



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년11월23일
 (11) 등록번호 10-1800833
 (24) 등록일자 2017년11월17일

- | | |
|--|---|
| (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07C 233/38 (2006.01) A61K 9/127 (2006.01)
C07C 235/10 (2006.01) C07C 235/60 (2006.01)
C07D 475/04 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-7024770
(22) 출원일자(국제) 2010년03월19일
심사청구일자 2015년03월18일
(85) 번역문제출일자 2011년10월20일
(65) 공개번호 10-2011-0129969
(43) 공개일자 2011년12월02일
(86) 국제출원번호 PCT/US2010/028000
(87) 국제공개번호 WO 2010/108108
국제공개일자 2010년09월23일
(30) 우선권주장
61/161,828 2009년03월20일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
WO2008042973 A2*
JP07018569 A*
US20030049310 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌 | (73) 특허권자
씨엘에스엔 래버러토리스, 인코퍼레이티드
미국 델라웨어주 윌밍턴 수트 400 센터빌 로드
2711 컴퍼니 코퍼레이션 (내) (우편번호 : 19808)
(72) 발명자
슬로보드킨, 그레고리
미국 35824 알라바마 헌츠빌 그랜드뷰 블러바드
1090 #927
콩고, 리차드
미국 35801 알라바마 헌츠빌 웨스차세 로우 207
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 남앤드남 |
|--|---|

전체 청구항 수 : 총 43 항

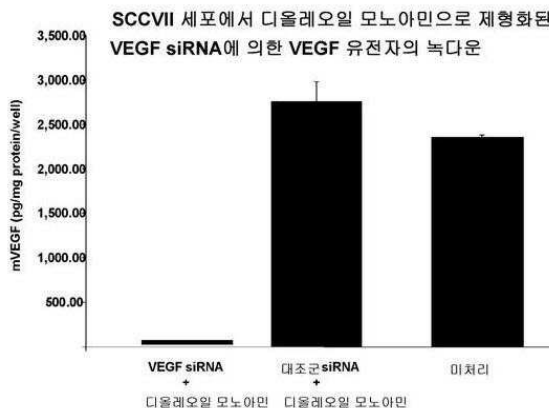
심사관 : 이선화

(54) 발명의 명칭 **플리아민 유도체**

(57) 요약

생물학적으로 활성인 분자의 전신적 및 국소적 전달을 위한 화합물, 조성물 및 방법이 기재된다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

마타르, 마제드

미국 35758 알라바마 메디슨 토론헤م 웨이 119

페웰, 제이슨

미국 35758 알라바마 메디슨 인랜드 베이 드라이브
111

앤워, 후르셰드

미국 35758 알라바마 메디슨 트워드 드라이브 109

스파크스, 브라이언, 제프리

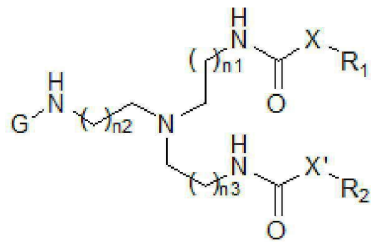
미국 35806 알라바마 헨즈빌 세 리 드라이브 121

명세서

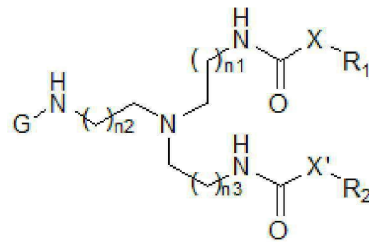
청구범위

청구항 1

하기 화학식 A의 화합물 및 하기 화학식 B의 화합물을 포함하는, 생물학적으로 활성인 분자의 전신적 및 국소적 전달의 효율을 개선시키는 조성물:



화학식 A



화학식 B

상기 식에서,

화학식 A 및 화학식 B 모두에서 n1, n2 및 n3는 독립적으로 1, 2, 3 또는 4이고;

화학식 A 및 화학식 B 모두에서 X 및 X'는 독립적으로 결합(bond), 산소 또는 질소이고;

화학식 A 및 화학식 B 모두에서 R1 및 R2는, 독립적으로 10 내지 22개의 탄소 원자를 가지는 포화, 모노불포화, 또는 폴리불포화 지방산으로부터 유래되고;

화학식 A에서 G는 수소이고;

화학식 B에서 G는 폴리옥시알킬렌이다.

청구항 2

제 1항에 있어서, 폴리옥시알킬렌이 폴리옥시에틸렌인 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 화학식 A의 화합물이 디올레오일 모노아민이고, 화학식 B의 화합물이 mPEG-디올레오일 모노아민인 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 화학식 A 및 화학식 B 모두에서 n1, n2 및 n3이 모두 1이고, 화학식 A 및 화학식 B 모두에서 X 및 X'가 결합인 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서, 화학식 A 및 화학식 B 모두에서 R1 및 R2는 독립적으로 1개의 이중 결합을 함유하는 C14-C20 탄화수소 기인 조성물.

청구항 6

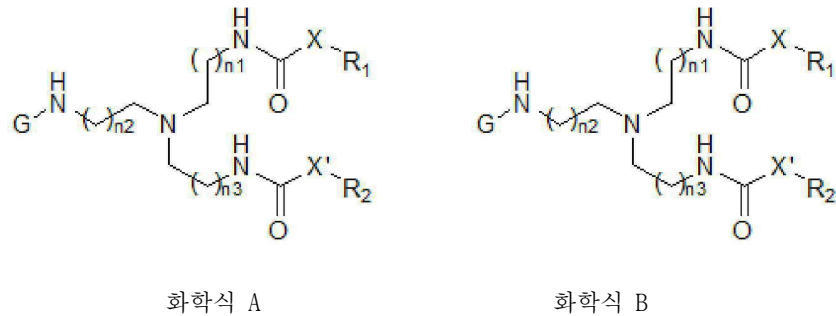
제 1항에 있어서, 화학식 A 및 화학식 B 모두에서 -C(O)X-R1 및 -C(O)X'-R2가 올레오일 기인 조성물.

청구항 7

제 1항에 있어서, 조성물 중의 화학식 A의 화합물 대 화학식 B의 화합물의 비율이 1:1 내지 10:1인 조성물.

청구항 8

생물학적으로 활성인 분자, 하기 화학식 A의 화합물 및 하기 화학식 B의 화합물을 포함하는, 생물학적으로 활성인 분자의 전신적 및 국소적 전달의 효율을 개선시키는 제형 (formulation):



상기 식에서,

화학식 A 및 화학식 B 모두에서 n1, n2 및 n3는 독립적으로 1, 2, 3 또는 4이고;

화학식 A 및 화학식 B 모두에서 X 및 X'는 독립적으로 결합(bond), 산소 또는 질소이고;

화학식 A 및 화학식 B 모두에서 R₁ 및 R₂는, 독립적으로 10 내지 22개의 탄소 원자를 가지는 포화, 모노불포화, 또는 폴리불포화 지방산으로부터 유래되고;

화학식 A에서 G는 수소이고;

화학식 B에서 G는 폴리옥시알킬렌이고;

상기에서 생물학적으로 활성인 분자는 리보솜 RNA; RNA 또는 DNA의 안티센스 폴리뉴클레오타이드; 앵타머 (aptamers); 리보자임 (ribozymes); siRNA; shRNA; miRNA; 및 치료적으로 유용한 단백질을 인코딩하는 게놈 DNA, cDNA, 또는 mRNA의 폴리뉴클레오타이드로 구성된 군으로부터 선택된 것인 제형.

청구항 9

제 8항에 있어서, 폴리옥시알킬렌이 폴리옥시에틸렌인 제형.

청구항 10

제 8항에 있어서, 화학식 A의 화합물이 디올레오일 모노아민이고, 화학식 B의 화합물이 mPEG-디올레오일 모노아민인 제형.

청구항 11

제 8항에 있어서, 화학식 A 및 화학식 B 모두에서 n1, n2 및 n3이 모두 1이고, 화학식 A 및 화학식 B 모두에서 X 및 X'가 결합인 제형.

청구항 12

제 8항에 있어서, 화학식 A 및 화학식 B 모두에서 R₁ 및 R₂는 독립적으로 1개의 이중 결합을 함유하는 C₁₄-C₂₀ 탄화수소 기인 제형.

청구항 13

제 8항 내지 제 12항 중 어느 한 항에 있어서, 리보솜 RNA; RNA 또는 DNA의 안티센스 폴리뉴클레오타이드; 앵타머; 리보자임; siRNA; shRNA; miRNA; 및 치료적으로 유용한 단백질을 인코딩하는 게놈DNA, cDNA, 또는 mRNA의 폴리뉴클레오타이드를 포유동물 개체에 전달하는데 사용하기 위한 제형.

청구항 14

제 8항 내지 제 12항 중 어느 한 항에 있어서, 포유동물 개체에서 질병을 치료 또는 예방하기 위한 제형.

청구항 15

제 14항에 있어서, 질병이 개체 내에서의 비조절된(unregulated) 세포 성장에 의한 것인 제형.

청구항 16

제 15항에 있어서, 질병이 암인 제형.

청구항 17

제 16항에 있어서, 질병이 폐암인 제형.

청구항 18

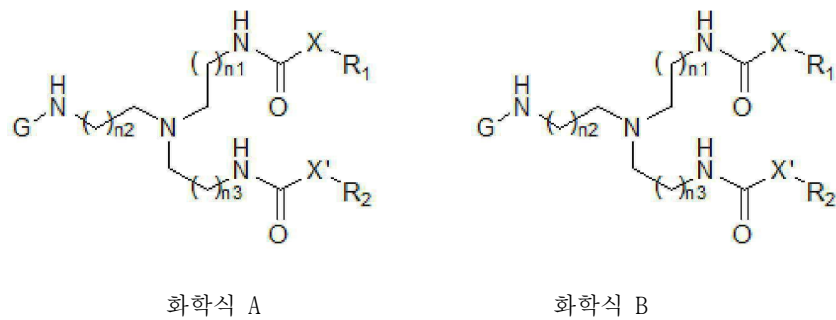
제 14항에 있어서, 제형이 포유동물 개체에게 경구적으로, 국소적으로, 비경구적으로, 흡입에 의해, 또는 직장으로(rectally) 투여되는 제형.

청구항 19

제 14항에 있어서, 제형이 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 제형.

청구항 20

생물학적으로 활성인 분자, 하기 화학식 A의 화합물 및 하기 화학식 B의 화합물을 포함하는, 포유동물 개체의 폐암을 치료하기 위한 제형 (formulation):



상기 식에서,

화학식 A 및 화학식 B 모두에서 n1, n2 및 n3는 독립적으로 1, 2, 3 또는 4이고;

화학식 A 및 화학식 B 모두에서 X 및 X'는 독립적으로 결합(bond), 산소 또는 질소이고;

화학식 A 및 화학식 B 모두에서 R₁ 및 R₂는 독립적으로 10 내지 22개의 탄소 원자를 가지는 포화, 모노불포화, 또는 폴리불포화 지방산으로부터 유도되고;

화학식 A에서 G는 수소이고;

화학식 B에서 G는 폴리옥시알킬렌이고;

상기에서 생물학적으로 활성인 분자는 리보솜 RNA; RNA 또는 DNA의 안티센스 폴리뉴클레오타이드; 리보자임(ribozymes); siRNA; shRNA; miRNA; 및 치료적으로 유용한 단백질을 인코딩하는 게놈DNA, cDNA, 또는 mRNA의 폴리뉴클레오타이드로 구성된 군으로부터 선택된다.

청구항 21

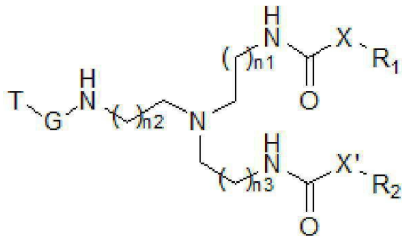
제 20항에 있어서, 화학식 A의 화합물이 디올레오일 모노아민이고, 화학식 B의 화합물이 mPEG-디올레오일 모노아민인 제형.

청구항 22

제 20항에 있어서, 제형이 포유동물 개체에게 경구적으로, 국소적으로, 비경구적으로, 흡입에 의해, 또는 직장으로 투여되는 제형.

청구항 23

하기 화학식의 화합물:



상기 식에서,

n1, n2 및 n3는 독립적으로 1, 2, 3 또는 4이고;

X 및 X'는 독립적으로 결합, 산소, 또는 질소이고;

R₁ 및 R₂는 독립적으로 1개 내지 4개의 이중 또는 삼중 결합을 함유하거나 함유하지 않는 C₈-C₂₅ 탄화수소 기이고;

T는 약제학적으로 활성인 소분자 (small molecule), 엔도솜 분해제 (endosomolytic agent), 융합성 펩타이드 (fusogenic peptide), 세포막 투과제 (cell membrane permeating agent), 전하 차단제 (charge masking agent), 핵산 및 세포 수용체 리간드로 구성된 군으로부터 선택된 표적 리간드이고;

G는 결합 또는 폴리옥시알킬렌이다.

청구항 24

제 23항에 있어서, 상기 폴리옥시알킬렌이 중합체 단위들 사이에 하나 이상의 링커 기를 포함하는 화합물.

청구항 25

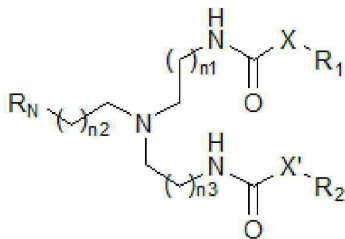
제 24항에 있어서, 옥시알킬렌 기들은 독립적으로 이들의 반복 단위 내에 2개 내지 5개의 탄소 원자를 갖는 직쇄 또는 분지쇄의 폴리옥시알킬렌 기들이인 화합물.

청구항 26

제 25항에 있어서, 폴리옥시알킬렌이 폴리옥시에틸렌이고, 표적 리간드는 염산 기인 화합물.

청구항 27

하기 화학식의 화합물:



상기 식에서,

n1, n2 및 n3는 독립적으로 1, 2, 3 또는 4이고;

X 및 X'는 독립적으로 결합, 산소, 또는 질소이고;

R₁ 및 R₂은 독립적으로 1개 내지 4개의 이중 또는 삼중 결합을 함유하거나 함유하지 않는 C₈-C₂₅ 탄화수소 기이고;

R_N 는 NHR_4 또는 $N^+R_4R_5R_6$ 를 나타내고; 여기서

R_4 , R_5 및 R_6 는 독립적으로 C_1 - C_6 알킬 기를 나타낸다.

청구항 28

제 23항 내지 제 27항 중 어느 한 항의 화합물 및 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 분자를 포함하는 제형:

(a) 리보솜 RNA; RNA 또는 DNA의 안티센스 폴리뉴클레오타이드; 앵타머; 리보자임; siRNA; shRNA; miRNA; 및 치료적으로 유용한 단백질을 인코딩하는 게놈DNA, cDNA, 또는 mRNA의 폴리뉴클레오타이드;

(b) 앵타머; 및

(c) 단백질, 펩타이드, 콜레스테롤, 호르몬, 소분자 억제학적 화합물, 비타민, 및 보조인자 (co-factors).

청구항 29

제 28항에 있어서, 제형이 상기 화합물 및 상기 분자에 의해 형성된 입자를 포함하는 제형.

청구항 30

제 28항에 있어서, 세포와의 접촉에 의해 세포 내로 siRNA를 도입하기 위한 제형.

청구항 31

제 28항에 있어서, 포유동물 개체에서 표적 서열의 발현을 조절하기 위한 제형.

청구항 32

제 28항에 있어서, 포유동물 개체에 siRNA의 생체내 (*in vivo*) 전달을 하기 위한 제형.

청구항 33

제 28항에 있어서, 포유동물 개체에서 질병을 치료 또는 예방하기 위한 제형.

청구항 34

제 28항에 있어서, 세포와의 접촉에 의해 세포에서 유전자의 발현을 저해하기 위한 제형.

청구항 35

제 34항에 있어서, 세포가 시험관내 (*in vitro*)에서 접촉되는 제형.

청구항 36

제 34항에 있어서, 세포가 생체내 (*in vivo*)에서 접촉되는 제형.

청구항 37

제 35항에 있어서, 세포가 포유동물 세포인 제형.

청구항 38

제 37항에 있어서, 포유동물 세포가 인간 세포인 제형.

청구항 39

제 28항에 있어서, 포유동물 개체에 플라스미드 DNA의 생체내 (*in vivo*) 전달을 하기 위한 제형.

청구항 40

제 8항 내지 제 12항 중 어느 한 항의 제형을 함유하는 이식형 장치 (implantable device)로서, 상기에서 제형은 장치 내에 포획되거나 캡슐화되고, 상기 장치는 상기 제형 외에 생분해성 및/또는 생체적합성

약물 방출 물질을 포함하는 이식형 장치.

청구항 41

제 40항에 있어서, 장치가 개체의 신체 내에 이식하기에 적합한 크기 및 모양을 갖는 이식형 장치.

청구항 42

제 28항의 제형을 함유하는 이식형 장치 (implantable device)로서,

상기에서 제형은 장치 내에 포획되거나 캡슐화되고, 상기 장치는 상기 제형 외에 생분해성 및/또는 생체적합성 약물 방출 물질을 포함하는 이식형 장치.

청구항 43

제 40항에 있어서, 장치가 개체의 신체 내에 주입하기에 적합한 크기 및 모양을 갖는 이식형 장치.

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

- 청구항 56
- 삭제
- 청구항 57
- 삭제
- 청구항 58
- 삭제
- 청구항 59
- 삭제
- 청구항 60
- 삭제
- 청구항 61
- 삭제
- 청구항 62
- 삭제
- 청구항 63
- 삭제
- 청구항 64
- 삭제
- 청구항 65
- 삭제
- 청구항 66
- 삭제
- 청구항 67
- 삭제
- 청구항 68
- 삭제
- 청구항 69
- 삭제
- 청구항 70
- 삭제
- 청구항 71
- 삭제

- 청구항 72
삭제
- 청구항 73
삭제
- 청구항 74
삭제
- 청구항 75
삭제
- 청구항 76
삭제
- 청구항 77
삭제
- 청구항 78
삭제
- 청구항 79
삭제
- 청구항 80
삭제
- 청구항 81
삭제
- 청구항 82
삭제
- 청구항 83
삭제
- 청구항 84
삭제
- 청구항 85
삭제
- 청구항 86
삭제
- 청구항 87
삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

청구항 98

삭제

청구항 99

삭제

청구항 100

삭제

청구항 101

삭제

청구항 102

삭제

청구항 103

삭제

청구항 104

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 대칭적 폴리아민 유도체 (polyamine derivatives) 및 이러한 화합물을 포함하는 제형 (formulations), 또한 보다 상세하게는 부분적으로 아실화되고 임의적으로 보조 그룹을 보유하는 폴리아민 유도체에 관한 것이다. 이러한 화합물은 세포 내로 소간섭 RNA (siRNA)를 도입하고, 표적 서열의 발현을 침묵시키며 (silencing), siRNA를 생체내로 운반하고, 또한 질환 및/또는 장애 (disorders)를 치료하는 데 유용하다.

배경 기술

[0002] 본 발명의 화합물, 조성물 및 방법은 세포, 조직 및 기관 내로 생물학적으로 활성인 분자의 효율적인 전달에 의존하는 치료적, 연구적, 및 진단적 적용 (applications)에 유용하다. 본 논의는 다음에 기술되는 본 발명의 이점을 위해서만 제공된다.

[0003] 항바이러스 및 화학치료 제제와 같은 다양한 치료적 화합물의 세포 전달 (cellular delivery)은 보통 두 가지 한계점과 타협하고 있다. 첫째, 많은 치료적 제제는 종종 선택성이 낮아서, 정상적 조직에 대해 높은 독성을 유발하는 것이다. 둘째, 많은 화합물의 살아있는 세포 내로 운반 (trafficking)은 세포의 복잡한 막 시스템에 의해 매우 제한된 것이다. 특이적 운반체 (transporters)는 핵산 및 단백질과 같은 가장 외인성인 분자를 배제하는 반면, 영양분 또는 조절 분자의 선택적 도입은 허용한다. 지질 담체 (lipid carriers), 생분해성 중합체 (biodegradable polymers), 및 다양한 결합체 시스템 (conjugate systems)의 사용을 포함하는 다양한 전략이 화합물의 세포 내로 전달을 개선시키는 데 사용될 수 있다.

[0004] 세포 내로 외래 핵산의 전달을 개선시키는 가장 잘 연구된 접근법은 바이러스 벡터 또는 양이온성 지질 (cationic lipids) 및 관련 사이토펙틴 (cytoflectins)의 사용과 연루되어 있다. 바이러스 벡터는 일정 유형의 세포 내로 유전자를 효율적으로 전달하는 데 사용될 수 있지만, 그들이 화학적으로 합성된 분자를 세포 내로 도입하는 데는 일반적으로 사용될 수 없다. 대안의 접근법은 양이온성 지질을 도입한 전달 제형 (delivery formulations)을 사용하는 것이고, 양이온성 지질은 한쪽 말단을 통해 핵산과 또한 다른 쪽을 통해서는 지질 또는 막 시스템과 상호작용한다. 합성 핵산뿐만 아니라 플라스미드는 이들 화합물의 유용성이 종종 세포-유형 특이성, 형질전환 시 낮은 혈청 요구도, 및 독성에 의해 제한되기는 하지만, 사이토펙틴을 사용하여 운반될 수 있다.

[0005] 생물학적으로 활성인 분자를 운반하는 또 다른 접근법은 결합체의 사용과 연루되어 있다. 결합체는 종종 소정 분자의 능력에 근거하여 선택되고, 예를 들어 수용체-매개성 세포내 이입 (endocytosis)을 통해 특이 세포 내로 선택적으로 운반된다. 관심이 있는 화합물은 세포막을 능동적으로 (actively) 통과하는 분자에 부착함에 의해, 해당 화합물의 세포 또는 특이 세포 소기관 내로 효과적인 전달이 실현될 수 있다. 대안으로, 능동적 운반 기작이 없이 세포막을 침투할 수 있는 분자, 예를 들어 다양한 지질친화성 분자는 관심있는 화합물을 전달하는 데 사용될 수 있다. 결합체로서 사용될 수 있는 분자의 예로는, 이에 제한되는 것은 아니지만 펩타이드, 호르몬, 지방산, 비타민, 플라보노이드, 당류, 리포터 분자, 리포터 효소, 킬레이트인자 (chelators), 포르피린 (porphyrins), 삽입인자 (intercalators), 및 능동적 운반 또는 수동적 운반에 의해 세포막을 침투할 수 있는 그 외 분자를 포함한다.

[0006] 특이 세포 유형, 예를 들어 암 세포 또는 특정 조직과 기관에 특이한 세포로의 화합물 전달은 특이 세포 유형과 관련된 수용체를 사용하여 수행될 수 있다. 특정한 수용체는 고친화성 엽산 (folic acid) 수용체를 포함하는 소정의 암성 (cancerous) 세포에서 과다 발현된다. 예를 들어, 고친화성 엽산 수용체는 유방, 난소, 자궁경부, 결장직장, 신장, 및 비인두 종양을 포함하는 다양한 신생증식 조직에서 과다 발현되는 종양 마커이지만, 정상 조직에서도 매우 제한적인 정도로 발현된다. 외인성 화합물을 세포막을 통과하여 운반하기 위한 엽산 기초한 결합체의 사용은 질환의 치료 및 진단에 대한 표적화된 전달 (targeted delivery) 접근법을 제공할 수 있고, 치료적 화합물의 필요한 용량을 감소시킬 수 있다. 또한, 치료적 생물유용성 (bioavailability), 약물역학 (pharmacodynamics), 및 약물동력학적 (pharmacokinetic) 매개변수는 엽산 생물결합체를 포함하는 생물결합체의 사용을 통하여 조절될 수 있다. 생물학적으로 활성인 프테로일 올리고-L-글루타르메이트 (pteroyl oligo-L-

glutamates)의 합성이 보고되어 왔다. 소정의 올리고뉴클레오타이드-폴레이트 결합체뿐만 아니라 특이 결합체 그룹으로 변형된 올리고뉴클레오타이드를 고체상 합성하는 방법이 보고되었다. 외인성 분자의 막 투과 전달을 증진시키기 위한 특이 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 바이오틴 및 폴레이트 결합체의 사용이 보고되어 왔다. 결합체의 핵산 성분에 부착된 포스포아미다이트 모이어티 (phosphoramidite moiety)을 가진 특이 핵산 폴레이트를 포함하는 소정의 폴레이트 결합체, 및 이들 폴레이트 결합체를 합성하는 방법이 기술되었다. 소정의 유형의 폴레이트-뉴클레오사이드 결합체의 합성에 유용한 중간물, 알파-[2-(트리메틸시릴)에톡시카르보닐]엽산 (alpha-[2-(trimethylsilyl)ethoxycarbonyl]folic acid)의 합성이 보고되었다.

[0007] 기타 세포 유형으로의 화합물 전달은 간세포와 같은 소정의 세포 유형과 관련된 수용체를 사용하여 수행될 수 있다. 예를 들어 수용체-매개성 세포내이입을 사용하는 약물 전달 시스템은 약물 표적화 (drug targeting)뿐만 아니라 약물-흡수 증진을 달성하기 위하여 적용되었다. 어시알로 당단백질 수용체 (asialoglycoprotein receptor, ASGPr)는 간세포에 독특한 것이고 어시알로오소뮤코이드 (asialoorosomuroid, ASOR)와 같은 분지된 갈락토스-말단 당단백질에 결합한다. 수용체에 이러한 당단백질 또는 합성 당결합체 (glycoconjugates)의 결합은 올리고사카라이드 사슬의 분지형성 정도에 강하게 의존하는 친화도로 생성되며, 예를 들어 삼중분지 구조 (triatennary structures)는 이중분지 (biateannary) 또는 단일분지 (monoatennary) 사슬보다 큰 친화도로 결합된다 (탄수화물 모이어티로서 N-아세틸-D-갈락토사민의 사용을 통한 본 높은 특이도의 예, 이는 갈락토스에 비해 수용체에 더 높은 친화도를 가진다). 또한 본 “군집 효과 (clustering effect)”는 만노실-종결 (mannosyl-terminating) 당단백질 또는 당결합체의 결합 및 흡수를 위하여 기술되어 왔다. 외인성 화합물을 세포막을 통과시키기 위한 갈락토스 및 갈락토사민 기초한 결합체의 사용은 HBV 및 HCV 감염 또는 간세포 암종과 같은 간 질환의 치료에 대한 표적화된 전달 접근법을 제공할 수 있다. 또한 생물결합체의 사용은 치료에 요구되는 치료적 화합물의 필요한 용량의 감소를 제공할 수 있다. 또한, 치료적 생물유용성, 약물역학, 및 약물동력학적 매개변수는 생물결합체의 사용을 통하여 조절될 수 있다.

[0008] 많은 펩타이드 기초한 세포 운반체 (cellular transporters)는 여러 연구 그룹에 의해 개발되어 왔다. 이들 펩타이드는 높은 효율로 세포막을 시험관내 (in vitro) 및 생체내 (in vivo) 통과할 수 있다. 이러한 융합성 (fusogenic) 펩타이드의 예로는 축각동물 (ANTENNAPEDIA), 초파리 전사인자의 호메오도메인 (homeodomain)의 16개-아미노산 단편; NLS 도메인이 있거나 없는 카포시 섬유모세포 성장인자 (Kaposi fibroblast growth factor)의 시그널 서열의 소수성 부위를 나타내는 17개-단위 단편; 케이만 악어 (caiman crocodylus)의 Ig(5) 경쇄의 17개-단위 시그널 펩타이드 서열; HIV 외막 당단백질 gp4114의 17개-아미노산 융합 서열; HIV-1 Tat49-57 단편; 트랜스포탄 A (transportan A) - 신경펩타이드 갈라닌 (galanine)의 N-말단 및 막과 상호작용하는 말별 독 펩타이드 마스토포란 (mastoporan)으로 구성된 비조합 27개-단위체; 또한 인플루엔자 바이러스 헤마글루티닌 외막 당단백질 (hemagglutinin envelope glycoprotein)로부터 유래한 24개-단위체를 포함한다. 이들 펩타이드는 지질이 없는 세포 배양 형질전환 (transfection)을 위한 안티센스 올리고 테옥시리보뉴클레오타이드-펩타이드 결합체의 일부로서 사용되었다. 많은 경우에, 이러한 결합체는 지질 운반을 사용하여 형질전환된 부모 올리고뉴클레오타이드보다 더 나은 세포 배양 효능을 보여주었다. 또한, 파지 디스플레이 기법의 사용은 여러 가지의 생체내 기관 표적화 및 종양 표적화를 확인시켜 주었다. 독소루비신 (doxorubicin)에 종양 표적화 펩타이드의 결합은 독성 프로파일을 유의하게 개선시키는 것을 보여주었고 독소루비신의 증진된 효능을 생체내 마우스 암 모델 MDA-MB-435 유방 암종에서 나타내었다.

[0009] 생물학적으로 활성인 분자의 세포내 전달의 또 다른 접근법은 양이온성 중합체의 사용과 연루되어 있다 (예를 들어, 세포막을 통한 다양한 분자의 전달을 증가시키기 위한 고분자량 라이신 중합체의 사용이 기술되었다). 약물 또는 거대분자가 6개로부터 25개까지의 소단위 (subunits)로 구성되는 전달 중합체 (transport polymer)에 공유적으로 부착되고, 이들 중 적어도 50%는 구아니딘 또는 아미딘 측쇄 (side chain)를 포함하는 약물 또는 거대분자를 생물학적 막을 통과하여 전달하는 소정의 방법 및 조성물이 기재되어 왔다. 바람직하게 운반 중합체는 모두 D-, 모두 L- 또는 D- 와 L-아르기닌의 혼합물로 구성된 폴리아르기닌 펩타이드이다. 또한 피부, 위장관, 호흡 상피 및 혈액-뇌 장벽 (blood-brain barrier)을 포함하는 상피 조직을 관통하는 약물 및 기타 제제의 전달을 위한 소정의 폴리-라이신 및 폴리-아르기닌도 기술되어 있다. 약물의 안구내 전달 (intra-ocular delivery)을 위한 소정의 폴리아르기닌 화합물 및 소정의 폴리-라이신 및 폴리-아르기닌 화합물도 역시 기재되어 왔다. 교차-연결된 양이온성 중합체 성분을 포함하는 소정의 사이클로덱스트린 (cyclodextran) 중합체 조성물 및 소정의 기질 기초한 제형이 기재되었다.

[0010] 생물학적으로 활성인 분자의 세포내 전달의 또 다른 접근법은 리포솜 (liposomes) 또는 기타 입자 형성 조성물과 연루되어 있다. 리포솜은 1965년 처음 기술된 이래로, 약제학적으로 활성인 화합물의 전달을 위한 지질-기

초한 담체 시스템을 개발하는 분야에서 지속적인 관심과 노력을 받아왔다. 리포솜은 생물학적 분자가 그들의 세포 흡수를 개선시키면서도 분해로부터 보호받기 때문에 주목 받는 약물 담체이다. 가장 보편적으로 사용되는 폴리음이온 (polyanions) (예로,)을 전달하는 리포솜 제형 부류의 하나는 양이온성 지질을 포함하는 것이다. 지질 응집체 (aggregates)는 양이온성 지질을 단독으로 또는 기타 지질 및 포스파티딜에탄올아민 (phosphatidylethanolamine)과 같은 양친화성 물질 (amphiphiles)을 포함하는 것을 사용하여 거대분자로 형성 될 수 있다. 지질 제형의 조성물 뿐만 아니라 그의 제조 방법 둘 다가 그 결과 얻은 음이온성 거대분자-양이온성 지질 응집체의 구조 및 크기에 영향을 주는 것은 당해 기술분야에 잘 알려져 있다. 이들 인자는 특이 세포 유형으로 폴리음이온의 *시험관내* 및 *생체내* 전달을 최적화하기 위하여 조절될 수 있다. 생물학적으로 활성인 분자의 세포 전달을 위한 양이온성 지질의 사용은 몇 가지 장점을 가진다. 양이온성 지질을 사용한 음이온성 화합물의 캡슐화 (encapsulation)는 정전기적 상호작용으로 인해 본질적으로 정량적이다. 또한, 양이온성 지질은 음성 전하를 띤 세포막과 상호작용하여 세포막 전달을 개시하는 것으로 사료된다.

[0011] 실험은 플라스미드 DNA가 이중막 지질 소포 (bilayer lipid vesicle) 내에 캡슐화된 단일 플라스미드로 구성된 작은 입자로 캡슐화될 수 있는 것을 보여주었다. 이들 입자는 전형적으로 양이온성 지질의 수준이 낮은 융합성 지질인 디올레오일포스파티딜에탄올아민 (dioleoylphosphatidylethanolamine, DOPE)를 포함하고 폴리(에틸렌 글리콜)(*P*) 코팅의 존재에 의해 수성 배지에서 안정화될 수 있다. 이들 입자는 정맥내 (i.v.) 주입에 이어지는 순환 반감기의 연장을 나타내기 때문에 전신적 적용이 되고, 다양한 조직 및 기관 또는 중앙에서 이러한 부위의 증진된 혈관 투과도로 인해 우선적으로 축적될 수 있으며, 엔도솜 막 (endosomal membranes)의 파괴에 의한 세포내이입의 리포솜 경로를 회피하도록 설계될 수 있다. 이들 특성은 실험적 및 치료적 적용을 위해 생물학적으로 활성인 분자를 다양한 세포 유형에 전달하는 데 유용할 수 있다. 예를 들어, 소간섭 RNA (siRNA), 안티센스, 리보자임, 데코이 (decoys), 삼중복합체 형성 올리고뉴클레오타이드 (triplex forming oligonucleotides), 2-5A 올리고뉴클레오타이드, 또한 *시험관내* 및 *생체내* 앵타머 (aptamers)와 같은 핵산 기법의 효과적인 사용은 이들 화합물의 세포막을 관통한 효율적인 전달로부터 유익을 얻을 수 있다. siRNA, 소정의 양친화성 화합물, 및 소정의 폴리양이온의 조합으로 구성된 소정의 조성물이 기재되었다. 소정의 지질 기초한 제형, 소정의 지질 캡슐화된 간섭 RNA 제형, 및 폴리뉴클레오타이드의 세포 전달을 위한 소정의 폴리양이온성 조성물이 기술되어 왔다. 소간섭 핵산 분자 (siNA) 또한 siNA 분자 및 기타 폴리뉴클레오타이드의 전달을 위한 다양한 기법도 역시 기술되었다.

[0012] 또한, 양이온성 지질 입자가 연루된 최근의 연구는 핵산 (또는 기타 폴리음이온성 화합물) 및 양이온성 지질을 포함하는 두 가지의 구조적으로 서로 다른 복합체의 형성을 보여주었다. 첫 번째 구조는 양이온성 지질 이중막 사이에 샌드위치된 핵산 단일막 [“라멜라 구조 (lamellar structure)”]을 가진 다중라멜라 구조 (multilamellar structure)를 포함한다. 두 번째 구조는 핵산 분자가 육각형 구조의 형성 시 양이온성 지질에 의해 원형화된 이차원적 육각 기둥상 구조 [“역전된 육각형 구조 (inverted hexagonal structure)”]를 포함한다. 저자도 역시 역전된 육각형 구조가 라멜라 구조보다 포유동물 세포를 더 효율적으로 형질전환하는 것을 확인하였다. 더 나아가, 광학 현미경 연구는 라멜라 구조를 포함하는 복합체가 소포 (vesicles)에 융합되지 않고 음이온성 소포에 안정적으로 결합하는 반면, 역전된 육각형 구조를 포함하는 복합체는 불안정하고 융합 시 핵산을 방출하면서 음이온성 소포에 신속히 융합하는 것을 보여주었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 라멜라 상으로부터 역전된 육각형 상 복합체로의 구조적 변환 (transformation)는 역전된 육각형 구조의 채택을 도와주는 적합한 헬퍼 지질을 통합시킴에 의해 또는 헥사놀 (hexanol)과 같은 공-계면활성제 (co-surfactant)를 사용함에 의해 달성된다. 그러나, 이들 변환 조건은 어떤 것도 생물학적 시스템에서의 전달에 적합하지 않다. 또한, 전환된 육각형 복합체는 더 큰 형질전환 효율을 나타내는 한편, 이것은 라멜라 복합체에 비해 매우 약한 혈청 안정성을 가진다. 따라서, 혈청에 안정한 전달 제제를 설계할 필요성이 여전히 남아있다.

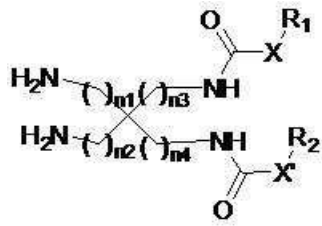
과제의 해결 수단

[0014] 본 발명은 생물학적으로 활성인 분자의 전신적 및 국소적 전달의 효율을 개선시키는 화합물, 조성물 및 방법을 제공한다. 이들 중에서, 본 발명은 순환 시 안정하고, 생물학적으로 활성인 분자의 전달 효율을 증가시키는 적절한 생리학적 조건 (예로, pH) 하에서 구조적 변화를 겪는 전달 제제 (delivery agents)를 제조하고 사용하기

위한 화합물, 조성물 및 방법을 제공한다.

[0015] 넓은 관점에서, 본 발명은 하기에 나타난 화학식 I-VI의 화합물을 포괄한다.

[0016] 따라서, 본 발명의 한 가지 관점은 화학식 I의 화합물을 제공하고,



[0017]

[0018] I

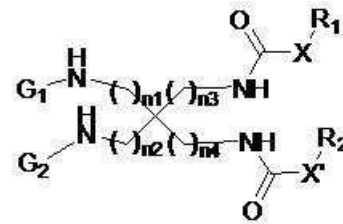
[0019] 여기에서

[0020] n1, n2, n3, 및 n4는 독립적으로 1, 2, 3, 또는 4이고;

[0021] X 및 X' 는 독립적으로 결합, 산소, 또는 질소이고;

[0022] R1 및 R2는 독립적으로 1-4개의 이중 또는 삼중 결합을 임의적으로 포함하는 C8-C25 탄화수소 기이고; 또한

[0023] G1 및 G2는 독립적으로 수소 또는 중합체 모이어티이다.



[0024] 본 발명의 두 번째 관점은 화학식 II의 화합물을 제공하고,

[0025] II

[0026] 여기에서

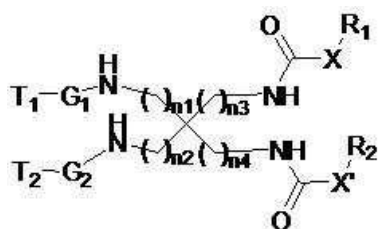
[0027] n1, n2, n3, 및 n4는 독립적으로 1, 2, 3, 또는 4이고;

[0028] X 및 X' 는 독립적으로 결합, 산소, 또는 질소이고;

[0029] R1 및 R2는 독립적으로 1-4개의 이중 또는 삼중 결합을 임의적으로 포함하는 C8-C25 탄화수소 기이고; 또한

[0030] G1 및 G2는 독립적으로 수소 또는 중합체 모이어티이다.

