	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2008-0082956 (43) 공개일자 2008년09월12일
<p>(51) Int. Cl. <i>A61K 47/16</i> (2006.01) <i>A61K 9/127</i> (2006.01) <i>A61P 1/04</i> (2006.01) <i>A61P 19/02</i> (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2008-7008987 (22) 출원일자 2008년04월15일 심사청구일자 없음 번역문제출일자 2008년04월15일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/EP2006/009013 국제출원일자 2006년09월15일 (87) 국제공개번호 WO 2007/031333 국제공개일자 2007년03월22일</p> <p>(30) 우선권주장 05020216.7 2005년09월15일 유럽특허청(EPO)(EP) (뒷면에 계속)</p>		<p>(71) 출원인 노보숨 아게 독일, 06120 할레, 웨인베르그weg 22</p> <p>(72) 발명자 판즈너, 스테펜 독일, 06114 할레, 헤르웨그스트라쎄 7 케르위츠, 이본네 독일, 99734 노르드하우젠, 스톨베르거 스트라쎄 71 (뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인 한양특허법인</p>

전체 청구항 수 : 총 55 항

(54) 양쪽성 리포솜의 개선 또는 양쪽성 리포솜에 관련된 개선

(57) 요약

리포솜을 형성하기 위한 활성 제제를 캡슐화할 수 있는 혈청-안정 지질 혼합물로서, 상기 혼합물은 포스파티딜콜린 및 포스파티딜에탄올아민을 약 0.5 내지 약 8 범위의 비율로 포함한다. 또한 상기 혼합물이, pH 7.4에서 음성으로 대전되거나 중성이고 pH 4에서는 양성으로 대전되는, 양쪽성인 정도로, 상기 혼합물은 pH 민감성 음이온성 및 양이온성 양친매성물질을 포함할 수 있다. 이러한 혼합물을 포함하는 양쪽성 리포솜은 올리고뉴클레오타이드 및 DNA 플라스미드와 같은 핵산 치료를 캡슐화하기 위하여 사용될 수 있다. 상기 약물/지질 비율은 상기 리포솜을 신체의 특정 기관 또는 기타 부위로 타겟팅하도록 조절될 수 있다.

(72) 발명자

라우츠하우스, 우나

독일, 06114 할레, 슈레이어마체르스트라쎄 12

루츠, 실케

독일, 06114 할레, 슈레이어마체르스트라쎄 33

엔데르트, 제롤드

독일, 06114 할레, 시베너 스트라쎄 20

(30) 우선권주장

05020217.5 2005년09월15일

유럽특허청(EPO)(EP)

05020218.3 2005년09월15일

유럽특허청(EPO)(EP)

05090322.8 2005년11월21일

유럽특허청(EPO)(EP)

06113784.0 2006년05월10일

유럽특허청(EPO)(EP)

11/266,999 2005년11월04일 미국(US)

11/267,423 2005년11월04일 미국(US)

60/717,199 2005년09월15일 미국(US)

60/717,291 2005년09월15일 미국(US)

60/717,293 2005년09월15일 미국(US)

PCT/EP2005/011905 2005년11월04일 세계지적재
산권기구(WIPO)(WO)

PCT/EP2005/011908 2005년11월04일 세계지적재
산권기구(WIPO)(WO)

특허청구의 범위

청구항 1

활성 제제(active agent)를 캡슐화하여 리포솜을 형성할 수 있는 지질 혼합물로서, 상기 혼합물은 포스파티딜콜린에 대한 포스파티딜에탄올아민의 비율이 약 0.5 내지 약 8의 범위로 포스파티딜콜린 및 포스파티딜에탄올아민을 포함하는 지질 혼합물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 비율이 약 0.75 내지 약 5의 범위인 것인 지질 혼합물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 비율이 약 1 내지 약 4의 범위인 것인 지질 혼합물.

청구항 4

청구항 1 내지 청구항 3 중 어느 한 항에 있어서, 상기 포스파티딜콜린이 DMPC, DPPC, DSPC, POPC, DOPC, 대두 PC 또는 계란 PC에서 선택되는 것인 지질 혼합물.

청구항 5

청구항 1 내지 청구항 4 중 어느 한 항에 있어서, 상기 포스파티딜에탄올아민이 DOPE 또는 DMPE 또는 DPPE에서 선택되는 것인 지질 혼합물.

청구항 6

청구항 1 내지 청구항 5 중 어느 한 항에 있어서, 상기 혼합물이 중성인 지질 혼합물.

청구항 7

청구항 1 내지 청구항 6 중 어느 한 항 기재의 지질 혼합물을 포함하는 중성 리포솜.

청구항 8

청구항 1 내지 청구항 6 중 어느 한 항에 있어서, 추가로 하나 이상의 대전된 양친매성 물질(amphiphile)을 포함하는 지질 혼합물.

청구항 9

청구항 8에 있어서, 상기 하나 이상의 대전된 양친매성 물질이 양쪽성이며, pH 7.4에서 중성 또는 음으로 대전되고, pH 4에서 양으로 대전된 것인 지질 혼합물.

청구항 10

청구항 9에 있어서, 상기 혼합물은 서로 조합하여 양쪽성 특성을 가지는, 복수의 대전된 양친매성 물질을 포함하는 지질 혼합물.

청구항 11

청구항 10에 있어서, 상기 하나 이상의 대전된 양친매성 물질이 적어도 하나의 pH 민감성 음이온성 지질 및 적어도 하나의 pH 민감성 양이온성 지질을 포함하는 것인 지질 혼합물.

청구항 12

청구항 11에 있어서, 상기 음이온성 지질이 DOGSucc, POGSucc, DMGSucc, DPGSucc 및 CHEMS에서 선택된 것인 지질 혼합물.

청구항 13

청구항 11 또는 청구항 12에 있어서, 상기 양이온성 지질이 MoChol, HisChol 및 CHIM에서 선택된 것인 지질 혼

합물.

청구항 14

청구항 11 내지 청구항 13 중 어느 한 항에 있어서, 상기 양이온성 및 음이온성 지질 간의 비율(대전된 비율)이 4:1 내지 1:4의 범위에 있는 것인 지질 혼합물.

청구항 15

청구항 11 내지 청구항 14 중 어느 한 항에 있어서, 상기 양이온성 지질 대 음이온성 지질의 비율이 3:1 내지 2:1의 범위에 있고, 상기 혼합물이 5 내지 95 mol.%의 대전된 지질과, 95 내지 5mol.%의 포스파티딜콜린 및 포스파티딜에탄올아민을 포함하는 것인 지질 혼합물.

청구항 16

청구항 11 내지 청구항 14 중 어느 한 항에 있어서, 상기 양이온성 지질 대 음이온성 지질의 비율이 약 1:1이고, 상기 혼합물이 5 내지 75 mol.%의 대전된 지질과, 95 내지 25mol.%의 포스파티딜콜린 및 포스파티딜에탄올아민을 포함하는 것인 지질 혼합물.

청구항 17

청구항 11 내지 청구항 14 중 어느 한 항에 있어서, 상기 양이온성 지질 대 음이온성 지질의 비율이 1:3 내지 1:2의 범위에 있고, 상기 혼합물이 40 내지 75 mol.%의 대전된 지질과, 60 내지 25mol.%의 포스파티딜콜린 및 포스파티딜에탄올아민을 포함하는 것인 지질 혼합물.

청구항 18

청구항 10 내지 청구항 14 중 어느 한 항에 있어서, 상기 혼합물이

POPC 및 DOPE를 1:1 내지 1:4의 범위의 비율로 70 내지 20mol.%; 및

대전된 지질의 양쪽성 쌍을 30 및 80 mol.% 포함하고,

상기 쌍은 MoChol 및 CHEMS, MoChol 및 DMGSucc, MoChol 및 DOGSucc, CHIM 및 CHEMS 또는 CHIM 및 DMGSucc에서 선택되며, 양이온성 지질 대 음이온성 지질의 비율이 3:1 내지 1:1의 범위에 있는 것인 지질 혼합물.

청구항 19

청구항 18에 있어서, 상기 혼합물이

POPC/DOPE/MoChol/CHEMS	6:24:47:23 (mol.%)
POPC/DOPE/MoChol/CHEMS	15:45:20:20 (mol.%)
POPC/DOPE/MoChol/CHEMS	10:30:30:30 (mol.%)
POPC/DOPE/MoChol/DMGSucc	6:24:47:23 (mol.%)
POPC/DOPE/MoChol/DMGSucc	16:24:30:30 (mol.%)

에서 선택된 제형(formulation)으로 구성되는 지질 혼합물.

청구항 20

청구항 11 내지 청구항 14, 또는 청구항 17 중 어느 한 항에 있어서, 상기 혼합물이 :

POPC 및 DOPE를 1:1 내지 1:4의 범위의 비율로 70 내지 20mol.%; 및

MoChol 및 DMGSucc 또는 DOGSucc를 30 및 80 mol.% 포함하고,

여기서 DMGSucc 또는 DOGSucc의 몰양(molar amount)이 MoChol의 몰양을 초과하는 것인 지질 혼합물.

청구항 21

청구항 20에 있어서, 상기 양이온성 지질 대 음이온성 지질의 비율이 1:3 내지 1:2의 범위에 있고, 상기 혼합물

이 30 내지 50 mol.%의 POPC 및 DOPE와, 70 내지 50 mol.%의 대전된 지질을 포함하는 것인 지질 혼합물.

청구항 22

청구항 21에 있어서, 상기 혼합물이

POPC/DOPE/MoChol/DMGSucc	6:24:23:47 (mol.%)
POPC/DOPE/MoChol/DMGSucc	10:30:20:40 (mol.%)

에서 선택된 제형으로 구성되는 지질 혼합물.

청구항 23

청구항 9 내지 청구항 22 중 어느 한 항에 기재된 지질 혼합물을 포함하는 양쪽성(amphoteric) 리포솜.

청구항 24

청구항 23에 있어서, 상기 리포솜이 50 내지 500nm 범위의 크기를 갖는 양쪽성 리포솜.

청구항 25

청구항 23 또는 청구항 24에 있어서, 상기 리포솜이 적어도 하나의 활성 제제를 캡슐화하는 양쪽성 리포솜.

청구항 26

청구항 25에 있어서, 상기 활성 제제는 척추동물 세포에서 하나 이상의 RNA로 전사될 수 있는 핵산을 포함하고, 상기 RNA는 mRNA, shRNA, miRNA 또는 리보자임(ribozyme)이며, 상기 mRNA는 하나 이상의 단백질 또는 폴리펩티드를 코딩하는 것인 양쪽성 리포솜.

청구항 27

청구항 26에 있어서, 상기 핵산은 원형 DNA 플라스미드, 선형 DNA 구조물 또는 mRNA인 것인 양쪽성 리포솜.

청구항 28

청구항 25에 있어서, 상기 활성 제제는 올리고뉴클레오티드인 것인 양쪽성 리포솜.

청구항 29

청구항 28에 있어서, 상기 올리고뉴클레오티드는 교란(decay) 올리고뉴클레오티드, 안티센스 올리고뉴클레오티드, siRNA, 전사에 영향을 주는 인자(agent influencing transcription), 스플라이싱에 영향을 주는 인자(agent influencing splicing), 리보자임(Ribozyme), DNA 효소(DNAzyme) 또는 압타머(Aptamer)인 것인 양쪽성 리포솜.

청구항 30

청구항 28 또는 청구항 29에 있어서, 상기 올리고뉴클레오티드는 DNA, RNA, 잠금 핵산(locked nucleic acid)(LNA), 펩티드 핵산(PNA), 2'0-메틸 RNA (2'Ome), 2' 0-메톡시에틸 RNA (2'MOE)와 같은 포스페이트 또는 포스포티오에이트 형태로 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 양쪽성 리포솜.

청구항 31

청구항 28 내지 청구항 30 중 어느 한 항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오티드는 15 내지 30 염기쌍 길이의 안티센스 올리고뉴클레오티드인 것인 양쪽성 리포솜.

청구항 32

청구항 28 내지 청구항 30 중 어느 한 항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오티드는 15 내지 30 염기쌍 길이의 siRNA인 것인 양쪽성 리포솜.

청구항 33

청구항 28 내지 청구항 30 중 어느 한 항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타드는 15 내지 30 염기쌍 길이의 교란 올리고뉴클레오타드인 것인 양쪽성 리포솜.

청구항 34

청구항 28 내지 청구항 30 중 어느 한 항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타드는 15 내지 30 염기쌍 길이의 전사에 영향을 주는 인자인 것인 양쪽성 리포솜.

청구항 35

청구항 28 내지 청구항 30 중 어느 한 항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타드는 25 내지 50 염기쌍 길이의 DNA 효소인 것인 양쪽성 리포솜.

청구항 36

청구항 28 내지 청구항 30 중 어느 한 항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타드는 25 내지 50 염기쌍 길이의 리보자임인 것인 양쪽성 리포솜.

청구항 37

청구항 28 내지 청구항 30 중 어느 한 항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타드는 15 내지 60 염기쌍 길이의 압타머인 것인 양쪽성 리포솜.

청구항 38

청구항 28 내지 청구항 37 중 어느 한 항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타드는 CD40 유전자를 인코딩하는 핵산, 그 센스 또는 안티센스 가닥, 그들의 엑손 또는 인트론 또는 비번역 영역을 타겟하고 그에 따라 포유동물 세포에서 CD40의 발현을 조절하도록 된 것인 양쪽성 리포솜.

청구항 39

청구항 38에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타드가 CD40의 모든 mRNA에 대해 지시되고, 여기서 상기 mRNA는 pre-mRNA 및 이들의 후속적으로 성숙된 형태를 포함하는 것인 양쪽성 리포솜.

청구항 40

청구항 38 또는 청구항 39에 있어서, 상기 지질 혼합물이

POPC/DOPE/MoChol/CHEMS	6:24:47:23 (mol.%)
POPC/DOPE/MoChol/CHEMS	15:45:20:20 (mol.%)
POPC/DOPE/MoChol/CHEMS	10:30:30:30 (mol.%)
POPC/DOPE/MoChol/DMGSucc	6:24:47:23 (mol.%)
POPC/DOPE/MoChol/DMGSucc	16:24:30:30 (mol.%)
POPC/DOPE/MoChol/DMGSucc	6:24:23:47 (mol.%)
POPC/DOPE/MoChol/DMGSucc	10:30:20:40 (mol.%)

에서 선택된 제형으로 구성되는 것인 양쪽성 리포솜.

청구항 41

청구항 28 내지 청구항 40 중 어느 한 항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타드의 적어도 80 wt.%가 상기 리포솜 내부에 위치되는 것인 양쪽성 리포솜.

청구항 42

청구항 28 내지 청구항 41 중 어느 한 항에 있어서, 상기 리포솜은 비-캡슐화된(non-encapsulated) 올리고뉴클레오타드를 포함하는 양쪽성 리포솜.

청구항 43

청구항 25 내지 청구항 42 중 어느 한 항에 기재된, 활성 제제가 로딩된(active agent-loaded) 양쪽성 리포솜 및 그들의 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물.

청구항 44

청구항 43에 있어서, 상기 리포솜은 약 150nm보다 큰 크기를 갖는 것인 약학적 조성물.

청구항 45

청구항 43에 있어서, 상기 리포솜은 약 150nm보다 작은 크기를 갖는 것인 약학적 조성물.

청구항 46

청구항 43 내지 청구항 45 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물이 상기 활성 제제-로딩된 양쪽성 리포솜과 유사한 조성 및 크기를 가지는 빈 리포솜(empty liposome)을 추가로 포함하는 약학적 조성물.

청구항 47

인간 및 인간의 동물의 염증성, 면역 또는 자가면역 질환의 예방 또는 치료를 위한, 청구항 38 또는, 청구항 38을 인용하는 청구항 39 내지 청구항 42 중 어느 한 항에 기재된 양쪽성 리포솜의 용도.

청구항 48

이식편거부(graft rejection), 이식편 대 숙주병(graft-versus-host disease), 당뇨병 타입 I, 다발경화증(multiple sclerosis), 전신홍반루푸스(systemic lupus erythematosus), 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis), 천식(asthma), 염증성장자병(inflammatory bowel disease), 건선(psoriasis) 또는 갑상선염(thyroiditis)의 예방 또는 치료를 위한, 청구항 38 또는, 청구항 38을 인용하는 청구항 39 내지 청구항 42 중 어느 한 항에 기재된 양쪽성 리포솜의 용도로서, 여기서 상기 양쪽성 리포솜이 전신 투여용으로 제형화되는 것인 양쪽성 리포솜의 용도.

청구항 49

이식편거부, 이식편 대 숙주병, 염증성장자병, 천식, 크론병(Crohn's disease) 또는 궤양대장염의 예방 또는 치료를 위한, 청구항 38 또는, 청구항 38을 인용하는 청구항 39 내지 청구항 42 중 어느 한 항에 기재된 양쪽성 리포솜의 용도로서, 여기서 상기 양쪽성 리포솜이 국소 투여용으로 제형화되는 것인 양쪽성 리포솜의 용도.

청구항 50

청구항 43 내지 청구항 46 중 어느 한 항에 기재된 약학적 조성물을 낮은 지질 투여량으로 전신적으로 투여하여 인간 또는 인간의 동물을 치료하는 방법으로서, 여기서 상기 리포솜은 150nm보다 큰 크기를 가지고, 이로써 간에 대해 상기 활성 제제를 타겟팅하는 것인 인간 또는 인간의 동물을 치료하는 방법.

