기 화학식 I에서 보여진 바와 같이 DILA2 아미노산 화합물의 범위 및 이의 염을 제공한다:
- [0315] [화학식 I]
- [0316]  $R^3-(C=O)-Xaa-Z-R^4$
- [0317] 상기 식에서,
- [0318] Xaa는 일반식  $-NR^N-CR^1R^2-(C=O)-$ 을 갖는 임의의 D- 또는 L-아미노산 잔기, 또는 2-20 아미노산 잔기의 펩타이드 이고, 여기서  $R^1$ 은 비수소, 아미노산의 치환 또는 비치환된 측쇄이고;
- [0319]  $R^2$ 는 수소, 또는 탄소, 산소, 질소, 황, 및 수소 원자로 이루어지고 1개 내지 20개의 탄소 원자를 갖는 유기 그룹, 또는 C(1-5)알킬, 시클로알킬, 시클로알킬알킬, C(3-5)알케닐, C(3-5)알키닐, C(1-5)알카노일, C(1-5)알카노일옥시, C(1-5)알콕시, C(1-5)알콕시-C(1-5)알킬, C(1-5)알콕시-C(1-5)알콕시, C(1-5)알킬-아미노-C(1-5)알킬-, C(1-5)디알킬-아미노-C(1-5)알킬-, 니트로-C(1-5)알킬, 시아노-C(1-5)알킬, 아릴-C(1-5)알킬, 4-바이페닐-C(1-5)알킬, 카복실, 또는 히드록실이고,
- [0320]  $R^N$ 는 수소, 또는 탄소, 산소, 질소, 황, 및 수소 원자로 이루어지고 1개 내지 20개의 탄소 원자를 갖는 유기 그룹, 또는 C(1-5)알킬, 시클로알킬, 시클로알킬알킬, C(3-5)알케닐, C(3-5)알키닐, C(1-5)알카노일, C(1-5)알카노일옥시, C(1-5)알콕시, C(1-5)알콕시-C(1-5)알킬, C(1-5)알콕시-C(1-5)알콕시, C(1-5)알킬-아미노-C(1-5)알킬-, C(1-5)디알킬-아미노-C(1-5)알킬-, 니트로-C(1-5)알킬, 시아노-C(1-5)알킬, 아릴-C(1-5)알킬, 4-바이페닐-C(1-5)알킬, 카복실, 또는 히드록실이고,
- [0321]  $R^3$ 은 천연 또는 합성 인지질, 당지질, 트리아실글리세롤, 글리세로포스포지질, 스펅고지질, 세라마이드, 스펅고미엘린, 세레브로사이드, 또는 강글리오사이드로부터 선택된 친지질성 테일; 또는 치환 또는 비치환된 C(3-22)알킬, C(6-12)시클로알킬, C(6-12)시클로알킬-C(3-22)알킬, C(3-22)알케닐, C(3-22)알키닐, C(3-22)알콕시, 또는 C(6-12)알콕시-C(3-22)알킬이고; 또는 임의의 다른 천연 또는 합성 지질의 친지질성 테일, 또는 하기에 기재된 지질들 중 임의의 하나의 친지질성 테일이고, 스테로이드를 함유할 수 있고;
- [0322]  $R^4$ 은 천연 또는 합성 인지질, 당지질, 트리아실글리세롤, 글리세로포스포지질, 스펅고지질, 세라마이드, 스펅고미엘린, 세레브로사이드, 또는 강글리오사이드로부터 유도된 친지질성 테일 (tail); 또는 치환 또는 비치환된 C(3-22)알킬, C(6-12)시클로알킬, C(6-12)시클로알킬-C(3-22)알킬, C(3-22)알케닐, C(3-22)알키닐, C(3-22)알콕시, 또는 C(6-12)알콕시-C(3-22)알킬이고; 또는 임의의 다른 천연 또는 합성 지질의 친지질성 테일, 또는 하기에 기재된 지질들 중 임의의 하나의 친지질성 테일이고, 스테로이드를 함유할 수 있고;
- [0323] Z는 NH, O, S,  $-CH_2S-$ ,  $-CH_2S(O)-$ , 또는 수소, 탄소, 산소, 질소, 및 황 원자로부터 선택된 1 내지 40개의 원자로 이루어진 유기 링커이다.
- [0324] 일부 구체예에서,  $R^3$ 은 독립적으로 치환 또는 비치환된 C(6-22)알킬 또는 C(6-22)알케닐이고;  $R^4$ 은 독립적으로 치환 또는 비치환된 C(6-22)알킬 또는 C(6-22)알케닐이다.
- [0325] 잔기 Xaa는 D- 또는 L-입체중심일 수 있다.
- [0326] 일부 구체예에서,  $R^1$ 은 비수소, 아미노산의 치환 또는 비치환된 측쇄이고, 여기서, 측쇄의 치환기는 수소, 탄소, 산소, 질소, 및 황 원자로부터 선택된 1 내지 40개의 원자로 이루어진 유기 그룹이다.
- [0327] 일부 구체예에서, Z는 알킬 또는 유기 링커 합성 폴리머, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜 사슬 (PEG), 또는 PEG 코폴리머, 예컨대 PEG-폴리우레탄 또는 PEG-폴리프로필렌이다. 참조, 예, J. Milton Harris, Poly(ethylene glycol) chemistry: biotechnical and biomedical applications (1992).

- [0328] 일부 구체예에서, 본 발명은 상기 화학식 I에서 보여진 바와 같은 DILA2 아미노산 화합물의 범위를 제공한다:
- [0329] Xaa는 일반식  $-NR^N-CR^1R^2-(C=O)-$ 로 표시되는 임의의 D- 또는 L-아미노산이고,
- [0330] 여기서,
- [0331]  $R^1$ 은 비수소, 아미노산의 치환 또는 비치환된 염기성 측쇄이고;
- [0332]  $R^2$ 는 수소, 또는 C(1-5)알킬이고,
- [0333]  $R^N$ 는 수소, 또는 C(1-5)알킬이고,
- [0334]  $R^3$ 은 천연 또는 합성 인지질, 당지질, 트리아실글리세롤, 글리세로포스포지질, 스펡고지질, 세라마이드, 스펡고미엘린, 세레브로사이드, 또는 강글리오사이드로부터 선택된 친지질성 테일; 또는 치환 또는 비치환된 C(3-22)알킬, C(6-12)시클로알킬, C(6-12)시클로알킬-C(3-22)알킬, C(3-22)알케닐, C(3-22)알키닐, C(3-22)알콕시, 또는 C(6-12)알콕시-C(3-22)알킬이고; 또는 임의의 다른 천연 또는 합성 지질의 친지질성 테일, 또는 하기에 기재된 지질들 중 임의의 하나의 친지질성 테일이고, 스테로이드를 함유할 수 있고;
- [0335]  $R^4$ 은 천연 또는 합성 인지질, 당지질, 트리아실글리세롤, 글리세로포스포지질, 스펡고지질, 세라마이드, 스펡고미엘린, 세레브로사이드, 또는 강글리오사이드로부터 선택된 친지질성 테일; 또는 치환 또는 비치환된 C(3-22)알킬, C(6-12)시클로알킬, C(6-12)시클로알킬-C(3-22)알킬, C(3-22)알케닐, C(3-22)알키닐, C(3-22)알콕시, 또는 C(6-12)알콕시-C(3-22)알킬이고; 또는 임의의 다른 천연 또는 합성 지질의 친지질성 테일, 또는 하기에 기재된 지질들 중 임의의 하나의 친지질성 테일이고, 스테로이드를 함유할 수 있고;
- [0336] Z는 NH, O, S,  $-CH_2S-$ ,  $-CH_2S(O)-$ , 또는 수소, 탄소, 산소, 질소, 및 황 원자로부터 선택된 1 내지 40개의 원자로 이루어진 유기 링커이다.
- [0337] 일부 구체예에서, 본 발명은 상기 화학식 I에서 보여진 바와 같은 DILA2 아미노산 화합물의 범위를 제공한다:
- [0338] 여기서,
- [0339] Xaa는 일반식  $-NR^N-CR^1R^2-(C=O)-$ 로 표시되는 임의의 D- 또는 L-아미노산이고,
- [0340] 여기서,
- [0341]  $R^1$ 은 비수소, 아미노산의 치환 또는 비치환된 염기성 측쇄이고;
- [0342]  $R^2$ 는 수소, 또는 C(1-5)알킬이고,
- [0343]  $R^N$ 는 수소, 또는 C(1-5)알킬이고,
- [0344]  $R^3$ 은 치환 또는 비치환된 C(3-22)알킬, C(6-12)시클로알킬, C(6-12)시클로알킬-C(3-22)알킬, C(3-22)알케닐, C(3-22)알키닐, C(3-22)알콕시, 또는 C(6-12)알콕시-C(3-22)알킬이고;
- [0345]  $R^4$ 은 치환 또는 비치환된 C(3-22)알킬, C(6-12)시클로알킬, C(6-12)시클로알킬-C(3-22)알킬, C(3-22)알케닐, C(3-22)알키닐, C(3-22)알콕시, 또는 C(6-12)알콕시-C(3-22)알킬이고;
- [0346] Z는 NH, O, S,  $-CH_2S-$ ,  $-CH_2S(O)-$ , 또는 수소, 탄소, 산소, 질소, 및 황 원자로부터 선택된 1 내지 40개의 원자로 이루어진 유기 링커이다.
- [0347] 일부 구체예에서, 본 발명은 상기 화학식 I에서 보여진 바와 같은 DILA2 아미노산 화합물의 범위를 제공한다:
- [0348] 여기서,
- [0349] Xaa는 일반식  $-NR^N-CR^1R^2-(C=O)-$ 로 표시되는 임의의 D- 또는 L-아미노산이고,
- [0350] 여기서,



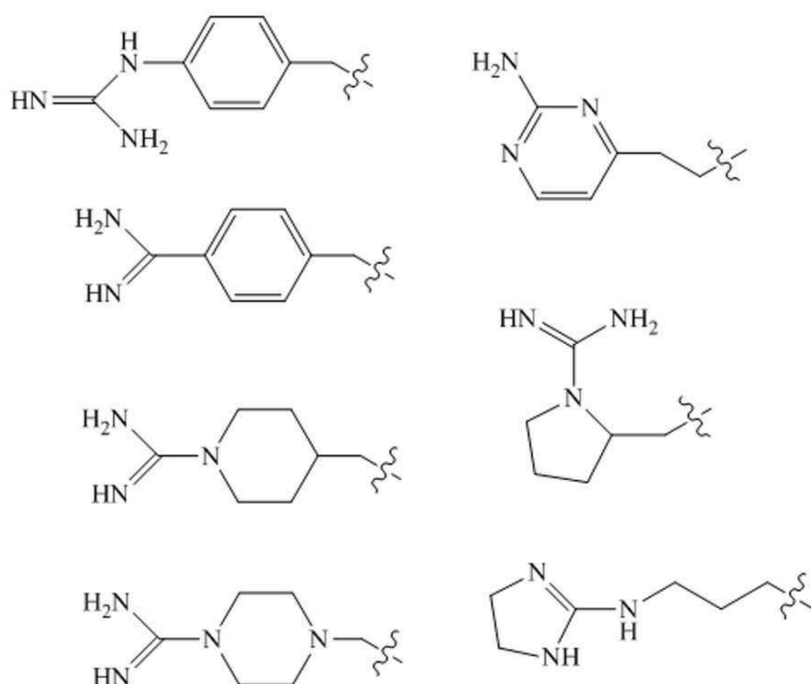
- [0351]  $R^1$ 은 비수소, 아미노산의 치환 또는 비치환된 염기성 측쇄이고;
- [0352]  $R^2$ 는 수소, 또는 C(1-5)알킬이고,
- [0353]  $R^N$ 는 수소, 또는 C(1-5)알킬이고,
- [0354]  $R^3$ 은 치환 또는 비치환된 C(3-22)알킬, C(6-12)시클로알킬, C(6-12)시클로알킬-C(3-22)알킬, C(3-22)알케닐, C(3-22)알키닐, C(3-22)알콕시, 또는 C(6-12)알콕시-C(3-22)알킬이고;
- [0355]  $R^4$ 은 치환 또는 비치환된 C(3-22)알킬, C(6-12)시클로알킬, C(6-12)시클로알킬-C(3-22)알킬, C(3-22)알케닐, C(3-22)알키닐, C(3-22)알콕시, 또는 C(6-12)알콕시-C(3-22)알킬이고;
- [0356] Z는 NH이다.
- [0357] 일부 구체예에서, 본 발명은 상기 화학식 I에서 보여진 바와 같은 DILA2 아미노산 화합물의 범위를 제공한다:
- [0358] Xaa는 일반식  $-NR^N-CR^1R^2-(C=O)-$ 로 표시되는 임의의 D- 또는 L-아미노산이고,
- [0359] 여기서,
- [0360]  $R^1$ 은 비수소, 아미노산의 치환 또는 비치환된 염기성 측쇄이고;
- [0361]  $R^2$ 는 수소, 또는 C(1-5)알킬이고,
- [0362]  $R^N$ 는 수소, 또는 C(1-5)알킬이고,
- [0363]  $R^3$ 은 치환 또는 비치환된 C(3-22)알킬, C(6-12)시클로알킬, C(6-12)시클로알킬-C(3-22)알킬, C(3-22)알케닐, C(3-22)알키닐, C(3-22)알콕시, 또는 C(6-12)알콕시-C(3-22)알킬이고;
- [0364]  $R^4$ 은 치환 또는 비치환된 C(3-22)알킬, C(6-12)시클로알킬, C(6-12)시클로알킬-C(3-22)알킬, C(3-22)알케닐, C(3-22)알키닐, C(3-22)알콕시, 또는 C(6-12)알콕시-C(3-22)알킬이고;
- [0365] Z는 O이다.
- [0366] 양이온성 DILA2 아미노산 화합물이 제조될 수 있고, 여기서, 예를 들어, Xaa는 염기성 측쇄를 갖는다. 염기성 측쇄를 갖는 아미노산의 예는 아르기닌 (Arg), 호모아르기닌 (homoArg) (측쇄  $-(CH_2)_4NH(C=NH)NH_2$ ), 노라르기닌 (norArg) (측쇄  $-(CH_2)_2NH(C=NH)NH_2$ ), 노르아르기닌 (nornorArg) (측쇄  $-(CH_2)NH(C=NH)NH_2$ ), 오르니틴, 리신, 호모리신, 히스티딘, 1-메틸히스티딘, 피리딜알라닌 (Pal), 아스파라긴, N-에틸아스파라긴, 글루타민, 및 4-아미노페닐알라닌, 및 그의 측쇄 변형된 유도체를 포함한다.
- [0367] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "호모(homo)"란, 아미노산을 참조할 때, 추가 탄소가 측쇄에 첨가된다는 것을 의미하고, 한편, 용어 "nor"란, 아미노산을 참조할 때, 탄소가 측쇄로부터 빠는 것을 의미한다. 따라서, 호모리신은 측쇄  $-(CH_2)_5NH_2$ 을 의미한다.
- [0368] 음이온성 DILA2 아미노산 화합물이 제조될 수 있고, 여기서, 예를 들어, Xaa는 글루타메이트 또는 아스파르테이트이다.
- [0369] 양이온성 및 음이온성 DILA2 아미노산 화합물이 또한 제조될 수 있고, 여기서, 아미노산 측쇄는 이온화가능 그룹 또는 치환기를 함유한다.
- [0370] 비(non)양이온성 DILA2 아미노산 화합물이 제조될 수 있고, 여기서, 예를 들어, Xaa는 류신, 발린, 알라닌, 또는 세린이다.
- [0371] 일부 구체예에서, Xaa는  $N^G$ -메틸아르기닌, 대칭 또는 비대칭  $N^G, N^G$ -디메틸아르기닌,  $N^G$ -메틸-호모아르기닌, 대칭 또는 비대칭  $N^G, N^G$ -디메틸-호모아르기닌,  $N^G$ -메틸-노라르기닌, 대칭 또는 비대칭  $N^G, N^G$ -디메틸-노라르기닌, 또는  $N^G$ -메틸-노르아르기닌, 대칭 또는 비대칭  $N^G, N^G$ -디메틸-노르아르기닌이다.

[0372] 일부 구체예에서, Xaa는  $N^G$ -에틸아르기닌, 대칭 또는 비대칭  $N^G, N^G$ -디에틸아르기닌,  $N^G$ -에틸-호모아르기닌, 대칭 또는 비대칭  $N^G, N^G$ -디에틸-호모아르기닌,  $N^G$ -에틸-노라르기닌, 대칭 또는 비대칭  $N^G, N^G$ -디에틸-노라르기닌, 또는  $N^G$ -에틸-노르아르기닌, 대칭 또는 비대칭  $N^G, N^G$ -디에틸-노르아르기닌이다.

[0373] 특정 구체예에서, Xaa는  $N^G$ -알킬아르기닌, 대칭 또는 비대칭  $N^G, N^G$ -디알킬아르기닌,  $N^G$ -알킬-호모아르기닌, 대칭 또는 비대칭  $N^G, N^G$ -디알킬-호모아르기닌,  $N^G$ -알킬-노라르기닌, 대칭 또는 비대칭  $N^G, N^G$ -디알킬-노라르기닌, 또는  $N^G$ -알킬-노르아르기닌, 대칭 또는 비대칭  $N^G, N^G$ -디알킬-노르아르기닌이다.

[0374] 일부 구체예에서, Xaa는 구아니딘 또는 아미딘 함유 측쇄를 갖는 아미노산이다. 예를 들어, Xaa 잔기의 측쇄는 그룹, 예컨대 구아니도, 아미디노, 디히드로이미다졸, 4-구아니도-페닐, 4-아미디노-페닐, N-아미디노-피페리딘, N-아미디노-피페라진, 4,5-디히드로이미다졸, 2-(N-아미디노)-피롤리딘, 또는 4-[(2-아미노피리미디닐)]에틸을 함유할 수 있다.

[0375] Xaa 측쇄의 예는 하기 구조, 및 이의 염 형태를 포함한다:



[0376]

[0377] DILA2 아미노산 화합물의 방출가능 형태에 적합한 아미노산의 치환된 측쇄의 예는 약 5 내지 약 7.5, 또는 약 6 내지 약 7의 pKa를 갖는 방출 관능 그룹을 포함한다. 일반적으로, 약 염기인 방출 관능 그룹은 pKa의 초과인 국소 pH에서 우세한 중성 형태를 나타낼 수 있고, pKa 미만의 국소 pH에서 우세한 이온 형태를 나타낼 수 있다. 약 산인 방출 관능 그룹은 pKa 초과인 국소 pH에서 이온 형태를 나타낼 수 있고, pKa 미만의 국소 pH에서 중성 형태를 나타낼 수 있다. 참조, 예, P. Heinrich Stahl, Handbook of Pharmaceutical 염 (2002).

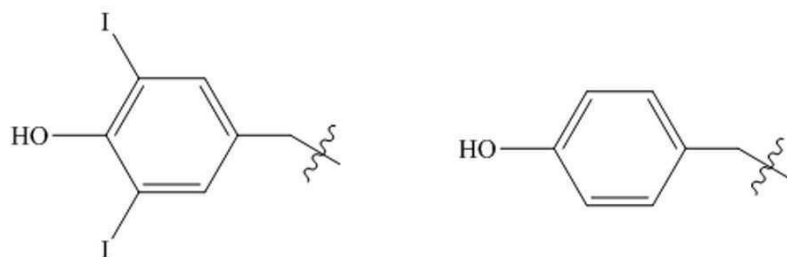
[0378] 일부 구체예에서, Xaa는 5 내지 7.5의 pKa를 갖는 관능 그룹을 함유하는 측쇄를 가질 수 있다.

[0379] DILA2 아미노산 화합물의 방출가능 형태에 적합한 아미노산의 치환된 측쇄의 예는 1-메틸히스티딘을 포함한다.

[0380] DILA2 아미노산 화합물의 방출가능 형태에 적합한 아미노산의 치환된 측쇄의 예는 3,5-디아이오도-티로신을 포함한다.

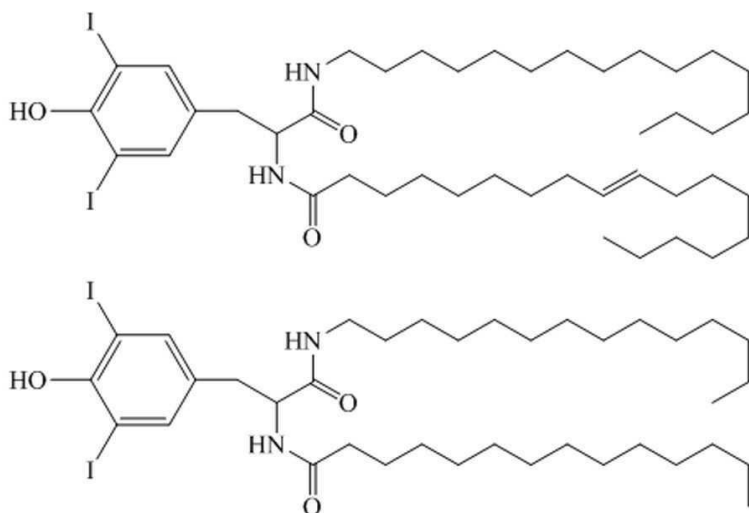


[0381] DILA2 아미노산 화합물의 방출가능 형태에 적합한 아미노산의 치환된 측쇄의 예는 하기 구조를 포함한다:



[0382]

[0383] DILA2 아미노산 화합물의 예는 하기 구조를 포함한다:

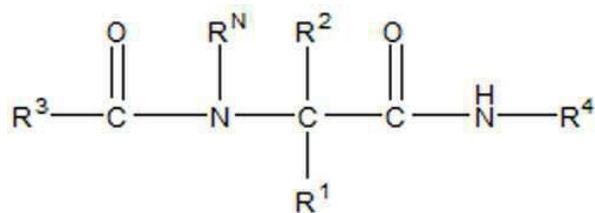


[0384]

[0385] DILA2 아미노산 화합물의 방출가능 형태에 적합한 아미노산의 측쇄 상의 치환기의 예는 하기로부터 유도된 방출 관능 그룹을 포함한다: 3,5-디아यो도-티로신, 1-메틸히스티딘, 2-메틸부탄산, 2-*o*-아니실프로판산, *meso*-타르타르산, 4,6-디메틸피리미딘아민, *p*-프탈산, 크레아티닌, 부탄산, *N,N*-디메틸-1-나프틸아민, 펜탄산, 4-메틸헥탄산, *N*-메틸아닐린, 1,10-펜안트롤린, 3-피리딘카복실산, 헥산산, 프로판산, 4-아미노벤조산, 2-메틸프로판산, 헵탄산, 옥탄산, 시클로헥산카복실산, 퀴놀린, 3-퀴놀린아민, 2-아미노벤조산, 4-피리딘카복실산, 노난산, 펠라민, 8-퀴놀리놀, 트리메틸아세트산, 6-메톡시퀴놀린, 4-(메틸아미노)벤조산, *p*-메틸아닐린, 3-(메틸아미노)벤조산, 말산, *N*-에틸아닐린, 2-벤질피리딘, 3,6-디니트로페놀, *N,N*-디메틸아닐린, 2,5-디메틸피페라진, *p*-페네티딘, 5-메틸퀴놀린, 2-페닐벤즈이미다졸, 피리딘, 피콜린산, 3,5-디이소티로신, *p*-아니시딘, 2-(메틸아미노)벤조산, 2-티아졸아민, 글루타르산, 아디프산, 이소퀴놀린, 이타콘산, *o*-프탈산, 벤즈이미다졸, 피페라진, 헵탄디오산, 아크리딘, 펜안트리딘, 석신산, 메틸석신산, 4-메틸퀴놀린, 3-메틸피리딘, 7-이소퀴놀리놀, 말론산, 메틸말론산, 2-메틸퀴놀린, 2-에틸피리딘, 2-메틸피리딘, 4-메틸피리딘, 히스타민, 히스티딘, 말레산, *cis*-1,2-시클로헥산디아민, 3,5-디메틸피리딘, 2-에틸벤즈이미다졸, 2-메틸벤즈이미다졸, 카코딜산, 페리미딘, 시트르산, 이소시트르산, 2,5-디메틸피리딘, 파라베린, 6-히드록시-4-메틸프테리딘, *L*-티록신, 3,4-디메틸피리딘, 메톡시피리딘, *trans*-1,2-시클로헥산디아민, 2,5-피리딘디아민, *l*-1-메틸히스티딘, *l*-3-메틸히스티딘, 2,3-디메틸피리딘, 크산토프테린, 1,2-프로판디아민, *N,N*-디에틸아닐린, 알록산산, 2,6-디메틸피리딘, *L*-카르노신, 2-피리딘아민, *N*- $\alpha$ -알라닐히스티딘, 필로카르핀, 1-메틸이미다졸, 1H-이미다졸, 2,4-디메틸피리딘, 4-니트로페놀, 2-니트로페놀, 티로신아미드, 5-히드록시퀴나졸린, 1,1-시클로프로판디카복실산, 2,4,6-트리메틸피리딘, 베로날, 2,3-디클로로페놀, 1,2-에탄디아민, 1-이소퀴놀린아민, 및 이의 조합.

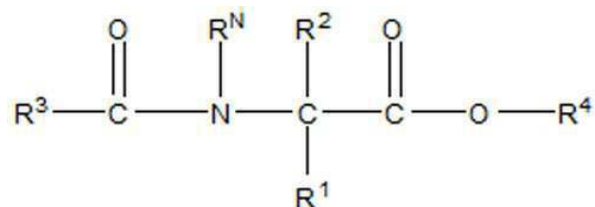
[0386] 일부 구체예에서, 화학식 I에 상응하는 DILA2 아미노산 화합물의 범위는 하기 구조로 표시된다:

[0387] [구조 1A]



[0388]

[0389] [구조 1B]



[0390]

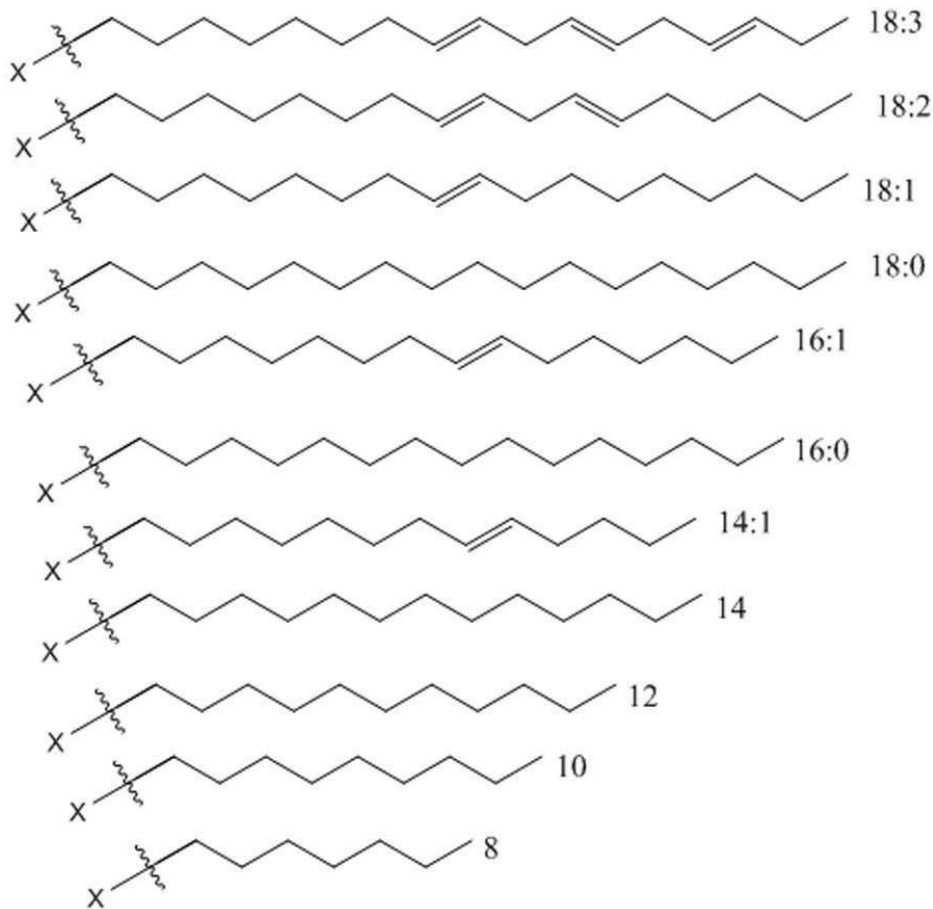
[0391] 여기서,  $\text{R}^1$ ,  $\text{R}^2$ ,  $\text{R}^{\text{N}}$ ,  $\text{R}^3$ , 및  $\text{R}^4$ 는 상기와 같이 정의된다.

[0392] 일부 구체예에서,  $\text{R}^3$  및  $\text{R}^4$ 는 멤브레인을 통한 전달 또는 세포에 의한 섭취를 제공하기 위해 물/옥탄올 분할에 의해 정의되는 바와 같이 충분한 친지질 특성 또는 친지질성을 부여하는 친지질성 테일로부터 독립적으로 선택된다. 이들 테일은, DILA2 아미노산 화합물에서 사용될 때, 양친매성 분자를 제공한다. 친지질성 테일은 인지질, 당지질, 트리아실글리세롤, 글리세로포스포지질, 스핑고지질, 세라마이드, 스핑고미엘린, 세레브로사이드, 또는 강글리오사이드로부터 유도될 수 있고, 이들 중에서 스테로이드를 함유할 수 있다.

[0393] 특정 구체예에서,  $\text{R}^3$  및  $\text{R}^4$ 는 독립적으로 글리세롤 주쇄를 갖는 친지질성 테일일 수 있다.

[0394] 일부 구체예에서,  $\text{R}^3$  및  $\text{R}^4$ 는 독립적으로 C10알킬, C11알킬, C12알킬, C13알킬, C14알킬, C15알킬, C16알킬, C17알킬, C18알킬, C19알킬, C20알킬, C21알킬, 또는 C22알킬일 수 있다.

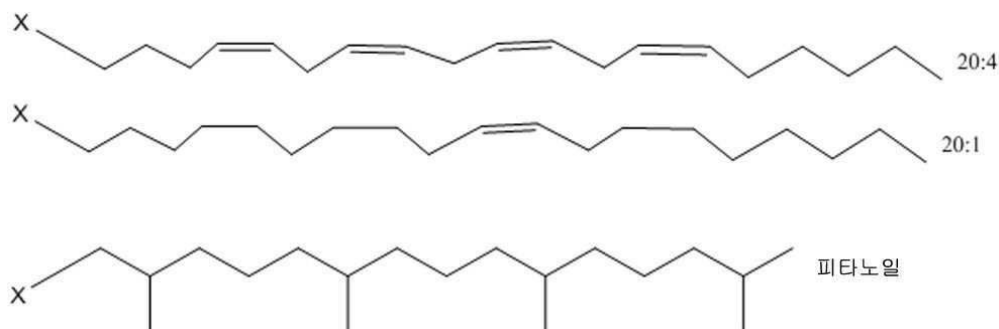
[0395] 일부 구체예에서,  $R^3$  및  $R^4$ 는 독립적으로 하기 구조 중의 하나를 갖는 친지질성 테일일 수 있다:



[0396]

[0397] 상기 구조에서, X는 아미노산 잔기 말단에 직접 부착된 테일의 원자를 나타내고, 수 명칭, 예를 들어, "18:3"에서 원자들 중 하나로서 카운트된다. 일부 구체예에서, X는 탄소, 질소, 또는 산소 원자일 수 있다.

[0398] 일부 구체예에서,  $R^3$  및  $R^4$ 는 독립적으로 하기 구조 중 하나를 갖는 친지질성 테일일 수 있다:



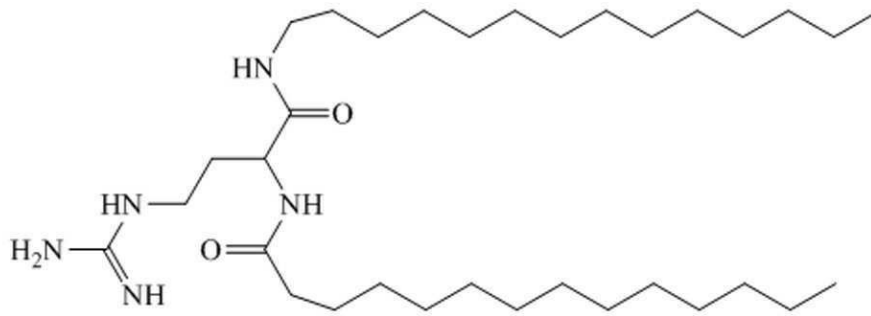
[0399]

[0400] 여기서, X는 상기에서 정의된 바와 같다.

[0401] 일부 구체예에서,  $R^3$  및  $R^4$ 는 콜레스테롤, 스테롤, 또는 스테로이드, 예컨대 고난(gonane), 에스트란(estrane), 안드로스탄(androstane), 프레그난(pregnane), 콜란(cholane), 콜레스탄(cholestane), 에르고스탄(ergostane), 캄페스탄(campestan), 포리페라스탄(poriferastane), 스티그마스탄(stigmastane), 고르고스탄(gorgostane), 라노스탄(lanostane), 시클로아르탄(cycloartane), 및 임의의 상기의 스테롤 또는 주스테롤(zosterol) 유도체, 및 이의 생물학적 중간체 및 전구체를 함유하는 독립적으로 선택된 친지질성 테일이고, 예를 들어, 콜레스테롤, 라노스테롤, 스티그마스탄올(stigmastanol), 디히드로라노스테롤, 지모스테롤(zymosterol), 지모스텐올(zymostenol), 테스모스테롤, 7-데히드로콜레스테롤, 및 이의 혼합물 및 유도체를 포함할 수 있다.

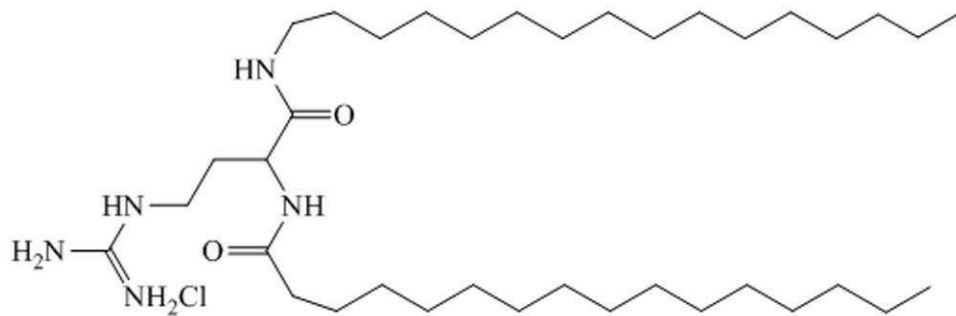
- [0402] 특정 구체예에서,  $R^3$  및  $R^4$ 는 독립적으로 지방산 같은 테일, 예컨대 테일 미리스트산 (C14:0)알케닐, 팔미트산 (C16:0)알케닐, 스테아르산 (C18:0)알케닐, 올레산 (C18:1, 9에서의 이중결합)알케닐, 리놀레산 (C18:2, 탄소 9 또는 12에서의 이중결합)알케닐, 리노넨산 (C18:3, 탄소 9, 12, 또는 15에서 이중결합)알케닐, 아라키돈산 (C20:4, 탄소 5, 8, 11, 또는 14에서 이중결합)알케닐, 및 에이코사펜탄산 (C20:5, 탄소 5, 8, 11, 14, 또는 17에서 이중결합)알케닐로부터 유도될 수 있다. 지방산 같은 테일의 다른 예는 하기에서 발견된다: Donald Voet 및 Judith Voet, *Biochemistry*, 3rd Edition (2005), p. 383.
- [0403] 일부 구체예에서,  $R^3$  및  $R^4$ 는 이소프레노이드로부터 독립적으로 유도될 수 있다.
- [0404] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "아미노산"은 천연 및 비천연 아미노산을 포함한다. 따라서, D/LA2 아미노산 화합물은 유전적 암호화된 아미노산, 천연 비유전적 암호화된 아미노산, 또는 합성 아미노산으로부터 만들어 질 수 있다.
- [0405] 아미노산의 예는 Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, 및 Val을 포함한다.
- [0406] 아미노산의 예는 아세트딘, 2-아미노옥타데카노산, 2-아미노아디프산, 3-아미노아디프산, 2,3-디아미노프로피온산, 2-아미노부티르산, 4-아미노부티르산, 2,3-디아미노부티르산, 2,4-디아미노부티르산, 2-아미노이소부티르산, 4-아미노이소부티르산, 2-아미노피멜산, 2,2'-디아미노피멜산, 6-아미노헥산산, 6-아미노카프로산, 2-아미노헵탄산, 데스모신, 오르니틴, 시트룰린, N-메틸이소류신, nor-류신, tert-류신, 페닐글리신, t-부틸글리신, N-메틸글리신, 사크로신, N-에틸글리신, 시클로헥실글리신, 4-옥소-시클로헥실글리신, N-에틸아스파라긴, 시클로헥실알라닌, t-부틸알라닌, 나프틸알라닌, 피리딜알라닌, 3-클로로알라닌, 3-벤조티에닐알라닌, 4-할로페닐알라닌, 4-클로로페닐알라닌, 2-플루오로페닐알라닌, 3-플루오로페닐알라닌, 4-플루오로페닐알라닌, 페니실아민, 2-티에닐알라닌, 메티오닌, 메티오닌 설폭사이드, 호모아르기닌, 노라르기닌, 노르아르기닌, N-아세틸리신, 4-아미노페닐알라닌, N-메틸발린, 호모시스테인, 호모세린, 히드록실리신, 알로-히드록실리신, 3-히드록시프롤린, 4-히드록시프롤린, 이소데스모신, 알로-이소류신, 6-N-메틸리신, 노르발린, O-알릴-세린, O-알릴-트레오닌,  $\alpha$ -아미노헥산산,  $\alpha$ -아미노발레르산, 및 파이로글루탐산을 포함한다.
- [0407] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "아미노산"은  $\alpha$ - 및  $\beta$ -아미노산을 포함한다.
- [0408] 다른 아미노산 잔기는 하기에서 발견될 수 있다: Fasman, *CRC Practical Handbook of Biochemistry and Molecular Biology*, CRC Press, Inc. (1989).
- [0409] 일반적으로, 화합물은 하나 이상의 키랄 중심을 함유할 수 있다. 하나 이상의 키랄 중심을 함유하는 화합물은 "이성질체", "입체이성질체", "부분입체이성질체", "거울상이성질체", "광학 이성질체"로서, 또는 "라세미 혼합물"로서 기재된 것을 포함할 수 있다. 입체화학 명명법에 대한 협정, 예를 들어 Cahn, Ingold 및 Prelog의 입체이성질체 명명 규칙, 및 입체화학의 결정 및 입체이성질체의 분리 방법은 본 기술분야에 공지되어 있다. 참조, 예를 들어, Michael B. Smith 및 Jerry March, *March's Advanced Organic Chemistry*, 5th edition, 2001. 본 명세서의 화합물 및 구조는 임의의 혼합물, 라세미 등을 포함하는, 특정 화합물 또는 구조에 대해 존재하는 것으로 이해되는 모든 가능한 이성질체, 입체이성질체, 부분입체이성질체, 거울상이성질체, 및/또는 광학 이성질체를 포함하는 것을 의미한다.
- [0410] D/LA2 아미노산 화합물의 예는  $R^3-(C=O)-Arg-NH-R^4$ 를 포함하고, 여기서, Arg는 D- 또는 L-아르기닌이고,  $R^3$  및  $R^4$ 는 독립적으로 알킬 또는 알케닐이다.

[0411] DILA2 아미노산 화합물의 예는 하기 구조를 포함한다:

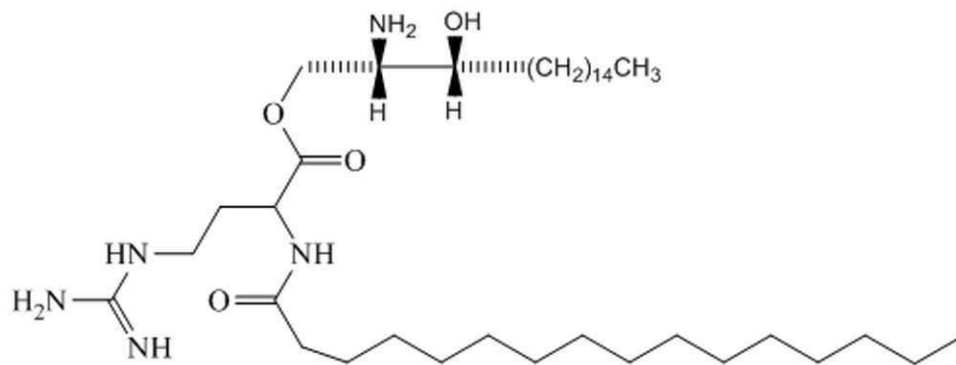


[0412]

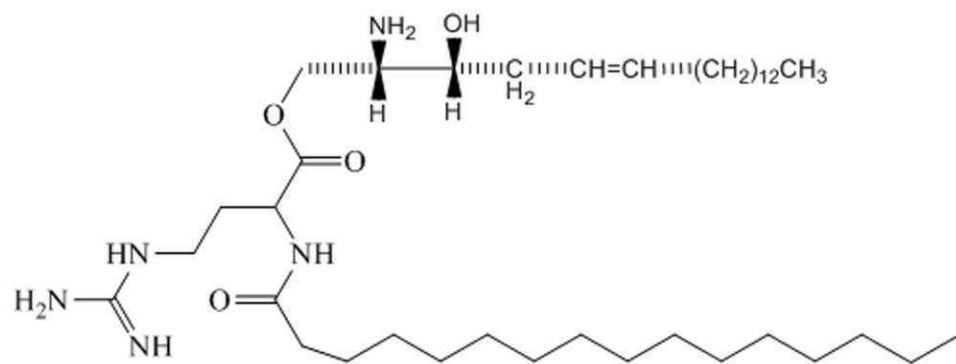
[0413] DILA2 아미노산 화합물의 예는 하기 구조를 포함한다:



[0414]

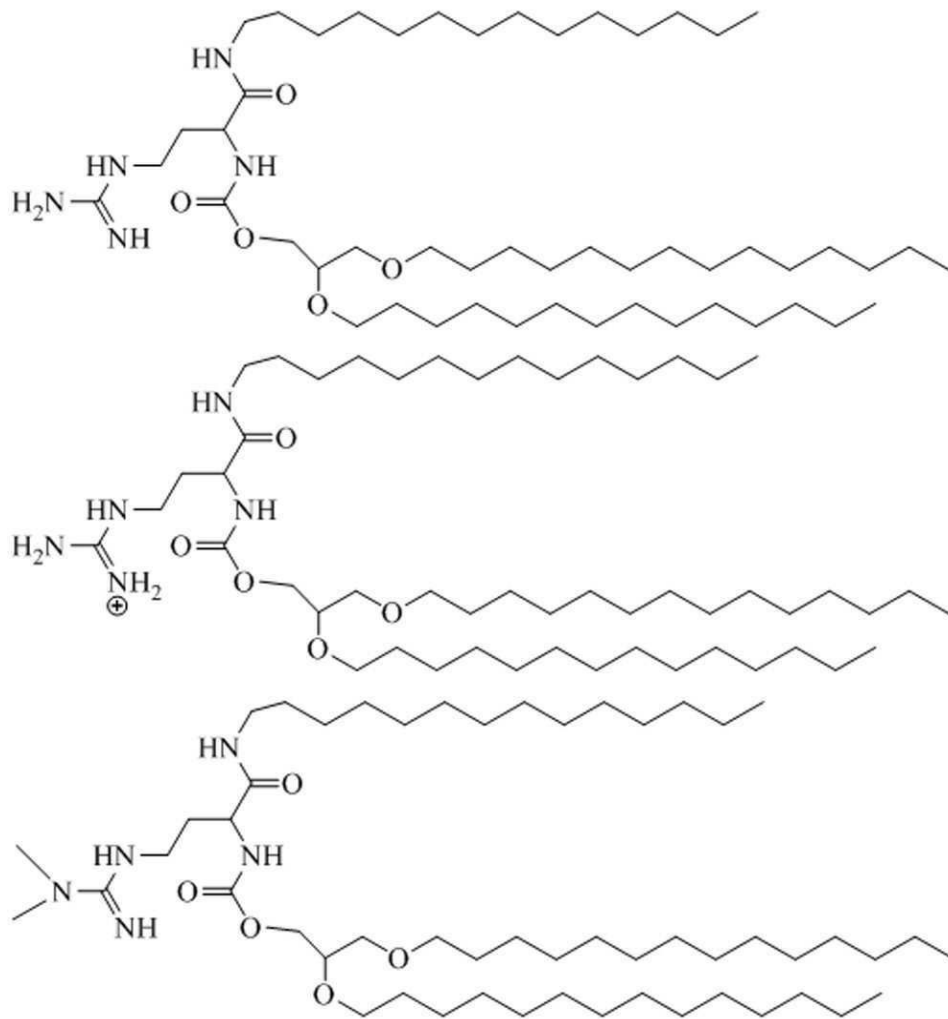


[0415]





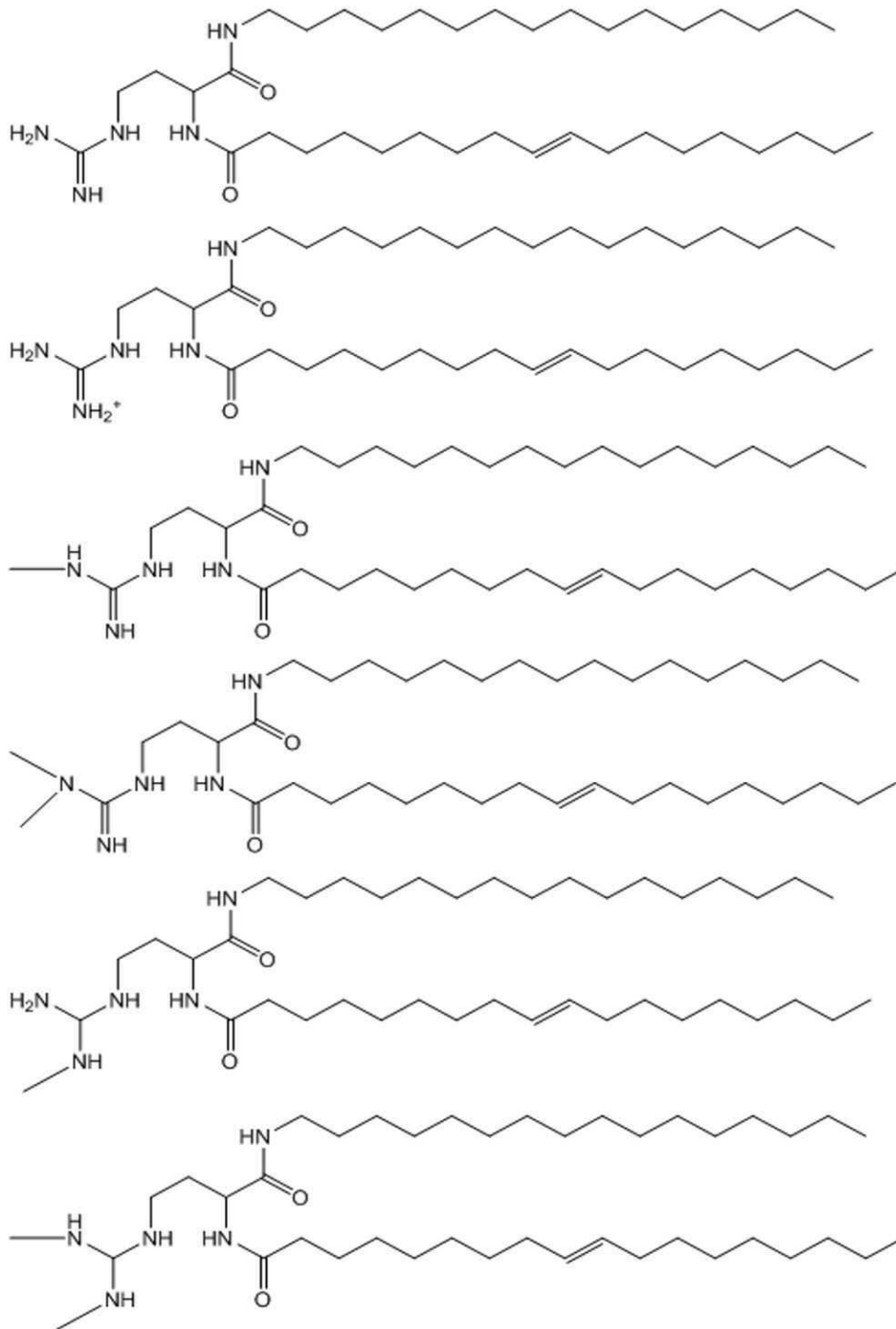
[0416] DILA2 아미노산 화합물의 예는 하기 구조를 포함한다:



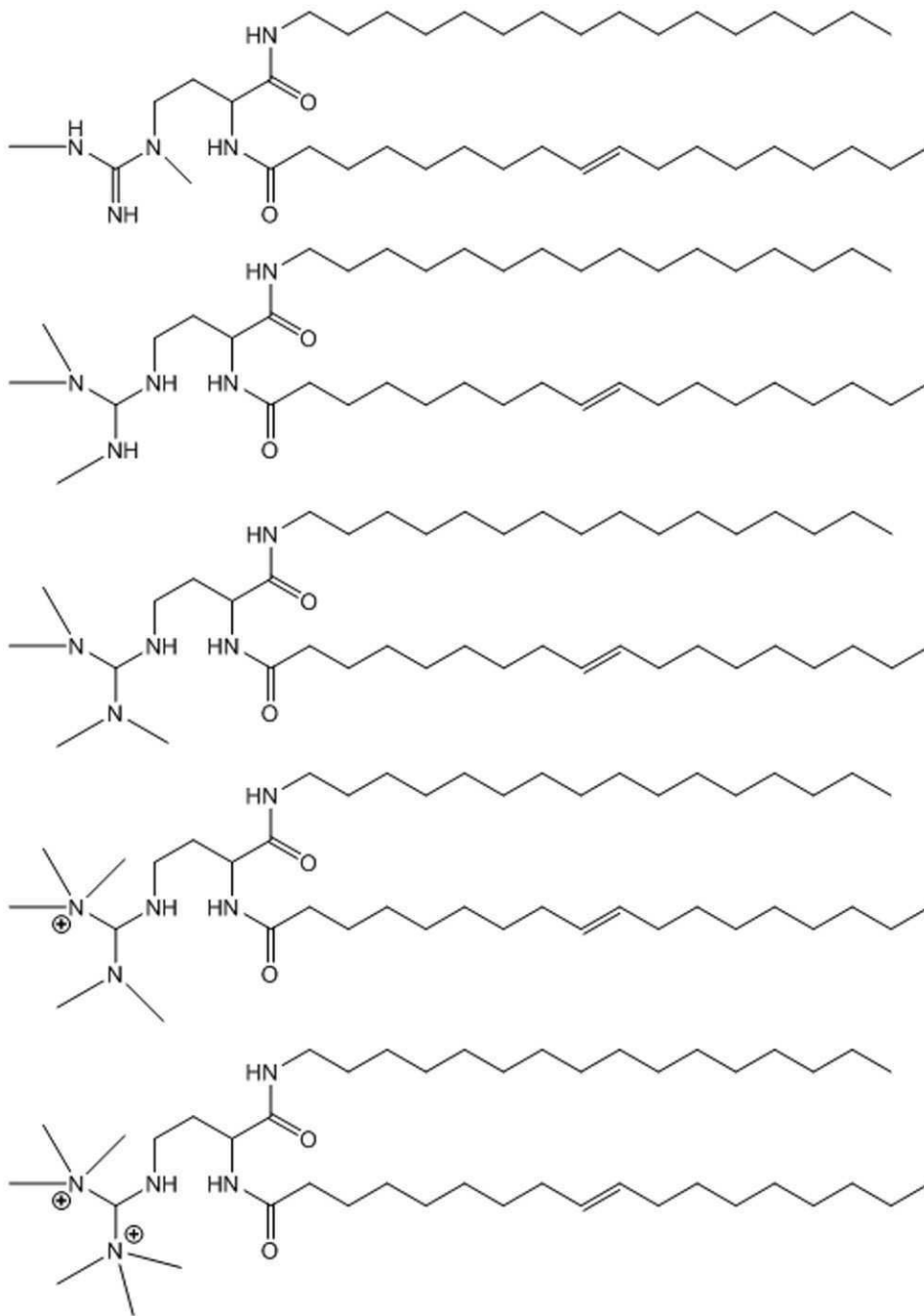
[0417]

[0418] DILA2 아미노산 화합물의 예는  $R^3-(C=O)-norArg-NH-R^4$ 를 포함하고, 여기서,  $norArg$ 는 D- 또는 L-노라르기닌이고,  $R^3$  및  $R^4$ 는 독립적으로 알킬 또는 알케닐이다.