[0031] 본 발명의 세 번째 관점은 화학식 III의 화합물을 제공하고,



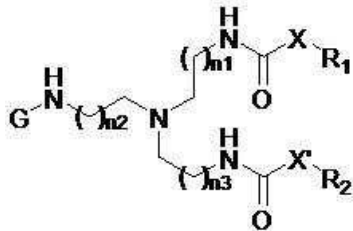
[0032]

[0033] III

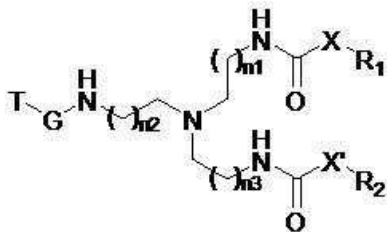
[0034] 여기에서

[0035] n1, n2, n3 및 n4는 독립적으로 1, 2, 3, 또는 4이고;

- [0036] X 및 X' 는 독립적으로 결합, 산소, 또는 질소이고;
- [0037] R₁ 및 R₂는 독립적으로 1-4개의 이중 또는 삼중 결합을 임의적으로 포함하는 C₈-C₂₅ 탄화수소 기이고;
- [0038] T₁ 및 T₂는 독립적으로 수소 또는 표적 리간드이고; 또한
- [0039] G₁ 및 G₂는 독립적으로 결합 또는 중합체 모이어티이고, 여기에서 T₁ 및 T₂의 적어도 하나는 표적 리간드이다.
- [0040] 본 발명의 네 번째 관점은 화학식 IV의 화합물을 제공하고,

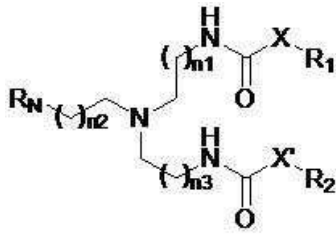


- [0041]
- [0042] IV
- [0043] 여기에서
- [0044] n1, n2, 및 n3은 독립적으로 1, 2, 3, 또는 4이고;
- [0045] X 및 X' 는 독립적으로 결합, 산소, 또는 질소이고;
- [0046] R₁ 및 R₂는 독립적으로 1-4개의 이중 또는 삼중 결합을 임의적으로 포함하는 C₈-C₂₅ 탄화수소 기이고; 또한
- [0047] G는 수소 또는 중합체 모이어티이다.
- [0048] 본 발명의 다섯 번째 관점은 화학식 V의 화합물을 제공하고,



- [0049]
- [0050] V
- [0051] 여기에서
- [0052] n1, n2, 및 n3은 독립적으로 1, 2, 3, 또는 4이고;
- [0053] X 및 X' 는 독립적으로 결합, 산소, 또는 질소이고;
- [0054] R₁ 및 R₂는 독립적으로 1-4개의 이중 또는 삼중 결합을 임의적으로 포함하는 C₈-C₂₅ 탄화수소 기이고;
- [0055] T는 표적 리간드이고; 또한
- [0056] G는 결합 또는 중합체 모이어티이다.

[0057] 또 다른 관점에서, 본 발명은 화학식 VI의 화합물을 제공하고,



[0058]

[0059] VI

[0060] 여기에서

[0061] n1, n2, 및 n3 는 독립적으로 1, 2, 3, 또는 4이고;

[0062] X 및 X' 는 독립적으로 결합, 산소, 또는 질소이고;

[0063] R₁ 및 R₂은 독립적으로 1-4개의 이중 또는 삼중 결합을 임의적으로 포함하는 C₈-C₂₅ 탄화수소 기이고; 또한

[0064] R_N 는 NHR₄, NR₄R₅, 또는 N⁺R₄R₅R₆를 나타내고; 여기에서

[0065] R₄, R₅, 및 R₆는 독립적으로 C₁-C₆ 알킬 그룹을 나타낸다.

[0066] 본 발명은 또한 화학식 I-VI의 화합물을 제조하는 데 유용한 합성 중간물을 제공한다.

[0067] 본 발명의 한 가지 관점은 화학식 I-VI이라면 모두의 화합물을 포함하는 제형을 제공한다. 본 발명의 제형은 화학식 I-VI의 화합물에 의해 형성되는 리포복합체 (lipoplexes) 또는 리포솜 (liposomes)을 포함한다.

[0068] 본 발명의 한 가지 관점은 화학식 I-VI이라면 모두의 화합물 및 생물학적으로 활성을 가질 수 있는 또 다른 분자를 포함하는 제형을 제공한다. 생물학적으로 활성인 분자는 (a) 리보솜 RNA; RNA 또는 DNA의 안티센스 폴리뉴클레오타이드; 리보자임(ribozymes); siRNA; shRNA; miRNA; 및 치료적으로 유용한 단백질을 인코딩하는 게놈 DNA, cDNA, 또는 mRNA의 폴리뉴클레오타이드로 이루어진 그룹으로부터 선택되거나; (b) 단백질, 펩타이드, 콜레스테롤, 호르몬, 항바이러스제 (antivirals) 또는 화학치료제 (chemotherapeutics)와 같은 소분자 (small molecules), 비타민, 및 보조인자 (co-factors)일 수 있다.

[0069] 관련된 관점에서, 본 발명은 화학식 I-VI이라면 모두의 화합물 및 앵타머 (aptamer)를 포함하는 제형을 제공한다. 이들 제형에서, 앵타머는 화합물에 공유적으로 결합하지 않는다. 따라서, 상기 화합물은 표적 리간드 (targeting ligand), T를 포함하고, 그 결과 나온 제형은 공유적으로 결합된 표적 리간드 및 공유적으로 결합되지 않은 앵타머를 포함할 수 있다. 이들 제형에서, 앵타머 및 표적 리간드는 동일하거나 서로 다를 수 있다.

[0070] 본 발명의 또 다른 관점은 화학식 I-VI이라면 모두의 화합물에 의해 형성되는 입자 및 또 다른 분자를 포함하는 제형을 제공하고, 상기 분자는 생물학적으로 활성인 분자일 수 있다. 본 관점에서, 본 발명은 예로 하나 이상의 siRNA 분자를 캡슐화하는 데 유용한 안정한 입자를 제공한다.

[0071] 본 발명의 한 가지 관점은 세포를 본 발명의 제형과 접촉시키는 것을 포함하는, 세포 내로 siRNA를 도입하는 방법을 제공한다.

[0072] 본 발명의 한 가지 관점은 포유동물 개체에 본 발명의 제형의 치료적 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 표적 서열의 발현을 조절하는 방법을 제공한다.

[0073] 본 발명의 또 다른 관점은 포유동물 개체에 본 발명의 제형의 치료적 유효량을 투여하는 것을 포함하는, siRNA의 생체내 전달 방법을 제공한다.

[0074] 본 발명의 또 다른 관점은 포유동물 개체에 본 발명의 제형의 치료적 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 플라스미드 DNA의 생체내 전달 방법을 제공한다.

[0075] 본 발명의 보다 또 다른 관점은 포유동물 개체에 본 발명의 제형의 치료적 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 상기 개체에서 질환을 치료하거나 예방하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

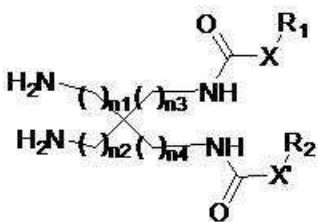
- [0076] 놀랍게도 본 발명의 화합물, 예를 들어 디올레오일 모노아민을 사용하여 만들어진 제형 및 전달 시스템은 전사체 특이 녹다운 (transcript specific knockdown)에 대해 효능을 가지면서도 비교적 비-독성이라는 점이 발견되었다.
- [0077] 또한 놀랍게도 본 발명의 제형 및 전달 시스템의 사용이 폐 조직에 의한 바람직한 흡수를 유발하고, 또한 간과 같은 다른 조직에 비해 폐에서 바람직한 전사체 녹다운을 유도하는 점도 발견되었다.

도면의 간단한 설명

- [0078] 도 1은 마우스 편평세포 암종 (SCCVII) 세포를 사용한 시험관내 형질전환 이후에 세포 배양배지에서 VEGF의 단백질 발현 수준을 보여주는 그래프이다. 세포는 디올레오일 모노아민으로 제형화된 siRNA로 형질전환시켰다.
- 도 2는 마우스 편평세포 암종 (SCCVII) 세포를 사용한 시험관내 형질전환 이후에 세포 배양배지에서 VEGF의 단백질 발현 수준을 보여주는 그래프이다. 세포는 메틸-디올레오일 모노아민으로 제형화된 siRNA로 형질전환시켰다.
- 도 3은 디올레오일 모노아민으로 제형화된 siRNA의 단일 정맥내 주입 이후에 마우스 폐 및 간에서 siRNA 특이 전사체 녹다운 (카베올린-1)을 보여주는 그래프이다.
- 도 4A 및 도 4B는 디올레오일 모노아민으로 제형화된 VEGF siRNA의 IT 주입 (도 4A) 이후에 SCCVII 종양에서 nVEGF 전사체 수준 또한 제형화된 VEGF siRNA의 종양내 투여 이후 종양 성장의 저해 (도 4B)를 보여주는 그래프이다.
- 도 5A 및 도 5B는 마우스 편평세포 암종 (SCCVII) 세포를 사용한 시험관내 형질전환 이후에 세포 배양배지에서 카베올린-1 (Cav-1) 의 상대적 전사체 수준을 보여주는 그래프이다. 세포는 siRNA 및 디올레오일 모노아민 /mPEG-디올레오일 모노아민 복합체 (도 5A)로 또는 디올레오일 모노아민/mPEG-디올레오일 모노아민으로 캡슐화된 siRNA로 형질전환시켰다 (도 5B).
- 도 6은 디올레오일 모노아민/mPEG-디올레오일 모노아민과 복합화된 siRNA의 단일 정맥내 주입 이후에 마우스 폐에서 용량 의존적 (10ug-100ug)인 siRNA 특이 전사체 녹다운을 보여준다.
- 도 7은 HepG2 세포를 사용한 시험관내 형질전환 이후에 세포 배양 배지에서 β-액틴의 단백질 발현 수준을 보여준다. 세포는 디올레오일 모노아민/락토바이오닐-디올레오일 모노아민으로 제형화된 siRNA로 형질전환시켰다.
- 도 8은 EDTA 존재 시 및 부재 시 알기네이트 젤 (alginate gels)로부터 디올레오일 모노아민으로 복합화된 Cav-1 siRNA의 조절된-방출을 보여준다.
- 도 9는 디올레오일 모노아민 및 mPEG-디올레오일 모노아민, 또는 DOTAP:DOPE (1:1), 또는 BPEI으로 복합화된 siRNA의 단일 정맥내 주입 이후에 마우스 폐 및 간에서 siRNA 특이 전사체 녹다운 (Cav-1)을 보여준다.
- 도 10은 디올레오일 크로스아민 (dioleoyl crossamine)/전립선 특이 막 항원 (PSMA) 표적 앵타머로 캡슐화된 (encapsulated) siRNA의 형질전환 활성을 보여준다.

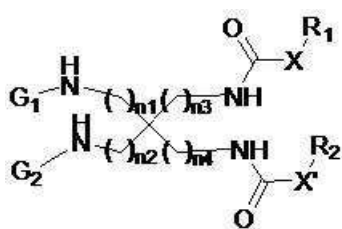
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0079] 발명의 한 가지 관점은 화학식 I의 화합물,



- [0080]
- [0081] I
- [0082] 및 그의 약제학적으로 허용가능한 염을 제공하고,

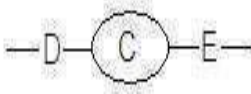
- [0083] 여기에서
- [0084] $n_1, n_2, n_3,$ 및 n_4 는 독립적으로 1, 2, 3, 또는 4이고;
- [0085] X 및 X' 는 독립적으로 결합 (bond), 산소, 또는 질소이고; 또한
- [0086] R_1 및 R_2 는 독립적으로 1-4개의 이중 또는 삼중 결합을 임의적으로 포함하는 C_8-C_{25} 탄화수소 기이다.
- [0087] 한 가지 구현예에서, 본 발명은 $n_1, n_2, n_3,$ 및 n_4 가 모두 1이고, X 및 X' 는 결합인 화학식 I의 화합물을 제공한다.
- [0088] 한 가지 구현예에서, 본 발명은 R_1 및 R_2 의 적어도 하나가 1-4개의 이중 결합을 포함하는 C_8-C_{25} 탄화수소 기인 화학식 I의 화합물을 제공한다.
- [0089] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 R_1 및 R_2 둘 다가 1-4개의 이중 결합을 포함하는 C_8-C_{25} 탄화수소 기인 화학식 I의 화합물을 제공한다.
- [0090] 보다 또 다른 구현예에서, 본 발명은 R_1 및 R_2 가 독립적으로 1 또는 2개의 이중 결합을 포함하는 C_8-C_{25} 탄화수소 기인 화학식 I의 화합물을 제공한다.
- [0091] 한 가지 구현예에서, 본 발명은 R_1 및 R_2 는 독립적으로 1 개의 이중 결합을 포함하는 C_8-C_{25} 탄화수소 기인 화학식 I의 화합물을 제공한다.
- [0092] 한 가지 구현예에서, 본 발명은 R_1 및 R_2 는 독립적으로 1 또는 2개의 이중 결합을 포함하는 $C_{14}-C_{20}$ 탄화수소 기인 화학식 I의 화합물을 제공한다.
- [0093] 보다 또 다른 구현예에서, 본 발명은 R_1 및 R_2 는 독립적으로 1 개의 이중 결합을 포함하는 $C_{14}-C_{20}$ 탄화수소 기인 화학식 I의 화합물을 제공한다.
- [0094] 한 가지 구현예에서, 본 발명은 $C(O)X-R_1$ 및 $C(O)X'-R_2$ 둘 다는 올레오일 그룹을 나타내는 화학식 I의 화합물을 제공한다.
- [0095] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 $n_1, n_2, n_3,$ 및 n_4 는 동일하고 1 또는 2이며; X 및 X' 는 결합이고; 또한 R_1 및 R_2 의 적어도 하나는 1-4개의 이중 결합을 포함하는 C_8-C_{25} 탄화수소 기인 화학식 I의 화합물을 제공한다.
- [0096] 보다 또 다른 구현예에서, 본 발명은 $n_1, n_2, n_3,$ 및 n_4 는 동일하고 1 또는 2이며; X 및 X' 는 결합이고; 또한 R_1 및 R_2 는 동일하고 1-4개의 이중 결합을 포함하는 C_8-C_{25} 탄화수소 기를 나타내는 화학식 I의 화합물을 제공한다.
- [0097] 보다 또 다른 구현예에서, 본 발명은 $n_1, n_2, n_3,$ 및 n_4 는 동일하고 1 또는 2이며; X 및 X' 는 결합이고; 또한 R_1 및 R_2 는 동일하고 1-2개, 바람직하게는 1개의 이중 결합을 포함하는 C_8-C_{25} 탄화수소 기를 나타내는 화학식 I의 화합물을 제공한다.
- [0098] 보다 또 다른 구현예에서, 본 발명은 $n_1, n_2, n_3,$ 및 n_4 는 1이며; X 및 X' 는 결합이고; 또한 R_1 및 R_2 는 동일하고 1-2개, 바람직하게는 1개의 이중 결합을 포함하는 $C_{14}-C_{20}$ 탄화수소 기를 나타내는 화학식 I의 화합물을 제공한다.
- [0099] 본 발명의 또 다른 관점은 화학식 II의 화합물을 제공하고,




- [0100]
- [0101] II

- [0102] 여기에서
- [0103] n1, n2, n3, 및 n4는 독립적으로 1, 2, 3, 또는 4이고;
- [0104] X 및 X' 는 독립적으로 결합, 산소, 또는 질소이고;
- [0105] R₁ 및 R₂는 독립적으로 1-4개의 이중 또는 삼중 결합을 임의적으로 포함하는 C₈-C₂₅ 탄화수소 기이고; 또한
- [0106] G₁ 및 G₂는 독립적으로 수소 또는 중합체 모이어티이다.
- [0107] 한 가지 구현예에서, 본 발명은 n1, n2, n3, 및 n4가 모두 1이고, X 및 X' 는 결합인 화학식 II의 화합물을 제공한다.
- [0108] 한 가지 구현예에서, 본 발명은 R₁ 및 R₂의 적어도 하나가 1-4개의 이중 결합을 포함하는 C₈-C₂₅ 탄화수소 기인 화학식 II의 화합물을 제공한다.
- [0109] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 R₁ 및 R₂ 둘 다가 1-4개의 이중 결합을 포함하는 C₈-C₂₅ 탄화수소 기인 화학식 II의 화합물을 제공한다.
- [0110] 보다 또 다른 구현예에서, 본 발명은 R₁ 및 R₂가 독립적으로 1 또는 2개의 이중 결합을 포함하는 C₈-C₂₅ 탄화수소 기인 화학식 II의 화합물을 제공한다.
- [0111] 보다 또 다른 구현예에서, 본 발명은 R₁ 및 R₂는 독립적으로 1 개의 이중 결합을 포함하는 C₈-C₂₅ 탄화수소 기인 화학식 II의 화합물을 제공한다.
- [0112] 한 가지 구현예에서, 본 발명은 R₁ 및 R₂는 독립적으로 1 또는 2개의 이중 결합을 포함하는 C₁₄-C₂₀ 탄화수소 기인 화학식 II의 화합물을 제공한다.
- [0113] 보다 또 다른 구현예에서, 본 발명은 R₁ 및 R₂는 독립적으로 1 개의 이중 결합을 포함하는 C₁₄-C₂₀ 탄화수소 기인 화학식 II의 화합물을 제공한다.
- [0114] 한 가지 구현예에서, 본 발명은 C(O)X-R₁ 및 C(O)X' -R₂ 둘 다는 올레오일 그룹을 나타내는 화학식 II의 화합물을 제공한다.
- [0115] 한 가지 구현예에서, 본 발명은 G₁ 및 G₂중의 하나가 중합체 모이어티이고 다른 하나는 수소인 화학식 II의 화합물을 제공한다.
- [0116] 한 가지 구현예에서, 본 발명은 G₁ 및 G₂ 중의 하나가 폴리옥시알킬렌, 폴리비닐피롤리돈, 폴리아크릴아마이드, 폴리디메틸아크릴아마이드, 폴리비닐 알코올, 텍스트란, 폴리(L-글루탐산), 스티렌 말레산 무수물 (styrene maleic anhydride), 폴리-N-(2-하이드록시프로필)메타크릴아마이드, 또는 폴리디비닐에테르 말레산 무수물인 화학식 II의 화합물을 제공한다.
- [0117] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 중합체가 중합체 단위들 사이에 적어도 하나의 링커 기 (linker group)를 포함하는 화학식 II의 화합물을 제공한다.
- [0118] 보다 또 다른 구현예에서, 본 발명은 중합체 모이어티가 폴리옥시알킬렌인 화학식 II의 화합물을 제공한다.
- [0119] 보다 또 다른 구현예에서, 본 발명은 중합체의 분자량이 약200-10,000 Da부터인 화학식 II의 화합물을 제공한다. 바람직한 중합체는 약 1,000-5,000 Da 범위로 분포하는 분자량을 가진다.
- [0120] 한 가지 구현예에서, 본 발명은 중합체 모이어티가 -C(O)-, -O-, -O-C(O)O-, -C(O)CH₂CH₂C(O)-, -S-S-, -NR³-, -NR³C(O)O-, -OC(O)NR³-, -NR³C(O)-, -C(O)NR³-, -NR³C(O)NR³-, -알킬렌-NR³C(O)O-, -알킬렌-NR³C(O)NR³-, -알킬렌-OC(O)NR³-, -알킬렌-NR³-, -알킬렌-O-, -알킬렌-NR³C(O)-, -알킬렌-C(O)NR³-, -NR³C(O)O-알킬렌-, -NR³C(O)NR³-알킬렌-, -OC(O)NR³-알킬렌-, -NR³-알킬렌-, -O-알킬렌-, -NR³C(O)-알킬렌-, -C(O)NR³-알킬렌-, -알킬렌-NR³C(O)O-알킬렌-, -알킬렌-NR³C(O)NR³-알킬렌-, -알킬렌-OC(O)NR³-알킬렌-, -알킬렌-NR³-알킬렌-, -알킬렌-O-알킬렌-, -알킬렌-NR³C(O)-알킬렌-, -C(O)NR³-알킬렌-, -NR³C(O)O-알킬렌옥시-, -NR³C(O)NR³-알킬렌옥시-,

-OC(O)NR³-알킬렌옥시-, -NR³-알킬렌옥시-, -O-알킬렌옥시-, -NR³C(O)-알킬렌옥시-, -C(O)NR³-알킬렌옥시-, -알킬렌옥시-NR³C(O)-알킬렌옥시- 및



[0121] 로부터 선택된 적어도 하나의 링커 기를 포함하고,

[0122] 여기에서 R³ 은 수소, 또는 임의적으로 치환된 알킬이고,  는 아릴, 치환된 아릴, 사이클로알킬, 치환된 사이클로알킬, 헤테로아릴, 치환된 헤테로아릴, 헤테로사이클릭 및 치환된 헤테로사이클릭으로 이루어진 그룹으로부터 선택되며, 또한 D 및 E는 독립적으로 결합, -O-, CO, -NR³-, -NR³C(O)-, -OC(O)NR³-, -NR³C(O)-, -C(O)NR³-, -NR³C(O)NR³-, -알킬렌-NR³C(O)-, -알킬렌-NR³C(O)NR³-, -알킬렌-OC(O)NR³-, -알킬렌-NR³-, -알킬렌-O-, -알킬렌-NR³C(O)-, -알킬렌-C(O)NR³-, -NR³C(O)-알킬렌-, -NR³C(O)NR³-알킬렌-, -OC(O)NR³-알킬렌-, -NR³-알킬렌-, -O-알킬렌-, -NR³C(O)-알킬렌-, -NR³C(O)-알킬렌옥시-, -NR³C(O)NR³-알킬렌옥시-, -OC(O)NR³-알킬렌옥시-, -NR³-알킬렌옥시-, -O-알킬렌옥시-, -NR³C(O)-알킬렌옥시-, -C(O)NR³-알킬렌옥시-, -알킬렌옥시-NR³C(O)-알킬렌옥시-, -C(O)NR³-알킬렌-, -알킬렌-NR³C(O)-알킬렌-, -알킬렌-NR³C(O)NR³-알킬렌-, -알킬렌-OC(O)NR³-알킬렌-, -알킬렌-NR³-알킬렌-, -알킬렌-O-알킬렌-, -알킬렌-NR³C(O)-알킬렌-, 및 -C(O)NR³-알킬렌-으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, 여기에서 R³ 는 상기에서 정의된 바와 같은 화학식 II의 화합물을 제공한다.

[0123] 한 가지 구현예에서, 본 발명은 중합체가 옥시알킬렌 그룹이 독립적으로 그들의 반복 단위에서 2-5개의 탄소 원자를 가지는 직쇄 또는 분지쇄 폴리옥시알킬렌 그룹인 폴리옥시에틸렌인 화학식 II의 화합물을 제공한다.

[0124] 한 가지 구현예에서, 본 발명은 폴리옥시알킬렌이 폴리옥시에틸렌, 직쇄 또는 분지쇄 폴리옥시프로필렌, 또는 직쇄 또는 분지쇄 폴리옥시부틸렌인 화학식 II의 화합물을 제공한다.

[0125] 한 가지 구현예에서, 본 발명은 폴리옥시알킬렌이 폴리옥시에틸렌인 화학식 II의 화합물을 제공한다.

[0126] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 n₁, n₂, n₃, 및 n₄가 모두 동일하고 1 또는 2이며; X 및 X' 는 둘 다 결합이고; R₁ 및 R₂의 적어도 하나는 1-4개의 이중 결합을 포함하는 C₈-C₂₅ 탄화수소 기인 화학식 II의 화합물을 제공한다.

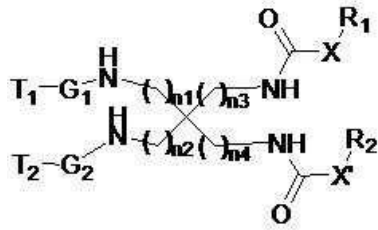
[0127] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 n₁, n₂, n₃, 및 n₄가 모두 동일하고 1 또는 2이며; X 및 X' 는 둘 다 결합이고; 또한 R₁ 및 R₂는 일치하고 1-4개의 이중 결합을 포함하는 C₈-C₂₅ 탄화수소 기를 나타내는 화학식 II의 화합물을 제공한다.

[0128] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 n₁, n₂, n₃, 및 n₄가 모두 동일하고 1이며; X 및 X' 는 둘 다 결합이고; 또한 R₁ 및 R₂는 일치하고 1-4개의 이중 결합을 포함하는 C₈-C₂₅ 탄화수소 기를 나타내는 화학식 II의 화합물을 제공한다.

[0129] 보다 또 다른 구현예에서, 본 발명은 n₁, n₂, n₃, 및 n₄가 모두 동일하고 1 이며; X 및 X' 는 둘 다 결합이고; 또한 R₁ 및 R₂는 일치하고 1-4개의 이중 결합을 포함하는 C₁₄-C₂₀ 탄화수소 기를 나타내는 화학식 II의 화합물을 제공한다.

[0130] 보다 또 다른 구현예에서, 본 발명은 n₁, n₂, n₃, 및 n₄가 모두 동일하고 1 이며; X 및 X' 는 둘 다 결합이고; 또한 R₁ 및 R₂는 일치하고 1 또는 2개의 이중 결합을 포함하는 C₁₄-C₂₀ 탄화수소 기를 나타내는 화학식 II의 화합물을 제공한다.

[0131] 본 발명의 또 다른 과점은 화학식 III의 화합물을 제공하고,



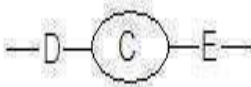
- [0132]
- [0133] III
- [0134] 여기에서
- [0135] n1, n2, n3, 및 n4는 독립적으로 1, 2, 3, 또는 4이고;
- [0136] X 및 X' 는 독립적으로 결합, 산소, 또는 질소이고;
- [0137] R1 및 R2는 독립적으로 1-4개의 이중 또는 삼중 결합을 임의적으로 포함하는 C₈-C₂₅ 탄화수소 기이고;
- [0138] T1 및 T2는 독립적으로 수소 또는 표적 리간드이고; 또한
- [0139] G1 및 G2는 독립적으로 결합 또는 중합체 모이어티이고,
- [0140] 여기에서 적어도 하나의 T1 및 T2는 표적 리간드이다.
- [0141] 한 가지 구현예에서, 본 발명은 n1, n2, n3, 및 n4가 모두 1이고, X 및 X' 둘 다는 결합인 화학식 III의 화합물을 제공한다.
- [0142] 한 가지 구현예에서, 본 발명은 R1 및 R2의 적어도 하나가 1-4개의 이중 결합을 포함하는 C₈-C₂₅ 탄화수소 기인 화학식 III의 화합물을 제공한다.
- [0143] 한 가지 구현예에서, 본 발명은 R1 및 R2둘 다 1-4개의 이중 결합을 포함하는 C₈-C₂₅ 탄화수소 기인 화학식 III의 화합물을 제공한다.
- [0144] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 R1 및 R2가 독립적으로 1 또는 2개의 이중 결합을 포함하는 C₈-C₂₅ 탄화수소 기인 화학식 III의 화합물을 제공한다.
- [0145] 보다 또 다른 구현예에서, 본 발명은 R1 및 R2가 독립적으로 1 개의 이중 결합을 포함하는 C₈-C₂₅ 탄화수소 기인 화학식 III의 화합물을 제공한다.
- [0146] 보다 또 다른 구현예에서, 본 발명은 R1 및 R2가 독립적으로 1 또는 2개의 이중 결합을 포함하는 C₁₄-C₂₀ 탄화수소 기인 화학식 III의 화합물을 제공한다.
- [0147] 한 가지 구현예에서, 본 발명은 R1 및 R2가 독립적으로 1 개의 이중 결합을 포함하는 C₁₄-C₂₀ 탄화수소 기인 화학식 III의 화합물을 제공한다.
- [0148] 한 가지 구현예에서, 본 발명은 C(O)X-R1 및 C(O)X' -R2 둘 다가 올레오일 그룹을 나타내는 화학식 III의 화합물을 제공한다.
- [0149] 한 가지 구현예에서, 본 발명은 G1 및 G2중의 하나가 중합체 모이어티이고 다른 하나는 수소인 화학식 III의 화합물을 제공한다.
- [0150] 보다 또 다른 구현예에서, 본 발명은 G1 및 G2 중의 하나가 폴리옥시알킬렌, 폴리비닐피롤리돈, 폴리아크릴아마이드, 폴리디메틸아크릴아마이드, 폴리비닐 알코올, 텍스트란, 폴리(L-글루탐산), 스티렌 말레산 무수물, 폴리-N-(2-하이드록시프로필)메타크릴아마이드, 또는 폴리디비닐에테르 말레산 무수물인 화학식 III의 화합물을 제공한다.
- [0151] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 중합체가 중합체 단위들 사이에 적어도 하나의 링커 기를 포함하는 화학식 III

의 화합물을 제공한다.


[0152] 보다 또 다른 구현예에서, 본 발명은 중합체 모이어티가 폴리옥시알킬렌인 화학식 III의 화합물을 제공한다.

[0153] 한 가지 구현예에서, 본 발명은 중합체의 분자량이 약200-10,000 Da부터인 화학식 III의 화합물을 제공한다. 바람직한 중합체는 약 1,000-5,000 Da 로부터 분포하는 분자량을 가진다.

[0154] 한 가지 구현예에서, 본 발명은 중합체 모이어티가 -C(O)-, -O-, -O-C(O)O-, -C(O)CH₂CH₂C(O)-, -S-S-, -NR³-, -NR³C(O)O-, -OC(O)NR³-, -NR³C(O)-, -C(O)NR³-, -NR³C(O)NR³-, -알킬렌-NR³C(O)O-, -알킬렌-NR³C(O)NR³-, -알킬렌-OC(O)NR³-, -알킬렌-NR³-, -알킬렌-O-, -알킬렌-NR³C(O)-, -알킬렌-C(O)NR³-, -NR³C(O)O-알킬렌-, -NR³C(O)NR³-알킬렌-, -OC(O)NR³-알킬렌-, -NR³-알킬렌-, -O-알킬렌-, -NR³C(O)-알킬렌-, -C(O)NR³-알킬렌-, -알킬렌-NR³C(O)O-알킬렌-, -알킬렌-NR³C(O)NR³-알킬렌-, -알킬렌-OC(O)NR³-알킬렌-, -알킬렌-NR³-알킬렌-, -알킬렌-O-알킬렌-, -알킬렌-NR³C(O)-알킬렌-, -C(O)NR³-알킬렌-, -NR³C(O)O-알킬렌옥시-, -NR³C(O)NR³-알킬렌옥시-, -OC(O)NR³-알킬렌옥시-, -NR³-알킬렌옥시-, -O-알킬렌옥시-, -NR³C(O)-알킬렌옥시-, -C(O)NR³-알킬렌옥시-, -알킬렌옥시-NR³C(O)O-알킬렌옥시- 및



[0155] 로부터 선택된 적어도 하나의 링커 기를 포함하고,

[0156] 여기에서 R³ 은 수소, 또는 임의적으로 치환된 알킬이고,  는 아릴, 치환된 아릴, 사이클로알킬, 치환된 사이클로알킬, 헤테로아릴, 치환된 헤테로아릴, 헤테로사이클릭 및 치환된 헤테로사이클릭으로 이루어진 그룹으로부터 선택되며, 또한 D 및 E는 독립적으로 결합, -O-, CO, -NR³-, -NR³C(O)O-, -OC(O)NR³-, -NR³C(O)-, -C(O)NR³-, -NR³C(O)NR³-, -알킬렌-NR³C(O)O-, -알킬렌-NR³C(O)NR³-, -알킬렌-OC(O)NR³-, -알킬렌-NR³-, -알킬렌-O-, -알킬렌-NR³C(O)-, -알킬렌-C(O)NR³-, -NR³C(O)O-알킬렌-, -NR³C(O)NR³-알킬렌-, -OC(O)NR³-알킬렌-, -NR³-알킬렌-, -O-알킬렌-, -NR³C(O)-알킬렌-, -NR³C(O)O-알킬렌옥시-, -NR³C(O)NR³-알킬렌옥시-, -OC(O)NR³-알킬렌옥시-, -NR³-알킬렌옥시-, -O-알킬렌옥시-, -NR³C(O)-알킬렌옥시-, -C(O)NR³-알킬렌옥시-, -알킬렌옥시-NR³C(O)O-알킬렌옥시-, -C(O)NR³-알킬렌-, -알킬렌-NR³C(O)O-알킬렌-, -알킬렌-NR³C(O)NR³-알킬렌-, -알킬렌-OC(O)NR³-알킬렌-, -알킬렌-NR³-알킬렌-, -알킬렌-O-알킬렌-, -알킬렌-NR³C(O)-알킬렌-, 및 -C(O)NR³-알킬렌-으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, 여기에서 R³ 는 상기에서 정의된 바와 같은 정의된 바와 같은 화학식 III의 화합물을 제공한다.

[0157] 한 가지 구현예에서, 본 발명은 중합체가 옥시알킬렌 그룹이 독립적으로 그들의 반복 단위에서 2-5개의 탄소 원자를 가지는 직쇄 또는 분지쇄 폴리옥시알킬렌 그룹인 폴리옥시에틸렌인 화학식 III의 화합물을 제공한다.

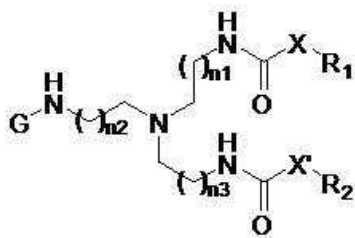
[0158] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 폴리옥시알킬렌이 폴리옥시에틸렌, 직쇄 또는 분지쇄 폴리옥시프로필렌, 또는 직쇄 또는 분지쇄 폴리옥시부틸렌인 화학식 III의 화합물을 제공한다.

[0159] 한 가지 구현예에서, 본 발명은 폴리옥시알킬렌이 폴리옥시에틸렌이고, 표적 리간드 (targeting ligand)는 약제학적으로 활성인 소분자 (small molecule), 엔도솜 분해제 (endosomolytic agent), 융합성 펩타이드 (fusogenic peptide), 세포막 투과제 (cell membrane permeating agent), 전하 차단제 (charge masking agent), 핵산 또는 세포 수용체 리간드인 화학식 III의 화합물을 제공한다.

[0160] 한 가지 구현예에서, 본 발명은 표적 리간드가 항-증식 활성을 가지는 약제학적으로 활성인 소분자인 화학식 III의 화합물을 제공한다.

[0161] 한 가지 구현예에서, 본 발명은 폴리옥시알킬렌이 폴리옥시에틸렌이고, 표적 리간드는 항-증식 활성을 가지는 약제학적으로 활성인 소분자인 화학식 III의 화합물을 제공한다.

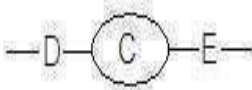
- [0162] 한 가지 구현예에서, 본 발명은 표적 리간드가 염산 그룹인 화학식 III의 화합물을 제공한다.
- [0163] 한 가지 구현예에서, 본 발명은 폴리옥시알킬렌이 폴리옥시에틸렌이고, 표적 리간드는 염산인 화학식 III의 화합물을 제공한다.
- [0164] 한 가지 구현예에서, 본 발명은 표적 리간드가 융합성 펩타이드인 화학식 III의 화합물을 제공한다.
- [0165] 한 가지 구현예에서, 본 발명은 폴리옥시알킬렌이 폴리옥시에틸렌이고, 표적 리간드는 융합성 펩타이드인 화학식 III의 화합물을 제공한다.
- [0166] 한 가지 구현예에서, 본 발명은 표적 리간드가 바이오틴 (biotin), 갈락토스, 아세틸살리실산 (acetylsalicylic acid), 나프록센 (naproxen), 및 세포 수용체 리간드로부터 선택되는 화학식 III의 화합물을 제공한다.
- [0167] 한 가지 구현예에서, 본 발명은 폴리옥시알킬렌이 폴리옥시에틸렌이고, 표적 리간드는 바이오틴, 갈락토스, 아세틸살리실산, 나프록센, 및 세포 수용체 리간드로부터 선택되는 화학식 III의 화합물을 제공한다.
- [0168] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 n1, n2, n3, 및 n4가 동일하고 1 또는 2이며; X 및 X' 는 둘 다 결합이고; 또한 R1 및 R2의 적어도 하나는 1-4개의 이중 결합을 포함하는 C8-C25 탄화수소 기인 화학식 III의 화합물을 제공한다.
- [0169] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 n1, n2, n3, 및 n4가 동일하고 1 또는 2이며; X 및 X' 는 둘 다 결합이고; 또한 R1 및 R2는 동일하고 1-4개의 이중 결합을 포함하는 C8-C25 탄화수소 기를 나타내는 화학식 III의 화합물을 제공한다.
- [0170] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 n1, n2, n3, 및 n4가 1 이며; X 및 X' 는 둘 다 결합이고; 또한 R1 및 R2는 동일하고 1-4개의 이중 결합을 포함하는 C8-C25 탄화수소 기를 나타내는 화학식 III의 화합물을 제공한다.
- [0171] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 n1, n2, n3, 및 n4가 1 이며; X 및 X' 는 둘 다 결합이고; 또한 R1 및 R2는 동일하고 1 또는 2개의 이중 결합을 포함하는 C8-C25 탄화수소 기를 나타내는 화학식 III의 화합물을 제공한다.
- [0172] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 n1, n2, n3, 및 n4가 1 이며; X 및 X' 는 둘 다 결합이고; 또한 R1 및 R2는 동일하고 1개의 이중 결합을 포함하는 C14-C20 탄화수소 기를 나타내는 화학식 III의 화합물을 제공한다.
- [0173] 본 발명의 한 가지 관점은 화학식 IV의 화합물,




- [0174]
- [0175] IV
- [0176] 및 그의 약제학적으로 허용가능한 염을 제공하고, 여기에서
- [0177] n1, n2, 및 n3는 독립적으로 1, 2, 3, 또는 4이고;
- [0178] X 및 X' 는 독립적으로 결합, 산소, 또는 질소이고;
- [0179] R1 및 R2는 독립적으로 1-4개의 이중 또는 삼중 결합을 임의적으로 포함하는 C8-C25 탄화수소 기이고; 또한
- [0180] G는 수소 또는 중합체 모이어티이다.
- [0181] 한 가지 구현예에서, 본 발명은 n1, n2, 및 n3이 모두 1이고, X 및 X' 는 결합인 화학식 IV의 화합물을 제공한다.
- [0182] 한 가지 구현예에서, 본 발명은 R1 및 R2의 적어도 하나가 1-4개의 이중 결합을 포함하는 C8-C25 탄화수소 기인

화학식 IV의 화합물을 제공한다.

