



(19) 대한민국특허청(KR)  
 (12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0075742  
 (43) 공개일자 2017년07월03일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C12N 15/113* (2010.01) *A61K 31/713* (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
*C12N 15/1131* (2013.01)  
*A61K 31/713* (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2017-7011725
- (22) 출원일자(국제) 2015년10월01일  
 심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2017년04월28일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2015/053569
- (87) 국제공개번호 WO 2016/054421  
 국제공개일자 2016년04월07일
- (30) 우선권주장  
 62/059,056 2014년10월02일 미국(US)  
 62/120,149 2015년02월24일 미국(US)

- (71) 출원인  
**프로티바 바이오쎄라퓨틱스, 인코포레이티드**  
 캐나다 브이5제이 5제이8 브리티쉬 콜롬비아 베나  
 바이 글렌라이온 파크웨이 100-8900
- (72) 발명자  
**크로스, 제니퍼 엘.**  
 캐나다 브이5제이 5제이8 브리티쉬 콜롬비아 베나  
 바이 글렌라이온 파크웨이 100-8900  
**딜런, 엠멘 피.**  
 캐나다 브이5제이 5제이8 브리티쉬 콜롬비아 베나  
 바이 글렌라이온 파크웨이 100-8900  
 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
**양영준, 김영**

전체 청구항 수 : 총 77 항

(54) 발명의 명칭 B형 간염 바이러스 유전자 발현을 제거하는 조성물 및 방법

### (57) 요약

본 발명은 B형 간염 바이러스 (HBV) 유전자 발현을 표적하는 치료적 핵산, 가령, siRNA을 포함하는 조성물, 치료적 핵산을 하나 또는 그 이상 (예컨대, 조합) 포함하는 지질 입자들, 및 지질 입자들을 (예컨대, 인간에서 HBV 감염 및/또는 HDV 감염을 치료하기 위해) 전달 및/또는 투여하는 방법들을 제공한다.

(52) CPC특허분류

A61K 2300/00 (2013.01)  
C12N 2310/14 (2013.01)  
C12N 2310/321 (2013.01)  
C12N 2310/323 (2013.01)  
C12N 2310/3521 (2013.01)

(72) 발명자

리, 에이미 씨.에이취.

캐나다 브이5제이 5제이8 브리티쉬 콜롬비아 베나  
바이 글렌라이온 파크웨이 100-8900

맥라클란, 이안

캐나다 브이5제이 5제이8 브리티쉬 콜롬비아 베나  
바이 글렌라이온 파크웨이 100-8900

---

스니드, 니콜라스 엠.

캐나다 브이5제이 5제이8 브리티쉬 콜롬비아 베나  
바이 글렌라이온 파크웨이 100-8900

타이, 에밀리 피.

캐나다 브이5제이 5제이8 브리티쉬 콜롬비아 베나  
바이 글렌라이온 파크웨이 100-8900

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

서열번호:1, 서열번호:3, 서열번호:5, 서열번호:7, 서열번호:9, 서열번호:11, 서열번호:13, 서열번호:15, 서열번호:17, 서열번호:19, 서열번호:21, 서열번호:23, 서열번호:25, 서열번호:27 및 서열번호:29로 구성된 그룹에서 선택된 단리된 핵산 분자.

#### 청구항 2

서열번호:2, 서열번호:4, 서열번호:6, 서열번호:8, 서열번호:10, 서열번호:12, 서열번호:14, 서열번호:16, 서열번호:18, 서열번호:20, 서열번호:22, 서열번호:24, 서열번호:26, 서열번호:28 및 서열번호:30으로 구성된 그룹에서 선택된 단리된 핵산 분자.

#### 청구항 3

$1m$  (서열번호:1 및 2),  $2m$  (서열번호:3 및 4),  $3m$  (서열번호:5 및 6),  $4m$  (서열번호:7 및 8),  $5m$  (서열번호:9 및 10),  $6m$  (서열번호:11 및 12),  $7m$  (서열번호:13 및 14),  $8m$  (서열번호:15 및 16),  $9m$  (서열번호:17 및 18),  $10m$  (서열번호:19 및 20),  $11m$  (서열번호:21 및 22),  $12m$  (서열번호:23 및 24),  $13m$  (서열번호:25 및 26),  $14m$  (서열번호:27 및 28), 및  $15m$  (서열번호:29 및 30)로 구성된 그룹에서 선택된 단리된 이중-가닥 siRNA 분자.

#### 청구항 4

청구항 3의 단리된, 이중 가닥 siRNA 분자를 포함하는 조성물.

#### 청구항 5

청구항 4에 있어서,  $1m$  (서열번호:1 및 2),  $2m$  (서열번호:3 및 4),  $3m$  (서열번호:5 및 6),  $4m$  (서열번호:7 및 8),  $5m$  (서열번호:9 및 10),  $6m$  (서열번호:11 및 12),  $7m$  (서열번호:13 및 14),  $8m$  (서열번호:15 및 16),  $9m$  (서열번호:17 및 18),  $10m$  (서열번호:19 및 20),  $11m$  (서열번호:21 및 22),  $12m$  (서열번호:23 및 24),  $13m$  (서열번호:25 및 26),  $14m$  (서열번호:27 및 28), 및  $15m$  (서열번호:29 및 30)로 구성된 그룹에서 선택된 2개의 상이한 이중 가닥 siRNA 분자를 포함함을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 6

청구항 5에 있어서, 2개의 상이한 이중 가닥 siRNA 분자들의 조합은 실시예 2에 기재된 조합들 중 임의의 하나에서 선택됨을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 7

청구항 4에 있어서,  $1m$  (서열번호:1 및 2),  $2m$  (서열번호:3 및 4),  $3m$  (서열번호:5 및 6),  $4m$  (서열번호:7 및 8),  $5m$  (서열번호:9 및 10),  $6m$  (서열번호:11 및 12),  $7m$  (서열번호:13 및 14),  $8m$  (서열번호:15 및 16),  $9m$  (서열번호:17 및 18),  $10m$  (서열번호:19 및 20),  $11m$  (서열번호:21 및 22),  $12m$  (서열번호:23 및 24),  $13m$  (서열번호:25 및 26),  $14m$  (서열번호:27 및 28), 및  $15m$  (서열번호:29 및 30)로 구성된 그룹에서 선택된 3개의 상이한 이중 가닥 siRNA 분자를 포함함을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 8

청구항 7에 있어서, 3개의 상이한 이중 가닥 siRNA 분자들의 조합은 실시예 3에 기재된 조합들 중 임의의 하나에서 선택됨을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 9

청구항 4-8 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 제약상 허용가능한 담체를 포함하는 제약학적 조성물임을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 10**

청구항 4-9 중 어느 한 항에 있어서, 상기 siRNA는 B형 간염 바이러스 유전자의 발현을 침묵시킴을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 11**

다음을 포함하는 핵산-지질 입자:

- (a) 청구항 3의 단리된, 이중 가닥 siRNA 분자들에서 선택된 하나 또는 그 이상의 단리된, 이중 가닥 siRNA 분자들;
- (b) 양이온성 지질; 및
- (c) 비-양이온성 지질.

**청구항 12**

청구항 11에 있어서, 양이온성 지질은 1,2-디리놀레일옥시-N,N-디메틸아미노프로판 (DLinDMA), 1,2-디리놀레닐옥시-N,N-디메틸아미노프로판 (DLenDMA), 1,2-디- $\gamma$ -리놀레닐옥시-N,N-디메틸아미노프로판 ( $\gamma$ -DLenDMA; 화합물 (15)), 3-((6Z,9Z,28Z,31Z)-헵타트리아콘타-6,9,28,31-테트라엔-19-일옥시)-N,N-디메틸프로판-1-아민 (DLin-MP-DMA; 화합물 (8)), (6Z,9Z,28Z,31Z)-헵타트리아콘타-6,9,28,31-테트라엔-19-일 4-(디메틸아미노)부타노에이트 (화합물 (7)), (6Z,16Z)-12-((Z)-덱-4-엔일)도코사-6,16-디엔-11-일 5-(디메틸아미노)펜타노에이트 (화합물 (13)), 이의 염, 및 이의 혼합물로 구성된 그룹에서 선택됨을 특징으로 하는 핵산-지질 입자.

**청구항 13**

청구항 11-12 중 어느 한 항에 있어서, 상기 비-양이온성 지질은 콜레스테롤 또는 이의 유도체임을 특징으로 하는 핵산-지질 입자.

**청구항 14**

청구항 11-12 중 어느 한 항에 있어서, 상기 비-양이온성 지질은 인지질임을 특징으로 하는 핵산-지질 입자.

**청구항 15**

청구항 11-12 중 어느 한 항에 있어서, 상기 비-양이온성 지질은 인지질과 콜레스테롤 또는 이의 유도체의 혼합물임을 특징으로 하는 핵산-지질 입자.

**청구항 16**

청구항 14 또는 15에 있어서, 상기 인지질은 디팔미토일포스파티딜콜린 (DPPC), 디스테아로일포스파티딜콜린 (DSPC), 및 이의 혼합물로 구성된 그룹에서 선택됨을 특징으로 하는 핵산-지질 입자.

**청구항 17**

청구항 16에 있어서, 상기 인지질은 DPPC임을 특징으로 하는 핵산-지질 입자.

**청구항 18**

청구항 16에 있어서, 상기 인지질은 DSPC임을 특징으로 하는 핵산-지질 입자.

**청구항 19**

청구항 11-18 중 어느 한 항에 있어서, 입자들의 응집을 억제하는 복합 지질을 추가로 포함함을 특징으로 하는 핵산-지질 입자.

**청구항 20**

청구항 19에 있어서, 입자들의 응집을 억제하는 복합 지질은 폴리에틸렌글리콜 (PEG)-지질 접합체임을 특징으로 하는 핵산-지질 입자.

**청구항 21**

청구항 20에 있어서, 상기 PEG-지질 접합체는 PEG-디아실글리세롤 (PEG-DAG) 접합체, PEG-디알킬옥시프로필 (PEG-DAA) 접합체, PEG-인지질 접합체, PEG-세라마이드 (PEG-Cer) 접합체, 및 이의 혼합물로 구성된 그룹에서 선택됨을 특징으로 하는 핵산-지질 입자.

**청구항 22**

청구항 21에 있어서, 상기 PEG-지질 접합체는 PEG-DAA 접합체임을 특징으로 하는 핵산-지질 입자.

**청구항 23**

청구항 22에 있어서, 상기 PEG-DAA 접합체는 PEG-디데실옥시프로필 ( $C_{10}$ ) 접합체, PEG-디라우릴옥시프로필 ( $C_{12}$ ) 접합체, PEG-디미리스틸옥시프로필 ( $C_{14}$ ) 접합체, PEG-디팔미틸옥시프로필 ( $C_{16}$ ) 접합체, PEG-디스테아릴옥시프로필 ( $C_{18}$ ) 접합체, 및 이의 혼합물로 구성된 그룹에서 선택됨을 특징으로 하는 핵산-지질 입자.

**청구항 24**

청구항 11-23 중 어느 한 항에 있어서, 상기 siRNA는 입자 내에 완전히 캡슐화됨을 특징으로 하는 핵산-지질 입자.

**청구항 25**

청구항 11-24 중 어느 한 항에 있어서, 핵산-지질 입자는 약 5:1 내지 약 15:1의 총 지질:siRNA 질량비를 가짐을 특징으로 하는 핵산-지질 입자.

**청구항 26**

청구항 11-25 중 어느 한 항에 있어서, 상기 입자는 약 30 nm 내지 약 150 nm의 중위 직경을 가짐을 특징으로 하는 핵산-지질 입자.

**청구항 27**

청구항 11-26 중 어느 한 항에 있어서, 상기 입자는 전자 치밀 핵을 가짐을 특징으로 하는 핵산-지질 입자.

**청구항 28**

청구항 11-27 중 어느 한 항에 있어서, 상기 양이온성 지질은 입자 내 존재하는 총 지질의 약 48 몰% 내지 약 62 몰%를 포함함을 특징으로 하는 핵산-지질 입자.

**청구항 29**

청구항 15-28 중 어느 한 항에 있어서, 상기 입자는 인지질과 콜레스테롤 또는 콜레스테롤 유도체를 포함하며, 여기서 인지질은 입자 내 존재하는 총 지질의 약 7 몰% 내지 약 17 몰%를 포함하고 콜레스테롤 또는 이의 유도체는 입자 내 존재하는 총 지질의 약 25 몰% 내지 약 40 몰%를 포함함을 특징으로 하는 핵산-지질 입자.

**청구항 30**

청구항 19-29 중 어느 한 항에 있어서, 입자들의 응집을 억제하는 복합 지질은 입자 내 존재하는 총 지질의 약 0.5 몰% 내지 약 3 몰%를 포함함을 특징으로 하는 핵산-지질 입자.

**청구항 31**

청구항 28-30 중 어느 한 항에 있어서, 지질들은 제제 A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P, Q, R, S, T, U, V, W, X, Y 또는 Z 중 어느 하나에 기재된 바와 같이 제제화됨을 특징으로 하는 핵산-지질 입자.

**청구항 32**

청구항 11-31 중 어느 한 항에 있어서, 1m (서열번호:1 및 2), 2m (서열번호:3 및 4), 3m (서열번호:5 및 6),

4m (서열번호:7 및 8), 5m (서열번호:9 및 10), 6m (서열번호:11 및 12), 7m (서열번호:13 및 14), 8m (서열번호:15 및 16), 9m (서열번호:17 및 18), 10m (서열번호:19 및 20), 11m (서열번호:21 및 22), 12m (서열번호:23 및 24), 13m (서열번호:25 및 26), 14m (서열번호:27 및 28), 및 15m (서열번호:29 및 30)로 구성된 그룹에서 선택된 2개의 상이한 이중 가닥 siRNA 분자를 포함함을 특징으로 하는 핵산-지질 입자.

### 청구항 33

청구항 32에 있어서, 2개의 상이한 이중 가닥 siRNA 분자들의 조합은 실시예 2에 기재된 조합들 중 임의의 하나에서 선택됨을 특징으로 하는 핵산-지질 입자.

### 청구항 34

청구항 11-31 중 어느 한 항에 있어서, 1m (서열번호:1 및 2), 2m (서열번호:3 및 4), 3m (서열번호:5 및 6), 4m (서열번호:7 및 8), 5m (서열번호:9 및 10), 6m (서열번호:11 및 12), 7m (서열번호:13 및 14), 8m (서열번호:15 및 16), 9m (서열번호:17 및 18), 10m (서열번호:19 및 20), 11m (서열번호:21 및 22), 12m (서열번호:23 및 24), 13m (서열번호:25 및 26), 14m (서열번호:27 및 28), 및 15m (서열번호:29 및 30)로 구성된 그룹에서 선택된 3개의 상이한 이중 가닥 siRNA 분자를 포함함을 특징으로 하는 핵산-지질 입자.

### 청구항 35

청구항 34에 있어서, 3개의 상이한 이중 가닥 siRNA 분자들의 조합은 실시예 3에 기재된 조합들 중 임의의 하나에서 선택됨을 특징으로 하는 핵산-지질 입자.

### 청구항 36

청구항 11 내지 청구항 35 중 어느 한 항의 핵산-지질 입자 및 제약상 허용가능한 담체를 포함하는 제약학적 조성물.

### 청구항 37

siRNA가 세포로 유입하여 세포 내에서 B형 간염 바이러스 유전자의 발현을 침묵시키는 조건하에서, 발현된 B형 간염 바이러스 유전자를 포함하는 세포를 청구항 11 내지 35 중 어느 한 항의 핵산-지질 입자 또는 청구항 36의 제약학적 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는, 세포내에서 B형 간염 바이러스 유전자의 발현을 침묵시키는 방법.

### 청구항 38

청구항 37에 있어서, 상기 세포는 포유동물내 존재함을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 39

청구항 38에 있어서, 상기 세포는 입자를 포유동물에 전신 경로를 통해 투여함으로써 접촉됨을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 40

청구항 38 또는 39에 있어서, 상기 포유동물은 인간임을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 41

청구항 40에 있어서, 인간은 B형 간염 바이러스 감염 또는 B형 간염 바이러스/D형 간염 바이러스 감염에 의해 유발된 간 질병을 진단받았음을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 42

청구항 38-41 중 어느 한 항에 있어서, B형 간염 바이러스 유전자 발현의 침묵은 포유동물에서 B형 간염 바이러스 및/또는 D형 간염 바이러스 입자 부하량을 핵산-지질 입자 부재시 B형 간염 바이러스 및/또는 D형 간염 바이러스 입자 부하량에 비해 적어도 약 50% 만큼 감소시킴을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 43

청구항 11- 35 중 어느 한 항 또는 청구항 36에 있어서, 포유동물 (예컨대, 인간)의 세포에서 B형 간염 바이러스 유전자의 발현을 침묵시키는데 사용하기 위한 것임을 특징으로 하는 핵산-지질 입자 또는 제약학적 조성물.

#### **청구항 44**

포유동물 (예컨대, 인간)의 세포에서 B형 간염 바이러스 유전자의 발현을 침묵시키기 위한 약제를 제조하기 위한, 청구항 11- 35 중 어느 한 항의 핵산-지질 입자 또는 청구항 36의 제약학적 조성물의 용도.

#### **청구항 45**

치료적 유효량의 청구항 11-35 중 어느 한 항의 핵산-지질 입자 또는 청구항 36의 제약학적 조성물을 포유동물에 투여하는 단계를 포함하는, 포유동물에서 B형 간염 바이러스 및/또는 D형 간염 바이러스 감염 관련 하나 또는 그 이상의 증상들의 개선 방법.

#### **청구항 46**

청구항 45에 있어서, 상기 입자는 전신 경로를 통해 투여됨을 특징으로 하는 방법.

#### **청구항 47**

청구항 45-46 중 어느 한 항에 있어서, 핵산-지질 입자의 siRNA는 포유동물에서 B형 간염 바이러스 유전자의 발현을 억제함을 특징으로 하는 방법.

#### **청구항 48**

청구항 45-47 중 어느 한 항에 있어서, 포유동물은 인간임을 특징으로 하는 방법.

#### **청구항 49**

청구항 48에 있어서, 인간은 간 질병을 가짐을 특징으로 하는 방법.

#### **청구항 50**

청구항 11-35 중 어느 한 항 또는 청구항 36에 있어서, 포유동물 (예컨대, 인간)에서 B형 간염 바이러스 및/또는 D형 간염 바이러스 감염과 관련된 하나 또는 그 이상의 증상들의 개선에 사용하기 위한 것임을 특징으로 하는, 핵산-지질 입자 또는 제약학적 조성물.

#### **청구항 51**

포유동물 (예컨대, 인간)에서 B형 간염 바이러스 및/또는 D형 간염 바이러스 감염과 관련된 하나 또는 그 이상의 증상들을 개선하기 위한 약제를 제조하기 위한 청구항 11-35 중 어느 한 항의 핵산-지질 입자 또는 청구항 36의 제약학적 조성물의 용도.

#### **청구항 52**

치료적 유효량의 청구항 11-35 중 어느 한 항의 핵산-지질 입자 또는 청구항 36의 제약학적 조성물을 포유동물에 투여하는 단계를 포함하는, 포유동물에서 B형 간염 바이러스 및/또는 D형 간염 바이러스 감염의 치료 방법.

#### **청구항 53**

청구항 11-35 중 어느 한 항 또는 청구항 36에 있어서, 포유동물 (예컨대, 인간)에서 B형 간염 바이러스 및/또는 D형 간염 바이러스 감염의 치료에 사용하기 위한 것임을 특징으로 하는, 핵산-지질 입자 또는 제약학적 조성물.

#### **청구항 54**

포유동물 (예컨대, 인간)에서 B형 간염 바이러스 및/또는 D형 간염 바이러스 감염을 치료하기 위한 약제를 제조하기 위한 청구항 11-35 중 어느 한 항의 핵산-지질 입자 또는 청구항 36의 제약학적 조성물의 용도.

#### **청구항 55**

약물 요법에 사용하기 위한 청구항 11-35 중 어느 한 항의 핵산-지질 입자 또는 청구항 36의 제약학적 조성물.

#### **청구항 56**

siRNA가 세포로 유입하여 세포 내에서 B형 간염 바이러스 유전자의 발현을 침묵시키는 조건하에서, 발현된 B형 간염 바이러스 유전자를 포함하는 세포를 청구항 4 내지 10 중 어느 한 항의 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는, 세포내에서 B형 간염 바이러스 유전자의 발현을 침묵시키는 방법.

#### **청구항 57**

청구항 56에 있어서, 상기 세포는 포유동물 내 존재함을 특징으로 하는 방법.

#### **청구항 58**

청구항 57에 있어서, 상기 세포는 조성을 포유동물에 전신 경로를 통해 투여함으로써 접촉됨을 특징으로 하는 방법.

#### **청구항 59**

청구항 57 또는 58에 있어서, 상기 포유동물은 인간임을 특징으로 하는 방법.

#### **청구항 60**

청구항 59에 있어서, 인간은 B형 간염 바이러스 감염 또는 B형 간염 바이러스/D형 간염 바이러스 감염에 의해 유발된 간 질병을 진단받았음을 특징으로 하는 방법.

#### **청구항 61**

청구항 57-60 중 어느 한 항에 있어서, B형 간염 바이러스 유전자 발현의 침묵은 포유동물에서 B형 간염 바이러스 및/또는 D형 간염 바이러스 입자 부하량을 핵산-지질 입자 부재시 B형 간염 바이러스 및/또는 D형 간염 바이러스 입자 부하량에 비해 적어도 약 50% 만큼 감소시킴을 특징으로 하는 방법.

#### **청구항 62**

청구항 4-10 중 어느 한 항에 있어서, 포유동물(예컨대, 인간)의 세포에서 B형 간염 바이러스 유전자의 발현을 침묵시키는데 사용하기 위한 것임을 특징으로 하는 조성물.

#### **청구항 63**

포유동물(예컨대, 인간)의 세포에서 B형 간염 바이러스 유전자의 발현을 침묵시키기 위한 약제를 제조하기 위한 청구항 4-10 중 어느 한 항의 조성물의 용도.

#### **청구항 64**

치료적 유효량의 청구항 4-10 중 어느 한 항의 조성을 포유동물에 투여하는 단계를 포함하는, 포유동물에서 B형 간염 바이러스 및/또는 D형 간염 바이러스 감염 관련 하나 또는 그 이상의 증상들의 개선 방법.

#### **청구항 65**

청구항 64에 있어서, 상기 조성을 전신 경로를 통해 투여됨을 특징으로 하는 방법.

#### **청구항 66**

청구항 64-65 중 어느 한 항에 있어서, 조성을 siRNA는 포유동물에서 B형 간염 바이러스 유전자의 발현을 억제함을 특징으로 하는 방법.

#### **청구항 67**

청구항 64-66 중 어느 한 항에 있어서, 포유동물은 인간임을 특징으로 하는 방법.

#### **청구항 68**

청구항 67에 있어서, 인간은 간 질병을 가짐을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 69

청구항 4-10 중 어느 한 항에 있어서, 포유동물 (예컨대, 인간)에서 B형 간염 바이러스 및/또는 D형 간염 바이러스 감염과 관련된 하나 또는 그 이상의 증상들의 개선에 사용하기 위한 것임을 특징으로 하는 조성물.

### 청구항 70

포유동물 (예컨대, 인간)에서 B형 간염 바이러스 및/또는 D형 간염 바이러스 감염과 관련된 하나 또는 그 이상의 증상들을 개선하기 위한 약제를 제조하기 위한 청구항 4-10 중 어느 한 항의 조성물의 용도.

### 청구항 71

치료적 유효량의 청구항 4-10 중 어느 한 항의 조성물을 포유동물에 투여하는 단계를 포함하는, 포유동물에서 B형 간염 바이러스 및/또는 D형 간염 바이러스 감염의 치료 방법.

### 청구항 72

청구항 4-10 중 어느 한 항에 있어서, 포유동물 (예컨대, 인간)에서 B형 간염 바이러스 및/또는 D형 간염 바이러스 감염의 치료에 사용하기 위한 것임을 특징으로 하는 조성물.

### 청구항 73

포유동물 (예컨대, 인간)에서 B형 간염 바이러스 및/또는 D형 간염 바이러스 감염을 치료하기 위한 약제를 제조하기 위한 청구항 4-10 중 어느 한 항의 조성물의 용도.

### 청구항 74

청구항 4-10 중 어느 한 항에 있어서, 약물 요법에 사용하기 위한 것임을 특징으로 하는 조성물.

### 청구항 75

치료적 유효량의 청구항 4-10 중 어느 한 항의 조성물, 청구항 11-35 중 어느 한 항의 핵산-지질 입자 또는 청구항 36의 제약학적 조성물을 포유동물에 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 핵산-지질 입자 또는 조성물은 B형 간염 바이러스 표면 항원의 합성을 억제하는, 포유동물 (예컨대, 인간)에서 D형 간염 바이러스의 복제를 억제 및/또는 D형 간염 바이러스 감염의 하나 또는 그 이상의 증상들을 개선하는 방법.

### 청구항 76

청구항 4-10 중 어느 한 항, 청구항 11-35 중 어느 한 항 또는 청구항 36에 있어서, 포유동물 (예컨대, 인간)에서 D형 간염 바이러스의 복제를 억제 및/또는 D형 간염 바이러스 감염의 하나 또는 그 이상의 증상들을 개선함에 사용하기 위한 것이며, 핵산-지질 입자 또는 조성물은 B형 간염 바이러스 표면 항원의 합성을 억제함을 특징으로 하는, 조성물, 핵산-지질 입자 또는 제약학적 조성물.

### 청구항 77

핵산-지질 입자 또는 조성물은 B형 간염 바이러스 표면 항원의 합성을 억제하며, 포유동물 (예컨대, 인간)에서 D형 간염 바이러스의 복제를 억제 및/또는 D형 간염 바이러스 감염의 하나 또는 그 이상의 증상들을 개선하기 위한 약제를 제조하기 위한, 청구항 4-10 중 어느 한 항의 조성물, 청구항 11-35 중 어느 한 항의 핵산-지질 입자 또는 청구항 36의 제약학적 조성물의 용도.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 특허 출원은 2014년 10월 2일 출원된 미국 출원 번호 62/059,056, 및 2015년 2월 24일 출원된 미국 출원 번호 62/120,149의 우선권의 이익을 주장하며, 이 출원들은 본 출원에 참고문헌으로 포함된다.

## 배경 기술

[0003]

### 발명의 배경

[0004]

B형 간염 바이러스 (약칭 "HBV")는 헤파드나바이러스 군의 일 구성원이다. 이 바이러스 입자 (종종 비리온으로도 언급됨)는 지질 외피 및 단백질로 이루어진 정이십면체 뉴클레오캡시드 코어를 포함한다. 이러한 뉴클레오캡시드는 바이러스 DNA 및 역전사효소 활성을 가지는 DNA 중합효소를 둘러싸고 있다. 외피는, 감수성 세포들, 전형적으로 간세포의 바이러스 결합에 관여하여 이러한 세포들 내부로 유입하는 포매 단백질들을 함유한다. 감염성 바이러스 입자들 이외에도, 코어가 없는 사상(filamentous) 및 구상체가 감염된 개체들의 혈청에서 발견될 수 있다. 이러한 입자들은 비 감염성이며 비리온의 표면 일부를 형성하는 지질 및 단백질로 구성되는데, 비리온은 표면 항원 (HBsAg)이라 불리며 바이러스의 생활 주기 동안 과량으로 생성된다.

[0005]

HBV의 유전체는 원형 DNA로 이루어지지만, DNA가 완전히 이중-가닥은 아니기 때문에 이는 흔하지 않다. 전장 가닥 중 한쪽 단부는 바이러스 DNA 중합효소에 연결된다. 이 유전체는 3020-3320개 뉴클레오티드 길이 (전장 가닥) 및 1700-2800개 뉴클레오티드 길이 (보다 짧은 가닥)이다. 네거티브-센스 (비-코딩)는 바이러스 mRNA에 상보적이다. 이 바이러스 DNA는 세포 감염 후 핵에서 발견된다. 상기 유전체에 의해 인코딩되는, C, X, P, 및 S로 불리는 4가지 공지된 유전자들이 존재한다. 코어 단백질은 유전자 C (HBcAg)에 의해 코딩되는데, 이의 시작 코돈은 프리-코어(pre-core) 단백질을 생성하는 상위의 인-프레임(in-frame) AUG 시작 코돈을 선행시킨다. HBeAg는 프리-코어 단백질의 단백질분해 과정에 의해 생성된다. DNA 중합효소는 유전자 P에 의해 인코딩된다. 유전자 S는 표면 항원 (HBsAg)을 코딩하는 유전자이다. HBsAg 유전자는 하나의 긴 오픈 리딩 프레임(open reading frame)이지만 프레임 내 3개의 "출발" (ATG) 코돈들을 함유하는데, 이러한 코돈들은 유전자를 세 개의 섹션들, 프리-S1 (pre-S1), 프리-S2 (pre-S2), 및 S로 나눈다. 복수의 시작 코돈들로 인해, 대형, 중형, 소형으로 불리는 3가지 상이한 크기의 폴리펩티드들이 생성된다. 유전자 X에 의해 코딩되는 단백질의 기능은 완전히 이해되지는 않았으나 간암 발병과 관련되어 있다. HBV 복제는 복잡한 과정이다. 복제는 간에서 일어나지만, 바이러스는 혈액으로 확산하므로 감염된 사람들의 혈액에서 바이러스 단백질 및 이에 대한 항체들이 발견된다. HBV의 구조, 복제 및 생물학은 D. Glebe 및 C.M.Bremer 등의, Seminars in Liver Disease, Vol. 33, No. 2, pages 103-112 (2013)에 보고되어 있다.

[0006]

인간의 HBV 감염은 간의 감염성 염증병을 유발할 수 있다. 감염된 개체들은 수년간 증상을 보이지 않을 수 있다. 만성 보균자 35억명을 포함한 전세계 인구의 약 3분의 1이 간의 일부가 감염되어 있는 것으로 추정된다.

[0007]

이 바이러스는 감염성 혈액 또는 체액에 대한 노출에 의해 전달된다. 주산기 감염 또한 주된 감염 경로가 될 수 있다. 급성병은 간 염증, 구토, 황달을 유발하며, 사망을 유발할 수도 있다. 만성 B형 간염은 결국에는 경화증 및 간암을 유발할 수 있다.

[0008]

HBV에 감염된 대부분의 사람들은 면역계의 작용을 통해 감염을 제거하지만, 감염된 사람들 일부는 매우 빠른 속도의 감염 과정을 겪게 되는 반면 (전격 간염); 그 외 사람들은 만성적으로 감염되므로 이에 의한 간 질환 가능성이 증가한다. HBV 감염 치료에 있어 현재 몇몇 약제들이 승인되어 있으나, 감염된 개체들은 이를 약제들에 대하여 다양한 성공도로 반응하며, 이들 약제들 중 어느 것도 감염된 사람으로부터 바이러스를 제거하지 못한다.

[0009]

D형 간염 바이러스 (HDV)는 소형의 원형 외피 RNA 바이러스로, B형 간염 바이러스 (HBV)의 존재하에서만 번식할 수 있다. 특히, HDV는 자체 번식을 위해 HBV 표면 항원 단백질을 필요로 한다. HBV 및 HDV 모두의 감염은 HBV 단독 감염에 비해 더욱 심각한 합병증을 일으킨다. 이들 합병증들은 급성 감염시 간부전을 경험하게 될 더 큰 가능성 및 간 경화증으로의 급속한 진행을 포함하며, 만성 감염시 간암 발병 가능성이 증가한다. B형 간염 바이러스와 조합시, D형 간염은 모든 간염 감염 중 가장 높은 사망률을 가진다. HDV 전달 경로는 HBV에 대한 전달 경로와 유사하다. 감염은 대체로 HBV 감염 위험이 높은 사람들, 특히, 주사 약물 사용자들 및 응고 인자 농축물을 수여받은 사람들로 한정된다.

[0010]

그러므로 인간에서의 HBV 감염 치료, 뿐만 아니라 인간에서의 HBV/HDV 감염 치료를 위한 조성물 및 방법들에 대한 지속적인 필요성이 존재한다.

## 발명의 내용

[0011]

### 발명의 간단한 요약

[0012]

본 출원에서 보다 상세히 설명되는 한 양태에서, 본 발명은 단리된, 이중 가닥 siRNA 분자들을 제공하며, 이들

각각은 센스 가닥 및 이러한 센스 가닥에 혼성화되는 안티센스 가닥을 포함한다. 본 발명의 이러한 양태의 siRNA는 HBV 유전체의 하나 또는 그 이상의 유전자들 및/또는 전사체(transcripts)를 표적한다. 이러한 발명 양태의 siRNA 분자들의 예들은 본 출원의 표 A에 제시된 siRNA 분자들이다. 본 발명의 siRNA 분자들은, 예를 들면, HBV 또는 HBV/HDV에 감염된 인간 피험체에게 치료양으로 투여될 경우 HBV 감염 및/또는 HDV 감염의 치료에 유용하다. 더욱 일반적으로, 본 발명은 시험관내 및 생체내 HBV 유전자 발현을 억제 또는 침묵시킬 수 있는 siRNA 분자들을 제공한다.

[0013] 또 다른 양태에서, 본 발명은 단리된, 단일 가닥 핵산 분자들, 가령, 표 A에 제시된 siRNA 분자들의 단리된 센스 및 안티센스 가닥들을 제공한다. 전술한 단리된 센스 및 안티센스 가닥들은 본 출원의 표 B에 제시되어 있다. 본 출원에서 더욱 상세히 기재되는 바와 같이, 본 발명의 siRNA 및 단일 가닥 핵산 분자들은 변형되며 하나 또는 그 이상의 UNA 모이어티 및/또는 하나 또는 그 이상의 2'0-메틸 변형 (예컨대, 표 A 및 B 참고)을 포함한다.

[0014] 본 발명은 또한 본 발명의 하나 또는 그 이상의 siRNA 분자들 (예컨대, 표 A에 기재된 siRNA 분자들 참고)을 포함하는 조성물, 가령, 제약학적 조성물을 제공한다. 한 구체예에서, 본 발명은 2개의 상이한 본 발명의 siRNA 분자들 (예컨대, 본 출원의 표 A에 개시된 siRNA 분자들에서 선택된 2개의 상이한 siRNA 분자들)을 포함하는 조성물을 제공한다. 또 다른 구체예에서, 본 발명은 3개의 상이한 본 발명의 siRNA 분자들 (예컨대, 본 출원에서 표 A에 개시된 siRNA 분자들에서 선택된 3개의 상이한 siRNA 분자들)을 포함하는 조성물을 제공한다. 본 출원의 표 A에 개시된 siRNA 분자들에서 선택된 2개의 상이한 siRNAs의 모든 가능한 조합 ("2원 조합")이 본 출원의 실시예 2에 제시된다. 본 출원의 표 A에 개시된 siRNA 분자들에서 선택된 3개의 상이한 siRNAs의 모든 가능한 조합 ("3원 조합")이 본 출원의 실시예 3에 제시된다. 그러므로, 한 양태에서, 본 발명은 표 A에 제시된 siRNA의 전술한 2원 또는 3원 조합 중 하나를 포함하는 조성물 (예컨대, 제약학적 조성물)을 제공한다.

[0015] 본 발명은 또한 핵산-지질 입자들, 및 이의 제제들을 제공하는데, 여기서 지질 입자들 각각은 본 출원에 기재된 siRNA, 양이온성 지질, 및 비-양이온성 지질 중 하나 또는 그 이상(예컨대, 칵테일), 그리고 선택적으로 입자들의 응집을 억제하는 복합 지질을 포함한다. 본 발명의 지질 입자들에 포함될 수 있는 siRNA 분자들의 예는 표 A에 제시된 siRNA 분자들, 그리고 전술한 siRNA의 조합들 (예컨대, 본 출원에 기재된 2원 그리고 3원 조합)이다. 전형적으로, siRNA는 지질 입자 내부에 완전히 캡슐화된다. 본 발명의 지질 입자들은, 예를 들면, 치료적 유효량의 siRNA를 HBV 또는 HBV/HDV에 감염된 인체의 세포들 (예컨대, 간 세포들)로 전달함으로써, HBV 감염 및/또는 HDV 감염을 치료 및/또는 HBV 감염 및/또는 HDV 감염의 하나 또는 그 이상의 증상들을 개선함에 유용하다.

[0016] 본 발명은 또한 HBV 유전자 발현을 표적하는 siRNA 분자 하나 또는 이러한 분자들의 칵테일, 그리고 제약상 허용가능한 담체를 포함하는 제약학적 조성물을 제공한다. 예를 들면, 본 발명은 HBV 유전자 발현을 표적하는, 표 A에 제시된 siRNA 분자를 각각 1개, 2개 또는 3개 포함하는 제약학적 조성물을 제공한다. 지질 입자들 내에 캡슐화된 siRNA들의 칵테일을 포함하는 제제에 있어서, 상이한 siRNA 분자들은 동일한 지질 입자 내에 공동-캡슐화될 수 있거나, 또는 칵테일 내 존재하는 각 유형의 siRNA 종들은 해당 종 단독의 입자내에 캡슐화될 수 있거나, 또는 일부 siRNA 종들은 동일한 입자내에 공동캡슐화되고 그 외 siRNA 종들은 제제 내 상이한 입자들 내에 캡슐화될 수 있다. 전형적으로, 본 발명의 siRNA 분자들은 지질 입자에 완전히 캡슐화된다.

[0017] 본 발명의 핵산-지질 입자들은 HBV 또는 HBV/HDV에 감염된 인간에게, 하나 또는 그 이상의 HBV 유전자들을 침묵시키는 siRNA 분자들을 예방적 또는 치료적 전달하여, 인간에서 HBV 감염 및/또는 HDV 감염 증상을 적어도 하나 개선시키는데 유용하다. 일부 구체예들에서, 본 출원에 기재된 하나 또는 그 이상의 siRNA 분자들은 핵산-지질 입자들로 제제화되고, 입자들은 이러한 치료를 필요로하는 포유동물 (예컨대, 인간)에 투여된다. 특정 예들에서, 치료적 유효량의 핵산-지질 입자는 포유동물에 (예컨대, 인간에서 HBV 및/또는 HDV를 감염 치료를 위해) 투여될 수 있다. 본 발명의 핵산-지질 입자들은 대부분의 HBV 유전자 발현 부위인 인간의 간 세포들을 표적하는데 특히 유용하다. 핵산-지질 입자의 투여는 해당 분야에 공지된 임의의 경로, 가령, 예컨대, 경구, 비강내, 정맥내, 복강내, 근육내, 관절내, 병소내, 기관내, 피하, 또는 피부내에 의할 수 있다. 특정 구체예들에서, 핵산-지질 입자는 전신으로, 예컨대, 장관 또는 비장관 투여 경로를 통해 투여된다.

[0018] 일부 구체예들에서, HBV 유전자 발현의 하향조절은 핵산-지질 입자 투여 후 포유동물의 생물학적 샘플 내 HBV RNA 또는 단백질 수준을 검출함으로써 결정된다. 그 외 구체예들에서, HBV 유전자 발현의 하향조절은 핵산-지질 입자 투여 후 포유동물의 생물학적 샘플 내 HBV mRNA 또는 단백질 수준을 검출함으로써 결정된다. 특정 구체 예들에서, HBV 유전자 발현의 하향조절은 입자 투여 후 포유동물에서 HBV 감염과 관련된 증상들을 모니터링함으로써 검출된다.

- [0019] 또다른 구체예에서, 본 발명은, siRNA가 세포에 유입하여 세포 내에서 B형 간염 바이러스 유전자의 발현을 침묵시키는 조건하에서, HBV 유전자 발현을 침묵시키는 siRNA를 살아있는 세포 내로 유입시키는 방법들을 제공하는데, 이 방법은 본 발명의 핵산-지질 입자와 세포를 접촉시키는 단계를 포함하며, 여기서 핵산-지질 입자는 HBV를 표적하는 siRNA를 포함한다.
- [0020] 또다른 구체예에서, 본 발명은 인간에서 B형 간염 바이러스 및/또는 D형 간염 바이러스 감염과 관련된 하나 또는 그 이상의 증상들을 개선하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 치료적 유효량의 본 발명의 핵산-지질 입자를 인간에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구체예들에서, 이러한 본 발명의 양태의 방법들에서 사용되는 핵산-지질 입자들은 표 A에 제시된 siRNAs에서 독립적으로 선택되는 1, 2 또는 3 또는 그 이상의 상이한 siRNA를 포함한다.
- [0021] 또다른 구체예에서, 본 발명은 필요로 하는 포유동물(예컨대, 인간)에서 HBV 유전자 발현을 침묵시키는 방법들을 제공하는데, 여기서 이 방법들 각각은 포유동물에 본 발명의 핵산-지질 입자를 투여하는 단계를 포함한다.
- [0022] 또다른 양태에서, 본 발명은 인간에서 HBV 및/또는 HDV 감염과 관련된 하나 또는 그 이상의 증상들을 치료 및/또는 개선하는 방법들을 제공하는데, 여기서 이 방법들 각각은 치료적 유효량의 본 발명의 핵산-지질 입자를 인간에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0023] 본 발명의 특정 구체예들은 HDV에 감염된 개체에 HBV 표면 항원의 합성을 억제하는 치료적 유효량의 본 발명의 하나 또는 그 이상의 조성물 또는 핵산-입자들을 투여함으로써, HDV의 복제를 억제 및/또는 하나 또는 그 이상의 HDV 감염 증상들을 개선하는 조성물 및 방법들을 제공한다.
- [0024] 또다른 양태에서, 본 발명은 필요로 하는 포유동물(예컨대, HBV 또는 HBV/HDV에 감염된 인간)에서 HBV의 발현을 억제하는 방법들을 제공하는데, 여기서 방법들 각각은 포유동물에 치료적 유효량의 본 발명의 핵산-지질 입자를 투여하는 단계를 포함한다.
- [0025] 또다른 양태에서, 본 발명은 인간에서 HBV 및/또는 HDV 감염을 치료하는 방법들을 제공하는데, 여기서 방법들 각각은 인간에게 치료적 유효량의 본 발명의 핵산-지질 입자를 투여하는 단계를 포함한다.
- [0026] 또다른 양태에서, 본 발명은 살아있는 세포에서 B형 간염 바이러스 유전자 발현을 억제하기 위한 본 발명의 siRNA 분자의 용도를 제공한다.
- [0027] 또다른 양태에서, 본 발명은 살아있는 세포에서 B형 간염 바이러스 유전자 발현을 억제하기 위한 본 발명의 제약학적 조성물의 용도를 제공한다.
- [0028] 본 발명의 조성물(예컨대, siRNA 분자들 및 이의 단리된 센스 및 안티센스 가닥들, 그리고 핵산-지질 입자들)은 또한, 예를 들면, HBV 및/또는 HDV 복제 및 생물학을 연구하기 위해, 및/또는 하나 또는 그 이상의 HBV 유전자들 또는 전사체들의 기능을 연구 또는 조절하기 위해, 하나 또는 그 이상의 HBV 유전자들 및/또는 전사체들의 발현 억제에 관한 생물학적 분석(예컨대, 생체내 또는 시험관내 분석)에 있어 유용하다. 예를 들면, 본 발명의 siRNA 분자들은 HBV 및/또는 HDV의 복제를 억제하고 인간에서 HBV 및/또는 HDV 감염의 치료, 및/또는 인간에서 HBV 및/또는 HDV 감염과 관련된 적어도 하나의 증상의 개선을 위한 후보 치료 제제인 siRNA 분자들을 식별하기 위한 생물학적 분석법을 이용하여 선별될 수 있다.
- [0029] 그 외 본 발명의 목적, 특징 및 이점들은 하기 상세한 설명 및 도면들로부터 해당 기술 분야의 통상의 기술자에게 명확해질 것이다.
- [0030] **발명의 상세한 설명**
- [0031] **도입**
- [0032] 본 출원에 기재된 siRNA 약물 요법은 인간에서 HBV 및/또는 HDV 감염 및 이와 관련된 증상을 치료하기 위한 상당히 새로운 조성물 및 방법을 유리하게 제공한다. 본 발명의 구체예들은 예를 들면, 1일 1회, 1주 1회, 또는 수 주에 1회(예컨대, 2주, 3주, 4주, 5주 또는 6주에 1회)로 투여될 수 있다.
- [0033] 더욱이, 본 출원에 기재된 핵산-지질 입자들은 핵산 약물, 가령, siRNA의 신체 내 표적 조직 및 세포들로의 효과적인 전달을 가능하게 한다. 지질 입자의 존재는 혈류에서의 뉴클레아제 분해로부터의 보호를 제공하고, 표적 조직에서의 우선적 축적을 가능하게 하고 세포의 세포질 내부로의 약물 유입 수단을 제공하여, 세포질에서 siRNA가 의도한 RNA 간섭 기능을 수행할 수 있게 한다.

[0034] **정의**

[0035] 본 출원에서 사용되는, 하기 용어들은 달리 특정한 언급이 없는 한 하기 의미들을 가진다.

[0036] 용어 "B형 간염 바이러스" (HBV로 약칭)는 오르토헤파드나바이러스 속의 바이러스 종들을 지칭하고, 이는 바이러스들의 헤파드나비리다에 군 (Hepadnaviridae family)의 일부이며, 인간에서 간 염증을 유발할 수 있다.

[0037] 용어 "D형 간염 바이러스" (HDV로 약칭)는 델타비리다에(Deltaviridae) 속의 바이러스 종들을 지칭하고, 인간에서 간 염증을 유발할 수 있다.

[0038] 본 출원에서 사용되는 용어 "짧은-간섭 RNA" 또는 "siRNA"는 siRNA가 표적 유전자 또는 서열과 동일한 세포내 존재할 경우 (예컨대, siRNA 서열에 상보적인 mRNA의 분해를 막거나 mRNA의 번역을 억제함으로써) 표적 유전자 또는 서열의 발현을 감소 또는 억제 할 수 있는 이중 가닥 RNA (즉, 이중나선 RNA)를 지칭한다. siRNA는 표적 유전자 또는 서열에 대해 실질적 또는 완전한 동일성을 가질 수 있거나, 미스매치 구역 (즉, 미스매치 모티프)을 포함할 수 있다. 특정 구체예들에서, siRNA는 약 19-25개 (이중나선) 뉴클레오티드 길이일 수 있고, 바람직하게는 약 20-24, 21-22, 또는 21-23개 (이중나선) 뉴클레오티드 길이이다. siRNA 이중나선들은 약 1 내지 약 4개 뉴클레오티드 또는 약 2 내지 약 3개 뉴클레오티드의 3' 오버행 그리고 5' 포스페이트 말단을 포함할 수 있다. siRNA의 예에는, 제한없이, 2개의 별도 가닥의 분자들로부터 조합된 이중-가닥 폴리뉴클레오티드 분자가 포함되는데, 여기서 하나의 가닥은 센스 가닥이고 다른 가닥은 상보적인 안티센스 가닥이다.