[0419] DILA2 아미노산 화합물의 예는 하기 구조를 포함한다:



[0420]

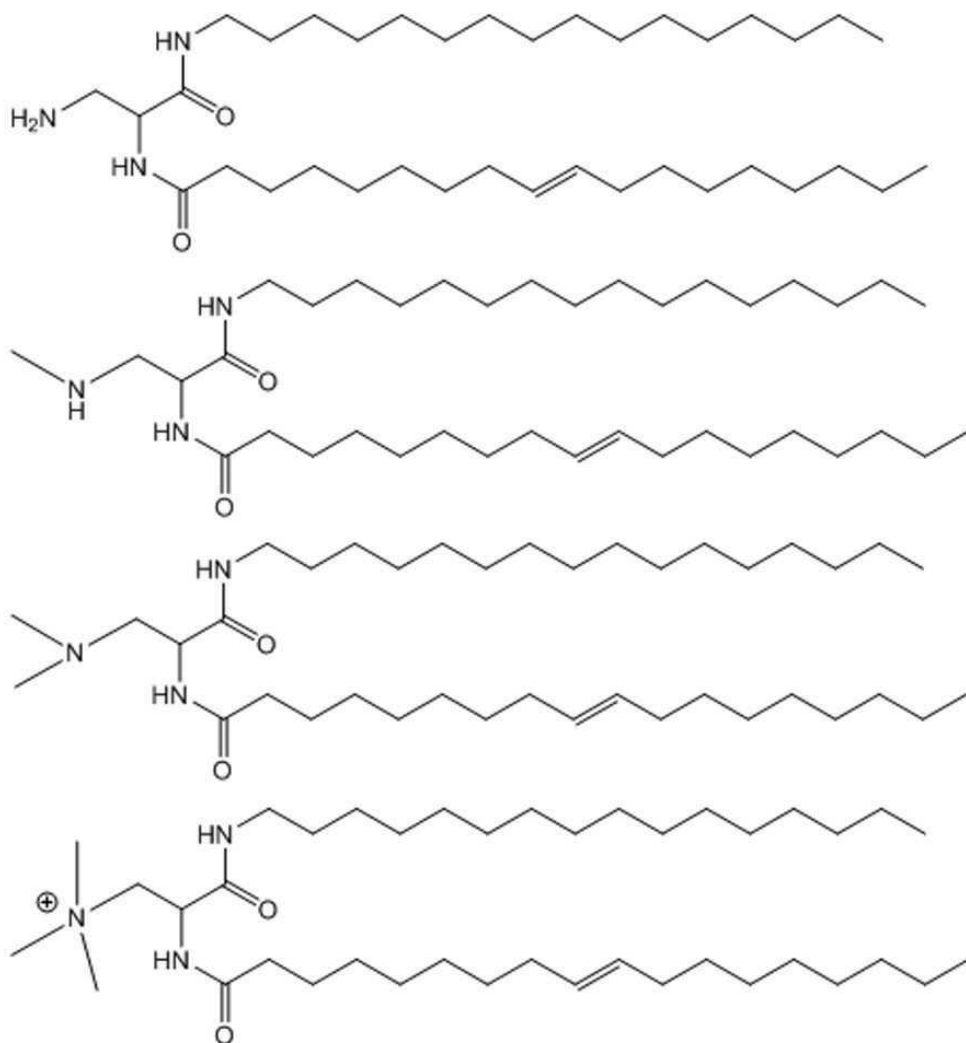


[0421]

[0422]

DILA2 아미노산 화합물의 예는  $R^3-(C=O)-\text{nornorArg}-\text{NH}-R^4$ 를 포함하고, 여기서, nornorArg는 D- 또는 L-노르아르기닌이고,  $R^3$  및  $R^4$ 는 독립적으로 알킬, 예컨대 헵틸, 옥틸, 노닐, 데실, 및 운데실이다.

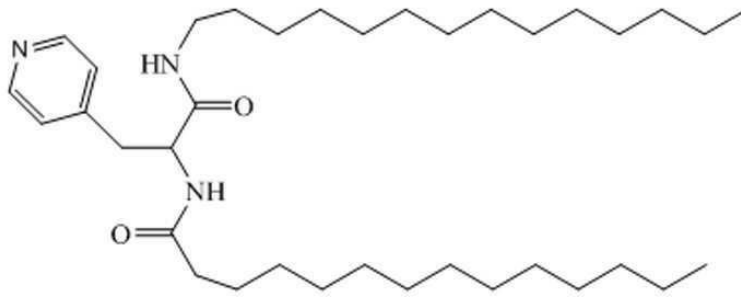
[0423] DILA2 아미노산 화합물의 예는 하기 구조를 포함한다:



[0424]

[0425] DILA2 아미노산 화합물의 예는  $R^3-(C=O)-\text{homoArg}-NH-R^4$ 를 포함하고, 여기서, homoArg는 D- 또는 L-호모아르기닌 이고,  $R^3$  및  $R^4$ 는 독립적으로 알킬, 예컨대 헵틸, 옥틸, 노닐, 데실, 및 운데실이다.

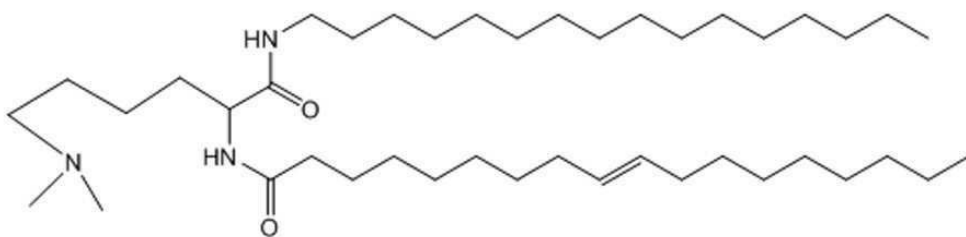
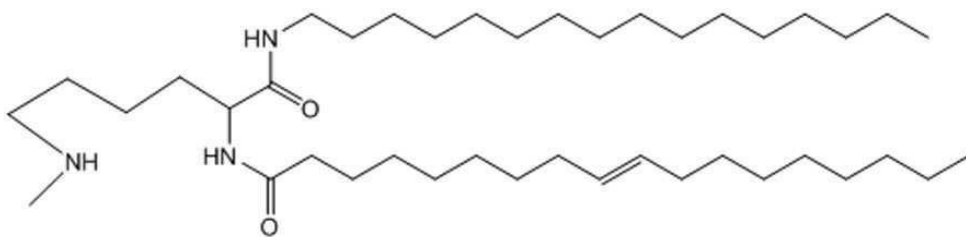
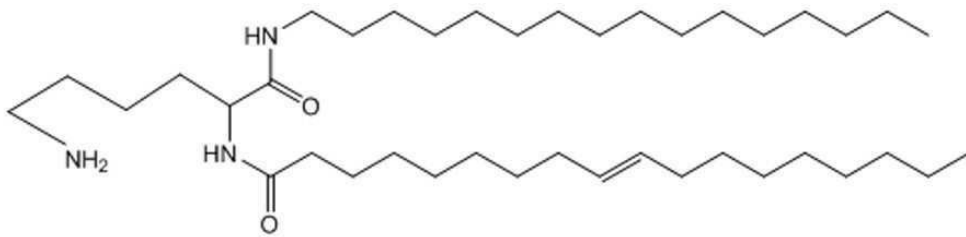
[0426] DILA2 아미노산 화합물의 예는  $R^3-(C=O)-4\text{-피리딜알라닌}-NH-R^4$ 를 포함하고, 여기서, 피리딜알라닌은 D- 또는 L-피리딜알라닌이고,  $R^3$  및  $R^4$ 는 독립적으로 알킬, 예컨대 헵틸, 옥틸, 노닐, 데실, 및 운데실이다.  $R^3-(C=O)-\text{피리딜알라닌}-NH-R^4$  DILA2 아미노산 화합물의 예는 약제학적으로 허용가능한 피리딜 염, 예컨대 4-[N-메틸피리딜]알라닌 클로라이드를 포함한다. 피리딜알라닌 DILA2 아미노산 화합물의 예는 하기 구조를 포함한다:



[0427]

[0428] DILA2 아미노산 화합물의 예는  $R^3-(C=O)-Lys-NH-R^4$ 를 포함하고, 여기서,  $R^3$  및  $R^4$ 는 독립적으로 알킬 또는 알케닐이다.

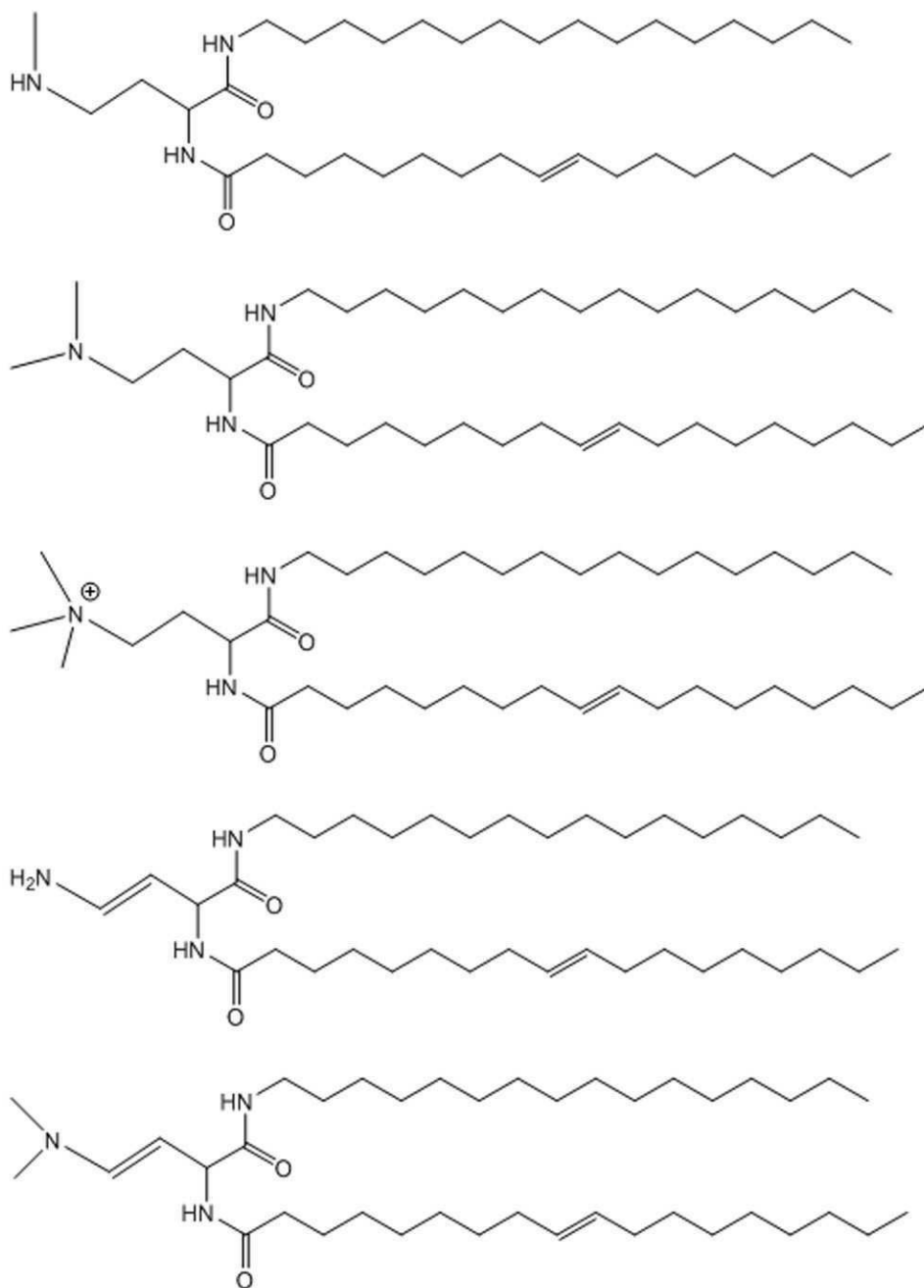
[0429] DILA2 아미노산 화합물의 예는 하기 구조를 포함한다:



[0430]



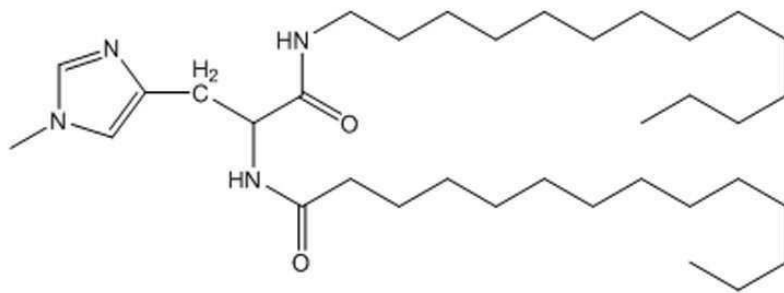
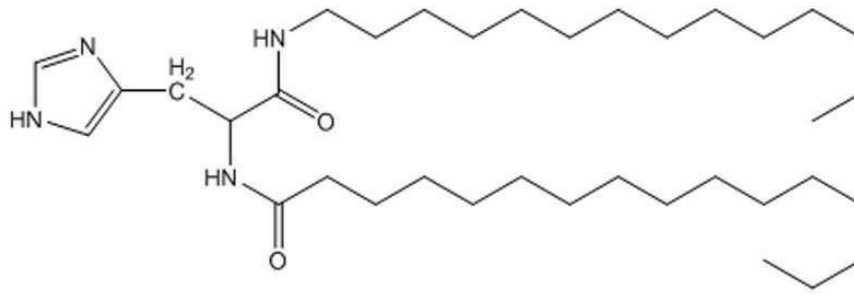
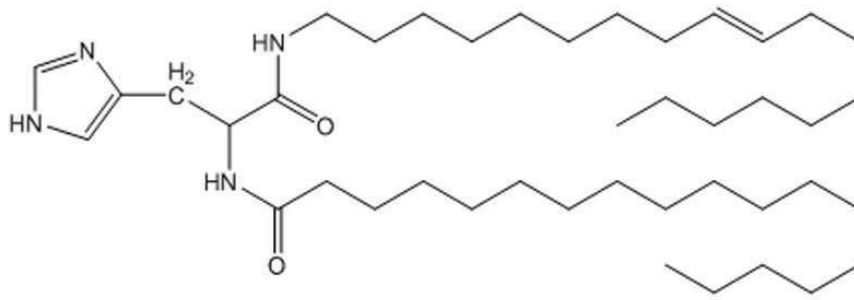




[0432]

[0433]

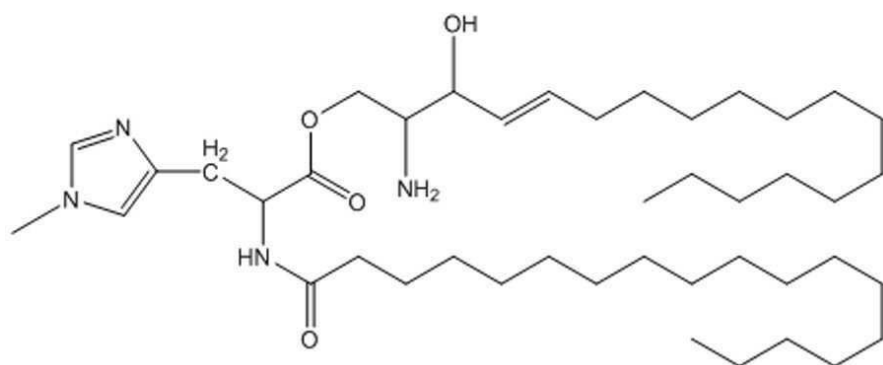
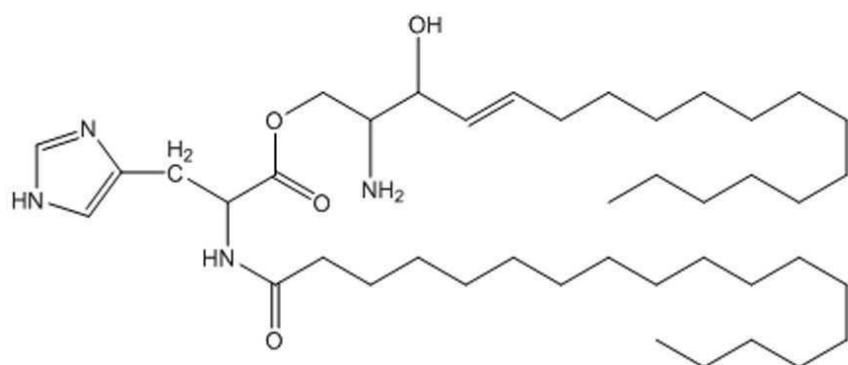
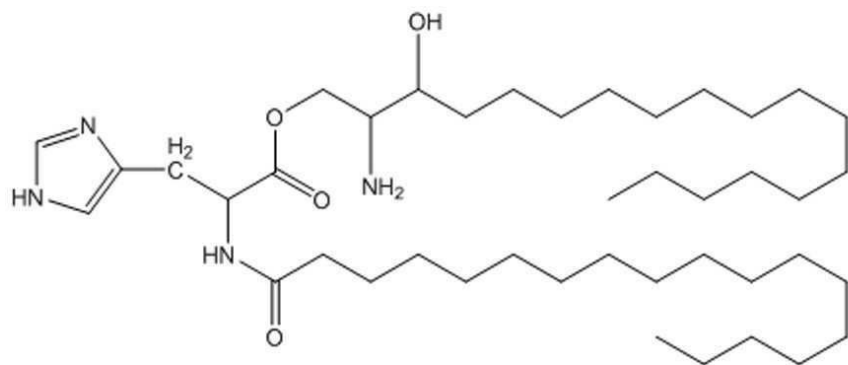
DILA2 아미노산 화합물의 예는  $R^3-(C=O)-His-NH-R^4$ 를 포함하고, 여기서,  $R^3$  및  $R^4$ 는 독립적으로 알킬 또는 알케닐이다. His DILA2 아미노산 화합물의 예는 하기 구조를 포함한다:



[0434]

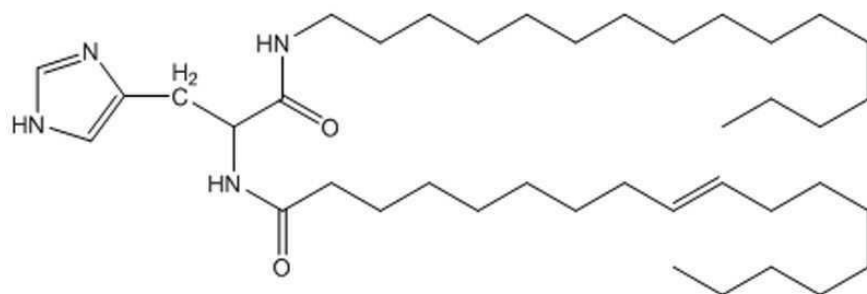
[0435] DILA2 아미노산 화합물의 예는  $R^3-(C=O)-Xaa-O-R^4$ 를 포함하고, 여기서,  $R^3$ 은 알킬이고,  $R^4$ 은 스펅고이드이다.

[0436] DILA2 아미노산 화합물의 예는 하기 구조를 포함한다:



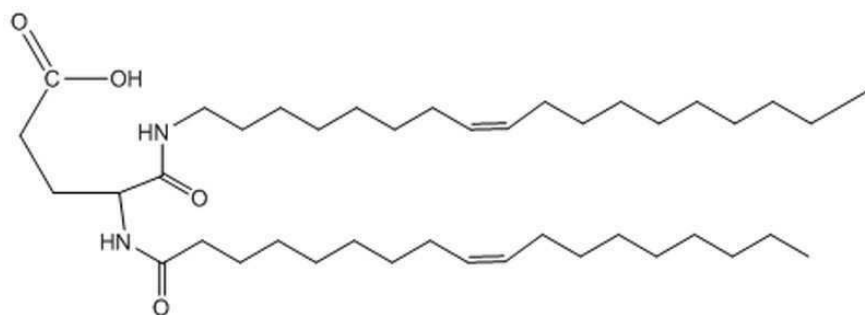
[0437]

[0438] DILA2 아미노산 화합물의 예는  $R^3-(C=O)-Xaa-NH-R^4$ 를 포함하고, 여기서,  $R^3$  및  $R^4$ 는 알킬 또는 알케닐이다.  
DILA2 아미노산 화합물의 예는 하기 구조를 포함한다:



[0439]

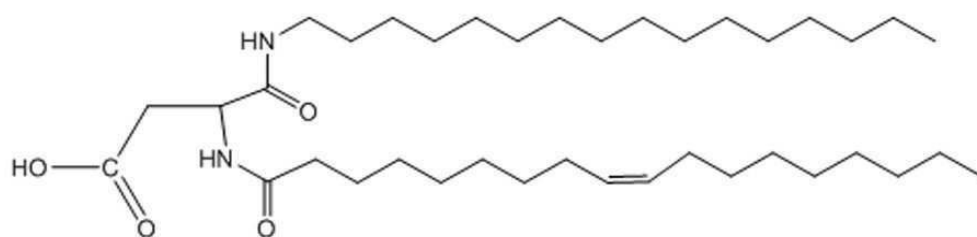
[0440] DILA2 아미노산 화합물의 예는 하기 구조를 포함한다:



C<sub>18:1</sub>-Glu-C<sub>18:1</sub>

[0441]

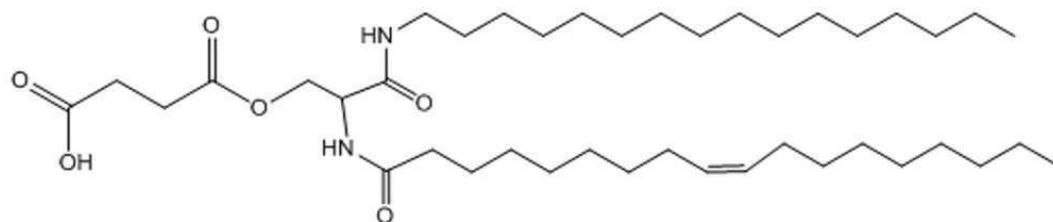
[0442] DILA2 아미노산 화합물의 예는 하기 구조를 포함한다:



C<sub>18:1</sub>-Asp-C<sub>16</sub>

[0443]

[0444] DILA2 아미노산 화합물의 예는 하기 구조를 포함한다:



C<sub>18:1</sub>-Ser(석시닐화된)-C<sub>16</sub>

[0445]

[0446] DILA2 아미노산 화합물의 예는 하기를 포함한다: (C10아실)-Arg-NH-(C10알킬) (SEQ ID NO: 11), (C12아실)-Arg-NH-(C12알킬) (SEQ ID NO: 11), (C14아실)-Arg-NH-(C14알킬) (SEQ ID NO: 11), (C16아실)-Arg-NH-(C16알킬) (SEQ ID NO: 11), (C18아실)-Arg-NH-(C18알킬) (SEQ ID NO: 11), (C10아실)-homoArg-NH-(C10알킬), (C12아실)-homoArg-NH-(C12알킬), (C14아실)-homoArg-NH-(C14알킬), (C16아실)-homoArg-NH-(C16알킬), (C18아실)-homoArg-NH-(C18알킬), (C10아실)-norArg-NH-(C10알킬), (C12아실)-norArg-NH-(C12알킬), (C14아실)-norArg-NH-(C14알킬), (C16아실)-norArg-NH-(C16알킬), (C18아실)-norArg-NH-(C18알킬), (C10아실)-nornorArg-NH-(C10알킬), (C12아실)-nornorArg-NH-(C12알킬), (C14아실)-nornorArg-NH-(C14알킬), (C16아실)-nornorArg-NH-(C16알킬), (C18아실)-nornorArg-NH-(C18알킬), (C10아실)-4-Pal-NH-(C10알킬), (C12아실)-4-Pal-NH-(C12알킬), (C14아실)-4-Pal-NH-(C14알킬), (C16아실)-4-Pal-NH-(C16알킬), (C18아실)-4-Pal-NH-(C18알킬), (C10아실)-4-Pal(Me)-NH-(C10알킬), (C12아실)-4-Pal(Me)-NH-(C12알킬), (C14아실)-4-Pal(Me)-NH-(C14알킬), (C16아실)-4-Pal(Me)-NH-(C16알킬), 및 (C18아실)-4-Pal(Me)-NH-(C18알킬).

[0447] 일반적으로, 명칭 "C14-norArg-C14"는, 예를 들어, (C14아실)-norArg-NH-(C14알킬)와 동일한 (C13알킬)-(C=O)-norArg-NH-(C14알킬)을 의미한다.

[0448] DILA2 아미노산 화합물의 예는 하기를 포함한다: (C10아실)-D-Arg-L-Arg-NH-(C10알킬), (C12아실)-D-Arg-L-Arg-NH-(C12알킬), (C14아실)-D-Arg-L-Arg-NH-(C14알킬), (C16아실)-D-Arg-L-Arg-NH-(C16알킬), (C18아실)-D-Arg-L-Arg-NH-(C18알킬), (C10아실)-D-homoArg-L-homoArg-NH-(C10알킬), (C12아실)-D-homoArg-L-homoArg-NH-(C12알킬), (C14아실)-D-homoArg-L-homoArg-NH-(C14알킬), (C16아실)-D-homoArg-L-homoArg-NH-(C16알킬),



(C18아실)-D-homoArg-L-homoArg-NH-(C18알킬), (C10아실)-D-norArg-L-norArg-NH-(C10알킬), (C12아실)-D-norArg-L-norArg-NH-(C12알킬), (C14아실)-D-norArg-L-norArg-NH-(C14알킬), (C16아실)-D-norArg-L-norArg-NH-(C16알킬), (C18아실)-D-norArg-L-norArg-NH-(C18알킬), (C10아실)-D-nornorArg-L-nornorArg-NH-(C10알킬), (C12아실)-D-nornorArg-L-nornorArg-NH-(C12알킬), (C14아실)-D-nornorArg-L-nornorArg-NH-(C14알킬), (C16아실)-D-nornorArg-L-nornorArg-NH-(C16알킬), (C18아실)-D-nornorArg-L-nornorArg-NH-(C18알킬).

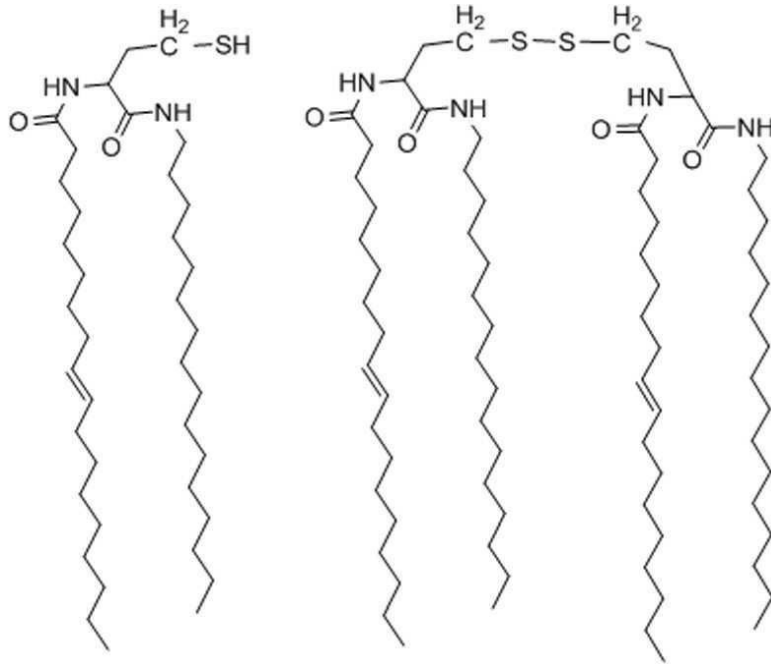
[0449] DILA2 아미노산 화합물의 예는 하기를 포함한다: (C10아실)-His-Arg-NH-(C10알킬), (C12아실)-His-Arg-NH-(C12알킬), (C14아실)-His-Arg-NH-(C14알킬), (C16아실)-His-Arg-NH-(C16알킬), (C18아실)-His-Arg-NH-(C18알킬), (C10아실)-His-Arg-NH-(C10알킬), (C12아실)-His-Arg-NH-(C12알킬), (C14아실)-His-Arg-NH-(C14알킬), (C16아실)-His-Arg-NH-(C16알킬), (C18아실)-His-Arg-NH-(C18알킬), (C10아실)-His-Arg-(C10알킬), (C12아실)-His-Arg-NH-(C12알킬), (C14아실)-His-Arg-NH-(C14알킬), (C16아실)-His-Arg-NH-(C16알킬), (C18아실)-His-Arg-NH-(C18알킬), (C10아실)-His-Arg-NH-(C10알킬), (C12아실)-His-Arg-NH-(C12알킬), (C14아실)-His-Arg-NH-(C14알킬), (C16아실)-His-Arg-NH-(C16알킬), (C18아실)-His-Arg-NH-(C18알킬).

[0450] DILA2 아미노산 화합물의 예는 하기를 포함한다: (C10아실)-His-Asp-NH-(C10알킬), (C12아실)-His-Asp-NH-(C12알킬), (C14아실)-His-Asp-NH-(C14알킬), (C16아실)-His-Asp-NH-(C16알킬), (C18아실)-His-Asp-NH-(C18알킬), (C10아실)-His-Asp-NH-(C10알킬), (C12아실)-His-Asp-NH-(C12알킬), (C14아실)-His-Asp-NH-(C14알킬), (C16아실)-His-Asp-NH-(C16알킬), (C18아실)-His-Asp-NH-(C18알킬), (C10아실)-His-Asp-(C10알킬), (C12아실)-His-Asp-NH-(C12알킬), (C14아실)-His-Asp-NH-(C14알킬), (C16아실)-His-Asp-NH-(C16알킬), (C18아실)-His-Asp-NH-(C18알킬), (C10아실)-His-Asp-NH-(C10알킬), (C12아실)-His-Asp-NH-(C12알킬), (C14아실)-His-Asp-NH-(C14알킬), (C16아실)-His-Asp-NH-(C16알킬), (C18아실)-His-Asp-NH-(C18알킬).

[0451] DILA2 아미노산 화합물의 예는 하기를 포함한다: (C10아실)-Pal-Arg-NH-(C10알킬), (C12아실)-Pal-Arg-NH-(C12알킬), (C14아실)-Pal-Arg-NH-(C14알킬), (C16아실)-Pal-Arg-NH-(C16알킬), (C18아실)-Pal-Arg-NH-(C18알킬), (C10아실)-Pal-Arg-NH-(C10알킬), (C12아실)-Pal-Arg-NH-(C12알킬), (C14아실)-Pal-Arg-NH-(C14알킬), (C16아실)-Pal-Arg-NH-(C16알킬), (C18아실)-Pal-Arg-NH-(C18알킬), (C10아실)-Pal-Arg-(C10알킬), (C12아실)-Pal-Arg-NH-(C12알킬), (C14아실)-Pal-Arg-NH-(C14알킬), (C16아실)-Pal-Arg-NH-(C16알킬), (C18아실)-Pal-Arg-NH-(C18알킬), (C10아실)-Pal-Arg-NH-(C10알킬), (C12아실)-Pal-Arg-NH-(C12알킬), (C14아실)-Pal-Arg-NH-(C14알킬), (C16아실)-Pal-Arg-NH-(C16알킬), (C18아실)-Pal-Arg-NH-(C18알킬).

[0452] DILA2 아미노산 화합물은 폴리머 또는 멀티머(multi-mer) 중, 예컨대 다이머, 트리머, 또는 테트라머로서 제조될 수 있다. 폴리머 또는 멀티머 중은 단일 DILA2 아미노산 화합물, 또는 하나 초과 종으로부터 제조될 수 있다. 폴리머 또는 멀티머 DILA2 아미노산 화합물은, 설프히드릴 그룹 또는 다른 교차결합이능 그룹을 아미노산의 측쇄 상에, 또는 결합 또는 테더링(Tethering)된 아미노산 구조, 예컨대 데스모신 또는 시트룰린를 제공하여 일부 구체예에서 제조될 수 있다. 다른 구체예에서, 폴리머 또는 멀티머 DILA2 아미노산 화합물은 바이오콘쥬게이트 링커 화학으로 제조될 수 있다.

[0453] DILA2 아미노산 화합물의 예는 하기 구조를 포함한다:



[0454]

[0455] DILA2 아미노산 화합물은 아미노산 측쇄에 공유결합된 펩타이드 또는 폴리머 사슬을 갖는 콘쥬게이트로서 제조될 수 있다. 펩타이드 또는 폴리머 사슬은 아미노산 측쇄의 반응성 그룹을 사용하여, 예를 들어, 시스테인 또는 메티오닌 각각의 티올 또는 메틸머캅탄 그룹, 또는 세린의 알코올 그룹, 또는 리신의 아미노 그룹을 사용하여 부착될 수 있다. 펩타이드 또는 폴리머 사슬은 치환된 또는 변형된 아미노산 측쇄의 임의의 반응성 그룹을 사용하여 부착될 수 있다. 다양한 링커 그룹, 예컨대 NHS, 말레이미도, 및 바이오콘쥬게이트 기술 및 링커가 사용될 수 있다.

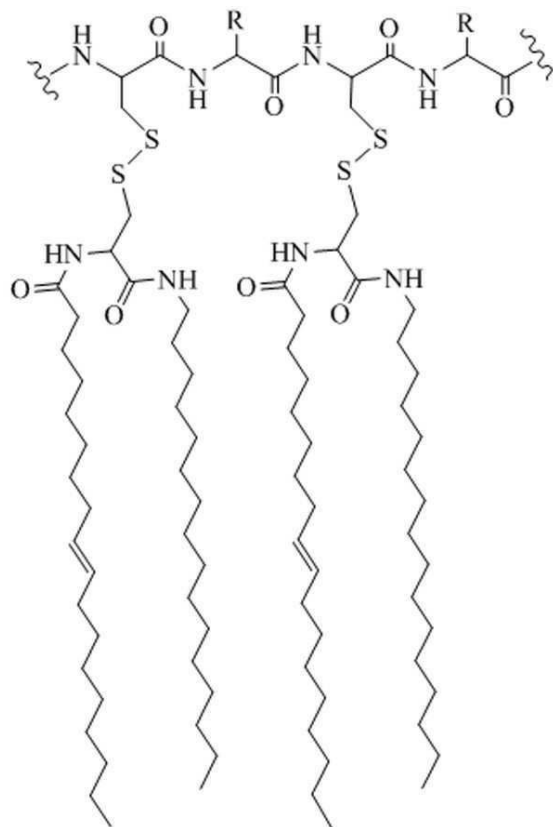
[0456]

DILA2 아미노산 화합물은 올리고머 또는 폴리머 골격에 부착된 구조물로서 제조될 수 있다. 예를 들어, DILA2 아미노산 화합물은 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 올리고뉴클레오타이드 네트워크 또는 격자, 폴리(아미노산), 카보히드레이트, 덱스트란, 히드로겔, 또는 전분에 부착될 수 있다.

[0457]

DILA2 아미노산 화합물은 약제학적 약물 화합물 또는 조성물, 또는 생물학적 활성제에 부착된 구조물로서 제조될 수 있다. 예를 들어, DILA2 아미노산 화합물은 핵산 약물, 예컨대 조절 또는 간섭 RNA에 콘쥬게이트될 수 있다.

[0458] DILA2 아미노산 화합물의 예는 하기 구조를 포함한다:



[0459]

[0460] 여기서, R은 임의의 아미노산 측쇄이다.

[0461] 본 명세서의 화합물 및 조성물은 그룹, 또는 폴리머 구조를 포함하는 구조를 용해시키거나 관능화시키는 것을 포함할 수 있다. 참조, 예, R. L. Dunn 및 R. M. Ottenbrite, Polymeric Drugs 및 Drug Delivery Systems, ACS Symp. Ser. 469 (1991). DILA2 아미노산 화합물은 용해도를 향상시키기 위해, 예를 들어, 디올을 부착시키고, 4 급 암모늄 또는 하전된 그룹을 제조하고, 히드록실 또는 아민 그룹, 예컨대 알콜, 폴리올, 또는 폴리에테르를 부착시키고, 또는 폴리에틸렌이민, 폴리에틸렌글리콜 또는 폴리프로필렌글리콜을 부착시키기 위해 유도화될 수 있다. 부착된 폴리머 성분, 예컨대 폴리에틸렌글리콜의 분자량은 임의의 값, 예를 들어, 200, 300, 400, 500, 750, 1000, 1250, 1500, 2000, 3000, 4000, 5000, 7500, 10,000, 15,000, 20,000, 25,000, 또는 30,000 Da, 또는 그 초과일 수 있다. 예를 들어, 폴리에틸렌글리콜 사슬은 아미노 그룹 또는 아미노산 측쇄의 다른 반응성 그룹을 통해 부착될 수 있다.

[0462] 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 일반적인 화학 용어들은, 달리 특정되지 않으면, 임의의 수 및 유형의 원자를 갖는 그룹을 포함하는, 모든 그룹의 특정 유형을 의미한다.. 예를 들어 "알케닐"은 하기에 정의된 바와 같이 2 내지 22개의 탄소 원자를 갖는 알킬을 대체로 의미하고, 한편, (C18:1)알케닐은 18개의 탄소 원자 및 하나의 이중결합을 갖는 알케닐을 의미한다.

[0463] 용어 "알킬"은, 본 명세서에 사용된 바와 같이, 1 내지 22개의 탄소 원자를 함유하는 포화, 분지화 또는 비분지화, 치환 또는 비치환된 지방족 그룹을 의미한다. 본 정의는, 예를 들어, 알콕시, 알카노일, 아르알킬, 및 하기에 정의된 다른 그룹과 같은 다른 그룹의 알킬 부분에 적용된다. 용어 "시클로알킬"은, 본 명세서에 사용된 바와 같이, 3 내지 12개의 탄소 원자를 함유하는 포화, 치환 또는 비치환된 시클릭 알킬 고리를 의미한다.

[0464] 용어 "알케닐"은, 본 명세서에 사용된 바와 같이, 2 내지 22개의 탄소 원자 및 적어도 하나의 탄소-탄소 이중결합을 갖는 불포화, 분지화 또는 비분지화, 치환 또는 비치환된 알킬 또는 시클로알킬을 의미한다. 용어 "알키닐"은, 본 명세서에 사용된 바와 같이, 2 내지 22개의 탄소 원자 및 적어도 하나의 탄소-탄소 삼중결합을 갖는 불포화, 분지화 또는 비분지화, 치환 또는 비치환된 알킬 또는 시클로알킬을 의미한다.

[0465] 용어 "알콕시"는, 본 명세서에 사용된 바와 같이, 산소 원자에 공유결합된 알킬, 시클로알킬, 알케닐, 또는 알키닐 그룹을 의미한다. 용어 "알카노일"은, 본 명세서에 사용된 바와 같이, -C(=O)-알킬을 의미하고, 이는 대안

적으로 "아실"로 불릴 수 있다. 용어 "알카노일옥시"는, 본 명세서에 사용된 바와 같이,  $-O-C(=O)-$ 알킬 그룹을 의미한다. 용어 "알킬아미노"는, 본 명세서에 사용된 바와 같이, 그룹  $-NRR'$ 를 의미하고, 여기서, R 및 R' 각각은 수소 또는 알킬이고, R 및 R' 중 적어도 하나는 알킬이다. 알킬아미노 그룹, 예컨대 피페리디노를 포함하고, 여기서, R 및 R'는 고리를 형성한다. 용어 "알킬아미노알킬"은  $-알킬-NRR'$ 를 의미한다.

[0466] 용어 "아릴"은, 본 명세서에 사용된 바와 같이, 각 고리 내에 4 내지 12개의 원자의 임의의 안정한 모노시클릭, 바이시클릭, 또는 폴리시클릭 탄소 고리계를 의미하고, 여기서, 적어도 하나의 고리는 방향족이다. 아릴의 일부 예는 페닐, 나프틸, 테트라히드로-나프틸, 인다닐, 및 바이페닐을 포함한다. 아릴 치환기가 바이시클릭이고 하나의 고리가 비방향족인 경우, 부착은 방향족 고리에 대해서인 것으로 이해된다. 아릴은 치환 또는 비치환될 수 있다.

[0467] 용어 "헤테로아릴"은, 본 명세서에 사용된 바와 같이, 각 고리 내에 4 내지 12개의 원자의 임의의 안정한 모노시클릭, 바이시클릭, 또는 폴리시클릭 탄소 고리계를 의미하고, 적어도 하나의 고리는 방향족이고, 산소, 질소 및 황으로부터 선택된 1 내지 4개의 헤테로원자를 함유한다. 헤테로아릴의 일부 예는 아크리디닐, 퀴놀살리닐, 피라졸릴, 인돌릴, 벤조트리아졸릴, 푸라닐, 티에닐, 벤조티에닐, 벤조푸라닐, 퀴놀리닐, 이소퀴놀리닐, 옥사졸릴, 이속사졸릴, 피라지닐, 피리다지닐, 피리디닐, 피리미디닐, 피롤릴, 및 테트라히드로퀴놀리닐을 포함한다. 헤테로아릴은 질소 함유 헤테로아릴의 N-산화물 유도체를 포함한다.

[0468] 용어 "헤테로사이클" 또는 "헤테로시클릴"은, 본 명세서에 사용된 바와 같이, 5 내지 22개의 원자의 방향족 또는 비방향족 고리계를 의미하고, 여기서, 고리 원자의 1 내지 4개는 산소, 질소, 및 황으로부터 선택된 헤테로원자이다. 따라서, 헤테로사이클은 헤테로아릴 또는 이의 디히드로 또는 테트라히드로 버전일 수 있다.

[0469] 용어 "아로일"은, 본 명세서에 사용된 바와 같이, 방향족 카복실산, 예컨대 치환된 벤조산으로부터 유도된 아릴 라디칼을 의미한다. 용어 "아르알킬"은, 본 명세서에 사용된 바와 같이, 알킬 그룹, 예를 들어, 벤질 그룹에 결합된 아릴 그룹을 의미한다.

