(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0152014
(43) 공개일자 2023년11월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/00 (2006.01) *A61K 47/34* (2017.01)
A61K 48/00 (2006.01) *A61K 9/51* (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 9/0078 (2013.01)
A61K 47/34 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-7029355
(22) 출원일자(국제) 2022년02월25일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2023년08월29일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2022/054796
(87) 국제공개번호 WO 2022/180213
국제공개일자 2022년09월01일
(30) 우선권주장
21159455.1 2021년02월26일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
에트리스 게엠베하
독일 플라네그 제멜바이스슈트라쎄 3 (우: 82152)
(72) 발명자
도멘 크리스티안
독일, 82061 노이리트 암머제슈트라쎄 159
벡 필립
독일, 81373 뮌헨, 힌터배렌바트슈트라쎄 28에이
플랭크 크리스티안
독일, 82234 베슬링, 오베레 지켈트슈트라쎄 41
(74) 대리인
특허법인한얼

전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 **에어로졸 형성을 위한 제형 및 핵산 전달을 위한 에어로졸**

(57) 요 약

본 발명은 에어로졸 형성을 위한 수성 현탁액 제형으로서, 상기 현탁액 제형이 수성 비히클 용액에 현탁된 지질 또는 리피도이드 나노입자를 포함하고, 여기서 상기 지질 또는 리피도이드 나노입자가 다음 성분 (a) 및 (b)를 포함하고:

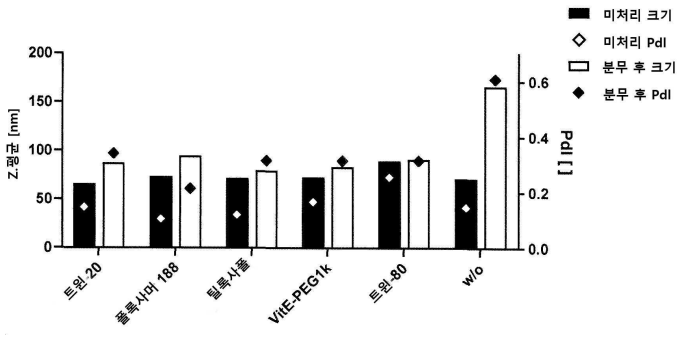
(a) 핵산 및

(b) 이온화 가능한 지질 또는 이온화 가능한 리피도이드;

상기 수성 비히클 용액이 하나의 폴리(프로필렌 옥사이드) 블록과 2개의 폴리(에틸렌 옥사이드) 블록을 함유하는 트리블록 공중합체를 포함하는, 수성 현탁액 제형에 관한 것이다.

또한, 본 발명은 에어로졸 형성을 위한 제형으로부터 수득된 에어로졸에 관한 것이다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61K 48/0075 (2013.01)
A61K 9/5123 (2013.01)
A61P 11/00 (2018.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

에어로졸 형성을 위한 수성 현탁액 제형으로서, 상기 현탁액 제형이 수성 비히클(vehicle) 용액에 현탁된 지질 또는 리피도이드 나노입자(lipioid nanoparticle)를 포함하고, 상기 지질 또는 리피도이드 나노입자가 다음 성분 (a) 및 (b)를 포함하고:

(a) 핵산 및

(b) 이온화 가능한 지질 또는 이온화 가능한 리피도이드;

상기 수성 비히클 용액이 하나의 폴리(프로필렌 옥사이드) 블록(block)과 2개의 폴리(에틸렌 옥사이드) 블록을 함유하는 트리블록 공중합체(triblock copolymer)를 포함하는, 수성 수성 현탁액 제형.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 현탁액 제형 중 핵산의 농도가 현탁액 제형의 총 용적을 기준으로 하여 0.01 내지 10mg/mL 범위인, 수성 현탁액 제형.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 나노입자가 동적 광 산란(dynamic light scattering)에 의해 결정된 바와 같이, 10 내지 500nm 범위의 Z-평균 직경(Z-average diameter)을 갖는, 수성 현탁액 제형.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 나노입자가 다음 성분 (c1) 내지 (c6) 중 하나 이상을 추가로 포함하는, 수성 현탁액 제형:

(c1) 스테롤 구조를 갖는 비이온화 가능한 지질(non-ioniable lipid);

(c2) 포스포글리세라이드 지질;

(c3) PEG 접합 지질(PEG-conjugated lipid);

(c4) 폴리사르코신 접합 지질;

(c5) 파실화 지질(PASylated lipid); 및

(c6) 양이온성 중합체.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 나노입자가

이온화 가능한 지질 또는 이온화 가능한 리피도이드(b) 30 내지 65mol%, 및 다음 성분:

스테롤 구조를 갖는 지질(c1) 10 내지 50mol%,

포스포글리세라이드 지질(c2) 4 내지 50mol%,

PEG 접합 지질(c3), 폴리사르코신 접합 지질(c4) 및 파실화 지질(c5) 중 하나 또는 이들의 임의의 조합 0.5 내지 10mol%,

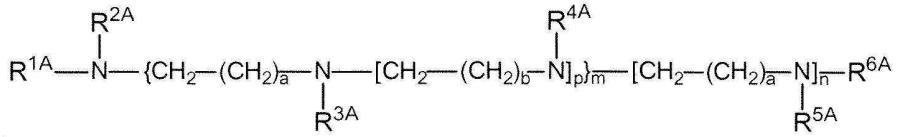
양이온성 중합체(c6) 0.5 내지 10mol% 중 하나 이상을 (b)와 (c1) 내지 (c6)의 합이 100mol%에 달하도록 포함하는, 수성 현탁액 제형.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 나노입자가 다음 화학식 b-1의 이온화 가능한 리피도이드(b),

또는 화학식 b-1의 화합물에 함유된 질소 원자 중 하나 이상이 양성화(protonating)되어 양전하(positive charge)를 띠는 화합물을 제공하는 이의 양성자화 형태(protonated form)를 포함하는, 수성 현탁액 제형:

[화학식 b-1]



상기 화학식 b-1에서,

a는 1이고 b는 2 내지 4의 정수이거나; a는 2 내지 4의 정수이고 b는 1이며,

p는 1 또는 2이고,

m은 1 또는 2이고; n은 0 또는 1이며, m+n은 ≥ 2이고;

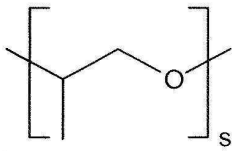
R^{1A} 내지 R^{6A}는 서로 독립적으로 수소; $-CH_2-CH(OH)-R^{7A}$, $-CH(R^{7A})-CH_2-OH$, $-CH_2-CH_2-(C=O)-O-R^{7A}$, $-CH_2-CH_2-(C=O)-NH-R^{7A}$; $-CH_2-R^{7A}$; $-C(NH)-NH_2$; 폴리(에틸렌 글리콜) 쇄; 및 수용체 리간드로부터 선택되고; 여기서 R^{7A}는 C3-C18 알킬 및 하나의 C-C 이중 결합을 갖는 C3-C18 알케닐로부터 선택되고;

단, R^{1A} 내지 R^{6A} 중 적어도 두 개의 잔기는 $-CH_2-CH(OH)-R^{7A}$, $-CH(R^{7A})-CH_2-OH$, $-CH_2-CH_2-(C=O)-O-R^{7A}$, $-CH_2-CH_2-(C=O)-NH-R^{7A}$ 및 $-CH_2-R^{7A}$로부터 선택되고, 여기서 R^{7A}는 C3-C18 알킬 및 하나의 C-C 이중 결합을 갖는 C3-C18 알케닐로부터 선택된다.

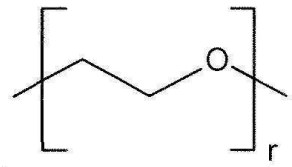
청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 트리블록 공중합체가 화학식 p-1의 폴리(프로필렌 옥사이드) 블록 B 1개, 및 화학식 p-2의 폴리(에틸렌 옥사이드) 블록 A 2개를 함유하는 A-B-A 트리블록 공중합체인, 수성 현탁액 제형:

[화학식 p-1]



[화학식 p-2]



상기 화학식 p-1 및 p-2에서,

s는 15 내지 67, 바람직하게는 20 내지 40의 정수이고,

r은 각 블록에 대해 독립적으로 2 내지 130, 바람직하게는 50 내지 100, 더욱 바람직하게는 60 내지 90의 정수이다.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 트리블록 공중합체를 수성 현탁액 제형의 총 용적을 기준으로 하여 0.05 내지 5%(w/v, 25℃ 온도에서)의 농도로 포함하는, 수성 현탁액 제형.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 에어로졸 형성을 위한 수성 현탁액 제형이 함유되는 구획(compartment)을 포함하는 네뷸라이저(nebulizer).

청구항 10

기체 상에 분산된 에어로졸 소적(aerosol droplet)을 포함하는 에어로졸로서, 상기 에어로졸 소적이 지질 또는 리피도이드 나노입자, 및 나노입자를 위한 수성 비히클 용액을 포함하고,

상기 지질 또는 리피도이드 나노입자가 다음 성분 (a) 및 (b)를 포함하고:

(a) 핵산 및

(b) 이온화 가능한 지질 또는 이온화 가능한 리피도이드;

상기 수성 비히클 용액이 하나의 폴리(프로필렌 옥사이드) 블록과 2개의 폴리(에틸렌 옥사이드) 블록을 함유하는 트리블록 공중합체를 포함하는, 에어로졸.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 에어로졸 소적의 질량 중앙 공기역학적 직경(mass median aerodynamic diameter; MMAD)이 2 내지 10㎛ 범위인, 에어로졸.

청구항 12

제11항 또는 제12항에 있어서, 상기 나노입자가 동적 광 산란에 의해 결정된 바와 같이, 10 내지 500nm 범위, 더욱 바람직하게는 10 내지 250nm 범위, 더욱 더 바람직하게는 20 내지 200nm 범위의 Z-평균 직경을 갖는, 에어로졸.

청구항 13

제10항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따르는 수성 현탁액 제형의 분무(nebulization)에 의해 수득 가능한, 에어로졸.

청구항 14

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 약제(medicament)로서 사용하기 위한 것이고, 상기 수성 현탁액 제형이 분무되어야 하고, 분무에 의해 제공되는 상기 에어로졸이 대상체(subject)에게 투여되어야 하는, 수성 수성 현탁액 제형.

청구항 15

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산 기반 요법을 통한 질환 또는 장애의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 것이고, 상기 치료 또는 예방이 수성 현탁액 제형의 분무 및 대상자의 호흡기에, 또는 대상체의 호흡기를 통한, 바람직하게는 폐 투여 또는 비강 투여를 통한 분무로 제공된 에어로졸의 투여를 포함하는, 수성 수성 현탁액 제형.

청구항 16

제15항에 있어서, 치료 또는 예방될 질환 또는 장애가 폐 질환(pulmonary disease)인, 수성 수성 현탁액 제형.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 에어로졸 형성을 위한 수성 현탁액 제형 및 대상체(subject)에게 핵산을 투여하는 데 유리하게 사용될 수 있는 에어로졸에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 리포좀을 포함한 지질 소포, 및 지질 또는 리피도이드 나노입자(lipioid nanoparticle; LNP)와 같은 지질 제형은 환자에게 활성 약제학적 성분을 전달하기 위해 자주 사용된다. 특히, 핵산의 지질 또는 리피도이드 제형은 핵산을 세포에 도입하는 데 매우 유용하고 효율적이다. 핵산의 지질 또는 리피도이드 제형의 이러한 유리한 특성은 수십 년 동안 생물학 및 의학 연구 및 i) 유전자를 과발현하거나 표적 세포의 유전적 결함을 보완하기 위한, 또는 ii) 세포에서 내인성 유전자 발현을 하향 조절하거나 상향 조절하기 위한, 또는 iii) 유전적 결함(돌연변이)을 복구하기 위한 치료적 접근법에서 사용되어 왔다.

[0003] 유전자의 과발현 및 유전적 결함의 보완을 위해, 단백질을 코딩하는 서열을 함유하는 핵산이 세포에 도입된다. 이들은 적합한 프로모터의 제어하에 코딩 영역을 포함하는 DNA 작제물(construct)이거나, 이는 세포의 핵에서 mRNA로 전사된다. mRNA는 세포질로 전위되어 단백질로 번역된다. 대안적으로, 시험관내 전사된 mRNA는 동일한 효과를 달성하기 위해 지질 제형을 사용하여 세포질 내로 도입될 수 있다. 유전자 요법 및 mRNA 전사체 요법에서, 환자 세포에 외인성 유전 정보를 도입하는 개념을 이용하여 환자 세포가 치료 효과를 갖는 단백질을 생산하도록 유도한다.

[0004] 내인성 유전자 발현을 하향 조절하기 위해, 합성 (안티센스(antisense)) 올리고뉴클레오티드 또는 siRNA 또는 리보자임과 같은 완전 합성 핵산, 또는 내인성 유전자 발현을 하향 조절하기에 적합한 세포에서 RNA로 전사되는 (플라스미드) DNA 작제물이 사용될 수 있다. 내인성 유전자 발현의 녹다운을 위해, 뉴클레아제, 예를 들어, 아연 핑거 뉴클레아제(zinc finger nuclease), TALE 뉴클레아제 또는 CRISPR-Cas 시스템을 코딩하는 핵산이 사용될 수 있다. 유사하게, 내인성 유전자 발현의 상향 조절은 다양한 메커니즘(Khorkova O, Hsiao J, Wahlestedt C. Oligonucleotides for upregulating gene expression. Pharm Pat Anal. 2013;2(2):215-29; Sargent RG, Kim S, Gruenert DC. Oligo/polynucleotide-based gene modification: strategies and therapeutic potential. Oligonucleotides. 2011;21(2):55-75), 치료적 유전자 변조(therapeutic gene modulation)로서 또한 공지된 접근법에 의해 특정 올리고뉴클레오티드로 달성될 수 있다. 치료적 유전자 변조의 특별한 사례는 CpG 모티프 함유 올리고뉴클레오티드를 사용한 면역 자극이다(Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. Annu Rev Immunol. 2002;20:709-60).

[0005] mRNA 수준에서 유전적 결함의 복구를 위해, 스플라이싱 반응에 영향을 미치는 핵산 작제물, 예를 들어, 엑손 스키핑(exon skipping)을 위한 올리고뉴클레오티드가 사용될 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 게놈 수준에서의 유전자 복구의 경우, 아연 핑거 뉴클레아제, TALE 뉴클레아제 또는 CRISPR-Cas 시스템과 같이 염색체의 핵산 서열을 변경할 수 있는 뉴클레아제를 코딩하는 핵산이 사용될 수 있다.

[0006] 임의의 핵산 요법의 세 가지 개념(과발현 유전자 보완/내인성 유전자의 하향 조절 또는 상향 조절/유전자 복구)에서, 핵산의 지질 제형은 환자가 견딜 수 있고 핵산이 표적 세포 또는 표적 기관 또는 환자 몸 전체에서 목적하는 효과를 발휘하기에 적합한 방식으로 환자의 체내에 도입되어야 한다. 자주 사용되는 투여 경로는 국소 주사, 예를 들어, 피내, 피하, 안구내, 근육내, 심근내, 종양내 또는 다른 표적 조직이나 기관에의 직접 투여 및 더욱이 전신 투여(일반적으로 정맥내)를 포함한다.

[0007] 덜 빈번하게 사용되는 것은 활성 약제학적 성분, 특히 핵산의 지질 또는 리피도이드 제형의 에어로졸의 흡입에 의한 투여이다. 이 투여 경로는 활성 약제학적 성분, 특히 핵산을 호흡기 내 표적 세포에 전달하는 데 가장 편리하고 유용한 것으로 나타나지만, 이 투여 경로는 특히 핵산의 지질 또는 지질 리피도이드 제형의 경우 아래에 요약된 바와 같이 수많은 도전과 관련이 있다.

[0008] 도전은 한편으로는 의료 적용의 요구 사항으로부터 비롯된다. 흡입으로 투여될 경우, 치료적 유효량이 목적하는 치료 효능을 개발할 수 있는 환자의 호흡기 부위에 합리적인 시간 내에 침착된다는 것이 보장되어야 한다. 의료적 적용에 따라, 이는, 예를 들어, 상기도(upper respiratory tract) 또는 폐포 영역(alveolar region)일 수 있다. 또한, 필요한 투여량 침착에 필요한 시간까지, 환자 순응도가 고려되어야 한다. 1시간 이상의 흡입 시간은 확실히 환자에게 큰 부담이 되는 반면, 30분 이하의 흡입 시간이 분명히 더 편리하다.

