



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2012년07월10일
(11) 등록번호 10-1164256
(24) 등록일자 2012년07월03일

- | | |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07C 235/06 (2006.01) A61K 47/48 (2006.01)
C07C 233/00 (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2006-7006599</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2004년09월15일
심사청구일자 2009년09월15일</p> <p>(85) 번역문제출일자 2006년04월05일</p> <p>(65) 공개번호 10-2006-0120009</p> <p>(43) 공개일자 2006년11월24일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/CA2004/001677</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2005/026372
국제공개일자 2005년03월24일</p> <p>(30) 우선권주장
60/503,239 2003년09월15일 미국(US)</p> <p>(56) 선행기술조사문헌
WO2000062813 A2*
US05976567 A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌</p> | <p>(73) 특허권자
프로티바 바이오제라퓨틱스, 인코포레이티드
캐나다 브리티시 콜롬비아 버나바이 길모어 웨이 100-3480 (우:브이5지 4와이1)</p> <p>(72) 발명자
헤예스, 제임스
캐나다 브이5지 4비2 브리티시 콜롬비아 밴쿠버 모버리 로드315-651
마클라클란, 이안
캐나다 브이5엘 2와이2 브리티시 콜롬비아 밴쿠버 그랜트스트리트 1514
암베기아, 엘렌 그레이스
캐나다 브이6케이 1알7 브리티시 콜롬비아 밴쿠버 #302 더블유. 4애브뉴 3150</p> <p>(74) 대리인
남상선</p> |
|--|---|

전체 청구항 수 : 총 65 항

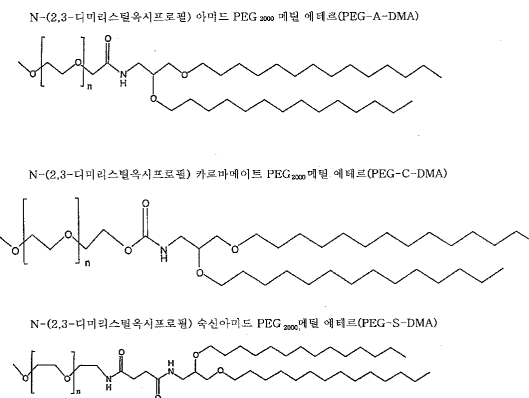
심사관 : 최원철

(54) 발명의 명칭 **폴리에틸렌글리콜 개질된 지질 화합물 및 그의 용도**

(57) 요약

통상 사용되는 PEG-지질 컨쥬게이트보다 증가된 안정성을 갖는 폴리에틸렌글리콜 (PEG) 디알킬옥시프로필 (DAA) 지질 컨쥬게이트가 개시된다. 세포 또는 환자에 생활성제를 전달하기 위한 상기 PEG-DAA 컨쥬게이트를 포함하는 리포솜 조성물, 안정화된 플라스미드-지질 입자 (SPLP) 및 안정화된 핵산-지질 입자 (SNALP)가 기재된다.

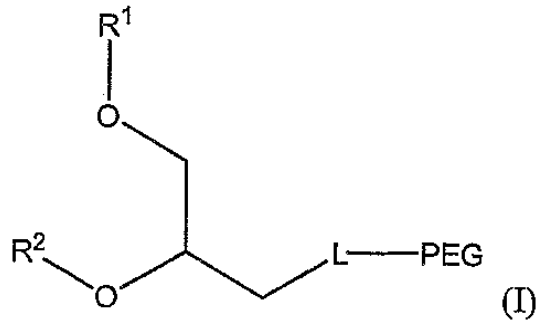
대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

하기 구조를 갖는 화학식 I의 화합물:



상기 식에서, R¹ 및 R²는 독립적으로 선택되며, 10 내지 20 개의 탄소 원자를 갖는 알킬기이고, PEG는, 말단 히드록실기가 메틸기로 치환된 폴리에틸렌글리콜이고, L은 카르바메이트 링커 잔기이다.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 R¹과 R²가 라우릴(C12), 미리스틸(C14), 팔미틸(C16), 스테아릴(C18) 및 이코실(C20)로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 화합물.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 R¹ 및 R²가 동일한 것인 화합물.

청구항 4

제 3 항에 있어서, 상기 R¹ 및 R²가 둘 모두 미리스틸(C14)인 화합물.

청구항 5

제 3 항에 있어서, 상기 R¹ 및 R²가 둘 모두 팔미틸(C16)인 화합물.

청구항 6

제 3 항에 있어서, 상기 R¹ 및 R²가 둘 모두 스테아릴(C18)인 화합물.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 알킬기가 포화된 것인 화합물.

청구항 8

제 1 항에 있어서, 상기 알킬기가 불포화된 것인 화합물.

청구항 9

제 1 항에 있어서, 상기 PEG가 550 달톤 내지 10,000 달톤 범위의 평균 분자량을 갖는 것인 화합물.

청구항 10

제 9 항에 있어서, 상기 PEG가 750 내지 5,000 달톤 범위의 평균 분자량을 갖는 것인 화합물.

청구항 11

제 9 항에 있어서, 상기 PEG가 1,000 내지 5,000 달톤 범위의 평균 분자량을 갖는 것인 화합물.

청구항 12

제 9 항에 있어서, 상기 PEG가 1,500 내지 3,000 달톤 범위의 평균 분자량을 갖는 것인 화합물.

청구항 13

제 9 항에 있어서, 상기 PEG가 2,000 달톤의 평균 분자량을 갖는 것인 화합물.

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

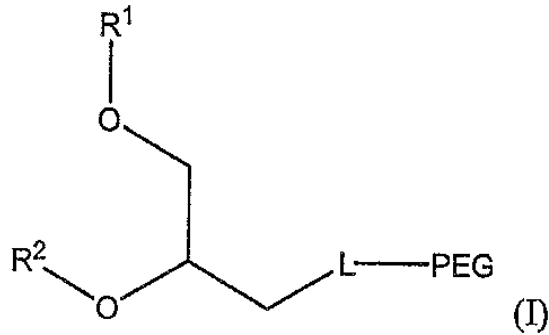
삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

하기 구조를 갖는 화학식 I의 폴리에틸렌글리콜-디아킬옥시프로필(PEG-DAA) 컨쥬게이트를 포함하는 리포솜:



상기 식에서, R¹ 및 R²는 독립적으로 선택되며, 10 내지 20 개의 탄소 원자를 갖는 알킬기이고,

PEG는, 말단 히드록실기가 메틸기로 치환된 폴리에틸렌글리콜이고,

L은 카르바메이트 링커 잔기이다.

청구항 19

제 18 항에 있어서, 생활성제(bioactive agent)를 추가로 포함하는 리포솜.

청구항 20

제 19 항에 있어서, 상기 생활성제가 항신생물제, 항생제, 면역조절제, 항염증제 및 중추신경계에 작용하는 약제로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 리포솜.

청구항 21

제 19 항에 있어서, 상기 생활성제가 단백질 또는 펩티드인 리포솜.

청구항 22

제 19 항에 있어서, 상기 생활성제가 핵산인 리포솜.

청구항 23

세포를, 활성제가 캡슐화되어 있는 제 18 항의 리포솜과 시험관내에서 접촉시키는 것을 포함하여, 시험관내에서 생활성제를 세포에 전달하는 방법.

청구항 24

생활성제를 환자에게 전달하기 위한 약제를 제조하는 데에 있어서, 생활성제가 캡슐화되어 있는 제 18 항의 리포솜을 사용하는 방법.

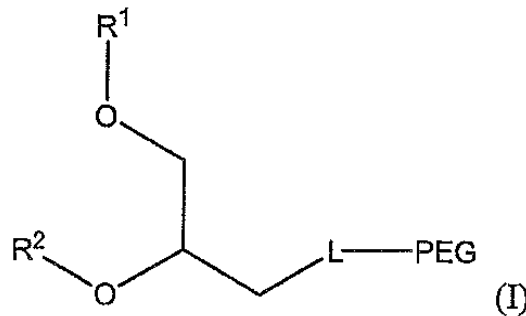
청구항 25

핵산,

양이온성 지질,

비양이온성 지질, 및

상기 구조를 갖는 화학식 I의 폴리에틸렌글리콜-디아킬옥시프로필(PEG-DAA) 컨주게이트를 포함하는, 핵산-지질 입자:



상기 식에서, R¹ 및 R²는 독립적으로 선택되며, 10 내지 20 개의 탄소 원자를 갖는 알킬기이고,

PEG는, 말단 히드록실기가 메틸기로 치환된 폴리에틸렌글리콜이고,

L은 카르바메이트 링커 잔기이다.

청구항 26

제 25 항에 있어서, 상기 양이온성 지질이,

N,N-디올레일-N,N-디메틸암모늄 클로라이드(DODAC),

N,N-디스테아릴-N,N-디메틸암모늄 브로마이드(DDAB),

N-(1-(2,3-디올레오일옥시)프로필)-N,N,N-트리메틸암모늄 클로라이드(DOTAP),

N-(1-(2,3-디올레오일옥시)프로필)-N,N,N-트리메틸암모늄 클로라이드(DOTMA), 및

N,N-디메틸-(2,3-디올레오일옥시)프로필아민(DODMA) 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 핵산-지질 입자.

청구항 27

제 25 항에 있어서, 상기 비양이온성 지질이 디올레오일포스파티딜에탄올아민(DOPE), 팔미토일올레오일포스파티딜콜린(POPC), 에그(egg) 포스파티딜콜린(EPC), 디스테아로일포스파티딜콜린(DSPC), 팔미토일올레오일포스파티딜글리세롤(POPG), 콜레스테롤 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 핵산-지질 입자.

청구항 28

제 25 항에 있어서, 상기 비양이온성 지질이 음이온성 지질인 핵산-지질 입자.

청구항 29

제 25 항에 있어서, 상기 비양이온성 지질이 중성 지질인 핵산-지질 입자.

청구항 30

제 25 항에 있어서, 상기 PEG-DAA 킨쥬게이트가 PEG-디라우틸옥시프로필(C12), PEG-디미리스틸옥시프로필(C14), PEG-디팔미틸옥시프로필(C16), 및 PEG-디스테릴옥시프로필(C18)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 핵산-지질 입자.

청구항 31

제 25 항에 있어서, 상기 양이온성 지질이 상기 입자에 존재하는 총 지질 중 2 몰% 내지 60 몰%를 차지하는 것인 핵산-지질 입자.

청구항 32

제 25 항에 있어서, 상기 양이온성 지질이 상기 입자에 존재하는 총 지질 중 5 몰% 내지 45 몰%를 차지하는 것인 핵산-지질 입자.

청구항 33

제 25 항에 있어서, 상기 양이온성 지질이 상기 입자에 존재하는 총 지질 중 5 몰% 내지 15 몰%를 차지하는 것인 핵산-지질 입자.

청구항 34

제 25 항에 있어서, 상기 양이온성 지질이 상기 입자에 존재하는 총 지질 중 40 몰% 내지 50 몰%를 차지하는 것인 핵산-지질 입자.

청구항 35

제 25 항에 있어서, 상기 비양이온성 지질이 상기 입자에 존재하는 총 지질 중 5 몰% 내지 90 몰%를 차지하는 것인 핵산-지질 입자.

청구항 36

제 25 항에 있어서, 상기 비양이온성 지질이 상기 입자에 존재하는 총 지질 중 20 몰% 내지 85 몰%를 차지하는 것인 핵산-지질 입자.

청구항 37

제 25 항에 있어서, 상기 PEG-DAA 킨쥬게이트가 상기 입자에 존재하는 총 지질 중 1 몰% 내지 20 몰%를 차지하는 것인 핵산-지질 입자.

청구항 38

제 25 항에 있어서, 상기 PEG-DAA 킨쥬게이트가 상기 입자에 존재하는 총 지질 중 2 몰% 내지 15 몰%를 차지하는 것인 핵산-지질 입자.

청구항 39

제 25 항에 있어서, 상기 PEG-DAA 킨쥬게이트가 상기 입자에 존재하는 총 지질 중 4 몰% 내지 10 몰%를 차지하는 것인 핵산-지질 입자.

청구항 40

제 25 항에 있어서, 상기 비양이온성 지질이 디스테아로일포스파티딜콜린(DSPC)인 핵산-지질 입자.

청구항 41

제 25 항에 있어서, 콜레스테롤을 추가로 포함하는 핵산-지질 입자.

청구항 42

제 41 항에 있어서, 상기 콜레스테롤이 상기 입자에 존재하는 총 지질 중 10 몰% 내지 60 몰%를 차지하는 것인 핵산-지질 입자.

청구항 43

제 41 항에 있어서, 상기 콜레스테롤이 상기 입자에 존재하는 총 지질 중 20 몰% 내지 45 몰%를 차지하는 것인 핵산-지질 입자.

청구항 44

제 25 항에 있어서, 상기 PEG-DAA 컨쥬게이트가 PEG-디라우틸옥시프로필(C12)인 핵산-지질 입자.

청구항 45

제 25 항에 있어서, 상기 PEG-DAA 컨쥬게이트가 PEG-디미리스틸옥시프로필(C14)인 핵산-지질 입자.

청구항 46

제 25 항에 있어서, 상기 PEG-DAA 컨쥬게이트가 PEG-디팔미틸옥시프로필(C16)인 핵산-지질 입자.

청구항 47

제 25 항에 있어서, 상기 PEG-DAA 컨쥬게이트가 PEG-디스테릴옥시프로필(C18)인 핵산-지질 입자.

청구항 48

제 25 항에 있어서, 상기 핵산이 DNA인 핵산-지질 입자.

청구항 49

제 25 항에 있어서, 상기 핵산이 플라스미드인 핵산-지질 입자.

청구항 50

제 25 항에 있어서, 상기 핵산이 안티센스 올리고뉴클레오티드인 핵산-지질 입자.

청구항 51

제 25 항에 있어서, 상기 핵산이 리보자임인 핵산-지질 입자.

청구항 52

제 25 항에 있어서, 상기 핵산이 소형 간섭 RNA(siRNA)인 핵산-지질 입자.

청구항 53

제 25 항에 있어서, 상기 핵산이 관심있는 치료 생성물을 엔코딩하는 것인 핵산-지질 입자.

청구항 54

제 53 항에 있어서, 상기 관심있는 치료 생성물이 펩티드 또는 단백질인 핵산-지질 입자.

청구항 55

제 53 항에 있어서, 상기 관심있는 치료 생성물이 소형 간섭 RNA(siRNA)인 핵산-지질 입자.

청구항 56

제 25 항에 있어서, 상기 핵산-지질 입자를 37 °C에서 20 분 동안 뉴클레아제에 노출시킨 후 상기 입자 중의 핵산이 분해되지 않는 것인 핵산-지질 입자.

청구항 57

제 25 항에 있어서, 상기 핵산-지질 입자를 37 °C에서 30 분 동안 혈청 중에서 인큐베이션한 후 상기 입자 중의 핵산이 분해되지 않는 것인 핵산-지질 입자.

청구항 58

제 25 항에 있어서, 핵산이 상기 핵산-지질 입자 중에 완전히 캡슐화된 것인 핵산-지질 입자.

청구항 59

제 25 항에 따른 핵산-지질 입자 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는, 생활성화제를 전달하기 위한 조성물.

청구항 60

제 59 항에 있어서, 상기 PEG-DAA 컨쥬게이트가 PEG-디미리스틸옥시프로필(C14)인 조성물.

청구항 61

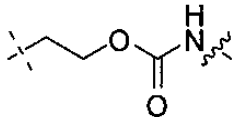
제 59 항에 있어서, 상기 PEG-DAA 컨쥬게이트가 PEG-디스테릴옥시프로필(C18)인 조성물.

청구항 62

핵산을 세포에 도입시키기 위한 약제를 제조하는 데에 있어서, 양이온성 지질, 비양이온성 지질, 제 1 항의 화합물 및 핵산을 포함하는 핵산-지질 입자를 사용하는 방법.

청구항 63

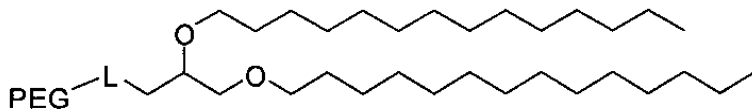
제 4 항에 있어서, L이 하기 화학식을 지니는 화합물:



상기 식에서, 점선은 PEG 말단 산소에 결합하는 지점을 나타내고, 물결선(wavy line)은 화합물의 나머지 부분에 결합하는 지점을 나타낸다.

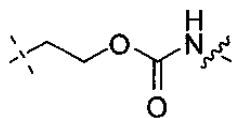
청구항 64

제 18 항에 있어서, 상기 PEG-DAA 컨쥬게이트가 하기 화학식을 지니는 것인 리포솜:



청구항 65

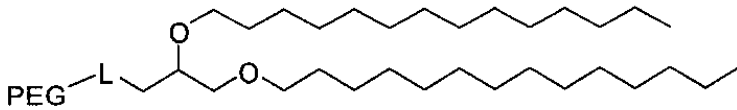
제 64 항에 있어서, L이 하기 화학식을 지니는 것인 리포솜:



상기 식에서, 점선은 PEG 말단 산소에 결합하는 지점을 나타내고, 물결선은 화합물의 나머지 부분에 결합하는 지점을 나타낸다.

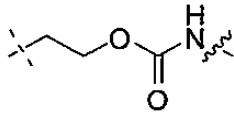
청구항 66

제 25 항에 있어서, 상기 PEG-DAA 컨쥬게이트가 하기 화학식을 지니는 것인 핵산-지질 입자:



청구항 67

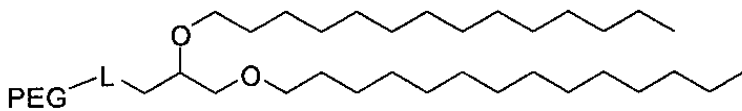
제 66 항에 있어서, L이 하기 화학식을 지니는 것인 핵산-지질 입자:



상기 식에서, 점선은 PEG 말단 산소에 결합하는 지점을 나타내고, 물결선은 화합물의 나머지 부분에 결합하는 지점을 나타낸다.

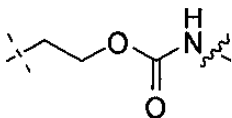
청구항 68

제 62 항에 있어서, 상기 PEG-DAA 컨쥬게이트가 하기 화학식을 지니는 것인 방법:



청구항 69

제 68 항에 있어서, L이 하기 화학식을 지니는 것인 방법:



상기 식에서, 점선은 PEG 말단 산소에 결합하는 지점을 나타내고, 물결선은 화합물의 나머지 부분에 결합하는 지점을 나타낸다.

명세서

배경 기술

[0001] 유전자 치료가 임상적으로 유용하기 위해서는 유효하고 안전한 유전자 전달 시스템이 필요하다. 바이러스 벡터는 비교적 효과적인 유전자 전달 시스템이지만 야생형으로의 복귀 가능성, 뿐만 아니라 면역 반응 문제와 같은 다양한 제약이 따른다. 그 결과, 비바이러스성 유전자 전달 시스템이 점점 주목을 받고 있다 (문헌 [Worgall, et al., Human Gene Therapy 8: 37-44 (1997); Peeters, et al., Human Gene Therapy 7: 1693-1699 (1996); Yei, et al., Gene Therapy 1: 192-200 (1994); Hope, et al., Molecular Membrane Biology 15: 1-14 (1998)] 참조). 현재, 플라스미드 DNA-양이온성 리포솜 복합체가 가장 흔히 사용되는 비바이러스성 유전자 전달 비히클이다 (문헌[Felgner, Scientific American 276: 102-106 (1997); Chonn, et al., Current Opinion in Biotechnology 6: 698-708 (1995)] 참조). 그러나, 복합체는 전신 적용에 적합하지 않은 대형의 잘 규명되지 않은 시스템이며, 상당한 독성 부작용을 나타낼 수 있다 (문헌[Harrison, et al., Biotechniques 19: 816-823 (1995); Huang, et al., Nature Biotechnology 15: 620-621 (1997); Templeton, et al., Nature Biotechnology 15: 647-652 (1997); Hofland, et al., Pharmaceutical Research 14: 742-749 (1997)] 참조).

[0002] 최근 연구는 플라스미드 DNA가 2층 지질 소포 내 캡슐화된 단일 플라스미드로 이루어진 소형 (약 70 nm 직경)의 "안정화된 플라스미드-지질 입자" (SPLP)에 캡슐화될 수 있다는 것을 밝혀내었다 (문헌[Wheeler, et al., Gene Therapy 6: 271-281 (1999)] 참조). 전형적으로, 이들 SPLP는 낮은 수준의 양이온성 지질인 "융합

성(fusogenic)" 지질 디올레오일포스파티딜-에탄올아민 (DOPE)을 함유하고, 폴리(에틸렌 글리콜) (PEG) 코팅의 존재에 의해 수성 매질 중에서 안정화된다. SPLP는 정맥내 (i. v.) 주사 후 연장된 순환 수명을 나타냄에 따라 전신 적용성을 갖고, 원위 종양 부위에서의 강화된 혈관 투과성으로 인해 이 영역에 우선적으로 축적되고, 이러한 종양 부위에서 이식유전자(transgene) 발현을 매개할 수 있다. 루시페라아제 마커 유전자를 함유하는 SPLP의 i. v. 주사 후 종양 부위에서 관찰되는 이식유전자 발현 수준은 플라스미드 DNA-양이온성 리포솜 복합체 (리포플렉스 (lipoplex)) 또는 나출(naked) DNA를 사용하여 달성될 수 있는 수준 보다 높다. 또한, 일부 적용에서는 최적의 치료적 이익을 위해 발현 수준의 개선이 필요할 수 있다 (예를 들면, 문헌[Monck, et al., J. Drug Targ. 7: 439-452 (2000)] 참조).

[0003] 전형적으로, 리포솜 및 SPLP는 둘 모두 PEG-지질 유도체를 포함한다. 전형적으로, PEG-지질은 PEG에 의한 디아실글리세로인지질, 예를 들면 디스테아로일포스파티딜에탄올아민 (DSPE)의 극성 헤드 기의 유도체화에 의해 제조된다. 대개, 이들 인지질은 에스테르 연결에 의해 글리세롤의 1-위치 및 2-위치에 결합된 2개의 지방 아실 쇄를 함유한다. 불행히도, 이들 아실기는 산성 또는 염기성 조건 하에서 절단되기 쉽다. 생성되는 가수분해 생성물, 예를 들면 글리세로포스페이트 및 리소인지질(lysophospholipid)의 유사체는 리포솜 또는 SPLP의 2층 구조와 회합된 채로 유지되지 않는다. 불행히도, 이러한 해리는 리포솜 또는 SPLP 구조의 일체성을 약화시켜, 리포솜 또는 SPLP로부터 생활성제 또는 약물을 현저하게 누출시키고 저장 동안 불안정성에 기여함으로써 리포솜 또는 SPLP 생성물의 저장 수명을 단축시킬 수 있다. 또한, 리포솜 또는 SPLP로부터 이들 가수분해 생성물, 예를 들면 PEG-리소인지질의 손실은 PEG-인지질의 존재로 인해 발생하는 이익을 무효화시킨다.

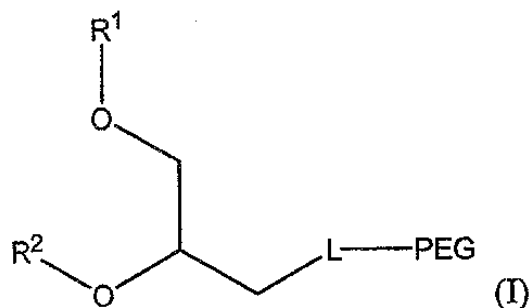
[0004] 지질 안정성은 리포솜 또는 SPLP 약물 전달 시스템 개발에 중요하다. 따라서, 가수분해에 덜 민감하여 리포솜 또는 SPLP의 순환 생명(circulation longevity)을 증가시키는 PEG-지질을 개발하는 것이 바람직하다. 본 발명은 상기 필요 및 다른 필요들을 충족시킨다.

발명의 상세한 설명

[0005] 발명의 개요

[0006] 본 발명은 통상 사용되는 PEG-지질 컨쥬게이트 (예를 들면, PEG-PE 컨쥬게이트)에 비해 증가된 안정성을 갖는 신규한 폴리에틸렌글리콜-디아킬옥시프로필(PEG-DAA) 컨쥬게이트를 제공한다. 본 발명의 PEG 개질된 디알킬프로필 컨쥬게이트는 리포솜, SNALP, 또는 SPLP의 순환 생명 또는 수명을 증가시킴으로써 리포솜, 뿐만 아니라 핵산-지질 입자 (예를 들면, SNALP 및 SPLP)의 특성을 강화시킨다. 사실상, 놀랍게도 본 발명의 PEG-DAA 컨쥬게이트가 다른 통상 사용되는 PEG-지질 유도체보다 안정하다는 것이 밝혀졌다. 본 발명의 PEG-DAA 컨쥬게이트는 이들의 증가된 안정성의 결과로써, 리포솜 또는 SPLP의 순환 생명 또는 수명을 증가시키고, 또한 다른 PEG-지질 컨쥬게이트가 사용되는 경우 SPLP 또는 리포솜 2중층의 지방 아실 쇄의 가수분해로 인한 누출을 감소시킨다.

[0007] 본 발명은 하기 구조를 갖는 화학식 I의 신규한 PEG-DAA 컨쥬게이트를 제공한다:



[0008]

[0009] 상기 식에서, "R¹ 및 R²"는 독립적으로 선택되며, 약 10 내지 약 20 개의 탄소 원자를 갖는 알킬기이고, PEG는 폴리에틸렌글리콜이고, L은 링커 잔기 (예를 들면, 에스테르 비함유 링커 잔기 또는 에스테르 함유 링커 잔기)이다. 적합한 알킬기는 라우릴(C12), 미리스틸(C14), 팔미틸(C16), 스테아릴(C18) 및 이코실(C20)을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. 바람직한 실시양태에서, R¹ 및 R²는 동일하며, 즉 이들은 둘 모두 미리스틸(C14) 또는 둘 모두 팔미틸(C16) 또는 둘 모두 스테아릴(C18)이다. 바람직한 실시양태에서, 알킬기는 포화된다.

[0010] 상기 화학식 I에서, "PEG"는 약 550 달톤 내지 약 10,000 달톤, 더욱 바람직하게는 약 750 달톤 내지 약

5,000 달톤, 더욱 바람직하게는 약 1,000 달톤 내지 약 5,000 달톤, 더욱 바람직하게는 약 1,500 달톤 내지 약 3,000 달톤, 훨씬 더 바람직하게는 약 2,000 달톤, 또는 약 750 달톤의 평균 분자량을 갖는 폴리에틸렌 글리콜이다. PEG는 임의적으로 알킬, 알콕시, 아실 또는 아릴로 치환될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 말단 히드록실기는 메톡시 또는 메틸기로 치환된다. PEG는 지질에 직접 컨쥬게이션되거나 또는 링커 잔기를 통해 지질에 연결될 수 있다. 예를 들면, 에스테르 비함유 링커 잔기 및 에스테르 함유 링커 잔기를 비롯한 PEG를 지질에 커플링하기 적합한 임의의 링커 잔기가 사용될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 링커 잔기는 에스테르 비함유 링커 잔기이다.

[0011] 본 명세서에 사용된 용어 "에스테르 비함유 링커 잔기"는 카르복실 에스테르 결합(-OC(O)-)을 함유하지 않는 링커 잔기를 지칭한다. 적합한 에스테르 비함유 링커 잔기는 아미도(-C(O)NH-), 아미노(-NR-), 카르보닐(-C(O)-), 카르바메이트(-NHC(O)O-), 우레아(-NHC(O)NH-), 디설피드(-S-S-), 에테르(-O-), 숙시닐(-(O)CCH₂CH₂C(O)-), 숙신아미딜(-NHC(O)CH₂CH₂C(O)NH-), 에테르, 디설피드 등, 뿐만 아니라 그들의 조합물 (예를 들면, 카르바메이트 링커 잔기와 아미도 링커 잔기 둘 모두를 함유하는 링커)을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. 바람직한 실시양태에서, 카르바메이트 링커가 PEG를 지질에 커플링시키는 데 사용된다.

[0012] 다른 실시양태에서, 에스테르 함유 링커 잔기가 PEG를 지질에 커플링시키는 데 사용된다. 적합한 에스테르 함유 링커 잔기는 예를 들면, 카르보네이트(-OC(O)O-), 숙시노일, 포스페이트 에스테르(-O-(O)POH-O-), 술포네이트 에스테르 및 그들의 조합물을 포함한다.

[0013] 상기 화학식 I에서, "L"은 에스테르 비함유 링커 잔기 또는 에스테르 함유 링커 잔기이다. 바람직한 실시양태에서, L은 에스테르 비함유 링커 잔기이다. 적합한 에스테르 비함유 링커는 아미도 링커 잔기, 아미노 링커 잔기, 카르보닐 링커 잔기, 카르바메이트 링커 잔기, 우레아 링커 잔기, 에테르 링커 잔기, 디설피드 링커 잔기, 숙신아미딜 링커 잔기 및 그들의 조합물을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. 바람직한 실시양태에서, 에스테르 비함유 링커 잔기는 카르바메이트 링커 잔기 (즉, PEG-C-DAA 컨쥬게이트)이다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 에스테르 비함유 링커 잔기는 아미도 링커 잔기 (즉, PEG-A-DAA 컨쥬게이트)이다. 바람직한 실시양태에서, 에스테르 비함유 링커 잔기는 숙신아미딜 링커 잔기 (즉, PEG-S-DAA 컨쥬게이트)이다.

[0014] 또 다른 측면에서, 본 발명은 화학식 I의 폴리에틸렌글리콜-디알킬옥시프로필(PEG-DAA) 컨쥬게이트를 포함하는 리포솜을 제공한다. 또한, 전형적으로 리포솜은 양이온성 지질 및 비양이온성 지질을 포함한다. 일부 측면에서, 리포솜은 스테롤 (예를 들면, 콜레스테롤)을 추가로 포함한다. 리포솜은 빈 상태이거나 또는 별법으로, 리포솜은 하나 이상의 생활성제(bioactive agent) (예를 들면, 본 명세서에 기재된 치료 생성물)를 추가로 포함할 수 있다. 적합한 생활성제는 항신생물제, 항생제, 면역조절제, 항염증제 및 중추신경계에 작용하는 약제를 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. 유사하게, 적합한 생활성제는 펩티드, 단백질 및 핵산을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다.

[0015] 또 다른 측면에서, 본 발명은 세포를 화학식 I의 PEG-DAA 컨쥬게이트를 포함하는 리포솜과 접촉시키는 것을 포함하여 생활성제를 세포에 전달하는 방법을 제공하며, 여기서 생활성제는 리포솜에 캡슐화된다. 유사하게, 또 다른 측면에서, 본 발명은 화학식 I의 PEG-DAA 컨쥬게이트를 포함하는 리포솜을 환자에게 투여하는 것을 포함하여 환자에게 생활성제를 전달하는 방법을 제공하며, 여기서 생활성제는 리포솜에 캡슐화된다.

[0016] 또 다른 측면에서, 본 발명은 핵산, 양이온성 지질, 비양이온성 지질; 및 화학식 I의 PEG-DAA 컨쥬게이트를 포함하는 핵산-지질 입자를 제공한다. 일부 측면에서, 핵산-지질 입자는 스테롤 (예를 들면, 콜레스테롤)을 추가로 포함한다.

[0017] 또한, 또 다른 측면에서, 본 발명은 세포를 양이온성 지질, 비양이온성 지질, 화학식 I의 PEG-DAA 컨쥬게이트 및 핵산을 포함하는 핵산-지질 입자와 접촉시키는 것을 포함하여 핵산을 세포에 도입시키는 방법을 제공한다.

[0018] 본 발명의 다른 특징, 목적 및 이점 및 그의 바람직한 실시양태는 하기 상세한 설명, 실시예, 청구의 범위 및 도면으로부터 명확히 이해될 것이다.