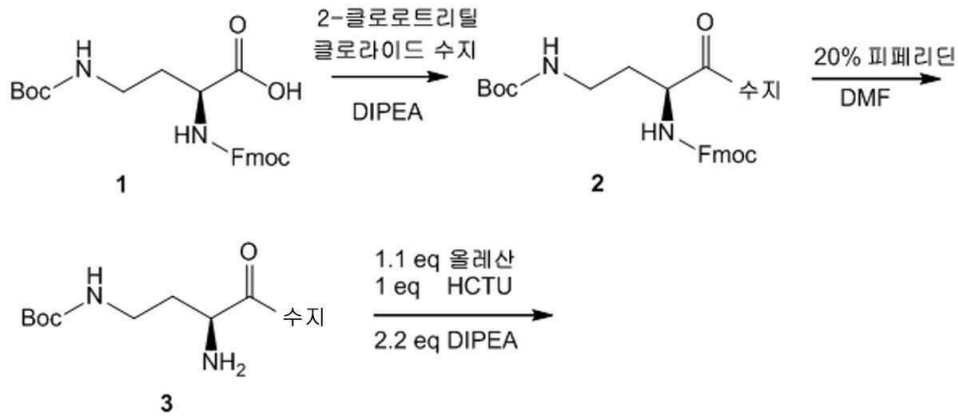
[0470] 용어 "카복실"은, 본 명세서에 사용된 바와 같이, 식  $-C(=O)OH$  또는  $-C(=O)O-$ 의 그룹을 나타낸다. 용어 "카보닐" 및 "아실"은, 본 명세서에 사용된 바와 같이, 산소 원자가 탄소 원자에 이중결합된 그룹  $>C=O$ 을 의미한다. 용어 "히드록실"은, 본 명세서에 사용된 바와 같이,  $-OH$  또는  $-O-$ 을 의미한다. 용어 "니트릴" 또는 "시아노"는, 본 명세서에 사용된 바와 같이,  $-CN$ 을 의미한다. 용어 "할로젠" 또는 "할로"는 플루오로 ( $-F$ ), 클로로 ( $-Cl$ ), 브로모 ( $-Br$ ), 및 아이오도 ( $-I$ )를 의미한다.

[0471] 용어 "치환된"은, 본 명세서에 사용된 바와 같이, 동일 또는 상이할 수 있고 수소 치환기를 포함하는 하나 이상의 치환 또는 치환기를 갖는 원자를 의미한다. 따라서, 용어 알킬, 시클로알킬, 알케닐, 알키닐, 알콕시, 알카노일, 알카노일옥시, 알킬아미노, 알킬아미노알킬, 아릴, 헤테로아릴, 헤테로사이클, 아로일, 및 아르알킬은, 본 명세서에 사용된 바와 같이, 치환된 변종을 포함하는 그룹을 의미한다. 치환된 변종은 곧은, 분지된, 및 시클릭 변종, 및 그룹의 임의의 탄소 원자에 부착된 하나 이상의 수소를 치환하는 치환 또는 치환기들을 갖는 그룹을 포함한다. 그룹의 탄소 원자에 부착될 수 있는 치환기는 알킬, 시클로알킬, 알케닐, 알키닐, 알콕시, 알카노일, 알카노일옥시, 알킬아미노, 알킬아미노알킬, 아릴, 헤테로아릴, 헤테로사이클, 아로일, 아르알킬, 아실, 히드록실, 시아노, 할로, 할로알킬, 아미노, 아미노아실, 알킬아미노아실, 아실옥시, 아릴옥시, 아릴옥시알킬, 머캅토, 니트로, 카바미, 카바모일, 및 헤테로사이클을 포함한다. 예를 들어, 용어 에틸은 비제한적으로  $-CH_2CH_3$ ,  $-CHFCH_3$ ,  $-CF_2CH_3$ ,  $-CHFCH_2F$ ,  $-CHFCHF_2$ ,  $-CHFCHF_3$ ,  $-CF_2CH_2F$ ,  $-CF_2CHF_2$ ,  $-CF_2CF_3$ , 및 상기에 기재된 다른 변종을 포함한다. 일반적으로, 치환기는 임의의 원자, 또는 원자의 그룹으로 추가 치환될 수 있다.

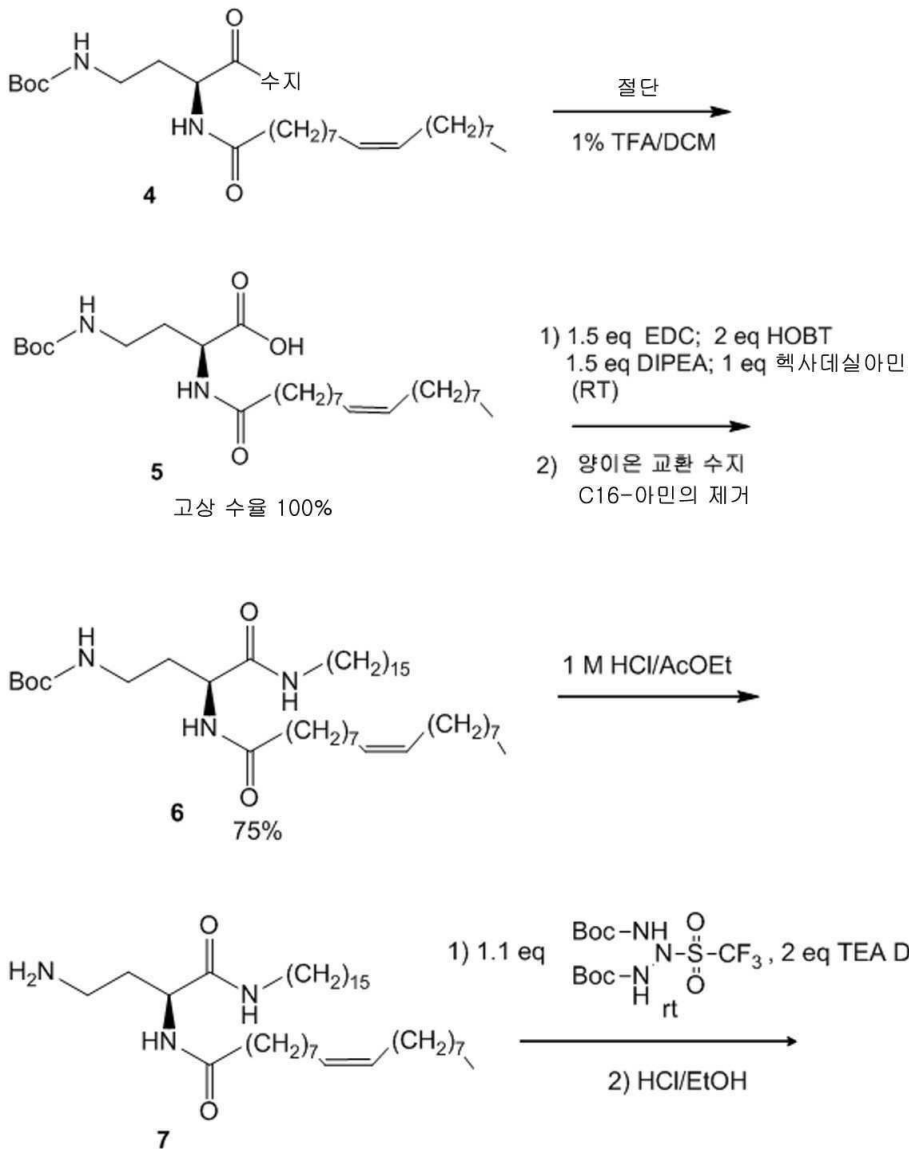
[0472] DILA2 아미노산 화합물은 본 기술분야에 공지된 방법으로 합성될 수 있다.

[0473] 다양한 유기 그룹 및 보호 그룹의 제조 방법은 본 기술분야에 공지되어 있고, 그의 용도 및 변형은 대체로 당업자의 능력 내에 있다. 참조, 예, Stanley R. Sandler and Wolf Karo, Organic Functional Group Preparations (1989); Greg T. Hermanson, Bioconjugate Techniques (1996); Leroy G. Wade, Compendium Of Organic Synthetic Methods (1980); 보호 그룹의 예는 하기에 발견된다: T. W. Greene 및 P. G. M. Wuts, Protective Functional Groups In Organic Synthesis (3rd ed. 1991).

[0474] 예를 들어, DILA2 아미노산 화합물 PONA는 하기 반응식에 따라 합성될 수 있다:

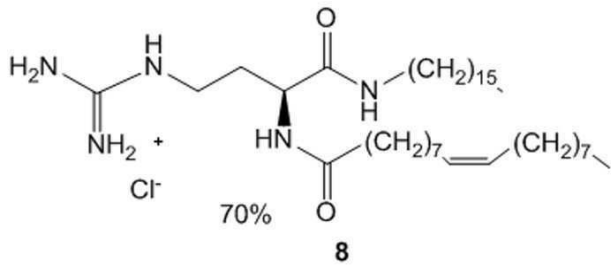


[0475]



[0476]





총 수율 53 %

[0477]

[0478]

충분히 염기성인 본 발명의 펩타이드 또는 단백질 조성물의 약제학적으로 허용가능한 염은, 예를 들어, 무기 또는 유기 산, 예컨대 염산, 브롬화수소산, 황산, 질산, 인산, 클로로설폰산, 트리플루오로아세트산, 시트르산, 말레산, 아세트산, 프로피온산, 옥살산, 말산, 말레산, 말로산, 푸마르산, 또는 타르타르산, 및 알칸- 또는 아렌설폰산, 예컨대 메탄설폰산, 에탄설폰산, 벤젠설폰산, 클로로벤젠설폰산, 톨루엔설폰산, 나프탈렌설폰산, 나프탈렌디설폰산, 및 캄포르설폰산을 갖는 산 부가 염일 수 있다.

[0479]

충분히 산성인 본 발명의 펩타이드 또는 단백질 조성물의 약제학적으로 허용가능한 염은, 알칼리 금속 염, 예를 들어, 나트륨 또는 칼륨 염, 또는 알칼리 토금속 염, 예를 들어, 칼슘 또는 마그네슘 염, 또는 아연 또는 망간 염, 또는 암모늄 염, 또는 생리학적으로 허용가능한 양이온을 제공하는 유기 염기를 갖는 염, 예를 들어, 염 with 메틸아민, 디메틸아민, 트리메틸아민, 트리에틸아민, 에탄올아민, 디에탄올아민, 트리에탄올아민, 에틸렌디아민, 트로메타민, N-메틸글루카민, 피페리딘, 모폴린 또는 트리스-(2-히드록시에틸)아민일 수 있고, 아미노산의 염, 예컨대 아르기네이트, 및 유기 산의 염, 예컨대 글루쿠론산 또는 갈락투오산을 포함한다. 참조, 예를 들어, Berge *et al.*, *J. Pharm. Sci.* 66:1-19, 1977.

[0480]

기타 성분 중에서 간접 RNA 제제 및 DILA2 아미노산 화합물, 지질, 펩타이드, 또는 단백질을 함유하는 본 명세서의 조성물의 염 또는 약제학적으로 허용가능한 염은, 간접 RNA 제제 및 DILA2 아미노산 화합물, 지질, 펩타이드, 또는 단백질의 염 착물을 함유할 수 있다. 간접 RNA 제제 및 DILA2 아미노산 화합물, 지질, 펩타이드, 또는 단백질의 염 착물은 간접 RNA 제제의 약제학적으로 허용가능한 염, 또는 DILA2 아미노산 화합물, 지질, 펩타이드, 또는 단백질의 약제학적으로 허용가능한 염으로부터 형성될 수 있다.

[0481]

본 명세서의 일부 화합물은 화합물을 염기 또는 산 부가 염으로 만들 수 있는 염기성 및 산성 관능기 모두를 함유할 수 있다.

[0482]

본 발명의 일부 화합물, 펩타이드 및/또는 단백질 조성물은 하나 이상의 키랄 중심 및/또는 기하 이성질체 중심 (E- 및 Z-이성질체)를 가질 수 있고, 본 발명은 모든 그와 같은 광학 이성질체, 부분입체이성질체, 기하 이성질체, 및 이의 혼합물을 포함하는 것으로 이해된다.

[0483]

본 명세서는 본 명세서에 개시된 화합물, 펩타이드 및/또는 단백질 조성물의 임의의 및 모든 호변체, 용매화된 또는 비용매화된, 수화된 또는 비수화된 형태, 및 임의의 원자 동위원소 형태를 포함한다.

[0484]

지질

[0485]

본 발명의 일부 측면에서, 하나 이상의 DILA2 아미노산 화합물 및 하나 이상의 지질은 조절 RNA 성분, RNA 길항제, 간접 RNA, 또는 핵산의 전달 및 투여를 위해 이용될 수 있다. 더욱 특히, 본 발명의 조성물은 양이온성 지질 및 비양이온성 지질과 함께 하나 이상의 DILA2 아미노산 화합물을 포함할 수 있다.

[0486]

양이온성 지질은 모노양이온성 또는 다양이온성일 수 있다. 일부 양이온성 지질은 중성 지질 및 지질을 포함하고, 이는 제로(zero) 순전하를 특정 pH에서 가지며, 그 예는 쯔비터이온성 지질이다. 비양이온성 지질은 또한 음이온성 지질을 포함한다.

[0487]

일부 구체예에서, 조성물은 RNA 성분과 DILA2 아미노산 화합물 및 양이온성 지질과의 혼합물 또는 착물이다. 일부 구체예에서, 조성물은 하나 이상의 조절 또는 간접 RNA 제제와 하나 이상의 DILA2 아미노산 화합물 및 하나 이상의 양이온성 지질과의 혼합물 또는 착물일 수 있다.

[0488]

본 명세서의 화합물 및 조성물은 활성제를 유기체의 세포, 조직, 기관 또는 부위에 전달하기 위해 다양한 표적 리간드 또는 제제와 혼합 또는 그에 부착될 수 있다. 표적 제제 예는 항체, 수용체용 리간드, 펩타이드, 단백질, 렉틴, (폴리)사카라이드, 갈락토오스, 만노오스, 시클로텍스트린, 핵산, DNA, RNA, aptamer, 및

및 폴리아미노산을 포함한다.

- [0489] 양이온성 지질의 예는 N-[1-(2,3-디올레오일옥시)프로필]-N,N,N-트리메틸암모늄 클로라이드 (DOTMA); 1,2-비스(올레오일옥시)-3-3-(트리메틸암모늄)프로판 (DOTAP), 1,2-비스(디미리스토일옥시)-3-3-(트리메틸암모니아)프로판 (DMTAP); 1,2-디미리스틸옥시프로필-3-디메틸히드록시에틸암모늄 브로마이드 (DMRIE); 디메틸디옥타데실암모늄 브로마이드 (DDAB); 3-(N-(N',N'-디메틸아미노에탄)카바모일)콜레스테롤 (DC-Chol); 3-β-[N',N'-디구아니디노에틸-아미노에탄)카바모일 콜레스테롤 (BGTC); 2-(2-(3-(비스(3-아미노프로필)아미노)프로필아미노)아세트아미도)-N,N-디테트라데실아세트아미드 (RPR209120); 이의 약제학적으로 허용가능한 염, 및 그의 혼합물을 포함한다.
- [0490] 양이온성 지질의 예는 1,2-디알케노일-sn-글리세로-3-에틸포스포콜린 (EPCs), 예컨대 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-에틸포스포콜린, 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-에틸포스포콜린, 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-에틸포스포콜린, 이의 약제학적으로 허용가능한 염, 및 그의 혼합물을 포함한다.
- [0491] 양이온성 지질의 예는 1,2-디스테아릴옥시-N,N-디메틸-3-아미노프로판 (DSDMA), 1,2-디올레일옥시-N,N-디메틸-3-아미노프로판 (DODMA), 1,2-디리놀레일옥시-N,N-디메틸-3-아미노프로판 (DLinDMA), 및 1,2-디리놀레일옥시-N,N-디메틸-3-아미노프로판 (DLenDMA)을 포함한다.
- [0492] 다양이온성 지질의 예는 테트라메틸테트라팔미토일 스페르민 (TMTPS), 테트라메틸테트라올레일 스페르민 (TMTOS), 테트라메틸테트라라우릴 스페르민 (TMTLS), 테트라메틸테트라미리스틸 스페르민 (TMTMS), 테트라메틸디올레일 스페르민 (TMDOS), 이의 약제학적으로 허용가능한 염, 및 그의 혼합물을 포함한다.
- [0493] 다양이온성 지질의 예는 1,2,5-비스(3-아미노프로필아미노)-N-(2-(디옥타데실아미노)-2-옥소에틸) 펜탄아미드 (DOGS); 2,5-비스(3-아미노프로필아미노)-N-(2-(디(Z)-옥타데카-9-디에닐아미노)-2-옥소에틸) 펜탄아미드 (DOGS-9-엔); 2,5-비스(3-아미노프로필아미노)-N-(2-(디(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디에닐아미노)-2-옥소에틸) 펜탄아미드 (DLinGS); 3-β-(N<sup>4</sup>-(N<sup>1</sup>,N<sup>8</sup>-디카보벤족시스페르미딘)카바모일)콜레스테롤 (GL-67); (9Z,9'Z)-2-(2,5-비스(3-아미노프로필아미노)펜탄아미도)프로판-1,3-디일-디옥타데카-9-에노에이트 (DOSPER); 2,3-디올레일옥시-N-[2(스페르민카복사미도)에틸]-N,N-디메틸-1-프로판아미늄 트리플루오로-아세테이트 (DOSPA); 이의 약제학적으로 허용가능한 염, 및 그의 혼합물을 포함한다.
- [0494] 양이온성 지질의 예는 DS404-28 BGTC (CAS 182056-06-0), DOSPER (CAS 178532-92-8), GL-67 (179075-30-0), RPR209120 (CAS 433292-13-8), DOGS (12050-77-7), DOGS (9-en, C18:1), DLinGS (C18:2), 및 DOTMA (104162-48-3)를 포함한다.
- [0495] 양이온성 지질의 예는 하기에 기재되어 있다: 미국 특허 번호 4,897,355; 5,279,833; 6,733,777; 6,376,248; 5,736,392; 5,334,761; 5,459,127; 2005/0064595; 5,208,036; 5,264,618; 5,279,833; 5,283,185; 5,753,613; 및 5,785,992.
- [0496] 일부 구체예에서, 조성물은 RNA 성분과 DILA2 아미노산 화합물 및 비양이온성 지질과의 혼합물 또는 착물이다. 일부 구체예에서, 조성물은 하나 이상의 RNA 성분과 하나 이상의 DILA2 아미노산 화합물 및 하나 이상의 비양이온성 지질과의 혼합물 또는 착물이다.
- [0497] 비양이온성 지질은 중성, 쯔비터이온성, 및 음이온성 지질을 포함한다. 따라서, 비양이온성 쯔비터이온성 지질은 양이온성 헤드(head) 그룹을 함유할 수 있다.
- [0498] 비양이온성 지질의 예는 하기를 포함한다: 1,2-디라우로일-sn-글리세롤 (DLG); 1,2-디미리스토일-sn-글리세롤 (DMG); 1,2-디팔미토일-sn-글리세롤 (DPG); 1,2-디스테아로일-sn-글리세롤 (DSG); 1,2-디라우로일-sn-글리세로-3-포스파타이드산 (나트륨 염; DLPA); 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스파타이드산 (나트륨 염; DMPA); 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스파타이드산 (나트륨 염; DPPA); 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스파타이드산 (나트륨 염; DSPA); 1,2-디아라키도일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (DAPC); 1,2-디라우로일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (DLPC); 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (DMPC); 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-0-에틸-3-포스포콜린 (클로라이드 또는 트리플레이트; DPePC); 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (DPPC); 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (DSPC); 1,2-디라우로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 (DLPE); 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 (DMPE); 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 (DPPE); 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 (DSPE); 1,2-디라우로일-sn-글리세로-3-포스포글리세롤 (나트륨 염; DLPG); 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포글리세롤 (나트륨 염; DMPG); 1,2-디미리스토

일-sn-글리세로-3-포스포-sn-1-글리세롤 (암모늄 염; DMP-sn-1-G); 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포글리세롤 (나트륨 염; DPPG); 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포글리세로 (나트륨 염; DSPG); 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포-sn-1-글리세롤 (나트륨 염; DSP-sn-1-G); 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포-L-세린 (나트륨 염; DPPS); 1-팔미토일-2-리놀레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (PLinoPC); 1-팔미토일-2-올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (POPC); 1-팔미토일-2-올레오일-sn-글리세로-3-포스포글리세롤 (나트륨 염; POPG); 1-팔미토일-2-올레오일-sn-글리세로-3-포스포글리세롤 (나트륨 염; POPG); 1-팔미토일-2-올레오일-sn-글리세로-3-포스포글리세롤 (암모늄 염; POPG); 1-팔미토일-2-4o-sn-글리세로-3-포스포콜린 (P-리소-PC); 1-스테아로일-2-리소-sn-글리세로-3-포스포콜린 (S-lyso-PC); 및 이의 혼합물.

[0499] 비양이온성 지질의 예는 폴리머 화합물 및 폴리머-지질 콘주게이트 또는 폴리머 지질, 예컨대 300, 500, 1000, 1500, 2000, 3500, 또는 5000 분자량의 PEG 영역을 갖는 폐길화된 지질을 포함하고, 이는 하기를 포함한다: 폴리에틸렌글리콜, N-(카보닐-메톡시폴리에틸렌글리콜-2000)-1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 (나트륨 염; DMPE-MPEG-2000); N-(카보닐-메톡시폴리에틸렌글리콜-5000)-1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 (나트륨 염; DMPE-MPEG-5000); N-(카보닐-메톡시폴리에틸렌글리콜 2000)-1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 (나트륨 염; DPPE-MPEG-2000); N-(카보닐-메톡시폴리에틸렌글리콜 5000)-1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 (나트륨 염; DPPE-MPEG-5000); N-(카보닐-메톡시폴리에틸렌글리콜 750)-1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 (나트륨 염; DSPE-MPEG-750); N-(카보닐-메톡시폴리에틸렌글리콜 2000)-1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 (나트륨 염; DSPE-MPEG-2000); N-(카보닐-메톡시폴리에틸렌글리콜 5000)-1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 (나트륨 염; DSPE-MPEG-5000); 나트륨 콜레스테릴 설페이트 (SCS); 이의 약제학적으로 허용가능한 염, 및 그의 혼합물.

[0500] 비양이온성 지질의 예는 폴리머 지질, 예컨대 DOPE-PEG, DLPE-PEG, DDPE-PEG DlinPE-PEG, 및 디아실글리세롤-PEG-2000 또는 -5000을 포함한다.

[0501] 비양이온성 지질의 예는 폴리머 지질, 예컨대 다분지된 폐길화된 화합물, 예를 들어 DSPE-PTE020 및 DSPE-AM0530K 을 포함한다.

[0502] 비양이온성 지질의 예는 폴리머 지질, 예컨대 DSPE-PG8G 폴리글리세린 지질을 포함한다.

[0503] 비양이온성 지질의 예는 디올레오일포스파티딜에탄올아민 (DOPE), 디피타노일포스파티딜에탄올아민 (DPhPE), 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (DOPC), 및 1,2-디피타노일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (DPhPC)을 포함한다.

[0504] 비양이온성 지질의 예는 콜레스테롤, 스테롤, 또는 스테로이드, 예컨대 고난(gonane), 에스트란(estrane), 안드로스탄(androstane), 프레그난(pregnan), 콜란(cholane), 콜레스탄(cholestane), 에르고스탄(ergostane), 캄페스탄(campestan), 포리페라스탄(poriferastane), 스티그마스탄(stigmastane), 고르고스탄(gorgostane), 라노스탄(lanostane), 시클로아르탄(cycloartane), 및 임의의 상기의 스테롤 또는 주스테롤(zosterol) 유도체, 및 이의 생물학적 중간체 및 전구체를 포함하고, 그 예는 콜레스테롤, 라노스테롤, 스티그마스탄올(stigmastanol), 디히드로라노스테롤, 지모스테롤(zymosterol), 지모스텐올(zymostenol), 데스모스테롤, 7-데히드로콜레스테롤, 및 이의 혼합물 및 유도체를 포함할 수 있다.

[0505] 비양이온성 지질의 예는 폐길화된 콜레스테롤, 및 콜레스탄 3-옥소(C1-22아실) 유도체, 예컨대 콜레스테릴 아세테이트, 콜레스테릴 아라키도네이트, 콜레스테릴 부티레이트, 콜레스테릴 헥사노에이트, 콜레스테릴 카프릴레이트, 콜레스테릴 n-도데카노에이트, 콜레스테릴 도데카노에이트, 콜레스테릴 미리스테이트, 콜레스테릴 팔리테이트, 콜레스테릴 베헤네이트, 콜레스테릴 스테아레이트, 콜레스테릴 노르보네이트, 콜레스테릴 펠라르코네이트, 콜레스테릴 n-발레레이트, 콜레스테릴 올레이트, 콜레스테릴 엘라이테이트(elaidate), 콜레스테릴 이루케이테(erucate), 콜레스테릴 헵타노에이트, 콜레스테릴 리놀레라이테이트(linolelaidate), 콜레스테릴 리놀레에이트, 및 이의 혼합물 및 유도체를 포함한다.

[0506] 비양이온성 지질의 예는 파이토스테롤,  $\beta$ -시토스테롤, 캄페스테롤, 에르고스테롤, 브라씨카스테롤,  $\delta$ -7-스티그마스테롤,  $\delta$ -7-아베나스테롤, 및 이의 혼합물 및 유도체를 포함하는 식물성 스테롤로부터 유도된 화합물을 포함한다.

[0507] 비양이온성 지질의 예는 담즙산, 콜산(cholic acid), 케노데옥시콜산(chenodeoxycholic acid), 글리코콜산(glycocholic acid), 타우로콜산(taurocholic acid), 데옥시콜산(deoxycholic acid), 리토콜산(lithocholic acid), 메틸-리토콜산, 및 이의 혼합물 및 유도체를 포함한다.

- [0508] 비양이온성 지질의 예는 글루코코르티코이드, 코르티솔, 히드로코르티손, 코르티코스테론,  $\Delta^5$ -프레그네놀론(pregnenolone), 프로게스테론(progesterone), 테옥시코르티코스테론, 17-OH-프레그네놀론, 17-OH-프로게스테론, 11-디옥시코르티솔, 데히드로에피안드로스테론, 데히드로에피안드로스테론 설페이트, 안드로스테네디온, 알도스테론, 18-히드록시코르티코스테론, 테트라히드로코르티솔, 테트라히드로코르티손, 코르티손, 프레드니손, 6 $\alpha$ -메틸프레디손, 9 $\alpha$ -플루오로-16 $\alpha$ -히드록시프레드니솔론, 9 $\alpha$ -플루오로-16 $\alpha$ -메틸프레드니솔론, 9 $\alpha$ -플루오로코르티솔, 및 이의 혼합물 및 유도체를 포함하는 스테로이드로부터 유도된 화합물을 포함한다.
- [0509] 비양이온성 지질의 예는 안드로겐, 테스토스테론, 디히드로테스토스테론, 안드로스텐디올(androstenediol), 안드로스텐디온(androstenedione), 안드로스텐디온(androstenedione), 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -안드로스탠디올(androstanediol), 및 이의 혼합물 및 유도체를 포함하는 스테로이드로부터 유도된 화합물을 포함한다.
- [0510] 비양이온성 지질의 예는 에스트로겐, 에스트리올(estriol), 에스트론(estrone), 에스트라디올(estradiol), 및 이의 혼합물 및 유도체를 포함하는 스테로이드로부터 유도된 화합물을 포함한다.
- [0511] 비양이온성 지질의 예는 루미스테롤 및 비타민 D 화합물로부터 유도된 화합물을 포함한다.
- [0512] 비양이온성 지질의 예는 C10:0 내지 C22:6의 범위의 테일을 갖는 지질, 예를 들어, DDPE (C10:0) (CAS 253685-27-7), DLPE (C12:0) (CAS 59752-57-7), DSPE (C18:0) (CAS 1069-79-0), DOPE (C18:1) (CAS 4004-05-1), DLinPE (C18:2) (CAS 20707-71-5), DLenPE (C18:3) (CAS 34813-40-6), DARAPE (C20:4) (CAS 5634-86-6), DDHAPE (C22:6) (CAS 123284-81-1), DPhPE (16:0[(CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>]) (CAS 201036-16-0)를 포함한다.
- [0513] 음이온성 지질의 예는 포스파티딜세린, 포스파타이드산, 포스파티딜콜린, 혈소판 활성 인자 (PAF), 포스파티딜 에탄올아민, 포스파티딜-DL-글리세롤, 포스파티딜이노시톨, 포스파티딜이노시톨 (pi(4)p, pi(4,5)p2), 카르디올리핀 (cardiolipin, 나트륨 염), 리소포스파타이드(lysophosphatide), 수소화된 인지질, 스펅고프지질, 강글리오사이드, 파이토스핑고신(phytosphingosine), 스펅가닌(sphinganine), 이의 약제학적으로 허용가능한 염, 및 그의 혼합물을 포함한다.
- [0514] RNA 치료요법제 전달을 위한 용도
- [0515] 일부 측면에서, 본 내용은 조절 RNA 및 RNA 간섭, 안티센스 치료요법제, 및 RNA 치료요법제 전달 분야에 일반적으로 관계한다. 좀더 특별하게는, 본 발명은 리보핵산용 조성물 및 제제, 약물 및 치료제 전달을 위한 이들의 용도에 관계한다. 본 발명은 세포 또는 포유류에서 질환 상태 또는 표현형을 변경시키기 위하여, 유전자 발현의 유전자 특이적 억제를 위한 RNA 간섭에 리보 핵산을 이용하는 방법에 일반적으로 관계한다.
- [0516] RNA 간섭은 짧은 간섭 RNA (siRNA)라고 불리는 이중가닥 RNA(dsRNA)에 의해 중재되는 전사후 서열 특이적 유전자 침묵 방법을 말한다. Fire, 등, *Nature* 391:806, 1998, 및 Hamilton, 등, *Science* 286:950951, 1999를 참고. RNAi는 다양한 식물 및 문(flora 및 phyla)에 의해 공유되며, 및 외부 유전자들의 발현에 대하여 발생학적으로 보존된 세포 방어 기준으로 보고 있다. Fire, 등, *Trends Genet.* 15:358, 1999 참고.
- [0517] 따라서, RNAi는 유전자 발현을 침묵시키기 위하여 작은 넌코딩 RNA를 이용하는 산재한, 내생성 기전이다. Dykxhoorn, D.M. 및 J., *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 8:377-402, 2006 참고. RNAi는 세포 사멸, 분화 및 발달에 관여하는 중요한 유전자들을 조절할 수 있다. RNAi는 또한 트랜스포존 및 바이러스에 의해 인코딩된 유전자 요소들의 침범으로부터 게놈을 보호할 수도 있다. siRNA가 세포로 도입될 때, siRNA는 내생성 RNAi 기전에 결합하여, 상보성 서열을 포함하는 mRNA 발현을 높은 특이성으로 파괴시킨다. 임의의 질환-원인 유전자 및 임의의 유형의 세포 또는 조직이 잠재적으로 표적이 될 수 있다. 이와 같은 기술은 유전자 기능 분석 및 약물-표적 발견 및 입증에 급속하게 이용되어 왔다. siRNA를 생체내 세포로 도입시키는 것이 여전히 주요한 한계로 남아있기는 하지만, RNAi의 이용은 치료에 대해 상당한 전망을 주고 있다.
- [0518] 완전하게 특징이 확인되지 않았지만, RNAi 기전은 표적 mRNA의 절단을 통하여 이루어진다. RNAi 반응은 RNA 유도된 침묵 복합체(RISC)로 알려진 엔도뉴클라제 복합체가 관련되며, 이 복합체는 siRNA 듀플렉스의 안티센스 가닥에 상보적인 단일가닥 RNA 절단을 중재한다. 표적 RNA의 절단은 siRNA 듀플렉스의 안티센스 가닥에 상보적인 부분의 중간에서 일어난다 (Elbashir, 등, *Genes Dev.* 15:188, 2001).
- [0519] RNAi를 꺼내는 한 가지 방법은 siRNA를 세포로 도입 또는 발현시키는 것이다. 또 다른 방법은 다이서(dicer)라고 불리는 내생성 리보뉴클라제 III 효소를 이용하는 것이다. 다이서의 한 가지 활성은 긴 dsRNA를 siRNA로 처리하는 것이다. Hamilton, 등, *Science* 286:950-951, 1999; Bernstein, 등, *Nature* 409:363, 2001 참고. 다이서



로부터 유도된 siRNA는 일반적으로, 전체 길이가 약 2123개의 뉴클레오티드이며, 듀플렉스된 약 19개 쌍을 가지고 있다. *Hamilton, 등, supra; Elbashir, 등, Genes Dev. 15:188, 2001* 참고. 기존적으로, 긴 dsRNA는 siRNA의 전구물질로 세포에 도입될 수 있다.

[0520] 본 발명은 DILAA2 아미노산 화합물, 지질, 및 자연적 또는 합성 폴리머를 포함하는 다양한 성분들과 복합된, 조절 RNA, 간섭 핵산 또는 이의 전구물질을 포함하는 조성물, 제제 및 방법을 제공한다.

[0521] 용어 "dsRNA"는 여기에서 사용된 것과 같이, 예를 들면, 서열 특이적인 방식으로 RNA 간섭("RNAi" 또는 "iRNA") 또는 유전자 침묵을 촉진시켜, 유전자 발현을 억제 또는 하향 조절할 수 있는 임의의 이중가닥 RNA 분자를 말한다. 본 내용의 dsRNA는 다이버(Dicer) 또는 RNAi에 의한 유전자 침묵을 조절시키기 위하여 RISC와의 연합에 적절한 기질이 될 수 있다. dsRNA의 한 가닥 또는 양가닥은 5'-포스페이트 또는 5', 3'-디포스페이트와 같은 말단 포스페이트 기를 추가로 포함할 수 있다. 여기에서 사용된 것과 같이, 최소한 하나의 리보뉴클레오티드에 추가하여, dsRNA 분자는 치환체, 화학적으로 변형된 뉴클레오티드, 및 비-뉴클레오티드를 추가로 포함할 수 있다.

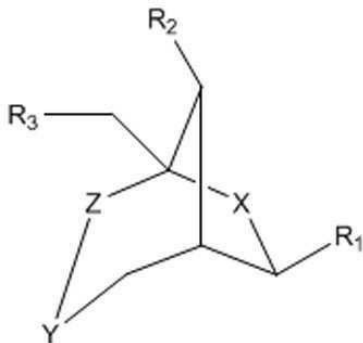
[0522] dsRNA 분자의 예들은 예를 들면, 미국 특허 출원번호 11/681,725, 미국 특허번호 7,022,828 및 7,034,009, 및 PCT 국제 출원 공개번호 WO/2003/070897에서 찾아볼 수 있다.

[0523] 본 내용의 핵산 물질의 예들은 PCT 국제 출원 공개번호 WO 2008/147824에서 설명된 하나 이상의 비환식 모노머를 포함할 수 있다. 비환식 모노머의 예로는 WO 2008/147824의 도 1 및 2에서 보여준 모노머 D 내지 K를 포함한다.

[0524] 본 내용의 활성제의 예는 WO 2008/147824의 비환식 모노머를 포함하는 핵산 분자를 포함한다.

[0525] 본 내용의 활성제의 예로는 UsiRNA를 포함한다. UsiRNA는 UNA를 함유하는 siRNA이며, 이때 UNA는 "잠금해제된 핵염기 유사체(unlocked nucleobase analogue)" 다. WO 2008/147824의 비환식 모노머 D 내지 J가 UNA의 예가 된다.

[0526] 변형된 뉴클레오시드의 예들은 미국 특허번호 6,403,566, 6,509,320, 6,479,463, 6,191,266, 6,083,482, 5,712,378, 및 5,681,940에서 볼 수 있다. 변형된 뉴클레오시드는 다음의 구조를 가질 수 있다;



[0527]

[0528] 이때, X는 O 또는 CH<sub>2</sub>이며, Y는 O이며, 및 Z는 CH<sub>2</sub>이고; R<sub>1</sub>은 아데닌, 시토신, 구아닌, 하이포산틴, 우라실, 티민, 및 헤테로사이클의 기로부터 선택되며, 이때 헤테로사이클은 치환된 1,3-디아진, 치환안된 1,3-디아진, 및 치환안된 7H 이미다조[4,5]1,3 디아진 군으로부터 선택되며; 그리고 R<sub>2</sub> 및 R<sub>3</sub>는 독립적으로 H, OH, DMTO, TBDMSO, BnO, THPO, AcO, BzO, OP(NiPr<sub>2</sub>)O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CN, OPO<sub>3</sub> H, 디포스페이트, 및 트리포스페이트 기로부터 선택되며, 이때 R<sub>2</sub> 및 R<sub>3</sub>는 함께 PhCHO<sub>2</sub>, TIPDSO<sub>2</sub> 또는 DTBSO<sub>2</sub>가 될 수도 있다. 여기에서 사용된 것과 같이, 약어 "Ac"는 아세틸을 말하며; "Bn"은 벤질을 나타내며; "Bz"는 벤조일을 나타내며; "DMT"는 디메톡시트리틸을 나타내며; "THP"는 테트라하이드로피라닐을 나타내며; "TBDMS"는 t-부틸디메틸실일을 나타내며; "TIPDS"는 테트라이소프로필디실일을 나타내며; 그리고 "DTBS"는 디(t-부틸)실일을 나타낸다.

[0529] 또한, 여기에서 사용된 것과 같이, "dsRNA," "RNAi 유도성 물질" 그리고 "RNAi-물질"은 메로듀플렉스 RNA (mdrRNA), nicked dsRNA (ndsRNA), gapped dsRNA (gdsRNA), 짧은 간섭 핵산 (siRNA), siRNA, microRNA (miRNA), 단일 가닥 RNA, 짧은 헤어핀 RNA (shRNA), 짧은 간섭 올리고뉴클레오티드, 짧은 간섭 치환된 올리고뉴클레오티드, 짧은 간섭 변형된 올리고뉴클레오티드, 화학적으로 변형된 dsRNA, 및 전사후 유전자 침묵 RNA (ptgsRNA), 뿐만 아니라 상기 것들중 임의의 전구물질을 포함하는 서열 특이적 RNAi를 중재할 수 있는 핵산 분자를 설명하는 다른 용어와 동의어이다.

- [0530] 용어 "큰 이중가닥(ds) RNA"는 약 40bp 내지 약 100또는 그 이상의, 특히 최대 약 300내지 약 500 bp 긴 임의의 이중가닥 RNA를 말한다. 큰 dsRNA의 서열은 mRNA의 단편 또는 전체 mRNA를 나타낼 수 있다. 이중가닥 구조는 자가-상보적인 핵산 분자에 의해 형성되거나 또는 두 개 이상의 별개의 상보적인 핵산 분자 가닥들의 어닐링에 의해 형성될 수 있다.
- [0531] 일부 측면에서, dsRNA는 제 1 가닥 (안티센스) 및 제 2 가닥 (센스)을 포함하는 두 개의 별도 올리고뉴클레오타이드를 포함하며, 이때 안티센스 및 센스 가닥들은 자가-상보적(가령, 각 가닥은 다른 가닥에 있는 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 가지고, 두 개의 별개 가닥은 듀플렉스 또는 이중 가닥 구조를 형성하고, 이중 가닥 부분은 약 15개 내지 약 24개 염기쌍 또는 약 26개 내지 약 40개 염기쌍이 된다)이며; 안티센스 가닥은 표적 핵산 분자의 뉴클레오타이드 서열(가령, 인간 mRNA) 또는 이의 일부분에 상보적인 핵산 서열을 포함하고; 센스 가닥은 표적 핵산 서열 또는 이의 일부분에 대응하는(가령, 상동성) 뉴클레오타이드 서열을 포함한다(가령, 약 15개 내지 약 25개 뉴클레오타이드 또는 약 26개 내지 약 40 개뉴클레오타이드의 센스 가닥은 표적 핵산 또는 이의 일부분에 대응한다).
- [0532] 일부 구체예들에서, dsRNA는 단일 올리고뉴클레오타이드로부터 어셈블리될 수 있는데, dsRNA의 자가-상보적인 센스 및 안티센스 가닥은 핵산 기반-링커 또는 비-핵산-기반 링커에 의해 서로 연결된다. 일부 구체예들에서, dsRNA 분자의 제 1(안티센스) 및 제 2 (센스) 가닥은 여기에서 설명된, 및 당분야에 공지된 뉴클레오타이드 또는 비-뉴클레오타이드 링커에 의해 공유적으로 연결된다. 일부 구체예들에서, 제 1 dsRNA 분자는 당분야에 공지된 뉴클레오타이드 또는 비-뉴클레오타이드 링커에 의해 최소한 하나의 제 2 dsRNA 분자에 공유적으로 연결되며, 이때 제 1 dsRNA 분자는 동일하거나 또는 상이한 다수의 다른 dsRNA 분자 또는 이들의 임의의 조합에 연결될 수 있다. 일부 구체예들에서, 연결된 dsRNA는 연결된 dsRNA와 메로듀플렉스(meroduplex)를 형성하는 제 3 가닥을 포함할 수 있다.
- [0533] 일부 측면에서, 여기에서 설명된 dsRNA 분자는 예를 들면, 'A' (제 1 또는 안티센스) 가닥, 'S1' (제 2) 가닥, 및 'S2' (제 3) 가닥과 같은, 세 개 이상의 가닥을 가지는 메로듀플렉스 RNA (mdRNA)를 형성하는데, 이때 'S1' 및 'S2' 가닥은 'A' 가닥에 상보적이며, 'A' 가닥의 넌-오버랩 부분과 염기쌍(bp)을 형성할 수 있다(가령, mdRNA는 A:S1S2 형태를 가질 수 있다). S1, S2, 또는 더 많은 가닥들이 함께 기본적으로 'A' 가닥에 대해 센스 가닥을 포함한다. 'S1' 과 'A' 가닥의 어닐링에 의해 형성된 이중 가닥 부분은 'S2' 와 'A' 가닥의 어닐링에 의해 형성된 이중 가닥 부분과 구별되며, 및 오버랩되지 않는다. mdRNA 분자는 "gapped" 분자를 말하며, "gap"은 0개 뉴클레오타이드에서부터 최대 약 10개 뉴클레오타이드 범위를 말한다. 일부 구체예들에서, A:S1 듀플렉스는 A:S1 듀플렉스와 A:S2 듀플렉스 사이에 위치한 'A' 가닥에 최소한 한 개의 염기쌍(최대 약 10개의 쌍을 이루지 않는 뉴클레오타이드)도 이루지 않은 뉴클레오타이드로 인하여 생성된 갭으로 인하여 A:S2 듀플렉스로부터 분리되며, 및 하나 이상의 'A', 'S1', 또는 'S2' 가닥의 3' 말단에서 임의의 하나 이상의 쌍을 이루지 않은 뉴클레오타이드와 구별된다. 일부 구체예들에서, A:S1 듀플렉스는 A:S1 듀플렉스와 A:S2 듀플렉스 사이에 0개 뉴클레오타이드 갭(가령, 니크(nick), 폴리뉴클레오타이드 분자에서 두 개 뉴클레오타이드 사이에 유일하게 하나의 포스포디에스테르 결합이 파괴되거나 또는 분실됨)에 의해 A:B2 듀플렉스로부터 구별되는데-이것을 니크된 dsRNA (ndsRNA)라고 부른다. 예를 들면, A:S1S2는 약 14개 bp 내지 약 40개 bp가 복합된 최소한 두 개의 이중가닥 부분을 가지는 dsRNA로 구성될 수 있고, 이중 가닥 부분은 선택적으로 블런트 엔드를 가지는 약 0개 내지 약 10개 뉴클레오타이드의 갭에 의해 분리되어 있거나, 또는 A:S1S2는 최대 10개 뉴클레오타이드에 의해 분리된 최소한 두 개의 이중 가닥 부분을 가진 dsRNA를 포함하며, 이때 이중 가닥 부분중 최소한 하나는 약 5개 염기쌍 내지 13개 염기쌍을 포함한다.
- [0534] 여기에서 설명된 것과 같이, 세 개 이상 가닥을 포함하는 dsRNA 분자는 "메로듀플렉스" RNA (mdRNA)로 지칭될 수 있다. mdRNA 분자의 예들은 미국 가특허 출원 60/934,930 및 60/973,398에서 찾아볼 수 있다.
- [0535] dsRNA 또는 큰 dsRNA는 포스페이트 기본골격 결합, 당, 염기 또는 뉴클레오시드에서 치환 또는 변형이 있는, 치환 또는 변형을 포함할 수 있다. 이와 같은 뉴클레오시드 치환은 자연적 비-표준 뉴클레오시드 (가령, 5-메틸우리딘 또는 5-메틸시티딘 또는 2-티오우리보티미딘)을 포함할 수 있고, 및 이와 같은 기본 골격, 당 또는 뉴클레오시드 변형은 알킬 또는 메틸, 알콕시알킬, 할로젠, 질소 또는 황 또는 당분야에 공지된 기타 변형과 같은 이중원자 치환 또는 추가를 포함할 수 있다.
- [0536] 또한, 여기에서 사용된 것과 같이, "RNAi"는 전사후 유전자 침묵, 전사 억제 또는 후성유전학(epigenetics)과 같은 서열 특이적 RNA 간섭을 설명하는 다른 용어와 등가의 의미다. 예를 들면, 본 내용의 dsRNA 분자는 전사후 수준 또는 전사 전 수준 또는 이의 임의의 복합 수준에서 후성유전학적으로 유전자를 침묵시키는데 이용될



수 있다.

