



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2012년07월27일
(11) 등록번호 10-1168440
(24) 등록일자 2012년07월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/48 (2006.01) A61K 9/127 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2006-7000992
(22) 출원일자(국제) 2004년07월16일
심사청구일자 2009년07월16일
(85) 번역문제출일자 2006년01월16일
(65) 공개번호 10-2006-0028655
(43) 공개일자 2006년03월30일
(86) 국제출원번호 PCT/CA2004/001051
(87) 국제공개번호 WO 2005/007196
국제공개일자 2005년01월27일
(30) 우선권주장
60/488,144 2003년07월16일 미국(US)
(뒷면에 계속)
(56) 선행기술조사문헌
W02002087541 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
프로티바 바이오제라퓨틱스, 인코포레이티드
캐나다 브리티쉬 콜롬비아 버나바이 길모어 웨이
100-3480 (우:브이5지 4와이1)
(72) 발명자
마클라클란, 이안
캐나다 브이6케이 1에스8 브리티쉬 콜롬비아 밴쿠
버 슈트 302더블유. 7 애브뉴 1812
엠베지아, 엘렌, 그레이스
캐나다 브이6케이 1알7 브리티쉬 콜롬비아 밴쿠버
#302 더블유. 4애브뉴 3150
헤예스, 제임스
캐나다 브이5제트 4비2 브리티쉬 콜롬비아 밴쿠버
모버리 로드315-651
(74) 대리인
남상선

전체 청구항 수 : 총 62 항

심사관 : 김희수

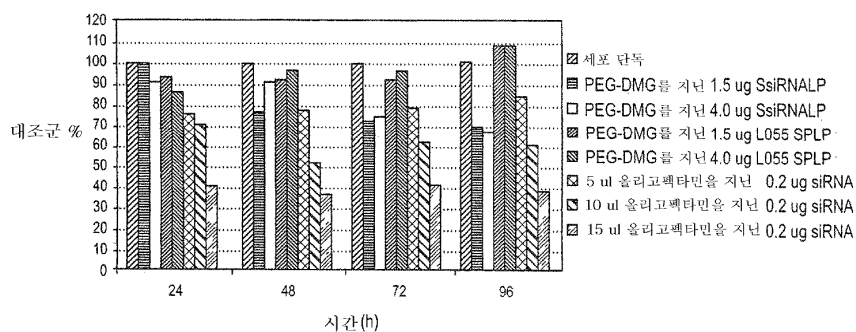
(54) 발명의 명칭 지질 캡슐화된 간접 RNA

(57) 요약

본 발명은 siRNA 분자를 포함하는 핵산-지질 입자를 세포에 전달함으로써 유전자 발현을 침묵시키는 조성물 및 방법을 제공한다.

대표도

안정하게 트랜스펙션된 CT26.CL25 세포에서의 B-gal 발현은 항-B-gal siRNA에 의해 하향 조절됨



(30) 우선권주장

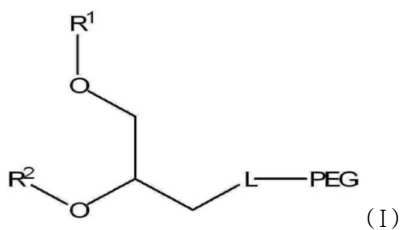
60/503,279 2003년09월15일 미국(US)

60/529,406 2003년12월11일 미국(US)

특허청구의 범위

청구항 1

화학적으로 합성된 siRNA,
양이온성 지질,
비양이온성 지질, 및
입자의 응집을 억제하는 컨쥬게이션된 지질 (conjugated lipid)
을 포함하는 핵산-지질 입자에 있어서,
상기 입자의 응집을 억제하는 컨쥬게이션된 지질이 하기 화학식을 갖는 폴리에틸렌글리콜-
디아لك옥시프로필(PEG-DAA) 컨쥬게이트를 포함하는 핵산-지질 입자:



상기 식 중:

R^1 및 R^2 는 독립적으로 선택되고, 10 내지 22 개의 탄소 원자를 갖는 알킬기이며;

PEG는 말단 하이드록시기가 메틸기로 치환된 폴리에틸렌 글리콜이고;

L은 카르바메이트(carbamate) 링커 잔기이며; 및

상기 siRNA는 상기 핵산-지질 입자 내에 완전히 캡슐화된다.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 핵산-지질 입자의 siRNA 성분이 수용액 중에서 뉴클레아제에 의한 분해에 저항성이 있는 것인 핵산-지질 입자.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 입자가 150 nm 미만의 중간 직경(median diameter)을 갖는 것인 핵산-지질 입자.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 siRNA가 15 내지 60 개의 뉴클레오타이드를 포함하는 것인 핵산-지질 입자.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 양이온성 지질이 N,N-디올레일-N,N-디메틸암모늄 클로라이드(DODAC), N,N-디스테아릴-N,N-디메틸암모늄 브로마이드(DDAB), N-(1-(2,3-디올레오일옥시)프로필)-N,N,N-트리메틸암모늄 클로라이드(DOTAP), N-(1-(2,3-디올레일옥시)프로필)-N,N,N-트리메틸암모늄 클로라이드(DOTMA), N,N-디메틸-2,3-디올레일옥시프로필아민(DODMA) 및 이들의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 핵산-지질 입자.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 비양이온성 지질이 디팔미토일포스파티딜콜린 (DPPC), 디올레일포스파티딜에탄올아민(DOPE), 팔미토일올레오일포스파티딜콜린(POPC), 에그 포스파티딜콜린(EPC), 디스테아로일포스파티딜콜린(DSPC), 콜레스테롤 및 이들의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 핵산-지질

입자.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 양이온성 지질이 상기 입자에 존재하는 총 지질의 2% 내지 60%를 차지하는 핵산-지질 입자.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 양이온성 지질이 상기 입자에 존재하는 총 지질의 5% 내지 45%를 차지하는 핵산-지질 입자.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 양이온성 지질이 상기 입자에 존재하는 총 지질의 40% 내지 50%를 차지하는 핵산-지질 입자.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 비양이온성 지질이 상기 입자에 존재하는 총 지질의 5% 내지 95%를 차지하는 핵산-지질 입자.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 비양이온성 지질이 상기 입자에 존재하는 총 지질의 20% 내지 85%를 차지하는 핵산-지질 입자.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 입자의 응집을 억제하는 키투게이션된 지질이 상기 입자에 존재하는 총 지질의 0.5% 내지 50%를 차지하는 핵산-지질 입자.

청구항 13

제1항에 있어서, 상기 입자의 응집을 억제하는 키투게이션된 지질이 상기 입자에 존재하는 총 지질의 0.5% 내지 25%를 차지하는 핵산-지질 입자.

청구항 14

제1항에 있어서, 상기 입자의 응집을 억제하는 키투게이션된 지질이 상기 입자에 존재하는 총 지질의 1% 내지 20%를 차지하는 핵산-지질 입자.

청구항 15

제1항에 있어서, 상기 입자의 응집을 억제하는 키투게이션된 지질이 상기 입자에 존재하는 총 지질의 3% 내지 15%를 차지하는 핵산-지질 입자.

청구항 16

제1항에 있어서, 상기 입자의 응집을 억제하는 키투게이션된 지질이 상기 입자에 존재하는 총 지질의 4% 내지 10%를 차지하는 핵산-지질 입자.

청구항 17

제1항에 있어서, 상기 비양이온성 지질이 디팔미토일포스파티딜콜린(DPPC)을 포함하는 핵산-지질 입자.

청구항 18

제1항에 있어서, 상기 핵산-지질 입자가 콜레스테롤을 추가로 포함하는 핵산-지질 입자.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 콜레스테롤이 상기 입자에 존재하는 총 지질의 10% 내지 60%를 차지하는 핵산-지질 입자.

청구항 20

제18항에 있어서, 상기 콜레스테롤이 상기 입자에 존재하는 총 지질의 20% 내지 45%를 차지하는 핵산-지질 입자.

청구항 21

제 1 항에 있어서, 상기 입자가 0.01 내지 0.08의 siRNA:지질 비 (mg:mg)를 지니는 핵산-지질 입자.

청구항 22

제 1 항에 있어서, 상기 입자가 0.04의 siRNA:지질 비 (mg:mg)를 지니는 핵산-지질 입자.

청구항 23

제 1 항에 있어서, 상기 입자가 100 nm 미만의 중간 직경을 지니는 핵산-지질 입자.

청구항 24

제 1 항에 있어서, 상기 비양이온성 지질이 인지질 및 콜레스테롤을 포함하고, 상기 R^1 및 R^2 가 모두 미리스틸(C14)일 핵산-지질 입자.

청구항 25

제 1 항에 있어서, 상기 siRNA가 15 내지 30 염기쌍 길이인 핵산-지질 입자.

청구항 26

제 1 항에 있어서, 상기 siRNA가 19 내지 25 염기쌍 길이인 핵산-지질 입자.

청구항 27

제 1 항에 있어서, 상기 siRNA가 3' 돌출부(overhangs)를 포함하는 핵산-지질 입자.

청구항 28

제 1 항에 있어서, 상기 siRNA가 2'-O-메틸 리보뉴클레오타이드를 포함하는 핵산-지질 입자.

청구항 29

제 1 항에 있어서, 상기 R^1 및 R^2 가 라우틸(C12), 미리스틸(C14), 팔미틸(C16), 스테아틸(C18) 및 이코실(C20)로 이루어진 군에서 선택되는 것인 핵산-지질 입자.

청구항 30

제 1 항에 있어서, 상기 R^1 및 R^2 가 동일한 핵산-지질 입자.

청구항 31

제 1 항에 있어서, 상기 R^1 및 R^2 는 모두 미리스틸(C14)인 핵산-지질 입자.

청구항 32

제 1 항에 있어서, 상기 R^1 및 R^2 가 모두 스테아틸(C18)인 핵산-지질 입자.

청구항 33

제 1 항에 있어서, 상기 알킬기가 포화된 것인 핵산-지질 입자.

청구항 34

제 1 항에 있어서, 상기 알킬기가 불포화된 것인 핵산-지질 입자.

청구항 35

제 1 항에 있어서, 상기 PEG가 550 내지 8,500 달톤의 평균 분자량을 갖는 핵산-지질 입자.

청구항 36

제 1 항에 있어서, 상기 PEG가 1,000 내지 5,000 달톤의 평균 분자량을 갖는 핵산-지질 입자.

청구항 37

제 1 항에 있어서, 상기 PEG가 1,000 내지 3,000 달톤의 평균 분자량을 갖는 핵산-지질 입자.

청구항 38

제 1 항에 있어서, 상기 PEG가 2,000 달톤의 평균 분자량을 갖는 핵산-지질 입자.

청구항 39

제1항 내지 제38항 중 어느 한 항에 따른 핵산-지질 입자를 단독으로 포함하거나 생리학적으로 허용되는 담체와 함께 포함하는, siRNA의 세포내 도입용 조성물

청구항 40

제 39 항에 있어서, 상기 세포 중의 상기 핵산-지질 입자의 존재가 상기 입자를 투여한 지 적어도 48 시간 후에 검출 가능한 것인 조성물.

청구항 41

제 39 항에 있어서, 상기 세포 중의 상기 핵산-지질 입자의 존재가 상기 입자를 투여한 지 적어도 24 시간 후에 검출 가능한 것인 조성물.

청구항 42

제 39 항에 있어서, 상기 세포가 포유류 중에 존재하는 것인 조성물.

청구항 43

제 42 항에 있어서, 상기 입자의 10 %를 초과하는 양이 투여 후 24 시간째에 상기 포유류의 혈장에 존재하는 것인 조성물.

청구항 44

제 42 항에 있어서, 투여 부위에 대해 원위에 있는 부위에서의 상기 siRNA의 존재가 상기 입자의 투여 후 적어도 48 시간 동안 검출 가능한 것인 조성물.

청구항 45

제 42 항에 있어서, 투여 부위에 대해 원위에 있는 부위에서의 상기 siRNA의 존재가 상기 입자의 투여 후 적어도 24 시간 동안 검출 가능한 것인 조성물.

청구항 46

제42항에 있어서, 상기 포유류가 인간인 조성물.

청구항 47

제1항 내지 제38항 중 어느 한 항에 따른 핵산-지질 입자를 단독으로 포함하거나 생리학적으로 허용되는 담체와 함께 포함하는, 포유류 피검체에서 표적 서열의 발현을 침묵시키기 위한 약제 조성물.

청구항 48

제 47 항에 있어서, 상기 조성물이 정맥내 투여되는 것인 조성물.

청구항 49

제47항에 있어서, 상기 포유류 피검체가 인간인 조성물

청구항 50

제49항에 있어서, 상기 인간이 상기 siRNA에 대한 표적 서열을 포함하는 유전자의 발현 또는 과발현과 관련된 질환 또는 장애를 갖는 조성물.

청구항 51

제50항에 있어서, 상기 유전자가 바이러스 감염 및 생존과 관련된 유전자, 대사 질환 또는 장애와 관련된 유전자, 종양생성 및 세포 형질전환과 관련된 유전자로 이루어진 군에서 선택되는 조성물.

청구항 52

제1항 내지 제38항 중 어느 한 항에 따른 핵산-지질 입자를 단독으로 포함하거나 생리학적으로 허용되는 담체와 함께 포함하는, siRNA의 포유류 피검체의 생체내 전달용 약제 조성물.

청구항 53

제 52 항에 있어서, 상기 조성물이 정맥내 투여되는 것인 조성물.

청구항 54

제 52 항에 있어서, 상기 포유류 피검체가 인간인 조성물

청구항 55

제 54 항에 있어서, 상기 인간이 상기 siRNA에 대한 표적 서열을 포함하는 유전자의 발현 또는 과발현과 관련된 질환 또는 장애를 갖는 조성물.

청구항 56

제 55 항에 있어서, 상기 유전자가 바이러스 감염 및 생존과 관련된 유전자, 대사 질환 또는 장애와 관련된 유전자, 종양생성 및 세포 형질전환과 관련된 유전자로 이루어진 군에서 선택되는 조성물.

청구항 57

제1항 내지 제38항 중 어느 한 항에 따른 핵산-지질 입자를 단독으로 포함하거나 생리학적으로 허용되는 담체와 함께 포함하는, siRNA의 포유류 피검체의 간 세포로의 생체내 전달용 약제 조성물.

청구항 58

제 57 항에 있어서, 상기 조성물이 정맥내 투여되는 것인 조성물.

청구항 59

제 57 항에 있어서, 상기 포유류 피검체가 인간인 조성물

청구항 60

제 59 항에 있어서, 상기 인간이 상기 siRNA에 대한 표적 서열을 포함하는 유전자의 발현 또는 과발현과 관련된 질환 또는 장애를 갖는 조성물.

청구항 61

제 60 항에 있어서, 상기 유전자가 대사 질환 또는 장애와 관련된 유전자, 종양생성 및 세포 형질전환과 관련

된 유전자로 이루어진 군에서 선택되는 조성물.

청구항 62

제61항에 있어서, 상기 대사 질환 또는 장애가 이상지혈증(dyslipidemia)인 조성물.

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

청구항 105

삭제

청구항 106

삭제

청구항 107

삭제

청구항 108

삭제

청구항 109

삭제

청구항 110

삭제

청구항 111

삭제

청구항 112

삭제

청구항 113

삭제

청구항 114

삭제

청구항 115

삭제

청구항 116

삭제

청구항 117

삭제

명세서

기술분야

- [0001] 본 발명은 핵산을 캡슐화한 혈청-안정성 지질 전달 비히클을 전달하여 세포 또는 포유류에서 효율적인 RNA 간섭(RNAi)을 제공함에 의한 핵산의 치료적 전달용 조성물 및 치료적 전달 방법에 관한 것이다. 더욱 특히, 본 발명은 전신 전달에 적합한 작은 직경을 갖는 혈청-안정성 지질 입자 중에 캡슐화된 작은 간섭 RNA(small interfering RNA "siRNA")의 사용에 관한 것이다.

배경기술

- [0002] RNA 간섭(RNAi)은 상보적 표적 단일 가닥 mRNA의 분해 및 대응하는 번역된 서열의 "침묵(silencing)"을 유발시키는 이중 가닥 RNA(dsRNA)에 의해 촉발되는 진화적으로 보존된 서열 특이적 기전이다(McManus and Sharp, Nature Rev. Genet. 3:737 (2002)). RNAi는 긴 dsRNA 가닥을 길이가 약 21-23 개의 뉴클레오티드의 생물학적 활성 "짧은 간섭 RNA (short-interfering RNA)"(siRNA) 서열로 효소 분해함으로써 기능한다(Elbashir, et al., Genes Dev. 15:188 (2001)). siRNA는 관심있는 유전자 생성물의 번역을 하향조절하거나 침묵시키는 데 사용될 수 있다. 예를 들면, 다양한 질환 및 장애와 관련된 유전자를 하향조절하는 것이 바람직하다.
- [0003] siRNA의 전달은 여전히 문제가 된다(예를 들면, 문헌[Novina and Sharp, Nature 430:161-163 (2004); and Garber, J. Natl. CancerInst. 95(7):500-2 (2003)] 참조). siRNA가 치료적으로 유용하게 되려면 유효한 안전한 핵산 전달 시스템이 요구된다. 대부분의 피검체로 투여되는 나출형(naked) dsRNA는 (1) 내인성 뉴클레아제에 의해 분해되고, (2) 그들의 표적 유전자 서열과 접촉하여 이들을 침묵시키기 위해 세포막을 횡단할 수 없다.
- [0004] 바이러스 벡터는 비교적 유효한 유전자 전달 시스템이지만 원치 않는 면역 반응 가능성과 같은 다양한 안전 문제가 있다. 또한, 바이러스 시스템은 순환으로부터 빠르게 제거되어, 형질감염이 "최초 통과(first-pass)" 기관, 예를 들면 폐, 간 및 비장으로 한정된다. 또한, 이들 시스템은 후속 주입에 의한 전달을 감약시키는 면역 반응을 유발한다. 그 결과, 비바이러스 유전자 전달 시스템이 점점 주목을 받고 있다(Worgall, et al., Human

Gene Therapy 8:37 (1997); Peeters, et al., Human Gene Therapy 7:1693 (1996); Yei, et al., Gene Therapy 1:192 (1994); Hope, et al., Molecular Membrane Biology 15:1 (1998)).

[0005] 현재, 플라스미드 DNA-양이온성 리포솜 복합체가 가장 통상적으로 사용되는 비바이러스 유전자 전달 비히클이다 (Felgner, Scientific American 276:102 (1997); Chonn, et al., Current Opinion in Biotechnology 6:698 (1995)). 예를 들면, 양친매성 화합물, 중성 지질, 및 곤충 세포 형질감염용 세제로 구성된 양이온성 리포솜 복합체가 미국 특허 번호 6,458,382에 개시되어 있다. 또한, 양이온성 리포솜 복합체는 미국 특허 출원 공개번호 2003/0073640에 개시되어 있다. 그러나, 양이온성 리포솜 복합체는 전신 적용에 적합하지 않은 큰 잘 정의되지 않은 시스템이며, 상당한 독성 부작용을 나타낼 수 있다(Harrison, et al., Biotechniques 19:816 (1995); Li, et al., The Gene 4:891 (1997); Tam, et al., Gene Ther. 7:1867 (2000)). 리포플렉스(lipoplex)는 큰 양하전된 응집체로서, 생체내 투여시 빠르게 제거되며, 가장 높은 발현 수준은 최초 통과 기관, 특히 폐에서 관찰된다(Huang, et al., Nature Biotechnology 15:620 (1997); Templeton, et al., Nature Biotechnology 15:647 (1997); Hofland, et al., Pharmaceutical Research 14:742 (1997)).

[0006] 다른 리포솜 전달 시스템은 예를 들면, 역미셀, 음이온성 및 중합체 리포솜을 사용하는 것을 포함하며, 예를 들면, 미국 특허 번호 6,429,200, 미국 특허 출원 번호 2003/0026831 및 미국 특허 출원 번호 2002/0081736 및 2003/0082103에 각각 개시되어 있다.

[0007] 최근 연구로부터, 핵산이, 이중층 지질 소포 내에 캡슐화된 단일 플라스미드로 이루어진 작은(약 70 nm 직경) "안정화된 플라스미드-지질 입자"(SPLP)에 캡슐화될 수 있다는 것이 밝혀졌다(Wheeler, et al., Gene Therapy 6:271 (1999)). 전형적으로, 이들 SPLP는 "융합생성(fusogenic)" 지질 디올레일포스파티딜에탄올아민(DOPE), 저수준의 양이온성 지질(즉, 10 % 이하)을 함유하고, 수성 매질 중에서 폴리(에틸렌 글리콜)(PEG) 코팅의 존재에 의해 안정화된다. SPLP는 정맥내(i.v.) 주사 후 연장된 순환 수명을 나타내므로 전신 적용성을 갖고, 원위 종양 부위에서의 강화된 혈관 투과성으로 인해 이러한 영역에서 우선적으로 축적되며, 이들 종양 부위에서 이식 유전자(transgene) 발현을 매개할 수 있다. 루시페라제 마커 유전자를 함유하는 SPLP의 i.v. 주사 후 종양 부위에서 관찰되는 이식유전자 발현 수준은 플라스미드 DNA-양이온성 리포솜 복합체(리포플렉스) 또는 나출형 DNA를 사용하여 달성될 수 있는 수준 보다 우수하다.

[0008] 그러나, 당업계에서는 핵산, 예를 들면 siRNA를 세포에 도입시키는 신규하고 더욱 유효한 방법 및 조성물이 여전히 강하게 요구되고 있다. 본 발명은 이러한 요구 및 다른 요구들을 충족시킨다.

발명의 상세한 설명

[0009] 발명의 개요

[0010] 본 발명은 하나 이상의 siRNA 분자를 캡슐화하기에 유용한 안정한 핵산-지질 입자(SNALP), siRNA를 포함하는 SNALP 제조 방법, siRNA를 포함하는 SNALP 및 표적 유전자 서열의 발현을 침묵시키기 위해 SNALP를 피검체에 전달하고/하거나 투여하는 방법을 제공한다.

[0011] 한 실시양태에서, 본 발명은 양이온성 지질, 비양이온성 지질, 입자의 응집을 억제하는 컨쥬게이션된 지질(conjugated lipid) 및 siRNA를 포함하는 핵산-지질 입자를 제공한다. 일부 실시양태에서, siRNA 분자는, 핵산-지질 입자 중의 핵산이 수용액 중에서 뉴클레아제에 의한 분해에 저항하도록 핵산-지질 입자의 지질 이중층 내에 완전히 캡슐화된다. 핵산 입자는 포유류에 실질적으로 비독성이다. siRNA 분자는 약 15 내지 약 60 개의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. siRNA 분자는 길이가 약 25 개의 뉴클레오티드를 초과하는 이중 가닥 RNA로부터 유래될 수 있다. 일부 실시양태에서, siRNA는 플라스미드, 특히 표적 서열의 DNA 주형을 포함하는 플라스미드로부터 전사된다.

[0012] 양이온성 지질은 N,N-디올레일-N,N-디메틸암모늄 클로라이드(DODAC), N,N-디스테아릴-N,N-디메틸암모늄 브로마이드(DDAB), N-(1-(2,3-디올레오일옥시)프로필)-N,N,N-트리메틸암모늄 클로라이드(DOTAP), N-(1-(2,3-디올레오일옥시)프로필)-N,N,N-트리메틸암모늄 클로라이드(DOTMA) 및 N,N-디메틸-2,3-디올레오일옥시)프로필아민(DODMA) 및 그들의 혼합물 중 하나 이상일 수 있다. 비양이온성 지질은 디올레오일포스파티딜에탄올아민(DOPE), 팔미토일 올레오일포스파티딜콜린(POPC), 에그 포스파티딜콜린(EPC), 디스테아로일포스파티딜콜린(DSPC), 콜레스테롤 및 그들의 조합물 중 하나 이상일 수 있다.

[0013] 입자의 응집을 억제하는 컨쥬게이션된 지질은 폴리(에틸렌글리콜)(PEG)-지질 컨쥬게이트(conjugate), 폴리(아미드)(ATTA)-지질 컨쥬게이트 및 그들의 조합물 중 하나 이상일 수 있다. PEG-지질 컨쥬게이트는 PEG-디알킬옥시프

로필(DAA), PEG-디아실글리세롤(DAG), PEG-인지질, PEG-세라미드 및 그들의 조합물 중 하나 이상일 수 있다. PEG-DAG 컨쥬게이트는 PEG-디라우로일글리세롤(C₁₂), PEG-디미리스토일글리세롤(C₁₄), PEG-디팔미토일글리세롤(C₁₆), 및 PEG-디스테아로일글리세롤(C₁₈) 및 그들의 조합물 중 하나 이상일 수 있다. PEG-DAA 컨쥬게이트는 PEG-디라우릴옥시프로필(C₁₂), PEG-디미리스틸옥시프로필(C₁₄), PEG-디팔미틸옥시프로필(C₁₆) 및 PEG-디스테아릴옥시프로필(C₁₈) 및 그들의 조합물 중 하나 이상일 수 있다. 핵산-지질 입자는 양이온성 중합체 지질을 추가로 포함할 수 있다.

[0014] 일부 실시양태에서, 입자는, 간접 RNA를 캡슐화한 리포솜을 실질적으로 즉시 생성하기 위해 제 1 저장소 중의 수용액 및 제 2 저장소 중의 유기 지질 용액을 제공하고, 수용액을 유기 지질 용액과 혼합함으로써 제조된다. 일부 실시양태에서, 입자는 세제 기재 또는 유기 용매 기재 시스템 중에서 소수성 중간체 복합체를 형성한 후, 세제 또는 유기 용매를 제거함으로써 제조된다. 바람직한 실시양태는 전하-중성화된 것들이다.

[0015] 한 실시양태에서, 간접 RNA를 플라스미드로부터 전사시키고, 이 플라스미드를 세제 용액 중에서 양이온성 지질과 함께 코팅된 핵산-지질 복합체를 제공한다. 그 다음, 복합체를 비양이온성 지질과 접촉시켜 세제, 핵산-지질 복합체 및 비양이온성 지질의 용액을 제공한 다음, 세제를 제거하여 혈청-안정성 핵산-지질 입자의 용액을 제공하며, 여기서 상기 간접 RNA 주형을 포함하는 플라스미드는 지질 이중층에 캡슐화된다. 이렇게 하여 형성된 입자는 약 50-150 nm의 크기를 갖는다.

[0016] 또 다른 실시양태에서, 혈청-안정성 핵산-지질 입자는 유기 용매 중의 양이온성 지질 및 비양이온성 지질의 혼합물을 제조하고, 간접 RNA를 포함하는 핵산의 수용액을 양이온성 및 비양이온성 지질의 혼합물과 접촉시켜 투명한 단일상을 제공하고, 유기 용매를 제거하여 핵산-지질 입자의 현탁액을 제공함으로써 형성되며, 여기서 상기 핵산은 지질 이중층에 캡슐화되고, 입자는 혈청에서 안정하고, 약 50-150 nm의 크기를 갖는다.

[0017] 본 발명의 핵산-지질 입자는 siRNA 서열을 포함하는 핵산의 치료적 전달에 유용하다. 특히, 본 발명의 목적은 표적 핵산 서열의 번역을 하향조절하거나 침묵시킴으로써 포유류의 질환을 치료하는 시험관내 및 생체내 방법을 제공하는 것이다. 이들 방법에서, siRNA 분자를 핵산-지질 입자로 포몰레이션화하고, 입자를 이러한 치료를 필요로 하는 환자(예를 들면, 표적 핵산 서열을 포함하는 유전자의 발현 또는 과발현과 관련된 질환 또는 장애로 진단받은 환자)에 투여한다. 별법으로, 세포를 환자로부터 분리하고, siRNA를 시험관내 전달하고, 세포를 환자에게 재주입시킨다. 한 실시양태에서, 본 발명은 세포를, 양이온성 지질, 비 양이온성 지질, 응집을 억제하는 컨쥬게이션된 지질 및 siRNA를 포함하는 핵산-지질 입자와 접촉시킴으로써 siRNA 분자를 세포에 도입시키는 방법을 제공한다.

[0018] 핵산-지질 입자는 예를 들면, 정맥내, 비경구 또는 복막내 투여될 수 있다. 한 실시양태에서, 핵산-지질 입자의 총 투여량의 약 10 % 이상이 주사 후 약 24, 36, 48, 60, 72, 84, 또는 96 시간 내에 혈장에 존재한다. 다른 실시양태에서, 핵산-지질 입자의 총 주입량의 20 %, 30 %, 40 % 초과 및 60 %, 70 % 또는 80 %가 주사 후 24, 36, 48, 60, 72, 84, 또는 96 시간 내에 혈장에 존재한다. 한 실시양태에서, 표적 조직(즉, 폐, 간, 종양 또는 염증 부위)의 세포 중 siRNA의 존재는 투여 후 24, 48, 72 및 96 시간 내에 검출가능하다. 한 실시양태에서, 표적 서열의 발현의 하향조절은 투여 후 24, 48, 72 및 96 시간 내에 검출가능하다. 한 실시양태에서, 표적 서열의 발현의 하향조절은 종양 세포 또는 염증 부위 세포에서 우선적으로 발생한다. 한 실시양태에서, 투여 부위에 대해 원위에 있는 부위에서의 세포내 siRNA의 존재는 핵산-지질 입자의 정맥내 주사한 지 적어도 4일 후에 검출가능하다. 또 다른 실시양태에서, 표적 조직(즉, 폐, 간, 종양 또는 염증 부위)의 세포내 siRNA의 존재는 핵산-지질 입자를 주사한 지 적어도 4일 후에 검출가능하다.

[0019] 입자는 순환에 안정하며, 이의 약역학적 거동이 혈관외 부위 및 표적 세포 집단에 접근하게 하는데 필요한 크기를 지니므로 정맥내 핵산 전달에 사용하기에 적합하다. 또한, 본 발명은 핵산-지질 입자를 포함하는 약제학적으로 허용되는 조성물을 제공한다.

[0020] 본 발명의 또 다른 실시양태는 siRNA의 생체내 전달 방법을 제공한다. 양이온성 지질, 비양이온성 지질, 입자의 응집을 억제하는 컨쥬게이션된 지질 및 siRNA를 포함하는 핵산-지질 입자를 피검체(예를 들면, 포유류, 예를 들면 인간)에 투여한다(예를 들면, 정맥내, 피하, 복막내, 또는 피부밑). 일부 실시양태에서, 본 발명은 간접 RNA를 포유류 피검체의 간에 생체내 전달하는 방법을 제공한다.

[0021] 본 발명의 추가의 실시양태는 포유류 피검체의 질환 또는 장애 치료 방법을 제공한다. 양이온성 지질, 비양이온성 지질, 입자의 응집을 억제하는 컨쥬게이션된 지질 및 siRNA를 포함하는 치료적으로 유효한 양의 핵산-지질

입자를 질환 또는 장애를 갖는 포유류 피검체(예를 들면, 설치류, 예를 들면 마우스, 영장류, 예를 들면 인간 또는 원숭이)에 투여한다. 일부 실시양태에서, 상기 질환 또는 장애는 유전자의 발현 및/또는 과발현과 관련되고, 유전자의 발현 또는 과발현은 siRNA에 의해 침묵된다. 일부 실시양태에서, 질환은 바이러스 질환, 예를 들면 간염(예를 들면, A형 간염, B형 간염, C형 간염, D형 간염, E형 간염, G형 간염 또는 그들의 조합)이다. 일부 실시양태에서, 질환 또는 장애는 간 질환 또는 장애, 예를 들면, 이상지혈증이다.

실시예

실시예 1. siRNA를 캡슐화한 SNALP 포물레이션

본 실시예는 단쇄 또는 장쇄 PEG-DAG로 포물레이션화되고, 혼합 유기 지질 및 수성 완충제 용액을 연속적으로 혼합하여 생성된 SNALP에 siRNA를 캡슐화하는 것을 보여준다. 사용된 PEG-DAG 지질은 PEG-디미리스틸글리세롤(C_{14})(PEG-DMG) 및 PEG-디스테아릴 글리세롤(C_{18})(PEG-DSG)이었다. 이 방법에 의해 DSPC:콜레스테롤:DODMA:PEG-DMG/PEG-DSG SNALP에 캡슐화된 항- β -갈락토시다아제(β -gal) siRNA는 $\geq 90\%$ 캡슐화(리보그린 어세이(Ribogreen Assay)) 및 ~ 120 nm 입자 크기(말번 사이저(Malvern sizer))를 제공하였다. 제제는 하기 특징을 가졌다.

4 ml 제제: DSPC:Chol:DODMA:PEG-DMG 리포솜 중의 항- β -gal siRNA

초기 혼합 = 94 % 캡슐화

희석 혼합 후 = 98 % 캡슐화

인큐베이션 혼합 후 = 97 % 캡슐화

밤새 투석 후 = 96 % 캡슐화

입자 크기 = 109.7 nm

다분산지수(polydispersity) = 0.14

8 ml 제제: DSPC:Chol:DODMA:PEG-DMG 리포솜 중의 항- β -gal siRNA

희석 & 인큐베이션 혼합 후 = 89 %

밤새 투석 후 = 91 %

입자 크기 = 127.5 nm

다분산지수 = 0.11

8 ml 제제: DSPC:Chol:DODMA:PEG-DSG 리포솜 중의 항- β -gal siRNA

희석 & 인큐베이션 혼합 후 = 90 %

밤새 투석 후 = 90 %

평균-여과 후 = 90 %

입자 크기 = 111.6 nm

다분산지수 = 0.24

실시예 2. siRNA를 캡슐화한 SNALP 포물레이션을 시험관내 전달함에 의한 세포에서 세포내 발현의 하향조절.

본 실시예는 항- β -gal siRNA를 캡슐화하는 DSPC:콜레스테롤:DODMA:PEG-DMG 리포솜이 시험관내 전달된 CT26.CL25 세포에서 항- β -gal 발현의 하향조절을 보여준다. 결과를 도 1에 도시한다.