[0039] 바람직하게는, siRNA는 화학적으로 합성된다. siRNA는 또한 보다 긴 dsRNA (예컨대, 약 25개 뉴클레오티드 길이 보다 큰 dsRNA)를 *E. coli* RNase III 또는 다이서(Dicer)로 절단함으로써 생성될 수 있다. 이러한 효소들은 dsRNA를 생물학적 활성 siRNA로 가공한다 (예컨대, Yang 등, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99:9942-9947 (2002); Calegari 등, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99:14236 (2002); Byrom 등, *Ambion TechNotes*, 10(1):4-6 (2003); Kawasaki 등, *Nucleic Acids Res.*, 31:981-987 (2003); Knight 등, *Science*, 293:2269-2271 (2001); 및 Robertson 등, *J. Biol. Chem.*, 243:82 (1968) 참고). 바람직하게는, dsRNA는 적어도 50개 뉴클레오티드 내지 약 100, 200, 300, 400, 또는 500개 뉴클레오티드 길이이다. dsRNA는 1000, 1500, 2000, 5000개 뉴클레오티드 길이만큼, 또는 그 이상 길 수 있다. dsRNA는 전체 유전자 전사체 또는 부분적 유전자 전사체에 관하여 인코딩될 수 있다. 특정 예들에서, siRNA는 플라스미드에 의해 인코딩 될 수 있다 (예컨대, 헤어핀 루프를 가지는 이중나선들로 자동적으로 폴드되는 서열들로서 전사된다).

[0040] 어구 "표적 유전자의 발현 억제"는 표적 유전자 (예컨대, HBV 유전체 내의 유전자)의 발현을 침묵, 감소 또는 억제시키는 본 발명의 siRNA의 능력을 지칭한다. 유전자 침묵 정도를 조사하기 위하여, 테스트 샘플 (예컨대, 표적 유전자를 발현시키는 관심 유기체로부터 얻은 생물학적 샘플 또는 표적 유전자를 발현시키는 배양 내 세포들의 샘플)을 표적 유전자의 발현을 침묵, 감소 또는 억제시키는 siRNA와 접촉시킨다. 테스트 샘플에서 표적 유전자의 발현은 siRNA와 접촉되지 않은 대조 샘플에서의 표적 유전자 발현과 비교된다 (예컨대, 표적 유전자를 발현시키는 관심 유기체로부터 얻은 생물학적 샘플 또는 표적 유전자를 발현시키는 배양 내 세포들의 샘플). 대조 샘플들 (예컨대, 표적 유전자를 발현시키는 샘플들)은 100%의 값이 할당될 수 있다. 특정 구체예들에서, 표적 유전자 발현의 침묵, 억제 또는 감소는 대조 샘플 (예컨대, 완충액 단독, 상이한 유전자를 표적하는 siRNA 서열, 스크램블 siRNA 서열등)에 대한 테스트 샘플의 값이 약 100%, 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89%, 88%, 87%, 86%, 85%, 84%, 83%, 82%, 81%, 80%, 79%, 78%, 77%, 76%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 또는 0%인 경우 구현된다. 적합한 분석법에는, 제한없이, 해당 분야의 통상의 기술자에게 공지된 기법들, 가령, 예컨대, 점상 블롯, 노던 블롯, 현장 혼성화(*in situ hybridization*), ELISA, 면역침강법, 효소 기능, 뿐만 아니라 해당 분야의 통상의 기술자들에게 공지된 표현형 분석법을 이용한 단백질 또는 mRNA 수준의 조사가 포함된다. 치료적 핵산, 가령, siRNA의 "유효량" 또는 "치료적 유효량"은 바람직한 효과, 예컨대, siRNA 부재시 검출되는 정상 발현 수준에 비해 표적 서열의 발현의 억제를 생성하기에 충분한 양이다. 특정 구체예들에서, 표적 유전자 또는 표적 서열의 발현 억제는 대조군 (예컨대, 완충액 단독, 상이한 유전자를 표적하는 siRNA 서열, 스크램бл siRNA 서열등)에 비해 siRNA를 이용하여 수득된 값이 약 100%, 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89%, 88%, 87%, 86%, 85%, 84%, 83%, 82%, 81%, 80%, 79%, 78%, 77%, 76%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 또는 0%일 경우 구현된다. 표적 유전자 또는 표적 서열의 발현을 측정하기에 적합한 분석법에는 해당 분야의 통상의 기술자에게 공지된 기법들, 가령, 예컨대, 점상 블롯, 노던 블롯, 현장 혼성화(*in situ hybridization*), ELISA, 면역침강법, 효소 기능, 뿐만 아니라 해당 분야의 통상의 기술자들에게 공지된 표현형 분석법을 이용한 단백질 또는 mRNA 수준의 조사가 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0041]

본 출원에서 사용되는 용어 "핵산"은 단일- 또는 이중-가닥 형태의 적어도 2개의 뉴클레오티드 (즉, 데옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드)를 함유하는 폴리머를 지칭하며 DNA 및 RNA를 포함한다. "뉴클레오티드"는 당 데옥시리보오스 (DNA) 또는 리보오스 (RNA), 염기, 및 포스페이트 기를 함유한다. 뉴클레오티드는 포스페이트 기들을 통해 서로 연결된다. "염기"는 퓨린 및 퓨리미딘을 포함하며, 상세하게는 천연 화합물 아데닌, 티민, 구아닌, 시토신, 우라실, 이노신, 및 천연 유사체, 그리고 퓨린과 퓨리미딘의 합성 유도체를 포함하고, 합성 유도체는 새로운 반응성 작용기들, 가령, 아민, 알콜, 티올, 카르복실레이트, 및 알킬할라이드를 배치시키는 변형을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 핵산은, 공지의 뉴클레오티드 유사체 또는 변형된 골격 잔기 또는 연결을 함유하는 핵산을 포함하고, 합성, 자연 발생, 및 비-자연 발생적이며, 기준 핵산과 유사한 결합 특성을 가진다. 이러한 유사체 및/또는 변형된 잔기의 예에는 제한없이, 포스포로티오에이트, 포스포르아미네이트, 메틸 포스포네이트, 키랄-메틸 포스포네이트, 2'-0-메틸 리보뉴클레오티드, 및 펩티드-핵산 (PNAs)이 포함된다. 추가적으로, 핵산은 하나 또는 그 이상의 UNA 모이어티를 포함할 수 있다.

[0042]

용어 "핵산"은 임의의 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드, 일반적으로 올리고뉴클레오티드로 명명되는 최대 60개 뉴클레오티드를 함유하는 분절들, 및 폴리뉴클레오티드로 명명되는 보다 긴 분절들을 포함한다. 데옥시리보올리고뉴클레오티드는 데옥시리보오스로 명명되는 5'-탄당으로 구성되는데, 이는 당의 5' 및 3' 탄소들에서 포스페이트에 공유적으로 결합되어 교대 비측쇄 폴리머를 형성한다. DNA는 예컨대, 안티센스 분자들, 플라스미드 DNA, 선-응축 DNA, PCR 산물, 벡터, 발현 카세트, 키메라 서열, 염색체 DNA, 또는 이들 그룹들의 유도체 및 조합의 형태일 수 있다. 리보올리고뉴클레오티드는 5'-탄당이 리보오스인 유사 반복 구조로 구성된다. RNA는, 예를 들면, 짧은 간섭 RNA (siRNA), 다이서-기질 dsRNA, 짧은 헤어핀 RNA (shRNA), 비대칭 간섭 RNA (airRNA), 마이크로RNA (miRNA), mRNA, tRNA, rRNA, tRNA, 바이러스 RNA (vRNA), 및 이의 조합의 형태일 수 있다. 따라서, 본 발명의 내용에서, 용어 "폴리뉴클레오티드" 및 "올리고뉴클레오티드"는 자연-발생 염기, 당 및 당간 (골격) 연결로 구성된 뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드 모노머들의 폴리머 또는 올리고머를 지칭한다. 용어 "폴리뉴클레오티드" 및 "올리고뉴클레오티드"는 또한 유사하게 기능하는 비-자연 발생 모노머들을 포함하는 폴리머 또는 올리고머, 또는 이의 일부를 포함한다. 이러한 변형된 또는 치환된 올리고뉴클레오티드는 종종 예를 들면, 뉴클레아제들의 존재시 향상된 세포 흡수, 감소된 면역원성, 및 증가된 안정성과 같은 특성들로 인해 고유의 형태를 보다 선호된다.

[0043]

달리 언급이 없는 한, 특정 핵산 서열은 또한 분명히 지시된 서열 뿐만 아니라 이러한 핵산의 보존적으로 변형된 변이체들 (예컨대, 퇴화 코돈 치환), 대립유전자, 상동유전자, SNP, 및 상보적인 서열들 또한 함축적으로 포함한다. 구체적으로, 퇴화 코돈 치환은 하나 또는 그 이상의 선택된 (또는 모든) 코돈들 중 3번째 위치가 혼합-염기 및/또는 데옥시이노신 잔기들로 치환되어 있는 서열들을 생성함으로서 구현될 수 있다 (Batzer 등의, *Nucleic Acid Res.*, 19:5081 (1991); Ohtsuka 등의, *J. Biol. Chem.*, 260:2605-2608 (1985); Rossolini 등의, *Mol. Cell. Probes*, 8:91-98 (1994)).

[0044]

본 발명은 단리된 또는 실질적으로 정제된 핵산 분자들 및 이러한 분자들을 함유하는 조성물을 포함한다. 본 발명의 내용에서, "단리된" 또는 "정제된" DNA 분자 또는 RNA 분자는 그 고유 환경으로부터 분리되어 존재하는 DNA 분자 또는 RNA 분자이다. 단리된 DNA 분자 또는 RNA 분자는 정제된 형태로 존재할 수 있거나 비-고유 환경, 가령, 예를 들면, 유전자삽입 숙주 세포에 존재할 수 있다. 예를 들면, "단리된" 또는 "정제된" 핵산 분자 또는 이의 생물학적 활성 부위는, 재조합 기술에 의해 제조된 경우 그 외 세포 물질 또는 배양 배지가 실질적으로 없거나, 화학적으로 합성된 경우 화학적 전구물질들 또는 그 외 화학물질들이 실질적으로 없다. 한 구체예에서, "단리된" 핵산은 핵산이 유래되는 유기체의 유전체 DNA에서 핵산을 자연적으로 플랭크시키는 서열들 (즉, 핵산의 5' 및 3' 단부에 위치한 서열들)이 없다. 예를 들면, 다양한 구체예들에서, 단리된 핵산 분자는 핵산 분자를 자연적으로 플랭크시키는 약 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0.5 kb, 또는 0.1 kb 미만의 뉴클레오티드 서열들을 핵산이 유래되는 세포의 유전체 DNA에 함유할 수 있다.

[0045]

용어 "유전자"는 폴리펩티드 또는 전구물질 폴리펩티드의 생성에 필요한 부분 길이 또는 전체 길이의 코딩 서열들을 포함하는 핵산 (예컨대, DNA 또는 RNA) 서열을 지칭한다.

[0046]

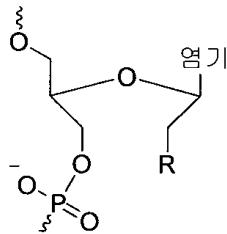
본 출원에서 사용되는 "유전자 산물"은 유전자의 산물, 가령, RNA 전사체 또는 폴리펩티드를 지칭한다.

[0047]

용어 "잠금해제 핵염기 유사체" ("UNA"로 약칭)는 리보오스 고리의 C2' 및 C3' 원자들이 공유적으로 연결되어 있지 않은 비환형(acyclic) 핵염기를 지칭한다. 용어 "잠금해제 핵염기 유사체"는 하기와 같이 구조식 A로 식별되는 구조를 가지는 핵염기 유사체들을 포함하는데:

[0048]

구조식 A



[0049]

[0050] 여기서 R은 하이드록실이고, 염기는 임의의 자연 또는 비자연 염기, 가령, 예를 들면, 아데닌 (A), 시토신 (C), 구아닌 (G) 및 티민 (T)이다. 본 발명의 실시에 유용한 UNA에는 미국 특허 제 8,314,227호에서 비환형 2'-3'-seco-뉴클레오티드 모노머들로 식별된 분자들이 포함되며, 이 문헌은 온전히 본 출원에 참고문헌으로 포함된다.

[0051]

[0051] 용어 "지질"은 지방산의 에스테르 (그러나 이에 제한되는 것은 아님)를 포함하며 물에 불용성이지만 많은 유기 용매들에서 가용성인 것으로 특징지어지는 유기 화합물들의 그룹을 지칭한다. 이들은 통상적으로 하기와 같은 최소 3가지 분류로 나뉘어진다: (1) 지방 및 오일, 뿐만 아니라 액스를 포함하는 "단순 지질"; (2) 인지질 및 당지질을 포함하는 "복합 지질"; 및 (3) "유도 지질" 가령, 스테로이드.

[0052]

[0052] 용어 "지질 입자"는 관심 표적 부위 (예컨대, 세포, 조직, 장기 등)에 치료적 핵산 (예컨대, siRNA)을 전달하기 위하여 사용될 수 있는 지질 제제를 포함한다. 바람직한 구체예들에서, 본 발명의 지질 입자는 전형적으로 양 이온성 지질, 비-양이온성 지질, 그리고 선택적으로 입자들의 응집을 저해하는 복합 지질로부터 형성된다. 핵산 분자 (예컨대, siRNA 분자)를 포함하는 지질 입자는 핵산-지질 입자로 지칭된다. 전형적으로, 핵산은 지질 입자 내에 완전히 캡슐화되고, 이에 의해 핵산은 효소적 분해로부터 보호된다.

[0053]

[0053] 특정 예들에서, 핵산-지질 입자들은 전신 투여에 매우 유용한데, 이는 이 입자들이 정맥내 (i.v.) 주사 후 연장된 순환 수명을 나타낼 수 있고, 원위 부위들 (예컨대, 투여 부위로부터 물리적으로 분리된 부위들)에 축적될 수 있으며, 이러한 원위 부위들에서 표적 유전자 발현의 침묵을 매개할 수 있기 때문이다. 핵산은 PCT 공개출원 제 WO 00/03683호에 제시된 바와 같이 축합제와 복합되어 지질 입자 내에 캡슐화될 수 있으며, 이 문헌은 본 출원에 실제로 온전하게 참고문헌으로 포함된다.

[0054]

[0054] 본 발명의 지질 입자들은 전형적으로 약 30 nm 내지 약 150 nm, 약 40 nm 내지 약 150 nm, 약 50 nm 내지 약 150 nm, 약 60 nm 내지 약 130 nm, 약 70 nm 내지 약 110 nm, 약 70 nm 내지 약 100 nm, 약 80 nm 내지 약 100 nm, 약 90 nm 내지 약 100 nm, 약 70 nm 내지 약 90 nm, 약 80 nm 내지 약 90 nm, 약 70 nm 내지 약 80 nm, 또는 약 30 nm, 35 nm, 40 nm, 45 nm, 50 nm, 55 nm, 60 nm, 65 nm, 70 nm, 75 nm, 80 nm, 85 nm, 90 nm, 95 nm, 100 nm, 105 nm, 110 nm, 115 nm, 120 nm, 125 nm, 130 nm, 135 nm, 140 nm, 145 nm, 또는 150 nm의 평균 직경을 가지며, 실질적으로 비-독성이다. 또한 핵산은, 본 발명의 지질 입자를 내 존재할 경우, 수용액에서 뉴클레아제를 이용한 분해에 내성을 띤다. 핵산-지질 입자들 및 이들의 제조 방법은 예컨대, 미국 공개 특허 제 20040142025 및 20070042031호에 개시되어 있으며, 개시된 내용은 본 출원에 실제로 온전히 참고문헌으로 포함된다.

[0055]

[0055] 본 출원에서 사용되는 "캡슐화된 지질"은 완전히 캡슐화된, 부분 캡슐화된, 또는 이를 모두인 치료적 핵산, 가령, siRNA를 제공하는 지질 입자를 지칭할 수 있다. 한 바람직한 구체예에서, 핵산 (예컨대, siRNA)은 (예컨대, 핵산-지질 입자를 형성하기 위해) 지질 입자에 완전히 캡슐화된다.

[0056]

[0056] 용어 "지질 접합체"는 지질 입자들의 응집을 억제하는 복합 지질을 지칭한다. 이러한 지질 접합체들에는 PEG-지질 접합체, 가령, 예컨대, 디알킬옥시프로필에 커플링된 PEG (예컨대, PEG-DAA 접합체), 디아실글리세롤에 커플링된 PEG (예컨대, PEG-DAG 접합체), 콜레스테롤에 커플링된 PEG, 포스파티딜에탄올아민에 커플링된 PEG, 및 세라마이드에 접합된 PEG (예컨대, 미국 특허 제 5,885,613 참고), 양이온성 PEG 지질, 폴리옥사졸린 (POZ)-지질 접합체 (예컨대, POZ-DAA 접합체), 폴리아미드 올리고머 (예컨대, ATTA-지질 접합체), 및 이의 혼합물이 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다. POZ-지질 접합체들의 추가 예들은 PCT 공개번호 제 WO 2010/006282에 기재되어 있다. PEG 또는 POZ는 지질에 직접 접합될 수 있거나 링커 모이어티를 통해 지질에 연결될 수 있다. 에스테르-함유 링커 모이어티를 비롯하여, PEG 또는 POZ를 지질에 커플링하기에 적합한 임의의 링커 모이어티가 사용될 수 있다. 바람직한 특정 구체예들에서, 비-에스테르 함유 링커 모이어티, 가령, 아미드 또는 카르바메이트가 사용된다.

- [0057] 용어 "양친매성 지질"은, 부분적으로는, 지질 물질의 소수성 부위가 소수성 상으로 배향하고, 친수성 부위가 수성상으로 배향하는 임의의 적합한 물질을 지칭한다. 친수성 특징은 극성 또는 하전된 그룹들, 가령, 탄수화물, 포스페이트, 카르복실기, 설페이토기, 아미노기, 설프하이드릴기, 니트로기, 하이드록실기, 및 그 외 작용기들의 존재로부터 유래한다. 소수성은 장쇄 포화 및 불포화 지방족 탄화수소 그룹, 그리고 하나 또는 그 이상의 방향족, 치환족, 또는 헤테로사이클릭 그룹(들)에 의해 치환된 이러한 그룹들을 포함하는 (그러나 이에 제한되는 것은 아님) 비극성 그룹들을 내포함으로써 부여될 수 있다. 양친매성 화합물들의 예에는, 인지질, 아미노지질, 및 스팽고지질이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0058] 인지질의 대표적인 예에는, 포스파티딜콜린, 포스파티딜에탄올아민, 포스파티딜세린, 포스파티딜이노시톨, 포스파티딘산, 팔미토일올레오일 포스파티딜콜린, 라이소포스파티딜콜린, 라이소포스파티딜에탄올아민, 디팔미토일포스파티딜콜린, 디올레오일포스파티딜콜린, 디스테아로일포스파티딜콜린, 및 디리놀레오일포스파티딜콜린이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다. 인이 없는 그 외 화합물들, 가령, 스팽고지질, 글리코스팡고지질 계열(families), 디아실글리세롤, 및 b-아실옥시산 또한 양친매성 지질로 지정되는 그룹에 속한다. 추가적으로, 상기 기재된 양친매성 지질들은 트리글리세라이드 및 스테롤을 비롯한 그 외 지질들과 혼합될 수 있다.
- [0059] 용어 "중성 지질"은 선택된 pH에서 하전되지 않은 또는 중성의 양쪽성이온 형태로 존재하는 임의의 수많은 지질 종들을 지칭한다. 생리학적 pH에서, 이러한 지질들에는, 예를 들면, 디아실포스파티딜콜린, 디아실포스파티딜에탄올아민, 세라마이드, 스팽고미엘린, 세팔린, 콜레스테롤, 세레브로시드, 및 디아실글리세롤이 포함된다.
- [0060] 용어 "비-양이온성 지질"은 임의의 양친매성 지질, 뿐만 아니라 임의의 그 외 중성 지질 또는 음이온성 지질을 지칭한다.
- [0061] 용어 "음이온성 지질"은 생리학적 pH에서 음으로 하전되는 임의의 지질을 의미한다. 이러한 지질들에는, 포스파티딜글리세롤, 카디오리핀, 디아실포스파티딜세린, 디아실포스파티딘산, N-도데카노일 포스파티딜에탄올아민, N-석시닐 포스파티딜에탄올아민, N-글루타릴포스파티딜에탄올아민, 라이실포스파티딜글리세롤, 팔미토일올레이올포스파티딜글리세롤(POPG), 및 중성 지질들에 결합되는 그 외 음이온성 변형 그룹들이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0062] 용어 "소수성 지질"은 장쇄 포화 및 불포화 지방족 탄화수소 그룹, 그리고 하나 또는 그 이상의 방향족, 치환족, 또는 헤테로사이클릭 그룹(들)에 의해 선택적으로 치환된 이러한 그룹들을 포함하는 (그러나 이에 제한되는 것은 아님) 비극성 그룹들을 가지는 화합물들을 지칭한다. 적합한 예에는, 디아실글리세롤, 디알킬글리세롤, N-N-디알킬아미노, 1,2-디아실옥시-3-아미노프로판, 및 1,2-디알킬-3-아미노프로판이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0063] 용어 "양이온성 지질" 및 "아미노 지질"은 1, 2, 3 또는 그 이상의 지방산 또는 지방 알킬 사슬 및 pH-적정 아미노 헤드 그룹(예컨대, 알킬아미노 또는 디알킬아미노 헤드 그룹)을 가지는 지질들 및 이의 염들을 포함하기 위하여 본 출원에서 호환적으로 사용된다. 양이온성 지질은 양이온성 지질의  $pK_a$  미만의 pH에서 전형적으로 양성 자화되며 (즉, 양으로 하전되며) 상기  $pK_a$  이상의 pH에서 실질적으로 중성이다. 본 발명의 양이온성 지질들은 또한 적정 양이온성 지질들로도 명명될 수 있다. 일부 구체예들에서, 양이온성 지질들은 다음을 포함한다: 양성자 공여성(protonatable) 3차 아민(예컨대, pH-적정) 헤드 그룹;  $C_{18}$  알킬 사슬, 여기서 각 알킬 사슬은 독립적으로 0 내지 3(예컨대, 0, 1, 2, 또는 3)개의 이중 결합을 가지며; 그리고 에테르, 에스테르, 또는 헤드 그룹과 알킬 사슬 간의 케탈 연결. 이러한 양이온성 지질들에는, DSDMA, DODMA, DLinDMA, DLenDMA,  $\gamma$ -DLenDMA, DLin-K-DMA, DLin-K-C2-DMA(또한 DLin-C2K-DMA, XTC2, 및 C2K로도 공지됨), DLin-K-C3-DMA, DLin-K-C4-DMA, DLen-C2K-DMA,  $\gamma$ -DLen-C2K-DMA, DLin-M-C2-DMA(또한 MC2로도 공지됨), 및 DLin-M-C3-DMA(또한 MC3로도 공지됨)가 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0064] 용어 "염"은 임의의 음이온성 및 양이온성 복합체, 가령, 양이온성 지질과 하나 또는 그 이상의 음이온들 간에 형성되는 복합체를 포함한다. 음이온들의 비-제한적 예들에는, 무기 및 유기 음이온들, 예컨대, 하이드라이드, 플루오라이드, 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 옥살레이트(예컨대, 헤미옥살레이트), 포스페이트, 포스포네이트, 하이드로겐 포스페이트, 디하이드로겐 포스페이트, 옥사이드, 카르보네이트, 바이카르보네이트, 니트레이트, 니트라이트, 니트라이드, 바이설파이트, 설파이드, 설플레이트, 바이설레이트, 티오설레이트, 하이드로겐 설플레이트, 보레이트, 포르메이트, 아세테이트, 벤조에이트, 시트레이트, 타르트레이트, 락테이트, 아크릴레이트, 폴리아크릴레이트, 푸마레이트, 말레이트, 이타코네이트, 글리콜레이트, 글루코네이트, 말레이트, 만델레이트, 티글레이트, 아스코르베이트, 살리실레이트, 폴리메트아크릴레이트,

페클로레이트, 클로레이트, 클로라이트, 하이포클로라이트, 브로메이트, 하이포브로마이트, 아이오데이트, 알킬설포네이트, 아릴설포네이트, 아르세네이트, 아르세나이트, 크로메이트, 디크로메이트, 시아나이드, 시아네이트, 티오시아네이트, 하이드록사이드, 퍼옥사이드, 퍼망가네이트, 및 이의 혼합물이 포함된다. 특정 구체예들에서, 본 출원에 개시된 양이온성 지질들의 염은 결정질 염이다.

[0065] 용어 "알킬"은 1 내지 24개 탄소 원자들을 함유하는 직쇄 또는 측쇄, 비사이클릭 또는 사이클릭, 포화 지방족 탄화수소를 포함한다. 대표적인 포화 직쇄 알킬들에는, 메틸, 에틸, *n*-프로필, *n*-부틸, *n*-펜틸, *n*-헥실등이 포함되나 이에 제한되지 않으며, 포화 측쇄 알킬들에는, 제한없이, 이소프로필, *sec*-부틸, 이소부틸, *tert*-부틸, 이소펜틸등이 포함된다. 대표적인 포화 사이클릭 알킬들에는, 사이클로프로필, 사이클로부틸, 사이클로펜틸, 사이클로헥실등이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니며, 불포화 사이클릭 알킬들에는, 제한없이, 사이클로펜테닐, 사이클로헥세닐등이 포함된다.

[0066] 용어 "알케닐"은 인접한 탄소 원자들 간에 적어도 하나의 이중 결합을 함유하는 상기 정의된 알킬을 포함한다. 알케닐은 시스 및 트랜스 이성질체 모두를 포함한다. 대표적인 직쇄 및 측쇄 알케닐들에는, 에틸레닐, 프로필레닐, 1-부테닐, 2-부테닐, 이소부틸레닐, 1-펜테닐, 2-펜테닐, 3-메틸-1-부테닐, 2-메틸-2-부테닐, 2,3-디메틸-2-부테닐등이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0067] 용어 "알키닐"은 인접한 탄소들 간에 적어도 하나의 삼중 결합을 추가로 함유하는, 상기 정의된 임의의 알킬 또는 알케닐을 포함한다. 대표적인 직쇄 및 측쇄 알키닐들에는, 제한없이, 아세틸레닐, 프로피닐, 1-부티닐, 2-부티닐, 1-펜티닐, 2-펜티닐, 3-메틸-1-부티닐등이 포함된다.

[0068] 용어 "아실"은 다음에 정의된 바와 같이 부착 지점의 탄소가 옥소 그룹으로 치환되어 있는 임의의 알킬, 알케닐, 또는 알키닐을 포함한다. 다음은 아실 그룹들의 비-제한적 예들이다: -C(=O)알킬, -C(=O)알케닐, 및 -C(=O)알키닐.

[0069] 용어 "헤테로사이클"은 5- 내지 7-원의 모노사이클릭, 또는 7- 내지 10-원의 바이사이클릭, 헤테로사이클릭 고리를 포함하는데, 이는 포화, 불포화, 또는 방향족이며, 질소, 산소 및 황에서 독립적으로 선택된 1 또는 2개의 헤테로원자들을 함유하고, 여기서 질소 및 황 헤테로원자들은 선택적으로 산화될 수 있으며, 질소 헤테로원자는 선택적으로 4차화될 수 있고, 임의의 상기 헤테로사이클들이 벤젠 고리로 융합되어 있는 바이사이클릭 고리를 포함한다. 헤테로사이클은 임의의 헤테로원자 또는 탄소 원자를 통해 부착될 수 있다. 헤테로사이클에는, 하기 정의되는 헤테로아릴, 뿐만 아니라 모르폴리닐, 피롤리디노닐, 피롤리디닐, 피페리디닐, 피페리지닐, 하이단토이닐, 발레로락타밀, 옥시라닐, 옥세타닐, 테트라하이드로퓨라닐, 테트라하이드로피라닐, 테트라하이드로피리디닐, 테트라하이드로프리미디닐, 테트라하이드로티오페닐, 테트라하이드로티오피라닐, 테트라하이드로피리미디닐, 테트라하이드로티오페닐, 테트라하이드로티오피라닐등이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0070] 용어 "선택적으로 치환된 알킬", "선택적으로 치환된 알케닐", "선택적으로 치환된 알키닐", "선택적으로 치환된 아실", 및 "선택적으로 치환된 헤테로사이클"은 치환될 경우, 적어도 1개의 수소 원자가 치환체로 대체됨을 의미한다. 옥소 치환체 (=O)의 경우, 2개의 수소 원자들이 대체된다. 이와 관련하여, 치환체들에는 옥소, 할로겐, 헤테로사이클, -CN, -OR<sup>x</sup>, -NR<sup>x</sup>R<sup>y</sup>, -NR<sup>x</sup>C(=O)R<sup>y</sup>, -NR<sup>x</sup>SO<sub>2</sub>R<sup>y</sup>, -C(=O)R<sup>x</sup>, -C(=O)OR<sup>x</sup>, -C(=O)NR<sup>x</sup>R<sup>y</sup>, -SO<sub>n</sub>R<sup>x</sup>, 및 -SO<sub>n</sub>NR<sup>x</sup>R<sup>y</sup>이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니며, 여기서 n은 0, 1, 또는 2이고, R<sup>x</sup> 및 R<sup>y</sup>는 동일하거나 상이하고 독립적으로 수소, 알킬, 또는 헤테로사이클이고, 알킬 및 헤테로사이클 치환체들 각각은 옥소, 할로겐, -OH, -CN, 알킬, -OR<sup>x</sup>, 헤테로사이클, -NR<sup>x</sup>R<sup>y</sup>, -NR<sup>x</sup>C(=O)R<sup>y</sup>, -NR<sup>x</sup>SO<sub>2</sub>R<sup>y</sup>, -C(=O)R<sup>x</sup>, -C(=O)OR<sup>x</sup>, -C(=O)NR<sup>x</sup>R<sup>y</sup>, -SO<sub>n</sub>R<sup>x</sup>, 및 -SO<sub>n</sub>NR<sup>x</sup>R<sup>y</sup> 중 하나 또는 그 이상으로 추가로 치환될 수 있다. 치환체들의 목록 앞에 사용될 경우 용어 "선택적으로 치환된"은 목록의 치환체들 각각은 본 출원에 기재된 바와 같이 선택적으로 치환될 수 있음을 의미한다.

[0071] 용어 "할로겐"은 플루오로, 클로로, 브로모, 및 아이오도를 포함한다.

[0072] 용어 "융합성(fusogenic)"은 세포의 막과 융합하는 지질 입자의 능력을 지칭한다. 이러한 막은 형질막 또는 소기관들, 예컨대, 엔도솜, 핵 등을 둘러싸고 있는 막일 수 있다.

[0073] 본 출원에서 사용되는 용어 "수용액"은 물을 전부 또는 일부 포함하는 조성물을 지칭한다.

[0074] 본 출원에서 사용되는 용어 "유기 지질 용액"은 지질을 가지는 유기 용매를 전부 또는 일부 포함하는 조성물을 지칭한다.

- [0075] 본 발명의 지질 입자를 기재하기 위하여 사용될 경우 용어 "전자 치밀 핵"은 극저온 전자 현미경 ("cryoTEM")을 사용하여 가시화하였을 때 지질 입자의 내부 부위의 어두운 외형을 지칭한다. 본 발명의 일부 지질 입자들은 전자 치밀 핵을 가지며 지질 이중층 구조가 없다. 본 발명의 일부 지질 입자들은 전자 치밀 핵을 가지며, 지질 이중층 구조가 없고, 육방 또는 입방 역상 구조를 가진다. 이론으로 한정하고자 하는 것은 아니지만, 비-이중층 지질 패킹(packing)은 내부에 물과 핵산을 보유한 3-차원 네트워크의 지질 원통, 즉, 본질적으로, 핵산을 함유하는 수성 채널에 상호침투되는 지질 액적을 제공하는 것으로 생각된다.
- [0076] 본 출원에서 사용되는 "원위 부위"는 물리적으로 분리된 부위를 지칭하는데, 인접한 모세혈관상(capillary bed)에 제한되지 않으나, 유기체 전반에 걸쳐 광범위하게 분포되어 있는 부위들을 포함한다.
- [0077] 핵산-지질 입자들과 관련하여 "혈청-안정성"은 유리 DNA 또는 RNA를 현저히 분해시키는 혈청 또는 뉴클레아제 분석법에 노출후 이러한 입자가 현저히 분해되지 않음을 의미한다. 적합한 분석법들에는, 예를 들면, 표준 혈청 분석법, DNase 분석법, 또는 RNase 분석법이 포함된다.
- [0078] 본 출원에서 사용되는 "전신 전달"은 유기체 내부에 활성 제제, 가령, siRNA를 광범위하게 생체분포시키는 지질 입자들의 전달을 지칭한다. 일부 투여 기법들은 특정 제제의 전신 전달은 유발할 수 있으나 다른 제제는 전신 전달하지 않는다. 전신 전달은 유용한, 바람직하게는 치료적 양의 제제가 신체 대부분에 노출됨을 의미한다. 광범위한 생체 분포를 얻는 것은, 이러한 제제가 투여 부위와 먼 질병 부위에 도달하기 전 급속하게 분해되거나 제거 (가령, 첫번째 통과 장기 (간, 폐 등)에 의해 또는 신속한 비특이적 세포 결합에 의해) 되지 않는 혈중 수명(blood lifetime)을 일반적으로 필요로 한다. 지질 입자들의 전신 전달은 예를 들면, 정맥내, 피하, 및 복강내를 비롯한 해당 분야에 공지된 임의의 수단들에 의한 것일 수 있다. 한 바람직한 구체예에서, 지질 입자들의 전신 전달은 정맥내 전달에 의한다.
- [0079] 본 출원에서 사용되는 "국소 전달"은 활성 제제, 가령, siRNA의 유기체 내부 표적 부위로의 직접 전달을 지칭한다. 예를 들면, 이러한 제제는 질병 부위, 그 외 표적 부위, 또는 표적 장기, 가령, 간, 심장, 이자, 신장 등으로 직접 주사하여 국소적으로 전달될 수 있다.
- [0080] 본 출원에서 사용되는 용어 "바이러스 입자 부하량(virus particle load)"은 체액, 가령, 혈액에 존재하는 바이러스 입자들 (예컨대, HBV 및/또는 HDV) 수의 측정치를 지칭한다. 예를 들면, 입자 부하량은 예컨대, 혈액 1 밀리리터 당 바이러스 입자들의 수로 표현될 수 있다. 입자 부하량 테스트는 핵산 증폭 기반 테스트, 뿐만 아니라 비-핵산-기반 테스트를 사용하여 수행될 수 있다 (예컨대, Puren 등의, The Journal of Infectious Diseases, 201:S27-36 (2010) 참고).
- [0081] 용어 "포유동물"은 임의의 포유동물 종들, 가령, 인간, 마우스, 래트, 개, 고양이, 햄스터, 기니아 피그, 토끼, 가축 등을 지칭한다.
- [0082] **특정 구체예들의 설명**
- [0083] 본 발명은 하나 또는 그 이상의 HBV 유전자의 발현을 표적하는 siRNA 분자들, 이러한 siRNA의 하나 또는 그 이상 (예컨대, 칙테일)을 포함하는 핵산-지질 입자들, 및 (예컨대, 인간에서 HBV 및/또는 HDV 감염의 치료를 위한) 이러한 핵산-지질 입자들의 전달 및/또는 투여 방법을 제공한다.
- [0084] 한 양태에서, 본 발명은 하나 또는 그 이상의 HBV 유전자들의 발현을 표적하는 siRNA 분자들을 제공한다. 특정 예들에서, 본 발명은 HBV 유전체의 상이한 구역들을 표적하는 siRNA들의 조합(예컨대, 칙테일, 풀(pool), 또는 혼합물)을 포함하는 조성물을 제공한다. 특정 예들에서, 본 발명의 siRNA 분자들은 HBV 및/또는 HDV의 시험관내 또는 생체내 복제를 억제할 수 있다.
- [0085] 특정 구체예들에서, 본 발명은 표 A에 나타낸 siRNA 분자들을 제공하는데, 여기서 각 이중-가닥 siRNA 분자의 상부 가닥은 왼쪽에서 오른쪽으로 5'에서 3' 방향으로 가는 센스 가닥이고; 각 이중-가닥 siRNA 분자의 하부 가닥은 오른쪽에서 왼쪽으로 5'에서 3' 방향으로 가는 안티센스 가닥이다. 표 A에 나타낸 바와 같이, siRNA 분자들은 2'-O-메틸 변형 및/또는 하나 또는 그 이상의 UNA 모이어티를 보유한 하나 또는 그 이상의 리보뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 하기 표 A에 나타낸 IC<sub>50</sub> 값은 실시예 1에 설명된 분석법을 사용하여 결정되었다.

[0086]

**표 A.**

| 명칭  | 이중나선 서열   | IC 50<br>(nM) |
|-----|---|---------------|
| 1m  | 5' <u>A</u> g G u A U g u u U G C C C g U u U G U U U 3' (서열번호:1)<br>3' U U U C C A u A C A A C G G g C A A A C A 5' (서열번호:2)   | 1.43          |
| 2m  | 5' <u>G</u> C u c A g U U U A C U A G U G G C c A U U 3' (서열번호:3)<br>3' U U C g A G U C A A A u G A U C A C G G U 5' (서열번호:4)   | 0.37          |
| 3m  | 5' <u>C</u> C G U g u G C A C U u C G C u u C A U U 3' (서열번호:5)<br>3' U U G g C A C A C g U G A A G C G A A G U 5' (서열번호:6)     | 0.06          |
| 4m  | 5' <u>G</u> C u c A g U U U A C U A G U G G C c A U U 3' (서열번호:7)<br>3' U U C g A G U C A A A u G A U C A C G G U 5' (서열번호:8)   | 0.31          |
| 5m  | 5' <u>C</u> C G U g u G C A C U u C G C u u C A U U 3' (서열번호:9)<br>3' U U G g C A C A C g U G A A G C G A A G U 5' (서열번호:10)    | 0.06          |
| 6m  | 5' <u>C</u> u g g C U C A G U U U A C u A g U G U U 3' (서열번호:11)<br>3' U U G A C C g A g U C A A A U g A U C A C 5' (서열번호:12)   | 0.05          |
| 7m  | 5' <u>C</u> C G U g u G C A C U u C G C u u C A U U 3' (서열번호:13)<br>3' U U G g C A C A C g U G A A G C G A A G U 5' (서열번호:14)   | 0.06          |
| 8m  | 5' <u>G</u> C u C A g U U U A C u A g U G G C C A U U 3' (서열번호:15)<br>3' U U C G A G u C A A A U G A U C A C G G U 5' (서열번호:16) | 0.24          |
| 9m  | 5' <u>A</u> g G u A U G u U G C C C g U u U G U U U 3' (서열번호:17)<br>3' U U u C C A u A C A A C G G g C A A A C A 5' (서열번호:18)   | 0.13          |
| 10m | 5' <u>G</u> C C g A u C C A u A C u g C g g A A U U 3' (서열번호:19)<br>3' U U C g G C U A g G U A U g A C G C C U U 5' (서열번호:20)   | 0.34          |
| 11m | 5' <u>G</u> C C g A u C C A u A C u g C g g A A U U 3' (서열번호:21)<br>3' U U C g G C U A g G U A U g A C G C C U U 5' (서열번호:22)   | 0.31          |
| 12m | 5' <u>G</u> C C g A u C C A u A C u g C G g A A U U 3' (서열번호:23)<br>3' U U C g G C U A g G U A U g A C G C C U U 5' (서열번호:24)   | 0.16          |
| 13m | 5' <u>G</u> C C g A u C C A u A C u g C G g A A U U 3' (서열번호:25)  | 0.2           |

[0087]

| 명칭  | 이중나선 서열   | IC 50<br>(nM) |
|-----|---|---------------|
|     | 3' U U C g G C U A g G U A U g A C G C C U U 5' (서열번호:26)   |               |
| 14m | 5' <u>G</u> C u C A g U U U A C u A g U G C C A U U 3' (서열번호:27)<br>3' U U C G A G u C A A A U G A U C A C G G U 5' (서열번호:28) | 0.16          |
| 15m | 5' <u>C</u> u g G C u C A G U U U A C U A G U G U U 3' (서열번호:29)<br>3' U U G A C C g A G U C A A A U G A U C A C 5' (서열번호:30) | 0.17          |

소문자 = 2' O-메틸 변형

밀줄 = UNA 모이어티

[0088]

본 출원의 표 B에 제시된 바와 같은 그 외 구체예들에서, 본 발명은 표 A에 제시된 siRNA 문자들의 단리된 센스 가닥 및 안티센스 가닥들 (즉, 단리된 단일 가닥 핵산 문자들)을 제공한다. 표 B에 제시된 핵산 서열들은 서열들의 쌍으로 배열되는데, 각각의 쌍은 센스 가닥 및 이의 상보적인 안티센스 가닥을 포함한다. 서열들의 각 쌍은 (센스 플러스 안티센스 가닥) 표 A에 나타나있는 명칭들에 상응하는 특정 명칭으로 식별된다.

[0089]

표 B에 나타낸 이러한 단리된 센스 및 안티센스 가닥들은 예를 들면, 하나 또는 그 이상의 HBV 유전자들의 생체 내 또는 시험관내 발현을 감소시키는데 유용한 siRNA 문자들의 제조에 유용하다. 이러한 단리된 센스 및 안티센스 가닥들은 또한, 예를 들면, 생물학적 재료, 가령, HBV 또는 HBV/HDV로 감염된 인간으로부터 얻은 조직 또는 혈액 샘플 내 HBV 유전체를 식별하고 그 양을 측정하기 위한 혼성화 탐침자로서 유용하다.

[0090]

표 B에 나타낸 이러한 단리된 센스 및 안티센스 가닥들은 예를 들면, 하나 또는 그 이상의 HBV 유전자들의 생체

내 또는 시험관내 발현을 감소시키는데 유용한 siRNA 문자들의 제조에 유용하다. 이러한 단리된 센스 및 안티

센스 가닥들은 또한, 예를 들면, 생물학적 재료, 가령, HBV 또는 HBV/HDV로 감염된 인간으로부터 얻은 조직

또는 혈액 샘플 내 HBV 유전체를 식별하고 그 양을 측정하기 위한 혼성화 탐침자로서 유용하다.

[0091]

특정 구체예들에서, 본 발명의 올리고뉴클레오티드 (가령, 표 B에 제시된 센스 및 안티센스 RNA 가닥들)는 표적 폴리뉴클레오티드 서열에 특이적으로 혼성화하거나 이러한 서열에 상보적이다. 본 출원에서 사용되는 용어 "특

"이적으로 혼성화가능한" 및 "상보적인"은 DNA 또는 RNA 표적과 올리고뉴클레오티드 간에 안정하고 특이적인 결합이 일어나기에 충분한 정도의 상보성을 나타낸다. 올리고뉴클레오티드는 특이적으로 혼성화가능하게 되기 위해 그 표적 핵산 서열에 100% 상보적이어야 할 필요는 없는 것으로 이해된다. 바람직한 구체예들에서, 올리고뉴클레오티드는 표적 서열에 대한 올리고뉴클레오티드의 결합이 표적 서열의 정상 기능을 방해하여 표적 서열로부터 유용성 또는 발현의 손실을 유발할 경우, 그리고 특이적 결합이 바람직한 조건들 하에서, 즉, 생체내 분석법 또는 치료적 처리의 경우 생리학적 조건들하에서, 또는, 시험관내 분석법들의 경우, 이러한 분석법들이 수행되는 조건들하에서 비-표적 서열들에 대한 올리고뉴클레오티드의 비-특이적 결합을 방지하기에 충분한 정도의 상보성이 존재하는 경우 특이적으로 혼성화가능하다. 그러므로 올리고뉴클레오티드는 표적하고 있는 또는 특이적으로 혼성화하는 유전자 또는 mRNA 서열의 구역에 비해 1, 2, 3, 또는 그 이상의 염기 치환들을 포함할 수 있다.

표 B.

| 명칭               | 센스 서열 (5'-3')   | 안티센스 서열 (5' - 3')                                    |
|------------------|---|--|
| 1m               | <u>A</u> gGuAU <u>g</u> uUGCC <u>C</u> gUuUGUU <u>U</u><br>(서열번호:1) | ACAAACgGGCAACAuACC <u>U</u> U (서열번호:2)               |
| 2m               | <u>G</u> CucAgUUUACUAGUGC <u>C</u> cAUU<br>(서열번호:3)                 | UGGCACUAG <u>U</u> AAACUGA <u>g</u> GUU<br>(서열번호:4)  |
| 3m               | <u>C</u> CGUguGCACUuCGCuuCAUU<br>(서열번호:5)                           | UGAACGGAAGU <u>g</u> CACACgGUU<br>(서열번호:6)           |
| 4m               | <u>G</u> CucAgUUUACUAGUGC <u>C</u> cAUU<br>(서열번호:7)                 | UGGCACUAG <u>U</u> AAACUGA <u>g</u> GUU<br>(서열번호:8)  |
| 5m               | <u>C</u> CGUguGCACUuCGCuUCAUU<br>(서열번호:9)                           | UGAACGGAAGU <u>g</u> CACACgGUU<br>(서열번호:10)          |
| 6m               | <u>C</u> uggCUCAGUUUACuAgUGUU<br>(서열번호:11)                          | CACUA <u>g</u> UAAACU <u>g</u> AgCCAGUU<br>(서열번호:12) |
| 7m               | <u>C</u> CGUguGCACUuCGCuUCAUU<br>(서열번호:13)                          | UGAACGGAAGU <u>g</u> CACACgGUU<br>(서열번호:14)          |
| 8m               | <u>G</u> CuCAgUUUACuAgUGCAUU<br>(서열번호:15)                           | UGGCACUAGUAAACuGAGCUU<br>(서열번호:16)                   |
| 9m               | <u>A</u> gGuAU <u>guUGCC<u>C</u>gUuUGUU<u>U</u><br/>(서열번호:17)</u>   | ACAAACgGGCAACAuACC <u>U</u> U<br>(서열번호:18)           |
| 10m              | <u>G</u> CCgAuCCAUCugCggAAUU<br>(서열번호:19)                           | UUCCGCAgUAUG <u>g</u> AUCGgCUU<br>(서열번호:20)          |
| 11m              | <u>G</u> CCgAuCCAUCugCggAAUU<br>(서열번호:21)                           | UUCCGCAgUAUG <u>g</u> AUCGgCUU<br>(서열번호:22)          |
| 12m              | <u>G</u> CCgAuCCAUCugCGgAAUU<br>(서열번호:23)                           | UUCCGCAgUAUG <u>g</u> AUCGgCUU<br>(서열번호:24)          |
| 13m              | <u>G</u> CCgAuCCAUCugCGgAAUU<br>(서열번호:25)                           | UUCCGCAgUAUG <u>g</u> AUCGgCUU<br>(서열번호:26)          |
| 14m              | <u>G</u> CuCAgUUUACuAgUGCAUU<br>(서열번호:27)                           | UGGCACUAGUAAACuGAGCUU<br>(서열번호:28)                   |
| 15m              | <u>C</u> ugGCuCAGUUuACUAGUGUU<br>(서열번호:29)                          | CACUAGUAAACUGA <u>g</u> CCAGUU<br>(서열번호:30)          |
| 소문자 = 2' O-메틸 변형 |   |  |
| 밑줄 = UNA 모이어티    |   |  |

[0093]

[0094]

그러므로 본 발명의 특정 구체예들은 1m (서열번호:1 및 2), 2m (서열번호:3 및 4), 3m (서열번호:5 및 6), 4m (서열번호:7 및 8), 5m (서열번호:9 및 10), 6m (서열번호:11 및 12), 7m (서열번호:13 및 14), 8m (서열번호:15 및 16), 9m (서열번호:17 및 18), 10m (서열번호:19 및 20), 11m (서열번호:21 및 22), 12m (서열번호:23 및 24), 13m (서열번호:25 및 26), 14m (서열번호:27 및 28), 15m (서열번호:29 및 30)이다.

