(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년10월30일
(11) 등록번호 10-2723213
(24) 등록일자 2024년10월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 48/00 (2006.01) *A61K 31/7088* (2006.01)
A61K 47/14 (2017.01) *A61K 47/18* (2017.01)
A61K 47/24 (2017.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C07C 219/00 (2006.01) *C07C 233/00* (2006.01)
C07F 9/09 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 48/0033 (2013.01)
A61K 31/7088 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-7031968
(22) 출원일자(국제) 2018년03월29일
심사청구일자 2021년03월29일
(85) 번역문제출일자 2019년10월29일
(65) 공개번호 10-2020-0002866
(43) 공개일자 2020년01월08일
(86) 국제출원번호 PCT/CN2018/081155
(87) 국제공개번호 WO 2018/177383
국제공개일자 2018년10월04일
(30) 우선권주장
PCT/CN2017/078683 2017년03월29일 중국(CN)
(56) 선행기술조사문헌
WO2015187966 A1*
US06074667 A*
WO2009059201 A2
WO2016004318 A1
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
인스티튜트 오브 베이직 메디컬 사이언시즈, 차이니즈 아카데미 오브 메디컬 사이언시즈
중국 베이징 100005 동단 3 티아오 넘버 5
(72) 발명자
장, 청위
중국 베이징 100005 동청 디스트릭트 동 단 산 티아오 넘버 5 인스티튜트 오브 베이직 메디컬 사이언시즈 차이니즈 아카데미 오브 메디컬 사이언시즈
두, 잔차오
중국 베이징 100005 동청 디스트릭트 동 단 산 티아오 넘버 5 인스티튜트 오브 베이직 메디컬 사이언시즈 차이니즈 아카데미 오브 메디컬 사이언시즈
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 이상영

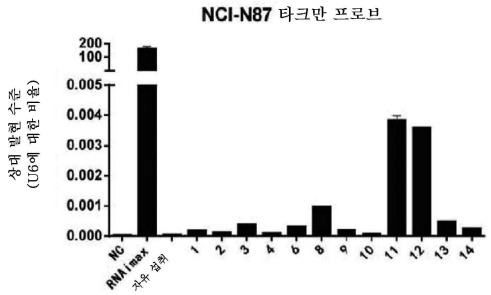
전체 청구항 수 : 총 8 항 심사관 : 최승희

(54) 발명의 명칭 **핵산 전달제 및 그의 관련 제품의 제조에 있어서의 화합물 또는 전통 중국 의약 추출물의 적용**

(57) 요 약

본 출원은, 전통 중국 의약으로부터, 핵산 전달을 촉진할 수 있는 복수개의 화합물 또는 합성 화합물을 추출하고, 추출된 화합물 또는 복수개의 조합을 사용하여 sRNA와 같은 핵산이 표적 세포에 흡수 및 진입하도록 촉진하고, 핵산이 대상체의 생체내의 필요한 표적 부위로 진입하도록 촉진하는 것에 관한 것이다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61K 47/14 (2013.01)
A61K 47/18 (2013.01)
A61K 47/24 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
C07C 219/00 (2013.01)
C07C 233/00 (2013.01)
C07F 9/09 (2013.01)
(72) 발명자
리앙, 주
중국 베이징 100005 동청 디스트릭트 동 단 산 티아오 넘버 5 인스티튜트 오브 베이직 메디컬 사이언시즈 차이니즈 아카데미 오브 메디컬 사이언시즈
리, 샤오윤
중국 베이징 100005 동청 디스트릭트 동 단 산 티아오 넘버 5 인스티튜트 오브 베이직 메디컬 사이언시즈 차이니즈 아카데미 오브 메디컬 사이언시즈

명 세 서

청구범위

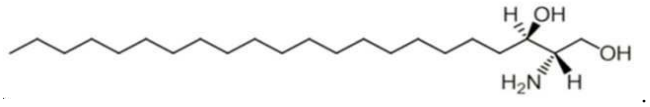
청구항 1

지질 조성물을 사용하여 핵산을 전달하는 시험관내 방법이며, 상기 방법은

비등법에 의해 지질 조성물을 핵산과 혼합하여 지질 핵산 혼합물을 수득하며, 여기서 비등법의 온도는 80℃ 내지 100℃의 범위인 단계, 및

지질 핵산 혼합물을 전달하여 핵산을 전달하는 단계를 포함하며,

여기서 지질 조성물은 하기 화학식을 갖는 화합물을 포함하는 것인 시험관내 방법:



.

청구항 2

제1항에 있어서, 비등법이 지질 조성물의 유기 용매 용액을 핵산의 수용액에 첨가하는 것을 포함하는 것인 시험관내 방법.

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

제1항에 있어서, 핵산이 소형 핵산인 시험관내 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 핵산이 단일 가닥 또는 이중 가닥인 시험관내 방법.

청구항 7

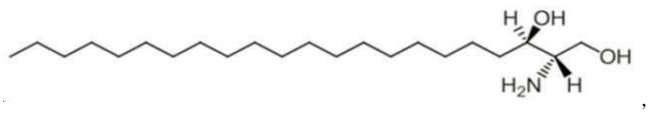
제1항에 있어서, 핵산이 스템-루프 구조를 갖는 것인 시험관내 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 핵산이 14-32 bp, 16-28 bp 또는 18-24 bp의 길이를 갖는 것인 시험관내 방법.

청구항 9

하기 화학식을 갖는 화합물을 포함하는, 핵산을 전달하기 위한 지질 조성물:



,

여기서 지질 조성물은 비등법에 의해 핵산과 혼합되어 지질 핵산 혼합물을 수득하고, 비등법의 온도는 80℃ 내지 100℃의 범위인 지질 조성물.

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

제9항에 있어서, 핵산이 표적 세포로 전달되는 지질 조성물.

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 출원은 전통 중국 의약(traditional Chinese medicine)으로부터 추출되거나 합성되고 핵산 전달을 촉진할 수 있는 다양한 화합물, 및 이를 필요로 하는 대상체의 생체내에서 표적 세포로의 sRNA와 같은 핵산의 흡수 및 진입을 촉진하기 위한, 및 표적 부위로의 진입을 촉진하기 위한, 상기 추출된 화합물 또는 그의 다양한 조합의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 지난 수십년 동안, 치료 약물로서 RNA 분자를 포함한 핵산 분자를 사용하는 개념은, 개념에서 임상 현실로 바뀌어 왔다. 실제로, 핵산 분자는 이를 치료 약물로 만드는 많은 특성을 갖는다. 이들은 단백질, 소분자 또는 다른 핵산에 결합가능하게 하는 복잡한 입체형태를 형성하기 위해 폴딩할 수 있으며, 일부는 심지어 촉매 중심을 형성할 수 있다. RNAi의 이펙터 분자로서 소형 간섭 RNA (siRNA)는 치료 약물로서 점점 더 광범위한 전망을 갖는다. 현재, 여러 가지의 siRNA 약물이 임상 시험에 진입하였으며, 이는 양호한 발달 전망을 나타내는 것이다. 일반적으로, siRNA, miRNA 및 다른 비-코딩 소형 RNA는 무차별적으로 소형 핵산 또는 소형 RNA (sRNA)로 지칭된다. 그러나, 핵산 분자는 쉽게 분해되고 비교적 짧은 생체내 반감기를 갖기 때문에, 이들은 일반적으로 치료 약물로서 좋지 않은 선택으로 여겨진다.

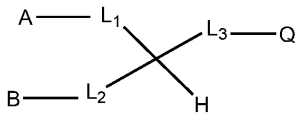
[0003] 따라서, 그의 생물학적 활성 및 치료 또는 예방 효과를 달성하기 위해 소형 RNA를 포함한 핵산 분자를 생체내의 표적 기관 및 표적 세포에 효율적으로 전달하는 방법은 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 고려될 문제이다.

발명의 내용

[0004] 광범위한 시험 후, 본 발명자는 일부 전통 중국 의약 (로디올라 크레눌라타(*Rhodiola crenulata*), 타락사쿰 몽

골리쿰(*Taraxacum mongolicum*), 안드로그라피스 파니쿨라타(*Andrographis paniculata*) 및 로니세라 자포니카(*Lonicera japonica*) 포함)에서 일부 지질 성분을 예기치 않게 밝혀냈고, 중국 전통 의약으로부터 유래된 이들 지질은 이를 필요로 하는 대상체에서 세포 및/또는 표적 부분으로의 소형 RNA와 같은 핵산의 흡수/진입을 촉진할 수 있다. 본 발명에서, 지질 성분은 합성이다.

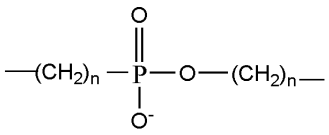
[0005] 구체적으로, 한 측면에서, 본 출원은 전통 중국 의약으로부터 추출된 하기 구조를 갖는 화합물, 및 핵산 전달용 시약의 제조를 위한 상기 화합물의 용도에 관한 것이다:



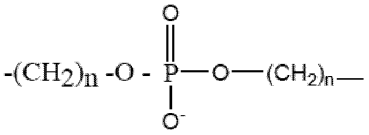
I

[0006]

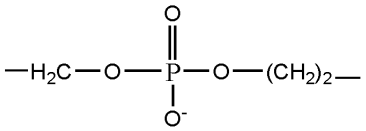
[0007] 상기 식에서, L_1, L_2 또는 L_3은 부재하거나, L_1, L_2 및 L_3은 각각 독립적으로 $-C(O)O-CH_2-$, $-CH(OH)-$, $-C(O)-NH-CH_2-$, $-CH_2-O-C(O)-$, $-CH_2-NH-C(O)-$, $-C(O)O-$, $-C(O)NH-$, $-OC(O)-$, $-NH-C(O)-$, $-CH_2-$,



,



, 및



로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0008] 단, L_1, L_2, 및 L_3 중 많아야 2개는 부재하고;

[0009] 2가 기 L_1, L_2와 관련하여, 좌측의 대시 "-"는 각각 기 A 및 B에 연결되고, 우측의 대시 "-"는 중심 탄소 원자에 연결되고;

[0010] 2가 기 L_3과 관련하여, 좌측의 대시 "-"는 중심 탄소 원자에 연결되고, 우측의 대시 "-"는 기 Q에 연결되고;

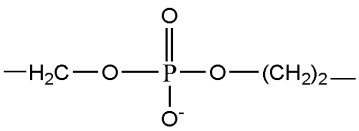
[0011] A, B 및 Q는 각각 독립적으로 H, -OH, C_{1-20} 알킬, C_{1-20} 알케닐, C_{1-20} 헤테로알킬, C_{1-20} 헤테로알케닐, $-NH_2$, 및 $-NR_3^+$로 이루어진 군으로부터 선택되고, R은 H 또는 C_{1-6} 알킬이고;

[0012] n은 0, 1, 2, 3 또는 4의 정수이다.

[0013] 한 실시양태에서, 상기 용도에서, 화합물의 구조에서:

[0014] L_1은 부재하거나, L_1은 $-C(O)O-CH_2-$ 및 $-CH(OH)-$로부터 선택되고,

[0015] L_2는 부재하거나, L_2는 $-C(O)O-$ 및 $-C(O)NH-$로부터 선택되고,



[0016] L_3은 부재하거나, L_3은 $-C(O)O-$, $-CH_2-OC(O)-$, $-CH_2-$ 및 로부터 선택되고;

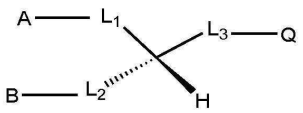
[0017] A는 H, C_{1-20} 알킬 및 C_{1-20} 알케닐로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0018] B는 H, $-NH_2$, C_{1-20} 알킬 및 C_{1-20} 알케닐로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0019] Q는 H, -OH, C_{1-20} 알킬 및 C_{1-20} 알케닐, 및 $-NR_3^+$로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 R은 H 또는 C_{1-6} 알킬이

다.

[0020] 한 실시양태에서, 화합물은 하기 화학식을 갖는다:



[0021] Ia

[0022] 한 실시양태에서, 화합물의 구조에서:

[0023] A는 H, C_{10-20} 알킬 및 C_{10-20} 알케닐로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0024] B는 H, $-NH_2$, C_{10-20} 알킬 및 C_{10-20} 알케닐로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0025] Q는 H, -OH, C_{10-20} 알킬 및 C_{10-20} 알케닐, 및 $-NR_3^+$로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 R은 H 또는 C_{1-4} 알킬이다.

[0026] 한 실시양태에서, 화합물의 구조에서:

[0027] A는 H, 직쇄 C_{15-18} 알킬 기 및 직쇄 C_{15-18} 알케닐 기로 이루어진 군으로부터 선택되고;

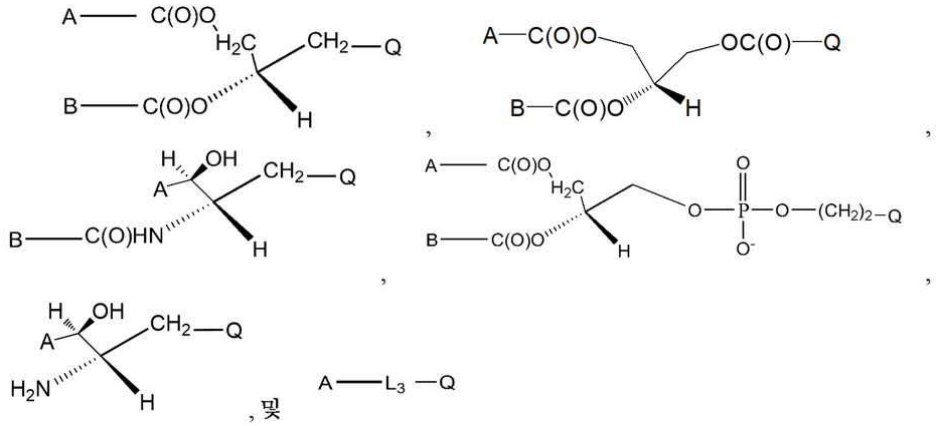
[0028] B는 H, $-NH_2$, 직쇄 C_{15-18} 알킬 기 및 직쇄 C_{15-18} 알케닐 기로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0029] Q는 H, -OH, 직쇄 C_{15-18} 알킬 기 및 직쇄 C_{15-18} 알케닐 기, 및 $-NR_3^+$로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 R은 H 또는 C_{1-4} 알킬 기이고;

[0030] A, B, Q에서의 알케닐 기는 1-5개의 이중 결합을 갖는다.

[0031] 한 실시양태에서, 상기 구조의 A, B, Q에서, 알케닐 기는 1-3개의 이중 결합을 갖고 Z 배위에 있다.

[0032] 한 실시양태에서, 상기 화합물은 하기 화학식으로부터 선택된다:



[0033] 및

[0034] 상기 식에서,

[0035] A는 직쇄 C_{15-18} 알킬 기 및 직쇄 C_{15-18} 알케닐 기로부터 선택되고;

[0036] B는 직쇄 C_{15-18} 알킬 기 및 직쇄 C_{15-18} 알케닐 기로부터 선택되고;

[0037] Q는 H, -OH, 직쇄 C_{15-18} 알킬 기 및 직쇄 C_{15-18} 알케닐 기, 및 $-NR_3^+$로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 R은 H 또는 메틸이고;

[0038] L_3은 -C(O)O-이다.

[0039] 한 실시양태에서, 화합물은 리소레시틴, 세라미드, 디글리세리드, 포스파티딜에탄올아민, 포스파티딜콜린, 트리글리세리드, 모노갈락토실 디글리세리드, 스핑고신, 포스파티딜 에탄올, 모노아실글리세롤, 지방산, 혈소판 활성화 인자, 또는 디메틸 포스파티딜 에탄올아민이다.

[0040] 한 실시양태에서, 화합물은 표 1에 나타낸 지질이다.

[0041] 한 실시양태에서, 화합물은 번호 11, 번호 12, 번호 41, 번호 71, 번호 38, 번호 64, 번호 40, 번호 37, 번호 39, 번호 60 또는 번호 62로서 표 1에 나타낸 지질이다.

[0042] 제2 측면에서, 본 출원은 핵산 전달 시약의 제조를 위한, 상기 화합물 중 어느 하나 이상, 바람직하게는 표 1로부터 선택된 지질 중 어느 하나 이상을 포함하는 조합물의 용도에 관한 것이다. 바람직하게는, 조합물은 번호 11, 번호 12, 번호 41, 번호 71, 번호 38, 번호 64, 번호 40, 번호 37, 번호 39, 번호 60 또는 번호 62로서 표 1에서의 지질 중 임의의 하나, 또는 표 1에서의 다른 지질 중 어느 하나 이상과의 그의 조합을 포함한다.

[0043] 제3 측면에서, 본 출원은 핵산 전달 시약의 제조를 위한 전통 중국 의약의 용도에 관한 것이다.

[0044] 한 실시양태에서, 전통 중국 의약은 로디올라 크레눌라타, 타락사쿰 몽골리쿰, 안드로그라피스 파니쿨라타 및 로니세라 자포니카 중국 의약 탕제 조각(decoction piece)으로부터 선택된다.

[0045] 한 실시양태에서, 시약은 전통 중국 의약으로부터 추출된 화합물을 포함한다. 바람직하게는, 시약은 상기 화합물 중 어느 하나 이상, 바람직하게는 표 1로부터 선택된 어느 하나 이상의 지질을 포함한다. 바람직하게는, 시약은 번호 11, 번호 12, 번호 41, 번호 71, 번호 38, 번호 64, 번호 40, 번호 37, 번호 39, 번호 60 또는 번호 62로서 표 1에 나타낸 지질 중 어느 하나, 또는 표 1에 나타낸 다른 지질 중 어느 하나 이상과의 그의 조합을 포함한다.

[0046] 한 실시양태에서, 화합물은 전통 중국 의약의 달임(decoction)에 의해 추출된다. 또 다른 실시양태에서, 화합물은 전통 중국 의약 조각을 물에 침지시킨 후, 순차적으로 강렬히 가열하고 서서히 가열한 다음에, 가열된 중국 의약 약액을 농축시킨 다음에, 클로로포름-메탄올, 클로로포름 및 물을 순차적으로 첨가하여 교반하고, 클로로포름 층이 수득됨으로써 추출된다.

[0047] 한 실시양태에서, 화합물은 상기 실시양태 중 어느 하나에 나타낸 구조를 갖는다.

[0048] 한 실시양태에서, 화합물은 리소레시틴, 세라미드, 디글리세리드, 포스파티딜에탄올아민, 포스파티딜콜린, 트리글리세리드, 모노갈락토실디글리세리드, (신경) 스핑고신, 포스파티딜 에탄올, 모노아실글리세롤, 지방산, 혈소판 활성화 인자, 또는 디메틸 포스파티딜 에탄올아민으로부터 선택된다.

[0049] 한 실시양태에서, 화합물은 표 1로부터 선택된다.

[0050] 한 실시양태에서, 화합물은 번호 11, 번호 12, 번호 41, 번호 71, 번호 38, 번호 64, 번호 40, 번호 37, 번호 39, 번호 60 또는 번호 62로서 표 1에 나타낸 지질이다.

[0051] 한 실시양태에서, 전달은 시험관내 세포 전달, 또는 생체내 위장 전달을 포함한다.

[0052] 한 실시양태에서, 용도는 지질 핵산 혼합물의 제조를 포함한다.

[0053] 한 실시양태에서, 지질 핵산 혼합물은 비등법(boiling method), 또는 역 증발법(reverse evaporation method), 또는 직접 혼합에 의해 제조된다.

[0054] 한 실시양태에서, 상기 비등법에서의 온도는 약 25℃ 내지 약 100℃, 바람직하게는 약 80℃ 내지 약 100℃이고; 역 증발법에서의 온도는 약 25℃ 내지 약 70℃, 바람직하게는 약 55℃이다.

[0055] 제4 측면에서, 본 출원은 선행 실시양태 중 어느 하나의 구조의 화합물 및 핵산을 포함하는 제약 조성물에 관한 것이다. 바람직하게는, 상기 제약 조성물은 상기 화합물 중 어느 하나 이상, 바람직하게는 표 1로부터 선택된 하나 이상의 지질을 포함한다. 바람직하게는, 제약 조성물은 번호 11, 번호 12, 번호 41, 번호 71, 번호 38, 번호 64, 번호 40, 번호 37, 번호 39, 번호 60 또는 번호 62로서 표 1에 나타낸 지질 중 어느 하나, 또는 표 1에 나타낸 다른 지질 중 어느 하나 이상과의 그의 조합, 또는 어느 하나 이상의 지질 및 다른 관련 화학물질과의 그의 조합을 포함한다.

[0056] 한 실시양태에서, 상기 제약 조성물에서, 지질 및 핵산은 적어도 부분적으로 또는 전체적으로 지질 핵산 혼합물의 형태로 존재한다.

[0057] 한 실시양태에서, 상기 제약 조성물에서, 지질 핵산 혼합물은 비등법, 또는 역 증발법, 또는 직접 혼합에 의해 제조된다.

[0058] 한 실시양태에서, 상기 제약 조성물에서, 비등법에서의 온도는 25℃ 내지 약 100℃, 바람직하게는 약 80℃ 내지 100℃이고, 역 증발법에서의 온도는 약 25℃ 내지 약 70℃, 바람직하게는 약 55℃이다.

[0059] 제5 측면에서, 본 출원은 선행 실시양태의 지질 및 핵산을 포함하는 키트에 관한 것이며, 여기서 지질 및 핵산은 각각 독립적으로 제1 용기 및 제2 용기에 제공되며, 제1 용기 및 제2 용기는 동일하거나 상이하다. 바람직하게는, 키트는 상기 화합물 중 어느 하나 이상, 바람직하게는 표 1로부터 선택된 어느 하나 이상의 지질을 포함한다. 바람직하게는, 키트는 번호 11, 번호 12, 번호 41, 번호 71, 번호 38, 번호 64, 번호 40, 번호 37, 번호 39, 번호 60, 또는 번호 62로서 표 1에 나타낸 지질 중 어느 하나, 또는 표 1에 나타낸 다른 지질 중 어느 하나 이상과의 그의 조합, 또는 어느 하나 이상의 지질 및 다른 관련 화학물질과의 그의 조합을 포함한다.

[0060] 한 실시양태에서, 상기 제약 조성물에서, 지질 및 핵산은 적어도 부분적으로 또는 전체적으로 사용 직전에 지질 핵산 혼합물로 제조된다.

[0061] 한 실시양태에서, 상기 제약 조성물에서, 지질 핵산 혼합물은 비등법, 또는 역 증발법, 또는 직접 혼합에 의해 제조된다.

[0062] 한 실시양태에서, 상기 제약 조성물에서, 비등법에서의 온도는 25℃ 내지 약 100℃, 바람직하게는 약 100℃이고, 역 증발법에서의 온도는 약 25℃ 내지 약 70℃, 바람직하게는 약 55℃이다.

[0063] 제6 측면에서, 본 출원은 핵산을 선행 실시양태 중 어느 하나의 제약 조성물 또는 키트의 형태로 제공하는 것을 포함하는, 핵산을 표적 세포내로 전달하는 방법에 관한 것이다.

[0064] 제7 측면에서, 본 출원은 핵산을 선행 실시양태 중 어느 하나의 제약 조성물 또는 키트의 형태로 제공하는 것을 포함하는, 핵산을 핵산의 전달을 필요로 하는 대상체의 생체내에 전달하는 방법에 관한 것이다.

[0065] 한 실시양태에서, 상기 방법에서, 대상체는 인간 또는 동물, 예컨대 포유동물이다.

[0066] 한 실시양태에서, 상기 방법에서, 핵산은 대상체의 생체내에서의 혈액 순환 또는 표적 조직/세포로 전달된다.

[0067] 한 실시양태에서, 상기 방법은 선행 실시양태 중 어느 하나의 제약 조성물 또는 키트를 이를 필요로 하는 대상체에게 소화관에 의해 직접 전달하는 것을 포함한다.

[0068] 선행 측면 또는 실시양태 중 어느 하나에서, 예를 들어 제약 조성물 또는 키트에서, 핵산 및 지질은 국소 투여 및/또는 주사용으로 제조된다.

[0069] 선행 측면 또는 실시양태 중 어느 하나에서, 예를 들어 제약 조성물 또는 키트에서, 여기서 핵산 및 지질은 소화기 투여, 호흡기 투여 및/또는 주사용으로 제조된다.

[0070] 선행 측면 또는 실시양태 중 어느 하나에서, 예를 들어 제약 조성물 또는 키트에서, 여기서 핵산 및 지질은 경구 투여, 흡입 투여 및/또는 주사용으로 제조된다.

[0071] 선행 측면 또는 실시양태 중 어느 하나에서, 예를 들어 제약 조성물 또는 키트에서, 여기서 핵산은 소형 RNA이다.

[0072] 선행 측면 또는 실시양태 중 어느 하나에서, 예를 들어 제약 조성물 또는 키트에서, 여기서 핵산은 스템-루프 구조를 갖는다.

[0073] 선행 측면 또는 실시양태 중 어느 하나에서, 예를 들어 제약 조성물 또는 키트에서, 여기서 소형 RNA는 14-32 bp 또는 18-24 bp의 길이, 예를 들어, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 및 32 bp의 길이를 갖는다.

[0074] 선행 측면 또는 실시양태 중 어느 하나에서, 제약 조성물, 키트 또는 화합물은 경구 투여될 수 있다.

[0075] 선행 측면 또는 실시양태 중 어느 하나에서, 핵산은 질환, 예컨대 암, 예를 들어 위암 또는 폐암을 치료하는데 사용될 수 있다.

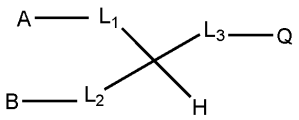
[0076] 선행 측면 또는 실시양태 중 어느 하나에서, 지질 조합이 사용될 수 있고, 지질 조합은 다음 중 어느 하나이다: 번호 8: 번호 41=6:1의 지질 조합; 번호 38:번호 41=6:1의 지질 조합; 번호 39:번호 41=6:1의 지질 조합; 번호 40:번호 41=6:1의 지질 조합; 번호 38:번호 12:번호 41:번호 29=1:1:2:1의 지질 조합; 번호 40:번호 12:번호

41=2:4:3의 지질 조합; 번호 12:번호 41=1:6의 지질 조합; 번호 12:번호 41=1:1의 지질 조합; 번호 12:번호 41=6:1의 지질 조합; 번호 40:번호 12:번호 41=2:2:2의 지질 조합; 번호 4:번호 12:번호 41=1:1:1의 지질 조합; 번호 1:번호 2:번호 3:번호 19:번호 35=1:1:1:1:1의 DG 조합; 번호 6:번호 9:번호 10:번호 13:번호 15:번호 16:번호 18:번호 20:번호 21:번호 22:번호 23:번호 24:번호 25:번호 26:번호 27:번호 28:번호 32:번호 33=1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1의 TG 조합; 번호 36:번호 37=1:1의 LPC 조합; 번호 11:번호 12=1:1의 PC 조합; 번호 8:번호 38=1:1의 PE 조합; 번호 4:번호 14=1:1의 Cer 조합; 번호 17:번호 30:번호 31=1:1:1의 So 조합; 번호 5, 번호 7이 없는 번호 1-36의 동일 부피 조합; 번호 5, 번호 7, 번호 34가 없는 번호 1-36의 동일 부피 조합; 번호 5, 번호 7, 번호 1, 번호 2, 번호 3, 번호 19, 번호 35가 없는 번호 1-36의 동일 부피 조합; 번호 5, 번호 7, 번호 6, 번호 9, 번호 10, 번호 13, 번호 15, 번호 16, 번호 18, 번호 20, 번호 21, 번호 22, 번호 23, 번호 24, 번호 25, 번호 26, 번호 27, 번호 28, 번호 32, 번호 33이 없는 번호 1-36의 동일 부피 조합; 번호 5, 번호 7, 번호 36, 번호 37이 없는 번호 1-36의 동일 부피 조합; 번호 5, 번호 7, 번호 11, 번호 12가 없는 번호 1-36의 동일 부피 조합; 번호 5, 번호 7, 번호 8이 없는 번호 1-36의 동일 부피 조합; 번호 5, 번호 7, 번호 4, 번호 14가 없는 번호 1-36의 동일 부피 조합; 번호 5, 번호 7, 번호 29가 없는 번호 1-36의 동일 부피 조합; 번호 1:번호 34=2:1의 지질 조합; 번호 1: 상기 DG 조성=2:1의 지질 조합; 번호 1: 상기 TG 조성=2:1의 지질 조합; 번호 1: 상기 LPC 조성=2:1의 지질 조합; 번호 1:번호 8=2:1의 지질 조합; 번호 1:번호 12=2:1의 지질 조합; 번호 1: 상기 Cer 조성=2:1의 지질 조합; 번호 1: 상기 So 조성=2:1의 지질 조합; 번호 1:번호 29=2:1의 지질 조합; 번호 1:번호 8:번호 12=1:1:1의 지질 조합; 번호 8:번호 34=2:1의 지질 조합; 번호 8: 상기 DG 조성=2:1의 지질 조합; 번호 8: 상기 TG 조성=2:1의 지질 조합; 번호 8: 상기 LPC 조성=2:1의 지질 조합; 번호 8:번호 37=4:1의 지질 조합; 번호 8:번호 12=2:1의 지질 조합; 번호 8: 상기 Cer 조성=2:1의 지질 조합; 번호 8: 상기 So 조성=2:1의 지질 조합; 번호 8:번호 31=6:1의 지질 조합; 번호 8:번호 29=2:1의 지질 조합; 번호 12:번호 34=2:1의 지질 조합; 번호 12: 상기 DG 조성=2:1의 지질 조합; 번호 12: 상기 TG 조성=2:1의 지질 조합; 번호 12: 상기 LPC 조성=2:1의 지질 조합; 번호 12:번호 8=2:1의 지질 조합; 번호 12: 상기 Cer 조성=2:1의 지질 조합; 번호 12: 상기 So 조성=2:1의 지질 조합; 번호 12:번호 29=2:1의 지질 조합; 번호 12:번호 8:번호 1&2=2:1:1의 지질 조합; 번호 12:번호 8:번호 15=2:1:1의 지질 조합; 번호 12:번호 8:번호 36&37=2:1:1의 지질 조합; 번호 12:번호 8:번호 11=2:1:1의 지질 조합; 번호 12:번호 8:번호 12=2:1:1의 지질 조합; 번호 12:번호 8:번호 4=2:1:1의 지질 조합; 번호 12:번호 8:번호 31=2:1:1의 의 지질 조합; 번호 12:번호 8:번호 29=2:1:1의 지질 조합; 번호 12:번호 8:번호 34=3:2:1의 지질 조합; 번호 12:번호 8:번호 34=4:2:3의 지질 조합; 번호 12:번호 8:번호 2=4:2:3의 지질 조합; 번호 12:번호 8:번호 2=16:8:3의 지질 조합; 번호 12:번호 8:번호 32=4:2:3의 지질 조합; 번호 12:번호 8:번호 37=4:2:3의 지질 조합; 번호 12:번호 8:번호 11=4:2:3의 지질 조합; 번호 12:번호 8:번호 38=4:2:3의 지질 조합; 번호 12:번호 8:번호 4=4:2:3의 지질 조합; 번호 12:번호 8:번호 31=4:2:3의 지질 조합; 번호 12:번호 8:번호 29=4:2:3의 지질 조합; 번호 12:번호 8:번호 29:번호 31=2:1:1:1의 지질 조합; 번호 12:번호 8:번호 29:번호 31:번호 34=4:2:2:2:5의 지질 조합; 번호 12:번호 8:번호 29:번호 31:번호 2=4:2:2:2:5의 지질 조합; 번호 12:번호 8:번호 29:번호 31:번호 32=4:2:2:2:5의 지질 조합; 번호 12:번호 8:번호 29:번호 31:번호 11=4:2:2:2:5의 지질 조합; 번호 12:번호 8:번호 29:번호 31:번호 37=4:2:2:2:5의 지질 조합; 번호 12:번호 8:번호 29:번호 31:번호 38=4:2:2:2:5의 지질 조합; 번호 12:번호 8:번호 29:번호 31:번호 4=4:2:2:2:5의 지질 조합; 번호 12:번호 8:번호 29:번호 31:번호 4:번호 1:번호 16=2:1:1:3:2:2:3의 지질 조합; 번호 1:번호 8:번호 12:번호 1&2=2:2:2:3의 지질 조합; 번호 1:번호 8:번호 12:번호 15=2:2:2:3의 지질 조합; 번호 1:번호 8:번호 12:번호 36&37=2:2:2:3의 지질 조합; 번호 1:번호 8:번호 12:번호 12=2:2:2:3의 지질 조합; 번호 1:번호 8:번호 12:번호 4=2:2:2:3의 지질 조합; 번호 1:번호 8:번호 12:번호 31=2:2:2:3의 지질 조합; 번호 1:번호 8:번호 12:번호 29=2:2:2:3의 지질 조합; 번호 8:번호 34:번호 1&2=2:1:1의 지질 조합; 번호 8:번호 34:번호 15=2:1:1의 지질 조합; 번호 8:번호 34:번호 36&37=2:1:1의 지질 조합; 번호 8:번호 34:번호 12=2:1:1의 지질 조합; 번호 8:번호 34:번호 4=2:1:1의 지질 조합; 번호 8:번호 34:번호 31=2:1:1의 지질 조합; 번호 8:번호 34:번호 29=2:1:1의 지질 조합; 번호 8:번호 31:번호 34=12:3:5의 지질 조합; 번호 8:번호 31:번호 2=12:3:5의 지질 조합; 번호 8:번호 31:번호 37=12:3:5의 지질 조합; 번호 8:번호 31:번호 11=12:3:5의 지질 조합; 번호 8:번호 31:번호 12=12:3:5의 지질 조합; 번호 8:번호 31:번호 4=12:3:5의 지질 조합; 번호 8:번호 31:번호 29=12:3:5의 지질 조합; 번호 8:번호 31:번호 32=12:3:5의 지질 조합; 번호 8:번호 4:번호 34=12:3:5의 지질 조합; 번호 8:번호 4:번호 2=12:3:5의 지질 조합; 번호 8:번호 4:번호 37=12:3:5의 지질 조합; 번호 8:번호 4:번호 12=12:3:5의 지질 조합; 번호 8:번호 4:번호 31=12:3:5의 지질 조합; 번호 8:번호 4:번호 29=12:3:5의 지질 조합; 번호 8:번호 4:번호 32=12:3:5의 지질 조합; 번호 38:번호 34=2:1의 지질 조합; 번호 38:번호 1=2:1의 지질 조합; 번호 38:번호 2=2:1의 지질 조합; 번호 38:번호 1&2=2:1의 지질 조합; 번호 38:번호 15=2:1의 지질 조합; 번호 38:번호 32=2:1의 지질 조

합; 번호 38:번호 37=2:1의 지질 조합; 번호 38:번호 37=4:1의 지질 조합; 번호 38:번호 11=2:1의 지질 조합; 번호 38:번호 12=2:1의 지질 조합; 번호 38:번호 11&12=2:1의 지질 조합; 번호 38:번호 12=4:1의 지질 조합; 번호 38:번호 8=2:1의 지질 조합; 번호 38:번호 4=2:1의 지질 조합; 번호 38: So (30)=2:1의 지질 조합; 번호 38:번호 31=2:1의 지질 조합; 번호 38:번호 29=2:1의 지질 조합; 번호 1:번호 38:번호 12:번호 34=2:2:2:3의 지질 조합; 번호 1:번호 38:번호 12:번호 15=2:2:2:3의 지질 조합; 번호 1:번호 38:번호 12:번호 37=2:2:2:3의 지질 조합; 번호 1:번호 38:번호 12:번호 8=2:2:2:3의 지질 조합; 번호 1:번호 38:번호 12:번호 4=2:2:2:3의 지질 조합; 번호 1:번호 38:번호 12:번호 31=2:2:2:3의 지질 조합; 번호 1:번호 38:번호 12:번호 29=2:2:2:3의 지질 조합; 번호 38:번호 34:번호 1=2:1:3의 지질 조합; 번호 38:번호 34:번호 15=2:1:3의 지질 조합; 번호 38:번호 34:번호 37=2:1:3의 지질 조합; 번호 38:번호 34:번호 12=2:1:3의 지질 조합; 번호 38:번호 34:번호 8=2:1:3의 지질 조합; 번호 38:번호 34:번호 4=2:1:3의 지질 조합; 번호 38:번호 34:번호 31=2:1:3의 지질 조합; 번호 38:번호 34:번호 29=2:1:3의 지질 조합; 번호 38:번호 12:번호 1=2:1:3의 지질 조합; 번호 38:번호 12:번호 2=4:1:3의 지질 조합; 번호 38:번호 12:번호 15=2:1:3의 지질 조합; 번호 38:번호 12:번호 37=2:1:3의 지질 조합; 번호 38:번호 12:번호 8=2:1:3의 지질 조합; 번호 38:번호 12:번호 4=2:1:3의 지질 조합; 번호 38:번호 12:번호 31=2:1:3의 지질 조합; 번호 38:번호 12:번호 29=2:1:3의 지질 조합; 번호 38:번호 12:번호 1:번호 15:번호 34=22:22:22:33:36의 지질 조합; 번호 38:번호 12:번호 1:번호 15:번호 37=22:22:22:33:36의 지질 조합; 번호 38:번호 12:번호 1:번호 15:번호 4=22:22:22:33:36의 지질 조합; 번호 38:번호 12:번호 1:번호 15:번호 31=22:22:22:33:36의 지질 조합; 번호 38:번호 12:번호 1:번호 15:번호 29=22:22:22:33:36의 지질 조합; 번호 38:번호 34:번호 37:번호 1=44:22:33:36의 지질 조합; 번호 38:번호 34:번호 37:번호 15=44:22:33:36의 지질 조합; 번호 38:번호 34:번호 37:번호 12=44:22:33:36의 지질 조합; 번호 38:번호 34:번호 37:번호 4=44:22:33:36의 지질 조합; 번호 38:번호 34:번호 37:번호 31=44:22:33:36의 지질 조합; 번호 38:번호 12:번호 4:번호 34=44:22:33:36의 지질 조합; 번호 38:번호 12:번호 4:번호 1=44:22:33:36의 지질 조합; 번호 38:번호 12:번호 4:번호 15=44:22:33:36의 지질 조합; 번호 38:번호 12:번호 4:번호 37=44:22:33:36의 지질 조합; 번호 38:번호 12:번호 4:번호 37=8:2:5:3의 지질 조합; 번호 38:번호 12:번호 4:번호 31=44:22:33:36의 지질 조합; 번호 38:번호 12:번호 4:번호 29=44:22:33:36의 지질 조합; 번호 38:번호 12:번호 4:번호 29:번호 34=88:44:66:72:135의 지질 조합; 번호 38:번호 12:번호 4:번호 29:번호 1=88:44:66:72:135의 지질 조합; 번호 38:번호 12:번호 4:번호 29:번호 15=88:44:66:72:135의 지질 조합; 번호 38:번호 12:번호 4:번호 29:번호 37=88:44:66:72:135의 지질 조합; 번호 38:번호 12:번호 4:번호 29:번호 31=88:44:66:72:135의 지질 조합; 번호 38:번호 12:번호 4:번호 2=20:10:15:9의 지질 조합; 번호 38:번호 12:번호 4:번호 6=20:10:15:9의 지질 조합; 번호 38:번호 12:번호 4:번호 17=20:10:15:9의 지질 조합; 번호 38:번호 12:번호 4:번호 29=20:10:15:9의 지질 조합; 번호 38:번호 12:번호 4:번호 34=20:10:15:9의 지질 조합; 번호 38:번호 12:번호 4:번호 37=20:10:15:9의 지질 조합; 번호 38:번호 12:번호 31:번호 34=2:1:3:3의 지질 조합; 번호 38:번호 12:번호 31:번호 1=2:1:3:3의 지질 조합; 번호 38:번호 12:번호 31:번호 15=2:1:3:3의 지질 조합; 번호 38:번호 12:번호 31:번호 37=2:1:3:3의 지질 조합; 번호 38:번호 12:번호 31:번호 4=2:1:3:3의 지질 조합; 번호 38:번호 12:번호 31:번호 29=2:1:3:3의 지질 조합; 번호 38:번호 34:번호 37:번호 31:번호 1=88:44:66:72:135의 지질 조합; 번호 38:번호 34:번호 37:번호 31:번호 15=88:44:66:72:135의 지질 조합; 번호 38:번호 34:번호 37:번호 31:번호 12=88:44:66:72:135의 지질 조합; 번호 38:번호 34:번호 37:번호 31:번호 4=88:44:66:72:135의 지질 조합; 번호 38:번호 34:번호 37:번호 31:번호 29=88:44:66:72:135의 지질 조합; 번호 38:번호 37:번호 34=4:2:3의 지질 조합; 번호 38:번호 37:번호 1=4:2:3의 지질 조합; 번호 38:번호 37:번호 2=4:2:3의 지질 조합; 번호 38:번호 37:번호 1&2=4:2:3의 지질 조합; 번호 38:번호 37:번호 2=32:8:5의 지질 조합; 번호 38:번호 37:번호 32=32:8:5의 지질 조합; 번호 38:번호 37:번호 15=4:2:3의 지질 조합; 번호 38:번호 37:번호 32=4:2:3의 지질 조합; 번호 38:번호 37:번호 8=4:2:3의 지질 조합; 번호 38:번호 37:번호 11=4:2:3의 지질 조합; 번호 38:번호 37:번호 12=4:2:3의 지질 조합; 번호 38:번호 37:번호 11&12=4:2:3의 지질 조합; 번호 38:번호 37:번호 12=4:1:1의 지질 조합; 번호 38:번호 37:번호 4=4:2:3의 지질 조합; 번호 38:번호 37:번호 30=4:2:3의 지질 조합; 번호 38:번호 37:번호 31=4:2:3의 지질 조합; 번호 38:번호 37:번호 29=4:2:3의 지질 조합; 번호 8:번호 37:번호 32=4:1:2의 지질 조합; 번호 8:번호 37:번호 2=4:1:2의 지질 조합; 번호 38:번호 37:번호 15:번호 34=64:16:10:45의 지질 조합; 번호 38:번호 37:번호 15:번호 1=64:16:10:45의 지질 조합; 번호 38:번호 37:번호 15:번호 12=64:16:10:45의 지질 조합; 번호 38:번호 37:번호 15:번호 4=64:16:10:45의 지질 조합; 번호 38:번호 37:번호 15:번호 31=64:16:10:45의 지질 조합; 번호 38:번호 37:번호 15:번호 29=64:16:10:45의 지질 조합; 번호 38:번호 2:번호 37=4:2:3의 지질 조합; 번호 38:번호 2:번호 31=4:2:3의 지질 조합; 번호 38:번호 2:번호 29=4:2:3의 지질 조합; 번호 38:번호 2:번호 34=4:2:3의 지질 조합; 번호 38:번호 2:번호 32=4:2:3의 지질 조합; 번호 38:번호 2:번호 12=4:2:3의 지질 조합; 번호

38:번호 2:번호 12=4:5:1의 지질 조합; 번호 38:번호 2:번호 4=4:4:2:3의 지질 조합. 한 실시양태에서, 지질 번호 1&2, 번호 11&12 또는 번호 36&37은 각각 임의의 비의 지질 번호 1 및 번호 2, 임의의 비의 지질 번호 11 및 번호 12, 임의의 비의 지질 번호 36 및 번호 37을 나타낼 수 있다.

[0077] 본 출원은 또한 하기 화학식의 구조를 갖는 화합물, 상기 화합물을 포함하는 조합물 또는 조성물, 및 핵산 전달을 위해 상기 화합물, 조합물 또는 조성물을 사용하는 방법, 및 핵산 전달 시약의 제조를 위한 상기 화합물, 조합물 또는 조성물의 용도를 제공한다:



I

[0078]

[0079] 상기 식에서,

[0080] L_1, L_2 또는 L_3은 부재하거나, L_1, L_2 및 L_3은 각각 독립적으로 -C(O)O-CH_2-, -CH(OH)-, -CH_2-OC(O), -C(O)O-, -C(O)NH-로 이루어진 군으로부터 선택되고;

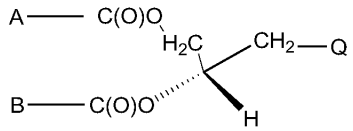
[0081] 단, L_1, L_2, 및 L_3 중 많아야 2개는 부재하고;

[0082] 2가 기 L_1, L_2와 관련하여, 좌측의 대시 "-"는 각각 기 A 및 B에 연결되고, 우측의 대시 "-"는 중심 탄소 원자에 연결되고;

[0083] 2가 기 L_3과 관련하여, 좌측의 대시 "-"는 중심 탄소 원자에 연결되고, 우측의 대시 "-"는 기 Q에 연결되고;

[0084] A, B 및 Q는 독립적으로 H, -OH, C_{1-20} 알킬, C_{1-20} 알케닐, -NH_2, 및 -NR_3^+로 이루어진 군으로부터 선택되고, R은 H 또는 C_{1-6} 알킬이다.

[0085] 한 실시양태에서, 화합물은 하기 구조를 가질 수 있다:



[0086]

[0087] 상기 식에서,

[0088] A는 직쇄 C_{10-20} 알킬 기 및 직쇄 C_{10-20} 알케닐 기로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0089] B는 직쇄 C_{10-20} 알킬 기 및 직쇄 C_{10-20} 알케닐 기로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0090] Q는 -OH이고;

[0091] 바람직하게는,

[0092] A는 직쇄 C_{15-20} 알킬 기 및 직쇄 C_{15-20} 알케닐 기로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0093] B는 직쇄 C_{15-20} 알킬 기 및 직쇄 C_{15-20} 알케닐 기로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0094] Q는 -OH이고;

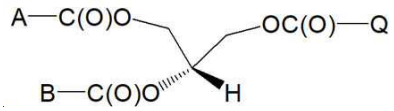
[0095] 바람직하게는,

[0096] A는 직쇄 C_{15-18} 알킬 기 및 직쇄 C_{15-18} 알케닐 기로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0097] B는 직쇄 C_{15-18} 알킬 기 및 직쇄 C_{15-18} 알케닐 기로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0098] Q는 -OH이다.

[0099] 또 다른 실시양태에서, 상기 화합물은 하기 구조를 가질 수 있다:

[0100] 

[0101] 상기 식에서,

[0102] A는 직쇄 C_{10-20} 알킬 기 및 직쇄 C_{10-22} 알케닐 기로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0103] B는 직쇄 C_{10-20} 알킬 기 및 직쇄 C_{10-22} 알케닐 기로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0104] Q는 직쇄 C_{10-20} 알킬 기 및 직쇄 C_{10-22} 알케닐 기로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0105] 바람직하게는,

[0106] A는 직쇄 C_{15-18} 알킬 기 및 직쇄 C_{15-22} 알케닐 기로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0107] B는 직쇄 C_{15-18} 알킬 기 및 직쇄 C_{15-22} 알케닐 기로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0108] Q는 직쇄 C_{15-18} 알킬 기 및 직쇄 C_{15-22} 알케닐 기로 이루어진 군으로부터 선택되고;

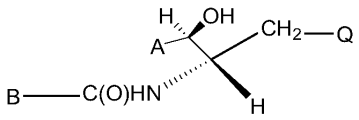
[0109] 바람직하게는,

[0110] A는 직쇄 C_{15-18} 알킬 기 및 직쇄 C_{15-20} 알케닐 기로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0111] B는 직쇄 C_{15-18} 알킬 기 및 직쇄 C_{15-20} 알케닐 기로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0112] Q는 직쇄 C_{15-18} 알킬 기 및 직쇄 C_{15-20} 알케닐 기로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0113] 또 다른 실시양태에서, 화합물은 하기 구조를 가질 수 있다:

[0114] 

[0115] 상기 식에서,

[0116] A는 직쇄 C_{10-20} 알킬 기 및 직쇄 C_{10-20} 알케닐 기로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0117] B는 직쇄 C_{10-20} 알킬 기 및 직쇄 C_{10-20} 알케닐 기로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0118] Q는 -OH이고;

[0119] 바람직하게는,

[0120] A는 직쇄 C_{15-20} 알킬 기 및 직쇄 C_{15-18} 알케닐 기로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0121] B는 직쇄 C_{15-18} 알킬 기 및 직쇄 C_{15-18} 알케닐 기로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0122] Q는 -OH이고;

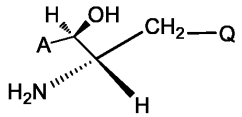
[0123] 바람직하게는,

[0124] A는 직쇄 C_{15-20} 알킬 기이고;

[0125] B는 직쇄 C_{15-18} 알킬 기이고;

[0126] Q는 -OH이다.

[0127] 또 다른 실시양태에서, 화합물은 하기 구조를 가질 수 있다:

[0128] 

[0129] 상기 식에서,

[0130] A는 직쇄 C_{10-20} 알킬 기 및 직쇄 C_{10-20} 알케닐 기로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0131] Q는 -OH이고;

[0132] 바람직하게는,

[0133] A는 직쇄 C_{10-20} 알킬 기 및 직쇄 C_{15-18} 알케닐 기로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0134] Q는 -OH이고;

[0135] 바람직하게는,

[0136] A는 직쇄 C_{15-20} 알킬 기이고;

[0137] Q는 -OH이다.

[0138] 본 출원의 임의의 측면 또는 실시양태에서, 화합물은 상기 기재된 바와 같은 화합물일 수 있다.

[0139] 본 출원의 임의의 측면 또는 실시양태에서, 화합물, 추출물 또는 조성물은 합성적으로, 자연적으로 유래되거나 전통 중국 의약으로부터 추출될 수 있다.

[0140] 본 출원에 의해 제공되는 상기 기술적 해결책은 핵산의 고효율 표적화된 전달을 상당히 개선시킬 수 있고, 낮은 캡슐화 속도, 저조한 안전성, 저조한 안정성, 복잡한 제조 공정, 제품의 이질성, 낮은 재현성 및 개선될 표적화를 포함한, 핵산 리포좀의 종래 기술의 단점을 극복할 수 있다.

[0141] <표 1-1>

[0142] 전통 중국 의약으로부터 유래된 69 가지 지질의 목록

번호	제조업체	카탈로그 번호	약어	작업 농도 (mg/mL)
1	아반티 (Avanti)	110882	DG(18:0/18:0/0:0)	5
2	아반티	110883	DG(18:0/16:0/0:0)	5
3	아반티	800816C	DG(16:0/16:0/0:0)	10
4	아반티	860627P	C18 디히드로세라미드 (d18:0/18:0)	10
6	아반티	110613	TG(18:1/18:1/18:1)	1
8	아반티	850756C	PE(16:0/18:2)	10
9	아반티	110521	TG(16:0/16:0/18:1)	5
10	아반티	111000	TG(16:0/16:0/16:0)	10
11	아반티	850468	PC(18:0/18:2)	10
12	아반티	850458C	PC(16:0/18:2)	10
13	아반티	111002	TG(18:2/18:2/18:2)	10

[0143]

14	아반티	860634P	C16 디히드로세라미드 (d18:0/16:0)	5
15	시그마	P8577	TG(16:0/18:1/18:2)	1
16	누-책 (Nu-chek)	T-160	TG(18:0/18:0/18:0)	1
17	마트레야 (Matreya)	1326	So(d16:0)	1
18	시그마	D1782	TG(16:0/18:1/18:1)	5
19	라로단 (Larodan)	32-1656-7	DG(16:0/18:2)	5
20	라로단	34-1603-7	TG(16:0/16:0/18:2)	5
21	라로단	34-1862-7	TG(16:0/18:2/18:2)	5
22	라로단	34-3003-7	TG(18:0/16:0/18:1)	5
23	라로단	34-1822-7	TG(18:0/18:1/18:1)	5
24	라로단	34-3007-7	TG(18:0/18:1/18:2)	5
25	라로단	34-1827-7	TG(18:1/18:1/18:2)	5
26	라로단	34-1828-7	TG(18:1/18:1/18:3)	5
27	라로단	34-1866-7	TG(18:1/18:2/18:2)	5

[0144]

28	라로단	34-1855-7	TG(18:3/18:2/18:2)	5
29	라로단	10-1840-4	FA(18:4)	5
30	아반티	110748	스핑가닌 (d18:0)	5
31	아반티	110749	스핑가닌 (d20:0)	1
32	아반티	110520	TG(18:0/16:0/16:0)	5
33	라로단	34-1810-7	TG(18:0/16:0/18:0)	10
34	라로단	31-1820-7	MG(18:2p)	10
35	누-첵	D-251	DG(18:2/18:2)	10
36	라로단	38-1802-0	LPC(18:2)	10
37	아반티	791251	LPC(18:3)	10
38	아반티	791016	PE(16:0/16:1)	10
39	아반티	792077C	16:1-18:1PE	10
40	아반티	792078C	16:0-22:1 PE	10
41	아반티	792079P	스핑가닌(d22:0)	10
42	라로단	31-2220	MG(22:2)	10
43	라로단	32-1658	DG(16:0/18:3)	10
44	라로단	34-1289	TG(18:1/18:1/20:4)	10

[0145]

45	라로단	34-1870	DG(18:3/18:2)	10
46	라로단	32-1871	DG(20:5/18:2)	10
47	라로단	34-1880	TG(18:3/18:2/18:3)	10
48	라로단	34-2230	TG(18:1/22:1/22:1)	10
49	라로단	34-3031	TG(16:0/16:1/18:1)	10
50	라로단	34-3032	TG(16:0/18:1/18:3)	10
51	라로단	34-3033	TG(16:0/18:1/20:4)	10
52	라로단	34-3034	TG(18:3/18:2/20:5)	10
53	아반티	792143	Cer(d16:0/16:0)	10
54	아반티	792144	Cer(d20:0/18:0)	10
55	아반티	792145	Cer(d22:0/18:0)	10
56	아반티	792146	TG(16:0/18:2/18:3)	10
57	아반티	792147	TG(18:1/18:2/18:3)	10
58	아반티	792150	PEt(16:1/16:1)	10
59	아반티	792151	dMePE(16:1/14:0)	10
60	아반티	792152	dMePE(16:1/16:1)	10
61	아반티	792153	dMePE(18:1/14:0)	10

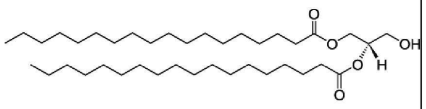
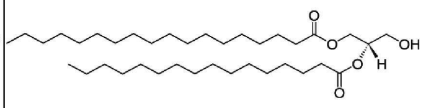
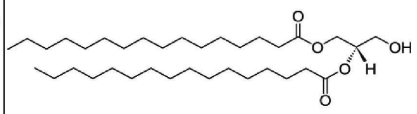
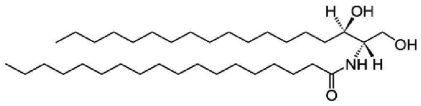
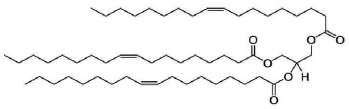
[0146]

62	아반티	792154	dMePE(16:1/18:1)	10
63	아반티	792156	PC(18:0/18:3(6Z,9Z,12Z))	10
64	아반티	792155	PE(15:0/24:1(15Z))	10
65	아반티	792157	PC(20:0/14:1(9Z))	10
66	아반티	792160	TG(18:0/18:2/18:3)	10
67	아반티	792148	TG(18:1/18:2/20:5)	10
68	아반티	792149	TG(20:5/18:2/18:2)	10
69	아반티	792158	PC(18:1(11Z)-16:1(9Z))	10
70	라로단	32-1830-7	DG(18:3/18:3)	25
71	라로단	37-1620-7	PE(16:0/16:0)	25

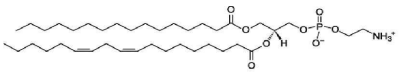
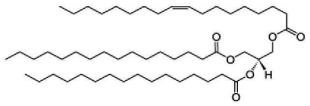
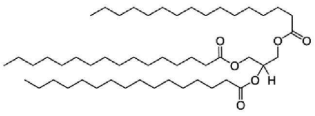
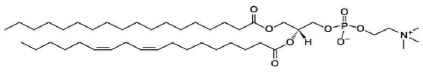
[0147]

[0148] <표 1-2>

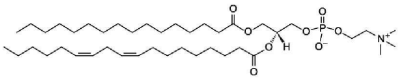
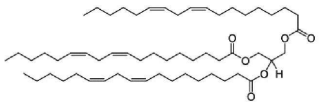
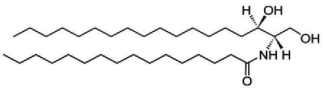
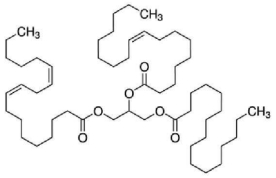
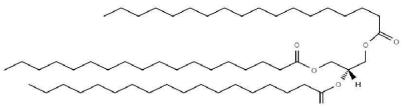
[0149] 지질 1-32의 설명

번호	약어	IUPAC 명칭	구조
1	DG(18:0/18:0/0:0)	(2S)-1-히드록시-3-(옥타데카노일옥시)프로판-2-일 옥타데카노에이트	
2	DG(18:0/16:0/0:0)	(2S)-2-(헥사데카노일옥시)-3-히드록시프로필 옥타데카노에이트	
3	DG(16:0/16:0/0:0)	(2S)-1-(헥사데카노일옥시)-3-히드록시프로판-2-일 헥사데카노에이트	
4	C18 디히드로세라미드 (d18:0/18:0)	N-[(2S,3R)-1,3-디히드록시옥타데칸-2-일]옥타데칸아미드	
6	TG(18:1/18:1/18:1)	1,3-비스[(9Z)-옥타데스-9-에노일옥시]프로판-	

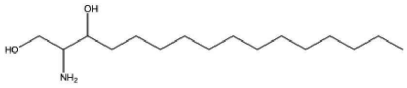
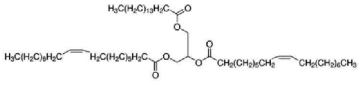
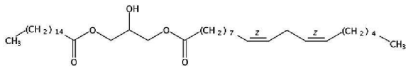
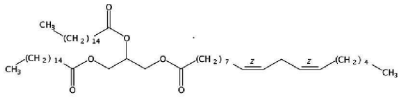
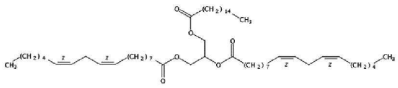
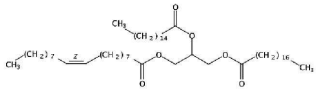
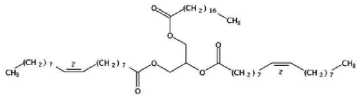
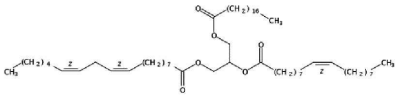
[0150]

		2-일 (9Z)-옥타데스-9-에노에이트	
8	PE(16:0/18:2)	(2-아미노에톡시)[(2R)-3-(헥사데카노일옥시)-2-[(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디에노일옥시]프로폭시]포스핀산	
9	TG(16:0/16:0/18:1)	(2R)-2,3-비스(헥사데카노일옥시)프로필 (9Z)-옥타데스-9-에노에이트	
10	TG(16:0/16:0/16:0)	1,3-비스(헥사데카노일옥시)프로판-2-일 헥사데카노에이트	
11	PC(18:0/18:2)	트리메틸(2-{[(2R)-2-[(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디에노일옥시]-3-(옥타데카노일옥시)프로필 포스포네이토]옥시}에틸)아자늄	

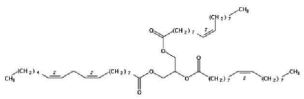
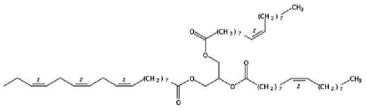
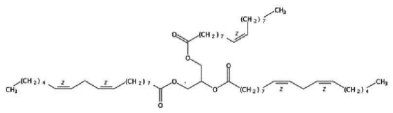
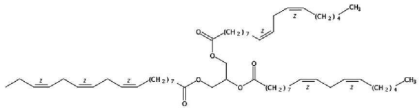
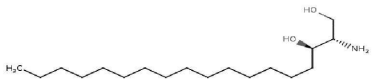
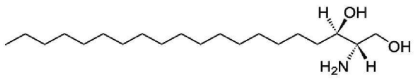
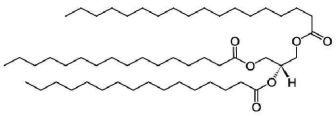
[0151]

12	PC(16:0/18:2)	(2-{[(2R)-3-(헥사데카노일옥시)-2-[(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디에노일옥시]프로필 포스포네이토]옥시}에틸)트리메틸아자늄	
13	TG(18:2/18:2/18:2)	1,3-비스[(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디에노일옥시]프로판-2-일 (9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디에노에이트	
14	C16 디히드로세라미드 (d18:0/16:0)	N-[(2S,3R)-1,3-디히드록시옥타데칸-2-일]헥사데칸아미드	
15	TG(16:0/18:1/18:2)	1-팔미토일-2-올레오일-3-리놀레오일-rac-글리세롤	
16	TG(18:0/18:0/18:0)	1,3-비스(옥타데카노일옥시)프로판-2-일 옥타데카노에이트	

[0152]

17	So(d16:0)	D,L-2-아미노헥사데칸-1,3-디올	
18	TG(16:0/18:1/18:1)	1,2-디(시스-9-옥타데세노일)-3-헥사데카노일-rac-글리세롤	
19	DG(16:0/18:2)	1-팔미토일-3-리놀레오일-sn-글리세롤	
20	TG(16:0/16:0/18:2)	1,2-팔미토일-3-리놀레오일-sn-글리세롤	
21	TG(16:0/18:2/18:2)	1,2-리놀레오일-3-팔미토일-sn-글리세롤	
22	TG(18:0/16:0/18:1)	1-스테아로일-2-팔미토일-3-올레오일-sn-글리세롤	
23	TG(18:0/18:1/18:1)	1,2-올레인-3-스테아린	
24	TG(18:0/18:1/18:2)	1-스테아로일-2-올레오일-3-리놀레오일-sn-글리세롤	

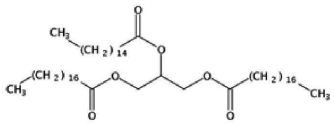
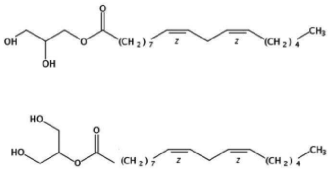
[0153]

25	TG(18:1/18:1/18:2)	1,2-올레오일-3-리놀레오일-sn-글리세롤	
26	TG(18:1/18:1/18:3)	1,2-올레오일-3-리놀레노일-sn-글리세롤	
27	TG(18:1/18:2/18:2)	1,2-리놀레오일-3-올레오일-sn-글리세롤	
28	TG(18:3/18:2/18:2)	1,2-리놀레오일-3-리놀레노일-sn-글리세롤	
29	FA(18:4)	6c,9c,12c,15c-옥타데카테트라엔산	
30	스핑가닌(d18:0)	(2S,3R)-2-아미노옥타데칸-1,3-디올	
31	스핑가닌(d20:0)	(2S,3R)-2-아미노-1,3-에이코산디올	
32	TG(18:0/16:0/16:0)	(2R)-2,3-비스(헥사데카노일옥시)프로필 옥타데카노에이트	

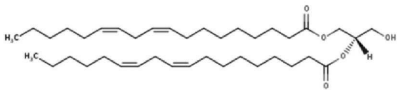
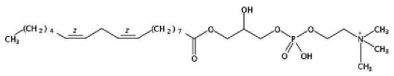
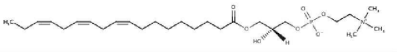
[0154]

[0155] <표 1-2>

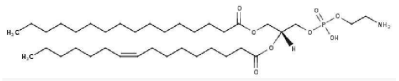
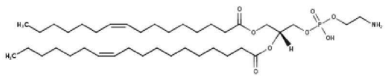
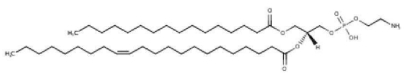
[0156] 지질 33-71의 설명

번호	약어	IUPAC 명칭	구조
33	TG(18:0/16:0/18:0)	1,3-스테아린 -2-팔미틴 1,3-옥타데카노일-2-팔미토일-글리세롤	
34	MG(18:2p)	글리세롤과의 (9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디엔산, 모노에스테르 1,2,3-프로판트리올과의 9,12-옥타데카디엔산 (9Z,12Z)-, 모노에스테르 1,2,3-프로판트리올과의 9,12-	

[0157]

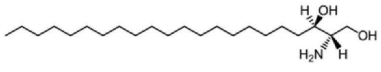
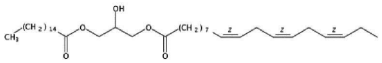
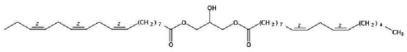
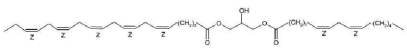
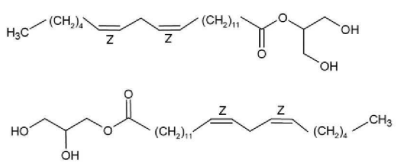
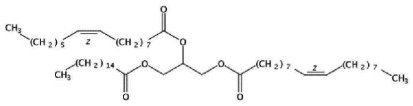
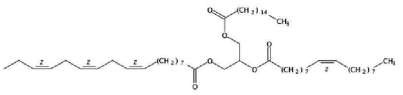
		옥타데카디엔산, (Z,Z)-, 모노에스테르	
35	DG(18:2/18:2)	(2S)-1-히드록시-3-[(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디에노일옥시]프로판-2-일 (9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디에노에이트,	
36	LPC(18:2)	1-리놀레오일-2-히드록시 -sn-글리세로-3-포스파티딜콜린	
37	LPC(18:3)	(2-{[(2R)-2-히드록시-3-[(9Z,12Z,15Z)-옥타데카-9,12,15-트리에노일옥시]프로필 포스포네이토]옥	

[0158]

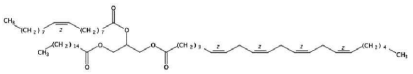
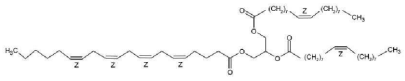
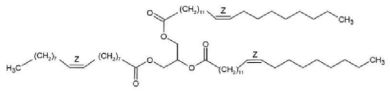
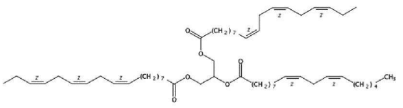
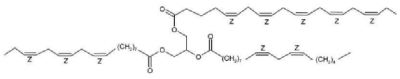
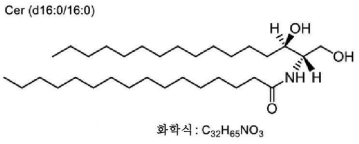
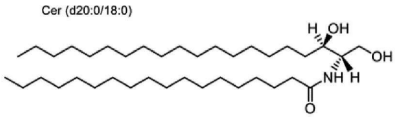
		시}에틸)트리메틸아자늄	
38	PE(16:0/16:1)	(2-아미노에톡시)[(2R)-2-[(9Z)-헥사데크-9-에노일옥시]-3-(헥사데카노일옥시)프로폭시]포스핀산	
39	16:1-18:1PE	(2-아미노에톡시)[(2R)-3-[(9Z)-헥사데크-9-에노일옥시]-2-[(11Z)-옥타데스-11-에노일옥시]프로폭시]포스핀산	
40	16:0-22:1 PE	(2-아미노에톡시)[(2R)-2-[(13Z)-도코스-13-에노일옥시]-3-	

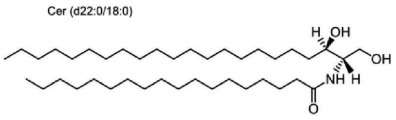
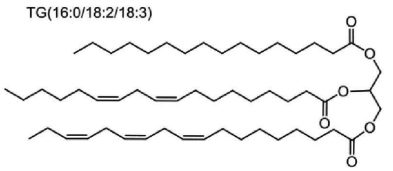
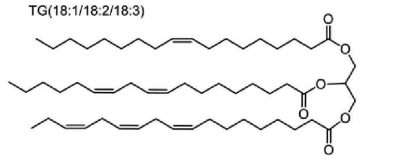
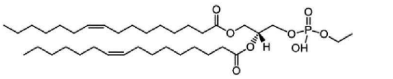
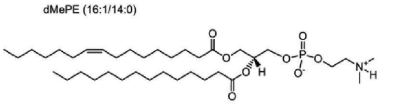
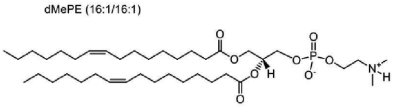
[0159]

[0160]

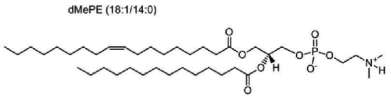
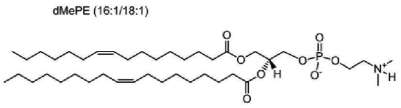
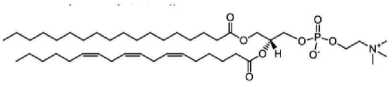
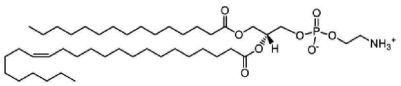
		(헥사데카노일옥시)프로폭시]포스핀산	
41	스핑가닌(d22:0)		
42	MG(22:2)	모노도코사디에노인	
43	DG(16:0/18:3)	1-팔미틴-3-리놀레닌	
44	TG(18:1/18:1/20:4)	1,2-올레인-3-아라키도닌(5Z,8Z,11Z,14Z)	
45	DG(18:3/18:2)	1-리놀레인-3-리놀레닌	
46	DG(20:5/18:2)	1-EPA-3-리놀레인	
47	TG(18:3/18:2/18:3)	1,3-리놀레닌-2-리놀레인	

[0161]

48	TG(18:1/22:1/22:1)	1,2-유신(13Z)-3-올레인	
49	TG(16:0/16:1/18:1)	1-팔미틴-2-팔미톨레인-3-올레인	
50	TG(16:0/18:1/18:3)	1-팔미틴-2-올레인-3-리놀레닌	
51	TG(16:0/18:1/20:4)	1-팔미틴-2-올레인-3-아라키도닌(5Z,8Z,11Z,14Z)	
52	TG(18:3/18:2/20:5)	1-리놀레닌-2-리놀레인-3-EPA	
53	Cer(d16:0/16:0)	C16 디히드로세라미드 (d16:0/16:0)	
54	Cer(d20:0/18:0)	C18 디히드로세라미드 (d20:0/18:0)	

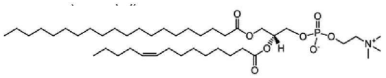
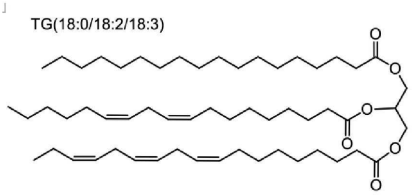
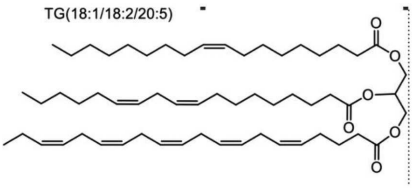
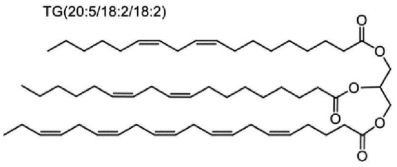
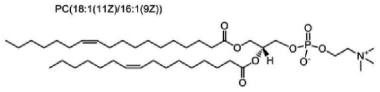
55	Cer(d22:0/18:0)	C18 디히드로세라미드 (d22:0/18:0)	
56	TG(16:0/18:2/18:3)	트리글리세리드(16:0/18:2/18:3)	
57	TG(18:1/18:2/18:3)	트리글리세리드(18:1/18:2/18:3)	
58	PEt(16:1/16:1)	1,2-디팔미톨레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올	
59	dMePE(16:1/14:0)	1-팔미톨레오일-2-미리스토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N,N-디메틸	
60	dMePE(16:1/16:1)	1,2-디팔미톨레오일-sn-글리세로-3-	

[0162]

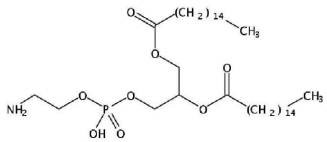
		포스포에탄올아민-N,N-디메틸	
61	dMePE(18:1/14:0)	1-올레오일-2-미리스토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N,N-디메틸	
62	dMePE(16:1/18:1)	1-팔미톨레오일-2-올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N,N-디메틸	
63	PC(18:0/18:3(6Z,9Z,12Z))	1-스테아로일-2-리놀레노일(감마)-sn-글리세로-3-포스포콜린	
64	PE(15:0/24:1(15Z))	1-펜타데카노일-2-너보노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민	

[0163]

[0164]

65	PC(20:0/14:1(9Z))	1-에이코사노일-2-미리스톨레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린	
66	TG(18:0/18:2/18:3)	트리글리세리드(18:0/18:2/18:3)	
67	TG(18:1/18:2/20:5)	트리글리세리드(18:1/18:2/20:5)	
68	TG(20:5/18:2/18:2)	트리글리세리드(20:5/18:2/18:2)	
69	PC(18:1(11Z)-16:1(9Z))	1-바세노일-2-팔미톨레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린	
70	DG(18:3/18:3)	디리놀레닌	CCC=CCC=CCC=CCCCCCCCC(=O)OCC(O)COC(=O)CCCCCCCC=CCC=CCC=CCC

[0165]

71	PE(16:0/16:0)	1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스파티딜에탄올아민	

[0166] **용어의 정의**

[0167] 본원에 사용된 바와 같은 용어는 언급된 치환기와 그의 모체 모이어티 사이의 결합의 결합 수준을 나타내기 위해 그 앞에 및/또는 그 뒤에 단일 대시 "-" (또는 수평선) 또는 이중 대시 "="를 가질 수 있고; 단일 대시 "-" (또는 수평선)는 단일 결합을 지칭하고, 이중 대시는 이중 결합을 지칭하고; 단일 또는 이중 대시의 부재하에, 치환기와 그의 모이어티 사이에 단일 결합이 형성되는 것으로 이해되고; 게다가, 대시가 달리 지시하지 않는 한, 치환기는 "좌측으로부터 우측으로" 해석되어야 하며; 예를 들어, C1-C6 알콕시카르보닐옥시 기 및

-OC(O)OC1-C6 알킬 기는 동일한 관능기를 지칭한다.