청구항 51

청구항 43 내지 청구항 46 중 어느 한 항에 기재된 약학적 조성물을 높은 지질 투여량으로 전신적으로 투여하여 인간 또는 인간의 동물을 치료하는 방법으로서, 여기서 상기 리포솜은 150nm보다 큰 크기를 가지고, 이로써 비장, 감염 및 염증 부위, 또는 고형 종양에 대해 상기 활성 제제를 타겟팅하는 것인 인간 또는 인간의 동물을 치료하는 방법.

청구항 52

청구항 43 내지 청구항 46 중 어느 한 항에 기재된 약학적 조성물을 낮은 지질 투여량으로 전신적으로 투여하여 인간 또는 인간의 동물을 치료하는 방법으로서, 여기서 상기 리포솜은 150nm보다 작은 크기를 가지고, 이로써 간에 대해 상기 활성 제제를 타겟팅하는 것인 인간 또는 인간의 동물을 치료하는 방법.

청구항 53

청구항 43 내지 청구항 46 중 어느 한 항에 기재된 약학적 조성물을 높은 지질 투여량으로 전신적으로 투여하여

인간 또는 인간의 동물을 치료하는 방법으로서, 여기서 상기 리포솜은 150nm보다 작은 크기를 가지고, 이로써 비장을 제외하고, 감염 및 염증 부위, 또는 고형 종양에 대해 상기 활성 제제를 타겟팅하는 것인 인간 또는 인간의 동물을 치료하는 방법.

청구항 54

청구항 51 또는 청구항 53에 있어서, 원하는 지질 농도로 약/지질 비율을 낮추는 것을 추가로 포함하는 인간 또는 인간의 동물을 치료하는 방법.

청구항 55

청구항 51 또는 청구항 53에 있어서, 상기 활성 제제-로딩된 리포솜과 유사한 크기 및 조성을 가지는 빈 리포솜을 상기 조성물에 함유하는 것을 추가로 포함하는 인간 또는 인간의 동물을 치료하는 방법.

명세서

기술 분야

- <1> 본 발명은 양쪽성 리포솜(amphoteric liposomes)에 관한 것이며 인간 또는 동물 혈청에서 개선된 안정성을 갖는 그러한 리포솜과 특히 관계된다. 또한 본 발명은 예를 들어 리포솜을 형성하는 약물 및 이러한 리포솜을 포함하는 약제학적 조성물과 같은 활성 제제(active agents) 또는 성분(ingredients)을 캡슐화할 수 있는 지질 혼합물을 포함한다.

배경 기술

- <2> 올리고뉴클레오티드(oligonucleotides)는, 매우 특이적으로 단백질 발현을 하향조절(down-regulate)하거나 방해할 수 있는 신규한 약물 집단을 나타낸다. 이러한 올리고뉴클레오티드는 안티센스(antisense), 잠금 핵산(locked nucleic acids)(LNA), 펩티드 핵산(PNA), 모폴리노 핵산(morpholino nucleic acids)(모폴리노스), 소간섭 RNA(small interfering RNAs)(siRNA) 및 다양한 화학적 성질의 전사 인자 교란(decay)을 포함한다. 이러한 올리고뉴클레오티드 치료 작용의 상이한 메커니즘에 대한 상세한 기술은 문헌에서 찾을 수 있다(예컨대, Crooke, BBA(1999), 1489(1), 31-44; Tijsterman et al., Cell(2004), 117(1), 1-3; 및 Mann et al., J Clin Invest, (2000), 106(9), 1071-5).
- <3> 마이크로 RNA 및 유전자 치료 적용을 위한 올리고뉴클레오티드의 사용(예컨대, Richardson et al., Stem Cells(2002), 20, 105-118 참고)은 신속하게 성장하는 이 분야에서의 다른 예이다.
- <4> 핵산 치료는, 그의 실제 화학적 근원에 관계없이, 체액에서의 불안정성 때문에 또는 세포로의 비효율적인 흡수 때문에, 또는 양자 모두 때문에, 치료적 효과가 부족하다는 점은 이 기술분야에서 잘 알려져 있다. 상기 언급된 변형을 포함하는 이러한 올리고뉴클레오티드의 화학적 변형 뿐만 아니라, 리간드(ligands) 또는 중합체와의 컨주게이트 형성은, 이러한 실제적인 제한을 극복할 하나의 전략을 의미한다.
- <5> 제2 세트의 전략은 향상된 세포 흡수의 보호, 타겟팅, 및 제공을 위한 담체(carrier) 시스템, 특히 리포솜의 사용을 수반한다. 리포솜은, 수성 코어(core)를 갖고, 소수성 및 친수성 성분을 모두 가지는 양친매성(amphiphilic) 분자로 형성되는(양친매성 분자(amphiphiles)), 인위적 단일, 올리고 또는 다중 판상 소포(vesicles)이다. 카고(cargo)는 리포솜의 코어에 사로잡혀서, 막 층(membrane layer) 또는 막 표면(membrane surface)에 배치될 수 있다. 이러한 담체 시스템은 하기 조건의 최적 스코어에 부합해야 한다: 높은 캡슐화 효율 및 경제적인 제조, 콜로이드 안정성(colloidal stability), 세포로의 향상된 흡수 및 당연히 낮은 독성 및 면역원성.
- <6> 음이온성 또는 중성 리포솜은 종종 콜로이드 안정성 측면에서 뛰어나면서도, 상기 담체와 주변 사이에 응집이 발생하지 않는다. 결과적으로 이들의 생체분포(biodistribution)가 뛰어나고 자극(irritation) 또는 세포독성(cytotoxicity)에 대한 잠재력은 낮다. 그러나, 이러한 담체는 캡슐화 효율이 부족하며 세포에 추가 흡수를 용이하게 하는 엔도솜 붕괴능(endosomolytic) 시그널을 공급하지 않는다(Journal of Pharmacology and experimental Therapeutics (2000), 292, 480-488 by Klimuk, et al.).
- <7> 많은 출판물이 양이온성 리포솜 시스템(liposomal systems)을 다룬다; 예를 들어, "Molecular Membrane Biology (1999), 16, 129-140 by Maurer, et al.; BBA (2000) 1464, 251-261 by Meidan, et al.; Reviews in

Biology and Biotechnology (2001), 1(2), 27-33 by Fiset & Gounni" 참고. 양이온성 시스템은 높은 로딩 (loading) 효율을 제공하지만, 특히 체액과 접촉한 후에, 콜로이드 안정성이 결여된다. 단백질 및/또는 생체고 분자와의 이온성 상호작용은 세포외(extracellular) 매트릭스 또는 세포 표면과 정위치(in situ) 응집 형성을 야기한다. "Filion et al., BBA(1997), 1329(2), 345-356; Dass, J. Pharm. Pharmacol. (2002), 54(5), 593-601; Hirko et al., Curr. Med. Chem., 10(14), 1185-1193"에 의해 나타난 바와 같이 양이온성 지질은 종종 독성인 것으로 발견되었다.

<8> 이러한 한계들은 상기 담체에 입체 안정화를 제공하는 성분을 추가함으로써 극복되었다. 예를 들어, 다양한 사슬 길이의 폴리에틸렌글리콜이 체액 내 양이온성 성분의 사용과 관련된 응집 문제를 제거하는 것으로 알려져 있고, PEG화된(PEGylated) 양이온성 리포솜은 인 비보(in vivo)에서 향상된 순환 시간을 보인다(BBA(2001) 1510, 152-166, Semple et al.). 그러나, PEG의 사용은 양이온성 지질과 관련된 내재적인 독성 문제를 해결하지 않는다. 또한 PEG는, 이러한 리포솜의 세포로의 풍부한 진입 또는 이들의 세포내 이동을 실질적으로 막는 것으로도 알려져 있다(Song et al., BBA(2002), 1558(1), 1-13). 최근에, Morrissey 등(Nature Biotechnology(2005), 23(8), 1002-1007)은 인 비보에서 간 세포로 siRNA를 이송할 수 있는 양이온성 벡터에 대하여 확산 가능한 PEG-지질을 설명하였다. 그러나, 이러한 용액에 대한 많은 수요 및 일정한 임상적 개발의 감소율은 아마도 개념적으로 독립적인 해결책 개발에 동기부여를 할 것이다.

<9> 양쪽성 리포솜은 pH 7.5에서 음이온성 또는 중성 전하를 갖고 pH 4에서 양이온성 전하를 갖는, 최근에 기술된 리포솜 집단을 나타낸다. 모두 Panzner 등에 의해 출원되고 여기에 인용에 의해 일체화된 WO 02/066490, WO 02/066012 및 WO 03/070735는 양쪽성 리포솜 및 그에 대한 적합한 지질을 상세하게 기술한다. 역시 Panzner 등에 의해 출원되고 여기에 인용에 의해 일체화된 WO 03/070220 및 WO 03/070735에 추가로 개시되었는데, 이는 이러한 양쪽성 리포솜을 제조하기 위한 추가의 pH 민감성 지질을 기술한다.

<10> 양쪽성 리포솜은 뛰어난 생체분포를 가지며 동물 내에서 매우 잘 견딘다. 이들은 고효율로 핵산 분자를 캡슐화할 수 있다.

<11> 포유류 내에서 상이한 병태 또는 질병의 예방 또는 치료를 위한 약물에 대한 담체로서 양쪽성 리포솜의 사용은, 이를 혈류에 주사한 후에 상기 리포솜의 안정을 요한다. 특히 전신 적용을 위하여, 타겟 조직 또는 세포에 최종적으로 흡수될 때까지 상기 리포솜 내에 상기 약물이 안정하게 캡슐화되어야 한다. FDA의 지침은 리포솜 제형을 포함하는 약물에 대한 상세한 임상전 시험(preclinical tests)을 규정한다 (<http://www.fda.gov/cder/guidance/2191dft.pdf>). 예를 들어, 캡슐화된 약물과 그렇지 않은 약물의 비율은 혈류 내의 순환 중에 결정되어야 한다.

<12> 리포솜을 혈류 내로 주사한 후에, 혈청 성분은 리포솜과 상호 작용을 하고 리포솜 막(liposomal membrane)의 투과성화(permeabilisation)를 야기할 수 있다. 그러나, 리포솜에 의해 캡슐화된 약물의 방출은 또한 상기 약물의 분자 크기에 의존적이다. 이는 천 개의 염기쌍 크기인 플라스미드 약물은, 예를 들어, 더 작은 올리고뉴클레오타이드 또는 다른 작은 분자보다 훨씬 느리게 방출될 수 있다는 것을 의미한다. 약물의 리포솜 전달을 위하여, 리포솜의 순환 중에 약물의 방출이 가능한 낮은 것이 필수적이다.

발명의 상세한 설명

<13> 발명의 목적

<14> 따라서 본 발명의 목적은 인간 또는 동물 혈청과 접촉할 때 향상된 안정성을 갖는 그러한 리포솜을 형성할 수 있는 지질들의 혼합물 및 리포솜을 제공하는 것이다.

<15> 특히, 본 발명의 목적은 이러한 향상된 혈청 안정성을 갖는 양쪽성 리포솜을 제공하는 것이다.

<16> 본 발명의 다른 목적은, 예컨대 올리고뉴클레오타이드 및 플라스미드와 같은 핵산 약물과 같은 약물을 포함하는, 활성 제제 또는 성분의 타겟팅된 이동을 위한 담체로서 이러한 리포솜을 포함하는 약제학적 조성물을 제공하는 것이다.

<17> 본 발명의 특정 목적은 인간 또는 인간의 동물의 염증, 면역 또는 자가면역(autoimmune) 질환의 치료 또는 예방을 위한 약제학적 조성물을 제공하는 것이다.

<18> 본 발명의 또 다른 목적은 인간 또는 인간의 동물의 치료를 위한 방법을 제공하는 것으로서, 여기서 활성 제제를 포함하는 약제학적 조성물은 특정 기관(organ)이나 기관들, 중앙 또는 감염이나 염증의 부위로 타겟팅된다.

발명의 요약

- <19> 따라서 본 발명의 일 측면에 따르면 활성 제제를 캡슐화하여 리포솜을 형성할 수 있는 지질 혼합물이 제공되며, 상기 혼합물은 포스파티딜콜린(phosphatidylcholine)(PC) 및 포스파티딜에탄올아민(PE)을 포스파티딜콜린에 대한 포스파티딜에탄올아민의 비율로 약 0.5 내지 약 8의 범위로 포함한다.
- <20> 적합하게는, 상기 비율은 약 0.75 내지 약 5, 바람직하게는 약 1 내지 약 4 범위이다.
- <21> 몇몇 구체예에서, 상기 포스파티딜콜린은 DMPC, DPPC, DSPC, POPC 또는 DOPC에서 선택되거나, 또는 예를 들어 대두(soy bean) PC 및 계란 PC와 같은 천연 원료로부터의 포스파티딜콜린에서 선택될 수 있다.
- <22> 상기 포스파티딜에탄올아민은 DOPE, DMPE 및 DPPE에서 선택될 수 있다.
- <23> 바람직한 천연 지질은 DOPE, POPC, 대두 PC 및 계란 PC를 포함한다.
- <24> 콜레스테롤이 혈청 공격으로부터 포스파티딜콜린 이중층을 안정시킨다는 것은 알려져 있다. 그러나, POPC 및 DOPE 모두 스스로 혈청 안정 구조를 형성하지 않는다. 그런데 놀랍게도 DOPE와 POPC의 혼합물은 혈청 안정 리포솜을 형성할 수 있다는 점이 발견되었다.
- <25> 따라서, 본 발명의 특정 측면에서, 상기 지질 혼합물은 중성일 수 있다. 몇몇 구체예에서 상기 혼합물은 상기 언급된 범위의 비율에서 포스파티딜콜린 및 포스파티딜에탄올아민으로 이루어지거나 본질적으로 이루어질 수 있다.
- <26> 본 발명의 다른 측면에서 본 발명에 따른 지질 혼합물을 포함하는 중성 리포솜이 제공된다. 이러한 리포솜은 약 물과 같은 활성 제제를 위한 혈청-안정 부형제 또는 담체로서 사용될 수 있다.
- <27> 그러나, 본 발명의 상이한 측면에서 상기 혼합물은 하나 이상의 대전된(charged) 양친매성물질(amphiphiles)을 포함할 수 있다.
- <28> 바람직하게는 상기 하나 이상의 대전된 양친매성물질은 양쪽성이며, pH 7.4에서는 음성으로 대전되거나 중성이고 pH 4에서는 양성으로 대전된다.
- <29> 여기서 "양쪽성"은, 음이온성 및 양이온성 특성 모두의 대전기(charged groups)를 포함하는, 물질, 물질의 혼합물 또는 초분자 복합체(supra-molecular complex)(예를 들어, 리포솜)을 의미하며, 여기서:
- <30> (i) 적어도 하나의 대전기는 pK가 4와 8 사이이고,
- <31> (ii) 양이온성 전하는 pH 4에서 우세하고,
- <32> (iii) 음이온성 전하는 pH 8에서 우세하며,
- <33> 이는 pH 4와 pH 8 사이에서 중성 순 전하(net charge)의 등전위점을 야기한다. 양쪽성 특성은 이러한 정의 상으로는 쯔비터이온성(zwitterionic) 특성과 상이하며, 이때 쯔비터이온은 상기 언급된 범위의 pK를 갖지 않는다. 결론적으로, 쯔비터이온은 pH 값 범위에서 실질적으로 중성으로 대전되며; 포스파티딜콜린 및 포스파티딜에탄올아민은 쯔비터이온성 특성이 있는 중성 지질이다.
- <34> 따라서 적절하게는, 상기 혼합물은, 양쪽성 특성을 갖는 다른 것과 결합된, 다수의 대전된 양친매성물질을 포함할 수 있다. 바람직하게는 상기 하나 이상의 대전된 양친매성물질은 pH 민감성 음이온성 지질 및 pH 민감성 양이온성 지질을 포함한다. 여기서, 대전성(chargeable) 양이온 및 대전성 음이온의 이러한 조합은 "양쪽성 II" 지질 쌍(pair)으로 지칭된다. 상기 대전성 양이온은 약 4 내지 약 8 사이, 바람직하게는 약 5.0 또는 5.5 내지 약 7.0 또는 7.5 사이의 pK 값을 가질 수 있다. 상기 대전성 음이온은 약 3.5 내지 약 7 사이, 바람직하게는 약 4 또는 4.5 내지 약 6.0 또는 6.5 사이의 pK 값을 가질 수 있다. 예로는 MoChol/CHEMS, DPIM/CHEMS 및 DPIM/DGSucc를 포함한다.
- <35> "양쪽성 I" 지질 쌍은 안정한 양이온(예컨대, DDAB/CHEMS, DOTAP/CHEMS 및 DOTAP/DOPS) 및 대전성 음이온을 포함하는 반면, "양쪽성 III" 지질 쌍은 안정한 음이온 및 대전성 양이온(예컨대, MoChol/DOPG 및 MoChol/Chol-SO₄)을 포함한다.
- <36> 본 발명의 범위 내에서, 예를 들어, 양친매성(amphipathic) 디카르복실산, 포스파티드산(phosphatidic acid), 양친매성 피페라진(piperazine) 유도체 등과 같은, 복수 전하를 갖는 양친매성물질(amphiphiles)을 사용하는 것이 물론 가능하다. 이러한 복수-대전된(multi-charged) 양친매성물질은 pH 민감성 양친매성물질 또는 안정한 음

이온 또는 양이온일 수 있고, 또한 이들은 "혼합된" 특성을 가질 수 있다.