0.2 μ g의 올리고펙타민-캡슐화 항- β -gal siRNA의 시험관내 전달은 노출되지 않은 대조군 세포에 비해 항- β -gal 활성을 약 60 % 감소시켰다. 1.5 μ g의 항- β -gal siRNA를 DSPC:콜레스테롤:DODMA:PEG-DMG 리포솜에 캡슐화한 결과 노출되지 않은 대조군 세포에 비해 항- β -gal 활성을 약 30 % 감소시켰다.

실시예 3. 혈청 안정성에 대한 분석시험

앞서 언급한 기술에 따라 포물레이션화된 지질/치료적 핵산 입자를 혈청 안정성에 대해 다양한 방법에 의해 분

석시험할 수 있다.

[0275] 예를 들면, 전형적인 DNase 1 분해의 경우, 관심있는 입자에 캡슐화된 1 μg 의 DNA를 총부피 100 μl 의 5 mM HEPES, 150 mM NaCl, 10.0 mM MgCl_2 (pH 7.4)에서 인큐베이션시켰다. DNase 처리된 샘플을 100 또는 10 U의 DNase I(Gibco-BRL)으로 처리하였다. 1.0 % 트리톤 X-100을 대조군 실험에 첨가하여 지질 포플레이션이 효소를 직접 불활성화시키지 않음을 확인할 수 있다. 샘플을 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30 분 동안 인큐베이션한 후, 500 μl 의 DNAzol을 첨가한 후 1.0 mL의 에탄올을 첨가함으로써 DNA를 단리시켰다. 샘플을 탁상용 원심 분리기에서 30 분 동안 15,000 rpm에서 원심분리하였다. 상청액을 따라내고, 생성되는 DNA 펠릿을 80 % 에탄올로 2 회 세척하고, 건조시켰다. 이 DNA를 30 μl 의 TE 완충제에서 재현탁하였다. 20 μl 의 이 샘플을 1.0 % 아가로오스 겔에 충전시키고, TAE 완충제 중에서 전기영동하였다.

[0276] 전형적 혈청 분석시험에서, 자유형(free), 캡슐화, 또는 캡슐화 + 0.5 % 트리톤 X100의 50 μg 의 DNA를 1.5 mL 에펜드로프 튜브로 분취하였다. 이 튜브들에 45 μl 정상 무린 또는 인간 혈청, dH_2O (최종 부피 50 μl 로 만듦)를 첨가하였다. 튜브를 파라필름(parafilm)으로 밀봉하고, 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 인큐베이션하였다. 뉴클레아제(표준)에 의해 분해되지 않은 자유형, 캡슐화, 또는 캡슐화 + 0.5 % 트리톤 X100의 샘플을 에펜드로프 튜브 중의 액체 질소 중에서 동결시키고, -20 $^{\circ}\text{C}$ 에서 저장하였다. 분취액을 다양한 시점(timepoint)에서 취하고, 프로테이나아제 K(133 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 함유하는 GDP 완충제에 첨가하고, 액체 질소 중에서 즉시 동결시켜 반응을 중단시켰다. 모든 시점에서 수집이 완료되면, 샘플을 55 $^{\circ}\text{C}$ 에서 수조에서 인큐베이션시켜 프로테이나아제 K를 활성화시켜 이것이 임의의 잔여 엑소뉴클레아제를 변성시킬 수 있게 하였다. 프로테이나아제 K 분해된 샘플을 폴리아크릴아미드 겔에 가하여 엑소뉴클레아제 분해 수치를 평가하였다.

[0277] 앞서 개시된 입자는 이러한 처리의 결과로, 심지어 100 U DNase 1의 존재 하에서 5 % 미만 및 바람직하게는 검출가능하지 않은 양의 DNA 분해(부분 또는 전체)를 나타냄으로써 혈청 안정성을 나타내었다. 이는 완전히 분해되는 자유형 DNA, 및 처리 후 DNA가 실질적으로(즉, 20 % 초과, 종종 80 %) 분해된 플라스미드/지질 복합체(예를 들면, DOTMA 또는 DODAC:DOPE 복합체)에 비해 유리하다.

[0278] 실시예 4. SNALP의 특성화.

[0279] 본 실시예는 중양 함유 마우스에서 SNALP의 정맥내 투여로부터 기인한 질환 부위 표적화 및 유전자 발현을 설명한다. 이 실시예에서, 캡슐화된 핵산은 플라스미드였다.

[0280] SNALP 방법은 작은(직경 ~70 nm) "안정화된 핵산-지질 입자"(SNALP)내에 플라스미드 DNA를 캡슐화하였다. SNALP는 이중층 안정화 성분, 예를 들면 폴리(에틸렌글리콜)(PEG) 코팅의 존재 하에서 안정화된 지질 이중층 내에 캡슐화된 입자 당 한 플라스미드로 이루어졌다. SNALP는 정맥내 투여 후 연장된 순환 수명을 나타내고, 본연 그대로의 플라스미드의 원위 중양 부위로의 전달을 촉진하여 질환 부위에서 리포터 유전자를 발현시켰다.

[0281] 중양 1 그램 당 총 주입량의 5 내지 10 % 또는 세포 당 1000 카피 초과 플라스미드 DNA에 대응하는 수준으로 축적된 긴 순환 시간을 갖는 SNALP는 임의의 다른 조직에서 관찰된 것들보다 두 배 큰 유전자 발현 수준을 제공하였다. 흥미롭게도, 비록 간은 총 주입량 중 20-30 %를 축적하였지만, 매우 낮은 양의 유전자 발현이 간에서 발견되었다. 이는 PEG화(PEG-ylated) SNALP의 제한된 간세포 흡수로 인한 것으로 생각된다. 도 7-9 참조.

[0282] 이중층 안정화 성분을 함유하는 핵산-지질 입자의 생체내 전달 및 형질감염 잠재성을 DSPE 앵커, PEG₃₄₀₀ 스페이서 쇠 및 양이온성 머리 부분으로 이루어진 양이온성 PEG 지질(CPL)의 혼입을 통해 추가로 향상시켰다. CPL이 SNALP로 2 내지 4 몰%의 농도에서 혼입되는 경우, 생성되는 CPL-SNALP는 고유 SNALP와 유사한 크기 및 안정성을 갖는다. CPL의 혼입은 세포내 전달을 극적으로 증가시키고, 시험관내 및 생체내 양쪽 모두에서 측정된 형질감염 활성에서 부수된 증가를 제공하였다. 구체적으로, CPL-SNALP는 천연 SNALP보다 10^5 배 많은 시험관내 유전자 발현을 제공하였다. CPL-SNALP는 정맥내 투여된 경우, 천연 SNALP에 비해 간 유전자 발현에서 실질적인(250 배) 증가를 제공하였다. CPL-SNALP 효능의 증가는 간에 특이적이다. 폐, 신장, 비장 또는 심장에서 측정된 유전자 발현 수치는 변화가 없었으며, 간 대 다른 기관에서 측정된 유전자 발현에는 10^2 보다 큰 차이를 제공하였다.

[0283] 이 결과들은 PEG-지질 함유 시스템의 전달 특성을 조절하면서 전신 유전자 전달을 달성하는 데 요구되는 안정성 및 작은 균일한 크기를 보유할 수 있음을 나타낸다. 특히 이들은 질환 부위 표적화 및 조직 특이적 유전자 발현이 비바이러스 유전자 전달 체계의 지질 조성을 변화시킴으로써 재프로그램될 수 있다는 것을 보여준다.

- [0284] 실시예 5. PEG-DAG 컨쥬게이트를 함유하는 SNALP
- [0285] 본 실시예는 일련의 PEG-디아실글리세롤 지질(PEG-DAG) SNALP의 제조를 보여준다. 이 실시예에서, 캡슐화된 핵산은 플라스미드였다.
- [0286] 10 몰% PEG-디라우릴글리세롤(C_{12}), PEG-디미리스틸글리세롤(C_{14}), PEG-디팔미토일글리세롤(C_{16}) 또는 PEG-디스테아릴글리세롤(C_{18})을 혼입시킴으로써 PEG-DAG SNALP를 제조하고, 시험관내 형질감염 활성화, 약동학 및 종양 함유 마우스에서 전신 투여로 인한 유전자 발현의 생체분포에 대해 평가하였다. SNALP를 함유하는 PEG-DAG 지질은 PEG-세라미드를 함유하는 것과 아실 쇠 길이 및 시험관내 형질감염 활성화 간의 유사한 관계를 나타내었다. 짧은 아실 쇠 앵커(디미리스틸(C_{14}) 및 디팔미토일(C_{16}))는 덜 안정하지만 긴 아실 쇠 앵커(디스테아릴(C_{18}))를 혼입시킨 경우보다 높은 시험관내 형질감염 활성을 갖는 SNALP 입자를 제공하였다. PEG-DAG를 함유하는 SNALP의 약동학 평가는 PEG 지질 성분의 안정성과 SNALP의 순환 수명과 상관성을 확인시켰다. PEG-디미리스틸글리세롤(C_{14}), PEG-디팔미토일글리세롤(C_{16}) 및 PEG-디스테아릴글리세롤(C_{18})을 함유하는 SNALP는 각각 0.75, 7 및 15 시간의 순환 반감기를 나타내었다. 이에 따라, 연장된 순환 수명은 종양 전달 증가 및 부수된 유전자 발현과 상관되어 있다.
- [0287] 정맥내 투여시, PEG-디스테아릴글리세롤(C_{18}) 함유 SNALP는 폐를 비롯한 소위 '최초 통과' 기관을 우회하고, 원위 종양 조직에서 유전자 발현을 일으켰다. 종양에서 관찰되는 리포터 유전자 발현 수치는 임의의 다른 조직에서 관찰되는 것과 100 내지 1000배 차이 났다. 이는 PEG-세라미드 C_{20} 을 함유하는 SNALP의 거동과 잘 비교되었다. PEG-DAG를 SNALP에 혼입하여, 작은 크기, 낮은 표면 전하 및 연장된 순환 수명이, 비바이러스 형질감염 시스템의 전신 투여 후 종양에서 유전자 발현 및 플라스미드 DNA의 축적을 일으키는 수동 질환 부위 표적화에 필수불가결한 것임을 확인하였다. 도 3-9 참조.
- [0288] 물질 및 방법
- [0289] 물질
- [0290] DOPE 및 DSPC를 노던 리피즈(Northern Lipids)(Vancouver, BC)로부터 입수하였다. DODAC 및 PEG-디아실글리세롤을 Inex Pharmaceuticals(Burnaby, BC)에 의해 제조하였다. 다른 물질들, HEPES, OGP 및 ^3H -콜레스테릴 헥사데실 에테르를 다수의 상이한 상업적 공급처로부터 입수하였다.
- [0291] DOPE:DODAC:PEG-디아실글리세롤(82.5:7.5:10) 대형 유니라멜라(unilamellar) 소포를 Hepes 완충 식염수(150 mM NaCl 및 10 mM HEPES) 중에서 48 시간 동안 세제 투석을 통해 제조하였다. 지질 저장 용액을 에탄올 중에서 제조한 다음, 건조시켜 최종 200 mM OGP에서 재구성되는 지질 필름을 생성하였다. LUV를 1 uCi/1 mg 지질에서 ^3H -콜레스테릴 헥사데실 에테르로 표지화하였다. 입도를 nicomp 분석에 의해 결정하였다. 방사능을 Picofluor20을 사용하여 섬광 계수에 의해 결정하였다.
- [0292] PEG-디아실글리세롤을 함유하는 SNALP를 염 농도를 변화시켜 DNA 캡슐화 %를 최대화시킴으로써 세제 투석에 의해 포몰레이션화하였다. 48 시간 세제 투석에 대한 최적 염 농도를 선택하였다. 빈 소포를 1 단계 슈크로오스 원심분리에 의해 제거하였다. 5.0 % 슈크로오스를 사용하는 PEG-디미리스틸글리세롤 함유 SNALP를 제외한 플라스미드 함유 PEG-디아실글리세롤 포몰레이션으로부터 빈 입자를 분리시키는 데 3.5 % 슈크로오스를 사용하였다. 빈 소포를 튜브 상부로 이동시키고, 튜브를 분별하여 제거하였다.
- [0293] 시험관내 형질감염
- [0294] 5×10^4 개의 세포/ml를 24-웰 플레이트(1 ml)에 플레이팅하였다. 세포를 24 시간 동안 성장시켰다. 500 μl 의 형질감염 배지(2.5 μg /웰)를 첨가한 다음, 정해진 시점에 대해 인큐베이션하였다. 상기 시점 후 형질감염 배지를 흡입시킨 다음, 또 다른 24 시간 동안 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5.0 % CO_2 중에서 완전 배지에 노출시켰다. 완전 배지를 회수하였다. 세포를 PBS로 2 회 세척하고, 실험일까지 -70 $^{\circ}\text{C}$ 에서 저장하였다. 세포를 프로테아제 억제제를 함유하는 150 μl 의 1 x CCLR로 용해시켰다. 플레이트를 5 분 동안 진탕하였다. 20 μl 의 각각의 샘플을 루시페라제 활성화에 대해 96-웰 발광 플레이트 상에서 2 회 분석시험하였다.
- [0295] 약동학, 생체분포 및 생체내 유전자 발현
- [0296] 약동학 및 생체분포를 모두 존재하는 방사능의 양에 대한 데이터를 표준화함으로써 결정하였다. 심장 천자에

의해 대략 500 μ l의 혈액을 얻었다. 적혈구 및 혈장을 원심분리(4 $^{\circ}$ C, 3000 rpm, 10 분)에 의해 분리시키고, 100 μ l의 혈장을 사용하여 방사능 계수(count)를 결정하였다. 기관을 특정된 시점에서 수거하고, 용해 매트릭스 튜브(Fast Prep, 2 x 15 초, 4.5 강도) 중에서 균질화하여 혼합물의 일부를 분석시험하였다.

[0297] 유전자 발현을 루시페라제 분석시험에 의해 결정하였다. 기관을 수거하고, 균질화시키고, 실험 전체 동안 얼음 위에서 유지시켰다. 용해물을 원심분리하고(10,000 rpm, 5 분), 20 μ l의 상청액을 루시페라제 활성에 대해 96-웰 발광 플레이트 상에서 2 회 분석시험하였다. 결과를 도 6-9에 도시한다.

[0298] 시험관내 유전자 침묵

[0299] 세포를 CMV 프로모터, 및 항루시페라제 siRNA를 함유하는 SNALP의 조절 하에서 PEG-지질 컨주게이트를 포함하고 루시페라제를 엔코딩하는 플라스미드를 함유하는 SPLP로 상기한 방법에 따라 형질감염시켰다. 유전자 발현을 루시페라제 분석시험에 의해 결정하였다. 결과를 도 17에 도시한다.

[0300] 실시예 6. PEG-디알킬옥시프로필 컨주게이트를 포함하는 SPLP에 캡슐화된 핵산의 발현

[0301] 본 실시예는 PEG-디알킬옥시프로필 컨주게이트를 포함하는 SPLP에 캡슐화된 핵산의 발현을 비교하는 실험을 설명한다. 모든 SPLP 포물레이션은 CMV 프로모터(pL055)의 조절 하에서 루시페라제를 엔코딩하는 플라스미드를 포함한다.

군	# 마우스	종양	경로	처리	경로	# 투여	시점	분석시험 ***
A	4	뉴로-2a	SC	PBS	IV	1	48 hrs	체중, 혈액 분석, 루시페라제 활성
B	5	뉴로-2a	SC	SPLP PEG-DSG	IV	1	48 hrs	
C	5	뉴로-2a	SC	SPLP PEG-A-DSA	IV	1	48 hrs	
D	5	뉴로-2a	SC	SPLP PEG-A-DPA	IV	1	48 hrs	
E	5	뉴로-2a	SC	SPLP PEG-A-DMA	IV	1	48 hrs	

[0302]

[0303] 지질(DSPC:CHOL:DODMA:PEG-지질)은 SPLP 중에서 하기 몰비(20:55:15:10)로 존재하였다. 하기 포물레이션을 제조하였다:

[0304] A: 멸균 여과된 PBS, 5 mL.

[0305] B: pL055-SPLP와 PEG-DSG, 0.50 mg/mL에서 2 mL.

[0306] C: pL055-SPLP와 PEG-A-DSA, 0.50 mg/mL에서 2 mL.

[0307] D: pL055-SPLP와 PEG-A-DPA, 0.50 mg/mL에서 2 mL.

[0308] E: pL055-SPLP와 PEG-A-DMA, 0.50 mg/mL에서 2 mL.

[0309]

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

[0310] 1.5×10^6 개의 뉴로2A 세포를 제 0일에 각각의 마우스에 투여하였다. 종양이 적합한 크기로 된 경우(200-400 mm³), 마우스를 무작위화하고, 정맥내(IV) 주사에 의해 SPLP 포물레이션 또는 PBS의 1회 투여량으로 처리하였다. 투여량은 투여일에 측정된 체중 측정값을 기준하였다. SPLP 투여 후 48 시간째에, 마우스를 희생시키고, 그들의 혈액을 수집하고, 종양, 간(반으로 절단), 폐, 비장 및 심장 조직을 수집하고, 중량을 재고, 즉시 동결시키고, 추가의 분석시까지 -80 $^{\circ}$ C에서 저장하였다.

[0311] 발현된 루시페라제 리포터 단백질의 효소 활성에 대해 분석시험함으로써 수집된 조직에서 유전자 발현을 결정하였다. 결과를 도 11 및 12에 도시한다.

[0312] 결과는 PEG-디알킬옥시프로필(즉, PEG-DAA)을 포함하는 SPLP가 원위 종양을 PEG-디아실글리세롤을 포함하는 SPLP와 실질적으로 동일한 정도로 형질감염시키는 데 편리하게 사용될 수 있다는 것을 나타낸다. 또한, PEG-디알킬옥시프로필을 함유하는 SPLP로 관측되는 형질감염 수치는 PEG-디아실글리세롤(예를 들면, PEG-DSG)을 함유하는 SPLP에서 관측되는 것들과 유사하다. 또한, PEG-디아실글리세롤 시스템과 유사하게, 매우 적은 형질감염이 비종양 조직에서 발생하였음이 밝혀졌다. 또한, PEG-디알킬옥시프로필을 포함하는 SPLP는 다른 SPLP 포물레이션에 비해 감소된 독성을 나타내었다.

[0313] 실시예 7. PEG-디알킬옥시프로필 컨쥬게이트를 함유하는 SNALP

[0314] 본 실시예는 일련의 PEG-디알킬옥시프로필 지질 SNALP(즉, 캡슐화 siRNA를 함유하는 SPLP)의 생체분포(국소 및 전신) 및 약동학을 분석하는 실험을 설명한다.

[0315] 국소 생체분포

[0316] 뉴로-2a 종양 함유 마우스에서 항-β-갈락토시다아제 siRNA 함유 SNALP의 전신 투여로부터 SPLP의 국소 분포의 형광 현미경을 통한 측정.

[0317] A: PBS

[0318] B: 항-β-gal siRNA-로다민-PE 표지된-DSPC:Chol:DODMA:PEG-A-DMA SNALP (1:20:54:15:10)

군	마우스	세포	처리	시점	분석시험
A	2	뉴로2A	PBS	24hr	형광 현미경 사진 촬영
B	5	뉴로2A	항-Bgal siRNA-로다민-PE 표지된-DSPC:Chol:DODMA:PEG-A-DMA	24hr	형광 현미경 사진 촬영

[0320] 1.5×10^6 개의 뉴로2A 세포를 제 0일에 각각의 마우스에 투여하였다. 종양이 적합한 크기로 된 경우(200-400 mm³, 전형적으로 제 9-12일), 마우스를 무작위화하고, 정맥내(IV) 주사에 의해 230 μl의 총 부피로 100 μg siRNA 또는 PBS를 포함하는 SNALP 포물레이션 1 회 투여량으로 처리하였다. 투여량은 투여일에 측정한 체중 측정값을 기준하였다. SPLP 투여 후 24 시간째에, 마우스를 희생시키고, 그들의 혈액을 수집하고, 종양, 간(반으로 절단), 폐, 비장 및 심장 조직을 수집하고, 중량을 재고, 즉시 동결시키고, 추가의 분석시까지 -80 °C에서 저장하였다.

[0321] SNALP의 국소 분포를 형광 현미경에 의해 결정하였다. SNALP의 축적은 예를 들면, 간에서 관측되었으며, 이는 PEG-디알킬옥시프로필을 포함하는 SNALP가 침출할 수 있는, 즉 순환으로부터 나와서 표적 조직 또는 기관으로 돌아갈 수 있다는 것을 보여준다.

[0322] 약동학 및 전신 생체분포

[0323] 본 실시예는 CMV 프로모터(L055) 및 항루시페라제 siRNA를 함유하는 SNALP의 조절 하에서 뉴로2A 종양을 사용하여 피하 접종된 마우스에서 루시페라제를 엔코딩하는 플라스미드를 함유하는 SPLP의 약동학 및 생체분포를 나타낸다.

군	마우스	세포	처리	시점(h)
A	6	뉴로2A	[3-H]CHE-L055-DSPC:Chol:DODMA:PEG-A-DMA	0.25, 1, 4, 8, 24
B	6	뉴로2A	[3-H]CHE-항-luc siRNA-DSPC:Chol:DODMA:PEG-A-DMA	0.25, 1, 4, 8, 24
C	6	뉴로2A	[3-H]CHE-L055 -DSPC:Chol:DODMA:PEG-C-DMA	0.25, 1, 4, 8, 24
D	6	뉴로2A	[3-H]CHE-L055-pSPLP (PEI)	0.25, 1, 4, 8, 24
E	6	뉴로2A	[3-H] CHE-L055-DSPC:Chol:DODMA:PEG-DSG	0.25, 1, 4, 8, 24

[0325] 모든 샘플에 0.5 mg/ml 핵산을 제공하였다. 하기 SPLP 및 SNALP 포물레이션을 제조하였다:

[0326] A. [³H] CHE-L055-DSPC:Chol:DODMA:PEG-A-DMA(20:55:15:10)

[0327] B. [³H] CHE-항-luc siRNA-DSPC:Chol:DODMA:PEG-A-DMA(20:55:15:10)

[0328] C. [³H] CHE-L055-DSPC:Chol:DODMA:PEG-C-DMA(20:55:15:10)

[0329] D. [³H] CHE-L055-pSPLP(PEI)(즉, 예비축합된 SPLP)

[0330] E. [³H] CHE-L055-DSPC:Chol:DODMA:PEG-DSG(20:55:15:10)

군	# 마우스	접종일	처리	주사일	수집일
A	6	제 0일	[3-H]CHE-L055-DSPC:Chol:DODMA:PEG-A-DMA A	제 12일	7월 31일
B	6	제 0일	[3-H]CHE-항-luc siRNA-DSPC:Chol:DODMA:PEG-A-DMA	제 12일	7월 31일
C	6	제 0일	[3-H]CHE-L055-DSPC:Chol:DODMA:PEG-C-DMA A	제 13일	제 14일
D	6	제 0일	[3-H]CHE-L055-pSPLP (PEI)	제 13일	제 14일
E	6	제 0일	[3-H]CHE-L055-DSPC:Chol:DODMA:PEG-DSG	제 14일	제 15일

[0332] 30 마리의 수컷 A/J 마우스(Jackson Laboratories)를 제 0일에 50 μ l 포스포이트 완충 식염수의 총 부피에서 1.5×10^6 개의 세포의 투여량으로 뉴로 2A 세포로 피하 접종하였다. 종양이 적합한 크기에 도달한 후(전형적으로 제 9일 이후), 상기한 200 μ l(100 μ g 핵산)의 SPLP 또는 SNALP 제제를 정맥내 투여하였다. SPLP 또는 SNALP의 투여 후 0.25, 1, 2, 4, 및 8 시간 후에, 마우스의 중량을 재고, 혈액(전형적으로 25 μ l)을 테일 닉(tail nick)에 의해 수집하였다. SPLP 또는 SNALP 투여 후 24 시간째에, 마우스를 희생시키고, 혈액을 수집하고, [³H]CHE의 제거율에 대해 분석시험하였다. 기관(예를 들면, 간, 폐, 비장, 신장, 심장) 및 종양을 수집하고, [³H] CHE 축적에 대해 평가하였다. 결과를 도 13-16에 도시한다.

[0333] 모든 포물레이션에 대해, 6 시간 후에 잔류하는 50 %의 주사 투여량을 사용할 때 PEG-DSG를 함유하는 SPLP가 순환에 가장 오래 잔류하였다. 흥미롭게도, 임의의 다른 포물레이션에서는 관측되지 않는 첫 15 분 내의 pSPLP의 초기의 빠른 제거율이 나타났다. 1 시간 후 pSPLP의 제거율 프로파일은 SPLP와 상당히 유사하였다. pSPLP 샘플에 대한 이러한 초기의 빠른 제거율은 실제 두 타입의 입자가 존재하고, 하나는 매우 신속하게 제거되고 다른 하나는 SPLP와 매우 유사하게 거동한다는 것을 시사할 수 있다.

[0334] C14 PEG-A-DMA로 포물레이션화된 항-luc siRNA 함유 소포(SNALP)는 혈액으로부터 C18 PEG-DSG를 함유하는 SPLP보다 빠른 제거율을 나타내었다. 그러나, 이 SNALP 포물레이션은 동일한 PEG 지질로 포물레이션화된 SPLP보다 상당히 느린 혈액 제거율을 나타내었다. 이 결과에 대한 가능한 이유는 siRNA 함유 입자가 플라스미드 함유 SPLP보다 용이하게 세포 면역 시스템을 피할 수 있기 때문일 수 있다.

[0335] PEG-C-DMA를 포함하는 SPLP는 혈액으로부터의 빠른 제거율을 나타냈으며, 이는 PEG-A-DMA를 포함하는 SPLP에 대해 관찰되는 것과 실질적으로 동일하였다. 이들 포물레이션 양쪽 모두의 경우, 혈장 반감기는 C18 PEG-지질을 함유하는 SPLP보다 낮은 거의 2 h였다.

[0336] PEG-DSG를 함유하는 SPLP는 조직 그램 당 10.9 % 주사 투여량에서 가장 높은 종양 축적을 가졌다. C14 PEG-지질, PEG-A-DMA 및 PEG-C-DMA를 함유하는 두 SPLP 포물레이션은 조직 그램 당 6.1 % 및 5.9 % 주사 투여량의 훨씬 낮은 종양 축적을 가졌다. siRNA SNALP는 7.3 %에서, 동일한 PEG-지질을 갖는 SPLP 샘플보다 약간 많은 종양 축적을 가졌으며, 이는 이 SNALP에 대한 혈장 반감기와도 비교적 우수하게 상관되었다. pSPLP 포물레이션은 동등한 PEG-DSG SPLP보다 낮은 7.5 %에서의 종양 축적을 가졌다.

[0337] 심장 및 폐에서 PEG-DSG를 함유하는 SPLP 및 pSPLP의 축적은 다른 SPLP 및 SNALP보다 높고, C18 PEG-지질을 갖는 입자의 증가된 순환 반감기와 연관되었다. 시험된 모든 샘플에 대해 간에서의 축적과 혈장 반감기는 역의 관계인 반면, 비장에서의 샘플 축적에 대해서는 어떠한 뚜렷한 경향이 없는 것은 놀라운 일이 아니었다. 신장에서의 축적은 시험된 모든 포물레이션의 경우 매우 낮았으며, 축적은 조직 그램 당 1.2 내지 2.4 % 주사 투여량이었다.

[0338] 실시예 8: SNALPS를 사용한 유전자의 침묵 발현

[0339] 본 실시예는 뉴로 2A종양 함유 마우스에서 CMV 프로모터, 및 항루시페라제 siRNA를 함유하는 SNALP의 조절 하에서 루시페라제를 엔코딩하는 플라스미드를 함유하는 SPLP의 공투여 후 유전자의 침묵 발현을 나타낸다.

[0340]

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

[0341]

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

[0342]

36 마리의 수컷 A/J 마우스(Jackson Laboratories)를 제 0일에 50 μ l 포스페이트 완충 식염수의 총 부피에서 1.5×10^6 개의 세포의 투여량으로 뉴로 2A 세포로 피하 접종하였다. 종양이 적합한 크기에 도달한 후(전형적으로 제 9일 이후), 앞서 실시예 6에 기재한 바와 같이 200-240 μ l PBS, SPLP, 또는 SNALP 포몰레이션(총 100 μ g 핵산)를 정맥내 투여하였다. PBS, SPLP 또는 SPLP 및 SNALP의 혼합물의 투여 후 24, 48, 또는 72 시간째에, 마우스를 희생시키고 및 기관(예를 들면, 간, 폐, 비장, 신장, 심장) 및 종양을 수집하고, 루시페라제 활성에 대해 평가하였다. 결과를 도 18-22에 도시한다.

[0343]

결과는 pL055 SPLP 및 항-luc siRNA SNALP(양쪽 모두 PEG-A-DMA 함유)의 공투여가 단일 iv 투여 후 48 시간째에 루시페라제 유전자 발현을 최대 40 % 감소시킨다는 것을 나타내었다.

[0344]

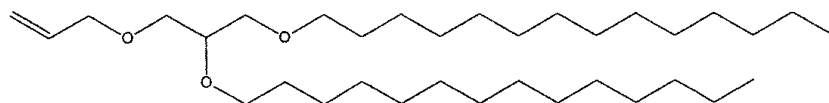
실시예 9. PEG-디알킬옥시프로필(PEG-DAA's)의 합성

[0345]

하기 실시예는 세 PEG-지질, PEG-A-DMA(7), PEG-C-DMA(8) 및 PEG-S-DMA(9)의 합성을 나타낸다. 이들은 공통 전구체, 아민 지질 1,2-디미리스틸옥시프로필아민(5)을 갖는다. 이 지질은 길이가 알킬 쇠 14 탄소 단위(C_{14})를 갖는다. 본 발명에 사용하기 적합한 다른 PEG DAA는 유사한 프로토콜을 사용하여 합성될 수 있다. 예를 들면, PEG-A-DSA 및 PEG-C-DSA는 (5)의 C_{18} 유사체를 사용함으로써 합성될 수 있다. C_{18} 유사체는 가장 최초 단계(화합물(1)의 합성)에서 등몰량의 스테아릴 브로마이드를 미리스틸 브로마이드로 단순히 치환함으로써 합성될 수 있다.

[0346]

1. 1,2-디미리스틸옥시-3-알릴옥시프로판(1)의 제조



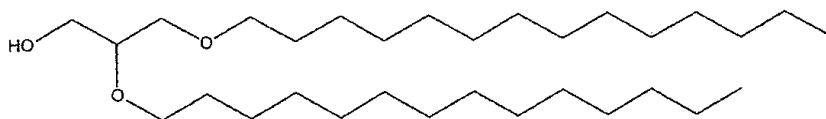
[0347]

[0348]

벤젠(250 ml)을 95 % 수소화나트륨(11.4 g, 450.0 mmol)에 첨가하고, 플라스크를 질소로 플러싱하고, 밀봉하였다. 벤젠(75 ml) 중의 3-알릴옥시-1,2-프로판디올(6.6 g, 50.0 mmol)의 용액을 플라스크에 첨가하였다. 주사기를 사용하여, 97 % 1-브로모테트라데칸(36.7 ml, 120.0 mmol)을 플라스크에 첨가하고, 반응물을 밤새 질소의 일정한 스트림 하에서 환류시켰다. 실온으로 냉각시킨 후, 더 이상 거품이 관찰되지 않을 때까지 과량의 수소화나트륨을 에탄올을 사용하여 천천히 켄칭시켰다. 용액을 분리 깔대기로 벤젠(250 ml)과 함께 옮기고, 증류수로

세척하였다(3 x 200 ml). 유기층을 황산마그네슘으로 건조시키고, 용매를 회전 증발기 상에서 제거하여 무색 오일을 얻었다. TLC(5 % 에테르-헥산, 몰리브데이트 중에서 발색)는 대부분의 출발 물질이 반응하여 생성물을 형성하였음을 시사하였다. 이 생성되는 생성물을 플래쉬 칼럼 크로마토그래피(1-5 % 에테르-헥산)에 의해 추가 정제하여 15.0 g(57.3 %)의 1,2-디미리스틸옥시-3-알틸옥시프로판 1을 얻었다.

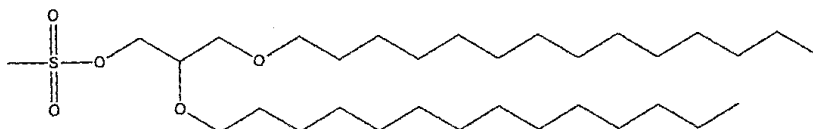
[0349] 2. 1,2-디미리스틸옥시프로판-3-올(2)의 제조



[0350]

[0351] 1,2-디미리스틸옥시-3-알틸옥시프로판 1(15.0 g, 28.6 mmol)을 에탄올(250 ml) 중에 용해시켰다. 트리플루오로아세트산(20 ml)을 첨가한 후, 테트라키스(트리페닐포스핀) 팔라듐(0)(4.5 g, 3.9 mmol)을 첨가하였다. 플라스크를 주석 포일에 랩핑하고, 질소로 플러싱하여 빛 및 공기에 대한 노출을 감소시킨 다음, 80 °C에서 밤새 교반하였다. 에탄올을 회전 증발기 상에서 제거하였다. TLC(100 % CHCl₃, 몰리브데이트 중에서 발색)는 대부분의 출발 물질이 반응하여 생성물을 형성하였음을 시사하였다. 이 생성되는 생성물을 플래쉬 칼럼 크로마토그래피(100 % DCM)에 의해 추가 정제하여 11.5 g(83.1 %) 1,2-디미리스틸옥시프로판-3-올 2를 얻었다.