[0168] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "알킬"은 직쇄 또는 분지형 포화 탄화수소 쇄를 지칭한다. 본원에 기재된 바와 같이, 알킬 기는 1 내지 20개의 탄소 원자 (즉, C1-20 알킬), 1 내지 8개의 탄소 원자 (즉, C1-8 알킬), 1 내지 6개의 탄소 원자 (즉, C1-6 알킬), 또는 1 내지 4개의 탄소 원자 (즉, C1-4 알킬)를 갖는다. 한 실시양태에서, 알킬 기는 C10-20 알킬 기이다. 한 실시양태에서, 알킬 기는 C15-20 알킬 기이다. 한 실시양태에서, 알킬 기는 C15-18 알킬 기, 즉, C15, C16, C17, C18 알킬 기이다.

[0169] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "알케닐"은 적어도 1개의 탄소-탄소 이중 결합을 함유하고 2 내지 20개의 탄소 원자 (즉, C2-20 알케닐), 2 내지 8개의 탄소 원자 (즉, C2-8 알케닐), 2 내지 6개의 탄소 원자 (즉, C2-6 알케닐) 또는 2 내지 4개의 탄소 원자 (즉, C2-4 알케닐)를 갖는 지방족 기를 지칭한다. 한 실시양태에서, 알케닐 기는 C10-20 알케닐 기이다. 한 실시양태에서, 알케닐 기는 C15-20 알케닐 기이다. 한 실시양태에서, 알케닐 기는 C15-18 알케닐 기, 즉 C15, C16, C17, C18 알케닐 기이다.

[0170] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "헤테로알킬" 및 "헤테로 알케닐"은 1개 이상의 탄소 원자가 동일하거나 상이한 헤테로원자 기에 의해 각각 독립적으로 치환된, 상기 정의된 바와 같은 알킬 및 알케닐을 각각 지칭한다. 예를 들어, 1, 2 또는 3개의 탄소 원자는 동일하거나 상이한 헤테로원자 기에 의해 독립적으로 치환될 수 있다. 헤테로원자 기는 -NR1-, -O-, -S-, -S(O)-, -S(O)2- 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않으며, 여기서 R1은 H, 알킬이다. 헤테로알킬 기의 예는 -OCH3, -CH2OCH3, -SCH3, -CH2SCH3, -NR1CH3 및 -CH2NR1CH3을 포함하고, 여기서 R1은 수소, 알킬이다.

[0171] 본원에 기재된 바와 같은 용어 역 증발법은 핵산의 수용액을 지질의 유기 용매 용액에 첨가하고, 초음파처리하고, 증발시켜 유기 용매를 제거한 다음에, 수화시켜 지질 핵산 혼합물을 수득하는 것을 지칭한다.

[0172] 본원에 기재된 바와 같은 용어 "비등법" ("가열법"으로도 지칭됨)은 지질의 유기 용매 용액을 핵산의 수용액에 첨가하고 약 100℃에서 30분 동안 비등시켜 지질 핵산 혼합물을 수득하는 것을 지칭한다. 상기 방법은 비등에 의한 가열에 제한되지 않으며, 관련 기술분야에 공지된 다른 가열 또는 승온 수단이 또한 사용될 수 있다.

[0173] 역 증발법 및 비등법은 제어된 온도 및 혼합 조건하에 수행된다. 적합한 가공 시간, 및 온도는 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 예를 들어, 역 증발법의 온도는 바람직하게는 약 25℃ 내지 약 70℃, 더 바람직하게는 약 30℃ 내지 약 65℃, 그리고 더 바람직하게는 약 40℃ 내지 약 60℃, 특별히 약 55℃의 범위이다. 비등법의 온도는 바람직하게는 약 25℃ 내지 약 100℃, 더 바람직하게는 약 50℃ 내지 약 100℃, 그리고 더 바람직하게는 약 95℃ 내지 약 100℃, 특별히 바람직하게는 약 80℃ 내지 100℃의 범위이다.

[0174] 본원에 기재된 바와 같은 핵산은 DNA 및 RNA, 바람직하게는 소형 RNA, 예를 들어, 14-32 bp, 16-28 bp, 18-24 bp의 길이, 그리고 특히, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32 bp의 길이를 갖는 소형 RNA를 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0175] 도 1: 12 가지 지질이 핵산 (HJT-sRNA-m7) 흡수 및 세포 (인간 위암 세포주 NCI-N87)로의 진입에 미치는 영향 (역 증발법).

도 2: 27 가지 단일 지질은 MRC-5 세포주로의 핵산 진입을 촉진한다 (역 증발법).

도 3: 23 가지 단일 지질은 MRC-5 세포주로의 핵산 진입을 촉진한다 (비등법).

도 4: 23 가지 단일 지질은 A549 세포주로의 핵산 진입을 촉진한다 (비등법)

도 5: 지질 조합은 MRC-5 세포주로의 핵산 진입을 촉진할 수 있다 (역 증발법).

도 6: 지질 조합은 A549 세포주로의 핵산 진입을 촉진할 수 있다 (역 증발법).

도 7: 지질 조합은 MRC-5 세포주로의 핵산 진입을 촉진할 수 있다 (비등법).

도 8: 지질 조합은 A549 세포주로의 핵산 진입을 촉진할 수 있다 (비등법).

도 9: 상이한 유형의 지질 조합은 Caco-2 세포주로의 핵산 진입을 촉진한다(역 증발법).

도 10: 상이한 유형의 지질 조합은 Caco-2 세포주로의 핵산 진입을 촉진한다 (비등법).

도 11a-c: 단일 지질 (번호 11 및 번호 12)은 상이한 세포로의 상이한 서열을 갖는 핵산의 진입을 촉진한다.

도 12: 형광 계내 하이브리드화 실험은 핵산이 단일 지질의 도움으로 세포질 로 진입하는 것을 나타낸다.

도 13: 단일 지질 (번호 11 및 번호 12)은 유전자 3'UTR 영역을 표적으로 하여, 세포로의 핵산 진입을 촉진한다.

도 14: 단일 지질 (번호 11 및 번호 12)은 소화관에 의한 혈액과 폐로의 핵산 진입을 촉진한다.

도 15: 역 증발법 및 비등법에 의해 제조된 지질 조합물은 소화관에 의한 혈액과 폐로의 핵산 진입을 용이하게 한다.

도 16: 상이한 유형의 지질 조합은 단일 가닥 핵산을 MRC-5 내로 전달한다.

도 17a-b: 지질 조합은 단일 가닥 핵산을 MRC-5 또는 Caco-2 세포내로 전달한다.

도 18: 지질 조합은 단일 가닥 핵산을 세포내로 전달한다.

도 19: 지질 조합은 단일 가닥 핵산을 세포내로 전달한다.

도 20: 지질 조합은 단일 가닥 핵산을 세포내로 전달한다.

도 21: 지질 조합은 단일 가닥 핵산을 A549 세포내로 전달한다.

도 22: 지질 조합은 단일 가닥 핵산을 A549 세포내로 전달한다.

도 23: 지질 조합은 단일 가닥 핵산을 A549 세포내로 전달한다.

도 24: 지질 조합은 단일 가닥 핵산을 A549 세포내로 전달한다.

도 25: 지질 조합은 단일 가닥 핵산을 A549 세포내로 전달한다.

도 26: 지질 조합은 단일 가닥 핵산을 A549 세포내로 전달한다.

도 27: 지질 조합은 단일 가닥 핵산을 A549 세포내로 전달한다.

도 28: 지질 조합은 단일 가닥 핵산을 A549 세포내로 전달한다.

도 29: 지질 조합은 단일 가닥 핵산을 A549 세포내로 전달한다.

도 30: 지질 조합은 단일 가닥 핵산을 A549 세포내로 전달한다.

도 31: 지질 조합은 단일 가닥 핵산을 A549 세포내로 전달한다.

도 32: 지질 조합은 단일 가닥 핵산을 A549 세포내로 전달한다.

도 33: 지질 조합은 이중 가닥 핵산을 MRC-5 세포내로 전달한다.

도 34: 지질 조합은 이중 가닥 핵산을 MRC-5 세포내로 전달한다.

도 35: 지질 조합은 이중 가닥 핵산을 A549 세포내로 전달한다.

도 36: 지질 조합은 이중 가닥 핵산을 A549 세포내로 전달한다.

도 37: 지질 조합은 이중 가닥 핵산을 A549 세포내로 전달한다.

도 38: 지질 조합은 이중 가닥 핵산을 A549 세포내로 전달한다.

도 39: 지질 조합은 이중 가닥 핵산을 A549 세포내로 전달한다.

도 40: 지질 조합은 이중 가닥 핵산을 A549 세포내로 전달한다.

도 41: 지질 조합은 이중 가닥 핵산을 A549 세포내로 전달한다.

도 42: 지질 조합은 이중 가닥 핵산을 A549 세포내로 전달한다.

도 43: 지질 조합은 이중 가닥 핵산을 MRC-5 세포내로 전달한다.

도 44: 지질 조합은 이중 가닥 핵산을 MRC-5 세포내로 전달한다.

도 45: 지질 조합은 이중 가닥 핵산을 MRC-5 세포내로 전달한다.

도 46: 지질 조합은 이중 가닥 핵산을 MRC-5 세포내로 전달한다.

도 47: 지질 조합은 이중 가닥 핵산을 MRC-5 세포내로 전달한다.

도 48: 지질 조합은 이중 가닥 핵산을 MRC-5 세포내로 전달한다.

도 49: 지질 조합은 이중 가닥 핵산을 MRC-5 세포내로 전달한다.

도 50: 지질 조합은 소화관을 통한 폐로의 핵산 진입을 촉진한다.

도 51: 번호 8(PE):번호 12(PC) (v:v=1:2)는 MRC-5 세포로의 항섬유성 HJT-sRNA-m7 진입을 매개한다.

도 52: 번호 8(PE):번호 12(PC) (v:v=1:2)는 A549 세포로의 siRNA 진입을 매개한다.

도 53: 번호 8(PE):번호 12(PC) (v:v=1:2)는 A549 세포로의 siRNA 진입을 매개한다.

도 54: 번호 8(PE):번호 12(PC) (v:v=1:2)는 THP-1 세포로의 siRNA 진입을 매개한다

도 55: 번호 8(PE):번호 12(PC):번호 2(DG) (v:v:v=2:4:3)는 MRC-5 세포로의 항섬유성 HJT-sRNA-m7 진입을 매개한다.

도 56: 번호 8(PE):번호 12(PC):번호 2(DG) (v:v:v=2:4:3) 지질 혼합물은 A549 세포로의 XRN2 siRNA 진입을 매개하여 유전자 발현을 억제한다.

도 57: 번호 8(PE):번호 12(PC):번호 4(Cer) (v:v:v=1:2:1) 지질 혼합물은 MRC-5 세포로의 항섬유성 HJT-sRNA-m7 진입을 매개한다 (비등법).

도 58: 번호 8(PE):번호 12(PC):번호 4(Cer) (v:v:v=1:2:1) 지질 혼합물은THP-1 세포로의 NFκB siRNA 진입을 매개하여 유전자 발현을 억제한다 (비등법).

도 59: 번호 8(PE):번호 12(PC):번호 PC(11) (v:v:v=1:2:1) 지질 혼합물은 A549 세포로의 XRN2 siRNA 진입을 매개하여 유전자 발현을 억제한다.

도 60: 번호 8(PE):번호 12(PC):번호 LPC(37) (v:v:v=1:2:1) 지질 혼합물은 A549 세포로의 XRN2 siRNA 진입을 매개하여 유전자 발현을 억제한다.

도 61: 번호 8(PE):번호 12(PC):번호 MG(34) (v:v:v=2:3:1) 지질 혼합물은 A549 세포로의 CPSF4 siRNA 진입을 매개하여 유전자 발현을 억제한다.

도 62: 번호 38(PE):번호 37(LPC):번호 32(TG) (v:v:v=32:8:5) 지질 혼합물은 MRC-5 세포로의 항섬유성 HJT-sRNA-m7 진입을 매개한다 (비등법).

도 63: 번호 38(PE):번호 37(LPC):번호 32(TG) (v:v:v=32:8:5) 지질 혼합물은 A549 세포로의 XRN2 siRNA 진입을 매개하여 유전자 발현을 억제한다.

도 64: 번호 1(DG):번호 8(PE):번호 12(PC):번호 4(Cer):번호 31(So):번호 29(FA):번호 16(TG) (v:v:v:v:v:v:v=2:1:2:2:3:1:3)은 MRC-5 세포로의 항섬유성 HJT-sRNA-m7 진입을 매개한다 (비등법).

도 65: 번호 1(DG):번호 8(PE):번호 12(PC):번호 4(Cer):번호 31(So):번호 29(FA):번호 16(TG) (v:v:v:v:v:v:v=2:1:2:2:3:1:3) 지질 혼합물은 A549 세포로의 XRN2 siRNA 진입을 매개하여 유전자 발현을 억제한다 (비등법).

도 66: 번호 8(PE):번호 12(PC):번호 31(So):번호 29(FA):번호 4(Cer) (v:v:v:v:v=2:4:2:2:2:5)는 MRC-5 세포로의 항섬유성 HJT 소형 RNA HJT-sRNA-3, HJT-sRNA-a2, HJT-sRNA-h3, HJT-sRNA-m7 진입을 매개한다 (비등법).

도 67: 번호 8(PE):번호 12(PC):번호 31(So):번호 29(FA):번호 4(Cer) (v:v:v:v:v=2:4:2:2:5) 지질 혼합물은 핵산을 세포내로 효과적으로 전달할 수 있다.

도 68: 번호 38(PE):번호 37(LPC) (v:v=4:1)은 MRC-5 세포로의 항섬유성 HJT 소형 RNA HJT-sRNA-3, HJT-sRNA-a2, HJT-sRNA-h3, HJT-sRNA-m7 진입을 매개한다 (비등법).

도 69: 번호 38(PE):번호 37(LPC) (v:v=4:1) 지질 혼합물은 A549 세포로의 XRN2 siRNA 진입을 매개하여 유전자

발현을 억제한다 (비등법).

도 70: 번호 38(PE):번호 12(PC):번호 2(DG) (v:v:v=4:1:3) 지질 혼합물은 A549 세포로의 XRN2 siRNA 진입을 매개하여 유전자 발현을 억제한다.

도 71: 번호 38(PE):번호 37(LPC):번호 12(PC) (v:v:v=4:1:1) 지질 혼합물은 A549 세포로의 XRN2 siRNA 진입을 매개하여 유전자 발현을 억제한다 (역 증발법).

도 72: 번호 4(Cer):번호 12(PC):번호 38(PE):번호 37(LPC) (v:v:v:v=5:2:8:3) 지질 혼합물은 MRC-5 세포로의 항섬유성 소형 RNA HJT-sRNA-3, HJT-sRNA-a2, HJT-sRNA-h3, 및 HJT-sRNA-m7 진입을 매개한다 (비등법).

도 73: 번호 4(Cer):번호 12(PC):번호 38(PE):번호 37(LPC) (v:v:v:v=5:2:8:3) 지질 혼합물은 A549 세포로의 XRN2 siRNA 진입을 매개하여 유전자 발현을 억제한다 (비등법).

도 74: 번호 38(PE):번호 2(DG):번호 31(So) (v:v:v=4:2:3) 지질 혼합물은 MRC-5 세포로의 항섬유성 소형 RNA HJT-sRNA-3, HJT-sRNA-a2, HJT-sRNA-h3, HJT-sRNA-m7 진입을 매개한다 (비등법).

도 75: 번호 38(PE):번호 2(DG):번호 31(So) (v:v:v=4:2:3) 지질 혼합물은 A549 세포로의 XRN2 siRNA 진입을 매개하여 유전자 발현을 억제한다 (비등법).

도 76: 지질 번호 41은 상이한 제조 방법 (비등법 또는 역 증발법)에 의해 이중 가닥 RNA를 A549 세포내로 전달한다.

도 77: 지질 번호 41은 상이한 제조 방법 (비등법 또는 역 증발법)에 의해 이중 가닥 RNA를 MRC-5 세포내로 전달한다.

도 78: 비등법에 의한 지질 번호 41은 단일 가닥 RNA를 A549 및 MRC-5 세포내로 전달한다.

도 79: 디지털 PCR (ddPCR) 기술은 지질에 의한 핵산 전달 효율을 결정한다.

도 80: 유세포 분석 기술은 지질에 의한 핵산 전달 효율을 결정한다.

도 81: 공초점 형광 현미경검사는 세포에서 지질에 의해 전달된 핵산의 국소화를 관찰한다.

도 82: 웨스턴 블로팅(Western Blotting) 검정은 지질에 의한 핵산 전달 효율을 결정하였다.

도 83: 단일 지질 번호 41은 MRC-5 세포로의 항섬유성 HJT-sRNA-m7 진입을 매개한다 (비등법).

도 84: 핵산 전달에서 지질 조합 1 (번호 8+번호 41=6:1) 및 지질 조합 2 (번호 38+번호 41=6:1)의 효과.

도 85: 핵산 전달에서 지질 조합 3 (번호 39+번호 41=6:1) 및 지질 조합 4 (번호 40+번호 41=6:1)의 효과.

도 86: 핵산 전달에서 지질 조합 5 (38+12+41+29=1:2:1:1)의 효과.

도 87: 핵산 전달에서 지질 조합 6 (40(PE)+12(PC)+41(So)=2:4:3)의 효과.

도 88: 핵산 전달에서 지질 조합 7 (12(PC)+41(So)=1:6) 및 지질 조합 8 (12(PC)+41(So)=1:1)의 효과.

도 89: 핵산 전달에서 지질 조합 9 (12(PC)+41(So)=6:1) 및 지질 조합 10 (40(PE)+12(PC)+41(So)=2:2:2)의 효과.

도 90: 핵산 전달에서 지질 조합 11 (4(Cer)+12(PC)+41(So)=1:1:1)의 효과.

도 91: 비등법에 의한 지질 38은 이중 가닥 RNA를 A549 및 MRC-5 세포내로 전달한다.

도 92: 비등법에 의한 지질 38은 단일 가닥 RNA를 A549 세포 및 MRC-5 세포내로 전달한다.

도 93: 디지털 PCR (ddPCR) 기술은 지질에 의한 핵산 전달 효율을 결정하였다.

도 94: 유세포 분석 기술은 지질에 의한 핵산 전달 효율을 결정하였다.

도 95: 공초점 형광 현미경검사는 세포에서 지질에 의해 전달된 핵산의 국소화를 관찰한다.

도 96: 지질 64는 상이한 제조 방법 (비등법 또는 역 증발법)에 의해 이중 가닥 RNA를 A549 세포내로 전달한다.

도 97: 유세포 분석 기술에 의해 결정된 바와 같은 지질에 의한 핵산 전달 효율.

도 98: 공초점 형광 현미경검사에 의해 관찰된 바와 같은 세포에서 지질에 의해 전달된 핵산의 국소화.

도 99: 디지털 PCR (ddPCR)에 의해 결정된 바와 같은 지질에 의한 핵산 전달 효율.

도 100: 공초점 형광 현미경검사에 의해 관찰된 바와 같은 세포에서 지질에 의해 전달된 핵산의 국소화.

도 101: 웨스턴 블로팅 검정에 의해 결정된 바와 같은 지질에 의한 핵산 전달 효율.

도 102: 단일 포스파티딜에탄올아민 지질 40은 MRC-5 세포로의 항섬유성 이중 가닥 RNA HJT-sRNA-m7 진입을 매개하여 피브로넥틴 단백질 발현 수준을 하향 조절한다.

도 103: 비등법에 의해 제조된 지질 38은 단일 가닥 RNA를 A549 및 MRC-5 세포내로 전달한다.

도 104: 상이한 방법 (비등법 또는 역 증발법)에 의해 제조된 지질 39는 이중 가닥 RNA를 A549 세포내로 전달한다.

도 105: 디지털 PCR (ddPCR)에 의해 결정된 지질에 의한 핵산 전달 효율.

도 106: 상이한 방법 (비등법 또는 역 증발법)에 의해 제조된 지질 60은 이중 가닥 RNA를 A549 세포내로 전달한다.

도 107: 상이한 방법 (비등법 또는 역 증발법)에 의해 제조된 지질 62는 이중 가닥 RNA를 A549 세포내로 전달한다.

도 108: 지질 번호 41은 혈액으로의 소형 RNA 진입을 촉진하여 그것이 혈액에서 분해되지 않도록 보호한다.

도 109: 지질 번호 41은 위 세포로의 소형 RNA 진입을 촉진하여 그것이 위에서 분해되지 않도록 보호한다.

도 110: 지질 번호 41은 소장 세포로의 소형 RNA 진입을 촉진하여 그것이 소장 분해되지 않도록 보호한다.

도 111: 지질 번호 41은 간으로의 소형 RNA 진입을 촉진하여 그것이 간에서 분해되지 않도록 보호한다.

도 112: 단일 PE (번호 38)는 경구 투여에 의해 단일 가닥 sRNA 핵산을 마우스 혈액내로 효과적으로 전달한다.

도 113: 단일 PE (번호 40)는 경구 투여에 의해 단일 가닥 sRNA 핵산을 마우스 혈액내로 효과적으로 전달한다.

도 114: 단일 PE (번호 64)는 경구 투여에 의해 단일 가닥 sRNA 핵산을 마우스 혈액내로 효과적으로 전달한다.

도 115: 단일 PE (번호 71)는 경구 투여에 의해 단일 가닥 sRNA 핵산을 마우스 혈액내로 효과적으로 전달한다.

도 116: 지질은 상이한 온도 구배에서 단일 가닥 핵산을 MRC-5 세포내로 효과적으로 전달한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0176] 다음은 본 출원의 추가 설명이나, 본 발명을 어떤 식으로든 제한하려는 것은 아니며, 본 출원의 교시에 기초하여 이루어진 임의의 변화는 본 출원의 보호 범위 내에 있다.

[0177] 본 출원에서, 액체-가용성 성분은 블라이 앤드 다이어(Bligh & Dyer) 방법에 의해 전통 중국 의약 (로디올라 크레눌라타, 타락사쿰 몽골리쿰, 안드로그라피스 파니쿨라타 및 로니세라 자포니카 포함)으로부터 추출되었고, 지질 성분은 HPLC-MS/MS에 의해 확인되었다 (총 138개의 지질 성분이, 양성 모드로 125개, 음성 모드로 13개로 확인되었다). 이들 중 71개 (표 1-1 내지 표 1-3 참조)를 지질 핵산 혼합물의 제조에 사용하였고, 이들이 외인성 핵산의 세포 흡수 및 진입을 촉진할 수 있는지의 여부를 관찰하였다. 본 출원에 사용된 지질은 상업적으로 구매하거나 상업적으로 합성되었으며, 전통 중국 의약으로부터 직접 추출되지 않았다는 점에 주목하여야 한다. 본 발명자는 놀랍게도 다양한 지질이 핵산의 세포 흡수 및 진입을 효과적으로 촉진하는 지질 핵산 혼합물을 형성할 수 있어 (도 1-116 참조), 임상 환경에서 핵산 약물 전달의 효율을 증가시킬 가능성을 갖는다는 것을 밝혀냈다. 추가 연구에 따르면, 본 출원의 지질 핵산 혼합물은 상이한 세포주에서 핵산 흡수 및 진입의 효율을 촉진하나, 상이한 세포주에서 차이가 관찰된 것으로 나타났으며 (도 1-10 참조), 이는 표적화 약물 전달의 가능성을 열어 준다. 게다가, 이러한 지질 핵산 혼합물에 의한 핵산 전달은 서열 특이적이지 않으며, 이는 소형 RNA의 것에 상응하는 크기 (예를 들어, 약 20 bp) 및 상이한 서열을 갖는 핵산 단편을 전달할 수 있다 (도 11 참조). 게다가, 형광 계내 하이브리드화 (FISH)는 달임으로부터 유래된 지질에 의해 형성된 지질 핵산 혼합물이 세포질로의 외인성 핵산의 진입을 효과적으로 촉진할 수 있음을 확인해 주었다 (도 12 참조). 본 발명자는 예기치 않게 비등법 또는 역 증발법에 의해 제조된 지질 핵산 혼합물이 비침습적 경로를 통해 (예를 들어 소화

관, 기도 및 국소 투여를 통해) 혈액 순환 및 표적 조직으로 sRNA와 같은 핵산의 진입을 용이하게 할 수 있음을 밝혀냈다. (도 14-15 참조). 본 발명자는 또한 놀랍게도 본 출원의 지질이 세포로의 sRNA와 같은 핵산의 진입을 촉진할 수 있고 그의 표적 서열의 발현을 조정할 수 (예를 들어, 억제할 수) 있으며, 한편 비-표적 서열에 대한 이러한 조절 효과를 나타내지 않을 수 있음을 밝혀냈으며, 이는 핵산 약물의 전달 수단으로서 사용될 수 있는 표적-특이적 조절을 시사한다 (도 13 참조).

[0178] 상기 예기치 않은 발견에 기초하여, 본 발명자는 본 출원에 도달하였다.

[0179] 한 측면에서, 본 출원은 핵산 전달을 용이하게 하기 위한 전통 중국 의약으로부터 추출된 화합물을 제공하며, 여기서 상기 화합물은 리소레시틴, 세라미드, 디글리세리드, 포스파티딜에탄올아민, 포스파티딜콜린, 트리글리세리드, 모노갈락토실 디글리세리드, 스핑고신, 포스파티딜 에탄올, 모노아실글리세롤, 지방산, 혈소판 활성화 인자, 또는 디메틸 포스파티딜 에탄올아민으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 바람직하게는 표 1에 나타낸 지질로부터 선택된다. 한 실시양태에서, 지질은 비천연, 예를 들어 합성이거나, 발효로부터 제조된다.

[0180] 한 실시양태에서, 지질은 핵산을 표적 세포내로 전달하는데 사용된다. 또 다른 실시양태에서, 지질은 핵산을 이를 필요로 하는 대상체 및 그의 혈액 순환 및/또는 표적 부위/세포내로 전달하는데 사용된다.

[0181] 바람직한 실시양태에서, 지질은 포스파티딜콜린, 예를 들어, 1-스테아로일-2-올레오일-sn-글리세롤-3-포스포콜린 (PC(18:0/18:2), 즉, 표 1 중 지질 번호 11), 및 1-팔미토일-2-올레오일-sn-글리세롤-3-포스포콜린 (PC(16:0/18:2), 즉, 표 1 중 지질 번호 12)으로부터 선택된다. 이들 두 포스포콜린 (PC)은 핵산을 효율적으로 캡슐화하거나 세포로의 핵산의 진입을 촉진할 수 있다. 한 실시양태에서, 지질은 표 1중 지질 번호 41, 즉 스핑가닌(d22:0)일 수 있으며, 이는 핵산을 효율적으로 캡슐화하거나 세포로의 핵산의 진입을 촉진할 수 있다.

[0182] 또 다른 측면에서, 본 출원은 상기 지질 및 핵산을 포함하는 제약 조성물을 제공한다. 바람직하게는 핵산은 소형 RNA이다.

[0183] 한 실시양태에서, 본 출원의 제약 조성물은 비침습적 경로 (예를 들어, 국소 투여) 및/또는 주사를 통한 투여, 예를 들어, 소화관, 기도, 및/또는 주사를 통한 투여, 예를 들어, 경구 투여, 흡입 및/또는 주사를 위해 제조될 수 있다. 일부 경우에, 침습적 경로가 바람직하고 (예를 들어, 근육내, 피하, 정맥내, 동맥내, 복강내, 및 표적 조직으로의 주사를 포함한 주사); 다른 경우에, 비침습적 경로가 바람직하다.

[0184] 또 다른 실시양태에서, 본 출원의 제약 조성물에서, 지질 및 핵산의 적어도 일부 또는 전부는 지질 핵산 혼합물의 형태로 제조될 수 있다. 지질 핵산 혼합물의 제조를 위한 다양한 방법이 널리 개시되어 있으며, 지질 핵산 혼합물의 제조를 위한 적합한 방법은 실제 필요에 따라 선택될 수 있다.

[0185] 제3 측면에서, 본 출원은 본원에 기재된 지질 및 핵산을 포함하는 키트를 제공하며, 여기서 지질 및 핵산은 각각 독립적으로 제1 용기 및 제2 용기에 제공된다. 제1 용기 및 제2 용기는 동일하거나 상이할 수 있다. 일부 실시양태에서, 지질 및 핵산의 적어도 일부 또는 전부는 사용 직전에 지질 핵산 혼합물로 제조된다.

[0186] 제4 측면에서, 본 출원은 핵산을 표적 조직/세포로 전달하는 방법을 제공하며, 여기서 핵산은 본원에 기재된 바와 같은 제약 조성물 또는 키트의 형태로 제공된다.

[0187] 제5 측면에서, 본 출원은 핵산을 핵산의 전달을 필요로 하는 대상체의 생체내에 전달하는 방법을 제공하며, 여기서 핵산은 본원에 기재된 바와 같은 제약 조성물 또는 키트의 형태로, 예를 들어, 핵산을 대상체의 생체내의 혈액 순환 또는 표적 조직/세포로 전달하여 제공되며, 예를 들어, 여기서 지질 및 핵산은 비침습적 경로 (예를 들어, 국소 투여) 및/또는 주사에 의해, 예를 들어, 소화관, 기도 및/또는 주사에 의해, 예를 들어, 경구 투여, 흡입 및/또는 주사에 의해 투여된다.

[0188] 제6 측면에서, 본 출원은 핵산으로 예방 및/또는 치료될 수 있는 질환/장애를 예방 및/또는 치료하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 본원에 기재된 제약 조성물 또는 키트를 상기 질환/장애의 치료를 필요로 하는 대상체에게 제공하는 것을 포함하고, 예를 들어, 여기서 지질 및 핵산은 비침습적 경로 (예를 들어, 국소 투여) 및/또는 주사에 의해, 예를 들어, 소화관, 기도 및/또는 주사에 의해, 예를 들어, 경구 투여, 흡입 및/또는 주사에 의해 투여된다. 놀랍게도, 투여의 비침습적 경로 (예를 들어, 경구 투여, 위관영양, 흡입 등을 포함한, 소화관, 기도에 의해)는 핵산의 진입 및 효능을 상당히 촉진할 수 있다.

[0189] 제7 측면에서, 본 출원은 제약 조성물 또는 키트의 제조 방법, 및 상기 측면에 기재된 방법에서 제약 조성물 및/또는 키트의 용도를 제공한다. 게다가, 상기 기재된 다양한 방법에 사용하기 위한 지질, 제약 조성물 및/또는

키트가 또한 제공된다.

[0190] 본 출원의 다양한 실시양태에서, 핵산은 소형 RNA일 수 있고, 예를 들어, 소형 RNA는 14-32 bp, 16-28 bp, 18-24 bp의 길이, 특히, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32 bp의 길이를 가질 수 있다. 게다가, 소형 RNA는 단일 가닥, 예를 들어, 스템-루프 구조를 갖는 단일 가닥이거나, 이중 가닥일 수 있다. 예를 들어, 핵산은 하기 서열을 갖는 HJT-sRNA-m7일 수 있다: ugagguagua gguugugugg uuguaagc.

[0191] 한 실시양태에서, 본 출원의 제약 조성물 또는 키트 또는 화합물은 질환, 예컨대 암, 예를 들어, 위암, 폐암 등을 치료하는데 사용될 수 있다.

[0192] 한 실시양태에서, 본 출원의 제약 조성물 또는 키트 또는 화합물은, 예를 들어, NCI-N87 세포 (위암 세포), MRC-5 세포 (폐 섬유모세포) 및 A549 세포 (폐암 세포)의 성장을 억제하기 위해, 시험관내 또는 생체내 치료를 위해 사용될 수 있다,

[0193] 본 출원의 다양한 실시양태에서, 지질 핵산 혼합물은 여러 가지의 방법, 예를 들어, 역 증발법 또는 비등법에 의해 수득될 수 있다. 역 증발법에서, 핵산의 수용액을 지질의 유기 용매 용액에 첨가하고, 초음파처리하고, 증발시켜 유기 용매를 제거한 다음에, 수화시켜 지질 핵산 혼합물을 수득한다. 본 출원에서의 비등법은 지질의 유기 용매 용액을 핵산의 수용액에 첨가하고 약 100℃에서 30분 동안 비등시켜 지질 핵산 혼합물을 수득하는 것을 지칭한다. 역 증발법 및 비등법은 제어된 온도 및 혼합 조건하에 수행된다. 적합한 가공 시간 및 온도는 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 예를 들어, 역 증발법의 온도는 바람직하게는 약 25℃ 내지 약 70℃, 더 바람직하게는 약 30℃ 내지 약 65℃, 더 바람직하게는 약 40℃ 내지 약 60℃, 특별히 바람직하게는 약 55℃의 범위일 수 있다. 비등법 (가열법으로도 지칭됨)의 온도는 바람직하게는 약 25℃ 내지 약 100℃, 더 바람직하게는 약 50℃ 내지 약 100℃, 더 바람직하게는 약 95℃ 내지 약 100℃, 특별히 바람직하게는 약 100℃의 범위일 수 있다.

[0194] **실시예**

[0195] 하기 실시예는 본원에 개시된 본 발명의 단지 실례가 되는 것이며, 첨부된 청구범위의 범위를 제한하는 것으로 해석되지 않아야 한다.

[0196] <표 2>

[0197] 실시예에서 사용된 소형 RNA 및 그의 서열

번호	siRNA	서열	길이
1	sly-miR168b-5p	TCGCTTGGTGCAGGTCGGGAC	21
2	Pab-miR3711	GGCCCTCCTTCTAGCGCCA	19
3	CXL-sRNA-17	CAGAGTCGCGCAGCGGAA	18
4	PGY-sRNA-6	GTTCAGAGTTCTACAGTCCGA	21
5	PGY-sRNA-18	CGGGGCTACGCCTGTCTGAGCGTCGC	26
6	HJT-sRNA-m7	TGAGGTAGTAGGTTGTGTGGTTGTAAGC	28
7	HJT-sRNA-3	CAGCCAAGGATGACTTGCCGG	21
8	HJT-sRNA-a2	TAGCACCATCCGAAATCGGTA	21
9	HJT-sRNA-h3	TGGGGCTACGCCTGTCTGAGCGTCGCT	27
10	si-XRN2	GAGUACAGAUGAUCAUGUUGAGTACAGATGATCATGTT	19
11	si-Ssu72	GACUCACGUGAAGCUUCCAGACTCACGTGAAGCTTCCA	19
12	si-CPSF4	GAGUCAUCUGUGUGAAUUAGAGTCATCTGTGTGAATTA	19
13	si-LAMP1	CAAUGCGAGCUCCAAAGAA	19
14	si-LAMP2	GCGGUCUUAUGCAUUGGAA	19
15	si-NFκB	AGUACCCUGAAGCUAUAUUUU	21
16	si-TNFα	CACAACCAACUAGUGGUGCUU	21
17	PGY-sRNA-23	CCCTCCGCGGCCAGCTTCT	19
18	PGY-sRNA-26	TCCGGAATGATTGGGCGTAAAGCGT	25
19	PGY-sRNA-32	CCGGCCCCGAACCCGTCGGC	20

[0198]

[0199] 주: 이중 가닥 sRNA는 "si-" 접두사로 표시된다.

[0200] **번호 1-32로서 표 1에 나타낸 지질의 실시예**

[0201] **1. 전통 중국 의약으로부터의 지질의 추출**

[0202] **1.1 전통 중국 의약의 달임**

[0203] 1) 100 g 중국 의약 탕제 조각 (로디올라 크레눌라타, 닝보 하이수 킨카오 바이오테크놀로지 캄파니, 리미티드(Ningbo Haishu Qiancao Biotechnology Co., Ltd.)로부터 구매; 타락사쿰 몽골리쿰, 로니세라 자포니카, 안드로그라피스 파니쿨라타, 북경 동인당 약방(Beijing Tongrentang pharmacy)으로부터 구매)을 1000 mL ddH_2O에 첨가하고 30분 동안 침지시켰다.

[0204] 2) 중국 의약 달임 포트를 강하게 가열하면서 15분 동안 그리고 서서히 가열하면서 20분 동안 끓였다.

[0205] 3) 400 mL의 가열된 중국 의약 약액을 60℃, 60 rpm, 30분으로, 회전 증발기에 첨가하고, 100 mL로 농축시켰다.

[0206] **1.2 지질 추출**

[0207] 1) 클로로포름-메탄올 혼합물 (클로로포름: 메탄올=1:2, v/v) 600 ml를 상기 단계 1.1로부터 수득된 중국 의약 약액 (회전 증발기에 의해 농축됨)에 첨가하여, 클로로포름:메탄올:물=1:2:0.8이 되도록 하고, 10-15분 동안 교반 혼합하였다.

[0208] 2) 200 mL 클로로포름을 삼각 플라스크에 첨가하고, 10분 동안 교반 혼합하였다.

[0209] 3) 200 ml ddH_2O를 삼각 플라스크에 첨가하여, 클로로포름:메탄올:물=2:2:1.8이 되도록 하고, 10분 동안 교반 혼합하였다.

[0210] 4) 상부층의 액체 및 중간층으로부터의 불용성 물질을 제거하고, 하부의 클로로포름 층을 수득하였다. -40℃에

서 보관.

[0211] **1.3 지질 성분의 HPLC-MS/MS 확인**

[0212] 기기 조건

[0213] 1) 크로마토그래피 조건:

[0214] 기기: 얼티메이트(Ultimate) 3000; 칼럼: 키네텍스(Kinetex) C18 (100 × 2.1 mm, 1.9 μm); 칼럼 온도: 45℃; 이동상 A: 아세토니트릴: 물 (V/V, 60:40), 10 mmol/L 포름산암모늄을 함유하는 용액, 이동상 B: 아세토니트릴: 이소프로판올 (10:90, V/V), 10 mmol/L 포름산암모늄 및 0.1% 포름산을 함유하는 용액. 유량: 0.4 mL/분; 주사량: 4 μl.

[0215] 2) 질량 분석 파라미터:

[0216] a) 양성 모드: 히터 온도 300℃, 쉬스(Sheath) 기체 유량, 45 arb, Aux 기체 유량, 15 arb, 스위프(Sweep) 기체 유량, 1 arb, 분무 전압, 3.0 KV, 모세관 온도, 350℃, S-렌즈(Lens) RF 수준, 30%. 스캔 범위: 200-1500.

[0217] b) 음성 모드: 히터 온도 300℃, 쉬스 기체 유량, 45 arb, Aux 기체 유량, 15 arb, 스위프 기체 유량, 1 arb, 분무 전압, 2.5 KV, 모세관 온도, 350℃, S-렌즈 RF 수준, 60%. 스캔 범위: 200-1500.

[0218] **1.4 중국 의약으로부터 유래된 지질의 확인**

[0219] 지질 성분은 HPLC-MS/MS에 의해 확인되었고, 전통 중국 의약으로부터 유래된 총 138개의 지질 성분이 확인되었고, 이 중 125개는 양성 모드로, 그리고 13개는 음성 모드로 확인되었다. 표 1에 나타낸 바와 같은 화합물 번호 1-32에 대해 하기 실험을 수행하였다.

[0220] 하기 시험된 지질은 모두 표 1-1에 기재된 바와 같이 상업적으로 구매하거나 상업적으로 합성하여, 사용하였다는 점에 주목하여야 한다.

[0221] **2. 지질 핵산 혼합물의 제조**

[0222] **2.1 역 증발법:**

[0223] 디에틸 에테르 용액 중의 600 μl 지질을 제조하고, 표 1에 나타낸 지질 번호에 따라 그룹화하였으며, 여기서 디에틸 에테르 용액은 지질 군 번호 1/2/4/9/14/18/19/20/21/22/23/24/25/26/27/28/29/30/32의 경우 0.017857 mg/mL, 지질 군 번호 3/8/10/11/12/13의 경우 0.035714 mg/mL, 그리고 지질 군 번호 6/15/16/17/31의 경우 0.0035714 mg/mL의 농도를 가졌고; 지질 용액을 5:1의 부피비로 DEPC-처리 수용액 (15 nmol) 중 120 μl HJT-sRNA-m7 단일 가닥 RNA에 첨가하고, 3분 동안 초음파처리하였다. 디에틸 에테르를 55℃에서 증발 제거한 다음에, 600 μl DEPC 물을 첨가하여 수화시켜 HJT-sRNA-m7 지질 혼합물을 수득하였다.

[0224] **2.2 비등법:**

[0225] 클로로포름 용액 중의 60 μl 지질을 제조하고, 표 1에 나타낸 지질 번호에 따라 그룹화하였으며, 여기서 클로로포름 용액은 지질 군 번호 1/2/4/9/14/18/19/20/21/22/23/24/25/26/27/28/29/30/32의 경우 5 mg/mL, 지질 군 번호 3/8/10/11/12/13의 경우 10 mg/mL, 지질 군 번호 6/15/16/17/32의 경우 1 mg/mL의 농도를 가졌고; 상기 지질 클로로포름 용액을 DEPC-처리 수용액 (15 nmol) 중 600 μl HJT-sRNA-m7 단일 가닥 RNA와 혼합하고 100℃에서 30분 동안 가열하여 HJT-sRNA-m7 지질 혼합물을 수득하였다.

[0226] **3. 지질 핵산 혼합물의 시험관내 전달 실험**

[0227] **3.1** NCI-N87 세포 (위암 세포), MRC-5 세포 (폐 섬유모세포), A549 세포 (폐암 세포)를 대수생장기로 배양한 다음에, $1x10^6$/2 mL 배지/웰의 세포 농도로 6-웰 플레이트에 플레이팅하고; MRC-5 세포를 이글 MEM 배지(Eagle's MEM medium) (MEM, 깁코(Gibco))에서 배양하고; A549 세포를 햄 F-12 배지(Ham's F-12) (히클론(HyClone))에서 배양하고; NCI-N87를 RPMI-1640 배지 (히클론)에서 배양하고; 이어서 37℃에서 밤새 인큐베이션하고, 세포가 벽에 부착된 후 후속 실험을 수행하였다.

[0228] **3.2 실험군은 다음과 같았다:**

[0229] 1) NC 군: 미처리된 세포를 지칭하고; 이 군은 음성 대조군의 역할을 하였다.

[0230] 2) RNAimax 처리군: 2 μl RNAimax 형질감염 시약 및 HJT-sRNA-m7 용액을 100 μl opti-MEM 배지에 각각 희석

한 다음에 상기 둘을 혼합하고, 15분 동안 방치하고, 세포내로 첨가한 다음에, 혼합하였다. HJT-sRNA-m7의 최종 농도는 200 nM이었고; 이 군은 양성 대조군으로서의 역할을 하였다.

[0231] 3) 자유 섭취군(Free uptake): HJT-sRNA-m7 용액을 직접 첨가하고 (최종 농도는 200 nM이었다), 상기 군은 음성 대조군으로서의 역할을 하였다.

[0232] 4) 지질 핵산 혼합물: 단계 2로부터 제조된 지질과 HJT-sRNA-m7의 혼합물을 세포내로 첨가하고 혼합하고, RNA의 최종 농도는 200 nM으로 유지되었다.

[0233] **3.3** 소형 RNA와 3시간 동안 공동-인큐베이션 후, 세포를 PBS로 2-3회 세척하였다. 세포를 트리졸(TRIzol) 용해 완충제로 수확하고, 총 RNA를 추출하였다. 세포에 진입된 소형 RNA의 존재도(abundance)는 RT-qPCR에 의해 검출하였고, RNA의 국소화는 형광 계내 하이브리드화에 의해 검출하였고; 각각의 검출 방법의 프로토콜은 다음과 같았다:

[0234] 3.3.1 소형 RNA의 RT-qPCR 검출 (타크만(TaqMan) 프로브법)

[0235] 1) sRNA를 cDNA로 역전사시켰다: 역전사 키트(Reverse Transcription Kit) (타크만® 마이크로RNA(MicroRNA) 역전사 키트, 카탈로그 번호 4366597)를 사용하여 sRNA를 cDNA로 역전사시켰다. 역전사 시스템은 다음과 같았다: 100 mM dNTPs (dTTP와 함께) 0.15 μl, 멀티스크라이브(MultiScribe)™ 역전사효소 50 U/μl 1.00 μl, 10X RT 완충제 1.5 μl, RNase 억제제 (20 U/μl) 0.19 μl, 뉴클레아제-미함유 H_2O 4.6 μl, 5 μl RNA 주형 (200 ng/μl)을 혼합 후 첨가하고, 3 μl 5 x 타크만 프로브 프라이머를 혼합 후 첨가하고, 혼합 후 간단히 원심분리한 다음에, 5분 동안 얼음 위에 유지시킨 후에 PCR 반응기에 로딩하였다. 반응 조건은 다음과 같았다: (1) 16℃, 30분; (2) 42℃, 30분; (3) 85℃, 5분; (4) 4℃, 반응 종료. 10 μl RNase-미함유 ddH_2O를 첨가하여 반응 후 최종 부피가 25 μl가 되도록 하였다. 역전사 과정에서 사용된 타크만 프로브 프라이머는 인비트로겐(Invitrogen)에 의해 합성되었다 (U6: 4440887, HJT-sRNA-m7: 4398987).

[0236] 2) 정량적 PCR 증폭 반응: qPCR 반응 시스템은 다음을 함유하는, 10 μl의 총 부피를 가졌다: 5 μl 2 × 타크만® 유니버설 매스터 믹스(Universal Master Mix) II, UNG 포함, 0.5 μl 20 × 타크만 프라이머, 1 μl 역전사에 의한 cDNA, 3.5 μl RNase-미함유 dH_2O. 라이트사이클러(LightCycler) 480 형광 정량적 PCR 기기를 사용하였고, PCR 반응 조건은 다음과 같았다: 50℃, 2분 동안, 95℃, 10분 동안 사전-변성(pre-denaturation), 이어서 PCR 증폭 사이클: (1) 95℃, 15s; (2) 60℃, 60s; (3) 60℃, 60s; 총 40 사이클; 결국 40℃ 10s 동안 냉각. 증폭 반응을 위한 타크만 프로브는 인비트로겐에 의해 설계되고 합성되었다 (U6: 4440887, HJT-sRNA-m7: 4398987).

[0237] 3) 상대 발현 수준은 2-ΔCt 방법에 의해 계산하였다.

[0238] 3.3.2 소형 RNA의 RT-qPCR 검출 (SYBR 그린(Green) 염색법)

[0239] 1) sRNA는 cDNA로 역전사되었다: 역전사 키트 (고용량 cDNA 역전사 키트(High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits), 어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystems), 카탈로그 번호 4368813)를 사용하여 스템-루프 방법에 의해 sRNA를 cDNA로 역전사시키고, 역 전사 시스템은 다음과 같았다: RNA 주형 (150 ng/μl) 10 μl, 10X RT 완충제, 2.0 μl, 25X dNTP Mix (100 mM) 0.8 μl, U6 RT 스템-루프 프라이머 2.0 μl, HJT-sRNA-RT-m7 스템-루프 프라이머 2.0 μl, 멀티스크라이브™ 역전사효소 1.0 μl, RNase 억제제 1.0 μl, 뉴클레아제-미함유 H_2O 1.2 μl, 간단한 원심분리 후 PCR 반응기에 로딩하고, 반응 조건은 다음과 같았다: (1) 25℃, 10분; (2) 37℃, 120분; (3) 85℃, 5분; (4) 4℃, 반응 종료. 20 μl RNase-미함유 ddH_2O를 첨가하여 반응 후 최종 부피가 40 ul가 되도록 하였다. 역전사 과정에서 사용된 스템-루프 프라이머는 베이징 싱케 바이오테크놀로지 캄파니, 리미티드(Beijing Tsingke Biotechnology Co., Ltd.)에 의해 합성되었다 (U6 RT 프라이머: GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAAAAATATG; HJT-sRNA-m7 RT 스템-루프 프라이머: GTCGTATCCAGTGCACGCTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGCTTACAA).

[0240] 2) 정량적 PCR 증폭 반응: qPCR 반응 시스템은 다음을 함유하는, 10 μl의 총 부피를 가졌다: 5 μL 2 × SYBR 그린 매스터 믹스, 0.5 μl 정방향 프라이머 (10 μM), 0.5 μl 역방향 프라이머 (10 μM), 1 μl 역전사에 의한 cDNA, 3 μl RNase-미함유 dH_2O. 라이트사이클러 480 형광 정량적 PCR 기기를 사용하였고, PCR 반응 조건은 다음과 같았다: 95℃, 5분 동안 사전-변성, 이어서 PCR 증폭 사이클: (1) 95℃, 10s; (2) 55℃, 10s; (3) 72℃, 20s; 총 40 사이클; 결국 40℃ 10s 동안 냉각. 증폭 반응의 정방향 및 역방향 프라이머 둘 다가 베이징

싱케 바이오테크놀로지 캄파니, 리미티드에 의해 설계되고 합성되었다 (U6 F 프라이머: GCGCGTCGTGAAGCGTTC, U6 R 프라이머: GTGCAGGGTCCGAGGT, HJT-sRNA-m7 F 프라이머: TCGCGCTGAGGTAGTAGGTT, HJT-sRNA-m7 R 프라이머: GTGCACGCTCCGAGGT).

[0241] 3) 상대 발현 수준은 2-ΔCt 방법에 의해 계산하였다.

[0242] 3.3.3 소형 RNA의 형광 계내 하이브리드화 (FISH)

[0243] 1) 배지를 제거하고 PBS (500 μl/웰)로 3회 세척하였다.

[0244] 2) 4% 파라포름알데히드 (500 μl/웰, PBS 완충제 중에서 제조) 중에서 실온에서 20분 동안 고정시켰다.

[0245] 3) 1 × PBS (500 μl/웰)로 세척하고 새로운 1 × PBS (500 μl/웰) 중에서 5분 동안 침지시켰다.

[0246] 4) PBS를 제거하고, 세포를 실온에서 10분 동안 PK (프로테이나제 K) 완충제로 투과화시켰다.

[0247] 5) 1 × PBS (500 μl/웰)로 세척하고, 4% 파라포름알데히드 (500 μl/웰, PBS 완충제 중에서 제조) 중에서 실온에서 10분 동안 고정시켰다.

[0248] 6) 1 × PBS로 세척하고, 새로운 1 × PBS (500 μl/웰) 중에서 5분 동안 침지시켰다.

[0249] 7) 세포를 0.1 M TEA로 실온에서 10분 동안 처리하였다.

[0250] 8) 1 × PBS (500 μl/웰)로 세척하고 새로운 1 x PBS (500 μl/웰) 중에서 5분 동안 침지시켰다.

[0251] 9) 배양 플레이트를 하이브리드화 완충제 (50% 포름아미드, 5 x SSC, 5 × 덴하르트(Denharts), 250 μg/mL 효모 RNA, 500 μg/mL 청어 정자 DNA) 중 하이브리드화 카세트에 배치하고 실온에서 1시간 동안 미리 인큐베이션하였다.

[0252] 10) RNA 프로브 (HJT-sRNA-m7 프로브: 5'-GCTTACAACCACACAACCTACTACCTCA-3', 스크램블된 프로브: 5'-CAGTACTTTTGTGTAGTACAA-3', U6 프로브: 5'-TTTGCGTGTCATCCTTGCG-3')을 하이브리드화 완충제 (RNA 프로브의 농도는 0.1-0.2 ng/μl이었다)에 첨가하고, 85℃에서 5분 동안 변성시키고, 이를 얼음 위에 신속히 배치하였다.

[0253] 11) 단계 9로부터의 사전-하이브리드화 완충제를 제거하고, 이를 단계 10으로부터의 RNA 프로브를 함유하는 하이브리드화 완충제로 대체한 다음에, 플레이트를 혼성화 카세트에 배치하고, 65℃에서 밤새 (12-16시간) 인큐베이션하였다.

[0254] 12) 0.2×SSC 용액을 65℃로 예열하고 매회 20분 동안 0.2×SSC (1 mL/웰)로 3회 세척하였다.

[0255] 13) 0.2×SSC 용액 (1 mL/웰)을 실온에서 첨가하고 5분 동안 방치하였다.

[0256] 14) 0.2×SSC를 흡인하고, 완충제 B1 (0.1 M Tris-HCl (pH 7.4~7.5), 150 mM NaCl)을 첨가하고, 매회 5분 실온에서 2회 세척하였다.

[0257] 15) PBS로, 매회 5분 3회 세척하였다.

[0258] 16) 공초점 현미경검사하에 관찰하였다.

[0259] **3.4 전통 중국 의약 추출물이 핵산의 세포내로의 흡수 및 진입에 미치는 영향**

[0260] 1) 실험을 위해 표 1에 나타낸 30개의 지질을 선택하고, 실험 군을 표 1에 나타낸 지질 번호에 따라 번호를 매겼다. 지질 핵산 혼합물을 단계 2에 기재된 역 증발법 및 비등법에 따라 제조하였다. 단계 3.1-3.3에 따른 지질 핵산 혼합물을 사용하여 시험관내 전달 실험을 수행하고, 세포내 RNA의 존재도를 결정하였다.

[0261] 실험 결과는 도 1-4에 나타냈다. 도 1-2는 역 증발법에 의해 제조된 지질 핵산 혼합물이 핵산을 NCI-N87 및 MRC-5 세포에 성공적으로 전달할 수 있음을 나타내고; 도 3-4는 비등법에 의해 제조된 지질 핵산 혼합물이 핵산을 MRC-5 및 A549 세포에 성공적으로 전달할 수 있음을 나타냈다.

[0262] 2) 추가로, 표 1의 다양한 지질이 조합되었다. 디에틸 에테르 용액 중 200 μl 지질 조합 (번호 1/2/4/9/18/19/20/21/22/23/24/25/26/27/28/29의 지질 조합의 경우 0.00326 mg/mL, 번호 3/8/10/13의 지질 조합의 경우 0.00652 mg/mL, 번호 15/16/17의 지질 조합의 경우 0.000652 mg/mL의 농도를 가짐) 및 클로로포름 용액 중 3 μl 지질 조합 (번호 1/2/4/9/18/19/20/21/22/23/24/25/26/27/28/29의 지질 조합의 경우 5 mg/mL, 번호 3/8/10/13의 지질 조합의 경우 10 mg/mL, 번호 5/16/17의 지질 조합의 경우 1 mg/mL의 농도를 가짐)을 제조하였다. 상기 지질을 동일한 부피로 혼합하여 혼합 지질을 수득하고, 하기에 기재된 바와 같이 각각 역 증발

법 및 비등법에 의해 지질 핵산 혼합물을 제조하였다. 단계 3.1-3.3에 따른 지질 핵산 혼합물을 사용하여 시험관내 전달 실험을 수행하고, 세포내 RNA의 존재도를 결정하였다.

[0263] 역 증발법에 의한 지질 조합과 핵산의 혼합물의 제조:

[0264] 디에틸 에테르 용액 중의 200 μl 지질 조합을 지질 용액과 RNA 사이의 5:1의 부피비로 40 μl HJT-sRNA-m7 수용액 (5 μM)에 첨가하고, 3분 동안 초음파처리하고; 디에틸 에테르를 55℃에서 증발 제거한 다음에, 200 μl DEPC 물을 첨가하여 수화시켜 지질 핵산 혼합물을 수득하였다.

[0265] 비등법에 의한 지질 조합과 핵산의 혼합물의 제조:

[0266] 클로로포름 용액 중의 3 μl 지질 조합을 100 μl HJT-sRNA-m7 수용액 (2 μM)과 혼합하고, 100℃에서 30분 동안 가열하였다.

[0267] 실험 결과는 도 5-8에 나타냈다. 도 5-6은 역 증발법에 의해 제조된 지질 조합과 핵산의 혼합물이 표적 세포로의 핵산 진입을 성공적으로 용이하게 할 수 있음을 입증하고; 도 7-8은 비등법에 의한 지질 조합과 핵산의 혼합물이 표적 세포로의 핵산 진입을 성공적으로 용이하게할 수 있음을 입증하였다.

[0268] 3) 표 1에 나타낸 상이한 유형의 지질, 예를 들어, TG 혼합물, DG 혼합물 등을 조합하여, 역 증발법 및 비등법에 의한 지질 핵산 혼합물의 제조에 각각 사용하였다. 단계 3.1-3.3에 따른 지질 핵산 혼합물을 사용하여 시험관내 전달 실험을 수행하고, 세포내 RNA의 존재도, 세포내 국소화 및 표적화된 영역을 결정하였다.

[0269] 상이한 유형의 지질이 다음과 같이 조합되었다:

[0270] 조합 1: 지질 번호 1-32의 조합, 지질 번호 5, 7, 11, 및 12가 없는 번호 1/2/3/4/6/8/9/10/13-32;

[0271] 조합 2: 지질 번호 29가 없는 조합 1;

[0272] 조합 3: 지질 번호 1, 2, 3, 19가 없는 조합 1;

[0273] 조합 4: 지질 번호 4, 14가 없는 조합 1;

[0274] 조합 5: 지질 번호 6, 9, 10, 13, 15, 16, 18, 20-28, 32이 없는 조합 1;

[0275] 조합 6: 지질 번호 8이 없는 조합 1;

[0276] 조합 7: 지질 번호 17, 30, 31이 없는 조합 1;

[0277] FA: 지질 번호 29;

[0278] DG 조합: 지질 번호 1, 2, 3, 19의 조합;

[0279] Cer 조합: 지질 번호 4, 14의 조합;

[0280] TG 조합: 지질 번호 6, 9, 10, 13, 15, 16, 18, 20-28, 32의 조합;

[0281] PE 조합: 지질 번호 8;

[0282] So 조합: 지질 번호 17, 30, 31의 조합.

[0283] 실험 결과는 도 9-10에 나타냈다. 결과는 상이한 방법 (비등법 또는 역 증발법)에 의한 상이한 유형의 지질 조합 (예를 들어, TG의 혼합물, DG의 혼합물 등)이 표적 세포로의 핵산 진입을 촉진할 수 있음을 나타냈다.

[0284] 4) 추가로, 지질 번호 11 및 번호 12는 상이한 서열을 갖는 핵산 단편뿐만 아니라 핵산의 국소화 및 표적화된 유전자 영역을 갖는 핵산 단편을 전달하는 지질의 효율을 조사하기 위한 실험을 위해 선택하였다. 프로토콜은 다음과 같았다:

[0285] 대두 PC, 지질 번호 11 (18:0/18:2) 및 지질 번호 12 (16:0/18:2), 및 다양한 소형 RNA (하기 표 3 참조)의 혼합물을 역 증발법에 의해 제조한 다음에 A549 세포주에 첨가하였고 (sRNA의 최종 농도는 200 nM이었다); 음성 대조군 (대조군)은 동일한 농도의 sRNA로 직접 첨가하였고; 양성 대조군 (RNAimax)은 리포펙타민 RNAimax (형질감염 시약 6 μl/웰)로 형질감염시켰다. 세포 중의 sRNA의 존재도는 3시간 후에 타크만 프로브에 의해 검출하였고, sRNA의 상대 발현 수준은 2-ΔCt 방법에 의해 계산하였다.

[0286] 실험 결과는 도 11-13에 나타냈다. 도 11a-c는 대조군과 비교하여 2개의 지질 지질 (지질 번호 11 (18:0/18:2) 및 지질 번호 12 (16:0/18:2))이 다양한 세포로의 상이한 서열의 핵산 분자의 진입을 효과적으로 용이하게 할

수 있음을 나타냈고; 도 12는 지질 번호 11(18:0/18:2) 및 지질 번호 12 (16:0/18:2)에 의해 전달된 핵산이 세포질로 진입하고 주로 세포질에 국소화됨을 나타냈다. 게다가, 도 13을 참조하면, 본 발명자는 예기치 않게 지질 번호 11 및 번호 12 둘 다가 핵산의 소형 단편의 진입을 촉진하고, 이는 그의 표적 유전자의 야생형 3'UTR에 작용하여 표적 유전자의 야생형 3'UTR을 가진 루시퍼라제의 상대 발현 수준을 감소시며, 한편, 그의 표적 유전자의 돌연변이된 3'UTR에는 작용하지 않는다는 것을 밝혀냈다. 이는 핵산 약물의 전달 수단으로서 사용될 수 있다.

[0287] **4. 지질 핵산 혼합물의 생체내 전달 실험**

[0288] 4.1 실험 단계

[0289] 1. 지질 핵산 혼합물의 제조: 지질 번호 11 또는 번호 12와 핵산의 혼합물, 및 번호 1/2/4/9/14/18/19/20/21/22/23/24/25/26/27/28/29/30/32, 번호 3/8/10/11/12/13, 및 번호 6/15/16/17/31의 지질 조합과 핵산의 혼합물을 역 증발법 및 비등법에 의해 제조하였다 (단계 2.1-2.2 참조).

[0290] 2. 다음과 같이 그룹화된, 6-8주령 수컷 C57 마우스: 200 μl/동물에 대해 위관영양을 수행하였다:

[0291] (1) 대조군 (자유 섭취군): 위관영양에 의해 어떠한 처리 또는 HJT-sRNA-m7이 제공되지 않았다;

[0292] (2) 지질 번호 11 (18:0/18:2) 군: 지질 번호 11 (18:0/18:2) 또는 지질 번호 11 (18:0/18:2)과 HJT-sRNA-m7의 혼합물이 위관영양에 의해 제공되었다;

[0293] (3) 지질 번호 12 (16:0/18:2) 군: 지질 번호 12 (16:0/18:2) 또는 지질 번호 12 (16:0/18:2)와 HJT-sRNA-m7의 혼합물이 위관영양에 의해 제공되었다;

[0294] 3. 샘플 수집: 위관영양 6시간 후, 마우스 전혈 (500 μl) 및 폐 (110 mg)를 각각 1.5 mL 트리졸-LS 또는 3 mL 트리졸에 의해 수집하고, 균질화한 다음에 -80℃에서 냉동 보관하였다.

[0295] 4. 총 RNA 추출: (1) 트리졸 또는 트리졸-LS 용해 완충제 (시그마 코포레이션(Sigma Corporation))을 세포에 첨가한 다음에, 실온에서 5분 동안 방치하여 완전히 용해시키고 (마우스 폐 조직의 경우, 100 mg 조직에 1.0 mL 트리졸 용해 완충제를 첨가하고, 용액을 균질화기로 분쇄하고, 12,000 rpm, 4℃에서 10분 동안 원심분리하여 균질화되지 않은 조직 침전물을 제거하고; 마우스 전혈의 경우, 500 μl의 전혈에 12,000 rpm, 4℃에서 10분 동안 원심분리된 1.5 mL 트리졸-LS 용해 완충제를 첨가하여 완전히 절단되지 않은 침전물을 제거하였다); (2) 12,000 rpm, 4℃에서, 5분 동안 원심분리하고, 침전물을 폐기하고; (3) 200 μl/mL 트리졸의 비율로 클로로포름을 첨가하고, 볼텍스로 혼합하고, 실온에서 15분 동안 방치하였다. (4) 12,000 rpm, 4℃에서, 15분 동안 원심분리하고, 상부 수성 상을 또 다른 원심분리관으로 피펫팅하고; (5) 단계 4를 반복하고, 동일한 양의 클로로포름을 상부 수성 상에 첨가하고, 잘 혼합하고, 10분 동안 실온, 12,000 rpm, 4℃에서 유지시키고, 15분 동안 원심분리하고; (6) 상부 수성 상을 새로운 EP 관에 흡취하고, 이소프로판올을 0.5 ml/mL 트리졸의 비율로 첨가하고, 혼합하고, 실온에서 5-10분 동안 방치하고; (7) 12,000 rpm, 4℃에서, 10분 동안 원심분리하고, 상청액을 폐기하고; (8) 1 mL 75% 에탄올을 첨가하고, 원심분리관을 부드럽게 진탕시켜 침전물을 현탁시키고; (9) 8000 g, 4℃에서, 5분 동안 원심분리하고, 상청액을 가능한 한 많이 폐기하고; (10) 실온에서 5-10분 동안 건조시키고 50 μl DEPC-처리 H_2O로 RNA 샘플을 용해시켰다.

[0296] 5. RT-qPCR 검출: 상기 항목 3.3.1 및 3.3.2에 기재된 방법을 참조

[0297] 4.2 실험 결과

[0298] 도 14를 참조하면, 본 발명자는 예기치 않게 지질 번호 11 (18:0/18:2) 및 지질 번호 12 (16:0/18:2)가 (비침습적) 위관영양에 의해 혈액 및 폐로의 핵산의 소형 단편의 진입을 촉진할 수 있고, 이는 핵산 약물의 전달 수단으로서 사용될 수 있음을 밝혀냈다. 놀랍게도, 직접 비등법에 의해 수득된 지질 핵산 혼합물은 상당한 전달 효과를 달성하였다.

[0299] 도 15를 참조하면, 본 발명자는 놀랍게도, 28개 지질의 혼합물이 (비침습적) 위관영양에 의해 혈액으로의 핵산의 소형 단편의 진입을 촉진할 수 있고, 이는 핵산 약물의 전달 수단으로서 사용될 수 있음을 밝혀냈다. 놀랍게도, 직접 비등법에 의해 수득된 지질 조합과 핵산의 혼합물은 상당한 전달 효과를 달성하였다.

[0300] **번호 1-71로서 표 1에 나타낸 지질의 실시예**

[0301] **방법**

[0302] **1. 전통 중국 의약으로부터의 지질의 추출**

[0303] **1.1 전통 중국 의약의 달임**

[0304] 1) 100 g 중국 의약 탕제 조각 (로디올라 크레눌라타, 타락사쿰 몽골리쿰, 로니세라 자포니카 및 안드로그라피스 파니쿨라타, 북경 동인당 약방으로부터 구매)을 1000 mL ddH_2O에 첨가하고 30분 동안 침지시켰다.

[0305] 2) 중국 의약 달임 포트를 강하게 가열하면서 15분 동안, 그리고 서서히 가열하면서 20분 동안 끓였다.

[0306] 3) 400 mL의 가열된 중국 의약 약액을 60℃, 60 rpm, 30분으로, 회전 증발기에 첨가하고, 100 mL로 농축시켰다.

[0307] **1.2 지질 추출**

[0308] 1) 160 mL 중국 의약 약액 (회전 증발기에 의해 농축됨)에 클로로포름-메탄올 혼합물 (클로로포름:메탄올=1:2, v/v) 600 mL를 첨가하여 클로로포름:메탄올:물=1:2:0.8이 되도록 하고, 10-15분 동안 교반 혼합하였다.

[0309] 2) 200 mL 클로로포름을 삼각 플라스크에 첨가하고, 10분 동안 교반 혼합하였다.

[0310] 3) 200 ml ddH_2O를 삼각 플라스크에 첨가하여, 클로로포름:메탄올:물=2:2:1.8이 되도록 하고, 10분 동안 교반 혼합하였다.

[0311] 4) 상부층의 액체 및 중간층으로부터의 불용성 물질을 제거하고, 하부 층의 클로로포름 층을 취하여 -40℃에서 보관하였다.

[0312] **1.3 지질 성분의 HPLC-MS/MS 확인**

[0313] 기기 조건

[0314] 1) 크로마토그래피 조건:

[0315] 기기: 얼티메이트 3000; 칼럼: 키네텍스 C18 (100 × 2.1 mm, 1.9 μm); 칼럼 온도: 45℃; 이동상 A: 아세토니트릴 : 물 (v/v, 60:40), 10 mmol/L 포름산암모늄을 함유하는 용액, 이동상 B: 아세토니트릴:이소프로판올 (10:90, v/v), 10 mmol/L 포름산암모늄 및 0.1% 포름산을 함유하는 용액. 유량: 0.4 mL/분; 주사량: 4 μl.

[0316] 2) 질량 분석 파라미터:

[0317] a) 양성 모드: 히터 온도 300℃, 쉬스 기체 유량, 45 arb, Aux 기체 유량, 15 arb, 스위프 기체 유량, 1 arb, 분무 전압, 3.0 KV, 모세관 온도, 350℃, S-렌즈 RF 수준, 30%. 스캔 범위: 200-1500.

[0318] b) 음성 모드: 히터 온도 300℃, 쉬스 기체 유량, 45 arb, Aux 기체 유량, 15 arb, 스위프 기체 유량, 1 arb, 분무 전압, 2.5 KV, 모세관 온도, 350℃, S-렌즈 RF 수준, 60%. 스캔 범위: 200-1500.

[0319] **1.4 중국 의약으로부터 유래된 지질의 확인**

[0320] 지질 성분은 HPLC-MS/MS에 의해 확인되었고, 전통 중국 의약으로부터 유래된 총 138개의 지질 성분이 확인되었고, 이 중 125개는 양성 모드로, 그리고 13개는 음성 모드로 확인되었다. 표 1에 나타낸 화합물 1-69에 대해 하기 실험을 수행하였다. 하기 시험된 지질은 모두 표 1-1에 기재된 바와 같이 상업적으로 구매하거나 상업적으로 합성하여, 사용하였다는 점에 주목하여야 한다.

[0321] **2. 지질 핵산 혼합물의 제조**

[0322] **2.1 역 증발법:**

[0323] 디에틸 에테르 용액 중의 100 μl 지질을 제조하고, 표 1에 나타낸 지질 번호에 따라 그룹화하였다 (지질 농도는 하기 표에 나타냈다). 지질 용액에 20 μl 핵산 용액 (HJT sRNA 또는 siRNA)을 5:1의 부피비로 첨가하고, 3분 동안 초음파처리하였다. 디에틸 에테르를 55℃에서 증발 제거한 다음에, 100 μl의 DEPC 물을 첨가하여 수화시켜 핵산 지질 혼합물을 수득하였다.

[0324] <표 3>

도면	단일 지질 또는 지질 조합	농도/(mg/mL)	
51	8 + 12 =1:2	번호 8	0.0833
		번호 12	0.1667
71	38+12+37=4:1:1	번호 38	0.2
		번호 12	0.05
		번호 37	0.05
76/77/79/82	번호 41	번호 41	0.25
87	40+12+41=2:4:3	번호 40	0.0667
		번호 12	0.1333
		번호 41	0.1
88 좌	12+41=1:6	번호 12	0.0428
		번호 41	0.2571
88 좌	12+41=1:1	번호 12	0.15
		번호 41	0.15

[0325]

89 좌	12+41=6:1	번호 12	0.2571
		번호 41	0.0428
89 우	4+12+41=1:1:1	번호 4	0.1
		번호 12	0.1
		번호 41	0.1
90	4+12+41=1:1:1	번호 4	0.1
		번호 12	0.1
		번호 41	0.1
93	번호 38	번호 38	0.25
99/100/102	번호 40	번호 40	0.25
104/105	번호 39	번호 39	0.25
106	번호 60	번호 60	0.25
107	번호 62	번호 62	0.25

[0326]

[0327] **2.2 비등법:**

[0328] 100 μL의 핵산 용액 (HJT sRNA 또는 siRNA)을 2-5 μL의 지질 용액 (농도는 표 1에 나타냈다)에 첨가하고, 혼합하고, 80-100℃에서 15-30분 동안 가열하여 핵산 지질 혼합물을 수득하였다.

[0329] **3. 지질 핵산 혼합물의 시험관내 전달 실험**

[0330] **3.1 지질에 의해 전달된 핵산의 세포내 발현의 실시간 정량적 PCR (RT-qPCR) 검출.**

[0331] 3.1.1 MRC-5 세포 (폐 배아 섬유모세포), A549 세포 (인간 폐 선암종 세포), Caco-2 세포 (인간 결장 선암종 세포) (중국 의학과학원 기초 의학 연구소의 세포 자원 센터(Cell Resource Center of the Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences)로부터 구매)를 대수생장기로 배양한 다음에, 6×10^5/1 mL 배지/웰의 세포 농도로 12-웰 플레이트에 플레이팅하고; MRC-5 및 Caco-2 세포를 이글 MEM 배지 (MEM, 깁코)에서 배양하고; A549 세포를 햄 F-12 배지 (히클론)에서 배양하고; 이어서 37℃에서 밤새 인큐베이션하고, 세포가 벽에 부착된 후 후속 실험을 수행하였다.

[0332] 3.1.2 실험군은 다음과 같았다:

[0333] 1) 미처리 군(naive group): 이는 미처리된 세포를 지칭하고, 이 군은 블랭크 대조군으로서의 역할을 하였다.

[0334] 2) RNAimax 처리군: 2 μl 리포펙타민™ RNAimax 형질감염 시약 (리포펙타민 RNAiMAX의 완전한 명칭, 인비트로겐, 써모 피셔 사이언티픽(Thermo Fisher Scientific)) 및 HJT-sRNA-m7 용액을 100 μl opti-MEM 배지

(인비트로겐, 써모 피셔 사이언티픽으로부터 구매)에 각각 희석한 다음에 상기 둘을 혼합하고, 15분 동안 방치하고, 세포내로 첨가한 다음에, 혼합하였다. HJT-sRNA-m7의 최종 농도는 100 nM이었고; 이 군은 양성 대조군으로서의 역할을 하였다.

[0335] 3) 자유 섭취군: HJT-sRNA-m7 용액을 직접 첨가하고 (최종 농도는 100 nM이었다), 상기 군은 음성 대조군으로서의 역할을 하였다.

[0336] 4) 지질 핵산 혼합물: 단계 2로부터 제조된 지질과 HJT-sRNA-m7의 혼합물을 세포내로 첨가하고 혼합하고, HJT-sRNA-m7의 최종 농도는 100 nM이었다.

[0337] 3.1.3 세포와 12-24시간 동안 공동-인큐베이션 후, 세포를 PBS로 2회 세척하였다. 세포를 트리졸 용해 완충제 (시그마-알드리치(Sigma-Aldrich)로부터 구매))로 수확하고, 총 RNA를 추출하였다. 세포에 진입된 HJT-sRNA-m7의 존재도는 RT-qPCR에 의해 검출하였고, 프로토콜은 다음과 같았다:

[0338] 1) 총 세포 RNA의 추출:

[0339] A. 12-웰 플레이트 (약 1×10^6 세포/웰)에서 배양된 세포에 각각의 웰에 1 mL 트리졸 용해 완충제를 첨가한 다음에, 얼음 위에 배치하였다. 모든 샘플에 트리졸을 첨가한 후, 실온에서 5분 동안 방치하여 이들이 완전히 용해되도록 하였다.

