



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0097823
(43) 공개일자 2011년08월31일

- | | |
|--|--|
| <p>(51) Int. Cl.
A61K 47/06 (2006.01) A61K 47/48 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) C07C 217/46 (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2011-7013224</p> <p>(22) 출원일자(국제출원일자) 2009년11월10일
심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2011년06월09일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2009/063931</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2010/054405
국제공개일자 2010년05월14일</p> <p>(30) 우선권주장
61/113,179 2008년11월10일 미국(US)
(뒷면에 계속)</p> | <p>(71) 출원인
알닐람 파마슈티칼스 인코포레이티드
미국 매사추세츠주 02142 캠프릿지 씨드 스트리트 300</p> <p>(72) 발명자
마노하란 무티아
미국 매사추세츠 02142 캠프릿지 씨드 스트리트 300 알닐람 파마슈티칼스 인코포레이티드
라지브 칼란토파틸 쥬.
미국 매사추세츠 02142 캠프릿지 씨드 스트리트 300 알닐람 파마슈티칼스 인코포레이티드
(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
박장원</p> |
|--|--|

전체 청구항 수 : 총 25 항

(54) 치료제 운반용 신규 지질 및 조성물

(57) 요약

본 발명은 생체내에서 세포로 치료제 운반을 위한 지질 입자에 유익하게 이용되는 지질을 제공한다. 특히, 본 발명은 다음의 구조 (I)을 가지는 지질을 제시하며, 여기서 구조식 (I)에서

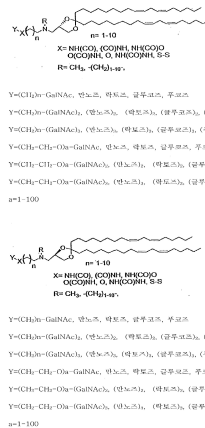
R₁ 및 R₂는 서로 독립적으로 임의로 치환된 C₁₀-C₃₀ 알킬, 임의로 치환된 C₁₀-C₃₀ 알케닐, 임의로 치환된 C₁₀-C₃₀ 알키닐, 임의로 치환된 C₁₀-C₃₀ 아실, 또는 -링커-리간드이고;

R₃은 H, 임의로 치환된 C₁-C₁₀ 알킬, 임의로 치환된 C₂-C₁₀ 알케닐, 임의로 치환된 C₂-C₁₀ 알키닐, 알킬헥테로사이클, 알킬포스페이트, 알킬포스포로티오에이트, 알킬포스포로디티오에이트, 알킬포스포네이트, 알킬아민, 하이드록시알킬, ω-아미노알킬, ω-(치환된)아미노알킬, ω-포스포알킬, ω-티오포스포알킬, 임의로 치환된 폴리에틸렌 글리콜 (PEG, mw 100-40K), 임의로 치환된 mPEG (mw 120-40K), 헥테로아릴, 헥테로사이클, 또는 링커-리간드이며;

E는 O, S, N(Q), C(O), N(Q)C(O), C(O)N(Q), (Q)N(CO)O, O(CO)N(Q), S(O), NS(O)₂N(Q), S(O)₂, N(Q)S(O)₂, SS, O=N, 아릴, 헥테로아릴, 사이클릭 또는 헥테로사이클이고;

Q는 H, 알킬, ω-아미노알킬, ω-(치환된)아미노알킬, ω-포스포알킬 또는 ω-티오포스포알킬이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

자야라만 무투사미

미국 매사추세츠 02142 캠프릿지 씨드 스트리트
300 알닐람 파마슈티칼스 인코포레이티드

버틀러 데이비드

미국 매사추세츠 02142 캠프릿지 씨드 스트리트
300 알닐람 파마슈티칼스 인코포레이티드

나라야난나이르 자야프라카쉬 케이.

미국 매사추세츠 02142 캠프릿지 씨드 스트리트
300 알닐람 파마슈티칼스 인코포레이티드

마이엘 마틴

미국 매사추세츠 02142 캠프릿지 씨드 스트리트
300 알닐람 파마슈티칼스 인코포레이티드

엘테푸 락스만

미국 매사추세츠 02142 캠프릿지 씨드 스트리트
300 알닐람 파마슈티칼스 인코포레이티드

(30) 우선권주장

61/154,350 2009년02월20일 미국(US)

61/171,439 2009년04월21일 미국(US)

61/185,438 2009년06월09일 미국(US)

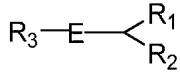
61/225,898 2009년07월15일 미국(US)

61/234,098 2009년08월14일 미국(US)

특허청구의 범위

청구항 1

화학식 XXXIII의 지질 또는 이의 염 또는 이성체.



XXXIII

상기 식에서

R₁ 및 R₂는 서로 독립적으로 임의로 치환된 C₁₀-C₃₀ 알킬, 임의로 치환된 C₁₀-C₃₀ 알케닐, 임의로 치환된 C₁₀-C₃₀ 알키닐, 임의로 치환된 C₁₀-C₃₀ 아실, 또는 -링커-리간드이고;

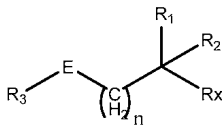
R₃은 H, 임의로 치환된 C₁-C₁₀ 알킬, 임의로 치환된 C₂-C₁₀ 알케닐, 임의로 치환된 C₂-C₁₀ 알키닐, 알킬헤테로사이클, 알킬포스페이트, 알킬포스포로티오에이트, 알킬포스포로디티오에이트, 알킬포스포네이트, 알킬아민, 하이드록시알킬, ω-아미노알킬, ω-(치환된)아미노알킬, ω-포스포알킬, ω-티오포스포알킬, 임의로 치환된 폴리에틸렌 글리콜 (PEG, mw 100-40K), 임의로 치환된 mPEG (mw 120-40K), 헤테로아릴, 헤테로사이클, 또는 링커-리간드이며;

E는 O, S, N(Q), C(O), N(Q)C(O), C(O)N(Q), (Q)N(CO)O, O(CO)N(Q), S(O), NS(O)₂N(Q), S(O)₂, N(Q)S(O)₂, SS, O=N, 아릴, 헤테로아릴, 사이클릭 또는 헤테로사이클이고;

Q는 H, 알킬, ω-아미노알킬, ω-(치환된)아미노알킬, ω-포스포알킬 또는 ω-티오포스포알킬이다.

청구항 2

화학식 XXXVIII의 지질.



XXXVIII

상기 식에서,

E는 O, S, N(Q), C(O), N(Q)C(O), C(O)N(Q), (Q)N(CO)O, O(CO)N(Q), S(O), NS(O)₂N(Q), S(O)₂, N(Q)S(O)₂, SS, O=N, 아릴, 헤테로아릴, 사이클릭 또는 헤테로사이클이고;

Q는 H, 알킬, ω-아미노알킬, ω-(치환된)아미노알킬, ω-포스포알킬 또는 ω-티오포스포알킬이며;

R₁ 및 R₂ 및 R_x는 서로 독립적으로 H, 임의로 치환된 C₁-C₁₀ 알킬, 임의로 치환된 C₁₀-C₃₀ 알킬, 임의로 치환된 C₁₀-C₃₀ 알케닐, 임의로 치환된 C₁₀-C₃₀ 알키닐, 임의로 치환된 C₁₀-C₃₀ 아실, 또는 링커-리간드인데, 단, R₁, R₂ 및 R_x 중 적어도 하나는 H가 아니고;

R₃은 H, 임의로 치환된 C₁-C₁₀ 알킬, 임의로 치환된 C₂-C₁₀ 알케닐, 임의로 치환된 C₂-C₁₀ 알키닐, 알킬헤테로사이클, 알킬포스페이트, 알킬포스포로티오에이트, 알킬포스포로디티오에이트, 알킬포스포네이트, 알킬아민, 하이드록시알킬, ω-아미노알킬, ω-(치환된)아미노알킬, ω-포스포알킬, ω-티오포스포알킬, 임의로 치환된 폴리에틸렌 글리콜 (PEG, mw 100-40K), 임의로 치환된 mPEG (mw 120-40K), 헤테로아릴, 헤테로사이클, 또는 링커-리간드이며;

n은 0, 1, 2, 또는 3이다.

청구항 3

청구항 1 또는 청구항 2의 지질을 포함하는 지질 입자.

청구항 4

청구항 3에 있어서, 청구항 1의 지질을 포함하는 지질 입자.

청구항 5

청구항 3에 있어서, 입자가 중성 지질 및 응집을 감소시킬 수 있는 지질을 추가로 포함하는 지질 입자.

청구항 6

청구항 4에 있어서, 지질 입자가 필수적으로

- a. 청구항 1 또는 청구항 2의 지질;
- b. DSPC, DPPC, POPC, DOPE 및 SM으로부터 선택되는 중성 지질;
- c. 스테롤; 및
- d. PEG-DMG로 이루어지며,

이들의 몰비가 약 20 내지 60% 지질: 5 내지 25% 중성 지질: 25 내지 55% 스테롤: 0.5 내지 15% PEG-DMG 또는 PEG-DMA인 지질 입자.

청구항 7

청구항 3에 있어서, 치료제를 추가로 포함하는 지질 입자.

청구항 8

청구항 7에 있어서, 치료제가 핵산인 지질 입자.

청구항 9

청구항 8에 있어서, 핵산이 플라스미드인 지질 입자.

청구항 10

청구항 8에 있어서, 핵산이 면역자극 올리고뉴클레오티드인 지질 입자.

청구항 11

청구항 8에 있어서, 핵산이 siRNA, 안티센스 올리고뉴클레오티드, 마이크로RNA, 안타고미르, 압타머, 및 리보자임으로 이루어진 군으로부터 선택되는 지질 입자.

청구항 12

청구항 11에 있어서, 핵산이 siRNA인 지질 입자.

청구항 13

청구항 8의 지질 입자와 약제학적으로 허용되는 부형제, 담체 또는 희석제를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 14

청구항 7의 지질 입자를 세포에 제공함을 특징으로 하여, 세포에서 표적 유전자의 발현을 조절하는 방법.

청구항 15

청구항 14에 있어서, 치료제가 siRNA, 안타고미르, 안티센스 올리고뉴클레오티드, 및 siRNA, 리보자임, 압타머

또는 안티센스 올리고뉴클레오티드를 발현시킬 수 있는 플라스미드로부터 선택되는 방법.

청구항 16

청구항 14에 있어서, 폴리펩티드 또는 이의 기능성 변이체 또는 단편이 증가되도록, 핵산이 폴리펩티드 또는 이의 기능성 변이체 또는 단편을 암호화하는 플라스미드인 방법.

청구항 17

치료제가 siRNA, 마이크로RNA, 안티센스 올리고뉴클레오티드, 및 siRNA, 마이크로RNA, 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드를 발현시킬 수 있는 플라스미드로부터 선택되며, siRNA, 마이크로RNA, 또는 안티센스 RNA가 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드에 특이적으로 결합하는 폴리뉴클레오티드, 또는 이의 보체를 포함하는, 청구항 13의 약제학적 조성물을 개체에 제공함을 특징으로 하여, 개체에서 폴리펩티드의 과발현으로 특징되는 질병 또는 질환을 치료하는 방법.

청구항 18

치료제가 폴리펩티드 또는 이의 기능성 변이체 또는 단편을 암호화하는 플라스미드인, 청구항 13의 약제학적 조성물을 개체에 제공함을 특징으로 하여, 개체에서 폴리펩티드의 발현 저하 (underexpression)로 특징되는 질병 또는 질환을 치료하는 방법.

청구항 19

치료제가 면역자극 올리고뉴클레오티드인, 청구항 13의 약제학적 조성물을 개체에 제공함을 특징으로 하여, 개체에서 면역반응을 유발하는 방법.

청구항 20

청구항 19에 있어서, 약제학적 조성물을 환자에게 백신 또는 항원과 함께 제공하는 방법.

청구항 21

청구항 9의 지질 입자 및 질병 또는 병원균과 관련되어 있는 항원을 포함하는 백신.

청구항 22

청구항 22에 있어서, 상기 항원이 종양 항원인 백신.

청구항 23

청구항 22에 있어서, 상기 항원이 바이러스성 항원, 세균성 항원, 또는 기생충성 항원인 백신.

청구항 24

청구항 7에 있어서, 몰비가 52% 지질: 5% 중성 지질: 30% 스테롤: 13% PEG-DMG인 지질 입자.

청구항 25

청구항 15에 있어서, 표적 유전자가 인자 VII, Eg5, PCSK9, TPX2, apoB, SAA, TTR, RSV, PDGF 베타 유전자, Erb-B 유전자, Src 유전자, CRK 유전자, GRB2 유전자, RAS 유전자, MEKK 유전자, JNK 유전자, RAF 유전자, Erk1/2 유전자, PCNA(p21) 유전자, MYB 유전자, JUN 유전자, FOS 유전자, BCL-2 유전자, Cyclin D 유전자, VEGF 유전자, EGFR 유전자, Cyclin A 유전자, Cyclin E 유전자, WNT-1 유전자, 베타-카테닌 유전자, c-MET 유전자, PKC 유전자, NFkB 유전자, STAT3 유전자, 서바이빈 유전자, Her2/Neu 유전자, SORT1 유전자, XBP1 유전자, 토포이소머라제 I 유전자, 토포이소머라제 II 알파 유전자, p73 유전자, p21(WAF1/CIP1) 유전자, p27(KIP1)유전자, PPM1D 유전자, RAS 유전자, 카베올린 I 유전자, MIB I 유전자, MTAI 유전자, M68 유전자, 종양 억제제 유전자, 및 p53 종양 억제제 유전자로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

명세서

기술분야

[0001] **우선권 주장**

[0002] 출원은 2008년 11월 10일에 출원된 U.S.S.N.61/113,179; 2009년 2월 20일 출원된 U.S.S.N.61/154,350; 2009년 4월 21일 출원된 U.S.S.N.61/171,439; 2009년 6월 9일 출원된 U.S.S.N.61/185,428; 2009년 7월 15일 출원된 U.S.S.N.61/225,898; 및 2009년 8월 14일 출원된 U.S.S.N.61/234,098에 대해 우선권을 주장하며, 이들 각각의 내용은 본 명세서에서 전문 참고로 인용된다.

[0003] **정부 지원**

[0004] 본 명세서에 기재된 연구는 적어도 부분적으로, National Institute of Allergy and Infectious Diseases에 의해 부여된 허가 번호 HHSN266200600012C 하에 수행되었다. 따라서, 정부는 본 발명에서 일정 권리를 가질 수 있다.

[0005] 본 발명은 지질 입자를 사용한 치료제 운반 분야에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 양이온성 지질 및 이들 지질을 포함하는 지질 입자를 제공하는데, 이들은 핵산의 운반 뿐만 아니라, 생체내 치료용으로 적합한 핵산-지질 입자 조성물의 생체내 운반에 유용하다. 또한, 본 발명은 이들 조성물의 제조 방법 뿐만 아니라, 예를 들어, 다양한 질병의 치료를 위하여, 이들 조성물을 사용하여 핵산을 세포중으로 도입시키는 방법을 제공한다.

배경 기술

[0006] 치료용 핵산으로는, 예를 들어, 소간섭 RNA (small interfering RNA; siRNA), 마이크로 RNA (miRNA), 안티센스 (antisense) 올리고뉴클레오티드, 리보자임, 플라스미드, 면역 자극 핵산, 안티센스 (antisense), 안타고미르 (antagomir), 안티미르 (antimir), 마이크로 RNA 모방체, 슈퍼미르, U1 아답터, 및 압타머가 있다. 이들 핵산은 다양한 메카니즘을 통하여 작용한다. siRNA 또는 miRNA의 경우, 이들 핵산은 RNA 간섭 (RNAi)이라 불리는 과정을 통하여 특정 단백질의 세포내 수준을 하향-조절할 수 있다. siRNA 또는 miRNA를 세포의 세포질내에 도입시키면, 이들 이중사 RNA 작제물이 RISC로 불리는 단백질에 결합할 수 있다. siRNA 또는 miRNA의 센스 스트랜드 (sense strand)는 결합된 siRNA 또는 miRNA의 서열에 대해 상보적인 서열을 갖는 mRNA를 인식하여 결합할 수 있는 RISC내에 주형을 제공하는 RISC 복합체로부터 대체된다. 상보적 mRNA가 결합되면, RISC 복합체는 mRNA를 절단시켜 절단된 스트랜드를 방출시킨다. RNAi는 단백질 합성을 암호화하는 대응하는 mRNA의 특이적 파괴를 표적화함으로써 특정 단백질의 하향-조절을 제공할 수 있다.

[0007] siRNA 및 miRNA 작제물은 표적 단백질에 대해 지시된 뉴클레오티드 서열로 합성할 수 있기 때문에, RNAi의 치료적 응용은 극히 광범위하다. 현재까지, siRNA 작제물은 시험관내 및 생체내 모델 둘 다에서 표적 단백질을 특이적으로 하향-조절할 수 있는 능력을 나타내었다. 또한, siRNA 작제물은 임상 연구에서 현재 평가중이다.

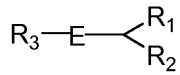
[0008] 그러나, siRNA 또는 miRNA 작제물이 현재 직면하고 있는 문제점 두가지는 첫째, 혈장 중 뉴클레아제 분해에 대한 이들의 감수성, 및 둘째, 자유 siRNA 또는 miRNA로 전신 투여시 이들이 RISC 결합할 수 있는 세포내 구획으로의 접속 가능성이 제한된다는 것이다. 이들 이중사 작제물은 분자내에 화학적으로 개질된 뉴클레오티드 링커, 예를 들면, 포스포티오에이트 그룹을 포함시킴으로써 안정화시킬 수 있다. 그러나, 이들 화학적 개질은 뉴클레아제 분해로부터 제한된 보호만을 제공하며 작제물의 활성을 감소시킬 수 있다. siRNA 또는 miRNA의 세포내 운반은 폴리머, 양이온성 리포솜과 같은 담체 시스템을 사용하거나 작제물을 화학적 개질시켜, 예를 들면, 콜레스테롤 분자를 공유결합으로 부착시킴으로써 용이하게 할 수 있다. 그러나, 개선된 운반 시스템은 siRNA 및 miRNA 분자의 효능을 증가시키고 화학적 개질에 대한 필요조건을 감소시키거나 제거할 필요가 있다.

[0009] 안티센스 올리고뉴클레오티드 및 리보자임 또한 mRNA가 단백질로 해독되는 것을 억제할 수 있다. 안티센스 작제물의 경우, 이들 단일사 테옥시핵산은 표적 단백질 mRNA의 서열에 대해 상보적인 서열을 가지며 Watson-Crick 염기 짝짓기에 의해 상기 mRNA에 결합할 수 있다. 이 결합은 표적 mRNA의 해독을 방해하고(하거나) mRNA 전사물의 RNase H 분해를 일으킨다. 결과적으로, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 작용의 특이성 (즉, 특정 질병-관련 단백질의 하향-조절)에 대해 엄청난 가능성을 갖는다. 지금까지, 이들 화합물은 염증성 질병, 암, 및 HIV 모델을 포함하여, 수개의 시험관내 및 생체내 모델에서 장래성을 보여줬다 (Agrawal, Trends in Biotech, 14:376-387 (1996)에서 참고). 안티센스는 또한 염색체 DNA와 특이적으로 하이브리드화함으로써 세포 활성에 영향을 줄 수 있다. 수종의 안티센스 약물의 인간에 대한 임상적 평가가 현재 진행중이다. 이들 약물에 대한

표적물로 bc12 및 아포리포단백질 B 유전자 및 mRNA 생성물이 있다.

- [0010] 면역-자극 핵산으로는 데옥시리보핵산 및 리보핵산이 있다. 데옥시리보핵산의 경우, 특정 서열 또는 모티프 (motifs)가 포유류에서 면역 자극을 이끌어내는 것으로 밝혀졌다. 이들 서열 또는 모티프로는 CpG 모티프, 피리미딘-풍부 서열 및 회귀성 서열이 있다. 데옥시리보핵산 중 CpG 모티프는 엔도조말 수용체, 톨-유사 수용체 9 (TLR-9)에 의해 특이적으로 인식되어, 이후 선천성 및 후천성 면역 자극 경로를 돌다 야기시키는 것으로 생각된다. 특정 면역 자극 리보핵산 서열이 또한 보고된 바 있다. 이들 RNA 서열은 톨-유사 수용체 6 및 7 (TLR-6 및 TLR-7)에 결합하여 면역 활성화를 야기시키는 것으로 생각된다. 또한, 이중사 RNA가 또한 면역을 자극시키는 것으로 보고되었으며 TLR-3으로의 결합을 통하여 활성화시키는 것으로 생각된다.
- [0011] 치료용 핵산의 사용과 관련하여 숙지되어 있는 문제점 중 하나는 포스포디에스테르 뉴클레오티드간 결합의 안정성 및 이 링커의 뉴클레아제에 대한 감수성과 관련있다. 혈청중에 엑소뉴클레아제와 엔도뉴클레아제가 존재하게 되면 포스포디에스테르 링커를 갖고 있는 핵산의 분해가 신속하게 일어나게 되어, 그 결과, 혈청의 존재하에서 또는 세포내에서의 핵산의 반감기가 매우 짧아질 수 있다 (Zelphati, O., et al., *Antisense. Res. Dev.* 3:323-338 (1993); 및 Thierry, A.R., et al., pp147-161 in *Gene Regulation: Biology of Antisense RNA and DNA* (Eds. Erickson, RP and Izant, JG; Raven Press, NY (1992)). 현재 개발중인 치료용 핵산은 이들 및 기타 공지되어 있는 문제점으로 인하여, 천연 핵산에서 발견되는 기본적인 포스포디에스테르 화학을 이용하지 않는다.
- [0012] 이런 문제는 혈청 또는 세포내 분해를 감소시키는 화학적 개량에 의해 부분적으로 극복되었다. 개량은 뉴클레오티드간 포스포디에스테르 가교 (예, 포스포로티오에이트, 메틸포스포네이트 또는 포스포르아미테이트 결합을 사용), 뉴클레오티드 염기 (예, 5'-프로피닐-피리미딘), 또는 슈가 (예, 2'-개질된 슈가)에서 시험하였다 (Uhlmann E., et al. *Antisense: Chemical Modifications. Encyclopedia of Cancer, Vol. X.*, pp64-81 Academic Press Inc. (1997)). 2'-5'-슈가 결합을 사용하여 안정성을 개선하기 위한 시도가 있었다 (참조: 미국 특허 제5,532,130호). 다른 변화도 시도된 바 있다. 그러나, 이들 해결책 중 어느 것도 전체적으로 만족스러운 것으로 입증된 것은 없으며, 생체내 치료용 유리 핵산은 여전히 제한된 효과만을 가지고 있다.
- [0013] 또한, siRNA 및 miRNA와 관련하여 상기에 기재한 바와 같이, 세포막을 가로지르기 위해서는 치료용 핵산의 제한된 안정성과 관련한 문제점 (참조: Vlassov, et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1197-1082 (1994)) 및 전신성 독성, 예를 들면, 보체-매개된 과민증, 변형된 응고 특성, 및 혈구감소증과 연관된 문제점 (Galbraith, et al., *Antisense Nucl. Acid Drug Des.* 4:201-206 (1994))이 있다.
- [0014] 효과를 개선하기 위하여, 연구원들은 화학적으로 개질된 또는 비개질된 치료용 핵산을 운반하기 위한 지질-기체 담체 시스템을 사용하기도 하였다. 문헌: Zelphati, O and Szoka, F.C., *J. Contr. Rel.* 41:99-110 (1996)에서, 저자는 음이온성 (통상적) 리포솜, pH-감응성 리포솜, 면역리포솜, 융합유도성 (fusogenic) 리포솜, 및 양이온성 지질/안티센스 응집체의 사용을 언급하고 있다. 유사하게, siRNA를 양이온성 리포솜 중에 전신 투여한 바 있으며, 이들 핵산-지질 입자는 비-인간 영장류를 포함한 포유동물에서 표적 단백질의 하향-조절을 개선하는 것으로 보고된 바 있다 (Zimmermann et al., *Nature* 441:111-114 (2006)).
- [0015] 이러한 진전에도 불구하고, 당해 분야에는 일반적인 치료용으로 적합한 개선된 지질-치료용 핵산 조성물에 대한 필요성이 남아 있다. 바람직하게는, 이들 조성물은 효과가 높은 핵산을 캡슐화하고, 약물:지질 비율을 높이며, 캡슐화된 핵산이 혈청중에서 분해되어 없어지는 것으로부터 보호하여야 하고, 전신 운반에 적합하도록 하며, 캡슐화된 핵산을 세포내 운반할 수 있어야 한다. 또한, 이들 지질-핵산 입자는 내구성이 좋아야 하고 적절한 치료 지수, 예를 들면, 유효량의 핵산으로 치료한 환자가 현격한 독성 및(또는) 환자에 대한 위험과 연관 없을 정도의 치료 지수를 제공하여야 한다. 본 발명은 그러한 조성물, 조성물의 제조 방법, 및 질병의 치료를 포함하여, 핵산을 세포중으로 도입시키기 위하여 상기 조성물을 사용하는 방법을 제공한다.
- [0016] 본 발명은 신규 양이온성 지질, 뿐만 아니라, 이를 포함하는 지질 입자를 제공한다. 이들 지질 입자는 또한 활성제를 포함할 수 있으며 본 발명의 관련 방법에 따라서 활성제를 세포로 운반하기 위하여 사용될 수 있다.

[0017] 하나의 양상으로, 본 발명은 하기식 XXXIII의 지질 및 이의 대응하는 염 및 이성체를 제공한다:



XXXIII

[0018]

상기 식에서

[0019]

R₁ 및 R₂는 서로 독립적으로 임의로 치환된 C₁₀-C₃₀ 알킬, 임의로 치환된 C₁₀-C₃₀ 알케닐, 임의로 치환된 C₁₀-C₃₀ 알키닐, 임의로 치환된 C₁₀-C₃₀ 아실, 또는 -링커-리간드이고;

[0020]

R₃은 H, 임의로 치환된 C₁-C₁₀ 알킬, 임의로 치환된 C₂-C₁₀ 알케닐, 임의로 치환된 C₂-C₁₀ 알키닐, 알킬헤테로사이클, 알킬포스페이트, 알킬포스포로티오에이트, 알킬포스포로디티오에이트, 알킬포스포네이트, 알킬아민, 하이드록시알킬, ω-아미노알킬, ω-(치환된)아미노알킬, ω-포스포알킬, ω-티오포스포알킬, 임의로 치환된 폴리에틸렌 글리콜 (PEG, mw 100-40K), 임의로 치환된 mPEG (mw 120-40K), 헤테로아릴, 헤테로사이클, 또는 링커-리간드이며;

[0021]

E는 O, S, N(Q), C(O), N(Q)C(O), C(O)N(Q), (Q)N(CO)O, O(CO)N(Q), S(O), NS(O)₂N(Q), S(O)₂, N(Q)S(O)₂, SS, O=N, 아릴, 헤테로아릴, 사이클릭 또는 헤테로사이클이고;

[0022]

Q는 H, 알킬, ω-아미노알킬, ω-(치환된)아미노알킬, ω-포스포알킬 또는 ω-티오포스포알킬이다.

[0023]

다른 양상으로, 본 발명은 본 발명의 지질을 포함하는 지질 입자를 제공한다. 특정 양태로, 상기 지질 입자는 중성 지질 또는 입자 응집을 감소시킬 수 있는 지질을 추가로 포함한다. 하나의 양태로, 지질 입자는 필수적으로 (i) 본 발명의 지질 1종 이상; (ii) DSPC, DPPC, POPC, DOPE 및 SM으로부터 선택된 중성 지질; (iii) 스테롤, 예를 들면, 콜레스테롤; 및 (iv) peg-지질, 예를 들면, PEG-DMG 또는 PEG-DMA로 이루어져 있는데, 몰비는 양이온성 지질 약 20 내지 60%; 중성 지질 5 내지 25%; 스테롤 25 내지 55%; PEG-지질 0.5 내지 15% 이다. 하나의 양태로, 본 발명의 지질은 광학적으로 순수하다.

[0024]

추가적 관련 양태로, 본 발명은 치료제를 추가로 포함하는 본 발명의 지질 입자를 포함한다. 하나의 양태로, 치료제는 핵산이다. 하나의 양태로, 핵산은 플라스미드, 면역자극 올리고뉴클레오티드, 단일사 올리고뉴클레오티드, 예를 들면, 안티센스 올리고뉴클레오티드, 안타고미르; 이중사 올리고뉴클레오티드, 예를 들면, siRNA; 압타머 또는 리보자임이다.

[0025]

또 다른 관련 양태로, 본 발명은 본 발명의 지질 입자 및 약제학적으로 허용되는 부형제, 담체 또는 희석제를 포함하는 약제학적 조성물을 포함한다.

[0026]

본 발명은 또한, 다른 관련 양태로, 세포에서 표적 유전자의 발현을 조절하는 방법을 포함하며, 이 방법은 세포에 본 발명의 지질 입자 또는 약제학적 조성물을 제공함을 특징으로 한다. 표적 유전자는 와일드 타입 유전자일 수 있다. 다른 양태로, 표적 유전자가 돌연변이를 하나 이상 함유한다. 특정 양태로, 상기 방법은 돌연변이를 하나 이상 함유하는 표적 유전자의 발현을 특이적으로 조절함을 특징으로 한다. 특정 양태로, 지질 입자가 면역자극 올리고뉴클레오티드, 단일사 올리고뉴클레오티드, 예를 들면, 안티센스 올리고뉴클레오티드, 안타고미르; 이중사 올리고뉴클레오티드, 예를 들면, siRNA, 압타머, 리보자임으로부터 선택되는 치료제를 포함한다. 하나의 양태로, 핵산은 siRNA, 안티센스 올리고뉴클레오티드, 압타머 또는 리보자임을 암호화하는 플라스미드이다.

[0027]

본 발명의 하나의 양상으로, 표적 유전자는 인자 VII, Eg5, PCSK9, TPX2, apoB, SAA, TTR, RSV, PDGF 베타 유전자, Erb-B 유전자, Src 유전자, CRK 유전자, GRB2 유전자, RAS 유전자, MEKK 유전자, JNK 유전자, RAF 유전자, Erk 1/2 유전자, PCNA(p21) 유전자, MYB 유전자, JUN 유전자, FOS 유전자, BCL-2 유전자, Cyclin D 유전자, VEGF 유전자, EGFR 유전자, Cyclin A 유전자, Cyclin E 유전자, WNT-1 유전자, 베타-카테닌 유전자, c-MET 유전자, PKC 유전자, NFKB 유전자, STAT3 유전자, 서바이빈 (survivin) 유전자, Her2/Neu 유전자, SORT1 유전자, XBP1 유전자, 토포이소머라제 I 유전자, 토포이소머라제 II 알파 유전자, p73 유전자, p21(WAF1/CIP1) 유전자, p27(KIP1) 유전자, PPM1D 유전자, RAS 유전자, 카베올린 I 유전자, MIB I 유전자, MTA1 유전자, M68 유전자, 중앙 억제제 유전자 중 돌연변이, p53 중앙 억제제 유전자, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터

[0028]

선택된다.

- [0029] 다른 양태로, 핵산은 상기 폴리펩타이드 또는 이의 기능성 변이체 또는 단편의 발현을 증가시키는, 폴리펩타이드 또는 이의 기능성 변이체 또는 단편을 암호화하는 플라스미드이다.
- [0030] 또 다른 관련 양태로, 본 발명은 개체에게 본 발명의 지질 입자 또는 약제학적 조성물을 제공함을 특징으로 하는, 개체에서 폴리펩타이드의 과발현으로 특징되는 질병 또는 질환을 치료하는 방법을 포함하며, 여기서 치료제는 siRNA, 마이크로RNA, 안티센스 올리고뉴클레오티드, 및 siRNA, 마이크로RNA, 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드를 발현시킬 수 있는 플라스미드로부터 선택되고, siRNA, 마이크로RNA, 또는 안티센스 RNA는 상기 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드에 특이적으로 결합하는 폴리뉴클레오티드, 또는 이의 보체를 포함한다.
- [0031] 다른 관련 양태로, 본 발명은 본 발명의 약제학적 조성물을 개체에게 공급함을 특징으로 하는, 개체에서 폴리펩타이드의 불충분한 발현 (underexpression)으로 특징되는 질병 또는 질환의 치료 방법을 포함하며, 여기서 치료제는 폴리펩타이드 또는 이의 기능성 변이체 또는 단편을 암호화하는 플라스미드이다.
- [0032] 추가의 양태로, 본 발명은 본 발명의 약제학적 조성물을 개체에 공급함을 특징으로 하여, 개체에서 면역 반응을 일으키는 방법을 포함하며, 여기서 치료제는 면역자극 올리고뉴클레오티드이다. 특정 양태로, 본 발명의 약제학적 조성물은 백신 또는 항원과 함께 환자에게 공급된다.
- [0033] 관련 양태로, 본 발명은 본 발명의 지질 입자와 질병 또는 병원균과 관련된 항원을 포함하는 백신을 포함한다. 하나의 양태로, 지질 입자는 면역자극 핵산 또는 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 특정 양태로, 항원은 중양 항원이다. 다른 양태로, 항원은 바이러스성 항원, 세균성 항원, 또는 기생충성 항원이다.
- [0034] 본 발명은 또한 본 발명의 지질 입자 및 약제학적 조성물의 제조 방법, 뿐만 아니라 이들 지질 입자 및 약제학적 조성물의 제조에 유용한 키트를 포함한다.
- [0035] 다른 양상으로, 본 발명은 약제, 예를 들면, 치료제 또는 진단제, 및 본 발명의 지질을 포함하는 조성물의 평가 방법을 제공한다.

도면의 간단한 설명

- [0036] 도 1은 집합된 표적화 리간드를 갖는 광학적으로 순수한 지질을 도식적으로 나타낸 것이다.
 - 도 2는 본 발명의 지질의 특징을 도식적으로 나타낸 것이다.
 - 도 3은 상이한 양이온성 지질을 함유하는 지질 입자를 0.05 또는 0.005 mg/kg 투여한 동물에서의 상대적 FVII 단백질 농도를 설명하는 그래프이다.
 - 도 4는 실시예에 기재된 방법을 사용하여 시험된 예시적 지질의 EC50 및 pKa 값을 나타낸 표이다.
- 본 발명은 부분적으로, 치료제의 생체내 운반을 위하여 지질 입자중에 사용시 장점을 제공하는 양이온성 지질의 발견에 근거한다. 특히, 수반되는 실시예에 설명되는 바와 같이, 본 발명은 본 발명에 따르는 양이온성 지질을 포함하는 핵산-지질 입자 조성물을 제공한다. 일부 양태로, 본 명세서에 기재되는 조성물은 핵산의 증가된 활성 및(또는) 생체내에서 조성물의 향상된 내성을 제공하는데, 이는 이전에 기재된 지질-핵산 입자 조성물과 비교하여 치료 지수를 현저히 증가시킬 수 있다. 추가로, 특정 치료용 핵산-지질 입자에 대해 관찰된 독성을 완화시킬 수 있는 조성물 및 사용 방법이 개시된다.
- 특정 양태로, 본 발명은 siRNA 분자의 운반을 위하여 개선된 조성물을 특이적으로 제공한다. 이들 조성물은 표적 단백질 수준 및(또는) 상기 단백질의 mRNA 수준을 하향-조절하는데 효과적인 것으로 밝혀졌다. 또한, 이들 개선된 조성물의 활성은 특정 양이온성 지질의 존재에 의존적이며 체제 중 양이온성 지질의 몰비는 활성에 영향을 줄 수 있는 것으로 밝혀졌다.
- 본 발명의 지질 입자 및 조성물은 관련된 또는 캡슐화된 치료제를 세포로, 시험관내 및 생체 내로 운반함을 포함하여, 다양한 목적으로 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명은 개체를 적합한 치료제와 관련된 본 발명의 지질 입자와 접촉시킴으로써, 이를 필요로 하는 개체에서 질병 또는 질환을 치료하는 방법을 제공한다.
- 본 명세서에 기재되는 바와 같이, 본 발명의 지질 입자는 예를 들어, siRNA 분자 및 플라스미드를 포함하여, 핵산의 운반에 특히 유용하다. 그러므로, 본 발명의 지질 입자 및 조성물은 표적 유전자 발현을 감소시키는 핵산 (예, siRNA) 또는 목적 단백질의 발현을 증가시키는데 사용할 수 있는 핵산 (예, 목적하는 단백질을 암호화하는 플라스미드)과 조합된 본 발명의 지질 입자를 세포와 접촉시킴으로써 시험관내 및 생체내 모두 표적 유전자와

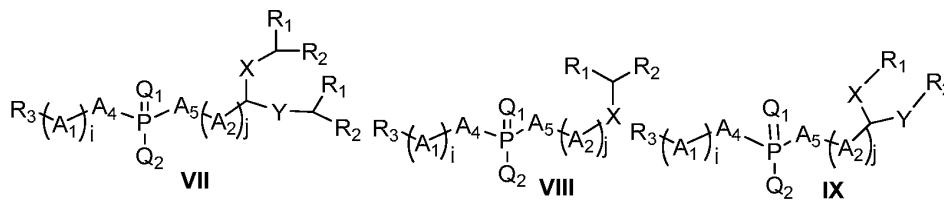
단백질의 발현을 조절하는데 사용할 수 있다.

본 발명의 양이온성 지질의 다양한 예시적 양태, 뿐만 아니라 이를 포함하는 지질 입자 및 조성물, 및 치료제를 운반하고 유전자 및 단백질 발현을 조절하기위한 이들의 용도가 이후 추가로 기재된다.

지질

본 발명은 특정 디자인 특징을 갖는 신규 지질을 제공한다. 도 2에 나타낸 바와 같이, 지질 디자인 특징은 하기와 같은 것 중 적어도 하나를 포함한다: pKa가 변화되는 헤드 그룹, 양이온성, 1°, 2° 및 3°, 모노아민, 디 및 트리아민, 올리고아민/폴리아민, 낮은 pKa 헤드 그룹 - 이미다졸 및 피리딘, 구아니디늄, 음이온성, 쯔비터이온성 및 소수성 테일은 대칭 및(또는) 비대칭 쇄, 장쇄 및 더 단쇄, 포화 및 불포화 쇄를 포함할 수 있으며; 백본은 백본 글리세라이드 및 기타 사이클릭 유사체, 에테르, 에스테르와 사이클릭, 스피로, 비사이클릭 및 폴리사이클릭 결합, 포스페이트 및 유사체, 술포네이트 및 유사체, 디술포이드, pH 감응성 결합 유사 아세탈 및 케탈, 이민 및 하이드라존, 및 옥심을 포함한다.

하나의 양태로, 지질은 하기식의 화합물 또는 이들의 염 또는 이성체 중 하나를 갖는다:



상기 식에서

R₁ 및 R₂는 서로 독립적으로 임의로 치환된 C₁₀-C₃₀ 알킬, 임의로 치환된 C₁₀-C₃₀ 알케닐, 임의로 치환된 C₁₀-C₃₀ 알키닐, 임의로 치환된 C₁₀-C₃₀ 아실, 또는 -링커-리간드이고;

R₃은 서로 독립적으로 H, 임의로 치환된 C₁-C₁₀ 알킬, 임의로 치환된 C₂-C₁₀ 알케닐, 임의로 치환된 C₂-C₁₀ 알키닐, 알킬헤테로사이클, 알킬포스페이트, 알킬포스포로티오에이트, 알킬포스포로디티오에이트, 알킬포스포네이트, 알킬아민, 하이드록시알킬, ω-아미노알킬, ω-(치환된)아미노알킬, ω-포스포알킬, ω-티오포스포알킬, 임의로 치환된 폴리에틸렌 글리콜 (PEG, mw 100-40K), 임의로 치환된 mPEG (mw 120-40K), 헤테로아릴, 헤테로사이클, 또는 링커-리간드이며;

X 및 Y는 서로 독립적으로 O, S, 알킬 또는 N(Q)이고;

Q₁은 서로 독립적으로 O 또는 S이며;

Q₂는 서로 독립적으로 O, S, N(Q), 알킬 또는 알콕시이고;

A₁, A₂, A₄ 및 A₅는 서로 독립적으로 O, S, CH₂, CHF 또는 CF₂이며;

i 및 j는 0 내지 10이다.

하나의 양태로, X 및 Y는 독립적으로 (CO), O(CO), O(CO)N, N(CO)O, (CO)O, O(CO)O, 술포네이트 또는 포스페이트일 수 있다.

불포화 알킬쇄를 포함하는 양이온성 지질은 막 유동성이 증가되어 지질 핵산 입자를 형성하는데 있어 특히 유용하다. 하나의 양태로, R₁ 또는 R₂ 중 적어도 하나는 적어도 1개, 적어도 2개, 또는 적어도 3개의 불포화 부위, 예를 들면, 이중 결합 또는 삼중 결합을 포함한다.

하나의 양태로, R₁ 또는 R₂ 중 하나만이 적어도 1개, 적어도 2개, 또는 적어도 3개의 불포화 부위를 포함한다.

하나의 양태로, R₁ 및 R₂ 둘 다 적어도 1개, 적어도 2개, 또는 적어도 3개의 불포화 부위를 포함한다.

하나의 양태로, R₁ 및 R₂가 상이한 타입의 불포화를 포함하는 것, 예를 들어, R₁ 및 R₂ 중 하나가 불포화 부위를 1개 갖고 다른 것은 2개 또는 3개의 불포화 부위를 갖는다.

하나의 양태로, R₁ 및 R₂가 둘 다 동일한 수의 불포화 부위를 포함한다.

하나의 양태로, R₁ 및 R₂가 상이한 타입의 불포화를 포함하는 것, 예를 들어, R₁ 및 R₂ 중 하나의 불포화는 이중결합이고 다른 것의 불포화는 삼중결합이다.

하나의 양태로, R₁ 및 R₂가 둘 다 동일한 타입의 불포화, 예를 들면, 이중결합 또는 삼중결합을 포함한다.

하나의 양태로, R₁ 또는 R₂ 중 적어도 하나가 이중결합 적어도 1개 및 삼중결합 적어도 1개를 포함한다.

하나의 양태로, R₁ 또는 R₂ 중 하나만이 하나가 적어도 1개의 이중결합과 적어도 1개의 삼중결합을 포함한다.

하나의 양태로, R₁ 및 R₂가 둘 다 이중결합 적어도 1개 및 삼중결합 적어도 1개를 포함한다.

하나의 양태로, R₁ 및 R₂가 둘 다 동일한 것, 예를 들어, R₁ 및 R₂가 둘 다 리놀레일(C18)이거나 R₁ 및 R₂가 둘 다 헵타데카-9-에닐이다.

하나의 양태로, R₁ 및 R₂가 서로 상이하다.

하나의 양태로, R₁ 및 R₂ 중 적어도 하나가 콜레스테롤이다.

하나의 양태로, R₁ 및 R₂ 중 하나가 -링커-리간드이다.

하나의 양태로, R₁ 및 R₂ 중 하나가 -링커-리간드이고 리간드는 친유성기이다.

하나의 양태로, R₁ 또는 R₂ 중 적어도 하나가, H 하나 또는 둘 다 F로 대체되는 CH₂ 그룹, 예를 들면, CHF 또는 CF₂를 적어도 1개 포함한다. 하나의 양태로, R₁ 및 R₂가 둘 다, H 하나 또는 둘 다 F로 대체되는 CH₂ 그룹, 예를 들면, CHF 또는 CF₂를 적어도 1개 포함한다.

하나의 양태로, R₁ 및 R₂ 중 하나 만이 H 하나 또는 둘 다 F로 대체되는 CH₂ 그룹을 적어도 1개 포함한다.

하나의 양태로, R₁ 또는 R₂ 중 적어도 하나가 CH₂F, CHF₂ 또는 CF₃로 종결된다. 하나의 양태로, R₁ 및 R₂가 둘 다 CH₂F, CHF₂ 또는 CF₃로 종결된다.

하나의 양태로, R₁ 또는 R₂ 중 적어도 하나가 -(CF₂)_y-Z''-(CH₂)_y-CH₃로, 여기서 y는 각각 독립적으로 1 내지 10이고 Z''는 O, S 또는 N(Q)이다.

하나의 양태로, R₁ 및 R₂ 둘 다 -(CF₂)_y-Z''-(CH₂)_y-CH₃로, 여기서 y는 각각 독립적으로 1 내지 10이고 Z''는 O, S 또는 N(Q)이다.

하나의 양태로, R₁ 또는 R₂ 중 적어도 하나가 -(CH₂)_y-Z''-(CF₂)_y-CF₃로, 여기서 y는 각각 독립적으로 1 내지 10이고 Z''는 O, S 또는 N(Q)이다.

하나의 양태로, R₁ 및 R₂ 둘 다 -(CH₂)_y-Z''-(CF₂)_y-CF₃로, 여기서 y는 각각 독립적으로 1 내지 10이고 Z''는 O, S 또는 N(Q)이다.

하나의 양태로, R₁ 또는 R₂ 중 적어도 하나가 -(CF₂)_y-(CF₂)_y-CF₃로, 여기서 y는 각각 독립적으로 1 내지 10이다.

하나의 양태로, R₁ 및 R₂ 둘 다 -(CF₂)_y-(CF₂)_y-CF₃로, 여기서 y는 각각 독립적으로 1 내지 10이다.

하나의 양태로, R₃은 메틸, 에틸, 폴리아민, -(CH₂)_h-헤테로아릴, -(CH₂)_h-N(Q)₂⁻, -O-N(Q)₂⁻, -(CH₂)_h-Z'-(CH₂)_h-헤테로아릴, 링커-리간드, -(CH₂)_h-헤테로사이클, 및 -(CH₂)_h-Z''-(CH₂)_h-헤테로사이클로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 h는 각각 독립적으로 0 내지 13이며 Z''는 O, S 또는 N(Q)이다.

하나의 양태로, 리간드가 융합유도성 펩타이드이다.

하나의 양태로, 지질이 라세믹 혼합물이다.

하나의 양태로, 지질이 부분입체이성질체 하나가 더 많은 것으로, 예를 들면, 지질이 부분입체이성질체를 적어도 95%, 적어도 90%, 적어도 80% 또는 적어도 70% 더 많이 갖는다.

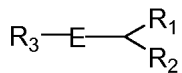
하나의 양태로, 지질이 거울상체 하나가 더 많은 것으로, 예를 들면, 지질이 거울상체를 적어도 95%, 적어도 90%, 적어도 80% 또는 적어도 70% 더 많이 갖는다.

하나의 양태로, 지질이 광학순수형인 것, 예를 들어, 단일 광학 이성체이다.

하나의 양태로, 지질이 한 종의 광학이성체에 더 많다.

이중결합이 존재할 경우 (예, 탄소-탄소 이중결합 또는 탄소-질소 이중결합), 이중결합 주변의 배열에서 이성질 현상이 있을 수 있다 (즉, 시스/트랜스 또는 E/Z 이성질현상). 이중결합의 배열이 화학구조로 설명될 경우, 대응하는 이성체가 또한 존재할 수 있는 것으로 이해된다. 존재하는 이성체의 양은 이성체의 상대적 안정성 및 이성체간 전환에 요구되는 에너지에 따라 변화될 수 있다. 따라서, 실시 목적의 경우, 일부 이중결합이 단일 배열로만 존재하는 반면, 다른 것들 (예, 상대적 안정성이 유사하고 전환 에너지는 낮은 경우)은 불가분한 평형 혼합물의 배열로 존재할 수 있다.

하나의 양상으로, 지질이 화학식 XXXIII의 화합물 또는 이들의 염 또는 이성체이다:



XXXIII

상기 식에서

R₁ 및 R₂는 서로 독립적으로 임의로 치환된 C₁₀-C₃₀ 알킬, 임의로 치환된 C₁₀-C₃₀ 알케닐, 임의로 치환된 C₁₀-C₃₀ 알키닐, 임의로 치환된 C₁₀-C₃₀ 아실, 또는 -링커-리간드이고;

R₃은 H, 임의로 치환된 C₁-C₁₀ 알킬, 임의로 치환된 C₂-C₁₀ 알케닐, 임의로 치환된 C₂-C₁₀ 알키닐, 알킬헤테로사이클, 알킬포스페이트, 알킬포스포로티오에이트, 알킬포스포로디티오에이트, 알킬포스포네이트, 알킬아민, 하이드록시알킬, ω-아미노알킬, ω-(치환된)아미노알킬, ω-포스포알킬, ω-티오포스포알킬, 임의로 치환된 폴리에틸렌 글리콜 (PEG, mw 100-40K), 임의로 치환된 mPEG (mw 120-40K), 헤테로아릴, 헤테로사이클, 또는 링커-리간드이며;

E는 O, S, N(Q), C(O), N(Q)C(O), C(O)N(Q), (Q)N(CO)O, O(CO)N(Q), S(O), NS(O)₂N(Q), S(O)₂, N(Q)S(O)₂, SS, O=N, 아릴, 헤테로아릴, 사이클릭 또는 헤테로사이클이고;

Q는 H, 알킬, ω-아미노알킬, ω-(치환된)아미노알킬, ω-포스포알킬 또는 ω-티오포스포알킬이다.

하나의 양태로, R₁ 및 R₂는 서로 독립적으로 임의로 치환된 C₁₀-C₃₀ 알킬, 임의로 치환된 C₁₀-C₃₀ 알콕시, 임의로 치환된 C₁₀-C₃₀ 알케닐, 임의로 치환된 C₁₀-C₃₀ 알케닐옥시, 임의로 치환된 C₁₀-C₃₀ 알키닐, 임의로 치환된 C₁₀-C₃₀ 알키닐옥시, 또는 임의로 치환된 C₁₀-C₃₀ 아실이다.

다른 양태로, R₃은 H, 임의로 치환된 C₁-C₁₀ 알킬, 임의로 치환된 C₂-C₁₀ 알케닐, 임의로 치환된 C₂-C₁₀ 알키닐, 임의로 치환된 알킬헤테로사이클, 임의로 치환된 헤테로사이클알킬, 임의로 치환된 알킬포스페이트, 임의로 치환된 포스포알킬, 임의로 치환된 알킬포스포로티오에이트, 임의로 치환된 포스포로티오알킬, 임의로 치환된 알킬포스포로디티오에이트, 임의로 치환된 포스포로디티오알킬, 임의로 치환된 알킬포스포네이트, 임의로 치환된 포스포노알킬, 임의로 치환된 아미노, 임의로 치환된 알킬아미노, 임의로 치환된 디(알킬)아미노, 임의로 치환된 아미노알킬, 임의로 치환된 알킬아미노알킬, 임의로 치환된 디(알킬)아미노알킬, 임의로 치환된 하이드록시알킬, 임의로 치환된 폴리에틸렌 글리콜 (PEG, mw 100-40K), 임의로 치환된 mPEG (mw 120-40K), 임의로 치환된 헤테로아릴, 임의로 치환된 헤테로사이클, 또는 링커-리간드이다.

또 다른 양태로, E는 -O-, -S-, -N(Q)-, -C(O)-, -N(Q)C(O)-, -C(O)N(Q)-, -N(Q)C(O)O-, -O(CO)N(Q)-, S(O), -N(Q)S(O)₂N(Q)-, -S(O)₂-, -N(Q)S(O)₂-, -SS-, -O-N=, =N-O-, -C(O)-N(Q)-N=, -N(Q)-N=, -N(Q)-O-, -C(O)S-,

아릴렌, 헤테로아릴렌, 사이클알킬렌 또는 헤테로사이클알킬렌이고;

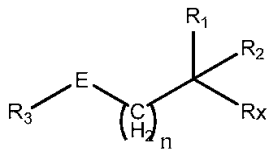
Q는 H, 알킬, ω -아미노알킬, ω -(치환된)아미노알킬, ω -포스포알킬 또는 ω -티오포스포알킬이다.

다른 양태로, 지질은 E가 O, S, N(Q), C(O), N(Q)C(O), C(O)N(Q), (Q)N(CO)O, O(CO)N(Q), S(O), NS(O)₂N(Q), S(O)₂, N(Q)S(O)₂, SS, O=N, 아릴, 헤테로아릴, 사이클릭 또는 헤테로사이클인, 화학식 XXXIII의 화합물이다.

하나의 양태로, 지질은 R₃이 H, 임의로 치환된 C₂-C₁₀ 알케닐, 임의로 치환된 C₂-C₁₀ 알키닐, 알킬헤테로사이클, 알킬포스페이트, 알킬포스포로티오에이트, 알킬포스포로디티오에이트, 알킬포스포네이트, 알킬아민, 하이드록시알킬, ω -아미노알킬, ω -(치환된)아미노알킬, ω -포스포알킬, ω -티오포스포알킬, 임의로 치환된 폴리에틸렌 글리콜 (PEG, mw 100-40K), 임의로 치환된 mPEG (mw 120-40K), 헤테로아릴, 헤테로사이클, 또는 링커-리간드인, 화학식 XXXIII의 화합물이다.

또 다른 양태로, 지질은 R₁ 및 R₂가 서로 독립적으로 임의로 치환된 C₁₀-C₃₀ 알킬, 임의로 치환된 C₁₀-C₃₀ 알키닐, 임의로 치환된 C₁₀-C₃₀ 아실, 또는 -링커-리간드인, 화학식 XXXIII의 화합물이다.

하나의 양태로, 본 발명은 화학식 XXXVIII의 지질 또는 이의 염 또는 이성체를 특징으로 한다:



XXXVIII

상기 식에서,

E는 O, S, N(Q), C(O), N(Q)C(O), C(O)N(Q), (Q)N(CO)O, O(CO)N(Q), S(O), NS(O)₂N(Q), S(O)₂, N(Q)S(O)₂, SS, O=N, 아릴, 헤테로아릴, 사이클릭 또는 헤테로사이클이고;

Q는 H, 알킬, ω -아미노알킬, ω -(치환된)아미노알킬, ω -포스포알킬 또는 ω -티오포스포알킬이며;

R₁ 및 R₂ 및 R_x는 서로 독립적으로 H, 임의로 치환된 C₁-C₁₀ 알킬, 임의로 치환된 C₁₀-C₃₀ 알킬, 임의로 치환된 C₁₀-C₃₀ 알케닐, 임의로 치환된 C₁₀-C₃₀ 알키닐, 임의로 치환된 C₁₀-C₃₀ 아실, 또는 -링커-리간드인데, 단, R₁, R₂ 및 R_x 중 적어도 하나는 H가 아니고;

R₃은 H, 임의로 치환된 C₁-C₁₀ 알킬, 임의로 치환된 C₂-C₁₀ 알케닐, 임의로 치환된 C₂-C₁₀ 알키닐, 알킬헤테로사이클, 알킬포스페이트, 알킬포스포로티오에이트, 알킬포스포로디티오에이트, 알킬포스포네이트, 알킬아민, 하이드록시알킬, ω -아미노알킬, ω -(치환된)아미노알킬, ω -포스포알킬, ω -티오포스포알킬, 임의로 치환된 폴리에틸렌 글리콜 (PEG, mw 100-40K), 임의로 치환된 mPEG (mw 120-40K), 헤테로아릴, 헤테로사이클, 또는 링커-리간드이며;

n은 0, 1, 2, 또는 3이다.

하나의 양태로, R₁ 및 R₂는 서로 독립적으로 임의로 치환된 C₁₀-C₃₀ 알킬, 임의로 치환된 C₁₀-C₃₀ 알케닐, 임의로 치환된 C₁₀-C₃₀ 알키닐, 임의로 치환된 C₁₀-C₃₀ 아실, 또는 링커-리간드이다.

하나의 양태로, R_x는 H 또는 임의로 치환된 C₁-C₁₀ 알킬이다.

하나의 양태로, R_x는 임의로 치환된 C₁₀-C₃₀ 알킬, 임의로 치환된 C₁₀-C₃₀ 알케닐, 임의로 치환된 C₁₀-C₃₀ 알키닐, 임의로 치환된 C₁₀-C₃₀ 아실, 또는 링커-리간드이다.

하나의 양태로, R₁ 및 R₂는 서로 독립적으로 임의로 치환된 C₁₀-C₃₀ 알킬, 임의로 치환된 C₁₀-C₃₀ 알콕시, 임의로 치환된 C₁₀-C₃₀ 알케닐, 임의로 치환된 C₁₀-C₃₀ 알케닐옥시, 임의로 치환된 C₁₀-C₃₀ 알키닐, 임의로 치환된 C₁₀-C₃₀

알킬닐옥시, 또는 임의로 치환된 C₁₀-C₃₀ 아실, 또는 링커-리간드이다.

하나의 양태로, R₃은 H, 임의로 치환된 C₁-C₁₀ 알킬, 임의로 치환된 C₂-C₁₀ 알케닐, 임의로 치환된 C₂-C₁₀ 알키닐, 임의로 치환된 알킬헤테로사이클, 임의로 치환된 헤테로사이클알킬, 임의로 치환된 알킬포스페이트, 임의로 치환된 포스포알킬, 임의로 치환된 알킬포스포로티오에이트, 임의로 치환된 포스포로티오알킬, 임의로 치환된 알킬포스포로디티오에이트, 임의로 치환된 포스포로디티오알킬, 임의로 치환된 알킬포스포네이트, 임의로 치환된 포스포노알킬, 임의로 치환된 아미노, 임의로 치환된 알킬아미노, 임의로 치환된 디(알킬)아미노, 임의로 치환된 아미노알킬, 임의로 치환된 알킬아미노알킬, 임의로 치환된 디(알킬)아미노알킬, 임의로 치환된 하이드록시알킬, 임의로 치환된 폴리에틸렌 글리콜 (PEG, mw 100-40K), 임의로 치환된 mPEG (mw 120-40K), 임의로 치환된 헤테로아릴, 임의로 치환된 헤테로사이클, 또는 링커-리간드이다.

하나의 양태로, X 및 Y는 서로 독립적으로 -O-, -S-, 알킬렌, -N(Q)-, -C(O)-, -O(CO)-, -OC(O)N(Q)-, -N(Q)C(O)O-, -C(O)O-, -OC(O)O-, -OS(O)(Q₂)O-, 또는 -OP(O)(Q₂)O- 이다.

하나의 양태로, Q는 H, 알킬, ω-아미노알킬, ω-(치환된)아미노알킬, ω-포스포알킬, 또는 ω-티오포스포알킬이다.

하나의 양태로, Q₁은 각각 독립적으로 O 또는 S이다.

하나의 양태로, Q₂는 각각 독립적으로 O, S, N(Q)(Q), 알킬 또는 알콕시이다.

하나의 양태로, A₁, A₂, A₄ 및 A₅가 서로 독립적으로 -O-, -S-, -CH₂-, -CHR⁵-, -CR⁵R⁵-, -CHF- 또는 -CF₂-이다.

하나의 양태로, E는 -O-, -S-, -N(Q)-, -C(O)-, -C(O)N(Q)-, -N(Q)C(O)-, -S(O)-, -S(O)₂-, -SS-, -O-N=, =N-O-, 아릴렌, 헤테로아릴렌, 사이클로알킬렌, 또는 헤테로사이클로알킬렌이다.

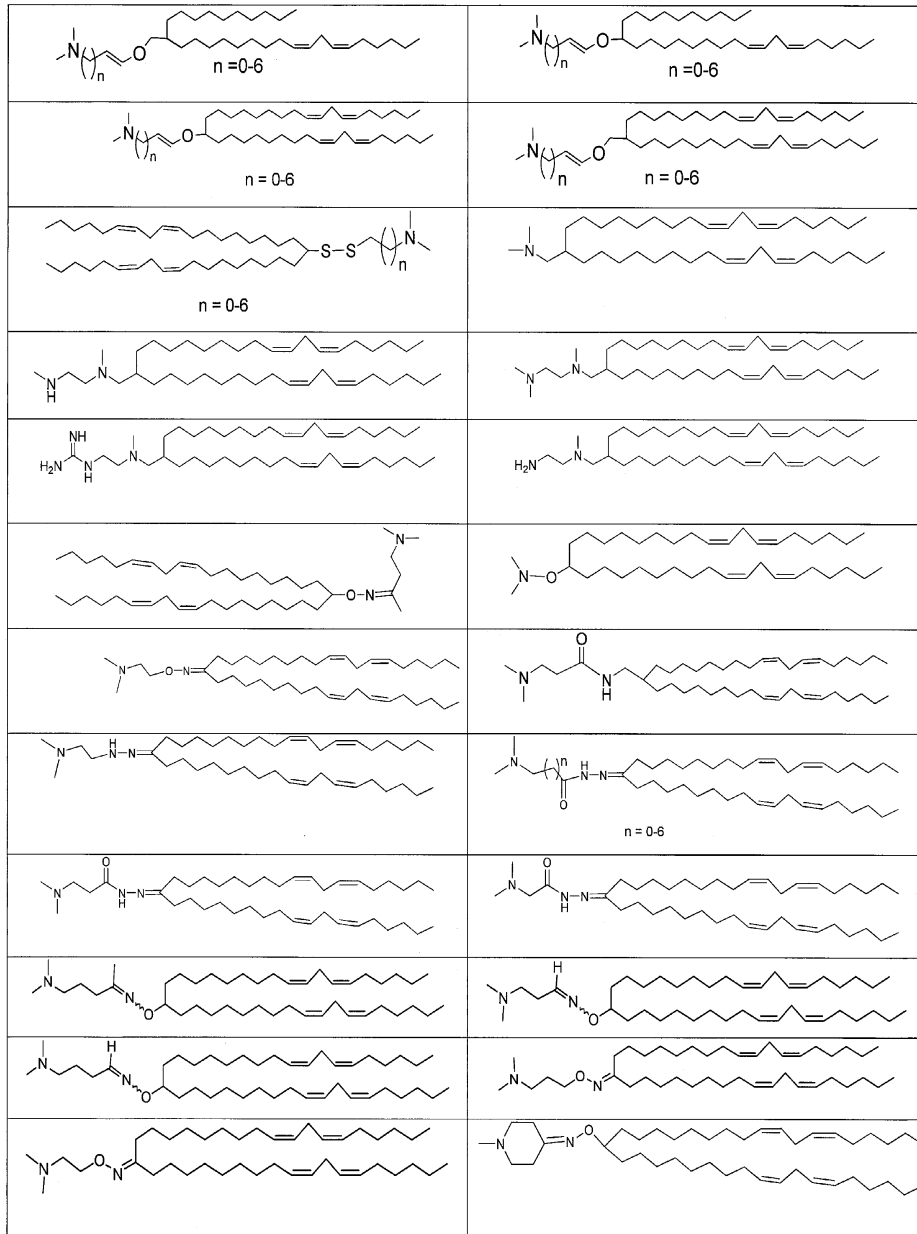
하나의 양태로, i 및 j는 서로 독립적으로 0 내지 10이다.

