

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2013-0124308 (43) 공개일자 2013년11월13일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) <i>C07C 229/12</i> (2006.01) <i>A61K 48/00</i> (2006.01) <i>A61K 47/44</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2013-7009957 (22) 출원일자(국제) 2011년10월17일 심사청구일자 없음 (85) 번역문제출일자 2013년04월19일 (86) 국제출원번호 PCT/US2011/056502 (87) 국제공개번호 WO 2012/054365 국제공개일자 2012년04월26일 (30) 우선권주장 61/405,413 2010년10월21일 미국(US)		(71) 출원인 머크 샤프 앤드 돔 코퍼레이션 미국 뉴저지 (우편번호 07065-0907) 라웨이 이스 트 링컨 애비뉴 126 (72) 발명자 콜레티, 스티븐, 엘. 미국 19486 펜실베이니아 웨스트 포인트 섬니타운 파이크 770 스텐튼, 매튜, 지. 미국 19486 펜실베이니아 웨스트 포인트 섬니타운 파이크 770 (74) 대리인 심미성, 양영준, 양영환

전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **올리고뉴클레오타이드 전달을 위한 신규 저분자량 양이온성 지질**

(57) 요약

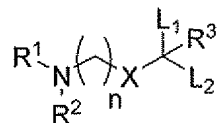
본 발명은 올리고뉴클레오타이드를 가진 지질 나노입자를 형성하기 위해 콜레스테롤 및 PEG-지질과 같은 다른 지질 성분과 조합하여 사용될 수 있는 신규의 양이온성 지질을 제공한다. 본 발명의 목적은 간에서 낮은 지질 수준의 결과로서 낮은 간 독성과 함께 향상된 효능을 나타내는 양이온성 지질 스캐폴드를 제공하는 것이다. 본 발명은 적어도 하나의 지질 단쇄를 포함하는 저분자량 양이온성 지질을 이용하여 siRNA의 생체내 전달의 효율 및 허용성을 증진시킨다.

특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식 A의 양이온성 지질 또는 그의 임의의 제약상 허용되는 염 또는 입체이성질체.

<화학식 A>



상기 식에서,

R^1 및 R^2 는 H, (C_1-C_6) 알킬, 헤테로시클릴 및 폴리아민으로부터 독립적으로 선택되고, 여기서 상기 알킬, 헤테로시클릴 및 폴리아민은 R' 로부터 선택된 1 내지 3개의 치환기로 임의로 치환되거나, 또는 R^1 및 R^2 는 이들이 부착된 질소와 함께 취해져, 질소에 더하여 N, O 및 S로부터 선택된 1 또는 2개의 추가의 헤테로원자를 임의로 함유하는 4-7원 모노시클릭 헤테로사이클을 형성할 수 있고, 상기 모노시클릭 헤테로사이클은 R' 로부터 선택된 1 내지 3개의 치환기로 임의로 치환되고;

R^3 은 H 및 (C_1-C_6) 알킬로부터 선택되고, 상기 알킬은 R' 로부터 선택된 1 내지 3개의 치환기로 임의로 치환되고;

R' 는 할로젠, R'' , OR'' , SR'' , CN , CO_2R'' 또는 $CON(R'')_2$ 로부터 독립적으로 선택되고;

R'' 는 H 및 (C_1-C_6) 알킬로부터 독립적으로 선택되고, 여기서 상기 알킬은 할로젠 및 OH로 임의로 치환되고;

n 은 0, 1, 2, 3, 4 또는 5이고;

X 는 O, NR'' , $(C=O)O$, $NR''(C=O)$, $O(C=O)O$, $NR''(C=O)NR''$, $O(C=O)NR''$ 및 $NR''(C=O)O$ 로부터 선택되고;

L_1 은 C_4-C_{24} 알킬 및 C_4-C_{24} 알케닐로부터 선택되고, 상기 알킬 및 알케닐은 R' 로부터 선택된 하나 이상의 치환기로 임의로 치환되고;

L_2 는 C_3-C_9 알킬 및 C_3-C_9 알케닐로부터 선택되고, 상기 알킬 및 알케닐은 R' 로부터 선택된 하나 이상의 치환기로 임의로 치환된다.

청구항 2

제1항에 있어서,

R^1 및 R^2 가 각각 메틸이고;

R^3 이 H이고;

n 이 3이고;

X 가 $(C=O)O$ 이고;

L_1 이 C_4-C_{24} 알킬 및 C_4-C_{24} 알케닐로부터 선택되고;

L_2 가 C_3-C_9 알킬 및 C_3-C_9 알케닐로부터 선택된 것인

화학식 A의 양이온성 지질 또는 그의 임의의 제약상 허용되는 염 또는 입체이성질체.

청구항 3

(20Z,23Z)-노나코사-20,23-디엔-10-일 4-(디메틸아미노)부타노에이트 (화합물 1); 및

(18Z)-헵타코스-18-엔-10-일 4-(디메틸아미노)부타노에이트 (화합물 2)

인 양이온성 지질 또는 그의 임의의 제약상 허용되는 염 또는 입체이성질체.

청구항 4

지질 나노입자의 제조를 위한 제1항에 따른 양이온성 지질의 용도.

청구항 5

올리고뉴클레오타이드의 전달을 위한 지질 나노입자에서의 성분으로서의 제1항에 따른 양이온성 지질의 용도.

청구항 6

제5항에 있어서, 올리고뉴클레오타이드가 siRNA 또는 miRNA인 용도.

청구항 7

제5항에 있어서, 올리고뉴클레오타이드가 siRNA인 용도.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 올리고뉴클레오타이드를 가진 지질 나노입자를 형성하기 위해, 세포 흡수 및 엔도솜 방출을 촉진하기 위해, 그리고 시험관내 및 생체내 둘 모두에서 표적 mRNA를 녹다운(knockdown)하기 위해, 콜레스테롤 및 PEG-지질과 같은 다른 지질 성분과 조합하여 사용될 수 있는 신규의 양이온성 지질에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 양이온성 지질 및, 올리고뉴클레오타이드, 특히 siRNA 및 miRNA의 전달을 위해 지질 나노입자에서 양이온성 지질의 사용이 이전에 공개되었다. 지질 나노입자 및 올리고뉴클레오타이드, 특히 siRNA 및 miRNA의 전달을 위한 지질 나노입자의 사용이 이전에 공개되었다. 올리고뉴클레오타이드 (siRNA 및 miRNA 포함) 및 올리고뉴클레오타이드의 합성이 이전에 공개되었다. (미국 특허 출원: US 2006/0083780, US 2006/0240554, US 2008/0020058, US 2009/0263407 및 US 2009/0285881 및 PCT 특허 출원: WO 2009/086558, WO 2009/127060, WO 2009/132131, WO 2010/042877, WO 2010/054384, WO 2010/054401, WO 2010/054405, WO 2010/054406 및 WO 2010/105209 참조). 또한 문헌 [Semple S. C. et al., Rational design of cationic lipids for siRNA delivery, Nature Biotechnology, 2010년 1월 17일 온라인 발표; doi:10.1038/nbt.1602] 참조.

[0003] 다른 양이온성 지질은 미국 특허 출원: US 2009/0263407, US 2009/0285881, US 2010/0055168, US 2010/0055169, US 2010/0063135, US 2010/0076055, US 2010/0099738 및 US 2010/0104629에 개시되어 있다.

[0004] 또한, 양이온성 지질 DLin-M-C3-DMA (즉, (6Z,9Z,28Z,31Z)-헵타트리아콘타-6,9,28,31-테트라엔-19일-4-(디메틸아미노)부타노에이트)는 WO 2010/105209에 개시되어 있다.

[0005] CLinDMA 및 DLinDMA와 같은 전통적인 양이온성 지질은 간으로 siRNA 전달을 위해 이용되어 왔으나, 고 용량에서 간 독성과 함께 비-최적 전달 효율을 겪는다. 본 발명의 목적은 간에서 낮은 지질 수준의 결과로서 낮은 간 독성과 함께 향상된 효능을 나타내는 양이온성 지질 스캐폴드를 제공하는 데 있다. 본 발명은 siRNA의 생체내 전달의 효율 및 허용성을 증진시키기 위하여 적어도 하나의 지질 단쇄를 포함하는 저분자량 양이온성 지질을 이용한다.

발명의 내용

[0006] 발명의 개요

[0007] 본 발명은 올리고뉴클레오타이드를 가진 지질 나노입자를 형성하기 위해 콜레스테롤 및 PEG-지질과 같은 다른 지질 성분과 조합하여 사용될 수 있는 신규의 양이온성 지질을 제공한다. 본 발명의 목적은, 간에서 낮은 지질 수준의 결과로서 낮은 간 독성과 함께 향상된 효능을 나타내는 양이온성 지질 스캐폴드를 제공하는 데 있다. 본 발명은 siRNA의 생체내 전달의 효율 및 허용성을 증진시키기 위해 하나의 지질 단쇄를 가진 저분자량 양이온

성 지질을 이용한다.

