



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년12월17일

(11) 등록번호 10-2056702

(24) 등록일자 2019년12월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
**A61K 9/127** (2006.01) **A61K 47/36** (2017.01)  
**C12N 15/113** (2010.01)

(21) 출원번호 10-2014-7014826

(22) 출원일자(국제) 2012년11월02일

심사청구일자 2017년09월18일

(85) 번역문제출일자 2014년05월30일

(65) 공개번호 10-2014-0097276

(43) 공개일자 2014년08월06일

(86) 국제출원번호 PCT/IB2012/003109

(87) 국제공개번호 WO 2013/093648

국제공개일자 2013년06월27일

(30) 우선권주장

61/556,124 2011년11월04일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

WO2010021865 A1\*

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

닛토덴코 가부시기가이샤

일본국 오사카후 이바라키시 시모호즈미 1-1-2

(72) 발명자

크노포브, 빅토르

미합중국 92056 캘리포니아 오션사이드 시 클리프웨이 2104

위트, 리처드 피.

미합중국 92110 캘리포니아 샌디에이고 스프링 타이드 테라스 3462

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이원희

전체 청구항 수 : 총 22 항

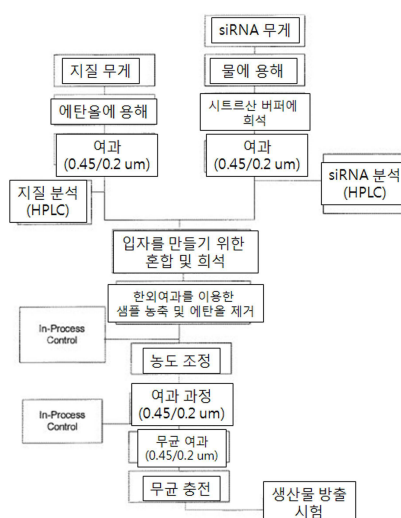
심사관 : 한정희

(54) 발명의 명칭 약물 전달을 위한 지질 나노입자 생산 방법

## (57) 요약

본 발명은 siRNA와 같은 음전하 치료 고분자를 효율적으로 피막형성하는 리포솜 제조 방법에 관한 것이다. 상기 제조는 에탄올과 같은 수산화성 유기용매에서 양이온 지질을 포함하는 지질 혼합물을 제조하며, 평균 사이즈 50 내지 150 nm 및 최종 전하 비율 약물:지질=1:2.5을 가지는 나노입자를 생산하기 위해 상기 용액을 물에 녹은 고분자에 최종농도 35% 에탄올을 물에서 주입한다.

## 대표도 - 도1



(72) 발명자

**카르마리, 프리야**

미합중국 92122 캘리포니아 샌디에이고 유닛#68 노  
벨 드라이브 4353

**리, 로빈**

미합중국 92128 캘리포니아 샌디에이고 비아 카라  
노바 15612

**웹브, 데이비드**

미합중국 92056 캘리포니아 오션사이드 베이클리프  
웨이 4147

**아코피언, 비올레타**

미합중국 92056 캘리포니아 오션사이드 시 클리프  
웨이 2308

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

하기 단계를 포함하는 이중 가닥 RNA 분자를 피막형성하는(encapsulating) 지질 나노입자(lipid nanoparticle) 제조 방법:

에탄올 용액(ethanol solution)에 용해된 양전하를 띠는 지질(positively charged lipid), 중성 지질(neutral lipid), 스테롤(sterol), 및 폴리에틸렌 글리콜-함유 지질 접합체(polyethylene glycol-containing lipid conjugate)를 포함하는 지질 용액을 제조하는 단계;

RNA 분자 및 pH 3.5-6.5의 수성 버퍼를 포함하는 첫 번째 수용액(aqueous solution)을 제조하는 단계;

상기 수용액을 교반하면서 1-100 분 이상 일정한 비율(constant rate)로 상기 지질 용액을 수용액 내로 주입하여, 25-45%(v:v) 에탄올 용액(ethanol solution)을 포함하는 최종 용액을 수득하는 단계;

0.06 내지 0.16 (w:w)의 RNA:지질 비율, 및 1:2.5 내지 1:1의 RNA: 지질 전하 비율(RNA:lipid charge ratio)를 가지는 지질 나노입자를 생산하는 단계; 및

중성 pH에서 두 번째 수용성 완충 용액으로 정용여과(diafiltration)하여 혼합물로부터 에탄올 용액(ethanol solution)을 제거하는 단계.

#### 청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 두 번째 용액은 다당류(polysaccharide)를 추가적으로 포함하는 방법.

#### 청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 다당류는 수크로스(sucrose), 락토오스(lactose), 말토오스(maltose) 및 이눌린(inulin)으로 구성된 군으로부터 선택되는 방법.

#### 청구항 4

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서, 다가 음이온(polyanion)을 피막형성하는 지질 나노입자를 동결건조하는(lyophilizing) 단계를 추가적으로 포함하는 방법.

#### 청구항 5

삭제

#### 청구항 6

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 양전하를 띠는 지질(positively charged lipid)은 지질의 40 내지 60 몰 퍼센트인 방법.

#### 청구항 7

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 양전하를 띠는 지질(positively charged lipid)은 HEDC, HEDDC 및 HE-Et-DODC로 구성된 군으로부터 선택되는 방법.

#### 청구항 8

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 양전하를 띠는 지질(positively charged lipid)은 이온화(ionizable) 또는 비-이온화(non-ionizable)된 양전하로 구성된 방법.

#### 청구항 9

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 지질은 레티노이드 분자(retinoid molecule)를 추가적으로 포함하는 방법.

#### 청구항 10

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 첫 번째 수용액 및 두 번째 용액은 25-55℃인 방법.

#### 청구항 11

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 첫 번째 수용액은 시트르산염(citrate)을 포함하는 방법.

#### 청구항 12

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 에탄올 용액은 다중 노즐(multinozzle)을 통해 공기 물 경계면(air-water interface)에 주입됨으로써 수용액에 첨가되는 방법.

#### 청구항 13

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 에탄올 용액은 침수 주입(submerged injection)으로 수용액에 첨가되는 방법.

#### 청구항 14

제 1항 내지 제 3항 중 어느 하나의 공정에 의해 생산된 다가음이온(polyanion)을 피막형성하는 지질 나노입자를 포함하는 약학적 제형.

#### 청구항 15

제 14항에 있어서, 상기 양전하를 띠는 지질(positively charged lipid)은 지질의 40 내지 60 몰 퍼센트인 약학적 제형.

#### 청구항 16

제 14항에 있어서, 상기 양전하를 띠는 지질(positively charged lipid)은 HEDC, HEDDC 및 HE-Et-DODC로 구성된 군으로부터 선택되는 약학적 제형.

#### 청구항 17

제 14항에 있어서, 상기 양전하를 띠는 지질(positively charged lipid)은 이온화 또는 비-이온화 된 양전하로 구성된 약학적 제형.

#### 청구항 18

제 14항에 있어서, 상기 지질은 레티노이드 분자(retinoid molecule)를 추가적으로 포함하는 약학적 제형.

#### 청구항 19

제 14항에 있어서, 다가음이온을 피막형성하는 리포솜의 동결건조하는 단계를 추가적으로 포함하는 약학적 제형.

#### 청구항 20

제 14항에 있어서, 다당류를 추가적으로 포함하는 약학적 제형.

#### 청구항 21

제 20항에 있어서, 상기 다당류는 수크로스, 트레할로오스(trehalose), 락토오스, 말토오스 및 이눌린로 구성된 군으로부터 선택되는 약학적 제형.

#### 청구항 22

제 14항에 있어서, 상기 다가음이온을 피막형성하는 지질 나노입자의 평균 입자 지름은 50-100 nm인 약학적 제형.

#### 청구항 23

제 14항에 있어서, 상기 다가음이온을 피막형성하는 지질 나노입자는 0.2 보다 적은 다분산 지수(polydispersity index)를 가지는 약학적 제형.

### 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명의 상호 참조

[0002] 본 발명은 2011. 11. 4일 출원된 미국 가출원(Provisional Application) 번호 61/556,124의 이익을 주장하고, 전체로서 참조로 본 명세서에 통합된다.

[0003] 기술분야

[0004] 본 명세서(description)는 간단하고 재현성을 가지는 지질-핵산 입자(lipid-nucleic acid particles)를 형성하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 평균 크기 50-150 nm로 단분산(monodisperse)된 입자를 생성한다.

### 배경 기술

[0005] 지질은 치료 분자의 운반, 특히 핵산의 운반을 위한 담체(carriers)로서 잠재적으로 유용하다. 지질은 복합체

(complex)를 피막형성(encapsulate)할 수 있는 리포솜(liposome)을 형성하거나, 또는 핵산 분자를 잡아서, 투여, 예를 들면, 순환계에 정맥 내 투여에 따라 표적 세포로 이런 종류의 치료 분자의 운반을 증강시킨다. 약학적 조성물에 있어서 이들의 유용성은 지질-핵산 나노 입자를 재생적으로 생성하는 활용가능한 방법에 의해 제한된다. 다양한 방법이 이러한 나노입자를 생성하는데 고안되어 왔다.

[0006] Batzri 등(1973, Biophys Biochem Acta 298:1015-19), 및 Kremer 등(1977, Biochemistry 16:3932-35)에서는 지질이 자발적으로 리포솜을 형성하는 수용액으로 에탄올 용액을 주입하고, 에탄올에 지질을 녹임으로써 지질 소포(lipid vesicles)의 생산을 설명하였다. Hirota 등(1999, BioTechniques 27:286-89)에서는 에탄올에서 양이온성 지질을 용해함으로써 핵산 분자로 코팅된 지질 소포의 생산과 핵산 분자를 함유하는 수용액에 에탄올 용액을 주입을 설명하였다. 상기 방법은 핵산으로 피막형성된 리포솜의 생산에 실패하였다.

[0007] Maurer 등(US 7094423)은 수용액에서 처음 제조되는 단층 지질 소포에 의해 핵산을 피막형성하는 리포솜 생산을 설명하였다. 미리 형성되는 지질 소포는 에탄올에 지질을 용해시킴으로써 준비되며, 수용성 버퍼에 지질 혼합물을 주입시킨다. 미리 형성된 빈 소포를 제조하는 과정은 압출에 의한 사이징(sizing)을 포함한다. 에탄올은 불안정한 상태의 미리 형성된 빈 소포체가 사이징된 후 첨가되며, 40% 에탄올의 핵산은 불안정한 지질 소포에 투입된다. 배양 후, 상기 혼합물은 에탄올을 제거하기 위해 투석된다. 다양한 퍼센트의 에탄올, 온도, 배양 시간, 지질 구성, 약물/지질 비율, 및 초기 핵산의 농도 모두는 상기 방법의 피막형성 효율 및 습득 수율에 영향을 준다. 예를 들어, Maurer 등은 큰 리포솜의 수와 그 분산도(polydispersity) 증가를 생산하는 동안 지질(mg)당 0.16 mg의 안티센스(antisense) 올리고뉴클레오티드보다 최대도 도달하는, 올리고뉴클레오티드:지질 비율 증가와 함께 포착 증가를 개시한다.

[0008] Semple 등(US 6858225)은 이온화 양이온성 지질을 이용한 RNA 피막형성하는 리포솜을 생산한다. 지질은 에탄올에 용해되고 수용성 버퍼의 낮은 pH에서 핵산과 함께 결합된다. 에탄올은 제거되고 pH는 중성으로 리포솜을 형성한다. 이러한 결과의 리포솜은 이질성을 가지며, 단 분산(monodisperse) 지질소포를 얻기 위해 균질화 및 압출을 필요로 한다. Maurer 등 및 Semple 등도 큰 리포솜의 수와 그 분산도 증가를 생산하는 동안 지질(mg)당 0.16 mg의 안티센스(antisense) 올리고뉴클레오티드보다 최대도 도달하는, 올리고뉴클레오티드:지질 비율 증가와 함께 포착 증가를 개시한다.

[0009] MacLachlan 등(US 7901708)은 지질 및 RNA가 단계적으로 희석되어 실질적으로 순간적인 소포체를 형성하는 혼합 챔버(T-튜브)의 수용액에서 RNA와 함께 에탄올에 용해된 혼합 지질에 의해 RNA 피막형성된 지질 소포체 생산을 개시한다.

[0010] Wheeler 등(US 20100041152)은 에탄올에 양이온 지질을 용해함으로써 RNA를 피막형성하는 리포솜의 생산과, 용해가능하고 전기적으로 중성을 띠는 복합체를 생산하기 위해 65-85% 에탄올에서 RNA와의 혼합과, 지질-핵산 혼합물을 형성하기 위해 상기 복합체에 비-양이온성 지질의 첨가, 및 에탄올의 제거를 개시한다. 상기 리포솜은 단분산 지질소포를 얻기 위해 균질화 및 압출을 필요로 한다.

[0011] 수행된 리포솜을 제조하기 위한 과도한 기계적 공정단계가 필요 없고 집단을 단분산(monodisperse) 시키기 위한 지질-핵산입자를 감소시키는 공정단계가 필요 없이 핵산을 피막형성하는 제작방법을 위한 충족되지 않는 필요가 남아있다.

## 발명의 내용

[0012] [발명이 요약]

[0013] 본 발명의 하나의 측면은 다가음이온(polyanion)을 피막형성(encapsulate)하는 지질 나노입자를 제조하는 방법이며, 일정한 속도로 수혼화성(water miscible organic solvent) 유기 용매에 용해시킨 지질을 포함하는 첫 번째 용액을 유기 용매 25-45%(v/v)를 포함하는 혼합물을 생산하기 위해 두 번째 용액을 혼합하는 동안 수용성 버퍼에서 다가음이온을 포함하는 두 번째 용액에 첨가하는 단계를 포함하며; 및 중성 pH의 수용성 버퍼 용액에 대해 정용여과(diafiltration)되는 혼합물로부터 유기 용액을 제거한다. 상기 첫 번째 용액에 두 번째 용액을 첨가하는 것은 1 내지 100분에서 완성되는 것이 바람직하다. 상기 다가음이온은 핵산, 즉, RNA 분자이다. 상기 다가음이온은 0.08 내지 0.8 mg/ml의 농도인 것이 바람직하다. 상기 지질 나노입자의 약물:지질의 비율(w/w)은 0.06 내지 0.16인 것이 바람직하다. 상기 지질 나노입자의 약물:지질 전기적 비율은 1:25:1 내지 1:1인 것이 바람직하다.

- [0014] 또 다른 방법의 실시예에서, 수용성 용액에서 다당류(polysaccharide)를 사용한다. 상기 다당류는 수크로스(sucrose), 트레할로오스(trehalose), 만니톨(mannitol), 솔비톨(sorbitol), 자일리톨(xylitol), 락토오스(lactose), 말토오스(maltose) 및 이눌린(inulin)로 구성된 군으로부터 선택되는 것이 바람직하다. 또 다른 실시예에서 상기 방법은 다가음이온을 피막형성하는 지질 나노입자를 동결건조하는 단계를 포함한다.
- [0015] 상기 방법의 또 다른 실시예에서, 상기 유기 용액은 에탄올인 것이 바람직하다. 더욱 바람직하게는, 지질 및 다가음이온의 혼합물의 완성시, 상기 혼합물은 에탄올 35%(v/v)를 포함한다.
- [0016] 상기 방법의 또 다른 실시예에서, 상기 지질은 양이온 지질(cationic lipid), 헬퍼 지질(helper lipid), 스테롤(sterol), 및 PEG 지질로 구성된 것이 바람직하다. 더 바람직하게는, 상기 양이온 지질은 지질의 40 내지 60 몰 퍼센트인 것이다. 또한, 상기 양이온 지질은 HEDC, HEDODC 및 HE-Et-DODC로 구성된 군으로부터 선택되는 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 이온화 또는 비인온화 양전화로 구성된 것이다. 상기 지질은 표적(targeting) 지질을 추가적으로 포함하는 것이 바람직하다.
- [0017] 상기 방법에 있어 또 다른 실시예에서, 상기 에탄올 및 수용성 용액은 25-55℃에서 혼합되며, pH 3.5 내지 6.5의 범위, 더욱 바람직하게는 시트르산(sitrate)인 것이 바람직하다.
- [0018] 본 발명의 또 다른 측면은 약학적 제형이며, 다가음이온으로 피막형성된 지질 나노입자를 생산하는 단계를 포함하며, 상기 단계는 첫 번째 용액을 추가하는 것을 포함하며, 상기 첫 번째 용액은 두 번째 용액에서 일정한 속도로 수산화성 유기용매에서 용해된 지질을 포함하며 상기 다가음이온은 두 번째 수용액에서 교반되는 동안 혼합물을 생산하기 위한 것이며 상기 유기 용매는 25-45%(v/v)이며; 및 중성 pH에서 수용성 범위 용액에 대해 정용여과되는 혼합물로부터 유기 용매를 제거하는 것을 포함한다.
- [0019] 실시예는 핵산, RNA 분자, 또는 이중 가닥 siRNA분자를 포함하는 약학적 제형을 포함한다. 바람직하게, 상기 지질 나노입자의 약물:지질 비율은 0.06 내지 0.16(w/w)이며, 및 상기 지질 나노입자의 약물:지질 전하 비율은 1:25:1 내지 1:1이다.
- [0020] 상기 약학적 제형의 또 다른 실시예에서, 상기 지질은 양이온 지질(cationic lipid), 헬퍼 지질(helper lipid), 스테롤(sterol), 및 PEG 지질로 구성된 것이 바람직하다. 더 바람직하게는, 상기 양이온 지질은 지질의 40 내지 60 몰 퍼센트인 것이다. 또한, 상기 양이온 지질은 HEDC, HEDODC 및 HE-Et-DODC로 구성된 군으로부터 선택되는 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 이온화 또는 비인온화 양전화로 구성된 것이다. 상기 지질은 표적(targeting) 지질을 추가적으로 포함하는 것이 바람직하다.
- [0021] 또 다른 실시예에서, 상기 약학적 제형은 다당류(polysaccharide)를 추가적으로 포함하며, 수크로스(sucrose), 트레할로오스(trehalose), 만니톨(mannitol), 솔비톨(sorbitol), 자일리톨(xylitol), 락토오스(lactose), 말토오스(maltose) 및 이눌린(inulin)로 구성된 군으로부터 선택되는 것이 바람직하다. 상기 약학적 제형은 제조하기 위해 다가음이온 피막형성된 리포솜의 동결건조하는 단계를 추가적으로 포함하는 것이 바람직하다. 상기 약학적 제형은 시트르산을 추가적으로 포함한다. 상기 약학적 제형은 폴록사머(poloxamers), 계면활성제(surfactants), 세제(detergents), 또는 폴리히드록시(polyhydroxy) 또는 폴리히드록시테틸렌(polyhydroxyethylene) 중합체로 이루어진 제품을 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0022] 또 다른 실시예에서, 상기 약학적 제형은 50 내지 150 nm의 평균 입자 직경을 갖으며, 바람직하게는 100 nm 이하, 더욱 바람직하게는 최소 다 분산을 갖는 RNA 분자 피막형성하는 지질 나노분자로 구성된다.