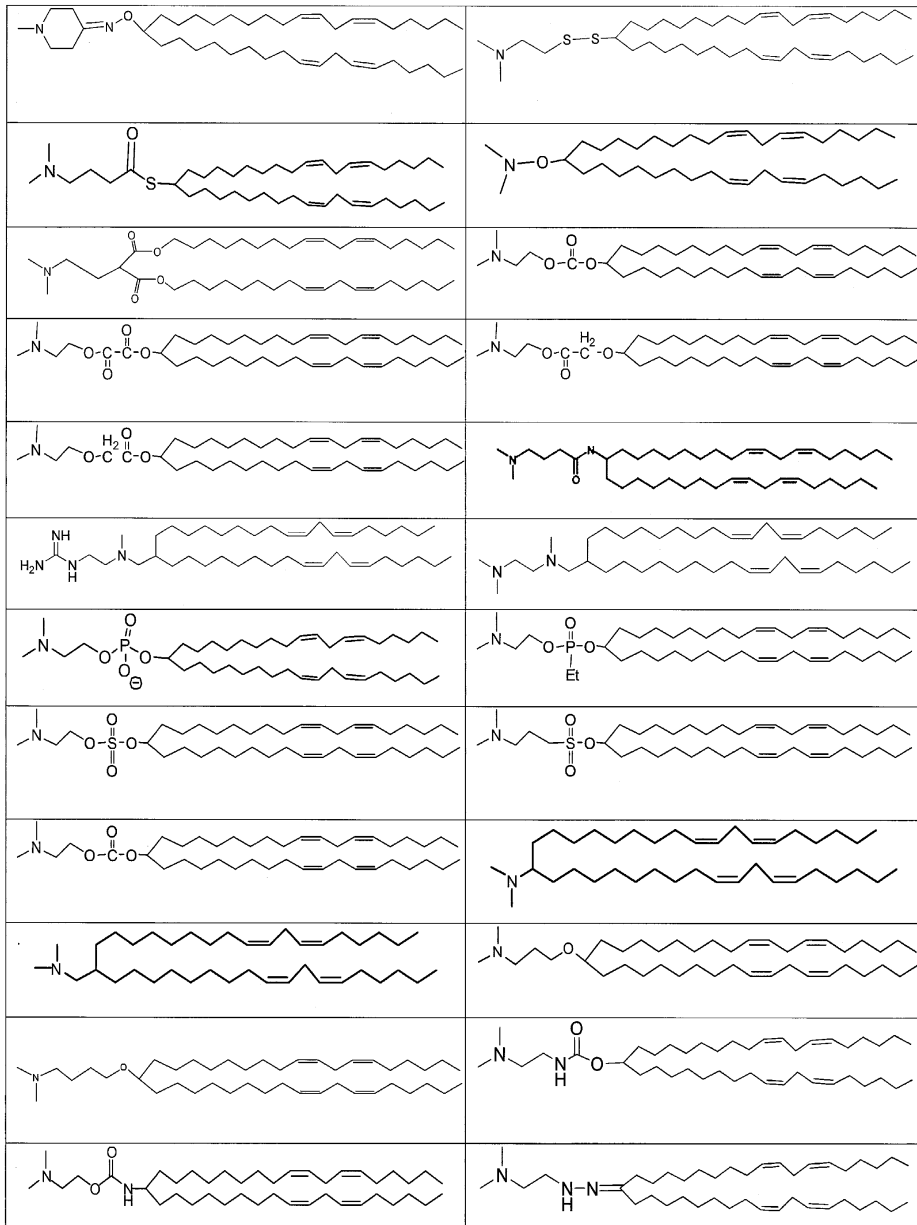
어떤 경우, R₃은 ω-아미노알킬, ω-(치환된)아미노알킬, ω-포스포알킬, 또는 ω-티오포스포알킬이고; 이들은 각각 임의로 치환된다. ω-(치환된)아미노알킬그룹의 예로 2-(디메틸아미노)에틸, 3-(디이소프로필아미노)프로필, 또는 3-(N-에틸-N-이소프로필아미노)-1-메틸프로필이 있다.

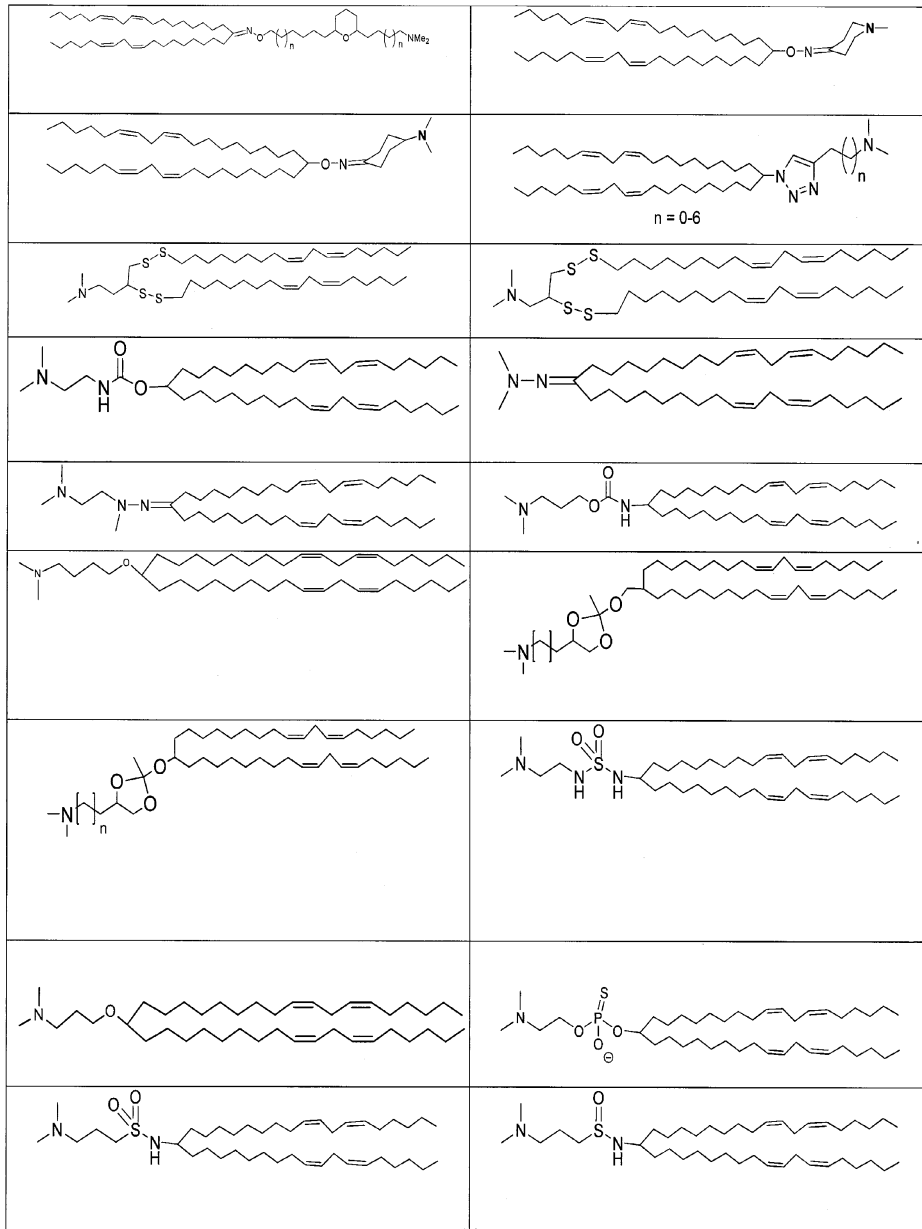
하나의 양태로, X 및 Y는 독립적으로 -O-, -S-, 알킬렌, 또는 -N(Q)-이다.

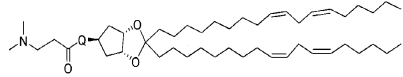
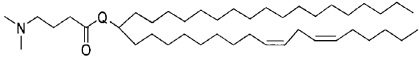
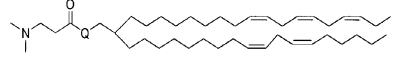
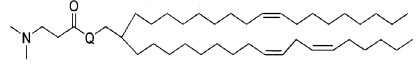
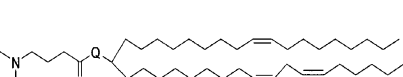
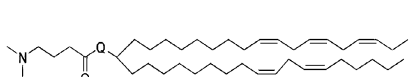
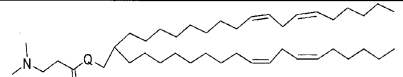
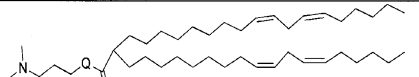
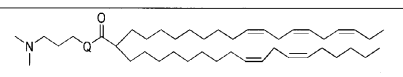
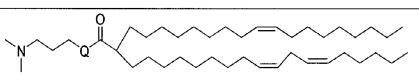
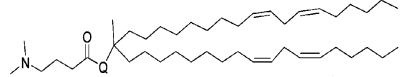
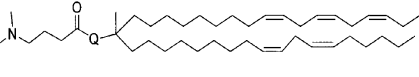
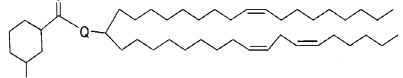
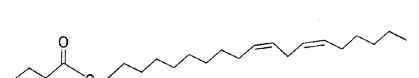
하나의 양태로, 양이온성 지질은 하기 표1에 나타낸 지질로 이루어진 군으로부터 선택된다.

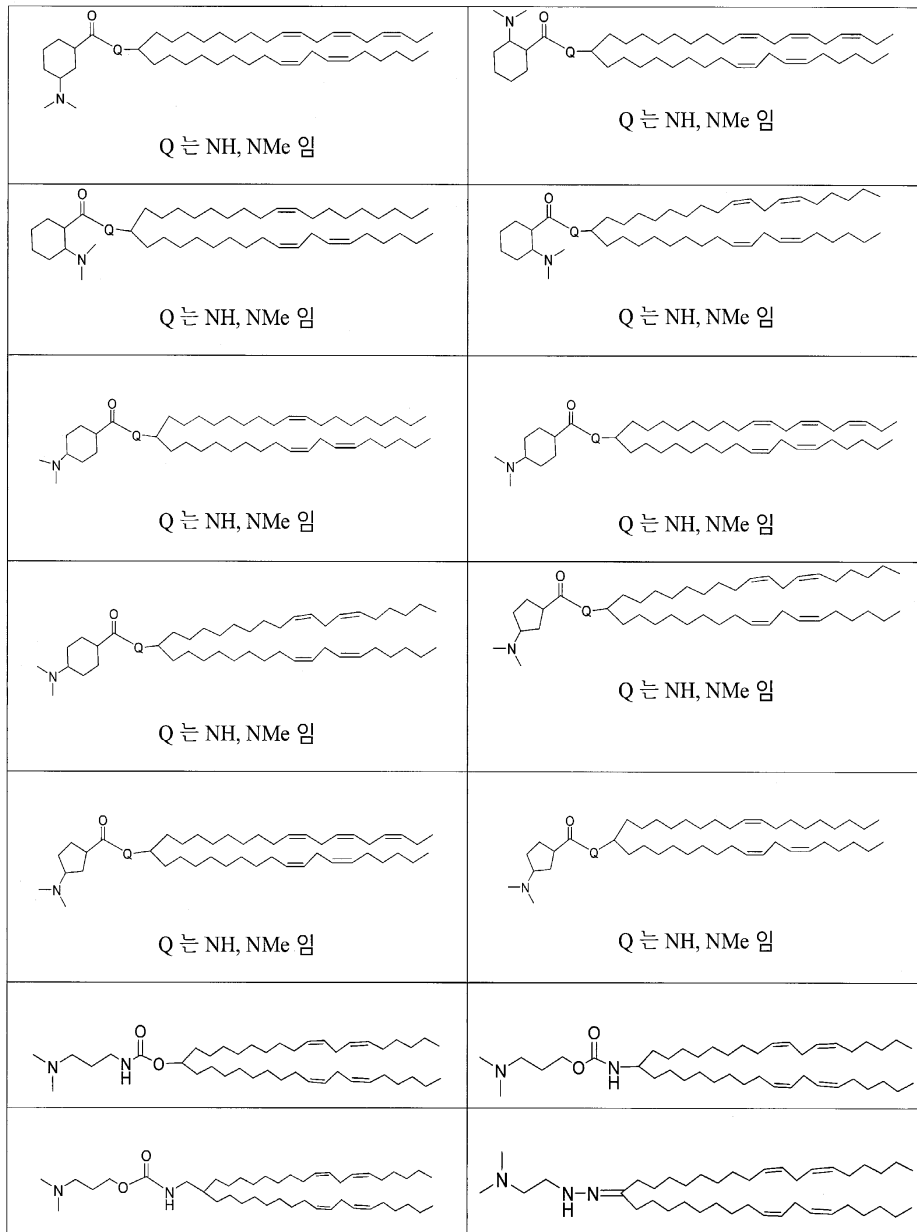
[표 1] 본 발명의 일부 양이온성 지질







 <p>Q 는 NH, NMe 임</p>	 <p>Q 는 NH, NMe 임</p>
 <p>Q 는 NH, NMe 임</p>	 <p>Q 는 NH, NMe 임</p>
 <p>Q 는 NH, NMe 임</p>	 <p>Q 는 NH, NMe 임</p>
 <p>Q 는 NH, NMe 임</p>	 <p>Q 는 NH, NMe 임</p>
 <p>Q 는 NH, NMe 임</p>	 <p>Q 는 NH, NMe 임</p>
 <p>Q 는 NH, NMe 임</p>	 <p>Q 는 NH, NMe 임</p>
 <p>Q 는 NH, NMe 임</p>	 <p>Q 는 NH, NMe 임</p>



지질에 대한 모든 부분입체이성질체를 제시하진 않았으나, 본 발명의 양상 중 하나는 모든 부분입체이성질체를 제공하는 것이며 그러하듯, 광학적으로 순수하고 부분입체이성질체적으로 강화된 지질이 또한 본 발명의 일부가 된다.

하나의 양태로, R₃은 -링커-리간드이다.

특정 양태로, 본 발명의 지질은 양이온성 지질이다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "양이온성 지질"은 1개 또는 2개의 지방산 또는 지방 알킬쇄와 양성자화되어 생리학적 pH에서 양이온성 지질을 형성할 수 있는 아미노 헤드 그룹 (알킬아미노 또는 디알킬아미노 그룹 포함)을 갖는 지질들을 포함함을 의미한다. 일부 양태로, 양이온성 지질은 "아미노 지질"을 언급한다.

기타 양이온성 지질은 교체가능한 지방산 그룹과 기타 디알킬아미노 그룹을 갖는 것들로서, 알킬 치환체가 상이한 것들이 있다 (예, N-에틸-N-메틸아미노-, N-프로필-N-에틸아미노- 등). R₁과 R₂가 둘 다 장쇄 알킬 또는 아실 그룹인 양태의 경우, 이들은 동일하거나 상이할 수 있다. 일반적으로, 덜 포화된 아실 쇠를 갖는 지질 (예, 양이온성 지질)은 더욱 용이하게 크기를 맞출 수 있는데, 특히, 복합체의 크기를 여과살균 목적으로 약 0.3 마이크로 이하로 할 경우 그러하다. 탄소쇄 길이의 범위가 C₁₀ 내지 C₂₀인 불포화 지방산을 함유하는 양이온성 지질이 전형적인 것이다. 다른 스캐폴드 (scaffolds)를 또한 사용하여 아미노 그룹 (예, 양이온성 지질의 아미노 그룹)와 양이온성 지질의 지방산 또는 지방 알킬 부위를 분리할 수 있다. 적합한 스캐폴드는 당해 분야의

숙련가에게 공지되어 있다.

특정 양태로, 본 발명의 양이온성 지질은 지질이 생리학적 pH 또는 그 이하 (예, pH 7.4)에서 양으로 하전되고, 제2의 pH, 바람직하게는 생리학적 pH 또는 그 이상의 pH에서 중성이도록, 양자화 또는 탈양자화될 수 있는 그룹을 적어도 1개 갖는다. 그러한 지질이 또한 양이온성 지질로 언급된다. 물론, pH의 함수로서 양성자를 첨가 또는 제거하는 것이 평형 공정이며, 하전된 또는 중성 지질에 대한 언급은 우세한 화학종의 특성을 언급하는 것이고 모든 지질이 하전된 또는 중성 형태로 존재하는 것을 요구하는 것이 아니라는 것으로 이해되어야 한다. 양자화 또는 탈양자화될 수 있는 그룹을 1개 이상 갖거나, 또는 썬비터이온성인 지질의 사용이 본 발명에서 배제되는 것은 아니다.

특정 양태로, 본 발명에 따르는 양자화가능한 지질 (즉, 양이온성 지질) 중 양자화가능 그룹의 pKa 범위는 약 4 내지 약 11이다. 전형적으로, 지질 입자로 혼입될 때, 지질의 pKa는 약 4 내지 약 7로, 예를 들면, 약 5.5 내지 6.8 사이와 같이, 약 5 내지 7 사이의 값이다. 그러한 지질은 더 낮은 pH인 제형화 단계에서는 양이온성인 반면, 생리학적 pH 근처인 pH 7.4에서 입자는 대체로 (그러나 완전히는 아니게) 표면 중성화된다. 약 4 내지 7 범위의 pKa의 장점 중 하나가 입자의 외부 표면과 관련된 적어도 일부의 핵산이 생리학적 pH에서 이의 정전기적 상호반응을 상실하고 단순한 투석에 의해서 제거되어; 입자의 클리어런스에 대한 감응성을 크게 감소시키는 것이다. 지질 입자 내 지질의 pKa 측정은 예를 들어, 형광 프로브 2-(p-톨루이디노)-6-나프탈렌 술폰산 (TNS)을 사용하여, 문헌: Cullis et al., (1986) Chem Phys Lipids 40, 127-144에 기재된 방법으로 수행할 수 있다.

하나의 양태로, 본 발명의 제제를 적어도 75%, 적어도 80% 또는 적어도 90% 포집된다.

하나의 양태로, 본 발명의 제형이 아포리포단백질을 추가로 포함한다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "아포리포단백질" 또는 "리포단백질"은 당해 분야의 숙련가에게 공지되어 있는 아포리포단백질 및 이들의 변이체 및 단편과 이후 기재되는 아포리포단백질 항진제, 이들의 유사체 또는 단편을 언급한다. 적합한 아포리포단백질로는, 비제한적으로, ApoA-I, ApoA-II, ApoA-IV, ApoA-V 및 ApoE, 및 이들의 활성 다형성체 형태, 이소형태 (isoforms), 변이체 및 돌연변이체, 뿐만 아니라 이들의 단편 또는 절단된 형태가 있다. 특정 양태로, 아포리포단백질이 티올 함유 아포리포단백질이다. "티올 함유 아포리포단백질"은 시스테인 잔기를 적어도 1개 함유하는 아포리포단백질, 변이체, 단편 또는 이소형태를 언급한다. 가장 통상적인 티올 함유 아포리포단백질은 ApoA-I Milano (ApoA-I_M) 및 ApoA-I Paris (ApoA-I_P)로, 이들은 시스테인 잔기를 1개 함유한다 (Jia et al., 2002, Biochem. Biophys. Res. Comm. 297:206-13; Bielicki and Oda, 2002, Biochemistry 41:2089-96). ApoA-II, ApoE2 및 ApoE3이 또한 티올 함유 아포리포단백질이다. 단리된 ApoE 및(또는) 재조합적으로 생산한 이들의 형태를 포함한, 이의 활성 단편 및 폴리펩타이드 유사체가 미국 특허 제5,672,685호; 제5,525,472호; 제5,473,039호; 제5,182,364호; 제5,177,189호; 제5,168,045호; 제5,116,739호에 기재되어 있으며; 이들의 내용은 본 명세서에서 참고로 인용된다. ApoE3은 다음 문헌에 개시되어 있다: Weisgraber, et al., "Human E apoprotein heterogeneity: cysteine-arginine interchanges in the amino acid sequence of the apo-E isoforms," J. Biol. Chem. (1981)256:9077-9083; 및 Rall, et al., "Structural basis for receptor binding heterogeneity of apolipoprotein E from type III hyperlipoproteinemic subjects," Proc. Nat. Acad. Sci. (1982)79:4696-4700. GenBank 수탁번호 K00396도 참고.

특정 양태로, 아포리포단백질은 성숙 형태, 프리프로아포리포단백질의 형태 또는 프로아포리포단백질의 형태로 존재할 수 있다. 프로- 및 성숙 ApoA-I (Duverger et al., 1996, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 16(12):1424-29), ApoA-I Milano (Klon et al., 2000, Biophys.J.79:(3)1679-87; Franceschini et al., 1985, J. Biol. Chem.260:1632-35), ApoA-I Paris (Daum et al., 1999, J. Mol. Med. 77:614-22), ApoA-II (Shelness et al., 1985, J. Biol. Chem. 260(14):8637-46; Shelness et al., 1984, J. Bio. Chem.259(15):9929-35), ApoA-IV (Duverger et al., 1991, Euro. J. Biochem.201(2):373-83), 및 ApoE (McLean et al., 1983, J. Biol. Chem. 258(14):8993-9000)의 호모- 및 헤테로다이어머 (실현가능한 경우)를 또한 본 발명의 범주내에서 이용할 수 있다.

특정 양태로, 아포리포단백질은 상기 아포리포단백질의 단편, 변이체 또는 이소형태일 수 있다. 용어 "단편"은 원래의 아포리포단백질의 아미노산 서열보다 더 짧은 아미노산 서열을 갖는 아포리포단백질을 언급하는 것으로 상기 단편은 지질 결합 특성을 포함한, 원래의 아포리포단백질의 활성을 보유한다. "변이체"는 아포리포단백질의 아미노산 서열에서의 치환 또는 변형을 의미하는 것으로, 치환 또는 변형, 예를 들어 아미노산 잔기의 첨가 및 결실은 지질 결합 특성을 포함한 원래의 아포리포단백질의 활성을 폐기시키지 않는다. 따라서, 변이체는 원래의 아포리포단백질의 아미노산 서열과 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 갖는 단백질 또는 펩타이드를 포함

할 수 있는데, 단 여기서 아미노산 잔기 중 1개 이상은 화학적으로 유사한 아미노산으로 보존적으로 치환된다. 보존적 치환의 예로 이소루이신, 발린, 루이신 또는 메티오닌과 같은 소수성 잔기 중 적어도 1개가 다른 것으로 치환되는 것을 포함한다. 마찬가지로, 본 발명은 예를 들어, 아르기닌과 리신, 글루타민과 아스파라긴, 및 글리신과 세린과 같이, 친수성 잔기 중 적어도 1개의 치환을 고려한다 (참조: 미국 특허 제6,004,925호, 제 6,037,323호 및 제6,046,166호). 용어 "이소형태"는 동일하고, 더 큰 또는 부분적인 기능 및 유사, 동일 또는 부분적인 서열을 갖는 단백질을 언급하는 것으로, 동일한 유전자의 생성물이거나 아닐 수 있으며 통상적으로 조직 특이적거나 아닐 수 있다 (참조: Weisgraber 1990, J.Lipid Res. 31(8):1503-11; Hixson and Powers 1991, J.Lipid Res.32(9):1529-35; Lackner et al., 1985, J.Biol. Chem. 260(2):703-6; Hoeg et al., 1986, J. Biol. Chem.261(9):3911-4; Gordon et al., 1984, J. Biol.Chem. 259(1):468-74; Powell et al., 1987, Cell 50(6):831-40; Aviram et al., 1998, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.18(10):1617-24; Aviram et al., 1998, J.Clin. Invest.101(8):1581-90; Billecke et al., 2000, Drug Metab. Dispos.28(11):1335-42; Draganov et al., 2000, J.Biol. Chem.275(43):33435-42; Steinmetz and Utermann 1985, J. Biol. Chem. 260(4):2258-64; Widler et al., 1980, J. Biol. Chem. 255(21):10464-71; Dyer et al., 1995, J.Lipid Res.36(1):80-8; Sacre et al., 2003, FEBS Lett. 540(1-3):181-7; Weers, et al., 2003, Biophys. Chem.100(1-3):481-92; Gong et al., 2002, J. Biol.Chem. 277(33):29919-26; Ohta et al., 1984, J.Biol.Chem.259(23):14888-93 및 미국 특허 제6,372,886호).

특정 양태로, 본 발명의 방법 및 조성물은 아포리포단백질의 키메라 작제물의 사용을 포함한다. 예를 들면, 아포리포단백질의 키메라 작제물은 허혈 재관류 보호 특성을 함유하는 아포리포단백질 도메인과 관련있는 지질 결합능이 높은 아포리포단백질 도메인으로 이루어질 수 있다. 아포리포단백질의 키메라 작제물은 아포리포단백질 내의 별개의 영역을 포함하는 작제물 (즉, 동족성 작제물)일 수 있거나 키메라 작제물은 상이한 아포리포단백질 간의 별개의 영역을 포함하는 작제물 (즉, 이종성 작제물)일 수 있다. 키메라 작제물을 포함하는 조성물은 또한 특이적인 특성 (예, 지질 결합, 수용체 결합, 효소, 효소 활성화, 항산화 또는 환원-산화반응 특성)을 갖도록 고안된 아포리포단백질 변이체 또는 절편인 절편을 포함할 수 있다 (참조: Weisgraber 1990, J.Lipid Res. 31(8):1503-11; Hixson and Powers 1991, J.Lipid Res.32(9):1529-35; Lackner et al., 1985, J.Biol. Chem. 260(2):703-6; Hoeg et al., 1986, J. Biol. Chem.261(9):3911-4; Gordon et al., 1984, J. Biol.Chem. 259(1):468-74; Powell et al., 1987, Cell 50(6):831-40; Aviram et al., 1998, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.18(10):1617-24; Aviram et al., 1998, J.Clin. Invest.101(8):1581-90; Billecke et al., 2000, Drug Metab. Dispos.28(11):1335-42; Draganov et al., 2000, J.Biol. Chem.275(43):33435-42; Steinmetz and Utermann 1985, J. Biol. Chem. 260(4):2258-64; Widler et al., 1980, J. Biol. Chem. 255(21):10464-71; Dyer et al., 1995, J.Lipid Res.36(1):80-8; Sorenson et al, 1999, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 19(9):2214-25; Palgunachari 1996, Arterioscler. Throb. Vasc. Biol.16(2):328-38;Thurberg et al., J. Biol. Chem.271(11):6062-70; Dyer 1991, J. Biol.Chem. 266(23):150009-15; Hill 1998, J.Bio.Chem.273(47):30979-84).

본 발명에서 이용되는 아포리포단백질은 또한 재조합, 합성, 반-합성 또는 정제된 아포리포단백질을 포함한다. 본 발명에서 이용되는, 아포리포단백질 또는 이의 등가물을 수득하는 방법은 당해 분야에 숙지되어 있다. 예를 들어, 아포리포단백질은 예를 들어, 밀도 구배 원심분리법 또는 면역침화성 크로마토그래피, 또는 합성, 반-합성 또는 당해 분야의 숙련자에게 공지된 재조합 DNA 기술(참조: Mulugeta et al., 1998, J.Chromatogr.798(1-2):83-90; Chung et al., 1980, J.Lipid Res.21(3):284-91; Cheung et al., 1987, J.Lipid Res. 28(8):913-29; Persson, et al., 1998, J.Chromatogr.711:97-109; 미국 특허 제5,059,528호, 제5,834,596호, 제 5,876,968호 및 제5,721,114호; 및 PCT 공개특허공보 W086/04920 및 W087/02062)로 생산된, 플라즈마 또는 천연 생성물로부터 분리시킬 수 있다.

본 발명에서 이용되는 아포리포단백질은 추가로 ApoA-I, ApoA-I Milano (ApoA-I_M), ApoA-I Paris (ApoA-I_P), ApoA-II, ApoA-IV, 및 ApoE의 활성을 모방하는 펩타이드 및 펩타이드 유사체와 같은 아포리포단백질 항진제를 포함한다. 예를 들어, 아포리포단백질은 미국 특허 제6,004,925호, 제6,037,323호, 제6,046,166호 및 제 5,840,688호에 기재된 것들 중 하나일 수 있으며, 이들 문헌의 내용은 본 명세서에서 전문 참고로 인용된다.

아포리포단백질 항진제 펩타이드 또는 펩타이드 유사체는 예를 들어, 미국 특허 제6,004,925호, 제6,037,323호 및 제6,046,166호에 기재된 기술을 포함하여, 당해 분야에 공지된 펩타이드 합성을 위한 기술을 사용하여 합성하거나 제조할 수 있다. 예를 들어, 상기 펩타이드는 Merrifield (1963, J.Am.Chem.Soc.85:2149-2154)에 의해 초기에 기재된 고체상 합성 기술을 사용하여 제조할 수 있다. 다른 펩타이드 합성 기술은 문헌: Bodanszky et

al., Peptide Synthesis, John Wiley & Sons, 2d Ed., (1976)으로부터 알 수 있으며 다른 참고 문헌도 당해 분야의 숙련가들이 용이하게 입수할 수 있다. 폴리펩타이드 합성 기술의 요약은 문헌: Stuart and Young, Solid Phase Peptide. Synthesis, Pierce Chemical Company, Rockford, III., (1984)에서 알 수 있다. 펩타이드는 또한 다음 문헌에 기재된 용액법으로 합성할 수 있다: The Proteins, Vol.II, 3d Ed., Neurath et al., Eds., p.105-237, Academic Press, New York, N.Y.(1976). 다른 펩타이드 합성에 사용하기에 적합한 보호기가 상기 언급한 교재 뿐만 아니라 다음 문헌: McOmie, Protective Groups in Organic Chemistry, Plenum Press, New York, N.Y. (1973)에 기재되어 있다. 본 발명의 펩타이드는 또한 예를 들어, 아포리포단백질 A-I의 더 큰 영역으로부터 화학적 또는 효소적 절단에 의해 제조할 수 있다.

특정 양태로, 아포리포단백질은 아포리포단백질의 혼합물일 수 있다. 하나의 양태로, 아포리포단백질은 균질 혼합물, 즉, 단일 타입의 아포리포단백질일 수 있다. 다른 양태로, 아포리포단백질은 아포리포단백질의 비균질 혼합물, 즉, 2종 이상의 상이한 아포리포단백질일 수 있다. 아포리포단백질의 비균질 단백질의 양태는 예를 들어, 동물 공급원으로부터의 아포리포단백질 및 반-합성 공급원으로부터의 아포리포단백질의 혼합물을 포함할 수 있다. 특정 양태로, 비균질 혼합물은 예를 들어, ApoA-I 및 ApoA-I Milano의 혼합물을 포함할 수 있다. 특정 양태로, 비균질 혼합물은 예를 들어, ApoA-I Milano 및 ApoA-I Paris의 혼합물을 포함할 수 있다. 본 발명의 방법 및 조성물에 사용하기에 적합한 혼합물은 당해 분야의 숙련가에게 자명할 것이다.

아포리포단백질을 천연 공급원으로부터 수득하는 경우, 식물 또는 동물 공급원으로부터 수득할 수 있다. 아포리포단백질을 동물 공급원으로부터 수득하는 경우, 아포리포단백질은 어떠한 종으로부터 수득될 수 있다. 특정 양태로, 아포리포단백질을 동물 공급원으로부터 수득할 수 있다. 특정 양태로, 아포리포단백질을 인간 공급원으로부터 수득할 수 있다. 본 발명의 바람직한 양태로, 아포리포단백질이 아포리포단백질을 투여할 개체와 동일한 종으로부터 유래된다.

지질 입자

본 발명은 또한 상기한 양이온성 지질 1종 이상을 포함하는 지질 입자를 제공한다. 지질 입자는, 비제한적으로, 리포솜을 포함한다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같은, 리포솜은 수성 내부를 에워싸는 지질-함유 막을 갖는 구조이다. 리포솜은 지질막을 1개 이상 가질 수 있다. 본 발명은 단일라멜라 (unilamellar)로 명칭되는, 단일층 리포솜, 및 다중라멜라 (multilamellar)로 명칭되는, 다중층 리포솜 둘 다 고려한다. 핵산과 복합체화될 경우, 지질 입자는 또한 예를 들어, 하기 문헌에 기재된 바와 같이, DNA 층 사이에 샌드위치되어 있는 양이온성 지질 2개 층으로 이루어진 리포플렉스일 수 있다: Felgner, Scientific American.

본 발명의 지질 입자는 추가의 지질 및(또는) 콜레스테롤과 같은 다른 성분 1종 이상을 추가로 포함할 수 있다. 기타 지질이 다양한 목적으로, 예를 들면, 지질 산화를 방지하기 위하여 또는 리포솜 표면에 리간드를 부착시키기 위하여 본 발명의 리포솜 조성물에 포함될 수 있다. 양쪽성, 중성, 양이온성, 및 음이온성 지질을 포함하여, 어떠한 수의 지질이라도 본 발명의 리포솜에 존재할 수 있다. 그러한 지질은 단독으로 또는 함께 사용될 수 있다. 존재할 수 있는 추가의 지질 성분의 특정 예는 하기와 같다.

본 발명의 지질 입자에 존재할 수 있는 추가의 성분으로 폴리아미드 올리고머 (참조: 예를 들어, 미국 특허 제 6,320,017호), 펩타이드, 단백질, 세제, 지질-유도체, 예를 들어, 포스파티딜에탄올아민에 커플링되어 있는 PEG 및 세라마이드에 접합되어 있는 PEG (참조: 미국 특허 제5,885,613호)와 같은 2개층 안정화 성분이 있다.

특정 양태로, 지질 입자가 제2의 아미노 지질 또는 양이온성 지질, 중성 지질, 스테롤, 및 제형화 중 지질 입자의 응집을 감소시키기 위하여 선택되어, 제형화 중 전하-유발된 응집을 방지하는 입자의 입체적 안정화를 일으킬 수 있는, 지질을 1종 이상 포함한다.

제형화 중 입자의 응집을 감소시키는 지질의 예로, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)-개질된 지질, 모노시알로강글리오사이드 Gm1, 및 폴리아미드 올리고머 ("PAO"), 예를 들면, 미국 특허 제6,320,017호에 기재된 것들이 있다. PEG, Gm1 또는 ATTA와 같이, 제형화 중 응집을 방지하는, 비하전된, 친수성, 입체-방벽 부위를 갖는 기타 화합물을 또한 본 발명의 방법 및 조성물에 사용하기 위하여 지질에 커플링시킬 수 있다. ATTA-지질은 예를 들면, 미국 특허 제6,320,017호에 기재되어 있으며, PEG-지질 접합체는 예를 들면, 미국 특허 제5,820,873호, 제 5,534,499호 및 제5,885,613호에 기재되어 있다. 전형적으로, 응집을 방지하기 위하여 선택되는 지질 성분의 농도는 약 1 내지 15% (지질의 몰%)이다.

본 발명에서 유용한 PEG-개질된 지질 (또는 지질-폴리옥시에틸렌 접합체)의 특정 예는 지질 소낭의 표면에 PEG 부분을 확실하게하기 위하여 여러 가지 "앵커링" 지질 부분을 가질 수 있다. 적합한 PEG-개질된 지질의 예로

PEG-개질된 포스파티딜에탄올아민 및 포스파티드산, 본 명세서에서 참고로 인용되는 계류중인 USSN 08/486,214에 기재되어 있는 PEG-세라마이드 접합체 (예, PEG-CerC14 또는 PEG-CerC20), PEG-개질된 디알킬아민 및 PEG-개질된 1,2-디아실옥시프로판-3-아민이 있다. PEG-개질된 디아실글리세롤 및 디알킬글리세롤이 특히 바람직하다.

PEG 또는 ATTA와 같이 입체적으로-큰 부위가 지질 앵커에 접합되는 경우의 양태에서, 지질 앵커의 선택은 접합체가 지질 입자에 대해 갖도록 할 타입에 따른다. mPEG (mw2000)-디아스테아로일포스파티딜에탄올아민 (PEG-DSPE)는 입자가 순환되어 없어질 때 까지, 가능하게는 며칠 상관으로, 리포솜과 연합된 상태로 남아 있다는 것은 숙지되어 있다. PEG-CerC20과 같은 다른 접합체가 유사한 스테이닝 능력 (staying capacity)을 갖는다. 그러나, PEG-CerC14는 혈청에 노출시 제형으로부터 신속하게 교체되어, 일부 검정에서 $T_{1/2}$ 이 60분 미만이었다. 미국 특허원 SN 08/486,214에 설명되어 있는 바와 같이, 적어도 3가지 특징이 교체 속도에 영향을 준다: 아실쇄의 길이, 아실쇄의 포화도, 및 입체-방벽 헤드 그룹의 크기. 이들 특징을 적합하게 변화시킨 화합물이 본 발명에 유용할 수 있다. 일부 치료용의 경우, PEG-개질된 지질은 생체내에서 핵산-지질 입자로부터 신속하게 소실되는 것이 바람직할 수 있으며, 따라서 PEG-개질된 지질은 상대적으로 짧은 지질 앵커를 갖는다. 다른 치료용의 경우, 핵산-지질 입자는 혈장 순환 수명이 더 긴 것이 바람직할 수 있으며, 따라서 PEG-개질된 지질은 상대적으로 더 긴 지질 앵커를 갖는다.

응집 방지 화합물이 적절하게 기능하도록 지질 접합이 필수적으로 요구되는 것이 아니라는 것을 알아야 한다. 용액중의 유리 PEG 또는 유리 ATTA도 응집을 방지하는데 충분할 수 있다. 입자가 체형화 후 안정할 경우, PEG 또는 ATTA는 개체에 투여하기 전에 투석하여 제거할 수 있다.

지질 입자중에 존재하는 경우, 중성 지질은 생리학적 pH에서 비하전된 또는 중성 쓰비터이온 형태로 존재하는 수많은 지질 중 중 하나일 수 있다. 그러한 지질의 예로, 디아실포스파티딜콜린, 디아실포스파티딜에탄올아민, 세라마이드, 스펅고미엘린, 디하이드로스핑고미엘린, 세팔린, 및 세레브로사이드가 있다. 본 명세서에 기재된 입자에 사용하기 위한 중성 지질의 선택은 일반적으로, 예를 들어 리포솜 크기 및 혈류중 리포솜의 안정성을 고려하여 이루어진다. 바람직하게는, 중성 지질 성분이 아실기를 2개 갖는 지질 (즉, 디아실포스파티딜콜린 및 디아실포스파티딜에탄올아민)이다. 쇠의 길이와 포화도가 다양한 여러 가지 아실쇄 기를 갖는 지질을 입수할 수 있거나 숙지되어 있는 기술로 단리 또는 합성할 수 있다. 하나의 양태로, 탄소쇄 길이의 범위가 C_{10} 내지 C_{20} 인 포화 지방산을 함유하는 지질이 바람직하다. 다른 양태로, 탄소쇄 길이의 범위가 C_{10} 내지 C_{20} 인 단일 또는 이중불포화 지방산을 갖는 지질을 사용한다. 추가로, 포화 및 불포화 지방산쇄의 혼합물을 갖는 지질을 사용할 수 있다. 바람직하게는, 본 발명에서 사용되는 중성 지질은 DOPE, DSPC, POPC, DPPC 또는 관련 포스파티딜콜린이다. 본 발명에서 유용한 중성 지질은 또한 스펅고미엘린, 디하이드로스핑고미엘린, 또는 다른 헤드 그룹, 예로서 세린 및 이노시톨을 갖는 인지질로 이루어질 수 있다.

존재할 경우, 지질 혼합물의 스테롤 성분은 리포솜, 지질 소낭 또는 지질 입자 제조 분야에서 통상적으로 사용되는 스테롤 중 어느 하나 일 수 있다. 바람직한 스테롤은 콜레스테롤이다.

상기에서 상세하게 기재한 것들 외에, 생리학적 pH 근처에서 순수 양전하를 띠는 기타 양이온성 지질이 또한 본 발명의 지질 입자에 포함될 수 있다. 그러한 양이온성 지질로는 비제한적으로, N,N-디올레일-N,N-디메틸암모늄 클로라이드 ("DODAC"); N-(2,3-디올레일옥시)프로필-N,N-트리메틸암모늄 클로라이드 ("DOTMA"); N,N-디스테아릴-N,N-디메틸암모늄 브로마이드 ("DDAB"); N-(2,3-디올레오일옥시)프로필-N,N,N-트리메틸암모늄 클로라이드 ("DOTAP"); 1,2-디올레일옥시-3-트리메틸아미노프로판 클로라이드 염 ("DOTAP.Cl"); 3-(N-(N',N'-디메틸아미노에탄)-카바모일)콜레스테롤 ("DC-Chol"), N-(1-(2,3-디올레일옥시)프로필)-N-2-(스퍼민카복스아미도)에틸-N,N-디메틸암모늄 트리플루오르아세테이트 ("DOSPA"), 디옥타데실아미도글리실 카복시스퍼민 ("DOGS"), 1,2-디올레일-sn-3-포스포에탄올아민 ("DOPE"), 1,2-디올레오일-3-디메틸암모늄 프로판 ("DODAP"), N,N-디메틸-2,3-디올레일옥시)프로필아민 ("DODMA"), 및 N-(1,2-디미리스틸옥시프로프-3-일)-N,N-디메틸-N-하이드록시에틸 암모늄 브로마이드 ("DMRIE")가 있다. 추가로, 수많은 상업적 양이온성 지질 제제가 사용될 수 있으며, 예를 들면, LIPOFECTIN (DOTMA 및 DOPE 포함, GIBCO/BRL로부터 입수), 및 LIPOFECTAMINE (DOSPA 및 DOPE 포함, GIBCO/BRL로부터 입수)가 있다. 특정 양태로, 양이온성 지질이 아미노 지질이다.

본 발명의 지질 입자에 사용하기에 적합한 음이온성 지질로는 비제한적으로, 포스파티딜글리세롤, 카디오리핀, 디아실포스파티딜세린, 디아실포스파티드산, N-도데카노일 포스파티딜에탄올아민, N-숙시닐 포스파티딜에탄올아민, N-글루타릴 포스파티딜에탄올아민, 라이실포스파티딜글리세롤, 및 중성 지질에 연결된 음이온성 개질 그룹

이 있다.

수많은 양태에서, 양쪽성 지질이 본 발명의 지질 입자에 포함된다. "양쪽성 지질"이란 지질 물질의 소수성 부위는 소수성 상으로 배향되는 반면, 친수성 부위는 수상쪽으로 배향되는 물질을 칭한다. 그러한 화합물로는 비제한적으로, 인지질, 아미노지질, 및 스펅고지질이 있다. 대표적인 인지질로는 스펅고미엘린, 포스파티딜콜린, 포스파티딜에탄올아민, 포스파티딜세린, 포스파티딜이노시톨, 포스파티드산, 팔미토일올레오일 포스파티딜콜린, 리소포스파티딜콜린, 리소포스파티딜에탄올아민, 디팔미토일포스파티딜콜린, 디올레오일포스파티딜콜린, 디스테아로일포스파티딜콜린, 또는 디리놀레오일포스파티딜콜린이 있다. 스펅고지질, 글리코스핑고지질 족, 디아실글리세롤, 및 δ -아실옥시산과 같은, 다른 인-결핍 화합물이 또한 사용될 수 있다. 추가로, 그러한 양쪽성 지질은 트리글리세라이드 및 스테롤과 같은 다른 지질과 용이하게 혼합될 수 있다.

프로그램가능한 융합 지질이 또한 본 발명의 지질 입자에 포함시키기에 적합하다. 그러한 지질 입자는 세포막과의 융합 경향이 거의 없으며 주어진 시그널 이벤트가 일어날 때까지 이들의 페이로드(payload)를 운반한다. 이는 지질 입자가 세포와의 융합을 시작하기 전에 유기체 또는 질병 부위로 주사후 더욱 균질하게 배분될 수 있도록 한다. 시그널 이벤트는 예를 들면, pH, 온도, 이온 환경, 또는 시간에서의 변화일 수 있다. 후자의 경우, ATTA-지질 접합체 또는 PEG-지질 접합체와 같은 융합 지연 또는 "클로킹(cloaking)" 성분은 시간이 지남에 따라 지질 입자 막으로부터 단순하게 교체될 수 있다. 시간에 따라 지질 입자는 체내에 적합하게 배분되고, 클로킹제를 충분히 소실하게 되어 융합유도성이 된다. 다른 시그널 이벤트의 경우, 염증 부위에서의 온도 증가와 같이, 질병 부위 또는 표적 세포와 관련된 시그널을 선택하는 것이 바람직하다.

특정 양태로, 세포 타입 또는 조직에 대해 특이적인 표적화 부위를 사용하여 본 발명의 지질 입자를 표적화하는 것이 바람직하다. 리간드, 세포 표면 수용체, 당단백질, 비타민(예, 리보플라빈) 및 단클론 항체와 같이, 여러가지 표적화 부위를 사용하여 지질 입자를 표적화하는 것은 이미 기재되어 있다(참조: 예를 들면, 미국 특허 제4,957,773호 및 제4,603,044호). 표적화 부위는 온전한 단백질 또는 이의 단편을 포함할 수 있다. 표적화 메카니즘은 일반적으로 표적화제를 지질 입자의 표면에 표적 부위가 표적과의 상호반응에 용이할 수 있도록 하는 방식으로, 예를 들면 세포 표면 수용체에 배치시키는 것을 필요로 한다. 여러가지 표적화제 및 방법이 공지되어 있으며, 예를 들면 하기 문헌에 기재된 것들을 포함하여, 당해 분야에서 입수가 가능하다: Sapra, P. and Allen, TM, *Prog. Lipid Res.* 42(5):439-62(2003); 및 Abra, RM et al., *J. Liposome Res.* 12:1-3, (2002).

폴리에틸렌 글리콜(PEG) 쇄와 같은, 친수성 중합체 쇄의 표면 코팅을 갖는 지질 입자, 즉, 리포솜을 표적화를 위하여 사용하는 것이 제안된 바 있다: Allen, et al. *Biochimica et Biophysica Acta* 1237:99-108 (1995); DeFrees, et al., *Journal of the American Chemistry Society* 118:6101-6104 (1996); Blume, et al., *Biochimica et Biophysica Acta* 1149:180-184(1993); Klivanov, et al., *Journal of Liposome Research* 2:321-334 (1992); 미국 특허 제5,013,556호; Zalipsky, *Bioconjugate Chemistry* 4:296-299 (1993); Zalipsky, *FEBS Letters* 353:71-74 (1994); Zalipsky, in *Stealth Liposomes Chapter 9*(Lasic and Martin, Eds) CRC Press, Boca Raton FL(1995). 접근법 중 하나로, 항체와 같은 리간드를 지질 입자의 표적화를 위하여 지질 입자를 형성하는 지질의 극성 헤드 그룹에 결합시킨다. 다른 방법으로, 표적화 리간드를 친수성 중합체 코팅을 형성하는 PEG 쇄의 떨어져 있는 말단에 부착시킨다(Klivanov, et al., *Journal of Liposome Research* 2:321-334 (1992); Kirpotin et al., *FEBS Letters* 388:115-118 (1996)).

표적화제를 커플링시키기 위한 표준 방법을 사용할 수 있다. 예를 들면, 표적화제의 부착을 위하여 활성화될 수 있는 포스파티딜에탄올아민, 또는 지질-유도된 블레오마이신과 같은 유도된 친유성 화합물을 사용할 수 있다. 항체-표적화된 리포솜은 예를 들면, 단백질 A를 혼입시킨 리포솜을 사용하여 제작할 수 있다(참조: Renneisen, et al., *J. Bio. Chem.*, 265:16337-16342 (1990) 및 Leonetti, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 87:2448-2451 (1990)). 항체 접합의 다른 예가 미국 특허 제6,027,726호에 개시되어 있으며, 이의 교시 내용은 본 명세서에서 참고로 인용된다. 표적화 부위의 예로 신생물(neoplasms) 또는 종양과 관련있는 항원을 포함하여, 세포 성분에 대해 특이적인 다른 단백질이 또한 포함될 수 있다. 표적화 부위로서 사용되는 단백질은 공유결합을 통하여 리포솜에 부착될 수 있다(참조: Heath, *Covalent Attachment of Proteins to Liposomes*, 149 *Methods in Enzymology* 111-119 (Academic Press, Inc. 1987)). 기타 표적화 방법으로 바이오틴-아비딘 시스템이 있다.

일례의 양태로, 지질 입자가 본 발명의 양이온성 지질, 중성 지질(양이온성 지질 제외), 스테롤(예, 콜레스테롤) 및 PEG-개질된 지질(예, PEG-DMG 또는 PEG-DMA)의 혼합물을 포함한다. 특정 양태로, 지질 혼합물은 본 발명의 양이온성 지질, 중성 지질, 콜레스테롤, 및 PEG-개질된 지질로 이루어지거나 필수적으로 이루어진다. 추

가의 바람직한 양태로, 지질 입자가 아미노 지질 약 20 내지 70%: 중성 지질 5 내지 45%: 콜레스테롤 20 내지 55%: PEG-개질된 지질 0.5 내지 15%의 몰비의 상기 지질 혼합물로 이루어지거나 필수적으로 이루어진다.

하나의 양태로, 지질 입자가 본 명세서에 개시된 지질을 적어도 2종 포함한다. 예를 들면, 양이온성 지질의 혼합물은 혼합물이 몰 기준으로 전체 지질 함량의 20 내지 60% 포함하도록, 지질 입자에 사용될 수 있다.

특정 양태로, 지질 입자는 표 1로부터 선택된 양이온성 지질, DSPC, Chol, 및 PEG-DMG 또는 PEG-DMA 중 하나로, 예를 들면, 양이온성 지질 약 20 내지 60%: DSPC 5 내지 25%: Chol 25 내지 55%: PEG-DMG 또는 PEG-DMA 0.5 내지 15%의 몰비로 이루어지거나 필수적으로 이루어진다. 특정 양태로, 지질 몰비가 대략 40/10/40/10 (양이온성 지질/DSPC/Chol/PEG-DMG 또는 PEG-DMA의 몰%), 35/15/40/10 (양이온성 지질/DSPC/Chol/PEG-DMG 또는 PEG-DMA의 몰%) 또는 52/13/30/5 (양이온성 지질/DSPC/Chol/PEG-DMG 또는 PEG-DMA의 몰%)이다. 다른 군의 양태로, 이들 조성물 중 중성 지질, DSPC가 POPC, DPPC, DOPE 또는 SM으로 대체된다.

치료제-지질 입자 조성물 및 제형

본 발명은 본 발명의 지질 입자와 활성제를 포함하는 조성물을 포함하며, 여기서 활성제는 지질 입자와 관련있다. 특정 양태로, 활성제는 치료제이다. 특정 양태로, 활성제는 지질 입자의 수성 내부에 캡슐화시킨다. 다른 양태로, 활성제가 지질 입자의 지질층 1개 이상에 존재한다. 다른 양태로, 활성제가 지질 입자의 외부 또는 내부 지질 표면에 결합되어 있다.

본 명세서에서 사용되는 바와 같은 "완전히 캡슐화된"은 입자중 핵산이 혈청에 노출 또는 유리 핵산을 현격하게 분해시키는 뉴클레아제 검정 후 현격하게 분해되지 않음을 나타낸다. 완전 캡슐화된 시스템에서, 통상적으로 유리 핵산 100%를 분해시키는 처리시 바람직하게는 입자 핵산의 25% 미만, 더욱 바람직하게는 10% 미만, 가장 바람직하게는 5% 미만이 분해된다. 달리, 완전 캡슐화는 Oligreen[®] 검정법으로 측정할 수 있다. Oligreen[®]은 용액중 올리고뉴클레오타이드 및 단일사 DNA를 정량하기 위한 초-감수성 형광 핵산 염색법이다 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA로부터 입수가 가능). 완전 캡슐화는 또한 입자가 혈청 안정성 즉, 생체내 투여시 이들이 신속하게 이들의 성분들로 분해되지 않음을 나타낸다.

본 명세서에서 사용되는 바와 같은 활성제는 세포, 조직, 기관, 또는 개체에 대해 목적하는 효과를 발휘할 수 있는 분자 또는 화합물이다. 그러한 효과는 예를 들어, 생물학적, 생리학적 또는 미용적 일 수 있다. 활성제는 예를 들어, 핵산, 펩타이드 및 폴리펩타이드, 예를 들어, 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체, 항체 단편과 같은 항체; 인간화된 항체, 재조합 항체, 재조합 인간 항체, 및 Primatized[™] 항체, 사이토킨, 성장 인자, 세포 사멸 인자, 분화-유도 인자, 세포 표면 수용체 및 이들의 리간드; 호르몬; 및 작은 유기 분자 또는 화합물을 포함하는 소 분자를 포함하는, 다양한 타입의 분자 또는 화합물일 수 있다.

하나의 양태로, 활성제는 치료제, 또는 이의 염 또는 유도체이다. 치료제 유도체는 자체가 치료적으로 활성이거나 이들은 추가 개질시 활성을 갖는 프로드럭 (prodrugs)일 수 있다. 따라서, 하나의 양태로, 치료제 유도체가 비개질 제제와 비교시 치료 활성을 일부 또는 모두 보유하는 것이며, 한편으로 다른 양태로, 치료제 유도체가 치료 활성이 결여되어 있는 것이다.

여러 가지 양태로, 치료제는 염증치료 화합물, 우울증 치료제, 흥분제, 진통제, 항생제, 출산 조절 약제, 해열제, 혈관확장제, 항혈관생성제, 세포혈관계, 시그널 전달억제제, 심혈관 약물, 예로서, 부정맥 치료제, 혈관수축제, 호르몬, 및 스테로이드와 같은 치료적으로 유효한 약제 또는 약물이다.

특정 양태로, 치료제는 항-종양 약물, 항암 약물, 종양 약물, 항신형성 약제 (antineoplastic agent) 등으로도 불릴 수 있는 종양학 약물이다. 본 발명에 따라서 사용할 수 있는 종양학 약물의 예로는 비제한적으로, 아드리마이신, 알케탄, 알로푸리놀, 알트레타민, 아미포스틴, 아나스트로졸, araC, 삼산화비소, 아자티오프린, 백사로텐, biCNU, 블레오마이신, 부설판 정맥용, 부설판 경구용, 카페시타빈 (Xeloda), 카르보플라틴, 카르무스틴, CCNU, 셀레록시 (celecoxib), 클로르암부실, 시스플라틴, 클라드리빈, 사이클로스포린 A, 시타라빈, 사이토신 아라비노사이드, 다우노루비신, 사이톡산, 다우노루비신, 텍사메타손, 텍스라족산, 도데탁셀, 독소루비신, DTIC, 에피루비신, 에스트라무스틴, 에토포사이드 포스페이트, 에토포사이드 및 VP-16, 엑세메스탄, FK506, 플루다라빈, 플루오로우라실, 5-FU, 젬시타빈 (Gemzar), 젬투주맵-오조가마이신, 고세렐린 아세테이트, 하이드레아, 하이드록시우레아, 이다루비신, 이포스파미드, 이마티닙 메실레이트, 인터페론, 이리노테칸 (Camptostar, CTP-111), 레트조졸, 류코보린, 류스타틴, 류프롤라이드, 레바미줄, 리트레티노인, 메가스트롤, 멜팔란, L-PAM, 메스나, 메토크세이트, 메톡살렌, 미트라마이신, 미토마이신, 미톡산트론, 니트로젠 머스타드, 파클리탁셀, 파미드로네이트, 페가데마세 (Pegademase), 펜토스타틴, 포피머 나트륨, 프레드니손, 리툭산, 스트렙토조신,

STI-571, 타목시펜, 탁소테레, 테모졸라미드, 테니포사이드, VM-26, 토포테칸 (Hycamtin), 토레미펜, 트레티노인, ATRA, 발루비신, 벨판, 빈블라스틴, 빈크리스틴, VP16, 및 비노렐빈이 있다. 본 발명에 따라서 사용할 수 있는 종양학 약물의 다른 예는 엘립티신 및 엘립티신 유사체 또는 유도체, 에포틸로네스, 세포내 키나제 억제제 및 캅토포텍신이다.

핵산-지질입자

특정 양태로, 본 발명의 지질 입자를 핵산과 연결하여, 핵산-지질 입자를 생성시킨다. 특정 양태로, 핵산을 지질 입자에 완전히 캡슐화시킨다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "핵산"은 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드를 포함함을 의미한다. 뉴클레오티드를 50개 이하로 함유하는 단편을 일반적으로 올리고뉴클레오티드로 칭하며, 더 긴 단편을 폴리뉴클레오티드로 칭한다. 특정 양태로, 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 뉴클레오티드 길이가 15 내지 50인 것이다.

본 발명의 문장에서, 용어 "폴리뉴클레오티드" 및 "올리고뉴클레오티드"는 천연 염기, 슈가 및 인티슈가 (백분) 결합으로 이루어진 뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드 모노머의 폴리머 또는 올리고머를 칭한다. 용어 "폴리뉴클레오티드" 및 "올리고뉴클레오티드"는 또한 비-천연 모노머를 포함하는 폴리머 또는 올리고머, 또는 유사하게 작용하는 이의 부분을 포함한다. 이러한 개질된 또는 치환된 올리고뉴클레오티드는 통상적으로 천연 형태보다 바람직한데, 이유는, 예를 들어, 뉴클레아제의 존재하에서의 향상된 세포 흡수력 및 증가된 안정성과 같은 특성 때문이다.

본 발명에 따르는 지질-핵산 입자에 존재하는 핵산은 공지되어 있는 핵산의 형태를 포함한다. 본 발명에서 사용되는 핵산은 단일사 DNA 또는 RNA, 또는 이중사 DNA 또는 RNA, 또는 DNA-RNA 하이브리드일 수 있다. 이중사 DNA의 예로는 구조유전자, 조절 및 종결 영역을 포함하는 유전자, 및 바이러스 또는 플라스미드 DNA와 같은 자기-복제 시스템이 있다. 이중사 RNA의 예로는 siRNA 및 기타 RNA 간섭 시약이 있다. 단일사 핵산의 예로는 안티센스 올리고뉴클레오티드, 리보자임, 마이크로RNA, 및 트리플렉스-형성 올리고뉴클레오티드가 있다. 본 발명의 지질-핵산 입자에 존재하는 핵산은 하기 올리고뉴클레오티드 개질 중 1개 이상을 포함할 수 있다.

본 발명의 핵산은 길이가 다양할 수 있으며, 일반적으로 핵산의 특정 형태에 따른다. 예를 들어, 특정 양태로, 플라스미드 또는 유전자의 뉴클레오티드 잔기의 길이는 약 1,000 내지 100,000개일 수 있다. 특정 양태로, 올리고뉴클레오티드는 뉴클레오티드 길이 범위가 약 10 내지 100개일 수 있다. 다양한 관련 양태로, 올리고뉴클레오티드, 단일사, 이중사, 및 삼중사의 뉴클레오티드 길이 범위는 약 10 내지 약 50개, 약 20 내지 약 50개, 약 15 내지 약 30개, 약 20 내지 약 30개이다.

특정 양태로, 본 발명의 올리고뉴클레오티드 (또는 이의 스트랜드)는 표적 폴리뉴클레오티드와 특이적으로 하이브리드화되거나 이에 대해 상보적이다. "특이적으로 하이브리드화가능한" 및 "상보적"이란 DNA 또는 RNA 표적과 올리고뉴클레오티드 사이에 안정하고 특이적인 결합이 생성될 수 있도록 충분한 정도의 상보성을 표시하기 위하여 사용되는 용어이다. 올리고뉴클레오티드가 특이적으로 하이브리드화할 수 있는 표적 핵산 서열에 대해 100% 상보적일 필요는 없는 것으로 이해된다. 올리고뉴클레오티드는 올리고뉴클레오티드의 표적으로의 결합이 표적 분자의 정상적인 기능을 방해하여 이로부터 유용성 또는 발현을 소실시킬 때 특이적으로 하이브리드화할 수 있으며, 특이적 결합이 요구되는 조건하에서, 즉, 생체내 검정법 또는 치료적 처치의 경우, 또는 검정이 수행되는 조건하에서의 시험관내 검정법의 경우 비-표적 서열에 올리고뉴클레오티드의 비-특이적 결합을 피하기에 충분한 정도의 상보성이 있다. 따라서, 다른 양태로, 상기 올리고뉴클레오티드는 표적화 또는 특이적으로 하이브리드화하는 유전자 또는 mRNA 서열의 영역과 비교하여, 1개, 2개 또는 3개의 염기 치환, 예를 들어, 미스매치 (mismatches)를 포함한다.