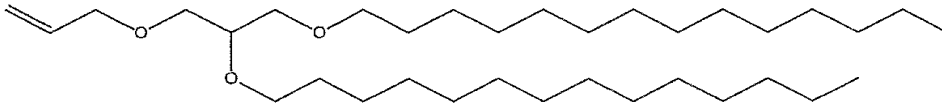
실시예

[0242] 실시예 1: PEG-디알킬옥시프로필(PEG-DAA's)의 합성

[0243] 하기 실시예는 PEG-A-DMA (7), PEG-C-DMA (8), 및 PEG-S-DMA (9)의 세 PEG-지질의 합성을 예시한다. 이들은 공통 전구체인 아민 지질 1,2-디미리스틸옥시프로필아민 (5)을 갖는다. 이러한 지질은 알킬 쇠 14 탄소 단위

(C₁₄) 길이를 갖는다. 본 발명에 사용하기 적합한 다른 PEG DAA는 유사한 프로토콜을 사용하여 합성될 수 있다. 예를 들면, PEG-A-DSA 및 PEG-C-DSA는 (5)의 C₁₈ 유사체를 사용하여 합성될 수 있다. C₁₈ 유사체는 제일 첫 단계에서 (화합물 (1)의 합성) 미리스틸 브로마이드를 등몰량의 스테아릴 브로마이드로 단순히 치환함으로써 합성될 수 있다.

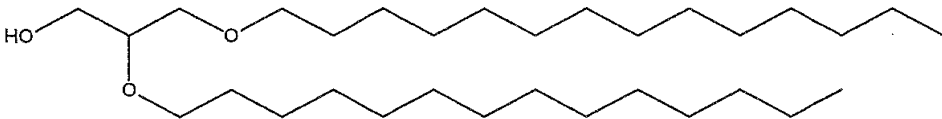
[0244] 1. 1,2-디미리스틸옥시-3-알릴옥시프로판 (1)의 제조



[0245]

[0246] 벤젠 (250 ml)을 95 % 수소화나트륨 (11.4 g, 450.0 mmol)에 첨가하고, 플라스크를 질소로 플러싱하고, 밀봉하였다. 벤젠 (75 ml) 중의 3-알릴옥시-1,2-프로판디올 (6.6 g, 50.0 mmol)의 용액을 플라스크에 첨가하였다. 주사기를 사용하여, 97 % 1-브로모테트라데칸 (36.7 ml, 120.0 mmol)을 플라스크에 첨가하고, 반응물을 밤새 질소의 일정한 스트림 하에서 환류시켰다. 실온으로 냉각시킨 후, 더 이상 발포가 관찰되지 않을 때까지 과량의 수소화나트륨을 에탄올로 천천히 켄칭시켰다. 용액을 벤젠 (250 ml)을 사용하여 분리 깔대기로 옮기고, 증류수 (3 x 200 ml)로 세척하였다. 유기층을 황산 마그네슘을 사용하여 건조시키고, 용매를 회전 증발기 상에서 제거하여 무색 오일을 얻었다. TLC (5 % 에테르-헥산, 몰리브데이트(Molybdate) 중에서 전개됨)는 대부분의 출발 물질이 반응하여 생성물을 형성하였음을 나타내었다. 이렇게 생성되는 생성물을 플래시 칼럼 크로마토그래피 (1-5 % 에테르-헥산)에 의해 추가 정제하여 15.0 g (57.3 %)의 1,2-디미리스틸옥시-3-알릴옥시프로판 **1**을 얻었다.

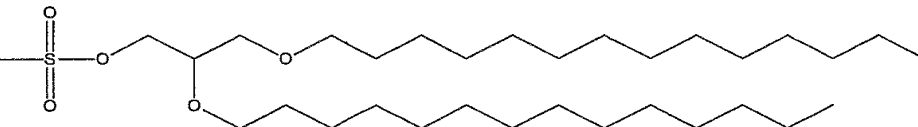
[0247] 2. 1,2-디미리스틸옥시프로판-3-올 (2)의 제조



[0248]

[0249] 1,2-디미리스틸옥시-3-알릴옥시프로판 **1** (15.0 g, 28.6 mmol)을 에탄올 (250 ml) 중에 용해시켰다. 트리플루오로아세트산 (20 ml)을 첨가한 후, 테트라키스 (트리페닐포스핀)팔라듐 (0) (4.5 g, 3.9 mmol)을 첨가하였다. 플라스크를 주석 포일(foil)에 랩핑하고, 질소로 플러싱하여 빛 및 공기에 대한 노출을 감소시킨 다음, 80 °C에서 밤새 교반하였다. 에탄올을 회전 증발기 상에서 제거하였다. TLC (100 % CHCl₃, 몰리브데이트 중에서 전개됨)는 대부분의 출발 물질이 반응하여 생성물을 형성하였음을 나타내었다. 이렇게 생성되는 생성물을 플래시 칼럼 크로마토그래피 (100 % DCM)에 의해 추가 정제하여 11.5 g (83.1 %)의 1,2-디미리스틸옥시프로판-3-올 **2**를 얻었다.

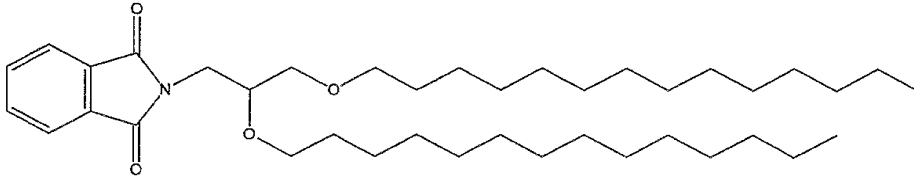
[0250] 3. 0-(2,3-디미리스틸옥시프로필)메탄술포네이트 (3)의 제조



[0251]

[0252] 97 % 메탄술포산 무수물 (8.4 g, 48.0 mmol)을 함유하는 플라스크를 질소로 플러싱하고, 무수 디클로로메탄 (50 ml) 중에 용해시켰다. 무수 피리딘 (3.9 ml, 48.0 mmol)을 천천히 첨가하여 백색 침전물을 형성시켰다. 무수 디클로로메탄 (100 ml) 중의 1,2-디미리스틸옥시프로판-3-올 **15** (11.5 g, 24.0 mmol)의 용액을 첨가하고, 반응물을 밤새 실온에서 교반하였다. 용액을 디클로로메탄 (100 ml)을 사용하여 분리 깔대기로 옮기고, 증류수 (3 x 100 ml)로 세척하였다. 그 다음, 합쳐진 수성 세척액을 디클로로메탄 (100 ml)으로 역추출하였다. 합쳐진 유기층을 황산나트륨으로 건조시키고, 디클로로메탄을 회전 증발기 상에서 제거하여 무색 오일을 얻었다. TLC (100 % CHCl₃, 몰리브데이트 중에서 전개됨)는 출발 물질이 모두 반응하여 생성물을 형성하였음을 나타내었다. 이러한 반응은 11.9 g의 미정제 0-(2,3-디미리스틸옥시프로필)메탄술포네이트 **3**을 제공하였다.

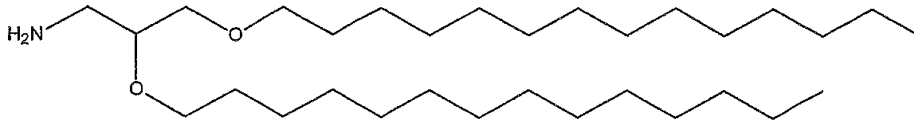
[0253] 4. N-(2,3-디미리스틸옥시프로필)프탈이미드 (4)의 제조



[0254]

[0255] 미정제 0-(2,3-디미리스틸옥시프로필)메탄술포네이트 **3** (14.2 g, 25.3 mmol) 및 포타슘 프탈이미드 (13.9 g, 75.0 mmol)를 질소로 플라싱하고, 무수 N,N-디메틸포름아미드 (250 ml) 중에 용해시켰다. 반응물을 70 °C에서 밤새 질소의 일정한 스트림 하에서 교반하였다. 통상의 흡인기 대신 고 진공 펌프를 사용하여 N,N-디메틸포름아미드를 회전 증발기 상에서 제거하였다. 잔여물을 클로로포름 (300 ml) 중에 용해시키고, 클로로포름 세정액 (50 ml)을 사용하여 분리 깔대기로 옮긴 다음, 증류수 및 에탄올 (3 x 300 ml 증류수, 50 ml 에탄올)로 세척하였다. 합쳐진 수성 세척액을 클로로포름 (2 x 100 ml)으로 역추출하였다. 합쳐진 유기층을 황산 마그네슘으로 건조시키고, 클로로포름을 회전 증발기 상에서 제거하였다. TLC (30 % 에테르-헥산, 몰리브데이트 중에서 전개됨)는 출발 물질이 반응하여 생성물을 형성하였음을 나타내었다. 이러한 반응은 13.5 g의 미정제 N-(2,3-디미리스틸옥시프로필)프탈이미드 **4**를 제공하였다.

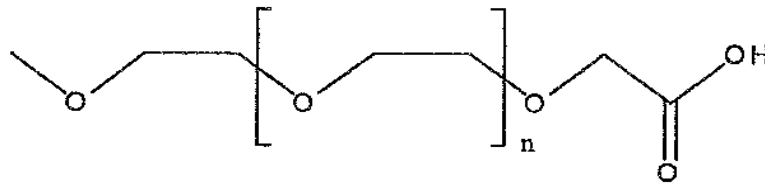
[0256] 5. 1,2-디미리스틸옥시프로필아민 (5)의 제조



[0257]

[0258] 미정제 N-(2,3-디미리스틸옥시프로필)프탈이미드 **4** (20.0 g, 25.0 mmol)를 에탄올 (300 ml) 중에 용해시켰다. 히드라진 일수화물 (20 ml, 412.3 mmol)을 첨가하고, 반응물을 밤새 환류시켰다. 에탄올을 회전 증발기 상에서 제거하고, 잔여물을 클로로포름 (200 ml) 중에 재용해시켰다. 침전물을 여과하고, 클로로포름을 회전 증발기 상에서 제거하였다. TLC (10 % MeOH-CHCl₃, 몰리브데이트 중에서 전개됨)는 대부분의 출발 물질이 반응하여 생성물을 형성하였음을 나타내었다. 이렇게 생성되는 생성물을 플래시 칼럼 크로마토그래피 (0-5 % MeOH-CHCl₃)에 의해 추가 정제하여 10.4 g (89.7 %, 1,2-디미리스틸옥시프로판-3-올 **2**로부터 3 단계에 걸쳐)의 1,2-디미리스틸옥시프로필아민 **5**를 얻었다.

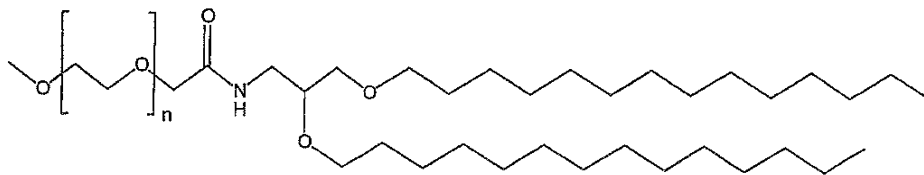
[0259] 6. 메톡시 PEG₂₀₀₀ 아세트산 (6)의 제조



[0260]

[0261] 물 (180 ml) 중 10 %의 진한 황산 수용액 (20 ml)을 중크롬산나트륨 (3.0 g, 10 mmol)에 첨가하였다. PEG₂₀₀₀ 메틸 에테르 (20.0 g, 10 mmol)를 이러한 밝은 오렌지색 용액 중에 용해시키고, 반응물을 실온에서 밤새 교반하였다. 그 다음, 생성물을 클로로포름 (3 x 250 ml)으로 추출하여 수성층에 어두운 청색을 남게 하였다. 클로로포름 용매를 회전 증발기 상에서 제거하여 옅은 청색 왁스를 얻었다. TLC (13 % MeOH-CHCl₃, 요오드 중에서 전개됨)는 대부분의 출발 물질이 반응하여 생성물을 형성하였음을 나타내었다. 그 다음, 이러한 미정제 물질을 플래시 칼럼 크로마토그래피 (0-15 % MeOH-CHCl₃)에 의해 추가 정제하였다. 그 다음, 생성되는 생성물을 에테르 중에서 결정화하여 5.6 g (27.1 %)의 메톡시 PEG₂₀₀₀ 아세트산 **6**을 백색 고체로 얻었다.

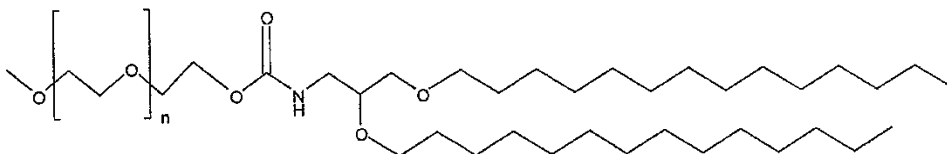
[0262] 7. N-(2,3-디미리스틸옥시프로필) 아미드 PEG₂₀₀₀ 메틸 에테르 (7)의 제조



[0263]

[0264] N-(2,3-디미리스틸옥시프로필) 아미드 PEG₂₀₀₀ 메틸 에테르 (즉, PEG-A-DMA)의 제조를 위해, 메톡시 PEG₂₀₀₀ 아세트산 **6** (3.4 g, 1.7 mmol)을 벤젠 (40 ml) 중에 용해시키고, 질소로 플라싱하였다. 옥살릴 클로라이드 (1.7 ml, 2.5 g, 20 mmol)를 서브아실(subbaseal)을 통해 주사기 및 바늘에 의해 천천히 첨가하였다. 이 반응물을 2 시간 동안 교반한 다음, 벤젠 용매를 회전 증발기 상에서 제거하였다. 2,3-디미리스틸옥시프로필아민 **5** (0.87 g, 1.8 mmol)를 플라스크에 첨가한 후, 무수 디클로로메탄 (40 ml) 및 트리에틸아민 (1.5 ml, 10 mmol)을 첨가하였다. 반응물을 48 시간 동안 교반하였다. 증류수 (250 ml)를 첨가하고, 용액을 염산 (1.5 ml)으로 산성화하고, 진탕시키고, 유기층을 수집하였다. 생성물을 수성층으로부터 클로로포름 (2 x 65 ml)을 사용하여 추출하였다. 합쳐진 유기층을 황산마그네슘으로 건조시켰다. 클로로포름을 회전 증발기 상에서 제거하여 황색 고체를 얻었다. TLC (10 % MeOH-CHCl₃, 황산 구리 및 요오드 중에서 전개됨)는 대부분의 출발 물질이 반응하여 생성물을 형성하였음을 나타내었다. 이러한 미정제 물질을 플래시 칼럼 크로마토그래피 (0-7 % MeOH-CHCl₃)에 의해 추가 정제하였다. 그 다음, 이를 활성탄(activated charcoal) (2 g) 및 에탄올 (100 ml)을 첨가함으로써 탈색시키고, 혼합물을 30 분 동안 55 °C에서 회전 증발기 상에서 회전시켰다. 상기 활성탄을 여과하고, 에탄올을 회전 증발기 상에서 제거하였다. 생성물을 동결건조시켜 1.7 g (38.1 %)의 N-(2,3-디미리스틸옥시프로필) 아미드 PEG₂₀₀₀ 메틸 에테르 **7**을 솜털같은(fluffy) 백색 분말로 얻었다.

[0265] 8. N-(2,3-디미리스틸옥시프로필) 카르바메이트 PEG₂₀₀₀ 메틸 에테르 (8)의 제조



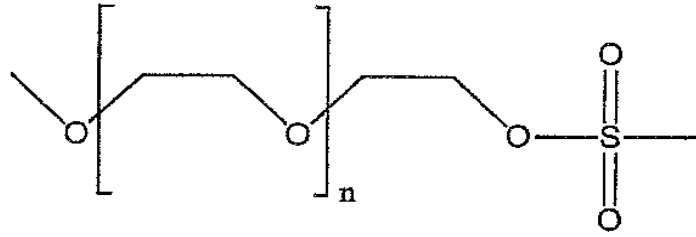
[0266]

[0267] N-(2,3-디미리스틸옥시프로필) 카르바메이트 PEG₂₀₀₀ 메틸 에테르 (즉, PEG-C-DMA)의 제조를 위해, 상기 단계 1-5를 수행하였다. 그 다음, PEG₂₀₀₀ 메틸 에테르 (2.0 g, 1.0 mmol)를 질소로 플라싱하고, 무수 디클로로메탄 (15 ml) 중에 용해시켰다. 디포스젠 (300 μl, 2.5 mmol)을 첨가하고, 반응물을 실온에서 3 시간 동안 교반하였다. 디클로로메탄을 회전 증발기 상에서 제거하고, 임의의 잔여 디포스젠을 고 진공 펌프를 사용하여 제거하였다. 플라스크를 질소로 플라싱하고, 2,3-디미리스틸옥시프로필아민 **5** (0.7 g, 1.5 mmol)을 첨가하였다. 이를 무수 디클로로메탄 (15 ml) 중에 용해시키고, 트리에틸아민을 첨가하고 (280 μl), 반응물을 실온에서 밤새 교반하였다. 용액을 디클로로메탄 (5 ml)을 사용하여 분리 깔대기로 옮기고, 증류수 (2 x 20 ml)로 세척하였다. 유기층을 황산마그네슘을 사용하여 건조시키고, 디클로로메탄을 회전 증발기 상에서 제거하였다. TLC (3 % MeOH-CHCl₃, 몰리브데이트 및 요오드중에서 전개됨)는 대부분의 출발 물질이 반응하여 생성물을 형성하였음을 나타내었다. 이렇게 생성되는 생성물을 플래시 칼럼 크로마토그래피 (1.5-10 % MeOH-CHCl₃)에 의해 추가 정제하여 1.2 g (46.5 %)의 N-(2,3-디미리스틸옥시프로필) 카르바메이트 PEG₂₀₀₀ 메틸 에테르 **8**을 얻었다.

[0268] 9. N-(2,3-디미리스틸옥시프로필) 숙신아미드 PEG₂₀₀₀ 메틸 에테르 (13)의 제조

[0269] N-(2,3-디미리스틸옥시프로필) 숙신아미드 PEG₂₀₀₀ 메틸 에테르 (13)의 제조를 위해, 상기 단계 1-5를 수행하였다. 나머지 절차는 다음과 같다.

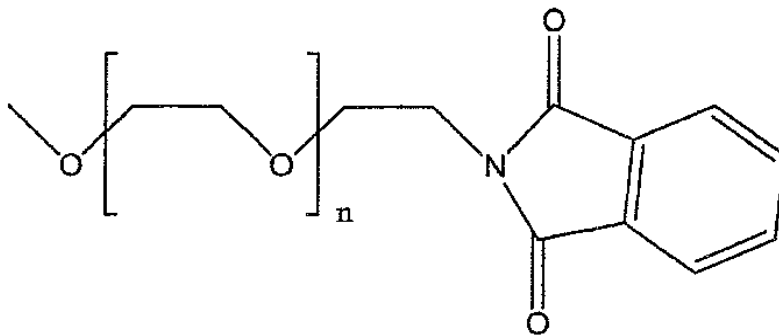
[0270] a. PEG₂₀₀₀ 메실레이트 (9)의 제조



[0271]

[0272] 메실 무수물 (8.2 g, 47.1 mmol)을 무수 클로로포름 (80 ml) 중에 용해시켰다. 피리딘 (3.8 ml, 47.0 mmol)을 용액에 첨가하였고, 백색 침전물이 형성되는 동안 발연(fuming)이 관찰되었다. 무수 클로로포름 (70 ml) 중의 PEG₂₀₀₀ 메틸 에테르 (31.5 g, 15.5 mmol)의 용액을 첨가하고, 반응물을 3 시간 동안 교반하였다. 형성된 백색 침전물을 여과하고, 여액의 클로로포름 용매를 회전 증발기 상에서 제거하였다. TLC (5 % MeOH-CHCl₃, 요오드 중에서 전개됨)는 대부분의 출발 물질이 반응하여 생성물을 형성하였음을 나타내었다. 이러한 생성물을 플래시 칼럼 크로마토그래피 (0-10 % MeOH-CHCl₃)에 의해 추가 정제하여 30.1 g (92.8 %)의 PEG₂₀₀₀ 메실레이트 9를 백색 고체로 얻었다.

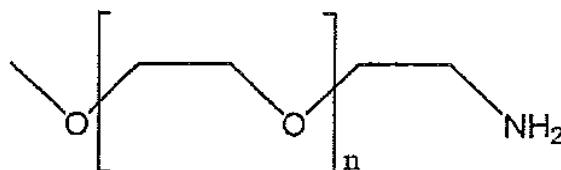
[0273] b. PEG₂₀₀₀ 프탈이미드 (10)의 제조



[0274]

[0275] 포타슘 프탈이미드 (11.1 g, 59.7 mmol)를 무수 N,N-디메틸포름아미드 (400 ml) 중에 용해시켰다. 무수 N,N-디메틸포름아미드 (100 ml) 중의 PEG₂₀₀₀ 메실레이트 9 (35.0 g, 16.7 mmol)의 용액을 플라스크에 첨가하고, 반응물을 75 °C에서 밤새 교반하였다. 통상의 흡인기 대신 고 진공 펌프를 사용하여 N,N-디메틸포름아미드 용매를 회전 증발기 상에서 제거하였다. 생성되는 생성물을 디클로로메탄 (250 ml) 중에 용해시키고, 증류수 (2 x 250 ml) 및 염수 (250 ml)로 세척하였다. 합쳐진 유기층의 디클로로메탄 용매를 회전 증발기 상에서 제거하였다. TLC (7 % MeOH-CHCl₃, UV 광 및 마리(Mary)의 시약을 사용하여 가시화됨)는 대부분의 출발 물질이 반응하여 생성물을 형성하였음을 나타내었다. 이렇게 생성되는 생성물을 플래시 칼럼 크로마토그래피 (0-10 % MeOH-CH₂Cl₂)에 의해 추가 정제하였다. 생성물을 에테르로부터 결정화하여 19.4 g (54.1 %)의 PEG₂₀₀₀ 프탈이미드 10을 얻었다.

[0276] c. PEG₂₀₀₀ 아민 (11)의 제조

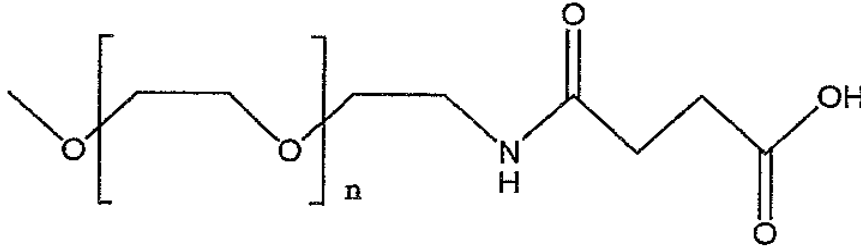


[0277]

[0278] PEG₂₀₀₀ 프탈이미드 10 (10.3 g, 4.8 mmol)을 에탄올 (200 ml) 중에 용해시켰다. 히드라진 일수화물 (6.0 ml, 123.7 mmol)을 천천히 첨가하고, 반응물을 100 °C에서 밤새 환류시켰다. 백색 침전물을 여과하고, 에탄올 용매를 회전 증발기 상에서 제거하였다. 생성되는 생성물을 클로로포름 중에 용해시키고, 클로로포름 중에 불용성인 잔여 백색 고체를 여과하고, 또 다시 클로로포름을 회전 증발기 상에서 제거하였다. TLC (10 % MeOH-

CHCl₃, 요오드, 몰리브데이트 및 마리의 시약중에서 전개됨)는 모든 출발 물질이 반응하여 생성물을 형성하였음을 나타내었다. 그 다음, 이러한 생성물을 에테르로부터 결정화하여 9.0 g (93.0 %)의 PEG₂₀₀₀ 아민 **11**을 백색 분말로 얻었다.

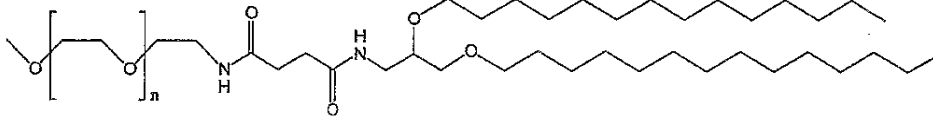
[0279] d. PEG₂₀₀₀ 숙신아미드 (12)의 제조



[0280]

[0281] PEG₂₀₀₀ 아민 **11** (9.0 g, 4.4 mmol) 및 숙신산 무수물 (3.8 g, 38.1 mmol)을 피리딘 (100 ml) 중에 용해시키고, 반응물을 밤새 교반하였다. 피리딘 용매를 회전 증발기 상에서 60 °C에서 제거하였다. 잔여물을 증류수 (100 ml) 중에 용해시키고, 염산으로 산성화하고, 디클로로메탄 (100 ml, 2 x 70 ml)으로 추출하고, 황산마그네슘으로 건조시켰다. TLC (10 % MeOH-CHCl₃, 요오드 중에서 전개됨)는 대부분의 출발 물질이 반응하여 생성물을 형성하였음을 나타내었다. 이러한 생성물을 플래시 칼럼 크로마토그래피 (0-10 % MeOH-CHCl₃)에 의해 추가 정제하여 5.2 g (55.9 %)의 PEG₂₀₀₀ 숙신아미드 **12**를 얻었다.

[0282] e. N-(2,3-디미리스틸옥시프로필) 숙신아미드 PEG₂₀₀₀ 메틸 에테르 (13)의 제조



[0283]

[0284] PEG₂₀₀₀ 숙신아미드 (2.0 g, 0.9 mmol) 및 N-히드록시숙신아미드 (0.2 g, 2.0 mmol)를 무수 클로로포름 (10 ml) 중에 용해시켰다. 그 다음, 무수 클로로포름 (5 ml) 중의 1,3-디시클로헥실-카르보다이미드 (0.3 g, 1.5 mmol)의 용액을 첨가하고, 반응물을 1 시간 동안 교반하였다. 트리에틸아민 (0.6 ml, 4 mmol) 및 무수 클로로포름 (5 ml) 중의 1,2-디미리스틸옥시프로필아민 **5** (0.48 g, 1.0 mmol)의 용액을 첨가하고, 반응물을 1 시간 동안 교반하였다. TLC (12 % MeOH-CHCl₃, 몰리브데이트 중에서 전개됨)는 대부분의 출발 물질이 반응하여 생성물을 형성하였음을 나타내었다. 용액을 디클로로메탄을 사용하여 셀라이트를 통해 여과시키고, 염산으로 산성화시키고, 증류수 (2 x 50 ml) 및 염수 (50 ml)로 세척하였다. 수성층을 클로로메탄 (50 ml)으로 역추출하고, 합쳐진 유기층을 황산마그네슘 상에서 건조시켰다. 생성물을 플래시 칼럼 크로마토그래피 (0-7 % MeOH-CHCl₃)에 의해 추가 정제하여 1.8 g (69.0 %)의 N-(2,3-디미리스틸옥시프로필) 숙신아미드 PEG₂₀₀₀ 메틸 에테르 **13**을 얻었다.

[0285] 안정성을 시험하기 위해, 각각의 C₁₈ PEG-지질을 빈 리포솜으로 제형화하고, 37 °C 인큐베이터에서 42 일 동안 저장하였다. 리포솜은 팔호 안의 관련 물비를 갖는 하기 지질들을 함유하였다:

[0286] 콜레스테롤 (55 %),

[0287] 1,2-디올레일옥시-N,N-디메틸-3-아미노프로판 (15 %),

[0288] 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (20 %),

[0289] PEG-지질 (10 %). 또한, PEG-CerC₂₀ 및 상업적으로 제조된 PEG-DSPE를 제형화하고, PEG-DSG를 대조군으로서 제형화하였다. 상이한 시점에서, 각각의 샘플의 분액을 인큐베이터로부터 분리하고, 에탄올로 희석시키고, HPLC에 의해 분석하여 존재하는 특이적 PEG₂₀₀₀ 지질의 농도를 결정하였다. 검출 방법으로 증발 광-산란 검출기를 사용하였다. 그 결과를 도 2에 도시한다.

[0290] 실시예 2: PEG-디알킬옥시프로필 컨쥬게이트를 포함하는 SPLP에 캡슐화된 핵산의 발현

[0291] 본 실시예는 PEG-디아실글리세롤 컨쥬게이트를 포함하는 SPLP에 캡슐화된 핵산의 발현과 PEG-디알킬옥시프로필 컨쥬게이트를 포함하는 SPLP에 캡슐화된 핵산의 발현을 비교하는 실험을 설명한다. 모든 SPLP 제형은 CMV 프로모터 (pL055)의 조절하에서 루시페라아제를 엔코딩하는 플라스미드를 포함한다.

[0292]

군	마우스 수	세포	경로	처리	경로	투여 회수	최종 주사 후 시간	검정*
A	6	뉴로-2a	SC	PBS	IV	1	48 시간	체중, 혈액 분석, 루시페라아제 활성
B	6	뉴로-2a	SC	SPLP PEG-DSG	IV	1	48 시간	
C	6	뉴로-2a	SC	SPLP PEG-DSPE	IV	1	48 시간	
D	6	뉴로-2a	SC	SPLP PEG-세라미드C20	IV	1	48 시간	
E	6	뉴로-2a	SC	SPLP PEG-A-DSA	IV	1	48 시간	
F	6	뉴로-2a	SC	SPLP PEG-C-DSA	IV	1	48 시간	
G	6	뉴로-2a	SC	SPLP PEG-S-DSA	IV	1	48 시간	

[0293] 모든 SPLP 제형은 pL055 및 DSPE:Chol:DODMA:PEG-지질 (20:55:15:10)을 함유하였다. 하기 제형을 제조하였다:

[0294] A: PBS (pH 7.4).

[0295] B: L055 PEG-DSG SPLP, 0.50 mg/ml.

[0296] C : L055 PEG-DSPE SPLP, 0.50 mg/ml.

[0297] D: L055 PEG-세라미드C20 SPLP, 0.50 mg/ml.

[0298] E: L055 PEG-A-DSA SPLP, 0.50 mg/ml.

[0299] F: L055 PEG-C-DSA SPLP, 0.50 mg/ml.

[0300] G: L055 PEG-S-DSA SPLP, 0.50 mg/ml.

[0301]

군	마우스 수	접종일	처리	주사일	수집일
A	6	제 0 일	PBS	제 13 일	제 15 일
B	6	제 0 일	SPLP PEG-DSG	제 13 일	제 15 일
C	6	제 0 일	SPLP PEG-DSPE	제 13 일	제 15 일
D	6	제 0 일	SPLP PEG-세라미드C20	제 13 일	제 15 일
E	6	제 0 일	SPLP PEG-A-DSA	제 13 일	제 15 일
F	6	제 0 일	SPLP PEG-C-DSA	제 13 일	제 15 일
G	6	제 0 일	SPLP PEG-S-DSA	제 13 일	제 15 일

[0302] 제 0 일에, 50 μ l PBS 중의 1.5×10^6 뉴로2A 세포를 각각의 마우스에 피하 투여하였다. 제 13 일에, 마우스를 랜덤화하고, 정맥내 (IV) 주사에 의해 SPLP 제형 또는 PBS의 1회 투여로 처리하였다. 투여량은 투여일에 수득된 체중 측정값을 기준으로 한다. SPLP 투여 후 48 시간째에, 마우스를 중량을 재고, 희생시키고, 그들의 혈액을 수집하고, 하기 조직들을 수집하고, 중량을 재고, 즉시 동결시키고, 추가 분석시까지 -80 °C에서 저장하였다: 종양, 간 (반으로 절단), 폐, 비장 및 심장.

[0303] 발현된 루시페라아제 리포터 단백질의 효소 활성에 대해 검정함으로써 수집된 조직에서의 유전자 발현을 결정하였다. 그 결과를 도 3 및 도 4에 도시한다.

[0304] 상기 결과는 SPLP의 i. v. 주사 후 48 시간째에 PEG-디알킬옥시프로필 컨쥬게이트를 포함하는 SPLP에 의한 중앙에서의 트랜스펙션 수준이 PEG-디아실글리세롤 컨쥬게이트를 포함하는 SPLP에 의한 것과 실질적으로 유사하

다는 것을 나타낸다. 또한, PEG-디알킬옥시프로필 컨쥬게이트를 포함하는 SPLP를 주사한 마우스의 기관 (간, 폐, 비장, 및 심장)에서의 유전자 발현량이 PEG-디아실글리세롤 컨쥬게이트를 포함하는 SPLP의 경우와 실질적으로 유사하다.