<38> 적절하게는, 상기 음이온성 지질은 DOGSucc, POGSucc, DMGSucc, DPGSucc 및 CHEMS에서 선택될 수 있다.

<39> 상기 양이온성 지질은 MoChol, HisChol 및 CHIM에서 선택될 수 있다.

<40> 본 발명의 또 다른 측면에서 상기 언급된 비율의 포스파티딜콜린과 포스파티딜에탄올아민, pH 민감성 음이온성 지질 및 pH 민감성 양이온성 지질을 포함하는 양쪽성 리포솜이 제공된다.

<41> 상기 양쪽성 리포솜은 pH 7.4에서 음성 또는 중성으로 대전될 수 있고 pH 4에서 양성일 수 있다.

<42> 본 발명의 다른 특정 측면에서, 상기 리포솜은 적어도 하나의 활성 제제를 캡슐화한다. 상기 활성 제제는 약물을 포함할 수 있다. 몇몇 구체예에서, 상기 활성 제제는 척추세포(vertebrate cell)에서 하나 이상의 RNA로 전사될 수 있는 DNA 플라스미드 또는 예를 들어 올리고뉴클레오타이드와 같은 핵산을 포함할 수 있는데, 여기서 상기 RNA는 mRNA, shRNA, miRNA 또는 리보자임(ribozymes)이고, 상기 mRNA는 하나 이상의 단백질 또는 폴리펩티드를 코딩한다.

<43> 상기 올리고뉴클레오타이드 또는 다른 핵산 기반 약물은 상기 양쪽성 리포솜에 캡슐화될 수 있다. 상기 올리고뉴클레오타이드의 상당한 부분 또는 전부는 양쪽성 리포솜에 물리적으로 불잡힐(entrapped) 수 있다. 혈청 안정 양쪽성 리포솜(serum stable amphoteric liposomal) 제형은 세포내 약물 전달을 위해 사용될 수 있거나 또는 포유류 또는 일부의 포유류, 특히 인간 또는 그 기관에서의 병태 및/또는 질병의 치료 또는 예방을 위해 사용될 수 있다.

<44> 몇몇 구체예에서, 상기 올리고뉴클레오타이드는 CD40을 인코딩하는 핵산을 타겟팅하도록 적합화될 수 있으며, 이에 의해 포유류의 세포에서 CD40의 발현을 조절한다. 적절하게는, 상기 올리고뉴클레오타이드는 CD40의 mRNA에 반대로 향해질 수 있다.

<45> 본 발명의 또 다른 측면에서, 본 발명에 따른 활성 제제가 로딩된(active agent-loaded) 양쪽성 리포솜을 포함하는 약제학적 조성물 및 이를 위한 약제학적으로 허용가능한 담체가 제공된다.

<46> 상기 조성물은 높거나 낮은 지질 투여량(doses)에 대하여 제조될 수 있으며, 이에따라 적절하게는 상기 약물/지질 비율은 원하는 지질 농도로 조절될 수 있다. 몇몇 구체예에서, 상기 약물/지질 비율을 감소시키기 위하여 상기 조성물은 빈 리포솜(empty liposomes)을 추가로 포함할 수 있으며, 여기서 상기 빈 리포솜은 상기 활성 제제가 로딩된 리포솜과 동일하거나 유사한 크기 및 조성을 갖는다. 상기 빈 리포솜은 본 발명에 따른 지질 혼합물을 포함할 수 있다.

<47> 또 다른 측면에서, 본 발명은 인간 또는 인간외 동물의 염증, 면역 또는 자기면역(autoimmune) 질환의 치료 또는 예방을 위한 본 발명에 따른 약제학적 조성물의 사용을 포함하며, 여기서 상기 조성물은 포유류 세포에서 CD40의 발현을 조절하기 위하여 CD40을 인코딩하는 핵산을 타겟팅하도록 적합화된 올리고뉴클레오타이드를 포함한다.

<48> 상기 조성물은 전신 투여 또는 국소 투여를 위해 제조될 수 있다. 전신에 사용되는 경우, 본 발명은 특히 이식편거부(graft rejection), 이식편 대 숙주병(graft-versus-host disease), 당뇨병 타입 I, 다발경화증(multiple sclerosis), 전신홍반루푸스(systemic lupus erythematosous), 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis), 천식(asthma), 염증성장자병(inflammatory bowel disease), 건선(psoriasis) 또는 갑상선염(thyroiditis)의 예방 또는 치료를 위한 상기 조성물의 사용을 포함한다.

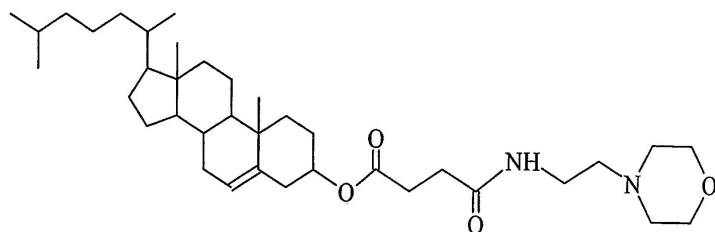
<49> 국소 적용을 위해 제조되는 경우, 본 발명은 특히 이식편거부, 이식편 대 숙주 병, 염증성장자 병, 천식, 크론병(Crohn's disease) 또는 궤양대장염(ulcerative colitis)의 예방 또는 치료를 위한 상기 조성물의 사용을 포함한다.

<50> 발명의 상세한 설명

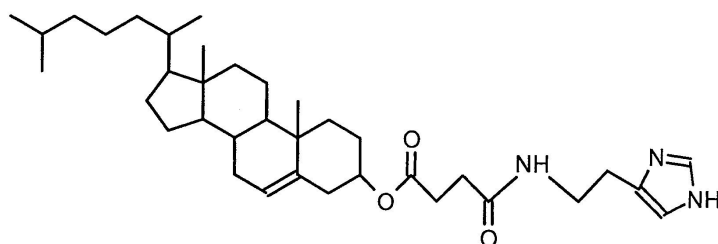
<51> 상기 언급된 바와 같이, 본 발명의 양쪽성 리포솜 음이온성 및 양이온성 성분을 포함할 수 있는데, 여기서 양성분은, WO 02/066012에 개시된 바와 같이, pH-민감성이며, 그 내용은 인용에 의해 본원에 삽입된다.

<52> pH에 민감성인 양이온성 지질은 WO 02/066489 및 WO 03/070220, 및 이들에 기재된 참고문헌, 특히 "Budker et al., 1996, Nat Biotechnol. 14(6):760-4"에 개시되어 있으며, 이들 모두의 내용은 인용에 의해 본원에 삽입된다.

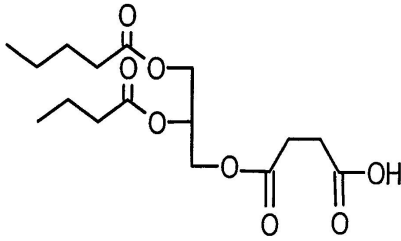
- <53> 바람직한 양이온성 성분은 MoChol, HisChol 및 CHIM이며, 특히 MoChol이다.
- <54> 바람직한 음이온성 지질은 DOGSucc, POGSucc, DMGSucc, DPGSucc 및 CHEMS, 특히 DOGSucc, DMGSucc 및 CHEMS를 포함하는 군에서 선택된다.
- <55> 지질에 대한 하기 약어들이 여기에서 사용되며, 이 약어들의 대다수는 상기 문헌의 표준 용법이다:
- <56> PC Phosphatidylcholine, unspecified membrane anchor
- <57> PE Phosphatidylethanolamine, unspecified membrane anchor
- <58> DMPC Dimyristoylphosphatidylcholine
- <59> DPPC Dipalmitoylphosphatidylcholine
- <60> DSPC Distearoylphosphatidylcholine
- <61> POPC Palmitoyl-oleoylphosphatidylcholine
- <62> DOPC Dioleoylphosphatidylcholine
- <63> DOPE Dioleoylphosphatidylethanolamine
- <64> DMPE Dimyristoylphosphatidylethanolamine
- <65> DPPE Dipalmitoylphosphatidylethanolamine
- <66> CHEMS Cholesterolhemisuccinate
- <67> CHIM Cholesterol-(3-imidazol-1-yl propyl)carbamate
- <68> DDAB Dimethyldioctadecylammonium bromide
- <69> DOTAP (1,2-dioleoyloxypropyl)-N,N,N- trimethylammonium salt
- <70> DOPS Dioleoylphosphatidylserine
- <71> DOPG Dioleoylphosphatidylglycerol
- <72> Chol-SO₄ cholesterol sulfate
- <73> MoChol 4-(2-Aminoethyl)-Morpholino- Cholesterolhemisuccinate:



- <74>
- <75> HisChol Histaminyl-Cholesterolhemisuccinate :



- <76>
- <77> DGSucc 1,2-Dipalmitoylglycerol-3-hemisuccinate (및 Distearoyl-, dimyristoyl- Dioleoyl 또는 palmitoyl-oleoylderivatives) (하기 구조체에서 아실 쇠는 개략적으로 도시됨)



<78>

<79> 음이온성 지질과 양이온성 지질 사이의 비율(전하비)은 등전위점(isoelectric point)을 결정할 뿐만 아니라, 조성물의 혈청 안정성에도 영향을 줄 수 있다는 점이 발견되었다. 따라서, 상기 전하비는 4:1에서 1:4까지 바뀔 수 있고, 바람직하게는 3:1 내지 1:3(양이온:음이온) 사이이다.

<80> 본 발명의 몇몇 구체예에서, 양이온은 음이온을 초과하여 존재할 수 있다. 바람직하게는 상기 전하비는 3:1 및 2:1 사이이다. 대전된 지질의 총량은 지질 혼합물의 5부터 95 몰%까지, 바람직하게는 30부터 80 몰%까지, 더욱 바람직하게는 45 또는 50 몰%부터 75 몰%까지 변할 수 있으며, 이때 잔여 지질은 중성 인지질 PC 및 PE로부터 형성된다.

<81> 대안적으로, 상기 양이온 및 음이온은 실질적으로 동일한 양으로 존재할 수 있다. 대전된 지질의 총량은 지질 혼합물의 5부터 75 몰%까지, 바람직하게는 20부터 65 몰%까지 변할 수 있으며, 이때 잔여 지질은 중성 인지질 PC 및 PE로부터 형성된다.

<82> 다른 대안에서, 음이온은 양이온을 초과하여 존재할 수 있다. 상기 전하비는 1:3 내지 1:2 사이, 바람직하게는 약 1:2(양이온:음이온)일 수 있다. 대전된 지질의 총량은 지질 혼합물의 40 몰%부터 75 또는 80 몰%까지, 바람직하게는 45 또는 50 몰%부터 70 또는 75 몰%까지, 더욱 바람직하게는 55부터 65 몰%까지 변할 수 있으며, 이때 잔여 지질은 중성 인지질 PC 및 PE로부터 형성된다.

<83> 양이온과 음이온의 상이한 조합 다수가 상기 주어진 적절한 성분의 리스트로부터 선택될 수 있다. 유리하게는, 본 발명은 대전성 양이온으로서 MoChol 또는 CHIM을 사용하고 대전성 음이온으로서 CHEMS, DMGSucc 또는 DOGSucc을 사용하여 실행될 수 있다.

<84> 현재 선호되는 리포솜은 POPC 및 DOPE를 1:1 및 1:4 사이 비율로 포함하고, MoChol와 CHEMS, MoChol와 DMGSucc, MoChol와 DOGSucc, CHIM와 CHEMS, 및 CHIM와 DMGSucc에서 선택되는 양쪽성 지질 쌍을 3:1 및 1:1 사이 비율로 포함하는 지질의 혼합물에서 만들어지며, 여기서 상기 대전된 지질의 양은 지질 혼합물의 30 및 80 몰% 사이이다.

<85> 본 발명에 따른 이러한 리포솜의 특정 예는 하기를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다:

POPC/DOPE/MoChol/CHEMS	6 : 24 : 53 : 17
POPC/DOPE/MoChol/CHEMS	6 : 24 : 47 : 23
POPC/DOPE/MoChol/CHEMS	15 : 45 : 20 : 20
POPC/DOPE/MoChol/CHEMS	10 : 30 : 30 : 30
POPC/DOPE/MoChol/CHEMS	24.5 : 35.5 : 20 : 20
POPC/DOPE/MoChol/CHEMS	16 : 24 : 30 : 30
POPC/DOPE/MoChol/DMGSucc	6 : 24 : 53 : 17
POPC/DOPE/MoChol/DMGSucc	6 : 24 : 47 : 23
POPC/DOPE/MoChol/DMGSucc	15 : 45 : 20 : 20
POPC/DOPE/MoChol/DMGSucc	10 : 30 : 30 : 30
POPC/DOPE/MoChol/DMGSucc	24.5 : 35.5 : 20 : 20
POPC/DOPE/MoChol/DMGSucc	16 : 24 : 30 : 30
POPC/DOPE/MoChol/DOGSucc	12.5 : 37.5 : 33 : 17
POPC/DOPE/MoChol/DOGSucc	7.5 : 22.5 : 47 : 23
POPC/DOPE/CHIM/CHEMS	12.5 : 37.5 : 33 : 17
POPC/DOPE/CHIM/CHEMS	7.5 : 22.5 : 47 : 23
POPC/DOPE/CHIM/DMGSucc	12.5 : 37.5 : 33 : 17
POPC/DOPE/CHIM/DMGSucc	7.5 : 22.5 : 47 : 23

<86>

<87> 현재 더욱 선호되는 리포솜은 1:1 및 1:4 사이 비율의 POPC와 DOPE, DMGSucc 또는 DOGSucc, 및 MoChol을 포함하는 지질 혼합물을 포함하는데, 여기서 DMGSucc 또는 DOGSucc의 몰량(molar amount)은 MoChol의 몰량을 초과하고 대전된 지질의 양은 30 및 80 몰% 사이이다.

<88> 바람직하게는, 상기 전하비는 1:2 및 1:3 사이이고 대전된 성분은 상기 지질 혼합물의 45 또는 50 몰% 및 70 또는 75 몰% 사이를 구성한다.

<89> 이러한 추가의 리포솜의 특정 예는 하기를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다:

POPC/DOPE/MoChol/DMGSucc	6 : 24 : 23 : 47
POPC/DOPE/MoChol/DMGSucc	8 : 32 : 20 : 40
POPC/DOPE/MoChol/DMGSucc	10 : 40 : 17 : 33
POPC/DOPE/MoChol/DMGSucc	10 : 20 : 23 : 47
POPC/DOPE/MoChol/DMGSucc	13 : 27 : 20 : 40
POPC/DOPE/MoChol/DMGSucc	10 : 30 : 20 : 40
POPC/DOPE/MoChol/DMGSucc	17 : 33 : 17 : 33
POPC/DOPE/MoChol/DOGSucc	12.5 : 37.5 : 17 : 33

<90>

<91> 이러한 용도에 한정되지 않고, 본 발명에서 기술된 상기 물질은 예를 들어 올리고뉴클레오타이드 및 DNA 플라스미드와 같은 핵산-기반 약물에 대한 담체로서의 사용에 적합하다. 이들 약물은, 단백질, 폴리펩티드 또는 RNA에 대한 하나 이상의 특이 서열을 인코딩하는 핵산 및 특히 스플라이싱(splicing) 및 인위적 절단(truncation)과의 간섭을 통해 단백질 구조에 영향을 주거나 단백질 발현을 특이적으로 조절할 수 있는 올리고뉴클레오타이드로 분류된다.

<92> 따라서, 본 발명의 몇몇 구체예에서, 상기 핵산-기반 치료는 척추 세포(vertebrate cell)에서 하나 이상의 RNA로 전사될 수 있는 핵산을 포함할 수 있는데, 이 RNA는 mRNAs, shRNAs, miRNAs 또는 리보자임일 수 있고, 여기서 이러한 mRNA는 하나 이상의 단백질 또는 폴리펩티드를 코딩한다. 이러한 핵산 치료는, WO 98/21322 또는 DE 19753182에 개시된 바의 MIDGE 벡터(Minimalistic Immunogenically Defined Gene Expression) 같은, 환형 DNA

플라스미드, 선형 DNA 구조, 또는 번역을 위해 준비된 mRNA(예컨대, EP 1392341)일 수 있다.