### 도면의 간단한 설명

- [0023] 도 1은 지질-핵산 나노입자를 제조하는 본 발명에 기재된 공정의 대략도를 나타낸다. 각 단계의 세부사항은 하기에 설명된다.
- 도 2는 0.05 내지 0.5 mg/ $\mu$ l의 최종 RNA 농도 함수로 나노미터(nm)의 평균 입자 크기를 나타낸다. 실험적인 세부사항은 실시예 1에서 나타낸다.
- 도 3은 지질을 RNA에 혼합하면서 범위 pH의 함수를 나노미터의 평균입자 크기를 나타낸다. 실험적인 세부사항은 실시예 2에 나타낸다.
- 도 4는 실시예 2(NDT-0009)의 방법 또는 실시예 3에 나타낸 바와 같이 Semple 방법을 사용하여 제조된 입자들의

평균 입자 크기를 나타낸 도이다. 왼쪽 직선은 혼합 후 사이즈를 잰 것이다. 오른쪽 직선은 최종 산물을 측정  
한 것이다(압출 및 정용여과 후, Semple 방법의 생산물을 위함).

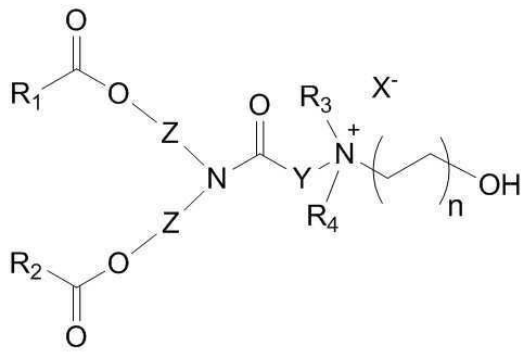
도 5는 실시예 2 및 실시예 3에 나타난 Semple 방법을 사용하여 제조된 입자들을 위한, 피막형성 효율(EE)을 나  
타낸 도이다. 왼쪽 직선은 혼합 후 사이즈를 측정한 것이다. 오른쪽 직선은 최종산물을 측정한 것이다(압출  
및 정용여과 후, Semple 방법의 생산물을 위함).

도 6은 실시예 2 및 실시예 3에 나타난 Semple 방법을 사용하여 제조된 입자들을 위한, siRNA 회복률(recover  
y)을 퍼센테이지로 나타낸 도이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0024] 본 명세서의 설명은, 예를 들면, 핵산, 단백질, 및 펩티드와 같은 음전하를 띠는 치료 중합체를 포함하는 지질-  
피막형성된 치료 분자를 만드는 방법에 관한 것이다. 제공된 본 명세서의 설명은 지질-피막형성된 핵산 분자를  
만드는 방법을 포함한다. 상기 방법은 리포좀 피막형성된 분자로 구성된 입자의 대규모 제작에 특히 익숙할 수  
있다. 상기 방법은 생성된 입자가 50과 150 nm 사이의 0.2보다 작은 다분산 지수(PDI)를 가지는 결과를 제공한  
다. 상기 방법은 에탄올과 같은, 수용액에서 용해된 음전하를 띠는 치료 중합체를 갖는, 수산화성 유기용매에  
서 용해된 지질을 혼합하고 유기용매를 제거하여 피막형성하는 수단을 제공한다. 지질 및 음전하를 띠는 치료  
중합체의 절대적 및 상대적 농도는 소입자를 생성하기 위해 충분하다. 본 명세서의 방법에 따라 생성된 입자는  
0.2보다 적은 다분산 지수의 입자 집단을 얻기 위하여 분출과 같은 기계적 공정을 요구하지 않는다.
- [0025] 본 명세서의 방법은 큰 부피로 규모를 상승시킬 수 있는 용이성 및 넓은 범위의 온도, 용질, pH 및 공정시간에  
대한 탄탄함으로 인하여 기존의 방법에 대해서 장점을 가진다.
- [0026] 본 명세서의 방법은 수행된 소포체를 생성하기 위해 요구되는 여분의 단계 없이 0.2보다 적은, 바람직하게는  
0.1보다 적은 다분산 지수를 갖는 입자들의 집단을 재생적으로 생성하는 기존의 방법에 대해서 장점을 가진다.
- [0027] 본 명세서의 방법은 지질 및 음전하를 띠는 치료 중합체의 혼합물에 따라 생성된 기계적 공정 입자에 요구되는  
여분의 단계 없이 균일한 집단의 나노입자 재생적으로 생성하는 기존의 방법에 대해서 장점을 가진다. 상기 여  
분의 단계는 자체의 크기를 감소시키고 치료적으로 허용가능한 범위에 균일성을 얻기 위해서, 예를 들면 초음파  
처리, 균질화, 또는 분출(extrusion)을 포함한다.
- [0028] 본 명세서의 방법은 나노 입자를 생성하는 여분의 공정 단계 없이 기존의 방법보다 같거나 더 나은 핵산 피막형  
성 효율을 얻는데 장점을 가진다.
- [0029] 본 명세서의 방법의 다른 장점은 지질 성분 및 조건에 관하여 본 명세서에서 제공된 추가 세부사항으로서 명백  
해질 것이다
- [0030] 본 명세서의 방법에 사용된 지질 혼합물은 음전하를 띠는 치료 중합체와 복합체를 형성하기 위해 적어도 양전하  
를 띠는 지질(양이온지질), 및 응집을 방지하기 위해 지질 접합체(PEG-지질)을 포함하는 폴리에틸렌 글리콜  
(polyethylene glycol)을 포함한다. 양이온 지질은 넓은 범위의 pH 조건에 대한 영구적 양이온 전하, 낮은  
pH(pH 6보다 적은) 및 중성 pH (pH 6.5 내지 8)에서 네트전하(net charge)없이 전하되는 이온화 양이온지질,  
또는 영구적이고 이온화 양이온 지질의 혼합체일 수 있다. 또한, 지질혼합물은 표적지질, 중합체, 스테로이  
드, 인지질, 또는 지방, 왁스(wax), 지용성 비타민(fat-soluble vitamin), 모노글리세리드(monoglyceride)  
또는 디글리세리드(diglyceride), 지방 아실(fatty acyls), 글리세로지질(glycerolipids), 글리세로인산지질  
(glycerophospholipids), 스펅고지질(sphingolipids), 사카로지질(saccharolipids) 및 폴리케티드  
(polyketides)을 포함하는 또 다른 군의 구성원을 포함할 수 있다. 또한, 상기 방법은 단지 중성 또는 음전하  
를 띠는 성분을 갖는 리포좀의 형성을 위해 사용될 수 있다.
- [0031] 바람직하게는 지질혼합물의 성분을 하기의 군으로부터 선택할 수 있다.
- [0032] **양이온지질(Cationic lipid)**

[0033] 본 명세서의 범위 내에서 공식 I의 양이온 지질이다.



[0034]

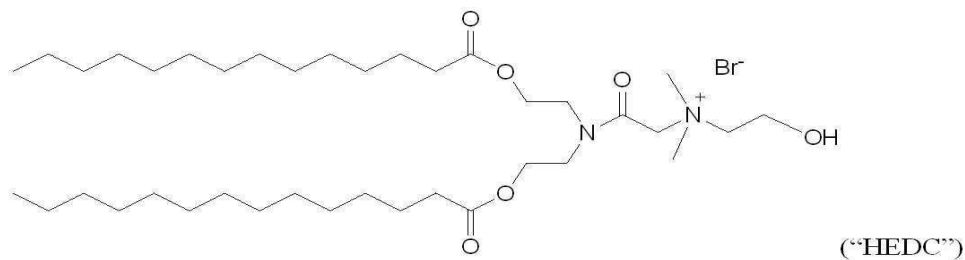
[0035] 여기서

[0036] Z = 알킬 링커, C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub> 알킬

[0037] Y = 알킬 링커, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 알킬

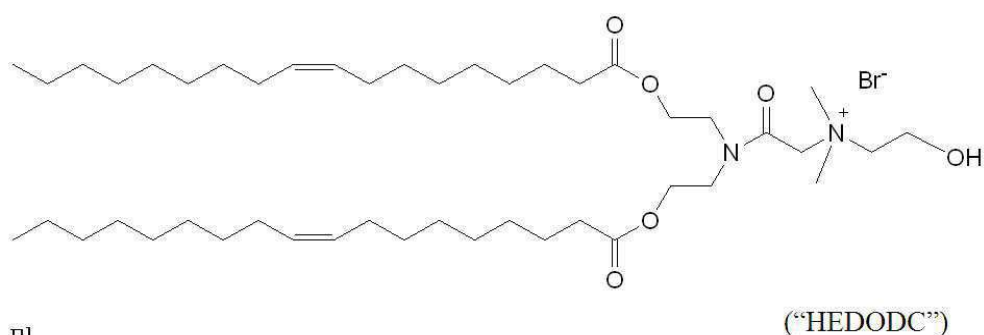
[0038] R<sub>1</sub> 및 R<sub>2</sub>은 각각 독립적으로 C<sub>10</sub>-C<sub>30</sub>알킬, C<sub>10</sub>-C<sub>30</sub>알켄닐, 또는 C<sub>10</sub>-C<sub>30</sub>알키닐, C<sub>10</sub>-C<sub>30</sub>알킬, C<sub>10</sub>-C<sub>20</sub>알킬, C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub>알킬, C<sub>13</sub>-C<sub>17</sub>알킬, C<sub>13</sub>알킬, C<sub>10</sub>-C<sub>30</sub>알켄닐, C<sub>10</sub>-C<sub>20</sub>알켄닐, C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub>알켄닐, C<sub>13</sub>-C<sub>17</sub>알켄닐, C<sub>17</sub>알켄닐이고; R<sub>3</sub> 및 R<sub>4</sub>은 각각 독립적으로 수소, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>알킬, 또는 -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>알킬, C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>알킬이고; n은 1-6이고; 및 상기 용어는 당업계에 서 쉽게 이해될 수 있는 것으로서, X는 임의 질소 반대이온을 포함하여, 반대이온(counterion)이다. 바람직한 질소 반대이온은, 특히 바람직한 클로라이드(chloride) 및 브로마이드(bromide)와 같이 할로젠(halogens)을 포함한다. 다른 바람직한 반대이온은 메실레이트(mesylate)(-SO<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>)이다.

[0039] 공식 I의 시범적 화합물은 하기를 포함한다:

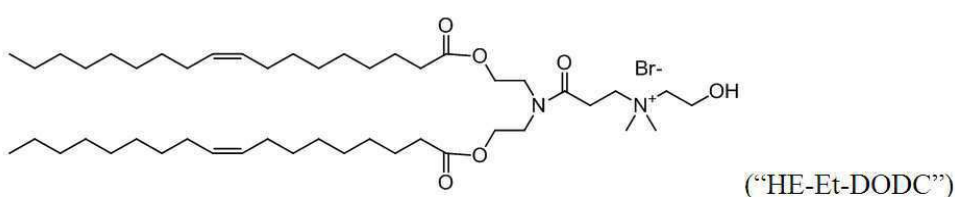


[0040]

[0041] 및



및

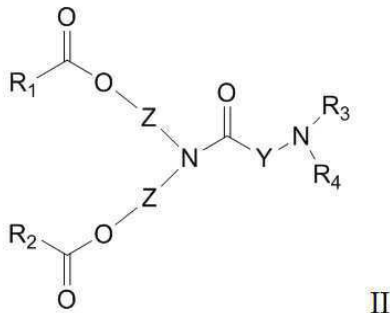


[0042]

[0043] 다른 생리학적 pH의 양이온 전하된 지질은 N,N-디올레일-N,N-디메틸암모늄 클로라이드(N,N-dioleoyl-N,N-dimethylammonium chloride)("DODAC"); N-(2,3-디올레일옥시)프로필-N,N,N-트리메틸암모늄 클로라이드(N-(2,3-dioleoyloxy)propyl-N,N,N-trimethylammonium chloride)("DOTMA"); N,N-디스테아릴-N,N-디메틸암모늄 브로마이드(N,N-distearyl-N,N-dimethylammonium bromide)("DDAB"); N-(2,3-디올레일옥시)프로필-N,N,N-트리메틸암모늄 클로라이드(N-(2,3-dioleoyloxy)propyl-N,N,N-trimethylammonium chloride)("DOTAP"); N-(1,2-디미리스틸옥시 프로프-3-일)-N,N-디메틸-N-하이드록시에틸암모늄 브로마이드(N-(1,2-dimyristyloxyprop-3-yl)-N,N-dimethyl-N-hydroxyethylammonium bromide)("DMRIE"),  $3\beta$ -(N-(N',N'-디메틸아미노에탄)카바모일)콜레스테롤( $3\beta$ -(N-(N',N'-dimethylaminoethane)carbamoyl)cholesterol)("DC-Chol"), 디옥타데실아미도글리실카르복시스페르미딘(dioctadecylamidoglycyl carboxyspermidine)("DOGS"); 및 N-(1-(2,3-디올레일옥시)프로필)-N-(2-(스페르민카르복사미도)에틸)-N,N-디메틸암모늄 트리플루오로아세트레이트(N-(1-(2,3-dioleoyloxy)propyl)-N-(2-(spermincarboxamido)ethyl)-N,N-dimethylammonium trifluoroacetate)("DOSPA")를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0044] **이온화 양이온 지질(Ionizable cationic lipids).**

[0045] 본 명세서의 범위 내는 공식 II의 이온화 양이온 지질이다.



[0046]

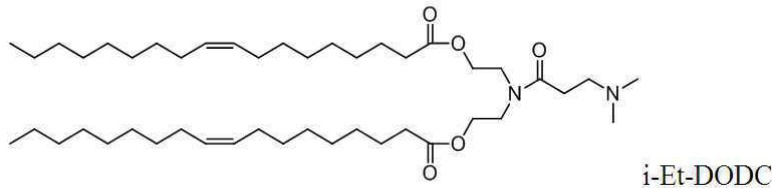
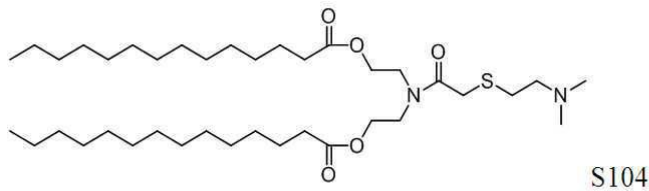
[0047] 여기서

[0048] Z = 알킬 링커, C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub> 알킬, -CH<sub>2</sub>SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-

[0049] Y = 알킬 링커, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 알킬

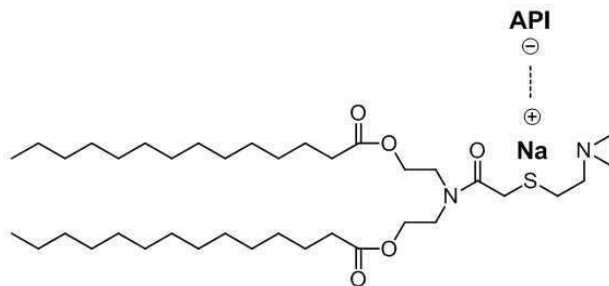
[0050] R<sub>1</sub> 및 R<sub>2</sub>는 각각 독립적으로 C<sub>10</sub>-C<sub>30</sub>알킬, C<sub>10</sub>-C<sub>30</sub>알켄닐, 또는 C<sub>10</sub>-C<sub>30</sub>알키닐, C<sub>10</sub>-C<sub>30</sub>알킬, C<sub>10</sub>-C<sub>20</sub>알킬, C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub>알킬, C<sub>13</sub>-C<sub>17</sub>알킬, C<sub>13</sub>알킬, C<sub>10</sub>-C<sub>30</sub>알켄닐, C<sub>10</sub>-C<sub>20</sub>알켄닐, C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub>알켄닐, C<sub>13</sub>-C<sub>17</sub>알켄닐, C<sub>17</sub>알켄닐이고; R<sub>3</sub> 및 R<sub>4</sub>은 각각 독립적으로 수소, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>알킬, 또는 -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>알킬, C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>알킬이다.