[0305] 실시예 3: PEG-디알킬옥시프로필 컨쥬게이트를 포함하는 SPLP에서 캡슐화된 핵산의 발현

[0306] 본 실시예는 PEG-디알킬옥시프로필 컨쥬게이트를 포함하는 SPLP에 캡슐화된 핵산의 발현을 비교하는 실험을 설명한다. 모든 SPLP 제형은 CMV 프로모터 (pL055)의 조절 하에서 루시퍼라아제를 엔코딩하는 플라스미드를 포함한다

[0307]

군	마우스 수	종양	경로	처리	경로	투여 회 수	시점	검정***
A	4	뉴로-2a	SC	PBS	IV	1	48 시간	체중, 혈액 분석, 루시퍼라아제 활성
B	5	뉴로-2a	SC	SPLP PEG-DSG	IV	1	48 시간	
C	5	뉴로-2a	SC	SPLP PEG-A-DSA	IV	1	48 시간	
D	5	뉴로-2a	SC	SPLP PEG-A-DPA	IV	1	48 시간	
E	5	뉴로-2a	SC	SPLP PEG-A-DMA	IV	1	48 시간	

[0308] 지질 (DSPC:CHOL:DODMA:PEG-지질)은 SPLP 중에 다음의 몰비 (20:55:15:10)로 존재하였다. 하기 제형을 제조하였다:

- [0309] A: 멸균 여과된 PBS, 5 mL.
- [0310] B: PEG-DSG를 갖는 pL055-SPLP, 0.50 mg/mL에서 2 mL.
- [0311] C : PEG-A-DSA를 갖는 pL055-SPLP, 0.50 mg/mL에서 2 mL.
- [0312] D: PEG-A-DPA를 갖는 pL055-SPLP, 0.50 mg/mL에서 2 mL.
- [0313] E: PEG-A-DMA를 갖는 pL055-SPLP, 0.50 mg/mL에서 2 mL.

[0314]

군	마우스 번호	접종일	처리	주사일	수집일
A	4	제 0 일	PBS	제 12 일	제 14 일
B	5	제 0 일	SPLP PEG-DSG	제 12 일	제 14 일
C	5	제 0 일	SPLP PEG-A-DSA	제 12 일	제 14 일
D	5	제 0 일	SPLP PEG-A-DPA	제 12 일	제 14 일
E	5	제 0 일	SPLP PEG-A-DMA	제 12 일	제 14 일

[0315] 제 0 일에, 1.5×10^6 뉴로2A 세포를 각각의 마우스에 투여하였다. 종양이 적합한 크기 (200-400 mm³)로 된 때, 마우스를 랜덤화하고, 정맥내 (IV) 주사에 의해 SPLP 제형 또는 PBS의 1회 투여로 처리하였다. 투여량은 투여일에 수득된 체중 측정값을 기준으로 한다. SPLP 투여 후 48 시간째에, 마우스를 희생시키고, 그들의 혈액을 수집하고, 하기 조직들을 수집하고, 중량을 재고, 즉시 동결시키고, 추가 분석시까지 -80 °C에서 저장하였다: 종양, 간 (반으로 절단), 폐, 비장 및 심장.

[0316] 발현된 루시퍼라아제 리포터 단백질의 효소 활성에 대해 검정함으로써 수집된 조직에서의 유전자 발현을 결정하였다. 그 결과를 도 5 및 도 6에 도시한다.

[0317] 상기 결과는 PEG-디알킬옥시프로필 (즉, PEG-DAA)을 포함하는 SPLP가 PEG-디아실글리세롤을 포함하는 SPLP와 실질적으로 동일한 정도로 원위 종양을 트랜스펙션시키는 데 편리하게 사용될 수 있다는 것을 나타낸다. 더욱이, PEG-디알킬글리세롤을 함유하는 SPLP를 사용한 경우 관찰되는 트랜스펙션 수치는 PEG-디아실글리세롤 (예를 들면, PEG-DSG)을 함유하는 SPLP를 사용한 경우 관찰되는 것과 유사하다. 또한, 상기 결과는 비종양 조직에서 매우 적은 트랜스펙션이 발생하였음을 나타낸다. 더욱이, PEG-디알킬옥시프로필을 포함하는 SPLP는 다른 SPLP 제형에 비해 감소된 독성을 나타낸다.

[0318] 실시예 4: PEG-디알킬옥시프로필 컨쥬게이트를 포함하는 SPLP 및 pSPLP에 캡슐화된 핵산의 발현

[0319] 본 실시예는 상기 SPLP에 비해 PEG-디알킬옥시프로필을 포함하는 SPLP 대 PEI 축합된 DNA (pSPLP)에 캡슐화된 핵산의 발현을 비교하는 실험을 설명한다.

[0320]

군	마우스 수	세포	처리	경로	최종 주사 후 시점	검정*
A	4	SC 뉴로-2a	1회 투여 PBS	IV	48 시간	루시페라아제 활성
B	4	SC 뉴로-2a	1회 투여 L055-pSPLP PEG-DSG	IV	48 시간	
C	4	SC 뉴로-2a	1회 투여 L055-pSPLP PEG-DPG	IV	48 시간	
D	4	SC 뉴로-2a	1회 투여 L055-pSPLP PEG-DMG	IV	48 시간	
E	4	SC 뉴로-2a	1회 투여 L055-pSPLP PEG-A-DSA	IV	48 시간	
F	4	SC 뉴로-2a	1회 투여 L055-pSPLP PEG-A-DPA	IV	48 시간	
G	4	SC 뉴로-2a	1회 투여 L055-pSPLP PEG-A-DMA	IV	48 시간	
H	4	SC 뉴로-2a	1회 투여 L055-SPLP PEG-A-DSA	IV	48 시간	
I	4	SC 뉴로-2a	1회 투여 L055-SPLP PEG-A-DPA	IV	48 시간	
J	4	SC 뉴로-2a	1회 투여 L055-SPLP PEG-A-DMA	IV	48 시간	
K	4	SC 뉴로-2a	1회 투여 L055-SPLP PEG-A-DMA, 20 mg pDNA/Kg	IV	48 시간	

[0321] 모든 제형은 DSPC:Cho1:DODMA:PEG-DAG (20:55:15:10)를 함유하였다. 하기 제형을 제조하였다:

[0322] A: PBS (pH 7.4).

[0323] B: L055 PEG-DSG pSPLP, 0.5 mg/ml.

[0324] C : L055 PEG-DPG pSPLP, 0.43 mg/ml.

[0325] D: L055 PEG-DMG pSPLP, 0.5 mg/ml.

[0326] E: L055 PEG-A-DSA pSPLP, 0.5 mg/ml.

[0327] F: L055 PEG-A-DPA pSPLP, 0.5 mg/ml.

[0328] G: L055PEG-A-DMA pSPLP, 0.5 mg/ml.

[0329] H: L055 PEG-A-DSA SPLP, 0.5 mg/ml.

[0330] I: L055 PEG-A-DPA SPLP, 0.5 mg/ml.

[0331] J: L055 PEG-A-DMA SPLP, 0.5 mg/ml.

[0332] K: L055 PEG-A-DMA SPLP, 2.1 mg/ml.

[0333] 제 0 일에, 50 μ l PBS 중의 1.5×10^6 뉴로2A 세포를 각각의 마우스에 피하 투여하였다. 제 13 일에, 마우스를 랜덤화하고, 정맥내 (IV) 주사에 의해 SPLP 제형 또는 PBS의 1회 투여로 처리하였다. 투여량은 투여일에 수득된 체중 측정값을 기준으로 한다. SPLP 투여 후 48 시간째에, 마우스를 중량을 재고, 희생시키고, 그들의 혈액을 수집하고, 하기 조직들을 수집하고, 중량을 재고, 즉시 동결시키고, 추가 분석시까지 -80 °C에서 저장하였다: 종양, 간 (반으로 절단), 폐, 비장 및 심장.

[0334] 발현된 루시페라아제 리포터의 효소 활성에 대해 검정함으로써 수집된 조직에서의 유전자 발현을 결정하였다. 그 결과를 도 7 및 도 8에 도시한다.

[0335]

군	마우스 수	종양 SC	SPLP 처리	종결
A	4	제 0 일	제 12 일	제 14 일
B	4	제 0 일	제 12 일	제 14 일
C	4	제 0 일	제 12 일	제 14 일
D	4	제 0 일	제 12 일	제 14 일
E	4	제 0 일	제 12 일	제 14 일
F	4	제 0 일	제 12 일	제 14 일
G	4	제 0 일	제 12 일	제 14 일
H	4	제 0 일	제 12 일	제 14 일
I	4	제 0 일	제 12 일	제 14 일
J	4	제 0 일	제 12 일	제 14 일

[0336]

상기 결과는 SPLP 중 짧은 사슬 PEG-지질 (즉 PEG-DMG 및 PEG-A-DMA)의 존재가 긴 사슬 변형체 (즉, PEG-DSG 및 PEG-A-DSA)에 비해 종양 트랜스펙션을 대략 5-10 배 감소시킨다는 것을 나타낸다. 이러한 결과들은 함께 pSPLP가 C₁₄ PEG-지질을 함유하는 경우, SPLP에 비해 pSPLP (C₁₈ PEG-지질)에서 관찰되는 종양 트랜스펙션의 강화가 완전히 없어진다는 것을 나타낸다. 이는 하기의 다수의 요인에 의한 것일 수 있다: (1) PEG-지질이 pSPLP로 된 2중층을 이탈하는 경우 pSPLP의 안정성 감소, (2) PEG-지질 제거시 전하의 증가, 또는 (3) C₁₄ PEG-지질에 대한 조건 (예를 들면, 2중층 내 음이온성 지질의 양)이 최적화되지 않은 경우. 이들 중 어느 것이 문제가 되는 지 결정하기 위해 추가의 실험이 필요할 것이다. 또한, 시험된 다른 기관에서의 활성은 모든 시스템에 대해 매우 낮았다. 흥미롭게도, 20 mg/kg 투여량의 PEG-A-DMA SPLP는 종양에서 5 mg/kg 투여량과 필적하는 수준의 루시페라아제 유전자 발현을 제공하였지만, 간에서는 동일한 5 mg/kg 투여량과 비교하여 훨씬 높은 유전자 발현을 제공하였다.

[0337]

실시예 5: SNALP를 사용한 유전자 발현의 침묵

[0338]

본 실시예는 CMV 프로모터의 조절하에서 루시페라아제를 코딩하는 플라스미드를 함유하는 SPLP 및 항루시페라아제 siRNA를 함유하는 SNALP의 공동투여 후 뉴로 2A 종양 함유 마우스에서의 유전자 발현의 침묵을 예시한다.

[0339]

군	마우스 수	종양	경로	처리	시점	경로	투여 회 수
1	3	뉴로-2a	SQ	PBS/PBS	48 h	IV	1
24A	4			L055-SPLP/PBS 혼합물	24 h		
24B	4			L055-SPLP/항-luc siRNA 리포솜 혼합물			
48A	4			L055-SPLP/PBS 혼합물	48 h		
48B	4			L055-SPLP/항-luc siRNA 리포솜 혼합물			
72A	4			L055-SPLP/PBS 혼합물	72 h		
72B	4			L055-SPLP/항-luc siRNA 리포솜 혼합물			

[0340]

군	마우스 수	접종일	경로	IV 처리	시점	주사일	수집일
1	3	제 0 일	SQ	PBS/PBS	48 h	제 13 일	제 15 일
24A	4			L055-SPLP/PBS 혼합물	24 h	제 14 일	
24B	4			L055-SPLP/항-luc siRNA 리포솜 혼합물		제 14 일	
48A	4			L055-SPLP/PBS 혼합물	48 h	제 13 일	
48B	4			L055-SPLP/항-luc siRNA 리포솜 혼합물		제 13 일	
72A	4			L055-SPLP/PBS 혼합물	72 h	제 12 일	
72B	4			L055-SPLP/항-luc siRNA 리포솜 혼합물		제 12 일	

[0341] 제 0 일에, 36 마리의 수컷 A/J 마우스 (잭슨 라보라토리즈(Jackson Laboratories))에 50 μ l 포스페이트 완충 된 식염수의 총 부피 중 1.5×10^6 개 세포의 투여량으로 뉴로 2A 세포로 피하 접종하였다. 종양이 적절한 크기에 도달한 후 (전형적으로 제 9 일 이상), 200-240 μ l의 PBS, 상기 실시예 6에 기재된 바와 같이 제조된 SPLP, 또는 SNALP 제형 (총 100 μ g의 핵산)을 정맥내 투여하였다. PBS, SPLP 또는 SPLP와 SNALP의 혼합물의 투여 후 24, 48, 또는 72 시간째에, 마우스를 희생시키고, 기관 (예를 들면, 간, 폐, 비장, 신장, 심장) 및 종양을 수집하고, 루시페라아제 활성에 대해 평가하였다.

[0342] pL055 SPLP 및 항-luc siRNA SNALP (둘 모두 PEG-A-DMA 함유)의 공동투여는 단일 iv 투여 후 48 시간째에 루시페라아제 유전자 발현을 40% 만큼 최대로 감소시켰다. 그 결과를 도 9-13에 도시한다.

[0343] 실시예 6: PEG-DAA 컨쥬게이트를 포함하는 SPLP의 흡수

[0344] 본 실시예는 시험관내에서 포유류 세포에 의한 PEG-DAA 컨쥬게이트를 포함하는 SPLP의 흡수를 예시한다. 하기 표에 나타난 SPLP 제형을 ³H-CHE를 사용하여 표지화시키고, 세포상에서 4 °C 또는 37 °C에서 24 시간 동안 인큐베이션하였다. SPLP는 2, 4, 또는 10 몰% PEG-C-DMA를 포함하였다.

[0345]

	몰% (DSPC:Chol:PEG-C-DMA:DODMA)
A	20:50:10:15
B	20:61:4:15
C	20:63:2:15

[0346] SPLP의 흡수는 37 °C에서 그리고 PEG-C-DMA의 양이 감소함에 따라 보다 큰 효율로 일어났다. 그 데이터를 도 14에 도시한다.

[0347] 실시예 7: PEG-DAA 컨쥬게이트를 포함하는 SPLP의 생체분포 및 혈액 제거율

[0348] 본 실시예는 PEG-DAA 컨쥬게이트를 포함하는 SPLP의 생체분포 및 혈액 제거율을 예시한다. PEG-C-DMA 또는 PEG-C-DSA를 포함하는 ³H-CHE-표지화된 SPLP를 뉴로-2a 종양-함유 수컷 A/J 마우스에 정맥내 투여하였다. SPLP를 다음과 같이 제형화하였다:

[0349]

군	처리	몰% (DSPC:Chol:PEG-C-DMA:양이온성 지질)
A	SPLP (15 몰% PEG-C-DMA)	20:50:15:15
B	SPLP (10 몰% PEG-C-DMA)	20:55:10:15
C	SPLP (5 몰% PEG-C-DMA)	20:60:5:15

[0350] SPLP 투여 후 48 시간째에 간, 비장, 폐, 및 종양에서의 SPLP의 생체분포를 결정하였다. 그 결과를 도 15에 도시한다.

[0351] SPLP 투여 후 1, 2, 4, 및 24 시간째에 SPLP의 혈액 제거율을 결정하였다. 그 결과를 도 16에 도시한다.

[0352] 실시예 8: PEG-DAA 컨쥬게이트를 포함하는 SPLP 및 SNALP의 생체분포 및 혈액 제거율

[0353] 본 실시예는 PEG-DAA 컨쥬게이트를 포함하는 SPLP 및 SNALP의 생체분포 및 혈액 제거율을 예시한다. PEG-C-DMA 또는 PEG-C-DSA를 포함하는 ³H-CHE-표지화된 SPLP 또는 SNALP를 뉴로-2a 종양-함유 수컷 A/J 마우스에 정맥내 투여하였다. SPLP는 루시페라아제를 엔코딩하는 캡슐화된 플라스미드를 포함하고, SNALP는 캡슐화된 항 루시페라아제 siRNA 서열을 포함하였다. SPLP 및 SNALP 제형은 모두 하기 지질 비를 가졌다: DSPC 20 %: 콜레스테롤 55 %: PEG-지질 10 %: DODMA 15 %.

[0354] SPLP 또는 SNALP의 투여 후 24 시간째에 간, 비장, 부신, 종양, 소장, 림프절, 신장, 대장, 대퇴골, 심장, 흉선, 고환 및 뇌에서의 SPLP 또는 SNALP의 생체분포를 결정하였다. 그 결과를 도 17에 도시한다.

[0355] SPLP 및 SNALP의 투여 후 1, 2, 4, 8 및 24 시간째에 PEG-C-DMA 또는 PEG-C-DSA를 포함하는 SPLP 및 SNALP의 혈액 제거율을 결정하였다. 그 결과를 도 18에 도시한다.

[0356] 실시예 9: PEG-DAA 컨쥬게이트를 포함하는 SPLP 및 pSPLP에 의한 세포의 트랜스펙션

[0357] 본 실시예는 CMV 프로모터의 조절하에서, 루시페라아제를 엔코딩하는 플라스미드를 캡슐화하는 다양한 SPLP 제형을 사용한 생체내 트랜스펙션 후 기관 및 종양에서의 유전자 발현을 평가하도록 수행되는 3 개의 별도의 실험을 기재한다.

[0358] 제 1 실험은 SPLP 및 pSPLP를 정맥내 투여한 후 뉴로2A 종양 함유 수컷 A/J 마우스에서의 루시페라아제 유전자 발현을 평가하였다. C14 및 C18 PEG-C-DAA를 포함하는 제형을 등가의 PEG-DAG와 비교하였다. PEG 잔기는 2000 달톤의 분자량을 가졌다. DODMA를 SPLP 중에서 양이온성 지질로서 사용하였다. POPG 또는 DOP를 pSPLP 중에서 음이온성 지질로서 사용하였다. SPLP 및 pSPLP를 다음과 같이 제형화하였다:

샘플 설명 (PEG-지질 유형, 하전된 지질 유형)	몰% (DSPC:Chol:PEG-지질:하전된 지질)
A SPLP (PEG-DSG, DODMA)	20:50:15:15
B SPLP (PEG-DMG, DODMA)	20:55:10:15
C SPLP (PEG-C-DSA, DODMA)	20:60:5:15
D SPLP (PEG-C-DMA, DODMA)	20:62.5:2.5:15
E pSPLP (PEG-C-DSA, POPG)	20:55:10:15
F pSPLP (PEG-C-DSA, DOP)	20:60:5:15
G pSPLP (PEG-DSG, POPG)	20:62.5:2.5:15

[0360] SPLP 및 pSPLP를 정맥내 투여한 후 48 시간째에 간, 폐, 비장, 심장 및 종양에서의 루시페라아제 유전자 발현을 측정하였다. 루시페라아제 발현은 시험된 모든 SPLP 및 pSPLP 제형에 대해 다른 조직 유형에 비해 종양에서 가장 높았다. 그 결과를 도 19에 도시한다.

[0361] 제 2 실험은 다양한 % (즉, 15 %, 10 %, 5 %, 또는 2.5 %)의 PEG-C-DMA를 포함하는 SPLP를 정맥내 투여한 후 뉴로2A 종양 함유 수컷 A/J 마우스에서의 루시페라아제 유전자 발현을 평가하였다.

	몰% (DSPC:Chol:PEG-C-DMA:DODMA)
A	20:50:15:15
B	20:55:10:15
C	20:60:5:15
D	20:62.5:2.5:15

[0363] SPLP의 투여 후 48 시간째에 종양에서의 루시페라아제 발현을 측정하였다. 그 결과를 도 20에 도시한다.

[0364] 제 3 세트의 실험은 다양한 크기의 PEG 잔기 (즉, 2000 또는 750 달톤)를 갖는 PEG-C-DMA 컨쥬게이트를 포함하는 SPLP를 정맥내 투여한 후 뉴로2A 종양 함유 수컷 A/J 마우스에서의 루시페라아제 유전자 발현을 평가하였다.

샘플 설명
A SPLP-PEG ₂₀₀₀ -C-DMA (CHOL:DSPC:DODMA:PEG ₂₀₀₀ -C-DMA 55:20:15:10 몰%)
B SPLP-PEG ₇₅₀ -C-DMA/DODMA (CHOL:DSPC:DODMA:PEG ₇₅₀ -C-DMA 55:20:15:10 몰%)
C SPLP-High PEG ₇₅₀ -C-DMA (CHOL:DSPC:DODMA:PEG ₇₅₀ -C-DMA 50:20:15:15 몰%)
D SPLP-DODAC (CHOL:DSPC:DODMA:PEG ₂₀₀₀ -C-DMA:DODAC 45:20:15:10:10 몰%) 0.35 mg/ml

[0366] SPLP의 투여 후 48 시간째에 간, 폐, 비장, 심장 및 종양에서의 루시페라아제 유전자 발현을 측정하였다. 루시페라아제 발현은 시험된 모든 SPLP 제형에 대해 다른 조직 유형에 비해 종양에서 가장 높았다. 그 결과를 도 21에 도시한다.

[0367] 실시예 10: PEG-DAA 컨쥬게이트를 포함하는 SNALP를 사용한 시험관내에서의 유전자 발현의 침묵

[0368] 본 실시예는 siRNA를 캡슐화하는 SNALP의 전달 후 시험관내에서의 유전자 발현의 침묵을 기재한다. 루시퍼라아제를 발현하는 뉴로2A-G 세포를 항루시퍼라아제 siRNA (즉, 서열 GAUUAUGUCCGGUUAUGUAUU를 포함하며 DNA 서열 GATTATGTCCGGTTATGTATT를 표적화하는 siRNA)를 캡슐화하는 SNALP 제형과 클로로퀸(chloroquine)의 존재 또는 부재 하에서 48 시간 동안 접촉시켰다. SNALP 제형은 다양한 양의 PEG-C-DMA (C₁₄), 즉 1 %, 2 %, 4 %, 또는 10 %를 함유하였다. 양이온성 지질은 DODMA였다.

[0369]

군	처리	몰% (DSPC:Chol:PEG-C-DAA:DODMA)
A	PBS	-
B	나출 siRNA	-
C	SNALP (PEG-C-DMA)	20:40:10:30
D	SNALP (PEG-C-DMA)	20:46:4:30
E	SNALP (PEG-C-DMA)	20:48:2:30
F	SNALP (PEG-C-DMA)	20:49:1:30

[0370] 그 결과를 도 22에 도시한다.

[0371] 실시예 11: PEG-DAA 컨쥬게이트를 포함하는 SNALP를 사용한 생체내에서의 유전자 발현의 침묵

[0372] 본 실시예는 siRNA를 캡슐화하는 SNALP의 투여 후 생체내에서의 유전자 발현의 침묵을 기재한다.

[0373] 본 실험은 siRNA를 캡슐화하는 SNALP의 투여가 전이 종양에서 유전자 발현을 침묵시킬 수 있다는 것을 나타낸다. 전이 간 종양을 지닌 루시퍼라아제를 발현하는 뉴로-2a 종양 함유 수컷 A/J 마우스를 PEG-DAA 컨쥬게이트를 포함하고 항루시퍼라아제 siRNA (즉, 서열 GAUUAUGUCCGGUUAUGUAUU를 포함하며 DNA 서열 GATTATGTCCGGTTATGTATT를 표적화하는 siRNA)를 캡슐화하는 SNALP로 처리하였다. 모든 SNALP는 하기 제형을 가졌다: DSPC 20 %: 콜레스테롤 55 %: PEG-C-DMA 10 %: DODMA 15 %. 마우스들은 SNALP의 단일 정맥내 투여를 받았다. SNALP 주사 후 48 시간째에 종양에서의 루시퍼라아제 발현을 결정하였다. 그 결과는 SNALP의 투여가 SNALP 투여 부위에 대한 원위 부위에서 생체내 유전자 발현을 침묵시킬 수 있다는 것을 나타낸다. 이들 결과를 도 23에 도시한다.

[0374] 상기 설명이 예시를 위한 것이지만 이들에 한정되지 않는다는 것이 이해되어야 한다. 당업자는 상기 설명을 읽은 후 많은 실시양태들이 명확히 이해될 것이다. 따라서, 본 발명의 범위는 상기 설명을 기준으로 결정되는 것이 아니라, 첨부하는 청구범위와 이러한 청구범위에 포함되는 등가물의 전체 범위를 기준으로 결정되어야 한다. 특허 출원, 특허 및 PCT 공보를 비롯한 모든 문서 및 참조 문헌의 개시 내용은 모든 목적으로 본 명세서에 참고 문헌으로 인용된다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 두 예시적인 PEG-디알킬옥시프로필 유도체, 즉 N-(2,3-디미리스틸옥시프로필) 카르바메이트 PEG₂₀₀₀ 메틸 에테르 (즉, PEG-C-DMA), N-(2,3-디미리스틸옥시프로필) 아마이드 PEG₂₀₀₀ 메틸 에테르 (즉, PEG-A-DMA), 및 N-(2,3-디미리스틸옥시프로필) 숙신아מיד PEG₂₀₀₀ 메틸 에테르 (즉, PEG-S-DMA)의 구조를 도시한다.

[0020] 도 2는 PEG-DAA 컨쥬게이트, PEG-DAG 컨쥬게이트, PEG-세라미드 컨쥬게이트 및 PEG-DSPE 컨쥬게이트를 포함하는 리포솜의 안정성을 나타내는 데이터를 도시한다.

[0021] 도 3은 PEG-DAA 컨쥬게이트, PEG-DAG 컨쥬게이트 및 PEG-세라미드 컨쥬게이트를 포함하는 SPLP의 IV 투여 후 종양에서의 루시퍼라아제 유전자 발현을 나타내는 데이터를 도시한다.

[0022] 도 4는 PEG-DAA 컨쥬게이트, PEG-DAG 컨쥬게이트, PEG-세라미드 컨쥬게이트 및 PEG-DSPE 컨쥬게이트를 포함하는 SPLP에 의한 생체내 트랜스펙션을 나타내는 데이터를 도시한다.

[0023] 도 5는 PEG-DAA 컨쥬게이트 및 PEG-DAG 컨쥬게이트를 포함하는 SPLP를 정맥내 투여한 후 48 시간째의 종양에서의 루시퍼라아제 유전자 발현을 나타내는 데이터를 도시한다.

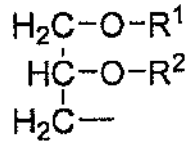
[0024] 도 6은 PEG-DAA 컨쥬게이트 및 PEG-DAG 컨쥬게이트를 포함하는 SPLP를 정맥내 투여한 후 간, 폐, 비장, 심장 및 종양에서의 루시퍼라아제 유전자 발현을 나타내는 데이터를 도시한다.

- [0025] 도 7은 PEG-DAA 컨쥬게이트 및 PEG-DAG 컨쥬게이트를 포함하는 SPLP 또는 pSPLP를 정맥내 투여한 후 48 시간째의 종양에서의 루시페라아제 유전자 발현을 나타내는 데이터를 도시한다.
- [0026] 도 8은 PEG-DAA 컨쥬게이트 및 PEG-DAG 컨쥬게이트를 포함하는 SPLP에 의한 생체내 트랜스펙션을 나타내는 데이터를 도시한다.
- [0027] 도 9는 PEG-DAA 컨쥬게이트를 포함하고 CMV 프로모터의 조절하에 루시페라아제를 엔코딩하는 플라스미드를 함유하는 SPLP 및 PEG-DAA 컨쥬게이트를 포함하고 항루시페라아제 siRNA를 함유하는 SNALP로 처리된, 뉴로 (Neuro)-2a 종양 함유 수컷 A/J 마우스에서 루시페라아제 발현의 침묵을 나타내는 생체내 데이터를 도시한다.
- [0028] 도 10은 PEG-DAA 컨쥬게이트를 포함하고 CMV 프로모터의 조절하에 루시페라아제를 엔코딩하는 플라스미드를 함유하는 SPLP 및 PEG-DAA 컨쥬게이트를 포함하고 항루시페라아제 siRNA를 함유하는 SNALP로 처리된, 뉴로 (Neuro)-2a 종양 함유 수컷 A/J 마우스에서 루시페라아제 발현의 침묵을 나타내는 생체내 데이터를 도시한다.
- [0029] 도 11은 PEG-DAA 컨쥬게이트를 포함하고 CMV 프로모터의 조절하에 루시페라아제를 엔코딩하는 플라스미드를 함유하는 SPLP 및 PEG-DAA 컨쥬게이트를 포함하고 항루시페라아제 siRNA를 함유하는 SNALP로 처리된, 뉴로 (Neuro)-2a 종양 함유 수컷 A/J 마우스에서 루시페라아제 발현의 침묵을 나타내는 생체내 데이터를 도시한다.
- [0030] 도 12는 PEG-DAA 컨쥬게이트를 포함하고 CMV 프로모터의 조절하에 루시페라아제를 엔코딩하는 플라스미드를 함유하는 SPLP 및 PEG-DAA 컨쥬게이트를 포함하고 항루시페라아제 siRNA를 함유하는 SNALP로 처리된, 뉴로 (Neuro)-2a 종양 함유 수컷 A/J 마우스에서 루시페라아제 발현의 침묵을 나타내는 생체내 데이터를 도시한다.
- [0031] 도 13은 PEG-DAA 컨쥬게이트를 포함하고 CMV 프로모터의 조절하에 루시페라아제를 엔코딩하는 플라스미드를 함유하는 SPLP 및 PEG-DAA 컨쥬게이트를 포함하고 항루시페라아제 siRNA를 함유하는 SNALP로 처리된, 뉴로 (Neuro)-2a 종양 함유 수컷 A/J 마우스에서 루시페라아제 발현의 침묵을 나타내는 생체내 데이터를 도시한다.
- [0032] 도 14는 PEG-C-DMA 컨쥬게이트를 포함하는 SPLP의 세포에 의한 흡수를 나타내는 데이터를 도시한다.
- [0033] 도 15는 SPLP 또는 SNALP의 투여 후 24 시간째의 뉴로-2a 종양 함유 수컷 A/J 마우스에서의 PEG-C-DMA를 포함하는 SNALP 및 SPLP의 생체분포를 나타내는 데이터를 도시한다.
- [0034] 도 16은 SPLP의 투여 후 24 시간까지의 수컷 A/J 마우스에서의 PEG-C-DMA를 포함하는 SPLP의 혈액 제거율을 나타내는 데이터를 도시한다.
- [0035] 도 17은 SPLP 또는 SNALP의 투여 후 48 시간째의 뉴로-2a 종양 함유 수컷 A/J 마우스에서의 PEG-C-DMA 또는 PEG-C-DSA를 포함하는 SPLP 및 SNALP의 생체분포를 나타내는 데이터를 도시한다.
- [0036] 도 18은 SPLP 및 SNALP의 투여 후 24 시간까지의 수컷 A/J 마우스에서의 PEG-C-DMA 또는 PEG-C-DSA를 포함하는 SPLP 및 SNALP의 혈액 제거율을 나타내는 데이터를 도시한다.
- [0037] 도 19는 PEG-DAA 컨쥬게이트 및 PEG-DAG 컨쥬게이트를 포함하고 루시페라아제를 엔코딩하는 플라스미드를 캡슐화하는 SPLP 및 pSPLP에 의한 생체내 트랜스펙션을 나타내는 데이터를 도시한다.
- [0038] 도 20은 PEG-C-DMA 컨쥬게이트를 포함하고 루시페라아제를 엔코딩하는 플라스미드를 캡슐화하는 SPLP에 의한 생체내 트랜스펙션을 나타내는 데이터를 도시한다.
- [0039] 도 21은 PEG-C-DMA 컨쥬게이트를 포함하고 루시페라아제를 엔코딩하는 플라스미드를 캡슐화하는 SPLP에 의한 생체내 트랜스펙션을 나타내는 데이터를 도시한다.
- [0040] 도 22는 PEG-C-DMA 컨쥬게이트를 포함하고 항루시페라아제 siRNA를 함유하는 SNALP와 접촉한 뉴로-2a 세포에서의 루시페라아제 발현의 침묵을 나타내는 데이터를 도시한다.
- [0041] 도 23은 루시페라아제를 발현하고, PEG-C-DMA 컨쥬게이트를 포함하고 항루시페라아제 siRNA를 캡슐화하는 SNALP로 처리된 수컷 A/J 마우스의 전이성 뉴로-2a 종양에서의 루시페라아제 발현의 침묵을 나타내는 생체내 데이터를 도시한다.
- [0042] 발명의 상세한 설명
- [0043] I. 도입
- [0044] 본 발명은 통상 사용되는 PEG-지질 컨쥬게이트 (예를 들면, PEG-PE 컨쥬게이트)에 비해 증가된 안정성을 갖는 신규한 폴리에틸렌글리콜-디알킬옥시프로필(PEG-DAA) 컨쥬게이트를 제공한다. 본 발명의 PEG 개질된 디알킬

프로필 컨쥬게이트는 리포솜, SNALP, 또는 SPLP의 순환 생명 또는 수명을 증가시킴으로써 리포솜, 뿐만 아니라 핵산-지질 입자 (예를 들면, SNALP 및 SPLP)의 특성을 강화시킨다. 사실상, 놀랍게도 링커를 통해 DAA에 컨쥬게이션된 PEG를 포함하는 PEG-DAA 컨쥬게이트가 다른 통상 사용되는 PEG-지질 유도체보다 안정한 것으로 밝혀졌다. 특히, 놀랍게도 에스테르 비함유 링커 잔기가 사용된 경우 통상 사용되는 PEG-지질 컨쥬게이트 (예를 들면, PEG-PE 컨쥬게이트)에 비해 증가된 안정성을 갖는 PEG-DAA 컨쥬게이트가 생성되는 것으로 밝혀졌다. 본 발명의 PEG-DAA 컨쥬게이트는 이들의 증가된 안정성의 결과로써, 리포솜, SNALP 또는 SPLP의 순환 생명 또는 수명을 증가시키고, 또한 다른 PEG-지질 컨쥬게이트가 사용되는 경우 리포솜 2중층, SNALP, 또는 SPLP의 지방 아실 쇄의 가수분해로 인한 누출을 감소시킨다.