도면의 간단한 설명

도 1: 마우스에서 LNP (화합물 1) 효능.

도 2: 래트에서 LNP (화합물 2) 효능.

도 3: 래트 간에서 지질 (화합물 2) 수준.

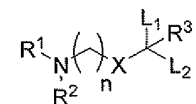
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

본 발명의 다양한 측면 및 실시양태는 올리고뉴클레오타이드, 특히 siRNA 및 miRNA를 임의의 표적 유전자에 전달하기 위해 지질 나노입자에서 유용한 신규의 양이온성 지질의 용도에 관한 것이다 (미국 특허 출원: US 2006/0083780, US 2006/0240554, US 2008/0020058, US 2009/0263407 및 US 2009/0285881, 및 PCT 특허 출원: WO 2009/086558, WO 2009/127060, WO 2009/132131, WO 2010/042877, WO 2010/054384, WO 2010/054401, WO 2010/054405, WO 2010/054406 및 WO 2010/105209 참조). 또한, 문헌 [Semple S. C. et al., Rational design of cationic lipids for siRNA delivery, Nature Biotechnology, 2010년 1월 17일 온라인 발표; doi:10.1038/nbt.1602] 참조.

본 발명의 양이온성 지질은 올리고뉴클레오타이드, 특히 siRNA 및 miRNA의 전달을 위해 지질 나노입자에서 유용한 성분이다.

본 발명의 첫 번째 실시양태에서, 양이온성 지질은 하기 화학식 A로 예시되거나 또는 그의 임의의 제약상 허용되는 염 또는 입체이성질체이다.

<화학식 A>



상기 식에서,

R^1 및 R^2 는 H, (C_1-C_6) 알킬, 헤테로시클릴 및 폴리아민으로부터 독립적으로 선택되고, 여기서 상기 알킬, 헤테로시클릴 및 폴리아민은 R' 로부터 선택된 1 내지 3개의 치환기로 임의로 치환되거나, 또는 R^1 및 R^2 는 이들이 부착된 질소와 함께 취해져, 질소에 더하여 N, O 및 S로부터 선택된 1 또는 2개의 추가의 헤테로원자를 임의로 함유하는 4-7원 모노시클릭 헤테로사이클을 형성할 수 있고, 상기 모노시클릭 헤테로사이클은 R' 로부터 선택된 1 내지 3개의 치환기로 임의로 치환되고;

R^3 은 H 및 (C_1-C_6) 알킬로부터 선택되고, 상기 알킬은 R' 로부터 선택된 1 내지 3개의 치환기로 임의로 치환되고;

R' 는 할로젠, R'' , OR'' , SR'' , CN , CO_2R'' 및 $CON(R'')_2$ 로부터 독립적으로 선택되고,

R'' 는 H 및 (C_1-C_6) 알킬로부터 독립적으로 선택되고, 여기서 상기 알킬은 할로젠 및 OH로 임의로 치환되고;

n 은 0, 1, 2, 3, 4 또는 5이고;

X 는 O, NR'' , $(C=O)O$, $NR''(C=O)$, $O(C=O)O$, $NR''(C=O)NR''$, $O(C=O)NR''$ 및 $NR''(C=O)O$ 로부터 선택되고;

L_1 은 C_4-C_{24} 알킬 및 C_4-C_{24} 알케닐로부터 선택되고, 상기 알킬 및 알케닐은 R' 로부터 선택된 하나 이상의 치환기로 임의로 치환되고;

L_2 는 C_3-C_9 알킬 및 C_3-C_9 알케닐로부터 선택되고, 상기 알킬 및 알케닐은 R' 로부터 선택된 하나 이상의 치환기로 임의로 치환된다.

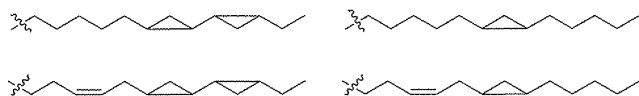
두 번째 실시양태에서, 본 발명은

- [0024] R^1 및 R^2 가 각각 메틸이고;
- [0025] R^3 이 H이고;
- [0026] n이 3이고;
- [0027] X가 (C=O)O이고;
- [0028] L_1 이 C_4-C_{24} 알킬 및 C_4-C_{24} 알케닐로부터 선택되고;
- [0029] L_2 가 C_3-C_9 알킬 및 C_3-C_9 알케닐로부터 선택된 것인
- [0030] 화학식 A를 갖는 화합물 또는 그의 임의의 제약상 허용되는 염 또는 입체이성질체를 특징으로 한다.
- [0031] 특정한 양이온성 지질은 다음과 같다:
- [0032] (20Z,23Z)-노나코사-20,23-디엔-10-일 4-(디메틸아미노)부타노에이트 (화합물 1); 및
- [0033] (18Z)-헵타코스-18-엔-10-일 4-(디메틸아미노)부타노에이트 (화합물 2)
- [0034] 또는 그의 임의의 제약상 허용되는 염 또는 입체이성질체.
- [0035] 다른 실시양태에서, 개시된 양이온성 지질은 지질 나노입자의 제조에서 유용하다.
- [0036] 다른 실시양태에서, 개시된 양이온성 지질은 올리고뉴클레오타이드의 전달을 위한 지질 나노입자에서 유용한 성분이다.
- [0037] 다른 실시양태에서, 개시된 양이온성 지질은 siRNA 및 miRNA의 전달을 위한 지질 나노입자에서 유용한 성분이다.
- [0038] 다른 실시양태에서, 개시된 양이온성 지질은 siRNA의 전달을 위한 지질 나노입자에서 유용한 성분이다.
- [0039] 본 발명의 양이온성 지질은 비대칭 중심, 키랄 축 및 키랄 면을 가질 수도 있고 (문헌 [E.L. Eliel and S.H. Wilen, Stereochemistry of Carbon Compounds, John Wiley & Sons, New York, 1994, pages 1119-1190])에 기재됨), 본 발명에 포함되는 광학 이성질체를 포함한 모든 가능한 이성질체 및 혼합물과 함께, 라세미체, 라세미 혼합물로서 그리고 개개의 부분입체이성질체로서 발생한다. 추가로, 본원에 개시된 양이온성 지질은 호변이성질체로서 존재할 수도 있고, 단지 하나의 호변이성질체 구조가 묘사되긴 하지만 두 호변이성질체 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 의도된다.
- [0040] 본 발명의 양이온성 지질 위의 치환기 및 치환 패턴은, 화학적으로 안정하고, 쉽게 입수가 가능한 출발 물질로부터 당업계에 공지된 기술 뿐만 아니라 하기 개시된 방법에 의해 쉽게 합성될 수 있는 양이온성 지질을 제공하기 위하여, 당업자에 의해 선택될 수 있는 것으로 이해된다. 치환기가 하나 초과인 기로 그 자체로 치환된다면, 안정한 구조가 얻어지는 한, 동일한 탄소 위 또는 상이한 탄소 위에서 다수의 기가 존재할 수 있는 것으로 이해된다.
- [0041] 화학적으로 안정하고 쉽게 입수가 가능한 출발 물질로부터 당업계에 공지된 기술에 의해 쉽게 합성될 수 있는 양이온성 지질을 제공하기 위하여, 당업자에 의해 하나 이상의 Si 원자가 본 발명의 양이온성 지질에 혼입될 수 있는 것으로 이해된다.
- [0042] 화학식 A의 화합물에서, 원자는 그들의 천연 동위원소 존재비를 나타낼 수도 있거나, 또는 원자의 하나 이상이 동일한 원자번호를 갖지만 천연에서 주로 발견되는 원자질량 또는 질량수와 상이한 원자질량 또는 질량수를 가진 특정한 동위원소가 인위적으로 풍부하게 될 수도 있다. 본 발명은 화학식 A의 화합물의 모든 적절한 동위원소 변형을 포함하는 것으로 의도된다. 예를 들어, 수소(H)의 상이한 동위원소 형태는 경수소(^1H) 및 중수소(^2H)를 포함한다. 경수소는 천연에서 발견되는 주된 수소 동위원소이다. 중수소의 농축은 특정한 치료적 장점, 예컨대 생체내 반감기의 증가 또는 투여량 요건의 감소를 제공할 수도 있거나, 또는 생물학적 샘플의 특징결정을 위한 표준으로서 유용한 화합물을 제공할 수도 있다. 화학식 A 내의 동위원소-농축된 화합물은, 당업자에게 알려진 통상적인 기술에 의해, 또는 적절한 동위원소-농축된 시약 및/또는 중간체를 사용하여 본원에서 반응식 및 실시예에 기재된 것과 유사한 방법에 의해, 과도한 실험 없이 제조될 수도 있다.
- [0043] 본원에서 사용된 "알킬"은 특정한 수의 탄소 원자를 가진 직쇄, 시클릭 또는 분지형 포화 지방족 탄화수소를 의

미한다.