[0051] 일부 양전하를 띠는 지질은 생리학적 pH에서 또는 근처에서 pKa를 가지고 약산(mild acid) 조건의 양이온 및 생리학적 pH에서 약한 양이온이다. 상기 이온화 양이온 지질은 ((2-((2-(디메틸아미노)에틸)티오)아세틸)아자네디일)비스(에탄-2,1-디일) 디테트라데카노에이트 ((2-((2-(dimethylamino)ethyl)thio)acetyl)azanediy)bis(ethane-2,1-diyl) ditetradecanoate ("S104"), (Z)-((3-(디메틸아미노)프로페노일)아자네디일)비스(에탄-2,1-디일) 디올레이트((Z)-((3-(dimethylamino)propanoyl)azanediy)bis(ethane-2,1-diyl) dioleate)("i-Et-DODC"), N-(2,3-디올레일옥시)프로필N,N-디메틸암모늄 클로라이드(N-(2,3-dioleoyloxy)propylN,N-dimethylammonium chloride)("DODMA") 및 1,2-디올레오일-3-디메틸암모늄-프로판(1,2-dioleoyl-3-dimethylammonium-propane)("DODAP")를 포함하나, 이에 한정하지 않는다.



[0052]

[0053] 하기에 나타낸 바와 같이, 이온화 지질은 결합 및/또는 활성 약학적 성분(active pharmaceutical ingredient(API))의 방출을 용이하게 할 수 있음을 알았다.



[0054]

[0055] **중성 지질(Neutral lipids)**

[0056] 중성 지질의 예는 포스포지질(phospholipids), 아미노지질(aminolipids) 및 스펅고지질(sphingolipids)을 포함하나, 이에 한정하는 것은 아니다. 중성지질은 양친매성 지질(amphipathic lipids)를 포함한다. 포스포지질의 대표적 예는 포스페티딜콜린(phosphatidylcholine), 포스페티딜에탄올아민(phosphatidylethanolamine), 포스페티딜세린(phosphatidylserine), 포스페티딜이노시톨(phosphatidylinositol), 포스파티드산(phosphatidic acid), 팔미토일올레오일 포스페티딜콜린(palmitoyl oleoyl phosphatidylcholine), 리소포스페티딜콜린(lysophosphatidylcholine), 리소포스페티딜에탄올아민(lysophosphatidylethanolamine), 디팔미토일포스페티딜콜린(dipalmitoylphosphatidylcholine), 디올레오일포스페티딜콜린(dioleoylphosphatidylcholine), 디스테아로일포스페티딜콜린(distearylphosphatidylcholine), 오르딜린올레오일일포스페티딜콜린(ordilinoyleoylphosphatidylcholine)를 포함하나, 이에 한정하는 것은 아니다.

[0057] 또한, 스펅고지질, 글리코스페고지질 페밀리(glycosphingolipids families), 디아실글리세롤(diacylglycerols) 및 3-아실옥시산(3-acyloxyacids)와 같은 포스포러스(phosphorus)가 부족한 다른 화합물은 양친매성 지질(amphipathic lipids)로서 지정된 군(group) 내에 있다. 추가적으로, 상기에서 설명된 양친매성 지질은 트리글리세리드 및 스테롤(sterols)를 포함하는 다른 지질과 혼합될 수 있다.

[0058]

[0059] **PEG-지질**

[0060] 이중층 안정화 성분(bilayer stabilizing component)은 지질헤드 군, 예를 들면, 포스페티딜에탄올아민(phosphatidylethanolamine)에 결합된 폴리에틸렌글리콜 ("PEG") 이다. 또 다른 이중층 성분은 세라마이드(ceramide)에 결합된 PEG이다. PEG를 당업자에 의해 알려지고 사용되는 표준 결합반응을 사용하여 포스페티딜에탄올아민 또는, 선택적으로, 세라마이드에 결합할 수 있다. 추가적으로, 수행된 PEG-포스페티딜에탄올아민("PEG-PE")접합체는 상업적으로 활용가능하다.

[0061] 다양한 분자량의 PEG는 본 발명의 이중층 안정화 성분을 형성하기 위하여 사용될 수 있다. 다양한 분자량의 PEG는 다수의 다른 출처로부터 상업적으로 구입할 수 있거나 또는, 선택적으로, 당업자에 의해 알려진 표준 중합체 기술을 사용하여 합성할 수 있다. 본 발명의 바람직한 실시형태에서, 폴리에틸렌 글리콜은 200 내지

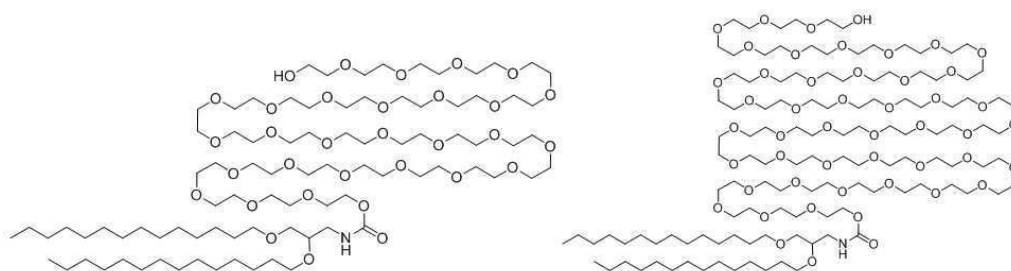
10000 Da, 바람직하게는 500 내지 4000 Da, 및 가장 바람직하게는 1000 내지 2000 Da 범위의 분자량을 가진다. 일반적으로, PEG 분자량의 증가는 안정화를 얻는데 요구되는 이중층 안정화 성분의 농도를 감소시킴을 알았다. 사슬 길이 및 포화 정도가 다양한 아실 사슬기(acyl chain groups)이 다양성을 갖는 포스페티딜에탄올아민은 이중층 안정화 성분을 형성하기 위하여 PEG에 결합할 수 있다.

[0062] 상기 포스페티딜에탄올아민은 상업적으로 활용가능하고, 또는 당업자에게 알려진 종래의 기술을 사용하여 분리하거나 합성할 수 있다. C10 내지 C20의 범위에서 탄소(carbon)사슬 길이를 갖는 포화 또는 불포화 지방산을 포함하는 포스페티딜에탄올아민이 바람직하다. 모노- 또는 디불포화(mono- or diunsaturated) 지방산 및 포화 및 불포화 지방산의 혼합물을 갖는 포스페티딜에탄올아민을 또한 사용할 수 있다. 적절한 포스페티딜에탄올아민은 디미리스토일포스페티딜에탄올아민(dimyristoylphosphatidylethanolamine)(DMPE), 디팔미토일포스페티딜에탄올아민(dipalmitoylphosphatidylethanolamine)(DPPE), 디올레오일포스페티딜에탄올아민(dioleoylphosphatidylethanolamine)(DOPE) 및 디스테아로일포스페티딜-에탄올아민(distearoylphosphatidylethanolamine)(DSPE)를 포함하나, 이에 한정하지 않는다.

[0063] 상기 조성물은 PEG-포스포지질 및 PEG-세라마이드를 포함하고, 하기로부터 선택되는 하나 또는 그 이상의 분자를 포함하는 자체 당업계에 알려진, PEG-결합된 지질을 또한 포함한다: PEG2000-DSPE, PEG2000-DPPE, PEG2000-DMPE, PEG2000-DOPE, PEG1000-DSPE, PEG1000-DPPE, PEG1000-DMPE, PEG1000-DOPE, PEG550-DSPE, PEG550-DPPE, PEG-550DMPE, PEG-1000DOPE, PEG-콜레스테롤, PEG2000-세라마이드, PEG1000-세라마이드, PEG750-세라마이드, 및 PEG550-세라마이드.

[0064] 추가적으로, 조성물은 예로써, 83-하이드록시-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72,75,78,81-헵타코사옥사트리옥타콘틸(2,3-비스(테트라데실록시)프로필)카바메이트(83-hydroxy-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72,75,78,81-heptacosaoxatrioctacontyl (2,3-bis(tetradecyloxy)propyl)carbamate)("HO-PEG1251-cBTP") 및 134-하이드록시-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72,75,78,81,84,87,90,93,96,99,102,105,108,111,114,117,120,123,126,129,132-테트라테트라콘타옥사테트라트리아콘타헵틸(2,3-비스(테트라데실록시)프로필)카바메이트

[0065] (134-hydroxy-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72,75,78,81,84,87,90,93,96,99,102,105,108,111,114,117,120,123,126,129,132-tetratetracontaoxatetratriacontaheptyl (2,3-bis(tetradecyloxy)propyl)carbamate)("HO-PEG2000-cBTP")를 포함하나, 이에 한정하지 않는 일반적 공식 mdPEG-링커-지질을 갖는, 단분산(monodisperse)(md) peg-지질을 또한 포함할 수 있다.



**HO-PEG1251-cBTP**

**HO-PEG2000-cBTP**

[0066]

[0067] 스테로이드(Steroids)

[0068] 스테로이드는 콜레스탄(cholestanes)(예, 콜레스테롤), 콜란(cholanes) 및 담즙산(bile acids)(예, 케노디옥시콜레이트(chenodeoxycholate) 및 콜레이트(cholate)), 에르고스테롤(ergosterol), 라노스테롤(lanosterol), 코르티코스테로이드(corticosteroids)(예, glucocorticoid), 프레그난(pregnan)(예, 프로제스테론(progesterone)), 및 피토스테롤(phytosterols)을 포함한다. 상기는 또한 친수성 부분(hydrophilic moiety), 예를 들면, 폴리에틸렌 글리콜과 결합을 형성할 수 있다. 바람직한 스테로이드는 콜레스테롤이다.

- [0069] **표적지질(Targeting lipids)**
- [0070] 표적지질이 예는 공식(A)의 화합물이다.
- [0071] 
$$\text{L-X-R} \quad \text{A}$$
- [0072] 여기서
- [0073] · 지질(L)은 DSPE, DOPE, 및 DC로 구성된 군으로부터 선택되고;
- [0074] · 링커(X)는 DSPE, DOPE, 및 DC; 링커 (X)는 아무것도 없음, PEG550, PEG2000, PEG-글루타메이트(-Glu), 글루(Glu), C6, 글라이신, 및 글루NH(GluNH), N1,N19-비스(3-(2-(2-(3-아미노프로폭시)에톡시)에톡시)프로필)-4,7,10,13,16-펜타옥사논아데칸-1,19-디아미드 (N1,N19-bis(3-(2-(2-(3-aminopropoxy)ethoxy)ethoxy)propyl)-4,7,10,13,16-pentaaxanadecane-1,19-diamide)로부터 구성된 군으로부터 선택되고;
- [0075] · 레티노이드(retinoid (R))는 트레티노인(tretinoin), 아다팔렌(adapalene), 레티놀(retinol), 4-하이드록시(페닐)레틴아미드(4-hydroxy(phenyl)retinamide)(4-HPR), 레티노산(retinoic acid)(vitamin A), 9-(2,6,6-트리메틸사이클로헥스-1-엔-1-일)노난산(9-(2,6,6-trimethylcyclohex-1-en-1-yl)nonanoic acid), 3,7-디메틸-9-(2,6,6-트리메틸사이클로헥스-1-엔-1-일)노난산(3,7-dimethyl-9-(2,6,6-trimethylcyclohex-1-en-1-yl)nonanoic acid), 3,7-디메틸-9-(2,2,6-트리메틸사이클로헥실)노난산(3,7-dimethyl-9-(2,2,6-trimethylcyclohexyl)nonanoic acid)), 및 임의 부분적 또는 완전히 포화된 레티노이드 또는 이의 유도체로부터 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0076] 표적지질의 도 다른 예는 공식(B)의 화합물이다.
- [0077] 
$$\text{R-X-R} \quad \text{B,}$$
- [0078] 여기서
- [0079] · 링커(X)는 N1,N19-비스(3-(2-(2-(3-아미노프로폭시)에톡시)에톡시)프로필)-4,7,10,13,16-펜타옥사논아데칸-1,19-디아미드(N1,N19-bis(3-(2-(2-(3-aminopropoxy)ethoxy)ethoxy)propyl)-4,7,10,13,16-pentaaxanadecane-1,19-diamide) ("bisamido-PEG") 또는 (N1,N19-비스(16,20-디아미노-15-옥소-4,7,10-트리옥사-14-아자이코실)-4,7,10,13,16-펜타옥사논아데칸-1,19-디아미드)N1,N19-bis(16,20-diamino-15-oxo-4,7,10-trioxa-14-azaicosyl)-4,7,10,13,16-pentaaxanadecane-1,19-diamide ("lys-bisamido-PEG-lys")이고; 및
- [0080] · 레티노이드(R)은 트레티노인(tretinoin), 아다팔렌(adapalene), 레티놀(retinol), 4-하이드록시(페닐)레틴아미드(4-hydroxy(phenyl)retinamide)(4-HPR), 레티노산(retinoic acid)(vitamin A), 9-(2,6,6-트리메틸사이클로헥스-1-엔-1-일)노난산(9-(2,6,6-trimethylcyclohex-1-en-1-yl)nonanoic acid), 3,7-디메틸-9-(2,6,6-트리메틸사이클로헥스-1-엔-1-일)노난산(3,7-dimethyl-9-(2,6,6-trimethylcyclohex-1-en-1-yl)nonanoic acid), 3,7-디메틸-9-(2,2,6-트리메틸사이클로헥실)노난산(3,7-dimethyl-9-(2,2,6-trimethylcyclohexyl)nonanoic acid)), 및 임의 부분적 또는 완전히 포화된 레티노이드 또는 이의 유도체로부터 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0081] 다른 표적분자는 지질혼합물, 예를 들면, 엽산(folic acid), 비타민 E, 펩티드 리간드 및/또는 단클론 항체를 포함할 수 있다.
- [0082] **약물-지질 입자조성물 및 제제(RNA-Lipid Particle Compositions and Formulations)**
- [0083] 본 명세서는 존재하는 활성제가 지질입자와 관련되어 있을 때, 활성제가 있고 없는 지질입자를 포함하는 조성물을 포함한다. 특정 실시형태에서, 활성제는 치료제이다. 특정 실시형태에서, 활성제는 지질입자의 수용성 내부 내에 피막형성된 음전하 치료 중합체이다. 다른 실시형태에서, 상기 활성제는 지질입자의 하나 이상의 지질층 내에 존재한다. 다른 실시형태에서 활성제는 지질입자의 외부 또는 내부 지질표면에 묶여있다.
- [0084] 특정 실시형태에서, 본 발명의 지질입자는 핵산과 연관되어 있고, 핵산-지질 입자를 유도한다. 특정 실시형태에서, 상기 핵산은 지질입자에서 완전히 피막형성된다. 본 명세서에서 사용된 것처럼, 상기 용어 "핵산"은 임의의 올리고뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 것을 의미한다. 특정 실시형태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 길이에서 15-50 뉴클레오타이드이다.