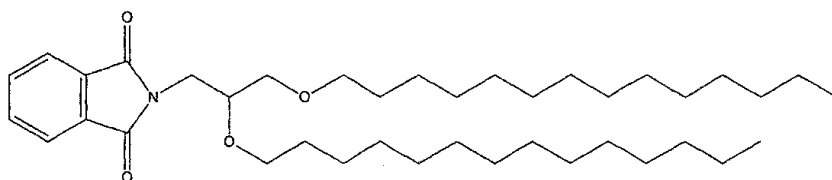
[0352] 3. 0-(2,3-디미리스틸옥시프로필) 메탄술포네이트(3)의 제조



[0353]

[0354] 97 % 메탄술포산 무수물(8.4 g, 48.0 mmol)을 함유하는 플라스크를 질소로 플러싱하고, 무수 디클로로메탄(50 ml) 중에 용해시켰다. 무수 피리딘(3.9 ml, 48.0 mmol)을 천천히 첨가하여 백색 침전물을 형성시켰다. 무수 디클로로메탄(100 ml) 중의 1,2-디미리스틸옥시프로판-3-올 15(11.5 g, 24.0 mmol)의 용액을 첨가하고, 반응물을 밤새 실온에서 교반하였다. 용액을 디클로로메탄(100 ml)과 함께 분리 깔대기로 옮기고, 증류수로 세척하였다(3 x 100 ml). 그 다음, 합쳐진 수성 세척물을 디클로로메탄(100 ml)으로 역추출하였다. 합쳐진 유기층을 황산마그네슘을 사용하여 건조시키고, 디클로로메탄을 회전 증발기 상에서 제거하여 무색 오일을 얻었다. TLC(100 % CHCl₃, 몰리브데이트 중에서 발색)는 모든 출발 물질이 반응하여 생성물을 형성하였음을 시사하였다. 이 반응은 11.9 g의 미정제 0-(2,3-디미리스틸옥시프로필) 메탄술포네이트 3을 생성하였다.

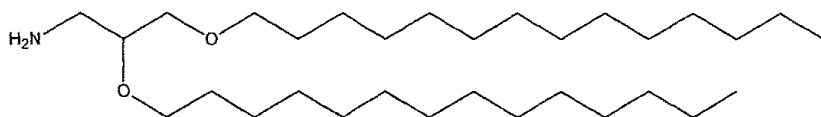
[0355] 4. N-(2,3-디미리스틸옥시프로필) 프탈이미드(4)의 제조



[0356]

[0357] 미정제 0-(2,3-디미리스틸옥시프로필) 메탄술포네이트 3(14.2 g, 25.3 mmol) 및 포타슘 프탈이미드(13.9 g, 75.0 mmol)를 질소로 플러싱하고, 무수 N,N-디메틸포름아미드(250 ml) 중에 용해시켰다. 반응을 70 °C에서 밤새 질소의 일정한 스트림 하에서 교반하였다. N,N-디메틸포름아미드를 통상의 흡입기 대신 고진공 펌프를 사용하여 회전 증발기 상에서 제거하였다. 잔여물을 클로로포름(300 ml) 중에 용해시키고, 클로로포름 세정액(50 ml)과 분리 깔대기로 옮긴 다음, 증류수 및 에탄올(3 x 300 ml 증류수, 50 ml 에탄올)로 세척하였다. 합쳐진 수성 세척물을 클로로포름(2 x 100 ml)으로 역추출하였다. 합쳐진 유기층을 황산마그네슘을 사용하여 건조시키고, 클로로포름을 회전 증발기 상에서 제거하였다. TLC(30 % 에테르-헥산, 몰리브데이트 중에서 발색)는 출발 물질이 반응하여 생성물을 형성하였음을 시사하였다. 이 반응은 13.5 g의 미정제 N-(2,3-디미리스틸옥시프로필) 프탈이미드 4를 생성하였다.

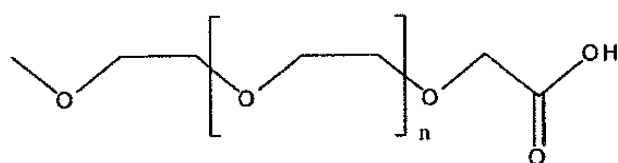
[0358] 5. 1,2-디미리스틸옥시프로필아민(5)의 제조



[0359]

[0360] 미정제 N-(2,3-디미리스틸옥시프로필) 프탈이미드 4(20.0 g, 25.0 mmol)를 에탄올(300 ml) 중에 용해시켰다. 히드라진 일수화물(20 ml, 412.3 mmol)을 첨가하고, 반응물을 밤새 환류시켰다. 에탄올을 회전 증발기 상에서 제거하고, 잔여물을 클로로포름 (200 ml) 중에 재용해시켰다. 침전물을 여과하고, 클로로포름을 회전 증발기 상에서 제거하였다. TLC(10 % MeOH-CHCl₃, 물리브테이트 중에서 발색)는 대부분의 출발 물질이 반응하여 생성물을 형성하였음을 시사하였다. 이 생성되는 생성물을 플래쉬 칼럼 크로마토그래피(0-5 % MeOH-CHCl₃)에 의해 추가 정제하여 10.4 g(1,2-디미리스틸옥시프로판-3-올 2로부터 3 단계에 걸쳐 89.7 %)의 1,2-디미리스틸옥시프로필아민 5를 얻었다.

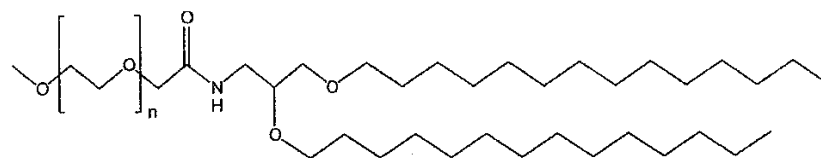
[0361] 6. 메톡시 PEG₂₀₀₀ 아세트산(6)의 제조



[0362]

[0363] 수 중(180 ml) 진한 황산(20 ml)의 10 % 용액을 중크롬산나트륨(3.0 g, 10 mmol)에 첨가하였다. PEG₂₀₀₀ 메틸 에테르(20.0 g, 10 mmol)를 이 밝은 오렌지색 용액에 용해시키고, 반응물을 실온에서 밤새 교반하였다. 그 다음, 생성물을 클로로포름(3 x 250 ml)으로 추출하여 수층이 어두운 푸른 색상이 되었다. 클로로포름 용매를 회전 증발기 상에서 제거하여 연한 푸른색 왁스를 생성하였다. TLC(13 % MeOH-CHCl₃, 요오드 중에서 발색)는 대부분의 출발 물질이 반응하여 생성물을 형성하였음을 시사하였다. 그 다음, 이 미정제 물질을 플래쉬 칼럼 크로마토그래피(0-15 % MeOH-CHCl₃)에 의해 추가 정제하였다. 그 다음, 생성되는 생성물을 에테르 중에서 결정화하여 5.6 g(27.1 %)의 메톡시 PEG₂₀₀₀ 아세트산 6을 백색 고형물로 얻었다.

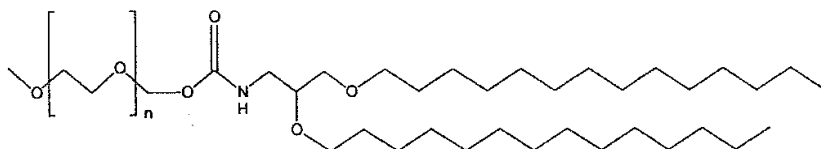
[0364] 7. N-(2,3-디미리스틸옥시프로필) 아마이드 PEG₂₀₀₀ 메틸 에테르(7)의 제조



[0365]

[0366] N-(2,3-디미리스틸옥시프로필) 아마이드 PEG₂₀₀₀-메틸 에테르(즉, PEG-A-DMA)의 제조를 위해서, 메톡시 PEG₂₀₀₀-아세트산 6(3.4 g, 1.7 mmol)을 벤젠(40 ml) 중에 용해시키고, 질소로 플라싱하였다. 옥살릴 클로라이드(1.7 ml, 2.5 g, 20 mmol)를 수바실(subaseal)을 통해 바늘 및 주사기에 의해 천천히 첨가하였다. 이 반응물을 2 시간 동안 교반한 다음, 벤젠 용매를 회전 증발기 상에서 제거하였다. 2,3-미리스틸일옥시프로필아민 5(0.87 g, 1.8 mmol)를 플라스크에 첨가한 후, 무수 디클로로메탄(40ml) 및 트리에틸아민(1.5 ml, 10 mmol)을 첨가하였다. 반응물을 48 시간 동안 교반하였다. 증류수(250 ml)를 첨가하고, 용액을 염산(1.5 ml)으로 산화시키고, 진탕시키고, 유기층을 수집하였다. 수층으로부터 생성물을 클로로포름(2 x 65 ml)을 사용하여 추출하였다. 합쳐진 유기층을 황산마그네슘으로 건조시켰다. 클로로포름을 회전 증발기 상에서 제거하여 황색 고형물을 얻었다. TLC(10 % MeOH-CHCl₃, 황산구리 및 요오드 중에서 발색)는 대부분의 출발 물질이 반응하여 생성물을 형성하였음을 시사하였다. 이 미정제 물질을 플래쉬 칼럼 크로마토그래피(0-7 % MeOH-CHCl₃)에 의해 추가 정제하였다. 그 다음, 활성탄(2 g) 및 에탄올(100 ml)을 첨가하고 혼합물을 55 °C에서 회전 증발기 상에서 30 분 동안 회전시킴으로써 탈색시켰다. 활성탄을 여과하고, 에탄올을 회전 증발기 상에서 제거하였다. 생성물을 동결건조시켜 1.7 g(38.1 %)의 N-(2,3-디미리스틸옥시프로필) 아마이드 PEG₂₀₀₀-메틸 에테르 7을 솜털같은 백색 분말로 얻었다.

[0367] 8. N-(2,3-디미리스틸옥시프로필) 카르바메이트 PEG₂₀₀₀ 메틸 에테르(8)의 제조



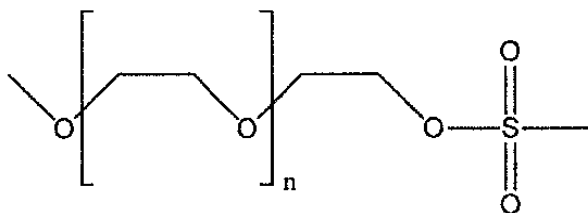
[0368]

[0369] N-(2,3-디미리스틸옥시프로필) 카르바메이트 PEG₂₀₀₀ 메틸 에테르(즉, PEG-C-DMA)의 제조를 위해서, 상기 단계 1-5를 따랐다. 그 다음, PEG₂₀₀₀-메틸 에테르(2.0 g, 1.0 mmol)를 질소로 플러싱하고, 무수 디클로로메탄(15 ml) 중에 용해시켰다. 디포스젠(300 μ l, 2.5 mmol)을 첨가하고, 반응물을 실온에서 3 시간 동안 교반하였다. 디클로로메탄을 회전 증발기 상에서 제거하고, 임의의 잔여 디포스젠을 고진공 펌프를 사용하여 제거하였다. 플라스크를 질소로 플러싱하고, 2,3-디미리스틸옥시프로필아민 5(0.7 g, 1.5 mmol)를 첨가하였다. 이를 무수 디클로로메탄(15 ml) 중에 용해시키고, 트리에틸아민을 첨가하고(280 μ l), 반응물을 실온에서 밤새 교반하였다. 용액을 디클로로메탄(5 ml)과 분리 깔대기로 옮기고, 증류수로 세척하였다(2 x 20 ml). 유기층을 황산마그네슘으로 건조시키고, 디클로로메탄을 회전 증발기 상에서 제거하였다. TLC(3 % MeOH-CHCl₃, 몰리브데이트 및 요오드 중에서 발색)는 대부분의 출발 물질이 반응하여 생성물을 형성하였음을 시사하였다. 이 생성되는 생성물을 플래쉬 칼럼 크로마토그래피(1.5-10 % MeOH-CHCl₃)에 의해 추가 정제하여 1.2 g(46.5 %)의 N-(2,3-디미리스틸옥시프로필) 카르바메이트 PEG₂₀₀₀ 메틸 에테르 8을 얻었다.

[0370] 9. N-(2,3-디미리스틸옥시프로필) 숙신아미드 PEG₂₀₀₀ 메틸 에테르(13)의 제조

[0371] N-(2,3-디미리스틸옥시프로필) 숙신아미드 PEG₂₀₀₀ 메틸 에테르(13)의 제조를 위해서, 상기 단계 1-5를 따랐다. 나머지 절차는 다음과 같다.

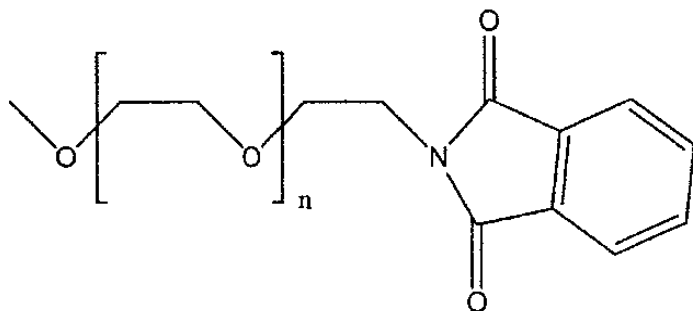
[0372] a. PEG₂₀₀₀ 메실레이트(9)의 제조



[0373]

[0374] 메실 무수물(8.2 g, 47.1 mmol)을 무수 클로로포름(80 ml) 중에 용해시켰다. 피리딘(3.8 ml, 47.0 mmol)을 용액에 첨가하고, 백색 침전물이 형성되는 동안 연무가 관찰되었다. 무수 클로로포름(70 ml) 중의 PEG₂₀₀₀ 메틸 에테르(31.5 g, 15.5 mmol)의 용액을 첨가하고, 반응물을 3 시간 동안 교반하였다. 형성된 백색 침전물을 여과하고, 여액의 클로로포름 용매를 회전 증발기 상에서 제거하였다. TLC(5 % MeOH-CHCl₃, 요오드 중에서 발색)는 대부분의 출발 물질이 반응하여 생성물을 형성하였음을 시사하였다. 이 생성물을 플래쉬 칼럼 크로마토그래피(0-10 % MeOH-CHCl₃)에 의해 추가 정제하여 30.1 g(92.8 %)의 PEG₂₀₀₀ 메실레이트 9를 백색 고형물로 얻었다.

[0375] b. PEG₂₀₀₀ 프탈이미드(10)의 제조

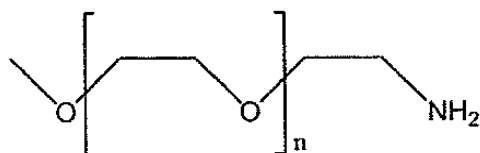


[0376]

[0377] 포타슘 프탈이미드(11.1 g, 59.7 mmol)를 무수 N,N-디메틸포름아미드(400 ml) 중에 용해시켰다. 무수 N,N-디메틸포름아미드(100 ml) 중의 PEG₂₀₀₀ 메실레이트 9(35.0 g, 16.7 mmol)의 용액을 플라스크에 첨가하고, 반응물을 75 °C에서 밤새 교반하였다. N,N-디메틸포름아미드 용매를 통상의 흡입기 대신 고진공 펌프를 사용하여 회전 증발기 상에서 제거하였다. 생성되는 생성물을 디클로로메탄(250 ml) 중에 용해시키고, 증류수(2 x 250 ml) 및 염수(250 ml)로 세척하였다. 합쳐진 유기층의 디클로로메탄 용매를 회전 증발기 상에서 제거하였다. TLC(7 % MeOH-CHCl₃, UV선 및 마리의 시약(Mary's Reagent)을 사용하여 가시화됨)는 대부분의 출발 물질이 반응하여 생성물을 형성하였음을 시사하였다. 이 생성되는 생성물을 플래쉬 칼럼 크로마토그래피(0-10 % MeOH-CH₂Cl₂)에 의해 추가 정제하였다. 생성물을 에테르로부터 결정화하여 19.4 g(54.1 %)의 PEG₂₀₀₀ 프탈이미드 10을 얻었다.

[0378]

c. PEG₂₀₀₀ 아민(11)의 제조

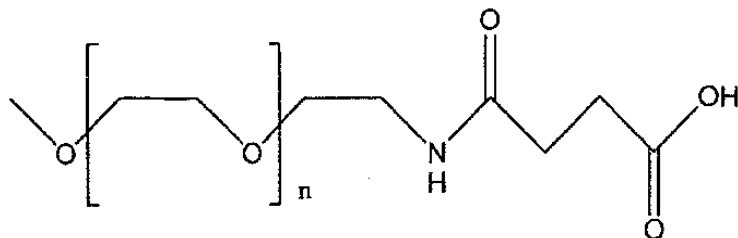


[0379]

[0380] PEG₂₀₀₀ 프탈이미드 10(10.3g, 4.8 mmol)을 에탄올 (200 ml) 중에 용해시켰다. 히드라진 일수화물(6.0 ml, 123.7 mmol)을 천천히 첨가하고, 반응물을 100 °C에서 밤새 환류시켰다. 백색 침전물을 여과하고, 에탄올 용매를 회전 증발기 상에서 제거하였다. 생성되는 생성물을 클로로포름 중에 용해시키고, 클로로포름에 불용성인 잔여 백색 고체를 여과하고, 또 다시 클로로포름을 회전 증발기 상에서 제거하였다. TLC(10 % MeOH-CHCl₃, 요오드, 몰리브데이트 및 마리의 시약 중에서 발색)는 모든 출발 물질이 반응하여 생성물을 형성하였음을 시사하였다. 그 다음, 이 생성물을 에테르로부터 결정화하여 9.0 g(93.0 %)의 PEG-아민 11을 백색 분말로 얻었다.

[0381]

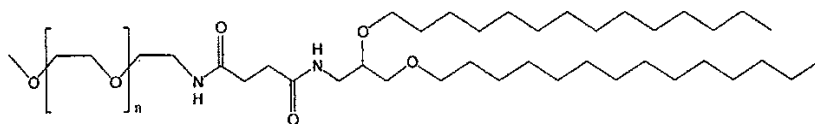
d. PEG₂₀₀₀ 숙신아미드(12)의 제조



[0382]

[0383] PEG₂₀₀₀ 아민 11(9.0 g, 4.4 mmol) 및 숙신산 무수물(3.8 g, 38.1 mmol)을 피리딘(100 ml) 중에 용해시키고, 반응물을 밤새 교반하였다. 피리딘 용매를 60 °C에서 회전 증발기 상에서 제거하였다. 잔여물을 증류수(100 ml) 중에 용해시키고, 염산으로 산성화시키고, 디클로로메탄(100 ml, 2 x 70 ml)으로 추출하고, 황산마그네슘으로 건조시켰다. TLC(10 % MeOH-CHCl₃, 요오드 중에서 발색)는 대부분의 출발 물질이 반응하여 생성물을 형성하였음을 시사하였다. 이 생성물을 플래쉬 칼럼 크로마토그래피(0-10 % MeOH-CHCl₃)에 의해 추가 정제하여 5.2 g(55.9 %)의 PEG₂₀₀₀-숙신아미드 12를 얻었다.

[0384] e. N-(2,3-디미리스틸옥시프로필) 숙신아미드 PEG₂₀₀₀ 메틸 에테르(13)의 제조



[0385]

[0386] PEG₂₀₀₀-숙신아미드(2.0 g, 0.9 mmol) 및 N-히드록시숙신아미드(0.2 g, 2.0 mmol)를 무수 클로로포름(10 ml) 중에 용해시켰다. 그 다음, 무수 클로로포름(5 ml) 중의 1,3-디시클로헥실-카르보디이미드(0.3 g, 1.5 mmol)의 용액을 첨가하고, 반응물을 1 시간 동안 교반하였다. 무수 클로로포름(5 ml) 및 트리에틸아민(0.6 ml, 4 mmol) 중의 1,2-디미리스틸옥시프로필아민 5(0.48 g, 1.0 mmol)의 용액을 첨가하고, 반응물을 1 시간 동안 교반하였다. TLC(12 % MeOH-CHCl₃, 폴리브레이트 중에서 발색)는 대부분의 출발 물질이 반응하여 생성물을 형성하였음을 시사하였다. 용액을 셀라이트를 통해 디클로로메탄을 사용하여 여과시키고, 염산으로 산성화시키고, 증류수(2 x 50 ml) 및 염수(50 ml)로 세척하였다. 수층을 디클로로메탄(50 ml)으로 역추출하고, 합쳐진 유기층을 황산마그네슘 상에서 건조시켰다. 생성물을 플라쉬 칼럼 크로마토그래피(0-7 % MeOH-CHCl₃)에 의해 추가 정제하여 1.8 g(69.0 %)의 N-(2,3-디미리스틸옥시프로필) 숙신아미드 PEG₂₀₀₀-메틸 에테르 13을 얻었다.

[0387] 상기 상세한 설명은 예시를 위한 것이며 제한적인 것이 아님을 이해해야 한다. 당업자는 상기 상세한 설명을 읽은 후 많은 실시양태들이 명확히 이해될 것이다. 따라서, 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명이 아닌 첨부하는 청구범위와 함께 이러한 청구범위에 대해 권리가 부여된 등가물의 전 범위를 기준으로 결정되어야 한다. 특허 출원, 특허 및 PCT 공보를 비롯한 모든 수탁 문헌, 논문 및 참고문헌의 개시내용은 모든 목적을 위해 본 명세서에 참고 문헌으로 인용된다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1은 DSPC:콜레스테롤:DODMA:PEG-DMG 리포솜 중의 캡슐화된 항-β-갈락토시다아제 siRNA의 시험관내 전달을 통한 CT26.CL25 세포에서의 β-갈락토시다아제 발현의 하향조절을 도시한다.

[0023] 도 2는 PEG-디아실글리세롤 및 PEG-세라미드 C₂₀의 구조를 도시한다.

[0024] 도 3은 PEG-DAG를 함유하는 SNALP가 PEG-세라미드 C₂₀을 함유하는 SNALP에 필적함을 보여준 LUV를 사용한 제거율 연구를 도시한다.

[0025] 도 4는 PEG-DAG를 함유하는 SNALP가 세제 투석 방법을 통해 포물레이션화될 수 있음을 도시한다.

[0026] 도 5는 PEG-DAG를 함유하는 SNALP의 약동학적 특성을 도시한다.

[0027] 도 6은 PEG-DAG를 함유하는 SNALP의 생체분포(biodistribution) 특성을 도시한다.

[0028] 도 7은 뉴로(Neuro)-2a 종양 함유 수컷 A/J 마우스에서 PEG-세라미드C₂₀을 함유하는 SPLP 대 PEG-DAG를 함유하는 SPLP의 IV 투여 후 24 시간 췌에 루시페라제 유전자 발현을 도시한다.

[0029] 도 8은 뉴로-2a 종양 함유 수컷 A/J 마우스에서 PEG-세라미드C₂₀을 함유하는 SPLP 대 PEG-DAG를 함유하는 SPLP의 IV 투여 후 48 시간 췌의 루시페라제 유전자 발현을 도시한다.

[0030] 도 9는 뉴로-2a 종양 함유 수컷 A/J 마우스에서 PEG-세라미드C₂₀을 함유하는 SPLP 대 PEG-DAG를 함유하는 SPLP의 IV 투여 후 72 시간 췌의 루시페라제 유전자 발현을 도시한다.

[0031] 도 10은 본 발명에 사용하기 적합한 세 가지 예시적인 PEG-디알킬옥시프로필 유도체, 즉 N-(2,3-디미리스틸옥시프로필) 카르바메이트 PEG₂₀₀₀ 메틸 에테르(즉, PEG-C-DMA), N-(2,3-디미리스틸옥시프로필) 아미드 PEG₂₀₀₀ 메틸 에테르(즉, PEG-A-DMA) 및 N-(2,3-디미리스틸옥시프로필) 숙신아미드 PEG₂₀₀₀-메틸 에테르(즉, PEG-S-DMA)의 구조를 도시한다.

[0032] 도 11은 SPEG-DAA 컨쥬게이트 및 PEG-DAG 컨쥬게이트를 포함하는 SPLP의 정맥내 투여 후 48 시간 췌의 종양에서

루시페라제 유전자 발현을 나타내는 데이터를 도시한다.

- [0033] 도 12는 PEG-DAA 컨쥬게이트 및 PEG-DAG 컨쥬게이트를 포함하는 SPLP의 정맥내 투여 후 간, 폐, 비장, 심장, 및 종양에서 루시페라제 유전자 발현을 나타내는 데이터를 도시한다.
- [0034] 도 13은 PEG-DAA 컨쥬게이트를 포함하고 CMV 프로모터의 조절하에 루시페라제를 엔코딩하는 플라스미드를 함유하는 SPLP 및 PEG-DAA 컨쥬게이트를 포함하고 항루시페라제 siRNA를 함유하는 SNALP의 투여 후 뉴로-2a 종양 함유 수컷 A/J 마우스에서의 제거율 연구로부터의 데이터를 도시한다.
- [0035] 도 14는 뉴로-2a 종양 함유 수컷 A/J 마우스에서 PEG-DAA 컨쥬게이트를 포함하고 CMV 프로모터의 조절하에 루시페라제를 엔코딩하는 플라스미드를 함유하는 SPLP 및 PEG-DAA 컨쥬게이트를 포함하고 항루시페라제 siRNA를 함유하는 SNALP의 약동학적 특성 연구로부터의 데이터를 도시한다.
- [0036] 도 15는 뉴로-2a 종양 함유 수컷 A/J 마우스에서 PEG-DAA 컨쥬게이트 또는 PEG-DAG 컨쥬게이트를 포함하고 CMV 프로모터의 존재하에 루시페라제를 엔코딩하는 플라스미드를 함유하는 SPLP, PEG-DAG 컨쥬게이트를 포함하고 CMV 프로모터의 조절하에 루시페라제를 엔코딩하는 플라스미드를 함유하는 pSPLP 및 PEG-DAA 컨쥬게이트를 포함하고 항루시페라제 siRNA를 함유하는 SNALP의 투여 후 제거율 연구로부터의 데이터를 도시한다.
- [0037] 도 16은 뉴로-2a 종양 함유 수컷 A/J 마우스에서 PEG-DAA 컨쥬게이트 또는 PEG-DAG 컨쥬게이트를 포함하고 CMV 프로모터의 존재하에 루시페라제를 엔코딩하는 플라스미드를 함유하는 SPLP, PEG-DAG 컨쥬게이트를 포함하고 CMV 프로모터의 조절하에 루시페라제를 엔코딩하는 플라스미드를 함유하는 pSPLP 및 PEG-DAA 컨쥬게이트를 포함하고 항루시페라제 siRNA를 함유하는 SNALP의 약동학적 특성 연구로부터의 데이터를 도시한다.
- [0038] 도 17은 PEG-지질 컨쥬게이트를 포함하고 CMV 프로모터의 조절하에 루시페라제를 엔코딩하는 플라스미드를 함유하는 SPLP 및 PEG-지질 컨쥬게이트를 포함하고 항루시페라제 siRNA를 함유하는 SNALP로 처리된 루시페라제 발현 세포에서 루시페라제 발현의 침묵을 나타내는 시험관내 데이터를 도시한다.
- [0039] 도 18은 PEG-DAA 컨쥬게이트를 포함하고 CMV 프로모터의 조절하에 루시페라제를 엔코딩하는 플라스미드를 함유하는 SPLP 및 PEG-DAA 컨쥬게이트를 포함하고 항루시페라제 siRNA를 함유하는 SNALP로 처리된 뉴로-2a 종양 함유 수컷 A/J 마우스에서 루시페라제 발현의 침묵을 나타내는 생체내 데이터를 도시한다.
- [0040] 도 19는 PEG-DAA 컨쥬게이트를 포함하고 CMV 프로모터의 조절하에 루시페라제를 엔코딩하는 플라스미드를 함유하는 SPLP 및 PEG-DAA 컨쥬게이트를 포함하고 항루시페라제 siRNA를 함유하는 SNALP로 처리된 뉴로-2a 종양 함유 수컷 A/J 마우스에서 루시페라제 발현의 침묵을 나타내는 생체내 데이터를 도시한다.
- [0041] 도 20은 PEG-DAA 컨쥬게이트를 포함하고 CMV 프로모터의 조절하에 루시페라제를 엔코딩하는 플라스미드를 함유하는 SPLP 및 PEG-DAA 컨쥬게이트를 포함하고 항루시페라제 siRNA를 함유하는 SNALP로 처리된 뉴로-2a 종양 함유 수컷 A/J 마우스에서 루시페라제 발현의 침묵을 나타내는 생체내 데이터를 도시한다.
- [0042] 도 21은 PEG-DAA 컨쥬게이트를 포함하고 CMV 프로모터의 조절하에 루시페라제를 엔코딩하는 플라스미드를 함유하는 SPLP 및 PEG-DAA 컨쥬게이트를 포함하고 항루시페라제 siRNA를 함유하는 SNALP로 처리된 뉴로-2a 종양 함유 수컷 A/J 마우스에서 루시페라제 발현의 침묵을 나타내는 생체내 데이터를 도시한다.
- [0043] 도 22는 PEG-DAA 컨쥬게이트를 포함하고 CMV 프로모터의 조절하에 루시페라제를 엔코딩하는 플라스미드를 함유하는 SPLP 및 PEG-DAA 컨쥬게이트를 포함하고 항루시페라제 siRNA를 함유하는 SNALP로 처리된 뉴로-2a 종양 함유 수컷 A/J 마우스에서 루시페라제 발현의 침묵을 나타내는 생체내 데이터를 도시한다.
- [0044] 발명의 상세한 설명
- [0045] I. 서론
- [0046] 본 발명은 하나 이상의 siRNA 분자를 캡슐화하기 유용한 안정한 핵산-지질 입자(SNALP), siRNA를 포함하는 SNALP 제조 방법, siRNA를 포함하는 SNALP 및 표적 유전자 서열의 발현을 침묵시키기 위해 SNALP를 피검체에 전달하고/하거나 투여하는 방법을 제공한다.
- [0047] 본 발명은 짧은 간섭 RNA(siRNA) 분자를 SNALP에 캡슐화한 예기치 않은 성공에 기초한다. 본 발명의 방법을 사용하여, siRNA 분자는 70 % 초과, 더욱 통상적으로 80 내지 90 %의 효율로 SNALP에 캡슐화된다. 본 명세서에 기재된 SNALP는 시험관내 및 생체내에서 편리하게 사용되어 표적 유전자를 발현하는 세포로 siRNA 분자 국소적으로 또는 전신적으로 유효하게 전달 투여될 수 있다. SNALP 중의 siRNA 분자는 전달되는 경우 표적 유전자의

발현을 침묵시킨다.

- [0048] 본 명세서에 기재된 SNALP는 전형적으로 < 150 nm 직경을 가지며, siRNA를 표적 조직에 전달하기 위해 연장된 기간 동안 순환에서 본연 그대로의 상태로 유지된다. SNALP는 혈관 구획의 세포 및 다른 성분들과 상호작용하지 않는 매우 안정한 혈청-내성 핵산 함유 입자이다. 또한, SNALP는 원하는 핵산(예를 들면, siRNA 또는 siRNA를 엔코딩하는 플라스미드)의 세포내 전달을 용이하게 하기 위해 질환 부위에서 표적 세포와 용이하게 상호작용한다.
- [0049] II. 정의
- [0050] 용어 "지질"은 지방산의 에스테르를 포함하지만 이에 한정되지 않고, 수 중 불용성이지만 많은 유기 용매 중에는 가용성인 것으로 특성화되는 유기 화합물의 군을 지칭한다. 이들은 통상 하기한 적어도 세 부류로 나뉜다: (1) 지방 및 오일, 뿐만 아니라 왁스를 포함하는 "단순 지질", (2) 인지질 및 당지질을 포함하는 "화합물 지질", (3) "유도 지질 (derived lipid)", 예를 들면 스테로이드.
- [0051] "지질 소포(lipid vesicle)"는 리포솜을 포함하지만 이에 한정되지 않는 화합물을 전달하는 데 사용되는 임의의 지질 조성물을 지칭하며, 여기서 수성 부피는 양친매성 지질 이중층에 의해 캡슐화되거나, 상기 지질은 큰 분자 성분, 예를 들면 간접 RNA 서열을 포함하는 플라스미드를 포함하는 내부를 감소된 수성 내부로 코팅하거나, 또는 캡슐화 성분이 비교적 장애된 지질 혼합물에 함유된 지질 응집체 또는 미셀을 지칭한다.
- [0052] 본 명세서에 사용된 "지질 캡슐화"는 전체 캡슐화되거나, 부분 캡슐화된 또는 양쪽 모두의 화합물을 제공하는 지질 포물레이션화를 지칭할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 핵산은 지질 포물레이션 중에 완전히 캡슐화된다.
- [0053] 본 명세서에 사용된 용어 "SNALP"는 안정한 핵산 지질 입자를 지칭한다. SNALP는 핵산, 예를 들면 간접 RNA 서열 또는 간접 RNA가 전사되는 플라스미드를 포함하는 감소된 수성 내부를 코팅하는 지질의 소포를 나타낸다.
- [0054] 용어 "소포 형성 지질"은 소수성 잔기 및 극성 머리 부분을 갖고 대부분의 인지질에 의해 예시되는 바와 같이 그 자체로 수 중 이중층 소포를 자발적으로 형성할 수 있는 임의의 양친매성 지질을 포함하는 것으로 의도된다.
- [0055] 용어 "소포 채용 지질"은 다른 양친매성 지질과 함께 지질 이중층내로 안정하게 혼입되는 임의의 양친매성 지질을 포함하는 것으로 의도되며, 이의 소수성 잔기는 이중층막의 소수성 영역인 내부와 접촉하고, 이의 극성 머리 부분 잔기는 막의 극성 표면인 외부로 향해 배향되어 있다. 소포 채용 지질은 스스로 비라멜라 상(nonlamellar phase)을 채용하기 쉬우며, 이중층-안정화 성분의 존재 하에서 이중층 구조를 취할 수 있는 지질을 포함한다. 전형적 예로는 DOPE(디올레오일포스파티딜에탄올아민)가 있다. 이중층 안정화 성분들은 SNALP, 폴리아미드 올리고머(예를 들면, ATTA-지질 유도체), 펩티드, 단백질, 세제, 지질-유도체, PEG-지질 유도체, 예를 들면 디알킬옥시프로필에 커플링된 PEG, 디아실글리세롤에 커플링된 PEG, 포스파티딜-에탄올아민에 커플링된 PEG, 및 세라미드에 컨쥬게이션된 PEG(본 명세서에 참고 문헌으로 인용되는 미국 특허 번호 5,885,613 참조)의 응집을 억제하는 컨쥬게이션된 지질을 포함하며 이에 한정되지 않는다.
- [0056] 용어 "양친매성 지질"은 부분적으로, 지질 물질의 소수성 부분이 소수상으로 배향되고, 친수성 부분은 수상을 향해 배향된 임의의 적합한 물질을 지칭한다. 양친매성 지질은 통상 지질 소포의 주성분이다. 친수성 특징은 극성 또는 하전 기, 예를 들면 탄수화물, 포스페이트, 카르복실기, 술파토, 아미노, 술프히드릴, 니트로, 히드록시 및 다른 유사 기들의 존재로부터 유래된다. 소수성은, 장쇄 포화 및 불포화 지방족 탄화수소 기 및 하나 이상의 방향족, 지환족 또는 헤테로시클릭 기(들)에 의해 치환된 기를 포함하며 이에 한정되지 않는 무극성 기를 포함함으로써 부여될 수 있다. 양친매성 화합물의 예는 인지질, 아미노지질 및 스핑고리피드(sphingolipid)를 포함하며 이에 한정되지 않는다. 인지질의 대표예는 포스파티딜콜린, 포스파티딜에탄올아민, 포스파티딜세린, 포스파티딜이노시톨, 포스파티드산, 팔미토일올레오일 포스파티딜콜린, 리소포스파티딜콜린, 리소포스파티딜에탄올아민, 디팔미토일포스파티딜콜린, 디올레오일포스파티딜콜린, 디스테아로일포스파티딜콜린 또는 디리놀레오일포스파티딜콜린을 포함하며 이에 한정되지 않는다. 또한, 인 결합된 다른 화합물들, 예를 들면 스핑고리피드, 글리코스핑고리피드 족, 디아실글리세롤 및 베타-아실옥시산이 양친매성 지질로 명명된 기 내에 속한다. 또한, 상기한 양친매성 지질은 트리글리세리드 및 스테롤을 비롯한 다른 지질들과 혼합될 수 있다.
- [0057] 용어 "중성 지질"은 선택된 pH에서 비하전 또는 중성 쯔비터이온 형태로 존재하는 임의의 수의 지질 종을 지칭한다. 생리학적 pH에서, 이러한 지질은 예를 들면, 디아실포스파티딜콜린, 디아실포스파티딜에탄올아민, 세라미드, 스핑고미엘린(sphingomyelin), 세팔린(cephalin), 콜레스테롤, 세레브로사이드(cerebrosides) 및 디아실

글리세롤을 포함한다.