- <93> 본 발명의 또 다른 구체예에서, 올리고뉴클레오타이드는 존재하는 세포간 핵산 또는 단백질을 타겟으로 할 수 있다. 상기 핵산들은 특이 유전자를 코딩하고, 상기 올리고뉴클레오타이드는 전사를 약화 또는 조절하거나, 전사의 진행을 변형시키거나 또는 단백질의 발현을 방해하기에 적합하게 되도록 한다. 용어 "타겟 핵산"은 특이 유전자를 인코딩하는 DNA와 더불어, 이러한 DNA로부터 유도되는 모든 RNA들, pre-mRNA 또는 mRNA를 포괄한다. 타겟 핵산과 이러한 서열에 대한 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드간의 특이적 교잡반응은 단백질 발현을 저해 또는 조절할 수 있다. 이러한 특이적 타겟팅을 달성하기 위하여, 올리고뉴클레오타이드는 타겟 핵산의 서열에 실질적으로 상보적인 연속 스트레치 뉴클레오타이드를 포함하는 것이 바람직하다.
- <94> 상기 기준을 만족하는 올리고뉴클레오타이드들은 다수의 상이한 화학적 구성 및 토폴로지를 가지고 구성될 수 있다. 올리고뉴클레오타이드들은 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있다.
- <95> 올리고뉴클레오타이드들의 작용 메커니즘은 다양한데, 그중에서도 특히 스플라이싱, 전사, 핵-세포질 이동 및 번역에 대한 영향력을 포함할 수 있다.
- <96> 본 발명의 바람직한 실시예에서, 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드들은, DNA-기반 올리고뉴클레오타이드, 잠금 핵산(locked nucleic acids), 2'-변형 올리고뉴클레오타이드 및 그 외의 것들, 일반적으로 안티센스 올리고뉴클레오타이드라고 알려진 것을 포함하나, 여기에 한정되는 것은 아니다. 주쇄 또는 염기 또는 당 변형은 포스포티오에이트 DNA(PTO), 2'-O-메틸 RNA (2'Ome), 2' O-메톡시에틸-RNA(2'MOE), 펩티드 핵산(PNA), N3'-P5' 포스포아미데이트(NP), 2'플루오로아라비노 핵산(FANA), 잠금 핵산(LNA), 모르폴린 포스포아미데이트(Morpholino), 사이클로헥센 핵산(CeNA), 트리시클로-DNA(tcDNA) 및 그 외를 포함하나, 이들에 한정되는 것은 아니다. 또한, 이 기술분야에서, 공중합체, 블록-공중합체 또는 갭중합체(gapmer) 또는 그 외의 배열과 같이 하나 이상의 단일 뉴클레오타이드 종으로 구성된 혼합 화학물질들도 알려져 있다. 상술한 올리고뉴클레오타이드에 추가하여, 단백질 발현은 또한 상보적 서열 모티프를 함유하는 이중 가닥 RNA 분자를 이용하여 저해될 수 있다. 이러한 RNA 분자는 이 기술분야에서(예를 들어, WO 99/32619 또는 WO 02/055693) siRNA분자 라고 알려져 있다. 또한, 다양한 화학물질들이 이 종류의 올리고뉴클레오타이드에 적합화되었다. 또한, DNA/RNA 혼성 시스템도 이 기술분야에서 알려져 있다.
- <97> 본 발명의 다른 구체예로서, 교란(decoy) 올리고뉴클레오타이드가 사용될 수 있다. 이들 이중 가닥 DNA 분자 및 그 화학적 변형물은 핵산이 아닌 전사 인자를 타겟으로 한다. 이것은 교란 올리고뉴클레오타이드가 서열-특이적 DNA-결합 단백질과 결합하고 전사를 방해하는 것을 의미한다(예: Cho-Chung, et al. in Curr. Opin. Mol. Ther., 1999).
- <98> 본 발명의 또 다른 구체예에서, 생리학적 조건하에서 유전자의 프로모터 영역으로 올리고뉴클레오타이드를 교잡시킴으로써 전사에 영향을 줄 수 있는 올리고뉴클레오타이드가 사용될 수 있다. 또한, 다양한 화학물질이 이 종류의 올리고뉴클레오타이드로서 적합하게 사용될 수 있다.
- <99> 본 발명의 또 다른 구체예에서, DNA 효소(DNAzyme)가 사용될 수 있다. DNA 효소는 효소 활성을 가지는 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드 및 그 화학적 변형물이다. 전형적인 DNA 효소로, "10-23" 모델로 알려진 것은, 생리학적 조건 하에서 특이적 부위(site)에서 단일-가닥 RNA를 절단할 수 있다.
- <100> 이 DNA 효소 10-23 모델은 RNA 상에서 타겟 서열에 상보적이고, 측면에 2-치환체-인식 도메인(domain)을 가지는, 15개의 보존성이 높은 디옥시리보뉴클레오타이드의 촉매 도메인(domain)을 가진다. 이 타겟 mRNA의 절단은 이를 파괴하고 그 DNA 효소는 재순환하여 다수개의 치환체를 절단한다.
- <101> 본 발명의 다른 구체예에서, 리보자임이 사용될 수 있다. 리보자임은 효소 활성을 가지는 단일-가닥 올리고리보뉴클레오타이드 및 그 화학적 변형물이다. 이들은 작동하여 두 개의 성분(components), 즉, 촉매 코어를 형성하는 보존된 스템-루프(stem-loop)와, 소정의 RNA 전사에서 타겟 부위를 둘러싸는 서열에 역상보적인 측면 서열(flanking sequence)로 분리된다. 측면 서열은 특이도를 부여할 수 있고, 일반적으로는 선택된 타겟 부위(site)의 양 사이드로 연장되는 총 14-16 nt를 구성할 수 있다.
- <102> 본 발명의 다른 구체예에서, 타겟 단백질에 애타머(aptamer)가 사용될 수 있다. 애타머는 RNA 및 DNA와 같은 핵산으로 구성된 거대분자 및 이들의 화학적 변형물로서, 특이적 분자 타겟에 타이트하게 결합하고 전형적으로는 15-60 nt 길이이다. 이 뉴클레오타이드의 사슬은 분자를 복잡한 3차원 형태 접을 수 있는 세포간 상호작용을 형성한다. 이 애타머의 형상은 그 타겟 분자의 표면에 대하여 타이트하게 결합할 수 있도록 하는데, 이 타겟 분자는 산성 단백질, 염기성 단백질, 막 단백질, 전사 인자 및 효소를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

압타머 분자의 결합은 타겟 분자의 기능에 영향을 줄 수 있다.

- <103> 상술한 모든 올리고뉴클레오타이드들은 10, 바람직하게는 15, 더욱 바람직하게는 18, 내지는 50, 바람직하게는 30, 더욱 바람직하게는 25 뉴클레오타이드의 길이 변화될 수 있다. 올리고뉴클레오타이드와 타겟 서열 간의 적합(fit)성은 바람직하게는, 상술한 수의 올리고뉴클레오타이드의 연속적 스트레치에 걸친 타겟 핵산 상에서 그 상보적 염기를 가지는 염기쌍을 형성하는 올리고뉴클레오타이드의 각 염기일 때가 완벽하다. 서열의 쌍은, 덜 바람직하기는 하나, 상기한 염기 쌍의 연속적 스트레치 내에서 하나 이상의 미스매치를 포함할 수도 있다. 일반적으로 이러한 핵산의 타입 및 화학적 조성은 in vivo 또는 in vitro에서 담체로서의 본 발명의 리포솜의 성능에 거의 영향을 미치지 않으므로, 당업자는 본 발명의 리포솜과의 조합에 적당한 다른 타입의 올리고뉴클레오타이드 또는 핵산을 찾을 수 있을 것이다.
- <104> 그러나, 본 발명의 바람직한 구체예에는 CD40 유전자를 인코딩하는 핵산, 그 센스 혹은 안티센스 가닥, 엑손 또는 인트론 또는 그 비번역 영역(region)을 타겟으로서 함으로써, 포유동물 세포에서의 CD40의 발현을 조절할 수 있도록 적합하게 된 올리고뉴클레오타이드가 사용될 수 있다.
- <105> 본 발명의 다른 구체예에서, 상기 올리고뉴클레오타이드는 CD40의 모든 mRNA에 대하여 지시될 수 있고, 여기서 이러한 mRNA는 pre-mRNA 및 이들이 후속적으로 성숙한 형태일 수 있다.
- <106> 단백질 발현은 예를 들어, 안티센스, 잠금 핵산(LNA), 펩티드 핵산(PNA), 모르폴리노 핵산(Morpholinos) 및 다양한 화학적 형태를 가지는 소형 간섭 RNA(siRNA)와 같은 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 특이적으로 하향 조절(down regulated)될 수 있다.
- <107> CD40은 Pauli, et al. 1984(Cancer Immunol. Immunotherapy 17:173-179)에 의해 처음 개시되었다. 이 단백질은 주로 수상돌기(dendritic) 세포, 내피(endothelia) 세포 및 B-세포 상에서 발현하고, T-세포 상에서 리간드(CD40 리간드 혹은 CD154)와 상호작용한다. CD40 및 CD154 사이의 시그널링은 인간 면역 반응의 발전에 매우 중요하다. 경로를 과도하게 자극하는 것은, 이식편 거부, 이식편 대 숙주병, 다발경화증, 전신홍반루푸스, 류마티스 관절염, 천식, 염증성장자병, 건선 또는 갑상선염을 포함하는 다양한 면역 관련 장애를 유발할 수 있다. CD40 과발현은 또한 종양 성장에도 관여할 수 있고(Gruss, et al. 1997, Leuk. Lymphoma. 24(5-6): 393-422), 향상된 수준의 가용성 형태의 CD40은 알츠하이머 질환과 연관된 것으로 보고되어 있다(Mocali et al. 2004, Exp Gerontol. 39(10):1555-61). NF- κ B 경로로의 CD40 시그널은, 결과적으로 전사 인자의 활성화를 유도하고, 결국 IL-1, TNF α 및 IFN γ 와 같은 시토카인의 방출을 유도하며, 이는 다시 다른 세포들을 활성화시켜, 양성적(positive) 피드백 메커니즘을 이용한 염증을 촉진한다.
- <108> 상술한 바와 같은 경로 내의 초기 이벤트의 저해는 면역 장애 또는 염증 진행을 저해하기 위한 효과적인 전략으로서 제안되어 왔다. 예로서, 항체를 이용한 TNF α 의 경쟁적 결합, 이 TNF α -수용체에 대한 항체를 사용한 수용체 차단 및 FN- γ B 결합의 경쟁적 저해 등을 들 수 있다. CD40은 삼량체 리간드, CD154와의 상호작용을 통해 시그널을 보내므로, 소분자 저해제로 시그널링 이벤트를 저해하는 경우는 일어나지 않고, 치료법의 개발은 따라서 차단 항체의 사용에 집중된다. 보다 구체적으로, CD40/CD154 상호작용은 Holstager, et al. 2000 (J.Biol. Chem. 275:15392-15398) 또는 Baccam & Bishop 1999 (Eur.J.Immunol.29:3855-3866)에 기재된 바와 같이, 성분들 중 하나를 타겟으로 하는 항체를 사용하여 차단될 수 있다. 그러나, 개발 중인 CD40 항체는 부작용을 일으킬 수 있고, 따라서, 이 점에서 염증 피드백 루프를 절단하기 위한 대체적인 수단이 필요한 상황이다.
- <109> 이제까지 CD40 mRNA에 대하여 타겟으로 한 많은 올리고뉴클레오타이드 서열이 in vitro로 확인되어 왔다. 예를 들어, US2004/0186071 및 US 6197584 (양자 모두 Bennett, et al.)은 안티센스 메커니즘에 기초한 이러한 올리고뉴클레오타이드에 대한 상세한 설명을 제공한다. Pluvinet, et al(Blood, 2004)는 인간 타겟에 대한 siRNA를 이용한 CD40의 하향 조절에 대하여 처음으로 기술하였다. 또한, Manoharan에 대한 WO 2004/090108은 CD40 단백질의 발현을 저해하기 위한 신규한 올리고뉴클레오타이드의 활용성을 개시한다. CD40 발현을 하향 조절하기 위한 간접 수단으로서, 전사인자 IFR-1의 저해를 이용하는 것이 DE 10049549에서, Hecker와 Wagner에 개시되어 있다. CD40의 발현을 조절하기에 적합한 특이적 핵산이 아래 실시예 11에 나와 있다.
- <110> 따라서, 본 발명의 구체적인 관점에는, 활성제로서 CD40에 대해 지시되는 올리고뉴클레오타이드 및 부형제로서 본 발명의 양쪽성 리포솜을 포함하는 약학적 조성물을 제공한다. 이러한 제형은 염증 및 자가면역질환의 치료에 치료학적으로 활성인 것으로 알려졌고, 따라서 본 발명은 또한 이식편 거부, 이식편 대 숙주병, 다발경화증, 전신홍반루푸스, 류마티스 관절염, 천식, 염증성장자병, 건선 또는 갑상선염, 모버스크론(Morbus Crohn), 급성 대장염(Colitis ulcerosa), COPD 및 아토피성 피부염을 포함하는 염증, 면역 혹은 자가면역 질환의 치료 및 예방

을 위한 조성물의 용도를 포함한다.

- <111> 본 발명의 약학적 조성물은 또한, 예를 들어, 점막염의 치료와 같은 국소 치료용으로 사용될 수 있다. 특히, 본 발명의 조성물은 염증성장자병 또는 이식 편 거부의 치료 또는 예방에 사용될 수 있다. 본 발명의 조성물은 또한 피부나 폐의 국소적 적용에도 적합할 수 있다.
- <112> 리포솜은 in vivo로 캡슐화된 약의 약동력학적 및 생체분포적 프로파일을 바꾸기 위해 널리 사용된다. 본 발명의 리포솜은 그 카고(cargo)와 더불어, 간에 의해 급속히 그리고 매우 넓은 범위로 제거될 수 있다. 그러나, 생체분포 프로파일 뿐 아니라 약동력학적 파라미터는 아래의 실시예에 기술된 바와 같이, 리포솜의 크기 및/또는 지질의 단위투여량(dose)을 조절함으로써 조절될 수 있다.
- <113> 몇몇 구체예에서, 본 발명의 리포솜은 약 150nm보다 큰 크기를 가질 수 있다. 이러한 리포솜은 낮은 지질 단위투여량으로 투여될 수 있다. 이러한 투여량 설계도는 간에 대한 유효하고 급속한 타겟팅을 가능하게 하고, 예를 들어, 비장과 같은 다른 기관에서의 리포솜 및 약의 축적을 방지할 수 있게 한다.
- <114> 또한, 150nm 이상의 크기를 가지는 리포솜은 고 지질 단위투여량으로 투여될 수 있고, 이는 간을 포화시키고 및 생체분포 패턴을 바꾸어 비장 및 순환기 중 보다 원부(distal) 부위, 예를 들어, 염증 또는 종양의 감염 부위에서 리포솜이 축적하도록 한다. 체내의 이들 부분들은 천공되거나 불완전한 모세혈관을 가질 수 있고, 이를 통하여 리포솜이 필터되어버릴 수 있다. 게다가, 비장 및 다른 감염 또는 염증 부위 및 많은 종양들은 종종 다량의 마크로파지를 가지고, 이는 순환기로부터 리포솜을 제거할 수 있다.
- <115> 본 발명에 의한 상기 약학적 조성물은 상이한 방법에 의하여 고 지질 투여량을 가지고 제공될 수 있다. 몇몇 구체예에서, 소망하는 지질 농도를 얻기 위해 본 조성물의 약/지질 비율을 낮게 할 수 있다. 또한, 약학적 조성물의 지질 농도는 약이 넣어진 리포솜에 대하여 비교가능한 조성물의 조성 및 크기에 상응하는 빈 리포솜을 추가함으로써 조절될 수 있다.
- <116> 몇몇 구체예에서, 본 발명에 의한 리포솜은 약 150nm보다 작은 크기를 가질 수 있다. 상기 리포솜은 단일관상, 올리고관상 또는 다중관상일 수 있다. 비장은 원하지 않는 적혈구 세포 및 혈액으로부터의 입자를 제거하는 필터로서 작용한다. 대형 리포솜 역시 이와 마찬가지로 그물망 필터에 의해 걸러지지 않을 수 있다. 그러나, 소형 리포솜은 걸러질 수 있으므로 비장에 축적되지 않는다. 따라서, 본 발명에 의한 리포솜은 150nm보다 작은 크기를 가지므로, 기관으로서 비장을 빠져나올 수 있다.
- <117> 간세포를 타겟으로 하기 위한 경우에, 150nm보다 작은 크기를 가지는 이러한 리포솜은 낮은 지질 단위투여량으로 투여될 수 있다. 이러한 리포솜은 특히 전체 간을 완전히 투과하여 간세포와 같은, 간의 실질(parenchymal) 세포의 실질적 부분에 도달하기에 적합하다.
- <118> 또한, 순환기내의 보다 원부 부위, 예를 들어, 고형 종양의 감염 또는 염증 부위를 타겟으로 하고, 동시에 비장을 빠져나오기 위한 경우에, 150nm보다 작은 크기를 가지는 상기 리포솜은 높은 지질 투여량으로 투여될 수 있다.
- <119> 일반적으로, 본 발명의 리포솜의 약동력학적 프로파일 및 생체분포는 많은 인자에 의존한다. 리포솜의 지질 구성에 이어서, 크기 및 지질 단위투여량은 리포솜의 in vivo의 운명을 결정한다. 본 발명의 리포솜은 그 크기와 관계없이, 단일관상, 올리고관상 또는 다중관상일 수 있다.
- <120> 몇몇 구체예에서, 본 발명의 리포솜은 인간 혹은 인간의 환자에 전신 투여함으로써 폐염증을 타겟으로 하는 경우에 사용될 수 있다.
- <121> 여기 제공된 데이터로부터, 당업자는 다른, 특히 다른 포유동물 또는 사람에 대한 적절한 투여 치료법을 설계할 수 있을 것이다. 특히, 다른 종(예를 들어, 사람)에서의 지질 농도가 낮거나 높은 것은 약동력학적 데이터에 의해 결정될 수 있다. 상술한 바와 같이, 고 지질 투여량은 간의 포화 및 생체분포 패턴의 변경을 유발할 수 있다. 이점은 약동력학적 곡선의 끝부분에서의 C_{max}이 향상되도록 한다.
- <122> 본 발명의 약학적 조성물은 약제학적으로 적합한 적당한 담체에서 콜로이드로 조제될 수 있다. 물, 식염수, 인산염 중화 식염수 등과 같은 담체는 이러한 목적으로 이 기술분야에서 당업자에게 잘 알려져 있다.
- <123> 몇몇 구체예에서, 본 발명의 조성물은 약 7 및 약 8의 사이의 생리학적 pH에서 투여될 수 있다. 이러한 목적으로, 그 활성 약, 부형제 및 담체를 포함하는 조성물이 이 범위 내의 pH를 가지도록 조제될 수 있다.
- <124> 리포솜을 제조하는 방법은 이 기술분야의 당업자들에게 알려져 있다. 이들은, 정해진 포어 크기의 막을 통해

압출하는 것, 에탄올 내의 지질 용액을 카고(cargo)를 함유하는 수상(water phase)으로 주입하는 것, 또는 고압 균질화를 포함하나, 여기에 한정되는 것은 아니다.