- [0085] 본 명세서의 용어 "폴리뉴클레오티드"(PNA) 및 "올리고뉴클레오티드"는 자연적으로 발생하는 베이스(bases), 슈가(sugars) 및 인터-슈가(백본) (inter-sugar (backbone))결합으로 구성된 뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드 단량체(nucleotide 또는 nucleoside monomers)의 중합체 또는 올리고머를 의미한다. 또한, 상기 용어 "폴리뉴클레오티드" 및 "올리고뉴클레오티드"는 비자연적으로 발생하는 유사하게 기능하는 단량체, 또는 이의 일부를 포함하는 중합체 또는 올리고머를 포함한다. 상기 변형되거나 대체된 올리고뉴클레오티드는, 예를 들면, 핵산 분해효소(nuclease)의 존재하에서 증강된 세포 내 섭취 및 증가된 안정성과 같은 특성 때문에 종종 자연적 형태를 선호한다.
- [0086] 올리고뉴클레오티드는 올리고데옥시리보뉴클레오티드 또는 올리고리보뉴클레오티드일 수 있다. 올리고데옥시리보뉴클레오티드는 음전하를 띠는 교대로 가지 없는 중합체를 형성하는 상기 슈가(sugar)의 5' 및 3' 탄소에서 포스페이트에 공유결합된 디옥시리보스로 구성한다. 올리고리보뉴클레오티드는 각각의 뉴클레오티드가 리보스 슈가 기(ribose sugar group)를 가지는 비슷한 반복 구조를 구성한다. 변형된 리보스 분자는 올리고리보뉴클레오티드에서 포함될 수 있다.
- [0087] 본 발명에 따른 지질-핵산 입자에서 존재하는 핵산은 알려진 임의 핵산형태를 포함한다. 본 명세서에서 사용된 핵산은 단일-가닥 DNA 또는 RNA, 또는 이중-가닥 DNA 또는 RNA, 또는 DNA-RNA 하이브리드 또는 RNA-PNA 및/또는 PNA 듀플렉스 또는 DNA-PNA 하이브리드일 수 있다. 이중-가닥 DNA의 예는 조절 및 종결영역, 및 바이러스 또는 플라스미드와 같은 DNA자가-복제 시스템을 포함하는 구조적 유전자를 포함한다. 이중-가닥 RNA의 예는 siRNA 및 다른 RNA간섭체를 포함한다. 단일-가닥 핵산은, 예를 들면, 안티센스 올리고뉴클레오티드, 리보자임(ribozymes), 마이크로RNA(microRNA), 및 트리플렉스-형성(triplex-forming) 올리고뉴클레오티드를 포함한다.
- [0088] 핵산은 일반적으로 특정한 형태의 핵산에 따라 다양한 길이일 수 있다. 예를 들면, 특정 실시형태에서, 플라스미드 또는 유전자는 길이에서 약 1,000부터 100,000까지의 뉴클레오티드 잔류물일 수 있다. 특정 실시형태에서, 올리고뉴클레오티드는 길이에서 약 10부터 약 100까지의 뉴클레오티드 범위일 수 있다. 다양성에 관련된 실시형태에 있어서, 단일-가닥, 이중-가닥, 및 3중-가닥이든지 간에, 올리고뉴클레오티드는 길이에서 약 10부터 약 50까지의 뉴클레오티드, 약 21부터 약 50까지의 뉴클레오티드, 약 15부터 약 30까지의 뉴클레오티드, 약 20부터 약 30까지의 뉴클레오티드 범위일 수 있다. 50 뉴클레오티드 또는 그보다 적은 폴리뉴클레오티드는 일반적으로 "단편(fragment)"라 한다.
- [0089] 특정 실시형태에서, 올리고뉴클레오티드(또는 이의 가닥)는 특히 표적 폴리뉴클레오티드에 하이브리드하거나 또는 상호보완할 수 있다. "특히 하이브리드화(Specifically hybridizable)" 및 "상호보완(complementarity)"은 안정적인 특정 결합이 DNA 또는 RNA표적과 올리고뉴클레오티드 사이에 발생하는 것과 같은 충분한 정도의 상호보완을 나타내는데 사용하는 용어이다. 올리고뉴클레오티드는 특정 하이브리드화 되는 자체의 표적핵산 서열에 100% 상호보완일 필요가 없다는 것이 이해된다. 표적으로의 올리고뉴클레오티드의 결합이 이로부터 유용성 또는 발현의 저감 또는 손실의 원인이 되는 표적 분자의 정상기능을 간섭할 때, 올리고뉴클레오티드는 특정적으로 하이브리드화되고, 특정 결합을 원하는 조건하에서, 예를 들면, 생체 내 분석 또는 치료인 경우에 생리학적인 조건하에서, 또는 시험관 내 분석인 경우에 분석이 수행되는 조건하에서 비표적 서열에 올리고뉴클레오티드의 비특정 결합을 피하기 위한 충분한 정도의 특정 베이스-짝짓기(base-pairing)가 있다. 따라서, 다른 실시형태에서 상기 올리고뉴클레오티드는 표적되는 유전자 또는 mRNA서열 또는 특정적으로 하이브리드 하는 것에 비교하여 1, 2, 또는 3 베이스(base) 치환기를 포함한다.
- [0090] 특정 실시형태에서, 핵산-지질입자는 RNA간섭(RNAi) 분자와 관련될 수 있다. RNAi 분자를 이용한 RNA간섭방법은 관심있는 유전자 또는 폴리뉴클레오티드의 발현을 방해하는데 사용할 수 있다. siRNAs는 RNAi-유도된 침묵복합체(RNAi-induced silencing complex (RISC))로 알려진 세포질 다중-단백질 복합체와 연관될 수 있는 보통 15-30 뉴클레오티드인 RNA 듀플렉스(RNA duplexes)이다. siRNA로 로드된 RISC는 상동 mRNA 전사(homologous mRNA transcripts)의 분해를 매개한다; 따라서 siRNA는 높은 특이성으로 단백질 발현을 녹다운(knock down)시키도록 디자인될 수 있다. 다른 안티센스 기술과 같지않게, 자연적 기전을 통한 siRNA 기능은 비코드화 RNA를 통하여 유전자 발현을 통제하도록 진화하였다. 상기는 이들의 활성이 안티센스 올리고뉴클레오티드 또는 리보자임(ribozymes) 보다 시험관 내 및 생체 내에서 더욱 강력한 이유가 되도록 일반적으로 고려된다. RNAi 시약은 DNA센스:RNA안티센스 하이브리드, RNA센스:DNA안티센스 하이브리드, 및 DNA:DNA 하이브리드가 RNAi를 매개할 수 있는 것을 포함한다. 따라서, 임의의 상기 다른 타입의 이중-가닥 분자를 포함하는 RNAi 분자는 사용될 수 있다. 추가적으로, RNAi 분자는 다양한 형태로 세포에 사용되고 소개될 수 있음이 이해된다. 따라서, 본 명세서에서 사용한 것처럼, RNAi 분자는 2개의 분리된 가닥을 포함하는 이중-가닥 폴리뉴클레오티드, 예를 들면, 센스가닥 및 안티센스가닥, 예, 소간섭 RNA(siRNA); 이중-가닥영역을 형성하는 상호보완서열의 헤어핀 루프를 포함하는

폴리뉴클레오티드, 예, shRNAi 분자, 및 단독 또는 또 다른 폴리뉴클레오티드와 혼합으로 이중-가닥 폴리뉴클레오티드를 형성할 수 있는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 표현하는 발현 벡터를 포함하나, 이에 한정하지 않는, 세포에 반응하는 RNAi를 유도할 수 있는 임의 및 모든 분자를 포함한다.

[0091] RNA간섭(RNAi)는 표적 폴리뉴클레오티드의 발현을 특정적으로 억제하도록 사용될 수 있다. 이중가닥 RNA가 매개된 유전자 및 핵산 발현의 억제는 세포 또는 유기체로 dsRNA, siRNA 또는 shRNA를 소개함으로써 본 발명에 따라 성취될 수 있다. siRNA는 RNA 및 DNA 모두, 예를 들면, 하나의 RNA가닥 및 하나의 DNA가닥, 또는 siRNA를 포함하는 이중-가닥 RNA, 또는 하이브리드 분자일 수 있다.

[0092] RNAi 분자표적 특정 폴리뉴클레오티드는 당업계에 알려진 절차에 따라 쉽게 제조될 수 있다. 따라서, 당업자는 넓은 다양한 siRNA 분자는 특정 유전자 또는 전사체를 표적하는 데 사용할 수 있다는 것을 이해한다. 특정 실시형태에서, 본 발명에 따른 siRNA 분자는 사이에서 각각의 완전체를 포함하여, 길이에서 이중-가닥 및 16-30 또는 18-25 뉴클레오티드이다.

[0093] 일반적으로, siRNA 분자는 표적 DNA 분자의 단일 가닥에 완전히 상호보완적이다. 다른 실시형태에서, siRNA는, 예를 들면, 2'-데옥시(2'-deoxy) 또는 2'-O-메틸(2'-O-methyl)변형과 같은 변형된 조성물을 가진다. 그러나, 바람직한 실시형태에서, siRNA의 전체 가닥은 2' 데옥시 또는 2'-O-변형된 베이스로 만들지 않는다.

[0094] 특정 실시형태에서, 본 발명은 핵산이 지질층 내에 피막된 지질-피막된 핵산입자를 생성하기 위한 방법 및 조성물에 관한 것이다. siRNA 올리고뉴클레오티드가 결합하는 상기 핵산-지질입자는 하기를 포함하는 다양한 생물리학적 파라미터를 사용하여 특징화된다: (1)지질에 대한 핵산 비율; (2) 피막형성 효율; 및 (3) 입자크기. 높은 피막형성 효율, 좋은 핵산분해효소 저항 및 혈청 안정성 및 일반적으로 지름에서 20 nm보다 적은, 통제할 수 있는 입자크기가 바람직하다. 추가적으로, 핵산분해효소 저항을 주기 위한 노력으로 핵산 변형은 단지 제한된 저항을 제공하는 많은 경우임에도 치료비용에 첨가되기 때문에, 핵산 중합체의 성질이 중요하다. 굳이 서술되지 않는다면, 상기 기준은 하기와 같이 본 명세서에서 계산되었다:

[0095] 약물:지질의 비율은 한정된 제조부피의 약물의 양을 동일한 부피의 지질이 양으로 나눈 것으로 정의된다. 상기 는 몰 베이스 당 몰(mole per mole basis) 또는 무게 베이스 당 무게(weight per weight basis)상에서, 또는 몰 베이스 당 무게(weight per mole basis)상으로 나타낼 수 있다. 최종 투여-준비 제제를 위하여, 약물:지질 비는 투석(dialysis)후에 계산되고, 크로마토그래피 및/또는 효소(예, 핵산분해효소) 소화는 가능한 외부 약물만큼 제거하도록 사용된다.

#### [0096] **피막형성(Encapsulation)**

[0097] 지질-핵산입자에서 피막된 siRNA를 퍼센트로서 표현된, siRNA 피막형성 효율 (EE)을 결정하기 위하여, 리보그린(RiboGreen)분석을 하기와 같이 활용하였다. 상기 절차는 용액에서 듀플렉스 및 단일 가닥 RNA 또는 DNA를 결정하도록 사용되었다.

[0098] 장비는 BioTek 기구, Inc. FLx800, 다양한 파이펫, 및 볼텍스 혼합기를 포함한다. 시약은 RNase-없는 물(MilliQ 등급, 또는 동등), 20x TE버퍼 "RNases free"(Invitrogen, T11493, 또는 동등), Quant-iT 리보그린 시약(Invitrogen, R11491), 및 물에 있는 10% 트리톤 X-100(Thermo Scientific, 28314, 또는 동등)을 포함한다.

[0099] 1X TE버퍼의 제조는 50 mL 눈금 실린더를 사용하여 38 mL의 RNase-없는 물을 50 mL 원심분리튜브로 트랜스퍼하고; 및 2 mL의 20X TE버퍼용액을 원심분리튜브에서 파이펫팅하고 교반기를 사용하여 혼합을 포함한다.

[0100] 1X TE버퍼에서 2% 트리톤 X-100 및 1% 트리톤 X-100의 제조는 각각 트리톤 10% X-100의 2 mL 또는 1 mL를 RNase-없는 15 mL 코니컬 튜브로 파이펫팅하고, 1X TE버퍼를 각각 8 mL 또는 9 mL 첨가하고 흔들어서 잘 혼합한다.

[0101] 리보그린 작동 용액(RiboGreen working solution)의 제조는 상온으로 가온한 리보그린 시약의 냉동 스톱의 제거, 및 TE 버퍼로 1:200을 희석하는 것을 포함한다. 원심분리 튜브를 용액으로부터의 임의적인 초과 빛을 방지하기 위하여 알루미늄 호일로 씌운다.

[0102] 표준은 TE버퍼에서 RNA용액을 제조하여 준비하고, 96 웰 플레이트로 분주한다. 시료를 대략 80  $\mu\text{g/mL}$  siRNA의 최종농도로 희석하고 도 1에서 나타난 96-웰 플레이트로 옮긴다. 리보그린 작용용액을 첨가하고 각각의 시료 및 표준과 혼합한다. 상기 시료를 분석하기 전에 어둠속에서 1-2분 동안 배양한다.

- [0103] 그 다음, TE버퍼의 1% 트리톤 X-100을 시료를 복제하기 위하여 첨가하고 리보그린 작용 용액이 첨가되었다.
- [0104] 피막형성 효율은 외부시료의 평균의 기저 측정(RNA가 없는 리보그린 시약의 형광)을 위해 정정되고 트리톤 X-100의 존재로 인해 신호 강도에서 8%감소에 대해 정정한 후에, 각각의 시료로부터 형광 결과의 평균을 사용하여 형광측정으로부터 결정되었다. 그 다음, 피막형성 효율은 하기의 방정식을 이용하여 계산하였다:
- [0105]  $EE = (\text{트리톤시료} - \text{리포솜 시료}) / (\text{트리톤 시료})$
- [0106] 즉, 피막형성 효율은 총 RNA 값(세척제로 리포솜을 용해시킨 후 측정) 및 완전한 리포솜 값을 총 RNA 값으로 나눈 차이이다. 완전한 리포솜 시료로부터 얻어진 형광은 용액에 RNA가 없는 것에 더하여 리포솜의 바깥표면 상에 흡수된 RNA로 구성할 것이다.
- [0107] **크기(size)**
- [0108] 크기는 형성된 입자의 크기(지름)를 나타낸다. 크기 분포를 Malvern Zetasizer Nano-ZS dynamic light scattering (DLS) 기구를 사용하여 결정할 수 있다.
- [0109] 상기 절차는 부피 평균 지름, Z-평균지름, 및 내공정(in-process) 리포솜 시료를 위한 다분포(polydispersity)의 측정에 적용한다. 다분포는 특정 크기 분포를 위한 수치 값이다.
- [0110] 측정은 상온에서 수행된다. 시료 및 시약은 상온에서 평형 되어야만 한다. 부피-무게 평균 입자 지름 및 다분포 지수를 결정하였다.
- [0111] **제작방법**
- [0112] *리포솜의 제조*
- [0113] 지질혼합물은 수혼화성 유기용매, 바람직하게는 순수에탄올에 용해될 수 있다. 대부분의 실시형태에서, 유기용매는 상업적으로 시판되는 형태로 사용될 수 있다.
- [0114] 하나의 실시예 형태에서, 지질 혼합물은 양이온 아미노 지질, 중성지질(아미노 지질 외에 다른), 스테로이드(예, 콜레스테롤), 및 PEG-변형된 지질(예, PEG-S-DMG, PEG-C-DMG 또는 PEGDMA)의 혼합체를 유기용매에서 공-용해되었다. 바람직한 실시형태에서, 지질 혼합물은 양이온 아미노 지질, 중성지질, 콜레스테롤 및 PEG-변형된 지질을 필수적으로 포함한다. 추가적으로 바람직한 실시형태에서, 지질혼합물은 다양한 몰라(molar) 비에서, 양이온지질, DOPE(또는 이온화 또는 영구 양이온 전하를 갖는 다른 헬퍼지질), 콜레스테롤 및 PEG-결합된 지질을 구성한다. 바람직한 몰라범위는 40 내지 60 몰% 양이온지질, 10 내지 30% 중성지질, 20 내지 40% 콜레스테롤과 1 내지 10% PEG-변형된 지질 사이에 있다.
- [0115] 표적지질은 지질혼합물, 예, 0.1 내지 5 (표적지질 : 총지질)의 몰라 비에서 diVA-PEG750-diVA (또는 다른 VA-결합된 표적지질)에 첨가될 수 있다.
- [0116] 지질의 총 농도는 25 mg/ml보다 적고, 바람직하게는 5 mg/ml보다 적다. 지질혼합물은 멤브린, 예, 0.45 또는 0.2  $\mu\text{m}$  여과기를 통해서 여과된다.
- [0117] 본 발명에 따라서, 지질혼합물은 버퍼된 수용액과 혼합된다. 버퍼된 수용액은 버퍼가 지질혼합물에서 양성자화된 지질의 pKa보다 적은 pH를 가지는 용액일 수 있다. 적절한 버퍼의 실시예는 시트레이트(citrate), 포스페이트, 및 아세테이트를 포함한다. 특정 바람직한 버퍼는 시트레이트 버퍼이다. 바람직한 버퍼는 피막된 핵산의 화학에 따라, 음이온의 1-1000 mM의 농도범위에 있을 것이고, 버퍼 농도의 최적화는 높은 로딩 수준을 얻는데 현저할 수 있다. 이는, 예를 들면, 상기 입자가 에탄올을 제거하고, pH를 증가시키기 위해 투석되거나 또는 약학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제와 혼합될 때, 입자 멤브린을 가로질러 삼투능을 발란스할 것인 동결방지제(cryoprotectant), 및/또는 비이온 용질(non-ionic solute)을 첨가하는데 적절할 수 있다. 버퍼에서 핵산의 양은 약 0.08부터 0.8 mg/mL까지이다.
- [0118] 에탄올을 첨가할 때에, 수용액의 온도는 25 내지 45°C, 바람직하게는 30 내지 40°C이다. 에탄올용액을 좁은 줄기(stream)에서, 공기-물 경계면 상에 스프레이에 의하거나 또는 수용액에서 물속에 잠긴 튜브를 통하여 운반된 에탄올 사이의 액체-액체 경계면을 통하여 수용액으로 첨가한다.