[0045] II. 정의

[0046] 용어 "디알킬옥시프로필"은 2-알킬 쇄인 R¹ 및 R²를 지니는 화합물로서, R¹ 및 R² 둘 모두가 독립적으로 2 내지 30 개의 탄소를 갖는 화합물을 지칭한다. 알킬기는 포화되거나 또는 다양한 불포화도를 가질 수 있다. 디알킬옥시프로필은 하기 화학식을 갖는다:



[0047] 용어 "PEG"는 폴리에틸렌 글리콜로서, 두 말단 히드록실기를 갖는 에틸렌 PEG 반복 단위로 된 선형 수용성 중합체를 지칭한다. PEG는 그들의 분자량으로 분류되며, 예를 들면 PEG 2000은 약 2,000 달톤 평균 분자량을 갖고, PEG 5000은 약 5,000 달톤의 평균 분자량을 갖는다. PEG는 시그마 케미칼 캄파니 (Sigma Chemical Co.) 및 다른 제조사들로부터 상업적으로 입수가 가능하고, 예를 들면 모노메톡시폴리에틸렌 글리콜(MePEG-OH), 모노메톡시폴리에틸렌 글리콜-숙시네이트(MePEG-S), 모노메톡시폴리에틸렌 글리콜-숙신이미딜 숙시네이트(MePEG-S-NHS), 모노메톡시폴리에틸렌 글리콜-아민(MePEG-NH₂), 모노메톡시폴리에틸렌 글리콜-트레실레이트(MePEG-TRES), 및 모노메톡시폴리에틸렌 글리콜-이미다졸릴-카르보닐(MePEG-IM)을 포함한다. 또한, 실시예는 본 발명의 PEG-DAA 컨쥬게이트를 제조하는 데 특히 유용한 모노메톡시폴리에틸렌글리콜-아세트산(MePEG-CH₂COOH)을 합성하는 프로토콜을 제공한다.

[0049] 바람직한 실시양태에서, PEG는 약 550 내지 약 10,000 달톤의 평균 분자량을 갖는 폴리에틸렌 글리콜이고, 알킬, 알콕시, 아실 또는 아릴에 의해 임의적으로 치환된다. 바람직한 실시양태에서, PEG는 말단 히드록실 위치에서 메틸로 치환된다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, PEG는 약 750 내지 약 5,000 달톤, 더욱 바람직하게는 약 1,000 내지 약 5,000 달톤, 더욱 바람직하게는 약 1,500 내지 약 3,000 달톤, 훨씬 더 바람직하게는 약 2,000 달톤 또는 약 750 달톤의 평균 분자량을 갖는다. PEG는 임의적으로 알킬, 알콕시, 아실 또는 아릴로 치환될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 말단 히드록실기는 메톡시 또는 메틸기로 치환된다.

[0050] 본 명세서에 사용된 PEG-DAA 컨쥬게이트는 디알킬옥시프로필에 컨쥬게이션된 폴리에틸렌 글리콜을 지칭한다. PEG는 DAA에 직접 컨쥬게이션되거나 또는 링커 잔기를 통해 DAA에 컨쥬게이션될 수 있다. 적합한 링커 잔기는 에스테르 비함유 링커 잔기 및 에스테르 함유 링커 잔기를 포함한다.

[0051] 본 명세서에 사용된 용어 "에스테르 비함유 링커 잔기"는 카르복실 에스테르 결합(-OC(O)-)을 함유하지 않는 링커 잔기를 지칭한다. 적합한 에스테르 비함유 링커 잔기는 아미도(-C(O)NH-), 아미노(-NR-), 카르보닐(-C(O)-), 카르바메이트(-NHC(O)O-), 우레아(-NHC(O)NH-), 디설피드(-S-S-), 에테르(-O-), 숙시닐(-(O)CCH₂CH₂C(O)-), 숙신이미딜(-NHC(O)CH₂CH₂C(O)NH-), 에테르, 디설피드 등, 뿐만 아니라 그들의 조합물 (예를 들면, 카르바메이트 링커 잔기와 아미도 링커 잔기 둘 모두를 함유하는 링커)을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. 바람직한 실시양태에서, 카르바메이트 링커는 PEG를 지질에 커플링시키는 데 사용된다.

[0052] 다른 실시양태에서, 에스테르 함유 링커 잔기는 PEG를 지질에 커플링시키는 데 사용된다. 적합한 에스테르 함유 링커 잔기는 예를 들면, 카르보네이트(-OC(O)O-), 숙시노일, 포스페이트 에스테르(-O-(O)POH-O-), 술포네이트 에스테르 및 그들의 조합물을 포함한다.

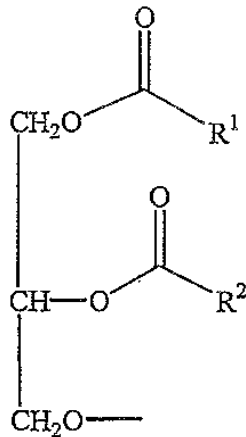
[0053] 용어 "지질"은 비제한적으로 지방산의 에스테르를 포함하며 수중에 불용성이지만 많은 유기 용매 중에 가용성임을 특징으로 하는 유기 화합물 군을 지칭한다. 대개 이들은 다음의 3 개 이상의 부류로 나뉜다: (1) 지방 및 오일, 뿐만 아니라 왁스를 포함하는 "단순 지질", (2) 인지질 및 당지질을 포함하는 "복합 지질", (3) 스

테로이드와 같은 "유도 지질(derived lipid)".

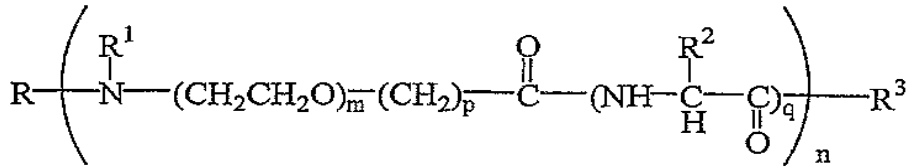
- [0054] "지질 소포"는 리포솜 (여기서, 수성 부피가 양쪽성 지질 2중층에 의해 캡슐화되거나, 또는 지질이 대형 분자 성분, 예를 들면 간섭 RNA 서열을 포함하는 플라즈미드를 포함하는 내부를 감소된 수성 내부로 코팅함) 또는 지질 응집체 또는 미셀 (여기서, 캡슐화된 성분이 비교적 무질서한 지질 혼합물 내에 함유됨)을 포함하지만 이들에 한정되지 않는 화합물을 전달하는 데 사용될 수 있는 임의의 지질 조성물을 지칭한다.
- [0055] 본 명세서에 사용된 "지질 캡슐화된"이란 완전 캡슐화되거나, 부분 캡슐화되거나, 둘 모두인 화합물을 제공하는 지질 제형(formulation)을 지칭할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 핵산은 지질 제형 중에 완전히 캡슐화된다 (예를 들면, SPLP, pSPLP, SNALP, 또는 다른 핵산 지질 입자를 형성하도록). 핵산 지질 입자 및 그들의 제조 방법은 미국 특허 제 5,976,567호, 미국 특허 제 5,981,501호 및 PCT 특허 공보 WO 96/40964에 개시되어 있다.
- [0056] 본 명세서에 사용된 용어 "SNALP"는 SPLP를 비롯한 안정한 핵산 지질 입자를 지칭한다. SNALP는 핵산 (예를 들면, ssDNA, dsDNA, ssRNA, dsRNA, siRNA, 또는 간섭 RNA가 전사되는 플라즈미드를 비롯한 플라즈미드)을 포함하는 감소된 수성 내부를 코팅하는 지질의 소포를 나타낸다. 본 명세서에 사용된 용어 "SPLP"는 지질 소포 내에 캡슐화된 핵산 (예를 들면, 플라즈미드)을 포함하는 핵산 지질 입자를 지칭한다. 전형적으로, SNALP 및 SPLP는 양이온성 지질, 비양이온성 지질, 및 입자의 응집을 방지하는 지질 (예를 들면, PEG-지질 컨쥬게이트)을 함유한다. SNALP 및 SPLP는 정맥내(i.v.) 주사 후 연장된 순환 수명을 나타냄에 따라 전신 적용성을 갖고, 원위 부위 (예를 들면, 투여 부위로부터 물리적으로 분리된 부위)에 축적되고, 이러한 원위 부위에서 트랜스펙션된 유전자의 발현을 매개할 수 있다. SPLP는 WO 00/03683에 나타난 바와 같이 캡슐화된 축합제-핵산 복합체를 포함하는 "pSPLP"를 포함한다.
- [0057] 용어 "소포 형성 지질"은 소수성 잔기 및 극성 헤드 기를 갖는 임의의 양쪽성 지질을 포함하는 것으로 의도되며, 대부분의 인지질에 의해 예시화되는 바와 같이 그 자체로 자발적으로 수중에서 2중층 소포를 형성할 수 있다.
- [0058] 용어 "소포 채택 지질"은 다른 양쪽성 지질과 함께 지질 2중층내로 안정적으로 혼입되는 임의의 양쪽성 지질을 포함하는 것으로 의도되며, 그의 소수성 잔기는 2중층 막의 내부 소수성 영역과 접촉하고, 그의 극성 헤드 기 잔기는 막의 외부 극성 표면을 향해 배향된다. 소포 채택 지질은 단독으로 비라멜라상(nonlamellar phase)을 채택하는 경향이 있지만, 2중층 안정화 성분의 존재 하에서 2중층 구조를 취할 수 있는 지질을 포함한다. 전형적 예로는 DOPE(디올레오일포스파티딜에탄올아민)가 있다. 2중층 안정화 성분은 SNALP, 폴리아미드 올리고머 (예를 들면, ATTA-지질 유도체), 펩티드, 단백질, 세정제, 지질-유도체, PEG-지질 유도체, 예를 들면 디알킬옥시프로필에 커플링된 PEG, 디아실글리세롤에 커플링된 PEG, 포스파티딜-에탄올아민에 커플링된 PEG, 및 세라미드에 컨쥬게이션된 PEG의 응집을 억제하는 컨쥬게이션된 지질을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다 (본 명세서에 참고문헌으로 인용된 미국 특허 제 5,885,613호 참조). PEG는 지질에 직접 컨쥬게이션되거나 또는 링커 잔기를 통해 지질에 연결될 수 있다. 예를 들면, 에스테르 비함유 링커 잔기 및 에스테르 함유 링커 잔기를 비롯한 PEG를 지질에 커플링하기에 적합한 임의의 링커 잔기가 사용될 수 있다.
- [0059] 용어 "양쪽성 지질"은 부분적으로는, 지질 물질의 소수성 부분이 소수성 상으로 배향되고, 친수성 부분은 수성상을 향해 배향되는 임의의 적합한 물질을 지칭한다. 양쪽성 지질은 대개 지질 소포의 주성분이다. 친수성 특징은 극성기 또는 하전된 기, 예를 들면 탄수화물, 포스페이트, 카르복실, 술폰, 아미노, 술폰히드릴, 니트로, 히드록시 및 다른 유사한 기의 존재로부터 유래된다. 장쇄의 포화된 및 불포화된 지방족 탄화수소기를 포함하지만 이에 한정되지 않는 비극성기를 포함함으로써 소수성이 제공될 수 있으며, 이러한 기는 하나 이상의 방향족, 지환족(cycloaliphatic) 또는 헤테로시클릭기(들)에 의해 치환된다. 양쪽성 화합물의 예는 인지질, 아미노지질 및 스펅고지질을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. 인지질의 대표적인 예는 포스파티딜콜린, 포스파티딜에탄올아민, 포스파티딜세린, 포스파티딜이노시톨, 포스파티드산, 팔미토일올레오일 포스파티딜콜린, 리소포스파티딜콜린, 리소포스파티딜에탄올아민, 디팔미토일포스파티딜콜린, 디올레오일포스파티딜콜린, 디스테아로일포스파티딜콜린 또는 디리놀레오일포스파티딜콜린을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. 또한, 인이 결여된 다른 화합물, 예를 들면 스펅고지질, 글리코스핑고지질 족(family), 디아실글리세롤 및 베타-아실옥시산도 양쪽성 지질로서 명명된 군에 속한다. 또한, 상기 양쪽성 지질은 트리글리세리드 및 스테롤을 비롯한 다른 지질과 혼합될 수 있다.
- [0060] 용어 "중성 지질"은 선택된 pH에서 비하전된 또는 중성 쯔비터이온 형태로 존재하는 다수의 지질 중 중 어느 하나를 지칭한다. 생리학적 pH에서, 이러한 지질은 예를 들면, 디아실포스파티딜콜린, 디아실포스파티딜에탄

올아민, 세라미드, 스펅고미엘린, 세팔린(cephalin), 콜레스테롤, 세레브로시드(cerebroside) 및 디아실글리세롤을 포함한다.

- [0061] 용어 "비양이온성 지질"은 상기 임의의 중성 지질, 뿐만 아니라 음이온성 지질을 지칭한다.
- [0062] 용어 "음이온성 지질"은 생리학적 pH에서 음 하전된 임의의 지질을 지칭한다. 이들 지질은 포스파티딜글리세롤, 카르디올리핀(cardiolipin), 디아실포스파티딜세린, 디아실포스파티드산, N-도데카노일 포스파티딜에탄올아민, N-숙시닐 포스파티딜에탄올아민, N-글루타릴포스파티딜에탄올아민, 리실포스파티딜글리세롤, 팔미토일 올레이올포스파티딜글리세롤(POPG), 및 중성 지질에 결합되는 다른 음이온성 개질기를 포함하지만 이들에 한정되지 않는다.
- [0063] 용어 "양이온성 지질"은 선택된 pH, 예를 들면 생리학적 pH에서 순 양전하를 함유하는 다수의 지질 중 중 어느 하나를 지칭한다. 이러한 지질은
- [0064] N,N-디올레일-N,N-디메틸암모늄 클로라이드("DODAC");
- [0065] N-(2,3-디올레일옥시)프로필-N,N,N-트리메틸암모늄 클로라이드("DOTMA");
- [0066] N,N-디스테아릴-N,N-디메틸암모늄 브로마이드("DDAB");
- [0067] N-(2,3-디올레일옥시)프로필-N,N,N-트리메틸암모늄 클로라이드("DOTAP");
- [0068] 3-(N-(N',N'-디메틸아미노에탄)-카르바모일)콜레스테롤("DC-Chol") 및
- [0069] N-(1,2-디미리스틸옥시프로프-3-일)-N,N-디메틸-N-히드록시에틸 암모늄 브로마이드("DMRIE")를 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. 하기 지질들은 양이온성이고, 생리학적 pH 미만에서 양전하를 갖는다: DODAP, DODMA, DMDMA 등.
- [0070] 용어 "소수성 지질"은 장쇄의 포화된 및 불포화된 지방족 탄화수소기를 포함하지만 이들에 한정되지 않는 비극성기를 갖는 화합물을 지칭하며, 상기 기는 하나 이상의 방향족, 지환족 또는 헤테로시클릭기(들)에 의해 임의적으로 치환된다. 적합한 예는 디아실글리세롤, 디알킬글리세롤, N-N-디알킬아미노, 1,2-디아실옥시-3-아미노프로판 및 1,2-디알킬-3-아미노프로판을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다.
- [0071] 용어 "융합성"은 세포의 막과 융합할 수 있는 리포솜, SNALP 또는 다른 약물 전달 시스템의 능력을 지칭한다. 막은 원형질막이거나 소기관, 예를 들면 엔도솜, 핵 등을 둘러싸는 막일 수 있다.
- [0072] 용어 "디아실글리세롤"은 2-지방 아실 체인 R¹ 및 R²를 지닌 화합물로서, R¹ 및 R² 둘 모두는 독립적으로 에스테르 연결에 의해 글리세롤의 1-위치 및 2-위치에 결합된 2 내지 30 개의 탄소를 갖는 화합물을 지칭한다. 아실기는 포화되거나 다양한 불포화도를 가질 수 있다. 디아실글리세롤은 하기 화학식을 갖는다:



- [0073]
- [0074] 용어 "ATTA" 또는 "폴리아미드"는 둘 모두 본 명세서에 참고문헌으로 인용되는 미국 특허 제 6,320,017호 및 제 6,586,559호에 개시된 화합물을 지칭하지만 이들에 한정되지 않는다. 이들 화합물은 하기 화학식을 갖는 화합물을 포함한다:



[0075]

[0076]

상기 식에서, R은 수소, 알킬 및 아실로 이루어진 군으로부터 선택되고; R¹은 수소 및 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되거나; 임의적으로, R 및 R¹ 및 이들에 결합된 질소는 아지도 잔기를 형성하고, R²는 수소, 임의적으로 치환된 알킬, 임의적으로 치환된 아릴 및 아미노산의 측쇄로부터 선택된 기이고; R³은 수소, 할로젠, 히드록시, 알콕시, 메르캅토, 히드라지노, 아미노 및 NR⁴R⁵ (여기서, R⁴ 및 R⁵는 독립적으로 수소 또는 알킬 임)로 이루어진 군으로부터 선택되고; n은 4 내지 80이고; m은 2 내지 6이고; p는 1 내지 4이고; q는 0 또는 1이다. 다른 폴리아미드가 본 발명의 화합물에 사용될 수 있다는 것이 당업자에게 명확히 이해될 것이다.

[0077]

용어 "핵산" 또는 "폴리뉴클레오티드"는 단일 가닥 또는 이중 가닥 형태의 2 개 이상의 데옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드를 함유하는 중합체를 지칭한다. 핵산은 합성, 천연 및 비천연 핵산이고, 기준 핵산과 유사한 결합 특성을 갖고, 기준 뉴클레오티드와 유사한 방식으로 대사되는 공지된 뉴클레오티드 유사체 또는 개질된 골격 잔기 또는 연결을 함유하는 핵산을 포함한다. 이러한 유사체의 예는 포스포로티오에이트, 포스포라미데이트, 메틸 포스포네이트, 키랄-메틸 포스포네이트, 2-O-메틸 리보뉴클레오티드, 펩티드-핵산 (PNA)을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. 특별히 한정 없으면, 상기 용어는 기준 핵산과 유사한 결합 특성을 갖고 천연 뉴클레오티드와 유사한 방식으로 대사되는 천연 뉴클레오티드의 공지된 유사체를 함유하는 핵산을 포함한다. 또한, 달리 언급이 없으면, 특정 핵산 서열은 명시적으로 지시된 서열 뿐만 아니라 그의 보존적으로 변형된 변이체 (예를 들면, 측중 코돈 치환), 대립유전자, 오르톨로그(ortholog), SNP, 및 상보적 서열을 내재적으로 포함한다. 구체적으로, 측중 코돈 치환은 하나 이상의 선택된 (또는 모든) 코돈의 제 3 위치가 혼합된 염기 및/또는 데옥시노신 잔기로 치환되는 서열을 생성시킴으로써 달성될 수 있다 (문헌 [Batzer et al., Nucleic Acid Res. 19: 5081 (1991); Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260: 2605-2608 (1985); and Cassol et al. (1992); Rossolini et al., Mol. Cell. Probes 8: 91-98 (1994)] 참조). "뉴클레오티드"는 당 데옥시리보오스(DNA) 또는 리보오스(RNA), 염기, 및 포스페이트기를 함유한다. 뉴클레오티드는 포스페이트기를 통해 함께 연결된다. "염기"는 퓨린 및 피리미딘 (이는 천연 화합물인 아데닌, 티민, 구아닌, 시토신, 우라실, 이노신, 및 천연 유사체를 추가로 포함함), 및 퓨린 및 피리미딘의 합성 유도체 (이는 비제한적으로 아민, 알코올, 티올, 카르복실레이트 및 알킬할라이드와 같은 새로운 반응성 기를 위치시키는 개질을 포함하지만 이들에 한정되지 않음)를 포함한다. DNA는 안티센스(antisense), 플라스미드 DNA, 플라스미드 DNA의 일부, 예비축합된 DNA, 중합효소 연쇄 반응(PCR)의 생성물, 벡터 (P1, PAC, BAC, YAC, 인공 염색체), 발현 카세트, 키메라 서열, 염색체 DNA, 또는 이들 기의 유도체의 형태일 수 있다. 용어 핵산은 유전자, cDNA, 유전자에 의해 엔코딩되는 mRNA, 및 간접 RNA 분자와 상호교환적으로 사용된다.

[0078]

용어 "유전자"는 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 전구체 (예를 들면, 간염 바이러스 A, B, C, D, E, 또는 G; 또는 헤르페스 심플렉스 바이러스로부터의 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 전구체)의 생산에 필요한 부분 길이 또는 전체 길이 코딩 서열을 포함하는 핵산 (예를 들면, DNA 또는 RNA) 서열을 지칭한다.

[0079]

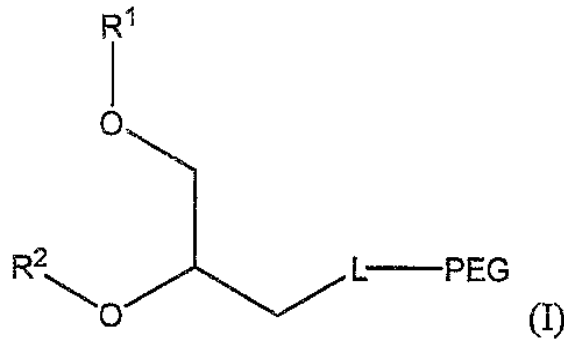
본 명세서에 사용된 "유전자 생성물"은 예를 들면, mRNA를 비롯한 RNA 전사체와 같은 유전자의 생성물을 지칭한다.

[0080]

III. 폴리에틸렌글리콜 개질된 디알킬옥시프로필(PEG-DAA) 컨쥬게이트

[0081]

본 발명은 통상 사용되는 PEG-지질 컨쥬게이트 (예를 들면, PEG-PE 컨쥬게이트)에 비해 증가된 안정성을 갖는 신규한 폴리에틸렌글리콜-디알킬옥시프로필(PEG-DAA) 컨쥬게이트를 제공한다. 더욱 특히, 본 발명은 하기 구조를 갖는 신규한 화학식 I의 PEG-DAA 컨쥬게이트를 제공한다:



[0082]

[0083]

상기 화학식 I에서, R¹ 및 R²는 독립적으로 선택되며, 약 10 내지 약 20 개의 탄소 원자를 갖는 알킬기이다. 알킬기는 포화되거나 불포화될 수 있다. 적합한 알킬기는 라우릴(C12), 미리스틸(C14), 팔미틸(C16), 스테아릴(C18) 및 이코실(C20)을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. 한 실시양태에서, R¹ 및 R²는 둘 모두 동일하며, 즉 R¹ 및 R²는 둘 모두 미리스틸(C14) 또는 둘 모두 스테아릴(C18) 등이다. 또 다른 실시양태에서, R¹ 및 R²는 상이하며, 즉 R¹은 미리스틸(C14)이고, R²는 스테아릴(C18)이다. 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 PEG-DAA 컨쥬게이트는 대칭적이며, 즉 R¹ 및 R²는 둘 모두 동일하다.

[0084]

상기 화학식 I에서, PEG는 2개의 말단 히드록실기를 갖는 에틸렌 PEG 반복 단위로 된 선형 수용성 중합체인 폴리에틸렌 글리콜이다. PEG는 그들의 분자량으로 분류되며, 예를 들면 PEG 2000은 약 2,000 달톤의 평균 분자량을 갖고, PEG 5000은 약 5,000 달톤의 평균 분자량을 갖는다. PEG는 시그마 케미칼 캄파니 및 다른 제조사들로부터 상업적으로 입수가능하고, 예를 들면 모노메톡시폴리에틸렌 글리콜(MePEG-OH), 모노메톡시폴리에틸렌 글리콜-숙시네이트(MePEG-S), 모노메톡시폴리에틸렌 글리콜-숙신이미딜 숙시네이트(MePEG-S-NHS), 모노메톡시폴리에틸렌 글리콜-아민(MePEG-NH₂), 모노메톡시폴리에틸렌 글리콜-트레실레이트(MePEG-TRES), 및 모노메톡시폴리에틸렌 글리콜-이미다졸릴-카르보닐(MePEG-IM)을 포함한다. 또한, 실시예는 본 발명의 PEG-DAA 컨쥬게이트를 제조하는 데 특히 유용한 모노메톡시폴리에틸렌글리콜-아세트산(MePEG-CH₂COOH)을 합성하는 프로토콜을 제공한다.

[0085]

바람직한 실시양태에서, PEG는 약 550 내지 약 10,000 달톤의 평균 분자량을 갖는 폴리에틸렌 글리콜이며, 알킬, 알콕시, 아실 또는 아릴에 의해 임의적으로 치환된다. 바람직한 실시양태에서, PEG는 말단 히드록실 위치에서 메틸로 치환된다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, PEG는 약 750 내지 약 5,000 달톤, 더욱 바람직하게는 약 1,000 내지 약 5,000 달톤, 더욱 바람직하게는 약 1,500 내지 약 3,000 달톤, 훨씬 더 바람직하게는 약 2,000 달톤 또는 약 750 달톤의 평균 분자량을 갖는다.

[0086]

상기 화학식 I에서, "L"은 에스테르 비함유 링커 잔기 또는 에스테르 함유 링커 잔기이다. 바람직한 실시양태에서, L은 에스테르 비함유 링커 잔기, 즉 카르복실 에스테르 결합(-OC(O)-)을 함유하지 않는 링커 잔기이다. 적합한 에스테르 비함유 링커는 아미도 링커 잔기, 아미노 링커 잔기, 카르보닐 링커 잔기, 카르바메이트 링커 잔기, 우레아 링커 잔기, 에테르 링커 잔기, 디설피드 링커 잔기, 숙신아미딜 링커 잔기, 숙시닐 링커 잔기 및 그들의 조합물을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. 바람직한 실시양태에서, 에스테르 비함유 링커 잔기는 카르바메이트 링커 잔기 (즉, PEG-C-DAA 컨쥬게이트)이다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 에스테르 비함유 링커 잔기는 아미도 링커 잔기 (즉, PEG-A-DAA 컨쥬게이트)이다. 바람직한 실시양태에서, 에스테르 비함유 링커 잔기는 숙신아미딜 링커 잔기 (즉, PEG-S-DAA 컨쥬게이트)이다.

[0087]

다른 실시양태에서, L은 에스테르 함유 링커 잔기이다. 적합한 에스테르 함유 링커 잔기는 예를 들면, 카르보네이트(-OC(O)O-), 숙시노일, 포스페이트 에스테르(-O-(O)POH-O-), 술포네이트 에스테르 및 그들의 조합물을 포함한다.

[0088]

본 발명의 PEG-DAA 컨쥬게이트는 당업자에게 공지된 표준 기술 및 시약을 사용하여 합성된다. 본 발명의 PEG-DAA 컨쥬게이트가 다양한 아미드, 아민, 에테르, 티오, 카르바메이트 및 우레아 연결을 함유한다는 것이 인식될 것이다. 당업자는 이들 결합을 형성하는 방법 및 시약이 널리 공지되어 있고, 용이하게 입수가능하다는 것을 인식할 것이다. 예를 들면, 문헌[March, ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY (Wiley 1992), Larock, COMPREHENSIVE ORGANIC TRANSFORMATIONS (VCH 1989); and Furniss, VOGEL'S TEXTBOOK OF PRACTICAL ORGANIC CHEMISTRY 5th ed. (Longman 1989)]을 참조할 수 있다. 또한, 존재하는 임의의 작용기가 본 발명의 PEG-DAA

컨쥬게이트의 합성시 상이한 지점에서 보호 및 탈보호를 필요로 할 수 있다는 것이 이해될 것이다. 당업자는 이러한 기술이 널리 공지되어 있다는 것을 인식할 것이다. 예를 들면, 문헌[Green and Wuts, PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS (Wiley 1991)]을 참조할 수 있다.

[0089] 본 발명의 PEG-DAA 컨쥬게이트 형성 반응의 일반적 순서는 하기 실시예 섹션에 나타나 있다. 실시예는 본 발명의 PEG-A-DMA, PEG-C-DMA 및 PEG-S-DMA 컨쥬게이트를 제조하는 합성 반응식을 제공한다. 유사한 프로토콜을 사용하여, 당업자는 다른 본 발명의 PEG-DAA 컨쥬게이트를 용이하게 생성할 수 있다.

[0090] 상기 외에도, PEG 대신에 다른 친수성 중합체를 사용할 수 있다는 것이 당업자에게 용이하게 이해될 것이다. PEG 대신에 사용될 수 있는 적합한 중합체의 예는 폴리비닐피롤리돈, 폴리메틸옥사졸린, 폴리에틸옥사졸린, 폴리히드록시프로필 메타크릴아미드, 폴리메타크릴아미드 및 폴리디메틸아크릴아미드, 폴리락트산, 폴리글리콜산, 및 유도체화된 셀룰로오스, 예를 들면 히드록시메틸셀룰로오스 또는 히드록시에틸셀룰로오스를 포함하지만 이들에 한정되지 않는다.

[0091] IV. PEG-DAA 컨쥬게이트를 함유하는 SPLP 및 SNALP

[0092] 한 실시양태에서, 본 발명은 폴리에틸렌글리콜(PEG)-디알킬옥시프로필(DAA) 컨쥬게이트, 즉 PEG-DAA 컨쥬게이트를 함유하는 안정화된 핵산-지질 입자 (예를 들면, SPLP 및 SNALP) 및 다른 지질 기재 담체 시스템을 제공한다. 전형적으로, 본 발명의 지질-핵산 입자는 핵산, 양이온성 지질, 비양이온성 지질 및 PEG-DAA 컨쥬게이트를 포함한다. 양이온성 지질은 전형적으로 상기 입자에 존재하는 총 지질 중 약 2 % 내지 약 60 %, 바람직하게는 약 5 % 내지 약 45 %를 차지한다. 특정한 바람직한 실시양태에서, 양이온성 지질은 상기 입자에 존재하는 총 지질 중 약 5 % 내지 약 15 %를 차지한다. 다른 바람직한 실시양태에서, 양이온성 지질은 상기 입자에 존재하는 총 지질 중 약 40 % 내지 약 50 %를 차지한다. 비양이온성 지질은 전형적으로 상기 입자에 존재하는 총 지질 중 약 5 % 내지 약 90 %, 바람직하게는 약 20 % 내지 약 85 %를 차지한다. PEG-DAA 컨쥬게이트는 전형적으로 상기 입자에 존재하는 총 지질 중 1 % 내지 약 20 %, 바람직하게는 2 % 내지 약 15 %, 더욱 바람직하게는 약 4 % 내지 약 10 %를 차지한다. 본 발명의 핵산-지질 입자는 콜레스테롤을 추가로 포함할 수 있다. 콜레스테롤은 존재하는 경우, 전형적으로 상기 입자에 존재하는 총 지질 중 약 10 % 내지 약 60 %, 바람직하게는 약 20 % 내지 약 45 %를 차지한다. 예를 들면, 실시예 섹션에 기재된 ERP 검정을 사용하여 핵산-지질 입자의 성분 비율이 변화될 수 있다는 것이 당업자에게 용이하게 이해될 것이다. 예를 들면, 전신 전달의 경우, 양이온성 지질은 상기 입자에 존재하는 총 지질 중 약 5 % 내지 약 15 %를 차지하고, 국소 또는 국지 전달의 경우, 상기 입자에 존재하는 총 지질 중 약 40 % 내지 약 50 %를 차지할 수 있다.