RNA 간섭 핵산

특정 양태로, 본 발명의 핵산-지질 입자는 RNA 간섭 (RNAi) 분자와 관련있다. RNAi 분자를 사용하는 RNA 간섭법은 당해 유전자 또는 폴리뉴클레오티드의 발현을 방해하기 위하여 사용될 수 있다. 소간섭 RNA (siRNA)는 개발 중인 차세대 표적화된 올리고뉴클레오티드 약물로서 안티센스 ODN 및 리보자임을 필수적으로 대체한다.

siRNA는 RNAi-유발된 침묵 복합체 (RISC)로 공지된 세포질 다중-단백질 복합체와 관련될 수 있는, 뉴클레오티드 길이가 보통 16 내지 30개인 RNA 듀플렉스이다. siRNA가 부하된 RISC는 동족성 mRNA 전사물의 분해를 매개하며, 따라서 siRNA는 높은 특이성으로 단백질 발현을 녹다운 (knock down)시키도록 고안될 수 있다. 다른 안티센스 기술과는 달리, 자연 메카니즘을 통한 siRNA 기능은 비-암호화 RNA를 통한 유전자 발현을 조절하도록 진화된다. 이는 일반적으로 이들의 활성이 시험관내 및 생체내에서 안티센스 ODN 또는 리보자임 보다 더 강력

한 지에 대한 이유일 것으로 판단된다. siRNAs 표적화 임상적으로 관련있는 표적물을 포함하여, 다양한 RNAi 시약이 예를 들어 하기 문헌에 기재된 바와 같이 현재 제약 개발중이다: de Fougerolles, A. et al., Nature Reviews 6:443-453 (2007).

먼저 기재된 RNAi 분자가 RNA 센스 및 RNA 안티센스 스트랜드를 둘 다 포함하는 RNA:RNA 하이브리드인 반면, 이제 DNA 센스:RNA 안티센스 하이브리드, RNA 센스:DNA 안티센스 하이브리드, 및 DNA:DNA 하이브리드가 RNAi를 매개할 수 있음이 증명되었다 (Lamberton, J.S. and Christian, A.T., (2003) Molecular Biotechnology 24:111-119). 따라서, 본 발명은 이들 상이한 타입의 이중사 분자로 이루어진 RNAi 분자의 용도를 포함한다. 또한, RNAi 분자는 여러가지 형태로 사용되고 세포로 도입될 수 있음을 알아야 한다. 따라서, 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, RNAi 분자는 비제한적으로, 2개의 별개의 스트랜드, 즉, 센스 스트랜드와 안티센스 스트랜드를 포함하는 이중사 올리고뉴클레오티드, 예를 들면, 소간섭 RNA (siRNA); 비-뉴클레오티드 링커에 의해 함께 결합되어 있는 2개의 별개의 스트랜드를 포함하는 이중사 올리고뉴클레오티드; 이중사 영역을 형성하는 상보적인 서열의 헤어핀 루프, 예를 들면, shRNAi 분자, 및 단독으로 또는 다른 폴리뉴클레오티드와 함께 이중사 폴리뉴클레오티드를 형성할 수 있는 폴리뉴클레오티드 1개 이상을 발현시키는 발현 벡터를 포함하는 올리고뉴클레오티드를 포함하여, 세포에서 RNAi 반응을 유발시킬 수 있는 분자를 포괄한다.

본 명세서에서 사용되는 바와 같은 "단일사 siRNA 화합물"은 단일 분자로만 이루어진 siRNA 화합물이다. 스트랜드내 짝짓기 (intra-strand pairing)에 의해 형성된, 듀플렉스화된 영역을 포함할 수 있으며, 예를 들면, 헤어핀 또는 팬-핸들 구조일 수 있거나 포함할 수 있다. 단일사 siRNA 화합물은 표적 분자에 대해 항센스일 수 있다.

단일사 siRNA 화합물은 RISC에 들어가 표적 mRNA의 RISC 매기된 절단에 참여할 수 있을 정도로 충분히 길 수 있다. 단일사 siRNA 화합물의 뉴클레오티드 길이는 적어도 14개, 다른 양태로, 적어도 15, 20, 25, 29, 35, 40, 또는 50개이다. 특정 양태로, 뉴클레오티드 길이가 200, 100 또는 60개 미만이다.

헤어핀 siRNA 화합물은 뉴클레오티드 쌍이 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 또는 25개이거나 적어도 그 이상인 듀플렉스 영역을 갖는다. 상기 듀플렉스 영역은 길이가 200, 100, 또는 50개 이거나 미만일 수 있다. 특정 양태로, 듀플렉스 영역에 대한 범위는 뉴클레오티드 쌍이 15 내지 30, 17 내지 23, 19 내지 23, 및 19 내지 21개 인 길이이다. 상기 헤어핀은 단일사 오버행 또는 말단 짝지어지지 않은 영역을 가질 수 있다. 특정 양태로, 오버행의 뉴클레오티드 길이는 2 내지 3개이다. 일부 양태로, 오버행은 헤어핀의 센스 면에 있으며 일부 양태에서는 헤어핀의 안티센스 면에 있다.

본 명세서에서 사용되는 바와 같은 "이중사 siRNA 화합물"은 쇠간 하이브리드화가 듀플렉스 구조 영역을 형성할 수 있는 스트랜드를 1개 이상, 일부 경우 2개 포함하는 siRNA 화합물이다.

이중사 siRNA 화합물의 안티센스 스트랜드는 뉴클레오티드 길이가 14, 15, 16, 17, 18, 19, 25, 29, 40 또는 60개이거나 그 이상일 수 있다. 뉴클레오티드 길이가 200, 100, 또는 50개이거나 미만일 수 있다. 뉴클레오티드 길이의 범위는 17 내지 25, 19 내지 23, 및 19 내지 21개일 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "안티센스 스트랜드"는 표적 분자, 예를 들어, 표적 RNA에 대해 충분히 상보적인 siRNA 화합물의 스트랜드를 의미한다.

이중사 siRNA 화합물의 센스 스트랜드는 뉴클레오티드 길이가 14, 15, 16, 17, 18, 19, 25, 29, 40 또는 60개 이거나 그 이상일 수 있다. 뉴클레오티드 길이가 200, 100, 또는 50개이거나 미만일 수 있다. 뉴클레오티드 길이의 범위는 17 내지 25, 19 내지 23, 및 19 내지 21개일 수 있다.

이중사 siRNA 화합물의 이중사 영역은 뉴클레오티드 쌍의 길이가 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 29, 40 또는 60개이거나 그 이상일 수 있다. 뉴클레오티드 쌍의 길이가 200, 100, 또는 50개이거나 미만일 수 있다. 뉴클레오티드 쌍의 길이의 범위는 15 내지 30, 17 내지 23, 19 내지 23, 및 19 내지 21개일 수 있다.

수많은 양태에서, siRNA 화합물은 내생성 분자, 예를 들면, Dicer에 의해 절단되어 siRNA 화합물, 예를 들면, 더 작은 siRNAs 약제가 생산될 수 있도록 충분히 크다.

센스 및 안티센스 스트랜드는 이중사 siRNA 화합물이 분자의 말단 중 하나 또는 둘 다에서 단일사 또는 짝짓지 않은 영역을 포함하도록 선택할 수 있다. 따라서, 이중사 siRNA 화합물은 오버행, 예를 들어, 1개 또는 2개의 5' 또는 3' 오버행, 또는 1 내지 3개의 뉴클레오티드로 된 3' 오버행을 함유하도록 짝지어진, 센스 및 안티센스 스트랜드를 함유할 수 있다. 상기 오버행은 스트랜드 하나가 다른 것 보다 더 긴 것, 또는 동일한 길이의 스트

랜드 2개가 엇갈려 있는 것일 수 있다. 일부 양태는 3' 오버행을 적어도 1개 갖는다. 하나의 양태로, siRNA 분자의 양쪽 말단이 3' 오버행을 갖는다. 일부 양태로, 상기 오버행은 뉴클레오티드 2개인 것이다.

특정 양태로, 듀플렉스화된 영역에 대한 길이는 예를 들면, 상기 논의된 ssiRNA 화합물 범위에서, 15 내지 30, 또는 18, 19, 20, 21, 22, 및 23개의 뉴클레오티드 길이이다. ssiRNA 화합물은 길이 및 구조에서 길이가 긴 dsRNAs로부터 천연 Dicer 가공된 생성물과 닮을 수 있다. ssiRNA 화합물의 스트랜드 2개가 결합, 예를 들어, 공유결합되어 있는 양태가 또한 포함된다. 헤어핀, 또는 필요한 이중사 영역, 및 3' 오버행을 제공하는 기타 단일사 구조물이 또한 본 발명내에 있다.

이중사 siRNA 화합물 및 단일사 siRNA 화합물을 포함하여, 본 명세서에 기재된 siRNA 화합물은 표적 RNA, 예를 들어, mRNA의 침묵, 예를 들어, 단백질을 암호화하는 유전자의 전사를 매개할 수 있다. 편의를 위하여, 그러한 mRNA를 또한 본 명세서에서는 침묵될 mRNA로 칭한다. 그러한 유전자는 또한 표적 유전자로 칭한다. 일반적으로, 침묵할 RNA는 내생성 유전자 또는 병원성 유전자이다. 또한, mRNA 이외의 RNAs, 예를 들면, tRNAs, 및 바이서스성 RNAs가 또한 표적화될 수 있다.

본 명세서에서 사용되는 바와 같은 문장 "RNAi를 매개한다"란 서열 특이적 방식으로 표적 RNA를 침묵할 수 있는 능력을 언급한다. 이론에 얽매이는 것을 원하진 않지만, 침묵은 RNAi 기전 또는 공정과 가이드 RNA, 예를 들면, 21 내지 23개의 뉴클레오티드로 된 ssiRNA 화합물을 사용하는 것으로 생각된다.

하나의 양태로, siRNA 화합물은 siRNA 화합물이 표적 mRNA에 의해 암호화된 단백질의 생산을 침묵하도록, 표적 RNA, 예를 들면, 표적 mRNA에 대해 "충분하게 상보적"이다. 다른 양태로, siRNA 화합물은 표적 RNA, 예를 들면, 표적 RNA 및 siRNA 화합물 어닐에 대해 "정확하게 상보적"이어서, 예를 들어, 정확한 상보성 영역에서 Watson-Crick 염기쌍으로만 이루어진 하이브리드를 형성한다. "충분히 상보적인" 표적 RNA는 표적 RNA에 대해 정확하게 상보적인 내부 영역 (예, 적어도 10개의 뉴클레오티드)을 포함할 수 있다. 또한, 특정 양태로, siRNA 화합물은 단일-뉴클레오티드 차이를 특이적으로 식별한다. 이런 경우, 단일-뉴클레오티드 차이 영역 (예, 7개의 뉴클레오티드 이내)에서 정확한 상보성인 것으로 밝혀진다면, siRNA 화합물만이 RNAi를 매개한다.

마이크로RNAs

마이크로 RNAs (miRNAs)는 식물 및 동물의 게놈중에서 DNA로부터 전사되지만, 단백질로 해독되지 않는, 잘 보존된 부류의 작은 RNA 분자이다. 가공된 miRNAs는 단일사인, 대략 17 내지 25개의 뉴클레오티드 (nt)로 이루어진 RNA 분자로 이는 RNA-유발된 침묵 복합체 (RISC)중으로 혼입되며 발달, 세포 증식, 세포사멸 및 분화의 중요한 조절자 (regulators)인 것으로 확인되었다. 이들은 특이적인 mRNAs의 3'-비해독 영역에 결합함으로써 유전자 발현을 조절하는데 있어서 역할을 하는 것으로 생각된다. RISC는 해독 억제, 전사 절단, 또는 둘다를 통하여 유전자 발현을 하향-조절하는 것을 매개한다. RISC는 또한 넓은 범위의 진핵생물의 핵에서의 전사적 침묵에 관련되어 있다.

지금까지 확인된 수많은 miRNA 서열은 크고 성장하고 있으며, 이의 실례는 예를 들어 하기와 같은 문헌으로부터 발견할 수 있다: "miRBase:microRNA sequences, targets and gene nomenclature" Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ.NAR, 2006, 34, Database Issue, D140-D144; "The microRNA Registry"Griffiths-Jones S.NAR, 2004, 32 Database Issue, D109-D111; 및 또한 <http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/>.

안티센스 올리고뉴클레오티드

하나의 양태로, 핵산이 표적 폴리뉴클레오티드에 대해 지시된 안티센스 올리고뉴클레오티드이다. 용어 "안티센스 올리고뉴클레오티드" 또는 단순히 "안티센스"은 표적화된 폴리뉴클레오티드 서열에 대해 상보적인 올리고뉴클레오티드를 포함하는 것을 의미한다. 안티센스 올리고뉴클레오티드는 선택된 서열, 예를 들면, 표적 유전자 mRNA에 대해 상보적인 DNA 또는 RNA의 단일 스트랜드이다. 안티센스 올리고뉴클레오티드는 상보적 mRNA에 결합함으로써 유전자 발현을 억제하는 것으로 생각된다. 표적 mRNA에 대한 결합은 표적 mRNA에 결합하여 상보적 mRNA 스트랜드의 해독을 방지하거나 표적 mRNA가 분해되도록 함으로써 유전자 발현을 억제시킬 수 있다. 안티센스 DNA를 사용하여 특이적인, 상보적 (암호화 또는 비-암호화) RNA를 표적화할 수 있다. 결합이 일어날 경우 상기 DNA/RNA 하이브리드는 효소 RNase H에 의해 분해될 수 있다. 특정 양태로, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 약 10 내지 약 50개의 뉴클레오티드, 더욱 바람직하게는 약 15 내지 약 30개의 뉴클레오티드를 함유한다. 상기 용어는 또한 목적하는 표적 유전자에 대해 정확하게 상보적이지 않을 수 있는 안티센스 올리고뉴클레오티드를 포괄한다. 따라서, 본 발명은 비-표적 특이적-활성이 안티센스인 것으로 밝혀진 경우, 또는 표적 서열과

의 미스매치 1개 이상을 함유하는 안티센스 서열이 특정 용도에 가장 바람직한 경우에 이용될 수 있다.

안티센스 올리고뉴클레오티드는 단백질 합성의 효과적이고 표적화된 억제제인 것으로 증명되었으며, 따라서 표적화된 유전자에 의한 단백질 합성을 특이적으로 억제하기 위하여 사용될 수 있다. 단백질 합성을 억제하기 위한 안티센스 올리고뉴클레오티드의 효과는 확립되어 있다. 예를 들어, 폴리갈락타우로나제 및 무스카린 타입 2 아세틸콜린 수용체의 합성은 이들 각각의 mRNA 서열에 대해 지시된 안티센스 올리고뉴클레오티드에 의해 억제된다 (미국 특허 제5,739,119호 및 미국 특허 제5,759,829호). 또한, 안티센스 억제의 예가 핵 단백질 사이클린, 다중 약물 내성 유전자 (MDG1), ICAM-1, E-셀렉틴, STK-1, 선조 GABA_A 수용체 및 사람 EGF에 대해 증명되었다 (Jaskulski et al., Science. 1988 Jun 10;240(4858):1544-6; Vasanthakumar and Ahmed, Cancer Commun. 1989; 1(4):225-32; Peris et al., Brain Res Mol Brain Res. 1998 Jun 15;57(2):310-20; 미국 특허 제 5,801,154호; 미국 특허 제5,789,573호; 미국 특허 제5,718,709호 및 미국 특허 제5,610,288호). 또한, 안티센스 작제물이 또한 억제하고 여러 가지 비정상적인 세포 증식, 예를 들어, 암을 치료하는데 사용될 수 있는 것으로 기재되어 있다 (미국 특허 제5,747,470호; 미국 특허 제5,591,317호 및 미국 특허 제5,783,683호).

안티센스 올리고뉴클레오티드의 제조 방법은 당해 분야에 공지되어 있으며 폴리뉴클레오티드 서열을 표적화하는 안티센스 올리고뉴클레오티드를 생산하기 위하여 용이하게 개조할 수 있다. 제시된 표적 서열에 대해 특이적인 안티센스 올리고뉴클레오티드 서열의 선택은 선택된 표적 서열의 분석 및 2차 구조의 결정, T_m, 결합 에너지, 및 상대적 안정성의 측정을 기본으로 한다. 안티센스 올리고뉴클레오티드는 숙주 세포에서 표적 mRNA로의 특이적 결합을 감소시키거나 금지하는 다이머, 헤어핀, 또는 기타 2차 구조를 형성하기 위한 이들의 상대적 불능을 기준으로 하여 선택할 수 있다. mRNA의 매우 바람직한 표적 영역은 AUG 해독 개시 코돈 또는 이 근처의 영역 및 mRNA의 5' 영역에 대해 실질적으로 상보적인 서열이다. 이들 2차 구조 분석 및 표적 부위 선택은 예를 들어, v.4의 OLIGO 프라이머 분석 소프트웨어 (Molecular Biology Insights) 및(또는) BLASTN 2.0.5 알고리즘 소프트웨어 (Altschul et al., Nucleic Acids Res. 1997, 25(17):3389-402)를 사용하여 수행할 수 있다.

안타고미르(antagomirs)

안타고미르는 RNase 보호 및 약리학적 특성, 예를 들면 향상된 조직 및 세포 흡수성을 위하여 다양하게 개질시킨 RNA-유사 올리고뉴클레오티드이다. 이들은 정상적인 RNA와 예를 들어, 슈가의 완전 2'-O-메틸화, 포스포로티오에이트 백본 및, 예를 들어, 3'-말단에서의 콜레스테롤-부위로 구분된다. 안타고미르는 안타고미르와 내생성 miRNA를 포함하는 듀플렉스를 형성하여, mi-RNA-유발된 유전자 침묵을 방지함으로써 내생성 miRNAs를 효과적으로 침묵시키기 위하여 사용될 수 있다. 안타고미르-매개된 miRNA 침묵의 예로는 문헌에 기재되어 있는, miR-122의 침묵이 있다: Krutzfeldt et al, Nature, 2005, 438:685-689, 이는 본 명세서에서 전문 참고로 인용된다. 안타고미르 RNAs는 표준 고체상 올리고뉴클레오티드 합성 프로토콜을 사용하여 합성할 수 있다. 미국 특허원 11/502,158 및 11/657,341을 참고한다 (이들 각각의 기재 내용은 본 명세서에서 참고로 인용된다).

안타고미르는 리간드-접합된 모노머 서브유닛과 올리고뉴클레오티드 합성을 위한 모노머를 포함할 수 있다. 모노머의 예는 2004년 8월 10일자로 출원된 미국 특허원 제10/916,185호에 기재되어 있다. 안타고미르는 2004년 3월 8일자로 출원된 PCT 출원 PCT/US2004/07070에 기재되어 있는 바와 같이, ZXY 구조를 가질 수 있다. 안타고미르는 양극성 잔기와 복합될 수 있다. 올리고뉴클레오티드 제제와 함께 사용하기 위한 양극성 부위의 예는 2004년 3월 8일자로 출원된 PCT 출원 PCT/US2004/07070에 기재되어 있다.

압타머 (aptamers)

압타머는 당해 특정 분자에 높은 친화성과 특이성을 갖고 결합하는 핵산 또는 펩타이드 분자이다 (Tuerk and Gold, Science 249:505 (1990); Ellington and Szostak, Nature 346:818 (1990)). DNA 또는 RNA 압타머가 성공적으로 생산되었으며 이는 거대 단백질부터 작은 유기 분자에 이르기까지 수많은 상이한 것들과 결합한다. 참조: Eaton, Curr. Opin. Chem. Biol. 1:10-16 (1997), Famulok, Curr. Opin. Struct. Biol. 9:324-9(1999), 및 Hermann and Patel, Science 287:820-5(2000). 압타머는 RNA 또는 DNA 기재일 수 있으며, 리보스위치를 포함할 수 있다. 리보스위치는 작은 표적 분자와 직접 결합할 수 있는 mRNA의 일부이며, 표적에 결합하면 유전자의 활성에 영향을 준다. 따라서, 리보스위치를 함유하는 mRNA는 표적 분자의 존재 또는 부재에 따라서, 이의 자체 활성을 직접 조절한다. 일반적으로, 압타머는 반복되는 라운드의 시험관내 선택에 의해서 또는 등가적으로, 소분자, 단백질, 핵산, 및 심지어 세포, 조직 및 유기체와 같은 다양한 분자 표적에 결합시키기 위한 SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment)를 통하여 조작된다. 압타머는 합성, 재조합, 및 정제법을 포함하여, 공지의 방법으로 제조할 수 있으며, 단독으로 또는 동일 표적에 대해 특이적인 다른 압

타머와 함께 사용될 수 있다. 또한, 명세서에서 더욱 상세하게 기재되는 바와 같이, 용어 "압타머"는 특히 제시된 표적에 대해 공지의 압타머 2종 이상을 비교함으로써 유래되는 공통 서열을 함유하는 "2차 압타머"를 포함한다.

리보자임 (ribozymes)

본 발명의 다른 양태에 따르면, 핵산-지질 입자는 리보자임과 관련되어 있다. 리보자임은 엔도뉴클레아제 활성이 있는 특이적인 촉매적 도메인을 갖는 RNA 분자이다 (Kim and Cech, Proc Natl Acad Sci U S A. 1987 Dec; 84(24):8788-92; Forster and Symons, Cell. 1987 Apr 24; 49(2):211-20). 예를 들면, 다수의 리보자임은 높은 특이성을 갖고 포스포에스테르 전달 반응을 촉진시키는데, 통상적으로 올리고뉴클레오티드 기질중 수개의 포스포에스테르 중 1개 만을 분열시킨다 (Cech et al., Cell. 1981 Dec; 27(3 Pt 2):487-96; Michel and Westhof, J Mol Biol. 1990 Dec 5; 216(3):585-610; Reinhold-Hurek and Shub, Nature. 1992 May 14; 357(6374):173-6). 이런 특이성은 기질이 특이적 염기-페어링 상호반응을 통하여 화학 반응전에 리보자임의 내부 가이드 서열 ("IGS")에 결합하는 조건에 기인한다.

적어도 6개의 다양한 천연 효소적 RNAs가 지금까지 공지되어 있다. 이들 각각은 생리학적 조건하에서 트랜스의 RNA 포스포디에스테르 결합의 가수분해반응 (따라서 다른 RNA 분자를 절단할 수 있다)을 촉매할 수 있다. 일반적으로, 효소적 핵산은 먼저 표적 RNA에 결합함으로써 작용한다. 그러한 결합은 효소적 핵산의 표적 결합 영역을 통하여 이루어지는데, 이 영역은 표적 RNA를 분리시키는 작용을 하는 분자의 효소 영역에 밀착하여 유지된다. 따라서, 상기 효소적 핵산은 먼저 인식한 다음 상보적인 염기-페어링을 통하여 표적 RNA에 결합하고, 일단 정확한 부위에 결합하면, 표적 RNA를 효소적으로 절단하는 작용을 한다. 그러한 표적 RNA의 전략적 절단은 암호화된 단백질의 합성을 지시하는 능력을 파괴한다. 효소적 핵산이 결합하여 RNA 표적을 절단한 후, 다른 표적을 찾기 위하여 RNA로부터 방출되고 반복적으로 새로운 표적에 결합하여 절단할 수 있다.

상기 효소적 핵산 분자는 예를 들어, 망치머리 (hammerhead), 헤어핀, 간염 δ 바이러스, 그룹 I 인트론 또는 RNaseP RNA (RNA 가이드 서열과 관련하여) 또는 Neurospora VS RNA 모티프로 형성될 수 있다. 망치머리 모티프의 특정 예가 하기 문헌에 기재되어 있다: Rossi et al. Nucleic Acids Res. 1992 Sep 11; 20(17):4559-65. 헤어핀 모티프의 예가 하기 문헌에 기재되어 있다: Hampel et al. (Eur Pat. Appln. Publ. No. EP 0360257), Hampel and Tritz, Biochemistry 1989 Jun 13; 28(12):4929-33; Hampel et al., Nucleic Acids Res. 1990 Jan 25; 18(2):299-304 및 미국 특허 제5,631,359호. 간염 δ 바이러스 모티프의 예가 하기 문헌: Perrotta and Been, Biochemistry. 1992 Dec 1; 31(47):11843-52에 기재되어 있으며; RNaseP 모티프의 예가 문헌: Guerrier-Takada et al., Cell. 1983 Dec; 35(3 Pt 2):849-57에 기재되어 있고; Neurospora VS RNA 리보자임 모티프가 문헌: Collins (Saville and Collins, Cell. 1990 May 18; 61(4):685-96; Saville and Collins, Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 Oct 1; 88(19):8826-30; Collins and Olive, Biochemistry. 1993 Mar 23; 32(11):2795-9)에 기재되어 있으며; 그룹 I 인트론의 예가 미국 특허 제4,987,071호에 기재되어 있다. 본 발명에 따라서 사용되는 효소적 핵산 분자의 중요한 특징은 1개 이상의 표적 유전자 DNA 또는 RNA 영역에 대해 상보적인 특이적 기질 결합 부위를 가지며, 분자에 RNA 절단 활성을 부여하는 기질결합 부위내 또는 주변의 뉴클레오티드 서열을 갖는다는 것이다. 따라서, 상기 리보자임 작제물을 본 명세서에 언급된 특정 모티프로 제한할 필요는 없다.

폴리뉴클레오티드 서열에 대해 표적화된 리보자임을 제조하는 방법은 당해 분야에 공지되어 있다. 리보자임은 국제특허원 공개 공보 WO 93/23569 및 국제특허원 공개 공보 WO 94/02595 (이들은 각각 본 명세서에서 참고로 인용된다)에 기재된 바와 같이 디자인될 수 있으며, 상기 문헌에 기재된 바와 같이, 시험관내 및 생체내 시험할 수 있도록 합성될 수 있다.

리보자임 활성은 리보자임 결합 암 (arms)의 길이를 변형시키거나 혈청 리보뉴클레아제에 의한 이들의 분해를 방지하는 개질을 갖도록 리보자임을 화학적으로 합성함으로써 최적화될 수 있으며 (참조: 국제특허원 공개 공보 WO 92/07065; 국제특허원 공개 공보 WO 93/15187; 국제특허원 공개 공보 WO 91/03162; 유럽 특허원 공개 공보 92110298.4; 미국 특허 제5,334,711호; 및 효소적 RNA 분자의 슈가 부위에 대한 여러가지 화학적 개질을 기술한, 국제특허원 공개 공보 WO 94/13688), 개질은 이들의 세포내에서의 효과를 향상시키고, 스템(stem) II 염기를 제거하여 RNA 합성 시간을 단축시키며 화학적 요구조건을 감소시킨다.

면역자극성 올리고뉴클레오티드

본 발명의 지질 입자와 관련된 핵산은 포유류 또는 기타 환자일 수 있는 개체에 투여시 면역 반응을 유발할 수 있는 면역자극성 올리고뉴클레오티드 (ISS; 단일사 또는 이중사)를 포함하여, 면역자극성일 수 있다. ISS의 예

로 헤어핀 2차 구조로 이끄는 특정 팔린드롬 (palindromes)(참조: Yamamoto S., et al. (1992) J. Immunol. 148:4072-4076), 또는 CpG 모티프, 뿐만 아니라 다른 공지된 ISS 특징 (예를 들면, 다중-G 도메인, WO 96/11266 참고)을 포함한다.

면역 반응은 선천성 또는 적응성 면역 반응일 수 있다. 면역 시스템은 척추동물의 더욱 선천성인 면역 시스템과 후천적인 적응성 면역 시스템으로 나누어지는데, 후천적인 적응성 면역 시스템은 추가로 체액 세포 성분으로 나누어진다. 특정 양태로, 면역 반응은 점막성일 수 있다.

특정 양태로, 면역자극성 핵산은 지질 입자와 함께 투여시에만 면역자극성이고, "유리 형태"로 투여시에는 면역자극성이 아니다. 본 발명에 따르면, 그러한 올리고뉴클레오티드를 면역자극성으로 판단한다.

면역자극성 핵산은 이들이 면역 반응을 일으키기 위하여 표적 폴리뉴클레오티드에 특이적으로 결합하여 이의 발현을 감소시키는 것이 요구되지 않을 때 비-서열 특이적인 것으로 판단한다. 따라서, 특정 면역자극성 핵산은 천연 유전자 또는 mRNA의 영역에 대응하는 서열을 포함할 수 있지만, 여전히 비-서열 특이적인 면역자극성 핵산인 것일 수 있다.

하나의 양태로, 면역자극성 핵산 또는 올리고뉴클레오티드가 적어도 1개의 CpG 디뉴클레오티드를 포함한다. 올리고뉴클레오티드 또는 CpG 디뉴클레오티드는 비메틸화되거나 메틸화될 수 있다. 다른 양태로, 면역자극성 핵산이 메틸화된 사이토신을 갖는 CpG 디뉴클레오티드를 적어도 1개 포함한다. 하나의 양태로, 상기 핵산은 단일 CpG 디뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 상기 CpG 디뉴클레오티드중 사이토신은 메틸화되어 있다. 특정 양태로, 상기 핵산은 서열 5'TAACGTTGAGGGGCAT3'을 포함한다. 다른 양태로, 상기 핵산은 적어도 2개의 CpG 디뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 CpG 디뉴클레오티드 중 적어도 1개의 사이토신은 메틸화되어 있다. 추가의 양태로, 서열중에 존재하는 CpG 디뉴클레오티드 중 각각의 사이토신은 메틸화되어 있다. 다른 양태로, 상기 핵산이 다수의 CpG 디뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 상기 CpG 디뉴클레오티드 중 적어도 1개는 메틸화된 사이토신을 포함한다.

특정 양태로, 상기 핵산 서열이 서열 5'TTCCATGACGTTCTGACGT3'을 포함한다. 다른 특정 양태로, 상기 핵산 서열이 5'TCCATGACGTTCTGACGT 3' 서열을 포함하며, 여기서 진하게 표시한 2개의 사이토신은 메틸화되어 있다. 특정 양태로, ODN은 하기 나타낸 바와 같이, ODN #1, ODN #2, ODN #3, ODN #4, ODN #4, ODN #5, ODN #6, ODN #7, ODN #8, 및 ODN #9로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[표 3] 번역자극성 올리고뉴클레오타이드 (ODNs)의 일례

ODN 이름	서열 번호	ODN 서열 (5'-3') .
ODN 1 인간 c-myc		5'-TAACGTTGAGGGGCAT-3
* ODN 1m		5'-TAAZGTTGAGGGGCAT-3
ODN 2		5'-TCCATGACGTTCTCTGACGTT-3
* ODN 2m		5'-TCCATGAZGTTCTCTGAZGTT-3
ODN 3		5'-TAAGCATAACGGGGTGT-3
ODN 5		5'-AACGTT-3
ODN 6		5'- GATGCTGTGTCTCGGGTCTCCGGGC- 3'
ODN 7		5'-TCGTCGTTTTGTCTGTTTTGTCTGTT- 3'
ODN 7m		5'-TZGTZGTTTTGTZGTTTTGTZGTT- 3'
ODN 8		5'-TCCAGGACTTCTCTCAGGTT-3'
ODN 9		5'-TCTCCCAGCGTGCGCCAT-3'
ODN 10 뮤린 세포내 부착 분자-1		5'-TGCATCCCCCAGGCCACCAT-3
ODN 11 인간 세포내 부착 분자-1		5'-GCCCAAGCTGGCATCCGTC-3'
ODN 12 인간 세포내 부착 분자-1		5'-GCCCAAGCTGGCATCCGTC-3'
ODN 13 인간 erb-B-2		5'-GGT GCTCACTGC GGC-3'
ODN 14 인간 c-myc		5'-AACC GTT GAG GGG CAT-3'
ODN 15 인간 c-myc		5'-TAT GCT GTG CCG GGG TCT TCG GGC-3'
ODN 16		5'-GTGCCG GGGTCTTCCGGGC-3'
ODN 17 인간 인슐린성장 인자 1 - 수용체		5'-GGACCCTCTCCGGAGCC-3'
ODN 18 인간 인슐린성장 인자 1 - 수용체		5'-TCC TCC GGA GCC AGA CTT-3'
ODN 19 인간 상피 성장 인자- 수용체		5'-AAC GTT GAG GGG CAT-3'
ODN 20 상피 성장 인자- 수용체		5'-CCGTGGTCA TGCTCC-3'
ODN 21 인간 맥관 내피 성장 인자		5'-CAG CCTGGCTCACCG CCTTGG-3'

ODN 이름	서열 번호	ODN 서열 (5'-3') .
ODN 22 뮤린 포스포키나제 C - 알파		5'-CAG CCA TGG TTC CCC CCA AC- 3'
ODN 23		5'-GTT CTC GCT GGT GAG TTT CA-3'
ODN 24 인간 Bcl-2		5'-TCT CCCAGCGTGCGCCAT-3'
ODN 25 인간 C-Raf-s		5'-GTG CTC CAT TGA TGC-3'
ODN #26 인간 맥관 내피 성장 인자 수용체-1		5'- GAGUUCUGAUGAGGCCGAAAGG- CCGAAAGUCUG-3'
ODN #27		5'-RRCGY-3'
ODN # 28		5'-AACGTTGAGGGGCAT-3'
ODN #29		5'-CAACGTTATGGGGAGA-3'
ODN #30 인간 c-myc		5'-TAACGTTGAGGGGCAT-3'

각주: "Z"는 메틸화된 사이토신 잔기를 나타낸다. ODN 14는 15-mer 올리고뉴클레오타이드이고 ODN 1은 5' 말단상에 티미딘을 첨가하여 ODN 1을 16-mer로 만든, 동일한 올리고뉴클레오타이드이다. ODN 14와 ODN 1 간 생물학적

활성에서의 차이는 관측되지 않았으며 둘 다 유사한 면역자극 활성을 나타냈다 (Mui et al., 2001).

본 발명의 조성물 및 방법에 사용하기에 적합한 올리고뉴클레오티드 (ODNs)의 추가의 특이적 핵산 서열은 하기 문헌에 기재되어 있다: Raney et al., Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 298:1185-1192 (2001). 특정 양태로, 본 발명의 조성물 및 방법에 사용되는 ODNs는 포스포디에스테르 ("PO") 백본 또는 포스포로티오에이트 ("PS") 백본 및(또는) CpG 모티프 중에 메틸화된 사이토신 잔기를 적어도 1개 갖는다.

Decoy 올리고뉴클레오티드

전사 인자는 주변의 게놈성 DNA의 부재하에서도, 이들의 상대적으로 짧은 결합 서열을 인식하기 때문에, 특이적 전사 인자의 공통 결합 서열을 포함하는 짧은 올리고뉴클레오티드를 살아있는 세포에서의 유전자 발현을 조작하기 위한 도구 (tools)로 사용할 수 있다. 이런 전략은 상기와 같은 "decoy 올리고뉴클레오티드"의 세포내 운반을 필요로 하며, 이는 이후 표적 인자에 의해 인식되어 결합한다. 전사 인자의 DNA-결합 부위를 decoy가 점유하게 되면 전사 인자가 표적 유전자의 프로모터 영역에 결합할 수 없게 된다. decoys는 전사 인자에 의해 활성화되는 유전자의 발현을 억제하거나, 전사 인자의 결합에 의해 억제된 유전자를 상향 조절하기 위한 치료제로서 사용될 수 있다. decoy 올리고뉴클레오티드의 이용 예를 하기 문헌으로부터 알 수 있으며, 상기 문헌은 본 명세서에서 전문 참고로 인용된다: Mann et al., J. Clin. Invest., 2000, 106:1071-1075.

슈퍼미르 (supermir)

슈퍼미르는 miRNA와 실질적으로 동일하며 표적에 대해 안티센스인 뉴클레오티드 서열을 갖는, 리보핵산 (RNA) 또는 데옥시리보핵산 (DNA) 또는 둘 다 또는 이들의 개질체의 단일사, 이중사 또는 부분적 이중사 올리고머 또는 폴리머를 칭한다. 이 용어는 천연 핵산염기, 슈가 및 공유결합 인터뉴클레오시드 (백본) 결합으로 이루어져 있으며 유사하게 작용하는 비-천연 영역을 적어도 1개 함유하는 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 그러한 개질되거나 치환된 올리고뉴클레오티드는 예를 들어, 향상된 세포 흡수성, 핵산 표적에 대한 향상된 친화성 및 뉴클레아제 존재하에서의 증가된 안정성과 같은 바람직한 특성으로 인하여 천연 형 보다 바람직하다. 바람직한 양태로, 슈퍼미르가 센스 스트랜드를 포함하지 않으며, 다른 바람직한 양태로, 슈퍼미르가 확실한 정도로 자가-하이브리드화되지 않는다. 본 발명에서 구현되는 슈퍼미르는 2차 구조를 가질 수 있지만, 생리학적 조건하에서 실질적으로 단일사이다. 실질적으로 단일사인 슈퍼미르는 슈퍼미르의 약 50% 미만(예, 약 40%, 30%, 20%, 10% 또는 5%)이 자기와 듀플렉스화되는 정도로 단일사이다. 슈퍼미르는 헤어핀 절편, 예를 들면, 서열을 포함할 수 있으며, 바람직하게는 3' 말단에서 자가 하이브리드화하여 듀플렉스 영역, 예를 들면, 적어도 1, 2, 3 또는 4개, 바람직하게는 8, 7, 6개 또는 n개 미만의 뉴클레오티드, 예를 들면, 5개의 뉴클레오티드인, 듀플렉스 영역을 형성할 수 있다. 듀플렉스화된 영역은 링커, 예를 들면, 뉴클레오티드 링커, 예로서, 3, 4, 5, 또는 6 dTs, 예로서, 개질된 dTs에 의해 연결될 수 있다. 다른 양태로, 슈퍼미르가 더 짧은 올리고, 예를 들어, 길이가 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 뉴클레오티드인 올리고뉴클레오티드와, 예를 들면, 3'와 5' 말단 중 하나 또는 둘 다에서 또는 슈퍼미르의 말단 중 하나에서 및 비-말단부 또는 중간에서 듀플렉스화된다.

miRNA 모방체

miRNA 모방체는 1개 이상의 miRNAs의 유전자 침묵 능력을 모방하는데 사용할 수 있다. 따라서, 용어 "마이크로 RNA 모방체"는 RNAi 경로에 들어가 유전자 발현을 조절할 수 있는 합성 비-암호화 RNAs (즉, miRNA는 내생성 miRNA의 공급원으로부터 정체에 의해 획득되지 않는다)를 언급한다. miRNA 모방체는 성숙형 분자 (예, 단일사) 또는 모방 전구체 (예, pri- 또는 pre-miRNAs)로 디자인될 수 있다. miRNA 모방체는 제한 없이, RNA, 개질된 RNA, DNA, 개질된 DNA, 잠긴 (locked) 핵산, 또는 2'-O,4'-C-에틸렌-가교된 핵산 (ENA), 또는 상기한 것들의 조합체 (DNA-RNA 하이브리드 포함)를 포함하는 핵산 (개질된 또는 개질된 핵산들) 함유 올리고뉴클레오티드로 이루어질 수 있다. 또한, miRNA 모방체는 운반, 세포내 구획화, 안정성, 특이성, 기능성, 스트랜드 용도 및(또는) 강도에 영향을 줄 수 있는 접합체를 포함할 수 있다. 디자인 중 하나로, miRNA 모방체가 이중사 분자 (예, 약 16 내지 약 31개의 뉴클레오티드 길이인 듀플렉스 영역을 갖는)이고 주어진 miRNA의 성숙 스트랜드에 대한 정체성을 갖는 서열을 1개 이상 함유한다. 개질은 핵산 안정성 및(또는) 특이성을 향상시키는 분자의 스트랜드 중 하나 또는 둘다에서의 2' 개질 (2'-O 메틸 개질 및 2'F 개질 포함) 및 인터뉴클레오티드 개질 (예, 포스포티오에이트 개질)을 포함할 수 있다. 또한, miRNA 모방체는 오버행을 포함할 수 있다. 오버행은 스트랜드 중 하나의 3' 또는 5' 말단상에 1 내지 6개의 뉴클레오티드로 이루어질 수 있으며 안정성 또는 기능성을 향상시키기 위하여 개질시킬 수 있다. 하나의 양태로, miRNA 모방체가 16 내지 31개의 뉴클레오티드로 이루어진 듀플렉스 영역과 다음과 같은 화학적 개질 패턴 중 1개 이상을 포함한다: 센스 스트랜드가 뉴클레오티드 1과 2 (센스 올리고뉴클레오티드의 5' 말단으로부터 계수하여)의 2'-O-메틸 개질, 및 모든 Cs 및 Us를 함유하며; 안티센스 스

트랜드 개질은 모든 Cs 및 Us의 2'F 개질, 올리고뉴클레오타이드의 5' 말단의 포스포릴화, 및 2번 뉴클레오타이드 3' 오버행과 관련된 안정화된 뉴클레오타이드간 결합을 포함할 수 있다.

안티미르 또는 miRNA 억제제

용어 "안티미르", "마이크로RNA 억제제", "miR 억제제", 또는 "억제제"는 동의어이며 특이적 miRNAs의 능력을 방해하는 올리고뉴클레오타이드 또는 개질된 올리고뉴클레오타이드를 언급한다. 일반적으로, 억제제는 RNA, 개질된 RNA, DNA, 개질된 DNA, 잠긴 핵산 (LNAs), 또는 상기한 것들의 조합물을 포함하여, 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 자연계의 핵산 또는 개질된 핵산이다. 개질로는 운반, 안정성, 특이성, 세포내 구획화, 또는 강도에 영향을 줄 수 있는, 2'개질 (2'-O-알킬 개질 및 2'F 개질 포함) 및 뉴클레오타이드간 개질 (예, 포스포로티오에이트 개질)이 있다. 또한, miRNA 억제제는 운반, 안정성, 특이성, 세포내 구획화, 및(또는) 강도에 영향을 줄 수 있는 접합체를 포함할 수 있다. 억제제는 단일사, 이중사 (RNA/RNA 또는 RNA/DNA 듀플렉스), 및 헤어핀 디자인을 포함한 여러 가지 입체배치를 채택할 수 있으며, 일반적으로, 마이크로 RNA 억제제는 표적화할 miRNA의 성숙 스트랜드 (또는 스트랜드들)와 상보적인 또는 부분적으로 상보적인 서열 또는 서열의 일부를 1개 이상 포함하고, 또한, miRNA 억제제는 성숙 miRNA의 역 보체 (reverse complement)인 서열에 대해 5' 및 3'에 위치하는 추가의 서열을 포함할 수 있다. 상기 추가의 서열은 pri-miRNA (이로부터 성숙 miRNA가 유도됨) 중 성숙 miRNA에 인접한 서열의 역 보체일 수 있거나, 상기 추가의 서열은 임의의 서열 (A, G, C, 또는 U의 혼합물을 갖는)일 수 있다. 하나의 양태로, 상기 추가 서열 중 하나 또는 둘 다 헤어핀을 형성할 수 있는 임의의 서열이다. 따라서, 일부 양태에서, miRNA의 역 보체인 서열은 헤어핀 구조에 의해 5' 측 및 3' 측에서 위치된다. 이중사일 경우, 마이크로-RNA 억제제는 반대편 스트랜드상에서 뉴클레오타이드 사이의 미스매치를 포함할 수 있다. 또한, 마이크로-RNA 억제제는 세포중으로 억제제가 흡수되는 것을 촉진시키기 위하여 접합체 부위에 결합시킬 수 있다. 예를 들면, 마이크로-RNA 억제제를 콜레스테릴 5-(비스(4-메톡시페닐)(페닐)메톡시)-3-하이드록시펜틸카바메이트)에 결합시킬 수 있는데, 이는 마이크로-RNA 억제제가 세포로 수동적으로 흡수되도록 한다. 헤어핀 miRNA 억제제를 포함하는 마이크로-RNA 억제제는 하기 문헌에 상세하게 기재되어 있으며, 이들 문헌은 본 명세서에서 전문 참고로 인용된다: Vermeulen et al., "Double-Stranded Regions Are Essential Design Components Of Potent Inhibitors of RISC Function," RNA 13:723-730(2007) 및 W02007/095387 및 W02008/036825. 당해 분야의 숙련가들은 목적하는 miRNA에 대한 데이터베이스로부터 서열을 선택할 수 있으며 여기에 기재된 방법에 대해 유용한 억제제를 디자인할 수 있다.

U1 어댑터

U1 어댑터는 polyA 부위를 억제하며 표적 유전자의 종결 엑손 중의 부위에 대해 상보적인 표적 도메인과 U1 snRNP의 U1 더 작은 핵 RNA 성분에 결합하는 'U1 도메인'을 갖는 이중기능성 올리고뉴클레오타이드이다 (Goracznik, et al., 2008, Nature Biotechnology, 27(3), 257-263, 본 명세서에서 전문 참고로 인용된다). U1 snRNP는 pre-mRNA 엑손-인트론 경계에 결합함으로써 이어맞추기복합체 (spliceosome) 형성에 있어서 초기 단계를 주로 지시하는 기능을 하는 리보뉴클레오단백질 복합체이다 (Brown and Simpson, 1998, Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 49:77-95). U1 snRNA 염기쌍의 5'말단의 뉴클레오타이드 2-11은 pre mRNA의 5'ss와 결합한다. 하나의 양태로, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 U1 어댑터이다. 하나의 양태로, U1 어댑터는 적어도 하나의 다른 iRNA 제제와 함께 투여할 수 있다.

올리고뉴클레오타이드 개질

비개질 올리고뉴클레오타이드는 일부 용도에 있어서 최적성이 덜 할 수 있는데, 예를 들면, 비개질 올리고뉴클레오타이드는 예를 들어, 세포 뉴클레아제에 의해 분해되기 쉬울 수 있다. 뉴클레아제는 핵산 포스포디에스테르 결합을 가수분해할 수 있다. 그러나, 올리고뉴클레오타이드를 화학적으로 개질시켜 개선된 특성을 부여할 수 있으며, 예를 들어, 올리고뉴클레오타이드를 뉴클레아제에 대해 더욱 안정하게 할 수 있다.

올리고뉴클레오타이드가 서브유닛 또는 모노머의 폴리머이기 때문에, 하기 설명된 수많은 개질이 올리고뉴클레오타이드내의 반복되는 위치에서 일어나며, 예를 들면, 염기, 슈가, 포스페이트 부위, 또는 포스페이트 부위의 비-가교 산소의 개질이 있다. 주어진 올리고뉴클레오타이드의 모든 위치에 대해 균일하게 개질되는 것이 필요한 것은 아니며, 사실 상기 언급한 개질 중 1개 이상이 단일 올리고뉴클레오타이드에 또는 심지어 올리고뉴클레오타이드내의 단일 뉴클레오타이드에 포함될 수 있다.

일부 경우에 있어서, 올리고뉴클레오타이드 중 모든 대상 위치에서 개질이 일어날 수 있지만, 수많은 경우, 및 사실 대부분의 경우 그러하지 않다. 예시적으로, 개질이 3' 또는 5' 종결 위치에서만 일어날 수 있으며, 내부 영

역에서만 일어날 수 있고, 종결 영역, 예를 들면, 종결 뉴클레오티드상의 위치 또는 올리고뉴클레오티드의 마지막 2,3,4,5 또는 10번 뉴클레오티드에서만 일어날 수 있다. 개질은 이중 스트랜드 영역, 단일 스트랜드 영역, 또는 둘 다에서 일어날 수 있다. 개질은 이중사 올리고뉴클레오티드의 이중 스트랜드 영역에서만 일어날 수 있거나 이중사 올리고뉴클레오티드의 단일 스트랜드 영역에서만 일어날 수 있다. 예를 들어, 비-가교 산소 위치에서의 포스포로티오에이트 개질은 종결부 중 하나 또는 둘 다에서만 일어날 수 있고, 종결 영역, 예를 들면, 종결 뉴클레오티드상의 위치 또는 스트랜드의 마지막 2, 3, 4, 5, 또는 10번 뉴클레오티드에서만 일어날 수 있거나, 이중 스트랜드 및 단일 스트랜드 영역, 특히 종결부에서 일어날 수 있다. 5' 말단 또는 말단들은 포스포릴화될 수 있다.

본 명세서에 기재된 개질은 단독 개질, 또는 다중 뉴클레오티드상에 포함된 단독 타입의 개질일 수 있거나, 개질이 본 명세서에 기재된 다른 개질 1종 이상과 합해질 수 있다. 본 명세서에 기재된 개질은 또한 올리고뉴클레오티드상으로 합해질 수 있는데, 예를 들면, 올리고뉴클레오티드의 상이한 뉴클레오티드가 본 명세서에 기재된 상이한 개질을 갖는다.

일부 양태에서, 예를 들면, 안정성을 향상시키는 것, 오버행에 특정 핵산염기를 포함시키는 것, 또는 단일 스트랜드 오버행, 예로서, 5' 또는 3' 오버행, 또는 둘 다에 개질된 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 썬드스트랩을 포함시키는 것이 특히 바람직하다. 일부 양태로, 3' 또는 5' 오버행 중 모든 염기 또는 염기의 일부를 예를 들면, 본 명세서에 기재된 개질로 개질시킨다. 개질은 예를 들면, 리보스 슈가의 2'OH 그룹에서 개질의 사용, 예를 들어, 리보뉴클레오티드 대신, 데옥시리보뉴클레오티드, 예로서, 데옥시티미딘의 사용, 및 포스페이트 그룹에서의 개질, 예로서, 포스포티오에이트 개질을 포함할 수 있다. 오버행은 표적 서열에 대해 동족성일 필요는 없다.

상세한 개질이 이후 더욱 세부적으로 논의될 것이다.

포스페이트 그룹

포스페이트 그룹은 음으로 하전된 화학종이다. 전하는 2개의 비-가교 산소 원자에 균등하게 분배된다. 그러나, 포스페이트 그룹은 상기 산소 중 하나를 다른 치환체로 대체함으로써 개질될 수 있다. RNA 포스페이트 백본에 대한 이런 개질의 결과 중 하나가 핵산분해적 분해 (nucleolytic breakdown)에 대한 올리고리보뉴클레오티드의 내성을 증가시킬 수 있다는 것이다. 따라서, 이론으로 국한하고 싶지 않지만, 일부 양태에서 비하전 링커 또는 비대칭 전하 분배를 갖는 하전된 링커로 만드는 변형을 도입시키는 것이 바람직할 수 있다.

개질된 포스페이트 그룹의 예로 포스포로티오에이트, 포스포셀레네이트, 보라노 포스페이트, 보라노 포스페이트 에스테르, 하이드로젠 포스포네이트, 포스포로아미데이트, 알킬 또는 아릴 포스포네이트 및 포스포트리에스테르가 있다. 특정 양태로, 포스페이트 백본 부위의 비-가교 포스페이트 산소 원자 중 하나는 다음 중 하나로 대체될 수 있다: S, Se, BR₃ (R은 수소, 알킬, 아릴임), C (즉, 알킬 그룹, 아릴 그룹 등), H, NR₂ (R은 수소, 알킬, 아릴임), 또는 OR (R은 알킬 또는 아릴임). 비개질 포스페이트 그룹 중 인 원자는 비키랄성 (achiral)이다. 그러나, 비-가교 산소 중 하나를 상기 원자 또는 원자 그룹 중 하나로 대체시키면 인 원자가 키랄성으로 된다; 달리 말해서, 이 방법으로 개질된 포스페이트 그룹 중 인 원자는 입체 중심이다. 상기 입체성인 원자는 "R" 배열 (여기서는 Rp) 또는 "S" 배열 (여기서는 Sp)를 가질 수 있다.

포스포로티오에이트는 비-가교 산소 둘 다 황으로 대체된 것이다. 상기 포스포로티오에이트 중 인 중심은 아키랄로 이는 올리고리보뉴클레오티드 부분입체이성질체의 형성을 불가능하게 한다. 따라서, 이론으로 국한하고 싶지 않지만, 키랄 중심을 제거하는, 비-가교 산소 둘 다에 대한 개질, 예를 들어, 포스포로티오에이트 형성은 이들이 부분입체이성질체 혼합물을 생산할 수 없을 때 바람직할 수 있다. 따라서, 비-가교 산소는 독립적으로 S, Se, B, C, H, N, 또는 OR (R은 알킬 또는 아릴임) 중 어느 하나일 수 있다.

가교 산소 (즉, 포스페이트를 뉴클레오시드에 연결하는 산소)를 질소 (가교된 포스포로아미데이트), 황 (가교된 포스포로티오에이트) 및 탄소 (가교된 메틸렌포스포네이트)로 대체시킴으로써 포스페이트 링커를 또한 개질시킬 수 있다. 연결 산소 중 하나 또는 연결 산소 둘 다 대체시킬 수 있다. 가교 산소가 뉴클레오시드의 3'-산소일 경우, 탄소로 대체시키는 것이 바람직하다. 가교 산소가 뉴클레오시드의 5'-산소일 경우, 질소로 대체시키는 것이 바람직하다.

포스페이트 그룹의 대체

포스페이트 그룹을 커넥터 (connectors)를 함유하는 비-인계 화합물로 대체시킬 수 있다. 이론으로 국한하고

싶지 않지만, 하전된 포스포디에스테르 그룹이 핵산분해효소에 의한 분해에 있어서 반응 중심이기 때문에, 이를 중성의 입체 모방체로 대체시켜야 향상된 뉴클레아제 안정성이 부여되는 것으로 생각된다. 다시 말해서, 이론으로 국한하고 싶지 않지만, 일부 양태에 있어서, 하전된 포스페이트 그룹을 중성 부위로 대체시키는 변형을 도입시키는 것이 바람직할 수 있다.

포스페이트 그룹을 대체할 수 있는 부위의 예로 메틸 포스포네이트, 하이드록실아미노, 실록산, 카보네이트, 카복시메틸, 카바메이트, 아마이드, 티오에테르, 에틸렌 옥사이드 링커, 술포네이트, 술폰아미드, 티오포름아세탈, 포름아세탈, 옥심, 메틸렌이미노, 메틸렌메틸이미노, 메틸렌하이드라조, 메틸렌디메틸하이드라조 및 메틸렌옥시메틸이미노가 있다. 바람직한 대체물은 메틸렌카보닐아미노 및 메틸렌메틸이미노 그룹이다.

포스페이트에 연결되어 있는 산소 중 적어도 하나가 대체되어 있거나 포스페이트 그룹이 비-인 그룹으로 대체되어 있는 개질된 포스페이트 결합은 또한 "비 포스포디에스테르 백본 결합"으로 언급된다.

리보포스페이트 백본의 대체

올리고뉴클레오티드-모방 스캐폴드를 또한 작제할 수 있는데, 여기서 포스페이트 링커와 리보스 슈가는 뉴클레아제 내성 뉴클레오시드 또는 뉴클레오티드 썬로게이트로 대체된다. 이론으로 국한하고 싶지 않지만, 반복적으로 하전된 백본의 부재는 폴리음이온을 인식하는 단백질 (예, 뉴클레아제)에 대한 결합을 감소시키는 것으로 생각된다. 다시 말해서, 이론으로 국한하고 싶지 않지만, 일부 양태에 있어서, 염기가 중성 썬로게이트 백본으로 대체되는 변형을 도입시키는 것이 바람직할 수 있다. 예로서 모필리노, 사이클로부틸, 피롤리딘 및 펩타이드 핵산 (PNA) 뉴클레오시드 썬로게이트가 있다. 바람직한 썬로게이트는 PNA 썬로게이트이다.

슈가 개질

개질된 RNA는 리보핵산의 슈가 그룹 모두 또는 일부의 개질을 포함할 수 있다. 예를 들어, 2' 하이드록실 그룹 (OH)은 수많은 상이한 "옥시" 또는 "데옥시" 치환체로 개질되거나 대체될 수 있다. 이론으로 국한하고 싶지 않지만, 하이드록실은 2'-알콕사이드 이온을 형성하기 위한 탈양자화가 더 이상 될 수 없기 때문에 향상된 안정성이 기대된다. 2'-알콕사이드는 링커 인 원자상에서의 분자내 친핵성 공격에 의한 분해를 촉매할 수 있다. 다시 말해서, 이론으로 국한하고 싶지 않지만, 일부 양태에 있어서, 2' 위치에서의 알콕사이드 형성이 불가능한 변형을 도입시키는 것이 바람직할 수 있다.

"옥시"-2' 하이드록실 그룹 개질의 예로는 알콕시 또는 아릴옥시 (OR, 예로서, R = H, 알킬, 사이클로알킬, 아릴, 아르알킬, 헤테로아릴 또는 슈가); 폴리에틸렌글리콜 (PEG), O(CH₂CH₂O)_nCH₂CH₂OR; 2' 하이드록실이 예를 들어 메틸렌 가교에 의해 동일한 리보스 슈가의 4' 탄소에 연결되어 있는 "잠긴" 핵산 (LNA); O-AMINE (AMINE = NH₂; 알킬아미노, 디알킬아미노, 헤테로사이클릴, 아릴아미노, 디아릴 아미노, 헤테로아릴 아미노, 또는 디헤테로아릴 아미노, 에틸렌 디아민, 폴리아미노) 및 아미노알콕시, O(CH₂)_nAMINE, (예, AMINE = NH₂; 알킬아미노, 디알킬아미노, 헤테로사이클릴, 아릴아미노, 디아릴 아미노, 헤테로아릴 아미노, 또는 디헤테로아릴 아미노, 에틸렌 디아민, 폴리아미노)이 있다. 메톡시에틸 그룹 (MOE)만을 함유하는 올리고뉴클레오티드, (OCH₂CH₂OCH₃, PEG 유도체)가 강력한 포스포로티오에이트 개질로 개질된 것들에 필적하는 뉴클레아제 안정성을 나타낸다는 것은 주목할 만하다.

"데옥시" 개질로는 수소 (즉, 데옥시리보스 슈가, 부분적으로 ds RNA의 오버행 부분에 특히 관련되어 있다); 할로 (예, 플루오로); 아미노 (예, NH₂; 알킬아미노, 디알킬아미노, 헤테로사이클릴, 아릴아미노, 디아릴 아미노, 헤테로아릴 아미노, 디헤테로아릴 아미노, 또는 아미노산), NH(CH₂CH₂NH)_nCH₂CH₂-AMINE (AMINE=NH₂; 알킬아미노, 디알킬아미노, 헤테로사이클릴, 아릴아미노, 디아릴아미노, 헤테로아릴아미노, 또는 디헤테로아릴 아미노), -NHC(O)R (R = 알킬, 사이클로알킬, 아릴, 아르알킬, 헤테로아릴 또는 슈가), 시아노; 머캡토; 알킬-티오-알킬; 티오알콕시; 및 알킬, 사이클로알킬, 아릴, 알케닐 및 알키닐 (이들은 예를 들어, 아미노 기능성으로 임의로 치환될 수 있다)이 있다. 바람직한 치환은 2'-메톡시에틸, 2'-OCH₃, 2'-O-알릴, 2'-C-알릴, 및 2'-플루오로이다.

슈가 그룹은 또한 리보스중 대응하는 탄소의 것보다 반대 입체화학 배열을 갖는 탄소 원자를 1개 이상 함유할 수 있다. 따라서, 올리고뉴클레오티드는 슈가로서, 예를 들어, 아라비노오스를 함유하는 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 상기 모노머는 슈가 상의 1' 위치에서 알파 결합, 예를 들어, 알파-뉴클레오시드를 가질 수 있다. 올리고뉴클레오티드는 또한 C-1'에서 핵염기가 결합되어 있는, "어베이직 (abasic)" 슈가를 포함할 수 있다. 이들 어베이직 슈가는 또한 구성 슈가 원자 중 1개 이상에서의 개질을 추가로 함유하는 것일 수 있다. 올리고

뉴클레오티드는 또한 L형인 슈가, 예를 들어, L-뉴클레오시드를 1개 이상 함유할 수 있다.

중결부 개질

올리고뉴클레오티드의 3' 및 5' 말단을 개질시킬 수 있다. 그러한 개질은 분자의 3' 말단, 5' 말단 또는 두 말단 모두에서 있을 수 있다. 이들은 전체 중결부 포스페이트 또는 포스페이트 그룹의 원자 중 1개 이상의 개질 또는 대체를 포함할 수 있다. 예를 들어, 올리고뉴클레오티드의 3' 및 5' 말단을 표지화 부위, 예로서, 형광단 (예, 피렌, TAMRA, 플루오르세인, Cy3 또는 Cy5 염료) 또는 보호 그룹 (예를 들어 황, 실리콘, 붕소 또는 에스테르 기재)과 같은 다른 기능성 분자본체에 접합시킬 수 있다. 기능성 분자본체는 포스페이트 그룹 및(또는) 링커를 통하여 슈가에 부착될 수 있다. 링커의 중결부 원자는 포스페이트 그룹의 결합 원자 또는 슈가의 C-3' 또는 C-5'O, N, S 또는 C 그룹의 결합 원자에 연결하거나 대체할 수 있다. 달리, 상기 링커는 뉴클레오티드 썬로게이트 (예, PNAs)의 중결부 원자에 연결하거나 대체할 수 있다.

링커/포스페이트-기능성 분자본체-링커/포스페이트 어레이가 dsRNA의 2개의 스트랜드 사이에 배치되어 있는 경우, 상기 어레이는 헤어핀-타입 RNA 제제 중 헤어핀 RNA 루프를 대체할 수 있다.

활성을 조절하는데 유용한 중결부 개질로는 포스페이트 또는 포스페이트 유사체를 사용한 5'말단 개질을 포함한다. 예를 들어, 바람직한 양태로, dsRNAs의 안티센스 스트랜드는 5' 포스포틸화되거나 5' 프라임 중결부에 포스포틸 유사체를 포함한다. 5'-포스페이트 개질은 RISC 매개된 유전자 침묵에 적합한 것들이 있다. 적합한 개질은 다음과 같다: 5'-모노포스페이트 ((HO)2(O)P-O-5'); 5'-디포스페이트 ((HO)2(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); 5'-트리포스페이트 ((HO)2(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); 5'-구아노신 캡 (7-메틸화된 또는 비-메틸화된)(7m-G-O-5'-(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); 5'-아데노신 캡 (App), 및 개질된 또는 비개질된 뉴클레오티드 캡 구조 (N-O-5'-(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); 5'-모노티오포스페이트 (포스포로티오에이트; (HO)2(S)P-O-5'); 5'-모노디티오포스페이트 (포스포로디티오에이트; (HO)(HS)(S)P-O-5'), 5'-포스포로티올레이트 ((HO)2(O)P-S-5'); 산소/황 대체된 모노포스페이트, 디포스페이트 및 트리포스페이트 (예, 5'-알파-티오텐트리포스페이트, 5'-감마-티오텐트리포스페이트 등), 5'-포스포르아미네이트 ((HO)2(O)P-NH-5', (HO)(NH2)(O)P-S-5'), 5'-알킬포스포네이트 (R = 알킬 = 메틸, 에틸, 이소프로필, 프로필 등, 예로서, RP(OH)(O)-O-5'-, (OH)2(O)P-5'-CH2-), 5'-알킬에테르포스포네이트 (R = 알킬에테르=메톡시메틸 (MeOCH2-), 에톡시메틸 등, 예로서 RP(OH)(O)-O-5')의 추가의 조합물.