[0340] B. 4℃, 12,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하고, 펠렛을 폐기하고 트리졸을 새로운 원심분리관으로 옮기고;

[0341] C. 클로로포름을 200 μL 클로로포름/mL 트리졸의 비율로 첨가하고, 잘 진탕시키고, 혼합하고 5분 동안 실온에서 방치하고;

[0342] D. 4℃, 12,000 rpm에서 15분 동안 원심분리하고;

[0343] E. 상부 수성 상을 또 다른 원심분리관으로 피펫팅하고, 이소프로판올을 0.5 mL 이소프로판올/mL 트리졸의 비율로 첨가하고 실온에서 5-10분 동안 방치하고;

[0344] F. 4℃, 12,000 rpm에서 15분 동안 원심분리하고 상청액을 폐기하고, RNA를 상기 관의 바닥으로 침전시키고;

[0345] G. 1 mL 75% 에탄올을 첨가하고, 상기 관을 부드럽게 진탕시켜 침전물을 현탁시키고;

[0346] H. 4℃, 12,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하고, 상청액을 폐기하고, 1 mL 75% 에탄올을 첨가하고, 원심분리관을 부드럽게 진탕시켜 침전물을 현탁시키고;

[0347] I. 4℃, 12,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하고, 상청액을 폐기하고, 실온에서 건조시키고, RNA 샘플을 50 μL RNase-미함유 H_2O로 용해시키고, OD 값의 측정에 의해 RNA 농도를 정량화하였다.

[0348] 2) 총 RNA를 cDNA로 역전사시켰다: 역전사 키트 (고용량 cDNA 역전사 키트, 어플라이드 바이오시스템즈, 카탈로그 번호 4368813)를 사용하여 스템-루프 방법에 의해 sRNA를 cDNA로 역전사시켰다 (예를 들어 문헌 [Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR, Nucleic Acids Res. 2005 Nov 27; 33(20):e179] 참조, 본원에 참조로 포함됨). 역 전사 시스템은 다음과 같았다: 주형 RNA (150 ng/μL) 10 μL, 10X RT 완충제 2.0 μL, 25X dNTP Mix (100 mM) 0.8 μL, U6 RT 스템-루프 프라이머 2.0 μL, HJT-sRNA-m7 RT 스템-루프 프라이머 2.0 μL, 멀티스크라이브 ™ 역전사효소 1.0 μL, RNase 억제제 1.0 μL, 뉴클레아제-미함유 H_2O 1.2 μL, 간단한 원심분리 후 PCR 반응기에 로딩하였다. 반응 조건은 다음과 같았다: (1) 25℃, 10분; (2) 37℃, 120분; (3) 85℃, 5분; (4) 4℃, 반응 종료. 20 μl RNase-미함유 ddH_2O를 첨가하여 반응 후 최종 부피가 40 ul가 되도록 하였다. 역전사 과정에서 사용된 스템-루프 프라이머는 베이징 싱케 바이오테크놀로지 캄파니, 리미티드에 의해 합성되었다 (U6 RT 프라이머, RT-qPCR 반응에 의한 소형 RNA의 정량화는 단지 상대적일 수 있기 때문에, U6을 상대 발현 수준을 계산하기 위한 표준 참조 유전자로서 사용하였다): GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAAAAATATG; HJT-sRNA-m7 RT 스템-루프 프라이머: GTCGTATCCAGTGCACGCTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGCTTACAA).

[0349] 3) 정량적 PCR 증폭 반응: qPCR 반응 시스템은 다음을 함유하는, 10 μl의 총 부피를 가졌다: 5 μL 2 × SYBR 그린 매스터 믹스, 0.5 μl 정방향 프라이머 (10 μM), 0.5 μl 역방향 프라이머 (10 μM), 1 μl 역전사에 의한 cDNA, 3 μl RNase-미함유 dH_2O. 라이트사이클러 480 형광 정량적 PCR 기기를 사용하였고, PCR 반응 조건은 다음과 같았다: 95℃, 5분 동안 사전-변성, 이어서 PCR 증폭 사이클: (1) 95℃, 10s; (2) 55℃, 10s; (3)

72℃, 20s; 총 40 사이클; 결국 40℃ 10s 동안 냉각. 증폭 반응의 정방향 및 역방향 프라이머 둘 다 베이징 싱케 바이오테크놀로지 캄파니, 리미티드에 의해 설계되고 합성되었다 (U6 정방향 프라이머: GCGCGTCGTGAAGCGTTC, U6 역방향 프라이머: GTGCAGGGTCCGAGGT, HJT-sRNA-m7 정방향 프라이머: TCGCGCTGAGGTAGTAGGTT, HJT-sRNA-m7 역방향 프라이머: GTGCACGCTCCGAGGT).

[0350] 4) 2-ΔCt 방법 (상대 유전자 발현 수준= 2-(Ct 표적 유전자-Ct 내부 참조 유전자))을 사용하여 진입의 상대적 양 (단일 또는 이중 가닥 RNA)을 계산하였다.

[0351] **3.2 mRNA 발현 수준의 실시간 정량적 PCR (RT-qPCR) 검출**

[0352] 3.2.1 THP-1 세포 (인간 단핵구)를 대수생장기로 배양한 다음에, 6×10^5/1 mL 배지/웰의 세포 농도로 12-웰 플레이트에 플레이팅하고; THP-1 세포를 RPMI-1640 배지 (히클론)에서 배양하고; 세포를 37℃에서 밤새 인큐베이션하고, 세포가 벽에 부착된 후 후속 실험을 수행하였다

[0353] 3.2.2 실험군은 다음과 같았다:

[0354] 1) 미처리 군: 미처리된 THP-1 세포로 지칭되고, 이 군은 블랭크 대조군으로서의 역할을 하였다.

[0355] 2) RNAiMAX 처리군: 2 μl 리포펙타민™ RNAimax 형질감염 시약 (인비트로겐, 써모 피셔 사이언티픽) 및 핵산 용액 (TNFα siRNA)을 100 μl opti-MEM 배지 (인비트로겐, 써모 피셔 사이언티픽)에 각각 희석한 다음에 상기 둘을 혼합하고, 15분 동안 방치하고, 세포내로 첨가한 다음에, 혼합하였다. 핵산의 최종 농도는 400 nM이었고; 이 군은 양성 대조군으로서의 역할을 하였다.

[0356] 3) 자유 섭취군: 핵산 용액 (TNFα siRNA)을 직접 첨가하고 (최종 농도는 400 nM이었다), 상기 군은 음성 대조군으로서의 역할을 하였다.

[0357] 4) 지질 핵산 혼합물: 단계 2로부터 제조된 지질과 핵산의 혼합물을 세포내로 첨가하고 혼합하고, 핵산의 최종 농도는 400 nM이었다.

[0358] 3.2.3 처리 24시간 후, 세포를 1 μg/mL 이. 콜라이(E. coli) LPS (리포폴리사카라이드, LPS, 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*) 0111:B4, L4391, 시그마-알드리치)로 자극하고, 9시간 후 트리졸 용해 완충제를 사용하여 수확하여 총 RNA를 추출하였다. TNF-α의 mRNA 발현 수준 (후속 실시예의 표적 유전자는 경우에 따라 다양하고 도면에 표시하였다)은 RT-qPCR (SYBR 그린 염색법)에 의해 결정하였고, 프로토콜은 다음과 같았다:

[0359] 1) 세포로부터 총 RNA의 추출: 절차는 항목 3.1.3의 총 RNA 추출 방법과 동일하였다.

[0360] 2) 총 RNA를 cDNA로 역전사시켰다: 역전사 키트 (고용량 cDNA 역전사 키트, 어플라이드 바이오시스템즈, 카탈로그 번호 4368813)를 사용하여 총 RNA를 cDNA로 역전사시켰다. 역 전사 시스템은 다음과 같았다: 주형 RNA (150 ng/μL) 10 μL, 10X RT 완충제 2.0 μL, 25X dNTP Mix (100 mM) 0.8 μL, 무작위 프라이머 2.0 μL, 멀티스크라이브™ 역전사효소 1.0 μL, RNase 억제제 1.0 μL, 뉴클레아제-미함유 H_2O 3.2 μL, 간단한 원심분리 후 PCR 반응기에 로딩하였다. 반응 조건은 다음과 같았다: (1) 25℃, 10분; (2) 37℃, 120분; (3) 85℃, 5분; (4) 4℃, 반응 종료. 20 μl RNase-미함유 dd H_2O를 첨가하여 반응 후 최종 부피가 40 ul가 되도록 하였다.

[0361] 3) 정량적 PCR 증폭 반응: qPCR 반응 시스템의 총 부피는 다음을 함유하여 10 μl이었다: 5 μL 2 × SYBR 그린 매스터 믹스, 0.5 μl 정방향 프라이머 (10 μM), 0.5 μl 역방향 프라이머 (10 μM), 1 μl 역전사에 의한 cDNA, 3 μl RNase-미함유 dH_2O. 라이트사이클러 480 형광 정량적 PCR 기기를 사용하고, PCR 반응 조건은 다음과 같았다: 95℃, 5분 동안 사전-변성, 이어서 PCR 증폭 사이클: (1) 95℃, 10s; (2) 55℃, 10s; (3) 72℃, 20s; 총 40 사이클; 결국 40℃ 10s 동안 냉각. 증폭 반응의 정방향 및 역방향 프라이머 둘 다 베이징 싱케 바이오테크놀로지 캄파니, 리미티드에 의해 설계되고 합성되었다. 프라이머 서열은 다음과 같았다: 내부 참조 유전자 UBC의 정방향 프라이머: CTGGAAGATGGTCGTACCCTG, 내부 참조 유전자 UBC의 역방향 프라이머: GGTCTTGCCAGTGAGTGTCT; 표적 유전자 TNF-α의 정방향 프라이머: CTGCCCCAATCCCTTTATT: 표적 유전자 TNF-α의 역방향 프라이머: CCCAATTCTCTTTTTGAGCC.

[0362] 4) 상대 발현 수준은 상기 기재된 바와 같이 2-ΔCt 방법에 의해 계산하였다.

[0363] **3.3 단백질 발현 수준의 웨스턴 블롯 검출**

[0364] 3.3.1 MRC-5 세포 (폐 배아 섬유모세포), 및 A549 세포 (인간 폐 선암종 세포)를 대수생장기로 배양한 다음에,

6×10^5/1 mL 배지/웰의 세포 농도로 12-웰 플레이트에 플레이팅하고; MRC-5 세포를 이글 MEM 배지 (MEM, 깁코)에서 배양하고; A549 세포를 햄 F-12 배지 (히클론)에서 배양하고; 이어서 37℃에서 밤새 인큐베이션하고, 세포가 벽에 부착된 후 후속 실험을 수행하였다

[0365] 3.3.2 실험군은 다음과 같았다:

[0366] 1) 미처리 군: 이는 미처리된 세포로 지칭되고, 이 군은 블랭크 대조군으로서의 역할을 하였다.

[0367] 2) RNAiMAX 처리군: 2 μl 리포펙타민™ RNAimax 형질감염 시약 (인비트로겐, 써모 피셔 사이언티픽) 및 핵산 용액을 100 μl opti-MEM 배지 (인비트로겐, 써모 피셔 사이언티픽)에 각각 희석한 다음에 상기 둘을 혼합하고, 15분 동안 방치하고, 세포내로 첨가한 다음에, 혼합하였다. 핵산의 최종 농도는 400 nM이었고; 이 군은 양성 대조군으로서의 역할을 하였다.

[0368] 3) 자유 섭취군: 핵산 용액을 직접 첨가하고 (최종 농도는 400 nM이었다), 상기 군은 음성 대조군으로서의 역할을 하였다.

[0369] 4) 지질 핵산 혼합물: 단계 2로부터 제조된 지질과 핵산의 혼합물을 세포내로 첨가하고 혼합하고, 핵산의 최종 농도는 400 nM이었다.

[0370] 3.3.3 처리 24시간 후, 세포를 자극제 (이중 가닥 RNA 바이러스 모방체로서 1 μg/mL 폴리(I:C) (P1530, 시그마-알드리치) 또는 3 ng/mL 형질전환 성장 인자 TGFβ1 (페프로 테크(Pepro Tech))로 자극하였다. 세포를 강한 RIPA 용해 완충제를 사용하여 수확하고, 잠시 동안 인큐베이션 후, 웨스턴 블롯을 사용하여 관련 유전자의 단백질 발현 수준을 검출하였다 (관련 유전자의 유형은 경우에 따라 다양하고 상응하는 도면에 표시하였다) (REL-A의 단백질 발현 수준은 내부 참조 단백질로서 β-액틴으로 폴리(I:C)에 의해 A549 세포를 자극한 후 24시간 후에 검출하고; 피브로넥틴 및 α-SMA의 단백질 발현 수준은 내부 참조 단백질로서 GAPDH를 가진 TGF-β1로 MRC-5 세포를 자극한 후 72시간 후에 검출하고; 상응하는 녹다운(knockdown) 유전자의 단백질 발현은 내부 참조 단백질로서 β-액틴으로 siRNA 전달 검정에서 검출하였다). 프로토콜은 다음과 같았다:

[0371] 1) 단백질 샘플의 수집 및 BCA 방법에 의한 농도의 결정.

[0372] A. 배지를 폐기하고 12-웰 플레이트의 각각의 웰에 1 mL PBS 완충제를 첨가하여 세포를 1회 세척하고, 각각의 세포에 100 μL 미리 냉각된 강한 RIPA 용해 완충제를 첨가하고, 피펫 팁으로 세포를 긁어 내고 원심분리관에 옮기고, 얼음 위에 배치하고 20분 동안 유지시켜 용해시키고;

[0373] B. 4℃, 12,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하고, 상청액을 새로운 원심분리관에 옮기고;

[0374] C. BCA 시약 A 및 B (50:1, v/v)를 철저히 혼합하여 BCA 작업 용액을 제조하고;

[0375] D. 25 μL의 새로 제조된 BSA 표준 용액 및 시험될 샘플을 96-웰 플레이트에 첨가하고, 200 μL BCA 작업 용액을 각각의 웰에 첨가하고 잘 혼합하고; 37℃에서 30분 동안 인큐베이션하고;

[0376] E. 자외선 분광광도계 (시너지(Synergy) 4 다기능 마이크로플레이트 판독기)를 사용하여 562 nm에서의 흡광도를 측정하고, 표준 곡선에 따라 샘플의 단백질 농도를 계산하고;

[0377] F. 각각의 샘플의 농도가 동일하도록 RIPA 용해 완충제 및 로딩 완충제로 샘플의 농도를 조정하고;

[0378] G. 95℃에서 10분 동안 변성시켰다.

[0379] 2) 웨스턴 블롯

[0380] A. 겔 제조: 10%의 농도를 가진 분해 겔 (하부 층 겔) 및 5%의 농도를 가진 적층 겔 (상부 층 겔)을 사용하였다. 레인은 15-웰 콤(comb)으로 제조되었으며, 각각의 레인에 동일한 양의 단백질을 로딩하였다;

[0381] B. 단백질 전기영동: 전기영동 완충제를 첨가하고 전기영동을 위해 80 V의 초기 전압을 사용하고; 브로모페놀 블루 염료가 분해 겔에 도달할 때, 전압을 120 V로 증가시키고 브로모페놀 블루 염료가 분해 겔의 바닥에 도달하거나 완전히 빠져 나올 때까지 전기 영동을 계속하였다;

[0382] C. 습식 전달: 어셈블리를 다음 순서로 제조하였다: 전달 패드 (애노드)-스펀지-여과지-겔-PVDF 막-여과지-스펀지-전달 패드 (캐소드); 어셈블리를 설치하고 전체 전달 장치를 4℃ 냉 챔버에 두고; 120분 동안 300 mA에서 정전류 설정하여 전달하였다;

[0383] D. 차단: 전달 후 막을 3% BSA 차단 용액에 배치하고 실온에서 1시간 동안 차단하였다;

[0384] E. 1차 항체 인큐베이션: 차단된 PVDF 막을 하이브리드화 백으로 옮기고, 상응하는 1차 항체를 함유하는 3% BSA 차단 용액을 첨가하고 (1차 항체 정보는 다음과 같았다), 백에서 기포를 제거하고, 4℃에서 밤새 인큐베이션하였다.

[0385] <표 4>

1차 항체	회사	카탈로그 번호	1차 항체의 희석비	2차 항체
피브로넥틴	시그마 알드리치	F7387	1: 2000	M
α-SMA	압캠	ab7817	1:1000	M
GAPDH	프로테인 테크(Protein Tech)	60004-1-lg	1:5000	M
LAMP1	산타 크루즈(Santa Cruze)	sc-20011	1:1000	M
LAMP2	산타 크루즈	sc-18822	1:1000	M
XRN2	산타 크루즈	sc-365258	1:2000	M
CPSF4	프로테인 테크	15023-1-AP	1:1000	R
Ssu72	CST	12816s	1:1000	R
NF-κB	CST	4764S	1:2000	R
β-액틴	시그마 알드리치	A5441	1:5000	M

[0386]

[0387] F. 막 세척: PVDF 막을 꺼내고 막을 매회 10분 동안 TBST로 3회 세척하였다;

[0388] G. 2차 항체 인큐베이션: TBST를 폐기하고, 호스래디시 퍼옥시다제 (HRP) (항저우 리안케 바이오테크놀로지 캄파니, 리미티드(Hangzhou Lianke Biotechnology Co., Ltd.)로부터 구매)와 함께 염소 항-토끼 또는 염소 항-마우스 2차 항체를 함유하는 3% BSA 차단 용액을 첨가하고 (2차 항체의 희석 비는 1:5000이었다), 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다;

[0389] H. 막 세척: 막을 매회 10분 동안 TBST로 3회 세척하였다;

[0390] I. 현상: 웨스턴 현상액 (1:1, V/V, 머크 밀리포어(Merck Millipore), 밀리포어로부터 구매한 ECL 화학발광 현상액)을 준비하고, 준비된 현상액을 단백질에 결합된 막 측면에 균일하게 첨가하고; 플라스틱 랩으로 필름을 조심스럽게 감싸고 현상 후 관찰하였다;

[0391] J. 분석: 이미지(Image) J 소프트웨어를 사용하여 분석을 수행하였다.

[0392] **4. 지질 핵산 혼합물의 생체내 전달 실험**

[0393] **4.1 실험 단계:**

[0394] 1) 지질 핵산 혼합물의 제조: 비등법을 사용하였다. DEPC-처리 용액 중 400 μL HJT-sRNA-m7 (5 nmol) 단일 가닥 RNA에 9 μL 또는 18 μL 지질 조합 (지질 PE (번호 38) & LPC (번호 37) & TG (번호 32), 4:2:3, V/V/V)을 각각 첨가하고, 혼합하고 100℃에서 30분 동안 가열하였다.

[0395] 2) 6-8주령 수컷 C57BL/6J 야생형 마우스에서 RNA의 위내 투여: HJT-sRNA-m7 수용액 또는 지질과 HJT-sRNA-m7의 혼합물 용액을 위관영양 바늘을 사용하여 400 μL/동물 (HJT-sRNA-m7, 5 nmol/동물)에게 투여하였다. 군은 다음과 같았다:

[0396] A. 대조군 (미처리 군): 어떠한 처리도 받지 않은 마우스;

[0397] B. 음성 대조군 (지질 군): 9 μL 지질 조합 (지질 PE (번호 38) & LPC (번호 37) & TG (번호 32), 4:2:3, V/V/V)의 위내 투여;

[0398] C. 자유 섭취군: HJT-sRNA-m7 단일 가닥 RNA 용액의 직접 위내 투여;

[0399] D. 지질 및 핵산 혼합물 군: 지질 조합과 HJT-sRNA-m7 단일 가닥 RNA의 혼합물의 위내 투여.

[0400] 3) 샘플 수집: 위내 투여 후 3시간에, 마우스 전체 폐를 3 mL 트리졸로 용해시키고, 균질화하고 -80℃에서 냉동시켰다.

[0401] 4) 총 RNA 추출:

[0402] A. 3.0 mL 트리졸 용해 완충제를 마우스 폐 조직에 첨가하고, 균질화기로 분쇄하고, 12,000 rpm, 4℃에서 10분 동안 원심분리하여, 균질화되지 못한 조직 침전물을 제거하고;

[0403] B. 200 μl/mL 트리졸의 비율로 클로로포름을 첨가하고, 잘 진탕시켜 혼합하고, 실온에서 15분 동안 유지시켰다.

[0404] C. 12,000 rpm, 4℃에서, 15분 동안 원심분리하고, 상부 수성 상을 또 다른 원심분리관으로 피펫팅하고;

[0405] D. 상기 단계를 반복하고, 동일한 양의 클로로포름을 상부 수성 상에 첨가하고, 잘 혼합하고, 10분 동안 실온에서 유지시키고;

[0406] E. 12,000 rpm, 4℃에서 15분 동안 원심분리하고;

[0407] F. 상부 수성 상을 새로운 EP 관에 흡취하고, 이소프로판올을 0.5 ml/mL 트리졸의 비율로 첨가하고, 혼합하고, 실온에서 5-10분 동안 방치하고;

[0408] G. 12,000 rpm, 4℃에서, 15분 동안 원심분리하고, 상청액을 폐기하고;

[0409] H. 1 mL 75% 에탄올을 첨가하고, 원심분리관을 부드럽게 진탕시키고, 침전물을 현탁시키고;

[0410] I. 12,000 rpm, 4℃에서, 10분 동안 원심분리하고, 상청액을 가능한 한 많이 폐기하고;

[0411] J. 실온에서 5-10분 동안 건조시키고 50 μl DEPC-처리 H_2O로 RNA 샘플을 용해시켰다.

[0412] 5) RT-qPCR에 의한 HJT-sRNA-m7의 존재도의 검출 (SYBR 그린 통용 염색법).

[0413] 달리 명시되지 않는 한, 단일 가닥 HJT-sRNA-m7 용액은 DEPC-처리 수용액 중의 단일 가닥 HJT-sRNA-m7을 지칭한다. 이중 가닥 HJT-sRNA-m7 용액은 DEPC-처리 수용액 중의 이중 가닥 HJT-sRNA-m7을 지칭한다.

[0414] **실시예 1-1: 상이한 유형의 지질 조합에 의한 MRC-5 세포내로의 단일 가닥 핵산의 전달**

[0415] 1. 실험군:

[0416] 1) 미처리 군: 미처리된 MRC-5 세포;

[0417] 2) RNAiMAX 처리군: 2 μl RNAiMAX 형질감염 시약 및 DEPC-처리 수용액 중의 단일 가닥 HJT-sRNA-m7을 100 μl opti-MEM 배지에 각각 희석한 다음에, 상기 둘을 혼합하고, 15분 동안 방치하고, 세포내로 첨가한 다음에, 혼합하였다. 단일 가닥 HJT-sRNA-m7의 최종 농도는 200 nM이었다;

[0418] 3) 자유 섭취군: 단일 가닥 HJT-sRNA-m7 용액을 직접 첨가하였다 (최종 농도는 200 nM이었다);

[0419] 4) 지질 핵산 혼합물: 비등법에 의해 처리된 3 μL 단일 지질 또는 지질 조합 및 HJT-sRNA-m7 단일 가닥 핵산 용액의 혼합물을 세포에 첨가하고 혼합하였다. RNA의 최종 농도는 200 nM이었다.

[0420] 2. 실험 절차

[0421] 1) 비등법 조건: 100 μL 단일 가닥 HJT-sRNA-m7 용액에 클로로포름 용액 중 3 μL 단일 지질 또는 지질 조합 (5 mg/mL의 농도를 갖는 클로로포름 용액 중 지질 번호 1/2/4/9/14/18/19/20/21/22/23/24/25/26/27/28/29/30/32, 10 mg/mL의 농도를 갖는 클로로포름 용액 중 지질 번호 3/8/10/11/12/13/33/34/35/36, 1 mg/mL의 농도를 갖는 클로로포름 용액 중 지질 번호 6/15/16/17/31)을 첨가하고, 100℃에서 30분 동안 가열하였다;

[0422] a) 지질 조합:

[0423] b) MG (모노글리세리드): 3 μL 지질 번호 34;

[0424] c) DG (디글리세리드): 클로로포름 용액 중 지질 번호 1/2/3/19/35의 동일한 부피의 3 μL 혼합물;

[0425] d) TG (트리글리세리드): 클로로포름 용액 중 지질 번호 6/9/10/13/15/16/18/20/21/22/23/24/25/26/27/28/32/33의 동일한 부피의 3 μL 혼합물;

[0426] e) LPC (리소포스파티딜콜린): 클로로포름 용액 중 지질 번호 36/37의 동일한 부피의 3 μL 혼합물;

[0427] f) PC (포스파티딜콜린): 클로로포름 용액 중 지질 번호 11/12의 동일한 부피의 3 μL 혼합물;

[0428] g) PE (포스파티딜에탄올아민): 클로로포름 용액 중 지질 번호 8/38의 동일한 부피의 3 μL 혼합물;

[0429] h) Cer (세라미드): 클로로포름 용액 중 지질 번호 4/14의 동일한 부피의 3 μL 혼합물;

[0430] i) So (스핑고신): 클로로포름 용액 중 지질 번호 17/30/31의 동일한 부피의 3 μL 혼합물;

[0431] j) FA (지방산): 3 μL 지질 번호 29;

[0432] k) 혼합물: 클로로포름 용액 중 지질 번호 1-36 (번호 5/7 없이)의 동일한 부피의 3 μL 혼합물;

[0433] l) 혼합물 1: 클로로포름 용액 중 지질 번호 1-36 (번호 5/7/34 없이)의 동일한 부피의 3 μL 혼합물;

[0434] m) 혼합물 2: 클로로포름 용액 중 지질 번호 1-36 (번호 5/7/1/2/3/19/35 없이)의 동일한 부피의 3 μL 혼합물;

[0435] n) 혼합물 3: 클로로포름 용액 중 지질 번호 1-36 (번호 5/7/6/9/10/13/15/16/18/20/21/22/23/24/25/26/27/28/32/33 없이)의 동일한 부피의 3 μL 혼합물;

[0436] o) 혼합물 4: 클로로포름 용액 중 지질 번호 1-36 (번호 5/7/36/37 없이)의 동일한 부피의 3 μL 혼합물;

[0437] p) 혼합물 5: 클로로포름 용액 중 지질 번호 1-36 (번호 5/7/11/12 없이)의 동일한 부피의 3 μL 혼합물;

[0438] q) 혼합물 6: 클로로포름 용액 중 지질 번호 1-36 (번호 5/7/8 없이)의 동일한 부피의 3 μL 혼합물;

[0439] r) 혼합물 7: 클로로포름 용액 중 지질 번호 1-36 (번호 5/7/4/14 없이)의 동일한 부피의 3 μL 혼합물;

[0440] s) 혼합물 8: 클로로포름 용액 중 지질 번호 1-36 (번호 5/7/29 없이)의 동일한 부피의 3 μL 혼합물;

[0441] 2) 실험 조건: HJT-sRNA-m7의 최종 농도는 200 nM이었다. 세포에 첨가된 지 12시간 후, 세포에 진입한 HJT-sRNA-m7의 양을 RT-qPCR 방법 (SYBR 그린 통용 염색법)에 의해 검출하였다. 프로토콜에 대해서, "지질에 의해 전달된 핵산의 세포내 발현의 실시간 정량적 PCR 검출"을 참조한다. 실험을 모두 삼중으로 수행하였다.

[0442] **결론:** 결과는 상기 지질 조합이 자유 섭취군과 비교하여 핵산을 세포내로 전달하는데 모두 효과적이고 (도 16 참조), 임상 환경에서 핵산 약물의 전달 효율을 개선시킬 가능성을 가짐을 나타냈다. 혼합물 2, 혼합물 3, 혼합물 5, 혼합물 7에 의해 매개된 핵산은 더 많은 양으로 MRC-5 세포에 진입하였다.

[0443] **실시예 1-2: 지질 조합에 의한 MRC-5 세포 및 Caco-2 세포내로의 단일 가닥 핵산의 전달**

[0444] 1. 실험군:

[0445] 시험될 세포는 MRC-5 세포 및 Caco-2 세포이었다.

[0446] 1) 미처리 군: 미처리된 세포;

[0447] 2) RNAiMAX 처리군: 2 μl RNAiMAX 형질감염 시약 및 단일 가닥 HJT-sRNA-m7 용액을 100 μl opti-MEM 배지에 각각 희석하고, 상기 둘을 혼합하고, 15분 동안 방치하고, 세포내로 첨가한 다음에, 혼합하였다. 단일 가닥 HJT-sRNA-m7의 최종 농도는 200 nM이었다;

[0448] 3) 자유 섭취군: 단일 가닥 HJT-sRNA-m7 용액을 직접 첨가하였다 (최종 농도는 200 nM이었다);

[0449] 4) 단일 지질 및 핵산 처리군: 비등법에 의해 처리된 3 μL 단일 지질 (번호 1 또는 8 또는 12)과 HJT-sRNA-m7 단일 가닥 핵산 용액의 혼합물을 세포에 첨가하고, 혼합하고, RNA의 최종 농도는 200 nM이었다;

[0450] 5) 지질 조합 혼합물 및 핵산 혼합물 처리군: 비등법에 의해 처리된 3 μL 지질 조합 (동일한 부피로 혼합된 번호 1/8/12)과 HJT-sRNA-m7 단일 가닥 핵산 용액의 혼합물을 세포에 첨가하고, 혼합하고, RNA의 최종 농도는 200 nM이었다;

[0451] 6) 지질 조합 및 핵산 혼합물 처리군: 비등법에 의해 처리된 3 μL 지질 조합 (2 μL 단일 지질 번호 1 또는 번호 8 또는 번호 12 및 1 μL의 하기 유형의 지질 (MG, DG, TG, LPC, Cer, So, 또는 FA)의 혼합물)과 HJT-sRNA-m7 단일 가닥 핵산 용액의 혼합물을 세포에 첨가하고, 혼합하고, RNA의 최종 농도는 200 nM이었다. 도 17a 및 17b에서, 처리군을 번호 1 2 μL+혼합물 1 μL, 번호 8 2 μL+혼합물 1 μL, 및 번호 12 2 μL+혼합물 1 μL로서 집합적으로 나타냈으며, 여기서, 수평선 내에, MG는 번호 1 또는 번호 8 또는 번호 12+1 μL MG의 2 μL 단일 지질을 나타냈고, DG는 번호 1 또는 번호 8 또는 번호 12+1 μL DG의 2 μL 단일 지질을 나타냈고, TG는 번호 1 또는 번호 8 또는 번호 12+1 μL TG의 2 μL 단일 지질을 나타냈고, LPC는 번호 1 또는 번호 8 또는 번호 12+1 μL LPC의 2 μL 단일 지질을 나타냈고, Cer는 번호 1 또는 번호 8 또는 번호 12+1 μL Cer의 2 μL 단일 지질을 나타냈고, So는 번호 1 또는 번호 8 또는 번호 12+1 μL So의 2 μL 단일 지질을 나타냈고, FA는 번호 1 또는 번호 8 또는 번호 12+1 μL FA의 2 μL 단일 지질을 나타냈다.

[0452] 2. 실험 절차

[0453] 1) 비등법의 조건: 100 μL 단일 가닥 HJT-sRNA-m7 용액에 3 μL 단일 지질 (5 mg/mL의 농도를 갖는 클로로포름 용액 중 지질 번호 1, 10 mg/mL의 농도를 갖는 클로로포름 용액 중 지질 번호 8/12) 또는 지질 조합을 첨가하고, 100℃에서 30분 동안 가열하였다;

[0454] MG (모노글리세리드): 2 μL 지질 번호 34;

[0455] DG (디글리세리드): 클로로포름 용액 중 지질 번호 1/2/3/19/35의 동일한 부피의 2 μL 혼합물;

[0456] TG (트리글리세리드): 클로로포름 용액 중 지질 번호 6/9/10/13/15/16/18/20/21/22/23/24/25/26/27/28/32/33의 동일한 부피의 2 μL 혼합물;

[0457] LPC (리소포스파티딜콜린): 클로로포름 용액 중 지질 번호 36/37의 동일한 부피의 2 μL 혼합물;

[0458] Cer (세라미드): 클로로포름 용액 중 지질 번호 4/14의 동일한 부피의 2 μL 혼합물;

[0459] So (스핑고신): 클로로포름 용액 중 지질 번호 17/30/31의 동일한 부피의 2 μL 혼합물;

[0460] FA (지방산): 2 μL 지질 번호 29;

[0461] 2) 실험 조건: HJT-sRNA-m7의 최종 농도는 200 nM이었다. 세포에 첨가된 지 24시간 후, 세포에 진입한 HJT-sRNA-m7의 양을 RT-qPCR 방법 (SYBR 그린 통용 염색법)에 의해 검출하였다. 프로토콜에 대해서, "지질에 의해 전달된 핵산의 세포내 발현의 실시간 정량적 PCR 검출"을 참조한다. 모든 실험을 삼중으로 수행하였다.

[0462] **결론:** 결과는 MRC-5 세포에 대해, 혼합물 (동일한 부피로 혼합된 번호 1/8/12), 번호 1 2 μL+번호 8 1 μL, 번호 1 2 μL+번호 12 1 μL, 번호 1 2 μL+MG 1 μL, 번호 8 2 μL+MG 1 μL, 번호 12 2 μL+번호 8 1 μL, 및 번호 12 2 μL+So 1 μL가, 핵산을 더 효율적으로 전달했음을 나타냈다.

[0463] Caco-2 세포에 대해, 혼합물 (동일한 부피의 번호 1/8/12), 번호 1 2 μL+번호 8 1 μL, 번호 1 2 μL+번호 12 1 μL, 번호 1 2 μL+MG 1 μL, 번호 8 2 μL+MG 1 μL, 번호 12 2 μL+번호 8 1 μL, 번호 12 2 μL+LPC 1 μL 및 번호 12 2 μL+So 1 μL이, 핵산을 더 효율적으로 전달하였다.

[0464] **실시예 1-3: 지질 조합에 의한 세포내로의 단일 가닥 핵산의 전달**

[0465] 세포 유형: A549, MRC-5 및 Caco-2 세포.

[0466] 1. 실험군:

[0467] 1) 미처리 군: 미처리된 세포;

[0468] 2) RNAiMAX 처리군: 2 μl RNAiMAX 형질감염 시약 및 단일 가닥 HJT-sRNA-m7 용액을 100 μl opti-MEM 배지에 각각 희석한 다음에, 상기 둘을 혼합하고, 15분 동안 방치하고, 세포내로 첨가한 다음에, 혼합하였다. 단일 가닥 HJT-sRNA-m7의 최종 농도는 100 nM이었다;

[0469] 3) 자유 섭취군: 단일 가닥 HJT-sRNA-m7 용액을 직접 첨가하였다 (최종 농도는 100 nM이었다);

[0470] 4) 단일 지질 및 핵산에 의한 처리군: 비등법에 의해 처리된 3 μL 단일 지질 (번호 8 또는 번호 12)과 HJT-sRNA-m7 단일 가닥 핵산 용액의 혼합물을 세포에 첨가하고 혼합하고, RNA의 최종 농도는 100 nM이었다;

[0471] 5) 지질 조합 PC (번호 12) & PE (번호 8) 및 핵산 혼합물에 의한 처리군: 비등법에 의해 처리된 2.25 μL 지질 조합 (PC (번호 12) & PE (번호 8), 2:1, V/V)과 HJT-sRNA-m7 단일 가닥 핵산 용액의 혼합물을 세포에 첨가하고 혼합하고, RNA의 최종 농도는 100 nM이었다;

[0472] 6) 지질 조합 및 핵산 혼합물에 의한 처리군: 비등법에 의해 처리된 3 μL 지질 조합 (2.25 μL 지질 조합 PC (번호 12) & PE (번호 8) 및 0.75 μL의 하기 유형의 지질, DG, TG, LPC, PC, Cer, So 또는 FA의 혼합물)과 HJT-sRNA-m7 단일 가닥 핵산 용액의 혼합물을 세포에 첨가하고 혼합하고, RNA의 최종 농도는 100 nM이었다. 도 18에서, 혼합물 처리군은 "2.25 μL+0.75 μL" 위의 수평선 내의 처리군에 상응한다.

[0473] 2. 실험 절차

[0474] 1) 비등법 조건: 100 μL 단일 가닥 HJT-sRNA-m7 용액에 단일 지질 (10 mg/mL의 농도를 갖는 클로로포름 용액 중 지질 번호 8/12) 또는 지질 조합을 첨가하고, 100℃에서 30분 동안 가열하였다;

[0475] DG (디글리세리드): 클로로포름 용액 중 지질 번호 1/2의 동일한 부피의 0.75 μL 혼합물;

[0476] TG (트리글리세리드): 클로로포름 용액 중 0.75 μL 지질 번호 15;

[0477] LPC (리소포스파티딜콜린): 클로로포름 용액 중 지질 번호 36/37의 동일한 부피의 0.75 μL 혼합물;

[0478] PC (리소포스파티딜콜린): 클로로포름 용액 중 0.75 μL 지질 번호 12;

[0479] Cer (세라미드): 클로로포름 용액 중 0.75 μL 지질 번호 4;

[0480] So (스핑고신): 클로로포름 용액 중 0.75 μL 지질 번호 31;

[0481] FA (지방산): 0.75 μL 지질 번호 29;

[0482] 2) 실험 조건: HJT-sRNA-m7의 최종 농도는 100 nM이었다. 세포에 첨가된 지 24시간 후, 세포에 진입한 HJT-sRNA-m7의 양을 RT-qPCR 방법 (SYBR 그린 통용 염색법)에 의해 검출하였다. 프로토콜에 대해서, "지질에 의해 전달된 핵산의 세포내 발현의 실시간 정량적 PCR 검출"을 참조한다. 모든 실험을 삼중으로 수행하였다.

[0483] **결론:** 결과는 상기 단일 지질 및 지질 조합이 자유 섭취군과 비교하여 핵산을 세포내로 전달하는데 효과적이고 (도 18 참조), 임상 환경에서 핵산 약물의 전달 효율을 개선시킬 가능성을 가짐을 나타냈다.

[0484] A549, MRC-5 및 Caco-2 세포에 대해, 2.25 μL PC (번호 12) & PE (번호 8)+0.75 μL DG (클로로포름 용액 중 지질 번호 1/2의 동일한 부피의 혼합물)는 최선의 전달 효율을 달성하였다.

[0485] **실시예 1-4: 지질 조합에 의한 세포내로의 단일 가닥 핵산의 전달**

[0486] 세포 유형: A549, MRC-5 및 Caco-2 세포.

[0487] 1. 실험군:

[0488] 1) 미처리 군: 미처리된 세포;

[0489] 2) RNAiMAX 처리군: 2 μl RNAiMAX 형질감염 시약 및 단일 가닥 HJT-sRNA-m7 용액을 100 μl opti-MEM 배지에 각각 희석한 다음에, 상기 둘을 혼합하고, 15분 동안 방치하고, 세포내로 첨가한 다음에, 혼합하였다. 단일 가닥 HJT-sRNA-m7의 최종 농도는 100 nM이었다;

[0490] 3) 자유 섭취군: 단일 가닥 HJT-sRNA-m7 용액을 직접 첨가하였다 (최종 농도는 100 nM이었다);

[0491] 4) 단일 지질 및 핵산의 처리군: 비등법에 의해 처리된 3 μL 단일 지질 (번호 8 또는 번호 12)과 HJT-sRNA-m7 단일 가닥 핵산 용액의 혼합물을 세포에 첨가하고 혼합하고, RNA의 최종 농도는 100 nM이었다;

[0492] 5) 지질 조합 DG (번호 1) & PE (번호 8) & PC (번호 12) 및 핵산 혼합물의 처리군: 비등법에 의해 처리된 3 μL 지질 조합 (DG (번호 1) & PE (번호 8) & PC (번호 12), 1:1:1, V/V/V)과 HJT-sRNA-m7 단일 가닥 핵산 용액의 혼합물을 세포에 첨가하고 혼합하고, RNA의 최종 농도는 100 nM이었다;

[0493] 6) 지질 조합 및 핵산 혼합물의 처리군: 비등법에 의해 처리된 3 μL 지질 조합 (2 μL 지질 조합 DG (번호 1) & PE (번호 8) & PC (번호 12)과및 1 μL의 하기 유형의 지질, DG, TG, LPC, PC, Cer, So 또는 FA의 혼합물)과 HJT-sRNA-m7 단일 가닥 핵산 용액의 혼합물을 세포에 첨가하고 혼합하고, RNA의 최종 농도는 100 nM이었다. 도 19에서, 혼합물 처리군은 2 μL 지질 조합 DG (번호 1) & PE (번호 8) & PC (번호 12)) +1 μL 위의 수평선 내의 처리군에 상응한다.

[0494] 2. 실험 절차

[0495] 1) 비등법 조건: 100 μL 단일 가닥 HJT-sRNA-m7 용액에 3 μL 단일 지질 (5 mg/mL의 농도를 갖는 클로로포름 용액 중 지질 번호 1, 10 mg/mL의 농도를 갖는 클로로포름 용액 중 지질 번호 8/12) 또는 지질 조합을 첨가하고, 100℃에서 30분 동안 가열하였다;

[0496] DG (디글리세리드): 클로로포름 용액 중 지질 번호 1/2의 동일한 부피의 1 μL 혼합물;

[0497] TG (트리글리세리드): 클로로포름 용액 중 1 μL 지질 번호 15;

[0498] LPC (리소포스파티딜콜린): 클로로포름 용액 중 지질 번호 36/37의 동일한 부피의 1 μL 혼합물;

[0499] PC (리소포스파티딜콜린): 클로로포름 용액 중 1 μL 지질 번호 12;

[0500] Cer (세라미드): 클로로포름 용액 중 1 μL 지질 번호 4;

[0501] So (스핑고신): 클로로포름 용액 중 1 μL 지질 번호 31;

[0502] FA (지방산): 1 μL 지질 번호 29;

[0503] 2) 실험 조건: HJT-sRNA-m7의 최종 농도는 100 nM이었다. 세포에 첨가된 지 24시간 후, HJT-sRNA-m7의 양을 RT-qPCR 방법 (SYBR 그린 통용 염색법)에 의해 검출하였다. 프로토콜에 대해서, "지질에 의해 전달된 핵산의 세포내 발현의 실시간 정량적 PCR 검출"을 참조한다. 모든 실험을 삼중으로 수행하였다.

[0504] **결론:** 결과는 상기 지질 조합이 자유 섭취군과 비교하여 핵산을 세포내로 전달하는데 효과적이고 (도 19 참조), 임상 환경에서 핵산 약물의 전달 효율을 개선시킬 가능성을 가짐을 나타냈다.

[0505] A549, MRC-5 및 Caco-2 세포에 대해, 2 μL DG (번호 1) & PE (번호 8) & PC (번호 12)+1 μL TG (번호 15)는 최선의 전달 효율을 달성하였다.

[0506] **실시예 1-5: 지질 조합에 의한 세포내로의 단일 가닥 핵산의 전달**

[0507] 세포 유형: A549, MRC-5 및 Caco-2 세포.

[0508] 1. 실험군:

[0509] 1) 미처리 군: 미처리된 세포;

[0510] 2) RNAiMAX 처리군: 2 μl RNAiMAX 형질감염 시약 및 단일 가닥 HJT-sRNA-m7 용액을 100 μl opti-MEM 배지에 각각 희석한 다음에, 상기 둘을 혼합하고, 15분 동안 방치하고, 세포내로 첨가한 다음에, 혼합하였다. 단일 가닥 HJT-sRNA-m7의 최종 농도는 100 nM이었다;

[0511] 3) 자유 섭취군: 단일 가닥 HJT-sRNA-m7 용액을 직접 첨가하였다 (최종 농도는 100 nM이었다);

[0512] 4) 단일 지질 및 핵산의 처리군: 비등법에 의해 처리된 3 μL 단일 지질의 번호 8과 HJT-sRNA-m7 단일 가닥 핵산 용액의 혼합물을 세포에 첨가하고, 혼합하고, RNA의 최종 농도는 100 nM이었다;

[0513] 5) 지질 조합 PE (번호 8) & MG (번호 34) 및 핵산 혼합물의 처리군: 비등법에 의해 처리된 2.25 μL 지질 조합 (PE (번호 8) & MG (번호 34), 2:1, V/V)과 HJT-sRNA-m7 단일 가닥 핵산 용액의 혼합물을 세포에 첨가하고, 혼

합하고, RNA의 최종 농도는 100 nM이었다;

[0514] 6) 지질 조합 및 핵산 혼합물의 처리군: 비등법에 의해 처리된 3 μL 지질 조합 (2.25 μL 지질 조합 PE (번호 8) & MG (번호 34)과 0.75 μL의 하기 유형의 지질, DG, TG, LPC, PC, Cer, So 또는 FA의 혼합물)과 HJT-sRNA-m7 단일 가닥 핵산 용액의 혼합물을 세포에 첨가하고 혼합하고, RNA의 최종 농도는 100 nM이었다. 도 20에서, 혼합물 처리군은 "2.25 μL [지질 조합 PE (번호 8) & MG (번호 34)]+0.75 μL"위의 수평선 내의 처리군에 상응한다.

[0515] 2. 실험 절차

[0516] 1) 비등법 조건: 100 μL 단일 가닥 HJT-sRNA-m7 용액에 단일 지질 (클로로포름 용액 중 10 mg/mL의 농도를 갖는 지질 번호 8) 또는 지질 조합을 첨가하고, 100℃에서 30분 동안 가열하였다;

[0517] DG (디글리세리드): 클로로포름 용액 중 지질 번호 1/2의 동일한 부피의 0.75 μL 혼합물;

[0518] TG (트리글리세리드): 클로로포름 용액 중 0.75 μL 지질 번호 15 ;

[0519] LPC (리소포스파티딜콜린): 클로로포름 용액 중 지질 번호 36/37의 동일한 부피의 0.75 μL 혼합물;

[0520] PC (리소포스파티딜콜린): 클로로포름 용액 중 0.75 μL 지질 번호 12;

[0521] Cer (세라미드): 클로로포름 용액 중 0.75 μL 지질 번호 4;

[0522] So (스핑고신): 클로로포름 용액 중 0.75 μL 지질 번호 31;

[0523] FA (지방산): 0.75 μL 지질 번호 29;

[0524] 2) 실험 조건: HJT-sRNA-m7의 최종 농도는 100 nM이었다. 세포에 첨가된 지 24시간 후, 세포에 진입된 HJT-sRNA-m7의 양을 RT-qPCR 방법 (SYBR 그린 통용 염색법)에 의해 검출하였다. 프로토콜에 대해서, "지질에 의해 전달된 핵산의 세포내 발현의 실시간 정량적 PCR 검출"을 참조한다. 모든 실험을 삼중으로 수행하였다.

[0525] **결론:** 결과는 상기 단일 지질 및 지질 조합이 자유 섭취군과 비교하여 핵산을 세포내로 전달하는데 효과적이고 (도 20 참조), 임상 환경에서 핵산 약물의 전달 효율을 개선시킬 가능성을 가짐을 나타냈다.

[0526] A549, MRC-5 및 Caco-2 세포에 대해, 2.25 μL PE (번호 8) & MG (번호 34)+0.75 μL So (번호 31)는 최선의 전달 효율을 달성하였다.

[0527] **실시예 1-6: 지질 조합에 의한 A549 세포내로의 단일 가닥 핵산의 전달**

[0528] 1. 실험군:

[0529] 1) 미처리 군: 미처리된 A549 세포;

[0530] 2) RNAiMAX 처리군: 2 μl RNAiMAX 형질감염 시약 및 단일 가닥 HJT-sRNA-m7 용액을 100 μl opti-MEM 배지에 각각 희석한 다음에, 상기 둘을 혼합하고, 15분 동안 방치하고, 세포내로 첨가한 다음에, 혼합하였다. 단일 가닥 HJT-sRNA-m7의 최종 농도는 100 nM이었다;

[0531] 3) 자유 섭취군: 단일 가닥 HJT-sRNA-m7 용액을 직접 첨가하였다 (최종 농도는 100 nM이었다);

[0532] 4) 단일 지질 및 핵산의 처리군: 비등법에 의해 처리된 3 μL 단일 지질 번호 38과 HJT-sRNA-m7 단일 가닥 핵산 용액의 혼합물을 세포에 첨가하고, 혼합하고, RNA의 최종 농도는 100 nM이었다;

[0533] 5) 지질 조합 및 핵산 혼합물의 처리군: 비등법에 의해 처리된 3 μL 지질 조합 (2 μL 단일 지질 번호 38과 1 μL의 하기 유형의 지질, MG, DG, TG, LPC, PC, PE, Cer, So 또는 FA의 혼합물)과 HJT-sRNA-m7 단일 가닥 핵산 용액의 혼합물을 세포에 첨가하고 혼합하고, RNA의 최종 농도는 100 nM이었다;

[0534] 2. 실험 절차

[0535] 1) 비등법 조건: 100 μL 단일 가닥 HJT-sRNA-m7 용액에 3 μL 단일 지질 (클로로포름 용액 중 10 mg/mL의 농도를 갖는 지질 번호 38) 또는 지질 조합을 첨가하고, 100℃에서 30분 동안 가열하였다;

[0536] MG (모노글리세리드): 1 μL 지질 번호 34;

[0537] DG (디글리세리드): 클로로포름 용액 중 1 μL 지질 번호 1;

[0538] TG (트리글리세리드): 클로로포름 용액 중 1 μL 지질 번호 15;

[0539] LPC (리소포스파티딜콜린): 클로로포름 용액 중 1 μL 지질 번호 37;

[0540] PC (리소포스파티딜콜린): 클로로포름 용액 중 1 μL 지질 번호 12 클로로포름 용액 중;

[0541] PE (포스파티딜에탄올아민): 클로로포름 용액 중 1 μL 지질 번호 8;

[0542] Cer (세라미드): 클로로포름 용액 중 1 μL 지질 번호 4;

[0543] So (스핑고신): 클로로포름 용액 중 1 μL 지질 번호 31;

[0544] FA (지방산): 클로로포름 용액 중 1 μL 지질 번호 29;

[0545] 2) 실험 조건: HJT-sRNA-m7의 최종 농도는 100 nM이었다. 세포에 첨가된 지 24시간 후, 세포에 진입한 HJT-sRNA-m7의 양을 RT-qPCR 방법 (SYBR 그린 통용 염색법)에 의해 검출하였다. 프로토콜에 대해서, "지질에 의해 전달된 핵산의 세포내 발현의 실시간 정량적 PCR 검출"을 참조한다. 모든 실험을 삼중으로 수행하였다.

[0546] **결론:** 결과는 A549 세포에 대해, 상기 2 μL 단일 지질 번호 38 및 1 μL LPC (번호 37), TG (번호 15), PC (번호 12), DG (번호 1)가 자유 섭취군과 비교하여 핵산을 세포내로 전달하는데 효과적임을 나타냈다 (도 21 참조).

[0547] **실시예 1-7: 지질 조합에 의한 A549 세포내로의 단일 가닥 핵산의 전달**

[0548] 1. 실험군:

[0549] 1) 미처리 군: 미처리된 A549 세포;

[0550] 2) RNAiMAX 처리군: 2 μl RNAiMAX 형질감염 시약 및 단일 가닥 HJT-sRNA-m7 용액을 100 μl opti-MEM 배지에 각각 희석한 다음에, 상기 둘을 혼합하고, 15분 동안 방치하고, 세포내로 첨가한 다음에, 혼합하였다. 단일 가닥 HJT-sRNA-m7의 최종 농도는 100 nM이었다;

[0551] 3) 자유 섭취군: 단일 가닥 HJT-sRNA-m7 용액을 직접 첨가하였다 (최종 농도는 100 nM이었다);

[0552] 4) 지질 조합 DG (번호 1) & PE (번호 38) & PC (번호 12) 및 핵산 혼합물의 처리군: 비등법에 의해 처리된 3 μL 지질 조합 (DG (번호 1) & PE (번호 38) & PC (번호 12), 1:1:1, V/V/V) 및 HJT-sRNA-m7 단일 가닥 핵산 용액의 혼합물을 세포에 첨가하고 혼합하고, RNA의 최종 농도는 100 nM이었다;

[0553] 5) 지질 조합 및 핵산 혼합물의 처리군: 3 μL 지질 조합 (2 μL 지질 조합 DG (번호 1) & PE (번호 38) & PC (번호 12)과 1 μL의 하기 유형의 지질, MG, TG, LPC, PE, Cer, So 또는 FA의 혼합물)과 비등법에 의해 처리된 HJT-sRNA-m7 단일 가닥 핵산 용액의 혼합물을 세포에 첨가하고 혼합하고, RNA의 최종 농도는 100 nM이었다.

[0554] 2. 실험 절차

[0555] 1) 비등법 조건: 100 μL 단일 가닥 HJT-sRNA-m7 용액에 3 μL 지질 조합을 첨가하고, 100℃에서 30분 동안 가열하였다;

[0556] MG (모노글리세리드): 1 μL 지질 번호 34;

[0557] TG (트리글리세리드): 클로로포름 용액 중 1 μL 지질 번호 15;

[0558] LPC (리소포스파티딜콜린): 클로로포름 용액 중 1 μL 지질 번호 37;

[0559] PE (포스파티딜에탄올아민): 클로로포름 용액 중 1 μL 지질 번호 8;

[0560] Cer (세라미드): 클로로포름 용액 중 1 μL 지질 번호 4;

[0561] So (스핑고신): 클로로포름 용액 중 1 μL 지질 번호 31;

[0562] FA (지방산): 클로로포름 용액 중 1 μL 지질 번호 29;

[0563] 2) 실험 조건: HJT-sRNA-m7의 최종 농도는 100 nM이었다. 세포에 첨가된 지 24시간 후, HJT-sRNA-m7의 양을 RT-qPCR 방법 (SYBR 그린 통용 염색법)에 의해 검출하였다. 프로토콜에 대해서, "지질에 의해 전달된 핵산의 세포내 발현의 실시간 정량적 PCR 검출"을 참조한다. 모든 실험을 삼중으로 수행하였다.

[0564] **결론:** 결과는 상기 2 μL 지질 조합 DG (번호 1) & PE (번호 38) & PC (번호 12) 및 1 μL TG (번호 15), Cer

(번호 4), So (번호 31), FA (번호 29), LPC (번호 37), PE (번호 8)가 자유 섭취군과 비교하여 핵산을 A549 세포내로 전달하는데 모두 효과적이고 (도 22 참조), 임상 환경에서 핵산 약물의 전달 효율을 개선시킬 가능성을 가짐을 나타냈다.

[0565] **실시예 1-8: 지질 조합에 의한 A549 세포내로의 단일 가닥 핵산의 전달**

[0566] 1. 실험군:

[0567] 1) 미처리 군: 미처리된 A549 세포;

[0568] 2) RNAiMAX 처리군: 2 μl RNAiMAX 형질감염 시약 및 단일 가닥 HJT-sRNA-m7 용액을 100 μl opti-MEM 배지에 각각 희석한 다음에, 상기 둘을 혼합하고, 15분 동안 방치하고, 세포내로 첨가한 다음에, 혼합하였다. 단일 가닥 HJT-sRNA-m7의 최종 농도는 100 nM이었다;

[0569] 3) 자유 섭취군: 단일 가닥 HJT-sRNA-m7 용액을 직접 첨가하였다 (최종 농도는 100 nM이었다);

[0570] 4) 지질 조합 PE (번호 38) & MG (번호 34) 및 핵산 혼합물의 처리군: 비등법에 의해 처리된 3 μL 지질 조합 (PE (번호 38) & MG (번호 34), 2:1, V/V)과 HJT-sRNA-m7 단일 가닥 핵산 용액의 혼합물을 세포에 첨가하고 혼합하고, RNA의 최종 농도는 100 nM이었다;

[0571] 5) 지질 조합 및 핵산 혼합물의 처리군: 비등법에 의해 처리된 3 μL 지질 조합 (2 μL 지질 조합 PE (번호 38) & MG (번호 34)과 1 μL의 하기 유형의 지질, DG, TG, LPC, PC, PE, Cer, So 또는 FA의 혼합물)과 HJT-sRNA-m7 단일 가닥 핵산 용액의 혼합물을 세포에 첨가하고 혼합하고, RNA의 최종 농도는 100 nM이었다;

[0572] 2. 실험 절차

[0573] 1) 비등법 조건: 100 μL 단일 가닥 HJT-sRNA-m7 용액에 3 μL 지질 조합을 첨가하고, 100℃에서 30분 동안 가열하였다;

[0574] DG (디글리세리드): 클로로포름 용액 중 1 μL 지질 번호 1;

[0575] TG (트리글리세리드): 클로로포름 용액 중 1 μL 지질 번호 15;

[0576] LPC (리소포스파티딜콜린): 클로로포름 용액 중 1 μL 지질 번호 37;

[0577] PC (포스파티딜콜린): 클로로포름 용액 중 1 μL 지질 번호 12;

[0578] PE (포스파티딜에탄올아민): 클로로포름 용액 중 1 μL 지질 번호 8;

[0579] Cer (세라미드): 클로로포름 용액 중 1 μL 지질 번호 4;

[0580] So (스핑고신): 클로로포름 용액 중 1 μL 지질 번호 31;

[0581] FA (지방산): 클로로포름 용액 중 1 μL 지질 번호 29;

[0582] 2) 실험 조건: HJT-sRNA-m7의 최종 농도는 100 nM이었다. 세포에 첨가된 지 24시간 후, HJT-sRNA-m7의 양을 RT-qPCR 방법 (SYBR 그린 통용 염색법)에 의해 검출하였다. 프로토콜에 대해서, "지질에 의해 전달된 핵산의 세포내 발현의 실시간 정량적 PCR 검출"을 참조한다. 모든 실험을 삼중으로 수행하였다.

[0583] **결론:** 결과는 상기 지질 조합이 핵산을 세포내로 전달하는데 모두 효과적이고 (도 23 참조), 임상 환경에서 핵산 약물의 전달 효율을 개선시킬 가능성을 갖고, 여기서 2 μL 지질 조합 PE (번호 38) & MG (번호 34) 및 1 μL LPC (번호 37)가 최선의 전달 효과를 달성함을 나타냈다.

[0584] **실시예 1-9: 지질 조합에 의한 A549 세포내로의 단일 가닥 핵산의 전달**

[0585] 1. 실험군:

[0586] 1) 미처리 군: 미처리된 세포;

[0587] 2) RNAiMAX 처리군: 2 μl RNAiMAX 형질감염 시약 및 단일 가닥 HJT-sRNA-m7 용액을 100 μl opti-MEM 배지에 각각 희석한 다음에, 상기 둘을 혼합하고, 15분 동안 방치하고, 세포내로 첨가한 다음에, 혼합하였다. 단일 가닥 HJT-sRNA-m7의 최종 농도는 100 nM이었다;

[0588] 3) 자유 섭취군: 단일 가닥 HJT-sRNA-m7 용액을 직접 첨가하였다 (최종 농도는 100 nM이었다);

[0589] 4) 지질 조합 PE (번호 38) & PC (번호 12) 및 핵산 혼합물의 처리군: 비등법에 의해 처리된 3 μL 지질 조합 (PE (번호 38) & PC (번호 12), 2:1, V/V)과 HJT-sRNA-m7 단일 가닥 핵산 용액의 혼합물을 세포에 첨가하고, 혼합하고, RNA의 최종 농도는 100 nM이었다;

[0590] 5) 지질 조합 및 핵산 혼합물의 처리군: 비등법에 의해 처리된 3 μL 지질 조합 (2 μL 지질 조합 PE (번호 38) & PC (번호 12)과 1 μL의 하기 유형의 지질, MG, DG, TG, LPC, PE, Cer, So 또는 FA의 혼합물)과 HJT-sRNA-m7 단일 가닥 핵산 용액의 혼합물을 세포에 첨가하고, 혼합하고, RNA의 최종 농도는 100 nM이었다;

[0591] 2. 실험 절차

[0592] 1) 비등법 조건: 100 μL 단일 가닥 HJT-sRNA-m7 용액에 3 μL 지질 조합을 첨가하고, 100℃에서 30분 동안 가열하였다;

[0593] MG (모노글리세리드): 1 μL 지질 번호 34;

[0594] DG (디글리세리드): 클로로포름 용액 중 1 μL 지질 번호 1;

[0595] TG (트리글리세리드): 클로로포름 용액 중 1 μL 지질 번호 15;

[0596] LPC (리소포스파티딜콜린): 클로로포름 용액 중 1 μL 지질 번호 37;

[0597] PE (포스파티딜에탄올아민): 클로로포름 용액 중 1 μL 지질 번호 8;

[0598] Cer (세라미드): 클로로포름 용액 중 1 μL 지질 번호 4;

[0599] So (스핑고신): 클로로포름 용액 중 1 μL 지질 번호 31;

[0600] FA (지방산): 1 μL 지질 번호 29;

[0601] 2) 실험 조건: HJT-sRNA-m7의 최종 농도는 100 nM이었고, 세포에 첨가된 지 24시간 후, 세포에 진입한 HJT-sRNA-m7의 양을 RT-qPCR 방법 (SYBR 그린 통용 염색법)에 의해 검출하였다. 프로토콜에 대해서, "지질에 의해 전달된 핵산의 세포내 발현의 실시간 정량적 PCR 검출"을 참조한다. 모든 실험을 삼중으로 수행하였다.

[0602] **결론:** 결과는 상기 지질 조합이 핵산을 세포내로 전달하는데 효과적이고 (도24 참조), 임상 환경에서 핵산 약물의 전달 효율을 개선시킬 가능성을 갖고, 여기서 2 μL 지질 조합 PE (번호 38) & PC (번호 12) 및 1 μL Cer (번호 4)가 최선의 효과를 달성함을 나타냈다.

[0603] **실시예 1-10: 지질 조합에 의한 A549 세포내로의 단일 가닥 핵산의 전달**

[0604] 1. 실험군:

[0605] 1) 미처리 군: 미처리된 세포;

[0606] 2) RNAiMAX 처리군: 2 μl RNAiMAX 형질감염 시약 및 단일 가닥 HJT-sRNA-m7 용액을 100 μl opti-MEM 배지에 각각 희석한 다음에, 상기 둘을 혼합하고, 15분 동안 방치하고, 세포내로 첨가한 다음에, 혼합하였다. 단일 가닥 HJT-sRNA-m7의 최종 농도는 100 nM이었다;

[0607] 3) 자유 섭취군: 단일 가닥 HJT-sRNA-m7 용액을 직접 첨가하였다 (최종 농도는 100 nM이었다);

[0608] 4) 지질 조합 PE (번호 38) & PC (번호 12) & DG (번호 1) & TG (번호 15) 및 핵산 혼합물의 처리군: 비등법에 의해 처리된 3 μL 지질 조합 (PE (번호 38) & PC (번호 12) & DG (번호 1) & TG (번호 15), 2:2:2:3, V/V/V/V)과 HJT-sRNA-m7 단일 가닥 핵산 용액의 혼합물을 세포에 첨가하고, 혼합하고, RNA의 최종 농도는 100 nM이었다;

[0609] 5) 지질 조합 및 핵산 혼합물의 처리군: 비등법에 의해 처리된 3 μL 지질 조합 (2.2 μL 지질 조합 PE (번호 38) & PC (번호 12) & DG (번호 1) & TG (번호 15)과 0.8 μL의 하기 유형의 지질, MG, LPC, Cer, So 또는 FA의 혼합물)과 HJT-sRNA-m7 단일 가닥 핵산 용액의 혼합물을 세포에 첨가하고, 혼합하고, RNA의 최종 농도는 100 nM이었다.

[0610] 2. 실험 절차

[0611] 1) 비등법 조건: 100 μL 단일 가닥 HJT-sRNA-m7 용액에 3 μL 지질 조합을 첨가하고, 100℃에서 30분 동안 가열하였다;

[0612] MG (모노글리세리드): 0.8 μL 지질 번호 34;

[0613] LPC (리소포스파티딜콜린): 클로로포름 용액 중 0.8 μL 지질 번호 37;

[0614] Cer (세라미드): 클로로포름 용액 중 0.8 μL 지질 번호 4;

[0615] So (스핑고신): 클로로포름 용액 중 0.8 μL 지질 번호 31;

[0616] FA (지방산): 0.8 μL 지질 번호 29;

[0617] 2) 실험 조건: HJT-sRNA-m7의 최종 농도는 100 nM이었고, 세포에 첨가 후 24시간에, 세포에 진입한 HJT-sRNA-m7의 양을 RT-qPCR 방법 (SYBR 그린 통용 염색법)에 의해 검출하였다. 프로토콜에 대해서, "지질에 의해 전달된 핵산의 세포내 발현의 실시간 정량적 PCR 검출"을 참조한다. 모든 실험을 삼중으로 수행하였다.

[0618] **결론:** 결과는 상기 지질 조합이 핵산을 세포내로 전달하는데 효과적이고 (도 25 참조), 여기서 2.2 μL 지질 조합 PE (번호 38) & PC (번호 12) & DG (번호 1) & TG (번호 15), 2.2 μL 지질 조합 PE (번호 38) & PC (번호 12) & DG (번호 1) & TG (번호 15) 및 0.8 μL LPC (번호 37) 또는 So (번호 31)는 상대적으로 더 양호한 전달 효율을 달성함을 나타냈다.

[0619] **실시예 1-11: 지질 조합에 의한 A549 세포내로의 단일 가닥 핵산의 전달**

[0620] 1. 실험군:

[0621] 1) 미처리 군: 미처리된 세포;

[0622] 2) RNAiMAX 처리군: 2 μl RNAiMAX 형질감염 시약 및 단일 가닥 HJT-sRNA-m7 용액을 100 μl opti-MEM 배지에 각각 희석한 다음에, 상기 둘을 혼합하고, 15분 동안 방치하고, 세포내로 첨가한 다음에, 혼합하였다. 단일 가닥 HJT-sRNA-m7의 최종 농도는 100 nM이었다;

[0623] 3) 자유 섭취군: 단일 가닥 HJT-sRNA-m7 용액을 직접 첨가하였다 (최종 농도는 100 nM이었다);

[0624] 4) 지질 조합 PE (번호 38) & MG (번호 34) & LPC (번호 37) 및 핵산 혼합물의 처리군: 비등법에 의해 처리된 3 μL 지질 조합 (PE (번호 38) & MG (번호 34) & LPC (번호 37), 4:2:3, V/V/V)과 HJT-sRNA-m7 단일 가닥 핵산 용액의 혼합물을 세포에 첨가하고, 혼합하고, RNA의 최종 농도는 100 nM이었다;

[0625] 5) 지질 조합 및 핵산 혼합물의 처리군: 비등법에 의해 처리된 3 μL 지질 조합 (2.2 μL 지질 조합 PE (번호 38) & MG (번호 34) & LPC (번호 37)과 0.8 μL의 하기 유형의 지질, DG, TG, PC, Cer, 또는 So의 혼합물)과 HJT-sRNA-m7 단일 가닥 핵산 용액의 혼합물을 세포에 첨가하고, 혼합하고, RNA의 최종 농도는 100 nM이었다;

[0626] 2. 실험 절차

[0627] 1) 비등법 조건: 100 μL 단일 가닥 HJT-sRNA-m7 용액에 3 μL 지질 조합을 첨가하고, 100℃에서 30분 동안 가열하였다;

[0628] DG (디글리세리드): 클로로포름 용액 중 0.8 μL 지질 번호 1;

[0629] TG (트리글리세리드): 클로로포름 용액 중 0.8 μL 지질 번호 15;

[0630] PC (포스파티딜콜린): 클로로포름 용액 중 0.8 μL 지질 번호 12;

[0631] Cer (세라미드): 클로로포름 용액 중 0.8 μL 지질 번호 4;

[0632] So (스핑고신): 클로로포름 용액 중 0.8 μL 지질 번호 31;

[0633] 2) 실험 조건: HJT-sRNA-m7의 최종 농도는 100 nM이었고, 세포에 첨가 후 24시간에, 세포에 진입한 HJT-sRNA-m7의 양을 RT-qPCR 방법 (SYBR 그린 통용 염색법)에 의해 검출하였다. 프로토콜에 대해서, "지질에 의해 전달된 핵산의 세포내 발현의 실시간 정량적 PCR 검출"을 참조한다. 모든 실험을 삼중으로 수행하였다.

[0634] **결론:** 결과는 상기 지질 조합이 핵산을 세포내로 전달하는데 효과적이고 (도26 참조), 임상 환경에서 핵산 약물의 전달 효율을 개선시킬 가능성을 가짐을 나타냈다.

[0635] **실시예 1-12: 지질 조합에 의한 A549 세포내로의 단일 가닥 핵산의 전달**

[0636] 1. 실험군:

[0637] 1) 미처리 군: 미처리된 세포;

[0638] 2) RNAiMAX 처리군: 2 μl RNAiMAX 형질감염 시약 및 단일 가닥 HJT-sRNA-m7 용액을 100 μl opti-MEM 배지에 각각 희석한 다음에, 상기 둘을 혼합하고, 15분 동안 방치하고, 세포내로 첨가한 다음에, 혼합하였다. 단일 가닥 HJT-sRNA-m7의 최종 농도는 100 nM이었다;

[0639] 3) 자유 섭취군: 단일 가닥 HJT-sRNA-m7 용액을 직접 첨가하였다 (최종 농도는 100 nM이었다);

[0640] 4) 지질 조합 PE (번호 38) & PC (번호 12) & Cer (번호 4) 및 핵산 혼합물의 처리군: 비등법에 의해 처리된 3 μL 지질 조합 (PE (번호 38) & PC (번호 12) & Cer (번호 4), 4:2:3, V/V/V)과 HJT-sRNA-m7 단일 가닥 핵산 용액의 혼합물을 세포에 첨가하고, 혼합하고, RNA의 최종 농도는 100 nM이었다;

[0641] 5) 지질 조합 및 핵산 혼합물의 처리군: 비등법에 의해 처리된 3 μL 지질 조합 (2.2 μL 지질 조합 PE (번호 38) & PC (번호 12) & Cer (번호 4)과 0.8 μL의 하기 유형의 지질, MG, DG, TG, LPC, So 또는 FA의 혼합물)과 HJT-sRNA-m7 단일 가닥 핵산 용액의 혼합물을 세포에 첨가하고, 혼합하고, RNA의 최종 농도는 100 nM이었다.

[0642] 2. 실험 절차

[0643] 1) 비등법 조건: 100 μL 단일 가닥 HJT-sRNA-m7 용액에 3 μL 지질 조합을 첨가하고, 100℃에서 30분 동안 가열하였다;

[0644] MG (모노글리세리드): 0.8 μL 지질 번호 34;

[0645] DG (디글리세리드): 클로로포름 용액 중 0.8 μL 지질 번호 1;

[0646] TG (트리글리세리드): 클로로포름 용액 중 0.8 μL 지질 번호 15;

[0647] LPC (리소포스파티딜콜린): 클로로포름 용액 중 0.8 μL 지질 번호 37;

[0648] So (스핑고신): 클로로포름 용액 중 0.8 μL 지질 번호 31;

[0649] FA (지방산): 클로로포름 용액 중 0.8 μL 지질 번호 29;

[0650] 2) 실험 조건: HJT-sRNA-m7의 최종 농도는 100 nM이었고, 세포에 첨가 후 24시간에, 세포에 진입한 HJT-sRNA-m7의 양을 RT-qPCR 방법 (SYBR 그린 통용 염색법)에 의해 검출하였다. 프로토콜에 대해서, "지질에 의해 전달된 핵산의 세포내 발현의 실시간 정량적 PCR 검출"을 참조한다. 모든 실험을 삼중으로 수행하였다.

[0651] **결론:** 결과는 상기 지질 조합이 핵산을 세포내로 전달하는데 효과적이고 (도 27 참조), 여기서 2.2 μL 지질 조합 PE (번호 38) & PC (번호 12) & Cer (번호 4) 및 0.8 μL FA (번호 29)는 최선의 전달 효율을 달성하였다.

[0652] **실시예 1-13: 지질 조합에 의한 A549 세포내로의 단일 가닥 핵산의 전달**

[0653] 1. 실험군:

[0654] 1) 미처리 군: 미처리된 세포;

[0655] 2) RNAiMAX 처리군: 2 μl RNAiMAX 형질감염 시약 및 단일 가닥 HJT-sRNA-m7 용액을 100 μl opti-MEM 배지에 각각 희석한 다음에, 상기 둘을 혼합하고, 15분 동안 방치하고, 세포내로 첨가한 다음에, 혼합하였다. 단일 가닥 HJT-sRNA-m7의 최종 농도는 100 nM이었다;

[0656] 3) 자유 섭취군: 단일 가닥 HJT-sRNA-m7 용액을 직접 첨가하였다 (최종 농도는 100 nM이었다);

[0657] 4) 지질 조합 PE (번호 38) & PC (번호 12) & Cer (번호 4) & FA (번호 29) 및 핵산 혼합물의 처리군: 비등법에 의해 처리된 3 μL 지질 조합 (PE (번호 38) & PC (번호 12) & Cer (번호 4) & FA (번호 29), 44:22:33:36, V/V/V/V)과 HJT-sRNA-m7 단일 가닥 핵산 용액의 혼합물을 세포에 첨가하고, 혼합하고, RNA의 최종 농도는 100 nM이었다;

[0658] 5) 지질 조합 및 핵산 혼합물의 처리군: 비등법에 의해 처리된 3 μL 지질 조합 (PE (번호 38) & PC (번호 12) & Cer (번호 4) & FA (번호 29)과 1 μL의 하기 유형의 지질의 혼합물)과 HJT-sRNA-m7 단일 가닥 핵산 용액의 혼합물을 세포에 첨가하고, 혼합하고, RNA의 최종 농도는 100 nM이었다.