[0058] 용어 "비양이온성 지질"은 상기한 임의의 중성 지질, 뿐만 아니라 음이온성 지질을 지칭한다.

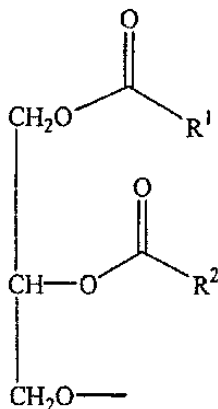
[0059] 용어 "음이온성 지질"은 생리학적 pH에서 음하전된 임의의 지질을 지칭한다. 이들 지질은 포스파티딜글리세롤, 카르디오펜, 디아실포스파티딜세린, 디아실포스파티드산, N-도데카노일 포스파티딜에탄올아민, N-숙시닐 포스파티딜에탄올아민, N-글루타릴포스파티딜에탄올아민, 리실포스파티딜글리세롤, 팔미토일올레오일스파티딜글리세롤(POPG), 및 중성 지질에 연결된 다른 음이온성 변형 기를 포함하며 이에 한정되지 않는다.

[0060] 용어 "양이온성 지질"은 선택된 pH, 예를 들면 생리학적 pH에서 순 양전하를 갖는 임의의 수의 지질 종을 지칭한다. 이러한 지질은 N,N-디올레일-N,N-디메틸암모늄 클로라이드("DODAC"), N-(2,3-디올레일옥시)프로필-N,N,N-트리메틸암모늄 클로라이드("DOTMA"), N,N-디스테아릴-N,N-디메틸암모늄 브로마이드("DDAB"), N-(2,3-디올레일옥시)프로필-N,N,N-트리메틸암모늄 클로라이드("DOTAP"), 3-(N-(N', N'-디메틸아미노에탄)-카르바모일)콜레스테롤("DC-Chol") 및 N-(1,2-디미리스틸옥시프로프-3-일)-N,N-디메틸-N-히드록시에틸 암모늄 브로마이드("DMRIE")를 포함하며 이에 한정되지 않는다. DODAP, DODMA, DMDMA 등의 지질은 양이온성이고, 생리학적 pH 미만에서 양전하를 갖는다.

[0061] 용어 "소수성 지질"은 장쇄 포화 및 불포화 지방족 탄화수소 기로서 하나 이상의 방향족, 지환족 또는 헤테로시클릭 기(들)에 의해 임의적으로 치환된 기를 포함하며 이에 한정되지 않는 무극성 기를 갖는 화합물을 지칭한다. 적합한 예는 디아실글리세롤, 디알킬글리세롤, N,N-디알킬아미노, 1,2-디아실옥시-3-아미노프로판 및 1,2-디알킬-3-아미노프로판을 포함하며 이에 한정되지 않는다.

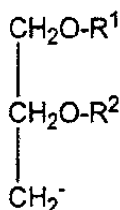
[0062] 용어 "융합생성(fusogenic)"은 리포솜, SNALP 또는 다른 약물 전달 시스템이 세포의 막과 융합하는 능력을 지칭한다. 막은 혈장 막 또는 소기관, 예를 들면, 엔도솜(endosome), 핵 등을 둘러싸는 막일 수 있다.

[0063] 용어 "디아실글리세롤"은 R¹ 및 R²가 양쪽 모두 독립적으로 에스테르 연결에 의해 글리세롤의 1- 및 2-위치에 결합된 2 내지 30 개의 탄소를 갖는 2-지방 아실 쇠를 갖는 화합물을 지칭한다. 아실기는 포화될 수 있거나 또는 다양한 불포화도를 가질 수 있다. 디아실글리세롤은 하기 화학식을 갖는다:



[0064]

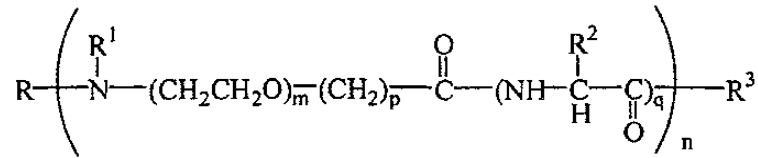
[0065] 용어 "디알킬옥시프로필"은 R¹ 및 R²가 양쪽 모두 독립적으로 2 내지 30 개의 탄소를 갖는 2-알킬 쇠를 지칭한다. 알킬기는 포화될 수 있거나 또는 다양한 불포화도를 가질 수 있다. 디알킬옥시프로필은 하기 화학식을 갖는다:



[0066]

[0067] 용어 "ATTA" 또는 "폴리아미드"는 미국 특허 번호 6,320,017 및 6,586,559에 개시되어 있으며 이에 한정되지 않는 화합물을 지칭하며, 양쪽 모두의 문헌은 본 명세서에 참고 문헌으로 인용된다. 이들 화합물은 하기 화학식

을 갖는 화합물을 포함한다:



[0068]

[0069]

상기 식 중, R은 수소, 알킬 및 아실로 이루어진 군으로부터 선택된 원이고, R¹은 수소 및 알킬로 이루어진 군으로부터 선택된 원이거나, 또는 임의적으로, R 및 R¹ 및 이들이 결합된 질소는 아지도 잔기를 형성하고, R²는 수소, 임의적으로 치환된 알킬, 임의적으로 치환된 아릴 및 아미노산의 측쇄로부터 선택된 군 중의 원이고, R³은 수소, 할로젠, 히드록시, 알콕시, 머캅토, 히드라지노, 아미노 및 NR⁴R⁵(여기서, R⁴ 및 R⁵는 독립적으로 수소 또는 알킬임)로 이루어진 군으로부터 선택된 원이고, n은 4 내지 80이고, m은 2 내지 6이고, p는 1 내지 4이고, q는 0 또는 1이다. 다른 폴리아미드가 본 발명의 화합물에 사용될 수 있다는 것이 당업자에게 자명할 것이다.

[0070]

용어 "핵산" 또는 "폴리뉴클레오티드"는 단일- 또는 이중 가닥 형태로 2 개 이상의 데옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드를 함유하는 중합체를 지칭한다. 구체적으로 한정되지 않으면, 상기 용어는 기준 핵산과 유사한 결합 특성을 갖고 천연 발생 뉴클레오티드와 유사한 방식으로 대사되는 천연 뉴클레오티드의 공지된 유사체를 함유하는 핵산을 포함한다. 달리 언급이 없으면, 특정 핵산 서열은 명시적으로 지시된 서열을 포함할 뿐만 아니라 그의 보존적으로 변형된 변이체(예를 들면, 축퇴 코돈 치환), 대립 유전자, 오르톨로그(ortholog), SNP 및 상보적 서열도 내재적으로 포함한다. 구체적으로, 축퇴 코돈 치환은 하나 이상의 선택된 (또는 모든) 코돈의 제 3 위치가 혼합된 염기 및/또는 데옥시이노신 잔기로 치환된 서열을 발생시킴으로써 달성될 수 있다 (Batzer et al., Nucleic acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985); and Cassol et al. (1992); Rossolini et al., Mol. Cell. Probes 8: 91-98 (1994)). "뉴클레오티드"는 당 데옥시리보스(DNA) 또는 리보스(RNA), 염기 및 포스페이트 기를 함유한다. 뉴클레오티드는 포스페이트 기를 통해 함께 연결된다. "염기"는 퓨린 및 피리미딘을 포함하며, 천연 화합물 아데닌, 티민, 구아닌, 시토신, 우라실, 이노신, 및 천연 유사체, 및 퓨린 및 피리미딘의 합성 유도체를 추가로 포함하며, 이는 예를 들면, 아민, 알코올, 티올, 카르복실레이트 및 알킬할리드에 한정되지 않는 새로운 반응성 기를 위치시키는 변형물을 포함하며 이에 한정되지 않는다. DNA는 안티센스, 플라스미드 DNA, 플라스미드 DNA의 일부, 예비 축합된 DNA, 중합효소 쉘 반응(PCR)의 생성물, 벡터(PI, PAC, BAC, YAC, 인공 염색체), 발현 카세트, 키메라 서열, 염색체 DNA, 또는 이들 기의 유도체의 형태일 수 있다. 용어 핵산은 유전자, cDNA, 유전자에 의해 엔코딩되는 mRNA 및 간접 RNA 분자와 상호교환적으로 사용된다.

[0071]

용어 "유전자"는 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 전구체(예를 들면, A, B, C, D, E, 또는 G형 간염 바이러스, 또는 헤르페스 심플렉스(herpes simplex) 바이러스)로부터의 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 전구체의 생성에 필요한 서열을 코딩하는 부분 길이 또는 전체 길이를 포함하는 핵산(예를 들면, DNA 또는 RNA) 서열을 지칭한다.

[0072]

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

[0073]

용어 "간접 RNA" 또는 "RNAi" 또는 "간접 RNA 서열"은 간접 RNA가 표적 유전자와 동일한 세포에 존재하는 경우 표적 유전자의 발현을 (즉, 간접 RNA의 서열에 상보적인 mRNA의 분해를 매개함으로써) 감소시키거나 억제할 수 있는 이중 가닥 RNA(즉, 듀플렉스 RNA)를 지칭한다. 따라서, 간접 RNA는 두 상보적 가닥 또는 단일의 자기 상보적 가닥에 의해 형성된 이중 가닥 RNA를 지칭한다. 전형적으로, 간접 RNA는 표적 유전자와 실질적으로 또는 완전한 동일성을 갖는다. 간접 RNA의 서열은 전장 표적 유전자, 또는 그의 서브시퀀스와 일치할 수 있다. 간접 RNA는 "작은 간접 RNA" 또는 "siRNA," 즉, 길이가 약 15-60, 15-50, 15-50, 또는 15-40개 (듀플렉스) 뉴클레오티드, 더욱 전형적으로 약, 15-30, 15-25 또는 19-25개 (듀플렉스) 뉴클레오티드, 바람직하게는 약 20-24 또는 약 21-22 또는 21-23개 (듀플렉스) 뉴클레오티드인 간접 RNA를 포함한다(예를 들면, 이중 가닥 siRNA의 각각의 상보적 서열은 길이가 15-60, 15-50, 15-50, 15-40, 15-30, 15-25 또는 19-25개, 바람직하게는 약 20-24 또는 약 21-22 또는 21-23개인 뉴클레오티드이고, 이중 가닥 siRNA는 길이가 약 15-60, 15-50, 15-50, 15-40, 15-30, 15-25 또는 19-25개, 바람직하게는 약 20-24 또는 약 21-22 또는 21-23 개의 염기쌍이다. siRNA 듀플렉스는 약 1 내지 약 4 개, 바람직하게는 약 2 내지 약 3 개의 뉴클레오티드로 된 3' 돌출부(overhangs) 및 5' 포스페이트 말단을 포함할 수 있다. siRNA는 화학적으로 합성되거나 또는 플라스미드에 의해 엔코딩될 수 있다

(예를 들면, 헤어핀 루프를 갖는 듀플렉스로 자동적으로 폴딩되는 서열로 전사됨). 또한, siRNA는 긴 dsRNA(예를 들면, 길이가 약 25 개의 뉴클레오티드를 초과하는 dsRNA)를 대장균 RNase III 또는 Dicer로 분해시킴으로써 생성될 수 있다. 이들 효소는 dsRNA를 생물학적 활성 siRNA로 프로세싱한다(예를 들면, 문헌[Yang et al., PNAS USA 99: 9942-7 (2002); Calegari et al., PNAS USA 99:14236 (2002); Byrom et al., Ambion TechNotes 10(1):4-6 (2003); Kawasaki et al., Nucleic acid Res. 31: 981-7 (2003); Knight and Bass, Science 293:2269-71 (2001); and Robertson et al., J. Biol. Chem. 243:82 (1968)] 참조). 바람직하게는, dsRNA는 길이가 50 개 이상 내지 약 100, 200, 300, 400 또는 500 개의 뉴클레오티드이다. dsRNA는 길이가 1000, 1500, 2000, 5000 개의 뉴클레오티드이거나 그 이상일 수 있다. dsRNA는 전체 유전자 전사체 또는 부분 유전자 전사체를 엔코딩할 수 있다.

[0074] "실질적인 동일성"은 엄격한 조건 하에서 기준 서열과 하이브리드화하는 서열, 또는 기준 서열의 특정된 영역에 대해 특정된 % 동일성을 갖는 서열을 지칭한다.

[0075] 문구 "엄격한 하이브리드화 조건"은 프로브가 전형적으로 핵산의 복합체 혼합물 중에서 그의 표적 서브시퀀스에 하이브리드화하지만 다른 서열들에 하이브리드화하지 않는 조건을 지칭한다. 엄격한 조건은 서열 의존적이고, 상이한 환경에서는 상이하게 된다. 긴 서열은 고온에서 특이적으로 하이브리드화한다. 핵산의 하이브리드화에 대한 광범위한 안내는 문헌[Tijssen, Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Probes, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays" (1993)]에서 발견된다. 일반적으로, 엄격한 조건은 정해진 이온 강도 pH에서 특이적 서열에 대한 열적 융점 (T_m)보다 약 5-10 °C 낮게 선택된다. T_m 은 표적에 상보적인 프로브의 50 %가 평형에서 표적 서열에 하이브리드화하는 온도(정해진 이온 강도, pH, 및 핵 농도 하에서)이다 (표적 서열이 과량으로 존재하는 경우, T_m 에서, 프로브의 50 %가 평형에서 차지됨). 또한, 엄격한 조건은 탈안정화제, 예를 들면 포름아미드를 첨가함으로써 달성될 수 있다. 선택적 또는 특이적 하이브리드화의 경우, 양성 신호는 바탕(background) 하이브리드화의 2 배, 바람직하게는 10 배이다.

[0076] 예시적인 엄격한 하이브리드화 조건은 다음과 같을 수 있다: 50 % 포름아미드, 5 × SSC, 및 1 % SDS, 42°C에서 인큐베이션, 또는 5 × SSC, 1 % SDS, 65°C에서 인큐베이션, 65°C에서 0.2 × SSC, 및 0.1 % SDS 중에서 세척. PCR의 경우, 비록 어닐링 온도는 프라이머 길이에 따라 약 32 °C 내지 48 °C에서 변할 수 있지만 낮은 엄격성 증폭의 경우 약 36 °C의 온도가 전형적이다. 높은 엄격성 PCR 증폭의 경우, 비록 높은 엄격성 어닐링 온도가 프라이머 길이 및 특이성에 따라 약 50 °C 내지 약 65 °C 범위일 수 있지만 약 62 °C의 온도가 전형적이다. 높은 엄격성 증폭 및 낮은 엄격성 증폭 양쪽 모두에 대한 전형적 주기 조건은 90 °C-95 °C에서 30 분-2 분간 변성기, 30 초-2 분간 지속하는 어닐링 기, 및 약 72 °C에서 1-2 분간 연장기를 포함한다. 낮은 엄격성 증폭 반응 및 높은 엄격성 증폭 반응에 대한 프로토콜 및 지침은 예를 들면, 문헌[Innis et al. (1990) PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, Academic Press, Inc. N.Y.]에 제공되어 있다.

[0077] 엄격한 조건 하에서 서로 하이브리드화하지 않는 핵산은 엔코딩하는 폴리펩티드가 실질적으로 동일한 경우 실질적으로 동일하다. 이는 예를 들면, 핵산의 카피가 유전 코드에 의해 허용되는 최대 코돈 축퇴성을 사용하여 생성된 경우 발생한다. 이러한 경우, 핵산은 전형적으로 온건하게 엄격한 하이브리드화 조건 하에서 하이브리드화한다. 예시적인 "온건하게 엄격한 하이브리드화 조건"은 37 °C에서 40 % 포름아미드, 1 M NaCl, 1 % SDS의 완충제 중 하이브리드화, 및 45 °C에서 1X SSC 중 세척을 포함한다. 포지티브 하이브리드화는 바탕의 2 배 이상이다. 당업자는 별법의 하이브리드화 및 세척 조건을 사용하여 유사한 엄격성 조건을 제공할 수 있다는 점을 용이하게 이해할 것이다. 하이브리드화 매개변수 결정에 대한 추가적인 지침은 다수의 문헌들, 예를 들면 문헌[Current Protocols in Molecular Biology, ed. Ausubel, et al]에 제공되어 있다.

[0078] 2 개 이상의 핵산과 관련하여 용어 "실질적으로 동일한" 또는 "실질적인 동일성"은 하기 서열 비교 알고리즘들 중 하나를 사용하여 또는 수동 정렬 및 가시적 검사에 의해 측정할 때 비교 창 (comparison window), 또는 지정된 영역에 대한 최대 대응성으로 비교하고 정렬한 경우 동일하거나 또는 동일한 특정된 % (즉, 특정된 영역에 대한 약 60 % 이상, 바람직하게는 65 %, 70 %, 75 %, 바람직하게는 80 %, 85 %, 90 % 또는 95 % 동일성)의 뉴클레오티드를 갖는 2 개 이상의 서열 또는 서브시퀀스를 지칭한다. 또한, 본 발명의 내용 중에서 이 정의는 유사하게 서열의 상보체를 지칭한다. 바람직하게는, 실질적인 동일성은 길이가 약 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75 또는 100 개 이상의 뉴클레오티드인 영역에 존재한다.

[0079] 서열 비교시, 전형적으로 한 서열을 기준 서열로 하고, 여기에 시험 서열을 비교한다. 서열 비교 알고리즘을 사용하는 경우, 시험 서열 및 기준 서열을 컴퓨터에 입력하고, 필요에 따라, 서브시퀀스 좌표를 지정하고, 서열

알고리즘 프로그램 매개변수를 지정한다. 디폴트 프로그램 매개변수를 사용하거나 또는 별법의 매개변수를 지정할 수 있다. 그 다음, 서열 비교 알고리즘은 프로그램 매개변수를 기초로 기준 서열에 대한 시험 서열에 대한 % 서열 동일성을 계산한다.

[0080] 본 명세서에 사용된 "비교 창 (comparison window)"은 20 내지 600, 통상 약 50 내지 약 200, 더욱 통상적으로 약 100 내지 약 150개로 이루어진 군으로부터 선택된 수의 인접 위치들 중 임의의 하나의 절편에 대한 기준으로 포함하며, 여기서 서열을 두 서열이 최적 정렬된 후 동일한 수의 인접 위치로 된 기준 서열에 비교할 수 있다. 비교용 서열의 정렬 방법은 당업계에 널리 공지되어 있다. 비교용 서열의 최적 정렬은 예를 들면, 문헌[Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981)]의 국소 상동성 알고리즘, 문헌[Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970)]의 상동성 정렬 알고리즘, 문헌[Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988)]의 유사성 방법에 대한 탐색, 이들 알고리즘들의 컴퓨터화된 실행(GAP, BESTFIT, FASTA, 및 TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), 또는 수동 정렬 및 가시적 검사(예를 들면, 문헌[Current Protocols in Molecular Biology(Ausubel et al., eds. 1995 supplement)] 참조)에 의해 수행될 수 있다.

[0081] % 서열 동일성 및 서열 유사성 결정에 적합한 알고리즘의 바람직한 예로는 BLAST 및 BLAST 2.0 알고리즘이 있으며, 이는 문헌[Altschul et al., Nuc. Acids Res. 25:3389-3402 (1977)] 및 문헌[Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)]에 각각 기재되어 있다. BLAST 및 BLAST 2.0은 본 명세서에 기재된 매개변수와 함께 본 발명의 핵산 및 단백질에 대한 % 서열 동일성을 결정하는 데 사용된다. BLAST 분석 수행용 소프트웨어는 생물공학 정보에 대한 국립 센터(National Center for Biotechnology Information(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>))를 통해 공개적으로 이용가능하다. 이 알고리즘은 데이터베이스 서열에서 동일한 길이의 단어(word)와 정렬된 경우 일부 양성값 역치(threshold) 스코어 T와 매칭하거나 이를 만족시키는 당해 서열 중 길이 W의 짧은 단어들을 확인함으로써 먼저 높은 스코어링 서열쌍(HSP)을 확인하는 것을 포함한다. T는 이웃 단어 스코어 역치로 지칭된다(Altschul et al., supra).

[0082] 이들 초기 이웃 단어 히트(hit)는 이들을 함유하는 긴 HSP를 찾는 검색을 개시하는 데 근원으로 작용한다. 단어 히트는, 누적 정렬 스코어가 증가될 수 있는 한 각각의 서열을 따라 양쪽 모두의 방향으로 연장된다. 누적 스코어는 뉴클레오티드 서열의 경우, 매개변수 M(매칭 잔기 쌍에 대한 보상 스코어; 항상 > 0) 및 N(미스매칭(mismatching) 잔기에 대한 패널티(penalty) 스코어; 항상 < 0)를 사용하여 계산된다. 아미노산 서열의 경우, 스코어링 매트릭스를 사용하여 누적 스코어를 계산한다. 누적 정렬 스코어가 그의 최대 획득된 값으로부터 양 X 만큼 떨어진 경우, 누적 스코어가 하나 이상의 음-스코어링 잔기 정렬의 축적에 의해 0 이하가 된 경우, 또는 서열의 말단에 도달한 경우, 각각의 방향에서 단어 히트의 연장이 중단된다. BLAST 알고리즘 매개변수 W, T, 및 X는 민감도 및 정렬 속도를 결정한다. BLASTN 프로그램(뉴클레오티드 서열의 경우)은 디폴트로서 단어 길이(W) 11, 기대값(E) 또는 10, M=5, N=-4 및 양쪽 모두 가닥의 비교를 사용한다. 아미노산 서열의 경우, BLASTP 프로그램은 디폴트로서 단어길이 3, 및 기대값(E) 10을 사용하고, BLOSUM62 스코어링 매트릭스(문헌[Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1989)] 참조)는 정렬(B) 50, 기대값(E) 10, M=5, N=-4, 및 양쪽 모두의 가닥의 비교를 사용한다.

[0083] 또한, BLAST 알고리즘은 두 서열간 유사성의 통계 분석을 수행한다(예를 들면, 문헌[Karlin & Altschul, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 90:5873-5787 (1993)] 참조). BLAST 알고리즘에 의해 제공된 유사성의 한 척도는 가장 작은 합계 확률(P(N))이며, 이는 두 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열 간 매치가 우연히 발생할 확률의 표시를 제공한다. 예를 들면, 핵산은, 기준 핵산에 대한 시험 핵산의 비교시 가장 작은 합계 확률이 약 0.2 미만, 더욱 바람직하게는 약 0.01 미만, 가장 바람직하게는 약 0.001 미만인 경우 기준 서열에 유사한 것으로 간주한다.

[0084] 문구 "표적 유전자 발현 억제"는 본 발명의 siRNA의 표적 유전자의 유전자 침묵을 개시 능력을 지칭한다. 유전자 침묵도를 조사하기 위해, 특정 구조체를 발현하는 배양물 중의 해당 유기체 또는 세포의 샘플 또는 분석시험을 구조체가 발현되지 않는 대조군 샘플과 비교한다. 대조군 샘플(구조체 발현 결여)에 100 %의 상대값을 배정한다. 표적 유전자의 발현의 억제는 대조군에 기준한 시험 값이 약 90 %, 바람직하게는 50 %, 더욱 바람직하게는 25-0 %인 경우 달성된다. 적합한 분석시험은 예를 들면, 당업자에게 공지된 기술, 예를 들면 도트 블롯, 노던 블롯, 인 시튜(in situ) 하이브리드화, ELISA, 면역 침전, 효소 기능, 뿐만 아니라 당업자에게 공지된 표현형 분석시험을 사용한 단백질 또는 mRNA 수준의 조사를 포함한다.

[0085] "핵산"은 데옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드 및 단일- 또는 이중 가닥 형태의 이의 중합체를 지칭

한다. 상기 용어는 합성, 천연 발생 및 비천연 발생된 것이고, 기준 핵산과 유사한 결합 특성을 갖고 기준 뉴클레오티드와 유사하게 대사되며 공지된 뉴클레오티드 유사체 또는 변형된 골격 잔기 또는 연결을 함유하는 핵산을 포함한다. 이러한 유사체의 예는 포스포로티오에이트, 포스포르아미데이트, 메틸 포스포네이트, 키랄-메틸 포스포네이트, 2-O-메틸 리보뉴클레오티드, 펩티드-핵산(PNA)을 포함하며 이에 한정되지 않는다.

[0086] 유전자 또는 핵산의 "침묵" 또는 "하향조절"은 간접 RNA 또는 다른 핵산 서열의 부재 하에서 검출되는 수준에 비해 표적 핵산 서열, 즉 RNAi에 의해 표적화된 서열의 번역의 검출가능한 감소, 또는 표적 서열 또는 단백질의 양 또는 활성의 감소를 의미하는 것으로 한다. 검출가능한 감소는 약 5 % 또는 10 %로 작을 수 있거나, 또는 약 80 %, 90 % 또는 100 %로 클 수 있다. 더욱 전형적으로, 검출가능한 감소는 약 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 % 또는 70 %이다.

[0087] siRNA의 "치료적으로 유효한 양" 또는 "유효한 양"은 원하는 효과, 예를 들면 siRNA의 부재 하에서 검출되는 정상 발현 수준에 비해 표적 서열의 발현의 감소를 제공하기에 충분한 양이다.

[0088] 본 명세서에 사용된 용어 "수용액"은 전체적으로 또는 부분적으로 물을 포함하는 조성물을 지칭한다.

[0089] 본 명세서에 사용된 용어 "유기 지질 용액"은 전체적으로 또는 부분적으로 지질을 갖는 유기 용매를 포함하는 조성물을 지칭한다.

[0090] 본 명세서에 사용된 "원위 부위"는 물리적으로 분리된 부위를 지칭하며, 이는 인접 모세관 베드에 한정되지 않으며, 유기체 전체에 널리 분포된 부위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 원위 부위는 질환 부위(예를 들면, 종양 부위, 염증 부위, 또는 감염 부위)로부터 물리적으로 분리된 부위를 지칭한다.

[0091] "혈청-안정성"은 핵산-지질 입자와 관련하여, 입자가, 유리 DNA를 상당히 분해시키는 혈청 또는 뉴클레아제 분석시험에 노출시킨 후 상당히 분해되지 않는 것을 의미한다. 적합한 분석시험은 예를 들면, 표준 혈청 분석시험 또는 DNase 분석시험, 예를 들면 하기 실시예에 기재된 것들을 포함한다.

[0092] 본 명세서에 사용된 "전신 전달"은 유기체 내에 화합물의 광역 생체분포를 유발하는 전달을 지칭한다. 일부 투여 기술은 특정한 화합물에 전신 전달을 유발하고, 다른 것들에는 그렇지 않을 수 있다. 전신 전달은 유용한, 바람직하게는 치료적 양의 화합물이 신체의 대부분에 노출되는 것을 의미한다. 일반적으로, 광역 생체분포를 얻기 위해, 화합물이 투여 부위와 멀리 떨어진 질환 부위에 도달하기 전에 빠르게 분해되거나 제거되지 않도록 (예를 들면, 최초 통과 기관(간, 폐 등)에 의해 또는 빠른 비특이적 세포 결합에 의해) 하는 혈액 수명이 요구된다. 핵산-지질 입자의 전신 전달은 당업계에 공지된 임의의 수단, 예를 들면 정맥내, 피하, 복막내를 포함하는 것들일 수 있고, 바람직한 실시양태에서, 핵산-지질 입자의 전신 전달은 정맥내 전달에 의해 이루어진다.

[0093] 본 명세서에 사용된 "국소 전달"은 유기체 내에서 표적 부위에 화합물을 직접 전달하는 것을 지칭한다. 예를 들면, 화합물은 질환 부위, 예를 들면 종양 또는 다른 표적 부위, 예를 들면 염증 부위 또는 표적 기관, 예를 들면 간, 심장, 췌장, 신장 등에 직접 주사함으로써 국소 전달될 수 있다.

[0094] III. 안정한 핵산-지질 입자

[0095] 본 명세서에 기재된 안정한 핵산-지질 입자(SNALP)는 전형적으로 핵산(예를 들면, siRNA 서열 또는 siRNA 서열을 코딩하는 DNA 서열), 양이온성 지질, 비양이온성 지질 및 이중중 안정화 성분, 예를 들면 SNALP의 응집을 억제하는 컨쥬게이션된 지질을 포함한다. 본 발명의 SNALP는 약 150 nm 미만의 평균 직경을 갖고, 실질적으로 비독성이다. 또한, 본 발명의 SNALP에 캡슐화된 핵산은 수용액 중에서 뉴클레아제 분해에 저항성을 갖는다.

[0096] A. 양이온성 지질

[0097] 다양한 적합한 양이온성 지질을 본 명세서에 기재된 SNALP에 단독으로 또는 하나 이상의 다른 양이온성 지질 중 또는 중성 지질 종과 함께 사용할 수 있다.

[0098] 본 발명에 유용한 양이온성 지질은 생리학적 pH에서 순 양전하를 운반하는 다수의 지질 중 임의의 것, 예를 들면 DODAC, DOTMA, DDAB, DOTAP, DOSPA, DOGS, DC-Chol 및 DMRIE 또는 그들의 조합물일 수 있다. 또한, 본 발명에 유용한 다수의 이들 지질 및 관련 유사체도 미국 특허 번호 5,208,036, 5,264,618, 5,279,833, 5,283,185, 5,753,613 및 5,785,992에 기재되었으며, 각각의 개시내용은 본 명세서에 참고 문헌으로 인용된다.

[0099] 전형적으로, 양이온성 지질은 상기 입자에 존재하는 총 지질 중 약 2 % 내지 약 60 %, 바람직하게는 약 5 % 내지 약 45 %를 차지한다. 특정한 바람직한 실시양태에서, 양이온성 지질은 상기 입자에 존재하는 총 지질 중 약

5 % 내지 약 15 %를 차지한다. 다른 바람직한 실시양태에서, 양이온성 지질은 상기 입자에 존재하는 총 지질 중 약 40 % 내지 약 50 %를 차지한다. 핵산-지질 입자의 의도된 용도에 따라, 성분들의 비율은 변하고, 특정 포물레이션의 전달 효율은 엔도솜 방출 매개변수(ERP) 분석시험을 사용하여 측정될 수 있다. 예를 들면, 전신 전달의 경우, 양이온성 지질은 상기 입자에 존재하는 총 지질 중 약 5 % 내지 약 15 %를 차지할 수 있고, 국소 또는 국부 전달의 경우, 양이온성 지질은 상기 입자에 존재하는 총 지질 중 약 40 % 내지 약 50 %를 차지한다.