- [0537] 일부 측면에서, 본 발명은 하나 이상의 전달 성분과 함께 하나 이상의 유전자 또는 표적 치료제를 표적으로 하는 하나 이상의 RNAi 유도성 물질들을 포함하는 조성물을 제공한다. 전달 성분의 예로는 DILA2 아미노산 화합물, 지질, 펩티드, 폴리머, 폴리머 지질, 및 이의 콘주게이트를 포함한다.
- [0538] 본 내용의 조성물 및 제제를 이용하여 고유한 포유류 개체들내 세포에게 dsRNA, siRNA, mdRNA, miRNA, shRNA, 또는 RNAi 유도성 벡터와 같은 RNAi 유도성 물질을 전달할 수 있고, 및 배양물에서 이들 물질들을 세포로 전달 하는데 이용될 수도 있다.
- [0539] 본 내용은 포유류의 신체내부에 세포들, 기관들 및 조직들에게 하나 이상의 RNAi 유도성 물질들 또는 엔터티를 전달하는 방법도 제공한다. 일부 측면에서, RNAi 유도성 엔터티를 포함하는 조성물을 다양한 경로를 통하여 신체내로 전달되고, 하나 이상의 기관들 또는 조직들간의 세포에 의해 취입되며, 여기서 표적 전사체의 발현이 조정된다.
- [0540] 일반적으로, 본 내용은 다양한 비정상 프로세스를 특징으로 하는 질환 또는 이상을 예방 및 치료하기 위한 유용한 치료제가 되는 RNAi 유도성 물질들을 포함한다. 예를 들면, 포유류를 감염시키는 바이러스는 숙주 세포의 세포 기전을 조절하여 복제할 수 있다. *Fields Virology (2001)* 참고. 따라서, dsRNA는 바이러스 생산 또는 복제를 조절하는 바이러스 경로를 파괴시키는데 유용하다.
- [0541] 본 내용은 표적 바이러스의 군주에 대하여 광범위한 효능을 가진 하나 이상의 치료요법적 RNAi 유도성 물질들을 이용하여, 개체에서 바이러스성 감염을 치료 또는 예방하는 방법을 포함한다. 본 발명의 RNAi 유도성 물질은 공지의 변이체 군주 또는 바이러스 변이체에서 바이러스 유전자 서열을 표적으로 하고, 이들 변이체에서 표적으로 한 바이러스 유전자의 서열 특이적 유전자 침묵을 나타낸다. 예를 들면, RNAi 유도성 물질은 인플루엔자 바이러스의 계절적 군주 뿐만 아니라, 인플루엔자 변이체 군주를 표적으로 하여, 이들에 대하여 효과를 나타낼 수 있다.
- [0542] 본 내용의 조성물 및 제제를 시험관에서 다양한 세포들에게 약물 또는 생물학적 활성제를 전달하는데 이용할 수 있다. 시험관 절단을 위한 세포의 예로는 A549와 같은 상피 세포, HeLa와 같은 불사화 세포주, HepG2와 같은 간 육종 세포, 9L/LacZ와 같은 쥐 교육종(gliosarcoma) 세포들, THP-1와 같은 인간 단핵세포, Madin-Darby 갓과 신장 세포들 (MDCK), 다양한 섬유아세포주, 및 다양한 혈청 존부하에 배양물에서 1차 세포들을 포함한다.
- [0543] 본 내용의 조성물 및 제제는 생체내에서 다양한 세포들, 조직들 또는 기관들에게 약물 또는 생물학적 활성제를 전달하는데 이용될 수 있다. 생체내 물질 절단을 위한 형태는 국소, 장(enteral) 및 장관의 경로를 포함한다. 생체내 물질 전달을 위한 형태의 예로는 입자들 또는 작은 방울의 흡입, 비강 또는 비인두강 드립, 입자 또는 현탁액의 전달, 경피 및 경점막 경로, 뿐만 아니라 근육내, 피하, 정맥, 동맥, 심장내, 수막강내, 하악골내, 복막내 그리고 경막 경로를 통한 주사 또는 주입을 포함한다.
- [0544] 일부 구체예들에서, 물질은 포유류 개체로부터 유래된 세포들, 조직들 또는 기관들에 직접적인 노출을 통하여 생체의(ex vivo)로 투여될 수 있다.
- [0545] 본 내용의 조성물 또는 제제를 이용하여 전달되는 약물 또는 생물학적으로 활성제는 예를 들면, 정제된 형태, 결정형, 고체형, 나노입자, 응축형, 복합된 형 또는 콘주게이트 형태를 포함하는 임의의 형태가 될 수 있다.
- [0546] 본 발명은 또한 포유류의 신체내 기관들 및 조직들에게 하나 이상의 RNAi 유도성 엔터티를 전달하는 방법도 제공한다. 일부 구체예들에서, RNAi 유도성 엔터티, 하나 이상의 DILA2 아미노산 화합물, 및 하나 이상의 지질 성분을 포함하는 조성물이 다양한 경로를 통하여 신체로 운반되고, 하나 이상의 기관들 또는 조직들 안에 있는 세포에 의해 취입되고, 여기에서 표적 전사체의 발현이 조절된다.
- [0547] 본 내용은 핵산 및 유전자를 침묵시키는 RNA의 치료요법적 전달에 유용한 다양한 DILA2 아미노산 화합물 또는 지질과 함께 약리학적으로 허용가능한 핵산 조성물을 제공한다. 특히, 본 발명은 표적 핵산 서열의 해독 또는 유전자의 발현을 감소, 하향조정 또는 침묵시키기 위한 dsRNA의 시험관 및 생체내 전달을 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 이와 같은 조성물 및 방법들은 포유류에서 질환의 예방 및/또는 치료를 위해 이용될 수 있다. 본 발명의 예시적인 방법에서, siRNA 또는 shRNA와 같은 리보핵산은 DILA2 아미노산 화합물과 접촉되어 조성물을 만들고, 이 조성물은 세포 또는 포유류와 같은 개체로 투여될 수 있다. 일부 구체예들에서, 본 발명은 핵산을 함유하는 조성물을 세포에 접촉시켜 siRNA 또는 shRNA를 세포내부로 전달하는 방법을 제공한다.
- [0548] 예시적인 구체예에서, 본 발명은 핵산 분자의 세포내 전달을 강화시키는 조성물을 만들기 위하여, 이중가닥 RNA

(dsRNA), 짧은 간섭 RNA (siRNA), 또는 짧은 헤어핀 RNA (shRNA)와 같은 핵산 분자를 DILA2 아미노산 화합물 및 폴리머 지질과 혼합 또는 복합시킨, 조성물을 포함한다. 일부 구체예들에서, 본 발명의 전달 조성물은 dsRNA 및, 하나, 둘 또는 그 이상의, 양이온 또는 양이온이 아닌 DILA2 아미노산 화합물을 포함할 수 있다. 일부 변이에서, 전달 조성물은 dsRNA, DILA2 아미노산 화합물, 및 하나 이상의 폴리머 지질을 포함할 수 있다. 일부 구체예들에서, 전달 조성물은 dsRNA, 하나 이상의 DILA2 아미노산 화합물, 하나 이상의 지질, 및 하나 이상의 폴리머 지질을 포함할 수 있다. 본 발명의 조성물은 간섭 RNA 물질로써 dsRNA를 결합시키는 적합한 입자를 만들 수 있다. 본 발명의 조성물 및 제제는 전달을 강화시키는 성분 또는 부형제를 추가로 포함할 수 있다.

[0549] 일부 구체예들에서, 본 발명의 조성물은 약 5 nm 내지 약 400 nm 직경을 가지는 적합한 RNA를 함유하는 입자들을 포함한다. 일부 구체예들에서, 입자들은 약 10 nm 내지 약 300 nm 범위의 균일한 직경을 가질 수 있다. 일부 구체예들에서, 입자들은 약 50 nm 내지 약 150 nm 범위의 균일한 직경을 가질 수 있다.

[0550] 본 발명의 예시적인 조성물 범위내에서, 이중가닥 RNA는 DILA2 아미노산 화합물과 혼합 또는 복합되어, 네이키드 dsRNA가 표적 세포와 접촉한 경우와 비교하였을 때, dsRNA의 세포내 전달을 강화시키는 조성물을 만들 수 있다.

[0551] 일부 구체예들에서, 본 발명의 조성물은 DILA2 아미노산 화합물 및 지질, 및 임의의 폴리머 성분을 포함하지만, RNA 성분은 포함하지 않은, 전달을 강화시키는 성분(존재한다면)의 총량의 약 0.5% 내지 약 70% (mol%)의 하나 이상의 DILA2 아미노산 화합물을 포함할 수 있다. 일부 구체예들에서, 본 발명의 조성물은 약 10% 내지 약 55% 범위의 하나 이상의 DILA2 아미노산 화합물을 포함할 수 있다. 일부 구체예들에서, 본 발명의 조성물은 약 15% 내지 약 35%의 하나 이상의 DILA2 아미노산 화합물을 포함할 수 있다.

[0552] 특정 구체예들에서, 본 발명의 조성물은 하나 이상의 비-양이온 지질을 포함할 수 있는데, 이때 비-양이온 지질은 DILA2 아미노산 화합물 및 지질, 및 임의의 폴리머 성분을 포함하지만, RNA 성분은 포함하지 않은, 전달을 강화시키는 성분(존재한다면)의 총량의 약 2% 내지 약 95% (mol%) 범위가 된다. 일부 구체예들에서, 본 발명의 조성물은 약 20% 내지 약 75%, 또는 약 45% 내지 약 75%, 또는 약 45% 내지 약 55%의 하나 이상의 비-양이온 지질을 포함할 수 있다. 일부 구체예들에서, 본 발명의 조성물은 약 10% 내지 약 50%의 하나 이상의 비-양이온 지질을 포함할 수 있다.

[0553] 일부 구체예들에서, 본 발명의 조성물은 하나 이상의 폴리머 지질을 포함할 수 있는데, 이때 폴리머 지질은 DILA2 아미노산 화합물 및 지질, 및 임의의 폴리머 성분을 포함하지만, RNA 성분은 포함하지 않은, 전달을 강화시키는 성분(존재한다면)의 총량의 약 0.2% 내지 약 20% (mol%) 범위가 된다. 일부 구체예들에서, 본 발명의 조성물은 약 0.5% 내지 약 10% 범위의 하나 이상의 폴리머 지질을 포함할 수 있다. 일부 구체예들에서, 본 발명의 조성물은 조성물의 약 1% 내지 약 5% 범위의 하나 이상의 폴리머 지질을 포함할 수 있다.

[0554] 핵산 치료요법제용 조성물 및 용도

[0555] 일부 구체예들에서, 본 발명은 포유류 개체에서 질환 또는 질병을 치료하는 방법을 제공한다. 간섭 RNA, DILA2 아미노산 화합물, 비-양이온 지질, 폴리머 지질, 및 하나 이상의 전달을 강화시키는 성분 또는 부형제를 포함하는 본 발명의 조성물의 치료요법적 유효량을 유전자의 발현 또는 과다발현과 연관된 질환 또는 장애를 가진 환자에게 투여하여, 투여된 조성물에 의해 유전자의 발현이 감소, 축소, 하향조절 또는 침묵될 수 있다.

[0556] 본 발명은 조성물의 치료요법적 유효량을 개체에게 투여하여, 호흡 곤란, 천식, 낭포성 섬유증, 폐 섬유증, 만성 폐쇄성 폐 질환, 기관지염 또는 폐기종과 같은 폐 질환 치료 방법을 포함한다.

[0557] 본 발명은 암, 방광암, 간암, 간 질환, 파골레스테롤혈증, 염증성 질환, 대사 질환, 염증, 관절염, 류마티스성 관절염, 뇌염, 뼈 골절, 심장 질환, 바이러스성 질환, 간염, 및 인플루엔자를 포함하는 질환 치료를 위한 방법을 포함한다.

[0558] 리포솜을 만드는 방법은 예를 들면, *G. Gregoriadis, Liposome Technology (CRC Press 1984)*, 및 *M. J. Ostro, Liposome (Marcel Dekker 1987)*에서 제공된다.

[0559] 핵산 성분, DILA2 아미노산 화합물, 및 기타 성분을 세포 배양 배지와 같은 적절한 배지에서 우선 함께 혼합하고, 그 다음 하나 이상의 지질 또는 화합물을 혼합물에 추가할 수 있다. 대안으로, DILA2 아미노산 화합물을 세포 배양 배지와 같은 적절한 배지에서 우선 함께 혼합하고, 그 다음 핵산 성분을 첨가할 수 있다.

[0560] 본 발명의 특정 구체예들 내에서, dsRNA는 하나 이상의 DILA2 아미노산 화합물, 또는 하나 이상의 DILA2 아미노

산 화합물과 비-양이온 지질의 복합물과 혼합된다.

- [0561] 간접 RNA 물질은 DILA2 아미노산 화합물 또는 폴리머 지질과 복합되거나 또는 콘주게이트되고, 및 하나 이상의 비-양이온 지질, 또는 하나 이상의 비-양이온 및 양이온 지질 복합물과 혼합될 수도 있다.
- [0562] 간접 RNA 물질 및 DILA2 아미노산 화합물을 우선 함께 혼합하고, 세포 배양 배지와 같은 적절한 배지에 첨가된 하나 이상의 비-양이온 지질, 또는 비-양이온 및 양이온 지질의 복합물을 첨가한다. 대안으로, DILA2 아미노산 화합물 및 지질 성분을 우선 혼합하고, 적절한 배지안에 첨가된 RNA 물질을 추가시킬 수 있다.
- [0563] 일부 구체예들에서, 본 내용은 약물 또는 활성제의 세포내 전달을 제공하는 조성물을 만들기 위하여, DILA2 아미노산 화합물 및 분산제와 혼합 또는 복합된 약물 또는 활성제를 포함하는 미셀라 분산 조성물을 포함한다.
- [0564] 특정 구체예들에서, 본 내용의 분산 조성물은 하나 이상의 약물 또는 활성제, 하나 이상의 DILA2 아미노산 화합물, 및 하나 이상의 분산제를 포함할 수 있다. 일부 변이에서, 전달 조성물은 약물 또는 활성제, 분산제, DILA2 아미노산 화합물, 및 선택적 폴리머 지질을 포함할 수 있다. 본 내용의 분산 조성물은 약물 또는 활성제를 결합시킬 수 있는 적절한 입자들을 형성할 수 있다.
- [0565] 일부 측면에서, 본 내용의 분산 조성물은 약 5 nm 내지 약 400 nm 범위의 직경을 가진 적합한 핵산 분산 입자들을 포함할 수 있다. 일부 구체예들에서, 입자들은 약 10 nm 내지 약 300 nm 범위의 균일한 직경을 가질 수 있다. 일부 구체예들에서, 입자들은 약 50 nm 내지 약 150 nm 범위의 균일한 직경을 가질 수 있다.
- [0566] 미셀라(micellar) 분산을 이용하여 RNAi 치료요법제를 포함하는 약물 또는 활성제를 조제하고, 및 이들의 생체 이용성을 개선시킬 수 있다. 미셀라 분산은 소수성 오일-유사 코어를 가지는 분산 방울 또는 나노입자들을 제공할 수 있다. 분산 나노입자들은 연속 수용성 상에 현탁될 수 있다. 분산 구조는 활성제의 전달을 위한 리포솜 구조 사용에 있어서 고유한 약간의 단점들을 회피할 수 있고, 및 친유성 코어로 인하여 전달에 이점을 제공할 수 있다.
- [0567] 본 내용은 RNA 물질들의 전달 및 투여용으로 DILA2 아미노산 화합물 또는 약물 또는 약제 약제용 지질 및 분산제를 포함하는 미셀라 분산 조성물을 제공한다.
- [0568] 분산제의 예로는 폴리글리콜화된 카프릴 글리세리드와 같은 폴리옥시글리세리드, 에톡시 디글리콜, 폐길화된 지방 글리세리드, 디에틸렌 글리콜 모노에틸 에테르, 및 이의 혼합물을 포함하는 합성 화합물을 포함한다. 분산제의 예로는 LABRAFIL, LABRASOL, ARLATONE, TRANSCUTOL, 및 이의 혼합물들을 포함한다. 분산제의 예로는 알킬포스포-N-메틸에탄올아민 및 알코일사르코신과 같은 합성 화합물을 포함한다. 분산제의 예로는 FOS-MEA 및 CRODASINIC를 포함한다.
- [0569] 일부 구체예들에서, 본 내용의 전달 조성물은 약물 또는 활성제, 하나 이상의 오일, 하나 이상의 DILA2 아미노산 화합물, 및 유화제 및 안정화제 지질을 포함할 수 있다. 일부 변이에서, 전달 조성물은 약물 또는 활성제, 오일, 지질 유화제, DILA2 아미노산 화합물, 비-양이온 지질, 및 폴리머 지질을 포함할 수 있다.
- [0570] 본 내용의 조성물은 약물 또는 활성제를 결합시킬 수 있는 적합한 입자들을 만들 수 있다. 일부 측면에서, 본 내용의 조성물은 약 5 nm 내지 약 400 nm 범위의 직경을 가지는 약물 또는 활성제 유상액 입자들을 포함한다. 일부 구체예들에서, 입자들은 약 10 nm 내지 약 300 nm 범위의 균일한 직경을 가질 수 있다. 일부 구체예들에서, 입자들은 약 50 nm 내지 약 150 nm 범위의 균일한 직경을 가질 수 있다.
- [0571] 일부 구체예들에서, 약물 또는 활성제는 오일, 유화제, DILA2 아미노산 화합물, 및 폴리머 안정화 지질과 혼합 또는 복합되어, 약물 또는 활성제의 세포내 전달을 강화시키는 조성물을 만들 수 있다.
- [0572] 수중유(oil-in-water) 유상액을 이용하여 RNAi 치료요법제를 포함하는 약물 또는 활성제를 만들고, 이들의 생체 이용성을 개선시킬 수 있다.
- [0573] 수중유 유상액은 소수성 오일 코어를 둘러싼 DILA2 아미노산 화합물 또는 지질 층을 가지는 유상액 방울 또는 나노입자들을 제공할 수 있다. 유상액 방울 또는 나노입자들은 연속 수용성 상에 현탁될 수 있다. 유상액 구조는 활성제의 전달을 위한 리포솜 구조 사용에 있어서 고유한 약간의 단점들을 회피할 수 있고, 및 친유성 코어로 인하여 전달에 이점을 제공할 수 있다.
- [0574] 간접-RNA 물질들과 함께 오일, 유화제, DILA2 아미노산 화합물 그리고 지질 성분의 신규한 조성물 및 용도를 포함하는 일련의 신규한 유상액 조성물들이 본 내용에서 제공된다.

- [0575] 오일의 예로는 합성 오일, 프로필렌 글리콜의 지방산 에스테르, 에틸렌 글리콜의 에스테르, 글리세릴 오일, 콜레스테릴 오일, 식물성 오일, 견과류, 필수 오일, 미네랄 오일, 지질-가용성 화합물 가령, 토코페롤 및 비타민 E, 및 이의 혼합물을 포함한다. 오일의 예로는 CAPRYOL 90 (프로필렌 글리콜 모노에스테르), CAPRYOL PGMC (프로필렌 글리콜 모노에스테르), LABRAFAC PC (프로필렌 글리콜 모노에스테르), LABRAFAC PG (프로필렌 글리콜 디에스테르), LAURO글리콜 90 (프로필렌 글리콜 모노에스테르), LAURO글리콜 FCC (프로필렌 글리콜 모노에스테르), PLUROL OLEIQUE CC 497 (프로필렌 글리콜 모노에스테르), LABRAFAC LIPOPHILE WL 1349 (트리글리세리드), PECEOL (글리세릴 모노에스테르), MAISINE 35-1 (글리세릴 모노에스테르), 및 이들의 혼합물과 같은 합성 오일을 포함한다.
- [0576] RNA 치료요법제를 위한 조성물 및 방법
- [0577] 본 발명은 RNA 간섭에 의해 조절 RNA를 이용하여 유전자 발현을 조절하는 조성물 및 방법을 제공한다. 본 발명의 조성물은 RNAi의 반응을 생성시킬 수 있는 리보핵산 물질을 세포로 전달할 수 있다. 본 발명에 유용한 핵산 물질의 예로는 이중 가닥 핵산, 변형된 또는 분해-저항성 핵산, RNA, siRNA, siRNA, shRNA, miRNA, piRNA, RNA 길항제, 단일가닥 핵산, DNARNNA 키메라, 안티센스 핵산, 및 리보자임을 포함한다. 여기에서 사용된 것과 같이, siRNA, siRNA, 및 shRNA 용어들은 차례로 siRNA, siRNA, 및 shRNA의 전구물질을 포함한다. 예를 들면, siRNA는 다이서 효소의 기질로 적합한 RNA 또는 이중가닥 RNA를 포함한다.
- [0578] 본 발명에 유용한 리보핵산 물질들은 다양한 유전자를 표적으로 할 수 있다. 표적으로 적합한 인간 유전자의 예로는 그 중에서도 TNF, FLT1, VEGF 패밀리, ERBB 패밀리, PDGFR 패밀리, BCR-ABL, 및 MAPK 패밀리를 포함한다. 표적으로 적합한 인간 유전자 및 이에 대한 핵산 서열의 예로는 PCT/US08/55333, PCT/US08/55339, PCT/US08/55340, PCT/US08/55341, PCT/US08/55350, PCT/US08/55353, PCT/US08/55356, PCT/US08/55357, PCT/US08/55360, PCT/US08/55362, PCT/US08/55365, PCT/US08/55366, PCT/US08/55369, PCT/US08/55370, PCT/US08/55371, PCT/US08/55372, PCT/US08/55373, PCT/US08/55374, PCT/US08/55375, PCT/US08/55376, PCT/US08/55377, PCT/US08/55378, PCT/US08/55380, PCT/US08/55381, PCT/US08/55382, PCT/US08/55383, PCT/US08/55385, PCT/US08/55386, PCT/US08/55505, PCT/US08/55511, PCT/US08/55515, PCT/US08/55516, PCT/US08/55519, PCT/US08/55524, PCT/US08/55526, PCT/US08/55527, PCT/US08/55532, PCT/US08/55533, PCT/US08/55542, PCT/US08/55548, PCT/US08/55550, PCT/US08/55551, PCT/US08/55554, PCT/US08/55556, PCT/US08/55560, PCT/US08/55563, PCT/US08/55597, PCT/US08/55599, PCT/US08/55601, PCT/US08/55603, PCT/US08/55604, PCT/US08/55606, PCT/US08/55608, PCT/US08/55611, PCT/US08/55612, PCT/US08/55615, PCT/US08/55618, PCT/US08/55622, PCT/US08/55625, PCT/US08/55627, PCT/US08/55631, PCT/US08/55635, PCT/US08/55644, PCT/US08/55649, PCT/US08/55651, PCT/US08/55662, PCT/US08/55672, PCT/US08/55676, PCT/US08/55678, PCT/US08/55695, PCT/US08/55697, PCT/US08/55698, PCT/US08/55701, PCT/US08/55704, PCT/US08/55708, PCT/US08/55709, 및 PCT/US08/55711에서 공개된 것들을 포함한다.
- [0579] 전달되는 본 내용의 RNA는 바이러스성 유전자의 부분에 상보적인 서열을 보유할 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 일부 조성물 및 방법들은 인플루엔자 바이러스의 바이러스 게놈의 발현을 조절하는데 유용하다. 일부 구체예들에서, 본 발명은 RNA 간섭에 의해 인플루엔자의 발현 및 감염 활성을 조절하는 조성물 및 방법을 제공한다. 인플루엔자의 발현 및/또는 활성은 인플루엔자의 RNA 폴리메라제 소단위 부분에 상보적인 서열을 가지는 짧은 간섭 RNA 분자를 세포로 전달함으로써 조절될 수 있다. 인플루엔자 바이러스를 표적으로 하는 RNA의 예는 미국 특허 공개번호 20070213293 A1에서 제시된다.
- [0580] 일부 구체예들에서, 본 발명은 짧은 간섭 올리고뉴클레오타이드 분자, 또는 이의 전구물질과 같은 RNAi 유도성 화합물의 유효량을 포함하는 조성물을 개체에게 투여함으로써, 개체에서 표적 전사체의 발현을 억제하는 조성물 및 방법을 제공한다. RNAi는 메신저 RNA (mRNA)를 표적으로 하고, 해독을 약화시키기 위하여 작은 간섭 RNA(siRNA)를 이용한다. 본 발명에서 이용되는 siRNA는 다이서 프로세싱, 예를 들면, 긴 dsRNA가 siRNA로 프로세싱되는 프로세싱을 위한 전구물질이 될 수 있다. 본 발명은 표적 전사체의 발현 또는 표적 전사체에 의해 인코딩된 펩티드 또는 단백질의 활성과 연관된 질환 또는 이상을 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다.
- [0581] RNAi에 근거한 치료요법적 전략을 이용하여 바이러스 또는 미생물의 성장 또는 기능을 중단시키고, 뿐만 아니라 질환 경로에서 내생성 유전자 산물의 기능을 중단시킴으로써 광범위한 질환을 치료할 수 있다.
- [0582] 일부 구체예들에서, 본 발명은 짧은 간섭 올리고뉴클레오타이드 분자, 및 이의 전구물질과 같은 RNAi 유도성 엔터티를 전달하기 위한 신규한 조성물 및 방법을 제공한다. 특히, 본 발명은 개체의 세포, 조직 및/또는 기관의 하



나 이상의 전사체를 표적으로 하는 RNAi 유도성 엔터티를 포함하는 조성물을 제공한다.

- [0583] siRNA는 길이가 약 19개 뉴클레오타이드의 상보성 부분을 가지는 두 개의 RNA 가닥이 될 수 있다. siRNA는 하나 또는 두 개의 단일 가닥 오버행 또는 루프를 선택적으로 포함한다.
- [0584] shRNA는 자가-상보성 부분을 가지는 단일 RNA 가닥이 될 수 있다. 단일 RNA 가닥은 스템 및 루프를 가지고, 선택적으로 RNA의 5' 및/또는 3'에서 하나 이상의 쌍을 이루지 않는 부분을 가지는 헤어핀 구조를 형성할 수 있다.
- [0585] 활성 치료요법적 물질은 RNAi 활성은 유지하면서, 생체내에서 뉴클레아제 분해에 대한 개선된 저항성, 및/또는 개선된 세포성 취입을 가지도록 화학적으로 변형된 RNA가 될 수 있다.
- [0586] 본 발명의 siRNA 물질은 표적 유전자 부분에 상보적인 서열을 가질 수 있다. 본 발명의 siRNA는 29-50개 염기쌍을 가질 수 있고, 예를 들면, dsRNA는 표적 유전자의 부분에 상보적인 서열을 가질 수 있다. 대안으로, 이중 가닥 핵산은 dsDNA가 될 수 있다.
- [0587] 특정 구체예들에서, 활성제는 유전자 산물의 발현을 조절할 수 있는 짧은 간섭 핵산 (siRNA), 짧은 간섭 RNA (siRNA), 이중 가닥 RNA (dsRNA), micro-RNA, 또는 짧은 헤어핀 RNA (shRNA)가 될 수 있다.
- [0588] 선택된 질환 상태와 관련하여 유전자의 발현이 비정상적으로 증가된 것이 원인적 또는 기여적 인자로 알려진 많은 유전자들중 임의의 것을 포함하는, 개체에서 특정 질환과 연관된 하나 이상의 상이한 유전자의 발현을 표적으로 하는 유사한 방법 및 조성물이 제공된다.
- [0589] 본 발명의 RNAi 유도성 화합물은 질환에 대해 다른 공지의 치료와 함께 투여될 수 있다.
- [0590] 일부 구체예들에서, 본 발명은 전달을 강화시키는 화합물과 혼합된 또는 복합된 또는 콘쥬게이트된 작은 핵산 분자, 가령, 짧은 간섭 핵산, 짧은 간섭 RNA, 이중 가닥 RNA, micro-RNA, 또는 짧은 헤어핀 RNA를 포함하는 조성물을 특징으로 한다.
- [0591] 여기에서 사용된 것과 같이, "조절 RNA," "짧은 간섭 핵산," "siRNA," "짧은 간섭 RNA," "짧은 간섭 올리고뉴클레오타이드 분자" 그리고 "화학적으로-변형된 짧은간섭 핵산 분자"는 서열 특이적인 방식으로 RNA 간섭 (RNAi)을 조절하거나 또는 유전자 침묵시킴으로써 유전자 발현, 예를 들면, 바이러스 복제를 조절, 억제 또는 하향 조절시킬 수 있는 임의의 핵산 분자를 지칭한다. 조절 RNA는 단일 가닥 RNA 길항제를 포함한다.
- [0592] 일부 구체예들에서, siRNA는 자가-상보적인 센스 및 안티센스 부분을 포함하는 이중 가닥 폴리뉴클레오타이드 분자이며, 여기서 안티센스 부분은 발현을 하향 조절하기 위하여 표적 리보핵산 분자의 뉴클레오타이드 서열 또는 이의 일부분에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하며, 및 센스 부분은 표적 리보핵산 서열 또는 이의 일부분에 상응하는(가령, 실질적으로 이에 동일한 서열) 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.
- [0593] 여기에서 사용된 것과 같이, "siRNA"은 상대적으로 짧은 길이의 이중 가닥 핵산, 또는 선택적으로 이의 긴 전구 물질이 되는 작은 간섭 리보핵산을 말한다. 본 발명에서 siRNA의 유용한 길이는 일부 구체예들에서, 대략 20개 내지 50개 bp가 바람직하다. 그러나, siRNA를 포함한 유용한 siRNA의 길이에 특별한 제한은 없다. 예를 들면, siRNA는 siRNA의 최종 또는 프로세스된 형태로 존재하게 되며, 표적 세포로 전달 시 또는 전달 후 유전자 침묵 활성을 발휘하게 되는 것과는 실질적으로 상이한 전구 형태로 세포에 처음 제시될 수 있다. siRNA의 전구 형태는 예를 들면, 유전자 침묵을 조절하기 위하여 세포내에서 활성인 siRNA를 만들기 위하여, 전달될 때 또는 전달된 후에 프로세스되고, 분해되고 또는 절단되는 전구 서열 요소들을 포함한다. 일부 구체예들에서, 유용한 siRNA는 대략 100-200개 염기쌍, 또는 50-100개 염기쌍, 또는 약 50개 미만의 염기쌍 길이를 가진 전구체를 가질 것이며, 이는 표적 세포내에서 활성이 있는, 프로세스된 siRNA를 만들 수 있다. 다른 구체예에서, 유용한 siRNA 또는 siRNA 전구물질은 대략 길이가 대략 10개 내지 49개, 또는 15개 내지 35개, 또는 약 21개 내지 30개가 될 것이다.
- [0594] 본 발명의 특정 구체예들에서, 폴리뉴클레오타이드 전달을 강화시키는 폴리펩티드를 이용하여 siRNA의 큰 핵산 전구물질을 포함하는 핵산 물질의 전달을 실시할 수 있다. 예를 들면, 여기의 방법 및 조성물은 바람직한 siRNA의 "전구물질"이 되는 더 큰 핵산의 전달을 강화시키는데 이용될 수 있으며, 이때 전구물질 아미노산들은 표적 세포로 전달되기 전 또는 후, 또는 전달되는 동안 절단되거나 프로세스되어, 표적 세포내에서 유전자 발현을 조절할 수 있는 활성 siRNA를 만들 수 있다.
- [0595] 예를 들면, dsRNA 전구물질 폴리뉴클레오타이드는 두 개 이상의 루프 구조 및 자가-상보적인 센스 및 안티센스 부

분을 포함하는 줄기를 가지는, 원형의, 단일 가닥의 폴리뉴클레오티드로 선택될 수 있으며, 이때 안티센스 부분은 표적 핵산 분자에서 뉴클레오티드 서열 또는 이의 일부분에 상보적인 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 및 센스 부분은 표적 핵산 서열 또는 이의 일부분에 상응하는 뉴클레오티드 서열을 가지며, 및 이때 원형 폴리뉴클레오티드는 생체내 또는 시험관에서 프로세스되어, RNAi를 유도할 수 있는 활성 dsRNA 분자를 만들 수 있다.

[0596] 본 발명의 siRNA 분자, 특히 비-전구물질 형태는 30개 미만의 염기쌍, 또는 약 17-19개, 또는 19-21개, 또는 21-23개의 염기쌍이 될 수 있다.

[0597] siRNA는 포유류 시스템에서 선택적인 유전자 침묵을 중재할 수 있다. 줄기에서 19 내지 27개 염기쌍을 가진, 짧은 루프의 헤어핀 RNA는 이중 가닥의 줄기에서 서열에 상동성인 유전자들의 발현을 선택적으로 침묵시킨다. 포유류 세포들은 짧은 헤어핀 RNA를 siRNA로 전환시켜 선택적 유전자 침묵을 중재할 수 있다.

[0598] RISC는 siRNA 듀플렉스의 안티센스 가닥에 상보적인 서열을 가지는 단일 가닥의 RNA의 절단을 중재한다. 표적 RNA의 절단은 siRNA 듀플렉스의 안티센스 가닥에 상보적인 부분내에서 일어난다. 두 개의 3'-오버행을 포함할 때, 21개 뉴클레오티드의 siRNA 듀플렉스가 일반적으로 가장 활성이 크다.

[0599] 2개 뉴클레오티드 3'-오버행을 가지는 21-mer siRNA 듀플렉스의 3'-오버행을 데옥시리보뉴클레오티드로 치환시키도 RNAi 활성에 불리한 효과를 가지지 않을 것이다. siRNA의 각 단부에서 최대 4개 뉴클레오티드의 치환은 수용할 수 있을 것이다.

[0600] 대안으로, 단일 또는 다중 siRNA를 인코딩하고, 표적 세포들내에서 이들의 발현을 지시하는 폴리뉴클레오티드 벡터에 의해 발현되는 단일 또는 다중 전사 산물로서 siRNA가 전달될 수 있다. 이와 같은 구체예들에서, 표적 세포내에서 발현되는 siRNA의 최종 전사 산물의 이중 가닥 부분은 예를 들면, 15개 내지 49개 bp, 15개 내지 35개 bp, 또는 약 21개 내지 30개 bp 길이가 될 수 있다.

[0601] 본 발명의 일부 구체예들에서, siRNA에서 두 개 가닥이 쌍을 이루는 이중 가닥 부분은 중배(bulge) 또는 미스매치된 부분 또는 이들 모두를 포함할 수 있다. siRNA에서 두 개 가닥이 쌍을 이루는 이중가닥 부분은 완전하게 쌍을 이루는 뉴클레오티드 단편으로 제한되지 않으며, 및 예를 들면, 미스매치(대응하는 뉴클레오티드가 상보적이지 않음), 중배(한 가닥상에 상응하는 상보 뉴클레오티드가 부족), 또는 오버행으로 인하여 쌍을 이루지 않는 부분들을 포함할 수 있다. 쌍을 이루지 않는 부분은 siRNA 형성을 간섭하지 않을 정도로 포함될 수 있다. 일부 구체예들에서, "중배(bulge)"는 1개 내지 2개의 쌍을 이루지 않는 뉴클레오티드를 포함할 수 있고, 및 siRNA에서 두 개 가닥이 쌍을 이루는 이중 가닥 부분은 약 1개 내지 5개 중배를 포함할 수 있다. 또한, siRNA의 이중 가닥 부분에 포함된 "미스매치" 부분은 약 1개 내지 7개, 또는 약 1개 내지 5개의 수로 제시될 수 있다. 미스매치의 경우 가장 흔하게는, 뉴클레오티드중 하나는 구아닌이며, 다른 하나는 우라실이다. 이와 같은 미스매치는 예를 들면, 센스 RNA를 코딩하는 상응하는 DNA에서 C가 T로, G가 A로의 돌연변이, 또는 이의 혼합 때문이지만, 다른 원인들도 고려할 수 있다.

[0602] 본 발명의 siRNA의 말단 구조는 siRNA가 표적 유전자의 발현을 침묵시키는 이의 활성을 유지하는 한, 블런트 또는 코헤시드(오버행잉)가 될 수 있다. 코헤시드(오버행잉) 말단 구조는 유전자 침묵을 유도하는 이의 활성이 유지되는 한, 3' 오버행잉에 제한되지 않으며, 5'오버행잉 구조를 포함한다. 또한, 오버행잉 뉴클레오티드의 수는 2개 또는 3개 뉴클레오티드에 한정되지 않으며, 전자 침묵을 유도할 수 있는 활성을 보유하는 한, 임의의 수의 뉴클레오티드가 될 수 있다. 예를 들면, 오버행은 1개 내지 약 8개 뉴클레오티드, 또는 2개 내지 4개 뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0603] 오버행 말단 구조를 가지는 siRNA의 길이는 쌍을 이룬 듀플렉스 부분 및 각 말단에 있는 임의의 오버행잉 부분으로 표현될 수 있다. 예를 들면, 2-bp의 3' 안티센스 오버행을 가진 25/27-mer siRNA 듀플렉스는 25-mer 센스 가닥 및 27-mer 안티센스 가닥을 가지며, 이때 쌍을 이룬 부분은 25개 bp 길이를 가진다.

[0604] 임의의 오버행 서열은 표적 유전자에 대해 낮은 특이성을 가질 수 있으며, 및 표적 유전자 서열에 상보적(안티센스)이거나 동일(센스)하지 않을 수 있다. siRNA가 유전자 침묵에 대한 활성을 보유하는 한, 오버행 부분에 낮은 분자량의 구조를 포함할 수 있는데, 예를 들면, tRNA, rRNA, 바이러스성 RNA와 같은 자연적 RNA 분자, 또는 인위적 RNA 분자를 포함할 수 있다.

[0605] siRNA의 말단 구조는 줄기-루프 구조를 가질 수 있는데, 이중 가닥 핵산의 한 측면 말단은 링커핵산, 예를 들면, 링커 RNA와 같은 링커 핵산에 의해 연결된다. 이중가닥 부분(줄기 부분)의 길이는 예를 들면, 15개 내지 49개 bp, 또는 15개 내지 35개 bp, 또는 약 21개 내지 30개 bp 길이가 될 수 있다. 대안으로, 표적 세포에서 발현되는 siRNA의 최종 전사 산물이 되는 이중 가닥 부분의 길이는 예를 들면, 대략 15개 내지 49개 bp, 또는 15



개 내지 35개 bp, 또는 약 21개 내지 30개 bp 길이가 될 수 있다.

- [0606] siRNA는 표적 핵산 분자, 또는 이의 일부분에서 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 가지는 단일 가닥의 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있으며, 이때 단일 가닥의 폴리뉴클레오타이드는 5'-포스페이트 (참조: Martinez, 등, *Cell*. 110:563-574, 2002, 및 Schwarz, et, *Molecular Cell* 10:537-568, 2002) 또는 5',3'-디포스페이트와 같은 말단 포스페이트를 포함할 수 있다.
- [0607] 여기에서 사용된 것과 같이, siRNA는 자연적으로 생성되는 RNA 또는 DNA만을 포함하는 분자에 한정되지 않으며, 화학적으로-변형된 뉴클레오타이드 및 비-뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 일부 구체예들에서, 본 발명의 짧은 간섭 핵산 분자는 2'-하이드록시 (2'-OH)를 포함하는 뉴클레오타이드가 없다. 일부 구체예들에서, 짧은 간섭 핵산은 RNAi를 중재하기 위하여 2'-하이드록시 기를 가지는 뉴클레오타이드의 존재를 요구하지 않으며, 따라서, 본 발명의 짧은 간섭 핵산 분자는 임의의 리보뉴클레오타이드(가령, 2'-OH 기를 가지는 뉴클레오타이드)를 선택적으로 포함하지 않는다. 그러나, RNAi를 지원하기 위하여 siRNA 분자내에 리보뉴클레오타이드 존재를 요구하지 않는 siRNA는 2'-OH 기를 가진 하나 이상의 뉴클레오타이드를 포함하는 부착된 링커(들) 또는 다른 부착된 또는 연합된 기, 모이어티 또는 쇄를 가질 수 있다. siRNA 분자는 뉴클레오타이드 부분의 최소한 약 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 또는 50%에서 리보뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.
- [0608] 여기에서 사용된 것과 같이, siRNA는 그중에서도 예를 들면, 짧은 간섭 RNA (siRNA) 분자, 이중 가닥 RNA (dsRNA) 분자, micro-RNA 분자, 짧은 헤어핀 RNA (shRNA) 분자, 짧은 간섭 올리고뉴클레오타이드 분자, 짧은 간섭 핵산 분자, 짧은 간섭 변형된 올리고뉴클레오타이드 분자, 화학적으로 변형된 siRNA 분자, 및 전사후 유전자를 침묵시키는 RNA (ptgsRNA) 분자와 같은 서열 특이적 RNAi를 중재시킬 수 있는 핵산 분자를 포함한다.
- [0609] 일부 구체예들에서, siRNA 분자는 별도의 센스 및 안티센스 서열 또는 부분을 포함하는데, 이때 센스 및 안티센스 부분은 뉴클레오타이드 또는 비-뉴클레오타이드 링커분자에 의해 공유적으로 연결되거나, 또는 이온 상호작용, 수소 결합, 반데르발스 상호작용, 소수성 상호작용, 및/또는 적층(stackings) 상호작용에 의해 비-공유적으로 연결된다.
- [0610] "안티센스 RNA"는 표적 유전자 mRNA에 상보적인 서열을 가지는 RNA 가닥이며, 표적 유전자 mRNA에 결합함으로써 RNAi를 유도할 수 있다.
- [0611] "센스 RNA"는 안티센스 RNA에 상보적인 서열을 가지고, 이의 상보적인 안티센스 RNA에 어닐되어, siRNA를 형성하는 RNA 가닥이다.
- [0612] 여기에서 사용된 것과 같이, "RNAi 구조체" 또는 "RNAi 전구물질"은 작은 간섭 RNA (siRNA), 헤어핀 RNA, 및 생체내에서 절단되어 siRNA를 형성할 수 있는 다른 RNA 종들과 같은 RNAi 유도할 수 있는 화합물을 말한다. 여기에서 RNAi 전구물질은 또한 세포내에서 dsRNA 또는 헤어핀 RNA를 형성하는 전사체, 및/또는 생체내에서 siRNA를 생산할 수 있는 전사체를 발생시킬 수 있는 발현 벡터(RNAi 발현 벡터라고 부르기도 함)를 포함한다.
- [0613] siHybrid 분자는 siRNA와 유사한 기능을 하는 이중 가닥 핵산이다. 이중 가닥 RNA 분자 대신, siHybrid는 RNA 가닥 및 DNA 가닥으로 구성된다. 바람직하게는, RNA 가닥은 표적 mRNA에 결합하는 안티센스 가닥이다. DNA 및 RNA 가닥의 하이브리드에 의해 만들어진 siHybrid는 하이브리드된 상보적인 부분을 가지고, 바람직하게는 최소한 하나의 3' 오버행잉 말단을 가진다.
- [0614] 본 발명내에서 이용되는 siRNA는 두 개의 별도 올리고뉴클레오타이드로부터 어셈블리될 수 있는데, 이때 한 가닥은 센스 가닥이며, 다른 가닥은 안티센스 가닥이고, 안티센스 및 센스 가닥은 자가-상보적이다(가령, 각 가닥은 다른 가닥에 있는 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하며; 이렇게 하여, 안티센스 가닥과 센스 가닥은 예를 들면, 듀플렉스 또는 이중 가닥의 구조를 형성하고, 이때 이중 가닥의 부분은 약 19개 염기쌍이 된다). 안티센스 가닥은 표적 핵산 분자 또는 이의 부분에서 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있고, 및 센스 가닥은 표적 핵산 서열 또는 이의 부분에 상응하는 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다. 대안으로, siRNA는 단일 올리고뉴클레오타이드로부터 어셈블리될 수 있으며, 이때 siRNA의 자가-상보적인 센스 및 안티센스 부분은 핵산-기반 또는 비-핵산-기반 링커에 의해 연결된다.
- [0615] 일부 구체예들에서, 세포내 전달을 위한 siRNA는 자가-상보적인 센스 및 안티센스 부분을 가지는 듀플렉스, 비대칭 듀플렉스, 헤어핀 또는 비대칭 헤어핀 2차 구조의 폴리뉴클레오타이드가 될 수 있으며, 이때 안티센스 부분은 별도의 표적 핵산 분자 또는 이의 부분에서 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있고, 및 센스 부분은 표적 핵산 서열 또는 이의 부분에 상응하는 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다.

- [0616] siRNA에서 만들 수 있는 화학적 변형의 예로는 포스포로티오에이트 인터뉴클레오티드 링키지, 2'-데옥시리보뉴클레오티드, 2'-O-메틸 리보뉴클레오티드, 2'-데옥시-2'-플루오르 리보뉴클레오티드, "공통(universal) 염기" 뉴클레오티드, "비환식(acyclic)" 뉴클레오티드, 5-C-메틸 뉴클레오티드, 및 말단 글리세릴 및/또는 역전된 데옥시 무염기(abasic) 잔기 통합을 포함한다.
- [0617] siRNA 분자의 안티센스 부분은 이 안티센스 부분의 3'-말단에서 포스포로티오에이트 인터뉴클레오티드 링키지를 포함할 수 있다. 안티센스 부분은 이 안티센스 부분의 5'-말단에서 약 1개 내지 약 5개의 포스포로티오에이트 인터뉴클레오티드 링키지를 포함할 수 있다. siRNA 분자의 3'-말단 뉴클레오티드 오버행은 핵산 당, 염기 또는 기본 골격에서 화학적으로 변형된 리보뉴클레오티드 또는 데옥시리보뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 3'-말단 뉴클레오티드 오버행은 하나 이상의 공통 염기 리보뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 3'-말단 뉴클레오티드 오버행은 하나 이상의 비환식 뉴클레오티드를 포함할 수 있다.
- [0618] 예를 들면, 화학적으로-변형된 siRNA는 한 가닥에서 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 또는 그 이상의 포스포로티오에이트 인터뉴클레오티드 링키지를 가질 수 있고, 또는 각 가닥에서 1개 내지 8개 이상의 포스포로티오에이트 인터뉴클레오티드 링키지를 가질 수 있다. 포스포로티오에이트 인터뉴클레오티드 링키지는 siRNA 듀플렉스의 한 개 올리고뉴클레오티드 가닥 또는 두 개 모두, 예를 들면, 센스 가닥 또는 안티센스 가닥, 또는 이들 모두 가닥의 가닥에 있을 수 있다.
- [0619] siRNA 분자는 센스 가닥, 안티센스 가닥, 또는 이 두 가닥 모두의 3'-단부, 5'-단부, 또는 3'- 및 5'-단부에서 하나 이상의 포스포로티오에이트 인터뉴클레오티드 링키지를 포함할 수 있다. 예를 들면, 예시적인 siRNA 분자는 센스 가닥, 안티센스 가닥, 또는 이 두 가닥 모두의 5'-단부에서 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 또는 그 이상의 연속 포스포로티오에이트 인터뉴클레오티드 링키지를 포함할 수 있다.
- [0620] 특정 구체예들에서, siRNA 분자는 센스 가닥, 안티센스 가닥, 또는 이 두 가닥 모두에서 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 또는 그 이상의 피리미딘 포스포로티오에이트 인터뉴클레오티드 링키지를 포함한다.
- [0621] 일부 구체예들에서, siRNA 분자는 센스 가닥, 안티센스 가닥, 또는 이 두 가닥 모두에서 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 또는 그 이상의 퓨린 포스포로티오에이트 인터뉴클레오티드 링키지를 포함한다.
- [0622] siRNA 분자는 원형 핵산 분자를 포함할 수 있는데, 이때 siRNA는 약 38개 내지 약 70개, 예를 들면, 약 38개, 40개, 45개, 50개, 55개, 60개, 65개, 또는 70개 뉴클레오티드 길이가 되며, 약 18개 내지 약 23개, 예를 들면, 약 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 또는 23개 염기쌍을 가지며, 이때 원형 올리고뉴클레오티드 형태는 약 19개 염기쌍 및 2개 루프를 가지는 덤벨-모양의 구조를 형성한다.
- [0623] 원형 siRNA 분자는 두 개 루프 모티프를 포함할 수 있는데, siRNA 분자의 한 개 또는 두 개 루프 부분은 생분해 가능하다. 예를 들면, 원형 siRNA 분자의 루프 부분은 생체에서 변형되어, 가령, 약 2개 뉴클레오티드를 포함하는 3'-말단 뉴클레오티드 오버행과 같은 3' 말단 오버행을 가지는 이중 가닥 siRNA 분자를 만들 수 있다.
- [0624] siRNA 분자에서 변형된 뉴클레오티드는 안티센스 가닥, 센스 가닥, 또는 이들 모두에 있을 수 있다. 예를 들면, 변형된 뉴클레오티드는 Northern 형상(가령, Northern Pseudorotation cycle; 참고 *Saenger, Principles of Nucleic Acid Structure, Springer-Verlag ed., 1984*)을 가질 수 있다. Northern 형태를 가지는 뉴클레오티드의 예는 잠금된 핵산 (LNA) 뉴클레오티드 (가령, 2'-O, 4'-C-메틸렌-(D-리보푸라노실) 뉴클레오티드), 2'-메톡시에톡시 (MOE) 뉴클레오티드, 2'-메틸-티오-에틸, 2'-데옥시-2'-플루오르 뉴클레오티드, 2'-데옥시-2'-클로로 뉴클레오티드, 2'-아지도 뉴클레오티드, 및 2'-O-메틸 뉴클레오티드를 포함한다.
- [0625] 화학적으로 변형된 뉴클레오티드는 RNAi를 중개하는 능력은 유지하면서, 동시에 뉴클레아제 분해에 저항성을 수 있다.
- [0626] 이중 가닥의 siRNA 분자의 센스 가닥은 센스 가닥의 3'-단부, 5'-단부, 또는 3' 및 5'-단부 모두에서 역전된 데옥시 무염기 모이어티와 같은 말단 캡 모이어티를 가질 수 있다.
- [0627] 콘쥬게이트의 예로는 *Vargeese*, 등, 미국 출원 번호 10/427,160, (2003년 4월 30일자 제출됨, 도면을 포함한 전문이 참고문헌에 통합된다)에서 설명된 콘쥬게이트 및 리간드를 포함한다.
- [0628] 본 발명의 일부 구체예들에서, 콘쥬게이트는 생분해가능한 링커를 통하여 화학적으로 변형된 siRNA 분자에 공유적으로 부착될 수 있다. 예를 들면, 콘쥬게이트 분자는 화학적으로-변형된 siRNA 분자의 센스 가닥, 안티센스

가닥, 또는 이들 모두 가닥의 3'-단부에 부착될 수 있다.