[0009] 추가의 도전은 "리포좀 의약품 화학, 제조 및 관리: 인간 약동학 및 생체이용률; 및 라벨링 문서"라는 제목의 산업용 FDA 가이드라인(Liposome Drug Products Chemistry, Manufacturing, and Controls; Human Pharmacokinetics and Bioavailability; and Labeling Documentation - Guidance for Industry, (2018)) 및 EMA 가이드라인 EMEA/CHMP/QWP/49313/2005 Corr, "흡입 및 비강 제품의 약제학적 품질에 관한 가이드라인", 2006에 개요된 규제 요건으로 인해 발생된다. 두 가이드라인 모두 의약품의 완전성의 중요성을 강조한다. 물리화학적 특성, 예를 들어, 소포/입자 크기 및 크기 분포, 및 형태는 중요 품질 특성(Critical Quality Attributes)으로 나열되어 있다. "개발 연구에는 제품의 작용성에 미치는 영향과 관련된 약물 물질 및 부형제

(excipient)의 물리적 특성화가 포함되어야 한다"(Guideline on the Pharmaceutical Quality of Inhalation and Nasal Products, (2006)). EMEA/CHMP/QWP/49313/2005 Corr은 "약물 물질 및/또는 부형제의 물리적 특성, 예를 들어, 용해도(solubility), 크기(size), 모양(shape), 밀도(density), 견고성(rugosity), 전하(charge), 및 결정성(crystallinity)은 완제품의 균질성(homogeneity) 및 재현성(reproducibility)에 영향을 미칠 수 있다"고 명시하고 있다. 이 가이드라인은 전달된 투여량 균일성(dose uniformity) 및 미세 입자 질량이 환자 유량 범위에 대해 보증될 것을 요구한다. 융합(즉, 더 큰 리포솜을 형성하기 위한 더 작은 리포솜의 비가역적 연합(irreversible coalition)), 응집(즉, 융합 없이 두 개 이상의 리포솜의 가역적 복합체 형성(conglomeration) 또는 풀링(pooling)) 및 저장 동안 함유된 약물 물질의 누출에 대한 민감성은 의약품의 안정성에 영향을 미칠 수 있다(Liposome Drug Products Chemistry, Manufacturing, and Controls; Human Pharmacokinetics and Bioavailability; and Labeling Documentation - Guidance for Industry, (2018)). 즉, 분무될 액체에 존재하는 의약품은 분무 동안 변하지 않아야 하며, 즉 약물 물질(미립자 의약품의 경우)의 조성, 입자 크기 및 캡슐화 효율(encapsulation efficiency) 및 이의 효율이 변하지 않아야 한다.

[0010] 흡입에 의한 투여의 경우, 활성 약제학적 성분의 지질 제형이 분무될 필요가 있다. 당업자에게 공지된 다양한 유형의 네뷸라이저(nebulizer)가 의료용으로 이용 가능하다. 네뷸라이저의 설계에 관계없이, 액체의 분무는 액체에 상당한 에너지의 도입을 필요로 한다. 약제학적 활성 성분의 지질 또는 리피도이드 제형은 분무될 때 약물 물질의 크기, 형태 및 캡슐화가 변하는 것으로 관찰되었다(Elhissi AM, Faizi M, Naji WF, Gill HS, Taylor KM. Physical stability and aerosol properties of liposomes delivered using an air-jet nebulizer and a novel micropump device with large mesh apertures. Int J Pharm. 2007;334(1-2):62-70; Li Z, Zhang Y, Wurtz W, Lee JK, Malinin VS, Durwas-Krishnan S, et al. Characterization of nebulized liposomal amikacin (Arikace) as a function of droplet size. J Aerosol Med Pulm Drug Deliv. 2008;21(3):245-54). 또한, mRNA의 지질 제형은 분무 동안 네뷸라이저를 막을 수 있고, 제형이 분무시 효능을 상실하는 것으로 관찰되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 따라서, 본 발명의 기초가 되는 과제는 핵산을 포함하는 조성물을 제공하는 것이었고, 이 조성물은 핵산이 폐 세포에서 단백질의 생산을 유도하거나 내인성 유전자의 발현의 하향 조절 또는 상향 조절을 유도하거나 유전자 복구를 유도하는 것과 같은 흡입 후 의도된 기능을 효율적으로 발휘하는 방식으로 상기 조성물의 분무 및 흡입시 핵산을 대상체의 호흡기 내의 세포에 전달하기에 적합하다. 또한, 합리적인 시간 내에 조성물의 유효량을 분무할 수 있어야 하며, 조성물의 성분은 분무 동안 온전하게 유지되어야 한다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명의 맥락에서, 핵산과 이온화 가능한 지질 또는 이온화 가능한 리피도이드를 포함하고, 폴리(에틸렌 옥사이드)-폴리(프로필렌 옥사이드) 블록(block) 공중합체를 포함하는 수성 비히클(vehicle) 용액에 현탁된 지질 또는 리피도이드 나노입자(LNP)의 현탁액 제형은, 그 안에 함유된 나노입자 및 핵산의 완전성에 대한 분무 절차의 부정적인 영향이 방지될 수 있는 동시에 효율적으로 분무될 수 있음이 밝혀졌다. 특히, 에어로졸의 제조를 위한 이 제형의 사용은 분무 공정 동안 응집에 대한 입자의 상당히 개선된 내성 및 분무 공정 후 핵산의 형질감염 효율의 유익한 보유가 달성되도록 한다.

[0013] 본 발명의 양태의 요약은 다음 항목에 제공된다.

[0014] 1. 에어로졸 형성을 위한 수성 현탁액 제형으로서, 상기 현탁액 제형이 수성 비히클 용액에 현탁된 지질 또는 리피도이드 나노입자를 포함하고, 상기 지질 또는 리피도이드 나노입자가 다음 성분 (a) 및 (b)를 포함하고:

[0015] (a) 핵산 및

[0016] (b) 이온화 가능한 지질 또는 이온화 가능한 리피도이드;

[0017] 상기 수성 비히클 용액이 하나의 폴리(프로필렌 옥사이드) 블록과 2개의 폴리(에틸렌 옥사이드) 블록을 함유하는 트리블록 공중합체(triblock copolymer)를 포함하는, 수성 현탁액 제형.

[0018] 2. 항목 1에 있어서, 상기 핵산이 RNA 및 플라스미드 DNA로부터 선택되는, 수성 현탁액 제형.

[0019] 3. 항목 1 또는 2에 있어서, 상기 핵산이 mRNA, siRNA, miRNA, 안티센스 RNA, tRNA 및 비코딩 RNA로부터 선택되고, 보다 바람직하게는 mRNA인, 수성 현탁액 제형.

[0020] 4. 항목 1 내지 3 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 현탁액 제형 중 핵산의 농도가 현탁액 제형의 총 용적을 기준으로 하여 0.01 내지 10mg/mL, 더욱 바람직하게는 0.02 내지 10mg/mL, 가장 바람직하게는 0.05 내지 5mg/mL 범위인, 수성 현탁액 제형.

[0021] 5. 항목 1 내지 4 중 어느 한 항목에 있어서, 수성 현탁액 중 나노입자의 중량 대 용적 비율이 리터당 그램 단위로 0.5g/L 내지 100g/L, 바람직하게는 10g/L 내지 100g/L, 더욱 바람직하게는 10g/L 내지 50g/L, 가장 바람직하게는 10g/L 내지 75g/L의 범위 내인, 수성 현탁액 제형.

[0022] 6. 항목 1 내지 5 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 나노입자가 동적 광 산란(dynamic light scattering)에 의해 결정된 바와 같이, 10 내지 500nm 범위, 더욱 바람직하게는 10 내지 250nm 범위, 더욱 더 바람직하게는 20 내지 200nm 범위의 Z-평균 직경(Z-average diameter)을 갖는, 수성 현탁액 제형.

[0023] 7. 항목 1 내지 6 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 나노입자가 동적 광 산란에 의해 결정된 바와 같이, 0.05 내지 0.4의 범위, 더욱 바람직하게는 0.05 내지 0.2의 범위의 다분산 지수(polydispersity index)를 갖는, 수성 현탁액 제형.

[0024] 8. 항목 1 내지 7 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 나노입자가 다음 성분 (c1) 내지 (c6) 중 하나 이상을 추가로 포함하는, 수성 현탁액 제형:

[0025] (c1) 스테롤 구조를 갖는 비이온화 가능한 지질(non-ioniable lipid);

[0026] (c2) 포스포글리세라이드 지질;

[0027] (c3) PEG 접합 지질(PEG-conjugated lipid);

[0028] (c4) 폴리사르코신 접합 지질;

[0029] (c5) 파실화 지질(PASylated lipid); 및

[0030] (c6) 양이온성 중합체.

[0031] 9. 항목 1 내지 8 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 나노입자가

[0032] 이온화 가능한 지질 또는 이온화 가능한 리피도이드(b) 30 내지 65mol%, 및 다음 성분:

[0033] 스테롤 구조를 갖는 지질(c1) 10 내지 50mol%,

[0034] 포스포글리세라이드 지질(c2) 4 내지 50mol%,

[0035] PEG 접합 지질(c3), 폴리사르코신 접합 지질(c4) 및 파실화 지질(c5) 중 하나 또는 이들의 임의의 조합 0.5 내지 10mol%,

[0036] 양이온성 중합체(c6) 0.5 내지 10mol% 중 하나 이상을 (b)와 (c1) 내지 (c6)의 합이 100mol%에 달하도록 포함하는, 수성 현탁액 제형.

[0037] 10. 항목 1 내지 9 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 나노입자가 다음 성분 (c1) 내지 (c3)을 추가로 포함하는, 수성 현탁액 제형:

[0038] (c1) 스테롤 구조를 갖는 비이온화 가능한 지질;

[0039] (c2) 포스포글리세라이드 지질; 및

[0040] (c3) PEG 접합 지질.

[0041] 11. 항목 10에 있어서, 상기 나노입자가

[0042] 30 내지 65mol%의 이온화 가능한 지질 또는 이온화 가능한 리피도이드(b),

[0043] 10 내지 50mol%의 스테롤 구조를 갖는 지질(c1),

[0044] 4 내지 50mol%의 포스포글리세라이드 지질(c2), 및

[0045] 0.5 내지 10mol%의 PEG 접합 지질(c3)을 (b)와 (c1) 내지 (c3)의 합이 100mol%에 달하도록 포함하는, 수성 현

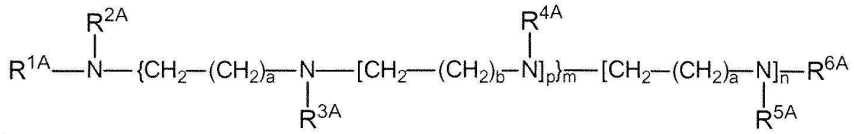
탁액 제형.

[0046] 12. 항목 1 내지 11 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 나노입자가 핵산과 상이한 폴리음이온 성분을 추가로 포함하는, 수성 현탁액 제형.

[0047] 13. 항목 1 내지 12 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 나노입자의 조성이 핵산의 중량에 대한 핵산 이외의 성분의 중량의 합의 나노입자 중의 중량 비율이 30:1 내지 1:1의 범위, 더욱 바람직하게는 20:1 내지 2:1, 가장 바람직하게는 15:1 내지 3:1이 되도록 하는, 수성 현탁액 제형.

[0048] 14. 항목 1 내지 13 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 나노입자가 다음 화학식 b-1의 이온화 가능한 리피도이드(b), 또는 화학식 b-1의 화합물에 함유된 질소 원자 중 하나 이상이 양성화(protonating)되어 양전하(positive charge)를 띠는 화합물을 제공하는 이의 양성자화 형태(protonated form)를 포함하는, 수성 현탁액 제형:

[0049] [화학식 b-1]

[0050] 

[0051] 상기 화학식 b-1에서,

[0052] a는 1이고 b는 2 내지 4의 정수이거나; a는 2 내지 4의 정수이고 b는 1이며,

[0053] p는 1 또는 2이고,

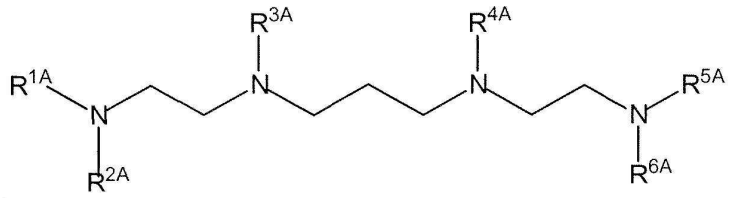
[0054] m은 1 또는 2이고; n은 0 또는 1이며, m+n은 ≥ 2이고;

[0055] R^{1A} 내지 R^{6A}는 서로 독립적으로 수소; $-CH_2-CH(OH)-R^{7A}$, $-CH(R^{7A})-CH_2-OH$, $-CH_2-CH_2-(C=O)-O-R^{7A}$, $-CH_2-CH_2-(C=O)-NH-R^{7A}$; $-CH_2-R^{7A}$; $-C(NH)-NH_2$; 폴리(에틸렌 글리콜) 쇄; 및 수용체 리간드로부터 선택되고; 여기서 R^{7A}는 C3-C18 알킬 및 하나의 C-C 이중 결합을 갖는 C3-C18 알케닐로부터 선택되고;

[0056] 단, R^{1A} 내지 R^{6A} 중 적어도 두 개의 잔기는 $-CH_2-CH(OH)-R^{7A}$, $-CH(R^{7A})-CH_2-OH$, $-CH_2-CH_2-(C=O)-O-R^{7A}$, $-CH_2-CH_2-(C=O)-NH-R^{7A}$ 및 $-CH_2-R^{7A}$로부터 선택되고, 여기서 R^{7A}는 C3-C18 알킬 및 하나의 C-C 이중 결합을 갖는 C3-C18 알케닐로부터 선택된다.

[0057] 15. 항목 1 내지 14 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 나노입자가 다음 화학식 b-1b의 이온화 가능한 리피도이드(b-1) 또는 화학식 b-1b의 화합물에 함유된 질소 원자 중 하나 이상이 양성화되어 양전하를 띠는 화합물을 제공하는 이의 양성자화 형태를 포함하는, 수성 현탁액 제형:

[0058] [화학식 b-1b]

[0059] 

[0060] 상기 화학식 b-1b에서,

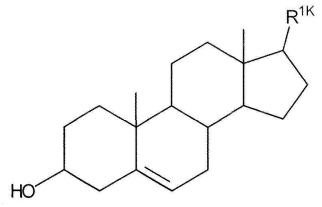
[0061] R^{1A} 내지 R^{6A}는 항목 14에서와 같이 정의된다.

[0062] 16. 항목 14 또는 15에 있어서, R^{1A} 내지 R^{6A}가 수소 및 $-CH_2-CH(OH)-R^{7A}$로부터 독립적으로 선택되고, 여기서 R^{7A}는 C8-C18 알킬 및 하나의 C-C 이중 결합을 갖는 C8-C18 알케닐로부터 선택되고, 단 R^{1A} 내지 R^{6A} 중 적어도 2개의 잔기, 바람직하게는 적어도 3개의 잔기, 더욱 바람직하게는 적어도 4개의 잔기는 $-CH_2-CH(OH)-R^{7A}$이고, 여기

서 R^{7A}는 C8-C18 알킬 및 하나의 C-C 이중 결합을 갖는 C8-C18 알케닐로부터 선택되는, 수성 현탁액 제형.

[0063] 17. 항목 8 내지 16 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 나노입자가 화학식 c1-1의 스테롤 구조를 갖는 비이온화 가능한 지질(c1)을 포함하는, 수성 현탁액 제형:

[0064] [화학식 c1-1]

[0065] 

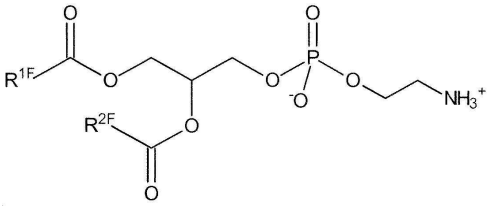
[0066] 상기 화학식 c1-1에서,

[0067] R^{1K}는 C3-C12 알킬 그룹이다.