[0100] B. 비양이온성 지질

[0101] 본 명세서에 기재된 SNALP의 비양이온성 지질 성분은 안정한 복합체를 생성할 수 있는 임의의 다양한 중성 비하전, 썬비터이온 또는 음이온성 지질일 수 있다. 이들은 비록 별법으로 양하전 또는 음하전될 수 있지만 바람직하게는 중성이다. 본 발명에 유용한 비양이온성 지질의 예는 인지질 관련 물질, 예를 들면 레시틴, 포스파티딜에탄올아민, 리소레시틴, 리소포스파티딜에탄올아민, 포스파티딜세린, 포스파티딜이노시톨, 스펅고미엘린, 세팔린, 카르디오테린, 포스파티드산, 세레브로사이드, 디세틸포스페이트, 디스테아로일포스파티딜콜린(DSPC), 디올레오일포스파티딜콜린(DOPC), 디팔미토일포스파티딜콜린(DPPC), 디올레오일포스파티딜글리세롤(DOPG), 팔미토일올레오일포스파티딜글리세롤(POPG), 디팔미토일포스파티딜글리세롤(DPPG), 디올레오일-포스파티딜에탄올아민(DOPE), 팔미토일올레오일포스파티딜콜린(POPC), 팔미토일올레오일-포스파티딜에탄올아민(POPE) 및 디올레오일-포스파티딜에탄올아민 4-(N-말레이미도메틸)-시클로헥산-1-카르복실레이트(DOPE-mal)를 포함한다. 비양이온성 지질 또는 스테롤, 예를 들면 콜레스테롤이 존재할 수 있다. 추가적인 비인화물 함유 지질로는 예를 들면, 스테아릴아민, 도데실아민, 헥사데실아민, 아세틸 팔미테이트, 글리세롤리시놀레이트, 헥사데실 스테아레이트, 이소프로필 미리스테이트, 양쪽성 아실릭 중합체, 트리에탄올아민-라우릴 술페이트, 알킬-아릴 술페이트 폴리에틸옥실화 지방산 아마이드, 디옥타데실디메틸 암모늄 브로마이드 등, 디아실포스파티딜콜린, 디아실포스파티딜에탄올아민, 세라미드, 스펅고미엘린, 세팔린 및 세레브로사이드이다. 다른 지질, 예를 들면 리소포스파티딜콜린 및 리소포스파티딜에탄올아민이 존재할 수 있다. 또한, 비양이온성 지질은 본 명세서에 참고 문헌으로 인용되는 미국 특허 번호 5,820,873에 기재된 바와 같은, 폴리에틸렌 글리콜 기재 중합체, 예를 들면 PEG 2000, PEG 5000 및 인지질 또는 세라미드에 컨쥬게이션된 폴리에틸렌 글리콜 (PEG-Cer로 불림)을 포함한다.

[0102] 바람직한 실시양태에서, 비양이온성 지질로는 디아실포스파티딜콜린(예를 들면, 디스테아로일포스파티딜콜린, 디올레오일포스파티딜콜린, 디팔미토일포스파티딜콜린 및 디리놀레오일포스파티딜콜린), 디아실포스파티딜에탄올아민(예를 들면, 디올레오일포스파티딜에탄올아민 및 팔미토일올레오일포스파티딜에탄올아민), 세라미드 또는 스펅고미엘린이 있다. 이들 지질 중 아실기는 바람직하게는 C₁₀-C₂₄ 탄소 채를 갖는 지방산으로부터 유래된 아실기이다. 더욱 바람직하게는, 아실기는 라우로일, 미리스토일, 팔미토일, 스테아로일 또는 올레오일이다. 특히 바람직한 실시양태에서, 비양이온성 지질은 콜레스테롤, 1,2-sn-디올레오일포스파티딜에탄올아민 또는 에그 스펅고미엘린(ESM) 중 하나 이상을 포함하게 된다.

[0103] 전형적으로, 비양이온성 지질은 상기 입자에 존재하는 총 지질 중 약 5 % 내지 약 90 %, 바람직하게는 약 20 % 내지 약 85 %를 차지한다. PEG-DAG 컨쥬게이트는 전형적으로 상기 입자에 존재하는 총 지질 중 1 % 내지 약 20 %, 바람직하게는 4 % 내지 약 15 %를 차지한다. 본 발명의 핵산-지질 입자는 콜레스테롤을 추가로 포함할 수 있다. 콜레스테롤은 존재하는 경우, 전형적으로 상기 입자에 존재하는 총 지질 중 약 10 % 내지 약 60 %, 바람직하게는 약 20 % 내지 약 45 %를 차지한다.

[0104] C. 이중층 안정화 성분

[0105] 한 실시양태에서, SNALP는 이중층 안정화 성분(BSC)을 추가로 포함한다. 적합한 BSC는 폴리아미드 올리고머, 펩티드, 단백질, 세제, 지질-유도체, PEG-지질, 예를 들면 디알킬옥시프로필에 커플링된 PEG (PEG-DAA), 디아실글리세롤에 커플링된 PEG (PEG-DAG), 포스파티딜에탄올아민(PE)에 커플링된 PEG(PEG-PE) 또는 세라미드에 컨쥬게이션된 PEG 또는 그들의 혼합물(본 명세서에 참고 문헌으로 인용되는 미국 특허 번호 5,885,613 참조)을 포함하며 이에 한정되지 않는다. 한 실시양태에서, 이중층 안정화 성분은 PEG-지질 또는 ATTA-지질이다. 한 바람직한 실시양태에서, BSC는 SNALP의 응집을 억제하는 컨쥬게이션된 지질이다. 적합한 컨쥬게이션된 지질은 PEG-지질 컨쥬게이트, ATTA-지질 컨쥬게이트, 양이온성-중합체-지질 컨쥬게이트(CPL) 또는 그들의 혼합물을 포함하며 이에 한정되지 않는다. 한 바람직한 실시양태에서, SNALP는 CPL과 함께 ATTA-지질 컨쥬게이트 또는 PEG-지질 컨쥬게이트를 포함한다.

[0106] 전형적으로, 이중층 안정화 성분은 입자에 존재하는 총 지질의 약 0.5 % 내지 약 50 % 범위로 존재한다. 바람직한 실시양태에서, 이중층 안정화 성분은 입자 중 총 지질의 약 0.5 % 내지 약 25 %로 존재한다. 다른 바람직

한 실시양태에서, 이중층 안정화 성분은 입자 중 총 지질의 약 1 % 내지 약 20 %, 또는 약 3 % 내지 약 15 % 또는 약 4 % 내지 약 10 %로 존재한다. 당업자는 이중층 안정화 성분의 농도가, 사용되는 이중층 안정화 성분 및 리포솜이 융합생성되는 속도에 따라 변할 수 있다는 점을 명확히 이해할 것이다.

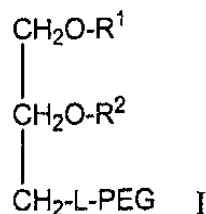
[0107] 이중층 안정화 성분의 조성 및 농도를 조절함으로써, 이중층 안정화 성분이 리포솜으로부터 교환되는 속도, 이에 따라 리포솜이 융합생성되는 속도를 조절할 수 있다. 예를 들면, 폴리에틸렌글리콜-포스파티딜에탄올아민 컨쥬게이트 또는 폴리에틸렌글리콜-세라미드 컨쥬게이트가 이중층 안정화 성분으로 사용되는 경우, 리포솜이 융합생성되는 속도는 예를 들면, 이중층 안정화 성분의 농도를 변화시킴으로써, 폴리에틸렌글리콜의 분자량을 변화시킴으로써 또는 쇠 길이, 및 포스파티딜에탄올아민 또는 세라미드 상의 아실쇄 기의 포화도를 변화시킴으로써 변화될 수 있다. 또한, 예를 들면, pH, 온도, 이온 강도 등을 비롯한 다른 변수들을 사용하여 리포솜이 융합생성되는 속도를 변화시키고/시키거나 조절하는 데 사용할 수 있다. 리포솜이 융합생성되는 속도를 조절하는 데 사용될 수 있는 다른 방법들은 이 개시내용을 읽은 후 당업자에게 자명해질 것이다.

[0108] 1. 디아실글리세롤-폴리에틸렌글리콜 컨쥬게이트

[0109] 한 실시양태에서, 이중층 안정화 성분은 디아실글리세롤-폴리에틸렌글리콜 컨쥬게이트, 즉 DAG-PEG 컨쥬게이트 또는 PEG-DAG 컨쥬게이트를 포함한다. 바람직한 실시양태에서, DAG-PEG 컨쥬게이트는 디라우틸글리세롤(C₁₂)-PEG 컨쥬게이트, 디미리스틸글리세롤(C₁₄)-PEG 컨쥬게이트(DMG), 디팔미토일글리세롤(C₁₆)-PEG 컨쥬게이트 또는 디스테아릴글리세롤(C₁₈)-PEG 컨쥬게이트(DSG)이다. 당업자는 다른 디아실글리세롤이 본 발명의 DAG-PEG 컨쥬게이트에 사용될 수 있다는 것을 용이하게 이해할 것이다. 본 발명에 사용하기에 적합한 DAG-PEG 컨쥬게이트, 및 이들의 제조 방법 및 사용 방법은 U.S.P.A. 2003/0077829로 공개된 미국 출원 10/136,707 및 PCT 특허 출원 번호 CA 02/00669에 개시되어 있으며, 각 문헌의 전문은 본 명세서에 참고문헌으로 인용된다.

[0110] 2. 디알킬옥시프로필 컨쥬게이트

[0111] 또 다른 실시양태에서, 이중층 안정화 성분은 디알킬옥시프로필 컨쥬게이트, 즉 PEG-DAA 컨쥬게이트를 포함한다. 한 바람직한 실시양태에서, PEG-DAA 컨쥬게이트는 하기 화학식 I을 갖는다:



[0112]

[0113] 상기 식 중, R¹ 및 R²는 독립적으로 선택되고, 약 10 내지 약 22 개의 탄소 원자를 갖는 장쇄 알킬기이다. 장쇄 알킬기는 포화 또는 불포화될 수 있다. 적합한 알킬기는 라우틸(C₁₂), 미리스틸(C₁₄), 팔미틸(C₁₆), 스테아릴(C₁₈) 및 이코실(C₂₀)을 포함하며 이에 한정되지 않는다. 바람직한 실시양태에서, R¹ 및 R²는 동일하며, 즉 R¹ 및 R² 양쪽 모두가 미리스틸(즉, 디미리스틸), R¹ 및 R² 양쪽 모두가 스테아릴(즉, 디스테아릴) 등이다. 화학식 I에서, PEG는 약 550 내지 약 8,500 달톤의 평균 분자량을 갖는 폴리에틸렌 글리콜이다. 바람직한 실시양태에서, PEG는 약 1000 내지 약 5000 달톤, 더욱 바람직하게는 약 1,000 내지 약 3,000 달톤, 훨씬 더 바람직하게는, 약 2,000 달톤의 평균 분자량을 갖는다. PEG는 알킬, 알콕시, 아실 또는 아릴기에 의해 임의적으로 치환될 수 있다. 화학식 I에서, L은 링커(linker) 잔기이다. PEG를 디알킬옥시프로필 골격에 커플링하기에 적합한 임의의 링커 잔기를 사용할 수 있다. 적합한 링커 잔기는 아미도(-C(O)NH-), 아미노(-NR-), 카르보닐(-C(O)-), 카르보네이트(O-C(O)O-), 카르바메이트(-NHC(O)O-), 우레아(-NHC(O)NH-), 숙시닐(-(O)CCH₂CH₂C(O)-), 에테르, 디설피드 및 그들의 조합물을 포함하며 이에 한정되지 않는다. 다른 적합한 링커들은 당업계에 공지되어 있다.

[0114] 다양한 쇠 길이 및 포화도로 된 다양한 아실쇄 기를 갖는 포스파티딜에탄올아민을 폴리에틸렌글리콜에 컨쥬게이션하여 이중층 안정화 성분을 형성할 수 있다. 이러한 포스파티딜에탄올아민은 상업적으로 입수가능하거나, 또는 단리될 수 있거나 또는 당업자에게 공지된 통상적인 기술을 사용하여 합성될 수 있다. C₁₀ 내지 C₂₀ 범위의 탄소 쇠 길이를 갖는 포화 또는 불포화 지방산을 함유하는 포스파티딜에탄올아민이 바람직하다. 또한, 일불포

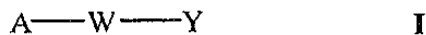
화 또는 이불포화된 지방산 및 포화 및 불포화 지방산의 혼합물을 갖는 포스파티딜에탄올아민을 사용할 수 있다. 적합한 포스파티딜에탄올아민은 디미리스토일포스파티딜에탄올아민(DMPE), 디팔미토일포스파티딜에탄올아민(DPPE), 디올레오일포스파티딜에탄올아민(DOPE) 및 디스테아로일포스파티딜에탄올아민(DSPE)을 포함하며 이에 한정되지 않는다.

[0115] 포스파티딜에탄올아민을 사용하여,쇄 길이 및 포화도로 된 다양한 아실쇄기를 갖는 세라미드를 폴리에틸렌글리콜에 커플링하여 이중층 안정화 성분을 형성할 수 있다. 당업자는 세라미드는 포스파티딜에탄올아민과 달리, 그의쇄 길이 및 포화도가 용이하게 변화될 수 있는 오직 하나의 아실기를 갖는다는 것을 명확히 이해할 것이다. 본 발명에 따라 사용하기 적합한 세라미드는 상업적으로 입수가 가능하다. 또한, 세라미드는 예를 들면, 공지된 단리 기술을 사용하여 난자(egg) 또는 뇌로부터 단리될 수 있거나 또는 별법으로, 본 명세서에 참고 문헌으로 인용되는 미국 특허 번호 5,820,873에 개시된 방법 및 기술을 사용하여 합성될 수 있다. 상기 출원에 나타난 합성 경로를 사용하여, C₂ 내지 C₃₁ 범위의 탄소쇄 길이를 갖는 포화 또는 불포화 지방산을 갖는 세라미드를 제조할 수 있다.

[0116] 3. 양이온성 중합체 지질

[0117] 또한, 양이온성 중합체 지질(CPL)도 본 명세서에 기재된 SNALPS에 사용될 수 있다. 적합한 CPL은 전형적으로 하기 구성적 특성을 갖는다: (1) CPL을 지질 이중층으로 혼입시키기 위한 지질 앵커(anchor), 예를 들면 소수성 지질, (2) 지질 앵커를 양이온성 머리 부분에 연결시키기 위한 친수성 스페이서(spacer), 예를 들면 폴리에틸렌글리콜, 및 (3) 양성자화가능한 양이온성 머리 부분을 생성하는 폴리양이온성 잔기, 예를 들면 천연 발생 아미노산. 본 발명에 사용하기 적합한 SNALP 및 SNALP-CPL, 및 SNALP 및 SNALP-CPL 제조 방법 및 사용 방법은 예를 들면, 미국 출원 번호 09/553,639 및 09/839,707(U.S.P.A. 2002/0072121로 공개됨) 및 PCT 특허 출원 번호 CA 00/00451(WO 00/62813으로 공개됨)에 개시되어 있으며, 각 전문은 본 명세서에 참고문헌으로 인용된다.

[0118] 간략히, 본 발명은 하기 화학식 II의 화합물을 제공한다:



[0119]

[0120] 상기 식 중, A, W 및 Y는 다음과 같다.

[0121] 화학식 II를 참고로, "A"는 지질 앵커로 작용하는 지질 잔기, 예를 들면 양친매성 지질, 중성 지질 또는 소수성 지질이다. 적합한 지질 예는 소포 형성 지질 또는 소포 채움 지질을 포함하고, 디알킬글리세롤, 디알킬글리세롤, N-N-디알킬아미노, 1,2-디아실옥시-3-아미노프로판 및 1,2-디알킬-3-아미노프로판을 포함하며 이에 한정되지 않는다.

[0122] "W"는 중합체 또는 올리고머, 예를 들면 친수성 중합체 또는 올리고머이다. 바람직하게는, 친수성 중합체는 비면역원성이거나 또는 낮은 고유한 면역원성을 갖는 생체적합성 중합체이다. 별법으로, 친수성 중합체는 적합한 에주반트와 함께 사용되는 경우 약한 항원성일 수 있다. 적합한 비면역원성 중합체는 PEG, 폴리아미드, 폴리락트산, 폴리글리콜산, 폴리락트산/폴리글리콜산 공중합체 및 그들의 조합물을 포함하며 이에 한정되지 않는다. 바람직한 실시양태에서, 중합체는 약 250 내지 약 7000 달톤의 분자량을 갖는다.

[0123] "Y"는 폴리양이온성 잔기이다. 용어 폴리양이온성 잔기는 선택된 pH, 바람직하게는 생리학 pH에서 양전하, 바람직하게는 2 개 이상의 양전하를 갖는 화합물, 유도체 또는 작용기를 지칭한다. 적합한 폴리양이온성 잔기는 염기성 아미노산 및 그들의 유도체, 예를 들면 아르기닌, 아스파라긴, 글루타민, 리신 및 히스티딘, 스페르민, 스페르미딘, 양이온성 덴드리머(dendrimer), 폴리아민, 폴리아민 당 및 아미노 다당류를 포함한다. 폴리양이온성 잔기는 구조가 선형, 예를 들면 선형 테트라리신, 분지형 또는 덴드리머일 수 있다. 폴리양이온성 잔기는 선택된 pH 값에서 약 2 내지 약 15 개, 바람직하게는 약 2 내지 약 12 개, 더욱 바람직하게는 약 2 내지 약 8 개의 양전하를 갖는다. 어떤 폴리양이온성 잔기를 사용할지 선택하는 것은 바람직한 리포솜 적용 타입에 의해 결정될 수 있다.

[0124] 폴리양이온성 잔기 상의 전하는 전체 리포솜 잔기 주변에 분포될 수 있거나, 또는 별법으로, 리포솜 잔기의 한 특정 구역에서 전하 밀도의 이산된 농도, 예를 들면 전하 스파이크(spike)일 수 있다. 전하 밀도가 리포솜 상에 분포된 경우, 전하 밀도는 균등하게 또는 불균등하게 분포될 수 있다. 폴리양이온성 잔기의 전하 분포의 모든 변화는 본 발명에 포함된다.

[0125] 지질 "A" 및 비면역원성 중합체 "W"는 다양한 방법 및 바람직하게는, 공유 부착에 의해 부착될 수 있다. "A"

및 "W"의 공유 부착에 대해 당업자에게 공지된 방법을 사용할 수 있다. 적합한 연결은 아미드, 아민, 카르복실, 카르보네이트, 카르바메이트, 에스테르 및 히드라존 연결을 포함하며 이에 한정되지 않는다. "A" 및 "W"가 연결을 이루는 상보적 작용기를 가져야 한다는 것이 당업자에게 자명할 것이다. 이들 두 기, 지질 상의 것 및 중합체 상의 것의 반응은 원하는 연결을 제공하게 된다. 예를 들면, 지질이 디아실글리세롤이고 말단 히드록실이 예를 들면, NHS 및 DCC로 활성화되어 활성 에스테르를 형성하면, 아미노기를 함유하는 중합체, 예를 들면 폴리아미드와 반응하고(양쪽 모두 본 명세서에 참고 문헌으로 인용되는 미국 특허 번호 6,320,017 및 6,586,559 참조), 두 기 사이에 아미드 결합이 형성되게 된다.

[0126] 특정한 경우, 폴리양이온성 잔기는 부착되는 리간드, 예를 들면 표적화 리간드 또는 칼슘 착화용 킬레이팅 잔기를 가질 수 있다. 바람직하게는, 리간드가 부착된 후, 양이온성 잔기는 양전하를 유지한다. 특정한 경우, 부착되는 리간드는 양전하를 갖는다. 적합한 리간드는 반응성 작용기를 갖는 화합물 또는 장치를 포함하며 이에 한정되지 않으며, 지질, 양친매성 지질, 담체 화합물, 생친화성 화합물, 생체재료, 생체고분자, 생체 의료 장치, 분석 검출가능한 화합물, 치료적 활성 화합물, 효소, 펩티드, 단백질, 항체, 면역 자극제, 방사선평지, 플루오로젠(fluorogen), 바이오틴, 약물, 헵텐, DNA, RNA, 다당류, 리포솜, 비로솜(virosome), 미셀, 면역글로불린, 작용기, 다른 표적화 잔기 또는 독소를 포함한다.

[0127] D. siRNA

[0128] 전형적으로, SNALP의 핵산 성분은 예를 들면, 하나 이상의 단리된 작은 간섭 RNA(siRNA) 듀플렉스, 긴 이중 가닥 RNA(dsRNA) 또는 DNA 플라스미드에서 전사 카세트로부터 전사되는 siRNA 또는 dsRNA를 비롯한 몇몇 형태로 제공될 수 있는 간섭 RNA(즉, siRNA)를 포함한다.

[0129] RNA 집단은 긴 전구체 RNA를 제공하는 데 사용될 수 있거나, 또는 선택된 표적 서열에 대해 실질적인 또는 완전한 동일성을 갖는 긴 전구체 RNA는 siRNA를 제조하는 데 사용될 수 있다. RNA는 당업자에게 공지된 방법에 의해 세포 또는 조직으로부터 단리되고, 합성되고/되거나 클로닝될 수 있다. RNA는 혼합된 집단(cDNA로부터 전사되고, 서브트레이트(substrate)되고, 선택된 세포 또는 조직 등으로부터 얻음)일 수 있거나, 또는 단일 표적 서열을 나타낼 수 있다. RNA는 천연 발생, 예를 들면, 조직 또는 세포 샘플로부터 단리된 것일 수 있고, 예를 들면, T7 또는 SP6 중합효소 및 PCR 생성물 또는 클로닝된 cDNA를 사용하여 시험관내 합성되거나 또는 화학적으로 합성될 수 있다.

[0130] 합성 RNA의 경우 긴 dsRNA를 형성하기 위해, 상보체도 시험관내 전사시키고 하이브리드화하여 dsRNA를 형성한다. 또한, 천연 발생 RNA 집단을 사용하는 경우, 예를 들면, RNA 집단에 대응하는 cDNA를 전사시키거나 또는 RNA 중합효소를 사용함으로써 RNA 상보체도 제공한다(예를 들면, 대장균 RNase III 또는 Dicer에 의한 분해를 위해 dsRNA 형성). 그 다음, 전구체 RNA를 하이브리드화하여 분해용 이중 가닥 RNA를 형성한다. dsRNA는 SNALP에 직접 캡슐화될 수 있거나 또는 캡슐화 전에 시험관내 분해될 수 있다.

[0131] 별법으로, 하나 이상의 siRNA 주형을 코딩하는 하나 이상의 DNA 플라스미드를 핵산-지질 입자에 캡슐화한다. siRNA는 예를 들면, 소형 핵 RNA U6 또는 인간 RNase P RNA H 1에 대한 천연 발생 전사 단위를 기준으로 RNA 중합효소 III 전사 단위를 갖는 플라스미드에서 DNA 주형으로부터 헤어핀 루프를 갖는 듀플렉스로 자동적으로 폴딩되는 서열로서 전사될 수 있다(문헌[Brummelkamp, et al., Science 296:550 (2002); Donze, et al., Nucleic acid Res. 30: e46 (2002); Paddison, et al., Genes Dev. 16: 948 (2002); Yu, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 99:6047 (2002); Lee, et al., Nat. Biotech. 20:500 (2002); Miyagishi, et al., Nat. Biotech. 20:497 (2002); Paul, et al., Nat. Biotech. 20:505 (2002); and Sui, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 99:5515 (2002)] 참조). 전형적으로, 전사 단위 또는 카세트는 2-3개 우리딘 잔기 및 폴리티미딘(T5) 서열(폴리아데닐화 신호)을 포함하는 원하는 종결 서열 및 siRNA 서열의 전사에 대한 주형에 작동가능하게 연결된 RNA 전사체 프로모터 서열, 예를 들면 H1-RNA 또는 U6 프로모터를 함유하게 된다(Brummelkamp, Science, supra). 선택된 프로모터는 항시성 또는 유도성 전사를 제공할 수 있다. RNA 간섭 분자의 DNA-지향 전사용 조성물 및 방법은 미국 특허 번호 6,573,099에 상세하게 기재되어 있고, 본 명세서에 참고 문헌으로 인용된다. 바람직하게는, 합성된 또는 전사된 siRNA는 약 1-4 개, 바람직하게는 약 2-3 개의 뉴클레오타이드의 3' 돌출부 및 5' 포스페이트 말단을 갖는다(Elbashir, et al., Genes Dev. 15:188 (2001); Nykanen, et al., Cell 107:309 (2001)). 전사 단위는 간섭 RNA가 이로부터 전사되는 플라스미드 또는 DNA 벡터로 혼입된다. 치료적 목적의 유전 물질의 생체내 전달에 적합한 플라스미드는 미국 특허 번호 5,962,428 및 5,910,488에 상세하게 기재되어 있고, 양쪽 모두 본 명세서에 참고 문헌으로 인용된다. 선택된 플라스미드는 표적 세포의 일시적 또는 안정한 전달을 제공할 수 있다. 본래 원하는 유전자 서열을 발현하도록 디자인된 플라스미드를 siRNA 전사용 전사 단

위 카세트를 함유하도록 변형할 수 있다는 점이 당업자에게 자명할 것이다.

[0132] RNA 단리, RNA 합성, 핵산 하이브리드화, cDNA 라이브러리 제조 및 스크리닝 및 PCR 수행 방법은 당업계에 공지되어 있으며(예를 들면, 문헌[Gubler & Hoffman, *Gene* 25:263-269 (1983); Sambrook et al., *supra*; Ausubel et al., *supra*] 참조), PCR 방법도 그러하다(미국 특허 번호 4,683,195 및 4,683,202; 문헌[PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications(Innis et al., eds, 1990)] 참조). 또한, 발현 라이브러리도 당업자에게 공지되어 있다. 본 발명에 사용되는 일반적 방법을 개시하는 추가적인 기본서는 문헌[Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*(2nd ed.1989); Kriegler, *Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual* (1990); and *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel et al., eds., 1994)]을 포함한다.

[0133] 1. 표적 유전자

[0134] 일반적으로, SNALPS를 전달하여 관심있는 유전자 생성물의 번역(즉, 발현)을 하향조절하거나 또는 침묵시키는 것이 바람직하다. 유전자 생성물의 적합한 부류는 바이러스 감염 및 생존과 관련된 유전자, 대사 질환 및 장애(예를 들면, 간이 표적인 질환 및 장애, 및 간 질환 및 장애) 및 장애와 관련된 유전자, 종양생성 및 세포 형질 전환과 관련된 유전자, 혈관형성 유전자, 면역조절 유전자, 예를 들면 염증 및 자가면역 반응과 관련된 것들, 리간드 수용체 유전자 및 신경퇴행성 장애와 관련된 유전자를 포함하며 이에 한정되지 않는다.

[0135] 바이러스 감염 및 생존과 관련된 유전자는 세포에 결합하고 들어가고 복제하기 위해 바이러스에 의해 결합된 것들을 포함한다. 만성 바이러스 질환과 관련된 바이러스 서열이 특히 중요하다. 간염 바이러스의 서열을 포함하는 바이러스 서열이 특히 중요하다(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)), Human Immunodeficiency Virus(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)), Herpes Viruses(Jia, et al., *J. Virol.* 77:3301 (2003)), and Human Papilloma Viruses(HPV)(Hall, et al., *J. Virol.* 77:6066 (2003); Jiang, et al., *Oncogene* 21:6041 (2002)). 침묵될 수 있는 예시적인 간염 바이러스 핵산 서열은 전사 및 번역에 관여하는 핵산 서열(예를 들면, En1, En2, X, P), 구조 단백질(예를 들면, C 및 C 관련 단백질을 비롯한 코어 단백질, S, M, 및(또는) L 단백질 또는 그들의 단편을 비롯한 엔벨로프(envelope) 단백질 및 캡시드)을 엔코딩하는 핵산 서열을 포함하며 이에 한정되지 않는다(예를 들면, 문헌[FIELDS VIROLOGY, 2001, *supra*] 참조). 침묵될 수 있는 예시적인 C형 간염 핵산 서열은 세린 프로테아제(예를 들면, NS3/NS4), 헬리카아제(예를 들면, NS3), 중합효소(예를 들면, NS5B) 및 엔벨로프 단백질(예를 들면, E1, E2, 및 p7)을 포함하며 이에 한정되지 않는다. A형 간염 핵산 서열은 예를 들면, 젠뱅크 수탁 번호(Genbank Accession No.) NC_001489에 나타나 있고, B형 간염 핵산 서열은 예를 들면, 젠뱅크 수탁 번호 NC_003977에 나타나 있고, C형 간염 핵산 서열은 예를 들면, 젠뱅크 수탁 번호 NC_004102에 나타나 있고, D형 간염 핵산 서열은 예를 들면, 젠뱅크 수탁 번호 NC_001653에 나타나 있고, E형 간염 핵산 서열은 예를 들면, 젠뱅크 수탁 번호 NC_001434에 나타나 있고, G형 간염 핵산 서열은 예를 들면, 젠뱅크 수탁 번호 NC_001710에 나타나 있다. 편리하게도, 바이러스 감염 및 생존과 관련된 유전자를 코딩하는 서열의 침묵은 바이러스 상태를 치료하는 데 사용되는 통상적인 약제의 투여와 함께 사용될 수 있다.

[0136] 대사 질환 및 장애(예를 들면, 간이 표적인 장애, 및 간 질환 및 장애)와 관련된 유전자는 예를 들면, 이상지혈증(예를 들면, 간 X 수용체(예를 들면, LXR α 및 LXR β 젠뱅크 수탁 번호 NM_007121), 파네소이드(farnesoid) X 수용체(FXR)(젠뱅크 수탁 번호 NM_005123), 스테롤 조절 요소 결합 단백질(SREBP), 부위-1 프로테아제(S1P), 3-히드록시-3-메틸글루타릴 조효소-A 리덕타아제(HMG 조효소-A 리덕타아제), 아포리포단백질(Apolipoprotein)(ApoB), 및 아포리포단백질(ApoE)) 및 당뇨(예를 들면, 글루코오스 6-포스파테아제)에서 발현되는 유전자를 포함한다(예를 들면, 문헌[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)] 참조). 당업자는 대사 질환 및 장애(예를 들면, 간이 표적인 질환 및 장애, 및 간 질환 및 장애)와 관련된 유전자가 간 자체에서 발현되는 유전자, 뿐만 아니라 다른 기관 및 조직에서 발현되는 유전자를 포함한다는 것을 명확히 이해할 것이다. 편리하게도, 대사 질환 및 장애와 관련된 유전자를 엔코딩하는 서열의 침묵은 질환 또는 장애를 치료하는 데 사용되는 통상적인 약제의 투여와 함께 사용될 수 있다.

- [0137] 종양생성 및 세포 형질전환과 관련된 유전자 서열의 예는 전좌 서열, 예를 들면 MLL 융합 유전자, BCR-ABL(Wilda, et al., Oncogene, 21:5716 (2002); Scherr, et al., Blood 101:1566), TEL-AML1, EWS-FLI1, TLS-FUS, PAX3-FKHR, BCL-2, AML1-ETO 및 AML1-MTG8(Heidenreich, et al., Blood 101:3157 (2003)), 과발현된 서열, 예를 들면 다중약물 내성 유전자(Nieth, et al., FEBS Lett. 545:144 (2003); Wu, et al., Cancer Res. 63:1515 (2003)), 시클린(Li, et al., Cancer Res. 63:3593 (2003); Zou, et al., Genes Dev. 16:2923 (2002)), 베타-카테닌(Catenin)(Verma, et al., Clin Cancer Res. 9:1291 (2003)), 텔로머라아제 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)), 및 변이된 서열, 예를 들면 RAS(문헌[Tuschl and Borkhardt, Mol. Interventions, 2:158 (2002)]에서 검토됨)를 포함한다. DNA 복구 효소를 엔코딩하는 서열의 침묵은 화학치료제의 투여와 함께 사용될 수 있다(Collis, et al., Cancer Res. 63: 1550 (2003)). 또한, 종양 이동과 관련된 단백질을 엔코딩하는 유전자는 관심 있는 표적 서열, 예를 들면 인테그린, 셀렉틴(selectin) 및 메탈로프로테아제이다. 상기 예들은 비제한적이다. 종양생성 또는 세포 형질전환, 종양 성장 또는 종양 이동을 용이하게 하거나 촉진하는 임의의 전체 또는 부분 유전자 서열이 주형 서열로 포함될 수 있다.
- [0138] 혈관형성 유전자는 새로운 혈관의 형성을 촉진할 수 있다. 혈관 내피 성장 인자(VEGF)가 특히 관심을 끈다(Reich, et al., Mol. Vis. 9:210 (2003)).
- [0139] 면역조절 유전자는 하나 이상의 면역 반응을 조절할 수 있는 유전자이다. 면역조절 유전자의 예는 시토킨, 예를 들면 성장 인자(예를 들면, TGF- α , TGF- β , EGF, FGF, IGF, NGF, PDGF, CGF, GM-CSF, SCF 등), 인터루킨(예를 들면, IL-2, IL-4, IL-12(Hill, et al., J. Immunol. 171:691 (2003)), IL-15, IL-18, IL-20 등), 인터페론(예를 들면, IFN- α , IFN- β , IFN- γ 등) 및 TNF를 포함한다. 또한, Fas 및 Fas 리간드 유전자는 관심있는 면역조절제 표적 서열이다(Song, et al., Nat. Med. 9:347 (2003)). 또한, 조혈 및 림프구 세포에서 이차 신호전달 분자, 예를 들면, Tec 족 키나아제, 예를 들면 브루톤(Bruton)의 티로신 키나아제(Btk)를 엔코딩하는 유전자도 본 발명에 포함된다(Heinonen, et al., FEBS Lett. 527:274 (2002)).
- [0140] 세포 수용체 리간드는 세포 표면 수용체(예를 들면, 인슐린 수용체, EPO 수용체, G-단백질 커플링된 수용체, 티로신 키나아제 활성을 갖는 수용체, 시토킨 수용체, 성장 인자 수용체 등)에 결합할 수 있고, 수용체가 관여된 생리학적 경로(예를 들면, 글루코코스 수준 조절, 혈액 세포 발생, 유사분열 등)를 조절(예를 들면, 억제, 활성화 등)할 수 있는 리간드를 포함한다. 세포 수용체 리간드의 예는 시토킨, 성장 인자, 인터루킨, 인터페론, 에리트로포이에틴(EPO), 인슐린, 글루카곤, G-단백질 커플링된 수용체 리간드 등을 포함한다. 트리뉴클레오타이드 반복서열(예를 들면, CAG 반복서열) 확장을 코딩하는 주형은 트리뉴클레오타이드 반복서열의 확장에 의해 유발되는 신경퇴행성 장애, 예를 들면 척추성 근위축증 및 헌팅톤 무도병에서 병원성 서열을 침묵시키는 데 사용된다(Caplen, et al., Hum. Mol. Genet. 11:175 (2002)).
- [0141] IV. SNALP 제조
- [0142] 본 발명은 핵산(예를 들면, siRNA 또는 siRNA를 엔코딩하는 플라스미드)이 지질 이중층에 캡슐화되고 분해로부터 보호되도록 혈청-안정성 핵산-지질 입자를 제조하는 방법을 제공한다. 전형적으로, 본 발명의 방법에 의해 제조된 SNALP는 직경이 약 50 내지 약 150 nm이다. 이들은 일반적으로 약 150 nm 미만, 더욱 전형적으로 약 100 nm 미만의 중간 직경을 가지며, 입자의 대다수는 약 65 내지 85 nm의 중간 직경을 갖는다. 입자는, 예를 들면, 세제 투석 방법을 비롯한 당업계에 공지된 임의의 방법을 사용함으로써 또는 유기 용매를 사용하여 성분들의 혼합 동안 단일상을 제공하는 역상 방법의 변형에 의해 형성될 수 있다. 임의의 특정 형성 이전에 얹매이 고자 하는 것은 아니지만, 플라스미드 또는 다른 핵산(즉, siRNA)이 양이온성 지질의 세제 용액과 접촉하여 코팅된 핵산 복합체를 형성한다. 이러한 코팅된 핵산은 응집하고 침전할 수 있다. 그러나, 세제의 존재는 이 응집을 감소시키고, 코팅된 핵산이 과량의 지질(전형적으로, 비양이온성 지질)과 반응하여 플라스미드 또는 다른 핵산이 지질 이중층에 캡슐화된 입자를 형성하게 한다. 유기 용매를 사용한 핵산-지질 입자의 형성에 대해 이하 기술하는 방법은 유사한 개요를 따른다. SNALPS를 제조하는 예시적인 방법은 미국 특허 번호 5,705,385, 5,981,501, 5,976,567, 6,586,410, 6,534,484, 미국 출원 일련번호 09/553,639, U.S.P.A. 공개번호 2002/0072121 및 2003/0077829, WO 96/40964 및 WO 00/62813에 개시되어 있다.
- [0143] 한 실시양태에서, 본 발명은 제 1 저장소에 수용액을 제공하고, 제 2 저장소에 유기 지질 용액을 제공하고, 핵산을 캡슐화하는 리포솜을 실질적으로 즉시 생성하기 위해 유기 지질 용액이 수용액과 혼합하도록 수용액을 유기 지질 용액과 혼합하는 것을 포함하는 방법에 의해 생성된 핵산-지질 입자를 제공한다. 이 방법 및 이 방법

을 수행하는 장치는 2003년 6월 30일 출원된 미국 특허 출원 번호 10/611,274에 상세하게 기재되어 있고, 본 명세서에 참고 문헌으로 인용된다.