- [0629] 특정 구체예들에서, 콘주게이트 분자는 화학적으로-변형된 siRNA 분자의 센스 가닥, 안티센스 가닥, 또는 이들 모두 가닥의 5'-단부에 부착된다. 일부 구체예들에서, 콘주게이트 분자는 화학적으로-변형된 siRNA 분자의 센스 가닥, 안티센스 가닥, 또는 이들 모두 가닥 또는 임의의 조합의 3'-단부 및 5'-단부에 모두 부착된다.
- [0630] 일부 구체예들에서, 콘주게이트 분자는 세포와 같은 생물학적 시스템으로 화학적으로-변형된 siRNA 분자를 전달시킬 수 있는 분자를 포함한다.
- [0631] 일부 구체예들에서, 화학적으로-변형된 siRNA 분자에 부착된 콘주게이트 분자는 폴리에틸렌 글리콜, 인간 혈청 알부민, 또는 세포 취입을 중재할 수 있는 세포 수용체에 대한 리간드다. 화학적으로-변형된 siRNA 분자에 부착될 수 있는 본 발명에서 고려되는 특정 콘주게이트 분자의 예는 *Vargeese*, 등, 미국 특허 공개 번호 20030130186 및에서 설명되고 있다.
- [0632] siRNA는 siRNA의 안티센스 부분에 siRNA의 센스 부분을 결합시키는 뉴클레오티드, 비-뉴클레오티드, 또는 혼합형 뉴클레오티드/비-뉴클레오티드 링커를 포함할 수 있다. 일부 구체예들에서, 뉴클레오티드 링커는 길이가 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 또는 10개 뉴클레오티드다. 일부 구체예들에서, 뉴클레오티드 링커는 핵산 압타머(aptamer)가 될 수 있다. 여기에서 사용된 것과 같이, "압타머" 또는 "핵산 압타머"는 표적 분자에 특이적으로 결합하는 핵산 물질을 포함하는데, 이때, 핵산 분자는 이의 자연적 환경에서 표적 분자에 의해 인지되는 서열을 포함한다. 대안으로, 압타머는 핵산에 자연적으로 결합되지 않는 표적 분자에 결합하는 핵산 물질가 될 수 있다.
- [0633] 예를 들면, 압타머를 이용하여 단백질의 리간드-결합 도메인에 결합시켜, 단백질과 자연적으로 생성되는 리간드의 상호작용을 방해할 수 있다. 예를 들면, *Gold*, 등, *Annu. Rev. Biochem.* 64:763, 1995; *Brody 및 Gold, J. Biotechnol.* 74:5, 2000; *Sun, Curr. Opin. Mol. Ther.* 2:100, 2000; *Kusser, J. Biotechnol.* 74:27, 2000; *Hermann 및 Patel, Science* 287:820, 2000; 및 *Jayasena, Clinical Chemistry* 45:1628, 1999 참고.
- [0634] 비-뉴클레오티드 링커는 무염기 뉴클레오티드, 폴리에테르, 폴리아민, 폴리아미드, 펩티드, 탄수화물, 지질, 폴리하이드로카본, 또는 다른 폴리머 화합물 (가령, 2개 내지 100개 에틸렌 글리콜 단위를 가지는 폴리에틸렌 글리콜)이 될 수 있다. 특정 예는 *Seela 및 Kaiser, Nucleic Acids Res.* 18:6353, 1990, 및 *Nucleic Acids Res.* 15:3113, 1987; *Cload 및 Schepartz, J. Am. Chem. Soc.* 113:6324, 1991; *Richardson 및 Schepartz, J. Am. Chem. Soc.* 113:5109, 1991; *Ma, 등, Nucleic Acids Res.* 21:2585, 1993, 및 *Biochemistry* 32:1751, 1993; *Durand, 등, Nucleic Acids Res.* 18:6353, 1990; *McCurdy, 등, Nucleosides & Nucleotide* 10:287, 1991; *Jaschke, 등, Tetrahedron Lett.* 34:301-304, 1993; *Ono, 등, Biochemistry* 30:9914, 1991; *Arnold, 등, 국제 공개번호 WO 89/02439; Usman, 등, 국제 공개번호 WO 95/06731; Dudycz, 등, 국제 공개 No.95/11910, 및 Ferentz 및 Verdine, J. Am. Chem. Soc.* 113:4000, 1991에서 설명된 것들을 포함한다.
- [0635] "비-뉴클레오티드 링커"는 하나 이상의 뉴클레오티드를 대신하여, 핵산 쇄로 통합될 수 있는 기 또는 화합물을 말하는데, 및/또는 포스페이트 치환을 포함하며, 나머지 염기들은 이들의 효소적 활성을 유지한다. 기 또는 화합물은 통상적으로 인지되는 뉴클레오티드 염기, 가령, 아데노신, 구아닌, 시토신, 우라실 또는 티민을 당의 C1 위치에 포함하지 않는 무염기가 될 수 있다.
- [0636] 일부 구체예들에서, 변형된 siRNA 분자는 하나 이상의 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 메틸포스포네이트, 포스포트리에스테르, 몰포리노, 아미테이트 카르바메이트, 카르복시메틸, 아세트아미데이트, 폴리아미드, 술포네이트, 술폰아미드, 술폰아미드, 포름아세탈, 티오포름아세탈, 및/또는 알킬실일 치환을 포함하는 포스페이트 기본골격 변형을 가질 수 있다. 올리고뉴클레오티드 기본골격 변형의 예는 *Hunziker 및 Leumann, Nucleic Acids Analogues: Synthesis 및 Properties, in Modern Synthetic Methods, VCH, pp.331-417, 1995, 및 Mesmaeker, 등, Novel Backbone Replacements for Oligonucleotides, in Carbohydrate Modification in Antisense Research, ACS, pp.24-39, 1994*에서 제공된다.
- [0637] 화학적으로-변형될 수 있는 siRNA 분자는 (a)분자의 두 개의 상보적 가닥의 합성; 그리고 (b)이중 가닥 siRNA 분자를 수득하는데 적합한 조건하에 두 개 상보적인 가닥을 함께 어닐링시켜 합성될 수 있다. 일부 구체예들에서, siRNA 분자의 상보적인 부분의 합성은 고품 상 올리고뉴클레오티드 합성, 또는 고품 상 텐덤 올리고뉴클레오티드 합성이다.
- [0638] 올리고뉴클레오티드 (가령, 리보뉴클레오티드가 없는 특정 변형된 올리고뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드의 부분)은 예를 들면, *Caruthers, 등, Methods in Enzymology* 211:3-19, 1992; *Thompson, 등, 국제 PCT 공개*

번호 WO 99/54459; Wincott, 등, *Nucleic Acids Res.* 23:26772684, 1995; Wincott, 등, *Methods Mol. Bio.* 74:59, 1997; Brennan, 등, *Biotechnol Bioeng.* 61:33-45, 1998; 및 Brennan, 미국 특허번호 6,001,311에서 설명된 것과 같이 당분야에 공지된 프로토콜에 따라 합성된다. 본 발명의 특정 siRNA 분자를 포함하는 RNA 합성은 예를 들면, Usman, 등, *J. Am. Chem. Soc.* 109:7845, 1987; Scaringe, 등, *Nucleic Acids Res.* 18:5433, 1990; 및 Wincott, 등, *Nucleic Acids Res.*:26772684, 1995; Wincott, 등, *Methods Mol. Bio.* 74:59, 1997에서 설명된 전반적인 과정을 따른다.

- [0639] "비대칭 헤어핀"은 여기에서 사용된 것과 같이, 안티센스 부분; 뉴클레오타이드 또는 비-뉴클레오타이드를 포함할 수 있는 루프 부분; 그리고 센스 부분; 이때 센스 부분은 안티센스 부분과 염기쌍을 이루는데 충분한 상보적인 뉴클레오타이드를 가지고, 및 루프와 듀플렉스를 형성할 수 있을 정도의 수준으로 안티센스 부분보다는 더 적은 뉴클레오타이드를 포함하는 센스 부분을 포함하는 선형의 siRNA 분자 분자다.
- [0640] "비대칭 듀플렉스"는 여기에서 사용된 것과 같이, 센스 부분과 안티센스 부분을 포함하는 두 개의 별도 가닥을 가지는 siRNA 분자이며, 이때 센스 부분은 안티센스 부분과 염기쌍을 이루는데 충분한 상보적인 뉴클레오타이드를 가지고, 및 루프와 듀플렉스를 형성할 수 있을 정도의 수준으로 안티센스 부분보다는 더 적은 뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0641] "유전자 발현을 조절하는"이란 여기에서 사용된 것과 같이, 표적 유전자의 발현을 상향 또는 하향 조절하는 것을 말하는데, 세포에 존재하는 mRNA 수준의 상향조절 또는 하향조절, mRNA 해독의 상향 또는 하향 조절, 또는 표적 유전자에 의해 인코딩된 단백질 또는 단백질 소단위의 합성의 상향조절 또는 하향조절을 포함할 수 있다.
- [0642] 여기에서 사용된 것과 같이, 용어 "억제하다(inhibit)" "하향 조절하다(down-regulate)" 또는 "발현을 감소시키다"는 하나 이상의 단백질 또는 단백질 소단위를 인코딩하는 유전자, 또는 RNA 분자 또는 등가의 RNA 분자의 발현 또는 표적 유전자에 의해 인코딩된 하나 이상의 단백질 또는 단백질 소단위의 활성 또는 수준이 본 발명의 핵산 분자 (가령, siRNA)가 없을 경우 관찰된 수준이하로 감소된 것을 의미한다.
- [0643] 여기에서 사용된 것과 같이, "유전자 침묵"은 세포에서 유전자 발현을 부분적으로 또는 완전하게 억제하는 것을 말하며, 여기에서 사용된 것과 같이 "유전자 녹다운(knockdown)"으로 공지되기도 한다. 유전자 침묵의 정도는 당분야에 공지된 방법들에 의해 결정될 수 있는데, 일부는 국제 공개 No.99/32619에 요약되어 있다.
- [0644] 여기에서 사용된 것과 같이, "리보핵산" 및 "RNA"는 최소한 한 개의 리보뉴클레오타이드 잔기를 포함하는 분자를 말한다. 리보뉴클레오타이드는 베타-D-리보-푸라노즈 모이어티의 2' 위치에서 하이드록시기를 가진 뉴클레오타이드다. 이들 용어들은 이중 가닥 RNA, 단일가닥 RNA, 부분적으로 정제된 RNA, 본질적으로 순수 RNA, 합성 RNA, 재조합적으로 생산된 RNA와 같은 분리된 RNA, 뿐만 아니라 하나 이상의 뉴클레오타이드의 추가, 결손, 치환, 변형 및/또는 교대에 의해 자연적으로 생성되는 RNA와는 상이한 변형된 또는 변경된 RNA를 포함한다. RNA 변형은 예를 들면, RNA의 하나 이상의 뉴클레오타이드에서 siRNA의 단부 또는 내부적으로 비-뉴클레오타이드 물질의 추가를 포함할 수 있다.
- [0645] RNA 분자에서 뉴클레오타이드는 비-표준 뉴클레오타이드, 가령 비-자연적으로 생성되는 뉴클레오타이드 또는 화학적으로 합성된 뉴클레오타이드 또는 데옥시뉴클레오타이드를 포함한다. 이와 같은 변경된 RNA를 유사체라고 할 수 있다.
- [0646] "고도로 보존된 서열 부분"은 표적 유전자의 하나 이상의 뉴클레오타이드 서열 부분이 한 세대로부터 다른 세대에 이르기 까지 또는 하나의 생물계에서 다른 생물계에 이르기 까지 유의적으로 변화되지 않는다는 것을 의미한다.
- [0647] "센스 부분"은 siRNA 분자의 안티센스 부분에 상보성을 가지는 siRNA 분자의 뉴클레오타이드 서열을 말한다. 또한, siRNA 분자의 센스 부분은 표적 핵산 서열과 상동성을 가지는 핵산 서열을 포함할 수 있다.
- [0648] "안티센스 부분"은 표적 핵산 서열에 상보성을 가지는 siRNA 분자의 뉴클레오타이드 서열을 의미한다. 또한, siRNA 분자의 안티센스 부분은 siRNA 분자의 센스 부분의 상보성을 가지는 핵산 서열을 포함할 수 있다.
- [0649] "표적 핵산"은 핵산 서열의 발현 또는 활성이 조절될 수 있는 임의의 핵산서열을 의미한다. 표적 핵산은 DNA 또는 RNA이 될 수 있다.
- [0650] "상보성(complementarity)"은 전통적인 Watson-Crick 또는 결합에 있어서 기타 비-전통적인 방식에 의해 핵산은 또 다른 핵산과 수소 결합을 할 수 있다는 것을 의미한다.
- [0651] 여기에서 사용된 것과 같이, 용어 "생분해가능한 링커"는 한 분자를 또 다른 분자에 연결시키는, 예를 들면, siRNA 분자에 생물학적 활성 분자를 연결시키거나 또는 siRNA 분자의 센스와 안티센스 가닥에 생물학적 활성 분



자를 연결시키는 생분해가능한 링커로 기획된 핵산 또는 비-핵산 링커 분자를 의미한다. 생분해가능한 링커는 특정 조직 또는 세포 유형으로 전달하는 것과 같은 특정 목적을 위하여 안정성이 조절될 수 있도록 기획된다. 핵산-기반 생분해가능한 링커분자의 안정성은 2'-O-메틸, 2'-플루오르, 2'-아미노, 2'-O-아미노, 2'-C-알릴, 2'-O-알릴, 및 기타 2'-변형된 또는 염기 변형된 뉴클레오타이드와 같은 리보뉴클레오타이드, 데옥시리보뉴클레오타이드, 및 화학적으로-변형된 뉴클레오타이드의 복합에 의해 다양하게 조절될 수 있다. 생분해가능한 핵산 링커분자는 이량체, 삼량체, 사량체 또는 더 긴 핵산 분자, 예를 들면, 약 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 또는 20개 길이의 뉴클레오타이드가 되거나, 또는 인-기반 링커지, 예를 들면, 포스포로아미데이트 또는 포스포디에스테르 링커지를 가진 단일 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 생분해가능한 핵산 링커분자는 핵산 기본골격, 핵산 당, 또는 핵산 염기 변형 또한 포함할 수 있다.

- [0652] 여기에서 설명된 것과 같이, 2'-변형된 뉴클레오타이드와 관련하여서, "아미노"는 변형될 수 있는 또는 변형되지 않은 2'-NH<sub>2</sub> 또는 2'-O-NH<sub>2</sub>를 말한다. 이와 같은 변형된 기들은 예를 들면, *Eckstein*, 등, 미국 특허번호 5,672,695 및 *Matulic-Adamic*, 등, 미국 특허번호 6,248,878에서 설명되어 있다.
- [0653] 본 발명에서 사용되는 핵산 분자의 전달을 위한 보충적인 또는 상보적인 방법은 예를 들면, *Akhtar* 등, *Trends Cell Bio.* 2:139, 1992; "*Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics*," ed. *Akhtar*, 1995, *Maurer* 등, *Mol. Membr. Biol.* 16:129-140, 1999; *Hofland* 및 *Huang*, *Handb. Exp. Pharmacol.* 137:165192, 1999; 및 *Lee* 등, *ACS Symp. Ser.* 752:184-192, 2000에서 설명되어 있다. *Sullivan*, 등, 국제 PCT 공개번호 WO 94/02595에서는 핵산 분자의 효소적 전달을 위한 일반적인 방법들을 더 설명한다.
- [0654] 핵산 분자는 약리학적으로 허용가능한 캐리어, 희석액, 부형제, 어주버트, 유화제, 완충액, 안정화제, 또는 보존제와 같은 하나 이상의 성분들을 포함하는 제제내에 포함되어 투여될 수 있다.
- [0655] 여기에서 사용된 것과 같이, 용어 "캐리어(carrier)" 는 약리학적으로 허용가능한 고체 또는 액체 희석액, 용매, 충전제 또는 포집 물질을 의미한다. 캐리어의 예로는 염, 생물학적 그리고 약리학 적 완충액 시스템, 및 생물학적으로 허용가능한 매질을 포함한다. 물을 함유하는 액체 캐리어는 약리학적으로 허용가능한 첨가제, 가령 산화 물질들, 알칼리화 물질들, 항균 보존제, 항산화제, 완충 물질들, 킬레이트 물질들, 복합 물질들, 가용화 물질들, 습윤제 용매, 현탁 및/또는 점성-증강 물질들, 강장성 물질들, 가습 물질들 또는 다른 생체적합성 물질을 포함한다. 상기 범주내 성분들의 예시들은 미국 *Pharmacopeia National Formulary*, 1990, pp.1857-1859에서 찾아볼 수 있을 것이며, 뿐만 아니라 *RaymondRowe*, 등, *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 5th ed., 2006, 및 "*Remington: The Science 및 Practice of Pharmacy*," 21st ed., 2006, editor *DavidTroy*에서도 찾아 볼 수 있다.
- [0656] 보존제의 예는 페놀, 메틸 파라벤, 파라벤, m-크레졸, 티오메르살, 벤질알코니움 클로라이드 및 이의 혼합물을 포함한다.
- [0657] 계면활성제의 예로는 올레산, 소르비탄 트리올레이트, 폴리소르베이트, 레시틴, 포스포티딜콜린, 다양한 장쇄 디글리세리드 및 인지질 및 이의 혼합물을 포함한다.
- [0658] 인지질의 예로는 포스파티딜콜린, 레시틴, 포스파티딜글리세롤, 포스파티딜이노시톨, 포스파티딜세린 및 포스파티딜에탄올아민 및 이의 혼합물을 포함한다.
- [0659] 분산제의 예로는 에틸렌디아민테트라아세트산을 포함한다.
- [0660] 가스의 예로는 질소, 헬륨, 클로로플루오르탄소(CFCs), 하이드로플루오르탄(HFCs), 이산화탄소, 공기 및 이의 혼합물을 포함한다.
- [0661] 특정 구체예들에서, siRNA 및/또는 폴리펩티드는 리포솜에 포집될 수 있고, 또는 리포솜의 내부 또는 외부에 존재하거나 또는 리포솜 층내에 존재할 수 있거나, 또는 이온토포레시스(iontophoresis)에 의해 투여될 수 있고, 또는 하이드로겔, 시클로덱스트란, 생분해가능한 나노캡슐, 생체흡착성 미소구, 또는 단백질성 벡터와 같은 다른 비이클에 통합될 수 있다. 예를 들면, *O'Hare* 및 *Normand*, PCT 국제 공개번호 WO 00/53722를 참고한다. 대안으로, 핵산 조성물은 직접 주사 또는 주입 펌프에 의해 국소적으로 전달될 수 있다. 본 발명의 핵산 분자의 직접 주사(피하, 근육내, 피내이든 상관없이)는 *Conry* 등, *Clin. Cancer Res.* 5:2330-2337, 1999, 및 *Barry* 등, 국제 PCT 공개번호 WO 99/31262에서 설명된 것과 같이, 표준 바늘 및 주사기 방법을 이용하여 또는 바늘-없는 기술을 이용하여 실시될 수 있다.

- [0662] 본 발명의 조성물은 약리학적 물질로 효과적으로 이용될 수 있다. 약리학적 물질들은 환자에서 질환 상태 또는 다른 불리한 상태의 발생을 방지, 조절 또는 중증도를 조절 또는 치료(하나 이상의 증상을 감지할 정도 또는 측정할 수 있을 정도로 경감)한다.
- [0663] 일부 구체예들에서, 본 발명은 DILA2 아미노산 화합물 또는 지질과 결합된, 복합된 또는 콘쥬게이트된 하나 이상의 폴리핵산, 전형적으로 하나 이상의 siRNA를 제공 또는 투여하는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물 및 방법을 제공하는데, 이때 약리학적으로 허용가능한 캐리어 가령, 희석액, 안정화제, 또는 완충액이 추가로 포함되어 조제될 수 있다.
- [0664] 전형적으로, siRNA는 개체의 질환 또는 불리한 상태와 연관된 원인 또는 기여 인자로써 상승된 수준으로 발현되는 유전자를 표적할 것이다. 본 내용에서, siRNA는 하나 이상의 질환 연관된 증상의 예방, 경감, 또는 증상의 중증도 또는 재발을 감소시키는 수준으로 유전자의 발현을 효과적으로 하향조절할 것이다. 대안으로, 표적 유전자의 발현이 질환의 결과로써 또는 질환 또는 다른 불리한 상태의 연속으로써 반드시 상승되지 않는 다양한 별개의 질환 모델의 경우, 그럼에도 불구하고, 표적 유전자의 하향 조절은 유전자 발현을 낮춤(가령, 표적 유전자의 선택된 mRNA 및/또는 단백질 산물의 수준을 감소)으로써 치료요법적 결과를 가져올 것이다. 대안으로, 본 발명의 siRNA는 한 유전자의 발현을 낮추도록 표적화되어, “하류” 유전자의 발현이 표적 유전자의 활성 또는 산물에 의해 네가티브하게 조절됨으로써, “하류” 유전자의 상향 조절을 초래될 것이다.
- [0665] 본 내용의 이와 같은 siRNA는 임의의 형태, 예를 들면, 경피 또는 국소 주사(건선을 치료하기 위하여 건선 플라크 부위에 국소 주사 또는 건선 관절염 또는 RA를 앓고 있는 환자의 관절 부위에 국소 주사)로 투여될 수 있다. 좀 더 상세한 구체예에서, 본 발명은 TNF- $\alpha$ 의 mRNA에 대항하는 siRNA 분자의 치료요법적 유효량의 제제 및 이를 투여하는 방법을 제공하고, 이로써, TNF- $\alpha$  RNA를 효과적으로 하향조절함으로써, 하나 이상의 TNF $\alpha$ -연합된 염증성 상태를 감소 또는 예방시킨다. 유전자의 발현의 비정상적 증가가 선택된 질환 상태와 연관된 원인 인자 또는 기여 인자로 알려진 다수의 유전자들중 임의의 것을 포함한, 동물 개체들에서 선택된 질환과 연관된 하나 이상의 상이한 유전자의 발현을 표적으로 하는 유사한 방법 및 조성물이 제공된다.
- [0666] 본 발명의 조성물은 경구 투여용 테블릿, 캡슐 또는 엘릭시르, 직장 투여를 위한 좌약, 주사용 멸균 용액, 현탁액 및 당분야에 공지된 다른 형태로 조제되고, 및 이용될 수 있다.
- [0667] 약제학적 조성물 또는 제제는 세포 또는 인간을 포함하는 환자에게 전신 투여를 포함하는 투여에 적합한 형태의 조성물 또는 제제를 말한다. 적합한 형태는 진입 용도 또는 경로, 가령, 경구, 경피, 상피 또는 주사에 따라 부분적으로 달라질 수 있다. 이와 같은 형태는 조성물 또는 제제가 표적 세포(가령, 음전하 전하를 띤 핵산이 바람직하게 전달되는 세포)에 도달하는 것을 방해하지 않아야 한다. 예를 들면, 혈류로 주사되는 약제학적 조성물은 가용성이어야 한다. 다른 인자는 당분야에 공지된 것들이며, 및 독성과 같은 고려사항을 포함한다.
- [0668] “전신 투여”는 혈류에 약물의 생체내 전신 흡수 또는 축적후, 전신으로 분포된다는 것을 의미한다. 전신 흡수로 이어지는 투여 경우는 정맥, 피하, 복막, 흡입, 경구, 폐 및 근육내 투여를 포함하나 이에 한정되지 않는다.
- [0669] 본 발명의 핵산 분자를 가진 제제에 적합한 물질들의 예로는 P-당단백질 억제제(가령, Pluronic P85)-약물이 CNS로 진입되는 것을 강화시킬 수 있다 (Jolliet-Riant 및 Tillement, *Fundam. Clin. Pharmacol.* 13:16-26, 1999); 생분해가능한 폴리머, 가령, 폴리(DL-락티드-코글리콜리드) 미소구-대뇌 이식후 지속 방출 전달을 위한 미소구(Emerich, D.F., 등, *Cell Transplant* 8:4758, 1999, Alkermes, Inc., Cambridge, Mass.); 그리고 폴리부틸시아노아크릴레이트로 만들어진 로딩된 나노입자들-혈관 뇌 장벽을 통과하여 신경 취입 기전을 변경시킬 수 있다(*Prog. Neuropsychopharmacol Biol. Psychiatry* 23:941-949, 1999). 본 발명의 핵산 분자용 전달 전략의 다른 예들은 Boado, 등, *J. Pharm. Sci.* 87:1308-1315, 1998; Tyler, 등, *FEBS Lett.* 421:280-284, 1999; Pardridge, 등, *PNAS USA* 92:5592-5596, 1995; Boado, *Adv. Drug Delivery Rev.* 15:73-107, 1995; AldrianHerrada 등, *Nucleic Acids Res.* 26:4910-4916, 1998; 및 Tyler, 등, *PNAS USA* 96:70537058, 1999에서 설명된 것들을 포함한다.
- [0670] 본 발명은 또한 저장 또는 투여용으로 준비된 조성물을 포함하는데, 이 조성물은 약리학적으로 허용가능한 캐리어 또는 희석액에 원하는 화합물의 약리학적 유효량을 포함한다. 치료요법적으로 이용되는 허용가능한 캐리어 또는 희석액은 당분야에 잘 공지되어 있고, 및 예를 들면, *Remington's Pharmaceuticals Sciences*, Mack Publishing Co. (A.R. Gennaro ed. 1985)에서 설명되고 있다. 예를 들면, 보존제, 안정화제, 염료 및 풍미 물질들이 제공될 수 있다. 이것들에는 벤조에이트 나트륨, 소르빈산, p-하이드록시벤조산 에스테르를 포함한다. 또한, 항산화제 및 현탁 물질들이 이용될 수 있다.



- [0671] 약리학적으로 유효량은 질환 발생의 방지, 억제, 질환을 치료, 증상을 어느 정도로 경감시키는데 요구되는 약량이다. 활성 핵산의 양은 일일 체중 kg당 0.01 mg/kg 내지 50 mg/kg 으로 투여되어야 한다.
- [0672] 수용성 현탁액은 수용성 현탁액 제조를 위하여 적합한 부형제와 혼합된 활성제를 포함한다. 이와 같은 부형제는 예를 들면, 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨, 메틸셀룰로오스, 하이드로프로필-메틸셀룰로오스, 알기네이트 나트륨, 폴리비닐피롤리돈, 트라가칸 검 및 아카시아 검과 같은 현탁 물질들이고; 분산 또는 가습 물질은 자연적으로 생성되는 포스파티드가 될 수 있는데, 예를 들면, 레시틴 또는 알킬렌 산화물과 지방산의 응축 산물, 예를 들면 폴리옥시에틸렌 스테아레이트 또는, 에틸렌 산화물과 장쇄 지방족 알코올의 응축 산물, 예를 들면, 헵타데카에틸렌옥시세탄올, 또는 에틸렌 산화물과 지방산 및 폴리옥시에틸렌 솔비톨 모노올레이트와 같은 핵시톨로부터 유도된 부분적 에스테르의 응축 산물, 또는 에틸렌 산화물과 지방산 및 폴리에틸렌 솔르비탄 모노올레이트와 같은 핵시톨 무수물로부터 유도된 부분적 에스테르의 응축 산물이 될 수 있다. 수용성 현탁액은 하나 이상의 보존제, 예를 들면 에틸, 또는 n-프로필 p-하이드록시벤조에이트, 하나 이상의 착색 물질들, 하나 이상의 풍미 물질들, 및 하나 이상의 감미 물질들, 가령, 슈크로스 또는 사카린을 또한 포함할 수 있다.
- [0673] 오일 현탁액은 예를 들면 아라키스 오일, 올리브 오일, 참깨 오일 또는 코코넛 오일과 같은 식물성 오일, 또는 액체 파라핀과 같은 미네랄 오일에 활성 성분들을 현탁시켜 조제될 수 있다. 오일 현탁액은 예를 들면 밀납, 경질 파라핀 또는 세틸 알코올과 같은 농후제를 포함할 수 있다. 감미제 및 풍미제가 맛있는 경구 제제에 추가될 수 있다. 아스코르브산과 같은 항-산화제를 추가시켜 이와 같은 조성물이 보존될 수 있다.
- [0674] 물을 첨가하여 수용성 현탁액을 준비하는데 적합한 분산가능한 분말 및 과립은 분산 또는 가습제, 현탁제 및 하나 이상의 보존제와 혼합된 활성 성분을 제공한다. 다른 부형제, 예를 들면, 감미제, 풍미제 및 착색제가 존재할 수도 있다.
- [0675] 본 발명의 약제학적 조성물은 수중유 유상액의 형태가 될 수도 있다. 오일 상은 식물성 오일 또는 미네랄 오일 또는 이의 혼합물이 될 수 있다. 적합한 유화제는 자연적으로 생성되는 검, 예를 들면, 아카시아 검 또는 트라가칸 검, 자연적으로 발생하는 포스파티드, 예를 들면, 대두, 레시틴 및 지방산 및 핵시톨 무수물, 예를 들면, 소르비탄 모노올레이트로부터 유도된 에스테르 또는 부분적 에스테르 및 부분적인 에스테르와 에틸렌 산화물의 응축 산물, 예를 들면, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노올레이트가 될 수 있다. 유상액은 또한 감미제 및 풍미제를 또한 포함할 수 있다.
- [0676] 약제학적 조성물은 멸균된 주사용 수용성 또는 유질성 현탁액의 형태가 될 수 있다. 이와 같은 현탁액은 상기에서 언급된 것과 같이 적절한 분산 또는 습윤 물질 및 현탁 물질들을 이용하여 당분야에 공지된 방법에 따라 조제될 수 있다. 멸균 주사용 준비물은 예를 들면, 1,3-부탄디올과 같은 비-독성 장관외로 허용가능한 희석액 또는 용매에 멸균 주사용 용액 또는 현탁액이 될 수 있다. 이용될 수 있는 허용가능한 비이칼 및 용매는 물, Ringer 용액 및 등장성 염화나트륨 용액이다. 또한, 멸균, 고정된 오일이 용매 또는 현탁 매질로 이용될 수 있다. 이와 같은 목적을 위하여, 합성 모노글리세리드 또는 디글리세리드를 포함한 임의의 블랜드 고정된 오일을 이용할 수 있다. 또한, 올레산과 같은 지방산은 주사용 준비물에 사용된다.
- [0677] siRNA는 예를 들면, 약물의 직장 투여를 위하여 좌약 형태로 또한 투여될 수 있다. 이와 같은 조성물은 실온에서는 고체이지만, 직장 체온에서 액체가 되어, 직장에서 용융되어 약물을 방출시키는 적합한 비-자극성 부형제와 약물을 혼합시켜, 준비될 수 있다. 이와 같은 물질은 카카오기름 및 폴리에틸렌 글리콜을 포함한다.
- [0678] siRNA는 뉴클레아제 저항성 기, 예를 들면, 2'-아미노, 2'-C-알릴, 2'-플루오르, 2'-O-메틸, 2'-H로 변형됨으로써 안정성이 강화되도록 상당히 변형될 수 있다. *Usman 및 Cedergren, TIBS 17:34, 1992; Usman, 등, 핵산 Symp. Ser. 31:163, 1994* 참고. siRNA 구조체는 일반적인 방법을 이용하여 겔 전기영동에 의해 정제되거나, 또는 고압 액체 크로마토그래피에 의해 정제되고, 물에 재현탁될 수 있다.
- [0679] 변형(염기, 당 및/또는 포스페이트)을 가진 화학적으로 합성된 핵산 분자는 혈청 리보뉴클레아제에 의한 분해를 막고, 따라서 이들의 효능이 증가될 수 있다. 예를 들면, *Eckstein, 등, 국제 공개번호 WO 92/07065; Perrault 등, Nature 344:565, 1990; Pieken, 등, Science 253, 314, 1991; Usman 및 Cedergren, Trends in Biochem. Sci. 17:334, 1992; Usman, 등, 국제 공개번호 WO 93/15187; 및 Rossi 등, 국제 공개번호 WO 91/03162; Sproat, 미국 특허번호 5,334,711; 및 Gold, 등, 미국 특허번호 6,300,074를 참고한다. 상기 모든 참고 문헌들은 여기에서 설명된 핵산 분자의 염기, 포스페이트 및/또는 당 모이어티에 만들어진 다양한 화학적 변형을 설명한다.*
- [0680] 핵산 분자의 뉴클레아제 안정성 및 효과를 상당히 강화된 핵산 분자로 도입될 수 있는 당, 염기 및 포스페이트

변형을 설명하는 몇 가지 실시예가 있다. 예를 들면, 올리고뉴클레오타이드는 예를 들면, 2'-아미노, 2'-C-알릴, 2'-플루오르, 2'-O-메틸, 2'-O-알릴, 2'-H, 뉴클레오타이드 염기 변형과 같은 뉴클레아제 저항성 기로 변형에 의해 안정성이 강화되고 및/또는 생물학적 활성이 강화되도록 변형된다. *Usman* 및 *Cedergren*, *TIBS* 17:34, 1992; *Usman*, 등, *Nucleic Acids Symp. Ser.* 31:163, 1994; *Burgin*, 등, *Biochemistry* 35:14090, 1996 참고. 핵산 분자의 당 변형은 당분야에 널리 설명되어 왔다. *Eckstein* 등, 국제 공개 PCT 번호 WO 92/07065; *Perrault*, 등 *Nature* 344:565-568, 1990; *Pieken*, 등 *Science* 253:314317, 1991; *Usman* 및 *Cedergren*, *Trends in Biochem. Sci.* 17:334-339, 1992; *Usman* 등 국제 공개 PCT 번호 WO 93/15187; *Sproat*, 미국 특허번호 5,334,711 및 *Beigelman*, 등, *J. Biol. Chem.* 270:25702, 1995; *Beigelman*, 등, 국제 PCT 공개번호 WO 97/26270; *Beigelman*, 등, 미국 특허번호 5,716,824; *Usman*, 등, 미국 특허번호 5,627,053; *Woolf*, 등, 국제 PCT 공개번호 WO 98/13526; *Thompson*, 등, *Karpeisky*, 등, *Tetrahedron Lett.* 39:1131, 1998; *Earnshaw* 및 *Gait*, *Biopolymers (Nucleic Acids Sciences)* 48:39-55, 1998; *Verma* 및 *Eckstein*, *Annu. Rev. Biochem.* 67:99-134, 1998; 및 *Burlina*, 등, *Bioorg. Med. Chem.* 5:1999-2010, 1997. 이와 같은 공개 내용들은 촉매 조절없이 핵산 분자에 당, 염기 및/또는 포스페이트 변형 및 이와 유사한 것들의 통합 위치를 결정하기 위한 일반적인 방법 및 전략들을 설명한다. 이와 같은 기술들을 고려하여, 세포에서 RNAi를 촉진시키는 siRNA 분자의 능력이 상당히 억제되지 않는 한, 본 발명의 siRNA 핵산 분자를 변형시키기 위하여 여기에서 설명된 것과 유사한 변형이 이용될 수 있다.

[0681] 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 및/또는 5'-메틸포스포네이트 링키지에 의한 올리고뉴클레오타이드 인터뉴클레오타이드 링키지의 화학적 변형이 안정성을 증가시키지만, 과도한 변형은 약간의 독성의 원인이 되거나 또는 활성 감소의 원인이 될 수 있다. 따라서, 핵산 분자를 기획할 때, 이와 같은 인터뉴클레오타이드 링키지의 양을 최소화시켜야 한다. 이와 같은 링키지 농도의 감소는 독성을 낮출 수 있어, 이들 분자의 효과의 증가 및 특이성의 향상을 가져온다.

[0682] 일부 구체예들에서, 본 발명은 하나 이상의 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 메틸포스포네이트, 포스포트리에스테르, 몰포리노, 아미데이트 카르바메이트, 카르복시메틸, 아세타아미데이트, 폴리아미드, 술포네이트, 술포아미드, 술포아메이트, 포름아세탈, 티오포름아세탈, 및/또는 알킬실일, 치환을 포함하는 포스페이트 기본골격의 변형을 가진 변형된 siRNA 분자를 특징으로 한다. 올리고뉴클레오타이드 기본골격 변형에 대해서는 *Hunziker* 및 *Leumann*, *Nucleic Acids Analogues: Synthesis 및 Properties*, in *Modern Synthesis Methods*, VCH, 1995, pp.331-417, 및 *Mesmaeker*, 등, "Novel Backbone Replacements for Oligonucleotides in Carbohydrate Modifications in Antisense Research," ACS, 1994, pp. 24-39를 참고한다.

[0683] 핵산 분자의 전달을 위한 방법들은 *Akhtar*, 등, *Trends Cell Bio.* 2:139, 1992; "Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotides Therapeutics," ed. *Akhtar*, 1995; *Maurer*, 등, *Mol. Membr. Biol.* 16:129-140, 1999; *Hofland* 및 *Huang*, *Handb. Exp. Pharmacol.* 137:165-192, 1999; 및 *Lee*, 등, *ACS Symp. Ser.* 752:184-192, 2000. *Beigelman*, 등, 미국 특허번호 6,395,713에서 설명하며, 및 *Sullivan* 등, PCT WO 94/02595에서는 핵산 물질의 전달을 위한 전반적인 방법을 설명한다. 이와 같은 프로토콜은 실질적으로 임의의 핵산 물질 전달에 이용할 수 있다. 핵산 분자는 리포솜에 의한 내부적 또는 외부적 포집화, 생분해가능한 폴리머, 하이드로겔, 시클로덱스트린(가령 *Gonzalez*, 등, *Bioconjugate Chem.* 10:10681074, 1999; *Wang*, 등, 국제 PCT 공개번호 WO 03/47518 및 WO 03/46185), 폴리(락트-co-글리콜)산(PLGA) 및 PLCA 미소구 (가령 미국 특허번호 6,447,796 및 미국 특허 출원 공개번호 US 2002130430), 생분해가능한 나노캡슐, 생체흡착성 미소구 또는 단백질성 벡터 (*O'Hare* 및 *Normand*, 국제 PCT 공개번호 WO 00/53722)와 같은 다른 소포로 통합하는 것을 포함하나 이에 한정되지 않은 당분야에 공지된 다양한 방법에 의해 세포로 투여될 수 있다. 대안으로, 핵산/소포 복합물은 직접적인 주사 또는 주입 펌프에 의해 국소적으로 전달된다. 본 발명의 핵산 분자의 직접 주사(피하, 근육내, 피내이든 상관없이)는 *Conry* 등, *Clin. Cancer Res.* 5:2330-2337, 1999, 및 *Barry* 등, 국제 PCT 공개번호 WO 99/31262에서 설명된 것과 같이, 표준 바늘 및 주사기 방법을 이용하여 또는 바늘-없는 기술을 이용하여 실시될 수 있다. 본 발명의 분자는 약리학적 물질로 이용될 수 있다. 약리학적 물질은 개체에서 질병의 발생을 방지, 조정 또는 치료(어느 정도까지 증상을 완화, 바람직하게는 모든 증상을 완화)시킨다.

[0684] "RNA"는 최소한 한 개의 리보뉴클레오타이드 잔기를 포함하는 분자를 말한다. "리보뉴클레오타이드"는 베타-D-리보-퓨라노스 모이어티의 2' 위치에서 하이드록시기를 가진 뉴클레오타이드다. 이들 용어들은 이중 가닥 RNA, 단일가닥 RNA, 부분적으로 정제된 RNA, 본질적으로 순수 RNA, 합성 RNA, 재조합적으로 생산된 RNA와 같은 분리된 RNA, 뿐만 아니라 하나 이상의 뉴클레오타이드의 추가, 결손, 치환, 변형 및/또는 교대에 의해 자연적으로 생성되는 RNA와는 상이한 변형된 RNA를 포함한다. RNA 변형은 예를 들면, RNA의 하나 이상의 뉴클레오타이드에서 siRNA의 단부

또는 내부적으로 비-뉴클레오타이드 물질의 추가를 포함할 수 있다. RNA 분자에서 뉴클레오타이드는 비-표준 뉴클레오타이드, 가령 비-자연적으로 생성되는 뉴클레오타이드 또는 화학적으로 합성된 뉴클레오타이드 또는 테옥시뉴클레오타이드를 포함한다. 이와 같은 변경된 RNA를 자연적 생성되는 RNA의 유사체라고 할 수 있다.

[0685] "캡 구조"는 올리고뉴클레오타이드의 한 쪽 말단에 통합된 화학적 변형을 말한다(가령 *Adamic*, 등, 미국 특허번호 5,998,203, 이는 참고문헌에 통합된다). 이와 같은 말단 변형은 엑소뉴클레아제 분해로부터 핵산 분자를 보호하고, 및 세포내 전달 및/또는 국소화에 도움을 줄 수 있다. 캡은 5'-말단(5'-캡) 또는 3'-말단(3'-캡)에 존재할 수 있고, 이 두 가지 말단에 모두 존재할 수도 있다. 비-제한적인 예로써, 5'-캡은 글리세릴, 역전된 테옥시 무염기 잔기(모이어티); 4',5'-메틸렌 뉴클레오타이드; 1-(베타-D-에리트로푸라노실) 뉴클레오타이드, 4'-티오 뉴클레오타이드; 카르보사이클 뉴클레오타이드; 1,5-안하이드로핵시톨 뉴클레오타이드; L-뉴클레오타이드; α-뉴클레오타이드; 변형된 염기 뉴클레오타이드; 포스포로디티오에이트 링키지; 트레오-펜토푸라노실 뉴클레오타이드; 비환식 3',4'-세코 뉴클레오타이드; 비환식 3,4-디하이드록시부틸 뉴클레오타이드; 비환식 3,5-디하이드록시펜틸 뉴클레오타이드, 3'-3'-역전된 뉴클레오타이드 모이어티; 3'-3'-역전된 무염기 모이어티; 3'-2'-역전된 뉴클레오타이드 모이어티; 3'-2'-역전된 무염기 모이어티; 1,4-부탄디올 포스페이트; 3'-포스포르아미데이트; 핵실포스페이트; 아미노핵실포스페이트; 3'-포스페이트; 3'-포스포로티오에이트; 포스포로디티오에이트; 또는 브리징 또는 비-브리징 메틸포스포네이트 모이어티를 포함하나 이에 한정되지 않는다..

[0686] 3'-cap의 예로는 글리세릴, 역전된 테옥시 무염기 잔기(모이어티), 4',5'-메틸렌 뉴클레오타이드; 1-(베타-D-에리트로푸라노실) 뉴클레오타이드; 4'-티오 뉴클레오타이드, 카르보사이클 뉴클레오타이드; 5'-아미노-알킬 포스페이트; 1,3-디아미노-2-프로필 포스페이트; 3-아미노프로필 포스페이트; 6-아미노핵실포스페이트; 1,2-아미노도데실 포스페이트; 하이드록시프로필 포스페이트; 1,5-안하이드로핵시톨 뉴클레오타이드; L-뉴클레오타이드; 알파뉴클레오타이드; 변형된 염기 뉴클레오타이드; 포스포로디티오에이트; 트레오-펜토푸라노실 뉴클레오타이드; 비환식 3',4'-세코 뉴클레오타이드; 3,4-디하이드록시부틸 뉴클레오타이드; 3,5-디하이드록시펜틸 뉴클레오타이드, 5'-5'-역전된 뉴클레오타이드 모이어티; 5'-5'-역전된 무염기 모이어티; 5'포스포아미데이트; 5'-포스포로티오에이트; 1,4-부탄디올 포스페이트; 5'-아미노; 브리징 및/또는 비-브리징 5'-포스포아미데이트, 포스포로티오에이트 및/또는 포스포로디티오에이트, 브리징 또는 비 브리징 메틸포스포네이트 그리고 5'-멀캡토 모이어티를 포함하나 이에 한정되지 않는다(좀더 상세한 내용은 *Beaucage* 및 *Lyer, Tetrahedron 49:1925, 1993*을 참고; 참고문헌에 통합된다).

[0687] "비-뉴클레오타이드"는 하나 이상의 뉴클레오타이드를 대신하여, 핵산 쇄로 통합될 수 있는 기 또는 화합물을 말하는데, 당 및/또는 포스페이트 치환을 포함하며, 나머지 염기들은 이들의 효소적 활성을 유지한다. 기 또는 화합물은 통상적으로 인지되는 뉴클레오타이드 염기, 가령, 아데노신, 구아닌, 시토신, 우라실 또는 티민을 포함하지 않고, 따라서, 1'-위치에 염기가 없는, 무염기가 될 수 있다.

[0688] 여기에서 사용된 것과 같이, "뉴클레오타이드"는 자연적 염기(표준) 및 당분야에 공지된 변형된 염기들을 포함하는 것으로 인지된다. 이와 같은 염기들은 뉴클레오타이드 당 모이어티의 1' 위치에 일반적으로 존재한다. 뉴클레오타이드는 일반적으로 염기, 당 및 포스페이트 기로 구성된다. 뉴클레오타이드는 당, 포스페이트 및/또는 염기 모이어티에서 변형되거나 변형되지 않을 수 있다(뉴클레오타이드 유사체, 변형된 뉴클레오타이드, 비-자연적 뉴클레오타이드, 비-표준 뉴클레오타이드 및 기타 등의 용어로 호환될 수도 있다; 가령 *Usman* 및 *McSwiggen, supra; Eckstein*, 등, 국제 PCT 공개번호 WO 92/07065; *Usman, et al*, 국제 PCT 공개번호 WO 93/15187; *Uhlman & Peyman, supra*, 모두 참고문헌에 통합된다). *Limbach*, 등, *Nucleic Acids Res. 22:2183, 1994*에 요약된 것과 같이, 변형된 핵산 염기의 몇 가지 예들이 있다. 핵산 분자에 도입될 수 있는 염기 변형의 비-제한적인 예로는 이노신, 퓨린, 피리딘-4-온, 피리딘-2-온, 페닐, 슈도우라실, 2, 4, 6-트리메톡시 벤젠, 3-메틸 우라실, 디하이드로우리딘, 나프틸, 아미노페닐, 5-알킬시티딘(가령, 5메틸시티딘), 5-알킬우리딘(가령, 리보티미딘), 5-할로우리딘(가령, 5-브로로우리딘) 또는 6-아자피리미딘 또는 6-알킬피리미딘(가령 6-메틸우리딘), 프로핀, 및 기타(*Burgin*, 등, *Biochemistry 35:14090, 1996; Uhlman & Peyman, supra*)를 포함한다. 이때 "변형된 염기"는 위치 1'에서 아데닌, 구아닌, 시토신 및 우라실이 아닌 뉴클레오타이드 염기 또는 이의 등가물을 의미한다.

[0689] "표적 위치" 또는 "표적 서열" 또는 "표적화된 서열"은 표적 서열에 상보적인 서열을 안티센스 부분에 포함하는 siRNA 구조체에 의해 중개된 절단에 대하여 "표적이 된" 표적 핵산(가령, RNA)의 서열을 말한다.

[0690] siRNA 분자는 DILA2 아미노산 화합물 또는 양이온 지질과 복합되어, 리포솜내에 포장되거나 또는 표적 세포들 또는 조직들에게 전달된다. 핵산 또는 핵산 복합체들은 주사, 주입 펌프 또는 스텐트를 통하여, 생체폴리머 통합되어 또는 통합되지 않은 채로 국소적으로 투여될 수 있다. 또 다른 구체예에서, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)은

본 발명의 siRNA 화합물, 폴리펩티드 또는 이들 모두에 공유적으로 부착될 수 있다. 부착된 PEG은 임의의 분자량, 바람직하게는 약 2,000 내지 약 50,000 daltons (Da)이 될 수 있다.