- [0183] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 R₁ 및 R₂ 둘 다가 1-4개의 이중 결합을 포함하는 C₈-C₂₅ 탄화수소 기인 화학식 IV의 화합물을 제공한다.
- [0184] 보다 또 다른 구현예에서, 본 발명은 R₁ 및 R₂가 독립적으로 1 또는 2개의 이중 결합을 포함하는 C₈-C₂₅ 탄화수소 기인 화학식 IV의 화합물을 제공한다.
- [0185] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 R₁ 및 R₂가 독립적으로 1 개의 이중 결합을 포함하는 C₈-C₂₅ 탄화수소 기인 화학식 IV의 화합물을 제공한다.
- [0186] 한 가지 구현예에서, 본 발명은 R₁ 및 R₂가 독립적으로 1 또는 2개의 이중 결합을 포함하는 C₁₄-C₂₀ 탄화수소 기인 화학식 IV의 화합물을 제공한다.
- [0187] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 R₁ 및 R₂가 독립적으로 1 개의 이중 결합을 포함하는 C₁₄-C₂₀ 탄화수소 기인 화학식 IV의 화합물을 제공한다.
- [0188] 한 가지 구현예에서, 본 발명은 C(O)X-R₁ 및 C(O)X' -R₂ 둘 다가 올레오일 그룹을 나타내는 화학식 IV의 화합물을 제공한다.
- [0189] 한 가지 구현예에서, 본 발명은 X가 산소인 화학식 IV의 화합물을 제공한다.
- [0190] 한 가지 구현예에서, 본 발명은 X가 질소인 화학식 IV의 화합물을 제공한다.
- [0191] 한 가지 구현예에서, 본 발명은 G가 폴리옥시알킬렌, 폴리비닐피롤리돈, 폴리아크릴아마이드, 폴리디메틸아크릴아마이드, 폴리비닐 알코올, 텍스트란, 폴리(L-글루탐산), 스티렌 말레산 무수물, 폴리-N-(2-하이드록시프로필)메타크릴아마이드, 또는 폴리디비닐에테르 말레산 무수물인 화학식 IV의 화합물을 제공한다.
- [0192] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 중합체가 중합체 단위들 사이에 적어도 하나의 링커 기를 포함하는 화학식 IV의 화합물을 제공한다.
- [0193] 보다 또 다른 구현예에서, 본 발명은 중합체 모이어티가 폴리옥시알킬렌인 화학식 IV의 화합물을 제공한다.
- [0194] 보다 또 다른 구현예에서, 본 발명은 중합체의 분자량이 약200-10,000 Da부터인 화학식 IV의 화합물을 제공한다. 바람직한 중합체는 약 1,000-5,000 Da 범위로 분포하는 분자량을 가진다.
- [0195] 한 가지 구현예에서, 본 발명은 중합체 모이어티가 -C(O)-, -O-, -O-C(O)O-, -C(O)CH₂CH₂C(O)-, -S-S-, -NR³-, -NR³C(O)O-, -OC(O)NR³-, -NR³C(O)-, -C(O)NR³-, -NR³C(O)NR³-, -알킬렌-NR³C(O)O-, -알킬렌-NR³C(O)NR³-, -알킬렌-OC(O)NR³-, -알킬렌-NR³-, -알킬렌-O-, -알킬렌-NR³C(O)-, -알킬렌-C(O)NR³-, -NR³C(O)O-알킬렌-, -NR³C(O)NR³-알킬렌-, -OC(O)NR³-알킬렌-, -NR³-알킬렌-, -O-알킬렌-, -NR³C(O)-알킬렌-, -C(O)NR³-알킬렌-, -알킬렌-NR³C(O)O-알킬렌-, -알킬렌-NR³C(O)NR³-알킬렌-, -알킬렌-OC(O)NR³-알킬렌-, -알킬렌-NR³-알킬렌-, -알킬렌-O-알킬렌-, -알킬렌-NR³C(O)-알킬렌-, -C(O)NR³-알킬렌-, -NR³C(O)O-알킬렌옥시-, -NR³C(O)NR³-알킬렌옥시-, -OC(O)NR³-알킬렌옥시-, -NR³-알킬렌옥시-, -O-알킬렌옥시-, -NR³C(O)-알킬렌옥시-, -C(O)NR³-알킬렌옥시-, -알킬렌옥시-NR³C(O)O-알킬렌옥시- 및

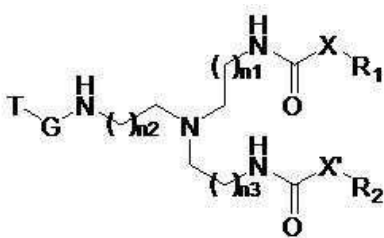


[0196] 로부터 선택된 적어도 하나의 링커 기를 포함하고,

[0197] 여기에서 R³ 은 수소, 또는 임의적으로 치환된 알킬이고,  는 아릴, 치환된 아릴, 사이클로알킬, 치환된 사이클로알킬, 헤테로아릴, 치환된 헤테로아릴, 헤테로사이클릭 및 치환된 헤테로사이클릭으로 이루어진 그룹으로부터 선택되며, 또한 D 및 E는 독립적으로 결합, -O-, CO, -NR³-, -NR³C(O)O-, -OC(O)NR³-, -NR³C(O)-,

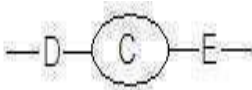
-C(O)NR³-, -NR³C(O)NR³-, -알킬렌-NR³C(O)O-, -알킬렌-NR³C(O)NR³-, -알킬렌-OC(O)NR³-, -알킬렌-NR³-, -알킬렌-O-, -알킬렌-NR³C(O)-, -알킬렌-C(O)NR³-, -NR³C(O)O-알킬렌-, -NR³C(O)NR³-알킬렌-, -OC(O)NR³-알킬렌-, -NR³-알킬렌-, -O-알킬렌-, -NR³C(O)-알킬렌-, -NR³C(O)O-알킬렌옥시-, -NR³C(O)NR³-알킬렌옥시-, -OC(O)NR³-알킬렌옥시-, -NR³-알킬렌옥시-, -O-알킬렌옥시-, -NR³C(O)-알킬렌옥시-, -C(O)NR³-알킬렌옥시-, -알킬렌옥시-NR³C(O)O-알킬렌옥시-, -C(O)NR³-알킬렌-, -알킬렌-NR³C(O)O-알킬렌-, -알킬렌-NR³C(O)NR³-알킬렌-, -알킬렌-OC(O)NR³-알킬렌-, -알킬렌-NR³-알킬렌-, -알킬렌-O-알킬렌-, -알킬렌-NR³C(O)-알킬렌-, 및 -C(O)NR³-알킬렌-으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, 여기에서 R³는 상기에서 정의된 바와 같은 화학식 IV의 화합물을 제공한다.

- [0198] 한 가지 구현예에서, 본 발명은 중합체가 옥시알킬렌 그룹이 독립적으로 그들의 반복 단위에서 2-5개의 탄소 원자를 가지는 직쇄 또는 분지쇄 폴리옥시알킬렌 그룹인 폴리옥시에틸렌인 화학식 IV의 화합물을 제공한다.
- [0199] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 폴리옥시알킬렌이 폴리옥시에틸렌, 직쇄 또는 분지쇄 폴리옥시프로필렌, 또는 직쇄 또는 분지쇄 폴리옥시부틸렌인 화학식 IV의 화합물을 제공한다.
- [0200] 보다 또 다른 구현예에서, 본 발명은 폴리옥시알킬렌이 폴리옥시에틸렌인 화학식 IV의 화합물을 제공한다.
- [0201] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 n1, n2, 및 n3가 동일하고 1 또는 2이며; X 및 X'는 결합이고; 또한 R₁ 및 R₂의 적어도 하나는 1-4개의 이중 결합을 포함하는 C₈-C₂₅ 탄화수소 기인 화학식 IV의 화합물을 제공한다.
- [0202] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 n1, n2, 및 n3가 동일하고 1 또는 2이며; X 및 X'는 결합이고; 또한 R₁ 및 R₂ 둘 다는 동일하고 1-4개의 이중 결합을 포함하는 C₈-C₂₅ 탄화수소 기를 나타내는 화학식 IV의 화합물을 제공한다.
- [0203] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 n1, n2, 및 n3가 동일하고 1이며; X 및 X'는 결합이고; 또한 R₁ 및 R₂는 동일하고 1-4개의 이중 결합을 포함하는 C₈-C₂₅ 탄화수소 기를 나타내는 화학식 IV의 화합물을 제공한다.
- [0204] 보다 또 다른 구현예에서, 본 발명은 n1, n2, 및 n3가 동일하고 1 또는 2이고; X 및 X'는 결합이고; 또한 R₁ 및 R₂는 동일하고 1-2개의 이중 결합을 포함하는 C₈-C₂₅ 탄화수소 기를 나타내는 화학식 IV의 화합물을 제공한다.
- [0205] 보다 또 다른 구현예에서, 본 발명은 n1, n2, 및 n3가 1 이고; X 및 X'는 결합이고; 또한 R₁ 및 R₂는 동일하고 1개의 이중 결합을 포함하는 C₁₄-C₂₀ 탄화수소 기를 나타내는 화학식 IV의 화합물을 제공한다.
- [0206] 본 발명의 또 다른 관점은 화학식 V의 화합물을 제공하고,




- [0207]
- [0208] V
- [0209] 여기에서
- [0210] n1, n2, 및 n3는 독립적으로 1, 2, 3, 또는 4이고;
- [0211] X 및 X'는 독립적으로 결합, 산소, 또는 질소이고;
- [0212] R₁ 및 R₂는 독립적으로 1-4개의 이중 또는 삼중 결합을 임의적으로 포함하는 C₈-C₂₅ 탄화수소 기이고;

- [0213] T는 표적 리간드이고; 또한
- [0214] G는 결합 또는 중합체 모이어티이다.
- [0215] 한 가지 구현예에서, 본 발명은 n1, n2, 및 n3가 모두 1이고, X 및 X' 둘 다는 결합인 화학식 V의 화합물을 제공한다.
- [0216] 한 가지 구현예에서, 본 발명은 R₁ 및 R₂의 적어도 하나가 1-4개의 이중 결합을 포함하는 C₈-C₂₅ 탄화수소 기인 화학식 V의 화합물을 제공한다.
- [0217] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 R₁ 및 R₂ 둘 다가 1-4개의 이중 결합을 포함하는 C₈-C₂₅ 탄화수소 기인 화학식 V의 화합물을 제공한다.
- [0218] 보다 또 다른 구현예에서, 본 발명은 R₁ 및 R₂가 독립적으로 1 또는 2개의 이중 결합을 포함하는 C₈-C₂₅ 탄화수소 기인 화학식 V의 화합물을 제공한다.
- [0219] 보다 또 다른 구현예에서, 본 발명은 R₁ 및 R₂가 독립적으로 1 개의 이중 결합을 포함하는 C₈-C₂₅ 탄화수소 기인 화학식 V의 화합물을 제공한다.
- [0220] 한 가지 구현예에서, 본 발명은 R₁ 및 R₂가 독립적으로 1 또는 2개의 이중 결합을 포함하는 C₁₄-C₂₀ 탄화수소 기인 화학식 V의 화합물을 제공한다.
- [0221] 보다 또 다른 구현예에서, 본 발명은 R₁ 및 R₂가 독립적으로 1 개의 이중 결합을 포함하는 C₁₄-C₂₀ 탄화수소 기인 화학식 V의 화합물을 제공한다.
- [0222] 한 가지 구현예에서, 본 발명은 C(O)X-R₁ 및 C(O)X' -R₂ 둘 다가 올레오일 그룹을 나타내는 화학식 V의 화합물을 제공한다.
- [0223] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 G가 중합체 모이어티인 화학식 V의 화합물을 제공한다.
- [0224] 보다 또 다른 구현예에서, 본 발명은 G가 폴리옥시알킬렌, 폴리비닐피롤리돈, 폴리아크릴아마이드, 폴리디메틸아크릴아마이드, 폴리비닐 알코올, 텍스트란, 폴리(L-글루탐산), 스티렌 말레산 무수물, 폴리-N-(2-하이드록시프로필)메타크릴아마이드, 또는 폴리디비닐에테르 말레산 무수물인 화학식 V의 화합물을 제공한다.
- [0225] 보다 또 다른 구현예에서, 본 발명은 중합체가 중합체 단위들 사이에 적어도 하나의 링커 기를 포함하는 화학식 V의 화합물을 제공한다.
- [0226] 한 가지 구현예에서, 본 발명은 중합체 모이어티가 폴리옥시알킬렌인 화학식 V의 화합물을 제공한다.
- [0227] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 중합체의 분자량이 약200-10,000 Da부터인 화학식 V의 화합물을 제공한다. 바람직한 중합체는 약 1,000-5,000 Da 범위로 분포하는 분자량을 가진다.
- [0228] 한 가지 구현예에서, 본 발명은 중합체 모이어티가 -C(O)-, -O-, -O-C(O)O-, -C(O)CH₂CH₂C(O)-, -S-S-, -NR³-, -NR³C(O)O-, -OC(O)NR³-, -NR³C(O)-, -C(O)NR³-, -NR³C(O)NR³-, -알킬렌-NR³C(O)O-, -알킬렌-NR³C(O)NR³-, -알킬렌-OC(O)NR³-, -알킬렌-NR³-, -알킬렌-O-, -알킬렌-NR³C(O)-, -알킬렌-C(O)NR³-, -NR³C(O)O-알킬렌-, -NR³C(O)NR³-알킬렌-, -OC(O)NR³-알킬렌-, -NR³-알킬렌-, -O-알킬렌-, -NR³C(O)-알킬렌-, -C(O)NR³-알킬렌-, -알킬렌-NR³C(O)O-알킬렌-, -알킬렌-NR³C(O)NR³-알킬렌-, -알킬렌-OC(O)NR³-알킬렌-, -알킬렌-NR³-알킬렌-, -알킬렌-O-알킬렌-, -알킬렌-NR³C(O)-알킬렌-, -C(O)NR³-알킬렌-, -NR³C(O)O-알킬렌옥시-, -NR³C(O)NR³-알킬렌옥시-, -OC(O)NR³-알킬렌옥시-, -NR³-알킬렌옥시-, -O-알킬렌옥시-, -NR³C(O)-알킬렌옥시-, -C(O)NR³-알킬렌옥시-, -알킬렌옥시-NR³C(O)O-알킬렌옥시- 및



- [0229]로부터 선택된 적어도 하나의 링커 기를 포함하고,

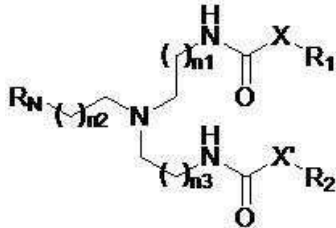


- [0230] 여기에서 R³ 은 수소, 또는 임의적으로 치환된 알킬이고,  는 아릴, 치환된 아릴, 사이클로알킬, 치환된 사이클로알킬, 헥테로아릴, 치환된 헥테로아릴, 헥테로사이클릭 및 치환된 헥테로사이클릭으로 이루어진 그룹으로부터 선택되며, 또한 D 및 E는 독립적으로 결합, -O-, CO, -NR³-, -NR³C(O)O-, -OC(O)NR³-, -NR³C(O)-, -C(O)NR³-, -NR³C(O)NR³-, -알킬렌-NR³C(O)O-, -알킬렌-NR³C(O)NR³-, -알킬렌-OC(O)NR³-, -알킬렌-NR³-, -알킬렌-O-, -알킬렌-NR³C(O)-, -알킬렌-C(O)NR³-, -NR³C(O)O-알킬렌-, -NR³C(O)NR³-알킬렌-, -OC(O)NR³-알킬렌-, -NR³-알킬렌-, -O-알킬렌-, -NR³C(O)-알킬렌-, -NR³C(O)O-알킬렌옥시-, -NR³C(O)NR³-알킬렌옥시-, -OC(O)NR³-알킬렌옥시-, -NR³-알킬렌옥시-, -O-알킬렌옥시-, -NR³C(O)-알킬렌옥시-, -C(O)NR³-알킬렌옥시-, -알킬렌옥시-NR³C(O)O-알킬렌옥시-, -C(O)NR³-알킬렌-, -알킬렌-NR³C(O)O-알킬렌-, -알킬렌-NR³C(O)NR³-알킬렌-, -알킬렌-OC(O)NR³-알킬렌-, -알킬렌-NR³-알킬렌-, -알킬렌-O-알킬렌-, -알킬렌-NR³C(O)-알킬렌-, 및 -C(O)NR³-알킬렌-으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, 여기에서 R³ 는 상기에서 정의된 바와 같은 화학식 V의 화합물을 제공한다.
- [0231] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 중합체가 옥시알킬렌 그룹이 독립적으로 그들의 반복 단위에서 2-5개의 탄소 원자를 가지는 직쇄 또는 분지쇄 폴리옥시알킬렌 그룹인 폴리옥시에틸렌인 화학식 V의 화합물을 제공한다.
- [0232] 보다 또 다른 구현예에서, 본 발명은 폴리옥시알킬렌이 폴리옥시에틸렌, 직쇄 또는 분지쇄 폴리옥시프로필렌, 또는 직쇄 또는 분지쇄 폴리옥시부틸렌인 화학식 V의 화합물을 제공한다.
- [0233] 한 가지 구현예에서, 본 발명은 폴리옥시알킬렌이 폴리옥시에틸렌이고, 표적 리간드는 약제학적으로 활성인 소분자, 엔도솜 분해제, 융합성 펩타이드, 세포막 투과제, 전하 차단제, 핵산 또는 세포 수용체 리간드인 화학식 V의 화합물을 제공한다.
- [0234] 한 가지 구현예에서, 본 발명은 표적 리간드가 항-중식 활성을 가지는 약제학적으로 활성인 소분자인 화학식 V의 화합물을 제공한다.
- [0235] 한 가지 구현예에서, 본 발명은 폴리옥시알킬렌이 폴리옥시에틸렌이고, 표적 리간드는 항-중식 활성을 가지는 약제학적으로 활성인 소분자인 화학식 V의 화합물을 제공한다.
- [0236] 보다 또 다른 구현예에서, 본 발명은 표적 리간드가 엽산 그룹인 화학식 V의 화합물을 제공한다.
- [0237] 보다 또 다른 구현예에서, 본 발명은 폴리옥시알킬렌이 폴리옥시에틸렌이고, 표적 리간드는 엽산인 화학식 V의 화합물을 제공한다.
- [0238] 한 가지 구현예에서, 본 발명은 표적 리간드가 융합성 펩타이드인 화학식 V의 화합물을 제공한다.
- [0239] 한 가지 구현예에서, 본 발명은 폴리옥시알킬렌이 폴리옥시에틸렌이고, 표적 리간드는 융합성 펩타이드인 화학식 V의 화합물을 제공한다.
- [0240] 한 가지 구현예에서, 본 발명은 표적 리간드가 바이오틴, 갈락토스, 아세틸살리실산, 나프록센, 및 세포 수용체 리간드로부터 선택되는 화학식 V의 화합물을 제공한다.
- [0241] 한 가지 구현예에서, 본 발명은 폴리옥시알킬렌이 폴리옥시에틸렌이고, 표적 리간드는 바이오틴, 갈락토스, 아세틸살리실산, 나프록센, 및 세포 수용체 리간드로부터 선택되는 화학식 V의 화합물을 제공한다.
- [0242] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 n1, n2, 및 n3가 동일하고 1 또는 2이며; X 및 X' 는 결합이고; 또한 R₁ 및 R₂ 의 적어도 하나는 1-4개의 이중 결합을 포함하는 C₈-C₂₅ 탄화수소 기인 화학식 V의 화합물을 제공한다.
- [0243] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 n1, n2, 및 n3가 동일하고 1 또는 2이며; X 및 X' 는 결합이고; 또한 R₁ 및 R₂ 는 동일하고 1-4개의 이중 결합을 포함하는 C₈-C₂₅ 탄화수소 기를 나타내는 화학식 V의 화합물을 제공한다.
- [0244] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 n1, n2, 및 n3가 동일하고 1 또는 2이며; X 및 X' 는 결합이고; 또한 R₁ 및 R₂ 는 동일하고 1-4개의 이중 결합을 포함하는 C₈-C₂₅ 탄화수소 기를 나타내는 화학식 V의 화합물을 제공한다.

[0245] 보다 또 다른 구현예에서, 본 발명은 n_1 , n_2 , 및 n_3 가 동일하고 1 또는 2이며; X 및 X' 는 결합이고; 또한 R_1 및 R_2 는 동일하고 1 또는 2개의 이중 결합을 포함하는 C_{14} - C_{20} 탄화수소 기를 나타내는 화학식 V의 화합물을 제공한다.

[0246] 보다 또 다른 구현예에서, 본 발명은 n_1 , n_2 , 및 n_3 가 1이고; X 및 X' 는 결합이고; 또한 R_1 및 R_2 는 동일하고 1개의 이중 결합을 포함하는 C_8 - C_{25} 탄화수소 기를 나타내는 화학식 V의 화합물을 제공한다.

[0247] 본 발명의 화학식 VI의 화합물을 제공하고,



[0248]

[0249] VI

[0250] 여기에서

[0251] n_1 , n_2 , 및 n_3 는 독립적으로 1, 2, 3, 또는 4이고;

[0252] X 및 X' 는 독립적으로 결합, 산소, 또는 질소이고;

[0253] R_1 및 R_2 은 독립적으로 1-4개의 이중 또는 삼중 결합을 임의적으로 포함하는 C_8 - C_{25} 탄화수소 기이고; 또한

[0254] R_N 는 NHR_4 , NR_4R_5 , 또는 $N^+R_4R_5R_6$ 를 나타내고; 여기에서

[0255] R_4 , R_5 , 및 R_6 는 독립적으로 C_1 - C_6 알킬 그룹을 나타낸다.

[0256] 한 가지 구현예에서, 본 발명은 n_1 , n_2 , 및 n_3 가 모두 1이고, X 및 X' 둘 다는 결합인 화학식 VI의 화합물을 제공한다.

[0257] 한 가지 구현예에서, 본 발명은 R_1 및 R_2 의 적어도 하나가 1-4개의 이중 결합을 포함하는 C_8 - C_{25} 탄화수소 기인 화학식 VI의 화합물을 제공한다.

[0258] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 R_1 및 R_2 둘 다가 1-4개의 이중 결합을 포함하는 C_8 - C_{25} 탄화수소 기인 화학식 VI의 화합물을 제공한다.

[0259] 보다 또 다른 구현예에서, 본 발명은 R_1 및 R_2 가 독립적으로 1 또는 2개의 이중 결합을 포함하는 C_8 - C_{25} 탄화수소 기인 화학식 VI의 화합물을 제공한다.

[0260] 보다 또 다른 구현예에서, 본 발명은 R_1 및 R_2 가 독립적으로 1 개의 이중 결합을 포함하는 C_8 - C_{25} 탄화수소 기인 화학식 VI의 화합물을 제공한다.

[0261] 한 가지 구현예에서, 본 발명은 R_1 및 R_2 가 독립적으로 1 또는 2개의 이중 결합을 포함하는 C_{14} - C_{20} 탄화수소 기인 화학식 VI의 화합물을 제공한다.

[0262] 보다 또 다른 구현예에서, 본 발명은 R_1 및 R_2 가 독립적으로 1 개의 이중 결합을 포함하는 C_{14} - C_{20} 탄화수소 기인 화학식 VI의 화합물을 제공한다.

[0263] 한 가지 구현예에서, 본 발명은 $C(O)X-R_1$ 및 $C(O)X'-R_2$ 둘 다가 올레오일 그룹을 나타내는 화학식 VI의 화합물을 제공한다.

[0264] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 R_N 이 NHR_4 를 나타내고 여기에서 R_4 는 C_1 - C_2 알킬 그룹을 나타내는 화학식 VI의 화합물을 제공한다.

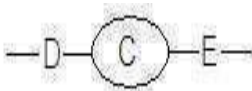
- [0265] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 R_N 이 NR_4R_5 를 나타내고 여기에서 R_4 및 R_5 는 독립적으로 C_1-C_2 알킬 그룹을 나타내는 화학식 VI의 화합물을 제공한다.
- [0266] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 R_N 이 $N^+R_4R_5R_6$ 를 나타내고 여기에서 R_4 , R_5 및 R_6 는 독립적으로 C_1-C_2 알킬 그룹을 나타내는 화학식 VI의 화합물을 제공한다.
- [0267] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 $n1$, $n2$, 및 $n3$ 가 동일하고 1 또는 2이며; X 및 X' 는 결합이고; 또한 R_1 및 R_2 의 적어도 하나는 1-4개의 이중 결합을 포함하는 C_8-C_{25} 탄화수소 기인 화학식 VI의 화합물을 제공한다.
- [0268] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 $n1$, $n2$, 및 $n3$ 가 동일하고 1 또는 2이며; X 및 X' 는 결합이고; 또한 R_1 및 R_2 둘 다는 1-4개의 이중 결합을 포함하는 C_8-C_{25} 탄화수소 기를 나타내는 화학식 VI의 화합물을 제공한다.
- [0269] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 $n1$, $n2$, 및 $n3$ 가 동일하고 1 또는 2이며; X 및 X' 는 결합이고; 또한 R_1 및 R_2 는 동일하고 1-4개의 이중 결합을 포함하는 C_8-C_{25} 탄화수소 기를 나타내는 화학식 VI의 화합물을 제공한다.
- [0270] 보다 또 다른 구현예에서, 본 발명은 $n1$, $n2$, 및 $n3$ 가 동일하고 1 또는 2이며; X 및 X' 는 결합이고; 또한 R_1 및 R_2 는 동일하고 1 또는 2개의 이중 결합을 포함하는 $C_{14}-C_{20}$ 탄화수소 기를 나타내는 화학식 VI의 화합물을 제공한다.
- [0271] 보다 또 다른 구현예에서, 본 발명은 $n1$, $n2$, 및 $n3$ 가 1이고; X 및 X' 는 결합이고; 또한 R_1 및 R_2 는 동일하고 1개의 이중 결합을 포함하는 C_8-C_{25} 탄화수소 기를 나타내는 화학식 VI의 화합물을 제공한다.
- [0272] 보다 또 다른 구현예에서, 본 발명은 $n1$, $n2$, 및 $n3$ 가 1이고; X 및 X' 는 결합이고; R_1 및 R_2 는 동일하고 1개의 이중 결합을 포함하는 C_8-C_{25} 탄화수소 기를 나타내며; 또한 R_N 은 $NHR_4R_5R_6$ 를 나타내고 여기에서 R_4 , R_5 및 R_6 는 독립적으로 C_1-C_2 알킬 그룹을 나타내는 화학식 VI의 화합물을 제공한다.
- [0273] 보다 또 다른 구현예에서, 본 발명은 $n1$, $n2$, 및 $n3$ 가 1이고; X 및 X' 는 결합이고; R_1 및 R_2 는 동일하고 1개의 이중 결합을 포함하는 C_8-C_{25} 탄화수소 기를 나타내며; 또한 R_N 은 $NHR_4R_5R_6$ 를 나타내고 여기에서 R_4 , R_5 및 R_6 는 독립적으로 C_1-C_2 알킬 그룹을 나타내는 화학식 VI의 화합물을 제공한다.
- [0274] X 및 X' 가 결합을 나타내는 화학식 I-VI의 화합물의 또 다른 구현예에서, 적합한 $C(O)XR_1$ 및 $C(O)X' R_2$ 모이어티는 10-22개의 탄소 원자, 바람직하게는 12-20개의 탄소 원자, 더욱 바람직하게는 14-18개의 탄소 원자를 가지는 포화, 모노불포화, 및 폴리불포화 지방산으로부터 유래한 그룹을 포함한다. 대표적인 $C(O)XR_1$ 및 $C(O)X' R_2$ 모이어티는, 예를 들어 미리스톨산 (myristoleic acid), 팔미톨산 (palmitoleic acid), 올레산 (oleic acid), 리놀산 (linoleic acid), 리놀렌산 (linolenic acid), 아라키돈산 (arachidonic acid), 에이코사펜텐노산 (eicosapentaenoic acid), 에루크산 (erucic acid), 도코사헥세노산 (docosahexaenoic acid), 이소스테아르산 (isostearic acid), 엘라이드산 (elaidic acid), 페트로셀린산 (petroselinic acid), 엘레오스테아르산 (eleostearic acid), 또는 로로르산 (lauroleic acid)으로부터 유래한 것을 포함한다.
- [0275] X 및 X' 가 독립적으로 질소 또는 산소를 나타내는 화학식 I-VI의 화합물의 또 다른 구현예에서는, 적합한 $C(O)XR_1$ 및 $C(O)X' R_2$ 모이어티가 10-22개의 탄소 원자, 바람직하게는 12-20개의 탄소 원자, 더욱 바람직하게는 14-18개의 탄소 원자를 가지는 포화 및 폴리불포화 지방산으로부터 유래한 그룹을 포함한다. 대표적인 $C(O)XR_1$ 및 $C(O)X' R_2$ 모이어티는, 예를 들어 미리스톨산, 팔미톨산, 올레산, 리놀산, 리놀렌산, 아라키돈산, 에이코사펜텐노산, 에루크산, 도코사헥세노산, 이소스테아르산, 엘라이드산, 페트로셀린산, 엘레오스테아르산, 또는 로로르산으로부터 유래한 것과 같은 유래한 것들을 포함한다.
- [0276] 본 발명의 한 가지 관점은 화학식 I-VI이라면 모두의 화합물을 포함하는 제형을 제공한다.
- [0277] 본 발명의 한 가지 관점은 화학식 I-VI이라면 모두의 화합물 및 생물학적으로 활성이 있을 수 있는 또 다른 분자를 포함하는 제형을 제공하고, 상기 분자는 리보솜 RNA; RNA 또는 DNA의 안티센스 폴리뉴클레오타이드; siRNA; shRNA; miRNA; 및 치료적으로 유용한 단백질을 인코딩하는 게놈DNA, cDNA, 또는 mRNA의 폴리뉴클레오타

이므로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.


- [0278] 본 발명의 또 다른 관점은 화학식 I-VI이라면 모두의 화합물에 의해 형성되는 입자 및 생물학적으로 활성인 분자를 포함하는 제형을 제공한다.
- [0279] 본 발명의 또 다른 관점은 화학식 I-VI이라면 모두의 화합물 및 생물학적으로 활성인 분자를 포함하고, 상기 생물학적으로 활성인 분자와 상기 화합물은 리포복합체를 형성하는 제형을 제공한다.
- [0280] 본 발명의 또 다른 관점은 화학식 I-VI이라면 모두의 화합물 및 생물학적으로 활성인 분자를 포함하고, 상기 생물학적으로 활성인 분자는 적어도 부분적으로 상기 화합물에 의해 형성되는 리포솜 내에 존재하는 제형을 제공한다
- [0281] 본 발명의 또 다른 관점은 화학식 I-VI이라면 모두의 화합물 및 생물학적으로 활성인 분자를 포함하고, 상기 생물학적으로 활성인 분자는 리포솜에 의해 캡슐화되는 제형을 제공한다.
- [0282] 한 가지 구현예에서, 본 발명은 상기 입자가 약 500 nm이하의 메디안 직경을 가지는 제형을 제공한다.
- [0283] 본 발명의 한 가지 관점은 세포를 본 발명의 제형과 접촉시키는 것을 포함하고, 상기 제형은 화학식 I-VI이라면 모두의 화합물 및 siRNA를 포함하는, 세포 내로 siRNA를 도입하는 방법을 제공한다.
- [0284] 본 발명의 또 다른 관점은 세포를 본 발명의 제형과 접촉시키는 것을 포함하고, 상기 제형은 화학식 I-VI이라면 모두의 화합물 및 shRNA를 포함하는, 세포 내로 합성 shRNA를 도입하는 방법을 제공한다.
- [0285] 본 발명의 보다 또 다른 관점은 세포를 본 발명의 제형과 접촉시키는 것을 포함하고, 상기 제형은 화학식 I-VI이라면 모두의 화합물 및 miRNA를 포함하는, 세포 내로 miRNA를 도입하는 방법을 제공한다.
- [0286] 본 발명의 또 다른 관점은 세포를 본 발명의 제형과 접촉시키는 것을 포함하고, 상기 제형은 화학식 I-VI이라면 모두의 화합물 및 안티센스 핵산을 포함하는, 세포 내로 안티센스 핵산을 도입하는 방법을 제공한다.
- [0287] 본 발명의 한 가지 관점은 포유동물 개체에게 화학식 I-VI이라면 모두의 화합물 및 생물학적으로 활성인 분자를 포함하는 제형의 치료적 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 표적 서열의 발현을 조절하는 방법을 제공한다.
- [0288] 본 발명의 또 다른 관점은 포유동물 개체에게 본 발명의 제형의 치료적 유효량을 투여하는 것을 포함하는, siRNA의 생체내 (*in vivo*) 전달 방법을 제공한다.
- [0289] 본 발명의 또 다른 관점은 포유동물 개체에게 화학식 I-VI이라면 모두의 화합물 및 생물학적으로 활성인 분자를 포함하는 제형의 치료적 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 상기 개체에서 질환을 치료하고 예방하는 방법을 제공한다.
- [0290] 본 발명의 또 다른 관점은 유전자의 발현을 저해할 수 있는 생물학적으로 활성인 분자 및 화학식 I-VI이라면 모두의 화합물을 포함하는 제형과 세포를 접촉시키는 것을 포함하는, 유전자의 발현을 저해하는 방법을 제공한다. 한 가지 구현예에서, 세포는 포유동물 세포, 바람직하게는 인간 세포이다. 더 나아가, 이들은 방법은 생체내 (*in vivo*) 또는 시험관내 (*in vitro*)에서 수행될 수 있다. 한 가지 구현예에서, 생물학적으로 활성인 분자는 예를 들어 siRNA, shRNA, miRNA, 안티센스 핵산, 리포솜 RNA, RNA 또는 DNA의 안티센스 폴리뉴클레오타이드, 리보자임, 및 치료적으로 유용한 단백질을 인코딩하는 게놈DNA, cDNA, 또는 mRNA의 폴리뉴클레오타이드로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 이러한 제형은 콜레스테롤, 호르몬, 항바이러스제, 펩타이드, 화학치료제, 소분자, 비타민, 보조인자 (co-factors), 또는 항체와 같은 단백질도 역시 포함할 수 있다.
- [0291] 본 발명의 또 다른 관점에서, 유전자 발현을 저해하지 않는 생물학적으로 활성인 분자, 예로 다양한 소분자 약제학적 화합물은 유전자 발현의 저해와 관련되지 않은 치료법에 사용을 위해 본 발명의 화합물과 함께 제형에 포함될 수 있다.
- [0292] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 (i) 하나 이상의 화학식 I-VI이라면 모두의 화합물 및 (ii) 하나 이상의 생물학적으로 활성인 분자의 제형을 포함하는 이식형 (implantable) 또는 주입가능한 (injectable) 장치를 제공한다. 이들 장치에서, 제형은 장치 내에 포획되거나 캡슐화되고, 상기 장치는 상기 제형에 더하여 생분해성 (biodegradable) 및/또는 생체적합성 (biocompatible) 약물 방출 물질을 포함한다. 장치는 개체, 바람직하게는 포유동물, 더욱 바람직하게는 인간 개체의 신체 내에 주입 또는 이식에 적합한 크기와 모양이 될 것이다.
- [0293] 상기에서 기술된 바와 같이, 본 발명의 특정한 화합물은 중합체 모이어티, G, G₁, 또는 G₂을 포함한다. 이들 중합체 그룹은 약 200 Da 으로부터 약 10,000 Da 범위로 분포하는 분자량을 가진다.

[0294] 중합체 모이어티는 바람직하게 폴리옥시알킬렌이거나 둘 이상의 폴리옥시알킬렌 그룹 또는 단위를 포함한다. 폴리옥시알킬렌 그룹은 원하는 크기와 무게의 중합체 모이어티를 제공하려고 알킬렌 옥사이드 모노머를 중합시킴에 의해 형성된다. 중합체 모이어티는 둘 이상의 폴리옥시알킬렌 그룹을 포함하는 한편, 개별 폴리옥시알킬렌 그룹은 링커 기에 의해 서로 연결된다. 적합한 링커 기의 예로는:

[0295] $-C(O)-$, $-O-$, $-O-C(O)O-$, $-C(O)CH_2CH_2C(O)-$, $-S-S-$, $-NR^3-$, $-NR^3C(O)O-$, $-OC(O)NR^3-$, $-NR^3C(O)-$, $-C(O)NR^3-$, $-NR^3C(O)NR^3-$, $-알킬렌-NR^3C(O)O-$, $-알킬렌-NR^3C(O)NR^3-$, $-알킬렌-OC(O)NR^3-$, $-알킬렌-NR^3-$, $-알킬렌-O-$, $-알킬렌-NR^3C(O)-$, $-알킬렌-C(O)NR^3-$, $-NR^3C(O)O-알킬렌-$, $-NR^3C(O)NR^3-알킬렌-$, $-OC(O)NR^3-알킬렌-$, $-NR^3-알킬렌-$, $-O-알킬렌-$, $-NR^3C(O)-알킬렌-$, $-C(O)NR^3-알킬렌-$, $-알킬렌-NR^3C(O)O-알킬렌-$, $-알킬렌-NR^3C(O)NR^3-알킬렌-$, $-알킬렌-OC(O)NR^3-알킬렌-$, $-알킬렌-NR^3-알킬렌-$, $-알킬렌-O-알킬렌-$, $-알킬렌-NR^3C(O)-알킬렌-$, $-C(O)NR^3-알킬렌-$, $-NR^3C(O)O-알킬렌옥시-$, $-NR^3C(O)NR^3-알킬렌옥시-$, $-OC(O)NR^3-알킬렌옥시-$, $-NR^3-알킬렌옥시-$, $-O-알킬렌옥시-$, $-NR^3C(O)-알킬렌옥시-$, $-C(O)NR^3-알킬렌옥시-$, $-알킬렌옥시-NR^3C(O)O-알킬렌옥시-$ 및



[0296]로부터 선택된 적어도 하나의 링커 기를 포함하고,

[0297] 여기에서 R^3 은 수소, 또는 임의적으로 치환된 알킬이고,  는 아릴, 치환된 아릴, 사이클로알킬, 치환된 사이클로알킬, 헤테로아릴, 치환된 헤테로아릴, 헤테로사이클릭 및 치환된 헤테로사이클릭으로 이루어진 그룹으로부터 선택되며, 또한 D 및 E는 독립적으로 결합, $-O-$, CO , $-NR^3-$, $-NR^3C(O)O-$, $-OC(O)NR^3-$, $-NR^3C(O)-$, $-C(O)NR^3-$, $-NR^3C(O)NR^3-$, $-알킬렌-NR^3C(O)O-$, $-알킬렌-NR^3C(O)NR^3-$, $-알킬렌-OC(O)NR^3-$, $-알킬렌-NR^3-$, $-알킬렌-O-$, $-알킬렌-NR^3C(O)-$, $-알킬렌-C(O)NR^3-$, $-NR^3C(O)O-알킬렌-$, $-NR^3C(O)NR^3-알킬렌-$, $-OC(O)NR^3-알킬렌-$, $-NR^3-알킬렌-$, $-O-알킬렌-$, $-NR^3C(O)-알킬렌-$, $-NR^3C(O)O-알킬렌옥시-$, $-NR^3C(O)NR^3-알킬렌옥시-$, $-OC(O)NR^3-알킬렌옥시-$, $-NR^3-알킬렌옥시-$, $-O-알킬렌옥시-$, $-NR^3C(O)-알킬렌옥시-$, $-C(O)NR^3-알킬렌옥시-$, $-알킬렌옥시-NR^3C(O)O-알킬렌옥시-$, $-C(O)NR^3-알킬렌-$, $-알킬렌-NR^3C(O)O-알킬렌-$, $-알킬렌-NR^3C(O)NR^3-알킬렌-$, $-알킬렌-OC(O)NR^3-알킬렌-$, $-알킬렌-NR^3-알킬렌-$, $-알킬렌-O-알킬렌-$, $-알킬렌-NR^3C(O)-알킬렌-$, 및 $-C(O)NR^3-알킬렌-$ 으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, 여기에서 R^3 는 상기에서 정의된 바와 같다.

[0298] 바람직한 링커 기는 $-C(O)-$, $O-$, NR^3- , $NR^3C(O)O$, $OC(O)NR^3-$, $NR^3C(O)-$, 및 $C(O)NR^3-$ 이고, 여기에서 각 R^3 는 상기에 정의된 바와 같다.

[0299] 여기에서 G , G_1 , 또는 G_2 는, 예를 들어 아마이드 그룹에 의해 연결되는 독립적인 단위로부터 형성되는 한편, 상기 단위는 크기와 분자량의 넓은 범위를 가지는 더 짧은 사슬 중합체 또는 단위로부터 선택될 수 있다. 상기에서 기술된 바와 같이, 중합체 G , G_1 , 및 G_2 는 약 200-10,000 Da의 분자량을 가질 수 있고; 이들 중합체라면 모두가 여러가지의 더 짧고, 독립적으로-크기를 가지는 단위로부터 형성될 수 있다. 단위는 독립적으로 약 50 (예로, 폴리에틸렌 글리콜의 반복 단위 하나), 200, 또는 500 Da로부터 약 3000, 4000 또는 5000 Da까지의 범위로 분포하는 분자량을 가질 수 있다.