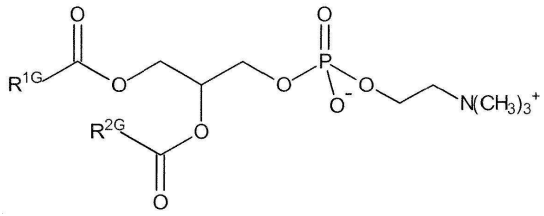
[0068] 18. 항목 8 내지 17 중 어느 한 항목에 있어서, 스테롤 구조를 갖는 비이온화 가능한 지질(c1-1)이 콜레스테롤을 포함하는, 수성 현탁액 제형.

[0069] 19. 항목 8 내지 18 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 나노입자가 화학식 c2-1의 포스포글리세라이드 지질(c2) 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염; 또는 화학식 c2-2의 포스포글리세라이드 지질(c2) 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는, 수성 현탁액 제형:

[0070] [화학식 c2-1]

[0071] 

[0072] [화학식 c2-2]

[0073] 

[0074] 상기 화학식 c2-1 및 c2-2에서,

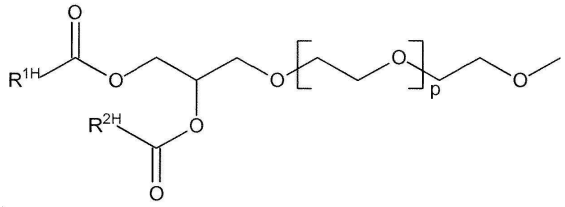
[0075] R^{1F} 및 R^{2F}는 독립적으로 C8-C18 알킬 그룹 또는 C8-C18 알케닐 그룹, 바람직하게는 C12-C18 알킬 그룹 또는 C12-C18 알케닐 그룹이고,

[0076] R^{1G} 및 R^{2G}는 독립적으로 C8-C18 알킬 그룹 또는 C8-C18 알케닐 그룹, 바람직하게는 C12-C18 알킬 그룹 또는 C12-C18 알케닐 그룹이다.

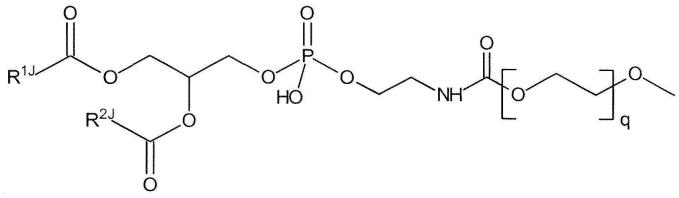
[0077] 20. 항목 8 내지 19 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 포스포글리세라이드 지질(c2)이 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포콜린(DPPC) 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는, 수성 현탁액 제형.

[0078] 21. 항목 8 내지 20 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 나노입자가 화학식 c3-1의 PEG 접합 지질(c3) 또는 화학식 c3-2의 PEG 접합 지질(c3) 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는, 수성 현탁액 제형:

[0079] [화학식 c3-1]

[0080] 

[0081] [화학식 c3-2]

[0082] 

[0083] 상기 화학식 c3-1 및 화학식 c3-2에서,

[0084] R^{1H} 및 R^{2H}는 독립적으로 C8-C18 알킬 그룹 또는 C8-C18 알케닐 그룹, 바람직하게는 C12-C18 알킬 그룹 또는 C12-C18 알케닐 그룹이고, p는 5 내지 200, 바람직하게는 10 내지 100, 더욱 바람직하게는 20 내지 60의 정수이고;

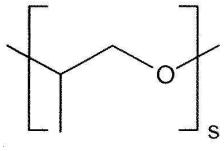
[0085] R^{1J} 및 R^{2J}는 독립적으로 C8-C18 알킬 그룹 또는 C8-C18 알케닐 그룹, 바람직하게는 C12-C18 알킬 그룹 또는 C12-C18 알케닐 그룹이고, q는 5 내지 200, 바람직하게는 10 내지 100, 더욱 바람직하게는 20 내지 60의 정수이다.

[0086] 22. 항목 21에 있어서, 상기 PEG 접합 지질(c3)이 1,2-디미리스토일-sn-글리세롤메톡시(폴리에틸렌 글리콜)-2000(DMG-PEG2k)을 포함하는, 현탁액 제형.

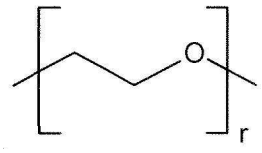
[0087] 23. 항목 1 내지 22 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 나노입자 중 N/P 비율이 0.5 내지 20의 범위, 더욱 바람직하게는 0.5 내지 10의 범위 내인, 수성 현탁액 제형.

[0088] 24. 항목 1 내지 23 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 트리블록 공중합체가 화학식 p-1의 폴리(프로필렌 옥사이드) 블록 B 1개, 및 화학식 p-2의 폴리(에틸렌 옥사이드) 블록 A 2개를 함유하는 A-B-A 트리블록 공중합체인, 수성 현탁액 제형:

[0089] [화학식 p-1]

[0090] 

[0091] [화학식 p-2]

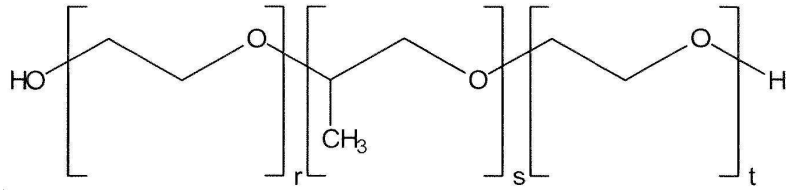
[0092] 

[0093] 상기 화학식 p-1 및 p-2에서,

[0094] s는 15 내지 67, 바람직하게는 20 내지 40의 정수이고,

[0095] r은 각 블록에 대해 독립적으로 2 내지 130, 바람직하게는 50 내지 100, 더욱 바람직하게는 60 내지 90의 정수이다.

[0096] 25. 항목 24에 있어서, 상기 트리블록 공중합체가 다음 구조를 갖는, 수성 현탁액 제형:

[0097] 

[0098] 상기 식에서,

[0099] r 및 t는 서로 독립적으로 2 내지 130, 바람직하게는 50 내지 100, 더욱 바람직하게는 60 내지 90의 정수이고, s는 15 내지 67, 바람직하게는 20 내지 40의 정수이다.

[0100] 26. 항목 24 또는 25에 있어서, 상기 트리블록 공중합체가 폴록사머(Poloxamer) P188인, 수성 현탁액 제형.

[0101] 27. 항목 1 내지 26 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 트리블록 공중합체를 현탁액 제형의 총 용적을 기준으로 하여 0.05 내지 5%(w/v, 25℃ 온도에서), 바람직하게는 0.1 내지 2%의 농도로 포함하는, 수성 현탁액 제형.

[0102] 28. 항목 1 내지 27 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 비히클 용액이 수크로스 또는 NaCl 중 적어도 하나, 더욱 바람직하게는 수크로스 및 NaCl을 추가로 포함하는, 수성 현탁액 제형.

[0103] 29. 항목 1 내지 28에 따르는 수성 비히클 용액에 현탁된 지질 또는 리피도이드 나노입자를 포함하는 에어로졸 형성을 위한 수성 현탁액 제형의 제조 방법으로서, 상기 방법이 핵산(a)를 함유하는 용액을 이온화 가능한 지질 또는 이온화 가능한 리피도이드(b)를 함유하는 용액과 혼합하여 지질 또는 리피도이드 나노입자를 포함하는 현탁액을 형성하는 단계;

[0104] 상기 항목에 정의된 바와 같은 하나의 폴리(프로필렌 옥사이드) 블록과 2개의 폴리(에틸렌 옥사이드) 블록을 함유하는 트리블록 공중합체를 현탁액에 첨가하는 단계; 및

[0105] 상기 현탁액을 접선 유동 여과에 적용하는 단계를 포함하는, 방법.

[0106] 30. 항목 1 내지 28 중 어느 한 항목에 있어서, 항목 29의 방법에 의해 수득되는, 에어로졸 형성을 위한 수성 현탁액 제형.

[0107] 31. 항목 1 내지 28 또는 30 중 어느 한 항목에 따른 에어로졸 형성을 위한 수성 현탁액 제형이 함유되는 구획(compartment)을 포함하는 네뷸라이저(nebulizer).

[0108] 32. 항목 31에 있어서, 제트 네뷸라이저(jet-nebulizer), 연무 흡입기(soft mist inhaler) 및 메쉬 네뷸라이저(mesh nebulizer)로부터 선택되고, 더욱 바람직하게는 연무 흡입기 또는 진동 메쉬 네뷸라이저(vibrating mesh nebulizer)인, 네뷸라이저.

[0109] 33. 기체 상에 분산된 에어로졸 소적(aerosol droplet)을 포함하는 에어로졸로서, 상기 에어로졸 소적이 지질 또는 리피도이드 나노입자, 및 나노입자를 위한 수성 비히클 용액을 포함하고,

[0110] 상기 지질 또는 리피도이드 나노입자가 다음 성분 (a) 및 (b)를 포함하고:

[0111] (a) 핵산 및

[0112] (b) 이온화 가능한 지질 또는 이온화 가능한 리피도이드;

[0113] 상기 수성 비히클 용액이 하나의 폴리(프로필렌 옥사이드) 블록과 2개의 폴리(에틸렌 옥사이드) 블록을 함유하는 트리블록 공중합체를 포함하는, 에어로졸.

[0114] 34. 항목 33에 있어서, 상기 기체 상이 공기인, 에어로졸.

[0115] 35. 항목 33 또는 34에 있어서, 상기 에어로졸 소적의 질량 중앙 공기역학적 직경(mass median aerodynamic diameter; MMAD)이 2 내지 10㎛, 바람직하게는 3 내지 8㎛ 범위인, 에어로졸.

[0116] 36. 항목 33 내지 35 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 핵산이 RNA 및 플라스미드 DNA로부터 선택되는, 에어로졸.

[0117] 37. 항목 33 내지 36 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 핵산이 mRNA, siRNA, miRNA, 안티센스 RNA, tRNA 및 비

코딩 RNA로부터 선택되고, 더욱 바람직하게는 mRNA인, 에어로졸.

[0118] 38. 항목 33 내지 37 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 나노입자가 동적 광 산란에 의해 결정된 바와 같이, 10 내지 500nm 범위, 더욱 바람직하게는 10 내지 250nm 범위, 더욱 더 바람직하게는 20 내지 200nm 범위의 Z-평균 직경을 갖는, 에어로졸.

[0119] 39. 항목 33 내지 38 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 나노입자가 동적 광 산란에 의해 결정된 바와 같이, 0.05 내지 0.4의 범위, 더욱 바람직하게는 0.05 내지 0.2의 범위의 다분산 지수를 갖는, 에어로졸.

[0120] 40. 항목 33 내지 39 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 나노입자가 다음 성분 (c1) 내지 (c6) 중 하나 이상을 추가로 포함하는, 에어로졸:

[0121] (c1) 스테롤 구조를 갖는 비이온화 가능한 지질;

[0122] (c2) 포스포글리세라이드 지질;

[0123] (c3) PEG 접합 지질;

[0124] (c4) 폴리사르코신 접합 지질;

[0125] (c5) 파실화 지질; 및

[0126] (c6) 양이온성 중합체.

[0127] 41. 항목 33 내지 40 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 나노입자가

[0128] 이온화 가능한 지질 또는 이온화 가능한 리피도이드(b) 30 내지 65mol%, 및 다음 성분:

[0129] 스테롤 구조를 갖는 지질(c1) 10 내지 50mol%,

[0130] 포스포글리세라이드 지질(c2) 4 내지 50mol%,

[0131] PEG 접합 지질(c3), 폴리사르코신 접합 지질(c4) 및 파실화 지질(c5) 중 하나 또는 이들의 임의의 조합 0.5 내지 10mol%,

[0132] 양이온성 중합체(c6) 0.5 내지 10mol% 중 하나 이상을 (b)와 (c1) 내지 (c6)의 합이 100mol%에 달하도록 포함하는, 에어로졸.

[0133] 42. 항목 33 내지 39 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 나노입자가 다음 성분 (c1) 내지 (c3)을 추가로 포함하는, 에어로졸:

[0134] (c1) 스테롤 구조를 갖는 비이온화 가능한 지질;

[0135] (c2) 포스포글리세라이드 지질; 및

[0136] (c3) PEG 접합 지질.

[0137] 43. 항목 42에 있어서, 상기 나노입자가

[0138] 30 내지 65mol%의 이온화 가능한 지질 또는 이온화 가능한 리피도이드(b),

[0139] 10 내지 50mol%의 스테롤 구조를 갖는 지질(c1),

[0140] 4 내지 50mol%의 포스포글리세라이드 지질(c2), 및

[0141] 0.5 내지 10mol%의 PEG 접합 지질(c3)을 (b)와 (c1) 내지 (c3)의 합이 100mol%에 달하도록 포함하는, 에어로졸.

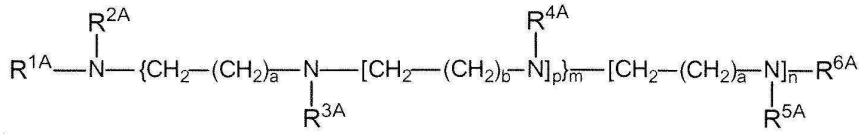
[0142] 44. 항목 33 내지 43 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 나노입자가 핵산과 상이한 폴리음이온 성분을 추가로 포함하는, 에어로졸.

[0143] 45. 항목 33 내지 44 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 나노입자의 조성이 핵산의 중량에 대한 핵산 이외의 성분의 중량의 합의 나노입자 중의 중량 비율이 30:1 내지 1:1의 범위, 더욱 바람직하게는 20:1 내지 2:1, 가장 바람직하게는 15:1 내지 3:1이 되도록 하는, 에어로졸.

[0144] 46. 항목 33 내지 45 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 나노입자가 다음 화학식 b-1의 이온화 가능한 리피도이드

(b), 또는 화학식 b-1의 화합물에 함유된 질소 원자 중 하나 이상이 양성화되어 양전하를 띠는 화합물을 제공하는 이의 양성자화 형태를 포함하는, 에어로졸:

[0145] [화학식 b-1]

[0146] 

[0147] 상기 화학식 b-1에서,

[0148] a는 1이고 b는 2 내지 4의 정수이거나; a는 2 내지 4의 정수이고 b는 1이며,

[0149] p는 1 또는 2이고,

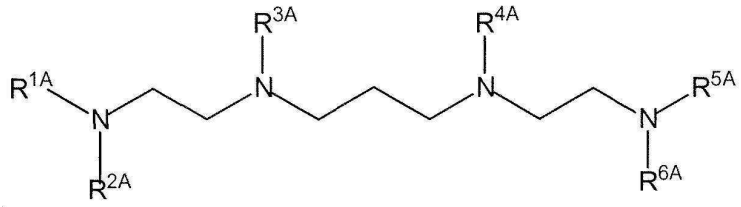
[0150] m은 1 또는 2이고; n은 0 또는 1이며, m+n은 ≥ 2이고;

[0151] R^{1A} 내지 R^{6A}는 서로 독립적으로 수소; $-CH_2-CH(OH)-R^{7A}$, $-CH(R^{7A})-CH_2-OH$, $-CH_2-CH_2-(C=O)-O-R^{7A}$, $-CH_2-CH_2-(C=O)-NH-R^{7A}$; $-CH_2-R^{7A}$; $-C(NH)-NH_2$; 폴리(에틸렌 글리콜) 쇄; 및 수용체 리간드로부터 선택되고; 여기서 R^{7A}는 C3-C18 알킬 및 하나의 C-C 이중 결합을 갖는 C3-C18 알케닐로부터 선택되고;

[0152] 단, R^{1A} 내지 R^{6A} 중 적어도 두 개의 잔기는 $-CH_2-CH(OH)-R^{7A}$, $-CH(R^{7A})-CH_2-OH$, $-CH_2-CH_2-(C=O)-O-R^{7A}$, $-CH_2-CH_2-(C=O)-NH-R^{7A}$ 및 $-CH_2-R^{7A}$로부터 선택되고, 여기서 R^{7A}는 C3-C18 알킬 및 하나의 C-C 이중 결합을 갖는 C3-C18 알케닐로부터 선택된다.