- [0691] 센스 부분은 링커분자, 가령, 폴리뉴클레오티드 링커 또는 비-뉴클레오티드 링커를 통하여 안티센스 부분에 연결될 수 있다.
- [0692] "역전된 반복체(inverted repeat)"는 반복체가 전사될 때 이중 가닥 siRNA 분자를 형성할 수 있도록 위치된 센스 및 안티센스 요소들을 포함하는 핵산 서열을 말한다. 역전된 반복체는 반복체의 두 개 요소간에 자가-절단가능한 리보자임과 같은 링커 또는 이중 서열을 선택적으로 포함할 수 있다. 역전된 반복체의 요소들은 이중 가닥의 RNA를 형성하는데 충분한 길이를 가진다. 전형적으로, 역전된 반복체의 각 요소는 길이가 약 15개 내지 약 100개 뉴클레오티드이며, 바람직하게는 약 20-30개 염기 뉴클레오티드, 바람직하게는 약 20-25개 뉴클레오티드, 가령, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개, 또는 30개 뉴클레오티드가 된다.
- [0693] "핵산"은 단일 또는 이중 가닥 형태의 데옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드 및 이의 폴리머를 말한다. 이 용어는 합성된, 자연적으로 생성된 그리고 비-자연적으로 생성되고, 및 기준 핵산과 유사한 결합 성질을 가지며, 및 기준 뉴클레오티드와 유사하게 대사되는 공지의 뉴클레오티드 유사체 또는 변형된 기본골격 잔기들 또는 링키지를 포함하는 핵산을 포함한다. 이와 같은 유사체의 예로는 포스포로티오에이트, 포스포로아미데이트, 메틸 포스포네이트, 키랄-메틸 포스포네이트, 2'-O-메틸 리보뉴클레오티드, 펩티드-핵산 (PNAs)을 포함하나 이에 한정되지 않는다.
- [0694] "큰 이중 가닥 RNA"는 약 40개 bp 이상의 크기, 예를 들면, 100개 bp보다 큰, 또는 좀더 특별하게는 300보다 큰 임의의 이중 가닥 RNA를 말한다. 큰 dsRNA의 서열은 mRNA의 단편 또는 전체 mRNA를 나타낼 수 있다. 큰 dsRNA의 최대 크기는 제한이 없다. 이중 가닥 RNA는 변형된 염기를 포함할 수 있는데, 변형은 포스포에이트 당 기본골격 또는 뉴클레오시드에 있을 수 있다. 이와 같은 변형은 질소 또는 황 이형원자 또는 당분야에 공지된 임의의 다른 변형을 포함할 수 있다.
- [0695] 이중 가닥 구조는 헤어핀 또는 micro RNA를 만들기 위한 자가-상보적 RNA 가닥에 의해 또는 두 개의 별개 상보적인 RNA 가닥의 어닐링에 의해 형성될 수 있다.
- [0696] "오버랩핑(Overlapping)"은 두 개 RNA 단편들이 한 가닥에서 다수의 뉴클레오티드에 의해 겹쳐지는 서열을 가질 때를 말하며, 여기서 다수의 뉴클레오티드(nt)의 수는 2-5개 정도로 작은 뉴클레오티드 또는 5-10개 뉴클레오티드 또는 그 이상이 된다.
- [0697] "하나 이상의 dsRNA"는 주요 서열에 근거하여 서로 상이한 dsRNA를 말한다.
- [0698] "표적 유전자 또는 mRNA"는 관심 대상의 임의의 유전자 또는 mRNA를 말한다. 표적 유전자 또는 mRNA는 발생학적 유전자 및 조절 유전자, 뿐만 아니라 대사 또는 구조적 유전자 또는 효소를 인코딩하는 유전자를 포함할 수 있다. 표적 유전자는 내생성 또는 외인성이 될 수 있다. 표적 유전자는 표현형이 조사되는 세포 또는 유기체에서 표현형 특징에 직간접적으로 영향을 주는 방식으로 발현될 수 있다. 이와 같은 세포들은 성인 신체에 있는 임의의 세포, 생식체(gamete)를 포함하는 동물 또는 식물의 배아에 있는 임의의 세포, 또는 불사화된 세포계 또는 주요 세포 배양물에서 생성되는 임의의 분리된 세포를 포함한다.
- [0699] 활성제의 전달을 위한 용도
- [0700] 본 발명의 화합물 및 조성물은 임의의 생리학적 또는 생물학적으로 활성제, 뿐만 아니라 당분야에 공지된 또는 위에서 설명된 활성물질의 임의의 조합을 전달하는데 이용될 수 있다. 활성제는 본 발명의 조성물 및 용도에 원하는 생리학적 또는 개선 효과를 제공하는데 충분한 양으로 존재할 수 있다.
- [0701] 본 발명의 화합물 및 조성물은 포유류 개체에서 소분자 화합물 및 약물, 펩티드, 단백질, 항체, 단클론 항체, 항체-기반 약물, 및 백신 물질들을 포함하는 약물 및 생물학적 활성제의 전달을 강화시키는 방향으로 유도된다.
- [0702] 활성제의 예로는 펩티드, 단백질, 핵산, 이중 가닥 RNA, 조혈제, 항감염제; 항-치매제; 항바이러스제, 항종양제, 해열제, 진통제, 소염제, 항게양제, 항알레르기제, 항울제, 항정신제, 항부정맥제, 혈관확장제, 항고혈압제, 저혈압 이뇨제, 항당뇨제, 항응고제, 콜레스테롤-강하 물질, 골다공증 치료요법제, 호르몬, 항생제, 백신, 사이토킨, 호르몬, 성장 인자, 심혈관 인자, 세포 흡착 인자, 증추 또는 말초 신경계 인자, 체액 전해질 인자, 혈액 유기 물질, 골 성장 인자, 위장 인자, 신장 인자, 결합 조직 인자, 감각 기관 인자, 면역계 인자, 호흡계 인자, 생식기관 인자, 안드로젠, 에스트로젠, 프로스타글란딘, 소마토트로핀, 고나도트로핀, 인터루킨, 스테로이드, 세균성 독소, 항체, 단클론 항체, 다클론 항체, 인간화 항체, 항체 단편 및 이뮤노글로빈을



포함한다.

[0703] 활성제의 예로는 에리트로포에틴, 과립세포-콜로니 자극 인자, 인슐린, Factor VII, Factor VIII, Factor IX, 인터페론, 헤파린, 히루젠, 리루로스, 리루딘을 포함한다.

[0704] 활성제의 예로는 몰핀, 하이드로몰폰, 옥시몰폰, 로보르파놀, 레발로판, 코데인, 날메펜, 날오르핀, 날오존, 날트렉손, 부프레노르핀, 부토르파놀 또는 날부핀, 코르티손, 하이드로코르티손, 플루드로코르티손, 프레디니손, 프레디니솔론, 메틸프레디니솔론, 트리암시놀론, 텍사메토손, 베타메토손, 파라메토손, 플루시놀론, 콜치신, 아세트아미노펜, 비-스테로이드성 소염 물질 NSAID, 아사클로비어, 리바바린, 트리플루오르티리딘, Ara-A 아라비노퓨라노실아데닌, 아실로구아노신, 노르데옥시구아노신, 아지도티미딘, 디데옥시아데노신, 디데옥시시티딘, 스피로노락톤, 테스토스테론, 에스트라디올, 프로게스틴, 고나도트로핀, 에스트로겐, 프로게스테론, 파파베린, 니트로글리세린, 혈관 활성 내장 펩티드, 칼시토닌유전자-관련된 펩티드, 시프로헵타딘, 독세핀, 이미프라민, 시메티딘, 텍스트로메토르판, 클로자릴, 슈퍼옥시드 디스무타제, 뉴로엔케팔리나제, 암포테리신 B, 그리세폴빈, 미코나졸, 케토코나졸, 티코나졸, 이트라코나졸, 플루코나졸, 세팔로스포린, 테트라사이클린, 아미노글루코시드, 에리트로마이신, 젠타마이신, 폴리믹신 B, 5-플루오르우라실, 블레오마이신, 메토틱세이트, 하이드록시우레아, 디데옥시이노신, 플록시우리딘, 6-멜캅토피린, 독소루비신, 다우노루비틴, I-다루비진, 탁솔, 파클리탁셀, 토코페롤, 퀴니딘, 프라조신, 베라파밀, 니페디핀, 딜티아젠펜, 조직 플라스미노겐 활성물질 TPA, 상피 성장 인자 EGF, 섬유아세포 성장인자 FGF-산성 또는 염기성, 혈소판 유도된 성장 인자 PDGF, 형질변환 성장 인자 TGF-알파 또는 베타, 혈관활성 내장 펩티드, 종양 괴사 인자 TNF, 시상하부 방출 인자, 프로락틴, 갑상선 자극 인자 TSH, 부신결절자극 호르몬 ACTH, 부갑상선 호르몬 PTH, 난포 자극 호르몬 FSH, 황체형성 호르몬 방출 호르몬 LHRH, 엔돌핀, 글루카곤, 칼시토닌, 옥시토신, 카르베토신, 알도엑테론, 엔카팔린, 소마토스틴, 소마토트로핀, 소마토메딘, 알파-멜라닌 세포 자극 호르몬, 리도카인, 수펜타닐, 테르부탈린, 스코폴아민, 고나도레린, 시클로피록스, 부스피론, 크로모린 나트륨, 미자돌람, 사이클로스포린, 리스이노프릴, 카프로프릴, 텔라프릴, 라니티딘, 파모티딘, 슈퍼옥시드 디스무타제, 아스파라기나제, 아르기나제, 아르기닌 데아미네아제, 아데노신 데아미나제 리보뉴클레아제, 트립신, 케모트립신, 파파인, 붐베신, 물질 P, 바소프레신, 알파-글로블린, 트랜스페린, 피브리노겐, 베타-리포단백질, 베타-글로블린, 프로트롬빈, 세룰로플라스민, 알파2-당단백질, 알파2-글로블린, 페투인, 알파1-리포단백질, 알파1-글로블린, 알부민, 및 프레알부민을 포함한다.

[0705] 활성제의 예는 오피오이드 또는 오피오이드 길항제, 가령, 몰핀, 하이드로몰폰, 옥시몰폰, 로보르파놀, 레발로판, 코데인, 날메펜, 날오르핀, 날로존, 날트렉손, 부프레노르핀, 부토르파놀, 및 날부핀; 코르티코스테론 가령, 코르티손, 하이드로코르티손, 플루드로코르티손, 프레디니손, 프레드니솔론, 메틸프레드니솔론, 트리암시놀론, 텍사메토손, 베타메토손, 파라메토손 및 플루시놀론; 기타-소염제, 가령, 콜치신, 이부프로펜, 인도메타신 및 피록시캄; 항-바이러스성 물질들, 가령 아시클로비르, 리바바린, 트리플루오르티리딘, Ara-A (아라비노퓨라노실아데닌), 아실구아노신, 노르데옥시구아노신, 아지도티미딘, 디데옥시아데노신, 및 디데옥시시티딘; 항안드로겐, 가령, 스피로놀락톤; 테스토스테론과 같은 안드로겐; 에스트라디올과 같은 에스트로겐; 프로게스틴; 파파베린과 같은 근육 이완제; 니트로글리세린, 혈관 활성 내장 펩티드 및 칼시토닌 관련 유전자 펩티드와 같은 혈관확장제; 시프로헵타딘과 같은 항히스타민; 히스타민 수용체 위치 차단 활성을 가진 물질들, 가령, 독세핀, 이미프라민 및 시메티딘; 텍스트로메토르판과 같은 진해제; 클로자릴과 같은 신경이완제; 항부정맥제; 항간질제; 슈퍼옥시드 디스무타제 및 뉴로엔케팔리나제와 같은 효소; 항-곰팡이제, 가령 암포테리신 B, 그리세폴빈, 미코나졸, 케토코나졸, 티코코나졸, 이트라코나졸 및 플루코나졸; 항균제, 가령, 페니실린, 세팔로스포린, 테트라사이클린, 아미노글루코시드, 에리트로마이신, 젠타마이신, 폴리믹신 B; 항암제, 가령, 5-플루오르우라실, 블레오마이신, 메토틱세이트, 및 하이드록시우레아, 디데옥시이노신, 플록시우리딘, 6-멜캅토피린, 독소루비신, 다우노루비신, I-다루비신, 탁솔 및 파클리탁셀; 항산화제, 가령, 토코페롤, 레티노이드, 카로티노이드, 유비퀴논, 금속 킬레이터 및 피탄산; 퀴니딘과 같은 항부정맥제; 프라조신, 베라파밀, 니페디핀, 딜티아젠펜과 같은 항고혈압제; 아세트아미노펜 및 아스피린과 같은 진통제; 인간화된 항체 및 항체 단편들을 포함하는 단클론 및 다클론 항체들; 안티센스 올리고뉴클레오타이드; 그리고 RNA, 조절 RNA, 간섭 RNA, DNA, 및 치료요법적 펩티드 및 단백질을 인코딩하는 유전자들을 포함하는 바이러스 벡터를 포함한다.

[0706] 투여용 조성물 및 제제

[0707] 여기에서 사용된 것과 같이, “투여하는(administering)” 그리고 “투여(administration)” 는 화합물 또는 조성물을 작용 위치로 직간접적으로 전달하는 모든 수단을 포함한다. 본 발명의 화합물 및 조성물은 단독으로 투

여되거나, 또는 여기에서 설명안된 다른 화합물, 조성물, 또는 치료요법제와 복합되어 투여될 수 있다.

- [0708] 본 발명의 조성물 및 방법은 다양한 점막 투여 경로에 의해 개체들에게 투여될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장, 질, 비강, 폐 또는 경피 전달을 통하여, 또는 눈, 귀, 피부 또는 다른 점막 표면으로 국소 전달될 수 있다. 본 발명의 일부 측면에서, 점막 조직 층은 상피 세포 층을 포함한다. 상피층은 폐, 기관(tracheal), 기관지, 폐포, 코, 볼, 상피 및 위장이 될 수 있다. 본 발명의 조성물은 기계적인 스프레이 장치와 같은 작동기 뿐만 아니라 가압된, 전기로 작동하는 또는 다른 유형의 작동기를 이용하여 투여될 수 있다.
- [0709] 본 발명의 조성물은 비강 또는 폐 스프레이와 같이 수용액으로 투여되거나 또는 당분야에 공지된 다양한 방법으로 스프레이형으로 분산될 수 있다. 본 발명의 조성물의 폐 전달은 연무화(aerosolized), 분무화(atomized) 또는 네블라이저화(nebulized)될 수 있는 드롭, 입자 또는 스프레이 형태로 조성물을 투여하여 이루어진다. 폐 전달은 코 또는 기관지 통로를 통하여 드롭, 입자 또는 스프레이 형태로 조성물을 투여하여 실시될 수 있다. 조성물의 입자, 스프레이 또는 에어로졸은 액체 또는 고체형이 될 수 있다. 코 스프레이와 같은 액체를 분배하는 바람직한 시스템은 미국 특허번호 4,511,069에 설명되어 있다. 이와 같은 제제는 본 발명의 조성물을 물에 용해시켜 수용성 용액을 만들고, 용액을 멸균시켜 통상적으로 준비될 수 있다. 제제는 다중-약량 용기에 제공될 수 있는데, 예를 들면, 미국 특허번호 4,511,069에서 설명하고 있는 밀봉된 분배 시스템에 제공될 수 있다. 다른 적합한 코 스프레이 전달 시스템은 *Transdermal Systemic Medication*, Y.W. Chien ed., Elsevier Publishers, New York, 1985; 및 미국 특허번호 4,778,810에서 설명되고 있다. 추가 에어로졸 전달 형태는 예를 들면, 압축된 공기-, 제트-, 초음파- 및 압전기 네블라이저를 포함할 수 있는데, 이것들은 예를 들면, 물, 에탄올, 또는 이의 혼합물과 같은 약리학적 용매에 용해 또는 현탁된 생물학적 활성제를 전달한다.
- [0710] 본 발명의 코 및 폐 스프레이 용액은 비-이온성 계면활성제(가령, 폴리소르베이트-80)와 같은 표면 활성제, 및 하나 이상의 완충액을 선택적으로 포함하도록 조제된 운반될 약물을 포함한다. 본 발명의 일부 구체예들에서, 코 스프레이 용액은 추진제를 추가로 포함한다. 코 스프레이 용액의 pH는 약 pH 6.8 내지 7.2이다. 이용되는 약리학적 용매는 pH 4-6의 약한 산성 수용성 완충액이 될 수 있다. 보존제, 계면활성제, 분산제 또는 가스를 포함하는 다른 성분들이 추가되어 화학적 안정성을 유지시키거나 강화시킬 수 있다.
- [0711] 일부 구체예들에서, 본 발명은 본 발명의 조성물을 포함하는 용액, 및 폐, 점막, 코안 스프레이 또는 에어로졸을 위한 작동기를 포함하는 약리학적 제품이다.
- [0712] 본 발명의 조성물의 제형은 방울 또는 유상액 형태 또는 에어로졸 형태의 액체가 될 수 있다.
- [0713] 본 발명의 조성물의 제형은 투여 전제 액체에서 재구성될 수 있는 고체가 될 수 있다. 고체는 분말로 투여될 수 있다. 고체는 캡슐, 테블릿 또는 젤의 형태가 될 수 있다.
- [0714] 본 발명의 폐 전달을 위한 조성물을 조제하기 위하여, 생물학적으로 활성제는 다양한 약리학적으로 허용가능한 첨가제 또는 전달을 강화시키는 성분, 뿐만 아니라 활성제의 분산을 위한 염기 또는 캐리어와 복합될 수 있다. 첨가제 또는 전달을 강화시키는 성분의 예로는 pH 조절 물질들, 가령, 아르기닌, 수산화 나트륨, 글리신, 염산, 구연산 및 이의 혼합물을 포함한다. 기타 첨가제 또는 전달을 강화시키는 성분은 국소 마취제(가령, 벤질 알코올), 등장성(isotonizing) 물질들 (가령, 염화나트륨, 만니톨, 소르비톨), 흡착 억제제(가령, Tween 80), 용해도 강화 물질들 (가령, 시클로덱스트린 및 이의 유도체들), 안정화제(가령, 혈청 알부민), 및 환원 물질들 (가령, 글루타티온)을 포함한다. 점막 전달용 조성물이 액체인 경우, 제제의 강장성(tonicity)은, 0.9% (w/v) 생리 식염수용액의 강장성을 기준 단위로서 측정하였을 때, 투여 위치에서 점막에 실질적인, 비가역적인 조직 손상을 유도하지 않는 값으로 일반적으로 조정된다. 일반적으로, 용액의 강장성은 약 1/3 내지 3, 좀더 일반적으로 1/2 내지 2, 및 가장 흔하게는 3/4 내지 1.7의 값으로 조정된다.
- [0715] 생물학적으로 활성제는 염기 또는 비이클에 분산될 수 있는데, 이들은 활성제 및 임의의 원하는 첨가제를 분산시킬 수 있는 능력을 가진 친수성 화합물을 포함할 수 있다. 염기는 폴리카르복실산 또는 이의 염, 카르복실 무수물(가령, 말레 무수물)과 다른 모노머(가령, 메틸 (메트)아크릴레이트, 아크릴산 등)와의 코폴리머, 친수성 비닐 폴리머 가령, 폴리비닐 아세테이트, 폴리비닐 알코올, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로오스 유도체들 가령, 하이드록시메틸셀룰로오스, 하이드록시프로필셀룰로오스, 등, 및 키토산, 콜라겐, 알기네이트 나트륨, 젤라틴, 히알루론산 및 이의 비-독성 금속 염과 같은 자연적 폴리머들을 포함하나 이에 한정되지 않는 광범위한 적합한 캐리어로부터 선택될 수 있다. 생분해가능한 폴리머는 예를 들면, 폴리락트산, 폴리(락트산-글리콜산) 코폴리머, 폴리하이드록시부틸산, 폴리(하이드록시부틸산-글리콜산) 코폴리머 및 이의 혼합물과 같은 염기 또는 캐리어로 선택될 수 있다. 합성 지방산 에스테르, 가령, 폴리글리세린 지방산 에스테르, 슈크로즈 지방산 에스테르 등이 캐



리어로 이용될 수 있다. 친수성 폴리머 및 기타 캐리어들은 단독으로 또는 복합되어 이용될 수 있으며, 및 부분적인 결정화, 이온 결합, 교차연결 및 이와 유사한 것들에 의해 강화된 구조적 일체성이 캐리어에 부여될 수 있다. 캐리어는 코 점막에 바로 사용하기 위한 유동성 또는 점성 용액, 겔, 페이스트, 분말, 미소구 및 필름을 포함하는 다양한 형태로 제공될 수 있다. 본 내용에서 선택된 캐리어를 사용하면 생물학적으로 활성제의 흡수를 촉진시킬 수 있다.

[0716] 생물학적으로 활성제는 다양한 방법에 따라 염기 또는 캐리어와 복합될 수 있고, 활성제의 방출은 캐리어의 확산, 분해에 의해 이루어지거나 또는 물 채널과 연합될 수 있다. 일부 환경에서, 활성제는 가령, 이소부틸 2-시아노아크릴레이트(가령, *Michael, 등, J. Pharmacy Pharmacol. 43:1-5, 1991* 참조)와 같은 적합한 폴리머로부터 준비된 미소캡슐(미소구) 또는 나노캡슐(나노스페어)에 분산되고, 및 코 점막에 적용되는 생체적합성 분산 매질에 분산되어, 장시간에 걸쳐 지속적인 전달 및 생물학적 활성을 가진다.

[0717] 점막, 코 또는 폐 전달을 위한 제제는 염기 또는 부형제로 분자량이 적은 친수성 화합물을 포함할 수 있다. 이와 같은 친수성 저분자량 화합물은 생리학적으로 활성 펩티드 또는 단백질과 같은 수용성 활성제가 염기를 통하여 활성물질이 흡수되는 신체 표면으로 확산될 수 있도록 통로 매체를 제공한다. 친수성 저분자량의 화합물은 점막 또는 투여 환경으로부터 선택적으로 수분을 흡수하여, 수용성 활성 펩티드를 용해시킨다. 친수성 저분자량 화합물의 분자량은 일반적으로 10,000을 넘지 않고, 바람직하게는 3000을 넘지 않는다. 친수성 저분자량 화합물의 예로는 폴리올 화합물, 가령, 슈크로즈, 만니톨, 락토즈, L-아라비노스, D-에리트로스, D-리보스, D-실로스, D-만로스, 락툴로스, 셀로비오스, 젠티비오스, 글리세린, 폴리에틸렌 글리콜 및 이의 혼합물을 포함하는 올리고사카라이드, 디사카라이드 및 모노사카라이드를 포함한다. 친수성 저분자량 화합물의 추가 예로는 N-메틸피롤리돈, 알코올(가령, 올리고비닐 알코올, 에탄올, 에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜, 등), 및 이의 혼합물을 포함한다.

[0718] 본 발명의 조성물은 대안으로 pH 조정 및 완충 물질들, 강장성 조정 물질들, 및 가습 물질들, 예를 들면, 아세트레이트 나트륨, 락테이트 나트륨, 염화 나트륨, 염화 칼륨, 염화 칼슘, 소르비탄 모노라우레이트, 트리에탄올아민 올레이트 및 이의 혼합물과 같은 적절한 생리학적 조건에 요구되는 약리학적으로 허용가능한 캐리어 물질을 포함할 수 있다. 고형 조성물의 경우, 예를 들면, 약학 등급의 만니톨, 락토스, 전분, 스테아레이트 마그네슘, 사카린 나트륨, 활석, 셀룰로오스, 글루코오스, 슈크로즈, 탄산 마그네슘 및 이와 유사한 것들을 포함한, 비-독성 약리학적으로 허용가능한 캐리어가 이용될 수 있다.

[0719] 본 발명의 특정 구체예들에서, 생물학적으로 활성제는 시간 방출 제제로 투여될 수 있는데, 예를 들면 느린 방출 폴리머를 포함하는 조성물로 투여될 수 있다. 활성제는 신속한 방출로부터 보호되는, 폴리머, 미소포집된 전달 시스템 또는 생체적합성 겔과 같은 조절된 방출 비이클과 같은 캐리어로 준비될 수 있다. 본 발명의 다양한 조성물에서 활성제의 장시간 전달은 예를 들면, 모노스테아레이트 알루미늄 하이드록젤 및 젤라틴과 같은 흡수를 지연시키는 조성물 물질을 포함시켜 제공될 수 있다.

[0720] 본 발명의 특정 구체예들내에서, 조성물은 하나 이상의 자연적 또는 합성 계면활성제를 포함할 수 있다. 특정 자연적 계면활성제는 인간의 폐 (폐 계면활성제)에서 볼 수 있으며, 및 폐포의 공기-액체 사이면에서 단층을 형성하는 인지질 및 단백질의 복합 혼합물이며, 숨을 내실 때 표면 장력을 거의 0으로 감소시키고, 폐포 충동을 방지시킨다. 폐 계면활성제의 90%이상(중량)은 인지질로 구성되며, 대략 40-80%는 DPPC가 되며, 및 나머지는 불포화 포스파티딜콜린 POPG, POPC 그리고 포스파티딜글리세롤이다. 계면활성제의 나머지 10%(중량비)는 표면 단백질 (SP)-A, SP-B, SP-C 및 SP-D와 같은 원형질 단백질 및 아포단백질로 구성된다.

[0721] 본 발명에 이용될 수 있는 자연적 계면활성제의 예로는 Survanta<sup>TM</sup> (beractant), Curosurf<sup>TM</sup> (poractant alfa) 및 Infasurf<sup>TM</sup> (calfactant), 및 이의 혼합물을 포함한다.

[0722] 합성 계면활성제의 예로는 시나폴티드; 디팔미토일포스파티딜콜린, 팔미토일올레일 포스파티딜글리세롤 및 팔미트산의 복합물; SURFAXIN<sup>TM</sup> (루시낙탄); 그리고 EXOSURF<sup>TM</sup> (콜포세틸); 킬옥사폴, DPPC, 및 헥사데카놀을 포함하는 성분; 그리고 이의 혼합물을 포함한다.

[0723] 조성물을 전달하는 방법은 에탄올 주사 방법 및 일정한 포어 크기의 폴리카르보네이트 막 필터가 적층된 Northern Lipids Lipex Extruder 시스템을 이용한 압출 방법을 포함한다. 프로브 팁과 바스 소니케이터를 이용한 소니케이션을 이용하여 균질한 크기의 입자들을 만들 수 있다. 핵산 성분의 추가 없이, 균일한 그리고 단일 분산 입자 크기를 수득할 수 있다. 시험관 형질감염 조성물의 경우, 핵산 성분들은 형질감염 물질이 만들어지고, 완충액 성분에 의해 안정화된 이후에 첨가될 수 있다. 생체내 전달 조성물의 경우, 핵산 성분은 제

제의 일부가 된다.

- [0724] 본 발명의 조성물 및 제제는 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있는데, 예를 들면, 정맥, 장관외 또는 복막 경로를 통하여 전신으로 전달될 수 있다. 일부 구체예들에서, 물질은 폐 또는 간과 같은 표적 조직 또는 염증이 있는 조직의 세포에 세포 내부로 전달될 수 있다. 개체의 세포들을 떼어내고, 떼어낸 세포들에게 물질을 전달하고, 및 다시 이 세포들을 개체로 재도입시킴으로써 물질을 전달하는 조성물 및 방법도 본 발명에 포함된다. 일부 구체예들에서, 본 발명은 생체내에서 물질을 전달하는 방법을 제공한다. 조성물은 개체의 정맥으로, 피하로, 복막으로 투여될 수 있다. 일부 구체예들에서, 본 발명은 포유류 개체의 폐로 물질을 생체내 전달하기 위한 방법을 제공한다.
- [0725] 본 발명의 활성제 리포솜 조성물은 생체내 약제학적 조성물에 이용될 수 있다. 개체에게 본 발명의 활성제 리포솜 조성물을 장관외, 경구, 흡입, 국소, 점막, 직장 또는 볼 경로를 통하여 투여할 수 있다. 장관외 사용은 피하, 피내, 정맥, 근육, 관절내, 활액내, 줄기내, 수막강내, 병소내 그리고 두개내 주사 또는 주입 기술을 포함한다.
- [0726] 특정 질환을 치료하기 위하여 본 발명의 활성제 리포솜 조성물의 유효량은 일반적으로 질환의 증상을 완화 또는 감소시키는 충분한 양이다. 조성물은 단일 투약량으로 투여되거나 반복된 투약에 의해 투여될 수 있다.
- [0727] 추가 구체예들
- [0728] 여기에서 언급된 모든 공개, 참고문헌, 특허, 특허 공개 및 특허 출원은 이들 각각의 전문이 참고문헌에 통합된다.
- [0729] 본 발명을 특정 구체예와 관련하여 설명되고 있고, 많은 세부적인 사항들이 설명을 목적으로 제시되어 있지만, 당업자들은 본 발명이 추가 구체예들을 포함하며, 여기에서 설명된 일부는 본 발명의 범위를 벗어나지 않고 상당히 변화될 수 있음을 인지할 것이다. 본 발명은 이와 같은 추가 구체예들, 변형 및 등가의 것들을 포함한다. 특히, 본 발명은 특징들, 용어들, 다양한 설명 성분들의 요소들 및 실시예를 포함한다.
- [0730] 여기에서, 발명을 설명하고, 및 청구범위에서 사용된 관사("a," "an," "the") 및 유사한 용어들은 단수 및 복수 개념을 모두 포함하는 것으로 해석되어야 한다.
- [0731] "포함하는"("comprising"), "가지는"("having"), "포함하는"("including"), "포함하는"("containing")은 개방된 용어로 예를 들면, “~을 포함하나 이에 한정되지 않은”으로 해석되어야 한다. 따라서, 이와 같은 “포함하는”("comprising," "having," "including" 및 "containing") 용어는 포괄적으로 해석되며, 배타적으로 해석되어서는 안된다.
- [0732] 여기에서 값의 범위를 언급할 때, 범위내에 일부의 값이 명시적으로 언급되던 아니던, 이 값이 개별적으로 언급된 것처럼, 각각의 그리고 임의의 별도의 값은 해당 범위에 속한다. 예를 들면, "4 내지 12"의 범위는 제한없이, 값 5, 5.1, 5.35 및 4이상 그리고 12 이하의 완전한(whole), 정수, 분수 또는 유리수를 포함한다. 여기에서 이용된 특정 값은 예시적인 것이며, 본 발명의 범위를 한정시키지 않는 것으로 이해할 것이다.
- [0733] 여기에서 탄소수의 범위를 언급할 때, 범위내에 일부의 값이 명시적으로 언급되던 아니던, 이 값이 개별적으로 언급된 것처럼, 각각의 그리고 임의의 별도의 값은 해당 범위에 속한다. 예를 들면, "C1-22"는 제한 없이 C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9, C10, C11, C12, C13, C14, C15, C16, C17, C18, C19, C20, C21, 및 C22를 포함한다.
- [0734] 여기에서 제공된 기술적 용어들의 정의는 당분야에 공지된 것들과 관련하여 이들 의미를 포함하는 것으로 해석되어야 하며, 및 본 발명의 범위를 제한시키는 의도가 아니다. 여기에서 제공된 기술적 용어들의 정의는 당분야에 대체 정의, 대체정의를 본 발명에서 제공되는 정의와 충돌되는 점에서, 대체 정의 또는 참고문헌에 첨부된 정의보다 우위에 있는 것으로 해석되어야 한다.
- [0735] 여기에서 제공된 실시예 그리고 여기에서 사용된 예시적인 용어는 오로지 설명을 위한 것이며, 본 발명의 범위를 제한하려는 의도는 아니다.
- [0736] 본 발명에 적합한 화합물 또는 분자들의 목록과 같은 실시예가 제공될 때, 열거된 화합물 또는 분자의 혼합물 또한 적합하다는 것이 당업자에게 자명할 것이다.
- [0737] 실시예들

- [0738] 실시예 1
- [0739] RNA를 함유하는 리포솜 제형을 준비하는 방법
- [0740] 본 실시예는 RNA를 함유하는 리포솜 제형을 만드는 방법의 구체예들을 설명한다. 이 방법에 이용된 일부 물질들을 하기에 요약한다:
- [0741] C18:1-norArg-C16 (팔미토일 올레일 노르-아르기닌, PONA) (MDRNA, Inc.) (분자량 683.3)
- [0742] 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[메톡시(폴리에틸렌 글리콜)-2000] (Ammonium Salt) (DMPE-PEG2k) (Genzyme Pharmaceuticals, Cambridge, Mass.)
- [0743] 콜레스테롤 (Solvay Pharmaceuticals)
- [0744] 콜레스테릴-헤미숙시네이트(CHEMS) GMP (Merck Eprova AG)
- [0745] 에탄올 (순수, 200 proof); 주사용 멸균수
- [0746] 포스페이트 나트륨: 일염기, 무수, 이염기, 무수
- [0747] 슈크로즈, 99+%
- [0748] 5 N 수산화나트륨; 2 N 염산; 빙초산
- [0749] 트로메타민 (트리스) USP 등급 (Research Organics)
- [0750] 150 mL 용량 0.2 필터 바틀, PES
- [0751] 눈금이 있는 Rainin 피펫 20  $\mu$ L, 200  $\mu$ L, 및 1 mL
- [0752] Iso-디스트 필터 PTFE25-10
- [0753] Cole-Parmer In-line 고정식 혼합기
- [0754] Watson Marlow 520 Di 펌프; Watson Marlow 523 펌프; Filtertec 펌프
- [0755] Vivaflow 50 100,00 MWCO PES (Sartorius)
- [0756] Slide-a-Lyser 투석 카세트 10,000 MWCO (Pierce)
- [0757] 완충용액 슈크로즈 포스페이트 (SUP) 제제 완충액 (20 mM 인산나트륨, 215 mM 슈크로즈, pH 7.4)는 다음과 같이 준비되었다. 2.17 g 의 무수 1염기 인산 나트륨과 8.79 g 의 무수 2염기 인산나트륨을 눈금이 있는 실린더내 3600 mL의 Milli-Q 탈이온수(DI water)에 첨가하고, 교반 막대로 완전히 혼합시켰다. 5N 수산화 나트륨 또는 2N 염산을 이용하여 pH를 pH 7.4로 조정하였다. 294.38 g의 슈크로즈를 서서히 첨가하고, 완전하게 용해시켰다. 최종 물 용적을 4 L로 조정하였다. 용액을 0.2  $\mu$ m 필터를 통하여 여과시켰다.
- [0758] 90% v/v 에탄올 USP에 리포솜을 형성하는 분자의 25mM 원액은 다음과 같이 준비하였다. 90 mL의 에탄올 USP (200 proof)을 깨끗하게 오토클레이브된 100 mL Pyrex 병에 넣었다. 에탄올에 연속적으로 1291  $\mu$ mol의 C18:1-norArg-C16 (PONA), 721.6  $\mu$ mol의 콜레스테릴-헤미숙시네이트(CHEMS) 분말, 61.7  $\mu$ mol 의 DMPE-PEG2K 분말, 및 515  $\mu$ mol 의 콜레스테롤을 첨가하였다. 성분들은 각각 용액에 첨가되었고, 교반 막대로 완전하게 혼합되었다. 혼합물을 15분간 소니케이트시켰다. 주사용 USP 멸균수 10mL를 첨가하고, 혼합하였다. 원액 용액을 ISO-DISC 필터 PTFE-25 mm, 1  $\mu$ m 포어 크기를 통하여 여과시켰다. 원액 용액을 80°C 보관하였고, 역상 HPLC 및 증기화 광산란 검출기(Evaporative Light Scattering Detection)에 의해 DILA2 아미노산 화합물 및 지질 성분에 대해 분석하였다.
- [0759] siRNA 원액 용액은 다음과 같이 주사용 멸균수에서 준비하였다. 5 mL의 주사용 멸균수를 멸균된 15 mL Falcon 튜브에 넣었다. 100 mg의 siRNA 분말을 튜브에 첨가하였고, 완전하게 혼합하였다. 용액을 10mL 주사기를 이용하여 0.22  $\mu$ M Millex GP 필터를 통하여 여과시켰다. siRNA 용액을 -20°C에 보관하였고, 및 순도 및 1:1000 희석 농도에 대해 OD 테스트하였다(A260 및 A280).
- [0760] Watson Marlow 520Di 튜브연동식 액체 펌프는 40 mL/min의 유속으로 조정되었다. 펌프는 210 rpm으로 설정되었고, 튜브로부터 분리시켰다. 라인을 행구기 위하여 40 mL의 90% 에탄올이 펌프되었다. 에탄올이 15초간 비이커

로 펌프되었고, 유속( mL/min)을 결정하기 위하여 무게를 측정하였다. 펌프 속도는  $40 \pm 0.5$  mL/min 유속을 제공하도록 조정되었다. siRNA 및 슈크로즈 포스페이트 용액의 펌프는 유사한 방식으로 조정되었다.

[0761] 세 가지 용액을 이용하여 다음과 같이 siRNA 제제를 준비하였다. (a)펌핑되는 제 1 용액은 siRNA 용액이다. 50 mL 원뿔형 튜브에서 SUP 완충액으로 siRNA를 희석시키고, 완전하게 혼합시켜 제 1 용액을 만들었다. (b)펌핑되는 제 2 용액은 DILA2 아미노산 화합물+ 세 가지 지질의 용액이다. 90% 에탄올에 혼합된 지질 원액은 다음의 지질을 포함하도록 만들었다: CHEMS, 콜레스테롤, 및 DMPE-PEG. 지질 원액에 DILA2 아미노산 화합물을 첨가하였다. 지질 원액에 주사용 멸균수의 트리스 몇 방울을 첨가하여, 용액에서 1:1 몰 트리스:CHEMS 농도를 만들었다. 펌핑되는 제 2 용액은 50 mL 원뿔형 튜브로 전방 이동 피펫(positive displacement pipette)으로 혼합된 지질 원액을 피펫하고, 90% 에탄올로 희석시키고, 완전하게 혼합시켜 만들었다. (c)펌핑되는 제 3 용액은 SUP 완충용액이다.

[0762] siRNA 제제는 다음과 같이 준비되었다. 제 1 siRNA 용액 및 리포좀을 형성하는 분자를 포함하는 제 2 용액을 충돌 스트림으로 동시에 펌프시켰다. 충돌 스트림의 처음 유출되는 1 mL을 버리고, 그 다음 siRNA 제제는 용기에 수거되었다. Watson Marlow 323 펌프를 이용하여 용기로 SUP 완충 용액을 펌프하여 에탄올 농도가 약 33%가 되도록 조정하였다. 용기내 siRNA 제제는 1시간 동안 자석 교반 플레이트 상에서 부드럽게 교반되면서 항온처리되었다.

[0763] 항온처리 후, 제제를 10,000 MWCO를 가진 Pierce slide-a-lyzer 투석 카세트에 로딩시키고, SUP 100 용적에 대해 4°C에서, 12-18시간 동안 투석시켰다.

[0764] 본 실시예는 접선흡음방식 및 정용여과에 의해 RNA를 함유하는 리포좀 제형을 만드는 방법의 구체예를 설명한다. siRNA 제제는 상기에서 설명된 것과 같이 제공되지만, 단 최종 투석 단계가 접선흡음방식 여과 (TFF) 프로세스로 대체되었다.

[0765] siRNA 제제는 2분간 자석 교반 플레이트 상에서 부드럽게 교반되면서 10% (v/v) 최종 에탄올 농도로 희석되었다.

[0766] Sartorius Vivaflow 50 100,000 MWCO PES 막을 이용하여 TFF 시스템을 50 mL의 70% 에탄올 USP로 세척시키고, 그 다음 60 mL/min의 펌프 유속에서 100 mL의 60% 에탄올로 재순환시켰다. TFF 시스템은 50 mL의 멸균수로 세척하고, 그 다음 60 mL/min의 펌프 유속에서 100 mL의 멸균수로 재순환시켰다. TFF 시스템은 50 mL의 SUP로 세척하고, 그 다음 60 mL/min의 펌프 유속에서 100 mL의 USP로 재순환시켰다.

[0767] 희석된 siRNA 제제를 TFF 용기로 로딩시키고, 및 siRNA 최종 농도가 0.5 mg/mL가 되도록 5회 농축시켰다(공급 압력 ~20 psi, 보유액(retentate) 압력 <0.2 psi 그리고 침투액(permeate) 유속 ~2 mL/min). 막 cm<sup>2</sup> 당 리포좀 조성물내에 조제된 최대 1 mg의 siRNA 구조가 프로세스되었다.

[0768] 농축된 siRNA 제제는 2 mL/min의 유속에서 5배 용적의 SUP(에탄올이 제거됨)에 대해 정용 여과에 의해 여과되었다.

[0769] 농축된 siRNA 제제는 1 mg/ml siRNA에서 원하는 용적으로 추가 농축되었다.

[0770] 본 실시예는 siRNA 리포좀 제형의 멸균 여과에 의해 RNA를 함유하는 리포좀 제형을 만드는 방법을 더 설명한다. siRNA 제제는 상기와 같이 제공되었다. 10 mL의 siRNA 제제를 10 mL 폴리프로필렌 주사기로 빼내고, 기포를 제거하였다. siRNA 제제를 0.22 uM Millex GP 필터 유닛을 통하여 여과시켰다. 10 mg의 siRNA 제제 (1 mg siRNA/mL)를 주사기에서 중간 정도의 압력으로 Millex GP 필터 유닛을 통하여 여과시켰다. 이 약물의 1 mL 방울은 사용하기 전 80°C에서 3 mL 타입 I 멸균 유리 바이알에 보관하였다.

[0771] 실시예 2

[0772] siRNA 리포좀 제형

[0773] 본 내용의 리포좀 siRNA 제제 구체예를 표 6에 나타낸다.

[0774] [표 6]

[0775] 리포솜 siRNA 제제

성분	μM	MW	mg/ml	mg/kg 투약
dsRNA	7.5	13255.4	0.100	1.0
DMPE-PEG2K	38.5	2815	0.108	1.1
chol	366.2	386	0.141	1.4
CHEMS	506.8	486	0.246	2.5
PONA	929.3	683	0.635	6.3

[0776]

[0777] 실시예 3

[0778] RNA를 함유하는 리포솜 조성물에 물리적 프로세스 매개변수들의 효과

[0779] 본 실시예에서, siRNA 리포솜 조성물의 성질에 있어서 수거, 향온처리 및 쿨엔칭의 특정 프로세스 매개변수들의 효과를 관찰하였다. 실시예 1에서 설명된 기본적인 프로토콜을 이용하여 조성물을 준비하였다.

[0780] 각 실시예에서, ApoB를 침묵시키기 위한 조성물의 활성제는 dsRNA다. 리포솜을 형성하는 성분은 지질 콜레스테롤 헤미숙시네이트 (CHEMS, Anatrace, CH210), 콜레스테롤 (Anatrace CH200), 및 DMPE-PEG2k (Genzyme)와 함께, DILA2 아미노산 화합물 C18:1-norArg(NH<sub>3</sub>Cl)-C16을 포함하는 에탄올-물 용액이다.

[0781] 제 1 실시예에서, 수거 단계에서, 리포솜 입자 크기 및 분산도에 유기 용매 농도의 효과가 표 4에 나타난 것과 같이 관찰되었다. 유기 용매 에탄올의 농도는 유속 및 이동 튜브 직경으로부터 계산되었다. 표 7에서 각 제제의 향온 처리 기간은 4시간이었다.

[0782] [표 7]

[0783] 리포솜 siRNA 제제의 수거 및 향온 처리

제제	pH	Z-avg	PdI Avg	포집화
33% EtOH 에서 수거	7.4	152	0.11	89%
37% EtOH 에서 수거	7.4	161	0.12	89%
40% EtOH 에서 수거	7.4	242	0.30	89%

[0784]

[0785] 표 7의 결과는 수거 용기안의 유기 용매 에탄올의 농도가 증가될 때 리포솜 입자들의 크기가 일반적으로 증가되었다는 것을 보여주고 있다. 입자 크기 분포의 분산도 또한 유기 용매의 농도가 증가될 때 증가되었다. 표 7의 결과는 pH 7.4에서 충돌 스트립 및 수거 용기 혼합물로부터 준비된 리포솜 조성물에 의해 활성 siRNA 물질의 높은 수준의 포집이 이루어졌다는 것을 보여주었다.

[0786] 제 2 실시예에서, 생체내 마우스에서 리포솜 siRNA 제제의 유전자를 침묵시키는 활성에 대해 향온 처리 시간의 효과를 관찰하였다. 생체내 마우스 간에서 리포솜 제형의 ApoB 유전자를 침묵시키는 활성이 측정되었다. ApoB를 침묵시키는 RNAi-물질들은 WO 08/109357에서 설명되어 있다.

[0787] 특정 리포솜 제형의 ApoB 유전자 침묵 활성을 생체내 마우스에서 측정하였고, 마우스 혈청 콜레스테롤 수준과 비교하였다. 표 8는 생체내 ApoB mRNA 감소 활성 및 생체내 상응하는 혈청 콜레스테롤 감소를 보여준다. 표 8의 리포솜 제형은 [C18-norArg-C16/CHEMS/chol/DMPE-PEG2k (50/28/20/2)]이다. 각 경우의 약량은 1.0 mg/kg/day이다. 각 제제는 유속 및 이동 튜브 직경에 근거하여, 수거용기내 33%의 에탄올 농도로 준비되었다.

[0788] [표 8]



[0789] 마우스에서 생체내 유전자를 침묵시키는 활성에 대한 항온 처리 기간의 효과

항온처리 기간(시간)	생체내 ApoB 녹다운 (%)	혈청 콜레스테롤 감소 (%)
0	19	8
1	31	24
2	38	6
4	51	27

[0790]

[0791] 표 8의 결과는 ApoB 유전자 침묵 RNAi-물질을 포함하는 리포좀 제형의 생체내 유전자를 침묵시키는 녹다운 활성은 항온 처리 기간이 증가될 때 유의한 수준으로 증가되었다는 것을 보여주었다.

[0792] 제 3 실시예에서, 리포좀 siRNA 제제의 생체내 유전자를 침묵시키는 활성에 대해 항온처리 기간의 효과를 표 9에서 나타낸 것과 같이 관찰되었다. 이와 같은 실험에서, 리포좀 siRNA 제제는 TFF 여과 대신 투석으로 준비되었다. 조성물은 pH 7.4에서 충돌 스트립 및 수거 용기 혼합물로 준비되었다. 수거 용기내 유기 용매 에탄올의 농도는 표 9에서 나타낸 것과 같이 30-36%로 변화되었다. 표 9의 각 리포좀 제형은 [C18-norArg-C16/CHEMS/cho1/DMPE-PEG2k (50/28/20/2)]이다.

[0793] [표 9]

[0794] 수거 용기내 다양한 에탄올 농도에서 리포좀 siRNA 제제의 생체내 유전자를 침묵시키는 활성에서 항온 처리 효과

프로토콜	항온처리 기간(시간)	생체내 ApoB 녹다운 (%)	혈청 콜레스테롤 감소 (%)
EtOH 30%	0	11	6
EtOH 30%	4	48	31
EtOH 33%	0	50	31
EtOH 33%	4	72	52
EtOH 33%, 난류 혼합	0	8	19
EtOH 33%, 난류 혼합	4	62	54
EtOH 36%	0	15	18
EtOH 36%	4	59	40

[0795]

[0796] 표 9의 결과는 ApoB 유전자 침묵 RNAi-물질을 포함하는 리포좀 제형의 생체내 마우스 유전자를 침묵시키는 활성은 항온 처리 기간이 이용될 때 유의한 수준으로 상당히 증가되었다는 것을 보여주었다.

[0797] 제 4 실시예에서, 생체내 마우스의 유전자를 침묵시키는 활성에서 리포좀 siRNA 분자 제제의 쿠엔칭 효과를 표 10에 나타낸 것과 같이 관찰하였다. 이 실험에서, 리포좀 siRNA 제제는 pH 7.4에서 충돌 스트립 및 수거 용기 혼합물, 및 1시간의 항온처리 기간을 이용하여 준비되었다. 수거 용기내 유기 용매 에탄올의 농도는 표 10에서 볼 수 있는 것과 같이, 33%로부터 더 낮은 농도로 쿠엔칭되었다. 표 10의 각 리포좀 제형은 [C18-norArg-C16/CHEMS/cho1/DMPE-PEG2k]이다. 제제의 안정성은 쿠엔칭후 1 시간 및 48 시간에서 siRNA 활성제의 포집화 및 평균 입자 크기를 측정하여 결정되었다.