[0093] 본 발명의 SPLP 및 SNALP는 전형적으로 약 150 nm 미만의 평균 직경을 갖고, 실질적으로 비독성이다. 또한, 핵산은 본 발명의 SPLP 및 SNALP에 존재하는 경우 뉴클레아제에 의한 분해에 대해 수용액에서 내성을 갖는다. SPLP 및 SNALP 및 그들의 제조 방법은 미국 특허 제 5,976,567호, 미국 특허 제 5,981,501호 및 PCT 특허 공보 WO 96/40964에 개시되어 있으며, 상기 문헌 모두의 교시내용은 본 명세서에 참조로 포함된다.

[0094] 다양한 적합한 양이온성 지질이 본 발명에서 단독으로 또는 하나 이상의 다른 양이온성 지질 종 또는 비양이온성 지질 종과 함께 사용될 수 있다.

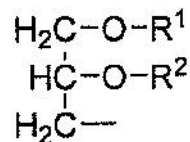
[0095] 본 발명에 유용한 양이온성 지질은 선택된 pH, 예를 들면 생리학적 pH에서 순 양전하를 함유하는 다수의 지질 종 중 어느 하나일 수 있다. 적합한 양이온성 지질은 DODAC, DOTMA, DDAB, DOTAP, DOSPA, DOGS, DC-Chol 및 DMRIE, 또는 그들의 조합물을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. 또한, 본 발명에 유용한 이러한 다수의 양이온성 지질 및 관련 유사체는 함께 계류 중인 USSN 08/316,399; 미국 특허 제 5,208,036호, 제 5,264,618호, 제 5,279,833호 및 제 5,283,185호에 기재되어 있으며, 상기 문헌의 개시내용은 본 명세서에 참조로 포함된다. 또한, 양이온성 지질의 다수의 상업적 제제가 입수가 가능하고, 본 발명에 사용될 수 있다. 이들은 예를 들면, 리포펙틴(LIPOFECTIN[®]) (미국 뉴욕주 그랜드 아일랜드 소재의 GIBCO/BRL로부터의 DOTMA 및 DOPE를 포함하는 시판되는 양이온성 리포솜), 리포펙타민(LIPOFECTAMINE[®]) (GIBCO/BRL로부터의 DOSPA 및 DOPE를 포함하는 시판되는 양이온성 리포솜), 및 트랜스펙탐(TRANSFECTAM[®]) (미국 위스콘신주 메디슨 소재의 프로메가 코퍼레이션 (Promega Corp.)으로부터의 DOGS를 포함하는 시판되는 양이온성 리포솜)을 포함한다.

[0096] 본 발명에 사용된 비양이온성 지질은 안정한 복합체를 생성할 수 있는 다양한 중성의 비하전된 쯔비터이온 또는 음이온성 지질 중 어느 하나일 수 있다. 이들은 비록 별법으로 양하전 또는 음하전될 수도 있지만 중성이 바람직하다. 본 발명에 유용한 비양이온성 지질의 예는 인지질 관련 물질, 예를 들면 레시틴, 포스파티딜에탄올아민, 리소레시틴, 리소포스파티딜에탄올아민, 포스파티딜세린, 포스파티딜이노시톨, 스펅고미엘린, 세팔

린, 카르디올리핀, 포스파티드산, 세레브로시드, 디세틸포스페이트, 디스테아로일포스파티딜콜린(DSPC), 디올레오일포스파티딜콜린(DOPC), 디팔미토일포스파티딜콜린(DPPC), 디올레오일포스파티딜글리세롤(DOPG), 디팔미토일포스파티딜글리세롤(DPPG), 디올레오일-포스파티딜에탄올아민(DOPE), 팔미토일올레오일포스파티딜콜린(POPC), 팔미토일올레오일-포스파티딜에탄올아민(POPE) 및 디올레오일-포스파티딜에탄올아민 4-(N-말레이미도메틸)-시클로헥산-1-카르복실레이트(DOPE-mal)를 포함한다. 비양이온성 지질 또는 스테롤, 예를 들면 콜레스테롤이 존재할 수 있다. 추가적인 인 비함유 지질로는 예를 들면, 스테아릴아민, 도데실아민, 헥사데실아민, 아세틸 팔미테이트, 글리세롤리시놀레이트, 헥사데실 스테아레이트, 이소프로필 미리스테이트, 앰포테릭(amphoteric) 아크릴 중합체, 트리에탄올아민-라우릴 술페이트, 알킬-아릴 술페이트 폴리에틸옥실화된 지방산 아마이드, 디옥타데실디메틸 암모늄 브로마이드 등, 디아실포스파티딜콜린, 디아실포스파티딜에탄올아민, 세라미드, 스펅고미엘린, 세팔린, 및 세레브로시드가 있다. 다른 지질, 예를 들면 리소포스파티딜콜린 및 리소포스파티딜에탄올아민이 존재할 수 있다. 또한, 비양이온성 지질은 본 명세서에 참고 문헌으로 인용되는 함께 계류 중인 USSN 08/316,429에 기재된 바와 같이 폴리에틸렌 글리콜 기재 중합체, 예를 들면 인지질 또는 세라미드(PEG-Cer로 지칭됨)에 컨쥬게이션된 PEG 2000, PEG 5000 및 폴리에틸렌 글리콜을 포함한다.

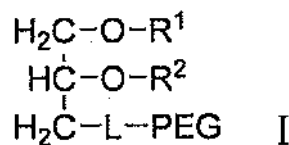
[0097] 바람직한 실시양태에서, 비양이온성 지질은 디아실포스파티딜콜린(예를 들면, 디스테아로일포스파티딜콜린, 디올레오일포스파티딜콜린, 디팔미토일포스파티딜콜린 및 디리놀레오일포스파티딜콜린), 디아실포스파티딜에탄올아민(예를 들면, 디올레오일포스파티딜에탄올아민 및 팔미토일올레오일포스파티딜에탄올아민), 세라미드 또는 스펅고미엘린이다. 이들 지질 중 아실기는 바람직하게는 C₁₀-C₂₄ 탄소 채를 갖는 지방산으로부터 유래된 아실기이다. 더욱 바람직하게는 아실기는 라우로일, 미리스토일, 팔미토일, 스테아로일 또는 올레오일이다. 특히 바람직한 실시양태에서, 비양이온성 지질은 콜레스테롤, 1,2-sn-디올레오일포스파티딜에탄올아민, 또는 에그(egg) 스펅고미엘린(ESM)일 것이다.

[0098] 양이온성 및 비양이온성 지질 외에, 본 발명의 SPLP는 폴리에틸렌글리콜-디아لك옥시프로필 컨쥬게이트, 즉 PEG-DAA 컨쥬게이트를 포함한다. 용어 "디아لك옥시프로필"은 2-알킬 쇠인 R¹ 및 R²를 지니는 화합물로서, R¹ 및 R² 둘 모두가 독립적으로 2 내지 30 개의 탄소를 갖는 화합물을 지칭한다. 알킬기는 포화되거나 다양한 불포화도를 가질 수 있다. 디알킬옥시프로필은 하기 화학식을 갖는다:



[0099] 본 발명의 바람직한 실시양태에서, PEG-DAA 컨쥬게이트는 디라우릴옥시프로필(C12)-PEG 컨쥬게이트, 디미리스틸옥시프로필(C14)-PEG 컨쥬게이트, 디팔미토일옥시프로필(C16)-PEG 컨쥬게이트 또는 디스테릴옥시프로필(C18)-PEG 컨쥬게이트이다. 당업자는 다른 디알킬옥시프로필이 본 발명의 PEG-DAA 컨쥬게이트에 사용될 수 있다는 점을 용이하게 이해할 것이다.

[0101] 한 바람직한 실시양태에서, PEG-DAA 컨쥬게이트는 하기 화학식을 갖는다:



[0102] 상기 화학식 I에서, R¹ 및 R²는 독립적으로 선택되고, 약 10 내지 약 22 개의 탄소 원자를 갖는 장쇄 알킬기이다. 장쇄 알킬기는 포화되거나 불포화될 수 있다. 적합한 알킬기는 라우릴(C12), 미리스틸(C14), 팔미틸(C16), 스테아릴(C18) 및 이코실(C20)을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. 바람직한 실시양태에서, R¹ 및 R²는 동일하며, 즉 R¹ 및 R²는 둘 모두 미리스틸(즉, 디미리스틸)이고, R¹ 및 R²는 둘 모두 스테아릴(즉, 디스테아릴)인 것 등이다. 상기 화학식 I에서, PEG는 약 550 내지 약 8,500 달톤의 평균 분자량을 갖는 폴리에틸렌 글리콜이다. 바람직한 실시양태에서, PEG는 약 1,000 내지 약 5,000 달톤, 더욱 바람직하게는, 약 1,000 내지 약 3,000 달톤, 훨씬 더 바람직하게는 약 2,000 달톤 또는 약 750 달톤의 평균 분자량을 갖는다. PEG는 알킬, 알콕시, 아실 또는 아릴기에 의해 임의적으로 치환될 수 있다.

- [0104] 상기 화학식 I에서, L은 링커 잔기 (예를 들면, 에스테르 비함유 링커 잔기 또는 에스테르 함유 링커 잔기)이다. PEG를 디알킬옥시프로필 골격에 커플링하기에 적합한 임의의 링커 잔기가 사용될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, L은 에스테르 비함유 링커 잔기, 즉 카르복실 에스테르 결합(-OC(O)-)을 함유하지 않는 링커 잔기이다. 적합한 에스테르 비함유 링커 잔기는 아미도(-C(O)NH-), 아미노(-NR-), 카르보닐(-C(O)-), 카르바메이트(-NHC(O)O-), 우레아(-NHC(O)NH-), 숙시닐(-(O)CCH₂CH₂C(O)-), 숙신아미딜, 에테르, 디설피드 및 그들의 조합물을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. 바람직한 실시양태에서, 에스테르 비함유 링커 잔기는 카르바메이트 링커 잔기 (즉, PEG-C-DAA 컨주게이트)이다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 에스테르 비함유 링커 잔기는 아미도 링커 잔기 (즉, PEG-A-DAA 컨주게이트)이다. 바람직한 실시양태에서, 에스테르 비함유 링커 잔기는 숙신아미딜 링커 잔기 (즉, PEG-S-DAA 컨주게이트)이다.
- [0105] 다른 실시양태에서, L은 에스테르 함유 링커 잔기이다. 적합한 에스테르 함유 링커 잔기는 예를 들면, 카르보네이트(-OC(O)O-), 숙시노일, 포스페이트 에스테르(-O-(O)POH-O-), 술포네이트 에스테르 및 그들의 조합물을 포함한다.
- [0106] 놀랍게도 PEG-DAA 컨주게이트가 본 발명의 핵산-지질 입자 (예를 들면, SNALP 및 SPLP)에 특히 유용한 것으로 밝혀졌다. PEG-DAA 컨주게이트는 PEG-인지질 유도체에 비해 다수의 이점을 갖는다. 예를 들면, PEG-인지질 유도체는 그들의 포스페이트기 상에 음전하를 지니며, 이는 다수의 단점을 유발한다. 첫째, 음전하는 제형 중에서 양이온성 지질과의 상호작용을 유발할 수 있어 결과적으로, 2중층으로부터의 PEG-인지질의 그러한 교환을 방해하는 정전기력을 발생시킨다. 둘째, 포스페이트기의 음전하는 캡슐화 공정의 필수적인 부분인 양이온성 전하를 중성화시킨다. 포스페이트기의 중성화 효과를 상쇄시키기 위해서는, 높은 몰 %의 양이온성 지질이 사용되어야 하므로, 이는 제형의 독성을 증가시키게 된다. 또한, PEG-세라미드와 달리, PEG-DAA 컨주게이트는 생산 및 제조가 더 용이하다.
- [0107] 상기 성분들 외에, 본 발명의 SPLP는 지질 2중층에 삽입되어 양전하를 제공하도록 디자인된 양이온성 폴리(에틸렌 글리콜)(PEG) 지질, 또는 CPL을 추가로 포함할 수 있다 (문헌[Chen, et al., Bioconj. Chem. 11: 433-437 (2000)] 참조). 본 발명에 사용하기 적합한 SPLP 및 SPLP-CPL, 및 SPLP 및 SPLP-CPL의 제조 방법 및 사용 방법은 예를 들면, 2000년 4월 20일 출원된 미국 출원 09/553,639, 및 2000년 4월 20일 출원되고 2000년 10월 26일 W000/62813로 공개된 PCT 특허 출원 CA 00/00451에 개시되어 있으며, 상기 각 문헌의 교시내용은 그 전문이 본 명세서에 참조로 포함된다.
- [0108] A. 관심있는 생성물
- [0109] 상기 성분들 외에, 본 발명의 SPLP 및 SNALP는 핵산 (예를 들면, 단일 가닥 또는 이중 가닥 DNA, 단일 가닥 또는 이중 가닥 RNA, RNAi, siRNA 등)을 포함한다. 적합한 핵산은 플라스미드, 안티센스 올리고뉴클레오티드, 리보자임, 뿐만 아니라 다른 폴리뉴클레오티드 및 올리고뉴클레오티드를 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. 바람직한 실시양태에서, 핵산은 관심있는 생성물, 예를 들면 치료 생성물을 엔코딩한다.
- [0110] 관심있는 생성물은 약제 또는 진단제로서의 치료적 목적을 포함하는 상업적 목적에 유용할 수 있다. 치료 생성물의 예는 단백질, 핵산, 안티센스 핵산, 리보자임, tRNA, snRNA, siRNA, 항원, 팩터(Factor) VIII, 및 아포틴(Apoptin)을 포함한다 (문헌[Zhuang et al. (1995) Cancer Res. 55 (3): 486-489] 참조). 적합한 부류의 유전자 생성물은 세포독성/자살 유전자, 면역조절제, 세포 수용체 리간드, 종양 억제제, 및 항-혈관생성 유전자를 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. 선택되는 특정 유전자는 의도하는 목적 또는 치료에 따라 좌우된다. 이러한 관심있는 유전자의 예는 이하 본 명세서 전체에 걸쳐 기재되어 있다.
- [0111] 1. siRNA
- [0112] 전형적으로, SNALP 및 SPLP의 핵산 성분은 예를 들면, 하나 이상의 단리된 소형 간섭 RNA(siRNA) 이중체, 보다 긴 이중 가닥 RNA(dsRNA) 또는 DNA 플라스미드에서 전사 카세트로부터 전사되는 siRNA 또는 dsRNA를 비롯하여 몇몇 형태로 제공될 수 있는 간섭 RNA (즉, siRNA)를 포함한다.
- [0113] RNA 집단은 긴 전구체 RNA를 제공하는 데 사용될 수 있거나, 또는 선택된 표적 서열과 실질적으로 또는 완전히 동일한 긴 전구체가 siRNA를 생성하는 데 사용될 수 있다. 상기 RNA는 당업자에게 공지된 방법에 따라 세포 또는 조직으로부터 단리되고, 합성되고/되거나 클로닝될 수 있다. 상기 RNA는 혼합된 집단 (세포 또는 조직으로부터 수득되고, cDNA로부터 전사되고, 서브트레이팅되고(subtrated), 선택되는 등)이거나, 또는 단일 표적 서열을 나타낼 수 있다. RNA는 천연 RNA로서, 예를 들면 조직 또는 세포 샘플로부터 단리될 수 있고,

예를 들면, T7 또는 SP6 중합효소 및 PCR 생성물 또는 클로닝된 cDNA를 사용하여 시험관내 합성되거나; 또는 화학적으로 합성될 수 있다.

[0114] 또한, 합성 RNA의 경우 긴 dsRNA를 형성하기 위해, 상보체가 시험관내 전사되고 하이브리드화되어 dsRNA를 형성한다. 천연 RNA 집단을 사용하는 경우, 예를 들면 RNA 집단에 상응하는 cDNA를 전사시킴으로써, 또는 RNA 중합효소를 사용함으로써 RNA 상보체가 또한 제공된다 (예를 들면, 대장균 RNase III 또는 다이서(Dicer)에 의해 분해되는 dsRNA를 형성하도록). 그 다음, 전구체 RNA가 하이브리드화되어 분해를 위한 이중 가닥 RNAs를 형성한다. dsRNA는 SNALP에 직접 캡슐화되거나 또는 캡슐화 전에 시험관내에서 분해될 수 있다.

[0115] 방법으로, 하나 이상의 siRNA 주형을 엔코딩하는 하나 이상의 DNA 플라스미드가 핵산-지질 입자에 캡슐화된다. siRNA는 예를 들면, 소형 핵 RNA U6 또는 인간 RNase P RNA H1에 대한 천연 전사 유닛을 기초로 하여 RNA 중합효소 III 전사 유닛을 갖는 플라스미드에서 DNA 주형으로부터 헤어핀 루프를 지닌 이중체로 자동적으로 폴딩되는 서열로서 전사될 수 있다 (문헌[Brummelkamp, et al., Science 296: 550 (2002); Donze, et al., Nucleic Acids Res. 30: e46 (2002); Paddison, et al., Genes Dev. 16: 948 (2002); Yu, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 99: 6047 (2002); Lee, et al., Nat. Biotech. 20: 500 (2002); Miyagishi, et al., Nat. Biotech. 20: 497 (2002); Paul, et al., Nat. Biotech. 20: 505 (2002); and Sui, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 99: 5515 (2002)] 참조). 전형적으로, 전사 유닛 또는 카세트는 요망되는 siRNA 서열 및 2-3 개의 우리딘 잔기와 폴리타미딘(T5) 서열 (폴리아데닐화 신호)로 구성된 중결 서열의 전사를 위한 주형에 작동 가능하게 연결된 RNA 전사체 프로모터 서열, 예를 들면 H1-RNA 또는 U6 프로모터를 함유한다 (문헌 [Brummelkamp, Science, supra] 참조). 선택된 프로모터는 항시적 또는 유도성 전사를 제공할 수 있다. RNA 간섭 분자의 DNA-유도된 전사를 위한 조성물 및 방법은 미국 특허 제 6,573,099호에 상세하게 기재되어 있으며, 본 명세서에 참고 문헌으로 인용된다. 바람직하게는, 합성된 또는 전사된 siRNA는 약 1-4 개의 뉴클레오티드, 바람직하게는 약 2-3 개의 뉴클레오티드의 3' 오버행(overhang) 및 5' 포스페이트 말단을 갖는다 (문헌 [Elbashir, et al., Genes Dev. 15: 188 (2001); Nykanen, et al., Cell 107: 309 (2001)] 참조). 전사 유닛은 간섭 RNA가 전사되는 플라스미드 또는 DNA 벡터로 혼입된다. 치료적 목적의 유전 물질의 생체내 전달에 적합한 플라스미드는 미국 특허 제 5,962,428호 및 제 5,910,488호에 상세하게 기재되어 있으며, 둘 모두 본 명세서에 참고문헌으로 인용된다. 선택된 플라스미드는 표적 세포의 일시적 전달 또는 안정적 전달을 제공할 수 있다. 본래는 요망되는 유전자 서열을 발현하도록 디자인된 플라스미드가 siRNA의 전사를 위한 전사 유닛 카세트를 함유하도록 개질될 수 있다는 것이 당업자에게 명확히 이해될 것이다.

[0116] RNA 단리 방법, RNA 합성 방법, 핵산 하이브리드화 방법, cDNA 라이브러리의 제조 및 스크리닝 방법, 및 PCR 수행 방법은 당업계에 공지되어 있으며(예를 들면, 문헌[Gubler & Hoffman, Gene 25: 263-269 (1983); Sambrook et al., supra; Ausubel et al., supra] 참조), PCR 방법도 공지되어 있다 (미국 특허 제 4,683,195호 및 제 4,683,202호; 문헌[PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis et al., eds, 1990)] 참조). 또한, 발현 라이브러리도 당업자에게 널리 공지되어 있다. 본 발명에 사용되는 일반적 방법을 개시하는 추가적인 기본서는 문헌[Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (2nd ed. 1989); Kriegler, Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual (1990); and Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds., 1994)]을 포함한다.

[0117] 적합한 플라스미드는 관심있는 유전자 생성물의 부분 길이 서열 또는 전체 길이 서열을 엔코딩하는 주형 서열을 발현가능한 형태로 함유하도록 공학처리(engineering)된다. 또한, 주형 서열이 단리된 또는 합성된 siRNA 및 dsRNA를 제공하는 데 사용할 수 있다. 일반적으로, 관심있는 유전자 생성물의 전사 및 번역을 하향조절하거나 침묵시키는 것이 바람직하다. 유전자 생성물의 적합한 부류는 종양생성 및 세포 형질전환과 관련된 유전자, 혈관생성 유전자, 면역조절제 유전자, 예를 들면 염증 반응 및 자가면역 반응과 관련된 것들, 리간드 수용체 유전자, 신경퇴행성 장애와 관련된 유전자, 및 바이러스 감염 및 생존과 관련된 유전자를 포함하지만 이들에 한정되지 않는다.

[0118] 종양생성 및 세포 형질전환과 관련된 유전자 서열의 예는 전좌(translocation) 서열, 예를 들면 MLL 융합 유전자, BCR-ABL (문헌[Wilda, et al., Oncogene, 21: 5716 (2002); Scherr, et al., Blood 101: 1566] 참조), TEL-AML1, EWS-FLI1, TLS-FUS, PAX3-FKHR, BCL-2, AML1-ETO 및 AML1-MTG8 (문헌[Heidenreich, et al., Blood 101: 3157 (2003)] 참조); 과발현된 서열, 예를 들면 다약물 내성 유전자 (문헌[Nieth, et al., FEBS Lett. 545: 144 (2003); Wu, et al., Cancer Res. 63: 1515 (2003)] 참조), 사이클린 (문헌[Li, et al., Cancer Res. 63: 3593 (2003); Zou, et al., Genes Dev. 16: 2923 (2002)] 참조), 베타-카테닌(Catenin) (문헌 [Verma, et al., Clin Cancer Res. 9: 1291 (2003)] 참조), 텔로머라아제 유전자 (문헌[Koscioliek, et al.,

Mol Cancer Ther. 2: 209 (2003)] 참조), c-MYC, N-MYC, BCL-2, ERBB1 및 ERBB2 (문헌[Nagy, et al. Exp. Cell Res. 285: 39 (2003)] 참조); 및 돌연변이된 서열, 예를 들면 RAS (문헌[Tuschl and Borkhardt, Mol. Interventions, 2: 158 (2002)]에서 검토)를 포함한다. DNA 복구 효소를 엔코딩하는 서열의 침묵이 화학치료제의 투여와 병용된다 (문헌[Collis, et al., Cancer Res. 63: 1550 (2003)] 참조). 또한, 종양 이동과 관련된 단백질, 예를 들면 인테그린(integrin), 셀렉틴(selectin) 및 메탈로프로테나아제를 엔코딩하는 유전자도 관심있는 표적 서열이다. 상기 예들은 이에 한정되지 않는다. 종양생성 또는 세포 형질전환, 종양 성장 또는 종양 이동을 용이하게 하거나 또는 촉진하는 임의의 전체 또는 부분 유전자 서열이 주형 서열로서 포함될 수 있다.

[0119] 혈관생성 유전자는 새로운 혈관의 형성을 촉진할 수 있다. 혈관 내피 성장 인자(VEGF)가 특히 관심을 끈다 (문헌[Reich, et al., Mol. Vis. 9: 210 (2003)] 참조).

[0120] 면역조절제 유전자는 하나 이상의 면역 반응을 조절하는 유전자이다. 면역조절제 유전자의 예는 사이토카인, 예를 들면 성장 인자 (예를 들면, TGF- α , TGF- β , EGF, FGF, IGF, NGF, PDGF, CGF, GM-CSF, SCF 등), 인터루킨 (예를 들면, IL-2, IL-4, IL-12 (Hill, et al., J. Immunol. 171: 691 (2003)), IL-15, IL-18, IL-20 등), 인터페론 (예를 들면, IFN- α , IFN- β , IFN- γ 등) 및 TNF를 포함한다. 또한, Fas 및 Fas 리간드 유전자도 관심있는 면역조절제 표적 서열이다 (문헌[Song, et al., Nat. Med. 9: 347 (2003)] 참조). 또한, 조혈 및 림프 세포에서 2차 시그널링 분자, 예를 들면 Tec 족 키나아제, 예를 들면 부르톤(Bruton)의 티로신 키나아제 (Btk)를 엔코딩하는 유전자도 본 발명에 포함된다 (문헌[Heinonen, et al., FEBS Lett. 527: 274 (2002)] 참조).

[0121] 세포 수용체 리간드는 세포 표면 수용체 (예를 들면, 인슐린 수용체, EPO 수용체, G-단백질 커플링된 수용체, 티로신 키나아제 활성을 갖는 수용체, 사이토카인 수용체, 성장 인자 수용체 등)에 결합하여, 수용체가 관여하는 생리학적 경로 (예를 들면, 글루코코스 수준 조절, 혈액 세포 발생, 유사분열 등)를 조절 (예를 들면, 억제, 활성화 등)할 수 있는 리간드를 포함한다. 세포 수용체 리간드의 예는 사이토카인, 성장 인자, 인터루킨, 인터페론, 에리트로포이에틴(EPO), 인슐린, 글루카곤, G-단백질 커플링된 수용체 리간드 등을 포함한다. 트리뉴클레오티드 반복체 (예를 들면, CAG 반복체)의 증식을 코딩하는 주형은 트리뉴클레오티드 반복체의 증식에 의해 유발되는 신경퇴행성 장애, 예를 들면 스피노볼불러(spino-bulbar) 근위축 및 헌팅톤 질환에서 병원성 서열을 침묵시키는 데에 사용된다 (문헌[Caplen, et al., Hum. Mol. Genet. 11: 175 (2002)] 참조).

[0122] 바이러스 감염 및 생존과 관련된 유전자는 세포에 결합하고 이에 진입하고 그러한 세포에서 복제되기 위해 바이러스에 의해 발현되는 것들을 포함한다. 만성 바이러스 질환과 관련된 바이러스 서열이 특히 관심을 끈다. 특히 관심있는 바이러스 서열은 인간 면역결핍 바이러스(HIV) (문헌[Banerjee, et al., Mol. Ther. 8: 62 (2003); Song, et al., J. Virol. 77: 7174 (2003); Stephenson JAMA 289: 1494 (2003); Qin, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 100: 183 (2003)] 참조), 간염 바이러스 (문헌[Hamasaki, et al., FEBS Lett. 543: 51 (2003); Yokota, et al., EMBO Rep. 4: 602 (2003); Schlomai, et al., Hepatology 37: 764 (2003); Wilson, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 100: 2783 (2003); Kapadia, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 100: 2014 (2003)] 참조), 헤르페스 바이러스 (문헌[Jia, et al., J. Virol. 77: 3301 (2003)] 참조), 및 인간 파필로마 (Papilloma) 바이러스 (HPV) (문헌[Hall, et al., J. Virol. 77: 6066 (2003); Jiang, et al., Oncogene 21: 6041 (2002)] 참조)의 서열을 포함한다.

[0123] 2. 추가적인 치료 생성물

[0124] 앞서 설명한 바와 같이, 본 발명의 일부 실시양태에서, SPLP 및 SNALP는 치료 생성물, 예를 들면 종양 억제제 유전자, 면역조절제 유전자, 세포 수용체 리간드 유전자, 항-혈관형성 유전자, 및 세포독성/자살 유전자를 엔코딩하는 핵산을 캡슐화한다.

[0125] a) 종양 억제제

[0126] 종양 억제제 유전자는 세포, 특히 종양 세포의 성장을 억제할 수 있는 유전자이다. 따라서, 이들 유전자를 종양 세포에 전달하는 것이 암 치료에 유용하다. 종양 억제제 유전자는 p53 (문헌[Lamb et al., Mol. Cell. Biol. 6: 1379-1385 (1986), Ewen et al., Science 255: 85-87 (1992), Ewen et al. (1991) Cell 66: 1155-1164, and Hu et al., EMBO J. 9: 1147-1155 (1990)] 참조), RB1 (문헌[Toguchida et al. (1993) Genomics 17: 535-543] 참조), WT1 (문헌[Hastie, N. D., Curr. Opin. Genet. Dev. 3: 408-413 (1993)] 참조), NF1 (문헌[Trofatter et al., Cell 72: 791-800 (1993), Cawthon et al., Cell 62: 193-201 (1990)] 참조), VHL (문헌[Latif et al., Science 260: 1317-1320 (1993)] 참조), APC (문헌[Gorden et al., Cell 66: 589-600

(1991)] 참조), DAP 키나아제 (예를 들면, 문헌[Diess et al. (1995) Genes Dev. 9: 15-30] 참조), p16 (예를 들면, 문헌[Marx (1994) Science 264 (5167): 1846] 참조), ARF (예를 들면, 문헌[Quelle et al. (1995) Cell 83 (6): 993-1000] 참조), 뉴로피브로민(Neurofibromin) (예를 들면, 문헌[Huynh et al. (1992) Neurosci. Lett. 143 (1-2): 233-236] 참조), 및 PTEN (예를 들면, 문헌[Li et al. (1997) Science 275 (5308): 1943-1947] 참조)을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다.

[0127] b) 면역조절제 유전자:

[0128] 면역조절제 유전자는 하나 이상의 면역 반응을 조절하는 유전자이다. 면역조절제 유전자의 예는 사이토카인, 예를 들면 성장 인자 (예를 들면, TGF- α , TGF- β , EGF, FGF, IGF, NGF, PDGF, CGF, GM-CSF, G-CSF, SCF 등), 인터루킨 (예를 들면, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, IL-20 등), 인터페론 (예를 들면, IFN- α , IFN- β , IFN- γ 등), TNF (예를 들면, TNF- α), 및 Flt3-리간드를 포함한다.

[0129] c) 세포 수용체 리간드

[0130] 세포 수용체 리간드는 세포 표면 수용체 (예를 들면, 인슐린 수용체, EPO 수용체, G-단백질 커플링된 수용체, 티로신 키나아제 활성을 갖는 수용체, 사이토카인 수용체, 성장 인자 수용체 등)에 결합하여, 수용체가 관여하는 생리학적 경로 (예를 들면, 글루코오스 수준 조절, 혈액 세포 발생, 유사분열 등)를 조절 (예를 들면, 억제, 활성화 등)할 수 있는 리간드를 포함한다. 세포 수용체 리간드의 예는 사이토카인, 성장 인자, 인터루킨, 인터페론, 에리트로포이에틴(EPO), 인슐린, 단일 사슬 인슐린 (문헌[Lee et al. (2000) Nature 408: 483-488] 참조), 글루카곤, G-단백질 커플링된 수용체 리간드 등을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. 이들 세포 표면 리간드는 질환을 앓는 환자의 치료에 유용할 수 있다. 예를 들면, 단일 사슬 인슐린은 글루코오스-반응성 간세포-특이적 L형 피루베이트 키나아제(LPK) 프로모터의 조절하에서 발현되는 경우 부작용 없이 스트렙토코진 유도된 당뇨 래트 및 자가면역 당뇨 마우스에서 당뇨를 완화시킬 수 있었다 (문헌[Lee et al. (2000) Nature 408: 483-488] 참조). 이 단일 사슬 인슐린은 인슐린의 C-펩티드의 35 개의 아미노산 잔기를 짧은 회전(short turn) 형성 펩타이드 (Gly-Gly-Gly-Pro-Gly-Lys-Arg)로 대체함으로써 생성되었다.

[0131] d) 항-혈관생성 유전자

[0132] 항-혈관생성 유전자는 신생혈관화를 억제할 수 있다. 이들 유전자는 혈관생성이 질환의 병리학적 발달에서 역할을 하는 암을 치료하는 데 특히 유용하다. 항-혈관생성 유전자의 예는 엔도스타틴(endostatin) (예를 들면, 문헌[미국 특허 제 6,174, 861호], 안지오스타틴(angiostatin) (예를 들면, 미국 특허 제 5,639,725호 참조), 및 VEGF-R2 (예를 들면, 문헌[Decaussin et al. (1999) J. Pathol. 188 (4): 369-737] 참조)를 포함하지만 이들에 한정되지 않는다.