[0659] 2. 실험 절차

[0660] 1) 비등법 조건: 100 μL 단일 가닥 HJT-sRNA-m7 용액에 3 μL 지질 조합을 첨가하고, 100℃에서 30분 동안 가

열하였다;

[0661] MG (모노글리세리드): 1 μL 지질 번호 34;

[0662] DG (디글리세리드): 클로로포름 용액 중 1 μL 지질 번호 1;

[0663] TG (트리글리세리드): 클로로포름 용액 중 1 μL 지질 번호 15;

[0664] LPC (리소포스파티딜콜린): 클로로포름 용액 중 1 μL 지질 번호 37;

[0665] So (스핑고신): 클로로포름 용액 중 1 μL 지질 번호 31;

[0666] 2) 실험 조건: HJT-sRNA-m7의 최종 농도는 100 nM이었고, 세포에 첨가 후 24시간에, 세포에 진입한 HJT-sRNA-m7의 양을 RT-qPCR 방법 (SYBR 그린 통용 염색법)에 의해 검출하였다. 프로토콜에 대해서, "지질에 의해 전달된 핵산의 세포내 발현의 실시간 정량적 PCR 검출"을 참조한다. 모든 실험을 삼중으로 수행하였다.

[0667] **결론:** 결과는 상기 지질 조합이 핵산을 세포내로 전달하는데 효과적이고 (도 28 참조), 임상 환경에서 핵산 약물의 전달 효율을 개선시킬 가능성을 가짐을 나타냈다.

[0668] **실시예 1-14: 지질 조합에 의한 A549 세포내로의 단일 가닥 핵산의 전달**

[0669] 1. 실험군:

[0670] 1) 미처리 군: 미처리된 세포;

[0671] 2) RNAiMAX 처리군: 2 μl RNAiMAX 형질감염 시약 및 단일 가닥 HJT-sRNA-m7 용액을 100 μl opti-MEM 배지에 각각 희석한 다음에, 상기 둘을 혼합하고, 15분 동안 방치하고, 세포내로 첨가한 다음에, 혼합하였다. 단일 가닥 HJT-sRNA-m7의 최종 농도는 100 nM이었다;

[0672] 3) 자유 섭취군: 단일 가닥 HJT-sRNA-m7 용액을 직접 첨가하였다 (최종 농도는 100 nM이었다);

[0673] 4) 지질 조합 PE (번호 38) & PC (번호 12) & So (번호 31) 및 핵산 혼합물의 처리군: 비등법에 의해 처리된 3 μL 지질 조합 (PE (번호 38) & PC (번호 12) & So (번호 31), 2:1:3, V/V/V)과 HJT-sRNA-m7 단일 가닥 핵산 용액의 혼합물을 세포에 첨가하고, 혼합하고, RNA의 최종 농도는 100 nM이었다;

[0674] 5) 지질 조합 및 핵산 혼합물의 처리군: 비등법에 의해 처리된 3 μL 지질 조합 (2 μL PE (번호 38) & PC (번호 12) & So (번호 31)과 1 μL의 하기 유형의 지질, MG, DG, TG, LPC, Cer 또는 FA의 혼합물)과 HJT-sRNA-m7 단일 가닥 핵산 용액의 혼합물을 세포에 첨가하고, 혼합하고, RNA의 최종 농도는 100 nM이었다.

[0675] 2. 실험 절차

[0676] 1) 비등법 조건: 100 μL 단일 가닥 HJT-sRNA-m7 용액에 3 μL 지질 조합을 첨가하고, 100℃에서 30분 동안 가열하였다;

[0677] DG (디글리세리드): 클로로포름 용액 중 1 μL 지질 번호 1;

[0678] TG (트리글리세리드): 클로로포름 용액 중 1 μL 지질 번호 15;

[0679] PC (포스파티딜콜린): 클로로포름 용액 중 1 μL 지질 번호 12;

[0680] Cer (세라미드): 클로로포름 용액 중 1 μL 지질 번호 4;

[0681] FA (지방산): 클로로포름 용액 중 1 μL 지질 번호 29;

[0682] 2) 실험 조건: HJT-sRNA-m7의 최종 농도는 100 nM이었고, 세포에 첨가 후 24시간에, 세포에 진입한 HJT-sRNA-m7의 양을 RT-qPCR 방법 (SYBR 그린 통용 염색법)에 의해 검출하였다. 프로토콜에 대해서, "지질에 의해 전달된 핵산의 세포내 발현의 실시간 정량적 PCR 검출"을 참조한다. 모든 실험을 삼중으로 수행하였다.

[0683] **결론:** 결과는 상기 지질 조합이 핵산을 세포내로 전달하는데 효과적이고 (도 29 참조), 여기서 2 μL 지질 조합 PE (번호 38) & PC (번호 12) & So (번호 31) 및 1 μL FA (번호 29) 최선의 전달 효과를 달성함을 나타냈다.

[0684] **실시예 1-15: 지질 조합에 의한 A549 세포내로의 단일 가닥 핵산의 전달**

[0685] 1. 실험군:

[0686] 1) 미처리 군: 미처리된 세포;

[0687] 2) RNAiMAX 처리군: 2 μl RNAiMAX 형질감염 시약 및 단일 가닥 HJT-sRNA-m7 용액을 100 μl opti-MEM 배지에 각각 희석한 다음에, 상기 둘을 혼합하고, 15분 동안 방치하고, 세포내로 첨가한 다음에, 혼합하였다. 단일 가닥 HJT-sRNA-m7의 최종 농도는 100 nM이었다;

[0688] 3) 자유 섭취군: 단일 가닥 HJT-sRNA-m7 용액을 직접 첨가하였다 (최종 농도는 100 nM이었다);

[0689] 4) 지질 조합 PE (번호 38) & MG (번호 34) & LPC (번호 37) & So (번호 31) 및 핵산 혼합물의 처리군: 비등법에 의해 처리된 3 μL 지질 조합 (PE (번호 38) & MG (번호 34) & LPC (번호 37) & So (번호 31), 44:22:33:36, V/V/V/V)과 HJT-sRNA-m7 단일 가닥 핵산 용액의 혼합물을 세포에 첨가하고, 혼합하고, RNA의 최종 농도는 100 nM이었다;

[0690] 5) 지질 조합 및 핵산 혼합물의 처리군: 비등법에 의해 처리된 3 μL 지질 조합 (2 μL PE (번호 38) & MG (번호 34) & LPC (번호 37) & So (번호 31)과 1 μL의 하기 유형의 지질, DG, TG, PC, Cer 또는 FA의 혼합물)과 HJT-sRNA-m7 단일 가닥 핵산 용액의 혼합물을 세포에 첨가하고, 혼합하고, RNA의 최종 농도는 100 nM이었다.

[0691] 2. 실험 절차

[0692] 1) 비등법 조건: 100 μL 단일 가닥 HJT-sRNA-m7 용액에 3 μL 지질 조합을 첨가하고, 100℃에서 30분 동안 가열하였다;

[0693] DG (디글리세리드): 클로로포름 용액 중 1 μL 지질 번호 1;

[0694] TG (트리글리세리드): 클로로포름 용액 중 1 μL 지질 번호 15;

[0695] PC (포스파티딜콜린): 클로로포름 용액 중 1 μL 지질 번호 12;

[0696] Cer (세라미드): 클로로포름 용액 중 1 μL 지질 번호 4;

[0697] FA (지방산): 클로로포름 용액 중 1 μL 지질 번호 29;

[0698] 2) 실험 조건: HJT-sRNA-m7의 최종 농도는 100 nM이었고, 세포에 첨가 후 24시간에, 세포에 진입한 HJT-sRNA-m7의 양을 RT-qPCR 방법 (SYBR 그린 통용 염색법)에 의해 검출하였다. 프로토콜에 대해서, "지질에 의해 전달된 핵산의 세포내 발현의 실시간 정량적 PCR 검출"을 참조한다. 모든 실험을 삼중으로 수행하였다.

[0699] 결론: 결과는 자유 섭취군과 비교하여, 1 μL DG (번호 1), TG (번호 15), PC (번호 12), Cer (번호 4) 또는 FA (번호 29)의 2 μL PE (번호 38) & MG (번호 34) & LPC (번호 37) & So (번호 31)로의 첨가가, 핵산을 세포로 효율적으로 전달할 수 있고 (도 30 참조), 임상 환경에서 핵산 약물의 전달 효율을 개선시킬 가능성을 가짐을 나타냈다. 1 μL PC (번호 12)의 첨가는 최선의 핵산 전달 효율을 달성하고 전달 효율을 증진시킬 수 있었다.

[0700] **실시예 1-16: 지질 조합에 의한 A549 세포내로의 단일 가닥 핵산의 전달**

[0701] 1. 실험군:

[0702] 1) 미처리 군: 미처리된 세포;

[0703] 2) RNAiMAX 처리군: 2 μl RNAiMAX 형질감염 시약 및 단일 가닥 HJT-sRNA-m7 용액을 100 μl opti-MEM 배지에 각각 희석한 다음에, 상기 둘을 혼합하고, 15분 동안 방치하고, 세포내로 첨가한 다음에, 혼합하였다. 단일 가닥 HJT-sRNA-m7의 최종 농도는 100 nM이었다;

[0704] 3) 자유 섭취군: 단일 가닥 HJT-sRNA-m7 용액을 직접 첨가하였다 (최종 농도는 100 nM이었다);

[0705] 4) 지질 조합 PE (번호 38) & LPC (번호 37) 및 핵산 혼합물의 처리군: 비등법에 의해 처리된 3 μL 지질 조합 (PE (번호 38) & LPC (번호 37), 2:1, V/V)과 HJT-sRNA-m7 단일 가닥 핵산 용액의 혼합물을 세포에 첨가하고, 혼합하고, RNA의 최종 농도는 100 nM이었다;

[0706] 5) 지질 조합 및 핵산 혼합물의 처리군: 비등법에 의해 처리된 3 μL 지질 조합 (2 μL PE (번호 38) & LPC (번호 37)과 1 μL의 하기 유형의 지질, MG, DG, TG, PC, Cer, So 또는 FA의 혼합물)과 HJT-sRNA-m7 단일 가닥 핵산 용액의 혼합물을 세포에 첨가하고, 혼합하고, RNA의 최종 농도는 100 nM이었다;

[0707] 2. 실험 절차

[0708] 1) 비등법 조건: 100 μL 단일 가닥 HJT-sRNA-m7 용액에 3 μL 지질 조합을 첨가하고, 100℃에서 30분 동안 가

열하였다;

[0709] MG (모노글리세리드): 1 μL 지질 번호 34;

[0710] DG (디글리세리드): 클로로포름 용액 중 1 μL 지질 번호 1;

[0711] TG (트리글리세리드): 클로로포름 용액 중 1 μL 지질 번호 15;

[0712] PC (포스파티딜콜린): 클로로포름 용액 중 1 μL 지질 번호 12;

[0713] Cer (세라미드): 클로로포름 용액 중 1 μL 지질 번호 4;

[0714] So (스핑고신): 클로로포름 용액 중 1 μL 지질 번호 31;

[0715] FA (지방산): 클로로포름 용액 중 1 μL 지질 번호 29;

[0716] 2) 실험 조건: HJT-sRNA-m7의 최종 농도는 100 nM이었고, 세포에 첨가 후 24시간에, 세포에 진입한 HJT-sRNA-m7의 양을 RT-qPCR 방법 (SYBR 그린 통용 염색법)에 의해 검출하였다. 프로토콜에 대해서, "지질에 의해 전달된 핵산의 세포내 발현의 실시간 정량적 PCR 검출"을 참조한다. 모든 실험을 삼중으로 수행하였다.

[0717] **결론:** 결과는 자유 섭취군과 비교하여, 상기 지질 조합이 핵산을 세포내로 전달하는데 효과적이고 (도 31 참조), 임상 환경에서 핵산 약물의 전달 효율을 개선시킬 가능성을 가짐을 나타냈다. 1 μL TG (번호 15)의, 2 μL 지질 조합 PE (번호 38) & LPC (번호 37)로의 첨가는 최선의 핵산 전달 효과를 달성하였다.

[0718] **실시예 1-17: 지질 조합에 의한 A549 세포내로의 단일 가닥 핵산의 전달**

[0719] 1. 실험군:

[0720] 1) 미처리 군: 미처리된 세포;

[0721] 2) RNAiMAX 처리군: 2 μl RNAiMAX 형질감염 시약 및 단일 가닥 HJT-sRNA-m7 용액을 100 μl opti-MEM 배지에 각각 희석한 다음에, 상기 둘을 혼합하고, 15분 동안 방치하고, 세포내로 첨가한 다음에, 혼합하였다. 단일 가닥 HJT-sRNA-m7의 최종 농도는 100 nM이었다;

[0722] 3) 자유 섭취군: 단일 가닥 HJT-sRNA-m7 용액을 직접 첨가하였다 (최종 농도는 100 nM이었다);

[0723] 4) 지질 조합 PE (번호 38) & LPC (번호 37) & TG (번호 15) 및 핵산 혼합물의 처리군: 비등법에 의해 처리된 3 μL 지질 조합 (PE (번호 38) & LPC (번호 37) & TG (번호 15), 32:8:5, V/V/V)과 HJT-sRNA-m7 단일 가닥 핵산 용액의 혼합물을 세포에 첨가하고, 혼합하고, RNA의 최종 농도는 100 nM이었다;

[0724] 5) 지질 조합 및 핵산 혼합물의 처리군: 비등법에 의해 처리된 3 μL 지질 조합 (2 μL PE (번호 38) & LPC (번호 37) & TG (번호 15)과 1 μL의 하기 유형의 지질, MG, DG, PC, Cer, So 또는 FA의 혼합물)과 HJT-sRNA-m7 단일 가닥 핵산 용액의 혼합물을 세포에 첨가하고, 혼합하고, RNA의 최종 농도는 100 nM이었다;

[0725] 2. 실험 절차

[0726] 1) 비등법 조건: 100 μL 단일 가닥 HJT-sRNA-m7 용액에 3 μL 지질 조합을 첨가하고, 100℃에서 30분 동안 가열하였다;

[0727] MG (모노글리세리드): 1 μL 지질 번호 34;

[0728] DG (디글리세리드): 클로로포름 용액 중 1 μL 지질 번호 1;

[0729] PC (포스파티딜콜린): 클로로포름 용액 중 1 μL 지질 번호 12;

[0730] Cer (세라미드): 클로로포름 용액 중 1 μL 지질 번호 4;

[0731] So (스핑고신): 클로로포름 용액 중 1 μL 지질 번호 31;

[0732] FA (지방산): 클로로포름 용액 중 1 μL 지질 번호 29;

[0733] 2) 실험 조건: HJT-sRNA-m7의 최종 농도는 100 nM이었고, 세포에 첨가 후 24시간에, 세포에 진입한 HJT-sRNA-m7의 양을 RT-qPCR 방법 (SYBR 그린 통용 염색법)에 의해 검출하였다. 프로토콜에 대해서, "지질에 의해 전달된 핵산의 세포내 발현의 실시간 정량적 PCR 검출"을 참조한다. 모든 실험을 삼중으로 수행하였다.

[0734] **결론:** 결과는 상기 지질 조합이 핵산을 세포내로 전달하는데 효과적이고 (도32 참조), 임상 환경에서 핵산 약물

의 전달 효율을 개선시킬 가능성을 가짐을 나타냈다. 지질 조합 PE (번호 38) & LPC (번호 37) & TG (번호 15)는 핵산을 세포로 효율적으로 전달하였다. 다른 유형의 지질의 지질 조합 PE (번호 38) & LPC (번호 37) & TG (번호 15)로의 추가 첨가는 이 효과를 증진시키지 않았다.

[0735] **실시예 2-1: 지질 조합에 의한 MRC-5 세포내로의 이중 가닥 핵산의 전달**

[0736] 1. 실험군:

[0737] 1) 미처리 군: 미처리된 세포;

[0738] 2) RNAiMAX 처리군: 2 μl RNAiMAX 형질감염 시약 및 이중 가닥 HJT-sRNA-m7 용액을 100 μl opti-MEM 배지에 각각 희석한 다음에, 상기 둘을 혼합하고, 15분 동안 방치하고, 세포내로 첨가한 다음에, 혼합하였다. 이중 가닥 HJT-sRNA-m7의 최종 농도는 100 nM이었다;

[0739] 3) 자유 섭취군: 이중 가닥 HJT-sRNA-m7 용액을 직접 첨가하였다 (최종 농도는 100 nM이었다);

[0740] 4) 단일 지질 및 핵산의 처리군: 비등법에 의해 처리된 3 μL 단일 지질 번호 38과 HJT-sRNA-m7 이중 가닥 핵산 용액의 혼합물을 세포에 첨가하고, 혼합하고, RNA의 최종 농도는 100 nM이었다;

[0741] 5) 지질 조합 및 핵산 혼합물의 처리군: 비등법에 의해 처리된 3 μL 지질 조합 (클로로포름 용액 중 2 μL 단일 지질 번호 38과 1 μL 지질 번호 8, 1, 2, 11, 12, 34, 37, 4, 30, 31, 29, 32, 1+2 (동일한 부피로 혼합됨) 또는 11+12 (동일한 부피로 혼합됨)의 혼합물)과 HJT-sRNA-m7 이중 가닥 핵산 용액의 혼합물을 세포에 첨가하고, 혼합하고, RNA의 최종 농도는 100 nM이었다;

[0742] 2. 실험 절차

[0743] 1) 비등법 조건: 100 μL 이중 가닥 HJT-sRNA-m7 용액에 3 μL 단일 지질 (10 mg/mL의 농도를 갖는 클로로포름 용액 중 지질 번호 38) 또는 지질 조합을 첨가하고, 100℃에서 30분 동안 가열하였다;

[0744] 2) 실험 조건: HJT-sRNA-m7의 최종 농도는 100 nM이었고, 세포에 첨가 후 24시간에, 세포에 진입한 HJT-sRNA-m7의 양을 RT-qPCR 방법 (SYBR 그린 통용 염색법)에 의해 검출하였다. 프로토콜에 대해서, "지질에 의해 전달된 핵산의 세포내 발현의 실시간 정량적 PCR 검출"을 참조한다. 모든 실험을 삼중으로 수행하였다.

[0745] **결론:** 결과는 상기 단일 지질 및 지질 조합이 핵산을 세포내로 전달하는데 효과적이고 (도 33 참조), 임상 환경에서 핵산 약물의 전달 효율을 개선시킬 가능성을 가짐을 나타냈다. 단일 지질 번호 38은 핵산을 MRC-5 세포내로 효과적으로 전달하여, 형질감염 시약 RNAiMAX에 가까운 효과를 나타냈다. 그로의 다른 지질의첨가는 상기 효과를 추가로 증진시키지 않았다.

[0746] **실시예 2-2: 지질 조합에 의한 MRC-5 세포내로의 이중 가닥 핵산의 전달**

[0747] 1. 실험군:

[0748] 1) 미처리 군: 미처리된 세포;

[0749] 2) RNAiMAX 처리군: 2 μl RNAiMAX 형질감염 시약 및 이중 가닥 HJT-sRNA-m7 용액을 100 μl opti-MEM 배지에 각각 희석한 다음에, 상기 둘을 혼합하고, 15분 동안 방치하고, 세포내로 첨가한 다음에, 혼합하였다. 이중 가닥 HJT-sRNA-m7의 최종 농도는 100 nM이었다;

[0750] 3) 자유 섭취군: 이중 가닥 HJT-sRNA-m7 용액을 직접 첨가하였다 (최종 농도는 100 nM이었다);

[0751] 4) 지질 조합 (번호 38 & 번호 37, 2:1, V/V) 및 핵산의 처리군: 비등법에 의해 처리된 3 μL 지질 조합과 HJT-sRNA-m7 이중 가닥 핵산 용액의 혼합물을 세포에 첨가하고, 혼합하고, RNA의 최종 농도는 100 nM이었다;

[0752] 5) 지질 조합 및 핵산 혼합물의 처리군: 비등법에 의해 처리된 3 μL 지질 조합 (클로로포름 용액 중 2 μL 지질 조합 번호 38 & 번호 37과 1 μL 지질 번호 8, 1, 2, 11, 12, 34, 37, 4, 30, 31, 29, 32, 1+2 (동일한 부피로 혼합됨) 또는 11+12 (동일한 부피로 혼합됨)의 혼합물)과 HJT-sRNA-m7 이중 가닥 핵산 용액의 혼합물을 세포에 첨가하고, 혼합하고, RNA의 최종 농도는 100 nM이었다;

[0753] 2. 실험 절차

[0754] 1) 비등법 조건: 100 μL 이중 가닥 HJT-sRNA-m7 용액에 3 μL 지질 조합을 첨가하고, 100℃에서 30분 동안 가열하였다;

[0755] 2) 실험 조건: HJT-sRNA-m7의 최종 농도는 100 nM이었고, 세포에 첨가 후 24시간에, 세포에 진입한 HJT-sRNA-m7의 양을 RT-qPCR 방법 (SYBR 그린 통용 염색법)에 의해 검출하였다. 프로토콜에 대해서, "지질에 의해 전달된 핵산의 세포내 발현의 실시간 정량적 PCR 검출"을 참조한다. 모든 실험을 삼중으로 수행하였다.

[0756] **결론:** 결과는 상기 단일 지질 및 지질 조합이 핵산을 세포내로 전달하는데 효과적이고 (도 34 참조), 임상 환경에서 핵산 약물의 전달 효율을 개선시킬 가능성을 가짐을 나타냈다. 지질 번호 38 & 번호 37 혼합물은 핵산을 MRC-5 세포로 효율적으로 전달하였다. 번호 11 및 34를 제외한, 1 μL 지질의, 2 μL 번호 38 & 번호 37 혼합물로의 첨가는 이 효과를 증진시킬 수 있었다. 게다가, 예기치 않게, 1 μL 지질 번호 32의, 2 μL 번호 38 & 번호 37 혼합물로의 첨가는 RNAiMAX의 효과보다 훨씬 양호한 최선의 효과를 달성하였다.

[0757] **실시예 2-3: 지질 조합에 의한 A549 세포내로의 이중 가닥 핵산의 전달**

[0758] 1. 실험군:

[0759] 1) 미처리 군: 미처리된 세포;

[0760] 2) RNAiMAX 처리군: 2 μl RNAiMAX 형질감염 시약 및 이중 가닥 HJT-sRNA-m7 용액을 100 μl opti-MEM 배지에 각각 희석한 다음에, 상기 둘을 혼합하고, 15분 동안 방치하고, 세포내로 첨가한 다음에, 혼합하였다. 이중 가닥 HJT-sRNA-m7의 최종 농도는 100 nM이었다;

[0761] 3) 자유 섭취군: 이중 가닥 HJT-sRNA-m7 용액을 직접 첨가하였다 (최종 농도는 100 nM이었다);

[0762] 4) 지질 조합 (PE (번호 38) & PC (번호 12) & Cer (번호 4)) 및 핵산의 처리군: 비등법에 의해 처리된 3 μL 지질 조합 (PE (번호 38) & PC (번호 12) & Cer (번호 4), 4:2:3, V/V/V)과 HJT-sRNA-m7 이중 가닥 핵산 용액의 혼합물을 세포에 첨가하고, 혼합하고, RNA의 최종 농도는 100 nM이었다;

[0763] 5) 지질 조합 및 핵산 혼합물의 처리군: 비등법에 의해 처리된 3 μL 지질 조합 (2.5 μL PE (번호 38) & PC (번호 12) & Cer (번호 4)과 0.5 μL 지질 (DG (번호 2), TG (번호 6), So (번호 17), FA (번호 29), MG (번호 34) 및 LPC (번호 37)의 혼합물)과 HJT-sRNA-m7 이중 가닥 핵산 용액의 혼합물을 세포에 첨가하고, 혼합하고, RNA의 최종 농도는 100 nM이었다;

[0764] 2. 실험 절차

[0765] 1) 비등법 조건: 100 μL HJT-sRNA-m7 이중 가닥 용액에 3 μL 지질 조합을 첨가하고, 100℃에서 30분 동안 가열하고;

[0766] 2) 실험 조건: HJT-sRNA-m7의 최종 농도는 100 nM이었고, 세포에 첨가 후 24시간에, 세포에 진입한 HJT-sRNA-m7의 양을 RT-qPCR 방법 (SYBR 그린 통용 염색법)에 의해 검출하였다. 프로토콜에 대해서, "지질에 의해 전달된 핵산의 세포내 발현의 실시간 정량적 PCR 검출"을 참조한다. 모든 실험을 삼중으로 수행하였다.

[0767] **결론:** 결과는 상기 단일 지질 및 지질 조합이 핵산을 세포내로 전달하는데 효과적이고 (도 35 참조), 임상 환경에서 핵산 약물의 전달 효율을 개선시킬 가능성을 가짐을 나타냈다. 1/5 LPC (번호 37)의 PE (번호 38) & PC (번호 12) & Cer (번호 4) 혼합물로의 첨가는 핵산 전달의 효과를 상당히 증진시킬 수 있었다. 게다가, DG (번호 2) 및 TG (번호 16)의 첨가는 또한 상기 전달의 효과를 추가로 증진시킬 수 있었다.

[0768] **실시예 2-4: 지질 조합에 의한 A549 세포내로의 이중 가닥 핵산의 전달**

[0769] 1. 실험군:

[0770] 1) 미처리 군: 미처리된 세포;

[0771] 2) RNAiMAX 처리군: 2 μl RNAiMAX 형질감염 시약 및 이중 가닥 HJT-sRNA-m7 용액을 100 μl opti-MEM 배지에 각각 희석한 다음에, 상기 둘을 혼합하고, 15분 동안 방치하고, 세포내로 첨가한 다음에, 혼합하였다. 이중 가닥 HJT-sRNA-m7의 최종 농도는 100 nM이었다;

[0772] 3) 자유 섭취군: 이중 가닥 HJT-sRNA-m7 용액을 직접 첨가하였다 (최종 농도는 100 nM이었다);

[0773] 4) 지질 조합 (PE (번호 38) & DG (번호 2)) 및 핵산의 처리군: 비등법에 의해 처리된 3 μL 지질 조합 (PE (번호 38) & DG (번호 2), 2:1, V/V)과 HJT-sRNA-m7 이중 가닥 핵산 용액의 혼합물을 세포에 첨가하고, 혼합하고, RNA의 최종 농도는 100 nM이었다;

[0774] 5) 지질 조합 및 핵산 혼합물의 처리군: 비등법에 의해 처리된 3 μL 지질 조합 (2 μL PE (번호 38) & DG (번

호 2) 혼합물과 1 μL 다른 지질의 번호 37, 31, 29, 34, 12 또는 4의 혼합물)과 HJT-sRNA-m7 이중 가닥 핵산 용액의 혼합물을 세포에 첨가하고, 혼합하고, RNA의 최종 농도는 100 nM이었다;

[0775] 2. 실험 절차

[0776] 1) 비등법 조건: 100 μL 이중 가닥 HJT-sRNA-m7 용액에 3 μL 지질 조합을 첨가하고, 100℃에서 30분 동안 가열하였다;

[0777] 2) 실험 조건: HJT-sRNA-m7의 최종 농도는 100 nM이었고, 세포에 첨가 후 24시간에, 세포에 진입한 HJT-sRNA-m7의 양을 RT-qPCR 방법 (SYBR 그린 통용 염색법)에 의해 검출하였다. 프로토콜에 대해서, "지질에 의해 전달된 핵산의 세포내 발현의 실시간 정량적 PCR 검출"을 참조한다. 모든 실험을 삼중으로 수행하였다.

[0778] **결론:** 결과는 상기 단일 지질 및 지질 조합이 핵산을 세포내로 전달하는데 효과적이고 (도 36 참조), 임상 환경에서 핵산 약물의 전달 효율을 개선시킬 가능성을 가짐을 나타냈다. 지질 조합 (2 μL PE (번호 38) & DG (번호 2) 혼합물)이 이중 가닥 핵산을 A549 세포내로 효과적으로 전달할 수 있었다. 이 지질 조합과 비교하여, 2:1의 비율로 혼합된 2 μL PE (번호 38) & DG (번호 2) 및 번호 37, 31, 12 또는 4의 지질 조합이 전달 효율을 증진시킬 수 있었다.

[0779] **실시예 2-5: 지질 조합에 의한 A549 세포내로의 이중 가닥 핵산의 전달**

[0780] 1. 실험군:

[0781] 1) 미처리 군: 미처리된 세포;

[0782] 2) RNAiMAX 처리군: 2 μl RNAiMAX 형질감염 시약 및 이중 가닥 HJT-sRNA-m7 용액을 100 μl opti-MEM 배지에 각각 희석한 다음에, 상기 둘을 혼합하고, 15분 동안 방치하고, 세포내로 첨가한 다음에, 혼합하였다. 이중 가닥 HJT-sRNA-m7의 최종 농도는 100 nM이었다;

[0783] 3) 자유 섭취군: 이중 가닥 HJT-sRNA-m7 용액을 직접 첨가하였다 (최종 농도는 100 nM이었다);

[0784] 4) 비등법에 의해 처리된 지질 조합 (PE (번호 38) & LPC (번호 37), 4:1, V/V)과 HJT-sRNA-m7 이중 가닥 핵산 용액의 혼합물을 세포에 첨가하고, 혼합하고, RNA의 최종 농도는 100 nM이었다;

[0785] 2. 실험 절차

[0786] 1) 비등법 조건: 100 μL 이중 가닥 HJT-sRNA-m7 용액에 3 μL 지질 조합을 첨가하고, 70℃에서 30분 동안 가열하였다;

[0787] 2) 실험 조건: HJT-sRNA-m7의 최종 농도는 100 nM이었고, 세포에 첨가 후 24시간에, 세포에 진입한 HJT-sRNA-m7의 양을 RT-qPCR 방법에 의해 검출하였다. 프로토콜에 대해서, "지질에 의해 전달된 핵산의 세포내 발현의 실시간 정량적 PCR 검출"을 참조한다. 모든 실험을 삼중으로 수행하였다.

[0788] **결론:** 결과는 상기 지질 조합이 핵산을 세포내로 전달하는데 효과적이고 (도37 참조), 형질감염 시약 RNAiMAX에 가까운 효과로, 임상 환경에서 핵산 약물의 전달 효율을 개선시킬 가능성을 가짐을 나타냈다.

[0789] **실시예 2-6: 지질 조합에 의한 A549 세포내로의 이중 가닥 핵산의 전달**

[0790] 1. 실험군:

[0791] 1) 미처리 군: 미처리된 세포;

[0792] 2) RNAiMAX 처리군: 2 μl RNAiMAX 형질감염 시약 및 이중 가닥 HJT-sRNA-m7 용액을 100 μl opti-MEM 배지에 각각 희석한 다음에, 상기 둘을 혼합하고, 15분 동안 방치하고, 세포내로 첨가한 다음에, 혼합하였다. 이중 가닥 HJT-sRNA-m7의 최종 농도는 100 nM이었다;

[0793] 3) 자유 섭취군: 이중 가닥 HJT-sRNA-m7 용액을 직접 첨가하였다 (최종 농도는 100 nM이었다);

[0794] 4) 비등법에 의해 처리된 지질 조합 (PE (번호 38) & PC (번호 12), 4:1, V/V)과 HJT-sRNA-m7 이중 가닥 핵산 용액의 혼합물을 세포에 첨가하고, 혼합하고, RNA의 최종 농도는 100 nM이었다;

[0795] 2. 실험 절차

[0796] 1) 비등법 조건: 100 μL 이중 가닥 HJT-sRNA-m7 용액에 3 μL 지질 조합을 첨가하고, 70℃에서 30분 동안 가열

하였다;

[0797] 2) 실험 조건: HJT-sRNA-m7의 최종 농도는 100 nM이었고, 세포에 첨가 후 24시간에, 세포에 진입한 HJT-sRNA-m7의 양을 RT-qPCR 방법에 의해 검출하였다. 프로토콜에 대해서, "지질에 의해 전달된 핵산의 세포내 발현의 실시간 정량적 PCR 검출"을 참조한다. 모든 실험을 삼중으로 수행하였다.

[0798] **결론:** 결과는 상기 지질 조합이 핵산을 세포내로 전달하는데 효과적이고 (도 38 참조), 임상 환경에서 핵산 약물의 전달 효율을 개선시킬 가능성을 가짐을 나타냈다. 효과는 RNAiMAX의 효과보다 더 양호하거나 동일하다.

[0799] **실시예 2-7: 지질 조합에 의한 A549 세포내로의 이중 가닥 핵산의 전달**

[0800] 1. 실험군:

[0801] 1) 미처리 군: 미처리된 세포;

[0802] 2) RNAiMAX 처리군: 2 μl RNAiMAX 형질감염 시약 및 이중 가닥 HJT-sRNA-m7 용액을 100 μl opti-MEM 배지에 각각 희석한 다음에, 상기 둘을 혼합하고, 15분 동안 방치하고, 세포내로 첨가한 다음에, 혼합하였다. 이중 가닥 HJT-sRNA-m7의 최종 농도는 100 nM이었다;

[0803] 3) 자유 섭취군: 이중 가닥 HJT-sRNA-m7 용액을 직접 첨가하였다 (최종 농도는 100 nM이었다);

[0804] 4) 비등법에 의해 처리된 지질 조합 (PE (번호 38) & PC (번호 12) & DG (번호 2), 4:1:5, V/V/V)과 이중 가닥 HJT-sRNA-m7 핵산 용액의 혼합물을 세포에 첨가하고, 혼합하고, RNA의 최종 농도는 100 nM이었다;

[0805] 2. 실험 절차

[0806] 1) 비등법 조건: 100 μL 이중 가닥 HJT-sRNA-m7 용액에 2 μL 지질 조합을 첨가하고, 80℃에서 30분 동안 가열하였다;

[0807] 2) 실험 조건: HJT-sRNA-m7의 최종 농도는 100 nM이었고, 세포에 첨가 후 24시간에, 세포에 진입한 HJT-sRNA-m7의 양을 RT-qPCR 방법에 의해 검출하였다. 프로토콜에 대해서, "지질에 의해 전달된 핵산의 세포내 발현의 실시간 정량적 PCR 검출"을 참조한다. 모든 실험을 삼중으로 수행하였다.

[0808] **결론:** 결과는 상기 지질 조합이 핵산을 세포내로 전달하는데 효과적이고 (도39 참조), 임상 환경에서 핵산 약물의 전달 효율을 개선시킬 가능성을 가짐을 나타냈다. 지질 조합 (PE (번호 38) & PC (번호 12) & DG (번호 2), 4:1:5, V/V/V)은 RNAiMAX보다 A549 세포내로의 이중 가닥 핵산의 전달에서 더 양호한 효과를 나타냈다.

[0809] **실시예 2-8: 지질 조합에 의한 A549 세포내로의 이중 가닥 핵산의 전달**

[0810] 1. 실험군:

[0811] 1) 미처리 군: 미처리된 세포;

[0812] 2) RNAiMAX 처리군: 2 μl RNAiMAX 형질감염 시약 및 이중 가닥 HJT-sRNA-m7 용액을 100 μl opti-MEM 배지에 각각 희석한 다음에, 상기 둘을 혼합하고, 15분 동안 방치하고, 세포내로 첨가한 다음에, 혼합하였다. 이중 가닥 HJT-sRNA-m7의 최종 농도는 100 nM이었다;

[0813] 3) 자유 섭취군: 이중 가닥 HJT-sRNA-m7 용액을 직접 첨가하였다 (최종 농도는 100 nM이었다);

[0814] 4) 비등법에 의해 처리된 지질 조합 (PE (번호 38) & LPC (번호 37) & DG (번호 2), 32:8:5, V/V/V)과 HJT-sRNA-m7 이중 가닥 핵산 용액의 혼합물을 세포에 첨가하고, 혼합하고, RNA의 최종 농도는 100 nM이었다;

[0815] 2. 실험 절차

[0816] 1) 비등법 조건: 100 μL 이중 가닥 HJT-sRNA-m7 용액에 2 μL 지질 조합을 첨가하고, 80℃에서 30분 동안 가열하였다;

[0817] 2) 실험 조건: HJT-sRNA-m7의 최종 농도는 100 nM이었고, 세포에 첨가 후 24시간에, 세포에 진입한 HJT-sRNA-m7의 양을 RT-qPCR 방법에 의해 검출하였다. 프로토콜에 대해서, "지질에 의해 전달된 핵산의 세포내 발현의 실시간 정량적 PCR 검출"을 참조한다. 모든 실험을 삼중으로 수행하였다.

[0818] **결론:** 결과는 상기 지질 조합이 핵산을 세포내로 전달하는데 효과적이고 (도 40 참조), 임상 환경에서 핵산 약물의 전달 효율을 개선시킬 가능성을 가짐을 나타냈다. 효과는 RNAiMAX의 효과와 유사하였다.

[0819] **실시예 2-9: 지질 조합에 의한 A549 세포내로의 이중 가닥 핵산의 전달**

[0820] 1. 실험군:

[0821] 1) 미처리 군: 미처리된 세포;

[0822] 2) RNAiMAX 처리군: 2 μl RNAiMAX 형질감염 시약 및 이중 가닥 HJT-sRNA-m7 용액을 100 μl opti-MEM 배지에 각각 희석한 다음에, 상기 둘을 혼합하고, 15분 동안 방치하고, 세포내로 첨가한 다음에, 혼합하였다. 이중 가닥 HJT-sRNA-m7의 최종 농도는 100 nM이었다;

[0823] 3) 자유 섭취군: 이중 가닥 HJT-sRNA-m7 용액을 직접 첨가하였다 (최종 농도는 100 nM이었다);

[0824] 4) 비등법에 의해 처리된 지질 조합 (PE (번호 8) & PC (번호 12), 1:2, V/V)과 HJT-sRNA-m7 이중 가닥 핵산 용액의 혼합물을 세포에 첨가하고, 혼합하고, RNA의 최종 농도는 100 nM이었다;

[0825] 2. 실험 절차

[0826] 1) 비등법 조건: 100 μL 이중 가닥 HJT-sRNA-m7 용액에 2 μL 지질 조합을 첨가하고, 80℃에서 30분 동안 가열하였다;

[0827] 2) 실험 조건: HJT-sRNA-m7의 최종 농도는 100 nM이었고, 세포에 첨가 후 24시간에, 세포에 진입한 HJT-sRNA-m7의 양을 RT-qPCR 방법에 의해 검출하였다. 프로토콜에 대해서, "지질에 의해 전달된 핵산의 세포내 발현의 실시간 정량적 PCR 검출"을 참조한다. 모든 실험을 삼중으로 수행하였다.

[0828] **결론:** 결과는 상기 지질 조합이 핵산을 세포내로 전달하는데 효과적이고 (도 41 참조), 임상 환경에서 핵산 약물의 전달 효율을 개선시킬 가능성을 가짐을 나타냈다. 지질 조합 (PE (번호 8) & PC (번호 12), 1:2, V/V)는 RNAiMAX보다 A549 세포내로의 이중 가닥 핵산의 전달에서 더 양호한 효과를 나타냈다.

[0829] **실시예 2-10: 지질 조합에 의한 A549 세포내로의 이중 가닥 핵산의 전달**

[0830] 1. 실험군:

[0831] 1) 미처리 군: 미처리된 세포;

[0832] 2) RNAiMAX 처리군: 2 μl RNAiMAX 형질감염 시약 및 이중 가닥 HJT-sRNA-m7 용액을 100 μl opti-MEM 배지에 각각 희석한 다음에, 상기 둘을 혼합하고, 15분 동안 방치하고, 세포내로 첨가한 다음에, 혼합하였다. 이중 가닥 HJT-sRNA-m7의 최종 농도는 100 nM이었다;

[0833] 3) 자유 섭취군: 이중 가닥 HJT-sRNA-m7 용액을 직접 첨가하였다 (최종 농도는 100 nM이었다);

[0834] 4) 비등법에 의해 처리된 지질 조합 (PE (번호 8) & LPC (번호 37), 4:1, V/V)과 HJT-sRNA-m7 이중 가닥 핵산 용액의 혼합물을 세포에 첨가하고, 혼합하고, RNA의 최종 농도는 100 nM이었다;

[0835] 2. 실험 절차

[0836] 1) 비등법 조건: 100 μL 이중 가닥 HJT-sRNA-m7 용액에 2 μL 지질 조합을 첨가하고, 80℃에서 30분 동안 가열하였다;

[0837] 2) 실험 조건: HJT-sRNA-m7의 최종 농도는 100 nM이었고, 세포에 첨가 후 24시간에, 세포에 진입한 HJT-sRNA-m7의 양을 RT-qPCR 방법에 의해 검출하였다. 프로토콜에 대해서, "지질에 의해 전달된 핵산의 세포내 발현의 실시간 정량적 PCR 검출"을 참조한다. 모든 실험을 삼중으로 수행하였다.

[0838] **결론:** 결과는 상기 지질 조합이 핵산을 세포내로 전달하는데 효과적이고 (도 42 참조), 임상 환경에서 핵산 약물의 전달 효율을 개선시킬 가능성을 가짐을 나타냈다.

[0839] **실시예 2-11: 지질 조합에 의한 MRC-5 세포내로의 이중 가닥 핵산의 전달**

[0840] 1. 실험군:

[0841] 1) 미처리 군: 미처리된 세포;

[0842] 2) RNAiMAX 처리군: 2 μl RNAiMAX 형질감염 시약 및 이중 가닥 HJT-sRNA-m7 용액을 100 μl opti-MEM 배지에 각각 희석한 다음에, 상기 둘을 혼합하고, 15분 동안 방치하고, 세포내로 첨가한 다음에, 혼합하였다. 이중 가닥 HJT-sRNA-m7의 최종 농도는 100 nM이었다;

[0843] 3) 자유 섭취군: 이중 가닥 HJT-sRNA-m7 용액을 직접 첨가하였다 (최종 농도는 100 nM이었다);

[0844] 4) 비등법에 의해 처리된 지질 조합 (PE (번호 8) & PC (번호 12), 1:2, V/V)과 HJT-sRNA-m7 이중 가닥 핵산 용액의 혼합물을 세포에 첨가하고, 혼합하고, RNA의 최종 농도는 100 nM이었다;

[0845] 5) 지질 조합 및 이중 가닥 HJT-sRNA-m7 혼합물의 처리군: 비등법에 의해 처리된 3 μL 지질 조합 (2 μL PE (번호 8) & PC (번호 12)과 1 μL 다른 유형의 지질 (MG (번호 34), DG (번호 2), TG (번호 32), LPC (번호 37), PC (번호 11), PE (번호 38), Cer (번호 4), So (번호 31) 또는 FA (번호 29)의 혼합물)과 이중 가닥 HJT-sRNA-m7 핵산 용액의 혼합물을 세포에 첨가하고, 혼합하고, RNA의 최종 농도는 100 nM이었다;

[0846] 2. 실험 절차

[0847] 1) 비등법 조건: 100 μL 이중 가닥 HJT-sRNA-m7 용액에 3 μL 지질 조합을 첨가하고, 80℃에서 30분 동안 가열하였다;

[0848] 2) 실험 조건: HJT-sRNA-m7의 최종 농도는 100 nM이었고, 세포에 첨가 후 24시간에, 세포에 진입한 HJT-sRNA-m7의 양을 RT-qPCR 방법에 의해 검출하였다. 프로토콜에 대해서, "지질에 의해 전달된 핵산의 세포내 발현의 실시간 정량적 PCR 검출"을 참조한다. 모든 실험을 삼중으로 수행하였다.

[0849] **결론:** 결과는 상기 지질 조합이 핵산을 세포내로 전달하는데 효과적이고 (도 43 참조), 임상 환경에서 핵산 약물의 전달 효율을 개선시킬 가능성을 가짐을 나타냈다. PE (번호 8) & PC (번호 12)는 RNAiMAX보다 상당히 더 양호한 효과로 핵산을 세포내로 효과적으로 전달할 수 있었다. PE (번호 8) & PC (번호 12)와 비교하여, 2:1의 비율의 PE (번호 8) & PC (번호 12) 및 Cer (번호 4) 또는 PE (번호 38)의 혼합물은 이 효과를 증진시킬 수 있었다.

[0850] **실시예 2-12: 지질 조합에 의한 MRC-5 세포내로의 이중 가닥 핵산의 전달**

[0851] 1. 실험군:

[0852] 1) 미처리 군: 미처리된 세포;

[0853] 2) RNAiMAX 처리군: 2 μl RNAiMAX 형질감염 시약 및 이중 가닥 HJT-sRNA-m7 용액을 100 μl opti-MEM 배지에 각각 희석한 다음에, 상기 둘을 혼합하고, 15분 동안 방치하고, 세포내로 첨가한 다음에, 혼합하였다. 이중 가닥 HJT-sRNA-m7의 최종 농도는 100 nM이었다;

[0854] 3) 자유 섭취군: 이중 가닥 HJT-sRNA-m7 용액을 직접 첨가하였다 (최종 농도는 100 nM이었다);

[0855] 4) 비등법에 의해 처리된 지질 조합 (PE (번호 8) & PC (번호 12) &DG (번호 2), 8:16:3, V/V/V)과 HJT-sRNA-m7 이중 가닥 핵산 용액의 혼합물을 세포에 첨가하고, 혼합하고, RNA의 최종 농도는 100 nM이었다;

[0856] 5) 실험 절차

[0857] 1) 비등법 조건: 100 μL 이중 가닥 HJT-sRNA-m7 용액에 2 μL 지질 조합을 첨가하고, 80℃에서 30분 동안 가열하였다;

[0858] 2) 실험 조건: HJT-sRNA-m7의 최종 농도는 100 nM이었고, 세포에 첨가 후 24시간에, 세포에 진입한 HJT-sRNA-m7의 양을 RT-qPCR 방법에 의해 검출하였다. 프로토콜에 대해서, "지질에 의해 전달된 핵산의 세포내 발현의 실시간 정량적 PCR 검출"을 참조한다. 모든 실험을 삼중으로 수행하였다.

[0859] **결론:** 결과는 자유 섭취군 및 RNAiMAX 군과 비교하여, 지질 조합 (PE (번호 8) & PC (번호 12) &DG (번호 2), 8:16:3, V/V/V)이 RNAiMAX보다 전달에서 더 양호한 효과를 나타내고 (도 44 참조), 임상 환경에서 핵산 약물의 전달 효율을 개선시킬 가능성을 가짐을 나타냈다.

[0860] **실시예 2-13: 지질 조합에 의한 MRC-5 세포내로의 이중 가닥 핵산의 전달**

[0861] 1. 실험군:

[0862] 1) 미처리 군: 미처리된 세포;

[0863] 2) RNAiMAX 처리군: 2 μl RNAiMAX 형질감염 시약 및 이중 가닥 HJT-sRNA-m7 용액을 100 μl opti-MEM 배지에 각각 희석한 다음에, 상기 둘을 혼합하고, 15분 동안 방치하고, 세포내로 첨가한 다음에, 혼합하였다. 이중 가닥 HJT-sRNA-m7의 최종 농도는 100 nM이었다;

[0864] 3) 자유 섭취군: 이중 가닥 HJT-sRNA-m7 용액을 직접 첨가하였다 (최종 농도는 100 nM이었다);

[0865] 4) 비등법에 의해 처리된 지질 조합과 HJT-sRNA-m7 이중 가닥 핵산 용액의 혼합물을 세포에 첨가하고, 혼합하고, RNA의 최종 농도는 100 nM이었다;

[0866] 혼합물 1: PE (번호 8):LPC (번호 37):TG (번호 32)-4:1:2

[0867] 혼합물 2: PE (번호 8):LPC(번호 37):DG (번호 2)-4:1:2

[0868] 혼합물 3: PE (번호 8):PC (번호 12):So (번호 31):FA (번호 29)-1:2:1:1

[0869] 5) 실험 절차

[0870] 1) 비등법 조건: 100 μL 이중 가닥 HJT-sRNA-m7 용액에 2.5 μL 지질 조합을 첨가하고, 90℃에서 15분 동안 가열하였다;

[0871] 2) 실험 조건: HJT-sRNA-m7의 최종 농도는 100 nM이었고, 세포에 첨가 후 24시간에, 세포에 진입한 HJT-sRNA-m7의 양을 RT-qPCR 방법에 의해 검출하였다. 프로토콜에 대해서, "지질에 의해 전달된 핵산의 세포내 발현의 실시간 정량적 PCR 검출"을 참조한다. 모든 실험을 삼중으로 수행하였다.

[0872] **결론:** 결과는 상기 지질 조합이 핵산을 세포내로 전달하는데 효과적이고 (도 45 참조), 임상 환경에서 핵산 약물의 전달 효율을 개선시킬 가능성을 가짐을 나타냈다. RNAiMAX 군과 비교하여, 혼합물 1: PE (번호 8):LPC (번호 37):TG (번호 32)-4:1:2, 및 혼합물 2: PE (번호 8):LPC(번호 37):DG (번호 2)-4:1:2는 비슷한 전달 효과를 나타냈으며 한편 혼합물 3: PE (번호 8):PC (번호 12):So (번호 31):FA (번호 29)-1:2:1:1은 더 양호한 효과를 나타냈다.

[0873] **실시예 2-14: 지질 조합에 의한 MRC-5 세포내로의 이중 가닥 핵산의 전달**

[0874] 1. 실험군:

[0875] 1) 미처리 군: 미처리된 세포로 지칭됨;

[0876] 2) RNAiMAX 처리군: 2 μl RNAiMAX 형질감염 시약 및 이중 가닥 HJT-sRNA-m7 용액을 100 μl opti-MEM 배지에 각각 희석한 다음에, 상기 둘을 혼합하고, 15분 동안 방치하고, 세포내로 첨가한 다음에, 혼합하였다. 이중 가닥 HJT-sRNA-m7의 최종 농도는 100 nM이었다;

[0877] 3) 자유 섭취군: 이중 가닥 HJT-sRNA-m7 용액을 직접 첨가하였다 (최종 농도는 100 nM이었다);

[0878] 4) 지질 조합 혼합물 및 이중 가닥 HJT-sRNA-m7 혼합물의 처리군: 비등법에 의해 처리된 3 μL 지질 조합 (PE (번호 8):PC (번호 12):So (번호 31):FA (번호 29)-1:2:1:1)과 HJT-sRNA-m7 이중 가닥 핵산 용액의 혼합물을 세포에 첨가하고, 혼합하고, RNA의 최종 농도는 100 nM이었다;

[0879] 5) 지질 조합 및 이중 가닥 HJT-sRNA-m7 혼합물의 처리군: 비등법에 의해 처리된 3 μL 지질 조합 (도 46에 나타낸 2 μL 지질 조합 혼합물과 1 μL 다른 유형의 지질, 즉 지질 번호 34, 2, 32, 11, 37, 38 또는 4의 혼합물)과 HJT-sRNA-m7 이중 가닥 핵산 용액의 혼합물을 세포에 첨가하고, 혼합하고, RNA의 최종 농도는 100 nM이었다;

[0880] 2. 실험 절차

[0881] 1) 비등법 조건: 100 μL 이중 가닥 HJT-sRNA-m7 용액에 3 μL 지질 조합을 첨가하고, 90℃에서 15분 동안 가열하였다;

[0882] 2) 실험 조건: HJT-sRNA-m7의 최종 농도는 100 nM이었고, 세포에 첨가 후 24시간에, 세포에 진입한 HJT-sRNA-m7의 양을 RT-qPCR 방법에 의해 검출하였다. 프로토콜에 대해서, "지질에 의해 전달된 핵산의 세포내 발현의 실시간 정량적 PCR 검출"을 참조한다. 모든 실험을 삼중으로 수행하였다.

[0883] **결론:** 결과는 상기 지질 조합이 핵산을 세포내로 전달하는데 효과적이고 (도 46 참조), 임상 환경에서 핵산 약물의 전달 효율을 개선시킬 가능성을 가짐을 나타냈다. 혼합물 (PE (번호 8):PC (번호 12):So (번호 31):FA (번호 29)-1:2:1:1)은 RNAiMAX보다 더 양호한 전달 효과를 나타냈다. 혼합물 (PE (번호 8):PC (번호 12):So (번호 31):FA (번호 29)-1:2:1:1)과 비교하여, 2:1의 비율의 혼합물 PE (번호 8):PC (번호 12):So (번호 31):FA (번호 29)-1:2:1:1)의 지질 번호 2, 38 또는 4로의 첨가는 전달 효과를 증진시킬 수 있었다.

[0884] **실시예 2-15: 지질 조합에 의한 MRC-5 세포내로의 이중 가닥 핵산의 전달**

[0885] 1. 실험군:

[0886] 1) 미처리 군: 미처리된 세포;

[0887] 2) RNAiMAX 처리군: 2 μl RNAiMAX 형질감염 시약 및 이중 가닥 HJT-sRNA-m7 용액을 100 μl opti-MEM 배지에 각각 희석한 다음에, 상기 둘을 혼합하고, 15분 동안 방치하고, 세포내로 첨가한 다음에, 혼합하였다. 이중 가닥 HJT-sRNA-m7의 최종 농도는 100 nM이었다;

[0888] 3) 자유 섭취군: 이중 가닥 HJT-sRNA-m7 용액을 직접 첨가하였다 (최종 농도는 100 nM이었다);

[0889] 4) 비등법에 의해 처리된 지질 조합 (PE (번호 8) & So (번호 31), 6:1, V/V)과 HJT-sRNA-m7 이중 가닥 핵산 용액의 혼합물을 세포에 첨가하고, 혼합하고, RNA의 최종 농도는 100 nM이었다;

[0890] 5) 실험 절차

[0891] 1) 비등법 조건: 100 μL 이중 가닥 HJT-sRNA-m7 용액에 2 μL 지질 조합을 첨가하고, 90℃에서 15분 동안 가열하였다;

[0892] 2) 실험 조건: HJT-sRNA-m7의 최종 농도는 100 nM이었고, 세포에 첨가 후 24시간에, 세포에 진입한 HJT-sRNA-m7의 양을 RT-qPCR 방법에 의해 검출하였다. 프로토콜에 대해서, "지질에 의해 전달된 핵산의 세포내 발현의 실시간 정량적 PCR 검출"을 참조한다. 모든 실험을 삼중으로 수행하였다.

[0893] **결론:** 결과는 지질 조합 (PE (번호 8) & So (번호 31), 6:1, V/V)이 RNAiMAX보다 더 양호한 전달 효과를 나타내고 (도 47 참조), 임상 환경에서 핵산 약물의 전달 효율을 개선시킬 가능성을 가짐을 나타냈다.

[0894] **실시예 2-16: 지질 조합에 의한 MRC-5 세포내로의 이중 가닥 핵산의 전달**

[0895] 1. 실험군:

[0896] 1) 미처리 군: 미처리된 세포;

[0897] 2) RNAiMAX 처리군: 2 μl RNAiMAX 형질감염 시약 및 이중 가닥 HJT-sRNA-m7 용액을 100 μl opti-MEM 배지에 각각 희석한 다음에, 상기 둘을 혼합하고, 15분 동안 방치하고, 세포내로 첨가한 다음에, 혼합하였다. 이중 가닥 HJT-sRNA-m7의 최종 농도는 100 nM이었다;

[0898] 3) 자유 섭취군: 이중 가닥 HJT-sRNA-m7 용액을 직접 첨가하였다 (최종 농도는 100 nM이었다);

[0899] 4) 지질 조합 (PE (번호 8) & So (번호 31), 4:1, V/V) 및 HJT-sRNA-m7 혼합물의 처리군: 비등법에 의해 처리된 2 μL 지질 조합과 HJT-sRNA-m7 이중 가닥 핵산 용액의 혼합물을 세포에 첨가하고, 혼합하고, RNA의 최종 농도는 100 nM이었다;

[0900] 5) 지질 조합 및 이중 가닥 HJT-sRNA-m7 혼합물의 처리군: 비등법에 의해 처리된 지질 조합 (PE (번호 8) & So (번호 31), 4:1, V/V)과 다른 유형의 지질 (MG (번호 34), DG (번호 2), LPC (번호 37), PC (번호 12), PC (번호 11), Cer (번호 4), FA (번호 29) 또는 TG (번호 32)의 혼합물, 12:3:5, V/V, 도 48)과 HJT-sRNA-m7 이중 가닥 핵산 용액의 혼합물을 세포에 첨가하고, 혼합하고, RNA의 최종 농도는 100 nM이었다;

[0901] 2. 실험 절차

[0902] 1) 비등법 조건: 100 μL 이중 가닥 HJT-sRNA-m7 용액에 2 μL 지질 조합을 첨가하고, 90℃에서 15분 동안 가열하였다;

[0903] 2) 실험 조건: HJT-sRNA-m7의 최종 농도는 100 nM이었고, 세포에 첨가 후 12시간에 세포에 진입한 HJT-sRNA-m7의 양을 RT-qPCR 방법에 의해 검출하였다. 프로토콜에 대해서, "지질에 의해 전달된 핵산의 세포내 발현의 실시간 정량적 PCR 검출"을 참조한다. 모든 실험을 삼중으로 수행하였다.

[0904] **결론:** 결과는 상기 지질 조합이 핵산을 세포내로 전달하기에 효과적이고 (도 48 참조), 임상 환경에서 핵산 약물의 전달 효율을 개선시킬 가능성을 가짐을 나타냈다. PE (번호 8):So (번호 31) (4:1, V/V)는 RNAiMAX에 가까운 효과로 핵산을 세포내로 효과적으로 전달할 수 있었다. PE (번호 8):So (번호 31)와 비교하여, 12:3:5의 비율의 PE (번호 8):So (번호 31) 및 MG (번호 34), DG (번호 2), PC (번호 12), PC (번호 11), 또는 TG (번호 32)의 혼합물은 핵산 전달 효과를 증진시킬 수 있었고, PE (번호 8):So (번호 31):PC (번호 11)는 RNAiMAX보다

상당히 더 양호한, 최선의 효과를 나타냈다.

[0905] **실시예 2-17: 지질 조합에 의한 MRC-5 세포내로의 이중 가닥 핵산의 전달**

[0906] 1. 실험군:

[0907] 1) 미처리 군: 미처리된 세포;

[0908] 2) RNAiMAX 처리군: 2 μl RNAiMAX 형질감염 시약 및 이중 가닥 HJT-sRNA-m7 용액을 100 μl opti-MEM 배지에 각각 희석한 다음에, 상기 둘을 혼합하고, 15분 동안 방치하고, 세포내로 첨가한 다음에, 혼합하였다. 이중 가닥 HJT-sRNA-m7의 최종 농도는 100 nM이었다;

[0909] 3) 자유 섭취군: 이중 가닥 HJT-sRNA-m7 용액을 직접 첨가하였다 (최종 농도는 100 nM이었다);

[0910] 4) 지질 조합 (PE (번호 8):Cer (번호 4), 4:1, V/V) 및 HJT-sRNA-m7 혼합물의 처리군: 비등법에 의해 처리된 2 μL 지질 조합과 HJT-sRNA-m7 이중 가닥 핵산 용액의 혼합물을 세포에 첨가하고, 혼합하고, RNA의 최종 농도는 100 nM이었다;

[0911] 5) 지질 조합 및 이중 가닥 HJT-sRNA-m7 혼합물의 처리군: 비등법에 의해 처리된 지질 조합 (PE (번호 8):Cer (번호 4)과 다른 유형의 지질 MG (번호 34), DG (번호 2), LPC (번호 37), PC (번호 12), PC (번호 31), FA (번호 29) 또는 TG (번호 32)의 혼합물, 12:3:5, V/V, 도 49)과 이중 가닥 HJT-sRNA-m7 핵산 용액의 혼합물을 세포에 첨가하고, 혼합하고, RNA의 최종 농도는 100 nM이었다;

[0912] 2. 실험 절차

[0913] 1) 비등법 조건: 100 μL 이중 가닥 HJT-sRNA-m7 용액에 2 μL 지질 조합을 첨가하고, 90℃에서 15분 동안 가열하였다;

[0914] 2) 실험 조건: HJT-sRNA-m7의 최종 농도는 100 nM이었고, 세포에 첨가 후 12시간에 세포에 진입한 HJT-sRNA-m7의 양을 RT-qPCR 방법에 의해 검출하였다. 프로토콜에 대해서, "지질에 의해 전달된 핵산의 세포내 발현의 실시간 정량적 PCR 검출"을 참조한다. 모든 실험을 삼중으로 수행하였다.

[0915] **결론:** 결과는 상기 지질 조합이 핵산을 세포내로 전달하기에 효과적이고 (도 49 참조), 임상 환경에서 핵산 약물의 전달 효율을 개선시킬 가능성을 가짐을 나타냈다. 지질 조합 PE (번호 8):Cer (번호 4)는 RNAiMAX에 가까운 효과로 핵산을 세포내로 효과적으로 전달할 수 있었다. PE (번호 8): So (번호 31)와 비교하여, 12:3:5의 비율의 PE (번호 8): So (번호 31) 및 DG (번호 2), FA (번호 29) 또는 TG (번호 32)의 혼합물은 핵산 전달 효과를 증진시킬 수 있었고, FA (번호 29)는 PE (번호 8):So (번호 31)의 전달 효과를 크게 개선시킬 수 있었다 (RNAiMAX보다 상당히 더 양호).

[0916] **실시예 3: 지질 조합은 소화관을 통한 폐로의 핵산 진입을 촉진한다**

[0917] 지질 조합은 다음과 같았다:

[0918] 지질 PE (번호 38) & LPC (번호 37) & TG (번호 32), 4:2:3, V/V/V

[0919] 1. 지질 핵산 혼합물의 제조:

[0920] 방법: 비등법

[0921] DEPC-처리 수용액 중 400 μL의 HJT-sRNA-m7 (5 nmol) 단일 가닥 RNA에 9 μL 또는 18 μL 지질 조합 (지질 PE (번호 38) & LPC (번호 37) & TG (번호 32), 4:2:3, V/V/V)을 첨가하고, 혼합하고 100℃에서 30분 동안 가열하였다.

[0922] 2. 소화관을 통한 핵산의 전달 실험

[0923] RNA를 위관영양을 통해 6-8주령 수컷 C57 마우스에 투여하였다: 수용액 중 HJT-sRNA-m7 또는 지질과 HJT-sRNA-m7의 혼합물 용액을 위관영양 바늘을 통해, 400 μL/동물 (HJT-sRNA-m7, 5 nmol/동물)에게 투여하였다. 군은 다음과 같았다:

[0924] (1) 대조군 (미처리 군): 어떠한 처리도 받지 않은 마우스;

[0925] (2) 음성 대조군 (지질 군): 위관영양을 통한 9 μL 지질 조합 (지질 PE (번호 38) & LPC (번호 37) & TG (번호 32), 4:2:3, V/V/V)의 투여;

[0926] (3) 자유 섭취군: 위관영양을 통한 단일 가닥 HJT-sRNA-m7 RNA의 직접 투여;

[0927] (4) 지질 및 핵산 혼합물 군: 위관영양을 통한 지질 조합과 단일 가닥 HJT-sRNA-m7 RNA의 혼합물의 투여.

[0928] 위관영양을 통한 투여 후 3시간에, 마우스 전체 폐를 3 mL 트리졸로 용해시키고, 총 RNA를 추출하고 HJT-sRNA-m7의 존재도를 RT-qPCR에 의해 검출하였다.

[0929] **결론:** 도 50에 나타낸 바와 같이, 9 μL 또는 18 μL 지질 조합 (지질 PE (번호 38) & LPC (번호 37) & TG (번호 32), 4:2:3, V/V/V)은 자유 섭취군과 비교하여 폐 조직으로의 핵산의 소형 단편의 진입을 상당히 촉진하였다 (* 0.05 미만의 P 값을 나타냄). 위관영양을 통한 이 (비침습적) 투여로, 지질 조합 (지질 PE (번호 38) & LPC (번호 37) & TG (번호 32), 4:2:3, V/V/V)은 핵산의 소형 단편이 폐 조직에 진입하는 것을 촉진할 수 있었고, 이는 핵산 약물 전달의 수단으로서 사용될 수 있었다.

[0930] **실시예 4: 중국 전통 의약-유래 지질 혼합물에 의해 매개된 세포내로의 이중 가닥 핵산의 전달 기능 실험**

[0931] 1. 번호 8 (PE):번호 12 (PC) (v:v=1:2) 지질 혼합물은 기능적으로 세포로의 핵산의 진입을 매개하였다.

[0932] 실험 방법: 웨스턴 블롯, 상기 "단백질 발현 수준의 웨스턴 블롯 검출"을 참조한다.

[0933] 1) 번호 8 (PE):번호 12 (PC) (v:v=1:2) 지질 혼합물은 MRC-5 세포로의 항섬유성 이중 가닥 HJT-sRNA-m7 진입을 매개하였다.

[0934] 도 51에 나타낸 바와 같이, 비등법 및 역 증발법에 의하면, 번호 8 (PE):번호 12 (PC) (V:V=1:2) 지질 혼합물은 기능적으로 핵산을 세포내로 효과적으로 전달할 수 있었다.

[0935] 미처리 군: 미처리된 MRC-5 세포, 즉, 블랭크 대조군;

[0936] TGFβ G1 군: MRC-5 세포를 TGFβ1 단백질 (3 ng/mL의 최종 농도)로 자극하고, 샘플을 72시간 후 수집하였다.

[0937] NC 군: 번호 8 (PE):번호 12 (PC) (V:V=1:2)의 지질 조합과 이중 가닥 NC 모방체의 혼합물을 MRC-5 세포에 첨가하고 잘 혼합하고, 핵산의 최종 농도는 200 nM이었다. 24시간 후, 세포를 TGFβ1 단백질 (3 ng/mL의 최종 농도)로 자극하고, 샘플을 TGFβ1로 자극 후 72시간에 수집하였다.

[0938] M7 군: 번호 8 (PE):번호 12 (PC) (V:V=1:2)의 지질 조합과 이중 가닥 HJT-sRNA-m7의 혼합물을 MRC-5 세포에 첨가하고 혼합하고, 핵산의 최종 농도는 200 nM이었다. 24시간 후, 세포를 TGFβ1 단백질 (3 ng/mL의 최종 농도)로 자극하고, 샘플을 72시간 후 수집하였다.

[0939] 2) 번호 8 (PE):번호 12 (PC) (v:v=1:2) 지질 혼합물은 A549 세포로의 siRNA 진입을 매개하였다.

[0940] 도 52 및 53에 나타낸 바와 같이, 비등법에 의하면, 지질 번호 8 (PE):번호 12 (PC) (v:v=1:2) 지질 혼합물은 핵산을 세포내로 효과적으로 전달하여 단백질 발현을 녹다운시킬 수 있었다.

[0941] 도 52에서의 미처리 군: 미처리된 세포, 즉, 블랭크 대조군;

[0942] si-NC: 번호 8 (PE):번호 12 (PC) (v:v=1:2)의 지질 조합과 si-NC (광저우 리보비오 캄파니, 리미티드 (Guangzhou Ribobio Co., Ltd.)에 의해 합성됨, 미지의 서열)의 혼합물을 A549 세포에 첨가하고 혼합하고, 최종 농도는 400 nM이었고; 세포를 48시간 후에 수확하고, RIPA 강한 용해 완충제에 의해 용해시켜 단백질 샘플을 수집하였다.

[0943] si-CPSF30: 번호 8 (PE):번호 12 (PC) (v:v=1:2)의 지질 조합과 si-CPSF30의 혼합물을 A549 세포에 첨가하고 혼합하고, 최종 농도는 400 nM이었고; 세포를 48시간 후에 수확하고, RIPA 강한 용해 완충제에 의해 용해시켜 단백질 샘플을 수집하였다.

[0944] si-LAMP1: 번호 8 (PE):번호 12 (PC) (v:v=1:2)의 지질 조합과 si-LAMP1의 혼합물을 A549 세포에 첨가하고 혼합하고, 최종 농도는 400 nM이었고; 세포를 48시간 후에 수확하고, RIPA 강한 용해 완충제에 의해 용해시켜 단백질 샘플을 수집하였다.

[0945] si-LAMP2: 번호 8 (PE):번호 12 (PC) (v:v=1:2)의 지질 조합과 si-LAMP2의 혼합물을 A549 세포에 첨가하고 혼합하고, 최종 농도는 400 nM이었고; 세포를 48시간 후에 수확하고, RIPA 강한 용해 완충제에 의해 용해시켜 단백질 샘플을 수집하였다.

[0946] 도 53에 나타낸 바와 같은 자유 섭취군: 핵산 용액을 직접 첨가하였다.

[0947] 리포(Lipo) 2000 군: 2 μL 리포펙타민™ 2000 형질감염 시약 (인비트로겐, 써모 피셔 사이언티픽) 및 si-NF-κB 용액을 100 μL opti-MEM 배지에 각각 희석하고, 상기 둘을 혼합하고, 15분 동안 방치하고, 세포에 첨가하고, 혼합하고, 핵산 용액의 최종 농도는 400 nM이었고; 24시간 후, 세포를 폴리I:C (농도는 1 μg/mL이었다)로 자극하고, 단백질 샘플을 6시간 후 수집하였다.

[0948] 번호 8 (PE):번호 12 (PC) (1:2): 번호 8 (PE):번호 12 (PC) (1:2)를 가열법에 의해 si-NF-κB 용액과 혼합한 다음에, 세포에 첨가하고, 핵산 용액의 최종 농도는 400 nM이었고; 24시간 후, 세포를 폴리I:C (농도는 1 μg/mL이었다)로 자극하고, 단백질 샘플을 6시간 후 수집하였다.

[0949] 상기 핵산의 유형 및 서열에 관해서는 표 2를 참조한다.

[0950] 3) 번호 8 (PE):번호 12 (PC) (v:v=1:2) 지질 혼합물은 THP-1 세포로의 siRNA 진입을 매개하였다.

[0951] 도 54에 나타낸 바와 같이, 비등법에 의하면, 번호 8 (PE):번호 12 (PC) (v:v=1:2) 지질 혼합물은 기능적으로 핵산을 세포내로 효과적으로 전달할 수 있었다.

[0952] 미처리 군: 미처리된 세포, 즉, 블랭크 대조군;

[0953] LPS 군: siRNA가 아니라 LPS만을 자극을 위해 첨가하였고, 최종 농도는 1 μg/mL이었다. RNA 샘플 및 세포 상청액은 9시간 후에 수확하였다;

[0954] si-NC 군: 번호 8 (PE):번호 12 (PC) (v:v=1:2)의 지질 조합과 si-NC의 혼합물을 THP-1 세포에 첨가하고, 혼합하고, 최종 농도는 400 nM이었고; LPS를 24시간 후 1 μg/mL의 최종 농도로 첨가하여 자극하고, 세포의 트리졸 용해물을 자극 후 9시간에 수집하고, ELISA 검출을 위해 상청액을 수집하였다.

[0955] si-TNFα 군: 번호 8 (PE):번호 12 (PC) (v:v=1:2)의 지질 조합과 si-TNFα의 혼합물을 THP-1 세포에 첨가하고, 혼합하고, 최종 농도는 400 nM이었고; LPS를 24시간 후 1 μg/mL의 최종 농도로 첨가하여 자극하고, 세포의 트리졸 용해물을 자극 후 9시간에 수집하고, ELISA 검출을 위해 상청액을 수집하였다.

[0956] 2. 번호 8 (PE):번호 12 (PC):번호 2 (DG) (v:v:v=2:4:3) 지질 혼합물은 기능적으로 세포로의 핵산의 진입을 매개하였다.

[0957] 1) 번호 8 (PE):번호 12 (PC):번호 2 (DG) (v:v:v=2:4:3) 지질 혼합물은 MRC-5 세포로의 항섬유성 HJT-sRNA-m7 진입을 매개하였다.

[0958] 도 55에 나타낸 바와 같이, 비등법에 의하면, 번호 8 (PE):번호 12 (PC):번호 2 (DG) (v:v:v=2:4:3) 지질 혼합물은 항섬유성 HJT-sRNA-m7을 MRC-5 세포내로 효과적으로 전달하여 피브로넥틴 단백질 발현을 감소시킬 수 있었다.

[0959] 2) 번호 8 (PE):번호 12 (PC):번호 2 (DG) (v:v:v=2:4:3) 지질 혼합물은 A549 세포로의 XRN2 siRNA 진입을 매개하여 유전자 발현을 억제하였다.

[0960] 도 56에 나타낸 바와 같이, 비등법에 의하면, 번호 2 (DG)의, 번호 8 (PE): 번호 12(PC): 번호 20 (DG), V:V:V=2:4:3의 혼합물로의 첨가는 기능적으로 핵산을 세포내로 효과적으로 전달할 수 있었다

[0961] 미처리 군: 미처리된 A549 세포;

[0962] NC siRNA 군: 비등법에 의해 제조된 번호 8 (PE):번호 12 (PC):번호 2 (DG) (v:v:v=2:4:3)의 지질 혼합물과 si-NC의 혼합물을 세포에 첨가하고 혼합하고, 핵산의 최종 농도는 400 nM이었다;

[0963] XRN2 siRNA 군: 비등법에 의해 제조된 번호 8 (PE):번호 12 (PC):번호 2 (DG) (v: v: v=2:4:3)의 지질 혼합물과 XRN2 siRNA의 혼합물을 세포에 첨가하고 혼합하고, 핵산의 최종 농도는 400 nM이었다.

[0964] 3. 번호 8 (PE):번호 12 (PC):번호 4 (Cer) (v:v:v=1:2:1) 지질 혼합물은 기능적으로 세포로의 핵산의 진입을 매개하였다.

[0965] 1) 번호 8 (PE):번호 12 (PC): 번호 4 (Cer) (v:v:v=1:2:1) 지질 혼합물은 MRC-5 세포로의 항섬유성 HJT-sRNA-m7 진입을 매개하였다 (비등법).

[0966] 도 57에 나타낸 바와 같이, 비등법에 의하면, 번호 4 (Cer)의, 번호 8 (PE), 번호 12 (PC) (V:V=1:2), v:v:v=1:2:1의 지질 혼합물로의 첨가는, 항섬유성 HJT-sRNA-m7을 MRC-5 세포내로 효과적으로 전달하여 피브로넥

틴 단백질 발현을 감소시킬 수 있었다.

[0967] 미처리 군: 미처리된 세포;

[0968] TGF-β1 군: TGF-β1 단백질을 3 ng/mL의 최종 농도로 첨가하여 자극하고, 샘플을 72시간 후 수집하였다.