- [0119] 유기용매를 통제되는 비율에서, 바람직하게는 일정한 비율에서 중력에 의해 또는 유기용매를 수용액으로 운반하는 펌프에 의해 첨가한다. 유기용매의 운반은 1 분 내지 100 분에서, 바람직하게는 1 내지 25 분에서 완성될 수 있다. 유기용매를 단일 스프레이 또는 줄기를 통하여, 튜브 또는 노즐(nozzle)을 통하여, 또는 다수-노즐 시스템을 통하여 첨가할 수 있다. 유기용매가 수용으로 첨가되는 동안에, 얻어진 용액은 교반, 흔들기, 또는 재순환에 의해 혼합될 수 있다. 첨가단계는 바람직하게는 25 내지 45%에탄올, 가장 바람직하게는 35%에탄올인 최종 농도를 초래한다.
- [0120] 최종용액을 투석 또는 여과에 의해, 바람직하게는 여과작용(diafiltration)에 의해, 유기용매를 제거하기 위해 처리한다. 에탄올이 제거되는 동안에, 수용액은 중성 pH, pH 6.8 내지 pH 7.5에서, 바람직하게는, pH 7.2, 예를 들면 포스페이트 또는 헤페스(HEPES) 버퍼의 하나의 버퍼로 전환될 수 있다. 바람직하게는 얻어 $\mu$ m진 수용액은 저장 또는 용도 전에, 예를 들면, 0.22  $\mu$ m 여과기를 통해서 멸균될 수 있다.
- [0121] 리포솜을 피막형성하는 음전하를 띠는 치료 중합체
- [0122] 본 명세서에서 설명된 방법은 음전하를 띠는 치료 중합체, 예를 들면, RNA 분자를 갖는 지질입자를 제조하는데 유용하다. 본 명세서에서 설명된 방법에서, 지질의 혼합물은 중합체의 수용액과 혼합된다. 중합체는 얻어진 지질입자에서 효과적으로 피막형성된다.
- [0123] 나노 입자는 다가음이온 활성제(polyanionic active agent) 또는 치료제, 예를 들면, RNA 및 하나, 두 개, 또는 세 개의 생체적합성 중합체를 포함할 수 있다. 치료제의 실시예로는 핵산, 타산(taxanes)과 같은 항종양제(antineoplastic agents)를 포함한다.
- [0124] 첨가시에 지질혼합물에 있는 다수의 양전하와 적거나 같아야만 하는 음전하를 띠는 중합체의 총 전하는 바람직하게는 0.06 내지 0.16 (w:w)이다. 예를 들면, RNA가 사용될 때, 피막형성된 핵산은 RNA:지질 0.06 내지 0.16, 전하:전하 (-/+), 바람직하게는 1:2.5 내지 1:1의 최종 비율에 존재한다.
- [0125] 지질 혼합물이 전하를 갖는 양이온지질을 구성할 때, 지질 소포체는 중합체를 피막형성하고 뒷에 걸리게 하기 위해 음전하를 띠는 중합체의 존재하에서 형성될 수 있다. 얻어진 입자는 비지의 pH를 생리학적 pH 또는 더 높은 것으로 증가시켜 중성화할 수 있다. 상기 방법으로 형성된 소포체는 고함유량의 핵산을 갖는 균일한 소포체 크기의 제제를 제공한다.
- [0126] 양쪽 경우에, 중합체(나노 입자)를 피막형성하는 소포체는 50 부터 150 nm 까지 범위의 크기를 가진다.
- [0127] 본 명세서에서 설명된 방법에 따라서, 지질혼합물은 음전하를 띠는 중합체를 포함하는 버퍼로 된 수용액과 혼합된다. 버퍼로 된 수용액은 지질혼합물에서 양성자화된 지질의 pKa보다 적은 pH를 가지는 버퍼인 용액일 수 있다. 적절한 버퍼의 실시예로는 시트레이트(citrate), 포스페이트, 아세테이트 및 MES를 포함한다. 특정 바람직한 버퍼는 시트레이트 버퍼이다. 바람직한 버퍼는 피막된 중합체의 화학에 따라 1-1000 mM의 음이온의 범위에 있을 것이고, 버퍼 농도의 최적화는 높은 로딩 수준을 얻는데 현저할 수 있다.
- [0128] 상기는 상기 입자가 에탄올을 제거하고, pH를 증가시키기 위해 투석되거나 또는 약학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제와 혼합될 때, 입자 멤브린을 가로질러 삼투능을 발란스할 것인 동결방지제(cryoprotectant), 및/또는 비이온 용질(non-ionic solute)을 첨가하는데 적절할 수 있다.
- [0129] RNA에 관하여, 본 명세서 설명된 상기 공정의 도면은 도 1에 나타났다. 용액은 물에서, 예를 들면, 50 mM 시트레이트로 바람직하게는 pH 3.5-4.5에서 버퍼화된 동결건조 또는 고체물질의 용해에 의해 제조된다. 버퍼의 핵산 양은 0.08 부터 0.8 mg/mL까지이다. 에탄올을 첨가할 시에, 수용액의 온도는 25 내지 45°C, 바람직하게는 30 내지 40°C이다. 만약 단일 가닥 핵산이 사용된다면, 상승된 온도에서 간단한 가열은, 예를 들면, 65°C에서 1-2분 동안 유용할 수 있다.
- [0130] 에탄올용액을 좁은 줄기(stream)에서, 공기-물 경계면 상에 스프레이에 의하거나 또는 수용액이 있는 용기와 연결된 튜브를 통하여 운반된 에탄올 사이의 액체-액체 경계면을 통하여 수용액에 첨가한다.
- [0131] 유기용매는, 통제되는 비율에서, 바람직하게는 일정한 비율에서 유기용매를 수용액으로의 운반에 의해 첨가된다. 유기용매의 운반은 1 분 내지 100 분에서, 바람직하게는 1 내지 25 분에서 완성될 수 있다. 유기용매를 단일 스프레이 또는 줄기를 통하여, 튜브 또는 노즐(nozzle)을 통하여, 또는 다수-노즐 시스템을 통하여 첨가할 수 있다. 유기용매가 수용으로 첨가되는 동안에, 얻어진 용액은 교반, 흔들기, 또는 재순환에 의해 혼

합될 수 있다. 첨가단계는 리포솜 이중층 구조를 파괴하기에 충분한 최종농도, 바람직하게는 25 내지 45% 에탄올, 가장 바람직하게는 35% 에탄올의 결과를 가진다.

[0132] 지질-핵산입자에 관하여, 최종 RNA 농도는 0.001 내지 1 mg/ml, 바람직하게는 0.01 내지 0.5 mg/ml, 가장 바람직하게는 0.05 내지 0.5 mg/ml이다. 최종 약물/지질 비는 0.06 내지 0.16 w:w (1:2.5 내지 1:1, 전하:전하비)이다.

[0133] 최종용액은 유기용매를 제거하기 위하여, 투석 또는 여과에 의해, 바람직하게는 여과작용에 의해 처리된다. 에탄올이 제거되는 동안에, 상기 수용액은 중성 pH, pH 6.8 내지 pH 7.5, 바람직하게는, pH 7.2, 예를 들면, 포스페이트 버퍼에서 하나의 버퍼로 전환된다. 바람직하게는 얻어진 수용액은 예를 들면, 0.22  $\mu$ m 여과기에 의해, 저장 또는 사용 전에 멸균된다.

[0134] 최종 피막형성효율은 85%보다 크다. 최종 평균입자 지름은 50 내지 150 nm이다. 다분산 지수(polydispersity index) PDI는 0.2 보다 적고, 바람직하게는 0.1보다 적다.

### [0135] 동결건조(Lyophilization)

[0136] 본 개시는 재구성될 때, 큰 응집체의 최소양을 가지는 동결건조된 약학적 조성물의 부분에 관한 것이다. 상기 큰 응집체는 약 0.2  $\mu$ m보다 큰, 약 0.5  $\mu$ m보다 크거나 또는 약 1  $\mu$ m보다 큰 크기를 가질 수 있고, 재구성된 용액에서 바람직하지 않을 수 있다. 응집체 크기는 미국약전(U.S. Pharmacopeia) 32<788>에서 나타난 것과 여기서 참조로 껴 넣은 것을 포함하여 다양한 기술을 사용하여 측정될 수 있다. 상기 테스트는 빛 암흑화 입자 카운트 테스트(light obscuration particle count test), 현미경 입자 카운트 테스트(microscopic particle count test), 레이저 회절법(laser diffraction), 및 단일입자 광학 센싱(single particle optical sensing)을 포함할 수 있다. 하나의 실시형태에서, 주어진 시료에서 입자크기는 레이저 회절법 및/또는 단일입자 광학 센싱을 사용하여 측정된다. 다이나믹 빛 산란(Dynamic light scattering (DLS))은 입자크기를 사용하는데 사용할 수 있으나, 상기는 브라운 운동(Brownian motion)에 의존하므로 상기 기술이 일부 큰 입자를 발견하지 않을 수 있다. 레이저 회절법(Laser diffraction)은 입자와 현탁액 배지 사이의 굴절(refraction) 지수의 차이에 의존한다. 상기 기술은 하위-마이크론(sub-micron) 내지 밀리미터(millimeter) 범위에서 입자를 발견할 수 있다. 상대적으로 소량(예, 약 1-5 무게 %)의 큰 입자는 나노 입자 현탁액에서 결정될 수 있다. 단일입자 광학 센싱(single particle optical sensing(SPOS))은 약 0.5  $\mu$ m의 각각의 입자를 세기(count)위하여 회색 현탁액의 빛 암흑화(light obscuration)를 사용한다. 측정된 시료의 입자농도를 알게됨으로 인해, 응집체의 무게 퍼센트 또는 응집체 농도 (입자/mL)를 계산할 수 있다.

[0137] 응집체 형성은, 예를 들면, 입자표면의 탈수로 인한, 동결건조의 냉동 및/또는 건조단계 동안에 발생할 수 있다. 냉동공정은 얼음형태로서 입자사이의 거리를 감소시킬수 있는 농축효과를 가진다(Alison et al., Biochim Biophys Acta. 2000 Sep 29;1468(1-2):127-38; Armstrong and Anchordoquy, J Pharm Sci. 2004 Nov;93(11):2698-709). 상기 탈수는 동결건조 전에 현탁액에서 다당류와 같은 동결건조 보호제(lyoprotectants)를 사용하여 피할 수 있다. 적절한 다당류는 수크로오스(sucrose), 락툴로오스(lactulose), 락토오스(lactose), 말토오스(maltose), 트레할로오스(trehalose), 또는 셀로비오스(cellobiose), 코지비오스(kojibiose), 니게로오스(nigerose), 이소말토오스(isomaltose), 트레할로오스(trehalose), 소포로오스(sophorose), 라미나리비오스(laminaribiose), 겐티오비오스(gentiobiose), 튜라노스(turanose), 말툴로오스(maltulose), 팔라티노스(palatinose), 겐티오비올로스(gentiobiulose), 만노비아세(mannobiase), 멜리비오스(melibiose), 멜리비우로오스(melibulose), 루티노스(rutinose), 루티누로오스(rutinulose), 및 자일로비오스(xylobiose)를 포함한다. 실시형태에서, 상기 조성물은 스크로오스인 다당류를 구성한다. 다른 실시형태에서, 상기 조성물은 트레할로오스인 다당류를 포함한다. 적용 결과는, 초기 현탁액과 비교했을 때, 동등한 DLS 크기 분포가 재구성에 따라 얻어지는 것을 나타낸다.

[0138] 유리첨가제(glassy excipient)에서 매크로분자(macromolecules)를 고정하는 공정인 유리화(vitrification)는 리포솜의 응집을 방지하는 기여 요인이 아니라고 기존에 생각되었고, 슈가의 고장성(hypertonic) 용액이 요구되었다(Alison et al.). 본 발명자들은 동결건조의 냉동 및 건조단계의 결과는 리포솜의 응집, 리포솜 막의 붕괴, 및 핵산 지방고정물을 형성하기 위해 피막된 RNA 방출을 방지하는 수단을 제공하는 지질: 다당류 비(w:w)에 의존한다는 것을 발견하였다. 일 실시형태에서, 상기 조성물은 12 내지 15% (w:w) 수크로오스 및 5 내지 20 mg/ml 지질, 바람직하게는 12% 수크로오스 및 9 mg/ml 지질을 구성한다. 더욱 바람직하게는, 상기 조

성물은 버퍼, 가장 바람직하게는 중성 pH에서 헤페스(HEPES)를 또한 구성한다.

- [0139] 동결건조단계는 적절한 유리 용기(glass receptacle), 바람직하게는 10 ml, 원통형 유리 바이알(vial)에서 수행된다. 유리 바이알은 짧은 시간에 -40℃보다 적고 상온보다 큰 온도에서 극도의 변화를 이겨내야만 하고, 균일한 모양으로 잘려야만 한다. 충전제(bulking agent) 및 핵산을 피막형성하는 리포솜을 포함하는 조성물을 바람직하게는 3 ml 부피로, 및 바람직하게는 9 mg/ml지질과 같이 바이알에 첨가한다.
- [0140] 동결건조단계는 -40℃보다 크고, 또는 예를 들면, 냉동 조성물을 형성하는 -30℃보다 적은 온도에서 냉동 조성물을 구성할 수 있고; 동결건조된 조성물을 형성하기 위해 냉동 조성물을 건조할 수 있다. 냉각단계는 바람직하게는 최종 약 6분 동안까지, 바람직하게는 20 내지 -40까지 1° C./분으로, 온도에서 직선 감소 결과를 나타낸다. 더욱 바람직하게는, 12-15%의 수크로오스를 사용할 수 있고, 건조단계는 50-150 mTorr이고, 첫 번째 약 -15 내지 약 -35℃의 낮은 온도이고, 이후로 약 25℃까지 상온의 높은 온도이고, 3일 내지 7일 동안 완성된다. 본 개시의 다른 실시형태에서, 트레할로오스를 사용할 수 있고, 건조단계는 약 50-100 mTorr에서, 첫 번째 약 0 내지 약 -15℃의 낮은 온도에서, 그 다음 높은 온도에서 이다.
- [0141] 또 다른 측면에서, 본 발명은 리포솜 내부로부터 핵산의 응집 및 방출을 방지하는 동결건조된 제제에 슈가 및 염의 첨가를 포함하는 약학적 나노입자 조성물에서 입자의 상당한 응집을 방지하는 방법을 제공한다.
- [0142] **약학적 조성물**
- [0143] 본 명세서에 개시된 지질입자는, 특히 치료제와 연관되어 있을 때, 예를 들면, 투여 경로 및 표준 약학적 실행과 연관되어 선택되는 식염수(saline) 또는 포스페이트 버퍼와 같은 약학적으로 허용가능한 희석제(diluent), 부형제(excipient), 또는 담체(carrier)를 추가적으로 구성하는 약학적 조성물로서 체제화될 수 있다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 상기 담체는 대상 위치, 약물이 전달되는 경로, 약물 전달의 시간 등과 같은 기초하에 선택될 수 있다.
- [0144] 본 발명의 약학적 조성물은 경구 및 비경구 경로를 포함하여 당해 분야에 공지된 임의의 수단에 의해 환자에게 투여할 수 있다. 본 발명에서 사용된 용어 "환자", 예를 들면 포유류, 조류, 파충류, 양서류, 어류 등 인간뿐만 아니라 비인간을 지칭한다. 예를 들어, 비인간 초유동물(예를 들어, 설치류, 마우스, 랫트, 토끼, 원숭이, 개, 고양이, 영장류 또는 돼지)일 수 있다. 이들은 소화관에서 발견되는 소화효소와의 접촉을 피하기 위해 비경구로 하는 것이 바람직하다. 실시예에 따르면, 본 발명의 조성물은 주사(예, 정맥내, 피하 또는 근육내, 복강내주사)에 의해 투여될 수 있으며, 직장내, 질내, 국소적(분말기준으로써, 크림, 연고, 또는 방울) 또는 흡입(스프레이에 의한)될 수 있다.
- [0145] 특정 실시예에서, 본 발명의 나노입자는 예를 들면, 비경구, 또는 정맥 주입 또는 주사에 의해 이들의 전신적으로 필요로 하는 환자에게 투여된다.
- [0146] 특정 실시형태에서, 본 발명의 지질-핵산입자를 포함하는 약학적 조성물은 표준 기술에 따라 제조되고, 약학적으로 허용가능한 담체를 추가적으로 구성한다. 일반적으로, 식염수는 약학적으로 허용가능한 담체로서 사용될 것이다. 다른 적절한 담체는 증강된 안정성을 위하여 알부민, 지질단백질(lipoprotein), 글로불린(globulin)과 같은 지질 단백질을 포함하여, 예를 들면, 물, 버퍼로 된 물, 0.9% 식염수, 0.3% 글라이신(glycine), 슈가 또는 다당류, 예를 들면, 수크로오스, 말토오스, 트레할로스, 카라기난(carrageenan), 잔탄검(xanthan gum), 만니톨, 프럭탄(fructan)(즉, 이눌린), 시크로덱스트린(cyclodextrin), 자일리톨(xylitol), 소르비톨, 또는 폴리에틸렌글리콜(PEG)등을 포함한다. 금속 제거제(metal scavengers), 예를 들면, EDTA 뿐만 아니라 충전제, 동결방지제(cytoprotectants) 및/또는 동결건조보호제(lyoprotectants)가 포함될 수 있다. 식염수 또는 담체를 포함하는 다른 염을 포함하는 조성물에서, 담체는 하기의 지질입자 형성에 첨가된다. 따라서, 지질-핵산조성물이 형성된 후에, 상기 조성물은 보통 식염수와 같은 약학적으로 허용가능한 담체로 희석될 수 있다.
- [0147] 얻어진 약학적 제제는 종래의 잘 알려진 멸균기술에 의해 멸균될 수 있다. 그런 다음, 수용액은 사용을 위해 포장될 수 있거나 또는 무균 조건 및 투여 전에 멸균 수용액과 혼합된 동결건조된 제제, 동결건조하에서 여과될 수 있다. 조성물은 pH 조절제 및 버퍼제, 강장조절제(tonicity adjusting agents) 등, 예를 들면, 소듐아세테이트(sodium acetate), 소듐락테이트(sodium lactate), 소듐클로라이드(sodium chloride), 포타슘클로라이드(potassium chloride), 칼슘클로라이드(calcium chloride), 등과 같은 대략적 생리학적 조건에 요구되는 것으로서 약학적으로 허용가능한 보조 물질을 포함할 수 있다. 추가적으로, 지질현탁액은 자유-라디칼(free-radical) 및 축적상에서 지질 과산화 손상에 대하여 지질을 보호하는 지질-보호제(lipid-protective agents)를

포함할 수 있다. a-토코페롤(a-tocopherol) 및 페리옥사민(ferrioxamine)과 같은 수용성 특정철환제(iron-specific chelators)와 같은 지방친화성(Lipophilic) 자유라디칼 제거물질(free-radical quencher)이 적절하다.