- [0144] 지질 및 완충제 용액을 혼합 환경, 예를 들면 혼합 챔버에 연속적으로 도입시키는 작용은 지질 용액의 완충제 용액과의 연속 희석을 일으켜 혼합시 실질적으로 즉시 리포솜을 형성시킨다. 본 명세서에 사용된 문구 "완충제 용액으로 연속적으로 희석되는 지질 용액" (및 변형문구)은 일반적으로 지질 용액이 소포를 생성시키기에 충분한 힘으로 수화 공정에서 충분히 신속하게 희석되는 것을 의미한다. 수용액을 유기 지질 용액과 혼합시킴으로써, 유기 지질 용액은 완충제(수성) 용액의 존재 하에서 연속 단계적으로 희석되어 리포솜을 생성한다.
- [0145] 일부 실시양태에서, 입자는 세제 투석을 사용하여 형성된다. 따라서, 본 발명은
- [0146] (a) 세제 용액 중에서 핵산을 양이온성 지질과 배합하여 코팅된 핵산-지질 복합체를 형성하는 단계,
- [0147] (b) 비양이온성 지질을 코팅된 핵산-지질 복합체와 접촉시켜 핵산-지질 복합체 및 비양이온성 지질을 포함하는 세제 용액을 형성하는 단계, 및
- [0148] (c) 단계 (b)의 세제 용액을 투석하여 혈청-안정성 핵산-지질 입자의 용액을 제공하며, 여기서 핵산은 지질 이중층에 캡슐화되고 입자는 혈청-안정성이고 약 50 내지 약 150 nm의 크기를 갖는 것인 단계
- [0149] 를 포함하는 혈청-안정성 핵산-지질 입자의 제조 방법을 제공한다.
- [0150] 코팅된 핵산-지질 복합체의 초기 용액은 세제 용액 중에서 핵산을 양이온성 지질과 배합시킴으로써 형성된다.
- [0151] 이들 실시양태에서, 세제 용액은 바람직하게는 15-300 mM, 더욱 바람직하게는 20-50 mM의 임계 미셀 농도를 갖는 중성 세제의 수용액이다. 적합한 세제의 예는 예를 들면, N,N'-((옥타노일이미노)-비스-(트리메틸렌))-비스-(D-글루콘아미드)(BIGCHAP), BRIJ 35, 데옥시(Deoxy)-BIGCHAP, 도데실폴리(에틸렌 글리콜) 에테르, 트윈 (Tween) 20, 트윈 40, 트윈 60, 트윈 80, 트윈 85, 메가(Mega) 8, 메가 9, 쯔비터젠트(Zwittergent)[®] 3-08, 쯔비터젠트[®] 3-10, 트리톤 X-405, 핵실-, 헵틸-, 옥틸- 및 노닐-β-D-글루코피라노시드 및 헵틸티오글루코피라노시드를 포함하며, 옥틸-D-글루코피라노시드 및 트윈-20이 가장 바람직하다. 세제 용액 중 세제의 농도는 전형적으로 약 100 mM 내지 약 2 M, 바람직하게는 약 200 mM 내지 약 1.5 M이다.
- [0152] 전형적으로, 양이온성 지질 및 핵산은 배합되어 약 1:1 내지 약 20:1, 바람직하게는 약 1:1 내지 약 12:1, 더욱 바람직하게는 약 2:1 내지 약 6:1의 전하 비(+/-)를 생성하게 된다. 또한, 용액 중 핵산의 전체 농도는 전형적으로 약 25 μg/mL 내지 약 1 mg/mL, 바람직하게는 약 25 μg/mL 내지 약 200 μg/mL, 더욱 바람직하게는 약 50 μg/mL 내지 약 100 μg/mL이게 된다. 세제 용액 중의 핵산 및 양이온성 지질의 조합물은 전형적으로 실온에서, 코팅된 복합체를 형성하기에 충분한 시간 동안 유지된다. 별법으로, 핵산 및 양이온성 지질을 세제 용액 중에서 배합하고, 약 37 °C 이하의 온도로 가온시킬 수 있다. 특히 온도에 민감한 핵산의 경우, 코팅된 복합체를 저온, 전형적으로 약 4 °C 미만에서 형성시킬 수 있다.
- [0153] 바람직한 실시양태에서, 형성된 SNALP 중의 핵산 대 지질 비(질량/질량 비)는 약 0.01 내지 약 0.08 범위이다. 또한, 정제 단계는 전형적으로 비캡슐화된 핵산, 뿐만 아니라 빈 리포솜을 제거하기 때문에 출발 물질의 비도 이 범위에 속한다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, SNALP 제조법은 10 mg 총 지질 당 약 400 μg 핵산 또는 약 0.01 내지 약 0.08, 더욱 바람직하게는 약 0.04의 핵산 대 지질 비를 사용하며, 이는 50 μg의 핵산 당 총 지질 1.25 mg에 대응한다.
- [0154] 그 다음, 코팅된 핵산-지질 복합체의 세제 용액을 비양이온성 지질과 접촉시켜 핵산-지질 복합체 및 비양이온성 지질의 세제 용액을 제공한다. 이 단계에 유용한 비양이온성 지질은 디아실포스파티딜콜린, 디아실포스파티딜에탄올아민, 세라미드, 스펡고미엘린, 세팔린, 카르디오페인 및 세레브로사이드를 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 비양이온성 지질은 디아실포스파티딜콜린, 디아실포스파티딜에탄올아민, 세라미드 또는 스펡고미엘린이다. 이들 지질 중 아실기는 바람직하게는 C₁₀-C₂₄ 탄소 쇄를 갖는 지방산으로부터 유래된 아실기이다. 더욱 바람직하게는, 아실기는 라우로일, 미리스토일, 팔미토일, 스테아로일 또는 올레오일이다. 특히 바람직한 실시양태에서, 비양이온성 지질은 1,2-sn-디올레오일포스파티딜에탄올아민(DOPE), 팔미토일 올레오일 포스파티딜콜린(POPC), 에그 포스파티딜콜린(EPC), 디스테아로일포스파티딜콜린(DSPC), 콜레스테롤 또는 그들의 혼합물이게 된

다. 가장 바람직한 실시양태에서, 핵산-지질 입자는 생체내 강화된 특성을 갖는 융합생성 입자이고, 비양이온성 지질은 DSPC 또는 DOPE이다. 또한, 본 발명의 핵산-지질 입자는 콜레스테롤을 추가로 포함할 수 있다. 다른 바람직한 실시양태에서, 비양이온성 지질은 미국 특허 번호 5,820,873 및 함께 계류중인 특허 출원 10/136,707(U.S.P.A. 공개번호 2003/0077829로서 공개됨)에 기재된 바와 같은 폴리에틸렌 글리콜 기재 중합체, 예를 들면 PEG 2000, PEG 5000 및 디아실글리세롤, 세라미드 또는 인지질에 컨쥬게이션된 폴리에틸렌 글리콜을 추가로 포함하며, 상기 문헌은 양쪽 모두 본 명세서에 참고 문헌으로 인용된다. 추가의 바람직한 실시양태에서, 비양이온성 지질은 폴리에틸렌 글리콜 기재 중합체, 예를 들면 디알킬옥시프로필에 컨쥬게이션된 PEG 2000, PEG 5000 및 폴리에틸렌 글리콜을 추가로 포함한다.

- [0155] 본 방법에서 사용되는 비양이온성 지질의 양은 전형적으로 50 μ g의 핵산을 기준으로 약 2 내지 약 20 mg의 총 지질이다. 바람직하게는 총 지질의 양은 50 μ g의 핵산 당 약 5 내지 약 10 mg이다.
- [0156] 핵산-지질 복합체 및 비양이온성 지질의 세제 용액 형성 후, 세제를 바람직하게는 투석에 의해 제거한다. 세제의 제거는 약 50 nm 내지 약 150 nm의 크기를 갖는 혈청-안정성 핵산-지질 입자를 제공하는 핵산을 둘러싸는 지질-이중층을 형성시킨다. 따라서, 형성되는 입자는 응집하지 않고, 임의적으로 균일한 입도를 얻도록 사이징된다.
- [0157] 혈청-안정성 핵산-지질 입자는 리포솜을 사이징하는 데 이용가능한 임의의 방법에 의해 사이징될 수 있다. 원하는 크기 범위 및 비교적 좁은 입도 분포를 얻기 위해 사이징을 수행할 수 있다.
- [0158] 입자를 원하는 크기로 사이징하는 데 몇몇 기술이 이용가능하다. 리포솜에 사용되고 본 입자에 균등하게 적용가능한 한 사이징 방법은 미국 특허 번호 4,737,323에 기재되어 있고, 상기 문헌은 본 명세서에 참고 문헌으로 인용된다. 배쓰(bath) 또는 프로브 초음파 처리에 의해 입자 현탁액을 초음파 처리하면 크기가 약 50 nm 미만인 입자로 크기가 점진적으로 감소된다. 균질화는 전단 에너지에 의존하여 큰 입자를 작은 것들로 절단하는 또 다른 방법이다. 전형적 균질화 절차에서, 입자는 선택된 입도, 전형적으로 약 60 내지 80 nm가 관찰될 때까지 표준 에멀션 균질화제를 통해 재순환된다. 양쪽 모두의 방법에서, 입도 분포를 통상적인 레이저 광선 입도 분별, 또는 QELS에 의해 모니터링할 수 있다.
- [0159] 또한, 작은 세공 폴리카르보네이트 막 또는 비대칭 세라믹 막을 통한 입자의 압출도 입도를 비교적 잘 정해진 크기 분포로 감소시키는 유효한 방법이다. 전형적으로, 원하는 입도 분포가 얻어질 때까지 현탁액을 1 회 이상 막을 통해 순환시킨다. 입자를 작은 세공 막을 통해 연속적으로 압출하여 점진적인 크기 감소를 얻을 수 있다.
- [0160] 실시양태의 또 다른 군에서, 본 발명은
- [0161] (a) 유기 용매 중에서 양이온성 지질 및 비양이온성 지질을 포함하는 혼합물을 제조하는 단계,
- [0162] (b) 핵산의 수용액을 단계 (a)의 상기 혼합물과 접촉시켜 투명한 단일상을 제공하는 단계, 및
- [0163] (c) 상기 유기 용매를 제거하여 핵산-지질 입자의 현탁액을 제공하며, 여기서 상기 핵산은 지질 이중층에 캡슐화되고, 상기 입자는 혈청 중에서 안정하고, 약 50 내지 약 150 nm의 크기를 갖는 것인 단계
- [0164] 를 포함하는 혈청-안정성 핵산-지질 입자의 제조 방법을 제공한다.
- [0165] 이 실시양태 군에 유용한 핵산(또는 플라스미드), 양이온성 지질 및 비양이온성 지질은 상기 세제 투석 방법에 기재한 바와 같다.
- [0166] 유기 용매의 선택은 전형적으로 용매 극성 및 용매가 입자 형성의 후기 단계에서 제거될 수 있는 용이성의 고려를 포함한다. 또한, 가용화제로 사용되는 유기 용매는 핵산 및 지질의 투명한 단일상 혼합물을 제공하기 충분한 양으로 사용한다. 적합한 용매는 클로로포름, 디클로로메탄, 디에틸에테르, 시클로헥산, 시클로펜탄, 벤젠, 톨루엔, 메탄올, 또는 다른 지방족 알코올, 예를 들면 프로판올, 이소프로판올, 부탄올, tert-부탄올, 이소-부탄올, 펜탄올 및 헥산올을 포함하며 이에 한정되지 않는다. 또한, 2 개 이상의 용매의 조합물도 본 발명에 사용할 수 있다.
- [0167] 핵산을 양이온성 및 비양이온성 지질의 유기 용액과 접촉시키는 것은 전형적으로 수용액인 핵산의 제 1 용액 및 지질의 제 2 유기 용액을 함께 혼합함으로써 달성된다. 당업자는 이 혼합을 임의의 다수의 방법, 예를 들면 기계적 수단에 의해, 예를 들면 볼텍스 믹서를 사용하여 수행될 수 있다는 점을 이해할 것이다.
- [0168] 핵산을 지질의 유기 용액과 접촉시킨 후, 유기 용매를 제거시킴으로써, 혈청-안정성 핵산-지질 입자의 수성 현

탁액을 형성시킨다. 유기 용매를 제거하는 데 사용되는 방법은 전형적으로 감압에서의 증발 또는 혼합물을 가로질러 불활성 기체(예를 들면, 질소 또는 아르곤)의 스트림을 취입시키는 것을 포함한다.

[0169] 이렇게 하여 형성된 혈청 안정 핵산-지질 입자는 전형적으로 약 50 nm 내지 150 nm로 사이징된다. 입자의 추가의 크기 감소 또는 크기의 균질성을 얻기 위해, 사이징을 상기와 같이 수행할 수 있다.

[0170] 다른 실시양태에서, 상기 방법은 본 조성물을 사용하여 세포로 전달시키는 데 유용한 비지질 폴리양이온을 첨가하는 것을 추가로 포함한다. 적합한 비지질 폴리양이온의 예는 헥사디메트린 브로마이드(미국 위스콘신주 밀와우케 소재의 알드리치 케미칼 캄파니(Aldrich Chemical Co.)로부터 상표명 폴리브렌(POLYBRENE)[®]

하에 시판됨) 또는 헥사디메트린의 다른 염을 포함하며 이에 한정되지 않는다. 다른 적합한 폴리양이온은 예를 들면, 폴리-L-오르니틴, 폴리-L-아르기닌, 폴리-L-리신, 폴리-D-리신, 폴리알릴아민 및 폴리에틸렌아민의 염을 포함한다.

[0171] 특정한 실시양태에서, 핵산-지질 입자의 형성은 적합하게 혼합하면서 단상 시스템(예를 들면, Bligh 및 Dyer 단상 또는 수성 및 유기 용매의 유사한 혼합물) 또는 이상(two-phase) 시스템에서 수행될 수 있다.

[0172] 복합체의 형성이 단상 시스템에서 수행되는 경우, 양이온성 지질 및 핵산은 각각 단상 혼합물의 소정의 부피에 용해된다. 두 용액의 조합물은 단일 혼합물을 제공하며 단일 혼합물 중에서 복합체가 형성된다. 별법으로, 복합체는 이상 혼합물에서 형성될 수 있고, 이상 혼합물 중에서는 양 이온성 지질이 핵산(수상 중에 존재함)에 결합하여 이를 유기상으로 "당길(pull)" 수 있다.

[0173] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은

[0174] (a) 핵산을 비양이온성 지질 및 세제를 포함하는 용액과 접촉시켜 핵산-지질 혼합물을 형성하는 단계,

[0175] (b) 양이온성 지질을 핵산-지질 혼합물과 접촉시켜 핵산의 음전하의 일부를 중성화시키고 핵산 및 지질로 된 중성 전하의 혼합물을 형성하는 단계, 및

[0176] (c) 중성 전하의 혼합물로부터 세제를 제거하여 핵산이 분해로부터 보호되는 핵산-지질 입자를 제공하는 단계

[0177] 를 포함하는 핵산-지질 입자의 제조 방법을 제공한다.

[0178] 실시양태의 한 군에서, 비양이온성 지질 및 세제의 용액은 수용액이다. 핵산을 비양이온성 지질 및 세제의 용액과 접촉시키는 것은 전형적으로 핵산의 제 1 용액 및 지질 및 세제의 제 2 용액을 함께 혼합함으로써 수행된다. 당업자는 이 혼합을 임의의 다수의 방법, 예를 들면 기계적 수단에 의해, 예를 들면 볼텍스 믹서를 사용하여 수행될 수 있다는 점을 이해할 것이다. 바람직하게는, 핵산 용액도 세제 용액이다. 본 방법에서 사용되는 비양이온성 지질의 양은 전형적으로 사용된 양이온성 지질의 양을 기준으로 결정되며, 전형적으로 사용된 양이온성 지질의 양의 약 0.2 내지 5 배, 바람직하게는 약 0.5 내지 약 2 배이다.

[0179] 일부 실시양태에서, 예를 들면, 미국 특허 출원 번호 09/744,103에 기재된 바와 같이 핵산을 예비축합한다.

[0180] 이렇게 하여 형성된 핵산-지질 혼합물을 양이온성 지질과 접촉시켜 존재하는 핵산(또는 다른 폴리음이온성 물질)과 관련된 음전하의 일부를 중성화시킨다. 사용된 양이온성 지질의 양은 핵산 중 50 % 이상의 음전하를 중성화시키는 데 충분하다. 바람직하게는, 음전하는 70 % 이상, 더욱 바람직하게는 90 % 이상 중성화된다. 본 발명에 유용한 양이온성 지질은 예를 들면, DODAC, DOTMA, DDAB, DOTAP, DC-Chol 및 DMRIE를 포함한다. 이들 지질 및 관련 유사체는 미국 특허 번호 5,208,036, 5,264,618, 5,279,833, 5,283,185, 5,753,613 및 5,785,992에 기재되었으며, 각각의 개시내용은 본 명세서에 참고 문헌으로 인용된다.

[0181] 양이온성 지질을 핵산-지질 혼합물과 접촉시키는 것은 임의의 다수의 기술, 바람직하게는 양이온성 지질의 용액 및 핵산 지질 혼합물을 함유하는 용액을 함께 혼합함으로써 수행될 수 있다. 두 용액의 혼합시 (또는 임의의 다른 방식으로 접촉시키는 경우), 핵산과 관련된 음전하의 일부가 중성화된다. 그럼에도 불구하고, 핵산은 비축합된 상태로 남고 친수성 특징을 획득한다.

[0182] 양이온성 지질을 핵산-지질 혼합물과 접촉시킨 후, 세제(또는 세제 및 유기 용매의 조합물)를 제거하여 핵산-지질 입자를 형성시킨다. 전형적으로, 세제를 제거하는 데 사용되는 방법은 투석을 포함한다. 유기 용매가 존재하는 경우, 제거는 전형적으로 감압하에 증발시키거나 또는 혼합물을 가로질러 불활성 기체(예를 들면, 질소 또는 아르곤)의 스트림을 취입시켜 수행된다.

[0183] 이렇게 하여 형성된 입자는 전형적으로 약 100 nm 내지 수 마이크로미터로 사이징된다. 입자의 추가의 크기 감소

또는 크기의 균질성을 얻기 위해, 핵산-지질 입자를 초음파처리하고, 여과시키거나, 또는 리포솜 포몰레이션에 사용되고 당업자에게 공지되어 있는 다른 사이징 기술로 처리할 수 있다.

[0184] 다른 실시양태에서, 상기 방법은 본 조성물을 사용하여 세포를 리포펙션(lipofection)하는 데 유용한 비지질 폴리양이온을 첨가하는 것을 추가로 포함한다. 적합한 비지질 폴리양이온의 예는 핵사디메트린 브로마이드(미국 위스콘신주 밀와우케 소재의 알드리치 케미칼 캄파니로부터 상표명 폴리브렌®

하에 시판됨) 또는 핵사디메트린의 다른 염을 포함한다. 다른 적합한 폴리양이온은 예를 들면, 폴리-L-오르니틴, 폴리-L-아르기닌, 폴리-L-리신, 폴리-D-리신, 폴리알릴아민 및 폴리에틸렌이민의 염을 포함한다. 이들 염의 첨가는 바람직하게는 입자가 형성된 후 이루어진다.

[0185] 또 다른 측면에서, 본 발명은

[0186] (a) 약 15-35 % 물 및 약 65-85 % 유기 용매를 포함하는 용액 중에서 약 0.85 내지 약 2.0의 +/-전하 비를 생성하기 충분한 양의 양이온성 지질을 핵산과 접촉시켜 소수성 핵산-지질 복합체를 제공하는 단계,

[0187] (b) 용액 중에서 소수성 핵산-지질 복합체를 비 양이온성 지질과 혼합시켜 핵산-지질 혼합물을 제공하는 단계, 및

[0188] (c) 유기 용매를 핵산-지질 혼합물로부터 제거하여 핵산이 분해로부터 보호되는 핵산-지질 입자를 제공하는 단계

[0189] 를 포함하는 핵산-지질 입자의 제조 방법을 제공한다.

[0190] 본 발명의 이 측면에서 유용한 핵산, 비양이온성 지질, 양이온성 지질 및 유기 용매는 세제를 사용한 상기 방법에 대해 기재한 것들과 동일하다. 실시양태의 한 군에서, 단계 (a)의 용액은 단상이다. 실시양태의 또 다른 군에서, 단계 (a)의 용액은 이상이다.

[0191] 바람직한 실시양태에서, 양이온성 지질은 DODAC, DDAB, DOTMA, DOSPA, DMRIE, DOGS 또는 그들의 조합물이다. 다른 바람직한 실시양태에서, 비양이온성 지질은 ESM, DOPE, DOPC, DSPC, 폴리에틸렌 글리콜 기재 중합체(예를 들면, PEG 2000, PEG 5000, PEG-변형된 디아실글리세롤, 또는 PEG-변형된 디알킬옥시프로필), 디스테아로일포스파티딜콜린(DSPC), 콜레스테롤 또는 그들의 조합물이다. 또한 다른 바람직한 실시양태에서, 유기 용매는 메탄올, 클로로포름, 메틸렌 클로라이드, 에탄올, 디에틸 에테르 또는 그들의 조합물이다.

[0192] 한 실시양태에서, 핵산은 간섭 RNA(interfering RNA)가 이로부터 전사되는 플라스미드이고, 양이온성 지질은 DODAC, DDAB, DOTMA, DOSPA, DMRIE, DOGS 또는 그들의 조합물이고, 비양이온성 지질은 ESM, DOPE, DAG-PEG, 디스테아로일포스파티딜콜린(DSPC), 콜레스테롤 또는 그들의 조합물(예를 들면, DSPC 및 DAG-PEGs)이고, 유기 용매는 메탄올, 클로로포름, 메틸렌 클로라이드, 에탄올, 디에틸 에테르 또는 그들의 조합물이다.

[0193] 상기과 같이, 핵산을 양이온성 지질과 접촉시키는 것은 전형적으로 핵산의 제 1 용액 및 지질의 제 2 용액을 바람직하게는 기계적 수단에 의해, 예를 들면 볼텍스 믹서를 사용함으로써 함께 혼합함으로써 수행된다. 생성되는 혼합물은 상기한 바와 같이 복합체를 함유한다. 그 다음, 이 복합체들을 비양이온성 지질을 첨가하고 유기 용매를 제거함으로써 입자로 전환시킨다. 전형적으로, 비양이온성 지질의 첨가는 비양이온성 지질의 용액을 복합체를 함유하는 혼합물에 단순히 첨가함으로써 수행된다. 또한, 역 첨가도 사용될 수 있다. 유기 용매의 후속 제거는 당업자에게 공지되고 상기한 방법에 의해 수행될 수 있다.

[0194] 본 발명의 이러한 측면에서 사용되는 비양이온성 지질의 양은 전형적으로 중성 전하의 핵산-지질 복합체를 제공하는데 사용된 양이온성 지질의 양의 약 0.2 내지 약 15 배(몰 기준)이다. 바람직하게는, 양은 사용된 양이온성 지질의 양의 약 0.5 내지 약 9 배이다.

[0195] 또한, 또 다른 측면에서, 본 발명은 상기한 방법에 의해 제조되는 핵산-지질 입자를 제공한다. 이들 실시양태에서, 핵산-지질 입자는 중성인 순전하(net charge)를 가지거나 또는 입자에 큰 유전자 리포펙션 활성을 제공하는 전체 전하(overall charge)를 갖는다. 바람직하게는, 입자의 핵산 성분은 원치 않는 단백질의 생성을 간섭하는 핵산이다. 바람직한 실시양태에서, 핵산은 간섭 RNA를 포함하고, 비양이온성 지질은 에그 스프링고미엘린이고, 양이온성 지질은 DODAC이다. 바람직한 실시양태에서, 핵산은 간섭 RNA를 포함하고, 비양이온성 지질은 DSPC 및 콜레스테롤의 혼합물이고, 양이온성 지질은 DOTMA이다. 다른 바람직한 실시양태에서, 비양이온성 지질은 콜레스테롤을 추가로 포함할 수 있다.

[0196] SNALP-CPL(CPL 함유 SNALP)을 제조하는 다양한 일반적 방법이 본 명세서에서 논의된다. 두 일반적 기술은, CPL

을, 예를 들면, 미리 형성된 SNALP에 삽입하는 "후-삽입(post-insertion)" 기술, 및 CPL을 예를 들면, SNALP 형성 단계 동안 지질 혼합물에 포함시키는 "표준" 기술을 포함한다. 후-삽입 기술은 주로 SNALP 이중층 막의 외면에 CPL을 갖는 SNALP를 제공하는 한편, 표준 기술은 내면 및 외면 양쪽 모두에 CPL을 갖는 SNALP를 제공한다. 상기 방법은 인지질(콜레스테롤을 함유할 수 있음)로부터 제조된 소포 및 또한 PEG-지질(예를 들면, PEG-DAG)을 함유하는 소포에 특히 유용하다. SNALP-CPL 제조 방법은 예를 들면, 미국 특허 번호 5,705,385, 6,586,410, 5,981,501 및 6,534,484, 미국 출원 09/553,639 및 09/839,707(U.S.P.A. 공개번호 2002/0072121로 공개됨), 뿐만 아니라 PCT 국제 출원 PCT/CA00/00451(WO 00/62813으로 공개됨)에 교시되어 있고, 각각은 본 명세서에 참고 문헌으로 인용된다.

[0197] 본 발명의 핵산-지질 입자는 단독으로 또는 투여 경로 및 표준 제약 실무에 따라 선택된 생리학적으로 허용되는 담체(예를 들면, 생리학 적 식염수 또는 포스페이트 완충제)와의 혼합물로 투여될 수 있다. 일반적으로, 정상 식염수를 약제학적으로 허용되는 담체로 사용하게 된다. 다른 적합한 담체는 안정성 강화를 위한 당단백질, 예를 들면 알부민, 리포단백질, 글로불린 등을 비롯하여 예를 들면, 물, 완충수, 0.4 % 식염수, 0.3 % 글리신 등을 포함한다.

[0198] 약제학적 담체는 일반적으로 입자 형성 후 첨가된다. 따라서, 입자가 형성된 후, 입자를 약제학적으로 허용되는 담체, 예를 들면 정상 식염수에 희석시킬 수 있다.

[0199] 약제학적 제형 중 입자의 농도는 광범위하게, 즉 약 0.05 % 미만, 통상 약 2.5 % 이상에서 10 내지 30 중량%에 이르기까지 다양할 수 있고, 선택된 특정 투여 방식에 따라 주로 유체 부피, 점도 등에 의해 선택되게 된다. 예를 들면, 농도를 증가시켜 치료와 관계된 유체의 양을 낮출 수 있다. 이는 울혈성 심부전 또는 중증 고혈압과 관련된 죽상경화증을 갖는 환자에게 특히 바람직할 수 있다. 별법으로, 자극성 지질로 구성된 입자를 저 농도로 희석하여 투여 부위에서 염증을 감소시킬 수 있다.

[0200] 상기한 바와 같이, 일부 실시양태에서, 본 발명의 핵산-지질 입자는 DAG-PEG 컨쥬게이트를 포함한다. 본 발명의 다른 실시양태에서, 핵산-지질 입자는 PEG-디알킬옥시프로필 컨쥬게이트를 포함한다. DAG-PEG 컨쥬게이트 또는 PEG-디알킬옥시프로필 컨쥬게이트와 유사한 방식으로 작용하고, 입자 응집을 방지하고 순환 수명을 증가시키고 핵산-지질 입자의 표적 조직으로의 전달을 증가시키는 수단을 제공하도록 작용하는 다른 성분들을 포함하는 것이 종종 바람직하다. 이러한 성분들은 입자에 대한 PEG-지질 컨쥬게이트, 예를 들면 PEG-세라미드 또는 PEG-인지질(예를 들면, PEG-PE), 갱글리오시드 GM1-변형된 지질 또는 ATTA-지질을 포함하며 이에 한정되지 않는다. 전형적으로, 입자 중 성분의 농도는 약 1-20 %, 더욱 바람직하게는 약 3-10 %이다.

[0201] 본 발명의 약제 조성물은 통상적인 공지된 멸균 기술에 의해 멸균될 수 있다. 수용액은 사용을 위해 액킹징되거나, 또는 무균 조건 하에서 여과 및 동결건조하여 투여 전 멸균 수용액과 조합되는 동결건조 제제로 할 수 있다. 조성물은 생리학 적 조건과 유사해지도록 하는 데 필요한 약제학적으로 허용되는 보조 물질, 예를 들면 pH 조정 및 완충제, 삼투조절제 등, 예를 들면, 아세트산나트륨, 락트산나트륨, 염화나트륨, 염화칼륨 및 염화칼슘을 함유할 수 있다. 또한, 입자 현탁액은 저장 중 자유 라디칼 및 지질-과산화 손상으로부터 지질을 보호하는 지질 보호제를 포함할 수 있다. 친유성 자유 라디칼 키펀제(quencher), 예를 들면 알파토코페롤 및 수용성 철 특이적 킬레이터, 예를 들면 페리옥사민이 적합하다.

[0202] V. SNALP의 투여

[0203] 편리하게도, 본 발명의 SNALP는 핵산을 세포로 도입시키는 데 사용될 수 있다(예를 들면, 표적 유전자의 발현과 관련된 질환 또는 장애를 치료 또는 방지하기 위해). 따라서, 또한 본 발명은 핵산(예를 들면, 간섭 RNA)을 세포에 도입하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 먼저 상기한 바와 같이 입자를 형성한 다음, siRNA의 전달이 일어나기 충분한 시간 동안 입자를 세포와 접촉시킴으로써 시험관내 또는 생체내 수행된다.

[0204] 본 발명의 SNALP는 이들이 혼합되거나 또는 접촉하는 거의 모든 세포 타입에 흡착될 수 있다. 입자는 일단 흡착되면 세포의 일부에 의해 세포내 이입되거나, 세포막과 지질을 교환하고나, 또는 세포와 융합할 수 있다. 입자의 핵산 부분의 전이 또는 혼입은 이들 경로들 중 어느 하나를 통해 일어날 수 있다. 특히, 융합이 일어나는 경우, 입자 막은 세포막으로 통합되고, 입자의 함유물들은 세포내액과 혼합된다.

[0205] 세포 타입 중 siRNA의 세포내 전달에 대해 가장 흔히 표적화된 것은 신생물 세포(예를 들면, 종양 세포) 및 간 세포이다. 표적화될 수 있는 다른 세포로는 예를 들면, 조혈 전구체(줄기) 세포, 섬유모세포, 각질세포, 간세포, 내피 세포, 골격근 및 평활근 세포, 골모세포, 뉴런, 무활동 림프구, 최종 분화된 세포, 느린 또는 비사이클링(noncycling) 일차 세포, 실질 세포, 림프구 세포, 상피 세포, 골 세포 등이 있다. 바람직한

실시양태에서, 간세포가 표적화된다.