호:23 및 24), 13m (서열번호:25 및 26), 14m (서열번호:27 및 28), 15m (서열번호:29 및 30)로 구성된 그룹에서 선택된 단리된, 이중-가닥, siRNA 분자를 제공한다.

[0095] 본 발명의 특정 구체예들은 또한 서열번호:1, 서열번호:3, 서열번호:5, 서열번호:7, 서열번호:9, 서열번호:11, 서열번호:13, 서열번호:15, 서열번호:17, 서열번호:19, 서열번호:21, 서열번호:23, 서열번호:25, 서열번호:27 및 서열번호:29로 구성된 그룹에서 선택된 핵산 분자를 제공한다.

[0096] 본 발명의 특정 구체예들은 또한 서열번호:2, 서열번호:4, 서열번호:6, 서열번호:8, 서열번호:10, 서열번호:12, 서열번호:14, 서열번호:16, 서열번호:18, 서열번호:20, 서열번호:22, 서열번호:24, 서열번호:26, 서열번호:28 및 서열번호:30으로 구성된 그룹에서 선택된 단리된 핵산 분자를 제공한다.

[0097] 본 발명은 또한 본 출원에 기재된 하나 또는 그 이상의 단리된, 이중 가닥 siRNA 분자들 (예컨대, 표 A에 기재된 siRNA 분자)을 포함하는 조성물을 제공한다.

[0098] 특정 구체예들에서, 상기 조성물은 1m (서열번호:1 및 2), 2m (서열번호:3 및 4), 3m (서열번호:5 및 6), 4m (서열번호:7 및 8), 5m (서열번호:9 및 10), 6m (서열번호:11 및 12), 7m (서열번호:13 및 14), 8m (서열번호:15 및 16), 9m (서열번호:17 및 18), 10m (서열번호:19 및 20), 11m (서열번호:21 및 22), 12m (서열번호:23 및 24), 13m (서열번호:25 및 26), 14m (서열번호:27 및 28), 15m (서열번호:29 및 30)로 구성된 그룹에서 선택된 2개의 상이한 이중-가닥, siRNA 분자들을 포함한다. 특정 구체예들에서, 2개의 상이한 이중 가닥 siRNA 분자들의 조합은 실시예 2에 기재된 조합들 중 임의의 하나에서 선택된다.

[0099] 특정 구체예들에서, 상기 조성물은 1m (서열번호:1 및 2), 2m (서열번호:3 및 4), 3m (서열번호:5 및 6), 4m (서열번호:7 및 8), 5m (서열번호:9 및 10), 6m (서열번호:11 및 12), 7m (서열번호:13 및 14), 8m (서열번호:15 및 16), 9m (서열번호:17 및 18), 10m (서열번호:19 및 20), 11m (서열번호:21 및 22), 12m (서열번호:23 및 24), 13m (서열번호:25 및 26), 14m (서열번호:27 및 28), 15m (서열번호:29 및 30)로 구성된 그룹에서 선택된 3개의 상이한 이중-가닥, siRNA 분자들을 포함한다. 특정 구체예들에서, 3개의 상이한 이중 가닥 siRNA 분자들의 조합은 실시예 3에 기재된 조합들 중 임의의 하나에서 선택된다.

[0100] 본 발명은 또한 본 출원에 기재된 하나 또는 그 이상의 (예컨대, 칙테일) siRNA 및 제약상 허용가능한 담체를 포함하는 제약학적 조성물을 제공한다.

[0101] 특정 구체예들에서, 본 출원에 기재된 조성물은 하나 또는 그 이상의 siRNA 분자들을 포함하는데, 이는 B형 간염 바이러스 유전자의 발현을 침묵시킨다.

[0102] 또 다른 양태에서, 본 발명은 HBV 유전자 발현을 표적하는 핵산-지질 입자를 제공한다. 핵산-지질 입자들은 전형적으로 본 출원에 기재된 (예컨대, 표 A에 기재된) 하나 또는 그 이상의 (예컨대, 칙테일) 단리된, 이중-가닥 siRNA 분자들, 양이온성 지질, 및 비-양이온성 지질을 포함한다. 특정 예들에서, 핵산-지질 입자들은 입자들의 응집을 억제하는 복합 지질을 추가로 포함한다. 바람직하게는, 핵산-지질 입자들은 본 출원에 기재된 하나 또는 그 이상의 (예컨대, 칙테일) 단리된, 이중-가닥 siRNA 분자들, 양이온성 지질, 비-양이온성 지질, 및 입자들의 응집을 억제하는 복합 지질을 포함한다.

[0103] 특정 구체예들에서, 핵산-지질 입자는 1m (서열번호:1 및 2), 2m (서열번호:3 및 4), 3m (서열번호:5 및 6), 4m (서열번호:7 및 8), 5m (서열번호:9 및 10), 6m (서열번호:11 및 12), 7m (서열번호:13 및 14), 8m (서열번호:15 및 16), 9m (서열번호:17 및 18), 10m (서열번호:19 및 20), 11m (서열번호:21 및 22), 12m (서열번호:23 및 24), 13m (서열번호:25 및 26), 14m (서열번호:27 및 28), 15m (서열번호:29 및 30)로 구성된 그룹에서 선택된 2개의 상이한 이중-가닥, siRNA 분자들을 포함한다. 특정 구체예들에서, 2개의 상이한 이중 가닥 siRNA 분자들의 조합은 실시예 2에 기재된 조합들 중 임의의 하나에서 선택된다.

[0104] 특정 구체예들에서, 핵산-지질 입자는 1m (서열번호:1 및 2), 2m (서열번호:3 및 4), 3m (서열번호:5 및 6), 4m (서열번호:7 및 8), 5m (서열번호:9 및 10), 6m (서열번호:11 및 12), 7m (서열번호:13 및 14), 8m (서열번호:15 및 16), 9m (서열번호:17 및 18), 10m (서열번호:19 및 20), 11m (서열번호:21 및 22), 12m (서열번호:23 및 24), 13m (서열번호:25 및 26), 14m (서열번호:27 및 28), 15m (서열번호:29 및 30)로 구성된 그룹에서 선택된 3개의 상이한 이중-가닥, siRNA 분자들을 포함한다. 특정 구체예들에서, 3개의 상이한 이중 가닥 siRNA 분자들의 조합은 실시예 3에 기재된 조합들 중 임의의 하나에서 선택된다.

[0105] 일부 구체예들에서, 본 발명의 siRNA들은 핵산-지질 입자 내에 완전히 캡슐화된다. siRNA 칙테일을 포함하는 제제들에 있어서, 상기 칙테일에 존재하는 상이한 유형들의 siRNA 화학종들 (예컨대, 상이한 서열들을 가지는

siRNA 화합물)은 동일한 입자 내에 공동-캡슐화될 수 있거나 또는 상기 각테일 내 존재하는 각 유형의 siRNA 종들은 별도의 입자 내에 캡슐화될 수 있다. siRNA 각테일은 동일한, 유사한 또는 상이한 농도 또는 몰비의 2, 3 또는 그 이상의 개개 siRNA들 (각각이 특유의 서열을 가짐)의 혼합물을 사용하여 본 출원에 기재된 입자들내에 제제화 될 수 있다. 한 구체예에서, siRNA들의 각테일 (상이한 서열들의 복수의 siRNA에 상응함)은 동일한, 유사한 또는 상이한 농도 또는 몰비의 각 siRNA 종들을 사용하여 제제화되며, 상이한 유형들의 siRNA들은 동일한 입자 내에 공동-캡슐화된다. 또다른 구체예에서, 각테일 내 존재하는 각 유형의 siRNA 종들은 동일한, 유사한 또는 상이한 siRNA 농도 또는 몰비로 상이한 입자들 내에 캡슐화되고, 이렇게 형성된 입자들(각각은 상이한 siRNA 유효부하량(payload)을 함유)은 별도로 투여되거나 (예컨대, 치료 투약방식에 따라 상이한 회수로), 또는 단일 단위 용량으로서 함께 조합되어 투여된다 (예컨대, 제약상 허용가능한 담체와 함께). 본 출원에 기재된 입자들은 혈청-안정성이고, 뉴클레아제 분해에 대해 내성을 띠며, 포유동물들, 가령, 인간에 대해 실질적으로 비-독성이다.

[0106] 본 발명의 핵산-지질 입자들에서 양이온성 지질은, 예컨대, 본 출원에 기재된 화학식 I-III의 양이온성 지질들 또는 그 외 양이온성 지질 종들 중 하나 또는 그 이상을 포함할 수 있다. 한 구체예에서, 양이온성 지질은 디알킬 지질이다. 또다른 구체예에서, 양이온성 지질은 트리알킬 지질이다. 한 특정 구체예에서, 양이온성 지질은 1,2-디리놀레일옥시-N,N-디메틸아미노프로판 (DLinDMA), 1,2-디리놀레닐옥시-N,N-디메틸아미노프로판 (DLenDMA), 1,2-디-γ-리놀레닐옥시-N,N-디메틸아미노프로판 ( $\gamma$ -DLenDMA; 화합물 (15)), 2,2-디리놀레일-4-(2-디메틸아미노에틸)-[1,3]-디옥솔란 (DLin-K-C2-DMA), 2,2-디리놀레일-4-디메틸아미노메틸-[1,3]-디옥솔란 (DLin-K-DMA), 디리놀레일메틸-3-디메틸아미노프로파오네이트 (DLin-M-C2-DMA), (6Z,9Z,28Z,31Z)-헵타트리아콘타-6,9,28,31-테트라엔-19-일 4-(디메틸아미노)부타노에이트 (DLin-M-C3-DMA; 화합물 (7)), 이의 염, 및 이의 혼합물로 구성된 그룹에서 선택된다.

[0107] 또다른 특정 구체예에서, 양이온성 지질은 1,2-디리놀레일옥시-N,N-디메틸아미노프로판 (DLinDMA), 1,2-디리놀레닐옥시-N,N-디메틸아미노프로판 (DLenDMA), 1,2-디-γ-리놀레닐옥시-N,N-디메틸아미노프로판 ( $\gamma$ -DLenDMA; 화합물 (15)), 3-((6Z,9Z,28Z,31Z)-헵타트리아콘타-6,9,28,31-테트라엔-19-일옥시)-N,N-디메틸프로판-1-아민 (DLin-MP-DMA; 화합물 (8)), (6Z,9Z,28Z,31Z)-헵타트리아콘타-6,9,28,31-테트라엔-19-일 4-(디메틸아미노)부타노에이트 (화합물 (7)), (6Z,16Z)-12-((Z)-덱-4-엔일)도코사-6,16-디엔-11-일 5-(디메틸아미노)펜타노에이트 (화합물 (13)), 이의 염, 또는 이의 혼합물로 구성된 그룹에서 선택된다.

[0108] 특정 구체예들에서, 양이온성 지질은 입자 내 존재하는 총 지질의 약 48 몰% 내지 약 62 몰%를 포함한다.

[0109] 본 발명의 핵산-지질 입자들 내 비-양이온성 지질은, 예컨대, 하나 또는 그 이상의 음이온성 지질 및/또는 중성 지질들을 포함할 수 있다. 일부 구체예들에서, 비-양이온성 지질은 다음과 같은 중성 지질 성분들 중 하나를 포함한다: (1) 인지질과 콜레스테롤 또는 이의 유도체의 혼합물; (2) 콜레스테롤 또는 이의 유도체; 또는 (3) 인지질. 바람직한 특정 구체예들에서, 인지질은 디팔미토일포스파티딜콜린 (DPPC), 디스테아로일포스파티딜콜린 (DSPC), 또는 이의 혼합물을 포함한다. 한 바람직한 구체예에서, 비-양이온성 지질은 DPPC와 콜레스테롤의 혼합물이다. 한 바람직한 구체예에서, 비-양이온성 지질은 DSPC와 콜레스테롤의 혼합물이다.

[0110] 특정 구체예들에서, 비-양이온성 지질은 인지질과 콜레스테롤 또는 이의 유도체의 혼합물을 포함하고, 여기서 인지질은 입자 내 존재하는 총 지질의 약 7 몰% 내지 약 17 몰%를 포함하고 콜레스테롤 또는 이의 유도체는 입자 내 존재하는 총 지질의 약 25 몰% 내지 약 40 몰%를 포함한다.

[0111] 본 발명의 핵산-지질 입자들 내 지질 접합체는 입자들의 응집을 억제하며, 예컨대, 본 출원에 기재된 지질 접합체들 중 하나 또는 그 이상을 포함할 수 있다. 한 특정 구체예에서, 지질 접합체는 PEG-지질 접합체를 포함한다. PEG-지질 접합체들의 예들에는 PEG-DAG 접합체, PEG-DAA 접합체, 및 이의 혼합물이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다. 특정 구체예들에서, PEG-지질 접합체는 PEG-디아실글리세롤 (PEG-DAG) 접합체, PEG-디알킬옥시프로필 (PEG-DAA) 접합체, PEG-인지질 접합체, PEG-세라마이드 (PEG-Cer) 접합체, 및 이의 혼합물로 구성된 그룹에서 선택된다. 특정 구체예들에서, PEG-지질 접합체는 PEG-DAA 접합체이다. 특정 구체예들에서, 지질 입자 내 PEG-DAA 접합체는 PEG-디데실옥시프로필 ( $C_{10}$ ) 접합체, PEG-디라우릴옥시프로필 ( $C_{12}$ ) 접합체, PEG-디미리스틸옥시프로필 ( $C_{14}$ ) 접합체, PEG-디팔미틸옥시프로필 ( $C_{16}$ ) 접합체, PEG-디스테아릴옥시프로필 ( $C_{18}$ ) 접합체, 또는 이의 혼합물을 포함할 수 있다. 특정 구체예들에서, PEG-DAA 접합체는 PEG-디미리스틸옥시프로필 ( $C_{14}$ ) 접합체이다. 또다른 구체예에서, PEG-DAA 접합체는 화합물 (66) (PEG-C-DMA) 접합체이다. 또다른 구체예에서, 지질 접합체는 POZ-지질 접합체, 가령, POZ-DAA 접합체를 포함한다.

- [0112] 특정 구체예들에서, 입자들의 응집을 억제하는 복합 지질은 입자 내 존재하는 총 지질의 약 0.5 몰% 내지 약 3 몰%를 포함한다.
- [0113] 특정 구체예들에서, 핵산-지질 입자는 약 5:1 내지 약 15:1의 총 지질 : siRNA 질량비를 가진다.
- [0114] 특정 구체예들에서, 핵산-지질 입자는 약 30 nm 내지 약 150 nm의 중위 직경을 가진다.
- [0115] 특정 구체예들에서, 핵산-지질 입자는 전자 치밀 핵(electron dense core)을 가진다.
- [0116] 일부 구체예들에서, 본 발명은 다음을 포함하는 핵산-지질 입자들을 제공한다: (a) 본 출원에 기재된 하나 또는 그 이상의 (예컨대, 칙테일) siRNA 분자들 (예컨대, 표 A 참고); (b) 입자 내 존재하는 총 지질의 약 50 몰% 내지 약 85 몰%를 포함하는 하나 또는 그 이상의 양이온성 지질 또는 이의 염; (c) 입자 내 존재하는 총 지질의 약 13 몰% 내지 약 49.5 몰%를 포함하는 하나 또는 그 이상의 비-양이온성 지질; 및 (d) 입자 내 존재하는 총 지질의 약 0.5 몰% 내지 약 2 몰%를 포함하는, 입자들의 응집을 억제하는 하나 또는 그 이상의 복합 지질.
- [0117] 이 구체예의 한 양태에서, 핵산-지질 입자는 다음을 포함한다: (a) 본 출원에 기재된 하나 또는 그 이상의 (예컨대, 칙테일) siRNA 분자들 (예컨대, 표 A 참고); (b) 입자 내 존재하는 총 지질의 약 52 몰% 내지 약 62 몰%를 포함하는 양이온성 지질 또는 이의 염; (c) 입자 내 존재하는 총 지질의 약 36 몰% 내지 약 47 몰%를 포함하는 인지질 및 콜레스테롤 또는 이의 유도체의 혼합물; 및 (d) 입자 내 존재하는 총 지질의 약 1 몰% 내지 약 2 몰%를 포함하는 PEG-지질 접합체. 한 특정 구체예에서, 상기 제제는 약 1.4 몲% PEG-지질 접합체 (예컨대, PEG2000-C-DMA), 약 57.1 몲% 양이온성 지질 (예컨대, DLin-K-C2-DMA) 또는 이의 염, 약 7.1 몲% DPPC (또는 DSPC), 및 약 34.3 몲% 콜레스테롤 (또는 이의 유도체)을 포함하는 4-성분 시스템이다.
- [0118] 이 구체예의 또다른 양태에서, 핵산-지질 입자는 다음을 포함한다: (a) 본 출원에 기재된 하나 또는 그 이상의 (예컨대, 칙테일) siRNA 분자들 (예컨대, 표 A 참고); (b) 입자 내 존재하는 총 지질의 약 56.5 몲% 내지 약 66.5 몲%를 포함하는 양이온성 지질 또는 이의 염; (c) 입자 내 존재하는 총 지질의 약 31.5 몲% 내지 약 42.5 몲%를 포함하는 콜레스테롤 또는 이의 유도체; 및 (d) 입자 내 존재하는 총 지질의 약 1 몲% 내지 약 2 몲%를 포함하는 PEG-지질 접합체. 한 특정 구체예에서, 상기 제제는 인지질이 없으며 약 1.5 몲% PEG-지질 접합체 (예컨대, PEG2000-C-DMA), 약 61.5 몲% 양이온성 지질 (예컨대, DLin-K-C2-DMA) 또는 이의 염, 및 약 36.9 몲% 콜레스테롤 (또는 이의 유도체)을 포함하는 3-성분 시스템이다.
- [0119] 추가 제제들은 PCT 공개번호 제 WO 09/127060 및 공개된 미국 특허 출원 번호 US 2011/0071208 A1에 기재되어 있으며, 이들의 내용은 실제적으로 본 출원에 온전히 참고문헌으로 포함된다.
- [0120] 그 외 구체예들에서, 본 발명은 다음을 포함하는 핵산-지질 입자들을 제공한다: (a) 본 출원에 기재된 하나 또는 그 이상의 (예컨대, 칙테일) siRNA 분자들 (예컨대, 표 A 참고); (b) 입자 내 존재하는 총 지질의 약 2 몲% 내지 약 50 몲%를 포함하는 하나 또는 그 이상의 양이온성 지질 또는 이의 염; (c) 입자 내 존재하는 총 지질의 약 5 몲% 내지 약 90 몲%를 포함하는 하나 또는 그 이상의 비-양이온성 지질; 및 (d) 입자 내 존재하는 총 지질의 약 0.5 몲% 내지 약 20 몲%를 포함하는, 입자들의 응집을 억제하는 하나 또는 그 이상의 복합 지질.
- [0121] 이 구체예의 한 양태에서, 핵산-지질 입자는 다음을 포함한다: (a) 본 출원에 기재된 하나 또는 그 이상의 (예컨대, 칙테일) siRNA 분자들 (예컨대, 표 A 참고); (b) 입자 내 존재하는 총 지질의 약 30 몲% 내지 약 50 몲%를 포함하는 양이온성 지질 또는 이의 염; (c) 입자 내 존재하는 총 지질의 약 47 몲% 내지 약 69 몲%를 포함하는 인지질 및 콜레스테롤 또는 이의 유도체의 혼합물; 및 (d) 입자 내 존재하는 총 지질의 약 1 몲% 내지 약 3 몲%를 포함하는 PEG-지질 접합체. 한 특정 구체예에서, 상기 제제는 약 2 몲% PEG-지질 접합체 (예컨대, PEG2000-C-DMA), 약 40 몲% 양이온성 지질 (예컨대, DLin-K-C2-DMA) 또는 이의 염, 약 10 몲% DPPC (또는 DSPC), 및 약 48 몲% 콜레스테롤 (또는 이의 유도체)을 포함하는 4-성분 시스템이다.
- [0122] 또다른 구체예들에서, 본 발명은 다음을 포함하는 핵산-지질 입자들을 제공한다: (a) 본 출원에 기재된 하나 또는 그 이상의 (예컨대, 칙테일) siRNA 분자들 (예컨대, 표 A 참고); (b) 입자 내 존재하는 총 지질의 약 50 몲% 내지 약 65 몲%를 포함하는 하나 또는 그 이상의 양이온성 지질 또는 이의 염; (c) 입자 내 존재하는 총 지질의 약 25 몲% 내지 약 45 몲%를 포함하는 하나 또는 그 이상의 비-양이온성 지질; 및 (d) 입자 내 존재하는 총 지질의 약 5 몲% 내지 약 10 몲%를 포함하는, 입자들의 응집을 억제하는 하나 또는 그 이상의 복합 지질.
- [0123] 이 구체예의 한 양태에서, 핵산-지질 입자는 다음을 포함한다: (a) 본 출원에 기재된 하나 또는 그 이상의 (예컨대, 칙테일) siRNA 분자들 (예컨대, 표 A 참고); (b) 입자 내 존재하는 총 지질의 약 50 몲% 내지 약 60 몲%를 포함하는 양이온성 지질 또는 이의 염; (c) 입자 내 존재하는 총 지질의 약 35 몲% 내지 약 45 몲%를 포함하

는 인지질 및 콜레스테롤 또는 이의 유도체의 혼합물; 및 (d) 입자 내 존재하는 총 지질의 약 5 몰% 내지 약 10 몰%를 포함하는 PEG-지질 접합체. 특정 예들에서, 상기 제제에서 비-양이온성 지질 혼합물은 다음을 포함한다: (i) 입자 내 존재하는 총 지질의 약 5 몲% 내지 약 10 몲%의 인지질; 및 (ii) 입자 내 존재하는 총 지질의 약 25 몲% 내지 약 35 몲%의 콜레스테롤 또는 이의 유도체. 한 특정 구체예에서, 상기 제제는 약 7 몲% PEG-지질 접합체 (예컨대, PEG750-C-DMA), 약 54 몲% 양이온성 지질 (예컨대, DLin-K-C2-DMA) 또는 이의 염, 약 7 몲% DPPC (또는 DSPC), 및 약 32 몲% 콜레스테롤 (또는 이의 유도체)을 포함하는 4성분 시스템이다.

[0124] 이 구체예의 또다른 양태에서, 핵산-지질 입자는 다음을 포함한다: (a) 본 출원에 기재된 하나 또는 그 이상의 (예컨대, 각테일) siRNA 분자들 (예컨대, 표 A 참고); (b) 입자 내 존재하는 총 지질의 약 55 몲% 내지 약 65 몲%를 포함하는 양이온성 지질 또는 이의 염; (c) 입자 내 존재하는 총 지질의 약 30 몲% 내지 약 40 몲%를 포함하는 콜레스테롤 또는 이의 유도체; 및 (d) 입자 내 존재하는 총 지질의 약 5 몲% 내지 약 10 몲%를 포함하는 PEG-지질 접합체. 한 특정 구체예에서, 상기 제제는 인지질이 없으며 약 7 몲% PEG-지질 접합체 (예컨대, PEG750-C-DMA), 약 58 몲% 양이온성 지질 (예컨대, DLin-K-C2-DMA) 또는 이의 염, 및 약 35 몲% 콜레스테롤 (또는 이의 유도체)을 포함하는 3-성분 시스템이다.

[0125] 유용한 제제들의 추가 구체예들이 공개된 미국 특허 출원 US 2011/0076335 A1에 기재되어 있으며, 기재 내용은 본 출원에 실제로 온전히 참고문헌으로 포함된다.

[0126] 본 발명의 특정 구체예들에서, 상기 핵산-지질 입자는 다음을 포함한다: (a) 본 출원에 기재된 하나 또는 그 이상의 (예컨대, 각테일) siRNA 분자들 (예컨대, 표 A 참고); (b) 입자 내 존재하는 총 지질의 약 48 몲% 내지 약 62 몲%를 포함하는 양이온성 지질 또는 이의 염; (c) 인지질 및 콜레스테롤 또는 이의 유도체의 혼합물, 여기서 인지질은 입자 내 존재하는 총 지질의 약 7 몲% 내지 약 17 몲%를 포함하고, 콜레스테롤 또는 이의 유도체는 입자 내 존재하는 총 지질의 25 몲% 내지 약 40 몲%를 포함하고; 및 (d) 입자 내 존재하는 총 지질의 약 0.5 몲% 내지 약 3.0 몲%를 포함하는 PEG-지질 접합체. 본 발명의 이러한 양태의 예시적인 지질 제제들 A-Z는 하기 포함되어 있다.

[0127] 예시적인 지질 제제 A는 하기 다음 성분들을 포함한다 (여기서 성분들의 백분율 값은 몰 백분율이다): PEG-지질 (1.2%), 양이온성 지질 (53.2%), 인지질 (9.3%), 콜레스테롤 (36.4%), 여기서 존재하는 지질들의 실제양은, 예컨대, ± 5 % (또는 예컨대, ± 4 몲%, ± 3 몲%, ± 2 몲%, ± 1 몲%, ± 0.75 몲%, ± 0.5 몲%, ± 0.25 몲%, 또는 ± 0.1 몲%) 만큼 달라질 수 있다. 예를 들면, 한 대표적인 구체예에서, PEG-지질은 PEG-C-DMA (화합물 (66)) (1.2%)이고, 양이온성 지질은 1,2-디리놀레일옥시-N,N-디메틸아미노프로판 (DLinDMA) (53.2%)이고, 인지질은 DPPC (9.3%)이고, 그리고 콜레스테롤은 36.4%로 존재하며, 여기서 존재하는 지질들의 실제양은, 예컨대, ± 5 % (또는 예컨대, ± 4 몲%, ± 3 몲%, ± 2 몲%, ± 1 몲%, ± 0.75 몲%, ± 0.5 몲%, ± 0.25 몲%, 또는 ± 0.1 몲%) 만큼 달라질 수 있다. 그러므로 본 발명의 특정 구체예들은 본 출원에 기재된 하나 또는 그 이상의 siRNA 분자들을 포함하는 제제 A에 기반한 핵산-지질 입자를 제공한다. 예를 들면, 특정 구체예들에서, 제제 A에 기반한 핵산 지질 입자는 2개의 상이한 siRNA 분자들을 포함할 수 있는데, 2개의 상이한 siRNA 분자들의 조합은 실시예 2에 기재된 조합들 중 임의의 하나에서 선택된다. 그 외 특정 구체예들에서, 제제 A에 기반한 핵산 지질 입자는 3개의 상이한 siRNA 분자들을 포함할 수 있는데, 3개의 상이한 siRNA 분자들의 조합은 실시예 3에 기재된 조합들 중 임의의 하나에서 선택된다. 특정 구체예들에서, 핵산-지질 입자는 약 5:1 내지 약 15:1, 또는 약 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, 또는 15:1, 또는 이의 임의의 부분 또는 그 내부의 범위의 총 지질:siRNA 질량비를 가진다. 특정 구체예들에서, 핵산-지질 입자는 약 9:1 (예컨대, 8.5:1 내지 10:1, 또는 8.9:1 내지 10:1, 또는, 9.1:1, 9.2:1, 9.3:1, 9.4:1, 9.5:1, 9.6:1, 9.7:1, 및 9.8:1을 비롯한 9:1 내지 9.9:1의 지질:약물비)의 총 지질:siRNA 질량비를 가진다.

[0128] 예시적인 지질 제제 B는 하기 다음 성분들을 포함한다 (여기서 성분들의 백분율 값은 몰 백분율이다): PEG-지질 (0.8%), 양이온성 지질 (59.7%), 인지질 (14.2%), 콜레스테롤 (25.3%), 여기서 존재하는 지질들의 실제양은, 예컨대, ± 5 % (또는 예컨대, ± 4 몲%, ± 3 몲%, ± 2 몲%, ± 1 몲%, ± 0.75 몲%, ± 0.5 몲%, ± 0.25 몲%, 또는 ± 0.1 몲%) 만큼 달라질 수 있다. 예를 들면, 한 대표적인 구체예에서, PEG-지질은 PEG-C-DOMG (화합물 (67)) (0.8%)이고, 양이온성 지질은 1,2-디리놀레일옥시-N,N-디메틸아미노프로판 (DLinDMA) (59.7%)이고, 인지질은 DSPC (14.2%)이고, 그리고 콜레스테롤은 25.3%로 존재하며, 여기서 존재하는 지질들의 실제양은, 예컨대, ± 5 % (또는 예컨대, ± 4 몲%, ± 3 몲%, ± 2 몲%, ± 1 몲%, ± 0.75 몲%, ± 0.5 몲%, ± 0.25 몲%, 또는 ± 0.1 몲%) 만큼 달라질 수 있다. 그러므로 본 발명의 특정 구체예들은 본 출원에 기재된 하나 또는 그 이상의 siRNA 분자들을 포함하는 제제 B에 기반한 핵산-지질 입자를 제공한다. 예를 들면, 특정 구체예들에서, 제제 B에 기반한 핵산 지질 입자는 2개의 상이한 siRNA 분자들을 포함할 수 있는데, 2개의 상이한 siRNA 분자들

의 조합은 실시예 2에 기재된 조합들 중 임의의 하나에서 선택된다. 그 외 특정 구체예들에서, 제제 B에 기반한 핵산-지질 입자는 3개의 상이한 siRNA 분자들을 포함할 수 있는데, 3개의 상이한 siRNA 분자들의 조합은 실시예 3에 기재된 조합들 중 임의의 하나에서 선택된다. 특정 구체예들에서, 핵산-지질 입자는 약 5:1 내지 약 15:1, 또는 약 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, 또는 15:1, 또는 이의 임의의 부분 또는 그 내부의 범위의 총 지질:siRNA 질량비를 가진다. 특정 구체예들에서, 핵산-지질 입자는 약 9:1 (예컨대, 8.5:1 내지 10:1, 또는 8.9:1 내지 10:1, 또는, 9.1:1, 9.2:1, 9.3:1, 9.4:1, 9.5:1, 9.6:1, 9.7:1, 및 9.8:1을 비롯한 9:1 내지 9.9:1의 지질:약물비)의 총 지질:siRNA 질량비를 가진다.

[0129] 예시적인 지질 제제 C는 하기 다음 성분들을 포함한다 (여기서 성분들의 백분율은 몰 백분율이다): PEG-지질 (1.9%), 양이온성 지질 (52.5%), 인지질 (14.8%), 콜레스테롤 (30.8%), 여기서 존재하는 지질들의 실제양은, 예컨대, ± 5 % (또는 예컨대, ± 4 몰%, ± 3 몰%, ± 2 몰%, ± 1 몰%, ± 0.75 몲%, ± 0.5 몲%, ± 0.25 몲%, 또는 ± 0.1 몲%) 만큼 달라질 수 있다. 예를 들면, 한 대표적인 구체예에서, PEG-지질은 PEG-C-DOMG (화합물 (67)) (1.9%)이고, 양이온성 지질은 1,2-디-γ-리놀레닐옥시-N,N-디메틸아미노프로판 ( $\gamma$ -DLenDMA; 화합물 (15)) (52.5%)이고, 인지질은 DSPC (14.8%)이고, 그리고 콜레스테롤은 30.8%로 존재하며, 여기서 존재하는 지질들의 실제양은, 예컨대, ± 5 % (또는 예컨대, ± 4 몲%, ± 3 몲%, ± 2 몲%, ± 1 몲%, ± 0.75 몲%, ± 0.5 몲%, ± 0.25 몲%, 또는 ± 0.1 몲%) 만큼 달라질 수 있다. 그러므로 본 발명의 특정 구체예들은 본 출원에 기재된 하나 또는 그 이상의 siRNA 분자들을 포함하는 제제 C에 기반한 핵산-지질 입자를 제공한다. 예를 들면, 특정 구체예들에서, 제제 C에 기반한 핵산-지질 입자는 2개의 상이한 siRNA 분자들을 포함할 수 있는데, 2개의 상이한 siRNA 분자들의 조합은 실시예 2에 기재된 조합들 중 임의의 하나에서 선택된다. 그 외 특정 구체예들에서, 제제 C에 기반한 핵산-지질 입자는 3개의 상이한 siRNA 분자들을 포함할 수 있는데, 3개의 상이한 siRNA 분자들의 조합은 실시예 3에 기재된 조합들 중 임의의 하나에서 선택된다. 특정 구체예들에서, 핵산-지질 입자는 약 5:1 내지 약 15:1, 또는 약 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, 또는 15:1, 또는 이의 임의의 부분 또는 그 내부의 범위의 총 지질:siRNA 질량비를 가진다. 특정 구체예들에서, 핵산-지질 입자는 약 9:1 (예컨대, 8.5:1 내지 10:1, 또는 8.9:1 내지 10:1, 또는, 9.1:1, 9.2:1, 9.3:1, 9.4:1, 9.5:1, 9.6:1, 9.7:1, 및 9.8:1을 비롯한 9:1 내지 9.9:1의 지질:약물비)의 총 지질:siRNA 질량비를 가진다.

[0130] 예시적인 지질 제제 D는 하기 다음 성분들을 포함한다 (여기서 성분들의 백분율은 몰 백분율이다): PEG-지질 (0.7%), 양이온성 지질 (60.3%), 인지질 (8.4%), 콜레스테롤 (30.5%), 여기서 존재하는 지질들의 실제양은, 예컨대, ± 5 % (또는 예컨대, ± 4 몲%, ± 3 몲%, ± 2 몲%, ± 1 몲%, ± 0.75 몲%, ± 0.5 몲%, ± 0.25 몲%, 또는 ± 0.1 몲%) 만큼 달라질 수 있다. 예를 들면, 한 대표적인 구체예에서, PEG-지질은 PEG-C-DMA (화합물 (66)) (0.7%)이고, 양이온성 지질은 3-((6Z,9Z,28Z,31Z)-헵타트리아콘타-6,9,28,31-테트라엔-19-일옥시)-N,N-디메틸프로판-1-아민 (DLin-MP-DMA; 화합물 (8)) (60.3%)이고, 인지질은 DSPC (8.4%)이고, 그리고 콜레스테롤은 30.5%로 존재하며, 여기서 존재하는 지질들의 실제양은, 예컨대, ± 5 % (또는 예컨대, ± 4 몲%, ± 3 몲%, ± 2 몲%, ± 1 몲%, ± 0.75 몲%, ± 0.5 몲%, ± 0.25 몲%, 또는 ± 0.1 몲%) 만큼 달라질 수 있다. 그러므로 본 발명의 특정 구체예들은 본 출원에 기재된 하나 또는 그 이상의 siRNA 분자들을 포함하는 제제 D에 기반한 핵산-지질 입자를 제공한다. 예를 들면, 특정 구체예들에서, 제제 D에 기반한 핵산-지질 입자는 2개의 상이한 siRNA 분자들을 포함할 수 있는데, 2개의 상이한 siRNA 분자들의 조합은 실시예 2에 기재된 조합들 중 임의의 하나에서 선택된다. 그 외 특정 구체예들에서, 제제 D에 기반한 핵산-지질 입자는 3개의 상이한 siRNA 분자들을 포함할 수 있는데, 3개의 상이한 siRNA 분자들의 조합은 실시예 3에 기재된 조합들 중 임의의 하나에서 선택된다. 특정 구체예들에서, 핵산-지질 입자는 약 5:1 내지 약 15:1, 또는 약 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, 또는 15:1, 또는 이의 임의의 부분 또는 그 내부의 범위의 총 지질:siRNA 질량비를 가진다. 특정 구체예들에서, 핵산-지질 입자는 약 9:1 (예컨대, 8.5:1 내지 10:1, 또는 8.9:1 내지 10:1, 또는, 9.1:1, 9.2:1, 9.3:1, 9.4:1, 9.5:1, 9.6:1, 9.7:1, 및 9.8:1을 비롯한 9:1 내지 9.9:1의 지질:약물비)의 총 지질:siRNA 질량비를 가진다.

[0131] 예시적인 지질 제제 E는 하기 다음 성분들을 포함한다 (여기서 성분들의 백분율은 몰 백분율이다): PEG-지질 (1.8%), 양이온성 지질 (52.1%), 인지질 (7.5%), 콜레스테롤 (38.5%), 여기서 존재하는 지질들의 실제양은, 예컨대, ± 5 % (또는 예컨대, ± 4 몲%, ± 3 몲%, ± 2 몲%, ± 1 몲%, ± 0.75 몲%, ± 0.5 몲%, ± 0.25 몲%, 또는 ± 0.1 몲%) 만큼 달라질 수 있다. 예를 들면, 한 대표적인 구체예에서, PEG-지질은 PEG-C-DMA (화합물 (66)) (1.8%)이고, 양이온성 지질은 (6Z,9Z,28Z,31Z)-헵타트리아콘타-6,9,28,31-테트라엔-19-일-(디메틸아미노)부타노에이트) (화합물 (7)) (52.1%)이고, 인지질은 DPPC (7.5%)이고, 그리고 콜레스테롤은 38.5%로 존재하며, 여기서 존재하는 지질들의 실제양은, 예컨대, ± 5 % (또는 예컨대, ± 4 몲%, ± 3 몲%, ± 2 몲%, ± 1 몲%, ± 0.75 몲%, ± 0.5 몲%, ± 0.25 몲%, 또는 ± 0.1 몲%) 만큼 달라질 수 있다. 그러므로 본 발명의 특

정 구체예들은 본 출원에 기재된 하나 또는 그 이상의 siRNA 분자들을 포함하는 제제 E에 기반한 핵산-지질 입자를 제공한다. 예를 들면, 특정 구체예들에서, 제제 E에 기반한 핵산 지질 입자는 2개의 상이한 siRNA 분자들을 포함할 수 있는데, 2개의 상이한 siRNA 분자들의 조합은 실시예 2에 기재된 조합들 중 임의의 하나에서 선택된다. 그 외 특정 구체예들에서, 제제 E에 기반한 핵산 지질 입자는 3개의 상이한 siRNA 분자들을 포함할 수 있는데, 3개의 상이한 siRNA 분자들의 조합은 실시예 3에 기재된 조합들 중 임의의 하나에서 선택된다. 특정 구체예들에서, 핵산-지질 입자는 약 5:1 내지 약 15:1, 또는 약 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, 또는 15:1, 또는 이의 임의의 부분 또는 그 내부의 범위의 총 지질:siRNA 질량비를 가진다. 특정 구체예들에서, 핵산-지질 입자는 약 9:1 (예컨대, 8.5:1 내지 10:1, 또는 8.9:1 내지 10:1, 또는, 9.1:1, 9.2:1, 9.3:1, 9.4:1, 9.5:1, 9.6:1, 9.7:1, 및 9.8:1을 비롯한 9:1 내지 9.9:1의 지질:약물비)의 총 지질:siRNA 질량비를 가진다.

[0132]

예시적인 제제 F는 하기 다음 성분들을 포함한다 (여기서 성분들의 백분율 값은 몰 백분율이다): PEG-지질 (0.9%), 양이온성 지질 (57.1%), 인지질 (8.1%), 콜레스테롤 (33.8%), 여기서 존재하는 지질들의 실제양은, 예컨대, ± 5 % (또는 예컨대, ± 4 몰%, ± 3 몲%, ± 2 몲%, ± 1 몲%, ± 0.75 몲%, ± 0.5 몲%, ± 0.25 몲%, 또는 ± 0.1 몲%) 만큼 달라질 수 있다. 예를 들면, 한 대표적인 구체예에서, PEG-지질은 PEG-C-DOMG (화합물 (67)) (0.9%)이고, 양이온성 지질은 1,2-디리놀레닐옥시-N,N-디메틸아미노프로판 (DLenDMA), 1,2-디-γ-리놀레닐옥시-N,N-디메틸아미노프로판 (γ-DLenDMA; 화합물 (15)) (57.1%)이고, 인지질은 DSPC (8.1%)이고, 그리고 콜레스테롤은 33.8%로 존재하며, 여기서 존재하는 지질들의 실제양은, 예컨대, ± 5 % (또는 예컨대, ± 4 몲%, ± 3 몲%, ± 2 몲%, ± 1 몲%, ± 0.75 몲%, ± 0.5 몲%, ± 0.25 몲%, 또는 ± 0.1 몲%) 만큼 달라질 수 있다. 그러므로 본 발명의 특정 구체예들은 본 출원에 기재된 하나 또는 그 이상의 siRNA 분자들을 포함하는 제제 F에 기반한 핵산-지질 입자를 제공한다. 예를 들면, 특정 구체예들에서, 제제 F에 기반한 핵산 지질 입자는 2개의 상이한 siRNA 분자들을 포함할 수 있는데, 2개의 상이한 siRNA 분자들의 조합은 실시예 2에 기재된 조합들 중 임의의 하나에서 선택된다. 그 외 특정 구체예들에서, 제제 F에 기반한 핵산 지질 입자는 3개의 상이한 siRNA 분자들을 포함할 수 있는데, 3개의 상이한 siRNA 분자들의 조합은 실시예 3에 기재된 조합들 중 임의의 하나에서 선택된다. 특정 구체예들에서, 핵산-지질 입자는 약 5:1 내지 약 15:1, 또는 약 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, 또는 15:1, 또는 이의 임의의 부분 또는 그 내부의 범위의 총 지질:siRNA 질량비를 가진다. 특정 구체예들에서, 핵산-지질 입자는 약 9:1 (예컨대, 8.5:1 내지 10:1, 또는 8.9:1 내지 10:1, 또는, 9.1:1, 9.2:1, 9.3:1, 9.4:1, 9.5:1, 9.6:1, 9.7:1, 및 9.8:1을 비롯한 9:1 내지 9.9:1의 지질:약물비)의 총 지질:siRNA 질량비를 가진다.

[0133]

예시적인 지질 제제 G는 하기 다음 성분들을 포함한다 (여기서 성분들의 백분율 값은 몰 백분율이다): PEG-지질 (1.7%), 양이온성 지질 (61.6%), 인지질 (11.2%), 콜레스테롤 (25.5%), 여기서 존재하는 지질들의 실제양은, 예컨대, ± 5 % (또는 예컨대, ± 4 몲%, ± 3 몲%, ± 2 몲%, ± 1 몲%, ± 0.75 몲%, ± 0.5 몲%, ± 0.25 몲%, 또는 ± 0.1 몲%) 만큼 달라질 수 있다. 예를 들면, 한 대표적인 구체예에서, PEG-지질은 PEG-C-DOMG (화합물 (67)) (1.7%)이고, 양이온성 지질은 1,2-디리놀레닐옥시-N,N-디메틸아미노프로판 (DLenDMA), 1,2-디-γ-리놀레닐옥시-N,N-디메틸아미노프로판 (γ-DLenDMA; 화합물 (15)) (61.6%)이고, 인지질은 DPPC (11.2%)이고, 그리고 콜레스테롤은 25.5%로 존재하며, 여기서 존재하는 지질들의 실제양은, 예컨대, ± 5 % (또는 예컨대, ± 4 몲%, ± 3 몲%, ± 2 몲%, ± 1 몲%, ± 0.75 몲%, ± 0.5 몲%, ± 0.25 몲%, 또는 ± 0.1 몲%) 만큼 달라질 수 있다. 그러므로 본 발명의 특정 구체예들은 본 출원에 기재된 하나 또는 그 이상의 siRNA 분자들을 포함하는 제제 G에 기반한 핵산-지질 입자를 제공한다. 예를 들면, 특정 구체예들에서, 제제 G에 기반한 핵산 지질 입자는 2개의 상이한 siRNA 분자들을 포함할 수 있는데, 2개의 상이한 siRNA 분자들의 조합은 실시예 2에 기재된 조합들 중 임의의 하나에서 선택된다. 그 외 특정 구체예들에서, 제제 G에 기반한 핵산 지질 입자는 3개의 상이한 siRNA 분자들을 포함할 수 있는데, 3개의 상이한 siRNA 분자들의 조합은 실시예 3에 기재된 조합들 중 임의의 하나에서 선택된다. 특정 구체예들에서, 핵산-지질 입자는 약 5:1 내지 약 15:1, 또는 약 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, 또는 15:1, 또는 이의 임의의 부분 또는 그 내부의 범위의 총 지질:siRNA 질량비를 가진다. 특정 구체예들에서, 핵산-지질 입자는 약 9:1 (예컨대, 8.5:1 내지 10:1, 또는 8.9:1 내지 10:1, 또는, 9.1:1, 9.2:1, 9.3:1, 9.4:1, 9.5:1, 9.6:1, 9.7:1, 및 9.8:1을 비롯한 9:1 내지 9.9:1의 지질:약물비)의 총 지질:siRNA 질량비를 가진다.