[0153] 47. 항목 46에 있어서, 상기 나노입자가 다음 화학식 b-1b의 이온화 가능한 리피도이드(b) 또는 화학식 1a의 화합물에 함유된 질소 원자 중 하나 이상이 양성화되어 양전하를 띠는 화합물을 제공하는 이의 양성자화 형태를 포함하는, 에어로졸:

[0154] [화학식 b-1b]

[0155] 

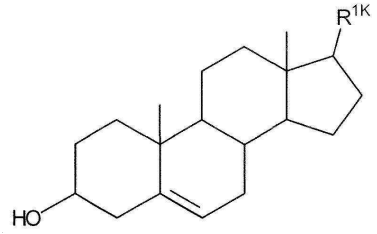
[0156] 상기 화학식 b-1b에서,

[0157] R^{1A} 내지 R^{6A}는 항목 46에서와 같이 정의된다.

[0158] 48. 항목 46 또는 47에 있어서, R^{1A} 내지 R^{6A}가 수소 및 $-CH_2-CH(OH)-R^{7A}$로부터 독립적으로 선택되고, 여기서 R^{7A}는 C8-C18 알킬 및 하나의 C-C 이중 결합을 갖는 C8-C18 알케닐로부터 선택되고, 단 R^{1A} 내지 R^{6A} 중 적어도 2개의 잔기, 바람직하게는 적어도 3개의 잔기, 더욱 바람직하게는 적어도 4개의 잔기는 $-CH_2-CH(OH)-R^{7A}$이고, 여기서 R^{7A}는 C8-C18 알킬 및 하나의 C-C 이중 결합을 갖는 C8-C18 알케닐로부터 선택되는, 에어로졸.

[0159] 49. 항목 40 내지 48 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 나노입자가 화학식 c1-1의 스테롤 구조를 갖는 비이온화 가능한 지질(c1)을 포함하는, 에어로졸:

[0160] [화학식 c1-1]

[0161] 

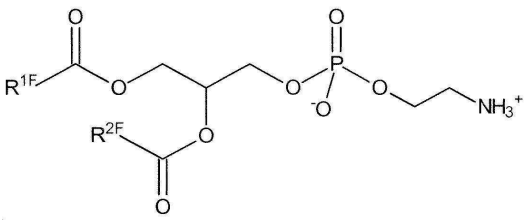
[0162] 상기 화학식 c1-1에서,

[0163] R^{1K}는 C3-C12 알킬 그룹이다.

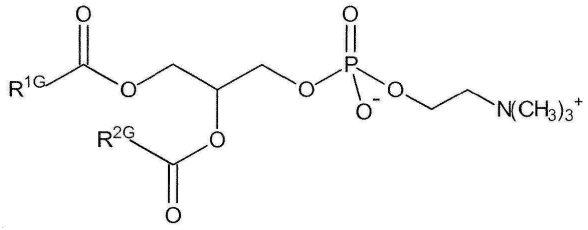
[0164] 50. 항목 40 내지 49 중 어느 한 항목에 있어서, 스테롤 구조를 갖는 비이온화 가능한 지질(c1)이 콜레스테롤을 포함하는, 에어로졸.

[0165] 51. 항목 40 내지 50 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 나노입자가 화학식 c2-1의 포스포글리세라이드 지질(c2) 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염; 또는 화학식 c2-2의 포스포글리세라이드 지질(c2) 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는, 에어로졸:

[0166] [화학식 c2-1]

[0167] 

[0168] [화학식 c2-2]

[0169] 

[0170] 상기 화학식 c2-1 및 c2-2에서,

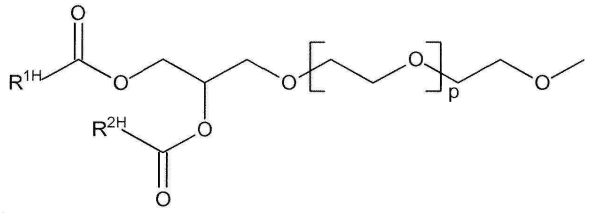
[0171] R^{1F} 및 R^{2F}는 독립적으로 C8-C18 알킬 그룹 또는 C8-C18 알케닐 그룹, 바람직하게는 C12-C18 알킬 그룹 또는 C12-C18 알케닐 그룹이고,

[0172] R^{1G} 및 R^{2G}는 독립적으로 C8-C18 알킬 그룹 또는 C8-C18 알케닐 그룹, 바람직하게는 C12-C18 알킬 그룹 또는 C12-C18 알케닐 그룹이다.

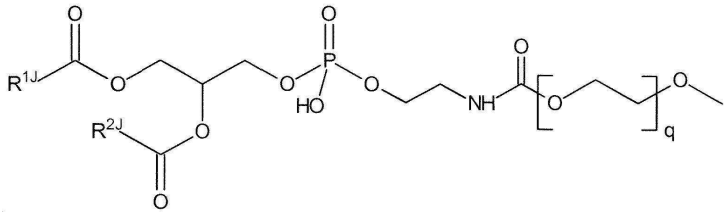
[0173] 52. 항목 40 내지 51 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 포스포글리세라이드 지질(c2)이 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포콜린(DPPC) 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는, 에어로졸.

[0174] 53. 항목 40 내지 52 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 나노입자가 화학식 c3-1의 PEG 접합 지질(c3) 또는 화학식 c3-2의 PEG 접합 지질(c3) 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는, 에어로졸:

[0175] [화학식 c3-1]

[0176] 

[0177] [화학식 c3-2]

[0178] 

[0179] 상기 화학식 c3-1 및 화학식 c3-2에서,

[0180] R^{1H} 및 R^{2H}는 독립적으로 C8-C18 알킬 그룹 또는 C8-C18 알케닐 그룹, 바람직하게는 C12-C18 알킬 그룹 또는 C12-C18 알케닐 그룹이고, p는 5 내지 200, 바람직하게는 10 내지 100, 더욱 바람직하게는 20 내지 60의 정수이고;

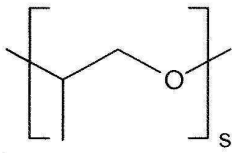
[0181] R^{1J} 및 R^{2J}는 독립적으로 C8-C18 알킬 그룹 또는 C8-C18 알케닐 그룹, 바람직하게는 C12-C18 알킬 그룹 또는 C12-C18 알케닐 그룹이고, q는 5 내지 200, 바람직하게는 10 내지 100, 더욱 바람직하게는 20 내지 60의 정수이다.

[0182] 54. 항목 53에 있어서, 상기 PEG 접합 지질(c3)이 1,2-디미리스토일-sn-글리세롤메톡시(폴리에틸렌 글리콜)-2000(DMG-PEG2k)을 포함하는, 에어로졸.

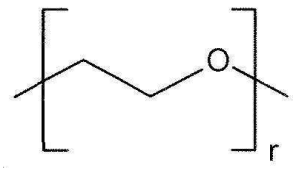
[0183] 55. 항목 33 내지 54 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 나노입자 중 N/P 비율이 0.5 내지 20의 범위 내인, 에어로졸.

[0184] 56. 항목 33 내지 55 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 트리블록 공중합체가 화학식 p-1의 폴리(프로필렌 옥사이드) 블록 B 1개 및 화학식 p-2의 폴리(에틸렌 옥사이드) 블록 A 2개를 함유하는 A-B-A 트리블록 공중합체인, 에어로졸:

[0185] [화학식 p-1]

[0186] 

[0187] [화학식 p-2]

[0188] 

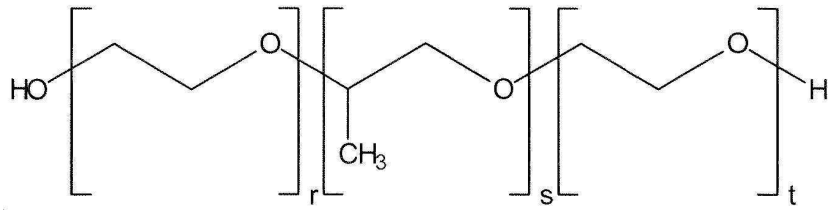
[0189] 상기 화학식 p-1 및 p-2에서,

[0190] s는 15 내지 67, 바람직하게는 20 내지 40의 정수이고,

[0191] r은 각 블록에 대해 독립적으로 2 내지 130, 바람직하게는 50 내지 100, 더욱 바람직하게는 60 내지 90의 정수

이다.

[0192] 57. 항목 56에 있어서, 상기 트리블록 공중합체가 다음 구조를 갖는, 에어로졸:

[0193] 

[0194] 상기 식에서,

[0195] r 및 t는 서로 독립적으로 2 내지 130, 바람직하게는 50 내지 100, 더욱 바람직하게는 60 내지 90의 정수이고,

[0196] s는 15 내지 67, 바람직하게는 20 내지 40의 정수이다.

[0197] 58. 항목 56 또는 57에 있어서, 상기 트리블록 공중합체가 폴록사머 P188인, 에어로졸.

[0198] 59. 항목 33 내지 58 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 비히클 용액이 수크로스 또는 NaCl 중 적어도 하나, 더욱 바람직하게는 수크로스 및 NaCl을 추가로 포함하는, 에어로졸.

[0199] 60. 항목 33 내지 59 중 어느 한 항목에 있어서, 항목 1 내지 28 및 30 중 어느 한 항목에 따르는 수성 현탁액 제형의 분무(nebulization)에 의해 수득 가능한, 에어로졸.

[0200] 61. 에어로졸의 제조 방법으로서, 상기 방법이 항목 1 내지 28 및 30 중 어느 한 항목에 따르는 에어로졸 형성을 위한 수성 현탁액 제형을 분무하는 단계를 포함하는, 방법.

[0201] 62. 항목 61에 있어서, 상기 에어로졸이 항목 33 내지 60 중 어느 한 항목에 따르는 에어로졸인, 방법.

[0202] 63. 항목 61 또는 62에 있어서, 상기 분무가 제트 네뷸라이저, 연무 흡입기 및 메쉬 네뷸라이저로부터 선택된 흡입기에 의해, 더욱 바람직하게는 연무 흡입기 또는 진동 메쉬 네뷸라이저에 의해 달성되는, 방법.

[0203] 64. 항목 1 내지 28 및 30 중 어느 한 항목에 있어서, 약제(medicament)로서 사용하기 위한 것이고, 상기 현탁액 제형이 분무되어야 하고, 분무에 의해 제공되는 상기 에어로졸이 대상체에게 투여되어야 하는, 수성 현탁액 제형.

[0204] 65. 항목 33 내지 60 중 어느 한 항목에 있어서, 약제로 사용하기 위한, 에어로졸.

[0205] 66. 항목 1 내지 28 및 30 중 어느 한 항목에 있어서, 핵산 기반 요법을 통한 질환 또는 장애의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 것이고, 상기 치료 또는 예방이 수성 현탁액 제형의 분무 및 대상자의 호흡기에, 또는 대상체의 호흡기를 통한, 바람직하게는 폐 투여 또는 비강 투여를 통한 분무로 제공된 에어로졸의 투여를 포함하는, 수성 현탁액 제형.

[0206] 67. 항목 33 내지 60 중 어느 한 항목에 있어서, 핵산 기반 요법을 통한 질환 또는 장애의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 것이고, 상기 치료 또는 예방이 대상체의 호흡기에, 또는 대상체의 호흡기를 통한, 바람직하게는 폐 투여 또는 비강 투여를 통한 에어로졸의 투여를 포함하는, 에어로졸.

[0207] 68. 항목 66 또는 항목 67에 있어서, 치료 또는 예방될 질환 또는 장애가 폐 질환인, 수성 현탁액 제형 또는 에어로졸.

[0208] 69. 항목 1 내지 28 및 30 중 어느 한 항목에 따른 수성 현탁액 제형의 분무 및 대상체의 호흡기로 또는 대상체의 호흡기를 통한, 바람직하게는 폐 투여 또는 비강 투여를 통한 분무로 제공된 에어로졸의 투여를 포함하는 치료 방법.

[0209] 70. 대상체의 호흡기로 또는 대상체의 호흡기를 통한, 바람직하게는 폐 투여 또는 비강 투여를 통한 항목 33 내지 60 중 어느 한 항목에 따른 에어로졸의 투여를 포함하는 치료 방법.

[0210] 71. 항목 69 또는 70에 있어서, 폐 질환의 치료를 위한, 방법.

[0211] 상기 항목에서의 요약은, 예를 들어, 추가의 바람직한 구현예 또는 임의의 특징과 관련하여 다음 상세한 설명에 제공되는 정보가 또한 상기 항목에 적용되고, 그 반대의 경우도 마찬가지 이도록, 본 발명의 일반적인 개시내용

의 일부를 형성한다는 것이 이해될 것이다.

[0212] 이하, 본 발명의 상세한 설명이 제공될 것이다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 그리고 특정 맥락에서 달리 명시되지 않는 한, 본 맥락에서 제공된 정보는 본 발명에 따른 에어로졸 형성을 위한 수성 현탁액 제형(본원에서 "수성 현탁액 제형" 또는 단순히 "현탁액 제형"으로 지칭될 수 있음), 본 발명에 따른 에어로졸 및 현탁액 제형 또는 에어로졸을 포함하는 방법 및 용도를 포함하는 본 발명의 모든 양태에 적용된다.

[0213] 먼저, 나노입자 및 이들의 성분이 설명될 것이다. 본 발명에 따른 에어로졸 형성을 위한 수성 현탁액 제형 및 에어로졸은 지질 나노입자 또는 리피도이드 나노입자를 포함한다. 따라서, 구체적으로 반대로 명시되지 않는 한, 본원에서 "나노입자" 또는 "LNP"에 대한 언급은 지질 나노입자뿐만 아니라 리피도이드 나노입자를 포함한다. 또한, 본 발명에 따른 에어로졸은 수성 현탁액 제형을 사용하여 편리하게 제조될 수 있기 때문에, 본원 나노입자의 성분에 대해 제공되는 정보는 본 발명에 따른 에어로졸 형성을 위한 제형에 함유된 나노입자 및 본 발명에 따른 에어로졸에 함유된 나노입자에 적용되는 것으로 이해되어야 한다.

[0214] 성분 (a)로서, 본 발명에 따른 에어로졸 형성을 위한 제형에 함유된 나노입자 및 본 발명에 따른 에어로졸에 함유된 나노입자는 일반적으로 나노입자의 약제학적 활성 성분을 제공하는 핵산을 포함한다.

[0215] 핵산의 성질은 특별히 제한되지 않는다. 원칙적으로, 본 발명의 맥락에서 임의 유형의 핵산이 사용될 수 있다. 핵산은 당업자에게 공지되어 있으며, 5-탄소 당, 포스페이트 그룹 및 질소 염기의 세 가지 성분으로 이루어진 단량체인 뉴클레오티드로 구성된 생체 중합체 또는 작은 생체 분자를 지칭한다.

[0216] 용어 핵산은 DNA(데옥시리보핵산) 및 RNA(리보핵산), 즉 상기 생체 중합체 계열의 구성원의 전체 명칭이다. 당이 화합물 리보스인 경우, 중합체는 RNA이며, 당이 데옥시리보스로서 리보스로부터 유래된 경우, 중합체는 DNA이다. 용어 "핵산"은 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 핵산은 뉴클레오티드로 구성된 생체 중합체이기 때문에, 용어 "핵산"은 종종 "뉴클레오티드의 서열"로서 지칭되기도 하며, 따라서 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 용어 "핵산" 및 "핵산 서열"은 종종 상호교환적으로 사용된다.

[0217] 바람직한 구현예에서, 본 발명에 따른 수성 현탁액 제형의 나노입자 및 본 발명에 따른 에어로졸의 나노입자는 핵산으로서 리보핵산(RNA), 더욱 바람직하게는 단일 가닥 RNA를 포함하고, 가장 바람직하게는 mRNA이다.