[0969] NC 군: 번호 38 (PE):번호 37 (LPC):번호 32 (TG) (V:V:V=32:8:5)의 지질 조합을 사용하여 NC 모방체를 전달하였다. 24시간 후, TGF-β1 TGFb1 단백질 (3 ng/mL의 최종 농도)을 첨가하여 자극하고, 샘플을 72시간 후 수집하였다.

[0970] m7 군: 번호 8 (PE):번호 12 (PC):번호 4 (Cer) (V:V:V=1:2:1)의 지질 조합과 이중 가닥 HJT-sRNA-m7의 혼합물을 MRC-5 세포에 첨가하고 혼합하고, 핵산의 최종 농도는 400 nM이었다. 24시간 후, TGF-β1 단백질 (3 ng/mL의 최종 농도)을 첨가하여 자극하고, 샘플을 72시간 후 수집하였다.

[0971] 2) 번호 8 (PE):번호 12 (PC):번호 4 (Cer) (v:v:v=1:2:1) 지질 혼합물은 A549 세포로의 NF-κB siRNA 진입을 매개하여 유전자 발현을 억제하였다 (비등법).

[0972] 도 58에 나타낸 바와 같이, 번호 8 (PE), 번호 12 (PC) (V:V=1:2), v:v:v=1:2:1의 지질 혼합물로의 번호 4 (Cer)의 첨가는 기능적으로 핵산을 세포내로 효과적으로 전달할 수 있었다.

[0973] 미처리 군: 미처리된 세포;

[0974] si-NC 군: 번호 8 (PE):번호 12 (PC):번호 4 (Cer) (v:v:v=1:2:1)의 지질 혼합물과 si-NC siNC의 혼합물을 세포에 첨가하고 혼합하고, 핵산의 최종 농도는 400 nM이었다;

[0975] si-NF-κB 군: 번호 8 (PE):번호 12 (PC):번호 4 (Cer) (v:v:v=1:2:1)의 지질 혼합물과 NF-κB siRNA의 혼합물을을 세포에 첨가하고 혼합하고, 핵산의 최종 농도는 400 nM이었다;

[0976] 4. 번호 8 (PE):번호 12 (PC):번호 PC (11) (v:v:v=1:2:1) 지질 혼합물은 기능적으로 세포로의 핵산의 진입을 매개하였다.

[0977] 1) 번호 8 (PE):번호 12 (PC):번호 PC (11) (v:v:v=1:2:1) 지질 혼합물은 A549 세포로의 XRN2 siRNA 진입을 매개하여 유전자 발현을 억제하였다.

[0978] 도 59에 나타낸 바와 같이, 번호 11 (PC)의, 번호 8 (PE), 번호 12 (PC) (V:V=1:2), V:V:V=1:2:1의 혼합물로의 첨가는, 기능적으로 핵산을 세포내로 효과적으로 전달할 수 있었다

[0979] 미처리 군: 미처리된 세포;

[0980] si-NC siNC 군: 번호 8 (PE):번호 12 (PC):번호 PC(11) (v:v:v=1:2:1)의 지질 혼합물과 si-NC의 혼합물을 세포에 첨가하고 혼합하고, 핵산의 최종 농도는 400 nM이었다;

[0981] si-XRN2 군: 번호 8 (PE):번호 12 (PC): 번호 PC(11) (v:v:v=1:2:1)의 지질 혼합물과 XRN2 siRNA의 혼합물을 세포에 첨가하고 혼합하고, 핵산의 최종 농도는 400 nM이었다.

[0982] 5. 번호 8 (PE):번호 12 (PC):번호 LPC (37) (v:v:v=1:2:1) 지질 혼합물은 기능적으로 세포로의 핵산의 진입을 매개하였다.

[0983] 1) 번호 8 (PE):번호 12 (PC):번호 LPC (37) (v:v:v=1:2:1) 지질 혼합물은 A549 세포로의 XRN2 siRNA 진입을 매개하여 유전자 발현을 억제하였다.

[0984] 도 60에 나타낸 바와 같이, 번호 37 (LPC)의 번호 8 (PE), 번호 12 (PC) (V:V=1:2), V:V:V=1:2:1의 지질 혼합물로의 첨가를 기준으로, 기능적으로 핵산을 세포내로 효과적으로 전달할 수 있었다.

[0985] 미처리 군: 미처리된 세포;

[0986] si-NC 군: 번호 8 (PE):번호 12 (PC):번호 LPC (37) (v:v:v=1:2:1)의 지질 혼합물과 si-NC의 혼합물을 세포에 첨가하고 혼합하고, 핵산의 최종 농도는 400 nM이었다;

[0987] si-XRN2 군: 번호 8 (PE):번호 12 (PC): 번호 LPC (37) (v:v:v=1:2:1)의 지질 혼합물과 XRN2 siRNA의 혼합물을 세포에 첨가하고 혼합하고, 핵산의 최종 농도는 400 nM이었다.

[0988] 6. 번호 8 (PE):번호 12 (PC):번호 MG (34) (v:v:v=2:3:1) 지질 혼합물은 기능적으로 세포로의 핵산의 진입을

매개하였다.

[0989] 1) 번호 8 (PE):번호 12 (PC):번호 MG (34) (v:v:v=2:3:1) 지질 혼합물은 A549 세포로의 CPSF4 siRNA 진입을 매개하여 유전자 발현을 억제하였다.

[0990] 미처리 군: 미처리된 세포;

[0991] si-NC siNC 군: 번호 8 (PE):번호 12 (PC):번호 MG (34) (v:v:v=2:3:1)의 지질 혼합물과 si-NCsiNC의 혼합물을 세포에 첨가하고 혼합하고, 핵산의 최종 농도는 400 nM이었다;

[0992] si-CPSF4 군: 번호 8 (PE):번호 12 (PC): 번호 MG (34) (v:v:v=2:3:1)의 지질 혼합물과 CPSF4 siRNA의 혼합물을 세포에 첨가하고 혼합하고, 핵산의 최종 농도는 400 nM이었다.

[0993] 도 61에 나타낸 바와 같이, 번호 8 (PE):번호 12 (PC):번호 MG (34) (v:v:v=2:3:1) 지질 혼합물은 기능적으로 핵산을 세포내로 효과적으로 전달할 수 있었다

[0994] 7. 번호 38 (PE):번호 37 (LPC):번호 32 (TG) (v:v:v=32:8:5) 지질 혼합물은 기능적으로 세포로의 핵산의 진입을 매개하였다.

[0995] 1) 번호 38 (PE):번호 37 (LPC):번호 32 (TG) (v:v:v=32:8:5) 지질 혼합물은 MRC-5 세포로의 항섬유성 HJT-sRNA-m7 진입을 매개하였다 (비등법).

[0996] 도 62에 나타낸 바와 같이, m7 밴드는 대조군과 비교하여 더 밝았다. M7의 효과는 세포를 자극되지 않은 수준으로 회복시키기에 충분하지 않았다.

[0997] 미처리 군: 미처리된 세포, 즉, 블랭크 대조군;

[0998] TGF-β1 군: 세포를 TGF-β1 단백질 (3 ng/mL의 최종 농도)로 자극하고, 샘플을 72시간 후 수집하였다.

[0999] NC 군: 번호 38 (PE):번호 37 (LPC):번호 32 (TG) (V:V:V=32:8:5)의 지질 조합을 사용하여 NC 모방체를 전달하였다. 24시간 후, 세포를 TGF-β1 단백질 (3 ng/mL의 최종 농도)로 자극하고, 샘플을 72시간 후 수집하였다.

[1000] M7 군: 번호 38 (PE):번호 37 (LPC):번호 32 (TG) (V:V:V=32:8:5)의 지질 조합과 이중 가닥 HJT-sRNA-m7의 혼합물을 MRC-5 세포에 첨가하고 혼합하고, 핵산의 최종 농도는 400 nM이었다. 24시간 후, 세포를 TGF-β1 단백질 (3 ng/mL의 최종 농도)로 자극하고, 샘플을 72시간 후 수집하였다.

[1001] 2) 번호 38 (PE):번호 37 (LPC):번호 32 (TG) (V:V:V=32:8:5) 지질 혼합물은 A549 세포로의 XRN2 siRNA 진입을 매개하여 유전자 발현을 억제하였다.

[1002] 도 63에 나타낸 바와 같이, 번호 38 (PE):번호 37 (LPC):번호 32 (TG) (V:V:V=32:8:5) 지질 혼합물은 기능적으로 세포에 진입하는 핵산을 효과적으로 전달할 수 있었다.

[1003] si-NC 군: 번호 38 (PE):번호 37 (LPC):번호 32 (TG) (V:V:V=32:8:5)의 지질 혼합물과 si-NC의 혼합물을 세포에 첨가하고 혼합하고, 핵산의 최종 농도는 400 nM이었다;

[1004] si-XRN2 군: 번호 38 (PE):번호 37 (LPC):번호 32 (TG) (V:V:V=32:8:5)의 지질 혼합물과 XRN2 siRNA의 혼합물을 세포에 첨가하고 혼합하고, 핵산의 최종 농도는 400 nM이었다.

[1005] 8. 번호 1 (DG):번호 8 (PE):번호 12 (PC):번호 4 (Cer):번호 31 (So):번호 29 (FA):번호 16 (TG) (v:v:v:v:v:v:v=2:1:2:2:3:1:3) 지질 혼합물은 기능적으로 세포로의 핵산의 진입을 매개하였다.

[1006] 1) 도 64에 나타낸 바와 같이, 번호 1 (DG):번호 8 (PE):번호 12 (PC):번호 4 (Cer):번호 31 (So):번호 29 (FA):번호 16 (TG) (v:v:v:v:v:v:v=2:1:2:2:3:1:3) 지질 혼합물은 MRC-5 세포로의 항섬유성 HJT-sRNA-m7 진입을 매개하였다 (비등법).

[1007] 미처리 군: 미처리된 세포, 즉, 블랭크 대조군;

[1008] TGF-β1 군: 세포를 TGF-β1 단백질 (3 ng/mL의 최종 농도)로 자극하고, 샘플을 72시간 후 수집하였다.

[1009] NC 군: 번호 1 (DG):번호 8 (PE):번호 12 (PC):번호 4 (Cer):번호 31 (So):번호 29 (FA):번호 16 (TG) (v:v:v:v:v:v:v=2:1:2:2:3:1:3)의 지질 조합을 사용하여 NC 모방체를 전달하였다. 24시간 후, TGF-β1 단백질 (3 ng/mL의 최종 농도)을 첨가하여 자극하고, 샘플을 72시간 후 수집하였다.

[1010] M7 군: 번호 1 (DG):번호 8 (PE):번호 12 (PC):번호 4 (Cer):번호 31 (So):번호 29 (FA):번호 16 (TG)

(v:v:v:v:v:v:v=2:1:2:2:3:1:3)의 지질 조합과 단일 가닥 HJT-sRNA-m7의 혼합물을 MRC-5 세포에 첨가하고, 혼합하고, 핵산의 최종 농도는 400 nM이었다. 24시간 후, TGF-β1 단백질 (3 ng/mL의 최종 농도)을 첨가하여 자극하고, 샘플을 72시간 후 수집하였다.

[1011] 2) 도 65에 나타낸 바와 같이, 번호 1 (DG):번호 8 (PE):번호 12 (PC):번호 4 (Cer):번호 31 (So):번호 29 (FA):번호 16 (TG) (v:v:v:v:v:v:v=2:1:2:2:3:1:3) 지질 혼합물은 A549 세포로의 XRN2 siRNA 진입을 매개하여 유전자 발현을 억제하였다 (비등법).

[1012] 번호 1 (DG):번호 8 (PE):번호 12 (PC):번호 4 (Cer):번호 31 (So):번호 29 (FA):번호 16 (TG) (v:v:v:v:v:v:v=2:1:2:2:3:1:3) 지질 혼합물은 기능적으로 세포에 진입하는 핵산을 효과적으로 전달할 수 있었다.

[1013] si-NC 군: 번호 1 (DG):번호 8 (PE):번호 12 (PC):번호 4 (Cer):번호 31 (So):번호 29 (FA):번호 16 (TG) (v:v:v:v:v:v:v=2:1:2:2:3:1:3)의 지질 혼합물과 si-NC의 혼합물을 세포에 첨가하고 혼합하고, 핵산의 최종 농도는 400 nM이었다;

[1014] si-XRN2 군: 번호 1 (DG):번호 8 (PE):번호 12 (PC):번호 4 (Cer):번호 31 (So):번호 29 (FA):번호 16 (TG) (v:v:v:v:v:v:v=2:1:2:2:3:1:3)의 지질 혼합물과 XRN2 siRNA의 혼합물을 세포에 첨가하고 혼합하고, 핵산의 최종 농도는 400 nM이었다.

[1015] 9. 번호 8 (PE):번호 12 (PC):번호 31 (So):번호 29 (FA):번호 4 (Cer) (v:v:v:v:v=2:4:2:2:5) 지질 혼합물은 기능적으로 세포로의 핵산의 진입을 매개하였다.

[1016] 1) 도 66에 나타낸 바와 같이, 번호 8 (PE):번호 12 (PC):번호 31 (So):번호 29 (FA):번호 4 (Cer) (v:v:v:v:v=2:4:2:2:5) 지질 혼합물은 MRC-5 세포로의 항섬유성 HJT-sRNA, HJT-sRNA-3, HJT-sRNA-a2, HJT-sRNA-h3, HJT-sRNA-m7 진입을 매개하였다 (비등법).

[1017] 미처리 군: 미처리된 세포, 즉, 블랭크 대조군;

[1018] TGF-β1 군: 세포를 TGF-β1 단백질 (3 ng/mL의 최종 농도)로 자극하고, 샘플을 72시간 후 수집하였다.

[1019] NC 군: 번호 8 (PE):번호 12 (PC):번호 31 (So):번호 29 (FA):번호 4 (Cer) (v:v:v:v:v=2:4:2:2:5)의 지질 조합을 사용하여 NC 모방체를 전달하였다. 24시간 후, 세포를 TGF-β1 단백질 (3 ng/mL의 최종 농도)로 자극하고, 샘플을 72시간 후 수집하였다.

[1020] M7 군: 번호 8 (PE):번호 12 (PC):번호 31 (So):번호 29 (FA):번호 4 (Cer) (v:v:v:v:v=2:4:2:2:5)의 지질 조합과 HJT-sRNA-m7 단일 가닥의 혼합물을 MRC-5 세포에 첨가하고, 혼합하고, 핵산의 최종 농도는 400 nM이었다. 24시간 후, 세포를 TGF-β1 단백질 (3 ng/mL의 최종 농도)로 자극하고, 샘플을 72시간 후 수집하였다.

[1021] 2) 도 67에 나타낸 바와 같이, 번호 8 (PE):번호 12 (PC):번호 31 (So):번호 29 (FA):번호 4 (Cer) (v:v:v:v:v=2:4:2:2:5) 지질 혼합물은 A549 세포로의 XRN2 siRNA 진입을 매개하여 유전자 발현을 억제하였다 (비등법).

[1022] 번호 8 (PE):번호 12 (PC):번호 31 (So):번호 29 (FA):번호 4 (Cer) (v:v:v:v:v=2:4:2:2:5) 지질 혼합물은 기능적으로 핵산을 세포내로 효과적으로 전달할 수 있었다

[1023] si-NC 군: 번호 8 (PE):번호 12 (PC):번호 31 (So):번호 29 (FA):번호 4 (Cer) (v:v:v:v:v=2:4:2:2:5)의 지질 혼합물과 si-NC의 혼합물을 세포에 첨가하고 혼합하고, 핵산의 최종 농도는 400 nM이었다;

[1024] si-XRN2 군: 번호 8 (PE):번호 12 (PC):번호 31 (So):번호 29 (FA):번호 4 (Cer) (v:v:v:v:v=2:4:2:2:5)의 지질 혼합물과 XRN2 siRNA의 혼합물을 세포에 첨가하고 혼합하고, 핵산의 최종 농도는 400 nM이었다.

[1025] 10. 번호 38 (PE):번호 37 (LPC) (v:v =4:1) 지질 혼합물은 기능적으로 세포로의 핵산의 진입을 매개하였다.

[1026] 1) 도 68에 나타낸 바와 같이, 번호 38 (PE):번호 37 (LPC) (v:v =4:1) 지질 혼합물은 MRC-5 세포로의 항섬유성 HJT-sRNA, HJT-sRNA-3, HJT-sRNA-a2, HJT-sRNA-h3, HJT-sRNA-m7 진입을 매개하였다 (비등법).

[1027] 미처리 군: 미처리된 세포, 즉, 블랭크 대조군;

[1028] TGF-β1 군: 세포를 TGF-β1 단백질 (3 ng/mL의 최종 농도)로 자극하고, 샘플을 72시간 후 수집하였다.

[1029] NC 군: 번호 38 (PE):번호 37 (LPC) (v:v =4:1)의 지질 조합을 사용하여 NC 모방체를 전달하였다. 24시간 후,

세포를 TGF-β1 단백질 (3 ng/mL의 최종 농도)로 자극하고, 샘플을 72시간 후 수집하였다.

[1030] M7 군: 번호 38 (PE):번호 37 (LPC) (v:v =4:1)의 지질 조합과 HJT-sRNA-3, HJT-sRNA-a2, HJT-sRNA-h3, HJT-sRNA-m7의 혼합물을 MRC-5 세포에 첨가하고, 혼합하고, 핵산의 최종 농도는 400 nM이었다. 24시간 후, 세포를 TGF-β1 단백질 (3 ng/mL의 최종 농도)로 자극하고, 샘플을 72시간 후 수집하였다.

[1031] 2) 도 69에 나타낸 바와 같이, 번호 38 (PE):번호 37 (LPC) (v:v =4:1) 지질 혼합물은 A549 세포로의 XRN2 siRNA 진입을 매개하여 유전자 발현을 억제하였다 (비등법).

[1032] 번호 38 (PE):번호 37 (LPC) (v:v =4:1) 지질 혼합물은 기능적으로 세포에 진입하는 핵산을 효과적으로 전달할 수 있었다.

[1033] si-NC 군: 번호 38 (PE):번호 37 (LPC) (v:v =4:1)의 지질 혼합물과 si-NC의 혼합물을 세포에 첨가하고 혼합하고, 핵산의 최종 농도는 400 nM이었다;

[1034] si-XRN2 군: 번호 38 (PE):번호 37 (LPC) (v:v =4:1)의 지질 혼합물과 XRN2 siRNA의 혼합물을 세포에 첨가하고 혼합하고, 핵산의 최종 농도는 400 nM이었다.

[1035] 11. 번호 38 (PE):번호 12 (PC):번호 2 (DG) (v:v:v =4:1:3) 지질 혼합물은 기능적으로 세포로의 핵산의 진입을 매개하였다.

[1036] 도 70에 나타낸 바와 같이, 번호 38 (PE):번호 12 (PC):번호 2 (DG) (v:v:v =4:1:3) 지질 혼합물은 A549 세포로의 XRN2 siRNA 진입을 매개하여 유전자 발현을 억제하였다.

[1037] 번호 8 (PE) 대신에, 번호 38 (PE)과 번호 12 (PC), 번호 2 (DG) (v:v:v=4:1:3)의 지질 혼합물은 기능적으로 세포에 진입하는 핵산을 효과적으로 전달할 수 있었다.

[1038] si-NC 군: 번호 38 (PE):번호 12 (PC):번호 2 (DG) (v:v:v =4:1:3)의 지질 혼합물과 si-NC의 혼합물을 세포에 첨가하고 혼합하고, 핵산의 최종 농도는 400 nM이었다;

[1039] si-XRN2 군: 번호 38 (PE):번호 12 (PC):번호 2 (DG) (v:v:v =4:1:3)의 지질 혼합물과 XRN2 siRNA의 혼합물을 세포에 첨가하고 혼합하고, 핵산의 최종 농도는 400 nM이었다.

[1040] 12. 번호 38 (PE):번호 37 (LPC):번호 12 (PC) (v:v:v =4:1:1) 지질 혼합물은 기능적으로 세포로의 핵산의 진입을 매개하였다.

[1041] 도 71에 나타낸 바와 같이, 번호 38 (PE):번호 37 (LPC):번호 12 (PC) (v:v:v =4:1:1) 지질 혼합물은 A549 세포로의 XRN2 siRNA 진입을 매개하여 유전자 발현을 억제하였다 (역 증발법).

[1042] 번호 12 (PC) (v:v:v =4:1:1)의, 번호 38 (PE):번호 37 (LPC) (v:v=4:1)의 지질 혼합물로의 첨가는, 핵산을 세포에 효과적으로 전달하여 유전자 발현을 억제할 수 있었다.

[1043] si-NC 군: 번호 38 (PE):번호 37 (LPC):번호 12 (PC) (v:v:v =4:1:1)의 지질 혼합물과 si-NC의 혼합물을 세포에 첨가하고 혼합하고, 핵산의 최종 농도는 400 nM이었다;

[1044] si-RNA 군: 번호 38 (PE):번호 37 (LPC):번호 12 (PC) (v:v:v =4:1:1)의 지질 혼합물과 XRN2 siRNA, β-액틴 siRNA, Ssu 72 siRNA 또는 CPSF4 siRNA의 혼합물을 세포에 첨가하고 혼합하고, 핵산의 최종 농도는 400 nM이었다.

[1045] 13. 번호 4 (Cer):번호 12 (PC):번호 38 (PE):번호 37 (LPC) (v:v:v:v=5:2:8:3) 지질 혼합물은 기능적으로 세포로의 핵산의 진입을 매개하였다.

[1046] 1) 도 72에 나타낸 바와 같이, 번호 4 (Cer)의, 번호 38 (PE), 번호 37 (LPC), 번호 12 (PC)의 지질 혼합물로의 첨가는 번호 4 (Cer):번호 12 (PC):번호 38 (PE):번호 37 (LPC) (v:v:v:v=5:2:8:3)의 지질 혼합물을 야기하여, 이 지질 혼합물은 MRC-5 세포로의 항섬유성 HJT-sRNA, HJT-sRNA-3, HJT-sRNA-a2, HJT-sRNA-h3, HJT-sRNA-m7 이중 가닥 RNA 진입을 매개하여 피브로넥틴 발현 수준을 감소시켰다 (비등법).

[1047] 미처리 군: 미처리된 세포, 즉, 블랭크 대조군;

[1048] TGF-β1 군: 세포를 TGF-β1 단백질 (3 ng/mL의 최종 농도)로 자극하고, 샘플을 72시간 후 수집하였다.

[1049] NC 군: 번호 4 (Cer):번호 12 (PC):번호 38 (PE):번호 37 (LPC) (v:v:v:v=5:2:8:3)의 지질 조합을 사용하여 NC

모방체를 전달하고, 24시간 후, TGF-β1 단백질 (3 ng/mL의 최종 농도)을 첨가하여 자극하고, 샘플을 72시간 후 수집하였다.

[1050] HJT-3 & a2 & h3 군: 번호 4 (Cer):번호 12 (PC):번호 38 (PE):번호 37 (LPC) (v:v:v:v=5:2:8:3)의 지질 혼합물과 HJT-sRNA-3, HJT-sRNA-a2, HJT-sRNA-h3 및 HJT-sRNA-m7 이중 가닥의 혼합물을 세포에 첨가하고, 혼합하고 및 핵산의 최종 농도는 400 nM이었다.

[1051] m7 군: 번호 4 (Cer):번호 12 (PC):번호 38 (PE):번호 37 (LPC) (v:v:v:v=5:2:8:3)의 지질 조합과 HJT-sRNA-m7의 혼합물을 세포에 첨가하고, 혼합하고, 핵산의 최종 농도는 400 nM이었다.

[1052] 2) 도 73에 나타낸 바와 같이, 번호 4 (Cer):번호 12 (PC):번호 38 (PE):번호 37 (LPC) (v:v:v:v=5:2:8:3) 지질 혼합물은 세포로의 XRN2 siRNA 진입을 매개하여 유전자 발현을 억제하였다.

[1053] si-NC 군: 번호 4 (Cer):번호 12 (PC):번호 38 (PE):번호 37 (LPC) (v:v:v:v=5:2:8:3)의 지질 혼합물과 si-NC의 혼합물을 세포에 첨가하고 혼합하고, 핵산의 최종 농도는 400 nM이었다;

[1054] si-XRN2 군: 번호 4 (Cer):번호 12 (PC):번호 38 (PE):번호 37 (LPC) (v:v:v:v=5:2:8:3)의 지질 혼합물과 XRN2 siRNA의 혼합물을 세포에 첨가하고 혼합하고, 핵산의 최종 농도는 400 nM이었다.

[1055] 14. 번호 38 (PE):번호 2 (DG):번호 31 (So) (v:v:v =4:2:3) 지질 혼합물은 기능적으로 세포로의 핵산의 진입을 매개하였다.

[1056] 1) 도 74에 나타낸 바와 같이, 번호 38 (PE):번호 2 (DG):번호 31 (So) (v:v:v =4:2:3) 지질 혼합물은 MRC-5 세포로의 항섬유성 HJT-sRNA, HJT-sRNA-3, HJT-sRNA-a2, HJT-sRNA-h3, HJT-sRNA-m7 이중 가닥 RNA 진입을 매개하여 피브로넥틴 발현 수준을 감소시켰다 (비등법).

[1057] 미처리 군: 미처리된 세포, 즉, 블랭크 대조군;

[1058] TGF-β1 군: 세포를 TGF-β1 단백질 (3 ng/mL의 최종 농도)로 자극하고, 샘플을 72시간 후 수집하였다.

[1059] NC 군: 번호 38 (PE):번호 2 (DG):번호 31 (So) (v:v:v =4:2:3)의 지질 조합을 사용하여 NC 모방체를 전달하였다. 24시간 후, TGF-β1 단백질 (3 ng/mL의 최종 농도)을 첨가하여 자극하고, 샘플을 72시간 후 수집하였다.

[1060] HJT-3 & a2 & h3 군: 번호 38 (PE):번호 2 (DG):번호 31 (So) (v:v:v =4:2:3)의 지질 혼합물과 HJT-sRNA-3, HJT-sRNA-a2 및 HJT-sRNA-h3의 혼합물을 세포에 첨가하고, 혼합하고 및 핵산의 최종 농도는 400 nM이었다.

[1061] M7 군: 번호 38 (PE):번호 37 (LPC) (v:v=4:1)의 지질 조합과 HJT-sRNA-m7의 혼합물을 세포에 첨가하고, 혼합하고, 핵산의 최종 농도는 400 nM이었다.

[1062] 2) 도 75에 나타낸 바와 같이, 번호 38 (PE):번호 2 (DG):번호 31 (So) (v:v:v =4:2:3) 지질 혼합물은 A549 세포로의 XRN2 siRNA 진입을 매개하여 유전자 발현을 억제하였다 (비등법).

[1063] 번호 38 (PE):번호 2 (DG):번호 31 (So) (v:v:v =4:2:3) 지질 혼합물은 기능적으로 XRN2 siRNA를 A549 세포로 효과적으로 전달하였다.

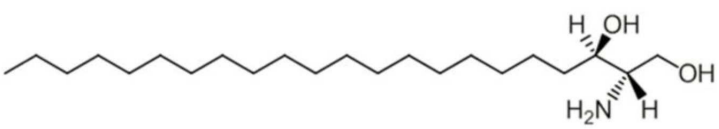
[1064] si-NC 군: 번호 38 (PE):번호 2 (DG):번호 31 (So) (v:v:v =4:2:3)의 지질 혼합물과 si-NC의 혼합물을 세포에 첨가하고 혼합하고, 핵산의 최종 농도는 400 nM이었다;

[1065] si-XRN2 군: 번호 38 (PE):번호 2 (DG):번호 31 (So) (v:v:v =4:2:3)의 지질 혼합물과 XRN2 siRNA의 혼합물을 세포에 첨가하고 혼합하고, 핵산의 최종 농도는 400 nM이었다.

[1066] **실시예 5: 지질 번호 41 및 그의 조성물의 효과의 검증**

[1067] **I. 단일 지질은 상이한 제조 방법 (역 증발법 및 비등법)에 의해 핵산 (이중 가닥 RNA 및 단일 가닥 RNA)을 세포내로 전달하였다**

[1068] **지질 번호 41. 스핑가닌 (d22:0)**



[1069]

[1070] **1. 지질에 의한 핵산 전달 효율의 정량적 실시간 PCR (실시간 PCR) 검출.**

[1071] 도 76에 나타낸 바와 같이, 상이한 방법 (비등법 또는 역 증발법)에 의해 제조된 지질 번호 41은 HJT-sRNA-m7 이중 가닥 RNA를 A549 세포내로 전달하였다. A549 세포에 대해, 비등법의 경우에, 지질 번호 41의 전달 효과는 RNAiMAX의 전달 효과의 약 2배이었고, 역 증발법의 경우에, 지질 번호 41의 전달 효과는 또한 RNAiMAX의 전달 효과보다 상당히 더 높았다.

[1072] 도 77에 나타낸 바와 같이, 상이한 방법 (비등법 또는 역 증발법)에 의해 제조된 지질 번호 41은 HJT-sRNA-m7 이중 가닥 RNA를 MRC-5 세포내로 전달하였다. MRC-5 세포에 대해, 비등법의 경우에, 지질 번호 41은 이중 가닥 RNA를 MRC-5 세포내로 전달하였고, 역 증발법의 경우에, 지질 번호 41의 전달 효과는 RNAiMAX의 전달 효과보다 상당히 더 높았다.

[1073] 도 78에 나타낸 바와 같이, 비등법에 의한 지질 번호 41은 HJT-sRNA-m7 단일 가닥 RNA를 A549 및 MRC-5 세포로 전달하였다.

[1074] **2. 지질에 의한 핵산 전달 효율의 디지털 PCR (ddPCR) 검출**

[1075] 2.1 실험 물질: A549 세포를 중국 의학과학원 기초 의학 연구소의 세포 센터로부터 구매하고, 트리졸 용해 완충제를 시그마로부터 구매하고, 고용량 cRNA 역전사 키트를 미국 ABI로부터 구매하고, 디지털 PCR 관련 시약을 미국 바이오-래드(Bio-Rad)로부터 구매하였다.

[1076] 2.2 실험 방법: 총 세포 RNA를 상기 방법에 따라 트리졸 용해 완충제에 의해 수집 및 추출하고, 고용량 cRNA 역전사 키트를 사용하여 cDNA로 역전사시키고, 상이한 군으로부터의 cDNA를 디지털 PCR 반응시켰다. 프로토콜에 관해서는 QX200 액적 판독기(Droplet Reader) 및 콴타소프트 소프트웨어(QuantaSoft Software) 매뉴얼을 참조하여, 콴타소프트 소프트웨어를 사용하여 결과를 분석하였다. 군은 다음과 같았다: (1) 미처리 군: 처리하지 않은 A549 세포; (2) 자유 섭취군: 세포를 6시간 동안 HJT-sRNA-m7 dsRNA와 직접 인큐베이션하였고; (3) RNAiMAX 군: A549 세포를 RNAiMAX에 의해 HJT-sRNA-m7 dsRNA로 형질감염시키고, 샘플을 6시간 후 검출을 위해 수집하였고; (4) 번호 41 군: 상이한 방법 (비등법 또는 역 증발법)에 의해 제조된 지질 번호 41은 이중 가닥 RNA를 A549 세포내로 전달하였고, 샘플은 6시간 후에 검출을 위해 수집하였다.

[1077] 실험 결과 및 분석: 도 79에 나타낸 바와 같이, 비등법 및 역 증발법 둘 다에 의해, 지질 번호 41은 HJT-sRNA-m7 dsRNA를 A549 세포내로 효과적으로 전달할 수 있었고, 비등법이 역 증발법보다 더 양호한 효과를 가졌다.

[1078] **3. 지질에 의한 핵산 전달 효율의 유세포 분석 검출**

[1079] 실험 물질: A549 세포 (중국 의학과학원의 세포 센터로부터 구매), FAM-sRNA (리보비오 바이오테크놀로지 캄파니, 리미티드(Ribobio Biotechnology Co., Ltd.)로부터 구매), 지질 번호 41, 아큐리(Accuri)® C6 기기 (미국 BD로부터 구매).

[1080] 실험 방법: PGY-sRNA-6-FAM을 100 μl 물에 용해시키고, 4 μl 지질과 혼합하고, 비등법에 의해 제조하였다. 이어서, 혼합물을 A549 세포에 적하하고, 6시간의 공동-인큐베이션 후, 샘플을 다음과 같이 검출을 위해 수집하였다: 먼저 PBS로 3회 세척한 다음에, 3분 동안 트립신으로 소화시키고 트립신을 제거하고, PBS로 다시 세척한 다음에 세포를 불로우 다운(blow down)시켰다. 아큐리® C6 기기를 사용하여 검출을 수행하였다.

[1081] 실험 결과: 도 80에 나타낸 바와 같이: 지질 번호 41은 PGY-sRNA-6 단일 가닥 RNA를 전달하는데 94.1%의 효율을 가졌으며, 이는 양성 대조군 RNAiMAX의 69.4%보다 더 높았다. 그리고 지질 번호 41은 PGY-sRNA-6 이중 가닥 RNA를 전달하는데 96.7%의 효율을 가졌으며, 이는 또한 양성 대조군 RNAiMAX의 94.9%보다 더 높았다. 지질 41은 단일 가닥 및 이중 가닥 핵산을 A549 세포내로 효율적으로 전달할 수 있었다.

[1082] **4. 공초점 형광 현미경검사에 의한 세포에서 지질에 의해 전달된 핵산의 국소화의 관찰**

[1083] 실험 물질: A549 세포 (중국 의학과학원의 세포 센터로부터 구매), PGY-sRNA-6-Cy3 (리보비오 바이오테크놀로지 캄파니, 리미티드로부터 구매), 지질 번호 41, 자이스(Zeiss) LSM780 (독일 자이스로부터 구매), 알렉사 플루오르® 488 팔로이딘 (미국 인비트로겐으로부터 구매), DAPI (미국 인비트로겐으로부터 구매), 파라포름알데히드 (미국 시그마로부터 구매).

[1084] 실험 방법: PGY-sRNA-6-FAM을 100 μl 물에 용해시키고, 4 μl 지질과 혼합하고, 비등법에 의해 제조하였다. 이어서, 혼합물을 A549 세포에 적하하고, 6시간의 공동-인큐베이션 후, 샘플을 PBS로 3회 세척하고, 4% 파라포름알데히드로 고정시키고, PBS로 3회 세척하고, 알렉사 플루오르(Alexa Fluor)® 488 팔로이딘으로 30분 동안

염색하고, PBS로 3회 세척하고, DAPI로 5분 동안 염색하고, PBS로 세척한 다음에, 밀봉하였다.

[1085] 도 81에 나타낸 바와 같은 실험 결과: 적색 PGY-sRNA-6-Cy3의 진입은 공초점 현미경검사하에 명백하게 관찰될 수 있었다. 지질 번호 41은 이중 가닥 핵산을 A549 세포내로 효과적으로 전달할 수 있었다.

[1086] **5. 지질에 의한 핵산 전달 효율의 웨스턴 블롯 검출**

[1087] 도 82에 나타낸 바와 같이, 단일 지질 번호 41은 MRC-5A549 세포로의 sRNAi 진입을 매개하여 단백질 발현을 녹다운시켰다 (역 증발법에 의해). 단백질 수준에서, 단일 지질 번호 41에 의해 매개된 단백질 녹다운 효과는 RNAiMAX에 의해 매개된 HJT-sRNA-m7의 억제 효과보다 상당히 더 높았다.

[1088] 미처리 군: 미처리된 MRC-5A549 세포.

[1089] siNC 군: 단일 지질 번호 41과 siNC의 혼합물을 세포에 첨가하고 혼합하고, 핵산의 최종 농도는 400 nM이었다;

[1090] siRNA 군: 단일 지질 번호 41과 LAMP2, XPN2, Ssu72, CPSF4 또는 β-액틴 siRNA의 혼합물을 세포에 첨가하고, 혼합하고, 핵산의 최종 농도는 400 nM이었다;

[1091] 자유 섭취군: 시험 물질을 직접 첨가하였다;

[1092] RNAiMAX 군: 2 ul RNAiMAX 형질감염 시약 및 핵산 용액을 100 ul opti-MEM 배지에 각각 희석하고, 상기 둘을 혼합하고, 15분 동안 방치하고, 세포에 첨가한 다음에, 혼합하고, 핵산의 최종 농도는 400 nM이었다;

[1093] So (41) 군 (역 증발법): 지질 번호 41과 핵산의 혼합물을 세포에 첨가하고 혼합하고, 핵산의 최종 농도는 400 nM이었다;

[1094] 도 83에 나타낸 바와 같이, 단일 지질 번호 41은 MRC-5 세포로의 항섬유성 HJT-sRNA-m7 이중 가닥 진입을 매개하였다 (역 증발법). 단백질 수준에서, 단일 지질 번호 41은 HJT-sRNA-m7 억제를 매개하였고, 이는 RNAiMAX 매개 HJT-sRNA-m7 억제보다 더 높았다.

[1095] TGF β 1 군: TGF-β 1 단백질 (최종 농도는 3 ng/mL이었다)을 첨가하여 자극하고, 샘플을 72시간 후 수집하였다;

[1096] NC 군: 단일 지질 번호 41은 NC 모방체를 전달하였다. 24시간 후, 세포를 TGF-β1 TGFb1 단백질 (최종 농도는 3 ng/mL이었다)로 자극하고, 샘플을 72시간 후 수집하였다;

[1097] HJT-3 & a2 & H3 군: 단일 지질 번호 41과 HJT-sRNA-3, HJT-sRNA-a2 및 HJT-sRNA-h3의 혼합물을 세포에 첨가하고 혼합하고, 핵산의 최종 농도는 400 nM이었다;

[1098] m7 군: 단일 지질 번호 41과 HJT-sRNA-m7의 혼합물을 세포에 첨가하고 혼합하고, 핵산의 최종 농도는 400 nM이었다;

[1099] **6. 지질 번호 41의 생체내 결과의 요약**

[1100] [실험 방법] 6-8 주령의 마우스, 22-24 g을 중국 의학과학원 기초 의학 연구소의 동물 센터의 SPF 실에서 사육하였다. 마우스를 위내 투여 전에 12시간 동안 금식시켰다. 마우스를 3개의 군으로 무작위로 나누었다: (1) 대조군, 400 μl DEPC-처리 물, 위내 투여; (2) 자유 섭취군, 소형 RNA (PGY-sRNA-26, PGY-sRNA-32 및 PGY-sRNA-23), 각각 소형 RNA 1 nmol/동물을, 400 μl DEPC-처리 물에 용해시킴, 위내 투여; (3) 지질 번호 41 군: 가열법에 의해 제조된 소형 RNA (PGY-sRNA-26 및 PGY-sRNA-32)과 지질 번호 41의 혼합물을 위내 투여하였고, 각각 소형 RNA 1 nmol/동물, 지질 번호 41 10 μl/동물을, 400 μl DEPC-처리 물에 용해시켰다. 모든 조직 및 기간 샘플을 위내 투여 6시간 후에 수집하였다. 모든 소형 RNA는 3p- 말단 2-O-메틸화에 의해 변형된 단일 가닥 RNA였다.

[1101] [실험 결과]

[1102] 도 108에 나타낸 바와 같이, 지질 번호 41은 소형 RNA의 혈액으로의 진입을 촉진하여, 혈액에서의 분해로부터 이를 보호할 수 있었다.

[1103] 도 109에 나타낸 바와 같이, 지질 번호 41은 소형 RNA의 위 세포로의 진입을 촉진하여, 위에서의 분해로부터 이를 보호할 수 있었다.

[1104] 도 110에 나타낸 바와 같이, 지질 번호 41은 소형 RNA의 소장 세포로의 진입을 촉진하여, 소장에서의 분해로부

터 이를 보호할 수 있었다.

[1105] 도 111에 나타낸 바와 같이, 지질 번호 41은 소형 RNA의 간으로의 진입을 촉진하여, 간에서의 분해로부터 이를 보호할 수 있었다.

[1106] **7. 지질 번호 41을 함유하는 지질 조합이 핵산 전달에 미치는 영향**

[1107] 1) 지질 조합 1 (번호 8+번호 41=6:1) 및 지질 조합 2 (번호 38+번호 41=6:1)가 핵산 전달에 미치는 영향.

[1108] 도 84에 나타낸 바와 같이, 지질 조합 1 (번호 8+번호 41=6:1) 및 지질 조합 2 (번호 38+번호 41=6:1)는 MRC-5 세포로의 항섬유성 HJT-3 & a2 & H3, HJT-sRNA-m7 진입을 매개하였고 (가열법), 단백질 수준에서 HJT-sRNA-m7의 상당한 억제 효과를 매개하였다.

[1109] TGF: TGF-β1 단백질 (최종 농도는 3 ng/mL이었다)을 첨가하여 자극하고, 샘플을 72시간 후 수집하였다;

[1110] NC 군: 단일 지질 번호 41을 사용하여 NC 모방체를 전달하였다. 24시간 후, TGF-β1 TGF-b1 단백질 (최종 농도는 3 ng/mL이었다)을 첨가하여 자극하고, 샘플을 72시간 후 수집하였다;

[1111] HJT-3 & a2 & H3 군: 지질 혼합물과 HJT-sRNA-3, HJT-sRNA-a2 및 HJT-sRNA-h3의 혼합물을 세포에 첨가하고 혼합하고, 핵산의 최종 농도는 400 nM이었다;

[1112] HJT-m7: 지질 혼합물과 HJT-sRNA-m7의 혼합물을 세포에 첨가하고 혼합하고, 핵산의 최종 농도는 400 nM이었다;

[1113] 2) 지질 조합 3 (번호 39+번호 41=6:1) 및 지질 조합 4 (번호 40+번호 41=6:1)가 핵산 전달에 미치는 영향.

[1114] 도 85에 나타낸 바와 같이, 지질 조합 3 (번호 39+번호 41=6:1) 및 지질 조합 4 (번호 40+번호 41=6:1)는 MRC-5 세포로 진입하는 항섬유성 HJT-3 & a2 & H3, HJT-sRNA-m7를 매개하였고 (가열법), 단백질 수준에서 HJT-sRNA-m7의 상당한 억제 효과를 매개하였다.

[1115] TGF: TGF-β1 단백질 (최종 농도는 3 ng/mL이었다)을 첨가하여 자극하고, 샘플을 72시간 후 수집하였다;

[1116] NC 군: 단일 지질 번호 41을 사용하여 NC 모방체를 전달하였다. 24시간 후, TGF-β1 단백질 (최종 농도는 3 ng/mL이었다)을 첨가하여 자극하고, 샘플을 72시간 후 수집하였다;

[1117] HJT-3 & a2 & H3 군: 지질 혼합물과 HJT-sRNA-3, HJT-sRNA-a2 및 HJT-sRNA-H3의 혼합물을 세포에 첨가하고 혼합하고, 핵산의 최종 농도는 400 nM이었다;

[1118] HJT-m7: 지질 혼합물과 HJT-sRNA-m7의 혼합물을 세포에 첨가하고 혼합하고, 핵산의 최종 농도는 400 nM이었다;

[1119] 3) 지질 조합 5 (번호 38+12+41+29=1:2:1:1)가 핵산 전달에 미치는 영향.

[1120] 도 86에 나타낸 바와 같이, 지질 조합 5 (번호 38+12+41+29=1:2:1:1)가 MRC-5 세포로 진입하는 항섬유성 HJT-3 & a2 & H3 및 HJT-sRNA-m7을 매개하였고, 단백질 수준에서 HJT-sRNA-m7의 상당한 억제 효과를 매개하였다.

[1121] TGF: TGF-β1 단백질 (최종 농도는 3 ng/mL이었다)을 첨가하여 자극하고, 샘플을 72시간 후 수집하였다;

[1122] NC 군: 단일 지질 번호 41을 사용하여 NC 모방체를 전달하였다. 24시간 후 TGF-β1 단백질 (최종 농도는 3 ng/mL이었다)을 첨가하여 자극하고, 샘플을 72시간 후 수집하였다;

[1123] HJT-3 & a2 & H3 군: 지질 혼합물과 HJT-sRNA-3, HJT-sRNA-a2 및 HJT-sRNA-H3 혼합물의 혼합물을 세포에 첨가하고 혼합하고, 핵산의 최종 농도는 400 nM이었다;

[1124] HJT-m7: 지질 혼합물과 HJT-sRNA-m7의 혼합물을 세포에 첨가하고 혼합하고, 핵산의 최종 농도는 400 nM이었다;

[1125] 4) 지질 조합 6 (번호 40 (PE)+번호 12 (PC)+번호 41 (So)=2:4:3)이 핵산 전달에 미치는 영향.

[1126] 도 87에 나타낸 바와 같이, 지질 조합 6 (번호 40 (PE)+번호 12 (PC)+번호 41 (So)=2:4:3)은 MRC-5 세포로 진입하는 항섬유성 HJT-3 & a2 & H3, HJT-sRNA-m7를 매개하였고 (비등법 및 역 증발법), 단백질 수준에서 HJT-3 & a2 & H3, HJT-sRNA-m7의 상당한 억제 효과를 매개하였다.

[1127] TGF: TGF-β1 단백질 (최종 농도는 3 ng/mL이었다)을 첨가하여 자극하고, 샘플을 72시간 후 수집하였다;

[1128] 3'-NC 군: 단일 지질 번호 41을 사용하여 NC 모방체를 전달하고, 24시간 후 TGF-β1 TGFb1 단백질 (최종 농도는 3 ng/mL이었다)을 첨가하여 자극하고, 샘플을 72시간 후 수집하였다;

[1129] 3'-3 & a2 & H3 군: 지질 혼합물과 HJT-sRNA-3, HJT-sRNA-a2, HJT-sRNA-H3의 혼합물을 세포에 첨가하고 혼합하고, 핵산의 최종 농도는 400 nM이었다;

[1130] 3'-m7: 지질 혼합물과 HJT-sRNA-m7의 혼합물을 세포에 첨가하고 혼합하고, 핵산의 최종 농도는 400 nM이었다;

[1131] 우측 도면: 지질-RNA 혼합물을 역 증발법에 의해 제조하였다. 지질 조합 6 (번호 40 (PE)+번호 12 (PC)+번호 41 (So)=2:4:3)은 XRN2, Ssu72, CPSF4 siRNA를 A549 세포내로 효과적으로 전달할 수 있었으며, 이는 단백질 수준에서 발현 수준을 상당히 감소시킨다.

[1132] siNC: 지질 혼합물과 siNC의 혼합물을 세포에 첨가하고 혼합하고, 핵산의 최종 농도는 400 nM이었다;

[1133] siRNA: 지질 혼합물과 XRN2, Ssu72, CPSF4 siRNA의 혼합물을 세포에 첨가하고, 혼합하고, 핵산의 최종 농도는 400 nM이었다;

[1134] 5) 지질 조합 7 (번호 12 (PC)+번호 41 (So)=6:1) 및 지질 조합 8 (번호 12 (PC)+번호 41 (So)=6:1)이 핵산 전달에 미치는 영향.

[1135] 도 88에 나타낸 바와 같이, 역 증발법에 의해, 지질 조합 7 (번호 12 (PC)+번호 41 (So)=6:1) 및 지질 조합 8 (번호 12 (PC)+번호 41 (So)=6:1)은 Ssu72, CPSF4 siRNA를 A549 세포내로 효과적으로 전달할 수 있었으며, 이는 단백질 수준에서 발현 수준을 상당히 감소시켰다.

[1136] siNC: 지질 혼합물과 siNC의 혼합물을 세포에 첨가하고 혼합하고, 핵산의 최종 농도는 400 nM이었다;

[1137] siRNA: 지질 혼합물과 XRN2, Ssu72, CPSF4 siRNA의 혼합물을 세포에 첨가하고 혼합하고, 핵산의 최종 농도는 400 nM이었다;

[1138] 6) 지질 조합 9 (번호 12 (PC)+번호 41 (So)=6:1) 및 지질 조합 10 (번호 40 (PE)+번호 12 (PC)+번호 41 (So)=2:2:2)이 핵산 전달에 미치는 영향.

[1139] 도 89에 나타낸 바와 같이, 역 증발법에 의해, 지질 조합 9 (번호 12 (PC)+번호 41 (So)=6:1) 및 지질 조합 10 (번호 40 (PE)+번호 12 (PC)+번호 41 (So)=2:2:2)은 XRN2, Ssu72, CPSF4 siRNA를 A549 세포내로 효과적으로 전달할 수 있었으며, 이는 단백질 수준에서 발현 수준을 상당히 감소시켰다.

[1140] siNC: 지질 혼합물과 siNC의 혼합물을 세포에 첨가하고 혼합하고, 핵산의 최종 농도는 400 nM이었다;

[1141] siRNA: 지질 혼합물과 XRN2, Ssu72, CPSF4 siRNA의 혼합물을 세포에 첨가하고 혼합하고, 핵산의 최종 농도는 400 nM이었다;

[1142] 7) 지질 조합 11 (번호 4 (Cer)+번호 12 (PC)+번호 41 (So)=1:1:1)이 핵산 전달에 미치는 영향.

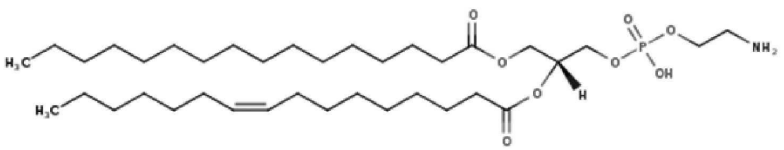
[1143] 도 90에 나타낸 바와 같이, 역 증발법에 의해, 지질 조합 11 (번호 4 (Cer)+번호 12 (PC)+번호 41 (So)=1:1:1)은 Ssu72 siRNA를 A549 세포내로 효과적으로 전달할 수 있었으며, 이는 단백질 수준에서 발현 수준을 상당히 감소시켰다.

[1144] siNC: 지질 혼합물과 siNC의 혼합물을 세포에 첨가하고 혼합하고, 핵산의 최종 농도는 400 nM이었다;

[1145] siSsu72: 지질 혼합물과 Ssu72 siRNA의 혼합물을 세포에 첨가하고 혼합하고, 핵산의 최종 농도는 400 nM이었다;

[1146] **실시예 6: 지질 번호 38 및 그의 조합의 효과의 검증**

[1147] **지질 번호 38 PE (16:0/16:1)**

[1148] 

[1149] **1. 지질에 의한 핵산 전달 효율의 정량적 실시간 PCR (실시간 PCR) 검출**

[1150] (1) 비등법에 의한 지질 번호 38은 이중 가닥 RNA를 A549 및 MRC-5 세포내로 전달하였다.

[1151] 도 91에 나타낸 바와 같이, 가열법에 의한 지질 번호 38은 이중 가닥 RNA를 A549 및 MRC-5 세포내로 전달하였다. MRC-5 세포에 대해, 가열법의 경우에, 이중 가닥 RNA에 대한 지질 번호 38의 전달 효과는 RNAiMAX

의 전달 효과의 약 2배이었다.

[1152] 1) 미처리 군: 미처리된 A549 세포;

[1153] 2) 자유 섭취군: HJT-sRNA-m7 dsRNA를 12시간 동안 세포와 직접 인큐베이션하였고; 핵산의 최종 농도는 100 nM이었다;

[1154] 3) RNAiMAX 군: 2 μL RNAiMAX 형질감염 시약 및 이중 가닥 HJT-sRNA-m7 용액을 100 μL opti-MEM 배지에 각각 희석한 다음에, 상기 둘을 혼합하고, 15분 동안 방치하고, 세포내로 첨가한 다음에, 혼합하였다. HJT-sRNA-m7 이중 가닥의 최종 농도는 100 nM이었다;

[1155] 4) 지질 및 핵산의 처리군: 2.5 μL 단일 지질 번호 38 및 HJT-sRNA-m7 이중 가닥 핵산 용액의 혼합물을 비등법 또는 역 증발법에 의해 제조한 다음에, A549 세포에 첨가하였다. RNA의 최종 농도는 100 nM이었다. 12시간 후, 샘플을 수집하여 진입량을 검출하였다.

[1156] (2) 비등법에 의한 지질 번호 38은 HJT-sRNA-m7 단일 가닥 RNA를 A549 및 MRC-5 세포내로 전달하였다.

[1157] 도 92에 나타낸 바와 같이, 가열법에 의한 지질 번호 38은 HJT-sRNA-m7 단일 가닥 RNA를 A549 및 MRC-5 세포내로 전달하였고, 여기서 전달 효율이 RNAiMAX의 전달 효율보다 훨씬 더 높았다.

[1158] 1) 미처리 군: 미처리된 A549 세포;

[1159] 2) 자유 섭취군: HJT-sRNA-m7 단일 가닥 RNA를 12시간 동안 세포와 직접 인큐베이션하였고; 핵산의 최종 농도는 100 nM이었다;

[1160] 3) RNAiMAX 군: 2 μL RNAiMAX 형질감염 시약 및 단일 가닥 HJT-sRNA-m7 용액을 100 μL opti-MEM 배지에 각각 희석한 다음에 ,상기 둘을 혼합하고, 15분 동안 방치하고, 세포내로 첨가한 다음에, 혼합하고, 단일 가닥 HJT-sRNA-m7의 최종 농도는 100 nM이었다;

[1161] 4) 지질 및 핵산의 처리군: 2.5 μL 단일 지질 번호 64와 HJT-sRNA-m7 이중 가닥 핵산 용액의 혼합물을 비등법 또는 역 증발법에 의해 제조하고, A549 세포에 첨가하고, RNA의 최종 농도는 100 nM이었다. 12시간 후, 샘플을 수집하여 진입량을 검출하였다.

[1162] **2. 지질에 의한 핵산 전달 효율의 디지털 PCR (ddPCR) 검출**

[1163] 2.1 실험 물질: A549 세포를 중국 의학과학원 기초 의학 연구소의 세포 센터로부터 구매하고, 트리졸 용해 완충제를 시그마로부터 구매하고, 고용량 cRNA 역전사 키트를 미국 ABI로부터 구매하고, 디지털 PCR 관련 시약을 바이오-래드로부터 구매하였다.

[1164] 2.2 실험 방법: 총 RNA를 상기 방법에 따라 트리졸 용해 완충제에 의해 수집 및 추출하고, 고용량 cRNA 역전사 키트를 사용하여 cDNA로 역전사시키고, 상이한 군으로부터의 cDNA를 디지털 PCR 반응시켰다. 프로토콜에 관해서는 QX200 액적 판독기 및 콴타소프트 소프트웨어 매뉴얼을 참조하고; 콴타소프트 소프트웨어를 사용하여 결과를 분석하였다.

[1165] (1) 미처리 군: 어떠한 처리도 하지 않은 A549 세포;

[1166] (2) 자유 섭취군: 세포를 6시간 동안 HJT-sRNA-m7 dsRNA와 직접 공동-인큐베이션하였다;

[1167] (3) RNAiMAX 군: HJT-sRNA-m7 dsRNA를 RNAiMAX에 의해 A549 세포로 형질감염시키고, 샘플을 6시간 후 검출을 위해 수집하였다;

[1168] (4) 번호 38 군: 지질 번호 38은 상이한 제조 방법 (비등법 또는 역 증발법)에 의해 이중 가닥 RNA를 A549 세포내로 전달하였고, 샘플을 6시간 후 검출을 위해 수집하였다;

[1169] 실험 결과 및 분석: 도 93에 나타낸 바와 같이, 비등법 또는 역 증발법으로, 지질 번호 38은 HJT-sRNA-m7 dsRNA를 A549 세포내로 효과적으로 전달할 수 있었다.

[1170] **3. 지질에 의한 핵산 전달 효율의 유세포 분석 검출**

[1171] 실험 물질: A549 세포 (중국 의학과학원의 세포 센터로부터 구매), FAM-sRNA (리보비오 바이오테크놀로지 캄파니, 리미티드로부터 구매), 지질 번호 38, 아큐리® C6 기기 (미국 BD로부터 구매).

[1172] 실험 방법: PGY-sRNA-6-FAM을 100 μl 물에 용해시키고, 4 μl 지질과 혼합하고, 비등법에 의해 지질-sRNA 혼합

물로 제조하였다. 이어서, 혼합물을 A549 세포에 적하하고, 6시간의 공동-인큐베이션 후, 샘플을 수집하고 PBS로 3회 세척한 다음에, 트립신을 사용하여 단일 세포로 소화시키고, PBS로 재-현탁시킨 다음에 불로우 다운시켜 아큐리® C6 기기 검출을 하였다.

[1173] 실험 결과 (도 94에 나타냄): 지질 번호 38은 PGY-sRNA-6 단일 가닥 RNA를 72.5%의 효율로 전달하였으며, 이는 양성 대조군 RNAiMAX의 효율에 가까웠다.

[1174] **4. 세포에서 지질에 의해 전달된 핵산의 국소화를 관찰하기 위한 공초점 형광 현미경검사**

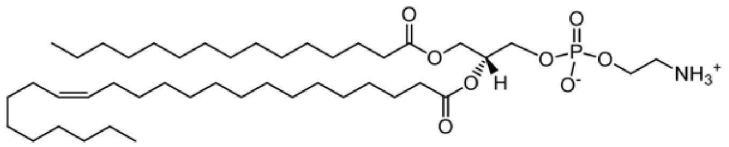
[1175] 실험 물질: A549 세포 (중국 의학과학원의 세포 센터로부터 구매), PGY-sRNA-6-Cy3 (리보비오 바이오테크놀로지 캄파니, 리미티드로부터 구매), 지질 번호 38, 자이스 LSM780 (독일 자이스로부터 구매), 알렉사 플루오르® 488 팔로이딘 (미국 인비트로겐으로부터 구매), DAPI (미국 인비트로겐으로부터 구매), 파라포름알데히드 (미국 시그마로부터 구매).

[1176] 실험 방법: PGY-sRNA-6-FAM을 100 μl 물에 용해시키고, 4 μl 지질과 혼합하고, 비등법에 의해 제조하였다. 이어서, 혼합물을 A549 세포에 적하하고, 6시간의 공동-인큐베이션 후, 샘플을 PBS로 3회 세척하고, 4% 파라포름알데히드로 고정시키고, PBS로 3회 세척하고, 알렉사 플루오르® 488 팔로이딘으로 30분 동안 염색하고, PBS로 3회 세척하고, DAPI로 5분 동안 염색하고, PBS로 세척한 다음에, 밀봉하였다.

[1177] 실험 결과 (도 95에 나타냄): 적색 PGY-sRNA-6-Cy3의 진입은 공초점 현미경검사하에 명백하게 관찰될 수 있었다. 비등법에 의해 제조된 지질 번호 38-sRNA 혼합물은 이중 가닥 핵산을 A549 세포내로 효과적으로 전달할 수 있었다.

[1178] **실시예 7: 지질 번호 64 및 그의 조성물의 효과의 검증**

[1179] **지질 번호 64 PE (15:0/24:1 (15Z))**

[1180] 

[1181] **1. 지질에 의한 핵산 전달 효율의 정량적 실시간 PCR (실시간 PCR) 검출**

[1182] (1) 상이한 방법 (비등법 또는 역 증발법)에 의해 제조된 지질 번호 64는 HJT-sRNA-m7 이중 가닥 RNA를 A549 세포내로 전달하였다.

[1183] 도 96에 나타낸 바와 같이, 지질 번호 64는 상이한 방법 (비등법 또는 역 증발법)에 의해 HJT-sRNA-m7 이중 가닥 RNA를 A549 세포내로 전달하였다. A549 세포에 대해, 비등법의 경우에, 지질 번호 64의 전달 효과는 RNAiMAX의 전달 효과의 약 3배이었다.

[1184] 1) 미처리 군: 미처리된 A549 세포;

[1185] 2) 자유 섭취군: HJT-sRNA-m7 dsRNA를 12시간 동안 세포와 직접 인큐베이션하였고; 핵산의 최종 농도는 100 nM이었다;

[1186] 3) RNAiMAX 군: 2 μL RNAiMAX 형질감염 시약 및 이중 가닥 HJT-sRNA-m7 용액을 100 μL opti-MEM 배지에 각각 희석하고, 혼합하고, 15분 동안 방치하고, 세포에 첨가하고 혼합하고, HJT-sRNA-m7 이중 가닥의 최종 농도는 100 nM이었다;

[1187] 4) 지질 및 핵산의 처리군: 2.5 μL 단일 지질 번호 64 및 HJT-sRNA-m7 이중 가닥 핵산 용액의 혼합물을 비등법 또는 역 증발법에 의해 제조하고 A549 세포에 첨가하고, RNA의 최종 농도는 100 nM이었다. 12시간 후, 샘플을 수집하여 진입량을 검출하였다.

[1188] **2. 지질에 의한 핵산 전달 효율의 유세포 분석 검출**

[1189] 실험 물질: A549 세포 (중국 의학과학원의 세포 센터로부터 구매), FAM-sRNA (리보비오 바이오테크놀로지 캄파니, 리미티드로부터 구매), 지질 번호 64, 아큐리® C6 기기 (미국 BD로부터 구매).

[1190] 실험 방법: FAM-sRNA를 100 μl 물에 용해시키고, 4 μl 지질과 혼합하고, 비등법에 의해 제조하였다. 이어서,

지질-sRNA 혼합물을 A549 세포에 적하하고, 6시간의 공동-인큐베이션 후, 샘플을 수집하고 PBS로 3회 세척한 다음에, 트립신을 사용하여 단일 세포로 소화시키고, PBS로 재-현탁시킨 다음에 불로우 다운시켜 아큐리® C6 기기 검출을 하였다.

[1191] 실험 결과 (도 97에 나타냄): 지질 번호 64는 양성 대조군 RNAiMAX의 효율의 약 절반 (1/2)의 효율로 PGY-sRNA-6 단일 가닥 RNA를 전달하였다.

[1192] **3. 세포에서 지질에 의해 전달된 핵산의 국소화를 관찰하기 위한 공초점 형광 현미경검사**

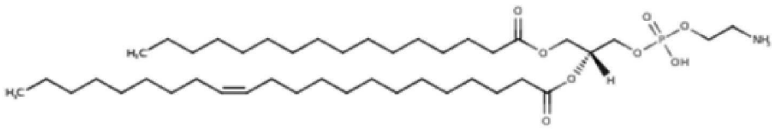
[1193] 실험 물질: A549 세포 (중국 의학과학원의 세포 센터로부터 구매), PGY-sRNA-6-Cy3 (리보비오 바이오테크놀로지 캄파니, 리미티드로부터 구매), 지질 번호 64, 자이스 LSM780 (독일 자이스로부터 구매), 알렉사 플루오르® 488 팔로이딘 (미국 인비트로겐으로부터 구매), DAPI (미국 인비트로겐으로부터 구매), 파라포름알데히드 (미국 시그마로부터 구매).

[1194] 실험 방법: PGY-sRNA-6-FAM을 100 μl 물에 용해시키고, 4 μl 지질과 혼합하고, 비등법에 의해 제조하였다. 이어서, 혼합물을 A549 세포에 적하하고, 6시간의 공동-인큐베이션 후, 샘플을 PBS로 3회 세척하고, 4% 파라포름알데히드로 고정시키고, PBS로 3회 세척하고, 알렉사 플루오르® 488 팔로이딘으로 30분 동안 염색하고, PBS로 3회 세척하고, DAPI로 5분 동안 염색하고, PBS로 세척한 다음에, 밀봉하였다.

[1195] 실험 결과 (도 98에 나타냄): 적색 PGY-sRNA-6-Cy3의 진입은 공초점 현미경검사하에 명백하게 관찰될 수 있었다. 지질 번호 64는 단일 가닥 RNA를 A549 세포내로 효과적으로 전달할 수 있었다.

[1196] **실시예 8: 지질 번호 40 및 그의 조성물의 효과의 검증**

[1197] **지질 번호 40 PE (16:0/22:1)**



[1198]

[1199] **1. 지질에 의한 핵산 전달 효율의 정량적 실시간 PCR (실시간 PCR) 검출**

[1200] (1) 상이한 방법 (비등법 또는 역 증발법)에 의해 제조된 지질 번호 40은 이중 가닥 RNA를 A549 세포내로 전달하였다.

[1201] 도 99에 나타낸 바와 같이, 상이한 방법 (비등법 또는 역 증발법)에 의해 제조된 지질 번호 40은 이중 가닥 RNA를 A549 세포내로 전달하였다. A549 세포에 대해, 역 증발법의 경우에, 지질 번호 40의 전달 효과는 RNAiMAX의 전달 효과의 약 절반 (1/2)이었다.

[1202] 1) 미처리 군: 미처리된 A549 세포;

[1203] 2) 자유 섭취군: HJT-sRNA-m7 dsRNA를 12시간 동안 세포와 직접 인큐베이션하였고; 핵산의 최종 농도는 100 nM이었다;

[1204] 3) RNAiMAX 군: 2 μL RNAiMAX 형질감염 시약 및 이중 가닥 HJT-sRNA-m7 용액을 100 μL opti-MEM 배지에 각각 희석한 다음에, 상기 둘을 혼합하고, 15분 동안 방치하고, 세포에 첨가하고, 혼합하고, HJT-sRNA-m7 이중 가닥의 최종 농도는 100 nM이었다;

[1205] 4) 지질 및 핵산의 처리군: 2.5 μL 단일 지질 번호 40과 HJT-sRNA-m7 이중 가닥 핵산 용액의 혼합물을 비등법 또는 역 증발법에 의해 제조하고, A549 세포에 첨가하였다. RNA의 최종 농도는 100 nM이었다. 12시간 후, 샘플을 수집하여 진입량을 검출하였다.

[1206] **2. 지질에 의한 핵산 전달 효율의 디지털 PCR (ddPCR) 검출**

[1207] 2.1 실험 물질: A549 세포를 중국 의학과학원 기초 의학 연구소의 세포 센터로부터 구매하고, 트리졸 용해 완충제를 시그마로부터 구매하고, 타크만™ 마이크로RNA 역전사 키트하이를 써모 피셔 테크놀로지(Thermo Fisher Technology)로부터 구매하고, 디지털 PCR 관련 시약을 바이오-래드로부터 구매하였다.

[1208] 2.2 실험 방법: 총 RNA를 상기 방법에 따라 트리졸 용해 완충제에 의해 수집 및 추출하고, 타크만™ 마이크로RNA

역전사 키트하이를 사용하여 cDNA로 역전사시키고, 상이한 군으로부터의 cDNA를 디지털 PCR 반응시켰다. 프로토콜에 관해서는 QX200 액적 판독기 및 콴타소프트 소프트웨어 매뉴얼을 참조하고; 콴타소프트 소프트웨어를 사용하여 결과를 분석하였다.

[1209] (1) 미처리 군: 어떠한 처리도 하지 않은 A549 세포

[1210] (2) 자유 섭취군: 세포를 6시간 동안 HJT-sRNA-m7 dsRNA와 직접 공동-인큐베이션하였다;

[1211] (3) RNAiMAX 군: HJT-sRNA-m7 dsRNA를 RNAiMAX에 의해 A549 세포로 형질감염시키고, 샘플을 6시간 후 검출을 위해 수집하였다;

[1212] (4) 번호 40 군: 상이한 방법 (비등법 또는 역 증발법)에 의해 제조된 지질 번호 40은 이중 가닥 RNA를 A549 세포내로 전달하였고, 샘플을 6시간 후 검출을 위해 수집하였다;

[1213] 실험 결과 및 분석: 도 100에 나타낸 바와 같이, 비등법 또는 역 증발법으로, 지질 번호 40은 HJT-sRNA-m7 dsRNA를 A549 세포내로 효과적으로 전달할 수 있었다

[1214] **3. 세포에서 지질에 의해 전달된 핵산의 국소화를 관찰하기 위한 공초점 형광 현미경검사**

[1215] 실험 물질: A549 세포 (중국 의학과학원의 세포 센터로부터 구매), PGY-sRNA-6-Cy3 (리보비오 바이오테크놀로지 캄파니, 리미티드로부터 구매), 지질 번호 40, 자이스 LSM780 (독일 자이스로부터 구매), 알렉사 플루오르® 488 팔로이딘 (미국 인비트로겐으로부터 구매), DAPI (미국 인비트로겐으로부터 구매), 파라포름알데히드 (미국 시그마로부터 구매).

[1216] 실험 방법: PGY-sRNA-6-FAM을 100 μl 물에 용해시키고, 4 μl 지질과 혼합하고, 비등법에 의해 제조하였다. 이어서, 혼합물을 A549 세포에 적하하고, 6시간의 공동-인큐베이션 후, 샘플을 PBS로 3회 세척하고, 4% 파라포름알데히드로 고정시키고, PBS로 3회 세척하고, 알렉사 플루오르® 488 팔로이딘으로 30분 동안 염색하고, PBS로 3회 세척하고, DAPI로 5분 동안 염색하고, PBS로 세척한 다음에, 밀봉하였다.

[1217] 실험 결과 (도 101에 나타냄): 적색 PGY-sRNA-6-Cy3의 진입은 공초점 현미경검사하에 명백하게 관찰될 수 있었다. 지질 번호 40은 단일 가닥 RNA를 A549 세포내로 효과적으로 전달할 수 있었다.

[1218] **4. 지질에 의한 핵산 전달 효율의 웨스턴 블로팅 검출**

[1219] 도 102에 나타낸 바와 같이, 포스파티딜에탄올아민 단일 지질 번호 40은 MRC-5 세포로의 항섬유성 이중 가닥 RNA HJT-sRNA-m7 진입을 매개하여 피브로넥틴 단백질 발현을 하향 조절하였다.

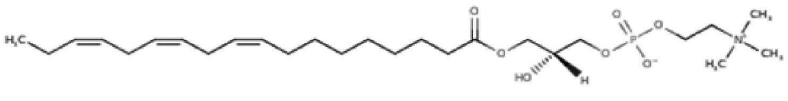
[1220] TGF: TGF-β1 단백질 (최종 농도는 3 ng/mL이었다)을 첨가하여 자극하고, 샘플을 72시간 후 수집하였다;

[1221] 3'-NC 군: 지질 혼합물을 사용하여 NC 모방체를 전달하고, 24시간 후, 세포를 TGF-β1 단백질 (최종 농도는 3 ng/mL이었다)로 자극하고, 샘플을 72시간 후 수집하였다;

[1222] 3'-m7 군: 지질 혼합물과 HJT-sRNA-m7 이중 가닥 핵산 용액의 혼합물을 세포에 첨가하고 혼합하고, 핵산의 최종 농도는 400 nM이었다;

[1223] **실시예 8: 지질 번호 37의 효과의 검증**

[1224] **지질 번호 37 LPC (18:3)**

[1225] 

[1226] **1. 지질에 의한 핵산 전달 효율의 정량적 실시간 PCR (실시간 PCR) 검출**

[1227] (1) 비등법에 의한 지질 번호 37은 단일 가닥 RNA를 A549 및 MRC-5 세포내로 전달하였다.

[1228] 도 103에 나타낸 바와 같이, 단일 가닥 RNA를 비등법에 의해 A549 및 MRC5 세포로 전달하였다.

[1229] 1) 미처리 군: 미처리된 A549 세포;

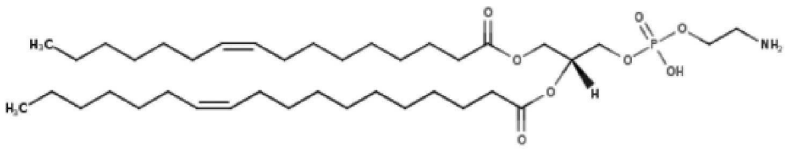
[1230] 2) 자유 섭취군: HJT-sRNA-m7 dsRNA를 3시간 동안 세포와 직접 인큐베이션하였고; 핵산의 최종 농도는 100 nM이었다;

[1231] 3) RNAiMAX 군: 2 μL RNAiMAX 형질감염 시약 및 단일 가닥 HJT-sRNA-m7 용액을 100 μL opti-MEM 배지에 각각 희석하고, 혼합하고, 15분 동안 방치하고, 세포에 첨가하고, 혼합하고, HJT-sRNA-m7 단일 가닥의 최종 농도는 100 nM이었다;

[1232] 4) 지질 및 핵산의 처리군: 2.5 μL 단일 지질 번호 39와 HJT-sRNA-m7 단일 가닥 핵산 용액의 혼합물을 비등법 또는 역 증발법에 의해 제조하고 A549 세포에 첨가하고, RNA의 최종 농도는 100 nM이었다. 3시간 후, 샘플을 수집하여 진입량을 검출하였다.

[1233] **실시예 9: 지질 번호 39의 효과의 검증**

[1234] **지질 번호 39 PE (16:1-18:1)**

[1235] 

[1236] **1. 지질에 의한 핵산 전달 효율의 정량적 실시간 PCR (실시간 PCR) 검출**

[1237] 도 104에 나타낸 바와 같이, 상이한 방법 (비등법 또는 역 증발법)에 의해 제조된 지질 번호 39는 이중 가닥 RNA를 A549 세포내로 전달하였다

[1238] 1) 미처리 군: 미처리된 A549 세포;

[1239] 2) 자유 섭취군: HJT-sRNA-m7 dsRNA를 6시간 동안 세포와 직접 인큐베이션하였고; 핵산의 최종 농도는 100 nM이었다;

[1240] 3) RNAiMAX 군: 2 μL RNAiMAX 형질감염 시약 및 이중 가닥 HJT-sRNA-m7 용액을 100 μL opti-MEM 배지에 각각 희석하고, 혼합하고, 15분 동안 방치하고, 세포에 첨가하고, 혼합하고, HJT-sRNA-m7 이중 가닥의 최종 농도는 100 nM이었다;

[1241] 4) 지질 및 핵산의 처리군: 2.5 μL 단일 지질 번호 39와 HJT-sRNA-m7 이중 가닥 핵산 용액의 혼합물을 비등법 또는 역 증발법에 의해 제조하고 A549 세포에 첨가하고, RNA의 최종 농도는 100 nM이었다. 12시간 후, 샘플을 수집하여 진입량을 검출하였다.

[1242] **2. 지질에 의한 핵산 전달 효율의 디지털 PCR (ddPCR) 검출**

[1243] 2.1 실험 물질: A549 세포를 중국 의학과학원 기초 의학 연구소의 세포 센터로부터 구매하고, 트리졸 용해 완충제를 시그마로부터 구매하고, 고용량 cRNA 역전사 키트를 미국 ABI로부터 구매하고, 디지털 PCR 관련 시약을 바이오-래드로부터 구매하였다.