중결부 개질은 또한 분포를 모니터링하는데 유용할 수 있으며, 그러한 경우 첨가할 바람직한 그룹은 형광단, 예를 들어 플루오르세인 또는 Alexa 염료, 예로서, Alexa 488이 있다. 중결부 개질은 또한 흡수력을 향상시키는데 유용할 수 있으며, 이에 유용한 개질은 콜레스테롤을 포함한다. 중결부 개질은 또한 RNA 제제를 다른 부위에 가교-결합시키는데 유용할 수 있으며; 이에 유용한 개질은 미토마이신 C를 포함한다.

핵산염기 (nucleobases)

아데닌, 구아닌, 시토신 및 우라실은 RNA에서 발견되는 가장 통상적인 염기이다. 이들 염기를 개질 또는 대체하여 향상된 특성을 갖는 RNA를 제공할 수 있다. 예를 들어, 뉴클레아제 내성 올리고리보뉴클레오티드는 이들 염기 또는 합성 및 천연 핵산염기 (예, 이노신, 티민, 크산틴, 하이포산틴, 누블라린, 이소구아니신, 또는 튜버시딘)와 상기 개질 중 하나를 사용하여 제조할 수 있다. 달리, 상기 염기의 치환 또는 개질된 유사체, 예를 들어, 본 명세서에 기재된 "비통상적 염기", "개질된 염기", "비-천연 염기" 및 "범용 염기"를 사용할 수 있다. 예로는, 제한없이, 2-아미노아데닌, 아데닌 및 구아닌의 6-메틸 및 기타 알킬 유도체, 아데닌 및 구아닌의 2-프로필 및 기타 알킬 유도체, 5-할로우라실 및 시토신, 5-프로피닐 우라실 및 시토신, 6-아조 우라실, 시토신 및 티민, 5-우라실 (슈도우라실), 4-티오우라실, 5-할로우라실, 5-(2-아미노프로필)우라실, 5-아미노 알릴 우라실, 8-할로, 아미노, 티올, 티오알킬, 하이드록실 및 기타 8-치환된 아데닌 및 구아닌, 5-트리플루오로메틸 및 기타 5-치환된 우라실 및 시토신, 7-메틸구아닌, 5-치환된 피리미딘, 6-아자피리미딘 및 N-2, N-6 및 O-6 치환된 퓨린, 2-아미노프로피리아데닌, 5-프로피닐우라실 및 5-프로피닐시토신을 포함하여, 디하이드로우라실, 3-테아자-5-아자시토신, 2-아미노퓨린, 5-알킬우라실, 7-알킬구아닌, 5-알킬 시토신, 7-테아자아데닌, N6,N6-디메틸아데닌, 2,6-디아미노퓨린, 5-아미노-알릴-우라실, N3-메틸우라실, 치환된 1,2,4-트리아졸, 2-피리디논, 5-니트로인돌, 3-니트로피롤, 5-메톡시우라실, 우라실-5-옥시아세트산, 5-메톡시카보닐메틸우라실, 5-메틸-2-티오우라실, 5-메톡시카보닐메틸-2-티오우라실, 5-메틸아미노메틸-2-티오우라실, 3-(3-아미노-3-카복시프로필)우라실, 3-메틸시토신, 5-메틸시토신, N⁴-아세틸 시토신, 2-티오시토신, N6-메틸아데닌, N6-이소퀸틸아데닌, 2-메틸티오-N6-이소퀸틸아데닌, N-메틸구아닌, 또는 O-알킬화 염기가 있다. 추가의 퓨린 및 피리미딘으로는 미국 특허 제 3,687,808호에 기재되어 있는 것들, 문헌: Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, pages

858-859, Kroschwitz, J.I., ed. John Wiley & Sons, 1990에 기재되어 있는 것들, 및 문헌: Englisch et al., *Angewandte Chemie, International Edition*, 1991, 30, 613에 기재되어 있는 것들이 있다.

양이온성 그룹

올리고뉴클레오타이드에 대한 개질은 또한 포스페이트 또는 개질된 포스페이트 백본 부위의 슈가, 염기 및(또는) 인 원자에 양이온성 그룹 1개 이상을 부착시키는 것을 포함할 수 있다. 양이온성 그룹은 천연, 비통상적 또는 범용 염기상의 치환가능한 원자에 부착시킬 수 있다. 바람직한 위치는 하이브리드화를 방해하지않는, 즉, 염기 페어링에 필요한 수소 결합 상호반응을 방해하지 않는 곳이다. 양이온성 그룹은 예를 들어, 환식 또는 비환식 슈가 써로게이트 중 슈가의 C2' 위치 또는 유사 위치를 통하여 부착될 수 있다. 양이온성 그룹의 예로는, 예를 들어, O-AMINE (AMINE = NH₂; 알킬아미노, 디알킬아미노, 헤테로사이클릴, 아릴아미노, 디아릴 아미노, 헤테로아릴 아미노, 또는 디헤테로아릴 아미노, 에틸렌 디아민, 폴리아미노); 아미노알콕시, 예로서, O(CH₂)_n-AMINE (AMINE = NH₂; 알킬아미노, 디알킬아미노, 헤테로사이클릴, 아릴아미노, 디아릴 아미노, 헤테로아릴 아미노, 또는 디헤테로아릴 아미노, 에틸렌 디아민, 폴리아미노); 아미노 (예, NH₂; 알킬아미노, 디알킬아미노, 헤테로사이클릴, 아릴아미노, 디아릴 아미노, 헤테로아릴 아미노, 디헤테로아릴 아미노, 또는 아미노산); 또는 NH(CH₂CH₂NH)_nCH₂CH₂-AMINE (AMINE = NH₂; 알킬아미노, 디알킬아미노, 헤테로사이클릴, 아릴아미노, 디아릴 아미노, 헤테로아릴 아미노, 또는 디헤테로아릴 아미노)로부터 유래된, 양자화된 아미노 그룹이 있다.

올리고뉴클레오타이드 내의 배치

일부 개질은 특정 위치에서 올리고뉴클레오타이드상에, 예를 들면, 스트랜드의 내부 위치, 또는 올리고뉴클레오타이드의 5' 또는 3' 말단상에 바람직하게 포함시킬 수 있다. 올리고뉴클레오타이드 상 개질의 바람직한 위치는 약제에 바람직한 특성을 부여할 수 있다. 예를 들어, 특정 개질의 바람직한 위치는 최적의 유전자 침묵 특성, 또는 엔도뉴클레아제 또는 엑소뉴클레아제 활성화에 대한 증가된 내성을 부여할 수 있다.

올리고뉴클레오타이드의 뉴클레오타이드 1개 이상은 2'-5' 결합을 가질 수 있다. 올리고뉴클레오타이드의 뉴클레오타이드 1개 이상은 역전된 결합, 예를 들면, 3'-3', 5'-5', 2'-2' 또는 2'-3' 결합을 가질 수 있다.

이중사 올리고뉴클레오타이드는 적어도 1개의 5'-우리딘-아데닌-3' (5'-UA-3') 디뉴클레오타이드(여기서 우리딘이 2'-개질된 뉴클레오타이드이다), 또는 종결 5'-우리딘-구아닌-3' (5'-UG-3')디뉴클레오타이드 (여기서 5'-우리딘이 2'-개질된 뉴클레오타이드이다), 또는 종결 5'-시티딘-아데닌-3' (5'-CA-3')디뉴클레오타이드 (여기서 5'-시티딘이 2'-개질된 뉴클레오타이드이다), 또는 종결 5'-우리딘-우리딘-3' (5'-UU-3')디뉴클레오타이드 (여기서 5'-우리딘이 2'-개질된 뉴클레오타이드이다), 또는 종결 5'-시티딘-시티딘-3' (5'-CC-3')디뉴클레오타이드 (여기서 5'-시티딘이 2'-개질된 뉴클레오타이드이다), 또는 종결 5'-시티딘-우리딘-3' (5'-CU-3')디뉴클레오타이드 (여기서 5'-시티딘이 2'-개질된 뉴클레오타이드이다), 또는 종결 5'-우리딘-시티딘-3' (5'-UC-3')디뉴클레오타이드 (여기서 5'-우리딘이 2'-개질된 뉴클레오타이드이다)를 포함할 수 있다. 이들 개질을 포함하는 이중사 올리고뉴클레오타이드는 엔도뉴클레아제 활성화에 대해 특히 안정화된다.

일반적인 참고사항

본 발명에 따라서 사용되는 올리고리보뉴클레오타이드 및 올리고리보뉴클레오시드는 고체상 합성법으로 합성할 수 있으며, 다음 문헌을 참고한다: "Oligonucleotide synthesis, a practical approach", Ed. M.J. Gait, IRL Press, 1984; "Oligonucleotides and Analogues, A Practical Approach", Ed.F.Eckstein, IRL Press, 1991 (특히 Chapter 1, Modern machine-aided methods of oligodeoxyribonucleotide synthesis, Chapter 2, Oligoribonucleotide synthesis, Chapter 3, 2'-O-Methyloligoribonucleotide-s: synthesis and applications, Chapter 4, Phosphorothioate oligonucleotides, Chapter 5, Synthesis of oligonucleotide phosphorodithioates, Chapter 6, Synthesis of oligo-2'-deoxyribonucleoside methylphosphonates, 및 Chapter 7, Oligodeoxynucleotides containing modified bases). 특히 유용한 다른 합성 공정, 시약, 차단 그룹 및 반응 조건은 하기 문헌에 기재되어 있다: Martin, P., *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78, 486-504; Beaucage, S. L. and Iyer, R.P., *Tetrahedron*, 1992, 48, 2223-2311 and Beaucage, S.L. and Iyer, R.P., *Tetrahedron*, 1993, 49, 6123-6194, 또는 여기에 언급되어 있는 참고문헌. WO 00/44895, WO 01/75164, 또는 WO 02/44321에 기재된 개질이 본 발명에 사용될 수 있다. 여기에 열거된 모든 공개공보, 특허, 및 공개된 특허원의 기재내용은 본 명세서에서 참고로 인용된다.

포스페이트 그룹 참고사항

포스피네이트 올리고리보뉴클레오티드의 제조 방법은 미국 특허 제5,508,270호에 기재되어 있다. 알킬 포스포네이트 올리고리보뉴클레오티드의 제조 방법은 미국 특허 제4,469,863호에 기재되어 있다. 포스포르아미다이트 올리고리보뉴클레오티드의 제조 방법은 미국 특허 제5,256,775호 또는 미국 특허 제5,366,878호에 기재되어 있다. 포스포트리에스테르 올리고리보뉴클레오티드의 제조 방법은 미국 특허 제5,023,243호에 기재되어 있다. 보라노 포스페이트 올리고리보뉴클레오티드의 제조 방법은 제5,130,302호 및 제5,177,198호에 기재되어 있다. 3'-데옥시-3'-아미노 포스포로아미데이트 올리고리보뉴클레오티드는 미국 특허 제5,476,925호에 기재되어 있다. 3'-데옥시-3'-메틸렌포스포네이트 올리고리보뉴클레오티드는 하기 문헌에 기재되어 있다: An, H, et al. *J. Org. Chem.* 2001, 66, 2789-2801. 황 가교된 뉴클레오티드의 제조 방법이 하기 문헌에 기재되어 있다: Sproat et al. *Nucleosides Nucleotides* 1988, 7, 651 및 Crosstick et al. *Tetrahedron Lett.* 1989, 30, 4693.

슈가 그룹 참고사항

2'개질에 대한 개질은 다음 문헌 및 본 명세서의 모든 참고문헌으로부터 발견할 수 있다: Verma, S. et al. *Annu. Rev. Biochem.* 1998, 67, 99-134. 리보스에 대한 특이적 개질은 다음 문헌으로부터 발견할 수 있다: 2'-플루오로(Kawasaki et al., *J. Med. Chem.*, 1993, 36, 831-841), 2'-MOE (Martin, P. *Helv. Chim. Acta* 1996, 79, 1930-1938), "LNA" (Wengel, J. *Acc. Chem. Res.* 1999, 32, 301-310).

포스페이트 그룹의 대체 참고사항

본 발명에서 MMI 결합된 올리고리보뉴클레오티드로 확인된, 메틸렌메틸아미노 결합된 올리고리보뉴클레오티드로 확인된, MDH 결합된 올리고리보뉴클레오티드로 확인된, 메틸렌디메틸하이드라조 결합된 올리고리보뉴클레오티드로 확인된, 및 본 발명에서 아미드-3 결합된 올리고리보뉴클레오티드로 확인된, 메틸렌카보닐아미노 결합된 올리고리보뉴클레오티드로 확인된, 및 본 발명에서 아미드-4 결합된 올리고리보뉴클레오티드로 확인된, 메틸렌아미노카보닐 결합된 올리고리보뉴클레오티드로 확인된, 교대 MMI 및 PO 또는 PS 결합을 갖는 혼합된 백본 화합물은 미국 특허 제5,378,825호, 제5,386,023호, 제5,489,677호 및 공개된 PCT 출원 PCT/US92/04294 및 PCT/US92/04305 (각각 WO 92/20822 및 WO 92/20823으로 공개)에 기재된 바와 같이 제조할 수 있다. 포름아세탈 및 티오포름아세탈 결합된 올리고리보뉴클레오티드는 미국 특허 제5,264,562호 및 제5,264,564호에 기재된 바와 같이 제조할 수 있다. 에틸렌 옥사이드 결합된 올리고리보뉴클레오티드는 미국 특허 제5,223,618호에 기재된 바와 같이 제조할 수 있다. 실록산 대체는 다음 문헌에 기재되어 있다: Cormier, J.F. et al. *Nucleic Acids Res.* 1988, 16, 4583. 카보네이트 대체는 다음 문헌에 기재되어 있다: Tittensor, J.R. *J. Chem. Soc. C* 1971, 1933. 카복시메틸 대체는 다음 문헌에 기재되어 있다: Edge, M.D. et al. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 1972, 1991. 카바메이트 대체는 다음 문헌에 기재되어 있다: Stirchak, E.P. *Nucleic Acids Res.* 1989, 17, 6129.

포스페이트-리보스 백본 대체 참고사항

사이클로부틸 슈가 써로게이트 화합물은 미국 특허 제5,359,044호에 기재된 바와 같이 제조할 수 있다. 피롤리딘 슈가 써로게이트는 미국 특허 제5,519,134호에 기재된 바와 같이 제조할 수 있다. 모르폴리노 슈가 써로게이트는 미국 특허 제5,142,047호 및 제5,235,033호, 및 기타 관련 특허 기재물에 기재된 바와 같이 제조할 수 있다. 펩타이드 핵산 (PNAs)은 자체가 공지되어 있으며 하기 문헌에 언급된 다양한 공정 중 하나에 따라서 제조할 수 있다: *Peptide Nucleic Acids (PNA): Synthesis, Properties and Potential Applications, Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 1996, 4, 5-23. 이들은 또한 미국 특허 제5,539,083호에 따라서 제조할 수 있다.

종결부 개질 참고사항

종결부 개질은 다음 문헌 및 본 명세서의 참고문헌에 기재되어 있다: Manoharan, M. et al. *Antisense and Nucleic Acid Drug Development* 12, 103-128 (2002).

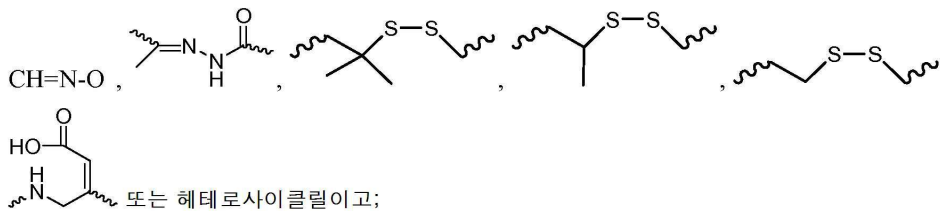
핵산염기 참고사항

N-2 치환된 퓨린 뉴클레오티드 아미다이트는 미국 특허 제5,459,255호에 기재된 바와 같이 제조할 수 있다. 3-데아자 퓨린 뉴클레오티드 아미다이트는 미국 특허 제5,457,191호에 기재된 바와 같이 제조할 수 있다. 5,6-치환된 피리미딘 뉴클레오티드 아미다이트는 미국 특허 제5,614,617호에 기재된 바와 같이 제조할 수 있다. 5-프로피닐 피리미딘 뉴클레오티드 아미다이트는 미국 특허 제5,484,908호에 기재된 바와 같이 제조할 수 있다.

링커

용어 "링커"는 화합물의 두 부분을 연결하는 유기 부위를 의미한다. 링커는 전형적으로 직접 결합 또는 산소 또는 황과 같은 원자, 유니트, 예로서, NR¹, C(O), C(O)NH, SO, SO₂, SO₂NH 또는 원자의 쇠, 예로서, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 알케닐, 치환 또는 비치환된 알키닐, 아릴알킬, 아릴알케닐, 아릴알키닐, 헤테로아릴알킬, 헤테로아릴알케닐, 헤테로아릴알키닐, 헤테로사이클릴알킬, 헤테로사이클릴알케닐, 헤테로사이클릴알키닐, 아릴, 헤테로아릴, 헤테로사이클릴, 사이클로알킬, 사이클로알케닐, 알킬아릴알킬, 알킬아릴알케닐, 알킬아릴알키닐, 알케닐아릴알킬, 알케닐아릴알케닐, 알케닐아릴알키닐, 알키닐아릴알킬, 알키닐아릴알케닐, 알키닐아릴알키닐, 알킬헤테로아릴알킬, 알킬헤테로아릴알케닐, 알킬헤테로아릴알키닐, 알케닐헤테로아릴알킬, 알케닐헤테로아릴알케닐, 알케닐헤테로아릴알키닐, 알키닐헤테로아릴알킬, 알키닐헤테로아릴알케닐, 알키닐헤테로아릴알키닐, 알킬헤테로사이클릴알킬, 알킬헤테로사이클릴알케닐, 알킬헤테로사이클릴알키닐, 알케닐헤테로사이클릴알킬, 알케닐헤테로사이클릴알케닐, 알케닐헤테로사이클릴알키닐, 알키닐헤테로사이클릴알킬, 알키닐헤테로사이클릴알케닐, 알킬아릴, 알케닐아릴, 알키닐아릴, 알킬헤테로아릴, 알케닐헤테로아릴, 알키닐헤테로아릴을 포함하며, 여기서 1개 이상의 메틸렌은 O, S, S(O), SO₂, N(R¹)₂, C(O), 절단가능한 연결 그룹, 치환 또는 비치환된 아릴, 치환 또는 비치환된 헤테로아릴, 치환 또는 비치환된 헤테로사이클릭에 의해 차단되거나 종결될 수 있고; 이때 R¹은 수소, 아실, 지방족 또는 치환된 지방족이다.

하나의 양태로, 링커는 -(P-Q-R)_q-X-(P'-Q'-R')_{q'}]-T-로, 여기서 P, R, T, P', R' 및 T는 서로 독립적으로 부재, CO, NH, O, S, OC(O), NHC(O), CH₂, CH₂NH, CH₂O; NHCH(R^a)C(O), -C(O)-CH(R^a)-NH-, CH=N-O,



Q 및 Q'는 서로 독립적으로 부재, -(CH₂)_n-, -C(R¹)(R²)(CH₂)_n-, -(CH₂)_nC(R¹)(R²)-, -(CH₂CH₂O)_mCH₂CH₂-, 또는 -(CH₂CH₂O)_mCH₂CH₂NH- 이며;

X는 부재하거나 절단가능한 연결 그룹이고;

R^a는 H 또는 아미노산 측쇄이며;

R¹ 및 R²는 서로 독립적으로 H, CH₃, OH, SH 또는 N(R^N)₂이고;

R^N은 서로 독립적으로 H, 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, 부틸 또는 벤질이며;

q, q' 및 q"는 서로 독립적으로 0 내지 20이고 이때 반복 유니트는 동일하거나 상이할 수 있으며;

n은 서로 독립적으로 1 내지 20이고;

m은 서로 독립적으로 0 내지 50이다.

하나의 양태로, 링커가 적어도 1개의 절단가능한 연결 그룹을 포함한다.

특정 양태로, 링커가 분지된 링커이다. 분지된 링커의 분지점은 적어도 3가일 수 있지만, 4가 5가 또는 6가 원자, 또는 그러한 다중 원자를 나타내는 그룹일 수 있다. 특정 양태로, 분지점은 -N-, -N(Q)-C-, -O-C-, -S-C-, -SS-C-, -C(O)N(Q)-C-, -OC(O)N(Q)-C-, -N(Q)C(O)-C-, 또는 -N(Q)C(O)O-C 이고; 여기서 Q는 서로 독립적으로 H 또는 임의로 치환된 알킬이다. 다른 양태로, 분지점은 글리세롤 또는 글리세롤 유도체이다.

절단가능한 연결 그룹

절단가능한 연결 그룹은 세포 외부에서 충분히 안정하지만, 표적 세포내로 들어가면 절단되어 2개의 부분을 방

출하고 링커는 함께 유지하는 것이다. 바람직한 양태로, 절단가능한 연결 그룹은 표적 세포내에서 또는 제1 지시 조건 (이는 예를 들어, 세포내 조건을 모방 또는 나타내도록 선택될 수 있다)하에서 개체의 혈액내에서 보다, 또는 제2 지시 조건 (이는 예를 들어, 혈액 또는 혈청에서 발견되는 조건을 모방하거나 나타내도록 선택될 수 있다)하에서 적어도 10배 이상, 바람직하게는 적어도 100배 더 빠르게 절단된다. 절단가능한 연결 그룹은 절단제, 예를 들면, pH, 산화환원 전위 또는 분해성 분자의 존재에 감응성이다. 일반적으로, 분해제는 혈청 또는 혈액에서보다 세포 내부에서 더욱 우세하거나 더 높은 수준 또는 활성으로 발견된다. 그러한 분해제의 예는 다음과 같다: 특정 기질에 대해 선택되거나 기질 특이성이 없는 산화환원제로, 예로는, 산화 또는 환원 효소 또는 환원에 의해 산화환원 절단가능한 연결 그룹을 분해시킬 수 있는, 세포내에 존재하는, 머갑탄과 같은 환원제; 에스테라제; 산성 환경을 생성할 수 있는 엔도솜 또는 체제로, 예로는, pH를 5 또는 그 이하로 만드는 것들; 산, 펩티다제 (이는 기질 특이적일 수 있다), 및 포스파타제로서 작용함으로써 산 절단가능한 연결 그룹을 가수분해 또는 분해시킬 수 있는 효소.

이황화 결합과 같은 절단가능한 연결 그룹은 pH에 감응성일 수 있다. 사람 혈청의 pH는 7.4인 반면, 세포내 평균 pH는 약 7.1 내지 7.3의 범위로, 약간 더 낮다. 엔도솜은 5.5 내지 6.0 범위의, 더욱 산성인 pH를 가지며, 리소솜은 5.0 부근의 더더욱 산성인 pH를 가지므로, 이에 의해 세포 내부로, 또는 세포의 목적하는 구획내로 리간드로부터 양이온성 지질을 방출시킨다.

링커는 특정 효소에 의해 절단가능한 절단가능 연결 그룹을 포함할 수 있다. 링커중에 포함되는 절단가능한 연결 그룹의 타입은 표적화할 세포에 따른다. 예를 들어, 간 표적화 리간드는 에스테르 그룹을 포함하는 링커를 통하여 양이온성 지질에 결합시킬 수 있다. 간 세포에는 에스테라제가 풍부하며, 따라서 링커는 에스테라제가 풍부하지 않은 세포 타입에서 보다 간 세포에서 더욱 효율적으로 절단된다. 에스테라제가 풍부한 다른 세포 타입은 폐, 신장 피질, 및 고환의 세포이다.

펩타이드 결합을 함유하는 링커는 간 세포 및 활막세포와 같이, 펩티다제가 풍부한 세포 타입을 표적화할 경우 사용될 수 있다.

일반적으로, 후보 절단가능성 연결 그룹의 적합성은 분해제 (또는 조건)의 후보 연결 그룹을 절단하는 능력을 시험함으로써 평가할 수 있다. 또한, 혈액중에서 또는 다른 비-표적 조직과 접촉할 경우 절단에 대해 저항하는 능력에 대해 후보 절단가능한 연결 그룹을 시험하는 것이 바람직하다. 따라서, 제1 및 제2 조건 간 상대적인 절단 감응성을 측정할 수 있는데, 이때 제1 조건은 표적 세포에서의 절단 치료가 될 수 있도록 선택하고 제2 조건은 다른 조직 또는 생물학적 유체, 예를 들면, 혈액 또는 혈청에서의 절단 지표가 될 수 있도록 선택한다. 평가는 세포가 없는 (cell free) 시스템, 세포, 세포 배양, 기관 또는 조직 배양, 또는 동물에서 수행할 수 있다. 세포가 없는 또는 배양 조건에서 먼저 평가하고 동물에서 추가로 평가하여 확인하는 것이 유용할 수 있다. 바람직한 양태로, 유용한 후보 화합물은 혈액 또는 혈청 (또는 세포의 조건을 모방하도록 선택된 시험관내 조건하에서)과 비교하여 세포에서 (또는 세포내 조건을 모방하도록 선택된 시험관내 조건하에서) 적어도 2, 4, 10 또는 100배 더 빨리 절단한다.

산화환원 절단가능한 연결 그룹

절단가능한 연결 그룹 중 하나는 환원 또는 산화 시 절단되는 산화환원 절단가능한 연결 그룹이다. 환원적으로 절단가능한 연결 그룹의 예는 이황화 연결 그룹 (-S-S-)이다. 절단가능한 후보 연결 그룹이 적합한 "환원적으로 절단가능한 연결 그룹"인지, 또는 예를 들어, 특정 iRNA 부위와 특정 표적화제에 대해 사용하기에 적합한지 결정하기 위하여 본 명세서에 기재된 방법들을 참고할 수 있다. 예를 들어, 디티오프레이톨 (DTT), 또는 세포, 예를 들면 표적 세포에서 관찰되는 절단 속도를 모방하는, 당해 분야에 공지되어 있는 시약을 사용하여 다른 환원제에 함께 배양시킴으로써 후보 물질을 평가할 수 있다. 후보 물질은 또한 혈액 또는 혈청 조건을 모방하도록 선택되는 조건하에서 평가할 수 있다. 바람직한 양태로, 후보 화합물은 혈액내에서 많아야 10% 절단된다. 바람직한 양태로, 유용한 후보 화합물은 혈액 (또는 세포의 조건을 모방하도록 선택되는 시험관내 조건하에서)과 비교하여 세포 (또는 세포내 조건을 모방하도록 선택되는 시험관내 조건하에서)에서 적어도 2, 4, 10 또는 100배 더 빠르게 분해된다. 후보 화합물의 절단 속도는 폐소내 매질을 모방하도록 선택된 조건하에서의 표준 효소 키네틱 검정법을 사용하여 측정할 수 있으며 세포의 매질을 모방하도록 선택된 조건과 비교할 수 있다.

포스페이트-기재 절단가능한 연결 그룹

포스페이트-기재 절단가능한 연결 그룹은 포스페이트 그룹을 분해하거나 가수분해시키는 제제에 의해 절단된다. 세포중에서 포스페이트 그룹을 절단하는 제제의 예는 세포중의 포스파타제와 같은 효소이다. 포스페이트-기재

연결 그룹의 예는 $-O-P(O)(OR_k)-O-$, $-O-P(S)(OR_k)-O-$, $-O-P(S)(SR_k)-O-$, $-S-P(O)(OR_k)-O-$, $-O-P(O)(OR_k)-S-$, $-S-P(O)(OR_k)-S-$, $-O-P(S)(OR_k)-S-$, $-S-P(S)(OR_k)-O-$, $-O-P(O)(R_k)-O-$, $-O-P(S)(R_k)-O-$, $-S-P(O)(R_k)-O-$, $-S-P(S)(R_k)-O-$, $-S-P(O)(R_k)-S-$, $-O-P(S)(R_k)-S-$ 이다. 바람직한 양태는 $-O-P(O)(OH)-O-$, $-O-P(S)(OH)-O-$, $-O-P(S)(SH)-O-$, $-S-P(O)(OH)-O-$, $-O-P(O)(OH)-S-$, $-S-P(O)(OH)-S-$, $-O-P(S)(OH)-S-$, $-S-P(S)(OH)-O-$, $-O-P(O)(H)-O-$, $-O-P(S)(H)-O-$, $-S-P(O)(H)-O-$, $-S-P(S)(H)-O-$, $-S-P(O)(H)-S-$, $-O-P(S)(H)-S-$ 이다. 바람직한 양태는 $-O-P(O)(OH)-O-$ 이다. 이들 후보 물질은 상기한 바와 유사한 방법을 사용하여 평가할 수 있다.

산 절단가능한 연결 그룹

산 절단가능한 연결 그룹은 산성 조건하에서 절단되는 연결 그룹이다. 바람직한 양태로, 산 절단가능한 연결 그룹은 약 6.5 또는 그 이하의 pH (예, 약 6.0, 5.5, 5.0, 또는 그 이하)를 갖는 산성 환경하에서, 또는 산으로 작용할 수 있는 효소와 같은 제제에 의해 절단된다. 세포에서, 엔도솜 및 리소솜과 같이, 특이적으로 낮은 pH의 세포소기관은 산 절단가능한 연결 그룹에 대해 절단 환경을 제공할 수 있다. 산 절단가능한 연결 그룹의 예로는 비제한적으로, 하이드라존, 에스테르, 및 아미노산의 에스테르가 있다. 산 절단가능한 그룹은 화학식 $-C(=NH)$, $C(O)O$, 또는 $-OC(O)$ 를 가질 수 있다. 바람직한 양태는 에스테르의 산소에 부착된 탄소 (알콕시 그룹)이 아릴기, 치환된 알킬기, 또는 3급 알킬기, 예로서, 디메틸 펜틸 또는 t-부틸인 경우이다. 이들 후보 물질은 상기한 것들과 유사한 방법을 사용하여 평가할 수 있다.

에스테르-기재 연결 그룹

에스테르-기재 절단가능한 연결 그룹은 세포내에서 에스테라제 및 아마이드제와 같은 효소에 의해 절단된다. 에스테르-기재 절단가능한 연결 그룹의 예로는 비제한적으로, 알킬렌, 알케닐렌 및 알킬닐렌 그룹의 에스테르가 있다. 에스테르 절단가능한 연결 그룹은 화학식 $-C(O)O-$, 또는 $-OC(O)-$ 를 갖는다. 이들 후보 물질은 상기한 것들과 유사한 방법을 사용하여 평가할 수 있다.

펩타이드-기재 절단 그룹

펩타이드-기재 절단가능한 연결 그룹은 세포 내에서 펩티다제 및 프로테아제와 같은 효소에 의해 절단된다. 펩타이드-기재 절단가능한 연결 그룹은 올리고펩타이드 (예, 디펩타이드, 트리펩타이드 등) 및 폴리펩타이드를 생산하기 위하여 아미노산 사이에 형성된 펩타이드 결합이다. 펩타이드-기재 절단가능한 그룹은 아마이드 그룹 ($-C(O)NH-$)를 포함하지 않는다. 아마이드 그룹은 알킬렌, 알케닐렌 또는 알킬닐렌 사이에 형성될 수 있다. 펩타이드 결합은 아미노산 사이에 형성되는 특별한 종류의 아마이드 결합으로 펩타이드와 단백질을 생산한다. 펩타이드-기재 절단 그룹은 일반적으로 펩타이드 및 단백질을 생산하는 아미노산 간에 형성된 펩타이드 결합 (즉, 아마이드 결합)으로 제한되며 전체적인 아마이드 작용기를 포함하지 않는다. 펩타이드-기재 절단가능한 연결 그룹은 화학식 $-NHCHR^A C(O)NHCHR^B C(O)-$ 를 가지며, 여기서 R^A 및 R^B 는 2개의 인접한 아미노산의 R 그룹이다. 이들 후보 물질은 상기한 것들과 유사한 방법을 사용하여 평가할 수 있다.

리간드

다양한 본체를 본 발명의 올리고뉴클레오티드와 지질에 커플링시킬 수 있다. 바람직한 부위는 리간드로, 이는 개재 테더 (intervening tether)를 통하여 직접 또는 간접적으로 커플링된다.

바람직한 양태로, 리간드는 분자중에 포함되어 그 분자의 분포, 표적화 또는 수명을 변화시킨다. 바람직한 양태로, 리간드는 예를 들어, 리간드와 같은 화학종 부제와 비교하여, 선택된 표적, 예를 들면, 분자, 세포 또는 세포 타입, 구획, 예로서 세포 또는 기관 구획, 조직, 기관 또는 영역에 대해 향상된 친화성을 제공한다. 선택된 표적에 대해 향상된 친화성을 제공하는 리간드는 또한 표적화 리간드으로도 호칭된다. 본 발명의 지질에 접합 시키기에 바람직한 리간드는 표적화 리간드이다.

일부 리간드는 엔도솜분해 특성 (endosomolytic properties)을 가질 수 있다. 엔도솜분해성 리간드는 엔도솜의 용해 (lysis)를 촉진하고(하거나) 본 발명의 조성물, 또는 이의 성분을 엔도솜으로부터 세포의 세포질로 운반한다. 엔도솜분해성 리간드는 pH-의존성 막 활성화와 융합유도성을 나타내는 다중음이온성 펩타이드 또는 펩티도미메틱일 수 있다. 특정 양태로, 엔도솜분해성 리간드는 엔도솜의 pH에서 이의 활성 형태인 것으로 생각된다.

"활성" 형태란 엔도솜분해성 리간드가 엔도솜의 용해를 촉진하고(하거나) 본 발명의 조성물, 또는 이의 성분을 엔도솜으로부터 세포의 세포질로 운반하는 형태이다. 엔도솜분해성 리간드의 예로는 GALA 펩타이드 (Subbarao et al., Biochemistry, 1987, 26:2964-2972), EALA 펩타이드 (Vogel et al., J. Am. Chem. Soc., 1996, 118:1581-1586), 및 이들의 유도체 (Turk et al., Biochem. Biophys. Acta, 2002, 1559:56-68)가 있다. 특정

양태로, 엔도솜분해성 성분은 pH 변화에 반응하여 전하를 변화시키거나 양자화되는 화학 그룹 (예, 아미노산)을 함유할 수 있다. 엔도솜분해성 성분은 직쇄 또는 측쇄일 수 있다. 펩타이드 기재 엔도솜분해성 리간드의 1차 서열의 예가 표 4에 제시되어 있다.

[표 4] 엔도솜분해 활성을 갖는 펩타이드 목록

이름	서열 (N to C)	Ref.
GALA	AALEALAEALEALAEALEALAEAAAAGGC	1
EALA	AALAEALAEALAEALAEALAEALAAAAGGC	2
	ALEALAEALEALAEA	3
INF-7	GLFEAIEGFIENGWEGMIWDYG	4
Inf HA-2	GLFGAIAAGFIENGWEGMIDGWYG	5
diINF-7	GLF EAI EGFI ENGW EGMI DGWYGC GLF EAI EGFI ENGW EGMI DGWYGC	5
diINF3	GLF EAI EGFI ENGW EGMI DGGC GLF EAI EGFI ENGW EGMI DGGC	6
GLF	GLFGALAEALAEALAEHLAEALAEALEALAAGGSC	6
GALA-INF3	GLFEAIEGFIENGWEGLAELAEALEALAAGGSC	6
INF-5	GLF EAI EGFI ENGW EGnI DG K GLF EAI EGFI ENGW EGnI DG	4

n, 노르류이신

References

1. Subbarao et al., *Biochemistry*, 1987, 26: 2964-2972.
2. Vogel et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, 118: 1581-1586
3. Turk, M. J., Reddy, J. A. et al. (2002). Characterization of a novel pH-sensitive peptide that enhances drug release from folate-targeted liposomes at endosomal pHs. *Biochim. Biophys. Acta* 1559, 56-68.
4. Plank, C. Oberhauser, B. Mechtler, K. Koch, C. Wagner, E. (1994). The influence of endosome-disruptive peptides on gene transfer using synthetic virus-like gene transfer systems, *J. Biol. Chem.* 269 12918-12924.
5. Mastrobattista, E., Koning, G. A. et al. (2002). Functional characterization of an endosome-disruptive peptide and its application in cytosolic delivery of immunoliposome-entrapped proteins. *J. Biol. Chem.* 277, 27135-43.
6. Oberhauser, B., Plank, C. et al. (1995). Enhancing endosomal exit of nucleic acids using pH-sensitive viral fusion peptides. *Deliv. Strategies Antisense Oligonucleotide Ther.* 247-66.

바람직한 리간드는 운반, 하이브리드화, 및 특이성을 향상시킬 수 있으며 생성된 천연 또는 개질된 올리고리보뉴클레오티드, 또는 본 명세서에 기재된 모노머의 조합 및(또는) 천연 또는 개질된 리보뉴클레오티드를 포함하는 폴리머 분자의 뉴클레아제 내성을 또한 향상시킬 수 있다.

리간드는 일반적으로 예를 들어, 흡수성을 향상시키기위한 치료용 개질제; 예를 들어, 분배를 모니터링하기위한 진단용 화합물 또는 수용성 그룹; 가교결합제; 및 뉴클레아제-내성 부여 부위를 포함할 수 있다. 일반적인 예로는 지질, 스테로이드, 비타민, 슈가, 단백질, 펩타이드, 폴리아민, 및 펩타이드 모방체가 있다. 리간드는 단백질 (예, 사람 혈청 알부민 (HSA), 저밀도 리포단백질 (LDL), 고밀도 리포단백질 (HDL), 또는 글로불린)과 같은 천연 물질; 탄수화물 (예, 텍스트란, 폴룰란, 키틴, 키토산, 이눌린, 사이클록텍스트린 또는 히아룰론산); 또는 지질을 포함할 수 있다. 리간드는 또한 제조합 또는 합성 분자, 예를 들면, 합성 폴리머, 예로서, 합성 폴리아미노산, 올리고뉴클레오티드 (예, 압타머)일 수 있다. 폴리아미노산의 예로는 폴리리신 (PLL), 폴리 L-아스파르트산, 폴리 L-글루탐산, 스티렌-말레산 무수물 코폴리머, 폴리(L-락타이드-co-글리콜리드) 코폴리머, 디비닐 에테르-말레산 무수물 코폴리머, N-(2-하이드록시프로필)메타크릴아미드 코폴리머 (HMPA), 폴리에틸렌

글리콜 (PEG), 폴리비닐 알코올 (PVA), 폴리우레탄, 폴리(2-에틸아크릴산), N-이소프로필아크릴아미드 폴리머, 또는 폴리포스파진이 있다. 폴리아민의 예는 다음과 같다: 폴리에틸렌이민, 폴리리신 (PLL), 스퍼민, 스퍼미딘, 폴리아민, 슈도펩타이드-폴리아민, 펩티도미메틱 폴리아민, 덴드리머 폴리아민, 아르기닌, 아미딘, 프로타민, 양이온성 지질, 양이온성 포르피린, 폴리아민의 4급 염, 또는 알파 헬리칼 펩타이드.

리간드는 또한 표적화 그룹, 예를 들면, 신장 세포와 같이 특이화된 세포 타입에 결합하는, 세포 또는 조직 표적화 제제, 예로서, 레시틴, 당단백질, 지질 또는 단백질, 예로서 항체를 포함할 수 있다. 표적화 그룹은 티로트로핀, 멜라노트로핀, 렉틴, 당단백질, 계면활성제 단백질 A, 뮤신 탄수화물, 다가 락토오스, 다가 갈락토오스, N-아세틸-갈락토사민, N-아세틸-글루코사민, 다가 만노오스, 다가 프럭토오스, 글리고실화된 폴리아미노산, 다가 갈락토오스, 트랜스페린, 비스포스포네이트, 폴리글루타메이트, 폴리아스파테이트, 지질, 콜레스테롤, 스테로이드 담즙산, 플레이트, 비타민 B12, 바이오틴, RGD 펩타이드, RGD 펩타이드 모방체 또는 압타머일 수 있다. 표 5에 표적화 리간드와 이들의 관련 수용체의 예를 나타내었다.

[표 5] 표적화 리간드 및 이들의 관련 수용체

간 세포	리간드	수용체
1) 실질 세포(PC) (간세포)	갈락토즈	ASGP-R (아시올로당단백질수용체)
	Gal NAc (n-아세틸-갈락토사민)	ASPG-R Gal NAc 수용체
	락토즈	
	아시올로페투인	ASPG-r
2) 동모양혈관내피세포 (SEC)	히알루로난	히알루로난 수용체
	프로콜라겐	프로콜라겐 수용체
	음하진 분자	소거 수용체 s
	만노즈	만노즈 수용체 s
	N-아세틸 글루코사민	소거 수용체 s
	면역글로블린	Fc 수용체
	LPS	CD14 수용체
	인슐린	수용체 중재된통과세포외배출
	트랜스페린	수용체 중재된통과세포외배출
	알부민	비-특이적
3) Kupffer 세포 (KC)	슈가-알부민 접합체	
	만노즈-6-포스페이트	만노즈-6-포스페이트 수용체
	만노즈	만노즈 수용체
	푸코스	푸코스 수용체
	알부민	비-특이적
	만노즈-알부민 접합체	

리간드의 다른 예로는 염료, 삽입제 (예, 아크리딘), 가교결합제 (예, 프소르알렌, 미토마이신 C), 포르피린 (TPPC4, 텍사피린, 사피린), 폴리사이클릭 방향족 탄화수소 (예, 페나진, 디하이드로페나진), 인공 엔도뉴클레아제 (예, EDTA), 친유성 분자, 예로서, 콜레스테롤, 콜산, 아다만탄 아세트산, 1-피렌 부티르산, 디하이드로테스토스테론, 1,3-비스-O(헥사데실)글리세롤, 제라닐옥시헥실 그룹, 헥사데실글리세롤, 보르네올, 멘톨, 1,3-프로판디올, 헵타데실 그룹, 팔미트산, 미리스트산, O3-(올레오일)리토콜산, O3-(올레오일)콜렌산, 디메톡시트리틸, 또는 페녹사진) 및 펩타이드 접합체 (예, 안테나페디아 펩타이드 Tat 펩타이드), 알킬화제, 포스페이트, 아미노, 머캅토, PEG (예, PEG-40K), MPEG, [MPEG]₂, 폴리아미노, 알킬, 치환된 알킬, 방사성표지된 마커, 효소, 합텐 (예, 바이오틴), 전달/흡수 촉진제 (예, 아스피린, 비타민 E, 염산), 합성 리보뉴클레아제 (예, 이미다졸, 비스이미다졸, 히스타민, 이미다졸 클러스터, 아크리딘-이미다졸 접합체, 테트라아자마크로사이클의 Eu³⁺ 복합체), 디니트로페닐, HRP, 또는 AP가 있다.

리간드는 단백질, 예로서 당단백질, 또는 펩타이드, 예로서 보조-리간드에 대한 특이적 친화성을 갖는 분자, 또는 항체, 예로서 암세포, 내피세포 또는 골세포와 같이 특이화된 세포 타입에 결합하는 항체일 수 있다. 리간드는 또한 호르몬과 호르몬 수용체를 포함할 수 있다. 이들은 또한 비-펩타이드 종, 예를 들어, 지질, 렉틴, 탄수화물, 비타민, 보조인자, 다가 락토오스, 다가 갈락토오스, N-아세틸-갈락토사민, N-아세틸-글루코사민, 다가 만노오스, 다가 푸코오스, 또는 압타머를 포함할 수 있다. 리간드는 예를 들어, 리포폴리사카라이드, p38MAP 키나제의 활성화제, 또는 NF- κ B의 활성화제일 수 있다.

리간드는 기질, 예를 들면, 세포의 미세소관, 미세섬유 및(또는) 중간 섬유를 파괴함으로써, 세포의 세포골격을 파괴하여, iRNA 제제가 세포로 흡수되는 것을 증가시킬 수 있는 약물일 수 있다. 그러한 약물의 예로는 탁손, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 사이토칼라신, 노코다졸, 자플라키놀라이드, 라트룬쿨린 A, 팔로이딘, 스원홀라이드 A, 인다노신, 또는 미오서빈일 수 있다.

리간드는 예를 들어, 염증 반응을 활성화시킴으로써 iRNA 제제가 세포로 흡수되는 것을 증가시킬 수 있다. 그러한 효과를 갖는 리간드의 예로 종양 괴사 인자 알파 (TNF알파), 인터류킨-1 베타, 또는 감마 인터페론이 있다.

하나의 양상으로, 리간드가 지질 또는 지질-기제 분자이다. 그러한 지질 또는 지질-기제 분자는 혈청 단백질, 예를 들면, 사람의 혈청 알부민 (HSA)와 바람직하게 결합한다. HSA 결합 리간드는 접합체가 표적 조직, 예를 들면, 체내의 비-신장 표적 조직으로 분배되도록 한다. 예를 들어, 표적 조직은 간의 조직 세포를 포함하여, 간일 수 있다. HSA와 결합할 수 있는 다른 분자를 또한 리간드로 사용할 수 있다. 예를 들어, 네프록신 또는 아스피린을 사용할 수 있다. 지질 또는 지질-기제 리간드는 (a) 접합체의 분해 내성을 증가시키고, (b) 표적 세포 또는 세포막의 표적화 또는 이들의 전달을 증가시킬 수 있고(있거나) (c) 혈청 단백질, 예를 들면, HSA로의 결합을 조절하기 위하여 사용될 수 있다.

지질 기제 리간드를 사용하여 조절, 예를 들면, 표적 조직에 대한 접합체의 결합을 조절할 수 있다. 예를 들어, HSA에 더욱 강력하게 결합하는 지질 또는 지질-기제 리간드는 신장에 대한 표적화가 덜 한 것 같아, 신체로부터 사라지는 것이 덜 한 것 같다. HSA에 대해 덜 강력하게 결합하는 지질 또는 지질-기제 리간드는 신장에 대한 접합체를 표적화하는데 사용될 수 있다.

바람직한 양태로, 지질 기제 리간드는 HSA와 결합한다. 바람직하게는, 접합체가 비-신장 조직에 바람직하게 분배되도록 하기에 충분한 친화성으로 HSA와 결합한다. 그러나, HSA-리간드 결합이 예약될 수 없을 정도로 너무 강력하지 않은 친화성이 바람직하다.

다른 바람직한 양태로, 지질 기제 리간드는 HSA와 약하게 또는 전혀 결합하지 않아, 접합체가 신장에 바람직하게 분배된다. 신장 세포에 대해 표적화하는 기타 부위를 지질 기제 리간드 대신 또는 그 외에 사용할 수 있다.

다른 양상으로, 리간드는 표적 세포, 예를 들면, 증식 세포에 의해 흡수되는 부위, 예를 들어, 비타민이다. 이들은 원치않는 세포, 예를 들면, 악성 또는 비-악성 타입의 세포(예를 들면, 암세포) 증식으로 특징되는 질병의 치료에 특히 유용하다. 비타민의 예로, 비타민 A, E 및 K가 있다. 다른 비타민의 예로 B 비타민, 예를 들면, 엽산, B12, 리보플라빈, 비오틴, 피리독살 또는 암세포에 의해 흡수되는 기타 비타민 또는 영양소이다. HSA, 저밀도 리포단백질 (LDL) 및 고밀도 리포단백질 (HDL)이 또한 포함된다.

다른 양상으로, 리간드는 세포-침투제, 바람직하게는 나선형 세포-침투제이다. 바람직하게는, 세포-침투제가 양쪽성인 것이다. 세포-침투제의 예로 tat 또는 안테노페디아와 같은 펩타이드가 있다. 세포 침투제가 펩타이드인 경우, 펩티달모방, 인버토머 (invertomers), 비-펩타이드 또는 슈도-펩타이드 결합, 및 D-아미노산의 사용을 포함하여, 개질시킬 수 있다. 나선형 세포 침투제는 알파-나선형 체제인 것이 바람직한데, 이는 친유성 및 소유성 상을 갖는 것이 바람직하다.

리간드가 펩타이드 또는 펩티도모방체일 수 있다. 펩티도모방체 (본 명세서에서 올리고펩티도미메틱으로도 호칭됨)는 천연 펩타이드와 유사한, 규정된 3차원 구조로 폴딩시킬 수 있는 분자이다. 상기 펩타이드 또는 펩티도모방체 부위는 약 5 내지 50개의 아미노산 길이, 예를 들면, 약 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 또는 50개의 아미노산 길이일 수 있다 (예를 들면, 표 6 참조).

[표 6] 세포 침투 펩타이드의 예

세포 침투 펩타이드	아미노산 서열	참고문헌
페네트라틴	RQIKIWFQNRRMKWKK	Derossi <i>et al.</i> , J. Biol. Chem. 269:10444, 1994
Tat 단편 (48-60)	GRKKRRQRRRPPQC	Vives <i>et al.</i> , J. Biol. Chem., 272:16010, 1997
시그널 서열-기재 펩타이드	GALFLGWLGAAGSTMGAWSQPKKKR KV	Chaloin <i>et al.</i> , Biochem. Biophys. Res. Commun., 243:601, 1998
PVEC	LLIILRRRIRKQAHASK	Elmqvist <i>et al.</i> , Exp. Cell Res., 269:237, 2001
트란스포르탄	GWTLNSAGYLLKINLKALAALAKKIL	Pooga <i>et al.</i> , FASEB J., 12:67, 1998
양쪽성 모델 펩타이드	KLALKLALKALKAAALKLA	Oehlke <i>et al.</i> , Mol. Ther., 2:339, 2000
Arg ₉	RRRRRRRRR	Mitchell <i>et al.</i> , J. Pept. Res., 56:318, 2000
세균 세포 벽 침투	KFFKFFKFFK	
LL-37	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLVPRTES	
세크로핀 P1	SWLSKTAKKLENSAKKRISGIAIAIQG GPR	
α-데펜신	ACYCRIPACIAGERRYGTCTIYQGRLWA FCC	
β-데펜신	DHYNCVSSGGQCLYSACPIFTKIQGTC YRGKAKCCK	
박테네신	RKCRIVVIRVCR	
PR-39	RRRPRPPYLPRPRPPFPRLPPRIPPGF PPRFPPRFPGKR-NH2	
인플리시딘	ILPWKWPWWPWRR-NH2	

펩타이드 또는 펩티도모방체는 예를 들어, 세포 침투 펩타이드, 양이온성 펩타이드, 양쪽성 펩타이드, 또는 소수성 펩타이드 (예, 주로 Tyr, Trp 또는 Phe로 이루어진 것)일 수 있다. 펩타이드 부위는 덴드리머 펩타이드, 속박되어 있는 펩타이드 또는 가교결합된 펩타이드일 수 있다. 달리, 상기 펩타이드 부위는 소수성 막 전좌 서열 (MTS)을 포함할 수 있다. 소수성 MTS-함유 펩타이드의 예로 아미노산 서열 AAVALLPAVLALLAP를 갖는 RFGF이다. 소수성 MTS를 함유하는 RFGF 유사체 (예, 아미노산 서열 AALLPVLLAAP)가 또한 표적화 부위일 수 있다. 펩타이드 부위는 펩타이드, 올리고뉴클레오티드, 및 단백질 횡단 세포막을 포함하여 극성이 큰 분자를 운반할 수 있는, "운반" 펩타이드일 수 있다. 예를 들어, HIV Tat 단백질로부터의 서열 (GRKKRRQRRRPPQ) 및 Drosophila Antennapedia 단백질로부터의 서열 (RQIKIWFQNRRMKWKK)이 운반 펩타이드로 작용할 수 있는 것으로 밝혀졌다. 펩타이드 또는 펩티도모방체는 파아지-디스플레이 라이브러리, 또는 원-비드-원-화합물 (OBOC) 조합 라이브러리 (Lam *et al.*, Nature, 354:82-84, 1991)로부터 확인된 펩타이드와 같은 DNA 랜덤 서열에 의해 암호화될 수 있다. 바람직하게는, 포함된 모노머 유닛을 통하여 iRNA 제체에 묶인 펩타이드 또는 펩티도모방체가 아르기닌-글리신-아스파르트산 (RGD)-펩타이드, 또는 RGD 모방체와 같은 세포 표적화 펩타이드이다. 펩타이드 부위의 길이 범위는 약 5개의 아미노산 내지 약 40개의 아미노산일 수 있다. 펩타이드 부위는 안정성을 증가시키거나 구조적 특성을 지시하기 위한 것과 같은 구조적 개질을 가질 수 있다. 하기에 기재된 구조적 개질을 이용할 수 있다.

RGD 펩타이드 부위를 사용하여 내피 종양 세포 또는 지방암 종양 세포와 같은 종양 세포를 표적화할 수 있다 (Zitzmann *et al.*, Cancer Res., 62:5139-43, 2002). RGD 펩타이드는 폐, 신장, 비장, 또는 간을 포함한, 여러 가지 조직의 종양에 대한 iRNA 제체의 표적화를 촉진시킬 수 있다 (Aoki *et al.*, Cancer Gene Therapy 8:783-787, 2001). 바람직하게는, RGD 펩타이드가 신장에 대한 iRNA 제체의 표적화를 촉진시킨다. RGD 펩타이드는 직쇄 또는 환식일 수 있으며, 특정 조직에 대한 표적화를 촉진하기 위하여 개질, 예를 들면, 글리코실화 또는 메틸화시킬 수 있다. 예를 들어, 글리코실화된 RGD 펩타이드는 α_vβ₃을 발현시키는 종양 세포로 iRNA 제체를 운반할 수 있다 (Haubner *et al.*, Jour. Nucl. Med., 42:326-336, 2001).

증식하는 세포에 풍부한 마커를 표적하는 펩타이드를 사용할 수 있다. 예를 들어, RGD 함유 펩타이드 및 펩티도모방체는 암세포, 특히 $\alpha_v\beta_3$ 인테그린을 나타내는 세포를 표적화할 수 있다. 따라서, RGD 펩타이드, RGD를 함유하는 환식 펩타이드, D-아미노산을 포함하는 RGD 펩타이드, 뿐만 아니라 합성 RGD 모방체를 사용할 수 있다. RGD 외에, $\alpha_v\beta_3$ 인테그린 리간드를 표적화하는 다른 부위를 사용할 수 있다. 일반적으로, 그러한 리간드는 증식하는 세포 및 혈관신생 (angiogenesis)을 조정하기 위하여 사용할 수 있다. 이런 타입 리간드의 바람직한 접합체는 PECAM-1, VEGF, 또는 다른 암 유전자, 예를 들어, 본 명세서에 기재된 암 유전자를 표적화한다.

"세포 침투 펩타이드"는 세포, 예를 들어, 세균 또는 진균 세포와 같은 미생물 세포, 또는 인간의 세포와 같은 포유동물 세포를 침투할 수 있다. 미생물 세포-침투 펩타이드는 예를 들어, α -나선형 직쇄 펩타이드 (예, LL-37 또는 Ceropin P1), 이황화 결합-함유 펩타이드 (예, α -데펜신, β -데펜신 또는 박테넥신), 또는 1종 또는 2종의 아미노산만 우세하게 함유하는 펩타이드 (예, PR-39 또는 인돌리시딘)일 수 있다. 세포 침투 펩타이드는 또한 핵 국지화 시그널 (NLS)을 포함할 수 있다. 예를 들면, 세포 침투 펩타이드는 HIV-1 gp41의 융합 펩타이드 도메인 및 SV40 거대 T 항원의 NLS로부터 유래되는, MPG와 같은, 이분 (bipartite) 양쪽성 펩타이드일 수 있다 (Simeoni et al., Nucl. Acids Res. 31:2717-2724, 2003).

하나의 양태로, iRNA 제제 및(또는) 담체 올리고머에 묶인 표적화 펩타이드는 양쪽성 α -나선형 펩타이드일 수 있다. 양쪽성 α -나선형 펩타이드의 예로는, 비제한적으로, 세크로핀, 라이코톡신, 파라다신, 부포린, CPF, 붐비닌-유사 펩타이드 (BLP), 카텔리시딘, 세라토톡신, S. clava 펩타이드, 먹장어 장내 항균 펩타이드 (HFIPs), 마가이닌, 브레비닌-2, 더마셉틴, 멜리틴, 플레우로시딘, H₂A 펩타이드, Xenopus 펩타이드, 에스쿨렌티니스-1, 및 카에린이 있다. 나선의 집결성 및 안정성을 유지하기 위하여 수많은 인자를 고려하는 것이 바람직하다. 예를 들어, 최대 수의 나선 안정화 잔기를 이용하고 (예, leu, ala, 또는 lys), 최소 수의 나선 탈안정화 잔기를 이용한다 (예, 프롤린, 또는 환식 모노머 유닛). 캡핑 잔기를 고려할 수 있으며, 예를 들어, Gly는 N-캡핑 잔기의 일레이고(이거나) C-말단 아미드화를 사용하여 엑스트라 H-결합을 제공함으로써 나선을 안정화시킬 수 있다. $i \pm 3$ 또는 $i \pm 4$ 위치 떨어져 있으며, 반대 전하를 갖는 잔기 사이에 염 가교를 형성시키면 안정성을 제공할 수 있다. 예를 들어, 리신, 아르기닌, 호모-아르기닌, 오르니틴 또는 히스티딘과 같은 양이온성 잔기는 음이온성 잔기인 글루타메이트 또는 아스파테이트와 염 가교를 형성할 수 있다.

펩타이드 및 펩티도모방체 리간드는 천연 또는 개질된 펩타이드, 예를 들어, D 또는 L 펩타이드; α , β 또는 γ 펩타이드; N-메틸 펩타이드; 아자펩타이드; 아미드를 1개 이상 갖는 펩타이드, 예로서, 결합이 우레아, 티오우레아, 카바메이트, 또는 술포닐 우레아 결합 1개 이상으로 대체된 펩타이드; 또는 환식 펩타이드를 갖는 것들이다.

표적화 리간드는 특정 수용체를 표적화할 수 있는 리간드일 수 있다. 예를 들면 다음과 같다: 폴레이트, GalNac, 갈락토오스, 만노오스, 만노오스-6P, 슈가 클러스터, 예로서, GalNac 클러스터, 만노오스 클러스터, 갈락토오스 클러스터, 또는 압타머. 클러스터는 슈가 유닛 2개 이상으로 된 조합물이다. 표적화 리간드는 또한 인테그린 수용체 리간드, 케모킨 수용체 리간드, 트랜스페린, 비오틴, 세로토닌 수용체 리간드, PSMA, 엔도텔린, GCPII, 소마토스타틴, LDL 및 HDL 리간드를 포함한다. 상기 리간드는 또한 핵산, 예를 들어 압타머,를 기재로 할 수 있다. 압타머는 비개질된 것일 수 있거나 본 명세서에 기재되어 있는 개질의 조합을 가질 수 있다.

엔도솜 방출제로는 이미다졸, 폴리 또는 올리고이미다졸, PEIs, 펩타이드, 융합유도성 펩타이드, 폴리카복실레이트, 폴리양이온, 차폐된 올리고 또는 폴리 양이온 또는 음이온, 아세탈, 폴리아세탈, 케탈/폴리케탈, 오르토에스테르, 차폐 또는 비차폐 양이온성 또는 음이온성 전하를 갖는 폴리머, 차폐 또는 비차폐 양이온성 또는 음이온성 전하를 갖는 덴드리머가 있다.

PK 조절자는 약력학적 조절자를 나타낸다. PK 조절자로는 친유성기, 담즙산, 스테로이드, 인지질 유도체, 펩타이드, 단백질 결합제, PEG, 비타민 등이 있다. PK 조절제의 예를 들면, 비제한적으로, 콜레스테롤, 지방산, 콜산, 리토콜산, 디알킬글리세라이드, 디아실글리세라이드, 인지질, 스펅고지질, 나프록센, 이부프로펜, 비타민 E, 비오틴 등이 있다. 수많은 포스포로티오에이트 결합을 포함하는 올리고뉴클레오티드가 또한 혈청 단백질에 결합하는 것으로 공지되어 있으며, 따라서 짧은 올리고뉴클레오티드, 예를 들면, 약 5개의 염기, 10개의 염기, 15개의 염기 또는 20개의 염기로 된, 백분중에 수많은 포스포로티오에이트 결합을 포함하는 짧은 올리고뉴클레오티드가 또한 리간드로서 (예를 들어 PK 조절 리간드로서) 본 발명에 적용시킬 수 있다.

또한, 혈청 성분 (예, 혈청 단백질)과 결합하는 압타머를 또한 PK 조절 리간드로서 본 발명에 적용시킬 수

있다.

본 발명에 적용가능한 기타 리간드가 계류중인 다음과 같은 출원에 기재되어 있으며, 이들은 전문 본 명세서에서 모든 목적으로 참고로 인용된다: USSN: 10/916,185 (2004년 8월 10일 출원); USSN: 10/946,873 (2004년 9월 21일 출원); USSN: 10/833,934 (2007년 8월 3일 출원); USSN: 11/115,989 (2005년 4월 27일 출원) 및 USSN: 11/944,227 (2007년 11월 21일 출원).

리간드가 2개 이상 존재할 경우, 리간드는 모두 동일한 특성을 가지며, 모두 상이한 특성을 갖거나 리간드 중 일부는 동일한 특성을 갖는 반면 다른 것들은 상이한 특성을 갖는다. 예를 들어, 리간드는 표적화 특성을 가질 수 있고, 엔도솜분해 활성을 갖거나 PK 조절 특성을 가질 수 있다. 바람직한 양태로, 리간드가 모두 상이한 특성을 갖는다.