[0134]

예시적인 지질 제제 H는 하기 다음 성분들을 포함한다 (여기서 성분들의 백분율 값은 몰 백분율이다): PEG-지질 (1.1%), 양이온성 지질 (55.0%), 인지질 (11.0%), 콜레스테롤 (33.0%), 여기서 존재하는 지질들의 실제양은, 예컨대, ± 5 % (또는 예컨대, ± 4 몲%, ± 3 몲%, ± 2 몲%, ± 1 몲%, ± 0.75 몲%, ± 0.5 몲%, ± 0.25 몲%, 또는 ± 0.1 몲%) 만큼 달라질 수 있다. 예를 들면, 한 대표적인 구체예에서, PEG-지질은 PEG-C-DMA (화합물

(66) (1.1%)이고, 양이온성 지질은 (6Z,16Z)-12-((Z)-덱-4-엔일)도코사-6,16-디엔-11-일 5-(디메틸아미노)펜타노에이트 (화합물 (13)) (55.0%)이고, 인지질은 DSPC (11.0%)이고, 그리고 콜레스테롤은 33.0%로 존재하며, 여기서 존재하는 지질들의 실제양은, 예컨대, ± 5 % (또는 예컨대, ± 4 몰%, ± 3 몰%, ± 2 몰%, ± 1 몰%, ± 0.75 몰%, ± 0.5 몰%, ± 0.25 몰%, 또는 ± 0.1 몰%) 만큼 달라질 수 있다. 그러므로 본 발명의 특정 구체예들은 본 출원에 기재된 하나 또는 그 이상의 siRNA 분자들을 포함하는 제제 H에 기반한 핵산-지질 입자를 제공한다. 예를 들면, 특정 구체예들에서, 제제 H에 기반한 핵산-지질 입자는 2개의 상이한 siRNA 분자들을 포함할 수 있는데, 2개의 상이한 siRNA 분자들의 조합은 실시예 2에 기재된 조합들 중 임의의 하나에서 선택된다. 그 외 특정 구체예들에서, 제제 H에 기반한 핵산-지질 입자는 3개의 상이한 siRNA 분자들을 포함할 수 있는데, 3개의 상이한 siRNA 분자들의 조합은 실시예 3에 기재된 조합들 중 임의의 하나에서 선택된다. 특정 구체예들에서, 핵산-지질 입자는 약 5:1 내지 약 15:1, 또는 약 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, 또는 15:1, 또는 이의 임의의 부분 또는 그 내부의 범위의 총 지질:siRNA 질량비를 가진다. 특정 구체예들에서, 핵산-지질 입자는 약 9:1 (예컨대, 8.5:1 내지 10:1, 또는 8.9:1 내지 10:1, 또는, 9.1:1, 9.2:1, 9.3:1, 9.4:1, 9.5:1, 9.6:1, 9.7:1, 및 9.8:1을 비롯한 9:1 내지 9.9:1의 지질:약물비)의 총 지질:siRNA 질량비를 가진다.

[0135]

예시적 지질 제제 I는 하기 다음 성분들을 포함한다 (여기서 성분들의 백분율 값은 몰 백분율이다): PEG-지질 (2.6%), 양이온성 지질 (53.1%), 인지질 (9.4%), 콜레스테롤 (35.0%), 여기서 존재하는 지질들의 실제양은, 예컨대, ± 5 % (또는 예컨대, ± 4 몰%, ± 3 몰%, ± 2 몰%, ± 1 몰%, ± 0.75 몲%, ± 0.5 몲%, ± 0.25 몲%, 또는 ± 0.1 몲%) 만큼 달라질 수 있다. 예를 들면, 한 대표적인 구체예에서, PEG-지질은 PEG-C-DMA (화합물 (66)) (2.6%)이고, 양이온성 지질은 (6Z,16Z)-12-((Z)-덱-4-엔일)도코사-6,16-디엔-11-일 5-(디메틸아미노)펜타노에이트 (화합물 (13)) (53.1%)이고, 인지질은 DSPC (9.4%)이고, 그리고 콜레스테롤은 35.0%로 존재하며, 여기서 존재하는 지질들의 실제양은, 예컨대, ± 5 % (또는 예컨대, ± 4 몲%, ± 3 몲%, ± 2 몲%, ± 1 몲%, ± 0.75 몲%, ± 0.5 몲%, ± 0.25 몲%, 또는 ± 0.1 몲%) 만큼 달라질 수 있다. 그러므로 본 발명의 특정 구체예들은 본 출원에 기재된 하나 또는 그 이상의 siRNA 분자들을 포함하는 제제 I에 기반한 핵산-지질 입자를 제공한다. 예를 들면, 특정 구체예들에서, 제제 I에 기반한 핵산-지질 입자는 2개의 상이한 siRNA 분자들을 포함할 수 있는데, 2개의 상이한 siRNA 분자들의 조합은 실시예 2에 기재된 조합들 중 임의의 하나에서 선택된다. 그 외 특정 구체예들에서, 제제 I에 기반한 핵산-지질 입자는 3개의 상이한 siRNA 분자들을 포함할 수 있는데, 3개의 상이한 siRNA 분자들의 조합은 실시예 3에 기재된 조합들 중 임의의 하나에서 선택된다. 특정 구체예들에서, 핵산-지질 입자는 약 5:1 내지 약 15:1, 또는 약 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, 또는 15:1, 또는 이의 임의의 부분 또는 그 내부의 범위의 총 지질:siRNA 질량비를 가진다. 특정 구체예들에서, 핵산-지질 입자는 약 9:1 (예컨대, 8.5:1 내지 10:1, 또는 8.9:1 내지 10:1, 또는, 9.1:1, 9.2:1, 9.3:1, 9.4:1, 9.5:1, 9.6:1, 9.7:1, 및 9.8:1을 비롯한 9:1 내지 9.9:1의 지질:약물비)의 총 지질:siRNA 질량비를 가진다.

[0136]

예시적 지질 제제 J는 하기 다음 성분들을 포함한다 (여기서 성분들의 백분율 값은 몰 백분율이다): PEG-지질 (0.6%), 양이온성 지질 (59.4%), 인지질 (10.2%), 콜레스테롤 (29.8%), 여기서 존재하는 지질들의 실제양은, 예컨대, ± 5 % (또는 예컨대, ± 4 몲%, ± 3 몲%, ± 2 몲%, ± 1 몲%, ± 0.75 몲%, ± 0.5 몲%, ± 0.25 몲%, 또는 ± 0.1 몲%) 만큼 달라질 수 있다. 예를 들면, 한 대표적인 구체예에서, PEG-지질은 PEG-C-DMA (화합물 (66)) (0.6%)이고, 양이온성 지질은 1,2-디리놀레일옥시-N,N-디메틸아미노프로판 (DLinDMA) (59.4%)이고, 인지질은 DPPC (10.2%)이고, 그리고 콜레스테롤은 29.8%로 존재하며, 여기서 존재하는 지질들의 실제양은, 예컨대, ± 5 % (또는 예컨대, ± 4 몲%, ± 3 몲%, ± 2 몲%, ± 1 몲%, ± 0.75 몲%, ± 0.5 몲%, ± 0.25 몲%, 또는 ± 0.1 몲%) 만큼 달라질 수 있다. 그러므로 본 발명의 특정 구체예들은 본 출원에 기재된 하나 또는 그 이상의 siRNA 분자들을 포함하는 제제 J에 기반한 핵산-지질 입자를 제공한다. 예를 들면, 특정 구체예들에서, 제제 J에 기반한 핵산-지질 입자는 2개의 상이한 siRNA 분자들을 포함할 수 있는데, 2개의 상이한 siRNA 분자들의 조합은 실시예 2에 기재된 조합들 중 임의의 하나에서 선택된다. 그 외 특정 구체예들에서, 제제 J에 기반한 핵산-지질 입자는 3개의 상이한 siRNA 분자들을 포함할 수 있는데, 3개의 상이한 siRNA 분자들의 조합은 실시예 3에 기재된 조합들 중 임의의 하나에서 선택된다. 특정 구체예들에서, 핵산-지질 입자는 약 5:1 내지 약 15:1, 또는 약 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, 또는 15:1, 또는 이의 임의의 부분 또는 그 내부의 범위의 총 지질:siRNA 질량비를 가진다. 특정 구체예들에서, 핵산-지질 입자는 약 9:1 (예컨대, 8.5:1 내지 10:1, 또는 8.9:1 내지 10:1, 또는, 9.1:1, 9.2:1, 9.3:1, 9.4:1, 9.5:1, 9.6:1, 9.7:1, 및 9.8:1을 비롯한 9:1 내지 9.9:1의 지질:약물비)의 총 지질:siRNA 질량비를 가진다.

[0137]

예시적 지질 제제 K는 하기 다음 성분들을 포함한다 (여기서 성분들의 백분율 값은 몰 백분율이다): PEG-지질

(0.5%), 양이온성 지질 (56.7%), 인지질 (13.1%), 콜레스테롤 (29.7%), 여기서 존재하는 지질들의 실제양은, 예컨대, ± 5 % (또는 예컨대, ± 4 몰%, ± 3 몰%, ± 2 몲%, ± 1 몲%, ± 0.75 몲%, ± 0.5 몲%, ± 0.25 몲%, 또는 ± 0.1 몲%) 만큼 달라질 수 있다. 예를 들면, 한 대표적인 구체예에서, PEG-지질은 PEG-C-DOMG (화합물 (67)) (0.5%)이고, 양이온성 지질은 (6Z,9Z,28Z,31Z)-헵타트리아콘타-6,9,28,31-테트라엔-19-일 4-(디메틸아미노)부타노에이트) (화합물 (7)) (56.7%)이고, 인지질은 DSPC (13.1%)이고, 그리고 콜레스테롤은 29.7%로 존재하며, 여기서 존재하는 지질들의 실제양은, 예컨대, ± 5 % (또는 예컨대, ± 4 몲%, ± 3 몲%, ± 2 몲%, ± 1 몲%, ± 0.75 몲%, ± 0.5 몲%, ± 0.25 몲%, 또는 ± 0.1 몲%) 만큼 달라질 수 있다. 그러므로 본 발명의 특정 구체예들은 본 출원에 기재된 하나 또는 그 이상의 siRNA 분자들을 포함하는 제제 K에 기반한 핵산-지질 입자를 제공한다. 예를 들면, 특정 구체예들에서, 제제 K에 기반한 핵산 지질 입자는 2개의 상이한 siRNA 분자들을 포함할 수 있는데, 2개의 상이한 siRNA 분자들의 조합은 실시예 2에 기재된 조합들 중 임의의 하나에서 선택된다. 그 외 특정 구체예들에서, 제제 K에 기반한 핵산 지질 입자는 3개의 상이한 siRNA 분자들을 포함할 수 있는데, 3개의 상이한 siRNA 분자들의 조합은 실시예 3에 기재된 조합들 중 임의의 하나에서 선택된다. 특정 구체예들에서, 핵산-지질 입자는 약 5:1 내지 약 15:1, 또는 약 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, 또는 15:1, 또는 이의 임의의 부분 또는 그 내부의 범위의 총 지질:siRNA 질량비를 가진다. 특정 구체예들에서, 핵산-지질 입자는 약 9:1 (예컨대, 8.5:1 내지 10:1, 또는 8.9:1 내지 10:1, 또는, 9.1:1, 9.2:1, 9.3:1, 9.4:1, 9.5:1, 9.6:1, 9.7:1, 및 9.8:1을 비롯한 9:1 내지 9.9:1의 지질:약물비)의 총 지질:siRNA 질량비를 가진다.

[0138]

예시적 지질 제제 L은 하기 다음 성분들을 포함한다 (여기서 성분들의 백분율 값은 몰 백분율이다): PEG-지질 (2.2%), 양이온성 지질 (52.0%), 인지질 (9.7%), 콜레스테롤 (36.2%), 여기서 존재하는 지질들의 실제양은, 예컨대, ± 5 % (또는 예컨대, ± 4 몲%, ± 3 몲%, ± 2 몲%, ± 1 몲%, ± 0.75 몲%, ± 0.5 몲%, ± 0.25 몲%, 또는 ± 0.1 몲%) 만큼 달라질 수 있다. 예를 들면, 한 대표적인 구체예에서, PEG-지질은 PEG-C-DOMG (화합물 (67)) (2.2%)이고, 양이온성 지질은 1,2-디-γ-리놀레닐옥시-N,N-디메틸아미노프로판 ( $\gamma$ -DLenDMA; 화합물 (15)) (52.0%)이고, 인지질은 DSPC (9.7%)이고, 그리고 콜레스테롤은 36.2%로 존재하며, 여기서 존재하는 지질들의 실제양은, 예컨대, ± 5 % (또는 예컨대, ± 4 몲%, ± 3 몲%, ± 2 몲%, ± 1 몲%, ± 0.75 몲%, ± 0.5 몲%, ± 0.25 몲%, 또는 ± 0.1 몲%) 만큼 달라질 수 있다. 그러므로 본 발명의 특정 구체예들은 본 출원에 기재된 하나 또는 그 이상의 siRNA 분자들을 포함하는 제제 L에 기반한 핵산-지질 입자를 제공한다. 예를 들면, 특정 구체예들에서, 제제 L에 기반한 핵산 지질 입자는 2개의 상이한 siRNA 분자들을 포함할 수 있는데, 2개의 상이한 siRNA 분자들의 조합은 실시예 2에 기재된 조합들 중 임의의 하나에서 선택된다. 그 외 특정 구체예들에서, 제제 L에 기반한 핵산 지질 입자는 3개의 상이한 siRNA 분자들을 포함할 수 있는데, 3개의 상이한 siRNA 분자들의 조합은 실시예 3에 기재된 조합들 중 임의의 하나에서 선택된다. 특정 구체예들에서, 핵산-지질 입자는 약 5:1 내지 약 15:1, 또는 약 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, 또는 15:1, 또는 이의 임의의 부분 또는 그 내부의 범위의 총 지질:siRNA 질량비를 가진다. 특정 구체예들에서, 핵산-지질 입자는 약 9:1 (예컨대, 8.5:1 내지 10:1, 또는 8.9:1 내지 10:1, 또는, 9.1:1, 9.2:1, 9.3:1, 9.4:1, 9.5:1, 9.6:1, 9.7:1, 및 9.8:1을 비롯한 9:1 내지 9.9:1의 지질:약물비)의 총 지질:siRNA 질량비를 가진다.

[0139]

예시적 지질 제제 M은 하기 다음 성분들을 포함한다 (여기서 성분들의 백분율 값은 몰 백분율이다): PEG-지질 (2.7%), 양이온성 지질 (58.4%), 인지질 (13.1%), 콜레스테롤 (25.7%), 여기서 존재하는 지질들의 실제양은, 예컨대, ± 5 % (또는 예컨대, ± 4 몲%, ± 3 몲%, ± 2 몲%, ± 1 몲%, ± 0.75 몲%, ± 0.5 몲%, ± 0.25 몲%, 또는 ± 0.1 몲%) 만큼 달라질 수 있다. 예를 들면, 한 대표적인 구체예에서, PEG-지질은 PEG-C-DMA (화합물 (66)) (2.7%)이고, 양이온성 지질은 1,2-디리놀레일옥시-N,N-디메틸아미노프로판 (DLinDMA) (58.4%)이고, 인지질은 DPPC (13.1%)이고, 그리고 콜레스테롤은 25.7%로 존재하며, 여기서 존재하는 지질들의 실제양은, 예컨대, ± 5 % (또는 예컨대, ± 4 몲%, ± 3 몲%, ± 2 몲%, ± 1 몲%, ± 0.75 몲%, ± 0.5 몲%, ± 0.25 몲%, 또는 ± 0.1 몲%) 만큼 달라질 수 있다. 그러므로 본 발명의 특정 구체예들은 본 출원에 기재된 하나 또는 그 이상의 siRNA 분자들을 포함하는 제제 M에 기반한 핵산-지질 입자를 제공한다. 예를 들면, 특정 구체예들에서, 제제 M에 기반한 핵산 지질 입자는 2개의 상이한 siRNA 분자들을 포함할 수 있는데, 2개의 상이한 siRNA 분자들의 조합은 실시예 2에 기재된 조합들 중 임의의 하나에서 선택된다. 그 외 특정 구체예들에서, 제제 M에 기반한 핵산 지질 입자는 3개의 상이한 siRNA 분자들을 포함할 수 있는데, 3개의 상이한 siRNA 분자들의 조합은 실시예 3에 기재된 조합들 중 임의의 하나에서 선택된다. 특정 구체예들에서, 핵산-지질 입자는 약 5:1 내지 약 15:1, 또는 약 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, 또는 15:1, 또는 이의 임의의 부분 또는 그 내부의 범위의 총 지질:siRNA 질량비를 가진다. 특정 구체예들에서, 핵산-지질 입자는 약 9:1 (예컨대, 8.5:1 내지 10:1, 또는 8.9:1 내지 10:1, 또는, 9.1:1, 9.2:1, 9.3:1, 9.4:1, 9.5:1, 9.6:1, 9.7:1, 및 9.8:1을 비롯한 9:1 내지 9.9:1의 지질:약물비)의 총 지질:siRNA 질량비를 가진다.

한 9:1 내지 9.9:1의 지질:약물비)의 총 지질:siRNA 질량비를 가진다.

[0140]

예시적 지질 제제 N은 하기 다음 성분들을 포함한다 (여기서 성분들의 백분율 값은 몰 백분율이다): PEG-지질 (3.0%), 양이온성 지질 (53.3%), 인지질 (12.1%), 콜레스테롤 (31.5%), 여기서 존재하는 지질들의 실제양은, 예컨대, ± 5 % (또는 예컨대, ± 4 몰%, ± 3 몲%, ± 2 몲%, ± 1 몲%, ± 0.75 몲%, ± 0.5 몲%, ± 0.25 몲%, 또는 ± 0.1 몲%) 만큼 달라질 수 있다. 예를 들면, 한 대표적인 구체예에서, PEG-지질은 PEG-C-DMA (화합물 (66)) (3.0%)이고, 양이온성 지질은 1,2-디리놀레일옥시-N,N-디메틸아미노프로판 (DLinDMA) (53.3%)이고, 인지질은 DPPC (12.1%)이고, 그리고 콜레스테롤은 31.5%로 존재하며, 여기서 존재하는 지질들의 실제양은, 예컨대, ± 5 % (또는 예컨대, ± 4 몲%, ± 3 몲%, ± 2 몲%, ± 1 몲%, ± 0.75 몲%, ± 0.5 몲%, ± 0.25 몲%, 또는 ± 0.1 몲%) 만큼 달라질 수 있다. 그러므로 본 발명의 특정 구체예들은 본 출원에 기재된 하나 또는 그 이상의 siRNA 분자들을 포함하는 제제 N에 기반한 핵산-지질 입자를 제공한다. 예를 들면, 특정 구체예들에서, 제제 N에 기반한 핵산 지질 입자는 2개의 상이한 siRNA 분자들을 포함할 수 있는데, 2개의 상이한 siRNA 분자들의 조합은 실시예 2에 기재된 조합들 중 임의의 하나에서 선택된다. 그 외 특정 구체예들에서, 제제 N에 기반한 핵산 지질 입자는 3개의 상이한 siRNA 분자들을 포함할 수 있는데, 3개의 상이한 siRNA 분자들의 조합은 실시예 3에 기재된 조합들 중 임의의 하나에서 선택된다. 특정 구체예들에서, 핵산-지질 입자는 약 5:1 내지 약 15:1, 또는 약 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, 또는 15:1, 또는 이의 임의의 부분 또는 그 내부의 범위의 총 지질:siRNA 질량비를 가진다. 특정 구체예들에서, 핵산-지질 입자는 약 9:1 (예컨대, 8.5:1 내지 10:1, 또는 8.9:1 내지 10:1, 또는, 9.1:1, 9.2:1, 9.3:1, 9.4:1, 9.5:1, 9.6:1, 9.7:1, 및 9.8:1을 비롯한 9:1 내지 9.9:1의 지질:약물비)의 총 지질:siRNA 질량비를 가진다.

[0141]

예시적 지질 제제 0은 하기 다음 성분들을 포함한다 (여기서 성분들의 백분율 값은 몰 백분율이다): PEG-지질 (1.5%), 양이온성 지질 (56.2%), 인지질 (7.8%), 콜레스테롤 (34.7%), 여기서 존재하는 지질들의 실제양은, 예컨대, ± 5 % (또는 예컨대, ± 4 몲%, ± 3 몲%, ± 2 몲%, ± 1 몲%, ± 0.75 몲%, ± 0.5 몲%, ± 0.25 몲%, 또는 ± 0.1 몲%) 만큼 달라질 수 있다. 예를 들면, 한 대표적인 구체예에서, PEG-지질은 PEG-C-DMA (화합물 (66)) (1.5%)이고, 양이온성 지질은 1,2-디리놀레일옥시-N,N-디메틸아미노프로판 (DLinDMA) (56.2%)이고, 인지질은 DPPC (7.8%)이고, 그리고 콜레스테롤은 34.7%로 존재하며, 여기서 존재하는 지질들의 실제양은, 예컨대, ± 5 % (또는 예컨대, ± 4 몲%, ± 3 몲%, ± 2 몲%, ± 1 몲%, ± 0.75 몲%, ± 0.5 몲%, ± 0.25 몲%, 또는 ± 0.1 몲%) 만큼 달라질 수 있다. 그러므로 본 발명의 특정 구체예들은 본 출원에 기재된 하나 또는 그 이상의 siRNA 분자들을 포함하는 제제 0에 기반한 핵산-지질 입자를 제공한다. 예를 들면, 특정 구체예들에서, 제제 0에 기반한 핵산 지질 입자는 2개의 상이한 siRNA 분자들을 포함할 수 있는데, 2개의 상이한 siRNA 분자들의 조합은 실시예 2에 기재된 조합들 중 임의의 하나에서 선택된다. 그 외 특정 구체예들에서, 제제 0에 기반한 핵산 지질 입자는 3개의 상이한 siRNA 분자들을 포함할 수 있는데, 3개의 상이한 siRNA 분자들의 조합은 실시예 3에 기재된 조합들 중 임의의 하나에서 선택된다. 특정 구체예들에서, 핵산-지질 입자는 약 5:1 내지 약 15:1, 또는 약 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, 또는 15:1, 또는 이의 임의의 부분 또는 그 내부의 범위의 총 지질:siRNA 질량비를 가진다. 특정 구체예들에서, 핵산-지질 입자는 약 9:1 (예컨대, 8.5:1 내지 10:1, 또는 8.9:1 내지 10:1, 또는, 9.1:1, 9.2:1, 9.3:1, 9.4:1, 9.5:1, 9.6:1, 9.7:1, 및 9.8:1을 비롯한 9:1 내지 9.9:1의 지질:약물비)의 총 지질:siRNA 질량비를 가진다.

[0142]

예시적 지질 제제 P는 하기 다음 성분들을 포함한다 (여기서 성분들의 백분율 값은 몰 백분율이다): PEG-지질 (2.1%), 양이온성 지질 (48.6%), 인지질 (15.5%), 콜레스테롤 (33.8%), 여기서 존재하는 지질들의 실제양은, 예컨대, ± 5 % (또는 예컨대, ± 4 몲%, ± 3 몲%, ± 2 몲%, ± 1 몲%, ± 0.75 몲%, ± 0.5 몲%, ± 0.25 몲%, 또는 ± 0.1 몲%) 만큼 달라질 수 있다. 예를 들면, 한 대표적인 구체예에서, PEG-지질은 PEG-C-DOMG (화합물 (67)) (2.1%)이고, 양이온성 지질은 3-((6Z,9Z,28Z,31Z)-헵타트리아콘타-6,9,28,31-테트라엔-19-일옥시)-N,N-디메틸프로판-1-아민 (DLin-MP-DMA; 화합물 (8)) (48.6%)이고, 인지질은 DSPC (15.5%)이고, 그리고 콜레스테롤은 33.8%로 존재하며, 여기서 존재하는 지질들의 실제양은, 예컨대, ± 5 % (또는 예컨대, ± 4 몲%, ± 3 몲%, ± 2 몲%, ± 1 몲%, ± 0.75 몲%, ± 0.5 몲%, ± 0.25 몲%, 또는 ± 0.1 몲%) 만큼 달라질 수 있다. 그러므로 본 발명의 특정 구체예들은 본 출원에 기재된 하나 또는 그 이상의 siRNA 분자들을 포함하는 제제 P에 기반한 핵산-지질 입자를 제공한다. 예를 들면, 특정 구체예들에서, 제제 P에 기반한 핵산-지질 입자는 2개의 상이한 siRNA 분자들을 포함할 수 있는데, 2개의 상이한 siRNA 분자들의 조합은 실시예 2에 기재된 조합들 중 임의의 하나에서 선택된다. 그 외 특정 구체예들에서, 제제 P에 기반한 핵산-지질 입자는 3개의 상이한 siRNA 분자들을 포함할 수 있는데, 3개의 상이한 siRNA 분자들의 조합은 실시예 3에 기재된 조합들 중 임의의 하나에서 선택된다. 특정 구체예들에서, 핵산-지질 입자는 약 5:1 내지 약 15:1, 또는 약 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, 또는 15:1, 또는 이의 임의의 부분 또는 그 내부의 범위의 총 지질:siRNA 질량비를 가진다.

비를 가진다. 특정 구체예들에서, 핵산-지질 입자는 약 9:1 (예컨대, 8.5:1 내지 10:1, 또는 8.9:1 내지 10:1, 또는, 9.1:1, 9.2:1, 9.3:1, 9.4:1, 9.5:1, 9.6:1, 9.7:1, 및 9.8:1을 비롯한 9:1 내지 9.9:1의 지질:약물비)의 총 지질:siRNA 질량비를 가진다.

[0143]

예시적 지질 제제 Q는 하기 다음 성분들을 포함한다 (여기서 성분들의 백분율 값은 몰 백분율이다): PEG-지질 (2.5%), 양이온성 지질 (57.9%), 인지질 (9.2%), 콜레스테롤 (30.3%), 여기서 존재하는 지질들의 실제양은, 예컨대, ± 5 % (또는 예컨대, ± 4 몰%, ± 3 몰%, ± 2 몰%, ± 1 몰%, ± 0.75 몲%, ± 0.5 몲%, ± 0.25 몲%, 또는 ± 0.1 몲%) 만큼 달라질 수 있다. 예를 들면, 한 대표적인 구체예에서, PEG-지질은 PEG-C-DMA (화합물 (66)) (2.5%)이고, 양이온성 지질은 (6Z,16Z)-12-((Z)-헥-4-엔일)도코사-6,16-디엔-11-일 5-(디메틸아미노)펜타노에이트 (화합물 (13)) (57.9%)이고, 인지질은 DSPC (9.2%)이고, 그리고 콜레스테롤은 30.3%로 존재하며, 여기서 존재하는 지질들의 실제양은, 예컨대, ± 5 % (또는 예컨대, ± 4 몲%, ± 3 몲%, ± 2 몲%, ± 1 몲%, ± 0.75 몲%, ± 0.5 몲%, ± 0.25 몲%, 또는 ± 0.1 몲%) 만큼 달라질 수 있다. 그러므로 본 발명의 특정 구체예들은 본 출원에 기재된 하나 또는 그 이상의 siRNA 분자들을 포함하는 제제 Q에 기반한 핵산-지질 입자를 제공한다. 예를 들면, 특정 구체예들에서, 제제 Q에 기반한 핵산 지질 입자는 2개의 상이한 siRNA 분자들을 포함할 수 있는데, 2개의 상이한 siRNA 분자들의 조합은 실시예 2에 기재된 조합들 중 임의의 하나에서 선택된다. 그 외 특정 구체예들에서, 제제 Q에 기반한 핵산 지질 입자는 3개의 상이한 siRNA 분자들을 포함할 수 있는데, 2개의 상이한 siRNA 분자들의 조합은 실시예 3에 기재된 조합들 중 임의의 하나에서 선택된다. 특정 구체예들에서, 핵산-지질 입자는 약 5:1 내지 약 15:1, 또는 약 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, 또는 15:1, 또는 이의 임의의 부분 또는 그 내부의 범위의 총 지질:siRNA 질량비를 가진다. 특정 구체예들에서, 핵산-지질 입자는 약 9:1 (예컨대, 8.5:1 내지 10:1, 또는 8.9:1 내지 10:1, 또는, 9.1:1, 9.2:1, 9.3:1, 9.4:1, 9.5:1, 9.6:1, 9.7:1, 및 9.8:1을 비롯한 9:1 내지 9.9:1의 지질:약물비)의 총 지질:siRNA 질량비를 가진다.

[0144]

예시적 지질 제제 R은 하기 다음 성분들을 포함한다 (여기서 성분들의 백분율 값은 몰 백분율이다): PEG-지질 (1.6%), 양이온성 지질 (54.6%), 인지질 (10.9%), 콜레스테롤 (32.8%), 여기서 존재하는 지질들의 실제양은, 예컨대, ± 5 % (또는 예컨대, ± 4 몲%, ± 3 몲%, ± 2 몲%, ± 1 몲%, ± 0.75 몲%, ± 0.5 몲%, ± 0.25 몲%, 또는 ± 0.1 몲%) 만큼 달라질 수 있다. 예를 들면, 한 대표적인 구체예에서, PEG-지질은 PEG-C-DMA (화합물 (66)) (1.6%)이고, 양이온성 지질은 3-((6Z,9Z,28Z,31Z)-헵타트리아콘타-6,9,28,31-테트라엔-19-일옥시)-N,N-디메틸프로판-1-아민 (화합물 (8)) (54.6%)이고, 인지질은 DSPC (10.9%)이고, 그리고 콜레스테롤은 32.8%로 존재하며, 여기서 존재하는 지질들의 실제양은, 예컨대, ± 5 % (또는 예컨대, ± 4 몲%, ± 3 몲%, ± 2 몲%, ± 1 몲%, ± 0.75 몲%, ± 0.5 몲%, ± 0.25 몲%, 또는 ± 0.1 몲%) 만큼 달라질 수 있다. 그러므로 본 발명의 특정 구체예들은 본 출원에 기재된 하나 또는 그 이상의 siRNA 분자들을 포함하는 제제 R에 기반한 핵산-지질 입자를 제공한다. 예를 들면, 특정 구체예들에서, 제제 R에 기반한 핵산 지질 입자는 2개의 상이한 siRNA 분자들을 포함할 수 있는데, 2개의 상이한 siRNA 분자들의 조합은 실시예 2에 기재된 조합들 중 임의의 하나에서 선택된다. 그 외 특정 구체예들에서, 제제 R에 기반한 핵산 지질 입자는 3개의 상이한 siRNA 분자들을 포함할 수 있는데, 3개의 상이한 siRNA 분자들의 조합은 실시예 3에 기재된 조합들 중 임의의 하나에서 선택된다. 특정 구체예들에서, 핵산-지질 입자는 약 5:1 내지 약 15:1, 또는 약 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, 또는 15:1, 또는 이의 임의의 부분 또는 그 내부의 범위의 총 지질:siRNA 질량비를 가진다. 특정 구체예들에서, 핵산-지질 입자는 약 9:1 (예컨대, 8.5:1 내지 10:1, 또는 8.9:1 내지 10:1, 또는, 9.1:1, 9.2:1, 9.3:1, 9.4:1, 9.5:1, 9.6:1, 9.7:1, 및 9.8:1을 비롯한 9:1 내지 9.9:1의 지질:약물비)의 총 지질:siRNA 질량비를 가진다.

[0145]

예시적 지질 제제 S는 하기 다음 성분들을 포함한다 (여기서 성분들의 백분율 값은 몰 백분율이다): PEG-지질 (2.9%), 양이온성 지질 (49.6%), 인지질 (16.3%), 콜레스테롤 (31.3%), 여기서 존재하는 지질들의 실제양은, 예컨대, ± 5 % (또는 예컨대, ± 4 몲%, ± 3 몲%, ± 2 몲%, ± 1 몲%, ± 0.75 몲%, ± 0.5 몲%, ± 0.25 몲%, 또는 ± 0.1 몲%) 만큼 달라질 수 있다. 예를 들면, 한 대표적인 구체예에서, PEG-지질은 PEG-C-DMA (화합물 (66)) (2.9%)이고, 양이온성 지질은 (6Z,16Z)-12-((Z)-헥-4-엔일)도코사-6,16-디엔-11-일 5-(디메틸아미노)펜타노에이트 (화합물 (13)) (49.6%)이고, 인지질은 DPPC (16.3%)이고, 그리고 콜레스테롤은 31.3%로 존재하며, 여기서 존재하는 지질들의 실제양은, 예컨대, ± 5 % (또는 예컨대, ± 4 몲%, ± 3 몲%, ± 2 몲%, ± 1 몲%, ± 0.75 몲%, ± 0.5 몲%, ± 0.25 몲%, 또는 ± 0.1 몲%) 만큼 달라질 수 있다. 그러므로 본 발명의 특정 구체예들은 본 출원에 기재된 하나 또는 그 이상의 siRNA 분자들을 포함하는 제제 S에 기반한 핵산-지질 입자를 제공한다. 예를 들면, 특정 구체예들에서, 제제 S에 기반한 핵산 지질 입자는 2개의 상이한 siRNA 분자들을 포함할 수 있는데, 2개의 상이한 siRNA 분자들의 조합은 실시예 2에 기재된 조합들 중 임의의 하나에서 선택된다.

그 외 특정 구체예들에서, 제제 S에 기반한 핵산 지질 입자는 3개의 상이한 siRNA 분자들을 포함할 수 있는데, 3개의 상이한 siRNA 분자들의 조합은 실시예 3에 기재된 조합들 중 임의의 하나에서 선택된다. 특정 구체예들에서, 핵산-지질 입자는 약 5:1 내지 약 15:1, 또는 약 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, 또는 15:1, 또는 이의 임의의 부분 또는 그 내부의 범위의 총 지질:siRNA 질량비를 가진다. 특정 구체예들에서, 핵산-지질 입자는 약 9:1 (예컨대, 8.5:1 내지 10:1, 또는 8.9:1 내지 10:1, 또는, 9.1:1, 9.2:1, 9.3:1, 9.4:1, 9.5:1, 9.6:1, 9.7:1, 및 9.8:1을 비롯한 9:1 내지 9.9:1의 지질:약물비)의 총 지질:siRNA 질량비를 가진다.

[0146]

예시적 지질 제제 T는 하기 다음 성분들을 포함한다 (여기서 성분들의 백분율 값은 몰 백분율이다): PEG-지질 (0.7%), 양이온성 지질 (50.5%), 인지질 (8.9%), 콜레스테롤 (40.0%), 여기서 존재하는 지질들의 실제양은, 예컨대, ± 5 % (또는 예컨대, ± 4 몰%, ± 3 몰%, ± 2 몰%, ± 1 몰%, ± 0.75 몲%, ± 0.5 몲%, ± 0.25 몲%, 또는 ± 0.1 몲%) 만큼 달라질 수 있다. 예를 들면, 한 대표적인 구체예에서, PEG-지질은 PEG-C-DOMG (화합물 (67)) (0.7%)이고, 양이온성 지질은 1,2-디리놀레일옥시-N,N-디메틸아미노프로판 (DLinDMA) (50.5%)이고, 인지질은 DPPC (8.9%)이고, 그리고 콜레스테롤은 40.0%로 존재하며, 여기서 존재하는 지질들의 실제양은, 예컨대, ± 5 % (또는 예컨대, ± 4 몲%, ± 3 몲%, ± 2 몲%, ± 1 몲%, ± 0.75 몲%, ± 0.5 몲%, ± 0.25 몲%, 또는 ± 0.1 몲%) 만큼 달라질 수 있다. 그러므로 본 발명의 특정 구체예들은 본 출원에 기재된 하나 또는 그 이상의 siRNA 분자들을 포함하는 제제 T에 기반한 핵산-지질 입자를 제공한다. 예를 들면, 특정 구체예들에서, 제제 T에 기반한 핵산 지질 입자는 2개의 상이한 siRNA 분자들을 포함할 수 있는데, 2개의 상이한 siRNA 분자들의 조합은 실시예 2에 기재된 조합들 중 임의의 하나에서 선택된다. 그 외 특정 구체예들에서, 제제 T에 기반한 핵산 지질 입자는 3개의 상이한 siRNA 분자들을 포함할 수 있는데, 3개의 상이한 siRNA 분자들의 조합은 실시예 3에 기재된 조합들 중 임의의 하나에서 선택된다. 특정 구체예들에서, 핵산-지질 입자는 약 5:1 내지 약 15:1, 또는 약 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, 또는 15:1, 또는 이의 임의의 부분 또는 그 내부의 범위의 총 지질:siRNA 질량비를 가진다. 특정 구체예들에서, 핵산-지질 입자는 약 9:1 (예컨대, 8.5:1 내지 10:1, 또는 8.9:1 내지 10:1, 또는, 9.1:1, 9.2:1, 9.3:1, 9.4:1, 9.5:1, 9.6:1, 9.7:1, 및 9.8:1을 비롯한 9:1 내지 9.9:1의 지질:약물비)의 총 지질:siRNA 질량비를 가진다.

[0147]

예시적 지질 제제 U는 하기 다음 성분들을 포함한다 (여기서 성분들의 백분율 값은 몰 백분율이다): PEG-지질 (1.0%), 양이온성 지질 (51.4%), 인지질 (15.0%), 콜레스테롤 (32.6%), 여기서 존재하는 지질들의 실제양은, 예컨대, ± 5 % (또는 예컨대, ± 4 몲%, ± 3 몲%, ± 2 몲%, ± 1 몲%, ± 0.75 몲%, ± 0.5 몲%, ± 0.25 몲%, 또는 ± 0.1 몲%) 만큼 달라질 수 있다. 예를 들면, 한 대표적인 구체예에서, PEG-지질은 PEG-C-DOMG (화합물 (67)) (1.0%)이고, 양이온성 지질은 1,2-디리놀레일옥시-N,N-디메틸아미노프로판 (DLinDMA) (51.4%)이고, 인지질은 DSPC (15.0%)이고, 그리고 콜레스테롤은 32.6%로 존재하며, 여기서 존재하는 지질들의 실제양은, 예컨대, ± 5 % (또는 예컨대, ± 4 몲%, ± 3 몲%, ± 2 몲%, ± 1 몲%, ± 0.75 몲%, ± 0.5 몲%, ± 0.25 몲%, 또는 ± 0.1 몲%) 만큼 달라질 수 있다. 그러므로 본 발명의 특정 구체예들은 본 출원에 기재된 하나 또는 그 이상의 siRNA 분자들을 포함하는 제제 U에 기반한 핵산-지질 입자를 제공한다. 예를 들면, 특정 구체예들에서, 제제 U에 기반한 핵산 지질 입자는 2개의 상이한 siRNA 분자들을 포함할 수 있는데, 2개의 상이한 siRNA 분자들의 조합은 실시예 2에 기재된 조합들 중 임의의 하나에서 선택된다. 그 외 특정 구체예들에서, 제제 U에 기반한 핵산 지질 입자는 3개의 상이한 siRNA 분자들을 포함할 수 있는데, 3개의 상이한 siRNA 분자들의 조합은 실시예 3에 기재된 조합들 중 임의의 하나에서 선택된다. 특정 구체예들에서, 핵산-지질 입자는 약 5:1 내지 약 15:1, 또는 약 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, 또는 15:1, 또는 이의 임의의 부분 또는 그 내부의 범위의 총 지질:siRNA 질량비를 가진다. 특정 구체예들에서, 핵산-지질 입자는 약 9:1 (예컨대, 8.5:1 내지 10:1, 또는 8.9:1 내지 10:1, 또는, 9.1:1, 9.2:1, 9.3:1, 9.4:1, 9.5:1, 9.6:1, 9.7:1, 및 9.8:1을 비롯한 9:1 내지 9.9:1의 지질:약물비)의 총 지질:siRNA 질량비를 가진다.

[0148]

예시적 지질 제제 V는 하기 다음 성분들을 포함한다 (여기서 성분들의 백분율 값은 몰 백분율이다): PEG-지질 (1.3%), 양이온성 지질 (60.0%), 인지질 (7.2%), 콜레스테롤 (31.5%), 여기서 존재하는 지질들의 실제양은, 예컨대, ± 5 % (또는 예컨대, ± 4 몲%, ± 3 몲%, ± 2 몲%, ± 1 몲%, ± 0.75 몲%, ± 0.5 몲%, ± 0.25 몲%, 또는 ± 0.1 몲%) 만큼 달라질 수 있다. 예를 들면, 한 대표적인 구체예에서, PEG-지질은 PEG-C-DOMG (화합물 (67)) (1.3%)이고, 양이온성 지질은 1,2-디리놀레닐옥시-N,N-디메틸아미노프로판 (DLenDMA) (60.0%)이고, 인지질은 DSPC (7.2%)이고, 그리고 콜레스테롤은 31.5%로 존재하며, 여기서 존재하는 지질들의 실제양은, 예컨대, ± 5 % (또는 예컨대, ± 4 몲%, ± 3 몲%, ± 2 몲%, ± 1 몲%, ± 0.75 몲%, ± 0.5 몲%, ± 0.25 몲%, 또는 ± 0.1 몲%) 만큼 달라질 수 있다. 그러므로 본 발명의 특정 구체예들은 본 출원에 기재된 하나 또는 그 이상의 siRNA 분자들을 포함하는 제제 V에 기반한 핵산-지질 입자를 제공한다. 예를 들면, 특정 구체예들에서,

제제 V에 기반한 핵산 지질 입자는 2개의 상이한 siRNA 분자들을 포함할 수 있는데, 2개의 상이한 siRNA 분자들의 조합은 실시예 2에 기재된 조합들 중 임의의 하나에서 선택된다. 그 외 특정 구체예들에서, 제제 V에 기반한 핵산 지질 입자는 3개의 상이한 siRNA 분자들을 포함할 수 있는데, 3개의 상이한 siRNA 분자들의 조합은 실시예 3에 기재된 조합들 중 임의의 하나에서 선택된다. 특정 구체예들에서, 핵산-지질 입자는 약 5:1 내지 약 15:1, 또는 약 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, 또는 15:1, 또는 이의 임의의 부분 또는 그 내부의 범위의 총 지질:siRNA 질량비를 가진다. 특정 구체예들에서, 핵산-지질 입자는 약 9:1 (예컨대, 8.5:1 내지 10:1, 또는 8.9:1 내지 10:1, 또는, 9.1:1, 9.2:1, 9.3:1, 9.4:1, 9.5:1, 9.6:1, 9.7:1, 및 9.8:1을 비롯한 9:1 내지 9.9:1의 지질:약물비)의 총 지질:siRNA 질량비를 가진다.

[0149] 예시적 지질 제제 W는 하기 다음 성분들을 포함한다 (여기서 성분들의 백분율 값은 몰 백분율이다): PEG-지질 (1.8%), 양이온성 지질 (51.6%), 인지질 (8.4%), 콜레스테롤 (38.3%), 여기서 존재하는 지질들의 실제양은, 예컨대, ± 5 % (또는 예컨대, ± 4 몰%, ± 3 몰%, ± 2 몰%, ± 1 몰%, ± 0.75 몲%, ± 0.5 몲%, ± 0.25 몲%, 또는 ± 0.1 몲%) 만큼 달라질 수 있다. 예를 들면, 한 대표적인 구체예에서, PEG-지질은 PEG-C-DMA (화합물 (66)) (1.8%)이고, 양이온성 지질은 1,2-디리놀레일옥시-N,N-디메틸아미노프로판 (DLinDMA) (51.6%)이고, 인지질은 DSPC (8.4%)이고, 그리고 콜레스테롤은 38.3%로 존재하며, 여기서 존재하는 지질들의 실제양은, 예컨대, ± 5 % (또는 예컨대, ± 4 몲%, ± 3 몲%, ± 2 몲%, ± 1 몲%, ± 0.75 몲%, ± 0.5 몲%, ± 0.25 몲%, 또는 ± 0.1 몲%) 만큼 달라질 수 있다. 그러므로 본 발명의 특정 구체예들은 본 출원에 기재된 하나 또는 그 이상의 siRNA 분자들을 포함하는 제제 W에 기반한 핵산-지질 입자를 제공한다. 예를 들면, 특정 구체예들에서, 제제 W에 기반한 핵산 지질 입자는 2개의 상이한 siRNA 분자들을 포함할 수 있는데, 2개의 상이한 siRNA 분자들의 조합은 실시예 2에 기재된 조합들 중 임의의 하나에서 선택된다. 그 외 특정 구체예들에서, 제제 W에 기반한 핵산 지질 입자는 3개의 상이한 siRNA 분자들을 포함할 수 있는데, 3개의 상이한 siRNA 분자들의 조합은 실시예 3에 기재된 조합들 중 임의의 하나에서 선택된다. 특정 구체예들에서, 핵산-지질 입자는 약 5:1 내지 약 15:1, 또는 약 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, 또는 15:1, 또는 이의 임의의 부분 또는 그 내부의 범위의 총 지질:siRNA 질량비를 가진다. 특정 구체예들에서, 핵산-지질 입자는 약 9:1 (예컨대, 8.5:1 내지 10:1, 또는 8.9:1 내지 10:1, 또는, 9.1:1, 9.2:1, 9.3:1, 9.4:1, 9.5:1, 9.6:1, 9.7:1, 및 9.8:1을 비롯한 9:1 내지 9.9:1의 지질:약물비)의 총 지질:siRNA 질량비를 가진다.

[0150] 예시적 지질 제제 X는 하기 다음 성분들을 포함한다 (여기서 성분들의 백분율 값은 몰 백분율이다): PEG-지질 (2.4%), 양이온성 지질 (48.5%), 인지질 (10.0%), 콜레스테롤 (39.2%), 여기서 존재하는 지질들의 실제양은, 예컨대, ± 5 % (또는 예컨대, ± 4 몲%, ± 3 몲%, ± 2 몲%, ± 1 몲%, ± 0.75 몲%, ± 0.5 몲%, ± 0.25 몲%, 또는 ± 0.1 몲%) 만큼 달라질 수 있다. 예를 들면, 한 대표적인 구체예에서, PEG-지질은 PEG-C-DMA (화합물 (66)) (2.4%)이고, 양이온성 지질은 1,2-디-γ-리놀레닐옥시-N,N-디메틸아미노프로판 ( $\gamma$ -DLenDMA; 화합물 (15)) (48.5%)이고, 인지질은 DPPC (10.0%)이고, 그리고 콜레스테롤은 39.2%로 존재하며, 여기서 존재하는 지질들의 실제양은, 예컨대, ± 5 % (또는 예컨대, ± 4 몲%, ± 3 몲%, ± 2 몲%, ± 1 몲%, ± 0.75 몲%, ± 0.5 몲%, ± 0.25 몲%, 또는 ± 0.1 몲%) 만큼 달라질 수 있다. 그러므로 본 발명의 특정 구체예들은 본 출원에 기재된 하나 또는 그 이상의 siRNA 분자들을 포함하는 제제 X에 기반한 핵산-지질 입자를 제공한다. 예를 들면, 특정 구체예들에서, 제제 X에 기반한 핵산 지질 입자는 2개의 상이한 siRNA 분자들을 포함할 수 있는데, 2개의 상이한 siRNA 분자들의 조합은 실시예 2에 기재된 조합들 중 임의의 하나에서 선택된다. 그 외 특정 구체예들에서, 제제 X에 기반한 핵산 지질 입자는 3개의 상이한 siRNA 분자들을 포함할 수 있는데, 3개의 상이한 siRNA 분자들의 조합은 실시예 3에 기재된 조합들 중 임의의 하나에서 선택된다. 특정 구체예들에서, 핵산-지질 입자는 약 5:1 내지 약 15:1, 또는 약 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, 또는 15:1, 또는 이의 임의의 부분 또는 그 내부의 범위의 총 지질:siRNA 질량비를 가진다. 특정 구체예들에서, 핵산-지질 입자는 약 9:1 (예컨대, 8.5:1 내지 10:1, 또는 8.9:1 내지 10:1, 또는, 9.1:1, 9.2:1, 9.3:1, 9.4:1, 9.5:1, 9.6:1, 9.7:1, 및 9.8:1을 비롯한 9:1 내지 9.9:1의 지질:약물비)의 총 지질:siRNA 질량비를 가진다.