[0218] 용어 "핵산"은 화학적 및/또는 효소적으로 합성된 핵산뿐만 아니라 천연 형태의 핵산의 모든 형태를 포함하며, 핵산 유사체 및 핵산 유도체도 포함한다. 상기 용어는 특히 임의의 백본 변형, 당 변형 또는 염기 변형된 단일 가닥 또는 이중 가닥 핵산, 예를 들어, 록킹 핵산(locked nucleic acid; LNA), 펩티드 핵산(peptide nucleic acid; PNA), 올리고뉴클레오사이드 티오포스페이트 및 포스포트리에스테르, 모르폴리노 올리고뉴클레오티드, 양이온성 올리고뉴클레오티드(US6017700 A, WO/2007/069092), 치환된 리보-올리고뉴클레오티드 또는 포스포로티오에이트를 포함한다. 더욱이, 용어 "핵산"은 또한 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 유사체를 포함하는 임의의 분자를 지칭한다. 본 발명의 나노입자에 포함된 핵산의 서열 또는 크기에 관한 제한은 없다. 핵산은 주로 본 발명의 나노입자가 전달되는 생물학적 표적에서 달성하고자 하는 생물학적 효과에 의해 정의된다. 예를 들어, 이하에서 추가로 더 상세히 요약되는 바와 같이, 유전자 또는 핵산 요법에서의 적용의 경우, 핵산 또는 핵산 서열은 발현될 유전자 또는 유전자 단편에 의해 또는 결함 유전자 또는 임의의 유전자 표적 서열의 의도된 치환 또는 복구에 의해 또는 억제, 녹다운, 하향 조절 또는 상향 조절될 유전자의 표적 서열에 의해 정의될 수 있다.

[0219] 본 발명에 따른 현탁액 및 에어로졸의 나노입자는 DNA 분자인 핵산을 포함할 수 있다. 이러한 DNA 분자의 바람직한 구현예는 mRNA 분자로 전사될 수 있는 DNA 분자이다. 전사는 유전자 발현의 첫 번째 단계이며, 여기서 DNA 분자의 특정 세그먼트는 효소 RNA 중합효소에 의해 mRNA 분자로 복사된다. 전사 동안, DNA 서열은 RNA 중합효소에 의해 판독되며, 이는 1차 전사체라고 하는 상보적인 역평행 RNA 가닥을 생성한다.

[0220] 본 발명에 따른 DNA 분자는 표준 분자 생물학 기술에 의해 벡터, 바람직하게는 발현 벡터에 도입될 수 있다(참조: 예를 들어, Sambrook et al., Molecular Cloning, A laboratory manual, 2nd Ed, 1989). 본 발명의 의미에서 "발현 벡터" 또는 "클로닝 벡터"와 같은 용어 "벡터"는 바람직하게는 염색체 DNA와 독립적으로 세포 내에서 복제할 수 있고, 유전 물질을 세포 내로 운반하여 (복제 및/또는) 발현(즉, RNA로 전사되고 아미노산 서열로 번역)될 수 있는 비히클로서 사용되는 DNA의 원형 이중 가닥 단위로 이해된다. 외래 DNA를 함유하는 벡터는 재조합 DNA라고 한다. 벡터 자체는 일반적으로 전형적으로 삽입물(예: 본 발명의 핵산 분자/DNA 분자) 및 벡터의 "백본" 역할을 하는 더 큰 서열로 구성되는 DNA 서열이다. 본 발명의 의미에서 플라스미드는 박테리아에서 가장 흔히 발견되며 세포 사이에 유전자를 전달하기 위한 재조합 DNA 연구에 사용되며, 자체로 본 발명의 의미에서 사용되는 바와 같은 "벡터"의 하위집단이다.

[0221] 추가의 조절 서열이 본 발명의 DNA 분자에 첨가될 수 있음이 당업자에게 명백하다. 예를 들어, 유도된 발현을 허용하는 전사 인핸서 및/또는 서열이 사용될 수 있다. 적절한 유도성 시스템은, 예를 들어, 문헌(Gossen and Bujard, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992), 5547-5551) 및 Gossen, Trends Biotech. 12 (1994), 58-62)에 기재된 바와 같은 테트라사이클린 조절 유전자 발현, 또는, 예를 들어, 문헌(Crook, EMBO J. 8 (1989), 513-519)에 기재된 바와 같은 덱사메타손 유도성 유전자 발현 시스템이다. 본 발명은 또한 DNA 분자를 포함하는 벡터, 바람직하게는 발현 벡터를 사용할 수 있다. 벡터는, 예를 들어, 플라스미드, 코스미드, 바이러스, 박테리오파지 또는, 예를 들어, 유전 공학에서 통상적으로 사용되는 다른 벡터일 수 있으며, 적절한 숙주 세포에서 그리고 적절한 조건하에서 상기 벡터의 선택을 허용하는 추가 유전자, 예를 들어, 마커 유전자를 포함할 수 있다.

[0222] 본 발명의 맥락에서 사용되는 핵산이 DNA 분자인 경우, 그것은 플라스미드 DNA(pDNA) 분자일 수 있다.

[0223] 상기 주시된 바와 같이, 본 발명에 따른 수성 현탁액 제형의 나노입자 및 본 발명에 따른 에어로졸의 나노입자는 바람직하게는 핵산으로서 리보핵산(RNA), 더욱 바람직하게는 단일 가닥 RNA를 포함하고, 가장 바람직하게는 mRNA이다.

[0224] RNA와 관련하여, 원칙적으로 임의 유형의 RNA가 본 발명의 맥락에서 사용될 수 있다. 바람직한 구현예에서, RNA는 단일 가닥 RNA이다. 용어 "단일 가닥 RNA"는 두 개 이상의 별개의 쇄가 별개의 쇄의 혼성화로 인해 이중 가닥 분자를 형성하는 RNA 분자와는 대조적으로 리보뉴클레오티드의 단일 연속 쇄를 의미한다. 용어 "단일 가닥 RNA"는 단일 가닥 분자가 그 자체로 이중 가닥 구조, 예를 들어, 2차(예: 루프 및 줄기-루프) 또는 3차 구조를 형성하는 것을 배제하지 않는다. 예는 tRNA 및 mRNA뿐만 아니라 안티센스-RNA, siRNA 등과 같은 임의의 다른 유형의 단일 가닥 RNA이다.

[0225] 용어 "RNA"는 아미노산 서열을 코딩하는 RNA뿐만 아니라 아미노산 서열을 코딩하지 않는 RNA를 포함한다. 게놈의 80% 이상이 단백질을 코딩하지 않는 기능적 DNA 요소를 함유한다고 제안되었다. 이러한 비코딩 서열은 조절 DNA 요소(전사 인자, 조절 인자 및 공동 조절 인자 등을 위한 결합 부위)와 단백질로 결코 번역되지 않는 전사체를 코딩하는 서열을 포함한다. 게놈에 의해 인코딩되고 RNA로 전사되지만 단백질로 번역되지 않는 이러한 전사체는 비코딩 RNA(ncRNA)라고 한다. 따라서, 하나의 구현예에서, RNA는 비코딩 RNA이다. 바람직하게는, 비코딩 RNA는 단일 가닥 분자이다. 연구는 ncRNA가 유전자 조절, 게놈 완전성의 유지, 세포 분화 및 발달에 중요한 역할을 하며, 이들은 다양한 인간 질환에서 잘못 조절된다는 것을 입증한다. 상이한 유형의 ncRNA: 짧은(20 내지 50nt), 중간(50 내지 200nt) 및 긴(>200nt) ncRNA가 있다. 짧은 ncRNA는 마이크로RNA(miRNA), 작은 간섭성 RNA(siRNA), piwi-상호작용 RNA(piRNA) 및 전사 개시 RNA(tiRNA)를 포함한다. 중간 ncRNA의 예는 작은 핵 RNA(snRNA), 작은 핵 RNA(snoRNA), 전이 RNA(tRNA), 전사 개시 부위 관련 RNA(TSSaRNA), 프로모터 관련 작은 RNA(PASR) 및 프로모터 업스트림 전사체(PROMPT)이다. 긴 비코딩 RNA(lncRNA)는 긴 유전자간 비코딩 RNA(lincRNA), 안티센스-lncRNA, 인트론 lncRNA, 전사된 초보존 RNA(T-UCR) 및 기타를 포함한다(Bhan A, Mandal SS, ChemMedChem. 2014 Mar 26. doi: 10.1002/cmdc.201300534). 상기 언급된 비코딩 RNA 중, siRNA만 이중 가닥이다. 따라서, 바람직한 구현예에서, 비코딩 RNA는 단일 가닥이기 때문에, 비코딩 RNA는 siRNA가 아닌 것이 바람직하다. 다른 구현예에서, RNA는 코딩 RNA, 즉 아미노산 서열을 코딩하는 RNA이다. 이러한 RNA 분자는 또한 mRNA(메신저 RNA)로 지칭되며, 단일 가닥 RNA 분자이다. RNA는 당업자에게 공지된 합성 화학 및 효소적 방법론에 의해 또는 재조합 기술의 사용에 의해 제조될 수 있으며, 천연 공급원으로부터 단리될 수 있거나 이들의 조합에 의해 제조될 수 있다.

[0226] 메신저 RNA(mRNA)는 주로 아데노신, 시티딘, 우리딘 및 구아노신을 뉴클레오사이드로서 갖는 뉴클레오사이드 포스페이트 구성 요소의 적층인 공중합체이며, 이는 중간 담체로서 세포핵의 DNA에서 세포질로 유전 정보를 가져와 단백질로 번역된다. 따라서, 이들은 유전자 발현을 위한 대안으로 적합하다.

[0227] 본 발명의 맥락에서, mRNA는 세포 내로 유입될 경우, 단백질 또는 이의 단편의 발현에 적합하거나 단백질 또는 이의 단편으로 번역 가능한 임의의 폴리리보뉴클레오티드 분자를 의미하는 것으로 이해되어야 한다. 여기서 용어 "단백질"은 임의의 종류의 아미노산 서열, 즉 각각 펩티드 결합을 통해 연결된 두 개 이상의 아미노산의 쇄를 포함하며, 펩티드 및 융합 단백질도 포함한다.

[0228] mRNA는 세포 또는 세포 부근에서 기능이 필요하거나 유익한 단백질 또는 이의 단편, 예를 들어, 결핍 또는 결함 형태가 질환 또는 질병에 대한 유발제이고 이의 제공이 질환 또는 장애를 완화하거나 예방할 수 있는 단백질 또는 세포 또는 그 의 부근에서 신체에 유익한 과정을 촉진할 수 있는 단백질을 인코딩하는 리보뉴클레오티드 서열을 함유한다. mRNA는 완전한 단백질 또는 이의 기능적 변이체를 위한 서열을 함유할 수 있다. 또한, 리보뉴

클레오티드 서열은 인자, 유도제, 조절제, 자극제 또는 효소로서 작용하는 단백질 또는 이의 기능적 단편을 인코딩할 수 있으며, 여기서 이 단백질은 기능이 장애, 특히 대사 장애(metabolic disorder)를 치료하기 위해 또는 새로운 혈관, 조직 등의 형성과 같은 생체내 과정을 개시하기 위해 필요한 것이다. mRNA로 인코딩될 수 있는 단백질의 예로는 항체, 사이토카인 또는 케모카인을 포함한다. 여기서, 기능적 변이체는 세포에서 기능이 필요하거나 결핍 또는 결함 형태가 병원성인 단백질의 기능을 수행할 수 있는 단편을 의미하는 것으로 이해된다. 또한, mRNA는 또한 추가의 기능적 영역 및/또는 3' 또는 5' 비코딩 영역, 특히 3' 및/또는 5' UTR을 가질 수 있다. 3' 및/또는 5' 비코딩 영역은 단백질 인코딩 서열 또는 인공 서열, 예를 들어, RNA의 안정화에 기여하는 서열을 자연적으로 인접하는 영역일 수 있다. 당업자는 일상적인 실험에 의해 각각의 경우에 이에 적합한 서열을 결정할 수 있다.

[0229] 바람직한 구현예에서, mRNA는 특히 번역을 개선하기 위해 5' 내지 5' 트리포스페이트 연결을 통해 mRNA에 연결된 m7GpppG, mRNA의 5'-말단으로부터 끝에서 두 번째 뉴클레오티드 상의 추가의 메틸 그룹(Cap-1, 항-역 Cap 유사체(ARCA)) 및/또는 내부 리보솜 진입 부위(IRES) 및/또는 3'-말단의 폴리A-테일로 이루어진 5'-cap(5-프라임-cap; cap-0)을 함유한다. mRNA는, 예를 들어, cap-2 구조 또는 히스톤 줄기-루프 구조와 같이 번역을 촉진하는 추가 영역을 가질 수 있다.

[0230] 본 발명에 따른 현탁액 제형 및 에어로졸에 존재할 수 있는 RNA는 변형되지 않은 뉴클레오티드 및 변형된 뉴클레오티드를 함유할 수 있다. 본원에 사용된 용어 "변형되지 않은 뉴클레오티드"는 A, C, G 및 U 뉴클레오티드를 지칭한다. 본원에 사용된 용어 "변형된 뉴클레오티드"는 A, C, G 및 U 뉴클레오티드의 임의의 천연 또는 비천연 이성체뿐만 아니라 임의의 천연 또는 천연 유사체, 예를 들어, 화학적 변형 또는 치환된 잔기를 갖는 대안적인 또는 변형된 뉴클레오티드 또는 이의 이성체를 지칭한다. 변형된 뉴클레오티드는 염기 변형 및/또는 당 변형을 가질 수 있다. 변형된 뉴클레오티드는 또한, 예를 들어, mRNA 분자의 5'-프라임 캡과 관련하여 포스페이트 그룹 변형을 가질 수 있다. 변형된 뉴클레오티드는 또한 뉴클레오티드의 공유 결합 변형에 의해 전사 후 합성되는 뉴클레오티드를 포함한다. 추가로, 변형되지 않은 뉴클레오티드와 변형된 뉴클레오티드의 임의의 적절한 혼합물이 가능하다. 변형된 뉴클레오티드의 예의 비제한적인 수는 문헌(예: US 2013/0123481 A1; Cantara et al., Nucleic Acids Res, 2011, 39(Issue suppl_1):D195-D201; Helm and Alfonzo, Chem Biol, 2014, 21(2):174-185; 또는 Carell et al., Angew Chem Int Ed Engl, 2012, 51(29):7110-31)에서 찾을 수 있고, 일부 바람직한 변형된 뉴클레오티드는 이들 각각의 뉴클레오사이드 잔기에 기초하여 아래에 예시적으로 언급된다: 1-메틸아데노신, 2-메틸티오-N6-하이드록시노르발릴 카바모일아데노신, 2-메틸아데노신, 2'-O-리보실포스페이트 아데노신, N6-메틸-N6-트레오닐카바모일아데노신, N6-아세틸아데노신, N6-글리시닐카바모일아데노신, N6-이소펜테닐아데노신, N6-메틸아데노신, N6-트레오닐카바모일아데노신, N6,N6-디메틸아데노신, N6-(시스-하이드록시이소펜테닐)아데노신, N6-하이드록시노르발릴카바모일아데노신, 1,2'-O-디메틸아데노신, N6,2'-O-디메틸아데노신, 2'-O-메틸아데노신, N6,N6,2'-O-트리메틸아데노신, 2-메틸티오-N6-(시스-하이드록시이소펜테닐)아데노신, 2-메틸티오-N6-메틸아데노신, 2-메틸티오-N6-이소펜테닐아데노신, 2-메틸티오-N6-트레오닐 카바모일아데노신, N6-2-메틸티오-N6-트레오닐 카바모일아데노신, 2-메틸티오-N6-(시스-하이드록시이소펜테닐)아데노신, 7-메틸아데노신, 2-메틸티오-아데노신, 2-메톡시-아데노신, 2'-아미노-2'-데옥시아데노신, 2'-아지도-2'-데옥시아데노신, 2'-플루오로-2'-데옥시아데노신, 2-아미노퓨린, 2,6-디아미노퓨린, 7-데아자-아데노신, 7-데아자-8-아자-아데노신, 7-데아자-2-아미노퓨린, 7-데아자-8-아자-2-아미노퓨린, 7-데아자-2,6-디아미노퓨린, 7-데아자-8-아자-2,6-디아미노퓨린; 2-티오시티딘, 3-메틸시티딘, N4-아세틸시티딘, 5-포르밀시티딘, N4-메틸시티딘, 5-메틸시티딘, 5-하이드록시메틸시티딘, 5-하이드록시시티딘, 리시딘, N4-아세틸-2'-O-메틸시티딘, 5-포르밀-2'-O-메틸시티딘, 5,2'-O-디메틸시티딘, 2-O-메틸시티딘, N4,2'-O-디메틸시티딘, N4,N4,2'-O-트리메틸시티딘, 이소시티딘, 슈도시티딘, 슈도이소시티딘, 2-티오-시티딘, 2'-메틸-2'-데옥시시티딘, 2'-아미노-2'-데옥시시티딘, 2'-플루오로-2'-데옥시시티딘, 5-요오도시티딘, 5-브로모시티딘, 2'-아지도-2'-데옥시시티딘, 2'-아미노-2'-데옥시시티딘, 2'-플루오르-2'-데옥시시티딘, 5-아자-시티딘, 3-메틸-시티딘, 1-메틸-슈도이소시티딘, 피롤로-시티딘, 피롤로-슈도이소시티딘, 2-티오-5-메틸-시티딘, 4-티오-슈도이소시티딘, 4-티오-1-메틸-슈도이소시티딘, 4-티오-1-메틸-1-데아자-슈도이소시티딘, 1-메틸-1-데아자-슈도이소시티딘, 2-메톡시-시티딘, 2-메톡시-5-메틸-시티딘, 4-메톡시-슈도이소시티딘, 4-메톡시-1-메틸-슈도이소시티딘, 제불라린,5-아자-제불라린, 5-메틸-제불라린, 5-아자-2-티오-제불라린, 2-티오-제불라린; 1-메틸구아노신, N2,7-디메틸구아노신, N2-메틸구아노신, 2'-O-리보실포스페이트 구아노신, 7-메틸구아노신, 하이드록시와이부토신, 7-아미노메틸-7-데아자구아노신, 7-시아노-7-데아자구아노신, N2,N2-디메틸구아노신, N2,7,2'-O-트리메틸구아노신, N2,2'-O-디메틸구아노신, 1,2'-O-디메틸구아노신, 2'-O-메틸구아노신, N2,N2,2'-O-트리메틸구아노신, N2,N2J-트리메틸구아노신, 이소구아노신, 4-데메틸와이오신, 에폭시케우오신, 변형되지 않은 하이