리간드를 올리고뉴클레오타이드의 다양한 위치, 예를 들어, 3'-말단, 5'-말단 및(또는) 내부 위치에 커플링시킬 수 있다. 바람직한 양태로, 리간드를 개재 테더 (intervening tether)를 통하여 올리고뉴클레오타이드에 부착시킨다. 리간드 또는 묶인 리간드는 모노머가 성장하는 스트랜드에 포함될 때 모노머상에 존재할 수 있다. 일부 양태로, 리간드가 커플링을 통하여 "전구체" 모노머에 포함될 수 있으며, 이후 상기 "전구체" 모노머는 성장하는 스트랜드중으로 포함된다. 예를 들어, 아미노-종결된 테더 (즉, 관련 리간드가 없는 것)를 갖는 모노머, 예로서, TAP-(CH₂)_nNH₂가 성장하는 센스 또는 안티센스 스트랜드중으로 포함될 수 있다. 후속 공정으로, 즉, 전구체 모노머가 스트랜드중으로 포함된 후, 친전자성 그룹, 후속적으로, 예를 들면, 펜타플루오로페닐 에스테르 또는 알데히드 그룹을 갖는 리간드는 리간드의 친전자성 그룹을 전구체 모노머의 테더의 말단 친핵성 그룹과 커플링시킴으로써 전구체 모노머에 부착될 수 있다.

이중사 올리고뉴클레오타이드의 경우, 리간드는 스트랜드 중 하나 또는 둘 다에 부착될 수 있다. 일부 양태로, 이중사 iRNA 제제는 센스 스트랜드에 접합되어 있는 리간드를 함유한다. 다른 양태로, 이중사 iRNA 제제는 안티센스 스트랜드에 접합되어 있는 리간드를 함유한다.

일부 양태로, 리간드를 핵산염기, 슈가 부위, 또는 핵산 분자의 뉴클레오시드간 결합에 접합시킬 수 있다. 퓨린 핵산염기 또는 이의 유도체로의 접합은 환내 및 환외 원자를 포함하여 어느 위치에서나 일어날 수 있다. 일부 양태로, 퓨린 핵산염기의 2-, 6-, 7-, 또는 8-위치가 접합체 부위에 부착된다. 피리미딘 핵산염기 또는 이의 유도체로의 접합 또한 어느 위치에서나 일어날 수 있다. 일부 양태로, 피리미딘 핵산염기의 2-, 5-, 및 6-위치는 접합체 부위로 치환될 수 있다. 뉴클레오시드의 슈가 부위에 대한 접합은 탄소 원자 어느 것에서나 일어날 수 있다. 접합체 부위에 부착될 수 있는 슈가 부위의 탄소 위치의 예로는 2', 3', 및 5'번 탄소 원자이다. 1'번 위치는 또한 어베이직 잔기에서와 같이, 접합체 부위에 부착될 수 있다. 뉴클레오시드간 결합 또한 접합체 부위를 포함할 수 있다. 인-함유 결합 (예, 포스포디에스테르, 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포로아미데이트 등)의 경우, 접합체 부위가 인 원자에 또는 인원자에 결합된 O, N, 또는 S 원자에 직접 부착될 수 있다. 아민- 또는 아미드-함유 뉴클레오시드간 결합 (예, PNA)의 경우, 접합체 부위가 아민 또는 아미드의 질소 원자 또는 인접한 탄소 원자에 부착될 수 있다.

올리고머 화합물의 접합체를 제조하는 수많은 방법이 있다. 일반적으로, 올리고머 화합물상의 반응성 그룹 (예, OH, SH, 아민, 카복실, 알데히드 등)을 접합체 부위상의 반응성 그룹과 접촉시켜 올리고머 화합물을 접촉성 부위에 부착시킨다. 일부 양태로, 반응성 그룹 중 하나는 친전자성이고 다른 것은 친핵성이다.

예를 들어, 친전자성 그룹은 카보닐-함유 작용성일 수 있으며 친핵성 그룹은 아민 또는 티올일 수 있다. 핵산과 관련 올리고머 화합물을 연결 그룹을 사용하여 또는 연결 그룹 없이 접합시키는 방법은 예를 들어 하기 문헌과 같은 문헌에 기재되어 있으며, 이들 문헌은 전문 본 명세서에서 참고로 인용된다: Manoharan in Antisense Research and Applications, Crooke and LeBleu, eds., CRC Press, Boca Raton, Fla., 1993, Chapter 17.

올리고뉴클레오타이드 접합체의 제조 방법을 교시하고 있는 대표적인 미국 특허는 비제한적으로 다음과 같으며, 이들은 각각 본 명세서에서 참고로 인용된다: 미국 특허 제4,828,979호; 제4,948,882호; 제5,218,105호; 제5,525,465호; 제5,541,313호; 제5,545,730호; 제5,552,538호; 제5,578,717호; 제5,580,731호; 제5,591,584호; 제5,109,124호; 제5,118,802호 제5,138,045호; 제5,414,077호; 제5,486,603호; 제5,512,439호; 제5,578,718호; 제5,608,046호; 제4,587,044호; 제4,605,735호; 제4,667,025호; 제4,762,779호; 제4,789,737호; 제4,824,941호; 제4,835,263호; 제4,876,335호; 제4,904,582호; 제4,958,013호; 제5,082,830호; 제5,112,963호; 제5,214,136호; 제5,149,782호; 제5,214,136호; 제5,245,022호; 제5,254,469호; 제5,258,506호; 제5,262,536호; 제5,272,250호; 제5,292,873호; 제5,317,098호; 제5,371,241호;

제5,391,723호; 제5,416,203호; 제5,451,463호; 제5,510,475호; 제5,512,667호; 제5,514,785호;
 제5,565,552호; 제5,567,810호; 제5,574,142호; 제5,585,481호; 제5,587,371호 제5,595,726호; 제5,597,696호;
 제5,599,923호; 제5,599,928호; 제5,672,662호; 제5,688,941호; 제5,714,166호; 제6,153,737호;
 제6,172,208호; 제6,300,319호; 제6,335,434호; 제6,335,437호; 제6,395,437호; 제6,444,806호;
 제6,486,308호; 제6,525,031호; 제6,528,631호; 제6,559,279호.

핵산-지질 입자의 특징

특정 양태로, 본 발명은 핵산이 지질층내에 캡슐화되어 있는 지질-캡슐화된 핵산 입자의 제조 방법 및 조성물에 관한 것이다. siRNA 올리고뉴클레오티드가 포함되어 있는, 상기와 같은 핵산-지질 입자는 (1) 약물 대 지질 비; (2) 캡슐화 효율; 및 (3) 입자 크기를 포함하여 여러 가지 생물물리학적 변수를 사용하여 특징화한다. 높은 약물 대 지질 비, 높은 캡슐화 효율, 양호한 뉴클레아제 내성 및 혈청 안정성 및 조정가능한 입자 크기, 일반적으로 200 nm 미만이 바람직하다. 또한, 뉴클레아제 내성을 부여하기위한 노력으로 핵산의 개질이 치료제의 단가에 부가되는 반면 수많은 경우에 있어서 제한된 내성만을 제공하기 때문에, 핵산 폴리머의 특성이 중요하다. 달리 언급이 없는 한, 이들 기준은 다음과 같이 본 명세서에서 계산한다:

핵산 대 지질 비는 한정된 용적의 제제 중 핵산의 양을 동일한 용적중 지질의 양으로 나눈 것이다. 이는 물/물 기준 또는 중량/중량 기준, 또는 중량/물 기준일 수 있다. 즉시 투여용 최종 제형의 경우, 핵산:지질 비는 투석, 크로마토그래피 및(또는) 효소 (예, 뉴클레아제) 분해법을 사용하여 가능한 많은 양의 외부 핵산을 제거한 후 계산한다.

캡슐화 효율은 출발 혼합물의 약물 대 지질 비를 최종, 투여에 맞는 제형의 약물 대 지질 비로 나눈 것이다. 이는 상대적인 효율의 척도이다. 절대적 효율의 척도의 경우, 최종적으로 투여에 맞는 제형으로 되는 출발 혼합물에 첨가된 핵산의 총량을 또한 계산할 수 있다. 제형과 공정중 소실되는 지질의 양을 또한 계산할 수 있다. 효율은 제형의 소모량과 비용의 척도이다.

크기는 형성된 입자의 크기 (직경)을 나타낸다. 크기 분배는 Nicomp Model 370 서브-마이크론 입자 사이저 (sizer)상에서 쿼시-탄성 광 산란법 (QELS)을 이용하여 측정할 수 있다. 200 nm 미만의 입자가 신생물 및 염증 부위와 같이, 혈관신생 (약한) 조직에 대한 분배에 바람직하다.

약제학적 조성물

본 발명의 지질 입자는 특히 치료제와 관련된 경우, 약제학적 조성물로 제형화될 수 있는데, 예를 들면, 이는 추가로 투여 경로 및 표준 약학 기준에 따라서 선택되는, 약제학적으로 허용되는 희석제, 부형제, 또는 담체, 예로서, 생리학적 염수 또는 인산염 완충액을 포함한다.

특정 양태로, 본 발명의 지질-핵산 입자를 포함하는 약제학적 조성물은 표준 기술에 따라서 제조하며 약제학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함한다. 일반적으로, 통상의 염수를 약제학적으로 허용되는 담체로 사용한다. 기타 적합한 담체의 예로는, 안정성 향상을 위한 당단백질, 예로서, 알부민, 리포단백질, 글로불린 등을 포함하여, 물, 완충수, 0.9% 염수, 0.3% 글리신 등이 있다. 염수 또는 기타 염 함유 담체를 포함하는 조성물에서, 담체는 지질 입자를 형성시킨 다음 가하는 것이 바람직하다. 따라서, 지질-핵산 조성물을 형성시킨 후, 상기 조성물을 통상의 염수와 같은 약제학적으로 허용되는 담체중에 희석시킬 수 있다.

생성된 약제학적 제제는 통상적이며, 숙지되어 있는 멸균 기술로 멸균시킬 수 있다. 이어서 수용액은 사용하기 위하여 포장하거나 무균 조건하에서 여과하고 동결건조시킬 수 있으며, 동결건조 제제는 투여전에 멸균 수용액으로 배합할 수 있다. 상기 조성물은 pH 조정 및 완충제, 강장성 조절제 등, 예를 들면, 나트륨 아세테이트, 나트륨 락테이트, 염화나트륨, 염화칼륨, 염화칼슘 등과 같은, 적절한 생리학적 조건에 요구되는 바와 같은 약제학적으로 허용되는 보조 물질을 함유할 수 있다. 추가로, 지방성 현탁액은 보관시 유리-라디칼 및 지질-과산화 손상으로부터 지질을 보호하는 지질-보호제를 포함할 수 있다. α-토코페롤과 같은, 친유성 자유-라디칼 소거제 (quencher) 및 페리옥사민과 같은, 수용성 철-특이적 킬레이터가 적합하다.

약제학적 제형중 지질 입자 또는 지질-핵산 입자의 농도는 광범위하게, 즉, 약 0.01 중량% 미만에서, 통상적으로 약 0.05 내지 5 중량% 또는 적어도 약 0.05 내지 5 중량%에서 많아야 10 내지 30 중량% 범위에서 변화될 수 있으며 선택되는 특정 투여 방식에 따라서, 주로 유체 용량, 점도 등에 의해 선택된다. 예를 들어, 치료와 관련한 유체 부하량을 낮추기 위해서 농도를 증가시킬 수 있다. 이는 동맥경화증-관련 충혈성 심장마비 또는 심한 고혈압 환자의 경우 특히 바람직하다. 달리, 자극이 되는 지질로 이루어진 복합체는 투여 부위에서의 염증을 감소시키기 위하여 낮은 농도로 희석시킬 수 있다. 일군의 양태로, 핵산이 부착된 표지물을 가지며 진단용

으로 사용된다 (상보적 핵산의 존재를 표시함으로써). 이 경우, 투여되는 복합체의 양은 사용되는 특정 표지물, 진단되는 질병 상태 및 임상상의 판단에 따르지만 일반적으로 체중 kg 당 약 0.01 내지 약 50 mg, 바람직하게는 약 0.1 내지 약 5 mg/체중 kg이다.

상기 표기한 바와 같이, 본 발명의 지질-치료제 (예, 핵산) 입자는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)-개질된 인지질, PEG-세라미드, 또는 강글리오사이드 G_{M1} -개질된 지질 또는 응집을 방지하거나 제한하는데 효과적인 다른 지질을 포함할 수 있다. 상기와 같은 성분의 첨가는 단지 복합체 응집을 방지하기 위함이다. 대신, 지질-핵산 조성물의 순환 수명을 증가시키고 이들의 표적 조직으로의 운반을 증가시키기 위한 수단을 또한 제공할 수 있다.

본 발명은 또한 키트 형의 지질-치료제 조성물을 제공한다. 상기 키트는 전형적으로 키트의 여러 가지 성분을 보유하기 위해 구획화된 용기로 이루어진다. 키트는 본 발명의 입자 또는 약제학적 조성물을, 바람직하게는 탈수 또는 농축 형태로, 이들의 재수화 (rehydration) 또는 희석 및 투여에 관한 지침서와 함께 포함한다. 특정 양태로, 상기 입자는 활성제를 포함하는 한편, 다른 양태에서는 입자가 활성제를 포함하지 않는다.

제조 방법

본 발명의 방법 및 조성물은 특정 양이온성 지질, 합성법, 제조 방법 및 특성화를 사용하며, 이들은 하기 및 첨부되는 실시예에 기술되어 있다. 또한, 본 발명은 치료제, 예를 들면, 핵산과 관련된 것들을 포함한, 지질 입자의 제조 방법을 제공한다. 명세서에 기재된 방법에서, 지질의 혼합물을 핵산의 완충된 수용액과 합하여 지질 입자에 캡슐화되어 있는 핵산을 함유하는 중간 혼합물을 생산하는데, 여기서 캡슐화된 핵산은 약 3 중량% 내지 약 25 중량%, 바람직하게는 5 내지 15 중량%의 핵산/지질 비로 존재한다. 상기 중간 혼합물을 임의로 크기화하여 지질-캡슐화된 핵산 입자를 수득하는데 여기서 지질 부분은 단일라멜라 소낭, 바람직하게는 직경이 30 내지 150 nm, 더욱 바람직하게는 약 40 내지 90 nm인 단일라멜라 소낭이다. 이어서, pH를 상승시켜 적어도 지질-핵산 입자상의 표면 전자 부분을 중성화시키고, 따라서 적어도 부분적으로 표면-중성화된 지질-캡슐화된 핵산 조성물을 제공한다.

상기한 바와 같이, 이들 양이온성 지질 중 몇몇은 아미노 그룹의 pK_a 이하의 pH에서 하전되며 pK_a 이상의 pH에서는 실질적으로 중성인 아미노 지질이다. 이들 양이온성 지질을 적정가능한 양이온성 지질이라 칭하며 2-단계 공정을 사용하여 본 발명의 제형에 사용할 수 있다. 첫째, 지질 소낭은 핵산의 존재하에서 적정가능한 양이온성 지질 및 기타 소낭 성분을 사용하여 더 낮은 pH에서 형성시킬 수 있다. 이 방법으로, 소낭을 캡슐화하고 핵산을 가두어둔다. 둘째, 새롭게 형성된 소낭의 표면 전자는 존재하는 적정가능한 양이온성 지질의 pH 이상의 수준으로, 즉, 생리학적 pH 또는 그 이상으로 매질의 pH를 증가시킴으로써 중화시킬 수 있다. 상기 공법의 특히 유리한 양상은 표면 흡수된 핵산의 용이한 제거 및 그 결과 생성되는, 중성 표면을 갖는 핵산 운반 소낭이다. 중성 표면을 갖는 리포솜 또는 지질 입자는 순환시 신속한 소거를 피하고 양이온성 리포솜 제제와 관련있는 특정 독성을 피할 수 있을 것으로 기대된다. 그러한 적정가능한 양이온성 지질을 핵산-지질 입자의 제형에 사용하는 것에 관한 추가의 세부사항은 미국 특허 제6,287,591호 및 미국 특허 제6,858,225호로부터 제공되며, 이들은 본 명세서에서 참고로 인용된다.

이 방식으로 형성된 소낭이 높은 함량의 핵산을 갖는 균일한 크기의 소낭을 제공한다는 것이 추가로 밝혀졌다. 또한, 소낭의 크기 범위는 약 30 내지 약 150 nm, 바람직하게는 약 30 내지 90 nm이다.

특정 이론으로 한정하고자 하는 것은 아니나, 핵산 캡슐화의 매우 높은 효율은 낮은 pH에서의 정전기적 상호반응의 결과인 것으로 생각된다. 산성 pH (예, pH 4.0)에서 소낭 표면은 하전되어 정전기적 상호반응을 통하여 핵산 부분과 결합한다. 외부의 산성 완충제를 더욱 중성인 완충제 (예, pH 7.5)로 교환할 경우, 지질 입자 또는 리포솜의 표면이 중성화되어, 외부로부터의 핵산이 제거되도록 한다. 상기 제형 공법에 대한 상세한 내용은 여러 가지 공보 (예, 미국 특허 제6,287,591호 및 미국 특허 제6,858,225호)에 제공되어 있다.

상기로부터, 본 발명은 지질/핵산 제형의 제조 방법을 제공한다. 본 명세서에 기재된 방법에서는, 지질의 혼합물을 핵산의 완충된 수용액과 합하여 지질 입자에 캡슐화되어 있는 핵산을 함유하는 중간 혼합물을 생산하는데, 여기서 캡슐화된 핵산은 약 10 중량% 내지 약 20 중량%의 핵산/지질 비로 존재한다. 상기 중간 혼합물을 임의로 크기화하여 지질-캡슐화된 핵산 입자를 수득하는데, 여기서 지질 부분은 단일라멜라 소낭으로, 직경이 바람직하게는 30 내지 150 nm, 더욱 바람직하게는 약 40 내지 90 nm이다. 이어서 pH를 상승시켜 적어도 지질-핵산 입자상의 표면 전하 부분을 중성화시켜, 적어도 부분적으로 표면-중성화된 지질-캡슐화된 핵산 조성물을 제공한다.

특정 양태로, 지질 혼합물은 적어도 2종의 지질 성분을 포함한다: 지질이 pK_a 보다 낮은 pH에서 양이온성이고 pK_a 보다 높은 pH에서 중성이도록 하는 pK_a 를 갖는 지질중에서 선택되는, 본 발명의 제1 지질 성분, 및 지질-핵산 입자 형성 중 입자가 응집되는 것을 방지하는 지질중에서 선택되는 제2 지질 성분. 특정 양태로, 아미노 지질이 본 발명의 신규한 양이온성 지질이다.

본 발명의 핵산-지질 입자 제조시, 지질 혼합물은 전형적으로 유기 용매중 지질의 용액이다. 이어서, 상기 지질 혼합물을 건조시켜 박막을 형성시키거나 동결건조시켜 분말을 형성시키는데 이전에 리포솜을 형성시키기위하여 수성 완충액으로 수화시킨다. 달리, 바람직한 방법에서, 지질 혼합물을 수산화성 알코올, 예로서 에탄올에 용해시킬 수 있으며, 상기 에탄올성 용액을 수성 완충액에 가하여 리포솜을 동시에 형성시킨다. 대부분의 양태에서, 시판되는 형태의 알코올이 사용된다. 예를 들어, 에탄올은 무수 에탄올 (100%)로서, 또는 95% 에탄올, 나머지는 물의 형태로 사용될 수 있다. 이 방법은 미국 특허 제5,976,567호에 상세하게 기재되어 있다.

일례의 양태로, 지질의 혼합물이 알코올 용매 중 양이온성 지질, 중성 지질 (양이온성 지질 제외), 스테롤 (예, 콜레스테롤) 및 PEG-개질된 지질 (예, PEG-DMG 또는 PEG-DMA)의 혼합물이다. 바람직한 양태로, 지질 혼합물은 필수적으로, 알코올, 더욱 바람직하게는 에탄올 중, 양이온성 지질, 중성 지질, 콜레스테롤 및 PEG-개질된 지질로 이루어져 있다. 추가의 바람직한 양태로, 제1 용액은 양이온성 지질 약 20 내지 70%:중성 지질 5 내지 45%:콜레스테롤 20 내지 55%:PEG-개질된 지질 0.5 내지 15%의 물비의 상기 지질 혼합물로 이루어져 있다. 또 다른 바람직한 양태로, 상기 제1 용액이 필수적으로 표 1에서 선택된 지질, DSPC, Chol 및 PEG-DMG 또는 PEG-DMA로, 더욱 바람직하게는 양이온성 지질 약 20 내지 60%:DSPC 5 내지 25%:Chol 22 내지 55%:PEG-DMG 또는 PEG-DMA 0.5 내지 15%의 물비로 이루어져 있다. 특정 양태로, 상기 지질의 물비는 대략 40/10/40/10 (양이온성 지질/DSPC/Chol/PEG-DMG 또는 PEG-DMA의 몰%), 35/15/40/10 (양이온성 지질/DSPC/Chol/PEG-DMG 또는 PEG-DMA의 몰%), 또는 52/13/30/5 (양이온성 지질/DSPC/Chol/PEG-DMG 또는 PEG-DMA의 몰%)이다. 다른 그룹의 바람직한 양태로, 이들 조성물 중 중성 지질을 POPC, DPPC, DOPE 또는 SM으로 대체한다.

본 발명에 따라서, 지질 혼합물을 핵산을 함유할 수 있는 완충된 수용액과 합한다. 상기 완충된 수용액은 전형적으로 완충액의 pH가 지질 혼합물의 양자성 지질의 pK_a 보다 더 낮은 pH를 갖는 용액이다. 적합한 완충제의 예로는 시트레이트, 포스페이트, 아세테이트, 및 MES가 있다. 특히 바람직한 완충제는 시트레이트 완충제이다. 바람직한 완충제는 캡슐화된 핵산의 화학에 따라서, 1 내지 1000 mM 범위의 음이온으로 존재하며, 완충액 농도의 최적화는 높은 부하 수준을 달성하는데 있어서 중요할 수 있다 (참조, 예를 들면 미국 특허 제6,287,591호 및 미국 특허 제6,858,225호). 달리, 클로라이드, 술페이트 등으로 pH 5 내지 6으로 산성화시킨 순수한 물이 유용할 수 있다. 이 경우, 에탄올을 제거하고, pH를 증가시키기위하여 입자를 투석할 때 입자막을 가로지르는 삼투성 전위를 균형잡는 5% 글루코오스, 또는 다른 비-이온성 용질을 가하는 것이 적합할 수 있거나, 통상의 염수와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합할 수 있다. 완충액중 핵산의 양은 변할 수 있지만, 전형적으로 약 0.01 mg/ml 내지 약 200 mg/ml, 더욱 바람직하게는 약 0.5 mg/ml 내지 약 50 mg/ml이다.

지질과 치료용 핵산의 완충된 수용액의 혼합물을 합하여 중간 혼합물을 제공한다. 중간 혼합물은 전형적으로 캡슐화된 핵산을 갖는 지질 입자의 혼합물이다. 추가로, 중간 혼합물을 또한 지질 입자 표면상에서 음으로 하전된 핵산과 양으로 하전된 지질의 이온 끌림현상으로 인하여 지질 입자 (리포솜 또는 지질 소낭)의 표면에 부착된 핵산의 일정 부분을 함유할 수 있다 (양자성 제1 지질 성분을 구성하는 아미노 지질 또는 다른 지질은 지질상의 양자성 그룹의 pK_a 보다 더 낮은 pH를 갖는 완충액중에서 양으로 하전된다). 일군의 바람직한 양태로, 지질의 혼합물이 지질의 알코올 용액이며 각 용액의 용적은 배합시 조절하여, 생성된 알코올 함량이 약 20 용적% 내지 약 45 용적%가 되도록 한다. 혼합물의 배합 방법은 통상적으로 생산되는 제형의 규모에 따라, 여러가지 공정을 포함할 수 있다. 예를 들어, 전체 용적이 약 10 내지 20 ml 이하인 경우, 용액을 시험관에서 배합하여 볼텍스 혼합기를 사용하여 함께 교반시킬 수 있다. 대규모 공정은 적합한 생산 규모의 유리 용기에서 수행할 수 있다.

임의로, 지질 혼합물과 치료제 (핵산)의 완충된 수용액을 합하여 생산되는 지질-캡슐화된 치료제 (예, 핵산) 복합체를 크기화하여 목적하는 크기 범위와 상대적으로 좁은 지질 입자 크기 분포를 달성할 수 있다. 바람직하게는, 여기에서 제공되는 조성물의 크기는 평균 직경이 약 70 내지 약 200 nm, 더욱 바람직하게는 약 90 내지 약 130 nm이다. 목적하는 크기로 리포솜을 크기화하는데 있어서 몇가지 기술을 이용할 수 있다. 크기화 방법 중 하나가 미국 특허 제4,737,323호에 기재되어 있으며, 본 명세서에서 참고로 인용된다. 옥 또는 프로브 초음파 처리로 리포솜 현탁액을 초음파처리하여 점진적으로 크기를 감소시켜 크기가 약 0.05 마이크론 미만인 작은 단

일라멜라 소낭 (SUVs)을 생산한다. 균질화는 다른 방법으로 이는 단편의 거대한 리포솜에 전단 에너지를 가하여 더 작은 리포솜으로 만든다. 전형적인 균질화 공정에서는, 다중라멜라 소낭을 표준 유액 균질화기를 통하여 선택된 리포솜 크기, 전형적으로는 약 0.1 내지 약 0.5 마이크로미터에 관찰될 때 까지 재순환시킨다. 두 방법 모두, 입자 크기 분포는 통상의 레이저-빔 입자 크기 측정법으로 모니터링할 수 있다. 여기서 특정 방법의 경우, 압출법을 사용하여 균일한 소낭 크기를 수득한다.

작은-기공 폴리카보네이트 막 또는 비대칭 세라믹 막을 통하여 리포솜 조성물을 압출시킴으로써 상대적으로 잘-한정된 크기 분포를 달성한다. 전형적으로, 현탁액을 목적하는 리포솜 복합체 크기 분포가 달성될 때까지 막을 통하여 1회 이상 순환시킨다. 리포솜을 더 작은-기공 막을 통하여 연속적으로 압출시켜, 리포솜 크기를 점차 감소시킨다. 어떤 경우에는, 형성되는 지질-핵산 조성물을 크기화하지 않고 사용할 수 있다.

특정 양태로, 본 발명의 방법은 지질-핵산 조성물의 지질 부분상의 표면 전자중 적어도 일부를 중성화시키는 단계를 추가로 포함한다. 적어도 부분적으로 표면 전하를 중성화시킴으로써, 캡슐화되지 않은 핵산을 지질 입자 표면으로부터 유리시키고 통상의 기술을 사용하여 조성물로부터 제거할 수 있다. 바람직하게는, 비캡슐화 및 표면 흡수된 핵산은 완충액 교환을 통하여 생성된 조성물로부터 제거된다. 예를 들어, 시트레이트 완충액 (조성물 형성을 위하여 사용, pH 약 4.0)을 HEPES-완충된 염수 용액 (HBS pH 약 7.5)으로 대체하면 리포솜 표면이 중성화되어 표면으로부터 핵산이 방출된다. 이어서, 방출된 핵산은 표준 방법을 사용하여 크로마토그래피를 통하여 제거한 다음, 사용되는 지질의 pK_a 이상인 pH를 갖는 완충액으로 스위칭시킬 수 있다.

임의로 지질 소낭 (즉, 지질 입자)은 수성 완충액중에서 수화시킴으로써 형성시킬 수 있으며 핵산 첨가 전에 상기한 방법 중 하나를 사용하여 크기화할 수 있다. 상기한 바와 같이, 수성 완충액의 pH는 반드시 아미노 지질의 pK_a 이하의 pH이어야 한다. 이어서 핵산의 용액을 이들 크기화된, 미리 형성된 소낭에 가할 수 있다. 핵산을 "미리-형성된" 소낭으로 캡슐화시키기 위해서는, 혼합물이 에탄올과 같은 알코올을 반드시 함유하여야 한다. 에탄올의 경우, 약 20% (w/w) 내지 약 45% (w/w)의 농도로 존재하여야 한다. 또한, 미리-형성된 소낭과 핵산의 혼합물을 수성 완충액-에탄올 혼합물 중에서 지질 소낭의 조성 및 핵산의 특성에 따라서 약 25 °C 내지 약 50 °C의 온도로 가온시키는 것이 필수적일 수 있다. 지질 소낭중에 목적하는 수준의 핵산을 성취하기 위해서는 캡슐화 공정의 최적화가 에탄올 농도 및 온도와 같은 변수의 조정을 필요로 한다는 것이 당해 분야의 숙련자에게 자명할 것이다. 핵산 캡슐화에 적합한 조건의 예가 실시예에 제공된다. 일단 핵산을 미리 형성된 소낭내에 캡슐화시킨 다음, 외부의 pH를 증가시켜 표면 전하를 적어도 부분적으로 중성화시킬 수 있다. 이어서, 비캡슐화되고 표면 흡수된 핵산을 상기한 바와 같이 제거한다.

사용 방법

본 발명의 지질 입자는 치료제를 세포, 시험관내 또는 생체내로 운반하는데 사용될 수 있다. 특정 양태로, 치료제는 핵산으로, 이는 본 발명의 핵산-지질 입자를 사용하여 세포로 운반된다. 본 발명의 지질 입자와 관련한 약제학적 조성물의 여러가지 사용 방법이 핵산-지질 입자와 관련한 서술에 의해 예시되었지만, 이들 방법 및 조성물은 치료로부터 이득을 얻게 되는 질병 또는 질환의 치료를 위한 치료제의 운반에 용이하게 채택될 수 있음을 알아야 한다.

특정 양태로, 본 발명은 핵산을 세포로 도입시키는 방법을 제공한다. 세포로의 도입에 적합한 핵산은 siRNA, 면역-자극 올리고뉴클레오티드, 플라스미드, 안티센스 및 리보자임이다. 이들 방법은 본 발명의 입자 또는 조성물을 세포와 세포내 전달되기에 충분한 시간 동안 접촉시킴으로써 수행될 수 있다.

본 발명의 조성물은 거의 대부분의 세포 타입에 흡수될 수 있다. 일단 흡수되면, 핵산-지질 입자는 세포 부분에 의해 흡수될 수 있으며, 세포막과 지질을 교환하거나, 세포와 융합할 수 있다. 복합체의 핵산 부분의 운반 또는 흡수는 이들 경로 중 하나를 통하여 발생할 수 있다. 본 발명의 범주에 대해 제한할 의도는 아니나, 내포작용 (endocytosis)에 의해 세포중으로 흡수되는 입자의 경우, 입자는 엔도솜 막과 상호반응하여, 엔도솜 막을 탈안정화시키고, 가능하게는 비-이중층 상을 형성시킴으로써, 캡슐화된 핵산이 세포질로 도입되도록 한다. 유사하게, 입자를 세포 혈장 막과 직접 융합시키는 경우, 융합이 일어날 때, 리포솜 막이 세포막에 통합되고 리포솜 내용물이 세포내 유체와 합해 진다. 세포와 지질-핵산 조성물간의 접촉을 시험관내에서 수행할 경우 생물학적으로 적합한 매질중에서 수행한다. 조성물의 농도는 특정 용도에 따라 광범위하게 변화될 수 있지만, 일반적으로 약 1 μmol 내지 약 10 mmol이다. 특정 양태로, 세포를 지질-핵산 조성물로 처리하는 것은 일반적으로 생리학 온도 (약 37 °C)에서 약 1 내지 24 시간, 바람직하게는 약 2 내지 8 시간 동안 수행한다. 시험관내 적용의 경우, 핵산은 식물 또는 동물 기원, 척추동물 또는 무척추동물, 어떤 조직 또는 타입이든지, 배양액중에서

성장시킨 세포로 운반할 수 있다. 바람직한 양태로, 세포는 동물 세포, 더욱 바람직하게는 포유동물 세포, 가장 바람직하게는 사람의 세포이다.

일군의 양태로, 지질-핵산 입자 현탁액을 약 10^3 내지 약 10^5 개의 세포/ml, 더욱 바람직하게는 약 2×10^4 개의 세포/ml의 세포 밀도를 갖는 60 내지 80% 융합성 플레이팅된 세포에 가한다. 세포에 첨가된 현탁액의 농도는 바람직하게는 약 0.01 내지 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 더욱 바람직하게는 약 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이다.

다른 양태로, 본 발명의 지질 입자를 사용하여 핵산을 세포 또는 세포주 (예, 종양 세포주)에 운반할 수 있다. 그러한 세포주의 비-제한적 예는 다음과 같다: HELA (ATCC Cat N: CCL-2), KB (ATCC Cat N: CCL-17), HEP3B (ATCC Cat N: HB-8064), SKOV-3 (ATCC Cat N: HTB-77), HCT-116 (ATCC Cat N: CCL-247), HT-29 (ATCC Cat N: HTB-38), PC-3 (ATCC Cat N: CRL-1435), A549 (ATCC Cat N: CCL-185), MDA-MB-231 (ATCC Cat N: HTB-26).

전형적인 용도는 숙지되어 있는 공정을 사용하여 특정 세포 표적을 녹-다운시키거나 침묵시키기 위하여 siRNA를 세포내로 운반하는 것이다. 다른 용도는 치료적으로 유용한 폴리펩타이드를 암호화하는 DNA 또는 mRNA 서열을 운반하는 것이다. 이 방법으로, 결핍되어 있거나 없는 유전자 생성물을 공급함으로써 유전적 질병에 대한 치료법을 제공한다 (즉, Duchenne's 위축증의 경우, Kunkel, et al., Brit. Med. Bull. 45(3):630-643 (1989) 참조, 낭포성 섬유증의 경우, Goodfellow, Nature 341:102-103 (1989) 참조). 본 발명의 조성물에 대한 기타 용도로는 세포중으로 안티센스 올리고뉴클레오티드를 도입시키는 것이 있다 (참조: Bennett, et al., Mol. Pharm. 41:1023-1033 (1992)).

달리, 본 발명의 조성물은 또한 당해 분야의 숙련가에게 공지되어 있는 방법을 이용하여, 핵산을 생체내에서 세포로 운반하는데 사용될 수 있다. DNA 또는 mRNA 서열의 운반에 대해서는, 본 명세서에서 참고로 인용되는 문헌: Zhu, et al., Science 261:209-211 (1993)에 DOTMA-DOPE 복합체를 사용하여 사이토메갈로바이러스 (CMV)-클로르암페니콜 아세틸트랜스피라제 (CAT) 발현 플라스미드를 정맥내 운반하는 것이 기재되어 있다. 본 명세서에서 참고로 인용되는 문헌: Hyde, et al., Nature 362:250-256 (1993)에는 리포솜을 사용하여, 쥐의 폐내의 기도의 상피 및 폐포로 낭포성 섬유증 경막 전도도 조절자 (CFTR) 유전자를 운반하는 것이 기재되어 있다. 본 명세서에서 참고로 인용되는 문헌: Brigham, et al., Am. J. Med. Sci. 298:278-281 (1989)에는 세포내 효소인 클로르암페니콜 아세틸트랜스피라제 (CAT)를 암호화하는 기능화 원핵세포 유전자로 쥐의 폐를 생체내 감염시키는 것이 기재되어 있다. 따라서, 본 발명의 조성물은 감염성 질환의 치료에 사용될 수 있다.

생체내 투여의 경우, 약제학적 조성물을 바람직하게는 비경구적으로, 즉, 관절내로, 정맥내로, 복강내로, 피하로, 또는 근육내로 투여한다. 특정 양태로, 약제학적 조성물을 볼러스 주사에 의해 정맥내로 또는 복강내로 투여한다. 예를 들어, 본 명세서에서 참고로 인용되는 다음 문헌을 참고한다: Stadler, et al., 미국 특허 제 5,286,634호. 정맥내 핵산 운반은 또한 하기 문헌에서 논의된 바 있다: Straubinger, et al., METHODS IN ENZYMOLOGY, Academic Press, New York. 101:512-527 (1983); Mannino, et al., Biotechniques 6:682-690 (1988); Nicolau, et al., Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 6:239-271 (1989), 및 Behr, Acc. Chem. Res. 26:274-278 (1993). 지질-기재 치료제의 또 다른 투여 방법은 예를 들어 하기 문헌에 기재되어 있다: Rahman et al., 미국 특허 제 3,993,754호; Sears, 미국 특허 제 4,145,410호; Papahadjopoulos et al., 미국 특허 제 4,235,871호; Schneider, 미국 특허 제 4,224,179호; Lenk et al., 미국 특허 제 4,522,803호; 및 Fountain et al., 미국 특허 제 4,588,578호.

다른 방법으로, 약제학적 제제를 조직에 직접 적용시킴으로써 표적 조직과 접촉시킬 수 있다. 상기 적용법은 국소적인, "개방" 또는 "폐쇄" 공정으로 이루어질 수 있다. "국소적"이란, 약제학적 제제를 환경에 노출된 조직, 예를 들어, 피부, 구강인두, 외이도 등에 직접 적용하는 것을 의미한다. "개방" 공정은 환자의 피부를 절개하여 약제학적 제제를 도포할 아래 조직을 직접 볼수 있게 하는 단계를 포함하는 공정이다. 이는 일반적으로 폐에 접근하기 위한 개흉술, 복부의 내장에 접근하기 위한 복부 개복술, 또는 기타 표적 조직으로의 직접적인 외과적 방법과 같은 외과적 시술에 의해 수행된다. "폐쇄" 공정은 내부 표적 조직을 직접적으로 가시화시키지 않지만, 피부에 작은 상처를 통하여 도구를 삽입시켜 접근하는 침투식 (invasive) 공정이다. 예를 들어, 약제학적 제제를 바늘 세척법 (needle lavage)으로 복강에 투여할 수 있다. 마찬가지로, 약제학적 제제는 요추천자에 이어서 척추마취 또는 척수의 메트라자미드 영상화에 대해 통상적으로 실행되는 바와 같이 환자에서 적절한 위치를 잡아 주입함으로써 뇌척수막 또는 척수에 투여할 수 있다. 달리, 제제를 내시경 도구를 통하여 투여할 수 있다.

지질-핵산 조성물은 또한 에어로졸 흡입식으로 (참조: Brigham, et al., Am. J. Sci. 298(4):278-281 (1989)) 또는 질병 부위에 직접 주사하여 (Culver, Human Gene Therapy, MaryAnn Liebert, Inc., Publishers, New

York, pp.70-71) 폐에 투여할 수 있다.

본 발명의 방법은 여러 가지 숙주에서 실행될 수 있다. 바람직한 숙주로는 포유동물 중, 예를 들어, 인간, 비-인간 영장류, 개, 고양이, 소, 말, 양 등이다.

본 발명의 지질-치료제 입자에 대한 투여량은 치료제 대 지질의 비 및 연령, 체중, 및 환자의 상태를 기준으로 한 투여 임상학의 의견에 따른다.

하나의 양태로, 본 발명은 표적 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩타이드의 발현을 조절하는 방법을 제공한다. 이들 방법은 일반적으로 표적 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩타이드의 발현을 조절할 수 있는 핵산과 관련된 본 발명의 지질 입자와 세포를 접촉시키는 단계를 포함한다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "조절"이란 표적 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩타이드의 발현을 변형시키는 것이다. 다른 양태로, 조절은 증가 또는 향상을 의미할 수 있거나, 감소 또는 절감을 의미할 수 있다. 표적 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩타이드의 발현 수준의 측정법은 당해 분야에 공지되어 있으며 입수가 가능하고 예를 들면, 역전사-폴리머라제 연쇄반응법 (RT-PCR) 및 면역조직화학적 기술을 사용하는 방법이 있다. 특정 양태로, 표적 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩타이드의 발현 수준을 적합한 대조 수치와 비교하여 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 또는 50% 이상 증가 또는 감소시킨다.

예를 들어, 폴리펩타이드의 증가된 발현이 요구되는 경우, 핵산은 목적하는 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터일 수 있다. 한편, 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩타이드의 감소된 발현이 요구되는 경우, 핵산은 예를 들어, 표적 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드에 특이적으로 하이브리드화되어, 표적 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩타이드의 발현을 파괴하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오티드, siRNA, 또는 마이크로RNA 일 수 있다.

특정 양태로, 본 발명은 표 1로부터 선택된 지질, DSPC, Chol 및 PEG-DMG 또는 PEG-DMA로, 예를 들어, 약 20 내지 60% 양이온성 지질: 5 내지 25% DSPC: 25 내지 55% Chol: 0.5 내지 15% PEG-DMG 또는 PEG-DMA의 몰비로 이루어져 있거나 필수적으로 이루어진 지질 입자를 세포에 제공함을 특징으로하여, 세포에 의해 폴리펩타이드의 발현을 조절하는 방법을 제공하며, 여기서 상기 지질 입자는 폴리펩타이드의 발현을 조절할 수 있는 핵산과 관련되어 있다. 특정 양태로, 상기 지질의 몰비는 대략 40/10/40/10 (양이온성 지질/DSPC/Chol/PEG-DMG 또는 PEG-DMA의 몰%), 35/15/40/10 (양이온성 지질/DSPC/Chol/PEG-DMG 또는 PEG-DMA의 몰%) 또는 52/13/30/5 (양이온성 지질/DSPC/Chol/PEG-DMG 또는 PEG-DMA의 몰%)이다. 다른 균의 양태로, 이들 조성물 중 중성 지질을 POPC, DPPC, DOPE 또는 SM으로 대체한다.

특정 양태로, 치료제는 siRNA, 마이크로RNA, 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드, 및 siRNA, 마이크로RNA, 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드를 발현시킬 수 있는 플라스미드로부터 선택되며, 여기서 siRNA, 마이크로RNA, 또는 안티센스 RNA는 폴리펩타이드의 발현이 감소되도록, 폴리펩타이드, 또는 이의 보체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드에 특이적으로 결합하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다.

다른 양태로, 핵산은 폴리펩타이드 또는 이의 기능성 변이체 또는 단편의 발현이 증가되도록, 폴리펩타이드 또는 이의 기능성 변이체 또는 단편을 암호화하는 플라스미드이다.

관련 양태로, 본 발명은 본 발명의 약제학적 조성물을 개체에 제공함을 특징으로 하여, 개체에서 폴리펩타이드의 과발현으로 특징되는 질병 또는 질환을 치료하는 방법을 제공하며, 여기서 치료제는 siRNA, 마이크로RNA, 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드, 및 siRNA, 마이크로RNA, 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드를 발현시킬 수 있는 플라스미드로부터 선택되며, 상기 siRNA, 마이크로RNA, 또는 안티센스RNA는 폴리펩타이드 또는 이의 보체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드에 특이적으로 결합하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다.

하나의 양태로, 약제학적 조성물은 표 1로부터 선택된 지질, DSPC, Chol 및 PEG-DMG 또는 PEG-DMA로, 예를 들어, 약 20 내지 60% 양이온성 지질: 5 내지 25% DSPC: 25 내지 55% Chol: 0.5 내지 15% PEG-DMG 또는 PEG-DMA의 몰비로 이루어져 있거나 필수적으로 이루어져 있으며, 치료용 핵산과 관련되어 있는 지질 입자를 포함한다. 특정 양태로, 상기 몰비는 대략 40/10/40/10 (양이온성 지질/DSPC/Chol/PEG-DMG 또는 PEG-DMA의 몰%), 35/15/40/10 (양이온성 지질/DSPC/Chol/PEG-DMG 또는 PEG-DMA의 몰%) 또는 52/13/30/5 (양이온성 지질/DSPC/Chol/PEG-DMG 또는 PEG-DMA의 몰%)이다. 다른 균의 양태로, 이들 조성물 중 중성 지질을 POPC, DPPC, DOPE 또는 SM으로 대체한다.

다른 관련 양태로, 본 발명은 본 발명의 약제학적 조성물을 개체에 제공함을 특징으로 하여, 개체에서 폴리펩타이드의 발현저하 (underexpression)로 특징되는 질병 또는 질환을 치료하는 방법을 포함하며, 치료제는 폴리펩

티드 또는 이의 기능성 변이체 또는 단편을 암호화하는 플라스미드이다.

하나의 양태로, 상기 약제학적 조성물은 표 1로부터 선택된 지질, DSPC, Chol 및 PEG-DMG 또는 PEG-DMA로, 예를 들어, 약 20 내지 60% 양이온성 지질: 5 내지 25% DSPC: 25 내지 55% Chol: 0.5 내지 15% PEG-DMG 또는 PEG-DMA의 몰비로 이루어져 있거나 필수적으로 이루어져 있으며, 치료용 핵산과 관련되어 있는 지질 입자를 포함한다. 특정 양태로, 상기 몰비는 대략 40/10/40/10 (양이온성 지질/DSPC/Chol/PEG-DMG 또는 PEG-DMA의 몰%), 35/15/40/10 (양이온성 지질/DSPC/Chol/PEG-DMG 또는 PEG-DMA의 몰%) 또는 52/13/30/5 (양이온성 지질/DSPC/Chol/PEG-DMG 또는 PEG-DMA의 몰%)이다. 다른 균의 양태로, 이들 조성물 중 중성 지질을 POPC, DPPC, DOPE 또는 SM으로 대체한다.

본 발명은 또한 본 발명의 약제학적 조성물을 개체에 제공함을 특징으로 하여, 개체에서 면역반응을 유발시키는 방법을 제공하며, 여기서 치료제는 면역자극 올리고뉴클레오티드이다. 특정 양태로, 면역반응은 체액 또는 점막 면역반응이다. 하나의 양태로, 상기 약제학적 조성물은 표 1로부터 선택된 지질, DSPC, Chol 및 PEG-DMG 또는 PEG-DMA로, 예를 들어, 약 20 내지 60% 양이온성 지질: 5 내지 25% DSPC: 25 내지 55% Chol: 0.5 내지 15% PEG-DMG 또는 PEG-DMA의 몰비로 이루어져 있거나 필수적으로 이루어져 있으며, 치료용 핵산과 관련되어 있는 지질 입자를 포함한다. 특정 양태로, 상기 몰비는 대략 40/10/40/10 (양이온성 지질/DSPC/Chol/PEG-DMG 또는 PEG-DMA의 몰%), 35/15/40/10 (양이온성 지질/DSPC/Chol/PEG-DMG 또는 PEG-DMA의 몰%) 또는 52/13/30/5 (양이온성 지질/DSPC/Chol/PEG-DMG 또는 PEG-DMA의 몰%)이다. 다른 균의 양태로, 이들 조성물 중 중성 지질을 POPC, DPPC, DOPE 또는 SM으로 대체한다.

다른 양태로, 상기 약제학적 조성물은 백신 또는 항원과 함께 개체에 제공된다. 따라서, 본 발명 자체는 면역 조절 올리고뉴클레오티드를 포함하며, 또한 면역반응이 요구되는 항원과 관련 있는, 본 발명의 지질 입자를 포함하는 백신을 제공한다. 특정 양태로, 상기 항원은 종양 항원이거나 감염제, 예를 들어, 바이러스, 세균 또는 기생충과 관련 있다.

여러가지 종양 항원, 감염제 항원 및 기타 질환과 관련되어 있는 항원은 당해 분야에 숙지되어 있으며 본 발명에서 사용하기에 적합한 항원의 예는 비제한적으로, 폴리펩티드 항원 및 DNA 항원이 있다. 항원의 특정 예를 들면, A형 간염, B형 간염, 천연두, 소아마비, 탄저병, 인플루엔자, 티푸스, 파상풍, 홍역, 로타바이러스, 디프테리아, 백일해, 결핵, 및 풍진 항원이 있다. 바람직한 양태로, 상기 항원이 B형 간염 제조항원이다. 다른 양상으로, 항원이 A형 간염 제조항원이다. 또 다른 양상으로, 항원이 종양 항원이다. 종양-관련 항원의 예로 MUC-1, EBV 항원 및 부르키트 (Burkitt's) 임파종과 관련 있는 항원이다. 다른 양상으로, 항원이 티로시나제-관련 단백질 종양 항원 제조항원이다. 당해 분야의 숙련가들은 본 발명에서 사용하기에 적합한 기타 항원에 대해 알고 있다.

본 발명에 사용하기에 적합한 종양-관련 항원은 단일 종양 타입, 수개 타입 간에 공유된 종양의 지표가 될 수 있으며(있거나) 정상 세포와 비교하여 종양 세포에서 독점적으로 발현되거나 과발현될 수 있는 돌연변이 및 비-돌연변이 분자를 둘 다 포함한다. 단백질 및 당단백질 외에, 종양-특이적 패턴의 탄수화물, 강글리오사이드, 당지질 및 뮤신의 발현이 또한 증명되었다. 본 발명의 암 백신에 사용하기 위한 종양-관련 항원의 예로, 발암 유전자, 종양 억제제 유전자 및 종양 세포에 대해 독특한 돌연변이 또는 재배열을 갖는 기타 유전자, 재활성화된 배아 유전자 생성물, 종양태아성 항원, 조직-특이적 (종양-특이적인 것은 아니다) 분화 항원, 성장 인자 수용체, 세포 표면 탄수화물 부위, 외래 바이러스 단백질 및 수많은 기타 자가 단백질이 있다.

종양-관련 항원의 특정 양태의 예를 들면, Ras p21 프로토발암유전자, 종양 억제제 p53 및 BCR-ab1 발암유전자, 뿐만 아니라 CDK4, MUM1, Caspase 8, 및 Beta 카테닌의 단백질 생성물과 같은 돌연변이 항원; 갈렉틴 4, 갈렉틴 9, 카보닉 안하이드라제, Aldolase A, PRAME, Her2/neu, ErbB-2 및 KSA와 같은 과발현된 항원; 알파 태아단백 (AFP), 인간 융모성 코나도프로핀 (hCG); 발암배아성 항원 (CEA) 및 멜라닌세포 분화 항원과 같은 자가 항원, 예로서, Mart 1/Melan A, gp100, gp75, 티로시나제, TRP1 및 TRP2; 전립선 관련 항원, 예로서 PSA, PAP, PSMA, PSM-P1 및 PSM-P2; 재활성화된 배아 유전자 생성물, 예로서, MAGE 1, MAGE 3, MAGE 4, GAGE1, GAGE 2, BAGE, RAGE, 및 기타 암 정소 항원, 예로서 NY-ESO1, SSX2 및 SCP1; 뮤신, 예로서 Muc-1 및 Muc-2; 강글리오사이드, 예로서 GM2, GD2 및 GD3, 중성 당지질 및 당단백질, 예로서 Lewis(y) 및 globo-H; 및 당단백질, 예로서 Tn, Thompson-Freidenreich 항원 (TF) 및 sTn이 있다. 종양-관련 항원으로서 전세포 (whole cell) 및 종양 세포 용해물 뿐만 아니라 이들의 면역원성 부분, 뿐만 아니라 B 세포 임파구에 대해 사용하기 위한 B 임파구의 모노클로날 증식상 발현된 면역글로불린 유전형이 또한 포함된다.

병원체로는 비제한적으로, 감염성 제제, 예를 들면, 포유동물, 더욱 바람직하게는 특히 인간을 감염시키는 바이

러스가 있다. 감염성 바이러스의 비제한적인 예는 다음과 같다: 레트로바이러스 (예, 인간 면역결핍증 바이러스, 예로서, HIV-1 (HTLV-III, LAV 또는 HTLV-III/LAV 또는 HIV-III으로도 호칭됨); 및 기타 단리물, 예로서, HIV-LP; 피코르나바이러스 (예, 소아마비 바이러스, A형 간염 바이러스; 엔테로바이러스, 인간 콕사키 바이러스, 리노바이러스, 에코바이러스); 칼시바이러스 (예, 위장염을 일으키는 균주); 토가바이러스 (예, 마 뇌염 바이러스, 풍진 바이러스); 플라바이러스 (예, 뎅기 바이러스, 뇌염 바이러스, 황열병 바이러스); 코로나 바이러스 (예, 코로나바이러스); 랩도바이러스 (예, 수포성 구내염 바이러스, 광견병 바이러스); 코로나바이러스 (예, 코로나바이러스); 랩도바이러스 (예, 수포성 구내염 바이러스, 광견병 바이러스); 필로바이러스 (예, 에볼라 바이러스); 파라믹소바이러스 (예, 파라인플루엔자 바이러스, 볼거리 바이러스, 홍역 바이러스, 호흡기 합포체 바이러스); 오르토믹소바이러스 (예, 인플루엔자 바이러스); 봉가바이러스 (예, Hantaan 바이러스, 봉가 바이러스, 플레보바이러스 및 나이로 바이러스); 아레나 바이러스 (출혈열 바이러스); 레오바이러스 (예, 레오 바이러스, 오르비바이러스 및 로타바이러스); 비르나바이러스; 헤파드나바이러스 (B형 간염 바이러스); 파르보 바이러스 (파르보바이러스); 파포바이러스 (유두종 바이러스, 폴리오마 바이러스); 아데노바이러스 (대부분의 아데노바이러스); 대상포진 바이러스 (HSV)1 및 2, 수두 바이러스, 사이토메갈로바이러스 (CMV), 헤르페스 바이러스; 폭스 바이러스 (바리올라 바이러스, 바시니아 바이러스, 폭스 바이러스); 및 이리도바이러스 (예, 아프리카 돼지 독감 바이러스); 및 비분류된 바이러스 (예, 스폰지형 뇌병증의 유병기생충, 델타 간염의 원인체 (간염 B 바이러스의 감염성 부수체인 것으로 생각됨), 비-A, 비-B형 간염의 원인체 (class 1=내부적으로 전이된 것; class 2=비경구적으로 전이성 (즉, C형 간염); Norwalk 및 관련 바이러스, 및 아스트로바이러스).

또한, 그램 음성 및 그램 양성 세균이 척추동물에서 항원으로 작용한다. 그러한 그램 양성 세균으로는, 비제한적으로, 파스퇴렐라 종 (*Pasteurella species*), 스타필로코커스 종 (*Staphylococci species*), 및 스트렙토코커스 종 (*Streptococcus species*)이 있다. 그램 음성 세균으로는 비제한적으로, 에세리키아 콜리 (*Escherichia coli*), 슈도모나스 종 (*Pseudomonas species*), 및 살모넬라 종 (*Salmonella species*)이 있다. 감염성 세균의 상세한 예로는 비제한적으로 다음과 같다: 헬리코박테로필로리스 (*Helicobacter pylori*), 보렐리아 부르그도르 페리 (*Borelia burgdorferi*), 레지오넬라 뉴모필리아 (*Legionella pneumophilia*), 마이코박테리아 종 (*Mycobacteria sps*, 예, *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. gordonae*), 스타필로코커스 아우레우스 (*Staphylococcus aureus*), 나이세리아 고노르호에 (*Neisseria gonorrhoeae*), 나이세리아 메닝기티디스 (*Neisseria meningitidis*), 리스테리아 모노사이토젠 (*Listeria monocytogenes*), 스트렙토코커스 피오게네스 (*Streptococcus pyogenes; Group A Streptococcus*), 스트렙토코커스 아갈락티아 (*Streptococcus agalactiae; Group B Streptococcus*), 스트렙토코커스 (*viridans group*), 스트렙토코커스 파칼리스 (*Streptococcus faecalis*), 스트렙토코커스 보비스 (*Streptococcus bovis*), 스트렙토코커스 (혐기성 종), 스트렙토코커스 뉴모니아 (*Streptococcus pneumoniae*), 병원성 캄필로박터 종 (*pathogenic Campylobacter sp.*), 엔테로코커스 종 (*Enterococcus sp.*), 해모필러스 인플루엔자 (*Haemophilus influenzae*), 바실러스 안트라시스 (*Bacillus anthracis*), 코리네박테리움 디프테리아 (*Corynebacterium diphtheriae*), 코리네박테리움 종 (*Corynebacterium sp.*), 에리시펠로트릭스 루시오파티아 (*Erysipelothrix rhusiopathiae*), 클로스트리움 퍼프링거스 (*Clostridium perfringens*), 클로스트리움 테타니 (*Clostridium tetani*), 엔테로박터 아에로게네스 (*Enterobacter aerogenes*), 클렙시엘라 뉴모니아 (*Dlebsiella pneumoniae*), 파스투렐라 몰토시다 (*Pasturella multocida*), 박테로이데스 종 (*Bacteroides sp.*), 푸소박테리움 누클레아툼 (*Fusobacterium nucleatum*), 스트렙토바실러스 모닐리포르미스 (*Streptobacillus moniliformis*), 트레포네마 팔리디움 (*Treponema pallidum*), 트레포네마 퍼테누 (*Treponema pertenu*), 렙토스피라 (*Leptospira*), 리케트시아 (*Rickettsia*), 및 악티노마이세스 이스라엘리 (*Actinomyces israelii*).

병원균의 추가적인 예로는, 비제한적으로, 포유동물, 더욱 특히 인간을 감염시키는 감염성 진균류가 있다. 감염성 진균류의 예로는 비제한적으로 다음과 같다: 크립토코커스 네오포르만스 (*Cryptococcus neoformans*), 히스토플라스마 캡슐라툼 (*Histoplasma capsulatum*), 콕시디오이데스 이미티스 (*Coccidioides immitis*), 블라스토마이세스 더마티티디스 (*Blastomyces dermatitidis*), 클라미디아 트라코마티스 (*Chlamydia trachomatis*), 칸디다 알비칸스 (*Candida albicans*). 감염성 기생충의 예는 다음과 같다: 플라스모디움 (*Plasmodium*), 예로서 플라스모디움 팔시파룸 (*Plasmodium falciparum*), 플라스모디움 말라리아 (*Plasmodium malariae*), 플라스모디움 오발레 (*Plasmodium ovale*), 및 플라스모디움 비박스 (*Plasmodium vivax*). 기타 감염성 유기체 (즉, 원생생물)로는 톡소플라스마 곤디 (*Toxoplasma gondii*)가 있다.

하나의 양태로, 본 발명의 제형을 사용하여 비제한적인 다음과 같은 표적 유전자를 침묵하거나 조절할 수 있다: FVII, Eg5, PCSK9, TPX2, apoB, SAA, TTR, RSV, PDGF 베타 유전자, Erb-B 유전자, Src 유전자, CRK 유전자, GRB2 유전자, RAS 유전자, MEKK 유전자, JNK 유전자, RAF 유전자, Erk1/2 유전자, PCNA(p21) 유전자, MYB 유전자

자, JUN 유전자, FOS 유전자, BCL-2 유전자, 사이클린 D 유전자, VEGF 유전자, EGFR 유전자, EGFR 유전자, 사이클린 A 유전자, 사이클린 E 유전자, WNT-1 유전자, 베타-카테닌 유전자, c-MET 유전자, PKC 유전자, NFkB 유전자, STAT3 유전자, 서바이빈 (survivin) 유전자, Her2/Neu 유전자, SORT1 유전자, XBP1 유전자, 토포이소머라제 I 유전자, 토포이소머라제 II 알파 유전자, p73 유전자, p21(WAF1/CIP1) 유전자, p27(KIP1) 유전자, PPM1D 유전자, RAS 유전자, 카베올린 I 유전자, MIB I 유전자, MTA1 유전자, M68 유전자, 종양 억제제 유전자, p53 종양 억제제 유전자, p53 즉 멤버 DN-p63, pRb 종양 억제제 유전자, APC1 종양 억제제 유전자, BRCA1 종양 억제제 유전자, PTEN 종양 억제제 유전자, mLL 융합 유전자, BCR/ABL 융합 유전자, TEL/AML 1 융합 유전자, EWS/FLI1 융합 유전자, TLS/FUS1 융합 유전자, PAX3/FKHR 융합 유전자, AML1/ETO 융합 유전자, 알파 v-인테그린 유전자, Flt-1 수용체 유전자, 튜블린 유전자, 인간 유두종 바이러스 유전자, 인간 유두종 바이러스 복제에 필요한 유전자, 인간 면역결핍 바이러스 유전자, 인간 면역결핍 바이러스 복제에 필요한 유전자, A형 간염 바이러스 유전자, A형 간염 바이러스 복제에 필요한 유전자, B형 간염 바이러스 유전자, B형 간염 바이러스 복제에 필요한 유전자, C형 간염 바이러스 유전자, C형 간염 바이러스 복제에 필요한 유전자, D형 간염 바이러스 유전자, D형 간염 바이러스 복제에 필요한 유전자, E형 간염 바이러스 유전자, E형 간염 바이러스 복제에 필요한 유전자, F형 간염 바이러스 유전자, F형 간염 바이러스 복제에 필요한 유전자, H형 간염 바이러스 유전자, H형 간염 바이러스 복제에 필요한 유전자, 호흡기세포융합 바이러스, 및 호흡기세포융합 바이러스 복제에 필요한 유전자, 단순헤르페스 바이러스 유전자, 단순헤르페스 바이러스 복제에 필요한 유전자, 헤르페스 거대세포 바이러스 유전자, 헤르페스 거대세포 바이러스 복제에 필요한 유전자, 헤르페스 엡스타인 바 바이러스 (Herpes Epstein Barr virus) 유전자, 헤르페스 엡스타인 바 바이러스 복제에 필요한 유전자, 카포시 육종-관련 헤르페스 바이러스 (Kaposi's Sarcoma-associated Herpes Virus) 유전자, 카포시 육종-관련 헤르페스 바이러스 복제에 필요한 유전자, JC 바이러스 유전자, JC 바이러스 복제에 필요한 사람의 유전자, 믹소바이러스 유전자, 믹소바이러스 유전자 복제에 필요한 유전자, 리노바이러스 유전자, 리노바이러스 복제에 필요한 유전자, 코로나바이러스 유전자, 코로나바이러스 복제에 필요한 유전자, 웨스트 나일 바이러스 (West Nile Virus) 유전자, 웨스트 나일 바이러스 복제에 필요한 유전자, 세인트 루이스 뇌염 유전자, 세인트 루이스 뇌염 복제에 필요한 유전자, 텍-본 뇌염 바이러스 유전자, 텍-본 뇌염 바이러스 복제에 필요한 유전자, 머레이 발리 (Murray Valley) 뇌염 바이러스 유전자, 머레이 발리 뇌염 바이러스 복제에 필요한 유전자, 뎅기 바이러스 유전자, 뎅기 바이러스 복제에 필요한 유전자, 시미안 (Simian) 바이러스 40 유전자, 시미안 바이러스 40 복제에 필요한 유전자, 사람 T 세포림프친화 바이러스 유전자, 사람 T 세포림프친화 바이러스 복제에 필요한 유전자, 몰로니-뮤린 백혈병 (Moloney-Murine Leukemia) 바이러스 유전자, 몰로니-뮤린 백혈병 바이러스 복제에 필요한 유전자, 뇌심근염 바이러스 유전자, 뇌심근염 바이러스 복제에 필요한 유전자, 홍역 바이러스 유전자, 홍역 바이러스 복제에 필요한 유전자, 수두 (Varicella zoster) 바이러스 유전자, 수두 바이러스 복제에 필요한 유전자, 아데노바이러스 유전자, 아데노바이러스 복제에 필요한 유전자, 황열병 바이러스 유전자, 황열병 바이러스 복제에 필요한 유전자, 소아마비 바이러스 유전자, 소아마비바이러스 복제에 필요한 유전자, 폭스바이러스 유전자, 폭스바이러스 복제에 필요한 유전자, 플라스모뎀 유전자, 플라스모뎀 유전자 복제에 필요한 유전자, 미코박테리움 울커란스 (*Mycobacterium ulcerans*) 유전자, 미코박테리움 울커란스 복제에 필요한 유전자, 미코박테리움 투버쿨로시스 (*Mycobacterium tuberculosis*) 유전자, 미코박테리움 투버쿨로시스 복제에 필요한 유전자, 미코박테리움 렵라에 (*Mycobacterium leprae*) 유전자, 미코박테리움 렵라에 복제에 필요한 유전자, 스타필로코커스 아우레우스 (*Staphylococcus aureus*) 유전자, 스타필로코커스 아우레우스 복제에 필요한 유전자, 스트렙토코커스 뉴모니아 (*Streptococcus pneumoniae*) 유전자, 스트렙토코커스 뉴모니아 복제에 필요한 유전자, 스트렙토코커스 피오게네스 (*Streptococcus pyogenes*) 유전자, 스트렙토코커스 피오게네스 복제에 필요한 유전자, 클라미디아 뉴모니아 (*Chlamydia pneumoniae*) 유전자, 클리미디아 뉴모니아 복제에 필요한 유전자, 미코플라즈마 뉴모니아 (*Mycoplasma pneumoniae*) 유전자, 미코플라즈마 뉴모니아 복제에 필요한 유전자, 인테그린 유전자, 셀렉틴 유전자, 보체 시스템 유전자, 케모킨 유전자, 케모킨 수용체 유전자, GCSF 유전자, Gro1 유전자, Gro2 유전자, Gro3 유전자, PF4 유전자, MIG 유전자, 프로-혈소판 기초 단백질(Pro-Platelet Basic Protein) 유전자, MIP-1I 유전자, MIP-1J 유전자, RANTES 유전자, MCP-1 유전자, MCP-2 유전자, MCP-3 유전자, CMBKR1 유전자, CMBKR2 유전자, CMBKR3 유전자, CMBKR5v, AIF-1 유전자, I-309 유전자, 이온 채널의 성분에 대한 유전자, 신경전달자 수용체에 대한 유전자, 신경전달자 리간드에 대한 유전자, 아밀로이드-즉 유전자, 프레세닐린 유전자, HD 유전자, DRPLA 유전자, SCA1 유전자, SCA2 유전자, MJD1 유전자, CACNL1A4 유전자, SCA7 유전자, SCA8 유전자, LOH 세포에서 발견되는 대립형 유전자, 또는 다형성 유전자의 대립형 유전자 중 하나.