[0044] 본원에서 사용된 "알케닐"은 이에 한정되지 않지만 디엔, 트리엔 및 테트라엔 불포화 지방족 탄화수소를 포함한, 특정한 수의 탄소 원자를 가진 직쇄, 시클릭 또는 분지형 불포화 지방족 탄화수소를 의미한다.

[0045] 시클릭 "알킬" 또는 "알케닐"의 예는 다음과 같다.



[0046]

[0047] 본원에서 사용된 "헤테로시클릴" 또는 "헤테로사이클"은 O, N 및 S로 이루어진 군에서 선택된 1 내지 4개의 헤테로원자를 함유하는 4- 내지 10-원 방향족 또는 비방향족 헤테로사이클을 의미하며, 비시클릭기를 포함한다. 따라서 "헤테로시클릴"은 다음을 포함한다: 벤조이미다졸릴, 벤조푸라닐, 벤조푸라자닐, 벤조피라졸릴, 벤조트리아졸릴, 벤조티오펜릴, 벤조사졸릴, 카르바졸릴, 카르볼리닐, 신놀리닐, 푸라닐, 이미다졸릴, 인돌리닐, 인돌릴, 인돌라지닐, 인다졸릴, 이소벤조푸라닐, 이소인돌릴, 이소퀴놀릴, 이소티아졸릴, 이속사졸릴, 나프트피리디닐, 옥사디아졸릴, 옥사졸릴, 옥사졸린, 이속사졸린, 옥세타닐, 피라닐, 피라지닐, 피라졸릴, 피리다지닐, 피리도피리디닐, 피리다지닐, 피리딜, 피리미딜, 피롤릴, 퀴나졸리닐, 퀴놀릴, 퀴녹살리닐, 테트라히드로피라닐, 테트라졸릴, 테트라졸로피리딜, 티아디아졸릴, 티아졸릴, 티에닐, 트리아졸릴, 아제티디닐, 1,4-디옥사닐, 헥사히드로아제피닐, 피페라지닐, 피페리디닐, 피롤리디닐, 모르폴리닐, 티오모르폴리닐, 디히드로벤조이미다졸릴, 디히드로벤조푸라닐, 디히드로벤조티오펜릴, 디히드로벤조사졸릴, 디히드로푸라닐, 디히드로이미다졸릴, 디히드로인돌릴, 디히드로이소옥사졸릴, 디히드로이소티아졸릴, 디히드로옥사디아졸릴, 디히드로옥사졸릴, 디히드로피라지닐, 디히드로피라졸릴, 디히드로피리디닐, 디히드로피리미디닐, 디히드로피롤릴, 디히드로퀴놀리닐, 디히드로테트라졸릴, 디히드로티아디아졸릴, 디히드로티아졸릴, 디히드로티에닐, 디히드로트리아졸릴, 디히드로아제티디닐, 메틸렌디옥시벤조일, 테트라히드로푸라닐 및 테트라히드로티에닐, 및 이들의 N-옥시드 (이들은 모두 R"로부터 선택된 1 내지 3개의 치환기로 임의로 치환됨).

[0048] 본원에서 사용된 "폴리아민"은 2 이상의 아미노 기를 가진 화합물을 의미한다. 그의 예는 푸트레신, 카다베린, 스페르미딘 및 스페르민을 포함한다.

[0049] 본원에서 사용된 "할로겐"은 Br, Cl, F 및 I를 의미한다.

[0050] 화학식 A의 실시양태에서, R¹ 및 R²는 H 및 (C₁-C₆)알킬로부터 독립적으로 선택되고, 여기서 상기 알킬은 R'로부터 선택된 1 내지 3개의 치환기로 임의로 치환되거나, 또는 R¹ 및 R²는 이들이 부착된 질소와 함께 취해져, 질소에 추가로 N, O 및 S로부터 선택된 1 또는 2개의 추가의 헤테로원자를 임의로 함유하는 4-7원 모노시클릭 헤테로사이클을 형성할 수 있고, 상기 모노시클릭 헤테로사이클은 R'로부터 선택된 1 내지 3개의 치환기로 임의로 치환된다.

[0051] 화학식 A의 실시양태에서, R¹ 및 R²는 H, 메틸, 에틸 및 프로필로부터 독립적으로 선택되고, 여기서 상기 메틸, 에틸 및 프로필은 R'로부터 선택된 1 내지 3개의 치환기로 임의로 치환되거나, 또는 R¹ 및 R²는 이들이 부착된 질소와 함께 취해져, 질소에 추가로 N, O 및 S로부터 선택된 1 또는 2개의 추가의 헤테로원자를 임의로 함유하는 4-7원 모노시클릭 헤테로사이클을 형성할 수 있고, 상기 모노시클릭 헤테로사이클은 R'로부터 선택된 1 내지 3개의 치환기로 임의로 치환된다.

[0052] 화학식 A의 실시양태에서, R¹ 및 R²는 H, 메틸, 에틸 및 프로필로부터 독립적으로 선택된다.

[0053] 화학식 A의 실시양태에서, R¹ 및 R²는 각각 메틸이다.

[0054] 화학식 A의 실시양태에서, R³은 독립적으로 H 및 메틸로부터 선택된다.

[0055] 화학식 A의 실시양태에서, R³은 H이다.

[0056] 화학식 A의 실시양태에서, R'는 R"이다.

[0057] 화학식 A의 실시양태에서, R"는 H, 메틸, 에틸 및 프로필로부터 독립적으로 선택되고, 여기서 상기 메틸, 에틸

및 프로필은 하나 이상의 할로젠 및 OH로 임의로 치환된다.

[0058] 화학식 A의 실시양태에서, R"는 H, 메틸, 에틸 및 프로필로부터 독립적으로 선택된다.

[0059] 화학식 A의 실시양태에서, n은 0, 1, 2, 3 또는 4이다.

[0060] 화학식 A의 실시양태에서, n은 2, 3 또는 4이다.

[0061] 화학식 A의 실시양태에서, n은 3이다.

[0062] 화학식 A의 실시양태에서, X는 O, NR", (C=O)O, NR"(C=O), O(C=O)O, NR"(C=O)NR", O(C=O)NR", 또는 NR"(C=O)O이다.

[0063] 화학식 A의 실시양태에서, X는 (C=O)O이다.

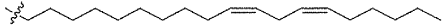
[0064] 화학식 A의 실시양태에서, L₁은 C₄-C₂₄ 알킬 및 C₄-C₂₄ 알케닐로부터 선택되고, 할로젠 및 OH로 임의로 치환된다.

[0065] 화학식 A의 실시양태에서, L₁은 C₄-C₂₄ 알킬 및 C₄-C₂₄ 알케닐로부터 선택된다.

[0066] 화학식 A의 실시양태에서, L₁은 C₄-C₂₄ 알케닐로부터 선택된다.

[0067] 화학식 A의 실시양태에서, L₁은 C₁₂-C₂₄ 알케닐로부터 선택된다.

[0068] 화학식 A의 실시양태에서, L₁은 C₁₉ 알케닐이다.

[0069] 화학식 A의 실시양태에서, L₁은  이다.

[0070] 화학식 A의 실시양태에서, L₁은  이다.

[0071] 화학식 A의 실시양태에서, L₂는 C₃-C₉ 알킬 및 C₃-C₉ 알케닐로부터 선택되고, 이는 할로젠 및 OH로 임의로 치환된다.

[0072] 화학식 A의 실시양태에서, L₂는 C₅-C₉ 알킬 및 C₅-C₉ 알케닐로부터 선택되고, 이는 할로젠 및 OH로 임의로 치환된다.

[0073] 화학식 A의 실시양태에서, L₂는 C₇-C₉ 알킬 및 C₇-C₉ 알케닐로부터 선택되고, 이는 할로젠 및 OH로 임의로 치환된다.

[0074] 화학식 A의 실시양태에서, L₂는 C₃-C₉ 알킬 및 C₃-C₉ 알케닐로부터 선택된다.

[0075] 화학식 A의 실시양태에서, L₂는 C₅-C₉ 알킬 및 C₅-C₉ 알케닐로부터 선택된다.

[0076] 화학식 A의 실시양태에서, L₂는 C₇-C₉ 알킬 및 C₇-C₉ 알케닐로부터 선택된다.

[0077] 화학식 A의 실시양태에서, L₂는 C₃-C₉ 알킬이다.

[0078] 화학식 A의 실시양태에서, L₂는 C₅-C₉ 알킬이다.