[1244] 2.2 실험 방법: 총 RNA를 상기 방법에 따라 트리졸 용해 완충제에 의해 수집 및 추출하고, 고용량 cRNA 역전사 키트를 사용하여 cDNA로 역전사시키고, 상이한 군으로부터의 cDNA를 디지털 PCR 반응시켰다. 프로토콜에 관해서는 QX200 액적 판독기 및 콴타소프트 소프트웨어 매뉴얼을 참조하고; 콴타소프트 소프트웨어를 사용하여 결과를 분석하였다.

[1245] (1) 미처리 군: 어떠한 처리도 하지 않은 A549 세포;

[1246] (2) 자유 섭취군: 세포를 6시간; 12시간 동안 HJT-sRNA-m7 dsRNA와 직접 공동-인큐베이션하였다;

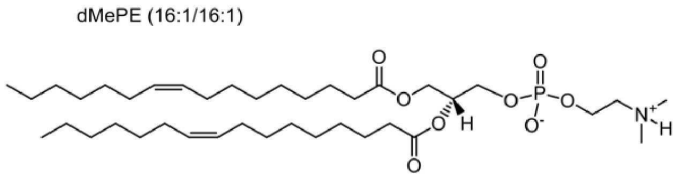
[1247] (3) RNAiMAX 군: HJT-sRNA-m7 dsRNA를 RNAiMAX에 의해 A549 세포로 형질감염시키고, 샘플을 6시간; 12시간 후 검출을 위해 수집하였다;

[1248] (4) 번호 39 군: 역 증발법에 의한 지질 번호 39는 이중 가닥 RNA를 A549 세포내로 전달하였고, 샘플을 6시간; 12시간 후 검출을 위해 수집하였다;

[1249] 도 105에 나타낸 바와 같이, 역 증발법에 의해, 지질 번호 39는 HJT-sRNA-m7 dsRNA를 A549 세포내로 효과적으로 전달할 수 있었다.

[1250] **실시예 10: 지질 번호 60 및 번호 612의 효과의 검증**

[1251] **지질 번호 60 dMePE (16:1/16:1)**



[1252]

[1253] **1. 지질에 의한 핵산 전달 효율의 정량적 실시간 PCR (실시간 PCR) 검출**

[1254] 도 106에 나타낸 바와 같이, 상이한 방법 (비등법 또는 역 증발법)에 의해 제조된 지질 번호 60은 이중 가닥 RNA를 A549 세포내로 전달하였다

[1255] 7) 미처리 군: 미처리된 A549 세포;

[1256] 8) 자유 섭취군: HJT-sRNA-m7 dsRNA를 6시간 동안 세포와 직접 인큐베이션하였고; 핵산의 최종 농도는 100 nM이었다;

[1257] RNAiMAX 군: 2 μL RNAiMAX 형질감염 시약 및 이중 가닥 HJT-sRNA-m7 용액을 100 μL opti-MEM 배지에 각각 희석한 다음에, 상기 둘을 혼합하고, 15분 동안 방치하고, 세포내로 첨가한 다음에, 혼합하고, 이중 가닥 HJT-sRNA-m7의 최종 농도는 100 nM이었다;

[1258] 4) 지질 및 핵산: 2.5 μL 단일 지질 번호 60과 HJT-sRNA-m7 이중 가닥 핵산 용액의 혼합물을 비등법 또는 역 증발법에 의해 제조하고 세포에 첨가하고, RNA의 최종 농도는 100 nM이었다. 12시간 후, 샘플을 수집하여 진입량을 검출하였다.

[1259] **지질 번호 62 dMePE (16:1/18:1)**

[1260] **1. 지질에 의한 핵산 전달 효율의 정량적 실시간 PCR (실시간 PCR) 검출**

[1261] 도 107에 나타낸 바와 같이, 상이한 방법 (비등법 또는 역 증발법)에 의해 제조된 지질 번호 62는 이중 가닥 RNA를 A549 세포내로 전달하였다

[1262] 1) 미처리 군: 미처리된 A549 세포;

[1263] 2) 자유 섭취군: HJT-sRNA-m7 dsRNA를 6시간 동안 세포와 직접 인큐베이션하였고; 핵산의 최종 농도는 100 nM이었다;

[1264] 3) RNAiMAX 군: 2 μL RNAiMAX 형질감염 시약 및 이중 가닥 HJT-sRNA-m7 용액을 100 μL opti-MEM 배지에 각각 희석한 다음에, 상기 둘을 혼합하고, 15분 동안 방치하고, 세포내로 첨가한 다음에, 혼합하고, HJT-sRNA-m7 이중 가닥의 최종 농도는 100 nM이었다;

[1265] 4) 지질 및 핵산의 처리군: 2.5 μL 단일 지질 번호 62와 HJT-sRNA-m7 이중 가닥 핵산 용액의 혼합물을 비등법 또는 역 증발법에 의해 제조하고 세포에 첨가하고, RNA의 최종 농도는 100 nM이었다. 12시간 후, 샘플을 수집하여 진입량을 검출하였다.

[1266] **지질 핵산 혼합물의 생체내 전달 실험**

[1267] 1. 실험 동물: C57 마우스, 수컷, 대략 6주령.

[1268] 2. 지질 혼합물의 제조: 제조는 다음과 같이 마우스당 10 μl 지질-1 nmol sRNA의 용량을 기준으로 하여 수행하였다: 1 nmol의 각각의 sRNA를 500 μl DEPC 물에 용해시키고, 10 μl의 상응하는 지질을 첨가하고, 피펫팅하여 철저히 혼합한 다음에, 15분 동안 90℃에서 수조 후에 자연적으로 냉각시킨 다음에, 위관영양을 통해 투여하였다.

[1269] 3. sRNA: PGY-sRNA-26, PGY-sRNA-32

[1270] 4. 실험군:

[1271] 1) 미처리 군: 500 μl 식염수의 위내 투여;

[1272] 2) RNAiMAX 처리군: 10 μl RNAiMAX-1 nmol sRNA를 철저히 혼합하고 각각의 마우스에 위내 투여하였다. 이 군

은 양성 대조군으로서의 역할을 하였다. RNAiMAX는 인비트로겐으로부터 구매하였다.

[1273] 3) 자유 섭취군: sRNA 용액 (1 nmol/동물, 500 μL)을 직접 첨가하고, 상기 군은 음성 대조군으로서의 역할을 하였다;

[1274] 4) 지질 핵산 혼합물의 처리군: 단계 2에서 제조된 지질-sRNA 혼합물을 위내 투여하였다.

[1275] 5. 상대 진입량의 검출:

[1276] 1) 조직 샘플링 및 RNA의 추출: 마우스에서 위관영양 후 6시간에, 안구로부터 500 μl의 혈액을 취하고 1.5 ml 트리졸 시약 LS를 첨가하여 철저히 혼합하여 용해시키고, 3 ml 트리졸 시약 (인비트로겐으로부터 구매)을 조직 샘플에 첨가하고 완전히 용해될 때까지 균질화하였다. 샘플링된 조직: 간/위/소장.

[1277] 2) sRNA의 cDNA로의 역전사: 역전사 키트 (고용량 cDNA 역전사 키트, 어플라이드 바이오시스템즈, 카탈로그 번호 4368813)를 사용하여, 총 RNA를 cDNA로 역전사시키고, 상기 역 시스템은 다음과 같았다: 주형 RNA (150 ng/μL) 10 μL, 10X RT 완충제, 2.0 μL, 25X dNTP Mix (100 mM) 0.8 μL, 무작위 프라이머 2.0 μL, 멀티스크라이브™ 역전사효소 1.0 μL, RNase 억제제 1.0 μL, 뉴클레아제-미함유 H_2O 3.2 μL. 간단한 원심분리 후, 반응물을 PCR 반응기에 로딩하였다. 반응 조건은 다음과 같았다: (1) 25℃, 10분; (2) 37℃, 120분; (3) 85℃, 5분; (4) 4℃, 반응 종료. 반응 후, 20 μL RNase-미함유 ddH_2O를 첨가하여 최종 부피가 40 μL가 되도록 하였다.

[1278] 3) 정량적 PCR 증폭 반응: qPCR 반응 시스템은 다음을 함유하는, 10 μl의 총 부피를 가졌다: 5 μl 2 × SYBR 그린 매스터 믹스, 0.5 μl 정방향 프라이머 (10 μM), 0.5 μL 역방향 프라이머, 1 μl 역전사에 의한 cDNA, 3 μl RNase-미함유 dH_2O. 라이트사이클러 480 형광 정량적 PCR 기기를 사용하였고, PCR 반응 조건은 다음과 같았다: 95℃, 5분 사전-변성, 이어서 PCR 증폭 사이클: (1) 95℃, 10s; (2) 55℃, 10s; (3) 72℃, 20s; 총 40 사이클; 결국 40℃ 10s 동안 냉각. 증폭 반응의 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머가 베이징 킹 케 뉴 인더스트리얼 바이오테크놀로지 캄파니, 리미티드(Beijing Qing Ke New Industrial Biotechnology Co., Ltd)에 의해 설계되고 합성되었다 (U6 F 프라이머: GCGCGTCGTGAAGCGTTC, U6 R 프라이머: GTGCAGGGTCCGAGGT).

[1279] 3) 상대 발현량은 2-ΔCt 방법에 의해 계산하였다.

[1280] **실시예 11-1: 단일 지질 번호 41에 의한 단일 가닥 핵산의 생체내 전달**

[1281] 1. 실험 동물: C57 마우스, 수컷, 대략 6주령.

[1282] 1) 미처리 군: 500 μl 식염수의 위내 투여;

[1283] 2) RNAiMAX 처리군: 10 μl RNAiMAX-1 nmol sRNA를 혼합하고 각각의 마우스에게 위내 투여하였다. 이 군은 양성 대조군으로서의 역할을 하였다. RNAiMAX는 인비트로겐으로부터 구매하였다.

[1284] 3) 자유 섭취군: 단일 가닥 sRNA 혼합물 용액을 직접 첨가하였다 (각각 1 nmol);

[1285] 4) 단일 지질 및 핵산 혼합물의 처리군: 10 μL의 단일 지질 (번호 41)과 단일 가닥 sRNA 혼합물 용액 (PGY-sRNA-23, PGY-sRNA-26 및 PGY-sRNA-32, 각각 1 nmol)의 혼합물을 가열법에 의해 처리한 다음에 마우스에게 위내 투여에 의해 제공하였다.

[1286] 2. 위내 투여 후 12시간에, 혈액을 안구로부터 취하고, 다양한 조직 (간/위/소장)을 샘플링하였다. 트리졸을 충분한 용해를 위해 사용하고 RNA를 추출하여 진입량을 검출하였다.

[1287] 결론:

[1288] 도 108에 나타낸 바와 같이, 단일 PE (번호 41)는 sRNA 단일 가닥 핵산을 마우스 혈액내로 경구 투여를 통해 효과적으로 전달하여 sRNA를 분해로부터 보호할 수 있었고, 전달 효과는 POPC 및 리포펙타민 RNAiMAX보다 더 양호하였다.

[1289] 도 109에 나타낸 바와 같이, 단일 PE (번호 41)는 sRNA 단일 가닥 핵산을 마우스 위내로 경구 투여를 통해 효과적으로 전달하여 sRNA를 분해로부터 보호할 수 있었다.

[1290] 도 110에 나타낸 바와 같이, 단일 PE (번호 41)는 sRNA 단일 가닥 핵산을 마우스 소장내로 경구 투여를 통해 효과적으로 전달하여 sRNA를 분해로부터 보호할 수 있었다.

[1291] 도 111에 나타낸 바와 같이, 단일 PE (번호 41)는 sRNA 단일 가닥 핵산을 마우스 간내로 경구 투여를 통해 효과적으로 전달하여 sRNA를 분해로부터 보호할 수 있었다.

[1292] **실시예 11-2: 단일 지질 번호 38에 의한 단일 가닥 핵산의 생체내 전달**

[1293] 1. 실험 동물: C57 마우스, 수컷, 대략 6주령.

[1294] 1) 미처리 군: 500 μl 식염수의 위내 투여;

[1295] 2) RNAiMAX 처리군: 10 μl RNAiMAX-1 nmol sRNA를 혼합하고 각각의 마우스에게 위내 투여하였다. 이 군은 양성 대조군으로서의 역할을 하였다. RNAiMAX는 인비트로겐으로부터 구매하였다.

[1296] 3) 자유 섭취군: 단일 가닥 sRNA 혼합물 용액을 직접 첨가하였다 (각각 1 nmol);

[1297] 4) POPC 및 핵산의 처리군: 가열법에 의해 처리된 10 μL POPC와 단일 가닥 PGY-sRNA-32 sRNA (각각 1 nmol) 혼합물 용액의 혼합물을 마우스에게 위관영양에 의해 제공하였다.

[1298] 5) 단일 지질 및 핵산 혼합물의 처리군: 가열법에 의해 처리된 10 μL 단일 지질 (번호 38)과 단일 가닥 sRNA (PGY-sRNA-32) 혼합물 용액 (각각 1 nmol)의 혼합물을 마우스에게 위관영양에 의해 제공하였다.

[1299] 2. 위관영양 후 12시간에, 혈액을 안구로부터 취하고 트리졸에 의해 용해시켜 RNA를 추출하여 진입량을 검출하였다.

[1300] 결론:

[1301] 도 112에 나타낸 바와 같이, 단일 PE (번호 38)는 sRNA 단일 가닥 핵산을 마우스 혈액내로 경구 투여를 통해 효과적으로 전달할 수 있었고, 전달 효과는 POPC 및 리포펙타민 RNAiMAX보다 더 양호하였다.

[1302] **실시예 11-3: 단일 지질 번호 40에 의한 단일 가닥 핵산의 생체내 전달**

[1303] 1. 실험 동물: C57 마우스, 수컷, 대략 6주령.

[1304] 1) 미처리 군: 500 μl 식염수의 위내 투여;

[1305] 2) RNAiMAX 처리군: 10 μl RNAiMAX-1 nmol sRNA를 혼합하고 각각의 마우스에게 위내 투여하였다. 이 군은 양성 대조군으로서의 역할을 하였다. RNAiMAX는 인비트로겐으로부터 구매하였다.

[1306] 3) 자유 섭취군: 단일 가닥 sRNA 혼합물 용액을 직접 첨가하였다 (각각 1 nmol);

[1307] 4) POPC 및 핵산의 처리군: 가열법에 의해 처리된 10 μL POPC와 단일 가닥 sRNA (각각 1 nmol) 혼합물 용액의 혼합물을 마우스에게 위관영양에 의해 제공하였다.

[1308] 5) 단일 지질 및 핵산 혼합물의 처리군: 가열법에 의해 처리된 10 μL 단일 지질 (번호 40)과 단일 가닥 sRNA (PGY-sRNA-32 및 PGY-sRNA-26, 각각 1 nmol) 혼합물 용액의 혼합물을 마우스에게 위관영양에 의해 제공하였다.

[1309] 2. 위관영양 후 12시간에, 혈액을 안구로부터 취하고 트리졸에 의해 용해시켜 RNA를 추출하여 진입량을 검출하였다.

[1310] 결론:

[1311] 도 113에 나타낸 바와 같이, 단일 PE (번호 40)는 sRNA 단일 가닥 핵산을 마우스 혈액내로 경구 투여를 통해 효과적으로 전달할 수 있었고, 전달 효과는 POPC 및 리포펙타민 RNAiMAX보다 더 양호하였다.

[1312] **실시예 11-4: 단일 지질 번호 64에 의한 단일 가닥 핵산의 생체내 전달**

[1313] 1. 실험 동물: C57 마우스, 수컷, 대략 6주령.

[1314] 1) 미처리 군: 500 μl 식염수의 위내 투여;

[1315] 2) RNAiMAX 처리군: 10 μl RNAiMAX-1 nmol sRNA를 혼합하고 각각의 마우스에게 위내 투여하였다. 이 군은 양성 대조군으로서의 역할을 하였다. RNAiMAX는 인비트로겐으로부터 구매하였다.

[1316] 3) 자유 섭취군: 단일 가닥 sRNA 혼합물 용액을 직접 첨가하였다 (각각 1 nmol);

[1317] 4) POPC 및 핵산의 처리군: 가열법에 의해 처리된 10 μL POPC와 단일 가닥 sRNA (각각 1 nmol) 혼합물 용액의

혼합물을 마우스에게 위관영양에 의해 제공하였다.

[1318] 5) 단일 지질 및 핵산 혼합물의 처리군: 가열법에 의해 처리된 10 μL 단일 지질 (번호 64)과 단일 가닥 sRNA (PGY-sRNA-32, 각각 1 nmol) 혼합물 용액의 혼합물을 마우스에게 위관영양에 의해 제공하였다.

[1319] 2. 위관영양 후 12시간에, 혈액을 안구로부터 취하고 트리졸에 의해 용해시켜 RNA를 추출하여 진입량을 검출하였다.

[1320] 결론:

[1321] 도 114에 나타낸 바와 같이, 단일 PE (번호 64)는 sRNA 단일 가닥 핵산을 마우스 혈액내로 경구 투여를 통해 효과적으로 전달할 수 있었고, 전달 효과는 POPC 및 리포펙타민 RNAiMAX보다 더 양호하였다.

[1322] **실시예 11-5: 단일 지질 번호 71에 의한 단일 가닥 핵산의 생체내 전달**

[1323] 1. 실험 동물: C57 마우스, 수컷, 대략 6주령.

[1324] 1) 미처리 군: 500 μl 식염수의 위내 투여;

[1325] 2) RNAiMAX 처리군: 10 μl RNAiMAX-1 nmol sRNA를 혼합하고 각각의 마우스에게 위내 투여하였다. 이 군은 양성 대조군으로서의 역할을 하였다. RNAiMAX는 인비트로겐으로부터 구매하였다.

[1326] 3) 자유 섭취군: 단일 가닥 sRNA 혼합물 용액을 직접 첨가하였다 (각각 1 nmol);

[1327] 4) POPC 및 핵산의 처리군: 가열법에 의해 처리된 10 μL POPC와 단일 가닥 sRNA (각각 1 nmol) 혼합물 용액의 혼합물을 마우스에게 위관영양에 의해 제공하였다.

[1328] 5) 단일 지질 및 핵산 혼합물의 처리군: 가열법에 의해 처리된 10 μL 단일 지질 (번호 71)과 단일 가닥 sRNA 혼합물 (PGY-sRNA-32, 각각 1 nmol) 용액의 혼합물을 마우스에게 위관영양에 의해 제공하였다.

[1329] 2. 위관영양 후 12시간에, 혈액을 안구로부터 취하고 트리졸에 의해 용해시켜 RNA를 추출하여 진입량을 검출하였다.

[1330] 결론:

[1331] 도 115에 나타낸 바와 같이, 단일 PE (번호 71)는 sRNA 단일 가닥 핵산을 마우스 혈액내로 경구 투여를 통해 효과적으로 전달할 수 있었고, 전달 효과는 POPC 및 리포펙타민 RNAiMAX보다 더 양호하였다.

[1332] **실시예 12: 지질은 상이한 온도 구배에서 단일 가닥 핵산을 MRC-5 세포내로 효과적으로 전달한다**

[1333] 1. 실험군:

[1334] 1) 미처리 군: 미처리된 세포;

[1335] 2) RNAiMAX 처리군: 2 μL RNAiMAX 형질감염 시약 및 단일 가닥 HJT-sRNA-m7 용액을 100 μL opti-MEM 배지에 각각 희석한 다음에, 상기 둘을 혼합하고, 15분 동안 방치하고, 세포내로 첨가한 다음에, 혼합하고, 단일 가닥 HJT-sRNA-m7의 최종 농도는 100 nM이었다;

[1336] 3) 단일 지질 및 핵산 혼합물의 처리군: 상이한 온도에서 비등법에 의해 처리된 2.5 μL 단일 지질 (번호 38)과 HJT-sRNA-m7 이중 가닥 핵산 용액의 혼합물을 세포에 첨가한 다음에 혼합하고, RNA의 최종 농도는 100 nM이었다.

[1337] 4℃: 100 μL 단일 가닥 HJT-sRNA-m7 용액에 2.5 μL 단일 지질을 첨가하고 4℃에서 15분 동안 두었고; 세포 첨가 후 6시간에, 세포 중 HJT-sRNA-m7의 발현 수준은 RT-qPCR에 의해 검출하였다.

[1338] 37℃: 100 μL 단일 가닥 HJT-sRNA-m7 용액에 2.5 μL 단일 지질을 첨가하고 37℃에서 15분 동안 두었다. 세포 첨가 후 6시간에, 세포 중 HJT-sRNA-m7의 발현 수준은 RT-qPCR에 의해 검출하였다.

[1339] 60℃: 100 μL 단일 가닥 HJT-sRNA-m7 용액에 2.5 μL 단일 지질을 첨가하고 50℃에서 15분 동안 두었다. 세포 첨가 후 6시간에, 세포 중 HJT-sRNA-m7의 발현 수준은 RT-qPCR에 의해 검출하였다.

[1340] 80℃: 100 μL 단일 가닥 HJT-sRNA-m7 용액에 2.5 μL 단일 지질을 첨가하고 50℃에서 15분 동안 두었다. 세포 첨가 후 6시간에, 세포 중 HJT-sRNA-m7의 발현 수준은 RT-qPCR에 의해 검출하였다.

[1341] 100℃: 100 μL HJT-sRNA-m7 단일 가닥 용액에 2.5 μL 단일 지질을 첨가하고 50℃에서 15분 동안 두었다. 세

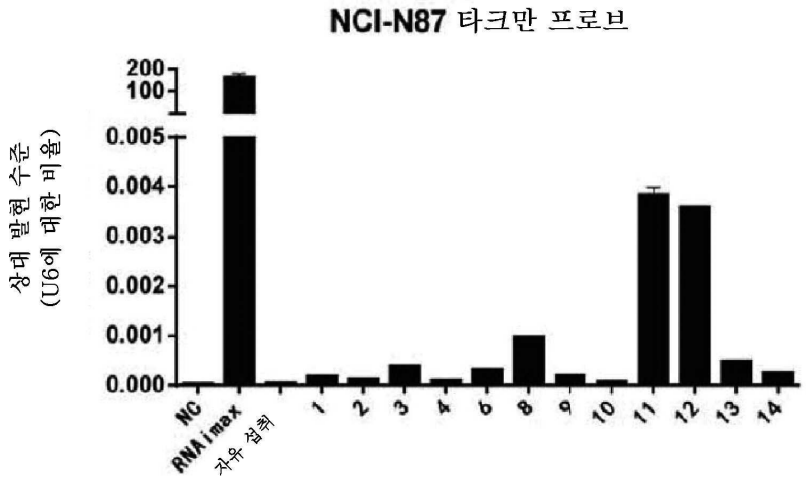
포 첨가 후 6시간에, 세포 중 HJT-sRNA-m7의 발현 수준은 RT-qPCR에 의해 검출하였다.

[1342] 결론:

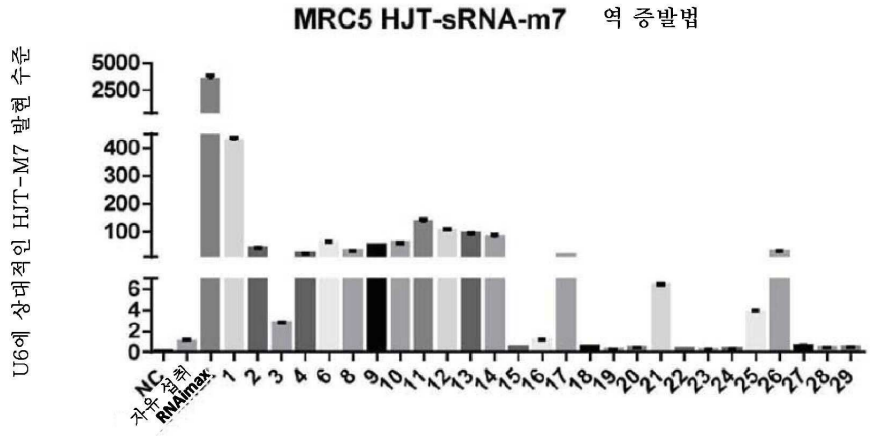
[1343] 도 116에 나타낸 바와 같이, 결과는 상이한 온도 조건에서 비등법에 의한 지질은 핵산을 세포내로 효과적으로 전달할 수 있었고 (통계적으로 유의한, $p< 0.01$), 임상 환경에서 핵산 약물의 전달 효율을 개선시킬 가능성을 가짐을 나타냈다.

도면

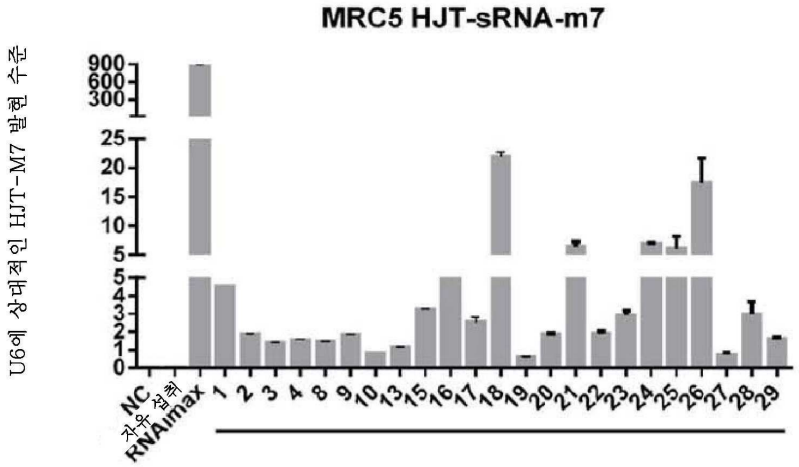
도면1



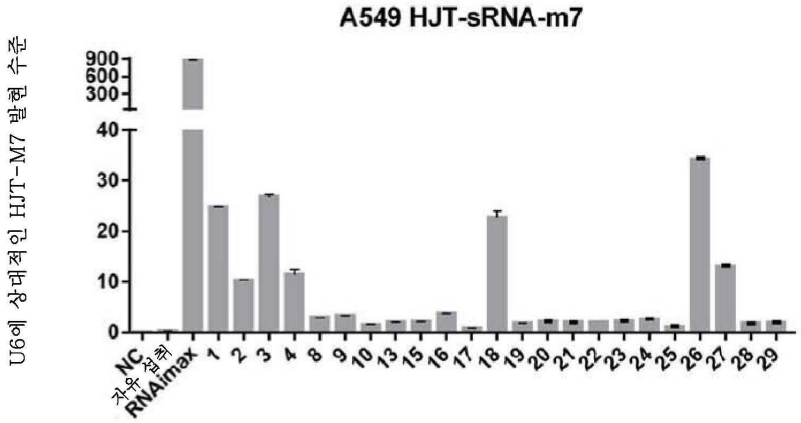
도면2



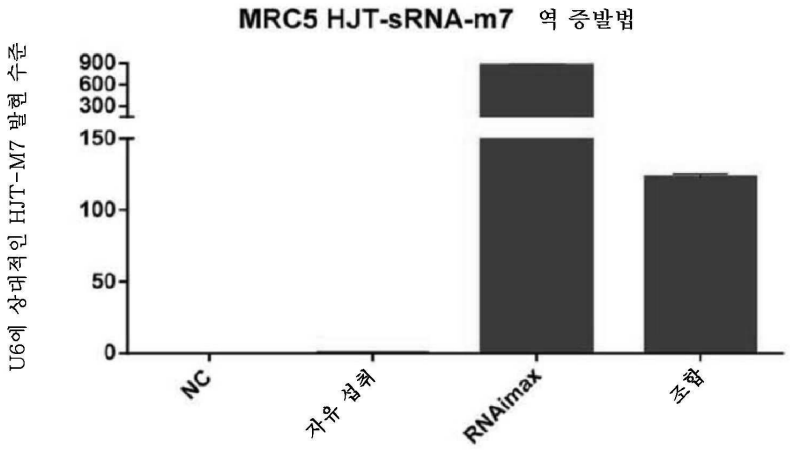
도면3


MRC5 HJT-sRNA-m7
U6에 상대적인 HJT-M7 발현 수준
900
600
300
25
20
15
10
5
5
4
3
2
1
0
NC
자유 섭취
RNAimax
1 2 3 4 8 9 10 13 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29

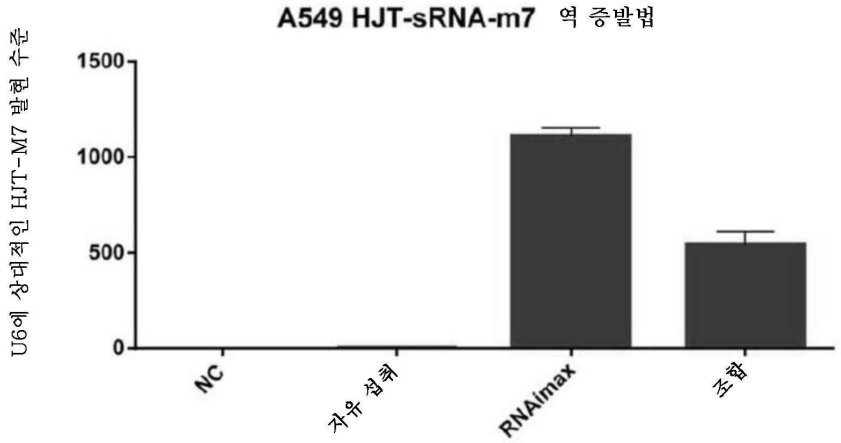
도면4


A549 HJT-sRNA-m7
U6에 상대적인 HJT-M7 발현 수준
900
600
300
40
30
20
10
0
NC
자유 섭취
RNAimax
1 2 3 4 8 9 10 13 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29

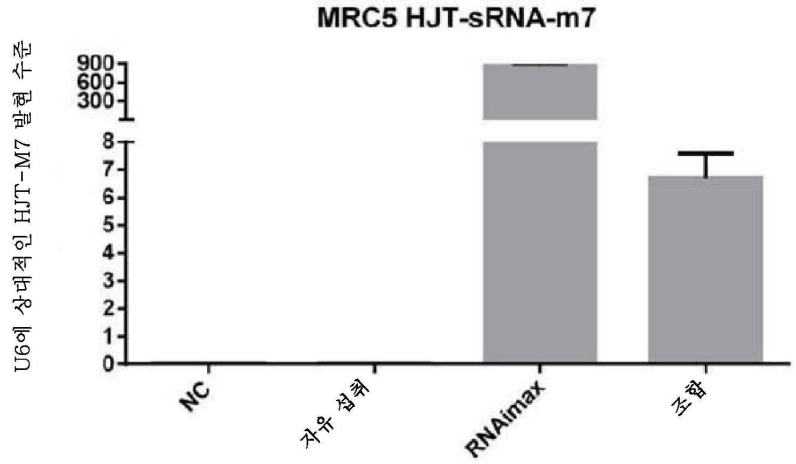
도면5


MRC5 HJT-sRNA-m7 역 증발법
U6에 상대적인 HJT-M7 발현 수준
900
600
300
150
100
50
0
NC
자유 섭취
RNAimax
조합

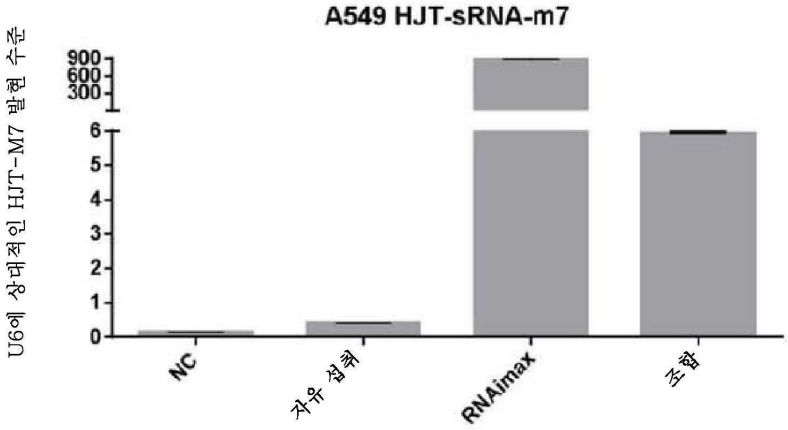
도면6


A549 HJT-sRNA-m7 역 증발법
U6에 상대적인 HJT-M7 발현 수준
1500
1000
500
0
NC
자유 siRNA
RNAimax
조합

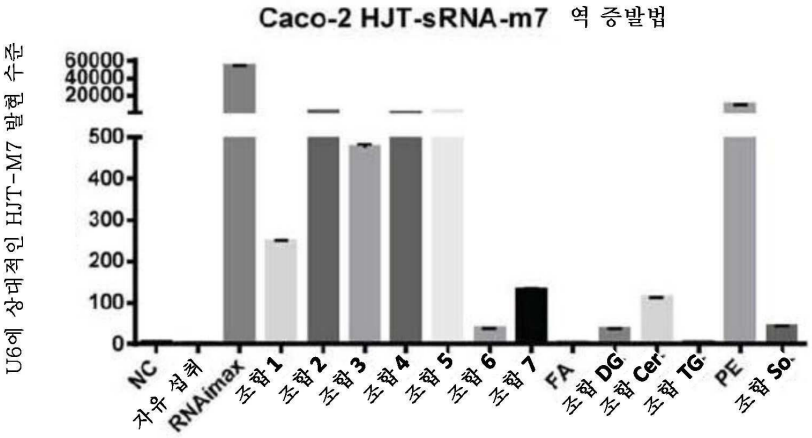
도면7


MRC5 HJT-sRNA-m7
U6에 상대적인 HJT-M7 발현 수준
900
600
300
8
7
6
5
4
3
2
1
0
NC
자유 siRNA
RNAimax
조합

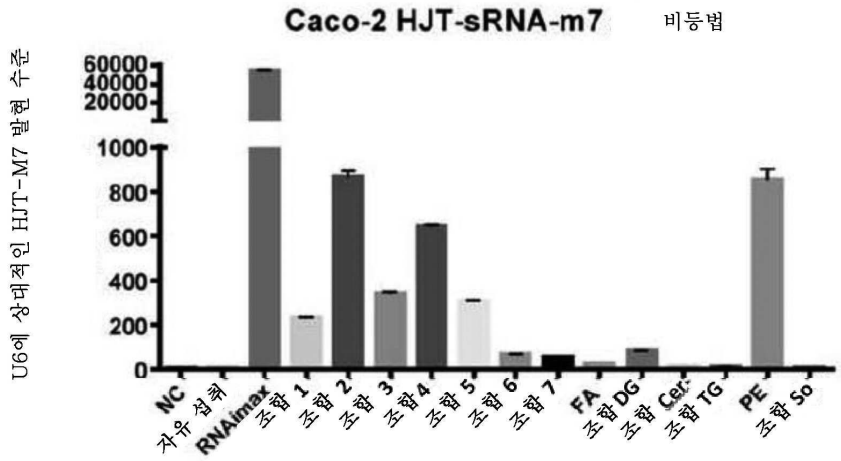
도면8


A549 HJT-sRNA-m7
U6에 상대적인 HJT-M7 발현 수준
900
600
300
6
5
4
3
2
1
0
NC
자유 siRNA
RNAimax
조합

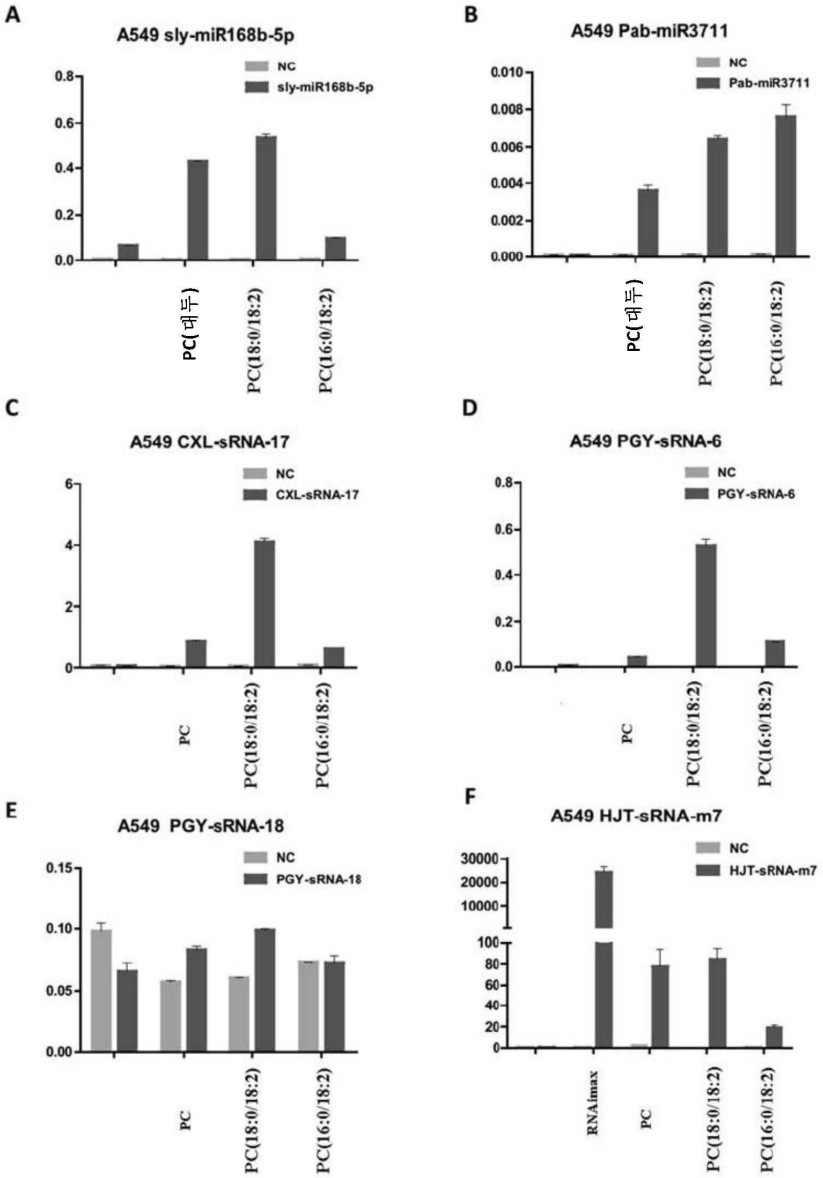
도면9


Caco-2 HJT-sRNA-m7 역 증발법
U6에 상대적인 HJT-M7 발현 수준
60000
40000
20000
500
400
300
200
100
0
NC
자유 섬쿼
RNAimax
조합 1
조합 2
조합 3
조합 4
조합 5
조합 6
조합 7
FA
조합 DG
조합 Cer
조합 TG
PE
조합 So

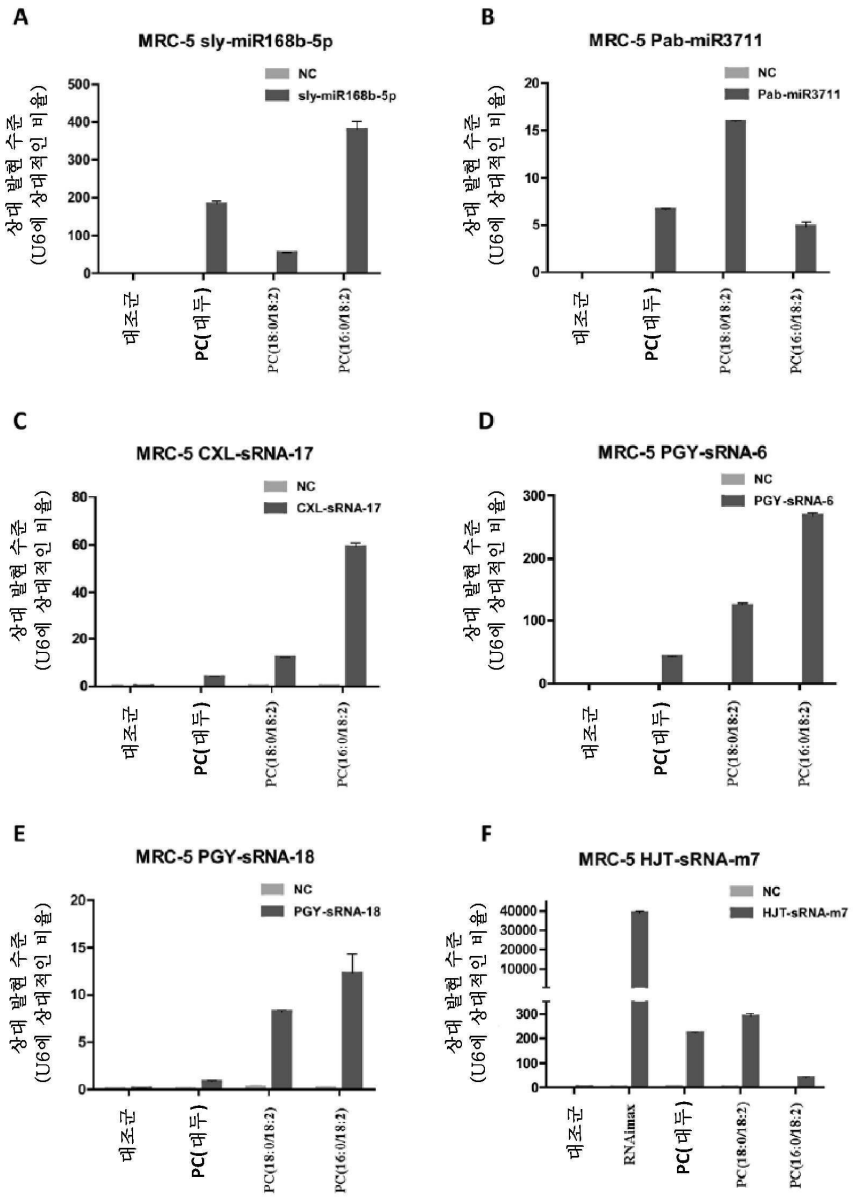
도면10


Caco-2 HJT-sRNA-m7 비등법
U6에 상대적인 HJT-M7 발현 수준
60000
40000
20000
1000
800
600
400
200
0
NC
자유 섬쿼
RNAimax
조합 1
조합 2
조합 3
조합 4
조합 5
조합 6
조합 7
FA
조합 DG
조합 Cer
조합 TG
PE
조합 So

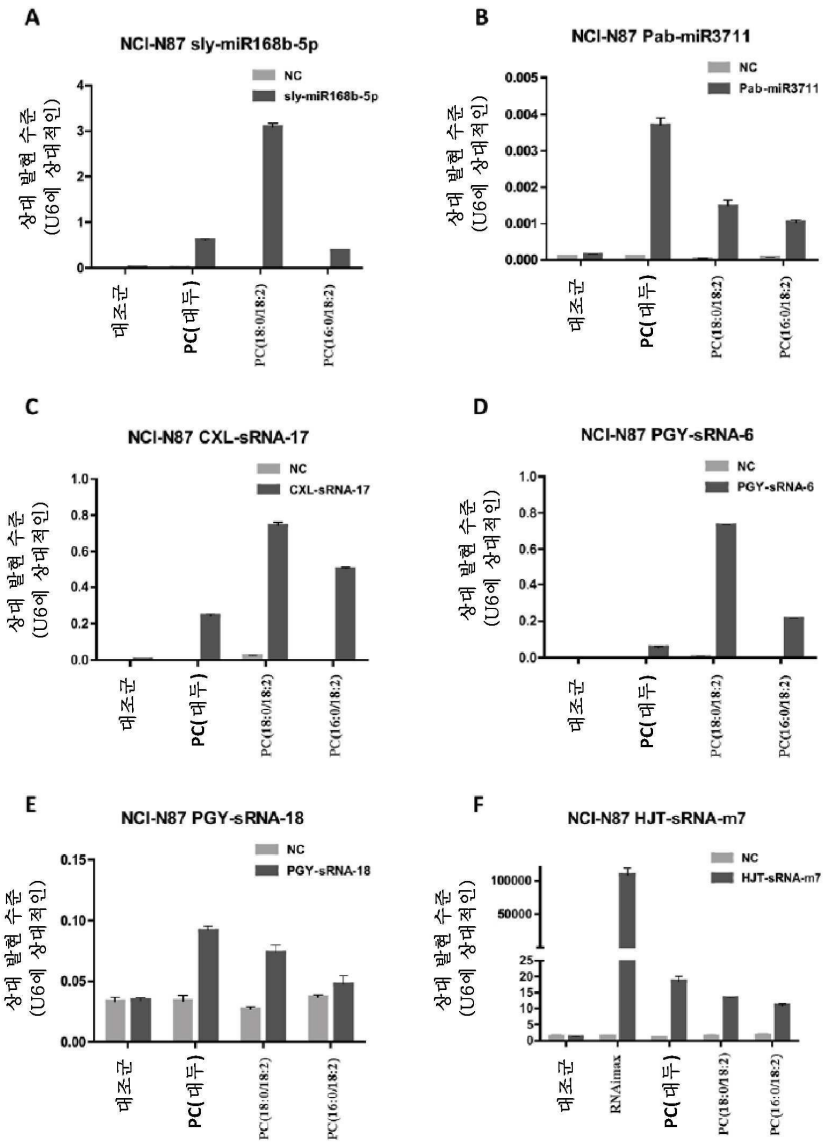
도면11a


A
A549 sly-miR168b-5p
NC
sly-miR168b-5p
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
PC(대두)
PC(18:0/18:2)
PC(16:0/18:2)
B
A549 Pab-miR3711
NC
Pab-miR3711
0.010
0.008
0.006
0.004
0.002
0.000
PC(대두)
PC(18:0/18:2)
PC(16:0/18:2)
C
A549 CXL-sRNA-17
NC
CXL-sRNA-17
6
4
2
0
PC
PC(18:0/18:2)
PC(16:0/18:2)
D
A549 PGY-sRNA-6
NC
PGY-sRNA-6
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
PC
PC(18:0/18:2)
PC(16:0/18:2)
E
A549 PGY-sRNA-18
NC
PGY-sRNA-18
0.15
0.10
0.05
0.00
PC
PC(18:0/18:2)
PC(16:0/18:2)
F
A549 HJT-sRNA-m7
NC
HJT-sRNA-m7
30000
20000
10000
100
80
60
40
20
0
RNAimax
PC
PC(18:0/18:2)
PC(16:0/18:2)

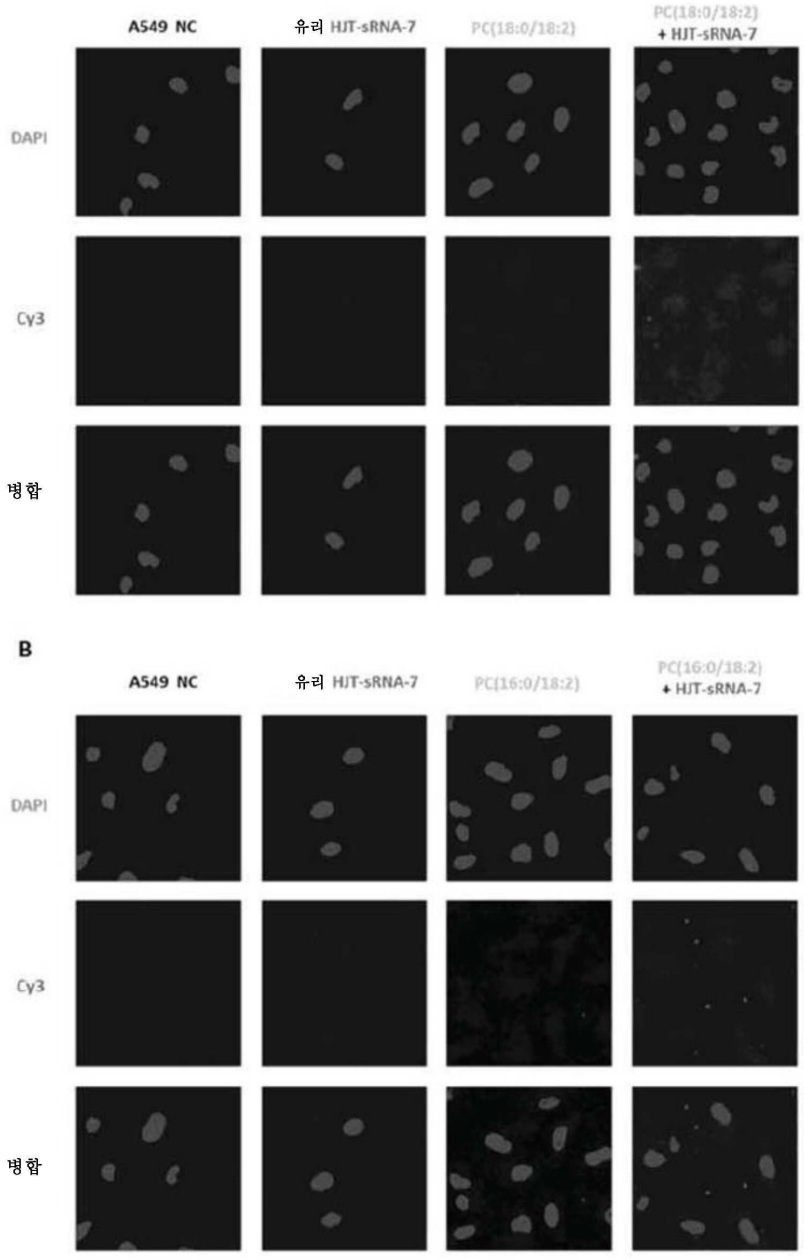
도면11b


A
MRC-5 sly-miR168b-5p
NC
sly-miR168b-5p
상대 발현 수준
(U6에 상대적인 비율)
대조군
PC(대두)
PC(18:0/18:2)
PC(16:0/18:2)
B
MRC-5 Pab-miR3711
NC
Pab-miR3711
C
MRC-5 CXL-sRNA-17
NC
CXL-sRNA-17
D
MRC-5 PGY-sRNA-6
NC
PGY-sRNA-6
E
MRC-5 PGY-sRNA-18
NC
PGY-sRNA-18
F
MRC-5 HJT-sRNA-m7
NC
HJT-sRNA-m7
RNAimax

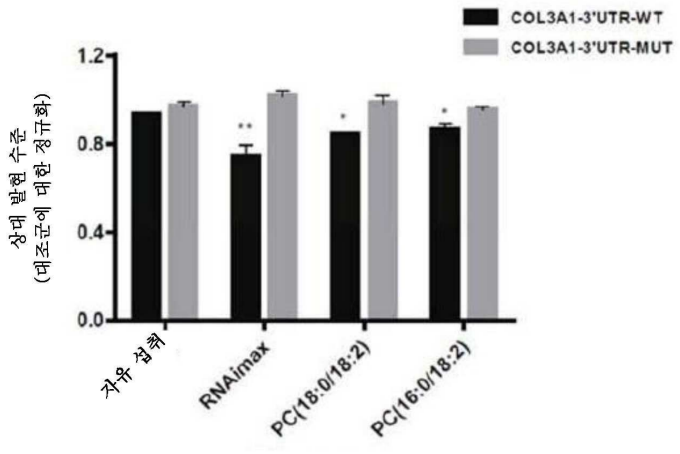
도면11c


A
NCI-N87 sly-miR168b-5p
NC
sly-miR168b-5p
상대 발현 수준
(U6에 상대적인)
대조군
PC(대두)
PC(18:0/18:2)
PC(16:0/18:2)
B
NCI-N87 Pab-miR3711
NC
Pab-miR3711
C
NCI-N87 CXL-sRNA-17
NC
CXL-sRNA-17
D
NCI-N87 PGY-sRNA-6
NC
PGY-sRNA-6
E
NCI-N87 PGY-sRNA-18
NC
PGY-sRNA-18
F
NCI-N87 HJT-sRNA-m7
NC
HJT-sRNA-m7
RNAimax

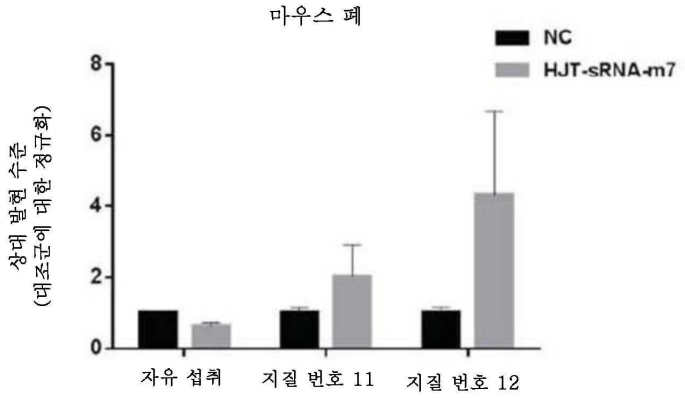
도면12


A549 NC
유리 HJT-sRNA-7
PC(18:0/18:2)
PC(18:0/18:2) + HJT-sRNA-7
DAPI
Cy3
병합
B
A549 NC
유리 HJT-sRNA-7
PC(16:0/18:2)
PC(16:0/18:2) + HJT-sRNA-7
DAPI
Cy3
병합

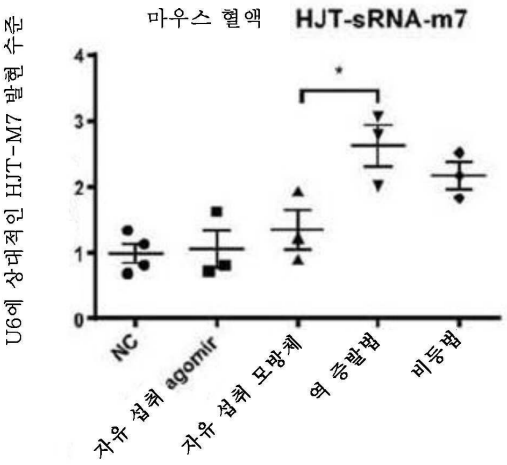
도면13



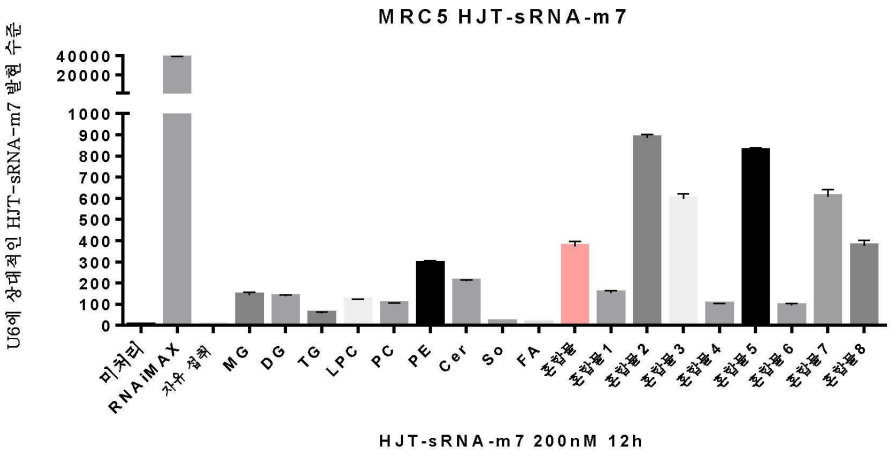
도면14



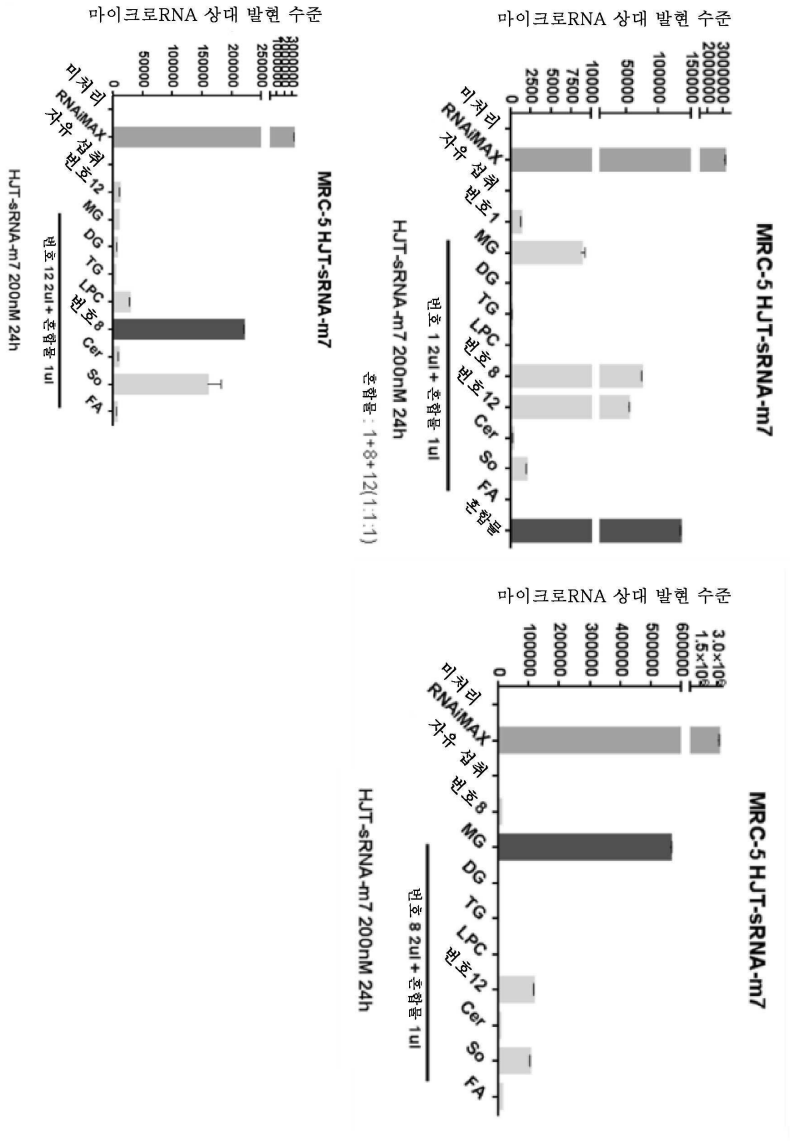
도면15



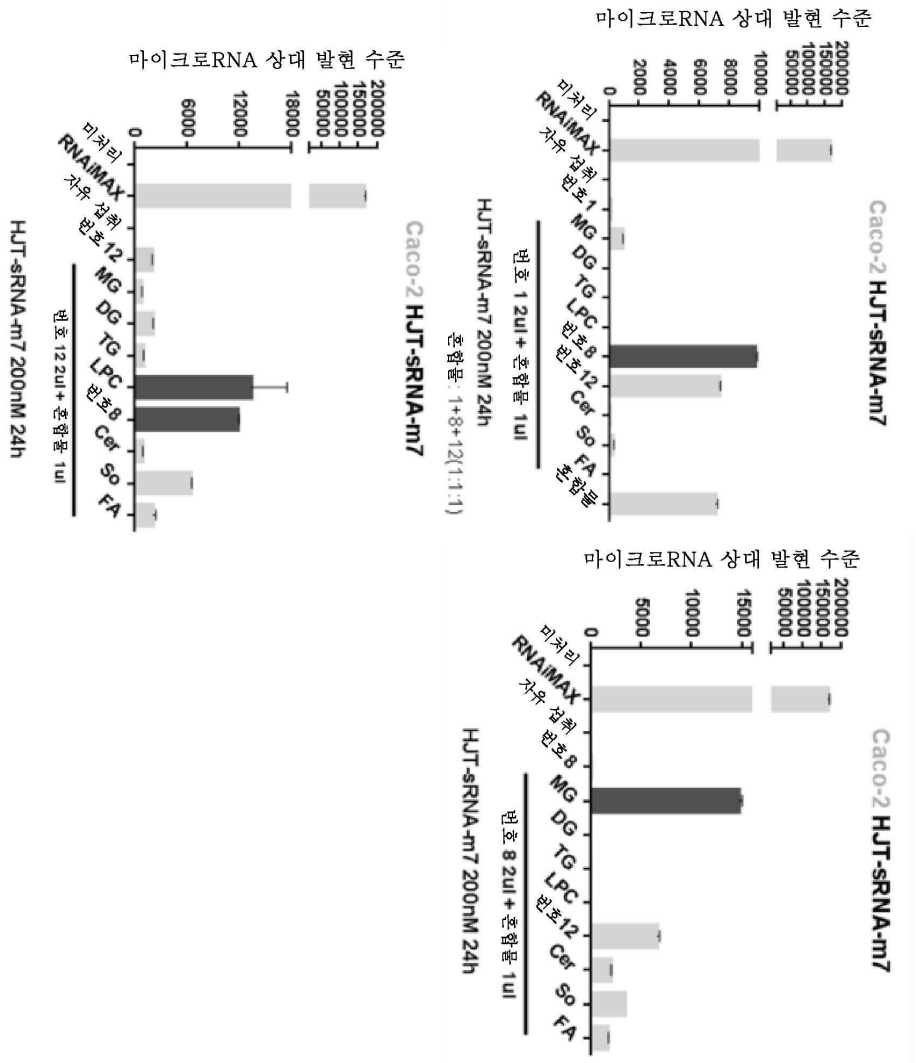
도면16


MRC5 HJT-sRNA-m7
U6에 상대적인 HJT-sRNA-m7 발현 수준
40000
20000
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
미처리
RNAiMAX
자유 섭쿼
MG
DG
TG
LPC
PC
PE
Cer
So
FA
혼합물
혼합물1
혼합물2
혼합물3
혼합물4
혼합물5
혼합물6
혼합물7
혼합물8
HJT-sRNA-m7 200nM 12h

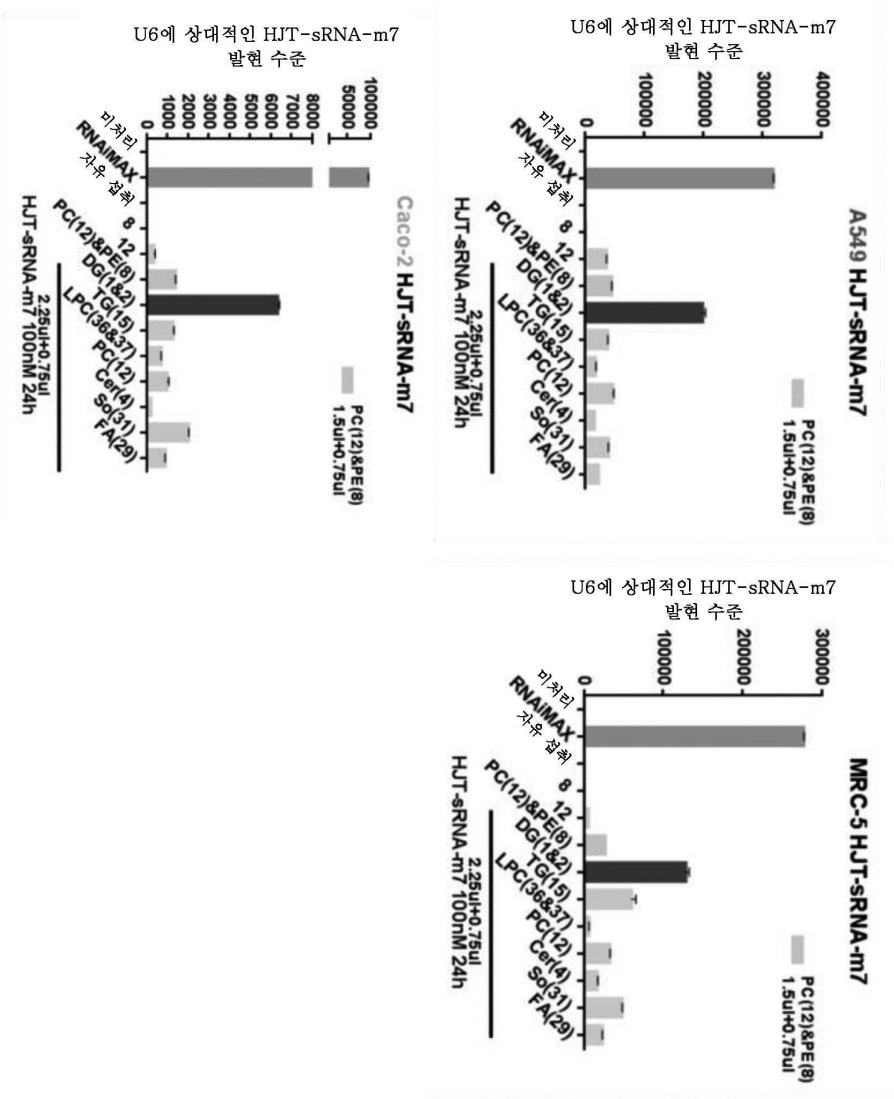
도면17a


마이크로RNA 상대 발현 수준
미처리
RNAiMAX
자유 섭쿼
편호12
MG
DG
TG
LPC
편호8
Cer
So
FA
편호 12 2ul + 혼합물 1ul
HJT-sRNA-m7 200nM 24h
MRC-5 HJT-sRNA-m7
마이크로RNA 상대 발현 수준
미처리
RNAiMAX
자유 섭쿼
편호1
MG
DG
TG
LPC
편호8
편호12
Cer
So
FA
혼합물
편호 1 2ul + 혼합물 1ul
HJT-sRNA-m7 200nM 24h
혼합물 : 1+8+12(1:1:1)
MRC-5 HJT-sRNA-m7
마이크로RNA 상대 발현 수준
미처리
RNAiMAX
자유 섭쿼
편호8
MG
DG
TG
LPC
편호12
Cer
So
FA
편호 8 2ul + 혼합물 1ul
HJT-sRNA-m7 200nM 24h
MRC-5 HJT-sRNA-m7

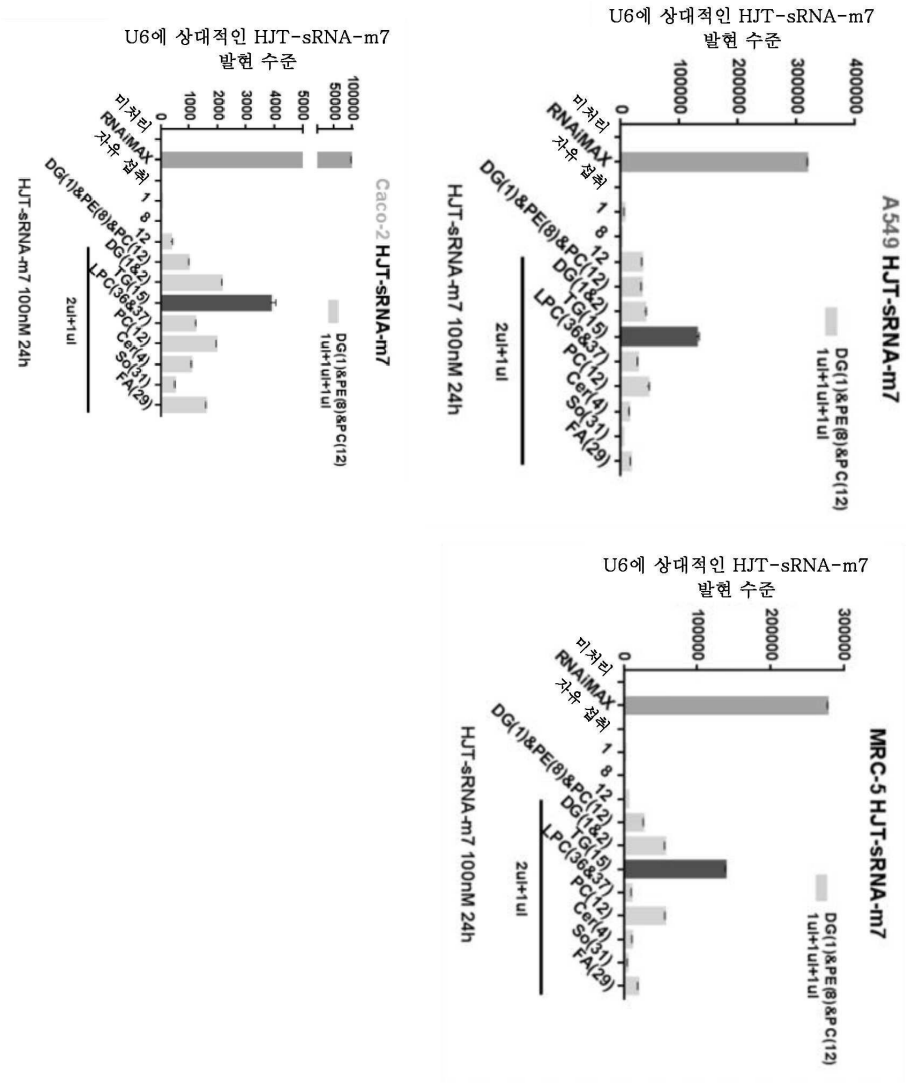
도면17b


마이크로RNA 상대 발현 수준
Caco-2 HJT-sRNA-m7
HJT-sRNA-m7 200nM 24h
번호 12 2ul + 혼합물 1ul
미처리
RNAiMAX
자우 섭취
번호12
MG
DG
TG
LPC
번호8
Cer
SO
FA
혼합물 : 1+8+12(1:1:1)
번호 1 2ul + 혼합물 1ul
번호1
번호 8 2ul + 혼합물 1ul

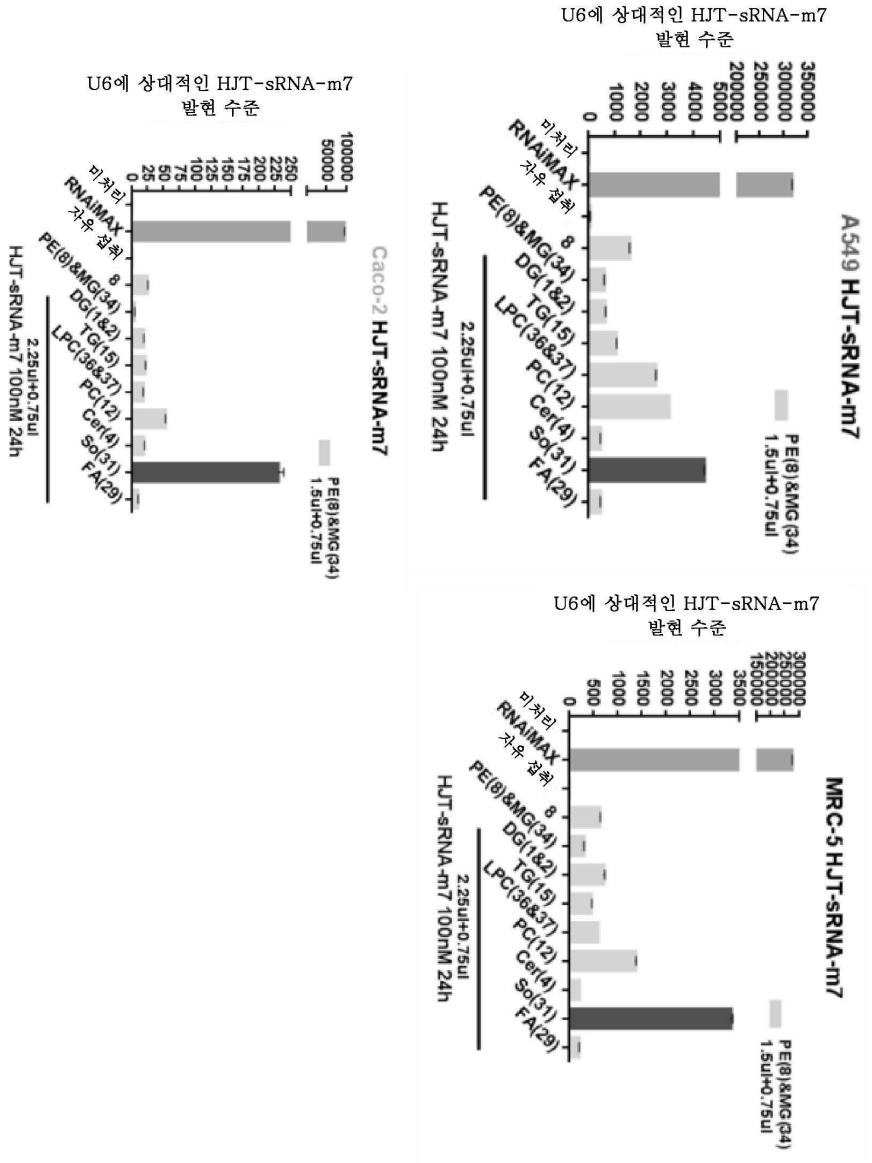
도면18


U6에 상대적인 HJT-sRNA-m7
발현 수준
Caco-2 HJT-sRNA-m7
A549 HJT-sRNA-m7
MRC-5 HJT-sRNA-m7
미처리
RNAiMAX
자유 칼콕
8
12
PC(12)&PE(8)
DG(1&2)
TG(15)
LPC(36&37)
PC(12)
Cer(4)
So(31)
FA(29)
HJT-sRNA-m7 100nM 24h
2.25ul+0.75ul
PC(12)&PE(8)
1.5ul+0.75ul

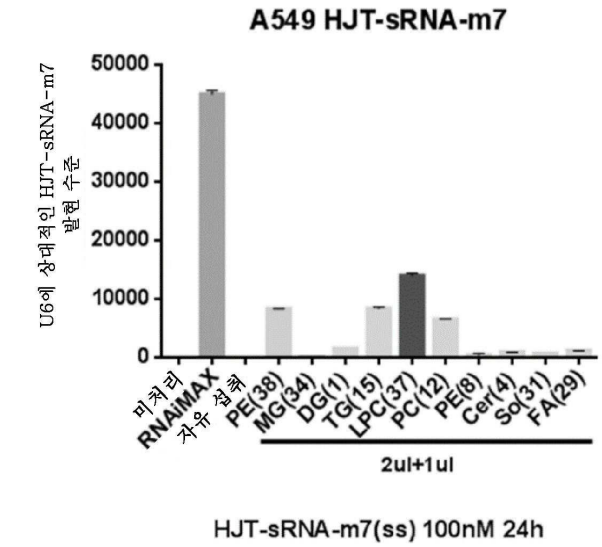
도면19


U6에 상대적인 HJT-sRNA-m7
발현 수준
Caco-2 HJT-sRNA-m7
A549 HJT-sRNA-m7
MRC-5 HJT-sRNA-m7
HJT-sRNA-m7 100nM 24h
2ul+1ul
DG(1)&PE(8)&PC(12)
1ul+1ul+1ul
미처리
RNAiMAX
자유 절취
1
8
12
DG(1)&PE(8)&PC(12)
DG(1&2)
TG(15)
LPC(36&37)
PC(12)
Cer(4)
Sol(31)
FA(29)