- [0206] 이는 세포의 조직 배양을 필요로 할 수 있는 정도로 당업계에 공지되어 있다. 문헌[Freshney (1994) (Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique, third edition Wiley-Liss, New York), Kuchler et al. (1977) Biochemical Methods in Cell Culture and Virology, Kuchler, R. J., Dowden, Hutchinson and Ross, Inc.] 및 상기 문헌에 언급된 참조문헌들은 세포 배양에 대한 일반적인 안내를 제공한다. 비록 세포 현탁액도 사용되지만 배양된 세포 시스템은 종종 세포의 단층 형태이다.
- [0207] A. 시험관내 유전자 전달
- [0208] 시험관내 적용시, siRNA의 전달은 식물이든 동물이든, 척추동물이든 무척추동물이든, 임의의 조직 또는 타입의 배양물 중에서 성장한 임의의 세포일 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 세포는 동물 세포, 더욱 바람직하게는 포유류 세포, 가장 바람직하게는 인간 세포이다.
- [0209] 세포와 지질 핵산 입자와의 접촉은 시험관내에서 수행하는 경우, 생물학적으로 적합한(biological compatible) 배지에서 일어난다. 입자의 농도는 특정 적용 분야에 따라 광범위하게 변하며, 일반적으로 약 1 μmol 내지 약 10 mmol이다. 세포의 핵산-지질 입자 처리는 일반적으로 생리학 적 온도(약 37 $^{\circ}\text{C}$)에서 약 1 내지 48 시간, 바람직하게는 약 2 내지 4 시간 동안 수행된다.
- [0210] 바람직한 실시양태의 한 군에서, 지질 핵산 입자 현탁액을 약 10^3 내지 약 10^5 세포/mL, 더욱 바람직하게는 약 2×10^4 세포/mL의 세포 밀도를 갖는 60-80 % 컨플루언트 플레이팅된(confluent plated) 세포에 첨가한다. 세포로 첨가되는 현탁액의 농도는 바람직하게는 약 0.01 내지 0.2 $\mu\text{g/mL}$, 더욱 바람직하게는 약 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 이다.
- [0211] 엔도솜 방출 매개변수(ERP) 분석시험을 사용하여, SNALP 또는 다른 지질 기재 담체 시스템의 전달 효율을 최적화할 수 있다. ERP 분석시험은 본 명세서에 참고 문헌으로 인용되는 미국 특허 출원 번호 10/136,707(U.S.P.A. 공개번호 2003/0077829로 공개됨)에 상세하게 기재되어 있다. 더욱 특히, ERP 분석시험의 목적은 엔도솜 막의 융합/탈안정화 또는 결합/흡수에 대한 상대적 영향을 기준으로 SNALP의 다양한 양이온성 지질 및 헬퍼(helper) 지질 성분들의 영향을 식별하는 것이다. 이 분석시험은 어떻게 SNALP의 각각의 성분 또는 다른 지질 기재 담체 시스템이 전달 효율에 영향을 미치는지 정량적으로 결정하여 SNALP 또는 다른 지질 기재 담체 시스템을 최적화한다. 통상, ERP 분석시험은 리포터(reporter) 단백질(예를 들면, 루시페라제, β -갈락토시다아제, 녹색 형광 단백질 등)의 발현을 측정하고, 일부 경우, 발현 플라스미드에 대해 최적화된 SNALP 포물레이션도 간접 RNA를 캡슐화하는 데 적합하다. 다른 경우에서, ERP 분석시험을 채용하여 간접 RNA의 존재 또는 부재 하에서 표적 서열의 번역의 하향조절을 측정할 수 있다. 다양한 SNALP 또는 다른 지질 기재 포물레이션 각각에 대한 ERP를 비교함으로써, 최적화된 시스템, 예를 들면 세포내 최대 흡수를 갖는 SNALP 또는 다른 지질 기재 포물레이션을 용이하게 결정할 수 있다.
- [0212] 본 발명의 ERP 분석시험을 수행하기 적합한 표지는 스펙트럼 표지, 예를 들면 형광 염료(예를 들면, 플루오레세인 및 유도체, 예를 들면 플루오레세인(fluorescein) 이소티오시아네이트(FITC) 및 오레곤 그린(Oregon Green)TM; 로다민 및 유도체, 예를 들어 텍사스 레드(Texas red), 테트라로다민 이소티오시아네이트(TRITC) 등, 디곡시게닌(digoxigenin), 바이오틴, 피코에리트린(phycoerythrin), AMCA, CyDyesTM 등; 방사선표지, 예를 들면 ^3H , ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C , ^{32}P , ^{33}P 등; 효소, 예를 들면 홀스 래디쉬 페록시다아제(horse radish peroxidase), 알칼리성 포스파타아제 등, 스펙트럼 비색 표지, 예를 들면 콜로이드성 금 또는 착색 유리 또는 플라스틱 비드, 예를 들면 폴리스티렌, 폴리프로필렌, 라텍스 등을 포함하며 이에 한정되지 않는다. 표지는 당업계에 공지되어 있는 방법을 사용하여 SNALP 또는 다른 지질 기재 담체 시스템의 성분에 직접 또는 간접적으로 커플링될 수 있다. 앞서 언급한 바와 같이, 광범위한 표지가 사용될 수 있고, 표지 선택은 필요로 하는 민감도, SNALP 성분과의 컨쥬게이션 용이성, 안정성 요건 및 이용가능한 장치 및 처리 규정에 따라 달라진다.
- [0213] B. 생체내 유전자 전달
- [0214] 일부 실시양태에서, SNALP는 포유류, 예를 들면 개, 고양이, 말, 소, 양, 염소, 설치류, 토끼, 돼지, 영장류, 예를 들면 인간을 비롯한 광범위한 척추동물에서 siRNA의 생체내 전달에 사용될 수 있다. SNALP의 생체내 전달은 국소(즉, 관심있는 부위에 직접) 또는 전신(즉, 관심있는 부위로부터 멀리 떨어짐) 전달일 수 있다.
- [0215] 생체내 유전자 치료용 전신 전달, 즉 신체 시스템, 예를 들면 순환을 통한 치료적 핵산의 원위 표적 세포로의 전달은 핵산-지질 입자, 예를 들면 PCT 특허 출원 공개번호 WO 96/40964, 미국 특허 번호 5,705,385,

5,976,567, 5,981,501 및 6,410,328에 개시된 것들을 사용하여 수행되었으며, 상기 각각은 본 명세서에 참고 문헌으로 인용된다. 이 후자의 형식은 혈청 중에서 뉴클레아제 분해로부터 핵산을 보호하는 완전히 캡슐화된 핵산-지질 입자를 제공하고, 비면역원성이고, 크기가 작고, 반복 투여에 적합하다.

[0216] 본 발명의 SNALP는 예를 들면, 정맥내, 근육내, 피하, 피내, 복막내, 경구, 비강내 또는 국소를 비롯한 당업계에 공지된 임의의 경로를 통해 투여될 수 있다. 예를 들면, 문헌[Zhu, et al., Science 261:209 (1993)]은 플라스미드-양이온성 지질 복합체의 정맥내 전달을 기재하고, 문헌[Hyde, et al., Nature 362:250 (1993)]은 플라스미드-리포솜 복합체(즉, 지질-유전자 결합체)의 비강내 전달을 기재하고, 문헌[Brigham, et al., Am. J. Med. Sci. 298:278 (1989)]은 플라스미드-양이온성 지질 복합체의 정맥내 및 기관내 전달을 기재하고 있다. SNALP는 단독으로 또는 투여 경로 및 표준 제약 실무에 따라 선택된 생리학적으로 허용되는 담체(예를 들면, 생리학 적 식염수 또는 포스페이트 완충제)와의 혼합물로 투여될 수 있다.

[0217] 본 발명의 핵산-지질 입자의 약제학적 제형을 제조하는 경우, 빈 지질 입자 또는 외부 표면과 회합된 핵산 부분을 갖는 입자를 감소시키거나 제거하도록 정제된 핵산-지질 입자량을 사용하는 것이 바람직하다. 약제학적 담체는 일반적으로 입자 형성 후 첨가된다. 따라서, 입자가 형성된 후, 입자는 약제학적으로 허용되는 담체로 희석될 수 있다.

[0218] 약제학적 제형 중의 입자의 농도는 광범위하게, 즉 약 0.05 % 미만, 통상 약 2.5 % 이상에서 10 내지 30 중량%에 이르기까지 다양할 수 있고, 선택된 특정 투여 방식에 따라 주로 유체 부피, 점도 등에 의해 선택되게 된다.

[0219] 투여되는 입자의 양은 핵산 대 지질 비, 사용되는 특정 핵산, 진단된 질환 상태, 환자의 연령, 체중 및 상태 및 임상적 판단에 따라 좌우되며, 일반적으로 1 킬로그램의 체중 당 약 0.01 내지 약 50 mg, 바람직하게는 약 0.1 내지 약 5 mg 또는 주사 당 약 10^8 - 10^{10} 개의 입자이다.

[0220] 1. 주사성 전달

[0221] 특정한 환경에서, 미국 특허 번호 5,543,158, 미국 특허 번호 5,641,515 및 미국 특허 번호 5,399,363에 기재된 바와 같이 본 명세서에 개시된 SNALP를 비경구, 정맥내, 근육내, 피하, 피내 또는 복막내 전달하는 것이 바람직하다. SNALP를 관심있는 부위(예를 들면, 질환, 예를 들면 염증 또는 신생물 부위 또는 표적 기관 또는 조직)에 국소 주사하거나 또는 유기체 전체에 널리 분포되도록 전신 주사할 수 있다. SNALP의 용액은 수중에서, 적합하게는 표면활성제와 혼합하여 제조될 수 있다. 또한, 분산물은 글리세롤, 액체 폴리에틸렌 글리콜, 및 그들의 혼합물 및 오일 중에서 제조될 수 있다. 전형적으로, 이들 제제는 미생물의 성장을 방지하기 위해 방부제를 함유한다. 일반적으로, 핵산-지질 입자 포블레이션은 정맥내 투여되는 경우 적합한 약제학적 담체로 제형화된다. 일반적으로, 정상 완충액 식염수(135-150 mM NaCl)를 약제학적으로 허용되는 담체로 사용할 수 있으나, 다른 적합한 담체로도 충분하다. 추가적인 적합한 담체는 예를 들면, 문헌[REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, Philadelphia, PA, 17th ed. (1985)]에 기재되어 있다. 본 명세서에 사용된 "담체"는 임의의 모든 용매, 분산물 매질, 비히클, 코팅, 희석액, 항균제 및 항진균제, 등장화제 및 흡수 지연제, 완충제, 담체 용액, 현탁액, 콜로이드 등을 포함한다. 어구 "약제학적으로 허용되는"은 인간에 투여되는 경우 알리지성 또는 유사한 부적합한 반응을 형성하지 않는 분자 자체 및 조성물을 지칭한다. 활성 성분으로서 단백질을 함유하는 수성 조성물의 제조는 당업계에서 잘 알려져 있다. 전형적으로, 이러한 조성물은 액체 용액 또는 현탁액으로서 주사 가능 물질로 제조되며, 주사 전에 액체 중에서 용액 또는 현탁액 형성에 적합한 고체 형태도 제조할 수 있다. 또한, 상기 제제는 유효될 수 있다.

[0222] 이들 조성물은 통상적인 리포솜 멸균 기술, 예를 들면 여과에 의해 멸균될 수 있다. 조성물은 생리학적 조건과 유사하게 하는데 필요한 약제학적으로 허용되는 보조 물질, 예를 들면 pH 조정 및 완충제, 삼투 조정제, 습윤제 등을 함유할 수 있다. 이들 조성물은 앞서 언급한 기술을 사용하여 멸균되거나 또는 별법으로, 멸균 조건 하에서 생성될 수 있다. 생성되는 수용액은 사용을 위해 패키징되거나, 또는 무균 조건 하에서 여과 및 동결건조되어, 투여 전 멸균 수용액과 조합되는 동결건조 제제로 할 수 있다.

[0223] 2. 경구 전달

[0224] 특정한 적용분야에서, 본 명세서에 개시된 SNALP는 경구 투여를 통해 개인에게 전달될 수 있다. 활성 화합물은 부형제와 혼합될 수 있고, 섭취용(ingestible) 정제, 버칼(buccal) 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭시르, 구강청결제, 현탁액, 경구 스프레이, 시럽, 웨이퍼, 등의 형태로 사용될 수 있다(문헌[Mathiowitz et al., 1997; Hwang et al., 1998], 미국 특허 번호 5,641,515, 미국 특허 번호 5,580,579 및 미국 특허 번호 5,792,451). 또한, 정

제, 트로키, 알약, 캡슐 등은 결합제, 젤라틴, 부형제, 운환제 또는 향미제를 함유할 수 있다. 제형이 캡슐인 경우, 상기 타입의 물질 외에 액체 담체를 함유할 수 있다. 다양한 다른 물질은 코팅제로서 존재하거나 또는 제형의 물리적 형태를 변화시킬 수 있다. 물론, 임의의 제형을 제조하는 데 사용되는 임의의 물질은 사용되는 양에서 약제학적으로 순수하고 실질적으로 비독성이어야 한다.

[0225] 전형적으로, 이들 제형은 비록 물론, 활성 성분(들)의 %가 변할 수 있지만 약 0.1 % 이상의 활성 화합물을 함유할 수 있으며, 편리하게는 총 제형의 중량 또는 부피의 약 1 또는 2 % 내지 약 60 % 또는 70 % 또는 그 이상일 수 있다. 자연적으로, 제조될 수 있는 각각의 치료적으로 유용한 조성물 중의 활성 화합물(들)의 양은 적합한 투여량이 화합물의 임의의 주어진 단위 용량에서 얻어지도록 한다. 인자, 예를 들면 용해도, 생체이용률, 생물학적 반감기, 투여 경로, 제품 저장기간, 뿐만 아니라 다른 약리학적 고려사항들이 이러한 약제학적 제형을 제조하는 당업자에 의해 고려될 것이며, 이로써 다양한 투여량 및 치료 요법이 바람직할 수 있다.

[0226] 3. 비강 전달

[0227] 특정한 실시양태에서, 약제학적 조성물은 비강내 스프레이, 흡입 및(또는) 다른 에어로졸 전달 비히클에 의해 전달될 수 있다. 핵산 조성물을 비강 에어로졸 스프레이를 통해 직접 폐에 전달하는 방법은 예를 들면, 미국 특허 번호 5,756,353 및 미국 특허 번호 5,804,212에 기재되었다. 유사하게, 비강내 미세입자 수지(Takenaga et al., 1998) 및 리소포스파티딜-글리세롤 화합물(미국 특허 번호 5,725,871)을 사용하여 약물을 전달하는 것도 제약 분야에 공지되어 있다. 유사하게, 폴리테트라플루오로에틸렌 지지 매트릭스 형태의 경점막 약물 전달이 미국 특허 번호 5,780,045에 기재되어 있다.

[0228] 4. 국소 전달

[0229] 핵산-지질 입자는 그들의 용도의 또 다른 예에서, 겔, 오일, 에멀션 등을 포함하며 이에 한정되지 않는 광범위한 국소 투여 형태로 혼입될 수 있다. 예를 들면, 핵산-지질 입자를 함유하는 현탁액을 제형화할 수 있고, 국소 크림, 페이스트, 연고, 겔, 로션 등으로 투여될 수 있다.

[0230] C. 예방적 치료 및 치료적 치료

[0231] 일부 실시양태에서, SNALP는 표적 서열의 발현 또는 과발현과 관련된 질환 또는 장애를 갖는 개체(예를 들면, 포유류 개체)의 예방적 또는 치료적 치료에 사용될 수 있다. SNALP는 환자에서 치료적 반응을 발휘하기 충분한 양으로 개체에 투여된다. 이를 달성하기 적합한 양을 "치료적으로 유효한 투여량 또는 양" 또는 "유효한 투여량 또는 양"으로 정의한다. 표적 유전자의 발현 또는 과발현으로 인한 상태의 치료 또는 예방시 투여되는 SNALP의 유효한 양을 결정함에 있어, 의사는 SNALP의 순환 혈장 수치, SNALP 독성, 및 표적 유전자의 발현 또는 과발현과 관련된 질환의 진행을 평가한다. 투여는 단일 또는 분할 투여를 통해 수행될 수 있다.

[0232] 예를 들면, SNALP는 병원성 미생물에 감염되거나 감염될 위험이 있는 개체에 투여될 수 있다. siRNA는 바람직하게는 미생물의 생활사에 필수적인 역할을 하는 서열과 일치해야 하며, 또한 미생물에 유일한 것이어야 한다(또는 적어도 치료를 받는 환자의 천연 게놈의 게놈은 없어야 한다). 핵산-지질 복합체는 생체의 또는 정맥내 주사에 의해 치료적으로 유효한 투여량으로 표적 세포, 조직 또는 기관에 도입된다. 편리하게는, 병원성 감염과 관련된 유전자를 코딩하는 서열의 침묵은 병원성 상태를 치료하는 데 사용되는 통상적인 약제의 투여와 병용될 수 있다. 치료제를 병원성 미생물에 감염될 위험이 있거나 이미 감염된 사람에게 예방적으로 투여할 수 있다.

[0233] 바람직한 실시양태에서, 조성물 및 본 발명의 방법은 편리하게도 간 장애, 예를 들면, 간염을 치료하는 데 사용될 수 있다. 예를 들면, B형 간염 바이러스 억제에 적합한 부위는 S, C, P, 및 X 단백질, PRE, EnI 및 EnII를 코딩하는 핵산 서열을 포함한다(예를 들면, 문헌[FIELDS VIROLOGY, 2001, supra] 참조). 당업자는 간염 감염과 관련된 유전자의 침묵이 간염에 대한 통상적인 치료제, 예를 들면, 면역 글로불린, 인터페론(예를 들면, 페그 및 비페그(unpegylated) 인터페론 α)(예를 들면, 문헌[Medina et al., Antiviral Res. 60(2): 135-143 (2003)] 참조), 리바비린(ribavirin)(예를 들면, 문헌[Hugle and Cerny, Rev. Med. Virol. 13(6):361-71 (2003)] 참조), 아데포비르(adeфовir) 및 라미부딘(lamivudine)(예를 들면, 문헌[Kock et al., Hepatology 38(6):1410-8 (2003)] 참조), 프레닐화(prenylation) 억제제(예를 들면, 문헌[Bordier et al., J. Clin. Invest. 112(3):407-414 (2003)] 참조), 팜시클로비르(famciclovir)(예를 들면, 문헌[Yurdaydin et al., J Hepatol. 37(2):266-71 (2002)] 참조) 및 사이코사포닌(saikosaponin) c 및 d(예를 들면, 문헌[Chiang et al., Planta Med. 69(8):705-9 (2003)] 참조)와 조합될 수 있다는 것을 명확히 이해할 것이다.

[0234] 또 다른 예시적인 실시양태에서, 병원성 미생물은 HIV이다. 예를 들면, HIV 바이러스 억제에 적합한 부위는

TAR, REV 또는 nef를 포함한다(Chatterjee et al., Science 258: 1485-1488 (1992)). Rev는 핵으로부터 스플라이싱되지 않은 HIV 에비-mRNA의 이출을 용이하게 하는 조절 RNA 결합 단백질이다. 문헌[Malim et al., Nature 338:254 (1989)] 참조. Tat는 5'플래깅 mRNA에서 인식 서열을 결합시킴으로써 기능하는 전사 활성화제로 생각된다. 문헌[Kam & Graebler, Trends Genet. 8:365 (1992)] 참조. 핵산-지질 복합체는 생체의 또는 정맥 내 주사에 의해 치료적으로 유효한 투여량으로 혈액구 또는 조혈 줄기 세포에 도입된다. 치료제를 HIV에 감염될 위험이 있거나 이미 감염된 사람에게 예방적으로 투여할 수 있다. 부착 단백질(adhesion protein)을 코딩하는 내인성 수여 세포 유전자의 발현을 억제하는 데 유사한 방법이 사용된다.

[0235] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 편리하게도 유전자 또는 유전자군의 발현 또는 과발현에 의해 특성화되는 질환 및 장애를 치료하는 데 사용될 수 있다. 일부 측면에서, 본 발명의 조성물 및 방법을 사용하여 대사 질환 및 장애(예를 들면, 간이 표적인 질환 및 장애 및 간 질환 및 장애), 예를 들면 고지혈증 및 당뇨를 치료할 수 있다. 당업자는 대사 질환 및 장애와 관련된 유전자의 침묵을 이들 장애에 대한 통상적인 치료와 조합될 수 있다는 것을 명확히 이해할 것이다. 예를 들면, 고지혈증과 연관된 유전자의 침묵은 예를 들면, 스타틴, 담즙산 격리제/수지 및 콜레스테롤 흡수 억제제, 예를 들면 에제티미브(ezetimibe), 식물 스타놀/스테롤, 폴리페놀, 뿐만 아니라 뉴트라세티칼(nutraceutical), 예를 들면 연맥강(oat bran), 실리엄(psyllium) 및 콩 단백질, 피토스탄올(phytostanol) 유사체, 스쿠알렌 신타아제 억제제, 담즙산 수송 억제제 SREBP 분절활성화 단백질(SCAP) 활성화 리간드, 니코틴산(니아신), 아시피모스(acipimox), 고용량 어유, 항산화제 및 폴리코사놀(policosanol), 미세소체 트리글리세리드 전이 단백질(MTP) 억제제, 아실 조효소 A:콜레스테롤 아실트랜스퍼라아제(ACAT) 억제제, 겐카벤(gemcabene), 리피브롤(lifibrol), 판토텐산 유사체, 니코틴산-수용체 작동제, 항염증제(예를 들면, L_p-PLA(2) 길항제 및 AGI1067) 기능성 오일, PPAR- α , - γ , - δ 작동제, 뿐만 아니라 이중 PPAR- α/γ 및 'pan' PPAR- $\alpha/\gamma/\delta$ 작동제, 콜레스테릴 에스테르 전이 단백질(CETP) 억제제(예를 들면, 토르세트라피브(torcetrapib)), CETP 백신, 레시틴 콜레스테롤 아실트랜스퍼라아제(LCAT), 스캐빈저 수용체 부류 B 타입 1(SRB1) 및 ATP-결합 카세트 수송체(ABC) A1의 상향조절제, 뿐만 아니라 개발중인 합성 아포리포단백질(Apo) E 관련 펩티드, 연장 방출 니아신/로바스타틴(lovastatin), 아토르바스타틴(atorvastatin)/아모디핀(amlodipine), 에제티미브/심바스타틴(simvastatin), 아토르바스타틴/CETP 억제제, 스타틴/PPAR 작동제, 연장 방출 니아신/심바스타틴 및 프라바스타틴(pravastatin)/아스피린 및 항비만제를 사용한 치료와 조합될 수 있다(예를 들면, 문헌[Bays and Stein, Expert Opin. Pharmacother 4(11):1901-38 (2003)] 참조). 유사하게, 당뇨와 관련된 유전자의 침묵은 인슐린, 뿐만 아니라 식이요법 변형 및 운동을 사용한 치료와 합쳐질 수 있다.

[0236] 종양생성 및 세포 형질전환, 종양 성장 및 종양 이동과 관련된 내인성 수여 세포 유전자, 혈관형성 유전자, 면역조절 유전자, 예를 들면 염증 및 자가면역 반응과 관련된 것들, 리간드 수용체 유전자, 신경퇴행성 장애와 관련된 유전자 및 추가적인 바이러스 감염 및 생존과 관련된 유전자의 발현을 억제하는 데 유사한 방법이 사용된다. 상기에 기재된 표적 유전자 서열이 특히 중요하다.

[0237] D. SNALP의 검출

[0238] 일부 실시양태에서, 핵산-지질 입자는 입자의 투여 후 8, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 또는 96 시간 후 개체의 혈장 및(또는) 세포에서 검출가능하다. 입자의 존재는 예를 들면, 입자의 직접 검출, 간접 RNA 서열의 검출, 관심있는 표적 서열의 검출(즉, 관심있는 서열의 발현 또는 감소된 발현의 검출에 의해) 또는 그들의 조합을 비롯한 당업계에 공지된 임의의 수단에 의해 검출될 수 있다.

[0239] 1. 입자의 검출

[0240] 본 명세서에서 핵산-지질 입자는 당업계에 공지되어 있는 임의의 방법을 사용하여 검출된다. 예를 들면, 표지는 당업계에 공지되어 있는 방법을 사용하여 SNALP 또는 다른 지질 기재 담체 시스템의 성분에 직접 또는 간접 접으로 커플링될 수 있다. 광범위한 표지가 사용될 수 있고, 필요로 하는 민감도, SNALP 성분과의 컨쥬게이션 용이성, 안정성 요건 및 이용가능한 장치 및 처리 규정에 따라 표지를 선택하여 사용할 수 있다. 적합한 표지는 스펙트럼 표지, 예를 들면 형광 염료(예를 들면, 플루오레세인 및 유도체, 예를 들면 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC) 및 오레곤 그린TM; 로다민 및 유도체, 예를 들어 텍사스 레드, 테트라로디민 이소티오시아네이트(TRITC) 등, 디곡시게닌, 바이오틴, 피코에리트린, AMCA, CyDyesTM 등; 방사선표지, 예를 들면 ³H, ¹²⁵I, ³⁵S, ¹⁴C, ³²P, ³³P 등; 효소, 예를 들면 홀스 래디쉬 페록시다아제(horse radish peroxidase), 알칼리성 포스파테아제 등; 스펙트럼 비색 표지, 예를 들면 콜로이드성 금 또는 착색 유리 또는 플라스틱 비드, 예를 들면 폴리스티렌, 폴리프로필렌, 라텍스 등을 포함하며 이에 한정되지 않는다. 표지는 당업계에 공지된 임의의 수단에 의해 검출

될 수 있다.

[0241] 2. 핵산의 검출

[0242] 핵산은 당업자에게 공지되어 있는 임의의 다수의 수단에 의해 검출되고 정량화된다. 핵산의 검출은 공지된 방법, 예를 들면 써던(Southern) 분석, 노던(northern) 분석, 겔 전기영동, PCR, 방사선표지화, 섬광 계수 및 친화성 크로마토그래피에 의해 진행된다. 또한, 추가적인 분석 생화학적 방법, 예를 들면 분광광도법, 방사선표지화, 전기영동, 모세관 전기영동, 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC), 박층 크로마토그래피(TLC), 과산화 크로마토그래피도 사용될 수 있다

[0243] 핵산 하이브리드화 형식의 선택은 중요치 않다. 다양한 핵산 하이브리드화 형식은 당업자에게 공지되어 있다. 예를 들면, 통상의 형식은 샌드위치 분석시험 및 경쟁 또는 전위 분석시험을 포함한다. 하이브리드화 기술은 문헌["Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach, "Ed. Hames, B. D. and Higgins, S. J. , IRL Press, 1985]에 일반적으로 기재되어 있다.

[0244] 하이브리드화 분석시험의 민감도는 검출되는 표적 핵산을 증가시키는 핵산 증폭 시스템의 사용을 통해 향상된다. 분자 프로브로 사용되는 서열을 증폭시키거나 또는 후속 서브클로닝에 대한 핵산 단편을 생성시키기 적합한 시험관내 증폭 기술이 공지되어 있다. 중합효소 연쇄 반응(PCR), 리가아제 연쇄 반응(LCR), Q β -리플리카아제 증폭 및 다른 RNA 중합효소 매개 기술(예를 들면, NASBATM)을 비롯한 시험관내 증폭 방법을 통해 숙련된 자가 이행하기 충분한 기술의 예는 문헌[Sambrook, et al., In Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000, and Ausubel et al., SHORT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, eds., Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., (2002)], 뿐만 아니라 문헌[Mullis et al. (1987)], 미국 특허 번호 4,683,202, 문헌[PCR Protocols A Guide to Methods and Applications (Innis et al. eds) Academic Press Inc. San Diego, CA (1990) (Innis); Arnheim & Levinson (October 1,1990), C & EN 36; The Journal of NIH Research, 3:81 (1991); (Kwohet al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 1173 (1989); Guatelli et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 1874 (1990); Lomell et al., J. Clin. Chem., 35:1826(1989); Landegren et al., Science, 241: 1077(1988); Van Brunt, Biotechnology, 8:291 (1990); Wu and Wallace, Gene, 4:560 (1989); Barringer et al., Gene, 89:117 (1990), and Sooknanan and Malek, Biotechnology, 13:563 (1995)]에서 발견된다. 시험관내 증폭된 핵산을 클로닝하는 개선된 방법은 Wallace et al.의 미국 특허 번호 5,426,039에 기재되어 있다. 당 분야에 기재된 다른 방법들로는 핵산 서열 기재 증폭(NASBATM, Cangene, Mississauga, Ontario) 및 Q 베타(Beta) 리플리카아제 시스템이 있다.

[0245] 예를 들면, 시험관내 증폭 방법에서 프로브로 사용되거나, 유전자 프로브로 사용되거나 또는 억제제 성분으로서의 올리고뉴클레오티드는 전형적으로 예를 들면, 문헌[Needham Van Devanter et al., Nucleic acid Res., 12:6159 (1984)]에 기재된 바와 같이 자동화된 합성기를 사용하여 문헌[Beaucage and Caruthers, Tetrahedron Letts., 22 (20):1859 1862 (1981)]에 의해 기재된 고체 상 포스포라미다이트 트리에스테르 방법에 따라 화학적으로 합성된다. 올리고뉴클레오티드의 정제는 필요한 경우, 전형적으로 문헌[Pearson and Regnier, J. Chrom., 255:137 149 (1983)]에 기재된 바와 같이 천연 아크릴아미드 겔 전기영동 또는 음이온 교환 HPLC에 의해 수행된다. 합성 올리고뉴클레오티드의 서열은 문헌[Maxam and Gilbert (1980) in Grossman and Moldave (eds.) Academic Press, New York, Methods in Enzymology, 65:499]의 화학적 분해 방법을 사용하여 확인될 수 있다.

[0246] 번역 수준을 결정하는 대안적인 수단은 인시튜(in situ) 하이브리드화이다. 인시튜 하이브리드화 분석시험은 공지되어 있고, 문헌[Angerer et al., Methods Enzymol., 152:649 (1987)]에 일반적으로 기재되어 있다. 인시튜 하이브리드화에서, 분석시험 세포를 고체 지지체, 전형적으로 유리 슬라이드에 고정시킨다. DNA를 프로빙하려는 경우, 세포를 열 또는 알칼리로 변성시킨다. 그 다음, 세포를 하이브리드화 용액과 온건한 온도에서 접촉시켜 표지화되는 특이적 프로브가 어닐링되게 한다. 바람직하게는, 프로브는 방사성 동위원소 또는 형광 리포터로 표지화된다.

[0247] VI. 키트

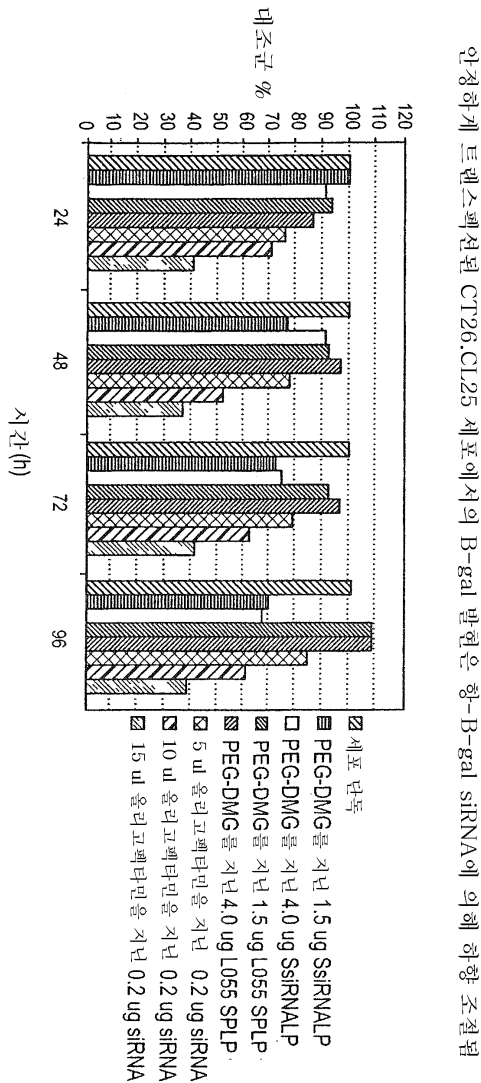
[0248] 또한, 본 발명은 키트 형태의 핵산-지질 입자를 제공한다. 키트는 전형적으로 핵산-지질 입자의 다양한 요소 및 엔도솜 막 탈안정화제(예를 들면, 칼슘 이온)를 보유하기 위해 구획화된 용기를 포함하게 된다. 키트는 재수화 및 투여에 대한 지시서와 함께, 본 발명의 조성물을 바람직하게는 탈수 형태로 함유하게 된다. 또한, 다

른 실시양태에서, 입자 및/또는 입자를 포함하는 조성물은 입자의 표면에 부착된 표적화 잔기를 갖는다. 표적화 잔기(예를 들면, 항체, 단백질)를 지질(예를 들면, 본 입자에 사용되는 것들)에 부착하는 방법은 당업자에게 공지되어 있다.

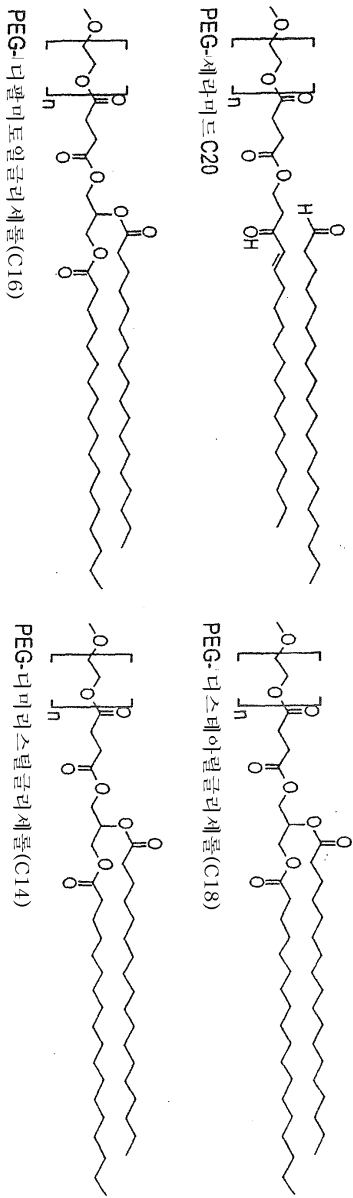
[0249] 하기 실시예는 예시를 위해 제공되는 것이며, 이에 본 발명을 제한하려는 것이 아니다. 당업자는 변화되거나 변형되어 근본적으로 동일한 결과를 제공할 수 있는 다양한 비임계적 매개변수를 용이하게 인식할 것이다.