[0079] 화학식 A의 실시양태에서, L₂는 C₇-C₉ 알킬이다.

[0080] 화학식 A의 실시양태에서, L₂는 C₉ 알킬이다.

[0081] 화학식 A의 실시양태에서, "헤테로시클릴"은 피롤리딘, 피페리딘, 모르폴린, 이미다졸 또는 피페라진이다.

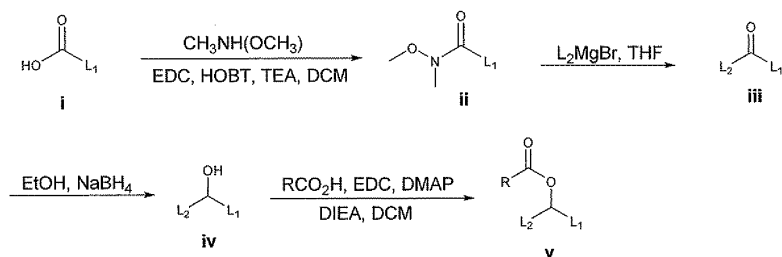
[0082] 화학식 A의 실시양태에서, "모노시클릭 헤테로시클릴"은 피롤리딘, 피페리딘, 모르폴린, 이미다졸 또는 피페라진이다.

[0083] 화학식 A의 실시양태에서, "폴리아민"은 푸트레신, 카다베린, 스페르미딘 또는 스페르민이다.

[0084] 실시양태에서, "알킬"은 특정한 수의 탄소 원자를 가진 직쇄 포화 지방족 탄화수소이다.

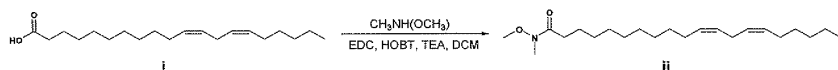
- [0085] 실시양태에서, "알케닐"은 특정한 수의 탄소 원자를 가진 직쇄 불포화 지방족 탄화수소이다.
- [0086] 화학식 A의 양이온성 지질의 유리 형태 뿐만 아니라 그의 제약상 허용되는 염 및 입체이성질체가 본 발명에 포함된다. 본원에 예시된 단리된 특정한 양이온성 지질의 일부는 아민 양이온성 지질의 양성자와 염이다. 용어 "유리 형태"란 비-염 형태의 아민 양이온성 지질을 가리킨다. 포함되는 제약상 허용되는 염은 본원에 기재된 특정한 양이온성 지질을 위해 예시된 단리된 염 뿐만 아니라, 화학식 A의 양이온성 지질의 유리 형태의 모든 전형적인 제약상 허용되는 염을 포함한다. 기재된 특정한 염 양이온성 지질의 유리 형태를 당업계에 공지된 기술을 사용하여 단리할 수 있다. 예를 들어, 염을 적절한 묶은 염기 수용액, 예컨대 묶은 수성 NaOH, 탄산칼륨, 암모니아 및 중탄산나트륨으로 처리함으로써 유리 형태를 재생할 수도 있다. 유리 형태는 특정한 물리적 성질, 예컨대 극성 용매 중의 용해도에서 그들의 각각의 염 형태와는 다소 상이할 수도 있지만, 산 및 염기 염은 다른 면에서 본 발명의 목적을 위해 개개의 유리 형태와 제약학적으로 동등하다.
- [0087] 본 발명의 양이온성 지질의 제약상 허용되는 염은 통상적인 화학적 방법에 의해 염기성 또는 산성 모이어티를 함유하는 본 발명의 양이온성 지질로부터 합성될 수 있다. 일반적으로, 염기성 양이온성 지질의 염은 이온 교환 크로마토그래피에 의해, 또는 적절한 용매 또는 다양한 용매의 조합 중에서 유리 염기를 화학양론적 양 또는 과량의 바람직한 염-형성 무기 또는 유기 산과 반응시킴으로써 제조된다. 유사하게, 산성 화합물의 염은 적절한 무기 또는 유기 염기와 반응에 의해 형성된다.
- [0088] 따라서, 본 발명의 양이온성 지질의 제약상 허용되는 염은 본 발명의 염기성 양이온성 지질과 무기 또는 유기 산을 반응시킴으로써 형성되는 본 발명의 양이온성 지질의 통상적인 비-독성 염을 포함한다. 예를 들어, 통상적인 비-독성 염은 염산, 브로민화수소산, 황산, 술폰산, 인산, 질산 등과 같은 무기 산으로부터 유래된 염 뿐만 아니라 아세트산, 프로피온산, 숙신산, 글리콜산, 스테아르산, 락트산, 말산, 타르타르산, 시트르산, 아스코르브산, 파모산, 말레산, 히드록시말레산, 페닐아세트산, 글루탐산, 벤조산, 살리실산, 술파닐산, 2-아세톡시-벤조산, 푸마르산, 톨루엔술폰산, 메탄술폰산, 에탄 디술폰산, 옥살산, 이세티온산, 트리플루오로아세트산(TFA) 등과 같은 유기 산으로부터 제조된 염을 포함한다.
- [0089] 본 발명의 양이온성 지질이 산성일 때, 적절한 "제약상 허용되는 염"이란 무기 염기 및 유기 염기를 포함한 제약상 허용되는 비-독성 염기로부터 제조된 염을 가리킨다. 무기 염기로부터 유래된 염은 알루미늄, 암모늄, 칼슘, 구리, 제2철, 제1철, 리튬, 마그네슘, 제2망가니즈염, 제1망가니즈, 칼륨, 나트륨, 아연 등을 포함한다. 특히 바람직한 것은 암모늄, 칼슘, 마그네슘, 칼륨 및 나트륨 염이다. 제약상 허용되는 유기 비-독성 염기로부터 유래된 염은 1급, 2급 및 3급 아민의 염, 천연 발생 치환된 아민을 포함한 치환된 아민, 시클릭 아민 및 염기성 이온 교환 수지, 예컨대 아르기닌, 베타인 카페인, 콜린, N,N¹-디벤질에틸렌디아민, 디에틸아민, 2-디에틸아미노에탄올, 2-디메틸아미노에탄올, 에탄올아민, 에틸렌디아민, N-에틸모르폴린, N-에틸피페리딘, 글루카민, 글루코사민, 히스티딘, 히드라바민, 이소프로필아민, 리신, 메틸글루카민, 모르폴린, 피페라진, 피페리딘, 폴리아민 수지, 프로카인, 푸린, 테오브로민, 트리에틸아민, 트리메틸아민, 트리프로필아민, 트로메타민 등을 포함한다.
- [0090] 상기 기재된 제약상 허용되는 염 및 다른 전형적인 제약상 허용되는 염의 제조는 문헌 [Berg et al., "Pharmaceutical Salts", J. Pharm. Sci., 1977:66:1-19]에 보다 상세히 기재되어 있다.
- [0091] 생리학적 조건 하에서, 화합물 내의 탈양성자와 산성 모이어티, 예컨대 카르복실기가 음이온성일 수도 있기 때문에, 본 발명의 양이온성 지질은 잠재적인 내부 염 또는 쯔비터이온이고, 이러한 전자 전하가 4급 질소 원자와 같은 양성자와 또는 알킬화 염기성 모이어티의 양이온성 전하에 대해 내부적으로 균형이 깨질 수도 있다는 것이 또한 주목될 것이다.
- [0092] **실시예**
- [0093] 본원에 제공된 실시예는 본 발명을 더욱 잘 이해하는 것을 돕기 위한 것이다. 이용된 특정한 물질, 종 및 조건은 본 발명을 더욱 예시하기 위한 것이고 그의 타당한 범위를 제한하는 것은 아니다. 양이온성 지질을 합성하는데 이용된 시약들은 상업적으로 입수가능하거나 당업자에 의해 쉽게 제조된다.
- [0094] 신규의 양이온성 지질의 합성은 지질 산(i)으로부터 출발한 선형 공정이다. N,O-디메틸 히드록실아민으로의 결합은 웨인레브(Weinreb) 아마이드(ii)를 제공한다. 그리나르 첨가는 케톤(iii)을 생성한다. 케톤의 환원은 알콜(iv)을 생성한다. EDC 결합을 통한 에스테르화는 유형(v)의 에스테르를 제공한다.