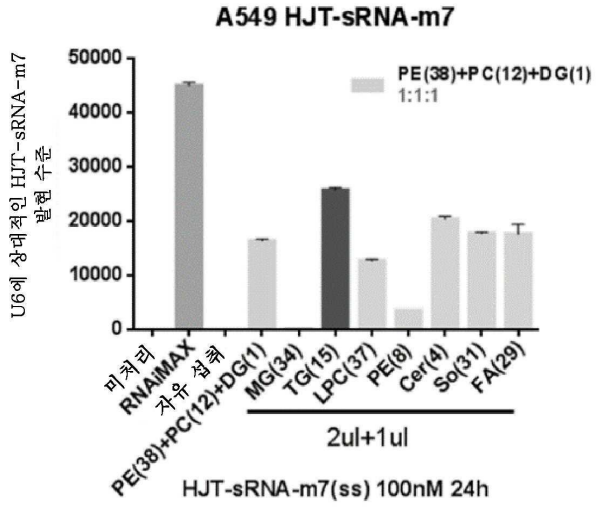
도면20


U6에 상대적인 HJT-sRNA-m7
발현 수준
A549 HJT-sRNA-m7
Caco-2 HJT-sRNA-m7
MRC-5 HJT-sRNA-m7
미처리
RNAiMAX
자유 접촉
PE(8)&MG(34)
8
DG(1&2)
TG(15)
LPC(36&37)
PC(12)
Cer(4)
So(31)
FA(29)
PE(8)&MG(34) 1.5ul+0.75ul
2.25ul+0.75ul
HJT-sRNA-m7 100nM 24h

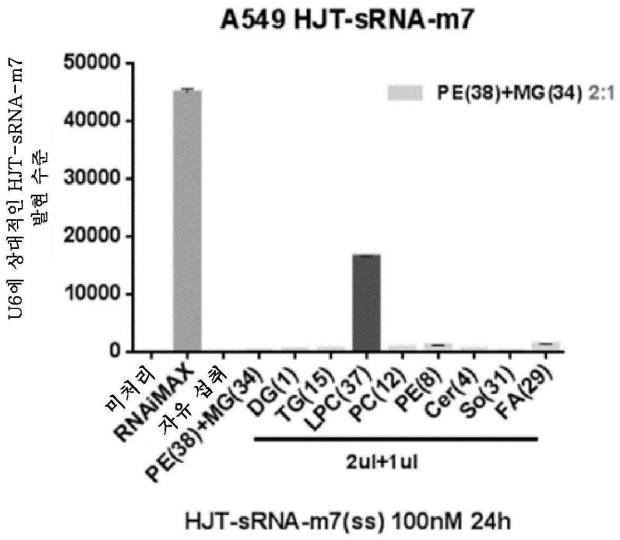
도면21


A549 HJT-sRNA-m7
U6에 상대적인 HJT-sRNA-m7 발현 수준
50000
40000
30000
20000
10000
0
미처리
RNAiMAX
자유 접촉
PE(38)
MG(34)
DG(1)
TG(15)
LPC(37)
PC(12)
PE(8)
Cer(4)
So(31)
FA(29)
2ul+1ul
HJT-sRNA-m7(ss) 100nM 24h

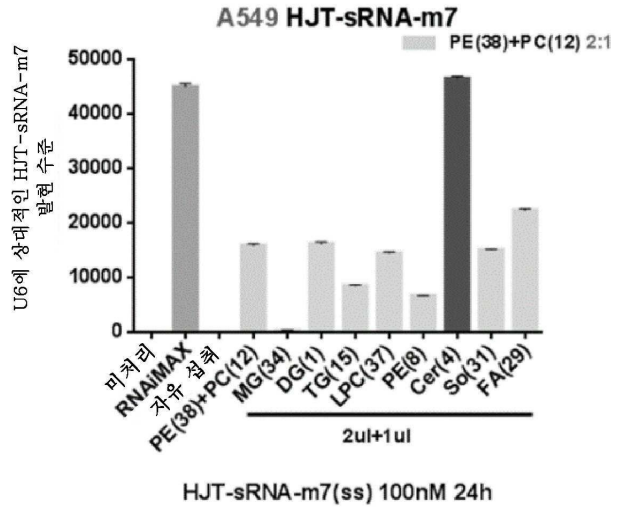
도면22


A549 HJT-sRNA-m7
U6에 상대적인 HJT-sRNA-m7 발현 수준
50000
40000
30000
20000
10000
0
PE(38)+PC(12)+DG(1)
1:1:1
미처리
RNAiMAX
자유 접촉
PE(38)+PC(12)+DG(1)
MG(34)
TG(15)
LPC(37)
PE(8)
Cer(4)
So(31)
FA(29)
2ul+1ul
HJT-sRNA-m7(ss) 100nM 24h

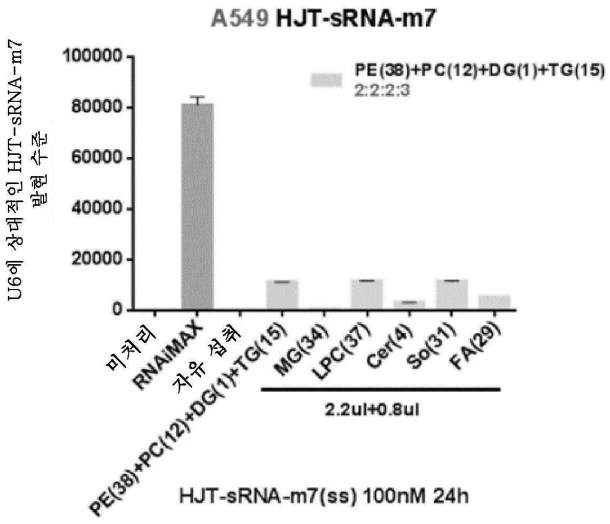
도면23


A549 HJT-sRNA-m7
PE(38)+MG(34) 2:1
U6에 상대적인 HJT-sRNA-m7 발현 수준
50000
40000
30000
20000
10000
0
미처리
RNAiMAX
자유 siRNA
PE(38)+MG(34)
DG(1)
TG(15)
LPC(37)
PC(12)
PE(8)
Cer(4)
Sol(31)
FA(29)
2ul+1ul
HJT-sRNA-m7(ss) 100nM 24h

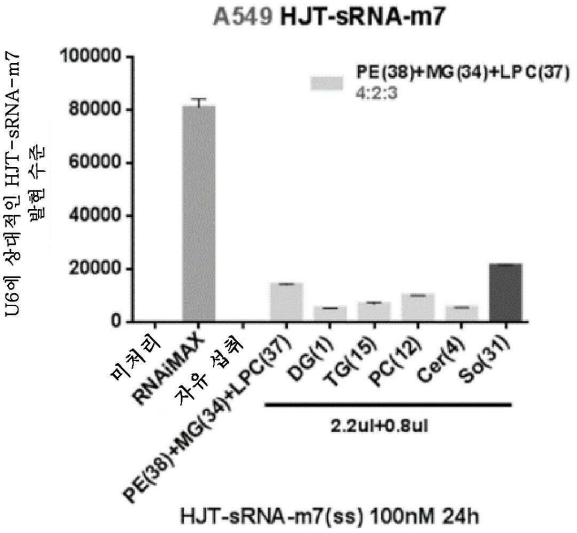
도면24


A549 HJT-sRNA-m7
PE(38)+PC(12) 2:1
U6에 상대적인 HJT-sRNA-m7 발현 수준
50000
40000
30000
20000
10000
0
미처리
RNAiMAX
자유 siRNA
PE(38)+PC(12)
MG(34)
DG(1)
TG(15)
LPC(37)
PE(8)
Cer(4)
Sol(31)
FA(29)
2ul+1ul
HJT-sRNA-m7(ss) 100nM 24h

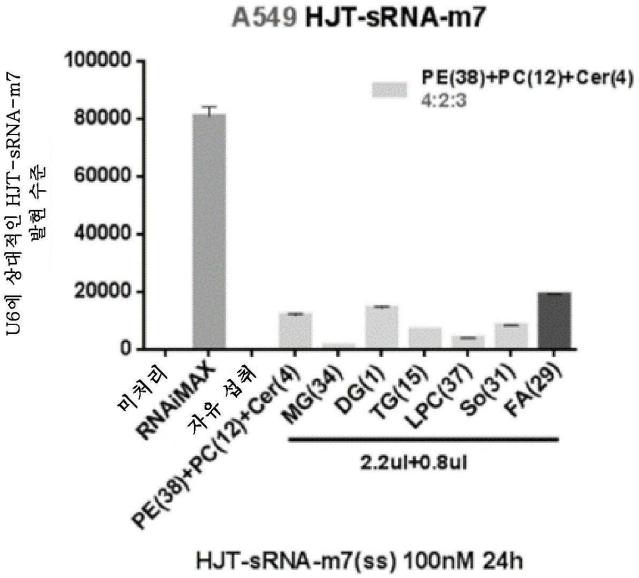
도면25


A549 HJT-sRNA-m7
U6에 상대적인 HJT-sRNA-m7 발현 수준
100000
80000
60000
40000
20000
0
PE(38)+PC(12)+DG(1)+TG(15)
2:2:2:3
미처리
RNAiMAX
자유 섭취
PE(38)+PC(12)+DG(1)+TG(15)
MG(34)
LPC(37)
Cer(4)
So(31)
FA(29)
2.2ul+0.8ul
HJT-sRNA-m7(ss) 100nM 24h

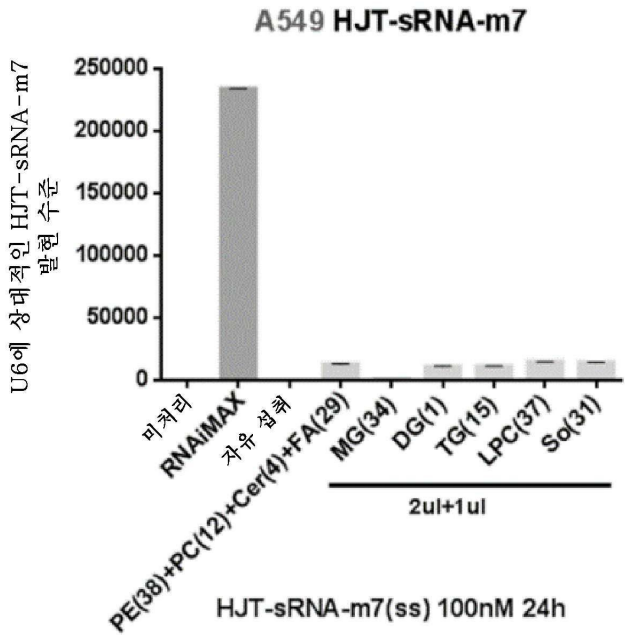
도면26


A549 HJT-sRNA-m7
U6에 상대적인 HJT-sRNA-m7 발현 수준
100000
80000
60000
40000
20000
0
PE(38)+MG(34)+LPC(37)
4:2:3
미처리
RNAiMAX
자유 섭취
PE(38)+MG(34)+LPC(37)
DG(1)
TG(15)
PC(12)
Cer(4)
So(31)
2.2ul+0.8ul
HJT-sRNA-m7(ss) 100nM 24h

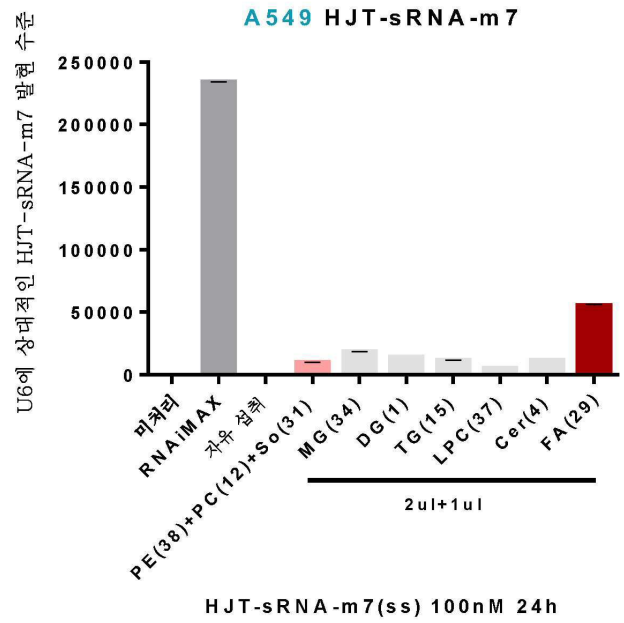
도면27


A549 HJT-sRNA-m7
U6에 상대적인 HJT-sRNA-m7 발현 수준
100000
80000
60000
40000
20000
0
PE(38)+PC(12)+Cer(4)
4:2:3
미처리
RNAiMAX
자유 칼쿼
PE(38)+PC(12)+Cer(4)
MG(34)
DG(1)
TG(15)
LPC(37)
So(31)
FA(29)
2.2ul+0.8ul
HJT-sRNA-m7(ss) 100nM 24h

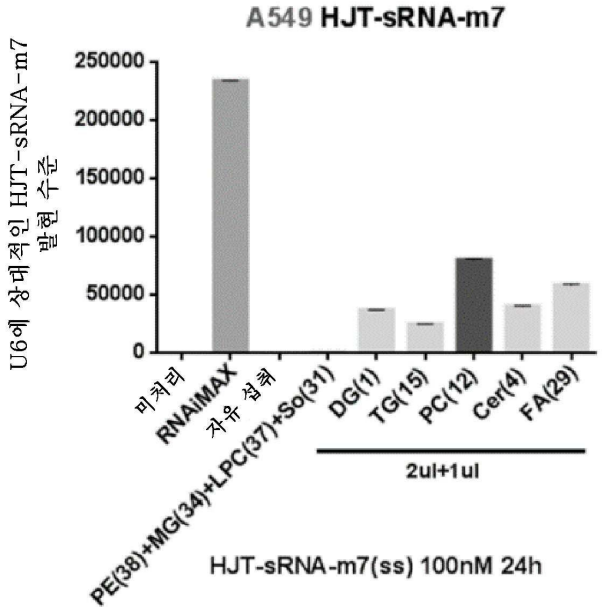
도면28


A549 HJT-sRNA-m7
U6에 상대적인 HJT-sRNA-m7 발현 수준
250000
200000
150000
100000
50000
0
미처리
RNAiMAX
자유 칼쿼
PE(38)+PC(12)+Cer(4)+FA(29)
MG(34)
DG(1)
TG(15)
LPC(37)
So(31)
2ul+1ul
HJT-sRNA-m7(ss) 100nM 24h

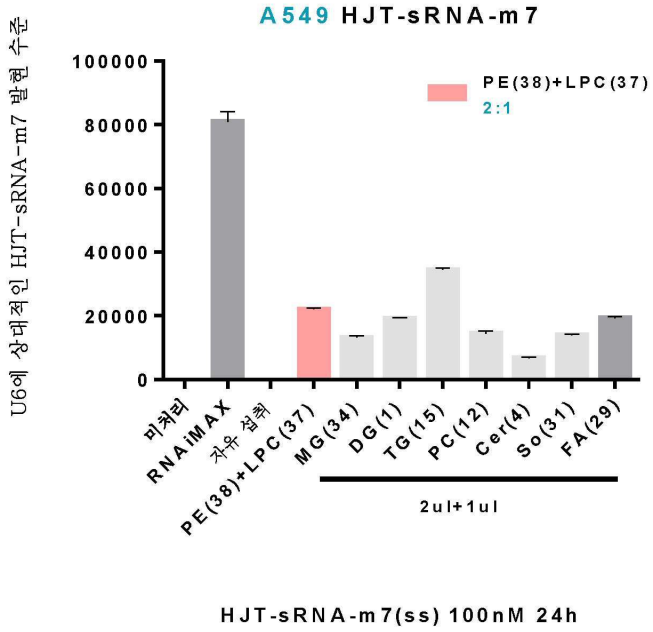
도면29


A549 HJT-sRNA-m7
U6에 상대적인 HJT-sRNA-m7 발현 수준
250000
200000
150000
100000
50000
0
미처리
RNAiMAX
자유 설쿼
PE(38)+PC(12)+So(31)
MG(34)
DG(1)
TG(15)
LPC(37)
Cer(4)
FA(29)
2ul+1ul
HJT-sRNA-m7(ss) 100nM 24h

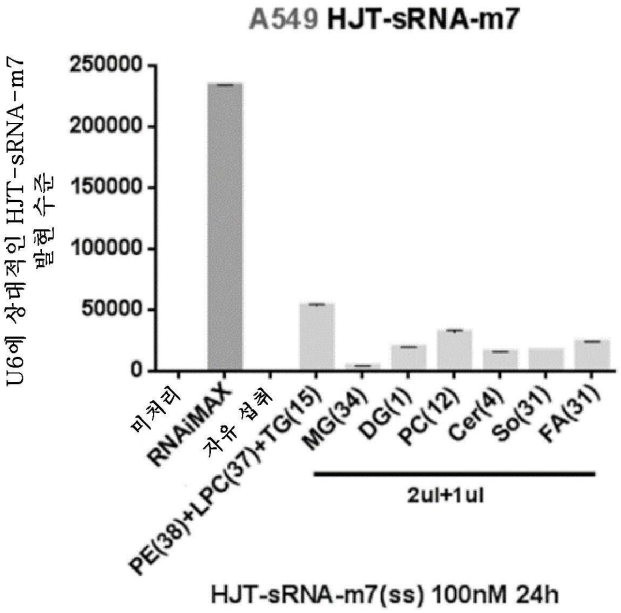
도면30


A549 HJT-sRNA-m7
U6에 상대적인 HJT-sRNA-m7 발현 수준
250000
200000
150000
100000
50000
0
미처리
RNAiMAX
자유 설쿼
PE(38)+MG(34)+LPC(37)+So(31)
DG(1)
TG(15)
PC(12)
Cer(4)
FA(29)
2ul+1ul
HJT-sRNA-m7(ss) 100nM 24h

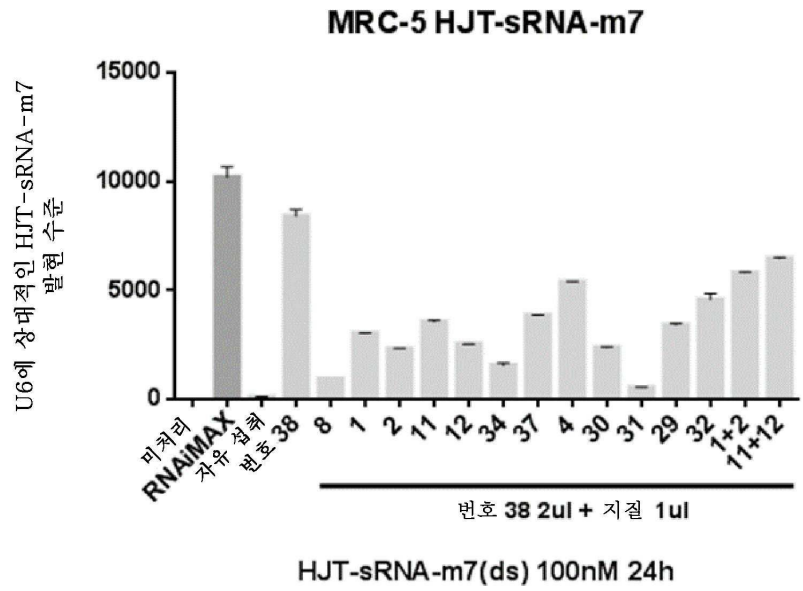
도면31


A549 HJT-sRNA-m7
U6에 상대적인 HJT-sRNA-m7 발현 수준
100000
80000
60000
40000
20000
0
PE(38)+LPC(37)
2:1
미처리
RNAiMAX
자유 섭취
PE(38)+LPC(37)
MG(34)
DG(1)
TG(15)
PC(12)
Cer(4)
So(31)
FA(29)
2ul+1ul
HJT-sRNA-m7(ss) 100nM 24h

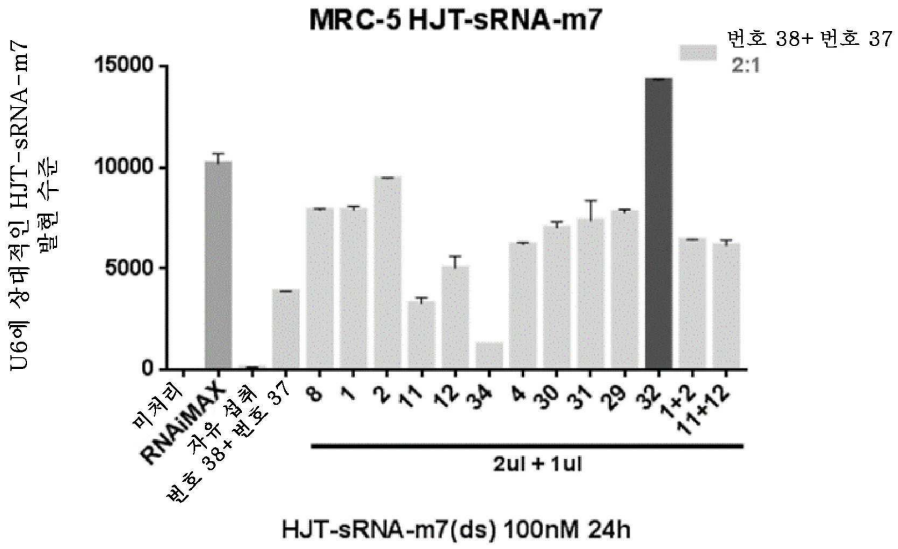
도면32


A549 HJT-sRNA-m7
U6에 상대적인 HJT-sRNA-m7 발현 수준
250000
200000
150000
100000
50000
0
미처리
RNAiMAX
자유 섭취
PE(38)+LPC(37)+TG(15)
MG(34)
DG(1)
PC(12)
Cer(4)
So(31)
FA(31)
2ul+1ul
HJT-sRNA-m7(ss) 100nM 24h

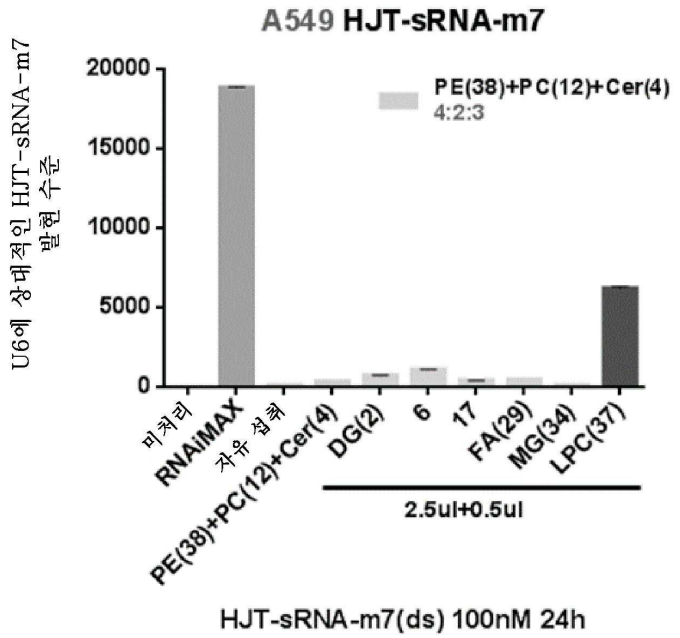
도면33


MRC-5 HJT-sRNA-m7
U6에 상대적인 HJT-sRNA-m7 발현 수준
15000
10000
5000
0
미처리
RNAiMAX
자유 siRNA 번호 38
8
1
2
11
12
34
37
4
30
31
29
32
1+2
11+12
번호 38 2ul + 지질 1ul
HJT-sRNA-m7(ds) 100nM 24h

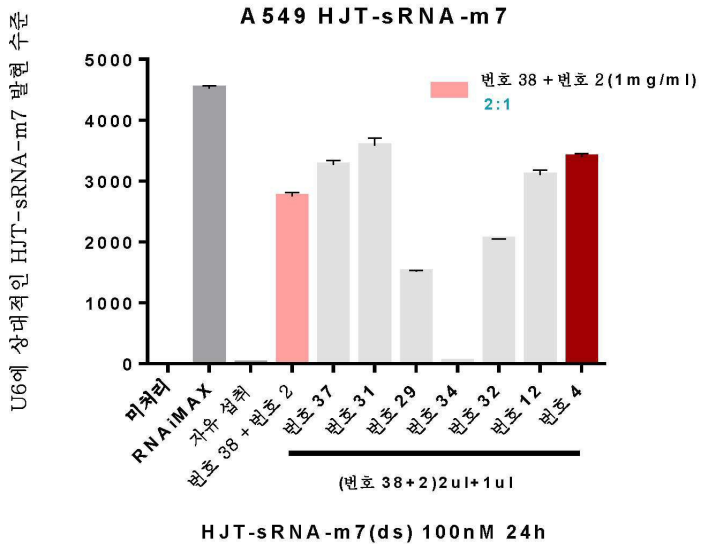
도면34


MRC-5 HJT-sRNA-m7
번호 38+ 번호 37 2:1
U6에 상대적인 HJT-sRNA-m7 발현 수준
15000
10000
5000
0
미처리
RNAiMAX
자유 siRNA 번호 38+ 번호 37
8
1
2
11
12
34
4
30
31
29
32
1+2
11+12
2ul + 1ul
HJT-sRNA-m7(ds) 100nM 24h

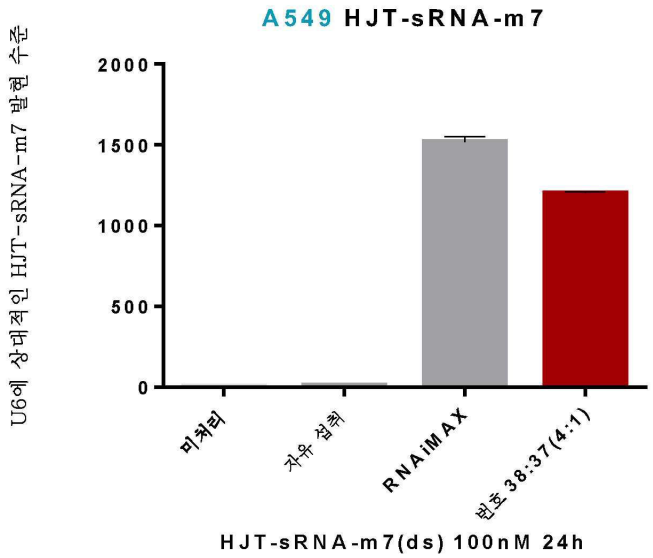
도면35


A549 HJT-sRNA-m7
U6에 상대적인 HJT-sRNA-m7 발현 수준
20000
15000
10000
5000
0
PE(38)+PC(12)+Cer(4)
4:2:3
미처리
RNAiMAX
자유 섭취
PE(38)+PC(12)+Cer(4)
DG(2)
6
17
FA(29)
MG(34)
LPC(37)
2.5ul+0.5ul
HJT-sRNA-m7(ds) 100nM 24h

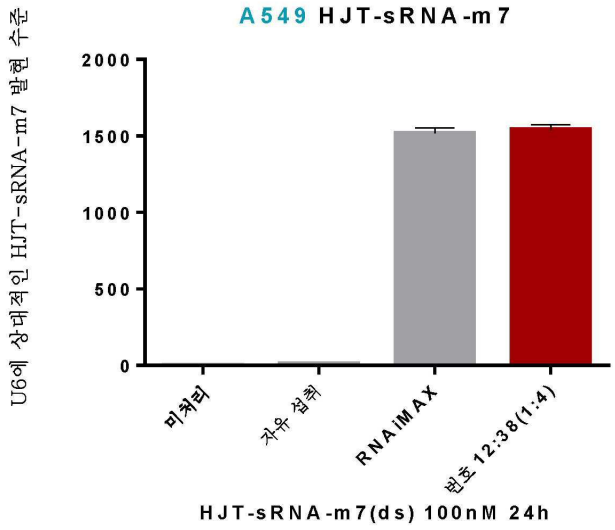
도면36


A549 HJT-sRNA-m7
U6에 상대적인 HJT-sRNA-m7 발현 수준
5000
4000
3000
2000
1000
0
번호 38 + 번호 2 (1mg/ml)
2:1
미처리
RNAiMAX
자유 섭취
번호 38 + 번호 2
번호 37
번호 31
번호 29
번호 34
번호 32
번호 12
번호 4
(번호 38+2)2ul+1ul
HJT-sRNA-m7(ds) 100nM 24h

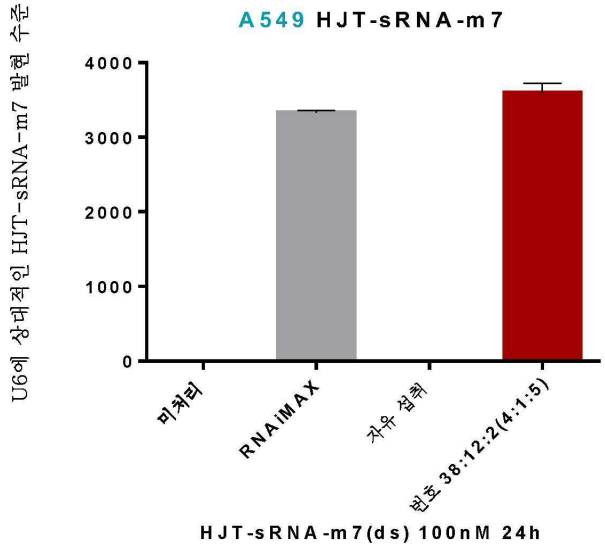
도면37


A549 HJT-sRNA-m7
U6에 상대적인 HJT-sRNA-m7 발현 수준
2000
1500
1000
500
0
미처리
자유 섭취
RNAiMAX
빈토 38:37(4:1)
HJT-sRNA-m7(ds) 100nM 24h

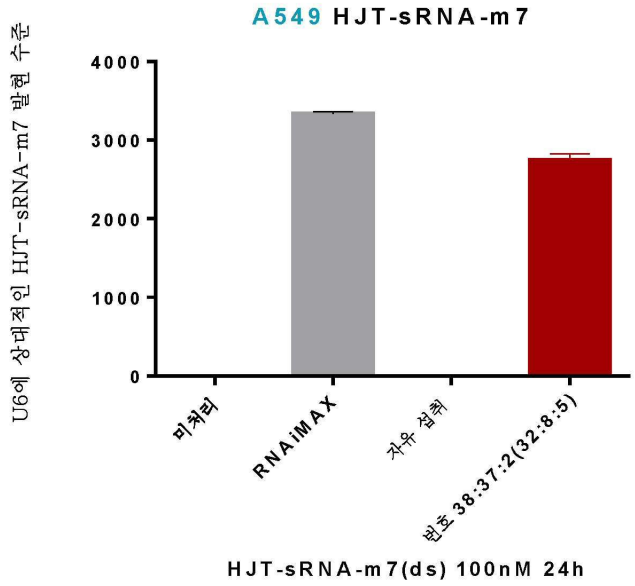
도면38


A549 HJT-sRNA-m7
U6에 상대적인 HJT-sRNA-m7 발현 수준
2000
1500
1000
500
0
미처리
자유 섭취
RNAiMAX
빈토 12:38(1:4)
HJT-sRNA-m7(ds) 100nM 24h

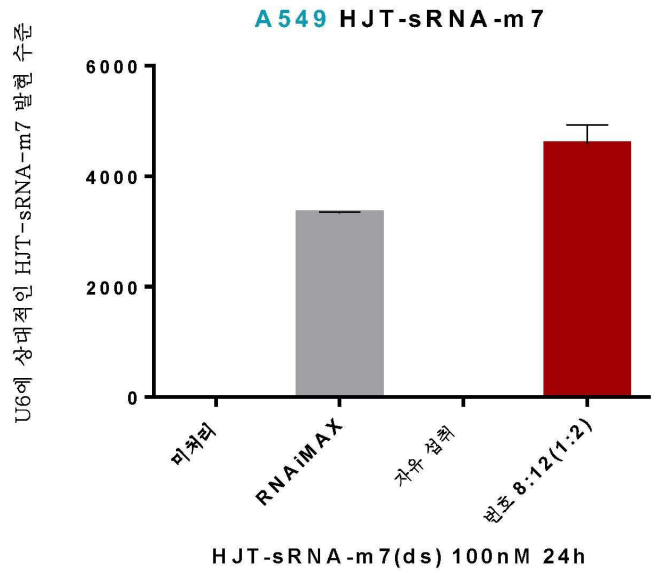
도면39


A549 HJT-sRNA-m7
U6에 상대적인 HJT-sRNA-m7 발현 수준
4000
3000
2000
1000
0
미처리
RNAiMAX
자유 섭취
번호 38:12:2(4:1:5)
HJT-sRNA-m7(ds) 100nM 24h

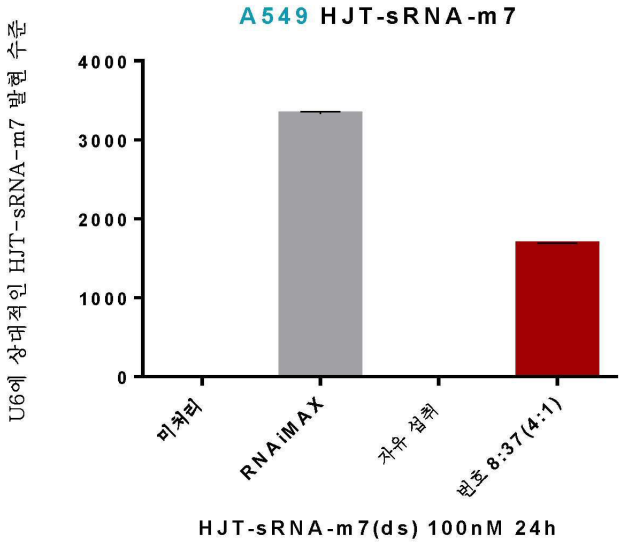
도면40


A549 HJT-sRNA-m7
U6에 상대적인 HJT-sRNA-m7 발현 수준
4000
3000
2000
1000
0
미처리
RNAiMAX
자유 섭취
번호 38:37:2(32:8:5)
HJT-sRNA-m7(ds) 100nM 24h

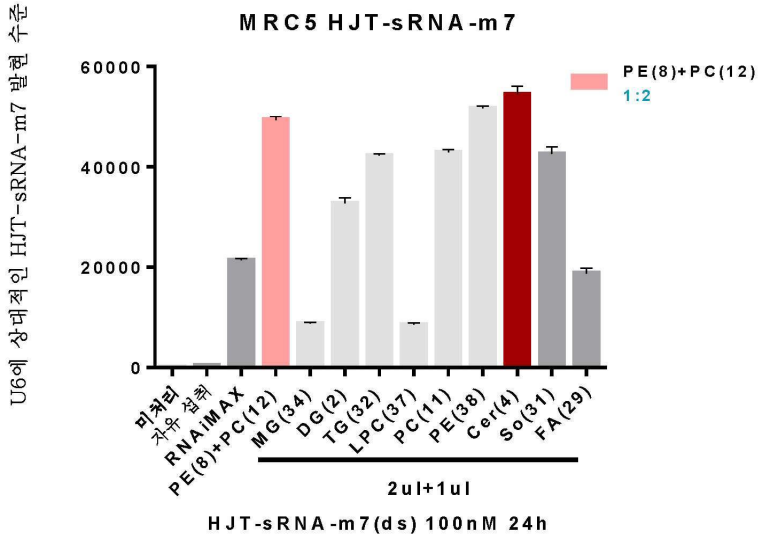
도면41


A549 HJT-sRNA-m7
U6에 상대적인 HJT-sRNA-m7 발현 수준
6000
4000
2000
0
미처리
RNAiMAX
자유 섭취
번호 8:12(1:2)
HJT-sRNA-m7(ds) 100nM 24h

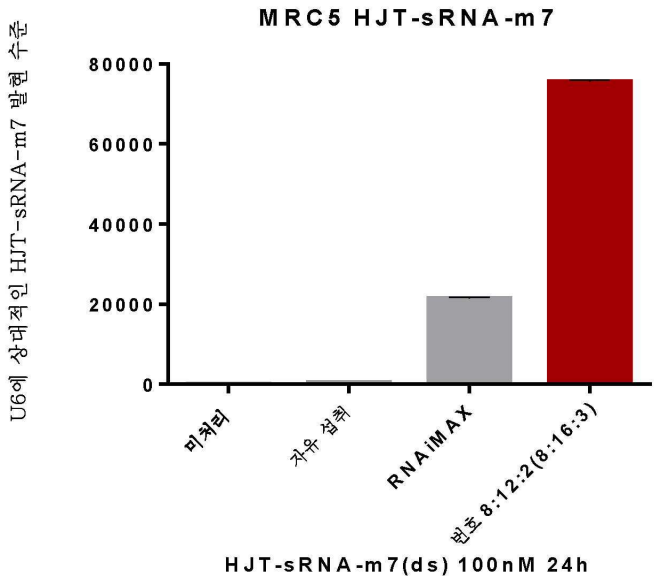
도면42


A549 HJT-sRNA-m7
U6에 상대적인 HJT-sRNA-m7 발현 수준
4000
3000
2000
1000
0
미처리
RNAiMAX
자유 섭취
번호 8:37(4:1)
HJT-sRNA-m7(ds) 100nM 24h

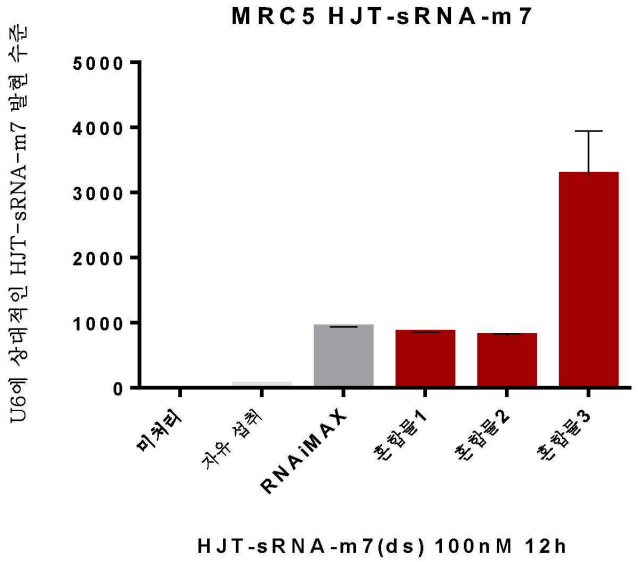
도면43


MRC5 HJT-sRNA-m7
U6에 상대적인 HJT-sRNA-m7 발현 수준
60000
40000
20000
0
PE(8)+PC(12)
1:2
미처리
자유 siRNA
RNAiMAX
PE(8)+PC(12)
MG(34)
DG(2)
TG(32)
LPC(37)
PC(11)
PE(38)
Cer(4)
So(31)
FA(29)
2ul+1ul
HJT-sRNA-m7(ds) 100nM 24h

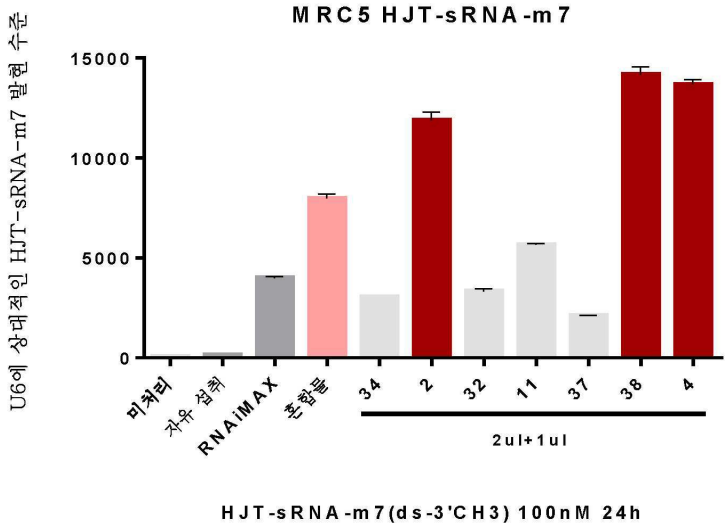
도면44


MRC5 HJT-sRNA-m7
U6에 상대적인 HJT-sRNA-m7 발현 수준
80000
60000
40000
20000
0
미처리
자유 siRNA
RNAiMAX
번호 8:12:2(8:16:3)
HJT-sRNA-m7(ds) 100nM 24h

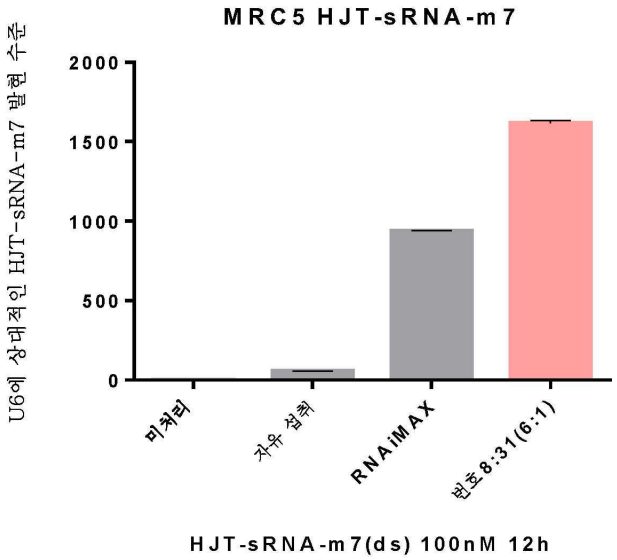
도면45


MRC5 HJT-sRNA-m7
U6에 상대적인 HJT-sRNA-m7 발현 수준
5000
4000
3000
2000
1000
0
미처리
자유 실험
RNAiMAX
혼합물1
혼합물2
혼합물3
HJT-sRNA-m7(ds) 100nM 12h

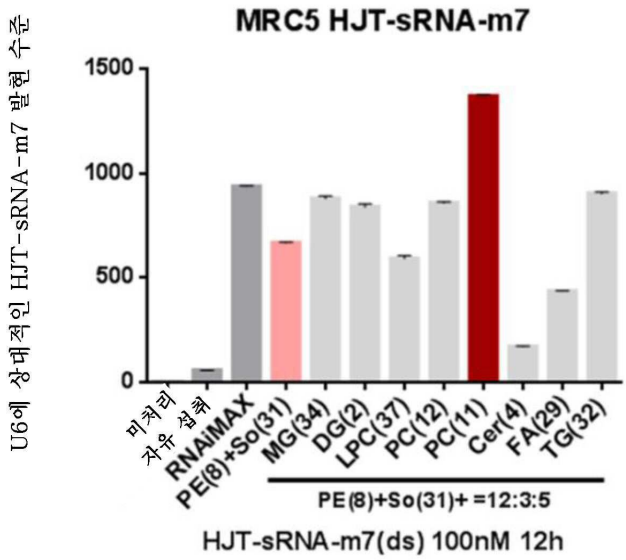
도면46


MRC5 HJT-sRNA-m7
U6에 상대적인 HJT-sRNA-m7 발현 수준
15000
10000
5000
0
미처리
자유 실험
RNAiMAX
혼합물
34
2
32
11
37
38
4
2ul+1ul
HJT-sRNA-m7(ds-3'CH3) 100nM 24h

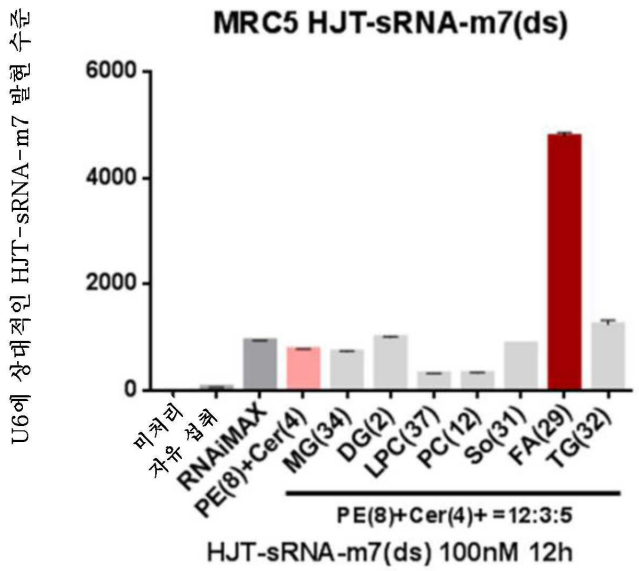
도면47


MRC5 HJT-sRNA-m7
U6에 상대적인 HJT-sRNA-m7 발현 수준
2000
1500
1000
500
0
미처리
자유 섭취
RNAiMAX
빈초8:31(6:1)
HJT-sRNA-m7(ds) 100nM 12h

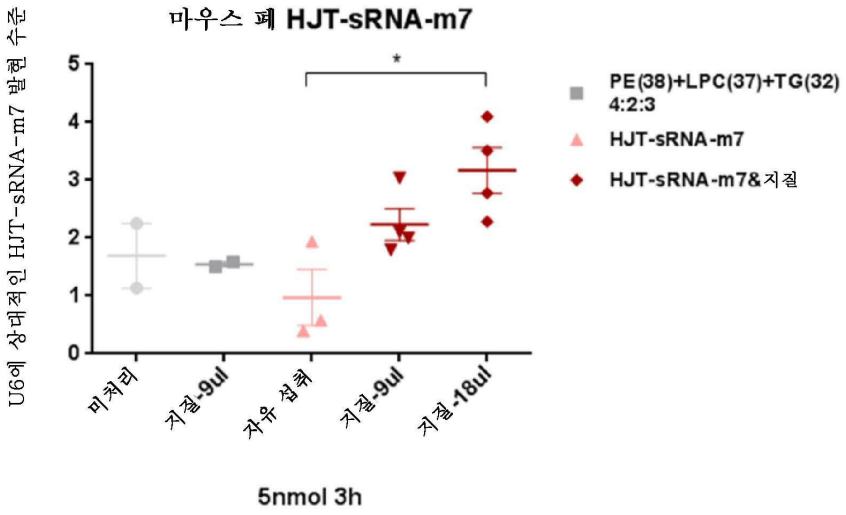
도면48


MRC5 HJT-sRNA-m7
U6에 상대적인 HJT-sRNA-m7 발현 수준
1500
1000
500
0
미처리
자유 섭취
RNAiMAX
PE(8)+So(31)
MG(34)
DG(2)
LPC(37)
PC(12)
PC(11)
Cer(4)
FA(29)
TG(32)
PE(8)+So(31)+ =12:3:5
HJT-sRNA-m7(ds) 100nM 12h

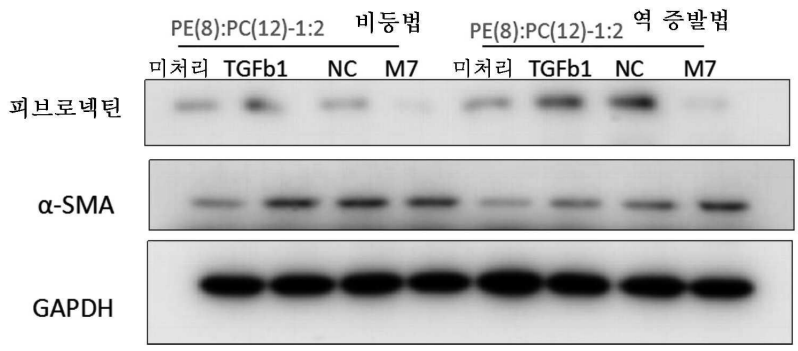
도면49



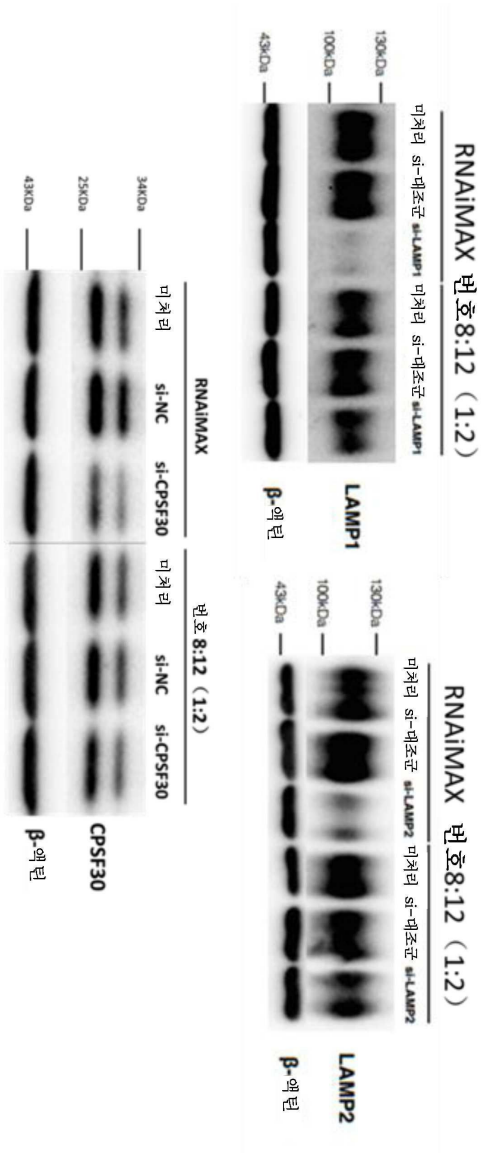
도면50



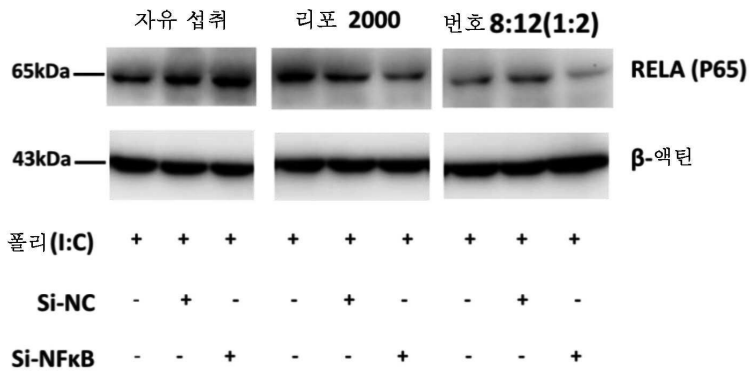
도면51



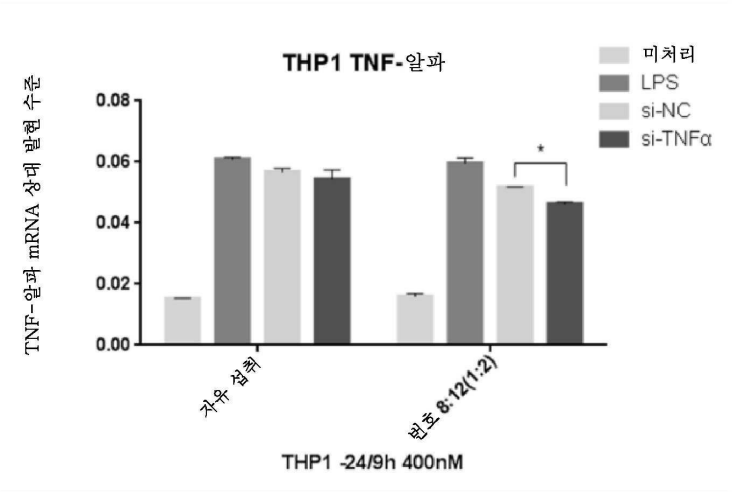
도면52

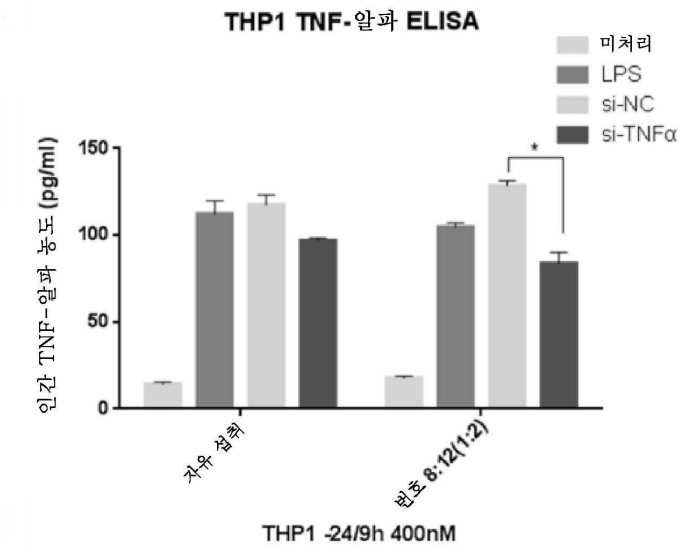

RNAiMAX 번호8:12 (1:2)
미처리 si-대조군 si-LAMP1 미처리 si-대조군 si-LAMP1
130kDa
100kDa
43kDa
LAMP1
β-액틴
RNAiMAX 번호8:12 (1:2)
미처리 si-대조군 si-LAMP2 미처리 si-대조군 si-LAMP2
130kDa
100kDa
43kDa
LAMP2
β-액틴
RNAiMAX
미처리 si-NC si-CPSF30
34KDa
25KDa
CPSF30
번호 8:12 (1:2)
미처리 si-NC si-CPSF30
43KDa
β-액틴

도면53

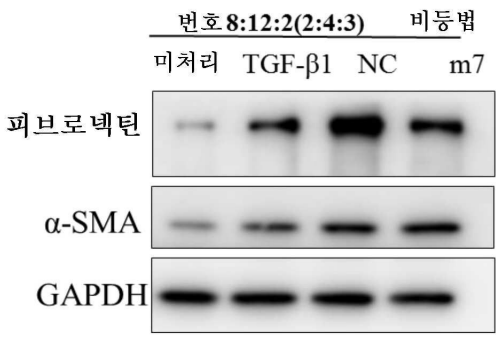

자유 섭취
리포 2000
번호 8:12(1:2)
65kDa
RELA (P65)
43kDa
β-액틴
폴리(I:C) + + + + + + + + +
Si-NC - + - - + - - + -
Si-NFκB - - + - - + - - +

도면54

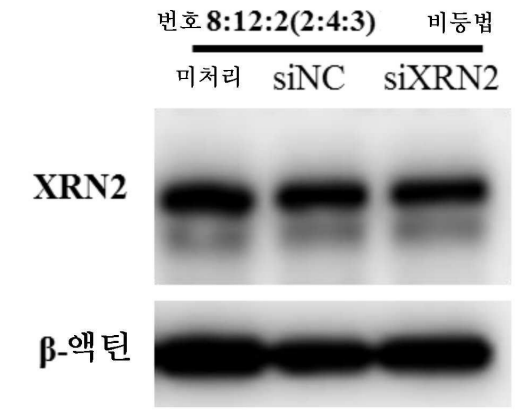

THP1 TNF-알파
미처리
LPS
si-NC
si-TNFα
TNF-알파 mRNA 상대 발현 수준
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
*
자우 섭취
번호 8:12(1:2)
THP1 -24/9h 400nM


THP1 TNF-알파 ELISA
미처리
LPS
si-NC
si-TNFα
인간 TNF-알파 농도 (pg/ml)
150
100
50
0
*
자우 섭취
번호 8:12(1:2)
THP1 -24/9h 400nM

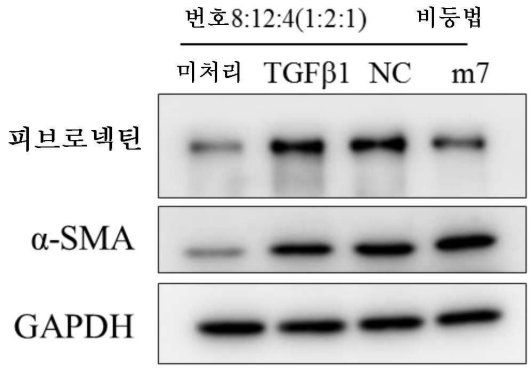
도면55


번호 8:12:2(2:4:3)
비등법
미처리
TGF-β1
NC
m7
피브로넥틴
α-SMA
GAPDH

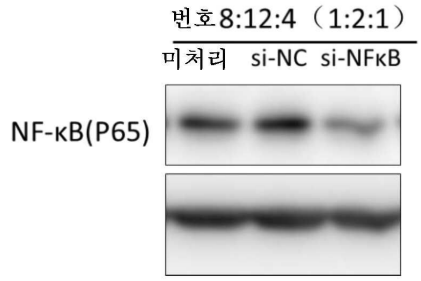
도면56



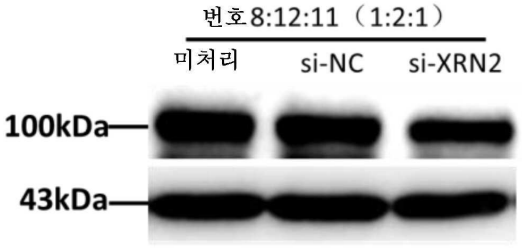
도면57



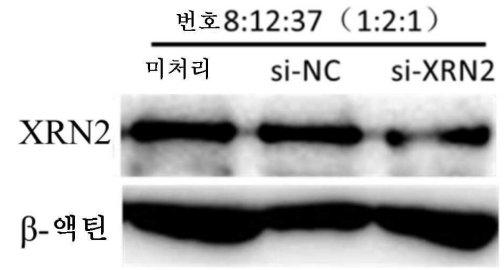
도면58



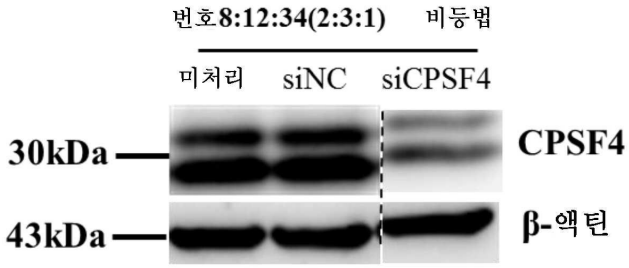
도면59



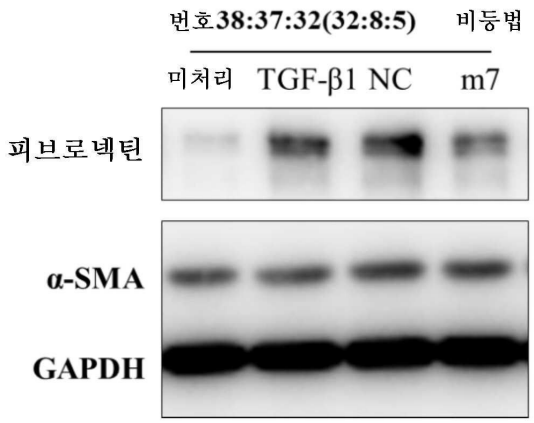
도면60



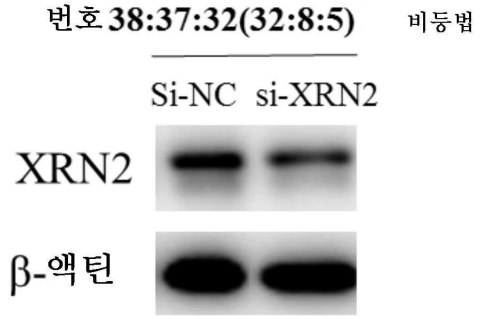
도면61



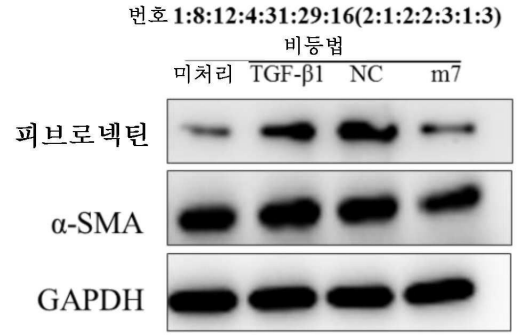
도면62



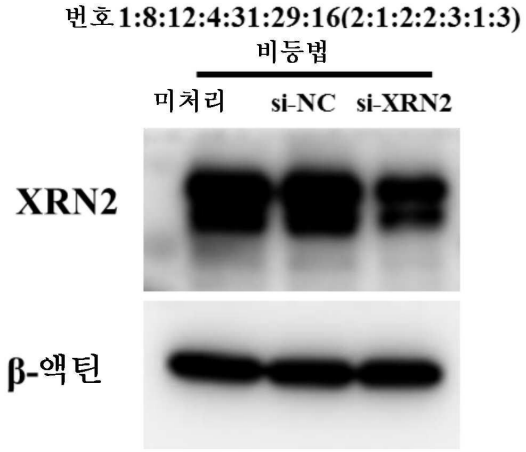
도면63



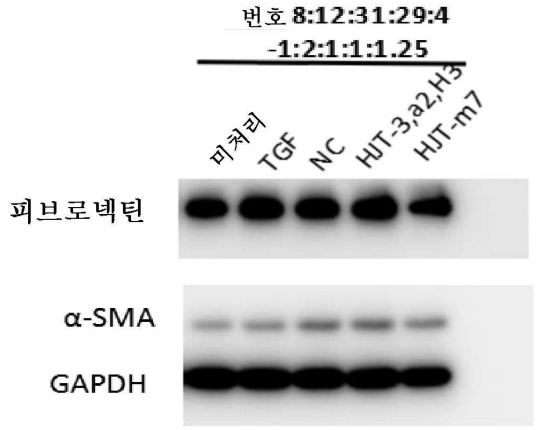
도면64



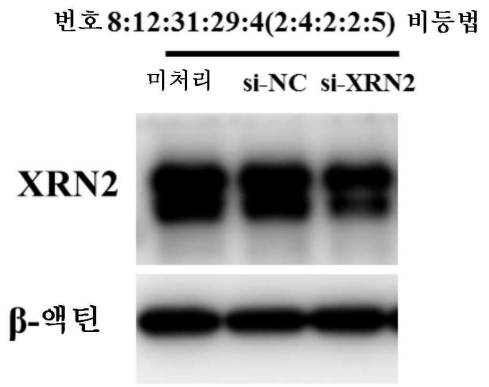
도면65



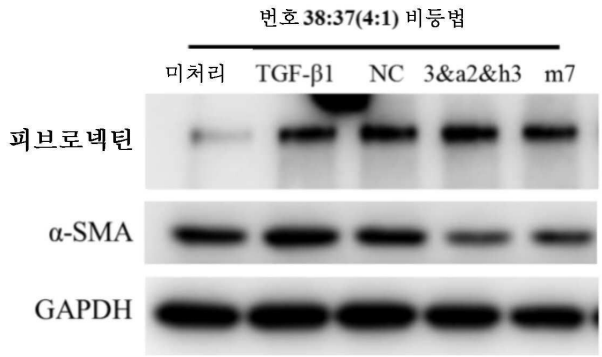
도면66



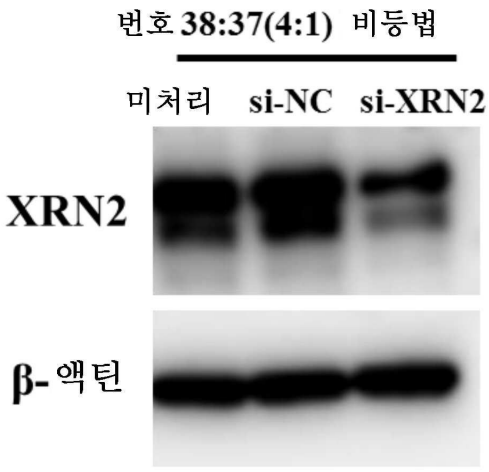
도면67



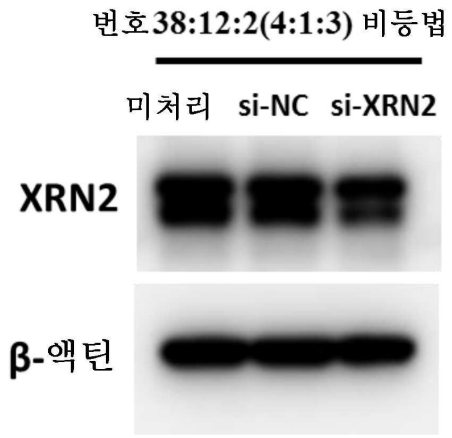
도면68



도면69



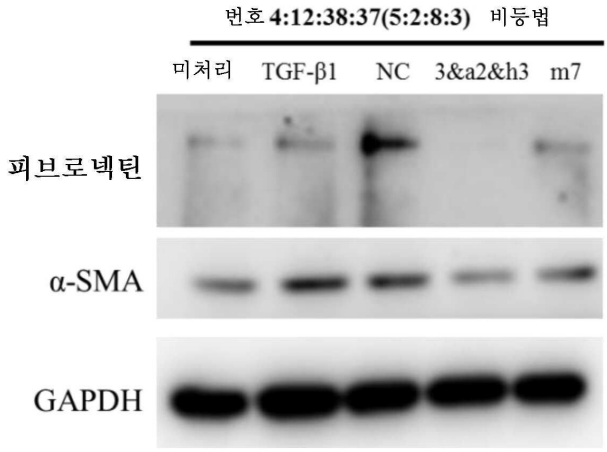
도면70



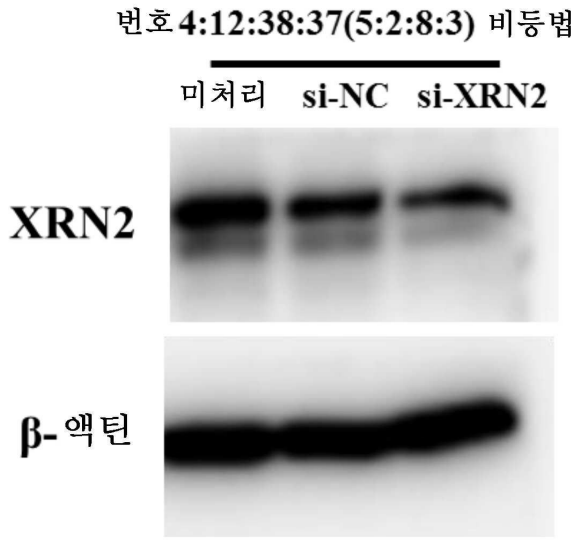
도면71



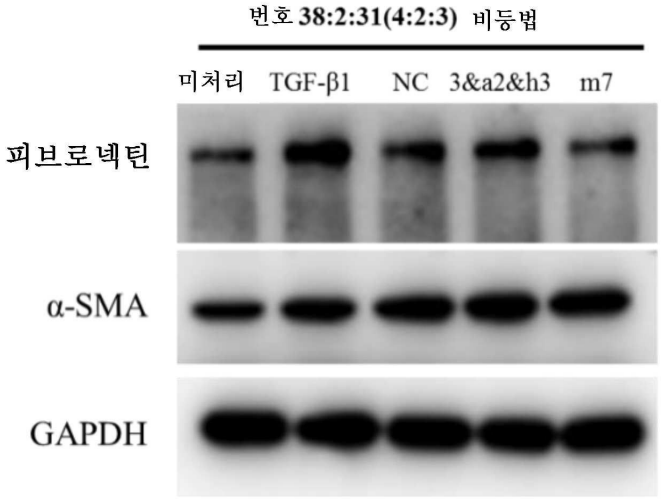
도면72



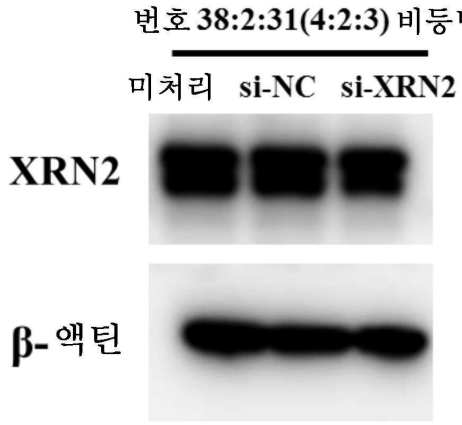
도면73



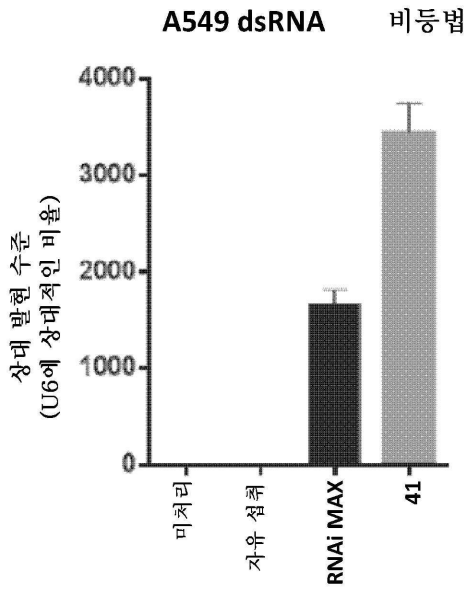
도면74

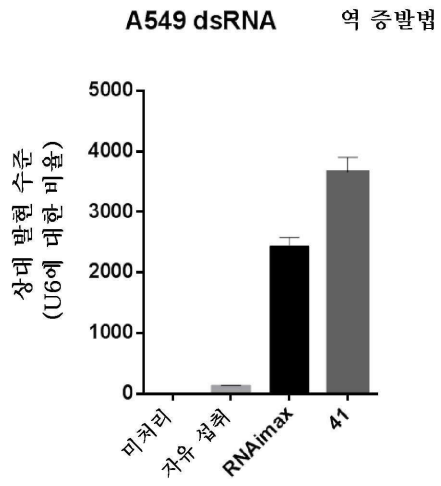


도면75

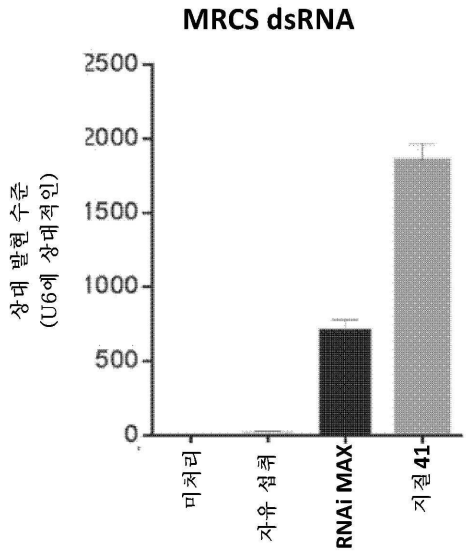


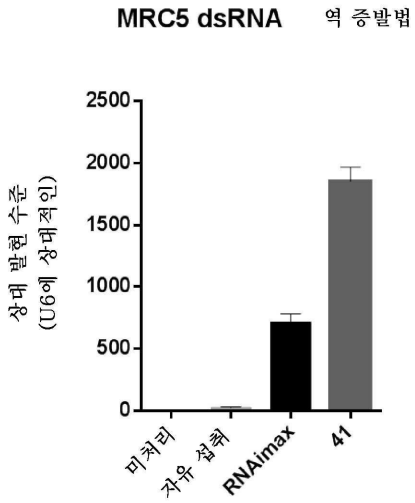
도면76


A549 dsRNA 비등법
상대 발현 수준
(U6에 상대적인 비율)
4000
3000
2000
1000
0
미처리
자유 섭취
RNAi MAX
41

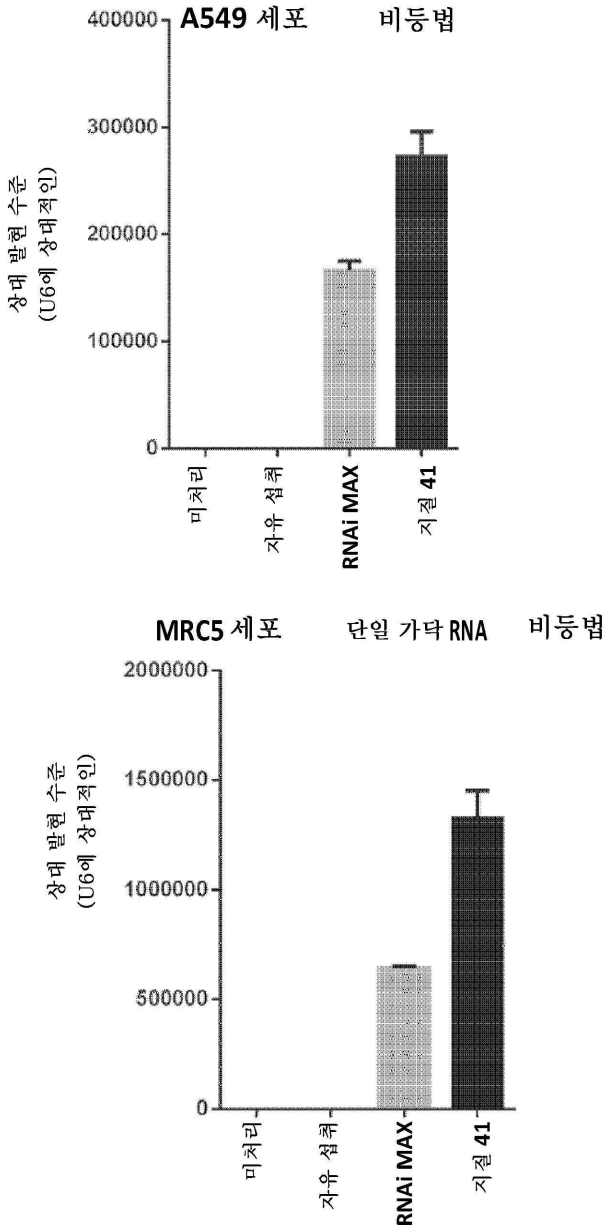

A549 dsRNA 역 증발법
상대 발현 수준
(U6에 대한 비율)
5000
4000
3000
2000
1000
0
미처리
자유 섭취
RNAimax
41