- <125> 또한, 이 기술분야에서는, 핵산 치료제를 중성 pH에서 지질과 접촉시켜, 핵산을 소정 % 부피로 포함하는 용액을 얻는 것이 잘 알려져 있다. 50mM 내지 150mM 범위의 고농도 지질은 약을 실질적으로 캡슐화하기에 바람직하다.
- <126> 이러한 표준적인 방법과는 대조적으로, 양쪽성(amphoteric) 리포솜은 그 등전점(isoelectric) 또는 그 이하에서 핵산과 결합함으로써, 리포솜 표면에서 그 약을 농축하는 고유의 장점을 제공한다. 이러한 공정은 WO 02/066012에 보다 상세히 기술되어 있다. 리포솜의 pH를 생리학적 pH(약 pH 7.4)로 올리면, 음으로 대전된 핵산은 리포솜 막으로부터 분리된다. 실제 제조공정과는 상관없이, 비캡슐화된 활성약은, 리포솜이 기밀한 용기로서 형성되는 초기 제조 단계 이후에는 리포솜으로부터 제거될 수 있다. 또한, 여기의 문헌 및 그 인용자료들은 이러한 방법론을 상세히 기술하고, 적당한 공정 단계들은 크기 압출 크로마토그래피, 침강법, 투석, 한외여과 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- <127> 본 발명의 몇몇 구체예들서, 80중량%보다 많은 약이 상기 리포솜 내에 분포될 수 있다.
- <128> 그러나, 비-캡슐화된 재료의 제거는 반드시 해야되는 것은 아니며, 조성물의 몇몇 구체예에서는 인트랩 또는 프리(free) 약을 포함할 수 있다.
- <129> 리포솜의 입자 크기는 50 내지 500 nm, 바람직하게는 50 내지 300 nm일 수 있다.
- <130> 다음은 본 발명의 구체예를 도면과 함께 단지 예로서 보인 것이다.

실시예

- <141> **실시예 1 : 양쪽성 II 지질 MoChol 및 CHEMS으로 카르복시플루오레세인(CF)로딩된 리포솜의 제조.**
- <142> 클로로포름 내의 지질의 스톱 용액을 혼합하고 원형 바닥 플라스크 내에서 진공 하에 최종적으로 증발시켜 건조시켰다. 지질 필름은 PBS pH 7.5 내에서 100mM CF로 수화되었다. 얻어진 지질 농도는 20mM였다. 서스펜션은 실온에서 수조 내에서 45분 동안 수화되었고, 5분 동안 초음파 처리 후, -70℃에서 얼리고 녹이는 것을 3회 반복하였다. 리포솜 서스펜션을 녹인 후에, 100nm의 포어 크기를 가지는 폴리카보네이트 막을 통해 15 회 압출하였다. 캡슐화되지 않은 CF는 겔 필터링으로 제거되는 한편, 리포솜은 인자 3에 의해 회석화되었다. 지질 재생 및 농축은 유기 인산염 분석법에 의해 분석되었다. 입자 크기는 Malvern Zetaxizer 300 HSA 상에서 다이내믹 광 산란에 의해 측정되었다.

표 1 : 대전된 성분들의 총량 및 DOPE/POPC 비율의 변화

지질	조성
DOPE/MoChol/CHEMS	60:20:20
DOPE/MoChol/CHEMS	50:20:30
DOPE/MoChol/CHEMS	40:30:30
DOPE/MoChol/CHEMS	20:40:40
POPC/MoChol/CHEMS	60:20:20
POPC/MoChol/CHEMS	40:30:30
POPC/MoChol/CHEMS	20:40:40
POPC	100
POPC/DOPE	20:80
POPC/DOPE/MoChol/CHEMS	10:50:20:20
POPC/DOPE/MoChol/CHEMS	7:35:30:30
POPC/DOPE/MoChol/CHEMS	3:17:40:40
POPC/DOPE	25:75
POPC/DOPE/MoChol/CHEMS	15:45:20:20
POPC/DOPE/MoChol/CHEMS	10:30:30:30
POPC/DOPE/MoChol/CHEMS	5:15:40:40
POPC/DOPE	40:60
POPC/DOPE/MoChol/CHEMS	24.5:35.5:20:20
POPC/DOPE/MoChol/CHEMS	16:24:30:30
POPC/DOPE/MoChol/CHEMS	8:12:40:40
POPC/DOPE	57:43
POPC/DOPE/MoChol/CHEMS	34:26:20:20
POPC/DOPE/MoChol/CHEMS	22.8:17.2:30:30
POPC/DOPE/MoChol/CHEMS	11.4:8.6:40:40

표 2 : MoChol/CHEMS 비율의 변화

지질	조성
POPC/DOPE/MoChol/CHEMS	6:24:53:17
POPC/DOPE/MoChol/CHEMS	6:24:47:23
POPC/DOPE/MoChol/CHEMS	6:24:35:35
POPC/DOPE/MoChol/CHEMS	6:24:23:47

표 3 : 대전된 성분들의 총량 및 DOPE/POPC 비율의 변화

지질	조성
POPC/DOPE/MoChol/CHEMS	4:16:27:53
POPC/DOPE/MoChol/CHEMS	6:24:23:47
POPC/DOPE/MoChol/CHEMS	8:32:20:40
POPC/DOPE/MoChol/CHEMS	10:40:17:33
POPC/DOPE/MoChol/CHEMS	7:13:27:53
POPC/DOPE/MoChol/CHEMS	10:20:23:47
POPC/DOPE/MoChol/CHEMS	13:26:20:40
POPC/DOPE/MoChol/CHEMS	17:33:17:33

실시예 2 : 양쪽성 II 지질 MoChol 및 DMGSucc로 카르복시플루오레세인(CF)이 로딩된 리포솜의 제조.

리포솜은 실시예 1에 기술된 바와 같이 제조되었다.

표 4 : 대전된 성분들의 총량 및 DOPE/POPC 비율의 변화

지질	조성
POPC/DOPE/MoChol/DMGSucc	15:45:20:20
POPC/DOPE/MoChol/DMGSucc	10:30:30:30
POPC/DOPE/MoChol/DMGSucc	5:15:40:40
POPC/DOPE/MoChol/DMGSucc	24.5:35.5:20:20

표 5: MoChol/DMGSucc 비율의 변화

지질	조성
POPC/DOPE/MoChol/DMGSucc	6:24:53:17
POPC/DOPE/MoChol/DMGSucc	6:24:47:23
POPC/DOPE/MoChol/DMGSucc	6:24:35:35
POPC/DOPE/MoChol/DMGSucc	6:24:23:47

표 6: 대전된 성분들의 총량 및 DOPE/POPC 비율의 변화

지질	조성
POPC/DOPE/MoChol/DMGSucc	4:16:27:53
POPC/DOPE/MoChol/DMGSucc	6:24:23:47
POPC/DOPE/MoChol/DMGSucc	8:32:20:40
POPC/DOPE/MoChol/DMGSucc	10:40:17:33
POPC/DOPE/MoChol/DMGSucc	7:13:27:53
POPC/DOPE/MoChol/DMGSucc	10:20:23:47
POPC/DOPE/MoChol/DMGSucc	13:26:20:40
POPC/DOPE/MoChol/DMGSucc	17:33:17:33

실시예 3: 양쪽성 II 지질 MoChol 및 DOGSucc으로 카르복시플루오레세인(CF)이 로딩된 리포솜의 제조

리포솜은 실시예 1에 기재된 바와 같이 제조하였다.

표 7: 대전된 성분들의 총량 및 MoChol/DOGSucc 비율의 변화

지질	조성	혈청 안정성
POPC/DOPE/MoChol/DOGSucc	12.5:37.5:17:33	+
POPC/DOPE/MoChol/DOGSucc	12.5:37.5:33:17	+
POPC/DOPE/MoChol/DOGSucc	7.5:22.5:23:47	-
POPC/DOPE/MoChol/DOGSucc	7.5:22.5:47:23	+

실시예 4: 양쪽성 II 지질 CHIM 및 CHEMS으로 카르복시플루오레세인(CF)이 로딩된 리포솜의 제조

리포솜은 실시예 1에 기재된 바와 같이 제조하였다.

표 8: 대전된 성분들의 총량 및 CHIM/CHEMS 비율의 변화

지질	조성	혈청 안정성
POPC/DOPE/CHIM/CHEMS	12.5:37.5:17:33	-
POPC/DOPE/CHIM/CHEMS	12.5:37.5:33:17	+
POPC/DOPE/CHIM/CHEMS	7.5:22.5:23:47	-
POPC/DOPE/CHIM/CHEMS	7.5:22.5:47:23	+

실시예 5: 양쪽성 II 지질 CHIM 및 DMGSucc로 카르복시플루오레세인(CF)이 로딩된 리포솜의 제조

리포솜은 실시예 1에 기재된 바와 같이 제조하였다.

표 8: 대전된 성분들의 총량 및 CHIM/DMGSucc 비율의 변화

지질	조성	혈청 안정성
POPC/DOPE/CHIM/DMGSucc	12.5:37.5:17:33	-
POPC/DOPE/CHIM/DMGSucc	12.5:37.5:33:17	+
POPC/DOPE/CHIM/DMGSucc	7.5:22.5:23:47	-
POPC/DOPE/CHIM/DMGSucc	7.5:22.5:47:23	+

실시예 6: 실시예 1 및 2의 CF가 로딩된 양쪽성 리포솜의 혈청 안정성 시험

카르복시플루오레세인(CF)을 양쪽성 리포솜의 혈청 안정성을 측정하기 위한 모델 약으로 사용하였다. 올리고뉴클레오티드뿐만 아니라, CF도 마이너스로 대전된다.

CF가 로딩된 리포솜 25 μ l를 100 μ l의 미리 데워둔 완전한(full) 인간 혈청 또는 PBS와 각각 혼합하고, 37 $^{\circ}$ C에서 인큐베이트하였다. 정해진 시점에서 5 μ l의 샘플을 96-웰 마이크로타이터(microtiter) 플레이트 내의 20 μ l PBS, pH 7.5 또는 20 μ l 트리톤 X-100(Triton X-100)으로 옮겼다. 최종적으로 275 μ l PBS를 각 웰에 첨가하고, 형광 농도를 475/530 nm에서 측정하였다.

혈청 안정성은, 리포솜으로부터의 CF의 방출을 형광 측정을 통해 측정함으로써 4시간의 시기에 걸쳐 관찰하였다. CF의 방출량은 (%로), 100% 방출치를 획득하기 위해 세제(트리톤 X-100)로 리포솜을 처리한 후뿐만 아니라 정해진 시점에서 측정된다.

결과:

POPC 및 DOPE의 혼합물은 혈청 내에서 안정하다. POPC 자체는 혈청으로부터의 공격을 견디어내는 리포솜을 형성하지 않는다. 또한, DOPE는 리포솜 자체를 형성하지 않는다. 매우 놀랍게도, 두 성분으로의 혼합물은 혈청 공격에 대해 매우 안정하며 저항력이 있는 것으로 드러났다. 이 실시예에서, 0.75에서 5까지의 DOPE/POPC 비율은 1.5 내지 5 사이의 넓은 최적 조건(optimum)을 갖는 안정한 구조를 형성하는 것으로 나타났다 (또한 도 1 및 2 참조).

대전된 성분 및 중성 지질은 독립적으로 변화할 수 있다. 1:1 비율의 MoChol/CHEMS 또는 MoChol/DMGSucc 모두에 대한 혈청 감수성은 매우 낮으며 안정한 입자는 넓은 범위의 혼합물에 걸쳐 형성된다. 이중층 안정성에 유의한 영향을 끼치기 위해 적어도 60 또는 70 mol.%의 대전된 총 성분이 요구된다.

대전된 성분의 70%를 함유하는 지질 혼합물의 혈청 안정성(표 2 및 5 참조)을 도 3에 나타낸다. 일반적으로, MoChol의 과잉은 안정화 효과를 갖는다.

2:1 또는 4:1 중 어느 하나인 비율의 DOPE와 POPC를 갖는 표 3 및 6의 제형을 혈청 안정성에 대해 시험하였다. 대전된 지질의 총량을 80% 내지 50%로 하향 조정하였다. 결과를 도 4에 나타낸다.

실시예 7: 혈청 안정 양쪽성 리포솜의 생체분포(biodistribution)

클로로포름 내의 지질의 스톱 용액(+/- 1 % 14C-DPPC)을 혼합한 후 최종적으로 진공 하에서 건조될 때까지 둥근 바닥 플라스크 내에서 증발시켰다. 지질 필름은 1.5 ml PBS pH 7.5내 3H-이눌린(Inulin) 또는 5 ml PBS만으로

수화시켰다. 얻어진 지질 농도는 100 mM이었다. 서스펜션을 실온의 수조 내에서 45분간 수화시키고, 30분간 초음파처리한 후, -70℃에서 얼리고 녹이는 것을 3회 반복하였다. 리포솜 서스펜션을 녹인 후 적절한 기공 크기를 갖는 폴리카보네이트 막을 통해 15회 압출시켰다. 리포솜을 초원심분리하여 비캡슐화된 3H-이눌린으로부터 분리하였다 (2회).

지질 재생 및 농도를 유기 포스페이트(organic phosphate) 분석법으로 분석하였으며, 방사성동위원소로 표지된 입자의 경우, 캡슐화 효율을 액체 섬광(liquid scintillation)으로 측정하였다. 입자 크기는 Malvern Zetasizer 3000 HSA를 이용한 동적 광 산란(dynamic light scattering)으로 측정하였다. 얻어진 비표지된 및 방사성동위원소로 표지된 조제품(preparation)을 혼합하고 최종 지질 농도로 PBS를 이용하여 희석하였다.

제형:

기호	제형	크기 [nm]	지질 [mM]	3H [kBq/ml]	14C [kBq/ml]
LD-1	POPC/DOPE/MoChol/CHEMS 15:45:20:20	229	12, 3	332	52
HD-2	POPC/DOPE/MoChol/CHEMS 15:45:20:20	231	54, 8	453	70
LD-3	POPC/DOPE/MoChol/CHEMS 15:45:20:20	148	10	173	53
HD-4	POPC/DOPE/MoChol/CHEMS 15:45:20:20	140	50	182	58

생체분포 연구

39마리의 웅성 위스타(Wistar) 랫트 (Charles River)를 5개 군으로 나누고, 꼬리 정맥을 통해 정맥 내 주사하였다. 특정 시점에서 혈액 샘플(PK용) 및/또는 조직 샘플(BD용)을 수합하고, 고온 하에서의 촉매 산화(catalytic oxidation)로 분석하였다. 샘플 사이의 캐리 오버(carry over)의 백분율을 측정하여 데이터 세트의 분석에 포함시켰다.

연구군	제형	기호	동물
1	POPC/DOPE/MoChol/CHEMS 15:45:20:20	LD-1	9
2	POPC/DOPE/MoChol/CHEMS 15:45:20:20	HD-2	9
3	POPC/DOPE/MoChol/CHEMS 15:45:20:20	LD-3	9
4	POPC/DOPE/MoChol/CHEMS 15:45:20:20	HD-4	9
5	PBS	PBS	3

생체분포 연구의 결과를 도 5-6에 나타내며, 여기서 간과 비장 내에서의 상이한 리포솜 제형의 생체분포를 나타낸다. 다른 기관 내에서의 리포솜의 축적은 5%를 초과하지 않았으며, 따라서 나타내지 않았다. 도 5는 본 발명의 150 nm를 초과하는 크기의 양쪽성 리포솜이 낮은 지질 용량으로 투여되었을 때 간에 단독으로 축적되는 것을 명백히 증명한다. 반면, 높은 지질 용량의 동일한 리포솜 제형을 투여함으로써 생체분포 패턴이 변화됨이 나타내어질 수 있다. 간은 별도로, 비장에서도 150 nm를 초과하는 크기의 리포솜이 축적된다.

도 6은 150 nm 미만의 크기로 제조된 본 발명의 양쪽성 리포솜의 생체분포를 나타낸다. 낮은 지질 용량으로 투여된 이들 리포솜의 생체 분포는 150 nm를 초과하는 크기의 리포솜과 상이하지 않으므로, 높은 지질 용량의 150 nm 미만의 크기를 갖는 리포솜의 투여가 비장 내 축적을 일으키지 않음을 증명할 수 있다.

실시예 8: 콜라겐 유도성 관절염 마우스에서의 Cy5.5 표지된 CD40 안티센스를 캡슐화한 양쪽성 리포솜의 생체분포

<190> 클로로포름 내의 지질의 스톱 용액을 혼합한 후 최종적으로 진공 하에서 건조될 때까지 둥근 바닥 플라스크 내에서 증발시켰다. 지질 필름은 10 mM NaAc, 50 mM NaCl, pH 4.5 내 Cy5.5 표지된 CD40 안티센스로 수화시켰다. 얻어진 지질 농도는 20 mM이었다. 서스펜션을 50℃의 수조 내에서 45분간 수화시키고, 5분간 초음파처리(sonicate)한 후, -70℃에서 얼리고 녹이는 것을 반복하였다. 리포솜 서스펜션을 녹인 후 200 nm 폴리 카보네이트 막을 통해 19회 압출시켰다. 압출 공정 후 리포솜 서스펜션의 pH는 1/10 부피의 1M HEPES, pH 8를 첨가함으로써 pH 7.5로 시프트되었다. 비캡슐화된 Cy5.5 표지된 CD40 안티센스는 고속 침강 (2회)하여 제거하였으며, 상청액을 제거하였다.