정의

"알킬"은 탄소수 1 내지 24의 직쇄 또는 측쇄, 비환식 또는 환식, 포화 지방족 탄화수소를 의미한다. 대표적인

포화 직쇄 알킬로는 메틸, 에틸, n-프로필, n-부틸, n-펜틸, n-헥실 등이 있으며; 포화 측쇄 알킬로는 이소프로필, 2급-부틸, 이소부틸, 3급-부틸, 이소펜틸 등이 있다. 대표적인 포화 환식 알킬로는 사이클로프로필, 사이클로부틸, 사이클로펜틸, 사이클로헥실 등이 있으며; 불포화 환식 알킬로는 사이클로펜테닐 및 사이클로헥세닐 등이 있다.

"알케닐"은 인접한 탄소 원자 사이에 이중결합을 적어도 1개 함유하는, 상기한 바와 같은 알킬을 의미한다. 알케닐은 시스 및 트랜스 이성체를 둘 다 포함한다. 대표적인 직쇄 및 측쇄 알케닐로는 에틸레닐, 프로필레닐, 1-부테닐, 2-부테닐, 이소부틸레닐, 1-펜테닐, 2-펜테닐, 3-메틸-1-부테닐, 2-메틸-2-부테닐, 2,3-디메틸-2-부테닐 등이 있다.

"알킬닐"은 인접한 탄소 사이에 삼중결합을 적어도 1개 함유하는, 상기한 바와 같은 알킬 또는 알케닐을 의미한다. 대표적인 직쇄 및 측쇄 알킬닐로는 아세틸레닐, 프로피닐, 1-부티닐, 2-부티닐, 1-펜티닐, 2-펜티닐, 3-메틸-1-부티닐 등이 있다.

용어 "아실"은 수소, 알킬, 부분적으로 포화 또는 완전 포화된 사이클로알킬, 부분적으로 포화 또는 완전 포화된 헤테로사이클, 아릴, 및 헤테로아릴 치환된 카보닐 그룹을 언급한다. 예를 들어, 아실로는 (C1-C20)알카노일; 예, 포르밀, 아세틸, 프로피오닐, 부티닐, 발레릴, 카프로일, t-부틸아세틸 등), (C3-C20)사이클로알킬카보닐 (예, 사이클로프로필카보닐, 사이클로부틸카보닐, 사이클로펜틸카보닐, 사이클로헥실카보닐 등), 헤테로사이클릭 카보닐 (예, 피롤리디닐카보닐, 피롤리드-2-온-5-카보닐, 피페리디닐카보닐, 피페라지닐카보닐, 테트라하이드로푸라닐카보닐 등), 아로일 (예, 벤조일) 및 헤테로아로일 (예, 티오펜-2-카보닐, 티오펜-3-카보닐, 푸라닐-2-카보닐, 푸라닐-3-카보닐, 1H-피로일-2-카보닐, 1H-피로일-3-카보닐, 벤조[b]티오펜-2-카보닐 등)이 있다.

용어 "아릴"은 환 원자 중 하나가 치환될 수 있는, 방향족 모노사이클릭, 비사이클릭 또는 트리사이클릭 탄화수소를 언급한다. 아릴 부위의 예로는 비제한적으로, 페닐, 나프틸, 안트라세닐, 및 피레닐이 있다.

"헤테로사이클"은 5- 내지 7-원 모노사이클릭, 또는 7- 내지 10-원 비사이클릭, 헤테로사이클릭 환으로 포화, 불포화, 또는 방향족이고, 질소, 산소 및 황으로부터 독립적으로 선택된 헤테로원자 1개 또는 2개 함유하며, 질소 및 황 헤테로원자는 임의로 산화될 수 있고, 질소 헤테로원자는 임의로 4급화되며, 상기 헤테로사이클 중 하나가 벤젠 환에 융합되어 있는 비사이클릭 환을 포함한다. 헤테로사이클은 헤테로원자 또는 탄소 원자를 통하여 부착될 수 있다. 헤테로사이클로는 하기 정의된 바와 같은 헤테로아릴이 있다. 헤테로사이클로는 모르폴리닐, 피롤리디노닐, 피롤리디닐, 피페리디닐, 피페리지닐, 하이단토이닐, 발레로락타밀, 옥시라닐, 옥세타닐, 테트라하이드로푸라닐, 테트라하이드로피라닐, 테트라하이드로피리디닐, 테트라하이드로피리미디닐, 테트라하이드로티오펜, 테트라하이드로티오피라닐, 테트라하이드로피리미디닐, 테트라하이드로티오펜, 테트라하이드로티오피라닐 등이 있다.

용어 "헤테로아릴"은 모노사이클릭일 경우 헤테로원자 1 내지 3개, 비사이클릭일 경우 헤테로원자 1 내지 6개, 또는 트리사이클릭일 경우 헤테로원자 1 내지 9개 갖는 방향족 5 내지 8원 모노사이클릭, 8 내지 12원 비사이클릭, 또는 11 내지 14원 트리사이클릭 환 시스템으로, 여기서 헤테로원자는 O, N, 또는 S로부터 선택되고 (예, 탄소 원자와 각각, 모노사이클릭, 비사이클릭, 또는 트리사이클릭일 경우 N, O, 또는 S의 환 원자 1 내지 3, 1 내지 6, 또는 1 내지 9개의 헤테로원자), 환 원자는 치환될 수 있다. 본 명세서에 기재된 헤테로아릴 그룹은 또한 공통의 탄소-탄소 결합을 공유하는 융합된 환을 함유할 수 있다. 용어 "알킬헤테로사이클"은 환 원자 중 적어도 1개가 알킬, 알케닐 또는 알킬닐로 치환된 헤테로아릴을 언급한다.

용어 "치환된"이란 제시된 구조 중 수소 라디칼 1개 이상이 비제한적으로, 할로, 알킬, 알케닐, 알킬닐, 아릴, 헤테로사이클릭, 티올, 알킬티오, 옥소, 티옥시, 아릴티오, 알킬티오알킬, 아릴티오알킬, 알킬술폰닐, 알킬술폰닐알킬, 아릴술폰닐알킬, 알콕시, 아릴옥시, 아르알콕시, 아미노카보닐, 알킬아미노카보닐, 아릴아미노카보닐, 알콕시카보닐, 아릴옥시카보닐, 할로알킬, 아미노, 트리플루오로메틸, 시아노, 니트로, 알킬아미노, 아릴아미노, 알킬아미노알킬, 아릴아미노알킬, 아미노알킬아미노, 히드록시, 알콕시알킬, 카복시알킬, 알콕시카보닐알킬, 아미노카보닐알킬, 아실, 아르알콕시카보닐, 카복실산, 술폰산, 술폰닐, 포스폰산, 아릴, 헤테로아릴, 헤테로사이클릭, 및 지방족으로 명시된 라디칼로 대체되는 것을 언급한다. 치환체는 추가로 치환될 수 있는 것으로 이해된다. 치환체의 예로는 아미노, 알킬아미노, 디알킬아미노, 및 사이클릭 아미노 화합물이 있다.

"할로겐"은 플루오로, 클로로, 브로모 및 요오드를 의미한다.

용어 "알킬아민" 및 "디알킬아민"은 각각 -NH(알킬) 및 -N(알킬)₂ 라디칼을 언급한다.

용어 "알킬포스페이트"는 -O-P(Q')(Q")-O-R 을 언급하는 것으로, 여기서 Q' 및 Q"는 서로 독립적으로 O, S, N(R)₂, 임의로 치환된 알킬 또는 알콕시이고; R은 임의로 치환된 알킬, ω-아미노알킬 또는 ω-(치환된)아미노알킬이다.

용어 "알킬포스포티오에이트"는 Q' 또는 Q" 중 적어도 하나가 S인 알킬포스페이트를 언급한다.

용어 "알킬포스포네이트"는 Q' 또는 Q" 중 적어도 하나가 알킬인 알킬포스페이트를 언급한다.

용어 "하이드록시알킬"은 -O-알킬 라디칼을 의미한다.

용어 "알킬헤테로사이클"은 적어도 1개의 메틸렌이 헤테로사이클로 대체된 알킬을 언급한다.

용어 "ω-아미노알킬"은 -알킬-NH₂ 라디칼을 언급한다. 또한, 용어 "ω-(치환된)아미노알킬"은 N상의 H 중 적어도 1개가 알킬로 대체된 ω-아미노알킬을 언급한다.

용어 "ω-포스포알킬"은 -알킬-O-P(Q')(Q")-O-R 을 언급하며, 여기서 Q' 및 Q"는 서로 독립적으로 O 또는 S이고 R은 임의로 치환된 알킬이다.

용어 "ω-티오포스포알킬"은 Q' 또는 Q" 중 적어도 하나가 S인 ω-포스포알킬을 언급한다.

일부 양태로, 본 발명의 방법은 보호 그룹의 사용을 필요로 할 수 있다. 보호 그룹 방법론은 당해 분야의 숙련자에게 숙지되어 있다 (참고: PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS, Green, T.W. et al., Wiley-Interscience, New York City, 1999). 간략하면, 본 발명에서 보호 그룹은 작용성 그룹의 원치않는 반응성을 감소시키거나 제거하는 그룹이다. 보호 그룹은 특정 반응 중에 이의 반응성을 차폐시키기 위하여 작용성 그룹에 첨가한 다음, 제거하여 원래의 작용성 그룹을 회복시킬 수 있다. 일부 양태에서, "알코올 보호 그룹"이 사용된다. "알코올 보호 그룹"은 알코올 작용성 그룹의 원치않는 반응성을 감소시키거나 제거하는 그룹이다. 보호 그룹은 당해 분야에 숙지되어 있는 기술을 사용하여 첨가하고 제거할 수 있다.

본 발명의 화합물은 실시예에 더욱 상세하게 기재된 방법을 포함하여, 공지의 유기 합성 기술로 제조할 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0037]

실시예

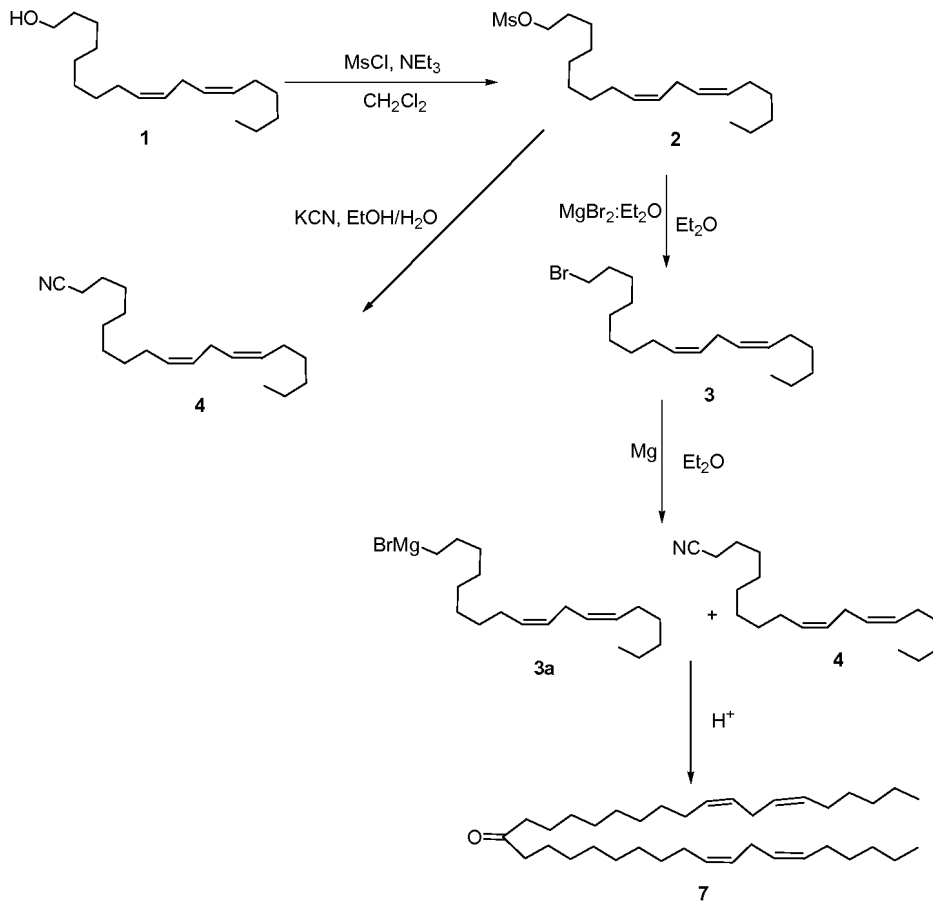
[0038]

실시예 1:

[0039]

메탄술폰산 옥타데카-9,12-디에닐 에스테르 2의 합성

[0040] 도식 1



[0041]

[0042] 디클로로메탄 (100 ml)중 알코올 1 (26.6 g, 100 밀리몰)의 용액에, 트리에틸아민 (13.13 g, 130 밀리몰)을 가하고 상기 용액을 얼음 용기중에서 냉각시킨다. 상기 냉 용액에, 디클로로메탄 (60 ml)중 메실 클로라이드 (12.6 g, 110 밀리몰)의 용액을 점적 첨가하고 첨가 완료 후, 반응 혼합물을 주위 온도로 가온시켜 밤새 교반시킨다. 반응 혼합물의 TLC는 반응이 완료된 것으로 나타난다. 반응 혼합물을 디클로로메탄 (200 ml)으로 희석하고, 물 (200 ml), 포화 NaHCO₃ (200 ml), 염수 (100 ml)로 세척하고 건조시킨다 (NaSO₄). 유기층을 농축시켜 정제안된 생성물을 수득하고 이를 컬럼 크로마토그래피 (실리카겔)로 헥산중 0 내지 10% EtO₂를 사용하여 정제한다. 순수한 생성물 분취를 합하고 농축시켜 무색의 오일로서 순수한 생성물 2를 수득한다 (30.6 g, 89%).

[0043] ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ = 5.42-5.21 (m, 4H), 4.20 (t, 2H), 3.06 (s, 3H), 2.79 (t, 2H), 2.19-2.00 (m, 4H), 1.90-1.70 (m, 2H), 1.06-1.18 (m, 18H), 0.88 (t, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃) δ = 130.76, 130.54, 128.6, 128.4, 70.67, 37.9, 32.05, 30.12, 29.87, 29.85, 29.68, 29.65, 29.53, 27.72, 27.71, 26.15, 25.94, 23.09, 14.60. MS. C₁₉H₃₆O₃S의 계산된 분자량. 344.53, 실측치 343.52 (M-H⁻).

[0044] 18-브로모-옥타데카-6,9-디엔 3의 합성

[0045] 메실레이트 2 (13.44 g, 39 밀리몰)를 무수 에테르 (500 ml)에 용해시키고 여기에 MgBr·Et₂O 복합체 (30.7 g, 118 밀리몰)를 아르곤하에서 가한 다음 혼합물을 아르곤하에서 26 시간 동안 환류시키고, 이후 TLC는 반응이 완료된 것으로 나타난다. 반응 혼합물을 에테르 (200 ml)로 희석하고 빙냉수 (200 ml)를 상기 혼합물에 가하면 층이 분리된다. 유기층을 1% 수성 K₂CO₃ (100 ml), 염수 (100 ml)로 세척하고 건조시킨다 (무수 Na₂SO₄). 유기층을 농축시키면 정제안된 생성물이 수득되고 이를 컬럼 크로마토그래피 (실리카겔)로 헥산중 0 내지 1% Et₂O

를 사용하여 추가로 정제하면 브로마이드 **3**이 무색 오일로서 단리된다 (12.6 g, 94%).

[0046] ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ = 5.41-5.29 (m, 4H), 4.20 (d, 2H), 3.40 (t, J = 7 Hz, 2H), 2.77 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 2.09-2.02 (m, 4H), 1.88-1.00 (m, 2H), 1.46-1.27 (m, 18H), 0.88 (t, J = 3.9 Hz, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ = 130.41, 130.25, 128.26, 128.12, 34.17, 33.05, 31.75, 29.82, 29.57, 29.54, 29.39, 28.95, 28.38, 27.42, 27.40, 25.84, 22.79, 14.28.

[0047] **18-시아노-옥타데카-6,9-디엔 4의 합성**

[0048] 에탄올 (90 ml)중 메실레이트 (3.44 g, 10 밀리몰)의 용액에, 물 (10 ml)중 KCN (1.32 g, 20 밀리몰)의 용액을 가하고 혼합물을 30분간 환류시키면, 이후, TLC는 반응이 완료된 것으로 나타난다. 이후, 에테르 (200 ml)를 반응 혼합물에 가한 다음 물을 가한다. 반응 혼합물을 에테르로 추출하고 유기층을 합한 다음 물 (100 ml), 염수 (200 ml)로 세척하고 건조시킨다. 유기층을 농축시키면 정제안된 생성물이 생성되고 이를 컬럼 크로마토그래피 (헥산 중 0 내지 10% Et_2O)로 정제한다. 순수 생성물 **4**가 무색 오일로서 단리된다 (2 g, 74%).

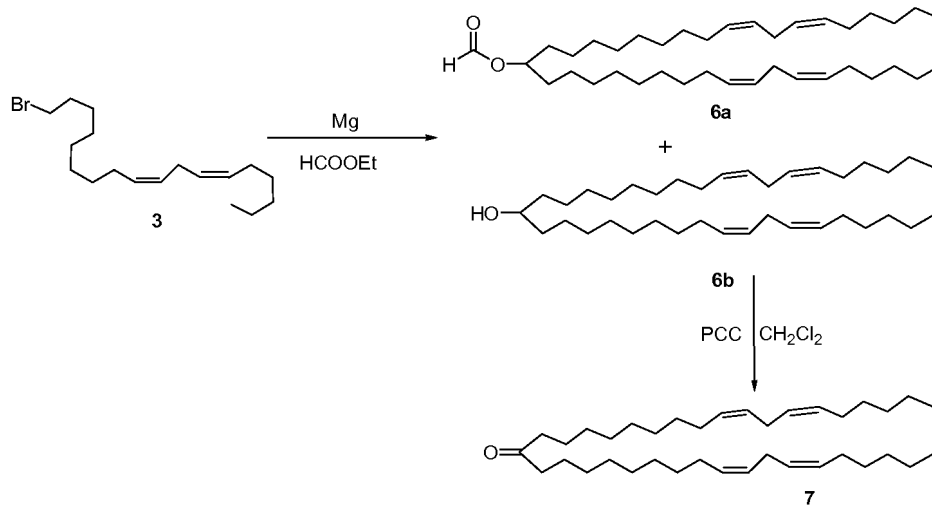
[0049] ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ = 5.33-5.22 (m, 4H), 2.70 (t, 2H), 2.27-2.23 (m, 2H), 2.00-1.95 (m, 4H), 1.61-1.54 (m, 2H), 1.39-1.20 (m, 18H), 0.82 (t, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ = 130.20, 129.96, 128.08, 127.87, 119.78, 70.76, 66.02, 32.52, 29.82, 29.57, 29.33, 29.24, 29.19, 29.12, 28.73, 28.65, 27.20, 27.16, 25.62, 25.37, 22.56, 17.10, 14.06. MS. $\text{C}_{19}\text{H}_{33}\text{N}$ 의 계산된 분자량 275.47, 실측치 276.6 (M^-).

[0050] **헵타트리아콘타-6,9,28,31-테트라엔-19-온 7의 합성**

[0051] 화염 건조시킨 500 ml 2NRB 플라스크에, 방금 활성화시킨 Mg 터닝 (0.144 g, 6 밀리몰)을 가하고 플라스크에 자기 교반 막대와 환류 콘덴서를 장착시킨다. 상기 셋-업을 탈기시키고, 아르곤으로 플러싱하여 주사기를 통하여 무수 에테르 10 ml를 상기 플라스크에 가한다. 브로마이드 **3** (1.65 g, 5 밀리몰)을 무수 에테르 (10 ml)에 용해시켜 주사기를 통하여 상기 플라스크에 점적 첨가한다. 발열반응이 관찰되며 (그리나드 시약 형성을 확인/촉진하기 위하여, 요오드 2 mg을 가하면 즉각적인 탈색반응이 관찰되는데 이는 그리나드 시약의 형성을 확인하는 것이다) 에테르를 환류시키기 시작한다. 첨가 완료 후, 반응 혼합물을 35 °C에서 1시간 동안 보관한 다음 얼음 용기에서 냉각시킨다. 시아나이드 **4** (1.38 g, 5 밀리몰)를 무수 에테르 (20 ml)에 용해시키고 교반하면서 상기 반응 혼합물에 점적 첨가한다. 발열 반응이 관측되고 반응 혼합물을 주위 온도에서 밤새 교반시킨다. 아세톤 10 ml를 적가한 다음 빙냉수 (60 ml)를 가하여 반응을 중단시킨다. 용액이 균질해지고 층이 분리될 때까지 반응 혼합물을 수성 H_2SO_4 (10 용적%, 200 ml)로 처리한다. 수상을 에테르 (2x100 ml)로 추출한다. 에테르층을 합하여 건조시키고(Na_2SO_4) 농축시키면 정제안된 생성물이 수득되고 이를 컬럼 (실리카겔, 헥산 중 1 내지 10% 에테르) 크로마토그래피로 정제한다. 순수 생성물 분취를 증발시켜 무색 오일로서 순수한 케톤 **7**을 수득한다 (2 g, 74%).

[0052] ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ = 5.33-5.21 (m, 8H), 2.69 (t, 4H), 2.30 (t, 4H), 2.05-1.95 (m, 8H), 1.55-1.45 (m, 2H), 1.35-1.15 (m, 18H), 0.82 (t, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ = 211.90, 130.63, 130.54, 128.47, 128.41, 43.27, 33.04, 32.01, 30.93, 29.89, 29.86, 29.75, 29.74, 27.69, 26.11, 24.35, 23.06, 14.05. MS. $\text{C}_{37}\text{H}_{66}\text{O}$ 의 계산된 분자량 526.92, 실측치 528.02 ($\text{M}+\text{H}^+$).

[0053] 실시예 2: 케톤 7의 다른 합성



[0054]

[0055] 화합물 6b의 합성

[0056]

화염 건조시킨 500 ml RB 플라스크에, 방금 활성화시킨 Mg 터닝 (2.4 g, 100 밀리몰)을 가하고 플라스크에 자기 교반 막대, 첨가 깔대기 및 환류 콘텐서를 장착시킨다. 상기 셋-업을 탈기시키고, 아르곤으로 플러싱하여 주사기를 통하여 무수 에테르 10 ml를 상기 플라스크에 가한다. 브로마이드 3 (26.5 g, 80.47 밀리몰)을 무수 에테르 (50 ml)에 용해시켜 첨가 깔대기를 통하여 가한다. 강력하게 교반시키면서 상기 에테르 용액 약 5 ml를 Mg 터닝에 가한다. 발열반응이 관찰되며 (그리나드 시약 형성을 확인/촉진하기위하여, 요오드 5 mg을 가하면 즉각적인 탈색반응이 관찰되는데 이는 그리나트시약의 형성을 확인하는 것이다) 에테르를 환류시키기 시작한다. 수중에서 플라스크를 냉각시키면서 반응을 부드러운 환류하에 유지시키면서 나머지 브로마이드 용액을 점적 첨가한다. 첨가 완료 후, 반응 혼합물을 35 °C에서 1시간 동안 보관한 다음 얼음 용기에서 냉각시킨다. 에틸 포르메이트 (2.68 g, 36.2 밀리몰)를 무수 에테르 (40 ml)에 용해시키고 첨가 깔대기로 옮겨 교반하면서 상기 반응 혼합물에 점적 첨가한다. 발열 반응이 관측되고 반응 혼합물을 환류시키기 시작한다. 반응 개시 후, 포르메이트의 나머지 에테르성 용액을 신속하게 스트립으로 가하고 반응 혼합물을 주위 온도에서 추가로 1시간 동안 교반시킨다. 아세톤 10 ml를 점적 첨가한 다음 빙냉수 (60 ml)를 가하여 반응을 중단시킨다. 용액이 균질해지고 층이 분리될 때까지 반응 혼합물을 수성 H₂SO₄ (10 용적%, 300 ml)로 처리한다. 수상을 에테르 (2x100 ml)로 추출한다. 에테르층을 합하여 건조시키고(Na₂SO₄) 농축시키면 정제안된 생성물이 수득되고 이를 컬럼 (실리카겔, 헥산 중 1 내지 10% 에테르) 크로마토그래피로 정제한다. 약간 극성이 덜한 분취를 농축시키면 포르메이트 6a (1.9 g)이 수득되고 순수 생성물 분취를 증발시켜 무색 오일로서 순수한 생성물 6b를 수득한다 (14.6 g, 78%).

[0057] 화합물 7의 합성

[0058]

CH₂Cl₂ (60 ml)중 알코올 6b (3 g, 5.68 밀리몰)의 용액에, 방금 활성화시킨 4A 분자체 (50 g)을 가하고 상기 용액에 분말화된 PCC (4.9 g, 22.7 밀리몰)을 20분에 걸쳐 나누어 가한 다음 혼합물을 추가로 1시간 동안 교반시키고 (각주: 반응시간이 연장되면 수율이 저하되기 때문에 양호한 수율을 얻기 위해서는 반응의 주의 깊은 모니터링이 필수적이다) 이어서 10분마다 반응 혼합물의 TLC를 수행한다 (헥산중 5% 에테르). 반응 완료후, 반응 혼합물을 실리카겔 패드를 통하여 여과하고 잔사를 CH₂Cl₂ (400 ml)로 세척한다. 여액을 농축시키고 수득한 정제안된 생성물을 컬럼 크로마토그래피 (실리카겔, 헥산중 1% Et₂O)로 추가 정제하면 무색 오일로서 순수한 생성물 7 (2.9 g, 97%)이 단리된다.

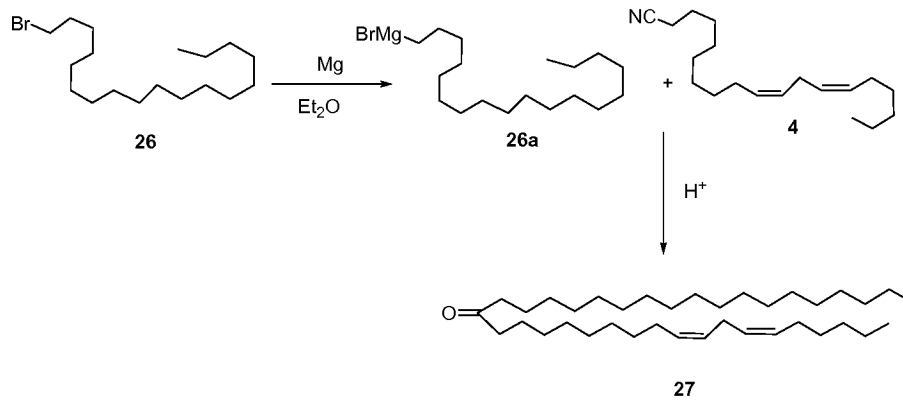
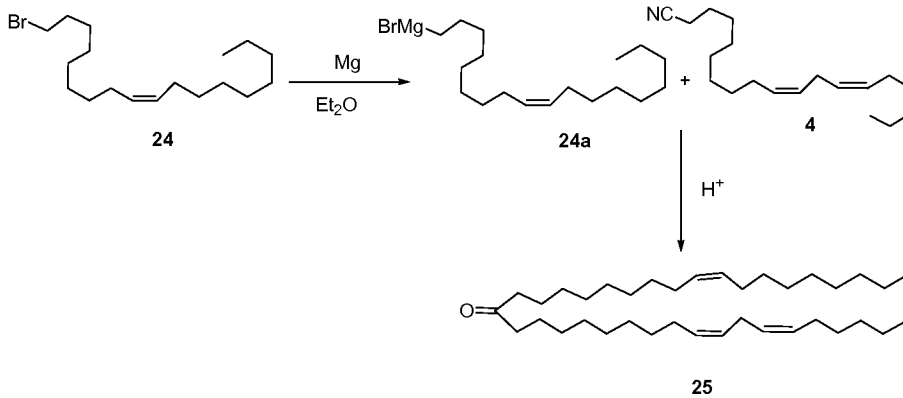
[0059]

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ = 5.33-5.21 (m, 8H), 2.69 (t, 4H), 2.30 (t, 4H), 2.05-1.95 (m, 8H), 1.55-1.45 (m, 2H), 1.35-1.15 (m, 18H), 0.82 (t, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃) δ = 211.90, 130.63, 130.54, 128.47, 128.41, 43.27, 33.04, 32.01, 30.93, 29.89, 29.86, 29.75, 29.74, 27.69, 26.11, 24.35, 23.06, 14.05. MS.

C₃₇H₆₆O의 계산된 분자량. 526.92, 실측치 528.02 (M+H⁺).

[0060] 실시예 3: 비대칭 케톤 25 및 27의 합성

[0061] 도식 3



[0062]

[0063] 헵타트리아콘타-6,9,28-트리엔-19-온 25의 합성

[0064] 무수 50 ml 2NRB 플라스크에, 방금 활성화시킨 Mg 터닝 (132 mg, 0.0054 몰)을 가하고 플라스크에 자기 교반 막대와 환류 콘덴서를 장착시킨다. 상기 셋업을 탈기시키고, 질소로 플러싱하여 주사기를 통하여 무수 에테르 10 ml를 상기 플라스크에 가한다. 브로마이드 **24** (1.8 g, 0.0054 몰)을 무수 에테르 (10 ml)에 용해시켜 주사기를 통하여 상기 플라스크에 점적 첨가한다. 발열반응이 관찰되며 (디브로모에탄으로 개시된 반응) 에테르를 환류시키기 시작한다. 첨가 완료 후, 반응 혼합물을 35 °C에서 1시간 동안 보관한 다음 얼음 용기중에서 10 내지 15 °C로 냉각시킨다. 시아나이드 **4** (0.5 g, 0.0018 몰)를 무수 THF (5 ml)에 용해시키고 교반하면서 상기 반응물에 점적 첨가한다. 발열 반응이 관측되고 반응 혼합물을 12시간 동안 환류시킨다음 (70 °C), 염화암모늄 용액으로 중단시킨다. 용액이 균질해지고 층이 분리될 때까지 반응 혼합물을 25% HCl 용액으로 처리한다. 수상을 에테르로 추출한다. 에테르층을 합하여 건조시키고 농축시키면 정제안된 생성물이 수득되고 이를 컬럼 크로마토그래피로 정제한다. 순수 생성물 분취를 증발시켜 무색 오일로서 순수한 케톤 **25**를 수득한다.(수율 : 0.230g(24%)).

[0065] ¹H-NMR (CDCl₃, 400MHz): δ = 5.37-5.30 (m, 6H), 2.77-2.74 (t, 2H), 2.38-2.34 (t, 4H), 2.05-1.95 (m, 8H), 1.56-1.52 (m, 4H), 1.35-1.25 (m, 지방족 양자), 0.89-0.85 (t, 6H). IR (cm⁻¹): 2924, 2854, 1717, 1465, 1049, 721.

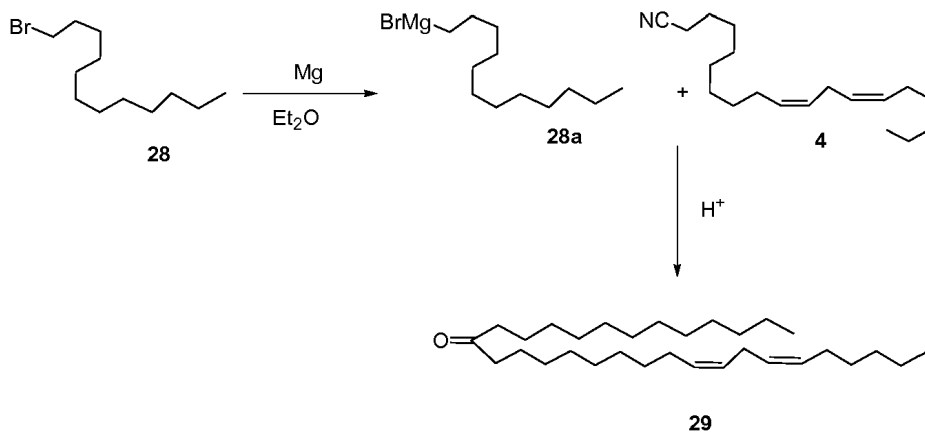
[0066] 헵타트리아콘타-6,9-디엔-19-온 27의 합성

[0067] 화염 건조시킨 500 ml 2NRB 플라스크에, 방금 활성화시킨 Mg 터닝 (0.144 g, 6 밀리몰)을 가하고 플라스크에 자기 교반 막대와 환류 콘덴서를 장착시킨다. 상기 셋-업을 탈기시키고, 아르곤으로 플러싱하여 주사기를 통하여 무수 에테르 10 ml를 상기 플라스크에 가한다. 상업적으로 입수가 가능한 브로마이드 **26** (2.65 g, 5 밀리몰)을 무수 에테르 (10 ml)에 용해시켜 주사기를 통하여 상기 플라스크에 점적 첨가한다. 첨가 완료 후, 반응 혼합물을 35 °C에서 1시간 동안 보관한 다음 얼음 용기중에서 냉각시킨다. 시아나이드 **4** (1.38 g, 5 밀리몰)를 무수 에테르 (20 ml)에 용해시키고 교반하면서 상기 반응 혼합물에 점적 첨가한다. 발열 반응이 관측되고 반응 혼합물을 주위 온도에서 밤새 교반시킨다. 아세톤 10 ml를 점적 첨가한 다음 빙냉수 (60 ml)를 가하여 반응을 중단시킨다. 용액이 균질해지고 층이 분리될 때까지 반응 혼합물을 수성 H₂SO₄ (10 용적%, 200 ml)로 처리한다. 수상을 에테르 (2x100 ml)로 추출한다. 에테르층을 합하여 건조시키고(Na₂SO₄) 농축시키면 정제안된 생성물이 수득되고 이를 컬럼 크로마토그래피로 정제하면 무색 오일로서 순수한 케톤 **27**이 수득된다.

[0068] ¹H-NMR (CDCl₃, 400MHz): δ = 5.42-5.30 (m, 4H), 2.79-2.78 (t, 2H), 2.40-2.37 (t, 4H), 2.08-2.03 (m, 4H), 1.58-1.54 (m, 4H), 1.36-1.26 (br m, 지방족 양자), 0.91-0.87 (t, 6H). IR (cm⁻¹): 2924, 2854, 1716, 1465, 1375, 721.

[0069] 실시예 4: C₁₂ 쇠를 갖는 비대칭 케톤의 합성

[0070] 도식 4



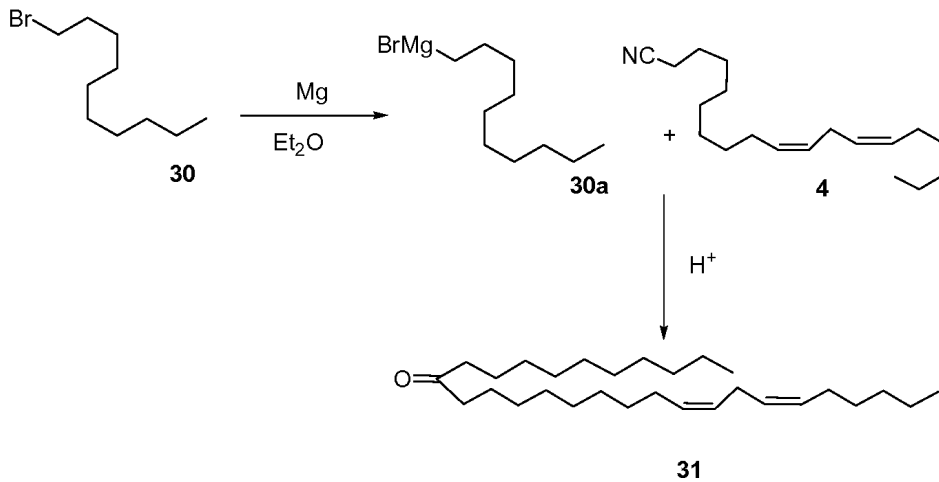
[0071]

[0072] 무수 50 ml 2NRB 플라스크에, 방금 활성화시킨 Mg 터닝 (175 mg, 0.0072 몰)을 가하고 플라스크에 자기 교반 막대와 환류 콘덴서를 장착시킨다. 상기 셋업을 탈기시키고, 질소로 플러싱하여 주사기를 통하여 무수 에테르 10 ml를 상기 플라스크에 가한다. 브로마이드 **28** (1.5 g, 0.006 몰)을 무수 에테르 (7 ml)에 용해시켜 주사기를 통하여 상기 플라스크에 점적 첨가한다. 발열반응이 관찰되며 (디브로모에탄으로 개시된 반응) 에테르를 환류시키기 시작한다. 첨가 완료 후, 반응 혼합물을 35 °C에서 1시간 동안 보관한 다음 얼음 용기중에서 10 내지 15 °C로 냉각시킨다. 시아나이드 **4** (1 g, 0.0036 몰)를 무수 에테르 (7 ml)에 용해시키고 교반하면서 상기 반응물에 점적 첨가한다. 발열 반응이 관측되고 반응 혼합물을 12시간 동안 환류시킨다음, 염화암모늄 용액으로 중단시킨다. 용액이 균질해지고 층이 분리될 때까지 반응 혼합물을 25% HCl 용액으로 처리한다. 수상을 에테르로 추출한다. 에테르층을 합하여 건조시키고 농축시키면 정제안된 생성물이 수득되고 이를 컬럼 크로마토그래피로 정제한다. 순수 생성물 분취를 증발시켜 무색 오일로서 순수한 케톤 **29**를 수득한다.(수율 :0.65g(26%))

[0073] ¹H-NMR (δ ppm): 5.388-5.302 (m, 4H), 2.77 - 2.74 (t, 2H), 2.38 - 2.34 (t, 4H), 2.04-2.01 (m, 4H), 1.34 - 1.18 (m, 36H), 0.89 - 0.85 (m 6H). IR (cm⁻¹): 3009, 2920, 2851, 1711 (C=O), 1466, 1376, 1261.

[0074] 실시예 5: C₁₀ 쇠를 갖는 비대칭 케톤 31의 합성

[0075] 도식 5



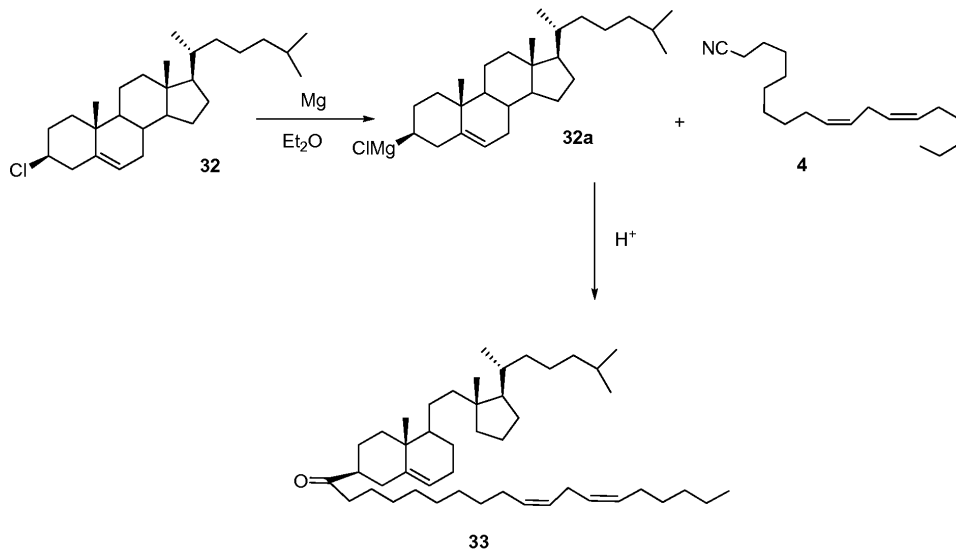
[0076]

[0077] 무수 50 ml 2NRB 플라스크에, 방금 활성화시킨 Mg 터닝 (266 mg, 0.0109 몰)을 가하고 플라스크에 자기 교반 막대와 환류 콘덴서를 장착시킨다. 상기 셋업을 탈기시키고, 질소로 플리칭하여 주사기를 통하여 무수 에테르 10 ml를 상기 플라스크에 가한다. 브로마이드 (2.43 g, 0.0109 몰)을 무수 에테르 (7 ml)에 용해시켜 주사기를 통하여 상기 플라스크에 점적 첨가한다. 발열반응이 관찰되며 (디브로모에탄으로 개시된 반응) 에테르를 환류시키기 시작한다. 첨가 완료 후, 반응 혼합물을 35 °C에서 1시간 동안 보관한 다음 얼음 용기중에서 10 내지 15 °C로 냉각시킨다. 시아나이드 (1 g, 0.0036 몰)를 무수 에테르 (7 ml)에 용해시키고 교반하면서 상기 반응물에 점적 첨가한다. 발열 반응이 관측되고 반응 혼합물을 2시간 동안 주위 온도에서 교반시킨다. THF (4 ml)를 반응 혼합물에 가하고 이를 시아노 유도체가 완전히 소모될 때까지 45 내지 50 °C로 4시간 동안 가온시킨다. 아세톤 3 ml, 이어서 빙냉수를 가하여 반응을 중단시킨다. 용액이 균질해지고 층이 분리될 때까지 반응 혼합물을 25% HCl 용액으로 처리한다. 수상을 에테르로 추출한다. 에테르층을 합하여 건조시키고 농축시키면 정제안된 생성물이 수득되고 이를 컬럼 크로마토그래피로 정제한다. 순수 생성물 분취를 증발시켜 무색 오일로서 순수한 케톤을 수득한다.(수율 :0.93g(61%))

[0078] ¹H-NMR (δ ppm): 5.37-5.302 (m, 4H), 2.77 - 2.74 (t, 2H), 2.38 - 2.34 (t, 4H), 2.05-2.00 (m, 4H), 1.55 - 1.52 (m, 2H), 1.35 - 1.24 (m, 34H), 0.89 - 0.84 (m 6H). IR (cm⁻¹): 3009, 2925, 2854, 1717 (C=O), 1465, 1376.

[0079] 실시예 6: 콜레스테롤을 갖는 비대칭 케톤 33의 합성

[0080] 도식 6

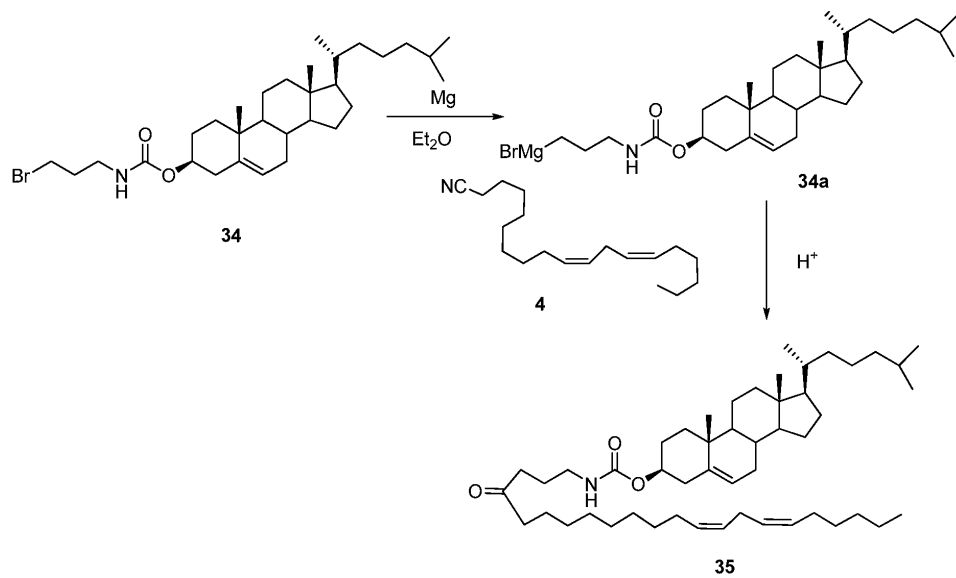


[0081]

[0082] 케톤 **31**의 합성에 사용된 것과 유사한 공정을 사용하여, 대응하는 염화마그네슘을 콜레스테릴 클로라이드로 전환시킨 다음 리놀레일 시아나이드에 가하여 케톤 **33**을 수득한다.

[0083] 실시예 7: 콜레스테롤을 갖는 비대칭 케톤 **35**의 합성

[0084] 도식 7

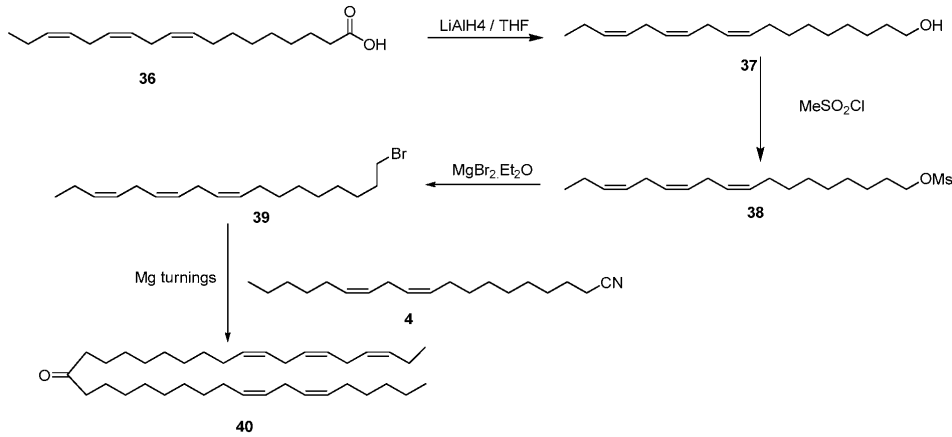


[0085]

[0086] 콜레스테롤클로로포르메이트를 3-브로모프로필아민으로 처리하면 브로마이드 **34**가 수득되고 이는 대응하는 그리나드 시약 **34a**로 전환되어 리놀레일 시아나이드로 처리시 대응하는 비대칭 케톤 **35**을 양호한 수율로 제공한다.

[0087] 실시예 8: 비대칭 케톤 **40**의 합성

[0088] 도식 8



[0089]

[0090] **화합물 37의 합성**

[0091]

LiAlH₄ (1.02 g, 0.0269 몰)을 함유하는 500 ml 2목 RBF에 무수 THF (20 ml)를 질소 대기하에 실온에서 가한다. 상기 현탁액을 1시간 동안 실온에서 교반시킨 다음 0 °C로 냉각시킨다. 상기 혼합물에 무수 THF (50 ml)중 화합물 1 (5 g, 0.01798 몰)의 용액을 내부 온도를 0 °C로 유지하면서 천천히 가한다. 첨가 완료 후, 반응 혼합물을 주위 온도로 가온시키고 1시간 동안 교반시킨다. 반응의 진행상황은 TLC로 모니터한다. 반응 완료시, 혼합물을 0 °C로 냉각시키고 Na₂SO₄ 포화수용액으로 중단시킨다. 반응 혼합물을 30분간 교반시키고 형성된 고체를 셀라이트대를 통하여 여과한 다음 에틸 아세테이트 (100 ml)로 세척한다. 여액과 세액을 합하고 회전 증발기상에서 증발시키면 무색 액체로서 화합물 37이 수득되며, 이는 다음 단계에서 정제하지 않고 사용된다. (수율 : 4.5g(95%))

[0092]

¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ = 5.39-5.28 (m, 6H), 3.64-3.61 (t, 2H), 2.81-2.78 (t, 4H), 2.10-2.01(m, 4H), 1.59-1.51 (m, 2H), 1.29-1.22 (m, 지방족 양자), 0.98-0.94 (t, 3H).

[0093]

화합물 38의 합성

[0094]

화합물 37 (14 g, 0.0530 몰)을 500 ml 2목 RBF 중 DCM (300 ml)에 용해시킨 다음, 0 °C로 냉각시킨다. 상기 용액에 불활성 대기하에서 트리에틸아민 (29.5 ml, 0.2121 몰)을 천천히 가한다. 이어서 반응 혼합물을 10 내지 15분간 교반시키고 여기에 메실 클로라이드 (6.17 ml, 0.0795 몰)를 천천히 가한다. 반응 완료 후, 반응 혼합물을 주위 온도로 가온시키고 20 시간 동안 교반시킨다. 반응은 TLC로 모니터한다. 완료시, 반응 혼합물을 물 (200 ml)로 희석하고 수분 동안 교반시키면 유기층이 분리된다. 유기상을 염수 (1 x 70 ml)로 추가로 세척하고, Na₂SO₄ 상에서 건조시켜 용매를 회전 증발기상에서 증발시키면 정제안된 화합물 38이 갈색 오일로 수득되며 이를 다음 단계에 사용한다. (수율 : 17g, 93%)

[0095]

¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ = 5.39-5.31 (m, 6H), 4.22-4.19 (t, 2H), 2.99 (s, 3H), 2.81-2.78 (m, 4H), 2.08-2.01 (m, 4H), 1.75.1.69 (m, 2H), 1.39-1.29 (m, 지방족 양자), 0.98-0.94 (t, 3H).

[0096]

화합물 39의 합성

[0097]

메실레이트 38 (10 g, 0.2923 몰)을 1000 ml 2목 RBF 중 무수 에테르(300 ml)에 용해시키고 질소 대기하에서 MgBr₂·Et₂O 복합체 (22.63 g, 0.0877 몰)을 가한다. 생성된 혼합물을 환류 온도로 26 시간 동안 가열한다. 반응 완료 후 (TLC로), 반응 혼합물을 에테르 (300 ml) 및 빙냉수 (200 ml)로 희석시키고 에테르 층을 분리시킨다. 이어서 유기층을 1% K₂CO₃ 수용액 (100 ml), 이어서 염수 (80 ml)로 세척한다. 유기상을 무수 Na₂SO₄상에서 건조시키고 용매를 진공하에서 증발 제거하면 정제안된 생성물이 수득되고 용리 시스템으로서 헥산 중 0 내지 1% 에틸 아세테이트를 사용하여 이를 실리카겔 (60 내지 120 메쉬)상에서 크로마토그래피하면 오일로

서 목적하는 화합물 39가 수득된다. 수율:(7g, 73 %) ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ = 5.39-5.31 (m, 6H), 3.41-3.37 (t, 2H), 2.81-2.78 (m, 4H), 2.08-2.02 (m, 4H), 1.86-1.80 (m, 2H), 1.42-1.29 (m, 지방족 양자), 0.98-0.94 (t, 3H).

[0098] **비대칭 케톤 40의 합성**

[0099] 자기 교반 막대 및 환류 콘덴서가 장착되어 있는, 화염 건조된 500 ml 2목 RBF에, 방금 활성화시킨 Mg 터닝 (0.88 g, 0.03636 몰)을 가한다. 상기 셋업을 탈기시키고, 아르그오로 플러싱하여 에테르 (150 ml)를 가한다. 에테르 50 ml 중 브로모 화합물 4 (11.89 g, 0.03636 몰) 몇방울을 초기에 가하여 반응을 개시한다 (각주: 촉매량의 1,2-디브로모 에탄을 또한 가하여 그리나드 시약 형성을 촉진한다). 개시되면, 브로모 화합물의 나머지 용액을 환류하는 에테르성 용액에 천천히 가한다. 첨가 완료 후, 반응 혼합물을 40 °C에서 1.5 시간 동안 환류시킨다. 이어서 10 °C로 냉각시키고 무수 에테르 30 ml중 리놀레일 클로라이드 4 (5 g, 0.01818 몰)을 점적 첨가한 다음, 생성된 혼합물을 40 °C에서 20 시간 동안 환류시키면서 가열한다. 반응의 진행은 TLC로 모니터한다. 시아노유도체 40가 완전히 소모된 후 (TLC로), 혼합물을 실온으로 냉각시키고 아세톤 30 ml, 이어서 빙수 (50 ml)로 중단시킨다. 상기 용액을 10% HCl 용액으로 추가로 산성화하면 에테르 층이 분리된다. 수상을 추가로 디에틸 에테르 (2 x 100 ml)로 추출한다. 용매를 제거하고 무수 Na₂SO₄ 상에서 건조시킨 후 정제안된 케톤을 수득하고 용리 시스템으로 헥산 중 0 내지 5% 에테르를 사용하여 이를 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 (100 내지 200 메쉬)로 정제하면 표제 화합물 40이 담황색 오일로 수득된다.

[0100] 수율: (4.8g, 50.5%) ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 5.38-5.28 (m, 10H), 2.80-2.74 (m, 6H), 2.38-2.34 (t, 4H), 2.08-2.00 (m, 8H), 1.55-1.52 (m, 4H), 1.35-1.26 (m, 지방족 양자), 0.98-0.94 (t, 3H), 0.89-0.85 (t, 3H). HPLC- 98.04%.

[0101] **실시예 9: 올리고뉴클레오티드 합성**

[0102] 모든 올리고뉴클레오티드는 AKTA 올리고파이프 합성기상에서 합성한다. 상업적으로 입수가 가능한 조절된 기공 유리 고체 지지체 (dT-CPG, 500 Å, Prime Synthesis) 및 표준 보호 그룹을 갖는 RNA 포스포르아미다이트, 5'-O-디메톡시트리틸 N6-벤조일-2'-t-부틸디메틸실릴-아데노신-3'-O-N,N'-디이소프로필-2-시아노에틸포스포르아미다이트, 5'-O-디메톡시트리틸-N4-아세틸-2'-t-부틸디메틸실릴-시티딘-3'-O-N,N'- 디이소프로필-2-시아노에틸포스포르아미다이트, 5'-O-디메톡시트리틸-N2-이소부틸-2'-t-부틸디메틸실릴-구아노신-3'-O-N,N'-디이소프로필-2-시아노에틸포스포르아미다이트, 및 5'-O-디메톡시트리틸-2'-t-부틸디메틸실릴-우리딘-3'-O-N,N'- 디이소프로필-2-시아노에틸포스포르아미다이트 (Pierce Nucleic Acids Technologies)를 올리고뉴클레오티드 합성에 사용한다. 2'-F 포스포르아미다이트, 5'-O-디메톡시트리틸-N4-아세틸-2'-플루오로-시티딘-3'-O-N,N'- 디이소프로필-2-시아노에틸-포스포르아미다이트는 Promega로부터 구입한다. 모든 포스포르아미다이트는 구아노신을 제외하고 아세토니트릴 (CH₃CN) 중 0.2M의 농도로 사용하고, 구아노신은 10% THF/ANC (v/v) 중 0.2M 농도로 사용한다. 커플링/재순환 시간은 16분을 사용한다. 활성화제는 5-에틸 티오테트라졸 (0.75M, American International Chemicals)이고, PO-산화의 경우 요오드/물/피리딘을 사용하며 PS-산화의 경우 2,6-루티딘/ACN (1:1 v/v) 중 PADS (2%)를 사용한다.

[0103] 3'-리간드 접합된 스트랜드는 대응하는 리간드를 함유하는 고체 지지체를 사용하여 합성한다. 예를 들어, 서열 중 콜레스테롤 유닛의 도입은 하이드록시프롤리놀-콜레스테롤 포스포르아미다이트로부터 수행된다. 콜레스테롤은 6-아미노헥사노에이트를 통하여 트랜스-4-하이드록시프롤리놀에 묶여 하이드록시프롤리놀-콜레스테롤 부위가 수득된다. 5'-말단 Cy-3 및 Cy-5.5 (형광단) 표지된 siRNAs는 대응하는 Quasar-570 (Cy-3)포스포르아미다이트로부터 합성하며 이는 Biosearch Technologies로부터 구입한다. 리간드를 5'-말단 및(또는) 내부 위치에 접합시키는 것은 적합하게 보호된 리간드-포스포르아미다이트 빌딩 블록을 사용하여 수행한다. 5-(에틸티오)-1H-테트라졸 활성화제의 존재하에서 무수 CH₃CN 중 포스포르아미다이트 0.1M 용액을 올리고뉴클레오티드가 결합되어 있는 상에 15분 간 커플링시킨다. 뉴클레오티드간 포스포이트가 포스페이트로 산화시키는 것은 보고된 바와 같은 표준 요오드-물을 사용하거나 3급-부틸 하이드로퍼옥사이드/아세토니트릴/물 (10:87:3)으로 처리함으로써 수행하고 10분의 산화 대기 시간이 경과되면 올리고뉴클레오티드가 접합된다. 포스포로티오에이트는 DDTT

(AM Chemicals로부터 구입), PADS 및(또는) Beaucage 시약과 같은 황 전달제를 사용함으로써 포스포이트를 포스포로티오에이트로 산화시킴으로써 도입된다. 콜레스테롤 포스포르아미다이트는 실내에서 합성하고, 디클로로메탄 중 0.1M의 농도로 사용한다. 콜레스테롤 포스포르아미다이트에 대한 커플링 시간은 16분이다.

[0104] 합성 완료 후, 지지체를 100 ml 유리병 (VWR)으로 옮긴다. 에탄올성 암모니아 혼합물 80 ml로 55 °C에서 6.5 시간 동안 염기와 포스포이트 그룹을 동시에 탈보호시켜 지지체로부터 올리고뉴클레오티드를 소거한다. 병을 빙상에서 잠깐 냉각시킨 다음 에탄올성 암모니아 혼합물을 새로운 250 ml 병에 여과하여 넣는다. CPG를 에탄올/물 (1:1 v/v) 2 x 40ml로 세척한다. 이후 혼합물의 용적을 회전 증발시켜 대략 30 ml로 감소시킨다. 이어서 혼합물을 드라이아이스상에서 동결시키고 진공하에 고속 증발기상에서 건조시킨다.

[0105] 건조된 잔사를 트리에틸아민, 트리에틸아민 트리하이드로플루오라이드 (TEA.2HF) 또는 피리딘-HF 및 DMSO (3:4:6) 26 ml에 재현탁시키고 60 °C에서 90분간 가열하여 2' 위치의 3급-부틸디메틸실릴 (TBDMS)을 제거한다. 이어서 20 mM 나트륨 아세테이트 50 ml로 반응을 중단시키고 pH를 6.5로 조정하여 정제할 때 까지 냉동고에 보관한다.