[0148] 약학적 제제에서 지질입자 또는 지질-핵산 입자의 농도는, 예를 들면, 무게에 의해 약 0.01% 미만으로부터 10 내지 30% 만큼까지, 항상 약 0.05-5%에서 또는 적어도 약 0.05-5%에서, 넓게 다양할 수 있고 선택된 투여의 특정 모드에 따라서 액체(fluid)부피, 점도(viscosities) 등에 의해 우선 선택될 것이다. 예를 들면, 농도는 치료와 연관된 액체로드(fluid load)를 낮게 하여 증가시킬 수 있다. 상기는 특히 죽상동맥경화증-관련 울혈성심장기능상실(atherosclerosis-associated congestive heart failure) 또는 심각한 고혈압(hypertension)을 갖는 환자에게 바람직할 수 있다. 선택적으로, 자극 지질로 구성된 복합체는 투여부위의 염증을 약하게 하기 위하여 농도를 줄이도록 희석될 수 있다. 실시형태의 하나의 군에서, 핵산은 부착된 라벨을 가질 것이고 진단(상호보완 핵산 존재의 지적에 의해)을 위해 사용될 것이다. 상기 예에서, 투여되는 복합체의 양은 사용되는 특정 라벨 및 임상 의사의 판단에 따를 것이나 일반적으로 신체무게의 킬로그램 당 약 0.01과 약 50 mg 사이, 바람직하게는 신체무게의 약 0.001 과 약 5 mg/kg 사이가 될 것이다.

#### [0149] 사용방법

[0150] 본 명세서에서 설명된 지질입자는 핵산과 같은 음전하 치료 중합체를 세포, 시험관 내 또는 생체 내로 운반하는 데 사용될 수 있다. 본 발명의 지질입자 및 관련 약학적 조성물을 사용한 다양한 방법의 하기 설명이 핵산-지질입자와 관련된 설명에 의해 실시예되는 동안에, 상기 방법 및 조성물이 상기 치료로부터 혜택받을 수 있는 임의 질환 또는 장애의 치료를 위한 임의 치료제 운반을 위해 쉽게 적용될 수 있다는 것은 이해되었다.

[0151] 특정 실시형태에서, 본 발명은 핵산을 세포로 소개하는 방법을 제공한다. 세포로 소개하는 바람직한 핵산은 siRNA, 면역-촉진 올리고뉴클레오타이드, 플라스미드, 안티센스 및 라이소자임(ribozymes)이다. 상기 방법은 발생하는 세포 내 운반을 위해 충분한 시간의 기간을 위하여 본 발명의 입자 또는 조성물을 세포와 접촉하여 수행될 수 있다.

[0152] 본 발명의 조성물은 거의 임의 세포타입에 흡수될 수 있다. 일단 흡수되면, 핵산-지질입자는 세포 일부에 의해, 지질과 세포 맴브린을 교환하는 엔도사이토스(endocytosed)될 수 있거나 또는 세포와 융합될 수 있다. 복합체의 핵산 일부의 옮김 또는 결합은 상기 경로의 임의 하나를 경유하여 장소를 차지할 수 있다. 본 발명의 범위에 대하여 제한되는 의도 없이, 엔도사이토스에 의해 세포로 차지되는 입자 경우에서 입자는 엔도솜 맴브린(endosomal membrane)과 상호작용하고, 아마도 비이중층 상의 형성에 의해, 엔도솜 맴브린의 안정화를 초래하고, 피막된 핵산을 세포 세포질로 소개를 초래한다는 것을 믿게된다. 유사하게 세포 형질막을 갖는 입자의 직접적 융합의 경우에서, 융합이 일어날 때, 상기 리포솜 맴브린은 세포 맴브린으로 통합되고 리포솜의 내용물은 세포내 액체와 혼합된다. 시험관 내에서 수행될 때, 세포 및 지질-핵산조성물 사이의 접촉은 생체 적합적 배지에서 일어날 것이다. 조성물의 농도는 특정 적용에 따라 넓게 다양할 수 있으나, 일반적으로 1  $\mu\text{mol}$ 과 10 mmol 사이이다. 특정 실시형태에서, 지질-핵산조성물로 세포의 치료는 일반적으로 1부터 24시간까지, 바람직하게는 2부터 8시간까지의 시간의 기간 동안 생리학적 온도(37°C.)에서 수행될 것이다. 시험관 내 적용을 위하여, 식물 또는 동물 기원, 척추동물 또는 무척추동물, 및 임의 조직 또는 타입이든지 간에, 핵산의 운반은 배양에서 자란 임의 세포일 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 세포는 동물세포일 것이고, 더욱 바람직하게는 포유동물세포이고, 가장 바람직하게는 인간세포이다.

[0153] 실시형태의 하나의 군에서, 지질-핵산 입자 현탁액은 약 10<sup>3</sup>으로부터 약 10<sup>5</sup> 세포/mL까지, 더욱 바람직하게는 약 2x10<sup>4</sup> 세포/mL의 세포농도를 갖는 60-80% 치밀함으로 분주된 세포에 첨가되었다. 세포에 첨가된 현탁액의 농도는 바람직하게는 약 0.01 부터 20  $\mu\text{g/mL}$ 까지, 더욱 바람직하게는 약 1  $\mu\text{g/mL}$ 이다.

[0154] 통상의 적용은 잘 알려진 절차를 사용하여 특정 세포 내 표적을 녹다운 또는 침묵하기 위하여 siRNA의 세포내 운반을 제공하는 것을 포함한다. 선택적으로 적용은 치료적으로 유용한 폴리펩티드를 위한 코딩하는 DNA 또는 mRNA서열의 운반을 포함한다.

[0155] 본 발명의 방법은 시험관 내, 생체 외, 또는 생체 내에서 실행될 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 조성물은 당업자에게 알려진 방법을 사용하여 핵산을 세포 생체 내로 운반하기 위하여 또한 사용될 수 있다.

[0156] 생체 내 투여를 위하여, 약학적 조성물은 바람직하게는 비경구적으로(parenterally), 예를 들면, 관절내

(intraarticularly), 정맥내(intravenously), 복강내(intraperitoneally), 피하 내(subcutaneously), 또는 근육 내(intramuscularly)에 투여된다. 특정 실시형태에서 약학적조성물은 일시주사(bolus injection)에 의해 정맥 내에 또는 복강내에 투여된다.

[0157] 다른 방법에서, 약학적 제제는 조직으로 제조의 직접 적용에 의해 표적조직과 접촉될 수 있다. 상기 적용은 국소(topical), "개방(open)" 또는 "폐쇄(Closed)" 절차에 의해 만들어질 수 있다. "국소"에 의하면, 입인두(oropharynx), 외이도(external auditory canal), 등과 같은 환경에 노출된 조직에 약학적 제조의 직접 적용을 의미한다. "개방" 절차는 환자의 피부를 절개하고 약학적 제제가 적용된 조직 밑을 직접 육안으로 보는 것을 포함하는 이러한 절차를 포함한다. 상기는 일반적으로 폐에 접근하기 위한 개흉술(thoracotomy), 복부내장(abdominal viscera)에 접근하기 위한 복부개복술(abdominal laparotomy), 또는 표적조직에 접근하기 위한 다른 직접 수술과 같은 외과적 절차에 의해 완성된다. "폐쇄" 절차는 내부 표적조직이 직접적으로 보이지 않으나, 피부의 작은 상처를 통하여 기구를 삽입하여 접근되는 침습(invasive) 절차이다. 예를 들면, 상기 제제는 바늘세척(needle lavage)에 의해 복막(peritoneum)으로 투여될 수 있다. 이와 같이, 약학적 제제는 허리 천자(lumbar puncture)에 뒤이어 척추마비(spinal anesthesia) 또는 척수의 메트라자미드 이미징(metrazamide imaging)을 위해 통상 실행되었던 것으로 환자의 적합한 위치화 동안에 주입에 의해 수막(meninges) 또는 척수(spinal cord)로 투여될 수 있다. 선택적으로 상기 제제는 내시경 장치(endoscopic device)를 통하여 투여될 수 있다.

[0158] 또한 지질-핵산 조성물은 폐로 흡입된 분무제로 또는 질환 부위의 직접 주사에 의하여 투여될 수 있다.

[0159] 본 발명의 방법은 다양한 개체 또는 숙주에서 실행될 수 있다. 바람직한 개체 또는 숙주는 인간, 비인간 영장류, 개, 고양이, 가축, 말, 양, 등과 같은 포유종을 포함한다. 실험실시형태에서, 개체는 질환 또는 장애의 치료 또는 예방의 필요에서, 예를 들면, 질환 또는 장애를 위한 위험에서 진단되거나 또는 고려되는 개체, 인간과 같은 포유동물이다.

[0160] 본 발명의 지질-치료제 입자의 용량은 지질에 대한 치료제의 비와 연령, 무게, 및 환자의 조건에 기초한 의사의 의견 투여에 의존할 것이다.

[0161] 하나의 실시형태에서, 본 발명은 표적 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드를 모듈레이팅하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 세포를 표적 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드의 발현을 모듈레이팅할 수 있는 핵산과 연관된 본 발명의 지질입자와 접촉하는 것을 구성한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "모듈레이팅(modulating)"은 표적 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드의 발현을 변경시키는 것을 의미한다. 다른 실시형태에서, 모듈레이팅은 증가(increasing)시키거나 증강시키는 것(enhancing)을 의미할 수 있고, 또는 감소(decreasing)시키거나 축소(reducing)시키는 것을 의미할 수 있다. 표적 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드의 발현수준을 측정하는 방법은 당업계에서 잘 알려지고 활용되고 예를 들면, 역전사-중합효소 사슬 반응(reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR) 및 면역조직화학(immunohistochemical) 기술을 포함한다. 특정 실시형태에서, 표적 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드의 발현 수준은 적절한 대조군 값과 비교하여 50%보다 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 또는 그 이상에 의해 증가되거나 감소된다.

[0162] 예를 들면, 만약 증가되는 폴리펩티드의 발현을 원한다면, 핵산은 원하는 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터일 수 있다. 다른 한편으로, 감소된 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드의 발현을 원한다면, 그 다음 핵산은 표적 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드에 특정적으로 하이브리드하여, 표적 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드의 발현을 방해하는 폴리뉴클레오티드서열을 구성하는, 예를 들면, 안티센스 올리고뉴클레오티드, siRNA, 또는 마이크로 RNA(microRNA)일 수 있다. 선택적으로, 핵산은 안티센스올리고뉴클레오티드, siRNA, 또는 마이크로 RNA(microRNA)를 발현하는 플라스미드일 수 있다.

[0163] 특정 실시형태에서, 핵산 활성제 또는 치료제는 siRNA, 마이크로RNA, 안티센스 올리고뉴클레오티드, 및 siRNA, 마이크로RNA, 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드를 발현시킬 수 있는 플라스미드로부터 선택되고, siRNA, 마이크로RNA, 또는 안티센스 RNA는 폴리펩티드의 발현을 감소시키는 것과 같은 폴리펩티드 또는 이의 보완체(complement)를 암호화하는 폴리뉴클레오티드에 특정적으로 결합하는 올리고뉴클레오티드를 포함한다.

[0164] 다른 실시형태에서, 핵산은 폴리펩티드 또는 이의 기능적 변이체(variant) 또는 조각의 발현이 증가되는 것과 같은, 폴리펩티드 또는 이의 기능적 변이체 또는 조각을 암호화하는 플라스미드이다.

[0165] 관련된 실시형태에서, 치료제가 siRNA, microRNA, 안티센스 올리고뉴클레오티드, 및 siRNA, microRNA, 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드를 발현할 수 있는 플라스미드로부터 선택되고, siRNA, microRNA, 또는 안티센스 RNA

는 폴리펩티드 또는 이의 보완물을 암호화하는 폴리뉴클레오티드에 특정적으로 결합하는 올리고뉴클레오티드를 포함하는 경우에, 본 발명은 본 발명의 약학적 조성물을 개체에게 제공하는 것을 포함하는, 개체에서 폴리펩티드 과발현에 의해 특징되는 질환 및 장애를 치료하는 방법을 제공한다.

[0166] 다른 관련된 실시형태에서, 치료제가 폴리펩티드 또는 이의 기능적 변이체 또는 조각을 암호화하는 플라스미드인 경우에, 본 발명은 본 발명의 약학적 조성물을 개체에게 제공하는 것을 포함하는, 개체에서 폴리펩티드의 저발현에 의해 특징되는 질환 또는 장애를 치료하는 방법을 포함한다.

#### [0167] 보관수명(shelf life)의 분석

[0168] 용어 "유효 기간"은 지질:RNA 나노입자가 생물학적 활성을 잃기 전까지 보관될 수 있는 시간의 기간을 의미하는 것으로 사용된다(하기 정의된 조건 즉, 4℃의 버퍼). 본 발명의 보관수명을 확인하기 위한 생물학적 활성 측정은 지질:RNA 나노입자가 생체 내에서 정맥 투여후 포유동물 세포를 형질전환시키는 능력을 이용한다.

[0169] 실시예에서, 보관수명은 실시예에 서술한 바와 같이 지질:RNA 나노입자를 하나 또는 그 이상의 시험 동물에 나노입자를 투여하여 형질전환(예를 들어, 리포터 유전자의 발현) 동물에서 선택된 조직을 분석하여 다양한 기간 동안 보관하면서 결정된다.

[0170] 보관수명은 절대적인 관점으로 표현되며, 즉 조성물의 시간 길이는 활성을 잃기 전에 저장될 수 있다. 반면, 보관수명은 다른 조성물과의 참조에 의해 상대적인 용어로 표현될 수 있다. 따라서, 예를 들면, 지질:RNA 나노입자가 보관기간이 지나고 형질전환 활성을 보이고 그 활성이 같은 시간에 저장된 비슷한 다른 복합물의 활성보다 큰 경우, 피검물 복합체는 다른 복합물과 비교하여 보관수명이 증가한 것이라 말할 수 있다.

#### [0171] 리포솜으로 캡슐화된 다가음이온 치료를 포함하는 키트

[0172] 본 발명은 본 발명에서 기재된 지질:RNA 나노입자의 제조를 위한 키트를 제공한다. 이러한 키트는 손쉽게 이용 가능한 물질 및 시약으로부터 제조할 수 있다. 예를 들면, 이러한 키트는 다음 재료 중 어느 하나 이상을 포함할 수 있다: 리포솜, 핵산(RNA, DNA, 단일 또는 이중 가닥), 펩(Fab's) 단편과 같은 표적 잔기와 함께 유도된 친수성 중합체, 및 지침. 키트 및 부품의 다양함은 사용자의 특정 요구 및 의도된 사용자에 따라 본 설명에 따라 제조될 수 있다. 예를 들어, 키트는 전술한 바와 같이, 특정한 세포 유형으로 복합체를 표적화하여 표적 잔기의 수 중 어느 하나를 포함할 수 있다.