[0095] <반응식 1>



[0096]

[0097] (20Z,23Z)-노나코사-20,23-디엔-10-일 4-(디메틸아미노)부타노에이트 (화합물 1)

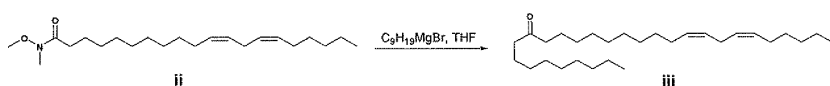


[0098]

[0099] 11,14-에이코사디엔산, (11Z,14Z)- (50 g, 162 mmol), N,0-디메틸히드록실아민 히드로클로라이드 (31.6 g, 324 mmol), HOAt (44.1 g, 324 mmol), Et₃N (45.2 mL, 324 mmol) 및 EDC (62.1 g, 324 mmol)를 DCM (810 mL)에 혼합하고, 주위 온도에서 밤새 교반하였다. 이어서, 반응물을 5×700 mL 물로 세척한 다음 1×600 mL 1M NaOH로 세척하고, 황산나트륨으로 건조시키고, 셀라이트를 통해 여과하고 증발시켜, 투명한 금색 오일로서 53.06 g (93%) 11,14-에이코사디엔아미드, N-메톡시-N-메틸-, (11Z,14Z)을 수득하였다.

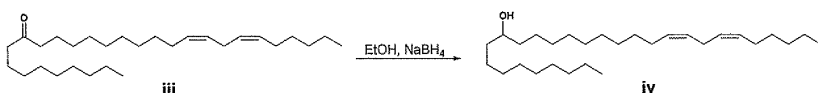
[0100]

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.35 (m, 4H), 3.68 (s, 3H), 3.18 (s, 3H), 2.77 (m, 2H), 2.41 (t, J = 7 Hz, 2H), 2.05 (m, 4H), 1.63 (m, 2H), 1.40-1.26 (m, 18H), 0.89 (t, J = 7 Hz, 3H).



[0101]

[0102] 11,14-에이코사디엔아미드, N-메톡시-N-메틸-, (11Z,14Z)-1 (4 g, 11.38 mmol)을 250 mL 플라스크에서 무수 THF (50.0 mL)에 용해시킨 다음, 주위 온도에서 질소 하에 1M 노닐마그네슘 브로마이드 (22.76 mL, 22.76 mmol)를 첨가하였다. 10분 후에, 과량의 포화 수성 NH₄Cl로 반응물을 서서히 켄칭하였다. 반응물을 헥산 및 물로 분별 깔때기에서 세척하고, 진탕하고, 하부 수성 층을 버리고, 상부 층을 황산나트륨으로 건조시키고, 여과하고 증발시켜, 금색 오일로서 조 케톤을 수득하였다. 케톤을 이후의 조 반응으로 직접 보내었다.

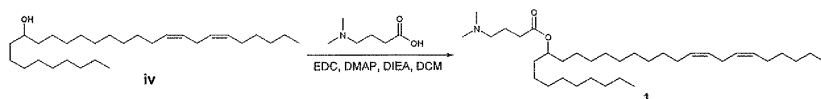


[0103]

[0104] 케톤 (6.32 g, 15.1 mmol, 1 당량)을 EtOH (75 mL)에 용해시키고, NaBH₄ (2.86 g, 75 mmol, 5 당량)를 첨가하였다. 실온에서 15분 교반 후에, 반응물을 증발시켜 잔류물을 얻고 이것을 헥산 (200 mL) 및 물 (200 mL)에 취하고, 유기 층을 분리시키고, 황산나트륨으로 건조시키고, 여과하고 증발시켜, 20,23-노나코사디엔-10-올, (20Z,23Z)- (iv)를 백색 고체로서 수득하고, 추가의 정제 없이 사용하였다.

[0105]

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 5.35 (m, 4H), 3.58 (m, 1H), 2.77 (m, 2H), 2.05 (m, 4H), 1.48-1.22 (m, 39H), 0.89 (m, 6H).



[0106]

[0107]

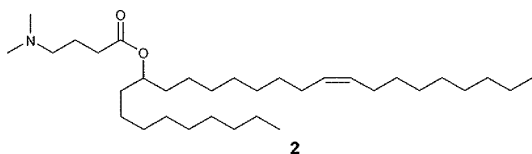
4-(디메틸아미노)부티르산 히드로클로라이드 (3.03 g, 18.05 mmol, 1.2 당량), 20,23-노나코사디엔-10-올, (20Z,23Z)- (iv) (6.33 g, 15.04 mmol, 1 당량), EDC (3.46 g, 18.05 mmol, 1.2 당량), DMAP (0.368 g, 3.01 mmol, 0.2 당량) 및 DIEA (7.88 mL, 45.1 mmol, 3 당량)를 DCM (100 mL)에서 조합하고, 주위 온도에서 16시간 동안 교반하였다. 이어서 반응물을 1×250 mL 포화 NaHCO₃로 세척한 다음, 하부 유기 층을 330g 실리카 칼럼에 직접 주입하고, 30분 동안 0-15% MeOH/DCM으로 용리시켜 정제하였다. 부탄산, 4-(디메틸아미노)-, (11Z,14Z)-1-노닐-11,14-에이코사디엔-1-일 에스테르(1)를 황색 오일로서 수집하였다.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 5.35 (m, 4H), 4.87 (m, 1H), 2.77 (m, 2H), 2.34-2.26 (m, 4H), 2.22 (s, 6H), 2.05 (m, 4H), 1.79 (m, 2H), 1.51 (m, 4H), 1.38-1.22 (m, 34H), 0.88 (m, 6H).

[0108]

[0109]

(18Z)-헵타코스-18-엔-10-일 4-(디메틸아미노)부타노에이트 (화합물 2)



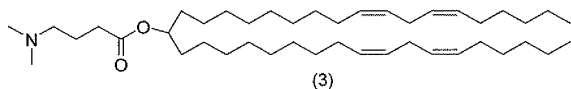
[0110]

[0111]

상기 화합물 1에 대해 기재된 것과 유사한 방식으로 화합물 2을 제조하였다. HRMS (M+H) 계산치 508.5088, 실측치 508.5091.

[0112]

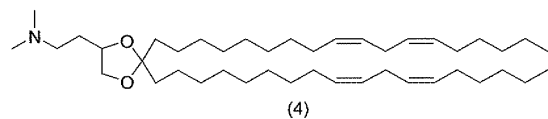
화합물 3은 WO 2010/054401 및 WO 2010/144740 A1에 기재된 것과 같이 MC3이다.



[0113]

[0114]

화합물 4는 문헌 [Nature Biotechnology, 2010, 28, 172-176], WO 2010/042877 A1, WO 2010/048536 A2, WO 2010/088537 A2 및 WO 2009/127060 A1에 기재된 DLinkC2DMA이다.



[0115]

[0116]

LNP 조성물

[0117]

본 발명의 하기 지질 나노입자 조성물 (LNP)은 올리고뉴클레오타이드, 특히 siRNA 및 miRNA의 전달을 위해 유용하다:

양이온성 지질 / 콜레스테롤 / PEG-DMG 56.6/38/5.4;

양이온성 지질 / 콜레스테롤 / PEG-DMG 60/38/2;

양이온성 지질 / 콜레스테롤 / PEG-DMG 67.3/29/3.7;

양이온성 지질 / 콜레스테롤 / PEG-DMG 49.3/47/3.7;

양이온성 지질 / 콜레스테롤 / PEG-DMG 50.3/44.3/5.4;

양이온성 지질 / 콜레스테롤 / PEG-C-DMA / DSPC 40/48/2/10;

양이온성 지질 / 콜레스테롤 / PEG-DMG / DSPC 40/48/2/10; 및

양이온성 지질 / 콜레스테롤 / PEG-DMG / DSPC 58/30/2/10.

[0118]

[0119] LNP 방법 설명:

[0120] 충돌 제트 방법에 의하여 지질 나노-입자 (LNP)를 제조한다. 알콜에 용해된 지질을 시트레이트 완충제에 용해된 siRNA와 혼합함으로써 입자를 형성한다. 지질 대 siRNA의 혼합비는 45-55% 지질 및 65-45% siRNA를 목표로 한다. 지질 용액은 본 발명의 신규 양이온성 지질, 헬퍼 지질 (콜레스테롤), PEG (예컨대, PEG-C-DMA, PEG-DMG) 지질 및 DSPC를 알콜 (예를 들어, 에탄올) 중의 9-12 mg/mL를 목표로 5-15 mg/mL 농도로 함유한다. 지질의 비율은 35-65를 목표로 하여 양이온성 지질에 대해 25-98의 몰% 범위를 갖고, 헬퍼 지질은 30-50을 목표로 하여 0-75의 몰% 범위를 갖고, PEG 지질은 1-6을 목표로 하여 1-15의 몰% 범위를 갖고, DSPC는 0-12를 목표로 하여 0-15의 몰% 범위를 갖는다. siRNA 용액은 3.5-5 범위의 pH를 가진 시트르산나트륨 완충 염 용액에서 0.3-0.9 mg/mL를 목표로 하여 0.3 내지 1.0 mg/mL의 농도 범위에서 하나 이상의 siRNA 서열을 함유한다. 2개의 액체를 30-40℃를 목표로 하여 15-40℃ 범위의 온도로 가열하고, 이어서 충돌 제트 믹서에서 즉시 혼합하여 LNP를 형성한다. teeID는 0.25 내지 1.0 mm의 범위를 갖고 총 유량은 10-600 mL/분이다. 유량 및 관 ID의 조합은 30 내지 200 nm의 LNP의 입자 크기를 조절하는 효과를 갖는다. 이어서, 용액을 1:1 내지 1:3 vol:vol 범위의 혼합비로, 그러나 1:2 vol:vol을 목표로 하여 더 높은 pH의 완충 용액과 혼합한다. 이러한 완충 용액은 15-40℃ 범위의 온도이고, 30-40℃를 목표로 한다. 음이온 교환 여과 단계 전에, 혼합된 LNP를 30분 내지 2시간 동안 유지한다. 인큐베이션 동안의 온도는 15-40℃의 범위이고, 30-40℃를 목표로 한다. 인큐베이션 후에 용액을 음이온 교환 분리 단계를 함유한 0.8 μ m 필터를 통해 여과한다. 이 방법은 1 mm ID 내지 5 mm ID 범위의 관 ID 및 10 내지 2000 mL/분의 유량을 사용한다. LNP를 농축하고 한외여과 공정을 통해 정용여과하고, 이때 알콜을 제거하고 시트레이트 완충제를 포스페이트 완충 염수와 같은 최종 완충 용액으로 교환한다. 한외여과 공정은 접선 흐름 여과 형식(TFF)을 사용한다. 이러한 공정은 30-500 KD 범위의 막 공칭 분자량 컷오프 범위를 사용한다. 막 형식은 중공 섬유 또는 평판 카세트일 수 있다. 적절한 분자량 컷오프를 가진 TFF 공정은 체류 물에 LNP를 유지하고, 여과물 또는 투과물은 알콜; 시트레이트 완충제; 최종 완충제 폐기물을 함유한다. TFF 공정은 초기 농도에서 1-3 mg/mL의 siRNA 농도까지를 가진 다단계 공정이다. 농축 후에, LNP 용액을 10 내지 20배 부피로 최종 완충제에 대해 정용여과하여 알콜을 제거하고 완충제 교환을 수행한다. 이어서, 물질을 추가의 1-3배로 농축한다. LNP 공정의 최종 단계는 농축된 LNP 용액을 멸균 여과하고 생성물을 바이알에 넣는 것이다.

[0121] 분석 절차:

[0122] 1) siRNA 농도

[0123] 2996 PDA 검출기와 함께 워터스 2695 알리안스 시스템(Waters 2695 Alliance system) (워터 코포레이션(Water Corporation), 미국 메사추세츠 밀포드)를 사용하여 강 음이온-교환 고성능 액체 크로마토그래피 (SAX-HPLC)에 의하여 siRNA 듀플렉스 농도를 결정한다. 달리 RNAi 전달 비히클(RNAi Delivery Vehicle; RDV)이라 일컬어지는 LNP를 0.5% 트리톤 X-100으로 처리하여 전체 siRNA를 유리시키고, 254 nm에서 UV 검출과 함께 디오넥스 바이오LC DNA팩(Dionex BioLC DNAPac) PA 200 (4×250 mm) 칼럼을 사용하여 SAX 분리에 의해 분석한다. 이동상은 A: 25 mM NaClO₄, 10 mM 트리스(Tris), 20% EtOH, pH 7.0 및 B: 250 mM NaClO₄, 10 mM 트리스, 20% EtOH, pH 7.0으로 구성되고, 0-15분의 선형 구배 및 1 ml/분의 유량을 갖는다. siRNA 표준 곡선에 비교함으로써 siRNA 양을 결정한다.

[0124] 2) 캡슐화 속도

[0125] RDV의 캡슐화 속도를 모니터링하기 위하여 RNA 정량화를 위해 형광 시약 SYBR 골드(SYBR Gold)를 이용한다. 유리 siRNA 및 총 siRNA 양을 결정하기 위하여 트리톤 X-100을 갖거나 갖지 않은 RDV를 사용한다. 스펙트라맥스(SpectraMax) M5e 마이크로플레이트 분광계 (몰레큘러 디바이시스(Molecular Devices), 미국 캘리포니아주 서니 베일)를 사용하여 검정을 수행한다. 샘플은 485 nm에서 여기되고, 530 nm에서 형광 방출을 측정한다. siRNA 표준 곡선에 비교함으로써 siRNA 양을 결정한다.

[0126] 캡슐화 속도 = $(1 - \text{유리 siRNA} / \text{총 siRNA}) \times 100\%$

[0127] 3) 입자 크기 및 다분산도

[0128] 1 μ g siRNA를 함유하는 RDV를 1 × PBS로 3 ml의 최종 부피로 희석한다. 제타팔스(ZetaPALS) 기기 (브룩해븐 인스트루먼트즈 코포레이션(Brookhaven Instruments Corporation), 미국 뉴욕주 홀스빌)를 사용하여 동적 광 산란 방법에 의해 샘플의 입자 크기 및 다분산도를 측정한다. 산란된 강도를 25℃에서 90°의 산란각으로 He-Ne

레이저에 의해 측정한다.

[0129] 4) 제타 전위 분석

[0130] 1 μ g siRNA를 함유하는 RDV를 1 mM 트리스 완충제 (pH 7.4)에 의해 2 mL의 최종 부피로 희석한다. 전극 및 광원으로서 He-Ne 레이저를 가진 제타팔스 기기 (브룩헤븐 인스트루먼트 코포레이션, 미국 뉴욕주 홀스빌)를 사용하여 샘플의 전기영동 이동도를 결정한다. 제타 전위의 계산에서 스몰루초우스키(Smoluchowski) 한계를 가정한다.

[0131] 5) 지질 분석

[0132] 코로나 하전 에어로졸 검출기(CAD) (ESA 바이오사이언시스, 인코포레이티드(ESA Biosciences, Inc), 미국 메사추세츠주 첼름스포스)와 함께 워터스 2695 알리안스 시스템 (워터 코포레이션, 미국 메사추세츠 밀포드)를 사용하여 역상 고성능 액체 크로마토그래피 (RP-HPLC)에 의해 각각의 지질 농도를 결정한다. 60°C에서 CAD와 함께 아질런트 조르박스(Agilent Zorbax) SB-C18 (50×4.6 mm, 1.8 μ m 입자 크기)을 사용하여 RDV 중의 각각의 지질을 분석한다. 이동상은 A: H₂O 중의 0.1% TFA 및 B: IPA 중의 0.1% TFA로 구성된다. 구배는 시간 0으로부터 60% 이동상 A 및 40% 이동상 B로부터 1.00분에 40% 이동상 A 및 60% 이동상 B; 1.00분 내지 5.00분에 40% 이동상 A 및 60% 이동상 B; 5.00분으로부터 40% 이동상 A 및 60% 이동상 B로부터 10.00분에 25% 이동상 A 및 75% 이동상 B; 10.00분으로부터 25% 이동상 A 및 75% 이동상 B로부터 15.00분에 5% 이동상 A 및 95% 이동상 B; 및 15.00분으로부터 5% 이동상 A 및 95% 이동상 B로부터 20.00분에 60% 이동상 A 및 40% 이동상 B로 1 ml/분의 유량으로 변한다. 이차 곡선 맞춤과 함께 RDV에서 모든 지질 성분을 표준 곡선과 비교함으로써 각각의 지질 농도를 결정한다. 각각의 지질의 몰 %는 그의 분자량을 기준으로 하여 계산된다.

[0133] 상기 기재된 LNP 공정을 이용하여, 하기 비를 가진 특정한 LNP를 확인하였다:

[0134] 공칭 조성:

양이온성 지질 / 콜레스테롤 / PEG-DMG 60/38/2; 및
양이온성 지질 / 콜레스테롤 / PEG-DMG / DSPC 58/30/2/10.

[0135]

[0136] 올리고뉴클레오타이드 합성은 당업계에 공지되어 있다. (US 특허 출원: US 2006/0083780, US 2006/0240554, US 2008/0020058, US 2009/0263407 및 US 2009/0285881 및 PCT 특허 출원: WO 2009/086558, WO 2009/127060, WO 2009/132131, WO 2010/042877, WO 2010/054384, WO 2010/054401, WO 2010/054405 및 WO 2010/054406 참조). 실시예에 개시되고 이용된 LNP에 혼입된 Luc 및 ApoB siRNA는 표준 고체상 절차를 통해 합성되었다.