[0133] e) 세포독성/자살 유전자

[0134] 세포독성/자살 유전자는 직접 또는 간접적으로 세포를 사멸시키거나, 세포자멸사를 유발하거나, 또는 세포 주기에서 세포를 정지시킬 수 있는 유전자이다. 이러한 유전자는 면역독소, 헤르페스 심플렉스 바이러스 티미딘 키나아제(HSV-TK), 시토신 데아미나아제, 크잔틴-구아닌포스포리보실 트랜스퍼라아제, p53, 풀린 뉴클레오시드 포스포릴라아제, 카르복실에스테라아제, 테옥시시티딘 키나아제, 니트로리덕타아제(nitroreductase), 티미딘 포스포릴라아제, 및 시토크롬 P450 2B1에 대한 유전자를 포함하지만 이들에 한정되지 않는다.

[0135] 유전자 전달된 효소 전구약물 요법("GDEPT") 또는 "자살 유전자/전구약물" 시스템으로 공지된 유전자 치료 기술에서, 약제, 예를 들면 아시클로버(acyclovir) 및 간시클로버(ganciclovir) (티미딘 키나아제의 경우), 시클로포스포아미드 (시토크롬 P450 2B1의 경우), 5-플루오로시토신 (시토신 데아미나아제의 경우)을 전형적으로 본 발명의 자살 유전자 조성물을 엔코딩하는 발현 카세트와 함께 전신 투여되어 (예를 들면, 동시적 또는 이시적, 예를 들면 순차적으로) 요망되는 세포독성 또는 세포정지(cytostatic) 효과를 달성한다 (예를 들면, 문헌[Moolten, F. L., Cancer Res., 46: 5276-5281 (1986)] 참조). GDEPT 시스템의 검토를 위해, 문헌[Moolten, F. L., The Internet Book of Gene Therapy, Cancer Therapeutics, Chapter 11 (Sobol, R. E., Scanlon, NJ (Eds) Appelton & Lange (1995)]을 참조할 수 있다. 이 방법에서, 이중 유전자는 RNAP 프로모터를 함유하는 발현 카세트에서 세포로 전달되며, 이러한 이중 유전자는 세포가 덜 민감한 제 1 화합물 (즉, "전구약물")을 세포가 보다 민감한 제 2 화합물로 대사시키는 것을 촉진하는 효소를 엔코딩한다. 전구약물은 유전자와 함께 또는 유전자의 전달 후 세포에 전달된다. 이러한 효소는 전구약물을 제 2 화합물로 프로세싱하며 그에 따라 반응할 것이다. 몰텐(Moolten)에 의해 제안된 적합한 시스템은 헤르페스 심플렉스 바이러스-티미딘 키나아제(HSV-TK) 유전자 및 전구약물 간시클로버이다. 최근, 문헌[Zerrouqui, et al., Can. Gen.

Therapy, 3 (6): 385-392 (1996); Sugaya, et al., Hum. Gen. Ther., 7: 223-230 (1996) and Aoki, et al., Hum. Gen. Ther., 8: 1105-1113 (1997)]에 의해 TK 유전자를 마우스 종양에 국소전달 (즉, 종양내 직접 주사), 또는 국지 전달 (즉, 복막내)을 위한 양이온성 지질-핵 응집체를 사용하는 방법이 사용되었다. 바이러스 벡터를 사용하는 GDEPT 시스템을 사용한 인간 임상 실험이 제안되었으며 (문헌[Hum. Gene Ther., 8: 597-613 (1997), and Hum. Gene Ther., 7: 255-267 (1996)] 참조), 진행중이다.

[0136] 본 발명에서 사용되는 경우, 가장 바람직한 치료 생성물은 유전자 전달된 효소 전구약물 요법("GDEPT")에서 유용한 것들이다. 임의의 자살 유전자/전구약물 조합이 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 본 발명에 사용하기 적합한 몇몇 자살 유전자/전구약물 조합은 본 명세서에 참고 문헌으로 인용되는 문헌[Sikora, K. in OECD Documents, Gene Delivery Systems at pp. 59-71 (1996)]에 언급되어 있으며, 하기를 포함하지만 이들에 한정되지 않는다:

자살 유전자 생성물	덜 활성인 전구약물	활성화된 약물
헤르페스 심플렉스 바이러스 1형 티미딘 키나아제(HSV-TK)	간시클로버(GCV), 아시클로버, 브로모비닐-데옥시우리딘, 또는 다른 기질	인산화된 dGTP 유사체
시토신 데아미나아제(CD)	5-플루오로시토신	5-플루오로우라실
크잔틴-구아닌-포스포리보실 트랜스퍼라아제(XGPRT)	6-티오크잔틴(6TX)	6-티오구아노-시네모노포스페이트
퓨린 뉴클레오사이드 포스포릴라아제	MeP-dr	6-메틸퓨린
시토크롬 P450 2B1	시클로포스파미드	[세포독성 대사물]
리나마라아제(Linamarase)	아미그달린(amygdalin)	시아니드(cyanide)
니트로리덕타아제	CB 1954	니트로벤즈아미딘
베타-락타마아제	PD	PD 머스타드(mustard)
베타-글루쿠로니다아제(glucuronidase)	아드리아(adria)-glu	아드리아마이신(adriamycin)
카르복시펩티다아제	MTX-알라닌	MTX
글루코오스 옥시다아제	글루코오스	과산화물
페니실린 아미다아제	아드리아-PA	아드리아마이신
슈퍼옥시드 디스뮤타아제(superoxide dismutase)	XRT	DNA 손상제
리보뉴클레아제	RNA	절단 생성물

[0137] 전구약물이 이중 유전자 생성물에 의해 세포가 보다 민감하게 반응하는 화합물로 대사되는 경우 임의의 전구약물이 사용될 수 있다. 바람직하게는, 세포는 전구약물 보다 대사물에 10 배 이상 민감하다.

[0138] 본 발명에 유용할 수 있는 GDEPT 시스템의 개질은 예를 들면, TK 유전자가 돌연변이되어 전구약물이 약물로 보다 빠르게 전환되게 하는 개질된 TK 효소 구조체의 사용을 포함한다 (예를 들면, 문헌[Black, et al., Proc. Natl. Acad. Sci, U.S.A., 93: 3525-3529 (1996)] 참조). 별법으로, TK 유전자는 바이시트론성(bicistronic) 구조체 중에서 그의 효과를 강화시키는 또 다른 유전자와 함께 전달될 수 있다. 예를 들면, 또한, "이웃 효과(neighbor effect)" (여기서, 트랜스펙션된 세포에 인접한 세포가 또한 사멸됨)로도 공지된 구경꾼 효과(bystander effect)"를 증진시키기 위해, TK 유전자가 갭 연결 단백질, 예를 들면 코넥신(connexin) 43에 대한 유전자와 함께 전달될 수 있다. 코넥신 단백질은 한 세포로부터 또 다른 세포로 TK 효소의 독성 생성물을 확산시킬 수 있다. TK/코넥신 43 구조체는 내부 리보솜 진입 서열 및 코넥신 43-엔코딩 핵산에 의해 TK 유전자에 작동가능하게 연결된 CMV 프로모터를 갖는다.

[0139] B. SPLP 및 SNALP 제조 및 그의 용도

[0140] 본 발명의 SPLP 및 SNALP, 즉 PEG-DAA 컨쥬게이트를 함유하는 SPLP 및 SNALP는 다수의 상이한 방법 중 어느 하나를 사용하여 제조될 수 있다. 한 실시양태에서, 본 발명은 소수성 핵산-지질 중간체 복합체를 통해 생성된 지질-핵산 입자를 제공한다. 이 복합체는 바람직하게는 전하 중성화된다. 세정제 기재 또는 유기 용매 기재 시스템 중에서 이들 복합체를 조작하는 것은 핵산이 보호되는 입자 형성을 유발할 수 있다.

[0141] 본 발명은 핵산이 지질 2중층 중에서 캡슐화되고 분해로부터 보호되는 혈청 안정성 핵산-지질 입자를 제조하

는 방법을 제공한다. 또한, 본 발명에서 형성된 입자는 바람직하게는 생리학적 pH에서 중성 또는 음하전된다. 생체내 적용시, 중성 입자가 유리하며, 시험관내 적용시 음하전된 입자가 더욱 바람직하다. 이는 핵산이 양이온성 지질 중에서 캡슐화될 수 있는 양-하전된 리포솜 제형에 비해 응집이 감소되는 추가의 이점을 제공한다.

[0143] 본 발명의 방법에 의해 제조된 입자는 약 50 내지 약 150 nm의 크기를 가지며, 입자의 대다수는 약 65 내지 85 nm이다. 입자는 세정제 투석 방법 또는 성분의 혼합 동안 유기 용매를 사용하여 단일 상을 제공하는 역상 방법의 변형법에 의해 형성될 수 있다. 임의의 특정 형성 기전에 의해 한정하고자 하는 것은 아니지만, 플라스미드 또는 다른 핵산은 양이온성 지질의 세정제 용액과 접촉하여 코팅된 플라스미드 복합체를 형성한다. 이들 코팅된 플라스미드는 응집되고 침전할 수 있다. 그러나, 세정제의 존재는 이러한 응집을 감소시키고, 코팅된 플라스미드가 과량의 지질 (전형적으로, 비양이온성 지질)과 반응하여 플라스미드 또는 다른 핵산이 지질 2중층 중에 캡슐화된 입자를 형성하게 한다. 하기 유기 용매를 사용하여 플라스미드-지질 입자를 형성하기 위한 하기 기재된 방법은 유사한 체계를 따른다.

[0144] 일부 실시양태에서, 입자는 세정제 투석을 사용하여 형성된다. 따라서, 본 발명은,

[0145] (a) 세정제 용액 중에서 핵산을 양이온성 지질과 배합되어 코팅된 플라스미드-지질 복합체를 형성하는 단계;

[0146] (b) 비양이온성 지질을 코팅된 핵산-지질 복합체와 접촉시켜 플라스미드-지질 복합체 및 비양이온성 지질을 포함하는 세정제 용액을 형성하는 단계, 및

[0147] (c) 단계 (b)의 세정제 용액을 투석하여, 핵산이 지질 2중층에 캡슐화되고, 입자가 혈청 안정성이 되고, 약 50 내지 약 150 nm의 크기를 갖는 혈청 안정성 핵산-지질 입자의 용액을 제공하는 단계를 포함하여 혈청 안정성 핵산-지질 입자를 제조하는 방법을 제공한다.

[0148] 코팅된 핵산-지질 복합체의 초기 용액은 세정제 용액 중에서 플라스미드를 양이온성 지질과 합침으로써 형성된다.

[0149] 이들 실시양태에서, 세정제 용액은 바람직하게는 15 내지 300 mM, 더욱 바람직하게는 20 내지 50 mM의 임계 미셀 농도를 갖는 중성 세정제로 된 수용액이다. 적합한 세정제의 예는 예를 들면, N,N'-((옥타노일이미노)-비스-(트리메틸렌))-비스-(D-글루콘아미드) (BIGCHAP); BRIJ 35; 데옥시-빅참(Deoxy-BIGCHAP); 도데실폴리(에틸렌 글리콜) 에테르; 트윈(Tween) 20; 트윈 40; 트윈 60; 트윈 80; 트윈 85; 메가(Mega) 8; 메가 9; 쯔비터젠트(Zwittergent®) 3-08; 쯔비터젠트® 3-10; 트리톤(Triton) X-405; 핵실-, 헵틸-, 옥틸- 및 노닐-β-D-글루코피라노시드; 및 헵틸티오글루코피라노시드를 포함하며, 옥틸 β-D-글루코피라노시드 및 트윈-20이 가장 바람직하다. 세정제 용액 중 세정제의 농도는 전형적으로 약 100 mM 내지 약 2 M, 바람직하게는 약 200 mM 내지 약 1.5 M이다.

[0150] 전형적으로, 양이온성 지질 및 핵산이 배합되어 약 1:1 내지 약 20:1, 바람직하게는 약 1:1 내지 약 12:1, 더욱 바람직하게는 약 2:1 내지 약 6:1의 전하 비 (+/-)를 생성하게 된다. 또한, 용액 중 플라스미드의 전체 농도는 전형적으로 약 25 μg/mL 내지 약 1 mg/mL, 바람직하게는 약 25 μg/mL 내지 약 500 μg/mL, 더욱 바람직하게는 약 100 μg/mL 내지 약 250 μg/mL가 된다. 세정제 용액 중 핵산 및 양이온성 지질의 배합물은 전형적으로 실온에서, 코팅된 복합체가 형성되기 충분한 시간 동안 유지된다. 별법으로, 핵산 및 양이온성 지질은 세정제 용액 중에서 배합되고, 약 37 °C 이하의 온도로 가온될 수 있다. 온도에 특히 민감한 핵산의 경우, 코팅된 복합체는 저온, 전형적으로 약 4 °C에서 형성될 수 있다.

[0151] 바람직한 실시양태에서, 형성된 SPLP 또는 SNALP에서 핵산 대 지질 비 (질량/질량 비)는 약 0.01 내지 약 0.08 범위이다. 또한, 정제 단계가 전형적으로 비캡슐화된 핵산 뿐만 아니라 빈 리포솜을 제거하기 때문에 출발 물질의 비는 이 범위에 속한다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, SPLP 또는 SNALP 제제는 10 mg의 총 지질 당 약 400 μg의 핵산 또는 약 0.01 내지 약 0.08, 더욱 바람직하게는, 약 0.04 (50 μg의 핵산 당 1.25 mg의 총 지질에 상응함)의 핵산 대 지질 비를 사용한다.

[0152] 그 다음, 코팅된 핵산-지질 복합체의 세정제 용액이 비양이온성 지질과 접촉되어 핵산-지질 복합체 및 비양이온성 지질로 된 세정제 용액을 제공한다. 이 단계에 유용한 비양이온성 지질은 디아실포스파티딜콜린, 디아실포스파티딜에탄올아민, 세라미드, 스펅고미엘린, 세팔린, 카르디올리핀 및 세레브로시드를 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 비양이온성 지질로는 디아실포스파티딜콜린, 디아실포스파티딜에탄올아민, 세라미드 또는 스펅고미엘린이 있다. 바람직하게는, 이들 지질 중 아실기는 C₁₀-C₂₄ 탄소 쇄를 갖는 지방산으로부터 유래된

아실기이다. 더욱 바람직하게는 아실기는 라우로일, 미리스토일, 팔미토일, 스테아로일 또는 올레오일이다. 특히 바람직한 실시양태에서, 비양이온성 지질은 1,2-sn-디올레오일포스파티딜에탄올아민(DOPE), 팔미토일 올레오일 포스파티딜콜린(POPC), 에그(egg) 포스파티딜콜린(EPC), 디스테아로일포스파티딜콜린(DSPC), 콜레스테롤 또는 이들의 혼합물이다. 가장 바람직한 실시양태에서, 핵산-지질 입자는 생체내에서 강화된 특성을 갖는 융합성 입자이고, 비양이온성 지질은 DSPC 또는 DOPE이다. 앞서 설명한 바와 같이, 본 발명의 핵산-지질 입자는 PEG-DAA 컨쥬게이트를 추가로 포함한다. 또한, 본 발명의 핵산-지질 입자는 콜레스테롤을 추가로 포함한다.

[0153] 본 방법에 사용되는 비양이온성 지질의 양은 전형적으로 50 μg 의 핵산에 대해 약 0.5 내지 약 10 mg의 총 지질이다. 바람직하게는 총 지질의 양은 50 μg 의 핵산 당 약 1 내지 약 5 mg이다.

[0154] 핵산-지질 복합체 및 비양이온성 지질로 된 세정제 용액의 형성 후, 세정제는 바람직하게는 투석에 의해 제거된다. 세정제의 제거는 핵산을 둘러싸는 지질-2중층을 형성하여 약 50 nm 내지 약 150 nm의 크기를 갖는 혈청 안정성 핵산-지질 입자를 제공한다. 이렇게 형성된 입자는 응집되지 않고, 임의적으로 균일한 입도를 얻도록 크기조정(sizing)된다.

[0155] 혈청 안정성 핵산-지질 입자는 리포솜 크기조정을 위해 이용가능한 임의의 방법에 의해 크기조정될 수 있다. 요망되는 크기 범위 및 비교적 좁은 입자 크기 분포를 얻기 위해 크기조정이 수행될 수 있다.

[0156] 요망되는 크기로 입자를 크기조정하는 데 몇몇 기술들이 이용가능하다. 리포솜에 사용되고 본 발명의 입자에 동일하게 적용가능한 한 가지 크기조정 방법은 미국 특허 제 4,737,323호에 기재되어 있고, 이는 본 명세서에 참고 문헌으로 인용된다. 배쓰(bath) 또는 프로브 초음파처리에 의해 입자 현탁액을 초음파처리하면 크기가 약 50 nm 미만의 입자로 점진적으로 크기가 감소된다. 균질화는 전단 에너지에 의존하여 큰 입자를 작은 입자로 단편화하는 또 다른 방법이다. 전형적 균질화 절차에서, 선택된 입자 크기, 전형적으로 약 60 내지 80 nm가 관찰될 때까지 표준 에멀션 균질화기를 통해 입자가 재순환된다. 둘 모두의 방법에서, 통상적인 레이저 광산 입자 크기 차별화, 또는 QELS에 의해 입자 크기 분포가 모니터링될 수 있다.

[0157] 또한, 소형 세공(small-pore) 폴리카르보네이트 막 또는 비대칭 세라믹 막을 통한 입자의 압출도 입자 크기를 비교적 잘 규정된 크기 분포로 감소시키는 유효한 방법이다. 전형적으로, 요망되는 입자 크기 분포가 달성될 때까지 현탁액이 막을 통해 1 회 이상 순환된다. 입자가 연속적으로 소형 세공 막을 통해 압출되어 점진적으로 크기를 감소시킬 수 있다.

[0158] 또 다른 균의 실시양태에서, 본 발명은,

[0159] (a) 유기 용매 중에서 양이온성 지질 및 비양이온성 지질을 포함하는 혼합물을 제조하는 단계;

[0160] (b) 핵산의 수용액을 상기 단계 (a)의 혼합물과 접촉시켜 투명한 단일 상을 제공하는 단계; 및

[0161] (c) 상기 유기 용매를 제거하여 핵산이 지질 2중층에 캡슐화되고, 입자가 혈청 중에서 안정성이 되고, 약 50 내지 약 150 nm의 크기를 갖는 핵산-지질 입자로 된 현탁액을 제공하는 단계를 포함하여 혈청 안정성 핵산-지질 입자를 제조하는 방법을 제공한다.

[0162] 이러한 균의 실시양태에 유용한 핵산 (예를 들면, 플라스미드), 양이온성 지질 및 비양이온성 지질은 상기 세정제 투석 방법에 대해 기재한 것과 같다.

[0163] 유기 용매의 선택은 전형적으로 용매 극성 및 입자 형성 후기 단계에서 용매의 제거 용이성을 고려하는 것을 포함한다. 또한, 가용화제로도 사용되는 유기 용매는 플라스미드 및 지질로 된 투명한 단일 상 혼합물을 제공하기에 충분한 양으로 존재한다. 적합한 용매는 클로로포름, 디클로로메탄, 디에틸에테르, 시클로헥산, 시클로펜탄, 벤젠, 톨루엔, 메탄올, 또는 다른 지방족 알코올, 예를 들면 프로판올, 이소프로판올, 부탄올, 3차-부탄올, 이소-부탄올, 펜탄올 및 헥산올을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. 또한, 2 개 이상의 용매의 조합물도 본 발명에서 사용할 수 있다.

[0164] 핵산을 양이온성 및 비양이온성 지질의 유기 용액과 접촉시키는 것은 전형적으로 수용액인 핵산의 제 1 용액, 및 지질의 제 2 유기 용액을 함께 혼합함으로써 수행된다. 당업자는 이러한 혼합이 임의의 수의 방법, 예를 들면 기계적 수단, 예를 들면 볼텍스 혼합기를 사용함으로써 이루어질 수 있다는 것을 이해할 것이다.

[0165] 핵산이 지질의 유기 용액과 접촉한 후, 유기 용매가 제거되어 혈청 안정성 핵산-지질 입자로 된 수성 현탁액을 형성한다. 유기 용매를 제거하는 데 사용되는 방법은 전형적으로 감압에서 증발시키거나 또는 혼합물을

가로질러 비활성 기체 (예를 들면, 질소 또는 아르곤)의 스트림을 송풍시키는 것을 포함한다.

- [0166] 이렇게 형성된 혈청 안정성 핵산-지질 입자는 전형적으로 약 50 nm 내지 150 nm로 크기조정된다. 입자에서 추가의 크기 감소 또는 크기의 균질성을 달성하기 위해, 크기조정이 상기한 바와 같이 수행될 수 있다.
- [0167] 다른 실시양태에서, 상기 방법은 본 발명의 조성물을 사용하여 세포를 형질전환시키는 데 유용한 비지질 폴리양이온(polycation)을 첨가하는 것을 추가로 포함한다. 적합한 비지질 폴리양이온의 예는 핵사디메트린 브로마이드 (미국 위스콘신주 밀와우케 소재의 알드리치 케미칼 캄파니 (Aldrich Chemical Co.)로부터 상표명 폴리브렌(POLYBRENE®) 하에 판매됨) 또는 핵사디메트린의 다른 염을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. 다른 적합한 폴리양이온은 예를 들면, 폴리-L-오르니틴, 폴리-L-아르기닌, 폴리-L-리신, 폴리-D-리신, 폴리알릴아민 및 폴리에틸렌아민의 염을 포함한다.
- [0168] 일부 실시양태에서, SPLP 또는 SNALP 중에서의 핵산의 캡슐화 전에 폴리양이온이 사용되어 핵산을 축합시킬 수 있다. 예를 들면, 폴리양이온 (예를 들면, 폴리에틸렌아민)이 축합제로서 사용되어 WO 00/03683에 기재된 바와 같이 PEI-축합된 DNA 복합체를 형성할 수 있다.
- [0169] 특정한 실시양태에서, 핵산-지질 입자의 형성은 적절히 혼합하면서 단상 시스템 (예를 들면, 블리그(Bligh) 및 다이어(Dyer) 단상 또는 수성 및 유기 용매의 유사한 혼합물) 또는 2상 시스템 중에서 수행될 수 있다.
- [0170] 복합체의 형성이 단상 시스템에서 수행되는 경우, 양이온성 지질 및 핵산이 각각 단상 혼합물 부피에 용해된다. 두 용액의 배합은 복합체가 형성되는 단일 혼합물을 제공한다. 별법으로, 상기 복합체는 양이온성 지질이 핵산 (수성상 중에 존재)에 결합하여, 이를 유기상으로 "풀링(pulling)하는" 2상 혼합물에서 형성될 수 있다.
- [0171] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은,
- [0172] (a) 핵산을 비양이온성 지질 및 세정제를 포함하는 용액과 접촉시켜 핵산-지질 혼합물을 형성하는 단계;
- [0173] (b) 양이온성 지질을 핵산-지질 혼합물과 접촉시켜 핵산의 음전하의 부분을 중성화시키고, 핵산 및 지질의 전하 중성화된 혼합물을 형성하는 단계, 및
- [0174] (c) 상기 전하 중성화된 혼합물로부터 세정제를 제거하여 핵산이 분해로부터 보호되는 지질-핵산 입자를 제공하는 단계를 포함하여 핵산-지질 입자를 제조하는 방법을 제공한다.
- [0175] 한 군의 실시양태에서, 비양이온성 지질 및 세정제의 용액은 수용액이다. 핵산을 비양이온성 지질 및 세정제의 용액과 접촉시키는 것은 전형적으로 핵산으로 된 제 1 용액 및 지질 및 계면활성제로 된 제 2 용액을 함께 혼합함으로써 수행된다. 당업자는 이러한 혼합이 임의의 수의 방법, 예를 들면 기계적 수단, 예를 들면 볼텍스 혼합기를 사용함으로써 이루어질 수 있다는 것을 이해할 것이다. 또한, 바람직하게는 핵산 용액은 세정제 용액이다. 본 발명의 방법에서 사용되는 비양이온성 지질의 양은 전형적으로 사용되는 양이온성 지질의 양을 기준으로 결정되며, 이는 사용되는 양이온성 지질의 양의 전형적으로 약 0.2 내지 5 배, 바람직하게는 약 0.5 내지 약 2 배이다.
- [0176] 이렇게 형성된 핵산-지질 혼합물은 양이온성 지질과 접촉하여 존재하는 핵산 (또는 다른 폴리음이온성 물질)과 회합하는 음전하의 부분을 중성화시킨다. 사용되는 양이온성 지질의 양은 전형적으로 핵산의 음전하의 50% 이상을 중성화시키기에 충분하다. 바람직하게는, 상기 음전하는 70% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상 중성화된다. 본 발명에 유용한 양이온성 지질은 예를 들면, DODAC, DOTMA, DDAB, DOTAP, DC-Chol 및 DMRIE를 포함한다. 이들 지질 및 관련 유사체는 함께 계류 중인 USSN 08/316,399; 미국 특허 제 5,208,036호, 제 5,264,618호, 제 5,279,833호 및 제 5,283,185호에 기재되어 있으며, 상기 문헌의 개시내용은 본 명세서에 참조로 포함된다. 또한, 양이온성 지질로 된 다수의 상업적 제제가 입수가 가능하고, 본 발명에 사용될 수 있다. 이들은 예를 들면, 리포펙틴® (미국 뉴욕주 그랜드 아일랜드 소재의 GIBCO/BRL로부터의 DOTMA 및 DOPE를 포함하는 시판되는 양이온성 리포솜), 리포펙타민® (GIBCO/BRL로부터의 DOSPA 및 DOPE를 포함하는 시판되는 양이온성 리포솜); 및 트랜스펙탐® (미국 위스콘신주 메디슨 소재의 프로메가 코퍼레이션으로부터의 DOGS를 포함하는 시판되는 양이온성 리포솜)을 포함한다.
- [0177] 양이온성 지질을 핵산-지질 혼합물과 접촉시키는 것은 다수의 기술 중 어느 하나에 의해, 바람직하게는 양이온성 지질의 용액 및 핵산-지질 혼합물을 함유하는 용액을 함께 혼합함으로써 달성될 수 있다. 두 용액의 혼합 (또는 임의의 다른 방식으로 접촉)시, 핵산과 회합된 음전하의 부분이 중성화된다. 그럼에도 불구하고,

핵산은 비축합된 상태로 유지되고 친수성 특징을 획득한다.

- [0178] 양이온성 지질이 핵산-지질 혼합물과 접촉한 후, 세정제 (또는 세정제 및 유기 용매의 배합물)이 제거되어 지질-핵산 입자를 형성시킨다. 계면활성제를 제거하는 데 사용된 방법은 전형적으로 투석을 포함한다. 유기 용매가 존재하는 경우, 제거는 전형적으로 감압에서 증발시키거나 또는 혼합물을 가로질러 불활성 기체 (예를 들면, 질소 또는 아르곤)의 스트림을 송풍시킴으로써 달성된다.
- [0179] 이렇게 형성된 입자는 전형적으로 약 100 nm 내지 수 마이크로의 크기이게 된다. 입자에서 추가의 크기 감소 또는 크기의 균질성을 얻기 위해, 지질-핵산 입자를 초음파처리되거나, 여과되거나 또는 리포솜 제형에 사용되고 당업자에게 공지된 다른 크기조정 기술로 처리될 수 있다.
- [0180] 다른 실시양태에서, 상기 방법은 본 발명의 조성물을 사용하여 세포의 리포펙션(lipofection)을 수행하기에 유용한 비지질 폴리양이온을 첨가하는 것을 추가로 포함한다. 적합한 비지질 폴리양이온의 예는 헥사디메트린 브로마이드 (미국 위스콘신주 밀와우키 소재의 알드리치 케미칼 캄파니로부터 상표명 폴리브렌 (POLYBRENE®) 하에 판매됨) 또는 헥사디메트린의 다른 염을 포함한다. 다른 적합한 폴리양이온은 예를 들면, 폴리-L-오르니틴, 폴리-L-아르기닌, 폴리-L-리신, 폴리-D-리신, 폴리알릴아민 및 폴리에틸렌이민의 염을 포함한다. 이들 염의 첨가는 입자가 형성된 후 이루어지는 것이 바람직하다.
- [0181] 또 다른 측면에서, 본 발명은,
- [0182] (a) 약 15-35 % 물 및 약 65-85 % 유기 용매를 포함하는 용액 중에서 약 0.85 내지 약 2.0의 +/- 전하비를 생성하기에 충분한 양의 양이온성 지질을 핵산과 접촉시켜 소수성 지질-핵산 복합체를 제공하는 단계;
- [0183] (b) 용액 중의 소수성 지질-핵산 복합체를 비양이온성 지질과 접촉시켜 핵산-지질 혼합물을 제공하는 단계; 및
- [0184] (c) 지질-핵산 혼합물로부터 유기 용매를 제거하여 핵산이 분해로부터 보호되는 지질-핵산 입자를 제공하는 단계를 포함하여 핵산-지질 입자를 제조하는 방법을 제공한다.
- [0185] 본 발명의 이러한 측면에 유용한 핵산, 비양이온성 지질, 양이온성 지질 및 유기 용매는 세정제를 사용하는 상기 방법에 기재된 것과 동일하다. 한 군의 실시양태에서, 단계 (a)의 용액은 단상이다. 또 다른 군의 실시양태에서, 단계 (a)의 용액은 2상이다.
- [0186] 바람직한 실시양태에서, 양이온성 지질은 DODAC, DDAB, DOTMA, DOSPA, DMRIE, DOGS 또는 이들의 조합물이다. 다른 바람직한 실시양태에서, 비양이온성 지질은 ESM, DOPE, DOPC, DSPC, 폴리에틸렌 글리콜 기재 중합체 (예를 들면, PEG 2000, PEG 5000, PEG 개질된 디아실글리세롤, 또는 PEG 개질된 디알킬옥시프로필), 디스테아로일포스파티딜콜린(DSPC), 콜레스테롤, 또는 이들의 조합물이다. 또한 다른 바람직한 실시양태에서, 유기 용매는 메탄올, 클로로포름, 메틸렌 클로라이드, 에탄올, 디에틸 에테르 또는 이들의 조합물이다.
- [0187] 특히 바람직한 실시양태에서, 핵산은 플라스미드이고, 양이온성 지질은 DODAC, DDAB, DOTMA, DOSPA, DMRIE, DOGS 또는 이들의 조합물이고, 비양이온성 지질은 ESM, DOPE, PEG-DAA, 디스테아로일포스파티딜콜린(DSPC), 콜레스테롤, 또는 이들의 조합물 (예를 들면 DSPC 및 PEG-DAA)이고; 유기 용매는 메탄올, 클로로포름, 메틸렌 클로라이드, 에탄올, 디에틸 에테르 또는 이들의 조합물이다.
- [0188] 상기한 바와 같이, 핵산을 양이온성 지질과 접촉시키는 것은 전형적으로 바람직하게는 기계적 수단, 예를 들면 볼텍스 혼합기를 사용함으로써 핵산으로 된 제 1 용액 및 지질로 된 제 2 용액을 함께 혼합함으로써 달성된다. 상기한 바와 같이, 생성되는 혼합물은 복합체를 함유한다. 그 다음, 비양이온성 지질을 첨가하고 유기 용매를 제거함으로써 이들 복합체가 입자로 전환된다. 비양이온성 지질의 첨가는 전형적으로 비양이온성 지질로 된 용액을 복합체를 함유하는 혼합물에 단순히 첨가함으로써 달성된다. 또한, 역 첨가도 사용될 수 있다. 유기 용매의 후속 제거는 당업자에게 공지된 방법에 의해 수행될 수 있으며, 또한 상기한 바와 같다.
- [0189] 전형적으로, 본 발명의 이러한 측면에서 사용되는 비양이온성 지질의 양은 전하 중성화된 지질-핵산 복합체를 제공하는 데 사용되는 양이온성 지질의 양 (몰 기준)의 약 0.2 내지 약 15 배이다. 바람직하게는, 상기 양은 사용되는 양이온성 지질의 양의 약 0.5 내지 약 9 배이다.
- [0190] 또한, 또 다른 측면에서, 본 발명은 상기한 방법에 의해 제조된 지질-핵산 입자를 제공한다. 이들 실시양태에서, 지질-핵산 입자는 순 전하 중성이거나 또는 보다 큰 유전자 리포펙션 활성을 입자에 제공하는 전체 전하(overall charge)를 함유한다. 바람직하게는, 입자의 핵산 성분은 요망되는 단백질을 엔코딩하거나 또는

요망되지 않는 단백질의 생산을 차단하는 핵산이다. 바람직한 실시양태에서, 핵산은 플라스미드이고, 비양이온성 지질은 에그 스펡고미엘린이고, 양이온성 지질은 DODAC이다. 특히 바람직한 실시양태에서, 핵산은 플라스미드이고, 비양이온성 지질은 DSPC와 콜레스테롤의 혼합물이고, 양이온성 지질은 DOTMA이다. 다른 특히 바람직한 실시양태에서, 비양이온성 지질은 콜레스테롤을 추가로 포함할 수 있다.