[0106] 상기 올리고뉴클레오티드를 정제 및 완충액을 선택하기 전에 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC)로 분석하고 컬럼은 서열 및(또는) 접합된 리간드의 특성에 따른다.

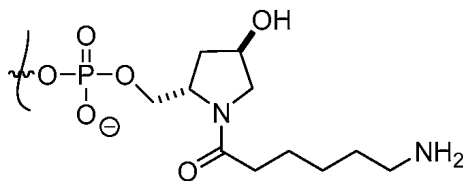
[0107] 리간드 접합된 올리고뉴클레오티드를 역상 분취용활용도 (peparative) HPLC로 정제한다. 비접합 올리고뉴클레오티드는 하우스에 포장된 TSK 겔 컬럼상에서 음이온-교환 HPLC로 정제한다. 완충액은 10% CH₃CN 중 20 mM 인산나트륨 (pH 8.5) (완충액 A) 및 10% CH₃CN, 1M NaBr 중 20 mM 인산나트륨 (pH 8.5) (완충액 B)이다. 완전한 길이의 올리고뉴클레오티드를 함유하는 분취를 모아, 탈염시키고 동결건조시킨다. 대략 0.15 OD의 탈염된 올리고뉴클레오티드를 물에 150 μl로 희석시킨 다음 CGE 및 LC/MS 분석용 바이알로 피펫팅한다. 화합물은 LC-ESMS 및 CGE로 최종적으로 분석한다.

[0108] siRNA 제조의 경우, 등물량의 센스 및 안티센스 스트랜드를 1xPBS 중에 95 °C에서 5분간 가열하고 실온이 될 때 까지 천천히 냉각시킨다. 듀플렉스의 집결도는 HPLC 분석으로 확인한다.

[0109] 표 7. Luc 및 FVII 표적화용 siRNA 듀플렉스

듀플렉스	센스/안티센스	서열 5'-3'	서열 번호:	표적
	1000/2434	CUU ACG CUG AGU ACU UCG AdTdT U*CG AAG fUAC UCA GCG fUAA GdT*dT		Luc
	2433/1001	C*UfU ACG CUG AGfU ACU UCG AdT*dT UCG AAG UAC UCA GCG UAA GdTT		Luc
	2433/2434	C*UfU ACG CUG AGfU ACU UCG AdT*dT U*CG AAG fUAC UCA GCG fUAA GdT*dT		Luc
	1000/1001	CUU ACG CUG AGU ACU UCG AdTdT UCG AAG UAC UCA GCG UAA GdTT		Luc
AD-1596		GGAUCAUCUCAAGUCUUAcdTdT GUAAGACUUGAGAUGAUCCdTdT		FVII
AD-1661		GGAfUfCAfUfCfUfCAAGfUfCfUfUafCdTsdT GfUAAGAfCfUfUGAGAfUGAfUfCfCdT*dT		FVII

[0110]



[0111] 각주: L8은 이고, 소문자는 2'-O-메틸 개질된 뉴클레오티드이며, *는 포스포로티오에이트 백본 결합이고, fN은 2'-플루오로 뉴클레오티드이며, dN은 2'-데옥시 뉴클레오티드이다.

[0112] 실시예 10: siRNA에 대한 혈청 안정성 검증

[0113] 초기 서열-기재 안정성 선택을 위한 매질 처리 검증법 (medium throughput assay)을 "스테인 올 (stains all)"

방식으로 수행한다. 검정을 수행하기 위하여, siRNA 듀플렉스를 90% 인간 혈청중 37 °C에서 배양시킨다. 반응 혼합물의 샘플을 다양한 시점에서 (0분, 15, 30, 60, 120 및 240분) 퀀칭 (quench)하여 전기영동 분석한다 (도면 1). 시간에 따른 RNA의 절단은 혈청 뉴클레아제 분해에 대한 siRNA 듀플렉스의 감수성에 관한 정보를 제공한다.

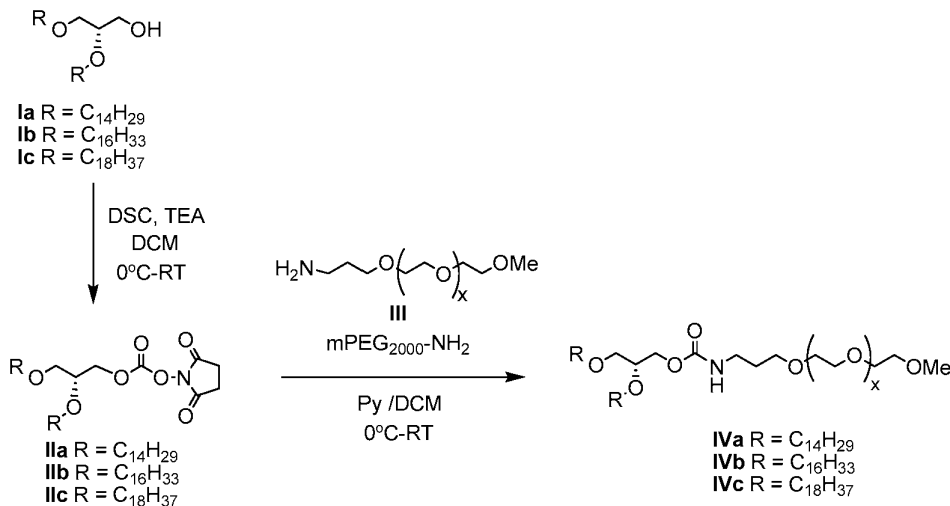
[0114] 방사성표지된 dsRNA 및 혈청 안정성 검정법을 사용하여 siRNA 절단에 대해 추가로 특징화한다. 먼저, siRNA 듀플렉스는 센스 또는 안티센스 스트랜드상의 ³²P로 5'말단-표지시킨다. 표지된 siRNA를 90% 인간 혈청과 함께 37 °C에서 배양시키고, 상기 용액의 샘플을 회수하여 증가되는 시점에서 퀀칭한다. 샘플은 전기영동법으로 분석한다.

[0115] **실시예 11: 양이온성 지질 유래된 리포솜을 사용한 FVII 생체내 평가**

[0116] **생체내 설치류 인자 VII 및 ApoB 침묵 실험**

[0117] C57BL/6 마우스 (Charles River Labs, MA) 및 Sprague-Dawley 쥐(Charles River Labs, MA)에게 꼬리 정맥 주사를 통하여 0.01 ml/g의 용량으로 염수 또는 siRNA를 목적하는 제형으로 투여한다. 투여 후 다양한 시점에서, 이소플루오란 흡입에 의해 동물을 마취시키고 레트로 오비탈 방혈법 (retro orbital bleed)으로 혈액을 혈청 분리기 튜브에 모은다. 염색체 검정법 (Coaster Factor Vii, DiaPharma Group, OH 또는 Biophen FVII, Aniara Corporation, OH)을 사용하여 제조업자의 프로토콜에 따라서 샘플 중 인자 VII 단백질의 혈청 농도를 측정한다. 염수 처리된 동물로부터 수집한 혈청을 사용하여 표준 곡선을 만든다. 간 mRNA 농도를 평가하는 실험에서는, 투여 후 다양한 시점에서, 동물을 희생시켜 간을 수거한 다음 액체 질소중에서 순간 동결시킨다. 동결된 간 조직을 분말이 되도록 분쇄한다. 조직 용해물을 제조하고 분지된 DNA 검정법 (QuantiGene Assay, Panomics, CA)을 사용하여 인자 VII 및 apoB의 간 mRNA 농도를 측정한다.

[0118] **실시예 12: 1,2-디-O-알킬-sn3-카보모일글리세라이드 (PEG-DMG)의 제조**



[0119]

[0120] **IVa의 제조**

[0121] 1,2-디-O-테트라데실-sn-글리세라이드 **Ia** (30 g, 61.80 밀리몰) 및 N,N'-숙신이미딜카보네이트 (DSC, 23.76 g, 1.5 당량)를 디클로로메탄 (DCM, 500 ml)에 흡수시켜 빙수 혼합물상에서 교반시킨다. 트리에틸아민 (TEA, 25.30 ml, 3 당량)을 상기 교반 용액에 가하고 이어서 반응 혼합물을 주위 온도에서 밤새 교반시킨다. 반응의 진행은 TLC로 모니터한다. 반응 혼합물을 DCM (400 ml)으로 희석하고 유기층을 물 (2x500 ml), NaHCO₃ 수용액 (500 ml)으로 세척한 다음 표준 후처리를 수행한다. 수득한 잔사를 높은 진공하에 주위 온도에서 밤새 건조시킨다. 건조 후, 상기 수득한 조 카보네이트 **IIa**를 디클로로메탄 (500 ml)에 용해시키고 얼음 용기상에서 교반시킨다. 상기 교반 용액에 mPEG₂₀₀₀-NH₂ (**III**, 103.00 g, 47.20 밀리몰, NOF Corporation, Japan)로부터 구입)

및 무수 피리딘 (Py, 80 ml, 과량)을 아르곤하에서 가한다. 이어서 반응 혼합물을 주위 온도에서 밤새 교반시킨다. 용매와 휘발물질을 진공하에서 제거하고 잔사를 DCM (200 ml)에 용해시켜 에틸 아세테이트층에 패킹된 실리카겔의 컬럼 상에 충전한다. 컬럼은 먼저 에틸 아세테이트로 용리시키고 이어서 디클로로메탄중 5 내지 10% 구배의 메탄올로 용리시켜 백색 고체로서 목적하는 PEG-지질 **IVa**를 수득한다 (105.30 g, 83%).

[0122] $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) = 5.20-5.12(m, 1H), 4.18-4.01(m, 2H), 3.80-3.70(m, 2H), 3.70-3.20(m, -O-CH₂-CH₂-O-, PEG-CH₂), 2.10-2.01(m, 2H), 1.70-1.60 (m, 2H), 1.56-1.45(m, 4H), 1.31-1.15(m, 48H), 0.84(t, J= 6.5Hz, 6H). MS range found: 2660-2836.

[0123] **IVb의 제조**

[0124] 1,2-디-0-헥사데실-*sn*-글리세라이드 **Ib** (1.00 g, 1.848 밀리몰) 및 DSC (0.710 g, 1.5 당량)을 함께 디클로로메탄 (20 ml)에 흡수시키고 빙수 혼합물중에서 0 °C로 냉각시킨다. 트리에틸아민 (1.00 ml, 3 당량)을 가하고 반응물을 밤새 교반시킨다. 반응을 TLC로 추적하고, DCM으로 희석하여 물 (2회), NaHCO₃ 용액으로 세척한 다음 황산나트륨 상에서 건조시킨다. 용매를 감압하에서 제거하고 생성된 **Ib**의 잔사를 고진공하에서 밤새 유지시킨다. 상기 화합물은 추가 정제없이 다음 반응에 직접 사용된다. MPEG₂₀₀₀-NH₂ **III** (1.50 g, 0.687 밀리몰, NOF Corporation, Japan으로부터 구입) 및 **Ib** (0.702 g, 1.5 당량)을 디클로로메탄 (20 ml)에 아르곤하에서 용해시킨다. 반응물을 0 °C로 냉각시킨다. 피리딘 (1 ml, 과량)을 가하고 반응물을 밤새 교반시킨다. 반응은 TLC로 모니터한다. 용매와 휘발물질을 진공하에서 제거하고 잔사를 크로마토그래피 (먼저 에틸 아세테이트, 이어서 구배 용리로서 5 내지 10% MeOH/DCM)로 정제하여 백색 고체로서 목적하는 화합물 **IVb**를 수득한다 (1.46 g, 76%).

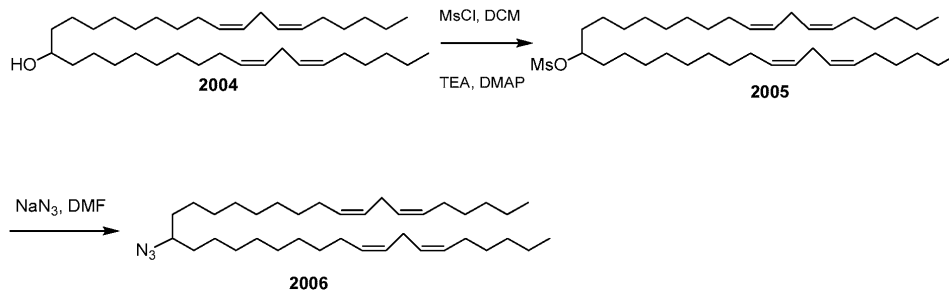
[0125] $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ = 5.17(t, J= 5.5Hz, 1H), 4.13(dd, J= 4.00Hz, 11.00 Hz, 1H), 4.05(dd, J= 5.00Hz, 11.00 Hz, 1H), 3.82-3.75(m, 2H), 3.70-3.20(m, -O-CH₂-CH₂-O-, PEG-CH₂), 2.05-1.90(m, 2H), 1.80-1.70 (m, 2H), 1.61-1.45(m, 6H), 1.35-1.17(m, 56H), 0.85(t, J= 6.5Hz, 6H). MS range found: 2716-2892.

[0126] **IVc의 제조**

[0127] 1,2-디-0-옥타데실-*sn*-글리세라이드 **Ic** (4.00 g, 6.70 밀리몰) 및 DSC (2.58 g, 1.5 당량)을 함께 디클로로메탄 (60 ml)에 흡수시키고 빙수 혼합물중에서 0 °C로 냉각시킨다. 트리에틸아민 (2.75 ml, 3 당량)을 가하고 반응물을 밤새 교반시킨다. 반응을 TLC로 추적하고, DCM으로 희석하여 물 (2회), NaHCO₃ 용액으로 세척한 다음 황산나트륨 상에서 건조시킨다. 용매를 감압하에서 제거하고 잔사를 고진공하에서 밤새 유지시킨다. 상기 화합물은 추가 정제없이 다음 반응에 직접 사용된다. MPEG₂₀₀₀-NH₂ **III** (1.50 g, 0.687 밀리몰, NOF Corporation, Japan으로부터 구입) 및 **Ic** (0.760 g, 1.5 당량)을 디클로로메탄 (20 ml)에 아르곤하에서 용해시킨다. 반응물을 0 °C로 냉각시킨다. 피리딘 (1 ml, 과량)을 가하고 반응물을 밤새 교반시킨다. 반응은 TLC로 모니터한다. 용매와 휘발물질을 진공하에서 제거하고 잔사를 크로마토그래피 (에틸 아세테이트, 이어서 구배 용리로서 5 내지 10% MeOH/DCM)로 정제하여 백색 고체로서 목적하는 화합물 **IVc**를 수득한다 (0.92 g, 48%).

[0128] $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ = 5.22-5.15(m, 1H), 4.16(dd, J= 4.00Hz, 11.00 Hz, 1H), 4.06(dd, J= 5.00Hz, 11.00 Hz, 1H), 3.81-3.75(m, 2H), 3.70-3.20(m, -O-CH₂-CH₂-O-, PEG-CH₂), 1.80-1.70 (m, 2H), 1.60-1.48(m, 4H), 1.31-1.15(m, 64H), 0.85(t, J= 6.5Hz, 6H). MS range found: 2774-2948.

[0129] 실시예 13:



[0130]

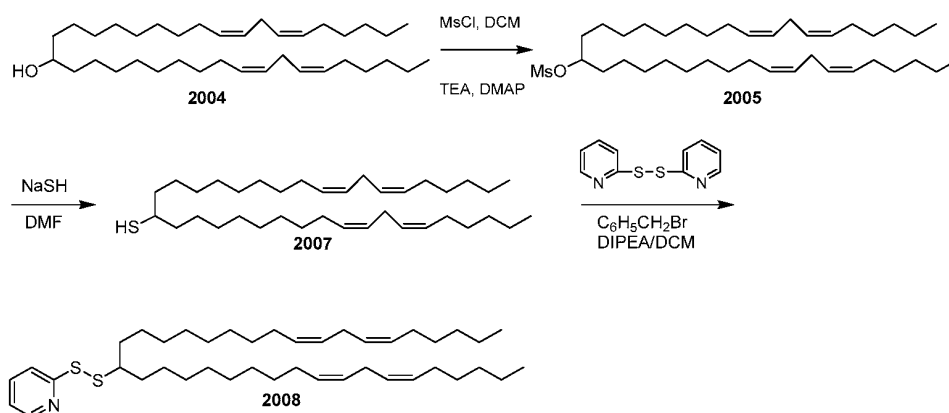
[0131] 2005의 합성: DCM (400 ml)중 2004 (50 g, 95 밀리몰)의 용액에 Ar 대기하에서 TEA (53 ml, 378 밀리몰) 및 DMAP (1.2 g, 9.5 밀리몰)을 가하고 실온에 Ar 대기하에서 교반시킨다. 반응물을 -5 °C로 냉각시키고 DCM (100 ml)중 메실 클로라이드 (15 ml, 190 밀리몰)의 용액을 5 °C 이하의 온도에서 천천히 가한 후 RT로 가온시킨다. 유기층이 분리되며, 1N HCl (30 ml), 물, 염수로 세척하고 황산나트륨 상에서 건조시킨 다음 감압하에서 증발시키면 황색 액체로서 순수한 생성물 (55 g, 95.5%)이 수득된다.

[0132] $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): d 0.89 (t, 6H, J = 6.8), 1.2-1.5 (m, 36H), 1.67 (m, 4H), 2.05 (q, 8H, J1 = 6.8, J2 = 6.8), 2.77 (t, 4H, J = 6.4), 2.99 (s, 3H), 4.71(m, 1H) and 5.36 (m, 8H).

[0133] 2006의 합성: DCM (500 ml)중 2005 (50 g, 82 밀리몰)의 용액에 아르곤 대기하에서 NaN_3 (27 g, 410 밀리몰)을 가하고 70 °C로 가열한 다음 상기 온도를 4 시간 동안 유지시킨다 (TLC). 혼합물을 물로 희석하고 에틸 아세테이트 (3x250 ml)로 추출한다. 유기층을 물, 염수로 세척하고 Na_2SO_4 상에서 건조시킨 다음 감압하에서 증발시키면 정제안된 생성물이 수득되고, 이를 용리제로서 헥산/에테르를 사용하여 시릴카겔 크로마토그래피로 정제한다. 생성물은 2% 에테르 헥산에서 용리되어 담황색 액체로서 2006 (36 g, 86%)이 수득된다.

[0134] $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): d 0.90 (t, 8H), 1.30 (m, 36H), 1.49 (t, 4H, J = 6.4 Hz) 2.04 (q, 8H, J1 = 7.6, J2 = 14Hz), 2.77 (t, 4H, J = 6.4 Hz), 3.22 (m, 1H), 5.34 (m, 8H). $^{13}\text{C NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): d 14.1, 22.5, 25.6, 26.1, 27.2, 29.2, 29.3, 29.45, 29.65, 31.5, 34.1, 63.1, 127.9, and 130.1. IR (KBr): 2098.

[0135] 실시예 14:



[0136]

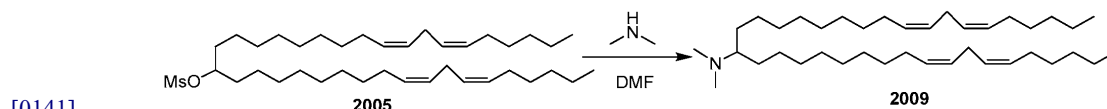
[0137] 2007의 합성: 디메틸포름아미드 (500 ml)중 2005 (76 g, 125 밀리몰)의 용액에 실온에서 황산수소나트륨 수화물 (35 g, 625 밀리몰)을 가한다. 반응 혼합물을 70 °C로 2시간 동안 가열한다 (TLC). 이어서 실온으로 냉각시키고 물 (7V)로 희석하고 에테르 (3x5V)로 추출한다. 에테르층을 합하여 물 (2x3V), 염수 용액 (2x3V)로 세척하고 황산나트륨 상에서 건조시킨 다음 감압하에서 증발시켜 정제안된 생성물을 수득하는데, 이는 용리제로서 헥

산을 사용하여 실리카겔 크로마토그래피로 정제하여 생성물 2007을 수득한다 (43.6 g, 64%). MS: C₃₇H₆₈S에 대해 계산된 분자량: 544.50, 실측치: 545.51 (M+H).

[0138] 2008의 합성: 디클로로메탄 (400 ml)중 알드리티올 (20.3 g, 92 밀리몰)의 용액에 벤질 브로마이드 (11 ml, 92 밀리몰)을 0 °C에서 가한다. 0 °C에서 15분간 교반시킨 후, 실온으로 가온시키고 15분간 교반시킨다. 반응 혼합물을 다시 0 °C로 냉각시키고 디클로로메탄 (100 ml)중 2007 (50 g, 92 밀리몰)의 용액, 이어서 디이소프로필 에틸아민 (16 ml, 92 밀리몰)을 가한다. 첨가 후, 환류 온도로 2시간 동안 가열한다 (TLC). 이어서 디클로로메탄 (10V)으로 희석한 다음, 물 (2x10V), 염수 용액 (2x10V)로 세척하고 황산나트륨 상에서 건조시킨 다음 감압하에서 증발시켜 정제안된 생성물을 수득하는데, 이는 3% 에테르/헥산을 사용하여 실리카겔 크로마토그래피로 정제하여 담황색 액체로서 순수한 생성물(35g, 58%)을 수득한다.

[0139] ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0.89 (t, 6H, J₁ = 6.4Hz, J₂ = 7.2Hz), 1.25-1.42 (m, 38H), 1.56-1.63 (m, 2H), 2.05 (q, 8H, J₁ = 6.4Hz, J₂ = 14Hz), 2.78 (t, 5H, J₁ = 6.4Hz, J₂ = 6Hz), 5.30-5.42 (m, 8H), 7.06 (t, 1H, J₁ = 5.2Hz, J₂ = 6.8Hz), 7.62 (t, 1H, J₁ = 7.6Hz, J₂ = 7.6Hz), 7.76 (d, 1H, J = 8Hz), 8.42 (d, 1H, J = 4.4Hz). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): d 22.6, 25.6, 26.7, 27.2, 29.2, 29.3, 29.5, 29.6, 31.5, 33.74, 52.9, 119.9, 120.4, 127.9, 128, 130.1, 130.2, 136.7, 149.3, 161.5. MS: C₄₂H₇₁NS₂ 계산된 분자량 653.50, 실측치: 654.49(M+H).

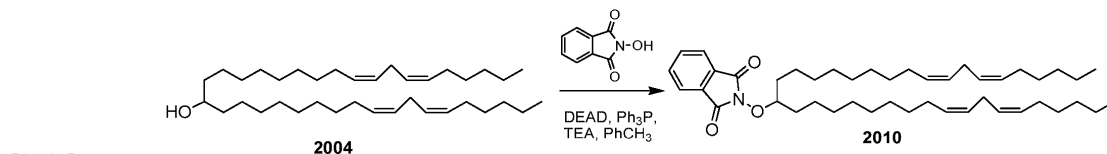
[0140] 실시예 15:



[0142] 2009 (ALNY-138)의 합성: DMF 및 디메틸아민중 2005 (5 g, 8 밀리몰)의 용액 - 40% 수용액을 밀봉된 관에 넣는다. 반응 혼합물을 90 °C에서 20 시간 동안 가열한다 (TLC). 이어서 실온으로 냉각시키고, 물에 부은 다음 에틸 아세테이트 (3x50 ml)로 추출한다. 유기층을 물과 염수로 세척하고, Na₂SO₄ 상에서 건조시킨 다음 증발시켜 담갈색 액체로서 순수한 생성물을 수득한다 (2.00 g, 45%).

[0143] ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0.89 (t, 6H, j = 6.8), 1.2-1.4 (m, 40H), 2.05 (q, 8H, J₁ = 6.8Hz, J₂ = 6.8 Hz), 2.2 (s, 6H), 2.77 (t, 4H, j = 6.4 Hz), 5.35 (m, 8H). ¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 14.1, 22.5, 22.6, 27.1, 27.2, 29.3, 29.5, 29.57, 29.63, 29.67, 30.0, 31.5, 32.5, 40.5, 64.0, 127.9 and 130.1 MS: C₃₉H₇₃N 계산된 분자량 555.57, 실측치: 556.55(M+H).

[0144] 실시예 16:

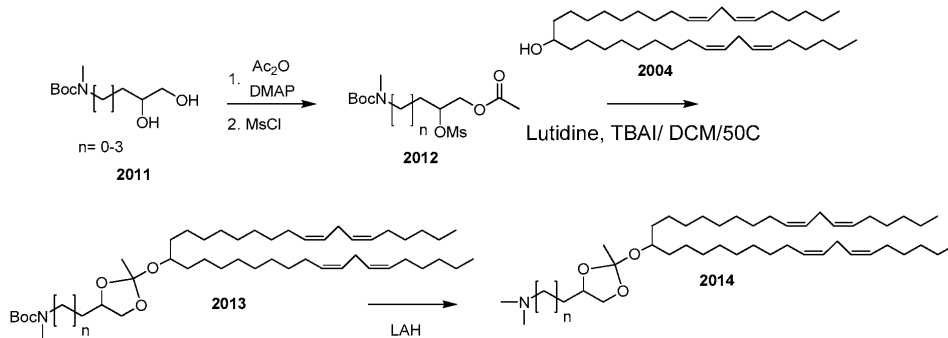


[0146] 2010의 합성: 톨루엔 중 2004 (30 g, 56.8 밀리몰)의 용액에, N-하이드록시프탈이미드 (13.9 g, 85 밀리몰) 및 TPP (22.30 g, 85 밀리몰)을 아르곤하에서 가한다. 반응물을 -5 °C로 냉각시키고, 여기에 TEA (11.84 ml), 이어서 DEAD (13.14 ml)를 가한다. 반응물을 실온에서 12 시간 동안 교반시킨다 (TLC). 이어서 셀라이트 대를

통하여 여과한다. 여액을 감압하에서 증발시켜 정제안된 생성물을 수득하고, 이를 실리카겔 크로마토그래피로 정제한 다음, 3% 디에틸 에테르와 헥산으로 용리시키면 담황색 액체로서 생성물 2010이 수득된다 (22.90 g, 60.50%).

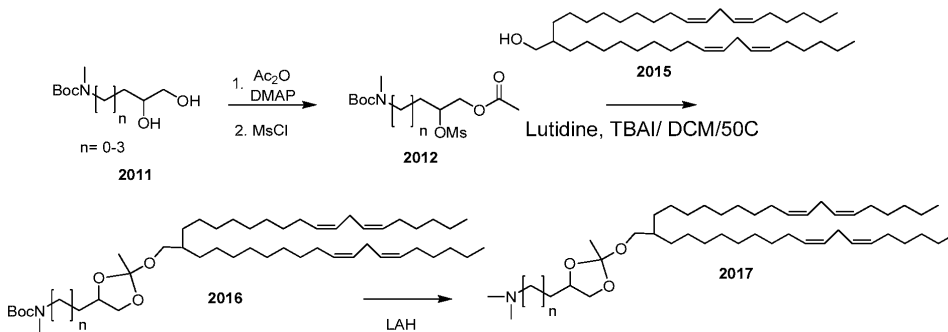
[0147] liquid ¹HNMR (400MHz, CDCl₃): δ 0.90 (6H, t, J = 7.2Hz), 1.2-1.4 (34H, m), 1.66-1.70 (4H, m), 2.03-2.08 (8H, m), 2.78 (4H, t, J = 12.8Hz), 4.22 (1H, m), 5.29-5.43 (8H, m), 7.74-7.76 (2H, m), 7.83-7.85 (2H, m). ¹³CNMR (100MHz, CDCl₃): d 14.3, 22.5, 24.9, 25.6, 27.2, 27.20, 29.3, 29.3, 29.5, 29.5, 29.6, 29.7, 31.5, 32.4, 88.3, 123.3, 127.9, 129.0, 130.1, 134.3, 164.3. MS: C₄₅H₇₁NO₃ 계산된 분자량 673.54, 실측치: 674.55(M+H).

[0148] 실시예 17:



[0149]

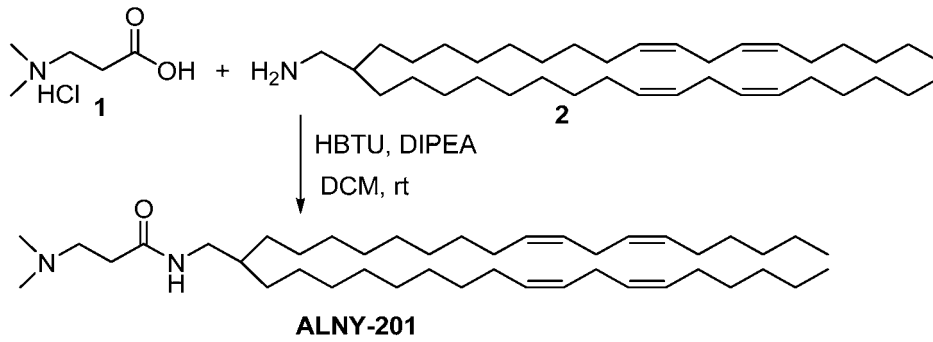
[0150] 실시예 18:



[0151]

[0152] 실시예 19: 3-(디메틸아미노)-N-((11Z, 14Z)-2-((9Z, 12Z)-옥타데카-9, 12-디에닐)이코사-11, 14-디에닐)프로판아미드 (ALNY-201)의 합성

[0153] 도식 1



[0154]

[0155] DCM중 N,N-디메틸아미노프로피온산 염산염 (**1**, 0.198 g, 1.3 밀리몰, 1.0 당량)의 교반된 현탁액에 HBTU (0.59 g, 1.56 밀리몰, 1.2 당량)와 DIPEA (0.71 ml, 3.9 밀리몰, 3.0 당량)을 실온에서 가한다. 10분간 교반시킨 후, DCM중 아민 (**2**, 0.7 g, 1.3 밀리몰, 1.0 당량)의 용액을 실온에서 점적 첨가하고 반응이 완결될 때까지 계속 교반시킨다. 반응 혼합물을 DCM으로 희석하고, NaHCO₃ 포화 용액, 이어서 염수로 세척한 다음, 유기층을 분리하고 MgSO₄상에서 건조시켜 농축시키고 용리제로서 DCM:MeOH (5%)를 사용하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 순수한 오일성 화합물 **3**을 70% 수율로 수득한다.

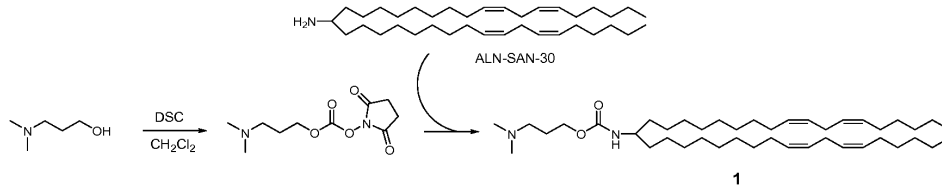
[0156] ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.18 (brs, 1H), 5.47 - 5.19 (m, 8H), 3.18 - 3.07 (m, 4H), 2.76 (t, J = 6.5, 4H), 2.70 (s, 6H), 2.60 (t, J = 6.0, 2H), 2.04 (q, J = 6.8, 9H), 1.48 (brs, 1H), 1.40 - 1.14 (m, 43H), 0.88 (t, J = 6.8, 6H). Calc. mass for the C₄₃H₈₀N₂O: 640.6, found 641.5.

[0157] 신규한 디리놀레일 유도체의 합성

No	화합물	이름
1		ALNY-192
2		ALNY-200
3		ALNY-175
4		ALNY-187
5		ALNY-149
6		ALNY-202

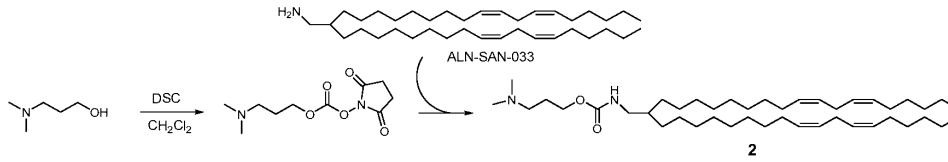
[0158]

[0159] 화합물 1



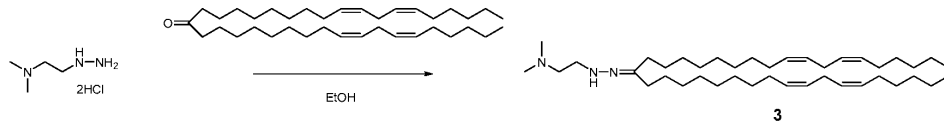
[0160]

[0161] 화합물 2



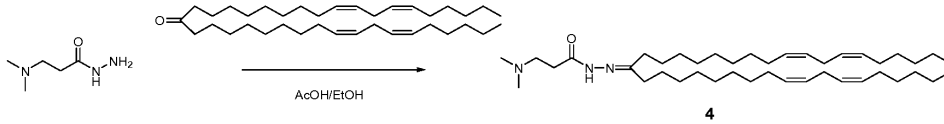
[0162]

[0163] 화합물 3



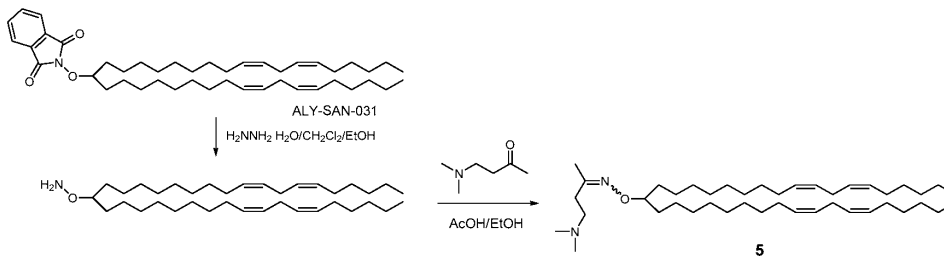
[0164]

[0165] 화합물 4



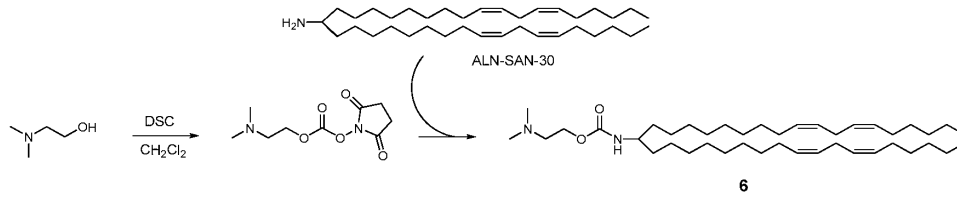
[0166]

[0167] 화합물 5



[0168]

[0169] **화합물 6**



[0170]

[0171] **실험 세부사항**

[0172] **화합물 1 (ALNY-192)**

[0173] CH_2Cl_2 (200 ml) 중 N,N'-디숙신이미딜 카보네이트 (5.50 g, 21.5 밀리몰)의 용액에 3-디메틸아미노-1-프로판올 (2.43 g, 23.6 밀리몰)을 점적 첨가한다. 생성된 혼합물을 실온에서 밤새 교반시킨다. 상기 용액 50 ml를 취하여, Et_3N (0.822 ml, 5.90 밀리몰) 및 ALN-SAN-30 (2.08 g, 3.93 밀리몰)을 가하고 실온에서 밤새 교반시킨다. 반응 혼합물을 CH_2Cl_2 로 희석하고 NaHCO_3 포화 수용액으로 세척한다. 유기층을 무수 MgSO_4 상에서 건조시키고, 여과하여 농축시킨다. 정제안된 생성물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 (CH_2Cl_2 중 0 내지 5% MeOH)로 정제하여 화합물 1을 수득한다(1.66g, 2.53밀리몰, 64% Rf=0.25 CH_2Cl_2 중 5% MeOH에 대해).

[0174] ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 5.30-5.41 (m, 8 H), 4.37 (d, $J = 8.0$ Hz, 1 H), 4.09 (t, $J = 6.0$ Hz, 2 H), 3.57 (brs, 1 H), 2.78 (t, $J = 6.0$ Hz, 4 H), 2.33 (t, $J = 8.0$ Hz, 2 H), 2.23 (s, 6 H), 2.02-2.06 (m, 8 H), 1.76-1.80 (m, 2 H), 1.27-1.45 (m, 40 H), 0.89 (t, $J = 8.0$ Hz, 6 H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 156.5, 130.4, 130.3, 128.2, 128.1, 63.2, 56.6, 51.4, 45.7, 35.7, 31.7, 29.9, 29.8, 29.7, 29.6, 29.5, 27.7, 27.5, 27.4, 26.0, 25.8, 22.8, 14.3. $\text{C}_{43}\text{H}_{81}\text{N}_2\text{O}_2$ (M+H) $^+$ 계산된 분자량 657.63, 실측치 657.5.

[0175] **화합물 2 (ALNY-200)**

[0176] CH_2Cl_2 (200 ml) 중 N,N'-디숙신이미딜 카보네이트 (5.50 g, 21.5 밀리몰)의 용액에 3-디메틸아미노-1-프로판올 (2.43 g, 23.6 밀리몰)을 점적 첨가한다. 생성된 혼합물을 실온에서 밤새 교반시킨다. 상기 용액 50 ml를 취하여, Et_3N (0.697 ml, 5.00 밀리몰) 및 ALN-SAN-033 (1.71 g, 3.15 밀리몰)을 가하고 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반시킨다. 반응 혼합물을 CH_2Cl_2 로 희석하고 NaHCO_3 포화 수용액으로 세척한다. 유기층을 무수 MgSO_4 상에서 건조시키고, 여과하여 농축시킨다. 정제안된 생성물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 (CH_2Cl_2 중 0 내지 5% MeOH)로 정제하여 화합물 2을 수득한다 (1.14 g, 1.70 밀리몰, 54%, $R_f = 0.13$, CH_2Cl_2 중 0 내지 5% MeOH에 대해). $\text{C}_{44}\text{H}_{83}\text{N}_2\text{O}_2$ (M+H) $^+$ 에 대한 분자량 계산치: 671.65, 실측치:671.5.

[0177] **화합물 3 (ALNY-175)**

[0178] EtOH (50 ml)를 함유하는 플라스크에, 디메틸아미노에틸 하이드라진 디하이드로클로라이드 (1.00 g, 5.70 밀리몰) 및 ALNY-SAN-003 (2.00 g, 3.80 밀리몰)을 가한다. 혼합물을 60 °C에서 16시간 동안 가열한다. Et_3N (0.5 ml)을 가한 후, 반응 혼합물을 증발시킨다. 잔사를 Et_2O 및 NaHCO_3 포화 수용액으로 추출하여 유기층을 MgSO_4 상에서 건조시키고, 여과하여 농축시킨다. 정제안된 생성물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 (CH_2Cl_2 :MeOH: NH_3 수용액 = 95:5:0.5, $R_f = 0.29$)로 정제하여 화합물 3을 수득한다 (1.78 g, 2.91 밀리몰, 76%). $\text{C}_{41}\text{H}_{78}\text{N}_3$ (M+H) $^+$ 에 대한 분자량 계산치: 612.62, 실측치:612.5.

[0179] 화합물 4 (ALNY-187)

[0180] EtOH (10 ml) 중 3-디메틸아미노-프로피온산 하이드라지드 (Ryan Scientific, 500 mg, 3.89 밀리몰) 및 EtOH (20 ml) 중 디리놀레일 케톤 (1.74 g, 3.31 밀리몰)을 함께 혼합한다. 상기 용액에 아세트산 (0.038 ml, 0.662 밀리몰)을 가하고, 반응 혼합물을 65 °C로 5 시간 동안 가열한다. Et₃N (0.5 ml)을 가한 후, 반응 혼합물을 증발시킨다. 잔사를 CH₂Cl₂ 및 NaHCO₃ 포화 수용액으로 추출하고, 유기층을 MgSO₄ 상에서 건조시키고, 여과하여 농축시킨다. 정제안된 생성물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 (CH₂Cl₂:MeOH:NH₃ 수용액 = 95:5:0.5, R_f = 0.30)로 정제하여 화합물 4를 수득한다 (1.40 g, 2.19 밀리몰, 66%). C₄₂H₇₈N₃O(M+H)⁺에 대한 분자량 계산치: 640.61, 실측치:640.5.

[0181] 화합물 5 (ALNY-149)

[0182] ALY-SAN-031 (2.36 g, 3.50 밀리몰)을 CH₂Cl₂ (36 ml) 및 EtOH (4 ml) 중 하이드라진 일수화물 (0.424 ml, 5.60 밀리몰)로 2시간 동안 처리한다. 생성된 백색 침전물을 여과한 후, 여액을 농축시킨다. 잔사를 Et₂O 및 NaHCO₃ 포화 수용액으로 추출하고, 유기층을 MgSO₄ 상에서 건조시키고, 여과하여 농축시킨다. 정제안된 생성물은 추가 정제없이 다음 단계에 사용한다. R_f 0.44 (헥산 중 10% EtOAc). C₃₇H₇₀NO(M+H)⁺에 대한 분자량 계산치: 544.55, 실측치:544.2.

[0183] 상기 아미노옥시 화합물을 EtOH (30 ml)에 용해시키고, 4-(디메틸아미노)부탄-2-온 (Matrix Scientific, 500 mg, 4.34 밀리몰) 및 아세트산 (0.040 ml, 0.70 밀리몰)을 상기 용액에 가한다. 반응 혼합물을 실온에서 14 시간 동안 교반시킨다. Et₃N (0.5 ml)을 가한 후, 반응 혼합물을 증발시킨다. 잔사를 Et₂O 및 NaHCO₃ 포화 수용액으로 추출하고, 유기층을 MgSO₄ 상에서 건조시키고, 여과하여 농축시킨다. 정제안된 생성물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 (헥산:EtOAc = 1:1)로 정제하여 화합물 5를 E/Z-이성체의 혼합물로 수득한다 (1.90 g, 2.96 밀리몰, 85%, 2단계, R_f = 0.39, 0.21, 헥산:EtOAc = 1:1로 전개). C₄₃H₈₁N₂O (M+H)⁺에 대한 분자량 계산치: 641.63, 실측치:641.5.

[0184] 화합물 6 (ALNY-202)

[0185] CH₂Cl₂ (200 ml) 중 N,N'-디숙신이미딜 카보네이트 (5.50 g, 21.5 밀리몰)의 용액에 3-디메틸아미노-1-프로판올 (2.37 ml, 23.6 밀리몰)을 점적 첨가한다. 생성된 혼합물을 실온에서 밤새 교반시킨다. 상기 용액 50 ml를 취하여, Et₃N (0.822 ml, 5.90 밀리몰) 및 ALN-SAN-30 (2.07 g, 3.93 밀리몰)을 가하고 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반시킨다. 반응 혼합물을 CH₂Cl₂로 희석하고 NaHCO₃ 포화 수용액으로 세척한다. 유기층을 무수 MgSO₄ 상에서 건조시키고, 여과하여 농축시킨다. 정제안된 생성물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 (CH₂Cl₂ 중 0 내지 5% MeOH)로 정제하여 화합물 6을 수득한다 C₄₂H₇₉N₂O₂(M+H)⁺에 대한 분자량 계산치: 643.61, 실측치:643.5.

[0186] 본 발명의 화합물은 하기 문헌에 기재된 방법으로 또한 합성할 수 있으며, 이들 문헌은 전문 본 명세서에서 참고로 인용된다:

[0187] 1. Schlueter, Urs; Lu, Jun; Fraser-Reid, Bert. Synthetic Approaches To Heavily Lipidated Phosphoglyceroinositides. Organic Letters (2003), 5(3), 255-257

[0188] 2. King, J.F.; Allbutt, A.D. Can. J. Chem. 1970, 48, 1754-1769

[0189] 3. Mach, Maeusz; Schlueter, Urs; Mathew, Felix; Fraser-Reid, Bert; Hazen, Kevin C. Comparing n-pentenyl orthoesters and n-pentenil glycosides as alternative glycosyl donors. Tetrahedron (2002), 58(36), 7345-7354.

[0190] 실시예 20: 생체내 설치류 인자 VII 침묵침묵사용하여 여러 가지 양이온성 지질을 함유하는 지질 입자 제제의 효과 측정

[0191] 응고 캐스케이드 (coagulation cascade)에서 우세한 단백질인 인자 VII (FVII)는 간 (간세포)에서 합성되어 혈장으로 분비된다. 혈장 중 FVII의 농도는 단순한, 플레이트-기재 색도계 검정법으로 측정할 수 있다. 그러한 바와 같이, FVII는 간세포-유래 단백질의 sirna-매개 다운조절을 측정하는데 뿐만 아니라, 핵산 지질 입자 및 siRNA의 혈장 농도와 조직 분포를 모니터하는데 있어 편리한 모델이다.

Duplex	서열 5'-3'	서열 번호 NO:	Target
AD-1661	GGAfUfCAfUfCfUfCAAGfUfCfUfUfUfCdTsdT		FVII
	GfUAAGAfCfUfUGAGAfUGAfUfCfCdTsdT		

[0192]

[0193] 소문자는 2'OMe 개질이고 Nf는 2'F 개질된 핵산염기이며, dT는 데옥시티미딘이고, s는 포스포티오에이트이다.

[0194] 다음 양이온성 지질을 시험한다:

화합물	화합물 구조	분자 데이터
A		C ₄₂ H ₇₇ N ₃ O Mol Wt: 640.08
B		C ₄₂ H ₇₈ N ₂ O ₂ Mol Wt: 643.08
C		C ₄₁ H ₇₇ NS ₂ Mol Wt: 648.19
D		C ₄₁ H ₇₇ N ₃ Mol Wt: 612.07
E		C ₄₃ H ₈₀ N ₂ O ₂ Mol Wt: 657.11
F		C ₄₃ H ₈₀ N ₂ O ₂ Mol Wt: 657.11
G		C ₄₄ H ₈₂ N ₂ O ₂ Mol Wt: 671.134
H		C ₄₃ H ₈₀ N ₂ O Mol Wt: 641.108
I		C ₄₃ H ₈₀ N ₂ O Mol Wt: 641.11
J		C ₄₂ H ₇₈ N ₂ O ₂ Mol Wt: 643.081
K		C ₄₃ H ₈₀ N ₂ O ₂ Mol Wt: 657.107

[0195]

[0196] 상기 나타낸 양이온성 지질을 사용하여 미국 가출원 제61/228,373호에 기재된 바와 같은, 인-라인 혼합법을 사

용하는 AD-1661 듀플렉스를 함유하는 리포좀의 제형화에 사용할 수 있다. 지질 입자는 다음과 같은 몰비를 사용하여 제형화한다: 50% 양이온성 지질/10% 디스테아로일포스파티딜콜린 (DSPC)/38.5% 콜레스테롤/1.5% PEG-DMG (1-(모노메톡시-폴리에틸렌글리콜)-2,3-디미리스토일글리세롤, PEG 평균 분자량은 2000임).

[0197] C57BL/6 마우스 (Charles River Labs, MA)에게 꼬리 정맥 주사를 통하여 염수 또는 제형화된 siRNA를 투여한다. 투여 후 다양한 시점에서, 레트로오비탈 방혈법으로 혈청 샘플을 수집한다. 인자 VII 단백질의 혈청 농도는 색소생산 분석법 (Biophen FVII, Aniera Corporation, OH)을 이용하여 측정한다. 인자 VII의 간 mRNA 농도를 측정하기 위해서는, 동물을 희생시키고 간을 수거하여 액체 질소에서 snap 동결시킨다. 조직 용해물을 상기 동결된 조직으로부터 제조하고 인자 VII의 간 mRNA 농도를 분지된 DNA 검정법 (QuantiGene Assay, Panomics, CA)을 사용하여 정량화한다.

[0198] FVII 활성은 C57BL/6 마우스에 정맥내 (볼러스) 주사 후 48시간 경과 후 FVII siRNA-처리된 동물에서 평가한다. FVII는 상업적으로 입수가능한 혈청 또는 조직중 단백질 농도 측정용 키트를 사용하여, 제조업자의 지침에 따라서 마이크로플레이트 스케일로 측정한다. FVII 감소는 비처리 대조용 마우스에 대해 측정하고, 결과는 잔류 FVII%로 표시한다. 각각의 신규 리포좀 조성물을 스크리닝하는데 있어서 2개의 투여량 수준 (0.05 및 0.005 mg/kg FVII siRNA)을 사용한다. 도 3은 상이한 양이온성 지질을 함유하는 지질 입자를 0.05 또는 0.005 mg/kg 투여한 동물에서의 상대적인 FVII 단백질 농도를 설명하는 그래프이다.

[0199] **실시예 21: 미리 형성시킨 소낭을 사용한 siRNA 제형화**

[0200] 양이온성 지질 함유 입자를 미리 형성시킨 소낭법을 사용하여 제조한다. 양이온성 지질, DSPC, 콜레스테롤 및 PEG-지질을 에탄올에 각각 40/10/40/10의 몰비로 용해시킨다. 상기 지질 혼합물을 혼합하면서 수성 완충액 (50 mM 시트레이트, pH 4)에 가하여 최종 에탄올과 지질의 농도가 각각 30% (v/v) 및 6.1 mg/ml가 되도록 한 다음 용리시키기 전에 실온에서 평형화시킨다. 수화된 지질을 2단 80 nm 기공-크기의 필터 (Nuclepore)를 통하여 22 °C에서 Lipex Extruder (Northern Lipids, Vancouver, BC)를 사용하여 Nicomp 분석법으로 측정된 소낭 직경이 70 내지 90 nm가 될 때까지 용리시킨다. 이는 일반적으로 1 내지 3회전이 요구된다. 작은 소낭을 형성하지 않는 일부 양이온성 지질 혼합물의 경우 더 낮은 pH의 완충액 (50 mM 시트레이트, pH 3)으로 지질 혼합물을 수화시키면 DSPC 헤드그룹상의 포스페이트 그룹을 양자화시켜 안정한 70 내지 90 nm 소낭을 형성하는데 도움이 된다.

[0201] FVII siRNA (30% 에탄올을 함유하는 50 nM 시트레이트, pH 4 수용액에 용해시킨 것)를 35 °C로 미리-평형시킨 상기 소낭에 혼합하면서 대략 5 ml/분의 속도로 가한다. 0.06 (wt/wt)의 최종 표적 siRNA/지질의 비에 도달한 후, 혼합물을 추가로 30분간 35 °C에서 배양하여, 소낭이 재-조직화되고 FVII siRNA가 캡슐화되도록 한다. 이어서 에탄올을 제거하고 투석 또는 탄젠트 플로우 정용여과법 (tangential flow diafiltration)으로 외부 완충액을 PBS (155 mM NaCl, 3 mM Na2HPO4, 1 mM KH2PO4, pH 7.5)로 대체한다. 비캡슐화 siRNA를 크기-배제 스피린 컬럼 또는 이온 교환 스피린 컬럼을 사용하여 제거한 후 최종 캡슐화된 siRNA-대-지질 비를 측정한다.

[0202] **실시예 22: 신규 지질 제제의 효과의 생체내 측정**

[0203] 암컷 7 내지 9 주령, 15 내지 25 g인 C57B1/6 마우스에서 녹다운된 (knockdown) FVII에 대해 0.1, 0.3, 1.0 및 5.0 mg/kg로 처리 그룹 당 3마리의 마우스에 대해 시험 제제를 먼저 평가한다. 모든 임상에는 인산염-완충된 염수 (PBS, 대조군) 또는 벤치마크 제제를 공급하는 동물이 포함된다. 시험 직전에 제제를 적합한 농도로 PBS에 희석시킨다. 마우스의 체중을 측정하고 적합한 투여 용약을 계산한다 (10 µl/체중 g). 시험 및 벤치마크 제제 뿐만 아니라 PBS (대조용 동물용)를 측면 꼬리 정맥을 통하여 정맥내로 투여한다. 24시간 경과 후 케타민/자일라진을 복강내 주사하여 동물을 마취시키고 심장 천공에 의해 혈액 500 내지 700 µl를 혈청 분리용 시험관 (BD Microtainer)에 수집한다. 혈액을 2,000 x g에서 10분간 15 °C에서 원심분리시키고 혈청을 수집하여 분석 시까지 -70 °C에서 보관한다. 혈청 샘플을 37 °C에서 30분간 해동시켜, PBS에 희석하고 96개-웰 검정용 플레이트로 분취한다. 색소생산 검정법 (Biophen FVII kit, Hyphen BioMed)을 사용하여 제조업자의 지침에 따라서 인자 FVII 농도를 평가하고 405 nm 파장 필터가 장착되어 있는 마이크로플레이트 판독기에서 흡광도를 측정한다. 혈장 FVII 수준을 정량화하고 대조용 동물로부터 수집한 혈청 샘플로부터 생성된 표준 곡선을 사용하여 ED50s (대조용 동물과 비교하여 혈장 FVII 수준을 50% 감소시키는 투여량)을 계산한다. 높은 수준의 FVII 녹다운 (ED50 << 0.1 mg/kg)을 나타내는 당해 제제는 독립적인 연구로 더 낮은 투여량 범위에서 다시 시험하여 강도를

확인하고 ED50을 확립한다.

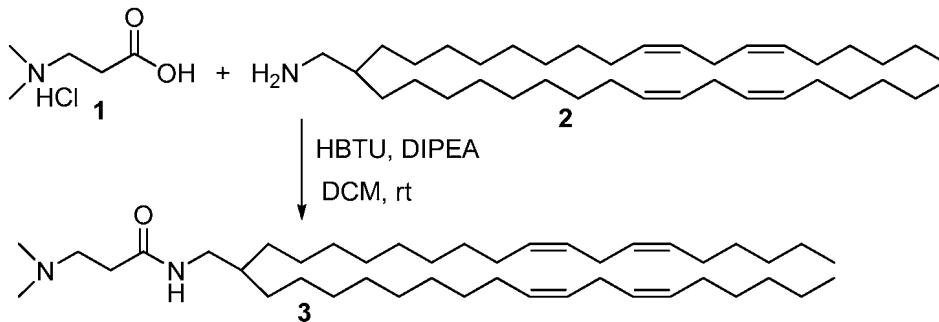
[0204] 도 4는 상기 방법을 사용하여 시험한 화합물의 EC50을 나타내는 표를 제공한다.

[0205] **실시예 22A: 제형화된 지질의 pKa 측정**

[0206] 여러 가지 이온화 양이온성 지질의 pKa는 필수적으로 문헌 (Eastman et al 1992 Biochemistry 31:4262-4268)에 기재된 바와 같이 형광 프로브 2-(p-톨루이디노)-6-나프탈렌술폰산 (TNS)를 사용하여 측정하는데, TNS는 수중에서는 비-형광성이지만 막에 결합시 분명하게 형광성이 된다. 양이온성 지질/DSPC/CH/PEG-c-DOMG (40:10:40:10 몰비)로 이루어진 소낭을 2 내지 11 범위의, 다양한 pH의 완충액 (130 mM NaCl, 10 mM CH₃COONH₄, 10 mM HEPE S)에 0.1 mM로 희석시킨다. TNS 수용액 분취량 (1 μM 최종)을 상기 희석시킨 소낭에 가하고 30초이 기간 경과 후, TNS-함유 용액의 형광을 각각 321 nm 및 445 nm의 여기 및 방출 파장에서 측정한다. 양이온성 지질-함유 소낭의 pKa는 상기 용액의 pH에 대해 측정된 형광을 플로팅하고 시판되는 그래프 프로그램 IgorPro를 사용하여 Sigmodial 곡선에 데이터를 적용시켜 측정한다.

[0207] 도 4는 상기 방법을 사용하여 시험한 화합물의 pKa를 나타낸 표를 제공한다.

[0208] **실시예 23: 아마이드 결합된 지질의 합성**



[0209]

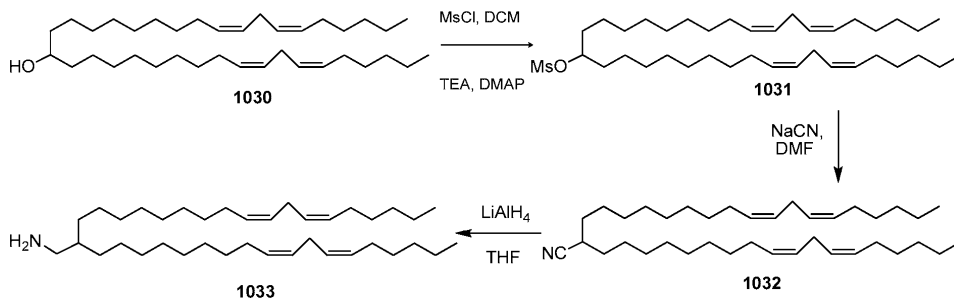
[0210] DCM중 N,N-디메틸아미노 프로피온산 염산염 (1, 0.198 g, 1.3 밀리몰, 1.0 당량)의 교반시킨 현탁액에 HBTU (0.59 g, 1.56 밀리몰, 1.2 당량) 및 DIPEA (0.71 ml, 3.9 밀리몰, 3.0 당량)을 실온에서 가한다. 10분간 교반시킨 후, DCM중 아민 (2, 0.7 g, 1.3 밀리몰, 1.0 당량)의 용액을 실온에서 점적 첨가하고 반응이 완결될 때까지 계속 교반시킨다. 반응 혼합물을 DCM으로 희석시키고, NaHCO₃ 포화 용액, 이어서 염수로 세척한 다음, 유기층을 분리하고 MgSO₄상에서 건조시켜 농축시키고 용리제로서 DCM:MeOH (5%)를 사용하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 순수한 오일성 화합물 3 (ALNY-201)을 70% 수율로 수득한다.

[0211] ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.18 (brs, 1H), 5.47 - 5.19 (m, 8H), 3.18 - 3.07 (m, 4H), 2.76 (t, J = 6.5, 4H), 2.70 (s, 6H), 2.60 (t, J = 6.0, 2H), 2.04 (q, J = 6.8, 9H), 1.48 (brs, 1H), 1.40 - 1.14 (m, 43H), 0.88 (t, J = 6.8, 6H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 172.26, 130.41, 130.36, 128.17, 128.15, 77.54, 77.22, 76.90, 55.70, 43.85, 43.02, 37.90, 31.99, 31.74, 30.25, 29.92, 29.86, 29.81, 29.57, 27.47, 27.42, 26.84, 25.85, 22.79, 14.29. C₄₃H₈₀N₂O: 계산된 분자량 640.6, 실측치 641.5.

[0212] **실시예 24: 카바메이트 및 우레아 결합된 지질의 합성**

[0213] **화합물 1033**

[0214] 도식 1



[0215]

[0216] 단계-1:

S. No	화학물질/시약 및 용매	M. Wt.	Mol.	Eq.	Qty.
1	알코올 1030	528	0.095	1	50 g
2	DCM				500 ml
3	트리에틸아민 (TEA)	101.2	0.378	4	53 ml
4	DMAP	122.17	0.0095	0.1	1.2 g
5	메실 클로라이드	114.55	0.19	2	15 ml

[0217]

[0218]

DCM (400 ml)중 알코올 1030의 용액에 Ar 대기하에서 TEA 및 DMAP을 가하고 실온에 Ar 대기하에서 교반시킨다. 반응물을 -5 °C로 냉각시키고 DCM (100 ml)중 메실 클로라이드의 용액을 -5 °C 이하의 온도에서 천천히 가한 후 RT로 가온시킨다. 30분 후 (TLC), 반응물을 빙냉수 (20 ml)로 퀴칭시킨다. 유기층이 분리되며, 1N HCl (30 ml), 물, 염수로 세척하고 황산나트륨 상에서 건조시킨 다음 감압하에서 증발시키면 황색 액체로서 순수한 생성물 1031 (55 g, 수율: 95.5%)이 수득된다.

[0219]

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0.89 (t, 6H, J = 6.8Hz), 1.2-1.5 (m, 36H), 1.67 (m, 4H), 2.05 (q, 8H, J = 6.8Hz), 2.77 (t, 4H, J = 6.4Hz), 2.99 (s, 3H), 4.71(m, 1H) and 5.36 (m, 8H). ¹³CNMR (100 MHz, CDCl₃): δ 14.0, 22.5, 24.9, 25.6, 27.2, 29.2, 29.3, 29.4, 29.5, 29.6, 31.5, 34.4, 38.6, 45.9, 84.3, 127.9, 128.0, 130.0, 130.1.

[0220]

단계-2:

S. No	M. Wt.	Mol.	Eq.	Qty.	
1	메실레이트 1031	606	0.0165	1	10g
2	디메틸포름아미드 (DMF)				100 ml
3	나트륨 시아나이드	49	0.0330	2	1.617g

[0221]

[0222]

Ar 대기하에서 DMF중 나트륨 시아나이드의 용액에, DMF중 단계-1의 생성물을 천천히 가한 다음, 24시간 동안 55 °C로 가열한다 (HPLC). 이어서 실온으로 냉각시키고, 물로 희석하여 에틸 아세테이트로 추출한다 (수회). 유기층을 합하여 물, 염수로 세척하고, 황산나트륨 상에서 건조시킨 다음, 감압하에서 증발시키면 정제안된 생성물이 수득되고, 이를 용리제로서 1% 에테르/헥산을 사용하여 실리카겔 크로마토그래피로 정제하면 순수한 생성물 1032 (5.8 g, 수율:62%)가 담황색 액체로 수득된다.

[0223] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 0.87 (t, 6H, J = 6.8 Hz), 1.25 (m, 38H), 1.52 (m, 4H), 2.03 (q, 8H, J = 6.8Hz), 2.47(m, 1H), 2.76 (t, 4H, J = 6.4Hz), 5.32 (m, 8H).