[0137] Luc siRNA

5'-iB-AUAAGGCUAUGAAGAGAUATT-iB 3' (서열 1)
3'-UUUAUCCGAUACUUCUCUUAU-5' (서열 2)

[0138]

[0139] AUGC - 리보스

[0140] iB - 전위 데옥시 어베이직(Inverted deoxy abasic)

[0141] UC - 2' 플루오로

[0142] AGT - 2' 데옥시

[0143] AGU - 2' OCH₃

[0144] 공칭 조성

양이온성 지질 / 콜레스테롤/PEG-DMG 60/38/2
양이온성 지질 / 콜레스테롤 / PEG-DMG / DSPC 40/48/2/10
양이온성 지질 / 콜레스테롤 / PEG-DMG / DSPC 58/30/2/10

[0145]

[0146] ApoB siRNA

5'-iB-CUUUAACAAUCCUGAAAUTsT-iB-3' (서열 3)
3'-UsUGAAAUUGUUAAGGACUsUsUsA-5' (서열 4)

[0147]

[0148] AUGC -리보스

[0149] iB -전위 데옥시 어베이직(Inverted deoxy abasic)

[0150] UC -2' 플루오로

[0151] AGT -2' 데옥시

[0152] AGU -2' OCH₃

[0153] UsA - 포스포로티오에이트 결합

[0154] 실시예 1

[0155] 마우스 생체내 효능 평가

[0156] 바로 앞서 기재된 공칭 조성으로 화합물 1을 사용하는 LNP를 생체내 효능에 대해 평가하였다. siRNA는 반딧불이 (포티누스 피랄리스(Photinus pyralis) 루시페라제 유전자 (수탁 번호 M15077)에 대한 mRNA 전사체를 표적으로 한다. 루시페라제 siRNA의 1차 서열 및 화학적 변형 패턴을 상기 나타낸다. 생체내 루시페라제 모델은, 반딧불이 루시페라제 코딩 서열이 모든 세포에 존재하는 트랜스제닉 마우스를 사용하였다. ROSA26-LoxP-Stop-LoxP-Luc (LSL-Luc) 트랜스제닉 마우스 (다나 파버 암 연구소로부터 허가)를 유도하여, 재조합 Ad-Cre 바이러스 (벡터 바이오랩스)로 LSL 서열을 먼저 제거함으로써 루시페라제 유전자를 발현시켰다. 바이러스의 유기영양 성질에 기인하여, 꼬리 정맥 주사를 통해 전달될 때 발현은 간에 한정되었다. 루시페린 기질 (캘리퍼 라이프 사이언시스(Caliper Life Sciences))의 투여 후에 IVIS 이미저 (제노겐(Xenogen))를 사용하여 광 방출을 측정함으로써 간에서 루시페라제 발현 수준을 정량화하였다. RDV의 투여 전에 투여-전 발광 수준을 측정하였다. PBS 중의 루시페린 (15 mg/mL)을 150 μ l의 부피로 복강내 (IP) 주사하였다. 4분의 인큐베이션 기간 후에 마우스를 이소플루란으로 마취하고 IVIS 이미저에 놓았다. PBS 비히클 중의 RDV (siRNA 함유)를 0.2 mL의 부피로 꼬리 정맥 주사하였다. 최종 용량 수준은 0.1 내지 0.5 mg/kg siRNA의 범위였다. PBS 비히클 단독을 대조군으로서 투여하였다. 상기 기재된 방법을 사용하여 투여 후 48시간에 마우스를 영상화하였다. 루시페린 광 방출의 변화는 루시페라제 mRNA 수준과 직접 상관관계가 있고, 루시페라제 siRNA 활성의 간접적인 측정을 나타낸다. 생체내 효능 결과를 투여-전 발광 수준에 비해 발광의 % 억제로서 표현하였다. 루시페라제 siRNA RDV의 전신 투여는 용량 의존적 방식으로 루시페라제 발현을 감소시켰다. 옥틸-CLinDMA (OCD) 양이온성 지질을 함유하는 RDV에 비하여 화합물 1 함유 RDV로 투여한 마우스에서 더욱 큰 효능이 관찰되었다 (도 1). OCD는 공지되어 있고 WO 2010/021865에 기재되어 있다.

[0157] 실시예 2

[0158] 래트 생체내 효능 및 독성 평가

[0159] 상기 기재된 공칭 조성으로 화합물을 이용하는 LNP를, 스프라그-돌리 (Cr1:CD(SD) 암컷 래트 (찰스 리버 랩스))에서 생체내 효능 및 알라닌 아미노 트랜스퍼라제 및 아스파르테이트 아미노 트랜스퍼라제의 증가에 대해 평가하였다. siRNA는 ApoB 유전자 (수탁 번호 NM 019287)에 대한 mRNA 전사체를 표적으로 한다. ApoB siRNA의 1차 서열 및 화학적 변형 패턴을 상기 나타낸다. PBS 비히클 중의 RDV (siRNA 함유)를 1 내지 1.5 mL의 부피로 꼬리 정맥 주사하였다. 주입 속도는 약 3 ml/분이었다. 각각의 투여 군에서 5마리 래트를 사용하였다. LNP 투여 후에, 래트를 일반 식이 및 물이 존재하는 우리에 넣어 두었다. 투여 후 6시간에 우리에서 음식을 제거하였다. LNP 투여 후 24시간에 동물 부검을 수행하였다. 래트를 이소플루란으로 5분 동안 마취시킨 다음 방혈이 끝날 때까지 이소플루란의 전달을 계속하는 노즈 콘(nose cone)에 놓아둠으로써 마취 상태를 유지하였다. 23 게이지 버터플라이 정맥천자 세트를 사용하여 대정맥으로부터 혈액을 모으고 혈청 화학 분석을 위해 혈청 분리장치 진공채혈관으로 분리하였다. 절단된 미상 간엽의 편지물을 취하여 mRNA 분석을 위해 RNeasy (엠티온(Ambion))에 놓았다. 보존된 간 조직을 균질화하고, 제조업자의 지시에 따라 퀴아젠(Qiagen) 비드 밀 및 퀴아젠 miRNA-이지(Easy) RNA 단리 키트를 사용하여 전체 RNA를 단리하였다. 정량적 RT-PCR에 의해 간 ApoB mRNA 수준을 측정하였다. 래트 ApoB 시판 프로브 세트 (어플라이드 바이오시스템스(Applied Biosystems) 카탈로그 # RN01499054_m1)를 이용하여 정제된 RNA로부터 메시지를 증폭시켰다. 96-웰 패스트 블록(Fast Block)을 가진 ABI 7500 기기에서 PCR 반응을 수행하였다. ApoB mRNA 수준을 하우스키핑 PPIB (NM 011149) mRNA로 표준화하였다. 시판되는 프로브 세트 (어플라이드 바이오시스템스 카탈로그 번호 Mm00478295_m1)를 사용하여 RT-PCR에 의해 PPIB mRNA 수준을 결정하였다. 결과를 ApoB mRNA/PPIB mRNA의 비율로서 표현하였다. 모든 mRNA 데이터를 PBS 대조 투여와 비교하여 표현하였다. 지멘스(Siemens) 알라닌 아미노트랜스퍼라제 (카탈로그# 03039631)

및 아스파르트레이트 아미노트랜스퍼라제 (카탈로그# 03039631) 시약을 이용하는 지멘스 애드비아(Siemens Advia) 1800 임상 화학 분석장치에서 혈청 ALT 및 AST 분석을 수행하였다. 양이온성 지질 DLinkC2DMA (화합물 4) 또는 MC3 (화합물 3, 도 2)을 함유하는 RDV의 경우에 비해 화합물 2 함유 RDV로 투여된 래트에서 유사한 효능이 관찰되었다. 추가로, 3 mg/kg DLinkC2DMA (화합물 4)로 처리된 4마리 래트 중의 3마리는 48시간을 생존하지 못하였고, 3 mg/kg MC3 (화합물 3)으로 처리된 4마리 래트 중의 2마리는 48시간을 생존하지 못하였다. 6 mg/kg 화합물 2로 처리된 4마리 래트 중 3마리는 투여 후 48시간에 생존하였다.

[0160] 실시예 3

[0161] 래트 간에서 양이온성 지질 수준의 결정

[0162] 간 조직을 20 ml 바이알 내로 칭량해 넣고, 제노그라인더(GenoGrinder) 2000 (OPS 디아그노스틱스, 1600 스트로크/분, 5분)을 사용하여 9 v/w의 물에서 균질화하였다. 각각의 조직 균질화물의 50 μ l의 분취량을 300 μ l의 추출/단백질 침전 용매 (500 nM 내부 표준을 함유한 50/50 아세토니트릴/메탄올)와 혼합하고, 플레이트를 원심분리하여 침전된 단백질을 침강시켰다. 이어서 각각의 상청액 200 μ l 부피를 96-웰 플레이트의 별도의 웰에 옮기고 10 μ l 샘플을 LC/MS-MS에 의해 직접 분석하였다.