[0191] SPLP-CPL (CPL 함유 SPLP) 또는 SNALP-CPL's (CPL 함유 SNALP)를 제조하는 다양한 일반적 방법들이 본 명세서에서 논의된다. 두 일반적 기술은 CPL을 예를 들면, 미리형성된 SPLP 또는 SNALP에 삽입시키는 "후-삽입 (post-insertion)"기술, 및 CPL이 예를 들면, SPLP 또는 SNALP 형성 단계 동안 지질 혼합물 중에 포함되는 "표준" 기술을 포함한다. 후-삽입 기술은 주로 SPLP 또는 SNALP 2중층 막의 외부면에 CPL를 갖는 SPLP를 생성시키는 한편, 표준 기술은 내부 및 외부면 양쪽 모두에 CPL를 갖는 SPLP 또는 SNALP를 제공한다.

[0192] 특히, "후-삽입"은 SPLP 또는 SNALP (임의의 방법에 의해)를 형성하고, 적절한 조건 (바람직하게는 60 °C에서 2-3 시간) 하에서 CPL의 존재 하에서 미리형성된 SPLP 또는 SNALP를 인큐베이션하는 것을 포함한다. CPL의 60-80%가 수용 소포의 외부 침판(leaflet)에 삽입되어 약 5 내지 10 몰% (총 지질 기준) 이하의 최종 농도를 제공할 수 있다. 상기 방법은 인지질로부터 생성된 소포 (이는 콜레스테롤을 함유할 수 있음), 및 또한 PEG-지질 (예를 들면, PEG-DAA)을 함유하는 소포에 특히 유용하다.

[0193] "표준" 기술의 예에서, 본 발명의 CPL-SPLP 및 CPL-SNALP는 압출에 의해 형성될 수 있다. 이 실시양태에서, CPL을 포함하는 모든 지질이 클로로포름 중에 함께 용해된 다음, 질소 하에서 제거된 후, 고 진공 하에서 제거된다. 지질 혼합물이 적절한 완충제 중에서 수화되고, 100 nm의 세공 크기를 지닌 두 폴리카르보네이트 필터를 통해 압출된다. 생성되는 SPLP 또는 SNALP는 내부면 및 외부면의 둘 모두 상에서 CPL을 함유한다. 또한, 또 다른 표준 기술에서, CPL-SPLP 또는 CPL-SNALP의 형성은 세정제 투석 또는 에탄올 투석 방법, 예를 들면 둘 모두 본 명세서에 참고문헌으로 인용되는 미국 특허 제 5,976,567호 및 제 5,981,501호에 논의된 것을 사용하여 수행될 수 있다.

[0194] 본 발명의 핵산-지질 입자는 단독으로 또는 투여 경로 및 표준 제약 관행에 따라 선택된 생리학적으로 허용되는 담체 (예를 들면, 생리학적 식염수 또는 포스페이트 완충제)와 혼합하여 투여될 수 있다. 일반적으로, 정상 식염수가 약제학적으로 허용되는 담체로서 사용된다. 다른 적합한 담체는 예를 들면 안정성 강화용 당단백질, 예를 들면 알부민, 지단백질, 글로불린 등을 비롯하여 물, 완충수, 0.4 % 식염수, 0.3 % 글리신 등을 포함한다.

[0195] 일반적으로, 약제학적 담체는 입자 형성 후 첨가된다. 따라서, 입자가 형성된 후, 입자가 약제학적으로 허용되는 담체, 예를 들면 정상 식염수내로 희석될 수 있다.

[0196] 약제학적 제형 중 입자의 농도는 광범위하게 변할 수 있는데, 즉, 약 0.05 중량% 미만, 대개 약 2-5 중량% 이상 내지 10 내지 30 중량%로 변할 수 있으며, 이는 선택된 특정 투여 방식에 따라 유체 부피, 점도 등에 의해 주로 선택된다. 예를 들면, 농도가 증가되어 치료와 관련된 유체 하중(load)을 낮출 수 있다. 이는 죽상경화증 관련 울혈성 심부전 또는 중증 고혈압을 갖는 환자에서 특히 바람직할 수 있다. 별법으로, 자극성 지질로 구성된 입자가 저 농도로 희석되어 투여 부위에서의 염증을 완화시킬 수 있다.

[0197] 상기한 바와 같이, 본 발명의 핵산-지질 입자는 PEG-DAA 컨쥬게이트를 포함한다. 종종, PEG-DAA 컨쥬게이트와 유사한 방식으로 작용하고, 입자 응집을 방지하는 역할을 하고 순환 수명을 증가시키고 핵산-지질 입자의 표적 조직으로의 전달을 증가시키는 수단을 제공하는 작용을 하는 다른 성분들을 포함하는 것이 바람직하다. 이러한 성분은 PEG-지질 컨쥬게이트, 예를 들면 PEG-세라미드 또는 PEG-인지질 (예를 들면, PEG-PE), 입자에 대한 강글리오시드 G_{M1} 개질된 지질 또는 ATTA-지질을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. 전형적으로, 입자 중 성분의 농도는 약 1-20 %, 더욱 바람직하게는 약 3-10 %이다.

[0198] 본 발명의 약제 조성물은 통상적인 널리 공지된 멸균 기술에 의해 멸균될 수 있다. 수용액은 사용을 위해 패키징되거나 또는 무균 조건 하에서 여과되고 동결건조될 수 있으며, 동결건조된 제제는 투여 전 멸균 수용액과 배합된다. 상기 조성물은 생리학적 조건에 근접하게 하는데 필요한 약제학적으로 허용되는 보조 물질, 예를 들면 pH 조정제 및 완충제, 긴장성 조정제 등, 예를 들면 아세트산나트륨, 락트산나트륨, 염화나트륨, 염화칼륨, 및 염화칼슘을 함유할 수 있다. 또한, 입자 현탁액은 저장시 지질을 자유 라디칼 및 지질-과산화성 손상으로부터 보호하는 지질-보호제를 포함할 수 있다. 친지성 자유 라디칼 켄칭제(quencher), 예를 들면 알파토코페롤 및 수용성 철-특이적 킬레이터, 예를 들면 페리옥사민이 적합하다.

[0199] 또 다른 사용례에서, 지질-핵산 입자는 젤, 오일, 에멀션 등을 포함하지만 이들에 한정되지 않는 광범위한 국

소 투여 형태내로 혼입될 수 있다. 예를 들면, 핵산-지질 입자를 함유하는 현탁액은 국소 크림, 페이스트, 연고, 젤, 로션 등으로 제형화되어 투여될 수 있다.

- [0200] 본 발명의 혈청 안정성 핵산-지질 입자가 형성된 경우, 세포로 핵산을 도입시키는 데 유용하다. 따라서, 또한, 본 발명은 핵산 (예를 들면, 플라스미드)을 세포로 도입시키는 방법을 제공한다. 상기 방법은 먼저 상기한 바와 같이 입자를 형성한 다음, 입자를 트랜스펙션이 일어나기에 충분한 시간 동안 세포와 접촉시킴으로써 시험관내 또는 생체내에서 수행된다.
- [0201] 본 발명의 핵산-지질 입자는 이러한 입자와 혼합되거나 접촉하는 거의 임의의 세포 유형으로 흡착될 수 있다. 입자는 흡착된 후, 세포의 부분에 의해 세포내이입되거나, 세포막과 지질을 교환하거나, 또는 세포와 융합할 수 있다. 입자의 핵산 부분의 전이 또는 혼입은 이들 경로 중 어느 하나를 통해 이루어질 수 있다. 특히, 융합이 발생하는 경우, 입자 막은 세포막으로 통합되고, 입자의 함유물은 세포내 유체와 배합된다.
- [0202] 본 발명의 ERP 검정을 사용하여, SPLP 또는 다른 지질 기재 담체 시스템의 트랜스펙션 효율이 최적화될 수 있다. 더욱 특히, ERP 검정의 목적은 엔도솜 막의 결합/흡수 또는 이와 유사한 융합/탈안정화에 대한 상대적 효과에 기초하여 SPLP의 다양한 양이온성 지질 및 헬퍼(helper) 지질 성분의 효과를 구별하는 것이다. 이러한 검정은 SPLP의 각 성분 또는 다른 지질 기재 담체 시스템이 트랜스펙션 효율에 영향을 미치는 방식을 정량적으로 결정함으로써 SPLP 또는 다른 지질 기재 담체 시스템을 최적화할 수 있게 한다. 본 명세서에 설명된 바와 같이, 엔도솜 방출 매개변수 또는 ERP는 다음과 같이 정의된다.
- [0203] 리포터(reporter) 유전자 발현/세포
- [0204] SPLP 흡수/세포
- [0205] 임의의 리포터 유전자 (예를 들면, 루시페라아제, β -갈락토시아아제, 녹색 형광 단백질 등)가 사용될 수 있다는 것이 당업자에게 용이하게 이해될 것이다. 또한, 지질 성분 (또는, 별법으로, 지질 기재 제형 또는 SPLP의 임의의 성분)은 세포로의 흡수를 억제하거나 이를 간섭하지 않도록 제공된 임의의 검출가능한 표지로 표지화될 수 있다. 본 발명의 ERP 검정을 사용하여, 당업자는 다양한 지질 성분 (예를 들면, 양이온성 지질, 비양이온성 지질, PEG-지질 유도체, PEG-DAA 컨쥬게이트, ATTA-지질 유도체, 칼슘, CPL, 콜레스테롤 등)의 세포 흡수 및 트랜스펙션 효율에 대한 영향을 평가하여 SPLP 또는 다른 지질 기재 담체 시스템을 최적화할 수 있다. 각각의 다양한 SPLP 또는 다른 지질 기재 제형에 대한 ERP를 비교함으로써, 최적화된 시스템, 예를 들면 최대 트랜스펙션 효율과 커플링된 세포에서의 최대 흡수를 갖는 SPLP 또는 다른 지질 기재 제형을 용이하게 결정할 수 있다.
- [0206] 본 발명의 ERP 검정을 수행하기 위한 적합한 표지는 스펙트럼 표지, 예를 들면 형광 염료 (예를 들면, 플루오레세인 및 유도체, 예를 들면 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC) 및 오레곤 그린(Oregon Green®); 로다민 및 유도체, 예를 들면 텍사스 레드(Texas red), 테트라로디민 이소티오시아네이트(TRITC) 등, 디곡시게닌(digoxigenin), 바이오틴, 피코에리트린(phycoerythrin), AMCA, 사이다이스(CyDyes®), 등; 방사성표지, 예를 들면 ³H, ¹²⁵I, ³⁵S, ¹⁴C, ³²P, ³³P 등; 효소, 예를 들면 홀스 래디쉬(horse radish) 퍼옥시다아제, 알칼리성 포스파타아제 등; 스펙트럼 비색분석용 표지, 예를 들면 콜로이드성 금 또는 착색된 유리 또는 플라스틱 비드, 예를 들면 폴리스티렌, 폴리프로필렌, 라텍스 등을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. 표지는 당업계에 널리 공지되어 있는 방법을 사용하여 SPLP 또는 다른 지질 기재 담체 시스템의 성분에 직접 또는 간접적으로 커플링될 수 있다. 앞서 기재한 바와 같이, 광범위한 표지가 사용될 수 있으며, 표지의 선택은 필요로 하는 민감도, SPLP 성분과의 컨쥬게이션 용이성, 안정성 요건, 및 이용가능한 기기 및 폐기 규정에 따라 좌우된다.
- [0207] V. PEG-DAA 컨쥬게이트를 함유하는 리포솜
- [0208] 상기 기재된 SPLP 제형 외에, 본 발명의 PEG-DAA 컨쥬게이트는 빈 리포솜, 또는 예를 들면, 본 명세서에 기재된 치료 생성물을 비롯하여 본 명세서에 기재된 하나 이상의 생활성제를 함유하는 리포솜의 제조에 사용될 수 있다. 또한, 전형적으로 리포솜은 양이온성 지질 및 비양이온성 지질을 포함한다. 일부 실시양태에서, 리포솜은 스테롤 (예를 들면, 콜레스테롤)을 추가로 포함한다.
- [0209] A. 리포솜 제조
- [0210] 예를 들면, 문헌[Szoka, et al., Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 9: 467 (1980)], 미국 특허 제 4,186,183호, 제 4,217,344호, 제 4,235,871호, 제 4,261,975호, 제 4,485,054호, 제 4,501,728호, 제 4,774,085호, 제 4,837,028호, 제 4,946,787호, PCT 공보 WO 91/17424, 문헌[Deamer and Bangham, Biochim. Biophys. Acta,

443: 629-634 (1976); Fraley, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 3348-3352 (1979); Hope, et al., Biochim. Biophys. Acta, 812: 55-65 (1985); Mayer, et al., Biochim. Biophys. Acta, 858: 161-168 (1986); Williams, et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 85: 242-246 (1988), text Liposomes, Marc J. Ostro, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1983, Chapter 1, and Hope, et al., Chem. Phys. Lip., 40: 89 (1986)]에 기재된 다양한 방법들이 리포솜 제조에 이용가능하며, 상기 모든 문헌들은 본 명세서에 참고 문헌으로 인용된다. 적합한 방법은 초음파처리, 압출, 고압/균질화, 미세유동화(microfluidization), 세정제 투석, 소형 리포솜 소포의 칼슘 유도된 융합, 및 에테르-주입 방법을 포함하고 이에 한정되지 않으며, 이들 모두는 당업계에 공지되어 있다.

[0211] 한 가지 방법은 불균일한 크기로 된 다층판(multilamellar) 소포를 생성한다. 이 방법에서, 소포 형성 지질은 적합한 유기 용매 또는 용매 시스템 중에 용해되고, 진공 또는 불활성 기체 하에서 건조되어 얇은 지질 필름을 형성한다. 필요에 따라, 필름은 적합한 용매, 예를 들면 3차 부탄올 중에 재용해된 다음, 동결건조되어 더욱 용이하게 수화되는 분말 유사 형태로 존재하는 더욱 균질한 지질 혼합물을 형성한다. 이 필름은 수성 완충 용액으로 덮어지고, 교반하면서 전형적으로 15-60 분에 걸쳐 수화된다. 생성되는 다층판 소포의 크기 분포는 더욱 격렬한 교반 조건 하에서 지질을 수화시키거나 또는 가용화 세정제, 예를 들면 테옥시콜레이트를 첨가함으로써 보다 작은 크기로 이동될 수 있다.

[0212] 단층판 소포는 초음파처리 또는 압출에 의해 제조될 수 있다. 일반적으로, 초음파처리는 얼음 배스(ice bath) 중에서 팁 음파처리기(tip sonifier), 예를 들면 브란손(Branson) 팁 음파처리기를 사용하여 수행된다. 전형적으로, 현탁액은 간헐성 초음파처리 주기에 적용된다. 압출은 생체막 압출기, 예를 들면 리펙스(Lipex) 생체막 압출기에 의해 수행될 수 있다. 압출 필터 중의 규정된 세공 크기는 특정 크기로 된 단층판 리포솜 소포를 생성할 수 있다. 또한, 리포솜은 비대칭 세라믹 필터, 예를 들면 메사추세츠주 워체스터 소재의 노르톤 캄파니 (Norton Company)로부터 상업적으로 입수가능한 세라플로우 마이크로필터(Ceraflow Microfilter)를 통해 압출함으로써 형성될 수 있다. 또한, 단층판 소포는 인지질을 에탄올 중에 용해시킨 다음, 지질을 완충제에 주입시키고, 지질이 자발적으로 단층판 소포를 형성하게 함으로써 생성될 수 있다. 또한, 인지질은 세정제, 예를 들면 콜레이트, 트리톤 X, 또는 n-알킬글루코시드내로 가용화될 수 있다. 약물을 가용화된 지질-세정제 미셀에 첨가한 후, 세정제는 투석, 겔 여과, 친화성 크로마토그래피, 원심분리, 및 한외여과를 비롯한 다수의 가능한 방법 중 어느 하나에 의해 제거된다.

[0213] 리포솜 제조 후, 형성 동안 크기조정되지 않은 리포솜은 요망되는 크기 범위 및 리포솜 크기의 비교적 좁은 분포를 얻기 위해 크기조정될 수 있다. 약 0.2-0.4 미크론의 크기 범위가 통상적인 필터를 통한 여과에 의해 리포솜 현탁액이 멸균되게 한다. 필터 멸균 방법은 리포솜이 약 0.2-0.4 미크론으로 크기조정된 경우 고 처리량 기준으로 수행될 수 있다.

[0214] 리포솜을 요망되는 크기로 크기조정하는 데 몇몇 기술들이 이용가능하다. 한 가지 크기조정 방법은 미국 특허 제 4,737,323호에 기재되어 있고, 이는 본 명세서에 참고 문헌으로 인용된다. 배스 또는 프로브 초음파처리에 의해 리포솜 현탁액을 초음파처리하면 크기가 약 0.05 미크론 미만인 소형 단층판 소포로 점진적으로 크기가 감소된다. 균질화는 전단 에너지에 의존하여 큰 리포솜을 작은 것들로 단편화하는 또 다른 방법이다. 전형적인 균질화 절차에서, 선택된 리포솜 크기, 전형적으로 약 0.1 및 0.5 미크론이 관찰될 때까지 표준 에멀션 균질화기를 통해 다층판 소포가 재순환된다. 리포솜 소포의 크기는 본 명세서에 참고 문헌으로 인용되는 문헌[Bloomfield, Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 10: 421-450 (1981)]에 기재된 준전기 광산란(quasi-electric light scattering; QELS)에 의해 결정될 수 있다. 평균 리포솜 직경은 형성된 리포솜의 초음파처리에 의해 감소될 수 있다. 단속적 초음파처리 주기는 효과적인 리포솜 합성을 안내하는 QELS 평가를 사용하여 교번될 수 있다.

[0215] 또한, 소형 세공 폴리카르보네이트 막 또는 비대칭 세라믹 막을 통한 리포솜의 압출도 비교적 잘 규정된 크기 분포로 리포솜 크기를 감소시키는 유효한 방법이다. 전형적으로, 요망되는 리포솜 크기 분포가 달성될 때까지 현탁액이 막을 통해 1 회 이상 순환된다. 리포솜이 연속적으로 소형 세공 막을 통해 압출되어 점진적으로 리포솜 크기를 감소시킬 수 있다. 본 발명에 사용시, 약 0.05 미크론 내지 약 0.40 미크론 범위의 크기를 갖는 리포솜이 바람직하다. 특히 바람직한 실시양태에서, 리포솜은 약 0.05 내지 약 0.2 미크론이다.

[0216] 바람직한 실시양태에서, 빈 리포솜은 당업자에게 공지된 통상적인 방법을 사용하여 제조된다.

[0217] B. 전달 비히클로서의 리포솜의 용도

[0218] 본 발명의 약물 전달 조성물 (예를 들면, 리포솜, 미셀, 지질-핵산 입자, 비리포솜 등)은 치료제 또는 생활성제

의 전신 또는 국소 전달에 유용하고, 또한 진단 검정에 유용하다.

- [0219] 하기 논의는 일반적으로 리포솜에 대한 것이지만, 이 논의가 본 발명의 다른 약물 전달 시스템 (예를 들면, 미셀, 비로솜, 핵산-지질 입자 (예를 들면, SNALP 및 SPLP) 등, 이들 모두는 본 발명의 PEG-DAA 컨쥬게이트를 사용하여 유리하게 형성될 수 있음)에 완전히 적용될 수 있다는 것이 당업자에게 용이하게 이해될 것이다.
- [0220] 치료제 또는 생활성제의 전달을 위해, PEG-DAA 함유 리포솜 조성물이 치료제로 로딩(loading)될 수 있고, 치료를 필요로 하는 피검체에게 투여될 수 있다. 본 발명의 조성물 및 방법을 사용하여 투여되는 치료제는 치료될 질환에 대한 적절한 치료제인 것으로 선택된 다양한 약물 중 어느 하나일 수 있다. 종종, 약물은 항신 생물제, 예를 들면 빈크리스틴(vincristine) (뿐만 아니라, 다른 빈카 알카노이드(vinca alkaloid)), 독소루 비신(doxorubicin), 미톡산트론(mitoxantrone), 캄포테신(camptothecin), 시스플라틴(cisplatin), 블레오마이 신, 시클로포스파미드, 메토틱세이트(methotrexate), 스트렙토조토신(streptozotocin) 등이다. 특히 바람 직한 항종양제는 예를 들면, 악티노마이신(actinomycin) D, 빈크리스틴, 빈블라스틴(vinblastine), 시스틴 아 라비노사이드(cystine arabinoside), 안트라시클린(anthracycline), 알킬화제(alkylating agent), 백금 화합물, 항대사물, 및 뉴클레오사이드 유사체, 예를 들면 메토틱세이트 및 퓨린 및 피리미딘 유사체를 포함한다. 또 한, 본 발명의 화합물 및 방법을 사용하여 항-감염제를 특정 조직에 전달하는 것도 바람직할 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물은 국소 마취제, 예를 들면 디부카인(dibucaine) 및 클로르프로마진(chlorpromazine); 베타-아드레날린 차단제, 예를 들면 프로판올올, 티몰올 및 라베탈올; 항고혈압제, 예를 들면 클로니딘(clonidine) 및 히드랄라진(hydralazine); 항우울제, 예를 들면 이미프라민(imipramine), 아미트리프틸린(amitriptyline) 및 독세핀(doxepin); 항경련제(anti-convulsant), 예를 들면 페니토인(phenytoin); 항히스타민, 예를 들면 디 펜히드라민, 클로르페니리민 및 프로메타진(promethazine); 항생제/항균제, 예를 들면 겐타마이신 (gentamycin), 시프로플록사신(ciprofloxacin), 및 세폭시틴(cefexitin); 항진균제, 예를 들면 미코나졸 (miconazole), 테르코나졸(terconazole), 에코나졸(econazole), 이소코나졸(isoconazole), 부타코나졸 (butaconazole), 클로트리마졸(clotrimazole), 이트라코나졸(itraconazole), 니스타틴(nystatin), 나프티핀 (naftifine) 및 앰포테리신(amphotericin) B; 항기생충제, 호르몬, 호르몬 길항제, 면역조절제, 신경전달물질 길항제, 항녹내장제, 비타민, 마취약(narcotic) 및 영상화 약물을 포함하지만 이들에 한정되지 않는 다른 약 물의 선택적 전달에 사용될 수 있다.
- [0221] 앞서 언급한 바와 같이, 양이온성 지질은 세포내에서 일부 단백질의 생성을 유도하거나 또는 차단하도록 의도 되는 치료 유전자 또는 올리고뉴클레오타이드의 전달에 사용될 수 있다. 핵산은 음 하전되고, 양 하전된 물질 과 배합되어 상기한 바와 같이 핵산의 제형화 및 세포 전달에 적합한 SPLP를 형성할 수 있다.
- [0222] 본 발명의 PEG-DAA 컨쥬게이트의 또 다른 임상적 적용은 동물 및 인간 둘 모두의 면역화를 위해 애주번트로 사용하는 것이다. 단백질 항원, 예를 들면 디프테리아 독소, 콜레라 독소, 기생충 항원, 바이러스 항원, 면 역글로불린, 효소 및 조직적합성 항원은 면역화 목적으로 본 발명의 PEG-DAA 컨쥬게이트를 함유하는 리포솜에 혼입되거나 또는 이러한 리포솜상에 부착될 수 있다.
- [0223] 또한, 본 발명의 PEG-DAA 컨쥬게이트를 함유하는 리포솜은 적절한 림프 기관을 표적화하여 면역 반응을 자극 하는 백신에 대한 담체로서 특히 유용하다.
- [0224] 또한, 본 발명의 PEG-DAA 컨쥬게이트를 함유하는 리포솜은 면역억제제 또는 면역자극제를 마크로파지에 선택 적으로 전달하는 벡터로 사용될 수 있다. 특히, 마크로파지 활성화 및 마크로파지를 활성화시키는 림포카인을 억 제하는 데 유용한 글루코코르티코이드가 본 발명의 리포솜을 사용하여 전달될 수 있다.
- [0225] 본 발명의 PEG-DAA 컨쥬게이트를 함유하고 표적화 분자를 함유하는 리포솜을 사용하여 세포를 자극하거나 억 제할 수 있다. 예를 들면, 특정 항원을 포함하는 리포솜을 사용하여 항원에 특이적으로 결합하는 표면 항체 를 디스플레이하는 B 세포 집단을 자극할 수 있다. 리포솜 표면에 성장 인자 또는 림포카인을 포함하는 리포 솜은 이들 인자에 대한 적절한 수용체를 발현하는 세포를 자극하도록 유도될 수 있다. 이러한 방법을 사용하 여, 암 환자의 치료의 일부로서 골수 세포가 증식하도록 자극될 수 있다.
- [0226] 본 발명의 PEG-DAA 컨쥬게이트를 함유하는 리포솜은 PEG-유도체화된 리포솜 중에 현재 제형화되는 것들을 비 롯한 임의의 생성물 (예를 들면, 치료제, 진단제, 표지 또는 다른 화합물)을 전달하는 데 사용될 수 있다.
- [0227] 특정한 실시양태에서, 세포 유형 또는 조직에 특이적인 표적화 잔기를 사용하여 본 발명의 리포솜을 표적화하 는 것이 바람직하다. 다양한 표적화 잔기, 예를 들면 리간드, 세포 표면 수용체, 당단백질, 비타민 (예를 들 면, 리보플라빈) 및 모노클로날 항체를 사용한 리포솜의 표적화가 이미 공지되어 있다 (예를 들면, 미국 특허

제 4,957,773호 및 제 4,603,044호를 참조할 수 있고, 이들 문헌의 교시내용은 본 명세서에 참조로 포함됨). 표적화 잔기는 전체 단백질 또는 이의 단편을 포함할 수 있다.

[0228] 일반적으로, 표적화 기전은 표적 잔기가 표적, 예를 들면 세포 표면 수용체와의 상호작용을 위해 이용가능하도록 하는 방식으로 표적화제가 리포솜의 표면에 위치할 것을 필요로 한다. 한 실시양태에서, 리포솜은 리포솜 형성시 컨넥터(connector) 부분을 막내로 혼입하도록 디자인된다. 컨넥터 부분은 막에 단단하게 임베딩되고(embedded), 앵커링된 친지성 부분을 가져야 한다. 또한, 이는 리포솜의 수성 표면에서 화학적으로 이용가능한 친수성 부분도 가져야 한다. 친수성 부분은 이 부분 및 표적화제가 안정한 화학적 결합을 형성하도록 표적화제와 화학적으로 적합하게 되도록 선택된다. 따라서, 대개 컨넥터 부분은 리포솜의 표면으로부터 연장되어 나오고, 표적화제를 정확하게 위치시키도록 구성된다. 일부 경우에서, 표적화제를 직접 컨넥터 부분에 부착시키는 것이 가능하지만, 많은 경우, 제 3 분자를 "분자 가교"로 작용하도록 사용하는 것이 더욱 적합하다. 이러한 가교는 리포솜의 표면으로부터 떨어져 컨넥터 부분과 표적화제를 연결하기 때문에 세포 표적과의 상호작용을 위해 표적화제가 자유롭게 이용가능하게 한다.

[0229] 표적화제를 커플링하는 표준 방법을 사용할 수 있다. 예를 들면, 표적화제의 부착을 위해 활성화될 수 있는 포스파티딜에탄올아민, 또는 유도체화된 친지성 화합물, 예를 들면 지질-유도체화된 블레오마이신이 사용될 수 있다. 항체-표적화된 리포솜이 예를 들면 단백질 A를 포함하는 리포솜을 사용하여 구성될 수 있다 (문헌 [Renneisen, et al., J. Bio. Chem., 265: 16337-16342 (1990) I: and Leonetti, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 87: 2448-2451 (1990)] 참조). 또한, 표적화 잔기의 예는 신생물 또는 종양과 회합된 항원을 비롯한 세포 성분에 특이적인 다른 단백질들을 포함할 수 있다. 표적화 잔기로서 사용된 단백질은 공유 결합을 통해 리포솜에 부착될 수 있다. 문헌[Heath, Covalent Attachment of Proteins to Liposomes, 149 Methods in Enzymology 111-119 (Academic Press, Inc. 1987)]을 참조할 수 있다. 다른 표적화 방법은 바이오틴-아비딘 시스템을 포함한다.

[0230] 일부 경우에서, 리포솜의 진단 표적화가 후속적으로 사용되어 표적화된 세포 또는 조직을 치료할 수 있다. 예를 들면, 독소가 표적화된 리포솜에 커플링된 경우, 독소는 표적화된 세포, 예를 들면 신생물 세포를 파괴하는 데 유효할 수 있다.

[0231] C. 진단제로서의 리포솜의 용도

[0232] 본 발명의 PEG-DAA 컨쥬게이트를 사용하여 제조된 약물 전달 조성물, 예를 들면 리포솜은 종양, 염증이 생긴 관절, 병변 등을 비롯한 다양한 질병 상태의 진단 영상화를 용이하게 하는 마커를 사용하여 표지화될 수 있다. 비록 형광 표지도 사용할 수 있지만 이들 표지는 전형적으로 방사성 마커이다. 섬광 웰 계수기(scintillation well counter)에서 용이하게 계수되고, 계수 전 조직 균질화를 필요로 하지 않으며, 감마선 카메라를 사용하여 영상화될 수 있기 때문에, 감마선-방출 방사성 동위원소를 사용하는 것이 특히 유리하다.

[0233] 감마선-방출 방사성 동위원소 또는 양전자-방출 방사성 동위원소가 전형적으로 사용되는데, 감마선-방출의 경우, 예를 들면 ⁹⁹Tc, ²⁴Na, ⁵¹Cr, ⁵⁹Fe, ⁶⁷Ga, ⁸⁶Rb, ¹¹¹In, ¹²⁵I, 및 ¹⁹⁵Pt가 사용되고, 양전자-방출의 경우 예를 들면 ⁶⁸Ga, ⁸²Rb, ²²Na, ⁷⁵Br, ¹²²I 및 ¹⁸F가 사용된다. 또한, 리포솜은, 자기 공명 영상화(MRI) 또는 전자 스핀 공명(ESR)의 사용을 통해 생체내 진단 목적으로 상자기성 동위원소로 표지화될 수 있다. 예를 들면, 미국 특허 제 4,728,575호를 참조할 수 있고, 이 문헌의 교시내용은 본 명세서에 참조로 포함된다.

[0234] D. 리포솜 로딩(loading)

[0235] 통상적인 약물을 리포솜에 로딩하는 방법은 예를 들면, 캡슐화 기술, 2중층내로의 로딩 및 막횡단 전위 로딩 방법을 포함한다.

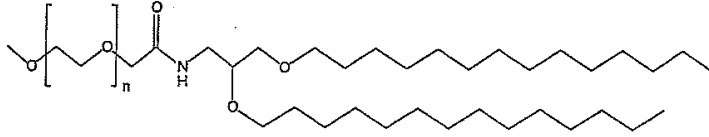
[0236] 한 가지 캡슐화 기술에서, 약물 및 리포솜 성분은 모든 층들이 혼화가능한 유기 용매 중에 용해되어, 건조 필름으로 농축된다. 그 다음, 완충제가 건조된 필름에 첨가되고, 소포 벽으로 혼입되는 약물을 갖는 리포솜이 형성된다. 별법으로, 약물이 완충제내로 위치되고, 오직 지질 성분으로 된 건조된 필름에 첨가될 수 있다. 이 방식에서, 약물은 리포솜의 수성 내부 중에 캡슐화되게 된다. 리포솜의 형성에 사용되는 완충제는 예를 들면, 등장성 식염수, 포스페이트 완충된 식염수, 또는 다른 저 이온 강도 완충제로 된 임의의 생물학적으로 상용가능한 완충제 용액일 수 있다. 일반적으로, 약물은 약 0.01 ng/mL 내지 약 50 mg/mL의 양으로 존재하게 된다. 그 다음, 수성 내부 또는 막 중에 혼입된 약물을 갖는 생성되는 리포솜은 임의적으로 상기한 바와 같이 크기조정된다.