[0173] 상기 키트는 부가적으로 생체 내, 생체 외, 또는 시험관 내에서 세포를 형질전환시키기 위해 상기 지질:RNA 나노입자의 사용법을 포함한 지침 자료(즉, 프로토콜)를 제공한다. 통상적으로, 상기 지침 자료는 상기 언급된 바와 같이 리포솜 및 핵산으로부터 지질:RNA 나노입자를 제조하는 방법을 설명한다. 상기 지침 자료는 또한 어떻게 친수성 고분자와 지질:RNA 나노입자를 혼합하는지 서술한다. 게다가, 상기 지침 자료는 지질:RNA 나노입자를 세포에 형질전환하는 방법을 서술한다.

#### [0174] 실시예

##### [0175] 실시예 1 : RNA-지질 입자 크기에 대한 농도의 효과

[0176] 상기 실시예는 입자크기에 대한 siRNA 및 지질농도의 효과를 설명한다.

[0177] 본 명세서에서 설명된 방법에 의해 나노 입자를 제조하기 위하여, 양이온지질, DOPE, 콜레스테롤, PEG-BML, 및 diVA-PEG750-diVA를 각각 50:10:38:2:5의 몰라비에서 순수에탄올에 용해시켰다. 상기 siRNA를 pH 4.5에서 50 mM 시트레이트 버퍼에 용해시켰다.

[0178] siRNA-포함하는 버퍼를 혼합관에서 계속해서 교반하는 동안에 35 내지 40℃로 가져왔다. siRNA로드된 리포솜을 자발적으로 형성하기 위하여 에탄올/지질 혼합물을 매니폴드/노즐 어레이를 사용하여 siRNA를 포함하는 버퍼 표면으로 스프레이 하였다. 지질 및 RNA 농도를 0.05부터 0.5 mg/mL까지 최종 siRNA 농도범위, 0.08 (wt:wt)의 약물:지질 비, 및 35%의 에탄올 농도에 도달하도록 조정한다. siRNA에 대한 지질 비는 테스트된 모드 조건을 위해 일정하게 유지되었다.

[0179] siRNA 로드된 리포솜을 입자를 안정시키기 위하여 ~10%에탄올에 희석시킨 후 에탄올을 제거하고 버퍼를 교환하

기 위하여 10X부피의 PBS (pH 7.2)에 대해 정용여과(diafiltered) 하였다. 미생물 오염도 감소를 위하여 최종 생성물을 0.22  $\mu\text{m}$ , 멸균등급, PES 여과기를 통하여 여과하였다. 부피, 평균 입자크기 및 다분산 지수(PDI)를 다이나믹 빛 산란(dynamic light scattering (DLS))을 사용하여 결정하였다. 결과를 표 1 및 도 2에 나타냈다.

표 1

최종 siRNA	부피 평균 지름(nm)		
	평균	SD	PDI
0.05	96.7	7.0	0.084
0.10	105.7	10.1	0.073
0.25	116.8	8.4	0.125
0.50	141.9	10.0	0.105

[0180]

[0181]

상기 결과는 입자크기가 siRNA 농도(mg/ml에서)가 증가함에 따라 증가하는 것을 나타냈다. 지질 및 siRNA 농도 (동일한 상대적 비를 유지)의 감소는 입자크기를 감소시키고, 농도 증가는 입자크기를 증가시킨다. 0.05 내지 0.5 mg/ml 사이의 최종 siRNA 농도는 96.7 내지 141.9 nm, 150 nm보다 작은 평균 입자지름을 갖고, 모든 경우에서 0.2보다 작은 다분산 지수로 된 나노입자를 생성한다.

[0182]

0.2보다 작은 PDI를 갖는 150보다 작은 입자크기는 속이 빈 수행된 지질 소포체 제조없이 및/또는 기계적 공정 없이, 본 명세서에서 설명된 방법에 의해 생성된다.

[0183]

## 실시예 2: RNA-지질 입자 형성에 공정 파라미터의 효과

[0184]

상기 실시예는 RNA-지질 입자 형성에 다양한 공정 파라미터의 효과를 설명한다. 몇 개의 파라미터는 온도, 에탄올 농도, 버퍼, 지질:siRNA 비, 및 지질용액을 분산에 사용되는 노즐 타입을 포함하는 상기 실험동안에 스크리닝되었다.

[0185]

HEDC, DOPE, 콜레스테롤, a PEG-BML, 및 diVA-PEG750-diVA를 40:30:25:5:2의 몰라비에서 순수에탄올에 용해시켰다. 혼합관에서 계속해서 교반하는 동안에 버퍼를 포함하는 siRNA를 지적된 온도로 가져왔다. siRNA로드된 리포솜을 자발적으로 형성하기 위하여 노즐을 사용하여 siRNA를 포함하는 버퍼 표면으로 에탄올/지질 혼합물을 스프레이 하였다. 지적된 약물/지질 비 및 지적된 최종 에탄올 퍼센트에서 0.1 mg/mL의 최종 siRNA 농도에 도달하도록 지질을 siRNA와 혼합하였다.

[0186]

siRNA를 25부터 100 mM까지 및 pH 3.5 내지 pH 6.5 강도에서 다양화된 시트레이트 버퍼에 용해시켰다. 혼합 온도는 25부터 45℃까지 다양하였다. 최종 에탄올 농도는 25부터 45%까지 다양하였다. 약물:지질 비 (wt/wt)는 0.07부터 0.11까지 다양하였다. 수화(hydration) 노즐 내부지름(ID)은 0.005부터 0.125인치까지 다양하였다. 각각의 조건은 각각의 공정 파라미터의 효과를 비교하기 위한 측정으로서 수행되었다. 지적되지 않는 한, 각각의 조건은 50 mM 시트레이트 버퍼, pH 4.5, 35℃, 35% 최종 에탄올, 0.07의 약물:지질 비, 및 0.005 인치의 노즐 ID에서 수행되었다.

[0187]

siRNA로드된 리포솜은 입자를 안정시키기 위해 10% 에탄올에 희석된 후에 에탄올을 제거하고 버퍼를 교환하기 위하여 10X부피의 PBS (pH 7.2)에 대해 정용여과하였다. 미생물 오염도 감소를 위해 최종 생성물은 0.22  $\mu\text{m}$ , 멸균등급, PES 여과기를 통하여 여과되었다.

[0188]

표 2 및 도 3은 지질-핵산 나노 입자의 평균지름 및 PDI 상의 pH 효과를 나타낸다. 비록 150 nm평균 입자크기보다 작을지라도, 증가하는 버퍼 pH는 증가하는 입자크기 결과를 나타냈다.

표 2

버퍼 pH	부피 평균 지름(nm)		PDI
	평균	SD	
5.5	130.7	17.7	0.111
4.5	108.5	7.1	0.163
3.5	86.1	10.2	0.149

[0189]

[0190]

표 3은 다양한 파라미터상에서 버퍼농도의 효과를 나타낸다. 상기 결과는 증가하는 버퍼 농도는 siRNA 회수를 감소시켰다. 평균 입자지름 및 PDI는 영향이 없는 것처럼 나타났다. 최소 입자크기는 pH 3.5에 대해서 관찰되었고 최소 siRNA 회수는 25 mM 시트레이트 버퍼에 대해서 관찰되었다.

표 3

버퍼 농도 (mM)	부피 평균 지름(nm)		PDI	EE [%]	siRNA 회수율(%)
	평균	SD			
25	103.1	13.4	0.179	96	94
50	113.8	15.5	0.156	94	87
100	101.0	9.4	0.185	94	80

[0191]

[0192]

표 4는 25℃부터 45℃까지 증가하는 수화(hydration)온도는 80%부터 87%까지 siRNA 회수를 개선하는 반면에 135.7부터 102.2 nm까지 입자크기를 감소시킨다. 증가하는 최종 에탄올 퍼센트는 siRNA 회수에 영향 없이 입자크기를 증가시켰으나 88%까지 피막형성 효율을 감소시키는 입자크기를 증가시킨다.

표 4

수화 온도(℃)	최종 %에탄올	부피 평균 지름(nm)		PDI	EE [%]	siRNA 회수율(%)
		평균	SD			
25	35	135.7	15.9	0.057	95	80
35	25	103.8	9.8	0.178	94	84
35	35	113.8	15.5	0.156	94	87
35	45	130.8	11.7	0.136	88	86
45	35	102.2	3.4	0.182	93	87

[0193]

[0194]

표 5는 증가하는 약물:지질 비는 80부터 87%까지 증가된 siRNA 회수를 감소시켰다. 최소 회수는 0.07 약물:지질 (w:w)의 비에서 관찰되었다. 모든 다른 측정 성질은 약물:지질 비에 의해 영향받지 않았다. 상기 결과는 놀랍고 최적 회수가 0.16보다 동등하거나 더 큰 약물:지질 (w:w)(지질:약물 (w:w) 6.26보다 동등하거나 적은)에 서라고 설명한 마우러 등(Maurer et al.) 및 샘플 등(Semple et al.)의 개사 관점에서 예상되지 않았다. 현재 결과는 반대 추세가 본 명세서에서 설명된 방법을 사용하여 얻어진다는 것을 제시한다.

표 5

지질:siRNA (wt/wt)	부피 평균 지름(nm)		PDI	EE [%]	siRNA 회수율(%)
	평균	SD			
9:1	93.9	17.6	0.186	95	80
12:1	85.6	14.0	0.218	95	82
14:1	113.8	15.5	0.156	94	87

[0195]

[0196] 표 6은 25 배까지 증가하는 노즐 ID는 입자크기, 피막형성 효율 또는 siRNA 회수에 영향을 주지 않았다. 버퍼 표면에 에탄올/지질을 첨가하기 위해 사용된 노즐 구멍에 상당한 유연성이 있다. 상기 유연성은 스케일 업(scale up)하는 동안에 주요 장점을 제공할 수 있다.

표 6

노즐 (inch)	부피 평균 지름(nm)		PDI	EE [%]	siRNA 회수율(%)
	평균	SD			
0.005	105.2	5.8	0.119	98	81
0.050	100.7	11.7	0.124	96	87
0.125	109.7	13.3	0.097	96	81

[0197]

[0198] 실시예 3: 리포솜의 배치생산을 위한 참조 방법에 대한 설명된 공정의 비교

[0199] 샘플 등 미국 특허 6,858,225(Semple, et al. US Patent 6,858,225)(대조군 방법에 의해 사용된 대조군 방법 또는 대조군 조성물)에 의해 설명된 방법에 지질/핵산입자를 준비하기 위한 본 명세서에서 설명된 공정을 비교한 상기 결과는 실시예 2의 조성물에 따라 또는 대조군 방법에 의해 제조되었다.

[0200] 실시예 2의 조성물은 40:30:25:5:2의 몰라 비(molar ratio)에서 공-용해된 양이온지질, DOPE, 콜레스테롤, PEG 접합된 지질, 및 표적 지질로 구성되었다(상기 실시예 2 참조).

[0201] 대조군 조성물은 25:20:45:10의 몰라 비에서 공-용해된 DODAP, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG-CER-14로 구성되었다.

[0202] 실시예 2의 방법에서, 지질은 순수에탄올에서 4.32 mg/ml에서 용해되었고, siRNA는 50 mM 시트레이트, pH 4.5에서 0.163 mg/ml에서 용해되었다. siRNA용액은 혼합관에서 계속해서 교반하는 동안에 35 내지 40℃로 가져왔다. 그런 다음 에탄올/지질 혼합물을 매니폴드/노즐 어레이를 사용하여 siRNA를 포함하는 버퍼의 표면상에 스프레이 하였다. 최종 에탄올 농도는 35%였고 최종 지질/siRNA 비는 14:1 (wt:wt)였다. 그런 다음 얻어진 입자를 10% 에탄올에 희석하였고 10x부피의 PBS(pH 7.2)에 대하여 정용여과하였다.

[0203] 대조군 방법에서, 지질은 순수에탄올에서 25 mg/ml로 용해되었고, siRNA는 300 mM 시트레이트, pH 4.0에서 4.17 mg/ml로 용해되었다. siRNA를 포함하는 버퍼는 혼합관에서 계속해서 교반하는 동안에 상온에서 보존시켰다. 에탄올/지질 혼합물을 siRNA 로드된 리포솜을 자발적으로 형성하기 위하여 단일 노즐을 사용하여 siRNA를 포함하는 버퍼의 표면상에 스프레이 하였다. 최종 에탄올 농도는 40%였고, 최종 지질/siRNA 비는 6:1(wt:wt)이었다. 혼합 후에, 지질/siRNA 현탁액은 2개, 100 nm 폴리카보네이트 멤브린으로 제조되고 65℃에서 전-평형된 10 mL 압출기(extruder)로 옮겨졌다. 현탁액은 300 psi에서 10 통과를 사용하여 압출되었다. 얻어진 입자는 10x부피의 PBS, pH 7.2에 대하여 정용여과되었다.

[0204] 각각의 방법으로부터 얻어진 입자는 0.22  $\mu$ m 여과기를 통해서 통과되었다. 평균 입자크기, PDI, 및 EE는 본 명세서에서 설명된 바와 같이 측정되었다.

[0205] 실시예 2의 방법은 압출단계 없이 대조군 방법보다 작은 지질나노 입자를 생성한다. 대조군 방법에 의해 입자 생성의 크기는 압출 전에 측정되었다(도 4). 대조군 방법을 사용하여 NDT-0009조성물로부터 제조된 입자는 250 nm 입자보다 큰 평균 입자크기를 가진다. 압출 및 여과작용 후에 평균 입자크기가 128 nm로 감소하였다. 실시예 2의 방법은 압출 없이 150 nm보다 적은 평균 입자크기를 갖는 입자를 생성하였다. 유사한 추세는 대조군 조성물로 시작하는 것을 관찰되었다.

[0206] 실시예 2의 방법은 대조군 방법보다 siRNA를 지질나노 입자로 피막형성하는 것에 더욱 효과적이다(도 5). 실시예 2의 방법에 의해 제조된 입자의 피막형성 효율 (EE)은 대조군 방법에 의해 형성된 입자의 것보다 더 높다(두 개의 생성물에서 정용여과전에 측정됨). 실시예 2의 방법에 의해 제조된 EE 입자는 대조군 방법에 의해 형성된 입자의 것보다 더 높은 95%보다 더 높다. 대조군 방법에서, 자유 siRNA의 대다수는 최종 생성물의 EE에서 개선 결과를 나타내는 정용여과 후에 제거되었다.

[0207] 실시예 2의 방법은 대조군 방법보다 더 높은 피막형성 효율을 갖는 나노 입자를 생성한다(도 6). 두 개의 생성

물에서 정용여과 후에 측정된 것으로서, 실시예 2의 방법에 의한 siRNA의 최종 회수는 대조군 방법에 의해 얻은 것 2배 이상이었다(72% 대 33%). 상기 데이터는 실시예 2의 방법에서 압출 단계의 부족뿐만 아니라 EE에서 개선을 반영한다. 대조군 방법의 여분의 압출단계는 리포솜을 구조저공로 변화하고, 입자로부터 siRNA를 명백히 분리하기 때문에 실시예 2의 방법은 더 나은 siRNA 회수를 제공한다. 상기 결과는 본 명세서에서 설명된 방법이 150 nm보다 적은 평균 입자크기를 갖는 나노입자의 피막형성 효율 및 수율을 개선하는 동안에 대조군 방법에 비해 다수의 공정단계를 감소시켜 몇 가지 장점을 제공하는 것을 나타낸다.

#### 실시예 4: 리포솜 배치 생성물의 스케일 업 동안에 가변성 (Variability) 비교

실시예 2에서 설명된 것처럼 상기 공정은 영구적으로 전하된 (HEDC) 양이온지질 및 이온화 (S104) 양이온지질분자의 혼합이 포함된 다른 지질 조성물로 수행되었다. HEDC, S104, DOPE, 콜레스테롤, PEG-BML, 및 diVA-PEG750-diVA는 순수에탄올에 20:20:30:25:5:2의 몰라 비로 용해되었다. 다른 siRNA 분자를 스케일 업하는 동안에, 다른 배치 부피, 및 다른 siRNA (약물)/지질 비를 평가하였다. 표 7은 조건의 범위로부터 원인이 되는 나노 입자의 성질 결과를 요약한다.

표 7

배스 부피 [L]	약물 지질	약물/지질 (wt/wt)	입자 사이즈 (nm)	PDI	EE [%]	생산물 수율 siRNA 회수율(%)
5	siRNA 1	0.07	93	0.14	97%	>90%
20	siRNA 1	0.07	83	0.15	95%	>90%
20	Empty Liposomes (no siRNA)	na	83	0.14	na	na
20	siRNA 2	0.11	90	0.16	92%	>90%
50	siRNA 2	0.07	82	0.14	94%	>90%
120	Empty Liposomes (no siRNA)	na	86	0.14	na	na
120	siRNA 2	0.11	82	0.14	94%	>90%
200	siRNA 1	0.07	86	0.17	94%	>90%
200	siRNA 2	0.07	86	0.17	96%	>90%

상기 결과는 본 명세서에서 설명된 방법이 꽤 강건함을 나타낸다. 유사한 입자크기 및 PDI는 50배 범위 기간을 스케일 업 동안에 얻었다. 입자크기는 >90% 생성물 수율로, 시종일관 100 nm보다 적다. 다분산 지수 값은 매우 적은 범위이고, 이는 거의 소포체(vesicles)의 단분산 집단을 나타낸다.