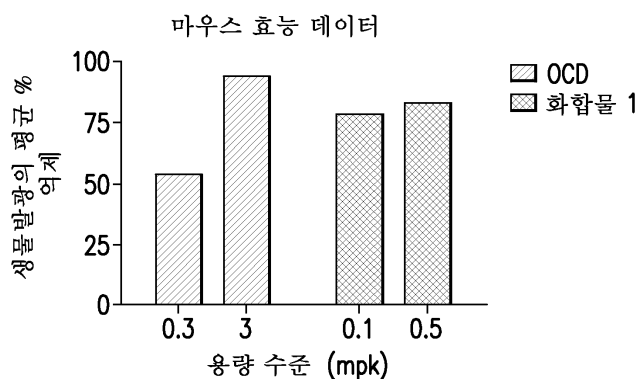
[0163] 공지된 양의 화합물의 메탄올 원액을 미처리 래트 간 균질화물 (9 부피 물/중량 간)으로 스파이킹함으로써 표준을 제조하였다. 각각의 표준/간 균질화물 분취량 (50 μ l)을 300 μ l의 추출/단백질 침전 용매 (500 nM 내부 표준을 함유하는 50/50 아세토니트릴/메탄올)와 혼합하고, 플레이트를 원심분리하여 침전된 단백질을 침강시켰다. 각각의 상청액 200 μ l 부피를 96-웰 플레이트의 별도의 웰에 옮기고, 10 μ l의 각각의 표준을 LC/MS-MS에 의해 직접 분석하였다.

[0164] API 4000 삼중 사중극자 질량 분광측정계 (어플라이드 바이오시스템스)에 커플링된 아리아(Aria) LX-2 HPLC 시스템 (서모 사이언티픽(Thermo Scientific))을 사용하여, 간 균질화물로부터 준비되고 추출된 표준에 대한 절대정량화를 수행하였다. 각각의 시행을 위하여, 총 10 μ l의 샘플을 BDS 하이퍼실(Hypersil) C8 HPLC 칼럼 (써모(Thermo), 50 $\times$ 2 mm, 3 μ m)에 주위 온도에서 주입하였다.

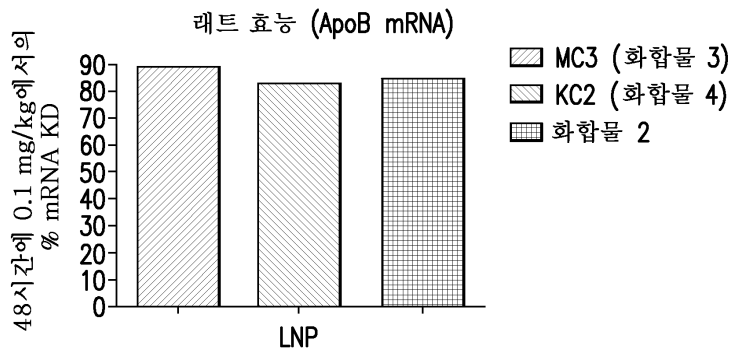
[0165] 이동상 A: 95% H₂O/5% 메탄올/10 mM 암모늄 포르메이트/0.1% 포름산, 이동상 B: 40% 메탄올/60% n-프로판올/10 mM 암모늄 포르메이트/0.1% 포름산. 유량은 0.5 mL/분이고, 구배 용리 프로파일은 다음과 같았다: 0.25분 동안 80% A에서 유지, 1.6분에 걸쳐 100% B로 선형 상승, 2.5분 동안 100% B로 유지, 이어서 1.75분 동안 80% A로 되돌려 유지. 전체 시행 시간은 5.8분이었다. API 4000 소스 파라미터는 CAD: 4, CUR: 15, GS1: 65, GS2: 35, IS: 4000, TEM: 550, CXP: 15, DP: 60, EP: 10이었다. 화합물 2 함유 RDV가 투여된 래트에서 간 수준은 양이온성 지질 DLinkC2DMA (화합물 4) 또는 MC3 (화합물 3, 도 3)을 함유하는 RDV로 투여된 것보다 더 낮았다.

도면

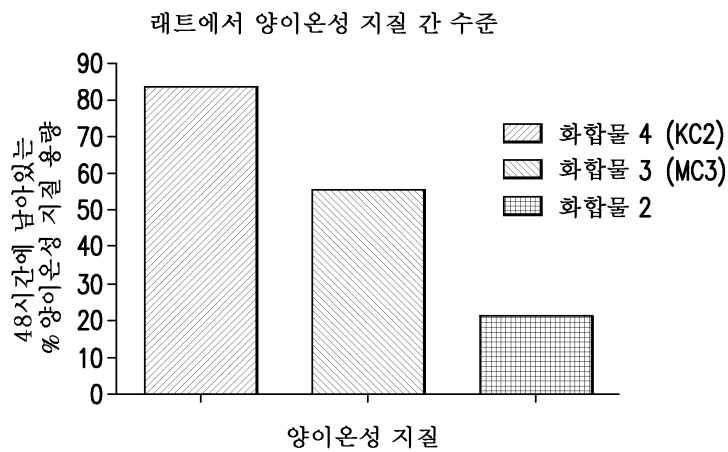
도면1



도면2



도면3



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Merck Sharp & Dohme Corp.

Colletti, Stephen L.

Stanton, Matthew G.

<120> NOVEL LOW MOLECULAR WEIGHT CATIONIC LIPIDS FOR
OLIGONUCLEOTIDE DELIVERY

<130> MRL-MIS-00046

<150> US 61/405,413

<150> 2010-10-21

<160> 4

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Enzymatic Nucleic Acid
 <221> misc_feature
 <222> (1)...(1)
 <223> 2'-deoxy

 <221> misc_feature
 <222> (2)...(2)
 <223> 2'-fluoro
 <221> misc_feature
 <222> (3)...(6)
 <223> 2'-deoxy
 <221> misc_feature
 <222> (7)...(8)
 <223> 2'-fluoro
 <221> misc_feature
 <222> (9)...(9)
 <223> 2'-deoxy
 <221> misc_feature
 <222> (10)...(10)
 <223> 2'-fluoro
 <221> misc_feature
 <222> (11)...(17)
 <223> 2'-deoxy
 <221> misc_feature
 <222> (18)...(18)
 <223> 2'-fluoro
 <221> misc_feature
 <222> (19)...(21)
 <223> 2'-deoxy
 <400> 1

auaaggcuau gaagagauat t

21

<210> 2

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Enzymatic Nucleic Acid

<221> misc_feature

<222> (1)...(3)

<223> ribose

<221> misc_feature

<222> (4)...(9)

<223> 2'-fluoro

<221> misc_feature

<222> (10)...(10)

<223> 2'-o-methyl

<221> misc_feature

<222> (11)...(11)

<223> 2'-fluoro

<221> misc_feature

<222> (12)...(13)

<223> 2'-o-methyl

<221> misc_feature

<222> (14)...(17)

<223> 2'-fluoro

<221> misc_feature

<222> (18)...(18)

<223> 2'-o-methyl

<221> misc_feature

<222> (19)...(19)

<223> 2'-fluoro

<221> misc_feature

<222> (20)...(21)

<223> 2'-o-methyl
 <400> 2
 uuuauuccga uacuucucua u 21
 <210> 3
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> amino linker
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> inverted deoxy abasic
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2' fluoro

 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(19)
 <223> ribonucleotide unmodified or modified as described for this
 sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (3)..(4)
 <223> 2' deoxy
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(6)
 <223> 2' fluoro
 <220><221> misc_feature
 <222> (7)..(9)
 <223> 2' deoxy
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> 2' fluoro
 <220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)
 <223> 2' deoxy
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> 2' fluoro

 <220><221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> 2' deoxy
 <220><221> misc_feature
 <222> (14)..(15)
 <223> 2' fluoro
 <220><221> misc_feature
 <222> (16)..(17)
 <223> 2' deoxy
 <220><221> misc_feature
 <222> (18)..(18)
 <223> 2' fluoro
 <220><221> misc_feature
 <222> (19)..(21)
 <223> 2' deoxy
 <220><221> misc_feature
 <222> (21)..(21)
 <223> inverted deoxy abasic
 <400> 3
 cuagcuggac acgucgauat t
 <210> 4
 <211> 21

 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 2' fluoro

21

<220><221> misc_feature
 <222> (5)..(6)
 <223> 2' O-methyl
 <220><221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> 2' fluoro
 <220><221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> 2' O-methyl
 <220><221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> 2' fluoro
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> 2' O-methyl
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(13)
 <223> 2' fluoro

 <220><221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> 2' O-methyl
 <220><221> misc_feature
 <222> (16)..(17)
 <223> 2' fluoro
 <220><221> misc_feature
 <222> (18)..(21)
 <223> 2' O-methyl
 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> phosphorothioate linkage
 <400> 4
 uaucgacgug uccagcuagu u