<191> 지질 재생 및 농도를 유기 포스페이트(organic phosphate) 분석법으로 분석하였다. 캡슐화 효율을 형광 분광기로 측정하였다. 입자 크기를 Malvern Zetasizer 3000 HSA를 이용한 동적 광 산란(dynamic light scattering)으로 측정하였다.

<192> 빈 리포솜은, 10 Vol-%의 에탄올성 지질 용액 (15 mol.% POPC, 45 mol.% DOPE, 20 mol.% MoChol 및 20 mol.% CHEMS의 혼합물)을, 10 mM NaAc 50 mM NaCl pH 4.5 내로 주입함으로써 제조하였다. 얻어진 지질 농도는 2 mM였다. 이 용액의 pH는 1/10 부피의 1M HEPES, pH 8를 첨가함으로써 즉시 시프트하였다. 회석된 리포솜을 농축시키기 위해 서스펜션을 여과(diafilter)하였다.

제형	크기 [nm]	지질 [mM]	카고 (Cargo)	캡슐화 효율
POPC/DOPE/MoChol/CHEMS 15:45:20:20	192	19	Cy5.5 CD40-ODN	77 %
POPC/DOPE/MoChol/CHEMS 15:45:20:20	104	195	없음	---

<193>

<194> 마우스 내 생체분포 연구를 위해 충전된 리포솜과 빈 리포솜을 하기와 같이 혼합하였다:

<195> 200 μ l Cy5.5 리포솜 및 41 μ l 빈 리포솜

<196> DBA/1 마우스는, 완전 프로인트 보조제(complete Freund's adjuvant)에 유화된 타입 II 콜라겐(200 μ g/마우스)을 피하 주사하여 면역화시켰다. 관절염을 유도한 최초일(콜라겐 타입 II로 단일 면역화(single immunization)시킨 후 21일경)에 마우스에게 리포솜 서스펜션(241 μ l)을 정맥 내로 주사하였다. 최초일은 염증이 명백히 있는 날로 정의된다 (R. O. Williams 후 2 이상의 임상 점수).

<197> 마우스는 리포솜 서스펜션을 주입하고 10시간 후 희생시켰다. 기관 및 발을 떼어내어 액체 질소에서 즉시 동결시켰다. 리포솜 내에 캡슐화된 Cy5.5 표지된 CD40 안티센스의 생체분포는 NIR-이미징으로 평가하였으며, 비처리한 마우스의 조직 샘플과 비교하였다. 특정한 농축이 양성 질환인 마우스의 염증성 발에서 발견되었다. 보다 구체적으로, 양쪽성 리포솜의 축적은 각각의 발 또는 심지어 발가락 또는 손가락 상의 질환의 고도의 양성 부위와 부합한다 (도 7 참조).

<198> **실시예 9: 향상된 로딩 공정으로의 CD40-ODN-함유 리포솜의 제조**

<199> 리포솜은, 10 Vol-%의 에탄올성 지질 용액 (15 mol.% POPC, 45 mol.% DOPE, 20 mol.% MoChol 및 20 mol.% CHEMS의 혼합물)을, CD40에 대한 18 bp 안티센스 60 μ g/ml을 함유하는 10 mM NaAc 50 mM NaCl pH 4.5 내로 주입함으로써 제조하였다.

<200> 결과물의 지질 농도는 2 mM이었다. 이 용액의 pH는 1/10 부피 1M HEPES pH 8.0을 가하자 즉시 시프트했다. 회석된 리포솜을 농축시키기 위해 서스펜션을 T865 로터(rotor)로 20 °C 및 65,000 rpm에서 2시간 5분 동안 침전시켰다 (Sorvall Ultra Pro 80). 그 후 상기 제형을 0.45 μ m를 통해 멸균 여과시켰다.

<201> 표 9: CD40 ODN를 캡슐화한 스마트클(Smarticle) 제형의 예

지질	Mol. %	크기	다분산율
POPC/DOPE/MoChol/CHEMS 15:45:20:20	15:45:20:20	178.5	0.317

<202>

<203> 캡슐화된 ODN의 양을 260nm에서의 광학적 농도(OD)를 확인하여 측정하였다. 이하의 ODN의 양이 스마트클 제형

내에 캡슐화되었다.

표 10: 스마티클 제형 내 캡슐화된 ODN의 양

지질	Mol. %	μg ODN/μmol 지질	캡슐화 효율
POPC/DOPE/MoChol/CHEMS	15:45:20:20	8, 87	29, 58%

실시예 10: 관절염에서의 치료 효과

DBA/1 마우스는 완전 프로인트 보조제(complete Freund's adjuvant)에 유화된 타입 II 콜라겐(200 μg/마우스)을 피하 주사하여 면역화시켰다. 스마티클 또는 대조군으로의 처리는 관절염 유도 최초일에 시작하였으며(콜라겐 타입 II로의 단일 면역화 후 21일경), 3일 및 5일째에 반복하였다. 최초일은 염증이 명백히 있는 날로 정의된다(R. O. Williams 후 적어도 2인 임상 점수).

치료 연구를 위해 염증이 입증된 랫트의 꼬리 정맥 내로 리포솜 CD40-ODN을 정맥 내 주사하였다. 각 용량은 kg 체중 당 4 mg의 CD40-ODN을 함유한다 (캡슐화된 CD40-ODN).

실험 동안 발의 종창을 관찰하였으며, 임상 관절염 점수를 측정하였다.

도 8 및 도 9에 의해 증명되는 바와 같이, 양쪽성 리포솜으로 캡슐화된 CD40-ODN으로 처리한 후 발의 종창이 상당히 감소했다. 또한 상기 리포솜으로 캡슐화된 CD40-ODN으로 처리한 후 임상 점수도 상당히 감소하였다.

실시예 11: 재료

본 실시예는, 본 발명에 따른 조성물에 사용하기에 적합하며, CD40의 발현을 조절하는 올리고뉴클레오타이드에 의해 타겟될 수 있는 CD40 뉴클레오타이드 서열의 제한되지 않는 예를 제공한다.

인간 CD40 mRNA (GenBank 접근 번호 X60592)

본 발명에 따라 타겟팅하기 위한 인간 CD40 mRNA 서열은 서열 식별 번호: 1에 나타낸다. 관련된 서열 정보는, 본원에 인용에 의해 일체화된 내용인, Bennette 등의 공개된 특허 출원 번호 US 2004/0186071 (예를 들면, 서열 식별 번호: 85) 및 Bennette 등의 미국 특허 제6197584호 (예를 들면, 서열 식별 번호: 85) 및 Pluvinet et al., Blood, 2004, 104(12), 3642-3646에서 발견할 수 있다.

(서열 식별 번호: 1):

```

1  gcctcgctcg ggcgcccagt ggtcctgccg cctggtctca cctcgccatg gttcgtctgc
61  ctctgcagtg cgtcctcttg ggctgcttgc tgaccgctgt ccatccagaa ccaccactg
121 catgcagaga aaaacagtac ctaataaaca gtcagtgtg ttctttgtgc cagccaggac
181 agaaactggt gagtgtactgc acagagtcca ctgaaacgga atgccttctt tgcggtgaaa
241 gcgaattcct agacaccttg aacagagaga cacactgcca ccagcacaaa tactgcgacc
301 ccaacctagg gcttcgggtc cagcagaagg gcacctcaga aacagacacc atctgcacct
361 gtgaagaagg ctggcactgt acgagtggag cctgtgagag ctgtgtcctg caccgctcat
421 gctcgcccgg ctttggggtc aagcagattg ctacaggggt ttctgatacc atctgcgagc
481 cctgcccagt cggcttcttc tccaatgtgt catctgcttt cgaaaaatgt cacccttgga
541 caagctgtga gaccaaagac ctggttgtgc aacaggcagg cacaacaag actgatgttg
601 tctgtgggtc ccaggatcgg ctgagagccc tgggtgtgat ccccatcatc ttcgggatcc
661 tgtttgccat cctcttggtg ctggtcttta tcaaaaaggt ggccaagaag ccaaccaata
721 agggccccca ccccaagcag gaaccccagg agatcaattt tcccagcagc ctctcctggc
781 ccaacactgc tgctccagtg caggagactt tacatggatg ccaaccggtc acccaggagg
841 atggcaaaag gactgcagtc tcagtgcagg agagacagtg aggctgcacc caccaggagg
901 tgtggccacg tgggcaaaca ggcagttggc cagagagcct ggtgtgtgtg ctgcaggggg
961 gcaggcagaa gcggggagct atgccagtc agtgccagcc cctc

```

무스 무스쿨루스(Mus musculus) CD40 mRNA

본 발명에 따라 타겟팅하기 위한 쥐(murine) CD40 mRNA 서열은 서열 식별 번호: 2에 나타낸다. 관련된 서열 정보는, 본원에 인용에 의해 일체화된 내용인, Bennette 등의 공개된 특허 출원 번호 US 2004/0186071 (예를

들면, 서열 식별 번호: 132)에서 발견할 수 있다.

<219> (서열 식별 번호: 2):

```
gcctcctggc ccttcagctg tggcttttcc cgttttctga ctttgcggtg acactgggga    60
cttccttaga cctctctgga gacgctttcg gttctgcaga gattcccagg ggtattgttg    120
gtggggtggg gtaacaatag tgtccctgtg gcgctccag tccctatagt aatccttcac    180
ccctctgcta tcttgcaatc aggagagtcc ttagccctgc tatagggtggc ttttgaggtc    240
ctggatgcga ggagggggac tgggggggtg gtcgggtaat gtaagaaaag ggctcccttt    300
gggaccctgg ctctccagc cactttggtg cccatccctt aaactcttgg ggacaatcag    360
actcctggga aggtcctggg gaaatccctg ctccagtact agccataggc ccaccgcgat    420
tggtgcccgga agaccccgcc ctcttctctg gcgggactcc tagcagggac tttggagtga    480
cttgtggctt cagcaggagc cctgtgattt ggctcttctg atctcgccct gcgatgggtg    540
ctttgcctcg gctgtgcgcg ctatggggct gcttgttgac agcgggtgagt ggcttgtgtt    600
ctaaccctcca agggagtttag ggcttagaga gtgagagatg gaaagaggaa agaggagaca    660
agactttgga gatgagagat cttcctactg gaagcggcgg ttagtaggat gggcaagatc    720
tctcgcgtct tgacacacac acacacacac acaaatgagg tgggctgctc ctctttcctt    780
ccagaaggtc ggggttctgt tccacgaagc ccacagggaa ccttagggag ggcattcctc    840
cacagcggtg cctggacagc tttgtctgac ccaagccttg ctccggagct gactgcagag    900
actggaaagg gttagcagac aggaagcctg gctggggg    938
```

<220>

<221> 랫트 CD40 mRNA (GenBank 접근 번호 AF 241231)

<222> 본 발명에 따라 타겟팅하기 위한 랫트 CD40 mRNA 서열은 서열 식별 번호: 3에 나타낸다 (참조, Gao, 박사학위 논문, 괴팅겐, 2003).

<223> (서열 식별 번호: 3):

```
1  tgggaccct gtgatctggc tgctctgac tcgctctgca atgctgcctt tgcctcagct
61  gtgcgcgctc tggggctgct tgttgacagc ggtccatcta ggacagtgtg ttacgtgcag
121 tgacaaacag tacctccaag gtggcgagtg ctgcgatttg tgccagccgg gaaaccgact
181 agttagccac tgcacagctc ttgagaagac ccaatgcaa ccgtgcgact caggcgaatt
241 ctccagctcac tggaacaggg agatccgctg ccaccagcac cgacactgcg aactcaatca
301 agggcttcag gtttaagaagg agggcaccgc ggtntcagac actgtttgta cctgcaagga
361 agggcagcac tgcgccagca aggagtgcga gacgtgcgct cagcacaggc cctgtggccc
421 tggctttgga gtcgtgcaga tggccactga gactactgat accgtctgcc aaccctgcc
481 ggctcgattc ttctccaatg ggtcatcact ttttgaaaag tgtcatccat ggacaagctg
541 tgaagat
```

<224>

<225> 돼지(porcine) CD40 cDNA

<226> 본 발명에 따라 타겟팅하기 위한 돼지 CD40 cDNA 서열은 서열 식별 번호: 4에 나타낸다 (도 10). 관련된 서열 정보는, 본원에 인용에 의해 일체화된 내용인, Rushworth et al., *Transplantation*, 2002, 73(4), 635-642에서 발견할 수 있다.

<227> 추가로, 이하는, 본 발명에서의 사용에 적합한, 안티-CD40 올리고뉴클레오타이드의 비제한적인 예, 예를 들어, 안티센스 CD40 핵산 서열을 제공한다:

<228> 인간 CD40에 대한 올리고뉴클레오타이드

<229> 인간 안티센스 CD40 올리고뉴클레오타이드의 예를 이하에 나타낸다. 추가적 서열 정보는, 그 내용이 인용에 의해 본 명세서에 제공되는 Bennett 등의 US 특허 제6197584호 및 공개된 특허 출원 번호 US 2004/0186071에서 발견할 수 있다. Bennett 등에 의해 언급된 서열 식별 번호는 오른쪽에 제공된다.

서열 식별 번호: 5	ccaggcggca ggaccact	Bennett 등의 서열 식별 번호: 1
서열 식별 번호: 6	gaccaggcgg caggacca	Bennett 등의 서열 식별 번호: 2
서열 식별 번호: 7	aggtgagacc aggcggca	Bennett 등의 서열 식별 번호: 3
서열 식별 번호: 8	gcagaggcag acgaacca	Bennett 등의 서열 식별 번호: 5
서열 식별 번호: 9	gcaagcagcc ccagagga	Bennett 등의 서열 식별 번호: 6
서열 식별 번호: 10	ggtcagcaag cagcccca	Bennett 등의 서열 식별 번호: 7
서열 식별 번호: 11	gacagcggtc agcaagca	Bennett 등의 서열 식별 번호: 8
서열 식별 번호: 12	gatggacagc ggtcagca	Bennett 등의 서열 식별 번호: 9
서열 식별 번호: 13	tctggatgga cagcggtc	Bennett 등의 서열 식별 번호: 10
서열 식별 번호: 14	gggtgttctg gatggaca	Bennett 등의 서열 식별 번호: 11
서열 식별 번호: 15	gtgggtgtgt ctggatgg	Bennett 등의 서열 식별 번호: 12
서열 식별 번호: 16	gcagtgggtg gttctgga	Bennett 등의 서열 식별 번호: 13
서열 식별 번호: 17	ctggcacaaa gaacagca	Bennett 등의 서열 식별 번호: 15
서열 식별 번호: 18	gtgcagtcac tcaccagt	Bennett 등의 서열 식별 번호: 20

서열 식별 번호: 19	attccgttc agtgaact	Bennett 등의 서열 식별 번호: 23
서열 식별 번호: 20	ttcaccgcaa ggaaggca	Bennett 등의 서열 식별 번호: 25
서열 식별 번호: 21	ctctgtcca ggtgtcta	Bennett 등의 서열 식별 번호: 26
서열 식별 번호: 22	ctggtggcag tgtgtctc	Bennett 등의 서열 식별 번호: 27
서열 식별 번호: 23	ggtgcccttc tgctggac	Bennett 등의 서열 식별 번호: 31
서열 식별 번호: 24	ctgaggtgcc cttctgct	Bennett 등의 서열 식별 번호: 32
서열 식별 번호: 25	gtgtctgttt ctgaggtg	Bennett 등의 서열 식별 번호: 33
서열 식별 번호: 26	acaggtgcag atggtgtc	Bennett 등의 서열 식별 번호: 35
서열 식별 번호: 27	gtgccagcct tcttcaca	Bennett 등의 서열 식별 번호: 37
서열 식별 번호: 28	tgaggagcac agctctca	Bennett 등의 서열 식별 번호: 40
서열 식별 번호: 29	gagcggtgca ggacacag	Bennett 등의 서열 식별 번호: 41
서열 식별 번호: 30	aatctgttg accccaaa	Bennett 등의 서열 식별 번호: 43
서열 식별 번호: 31	gctcgcagat ggtatcag	Bennett 등의 서열 식별 번호: 46
서열 식별 번호: 32	gcagggtctcg cagatggt	Bennett 등의 서열 식별 번호: 47
서열 식별 번호: 33	gactgggcag ggctcgca	Bennett 등의 서열 식별 번호: 49
서열 식별 번호: 34	gcagatgaca cattggag	Bennett 등의 서열 식별 번호: 52
서열 식별 번호: 35	tcgaaagcag atgacaca	Bennett 등의 서열 식별 번호: 53
서열 식별 번호: 36	gtccaagggt gacatttt	Bennett 등의 서열 식별 번호: 54
서열 식별 번호: 37	cagggtcttg gtctcaca	Bennett 등의 서열 식별 번호: 57
서열 식별 번호: 38	ctgttgacac accaggtc	Bennett 등의 서열 식별 번호: 58
서열 식별 번호: 39	gtttgtgcct gcctgttg	Bennett 등의 서열 식별 번호: 59
서열 식별 번호: 40	gtcttgtttg tgcctgcc	Bennett 등의 서열 식별 번호: 60
서열 식별 번호: 41	caccaccagg gctctcag	Bennett 등의 서열 식별 번호: 64
서열 식별 번호: 42	gggatcacca ccagggtc	Bennett 등의 서열 식별 번호: 65
서열 식별 번호: 43	gtcgggaaaa ttgatctc	Bennett 등의 서열 식별 번호: 71
서열 식별 번호: 44	ggagccagga agatcgtc	Bennett 등의 서열 식별 번호: 73
서열 식별 번호: 45	tggagccagg aagatcgt	Bennett 등의 서열 식별 번호: 74
서열 식별 번호: 46	tggcatccat gtaaagtc	Bennett 등의 서열 식별 번호: 77
서열 식별 번호: 47	gggtgcagct cactgtct	Bennett 등의 서열 식별 번호: 81
서열 식별 번호: 48	aactgcctgt ttgccac	Bennett 등의 서열 식별 번호: 82

이하의 siRNA 서열은 본 발명에서의 사용에 적합하다 (예를 들어, Pluvinet et al., *Blood*, 2004, 104(12), 3642-3646 참조).