[0300] 따라서, 화합물은 약 3000 Da의 분자량을 가지는 중합체 모이어티 G , G_1 , 또는 G_2 를 포함하는 한편, 중합체는 예를 들어,

[0301] 약 3000 Da의 분자량을 가지는 폴리에틸렌 그룹이거나;

[0302] (b) 세 개의 아마이드 링커 ($C(O)NH-$) 기에 의해 서로 공유적으로 결합된 네 개의 폴리옥시에틸렌 그룹으로 구성되고, 여기서 각각의 폴리옥시에틸렌 그룹은 중합체 모이어티가 약 3000 Da의 분자량을 가지게 하려고 약 750 Da의 분자량을 가지거나; 또는

[0303] (c)네 개의 아마이드 링커 (C(O)NH-) 기에 의해 서로 공유적으로 결합된 다섯 개의 폴리옥시에틸렌 그룹으로 구성되고, 여기서 다섯 개의 폴리옥시에틸렌 그룹은 각각 약 500, 1000, 250, 1000, 및 250 Da의 분자량을 가진다.

[0304] 이들 중합체 모이어티는 단지 예로서 포함되도 있다; 당업자라면 본 발명의 화합물에 적합하게 적용될 수 있는 다른 중합체 모이어티를 잘 숙지하고 있을 것이다.

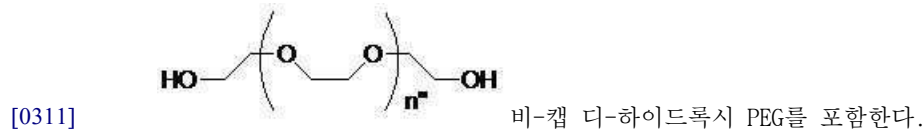
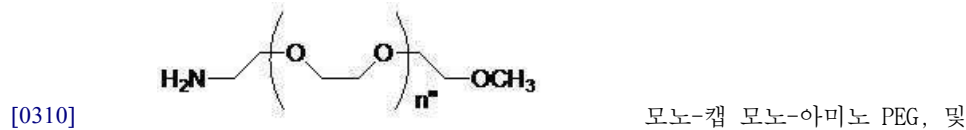
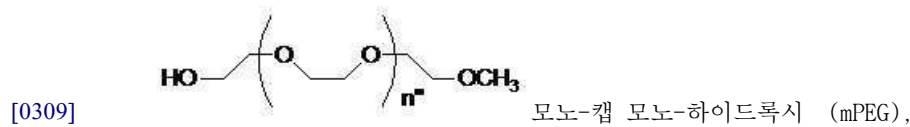
[0305] 본 발명의 중합체 모이어티를 제조하는 데 유용한 반응액의 비제한적 예로는 다음을 포함한다:

표 1

[0306] HO(알킬렌-O) _{pp} R ^{bb}	모노-캡 모노하이드록시 PEG (mPEG)
H ₂ N(알킬렌-O) _{pp} R ^{bb}	모노-캡 모노-아미노 PEG
HO(알킬렌-O) _{pp} R-OH	비-캡 디하이드록시 PEG
H ₂ N(알킬렌-O) _{pp} R-OH	비-캡 모노-아미노 PEG

[0307] 여기서 pp 및 알킬렌은 본 명세서에서 정의된 바와 같고, R^{bb}는 바람직하게 알킬 및 치환된 알킬로 구성된 그룹으로부터 선택된다.

[0308] 이러한 반응액의 특이적 예로는:



[0312] 일정 구현예에서, 입자는 첫 번째 저장고 (reservoir)에 수성 용액 및 두 번째 저장고에 유기 지질 용액 (예로, 물에 녹인 본 발명의 화합물 용액)를 넣고 유기 지질 용액과 수성 용액을 혼합하여 일시에 예로 간섭 RNA를 캡슐화하는 리포솜을 실질적으로 생산한다. 일정 구현예에서, 입자는 계면활성제-기초한 또는 유기용매-기초한 시스템 둘 중 하나에서 계면활성제 또는 유기용매의 제거 이후에 소수성 중간 복합체의 형성으로 만들어진다. 바람직한 구현예는 전하-중성화된다.

[0313] 한 가지 구현예에서, 간섭 RNA는 플라스미드로부터 전사되고, 플라스미드는 계면활성제 용액에서 양이온성 지질과 조합되어 코팅된 핵산-지질 복합체를 제공한다. 그 다음 복합체는 비-양이온성 지질과 접촉되어 계면활성제 용액, 핵산-지질 복합체 및 비-양이온성 지질을 제공하고, 또한 계면활성제는 다시 제거되어 혈청-안정한 핵산-지질 입자의 용액을 제공하며, 여기서 간섭 RNA 주형을 포함하는 플라스미드는 지질 이중막에 캡슐화된다. 따라서 입자는 약 50-500 nm의 크기를 가진다.

[0314] 또 다른 구현예에서, 안정한 지질 입자는 유기용매에서 양이온성 지질 및 비-양이온성 지질의 혼합물을 제조하고; 맑은 (clear) 단일상을 제공하도록, 예로 간섭 RNA를 포함하는 핵산의 수성 용액을 양이온성 및 비-양이온성 지질과 접촉시키며; 또한 유기용매를 제거하고 핵산-지질 입자를 현탁하는 것에 의해 형성된다. 여기에서 핵산은 지질 이중막으로 캡슐화되고, 입자는 혈청에 안정하고 약 50-500 nm의 크기를 가진다. 예로, 하기 실시예 32 및 33을 참조하라.

[0315] 원하는 크기 및/또는 전하를 가지는 본 발명의 입자와 복합체는, 예로 화학식 I-VI이라면 모두의 화합물과 siRNA의 복합체는 상기에서 제조한 혼합물을 적합한 필터에 관통시키는 것에 의해 획득될 수 있다. 예로, 하기

실시예 32 및 33을 보라.

- [0316] 본 발명의 지질 입자는 siRNA 를 포함하는 핵산의 치료적 전달에 유용하다. 상세하게, 본 발명의 목적은 표적 핵산 서열의 해독을 저하조절 (downregulating)하거나 침묵시키는 (silencing) 것에 의해 포유동물에서 질환의 *시험관내* 및 *생체내* 치료 방법을 제공하는 것이다. 이들 방법에서, siRNA 분자는 핵산-지질 입자 내로 제형화 되고, 입자는 이러한 치료를 필요로 하는 환자에게 투여된다 (예로, 표적 핵산 서열을 포함하는 유전자의 발현 또는 과다 발현과 관련된 질환 또는 장애로 진단된 환자). 대안으로, 세포가 환자로부터 분리되어 siRNA가 *시험관내*에서 전달되며, 다시 이 세포는 환자에게 주입된다. 한 가지 구현예에서, 본 발명은 양이온성 지질, 비-양이온성 지질, 응집을 저해하는 결합된 지질 (conjugated lipid), 및 siRNA를 포함하는 핵산-지질 입자와 세포를 접촉시키는 것에 의해 siRNA 분자를 세포 내로 도입하는 방법을 제공한다. 또 다른 구현예에서, 본 발명은 양이온성 지질, 응집을 저해하는 결합된 지질, 및 siRNA를 포함하는 핵산-지질 입자와 세포를 접촉시키는 것에 의해 siRNA 분자를 세포 내로 도입하는 방법을 제공한다. 보다 또 다른 구현예에서, 본 발명은 양이온성 지질, 및 siRNA를 포함하는 핵산-지질 입자와 세포를 접촉시키는 것에 의해 siRNA 분자를 세포 내로 도입하는 방법을 제공한다.
- [0317] 지질 입자는, 예로 정맥내, 또는 복강내 투여될 수 있다. 한 가지 구현예에서, 핵산-지질 입자의 전체 투여된 용량의 적어도 약 10%는 주입 이후 1, 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 또는 96시간 동안 혈장에 존재한다. 다른 구현예에서, 핵산-지질 입자의 전체 투여된 용량의 20%, 30%, 40% 이상 또한 60%, 70% 또는 80%는 주입 이후 1, 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 또는 96 시간 동안 혈장에 존재한다. 한 가지 구현예에서, 표적 조직의 (예로, 폐, 간, 종양, 혈관 내피 또는 염증 부위) 세포에서 siRNA의 존재는 투여 이후 24, 48, 72 및 96 시간에서 검출가능하다. 한 가지 구현예에서, 표적 서열의 발현의 저하조절은 투여 이후 24, 48, 72 및 96 시간에서 검출가능하다. 한 가지 구현예에서, 표적 서열의 발현의 저하조절은, 바람직하게 종양 세포에서 또는 염증 부위 또는 기타 다른 질환 조직의 세포에서 일어난다. 한 가지 구현예에서, 투여 부위의 말단 부위의 세포에서 siRNA의 존재는 핵산-지질 입자의 정맥내 주입하고 적어도 4일 이후에 검출가능하다. 또 다른 구현예에서, 표적 조직의 (예로, 폐, 간, 종양, 혈관 내피 또는 염증 부위) 세포에서 siRNA의 존재는 핵산-지질 입자의 주입하고 적어도 4일 이후에 검출가능하다.
- [0318] 입자는 순환 시 안정하고 혈관의 부위 및 표적 세포 집단에 접근을 유도하는 약물역학적 행동에 필요한 크기를 가지기 때문에, 정맥내 핵산 전달에 사용하는 데 적합하다. 본 발명은 또한 지질 입자를 포함하는 약제학적으로 허용가능한 조성물을 제공한다.
- [0319] 입자는 순환 시 안정하고 혈관의 부위 및 표적 세포 집단에 접근을 유도하는 약물역학적 행동에 필요한 크기를 가지기 때문에, 정맥내 핵산 전달에 사용하는 데 적합하다.
- [0320] 본 명세서에서 기술된 안정한 핵산-지질 입자는 전형적으로 핵산 (예로, siRNA 서열 또는 siRNA 서열을 인코딩하는 DNA 서열), 양이온성 지질, 및 예로 지질 입자의 응집을 저해하는 결합된 지질과 같은 비양이온성 지질 이중막을 안정화하는 성분을 포함한다. 본 발명의 지질 입자는 약 500 nm 이하의 평균 직경을 가지고 실질적으로 비독성이다. 또한, 본 발명의 지질 입자로 캡슐화된 핵산은 수성 용액에서 핵산분해효소 (nuclease)를 사용한 분해에 강하다.
- [0321] 핵산-지질 입자의 핵산 성분은 전형적으로 간접 RNA (예로, siRNA)를 포함하고, 이는 예로 하나 이상의 분리된 소-간접 RNA (siRNA) 이중체 (duplexes), 더 긴 이중가닥 RNA (dsRNA) 또는 DNA 플라스미드에 있는 전사 카세트로부터 전사되는 siRNA 또는 dsRNA를 포함하는 여러 가지 형태로 제공될 수 있다.
- [0322] RNA 집단은 긴 전구체 RNAs를 제공하는 데 사용될 수 있고, 또는 선택된 표적 서열과 실질적 또는 완전한 일치도를 가지는 전구체 RNAs는 siRNA를 만드는 데 사용될 수 있다. RNA는 당업자라면 잘 숙지하고 있는 방법에 따라 세포 또는 조직으로부터 분리, 합성, 및/또는 클론될 수 있다. RNAs는 혼합된 집단 (세포 또는 조직으로부터 획득되고, cDNA로부터 전사되고, 차감되고, 선택되는 등등)일 수 있거나, 단일한 표적 서열을 나타낼 수 있다. RNA는 자연적으로 생길 수 있고, 예로 조직 또는 세포 시료로부터 분리되거나, *시험관내* 예로 T7 또는 SP6 중합효소 및 PCR 산물 또는 클론된 cDNA를 사용하여 합성되거나; 또는 화학적으로 합성될 수 있다.
- [0323] 긴 dsRNA를 형성하기 위하여, 합성 RNAs의 경우 보체가 또한 *시험관내* 전사되고 ds RNA를 형성하도록 혼성화된다. 자연적으로 생긴 RNA 집단이 사용되는 경우라면, RNA 보체도 역시 예로 RNA 집단에 해당하는 cDNAs를 전사하는 것에 의해, 또는 RNA 중합효소를 사용하는 것에 의해 제공된다 (예로, 대장균 RNase III 또는 다이서 (Dicer)에 의한 소화를 위한 dsRNA를 형성하기 위함). 그 다음 전구체 RNAs는 소화를 위해 이중가닥 RNAs를 형

성하도록 혼성화된다. dsRNAs는 직접적으로 핵산-지질 입자에 캡슐화될 수 있거나 캡슐화 이전에 시험관내 소화될 수 있다.

[0324] 대안으로, 하나 이상의 siRNA 주형을 인코딩하는 하나 이상의 DNA 플라스미드는 핵산-지질 입자에 캡슐화된다. siRNA는 RNA 중합효소 III 전사 단위를 가지는 플라스미드에 있는 DNA 주형으로부터 나온 헤어핀 루프로 이중체 내에 자동적으로 접히는 서열로서 전사될 수 있고, 예를 들어 작은 핵 RNA U6 또는 인간 RNase P H1 (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); 또한 Sui, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 99:5515 (2002)를 보라)에 대한 자연적으로 생기는 전사 단위를 기초로 한다. 전형적으로, 전사 단위 또는 카세트는 원하는 siRNA 서열의 전사를 위한 주형에 작동적으로 연결된 H1- 또는 U6 프로모터와 같은 RNA 전사체 프로모터 서열 및 2-3개의 우리딘 잔기와 폴리티민 (T5) 서열 (폴리아데닐화 신호)을 포함하는 종결 서열을 포함할 것이다 (Brummelkamp, Science, 상기 기술함). 선택된 프로모터는 전신발현 (constitutive)하거나 유도가능한 (inducible) 전사를 제공할 수 있다. RNA 간섭 분자의 DNA-유도된 (DNA-directed) 전사를 위한 조성물 및 방법은 본 명세서에서 참고문헌에 의해 통합되어 있는 미국특허 번호 제 6,573,099호에 상세히 기술되어 있다. 상세하게는, 합성된 또는 전사된 siRNA는 약 1-4개의 뉴클레오타이드, 바람직하게는 2-3개의 뉴클레오타이드 및 5' 포스페이트 말단의 3' 돌출부 (overhangs)을 가진다 (Elbashir, et al., Genes Dev. 15:188 (2001); Nykanen, et al., Cell 107:309 (2001)). 전사 단위는 간섭 RNA가 이로부터 전사된 플라스미드 또는 DNA 벡터 내로 도입된다. 치료적 목적을 위한 유전 물질의 생체내 전달에 적합한 플라스미드는 미국특허 번호 제5,962,428호 및 제 5,910,488호에 상세히 기술되고, 이들 둘 다는 본 명세서에서 참고문헌에 의해 통합되어 있다. 선택된 플라스미드는 표적 세포의 일시적 또는 안정한 전달을 위해 제공된다. 원래 원하는 유전자 서열을 발현시키도록 설계된 플라스미드가 siRNA전사용 전사 단위 카세트를 포함하도록 변형될 수 있는 점은 당업자에게 자명할 것이다.

[0325] PCR 방법과 같이 (미국특허 번호 제 4,683,195호 및 제 683,202호; 프로토콜: 방법과 적용의 안내 (A Guide to Methods and Applications, Innis et al., eds, 1990)를 보라), RNA를 분리하고, RNA를 합성하고, 핵산을 혼성화하고, cDNA 라이브러리를 제조하고 검색하며, 또한 PCR을 수행하는 방법은 당해 기술분야에 잘 숙지되어 있다 (예로, Gubler & Hoffman, Gene 25:263-269 (1983); Sambrook et al., supra; Ausubel et al., 등을 보라). 또한 발현 라이브러리도 당업자라면 잘 숙지하고 있다. 본 명세서에서 사용하는 일반적인 방법을 기재하고 있는 추가적인 기본 참고서로는 샘브룩 등, 분자적 클로닝, 실험실 매뉴얼 (Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed. 1989); 크리글러, 유전자 전달 및 발현: 실험실 매뉴얼 (Kriegler, Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual, 1990); 및 분자생물학의 최신 프로토콜 (Current Protocols in Molecular Biology) (Ausubel et al., eds., 1994)을 포함한다.

[0326] 일반적으로, 관심 있는 유전자 산물의 해독 (예로, 발현)을 저하조절하거나 침묵시키기 위하여 핵산-지질 입자를 전달하는 것이 바람직하다. 적합한 부류의 유전자 산물로는, 이에 제한되는 것은 아니지만 바이러스 감염 및 생존과 연관된 유전자, 대사적 질환 및 장애와 연관된 유전자 (예로, 간이 표적이 되는 질환 및 장애, 또한 간 질환 및 장애) 및 장애, 종양화 (tumorigenesis) 및 세포 형질전환, 혈관형성 유전자, 염증성 및 자가면역 반응과 연관된 것과 같은 면역조절인자 유전자, 리간드 수용체 유전자 및 신경퇴화성 장애와 연관된 유전자를 포함한다.

[0327] 바이러스 감염 및 생존과 연관된 유전자로는 세포에 결합하고, 침투하고 복제하기 위하여 바이러스에 의해 발현되는 것을 포함한다. 특히 관심이 있는 것은 만성 바이러스 질환과 연관된 바이러스 서열이다. 특히 관심있는 바이러스 서열로는 간염 바이러스 (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); and FIELDS VIROLOGY (Knipe et al. eds. 2001)), 인간 면역결핍 바이러스 (HIV) (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)), 헤르페스 바이러스 (Jia, et al., J. Virol. 77:3301 (2003)), 및 인간 파필로마 바이러스 (HPV) (Hall, et al., J. Virol. 77:6066 (2003); Jiang, et al., Oncogene 21:6041 (2002))의 서열을 포함한다. 침묵될 수 있는 대표적인 간염 바이러스 핵산 서열로는 이에 제한되는 것은 아니지만: 전사 및 해독에 연루된 핵산 서열 (예로, En1, En2, X, P), 구조 단백질을 인코딩하는 핵산 서열 (예로, C 및 C-관련 단백질을 포함하는 코아 단백질; S, M, 및/또는 L 단백질을 포함하는 캡시드 및 외막 단백질, 또는 그들의 단편) (예로,

FIELDS VIROLOGY, 2001, 등을 보라)을 포함한다. 침묵될 수 있는 대표적인 간염 C핵산 서열로는 이에 제한되는 것은 아니지만: 세린 프로테아제 (예로, NS3/NS4), 헬리케이스 (helicases) (예로, NS3), 중합효소 (예로, NS5B), 및 외막 단백질 (예로, E1, E2, 및 p7)을 포함한다. 감염 A 핵산 서열은 예로, 진뱅크 기탁번호 (Genbank Accession) 제 NC_001489호에 설명되고; 감염 B 핵산 서열은 예로, 진뱅크 기탁번호 제 NC_003977호에 설명되고; 감염 C 핵산 서열은 예로, 진뱅크 기탁번호 제 NC_004102호에 설명되고; 감염 D 핵산 서열은 예로, 진뱅크 기탁번호 제 NC_001653호에 설명되고; 감염 E 핵산 서열은 예로, 진뱅크 기탁번호 제 NC_001434호에 설명되고; 또한 감염 G 핵산 서열은 예로, 진뱅크 기탁번호 제 NC_001710호에 설명된다. 바이러스 감염 및 생존과 연관된 유전자를 인코딩하는 서열의 침묵화는 바이러스 질병을 치료하는 데 사용되는 통상적인 제제의 투여와 조합하여 편리하게 사용될 수 있다.

[0328] 대사적 질환 및 장애와 연관된 유전자 (예로, 간이 표적이 되는 질환 및 장애, 또한 간 질환 및 장애)로는 예를 들어 이상지질혈증 (dyslipidemia)에서 발견되는 유전자 (예로, 간 X 수용체 (예로, LXR α 및 LXR β , 진뱅크 기탁번호 제 NM_007121호), 파네소이드 X 수용체 (farnesoid X receptors, FXR) (진뱅크 기탁번호 제 NM_005123호), 스테롤-조절성 요소 결합 단백질 (SREBP), Site-1 프로테아제 (S1P), 3-하이드록시-3-메틸글루타릴 공효소-A 환원효소 (coenzyme-A reductase), 아포리포단백질 B (ApoB), 및 아포리포단백질 E (ApoE)) 또한 당뇨병 (예로, 포도당 6-포스파타제)(예로, Forman et al., Cell 81:687 (1995); Seol et al., Mol. Endocrinol. 9:72 (1995), Zavacki et al., PNAS USA 94:7909 (1997); Sakai, et al., Cell 85:1037-1046 (1996); Duncan, et al., J. Biol. Chem. 272:12778-12785 (1997); Willy, et al., Genes Dev. 9(9):1033-45 (1995); Lehmann, et al., J. Biol. Chem. 272(6):3137-3140 (1997); Janowski, et al., Nature 383:728-731 (1996); Peet, et al., Cell 93:693-704 (1998)를 보라)에서 발견되는 유전자를 포함한다. 당뇨병이라면 대사적 질환 및 장애와 연관된 유전자(예로, 간이 표적이 되는 질환 및 장애, 또한 간 질환 및 장애)가 간 자체에서 발견될뿐만 아니라 다른 기관 및 조직에서 발견되는 유전자를 포함하는 것을 이해할 것이다. 대사적 질환 및 장애와 연관된 유전자를 인코딩하는 서열의 침묵화는 바이러스 질병을 치료하는 데 사용되는 통상적인 제제의 투여와 조합하여 편리하게 사용될 수 있다.

[0329] 종양화 및 세포 형질전환과 연관된 유전자 서열의 예로는 MLL 융합 유전자, - (Wilda, et al., Oncogene, 21:5716 (2002); Scherr, et al., Blood 101: 1566), TEL-1, EWS-1, -FUS, 3-FKHR, BCL-2, 1-ETO 및 1-8 (Heidenreich, et al., Blood 101:3157 (2003))와 같은 전위 (translocation) 서열; 다중약물 저항성 유전자 (Nieth, et al., FEBS Lett. 545:144 (2003); Wu, et al, Cancer Res. 63:1515 (2003)), 사이클린 (Li, et al., Cancer Res. 63:3593 (2003); Zou, et al., Genes Dev. 16:2923 (2002)), 베타-카테닌 (beta-Catenin) (Verma, et al., Clin Cancer Res. 9:1291 (2003)), 텔로머라제 유전자 (Kosciolek, et al., Mol Cancer Ther. 2:209 (2003)), c-MYC, N-MYC, BCL-2, ERBB1 및 ERBB2 (Nagy, et al. Exp. Cell Res. 285:39 (2003))와 같은 과다발현된 서열; 또한 (Tuschl and Borkhardt, Mol. Interventions, 2:158 (2002)에 리뷰됨)와 같은 돌연변이된 서열을 포함한다. DNA 복구효소를 인코딩하는 서열의 침묵화는 화학치료 제제의 투여와 조합하여 사용된다 (Collis, et al., Cancer Res. 63:1550 (2003)). 종양 이동 (tumor migration)과 연관된 단백질을 인코딩하는 유전자도 역시 관심있는 표적 서열이고, 예를 들어 인테그린 (integrins), 셀렉틴 (selectins) 및 금속단백질분해효소 (metalloproteinases)를 들 수 있다. 상기 예들은 배타적인 것이 아니다. 종양화 또는 세포 형질전환, 종양 성장 또는 종양 이동을 용이하게 하거나 상승시키는 전부 또는 부분적 유전자 서열이라면 모두가 주형 서열로서 포함될 수 있다.

[0330] 혈관형성 유전자는 새로운 혈관의 형성을 촉진시킬 수 있다. 특히 관심이 있는 것은 혈관 내피 성장인자 (VEGF)이다 (Reich, et al., Mol. Vis. 9:210 (2003)).

[0331] 면역조절인자 유전자는 하나 이상의 면역 반응을 조절하는 유전자이다. 면역조절인자 유전자의 예로는 성장인자 (예로, TGF- α , TGF- β , EGF, FGF, IGF, NGF, PDGF, CGF, GM-CSF, SCF, 등)과 같은 사이토카인, 인터루킨 (예로, IL-2, IL-4, IL-12 (Hill, et al., J. Immunol. 171:691 (2003)), IL-15, IL-18, IL-20, 등), 인터페론 (예로, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , 등) 및 TNF을 포함한다. Fas 및 Fas 리간드 유전자도 역시 관심있는 면역조절인자 표적 서열이다 (Song, et al., Nat. Med. 9:347 (2003)). 조혈 및 림프 세포에서 이차적 신호전달 분자를 인코딩하는 유전자, 예를 들어 브루턴 타이로신 키나제 (Bruton's tyrosine kinase. Btk)와 같은 Tec 패밀 리 키나제도 또한 본 발명에 포함된다 (Heinonen, et al., FEBS Lett. 527:274 (2002)).

[0332] 본 발명의 세포 수용체 리간드는 단백질 또는 스테로이드 분자일 수 있다. 세포 수용체 리간드는 세포 표면 수용체 (예로, 인슐린 수용체, EPO 수용체, G-단백질 결합된 수용체, 타이로신 키나제 활성인 수용체, 사이토카인 수용체, 성장인자 수용체, 등)에 결합할 수 있고, 수용체가 연루된 생리학적 경로를 조절 (예로, 저해, 활성화,

등)할 수 있는 리간드를 포함한다. 세포 표면 수용체 리간드의 예로는 사이토카인, 성장인자, 인터루킨, 인터페론, 에리트로포이에틴 (EPO), 인슐린, 글루카곤, G-단백질 결합 수용체 리간드 등을 포함한다. 트리뉴클레오타이드 반복서열 (repeats)의 확장을 코딩하는 주형 (예로, 반복서열)은 척수연수 근육위축증 (spinobulbular muscular atrophy) 및 헌팅턴씨 질환과 같은 트리뉴클레오타이드 반복서열의 확장에 의해 유발되는 신경퇴화성 장애에서 병원성 서열을 침묵시키는 데 사용된다 (Caplen, et al., Hum. Mol. Genet. 11:175 (2002)). 세포 수용체 리간드도 역시 세포 표면 수용체에는 결합하지 않지만 세포내 수용체에는 결합하는 리간드를 포함한다 (예로, 핵과 세포질에 위치하는 스테로이드 수용체, 및 세포질내 망상구조에 위치하는 이노시톨 포스페이트 수용체)를 포함한다. 세포내 수용체 리간드의 예로는 스테로이드 호르몬, 이노시톨 트리포스페이트, 및 세포내 (intracrine) 펩타이드 호르몬과 같은 친유성 호르몬을 포함한다.

[0333] 정의들

[0334] 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 “알킬 (alkyl)” 은 1개부터 10개까지 탄소 원자를 포함하는 이들 알킬 그룹을 포함한다. 알킬 그룹은 직선 또는 분지상이다. “알킬” 의 예로는 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, 부틸, 이소-, 세크- 및 터르-부틸, 펜틸, 이소펜틸, 헥실, 3-메틸헥실, 헵틸, 옥틸, 노닐, 및 3-에틸부틸 등을 포함한다. 바람직한 알킬 C₁-C₆ 알킬이다. 본 발명의 알킬 그룹은 임의적으로 본 명세서에서 제공된 바와 같은 다양한 그룹으로 치환될 수 있다. 따라서, 치환에 사용가능한 탄소 원자라면 모두가 더 나아가, 예를 들어 할로젠, OH, NO₂, CN, NH₂, C₁-C₈ 알킬, C₁-C₈ 알콕시, NH(C₁-C₈ 알킬), N(C₁-C₈ 알킬)(C₁-C₈ 알킬), C₃-C₁₀ 사이클로알킬, (C₃-C₁₀ 사이클로알킬) 알킬, (C₃-C₁₀ 사이클로알킬)알콕시, C₂-C₉ 헤테로사이클로알킬, C₁-C₈ 알케닐, C₁-C₈ 알키닐, 할로(C₁-C₈)알킬, 할로(C₁-C₈)알콕시, 옥소, 아미노(C₁-C₈)알킬, 모노- 및 디(C₁-C₈ 알킬)아미노(C₁-C₈) 알킬, C₁-C₈ 아실, C₁-C₈ 아실옥시, C₁-C₈ 설포닐, C₁-C₈ 티오, C₁-C₈ 설펜아미도, 및 C₁-C₈ 아미노설포닐과 같은 다양한 치환기에 결합될 수 있다.

[0335] 용어 “알킬렌 (alkylene)” 은 바람직하게 1개부터 5개까지, 더욱 바람직하게는 1개부터 3개까지의 직쇄 또는 분지쇄 둘 중 하나인 탄소 원자를 가지는 이가 (divalent) 포화 지방족 탄화수소 기를 말한다. 본 용어는 메틸렌 (CH₂), 에틸렌 (CH₂CH₂), n-프로필렌 (CH₂CH₂CH₂), 및 이소-프로필렌 (CH₂CH(CH₃)) 등과 같은 그룹으로 대표된다.

[0336] 용어 “알킬렌옥시 (alkyleneoxy)” 는 산소에 결합된 이가 포화 지방족 탄화수소 기를 말하고, 지방족 탄화수소 기는 바람직하게 1개부터 5개까지, 더욱 바람직하게 1개부터 3개까지의 직쇄 또는 분지쇄 둘 중 하나인 탄소 원자를 가진다.

[0337] 용어 “아릴 (aryl)” 은 적어도 하나의 방향족 고리를 포함하는 방향족 탄화수소 고리 시스템을 말한다. 방향족 고리는 임의적으로 다른 방향족 탄화수소 고리 또는 비-방향족 탄화수소 고리에 융합되거나 다른 경우라면 부착될 수 있다. 아릴 그룹의 예로는, 예를 들어 페닐 (phenyl), 나프틸 (naphthyl), 안트라세닐 (anthracenyl), 1,2,3,4-테트라하이드로나프탈렌 (1,2,3,4-tetrahydronaphthalene), 인데닐 (indenyl), 2,3-하이드로인덴일 (2,3-dihydroindenyl), 및 바이페닐 (biphenyl)을 포함한다. 아릴 그룹의 바람직한 예로는 페닐, 나프틸, 1,2,3,4-테트라하이드로나프탈렌, 및 2,3-하이드로인덴일을 포함한다. 더욱 바람직한 아릴 그룹은 페닐 및 나프틸이다. 가장 바람직한 것은 페닐이다. 본 발명의 아릴 그룹은 임의적으로 본 명세서에서 제공된 바와 같은 다양한 그룹으로 치환될 수 있다. 따라서, 아릴 고리 시스템 내에 존재하고 치환에 사용가능한 탄소 원자라면 모두가 더 나아가, 예를 들어 할로젠, OH, NO₂, CN, NH₂, C₁-C₈ 알킬, C₁-C₈ 알콕시, NH(C₁-C₈ 알킬), N(C₁-C₈ 알킬)(C₁-C₈ 알킬), C₃-C₁₀ 사이클로알킬, (C₃-C₁₀ 사이클로알킬) 알킬, (C₃-C₁₀ 사이클로알킬)알콕시, C₂-C₉ 헤테로사이클로알킬, C₁-C₈ 알케닐, C₁-C₈ 알키닐, 할로(C₁-C₈)알킬, 할로(C₁-C₈)알콕시, 옥소, 아미노(C₁-C₈)알킬, 모노- 및 디(C₁-C₈ 알킬)아미노(C₁-C₈) 알킬, C₁-C₈ 아실, C₁-C₈ 아실옥시, C₁-C₈ 설포닐, C₁-C₈ 티오, C₁-C₈ 설펜아미도, 및 C₁-C₈ 아미노설포닐과 같은 다양한 고리 치환기에 결합될 수 있다.

[0338] 용어 “사이클로알킬 (cycloalkyl)” 은 C₃-C₈ 사이클릭 탄화수소를 말한다. 사이클로알킬의 예로는 사이클로프로필, 사이클로부틸, 사이클로펜틸, 사이클로헥실, 사이클로헵틸 및 사이클로옥틸을 포함한다. 더욱 바람직한 것은 C₃-C₆ 사이클로알킬 그룹이다. 본 발명의 사이클로알킬 그룹은 임의적으로 본 명세서에서 제공된 바와 같은 다양한 그룹으로 치환될 수 있다. 따라서, 사이클로알킬 고리 시스템 내에 존재하고 치환에 사용가능한 탄소 원

자라면 모두가 더 나아가, 예를 들어 할로젠, OH, NO₂, CN, NH, C₁-C₈ 알킬, C₁-C₈ 알콕시, NH(C₁-C₈ 알킬), N(C₁-C₈ 알킬)(C₁-C₈ 알킬), C₃-C₁₀ cycloalkyl, (C₃-C₁₀ 사이클로알킬) 알킬, (C₃-C₁₀ 사이클로알킬)알콕시, C₂-C₉ 헤테로사이클로알킬, C₁-C₈ 알케닐, C₁-C₈ 알키닐, 할로(C₁-C₈)알킬, 할로(C₁-C₈)알콕시, 옥소, 아미노(C₁-C₈)알킬, 모노- 및 디(C₁-C₈알킬)아미노(C₁-C₈)알킬과 같은 다양한 고리 치환기에 결합될 수 있다.

[0339]

용어 “헤테로사이클로알킬 (heterocycloalkyl)”은 질소, 산소, 및 황으로부터 선택된 적어도 하나의 헤테로원자를 포함하는 고리 또는 고리 시스템을 말하고, 여기에서 상기 헤테로원자는 비-방향족 고리 내에 있고 고리 시스템은 비-방향족 고리(들)의 (하나의) 구성원에 의해 모 그룹에 부착된다. 헤테로사이클로알킬 고리는 임의적으로 다른 헤테로사이클로알킬 고리 및/또는 비-방향족 탄화수소 고리, 및/또는 페닐 고리에 융합된다. 따라서, 본 발명에 적합한 헤테로사이클로알킬 그룹은 적어도 3개의 구성원을 가지고, 20개까지의 구성원을 가질 수 있다. 바람직한 헤테로사이클로알킬 그룹은 3개부터 10개까지의 구성원을 가진다. 소정의 더욱 바람직한 헤테로사이클로알킬 그룹은 8-10개의 구성원을 가진다. 기타 더욱 바람직한 헤테로사이클로알킬 그룹은 5개 또는 6개의 구성원을 가진다. 헤테로사이클로알킬 그룹의 예로는, 예를 들어 1,2,3,4-테트라하이드로이소퀴놀리닐 (1,2,3,4-tetrahydroisoquinoliny), 1,2-디하이드로퀴놀리닐 (1,2-dihydroquinoliny), 1,2,3,4-테트라하이드로퀴놀리닐 (1,2,3,4-tetrahydroquinoliny), 벤조[1,4]옥사지닐 (benzo[1,4]oxazinyl), 2,3-디하이드로 벤조[1,4]옥사지닐 (2,3-dihydrobenzo[1,4]oxazinyl), 인도리닐 (indoliny), 벤조[1,3]디옥소릴 (benzo[1,3]dioxolyl), 2H-크로메닐 (2H-chromenyl), 피페라지닐 (piperazinyl), 모르포리닐 (morpholinyl), 피페리디닐 (piperidinyl), 피페라지닐 (piperazinyl), 테트라하이드로퓨라닐 (tetrahydrofuranyl), 피롤리디닐 (pyrrolidinyl), 피리디노닐 (pyridinonyl), 아제티디닐 (azetidiny), 아지리디닐 (aziridinyl), 및 피라졸리디닐 (pyrazolidinyl)을 포함한다. 바람직한 헤테로사이클로알킬 그룹은 피페리디닐, 피페라지닐, 모르포리닐, 피롤리디닐, 피리디노닐, 디하이드로피롤리디닐, 아제티디닐, 아지리디닐, 2,3,4-테트라하이드로퀴놀리닐, 2,3-디하이드로벤조[1,4]옥사지닐, 인도리닐, 벤조[1,3]디옥소릴, 및 피롤리디노닐을 포함한다. 더욱 바람직한 헤테로사이클로알킬 그룹은 피롤리디닐, 피페리디닐, 아제티디닐, 아지리디닐, 피페라지닐, 모르포리닐, 2,3,4-테트라하이드로퀴놀리닐, 2,3-디하이드로벤조 [1,4]옥사지닐, 인도리닐, 및 벤조[1,3]디옥소릴이다. 본 발명의 헤테로사이클로알킬 그룹은 임의적으로 본 명세서에서 제공된 바와 같은 다양한 그룹으로 치환될 수 있다. 따라서, 헤테로사이클로알킬 고리 시스템 내에 존재하고 치환에 사용가능한 탄소 원자라면 모두가 더 나아가, 예를 들어 할로젠, OH, NO₂, CN, NH, C₁-C₈ 알킬, C₁-C₈ 알콕시, NH(C₁-C₈ 알킬), N(C₁-C₈ 알킬)(C₁-C₈ 알킬), C₃-C₁₀ cycloalkyl, (C₃-C₁₀ 사이클로알킬) 알킬, (C₃-C₁₀ 사이클로알킬)알콕시, C₂-C₉ 헤테로사이클로알킬, C₁-C₈ 알케닐, C₁-C₈ 알키닐, 할로(C₁-C₈)알킬, 할로(C₁-C₈)알콕시, 옥소, 아미노(C₁-C₈)알킬, 모노- 및 디(C₁-C₈알킬)아미노(C₁-C₈)알킬과 같은 다양한 고리 치환기에 결합될 수 있다.

[0340]

용어 “헤테로아릴 (heteroaryl)”은 질소, 산소, 및 황으로부터 선택된 적어도 하나의 헤테로원자를 포함하는 방향족 고리 시스템을 말하고, 고리 시스템은 방향족 고리(들)의 (하나의) 구성원에 의해 모 그룹에 부착된다. 헤테로아릴 고리는 하나 이상의 헤테로아릴 고리, 방향족 또는 비-방향족 탄화수소 고리 또는 헤테로사이클로알킬 고리에 융합될 수 있다. 따라서, 본 발명에 적합한 헤테로아릴 그룹은 적어도 5개의 구성원을 가지고, 또한 20개까지 가질 수 있다. 헤테로아릴 그룹의 예로는, 예를 들어 피리딘 (pyridine), 퓨란 (furan), 티에닐 (thienyl), 5,6,7,8-테트라하이드로이소퀴놀리닐 (5,6,7,8-tetrahydroisoquinoliny) 및 피리미디닐 (pyrimidinyl)을 포함한다. 바람직한 헤테로아릴 그룹은 티에닐, 벤조티에닐, 피리디닐, 퀴놀리닐, 피라조닐, 피리디닐, 이미다조릴, 벤조이미다조릴, 퓨라닐, 벤조퓨라닐, 디벤조퓨라닐, 티아조릴, 벤조티아조릴, 이소옥사조릴, 옥사디아조릴, 이소티아조릴, 벤즈이소티아조릴, 트리아조릴, 피롤릴, 인도릴, 5,6-디하이드로퀴나조리닐, 4,5,6,7-테트라하이드로인도릴 4,5-디하이드로-2H-인다조릴, 5,6-디하이드로퀴나조리닐, 피라조릴, 및 벤즈피라조릴을 포함한다. 더욱 바람직한 헤테로아릴 그룹은 벤조피라조릴, 피리디닐, 피라조릴, 및 퀴놀리닐이다. 본 발명의 헤테로아릴 그룹은 임의적으로 본 명세서에서 제공된 바와 같은 다양한 그룹으로 치환될 수 있다. 따라서, 헤테로아릴 고리 시스템 내에 존재하고 치환에 사용가능한 탄소 원자라면 모두가 더 나아가, 예를 들어 할로젠, OH, NO₂, CN, NH, C₁-C₈ 알킬, C₁-C₈ 알콕시, NH(C₁-C₈ 알킬), N(C₁-C₈ 알킬)(C₁-C₈ 알킬), C₃-C₁₀ cycloalkyl, (C₃-C₁₀ 사이클로알킬) 알킬, (C₃-C₁₀ 사이클로알킬)알콕시, C₂-C₉ 헤테로사이클로알킬, C₁-C₈ 알케닐, C₁-C₈ 알키닐, 할로(C₁-C₈)알킬, 할로(C₁-C₈)알콕시, 옥소, 아미노(C₁-C₈)알킬, 모노- 및 디(C₁-C₈알킬)아미노(C₁-C₈)알킬과 같은 다양한 고리 치환기에 결합될 수 있다.