드록시와이부토신, 메틸화된 변형되지 않은 하이드록시와이부토신, 이소와이오신, 퍼옥시와이부토신, 갈락토실-케우오신, 만노실-케우오신, 케우오신, 아르케오신, 와이부토신, 메틸와이오신, 와이오신, 7-아미노카르복시프로필데메틸와이오신, 7-아미노카르복시프로필와이오신, 7-아미노카르복시프로필와이오신메틸에스테르, 7-데아자-구아노신, 7-데아자-8-아자-구아노신, 6-티오-구아노신, 6-티오-7-데아자-구아노신, 6-티오-7-데아자-8-아자-구아노신, 7-메틸-구아노신, 6-티오-7-메틸-구아노신, 7-메틸이노신, 6-메톡시-구아노신, 1-메틸구아노신, 8-옥소-구아노신, 7-메틸-8-옥소-구아노신, 1-메틸-6-티오-구아노신, N2-메틸-6-티오-구아노신, N2,N2-디메틸-6-티오-구아노신, N1-메틸구아노신, 2'-아미노-3'-데옥시구아노신, 2'-아지도-2'-데옥시구아노신, 2'-플루오로-2'-데옥시구아노신, 2-티오우리딘, 3-(3-아미노-3-카르복시프로필)우리딘, 3-메틸우리딘, 4-티오우리딘, 5-메틸-2-티오우리딘, 5-메틸아미노메틸우리딘, 5-카르복시메틸우리딘, 5-카르복시메틸아미노메틸우리딘, 5-하이드록시우리딘, 5-메틸우리딘, 5-타우리노메틸우리딘, 5-카바모일메틸우리딘, 5-(카르복시하이드록시메틸)우리딘 메틸 에스테르, 디하이드로우리딘, 5-메틸디하이드로우리딘, 5-메틸아미노메틸-2-티오우리딘, 5-(카르복시하이드록시메틸)우리딘, 5-(카르복시하이드록시메틸)-2'-O-메틸우리딘 메틸 에스테르, 5-(이소펜테닐아미노메틸)우리딘, 5-(이소펜테닐아미노메틸)-2-티오우리딘, 3,2'-O-디메틸우리딘, 5-카르복시메틸아미노메틸-2'-O-메틸우리딘, 5-카바모일하이드록시메틸우리딘, 5-카바모일메틸-2'-O-메틸우리딘, 5-카바모일메틸-2-티오우리딘, 5-메톡시카보닐메틸-2'-O-메틸우리딘, 5-(이소펜테닐아미노메틸)-2'-O-메틸우리딘, 5,2'-O-디메틸우리딘, 2'-O-메틸우리딘, 2'-O-메틸-2-티오루딘, 2-티오-2'-O-메틸우리딘, 우리딘 5-옥시아세트산, 5-메톡시카보닐메틸우리딘, 우리딘 5-옥시아세트산 메틸 에스테르, 5-메톡시우리딘, 5-아미노메틸-2-티오우리딘, 5-카르복시메틸아미노메틸-2-티오우리딘, 5-메틸아미노메틸-2-셀레노우리딘, 5-메톡시카보닐메틸-2-티오우리딘, 5-타우리노메틸-2-티오우리딘, 슈도우리딘, 1-메틸-3-(3-아미노-3-카르복시프로필)슈도우리딘, 1-메틸슈도우리딘, 3-메틸슈도우리딘, 2'-O-메틸슈도우리딘, 5-포르밀우리딘, 5-아미노메틸-2-게라닐우리딘, 5-타우리노메틸우리딘, 5-요오도우리딘, 5-브로모우리딘, 2'-메틸-2'-데옥시우리딘, 2'-아미노-2'-데옥시우리딘, 2'-아지도-2'-데옥시우리딘, 2'-플루오로-2'-데옥시우리딘, 이노신, 1-메틸이노신, 1,2'-O-디메틸이노신, 2'-O-메틸이노신, 5-아자-우리딘, 2-티오-5-아자-우리딘, 4-티오-슈도우리딘, 2-티오-슈도우리딘, 5-카르복시메틸-우리딘, 1-카르복시메틸-슈도우리딘, 5-프로피닐-우리딘, 1-프로피닐-슈도우리딘, 1-타우리노메틸-슈도우리딘, 5-타우리노메틸-2-티오-우리딘, 1-타우리노메틸-4-티오-우리딘, 5-메틸-우리딘, 1-메틸-슈도우리딘, 4-티오-1-메틸-슈도우리딘, 2-티오-1-메틸-슈도우리딘, 1-메틸-1-데아자-슈도우리딘, 2-티오-1-메틸-1-데아자-슈도우리딘, 디하이드로슈도우리딘, 2-티오-디하이드로우리딘, 2-티오-디하이드로슈도우리딘, 2-메톡시우리딘, 2-메톡시-4-티오-우리딘, 4-메톡시-슈도우리딘, 4-메톡시-2-티오-슈도우리딘, 1,2'-디메틸아데노신, 1,2'-O-디메틸구아노신, 1,2'-O-디메틸이노신, 2,8-디메틸아데노신, 2-메틸티오메틸렌티오-N6-이소펜테닐-아데노신, 2-게라닐티오우리딘, 2-리시딘, 2-메틸티오 사이클릭 N6-트레오닐카바모일아데노신, 2-메틸티오-N6-(시스-하이드록시이소펜테닐)아데노신, 2-메틸티오-N6-하이드록시노르발릴카바모일아데노신, 2-메틸티오-N6-트레오닐카바모일아데노신, 2-셀레노우리딘, 2-티오-2'-O-메틸우리딘, 2'-O-메틸아데노신, 2'-O-메틸시티딘, 2'-O-메틸구아노신, 2'-O-메틸이노신, 2'-O-메틸슈도우리딘, 2'-O-메틸우리딘, 2'-O-메틸우리딘 5-옥시아세트산 메틸 에스테르, 2'-O-리보실아데노신포스페이트, 2'-O-리보실구아노신포스페이트, 3,2'-O-디메틸우리딘, 3-(3-아미노-3-카르복시프로필)-5,6-디하이드로우리딘, 3-(3-아미노-3-카르복시프로필)슈도우리딘, 5,2'-O-디메틸시티딘, 5,2'-O-디메틸우리딘, 5-(카르복시하이드록시메틸)-2'-O-메틸우리딘메틸 에스테르, 55-(이소펜테닐아미노메틸)-2'-O-메틸우리딘, 5-아미노메틸-2-게라닐티오우리딘, 5-아미노메틸-2-셀레노우리딘, 5-아미노메틸우리딘, 5-카바모일메틸-2'-O-메틸우리딘, 5-카르복시하이드록시메틸우리딘, 5-카르복시메틸-2-티오우리딘, 5-카르복시메틸아미노메틸-2-게라닐티오우리딘, 5-카르복시메틸아미노메틸-2-셀레노우리딘, 5-카르복시메틸아미노메틸-2'-O-메틸우리딘, 5-시아노메틸우리딘, 5-포르밀-2'-O-메틸시티딘, 5-메톡시카보닐메틸-2'-O-메틸우리딘, 5-메틸아미노메틸-2-게라닐티오우리딘, 7-아미노카르복시프로필-데메틸와이오신, 7-메틸구아노신, 8-메틸아데노신, N2,2'-O-디메틸구아노신, N2,7,2'-O-트리메틸구아노신, N2,7-디메틸구아노신, N2,N2,2'-O-트리메틸구아노신, N2,N2,7-트리메틸구아노신, N2,N2,7-트리메틸구아노신, N4,2'-O-디메틸시티딘, N4,N4,2'-O-트리메틸시티딘, N4,N4-디메틸시티딘, N4-아세틸-2'-O-메틸시티딘, N6,2'-O-디메틸아데노신, N6,N6,2'-O-트리메틸아데노신, N6-포르밀아데노신, N6-하이드록시메틸아데노신, 아그마티딘, 2-메틸티오 사이클릭 N6-트레오닐카바모일아데노신, 글루타밀-케우오신, 임의의 뉴클레오티드에 첨가된 구아노신, 구아닐릴화 5' 말단, 하이드록시-N6-트레오닐카바모일아데노신; 가장 바람직하게는 슈도-우리딘, N1-메틸-슈도-우리딘, 2'-플루오로-2'-데옥시시티딘, 5-요오도시티딘, 5-메틸시티딘, 2-티오우리딘, 5-요오도우리딘 및/또는 5-메틸-우리딘.

[0231] 또한, 용어 "변형된 뉴클레오티드"는 중수소와 같은 동위원소를 함유하는 뉴클레오티드를 포함한다. 용어 "동위원소"는 동일한 양성자 수를 갖지만 상이한 중성자 수를 가져 상이한 질량수를 초래하는 원소를 지칭한다.

따라서, 수소의 동위원소는, 예를 들어, 중수소에 제한되지 않고 삼중수소도 포함한다. 또한, 폴리리보뉴클레오티드는 또한, 예를 들어, 탄소, 산소, 질소 및 인을 포함한 다른 원소의 동위원소를 함유할 수 있다. 변형된 뉴클레오티드는 중수소화되거나 수소 또는 산소, 탄소, 질소 또는 인의 다른 동위원소를 함유하는 것도 가능하다.

[0232] U, C, A 및 G 뉴클레오티드 중 어느 것도 변형되지 않거나, 이들 중 하나, 둘, 셋 또는 전부가 변형될 수 있다. 따라서, 일부 구현예에서, 하나의 뉴클레오티드 유형 중 적어도 하나의 뉴클레오티드, 예를 들어, 적어도 하나의 U 뉴클레오티드는 변형된 뉴클레오티드일 수 있다. 일부 구현예에서, 총 2개의 뉴클레오티드 유형 중 적어도 하나의 뉴클레오티드, 예를 들어, 적어도 하나의 U 뉴클레오티드 및 적어도 하나의 C 뉴클레오티드는 변형된 뉴클레오티드일 수 있다. 일부 구현예에서, 총 3개의 뉴클레오티드 유형 중 적어도 하나의 뉴클레오티드, 예를 들어, 적어도 하나의 G 뉴클레오티드, 적어도 하나의 U 뉴클레오티드 및 적어도 하나의 C 뉴클레오티드는 변형된 뉴클레오티드일 수 있다. 일부 구현예에서, 모두 4개의 뉴클레오티드 유형 중 적어도 하나의 뉴클레오티드는 변형된 뉴클레오티드일 수 있다. 이러한 모든 구현예에서, 뉴클레오티드 유형당 하나 이상의 뉴클레오티드가 변형될 수 있으며, 뉴클레오티드 유형당 상기 변형된 뉴클레오티드의 백분율은 0%, 2.5%, 5%, 7.5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 100%이다.

[0233] 일부 구현예에서, mRNA 분자에 포함된 변형된 뉴클레오티드의 총 백분율은 0%, 2.5%, 5%, 7.5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 100%이다.

[0234] 바람직한 구현예에서, mRNA는 변형된 뉴클레오티드와 변형되지 않은 뉴클레오티드의 조합을 함유하는 mRNA이다. 바람직하게는, 그것은 WO2011/012316에 기재된 바와 같은 변형된 뉴클레오티드와 변형되지 않은 뉴클레오티드의 조합을 함유하는 mRNA이다. 본원에 기재된 mRNA는 증가된 안정성(stability)과 감소된 면역원성(immunogenicity)을 나타내는 것으로 보고된다. 바람직한 구현예에서, 이러한 변형된 mRNA에서, 시티딘 뉴클레오티드의 5 내지 50% 및 우리딘 뉴클레오티드의 5 내지 50%가 변형된다. 아데노신- 및 구아노신 함유 뉴클레오티드는 변형되지 않을 수 있다. 아데노신 및 구아노신 뉴클레오티드는 변형되지 않거나 부분적으로 변형될 수 있으며, 이들은 바람직하게는 변형되지 않은 형태로 존재한다.

[0235] 전술한 임의의 특정 구현예에서, 주어진 뉴클레오티드의 유사체의 백분율은 입력 백분율(예: 출발 반응, 예를 들어, 출발 시험관내 전사 반응에서 유사체의 백분율)을 지칭한다. 전술한 임의의 특정 구현예에서, 주어진 뉴클레오티드의 유사체의 백분율은 출력(예: 합성된 또는 전사된 화합물에서의 백분율)을 지칭한다. 두 옵션 모두가 동등하게 고려된다.

[0236] 본 발명의 RNA, 바람직하게는 mRNA 분자는 당업자에게 공지된 방법에 의해 생체내 시스템에서 재조합적으로 생산될 수 있다.

[0237] 대안적으로, 본 발명의 변형된 RNA, 바람직하게는 mRNA 분자는, 예를 들어, 당업자에게 공지된 시험관내 전사 시스템을 사용하여 시험관내 시스템에서 생산될 수 있다. RNA, 바람직하게는 mRNA를 생산할 수 있는 시험관내 전사 시스템은 본 발명의 목적하는 특성을 갖는 변형된 RNA, 바람직하게는 mRNA 분자를 생산하기 위해 변형된 및 변형되지 않은 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 입력 혼합물을 필요로 한다. 특정 구현예에서, 5 내지 50%의 시티딘은 이러한 입력 혼합물에서 시티딘의 유사체이고, 5 내지 50%의 우리딘은 이러한 입력 혼합물에서 우리딘의 유사체이다. 특정 구현예에서, 시티딘의 5 내지 40%는 이러한 입력 혼합물에서 시티딘의 유사체이고, 우리딘의 5 내지 40%는 이러한 입력 혼합물에서 우리딘의 유사체이다. 특정 구현예에서, 5 내지 30%의 시티딘은 이러한 혼합물에서 시티딘의 유사체이고, 5 내지 30%의 우리딘은 이러한 입력 혼합물에서 우리딘의 유사체이다. 특정 구현예에서, 5 내지 30%의 시티딘은 이러한 혼합물에서 시티딘의 유사체이고, 10 내지 30%의 우리딘은 이러한 혼합물에서 우리딘의 유사체이다. 특정 구현예에서, 5 내지 20%의 시티딘은 이러한 입력 혼합물에서 시티딘의 유사체이고, 5 내지 20%의 우리딘은 이러한 입력 혼합물에서 우리딘의 유사체이다. 특정 구현예에서, 5 내지 10%의 시티딘은 이러한 입력 혼합물에서 시티딘의 유사체이고, 5 내지 10%의 우리딘은 이러한 입력 혼합물에서 우리딘의 유사체이다. 특정 구현예에서, 25%의 시티딘은이러한 입력 혼합물에서 시티딘의 유사체이고, 25%의 우리딘은 이러한 입력 혼합물에서 우리딘의 유사체이다. 특정 구현예에서, 입력 혼합물은 아데노신 및/또는 구아노신의 유사체를 포함하지 않는다. 다른 구현예에서, 임의로, 입력 혼합물은 아데노신 및/또는 구아노신의 하나 이상의 유사체(또는 둘 중 어느 것도 또는 모두)를 포함한다.