<233> (서열 인식 번호: 49):

5_-GCGAAUUCUAGACACCUUU-3_ (Pluvinet 등의 siRNA-2)
<234> 3_-UUCGCUUAAGGAUCUGUGGAC-5_

<235> (서열 인식 번호: 50):

5_-CUGGUGAGUGACUGCACAGUU-3_ (Pluvinet 등의 siRNA-6)
<236> 3_-UUGACCACUCACUGACGUGUC-5_

<237> (서열 인식 번호: 51):

5_-UACUGCGACCCCAACCUAGUU-3_ (Pluvinet 등의 siRNA-8)
<238> 3_-UUAUGACGCGGGGUUGGAUC-5_

<239> 모든 siRNA는 3' 말단에 2 뉴클로티드 오버행(overhang)을 함유한다.

<240> 쥐(murine) CD40에 대한 올리고뉴클레오티드

<241> 쥐 안티센스 CD40 올리고뉴클레오티드의 예는 이하에 나타난다. 추가의 서열 정보는, 본원에 인용에 의해 일체화된 내용인 Bennett 등의 공개된 특허 출원 번호 US 2004/0186071에서 발견할 수 있다. Bennett 등에 의해 언급된 서열 식별 번호는 오른쪽에 제공된다.

<242> 쥐

서열 식별 번호: 52	agacaccatc gcag	Bennett 등의 서열 식별 번호. 116
서열 식별 번호: 53	gcgagatcag aagag	Bennett 등의 서열 식별 번호. 117
서열 식별 번호: 54	cgctgtcaac aagca	Bennett 등의 서열 식별 번호. 118
서열 식별 번호: 55	ctgccctaga tggac	Bennett 등의 서열 식별 번호. 119
서열 식별 번호: 56	ctggctggca caaat	Bennett 등의 서열 식별 번호. 120
서열 식별 번호: 57	ctgtccagg gataa	Bennett 등의 서열 식별 번호. 123
서열 식별 번호: 58	cacagatgac attag	Bennett 등의 서열 식별 번호. 124
서열 식별 번호: 59	tgatatagag aaaca	Bennett 등의 서열 식별 번호. 125

서열 식별 번호: 60	ctcattatcc ttgg	Bennett 등의 서열 식별 번호. 127
서열 식별 번호: 61	ggttcagacc agg	Bennett 등의 서열 식별 번호. 128
서열 식별 번호: 62	tttatttagc cagta	Bennett 등의 서열 식별 번호. 130
서열 식별 번호: 63	agccccacgc actgg	Bennett 등의 서열 식별 번호. 131
서열 식별 번호: 64	tctcactcct atcccagt	Bennett 등의 서열 식별 번호. 134
서열 식별 번호: 65	attagtctga ctcgt	Bennett 등의 서열 식별 번호. 138
서열 식별 번호: 66	acattagtct gactc	Bennett 등의 서열 식별 번호. 139
서열 식별 번호: 67	cagatgacat tagtc	Bennett 등의 서열 식별 번호. 142
서열 식별 번호: 68	ctggactcac cacag	Bennett 등의 서열 식별 번호. 143
서열 식별 번호: 69	ggactcacca cagat	Bennett 등의 서열 식별 번호. 144
서열 식별 번호: 70	actcaccaca gatga	Bennett 등의 서열 식별 번호. 145
서열 식별 번호: 71	tcaccacaga tgaca	Bennett 등의 서열 식별 번호. 146
서열 식별 번호: 72	accacagatg acatt	Bennett 등의 서열 식별 번호. 147
서열 식별 번호: 73	agatgacatt ag	Bennett 등의 서열 식별 번호. 153
서열 식별 번호: 74	cagatgacat tag	Bennett 등의 서열 식별 번호. 154
서열 식별 번호: 75	acagatgaca ttag	Bennett 등의 서열 식별 번호. 155
서열 식별 번호: 76	ccacagatga cattag	Bennett 등의 서열 식별 번호. 156
서열 식별 번호: 77	accacagatg acattag	Bennett 등의 서열 식별 번호. 157
서열 식별 번호: 78	caccacagat gacattag	Bennett 등의 서열 식별 번호. 158
서열 식별 번호: 79	tcaccacaga tgacattag	Bennett 등의 서열 식별 번호. 159
서열 식별 번호: 80	ctcaccacag atgacattag	Bennett 등의 서열 식별 번호. 160

<244>

<245> 랫트 CD40에 대한 올리고뉴클레오티드

<246> 랫트 안티센스 CD40 올리고뉴클레오티드의 예는 이하에 나타낸다. (참조, Gao, 박사학위 논문, 2003, 괴팅겐 대학, 독일)

서열 식별 번호: 81 accgctgtcaacaagcagc (Gao의 rAS2)

서열 식별 번호: 82 tcctagatggaccgctgt (Gao의 rAS3)

서열 식별 번호: 83 taacacactgtcctag (Gao의 rAS4)

<247>

<248> 돼지 CD40에 대한 올리고뉴클레오티드

<249> 돼지 안티센스 CD40 올리고뉴클레오티드의 예들은 아래에 나타냈다. 그 내용이 인용에 의해 본 명세서에 일체화된 Rushworth, 등의, Transplantation(2002, 73(4), 635-642)를 참조한다.

서열 식별 번호: 84 gctgatgacagtgttct (Rushworth 등의 Aso3)

서열 식별 번호: 85 gcctcactctcgctcctg (Rushworth 등의 Aso8)

서열 식별 번호: 86 ggactgtatctggactgc (Rushworth 등의 Aso9)

서열 식별 번호: 87 gtggacagtcgttatat (Rushworth 등의 Aso10)

<250>

<251> 따라서 본 발명은 포유동물 혈청과 접촉할 시, 캡슐화된 약을 거의 또는 전혀 방출하지 않으면서 향상된 안정성을 나타내는 양쪽성(amphoteric) 리포솜의 제형을 제공한다. 그러한 리포솜형 제형은 혈류로의 전신 투여 후 약의 전달에 유용할 수 있다. 본 발명은 올리고뉴클레오티드, 현재 개발 중인 새로운 유형의 약, 및 DNA 플라스미드의 전달에 특히 적합하며, 그와 같은 용도로 한정되는 것은 아니다. 그러한 화합물의 대부분은 세포내 작용 부위를 갖는다. 담체 시스템이 사용되어 상기 물질의 열악한 흡수를 극복하며, 이는 종종 필수적의 필요조건이다.

도면의 간단한 설명

<131> 도 1은 4시간 동안 완전한 인간 혈청에서 배양한 후의 다음 표 1의 MoChol/CHEMS 제형로부터의 카르복시플로오레세인(CF)의 방출 그래프이다. CF 방출은 비퀸치(unquenched) CF 시그날의 %로 표현된다. x-축은 MoChol 및 CHEMS 1:1 비율에서의 대전된 지질의 총량을 보인 것이다.

<132> 도 2은 4시간 동안 완전한 인간 혈청에서 배양한 후의 다음 표 4의 MoChol/DMGSucc 제형로부터의 CF 방출 그래프이다. CF 방출은 비퀸치 CF 시그날의 %로 표현된다. x-축은 MoChol 및 DMGSucc 이 1:1 비율에서의 대전된 지질의 총량을 보인 것이다.

<133> 도 3은 37 °C에서 완전한 인간 혈청에서 배양한 후의 MoChol/CHEMS 또는 MoChol/DMGSucc 제형을 포함하는 리포솜으로부터의 CF 방출 그래프이다. CF 방출은 비퀸치 CF 시그날의 %로 표현된다. DMGSucc은 CHEMS보다 눈에 띄게 안정하다.

<134> 도 4은 37 °C에서 완전한 인간 혈청에서 배양한 후의 다음 표 3 및 6의 MoChol/CHEMS 또는 MoChol/DMGSucc 제형으로부터의 CF 방출 그래프이다. 이 제형은 DOPE/POPC 비율이 2 및 4이고, 양이온성 대 음이온성 지질의 비율은 1보다 작다. 방출량은 퀸치되지 않은 CF 시그날의 %로 표현된다.

<135> 도 5은 랫트 간 및 비장 내에서, 저 및 고 지질 투여량으로 투여되었을 때, 크기 > 150nm을 가지는 POPC/DOPE/MoChol/CHEMS 15:45:20:20의 제형의 생체분포를 보인 막대 차트이다.(실시예 7)

<136> 도 6은 랫트 간 및 비장 내에서, 저 및 고 지질 투여량에서 투여되었을 때, 크기 > 150nm을 가지는 POPC/DOPE/MoChol/CHEMS 15:45:20:20의 제형의 생체분포를 보인 막대 차트이다.(실시예 7)

<137> 도 7은 NIR-이미징에 의해 얻어진, 희생된 콜라겐-유도 관절염 생쥐의 사지의 사진 세트로서, Cy5.5 표지된 CD40 안티센스를 캡슐화하는 양쪽성 리포솜의 생체분포를 보인 것이다 (실시예 8).

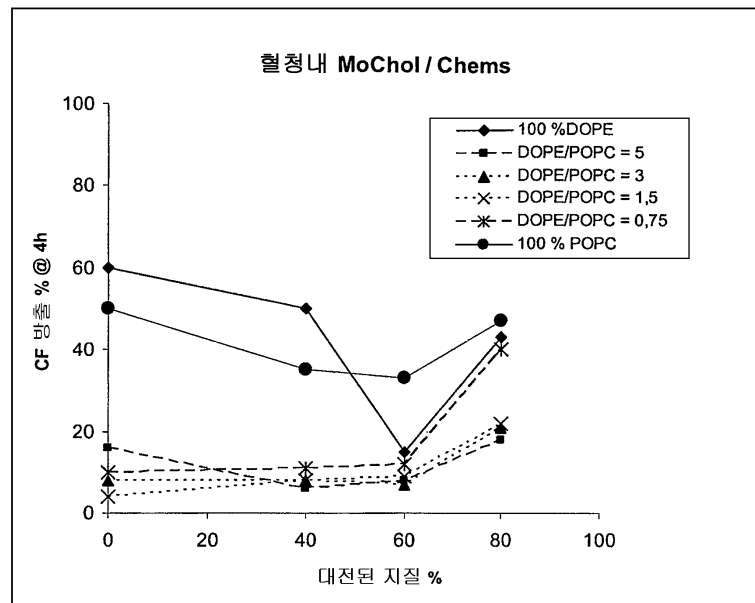
<138> 도 8은 염증유발된 생쥐의 발 종창(paw swelling) 상에서의 CD40 안티센스를 포함하는 양쪽성 리포솜에 의한 치료효과를 보인 그래프이다.

<139> 도 9는 CD40 안티센스를 포함하는 양쪽성 리포솜으로 치료된 생쥐들의 평가된 임상 스코어의 그래프이다.

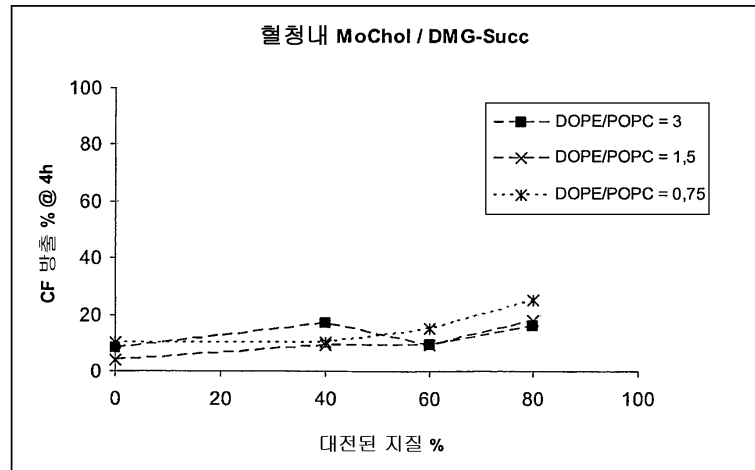
<140> 도 10은 본 발명에 따른 타겟팅을 위한 돼지 CD40 cDNA(서열식별번호 4) 서열이다.

도면

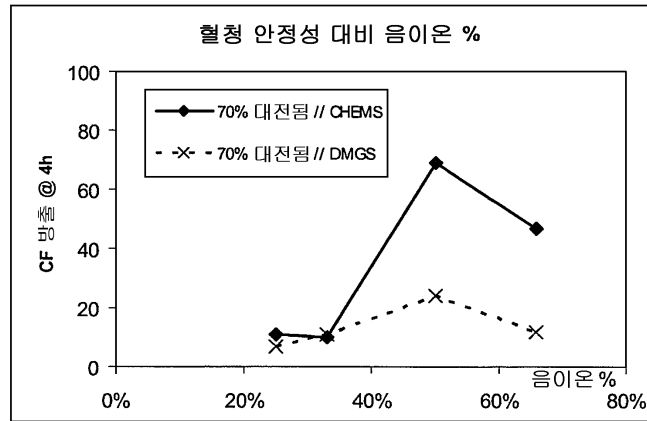
도면1



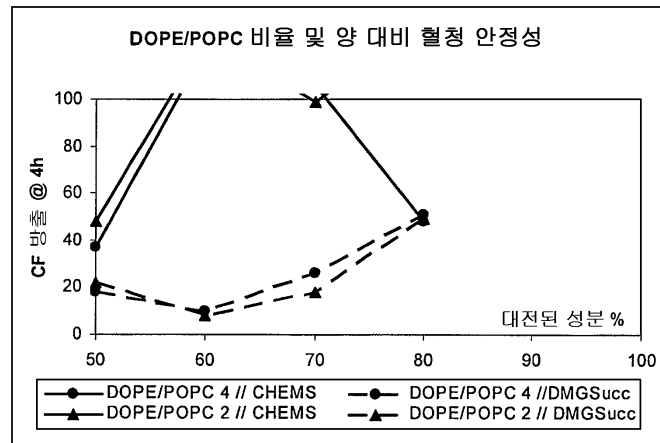
도면2



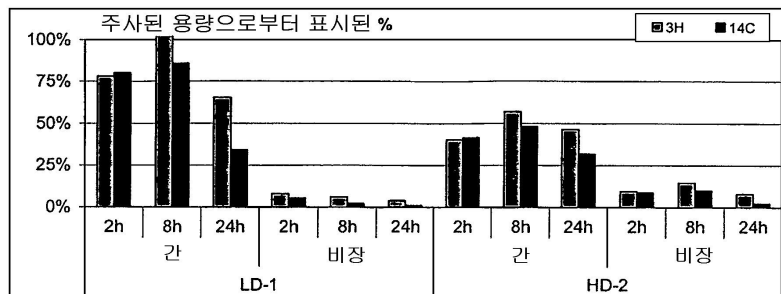
도면3



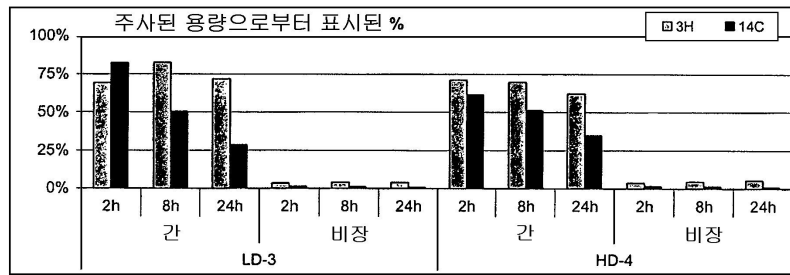
도면4



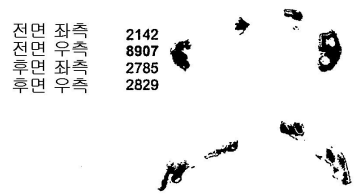
도면5



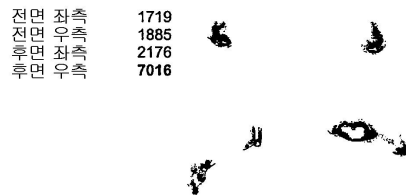
도면6



도면7



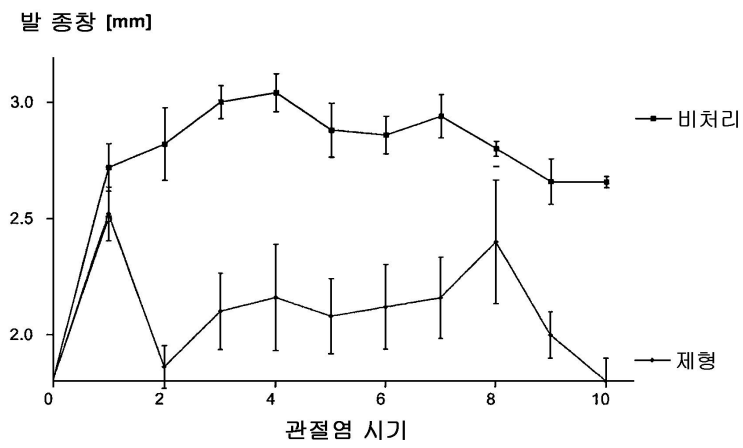
동물 71
후면 우측 발이 관절염에 걸림



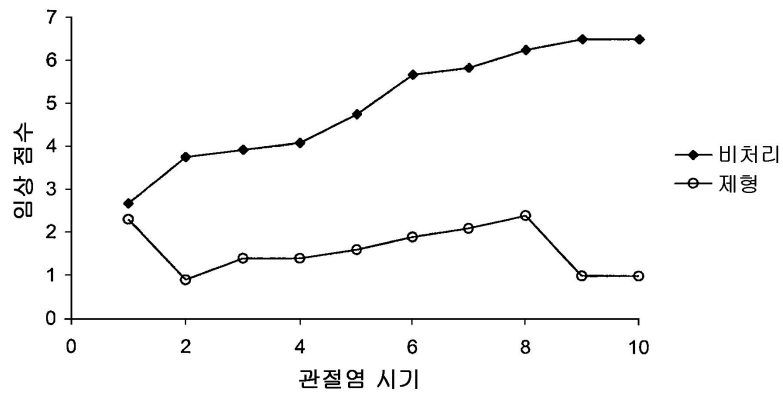
Cy5.5 가 없는 건강한 동물



도면8



도면9



도면10

(시열 식별 번호 : 4)