- [0341] 본 명세서에서 사용된 바 “항-증식 활성 (anti-proliferative activity)” 은 당해 기술분야에 알려져 있는 바와 같은 미조절된 세포 성장 또는 복제를 특징으로 하는 질환, 조건, 형질, 유전형 (genotype) 또는 표현형 (phenotype)에 대항하는 생물학적 활성을 의미하고, 백혈병, 예를 들어 급성 골수성 백혈병 (), 만성 골수성 백혈병 (CML), 급성 림프구성 백혈병 (), 및 만성 림프구성 백혈병, 카포시 육종과 같은 AIDS 관련 암; 유방암; 골육종과 같은 골암, 연골육종, 어빙 육종 (Ewing's sarcoma), 섬유육종, 거대세포 종양, 사기질종 (Adamantinomas), 및 척삭종 (Chordomas); 수막종 (Meningiomas), 신경교아세포종 (Glioblastomas) 저등급 성상세포종 (Lower-Grade Astrocytomas), 올리고가지세포종 (Oligodendrocytomas), 뇌하수체 종양, 슈반종 (Schwannomas) 및 전이성 뇌암과 같은 뇌암; 외투세포 림프종 (mantle cell lymphoma)와 같은 다양한 림프종을 포함하는 머리와 목의 암, 비-호지킨 림프종 (non-Hodgkins lymphoma), 선종 (adenoma), 편평세포 암종, 후두 암종, 담낭 및 담즙관 암, 망막모세포종 (retinoblastoma)와 같은 망막의 암, 식도의 암, 위암, 다발성 골수종, 난소암, 자궁암, 갑상선암, 정소암, 자궁내막암, 흑색종 (melanoma), 직장암, 폐암 (비-소세포 폐 암종을 포함함), 방광암, 전립선암, 췌장암, 육종, 윌름 종양 (Wilms' tumor), 자궁경부암, 머리 및 목 암, 피부암, 비인두 암종, 지방육종, 상피세포 암종, 신장세포 암종, 담낭 샘암종, 이하선 샘암종, 자궁내막 육종, 다중약물 저항성 암; 또한 종양 혈관형성과 연관된 신생혈관형성, 황반 변성 (예로, 습윤/건조 AMD), 각막 신생혈관형성, 당뇨병 망막증, 신생혈관형성 녹내장, 근시변성, 재협착 및 다낭 신장병과 같은 기타 증식성 질환 및 질병, 또한 그의 다른 암 또는 증식성 질환, 질병, 형질, 세포 또는 조직에서 단독으로 또는 다른 치료법과 조합하여 질환 관련 유전자 발현의 조절에 반응할 수 있는 유전형 또는 표현형을 포함한다
- [0342] 용어 “애타머 (aptamer)”는 또 다른 분자에 결합하는 핵산을 의미한다. 본 결합 상호작용은 왓슨-크릭 염기쌍 형성 (예로, A는 U 또는 T에 결합하고 G는 C에 결합한다)에 의해 대표되는 표준 핵산/핵산 수소결합 형성을 포괄하는 것은 아니지만, 그 외 모든 유형의 비-공유 (또는 일정 경우에 공유) 결합을 포괄한다. 비-공유 결합의 비-제한적인 예로는 수소 결합 형성, 정전기적 상호작용, 반데르 발스 상호작용 및 소수성 상호작용을 포함한다. 애타머는 이들 유형의 상호작용의 일부 또는 전부에 의해, 또는 일정 경우 공유적 상호작용에 의해 다른 분자와 결합한다. 애타머의 다른 분자와의 공유 결합은 애타머 또는 표적 분자가 화학적으로 반응하는 또는 광반응하는 모이어티 (moiety)을 포함한다. 용어 “애타머”는 의도된 표적 물질과 복합체를 형성할 수 있는 핵산을 말한다. “표적-특이적 (Target-specific)” 은 애타머가 표적 분석물에 그가 오염 물질에 결합하는 것보다 훨씬 더 높은 친화도를 가지고 결합하는 것을 의미한다.
- [0343] 용어 “생물학적으로 활성인 분자 (biologically active molecule)” 는 본 명세서에서 사용되는 바 시스템에서 생물학적 반응을 나타낼 수 있거나 변형시킬 수 있는 화합물 또는 분자를 말한다. 생물학적으로 활성인 분자의 비제한적인 예로는 항체 (예로, 모노클론, 키메라, 인간화 등), 콜레스테롤, 호르몬, 항바이러스제, 펩타이드, 단백질, 화학치료제, 올리고뉴클레오타이드, 효소적 핵산 (예로, 리보자임 등), 안티센스 핵산, 삼중복합체 형성 올리고뉴클레오타이드 (triplex forming oligonucleotides), 2,5-A 키메라, dsRNA, (예로, siNA, siRNA 등), 알로자임 (allozymes), 애타머, 데코이 (decoys), 리보솜, 또는 의 안티센스 폴리뉴클레오타이드 또는 및 의 조합, miRNA, shRNA, 또한 치료적으로 유용한 단백질을 인코딩하는 게놈DNA, cDNA, 또는 mRNA의 폴리뉴클레오타이드 및 그들의 유사체 (analogs)를 포함한다. 본 발명의 생물학적으로 활성인 분자는 다른 생물학적으로 활성인 분자의 약물동력학 및/또는 약물역학을 조절할 수 있는 분자, 예를 들어 지질 및 폴리아민, 플라아마이드, 폴리에틸렌 글리콜 및 기타 폴리에테르와 같은 중합체를 포함한다. 소정의 구현예에서, 용어 생물학적으로 활성인 분자는 본 명세서에서의 용어 “분자 (molecule)” 또는 “관심있는 분자 (molecule of interest)” 와 상호교환적으로 사용될 수 있다
- [0344] 본 명세서에서 사용되는 바, “양이온성 지질 (cationic lipid)” 은 화학식 I-VI이라면 모두의 화합물과 같은 약 생리학적 pH에서 절대 양성 전하를 가지는 친유성 화합물이라면 모두를 의미한다.
- [0345] 본 명세서에서 사용되는 바 “중성 지질 (neutral lipid)” 은 본 명세서에서 정의된 바와 같이 약 생리학적 pH에서 절대 전하를 보유하지 않는 양이온성 지질이 아닌 친유성 화합물이라면 모두를 의미한다. 약 생리학적 pH에서 절대 전하를 전혀 가지지 않는 적합한 화합물로는 쯔비터 이온 (zwitterions)을 포함한다.
- [0346] 본 명세서에서 사용되는 바 “세포 (cell)” 는 그의 보통의 생물학적 의미로 사용되고, 다중세포 생물 전체를 말하는 것은 아니며 예로 상세하게 인간을 말하는 것이 아니다. 세포는 생물, 예로 새, 식물 또한 인간, 소, 양, 유인원, 원숭이, 돼지, 개, 및 고양이와 같은 포유동물에 존재할 수 있다. 세포는 원핵성 (예로, 박테리아 세포) 또는 진핵성 (예로, 포유동물 또는 식물 세포)일 수 있다. 세포는 체세포 또는 생식 계열 기원이고, 전능성 (totipotent) 또는 다능성 (pluripotent)을 가지며, 분열 또는 미-분열할 수 있다. 또한 세포는 배우자

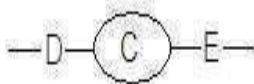
또는 배아, 줄기세포, 또는 완전히 분화된 세포로부터 유래될 수 있거나 이들을 포함할 수 있다.

[0347] 용어 “이중가닥 RNA (double stranded ” 또는 “dsRNA” 는 본 명세서에서 사용되는 바 단간섭 RNA (short interfering siRNA)를 포함하는 간섭을 할 수 있는 이중가닥 분자를 말한다.

[0348] “유전자 (gene)” 에 의하여, RNA를 인코딩하는 핵산, 예를 들어 이에 제한되는 아니지만 폴리펩타이드를 인코딩하는 구조 유전자를 포함하는 핵산 서열을 의미한다. 또한 유전자 또는 표적 유전자는 작은 일시적 (stRNA), 마이크로 (miRNA), 작은 핵 (snRNA), 단간섭 (siRNA), 작은 핵인 (snRNA), 리보솜 (rRNA), 트랜스퍼 (tRNA) 및 그들의 전구체 RNAs와 같은 기능적 RNA (RNA) 또는 비-코딩 DNA (ncRNA)를 인코딩할 수 있다.


[0349] “저해하다 (inhibit)” 또는 “저해 (inhibition)” 에 의하여, 유전자의 발현, 또는 하나 이상의 단백질 또는 단백질 소단위를 인코딩하는 RNA 분자 또는 동등한 RNA 분자의 수준, 또는 하나 이상의 단백질 또는 단백질 소단위의 활성이 핵산 분자 및 본 발명의 분자의 부재 시 관찰되는 것 미만으로 감소되는 것을 의미한다. 한 가지 구현예에서, siRNA 분자를 사용한 저해는 불활성 또는 지연된 분자의 존재 시 관찰되는 수준 미만이다. 또 다른 구현예에서, siRNA 분자를 사용한 저해는, 예를 들어 뒤섞인 서열 또는 불일치 (mismatches)를 가진 siRNA 분자의 존재 시 관찰되는 수준 미만이다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 핵산 분자를 사용한 유전자 발현의 저해는 핵산 분자의 부재 시보다 존재 시 더 크다. 한 가지 구현예에서, 유전자 발현의 저해는 표적 핵산 분자 (예로, RNA)의 RNAi 매개성 절단과 같은 전사후 침묵화 (post transcriptional silencing) 또는 해독의 저해와 연관되어 있다. 한 가지 구현예에서, 저해는 전사전 침묵화 (pretranscriptional silencing)와 연관되어 있다.

[0350] 용어 “링커 (linker)” 및 “링커 기 (linker group)” 는 하나 이상의 분자를 서로 연결하는 다가 (polyvalent), 바람직하게는 이가 모이어티를 말한다. 예로는 중합체 모이어티 G 의 부분들을 다 함께 연결하거나 표적 리간드 T를 중합체 모이어티 G 에 연결하는 모이어티이다. 링커는 생분해성 또는 생물안정성을 가질 수 있다. 생분해성 링커는 그들의 안정성이 특정한 조직 또는 세포 유형에 대한 전달과 같은 특정한 목적을 위해 조절될 수 있도록 설계된다. 적합한 링커 기의 예로는 다음의 그룹을 포함한다: -C(O)-, -O-, -O-C(O)O-, -C(O)CH₂CH₂C(O)-, -S-S-, -NR³-, -NR³C(O)O-, -OC(O)NR³-, -NR³C(O)-, -C(O)NR³-, -NR³C(O)NR³-, -알킬렌-NR³C(O)O-, -알킬렌-NR³C(O)NR³-, -알킬렌-OC(O)NR³-, -알킬렌-NR³-, -알킬렌-O-, -알킬렌-NR³C(O)-, -알킬렌-C(O)NR³-, -NR³C(O)O-알킬렌-, -NR³C(O)NR³-알킬렌-, -OC(O)NR³-알킬렌, -NR³-알킬렌-, -O-알킬렌 -, -NR³C(O)-알킬렌-, -C(O)NR³-알킬렌-, -알킬렌-NR³C(O)O-알킬렌-, -알킬렌-NR³C(O)NR³-알킬렌-, -알킬렌-OC(O)NR³-알킬렌-, -알킬렌-NR³-알킬렌-, -알킬렌-O-알킬렌-, -알킬렌-NR³C(O)-알킬렌-, -C(O)NR³-알킬렌-, -NR³C(O)O-알킬렌옥시-, -NR³C(O)NR³-알킬렌옥시-, -OC(O)NR³-알킬렌옥시-, -NR³-알킬렌옥시-, -O-알킬렌옥시-, -NR³C(O)-알킬렌옥시-, -C(O)NR³-알킬렌옥시-, -알킬렌옥시-NR³C(O)O-알킬렌옥시- 및



[0351]

[0352] 로부터 선택된 적어도 하나의 링커 기를 포함하고,

[0353] 여기에서 R³ 은 수소, 또는 임의적으로 치환된 알킬이고,  는 아릴, 치환된 아릴, 사이클로알킬, 치환된 사이클로알킬, 헤테로아릴, 치환된 헤테로아릴, 헤테로사이클릭 및 치환된 헤테로사이클릭으로 이루어진 그룹으로부터 선택되며, 또한 D 및 E는 독립적으로 결합, -O-, CO, -NR³-, -NR³C(O)O-, -OC(O)NR³-, -NR³C(O)-, -C(O)NR³-, -NR³C(O)NR³-, -알킬렌-NR³C(O)O-, -알킬렌-NR³C(O)NR³-, -알킬렌-OC(O) NR³-, -알킬렌-NR³-, -알킬렌-O-, -알킬렌-NR³C(O)-, -알킬렌-C(O)NR³-, -NR³C(O)O-알킬렌-, -NR³C(O)NR³-알킬렌-, -OC(O) NR³-알킬렌-, -NR³-알킬렌-, -O-알킬렌-, -NR³C(O)-알킬렌-, -NR³C(O)O-알킬렌옥시-, -NR³C(O)NR³-알킬렌옥시-, -OC(O) NR³-알킬렌옥시-, -NR³-알킬렌옥시-, -O-알킬렌옥시-, -NR³C(O)-알킬렌옥시-, -C(O)NR³-알킬렌옥시-, -알킬렌옥시-NR³C(O)O-알킬렌옥시-, -C(O)NR³-알킬렌-, -알킬렌-NR³C(O)O-알킬렌-, -알킬렌-NR³C(O)NR³-알킬렌-, -알킬렌-OC(O) NR³-알킬렌-, -알킬렌-NR³-알킬렌-, -알킬렌-O-알킬렌-, -알킬렌-NR³C(O)-알킬렌-, 및 -C(O)NR³-알킬렌-

으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, 여기에서 R³는 상기에서 정의된 정의된 바와 같다.

[0354] 용어 “표적 리간드 (targeting ligand)”는 수용체와 같은 또 다른 화합물과 직접 또는 간접적으로 상호작용할 수 있는 화합물 또는 약물, 펩타이드, 호르몬, 또는 신경전달물질 (neurotransmitter)과 같은 분자라면 모두를 말한다. 리간드와 상호작용하는 수용체는 세포의 표면에 존재할 수 있고 대안으로 세포내 수용체일 수 있다. 수용체와 리간드의 상호작용은 생화학적 반응을 유도할 수 있거나, 단순히 물리적 상호작용 또는 연관성일 수 있다. 리간드의 비제한적 예로는 약제학적으로 활성인 소분자, 엔도좀분해 제제, 융합성 펩타이드, 세포막 투과제, 전하 차단제, 또는 핵산을 포함한다. 리간드의 기타 비제한적 예로는 갈락토스, 갈락토사민, N-아세틸 갈락토사민과 같은 슈가와 탄수화물; 에스트로겐, 테스토스테론, 프로게스테론, 글루코코티손, 아드레날린, 인슐린, 글루카곤, 코티솔, 비타민 D, 갑상선 호르몬, 레티노산, 및 성장 호르몬과 같은 호르몬; VEGF, EGF, NGF, 및 PDGF과 같은 성장인자; 콜레스테롤; 담즙산; GABA, 글루타메이트, 아세틸콜린과 같은 신경전달물질; NOGO; 이노시톨 트리포스페이트; 디아실글리세롤; 에피네프린; 노르에피네프린; 펩타이드, 폴리에테르와 같은 비타민, 피리독신, 및 바이오틴, 아세틸살리실산 및 나프록센 과 같은 약물, 항체 및 생체내 또는 시험관내에서 수용체와 상호작용할 수 있는 기타 물질이라면 모두를 포함한다. 리간드는 아마이드, 카보닐, 에스테르, 펩타이드, 디설파이드, 실란, 뉴클레오사이드, 특수 뉴클레오사이드 (abasic nucleoside), 폴리에테르, 폴리아민, 폴리아마이드, 탄수화물, 지질, 폴리하이드로카본, 포스페이트 에스테르, 포스포르아미데이트, 티오포스페이트, 알킬 포스페이트, 또는 광-불안정한 링커 (photolabile linker)와 같은 링커 분자를 사용하여 본 발명의 화합물에 부착될 수 있다. 한 가지 구현예에서, 링커는 생분해성 링커이다. 절단에 적합한 조건은, 이에 제한되는 것은 아니지만 pH, UV 조사 (irradiation), 효소적 활성, 온도, 가수분해, 제거 (elimination) 및 치환 반응 또한 연결 (linkage)의 열역학적 특성을 포함할 수 있다.

[0355] 용어 “지질 (lipid)”은 본 명세서에서 사용되는 바, 지질친화성 화합물이라면 모두를 말한다. 지질 화합물의 비제한적 예로는 직쇄, 분지쇄, 포화 및 불포화 지방산, 카로티노이드 (carotenoids), 테르펜 (terpenes), 담즙산, 또한 콜레스테롤 및 그들의 유도체 또는 유사체를 포함하는 스테로이드를 포함하는 지방산 및 그들의 유도체를 포함한다.

[0356] 용어 “지질 입자 (lipid particle)” 또는 “지질 입자 조성물 (lipid particle composition)”은 하나 이상의 생물학적으로 활성인 분자를 독립적으로 또는 양이온성 지질, 중성 지질, 및/또는 폴리에틸렌글리콜-디아실글리세롤 결합체 (예로, 폴리에틸렌글리콜-디아실글리세롤 (-DAG), -콜레스테롤, 또는-DMB)와 조합하여 포함하는 조성물을 말한다. 제형화된 분자적 조성물은 더 나아가 콜레스테롤 또는 콜레스테롤 유도체를 포함할 수 있다. 본 발명의 양이온성 지질은 화학식 I-VI이라면 모두의 화합물, N,N-디올레오일-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), N,N-디메틸-2,3-디올레오일옥시)프로필아민 (DODMA), 1,2-디올레오일-3-디메틸암모늄-프로판 (DODAP), 1,2-디올레오일카바틸-3-디메틸암모늄-프로판 (DOCDAP), 1,2-디리네오일-3-디메틸암모늄-프로판 (DLINDAP), 3-디메틸아미노-2-(콜레스트-5-엔-3-베타-옥시부텐-4-옥시)-1-(시스,시스-9,12-옥타데카디엔옥시)프로판 (CLINDMA), 2-[5'-(콜레스트-5-엔-3-베타-옥시)-3'-옥사헥톡시)-3-디메틸-1-(시스,시스-9',12'-옥타데카디엔옥시)프로판 (CpLin DMA), N,N-디메틸-3,4-디올레오일옥시벤질아민 (DMOBA) 및/또는 그들의 혼합물을 포함할 수 있다. 중성 지질은 디올레오일포스파티딜에탄올아민 (DOPE), 팔미토일올레오일포스파티딜콜린 (POPC), 계란 포스파티딜콜린 (), 디스테아로일포스파티딜콜린 (DSPC), 콜레스테롤 및/또는 그들의 혼합물을 포함할 수 있다. 결합체는 -디로틸글리세롤 (C12), -디미리스틸글리세롤 (C14), -디팔미토일글리세롤 (C16), -디스테릴글리세롤 (C18), -디로틸글리카마이드 (C12), -디미리스틸글리카마이드 (C14), -디팔미토일글리카마이드 (C16), -디스테릴글리카마이드 (C18), -콜레스테롤, 또는 -DMB를 포함할 수 있다. 양이온성 지질 성분은 제형에 존재하는 전체 지질의 약 2%로부터 약 60%까지, 약 5%로부터 약 45%까지, 약 5%로부터 약 15%까지, 또는 약 40%로부터 약 50%까지를 포함할 수 있다. 중성 지질 성분은 제형에 존재하는 전체 지질의 약 5%로부터 약 90%까지, 또는 약 20%로부터 약 80%까지를 포함할 수 있다. -DAG 결합체 (예로, 폴리에틸렌글리콜-디아실글리세롤 (-DAG), -콜레스테롤, 또는-DMB)는 제형에 존재하는 전체 지질의 약 1%로부터 약 20%까지, 또는 약 4%로부터 약 14%까지를 포함할 수 있다. 콜레스테롤 성분은 제형에 존재하는 전체 지질의 약 10%로부터 약 60%까지, 또는 약 20%로부터 약 40%까지를 포함할 수 있다. 한 가지 구현예에서, 본 발명의 제형화된 분자적 조성물은 제형에 존재하는 전체 지질의 약 7.5%를 포함하는 양이온성 지질 성분, 제형에 존재하는 전체 지질의 약 82.5%를 포함하는 중성 지질, 및 제형에 존재하는 전체 지질의 약 10%를 포함하는 PEG 결합체를 포함한다. 한 가지 구현예에서, 본 발명의 제형화된 분자적 조성물은 생물학적으로 활성인 분자, DODMA, DSPC, 및 -DAG 결합체를 포함한다. 한 가

지 구현예에서, -DAG 결합체는 -디로틸글리세롤 (C12), -디미리스틸글리세롤 (C14), -디팔미토일글리세롤 (C16), 또는 PEG-디스테릴글리세롤 (C18)이다. 또 다른 구현예에서, 제형화된 분자적 조성물은 또한 콜레스테롤 또는 콜레스테롤 유도체를 포함한다.

[0357] “나노입자 (nanoparticle)” 에 의하여 크기가 나노미터로 측정되는 현미경적 입자를 의미한다. 본 발명의 나노입자는 전형적으로 직경이 약 1로부터 약 999 nm까지의 범위이고, 캡슐화되거나 밀폐된 생물학적으로 활성인 분자를 포함할 수 있다.

[0358] “” 에 의하여, 에틸렌 글리콜 또는 기타 폴리알킬렌 에테르 또는 그의 동등물을 의미한다.

[0359] 용어 “단간섭 핵산 (short interfering nucleic acid)”, “siNA”, “단간섭 RNA (short interfering RNA)”, “siRNA”, 및 “단간섭 핵산 분자 (short interfering nucleic acid molecule)” 는 본 명세서에서 사용되는 바 RNA 간섭 “RNAi” 을 매개하는 것 또는 서열-특이적 방식으로 유전자 침묵화에 의해 유전자 발현 또는 바이러스 복제를 저해하거나 저하 조절할 수 있는 핵산 분자라면 모두를 말한다. 예를 들어 siNA는 자가-상보적 (self-complementary) 센스 및 안티센스 부위를 포함하는 이중가닥 핵산 분자일 수 있고, 여기에서 안티센스 부위는 표적 핵산 분자 또는 그의 부분의 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 센스 부위는 표적 핵산 분자 또는 그의 부분에 해당하는 뉴클레오타이드 서열을 가진다. siNA는 두 가지 별도의 올리고 뉴클레오타이드로부터 집합될 수 있고, 여기에서 한 가닥은 센스 가닥이고 다른 하나는 안티센스 가닥이며, 또한 안티센스 및 센스 가닥은 자가-상보적이다 (예로, 각 가닥은; 안티센스 가닥과 센스 가닥이 이중체 또는 이중가닥 구조, 예를 들어 이중가닥 부위가 약 15개 내지 약 30개, 예로 약 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30개의 염기 쌍인 구조를 형성하는 것과 같은 다른 가닥의 뉴클레오타이드 서열과 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하고; 안티센스 가닥은 표적 핵산 분자 또는 그의 부분의 뉴클레오타이드 서열과 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 센스 가닥은 표적 핵산 분자 또는 그의 부분에 해당하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다 (예로, siRNA 분자의 약 15개 내지 약 25개 이상의 뉴클레오타이드가 표적 핵산 또는 그의 부분에 상보적이다). 대안으로, siNA는 단일 올리고뉴클레오타이드로부터 집합되고, 여기에서 siNA의 자가-상보적 센스- 및 안티센스 부위는 핵산 기초한 또는 비-핵산 기초한 링커(들)에 의해 연결된다. siNA는 자가-상보적 센스 및 안티센스 부위를 가지는 이중체, 비대칭적 이중체, 헤어핀 또는 비대칭적 헤어핀 이차 구조를 가진 폴리뉴클레오타이드일 수 있고, 여기에서 안티센스 부위는 별도의 표적 핵산 분자 또는 그의 부분의 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하고 센스 부위는 표적 핵산 서열 또는 그의 부분에 해당하는 뉴클레오타이드 서열을 가진다. siNA는 둘 이상의 루프 구조 및 자가-상보적 센스 및 안티센스 부위를 포함하는 스템을 가지는 원형의 단일가닥 폴리뉴클레오타이드일 수 있고, 여기에서 안티센스 부위는 별도의 표적 핵산 분자 또는 그의 부분의 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하고 센스 부위는 표적 핵산 서열 또는 그의 부분에 해당하는 뉴클레오타이드 서열을 가지며, 여기에서 원형의 폴리뉴클레오타이드는 RNAi를 매개할 수 있는 활성이 있는 siRNA 분자를 생성하도록 생체내 또는 시험관내에서 프로세싱될 수 있다. 또한 siNA는 표적 핵산 분자 또는 그의 부분의 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 가지는 단일가닥 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있고 (예를 들어, 이러한 siNA 분자는 표적 핵산 서열 또는 그의 부분에 해당하는 뉴클레오타이드 서열의 siNA 분자 내 존재를 필요로 하지 않는다), 여기에서 단일가닥 폴리뉴클레오타이드는 더 나아가 5' -포스페이트 (예를 들어, Martinez *et al.*, 2002, *Cell.*, 110, 563-574 and Schwarz *et al.*, 2002, *Molecular Cell*, 10, 537-568를 보라), 또는 5' ,3' -디포스페이트와 같은 말단 포스페이트 그룹을 포함할 수 있다. 소정의 구현예에서, 본 발명의 siNA 분자는 별도의 센스 및 안티센스 서열을 또는 부위를 포함하고, 여기에서 센스 및 안티센스 부위는 당해 기술분야에 알려진 바와 같이 뉴클레오타이드 또는 비-뉴클레오타이드 링커에 의해 공유적으로 연결되거나, 대안으로 이온 반응, 수소 결합, 반데르 발스 상호작용, 소수성 상호작용, 및/또는 스택킹 상호작용 (stacking interactions)에 의해 비-공유적으로 연결된다. 소정의 구현예에서, 본 발명의 siNA 분자는 표적 유전자의 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 siNA 분자는 표적 유전자 발현의 저해를 유발하는 방식으로 표적 유전자의 뉴클레오타이드 서열과 상호작용한다. 본 명세서에서 사용되는 바, siNA 분자는 단지 RNA를 포함하는 이들 분자에 제한될 필요는 없고 더 나아가 화학적으로-변형된 뉴클레오타이드 및 비- 뉴클레오타이드를 포괄한다. 소정의 구현예에서, 본 발명의 단간섭 핵산 분자는 뉴클레오타이드를 포함하는 2' -하이드록시 (2'-OH)가 결여되어 있다. 출원인은 소정의 구현예로 RNAi를 매개하기 위해 2' -하이드록시 그룹을 가지는 뉴클레오타이드의 존재를 요구하지 않는 단간섭 핵산을 기술하고 있고 이와 같이 본 발명의 단간섭 핵산 분자는 임의적으로 리보 뉴클레오타이드를 전혀 포함하지 않는다 (예로, 2' -OH 그룹을 가지는 뉴클레오타이드). 그러나 RNAi를 지지하도록 siNA 분자 내 리보뉴클레오타이드의 존재를 요구하지 않는 이러한 siNA 분자는 부착된 링커 또는 링커들 또는 다른 부착된 또는 연관된 그룹, 모이어티, 또는 2'-OH 그룹을 가지는 하나 이상의 뉴클레오타

이드를 포함하는 사슬을 가질 수 있다. 임의적으로, siNA 분자는 뉴클레오타이드 부위 (positions)의 약 5, 10, 20, 30, 40, 또는 50%에 리보뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 또한 본 발명의 변형된 단간섭 핵산 분자는 단간섭 변형된 올리고뉴클레오타이드라고도 말할 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 siNA는 서열 특이적 RNAi, 예를 들어 단간섭 (siRNA), 이중가닥 (dsRNA), 마이크로- (miRNA), 짧은 헤어핀 (shRNA), 단간섭 올리고뉴클레오타이드, 단간섭 핵산, 단간섭 변형된 올리고뉴클레오타이드, 화학적으로-변형된 siRNA, 전사후 유전자 침묵화 (ptgsRNA), 및 기타들을 매개할 수 있는 핵산 분자를 기술하는 데 사용되는 다른 용어와 동등한 것으로 의미된다. 본 발명의 siNA 분자의 비제한적인 예는 본 명세서에서 그의 전부가 참고문헌에 의해 통합되어 있는 2005년 9월 23일 제출된 미국특허 번호 제 USSN 11/234,730호에 나타나 있다. 이러한 siNA 분자는 리보자임, 안티센스, 삼중체 형성, 앵타머, 2,5-A 키메라, 또는 데코이 올리고뉴클레오타이드와 같은 유전자 발현의 저해를 매개하는 당해 기술분야에 알려진 다른 핵산 기술과는 구별된다.

[0360] 본 명세서에서 사용되는 바 " 표적 (target)" 에 의하여, 표적 단백질, 펩타이드, 또는 표적 유전자에 의해 인코딩된 폴리펩타이드라면 모두가 의미된다. 또한 용어 "표적"은 표적 RNA에 의해 인코딩된 것과 같은 표적 활성을 가지는 표적 단백질, 펩타이드, 또는 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산 서열을 말한다. 용어 "표적"은 또한 다른 표적 이소형, 돌연변이 표적 유전자, 표적 유전자의 스프라이스 변형체, 및 표적 유전자 다형성 (polymorphisms)과 같은 다른 표적 인코딩 서열을 포함하는 것으로 의미된다.

[0361] 약제학적 조성물

[0362] 본 발명의 조성물은 경구적으로, 국소적으로, 비경구적으로, 흡입 또는 스프레이에 의해 또는 직장 경로로 통상적 비독성인 약제학적으로 허용가능한 지지체, 아췌반트 및 담체 (vehicles)를 포함하는 단위 용량 제형으로 투여될 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 비경구적은 경피적, 피하적, 혈관내 (예로, 정맥내), 근육내, 또는 경막내 주사 또는 주입 기술 등을 포함한다. 또한, 본 발명의 화합물 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약제학적 제형이 제공된다. 본 발명의 하나 이상의 화합물은 하나 이상의 비독성 약제학적으로 허용가능한 담체 및/또는 희석제 및/또는 아췌반트와 연결하여 존재할 수 있다. 본 발명의 화합물을 포함하는 약제학적 조성물은, 예를 들어 정제, 트로키, 로젠지, 수성 또는 유성 현탁액, 분산가능한 분말 또는 입자, 에멀전, 딱딱한 또는 부드러운 캡슐, 또는 시럽 또는 엘릭시르와 같은 경구 사용에 적합한 형태로 될 수 있다.

[0363] 경구용으로 의도된 조성물은 약제학적 조성물의 제조를 위해 당해 기술분야에 알려진 방법이라면 모두에 따라 제조될 수 있고, 이러한 조성물은 약제학적으로 매력적이고 복용하기 쉬운 조제물을 제공하도록 감미제, 향미제, 착색제, 및 보존제로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 제제를 포함할 수 있다. 정제는 정제 제조에 적합한 비독성 약제학적으로 허용가능한 부형제를 첨가한 활성 성분을 포함한다. 이들 부형제는, 예를 들어 칼슘 카보네이트, 소듐 카보네이트, 락토스, 칼슘 포스페이트 또는 소듐 포스페이트와 같은 불활성 희석제; 예를 들어 옥수수 전분 또는 알긴산과 같은 입자화 및 봉쇄화 제제; 예를 들어, 전분, 젤라틴 또는 아카시아와 같은 결합 제제; 또한 예를 들어 마그네슘 스테아레이트, 스테아르산 또는 탈크와 같은 광택제일 수 있다. 정제는 비코팅될 수 있거나 기지의 기법에 의해 코팅될 수 있다. 일정 경우 이러한 코팅은 위장관에서 봉쇄와 흡수를 지연시키고 이로 인해 장기간 동안 계속 지속되는 작용을 제공한다. 예를 들어, 글리세롤 모노스테아레이트 또는 글리세릴 디스테아레이트와 같은 시간 지연 물질이 사용될 수 있다.

[0364] 또한 경구용 제형도 활성 성분이 예를 들어 칼슘 카보네이트, 칼슘 포스페이트 또는 카올린과 같은 불활성 고체 희석제와 혼합된 딱딱한 젤라틴 캡슐로서 또는 활성 성분이 물 또는 땅콩 오일, 액체 파라핀 또는 올리브 오일과 같은 오일 배지와 혼합된 부드러운 젤라틴 캡슐로서 표현될 수 있다.

[0365] 또한 경구용 제형은 로젠지로도 표현될 수 있다.

[0366] 수성 현탁액은 수성 현탁액의 제조에 적합한 부형제를 첨가한 활성 물질을 포함한다. 이러한 부형제는 현탁 제제, 예를 들어 소듐 카복시메틸셀룰로스, 메틸셀룰로스, 하이드로프로필-메틸셀룰로스, 소듐 알기네이트, 폴리비닐피롤리돈, 트라가칸스검 및 아카시아검이고; 분산 또는 습윤 제제는 자연적으로-생기는 포스포타이드, 예를 들어 레시틴 또는 지방산과 알킬렌 옥사이드의 농축 산물 예를 들어 폴리옥시에틸렌 스테아레이트, 또는 긴 사슬 지방족 알코올과 알킬렌 옥사이드의 농축 산물 예를 들어 헵타데카에틸렌옥시세탄올, 또는 지방산으로부터 유래된 부분적 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소비톨 모노올레이트와 같은 헥시톨과 알킬렌 옥사이드의 농축 산물, 또는 지방산으로부터 유래된 부분적 에스테르 및 헥시톨 무수물 예를 들어 폴리옥시에틸렌 소비탄 모노올레이트와 알킬렌 옥사이드의 농축 산물일 수 있다. 또한 수성 현탁액은 에틸, 또는 n-프로필-p-하이드록시벤조

에이트와 같은 하나 이상의 보존제, 하나 이상의 착색제, 하나 이상의 향미제, 또한 슈크로스 또는 사카린과 같은 하나 이상의 감미제를 포함할 수 있다.

- [0367] 오일성 현탁액은 예를 들어 아라키스 오일, 올리브 오일, 참깨 오일 또는 코코넛 오일과 같은 식물성 오일로, 또는 액체 파라핀과 같은 미네랄 오일로 활성 성분을 현탁시켜서 제형화될 수 있다. 오일성 현탁액은 예를 들어 꿀벌 왁스, 고체 파라핀 또는 세틸 알코올과 같은 비후제 (thickening agent)를 포함할 수 있다. 감미제 및 향미제가 복용하기 쉬운 경구 조제물을 제공하도록 첨가될 수 있다. 이들 조성물은 아스코빈산과 같은 항-산화제의 첨가에 의해 보존될 수 있다.
- [0368] 물 첨가에 의한 수성 현탁액의 조제에 적합한 분산가능한 분말 및 입자는 분산 또는 습윤 제제, 현탁제 및 하나 이상의 보존제를 첨가한 활성 성분을 제공한다. 적합한 분산 또는 습윤 제제, 또는 현탁제는 상기에 이미 언급된 것들로 예시된다. 또한 추가적인 부형제가, 예를 들어 감미제, 향미제 및 착색제가 존재할 수 있다.
- [0369] 본 발명의 약제학적 조성물은 또한 물 현탁액-오일 (oil-in-water emulsions)의 형태가 될 수 있다. 오일상은 식물성 오일 또는 미네랄 오일 또는 이들의 혼합물일 수 있다. 적합한 에멀전화 제제는 자연적으로-생기는 검 예를 들어 아카시아검 또는 트라카간스검, 자연적으로-생기는 포스포타이드 예를 들어 콩, 레시틴, 및 지방산과 핵시톨 무수물 예를 들어 소비탄 모노올레이트로부터 유래된 에스테르 또는 부분적 에스테르, 또한 에틸렌 옥사이드 예를 들어 폴리옥시에틸렌 소비탄 모노올레이트와 상기 부분적 에스테르의 농축 산물일 수 있다. 현탁제도 역시 감미제 및 향미제를 포함할 수 있다.
- [0370] 시럽제 및 엘리시르제는 감미제 예를 들어 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 소비톨, 포도당 또는 슈크로스로서 제형화될 수 있다. 이러한 제형도 역시 진통제, 보존제 또한 향미제 및 착색제를 포함할 수 있다. 약제학적 조성물은 무균의 주사가능한 수성 또는 유성의 현탁액 형태가 될 수 있다. 본 현탁액은 상기 언급되었던 분산 또는 습윤 제제 및 현탁 제제를 사용하는 기지의 기술에 따라 제형화될 수 있다. 무균의 주사가능한 조제물도 역시 무균의 주사가능한 용액 또는 비독성 비경구적으로 허용가능한 희석제 또는 용매에 녹인 현탁액, 예를 들어 1,3-부탄디올에 녹인 용액일 수 있다. 사용될 수 있는 허용가능한 담체 및 용매 중에는 물, 링거 용액 및 등장성 염화나트륨 용액이 있다. 또한, 무균의 고정 오일이 통상적으로 용매 또는 현탁 배지로서 사용된다. 본 목적을 위해, 합성 모노- 또는 디글리세라이드를 포함하여 순한 고정 오일이라면 모두가 사용될 수 있다. 또한, 올레산과 같은 지방산도 주사가능한 제제의 제조에 사용된다.
- [0371] 본 발명의 화합물은 또한 좌약 형태로, 예로 약물의 직장 투여를 위해 투여될 수 있다. 이들 조성물은 상온에서 고체이지만 직장 온도에서는 액체이고 따라서 직장 내에서 녹으면서 약물을 방출하는 적합한 비-조사된 부형제와 약물을 혼합하여 제조될 수 있다. 이러한 물질로는 코코아 버터 및 폴리에틸렌 글리콜을 포함한다.
- [0372] 본 발명의 화합물은 무균 배지에 녹여 비경구적으로 투여될 수 있다. 약물은, 사용된 담체 및 농도에 의존적으로 담체에 현탁되거나 용해될 수 있다. 유익하게는, 국소 마취제, 방부제 및 완충제와 같은 아췌반트가 담체에 용해될 수 있다.
- [0373] 눈 또는 기타 외부 조직, 예로 입과 피부의 장애를 위해, 제형은 바람직하게 국소 젤, 스프레이, 연고 또는 크림으로서, 또는 예를 들어 전량 0.075 내지 30% w/w, 바람직하게는 0.2 내지 20% w/w 또한 가장 바람직하게는 0.4 내지 15% w/w으로 활성 성분을 포함하는 좌약으로서 적용될 수 있다. 연고로 제형화될 때, 활성 성분은 파라핀성 또는 물-혼합 가능한 연고 베이스를 사용하여 적용될 수 있다.
- [0374] 대안으로, 활성 성분은 물 속의 오일 크림 베이스를 사용하여 크림으로 제형화될 수 있다. 원하는 경우, 크림 베이스의 수성 상은 적어도 30% w/w로 예를 들어 프로필렌 글리콜, 부탄-1,3-디올, 만니톨, 소비톨, 글리세롤, 폴리에틸렌글리콜 및 그들의 혼합물과 같은 폴리하이드릭 알코올을 포함할 수 있다. 국소적 제형은 바람직하게 피부 또는 기타 손상된 영역을 통한 활성 성분의 흡수 또는 침투를 증진시키는 화합물을 포함한다. 이러한 피부 침투 증진인자 (enhancers)의 예로는 디메틸설포옥사이드 및 관련 유사체를 포함한다. 본 발명의 화합물은 또한 경피적 장치에 의해 투여될 수 있다. 바람직하게, 국소적 투여는 저장기 (reservoir) 및 공극성 막 유형의 패치 또는 다양한 고체 기질의 패치를 사용하여 수행될 것이다. 둘 중 어느 경우라도, 활성 제제는 막을 통해 저장기 또는 마이크로캡슐로부터 수여자의 피부 또는 점막과 접촉하고 있는 활성 제제 투과성 접촉제 내로 계속적으로 전달된다. 활성 제제가 피부를 통해 흡수되는 경우, 활성 제제의 조절되고 미리 정해진 유동이 수여자에게 투여된다. 마이크로캡슐의 경우에는, 캡슐화 제제도 역시 막으로서 작용한다. 경피적 패치는 아크릴 에멀전과 같은 접촉 시스템, 및 폴리에스테르 패치와 함께 적합한 용매 시스템에 녹인 화합물을 포함할 수 있다. 본 발명의 에멀전의 오일상은 기지의 성분으로부터 기지의 방식으로 만들어진다. 상기 상이 단지 에멀전화제를

포함할 수 있는 한편, 지방 또는 오일 또는 지방과 오일 둘 다와 적어도 하나의 에멀전화제의 혼합물을 포함할 수 있다. 바람직하게, 친수성 에멀전화제는 안정화제로 작용하는 친유성 에멀전화제와 함께 포함된다. 또한 오일과 지방을 둘 다 포함하는 것이 바람직하다. 다 함께, 에멀전화제 (들)은 안정화제 (들)가 있거나 없이 소위 에멀전화 왁스를 만들고, 왁스는 오일과 지방과 함께 크림 제형의 오일성 분산된 상을 형성하는 소위 에멀전화 연고 베이스를 만든다. 본 발명의 제형의 용도에 적합한 에멀전화제 및 에멀전 안정화제는 다른 것들 중에서 트윈 60, 스팬 80, 세토스테아릴 알코올, 미리스틸 알코올, 글리세릴 모노스테아레이트, 및 소듐 로릴 설페이트를 포함한다. 제형에 적합한 오일 또는 지방의 선택은, 약제학적 에멀전 제형에 사용되는 대부분의 오일에서 활성 화합물은 용해도가 매우 낮기 때문에 원하는 화장품 특성을 성취하는 것을 기초로 한다. 따라서, 크림은 바람직하게 튜브 또는 다른 용기로부터 새지않도록 적합한 견고도를 가진 비-유성 (non-greasy), 비-염색 및 세척가능한 제품이 되어야 한다. 디-이소아디페이트, 이소세틸 스테아레이트, 코코넛 지방산의 프로필렌 글리콜 디에스테르, 이소프로필 미리스테이트, 테실 올레이트, 이소프로필 팔미테이트, 부틸 스테아레이트, 2-에틸헥실 팔미테이트 또는 분지쇄 에스테르의 혼합과 같은 직쇄 또는 분지쇄, 모노- 또는 디염기 알킬 에스테르가 사용될 수 있다. 이들은 필요한 특성에 따라 단독으로 또는 조합하여 사용될 수 있다. 대안으로, 흰색 소프트 파라핀 및/또는 액체 파라핀 또는 기타 미네랄 오일과 같은 높은 녹는점 지질이 사용될 수 있다.