[0238] 특정 구현예에서, 시티딘의 유사체인 입력 혼합물 중의 시티딘의 백분율은 우리딘의 유사체인 입력 혼합물 중의 우리딘의 백분율과 동일하지 않는다. 특정 구현예에서, 입력 혼합물 중의 시티딘의 유사체의 백분율은 입력 혼합물 중의 우리딘의 유사체의 백분율보다 낮다. 상기 주시된 바와 같이, 이는 입력 혼합물 내에 아데노신 및

구아노신의 유사체의 존재 또는 부재하에 있을 수 있지만, 특정 구현예에서는, 입력 혼합물 내에 아데노신의 유사체 및 구아노신의 유사체의 부재하에 있다.

[0239] 특정 구현예에서, 본 발명의 RNA, 바람직하게는 mRNA를 생성하는 시험관내 전사 시스템을 위한 뉴클레오티드의 입력 혼합물은 시티딘의 유사체 및 우리딘의 유사체를 포함하고, 입력 혼합물의 시티딘의 5 내지 20%는 시티딘의 유사체이고, 입력 혼합물의 우리딘의 25 내지 45%는 우리딘의 유사체이다. 즉, 입력 혼합물은 변형된 및 변형되지 않은 시티딘과 변형된 및 변형되지 않은 우리딘을 포함하고, 입력 혼합물의 시티딘의 5 내지 20%는 시티딘의 유사체를 포함하는 반면, 입력 혼합물의 우리딘의 25 내지 45%는 우리딘의 유사체를 포함한다. 다른 구현예에서, 입력 혼합물은 5 내지 10%의 시티딘 유사체 및 30 내지 40%의 우리딘 유사체, 예를 들어, 7 내지 9%의 시티딘 유사체, 예를 들어, 7, 7.5 또는 8% 및, 예를 들어, 32 내지 38%의 우리딘 유사체, 예를 들어, 33, 34, 35, 36%를 포함한다.

[0240] 특정 구현예에서, 본원에 기재된 우리딘의 유사체 및 시티딘의 유사체 중 임의의 것이 임의로 슈도우리딘을 제외하고 사용될 수 있다. 특정 구현예에서, 시티딘의 유사체는 (예를 들어, 그것은 사용되는 단일 C 유사체 유형임) 5-요오도시티딘을 포함하거나 이로 구성되고, 우리딘의 유사체는 (예를 들어, 그것은 사용되는 단일 U 유사체 유형임) 5-요오도우리딘을 포함하거나 이로 구성된다.

[0241] 예시적인 유사체는 상기 기재되어 있다. 목적하는 폴리펩티드를 인코딩하는 변형된 폴리리보뉴클레오티드의 경우, 유사체 및 변형 수준은 달리 명시되지 않는 한, 5' 및 3' 비번역 영역을 포함하여 목적하는 폴리펩티드를 인코딩하는 전체 폴리리보뉴클레오티드에 걸쳐 고려된다는 것을 이해해야 한다(예를 들어, 변형 수준은 전사되는 위치에 유사체가 혼입될 수 있도록 시험관내 전사 반응에서 유사체의 입력 비율에 기초한다).

[0242] 또한, 변형된 RNA, 바람직하게는 mRNA 분자는, 예를 들어, 고상 지지체 및 표준 기술을 사용하는 자동화된 뉴클레오티드 서열 합성기 상에서 통상적인 화학적 합성에 의해 또는 각각의 DNA 서열의 화학적 합성 및 이의 후속적인 시험관내 또는 생체내 전사에 의해 화학적으로 합성될 수 있다.

[0243] 또 다른 바람직한 구현예에서, mRNA는 표적 결합 부위, 표적 서열 및/또는 마이크로-RNA 결합 부위와 결합되어 관련 세포에서만 목적하는 mRNA의 활성을 허용할 수 있다. 추가의 바람직한 구현예에서, RNA는 비번역 영역에서 마이크로-RNA 또는 shRNA와 결합될 수 있다.

[0244] 일반적으로, 치료 효과는 리보핵산과 세포 분자 및 세포 소기관(organelle)의 상호작용에 의해 달성될 수 있다. 이러한 상호작용 단독은, 예를 들어, 톨-유사 및 기타 세포외 또는 세포내 수용체와 특이적으로 상호작용하도록 설계된 특정 CpG 올리고뉴클레오티드 및 서열의 경우와 같이 선천적 면역계를 활성화시킬 수 있다. 또한, 세포에서 핵산(바람직하게는 리보핵산, 더욱 바람직하게는 mRNA)의 흡수 또는 도입은 핵산(바람직하게는 리보핵산, 더욱 바람직하게는 mRNA)에 포함된 유전자와 같은 뉴클레오티드 서열의 발현을 유도하도록 의도될 수 있고, 도입된 외인성 핵산의 세포 내 존재의 결과로서 내인성 유전자 발현의 하향 조절, 침묵 또는 녹다운을 위해 의도될 수 있거나, 또는 선택된 염기 또는 내인성 핵산 서열의 전체 스트레치의 복구, 절제, 삽입 또는 교환과 같은 내인성 핵산 서열의 변형을 위해 의도될 수 있거나, 도입된 외인성 리보핵산(바람직하게는 mRNA)의 세포 내 존재 및 상호작용의 결과로 사실상 임의의 세포 과정에 의한 간섭을 위해 의도될 수 있다. 도입된 외인성 핵산(바람직하게는 리보핵산, 더욱 바람직하게는 mRNA)의 과발현은 특히 몇몇 예를 들면, 낭포성 섬유증(cystic fibrosis), 혈우병(hemophilia) 또는 근이영양증(muscular dystrophy)과 같은 많은 대사 및 유전 질환(metabolic and hereditary disease)의 경우와 같이 내인성 유전자에 결함이 있거나 침묵하여 유전자 발현이 없거나 불충분하거나 결함이 있거나 기능 장애 산물을 초래하는 경우 내인성 유전자 발현을 보상하거나 보완하기 위해 의도될 수 있다. 도입된 외인성 핵산(바람직하게는 리보핵산, 더욱 바람직하게는 mRNA)의 과발현은 또한 발현의 생성물이 유전자 발현의 조절, 신호 전달 및 기타 세포 과정과 같은 임의의 내인성 세포 과정과 상호작용하거나 간섭하도록 의도될 수도 있다. 도입된 외인성 핵산(바람직하게는 리보핵산, 더욱 바람직하게는 mRNA)의 과발현은 또한 형질감염된 또는 형질도입된 세포가 상주하거나 상주하도록 만들어진 유기체의 맥락에서 면역 반응을 일으키도록 의도될 수도 있다. 예로는 백신 접종 목적으로 항원을 제시하기 위해 수지상 세포와 같은 항원 제시 세포의 유전적 변형이 있다. 다른 예로는 종양 특이적 면역 반응을 유도하기 위해 종양에서 사이토카인의 과발현이다. 또한, 도입된 외인성 리보핵산(바람직하게는 mRNA)의 과발현은 또한 변형된 T-세포, NK 세포 및 기타 림프구 또는 재생 의학을 위한 전구체 또는 줄기 또는 기타 세포와 같은 세포 요법을 위한 생체내 또는 생체외 일시적 유전자 변형 세포를 생성하도록 의도될 수도 있다.

[0245] 치료 목적을 위한 내인성 유전자 발현의 하향 조절, 침묵 또는 녹다운은, 예를 들어, 리보자임, 안티센스 올리고뉴클레오티드, tRNA, 긴 이중 가닥 RNA에 의한 RNA 간섭(RNAi)에 의해 달성될 수 있으며, 여기서 이러한 하향

조절은 서열 특이적 또는 비특이적일 수 있으며, 또한 긴 이중 가닥 RNA가 세포에 도입되는 경우와 같이 세포 사멸로 이어질 수도 있다. 내인성 또는 기존 유전자 발현의 하향 조절, 침묵 또는 녹다운은 바이러스 감염(viral infection) 및 암(cancer)을 포함한 후천적, 유전적 또는 자발적으로 발생하는 질환의 치료에 유용할 수 있다. 또한, 세포 내로 핵산의 도입은, 예를 들어, 바이러스 감염 또는 신생물(neoplasia)을 예방하기 위해 예방 조치로서 실시될 수 있다고 생각될 수 있다. 내인성 유전자 발현의 하향 조절, 침묵 또는 녹다운은 전사 수준 및 번역 수준에서 발휘될 수 있다. 다수의 메카니즘은 당업자에게 공지되어 있으며, 예를 들어, 후성유전학적 변형(epigenetic modification), 염색질 구조의 변화, 도입된 핵산에 의한 전사 인자의 선택적 결합, 삼중 나선 형성과 같은 비통상적 염기쌍 메카니즘을 포함한 염기쌍에 의한 게놈 DNA, mRNA 또는 기타 RNA 종에서 상보적 서열에 대한 도입된 핵산의 혼성화를 포함한다. 유사하게, 유전자 복구, 염기 또는 서열 변경은 게놈 수준 및 엑손 스키핑(exon skipping)을 포함하는 mRNA 수준에서 달성될 수 있다. 염기 또는 서열 변경은, 예를 들어, RNA 유도 부위 특이적 DNA 절단에 의해, 트랜스 스플라이싱(trans-splicing), 트랜스-스플라이싱 리보자임(trans-splicing ribozyme), 키메라플라스트(chimeraplast), 스플리코솜 매개 RNA 트랜스 스플라이싱(splicosome-mediated RNA trans-splicing)을 활용하는 절단 및 페이스트 메카니즘(cut and paste mechanism)에 의해, 또는 그룹 II 또는 재표적 인트론을 활용함으로써 또는 바이러스에 의해 매개되는 삽입 돌연변이유발을 활용하거나 원핵생물, 진핵생물 또는 바이러스 인테그라제 시스템을 사용한 표적 게놈 삽입을 활용함으로써 달성될 수 있다. 핵산은 생명체의 구성 계획의 담체이며, 많은 세포 과정에 직접적 및 간접적 방식으로 참여하기 때문에, 이론적으로 임의의 세포 과정은 외부에서 세포로 핵산을 도입에 의해 영향을 받을 수 있다. 특히, 이러한 도입은 세포 또는 기관 배양에서 생체내 또는 생체외에서 직접 수행된 후 이렇게 변형된 기관 또는 세포를 수용자에게 이식할 수 있다. 본 발명의 맥락에서 치료 활성제로서 핵산과 함께 사용하기 위한 입자는 상기 기재된 모든 목적에 유용할 수 있다.

[0246] 상기 언급된 바와 같이, RNA, 바람직하게는 mRNA는 세포 내 또는 세포 부근에서 기능이 필요하거나 유익한 단백질 또는 이의 단편, 예를 들어, 결핍 또는 결함 형태가 질환 또는 질병의 유발제이고 이의 제공이 질환 또는 질병을 완화 또는 예방할 수 있는 단백질 또는 세포 내 또는 이의 부근에서 신체에 유익한 과정을 촉진할 수 있는 단백질을 인코딩하는 리보뉴클레오티드 서열을 함유할 수 있다.

[0247] 실제로 최근 몇 년 동안, RNA(특히 mRNA)는 신약 본체로서 점점 더 관련성이 증가되었다. DNA 기반 유전자 치료제와 달리, mRNA는 핵으로 운반될 필요가 없지만 세포질에서 단백질로 직접 번역된다(J Control Release, 2011, 150:238-247, 및 Eur J Pharm Biopharm, 2009, 71:484-489).

[0248] 또한, 단일 유전자의 돌연변이로 인해 유발되는 수많은 유전적 장애(genetic disorder)가 공지되어 있고, RNA, 바람직하게는 mRNA, 치료 접근법의 후보가 공지되어 있다. 낭포성 섬유증, 혈우병 및 기타 여러 가지와 같은 단일 유전자 돌연변이로 인해 유발된 장애는 특정 형질이 자손(offspring)에서 나타날 가능성과 관련하여 우성(dominant) 또는 열성(recessive)일 수 있다. 우성 대립 유전자는 대립 유전자의 하나의 사본만을 갖는 개체에서 표현형을 나타내지만, 열성 대립 유전자의 경우 개체는 각 부모로부터 하나씩 두 개의 사본을 가져야 나타난다. 대조적으로, 다유전적 장애(polygenic disorder)는 두 개 이상의 유전자에 의해 유발되며 각 질환의 발현은 종종 능숙하고 환경적 요인과 관련이 있다. 다유전성 장애의 예로는 고혈압(hypertension), 콜레스테롤 수치 상승(elevated cholesterol level), 암, 신경 퇴행성 장애(neurodegenerative disorder), 정신 질환(mental illness) 등이 있다. 또한 이러한 경우 이러한 유전자 중 하나 이상을 나타내는 치료적 RNA, 바람직하게는 mRNA가 이들 대상체에게 유익할 수 있다. 또한, 유전적 장애는 부모의 유전자에서 물려받은 것이 아니고 새로운 돌연변이에 의해 유발될 수도 있다. 또한 이러한 경우에, 정확한 유전자 서열을 나타내는 치료적 RNA, 바람직하게는 mRNA가 대상체에게 도움이 될 수 있다.

[0249] 현재 22,993개의 인간 유전자 및 유전적 장애 항목을 이들 각각의 유전자 및 이들 표현형의 설명과 함께 갖는 온라인 카탈로그는 ONIM(사람의 멘델 유전 온라인(Online Mendelian Inheritance in Man)) 웹페이지(http://onim.org)에서 이용 가능하며, 각각의 서열은 Uniprot 데이터베이스(http://www.uniprot.org)에서 이용 가능하다. 비제한적인 예로서, 다음 **표 A**는 몇 가지 선천성 질환 및 장애와 상응하는 유전자(들)를 나열한다. 세포 신호전달 경로의 고도의 상호작용으로 인해, 특정 유전자의 돌연변이는 여러 가지 병원성 증상을 유발하며, 그 중 특징적인 증상만 **표 A**에 나열되어 있다.

[0250] 본 발명의 일부 구현예에서, 본 발명의 현탁액 제형 및 에어로졸에 존재할 수 있는 RNA, 바람직하게는 mRNA에 의해 인코딩되는 치료용 단백질은 **표 A**에 열거된 세포 단백질로부터 선택된다. 따라서, RNA, 바람직하게는 mRNA 분자는 치료용 세포 단백질을 인코딩할 수 있으며, 여기서 인코딩된 치료용 단백질은 **표 A**에 나열된 것 또

는 이의 상동체(homolog)이다.

[0251] 본 발명의 다른 구현예에서, RNA, 바람직하게는 mRNA에 의해 인코딩되는 치료용 단백질은 **표 A**에 나열된 분비된 단백질로부터 선택된다. 따라서, RNA, 바람직하게는 mRNA는 치료용 융합 단백질을 인코딩할 수 있고, 여기서 인코딩된 치료용 단백질 또는 이의 상동체는 **표 A**에 열거된 것이고, 제2 단백질은 치료용 단백질의 분비를 허용하는 신호 펩티드이다. 신호 펩티드는 상기 치료용 단백질의 N-말단에 존재하는 짧은, 전형적으로 5 내지 30개의 아미노산 길이 서열이며, 그는 특정 세포 소기관(즉, 소포체, 골지체 장치 또는 엔도솜)을 통해 융합 단백질을 세포의 분비 경로로 유도한다. 따라서, 이러한 융합 단백질은 세포 또는 세포 소기관에서 분비되거나 세포 구획 또는 세포의 표면에서 세포막(예: 다중 스패닝 막관통 단백질)에 삽입된다.

[0252] 따라서, 본 발명의 바람직한 구현예에서, RNA, 바람직하게는 mRNA는 질환을 유발, 소인 또는 보호하는 유전자의 다음 단백질 중 하나 이상을 인코딩할 수 있지만, 이에 제한되지는 않는다. 치료(또는 예방)될 수 있는 이러한 질환 또는 장애의 비제한적인 예는 상기 폴리펩티드, 단백질 또는 펩티드가 다음 **표 A**에 요약된 것들로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것들을 포함한다.