[0151] 예시적 지질 제제 Y는 하기 다음 성분들을 포함한다 (여기서 성분들의 백분율 값은 몰 백분율이다): PEG-지질 (2.6%), 양이온성 지질 (61.2%), 인지질 (7.1%), 콜레스테롤 (29.2%), 여기서 존재하는 지질들의 실제양은, 예컨대, ± 5 % (또는 예컨대, ± 4 몲%, ± 3 몲%, ± 2 몲%, ± 1 몲%, ± 0.75 몲%, ± 0.5 몲%, ± 0.25 몲%, 또는 ± 0.1 몲%) 만큼 달라질 수 있다. 예를 들면, 한 대표적인 구체예에서, PEG-지질은 PEG-C-DMA (화합물 (66)) (2.6%)이고, 양이온성 지질은 (6Z,16Z)-12-((Z)-헥-4-엔일)도코사-6,16-디엔-11-일 5-(디메틸아미노)펜타노에이트 (화합물 (13)) (61.2%)이고, 인지질은 DSPC (7.1%)이고, 그리고 콜레스테롤은 29.2%로 존재하며, 여기서 존재하는 지질들의 실제양은, 예컨대, ± 5 % (또는 예컨대, ± 4 몲%, ± 3 몲%, ± 2 몲%, ± 1 몲%, ± 0.75 몲%, ± 0.5 몲%, ± 0.25 몲%, 또는 ± 0.1 몲%) 만큼 달라질 수 있다. 그러므로 본 발명의 특정 구체예

들은 본 출원에 기재된 하나 또는 그 이상의 siRNA 분자들을 포함하는 제제 Y에 기반한 핵산-지질 입자를 제공한다. 예를 들면, 특정 구체예들에서, 제제 Y에 기반한 핵산 지질 입자는 2개의 상이한 siRNA 분자들을 포함할 수 있는데, 2개의 상이한 siRNA 분자들의 조합은 실시예 2에 기재된 조합들 중 임의의 하나에서 선택된다. 그 외 특정 구체예들에서, 제제 Y에 기반한 핵산 지질 입자는 3개의 상이한 siRNA 분자들을 포함할 수 있는데, 3개의 상이한 siRNA 분자들의 조합은 실시예 3에 기재된 조합들 중 임의의 하나에서 선택된다. 특정 구체예들에서, 핵산-지질 입자는 약 5:1 내지 약 15:1, 또는 약 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, 또는 15:1, 또는 이의 임의의 부분 또는 그 내부의 범위의 총 지질:siRNA 질량비를 가진다. 특정 구체예들에서, 핵산-지질 입자는 약 9:1 (예컨대, 8.5:1 내지 10:1, 또는 8.9:1 내지 10:1, 또는, 9.1:1, 9.2:1, 9.3:1, 9.4:1, 9.5:1, 9.6:1, 9.7:1, 및 9.8:1을 비롯한 9:1 내지 9.9:1의 지질:약물비)의 총 지질:siRNA 질량비를 가진다.

[0152]

예시적 지질 제제 Z는 하기 다음 성분들을 포함한다 (여기서 성분들의 백분율 값은 몰 백분율이다): PEG-지질 (2.2%), 양이온성 지질 (49.7%), 인지질 (12.1%), 콜레스테롤 (36.0%), 여기서 존재하는 지질들의 실제양은, 예컨대, ± 5 % (또는 예컨대, ± 4 몰%, ± 3 몰%, ± 2 몰%, ± 1 몰%, ± 0.75 몲%, ± 0.5 몲%, ± 0.25 몲%, 또는 ± 0.1 몲%) 만큼 달라질 수 있다. 예를 들면, 한 대표적인 구체예에서, PEG-지질은 PEG-C-DOMG (화합물 (67)) (2.2%)이고, 양이온성 지질은 (6Z,9Z,28Z,31Z)-헵타트리아콘타-6,9,28,31-테트라엔-19-일 4-(디메틸 아미노)부타노에이트) (화합물 (7)) (49.7%)이고, 인지질은 DPPC (12.1%)이고, 그리고 콜레스테롤은 36.0%로 존재하며, 여기서 존재하는 지질들의 실제양은, 예컨대, ± 5 % (또는 예컨대, ± 4 몲%, ± 3 몲%, ± 2 몲%, ± 1 몲%, ± 0.75 몲%, ± 0.5 몲%, ± 0.25 몲%, 또는 ± 0.1 몲%) 만큼 달라질 수 있다. 그러므로 본 발명의 특정 구체예들은 본 출원에 기재된 하나 또는 그 이상의 siRNA 분자들을 포함하는 제제 Z에 기반한 핵산-지질 입자를 제공한다. 예를 들면, 특정 구체예들에서, 제제 Z에 기반한 핵산 지질 입자는 2개의 상이한 siRNA 분자들을 포함할 수 있는데, 2개의 상이한 siRNA 분자들의 조합은 실시예 2에 기재된 조합들 중 임의의 하나에서 선택된다. 그 외 특정 구체예들에서, 제제 Z에 기반한 핵산 지질 입자는 3개의 상이한 siRNA 분자들을 포함할 수 있는데, 3개의 상이한 siRNA 분자들의 조합은 실시예 3에 기재된 조합들 중 임의의 하나에서 선택된다. 특정 구체예들에서, 핵산-지질 입자는 약 5:1 내지 약 15:1, 또는 약 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, 또는 15:1, 또는 이의 임의의 부분 또는 그 내부의 범위의 총 지질:siRNA 질량비를 가진다. 특정 구체예들에서, 핵산-지질 입자는 약 9:1 (예컨대, 8.5:1 내지 10:1, 또는 8.9:1 내지 10:1, 또는, 9.1:1, 9.2:1, 9.3:1, 9.4:1, 9.5:1, 9.6:1, 9.7:1, 및 9.8:1을 비롯한 9:1 내지 9.9:1의 지질:약물비)의 총 지질:siRNA 질량비를 가진다.

[0153]

따라서, 본 발명의 특정 구체예들은 본 출원에 기재된 핵산-지질 입자를 제공하는데, 여기서 지질들은 제제 A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P, Q, R, S, T, U, V, W, X, Y 또는 Z 중 어느 하나에 기재된 바와 같이 제제화된다.

[0154]

본 발명은 또한 핵산-지질 입자 및 제약상 허용가능한 담체를 포함하는 제약학적 조성물을 제공한다.

[0155]

본 발명의 핵산-지질 입자들은, 예를 들면, 하나 또는 그 이상의 HBV 유전자들의 발현을 침묵시키는 siRNA들의 치료적 전달에 유용하다. 일부 구체예들에서, HBV 유전자 또는 전사체의 상이한 구역들 (예컨대, 중복 및/또는 비-중복 서열들)을 표적하는 siRNA들의 각테일은 동일하거나 상이한 핵산-지질 입자들로 제제화되고, 상기 입자들은 이러한 치료를 필요로하는 포유동물 (예컨대, 인간)에게 투여된다. 특정 예들에서, 치료적 유효량의 핵산-지질 입자들은 포유동물에, 예컨대, 인간에서 HBV 및/또는 HDV 감염 치료를 위하여 투여될 수 있다.

[0156]

특정 구체예들에서, 본 발명은 세포를 본 출원에 기재된 핵산-지질 입자와 접촉시킴으로써 본 출원에 기재된 하나 또는 그 이상의 siRNA 분자들을 세포 내부로 유입시키는 방법을 제공한다.

[0157]

특정 구체예들에서, 본 발명은 siRNA가 세포로 유입하여 세포 내에서의 B형 간염 바이러스 유전자의 발현을 침묵시키는 조건하에 세포를 본 출원에 기재된 핵산-지질 입자와 접촉시킴으로써 B형 간염 바이러스 유전자의 발현을 침묵시키는 하나 또는 그 이상의 siRNA 분자들을 세포 내로 유입시키는 방법을 제공한다. 특정 구체예들에서, 상기 세포는 포유동물, 가령, 인간 내부에 존재한다. 특정 구체예들에서, 인간은 B형 간염 바이러스 감염 또는 B형 간염 바이러스/D형 간염 바이러스 감염을 진단받았다. 특정 구체예들에서, B형 간염 바이러스 유전자 발현의 침묵은 포유동물에서 B형 간염 바이러스 및/또는 D형 간염 바이러스 입자 부하량을 핵산-지질 입자 부재시 B형 간염 바이러스 및/또는 D형 간염 바이러스 입자 부하량에 비해 적어도 약 50% (예컨대, 약 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100%)만큼 감소시킨다.

[0158]

특정 구체예들에서, 본 발명은, siRNA가 세포로 유입하여 세포 내에서 B형 간염 바이러스 유전자의 발현을 침묵

시키는 조건하에서, 발현된 B형 간염 바이러스 유전자를 포함하는 세포를 본 출원에 기재된 핵산-지질 입자 또는 조성물 (예컨대, 제약학적 조성물)과 접촉시키는 단계를 포함하는, 세포내에서 B형 간염 바이러스 유전자의 발현을 침묵시키는 방법을 제공한다. 특정 구체예들에서, 상기 세포는 포유동물, 가령, 인간 내부에 존재한다. 특정 구체예들에서, 인간은 B형 간염 바이러스 감염 또는 B형 간염 바이러스/D형 간염 바이러스 감염을 진단받았다. 특정 구체예들에서, 인간은 B형 간염 바이러스 감염 또는 B형 간염 바이러스/D형 간염 바이러스 감염에 의해 유발된 간 질병을 진단받았다. 특정 구체예들에서, B형 간염 바이러스 유전자 발현의 침묵은 포유동물에서 B형 간염 바이러스 및/또는 D형 간염 바이러스 입자 부하량을 핵산-지질 입자 부재시 B형 간염 바이러스 및/또는 D형 간염 바이러스 입자 부하량에 비해 적어도 약 50% (예컨대, 약 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100%)만큼 감소시킨다.

[0159] 일부 구체예들에서, 본 출원에 기재된 핵산-지질 입자들 또는 조성물 (예컨대, 제약학적 조성물)은 다음 투여 경로들 중 하나에 의해 투여된다: 경구, 비강내, 정맥내, 복강내, 근육내, 관절내, 병소내, 기관내, 피하, 및 피부내. 특정 구체예들에서, 핵산-지질 입자들은 전신으로, 예컨대, 장관 또는 비장관 투여 경로를 통해 투여된다.

[0160] 특정 양태들에서, 본 발명은 본 출원에 기재된 하나 또는 그 이상의 siRNA (예컨대, 표 A에 나타낸 하나 또는 그 이상의 siRNA)를 포함하는 치료적 유효량의 핵산-지질 입자를 포유동물에 투여하는 단계를 포함하는, 필요로 하는 포유동물 (예컨대, 인간)에서 HBV 유전자 발현을 침묵시키는 방법을 제공한다. 일부 구체예들에서, 본 출원에 기재된 하나 또는 그 이상의 siRNA들을 포함하는 핵산-지질 입자들의 투여는 siRNA의 부재하에서 검출되는 HBV RNA 수준들(예컨대, 완충액 대조군 또는 관련없는 비-HBV 표적 siRNA 대조군)에 비해 HBV RNA 수준을 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% (또는 이에 속하는 임의의 범위)만큼 감소시킨다. 그 외 구체예들에서, 하나 또는 그 이상의 HBV-표적 siRNA를 포함하는 핵산-지질 입자들의 투여는 음성 대조군, 가령, 예컨대, 완충액 대조군 또는 관련없는 비-HBV 표적 siRNA 대조군에 비해 HBV RNA 수준을 적어도 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 또는 100일 또는 그 이상 (또는 이에 속하는 임의의 범위) 동안 감소시킨다.

[0161] 그 외 양태들에서, 본 발명은 본 출원에 기재된 하나 또는 그 이상의 siRNA (예컨대, 표 A에 기재된 siRNA)를 포함하는 치료적 유효량의 핵산-지질 입자를 포유동물에 투여하는 단계를 포함하는, 필요로 하는 포유동물 (예컨대, 인간)에서 HBV 유전자 발현을 침묵시키는 방법을 제공한다. 일부 구체예들에서, 하나 또는 그 이상의 HBV siRNA를 포함하는 핵산-지질 입자들의 투여는 siRNA의 부재하에서 검출되는 HBV mRNA 수준들(예컨대, 완충액 대조군 또는 관련없는 비-HBV 표적 siRNA 대조군)에 비해 HBV mRNA 수준을 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% (또는 이에 속하는 임의의 범위)만큼 감소시킨다. 그 외 구체예들에서, 하나 또는 그 이상의 HBV-표적 siRNA를 포함하는 핵산-지질 입자들의 투여는 음성 대조군, 가령, 예컨대, 완충액 대조군 또는 관련없는 비-HBV 표적 siRNA 대조군에 비해 HBV mRNA 수준을 적어도 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 또는 100일 또는 그 이상 (또는 이에 속하는 임의의 범위) 동안 감소시킨다.

[0162] 본 발명의 특정 구체예들은 포유동물 (예컨대, 인간)의 세포에서 B형 간염 바이러스 유전자의 발현을 침묵시키는데 사용하기 위한 본 출원에 기재된 핵산-지질 입자 또는 조성물 (예컨대, 제약학적 조성물)을 제공한다.

[0163] 본 발명의 특정 구체예들은 포유동물 (예컨대, 인간)의 세포에서 B형 간염 바이러스 유전자의 발현을 침묵시키기 위한 약제를 제조하기 위한 본 출원에 기재된 핵산-지질 입자 또는 조성물 (예컨대, 제약학적 조성물)의 용도를 제공한다.

[0164] 그 외 양태들에서, 본 발명은 HBV 유전자 발현을 표적하는, 본 출원에 기재된 (예컨대, 표 A에 기재된) 하나 또는 그 이상의 siRNA 분자들을 포함하는 치료적 유효량의 핵산-지질 입자를 포유동물에 투여하는 단계를 포함하는, 필요로 하는 포유동물 (예컨대, 인간)에서 HBV 및/또는 HDV 감염과 관련된 하나 또는 그 이상의 증상들의 발달 위험 또는 가능성을 치료, 예방, 감소 (예컨대, 증상들에 대한 감수성 감소), 이러한 증상의 발병을 지연, 및/또는 이러한 증상을 개선하는 방법을 제공한다. 인간에서 HBV 및/또는 HDV 감염과 관련된 증상들의 예에는 열, 복통, 진한 소변, 관절 통증, 식욕 상실, 구역질, 구토, 쇠약, 피로 및 피부의 황변 (황달)이 포함된다.

[0165] 본 발명의 특정 구체예들은 본 출원에 기재된 치료적 유효량의 핵산-지질 입자 또는 조성물 (예컨대, 제약학적

조성물)을 포유동물에 투여하는 단계를 포함하는, 포유동물에서 B형 간염 바이러스 및/또는 D형 간염 바이러스 감염을 치료하는 방법을 제공한다.

[0166] 본 발명의 특정 구체예들은 포유동물 (예컨대, 인간)에서 B형 간염 바이러스 및/또는 D형 간염 바이러스 감염을 치료하는데 사용하기 위한 핵산-지질 입자 또는 조성물 (예컨대, 제약학적 조성물)을 제공한다.

[0167] 본 발명의 특정 구체예들은 포유동물 (예컨대, 인간)에서 B형 간염 바이러스 및/또는 D형 간염 바이러스 감염을 치료하기 위한 약제를 제조하기 위한 핵산-지질 입자 또는 조성물 (예컨대, 제약학적 조성물)의 용도를 제공한다.

[0168] 본 발명의 특정 구체예들은 본 출원에 기재된 (예컨대, 표 A에 기재된) 하나 또는 그 이상의 siRNA 분자들을 포함하는, 본 출원에 기재된 치료적 유효량의 핵산-지질 입자 또는 조성물 (예컨대, 제약학적 조성물)을 포유동물에 투여하는 단계를 포함하는, 포유동물에서 B형 간염 바이러스 및/또는 D형 간염 바이러스 감염 관련 하나 또는 그 이상의 증상들의 개선 방법을 제공한다. 특정 구체예들에서, 상기 입자는 전신 경로를 통해 투여된다. 특정 구체예들에서, 핵산-지질 입자의 siRNA는 포유동물에서 B형 간염 바이러스 유전자의 발현을 억제한다. 특정 구체예들에서, 포유동물은 인간이다. 특정 구체예들에서, 인간은 간 질병을 가진다.

[0169] 본 발명의 특정 구체예들은 포유동물 (예컨대, 인간)에서 B형 간염 바이러스 및/또는 D형 간염 바이러스 감염 관련 하나 또는 그 이상의 증상들을 개선하는데 사용하기 위한 본 출원에 기재된 핵산-지질 입자 또는 조성물 (예컨대, 제약학적 조성물)을 제공한다.

[0170] 본 발명의 특정 구체예들은 포유동물 (예컨대, 인간)에서 B형 간염 바이러스 및/또는 D형 간염 바이러스 감염 관련 하나 또는 그 이상의 증상들을 개선하기 위한 약제를 제조하기 위한, 본 출원에 기재된 핵산-지질 입자 또는 조성물 (예컨대, 제약학적 조성물)의 용도를 제공한다.

[0171] 본 발명의 특정 구체예들은 본 출원에 기재된 치료적 유효량의 핵산-지질 입자 또는 조성물 (예컨대, 제약학적 조성물)을 포유동물에 투여하는 단계를 포함하는, 포유동물 (예컨대, 인간)에서 HDV의 복제 억제 및/또는 HDV 감염의 하나 또는 그 이상의 증상들의 개선 방법을 제공하는데, 여기서 핵산-지질 입자 또는 조성물은 HBV 표면 항원의 합성을 억제한다.

[0172] 본 발명의 특정 구체예들은 포유동물 (예컨대, 인간)에서 HDV의 복제를 억제 및/또는 HDV 감염의 하나 또는 그 이상의 증상들을 개선하는데 사용하기 위한 본 출원에 기재된 핵산-지질 입자 또는 조성물 (예컨대, 제약학적 조성물)을 제공하는데, 여기서 핵산-지질 입자 또는 조성물은 HBV 표면 항원의 합성을 억제한다.

[0173] 본 발명의 특정 구체예들은 포유동물 (예컨대, 인간)에서 HDV의 복제를 억제 및/또는 HDV 감염의 하나 또는 그 이상의 증상들을 개선하기 위한 약제를 제조하기 위한, 본 출원에 기재된 핵산-지질 입자 또는 조성물 (예컨대, 제약학적 조성물)의 용도를 제공하는데, 여기서 핵산-지질 입자 또는 조성물은 HBV 표면 항원의 합성을 억제한다.

[0174] 본 발명의 특정 구체예들은 약물 요법에 사용하기 위한 본 출원에 기재된 핵산-지질 입자 또는 조성물 (예컨대, 제약학적 조성물)을 제공한다.

[0175] 또 다른 양태들에서, 본 발명은 HBV 유전자 발현을 표적하는 본 출원에 기재된 하나 또는 그 이상의 siRNA를 포함하는 치료적 유효량의 핵산-지질 입자를 포유동물에 투여하는 단계를 포함하는, 필요로 하는 포유동물 (예컨대, 인간) (예컨대, HBV 감염 또는 HBV/HDV 감염을 앓고 있는 인간)에서 HBV 및/또는 HDV의 비활성화 방법을 제공한다. 일부 구체예들에서, 하나 또는 그 이상의 HBV-표적 siRNA를 포함하는 핵산-지질 입자들의 투여는 siRNA의 부재시 검출되는 HBV 단백질 수준(예컨대, 완충액 대조군 또는 관련없는 비-HBV 표적 siRNA 대조군)에 비해 HBV 단백질 수준 (예컨대, HBV 표면 항원 단백질)을 적어도 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% (또는 이에 속하는 임의의 범위) 만큼 저하, 감소 또는 축소시킨다.

[0176] 한 예로서, HBV mRNA는 측쇄 DNA 분석법 (Quant iGene®; Affymetrix)을 사용하여 측정될 수 있다. 이 측쇄 DNA 분석법은 포획된 표적 RNA로부터의 신호를 증폭시키기 위하여 bDNA 분자들을 사용하는 샌드위치 핵산 혼성화법이다.

[0177] 치료 목적을 위한 임의의 HBV 유전자들의 발현을 침묵시키는데 있어서의 유용성 이외에도, 본 출원에 기재된 siRNA는 또한 연구 및 개발 분야 뿐만 아니라 진단, 예방, 예후, 임상, 및 그 외 의료 분야 (healthcare applications)에 유용하다. 한 비-제한적 예로서, siRNA는 HBV 유전자 군의 특정 구성원이 치료 표적이 될 가

능성을 가지는지 여부를 테스트하는 것을 겨냥한 표적 검증 연구에서 사용될 수 있다.

#### [0178] siRNA 분자 생성

siRNA는, 예컨대, 하나 또는 그 이상의 단리된 짧은-간섭 RNA (siRNA) 이중나선으로서, 긴 이중-가닥 RNA (dsRNA)로서, 또는 DNA 플라스미드 내 전사 카세트로부터 전사된 siRNA 또는 dsRNA로서를 비롯하여, 여러 형태들로 제공될 수 있다. 일부 구체예들에서, siRNA는 효소적으로 또는 부분적/전체적 유기 합성에 의해 생성될 수 있으며, 그리고 변형된 리보뉴클레오티드는 시험관내 효소적 또는 유기 합성에 의해 도입될 수 있다. 특정 예들에서, 각 가닥은 화학적으로 제조된다. RNA 분자들을 합성하는 방법들, 예컨대, Verma 및 Eckstein (1998)에 기재된 또는 본 출원에 기재된 화학적 합성법들이 해당 분야에 공지되어 있다.

RNA 단리, RNA 합성, 핵산 혼성화, cDNA 라이브러리의 제작 및 선별, 및 PCR 실시 방법들은 해당 기술분야에 널리 공지이며 (예컨대, Gubler 및 Hoffman의, *Gene*, 25:263-269 (1983); Sambrook 등의, *supra*; Ausubel 등의, *supra*), PCR 방법들 또한 그러하다 (미국 특허 제 4,683,195 및 4,683,202; *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Innis 등의, eds, 1990) 참고). 발현 라이브러리 또한 해당 분야의 숙련된 기술자들에게 널리 공지되어 있다. 본 발명에서 사용하는 일반적인 방법들을 개시하는 또다른 기본 문헌들에는 Sambrook 등의, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (2nd ed. 1989); Kriegler, *Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual* (1990); and *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel 등의, eds., 1994)가 포함된다. 이를 참고문헌들의 개시내용은 실제로 본 출원에 온전히 참고문헌으로 포함된다.

바람직하게는, siRNA는 화학적으로 합성된다. 본 발명의 siRNA 분자들을 포함하는 오리고뉴클레오티드는 해당 분야에 공지된 임의의 다양한 기법들, 가령, Usman 등의, *J. Am. Chem. Soc.*, 109:7845 (1987); Scaringe 등의, *Nucl. Acids Res.*, 18:5433 (1990); Wincott 등의, *Nucl. Acids Res.*, 23:2677-2684 (1995); 및 Wincott 등의, *Methods Mol. Bio.*, 74:59 (1997)에 기재된 기법들을 사용하여 합성될 수 있다. 오리고뉴클레오티드의 합성은 통상의 핵산 보호기 및 커플링기, 가령, 5'-단부에서 디메톡시트리틸 및 3'-단부에서 포스포라미다이트를 사용한다. 비-제한적 예로서, 소규모 합성은 0.2 μmol 규모 프로토콜을 사용하여 Applied Biosystems 합성장치에서 수행될 수 있다. 대안적으로, 0.2 mmol 규모의 합성은 Protogene사 (Palo Alto, CA)의 96-웰 플레이트 합성장치에서 실시될 수 있다. 그러나 그보다 크거나 작은 규모의 합성 또한 본 발명의 범위에 속한다. 오리고뉴클레오티드 합성에 적합한 시약들, RNA 탈보호 방법, 및 RNA 정제 방법들은 해당 분야의 통상의 기술자들에게 공지이다.

siRNA 분자들은 2개의 별개의 오리고뉴클레오티드로부터 조합될 수 있으며, 여기서 하나의 오리고뉴클레오티드는 센스 가닥을 포함하고 다른 하나는 상기 siRNA의 안티센스 가닥을 포함한다. 예를 들면, 각각의 가닥은 별도로 합성되고 합성 및/또는 탈보호 후 혼성화 또는 라이케이션(ligation)에 의해 함께 결합될 수 있다.

#### [0183] 치료적 핵산을 함유하는 담체 시스템

##### [0184] A. 지질 입자들

특정 양태들에서, 본 발명은 하나 또는 그 이상의 siRNA 분자들 (예컨대, 표 A에 기재된 하나 또는 그 이상의 siRNA 분자들) 및 양이온성 (아미노) 지질 또는 이의 염 중 하나 또는 그 이상을 포함하는 지질 입자들을 제공한다. 일부 구체예들에서, 본 발명의 지질 입자들은 하나 또는 그 이상의 비-양이온성 지질을 추가로 포함한다. 그 외 구체예들에서, 지질 입자들은 입자 응집을 감소 또는 억제할 수 있는 하나 또는 그 이상의 복합 지질들을 추가로 포함한다.

본 발명의 지질 입자들은 바람직하게는 하나 또는 그 이상의 siRNA (예컨대, 표 A에 기재된 siRNA 분자들), 양이온성 지질, 비-양이온성 지질, 및 입자들의 응집을 억제하는 복합 지질을 포함한다. 일부 구체예들에서, siRNA 분자는 지질 입자의 지질 부위 내부에 완전히 캡슐화되어, 지질 입자 내 siRNA 분자가 수용액에서 뉴클레아제 분해에 대해 내성을 띠게 된다. 그 외 구체예들에서, 본 출원에 기재된 지질 입자들은 포유동물, 가령, 인간에 대해 실질적으로 비-독성이다. 본 발명의 지질 입자들은 전형적으로 약 30 nm 내지 약 150 nm, 약 40 nm 내지 약 150 nm, 약 50 nm 내지 약 150 nm, 약 60 nm 내지 약 130 nm, 약 70 nm 내지 약 110 nm, 또는 약 70 nm 내지 약 90 nm의 평균 직경을 가진다. 특정 구체예들에서, 본 발명의 지질 입자들은 약 30 nm 내지 약 150 nm의 중위 직경을 가진다. 본 발명의 지질 입자들은 또한 전형적으로 약 1:1 내지 약 100:1, 약 1:1 내지 약 50:1, 약 2:1 내지 약 25:1, 약 3:1 내지 약 20:1, 약 5:1 내지 약 15:1, 또는 약 5:1 내지 약 10:1의 지질:핵산 비(예컨대, 지질:siRNA 비) (질량/질량 비)를 가진다. 특정 구체예들에서, 핵산-지질 입자는 약 5:1 내지 약 15:1의 지질:siRNA 질량비를 가진다.

- [0187] 바람직한 구체예들에서, 본 발명의 지질 입자들은 혈청-안정성 핵산-지질 입자들이며, 하나 또는 그 이상의 siRNA 분자들 (예컨대, 표 A에 기재된 siRNA 분자), 양이온성 지질 (예컨대, 본 출원에 제시된 화학식 I-III 또는 이의 염의 하나 또는 그 이상의 양이온성 지질), 비-양이온성 지질 (예컨대, 하나 또는 그 이상의 인지질 및 콜레스테롤의 혼합물), 및 상기 입자들의 응집을 억제하는 복합 지질 (예컨대, 하나 또는 그 이상의 PEG-지질 접합체)을 포함한다. 지질 입자는 본 출원에 기재된 하나 또는 그 이상의 유전자들을 표적하는 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 또는 그 이상의 siRNA 분자들 (예컨대, 표 A에 기재된 siRNA 분자)을 포함할 수 있다. 핵산-지질 입자들 및 이의 제조 방법은, 예컨대, 미국 특허 제 5,753,613; 5,785,992; 5,705,385; 5,976,567; 5,981,501; 6,110,745; 및 6,320,017; 그리고 PCT 공개번호 제 WO 96/40964에 기재되어 있으며, 이들의 내용은 실제로 온전히 본 출원에 참고문헌으로 포함된다.
- [0188] 본 발명의 핵산-지질 입자들에서, 하나 또는 그 이상의 siRNA 분자들 (예컨대, 표 A에 기재된 siRNA 분자)은 입자의 지질 부위 내부에 완전히 캡슐화됨으로써, 뉴클레아제 분해로부터 siRNA를 보호할 수 있다. 특정 예들에서, 핵산-지질 입자 내 siRNA는 입자가 37°C에서 적어도 약 20, 30, 45, 또는 60분간 뉴클레아제에 노출된 후에도 실질적으로 분해되지 않는다. 그 외 특정 예들에서, 핵산-지질 입자 내 siRNA는 37°C의 혈청에서 적어도 약 30, 45, 또는 60분간 또는 적어도 약 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 또는 36 시간 동안 입자 배양 후에도 실질적으로 분해되지 않는다. 그 외 구체예들에서, siRNA는 입자의 지질 부위와 복합체를 이룬다. 본 발명의 제제들의 이점들 중 하나는 핵산-지질 입자 조성물이 포유동물, 가령, 인간에 실질적으로 비-독성이라는 점이다.
- [0189] 용어 "완전히 캡슐화된"은 핵산-지질 입자 내 siRNA (예컨대, 표 A에 기재된 siRNA 분자)가 유리 DNA 또는 RNA를 현저히 분해시키는 혈청 또는 뉴클레아제 분석에 노출된 후에도 현저히 분해되지 않음을 나타낸다. 완전히 캡슐화된 시스템에서, 일반적으로 유리 siRNA의 100%를 분해시키는 처리시 바람직하게는 입자 내 siRNA의 약 25% 미만이 분해되고, 더욱 바람직하게는 입자 내 siRNA의 약 10% 미만, 가장 바람직하게는 약 5% 미만이 분해된다. "완전히 캡슐화된"은 또한 핵산-지질 입자들이 혈청-안정성임을, 즉, 입자들이 생체내 투여시 이들 입자들의 구성요소부들로 급속히 분해하지 않음을 나타낸다.
- [0190] 핵산에 관한 내용에서, 완전한 캡슐화는 불투막성 형광 염료 배제 분석법을 실시함으로써 결정될 수 있는데, 이 분석법은 핵산과 조합시 형광이 증강되는 염료를 사용한다. 특정 염료들, 가령, OliGreen® 및 RiboGreen® (Invitrogen Corp.; Carlsbad, CA)이 플라스미드 DNA, 단일-가닥 데옥시리보뉴클레오티드, 및/또는 단일- 또는 이중-가닥 리보뉴클레오티드의 정량적 결정에 이용될 수 있다. 캡슐화는 리포좀 제제에 이러한 염료를 추가하고, 생성된 형광을 측정하고, 이를 소량의 비이온성 세제를 추가시 관찰되는 형광과 비교함으로써 결정된다. 리포좀 이중층의 세제-매개 과정은 캡슐화된 핵산을 방출시키며, 이는 캡슐화된 핵산으로 하여금 불투막성 염료와 상호작용 할 수 있게 한다. 핵산 캡슐화는  $E = (I_0 - I)/I_0$ 로 계산될 수 있는데, 여기서  $I$  및  $I_0$ 는 세제 추가 전과 후의 형광 강도를 의미한다 (Wheeler 등, *Gene Ther.*, 6:271-281 (1999) 참고).
- [0191] 그 외 구체예들에서, 본 발명은 복수의 핵산-지질 입자들을 포함하는 핵산-지질 입자 조성물을 제공한다.
- [0192] 일부 예들에서, 핵산-지질 입자 조성물은 입자들의 지질 부위 내에 완전히 캡슐화된 siRNA 분자를 포함하며, 그리하여 입자들의 약 30% 내지 약 100%, 약 40% 내지 약 100%, 약 50% 내지 약 100%, 약 60% 내지 약 100%, 약 70% 내지 약 100%, 약 80% 내지 약 100%, 약 90% 내지 약 100%, 약 30% 내지 약 95%, 약 40% 내지 약 95%, 약 50% 내지 약 95%, 약 60% 내지 약 95%, 약 70% 내지 약 95%, 약 80% 내지 약 95%, 약 85% 내지 약 95%, 약 90% 내지 약 95%, 약 30% 내지 약 90%, 약 40% 내지 약 90%, 약 50% 내지 약 90%, 약 60% 내지 약 90%, 약 70% 내지 약 90%, 약 80% 내지 약 90%, 또는 적어도 약 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% (또는 이의 임의의 부분 또는 이에 속하는 임의의 범위)가 내부에 캡슐화된 siRNA를 가진다.
- [0193] 그 외 예들에서, 핵산-지질 입자 조성물은 입자들의 지질 부위 내에 완전히 캡슐화된 siRNA를 포함하고, 그리하여 투입 siRNA의 약 30% 내지 약 100%, 약 40% 내지 약 100%, 약 50% 내지 약 100%, 약 60% 내지 약 100%, 약 70% 내지 약 100%, 약 80% 내지 약 100%, 약 90% 내지 약 100%, 약 30% 내지 약 95%, 약 40% 내지 약 95%, 약 50% 내지 약 95%, 약 60% 내지 약 95%, 약 70% 내지 약 95%, 약 80% 내지 약 95%, 약 85% 내지 약 95%, 약 90% 내지 약 95%, 약 30% 내지 약 90%, 약 40% 내지 약 90%, 약 50% 내지 약 90%, 약 60% 내지 약 90%, 약 70% 내지 약 90%, 약 80% 내지 약 90%, 또는 적어도 약 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% (또는 이의 임의의 부분 또는 이에 속하는 임의의 범위)가 내부에 캡슐화된 siRNA를 가진다.

의 범위)가 입자들에 캡슐화된다.

[0194] 본 발명의 지질 입자들의 사용 의도에 따라, 상기 성분들의 비율은 달라질 수 있으며, 특정 제제의 전달 효율은, 예컨대, 엔도솜 방출 지표 (ERP) 분석법을 사용하여 측정될 수 있다.

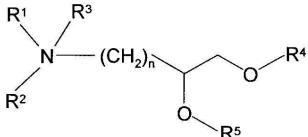
### 1. 양이온성 지질

[0196] 여러가지 임의의 양이온성 지질 또는 이의 염이 본 발명의 지질 입자들에서 단독으로 또는 하나 또는 그 이상의 그 외 양이온성 지질 종들 또는 비-양이온성 지질 종들과 조합하여 사용될 수 있다. 양이온성 지질들은 이의 (R) 및/또는 (S) 거울상 이성질체를 포함한다.

[0197] 본 발명의 한 양태에서, 양이온성 지질은 디알킬 지질이다. 예를 들면, 디알킬 지질들은 2개의 포화 또는 불포화 알킬 사슬을 포함하는 지질들을 포함할 수 있으며, 여기서 각각의 알킬 사슬은 치환되거나 비치환될 수 있다. 특정 구체예들에서, 2개의 알킬 사슬 각각은 적어도, 예컨대, 8개 탄소 원자들, 10개 탄소 원자들, 12개 탄소 원자들, 14개 탄소 원자들, 16개 탄소 원자들, 18개 탄소 원자들, 20개 탄소 원자들, 22개 탄소 원자들 또는 24개 탄소 원자들을 포함한다.

[0198] 본 발명의 한 양태에서, 양이온성 지질은 트리알킬 지질이다. 예를 들면, 트리알킬 지질들은 3개의 포화 또는 불포화 알킬 사슬을 포함하는 지질들을 포함할 수 있으며, 여기서 각각의 알킬 사슬은 치환되거나 비치환될 수 있다. 특정 구체예들에서, 3개의 알킬 사슬 각각은 적어도, 예컨대, 8개 탄소 원자들, 10개 탄소 원자들, 12개 탄소 원자들, 14개 탄소 원자들, 16개 탄소 원자들, 18개 탄소 원자들, 20개 탄소 원자들, 22개 탄소 원자들 또는 24개 탄소 원자들을 포함한다.

[0199] 한 양태에서, 다음 구조를 가지는 화학식 I의 양이온성 지질들 또는 이의 염이 본 발명에서 유용하다:



[0200]

[0201] (I),

[0202] 여기서:

[0203] R<sup>1</sup> 및 R<sup>2</sup>는 동일하거나 상이하고, 독립적으로 수소 (H) 또는 선택적으로 치환된 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 알킬, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> 알케닐, 또는 C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> 알키닐이거나, 또는 R<sup>1</sup> 및 R<sup>2</sup>는 결합하여 4 내지 6개의 탄소 원자들 및 질소 (N), 산소 (O), 그리고 이의 혼합물로 구성된 그룹에서 선택된 1 또는 2개의 헤테로원자들의 선택적으로 치환된 헤테로사이클릭 고리를 형성 할 수 있으며;

[0204] R<sup>3</sup>는 존재하지 않거나 수소 (H) 또는 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 알킬로 4차 아민을 제공하고;

[0205] R<sup>4</sup> 및 R<sup>5</sup>는 동일하거나 상이하고, 독립적으로 선택적으로 치환된 C<sub>10</sub>-C<sub>24</sub> 알킬, C<sub>10</sub>-C<sub>24</sub> 알케닐, C<sub>10</sub>-C<sub>24</sub> 알키닐, 또는 C<sub>10</sub>-C<sub>24</sub> 아실이며, 여기서 R<sup>4</sup> 및 R<sup>5</sup> 중 적어도 1개는 적어도 2개의 불포화 부위들을 포함하고; 그리고

[0206] n은 0, 1, 2, 3, 또는 4이다.

[0207] 일부 구체예들에서, R<sup>1</sup> 및 R<sup>2</sup>는 독립적으로, 선택적으로 치환된 C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 알킬, C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub> 알케닐, 또는 C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub> 알키닐이다. 한 바람직한 구체예에서, R<sup>1</sup> 및 R<sup>2</sup>는 모두 메틸 그룹이다. 그 외 바람직한 구체예들에서, n은 1 또는 2이다. 그 외 구체예들에서, R<sup>3</sup>은 pH가 양이온성 지질의 pK<sub>a</sub> 이상인 경우 존재하지 않으며 R<sup>3</sup>은 pH가 양이온성 지질의 pK<sub>a</sub> 이하여서 아미노 헤드 그룹이 양성자화되는 경우 수소이다. 한 대안적 구체예에서, R<sup>3</sup>은 선택적으로 치환된 C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 알킬로 4차 아민을 제공한다. 또 다른 구체예들에서, R<sup>4</sup> 및 R<sup>5</sup>는 독립적으로 선택적으로 치환된 C<sub>12</sub>-C<sub>20</sub> 또는 C<sub>14</sub>-C<sub>22</sub> 알킬, C<sub>12</sub>-C<sub>20</sub> 또는 C<sub>14</sub>-C<sub>22</sub> 알케닐, C<sub>12</sub>-C<sub>20</sub> 또는 C<sub>14</sub>-C<sub>22</sub> 알키닐, 또는 C<sub>12</sub>-C<sub>20</sub> 또는 C<sub>14</sub>-C<sub>22</sub>

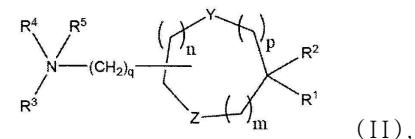
아실이고, 여기서  $R^4$  및  $R^5$  중 적어도 1개는 적어도 2개의 불포화 부위들을 포함한다.

[0208] 특정 구체예들에서,  $R^4$  및  $R^5$ 는 도데카디에닐 모이어티, 테트라데카디에닐 모이어티, 헥사데카디에닐 모이어티, 옥타데카디에닐 모이어티, 아이코사디에닐 모이어티, 도데카트리에닐 모이어티, 테트라덱트리에닐 모이어티, 헥사데카트리에닐 모이어티, 옥타데카트리에닐 모이어티, 아이코사트리에닐 모이어티, 아라키도닐 모이어티, 및 도코사헥사에노일 모이어티로 구성된 그룹, 뿐만 아니라 이의 아실 유도체들 (예컨대, 리놀레오일, 리놀레노일,  $\gamma$ -리놀레노일등.)에서 독립적으로 선택된다. 일부 예들에서,  $R^4$  및  $R^5$  중 하나는 측쇄 알킬 그룹 (예컨대, 피타닐 모이어티) 또는 이의 아실 유도체 (예컨대, 피타노일 모이어티)를 포함한다. 특정 예들에서, 옥타데카디에닐 모이어티는 리놀레일 모이어티이다. 그 외 특정 예들에서, 옥타데카트리에닐 모이어티는 리놀레닐 모이어티 또는  $\gamma$ -리놀레닐 모이어티이다. 특정 구체예들에서,  $R^4$  및  $R^5$ 는 모두 리놀레일 모이어티, 리놀레닐 모이어티, 또는  $\gamma$ -리놀레닐 모이어티이다. 특정 구체예들에서, 화학식 I의 양이온성 지질은 1,2-디리놀레일옥시-N,N-디메틸아미노프로판 (DLinDMA), 1,2-디리놀레닐옥시-N,N-디메틸아미노프로판 (DLenDMA), 1,2-디리놀레일옥시-(N,N-디메틸)-부틸-4-아민 (C2-DLinDMA), 1,2-디리놀레오일옥시-(N,N-디메틸)-부틸-4-아민 (C2-DLinDAP), 또는 이의 혼합물이다.

[0209] 일부 구체예들에서, 화학식 I의 양이온성 지질은 하나 또는 그 이상의 음이온들과 염 (바람직하게는 결정질 염)을 형성한다. 한 특정 구체예에서, 화학식 I의 양이온성 지질은 이의 옥살레이트 (예컨대, 헤미옥살레이트) 염이고, 이는 바람직하게는 결정질 염이다.

[0210] 양이온성 지질들, 가령, DLinDMA 및 DLenDMA, 뿐만 아니라 또 다른 양이온성 지질들의 합성은, 미국 특허 공개번호 제 20060083780에 기재되어 있으며, 그 내용은 본 출원에 실제로 온전히 참고문헌으로 포함된다. 양이온성 지질들, 가령, C2-DLinDMA 및 C2-DLinDAP, 뿐만 아니라 또 다른 양이온성 지질들의 합성은, 국제 특허 출원 번호 WO2011/000106에 기재되어 있으며, 그 내용은 본 출원에 실제로 온전히 참고문헌으로 포함된다.

[0211] 또 다른 양태에서, 다음 구조를 가지는 화학식 II의 양이온성 지질들 (또는 이의 염)이 본 발명에서 유용하다:



[0213] 여기서  $R^1$  및  $R^2$ 은 동일하거나 상이하고, 독립적으로 치환된  $C_{12}$ - $C_{24}$  알킬,  $C_{12}$ - $C_{24}$  알케닐,  $C_{12}$ - $C_{24}$  알키닐, 또는  $C_{12}$ - $C_{24}$  아실이거나;  $R^3$  및  $R^4$ 는 동일하거나 상이하고, 독립적으로 치환된  $C_1$ - $C_6$  알킬,  $C_2$ - $C_6$  알케닐, 또는  $C_2$ - $C_6$  알키닐이거나, 또는  $R^3$  및  $R^4$ 는 결합하여 4 내지 6개 탄소 원자들 및 질소 및 산소에서 선택된 1 또는 2개 헤테로원자들의 선택적으로 치환된 헤테로사이클릭 고리를 형성할 수 있고;  $R^5$ 는 존재하지 않거나 수소 (H) 또는  $C_1$ - $C_6$  알킬로 4차 아민을 제공하고;  $m$ ,  $n$ , 및  $p$ 는 동일하거나 상이하고 독립적으로 0, 1, 또는 2이며,  $m$ ,  $n$ , 및  $p$ 는 동시에 0이 아니고;  $q$ 는 0, 1, 2, 3, 또는 4이고; 그리고  $Y$  및  $Z$ 는 동일하거나 상이하고 독립적으로 0, S, 또는 NH임을 조건으로 한다. 한 바람직한 구체예에서,  $q$ 는 2이다.

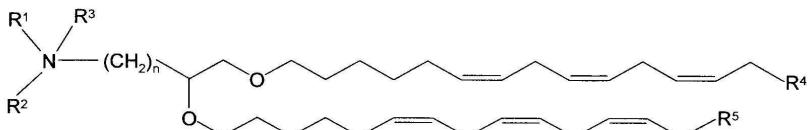
[0214] 일부 구체예들에서, 화학식 II의 양이온성 지질은 2,2-디리놀레일-4-(2-디메틸아미노에틸)-[1,3]-디옥솔란 (DLin-K-C2-DMA; "XTC2" 또는 "C2K"), 2,2-디리놀레일-4-(3-디메틸아미노프로필)-[1,3]-디옥솔란 (DLin-K-C3-DMA; "C3K"), 2,2-디리놀레일-4-(4-디메틸아미노부틸)-[1,3]-디옥솔란 (DLin-K-C4-DMA; "C4K"), 2,2-디리놀레일-5-디메틸아미노메틸-[1,3]-디옥산 (DLin-K6-DMA), 2,2-디리놀레일-4-N-메틸페피아지노-[1,3]-디옥솔란 (DLin-K-MPZ), 2,2-디리놀레일-4-디메틸아미노메틸-[1,3]-디옥솔란 (DLin-K-DMA), 2,2-디올레오일-4-디메틸아미노메틸-[1,3]-디옥솔란 (DO-K-DMA), 2,2-디스테아로일-4-디메틸아미노메틸-[1,3]-디옥솔란 (DS-K-DMA), 2,2-디리놀레일-4-N-모르폴리노-[1,3]-디옥솔란 (DLin-K-MA), 2,2-디리놀레일-4-트리메틸아미노-[1,3]-디옥솔란 클로라이드 (DLin-K-TMA.C1), 2,2-디리놀레일-4,5-비스(디메틸아미노메틸)-[1,3]-디옥솔란 (DLin-K<sup>2</sup>-DMA), 2,2-디리놀레일-4-메틸페페르진-[1,3]-디옥솔란 (D-Lin-K-N-메틸페페르진), 또는 이의 혼합물이다. 바람직한 구체예들에서, 화학식 II의 양이온성 지질은 DLin-K-C2-DMA이다.