#### 실시예 5: 제제를 포함하는 수크로오스를 위한 리포솜 배치 생성물의 스케일 업 동안 가변성 비교

실시예 2에서 설명된 공정은 20:20:30:25:5:2 몰라 비로 에탄올에 용해된 HEDC, S104, DOPE, 콜레스테롤, PEG-BML, 및 diVA-PEG750-diVA로 수행되었다. 수크로오스는 본 명세서에서 설명된 것처럼 소포체의 제조에 포함되었다. 다른 배치 부피는 평가되었고 냉동-해동에 대상이었다. 표 8은 조건의 범위로부터 원인이 되는 나노 입자의 성질 결과를 요약한다.

표 8

반 단일 사용 제조 트레인을 이용한 냉동(수크로스 포함) 제형 제조									
배스 부피 [L]	약물 지질	약물/지질 [wt/wt]	냉동 전			해동 후			생산물 수율 siRNA 회수율(%)
			사이즈 (nm)	PDI	EE [%]	사이즈 (nm)	PDI	EE [%]	
5	siRNA 2	0.11	94	0.12	95	96	0.14	93	>90%
20	siRNA 2	0.11	98	0.15	94	97	0.16	90	>90%
120	siRNA 2	0.11	96	0.14	90	96	0.14	89	>90%
120	siRNA 2	0.11	97	0.15	91	99	0.15	89	>90%
120	siRNA 2	0.11	100	0.15	91	tbd	tbd	tbd	>90%

상기 결과는 냉동 해동은 지질 나노입자의 성질을 변화하지 않는다. 또한 결과는 배치(batches) 사이에 가변성

이 때 낮고 상기 공정은 재생가능적으로 균일한 나노입자를 생성한다는 것을 나타냈다.

[0216]

조건은 동결건조에 의해 약물:지질입자의 안정화를 수립하였다. 실시예 2에 따라 제조된 약물:지질입자는 활성의 손실 없이 동결건조될 수 있다. 약물:지질입자가 형성된 스크로오스의 최종농도는 8% (w/v)였다. 동결건조된 제조는 증류수에 첨가하여 재구성되고 i.v. 주사 후에 마우스의 폐에 자체의 형질감염 활성을 측정하였다. 재구성된 제조를 냉동 및 해동하는 것은 활성에 영향을 주지 않았다. 표 9에서 나타낸 결과는 본 명세서에서 설명된 방법을 사용하여 제조된 입자가 동결건조 동안에 자체의 성질을 보존하고, 따라서 안정적임을 나타낸다. 특히, 입자크기는 동결건조 전, 동안, 및 후에 안정되고 보존된다.

표 9

반 단일 사용 제조 트레인을 이용한 동결건조(수크로스 포함) 제형 제조											
배스 부피(L)	약물/지질	약물/지질 (wt/wt)	냉동 전			해동 후			동결건조 후 + 재구성		
			사이즈 (nm)	PDI	EE (%)	사이즈 (nm)	PDI	EE (%)	사이즈 (nm)	PDI	EE (%)
20	siRNA2	0.11	98	0.15	94	97	0.16	90	115	0.15	93

[0217]

[0218]

입자의 안정성은 지질 조성물, 지질:RNA(w:w) 값, 및 제제에서 사용된 다당류의 선택의 기능성이다. 생체 내에서 높은 생물활성을 나타내는 지질:RNA 복합체의 안정적인 제제를 생성하기 위한 본 명세서에서 설명된 방법적 접근은 약학적으로 허용가능한 제조를 수립하는 장점을 수여하므로, 리포좀 기반 RNA 운반을 용이하게 한다.

[0219]

#### 실시예 6: 지질의 침하된 주사(Submerged injection of Lipid)

[0220]

실시예 2에서 설명된 것과 같은 공정은 침하된 주사를 사용하여 소포체 제조에 의해 변형되어 수행되었다. HEDC, S104, DOPE, 콜레스테롤, PEG-BML, 및 diVA-PEG750-diVA를 20:20:30:25:5:2의 몰라 비로 에탄올에 용해되었다. 표 10은 표면 첨가공정과 비교하여 침하 첨가공정으로부터 원인이 되는 나노입자 특징을 나타낼 수 있는 결과를 요약한다. 결과는 지질이 침하된 주사에 의해 수성층에 첨가될 때 평균 입자크기가 상당히 감소하는 놀랍고 예상치 못한 결과를 나타낸다.

표 10

반 단일 사용 제조 트레인을 이용한 액체 제형 제조							
배스 부피	약물/지질		추가 방법	입자 사이즈		EE	생산물 수율 siRNA 회수율(%)
[L]	약물 기질	[wt/wt]		평균(nm)	PDI	(%)	
5	siRNA 1	0.07	Surface	93	0.136	97	>90%
5	siRNA 1	0.07	Submerged	57	0.104	97	>90%

반 단일 사용 제조 트레인을 이용한 냉동(수크로스 포함) 제형 제조							
배스 부피	약물/지질		추가 방법	입자 사이즈		EE	생산물 수율 siRNA 회수율(%)
[L]	약물 기질	[wt/wt]		평균(nm)	PDI	(%)	
5	siRNA 1	0.11	Surface	94	0.119	95	>90%
1	siRNA 1	0.11	Submerged	63	0.102	95	>90%

[0221]

[0222]

동일한 공정방법은 버퍼에 있는 수크로오스를 포함하는 리포좀을 제조하기 위해 사용되었다. 표 11는 다른 첨가 시간으로부터 원인이 되는 나노 입자를 특징으로 하는 결과를 요약하고 표 12은 침하 첨가와 비교하여 표면 을 사용하여 제조된 나노입자의 특징으로 하는 결과를 요약한다.

표 11

반 단일 사용 제조 트레인을 이용한 액체 제형 제조

추가 시간 (min)	추가방법	입자 사이즈		EE [%]	생산물 수율 siRNA 회수율(%)
		평균 [nm]	PDI		
0.5	Submerged	66	0.140	90	>90%
2.0	Submerged	93	0.112	94	>90%
5.0	Submerged	99	0.133	92	>90%
10	Submerged	98	0.137	91	>90%

[0223]

표 12

반 단일 사용 제조 트레인을 이용한 액체 제형 제조

배스 부피 [L]	추가 시간 (min)	추가방법	입자 사이즈		EE [%]	생산물 수율 siRNA 회수율(%)
			평균 [nm]	PDI		
5	15	Surface	93	0.136	95	>90%
1	1.5	Submerged	63	0.102	95	>90%

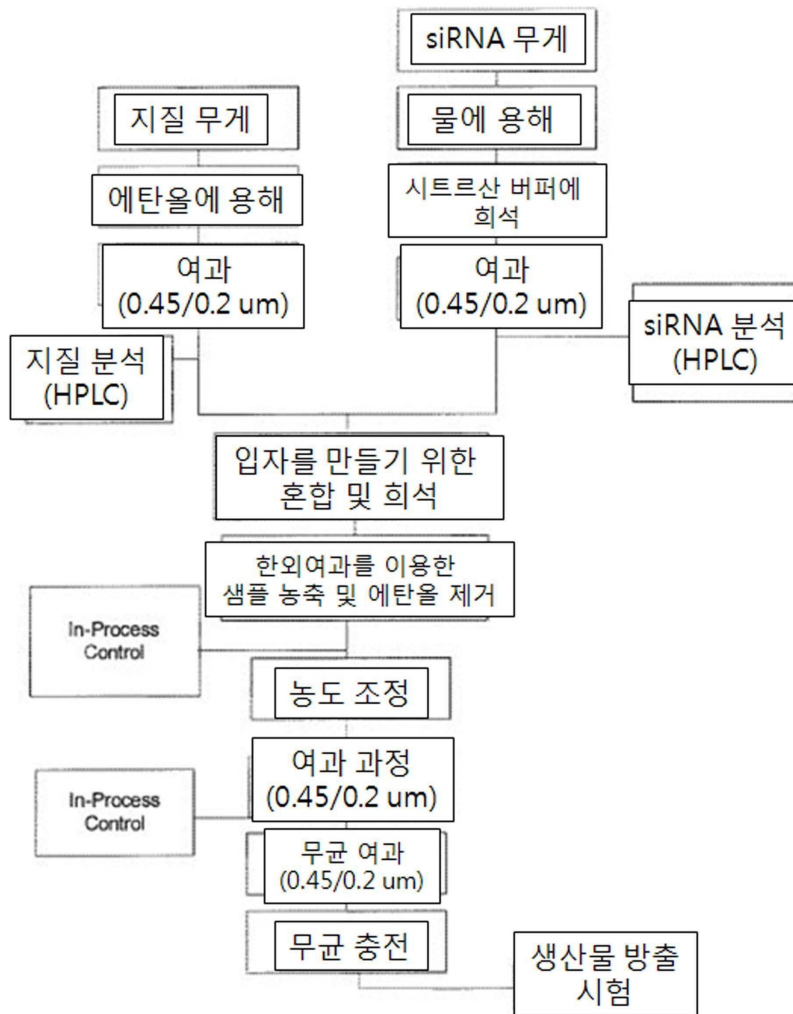
[0224]

[0225]

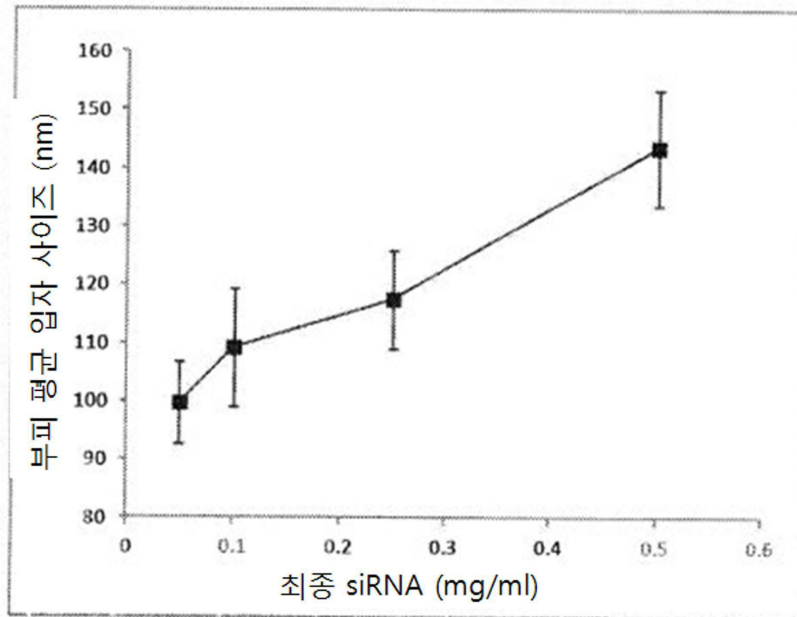
상기 결과는 지질이 2 분 보다 적은 첨가 시간으로 침하 주사에 의해 수성층에 첨가될 때 평균 입자크기가 상당히 감소하는 놀랍고 예상치 못한 결과를 나타낸다. 또한 결과는 지질이 침하 주사에 의해 수성층에 첨가될 때 평균 입자크기가 상당히 감소하는 놀라운 결과를 나타낸다.

도면

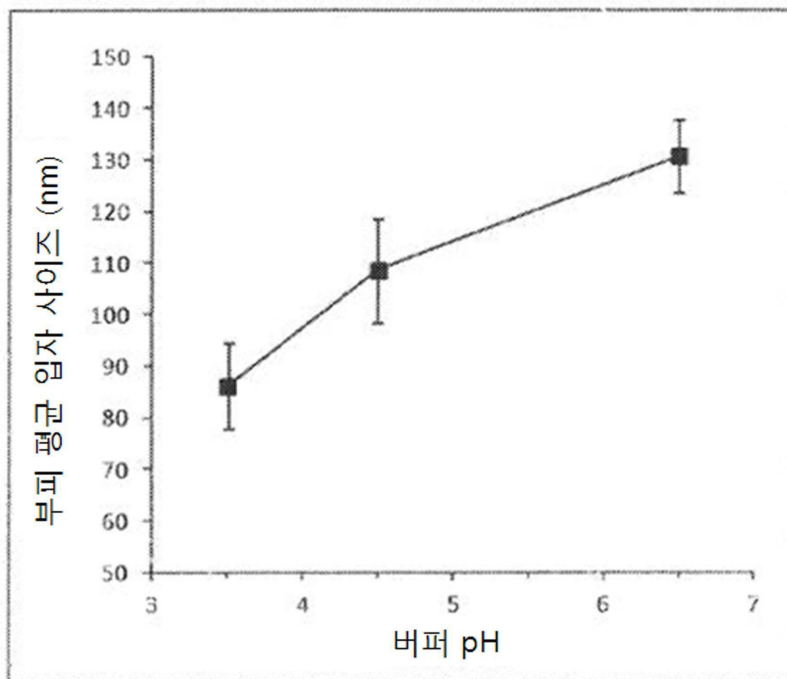
도면1



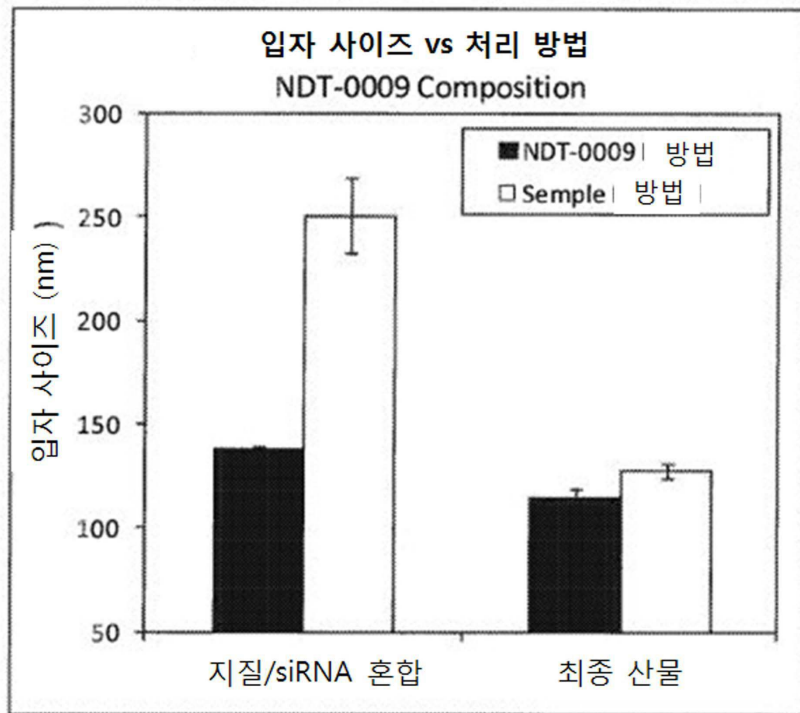
도면2



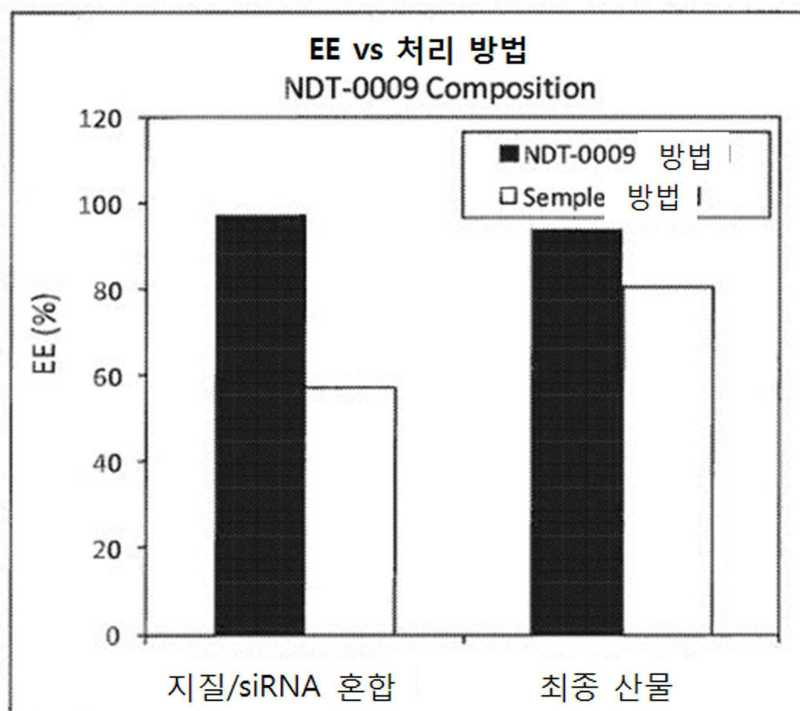
도면3



도면4



도면5



도면6