[0375] 또한 눈에 대한 국소적 투여에 적합한 제형로는 활성 성분이 적합한 담체, 특히 활성 성분을 위한 수성 용매에 용해되거나 현탁된 점안제도 포함한다. 항염증성 활성 성분이 바람직하게 이러한 제형에 0.5 내지 20%, 유익하게는 0.5 내지 10% 또한 상세하게는 1.5% w/w의 농도로 존재한다. 치료적 목적을 위해, 본 조합 발명의 활성 화합물은 보통 표시된 투여 경로에 적절한 하나 이상의 아췌반트와 조합된다. 경구로 투여되는 경우라면, 화합물은 락토스, 슈크로스, 전분 분말, 알카노익산의 셀룰로스 에스테르, 셀룰로스 알킬 에스테르, 탈크, 스테아르산, 마그네슘 스테아레이트, 마그네슘 옥사이드, 인산 및 황산의 소듐 및 칼슘 염, 젤라틴, 아카시아검, 소듐 알기네이트, 폴리비닐피롤리돈, 및/또는 폴리비닐알코올과 혼합될 수 있고 다시 편리한 투여를 위해 정제화 또는 캡슐화될 수 있다. 이러한 캡슐 또는 정제는 하이드록시프로필메틸 셀룰로스에 녹인 활성 화합물의 분산에서 제공될 수 있는 바와 같이 조절된-방출 제형을 포함할 수 있다. 비경구 투여를 위한 제형은 수성 또는 비-수성 등장성 무균 주사 용액 또는 현탁액의 형태일 수 있다. 이들 용액 및 현탁액은 경구 투여용 제형에서의 사용이 언급된 하나 이상의 담체 또는 희석제를 가지는 무균 분말 또는 입자로부터 제조될 수 있다. 화합물은 물, 폴리에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜, 에탄올, 옥수수 오일, 면종자 오일, 땅콩 오일, 참깨 오일, 벤질 알코올, 염화나트륨, 및/또는 다양한 완충용액에 용해될 수 있다. 그 외 아췌반트 및 투여의 방식은 약제학적 기술분야에 널리 잘 알려져 있다.

[0376] 용량 수준은 하루 체중 당 약 0.1 mg으로부터 약140 mg까지의 단위가 상기-표시된 조건의 치료에 유용하다 (하루 환자 당 약 0.5 mg 내지 약 7 g). 단일 용량 형태를 생산하기 위하여 담체와 조합될 수 있는 활성 성분의 양은 처리된 환자 및 특정한 투여의 방식에 따라 달라질 수 있다. 단위 용량 형태는 일반적으로 약 1 mg으로부터 약 500 mg 사이의 범위로 활성 성분을 포함할 것이다. 일간 용량은 하루에 한 번 내지 네 번 투여될 수 있다. 피부 질병인 경우에는, 본 발명의 화합물의 국소적 조제물을 손상된 부위에 하루 두 번 내지 네 번 적용하는 것이 바람직할 수 있다.

[0377] 그러나, 특정한 환자를 위한 특이 용량 수준은 사용된 특이 화합물의 활성, 나이, 체중, 일반적인 건강, 성별, 식사, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 속도, 약물 조합 또한 치료 받는 특정한 질환의 중증도를 포함하는 다양한 요소에 의존할 것이다.

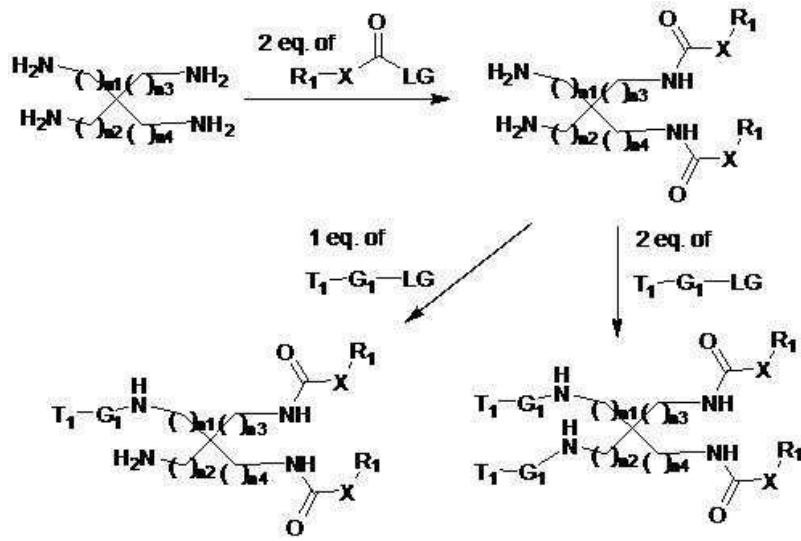
[0378] 일반적인 방법

[0379] 본 발명의 화합물의 제조를 위한 대표적인 합성 방법은 다음의 설계로 하기에 정리된다. 당업자라면 출발 물질과 반응 조건이 다양해질 수 있고 반응의 순서가 변화될 수 있으며, 원하는 화합물을 생산하도록 추가적인 단계가 적용될 수 있는 점을 인식할 것이다. 일정 경우에, 소정의 반응 기능성의 보호가 상기 변환의 일정 부분을 달성하기 위하여 필요할 수 있다. 일반적으로, 이러한 보호 그룹의 필요뿐만 아니라 이러한 그룹을 부착하고 제거하는 데 필요한 조건은 유기 합성의 기술분야의 당업자에게는 자명할 것이다.

[0380] 달리 표시되지 않은 경우라면, R₁, R₂, X, X', G, G₁, G₂, T, T₁, T₂, n1, n2, n3, 및 n4는 화학식 I-VI과 연결하여 상기에 기술된 정의를 가진다. 변화가능한 LG 는, 이에 제한되는 것은 아니지만 할로젠, 톨루엔설포닐, 메탄설포닐, 트리플루오로메탄설포닐, 2,2,2-트리플루오로에톡시, N-하이드록시숙시니미딜 등을 포함하는 적합

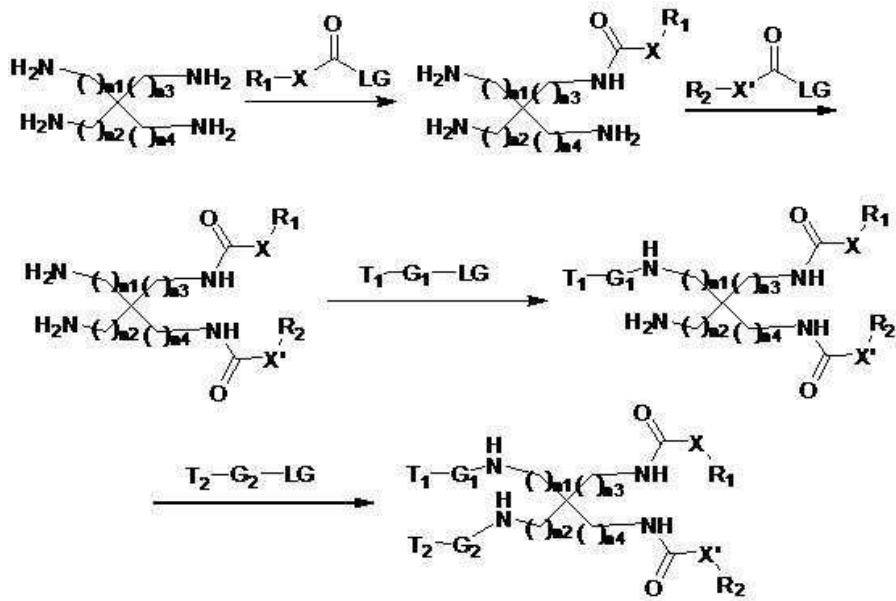
한 이탈 그룹을 나타낸다.

[0381] 설계 1



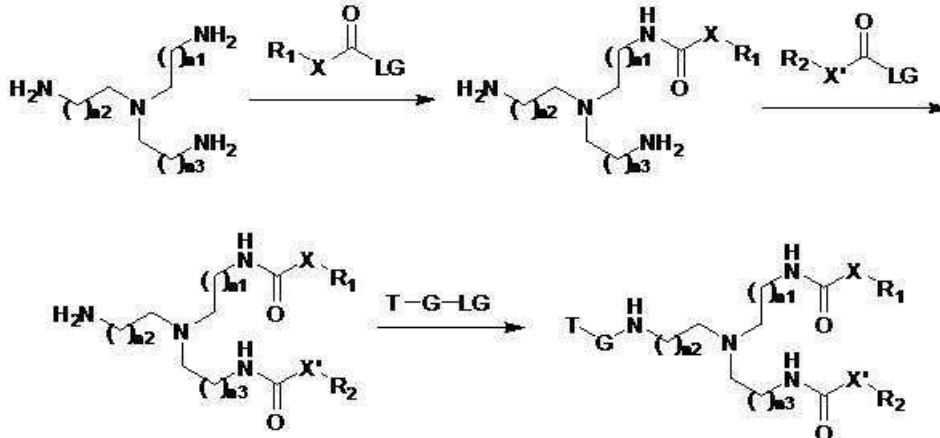
[0382]

[0383] 설계 2



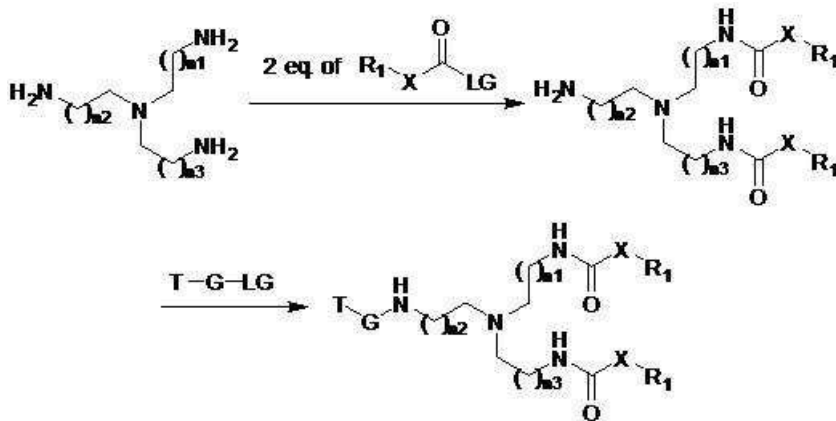
[0384]

[0385] 실계 3



[0386]

[0387] 실계 4



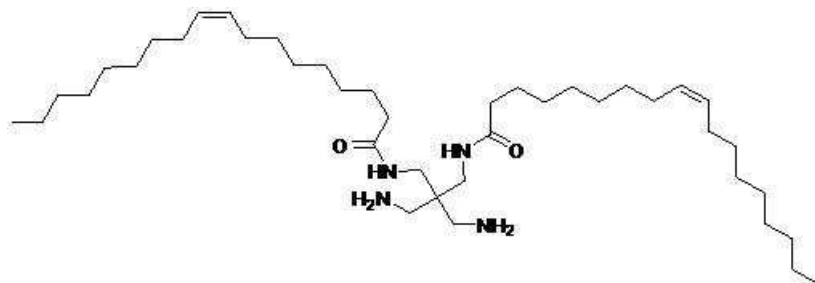
[0388]

[0389] 실시예들

[0390] 본 발명의 화합물의 제조는 더 나아가 다음의 실시예에 의해 설명되고, 이는 본 발명을 범위 또는 정신에서 실시예에 기술된 특정한 방법 (procedures) 및 화합물로 제한하려는 것으로 해석되지 않는다. 본 발명의 화합물을 합성하는 대표적인 방법이 하기에 나타나 있다. 원하는 표적 화합물에 대해 요구되는 성분의 성질이 종종 바람직한 합성 방법을 결정하는 것으로 이해된다.

[0391] 실시예 1

[0392] N,N'-디올레오일 테트라키스(아미노메틸)메탄 (“디올레오일 크로스아민”)의 합성



[0393]

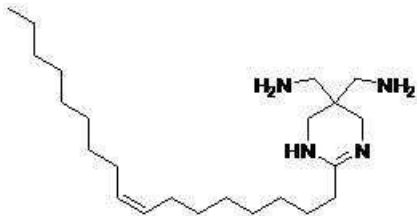
[0394] 디올레오일 크로스아민 (1)

[0395] 테트라키스(아미노메틸)메탄은 기지의 방법에 의해 제조된다 (Adil, K. *et al.*, Solid State Sciences, 6 (2004), 1229-1235). 50 mL 플라스크를 환류 농축기와 자기 교반기에 장착시킨다. 플라스크는 테트라키스(아미노메틸)메탄 테트라클로라이드 (800 mg, 2.88 mmol), 메탄올 (10 mL) 및 NaOMe/MeOH 용액 (2.10 g 의

5.457M, 11.50 mmol)으로 채워진다. 혼합물은 교반되고 4시간 동안 환류한 다음 식힌다. 메탄올 용액은 무기염으로부터 걸러지고, 염은 완전 에탄올 (15 mL)로 재-현탁된다. 현탁액은 원심분리되고, 조합된 유기물은 진공으로 (*in vacuo*) 농축된다. 잔여물은 메틸렌 클로라이드 (15 mL)로 녹이고 주사기 (0.45 마이크론 필터)를 사용하여 남아있는 무기염으로부터 여과시킨다. 여과물의 농축은 흰색 반-고체 물질로서 자유 테트라키스(아미노메틸)메탄을 정량적 수율로 분리시킨다 (잔여 알코올은 에 의해 측정된다). (D_2O) δ 2.9 (s, CH_2)

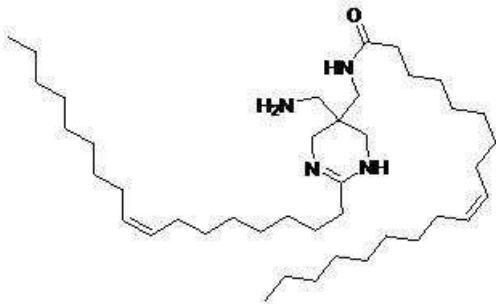
[0396] 획득된 테트라키스(아미노메틸)메탄 (420 mg, 정제도 90%, 2.86 mmol)은 순수 알코올 (15 mL)에 용해시키고 트리플루오로아세트산 (400 mg, 3.50 mmol)을 첨가하며, 이후에 2,2,2-트리플루오로에틸올레이트 (2.08 g, 5.72 mmol)가 첨가된다 [하기 실시예 3을 참조하라]. 균질한 혼합물을 상온에서 72시간 동안 반응하도록 하고 진공으로 농축시킨다. 잔여물은 MeOH/물 (10 %)/트리플루오로아세트산 (0.1%) (40 mL)에 용해시키고, pH는 ca. pH 2로 트리플루오로아세트산을 사용하여 조정한다. 잔여물은 용출용매로서 MeOH/물 (10 %)/트리플루오로아세트산 (0.1%)를 사용하는 C-8 변형된 실리카 상의 크로마토그래피에 의해 정제된다. N,N'-디올레오일 테트라키스(아미노메틸)메탄 (“디올레오일 크로스아민”)은 비스트리플루오로아세트산 염 (0.9 g)으로서 분리된다. MS (TFA 염) 661 [M+1]; ($CDCl_3$) δ 8.5 (br, 6H), 8.05 (br, 2H), 5.37 (m, 4H), 3.07 and 2.95 (poorly resolved, 4H each); 2.15 (t, 4H), 2.01 (m, 8H), 1.35 (m, 48H), 0.9 (t, 6H)

[0397] 소량의 2, 3, 및 4가 더 높은 pH 하에서 (예로, 트리플루오로아세트산이 없이 또는 NaOMe 존재 시) 반응이 수행될 때 생산되고 이들은 바로 제거될 수 있다 (예로, 크로마토그래피):



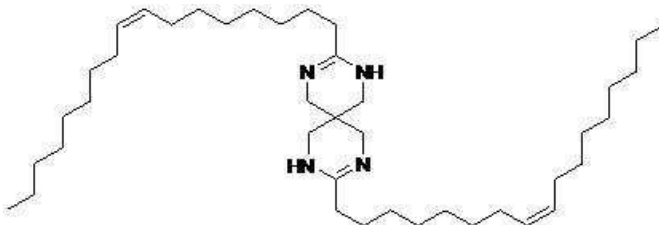
[0398]

(2) MS 379.4 [M+1]



[0400]

(3) MS 643.6 [M+1]



[0402]

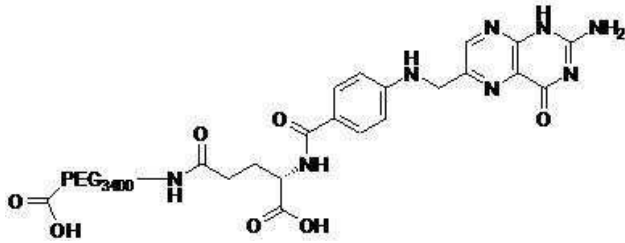
(4)

[0403]

실시예 2

[0404]

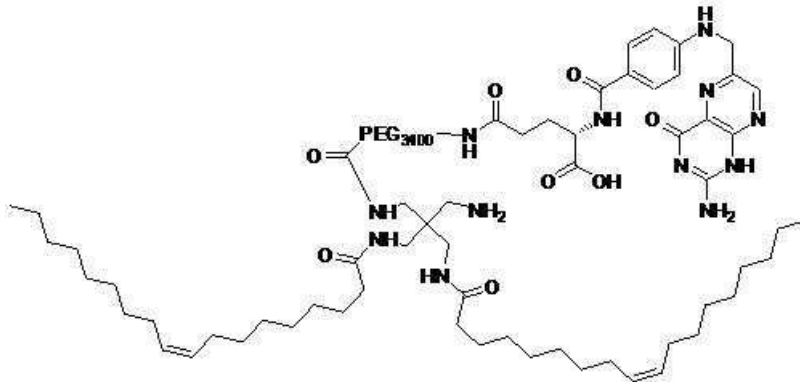
[0405] 2.1. 폴레이트-3400-COOH



[0406]

[0407] 170 mg의 H₂N-3400-COOH (레이산에 의해 제조됨)이 건조 DMSO (2 mL) 및 건조 클로로포름 (2 mL)에 용해된다. 허니그 염 (Hunig's base, 15 μL)이 첨가되고, 이후에 염산-NHS 에스테르 (60 mg, 기지의 방법 Lee, R. J.; Low, P. S.; “분자의학의 방법 (Methods in Molecular Medicine)”, 25, 69-76, April 2000에 의해 제조됨)가 첨가된다. 염산-NHS의 추가적 80 mg이 DMSO에 녹인 용액 (2.5 mL)으로 첨가된다. 교반된 혼합물은 상온에서 24시간 유지되고, 클로로포름이 진공으로 제거되며, 잔여물은 탈이온화된 물 (60 mL)로 희석시킨다. 그 결과 나온 균질한 노란색 용액은 pH 2-3까지 몇 방울의 TFA와 함께 3500 D 컷오프 막을 사용하여 탈이온화된 물을 제거하도록 투석된다. 여섯 번의 투석 수조 (dialysis bath) 교환 이후에 노란색 용액이 수집되고 폴레이트-3400-COOH를 얻도록 진공으로 농축된다.

[0408] 2.2. “폴레이트--디올레오일 크로스아민” (5)을 획득하기 위한 폴레이트-PEG3400-COOH와의 커플링



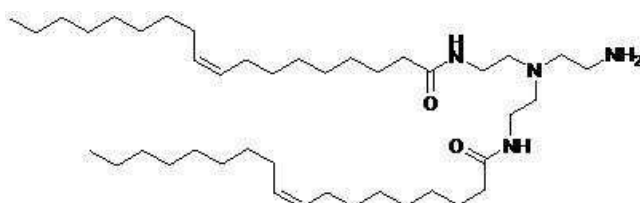
[0409]

[0410] 폴레이트--디올레오일 크로스아민 (5)

[0411] 150 mg의 폴레이트-3400-COOH는 건조 DMSO (2 mL)에 용해시키고 NHS (9 mg)가 첨가되며, 이후에 DCC (16 mg)가 첨가된다. 혼합물은 폴레이트-3400-COONHS를 획득하도록 암소에 20시간 동안 반응하도록 한다. 본 용액에, 건조 DMSO (2 mL)에 녹인 30 mg의 N,N'-디올레오일 테트라키스(아미노메틸)메탄이 첨가된다. 반응 혼합물을 24시간 동안 반응시킨 이후에, 탈이온화된 물 (60 mL)로 희석된다. 그 결과 얻은 균질한 노란색 용액은 3500 D 컷오프 백을 사용하여 탈이온화된 물을 제거하도록 투석되어 폴레이트--화된 N,N'-디올레오일 테트라키스(아미노메틸)메탄 (“폴레이트--디올레오일 크로스아민”)을 반응하지 않은 폴레이트-3400-COOH를 가진 ca. 50% 혼합물로써 얻는다.

[0412] 실시예 3

[0413] N,N'-디올레오일 트리스(아미노에틸)아민 (“디올레오일 모노아민”)(6)의 합성



[0414]

[0415] 디올레오일 모노아민 (6)

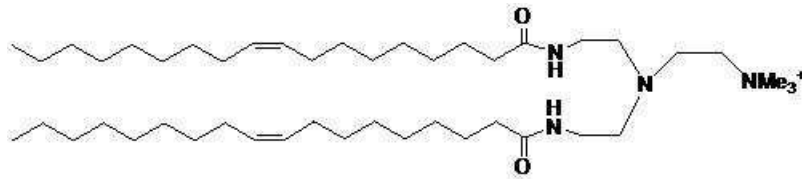
[0416] 올레오일 클로라이드 (75 g, 250 mmol)는 2,2,2-트리플루오로에탄올 (60 g, 600 mmol)로 환류하여 16시간 동안

가열된다. HCl의 발생이 정지된 이후에, 과다 트리플루오로에탄올은 진공으로 제거된다. 잔여물의 진공 증류는 87.6 g 의 2,2,2-트리플루오로에틸 올레이트를 무색 액체, bp 150° /0.3로 얻는다.

[0417] 트리스-(2-아미노에틸)아민 (1.45 g, 10 mmol)이 20 mL의 에탄올에 용해된다. 본 용액에 2,2,2-트리플루오로에틸 올레이트 (5.6 g)가 첨가되고, 반응 혼합물은 24시간 동안 환류된다. 혼합물은 진공으로 농축되며, 잔여물은 90% 아세토니트릴/10% 물에 용해되고 트리플루오로아세트산 (TFA)을 사용하여 pH 2-3으로 산성화된다. 본 용액의 C8 실리카 상 역상 크로마토그래피 (용출용매 89.9% 아세토니트릴/10% 물/0.1% TFA)는 1.8 g의 N,N'-디올레오일 트리스(아미노에틸)아민 (“디올레오일 모노아민”)을 그의 트리플루오로아세트산 염으로서 얻는다. MS (TFA 염) 675 [M+1]; (CDCl₃) δ 7.4 (br, 2H), 5.37 (m, 4H), 3.55, 3.37 및 3.05 (약하게 구분됨, 12H 전체), 2.15 (t, 4H), 2.01 (m, 8H), 1.35 (m, 48H), 0.9 (t, 6H).

[0418] 실시예 3A

[0419] 메틸-디올레오일 모노아민 (6.1)의 제조



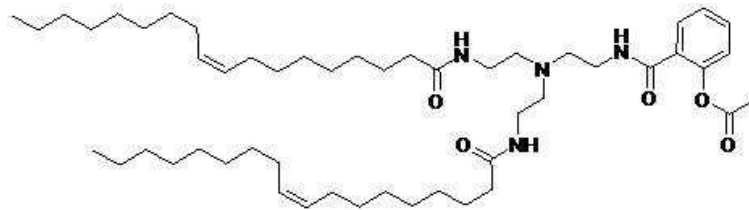
[0420]

[0421] 메틸-디올레오일 모노아민 (6.1)

[0422] 제목 화합물은 실시예 3의 산물, N,N'-디올레오일 트리스(아미노에틸)아민 (“디올레오일 모노아민”)을 과다한 요오드메탄으로 메틸화하여 제조된다.

[0423] 실시예 4

[0424] N,N'-디올레오일-N"-아세틸살리실오일 트리스(아미노에틸)아민 (7)의 합성



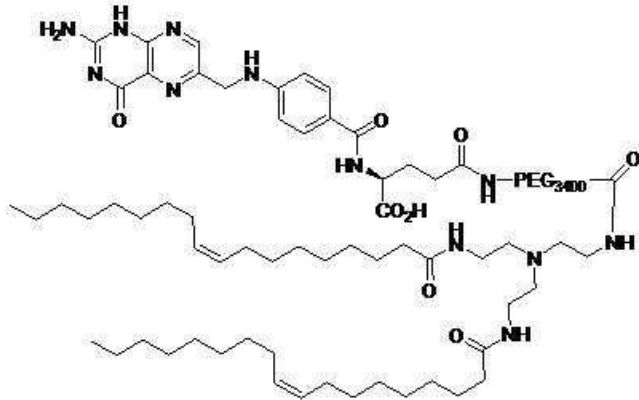
[0425]

[0426] (7)

[0427] N,N'-디올레오일 트리스(아미노에틸)아민 트리플루오로아세테이트 (80 mg, 100 μmol)는 5 mL 클로로포름에 용해시키고, 3 mL의 10% aq. K₂CO₃ 용액을 처리한다. 유기상은 분리되고 건조되며 진공으로 농축되어 N,N'-디올레오일 트리스(아미노에틸)아민을 자유염으로서 얻는다. 본 물질은 3 mL의 건조 클로로포름에 용해시키고 용액은 아세틸살리실오일클로라이드 (20 mg, 100 μmol)로 처리하여 제목 화합물을 얻는다.

[0428] 실시예 5

[0429] “플레이트--디올레오일 모노아민” (8)을 획득하기 위한 플레이트-PEG3400-COOH와의 커플링



[0430]

[0431] 플레이트--디올레오일 모노아민 (8)

[0432] 플레이트-디올레오일 모노아민은 본질적으로 실시예 2에서 기술된 바와 같이 플레이트-3400-COOH 및 디올레오일 모노아민으로부터 획득된다.

[0433] 실시예 6

[0434] 디올레오일 크로스아민과 siRNA의 복합체; 나노입자의 형성

[0435] 사용된 siRNA는 내인성 혈관 내피성장인자 (VEGF) 전사체 및 단백질 수준의 녹-다운 (knock-down)을 생산하도록 의도된 뉴클레오타이드의 이중가닥 서열이다. 사용된 양이온성 지질은 디올레오일 크로스아민이다. siRNA (3 mg/mL) 및 디올레오일 크로스아민 (5 mg/mL) 용액은 별도로 주입을 위해 물에 녹여 제조되고 이후 siRNA의 경우는 5% 텍스트로스로 0.3 mg/mL까지 또한 디올레오일 크로스아민의 경우는 1.5 mg/mL로 희석된다. 텍스트로스 용액에 녹인 siRNA는 마이크로피펫을 사용하여 5:1 (양성: 음성)의 전하 비율로 텍스트로스 용액에 녹인 디올레오일 크로스아민에 첨가된다. 제형은 상온에서 15분 동안 배양하여 복합체가 형성되도록 한다.

[0436] 실시예 7

[0437] 디올레오일 크로스아민과 DNA의 복합체; 나노입자의 형성

[0438] 사용된 DNA는 루시퍼라제 유전자를 인코딩하는 플라스미드 DNA이다. 사용된 양이온성 지질은 디올레오일 크로스아민이다. 플라스미드 DNA (3 mg/mL) 및 디올레오일 크로스아민 (5 mg/mL) 용액은 별도로 주입을 위해 물에 녹여 제조되고, 이후 플라스미드 DNA의 경우는 5% 텍스트로스로 0.3 mg/mL까지 또한 디올레오일 크로스아민의 경우는 1.5 mg/mL로 희석된다. 텍스트로스 용액에 녹인 플라스미드 DNA는 마이크로피펫을 사용하여 5:1 (양성: 음성)의 전하 비율로 텍스트로스 용액에 녹인 디올레오일 크로스아민에 첨가된다. 제형은 상온에서 15분 동안 배양하여 복합체가 형성되도록 한다.

[0439] 실시예 8

[0440] 플레이트-PEG-디올레오일 크로스아민과 siRNA의 복합체

[0441] 사용된 siRNA는 내인성 혈관 내피성장인자 (VEGF) 전사체 및 단백질 수준의 녹-다운을 생산하도록 의도된 뉴클레오타이드의 이중가닥 서열이다. 사용된 양이온성 지질은 플레이트 리간드에 결합되거나 플레이트화된 디올레오일 크로스아민과 서로 다른 몰 비율 (1:1), (2:1), (4:1), 또는 (10:1)로 공동-제형화된 디올레오일 크로스아민이다. 공동-제형은 디올레오일 크로스아민 클로로포름 용액에 첨가되고, 리포솜 제조는 실시예 9에 기술된 바와 같이 수행된다. siRNA (3 mg/mL) 및 플레이트-PEG-디올레오일 크로스아민 (5 mg/mL) 용액은 별도로 주입을 위해 물에 녹여 제조되고 이후 siRNA의 경우는 5% 텍스트로스로 0.3 mg/mL까지 또한 플레이트-PEG-디올레오일 크로스아민의 경우는 1.9 mg/mL로 희석된다. 텍스트로스 용액에 녹인 siRNA는 마이크로피펫을 사용하여 5:1 (양성 : 음성)의 전하 비율로 텍스트로스 용액에 녹인 플레이트-PEG-디올레오일 크로스아민에 첨가된다. 제형은 상온에서 15분 동안 배양하여 복합체가 형성되도록 한다.

[0442] 실시예 9

[0443] 디올레오일 모노아민과 siRNA의 복합체; 나노입자의 형성

- [0444] 사용된 siRNA는 내인성 혈관 내피성장인자 (VEGF) 전사체 및 단백질 수준의 녹-다운을 생산하도록 의도된 뉴클레오타이드의 이중가닥 서열이다. 사용된 양이온성 지질은 디올레오일 모노아민이다. siRNA (3 mg/mL) 및 디올레오일 모노아민 (5 mg/mL) 용액은 별도로 주입을 위해 물에 녹여 제조되고 이후 siRNA의 경우는 5% 텍스트로스로 0.3 mg/mL까지 또한 디올레오일 모노아민의 경우는 1.5 mg/mL로 희석된다. 텍스트로스 용액에 녹인 siRNA는 마이크로피펫을 사용하여 5:1 (양성 : 음성)의 전하 비율로 텍스트로스 용액에 녹인 디올레오일 모노아민에 첨가된다. 제형은 상온에서 15분 동안 배양하여 복합체가 형성되도록 한다.
- [0445] 실시예 10
- [0446] 디올레오일 모노아민과 DNA의 복합체; 나노입자의 형성
- [0447] 사용된 DNA는 루시퍼라제 유전자를 인코딩하는 플라스미드 DNA이고 사용된 양이온성 지질은 디올레오일 모노아민이다. 플라스미드 DNA (3 mg/mL) 및 디올레오일 모노아민 (5 mg/mL) 용액은 별도로 주입을 위해 물에 녹여 제조되고, 이후 플라스미드 DNA의 경우는 5% 텍스트로스로 0.3 mg/mL까지 또한 디올레오일 모노아민의 경우는 1.5 mg/mL로 희석된다. 텍스트로스 용액에 녹인 플라스미드 DNA는 마이크로피펫을 사용하여 5:1 (양성 : 음성)의 전하 비율로 텍스트로스 용액에 녹인 디올레오일 모노아민에 첨가된다. 제형은 상온에서 15분 동안 배양하여 복합체가 형성되도록 한다.
- [0448] 실시예 11
- [0449] 디올레오일 크로스아민으로 캡슐화된 siRNA의 제조
- [0450] 본 실시예는 디올레오일 크로스아민을 사용한 siRNA의 리포솜 캡슐화를 설명하고 있다. 사용된 siRNA는 내인성 혈관 내피성장인자 (VEGF) 전사체 및 단백질 수준의 녹-다운을 생산하도록 의도된 뉴클레오타이드의 이중가닥 서열이다. 사용된 양이온성 지질은 디올레오일 크로스아민이다. 캡슐화 리포솜을 제조하기 위하여, 지질은 클로로포름에 용해되고 혼합되어 지질의 균질한 혼합물을 얻는다. 유기 용매는 회전 증발에 의해 원형 플라스크의 측면 상에 얇은 지질 필름을 생성하면서 제거된다. 클로로포름은 원형 플라스크를 진공 펌프 상에 하룻밤 동안 놓아두어 더 증발시킨다. 그 결과 얻은 지질 필름은 먼저 100% 에탄올로 용해시킨 다음 50%로 다시 옮긴다. 물에 녹인 siRNA는 리포솜/에탄올 용액에 첨가된다. 에탄올은 회전 증발 시스템에 의해 리포솜/siRNA 혼합물로부터 증발된다. 그 결과 얻은 나노입자는 5% 텍스트로스로 캡슐화된 siRNA 입자에 동일한 양의 10% 텍스트로스를 첨가하여 현탁시킨다.
- [0451] 실시예 12
- [0452] 플레이트-PEG-디올레오일 크로스아민으로 캡슐화된 siRNA의 제조
- [0453] 본 실시예는 플레이트-PEG-디올레오일 크로스아민을 사용한 siRNA의 리포솜 캡슐화를 설명하고 있다. 사용된 siRNA는 내인성 혈관 내피성장인자 (VEGF) 전사체 및 단백질 수준의 녹-다운을 생산하도록 의도된 뉴클레오타이드의 이중가닥 서열이다. 사용된 양이온성 지질은 플레이트-PEG-디올레오일 크로스아민이다. 캡슐화 리포솜을 제조하기 위하여, 지질은 클로로포름에 용해되고 혼합되어 지질의 균질한 혼합물을 얻는다. 유기 용매는 회전 증발에 의해 원형 플라스크의 측면 상에 얇은 지질 필름을 생성하면서 제거된다. 클로로포름은 원형 플라스크를 진공 펌프 상에 하룻밤 동안 놓아두어 더 증발시킨다. 그 결과 얻은 지질 필름은 먼저 100% 에탄올로 용해시킨 다음 50%로 다시 옮긴다. 물에 녹인 siRNA는 리포솜/에탄올 용액에 첨가된다. 에탄올은 회전 증발 시스템에 의해 리포솜/siRNA 혼합물로부터 증발된다. 그 결과 얻은 나노입자는 5% 텍스트로스로 캡슐화된 siRNA 입자에 동일한 양의 10% 텍스트로스를 첨가하여 현탁시킨다.
- [0454] 실시예 13
- [0455] 공동-제형을 가진 디올레오일 모노아민으로 siRNA 형질전환 복합체의 제조
- [0456] 사용된 siRNA는 내인성 혈관 내피성장인자 (VEGF) 전사체 및 단백질 수준의 녹-다운을 생산하도록 의도된 뉴클레오타이드의 이중가닥 서열이다. 디올레오일 모노아민은 다른 지질과 4:1의 몰 비율로 제형화된다. 사용된 지질은 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 (DOPE), 1,2-디스테로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[메톡시 (폴리에틸렌 글리콜)-550], 1,2-디스테로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-락토실, 및 콜레스테롤이다. 공동-제형은 클로로포름에 녹인 디올레오일 모노아민에 첨가된다. 리포솜은 이전에 실시예 9에서 기술된 바와 같이 제조된다. siRNA (3 mg/mL) 및 디올레오일 모노아민 (5 mg/mL) 용액은 별도로 주입을 위해 물에 녹여 제조되고, 이후 siRNA의 경우는 5% 텍스트로스로 0.3 mg/mL까지 또한 디올레오일 모노아민의 경우는 1.9 mg/mL로 희석된다. 텍스트로스 용액에 녹인 siRNA는 마이크로피펫을 사용하여 5:1 (양성 : 음성)의 전하

비율로 텍스트로스 용액에 녹인 디올레오일 모노아민에 첨가된다. 제형은 상온에서 15분 동안 배양하여 복합체가 형성되도록 한다.

[0457] 실시예 14

[0458] 디올레오일 모노아민으로 형질전환 복합체의 제조

[0459] 사용된DNA는 루시퍼라제 유전자 및 디올레오일 모노아민 지질을 인코딩하는 플라스미드 DNA이다. 플라스미드 DNA (3 mg/mL) 및 디올레오일 모노아민 (5 mg/mL) 용액은 별도로 주입을 위해 물에 녹여 제조되고, 이후 플라스미드 DNA의 경우는 5% 텍스트로스 0.3 mg/mL까지 또한 디올레오일 모노아민의 경우는 1.9 mg/mL로 희석된다. 텍스트로스 용액에 녹인 플라스미드 DNA는 마이크로피펫을 사용하여 5:1 (양성: 음성)의 전하 비율로 텍스트로스 용액에 녹인 디올레오일 모노아민에 첨가된다. 제형은 상온에서 15분 동안 배양하여 복합체가 형성되도록 한다.

[0460] 실시예 15

[0461] 공동-제형을 가진 디올레오일 모노아민으로 DNA 형질전환 복합체의 제조

[0462] 사용된DNA는 루시퍼라제 유전자를 인코딩하는 플라스미드 DNA이고 사용된 양이온성 지질은 디올레오일 모노아민이다. 본 실시예에서 사용된 양이온성 지질은 다른 지질과 4:1의 물 비율로 제형화된 디올레오일 모노아민이다. 사용된 지질은 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 (DOPE), 1,2-디스테로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[메톡시 (폴리에틸렌 글리콜)-550], 1,2-디스테로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-락토실, 및 콜레스테롤이다. 공동-제형은 디올레오일 모노아민 클로로포름 용액에 첨가된다. 리포솜은 이전에 실시예 9에서 기술된 바와 같이 제조된다. DNA (3 mg/mL) 및 디올레오일 모노아민 공동-제형 (5 mg/mL) 용액은 별도로 주입을 위해 물에 녹여 제조되고, 이후 DNA의 경우는 5% 텍스트로스 0.3 mg/mL까지 또한 디올레오일 모노아민의 경우는 1.9 mg/mL로 희석된다. 텍스트로스 용액에 녹인 DNA는 마이크로피펫을 사용하여 5:1 (양성 : 음성)의 전하 비율로 텍스트로스 용액에 녹인 디올레오일 모노아민에 첨가된다. 제형은 상온에서 15분 동안 배양하여 복합체가 형성되도록 한다.