[0215] 일부 구체예들에서, 화학식 II의 양이온성 지질은 하나 또는 그 이상의 음이온들과 염 (바람직하게는 결정질

염)을 형성한다. 한 특정 구체예에서, 화학식 II의 양이온성 지질은 이의 옥살레이트 (예컨대, 헤미옥살레이트) 염이고, 이는 바람직하게는 결정질 염이다.

[0216] 양이온성 지질, 가령, DLin-K-DMA, 뿐만 아니라 또다른 양이온성 지질들의 합성은, PCT 공개번호 제 WO 09/086558에 기재되어 있으며, 그 내용은 본 출원에 실제로 온전히 참고문헌으로 포함된다. 양이온성 지질들, 가령, DLin-K-C2-DMA, DLin-K-C3-DMA, DLin-K-C4-DMA, DLin-K-K6-DMA, DLin-K-MPZ, DO-K-DMA, DS-K-DMA, DLin-K-MA, DLin-K-TMA.C1, DLin-K<sup>2</sup>-DMA, 및 D-Lin-K-N-메틸피페르진, 뿐만 아니라 또다른 양이온성 지질들의 합성은, 2009년 10월 9일 출원된 발명의 명칭 "Improved Amino Lipids and Methods for the Delivery of Nucleic Acids"의 PCT 출원 제 PCT/US2009/060251에 기재되어 있으며, 그 내용은 본 출원에 실제로 온전히 참고문헌으로 포함된다.

[0217] 또다른 양태에서, 한 양태에서, 다음 구조를 가지는 화학식 III의 양이온성 지질들 또는 이의 염이 본 발명에서 유용하다:



[0218]

(III)

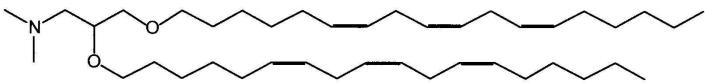
[0219] 여기서: R<sup>1</sup> 및 R<sup>2</sup>는 동일하거나 상이하고, 독립적으로, 선택적으로 치환된 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 알킬, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> 알케닐, 또는 C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> 알키닐이거나, 또는 R<sup>1</sup> 및 R<sup>2</sup>는 결합하여 4 내지 6개 탄소 원자들 및 질소 (N), 산소 (O), 및 이의 혼합물로 구성된 그룹에서 선택된 1 또는 2개 혼테로원자들의 선택적으로 치환된 혼테로사이클릭 고리를 형성할 수 있으며; R<sup>3</sup>은 존재하지 않거나 수소 (H) 또는 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 알킬로 4차 아민을 제공하고; R<sup>4</sup> 및 R<sup>5</sup>는 존재하지 않거나 존재하며, 존재할 경우 동일하거나 상이하고, 독립적으로, 선택적으로 치환된 C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 알킬 또는 C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> 알케닐이며; 그리고 n은 0, 1, 2, 3, 또는 4이다.

[0220] 일부 구체예들에서, R<sup>1</sup> 및 R<sup>2</sup>는 독립적으로, 선택적으로 치환된 C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 알킬, C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub> 알케닐, 또는 C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub> 알키닐이다. 한 바람직한 구체예에서, R<sup>1</sup> 및 R<sup>2</sup>는 모두 메틸 그룹이다. 또다른 바람직한 구체예에서, R<sup>4</sup> 및 R<sup>5</sup>는 모두 부틸 그룹이다. 또한 또다른 바람직한 구체예에서, n은 1이다. 그 외 구체예들에서, R<sup>3</sup>은 pH가 양이온성 지질의 pK<sub>a</sub> 이상인 경우 존재하지 않으며 R<sup>3</sup>은 pH가 양이온성 지질의 pK<sub>a</sub> 이하여서 아미노 헤드 그룹이 양성자화 되는 경우 수소이다. 한 대안적 구체예에서, R<sup>3</sup>은 선택적으로 치환된 C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 알킬로 4차 아민을 제공한다. 또다른 구체예들에서, R<sup>4</sup> 및 R<sup>5</sup>는 독립적으로 선택적으로 치환된 C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> 또는 C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub> 알킬 또는 C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> 또는 C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub> 알케닐이다.

[0221] 한 대안적 구체예에서, 화학식 III의 양이온성 지질은 알킬 사슬 중 하나 또는 두개와 아미노 헤드 그룹 간 에스테르 연결을 포함한다. 일부 구체예들에서, 화학식 III의 양이온성 지질은 하나 또는 그 이상의 음이온들과 염 (바람직하게는 결정질 염)을 형성한다. 한 특정 구체예에서, 화학식 III의 양이온성 지질은 이의 옥살레이트 (예컨대, 헤미옥살레이트) 염이고, 이는 바람직하게는 결정질 염이다.

[0222] 화학식 III의 알킬 사슬 각각은 위치 6, 9, 및 12에서 시스 이중 결합을 함유하지만 (즉, 시스, 시스, 시스-Δ<sup>6</sup>, Δ<sup>9</sup>, Δ<sup>12</sup>), 한 대안적 구체예에서, 하나 또는 두개의 알킬 사슬에서의 이러한 이중 결합들 중 1, 2 또는 3개는 트랜스 배열로 존재할 수 있다.

[0224] 한 바람직한 특정 구체예에서, 화학식 III의 양이온성 지질은 다음 구조를 가진다:



[0225]

[0226]  $\gamma$ -DLenDMA (15).

[0227] 양이온성 지질들, 가령,  $\gamma$ -DLenDMA (15), 뿐만 아니라 또 다른 양이온성 지질들의 합성은, 2009년 7월 1일 출원된 발명의 명칭 "Improved Cationic Lipids and Methods for the Delivery of Nucleic Acids,"의 미국 출원 제 61/222,462에 기재되어 있으며, 그 내용은 본 출원에 실제로 온전히 참고문헌으로 포함된다.

[0228]

양이온성 지질들, 가령, DLin-M-C3-DMA ("MC3"), 뿐만 아니라 또 다른 양이온성 지질들 (예컨대, MC3의 특정 유사체)의 합성은, 2009년 6월 10일 출원된 발명의 명칭 "Novel Lipids and Compositions for the Delivery of Therapeutics"의 미국 출원 제 61/185,800에 기재되어 있으며, 그 내용은 본 출원에 실제로 온전히 참고문헌으로 포함된다.

[0229]

본 발명의 지질 입자들에 포함될 수 있는 그 외 양이온성 지질들 또는 이의 염의 예들에는, 가령, WO2011/000106 (그 내용은 본 출원에 실제로 온전히 참고문헌으로 포함된다)에 기재된 양이온성 지질들, 뿐만 아니라 양이온성 지질들, 가령, N,N-디올레일-N,N-디메틸암모늄 클로라이드 (DODAC), 1,2-디올레일옥시-N,N-디메틸아미노프로판 (DODMA), 1,2-디스테아릴옥시-N,N-디메틸아미노프로판 (DSDMA), N-(1-(2,3-디올레일옥시)프로필)-N,N,N-트리메틸암모늄 클로라이드 (DOTMA), N,N-디스테아릴-N,N-디메틸암모늄 브로마이드 (DDAB), N-(1-(2,3-디올레일옥시)프로필)-N,N,N-트리메틸암모늄 클로라이드 (DOTAP), 3-(N-(N',N'-디메틸아미노에탄)-카르바모일)콜레스테롤 (DC-Chol), N-(1,2-디미리스틸옥시프로포-3-일)-N,N-디메틸-N-하이드록시에틸 암모늄 브로마이드 (DMRIE), 2,3-디올레일옥시-N-[2(스페르민-카르복스아미도)에틸]-N,N-디메틸-1-프로판아미니움트리플루오로아세테이트 (DOSPA), 디옥타데실아미도글리실 스페르민 (DOGS), 3-디메틸아미노-2-(콜레스트-5-엔-3-베타-옥시부탄-4-옥시)-1-(시스,시스-9,12-옥타데카디엔옥시)프로판 (CLinDMA), 2-[5'-(콜레스트-5-엔-3-베타-옥시)-3'-옥사펜토시)-3-디메티-1-(시스,시스-9',1-2'-옥타데카디엔옥시)프로판 (CpLinDMA), N,N-디메틸-3,4-디올레일옥시벤질아민 (DMOBA), 1,2-N,N'-디올레일카르바밀-3-디메틸아미노프로판 (DOcarbDAP), 1,2-N,N'-디리놀레일카르바밀-3-디메틸아미노프로판 (DLincarbDAP), 1,2-디리놀레일카르바모일옥시-3-디메틸아미노프로판 (DLin-C-DAP), 1,2-디리놀레이옥시-3-(디메틸아미노)아세톡시프로판 (DLin-DAC), 1,2-디리놀레이옥시-3-모르폴리노프로판 (DLin-MA), 1,2-디리놀레오일-3-디메틸아미노프로판 (DLinDAP), 1,2-디리놀레일티오-3-디메틸아미노프로판 (DLin-S-DMA), 1-리놀레오일-2-리놀레일옥시-3-디메틸아미노프로판 (DLin-2-DMAP), 1,2-디리놀레일옥시-3-트리메틸아미노프로판 클로라이드 염 (DLin-TMA.C1), 1,2-디리놀레오일-3-트리메틸아미노프로판 클로라이드 염 (DLin-TAP.C1), 1,2-디리놀레이옥시-3-(N-메틸피페라지노)프로판 (DLin-MPZ), 3-(N,N-디리놀레일아미노)-1,2-프로판디올 (DLinAP), 3-(N,N-디올레일아미노)-1,2-프로판디오 (DOAP), 1,2-디리놀레일옥소-3-(2-N,N-디메틸아미노)에톡시프로판 (DLin-EG-DMA), 1,2-디오에일카르바모일옥시-3-디메틸아미노프로판 (DO-C-DAP), 1,2-디미리스톨레오일-3-디메틸아미노프로판 (DMDAP), 1,2-디올레오일-3-트리메틸아미노프로판 클로라이드 (DOTAP.C1), 디리놀레일메틸-3-디메틸아미노프로페오네이트 (DLin-M-C2-DMA; DLin-M-K-DMA 또는 DLin-M-DMA로도 공지됨), 및 이의 혼합물이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 지질 입자들에 포함될 수 있는 또 다른 양이온성 지질들 또는 이의 염은 미국 특허 출원 제 20090023673에 기재되어 있으며, 그 내용은 본 출원에 실제로 온전히 참고문헌으로 포함된다.

[0230]

양이온성 지질들, 가령, CLinDMA, 뿐만 아니라 또 다른 양이온성 지질들의 합성은, 미국 특허 출원 제 20060240554에 기재되어 있으며, 그 내용은 본 출원에 실제로 온전히 참고문헌으로 포함된다. 양이온성 지질, 가령, DLin-C-DAP, DLinDAC, DLinMA, DLinDAP, DLin-S-DMA, DLin-2-DMAP, DLinTMA.C1, DLinTAP.C1, DLinMPZ, DLinAP, DOAP, 및 DLin-EG-DMA, 뿐만 아니라 또 다른 양이온성 지질들의 합성은, PCT 출원 제 WO 09/086558에 기재되어 있으며, 그 내용은 본 출원에 실제로 온전히 참고문헌으로 포함된다. 양이온성 지질들, 가령, DO-C-DAP, DMDAP, DOTAP.C1, DLin-M-C2-DMA, 뿐만 아니라 또 다른 양이온성 지질들의 합성은, 2009년 10월 9일 출원된 발명의 명칭 "Improved Amino Lipids and Methods for the Delivery of Nucleic Acids"의 PCT 출원 제 PCT/US2009/060251에 기재되어 있으며, 그 내용은 본 출원에 실제로 온전히 참고문헌으로 포함된다. 수많은 그 외 양이온성 지질들 및 관련 유사체의 합성은 미국 특허 제 5,208,036; 5,264,618; 5,279,833; 5,283,185; 5,753,613; 및 5,785,992; 및 PCT 출원 제 WO 96/10390에 기재된 바 있으며, 이들의 내용은 실제로 온전히 본 출원에 참고문헌으로 포함된다. 추가적으로, 수많은 시판 양이온성 지질 제제들, 가령, 예컨대, 리포펙틴

(LIPOFECTIN)<sup>®</sup> (DOTMA 및 DOPE 포함, Invitrogen사로부터 구입가능); 리포펙타민(LIPOFECTAMINE)<sup>®</sup> (DOSPA 및 DOPE 포함, Invitrogen사로부터 구입가능); 및 트랜스펙탐(TRANSFECTAM)<sup>®</sup> (DOGS 포함, Promega Corp.사로부터 구입가능)이 사용될 수 있다.

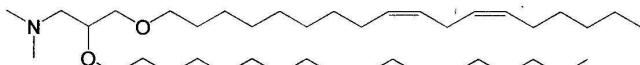
[0231] 일부 구체예들에서, 양이온성 지질은 입자 내 존재하는 총 지질의 약 50 몰% 내지 약 90 몰%, 약 50 몰% 내지 약 85 몰%, 약 50 몰% 내지 약 80 몰%, 약 50 몰% 내지 약 75 몰%, 약 50 몰% 내지 약 70 몰%, 약 50 몰% 내지 약 65 몰%, 약 50 몰% 내지 약 60 몰%, 약 55 몰% 내지 약 65 몰%, 또는 약 55 몰% 내지 약 70 몰% (또는 이의 임의의 부분 또는 이에 속하는 임의의 범위)를 포함한다. 특정 구체예들에서, 양이온성 지질은 입자 내 존재하는 총 지질의 약 50 몲%, 51 몲%, 52 몲%, 53 몲%, 54 몲%, 55 몲%, 56 몲%, 57 몲%, 58 몲%, 59 몲%, 60 몲%, 61 몲%, 62 몲%, 63 몲%, 64 몲%, 또는 65 몲% (또는 이의 임의의 부분)를 포함한다.

[0232] 그 외 구체예들에서, 양이온성 지질은 입자 내 존재하는 총 지질의 약 2 몲% 내지 약 60 몲%, 약 5 몲% 내지 약 50 몲%, 약 10 몲% 내지 약 50 몲%, 약 20 몲% 내지 약 50 몲%, 약 20 몲% 내지 약 40 몲%, 약 30 몲% 내지 약 40 몲%, 또는 약 40 몲% (또는 이의 임의의 부분 또는 이에 속하는 임의의 범위)를 포함한다.

[0233] 본 발명의 지질 입자들에서 사용하기에 적합한 양이온성 지질들의 추가 백분율 및 범위들은 PCT 공개번호 제 WO 09/127060, 미국 공개 출원 제 US 2011/0071208, PCT 공개번호 제 WO2011/000106, 및 미국 공개 출원 제 US 2011/0076335에 기재되어 있으며, 이들의 내용은 설계적으로 본 출원에 온전히 참고문헌으로 포함된다.

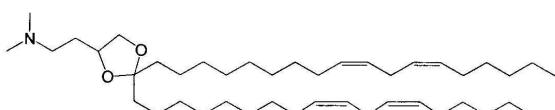
[0234] 본 발명의 지질 입자들에 존재하는 양이온성 지질의 백분율은 목표량이며, 제제 내 존재하는 양이온성 지질의 실제량은 예를 들면, ± 5 몲% 만큼 달라질 수 있음을 이해하여야 한다. 예를 들면, 한 예시적 지질 입자 제제에서, 양이온성 지질의 목표량은 57.1 몲%이지만, 양이온성 지질의 실제량은 목표량의 ± 5 몲%, ± 4 몲%, ± 3 몲%, ± 2 몲%, ± 1 몲%, ± 0.75 몲%, ± 0.5 몲%, ± 0.25 몲%, 또는 ± 0.1 몲%일 수 있으며, 제제의 잔부는 그 외 지질 성분들로 채워진다 (입자 내 존재하는 총 지질의 최대 100 몲%까지 첨가; 그러나 해당 분야의 통상의 기술자는 총 몲%가 반올림으로 인해 100%에서 약간 벗어날 수 있음, 예를 들면, 99.9 몲% 또는 100.1 몲%일 수 있음을 이해할 것이다.).

[0235] 본 발명에 사용되는 지질 입자들에 포함시키기에 유용한 양이온성 지질들의 또다른 예들이 하기에 나타나있다:



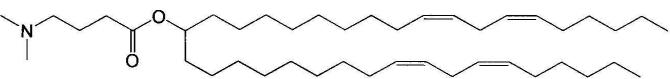
[0236]

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



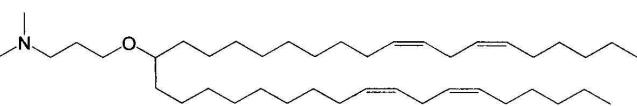
[0238]

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



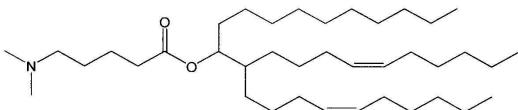
[0240]

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



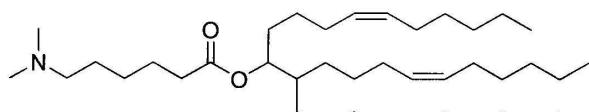
[0242]

[0243] 3-((6Z,9Z,28Z,31Z)-헵타트리아콘타-6,9,28,31-테트라엔-19-일옥시)-N,N-디메틸프로판-1-아민 (8)



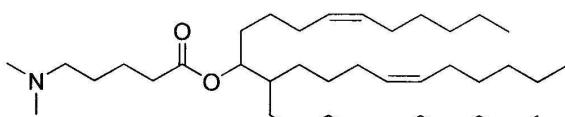
[0244]

[0245] (Z)-12-((Z)-덱-4-엔일)도코스-16-엔-11-일 5-(디메틸아미노)펜타노에이트 (53)



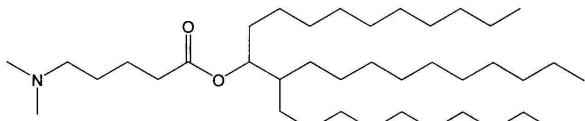
[0246]

[0247] (6Z,16Z)-12-((Z)-덱-4-엔일)도코사-6,16-디엔-11-일 6-(디메틸아미노)헥사노에이트 (11)



[0248]

[0249] (6Z,16Z)-12-((Z)-덱-4-엔일)도코사-6,16-디엔-11-일 5-(디메틸아미노)펜타노에이트 (13)



[0250]

[0251] 12-데실도코산-11-일 5-(디메틸아미노)펜타노에이트 (14).

## 2. 비-양이온성 지질

[0253] 본 발명의 지질 임자들에서 사용되는 비-양이온성 지질들은 안정한 복합체를 생성할 수 있는 다양한 임의의 중성의 하전되지 않은, 양쪽성이온 또는 음이온성 지질들일 수 있다.

[0254] 비-양이온성 지질들의 비-제한적 예들에는 인지질, 가령, 레시틴, 포스파티딜에탄올아민, 리소레시틴, 라이소포스파티딜에탄올아민, 포스파티딜세린, 포스파티딜이노시톨, 스핑고미엘린, 에그(egg) 스핑고미엘린 (ESM), 세팔린, 카르디올리핀, 포스파티딘산, 세레브로시드, 디세틸포스페이트, 디스테아로일포스파티딜콜린 (DSPC), 디올레오일포스파티딜콜린 (DOPC), 디팔미토일포스파티딜콜린 (DPPC), 디올레오일포스파티딜글리세롤 (DOPG), 디팔미토일포스파티딜글리세롤 (DPPG), 디올레오일포스파티딜에탄올아민 (DOPE), 팔미토일올레오일-포스파티딜콜린 (POPC), 팔미토일올레오일-포스파티딜에탄올아민 (POPE), 팔미토일올레이올-포스파티딜글리세롤 (POPG), 디올레오일포스파티딜에탄올아민 4-(N-말레이이미도메틸)-시클로헥산-1-카르복실레이트 (DOPE-말), 디팔미토일-포스파티딜에탄올아민 (DPPE), 디미리스토일-포스파티딜에탄올아민 (DMPE), 디스테아로일-포스파티딜에탄올아민 (DSPE), 모노메틸-포스파티딜에탄올아민, 디메틸-포스파티딜에탄올아민, 디엘라이도일-포스파티딜에탄올아민 (DEPE), 스테아로일올레오일-포스파티딜에탄올아민 (SOPE), 라이소포스파티딜콜린, 디리놀레오일포스파티딜콜린, 및 이의 혼합물이 포함된다. 그 외 디아실포스파티딜콜린 및 디아실포스파티딜에탄올아민 인지질 또한 사용될 수 있다. 이를 지질들 내 아실 그룹은 바람직하게는 C<sub>10</sub>-C<sub>24</sub> 탄소 사슬을 가지는 지방산으로부터 유도된 아실 그룹들, 예컨대, 라우로일, 미리스토일, 팔미토일, 스테아로일, 또는 올레오일이다.

[0255] 비-양이온성 지질들의 추가 예들은 스테롤, 가령, 콜레스테롤 및 이의 유도체들을 포함한다. 콜레스테롤 유도체의 비-제한적 예들에는 극성 유사체들, 가령, 5α-콜레스탄올, 5β-코프로스탄올, 콜레스테릴-(2'-하이드록시)-에틸 에테르, 콜레스테릴-(4'-하이드록시)-부틸 에테르, 및 6-케토콜레스타놀; 비-극성 유사체들, 가령, 5α-콜레스탄, 콜레스테논, 5α-콜레스타논, 5β-콜레스타논, 및 콜레스테릴 데카노에이트; 및 이의 혼합물이 포함된다. 바람직한 구체예들에서, 콜레스테롤 유도체는 극성 유사체, 가령, 콜레스테릴-(4'-하이드록시)-부틸 에테르이다. 콜레스테릴-(2'-하이드록시)-에틸 에테르의 합성은 PCT 공개번호 제 WO 09/127060에 기재되어 있으며, 그 내용은 본 출원에 실제로 온전히 참고문헌으로 포함된다.

- [0256] 일부 구체예들에서, 지질 입자들에 존재하는 비-양이온성 지질은 하나 또는 그 이상의 인지질 및 콜레스테롤 또는 이의 유도체의 혼합물을 포함하거나 이들로 구성된다. 그 외 구체예들에서, 지질 입자들에 존재하는 비-양이온성 지질은 하나 또는 그 이상의 인지질, 예컨대, 무-콜레스테롤(cholesterol-free) 지질 입자 제제를 포함하거나 이들로 구성된다. 또한 그 외 구체예들에서, 지질 입자들에 존재하는 비-양이온성 지질은 콜레스테롤 또는 이의 유도체, 예컨대, 무-인지질(phospholipid-free) 지질 입자 제제를 포함하거나 이들로 구성된다.
- [0257] 본 발명에 사용하기에 적합한 비-양이온성 지질들의 다른 예들은 인-불포함 지질, 가령, 예컨대, 스테아릴아민, 도데실아민, 헥사데실아민, 아세틸 팔미테이트, 글리세롤리시놀레이트, 헥사데실 스테아레이트, 이소프로필 미리스테이트, 양쪽성 아크릴 폴리머, 트리에탄올아민-라우릴 설페이트, 알킬-아릴 설페이트 폴리에틸옥실레이터드 지방산 아미드, 디옥타데실디메틸 암모늄 브로마이드, 세라마이드, 스팽고미엘린등을 포함한다.
- [0258] 일부 구체예들에서, 비-양이온성 지질은 입자 내 존재하는 총 지질의 약 10 몰% 내지 약 60 몲%, 약 20 몲% 내지 약 55 몲%, 약 20 몲% 내지 약 45 몲%, 약 20 몲% 내지 약 40 몲%, 약 25 몲% 내지 약 50 몲%, 약 25 몲% 내지 약 45 몲%, 약 30 몲% 내지 약 50 몲%, 약 30 몲% 내지 약 45 몲%, 약 30 몲% 내지 약 40 몲%, 약 35 몲% 내지 약 45 몲%, 약 37 몲% 내지 약 45 몲%, 또는 약 35 몲%, 36 몲%, 37 몲%, 38 몲%, 39 몲%, 40 몲%, 41 몲%, 42 몲%, 43 몲%, 44 몲%, 또는 45 몲% (또는 이의 임의의 부분 또는 이에 속하는 임의의 범위)를 포함한다.
- [0259] 지질 입자들이 인지질과 콜레스테롤 또는 콜레스테롤 유도체의 혼합물을 함유하는 구체예들에서, 혼합물은 입자 내 존재하는 총 지질의 최대 약 40 몲%, 45 몲%, 50 몲%, 55 몲%, 또는 60 몲%을 포함할 수 있다.
- [0260] 일부 구체예들에서, 혼합물 내 인지질 성분은 입자 내 존재하는 총 지질의 약 2 몲% 내지 약 20 몲%, 약 2 몲% 내지 약 15 몲%, 약 2 몲% 내지 약 12 몲%, 약 4 몲% 내지 약 15 몲%, 또는 약 4 몲% 내지 약 10 몲% (또는 이의 임의의 부분 또는 이에 속하는 임의의 범위)를 포함할 수 있다. 한 특정 구체예들에서, 혼합물 내 인지질 성분은 입자 내 존재하는 총 지질의 약 5 몲% 내지 약 17 몲%, 약 7 몲% 내지 약 17 몲%, 약 7 몲% 내지 약 15 몲%, 약 8 몲% 내지 약 15 몲%, 또는 약 8 몲%, 9 몲%, 10 몲%, 11 몲%, 12 몲%, 13 몲%, 14 몲%, 또는 15 몲% (또는 이의 임의의 부분 또는 이에 속하는 임의의 범위)를 포함한다. 한 비-제한적 예로서, 인지질과 콜레스테롤의 혼합물을 포함하는 지질 입자 제제는, 예컨대, 입자 내 존재하는 총 지질의 약 34 몲% (또는 이의 임의의 부분)의 콜레스테롤 또는 콜레스테롤 유도체와의 혼합물 내에 입자 내 존재하는 총 지질의 약 7 몲% (또는 이의 임의의 부분)의 인지질, 가령, DPPC 또는 DSPC를 포함할 수 있다. 또다른 비-제한적 예로서, 인지질과 콜레스테롤의 혼합물을 포함하는 지질 입자 제제는, 예컨대, 입자 내 존재하는 총 지질의 약 32 몲% (또는 이의 임의의 부분)의 콜레스테롤 또는 콜레스테롤 유도체와의 혼합물 내에, 약 7 몲% (또는 이의 임의의 부분)의 인지질, 가령, DPPC 또는 DSPC를 포함할 수 있다.
- [0261] 추가 예로서, 본 발명의 실시에 유용한 지질 제제는 약 10:1의 지질 대 약물 (예컨대, siRNA) 비 (예컨대, 9.5:1 내지 11:1, 또는 9.9:1 내지 11:1, 또는 10:1 내지 10.9:1의 지질:약물 비)를 가진다. 그 외 특정 구체예들에서, 본 발명의 실시에 유용한 지질 제제는 약 9:1의 지질 대 약물 (예컨대, siRNA) 비 (예컨대, 8.5:1 내지 10:1, 또는 8.9:1 내지 10:1, 또는 9.1:1, 9.2:1, 9.3:1, 9.4:1, 9.5:1, 9.6:1, 9.7:1, 및 9.8:1을 비롯한 9:1 내지 9.9:1의 지질: 약물 비)를 가진다.
- [0262] 그 외 구체예들에서, 혼합물에서 콜레스테롤 성분은 입자 내 존재하는 총 지질의 약 25 몲% 내지 약 45 몲%, 약 25 몲% 내지 약 40 몲%, 약 30 몲% 내지 약 45 몲%, 약 30 몲% 내지 약 40 몲%, 약 27 몲% 내지 약 37 몲%, 약 25 몲% 내지 약 30 몲%, 또는 약 35 몲% 내지 약 40 몲% (또는 이의 임의의 부분 또는 이에 속하는 임의의 범위)를 포함할 수 있다. 바람직한 특정 구체예들에서, 혼합물에서 콜레스테롤 성분은 입자 내 존재하는 총 지질의 약 25 몲% 내지 약 35 몲%, 약 27 몲% 내지 약 35 몲%, 약 29 몲% 내지 약 35 몲%, 약 30 몲% 내지 약 35 몲%, 약 30 몲% 내지 약 34 몲%, 약 31 몲% 내지 약 33 몲%, 또는 약 30 몲%, 31 몲%, 32 몲%, 33 몲%, 34 몲%, 또는 35 몲% (또는 이의 임의의 부분 또는 이에 속하는 임의의 범위)를 포함한다.
- [0263] 지질 입자들이 무-인지질인 구체예들에서, 콜레스테롤 또는 이의 유도체는 입자 내 존재하는 총 지질의 최대 약 25 몲%, 30 몲%, 35 몲%, 40 몲%, 45 몲%, 50 몲%, 55 몲%, 또는 60 몲%를 포함할 수 있다.
- [0264] 일부 구체예들에서, 무-인지질 지질 입자 제제 내 콜레스테롤 또는 이의 유도체는 입자 내 존재하는 총 지질의 약 25 몲% 내지 약 45 몲%, 약 25 몲% 내지 약 40 몲%, 약 30 몲% 내지 약 45 몲%, 약 30 몲% 내지 약 40 몲%, 약 31 몲% 내지 약 39 몲%, 약 32 몲% 내지 약 38 몲%, 약 33 몲% 내지 약 37 몲%, 약 35 몲% 내지 약 45 몲%, 약 30 몲% 내지 약 35 몲%, 약 35 몲% 내지 약 40 몲%, 또는 약 30 몲%, 31 몲%, 32 몲%, 33 몲%, 34 몲%, 35 몲%, 36 몲%, 37 몲%, 38 몲%, 39 몲%, 또는 40 몲% (또는 이의 임의의 부분 또는 이에 속하는 임의의 범위)를

포함할 수 있다. 한 비-제한적 예로서, 지질 입자 제제는 입자 내 존재하는 총 지질의 약 37 몰% (또는 이의 임의의 부분)의 콜레스테롤을 포함할 수 있다. 또 다른 비-제한적 예로서, 한 비-제한적 예로서, 지질 입자 제제는 입자 내 존재하는 총 지질의 약 35 몰% (또는 이의 임의의 부분)의 콜레스테롤을 포함할 수 있다.

[0265] 그 외 구체예들에서, 비-양이온성 지질은 입자 내 존재하는 총 지질의 약 5 몰% 내지 약 90 몲%, 약 10 몲% 내지 약 85 몲%, 약 20 몲% 내지 약 80 몲%, 약 10 몲% (예컨대, 인지질 단독), 또는 약 60 몲% (예컨대, 인지질과 콜레스테롤 또는 이의 유도체) (또는 이의 임의의 부분 또는 이에 속하는 임의의 범위)를 포함한다.

[0266] 본 발명의 지질 입자들에서 사용하기에 적합한 비-양이온성 지질들의 추가 백분율 및 범위들은 PCT 공개번호 제 WO 09/127060, 미국 공개 출원 제 US 2011/0071208, PCT 공개번호 제 WO2011/000106, 및 미국 공개 출원 제 US 2011/0076335에 기재되어 있으며, 이들의 내용은 실제적으로 본 출원에 온전히 참고문헌으로 포함된다.

[0267] 본 발명의 지질 입자들에 존재하는 비-양이온성 지질의 백분율은 목표량이며, 제제 내 존재하는 비-양이온성 지질의 실제량은 예를 들면, ± 5 몲%, ± 4 몲%, ± 3 몲%, ± 2 몲%, ± 1 몲%, ± 0.75 몲%, ± 0.5 몲%, ± 0.25 몲%, 또는 ± 0.1 몲% 만큼 달라질 수 있음을 이해하여야 한다.

### 3. 지질 접합체

[0269] 양이온성 및 비-양이온성 지질들 이외에도, 본 발명의 지질 입자들은 지질 접합체를 추가로 포함할 수 있다. 이러한 복합 지질은 입자들의 응집을 저해함에 있어 유용하다. 적합한 복합 지질들에는, PEG-지질 접합체, POZ-지질 접합체, ATTA-지질 접합체, 양이온성-폴리머-지질 접합체 (CPLs), 및 이의 혼합물이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다. 특정 구체예들에서, 이러한 입자들은 CPL과 함께 PEG-지질 접합체 또는 ATTA-지질 접합체를 포함한다.

[0270] 한 바람직한 구체예에서, 지질 접합체는 PEG-지질이다. PEG-지질들의 예들에는, 예컨대, PCT 공개번호 제 WO 05/026372에 기재된 디알킬옥시프로필에 커플된 PEG (PEG-DAA), 예컨대, 미국 특허 제. 20030077829 및 2005008689에 기재된 디아실글리세롤에 커플된 PEG (PEG-DAG), 인지질에 커플된 PEG, 가령, 포스파티딜에탄올아민 (PEG-PE), 예컨대, 미국 특허 제 5,885,613에 기재된 세라마이드에 접합된 PEG, 콜레스테롤 또는 이의 유도체에 접합된 PEG, 및 이의 혼합물이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다. 이들 특허문헌들의 개시내용은 실제로 본 출원에 온전히 참고문헌으로 포함된다.

[0271] 본 발명에서 사용하기에 적합한 추가적인 PEG-지질들은, 제한없이, mPEG2000-1,2-디-0-알킬-sn3-카르보모일글리세라이드 (PEG-C-DOMG)가 포함된다. PEG-C-DOMG의 합성은 PCT 공개번호 제 WO 09/086558에 기재되어 있으며, 그 내용은 본 출원에 실제로 온전히 참고문헌으로 포함된다. 또한 또 다른 적합한 PEG-지질 접합체들은, 제한없이, 1-[8'-(1,2-디미리스토일-3-프로판옥시)-카르복스아미도-3',6'-디옥사옥타닐]카르바모일-ω-메틸-폴리(에틸렌 글리콜) (2KPEG-DMG)이 포함된다. 2KPEG-DMG의 합성은, 미국 특허 제 7,404,969에 기재되어 있으며, 그 내용은 본 출원에 실제로 온전히 참고문헌으로 포함된다.

[0272] PEG는 2개의 말단 하이드록실 그룹들을 보유한 에틸렌 PEG 반복 단위들의 선형 수용성 폴리머이다. PEG는 이의 분자량으로 분류되는데; 예를 들면, PEG 2000은 약 2,000 달톤의 평균 분자량을 가지며, PEG 5000은 약 5,000 달톤의 평균 분자량을 가진다. PEG들은 Sigma Chemical Co.사 및 그 외 회사들로부터 상업적으로 구입 가능하며 다음이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다: 모노메톡시폴리에틸렌 글리콜 (MePEG-OH), 모노메톡시폴리에틸렌 글리콜-석시네이트 (MePEG-S), 모노메톡시폴리에틸렌 글리콜-석신이미딜 석시네이트 (MePEG-S-NHS), 모노메톡시 폴리에틸렌 글리콜-아민 (MePEG-NH<sub>2</sub>), 모노메톡시폴리에틸렌 글리콜-트레실레이트 (MePEG-TRES), 모노메톡시폴리에틸렌 글리콜-아미다졸릴-카르보닐 (MePEG-IM), 뿐만 아니라 말단 메톡시 그룹 대신 말단 하이드록실 그룹을 함유하는 이러한 화합물들 (예컨대, HO-PEG-S, HO-PEG-S-NHS, HO-PEG-NH<sub>2</sub> 등.). 그 외 PEG들, 가령, 미국 특허 제 6,774,180 및 7,053,150에 기재된 것들 (예컨대, mPEG (20 KDa) 아민) 또한 본 발명의 PEG-지질 접합체들을 제조함에 유용하다. 이들 특허들의 개시내용들은 실제로 본 출원에 온전히 참고문헌으로 포함된다. 또한, 모노메톡시폴리에틸렌글리콜-아세트산 (MePEG-CH<sub>2</sub>COOH)은 예컨대, PEG-DAA 접합체들을 비롯한 PEG-지질 접합체들을 제조함에 특히 유용하다.

[0273] 본 출원에 기재된 PEG-지질 접합체들의 PEG 모이어티는 약 550 달톤 내지 약 10,000 달톤 범위의 평균 분자량을 포함할 수 있다. 특정 예들에서, PEG 모이어티는 약 750 달톤 내지 약 5,000 달톤 (예컨대, 약 1,000 달톤 내지 약 5,000 달톤, 약 1,500 달톤 내지 약 3,000 달톤, 약 750 달톤 내지 약 3,000 달톤, 약 750 달톤 내지 약 2,000 달톤 등.)의 평균 분자량을 가진다. 바람직한 구체예들에서, PEG 모이어티는 약 2,000 달톤 또는 약 750

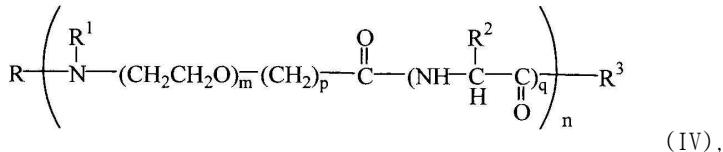
달톤의 평균 분자량을 가진다.

[0274] 특정 예들에서, PEG는 알킬, 알콕시, 아실, 또는 아릴 그룹에 의해 선택적으로 치환될 수 있다. PEG는 지질에 직접 접합될 수 있거나 링커 모이어티를 통해 지질에 연결될 수 있다. 예컨대, 비-에스테르 함유 링커 모이어티 및 에스테르-함유 링커 모이어티를 비롯하여 지질에 PEG를 커플링하기에 적합한 임의의 링커 모이어티가 사용될 수 있다. 한 바람직한 구체예에서, 링커 모이어티는 비-에스테르 함유 링커 모이어티이다. 본 출원에서 사용되는 용어 "비-에스테르 함유 링커 모이어티"는 카르복실릭 에스테르 결합 (-OC(O)-)을 함유하지 않는 링커 모이어티를 지칭한다. 적합한 비-에스테르 함유 링커 모이어티에는, 아미도 (-C(O)NH-), 아미노 (-NR-), 카르보닐 (-C(0)-), 카르바메이트 (-NHC(O)O-), 우레아 (-NHC(O)NH-), 디설파이드 (-S-S-), 에테르 (-O-), 석시닐 (-O)CCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)-), 석신아미딜 (-NHC(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)NH-), 에테르, 디설파이드, 뿐만 아니라 이의 조합 (가령, 카르바메이트 링커 모이어티 및 아미도 링커 모이어티 모두를 함유하는 링커)이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다. 한 바람직한 구체예에서, 지질에 PEG를 커플링하기 위해 카르바메이트 링커가 사용된다.

[0275] 그 외 구체예들에서, 지질에 PEG를 커플링하기 위해 에스테르 함유 링커 모이어티가 사용된다. 적합한 에스테르 함유 링커 모이어티에는, 예컨대, 카르보네이트 (-OC(O)O-), 석시노일, 포스페이트 에스테르 (-O-(O)POH-O-), 설포네이트 에스테르, 및 이의 조합이 포함된다.

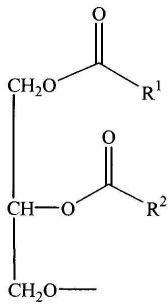
[0276] 사슬 길이 및 포화도가 달라지는 여러가지 아실 사슬 그룹을 가지는 포스파티딜에탄올아민이 PEG에 접합되어 지질 접합체를 형성할 수 있다. 이러한 포스파티딜에탄올아민은 상업적으로 구입 가능하거나, 또는 해당 분야의 통상의 기술자에게 공지된 종래의 기술들을 사용하여 단리되거나 합성될 수 있다. C<sub>10</sub> 내지 C<sub>20</sub> 범위의 탄소 사슬 길이를 가지는 포화 또는 불포화 지방산을 함유하는 포스파티딜-에탄올아민이 바람직하다. 단일- 또는 이중불포화 지방산 그리고 포화 및 불포화 지방산의 혼합물을 가지는 포스파티딜에탄올아민 또한 사용될 수 있다. 적합한 포스파티딜에탄올아민에는, 디미리스토일-포스파티딜에탄올아민 (DMPE), 디팔미토일-포스파티딜에탄올아민 (DPPE), 디올레오일포스파티딜에탄올아민 (DOPE), 및 디스테아로일-포스파티딜에탄올아민 (DSPE)이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0277] 용어 "ATTA" 또는 "폴리아미드"에는, 제한없이, 미국 특허 제 6,320,017 및 6,586,559에 기재된 화합물들이 포함되며, 그 개시내용들은 실제로 본 출원에 온전히 참고문헌으로 포함된다. 이러한 화합물들은 다음 화학식을 가지는 화합물을 포함한다:

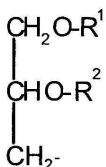


[0278] 여기서 R은 수소, 알킬 및 아실로 구성된 그룹에서 선택된 구성원이고; R<sup>1</sup>은 수소 및 알킬로 구성된 그룹에서 선택된 구성원이고; 또는 선택적으로, R 및 R<sup>1</sup> 그리고 이들이 결합되는 질소는 아지도 모이어티를 형성하고; R<sup>2</sup>는 수소, 선택적으로 치환된 알킬, 선택적으로 치환된 아릴 및 아미노산의 측쇄에서 선택된 그룹의 구성원이고; R<sup>3</sup>는 수소, 할로겐, 하이드록시, 알콕시, 메르캅토, 하이드라지노, 아미노 및 NR<sup>4</sup>R<sup>5</sup>로 구성된 그룹에서 선택된 구성원이며 여기서 R<sup>4</sup> 및 R<sup>5</sup>는 독립적으로 수소 또는 알킬이고; n은 4 내지 80이고; m은 2 내지 6이고; p는 1 내지 4이고; 그리고 q는 0 또는 1이다. 그 외 폴리아미드들이 본 발명의 화합물들에서 사용될 수 있음을 해당 분야의 숙련된 기술자들에게 자명할 것이다.

[0280] 용어 "디아실글리세롤" 또는 "DAG"는 2개의 지방 아실 사슬, R<sup>1</sup> 및 R<sup>2</sup>를 가지는 화합물을 포함하며, R<sup>1</sup> 및 R<sup>2</sup> 모두는 독립적으로 에스테르 연결에 의해 글리세롤의 1- 및 2-위치에 결합된 2 내지 30개의 탄소를 가진다. 아실 그룹들은 포화되거나 다양한 불포화도를 가질 수 있다. 적합한 아실 그룹들에는, 라우로일 (C<sub>12</sub>), 미리스토일 (C<sub>14</sub>), 팔미토일 (C<sub>16</sub>), 스테아로일 (C<sub>18</sub>), 및 아이코소일 (C<sub>20</sub>)이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다. 바람직한 구체예들에서, R<sup>1</sup> 및 R<sup>2</sup>는 동일한데, 즉, R<sup>1</sup> 및 R<sup>2</sup>는 모두 미리스토일 (즉, 디미리스토일)이고, R<sup>1</sup> 및 R<sup>2</sup>는 모두 스테아로일 (즉, 디스테아로일) 등이다. 디아실글리세롤은 다음 일반식을 가진다:



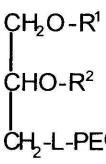
[0282] 용어 "디알킬옥시프로필" 또는 "DAA"는 2개의 알킬 사슬,  $\text{R}^1$  및  $\text{R}^2$ 를 가지는 화합물을 포함하며,  $\text{R}^1$  및  $\text{R}^2$  모두는 독립적으로 2 내지 30개의 탄소들을 가진다. 알킬 그룹들은 포화되거나 다양한 불포화도를 가질 수 있다. 디알킬옥시프로필은 다음 일반식을 가진다:



[0283]

(VI).

[0284] 한 바람직한 구체예에서, PEG-지질은 다음 화학식을 가지는 PEG-DAA 접합체이다:



[0285]

(VII),

[0286] 여기서  $\text{R}^1$  및  $\text{R}^2$ 는 독립적으로 선택되고, 약 10 내지 약 22개 탄소 원자들을 가지는 장쇄 알킬 그룹들이며; PEG는 폴리에틸렌글리콜이고; 그리고 L은 상기와 같은 비-에스테르 함유 링커 모이어티 또는 에스테르 함유 링커 모이어티이다. 장쇄 알킬 그룹들은 포화 또는 불포화일 수 있다. 적합한 알킬 그룹들에는, 데실 ( $\text{C}_{10}$ ), 라우릴 ( $\text{C}_{12}$ ), 미리스틸 ( $\text{C}_{14}$ ), 팔미틸 ( $\text{C}_{16}$ ), 스테아릴 ( $\text{C}_{18}$ ), 및 아이코실 ( $\text{C}_{20}$ )이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다. 바람직한 구체예들에서,  $\text{R}^1$  및  $\text{R}^2$ 는 동일한데, 즉,  $\text{R}^1$  및  $\text{R}^2$ 는 모두 미리스틸 (즉, 디미리스틸)이고,  $\text{R}^1$  및  $\text{R}^2$ 는 모두 스테아릴 (즉, 디스테아릴) 등이다.

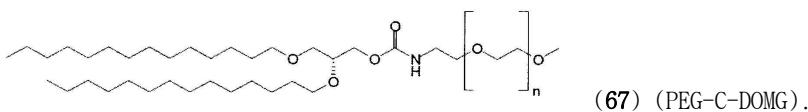
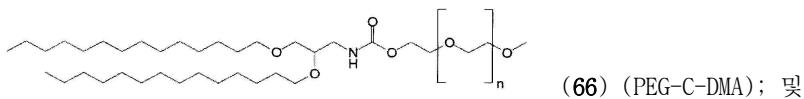
[0287]

상기 화학식 VII에서, PEG는 약 550 달톤 내지 약 10,000 달톤 범위의 평균 분자량을 가진다. 특정 예들에서, PEG는 약 750 달톤 내지 약 5,000 달톤 (예컨대, 약 1,000 달톤 내지 약 5,000 달톤, 약 1,500 달톤 내지 약 3,000 달톤, 약 750 달톤 내지 약 3,000 달톤, 약 750 달톤 내지 약 2,000 달톤 등.)의 평균 분자량을 가진다. 바람직한 구체예들에서, PEG는 약 2,000 달톤 또는 약 750 달톤의 평균 분자량을 가진다. PEG는 알킬, 알콕시, 아실, 또는 아릴 그룹으로 선택적으로 치환될 수 있다. 특정 구체예들에서, 말단 하이드록실 그룹은 메톡시 또는 메틸 그룹으로 치환된다.