도면

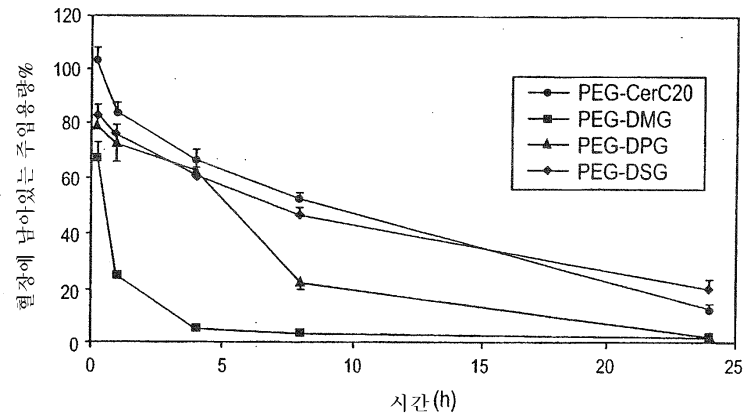
도면1



도면2

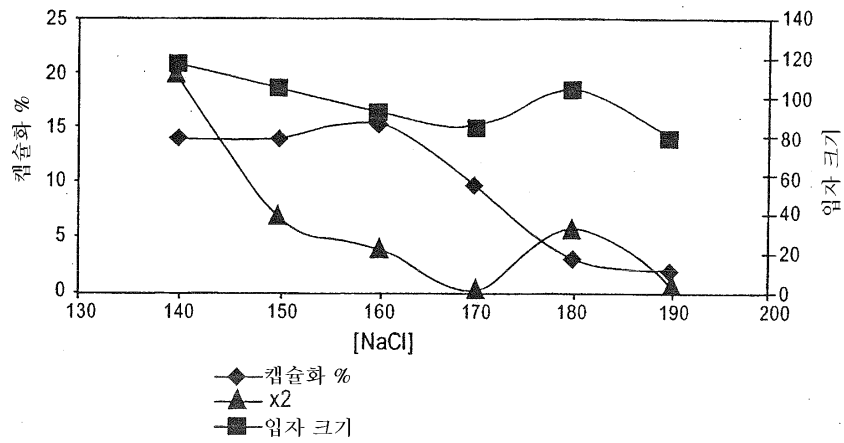


도면3



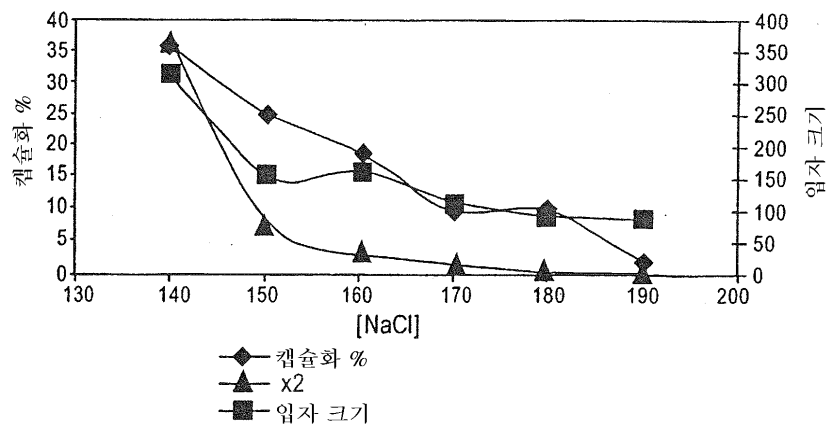
도면4a

SPLP 중의 DMG(C14)의 포블레이션화에 대한 [NaCl]의 효과

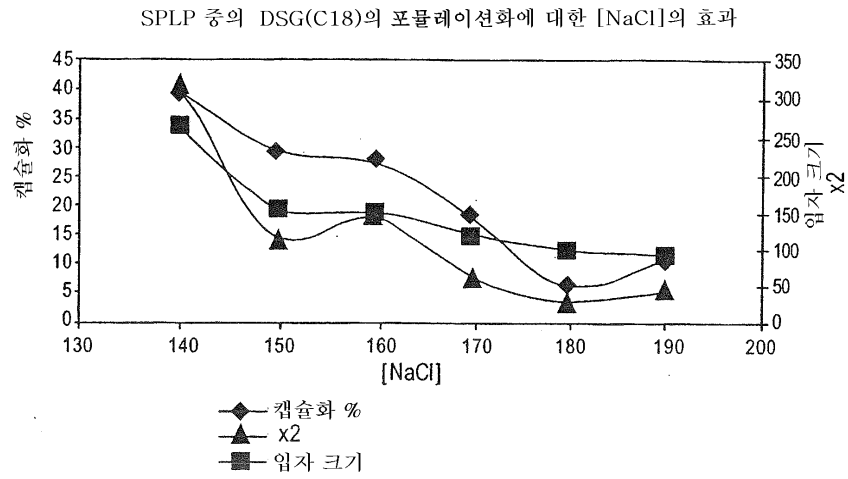


도면4b

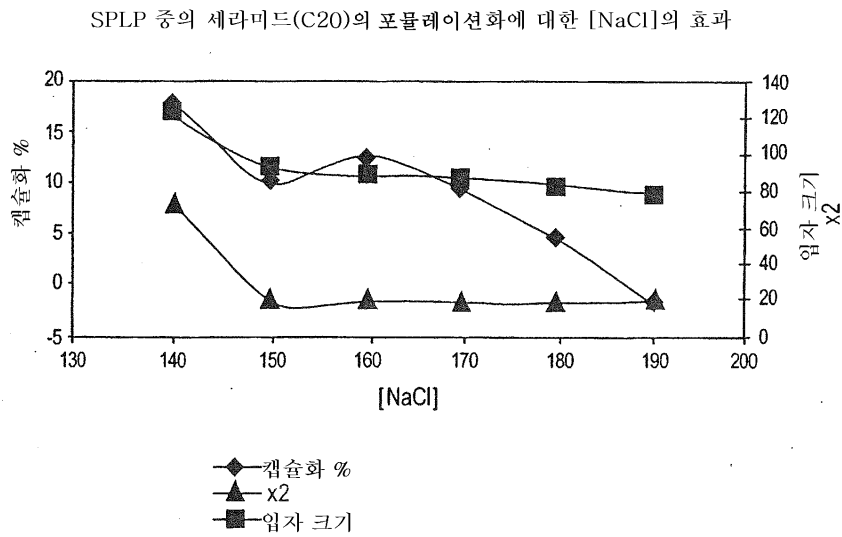
SPLP 중의 DPG(C16)의 포블레이션화에 대한 [NaCl]의 효과



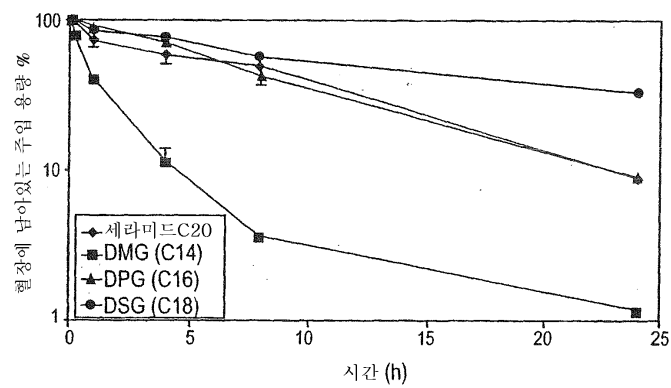
도면4c



도면4d

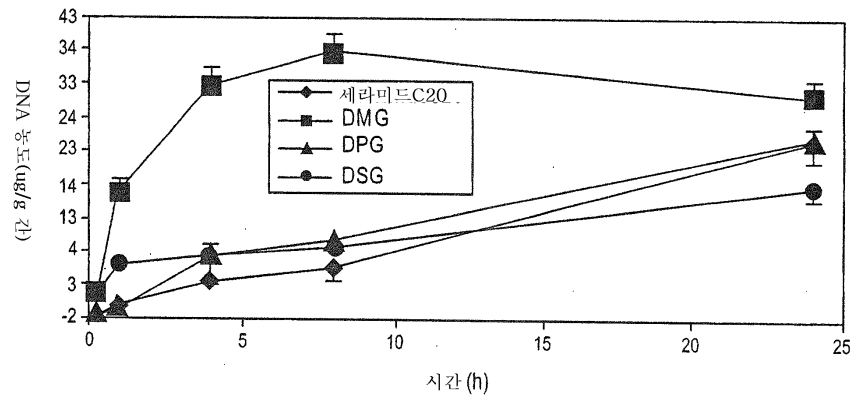


도면5



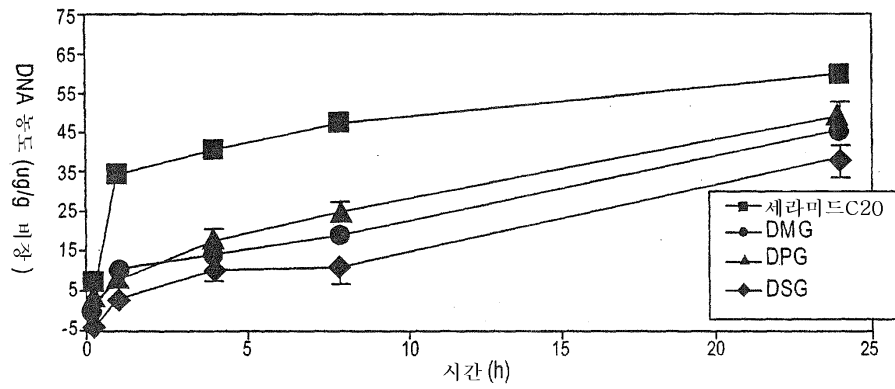
도면6a

PEG-디아실글리세롤을 함유하는 SPLP의 단일 정맥내 투여 후의 뉴로-2a 종양 함유 수컷 A/J 마우스에서의 간 DNA 농도 프로파일



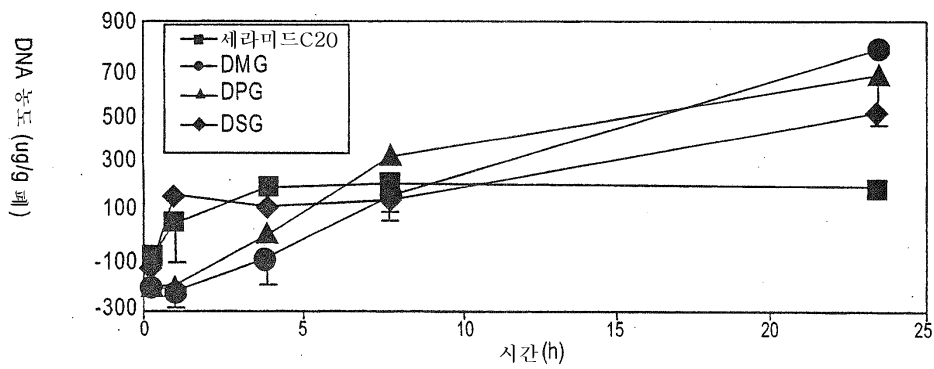
도면6b

PEG-디아실글리세롤을 함유하는 SPLP의 단일 정맥내 투여 후의 뉴로-2a 종양 함유 수컷 A/J 마우스에서의 비장 DNA 농도 프로파일



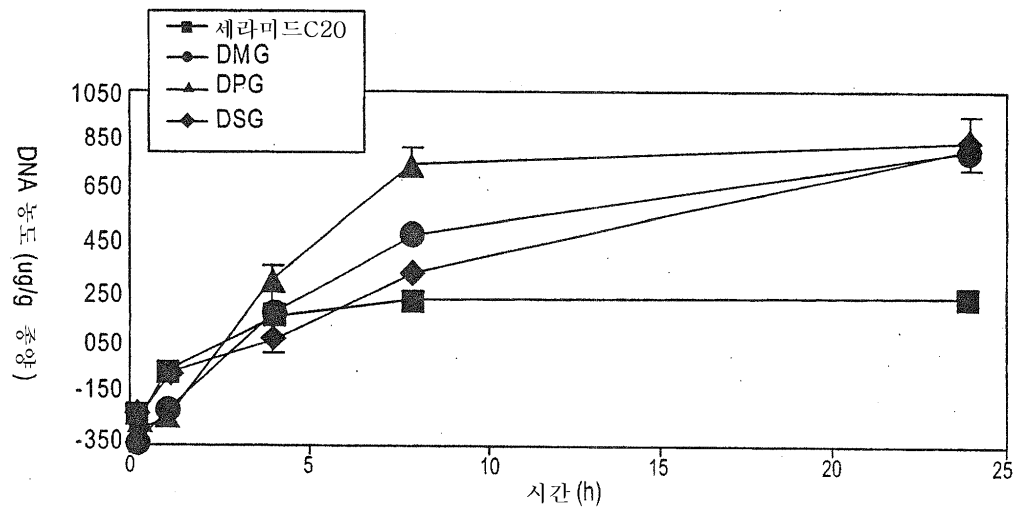
도면6c

PEG-디아실글리세롤을 함유하는 SPLP의 단일 정맥내 투여 후의 뉴로-2a 종양 함유 수컷 A/J 마우스에서의 폐 DNA 농도 프로파일



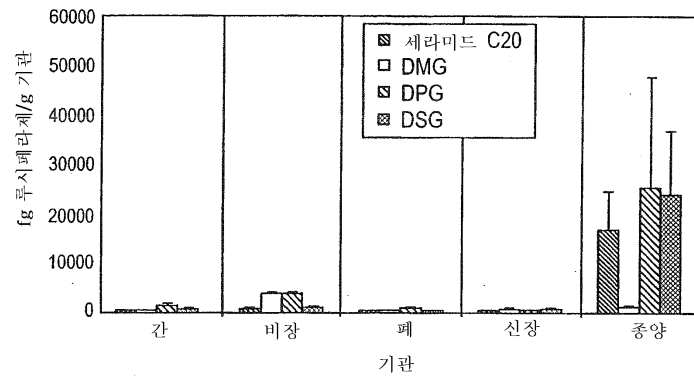
도면6d

PEG-디아실글리세롤을 함유하는 SPLP의 단일 정맥내 투여 후의 수컷 A/J 마우스에서의 뉴로-2a 종양 DNA 농도 프로파일



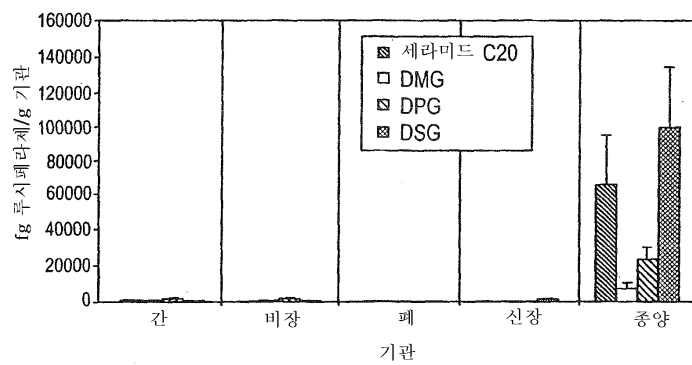
도면7

뉴로-2a 종양 함유 수컷 A/J 마우스에서의 PEG-세라미드C20을 함유하는 SPLP 대 PEG-디아실글리세롤을 함유하는 SPLP의 정맥내 투여 24시간 후의 루시페라제 유전자 발현



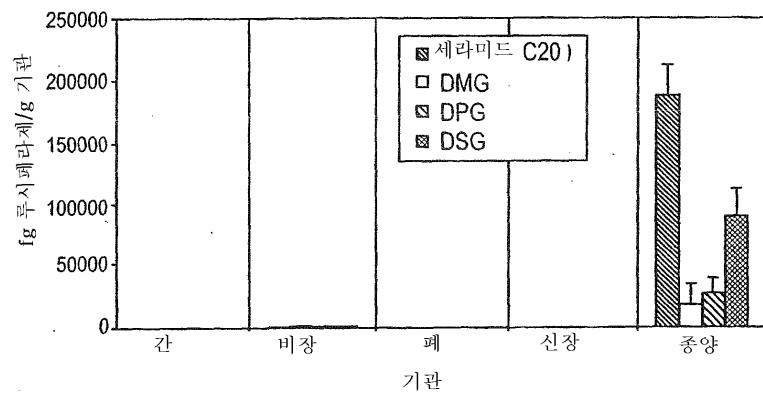
도면8

뉴로-2a 종양 함유 수컷 A/J 마우스에서의 PEG-세라미드C20을 함유하는 SPLP 대 PEG-디아실글리세롤을 함유하는 SPLP의 정맥내 투여 48시간후의 루시페라제 유전자 발현



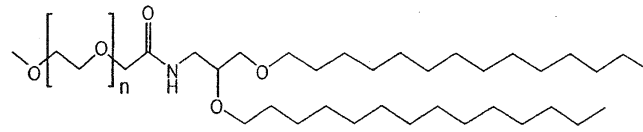
도면9

뉴로-2a 종양 함유 수컷 A/J 마우스에서의 PEG-세라미드C20을 함유하는 SPLP 대 PEG-디아실글리세롤을 함유하는 SPLP의 정맥내 투여 72시간 후의 루시페라제 유전자 발현

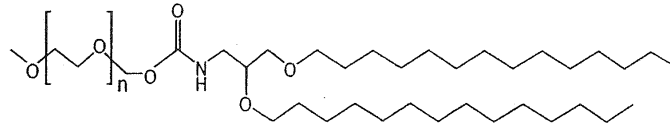


도면10

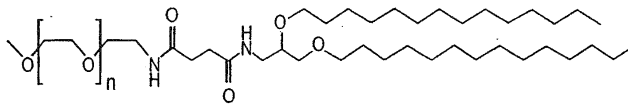
N-(2,3- 디미리스틸옥시프로필) 아미드PEG₂₀₀₀ 메틸 에테르 (PEG-A-DMA)



N-(2,3- 디미리스틸옥시프로필) 카르바메이트PEG₂₀₀₀ 메틸 에테르 (PEG-C-DMA)

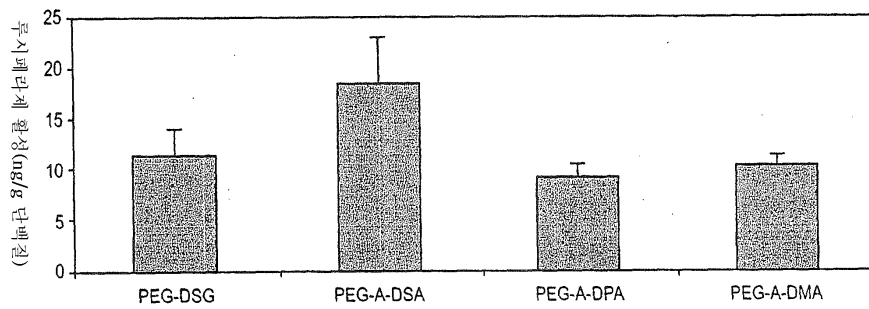


N-(2,3- 디미리스틸옥시프로필) 숙신아미드PEG₂₀₀₀ 메틸 에테르 (PEG-S-DMA)



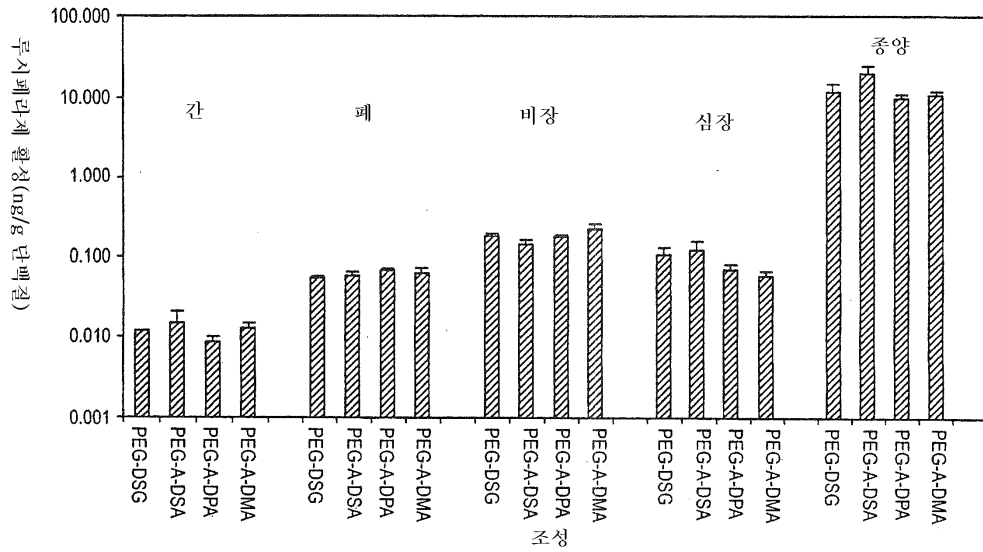
도면11

다양한 알킬 사슬 길이를 지닌 PEG-A-DAA 함유 SPLP의 정맥내 투여 48시간 후의 종양에서의 루시페라제 유전자 발현(PRO-221)



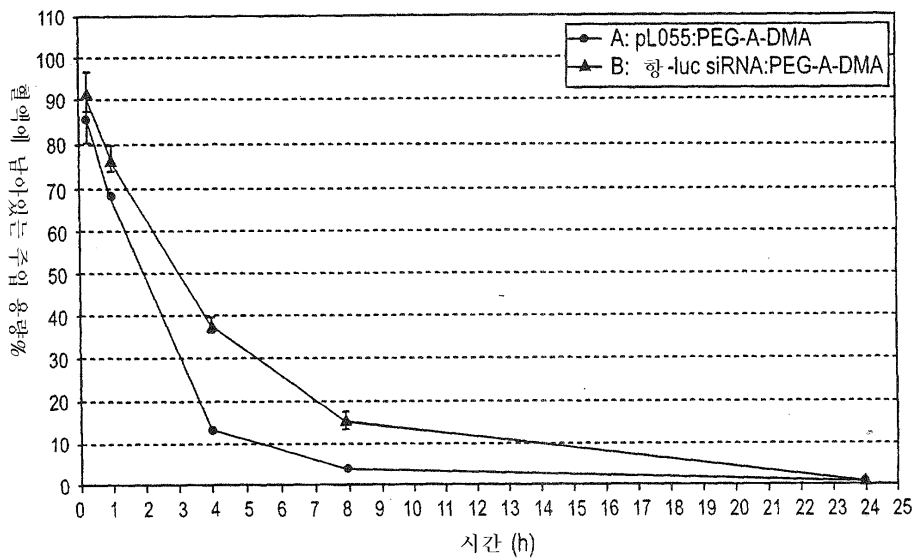
도면12

다양한 알킬 사슬 길이를 지닌 PEG-A-DAA를 함유하는 SPLP에 의한 다양한 기관의 생체내 트랜스펙션(PRO221)



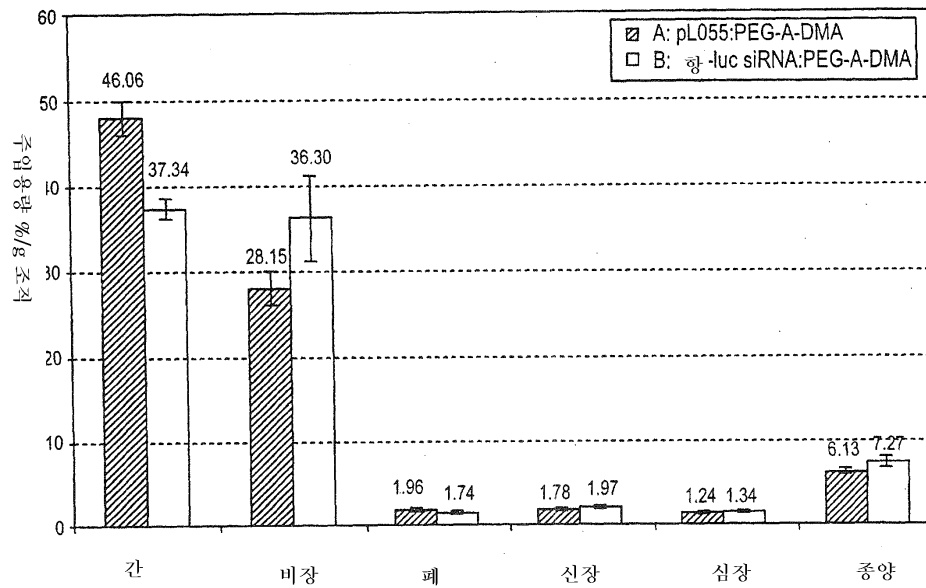
도면13

뉴로-2a 종양 함유 수컷 A/J 마우스에서의 DSPC:Chol:DODMA:PEG-A-DMA 리포솜을 함유하는 항-Luc siRNA 대 LO55 SNALPs의 단일 정맥내 주입의 24시간 혈액 제거율



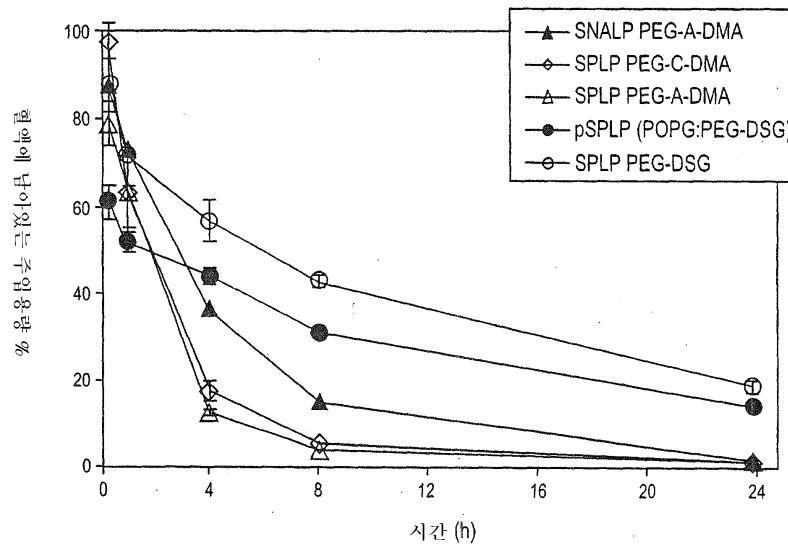
도면14

DSPC:Chol:DODMA:PEG-A-DMA를 함유하는 SNALP의 단일 정맥내 주입 24시간 후의 조직 그래프(g)당 주입용량 % (LO55 대 항-luc siRNA)



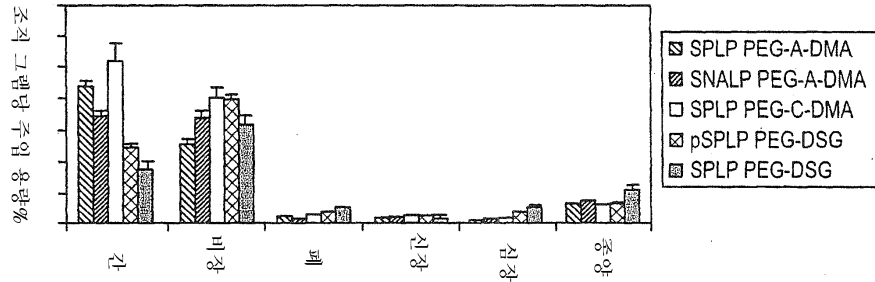
도면15

PRO-231:뉴로-2a 종양 함유 수컷 A/J 마우스에서의 3H-CHE로 표지된 pL 055 SPLP pSPLP 및 SNALP의 단일 IV 주입의 혈액 제거율



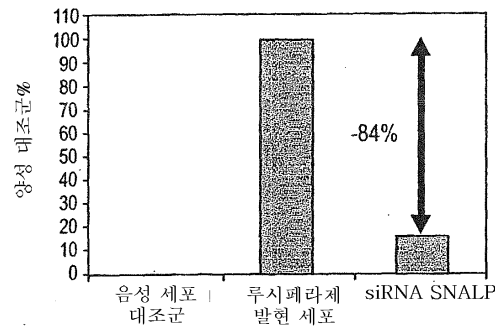
도면16

PRO-231 : 뉴로-2A 종양을 지닌 A/J 마우스에서의 24시간째의 3H-CHE 표지된 SPLP, pSPLP 및 SNALP의 생체분포



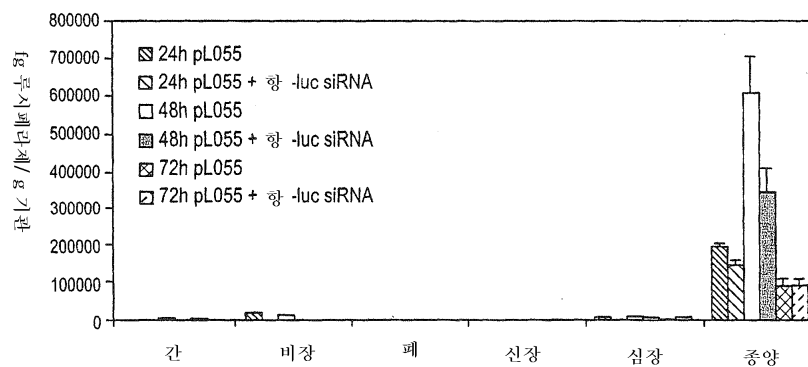
도면17

siRNA의 SNALP 전달은 표적 단백질의 효과적인 침묵을 일으킴-시험관내



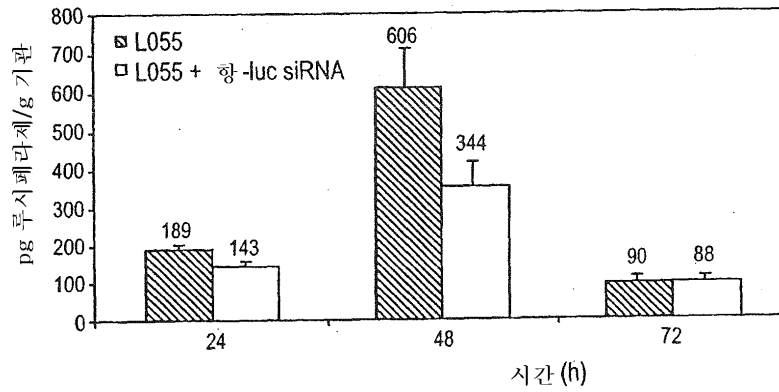
도면18

뉴로-2a 종양 함유 수컷 AJ 마우스에서의 50 ug의 항-luc siRNA 및 50 ug의 pL055의 단일 정맥내 투여 후의 종양에서의 루시페라제 유전자 발현에 대한 항-luc siRNA 및 pL055 SNALP (PEG-A-DMA)의 시간에 따른 침묵 효과



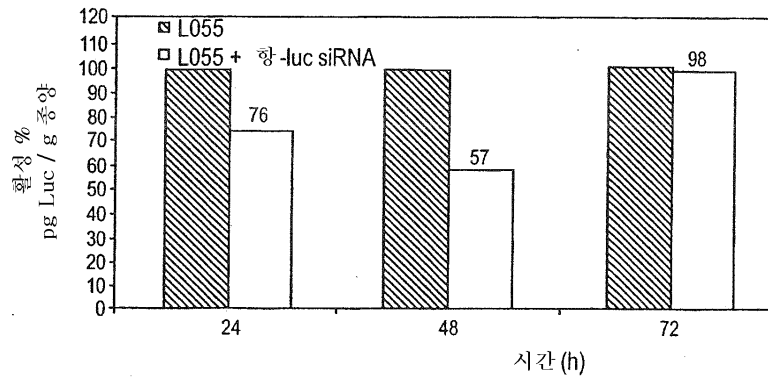
도면19

뉴로-2a 종양 함유 수컷 AJ 마우스에서의 50 ug의 항-luc siRNA
및 50 ug의 pL055의 단일 정맥내 투여 후의 종양에서의 루시페라제
유전자 발현에 대한 항-luc siRNA 및 pL055 SNALP (PBG-A-DMA)의
시간에 따른 침묵 효과



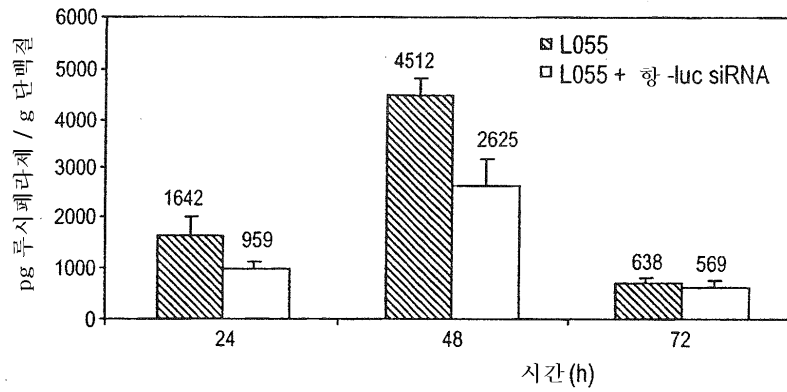
도면20

뉴로-2a 종양 함유 수컷 AJ 마우스에서의 50 ug의 항-luc siRNA
및 50 ug의 pL055의 단일 정맥내 투여 후의 종양에서의 루시페라제
유전자 발현에 대한 항-luc siRNA 및 pL055 SNALP (PBG-A-DMA)의
시간에 따른 사일런싱 효과



도면21

뉴로-2a 종양 함유 수컷 AJ 마우스에서의 50 ug의 항-luc siRNA 및 50 ug 의 pL055의 단일 정맥내 투여 후의 종양에서의 루시페라제 유전자 발현에 대한 항-luc siRNA 및 pL055 SNALP (PBG-A-DMA)의 시간에 따른 침묵 효과



도면22

SiRNA의 SNALP 전달은 표적 단백질의 효과적인 침묵을 일으킴-시험관내

SNALP의 단일 정맥내 투여 후의 시간에 따른 침묵