[0463] 실시예 16

[0464] 플레이트-PEG-디올레오일 크로스아민과 공동-제형화된 디올레오일 모노아민으로 siRNA 형질전환 복합체의 제조

[0465] 사용된siRNA는 내인성 혈관 내피성장인자 (VEGF) 전사체 및 단백질 수준의 녹-다운을 생산하도록 의도된 뉴클레오타이드의 이중가닥 서열이다. 사용된 양이온성 지질은 플레이트-PEG-디올레오일 모노아민과 서로 다른 물 비율 (1:1), (2:1), (4:1), 또는 (10:1)로 공동-제형화된 디올레오일 모노아민이다. 공동-제형은 디올레오일 모노아민 클로로포름 용액에 첨가된다. 리포솜은 이전에 실시예 9에 기술된 바와 같이 제조된다. siRNA (3 mg/mL) 및 디올레오일 모노아민/플레이트-PEG-디올레오일 모노아민 (5 mg/mL) 용액은 별도로 주입을 위해 물에 녹여 제조되고 이후 siRNA의 경우는 5% 텍스트로스 0.3 mg/mL까지 또한 디올레오일 모노아민의 경우는 1.9 mg/mL로 희석된다. 텍스트로스 용액에 녹인 siRNA는 마이크로피펫을 사용하여 5:1 (양성: 음성)의 전하 비율로 텍스트로스 용액에 녹인 디올레오일 모노아민에 첨가된다. 제형은 상온에서 15분 동안 배양하여 복합체가 형성되도록 한다.

[0466] 실시예 17

[0467] 디올레오일 모노아민으로 캡슐화된 siRNA의 제조

[0468] 사용된 siRNA는 내인성 혈관 내피성장인자 (VEGF) 전사체 및 단백질 수준의 녹-다운을 생산하도록 의도된 뉴클레오타이드의 이중가닥 서열이다. 사용된 양이온성 지질은 디올레오일 모노아민이다. 캡슐화 리포솜을 제조하기 위하여, 지질은 클로로포름에 용해되고 혼합되어 지질의 균질한 혼합물을 얻는다. 유기 용매는 회전 증발에 의해 원형 플라스크의 측면 상에 얇은 지질 필름을 생성하면서 제거된다. 클로로포름은 원형 플라스크를 진공 펌프 상에 하룻밤 동안 놓아두어 더 증발시킨다. 그 결과 얻은 지질 필름은 먼저 100% 에탄올로 용해시킨 다음 50%로 다시 옮긴다. 물에 녹인 siRNA는 리포솜/에탄올 용액에 첨가된다. 에탄올은 회전 증발 시스템에 의해 리포솜/siRNA 혼합물로부터 증발된다. 그 결과 얻은 나노입자는 5% 텍스트로스 캡슐화된 siRNA 입자에 동일한 양의 10% 텍스트로스를 첨가하여 현탁시킨다.

[0469] 실시예 18

[0470] 플레이트-PEG-디올레오일 모노아민 리포솜으로 캡슐화된 siRNA의 제조

- [0471] 사용된 siRNA는 내인성 혈관 내피성장인자 (VEGF) 전사체 및 단백질 수준의 녹-다운을 생산하도록 의도된 뉴클레오타이드의 이중가닥 서열이다. 사용된 양이온성 지질은 폴레이트-PEG-디올레오일 모노아민이다. 캡슐화 리포솜을 제조하기 위하여, 지질은 클로로포름에 용해되고 혼합되어 지질의 균질한 혼합물을 얻는다. 유기 용매는 회전 증발에 의해 원형 플라스크의 측면 상에 얇은 지질 필름을 생성하면서 제거된다. 클로로포름은 원형 플라스크를 진공 펌프 상에 하룻밤 동안 놓아두어 더 증발시킨다. 그 결과 얻은 지질 필름은 먼저 100% 에탄올로 용해시킨 다음 50%로 다시 옮긴다. 물에 녹인 siRNA는 리포솜/에탄올 용액에 첨가된다. 에탄올은 회전 증발 시스템에 의해 리포솜/siRNA 혼합물로부터 증발된다. 그 결과 얻은 나노입자는 5% 텍스트로스로 캡슐화된 siRNA 입자에 동일한 양의 10% 텍스트로스를 첨가하여 현탁시킨다.
- [0472] 실시예 19
- [0473] siRNA 및 디올레오일 크로스아민 복합체의 형질전환 활성
- [0474] siRNA 및 디올레오일 크로스아민 복합체의 형질전환 활성이 *시험관내* 에서 다음과 같이 측정된다. mVEGF 또는 루시퍼라제 siRNA 제작물을 포함하는 형질전환 복합체는 실시예 9에 기술된 방법에 의해 제조된다. SCCVII 세포 (0.5×10^5 세포/웰; 마우스 편평세포 암종 (squamous cell carcinoma))은 10% 우태아 혈청 (FBS)을 넣은 24-웰 조직 배양 플레이트 내에 접종된다. 각 웰은 전체 부피 250 μ L의 돌베코 이글 최소 필수배지 (Dulbecco Modified Eagle's Minimal Essential Medium, DMEM)를 넣어 FBS 존재 시 또는 부재 시, 0.5 μ g의 복합화된 siRNA와 6시간 동안 배양된다. 배양 기간에 세포가 그들의 배지에 FBS가 결핍된 경우라면, 20% FBS가 보충된 250 μ L의 DMEM가 형질전환된 세포에 첨가되고 더 나아가 추가 40 시간 동안 배양된다. 세포의 형질전환 배지에 FBS를 가진 경우, 10% FBS가 보충된 250 μ L의 DMEM가 형질전환된 세포에 첨가되고 더 나아가 추가 40 시간 동안 배양된다. 배양 기간의 마지막 시점에는, mVEGF 단백질 및 전사체의 녹-다운이 세포 배양 배지 (단백질) 또는 세포 용출물 (전사체)에서 측정된다. mVEGF 단백질 수준의 측정을 위해, 세포 배양 배지는 mVEGF ELISA 분석법에 의해 직접적으로 분석된다. mVEGF 전사체 분석을 위해, 세포는 트리-반응액을 사용하여 용해된 다음 qRT-검출 키트를 사용하여 mVEGF 전사체의 수준이 정량된다.
- [0475] 실시예 20
- [0476] 디올레오일 크로스아민으로 캡슐화된 siRNA의 형질전환 활성
- [0477] 본 실시예는 디올레오일 모노아민, 디올레오일 크로스아민, 또는 양이온성 제제 둘 다의 혼합물을 사용한 siRNA의 리포솜 캡슐화를 설명하고 있다. 사용된 siRNA는 내인성 혈관 내피성장인자 (VEGF) 전사체 및 단백질 수준의 녹-다운을 생산하도록 의도된 뉴클레오타이드의 이중가닥 서열이다. 사용된 양이온성 지질은 디올레오일 모노아민 (실시예 3), 디올레오일 크로스아민 (실시예 1), 또는 둘 다의 혼합물이다. 캡슐화 리포솜을 제조하기 위하여, 지질은 클로로포름에 용해되고 혼합되어 지질의 균질한 혼합물을 얻는다. 유기 용매는 회전 증발에 의해 원형 플라스크의 측면 상에 얇은 지질 필름을 생성하면서 제거된다. 클로로포름은 원형 플라스크를 진공 펌프 상에 하룻밤 동안 놓아두어 더 증발시킨다. 그 결과 얻은 지질 필름은 먼저 100% 에탄올로 용해시킨 다음 50%로 다시 옮긴다. 물에 녹인 siRNA는 리포솜/에탄올 용액에 첨가된다. 에탄올은 회전 증발 시스템에 의해 리포솜/siRNA 혼합물로부터 증발된다. 그 결과 얻은 나노입자는 5% 텍스트로스로 캡슐화된 siRNA 입자에 동일한 양의 10% 텍스트로스를 첨가하여 현탁시킨다. SCCVII 세포 (0.5×10^5 세포/웰)은 10% FBS를 넣은 24-웰 조직 배양 플레이트 내에 접종된다. 각 웰은 전체 부피 250 μ L의 DMEM를 넣어 FBS 존재 시 또는 부재 시 0.5 μ g의 복합화된 siRNA와 6시간 동안 배양된다. 배양 기간에 세포가 그들의 배지에 FBS가 결핍된 경우라면, 20% FBS가 보충된 250 μ L의 DMEM가 형질전환된 세포에 첨가되고 더 나아가 추가 40 시간 동안 배양된다. 세포의 형질전환 배지에 FBS를 가진 경우, 10% FBS가 보충된 250 μ L의 DMEM가 형질전환된 세포에 첨가되고 더 나아가 추가 40 시간 동안 배양된다. 배양 기간의 마지막 시점에는, mVEGF 단백질 및 전사체의 녹-다운이 세포 배양 배지 (단백질) 또는 세포 용출물 (전사체)에서 측정된다. mVEGF 단백질 수준의 측정을 위해, 세포 배양 배지는 mVEGF 엘라이자 (ELISA) 분석법에 의해 직접적으로 분석된다. mVEGF 전사체 분석을 위해, 세포는 트리-반응액을 사용하여 용해된 다음 qRT-검출 키트를 사용하여 mVEGF 전사체의 수준이 정량된다.
- [0478] 실시예 21
- [0479] 폴레이트-PEG-디올레오일 크로스아민으로 캡슐화된 siRNA의 형질전환 활성
- [0480] 본 실시예는 폴레이트-PEG-디올레오일 모노아민, 폴레이트-PEG-디올레오일 크로스아민, 또는 양이온성 제제 둘 다의 혼합물을 사용한 siRNA의 리포솜 캡슐화를 설명하고 있다. 사용된 siRNA는 내인성 혈관 내피성장인자

(VEGF) 전사체 및 단백질 수준의 녹-다운을 생산하도록 의도된 뉴클레오타이드의 이중가닥 서열이다. 사용된 양이온성 지질은 플레이트-PEG-디올레오일 모노아민 (실시예 5), 플레이트-PEG-디올레오일 크로스아민 (실시예 2), 또는 둘 다의 혼합물이다. 캡슐화 리포좀을 제조하기 위하여, 지질은 클로로포름에 용해되고 혼합되어 지질의 균질한 혼합물을 얻는다. 유기 용매는 회전 증발에 의해 원형 플라스크의 측면 상에 얇은 지질 필름을 생성하면서 제거된다. 클로로포름은 원형 플라스크를 진공 펌프 상에 하룻밤 동안 놓아두어 더 증발시킨다. 그 결과 얻은 지질 필름은 먼저 100% 에탄올로 용해시킨 다음 50%로 다시 옮긴다. 물에 녹인 siRNA는 에탄올 용액에 녹인 리포좀에 첨가된다. 에탄올은 회전 증발 시스템에 의해 리포좀/siRNA 혼합물로부터 증발된다. 그 결과 얻은 나노입자는 5% 텍스트로스로 캡슐화된 siRNA 입자에 동일한 양의 10% 텍스트로스를 첨가하여 현탁시킨다. SCCVII 세포 (0.5×10^5 세포/웰)은 10% FBS를 넣은 24-웰 조직 배양 플레이트 내에 접종된다. 각 웰은 전체 부피 250 μ l의 DMEM를 넣어 FBS 존재 시 또는 부재 시 0.5 μ g의 복합화된 siRNA와 6시간 동안 배양된다. 배양 기간에 세포가 그들의 배지에 FBS가 결핍된 경우라면, 20% FBS가 보충된 250 μ l의 DMEM가 형질전환된 세포에 첨가되고 더 나아가 추가 40 시간 동안 배양된다. 세포의 형질전환 배지에 FBS를 가진 경우, 10% FBS가 보충된 250 μ l의 DMEM가 형질전환된 세포에 첨가되고 더 나아가 추가 40 시간 동안 배양된다. 배양 기간의 마지막 시점에는, mVEGF 단백질 및 전사체의 녹-다운이 세포 배양 배지 (단백질) 또는 세포 용출물 (전사체)에서 측정된다. mVEGF 단백질 수준의 측정을 위해, 세포 배양 배지는 mVEGF 엘라이자 분석법에 의해 직접적으로 분석된다. mVEGF 전사체 분석을 위해, 세포는 먼저 트리-반응액을 사용하여 용해된 다음 qRT- 검출 키트를 사용하여 mVEGF 전사체의 수준이 정량된다.

- [0481] 실시예 22
- [0482] 디올레오일 모노아민 복합화된 siRNA의 질내 투여에 따른 자궁VEGF 단백질의 녹-다운
- [0483] siRNA 투여 2일 이전, ICR 마우스 암컷 (17-22그램)에게 동물에서 발정 주기를 정상화하도록 매일 두 번 프로그스테론의 피하 투여가 주어진다. 그 다음 제형화된 siRNA 표적 VEGF 전사체 또는 비-표적 siRNA 대조군이 마우스에게 질내 투여된다. SiRNA는 디올레오일 모노아민과 5:1 N:P 전하 비율로 복합화된다. 전부 9 μ g의 siRNA가 30 μ l (0.3 mg/mL)의 최종 부피로 투여된다. 투여 48시간 이후에, 동물은 안락사되고 질/자궁경부 및 자궁 (자궁뿔 포함)은 다른 조직과 분리되어 수집되고 액체 N₂에 냉동보관된다. 프로그스테론 처리에 의한 비대한 모양을 나타냈던 동물로부터의 조직만이 분석에 사용된다. 조직은 용해 완충용액으로 균질화되고 엘라이자에 의해 VEGF 단백질이 측정된다.
- [0484] 실시예 23
- [0485] 크로스아민 siRNA의 투여에 따른 과중된 복강 암을 가진 동물의 복수 및 복강내 종양 결절에서 성장인자의 단백질 및 전사체의 녹다운
- [0486] siRNA 및 디올레오일 크로스아민을 포함하는 제형이 과중된 (disseminated) 난소 암을 가진 동물에게 질내 투여와 연관되었던 VEGF 수준을 감소시키려고 투여된다. 과중된 난소 암을 유도하기 위하여, 암컷 C57BL/6 마우스에게 2.5×10^6 ID8 (마우스 난소 암종) 세포가 IP 이식된다. 종양 이식 이후 특정된 날에, 마우스에 디올레오일 모노아민과 5:1 N:P 전하 비율로 제형화된 200 μ g의 siVEGF (또는 비-코딩하는 대조군 siRNA)가 주입된다. 처리 이후 24시간부터 시작하여 동물을 안락사시키고, 종양 및 복수액을 복강으로부터 수확하여 VEGF 단백질 및 전사체 수준을 분석한다. 복수 전사체 분석을 위해, 시료는 처음에 적혈구 용해 프로토콜이 실시되고 RNA 분리 이전에 핵을 가진 세포를 늘린다.
- [0487] 실시예 24
- [0488] 플레이트-PEG-디올레오일 크로스아민을 사용한 종양 표적화된 siRNA
- [0489] 플레이트-PEG-디올레오일 크로스아민으로 제형화된 VEGF siRNA가 피하 SCCVII 종양을 보유하는 마우스 내로 정맥내 또는 복강내 전달된다. 투여 이후 특정된 시점에, 종양은 수확되고 표적화된 전사체의 전사체 및 단백질 측정이 시행된다.
- [0490] 실시예 25
- [0491] 펩타이드 변형된 디올레오일 크로스아민을 사용한 siRNA의 증진된 전신 흡수
- [0492] siRNA는 보존된 Arg-Gly-Asp 모티프 (motif)를 가지는 펩타이드의 첨가에 의해 인테그린 수용체를 표적하도록 기능적으로 변형되었던 디올레오일 크로스아민으로 제형화된다. 복합체는 종양을 보유하는 동물에게 정맥내 또

는 복강내 전달된다. 투여 이후 특정한 시점에 조직은 수확되고 표적화된 전사체의 전사체 및 단백질 측정이 시행된다.

- [0493] 실시예 26
- [0494] 디올레오일 모노아민 전달 반응액으로 복합화된 siRNA의 *시험관내* 형질전환에 따른 단백질 녹다운.
- [0495] siRNA 및 디올레오일 모노아민 전달 반응액 결합 복합체의 형질전환 활성이 *시험관내* 측정된다. simVEGF siRNA 제작물을 포함하는 형질전환 복합체는 실시예 9에 미리 기술된 방법에 의해 제조된다. SCCVII 세포 (0.5×10^5 세포/웰)가 10% FBS를 넣은 24-웰 조직 배양 플레이트 내에 접종된다. 각 웰은 전체 부피 250 μ L의 DMEM을 넣어 0.5 μ g의 복합화된 siRNA와 6시간 동안 배양된다. 배양 기간이 끝날 때, 20% FBS가 보충된 250 μ L의 DMEM가 형질전환된 세포에 첨가되고 더 나아가 추가 40 시간 동안 배양된다. 배양 기간의 마지막 시점에, 상청액의 mVEGF 단백질이 상기 기술된 바와 같이 측정된다. 그 결과는 VEGF 단백질의 유의한 (~95%) 녹다운을 나타낸다 (도 1).
- [0496] 실시예 27
- [0497] 디올레오일 모노아민 및 메틸-디올레오일 모노아민 전달 반응액으로 복합화된 siRNA의 *시험관내* 형질전환에 따른 단백질 녹다운.
- [0498] 디올레오일 모노아민 (실시예 3) 또는 메틸-디올레오일 모노아민 (실시예 3A) 전달 반응액을 가진 siRNA 복합체의 형질전환 활성이 *시험관내* 측정된다. simVEGF siRNA 제작물을 포함하는 형질전환 복합체는 이전에 기술된 방법에 의해 제조된다. SCCVII 세포 (0.5×10^5 세포/웰)가 10% FBS를 넣은 24-웰 조직 배양 플레이트 내에 접종된다. 각 웰은 전체 부피 250 μ L의 DMEM을 넣어 0.5 μ g의 복합화된 siRNA와 6시간 동안 배양된다. 배양 기간이 끝날 때, 20% FBS가 보충된 250 μ L의 DMEM가 형질전환된 세포에 첨가되고 더 나아가 추가 40 시간 동안 배양된다. 배양 기간의 마지막 시점에, 상청액의 mVEGF 단백질이 상기 기술된 바와 같이 측정된다. 그 결과는 VEGF 단백질의 유의한 (~95%) 녹다운을 나타낸다 (도 2).
- [0499] 실시예 28
- [0500] 플레이트-PEG-디올레오일 모노아민으로 복합화된 siRNA의 *시험관내* 형질전환에 따른 단백질 및 전사체의 녹다운.
- [0501] siRNA 및 플레이트-PEG-디올레오일 모노아민 결합 복합체의 형질전환 활성이 *시험관내* 측정된다. simVEGF siRNA 제작물을 포함하는 형질전환 복합체는 이전에 기술된 방법에 의해 제조된다. SCCVII 세포 (0.5×10^5 세포/웰)가 10% FBS를 넣은 24-웰 조직 배양 플레이트 내에 접종된다. 각 웰은 전체 부피 250 μ L의 DMEM을 넣고 다양한 농도로 플레이트 기질이 존재 시 또는 부재 시 0.5 μ g의 복합화된 siRNA와 6시간 동안 배양된다. 배양 기간이 끝날 때, 20% FBS가 보충된 250 μ L의 DMEM가 형질전환된 세포에 첨가되고 더 나아가 추가 40 시간 동안 배양된다. 배양 기간의 마지막 시점에, mVEGF 단백질 및 mVEGF 전사체 수준이 세포 배양 배지 및 세포 용출액으로부터 각각 측정된다. mVEGF 단백질 수준의 측정을 위해, 세포 배양 배지는 mVEGF 엘라이자 분석법에 의해 직접적으로 분석된다. mVEGF 전사체 분석을 위해, 세포는 트리-반응액을 사용하여 용해된 다음 qRT-검출 키트를 사용하여 mVEGF 전사체의 수준이 정량된다. 비-침묵시키는 대조군 siRNA로 형질전환되었던 세포에 대비하여 발생하는 VEGF 단백질 및 전사체 녹다운의 퍼센트가 계산된다.
- [0502] 실시예 29
- [0503] 디올레오일 모노아민 전달 반응액으로 복합화된 siRNA의 투여에 따른 폐와 간에서 카베올린-1 전사체 녹다운
- [0504] 암컷 ICR 마우스 (17-22 그램)에게 카베올린-1 (Caveolin-1, Cav-1) 전사체를 표적하는 제형화된 siRNA 또는 비-표적 siRNA 대조군이 정맥내 주사된다. siRNA는 디올레오일 모노아민 전달 반응액과 10:1 비율로 복합화된다. 전부 100 μ g siRNA가 최종 부피 200 μ L (0.5 mg/mL)로 주입된다. 주입 48시간 이후에 동물은 안락사되고 폐와 간이 qRT-PCR를 사용한 Cav-1 전사체 분석을 위해 수확된다. 전사체 수준은 내부 대조군으로서 β -액틴으로 정상화된다. 결과 (도 3)는 폐 (76% 녹다운) 및 간 (62% 녹다운) 둘 다에서 표적 특이적 Cav-1 전사체 수준의 유의한 감소를 나타내고 있다. 각 그룹의 경우, n = 5 이다.
- [0505] 실시예 30
- [0506] 마우스에서 피하 종양 내에 주입된 디올레오일 모노아민 제형화된 siVEGF에 의한 종양 저해를 유발하는 VEGF 전

사체의 녹다운

[0507] 본 실시예에서는, 종양이 CH3 마우스의 뒷 옆구리 내에 5×10^5 개의 편평세포 암종 (squamous cell carcinoma) 세포를 주입하여 이식되었다. 종양은 ~ 40mm³ 크기에 도달할 때까지 성장하도록 하였다. 그 다음 종양에는 디올레오일 모노아민과 5:1 N:P 비율로 제형화된 시판되는 siRNA 표적 VEGF 또는 유사하게 제형화된 비-침묵시키는 대조군 siRNA가 주입되었다. 최종 siRNA 농도는 0.3 mg/mL이었다. 전부 30 μ L의 제형화된 siRNA 용액은 종양 내에 주사되었고 주입은 모두 6번을 3-4일마다 반복 실시하였다. 일부 동물로부터 얻은 종양은 전사체 분석을 위해 두 번째 제형화된 siRNA 주입 48시간 이후에 수확되었다. 본 연구로부터 나온 결과 (도 4)는 VEGF siRNA의 투여가 비-침묵 대조군 그룹과 대비하여 VEGF 전사체의 32% 감소를 유발하는 것을 나타낸다. 마지막 종양 주입하고 한 주 이후에 비-침묵 siRNA와 대비하여 VEGF siRNA 그룹에서 종양 부피의 31% 감소가 또한 미처리 대조군 동물과 대비하여 57% 감소가 있었다. VEGF siRNA 처리는 더 나아가 비-침묵 대조군 (siNON) 또는 미처리 그룹 둘 중 하나와 대비하여 동물의 중간 생존에서 13% 개선을 유도하였다.

[0508] 실시예 31

[0509] 여과에 의해 디올레오일 모노아민으로 농축된 siRNA 형질전환 복합체의 제조

[0510] 사용된 siRNA는 내인성 혈관 내피성장인자 (VEGF) 전사체 및 단백질 수준의 녹-다운을 생산하도록 의도된 뉴클레오타이드의 이중가닥 서열이다. 양이온성 지질의 리포솜은 실시예 9에서 미리 기술된 바와 같이 제조된다. siRNA (20 mg/mL) 및 디올레오일 모노아민 (6.4 mg/mL) 용액은 별도로 주입을 위해 물에 녹여 제조된다. 25 μ g의 siRNA가 500 μ g의 디올레오일 모노아민 용액과 조합된다. 이후에 복합체는 5% 텍스트로스로 0.03 mg/mL의 siRNA까지 희석된다. 희석된 복합체는 25-50 kDa 원심분리 필터 내로 옮겨지고 보전물 (retentate)의 원하는 siRNA 농도에 도달할 때까지 수분 동안 원심분리 시킨다.

[0511] 실시예 32

[0512] 여과에 의해 디올레오일 크로스아민으로 농축된 siRNA 형질전환 복합체의 제조

[0513] 사용된 siRNA는 내인성 혈관 내피성장인자 (VEGF) 전사체 및 단백질 수준의 녹-다운을 생산하도록 의도된 뉴클레오타이드의 이중가닥 서열이다. 양이온성 지질의 리포솜은 실시예 9에서 미리 기술된 바와 같이 제조된다. siRNA (20 mg/mL) 및 디올레오일 크로스아민 (5 mg/mL) 용액은 별도로 주입을 위해 물에 녹여 제조된다. 25 μ g의 siRNA가 500 μ g의 디올레오일 모노아민 용액과 조합된다. 이후에, 복합체는 5% 텍스트로스로 0.03 mg/mL의 siRNA까지 희석된다. 희석된 복합체는 25-50 kDa 원심분리 필터 내로 옮겨지고 보전물의 원하는 siRNA 농도에 도달할 때까지 수분 동안 원심분리 시킨다.

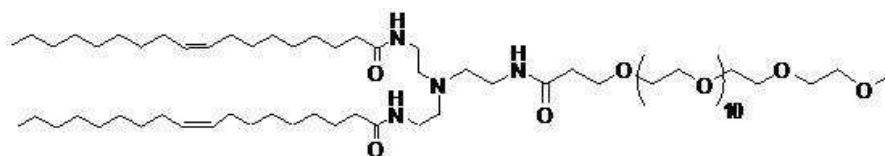
[0514] 실시예 33

[0515] 나노입자의 입자 크기 및 제타 전위의 측정

[0516] 디올레오일 크로스아민/siRNA 및 디올레오일 모노아민/siRNA 복합체는 실시예 6 및 9에서와 같이 제형화되고 50 mM NaCl로 적절한 농도까지 희석된다. 그 다음 시료는 폴리스티렌 큐벳에 첨가되고 90Plus/BI- 입자 측정기 (particles sizer)를 사용하여 입자 크기와 제타 전위 (zeta potential)가 측정된다. 관찰된 입자 크기는 80-400 nm 사이의 범위이고 관찰된 제타 전위는 +10 내지 +40 mV 사이의 범위이다.

[0517] 실시예 34

[0518] 디-[2-(올레오일아미노)에틸][2-[(메톡시도데카에틸렌글리콜카보닐 아미노)에틸]아민 “mPEG-디올레오일 모노아민” (9)



[0519]

[0520] mPEG-디올레오일 모노아민 (9)

[0521] 메톡시(도데카에틸렌 글리콜) (MW 550, 다중분산(polydisperse), 대략 12개의 에틸렌 글리콜 단위를 포함, 720 mg, 1.30 mmol)는 8 mL의 건조 톨루엔에 용해시킨다. 본 포스젠 (phosgene)에 톨루엔에 녹인 용액 (4 mL의 2

M 용액, 8 mmol)이 첨가된다. 반응 혼합물은 상온에서 3시간 동안 교반된 다음 상온에서 진공으로 농축되어 810 mg (1.31 mmol)의 조 메톡시(도데카에틸렌 글리콜) 클로로포르메이트를 얻는다.

[0522] 상기 메톡시(도데카에틸렌 글리콜) 클로로포르메이트 (810 mg, 1.31 mmol)는 6.313 g의 건조 메틸렌 클로라이드에 용해시킨다. 디올레오일 모노아민은 포타슘 카보네이트로의 처리 및 메틸렌 클로라이드로의 추출에 의해 자유 염기로 전환된다. 유기상은 건조되어 건조 오일성 물질 (700 mg, 1.04 mmol)을 내어놓고, 이는 6 mL의 건조 메틸렌 클로라이드에 재-용해된다. 5.66 g의 메톡시(도데카에틸렌 글리콜) 클로로포르메이트 용액 (1.04 mmol의 mPEG 클로로포르메이트)이 디올레오일 모노아민 자유 염기 용액에 교반되면서 첨가된다. 혼합물은 상온에서 3시간 동안 교반된 다음 농축되고 실리카겔을 사용하여 크로마토그래피로 정제된다 (메틸렌 클로라이드에 녹인 3 내지 15% 메탄올로 구배 용출). 정제는 -디올레오일 모노아민을 얻는다 (830 mg, 0.664 mmol).

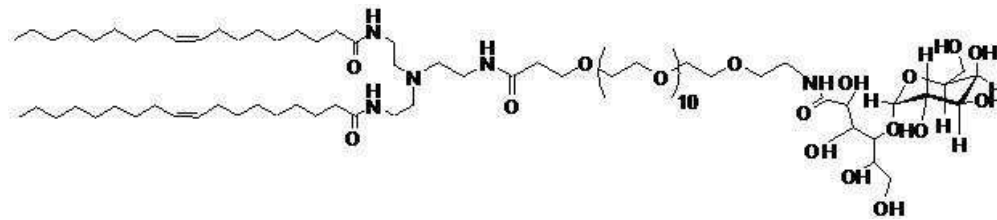
[0523] 실시예 35

[0524] 형광 태간트-보유 모노아민의 제조

[0525] 설포로다민B 아실 클로라이드 [Fluka, 115 mg, 0.2 mmol]가 7 mL의 건조 클로로포름에 용해시킨다. 본 용액은 5 mL의 건조 클로로포름에 녹인 디올레오일 모노아민 자유 염기의 잘 교반된 용액 [140 mg, ca. 0.2 mmol, 그의 TFA 염의 클로로포름 용액을 포타슘 카보네이트로 처리하여 상기와 같이 제조됨]에 첨가된다. 혼합물은 상온에서 3시간 동안 교반된 다음 농축되고 2000 마이크로미터 너비 층의 실리카겔 준비 플레이트를 사용한 크로마토그래피로 정제된다 [이후에 메틸렌 클로라이드에 녹인 3 내지 15% 메탄올로 용출]. 정제는 [로다민 B 설포닐]디올레오일 모노아민 (120 mg, 0.1 mmol)을 얻는다.

[0526] 실시예 36

[0527] α-락토바이오닐아미도-ω-프로피온산운데카에틸렌글리콜-디-[2-(올레오일아미노)에틸](2-아미노에틸)아민 “락토바이오닐-디올레오일 모노아민” (10)의 합성



[0528]

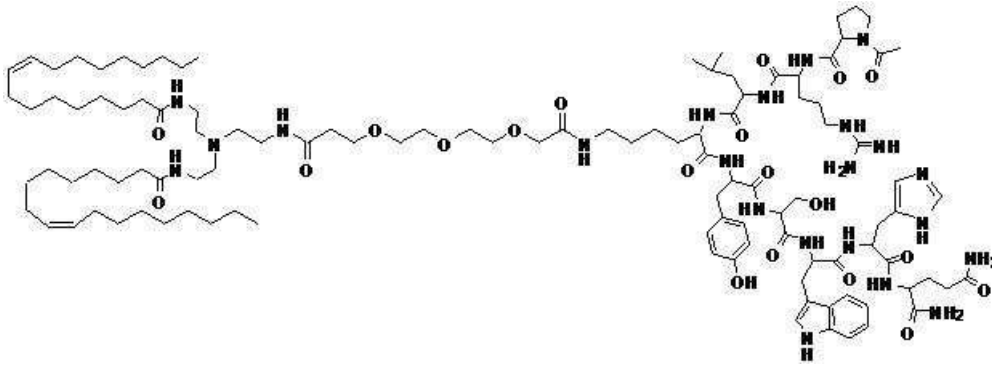
[0529] 락토바이오닐-디올레오일 모노아민 (10)

[0530] Fmoc아미노-ω-프로피온산-운데카에틸렌글리콜 링커 (Fmoc-₁₁-COOH) (100 mg, 0.119 mmol) 및 p-니트로페닐 (18 mg, 0.129 mmol)은 1 mL 메틸렌 클로라이드에 용해시킨다. DCC (27 mg, 0.131 mmol)은 1 mL 메틸렌 클로라이드에 용해시키고 교반되는 /p-니트로페닐 용액에 첨가된다. 반응은 상온에서 3시간 동안 진행되도록 하고, 이후에는 0.45 μm 주사기 필터를 사용하여 제거된다. 디올레오일 모노아민은 포타슘 카보네이트의 처리 및 메틸렌클로라이드로의 추출에 의해 자유 염기로 전환된다. 유기상은 건조되어 75 mg (0.111 mmol)의 건조 물질을 얻고 이는 0.5 mL 메틸렌 클로라이드에 재용해된다. 본 용액은 p-니트로페닐-활성화된 Fmoc아미노-ω-프로피온산-운데카에틸렌글리콜산 용액에 첨가된다. 반응은 상온에서 18시간 동안 진행되도록 한다. 조물질은 건조되고 200 μL 피페리딘이 첨가된 1.8 mL 디메틸포름아마이드에 재용해시킨다. Fmoc 절단은 15분 동안 진행되도록 하고 이후에 디메틸포름아마이드 및 피페리딘은 높은 진공 하에서 제거된다. α-아미노-ω-프로피온산-운데카에틸렌글리콜-디-[2-(올레오일아미노)에틸](2-아미노에틸)아민이 메탄올에 녹인 80% 메틸렌 클로라이드, 이후 75%를 포함하는 실리카겔 컬럼 상의 분리에 의해 정제된다. 적절한 분획은 건조되고 75 mg (0.59 mmol)의 갈색의 유성 물질을 얻는다.

[0531] 락토바이오닌산은 먼저 트리플루오로아세트산 한 방울을 포함하는 메탄올로 50° C에서 탈수화하여 해당하는 락톤으로 전환시킨다. α-아미노-ω-프로피온산-운데카에틸렌글리콜-디-[2-(올레오일아미노)에틸](2-아미노에틸)아민 (50 mg, 0.039 mmol)은 15 μL 디이소프로필에틸아민을 포함하는 1.5 mL의 메탄올에 용해시킨다. 본 교반하는 용액에 건조 락토바이오닌락톤 (15 mg, 0.044 mmol)이 첨가된다. 플라스크는 밀봉되고 반응은 60° C에서 20시간 동안 교반된다. 소량의 침전물은 주사기 여과에 의해 제거되고 α-락토바이오닐아미도-ω-프로피온산-운데카에틸렌글리콜-디-[2-(올레오일아미노)에틸](2-아미노에틸)아민은 높은 진공 하에서 건조되어 57 mg (0.035 mmol)의 순수한 물질을 얻는다.

[0532] 실시예 37

[0533] 디-[2-(올레오일아미노)에틸][2-[ω-프로피오닐-LHRH-옥타에틸렌글리콜프로피오닐아미노]에틸]아민 “LHRH-디올레오일 모노아민” (11)의 합성



[0534]

[0535] LHRH-디올레오일 모노아민 (11)

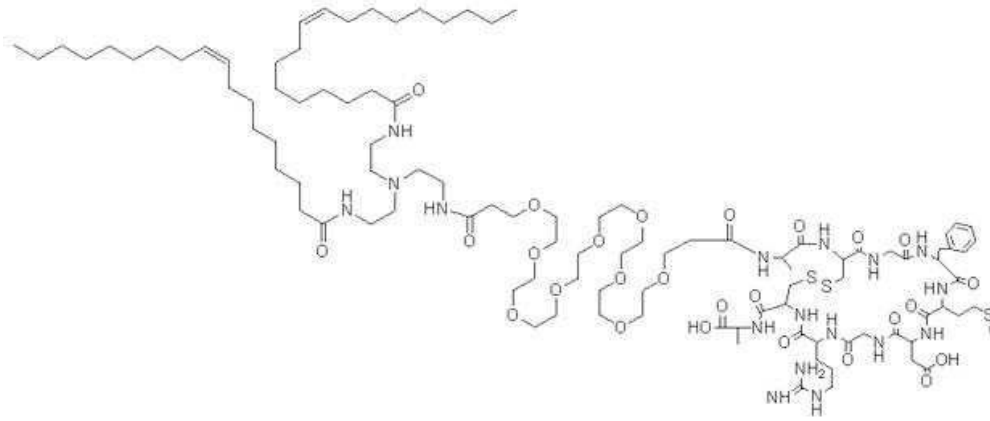
[0536] 옥타에틸렌글리콜디프로피온산 (347 mg, 0.675 mmol)은 8 mL의 건조 메틸렌 클로라이드에 용해시킨다. 본 용액에 p-니트로페닐 (210 mg, 1.5 mmol)을 첨가하고 이후에 디사이클로헥실카보디이미드 (DCC) (313 mg, 1.52 mmol)에 의한다. 다음 날, 반응 혼합물은 침전된 디사이클로헥실우레아로부터 여과되고, 여과물은 농축되며 주체 화합물은 실리카 상에서 크로마토그래피에 의해 정제된다 (먼저, 반응하지 않은 p-니트로페놀을 제거하도록 에테르로 용출한 다음, 4% 메탄올/메틸렌 클로라이드로 용출).

[0537] 상기 옥타에틸렌글리콜디프로피온산 디-p-니트로페닐 에스테르 (510 mg, 0.68 mmol)는 6 mL의 건조 메틸렌 클로라이드에 용해시킨다. 디-[2-(올레오일아미노)에틸](2-아미노에틸)아민은 포타슘 카보네이트로의 처리 및 메틸렌 클로라이드로의 추출에 의해 자유 염기로 전환된다. 유기상은 건조되어 건조 오일성 물질 (390 mg, 0.58 mmol)을 내어놓고, 이는 3 mL의 메틸렌 클로라이드에 재-용해된다. 혼합물은 하룻밤 동안 교반된 다음, 상기 언급된 디-p-니트로페닐 에스테르의 경우와 동일한 방법을 사용한 크로마토그래피로 정제된다. 반응하지 않은 디-[2-(올레오일아미노)에틸](2-아미노에틸)아민 분획 이후에, 디-[2-(올레오일아미노)에틸][2-[ω-프로피온산-옥타에틸렌글리콜프로피오닐아미노]에틸]아민 p-니트로페놀레이트 (268 mg, 0.207 mmol)가 수집된다.

[0538] 시판되는 LHRH 펩타이드 (서열: Ac-QHWSYKLRP-Am, 98 mg of TFA 염, 0.078 mmol)는 2 mL의 건조 디메틸포름아마이드에 용해시키고 용액은 펩타이드를 건조하도록 높은 진공 하에서 증발시킨다. 잔여물은 1 mL의 건조 디메틸포름아마이드에 용해시키고; 1 mL 포름아마이드에 녹인 상기 디-[2-(올레오일아미노)에틸][2-[ω-프로피온산-옥타에틸렌글리콜프로피오닐아미노]에틸]아민 p-니트로페놀레이트 (135 mg, 0.104 mmol)의 용액이 첨가되고 이후 트리에틸아민 (0.028 mL, 0.201 mmol)의 첨가된다. 교반된 반응 혼합물은 상온에서 17시간 동안 나뉜 다음 진공으로 농축된다. 표적 물질의 정제는 C8 컬럼을 사용한 역상 준비 크로마토그래피에 의해 수행되고 아세토니트릴/물 구배 용출 [15분 동안30% 아세토니트릴/물 (0.1% TFA) 내지 90%]로 97 mg의 디-[2-(올레오일아미노)에틸][2-[ω-프로피오닐-LHRH-옥타에틸렌글리콜프로피오닐아미노]에틸]아민을 얻는다.