[0288]

한 바람직한 구체예에서, "L"은 비-에스테르 함유 링커 모이어티이다. 적합한 비-에스테르 함유 링커들에는, 아미도 링커 모이어티, 아미노 링커 모이어티, 카르보닐 링커 모이어티, 카르바메이트 링커 모이어티, 우레아 링커 모이어티, 에테르 링커 모이어티, 디설파이드 링커 모이어티, 석신아미딜 링커 모이어티, 및 이의 조합이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다. 한 바람직한 구체예에서, 비-에스테르 함유 링커 모이어티는 카르바메이트 링커 모이어티 (즉, PEG-C-DAA 접합체)이다. 또 다른 바람직한 구체예에서, 비-에스테르 함유 링커 모이어티는 아미도 링커 모이어티 (즉, PEG-A-DAA 접합체)이다. 또한 또 다른 바람직한 구체예에서, 비-에스테르 함유 링커 모이어티는 석신아미딜 링커 모이어티 (즉, PEG-S-DAA 접합체)이다.

[0289] 특정 구체예들에서, PEG-지질 접합체는 다음에서 선택된다:



[0292] PEG-DAA 접합체들은 해당 분야의 숙련된 기술자들에게 공지된 표준 기법들 및 시약들을 사용하여 합성된다. PEG-DAA 접합체들은 다양한 아미드, 아민, 에테르, 티오, 카르바메이트, 및 우레아 연결을 함유하게 됨이 이해될 것이다. 해당 분야의 숙련된 기술자들은 이러한 결합들을 형성하기 위한 방법들 및 시약들이 널리 공지되어 용이하게 구입가능함을 이해할 것이다. 예컨대, March의, ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY (Wiley 1992); Larock의, COMPREHENSIVE ORGANIC TRANSFORMATIONS (VCH 1989); 및 Furniss의, VOGEL'S TEXTBOOK OF PRACTICAL ORGANIC CHEMISTRY, 5th ed. (Longman 1989)를 참고하라. 존재하는 임의의 작용기들은 PEG-DAA 접합체들의 합성시 상이한 지점들에서 보호 및 탈보호를 필요로 할 수 있음 또한 이해될 것이다. 해당 분야의 숙련된 기술자는 이러한 기법들이 널리 공지임을 이해할 것이다. 예컨대, Green 및 Wuts의, PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS (Wiley 1991)를 참고하라.

[0293] 바람직하게는, PEG-DAA 접합체는 PEG-디데실옥시프로필 ( $C_{10}$ ) 접합체, PEG-디라우릴옥시프로필 ( $C_{12}$ ) 접합체, PEG-디미리스틸옥시프로필 ( $C_{14}$ ) 접합체, PEG-디팔미틸옥시프로필 ( $C_{16}$ ) 접합체, 또는 PEG-디스테아릴옥시프로필 ( $C_{18}$ ) 접합체이다. 이들 구체예들에서, PEG는 바람직하게는 약 750 또는 약 2,000 달톤의 평균 분자량을 가진다. 특히 바람직한 한 구체예에서, PEG-지질 접합체는 PEG2000-C-DMA를 포함하며, 여기서 "2000"은 PEG의 평균 분자량을 의미하고, "C"는 카르바메이트 렁커 모이어티를 의미하며, 그리고 "DMA"는 디미리스틸옥시프로필을 의미한다. 특히 바람직한 또 다른 구체예에서, PEG-지질 접합체는 PEG750-C-DMA를 포함하며, 여기서 "750"은 PEG의 평균 분자량을 의미하고, "C"는 카르바메이트 렁커 모이어티를 의미하며, 그리고 "DMA"는 디미리스틸옥시프로필을 의미한다. 특정 구체예들에서, PEG의 말단 하이드록실 그룹은 메틸 그룹으로 치환된다. 해당 분야의 숙련된 기술자들은 본 발명의 PEG-DAA 접합체들에서 그 외 디알킬옥시프로필이 사용될 수 있음을 용이하게 이해할 것이다.

[0294] 전술한 내용에 더하여, 그 외 친수성 폴리머들이 PEG 자리에 사용될 수 있음은 해당 분야의 숙련된 기술자들에게 용이하게 자명할 것이다. PEG 자리에 사용될 수 있는 적합한 폴리머들의 예들에는, 폴리비닐피롤리돈, 폴리메틸옥사졸린, 폴리에틸옥사졸린, 폴리하이드록시프로필 메타크릴아미드, 폴리메트아크릴아미드 및 폴리디메틸아크릴아미드, 폴리락트산, 폴리글리콜산, 및 유도체화 셀룰로오스, 가령, 하이드록시메틸셀룰로오스 또는 하이드록시에틸셀룰로오스가 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0295] 전술한 성분들 이외에도, 본 발명의 지질 입자들은 양이온성 폴리(에틸렌 글리콜) (PEG) 지질 또는 CPL을 추가로 포함할 수 있다 (예컨대, Chen 등의, *Bioconj. Chem.*, 11:433-437 (2000); 미국 특허 제 6,852,334; PCT 공개번호 제 WO 00/62813 참고, 이들의 개시내용은 실제적으로 본 출원에 온전히 참고문헌으로 포함된다).

[0296] 적합한 CPL들은 화학식 VIII의 화합물들을 포함한다:

[0297] A-W-Y (VIII),

[0298] 여기서 A, W, 및 Y는 하기와 같다.

[0299] 화학식 VIII에 있어서, "A"는 지질 앵커(anchor)로서 작용하는 지질 모이어티, 가령, 양친매성 지질, 중성 지질, 또는 소수성 지질이다. 적합한 지질의 예들에는, 디아실글리세롤릴, 디알킬글리세롤릴, N-N-디알킬아미노, 1,2-디아실옥시-3-아미노프로판, 및 1,2-디알킬-3-아미노프로판이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0300] "W"는 폴리머 또는 올리고머, 가령, 친수성 폴리머 또는 올리고머이다. 바람직하게는, 친수성 폴리머는 비면역 원성이거나 낮은 선천 면역원성을 보유하는 생체적합성 폴리머이다. 대안적으로, 친수성 폴리머는 적절한 보조제와 함께 사용될 경우 약하게 항원성을 떨 수 있다. 적합한 비면역원성 폴리머들에는, PEG, 폴리아미드, 폴리락트산, 폴리글리콜산, 폴리락트산/폴리글리콜산 코폴리머, 및 이의 조합이 포함될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 한 바람직한 구체예에서, 폴리머는 약 250 내지 약 7,000 달톤의 분자량을 가진다.

- [0301] "Y"는 폴리양이온성 모이어티이다. 용어 폴리양이온성 모이어티는 양 전하, 바람직하게는 선택된 pH, 바람직하게는 생리학적 pH에서 적어도 2개의 양 전하들을 가지는 화합물, 유도체, 또는 작용기를 지칭한다. 적합한 폴리양이온성 모이어티에는 염기성 아미노산 및 이들의 유도체, 가령, 아르기닌, 아스파라긴, 글루타민, 리신, 및 히스티딘; 스페르민; 스페르미딘; 양이온성 덴드리머; 폴리아민; 폴리아민 당; 및 아미노 다당류가 포함된다. 폴리양이온성 모이어티는 구조상 선형, 가령, 선형의 테트라라리신, 측쇄 또는 덴드리머일 수 있다. 폴리양이온성 모이어티는 선택된 pH 값에서 약 2 내지 약 15개의 양 전하, 바람직하게는 약 2 내지 약 12개의 양 전하, 그리고 더욱 바람직하게는 약 2 내지 약 8개의 양 전하를 가진다. 사용할 폴리양이온성 모이어티의 선택은 필요한 입자 사용 유형에 의해 결정될 수 있다.
- [0302] 폴리양이온성 모이어티 상의 전하는 전체 입자 모이어티에 걸쳐 분포될 수 있으며, 또는 대안적으로, 입자 모이어티의 한 특정 영역 내에서의 별도 농도의 전하 밀도, 예컨대, 전하 스파이크일 수 있다. 전하 밀도가 입자 상에 분포되는 경우, 전하 밀도는 균일하게 분포되거나 불균일하게 분포될 수 있다. 폴리양이온성 모이어티 전하 분포의 모든 변형이 본 발명에 포함된다.
- [0303] 지질 "A" 및 비면역원성 폴리머 "W"는 다양한 방법들에 의해 그리고 바람직하게는 공유 부착에 의해 부착될 수 있다. 해당 분야의 숙련된 기술자들에게 공지된 방법들이 "A" 및 "W"의 공유 부착을 위해 사용될 수 있다. 적합한 연결에는, 아미드, 아민, 카르복실, 카르보네이트, 카르바메이트, 에스테르, 및 하이드라존 연결이 포함되어 이에 제한되는 것은 아니다. "A" 및 "W"가 연결을 유발하기 위해 상보적인 작용기들을 가져야 함은 해당 분야의 숙련된 기술자에게 자명할 것이다. 이를 두 그룹들의, 하나는 지질에 대한 그리고 하나는 폴리머에 대한 반응은 바람직한 연결을 제공할 것이다. 예를 들면, 지질이 디아실글리세롤이고, 예컨대, NHS 및 DCC를 보유하는 말단 하이드록실이 활성화되어 활성 에스테르를 형성한 다음, 아미노 그룹을 함유하는 폴리머, 가령, 폴리아미드와 반응하는 경우 (예컨대, 미국 특허 제 6,320,017 및 6,586,559 참고, 이를 개시내용은 본 출원에 실제로 온전히 참고문헌으로 포함됨), 아미드 결합이 두 그룹들 간에 형성될 것이다.
- [0304] 특정 예들에서, 폴리양이온성 모이어티는 부착된 리간드, 가령, 칼슘을 복합시키기 위한 표적화 리간드 또는 킬레이트화 모이어티를 가질 수 있다. 바람직하게는, 리간드가 부착된 후, 양이온성 모이어티는 양 전하를 유지한다. 특정 예들에서, 부착되는 리간드는 양 전하를 가진다. 적합한 리간드들은 반응성 작용기를 보유한 화합물 또는 장치를 포함하나 이에 제한되는 것은 아니며, 지질, 양친매성 지질, 담체 화합물, 생체친화성 화합물, 생물재료, 바이오플리머, 생체의료 장치, 분석상으로 검출가능한 화합물, 치료적 활성 화합물, 효소, 웨티드, 단백질, 항체, 면역 자극제, 방사선표지제(radiolabels), 플루오로겐, 비오틴, 약물, 핫텐, DNA, RNA, 다당류, 리포좀, 비로좀(viroosomes), 미포(micelles), 면역글로불린, 작용기, 그 외 표적화 모이어티, 또는 독소를 포함한다.
- [0305] 일부 구체예들에서, 지질 접합체 (예컨대, PEG-지질)는 입자 내 존재하는 총 지질의 약 0.1 몰% 내지 약 3 몰%, 약 0.5 몰% 내지 약 3 몰%, 또는 약 0.6 몰%, 0.7 몰%, 0.8 몰%, 0.9 몰%, 1.0 몰%, 1.1 몰%, 1.2 몰%, 1.3 몰%, 1.4 몰%, 1.5 몰%, 1.6 몰%, 1.7 몰%, 1.8 몰%, 1.9 몰%, 2.0 몰%, 2.1 몰%, 2.2 몰%, 2.3 몰%, 2.4 몰%, 2.5 몰%, 2.6 몰%, 2.7 몰%, 2.8 몰%, 2.9 몰% 또는 3 몰% (또는 이의 임의의 부분 또는 이에 속하는 임의의 범위)를 포함한다.
- [0306] 그 외 구체예들에서, 지질 접합체 (예컨대, PEG-지질)는 입자 내 존재하는 총 지질의 약 0 몰% 내지 약 20 몲%, 약 0.5 몲% 내지 약 20 몲%, 약 2 몲% 내지 약 20 몲%, 약 1.5 몲% 내지 약 18 몲%, 약 2 몲% 내지 약 15 몲%, 약 4 몲% 내지 약 15 몲%, 약 2 몲% 내지 약 12 몲%, 약 5 몲% 내지 약 12 몲%, 또는 약 2 몲% (또는 이의 임의의 부분 또는 이에 속하는 임의의 범위)를 포함한다.
- [0307] 또 다른 구체예들에서, 지질 접합체 (예컨대, PEG-지질)는 입자 내 존재하는 총 지질의 약 4 몲% 내지 약 10 몲%, 약 5 몲% 내지 약 10 몲%, 약 5 몲% 내지 약 9 몲%, 약 5 몲% 내지 약 8 몲%, 약 6 몲% 내지 약 9 몲%, 약 6 몲% 내지 약 8 몲%, 또는 약 5 몲%, 6 몲%, 7 몲%, 8 몲%, 9 몲%, 또는 10 몲% (또는 이의 임의의 부분 또는 이에 속하는 임의의 범위)를 포함한다.
- [0308] 본 발명의 지질 입자들에 존재하는 지질 접합체의 백분율은 목표량이며, 제제 내 존재하는 지질 접합체의 실제량은 예를 들면, ± 5 몲%, ± 4 몲%, ± 3 몲%, ± 2 몲%, ± 1 몲%, ± 0.75 몲%, ± 0.5 몲%, ± 0.25 몲%, 또는 ± 0.1 몲% 만큼 달라질 수 있음을 이해하여야 한다.
- [0309] 본 발명의 지질 입자들에서 사용하기에 적합한 지질 접합체들의 추가 백분율 및 범위들은 PCT 공개번호 제 WO 09/127060, 미국 공개 출원 제 US 2011/0071208, PCT 공개번호 제 WO2011/000106, 및 미국 공개 출원 제 US

2011/0076335에 기재되어 있으며, 이들의 내용은 실제적으로 본 출원에 온전히 참고문헌으로 포함된다.

- [0310] 해당 분야의 통상의 기술자는 지질 접합체의 농도가, 사용되는 지질 접합체 및 지질 입자가 융합성 이게 되는 비율에 따라 달라질 수 있음을 이해할 것이다.
- [0311] 지질 접합체의 조성을 및 농도를 제어함으로써, 지질 접합체가 지질 입자로부터 교환되는 비율을 제어할 수 있으며, 결과적으로 지질 입자가 융합성을 띠게 되는 비율을 제어할 수 있다. 예컨대, PEG-DAA 접합체가 지질 접합체로서 사용되는 경우, 지질 입자가 융합성을 띠게 되는 비율은, 예를 들면, 지질 접합체의 농도를 변화시킴으로써, PEG의 분자량을 변화시킴으로써, 또는 PEG-DAA 접합체 상의 알킬 그룹의 사슬 길이 및 포화도를 변화시킴으로써 변화될 수 있다. 또한, 지질 입자가 융합성을 띠게 되는 비율을 변화 및/또는 제어하기 위하여 예를 들면, pH, 온도, 이온 강도등을 비롯한 그 외 변수들이 사용될 수 있다. 지질 입자가 융합성을 띠게 되는 비율을 제어하기 위해 사용될 수 있는 그 외 방법들은 본 출원의 내용을 읽을 때 해당 분야의 숙련된 기술자에게 자명해질 것이다. 또한, 지질 접합체의 조성 및 농도를 제어함으로써, 지질 입자 크기를 제어할 수 있다.

## B. 추가적인 담체 시스템

- [0313] 본 발명에 사용하기에 적합한 추가적인 지질-계 담체 시스템의 비-제한적 예들에는 리포플렉스 (예컨대, 미국 특허 공개번호 제 20030203865; 및 Zhang 등의, *J. Control Release*, 100:165-180 (2004) 참고), pH-민감성 리포플렉스 (예컨대, 미국 특허 제 20030180950 참고), 양이온성 지질-계 조성을 (예컨대, 미국 특허 제 6,756,054; 및 미국 특허 공개번호 제 20050234232 참고), 양이온성 리포좀 (예컨대, 미국 공개 특허 제 20030229040, 20020160038, 및 20020012998; 미국 특허 제 5,908,635; 및 PCT 공개번호 제 WO 01/72283 참고), 음이온성 리포좀 (예컨대, 미국 특허 공개번호 제 20030026831 참고), pH-민감성 리포좀 (예컨대, 미국 특허 공개번호 제 20020192274; 및 AU 2003210303 참고), 항체-코팅된 리포좀 (예컨대, 미국 특허 공개번호 제 20030108597; 및 PCT 공개번호 제 WO 00/50008 참고), 세포-유형 특이적 리포좀 (예컨대, 미국 특허 공개번호 제 20030198664 참고), 핵산 및 웹 터드 함유 리포좀 (예컨대, 미국 특허 제 6,207,456 참고), 방출성 친수성 폴리머로 유도된 지질 함유 리포좀 (예컨대, 미국 특허 공개번호 제 20030031704 참고), 지질-포획 핵산 (예컨대, PCT 공개 번호 제 WO 03/057190 및 WO 03/059322 참고), 지질-캡슐화 핵산 (예컨대, 미국 특허 공개번호 제 20030129221; 및 미국 특허 제 5,756,122 참고), 그 외 리포좀 조성을 (예컨대, 미국 공개 특허 제 20030035829 및 20030072794; 및 미국 특허 제 6,200,599 참고), 리포좀과 에멀전의 안정화 혼합물 (예컨대, EP1304160 참고), 에멀전 조성을 (예컨대, 미국 특허 제 6,747,014 참고), 및 핵산 마이크로-에멀전 (예컨대, 미국 특허 공개번호 제 20050037086 참고)이 포함된다.

- [0314] 본 발명에 사용하기에 적합한 폴리머-계 담체 시스템의 예들에는 양이온성 폴리머-핵산 복합체 (즉, 폴리플렉스)가 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다. 폴리플렉스를 형성하기 위하여, 핵산 (예컨대, siRNA 분자, 가령, 표 A에 기재된 siRNA 분자)은 전형적으로 양이온성 폴리머와 복합되는데, 이러한 양이온성 폴리머는, 세포 표면에서 음이온성 프로테오글리칸과 상호작용하여 세포들을 세포내섭취에 의해 유입시킬 수 있는 양으로 하전된 입자들로 핵산을 응축시키는 선형, 측쇄, 별형, 또는 수지상(dendritic) 폴리머 구조를 가진다. 일부 구체예들에서, 폴리플렉스는 양이온성 폴리머, 가령, 폴리에틸렌이민 (PEI) (예컨대, 미국 특허 제 6,013,240 참고; 생체내 jetPEI, PEI의 선형 형태로서 Qbiogene, Inc. (Carlsbad, CA)로부터 상업적으로 구입 가능), 폴리프로필렌이민 (PPI), 폴리비닐파롤리돈 (PVP), 폴리-L-리신 (PLL), 디에틸아미노에틸 (DEAE)-덱스트란, 폴리(β-아미노 에스테르) (PAE) 폴리머 (예컨대, Lynn 등의, *J. Am. Chem. Soc.*, 123:8155-8156 (2001) 참고), 키토산, 폴리아미도아민 (PAMAM) 덴드리머 (예컨대, Kukowska-Latallo 등의, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:4897-4902 (1996) 참고), 포르파린 (예컨대, 미국 특허 제 6,620,805 참고), 폴리비닐에테르 (예컨대, 미국 특허 공개번호 제 20040156909 참고), 폴리사이클릭 아미디니움 (예컨대, 미국 특허 공개번호 제 20030220289 참고), 1차 아민, 이민, 구아니딘, 및/또는 이미다졸 그룹을 포함하는 그 외 폴리머 (예컨대, 미국 특허 제 6,013,240; PCT 공개번호 제 WO/9602655; PCT 공개번호 제 WO95/21931; Zhang 등의, *J. Control Release*, 100:165-180 (2004); 및 Tiera 등의, *Curr. Gene Ther.*, 6:59-71 (2006) 참고), 및 이의 혼합물과 복합된 핵산 (예컨대, siRNA 분자, 가령, 표 A에 기재된 siRNA 분자)을 포함한다. 그 외 구체예들에서, 폴리플렉스는 미국 공개 특허 제 20060211643, 20050222064, 20030125281, 및 20030185890, 그리고 PCT 공개번호 제 WO 03/066069에 기재된 양이온성 폴리머-핵산 복합체; 미국 특허 공개번호 제 20040071654에 기재된 생분해성 폴리(b-아미노 에스테르) 폴리머-핵산 복합체; 미국 특허 공개번호 제 20040142475에 기재된 폴리머 매트릭스를 함유하는 마이크로입자; 미국 특허 공개번호 제 20030157030에 기재된 그 외 마이크로입자 조성을; 미국 특허 공개번호 제 20050123600에 기재된 응축된 핵산 복합체; 및 AU 2002358514 및 PCT 공개번호 제 WO 02/096551에

기재된 나노캡슐 및 마이크로캡슐 조성물을 포함한다.

[0315] 특정 예들에서, siRNA는 시클로덱스트린 또는 이의 폴리머와 복합될 수 있다. 시클로덱스트린-계 담체 시스템의 비-제한적 예들에는 미국 특허 공개번호 제 20040087024에 기재된 시클로덱스트린-변형된 폴리머-핵산 복합체들; 미국 특허 제 6,509,323, 6,884,789, 및 7,091,192에 기재된 선형 시클로덱스트린 코폴리머-핵산 복합체들; 및 미국 특허 제 7,018,609에 기재된 시클로덱스트린 폴리머-복합화제-핵산 복합체들이 포함된다. 그 외 특정 예들에서, siRNA는 웨티드 또는 폴리웨티드와 복합될 수 있다. 단백질-계 담체 시스템의 한 예에는 PCT 공개번호 제 WO95/21931에 기재된 양이온성 올리고웨티드-핵산 복합체가 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다.

### 지질 입자들의 제조

[0317] 핵산 (예컨대, 표 A에 기재된 siRNA)이 입자의 지질 부위 내에 포획되고 분해로부터 보호되어 있는 본 발명의 핵산-지질 입자들은 연속 혼합법, 직접 희석 처리법, 및 인-라인(in-line) 희석 처리법을 비롯하여 해당 분야에 공지된 임의의 방법에 의해 형성될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0318] 특정 구체예들에서, 양이온성 지질은 화학식 I-III의 지질 또는 이의 염을 단독으로 또는 그 외 양이온성 지질들과 조합하여 포함할 수 있다. 그 외 구체예들에서, 비-양이온성 지질들은 에그 스피고미엘린 (ESM), 디스테아로일포스파티딜콜린 (DSPC), 디올레오일포스파티딜콜린 (DOPC), 1-팔미토일-2-올레오일-포스파티딜콜린 (POPC), 디팔미토일-포스파티딜콜린 (DPPC), 모노메틸-포스파티딜에탄올아민, 디메틸-포스파티딜에탄올아민, 14:0 PE (1,2-디미리스토일-포스파티딜에탄올아민 (DMPE)), 16:0 PE (1,2-디팔미토일-포스파티딜에탄올아민 (DPPE)), 18:0 PE (1,2-디스테아로일-포스파티딜에탄올아민 (DSPE)), 18:1 PE (1,2-디올레오일-포스파티딜에탄올아민 (DOPE)), 18:1 트랜스 PE (1,2-디엘라이도일-포스파티딜에탄올아민 (DEPE)), 18:0-18:1 PE (1-스테아로일-2-올레오일-포스파티딜에탄올아민 (SOPE)), 16:0-18:1 PE (1-팔미토일-2-올레오일-포스파티딜에탄올아민 (POPE)), 폴리에틸렌 글리콜-계 폴리머 (예컨대, PEG 2000, PEG 5000, PEG-변형된 디아실글리세롤, 또는 PEG-변형된 디알킬옥시프로필), 콜레스테롤, 이의 유도체, 또는 이의 조합이다.

[0319] 특정 구체예들에서, 본 발명은 연속 혼합법을 통해 제조된 핵산-지질 입자들을 제공하는데, 예컨대, 이 방법은 제 1 수조에 siRNA를 포함하는 수용액을 제공하는 단계, 제 2 수조에 유기 지질 용액을 제공하는 단계 (유기 지질 용액 내 존재하는 지질은 유기 용매, 예컨대, 저급 알칸올, 가령, 에탄올에 용해화된다), 그리고 유기 지질 용액이 수용액과 혼합되어 지질 소포체 내부에 siRNA를 캡슐화시킨 지질 소포체 (예컨대, 리포좀)를 실질적으로 즉각적으로 제조하기 위하여 수용액을 유기 지질 용액과 혼합하는 단계를 포함한다. 이 방법 및 이 방법을 실시하기 위한 장치는 미국 특허 공개번호 제 20040142025에 상세히 기재되어 있으며, 그 내용은 본 출원에 실제로 온전히 참고문헌으로 포함된다.

[0320] 지질 및 완충 용액을 혼합 환경, 가령, 혼합 챔버에 연속하여 도입하는 작업은, 지질 용액과 완충 용액의 연속 희석을 유발함으로써, 혼합시 실직적으로 즉각적으로 지질 소포체를 제조하게 한다. 본 출원에서 사용되는 어구 "지질 용액을 완충 용액으로 연속적으로 희석" (그리고 변형어구)은 소포체 생성을 유발하기에 충분한 힘으로 수화 과정에서 충분히 급속하게 희석됨을 일반적으로 의미한다. 핵산을 포함하는 수용액을 유기 지질 용액과 혼합함으로써, 유기 지질 용액은 완충 용액 (즉, 수용액)의 존재하에 연속적인 단계식 희석을 거쳐 핵산-지질 입자를 생성한다.

[0321] 연속 혼합법을 사용하여 형성된 핵산-지질 입자들은 전형적으로 약 30 nm 내지 약 150 nm, 약 40 nm 내지 약 150 nm, 약 50 nm 내지 약 150 nm, 약 60 nm 내지 약 130 nm, 약 70 nm 내지 약 110 nm, 약 70 nm 내지 약 100 nm, 약 80 nm 내지 약 100 nm, 약 90 nm 내지 약 100 nm, 약 70 nm 내지 약 90 nm, 약 80 nm 내지 약 90 nm, 약 70 nm 내지 약 80 nm, 약 120 nm, 110 nm, 100 nm, 90 nm, 또는 80 nm 미만, 또는 약 30 nm, 35 nm, 40 nm, 45 nm, 50 nm, 55 nm, 60 nm, 65 nm, 70 nm, 75 nm, 80 nm, 85 nm, 90 nm, 95 nm, 100 nm, 105 nm, 110 nm, 115 nm, 120 nm, 125 nm, 130 nm, 135 nm, 140 nm, 145 nm, 또는 150 nm (또는 이의 임의의 부분 또는 이에 속하는 임의의 범위)의 크기를 가진다. 이렇게 형성된 입자들은 응집하지 않으며 균일한 입자 크기를 구현하기 위해 선택적으로 크기가 결정된다.

[0322] 또다른 구체예에서, 본 발명은 직접 희석 처리 과정을 통해 제조된 핵산-지질 입자들을 제공하는데, 이 처리 과정은 지질 소포체 (예컨대, 리포좀) 용액을 형성하는 단계 및, 제어된 양의 희석 완충액을 함유하는 수집 용기에 지질 소포체 용액을 즉시 그리고 곧바로 유입시키는 단계를 포함한다. 바람직한 양태들에서, 수집 용기는 희석을 촉진시키기 위해 수집 용기의 내용물을 교반하도록 구성된 하나 또는 그 이상의 요소들을 포함한다. 한

양태에서, 수집 용기 내 존재하는 희석 완충액의 양은 수집 용기에 유입되는 지질 소포체 용액의 부피와 실질적으로 동일하다. 한 비-제한적 예로서, 희석 완충액과 동일한 부피를 함유하는 45% 에탄올에서의 지질 소포체 용액이 수집 용기에 유입될 때 보다 작은 입자들을 유리하게 산출할 것이다.

[0323] 또한 또 다른 구체예에서, 본 발명은 희석 완충액을 함유하는 제 3 수조가 제 2 혼합 구역에 유동적으로 결합되어 있는 인-라인 희석 처리 과정을 통해 제조된 핵산-지질 입자들을 제공한다. 이 구체예에서, 제 1 혼합 구역에서 형성된 지질 소포체 (예컨대, 리포좀) 용액은 제 2 혼합 구역에서 희석 완충액과 즉각적으로 그리고 곧바로 혼합된다. 바람직한 양태들에서, 제 2 혼합 구역은 지질 소포체 용액과 희석 완충액 유동들이 마주하는 180 ° 유동들로 만나도록 배열된 T-연결부를 포함하지만; 그러나, 보다 얇은 각도, 예컨대, 약 27 ° 내지 약 180 ° (예컨대, 약 90 °)를 제공하는 연결부들 또한 사용될 수 있다. 펌프 기전은 제어 가능한 완충액 유동을 제 2 혼합 구역에 전달한다. 한 양태에서, 제 2 혼합 구역에 제공되는 희석 완충액의 유동 비율은 제 1 혼합 구역으로부터 제 2 혼합 구역에 유입되는 지질 소포체 용액의 유동 비율과 실질적으로 동일하게 되도록 제어된다. 이 구체예는 유리하게는 제 2 혼합 구역에서 지질 소포체 용액과 혼합하는 희석 완충액의 유동을 보다 제어 가능하게 하므로, 제 2 혼합 과정 전반에 걸쳐 완충액에서의 지질 소포체 용액의 농도 또한 제어 가능하게 한다. 이러한 희석 완충액 유동 비율의 제어는 유리하게는 감소된 농도에서 작은 입자 크기 형성을 가능하게 한다.

[0324] 이러한 과정들 및 이러한 직접 희석 및 인-라인 희석 과정들을 실시하기 위한 장치들은 미국 특허 공개번호 제 20070042031에 상세히 기재되어 있으며, 그 내용은 본 출원에 실제로 온전히 참고문헌으로 포함된다.

[0325] 직접 희석 및 인-라인 희석 과정들을 사용하여 형성된 핵산-지질 입자들은 전형적으로 약 30 nm 내지 약 150 nm, 약 40 nm 내지 약 150 nm, 약 50 nm 내지 약 150 nm, 약 60 nm 내지 약 130 nm, 약 70 nm 내지 약 110 nm, 약 70 nm 내지 약 100 nm, 약 80 nm 내지 약 100 nm, 약 90 nm 내지 약 100 nm, 약 70 nm 내지 약 90 nm, 약 80 nm 내지 약 90 nm, 약 70 nm 내지 약 80 nm, less than 약 120 nm, 110 nm, 100 nm, 90 nm, 또는 80 nm, or 약 30 nm, 35 nm, 40 nm, 45 nm, 50 nm, 55 nm, 60 nm, 65 nm, 70 nm, 75 nm, 80 nm, 85 nm, 90 nm, 95 nm, 100 nm, 105 nm, 110 nm, 115 nm, 120 nm, 125 nm, 130 nm, 135 nm, 140 nm, 145 nm, 또는 150 nm (또는 이의 임의의 부분 또는 이에 속하는 임의의 범위)의 크기를 가진다. 이렇게 형성된 입자들은 응집하지 않으며 균일한 입자 크기를 구현하기 위해 선택적으로 크기결정(sized)된다.

[0326] 필요한 경우, 본 발명의 지질 입자들은 리포좀 크기결정에 사용가능한 임의의 방법들에 의해 크기결정될 수 있다. 크기결정은 바람직한 크기 범위 및 비교적 좁은 입자 크기 분포를 구현하기 위하여 실시될 수 있다.

[0327] 입자들을 바람직한 크기로 크기결정하기 위하여 몇가지 기법들이 이용가능하다. 리포좀에 사용되는 그리고 본 발명의 입자들에 동일하게 이용가능한 하나의 크기결정 방법은 미국 특허 제 4,737,323에 기재되어 있으며, 그 내용은 본 출원에 실제로 온전히 참고문헌으로 포함된다. 배쓰(bath) 또는 프로브(probe) 음파처리에 의한 입자 현탁액의 음파처리는 약 50 nm 미만 크기의 입자들로의 점진적인 크기 감소를 생성한다. 균질화는 보다 큰 입자들을 보다 작은 입자들로 분쇄하기 위한 전단 에너지를 필요로 하는 또다른 방법이다. 전형적인 균질화 절차에서, 입자들은 선택된 입자 크기, 전형적으로 약 60 내지 약 80 nm가 관찰될 때까지 표준 에멀젼 균질화장치를 통해 재순환된다. 두가지 방법 모두에서, 입자 크기 분포는 종래의 레이저-빔 입자 크기 판별, 또는 QELS에 의해 모니터 될 수 있다.

[0328] 소-공극 폴리카르보네이트 막 또는 비대칭 세라믹 막을 통한 입자들의 압출 또한 비교적 경계가 분명한 크기 분포로 입자 크기를 감소시키는 효과적인 방법이다. 전형적으로, 현탁액은 바람직한 입자 크기 분포가 구현될 때 까지 1회 또는 그 이상 막을 통해 순환된다. 입자들은 연속적으로 보다 작은-공극의 막들을 통해 압출되어 점진적인 크기 감소를 구현할 수 있다.

[0329] 일부 구체예들에서, 입자들 내 존재하는 핵산 (예컨대, siRNA 분자들)은 예컨대, 미국 특허 출원 제 09/744,103에 기재된 바와 같이 사전응축되며(precondensed), 그 내용은 본 출원에 실제로 온전히 참고문헌으로 포함된다.

[0330] 그 외 구체예들에서, 상기 방법들은 본 발명의 조성물을 사용하여 세포들의 리포펙션(lipofection)을 일으키기 위해 사용되는 비-지질 폴리양이온을 추가하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 적합한 비-지질 폴리양이온의 예들에는 핵사디메트린 브로마이드 (상표명 POLYBRENE®으로 판매, Aldrich Chemical Co.사, Milwaukee, Wisconsin, USA) 또는 핵사디메트린의 그 외 염이 포함된다. 그 외 적합한 폴리양이온에는, 예를 들면, 폴리-L-오르니틴, 폴리-L-아르기닌, 폴리-L-리신, 폴리-D-리신, 폴리알릴아민, 및 폴리에틸렌이민의 염들이 포함된다. 이러한 염들의 추가는 입자들이 형성된 이후가 바람직하다.

[0331] 일부 구체예들에서, 형성된 핵산-지질 입자에서 지질에 대한 핵산 (예컨대, siRNA) 비 (질량/질량 비)는 약

0.01 내지 약 0.2, 약 0.05 내지 약 0.2, 약 0.02 내지 약 0.1, 약 0.03 내지 약 0.1, 또는 약 0.01 내지 약 0.08 범위가 될 것이다. 출발 물질들(투입)의 비율 또한 이 범위에 속한다. 그 외 구체예들에서, 입자 제재는 10 mg의 총 지질 당 약 400  $\mu$ g 핵산 또는 약 0.01 내지 약 0.08, 그리고 더욱 바람직하게는, 약 0.04의, 지질에 대한 핵산 질량비를 사용하는데, 이는 50  $\mu$ g의 핵산 당 1.25 mg의 총 지질에 상응한다. 그 외 바람직한 구체예들에서, 입자는 약 0.08의 핵산:지질 질량비를 가진다.

[0332] 그 외 구체예들에서, 형성된 핵산-지질 입자에서 핵산(예컨대, siRNA)에 대한 지질 비(질량/질량 비)는 약 1 (1:1) 내지 약 100 (100:1), 약 5 (5:1) 내지 약 100 (100:1), 약 1 (1:1) 내지 약 50 (50:1), 약 2 (2:1) 내지 약 50 (50:1), 약 3 (3:1) 내지 약 50 (50:1), 약 4 (4:1) 내지 약 50 (50:1), 약 5 (5:1) 내지 약 50 (50:1), 약 1 (1:1) 내지 약 25 (25:1), 약 2 (2:1) 내지 약 25 (25:1), 약 3 (3:1) 내지 약 25 (25:1), 약 4 (4:1) 내지 약 25 (25:1), 약 5 (5:1) 내지 약 25 (25:1), 약 5 (5:1) 내지 약 20 (20:1), 약 5 (5:1) 내지 약 15 (15:1), 약 5 (5:1) 내지 약 10 (10:1), 또는 약 5 (5:1), 6 (6:1), 7 (7:1), 8 (8:1), 9 (9:1), 10 (10:1), 11 (11:1), 12 (12:1), 13 (13:1), 14 (14:1), 15 (15:1), 16 (16:1), 17 (17:1), 18 (18:1), 19 (19:1), 20 (20:1), 21 (21:1), 22 (22:1), 23 (23:1), 24 (24:1), 또는 25 (25:1) 범위, 또는 이의 임의의 부분 또는 이에 속하는 임의의 범위가 될 것이다. 출발 물질들(투입)의 비율 또한 이 범위에 속한다.

[0333] 전술한 바와 같이, 복합 지질은 CPL을 추가로 포함할 수 있다. 지질 입자-CPL(CPL-함유 지질 입자들)을 제조하는 여러가지 일반적인 방법들이 본 출원에서 논의된다. 2가지 일반적인 기법들에는 "후-삽입" 기법, 즉, 예를 들면, 사전-형성된 지질 입자로의 CPL 삽입 기법, 그리고 CPL이 예를 들면, 지질 입자 형성 단계들 동안 지질 혼합물에 포함되는 "표준" 기법이 포함된다. 후-삽입 기법은 주로 지질 입자 이중층 막의 외부면에 CPL을 보유하는 지질 입자들을 생성하는 반면, 표준 기법들은 내부 및 외부면들 모두에 CPL을 보유하는 지질 입자들을 제공한다. 이 방법은 인지질(콜레스테롤을 함유할 수 있음)로부터 제조된 소포체들과 또한 PEG-지질들(가령, PEG-DAA 및 PEG-DAG)을 함유하는 소포체들에 특히 유용하다. 지질 입자-CPL의 제조 방법들은, 예를 들면, 미국 특허 제 5,705,385; 6,586,410; 5,981,501; 6,534,484; 및 6,852,334; 미국 특허 공개번호 제 20020072121; 및 PCT 공개번호 제 WO 00/62813에 개시되어 있으며, 이들의 내용은 실제로 온전히 본 출원에 참고문헌으로 포함된다.

#### 키트

[0335] 본 발명은 또한 지질 입자들을 키트 형태로 제공한다. 일부 구체예들에서, 키트는 지질 입자들의 다양한 요소들(예컨대, 활성 제제, 가령, siRNA 분자들 및 입자들의 개별 지질 성분들)을 수용하기 위해 구분되어 있는 용기를 포함한다. 바람직하게는, 키트는 본 출원에 제시된 과정들 중 하나에 의해 제조된 본 발명의 지질 입자들을 수용하는 용기(예컨대, 바이얼 또는 앰플)를 포함한다. 특정 구체예들에서, 키트는 엔도솜 막 탈안정화제(예컨대, 칼슘 이온)를 추가로 포함할 수 있다. 키트는 전형적으로 본 발명의 입자 조성물들을, 제약상 허용 가능한 담체에서의 혼탁액으로서 또는 탈수 형태로서, 이들의 재수화(동결건조된 경우) 및 투여를 위한 지시사항과 함께 함유한다.

[0336] 본 발명의 제제들은 특정한 관심 세포들, 조직들, 또는 장기들을 우선적으로 표적하도록 조정될 수 있다. 핵산-지질 입자의 우선적 표적화는 지질 입자 자체의 조성을 제어함에 의해 이루어질 수 있다. 특정 구체예들에서, 본 발명의 키트는 이러한 지질 입자들을 포함하는데, 여기서 입자들은 혼탁액으로서 또는 탈수 형태로서 용기내 존재한다.

[0337] 특정 예들에서, 입자의 표적화를 더욱 향상시키기 위해 지질 입자의 표면에 표적화 모이어티를 부착시키는 것이 바람직할 수 있다. 표적화 모이어티(예컨대, 항체, 단백질 등.)를 지질(가령, 본 발명의 입자들에서 사용되는 것들)에 부착시키는 방법은 해당 분야의 숙련된 기술자들에게 공지이다.

#### 지질 입자들의 투여

[0339] 본 발명의 지질 입자들은, 일단 형성되면, siRNA 분자(예컨대, 표 A에 기재된 siRNA 분자)를 세포 내부로 유입시키는데 특히 유용하다. 따라서, 본 발명은 또한 siRNA 분자를 세포 내부로 유입시키는 방법들을 제공한다. 특정 구체예들에서, siRNA 분자는 감염된 세포 내부로 유입된다. 상기 방법들은 상기 기재된 입자들을 먼저 형성한 다음, 세포들로의 siRNA 전달이 일어나기에 충분한 시기동안 이 입자들을 상기 세포들과 접촉시킴으로써 시험관내 또는 생체내 실시될 수 있다.

[0340] 본 발명의 지질 입자들(예컨대, 핵산-지질 입자)은 이들이 혼합되거나 접촉되는 대부분의 임의의 세포 유형에 흡착될 수 있다. 일단 흡착되면, 입자들은 세포들의 한 부위에 의해 세포내이입되거나, 지질을 세포막과 교환

하거나, 세포들과 융합할 수 있다. 입자의 siRNA 부위의 전달 또는 혼입은 이러한 경로들 중 임의의 한 가지를 통해 일어날 수 있다. 특히, 융합이 일어날 경우, 입자 막은 세포막으로 통합되고 입자의 내용물은 세포내 유액과 조합된다.

[0341] 본 발명의 지질 입자들 (예컨대, 핵산-지질 입자들)은 투여 경로 및 표준 제약학적 관행에 따라 선택된 단독으로 또는 제약상 허용가능한 담체 (예컨대, 생리학적 식염수 또는 포스페이트 완충액)와의 혼합물로 투여될 수 있다. 일반적으로, 보통의 완충 식염수 (예컨대, 135-150 mM NaCl)가 제약상 허용가능한 담체로서 사용될 것이다. 그 외 적합한 담체들은 향상된 안정성을 위한 당단백질, 가령, 알부민, 지질단백질, 글로불린 등을 비롯하여 예컨대, 물, 완충수, 0.4% 식염수, 0.3% 글리신 등을 포함한다. 또다른 적합한 담체들은 예컨대, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, Mack Publishing Company, Philadelphia, PA, 17th ed. (1985)에 기재되어 있다. 본 출원에서 사용되는 "담체"에는 임의의 그리고 모든 용매들, 분산 매질, 운반체, 코팅, 희석액, 항균제 및 항진균제등장화 및 흡수 지연제, 완충제, 담체 용액, 혼탁액, 콜로이드 등이 포함된다. 어구 "제약상 허용가능한"은 인간에 투여시 알려지 또는 유사 부반응을 생성하지 않는 문자 물질 및 조성물을 지칭한다.

[0342] 제약상 허용가능한 담체는 일반적으로 지질 입자 형성 후 추가된다. 그러므로 지질 입자가 형성된 후, 입자는 제약상 허용가능한 담체, 가령, 보통의 완충 식염수에 희석될 수 있다.

[0343] 제약상 제제에서 입자들의 농도는 광범위하게, 즉, 중량으로 약 0.05% 미만, 통상적으로 약 2 내지 5% 또는 적어도 약 2 내지 5%로부터, 약 10 내지 90%까지 변화할 수 있으며, 선택된 특정 투여 방식에 따라 주로 유액 부피, 점도 등에 의해 선택될 것이다. 예를 들면, 이러한 농도는 치료 관련 유액 부하량을 저하시키기 위하여 증가될 수 있다. 이는 죽상경화증-연관 울혈성 심부전 또는 중증의 고혈압을 보유한 환자들에서 특히 바람직할 수 있다. 대안적으로, 자극성 지질들로 이루어진 입자들은 투여 부위에서의 염증을 줄이기 위해 저농도로 희석될 수 있다.

[0344] 본 발명의 제약학적 조성물은 종래의 널리-공지된 멸균 기법들에 의해 멸균될 수 있다. 수성 용액들은 사용을 위해 포장되거나 무균 상태하에 여과되어 동결건조될 수 있으며, 동결건조된 제재는 투여에 앞서 멸균 수용액과 조합된다. 이러한 조성물은 대략적인 생리학적 조건들에 요구되는 제약상 허용가능한 보조 물질, 가령, pH 조절 및 완충제, 장성 조절제 등, 예를 들면, 소듐 아세테이트, 소듐 락테이트, 소듐 클로라이드, 포타슘 클로라이드, 및 칼슘 클로라이드를 함유할 수 있다. 추가적으로, 입자 혼탁액은 보관시 자유-라디칼 및 지질-과산화성 손상에 대해 지질을 보호하는 지질-보호제를 포함할 수 있다. 지용성 자유-라디칼 소광제, 가령, 알파토코페롤, 및 수용성 철-특이적 키레이트제, 가령, 폐록사민이 적합하다.

[0345] 일부 구체예들에서, 본 발명의 지질 입자들은 하나 또는 그 이상의 siRNA 분자들 (예컨대, 표 A에 기재된 siRNA 분자)의 치료적 전달을 위한 방법들에서 특히 유용하다. 특히, 하나 또는 그 이상의 HBV 유전자들의 전사 및/또는 번역을 하향조절 또는 침묵시킴으로써 인간에서 HBV 및/또는 HDV 감염의 생체내 치료 방법들을 제공하는 것이 본 발명의 목적이다.

#### A. 생체내 투여

[0347] 생체내 치료를 위한 전신 전달, 예컨대, 신체 시스템, 가령, 순환을 통한 본 출원에 기재된 siRNA 분자, 가령, 표 A에 기재된 siRNA의 원위 표적 세포로의 전달은 핵산-지질 입자들, 가령, PCT 공개 번호 제 WO 05/007196, WO 05/121348, WO 05/120152, 및 WO 04/002453에 기재되어 있는 것들을 사용하여 구현된 바 있으며, 이들의 개시 내용은 본 출원에 실제로 온전히 참고문헌으로 포함된다. 본 발명은 또한 혈청에서의 뉴클레아제 분해로부터 siRNA를 보호하고, 비-면역원성이며, 크기가 작고, 반복 투약에 적합한 완전히 캡슐화된 지질 입자들을 제공한다. 추가적으로, 하나 또는 그 이상의 siRNA 분자들은 본 발명의 지질 입자들에서 단독으로 투여되거나 웹티드, 폴리웹티드, 또는 소형 분자들을 포함하는 지질 입자들, 가령, 종래의 약물과 조합하여 투여 (예컨대, 공-투여) 될 수 있다.

[0348] 생체내 투여에 있어, 투여는 해당 분야에 공지된 임의의 방식, 예컨대, 주사, 경구 투여, 흡입 (예컨대, 비강내 또는 기관내), 경피 적용, 또는 직장 투여에 의한 것일 수 있다. 투여는 단회 또는 분할 투약을 통해 이루어질 수 있다. 제약학적 조성물은 비장관, 즉, 관절내, 정맥내, 복강내, 피하, 또는 근육내 투여될 수 있다. 일부 구체예들에서, 제약학적 조성물은 볼러스(bolus) 주사에 의해 정맥내 또는 복강내 투여된다 (예컨대, 미국 특허 제 5,286,634 참고). 세포내 핵산 전달은 또한 Straubinger 등의, *Methods Enzymol.*, 101:512 (1983); Mannino 등의, *Biotechniques*, 6:682 (1988); Nicolau 등의, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 6:239 (1989); and Behr, *Acc. Chem. Res.*, 26:274 (1993)에 논의된 바 있다. 또한 지질-계 치료제를 투여하는 그

외 방법들은 예를 들면, 미국 특허 제 3,993,754; 4,145,410; 4,235,871; 4,224,179; 4,522,803; 및 4,588,578에 기재되어 있다. 지질 입자들은 질병 부위에 직접 주사함에 의해 또는 질병 부위로부터 먼 부위에 주사함에 의해 투여될 수 있다 (예컨대, Culver, HUMAN GENE THERAPY, MaryAnn Liebert, Inc., Publishers, New York. pp.70-71(1994) 참고). 상기 참고문헌들의 개시 내용들은 본 출원에 실제로 온전히 참고문헌으로 포함된다.