도면77

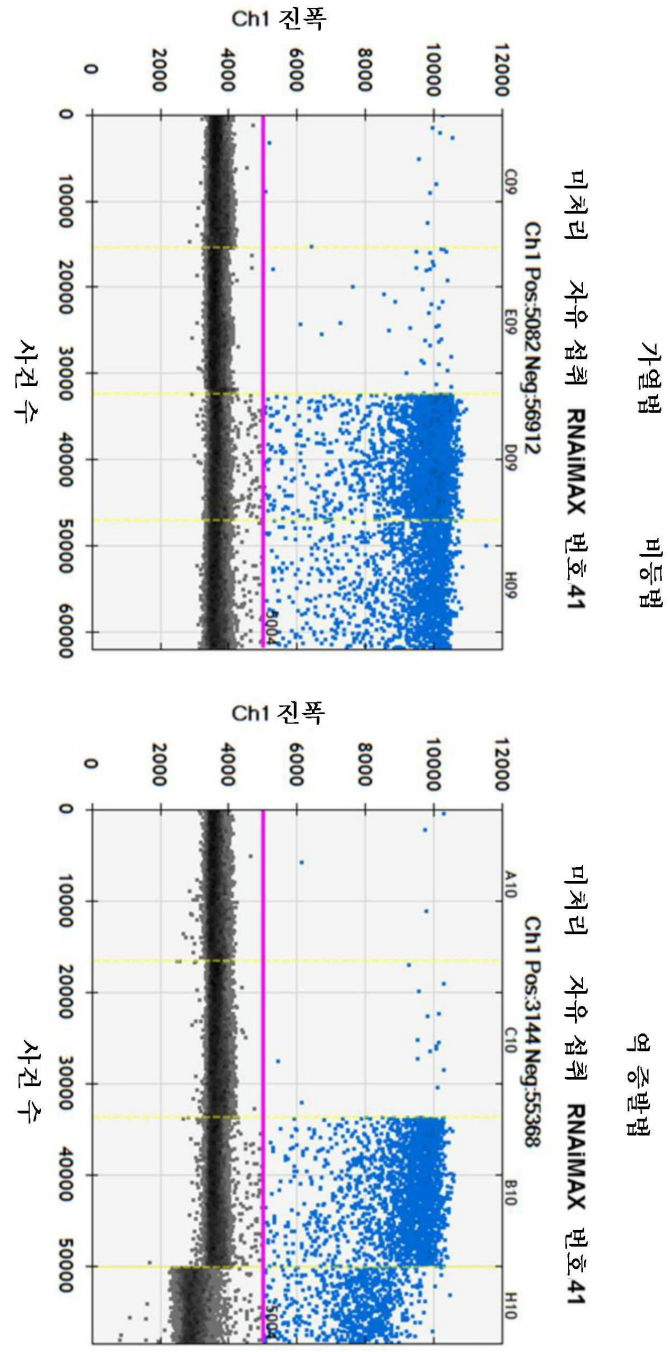

MRCS dsRNA
상대 발현 수준
(U6에 상대적인)
2500
2000
1500
1000
500
0
미처리
자유 섭취
RNAi MAX
지질 41


MRC5 dsRNA
역 증발법
상대 발현 수준
(U6에 상대적인)
2500
2000
1500
1000
500
0
미처리
자유 섭취
RNAimax
41

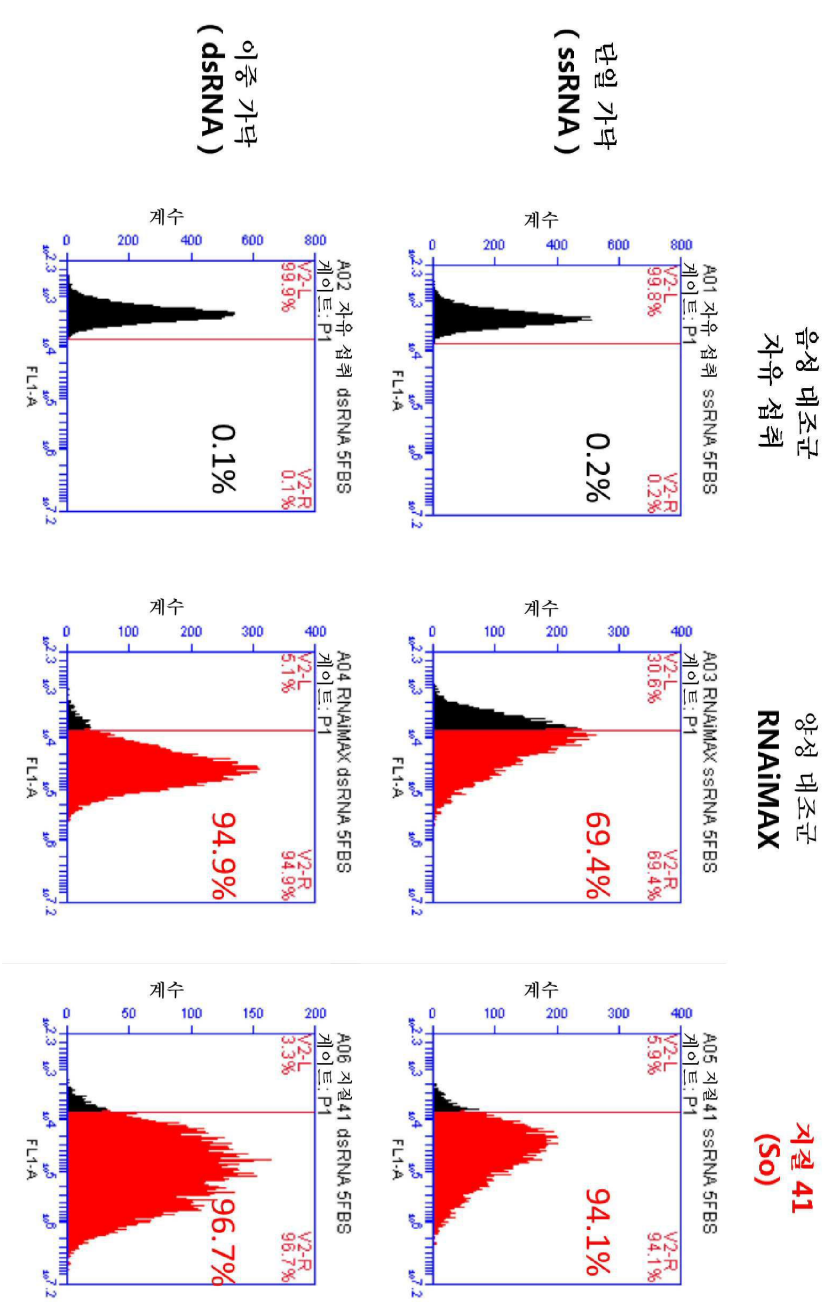
도면78


A549 세포 비등법
상대 발현 수준
(U6에 상대적인)
400000
300000
200000
100000
0
미처리
자유 섭취
RNAi MAX
지질 41
MRC5 세포 단일 가닥 RNA 비등법
상대 발현 수준
(U6에 상대적인)
2000000
1500000
1000000
500000
0
미처리
자유 섭취
RNAi MAX
지질 41

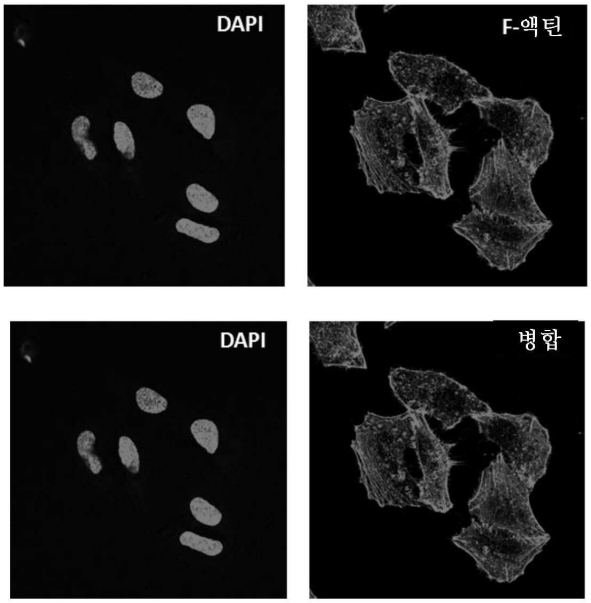
도면79


가열법
비등법
미처리 자유 섭취 RNAiMAX 번호41
Ch1 Pos:5082 Neg:56912
Ch1 진폭
사건 수
0
2000
4000
6000
8000
10000
12000
0
10000
20000
30000
40000
50000
60000
C09
E09
D09
H09
5004
역 증발법
미처리 자유 섭취 RNAiMAX 번호41
Ch1 Pos:3144 Neg:55368
Ch1 진폭
사건 수
A10
C10
B10
H10
5004

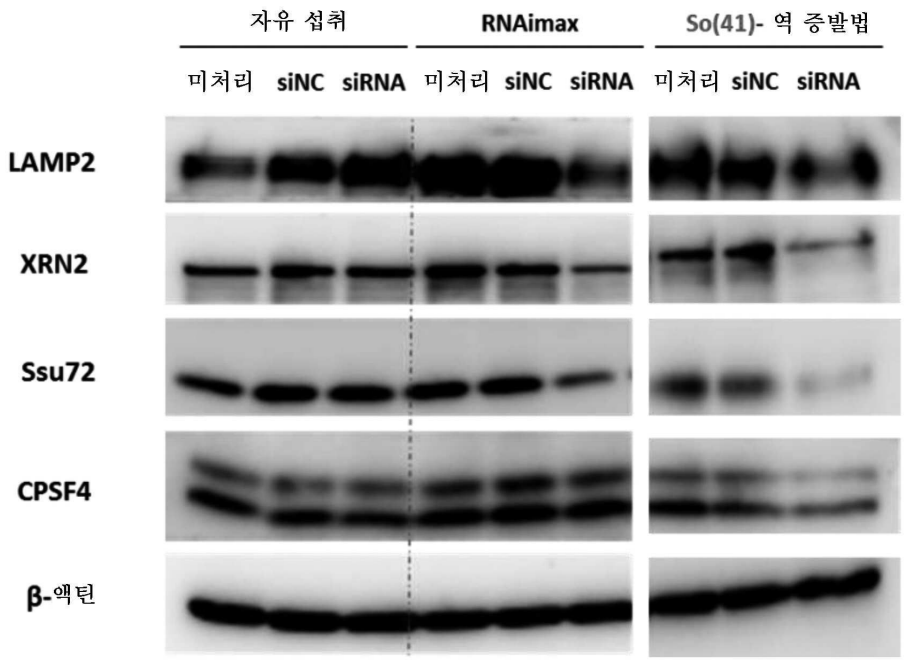
도면80


음성 대조군
자유 섭취
양성 대조군
RNAiMAX
지질 41
(So)
단일 가닥
(ssRNA)
이중 가닥
(dsRNA)
계수
A01 자유 섭취 ssRNA 5FBS
게이트: P1
V2-L 99.8%
V2-R 0.2%
0.2%
A02 자유 섭취 dsRNA 5FBS
게이트: P1
V2-L 99.9%
V2-R 0.1%
0.1%
A03 RNAiMAX ssRNA 5FBS
게이트: P1
V2-L 30.6%
V2-R 69.4%
69.4%
A04 RNAiMAX dsRNA 5FBS
게이트: P1
V2-L 5.1%
V2-R 94.9%
94.9%
A05 지질41 ssRNA 5FBS
게이트: P1
V2-L 5.9%
V2-R 94.1%
94.1%
A06 지질41 dsRNA 5FBS
게이트: P1
V2-L 3.3%
V2-R 96.7%
96.7%
FL1-A

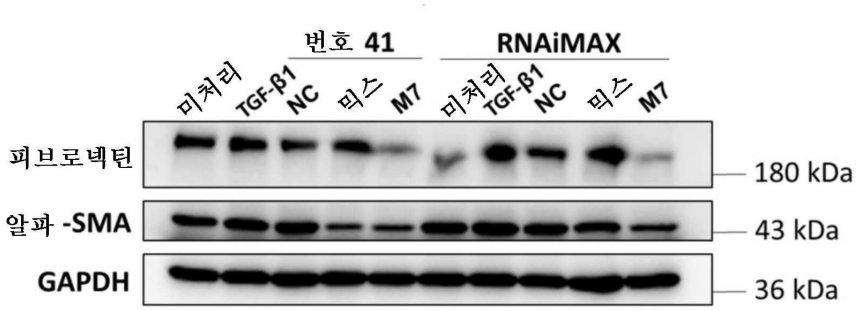
도면81


DAPI
F-액틴
DAPI
병합

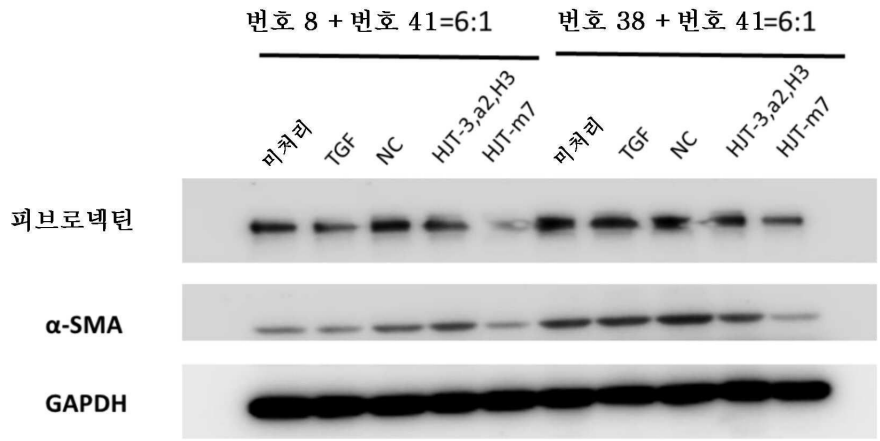
도면82


자유 섭취
RNAimax
So(41)- 역 증발법
미처리 siNC siRNA 미처리 siNC siRNA 미처리 siNC siRNA
LAMP2
XRN2
Ssu72
CPSF4
β-액틴

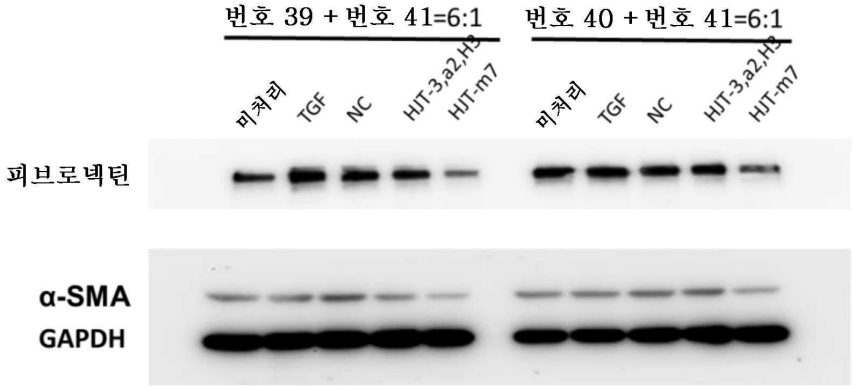
도면83



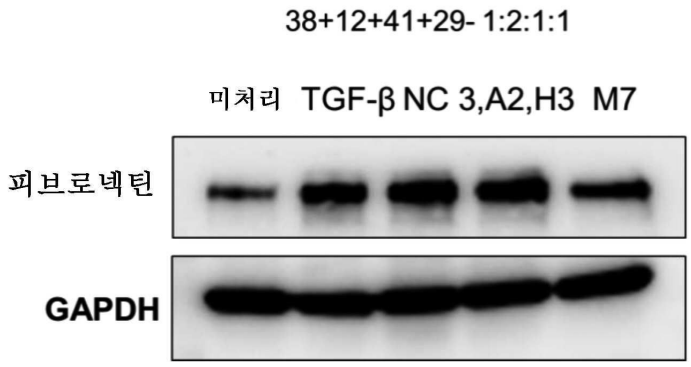
도면84



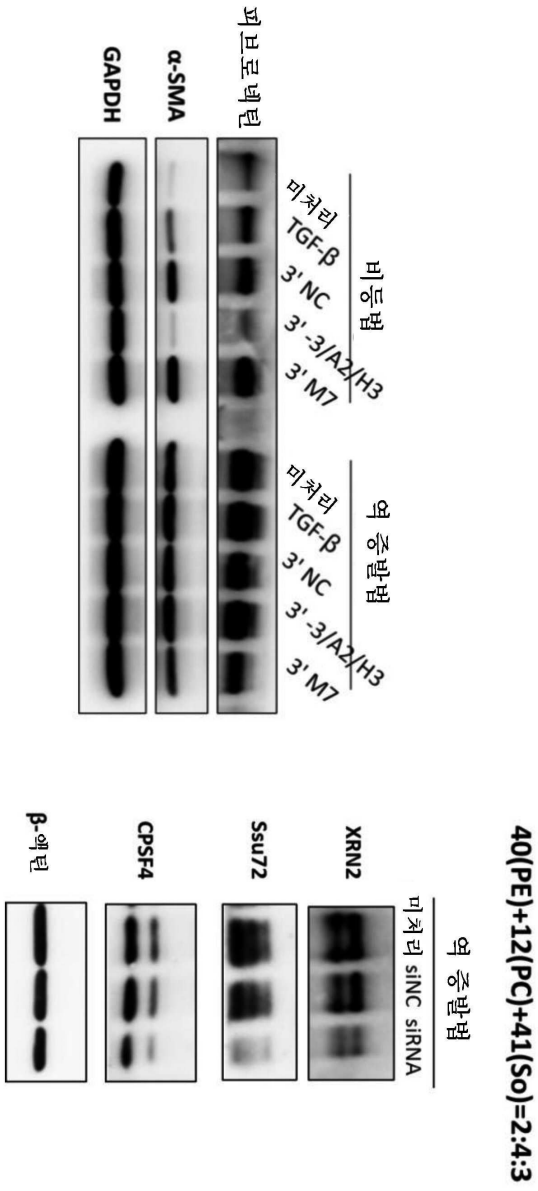
도면85



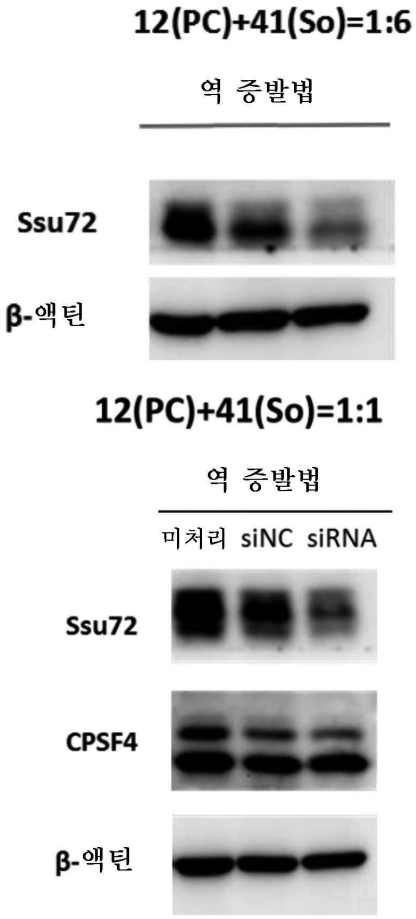
도면86


38+12+41+29- 1:2:1:1
미처리 TGF-β NC 3,A2,H3 M7
피브로넥틴
GAPDH

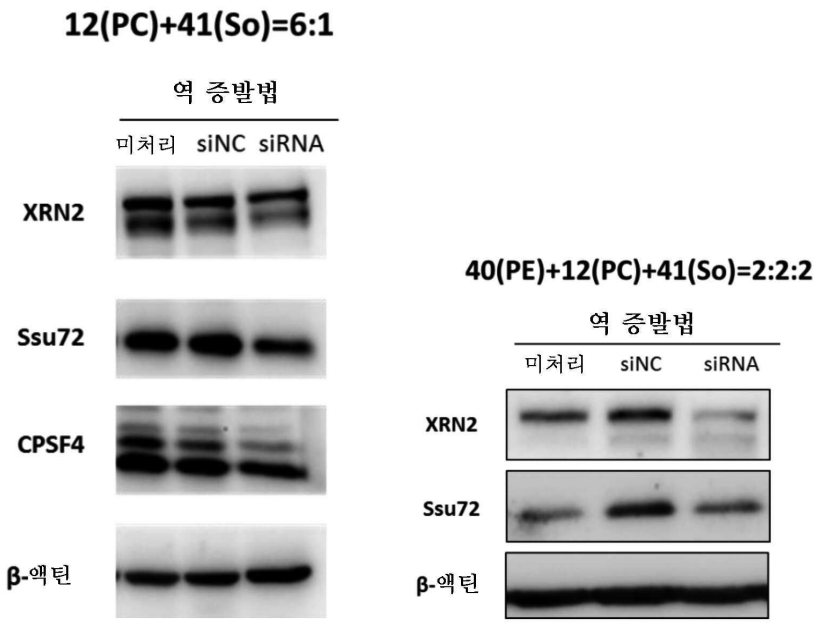
도면87


GAPDH
α-SMA
피브로넥틴
비흡혈
미처리
TGF-β
3' NC
3' -3/A2/H3
3' M7
흡혈
미처리
TGF-β
3' NC
3' -3/A2/H3
3' M7
β-액틴
CPSF4
Ssu72
XRN2
흡혈
미처리 siNC siRNA
40(PE)+12(PC)+41(So)=2:4:3

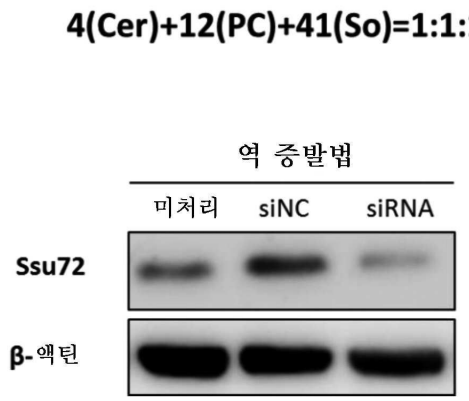
도면88


12(PC)+41(So)=1:6
역 증발법
Ssu72
β-액틴
12(PC)+41(So)=1:1
역 증발법
미처리 siNC siRNA
Ssu72
CPSF4
β-액틴

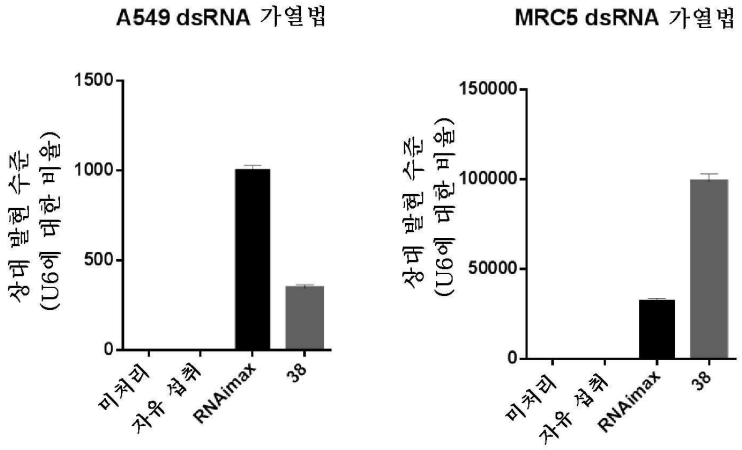
도면89


12(PC)+41(So)=6:1
역 증발법
미처리 siNC siRNA
XRN2
Ssu72
CPSF4
β-액틴
40(PE)+12(PC)+41(So)=2:2:2
역 증발법
미처리 siNC siRNA
XRN2
Ssu72
β-액틴

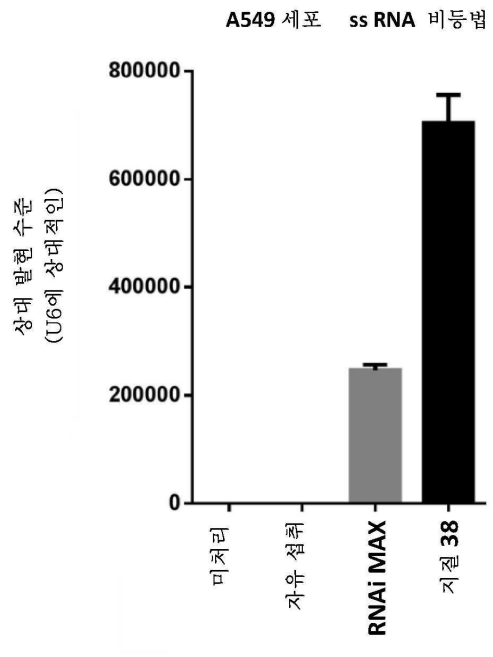
도면90

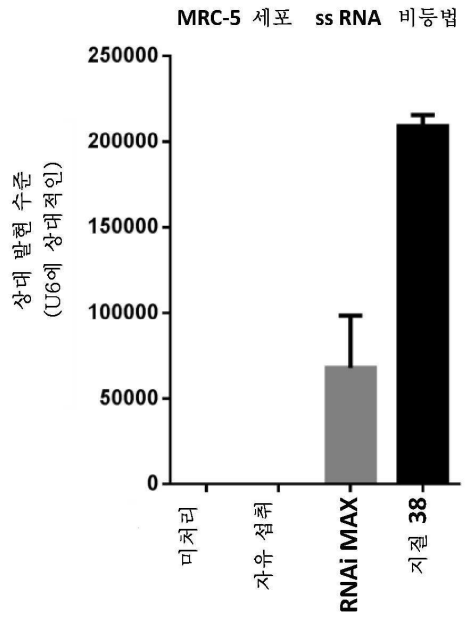

4(Cer)+12(PC)+41(So)=1:1:1
역 증발법
미처리
siNC
siRNA
Ssu72
β-액틴

도면91

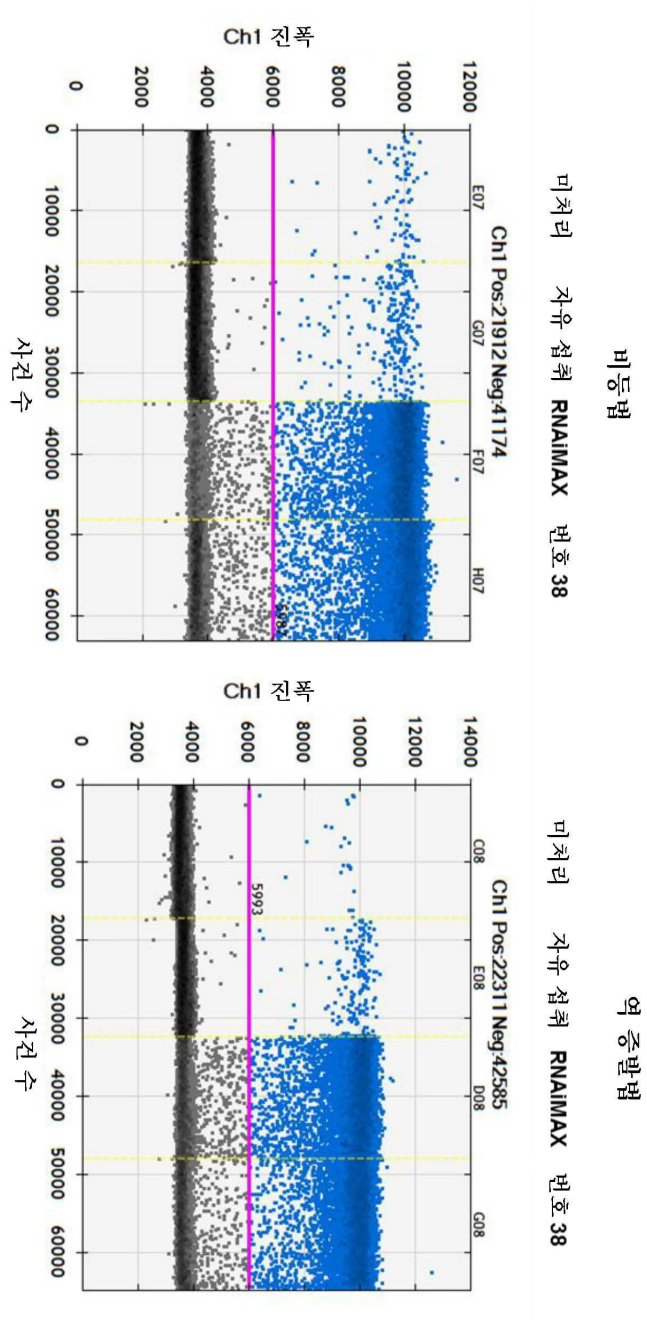

A549 dsRNA 가열법
MRC5 dsRNA 가열법
상대 발현 수준
(U6에 대한 비율)
1500
1000
500
0
150000
100000
50000
0
미처리
자유 칼쿠
RNAimax
38

도면92

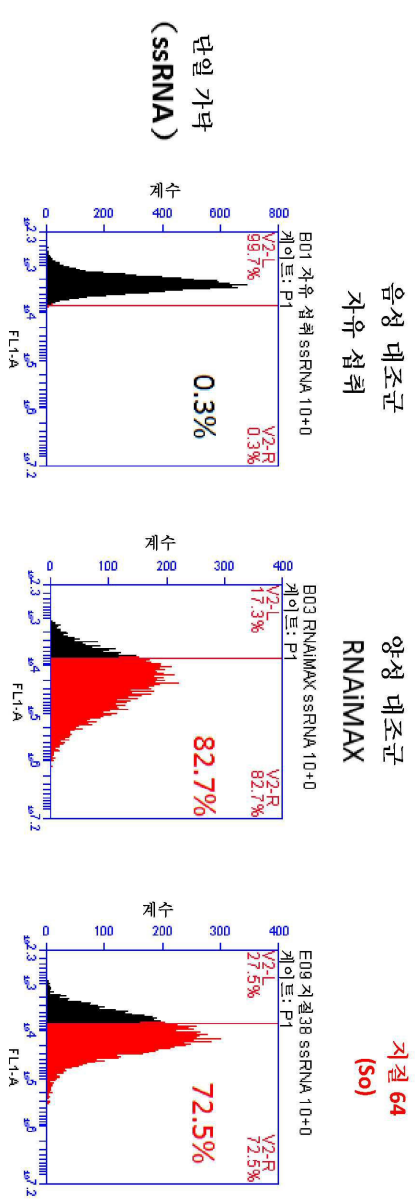

A549 세포 ss RNA 비등법
상대 발현 수준
(U6에 상대적인)
800000
600000
400000
200000
0
미처리
자유 섭취
RNAi MAX
지질 38


MRC-5 세포 ss RNA 비등법
상대 발현 수준
(U6에 상대적인)
250000
200000
150000
100000
50000
0
미처리
자유 섭취
RNAi MAX
지질 38

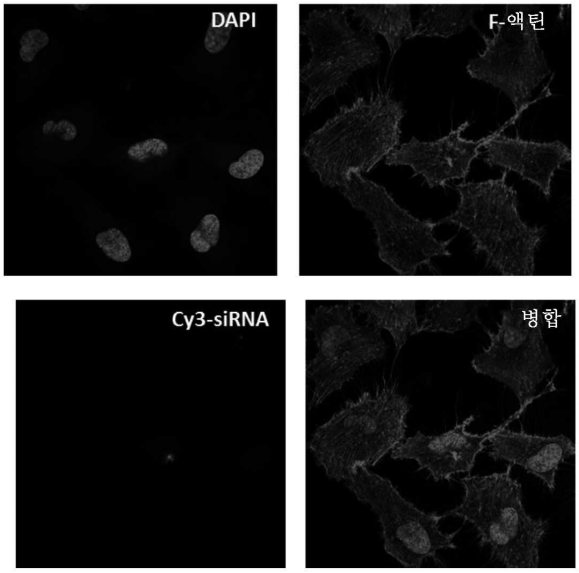
도면93


비등법
미처리 자유 섭취 RNAiMAX 변호 38
Ch1 진폭
사건 수
Ch1 Pos:21912 Neg:41174
E07
G07
F07
H07
역 증발법
미처리 자유 섭취 RNAiMAX 변호 38
Ch1 진폭
사건 수
Ch1 Pos:22311 Neg:42585
C08
E08
D08
G08
5993

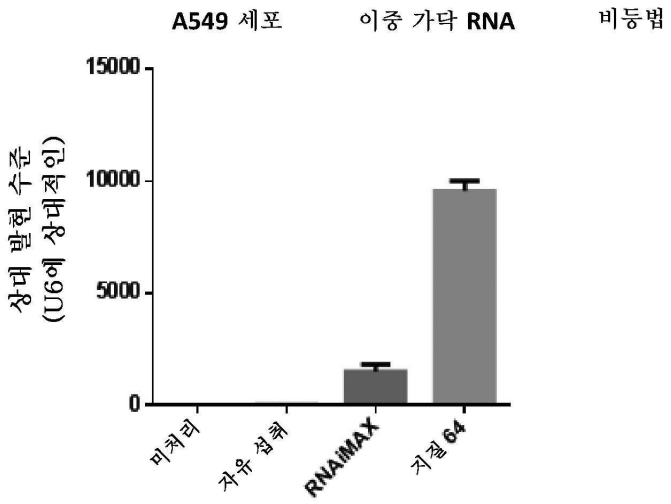
도면94


단일 가닥
(ssRNA)
음성 대조군
자유 섭취
양성 대조군
RNAiMAX
지질 64
(So)
계수
B01 자유 섭취 ssRNA 10+0
게이트: P1
V2-L
99.7%
V2-R
0.3%
0.3%
B03 RNAiMAX ssRNA 10+0
V2-L
17.3%
V2-R
82.7%
82.7%
E09 지질38 ssRNA 10+0
V2-L
27.5%
V2-R
72.5%
72.5%
FL1-A

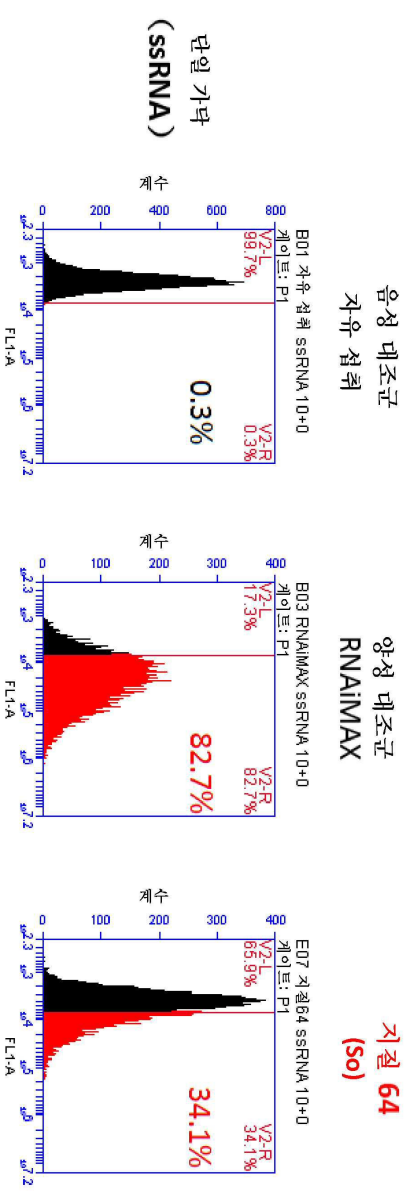
도면95


DAPI
F-액틴
Cy3-siRNA
병합

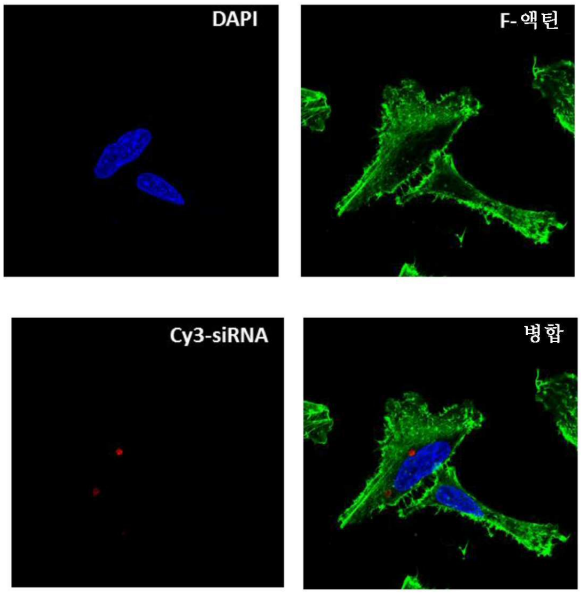
도면96


A549 세포
이중 가닥 RNA
비등법
상대 발현 수준
(U6에 상대적인)
15000
10000
5000
0
미처리
자유 섭취
RNAiMAX
지질64

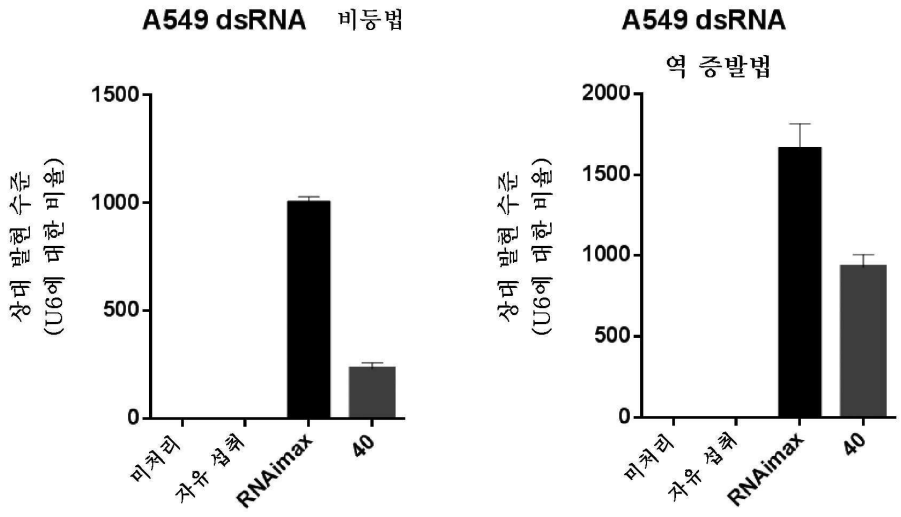
도면97


단일 가닥
(ssRNA)
음성 대조군
자유 섭취
양성 대조군
RNAiMAX
지질 64
(So)
계수
FL1-A
B01 자유 섭취 ssRNA 10+0
게이트: P1
V2-L
99.7%
V2-R
0.3%
0.3%
B03 RNAiMAX ssRNA 10+0
V2-L
17.3%
V2-R
82.7%
82.7%
E07 지질64 ssRNA 10+0
V2-L
65.9%
V2-R
34.1%
34.1%

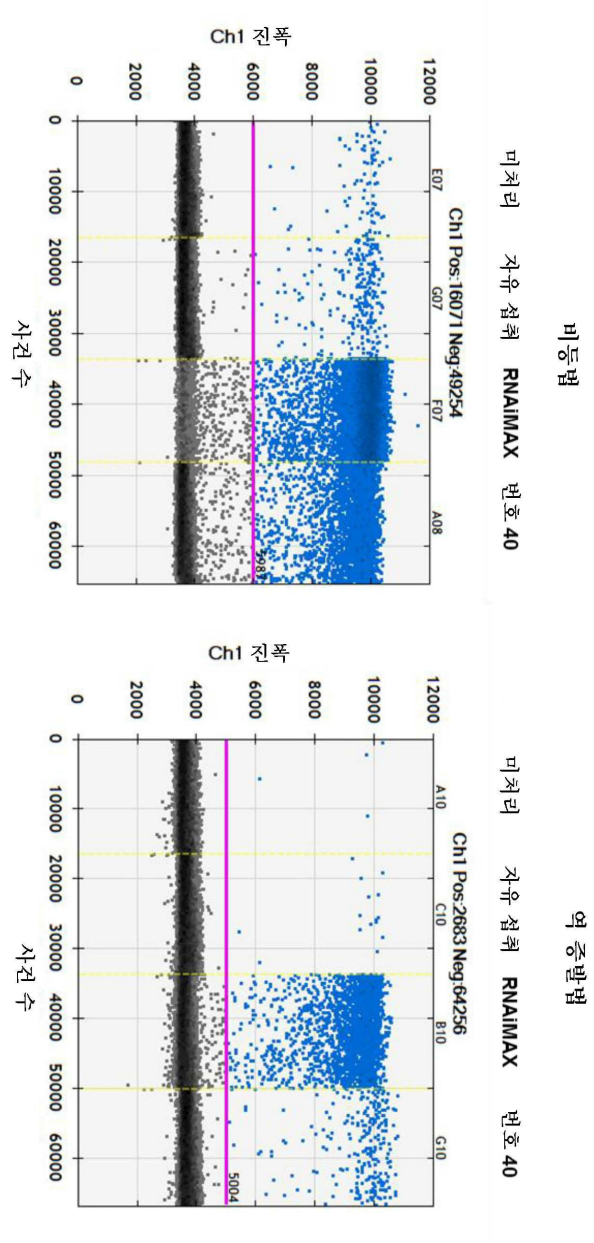
도면98


DAPI
F-액틴
Cy3-siRNA
병합

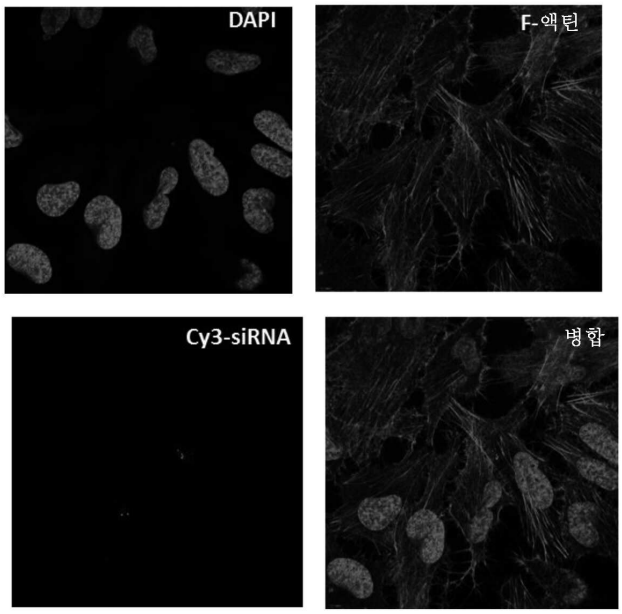
도면99


A549 dsRNA 비등법
상대 발현 수준
(U6에 대한 비율)
1500
1000
500
0
미처리
자유 섭취
RNAimax
40
A549 dsRNA
역 증발법
상대 발현 수준
(U6에 대한 비율)
2000
1500
1000
500
0
미처리
자유 섭취
RNAimax
40

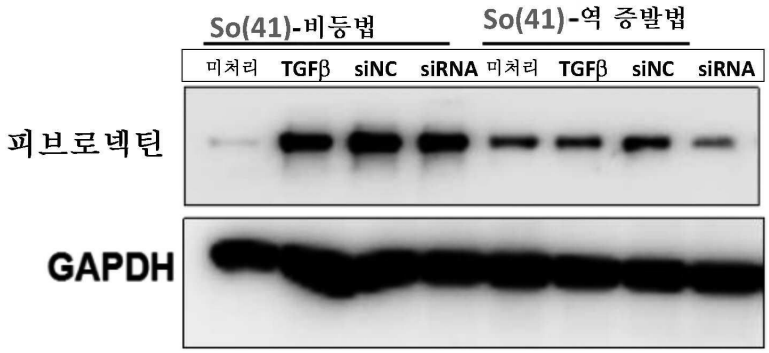
도면100


비등법
미처리 자유 섭취 RNAiMAX 변호 40
Ch1 진폭
사건 수
Ch1 Pos:16071 Neg:49254
E07
G07
F07
A08
역 중방법
미처리 자유 섭취 RNAiMAX 변호 40
Ch1 진폭
사건 수
Ch1 Pos:2683 Neg:64256
A10
C10
B10
G10
5004

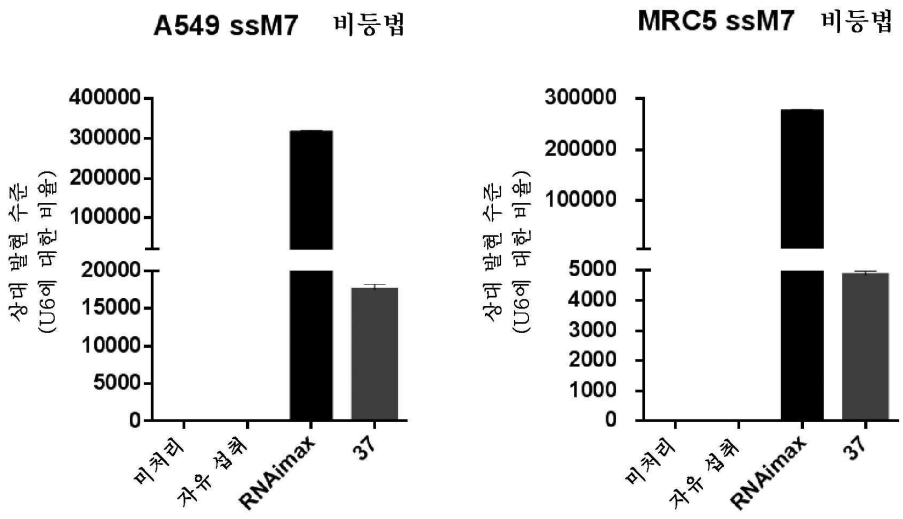
도면101



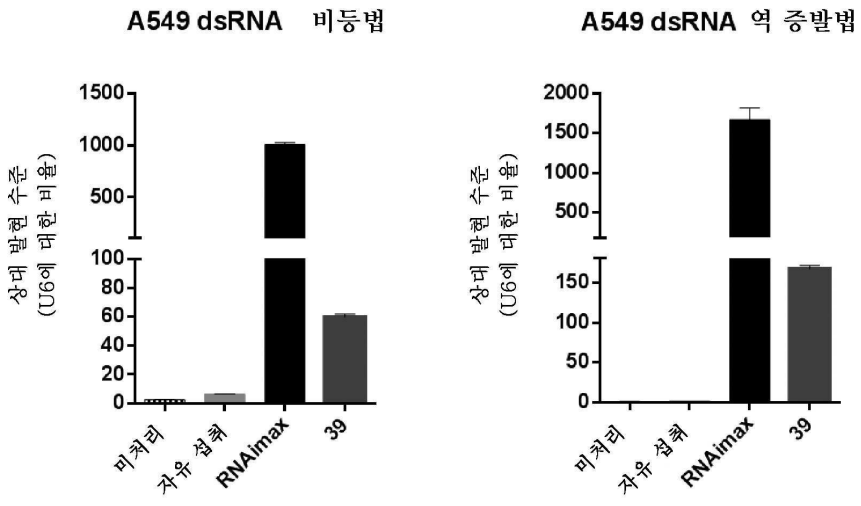
도면102



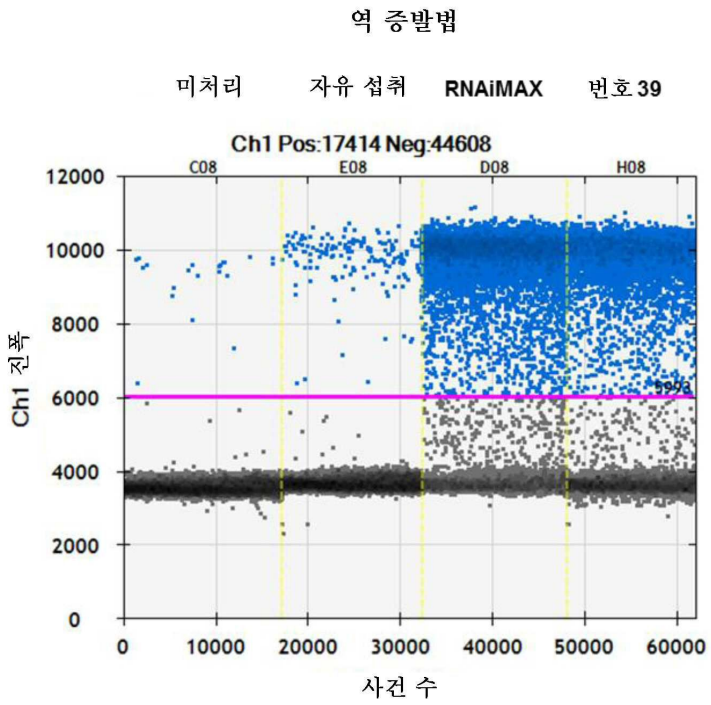
도면103



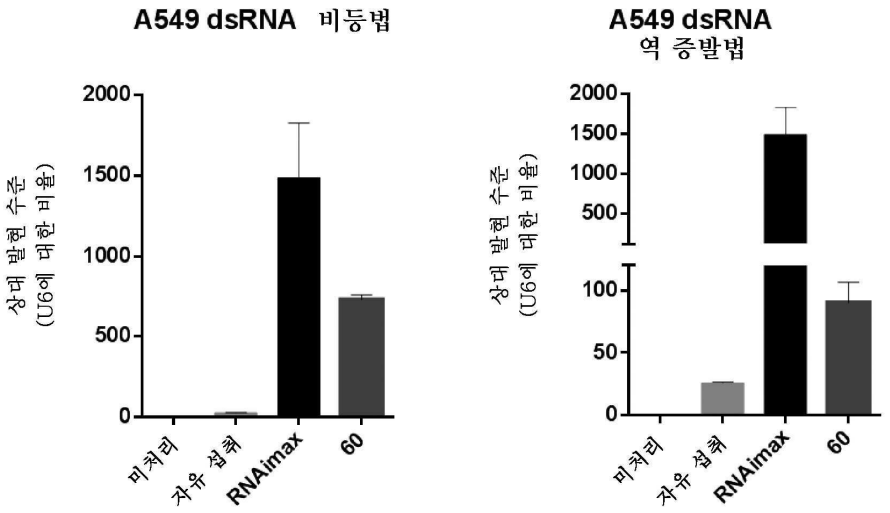
도면104


A549 dsRNA 비등법
A549 dsRNA 역 증발법
상대 발현 수준
(U6에 대한 비율)
1500
1000
500
100
80
60
40
20
0
2000
150
50
미처리
자유 섭취
RNAimax
39

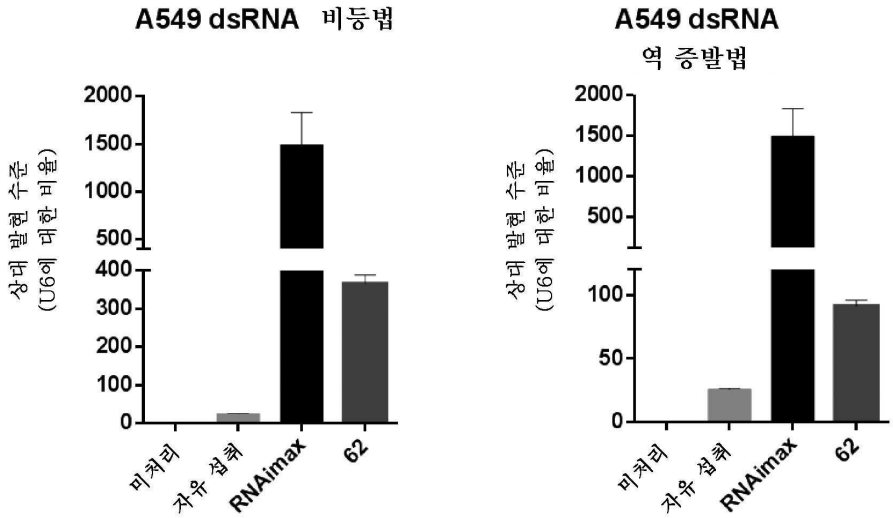
도면105


역 증발법
미처리
자유 섭취
RNAiMAX
번호 39
Ch1 Pos:17414 Neg:44608
C08
E08
D08
H08
Ch1 진폭
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
10000
20000
30000
40000
50000
60000
사건 수

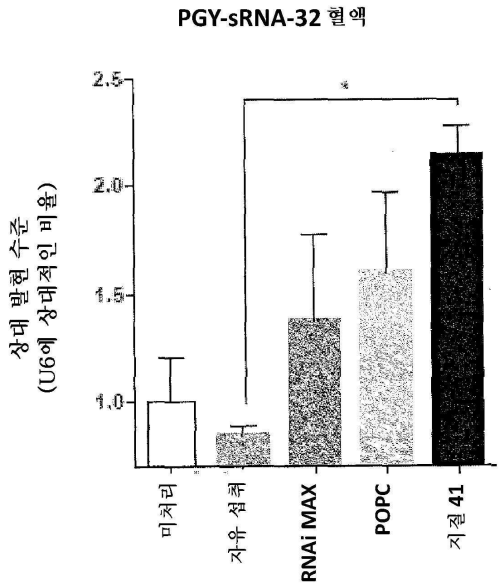
도면106


A549 dsRNA 비등법
상대 발현 수준
(U6에 대한 비율)
2000
1500
1000
500
0
미처리
자유 섭취
RNAimax
60
A549 dsRNA
역 증발법
상대 발현 수준
(U6에 대한 비율)
2000
1500
1000
500
100
50
0
미처리
자유 섭취
RNAimax
60

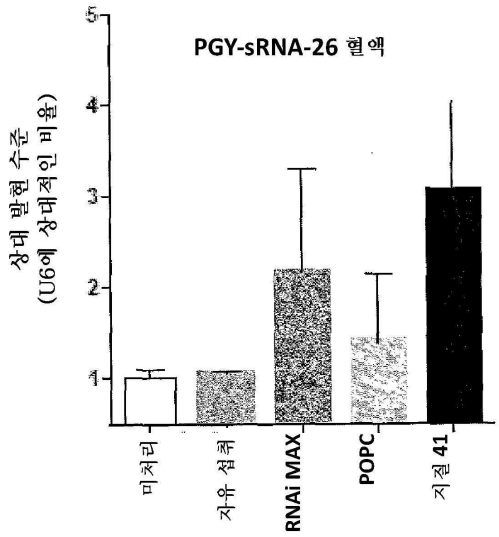
도면107


A549 dsRNA 비등법
상대 발현 수준
(U6에 대한 비율)
2000
1500
1000
500
400
300
200
100
0
미처리
자유 섭취
RNAimax
62
A549 dsRNA
역 증발법
상대 발현 수준
(U6에 대한 비율)
2000
1500
1000
500
100
50
0
미처리
자유 섭취
RNAimax
62

도면108

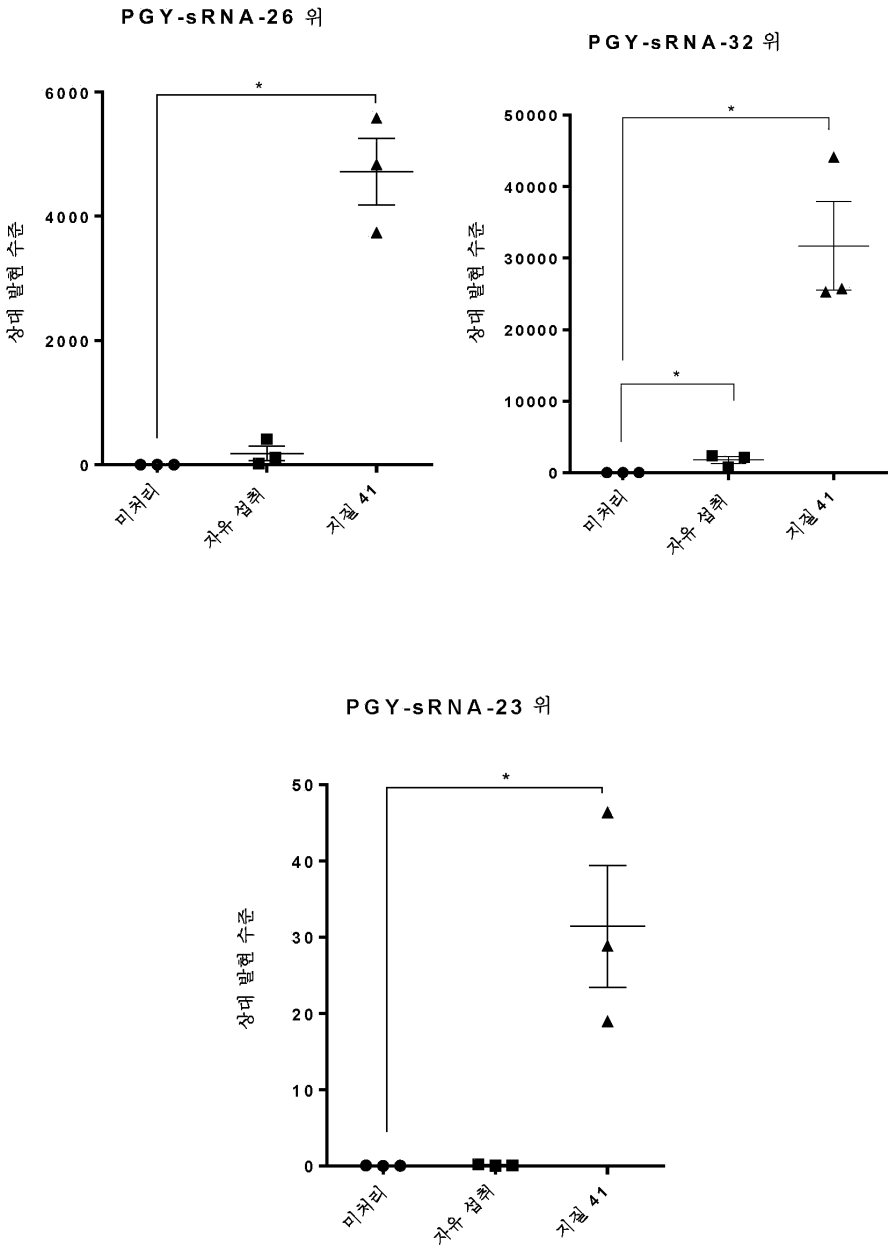


위관영양 후 12시간

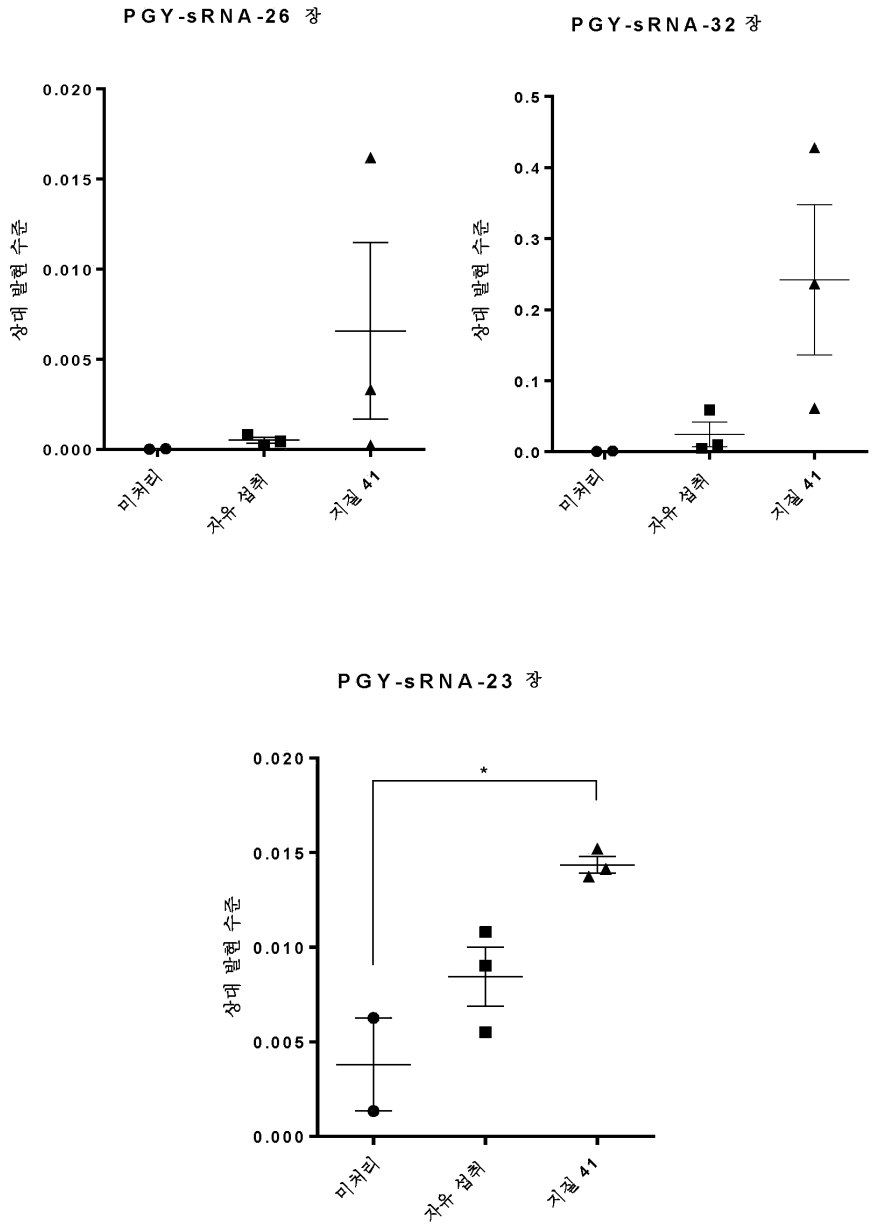


위관영양 후 12시간

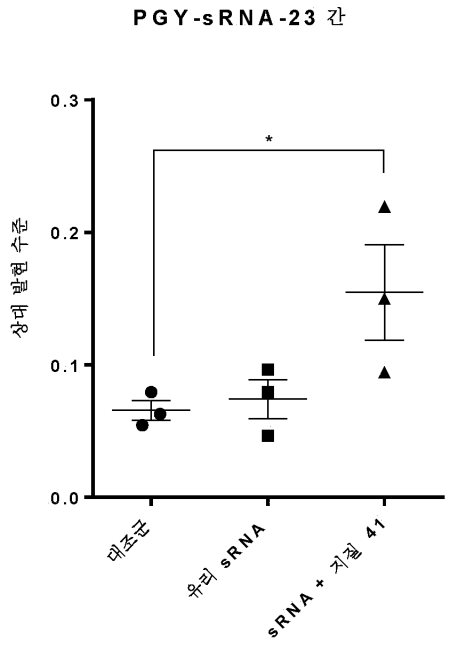
도면109


PGY-sRNA-26 위
상대 발현 수준
6000
4000
2000
0
*
미처리
자유 섭취
지질 41
PGY-sRNA-32 위
상대 발현 수준
50000
40000
30000
20000
10000
0
*
*
미처리
자유 섭취
지질 41
PGY-sRNA-23 위
상대 발현 수준
50
40
30
20
10
0
*
미처리
자유 섭취
지질 41

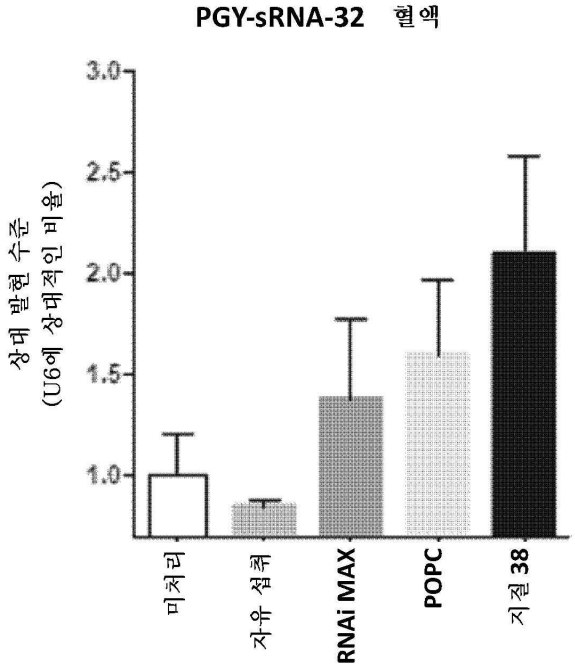
도면110


PGY-sRNA-26 장
상대 발현 수준
0.020
0.015
0.010
0.005
0.000
미처리
자유 섭취
지질 41
PGY-sRNA-32 장
상대 발현 수준
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
미처리
자유 섭취
지질 41
PGY-sRNA-23 장
상대 발현 수준
*
0.020
0.015
0.010
0.005
0.000
미처리
자유 섭취
지질 41

도면111

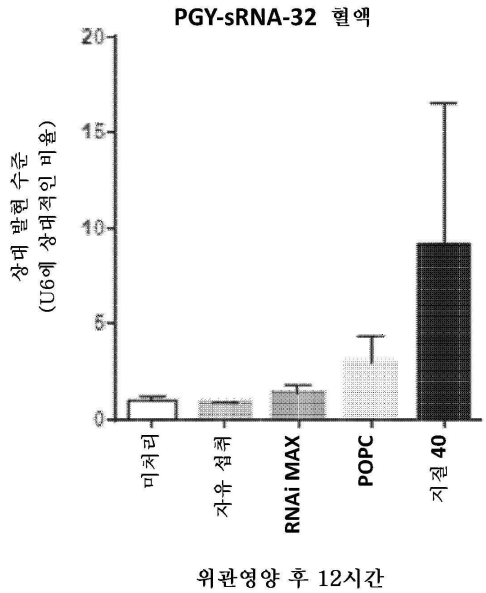


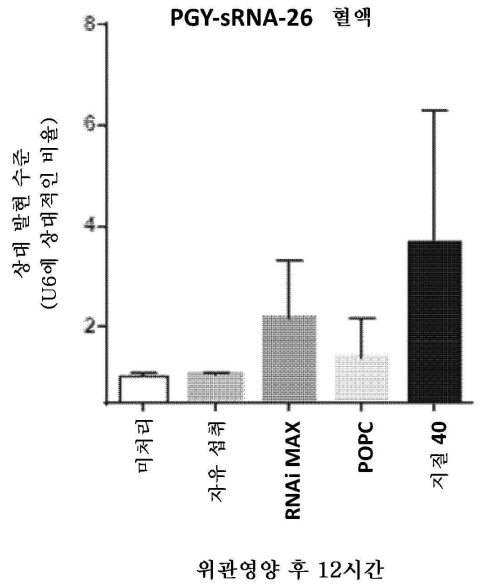
도면112



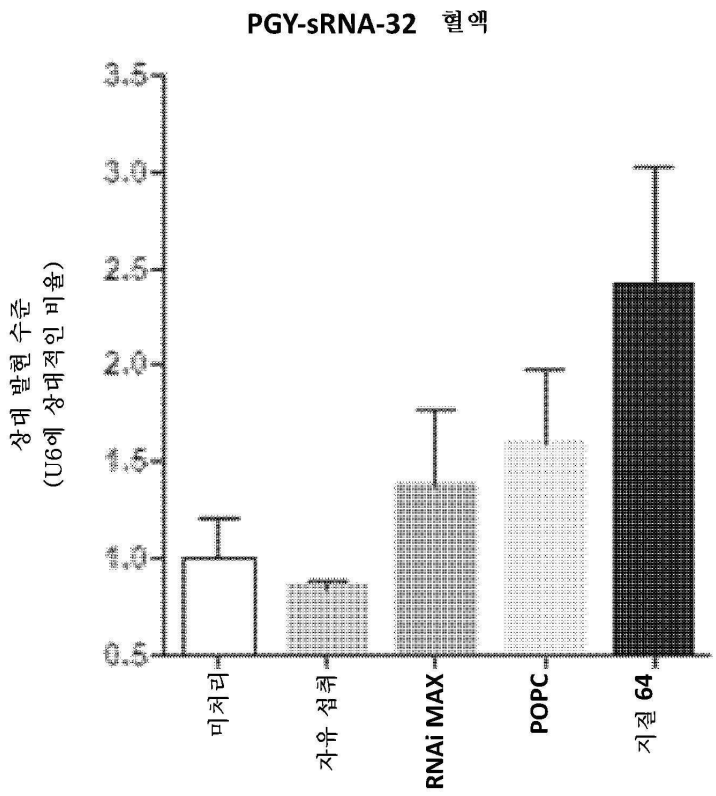
위관영양 후 12시간

도면113


PGY-sRNA-32 혈액
상대 발현 수준
(U6에 상대적인 비율)
20
15
10
5
0
미처리
자유 섭취
RNAi MAX
POPC
지질 40
위관영양 후 12시간

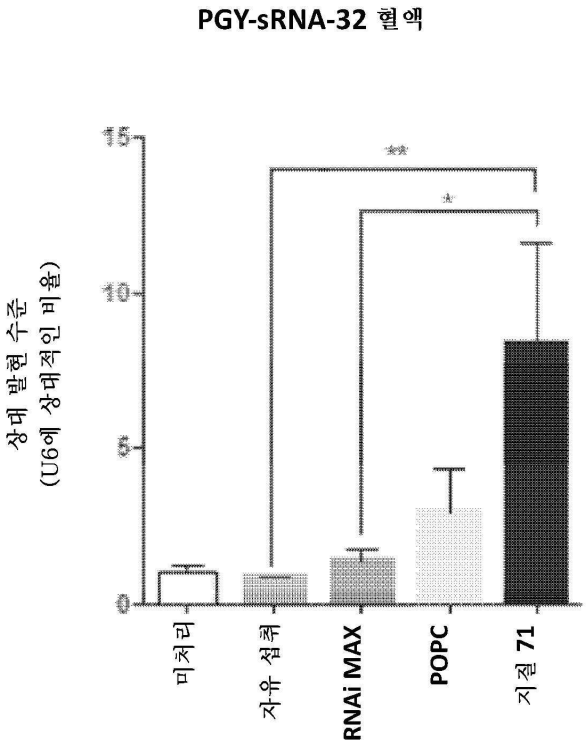

PGY-sRNA-26 혈액
상대 발현 수준
(U6에 상대적인 비율)
8
6
4
2
미처리
자유 섭취
RNAi MAX
POPC
지질 40
위관영양 후 12시간

도면114

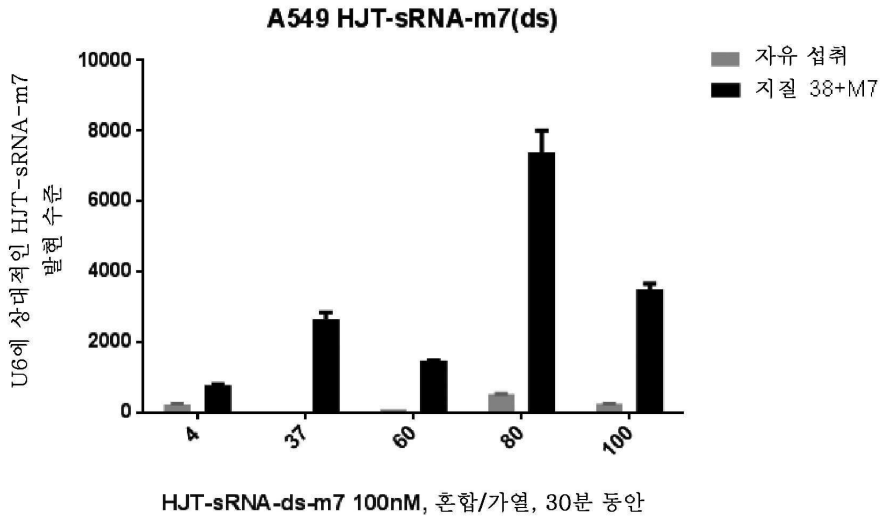


위관영양 후 12시간

도면115



도면116



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> INSTITUTE OF BASIC MEDICAL SCIENCES CHINESE ACADEMY OF MEDICAL SCIENCES

<120> APPLICATION OF COMPOUND OR TRADITIONAL CHINESE MEDICINE EXTRACT IN PREPARATION OF NUCLEIC ACID DELIVERY AGENT AND RELATED PRODUCTS THEREOF

<130> 074844-8002WO01

<160> 33

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 1

tcgcttggtg caggtcggga c 21

<210> 2

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 2

ggccctcctt ctagcgcca 19

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 3

cagagtcgcg cagcggaa 18

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 4

gttcagagtt ctacagtccg a 21

<210> 5

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 5

cggggctacg cctgtctgag cgtcgc 26

<210> 6

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 6

tgaggtagta ggttgtgtgg ttgtaagc 28

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 7

cagccaagga tgacttgccg g 21

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 8

tagcaccatc cgaaatcggt a 21

<210> 9

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 9

tggggctacg cctgtctgag cgtcgct 27

<210> 10

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 10

gaguacagau gaucauguug agtacagatg atcatgtt 38

<210> 11

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 11

gacucacgug aagcuuccag actcacgtga agcttcca 38

<210> 12

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 12

gagucaucug ugugaauuag agtcatctgt gtgaatta 38

<210> 13

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 13

caaugcgagc uccaaagaa 19

<210> 14

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 14

gcggucuuau gcauuggaa 19

<210> 15

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 15

aguacccuga agcuauauuu u 21

<210> 16

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 16

cacaaccaac uaguggugcu u 21

<210> 17

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 17

ccctccgcgg ccagcttct 19

<210> 18

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 18

tccggaatga ttgggcgtaa agcgt 25

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 19

ccggccccga acccgtcggc 20

<210> 20

<211> 28

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 20

ugagguagua gguugugugg uuguaagc 28

<210> 21

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 21

gtcgtatcca gtgcagggtc cgaggtattc gcactggata cgacaaaaat atg 53

<210> 22

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 22

gtcgtatcca gtgcacgctc cgaggtattc gcactggata cgacgcttac aa 52

<210> 23

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 23

gcgcgtcgtg aagcgttc 18

<210> 24

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 24

gtgcagggtc cgaggt 16

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 25

tcgcgctgag gtagtaggtt 20

<210> 26

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 26

gtgcacgctc cgaggt 16

<210> 27

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 27

gcttacaacc acacaaccta ctacctca 28

<210> 28

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 28

cagtactttt gtgtagtaca a 21

<210> 29

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 29

tttgcgtgtc atccttgcg 19

<210> 30

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 30

ctggaagatg gtcgtaccct g 21

<210> 31

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 31

ggtcttgcca gtgagtgtct 20

<210> 32

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 32

ctgccccaat ccctttatt 19

<210> 33

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 33

cccaattctc tttttgagcc 20