[0224] 단계-3:

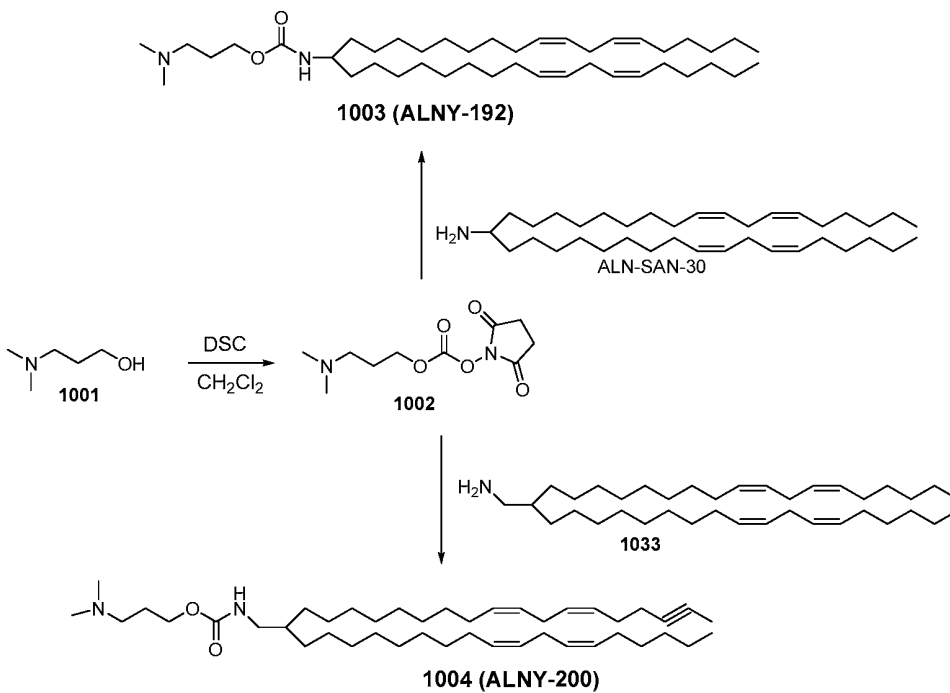
S. No	화학물질/시약 및 용매	M.Wt.	Mol.	Eq.	Qty.
1	니트릴 1032	538	0.0097	1	5.2g
2	리튬 알루미늄 수소화물	38	0.0387	4	1.5g
3	테트라하이드로퓨란 (THF)				52 ml

[0225]

[0226] 무수 THF중 리튬 알루미늄 수소화물의 현탁액에 Ar 대기하에서, THF중 단계-2의 생성물을 0 °C에서 점적 첨가한다. 이어서 실온 (RT)으로 가운시키고 RT에서 20시간 동안 교반시킨다 (TLC). 0 °C로 냉각시키고 황산나트륨 포화 용액으로 퀴칭시킨다. 퀴칭시킨 반응물을 셀라이트대를 통하여 여과하고 에틸 아세테이트로 세척한다. 여액을 합하여 감압하에서 증발시키면 정제안된 생성물이 수득되고, 이를 헥산중 10% 에틸 아세테이트를 사용하여 실리카겔 크로마토그래피로 정제하면 순수한 생성물 1033 (3.7 g, 수율: 71%)이 담갈색 액체로 수득된다. HPLC:93.8%

[0227] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 0.87 (t, 6H, J = 6.8 Hz), 1.27 (m, 48H), 2.03 (q, 8H, J = 6.8Hz), 2.60 (d, 2H, J = 4.0 Hz), 2.76 (t, 4H, J = 6.4Hz), 5.31 (m, 8H). ^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3): δ 14.1, 22.6, 25.6, 26.8, 27.1, 27.2, 29.3, 29.5, 29.6, 30.1, 31.5, 40.9, 45.2, 128.0, 130.1. LC-MS: 543(M+).

[0228] 도식 2



[0229]

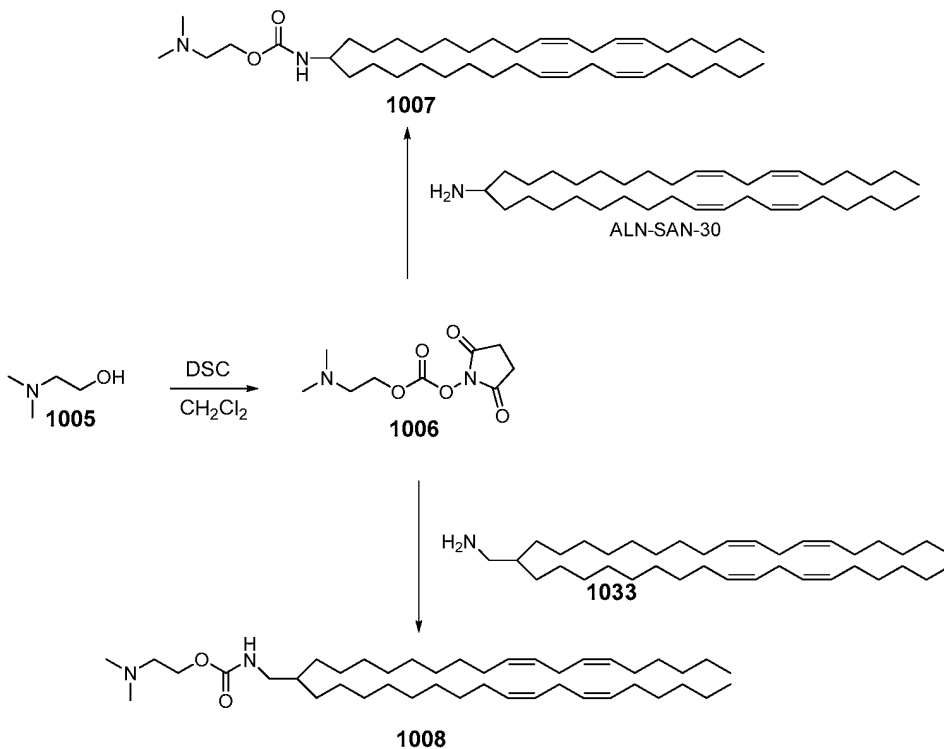
[0230] 화합물 1003 (ANLY-192)

[0231] CH_2Cl_2 (200 ml) 중 N,N'-디숙신이미딜 카보네이트 (5.50 g, 21.5 밀리몰)의 용액에 3-디메틸아미노-1-프로판올 (1001, 2.43 g, 23.6 밀리몰)을 점적 첨가한다. 생성된 혼합물을 실온에서 밤새 교반시킨다. 상기 용액 50 ml를 취하여, Et_3N (0.822 ml, 5.90 밀리몰) 및 ALN-SAN-30 (2.08 g, 3.93 밀리몰)을 가하고 실온에서 밤새 교반시킨다. 반응 혼합물을 CH_2Cl_2 로 희석하고 NaHCO_3 포화 수용액으로 세척한다. 유기층을 무수 MgSO_4 상에서 건조시키고, 여과하여 농축시킨다. 정제안된 생성물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 (CH_2Cl_2 중 0 내지 5% MeOH)로 정제하여 화합물 1003을 수득한다. (1.66g, 2.53 밀리몰, 64%, $R_f=0.22$ CH_2Cl_2 중 5% MeOH에 대해) ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 5.30-5.41 (m, 8 H), 4.37 (d, $J = 8.0$ Hz, 1 H), 4.09 (t, $J = 6.0$ Hz, 2 H), 3.57 (brs, 1 H), 2.78 (t, $J = 6.0$ Hz, 4 H), 2.33 (t, $J = 8.0$ Hz, 2 H), 2.23 (s, 6 H), 2.02-2.06 (m, 8 H), 1.76-1.80 (m, 2 H), 1.27-1.45 (m, 40 H), 0.89 (t, $J = 8.0$ Hz, 6 H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 156.5, 130.4, 130.3, 128.2, 128.1, 63.2, 56.6, 51.4, 45.7, 35.7, 31.7, 29.9, 29.8, 29.7, 29.6, 29.5, 27.7, 27.5, 27.4, 26.0, 25.8, 22.8, 14.3. $\text{C}_{43}\text{H}_{81}\text{N}_2\text{O}_2$ (M+H) $^+$ 계산된 분자량. 657.63, 실측치 657.5.

[0232] **화합물 1004 (ALNY-200)**

[0233] CH_2Cl_2 (200 ml) 중 N,N'-디숙신이미딜 카보네이트 (5.50 g, 21.5 밀리몰)의 용액에 3-디메틸아미노-1-프로판올 (1001, 2.43 g, 23.6 밀리몰)을 점적 첨가한다. 생성된 혼합물을 실온에서 밤새 교반시킨다. 상기 용액 50 ml를 취하여, Et_3N (0.697 ml, 5.00 밀리몰) 및 아민 1033 (1.71 g, 3.15 밀리몰)을 가하고 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반시킨다. 반응 혼합물을 CH_2Cl_2 로 희석하고 NaHCO_3 포화 수용액으로 세척한다. 유기층을 무수 MgSO_4 상에서 건조시키고, 여과하여 농축시킨다. 정제안된 생성물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 (CH_2Cl_2 중 0 내지 5% MeOH)로 정제하여 화합물 1004를 수득한다 (1.14 g, 1.70 밀리몰, 54%, $R_f = 0.13$, CH_2Cl_2 중 0 내지 5% MeOH에 대해). $\text{C}_{44}\text{H}_{83}\text{N}_2\text{O}_2$ (M+H) $^+$ 에 대한 분자량 계산치: 671.65, 실측치:671.5.

[0234] **도식 3**



[0235]

[0236] **화합물 1007**

[0237] CH_2Cl_2 (200 ml) 중 N,N'-디숙신이미딜 카보네이트 (5.50 g, 21.5 밀리몰)의 용액에 2-디메틸아미노에탄올 (1005, 2.37 ml, 23.6 밀리몰)을 점적 첨가한다. 생성된 혼합물을 실온에서 밤새 교반시킨다. 상기 용액 50 ml를 취하여, Et_3N (0.822 ml, 5.90 밀리몰) 및 ALN-SAN-30 (2.07 g, 3.92 밀리몰)을 가하고 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반시킨다. 반응 혼합물을 CH_2Cl_2 로 희석하고 NaHCO_3 포화 수용액으로 세척한다. 유기층을 무수 MgSO_4 상에서 건조시키고, 여과하여 농축시킨다. 정제안된 생성물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 (CH_2Cl_2 중 0 내지 5% MeOH)로 정제하여 화합물 1007를 수득한다 (1.78 g, 2.77 밀리몰, 71%, 2단계, $R_f = 0.26$, CH_2Cl_2 중 5% MeOH에 대해). $\text{C}_{42}\text{H}_{79}\text{N}_2\text{O}_2(\text{M}+\text{H})^+$ 에 대한 분자량 계산치: 643.61, 실측치:643.5.

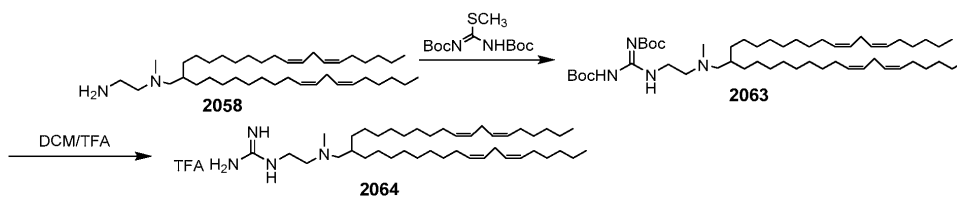
[0238] **화합물 1008**

[0239] CH_2Cl_2 (200 ml) 중 N,N'-디숙신이미딜 카보네이트 (5.50 g, 21.5 밀리몰)의 용액에 2-디메틸아미노에탄올 (1005, 2.37 ml, 23.6 밀리몰)을 점적 첨가한다. 생성된 혼합물을 실온에서 밤새 교반시킨다. 상기 용액 50 ml를 취하여, Et_3N (0.697 ml, 5.00 밀리몰) 및 아민 1033 (440 mg, 0.812 밀리몰)을 가하고 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반시킨다. 반응 혼합물을 CH_2Cl_2 로 희석하고 NaHCO_3 포화 수용액으로 세척한다. 유기층을 무수 MgSO_4 상에서 건조시키고, 여과하여 농축시킨다. 정제안된 생성물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 (CH_2Cl_2 중 0 내지 5% MeOH)로 정제하여 화합물 8을 수득한다 (332 mg, 0.505 밀리몰, 62%, $R_f = 0.30$, CH_2Cl_2 중 5% MeOH에 대해). $\text{C}_{43}\text{H}_{81}\text{N}_2\text{O}_2(\text{M}+\text{H})^+$ 에 대한 분자량 계산치: 657.63, 실측치:657.5.

[0240] **실시예 25: 구아니디늄 결합된 지질의 합성**

[0241] **구아니디늄 유사체**

[0242] **2064의 합성**



[0243]

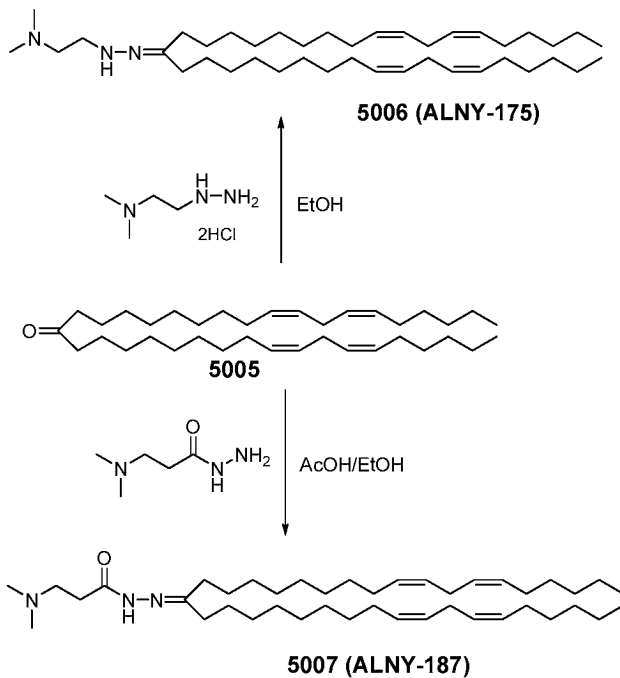
[0244] 2063의 합성: DMF/에틸 아세테이트 혼합물 중 2058 (6.7 g, 0.0112 몰)의 용액에 Bis-Boc-S-메틸이소티오우레아 (3.4 g, 0.0118 몰) 및 트리에틸아민 (3.5 ml, 0.246 몰)을 0 °C에 가한다. 상기 균질 용액에 HgCl_2 (3.3 g, 0.0123 몰)을 0 °C에서 가하고 RT에서 1 시간 동안 교반시킨다. TLC는 출발 물질의 부재를 나타낸다. 반응물을 에틸 아세테이트 (100 ml)로 희석한다. 셀라이트대를 통하여 여과하고 에틸 아세테이트로 세척한다. 여액을 수세척 (2 x 150 ml) 및 염수 (200 ml)로 세척한다. 흐릿한 유기층을 셀라이트/230-400 메쉬 실리카겔/셀라이트 대를 통하여 다시 여과한다. 여액을 감압하에서 증발시켜 정제안된 생성물을 수득하고, 이를 용리제로서 DCM/헥산을 사용하여 중성 알루미늄 크로마토그래피로 정제한다. 수득한 생성물을 헥산중 40% DCM에서 황색 액체로 용리된다 (5.2 g, 수율: 55%). ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): 0.89 (t, 6H, J=6.8Hz), 1.27 - 1.46 (m, 43H), 1.49 (s, 9H), 1.50(s,9H), 2.02 (q,8H, $J_1=6.8\text{Hz}$, $J_2=6.8\text{Hz}$), 2.12 (d, 2H, J=7.2Hz), 2.16 (s,3H), 2.46 (t, 2H, J = 5.6Hz), 2.77 (t, 4H, J=6Hz), 3.47 (m, 2H), 5.30(m, 8H), 8.67 (s,1H),11.48 (9s,1H).

[0245] **2064 (ALNY-139)**의 합성: DCM 10 ml 중 2063 (5.2 g, 0.0062 몰)의 용액에 0 °C에서, DCM 60 ml 중 TFA 10 ml를 천천히 가한다. 첨가후, 반응물을 RT에서 3시간 동안 교반시킨다. TLC는 출발 물질의 부재를 나타낸다. 과량의 TFA를 진공하에서 제거하여 갈색 점성 액체로서 목적하는 생성물을 수득한다 (5.3 g, 78%).

[0246] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): 0.89 (t, 6H, $J=6.8\text{Hz}$), 1.27 - 1.46 (m, 44H), 1.78 (s, 1H), 2.02 (q, 8H, $J_1=6.4\text{Hz}$, $J_2=6.8\text{Hz}$), 2.77 (t, 4H, $J=6.4\text{Hz}$), 2.86 (s, 3H), 2.92 - 3.01 (m, 2H), 3.27-3.39 (m, 2H), 3.76-3.9 (m, 2H), 5.30(m, 8H), 7.12 (m, 2H), 8.41(m, 1H), 10.02(m, 3H). ^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3): 14.0, 22.5, 25.6, 25.8, 26.0, 27.17, 27.19, 27.6, 29.3, 29.33, 29.5, 29.6, 31.0, 31.5, 33.9, 36.3, 41.0, 54.1, 55.2, 62.0, 62.19, 111.4, 114.3, 117.1, 119.9, 127.9, 127.95, 130.1, 130.2, 152.1, 155.0, 157.4, 161.2, 161.6, 161.96, 162.3. MS: 1093 (tetra TFA salt).

[0247] 실시예 26: 옥심- 및 하이드라존 결합된 지질의 합성

[0248] 도식 1



[0249]

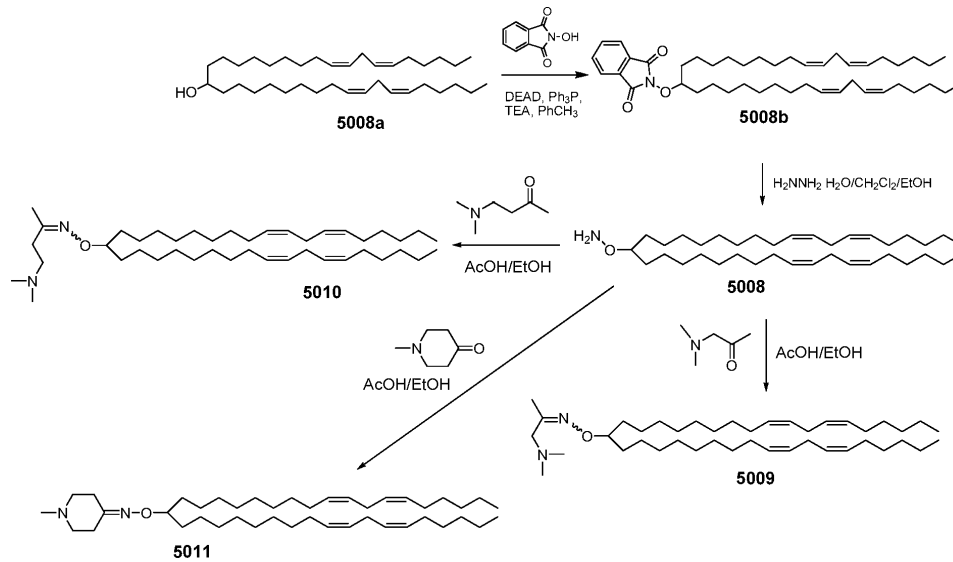
[0250] 실험 세부사항

[0251] **화합물 5006 (ALNY-175)**: EtOH (50 ml)를 함유하는 플라스크에, 디메틸아미노에틸 하이드라진 디하이드로클로라이드 (1.00 g, 5.70 밀리몰) 및 케톤 **5005** (2.00 g, 3.80 밀리몰)을 가한다. 혼합물을 60 °C에서 16시간 동안 가열한다. Et_3N (0.5 ml)을 가한 후, 반응 혼합물을 증발시킨다. 잔사를 Et_2O 및 NaHCO_3 포화 수용액으로 추출하여 유기층을 MgSO_4 상에서 건조시키고, 여과하여 농축시킨다. 정제안된 생성물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}:\text{NH}_3$ 수용액 = 95:5:0.5, $R_f = 0.29$)로 정제하여 화합물 3을 수득한다 (1.78 g, 2.91 밀리몰, 76%). $\text{C}_{41}\text{H}_{78}\text{N}_3(\text{M}+\text{H})^+$ 에 대한 분자량 계산치: 612.62, 실측치:612.5.

[0252] **화합물 5007 (ALNY-187)**: EtOH (10 ml) 중 3-디메틸아미노-프로피온산 하이드라지드 (Ryan Scientific, 500 mg, 3.89 밀리몰) 및 EtOH (20 ml) 중 디리놀레일 케톤 **5005** (1.74 g, 3.31 밀리몰)을 함께 혼합한다. 상기 용액에 아세트산 (0.038 ml, 0.662 밀리몰)을 가하고, 반응 혼합물을 65 °C로 5 시간 동안 가열한다. Et_3N

(0.5 ml)을 가한 후, 반응 혼합물을 증발시킨다. 잔사를 CH_2Cl_2 및 NaHCO_3 포화 수용액으로 추출하고, 유기층을 MgSO_4 상에서 건조시키고, 여과하여 농축시킨다. 정제안된 생성물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}:\text{NH}_3$ 수용액 = 95:5:0.5, $R_f = 0.30$)로 정제하여 화합물 **5007**을 수득한다 (1.40 g, 2.19 밀리몰, 66%). $\text{C}_{42}\text{H}_{78}\text{N}_3\text{O}(\text{M}+\text{H})^+$ 에 대한 분자량 계산치: 640.61, 실측치:640.5.

[0253] 도식 2



[0254]

[0255] **화합물 5008b**: 톨루엔중 **5008a** (30 g, 56.8 밀리몰)의 용액에 아르곤하에서 N-하이드록시프탈이미드 (13.9 g, 85 밀리몰) 및 TPP (22.30 g, 85 밀리몰)을 가한다. 반응물을 $-5\text{ }^\circ\text{C}$ 로 냉각시키고, 여기에 TEA (11.84 ml), 이어서 DEAD (13.14 ml)를 가한다. 반응물을 실온에서 12시간 동안 교반시킨다. 이어서 셀라이트대를 통하여 여과한다. 여액을 감압하에서 증발시켜 순수한 생성물을 수득하고, 이를 3% 디에틸 에테르 및 헥산에서 용리시키면 생성물 **5008b** (22.90 g, 60.50%)가 담황색 액체로 수득된다.

[0256] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 0.90 (6H, t, $J = 7.2\text{Hz}$), 1.2-1.4 (34H, m), 1.66-1.70 (4H, m), 2.03-2.08 (8H, m), 2.78 (4H, t, $J = 12.8\text{Hz}$), 4.22 (1H, m), 5.29-5.43 (8H, m), 7.74-7.76 (2H, m), 7.83-7.85 (2H, m). ^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3): d 14.3, 22.5, 24.9, 25.6, 27.2, 27.20, 29.3, 29.3, 29.5, 29.5, 29.6, 29.7, 31.5, 32.4, 88.3, 123.3, 127.9, 129.0, 130.1, 134.3, 164.3. MS: $\text{C}_{45}\text{H}_{71}\text{NO}_3$ 계산된 분자량 673.54, 실측치: 674.55(M+H).

[0257] **화합물 5010 (ALY-SAN-031)**: (2.36 g, 3.50 밀리몰)을 CH_2Cl_2 (36 ml) 및 EtOH (4 ml) 중에서 하이드라진 일수화물 (0.424 ml, 5.60 밀리몰)로 2 시간 동안 처리한다. 생성된 백색 침전물을 여과한 후, 여액을 농축시킨다. 잔사를 Et₂O 및 NaHCO_3 포화 수용액으로 추출하여 유기층을 MgSO_4 상에서 건조시키고, 여과하여 농축시킨다. 정제안된 생성물 **5008**은 추가 정제없이 다음 단계에 사용한다. R_f 0.44 (헥산 중 10% EtOAc). $\text{C}_{37}\text{H}_{70}\text{NO}(\text{M}+\text{H})^+$ 에 대한 분자량 계산치: 544.55, 실측치:544.2.

[0258] 상기 화합물 **5008**을 EtOH (30 ml)에 용해시키고, 4-(디메틸아미노)부탄-2-온 (Matrix Scientific, 500 mg, 4.34 밀리몰) 및 아세트산 (0.040 ml, 0.70 밀리몰)을 상기 용액에 가한다. 반응 혼합물을 실온에서 14 시간 동안 교반시킨다. Et₃N (0.5 ml)을 가한 후, 반응 혼합물을 증발시킨다. 잔사를 Et₂O 및 NaHCO_3 포화 수용액으로 추출하고, 유기층을 MgSO_4 상에서 건조시키고, 여과하여 농축시킨다. 정제안된 생성물을 실리카겔 컬럼 크로

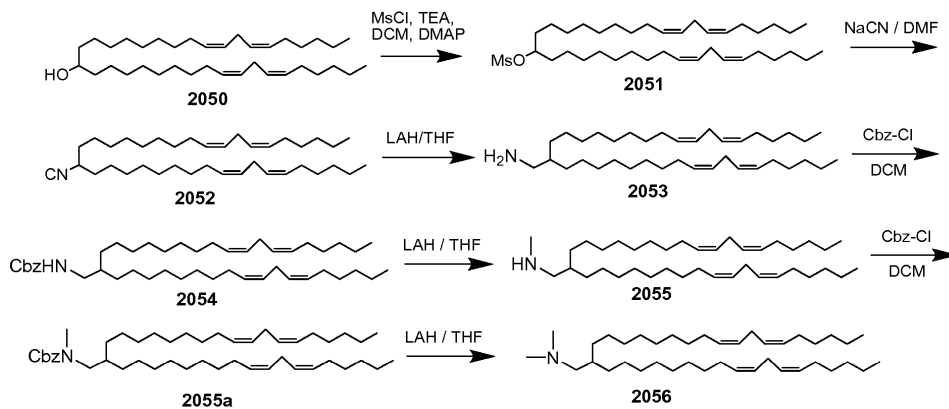
마토그래피 (헥산:EtOAc = 1:1)로 정제하여 화합물 5010를 E/Z-이성체의 혼합물로 수득한다 (1.90 g, 2.96 밀리몰, 85%, 2단계, $R_f = 0.39, 0.21$, 헥산:EtOAc = 1:1로 전개). $C_{43}H_{81}N_2O$ (M+H)⁺ 에 대한 분자량 계산치: 641.63, 실측치:641.5.

[0259] **화합물 5009:** 화합물 5006 (800 mg, 1.47 밀리몰)을 EtOH (15 ml)에 용해시키고, (디메틸아미노)아세톤 (Aldrich, 0.220 ml, 1.91 밀리몰) 및 아세트산 (0.017 ml, 0.294 밀리몰)을 상기 용액에 가한 다음 반응 혼합물을 실온에서 14 시간 동안 교반시킨다. Et₃N (0.5 ml)을 가한 후, 반응 혼합물을 증발시킨다. 잔사를 Et₂O 및 NaHCO₃ 포화 수용액으로 추출하고, 유기층을 MgSO₄ 상에서 건조시키고, 여과하여 농축시킨다. 정제안된 생성물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 (헥산:EtOAc = 9:1)로 정제하여 화합물 5009를 수득한다 (868 mg, 1.38 밀리몰, 94%, $R_f = 0.22$, 헥산:EtOAc = 9:1로 전개). $C_{42}H_{79}N_2O$ (M+H)⁺ 에 대한 분자량 계산치: 627.62, 실측치:627.5.

[0260] **화합물 5011:** 화합물 5006 (1.09 g, 2.00 밀리몰)을 EtOH (20 ml)에 용해시키고, 1-메틸-4-피페리돈 (Aldrich, 0.320 ml, 2.60 밀리몰) 및 아세트산 (0.40 ml, 0.400 밀리몰)을 상기 용액에 가한 다음 반응 혼합물을 실온에서 14 시간 동안 교반시킨다. Et₃N (0.5 ml)을 가한 후, 반응 혼합물을 증발시킨다. 잔사를 Et₂O 및 NaHCO₃ 포화 수용액으로 추출하고, 유기층을 MgSO₄ 상에서 건조시키고, 여과하여 농축시킨다. 정제안된 생성물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 (CH₂Cl₂:MeOH:NH₄OH = 97:3:0.3)로 정제하여 화합물 5011을 수득한다 (1.11 g, 1.74 밀리몰, 87%, , $R_f = 0.20$ CH₂Cl₂:MeOH:NH₄OH = 97:3:0.3로 전개). $C_{43}H_{79}N_2O$ (M+H)⁺에 대한 분자량 계산치: 639.62, 실측치:639.5.

[0261] **실시예 27: 다른 지질의 합성**

[0262] **화합물 2056 (ALNY-181)의 합성**



[0263]

[0264] **2051의 합성:** DCM (400 ml)중 2004 (50 g, 95 밀리몰)의 용액에 Ar 대기하에서 TEA (53 ml, 378 밀리몰) 및 DMAP (1.2 g, 9.5 밀리몰)을 가하고 실온에 Ar 대기하에서 교반시킨다. 반응물을 -5 °C로 냉각시키고 DCM (100 ml)중 메실 클로라이드 (15 ml, 190 밀리몰)의 용액을 -5 °C 이하의 온도에서 천천히 가한 후 RT로 가온시킨다. 30분 후 (TLC), 반응물을 빙냉수 (20 ml)로 쿼칭시킨다. 유기층이 분리되며, 1N HCl (30 ml), 물, 염수로 세척하고 황산나트륨 상에서 건조시킨 다음 감압하에서 증발시키면 황색 액체로서 순수한 생성물 (55 g, 수율: 95.5%)이 수득된다.

[0265] ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0.89 (t, 6H, J = 6.8), 1.2-1.5 (m, 36H), 1.67 (m, 4H), 2.05 (q, 8H, J₁ = 6.8, J₂ = 6.8), 2.77 (t, 4H, J = 6.4), 2.99 (s, 3H), 4.71(m, 1H) and 5.36 (m, 8H).

[0266] **2052의 합성:** DMF (100 ml) 중 나트륨 시아나이드 (1.70 g, 0.0330 몰)의 교반된 용액에, DMF (100 ml) 중 화

합물 2051 (10 g, 0.0165 몰)을 천천히 가한 다음, 24시간 동안 55 °C로 가열한다 (TLC). 이어서 실온으로 냉각시키고, 물로 희석하여 에틸 아세테이트로 수회 추출한다. 유기층을 합하여 물, 염수로 세척하고, 황산나트륨 상에서 건조시킨 다음, 감압하에서 증발시키면 정제안된 생성물이 수득되고, 이를 1% 에테르/헥산을 사용하여 실리카겔 크로마토그래피로 정제하면 생성물 (5.80 g, 62%)이 담황색 액체로 수득된다.

[0267] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 0.87 (t, 6H, J = 6.8 Hz), 1.25(m, 38H), 1.52 (m, 4H), 2.03 (q, 8H, J = 6.8Hz, J = 6.8Hz), 2.47 (m, 1H), 2.76 (t, 4H, J = 6.4Hz), 5.32 (m, 8H).

[0268] 2053의 합성: THF (52 ml) 중 LAH (1.50 g, 0.0387 몰)의 냉각된 현탁액에 0 °C, 아르곤 대기하에서, THF 중 화합물 2052 (5.2 g, 0.0097 몰)의 생성물을 점적 첨가한다. 이어서 RT로 가온시키고 20시간 동안 교반시킨다 (TLC). 0 °C로 냉각시키고 황산나트륨 포화 용액 (10 ml), 이어서 에틸 아세테이트로 퀴칭시킨다. 이를 셀라이트대를 통하여 여과하고 에틸 아세테이트로 세척한다. 여액을 합하여 감압하에서 증발시키면 정제안된 생성물이 수득되고, 이를 헥산중 10% 에틸 아세테이트를 사용하여 실리카겔 크로마토그래피로 정제하면 생성물 (3.70 g, 수율: 71%)이 담갈색 액체로 수득된다.

[0269] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 0.87(t, 6H, J=6.8 Hz), 1.27(m, 48H), 2.03(q, 8H, 6.8Hz, 6.8Hz), 2.60(d, 2H, J=4.0 Hz), 2.76(t, 4H, J=6.4Hz), 5.31(m, 8H). ^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3): δ 14.1, 22.6, 25.6, 26.8, 27.1, 27.2, 29.3, 29.5, 29.6, 30.1, 31.5, 40.9, 45.2, 128.0, 130.1. Mass 543 (M+).

[0270] 2054의 합성: DCM (450 ml)중 화합물 2053 (45 g, 0.083 몰)의 용액에 아르곤 대기하에, 0 °C에서 2,6-루티딘 (19.3 ml, 0.166 몰), 이어서 벤질 클로로포르메이트 (12.1 ml, 0.0847 몰)을 점적 첨가한다. 이어서 20 °C로 가온하고 이 온도에서 1시간 동안 교반시킨다 (TLC). 이어서 20 °C로 가온시켜 상기 온도에서 1시간 동안 교반시킨다 (TLC). 이어서 DCM (200 ml)으로 희석하고, 10% 시트르산 (2x200 ml), 물, 염수로 세척하고 무수 황산나트륨상에서 건조시킨 다음 감압하에서 증발시키면 정제안된 생성물이 수득되고, 이를 3% 에테르/헥산을 사용하여 실리카겔 크로마토그래피로 정제하면 담갈색 액체로 최종 생성물을 수득한다 (36 g, 64%).

[0271] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 0.87(t, 6H, J = 6Hz), 1.28 (m, 44H), 2.02(q, 8H, J₁ = 6.8Hz, J₂ = 6.8Hz), 2.76 (t, 4H, J = 6.4Hz), 3.11 (t, 2H, J = 5.6Hz), 4.67 (s, 1H), 5.18 (s, 2H), 5.30 (m, 8H), 7.31(m, 4H).

[0272] 2055의 합성: THF (360 ml) 중 리튬 알루미늄 수소화물 (4.05 g, 0.1066 몰)의 현탁액에 0 °C, 아르곤 대기하에서, THF 중 화합물 2054 (36 g, 0.0533 몰)의 용액을 점적 첨가한다. 첨가 후, 실온으로 가온시키고 15시간 동안 교반시킨다 (TLC). 0 °C로 냉각시키고 황산나트륨 포화 용액 (10 ml), 이어서 에틸 아세테이트로 퀴칭시킨다. 이를 셀라이트대를 통하여 여과하고 에틸 아세테이트로 세척한다. 여액을 합하여 감압하에서 증발시키고 100% 메탄올을 사용하여 실리카겔로 정제하면 최종 생성물 26 g (87%)이 수득된다.

[0273] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 0.87 (t, 6H, J = 6.8Hz), 1.27 (m, 42H), 2.03 (q, 8H, J₁ = 6.8Hz, J₂ = 6.8Hz), 2.45 (s, 3H), 2.49 (d, 2H, J = 6Hz), 2.76 (t, 4H, J = 6.4Hz), 5.30 (m, 8H).

[0274] 2055a의 합성: 화합물 2055 (4 g, 0.0072 몰)을 DCM (40 ml)에 아르곤 대기하에서 용해시키고 0 °C로 냉각시킨다. 상기 용액에 2,6-루티딘 (1.7 ml, 0.0144 몰)을 점적 첨가한 다음 벤질 클로로포르메이트 (1.0 ml, 0.0074 몰)을 가한다. 이어서 20 °C로 가온시키고 1시간 동안 교반시킨다 (TLC). DCM (200 ml)로 희석하고, 10% 시트르산 (2x200 ml), 물, 염수로 세척한다. 유기층을 무수 황산나트륨상에서 건조시킨 다음 감압하에서 증발시키면 정제안된 생성물이 수득되고, 이를 3% 에테르/헥산을 사용하여 실리카겔로 정제하면 최종 생성물을 수득한다 (3.80 g, 76%).

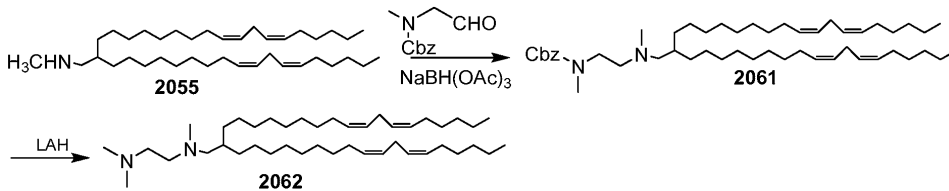
[0275] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 0.87(t, 6H, J=6.8Hz), 1.20 (m, 44H), 2.02 (q, 8H, J₁ = 6.8Hz, J₂ = 6.8Hz),

2.76 (t, 4H, J = 6.4Hz), 2.89 (d, 3H, J = 6Hz), 3.14 (m, 2H), 5.12 (s, 2H), 5.30 (m, 8H), 7.26 (m, 4H).

[0276] **2056**의 합성: THF 중 리튬 알루미늄 수소화물 (0.52 g, 0.0138 몰)의 현탁액에 0 °C, 아르곤 대기하에서, THF (38 ml) 중 화합물 **2055a** (3.80 g, 0.0055 몰)의 용액을 점적 첨가한다. 첨가 후, 실온으로 가온시키고 15시간 동안 교반시킨다 (TLC). 0 °C로 냉각시키고 황산나트륨 포화 용액, 이어서 에틸 아세테이트로 퀵칭시킨다. 이를 모두 셀라이트대를 통하여 여과하고 에틸 아세테이트로 세척한다. 여액을 합하여 감압하에서 증발시키고 100% 메탄올을 사용하여 실리카겔로 정제하면 최종 생성물이 무색 액체로 수득된다 (2.2 g, 70%)..

[0277] ¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 0.87 (t, 6H, J = 6.8 Hz), 1.21 (m, 44H), 2.03(q, 8H, J = 6.8Hz, J = 6.4Hz), 2.18 (s, 6H), 2.76 (t, 4H, J = 6.4Hz), 5.30 (m, 8H). ¹³C NMR (100MHz, CDCl₃): d 14.0, 22.4, 25.5, 26.5, 27.0, 27.1, 29.2, 29.4, 29.6, 30.0, 31.4, 32.1, 35.6, 45.9, 64.8, 127.8, 130.0. ELS: 99.0% Mass: 570.2(M+).

[0278] **2062 (ALNY-141)의 합성:**



[0279]

[0280] **2061**의 합성: DCM 100 ml 중 화합물 **2055** (5 g, 0.0089 몰)의 용액에 아르곤 대기하에, 0 °C에서 NaBH(OAc)₃ (2.30 g, 0.0106 몰)을 가한다. 20분간 교반시킨다. DCM 700 ml 중 알데하이드 (1.70 g, 0.0082 몰)를 상기 반응물에 45분에 걸쳐 천천히 가한다. 첨가 후, 반응물을 RT에서 15 내지 20분간 교반시킨다. TLC는 출발 물질의 부재를 나타낸다. 반응물을 NaHCO₃ 포화용액 (2x500 ml) 및 물로 세척한다. 수층을 DCM (500 ml)으로 다시 추출한다. 유기층을 합하여 염수 (500 ml)로 세척한다. 유기층을 Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 여과하여 농축시킨다. 수득한 정제안된 생성물은 실리카겔 크로마토그래피 및 용리제로서 헥산/디에틸 에테르를 정제한다. 수득한 생성물은 갈색 액체로서 헥산중 8% 에테르에서 용리된다 (수율, 6.40 g, 96%).

[0281] ¹H NMR: (400MHz, CDCl₃): 0.89 (t, 6H, J= 7.2Hz), 1.26 - 1.43 (m, 40H), 1.85 (m, 1H), 2.06 (q, 8H, J1=6.8Hz, J2=6.8Hz), 2.15 (s, 2H), 2.20 (s, 3H), 2.45 (m, 2H), 2.77 (t, 4H, J=6Hz), 2.95 (s, 3H), 3.35 (m, 2H), 5.12 (s, 2H), 5.32 (m, 8H), 7.35 (m, 5H).

[0282] **2062**의 합성: THF 중 리튬 알루미늄 수소화물 (0.751 g, 0.0198 몰)의 현탁액에 0 °C, 아르곤 대기하에서, THF (38 ml) 중 화합물 2061 (5.7 g, 0.0076 몰)의 용액을 점적 첨가한다. 첨가 후, 실온으로 가온시키고 15시간 동안 교반시킨다 (TLC). 반응물을 0 °C로 냉각시키고 황산나트륨 포화 용액 (50 ml), 이어서 에틸 아세테이트 (100 ml)로 퀵칭시킨다. 이를 셀라이트대를 통하여 여과하고 에틸 아세테이트로 세척한다. 여액을 합하여 감압하에서 증발시켜 정제안된 생성물을 수득하고, 이는 용리제로서 DCM/에틸 아세테이트/클로로포름/메탄올을 사용하는 실리카겔 크로마토-라피로 정제한다. 생성물은 메탄올 중 3% 클로로포름에서 갈색 액체 (3.80 g, 80 %)로 용리된다.

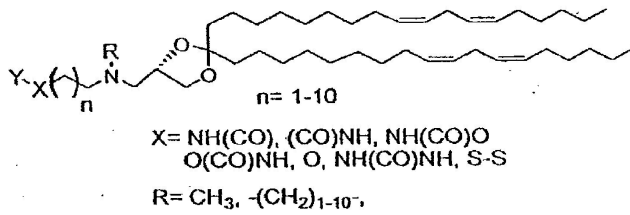
[0283] ¹H NMR: (400MHz, CDCl₃): 0.89 (t, 6H, J=6.8Hz), 1.26-1.37 (m, 40H), 1.42 (m, 1H), 2.06 (q, 8H, J1= 6.8Hz, J2= 6.8Hz), 2.15 (d, 2H, J= 7.2Hz), 2.20 (s, 3H), 2.29 (s, 6H), 2.45 (s, 4H), 2.78 (t, 4H, J=6.4Hz), 5.36 (m, 8H). ¹³C NMR: (100MHz, CDCl₃): 14.1, 22.6, 25.6, 26.6, 27.2, 27.22, 28.9, 29.3,

29.6, 29.7, 30.1, 31.5, 32.2, 35.8, 43.2, 45.7, 56.2, 57.2, 63.3, 127.9, 130.2. HPLC ELSD: 100% Mass: 627.53

- [0284] 상기한 여러가지 양태를 합하여 추가의 양태를 제공할 수 있다. 본 명세서 및(또는) 출원 데이터 스위트에 나열된 모든 미국 특허, 미국 공개 특허 공보, 외국 특허, 외국 특허원 및 비-특허 공보는 본 발명에서 전문 참고로 인용된다. 양태의 양상은 필요에 따라 여러가지 특허, 특허원 및 공보를 사용하여 변형시켜 또 다른 양태를 제공할 수 있다.
- [0285] 이들 및 기타 변형은 상기 발명의 상세한 설명에 비추어 양태에 대해 이루어질 수 있다. 일반적으로, 이후의 특허청구의범위에서, 사용되는 용어는 명세서 및 특허청구의 범위에 기재된 특정 양태에 대한 청구로 제한하는 것으로 해석되어서는 안되지만, 특허청구범위에 부여되는 것과 대등한 범주인 모든 가능한 양태도 포함되는 것으로 해석되어야 한다. 따라서, 특허청구의 범위는 기재 내용으로 제한되지 않는다.

도면

도면1



$Y = (\text{CH}_2)_n\text{-GalNAc}$, 만노즈, 락토즈, 글루코즈, 푸코즈

$Y = (\text{CH}_2)_n\text{-(GalNAc)}_2$, (만노즈)₂, (락토즈)₂, (글루코즈)₂, (푸코즈)₂,

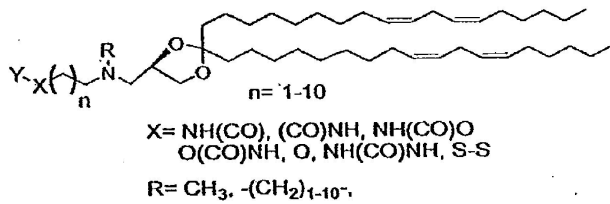
$Y = (\text{CH}_2)_n\text{-(GalNAc)}_3$, (만노즈)₃, (락토즈)₃, (글루코즈)₃, (푸코즈)₃,

$Y = (\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O})_a\text{-GalNAc}$, 만노즈, 락토즈, 글루코즈, 푸코즈

$Y = (\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O})_a\text{-(GalNAc)}_2$, (만노즈)₂, (락토즈)₂, (글루코즈)₂, (푸코즈)₂,

$Y = (\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O})_a\text{-(GalNAc)}_3$, (만노즈)₃, (락토즈)₃, (글루코즈)₃, (푸코즈)₃,

$a = 1-100$



$Y = (\text{CH}_2)_n\text{-GalNAc}$, 만노즈, 락토즈, 글루코즈, 푸코즈

$Y = (\text{CH}_2)_n\text{-(GalNAc)}_2$, (만노즈)₂, (락토즈)₂, (글루코즈)₂, (푸코즈)₂,

$Y = (\text{CH}_2)_n\text{-(GalNAc)}_3$, (만노즈)₃, (락토즈)₃, (글루코즈)₃, (푸코즈)₃,

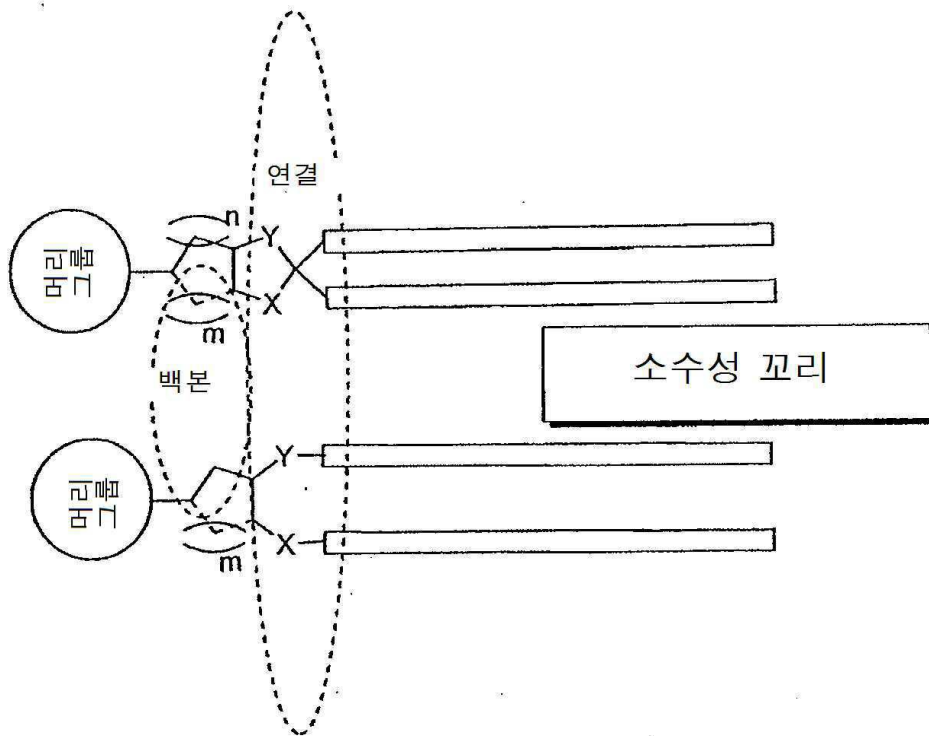
$Y = (\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O})_a\text{-GalNAc}$, 만노즈, 락토즈, 글루코즈, 푸코즈

$Y = (\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O})_a\text{-(GalNAc)}_2$, (만노즈)₂, (락토즈)₂, (글루코즈)₂, (푸코즈)₂,

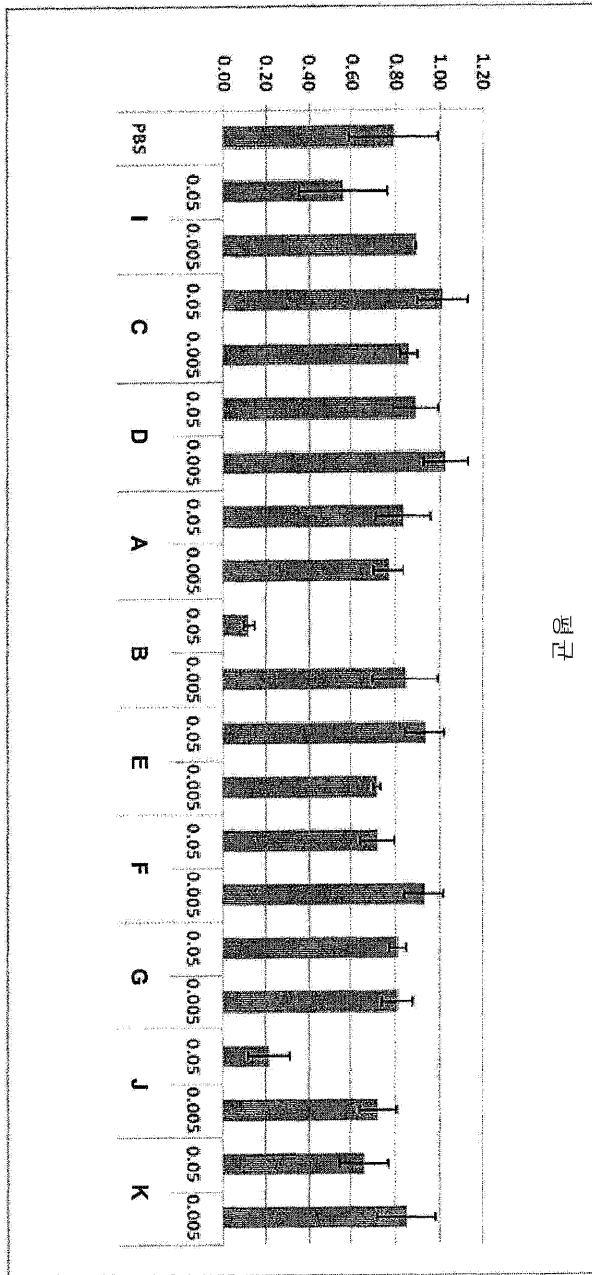
$Y = (\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O})_a\text{-(GalNAc)}_3$, (만노즈)₃, (락토즈)₃, (글루코즈)₃, (푸코즈)₃,

$a = 1-100$

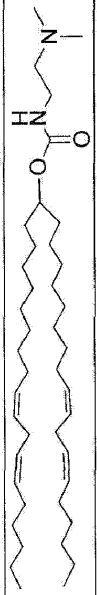
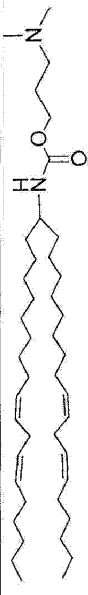
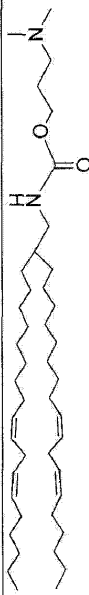
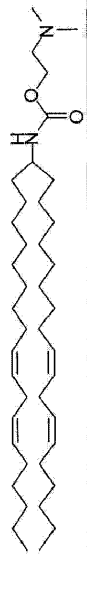
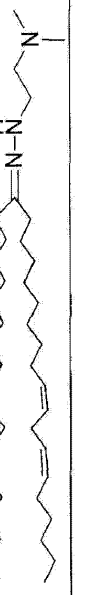
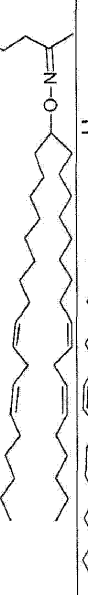
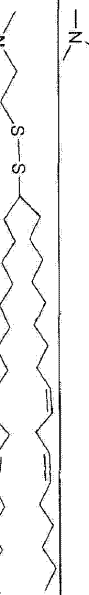
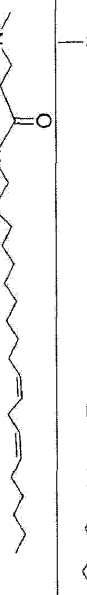
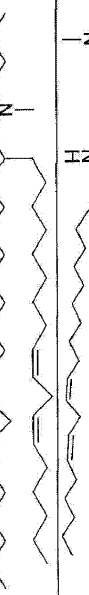

도면2



도면3



도면4

화합물	구조	ED50	pKa
ALNY-190		0.47	6.49
ALNY-192		2.1	7.21
ALNY-200		>5.00	7.57
ALNY-202		0.12	6.52
ALNY-175		2.7	
ALNY-149		0.1	5.81
ALNY-160		2.00	5.18
ALNY-201		>5.0	8.02
ALNY-141		0.14	6.62
ALNY-181		0.25	

서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> ALNYLAM PHARMACEUTICALS, INC.

<120> NOVEL LIPIDS AND COMPOSITIONS FOR THE DELIVERY OF THERAPEUTICS

<130> A2038-7187W0

<140> PCT/US2009/063931

<141> 2009-11-10

<150> 61/234,098

<151> 2009-08-14

<150> 61/225,898

<151> 2009-07-15

<150> 61/185,438

<151> 2009-06-09
 <150> 61/171,439
 <151> 2009-04-21
 <150> 61/154,350
 <151> 2009-02-20
 <150> 61/113,179
 <151> 2008-11-10
 <160> 73
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <
 211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 1
 taacgttgag gggcat 16
 <210> 2
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 2
 taacgttgag gggcat 16
 <210> 3
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <
 220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 3
 tccatgacgt tctgacgtt 20

<210> 4
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 4
 tccatgacgt tcctgacgtt 20
 <210> 5
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 5
 taagcatacg ggggtg 16
 <210> 6
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 6
 gatgctgtgt cggggtctcc gggc 24
 <210> 7
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 7
 tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24
 <210> 8

<211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 8
 tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt 24
 <210> 9
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 9
 tccaggactt ctctcaggtt 20
 <210> 10
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 10
 tctcccagcg tgcgcat 18
 <210> 11
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 11
 tgcatecccc aggccacat 20
 <210> 12
 <211> 20
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 12

gccaagctg gcatccgtca 20

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 13

gccaagctg gcatccgtca 20

<210> 14

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 14

ggtgctcact gcggc 15

<210> 15

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 15

aaccgttgag gggcat 16

<210> 16

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 16
 tatgctgtgc cgggtcttc gggc 24
 <210> 17
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 17
 gtgccggggt ctcgggc 18
 <210> 18
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 18
 ggacctcct ccggagcc 18
 <210> 19
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 19
 tcctccggag ccagactt 18
 <210> 20
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide
 <400> 20
 aacgttgagg ggcac 15
 <210> 21
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 21
 ccgtggtcat gctcc 15

 <210> 22
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 22
 cagcctggct caccgccttg g 21
 <210> 23
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 23
 cagccatggt tcccccaac 20
 <210> 24
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

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

<400> 24
 gttctcgctg gtgagtttca 20

<210> 25
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide

<400> 25
 tctcccagcg tgcgcat 18

<210> 26
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide

<400> 26
 gtgctccatt gatgc 15

<210> 27
 <211> 33
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide

<400> 27
 gaguucugau gaggccgaaa ggccgaaagu cug 33

<210> 28
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide

<400> 28

aacgttgagg ggcac 15

<210> 29
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 29

caacgttatg gggaga 16

<210> 30
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 30

ttccatgacg ttctgacgt 20

<210> 31
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide
 <400> 31
 Ala Ala Leu Glu Ala Leu Ala Glu Ala Leu Glu Ala Leu Ala Glu Ala
 1 5 10 15
 Leu Glu Ala Leu Ala Glu Ala Ala Ala Ala Gly Gly Cys
 20 25

<210> 32
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 32

Ala Ala Leu Ala Glu Ala Leu Ala Glu Ala Leu Ala Glu Ala Leu Ala

1 5 10 15

Glu Ala Leu Ala Glu Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Gly Cys

 20 25 30

<210> 33

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 33

Ala Leu Glu Ala Leu Ala Glu Ala Leu Glu Ala Leu Ala Glu Ala

1 5 10 15

<210> 34

<211> 22

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 34

Gly Leu Phe Glu Ala Ile Glu Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly

1 5 10 15

Met Ile Trp Asp Tyr Gly

 20

<210> 35

<211> 23

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 35

Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly

1 5 10 15

Met Ile Asp Gly Trp Tyr Gly

 20

<210> 36

<211> 24

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 36

Gly Leu Phe Glu Ala Ile Glu Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly

1 5 10 15

Met Ile Asp Gly Trp Tyr Gly Cys

20

<210> 37

<211> 22

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 37

Gly Leu Phe Glu Ala Ile Glu Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly

1 5 10 15

Met Ile Asp Gly Gly Cys

20

<210> 38

<211> 35

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 38

Gly Leu Phe Gly Ala Leu Ala Glu Ala Leu Ala Glu Ala Leu Ala Glu

1 5 10 15

His Leu Ala Glu Ala Leu Ala Glu Ala Leu Glu Ala Leu Ala Ala Gly

20 25 30

Gly Ser Cys

35

<210> 39

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 39

Gly Leu Phe Glu Ala Ile Glu Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly
1 5 10 15
Leu Ala Glu Ala Leu Ala Glu Ala Leu Glu Ala Leu Ala Ala Gly Gly
 20 25 30
Ser Cys

<210> 40

<211> 21

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<220><221> MOD_RES

<222> (17)..(17)

<223> Norleucine

<400> 40

Gly Leu Phe Glu Ala Ile Glu Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly
1 5 10 15

Leu Ile Asp Gly Lys
 20

<210> 41

<211> 20

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<220><221> MOD_RES

<222> (17)..(17)

<223> Norleucine

<400> 41

Gly Leu Phe Glu Ala Ile Glu Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly
1 5 10 15

Leu Ile Asp Gly

20

<210> 42

<211> 16

<212> PRT

<213> Drosophila sp.

<400> 42

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys

1 5 10 15

<210> 43

<211> 13

<212> PRT

<213> Human immunodeficiency virus 1

<400> 43

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gln

1 5 10

<210> 44

<211> 27

<212> PRT

<213> Human immunodeficiency virus 1

<400> 44

Gly Ala Leu Phe Leu Gly Trp Leu Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly

1 5 10 15

Ala Trp Ser Gln Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val

20

25

<210> 45

<211> 18

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 45

Leu Leu Ile Ile Leu Arg Arg Arg Ile Arg Lys Gln Ala His Ala His

1 5 10 15

Ser Lys

<210> 46

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 46

Gly Trp Thr Leu Asn Ser Ala Gly Tyr Leu Leu Lys Ile Asn Leu Lys

1 5 10 15

Ala Leu Ala Ala Leu Ala Lys Lys Ile Leu

20

25

<210> 47

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 47

Lys Leu Ala Leu Lys Leu Ala Leu Lys Ala Leu Lys Ala Ala Leu Lys

1 5 10 15

Leu Ala

<210> 48

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 48

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1 5

<210> 49

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 49

Lys Phe Phe Lys Phe Phe Lys Phe Phe Lys

1 5 10

<210> 50

<211> 37

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

Leu Leu Gly Asp Phe Phe Arg Lys Ser Lys Glu Lys Ile Gly Lys Glu

1 5 10 15

Phe Lys Arg Ile Val Gln Arg Ile Lys Asp Phe Leu Arg Asn Leu Val

20 25 30

Pro Arg Thr Glu Ser

35

<210> 51

<211> 31

<212> PRT

<213> Ascaris suum

<400> 51

Ser Trp Leu Ser Lys Thr Ala Lys Lys Leu Glu Asn Ser Ala Lys Lys

1 5 10 15

Arg Ile Ser Glu Gly Ile Ala Ile Ala Ile Gln Gly Gly Pro Arg

20 25 30

<210> 52

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

Ala Cys Tyr Cys Arg Ile Pro Ala Cys Ile Ala Gly Glu Arg Arg Tyr

1 5 10 15

Gly Thr Cys Ile Tyr Gln Gly Arg Leu Trp Ala Phe Cys Cys

 20 25 30

<210> 53

<211> 36

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 53

Asp His Tyr Asn Cys Val Ser Ser Gly Gly Gln Cys Leu Tyr Ser Ala

1 5 10 15

Cys Pro Ile Phe Thr Lys Ile Gln Gly Thr Cys Tyr Arg Gly Lys Ala

 20 25 30

Lys Cys Cys Lys

 35

<210> 54

<211> 12

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown: Unknown bactenecin peptide

<400> 54

Arg Lys Cys Arg Ile Val Val Ile Arg Val Cys Arg

1 5 10

<210> 55

<211> 42

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 55

Arg Arg Arg Pro Arg Pro Pro Tyr Leu Pro Arg Pro Arg Pro Pro Pro

1 5 10 15

Phe Phe Pro Pro Arg Leu Pro Pro Arg Ile Pro Pro Gly Phe Pro Pro

 20 25 30

Arg Phe Pro Pro Arg Phe Pro Gly Lys Arg

35

40

<210> 56

<211> 13

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown: Unknown indolicidin peptide

<400> 56

Ile Leu Pro Trp Lys Trp Pro Trp Trp Pro Trp Arg Arg

1

5

10

<210> 57

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 57

Ala Ala Val Ala Leu Leu Pro Ala Val Leu Leu Ala Leu Leu Ala Pro

1

5

10

15

<210> 58

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 58

Ala Ala Leu Leu Pro Val Leu Leu Ala Ala Pro

1

5

10

<210> 59

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 59
 cuuacgcuga guacuucgat t 21
 <210> 60
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 60
 ucgaaguacu cagcguaaagt t 21
 <210> 61
 <211>
 > 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 61
 cuuacgcuga guacuucgat t 21
 <210> 62
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide
 <400> 62
 ucgaaguacu cagcguaagt t 21
 <210> 63
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 63
 cuuacgcuga guacuucgat t 21
 <210> 64
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 64
 ucgaaguacu cagcguaagt t 21
 <210> 65
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 65
 cuuacgcuga guacuucgat t 21

<210> 66
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 66
 ucgaaguacu cagcguaagt t 21
 <210> 67
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 67
 ggaucaucuc aagucuuact t 21
 <210> 68
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 68
 guaagacuug agaugaucct t 21
 <210> 69
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 69

ggaucaucuc aagucuuact t

21

<210> 70

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 70

guaagacuug agaugaucct t

21

<210> 71

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 71

Glu Ala Leu Ala

1

<210> 72

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 72

ggaucaucuc aagucuuact t

21

<210> 73

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 73

guaagacuug agaugaucct t

21