[0349] 본 발명의 지질 입자들이 정맥내 투여되는 구체예들에서, 적어도 입자들의 총 주사 용량의 약 5%, 10%, 15%, 20%, 또는 25%가 주사 후 약 8, 12, 24, 36, 또는 48시간에 세포질에 존재한다. 그 외 구체예들에서, 지질 입자들의 총 주사 용량의 약 20%, 30%, 40% 이상 및 약 60%, 70% 또는 80% 만큼이 주사 후 약 8, 12, 24, 36, 또는 48시간에 세포질에 존재한다. 특정 예들에서, 복수의 입자를 중 약 10% 이상이 투여 후 약 1시간에 포유동물의 세포질에 존재한다. 그 외 특정 예들에서, 지질 입자들의 존재는 입자의 투여 후 적어도 약 1 시간에 검출가능하다. 일부 구체예들에서, siRNA 분자의 존재는 투여 후 약 8, 12, 24, 36, 48, 60, 72 또는 96 시간에 세포에서 검출가능하다. 그 외 구체예들에서, 표적 서열, 가령, 바이러스 또는 숙주 서열 발현의 siRNA 분자에 의한 하향조절은, 투여 후 약 8, 12, 24, 36, 48, 60, 72 또는 96 시간에 검출가능하다. 또한 그 외 구체예들에서, 표적 서열, 가령, 바이러스 또는 숙주 서열 발현의 siRNA 분자에 의한 하향조절은 우선적으로 감염된 세포들 및/또는 감염될 수 있는 세포들에서 일어난다. 또다른 구체예들에서, 투여 부위에 근접한 또는 먼 부위의 세포들에서 siRNA 분자의 존재 또는 효과는 투여 후 약 12, 24, 48, 72, 또는 96 시간, 또는 약 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 19, 20, 22, 24, 26, 또는 28일에 검출가능하다. 추가 구체예들에서, 본 발명의 지질 입자들은 비장관 또는 복강내 투여된다.

[0350] 단독으로 또는 그 외 적합한 성분들과 조합된 본 발명의 조성물은, 에어로졸 제제로 제조되어 (즉, 이 조성물은 "분무화(nebulized)"될 수 있다) 흡입 (예컨대, 비강내 또는 기관내)을 통해 투여될 수 있다 (Brigham 등의, Am. J. Sci., 298:278 (1989) 참고). 에어로졸 제제, 가령, 디클로로디플루오로메탄, 프로판, 질소등은 가압 허용가능한 추진장치(pressurized acceptable propellants)에 배치될 수 있다.

[0351] 특정 구체예들에서, 제약학적 조성물은 비강내 분사, 흡입, 및/또는 그 외 에어로졸 전달 운반체에 의해 전달될 수 있다. 비강 에어로졸 분사를 통해 폐로 직접 핵산 조성물을 전달하는 방법은, 예컨대, 미국 특허 제 5,756,353 및 5,804,212에 기재된 바 있다. 유사하게, 비강내 마이크로입자 레진 및 리소포스파티딜-글리세롤화합물 (미국 특허 5,725,871)을 사용하는 약물의 전달 또한 제약학 분야에 널리 공지이다. 유사하게, 폴리테트라플루오로에틸렌 지지 매트릭스 형태의 점막경유 약물 전달은 미국 특허 제 5,780,045에 기재되어 있다. 상기 설명된 특허들의 개시내용은 본 출원에 실제로 온전히 참고문헌으로 포함된다.

[0352] 비장관 투여, 가령, 예를 들면, 관절내 (관절에서), 정맥내, 근육내, 피부내, 복강내, 및 피하 경로에 의한 투여에 적합한 제형에는, 항산화제, 완충액, 정균제(bacteriostats), 및 의도한 수용자의 혈액과 함께 제제를 등장성으로 만드는 용질을 함유할 수 있는 수성 및 비-수성의 등장성 멸균 주사 용액들, 그리고, 혼탁화제, 용해화제, 증점제, 안정화제, 및 보존제를 포함할 수 있는 수성 및 비-수성 멸균 혼탁액이 포함된다. 본 발명의 실시에 있어서, 조성물은 바람직하게, 예를 들면, 정맥내 주입, 경구, 국소, 복강내, 방광내, 또는 척수강내로 투여된다.

[0353] 일반적으로, 정맥내 투여시, 지질 입자 제제들은 적합한 제약상 담체와 함께 제제화된다. 많은 제약상 허용가능한 담체들이 본 발명의 조성물 및 방법들에서 사용될 수 있다. 본 발명에 사용하기에 적합한 제제들은 예를 들면, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, Mack Publishing Company, Philadelphia, PA, 17th ed. (1985)에 기재되어 있다. 다양한 수성 담체들, 예를 들면, 물, 완충수, 0.4% 식염수, 0.3% 글리신 등이 사용될 수 있으며, 이러한 담체들은 향상된 안정성을 위해 당단백질, 가령, 알부민, 지질단백질, 글로불린 등을 포함할 수 있다. 일반적으로, 보통의 완충 식염수 (135-150 mM NaCl)가 제약상 허용가능한 담체로서 사용될 것이다, 그 외 적합한 담체들도 가능할 것이다. 이를 조성물은 종래의 리포좀 멸균 기법들, 가령, 여과에 의해 멸균될 수 있다. 이러한 조성물은 대략적인 생리학적 조건들에 요구되는 제약상 허용가능한 보조 물질, 가령, pH 조절 및 완충제, 장성 조절제, 습윤제 등, 예를 들면, 소듐 아세테이트, 소듐 락테이트, 소듐 클로라이드, 포타슘 클로라이드, 및 칼슘 클로라이드, 소르비탄 모노라우레이트, 트리에탄올아민 올레이트 등을 함유할 수 있다. 이들 조성물은 상기 언급된 기법들을 사용하여 멸균될 수 있거나, 또는 대안적으로, 이들은 멸균 조건하에 제조될 수 있다. 생성된 수용액들은 사용을 위해 포장되거나 무균 상태하에 여과되어 동결건조될 수 있으며, 동결건조된 제재는 투여에 앞서 살균 수용액과 조합된다.

[0354] 특정 응용에서, 본 출원에 개시된 지질 입자들은 개체에 경구 투여를 통해 전달될 수 있다. 입자들은 부형제와 함께 혼입될 수 있으며 섭취가능 정제, 구강 정제, 트로키제(troches), 캡슐, 알약(pills), 로젠지제, 엘릭실제

(elixirs), 구강세척제, 혼탁액, 경구 스프레이, 시럽, 웨이퍼(wafers) 등의 형태로 사용될 수 있다 (예컨대, 미국 특허 제 5,641,515, 5,580,579, 및 5,792,451 참고, 이들의 개시내용은 본 출원에 실제로 온전히 참고문헌으로 포함된다). 이들 경구 투약 형태는 또한 다음을 함유할 수 있다: 결합제, 젤라틴; 부형제, 윤활제, 및/또는 착향제. 단위 투약 형태가 캡슐일 때, 상기 재료들 이외에도 액체 담체를 함유할 수 있다. 다양한 그 외 재료들이 코팅으로서 또는 투약 단위의 물리적 형태를 달리 변형시키기 위해 제공될 수 있다. 물론, 임의의 단위 투약 형태를 제조하는데 사용되는 임의의 재료는 제약상 순수하고 사용되는 양에 있어 실질적으로 비-독성이어야 한다.

[0355] 전형적으로, 이들 경구 제제들은 지질 입자들의 적어도 약 0.1% 또는 그 이상을 함유할 수 있으나, 입자들의 백분율은 물론 달라질 수 있으며 편의적으로 총 제제의 중량 또는 부피의 약 1% 또는 2% 내지 약 60% 또는 70% 또는 그 이상일 수 있다. 당연히, 각각의 치료적으로 유용한 조성을 내 입자들의 양은 임의로 제공되는 화합물의 단위 용량으로 적합한 용량이 수득되도록 준비될 수 있다. 이러한 제약학적 제제들의 제조에 있어 해당 분야의 숙련된 기술자는 인자들, 가령, 용해도, 생체이용률, 생물학적 반감기, 투여 경로, 제품 수명, 뿐만 아니라 그 외 약물학적 고려사항들을 고려할 것이며, 그리하여 여러가지 투약 및 치료 방식들이 바람직 할 수 있다.

[0356] 경구 투여에 적합한 제형들은 다음으로 구성될 수 있다: (a) 액체 용액, 가령, 희석액, 가령, 물, 식염수, 또는 PEG 400에 혼탁된 유효량의 패키지형 siRNA 분자 (예컨대, 표 A에 기재된 siRNA 분자); (b) 예정된 양의 siRNA 분자를, 액체, 고체, 과립 또는 젤라틴으로서 각각 함유하는 캡슐, 샤셋(sachets), 또는 정제; (c) 적절한 액체에서의 혼탁액; 및 (d) 적합한 에멀젼. 정제 형태는 락토오스, 수크로스, 만니톨, 소르비톨, 칼슘 포스페이트, 옥수수 전분, 감자 전분, 마이크로결정질 셀룰로오스, 젤라틴, 콜로이드 실리콘 디옥사이드, 활석, 마그네슘 스테아레이트, 스테아르산, 및 그 외 부형제, 착색제, 충전제, 결합제, 희석액, 완충제, 보습제, 보존제, 착향제, 염료, 봉해제, 및 제약상 상용가능한 담체 중 하나 또는 그 이상을 포함할 수 있다. 로젠파크 형태는 향미제, 예컨대, 수크로스에 siRNA 분자를 포함할 수 있으며, 뿐만 아니라 캔디(pastilles)는 불활성 기체(inert base), 가령, 젤라틴 및 글리세린 또는 수크로스 및 아카시아 에멀젼, 젤등에 치료적 핵산을 포함하는데, 이들은 siRNA 분자 이외에도, 해당 분야에 공지된 담체들을 함유한다.

[0357] 또 다른 이들의 사용 예에서, 지질 입자들은 광범위한 국소 투약 형태에 혼입될 수 있다. 예컨대, 핵산-지질 입자들을 함유하는 혼탁액은 젤, 오일, 에멀젼, 국소 크림, 페이스트, 연고, 로션, 폼(foams), 무스(mousses) 등으로서 제형화되어 투여될 수 있다.

[0358] 본 발명의 지질 입자들의 제약학적 제재들의 제조시, 비어있는 입자들 또는 치료 제제, 가령, 외부 표면 관련 siRNA를 보유한 입자들을 감소 또는 제거하기 위하여 정제되어 있는 다양한 입자들을 사용하는 것이 바람직하다.

[0359] 본 발명의 방법들은 다양한 숙주들에서 실시될 수 있다. 바람직한 숙주들에는 포유동물 종들, 가령, 영장류동물 (예컨대, 인간 및 침팬지, 뿐만 아니라 그 외 비인간 영장류동물), 개, 고양이, 말, 소, 양, 염소, 설치류 (예컨대, 래트 및 마우스), 토끼류, 및 돼지가 포함된다.

[0360] 투여되는 입자들의 양은 지질에 대한 siRNA 분자들의 비율, 사용되는 특정 siRNA, 처리되는 HBV의 균주, 연령, 체중, 및 환자의 상태, 그리고 임상의사의 판단에 따라 달라질 것이나, 일반적으로 체중 1kg 당 약 0.01 내지 약 50 mg, 바람직하게는 약 0.1 내지 약 5 mg/kg 체중, 또는 투여 (예컨대, 주사) 1회 당 약  $10^8$ - $10^{10}$  개 입자들이 될 것이다.

## B. 시험관내 투여

[0361] 시험관내 적용에 있어, siRNA 분자들의 전달은 배양에서 성장시킨 임의의 세포에 대한 것일 수 있다. 바람직한 구체예들에서, 세포들은 동물 세포, 더욱 바람직하게는 포유동물 세포, 그리고 가장 바람직하게는 인간 세포이다.

[0362] 세포들과 지질 입자들 간의 접촉은, 시험관내 실시될 경우, 생물학적으로 상용가능한 배지에서 일어난다. 입자들의 농도는 특정 적용에 따라 광범위하게 변화하지만, 일반적으로 약 1  $\mu\text{mol}$  내지 약 10  $\text{mmol}$ 이다. 지질 입자들을 이용한 세포들의 처리는 일반적으로 생리학적 온도 (약 37°C)에서 약 1 내지 48 시간, 바람직하게는 약 2 내지 4 시간의 시기 동안 실시된다.

[0364] 바람직한 구체예들 중 한 그룹에서, 지질 입자 혼탁액은 약  $10^3$  내지 약  $10^5$  세포/ml, 더욱 바람직하게는 약 2 x  $10^4$  세포/ml의 세포 밀도를 가지는 60-80% 융합 플레이팅 세포에 추가된다. 세포에 추가되는 혼탁액의 농도는

바람직하게는 약 0.01 내지 0.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 더욱 바람직하게는 약 0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이다.

[0365] 세포의 조직 배양이 요구될 수 있는 정도는 해당 분야에 널리 공지이다. 예를 들면, Freshney, Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique, 3rd Ed., Wiley-Liss, New York (1994), Kuchler 등의, Biochemical Methods in Cell Culture and Virology, Dowden, Hutchinson and Ross, Inc. (1977), 및 본 출원에서 인용된 참고문헌들은 세포 배양에 대한 일반적인 지침을 제공한다. 배양된 세포 시스템은 종종 세포들의 단일층 형태로 존재할 것이나, 세포 혼탁액 또한 사용된다.

[0366] 엔도솜 방출 지표 (ERP) 분석법을 사용하여, 본 발명의 핵산-지질 입자의 전달 효율이 최적화될 수 있다. ERP 분석법은 미국 특허 공개번호 제 20030077829에 상세히 기재되어 있으며, 그 내용은 본 출원에 실제로 온전히 참고문헌으로 포함된다. 더욱 특히, ERP 분석법의 목적은 지질 입자의 다양한 양이온성 지질 및 헬퍼 지질 성분들의 효과를, 엔도솜 막과의 결합/흡수 또는 융합/엔도솜 막의 탈안정화에 대한 이들의 상대적 효과에 기초하여 구별하는 것이다. 이 분석법은 지질 입자의 각 성분이 전달 효율에 어떻게 영향을 미치는지, 이로써 지질 입자를 어떻게 최적화시키는지를 정량적으로 결정할 수 있게 한다. 보통, ERP 분석법은 리포터 단백질 (예컨대, 루시페라제,  $\beta$ -갈락토시다제, 녹색 형광 단백질 (GFP) 등)의 발현을 측정하며, 일부 예들에서, 발현 플라스미드에 대해 최적화된 지질 입자 제제 또한 siRNA의 캡슐화에 적절할 것이다. 그 외 예들에서, ERP 분석법은 siRNA의 존재 또는 부재시 표적 서열의 전사 또는 번역의 하향조절을 측정하도록 조정될 수 있다. 다양한 지질 입자들 각각에 대한 ERP를 비교함으로써, 최적화된 시스템, 예컨대, 세포에서의 흡수가 가장 큰 지질 입자를 용이하게 결정할 수 있다.

### C. 지질 입자들의 검출

[0368] 일부 구체예들에서, 본 발명의 지질 입자들은 피험체에서 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 또는 그 이후의 시간에 검출가능하다. 그 외 구체예들에서, 본 발명의 지질 입자들은 피험체에서 입자 투여 후 약 8, 12, 24, 48, 60, 72, 또는 96 시간에, 또는 약 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 19, 22, 24, 25, 또는 28일에 검출가능하다. 입자들의 존재는 피험체의 세포, 조직, 또는 그 외 생물학적 샘플들에서 검출될 수 있다. 입자들은, 예컨대, 입자들의 직접 검출, siRNA 서열의 검출, 관심 표적 서열의 검출 (즉, 관심 서열의 발현 또는 감소된 발현을 검출함으로써), EBOV 단백질에 의해 조절되는 화합물 (예컨대, 인터페론)의 검출, 피험체 내 바이러스 부하량의 검출, 또는 이의 조합에 의해 검출될 수 있다.

#### 1. 입자들의 검출

[0370] 본 발명의 지질 입자들은 해당 분야에 공지된 임의의 방법을 사용하여 검출될 수 있다. 예를 들면, 표지는 해당 분야에 널리 공지된 방법들을 사용하여 지질 입자의 일 성분에 직접적으로 또는 간접적으로 커플링 될 수 있다. 널리 다양한 표지들이 사용될 수 있으며, 표지의 선택은 요구되는 민감도, 지질 입자 성분과의 접합 용이성, 안정성 요건, 및 사용가능한 기구 및 취급 방침(disposal provisions)에 따라 달라진다. 적합한 표지에는, 제한 없이, 스펙트럼 표지, 가령, 형광 염료들 (예컨대, 형광물질 및 유도체, 가령, 형광물질 이소티오시아네이트 (FITC) 및 Oregon Green™; 로다민 및 유도체, 가령, 텍사스 레드(Texas red), 테트라로디민 이소티오시아네이트 (TRITC) 등., 디옥시제닌, 비오틴, 피코에리트린, AMCA, CyDyes™ 등; 방사선표지제, 가령,  $^3\text{H}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{33}\text{P}$  등; 효소, 가령, 호스 래디쉬 페옥시다제, 알칼리성 포스파타제등; 스펙트럼 비색 표지, 가령, 콜로이드 금 또는 착색 유리 또는 플라스틱 비드, 가령, 폴리스티렌, 폴리프로필렌, 라텍스등이 포함된다. 이러한 표지는 해당 분야에 공지된 임의의 수단을 이용하여 검출될 수 있다.

#### 2. 핵산의 검출

[0372] 핵산 (예컨대, siRNA 분자들)은 본 출원에서 해당 분야의 숙련된 기술자에게 널리 공지된 수많은 수단들에 의해 검출되고 정량화된다. 핵산의 검출은 널리 공지된 방법들, 가령, 서던 분석법(Southern analysis), 노던 분석법(Northern analysis), 젤 전기영동, PCR, 방사선표지, 섬광 계수, 및 친화 크로마토그래피에 의해 이루어질 수 있다. 또 다른 생화학적 분석법들, 가령, 분광광도법, 방사선촬영, 전기영동, 모세관 전기영동, 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC), 박층 크로마토그래피 (TLC), 및 고확산 크로마토그래피 또한 사용될 수 있다.

[0373] 핵산 혼성화 형식의 선택은 염격하지 않다. 다양한 핵산 혼성화 형식은 해당 분야의 숙련된 기술자에게 공지이다. 예를 들면, 통상의 형식에는 샌드위치 분석법 및 경쟁 또는 치환 분석법이 포함된다. 혼성화 기법들은 일반적으로, 예컨대, "Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach," Eds. Hames and Higgins, IRL Press (1985)에 기재되어 있다.

[0374]

흔성화 분석법의 민감도는 검출되는 표적 핵산을 증대시키는 핵산 증폭 시스템의 사용을 통해 향상될 수 있다. 분자 탐침자로서 사용하기 위한 서열들을 증폭시키기에 또는 후속 서브클로닝을 위한 핵산 분절들을 생성하기에 적합한 시험관내 증폭 기법들은 공지이다. 중합효소 연쇄 반응 (PCR), 리가아제 연쇄 반응 (LCR), Q $\beta$ -복제효소 증폭, 및 그 외 RNA 중합효소 매개 기법들 (예컨대, NASBA<sup>TM</sup>)을 비롯한, 이러한 시험관내 증폭 방법들에 관하여 숙련된 기술자들을 안내하기에 충분한 기법들의 예들은 Sambrook 등의, In *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2000); 및 Ausubel 등의, *Short Protocols in Molecular Biology*, eds., *Current Protocols*, Greene Publishing Associates, Inc. 및 John Wiley & Sons, Inc. (2002); 뿐만 아니라 미국 특허 제 4,683,202; PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications (Innis 등의 eds.) Academic Press Inc. San Diego, CA (1990); Arnheim & Levinson (October 1, 1990), *C&EN* 36; The *Journal of NIH Research*, 3:81 (1991); Kwoh 등의, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:1173 (1989); Guatelli 등의, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:1874 (1990); Lomeil 등의, *J. Clin. Chem.*, 35:1826 (1989); Landegren 등의, *Science*, 241:1077 (1988); Van Brunt 등의, *Biotechnology*, 8:291 (1990); Wu 및 Wallace, *Gene*, 4:560 (1989); Barringer 등의, *Gene*, 89:117 (1990); 및 Sooknanan 및 Malek의, *Biotechnology*, 13:563 (1995)에서 발견된다. 시험관내 증폭된 핵산들을 클로닝하는 개선된 방법들은 미국 특허 제 5,426,039에 기재되어 있다. 해당 분야에서 설명되는 그 외 방법들은 핵산 서열 기반 증폭 (NASBA<sup>TM</sup>, Cangene, Mississauga, Ontario) 및 Q $\beta$ -복제효소 시스템이다. 이러한 시스템은 선택된 서열이 존재하는 경우에만 PCR 또는 LCR 프라이머가 연장되거나 라이케이션(ligation)되도록 설계된 돌연변이를 곧바로 식별하기 위해 사용될 수 있다. 대안적으로, 선택된 서열들은 일반적으로 예를 들면, 비특이적 PCR 프라이머를 사용하여 증폭될 수 있으며 증폭된 표적 구역은 이후 돌연변이를 나타내는 특이적 서열에 대해 탐침된다. 상기 참고문헌들의 개시 내용들은 본 출원에 실제로 온전히 참고문헌으로 포함된다.

[0375]

탐침자로서 사용하기 위한, 예컨대, 시험관내 증폭법들에서, 유전자 탐침자로서, 또는 억제제 성분들로서 사용하기 위한 핵산은 전형적으로 Beaucage 등의, *Tetrahedron Letts.*, 22:1859 1862 (1981)에 의해 설명된 고체상 포스포라미다이트 트리에스테르법에 따라, 예컨대, Needham VanDevanter 등의, *Nucleic Acids Res.*, 12:6159 (1984)에 기재된 자동화 합성장치를 사용하여 화학적으로 합성된다. 필요한 경우, 폴리뉴클레오티드의 정제는 전형적으로 Pearson 등의, *J. Chrom.*, 255:137 149 (1983)에 기재된 바와 같이 자연(native) 아크릴아미드 젤 전기영동에 의해 또는 음이온 교환 HPLC에 의해 수행된다. 합성 폴리뉴클레오티드의 서열은 Grossman 및 Moldave (eds.) Academic Press, New York, *Methods in Enzymology*, 65:499에서의 Maxam 및 Gilbert의 화학적 분해법 (1980)을 사용하여 확인될 수 있다.

[0376]

전사 수준을 결정하기 위한 대안적 수단은 현장 흔성화이다. 현장 흔성화 분석법은 널리 공지이며 일반적으로 Angerer 등의, *Methods Enzymol.*, 152:649 (1987)에 기재되어 있다. 현장 흔성화 분석법에서, 세포들은 고체지지체, 전형적으로 유리 슬라이드에 고정된다. DNA가 탐침되어야 하는 경우, 세포들은 열 또는 알칼리로 변성된다. 그 후 세포들은 표지되는 특정 탐침자의 어닐링을 가능하게 하는 적절한(moderate) 온도에서 흔성화 용액과 접촉된다. 탐침자는 바람직하게는 방사성동위원소 또는 형광 리포터로 표지된다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

**실시예**

[0377]

본 발명은 구체적인 실시예들에 의해 보다 상세히 설명될 것이다. 다음의 실시예들은 설명을 목적으로 제공되는 것이며 본 발명을 어떠한 방식으로든 제한하고자 하는 것이 아니다. 해당 분야의 숙련된 기술자들은 본질적으로 동일한 결과들을 산출하기 위하여 변화 또는 변형될 수 있는 중요하지 않은 다양한 지표들을 용이하게 알고 있을 것이다.

**실시예 1.**

[0380]

본 실시예는 표 A에 제시된 15개 siRNA 서열들의 활성을 침묵시키는 HBV 유전자를 테스트하기 위하여 사용되는 생물학적 분석법을 설명한다.

[0381]

모든 후보 siRNA들을 완전하게 매칭시키기 위하여 HBV 유전체 서열 (등록 번호 EU939600.1)을 조작하였다. 구체적으로, 각 서열 구역에 대해 5' 및 3' 단부 모두에서 30 bp의 플랭킹 서열을 포함하고 우리의 후보 siRNA들에 대한 표적 부위들을 함유하는 다음 4가지 서열 구역들을 가상으로 조합하였다: 212 내지 803, 1062 내지 1922, 2237 내지 2460, 및 2783 내지 2862. 모든 후보 siRNA들이 이러한 합성의 공통(consensus) HBV 표적 분절에 완전히 상보적이었음을 확인하기 위하여 6개의 돌연변이들이 삽입되었다 (EU939600.1에 대해, 위치 454 C>T; 위치

598 T>C; 위치 1206 A>C; 위치 1287 A>C; 및 위치 1461 G>C). psiCHECK-2 듀얼 루시페라제 벡터(Dual Luciferase vector)로의 클로닝을 촉진시키기 위하여 5' 및 3' 단부에 각각 추가되는 제한 효소 부위들 XhoI 및 Not I를 보유한 합성의 공통 HBV 표적 분절이 합성되었다. XhoI/Not I 클로닝 부위는 psiCHECK-2 듀얼 루시페라제 벡터 상에서 레닐라(Renilla) 루시페라제의 정지 코돈과 폴리아데닐화 신호 사이에 존재한다.

[0382] 후보 siRNA들의 활성을 침목시키는 HBV 유전자는 Dual-Glo 분석 시스템에서 레닐라 루시페라제 (R-Luc) 활성의 감소를 반딧불이 루시페라제 (F-Luc) 활성과 관련하여 측정함으로써 테스트되었다 (Promega, Madison, WI, USA). 요약하자면, Cos-7 세포들을 96-웰 플레이트에서 각 웰당 25,000개 세포들의 밀도로 과종하고 리포펙타민 2000을 사용하여 각 웰 당 100 ng의 리포터 플라스미드로 형질감염시켰다. 37°C/5% CO<sub>2</sub>에서 4시간 동안 배양 후 배지를 제거하고 Cos-7 세포들을 변화하는 농도의 HBV siRNA로 4회 형질감염시킨 후, 상기 조건에서 20시간 동안 더 배양시켰다. 두가지 루시페라제들의 발현은 발광 검출에 의해 결정되었다. HBV-siRNA 처리된 샘플들의 R-Luc/F-Luc 발현은 음성 (비-표적화) siRNA 처리 세포들에서의 R-Luc/F-Luc 발현의 평균에 대해 정규화되었다. 양성 대조군으로서, R-Luc에 대한 siRNA가 포함되었다. 50% 억제 농도 (IC<sub>50</sub>)는 XLfit 함수 (IDBS MathIQ)에 의해 계산되었다.

### 실시예 2.

[0384] 본 실시예는 1m 내지 15m로 명명된 siRNA들의 그룹에서 선택된 2개의 상이한 siRNA들의 모든 가능한 "2원(two way)" 조합을 기재한다 (표 A 참고). 본 출원의 실시예 2 및 3에서 사용되는 용어 "조합"은 조합된 siRNA 문자들이 동일한 물질 조성을 내에 함께 존재함을 의미한다 (예컨대, 동일한 용액 내 함께 용해됨; 또는 동일한 지질 입자 내 함께 존재함; 또는 지질 입자들의 동일한 제약상 제제 내 함께 존재함, 이러한 제약상 제제 내 각 지질 입자는 siRNA 조합의 각각의 상이한 siRNA를 포함하거나 포함하지 않을 수 있음). 조합된 siRNA 문자들은 통상 공유적으로 함께 연결되지 않는다.

[0385] 개개의 siRNA들은 각각 표 A에 도시된 바와 같이 명칭, 1m 내지 15m으로 식별된다. 조합에서 각각의 siRNA 번호는 대시 (-)로 구분되는데; 예를 들면, 표기 "1m-2m"은 siRNA 번호 1m과 siRNA 번호 2m의 조합을 나타낸다. 대시는 조합 내 상이한 siRNA 문자들이 서로 공유적으로 연결되어 있음을 의미하지 않는다. 상이한 siRNA 조합들은 세미콜론으로 구분된다. 한 조합에서 siRNA 번호들의 순서는 중요하지 않다. 예를 들면, 조합 1m-2m은 조합 2m-1m과 동일한데 왜냐하면 이들 표기 모두가 siRNA 번호 1m과 siRNA 번호 2m의 동일한 조합을 기재하기 때문이다.

[0386] 본 실시예에 기재된 siRNA 조합들은, 예를 들면, 인간에서 HBV 및/또는 HDV 감염을 치료하기 위해, 그리고 HBV 감염 및/또는 HDV 감염과 관련된 적어도 1개의 증상을 개선하기 위해 본 발명을 실시함에 있어 유용하다.

[0387] siRNA 1m 내지 15m의 2원 siRNA 조합들은 다음과 같다: 1m-2m; 1m-3m; 1m-4m; 1m-5m; 1m-6m; 1m-7m; 1m-8m; 1m-9m; 1m-10m; 1m-11m; 1m-12m; 1m-13m; 1m-14m; 1m-15m; 2m-3m; 2m-4m; 2m-5m; 2m-6m; 2m-7m; 2m-8m; 2m-9m; 2m-10m; 2m-11m; 2m-12m; 2m-13m; 2m-14m; 2m-15m; 3m-4m; 3m-5m; 3m-6m; 3m-7m; 3m-8m; 3m-9m; 3m-10m; 3m-11m; 3m-12m; 3m-13m; 3m-14m; 3m-15m; 4m-5m; 4m-6m; 4m-7m; 4m-8m; 4m-9m; 4m-10m; 4m-11m; 4m-12m; 4m-13m; 4m-14m; 4m-15m; 5m-6m; 5m-7m; 5m-8m; 5m-9m; 5m-10m; 5m-11m; 5m-12m; 5m-13m; 5m-14m; 5m-15m; 6m-7m; 6m-8m; 6m-9m; 6m-10m; 6m-11m; 6m-12m; 6m-13m; 6m-14m; 6m-15m; 7m-8m; 7m-9m; 7m-10m; 7m-11m; 7m-12m; 7m-13m; 7m-14m; 7m-15m; 8m-9m; 8m-10m; 8m-11m; 8m-12m; 8m-13m; 8m-14m; 8m-15m; 9m-10m; 9m-11m; 9m-12m; 9m-13m; 9m-14m; 9m-15m; 10m-11m; 10m-12m; 10m-13m; 10m-14m; 10m-15m; 11m-12m; 11m-13m; 11m-14m; 11m-15m; 12m-13m; 12m-14m; 12m-15m; 13m-14m; 13m-15m; 및 14m-15m.

### 실시예 3.

[0389] 본 실시예는 1m 내지 15m로 명명된 siRNA 문자들의 그룹에서 선택된 3개의 상이한 siRNA들의 모든 가능한 "3원 (three way)" 조합을 기재한다 (표 A 참고). 개개의 siRNA들은 각각 표 A에 도시된 바와 같이 명칭, 1m 내지 15m으로 식별된다. 각각의 siRNA 번호는 대시 (-)로 구분되는데; 예를 들면, 표기 "1m-2m-3m"은 siRNA 번호 1m, siRNA 번호 2m 및 siRNA 번호 3m의 조합을 나타낸다. 대시는 조합 내 상이한 siRNA 문자들이 서로 공유적으로 연결되어 있음을 의미하지 않는다. 상이한 siRNA 조합들은 세미콜론으로 구분된다. 한 조합에서 siRNA 번호들의 순서는 중요하지 않다. 예를 들면, 조합 1m-2m-3m은 조합 3m-2m-1m과 동일한데 왜냐하면 이들 표기 모두가 siRNA 번호 1m과 siRNA 번호 2m 및 siRNA 번호 3m의 동일한 조합을 기재하기 때문이다.

[0390] 본 실시예에 기재된 siRNA 조합들은, 예를 들면, 인간에서 HBV 및/또는 HDV 감염을 치료하기 위해, 그리고 HBV 및/또는 HDV 감염과 관련된 적어도 1개의 증상을 개선하기 위해 본 발명을 실시함에 있어 유용하다.

[0391] siRNA 1m 내지 15m의 3원 siRNA 조합들은 다음과 같다: -13m; 8m-10m-14m; 8m-10m-15m; 8m-11m-12m; 8m-11m-

13m; 8m-11m-14m; 8m-11m-15m; 8m-12m-13m; 8m-12m-14m; 8m-12m-15m; 8m-13m-14m; 8m-13m-15m; 8m-14m-15m; 9m-10m-11m; 9m-10m-12m; 9m-10m-13m; 9m-10m-14m; 9m-10m-15m; 9m-11m-12m; 9m-11m-13m; 9m-11m-14m; 9m-11m-15m; 9m-12m-13m; 9m-12m-14m; 9m-12m-15m; 9m-13m-14m; 9m-13m-15m; 9m-14m-15m; 10m-11m-12m; 10m-11m-13m; 10m-11m-14m; 10m-11m-15m; 10m-12m-13m; 10m-12m-14m; 10m-12m-15m; 10m-13m-14m; 10m-13m-15m; 10m-14m-15m; 11m-12m-13m; 11m-12m-14m; 11m-12m-15m; 11m-13m-14m; 11m-13m-15m; 11m-14m-15m; 12m-13m-14m; 12m-13m-15m; 12m-14m-15m; 및 13m-14m-15m.

#### [0392] 실시예 4.

[0393] 본 실시예는 개개의 HBV siRNA 분자들에 대한 면역자극성 프로파일을 구현한 방법을 설명한다.

[0394] 건강한 성인 지원자들로부터 인간의 전혈을 개개의 혈액-함유 진공기(vacutainers)에 수집하였다. 응고 clotting)를 방지하기 위해 혈액 수집튜브들을 8번 뒤집었으며 멸균 식염수와 1:1 혼합한 후 이 혼합물 180 마이크로리터 ( $\mu\text{L}$ )를 96 웰의 깨끗한 폴리스테렌(polystyrene) 조직 배양 플레이트에 플레이팅하였다. 동시에, 희석제로서 PBS를 사용하여 각 LNP-제제화 siRNA 분자의 10X 용액을 제조하였다. 20 마이크로리터의 각 10X LNP-제제화 siRNA를 180  $\mu\text{L}$  혈액: 염수 함유 웰에 추가하여 600 nM의 최종 siRNA 농도를 산출하였다. 각각의 siRNA 분자는 각 제공자에 대하여 3개의 웰에서 테스트되었다. 단리된 인간 혈액을 개개의 siRNA 분자들과 함께 24 시간 동안 37°C의 5% CO<sub>2</sub>에서 배양하였다. 배양-후, 1200 rpm에서 20분간 배양 플레이트를 회전시켜 세포질을 수집하였다. 각 웰로부터 적어도 125  $\mu\text{L}$ 의 세포질을 수집하여 멸균 96웰 플레이트로 옮기고 깨끗한 아세테이트 밀봉제(seal)로 밀봉하였다.

[0395] 각 siRNA 분자에 대한 면역자극성 프로파일은 Luminex 분석 (Luminex Corp, Austin TX, USA)을 통해 인간 인터페론 알파 2 (IFN  $\alpha$  2), 인터루킨 1 수용체 길항제 (IL-1RA), 인터루킨 6 (IL-6), 및 단핵구 화학유인물질 단백질-1 (MCP-1)의 상대적 유도 수준을 PBS 단독으로 배양된 인간 전혈의 유도 수준과 비교하여 정량화함으로써 생성되었다. Luminex 200 시스템에서 데이터를 수집하고 표준 곡선에 대한 로지스틱 5-변수 가중 적합을 사용하는 xPonent 3.1.871.0 소프트웨어를 사용하여 보간하였다. 인간의 전혈을 3번 모으고 기술적 복제하여 분석하였다. 표 1의 데이터는 12명의 제공자의 PBS-처리된 혈액으로부터의 배수 변화의 평균이다. 이 실험에 있어 양성 대조군으로서 화학적으로 변형되지 않은 siRNA (S 가닥 서열 5'-3': GAAGGCCAGACGCGAAUATT; 서열번호:31)가 사용되었으며, 이 실험은 지시된 시토카인에 있어서 PBS-처리된 혈액 이상으로 다음과 같은 배수 증가를 생성하였다: 25.1 (IFN  $\alpha$  2); 14.3 (IL-1RA); 1,226.5 (IL-6); 및 51.6 (MCP-1).

표 1

| PBS-처리된 혈액으로부터의 배수 변화 |     | IFNa2 | IL-1RA  | IL-6 | MCP-1 |
|-----------------------|-----|-------|---------|------|-------|
| 명칭:                   |     |       |         |      |       |
| 1m                    | 0.9 | 5.7   | 571.3   | 16.6 |       |
| 2m                    | 1.0 | 12.9  | 1,986.8 | 43.3 |       |
| 3m                    | 0.8 | 9.6   | 1,384.1 | 31.3 |       |
| 4m                    | 1.1 | 13.3  | 2,109.1 | 45.7 |       |
| 5m                    | 1.0 | 10.6  | 1,944.9 | 37.5 |       |
| 6m                    | 0.9 | 13.2  | 1,403.1 | 43.7 |       |
| 7m                    | 1.0 | 10.5  | 1,598.3 | 34.9 |       |
| 8m                    | 1.0 | 12.2  | 1,429.3 | 45.4 |       |
| 9m                    | 0.9 | 5.6   | 479.6   | 16.3 |       |
| 10m                   | 0.7 | 9.3   | 945.7   | 27.2 |       |
| 11m                   | 0.8 | 9.7   | 1,189.9 | 29.8 |       |
| 12m                   | 0.8 | 9.4   | 1,111.4 | 28.0 |       |
| 13m                   | 0.7 | 8.8   | 855.5   | 20.6 |       |
| 14m                   | 1.0 | 13.5  | 1,967.7 | 49.0 |       |
| 15m                   | 0.9 | 13.3  | 1,335.4 | 46.1 |       |

[0396]

## 실시예 5.

[0398]

HBV siRNA의 센스 (S) 가닥이 RNAi 유전자 녹다운(knockdown)을 유발하는 능력을 가졌는지 여부를 평가하기 위한 수단으로서, S 가닥 침묵을 위한 센서로서 기능하는 루시페라제-계 리포터 플라스미드를 작제하였다. S 가닥 침묵에 있어 가능할 수 있는 영향(implications)에는 본 출원에 기재된 HBV siRNA의 S 가닥에 대한 상보성을 보유하는 내인성 유전자들에 있어서의 의도하지 않은 또는 바람직하지 않은 "오프-타겟" 효과가 포함된다. 이상적인 siRNA는 S 가닥 유전자 침묵 능력을 나타내지 않을 것이다.

[0399]

S 가닥 센서 리포터 플라스미드를 작제하기 위하여, 실시예 1에 기재된 HBV 표적 분절은 psi-CHECK2 플라스미드 벡터의 레닐라 루시페라제 정지 코돈과 폴리아데닐화 신호 사이에 역-보체 방향으로 클로닝되었다. 명칭 "psi-HBV BACKWARD"인 생성된 플라스미드는 레닐라 루시페라제-HBV mRNA를 전사하는데, 이는 S 가닥에 의한 RNAi 침묵에 대해서만 가능하고 안티센스 가닥에 의한 침묵에 대해서는 그렇지 않다. 특히, RNAi 유전자 침묵 효과는 표적 mRNA와 문제의 siRNA 가닥 사이에 완전한 상보성이 존재할 경우 가장 강하기 때문에, 이러한 리포터 설계는 S 가닥의 임의의 침묵 능력을 관찰하기에 가장 좋은 기회를 제공한다. 부분적 상보성은 단지 보다 약한 유전자 침묵을 생성하거나 유전자 침묵을 전혀 생성하지 않을 것으로 예상된다. 주석이 달린 어떠한 내인성 인간 mRNA도 표 A에 나열된 siRNA의 S 가닥에 완전히 상보적이지 않다.

[0400]

HBV siRNA의 유전자 침묵 활성은 Dual Luciferase Reporter (DLR) 분석 시스템 (Promega, Madison, WI, USA)에서 반딧불이 루시페라제 (FLuc) 활성과 관련하여 레닐라 루시페라제 (RLuc) 활성의 감소를 측정함으로써 테스트되었다. 96-웰 플레이트에서의 역-형질감염 과정에서 Cos-7 세포들이 사용되었다. 각각의 웰은 리포펙타민 2000과 복합된 지시된 농도의 siRNA와 함께 25,000개 세포들 및 40 ng 플라스미드를 함유하였다. 37°C/5% CO<sub>2</sub>에서 24시간 동안 배양 후, 배지를 제거하고 발광 측정을 위해 세포들을 가공하였다. Dual Luciferase ® Reporter 키트로부터, 50 uL의 수동 용해 완충액 (1x 농축)을 빛으로부터 보호된 각 웰에 추가하였으며 100 rpm에서 30분간 혼들었다. 용해물을 두 가지 루시페라제의 발현에 관하여 발광 검출에 의해 평가하였다. RLuc/FLuc 비율을 계산하고 플라스미드만으로 형질감염된 세포들 ("음성 대조군")에 대해 정규화하였다.

[0401]

기록된 데이터는 3개의 형질감염 웰들의 평균이다 (표 2). 100의 %RLuc/FLuc 대 음성 대조군 값은 유전자 침묵이 전혀 없음을 의미하는 것이다.

표 2

| psi-HBV BACKWARD    |                   |         |         |
|---------------------|-------------------|---------|---------|
| %RLuc/FLuc 대 음성 대조군 |                   |         |         |
|                     | 50<br>명칭<br>ng/ml | 5 ng/ml | 1 ng/ml |
| 3m                  | 99.5              | 92.1    | 104.0   |
| 12m                 | 98.6              | 97.6    | 106.6   |

[0402]

[0403] 레닐라 루시페라제 유전자를 직접 표적화하는, 실험 샘플들과 동일한 용량의 양성 대조군 siRNA는 각각 16.1, 37.3, 및 91.1의 평균 %RLuc/Fluc 대 음성 대조군 값을 산출하였다.

[0404]

[0404] 본 실시예에 개시된 세포 유형, 형질감염 방법, 및 용량 수준을 사용하는 지시된 siRNA의 온-타겟(on-target) 유전자 침묵 (즉, "psi-HBV" 리포터 플라스미드를 사용)은 다음과 같은 %RLuc/FLuc 대 음성 대조군 값을 산출하였으며, 이는 이러한 siRNA들의 온-타겟 침묵이 이러한 세포 유형 및 형질감염 조건에서 실제로 기능하고 있음을 나타낸다:

[0405]

3m: 각각 50, 5, 및 1 ng/ml 용량 수준에서 9.7, 18.2, 54.7; 그리고

[0406]

12m: 각각 50, 5, 및 1 ng/ml 용량 수준에서 11:2, 24.9, 59.5.

[0407]

[0407] 이와 더불어, 이들 결과들은 본 출원에 기재된 HBV siRNA의 S 가닥들이 주목할만한 RNAi 유전자 침묵 능력을 나타내지 않음을 의미한다. 그러므로 S 가닥이 원치않은 내인성 유전자들의 침묵을 유도할 가능성은 낮거나 무시해도 될 정도이다.

## 서 열 목 록

### SEQUENCE LISTING

<110> PROTIVA BIOTHERAPEUTICS, INC.

<120> COMPOSITIONS AND METHODS FOR SILENCING HEPATITIS B VIRUS GENE

EXPRESSION

<130> 08155.035W01

<140> PCT/US2015/053569

<141> 2015-10-01

<150> 62/120,149

<151> 2015-02-24

<150> 62/059,056

<151> 2014-10-02

<160> 31

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 1

agguauguug cccguuuguu u

21

<210> 2

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 2

acaaacgggc aacauaccuu u

21

<210> 3

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400>

3

gcucaguuua cuagugccau u

21

<210> 4

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 4

uggcacuagu aaacugagcu u

21

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

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

&lt;400&gt; 5

ccgugugcac uucgcuucau u 21

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

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

&lt;400&gt; 6

ugaagcgaag ugcacacgg u 21

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

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

&lt;400&gt; 7

gcucaguua cuagugccau u 21

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

&lt;223&gt; /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<400> 8

uggcacuagu aaacugagcu u 21

<210> 9

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 9

ccgugugcac uucgcuucau u 21

<210>

10

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 10

ugaaggcgaag ugcacacggu u 21

<210> 11

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 11

cuggcucagu uuacuagugu u 21

<210> 12

<211> 21

<212> RNA

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

&lt;400&gt; 12

cacuaguaaa cugagccagu u 21

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

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

&lt;400&gt; 13

ccgugugcac uucgcuucau u 21

&lt;210&gt; 14

&lt;

211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

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

&lt;400&gt; 14

ugaaggcgaag ugcacacggu u 21

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

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

&lt;400&gt; 15

gcucaguuua cuagugccau u 21

&lt;210&gt; 16

<211>  
 > 21  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 oligonucleotide"  
 <400> 16  
 uggcacuagu aaacugagcu u 21  
 <210> 17  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 oligonucleotide"  
 <400> 17  
 agguauug cccguuuguu u 21  
 <210> 18  
 <211>  
 21  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 oligonucleotide"  
 <400> 18  
 acaaacgggc aacauaccuu u 21  
 <210> 19  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 oligonucleotide"

&lt;400&gt; 19

gccgauccaa acugcggaa u

21

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

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

&lt;400&gt; 20

uuccgcagua uggaucggcu u

21

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

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

&lt;400&gt; 21

gccgauccaa acugcggaa u

21

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 21

&lt;

212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

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

&lt;400&gt; 22

uuccgcagua uggaucggcu u

21

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

<400> 23

gccgauccaa acugcgaaau u 21

<210> 24

<211> 21

<212>

> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 24

uuccgcagua uggaucggcu u 21

<210> 25

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 25

gccgauccaa acugcgaaau u 21

<210> 26

<211> 21

<212>

RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 26

uuccgcagua uggaucggcu u 21

<210> 27

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 27

gcucaguuua cuagugccau u

21

<210> 28

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 28

uggcacuagu aaacugagcu u

21

<210> 29

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 29

cuggcucagu uuacuagugu u

21

<210> 30

<211> 21

<212> RNA

<

213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 30

cacuaguaaa cugagccagu u

21

<210> 31

<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> 31

gaaggccaga cgcgaaauat t

21