[0798] [표 10]



[0799] 리포좀 siRNA 제제의 쿠엔칭

감소된 EtOH	Z-avg 입자 크기(nm)		포집화%	
	1 hr	48 hr	1 hr	48 hr
30	171	186	85	72
25	163	169	83	87
20	158	159	84	88
15	164	166	83	87
10	158	162	83	85
5	160	161	83	85

[0800]

[0801] 표 10에 나타난 결과는 에탄올 농도를 약 25% 이하로 쿠엔칭시킨 후, RNAi 물질을 포함하는 리포좀 제형은 48시간에 걸쳐 안정적인 평균 입자 크기를 유지하였고, RNAi-물질의 높은 포집 수준을 유지하였다는 것을 보여주었다.

[0802] 실시예 4

[0803] 항온처리에 의해 준비된 리포좀 조성물의 pH 효과

[0804] 본 실시예에서, 리포좀 조성물의 준비에 있어서 pH의 효과를 관찰하였다. 조성물은 실시예 1에서 설명된 기본 프로토콜을 이용하여 충돌 및 항온처리에 의해 준비되었다.

[0805] 활성제는 수용성 용액에서 준비된 ApoB를 침묵시키는 dsRNA 1 mg/mL이다.

[0806] 리포좀을 형성하는 성분은 지질 콜레스테릴 헤미숙시네이트 (CHEMS, Anatrace, CH210), 콜레스테롤 (Anatrace CH200), 및 DMPE-PEG2k (Genzyme)와 함께 DILA2 아미노산 화합물 C18:1-norArg(NH<sub>3</sub>Cl)-C16을 포함하는 에탄올 용액이다. DILA2 아미노산 화합물 및 지질의 상대적인 양은 (50/28/20/2)이며, 이는, 조성물 (C18:1-norArg(NH<sub>3</sub>Cl)-C16 / CHEMS / 콜레스테롤 / DMPE-PEG2k)용 DILA2 아미노산 화합물 및 지질 총량에 대해 각 성분의 비율(w/w)을 나타낸다.

[0807] 표 11에서 볼 수 있는 것과 같이, 128-137의 Z-avg 입자 크기를 가진 dsRNA는 pH 7.4 및 pH 4에서 만들었다. 표 11의 제제를 만드는 프로토콜은 완충액을 충돌 스트림에 첨가하여 에탄올 농도를 약 33%로 조정하고, 이어서 난류 혼합하는 것이다. 스트림이 수거되었고, 수거된 혼합물은 1시간 동안 항온처리되었다.

[0808] [표 11]

[0809] pH 7.4 및 4에서 리포좀 조성물

pH	PdI	Z-Avg	D(v) 0.25	D(v) 0.5	포집율(%)
7.4	0.11	134	94	120	90
	0.13	128	80	107	89
4	0.15	137	59	99	---
	0.12	130	78	105	---

[0810]

[0811] 표 11에 나타난 결과 뿐만 아니라, 실시예 3의 표 7, 9 및 10에서 나타난 결과에서, 리포좀에 포집된 RNAi를 유도하는 물질은 pH 7.4에서 준비되었다는 것을 보여주었다.

[0812] 실시예 5

[0813] 유속 조절에 의한 RNA를 함유하는 리포좀 조성물의 준비

[0814] 본 실시예에서, RNAi-물질 용액 및 리포좀을 형성하는 성분 용액의 유속을 이용하여 충돌 스트림 조성물을 조절함으로써 리포좀 조성물을 준비하였다. 조성물은 실시예 1에서 설명된 기본 프로토콜을 이용하여 충돌 및 항온처리에 의해 준비되지만, 단, RNAi-물질 용액 및 리포좀을 형성하는 성분의 용액의 유속은 추가 USP 완충액없이

수거 용기내 유기 용매 및 RNAi-물질의 특정 농도를 얻기 위하여 조정되었다. 제제는 충돌 스트립으로 준비되었고, 수거되고, 1시간 동안 항온처리되었다. pH는 7.4였고, 활성제는 ApoB를 침묵시키는 dsRNA이었다.

[0815] 리포솜을 형성하는 성분은 지질 콜레스테릴 헤미숙시네이트 (CHEMS, Anatrace, CH210), 콜레스테롤 (Anatrace CH200), 및 DMPE-PEG2k (Genzyme)와 함께, ILA2 아미노산 화합물 C18:1-norArg(NH<sub>3</sub>Cl)-C16을 포함하는 에탄올 용액이다. DILA2 아미노산 화합물 및 지질의 상대적인 양은 (50/28/20/2)이다.

[0816] 표 12에서 볼 수 있는 것과 같이, RNAi-물질 용액의 유속 대 리포솜을 형성하는 성분 용액의 유속 비 1.7:1, 3:1 그리고 5:1를 이용하여 dsRNA 제제를 준비하였다.

[0817] [표 12]

[0818] 조절된 유속비를 이용한 리포솜 조성물의 준비

dsRNA μM	유속비 RNAi:DI LA2	EtOH (%)	Z-avg (nm)	PdI	포집화%	생체내 Apo B KD (%)
12	5:1	15	80	0.21	58	48
12	5:1	15	170	0.16	83	71
18	3:1	22	80	0.10	75	59
18	3:1	22	170	0.22	91	69
26	1.7:1	33	189	0.17	73	75

[0819]

[0820] 표 12에 나타난 결과에서, 마우스 생체내에서 ApoB의 유전자를 침묵시키는 활성을 가지고, 및 활성물질의 양호한 포집화를 가지는 리포솜 조성물은 리포솜을 형성하는 성분의 용액에 대해 RNAi-물질 용액의 유속 비율이 약 2 내지 약 5가 될 때 만들어졌다.

[0821] 표 12에 나타난 결과에서, 평균 입자 크기가 80으로 낮은 입자 크기 분산도는 리포솜을 형성하는 성분의 용액에 대해 RNAi-물질 용액의 유속 비율이 약 3 내지 약 5가 될 때 수득되었다.

[0822] 실시예 6

[0823] RNA를 함유하는 리포솜 조성물의 여과

[0824] 본 실시예에서, 리포솜 조성물의 준비에서 접선희름방식 여과에 의해 활성 RNAi-물질을 농축시키는 효과를 관찰하였다. 조성물은 실시예 1에서 설명된 기본 프로토콜을 이용하여 pH 7.4에서, 수거 용기내 22% EtOH에서 충돌 스트립을 수거하고, 30분간 항온처리하여 준비하였다. 조성물은 접선희름방식 여과를 위하여 EtOH 농도를 10%로 하여 쿠엔칭되었다.

[0825] 리포솜을 형성하는 성분은 지질 콜레스테릴 헤미숙시네이트 (CHEMS, Anatrace, CH210), 콜레스테롤 (Anatrace CH200), 및 DMPE-PEG2k (Genzyme)와 함께, DILA2 아미노산 화합물 C18:1-norArg-C16을 포함하는 에탄올 용액이다. DILA2 아미노산 화합물 및 지질의 상대적인 양은 (50/28/20/2)이다.

[0826] 제제는 Amersham PES 컬럼을 이용하여 접선희름방식 여과에 의해 여과되었다. 표 13에서 볼 수 있는 것과 같이, 조성물은 활성 RNAi-물질을 최대 16배 농축시키기 위하여 실시된 접선희름방식 여과하에 입자크기 및 활성 RNAi-물질의 포집화에 대해 안정적이었다. 활성 RNAi-물질의 최종 농도는 최대 5 mg/ml이었다.

[0827] [표 13]

[0828] 항온처리 및 여과에 의해 만들어진 리포좀 RNAi 제제의 생체내 유전자를 침묵시키는 활성

프로토콜	농도 인자	Z-avg (nm)	PdI	포집화 %
TFF	1X	130	0.17	85
TFF	2X	132	0.13	84
TFF	4X	130	0.16	84
TFF	8X	133	0.15	80
TFF	12X	132	0.16	82
TFF	16X	134	0.17	84

[0829]

[0830] 실시예 7

[0831] RNA를 함유하는 리포좀 조성물의 안정성

[0832] 본 실시예에서, 상승된 온도에서 7일간 유지시킨 후 리포좀 조성물의 안정성을 관찰하였다. 조성물은 실시예 1에서 설명된 기본 프로토콜을 이용하여 충돌 및 1시간의 항온 처리에 의해 준비되었다. 난류 혼합 튜브가 이용되었으며, 수거 용기에서 EtOH의 농도는 33%이었다. 준비 후, 제제를 45°C에서 7일간 유지시켰다. 7일 후, 평균 입자 크기가 116 nm이었고, 포집도는 71% 였다. 열-처리된 제제의 경우, 7일 후 마우스 생체내 ApoB에 대한 유전자를 침묵시키는 활성의 상실이 관찰되지 않았다.

[0833] 실시예 8

[0834] 펩티드 결합 부분

[0835] 염료 결합 분석을 이용하여 양이온 펩티드가 RNAi 유도성 물질에 결합하는 상대적 강도를 측정하였다.

[0836] RNAi 유도성 물질은 10ml에서 7.8μl 준비하여, 20 /ml 원액과 75 μl/well을 만들었다. SYBR 금 희석은 2.5X 원액의 경우 1:4000 희석을 위하여 15 ml에서 3.75 μl로 준비되었다.

[0837] 펩티드를 5% 텍스트로브와 함께 Hepes 완충액에 용해시키고, 희석시켰다. 펩티드를 더 희석시켜, 원하는 N:P(0-4 범위)를 얻을 수 있도록 각 웰에 75 μl가 추가될 수 있다. 펩티드는 순도가 50%인 것으로 추정하지만, 실제 펩티드 양은 모른다.

[0838] SYBR-GOLD 염료 결합 분석(Dye Binding Assay)을 실시하였다. 웰당 150μl의 샘플 용적으로 96-웰 플레이트 분석. 최종 dsRNA 농도는 pH 7.4에서 10mM hepes/5% 텍스트로브에서 10μg/ml이었다. 펩티드는 상이한 작업 용액으로 희석되고, 상이한 N/P 비율이 되도록 동량의 용적이 첨가되었다. 추가 과정을 위하여, dsRNA가 우선 첨가되었고(20 /ml, 75 μl), 이어서 2.5X SYBR Gold가 150μl 첨가되었다. SYBR 염료와 경쟁하도록 펩티드 (75μl)가 그 다음 첨가되었다. 전체 용적은 300μl이었다. 완충액에 염료만으로 된 배경으로부터 형광이 보정되었다. Molecular Devices 플레이트 판독기로 판독하였을 때, SYBR-Gold ex/em는 495nm/537nm이었다.

[0839] 제제 입자 크기는 384-웰 플레이트로 옮겨, Wyatt 입자 크기측정기를 이용하여 결정되었다. 96 웰 플레이트의 각 웰은 중복 이동되었다. 플레이트에 남아있는 용적은 200 μl이었다.

[0840] 펩티드 방출은 적절한 곳에서 이황화물 환원 또는 효소 절단에 의해 촉발되었다. 시스테인으로 끝나는 펩티드는 글루타티온 환원에 의해 절단가능하였다. V-Cit를 포함하는 펩티드들은 카텡신 B에 의한 효소 절단에 의해 절단가능하였다. 글루타티온은 세포내 0.1-10 mM 농도로 존재하였고; 카텡신 B는 리소솜에서 1mM이었다. (카텡신 B의 경우, 0.14 ng/μl, Teich et al BMC Gastroenterology 2002, 2:16 참고).

[0841] 방출을 위하여, 중복된 웰중 하나에 최종 농도가 1mM이 되도록 적절한 분자를 첨가하고, 이어서 시간에 따른 SYBR GOLD 형광을 측정하였다.

[0842] 도 6에서 볼 수 있는 것과 같이, 폴리아르기닌 결합 부분의 dsRNA에 결합은 폴리아르기닌 결합 부분의 길이와 함께 증가되었다. 도 6에서, 최대 결합(SYBR-Gold 염료를 대체시키는 최고 능력)은 PN3499, 펩티드 (서열 번호:353) RRRRRCCRRRRR에서 관찰되었고, 이 펩티드는 10개 아르기닌을 포함하는 이량체 펩티드이다.

[0843] 실시예 9

- [0844] A549 세포들에서 PPIB 유전자 발현 녹다운에 대한 시험관 분석
- [0845] 시클로필린 B (PPIB) 유전자 녹다운 측정은 간접 RNA 전달 제제의 1차 활성-기반 시험관 분석으로 이용될 수 있다. 일반적으로 약간의 변이와 함께 아래 설명된 것과 같이 측정이 이루어졌다.
- [0846] 시클로필린 B (PPIB) 유전자 발현 녹다운은 A549 인간 폐포 기반 상피 세포들에서 측정되었다. PPIB 유전자 녹다운 측정에서, A549 세포에 간접 RNA 제제를 형질감염시키고, 형질감염후 24시간에 전체 RNA를 준비하였고, PPIB mRNA는 RT-PCR으로 분석되었다. 36B4(산성 리보솜성 인단백질 P0) mRNA 발현의 QRT-PCR는 표준적으로 실시되었다.
- [0847] A549 세포들을 웰당 7,500개 세포들(96-웰)로 접종시키고, 배지에서 하룻밤 동안 항온처리하였다. 형질감염시 융합도(Confluency)는 약 50% 였다. 형질감염 복합체를 간접 RNA를 배지(OptiMEM™)에 첨가하고, 볼텍스하고, 별도로 배지(OptiMEM™)에 전달 제제를 첨가하고, 및 최종적으로 간접 RNA 배지와 전달 제제 배지를 혼합시키고, 실온에서 20분간 항온처리하여, 형질감염 복합체를 만들어서 준비하였다. 항온처리 세포들의 배지를 새로운 OptiMEM™으로 교환하였고, 형질감염 복합체를 각 웰에 첨가하였다. 세포들을 37℃, 5% CO<sub>2</sub>에서 5시간 동안 항온처리하였고, 그 다음 완전 배지를 첨가하고(최종 태아 소 혈청 농도가 10%), 형질감염후 24시간이 될 때까지 항온처리를 지속하였다.
- [0848] PPIB 유전자 녹다운을 위하여, 세포들을 용해시키고, RNA를 준비하였다(Invisorb RNA Cell HTS 96-Kit/C, Invitek, Berlin, or RNeasy 96 Kit, Qiagen). DNA Engine Opticon2 thermal cycler(BioRad) 상에서 일-단계 qRT-PCR 키트 (Invitrogen)를 이용하여 정량적인 RT-PCR을 실행하였다.
- [0849] PPIB에 이용된 프라이머는 다음과 같다:
- [0850] (서열 번호:354)
- [0851] 5' -GGCTCCCAGTTCTTCATCAC-3' (포워드) 그리고
- [0852] (서열 번호:355)
- [0853] 5' -CCTTCGCACACCTC-3' (리버스)와
- [0854] (서열 번호:356)
- [0855] 5' -FAM-CTAGATGGCAAGCATGTGGTGTGG-TAMRA-3' -프로브용
- [0856] 36B4의 경우, 프라이머는 다음과 같다:
- [0857] (서열 번호:357)
- [0858] 5' -TCTATCATCAACGGGTACAAACGA-3' (포워드) 그리고
- [0859] (서열 번호:358)
- [0860] 5' -CTTTTCAGCAAGTGGGAAGGTG-3' (리버스)와
- [0861] (서열 번호:359)
- [0862] 5' -FAMCCTGGCCTGTCTGTGGAGACGGATTA-TAMRA-3' -프로브용.
- [0863] 본 내용의 일부 이중 가닥 RNA(dsRNA)의 구조는 표 14에 나타낸다.

[0864] [표 14]

이중 가닥 RNA

RNA	서열
DX4227 ApoB	(SEQ ID NO:360) 센스 5'-GGAAUC <sub>m</sub> U <sub>m</sub> UA <sub>m</sub> UA <sub>m</sub> U <sub>m</sub> UGAUC <sub>m</sub> CAsA-3' (SEQ ID NO:361) 안티센스 5'- <sub>m</sub> U <sub>m</sub> UGGAU <sub>m</sub> CAAA <sub>m</sub> UA <sub>m</sub> UAAGA <sub>m</sub> UUC <sub>m</sub> Cs <sub>m</sub> CsU-3'
DX4221 PPIB	(SEQ ID NO:362) 센스 5'-GGAAAGACUGUCCAAAAACAGUdGdG-3' (SEQ ID NO:363) 안티센스 5'-CCACUGUUUUUGGAACAGUCUUUCCUU-3'
DC4377 PPIB 콘주게이트	(SEQ ID NO:364) 센스 5'-GGAAAGACUGUCCAAAAAUU-3' (SEQ ID NO:365) 안티센스 5'-UUUUUGGAACAGUCUUUCCUU-3' 센스 가닥의 3'단부에서 트랜스포르탄과 함께 콘주게이트된: (SEQ ID NO:366) Mal-GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL-amide
DX2816 비-표적 Qneg	(SEQ ID NO:367) 센스 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUdTdT-3' (SEQ ID NO:368) 안티센스 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAAdTdT-3'
DX2940 LacZ	(SEQ ID NO:369) 센스 5'-CUACACAAAUCAGCGAUUUdTdT-3' (SEQ ID NO:370) 안티센스 5'-AAAUCGCUGAUUUUGUGUAGdTdC-3'
DX2742 PPIB MoCypB	(SEQ ID NO:371) 센스 5'-GGAAAGACUGUCCAAAAAUU-3' (SEQ ID NO:372) 안티센스 5'-UUUUUGGAACAGUCUUUCCUU-3'

[0865]

[0866] 표 14에서, “mU” 는 2'-O-메틸 우리딘을 나타내고, “mC” 는 2'-O-메틸 시티딘을 나타내고, 및 “s” 는 포스포로티오에이트 링키지를 나타낸다.

[0867] 실시예 10

[0868] 적층된 캐리어 및 촉발된 방출 펩티드를 이용한 PPIB 유전자 발현 녹다운

[0869] RNAi 유도성 물질을 위한 나노입자 캐리어를 A549 세포에서 PPIB 유전자 녹다운에 대해 테스트하였다. dsRNA RNAi 유도성 물질과 촉발된(triggered) 방출 펩티드의 이중 복합체가 특정 N/P 비율에서 우선 형성되었다. 엔도솜붕괴성 물질이 추가되었고, N/P 비율이 최종 값으로 조정되었다.

[0870] 적층 캐리어 제제는 HEPES/텍스트로즈 완충액에 dsRNA를 우선 볼텍스하여 일반적으로 준비되었다. 촉발된 방출 펩티드를 볼텍스를 하면서 첨가하여 dsRNA 복합물을 만들었다. 복합물은 15분간 항온처리되었다. 글루타알데히드가 첨가되었고, 코어는 1.5시간 동안 교차연결되도록 하였다. 1 M 트리스 완충액 pH 7.4을 첨가하여 반응을 쿼런칭시켰다. 엔도솜붕괴성 물질이 추가되었고, 세포에 추가시키기 전 15분간 캐리어 혼합물이 항온처리되었다.

[0871] 촉발된 방출 펩티드를 포함하는 적층 캐리어를 이용한 PPIB 유전자 발현 녹다운 측정은 표 15에 나타낸다. 표 15의 결과는 촉발된 방출 펩티드를 포함하는 캐리어가 엔도솜붕괴성 물질 존재하에 유의적인 유전자 침묵 효과를 만들기 위하여 세포로 활성 dsRNA 물질을 운반하는데 효과적이라는 것을 나타낸다.

[0872] [표 15]



[0873] 촉발된 방출 펩티드를 이용한 PPIB 유전자 발현 녹다운

촉발된 방출 펩티드	엔도솜붕괴성 물질	2 원성 N/P	최종 N/P	dsRNA	녹다운 (%) (대 dsRNA 기준)
PN4110	없음	5	---	DC4377 100 nM	0
PN4110	PN3033	5	2.5	DC4377 100 nM	65
PN4110	PN3033	10	5	DC4377 100 nM	63
RNAIMAX	없음			DC4377 25 nM	94

[0874]

[0875] 본 실시예에서 이용된 물질은 다음과 같다:

[0876] PN4110

[0877] 서열 번호:373

[0878] WWHHKKRRCCRRKKHHWW

[0879] PN3033 (diINF7)

[0880] 서열 번호:374

[0881] NH<sub>2</sub>-GLFEAIEGFIENGWEGMIDGWYGC-CO<sub>2</sub>H

[0882] 촉발된 방출 펩티드를 포함하는 적층 캐리어를 이용한 PPIB 유전자 발현 녹다운 측정에서 최종 N/P 비율의 효과를 측정하였고, 그 결과를 표 16에 나타낸다. 표 16의 결과는 촉발된 방출 펩티드를 포함하는 캐리어가 엔도솜 붕괴성 물질 존재하에 유의적인 유전자 침묵 효과를 만들기 위하여 세포로 활성 dsRNA 물질을 운반하는데 효과적이라는 것을 나타낸다. 더욱이, 표 16의 결과는 촉발된 방출 펩티드를 포함하는 적층 캐리어에 대한 시험관 녹다운은 최종 N/P 비율이 2.5-3.5로 더 낮을 때 강화되었다는 것을 보여주었다.

[0883] [표 16]

[0884] 시험관에서 유전자 녹다운에 최종 N/P 비율의 효과

축발된 방출 펩티드	엔도솜 붕괴성 물질	2 원성 N/P	최종 N/P	dsRNA	녹다운 (%) 대 형질감염안된대 기준	
PN4110	없음	5	---	DX4221 100 nM	11	14
PN4110	PN3033	5	2.5	DX4221 100 nM	70	72
PN4110	PN3033	5	3.5	DX4221 100 nM	72	74
PN4110	PN3033	5	4.5	DX4221 100 nM	40	36
PN4110	PN3033	4	2.5	DX4221 100 nM	55	50
PN4110	PN3033	4	3.5	DX4221 100 nM	36	41

[0885]

[0886] 실시예 11

[0887] 유리하게 낮은 전달 효율을 가지는 캐리어 입자들

[0888] PN4110로 응축된 DX4227을 이용하여 캐리어 나노입자 배취(batch)를 준비하였다. 배취의 전달 효율(efficiency ratio)은 0.63이었다. 입자 직경은 223 nm 이었다(Z-avg, PDI 0.2).

[0889] 캐리어 나노입자들의 배치는 PN183으로 응축된 DX4227을 이용하여 준비하였다. 배치의 전달 효율(efficiency ratio)은 1.28이었다. 입자 직경은 208nm 이었다(Z-avg, PDI 0.2).

[0890] 본 실시예에 이용된 물질은 다음과 같다:

[0891] PN183

[0892] 서열 번호:375

[0893] NH<sub>2</sub>-KETWWETWWTEWSQPGRKKRRQRRRPPQ

[0894] 실시예 12

[0895] 캐리어 입자들이 로드된 아미노산 지질로부터 준비된 리포솜 제형

[0896] 표 17에 나타낸 조성물로 RNAi-물질과 아미노산 지질의 리포솜 제형을 준비하였다. ApoB을 향한 RNAi-물질들은 WO 08/109357에서 설명하고 있다.

[0897] [표 17]

[0898] 아미노산 지질과 ApoB RNAi-물질의 리포솜 제형

No.	리포솜 제제	캐리어 입자들	초기 N/P	입자 크기 Z-avg 직경 (nm)	전달 효율
1	C18:1-norArg-C16/ CHEMS/ Chol/ DMPE-PEG2k (50/32/16/2)	DX4227/PN4110	1.6	185 (pH 7.4) 202 (pH 4.0)	9.21
2	C18:1-norArg-C16/ CHEMS/ Chol/ DMPE-PEG2k (50/32/16/2)	DX4227/PN183	1.6	298 (pH 7.4) 312 (pH 4.0)	9.86
3	C18:1-norArg-C16/ CHEMS/ Chol/ DMPE-PEG2k (50/32/16/2)	DX4227/PN183	1.6	180 (pH 7.4)	9.86
4	C18:1-norArg-C16/ CHEMS/ Chol/ DMPE-PEG2k (50/32/16/2)	DX4227/PN183	0.8	192	---

[0899]

[0900] 실시예 13

[0901] 펩티드 응축물 캐리어 입자들이 로드된 아미노산 지질로부터 준비된 리포솜 제형을 이용하여 HepG2 세포에서 시험관 ApoB 유전자 침묵 녹다운

[0902] 펩티드 응축물 캐리어 입자들이 로드된 아미노산 지질로부터 준비된 리포솜 제형의 시험관 ApoB 유전자 침묵 활성을 측정하였다. ApoB 유전자 녹다운 활성은 HepG2 세포에서 시험관 분석으로부터 얻었다. 제제에 대한 표준화된 ApoB mRNA 발현 값을 측정하였다.

[0903] HepG2 분석을 위한 방법 및 프로토콜은 다음과 같다:

[0904] 제1일: 25  $\mu$ l 복합체를 웰에 첨가하였고, 그 다음 75  $\mu$ l 세포들을 DMEM+10% FBS 배지 또는 혈청이 없는 OPTIMEM가 있는 웰에 첨가하였다. 혈청이 없는 OPTIMEM의 경우, 20% 혈청을 포함하는 완전 배지 100 $\mu$ l가 4-5시간 후에 최종 10% FBS 농도로 첨가되었다.

[0905] 제2일: 세포들을 24시간 시점에 용해시켰고, RNA를 준비하였고, ApoB 및 36B4에 대해 qRT-PCR을 실시하였고, 또는 GAPDH mRNA는 3일째에 실행되었다.

[0906] 리포솜 제형 [C18:1-norArg-C16/CHEMS/cho1/DMPE-PEG2k (50/32/16/2)]가 준비되었고, 이때 C18:1-norArg-C16는 미국 특허 출원번호 12/114,284에서 설명된 것과 같이, 아미노산 지질이다. 리포솜 제형에 펩티드 응축물 캐리어 입자들 DX4227/PN4110을 로딩하였다. 초기 N/P 비율은 0.8이었다. 이 제제는 DX4227 RNAi-물질 100nM 농도에서 Qneg와 비교하였을 때, 91% 녹다운을 나타내었다.

[0907] 추가 리포솜 제형 [C18:1-norArg-C16/CHEMS/cho1/DMPE-PEG2k (50/32/16/2)]를 준비하였고, 표 18에서 나타난 것과 같이, 펩티드 응축물 캐리어 입자들 DX4227/PN183를 로딩하였다.

[0908] [표 18]

[0909] 리포솜 제형에 대해 시험관 HepG2에서 ApoB 유전자 침묵 녹다운

No.	리포솜 제제에서 캐리어 입자들	펩티드와 N:P	전달 효율	%KD 대 Qneg (25 nM)	%KD 대 Qneg (2.5 nM)
1	DX4227/PN183	0.6	9.54	95	95
2	DX4227/PN183	0.7	9.7	95	89
3	DX4227/PN183	0.8	9.86	87	76
4	DX4227/PN183	0.6	11.69	89	88
5	DX4227/PN183	0.7	11.85	91	88
6	DX4227/PN183	0.8	12.01	90	80
7	RNAIMAX 에서 DX4227 기준	---	---	69	78

[0910]

[0911] 표 18에서 볼 수 있는 것과 같이, 이들 제제는 DX4227 RNAi-물질의 농도 25 nM 및 2.5 nM에서 Qneg와 비교하였을 때, 유리한 높은 녹다운 활성을 나타내었다.

[0912] 실시예 14

[0913] 펩티드 응축물 캐리어 입자들이 로딩된 아미노산 지질로부터 준비된 리포솜 제형을 이용하여 생체에서 ApoB 유전자 침묵 녹다운

[0914] 리포솜 제형은 ApoB 유전자 침묵 RNAi-물질을 포함하는 펩티드 응축 캐리어 입자들이 로딩된 아미노산 지질로 준비되었다. 이들 리포솜 제형에 대해 마우스 생체내에서 ApoB 유전자 침묵 활성이 측정되었고, 마우스 혈청 콜레스테롤 수준과 비교하였다. 표 9에는 생체내 ApoB mRNA 감소 활성과 대응하는 혈청 콜레스테롤 감소를 나타낸다. 표 19의 리포솜 제형은 [C18:1-norArg-C16/CHEMS/cho1/DMPE-PEG2k (50/32/16/2)]이며, 각 경우에 약량은 2 mg/kg이었다.

[0915] [표 19]

[0916] 펩티드 응축물 캐리어 입자들이 로딩된 리포솜 제형을 이용하여 마우스 생체내에서 ApoB 유전자 침묵

No.	캐리어 입자 (초기 N/P)/ (최종 N/P)	ApoB mRNA 감소% (p-값)	체중 변화% (48 hrs)	혈청 콜레스테롤 감소% (p-값)
1	DX4227 단독 (0.8) / (---)	55 (0.003)	-0.6	45 (0.000)
2	DX4227 단독 (1.4) / (---)	64 (0.001)	+1.3	56 (0.000)
3	DX4227/PN183 (0.8) / (0.6)	50 (0.009)	+0.8	43 (0.004)
4	DX4227/PN183 (0.8) / (0.7)	48 (0.007)	+0.9	38 (0.000)
5	DX4227/PN183 (0.8) / (0.8)	34 (0.036)	+1.1	27 (0.002)
6	DX4227/PN183 (1.0) / (0.6)	70 (0.001)	+1.4	52 (0.000)
7	DX4227/PN183 (1.0) / (0.7)	42 (0.014)	+0.6	31 (0.001)
8	DX4227/PN183 (1.0) / (0.8)	26 (0.073)	+3.2	18 (0.004)
9	기준	0	+3.5	0

[0917]

[0918] 표 19에 나타난 결과는 ApoB 유전자 침묵 RNAi-물질을 포함하는 펩티드 응축 캐리어 입자들이 로딩된 리포솜 제형은 펩티드 응축물 캐리어 입자들 없는 동일한 제제와 비교하였을 때, 투여 후 48시간 뒤 일반적으로 체중 증

가가 더 크기 때문에 마우스에서 유리한 내성이 있는 것을 나타낸다.

[0919] 더욱이, 표 19에 나타난 결과에서, ApoB mRNA 감소 및 혈청 콜레스테롤 감소로 인하여, 펩티드 응축물 캐리어 입자들이 로딩된 리포솜 제형은 생체내에서 ApoB 유전자 침묵에 대해 상당한 유의한 활성이 있다는 것을 보여준다. 표 19의 결과는 초기 N/P는 1.0로 더 높고, 및 최종 N/P는 0.6-0.7로 더 낮은 것이 바람직하다는 것을 보여 주었다.

[0920] ApoB 유전자 침묵 RNAi-물질을 포함하는 펩티드 응축물 캐리어 입자들이 로딩된 아미노산 지질로 추가 리포솜 제형을 준비하였다. 이들 리포솜 제형에 대한 마우스 생체내에서 ApoB 유전자 침묵 활성이 결정되었고, 마우스 혈청 콜레스테롤 수준과 비교되었다. 생체내에서 ApoB mRNA 감소 활성과 이에 상응하는 생체내 혈청 콜레스테롤 감소는 표 20에 나타낸다.

[0921] [표 20]

[0922] 펩티드 응축물 캐리어 입자들이 로딩된 리포솜 제형을 이용하여 마우스 생체에서 ApoB 유전자 침묵

No.	리포솜 제제	캐리어 입자 (초기 N/P) 약량 (mg/kg)	ApoB mRNA 감소% (p-값)	체중 변화% (48 hrs)	혈청 콜레스테롤 감소 % (p-값)
1	C18:1-norArg-C16/ CHEMS/ Chol/ DMPE-PEG2k (50/32/16/2)	DX4227 단독 (0.8) 2 (mg/kg)	71 (0.001)	-0.5	64 (0.000)
2	C18:1-norArg-C16/ CHEMS/ Chol/ DMPE-PEG2k (50/32/16/2)	DX4227 단독 (1.6) 2 (mg/kg)	82 (0.0001)	-1.2	71 (0.000)
3	C18:1-norArg-C16/ CHEMS/ Chol/ DMPE-PEG2k (50/32/16/2)	DX4227/PN4110 (1.6) 1.7 (mg/kg)	71 (0.0001)	+0.5	52 (0.0001)
4	C18:1-norArg-C16/ CHEMS/ Chol/ DMPE-PEG2k (50/32/16/2)	DX4227/PN183 (1.6) 1.4 (mg/kg)	88 (0.0002)	+3.7	64 (0.0001)
5	기준	PBS	-2	0.2	0

[0923]

[0924] 표 20에서 펩티드 응축물 캐리어 입자들이 로딩된 리포솜 제형의 경우, 제제3의 전달 효율은 9.21이며, 제제 4의 전달 효율은 9.86이었다.

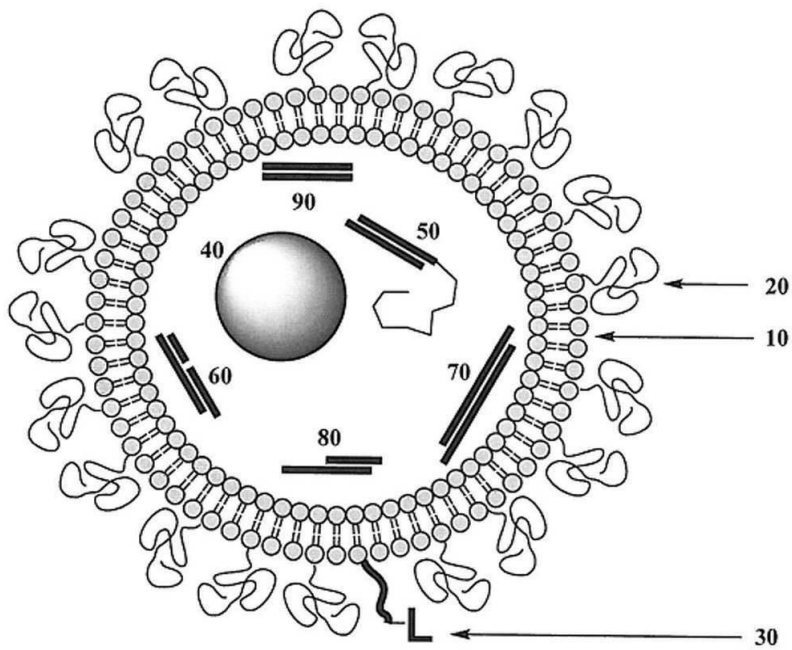
[0925] 표 20에 나타난 결과는, ApoB 유전자 침묵 RNAi-물질을 포함하는 펩티드 응축물 캐리어 입자들이 로딩된 리포솜 제형은 펩티드 응축물 캐리어 입자들 없는 동일한 제제와 체중 감소에 대해 비교하였을 때, 투여 후 48시간 뒤 체중 증가때문에 마우스에서 유리한 내성이 있는 것을 나타낸다.

[0926] 더욱이, 표 20에 나타난 결과는, ApoB mRNA 감소 및 혈청 콜레스테롤 감소로 인하여, 펩티드 응축물 캐리어 입자들이 로딩된 리포솜 제형은 생체내에서 ApoB 유전자 침묵에 대해 상당한 유의한 활성이 있다는 것을 보여준다.

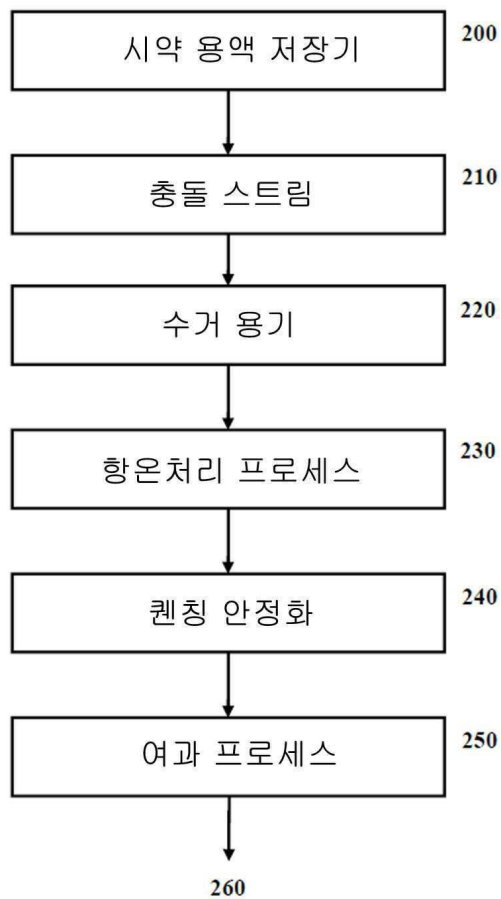


도면

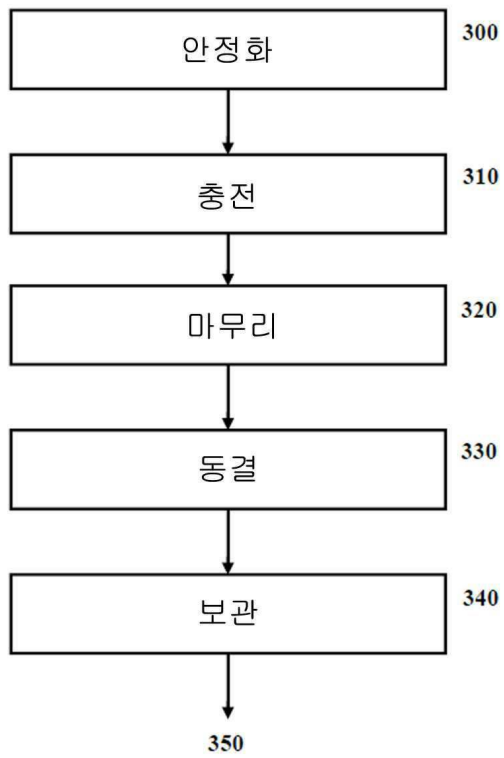
도면1



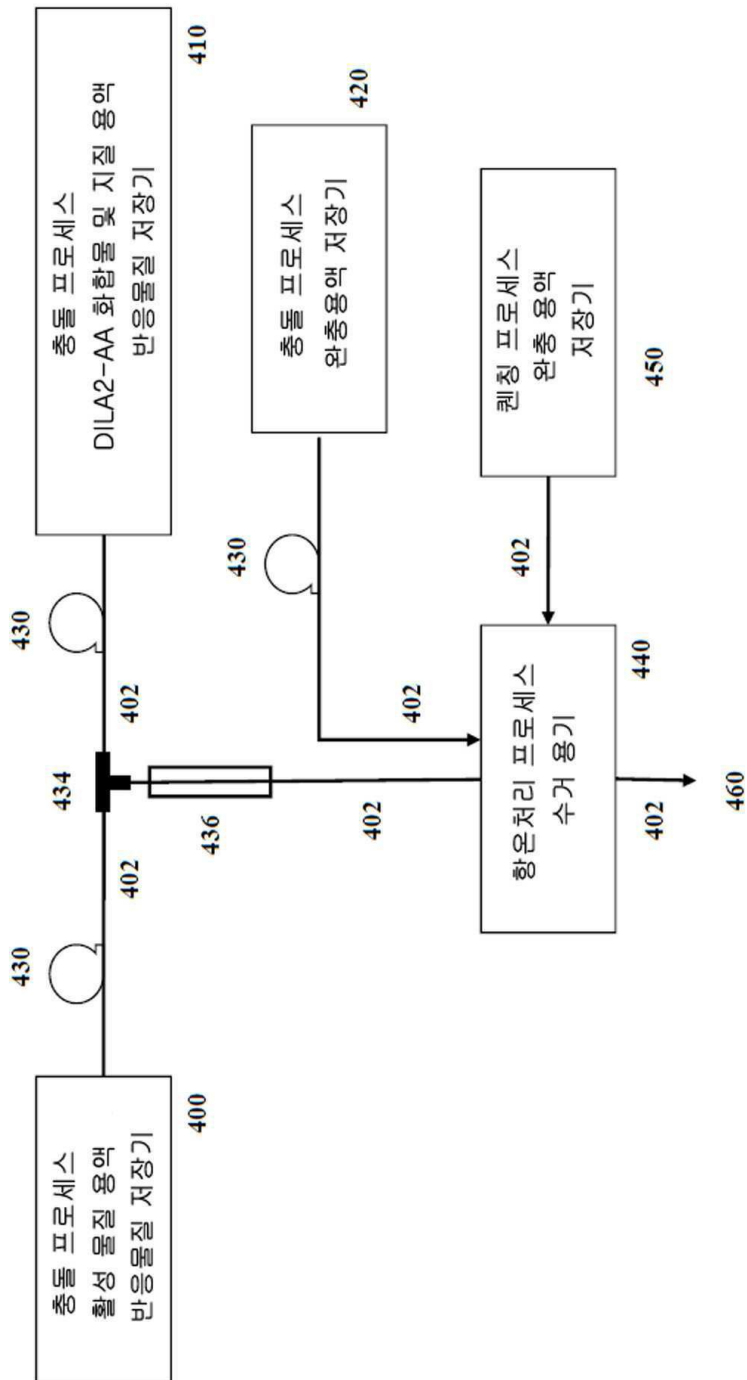
도면2



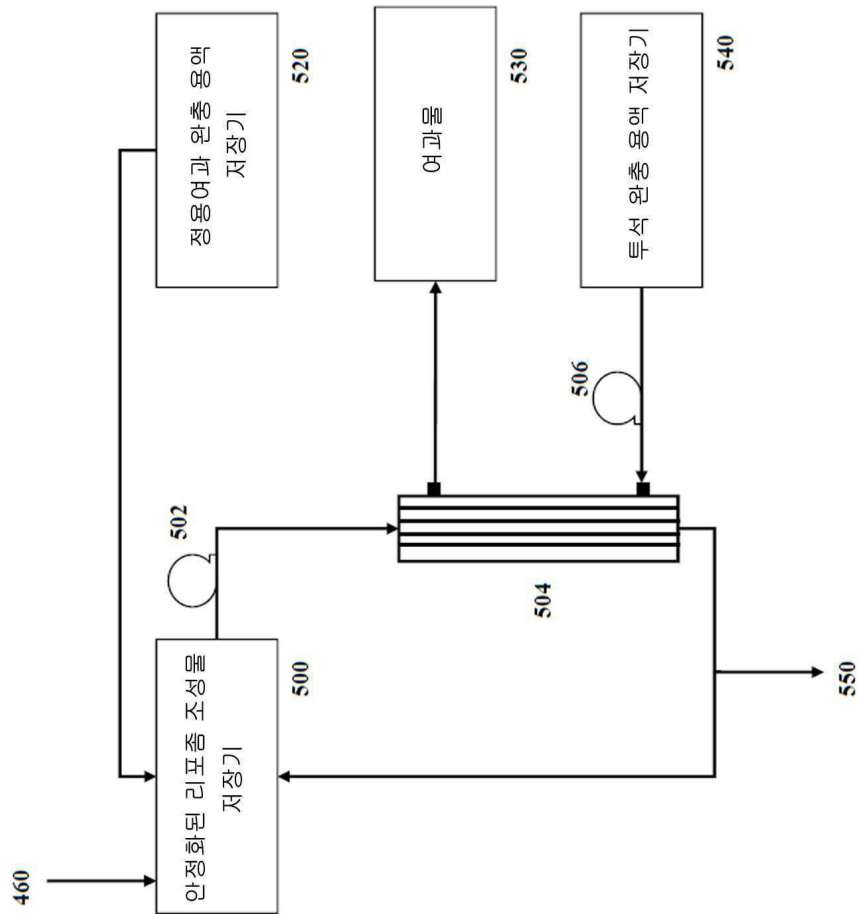
도면3



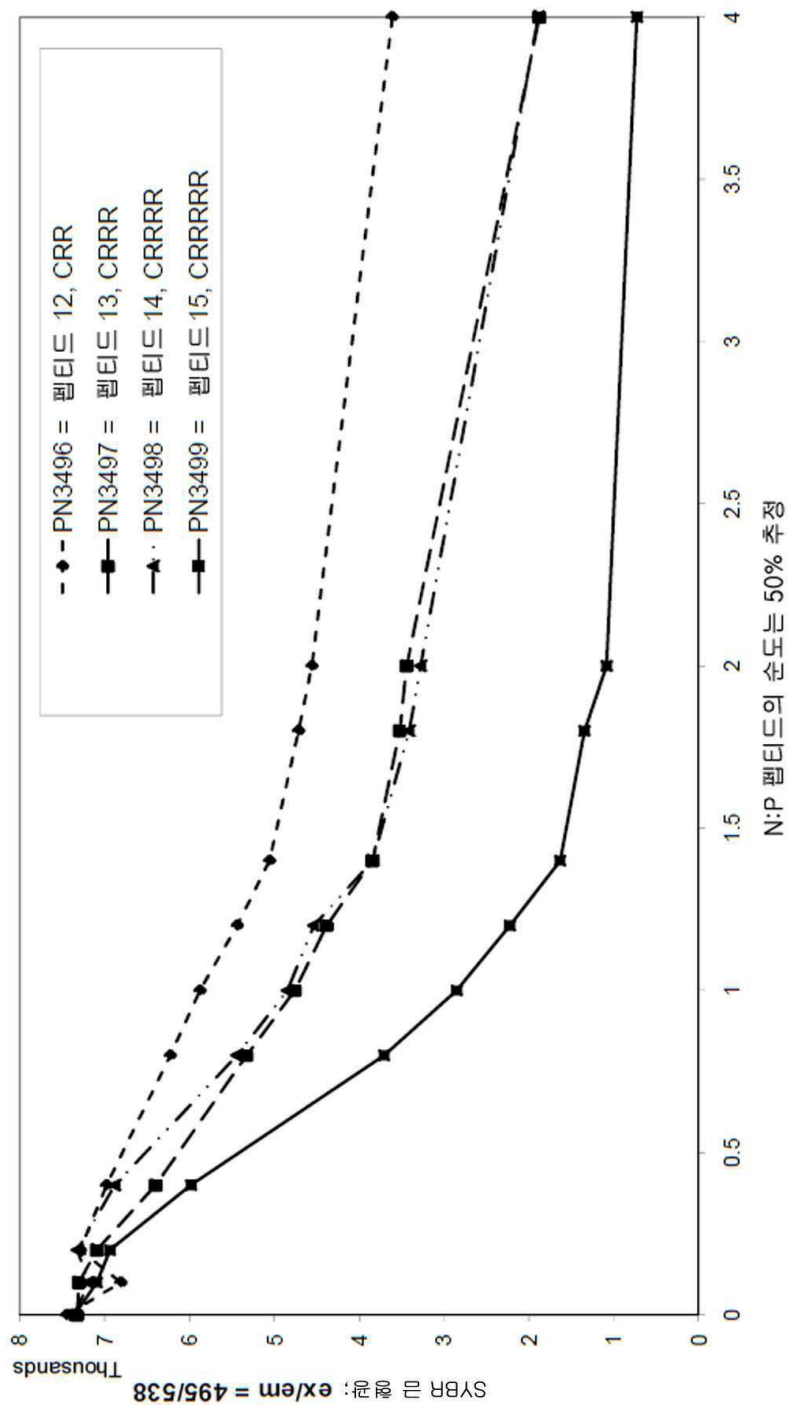
도면4



도면5



도면6



## 서열 목록

### SEQUENCE LISTING

<110> MDRNA, INC.