[0539] 실시예 38

[0540] 디-[2-(올레오일아미노)에틸][2-[ω-프로피오닐-RGD-옥타에틸렌글리콜프로피오닐아미노]에틸]아민 “RGD-디올레오일 모노아민” (12)의 합성



- [0541]
- [0542] RGD-디올레오일 모노아민 (12)
- [0543] 옥타에틸렌글리콜디프로피온산 (347 mg, 0.675 mmol)은 8 mL의 건조 메틸렌 클로라이드에 용해시킨다. 본 용액에 p-니트로페닐 (210 mg, 1.5 mmol)을 첨가하고 이후 디사이클로헥실카보다이미드 (DCC) (313 mg, 1.52 mmol)에 의한다. 다음 날, 반응 혼합물은 침전된 디사이클로헥실우레아로부터 여과되고, 여과물은 농축되며 주체 화합물은 실리카 상에서 크로마토그래피에 의해 정제된다 (먼저, 반응하지 않은 p-니트로페놀을 제거하도록 에테르로 용출한 다음, 4% 메탄올/메틸렌 클로라이드로 용출).
- [0544] 상기 옥타에틸렌글리콜디프로피온산 디-p-니트로페닐 에스테르 (510 mg, 0.68 mmol)는 6 mL의 건조 메틸렌 클로라이드에 용해시킨다. 디-[2-(올레오일아미노)에틸](2-아미노에틸)아민은 포타슘 카보네이트로의 처리 및 메틸렌 클로라이드로의 추출에 의해 자유 염기로 전환된다. 유기상은 건조되어 건조 오일성 물질 (390 mg, 0.58 mmol)을 내어놓고, 이는 3 mL의 메틸렌 클로라이드에 재-용해된다. 혼합물은 하룻밤 동안 교반된 다음, 상기 언급된 디-p-니트로페닐 에스테르의 경우와 동일한 방법을 사용한 크로마토그래피로 정제된다. 반응하지 않은 디-[2-(올레오일아미노)에틸](2-아미노에틸)아민 분획 이후에, 디-[2-(올레오일아미노)에틸][2-[ω-프로피온산-옥타에틸렌글리콜프로피오닐아미노]에틸]아민 p-니트로페놀레이트 (268 mg, 0.207 mmol)가 수집된다.
- [0545] 시판되는 RGD 펩타이드 [서열: A*CRGDMFG*CA (2-9개의 디설파이드 연결) 117 mg of TFA 염, 0.100 mmol)는 3 mL의 건조 디메틸포름아미드에 용해시키고 용액은 펩타이드를 건조하도록 높은 진공 하에서 증발시킨다. 잔여물은 3 mL의 건조 메탄올에 용해시키고; 3 mL 포름아미드에 녹인 상기 디-[2-(올레오일아미노)에틸][2-[ω-프로피온산-옥타에틸렌글리콜프로피오닐아미노]에틸]아민 p-니트로페놀레이트 (135 mg, 0.104 mmol)의 용액이 첨가되고 이후 허니그 염기 (Hunig's base, 0.065mL, 0.370 mmol)가 첨가된다. 반응 혼합물은 상온에서 72시간 동안 교반된 다음 진공으로 농축된다. 표적 물질의 정제는 C8 컬럼을 사용한 역상 준비 크로마토그래피에 의해 수행되고 아세토니트릴/물 구배 용출로 43 mg (0.020 mmol)의 디-[2-(올레오일아미노)에틸][2-[ω-프로피오닐-RGD-옥타에틸렌글리콜프로피오닐아미노]에틸]아민을 얻는다.
- [0546] 실시예 39
- [0547] 디올레오일 모노아민 및 mPEG-디올레오일 모노아민과 복합화된 siRNA의 제조
- [0548] 사용된 siRNA는 내인성 혈관 내피성장인자 (VEGF) 전사체 및 단백질 수준의 녹-다운을 생산하도록 의도된 뉴클레오타이드의 이중가닥 서열이다. 사용된 양이온성 지질은 디올레오일 모노아민 (실시예 3) 및 mPEG-디올레오일 모노아민 (실시예 34)의 혼합물이다. 리포솜을 제조하기 위하여, 지질은 클로로포름에 용해되고 혼합되어 지질의 균질한 혼합물을 얻는다. 유기 용매는 회전 증발에 의해 원형-바닥 플라스크의 벽 상에 얇은 지질 필름을 생성하면서 제거된다. 클로로포름은 원형-바닥 플라스크를 진공 펌프 상에 하룻밤 동안 놓아두어 더 증발시킨다. 그 결과 얻은 지질 필름은 원하는 농도로 증류수를 사용하여 재수화시키고 수분 동안 격렬히 볼텍스한다. 용액은 과쇄기 수조에 1시간 동안 놓아둔 다음 최종 리포솜 용액을 얻도록 200 nm 무균 주사기 필터를 통하여 여과시킨다. 물에 용해된 siRNA는 리포솜 용액에 첨가된다.
- [0549] 실시예 40
- [0550] 디올레오일 모노아민 및 mPEG-디올레오일 모노아민과 캡슐화된 siRNA의 제조
- [0551] 본 실시예는 mPEG-디올레오일 모노아민을 사용한 siRNA의 리포솜 캡슐화를 설명한다. 사용된 siRNA는 내인성 표적 전사체 및 단백질 수준의 녹-다운을 생산하도록 의도된 뉴클레오타이드의 이중가닥 서열이다. 사용된 양

이온성 지질은 디올레오일 모노아민 (실시예 3) 및 mPEG-디올레오일 모노아민 (실시예 34)의 혼합물이다. 캡슐화 리포좀을 제조하기 위하여, 지질은 클로로포름에 용해되고 혼합되어 지질의 균질한 혼합물을 얻는다. 유기 용매는 회전 증발에 의해 원형-바닥 플라스크의 벽 상에 얇은 지질 필름을 생성하면서 제거된다. 클로로포름은 원형-바닥 플라스크를 진공 펌프 상에 하룻밤 동안 놓아두어 더 증발시킨다. 그 결과 얻은 지질 필름은 먼저 100% 에탄올에 용해시킨 다음 50%로 옮긴다. 물에 용해된 siRNA는 에탄올에 녹인 리포좀에 첨가된다. 에탄올은 회전 증발 시스템에 의해 리포좀/siRNA 혼합물로부터 증발된다. 그 결과 얻은 나노입자는 5% 텍스트로스로 캡슐화된 siRNA 입자에 동일한 양의 10% 텍스트로스를 첨가하여 현탁시킨다.

[0552] 실시예 41

[0553] siRNA 및 디올레오일 모노아민/mPEG-디올레오일 모노아민 복합체의 형질전환 활성

[0554] siRNA 및 디올레오일 모노아민/ mPEG-디올레오일 모노아민 복합체의 형질전환 활성은 *시험관내* 에서 다음과 같이 측정된다. 사용된 siRNA는 내인성 카베올린-1 (Cav-1) 전사체 수준의 녹-다운을 생산하도록 의도된 뉴클레오타이드의 이중가닥 서열이다. 사용된 양이온성 지질은 디올레오일 모노아민 (실시예 3), 및 mPEG-디올레오일 모노아민 (실시예 34)의 혼합물이다. 리포좀을 제조하기 위하여, 지질은 클로로포름에 용해되고 혼합되어 지질의 균질한 혼합물을 얻는다. 유기 용매는 회전 증발에 의해 원형-바닥 플라스크의 벽 상에 얇은 지질 필름을 생성하면서 제거된다. 클로로포름은 원형-바닥 플라스크를 진공 펌프 상에 하룻밤 동안 놓아두어 더 증발시킨다. 그 결과 얻은 지질 필름은 원하는 농도로 증류수를 사용하여 재수화시키고 수분 동안 격렬히 볼텍스한다. 용액은 파쇄기 수조에 1시간 동안 놓아둔 다음 최종 리포좀 용액을 얻도록 200 nm 무균 주사기 필터를 통하여 여과시킨다. 물에 용해된 siRNA는 리포좀 용액에 첨가된다. 그 결과 얻은 나노입자는 5% 텍스트로스로 복합화된 siRNA 입자에 동일한 양의 10% 텍스트로스를 첨가하여 현탁시킨다. SCCVII 세포 (0.5×10^5 세포/웰)은 10% FBS를 넣은 24-웰 조직 배양 플레이트 내에 접종된다. 각 웰은 전체 부피 250 μ L의 DMEM를 넣어 FBS 존재 시 또는 부재 시 0.5 μ g의 복합화된 siRNA와 6시간 동안 배양된다. 배양 기간에 세포가 그들의 배지에 FBS가 결핍된 경우라면, 20% FBS가 보충된 250 μ L의 DMEM가 형질전환된 세포에 첨가되고 더 나아가 추가 40 시간 동안 배양된다. 세포의 형질전환 배지에 FBS를 가진 경우, 10% FBS가 보충된 250 μ L의 DMEM가 형질전환된 세포에 첨가되고 더 나아가 추가 40 시간 동안 배양된다. 배양 기간의 마지막 시점에는, Cav-1 전사체의 녹-다운이 세포 용출물 (전사체)에서 측정된다. Cav-1 전사체 분석을 수행하기 위하여, 세포는 트리-반응액을 사용하여 용해된 다음 qRT- 검출 키트를 사용하여 Cav-1 전사체의 수준이 정량된다. Cav-1 전사체는 비-침묵화된 대조군과 비교하여 90%까지 저해된다 (도 5A).

[0555] 실시예 42

[0556] 디올레오일 모노아민/mPEG-디올레오일 모노아민으로 캡슐화된 siRNA의 형질전환 활성

[0557] 디올레오일 모노아민/mPEG-디올레오일 모노아민으로 캡슐화된 siRNA의 형질전환 활성은 *시험관내* 에서 다음과 같이 측정된다. 사용된 siRNA는 내인성 카베올린-1 (Cav-1) 전사체 수준의 녹-다운을 생산하도록 의도된 뉴클레오타이드의 이중가닥 서열이다. 사용된 양이온성 지질은 디올레오일 모노아민 (실시예 3), 및 mPEG-디올레오일 모노아민 (실시예 34)의 혼합물이다. 캡슐화 리포좀을 제조하기 위하여, 지질은 클로로포름에 용해되고 혼합되어 지질의 균질한 혼합물을 얻는다. 유기 용매는 회전 증발에 의해 원형-바닥 플라스크의 벽 상에 얇은 지질 필름을 생성하면서 제거된다. 클로로포름은 원형-바닥 플라스크를 진공 펌프 상에 하룻밤 동안 놓아두어 더 증발시킨다. 그 결과 얻은 지질 필름은 먼저 100% 에탄올에 용해시킨 다음 50%로 옮긴다. 물에 용해된 siRNA는 에탄올에 녹인 리포좀에 첨가된다. 에탄올은 회전 증발 시스템에 의해 리포좀/siRNA 혼합물로부터 증발된다. 그 결과 얻은 나노입자는 5% 텍스트로스로 복합화된 siRNA 입자에 동일한 양의 10% 텍스트로스를 첨가하여 현탁시킨다. SCCVII 세포 (0.5×10^5 세포/웰)은 10% FBS를 넣은 24-웰 조직 배양 플레이트 내에 접종된다. 각 웰은 전체 부피 250 μ L의 DMEM를 넣어 FBS 존재 시 또는 부재 시 0.5 μ g의 복합화된 siRNA와 6시간 동안 배양된다. 배양 기간에 세포가 그들의 배지에 FBS가 결핍된 때는, 20% FBS가 보충된 250 μ L의 DMEM가 형질전환된 세포에 첨가되고 더 나아가 추가 40 시간 동안 배양된다. 세포의 형질전환 배지에 FBS를 가진 때는, 10% FBS가 보충된 250 μ L의 DMEM가 형질전환된 세포에 첨가되고 더 나아가 추가 40 시간 동안 배양된다. 배양 기간의 마지막 시점에는, Cav-1 전사체의 녹-다운이 세포 용출물에서 측정된다. Cav-1 전사체 분석을 수행하기 위하여, 세포는 트리-반응액을 사용하여 용해된 다음 qRT- 검출 키트를 사용하여 Cav-1 전사체의 수준이 정량된다. Cav-1 전사체는 비-침묵화된 대조군과 비교하여 45%까지 저해된다 (도 5B를 보라).

[0558] 실시예 43

- [0559] 디올레오일 모노아민 및 mPEG-디올레오일 모노아민으로 복합화된 siRNA의 투여에 따른 폐에서의 카베올린-1 전사체 녹다운
- [0560] 암컷 ICR 마우스 (17-22 그램)에게 카베올린-1 (Caveolin-1, Cav-1) 전사체를 표적하는 미리 제형화된 200 μ L의 siRNA가 정맥내 (IV) 주사된다. siRNA 복합체는 100, 60, 40, 20, 또는 10 μ g의 siRNA (20:1 N:P 비율)을 가진 디올레오일 모노아민 및 mPEG-디올레오일 모노아민의 10:1혼합물을 포함한다 (실시에 9를 참조하라). 주입 48시간 이후에 동물은 안락사되고 폐는 qRT-PCR 를 사용한 표적 Cav-1 전사체 분석 및 siRNA 정량을 위해 수확된다. Cav-1 전사체 수준 (내부 대조군으로서 β -액틴으로 정상화됨)은 처리되지 않은 대조군 동물에 대비한 발현 퍼센트로서 표현된다. 결과는 동물의 폐에서 100 μ g siRNA를 준 동물에서 >60% 로부터 100 μ g siRNA를 준 동물에서 ~ 13%까지 분포하는 Cav-1 전사체 수준의 용량-의존적 감소를 나타낸다. 주입된 siRNA의 정량은 폐에 분포하는 siRNA의 절대량의 용량 의존적 증가를 표시하고 있다 (도 6). 가장 낮은 용량으로 ~ 5%의 주입된 siRNA가 폐에 분포된다. 가장 높은 용량으로 ~ 50%의 주입된 siRNA가 폐에 분포된다. 각 그룹의 경우, 동물의 수 ("n")는 6 이다.
- [0561] 실시예 44
- [0562] 디올레오일 모노아민/락토바이오닐-디올레오일 모노아민으로 캡슐화된 siRNA의 형질전환 활성
- [0563] 디올레오일 모노아민/락토바이오닐-디올레오일 모노아민으로 캡슐화된 siRNA의 형질전환 활성은 시험관내 에서 다음과 같이 측정된다. 사용된 siRNA는 β -액틴 전사체 수준의 녹-다운을 생산하도록 의도된 뉴클레오타이드의 이중가닥 서열이다. 사용된 양이온성 지질은 디올레오일 모노아민 (실시에 3), 및 락토바이오닐-디올레오일 모노아민 (실시에 35)의 혼합물이다. 캡슐화 리포좀을 제조하기 위하여, 지질은 클로로포름에 용해되고 혼합되어 지질의 균질한 혼합물을 얻는다. 유기 용매는 회전 증발에 의해 원형-바닥 플라스크의 벽 상에 얇은 지질 필름을 생성하면서 제거된다. 클로로포름은 원형-바닥 플라스크를 진공 펌프 상에 하룻밤 동안 놓아두어 더 증발시킨다. 그 결과 얻은 지질 필름은 먼저 100% 에탄올에 용해시킨 다음 50%로 옮긴다. 물에 용해된 siRNA는 에탄올에 녹인 리포좀에 첨가된다. 에탄올은 회전 증발 시스템에 의해 리포좀/siRNA 혼합물로부터 증발된다. 그 결과 얻은 나노입자는 5% 텍스트로스로 복합화된 siRNA 입자에 동일한 양의 10% 텍스트로스를 첨가하여 현탁시킨다. Hepa16 세포 (0.5×10^5 세포/웰)은 10% FBS를 넣은 24-웰 조직 배양 플레이트 내에 접종된다. 각 웰은 전체 부피 250 μ L의 DMEM를 넣어 FBS 존재 시 또는 부재 시 0.5 μ g의 복합화된 siRNA와 6시간 동안 배양된다. 배양 기간에 세포가 그들의 배지에 FBS가 결핍된 때는, 20% FBS가 보충된 250 μ L의 DMEM가 형질전환된 세포에 첨가되고 더 나아가 추가 40 시간 동안 배양된다. 세포의 형질전환 배지에 FBS를 가진 때는, 10% FBS가 보충된 250 μ L의 DMEM가 형질전환된 세포에 첨가되고 더 나아가 추가 40 시간 동안 배양된다. 배양 기간의 마지막 시점에는, β -액틴 전사체의 녹-다운이 세포 용출물에서 측정된다. 전사체 분석을 위해, 세포는 트리-반응액을 사용하여 용해된 다음 qRT- 검출 키트를 사용하여 β -액틴 전사체의 수준이 정량된다. β -액틴 전사체는 비-침묵화된 대조군과 비교하여 90%까지 저해되는 한편, LBA 리간드가 결여된 동일한 입자를 포함하는 시료는 대조군과 비교하여 단지 57% 저해를 보여주었다 (도 7).
- [0564] 실시예 45
- [0565] 디올레오일 모노아민으로 복합화된 siRNA의 교차연결된 젤로부터 조절된 방출
- [0566] 디올레오일 모노아민과 복합화된 siRNA는 실시예 39에 기술된 바와 같이 50 μ L의 부피에 50 μ g Cav-1 siRNA 및 1.4 μ g 디올레오일 모노아민을 포함하도록 제형화된다. 소듐 알기네이트 (유형 A)는 물에 용해시키고 2% 용액을 얻는다. 알기네이트 용액 (100 μ L) 96-웰 플레이트의 단일 웰에 첨가되고 이후에 50 μ L의 디올레오일 모노아민 /Cav-1 siRNA 용액이 첨가된다. 완전히 혼합한 이후에, 50 μ L의 0.68 M CaCl_2 용액이 젤을 교차연결시키도록 이전의 혼합물에 첨가된다. 그 다음 100 μ L의 물 또는 0.1M EDTA (Ca^{2+} 이온을 복합화하여 젤을 파괴시킴)가 수성 용액에 젤이 완전히 잠기도록 첨가된다. 미리 정해진 시점에, 상청액이 제거되고 (200 μ L) 신선한 200 μ L 물 또는 0.1 M EDTA로 대체된다. 84시간 이후에, 수집된 모든 시료가 qRT-를 사용하여 Cav-1 siRNA에 대해 분석된다. 각 시점에 수집된 siRNA 양은 시간 내내 방출된 양을 측정하기 위해 합산된다. EDTA를 첨가한 시료에서, 로딩된 디올레오일 모노아민 제형화된 siRNA의 100%가 84시간 이후에 방출된다. EDTA를 포함하지 않는 시료에서는, 84시간 동안 방출된 로딩된 전체 siRNA의 < 20%로 유의하게 더 늦은 방출 동역학이 관찰되었다 (도 8).
- [0567] 실시예 46

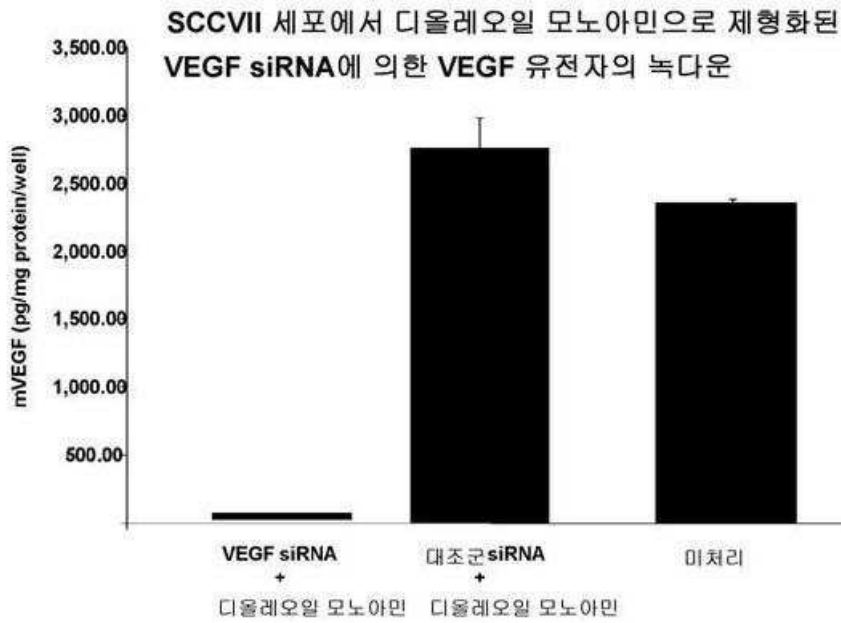
- [0568] 다른 시판되는 양이온성 지질 및 양이온성 중합체 시스템으로 복합화된 siRNA와 비교하여 디올레오일 모노아민 및 mPEG-디올레오일 모노아민으로 복합화된 siRNA의 투여에 따른 폐와 간에서의 카베올린-1 전사체 녹다운
- [0569] 암컷 ICR 마우스 (17-22 그램)에게 카베올린-1 (Cav-1) 전사체를 표적하는 미리 제형화된 200 μ L의 siRNA가 정맥내 (IV) 주사된다. siRNA 복합체는 40 ug siRNA (20:1 N:P 비율)을 가진 디올레오일 모노아민 및 mPEG-디올레오일 모노아민의 10:1혼합물을 포함한다 (실시에 39를 참조하라). 또한, siRNA는 20:1 N:P 비율로 DOTAP:DOPE (1:1)와, 또는 25 kDa 분지된 (10:1)와 함께 제형화된다. DOTAP:DOPE 와 제형화된 전체 40 μ g의 siRNA (200 μ L로)가 마우스에 정맥 주사되거나 분지된 PEI 와 제형화된 전체 20 μ g의 siRNA (100 μ L로)가 정맥 주사된다. 분지된 는 본 제형과 연관된 기지의 독성을 완화시키기 위하여 더 낮은 양으로 사용된다. 주입 48시간 이후에 동물은 안락사되고 폐와 간은 qRTPCR 를 사용한 표적 Cav-1 전사체 분석 및 siRNA 정량을 위해 수확된다. Cav-1 전사체 수준 (내부 대조군으로서 β -액틴으로 정상화됨)은 처리되지 않은 대조군 동물에 대비한 발현 퍼센트로서 표현된다. 각 그룹의 경우, 동물의 수 (“n”)는 5 이다. 결과는 폐 조직에서 Cav-1 발현의 유의한 (~60%) 전사체 녹다운을 또한 간에서 ~33% 전사체 녹다운을 나타낸다 (도 9). 유의한 전사체 녹다운이 DOTAP:DOPE 와 제형화된 siRNA의 경우에는 전혀 관찰되지 않았다. 분지된 PEI 제형화된 siRNA의 경우 동물이 제형과 연관된 독성으로 인해 조직 수확 이전에 죽었으며, 따라서 분석될 수 없었고; 디올레오일 모노아민/mPEG-디올레오일 모노아민 제형화된 siRNA 및 DOTAP:DOPE 와 제형화된 siRNA는 거의 독성이 없이 투여되었다.
- [0570] 실시예 47
- [0571] 디올레오일 크로스아민/PSMA 표적하는 앵타머와 캡슐화된siRNA의 형질전환 활성
- [0572] 디올레오일 크로스아민/PSMA 표적하는 앵타머와 캡슐화된dsRNA의 형질전환 활성은 *시험관내* 에서 다음과 같이 측정된다. 사용된 siRNA는 Cav-1 전사체 수준의 녹-다운을 생산하도록 의도된 뉴클레오타이드의 이중가닥 서열이다. 사용된 양이온성 지질은 디올레오일 크로스아민 (실시에 1)이다. RNA 앵타머는 전립선 특이 막 항원을 표적하고 ssRNA 우리딘 꼬리를 3' 말단 상에 포함한다 (PSMA 앵타머 서열: 5' GGGAGGACGAUGCGGAUCAGCCAUGUUUACGUCACUCCUAAUUUUUUUUUUUUUUUUUU 3'). 비-결합 돌연변이 앵타머가 음성 대조군으로서 포함된다 (돌연변이 PSMA aptamer sequence: 5' GGGAGGACGAUGCGGAUCAGCCAUCUUACGUCACUCCUAAUUUUUUUUUUUUUUUUUU 3'). 캡슐화된 리포솜은 실시예 45에 기술된 바와 같이 제조된다. 표적된 리포솜은 RNA 앵타머를 캡슐화된 리포솜에 첨가하고 혼합물을 상온에서 30분 동안 배양하여 제조된다. LNCaP 세포 (2.5 x 10⁵ 세포/웰)는 10% FBS를 넣은 24-웰 조직 배양 플레이트 내에 접종된다. 각 웰은 전체 부피500 uL의 RPMI 1640을 넣어 FBS 부재 시 0.1 μ g의 표적화된 리포솜 또는 비-표적화된 대조군 리포솜 (비-결합 돌연변이 앵타머와 복합화됨)과 5시간 동안 배양된다. 배양 기간이 다 될 때, 배지는 10% FBS가 보충된 500 uL의 RPMI 1640으로 교환되고 추가로 40 시간 동안 배양된다. 배양 기간의 마지막 시점에는, Cav-1 전사체의 녹-다운이 세포 용출물에서 측정된다. 전사체 분석을 위해, 세포는 용해되고 전체 RNA가 퀴아젠 키트 (Qiagen' s RNEasy kit; Qiagen 제품번호: 74106)를 사용하여 정제된다. Cav-1 및 GAPDH (내부 대조군)의 전사체 수준이 qRT- 검출 키트를 사용하여 정량되었다. Cav-1 전사체 수준은 PMSA 표적하는 리포솜으로 처리된 세포가 비-침묵시킨 대조군과 비교하여 70%까지 고갈되어 있다. 이것은 비-표적하는 돌연변이 PMSA 앵타머로 처리된 세포와 대조적이고, 이는 비-침묵시킨 대조군에 비해서는 Cav-1전사체의 고갈을 전혀 나타내지 않는다. 전립선 특이 막 항원이 결여된 세포 (중국 햄스터 난소세포)의 처리는 앵타머 표적이 없는 비-침묵시킨 대조군과 비교하여 유사한 수준 (~35%)의 Cav-1 고갈을 나타낸다 (도 10).
- [0573] 본 발명 및 이를 제조하고 사용하는 방식 및 방법은 현재 이것이 속하는 기술분야의 당업자라면 동일한 것을 제조하고 사용할 수 있도록 완전하고 분명하며 간단하고 정확한 용어로 기술되어 있다. 상기 내용은 본 발명의 바람직한 구현예를 기술하고 있고 또한 본 명세서에서 변형은 청구항에 설명하는 본 발명의 정신 또는 범위를 벗어나지 않고 만들어질 수 있는 것으로 이해되어야 한다. 상세하게는 본 발명에 관한 주제 문제를 지적하고 명확하게 청구하기 위하여, 다음의 청구항이 본 명세서를 결정한다.

부호의 설명

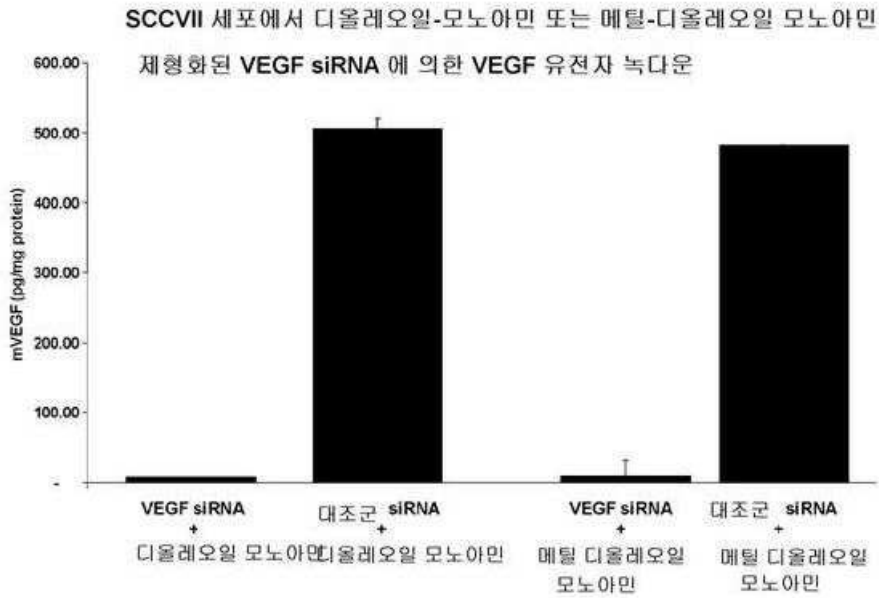
- [0574] 없음

도면

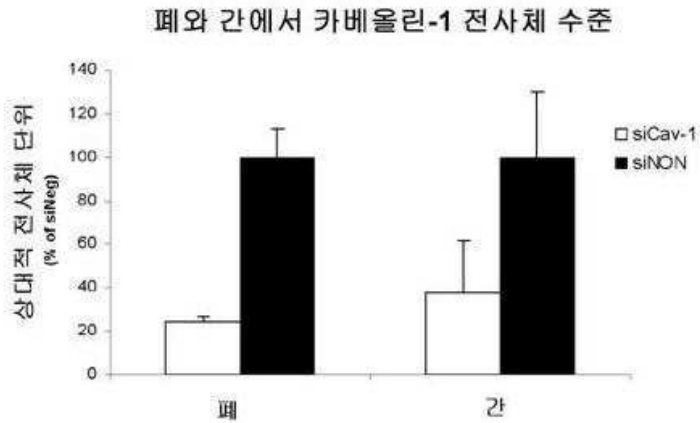
도면1



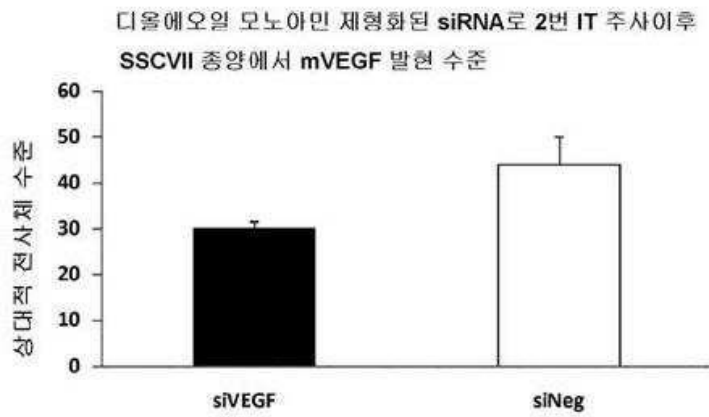
도면2



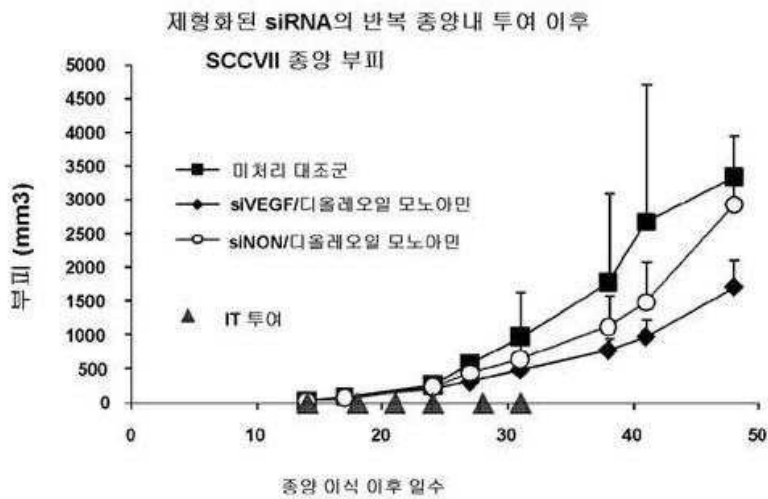
도면3



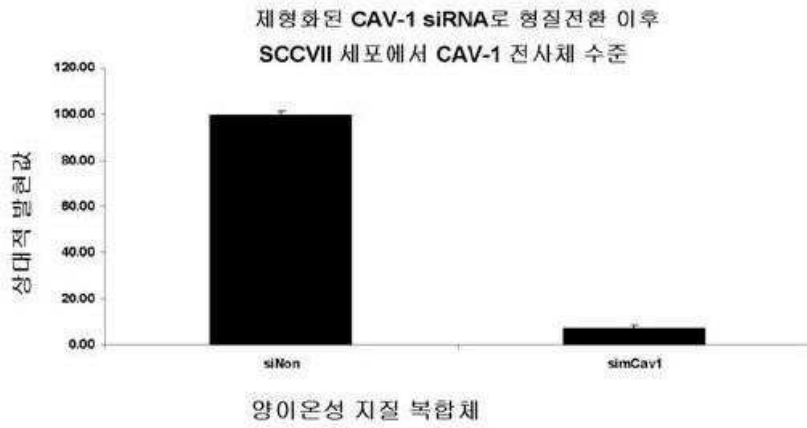
도면4a



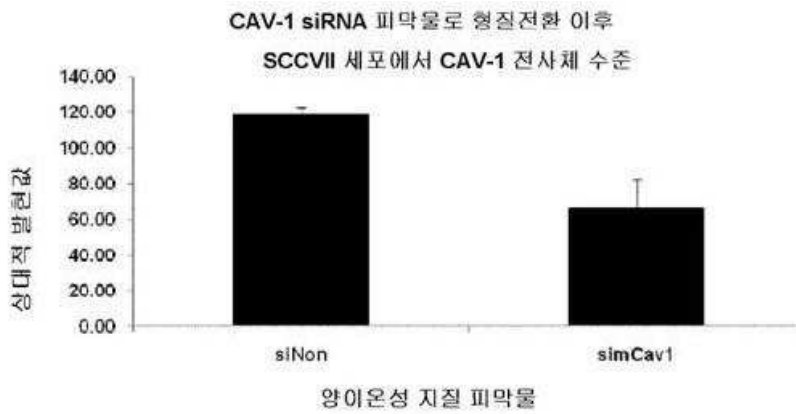
도면4b



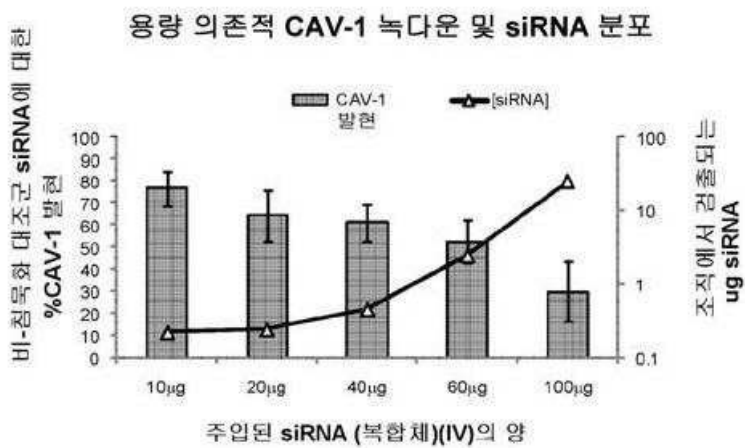
도면5a



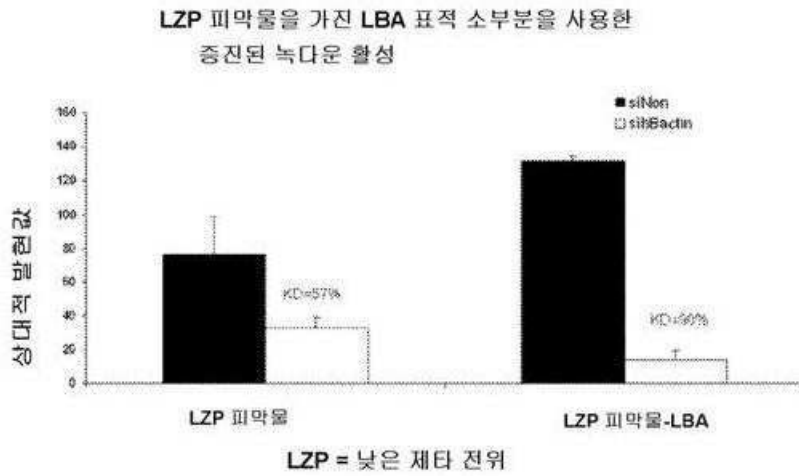
도면5b



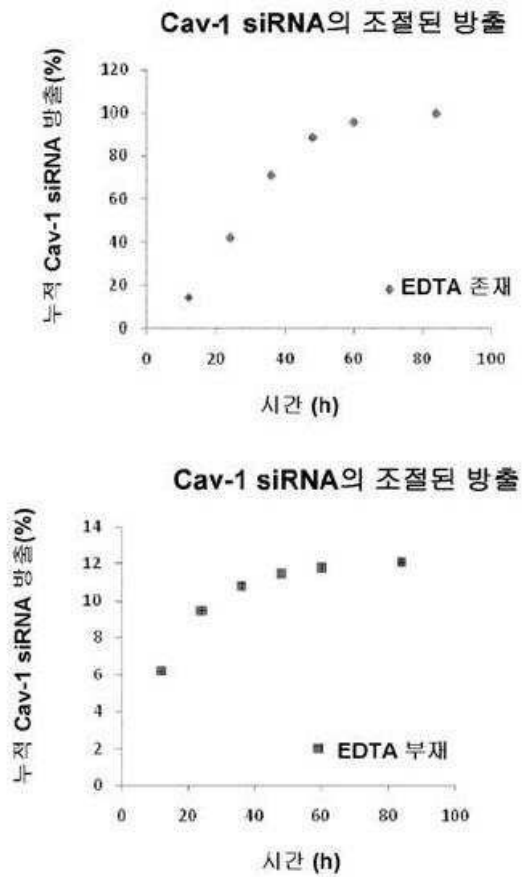
도면6



도면7

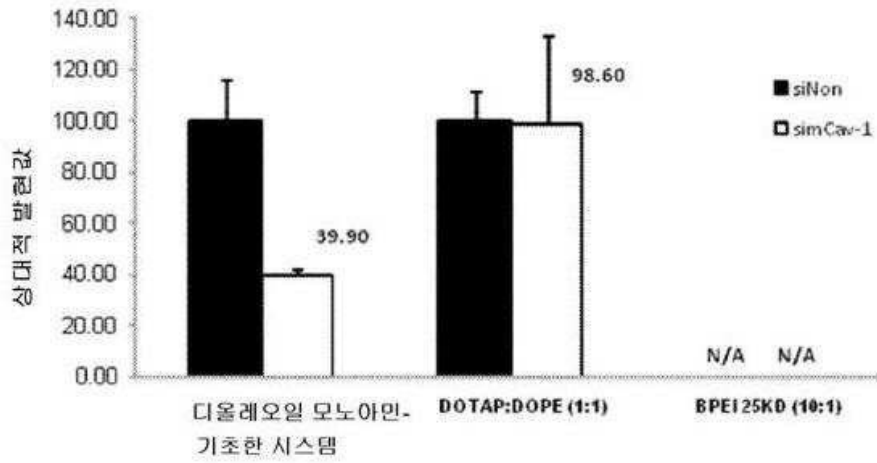


도면8

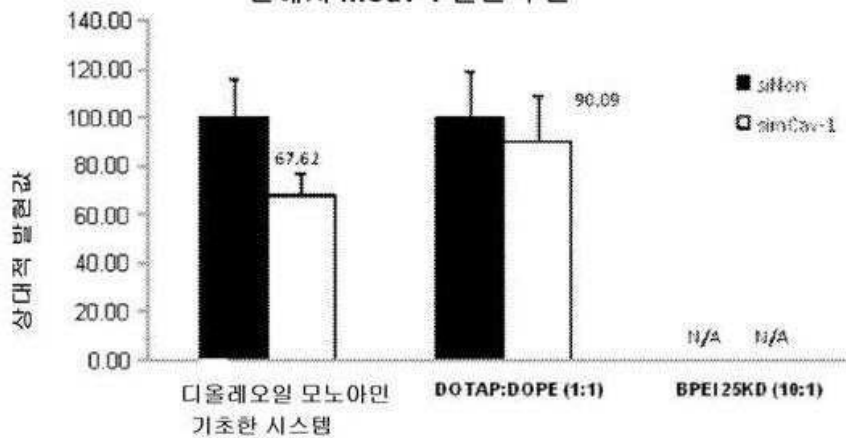


도면9

다양한 siRNA 제형물의 IV 주입이후
폐에서 mCav-1 발현 수준



다양한 siRNA 제형물의 IV 주입 이후
간에서 mCav-1 발현 수준



도면10