gcctcgccatggttgctgtgctctgaaagtgtctctcttgggctgcttttttgacccgctccaccagaaacccaccacttcatacaaaagaaacccaantacccaacaaacagccgg
ASO 1
 tgctgttaattttgtgccccagcagcagaaactggtgaaacctgcaagagctcactgaacagaaatgccttcttgcagttccacggaatttcctagccaccctgggaatagagagaa
ASO 2
 acaactgtcatcgcacaaatactgogaccccaacctaggtctccaggtccagaggagggcaccctcgaaacagacaccacttgtgtgcagtgaaggccatcacctgtaccaca
ASO 3
 ggcctctgtgaaagtgtgcacacttgacagcttggcttcccttggcctcagggtcaagcagatggcgacagaggtttctgacactatctgtgaacccctgccccagttggcttcttctcc
ASO 4
 aatgtatcatctcttccagaaagtgtcagccttggacaagctggcagagcgaagggcctggtggaaacacacgtcgggggactaaacagaccgaatgttctgtgtgtgttccagagtcg
ASO 5
 gatgagagccctggtgtatccccatcacgctggggtcctctgtttggcgtctctgttgcagaaaggtgacccaaggagcagacttaaggccctgcacctta
ASO 6
 agactgaaaggcaggatccctgtgagacgattgatctggaggattttcccgactccaccgtccggtgcaggagaccttacattggtgccagccctcaccagaggatggcchaa
ASO 7
 gagagccgcatctccgtgcagagacgcagctgaggtgtgctgtggccaggagcgtgagagcaaggcaacaggggcatgtgactgcagagccccgggctgctgctgtgtgctg
ASO 8
 gtggtgagagggtgtgctgtggcacagcccttctgctgcacccctgcagtcacagatacagtcacacctcgaggaggttctcaccccgccctggagccattcaatctcagttt
ASO 9
 cttttaaatgatggagacaaaactttgggagtcacagccacagtaataaccacagagcttccacccagaggttcagtcagatgcaagggtatggcgtctagggagccagg
ASO 10
 aggcatacatgactgtccaccactgattgttcgtgacagtgagtgactggaactgttaactgtccatcaacaggggactggctaaaaattgtaacatgttttatgcaaa
 aaaaaaaa

서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> NOVOSOM AG
 PANZNER, STEFFEN
 KERWITZ, YVONNE
 RAUCHHAUS, UNA
 LUTZ, SILKE
 ENDERT, GEROLD
- <120> Improvements in or Relating to Amphoteric Liposomes
- <130> 33841-503-W01

<150> 60/717,291
<151> 2005-9-15

<150> EP 05 020 216.7
<151> 2005-9-15

<150> EP 06 113 784.0
<151> 2006-5-10

<150> 11/267,423
<151> 2005-11-04

<150> 11/266,999
<151> 2005-11-04

<150> PCT/EP2005/011905
<151> 2005-11-04

<150> PCT/EP2005/011908
<151> 2005-11-04

<150> 60/717,293
<151> 2005-9-15

<150> EP 05 020 218.3
<151> 2005-9-15

<150> 60/717,199
<151> 2005-9-15

<150> EP 05 020 217.5
<151> 2005-9-15

<150> EP 05 090 322.8
<151> 2005-11-21

<160> 87

<170> Patent In Ver . 3.3

<210> 1

<211> 1004
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 1
gcctcgcctcg ggcgcccagt ggtcctgccc cctgggtctca cctcgccatg gttcgtctgc 60
ctctgcagtg cgtcctctgg ggctgcttgc tgaccgctgt ccatccagaa ccaccactg 120
catgcagaga aaaacagtac ctaataaaca gtcagtgtctg ttctttgtgc cagccaggac 180
agaaactggt gagtgcactgc acagagtcca ctgaaacgga atgccttcct tgcggtgaaa 240
gcgaattcct agacacctgg aacagagaga cacactgcca ccagcacaaa tactgcgacc 300
ccaacctagg gcttcgggtc cagcagaagg gcacctcaga aacagacacc atctgcacct 360
gtgaagaagg ctggcactgt acgagtgagg cctgtgagag ctgtgtcctg
caccgctcat 420
gctcgcccgg ctttggggtc aagcagattg ctacaggggt ttctgatacc atctgcgagc 480
cctgcccagt cggcttcttc tccaatgtgt catctgcttt cgaataatgt cacccttgga 540
caagctgtga gaccaaagac ctggttgtgc aacaggcagg cacaacaag actgatgttg 600
tctgtggtcc ccaggatcgg ctgagagccc tgggtggtgat ccccatcacc ttcgggatcc 660
tgtttgcat cctcttgggtg ctgggtctta tcaaaaagggt ggccaagaag ccaaccaata 720
aggcccccca cccaagcag gaacccagg agatcaattt tcccgcacgat cttcctggct 780
ccaacactgc tgctccagtg caggagactt tacatggatg
ccaaccgggtc acccaggagg 840
atggcaaaga gattcgcatc tcagtgcagg agagacagtg aggtcgcacc caccaggag 900
tgtggccacg tgggcaaaca ggcagtggc cagagagcct ggtgtgtgtg ctgcaggggg 960
gcaggcagaa gcggggagct atgcccagtc agtgccagcc cctc 1004

<210> 2
<211> 938
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 2
gcctcctggc ccttcagctg tggcttttcc cgttttctga ctttgcggtg acactgggga 60
cttccttaga cctctctgga gacgctttcg gttctgcaga gattcccagg ggtattgttg 120
gtgggggtgg gtaacaatag tgtccctgtg gcgctcccag tccctatagt aatccttcac 180
ccctctgcta tcttgcaatc aggagagtcc ttagccctgc tatagggtggc ttttgaggtc 240
ctggatgcga ggagggggac tgggggggtg gtcgggtaat gtaagaaaag ggctcctttt 300
gggaccctgg ctctccagc cacttgggtg cccatccctt aaactcttgg ggacaatcag 360
actcctggga aggtcctggg gaaatccctg ctgagtact agccataggc
ccaccgcgat 420
tggtgcccga agaccccgc ctttctctgg gcgggactcc tagcaggac tttggagtga 480
cttgtggctt cagcaggagc cctgtgattt ggctcttctg atctgcctt gcgatgggtg 540
ctttgcctcg gctgtgcgct ctatggggct gcttgttgac agcgggtgagt ggcttgtgtt 600
ctaactcca agggagttag ggcttagaga gtgagagatg gaaagaggaa agaggagaca 660
agactttgga gatgagagat cttcctactg gaagcgccgg ttagtaggat gggcaagatc 720
tctcgctct tgacacacac acacacacac acaaatgagg tgggctgtc ctcttctctt 780
ccagaaggtc ggggttctgt tccacgaagc ccacagggaa
ccttagggag ggcattctc 840
cacagcgggt cctggacagc tttgtctgac ccaagccttg ctccggagct gactgcagag 900
actggaaagg gtagcagac aggaagcctg gctggggg 938

<210> 3

<211> 547
 <212> DNA
 <213> Rattus sp.

<220>
 <221> modified_base
 <222> (334)
 <223> a, c, g, t, unknown or other

<400> 3
 tgggaccct gtgatctggc tgctctgac tcgctctgca atgctgcctt tgccctcagct 60
 gtgcgcgctc tggggctgct tgttgacagc ggtccatcta ggacagtgtg ttacgtgcag 120
 tgacaaacag tacctccaag gtggcgagtg ctgcgatttg tgccagccgg gaaaccgact 180
 agtttagccac tgcacagctc ttgagaagac ccaatgccaa ccgtgcgact caggcgaatt 240
 ctcagctcac tggaacaggg agatccgtg ccaccagcac cgacactgcg aactcaatca 300
 agggcttcag gttagaagg agggcaccgc ggtntcagac actgtttgta cctgcaagga 360
 agggcagcac tgcgccagca aggagtgcga gacgtgcgct cagcacaggc
 cctgtggccc 420
 tggctttgga gtcgtgcaga tggccactga gactactgat accgtctgcc aaccctgccc 480
 ggtcggattc ttctccaat ggtcactact ttttgaagag tgtcatccat ggacaagctg 540
 tgaagat 547

<210> 4
 <211> 1284
 <212> DNA
 <213> Sus sp.

<400> 4
 gcctcgccat gggtcgtctg cctctgaagt gtctcctctg gggtctgttt ttgaccgccc 60
 tccaccaga accaccact tcatgcaaag aaaaccaata cccaacaaac agccggtgct 120
 gtaatttgtt cccgccagga cagaaactgg tgaaccactg cacagaggtc actgaaacag 180
 aatgccttcc ttgcagtacc agcgaattcc tagccacctg gaatagagag aaacactgtc 240
 atcagcacia atactgcgac cccaacctag gtctccaggc ccagaggagag ggcacctcga 300
 aaacagacac cacttgtgtg tgcagtgaag gccatcactg taccaacagc gcctgtgaaa 360
 gttgcacctt gcacagcttg tgcttccctg gcctcggggg caagcagatg
 ggcacagagg 420
 tttctgacac tatctgtgaa ccctgcccag ttggcttctt ctccaatgta tcatctgctt 480
 cagaaaagtg tcagccttgg acaagctgcg agagcaaagg cctggtggaa caacgtgcgg 540
 ggactaacia gaccgatgtt gtctgtggtt tccagagtcg gatgagagcc ctggtggtta 600
 tccccatcac gctggggatc ctgtttgccg tcctgttggg atttctctgt atcagaaagg 660
 tgaccaagga gcaggagact aaggccctgc accctaagac tgaaaggcag gatcccgtgg 720
 agacgattga tctggaggat tttcccact ccaccgtcc ggtgcaggag accttacatt 780
 ggtgccagcc cgtcaccag gaggatggca aagagagccg
 catctccgtg caggagcgag 840
 agtgaggctg tgcgtggcca ggagcgtgga ggcacgggca caggggcatg tgactggaga 900
 gcccggggag gctgctgctg ctgtggcggt ggtgagaggg tggctgctgg cacagcccct 960
 tctgcctgca ccctgcagt ccagatacag tccacctcga ggagcttctc accccagccc 1020
 tggagcccat tcaatctcag tttgttttta aagatggaga caaaactttg gggagtcaca 1080
 gccacagtaa taaccaccag agcttccaac ccagaggttc agtacctgca gatgcaaggg 1140
 atggcgtcta ggagcccagg aggcataata atgactgtcc accactgcat tgttcgtgac 1200
 agtgagtgc tggaaactgc ttaactgtcc
 atcaacaggg gactggctaa ataaaattgt 1260

aacatgttta tgcaaaaaaa aaaa 1284

<210> 5
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 5
ccaggcggca ggaccact 18

<210> 6
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 6
gaccaggcgg caggacca 18

<210> 7
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 7
aggtgagacc aggcgga 18

<210> 8
<211> 18
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 8

gcagaggcag acgaacca

18

<210> 9

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 9

gcaagcagcc ccagagga

18

<210> 10

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 10

ggtcagcaag cagcccca

18

<210> 11

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 11
gacagcggtc agcaagca 18

<210> 12
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 12
gatggacagc ggtcagca 18

<210> 13
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 13
tctggatgga cagcggtc 18

<210> 14
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 14
ggtggttctg gatggaca 18

<210> 15
<211> 18
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 15

gtgggtggtt ctggatgg

18

<210> 16

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 16

gcagtgggtg gttctgga

18

<210> 17

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 17

ctggcacaaa gaacagca

18

<210> 18

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 18
gtgcagtcac tcaccagt 18

<210> 19
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 19
attccgtttc agtgaact 18

<210> 20
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 20
ttcaccgcaa ggaaggca 18

<210> 21
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 21
ctctgttcca ggtgtcta 18

<210> 22
<211> 18
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 22

ctggtggcag tgtgtctc

18

<210> 23

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 23

ggtgcccttc tgctggac

18

<210> 24

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 24

ctgaggtgcc cttctgct

18

<210> 25

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 25
gtgtctgttt ctgaggtg 18

<210> 26
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 26
acaggtgcag atggtgtc 18

<210> 27
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 27
gtgccagcct tcttcaca 18

<210> 28
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 28
tgcaggacac agctctca 18

<210> 29
<211> 18
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 29

gagcgggtgca ggacacag

18

<210> 30

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 30

aatctgcttg accccaaa

18

<210> 31

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 31

gctcgcagat ggtatcag

18

<210> 32

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 32
gcagggtctcg cagatggt 18

<210> 33
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 33
gactgggcag ggctcgca 18

<210> 34
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 34
gcagatgaca cattggag 18

<210> 35
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 35
tcgaaagcag atgacaca 18

<210> 36
<211> 18
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 36

gtccaagggt gacatttt

18

<210> 37

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 37

caggtctttg gtctcaca

18

<210> 38

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 38

ctgttgacac accaggtc

18

<210> 39

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 39
gtttgtgcct gcctgttg 18

<210> 40
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 40
gtcttgtttg tgcctgcc 18

<210> 41
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 41
caccaccagg gctctcag 18

<210> 42
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 42
gggatcacca ccagggct 18

<210> 43
<211> 18
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 43

gtcgggaaaa ttgatctc

18

<210> 44

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 44

ggagccagga agatcgtc

18

<210> 45

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 45

tggagccagg aagatcgt

18

<210> 46

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 46
tggcatccat gtaaagtc 18

<210> 47
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 47
ggtgcagcct cactgtct 18

<210> 48
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 48
aactgcctgt ttgccac 18

<210> 49
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 49
gcgaauuccu agacaccugu u 21

<210> 50
<211> 21
<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
siRNA sequence

<400> 50

cuggugagug acugcacagu u

21

<210> 51

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
siRNA sequence

<400> 51

uacugcgacc ccaaccuagu u

21

<210> 52

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 52

agacaccatc gcag

14

<210> 53

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 53
gcgagatcag aagag 15

<210> 54
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 54
cgctgtcaac aagca 15

<210> 55
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 55
ctgccctaga tggac 15

<210> 56
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 56
ctggctggca caaat 15

<210> 57
<211> 15
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 57

cttgtccagg gataa

15

<210> 58

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 58

cacagatgac attag

15

<210> 59

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 59

tgatatagag aaaca

15

<210> 60

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 60
ctcattatcc ttggtg 15

<210> 61
<211> 13
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 61
ggttcagacc agg 13

<210> 62
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 62
tttatttagc cagta 15

<210> 63
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 63
agccccacgc actgg 15

<210> 64
<211> 18
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 64

tctcactcct atcccagt

18

<210> 65

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 65

attagtctga ctcgt

15

<210> 66

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 66

acattagtct gactc

15

<210> 67

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 67
cagatgacat tagtc 15

<210> 68
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 68
ctggactcac cacag 15

<210> 69
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 69
ggactcacca cagat 15

<210> 70
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 70
actcaccaca gatga 15

<210> 71
<211> 15
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 71

tcaccacaga tgaca

15

<210> 72

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 72

accacagatg acatt

15

<210> 73

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 73

agatgacatt ag

12

<210> 74

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 74
cagatgacat tag 13

<210> 75
<211> 14
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 75
acagatgaca ttag 14

<210> 76
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 76
ccacagatga cattag 16

<210> 77
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 77
accacagatg acattag 17

<210> 78
<211> 18
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 78

caccacagat gacattag

18

<210> 79

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 79

tcaccacaga tgacattag

19

<210> 80

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 80

ctcaccacag atgacattag

20

<210> 81

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 81
accgctgtca acaagcagc 19

<210> 82
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 82
tcctagatgg accgctgt 18

<210> 83
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 83
taacacactg tcctag 16

<210> 84
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 84
gctgatgaca gtgtttct 18

<210> 85
<211> 18
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 85

gcctcactct cgctcctg

18

<210> 86

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 86

ggactgtatc tggactgc

18

<210> 87

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 87

gtggacagtc atgtatat

18