<120> PROCESSES AND COMPOSITIONS FOR LIPOSOMAL AND EFFICIENT  
DELIVERY OF GENE SILENCING THERAPEUTICS

<130> 08-16PCT



<140><141><150> 61/106,062  
 <151> 2008-10-16  
 <150> 61/167,379  
 <151> 2009-04-07  
 <160> 376  
 <170> PatentIn version 3.5  
 <210> 1  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"  
 <220><221> MOD\_RES  
 <222>  
 > (1)..(1)  
 <223> Aminobenzoic acid  
 <220><221> MOD\_RES  
 <222> (5)..(5)  
 <223> Lysine(2,4-dinitrophenyl)  
 <400> 1  
 Xaa Phe Arg Ala Lys  
 1 5  
 <210> 2  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"  
 <220><221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Aminobenzoic acid  
 <220><221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Lysine(2,4-dinitrophenyl)

<400> 2

Xaa Phe Arg Lys Trp

1 5

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> Aminobenzoic acid

<220><221> MOD\_RES

<222> (4)..(4)

<223> 4-nitrophenylalanine

<400> 3

Xaa Phe Arg Phe Phe

1 5

<210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> Aminobenzoic acid

<220><221> MOD\_RES

<222> (5)..(5)

<223> Lysine(2,4-dinitrophenyl)

<400> 4

Xaa Phe Arg Phe Lys

1 5

<210> 5

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 5

Asn Phe Phe Gly Val Gly Gly Glu

1 5

<210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 6

Cys Pro Val Thr Tyr Gly Gln Cys

1 5

<210> 7

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 7

Gln Ala Ser Arg Ser Phe Asn Gln

1 5

<210> 8

<211> 8

<212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"  
 <400> 8  
 Ser Arg Ser Phe Asn Gln Gly Arg

1 5  
 <210> 9  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"  
 <400> 9  
 Ala Ser Arg Ser Phe Asn Gln Gly

1 5  
 <210> 10  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"  
 <400> 10  
 Gly Arg Arg

1  
 <210> 11  
 <211> 1  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 11

Arg

1

<210> 12

<211> 2

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 12

Gly Arg

1

<210> 13

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 13

Tyr Leu Lys Arg Leu Cys Gly Thr

1 5

<210> 14

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 14

Lys Arg Leu Cys Gly Thr Phe Leu



1 5

<210> 15

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> MOD\_RES

<222> (7)..(7)

<223> Cysteic acid

<400> 15

Phe Val Asn Gln His Leu Xaa Gly

1 5

<210> 16

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> MOD\_RES

<222> (2)..(2)

<223> Cysteic acid

<400> 16

Leu Xaa Gly Ser His Leu Val Glu

1 5

<210> 17

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 17

His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu

1 5

<210> 18

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> MOD\_RES

<222> (8)..(8)

<223> Cysteic acid

<400> 18

Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Xaa

1 5

<210> 19

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> MOD\_RES

<222> (7)..(7)

<223> Cysteic acid

<400> 19

Glu Ala Leu Tyr Leu Val Xaa Gly

1 5

<210> 20

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

```

<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
      peptide"
<220><221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> Cysteic acid
<400> 20
Leu Tyr Leu Val Xaa Gly Glu Arg
1           5
<210> 21
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
      peptide"
<220><221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> Cysteic acid
<400> 21
Val Xaa Gly Glu Arg Gly Phe Phe
1           5
<210> 22
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
      peptide"
<400> 22
Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr
1           5
<210> 23
<211> 8

```

<212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 23  
 Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Ala  
 1 5

<210> 24

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"

<400> 24  
 Leu Lys Pro Ala Lys Ser Ala Arg  
 1 5

<210> 25

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"

<400> 25  
 Ala Pro Leu Lys Pro Ala Lys Ser

1 5

<210> 26

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 26

Lys Pro Ala Lys Ser Ala Arg Ser

1 5

<210> 27

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 27

Lys Leu Ser Gly Phe Ser Phe Lys

1 5

<210> 28

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 28

Lys Ser Phe Lys Leu Ser Gly Phe

1 5

<210> 29

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 29

Ala Tyr Arg Arg Phe Tyr Gly Pro

1 5

<210> 30

<211> 8

<212> PRT

<213

> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide"

<400> 30

Gln Trp Leu Gly Ala Pro Val Pro

1 5

<210> 31

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide"

<400> 31

Met Lys Leu Thr Leu Lys Gly Gly

1 5

<210> 32

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide"

<400> 32

Lys Lys Leu Thr Val Asn Pro Gly

1 5

<210> 33

<211> 8



<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 33

Leu Ser Lys Lys Val Lys Asn Met

1 5

<210> 34

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 34

Thr Phe Leu Arg Leu Ala Ala Leu

1 5

<210> 35

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 35

Ser Leu Asn His Tyr Ala Gly Tyr

1 5

<210> 36

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 36

Leu Leu Val Tyr

1

<210> 37

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 37

Arg Glu Ala Ala Ser Gly Asn Phe

1 5

<210> 38

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 38

Pro Thr Val Gly Ser Phe Gly Phe

1 5

<210> 39

<211>

8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 39

Glu Val Asp Leu Leu Ile Gly Ser

1 5

<210> 40

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 40

Pro Arg Phe Lys Ile Ile Gly Gly

1 5

<210> 41

<211> 2

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 41

Arg Arg

1

<210> 42

<211> 2

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 42

Arg Arg

1

<210> 43

<211> 2

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 43

Leu Arg

1

<

210> 44

<211> 2

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 44

Phe Arg

1

<210> 45

<211> 2

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 45

Phe Arg

1

<210> 46

<211> 2

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 46

Phe Arg

1

<210> 47

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> Aminobenzoic acid

<220><221> MOD\_RES

<222> (5)..(5)

<223> 4-nitrophenylalanine

<400> 47

Xaa Ile Glu Phe Phe Arg Leu

1 5

<210> 48

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 48

Leu Leu Ser Ala Leu Val Glu Thr

1 5

<210> 49

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 49

Ile Thr Leu Leu Ser Ala Leu Val

1 5

<210> 50

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 50

Leu Ser Ala Leu Val Glu Thr Arg

1 5

<210> 51

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 51

Val Val Ile Ala Thr Val Ile Val

1 5

<210> 52

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 52



Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly

1 5

<210> 53

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 53

Val Ile Thr Leu Val Met Leu Lys

1 5

<210> 54

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 54

Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp

1 5

<210> 55

<211> 8

<212> PRT

<213>

> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 55

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val

1 5

<210> 56

<211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
           peptide"  
 <400> 56  
 Thr Tyr Lys Phe Phe Glu Gln Met  
 1                  5  
 <210> 57  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
           peptide"  
 <400> 57  
 Val Ile Ala Thr Val Ile Val Ile  
 1                  5  
 <210> 58  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
           peptide"  
 <400> 58  
 Ile Val Ile Thr Leu Val Met Leu  
 1                  5  
 <210> 59  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 59

Leu Gly Asp Phe Phe Arg Lys Ser

1 5

<210> 60

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 60

Ile Lys Asp Phe Leu Arg Asn Leu

1 5

<210> 61

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 61

Gly Tyr Asp Leu Ser Phe Leu Pro

1 5

<210> 62

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 62

Ala Pro Gly Phe Leu Gly Leu Pro

1 5

<210> 63

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 63

Thr Met Thr Leu Ser Lys Ser Thr

1 5

<210> 64

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 64

Asn Tyr Phe Leu Asp Val Glu Leu

1 5

<210> 65

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 65

Ala Leu Asp Phe Ala Val Gly Glu

1 5

<210> 66

<211> 8

```

<212> PRT

<213>

> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
        peptide"

<400> 66

Phe Gln Ile Tyr Ala Val Pro Trp

1             5

<210> 67

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
        peptide"

<400> 67

Lys Asp Val Leu Asp Ser Val Leu

1             5

<210> 68

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
        peptide"

<400> 68

Val Glu Asp Leu Glu Ser Val Gly

1             5

<210> 69

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

```

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 69

Gly Asn Phe Lys Ser Gln Leu Gln

1 5

<210> 70

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 70

Trp Gly Thr Phe Glu Glu Val Ser

1 5

<210> 71

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 71

Leu Gly Glu Phe Val Ser Glu Thr

1 5

<210> 72

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 72



Ser His Cys Leu Leu Val Thr Leu

1 5

<210> 73

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 73

Leu Val Thr Leu Ala Ala His Leu

1 5

<210> 74

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 74

Ser Thr Val Leu Thr Ser Lys Tyr

1 5

<210> 75

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 75

Ala Glu Ala Leu Glu Arg Met Phe

1 5

<210> 76

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 76

Leu Glu Arg Met Phe Leu Ser Phe

1 5

<210> 77

<211> 8

<212> PRT

<213>

> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 77

Leu Asp Lys Phe Leu Ala Ser Val

1 5

<210> 78

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 78

Glu Arg Met Phe Leu Ser Phe Pro

1 5

<210> 79

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 79

Phe Leu Ser Phe Pro Thr Thr Lys

1 5

<210> 80

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 80

Ala Asn Val Ser Thr Val Leu Thr

1 5

<210> 81

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 81

Ala Ser Val Ser Thr Val Leu Thr

1 5

<210> 82

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 82  
 Leu Leu Val Thr Leu Ala Ser His  
 1 5  
 <210> 83  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"  
 <400> 83  
 Leu Leu Val Thr Leu Ala Ala His  
 1 5  
 <210> 84  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"  
 <400> 84  
 Ala Ala Glu Tyr Gly Ala Glu Ala  
 1 5  
 <210> 85  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"  
 <400> 85  
 Val Leu Ser Ala Ala  
 1 5  
 <210> 86

<211> 8

<212

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 86

Val Gln Ala Ala Tyr Gln Lys Val

1 5

<210> 87

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 87

Thr Ala Glu Glu Lys Ala Ala Val

1 5

<210> 88

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 88

Val Thr Ala Leu Trp Gly Lys Val

1 5

<210> 89

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 89

Val His Leu Thr Pro Glu Glu

1 5

<210> 90

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 90

Leu Gly Arg Leu Leu Val Val Tyr

1 5

<210> 91

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 91

Leu Gly Arg Leu Leu Val Val Tyr

1 5

<210> 92

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 92



Gly Arg Leu Leu Val Val Tyr Pro

1 5

<210> 93

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 93

Gly Arg Leu Leu Val Val Tyr Pro

1 5

<210> 94

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 94

Val Thr Ala Phe Trp Gly Lys Val

1 5

<210> 95

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 95

Thr Gln Arg Phe Phe Glu Ser Phe

1 5

<210> 96

<211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
           peptide"  
 <400> 96  
 Thr Gln Arg Phe Phe Glu Ser Phe  
 1                  5  
 <210> 97  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213>  
 > Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
           peptide"  
 <400> 97  
 Phe Glu Ser Phe Gly Asp Leu Ser  
 1                  5  
 <210> 98  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
           peptide"  
 <400> 98  
 Phe Glu Ser Phe Gly Asp Leu Ser  
 1                  5  
 <210> 99  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide"

<400> 99

Lys Gly Thr Phe Ala Thr Leu Ser

1 5

<210> 100

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide"

<400> 100

Thr Ala Leu Trp Gly Lys Val Asn

1 5

<210> 101

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
  
peptide"

<400> 101

Ala Asp Ala Val Met Asn Asn Pro

1 5

<210> 102

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide"

<220><221> MOD\_RES  
 <222> (8)..(8)  
 <223> Cysteic acid  
 <400> 102  
 Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Xaa  
 1 5  
 <210> 103  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<220><221> MOD\_RES  
 <222> (6)..(6)  
 <223> Cysteic acid  
 <400> 103  
 Ala Leu Tyr Leu Val Xaa Gly Glu  
 1 5  
 <210> 104  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 104  
 Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro  
 1 5  
 <210> 105  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 105

Arg Leu Arg Ala Tyr Leu Leu Pro

1 5

<210> 106

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 106

Leu Lys Phe Leu Asn Val Leu Ser

1 5

<210> 107

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 107

Ser Gln Arg Tyr Lys Val Asp Tyr

1 5

<210> 108

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 108

Lys Val Asp Tyr Glu Ser Gln Ser

1 5

<210> 109

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 109

Ser Gly Gly Lys Met Lys Val Asn

1 5

<210> 110

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 110

Arg Pro Phe Leu Val Val Ile Phe

1 5

<210> 111

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 111

Ala Ile Lys Phe Phe Ser Ala Gln

1 5

<210> 112

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 112

Ile Lys Phe Phe Ser Ala Gln Thr

1 5

<210> 113

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 113

Ile Thr Lys Leu Asn Ala Glu Asn

1 5

<210> 114

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 114

Ala Gly Lys Lys Tyr Phe Ile Asp

1 5

<210> 115

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source



<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide"

<400> 115

Phe Ile Asp Phe Val Ala Arg Glu

1 5

<210> 116

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide"

<400> 116

Pro Tyr Ile Leu Lys Arg Gly Ser

1 5

<210> 117

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide"

<400> 117

Phe Gln Glu Ala Tyr Arg Arg Phe

1 5

<210> 118

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide"

<400> 118

Leu Leu Lys Glu Ala Gln Leu Pro

1 5

<210> 119

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 119

Val Val Leu Leu Pro Asp Val Glu

1 5

<210> 120

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 120

Asp Val Val Leu Phe Glu Lys Lys

1 5

<210> 121

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 121

Gly Met Glu Leu Ile Val Ser Gln

1 5

<210> 122

<211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"  
 <400> 122  
 Tyr Pro Val Trp Ser Gly Leu Pro  
 1 5  
 <210> 123  
 <211> 8  
 <212> PRT  
  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"  
 <400> 123  
 Asn Glu Ile Tyr Pro Val Trp Ser  
 1 5  
 <210> 124  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"  
 <400> 124  
 Phe Ile Val Gly Phe Thr Arg Gln  
 1 5  
 <210> 125  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>

><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 125

Ala Asn Pro Lys Gln Thr Trp Val

1 5

<210> 126

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 126

His Pro Lys Phe Ile Val Gly Phe

1 5

<210> 127

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 127

Lys Gln Thr Trp Val Lys Tyr Ile

1 5

<210> 128

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 128

Trp Val Lys Tyr Ile Val Arg Leu

1 5

<210> 129

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 129

Pro Lys Glu Leu Trp Val Gln Gln

1 5

<210> 130

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 130

Leu Arg Tyr Asp Thr Glu Tyr Tyr

1 5

<210> 131

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 131

Lys Ile Leu Gly Cys Asp Trp Tyr

1 5

<210> 132

<211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"  
 <400> 132  
 Asp Val Gln Leu Lys Asn Ile Thr  
 1 5  
 <210> 133  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"  
 <400> 133  
 Phe Asn Asn Leu Asp Arg Ile Leu  
 1 5  
 <210> 134  
 <211> 8  
 <212> PRT  
  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"  
 <400> 134  
 Gln Leu Lys Leu Tyr Asp Asp Lys  
 1 5  
 <210> 135  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 135

Ser Leu Gly Leu Val Gly Thr His

1 5

<210> 136

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 136

Arg Asp Ile Leu Ile Ala Ser Asn

1 5

<210> 137

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 137

Thr Asp Tyr Met Tyr Leu Thr Asn

1 5

<210> 138

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 138



Ser Ile Thr Phe Leu Arg Asp Phe

1 5

<210> 139

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 139

Gly Leu Lys Phe Ile Ile Lys Arg

1 5

<210> 140

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 140

Ile Asp Ser Phe Val Lys Ser Gly

1 5

<210> 141

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 141

Glu Ile Asp Ser Phe Val Lys Ser

1 5

<210> 142

<211> 8

<212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"  
 <400> 142  
 Lys Thr Tyr Ser Val Gln Leu Lys  
 1 5

<210> 143  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"  
 <400> 143  
 Ala Ser Asn Trp Tyr Phe Asn His  
 1 5

<210> 144  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"  
 <400> 144  
 Gly Cys Asp Trp Tyr Phe Val Pro  
 1 5

<210> 145  
 <211> 8  
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence  
 <220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 145

Asp Thr Glu Tyr Tyr Leu Ile Pro

1 5

<210> 146

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 146

Ile Thr Asp Tyr Met Tyr Leu Thr

1 5

<210> 147

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 147

Asp Tyr Met Tyr Leu Thr Asn Ala

1 5

<210> 148

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 148

Leu Asn Ile Tyr Tyr Arg Arg Leu

1 5  
 <210> 149  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"  
 <400> 149  
 Ile Pro Leu Tyr Lys Lys Met Glu  
 1 5  
 <210> 150  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"  
 <400> 150  
 Lys Phe Leu Ala Ser Leu Leu Glu  
 1 5  
 <210> 151  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"  
 <400> 151  
 Thr Thr Glu Leu Phe Ser Pro Val  
 1 5  
 <210> 152  
 <211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 152

Asp Gly His Phe Leu Arg Glu Pro

1 5

<210> 153

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 153

Phe Ser His Phe Ile Arg Ser Gly

1 5

<210> 154

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> Aminobenzoic acid

<220><221> MOD\_RES

<222> (5)..(5)

<223> Lysine(2,4-dinitrophenyl)

<400> 154

Xaa Phe Arg Ala Lys

1 5

<210> 155  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"

<400> 155  
 Met Phe Leu Glu Ala Ile Pro Met  
 1 5

<210> 156  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"

<400> 156  
 Ala Ile Pro Met Ser Ile Pro Pro  
 1 5

<210> 157  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"

<400> 157  
 Cys Pro Val Thr Tyr Gly Gln Cys

1 5

<210> 158  
 <211> 8  
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"

<400> 158  
 Gln Ala Ser Arg Ser Phe Asn Gln  
 1 5

<210> 159

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"

<400> 159  
 Lys Val Phe Gln Glu Pro Leu Phe  
 1 5

<210> 160

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"

<400> 160  
 Leu Phe Tyr Glu Ala Pro Arg Ser  
 1 5

<210> 161

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"



<400> 161

Ala Thr Leu Thr Phe Asp His Ser

1 5

<210> 162

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 162

Pro Leu Phe Tyr Glu Ala Pro Arg

1 5

<210> 163

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> MOD\_RES

<222> (7)..(7)

<223> Hydroxyproline

<400> 163

Gln Gly Phe Gln Gly Pro Pro Gly

1 5

<210

> 164

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> MOD\_RES  
 <222> (6)..(6)  
 <223> Hydroxyproline  
 <400> 164  
 Gly Pro Arg Gly Leu Pro Gly Pro  
 1 5  
 <210> 165  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"  
 <220><221> MOD\_RES  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Hydroxyproline

<220><221> MOD\_RES  
 <222> (6)..(6)  
 <223> Hydroxyproline  
 <400> 165  
 Gly Pro Pro Gly Ala Pro Gly Pro  
 1 5  
 <210> 166  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"  
 <400> 166  
 Arg Leu Val Gly Gly Pro Met Asp  
 1 5  
 <210> 167  
 <211> 8

<212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 167  
 Thr Gly Leu Arg Asp Pro Phe Asn  
 1 5

<210> 168  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"

<400> 168  
 Lys Ile Leu His Leu Pro Thr Ser  
 1 5

<210> 169  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"

<400> 169  
 Ala His Leu Lys Asn Ser Gln Glu

1 5  
 <210> 170  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 170

Ile Gln Gln Lys Ile Leu His Leu

1 5

<210> 171

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 171

Ala Pro Leu Thr Ala Glu Ile Gln

1 5

<210> 172

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 172

Ile Met Phe Thr Ser Leu Pro Leu

1 5

<210> 173

<211> 1

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 173

Leu

1

<210> 174

<211> 2

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223>

/note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide"

<400> 174

Leu Phe

1

<210> 175

<211> 1

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide"

<400> 175

Leu

1

<210> 176

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide"

<400> 176

Glu His Tyr Gln Lys Lys Phe Lys

1

5

<210> 177

<211> 7

<212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"  
 <220><221> MOD\_RES  
 <222> (7)..(7)  
 <223> Cysteic acid  
 <400> 177  
 Phe Val Asn Gln His Leu Xaa  
 1 5  
 <210> 178  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"  
 <400> 178  
 His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu  
 1 5  
  
 <210> 179  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"  
 <220><221> MOD\_RES  
 <222> (6)..(6)  
 <223> Cysteic acid  
 <400> 179  
 Ala Leu Tyr Leu Val Xaa Gly Glu  
 1 5

<210> 180  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"

<400> 180  
 Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys  
 1 5

<210> 181  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"

<400> 181  
 Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Ala  
 1 5

<210> 182  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"

<400> 182  
 His Ser Lys Ile Ile Ile Ile Lys  
 1 5

<210> 183  
 <211> 8  
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"

<400> 183  
 Val Leu Pro Arg Ser Ala Lys Glu  
 1 5

<210> 184

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"

<400> 184  
 Glu Ala Tyr Arg Arg Phe Tyr Gly  
 1 5

<210> 185

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"

<400> 185  
 Gln Trp Leu Gly Ala Pro Val Pro  
 1 5

<210> 186

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"



<400> 186

Leu Ser Leu Ala His Thr His Gln

1 5

<210> 187

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 187

Lys Leu Leu Ala Val Ser Gly Pro

1 5

<210> 188

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 188

Gln Leu Phe Arg Arg Ala Val Leu

1 5

<210> 189

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 189

Glu Phe Ser Arg Lys Val Pro Thr

1 5

<210> 190  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"

<400> 190  
 Leu Leu Ile Gly Ser Ser Gln Asp  
 1 5

<210> 191  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"

<400> 191  
 Pro Arg Phe Lys Ile Ile Gly Gly  
 1 5

<210> 192  
 <211> 2  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"

<400> 192  
 Leu Arg  
 1

<210> 193  
 <211> 2  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 193

Phe Arg

1

<210> 194

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 194

Tyr Gly Gly Phe Met

1 5

<210> 195

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 195

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gln

1 5 10

<210> 196

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 196

Lys Lys Lys Arg Lys Val

1 5

<210> 197

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 197

Lys Lys Lys Arg Lys Val Lys Lys Lys Arg Lys Val

1 5 10

<210> 198

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 198

Gly Arg Lys Lys Arg Arg

1 5

<210> 199

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 199

Arg Arg Arg Pro Pro Gln

1 5

<210> 200

<211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
           peptide"  
 <400> 200  
 Trp Lys Lys Lys Lys  
 1                  5  
 <210> 201  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
           peptide"  
 <400> 201  
 Arg Arg Arg Pro Pro Gln His  
 1                  5  
 <210> 202  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
           peptide"  
 <400> 202  
 Lys Lys Arg Arg Gln His  
 1                  5  
 <210> 203  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 203

Arg Arg Arg

1

<210> 204

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 204

Arg Arg Arg Arg

1

<210> 205

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 205

Arg Arg Arg Arg Arg

1 5

<210> 206

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 206

Lys Lys Lys

1

<210> 207

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide"

<400> 207

Arg Arg Arg Arg Trp Trp

1 5

<210> 208

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide"

<400> 208

Arg Arg Arg Trp Trp

1 5

<210> 209

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide"

<400> 209

Arg Arg Trp Trp

1

<210> 210

<211> 4

<212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"  
 <400> 210  
 Lys Lys Trp Trp  
 1  
 <210> 211  
 <211> 5

<212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"  
 <400> 211  
 Lys Lys Lys Trp Trp  
 1 5  
 <210> 212  
 <211> 7

<212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"  
 <400> 212  
 Trp His His Arg Arg Lys Lys  
 1 5  
 <210> 213  
 <211> 8

<212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223>



```

> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
    peptide"
<400> 213
Arg Arg Lys Lys His His Trp Trp
1          5
<210> 214
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
    peptide"
<400> 214
Lys Lys Arg Arg Trp
1          5
<210> 215
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
    peptide"
<400> 215
Lys Lys Arg Arg His Trp
1          5
<210> 216
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
    peptide"
<400> 216
Lys Lys Arg Arg His His Trp

```

1 5

<210> 217

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 217

Lys Lys Arg Arg Gln

1 5

<210> 218

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 218

Lys Lys Arg Arg Gln

1 5

<210> 219

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 219

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln

1 5

<210> 220

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<

220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 220

Gln Gly Arg Lys Lys Arg Arg

1 5

<210> 221

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 221

Arg Arg His

1

<210> 222

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 222

Arg Arg Arg His

1

<210> 223

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

```

        peptide"
<400> 223
Arg Arg Arg Arg His
1           5
<210> 224
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
        peptide"
<400> 224
Arg Arg Arg Arg Arg His
1           5
<210>
225
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
        peptide"
<400> 225
Lys Lys His
1
<210> 226
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
        peptide"
<400> 226
Lys Lys Lys His
1

```

<210> 227  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 227  
 His Trp Lys Lys Arg Arg  
 1 5

<210> 228  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 228  
 His Trp Lys Lys Arg Arg  
 1 5

<210> 229  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 229  
 Pro Pro His Arg Arg Arg  
 1 5

<210> 230  
 <211> 6  
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 230

Pro Pro His Arg Arg Arg

1 5

<210> 231

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 231

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Val Arg Arg Arg Pro Pro Gln

1 5 10

<210> 232

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 232

Trp Trp His His Lys Lys Arg Arg Gly Gly Arg Arg Lys Lys His His

1 5 10 15

Trp Trp

<210> 233

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 233

Trp Trp His His Lys Lys Arg Arg

1 5

<210> 234

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 234

Tyr Tyr His His Lys Lys Arg Arg

1 5

<210> 235

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 235

Arg Arg Lys Lys His His Tyr Tyr

1 5

<210> 236

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 236

Val Gln Ala Ala Ile Asp Tyr Ile Asn Gly

1 5 10

<210> 237

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 237

Trp Trp Arg Arg His His

1 5

<210> 238

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 238

His His Arg Arg Trp Trp

1 5

<210> 239

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 239

Tyr Tyr Arg Arg His His

1 5

<210> 240

<211> 6



<212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"  
 <400> 240  
 His His Arg Arg Tyr Tyr  
 1 5

<210> 241  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"

<400> 241  
 Trp Trp Arg Arg Arg  
 1 5  
 <210> 242  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"

<400> 242  
 Arg Arg Arg Trp Trp  
 1 5  
 <210> 243  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide"

<400> 243

Tyr Tyr Arg Arg Arg

1 5

<210> 244

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide"

<400> 244

Arg Arg Arg Tyr Tyr

1 5

<210> 245

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide"

<400> 245

Trp Trp Arg Arg Arg His His

1 5

<210> 246

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide"

<400> 246

His His Arg Arg Arg Trp Trp

1 5  
 <210> 247  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"  
 <400> 247  
 Tyr Tyr Arg Arg Arg His His  
 1 5  
 <210> 248  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"  
 <400> 248  
 His His Arg Arg Arg Tyr Tyr  
 1 5  
 <210> 249  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"  
 <400> 249  
 Trp Trp Arg Arg Arg Arg  
 1 5  
 <210> 250  
 <211> 6

```

<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
        peptide"
<400> 250
Arg Arg Arg Arg Trp Trp
1           5
<210> 251
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
        peptide"
<400> 251
Tyr Tyr Arg Arg Arg Arg
1           5
<210> 252
<211> 6
<212> PRT
<213>
> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
        peptide"
<400> 252
Arg Arg Arg Arg Tyr Tyr
1           5
<210> 253
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

```

```

        peptide"
<400> 253
Trp Trp Arg Arg Arg Arg His His
1           5
<210> 254
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223>
> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
        peptide"
<400> 254
His His Arg Arg Arg Arg Trp Trp
1           5
<210> 255
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
        peptide"
<400> 255
Tyr Tyr Arg Arg Arg Arg His His
1           5
<210> 256
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
        peptide"
<400> 256
His His Arg Arg Arg Arg Tyr Tyr

```

1 5

<210> 257

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> MOD\_RES

<222> (5)..(6)

<223> Ornithine

<400> 257

Trp Trp His His Xaa Xaa Arg Arg

1 5

<210> 258

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 258

Trp Trp His His His Arg Arg Arg

1 5

<210> 259

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 259

Trp Trp His His His Arg Arg Arg

1 5

<210> 260  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"  
 <400> 260  
 Trp Trp Trp His His His His Arg Arg Arg

1 5 10  
 <210> 261  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"  
 <400> 261  
 Trp Trp Trp Lys Lys Arg Arg Arg

1 5  
 <210> 262  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"  
 <400> 262  
 Lys Lys Lys Trp Arg Arg Trp

1 5

<210> 263  
 <211> 7  
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 263

Trp Arg Arg Arg Trp Arg Arg

1 5

<210> 264

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 264

Trp Trp His His Lys Lys Arg Arg

1 5

<210> 265

<211> 10

<212> PRT

<213>

> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 265

Trp Trp Cys His His Lys Lys Cys Arg Arg

1 5 10

<210> 266

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"



<400> 266

Trp Trp His His His Arg Arg Arg

1 5

<210> 267

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 267

Trp Trp His His Cys Lys Lys Arg Arg

1 5

<210> 268

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 268

Trp Trp His His Lys Lys Cys Arg Arg

1 5

<210> 269

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 269

Arg Arg Trp Trp Lys Lys His His

1 5

<210> 270  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"

<400> 270  
 Trp Trp His His Lys Lys Lys Lys  
 1 5

<210> 271  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"

<400> 271  
 Trp Trp His His Arg Arg Arg Arg  
 1 5

<210> 272  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"

<400> 272  
 Arg Arg Arg Arg His His  
 1 5

<210> 273  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"

<400> 273

His His Lys Lys Lys Lys

1 5

<210> 274

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"

<400> 274

His His Arg Arg Arg Arg

1 5

<210> 275

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"

<400> 275

Tyr Tyr Arg Arg Arg Arg His His

1 5

<210> 276

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"

<400> 276

Tyr Tyr Lys Lys Lys Lys His His

1 5

<210> 277

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide"

<220><221> MOD\_RES

<222> (8)..(8)

<223> Citrulline

<400> 277

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Val Xaa Arg Arg Arg Pro Pro Gln

1 5 10

<210> 278

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide"

<220><221> MOD\_RES

<222> (8)..(8)

<223> Citrulline

<400> 278

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Val Xaa Arg Arg Lys Lys Arg Gly

1 5 10

<210> 279

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (8)..(8)

<223> Citrulline

<400> 279

Arg Arg Arg Pro Pro Gln Val Xaa Pro Pro Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 280

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> MOD\_RES

<222> (8)..(8)

<223> Citrulline

<400> 280

Arg Arg Lys Lys Arg Gly Val Xaa Gly Arg Lys Lys Arg Arg

1 5 10

<210> 281

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> MOD\_RES

<222> (8)..(8)

<223> Citrulline

<400> 281

Gln Pro Pro Arg Arg Arg Val Xaa Arg Arg Arg Pro Pro Gln

1	5	10
---	---	----

<210> 282

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (7)..(7)

<223> Citrulline

<400> 282

Trp Lys Lys Lys Lys Val Xaa Lys Lys Lys Lys Trp

1	5	10
---	---	----

<210> 283

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> MOD\_RES

<222> (7)..(7)

<223> Citrulline

<400> 283

Lys Lys Lys Lys Trp Val Xaa Trp Lys Lys Lys Lys

1	5	10
---	---	----

<210> 284

<211>

16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

```

        peptide"
<220><221> MOD_RES
<222> (9)..(9)
<223> Citrulline
<400> 284
His Gln Pro Pro Arg Arg Arg Val Xaa Arg Arg Arg Pro Pro Gln His
1           5           10           15
<210> 285
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
        peptide"
<220><
221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> Citrulline
<400> 285
Gln Pro Pro Arg Arg Arg Val Xaa Arg Arg Arg Pro Pro Gln
1           5           10
<210> 286
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
        peptide"
<220><221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> Citrulline
<400> 286
His Gln Arg Arg Lys Lys Val Xaa Lys Lys Arg Arg Gln His
1           5           10

```

<210> 287  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"

<220><221> MOD\_RES

<222> (4)..(4)

<223> Citrulline

<400> 287

Arg Arg Val Xaa Arg Arg

1 5

<210> 288

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"

<220><221> MOD\_RES

<222> (5)..(5)

<223> Citrulline

<400> 288

Arg Arg Arg Val Xaa Arg Arg Arg

1 5

<210> 289

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"

<220><221> MOD\_RES



<222> (6)..(6)

<223> Citrulline

<400> 289

Arg Arg Arg Arg Val Xaa Arg Arg Arg Arg

1                    5                    10

<210> 290

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220

><221> MOD\_RES

<222> (7)..(7)

<223> Citrulline

<400> 290

Arg Arg Arg Arg Arg Val Xaa Arg Arg Arg Arg Arg

1                    5                    10

<210> 291

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> MOD\_RES

<222> (4)..(4)

<223> Citrulline

<400> 291

Lys Lys Val Xaa Lys Lys

1                    5

<210> 292

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> MOD\_RES

<222> (5)..(5)

<223> Citrulline

<400> 292

Lys Lys Lys Val Xaa Lys Lys Lys

1                      5

<210> 293

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> MOD\_RES

<222> (6)..(6)

<223> Citrulline

<400> 293

Lys Lys Lys Lys Val Xaa Lys Lys Lys Lys

1                      5                      10

<210> 294

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> MOD\_RES

<222> (7)..(7)

<223> Citrulline

<400> 294

Lys Lys Lys Lys Lys Val Xaa Lys Lys Lys Lys Lys

1 5 10

<210> 295

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> MOD\_RES

<222> (8)..(8)

<223> Citrulline

<400> 295

Trp Trp Arg Arg Arg Arg Val Xaa Arg Arg Arg Arg Trp Trp

1 5 10

<210> 296

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> MOD\_RES

<222> (7)..(7)

<223> Citrulline

<400> 296

Trp Trp Arg Arg Arg Val Xaa Arg Arg Arg Trp Trp

1 5 10

<210> 297

<211>

10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> MOD\_RES

<222> (6)..(6)

<223> Citrulline

<400> 297

Trp Trp Arg Arg Val Xaa Arg Arg Trp Trp

1                    5                    10

<210> 298

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> MOD\_RES

<222> (6)..(6)

<223> Citrulline

<400> 298

Trp Trp Lys Lys Val Xaa Lys Lys Trp Trp

1                    5                    10

<210> 299

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> MOD\_RES

<222> (7)..(7)

<223> Citrulline

<400> 299

Trp Trp Lys Lys Lys Val Xaa Lys Lys Lys Trp Trp

```

1             5             10
<210> 300
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223>
> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
      peptide"
<220><221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> Citrulline
<400> 300
Trp Trp Lys Lys Lys Lys Val Xaa Lys Lys Lys Lys Trp Trp
1             5             10
<210> 301
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
      peptide"
<220><221> MOD_RES
<222> (9)..(9)
<223> Citrulline
<400> 301
Lys Lys Arg Arg His His Trp Val Xaa Trp His His Arg Arg Lys Lys

1             5             10             15
<210> 302
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

```

peptide"

<220><221> MOD\_RES

<222> (10)..(10)

<223> Citrulline

<400> 302

Trp Trp His His Lys Lys Arg Arg Val Xaa Arg Arg Lys Lys His His

1                    5                    10                    15

Trp Trp

<210> 303

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> MOD\_RES

<222> (7)..(7)

<223> Citrulline

<400> 303

Trp Arg Arg Lys Lys Val Xaa Lys Lys Arg Arg Trp

1                    5                    10

<210> 304

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> MOD\_RES

<222> (8)..(8)

<223> Citrulline

<400> 304

Trp His Arg Arg Lys Lys Val Xaa Lys Lys Arg Arg His Trp

1 5 10

<210> 305

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> MOD\_RES

<222> (9)..(9)

<223> Citrulline

<400> 305

Trp His His Arg Arg Lys Lys Val Xaa Lys Lys Arg Arg His His Trp

1 5 10 15

<210> 306

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> MOD\_RES

<222> (7)..(7)

<223> Citrulline

<400> 306

Gln Arg Arg Lys Lys Val Xaa Lys Lys Arg Arg Gln

1 5 10

<210> 307

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> MOD\_RES

<222> (7)..(7)

<223> Citrulline

<400> 307

Lys Lys Arg Arg Gln Val Xaa Gln Arg Arg Lys Lys

1 5 10

<210> 308

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> MOD\_RES

<222> (8)..(8)

<223> Citrulline

<400> 308

Arg Arg Lys Lys Arg Gly Val Xaa Gly Arg Lys Lys Arg Arg

1 5 10

<210> 309

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (8)..(8)

<223> Citrulline

<400> 309

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Val Xaa Arg Arg Lys Lys Arg Gly



```

1             5             10
<210> 310
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
        peptide"
<220><221> MOD_RES
<222> (9)..(9)
<223> Citrulline
<400> 310
Gln Arg Arg Lys Lys Arg Gly Val Xaa Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln
1             5             10             15

<210> 311
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
        peptide"
<220><221> MOD_RES
<222> (9)..(9)
<223> Citrulline
<400> 311
Gln Gly Arg Lys Lys Arg Arg Val Xaa Arg Arg Lys Lys Arg Gly Gln
1             5             10             15

<210> 312
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

```

peptide"

<220><221> MOD\_RES

<222> (5)..(5)

<223> Citrulline

<400> 312

His Arg Arg Val Xaa Arg Arg His

1 5

<210> 313

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<220><221> MOD\_RES

<222> (6)..(6)

<223> Citrulline

<400> 313

His Arg Arg Arg Val Xaa Arg Arg Arg His

1 5 10

<210> 314

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<220><221> MOD\_RES

<222> (7)..(7)

<223> Citrulline

<400> 314

His Arg Arg Arg Arg Val Xaa Arg Arg Arg Arg His

1 5 10

<210> 315  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"  
 <220><221> MOD\_RES  
 <222> (8)..(8)  
 <223> Citrulline  
 <400> 315  
 His Arg Arg Arg Arg Arg Val Xaa Arg Arg Arg Arg Arg His

1 5 10  
 <210> 316  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"  
 <220><221> MOD\_RES  
 <222> (5)..(5)  
 <223> Citrulline  
 <400> 316  
 His Lys Lys Val Xaa Lys Lys His

1 5  
 <210> 317  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"

<220><221> MOD\_RES  
 <222> (6)..(6)  
 <223> Citrulline  
 <400> 317  
 His Lys Lys Lys Val Xaa Lys Lys Lys His  
 1                    5                    10  
 <210> 318  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
           peptide"  
 <220><221> MOD\_RES  
 <222> (7)..(7)  
 <223> Citrulline  
 <400> 318  
 His Lys Lys Lys Lys Val Xaa Lys Lys Lys Lys His  
 1                    5                    10  
 <210> 319  
 <211> 14  
 <212>  
       PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
           peptide"  
 <220><221> MOD\_RES  
 <222> (8)..(8)  
 <223> Citrulline  
 <400> 319  
 His Lys Lys Lys Lys Lys Val Xaa Lys Lys Lys Lys Lys His  
 1                    5                    10  
 <210> 320  
 <211> 14

<212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"  
 <220><221> MOD\_RES  
 <222> (8)..(8)

<223> Citrulline  
 <400> 320  
 His Trp Lys Lys Arg Arg Val Xaa Arg Arg Lys Lys Trp His  
 1 5 10

<210> 321  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"  
 <220><221> MOD\_RES  
 <222> (8)..(8)

<223> Citrulline  
 <400> 321  
 Arg Arg Lys Lys Trp His Val Xaa His Trp Lys Lys Arg Arg  
 1 5 10

<210> 322  
 <211> 14

<212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"  
 <220><221> MOD\_RES  
 <222> (8)..(8)

<223> Citrulline

<400> 322

Pro Pro His Arg Arg Arg Val Xaa Arg Arg Arg His Pro Pro

1 5 10

<210> 323

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide"

<220><221> MOD\_RES

<222> (8)..(8)

<223> Citrulline

<400> 323

Arg Arg Arg His Pro Pro Val Xaa Pro Pro His Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 324

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide"

<400> 324

Tyr Tyr His His Lys Lys Arg Arg Cys Cys Arg Arg Lys Lys His His

1 5 10 15

Tyr Tyr

<210> 325

<211> 18

<212> PRT

<213>

> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> MOD\_RES

<222> (10)..(10)

<223> Citrulline

<400> 325

Tyr Tyr His His Lys Lys Arg Arg Val Xaa Arg Arg Lys Lys His His

1 5 10 15

Tyr Tyr

<210> 326

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400>

326

Trp Trp Arg Arg Cys Cys Arg Arg Trp Trp

1 5 10

<210> 327

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> MOD\_RES

<222> (6)..(6)

<223> Citrulline

<400> 327

Trp Trp Arg Arg Val Xaa Arg Arg Trp Trp

1 5 10

<210> 328  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 328  
 Tyr Tyr Arg Arg Cys Cys Arg Arg Tyr Tyr  
 1 5 10

<210> 329  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<220><221> MOD\_RES  
 <222> (6)..(6)  
 <223> Citrulline  
 <400> 329

Tyr Tyr Arg Arg Val Xaa Arg Arg Tyr Tyr  
 1 5 10

<210> 330  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source

<  
 223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"

<400> 330  
 Trp Trp Arg Arg His His Cys Cys His His Arg Arg Trp Trp  
 1 5 10



<210> 331  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"  
 <220><221> MOD\_RES  
 <222> (8)..(8)  
 <223> Citrulline  
 <400> 331  
 Trp Trp Arg Arg His His Val Xaa His His Arg Arg Trp Trp  
 1 5 10

<210> 332  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"  
 <400> 332  
 Tyr Tyr Arg Arg His His Cys Cys Arg Arg His His Tyr Tyr  
 1 5 10

<210> 333  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"  
 <220><221> MOD\_RES  
 <222> (8)..(8)  
 <223> Citrulline  
 <400>

333

Tyr Tyr Arg Arg His His Val Xaa Arg Arg His His Tyr Tyr

1 5 10

<210> 334

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 334

Trp Trp Arg Arg Arg Cys Cys Arg Arg Arg Trp Trp

1 5 10

<210> 335

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> MOD\_RES

<222> (7)..(7)

<223> Citrulline

<400> 335

Trp Trp Arg Arg Arg Val Xaa Arg Arg Arg Trp Trp

1 5 10

<210> 336

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 336

Tyr Tyr Arg Arg Arg Cys Cys Arg Arg Arg Tyr Tyr

1 5 10

<210> 337

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> MOD\_RES

<222> (7)..(7)

<223> Citrulline

<400> 337

Tyr Tyr Arg Arg Arg Val Xaa Arg Arg Arg Tyr Tyr

1 5 10

<210> 338

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 338

Trp Trp Arg Arg Arg His His Cys Cys His His Arg Arg Arg Trp Trp

1 5 10 15

<210> 339

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> MOD\_RES

<222> (9)..(9)

<223> Citrulline

<400> 339

Trp Trp Arg Arg Arg His His Val Xaa His His Arg Arg Arg Trp Trp

1 5 10 15

<210> 340

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 340

Tyr Tyr Arg Arg Arg His His Cys Cys Arg Arg Arg His His Tyr Tyr

1 5 10 15

<210> 341

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> MOD\_RES

<222> (9)..(9)

<223> Citrulline

<400> 341

Tyr Tyr Arg Arg Arg His His Val Xaa Arg Arg Arg His His Tyr Tyr

1 5 10 15

<210>

342

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 342

Trp Trp Arg Arg Arg Arg Cys Cys Arg Arg Arg Arg Trp Trp

1 5 10

<210> 343

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> MOD\_RES

<222> (8)..(8)

<223> Citrulline

<400> 343

Trp Trp Arg Arg Arg Arg Val Xaa Arg Arg Arg Arg Trp Trp

1 5 10

<210> 344

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 344

Tyr Tyr Arg Arg Arg Arg Cys Cys Arg Arg Arg Arg Tyr Tyr

1 5 10

<210> 345

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<220><221> MOD\_RES

<222> (8)..(8)

<223> Citrulline

<400> 345

Tyr Tyr Arg Arg Arg Arg Val Xaa Arg Arg Arg Arg Tyr Tyr

1 5 10

<210> 346

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 346

Trp Trp Arg Arg Arg Arg His His Cys Cys His His Arg Arg Arg Arg

1 5 10 15

Trp Trp

<210> 347

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<220><221> MOD\_RES

<222> (10)..(10)

<223> Citrulline

<400> 347

Trp Trp Arg Arg Arg Arg His His Val Xaa His His Arg Arg Arg Arg

1 5 10 15

Trp Trp

<210> 348

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 348

Tyr Tyr Arg Arg Arg Arg His His Cys Cys Arg Arg Arg Arg His His

1 5 10 15

Tyr Tyr

<210> 349

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<220><221> MOD\_RES

<222> (10)..(10)

<223> Citrulline

<400> 349

Tyr Tyr Arg Arg Arg Arg His His Val Xaa Arg Arg Arg Arg His His

1 5 10 15

Tyr Tyr

<210> 350

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> MOD\_RES

<222> (11)..(11)

<223> Citrulline

<400> 350

Trp Trp His His Lys Lys Arg Arg Trp Val Xaa Trp Arg Arg Lys Lys

1                    5                    10                    15

His His Trp Trp

                    20

<210> 351

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> MOD\_RES

<222> (5)..(6)

<223> Ornithine

<220><221> MOD\_RES

<222> (10)..(10)

<223> Citrulline

<220><221> MOD\_RES

<222> (13)..(14)

<223> Ornithine

<400> 351

Trp Trp His His Xaa Xaa Arg Arg Val Xaa Arg Arg Xaa Xaa His His

1                    5                    10                    15

Trp Trp

<210> 352

<211> 10



<212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"

<400> 352  
 Trp Trp His His Cys Cys Lys Lys Arg Arg  
 1 5 10

<210> 353  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide"

<400> 353  
 Arg Arg Arg Arg Arg Cys Cys Arg Arg Arg Arg Arg  
 1 5 10

<210> 354  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 354  
 ggctcccagt tcttcacac 20

<210> 355  
 <211> 16  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 355

ccttccgcac cacctc 16

<210> 356

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
probe"

<400> 356

ctagatggca agcatgtggt gtttgg 26

<210> 357

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
primer"

<400> 357

tctatcatca acgggtacaa acga 24

<210> 358

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
primer"

<400> 358

cttttcagca agtgggaagg tg 22

<210> 359

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic probe"

<400> 359

cctggccttg tctgtggaga cggatta 27

<210> 360

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"

<400> 360

ggaauucuau auuugaucca a 21

<210> 361

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"

<400> 361

uuggaucaaa uauaagauuc ccu 23

<210> 362

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"

<400> 362

ggaaagacug uuccaaaaac agugg 25

<210> 363

<211> 27

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide"

<400> 363

ccacuguuuu uggaacaguc uuuccuu

27

<210> 364

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide"

<400> 364

ggaaagacug uuccaaaaau u

21

<210> 365

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide"

<400> 365

uuuuuggaac agucuuuccu u

21

<210> 366

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"  
 <400> 366  
 Gly Trp Thr Leu Asn Ser Ala Gly Tyr Leu Leu Gly Lys Ile Asn Leu  
 1 5 10 15

Lys Ala Leu Ala Ala Leu Ala Lys Lys Ile Leu  
 20 25

<210> 367  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 oligonucleotide"  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic  
 oligonucleotide"

<400> 367  
 uucuccgaac gugucacgut t 21  
 <210> 368  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 oligonucleotide"  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic  
 oligonucleotide"

<400> 368  
 acgugacacg uucggagaat t 21  
 <210> 369  
 <211> 21  
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide"

<220><221> source

<223> /note="Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic  
oligonucleotide"

<400> 369

cuacacaaau cagcgauuut t

21

<210> 370

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide"

<220><221> source

<223> /note="Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic  
oligonucleotide"

<400> 370

aaaucgcuga uuuguguagt c

21

<210> 371

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide"

<400> 371

ggaaagacug uuccaaaaau u

21

<210> 372

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide"

<400> 372

uuuuuggaac agucuuuccu u

21

<210> 373

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide"

<400> 373

Trp Trp His His Lys Lys Arg Arg Cys Cys Arg Arg Lys Lys His His

1 5 10 15

Trp Trp

<210> 374

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide"

<400> 374

Gly Leu Phe Glu Ala Ile Glu Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly

1 5 10 15

Met Ile Asp Gly Trp Tyr Gly Cys

20

<210> 375

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide"

<400> 375

Lys Glu Thr Trp Trp Glu Thr Trp Trp Thr Glu Trp Ser Gln Pro Gly

1 5 10 15

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gln

20 25

<210> 376

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide"

<400> 376

Ala Leu Ala Leu

1