- [0237] 막횡단 전위 로딩은 미국 특허 제 4,885,172호, 제 5,059,421호 및 제 5,171,578호에 상세하게 기재되어 있고, 상기 문헌들의 내용은 본 명세서에 참조로 포함된다. 간략히, 막횡단 전위 로딩 방법은 적절한 수성 매질 중에 용해된 경우 하전된 상태로 존재할 수 있는 본질적으로 임의의 통상적인 약물과 함께 사용될 수 있다. 바람직하게는, 약물은 리포솜 막내로 분배되도록 비교적 친지성이다. 막횡단 전위는 리포솜 또는 단백질-리포솜 복합체의 2중층을 가로질러 생성되고, 약물은 막횡단 전위에 의해 리포솜내로 로딩된다. 막횡단 전위는 막을 가로지르는 하나 이상의 하전된 중 (예를 들면, Na^+ , K^+ 및/또는 H^+)에 대한 농도 구배를 생성함으로써 생성된다. 이 농도 구배는 상이한 내부 및 외부 매질을 갖는 리포솜을 형성함으로써 생성되고, 관련된 양성자 구배를 갖는다. 그 후, 약물 축적은 헨더슨-하셀바흐(Henderson-Hasselbach)식에 의해 예측되는 방식으로 발생할 수 있다.
- [0238] 본 발명의 리포솜 조성물은 표준 기술에 따라 피검체에 투여될 수 있다. 바람직하게는, 리포솜 조성물의 약제 조성물은 비경구, 즉 복막내, 정맥내, 피하 또는 근육내 투여된다. 더욱 바람직하게는, 약제 조성물은 볼루스(bolus) 주사에 의해 정맥내 투여된다. 본 발명에 사용하기 적합한 제형은 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Philadelphia, Pa., 17th ed. (1985)]에서 발견된다. 약제 조성물은 예를 들면, 다양한 질환을 진단하거나, 또는 다양한 질병 상태 (예를 들면, 염증, 감염 (바이러스 및 세균 감염 둘 모두), 네오플라시스(neoplasia), 암 등)를 치료하는 데 사용될 수 있다.
- [0239] 바람직하게는, 약제 조성물은 정맥내 투여된다. 따라서, 본 발명은 허용되는 담체, 바람직하게는 수성 담체 중에 현탁된 리포솜으로 된 용액을 포함하는 정맥내 투여용 조성물을 제공한다. 다양한 수성 담체, 예를 들면 물, 완충수, 0.9 % 등장성 식염수 등이 사용될 수 있다. 이들 조성물은 통상적인 널리 공지된 멸균 기술에 의해 멸균되거나, 또는 멸균 여과될 수 있다. 생성되는 수용액은 사용을 위해 그대로 또는 동결건조된 상태로 팩킹될 수 있으며, 동결건조된 제제는 투여 전 멸균 수용액과 배합된다. 상기 조성물은 생리학적 조건에 근접하게 하는데 필요한 약제학적으로 허용되는 보조 물질, 예를 들면 pH 조정제 및 완충제, 긴장성 조정제, 습윤화제 등, 예를 들면 아세트산나트륨, 락트산나트륨, 염화나트륨, 염화칼륨, 염화칼슘, 소르비탄 (sorbitan) 모노라우레이트, 트리에탄올아민 올레이트 등을 함유할 수 있다.
- [0240] 약제 제형 중 리포솜 조성물의 농도는 즉, 약 0.05 % 미만, 대개 약 2-5 % 이상 내지 10 내지 30 중량%로 널리 변할 수 있으며, 선택된 특정 투여 방식에 따라 유체 부피, 점도 등에 의해 주로 선택된다. 진단의 경우, 투여되는 조성물의 양은 사용되는 특정 표지 (즉, 방사능 표지, 형광 표지 등), 진단되는 질병 상태 및 임상 의의 판단에 따라 좌우되지만, 일반적으로 체중 킬로그램 당 약 1 내지 약 5 mg이다.
- [0241] 본 발명은 하기 구체적인 실시예를 통해 훨씬 더 상세하게 설명된다. 하기 실시예는 예시의 목적으로 제공되지만 이들에 어떤 방식으로든 본 발명을 제한하려는 것이 아니다. 당업자는 변하거나 또는 변형되어 본질적으로 동일한 결과를 제공할 수 있는 다양한 중요치 않은 매개변수들을 용이하게 인식할 것이다.

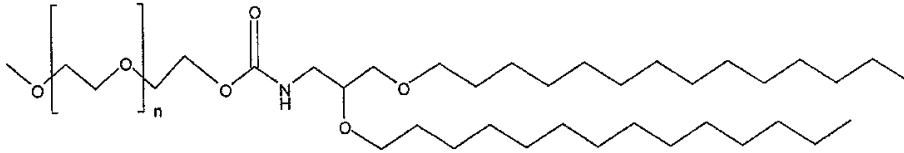
도면

도면1

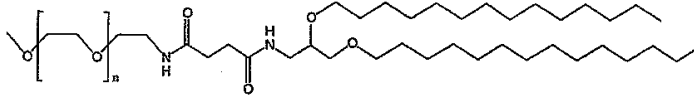
N-(2,3-디미리스틸옥시프로필) 아미드 PEG₂₀₀₀ 메틸 에테르(PEG-A-DMA)



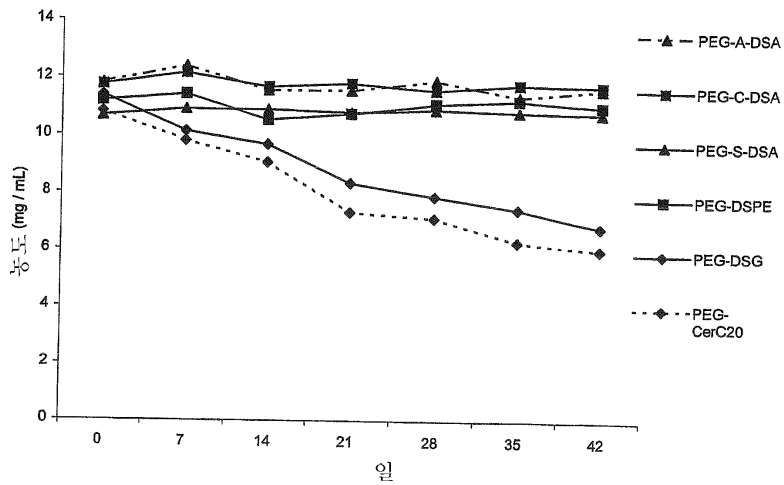
N-(2,3-디미리스틸옥시프로필) 카르바메이트 PEG₂₀₀₀ 메틸 에테르(PEG-C-DMA)



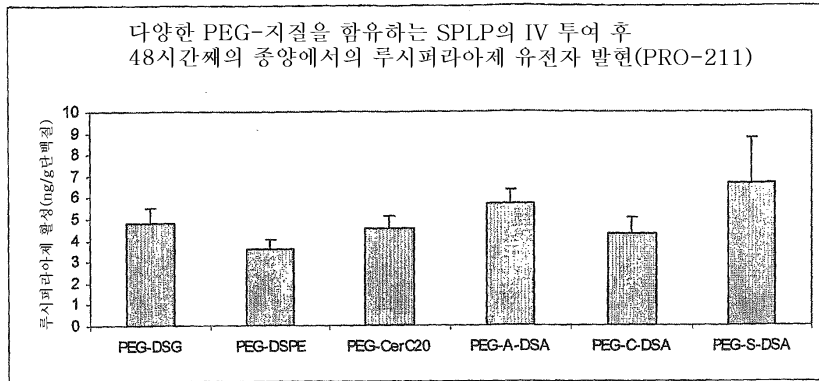
N-(2,3-디미리스틸옥시프로필) 숙신아미드 PEG₂₀₀₀ 메틸 에테르(PEG-S-DMA)



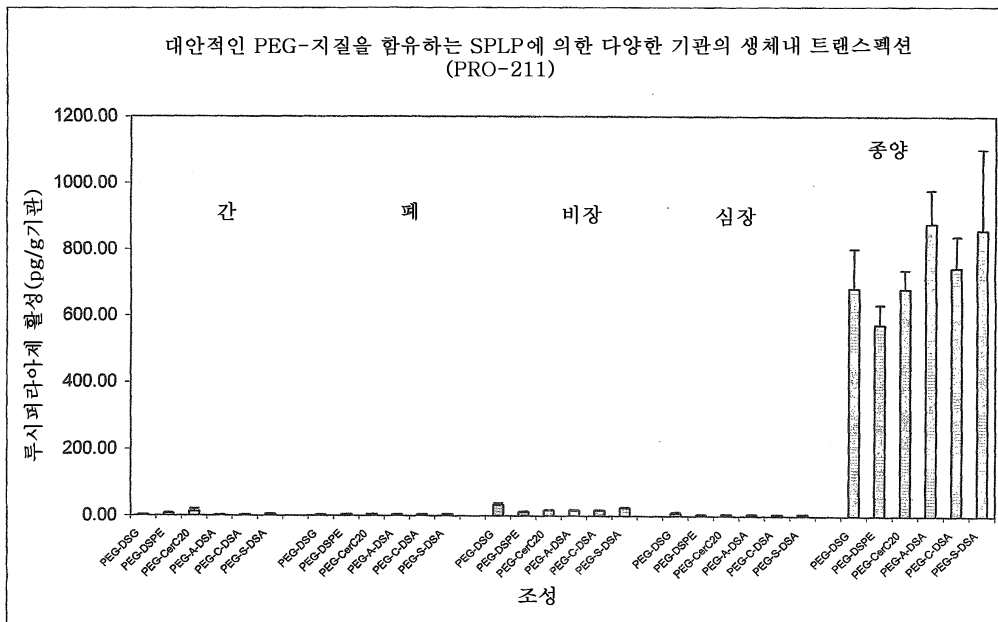
도면2



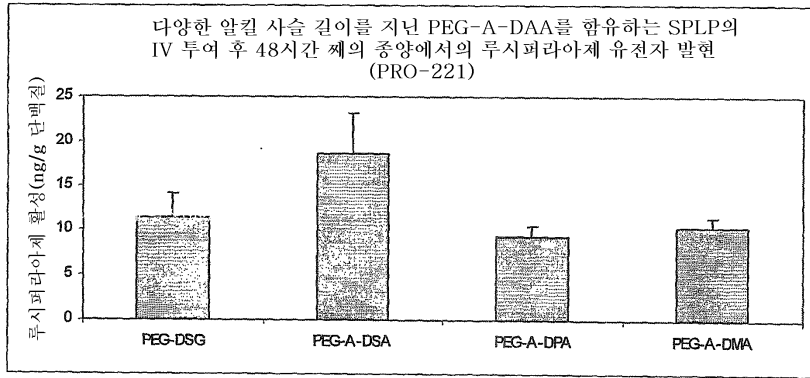
도면3



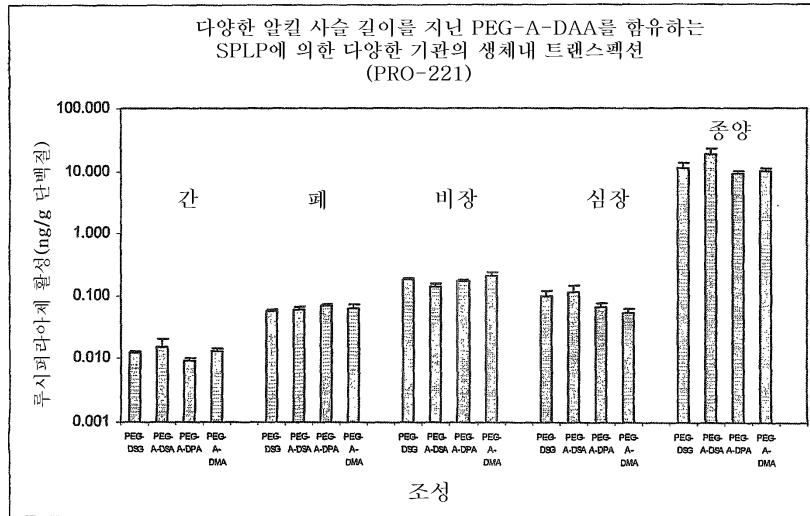
도면4



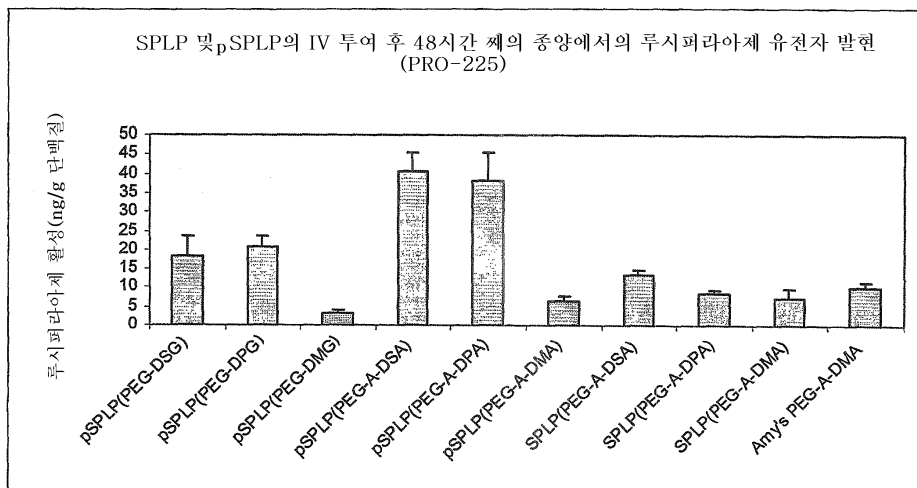
도면5



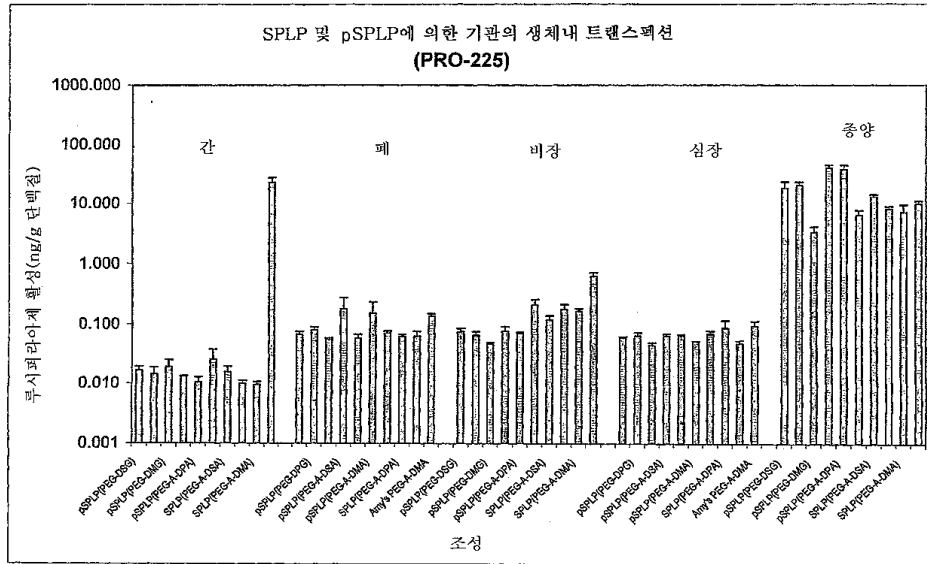
도면6



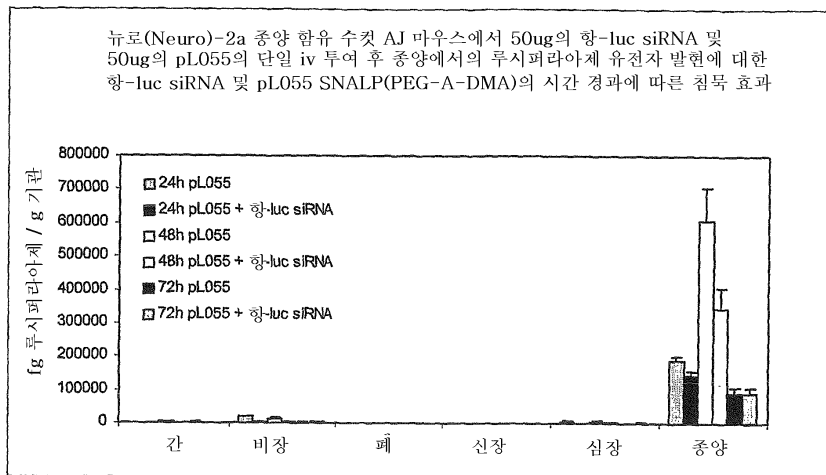
도면7



도면8

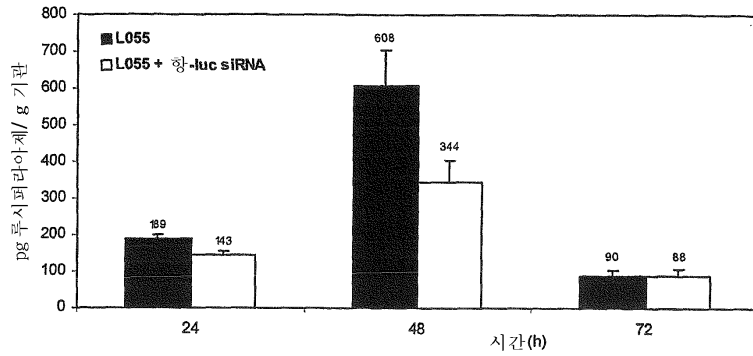


도면9



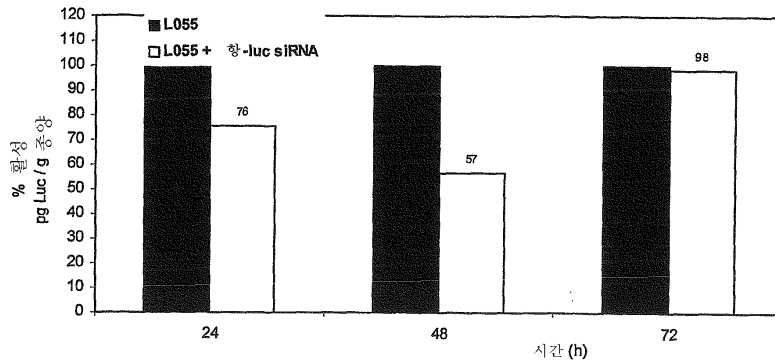
도면10

뉴로-2a 종양 함유 수컷 AJ 마우스에서 50ug의 항-luc siRNA 및 50ug의 pL055의 단일 iv 투여 후 종양에서의 루시페라아제 유전자 발현에 대한 항-luc siRNA 및 pL055 SNALP(PEG-A-DMA)의 시간 경과에 따른 침묵효과



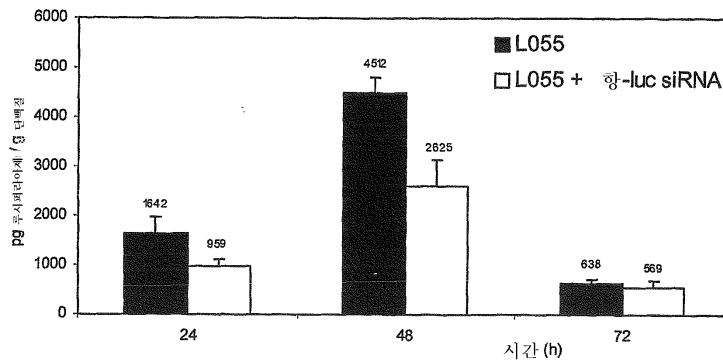
도면11

뉴로-2a 종양 함유 수컷 AJ 마우스에서 50 ug의 항-luc siRNA 및 50ug의 pL055의 단일 iv 투여 후 종양에서의 루시페라아제 유전자 발현에 대한 항-luc siRNA 및 pL055 SNALP(PEG-A-DMA)의 시간 경과에 따른 침묵효과

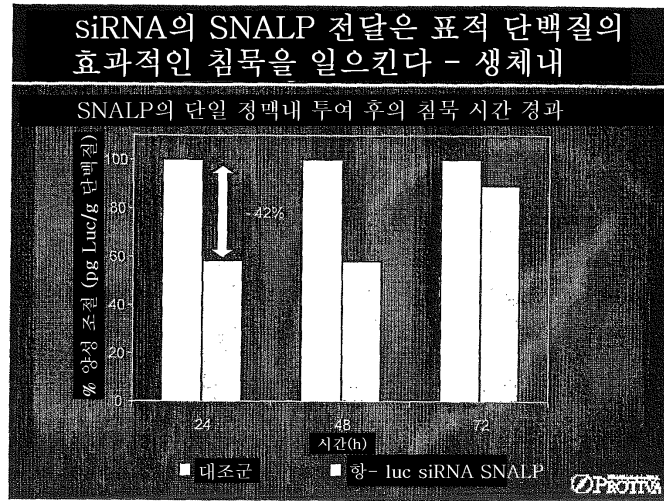


도면12

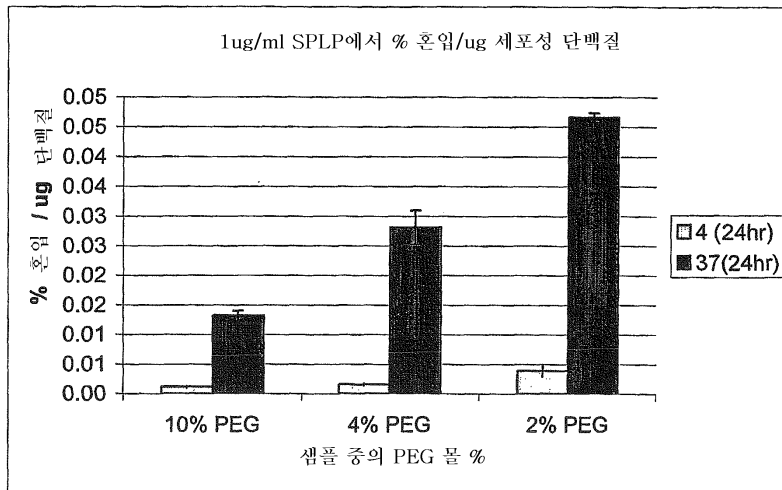
뉴로-2a 종양 함유 수컷 AJ 마우스에서 50ug의 항-luc siRNA 및 50ug의 pL055의 단일 iv 투여 후 종양에서의 루시페라아제 유전자 발현에 대한 항-luc siRNA 및 pL055 SNALP(PEG-A-DMA)의 시간 경과에 따른 침묵 효과



도면13

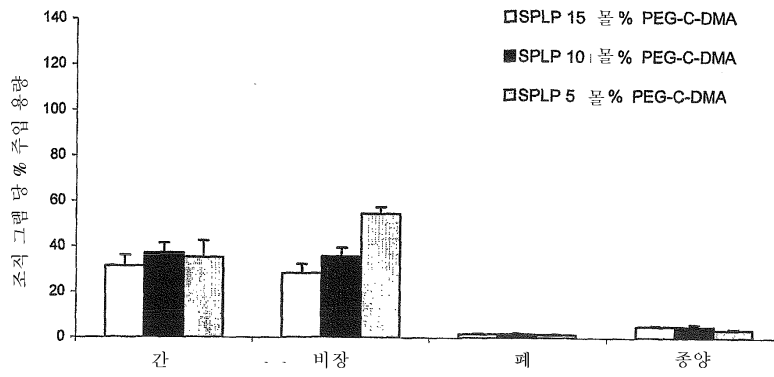


도면14



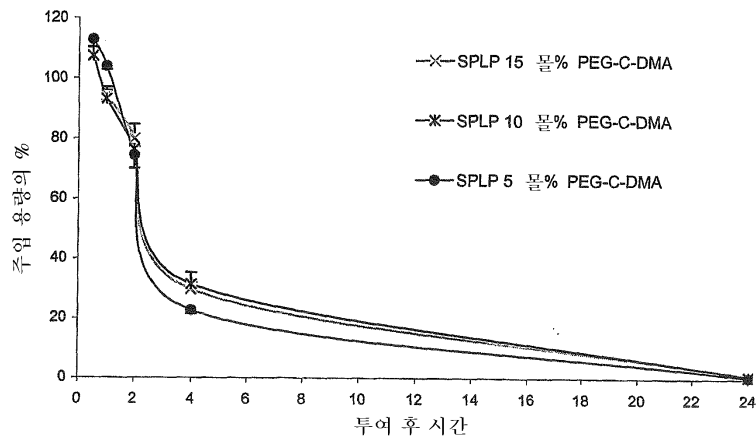
도면15

수컷 A/J 마우스에서 SNALP 및 SPLP의 생체 분포

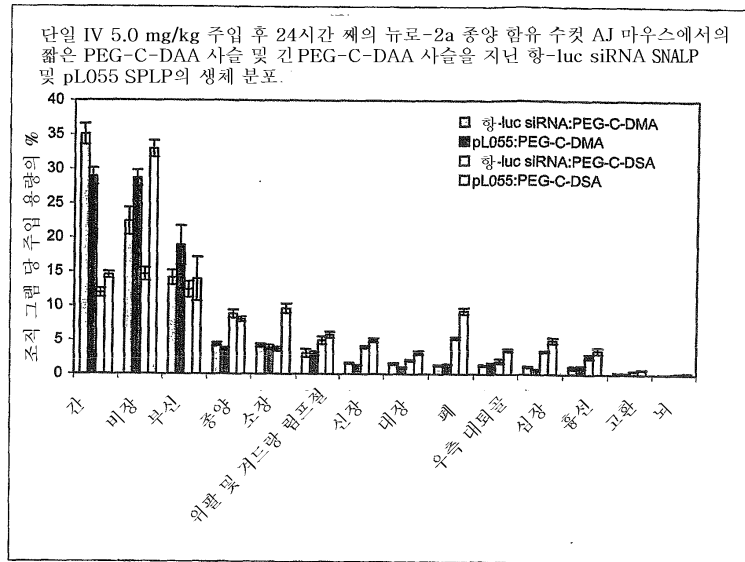


도면16

PRO-295 혈액 제거

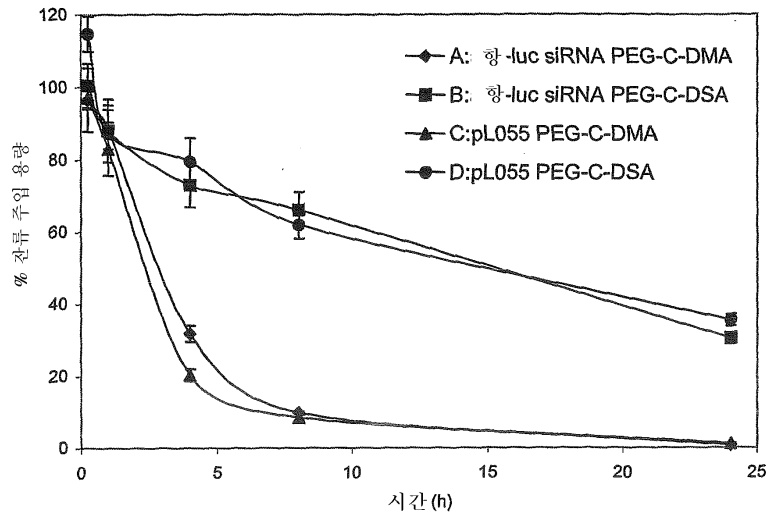


도면17

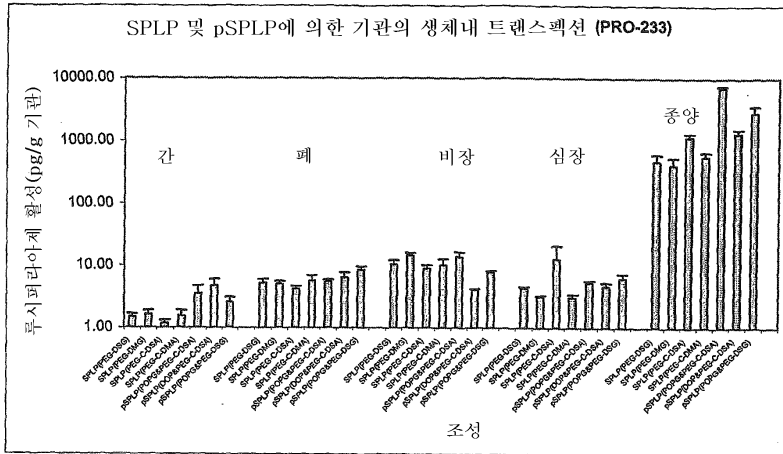


도면18

뉴로-2a 종양 함유 수컷 AJ 마우스에서의 짧은 사슬 및 긴 사슬(PEG-C-DAA) SPLP/SNALP 의 제거 프로파일

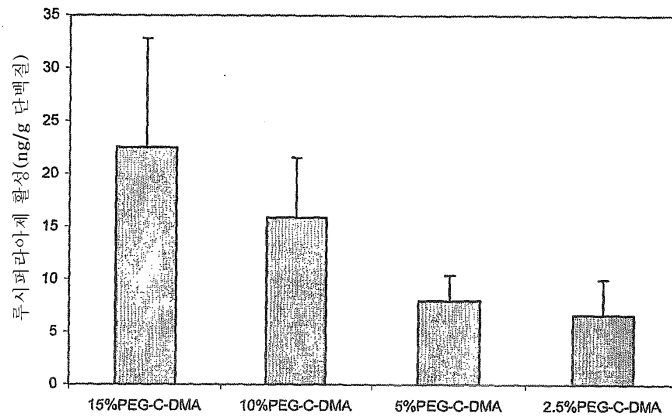


도면19

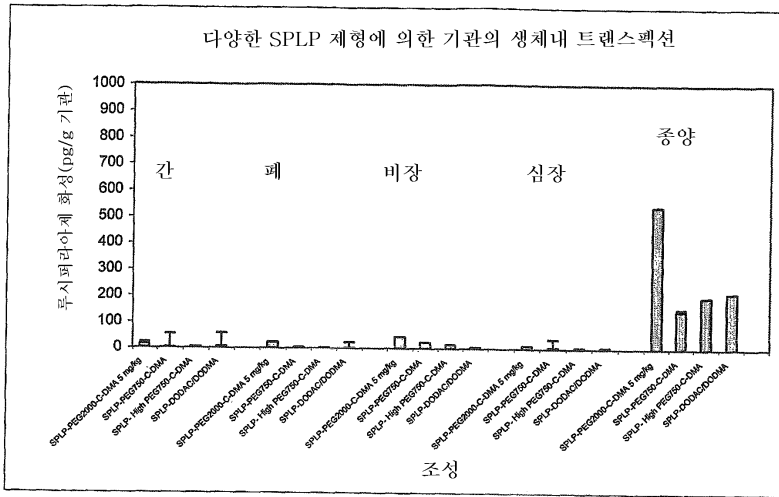


도면20

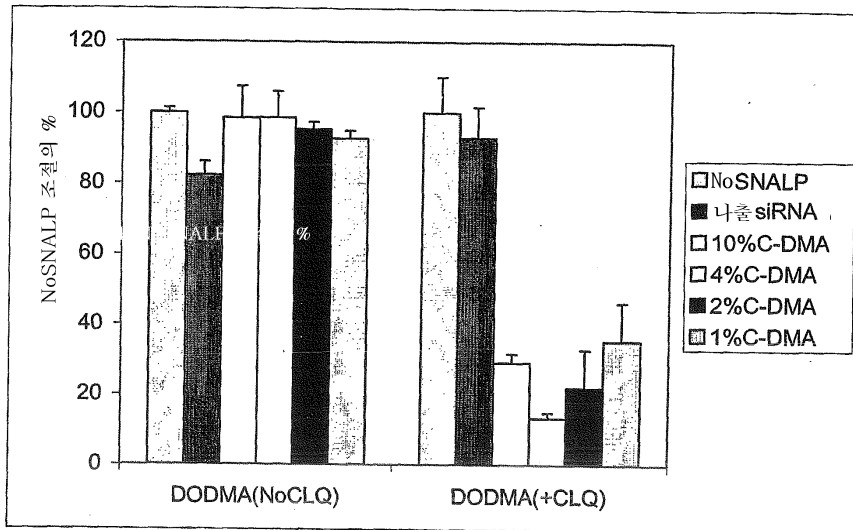
다양한 양의 PEG-C-DMA를 지닌 15몰% DODMA를 함유하는 SPLP의 48시간 루시페라아제 유전자 발현에 대한 효과



도면21



도면22



도면23