[0253] 일부 구현예에서, RNA, 바람직하게는 mRNA의 인코딩 서열은 네이티브 단백질의 수준과 동일하거나 더 높은 수준에서 세포 활성을 포함하는 일부 또는 전장(full-length) 단백질로 전사 및 번역될 수 있다. 일부 구현예에서, RNA, 바람직하게는 mRNA는 치료적 또는 예방적 효과를 갖는 치료적 또는 약제학적 활성 폴리펩티드, 단백질 또는 펩티드를 인코딩하며, 여기서 상기 폴리펩티드, 단백질 또는 펩티드는 다음 **표 A**에 요약된 것들로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. RNA, 바람직하게는 mRNA, 보다 구체적으로 이의 인코딩 서열은 네이티브 단백질의 수준과 동일하거나 더 낮은 수준에서 세포 활성을 갖는 부분 또는 전장 단백질을 발현시키는 데 사용될 수 있다. 이는 RNA 분자의 투여가 지시될 수 있는 질환의 치료를 허용할 수 있다.

[0254] [표 A]

인간 유전자 및 유전 질환 또는 장애의 비제한적 예

질병	병리학	유전자, 유전
혈액 질환		
판코니 빈혈(Fanconi Anemia)	빈혈(Anemia)과 호중구 감소증(neutropenia), DNA 복구 메커니즘이 영향을 받는다는 증거	FANCA, 상염색체 열성
혈우병(Hemophilia)-A	비정상적인 출혈	응고 인자 VIII, X-염색체 열성
혈우병-B	비정상적인 출혈	응고 인자 IX, X-염색체 열성
유전성 구상적혈구증(Hereditary Spherocytosis)(다양한 유형)	구형 적혈구(구상 세포)	안키린(ANK1)
발작성 야행성 헤모글로빈뇨증(Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria)	빈혈 및 소변에 혈액 존재	PIG-A, X-염색체
만발성 피부 포르피린증(Porphyria cutanea tarda)	헴의 과잉 생산, 철분 과부하	우로포르피리노겐 데카르복실라제(UROD), 상염색체 열성
중증 복합 면역 결핍증(Severe combined immune deficiency; SCID)	DNA 합성 장애로 인해 체액성 및 세포성 면역의 심각한 면역 결핍	아데노신 데아미나제, 상염색체 열성, IL-2R-γ, JAK3, (IL-7R-α, RAG1/2, 아르테미스, CD3δ, CD3ε)
겸상 적혈구 빈혈(Sickle-cell anemia)	비정상 헤모글로빈(HbS)	β-헤모글로빈(HB), 상염색체 열성
지중해빈혈(Thalassemia)(α형 및 β형)	빈혈을 초래하는 α- 또는 β 헤모글로빈 부족	HBA1 및/또는 HBA2 결실,
폰 빌레브란트병(Von Willebrand disease)(3가지 유형이 공지됨, 유형-III이 가장 심각함)	비정상적 출혈, 혈우병 A 및 B와 유사한 출혈	상염색체 우성 및 열성 형태
암		

[0255]

[0256]

악성 흑색종(Malignant melanoma)	P16 돌연변이는 섬유아세포의 통제되지 않은 증식을 유도한다	사이클린 의존성 키나제 억제제 2(CDKN2)
신경섬유종증(Neurofibromatosis)(2개 유형)	청각 신경의 양성 종양은 난청(deafness)을 유도한다.	NF1, NF2, 상염색체 우성
난청(귀)		
난청	청력 손실(Hearing loss)	난청-1A(DFNB1), 상염색체 열성
펜드레드 증후군(Pendred syndrome)	청력 손실	펜드린(PDS), 상염색체 열성
심장		
모세혈관확장성 운동실조증(Ataxia telangiectasia)	DNA 손상 복구 방해,	ATM,
죽상 동맥 경화증(Atherosclerosis)	혈중 콜레스테롤의 증가	apoE,
LQT 증후군(긴 QT)	칼륨 채널 결함	LQT1 및 기타 유전자
폰-히펠 린다우 증후군(Von-Hippel Lindau Syndrome)	혈관의 비정상적인 성장, 암으로 이어질 수 있다	VHL, 상염색체 우성
윌리엄스 보이렌 증후군(William's Beuren Syndrome)	엘라스틴의 결실은 혈관 결함, 판막상 대동맥 협착증(supravalvular aortic stenosis)을 초래한다	엘라스틴 및 LIM 키나제 유전자 결실
대사 장애 및 글리코겐 저장 질환		
부신백질이영양증(Adrenoleukodystrophy)	지방산 운반 및 대사 장애	ABCD1, X-염색체
알캅톤뇨증(Alkaptonuria)	질소 대사 결함, 산소에 노출되면 소변이 검게 변한다	호모겐티스산 옥시다제, 상염색체 열성
제1형 당뇨병(Diabetes type I)	인슐린 생산 장애	IDDM1, IDDM2, GCK, ...
갈락토스혈증(Galactosemia)	갈락토스 대사 장애	갈락토스-1-포스페이트 우리딜트

		랜스퍼라제 유전자(GALT), 상염색체 열성
고슈병(Gauche disease)	지방 대사 장애	글루코세레브로시다제
글루코스 갈락토시다제 흡수 장애(Glucose Galactosidase Malabsorption)	설사를 초래하는 장 내강에서 글루코스 및 갈락토스 수송 장애	SGLT1, 상염색체 열성
글리코겐 저장 질환 I형(Glycogen storage disease Type I), 폰-기에르케병(Von-Gierke's disease)	간과 신장에 글루코스 축적	글루코스-6-포스파타제, 상염색체 열성
글리코겐 저장 질환 II형(Glycogen storage disease Type II), 폼페병(Pompe's disease)	간, 심장, 골격근, 심비대에 글리코겐 축적	α-1-글루코시다제, 상염색체 열성
글리코겐 저장 질환 III형(Glycogen storage disease Type III), 코리병(Cori's disease)	간, 심장, 골격근, 간비대에 글리코겐 축적	탈분지 효소, 상염색체 열성
글리코겐 저장 질환 V형(Glycogen storage disease Type V), 맥아들병(McArdle's disease)	근육 세포 중 글리코겐을 활용할 수 없다	근육 포스포릴라제, 상염색체 열성
글루코스-6-포스페이트 탈수소효소	글루타티온을 유지하지 못하면 용혈성 빈혈을 유도한다	G6PD, X-염색체 열성
유전성 혈색소 침착증(Hereditary Hemochromatosis)(4개 유형)	장내 과도한 철분 흡수로 인한 체내(특히 간) 철분 과잉	혈색소 침착증(HFE)
호모시스틴뇨증(Homocystinuria)	질소 대사 결함	시스타티온 합성 효소 결함, 상염색체 열성
레쉬 니한 증후군(Lesh Nyhan Syndrome)	통풍, 요산 결석 및 근육 손실로 이어지는 요산 축적	HPRT1, X-염색체

[0257]

메이플 시럽 소변 질환(Maple Syrup Urine Disease)	아미노산 대사 결함은 α-케톤산의 축적과 치료하지 않으면 첫 달에 사망으로 이어진다	분지 쇄 알파 탈수소효소(BCKDH)
멘케스 증후군(Menkes' Syndrome)	구리 흡수 능력 감소, 치료하지 않으면 유아기 사망으로 이어진다	ATP7A, X-염색체 열성
비만(Obesity)	체중 증가	다원성, 상승된 렙틴 수치가 중요한 역할을 할 수 있다
페닐케톤뇨증(Phenylketonuria)	페닐알라닌을 티로신으로 분해하지 못하면 정신 지체로 이어진다	페닐알라닌 하이드록실라제(PAH), 상염색체 열성
탄지에르병(Tangier disease)	혈장 고밀도 지단백질의 수치 감소	ATP 결합 카세트-1 유전자(ABCA1)
젤웨거 증후군(Zellweger Syndrome)(유아 사망으로 이어짐)	혈중 철분 및 구리의 높은 수치	PXR1(퍼옥시좀 표면 상 수용체)
윌슨병(Wilsons Disease)	뇌와 간에 구리 축적	ATP7B(P형 ATPase), 상염색체 열성
근골격계		
연골무형성증(Achondroplasis)	연골 세포의 느린 증식으로 인해 대두를 갖는 단신	섬유아세포 성장 인자 수용체 3(FGF3R),
샤르코-마리-투스 증후군(Charcot-Marie-Tooth Syndrome) 및 그의 더 심한 형태인 데제린-소타스 증후군(Dejerine-Sottas Syndrome)	사지 근육의 퇴화	상이한 유전자 돌연변이에 의해 유발된 상이한 형태, 상염색체 열성 및 X-염색체
코카인 증후군(Cockayne syndrome)(2개 유형)	조기 노화 및 단신, "즉시(on the fly)" DNA 복구 상실	그룹 8 절제 복구 교차보완 단백질(ERCC8)
연골 외배엽 이형성증	뼈의 기형 및 다지증	EVC, 상염색체 열성

[0258]

(Chondroectodermal dysplasia)	(Malformation of bones and polydactyly)	
이영양성 이형성증(Diastrophic dysplasia; DTD)	기형 손, 황산염 수송체 결함	DTDST 유전자
듀센 근이영양증(Duchenne muscular dystrophy)	후속적 기능 상실을 갖는 근육 조직의 비대	DMD, X-염색체 열성
진행성 골화성 섬유이형성증(Fibrodysplasia Ossificans Progressiva)	이종성 뼈 형성	NOG, BMP, 상염색체 우성
프리드라이히 운동실조증(Friedreich's ataxia)	심장 비대 및 근육 조정의 점진적 상실	프라탁신, 상염색체 열성
저인산혈증(Hypophosphatasia)	광물화 과정에 영향을 미치는 알칼리성 포스파타제의 비정상적인 버전의 생성	ALPL, 상염색체 열성
마르판 증후군(Marfan Syndrome)	피브릴린 결핍으로 인한 결합 조직 장애	피브릴린 1(FBN), 상염색체 우성
근긴장성 이영양증(Myotonic dystrophy)(청년기에 발병)	골격근 세포의 단백질 키나제 결함	근이영양증 근긴장증 단백질 키나제(Dystrophia myotonica protein kinase; DMPK), 상염색체 우성
불완전한 골형성(Osteogenesis imperfect)(다양한 유형)	제1형 콜라겐 형성의 결함은 출생 후 다발성 골절을 유도한다	COL1A1, COL1A2
프라더-윌리 증후군(Prader-Willi Syndrome)	근긴장도 감소 및 정신 지체	염색체 15 상의 결실로 인해 결실된 SNRPN(작은 리보핵산단백질 N)
뉴런 및 뇌		
알츠하이머병(Alzheimer disease)	아밀로이드 생산 증가, 사실을 기억하는 점진적인 무능력	다유전자성, PS1, PS2, ...

[0259]

[0260]

근위축성 측삭 경화증(Amyotrophic lateral sclerosis; ALS)(다양한 형태)	운동 신경 세포의 점진적인 퇴화(슈퍼옥사이드 라디칼 제거 결함)	슈퍼옥사이드 디스뮤타제 1(SOD1), 관련된 다양한 유전자
엔젤만 증후군(Angelman syndrome)	부적절한 웃음을 동반한 정신 지체	염색체 15 상에 게놈 각인
피루바트 탈수소효소(Pyruvat dehydrogenase)	치료되지 않을 경우 신경학적 결함	피루바트 탈수소효소, 상염색체 열성
레프숨 병(Refsum disease)	피탄산 축적은 말초 신경병증으로 이어진다	피타노일-CoA 하이드록실라제(PHYH), 상염색체 열성
레트 증후군(Rett's syndrome)	생후 6 내지 18개월 사이에 발달이 정지된 정신 지체	메틸-CpG 결합 단백질-2(MECP2), X-염색체 우성
테이-삭스 병(Tay-Sachs disease)(다양한 형태의 중증도)	GM2 강글리오사이드의 분해 장애는 신경학적 손상으로 이어진다	HEXA(β-헥소사미니다스 A), 상염색체 열성
라포라 병(LaFora Disease)	공격적인 형태의 간질(epilepsy)	EPM2A, 상염색체 열성
본태성 진전(Essential tremor)(다양한 형태)	제어할 수 없는 흔들림	ETM1, ETM2, 상염색체 우성
취약 X 증후군(Fragile X syndrome)	FMR1 RNA 결합 단백질의 부족, 정신 지체	FMR1 유전자는 5'UTR 영역의 CGG 증폭으로 인해 발현되지 않는다
헌팅턴병(Huntington's disease)	성인기에 발병하는 진행성 치매(Progressive dementia)	HTT(헌팅틴), 상염색체 우성
장		
바터 증후군(Bartter's syndrome)(3개 유형)	신장 질환(Renal disease0	신장 클로라이드 채널 B 유전자(CLCNKB), 상염색체 열성
다낭성 신장 질환(Polycystic kidney disease)(2개 유형)	신장 질환	PDK1, PDK2, 상염색체 우성, 공지된 상염색체 열성 형태(ARPKD)도 있다

[0261]

폐		
알파-1-항트립신	제어되지 않은 엘라스타제 방출로 인한 폐포 결함 (Defect alveoli)	SERPINA1, 상염색체 공우성
천식(Asthma)	기도의 만성 염증성 장애	다유전자성
낭포성 섬유증(Cystic fibrosis)	Cl^- 이온 수송 결함으로 인해 과도한 점성 점액	CFTR(낭포성 섬유증 전도도 막관통 조절인자), 상염색체 열성
계면활성제 대사 기능 장애(다양한 유형)	신생아는 정상 체중이지만, 모두 팽창하지 않는다	ATP-결합 카세트 수송체(ABCA3)
원발성 섬모 운동 이상증 (Primary cliliary dyskinesia)	섬모 기능 결함/누락으로 인해 과도한 점성 점액	DNAI1, CCNO, CCDC40 등
리소좀 저장 질환		
파브리병(Fabry's disease)	다른 것 외에도 세라미드 트리헥소사이드 축적으로 인한 피부 병변	α-갈락토시다제 A, X-염색체 열성
고셔병(Gaucher's Disease) 유형-I: 성인형(치료 중 정상 수명) 유형 II: 영아형(1세 이전 사망) 유형-III: 소아형(유아기에 발병, 유형-II보다 덜 심함)	글루코세레브로사이드(강글리오사이드, 스핑고지질)의 축적	글루코세레브로시다제, 상염색체 열성,
헌터 증후군(Hunter's Syndrome)	점액 다당류의 축적	L-이두로노설파트 설파타제, X-염색체 열성
헐러 증후군(Hurler's Syndrome)(10세까지 사망)	점액 다당류의 축적	α-L-이두로니다제, 상염색체 열성
니만-픽병(Niemann-Pick Disease)(3개의 별개의 형태 A, B, C)	리소좀에서 콜레스테롤 방출 결함, 스핑고미엘린의 축적	스핑고미엘리나제, 상염색체 열성

테이-삭스병(4세까지 사망)	신경 세포에 G_{M2} 강글리오사이드 축적	헥소사미니다제 A, 상염색체 열성
피부		
백색증(Albinism)	질소 대사 결함	티로시나제 결핍, 상염색체 열성
백색증, 안구피부, II형	멜라닌 색소의 생합성 감소	OCA2, 상염색체 열성
엘러스-단로스 증후군(Ehlers-Danlos Syndrome)(다양한 유형)	횡격막 탈장(Diaphragmatic hernia). 일반적인 망막 박리(retinal detachment)	콜라겐 합성의 다양한 결함
수포성 표피박리증(Epidermolysis bullosa)(단순형 EB, 경계형 EB, 이영양성 EB, 킨들러 증후군(Kindler syndrome)을 포함한 다양한 유형)	각질 세포의 구조적 안정성 유지 또는 기저 진피에 대한 각질 세포의 부착 결함	횡반형 수포성 표피박리증(EBM), 진행성 수포성 표피박리증 3형(EBR3), 가성 수포성 표피박리증 4형(EBR4), 데스모플라킨(DSP), 플라코필린-1(PKP1), 크레아틴(KRT5, KRT14), 플렉틴(PLEC), ITGA6, 인테그린 서브유닛(ITGB4), 라미닌 서브유닛(LAMA3, LAMP3, LAMB3, LAMC2), 콜라겐(COL17A1, COL7A1(상염색체 우성), FERMT1, 상염색체 열성
하트눕병(Hartnup's disease)	위장관의 트립토판 흡수 결함, 빛에 민감한 피부	SLC6A19, 상염색체 열성
유전성 출혈성 모세혈관확장증(Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia), 오슬러-베버-렌두 증후군(Osler-Weber-Rendu Syndrome)	피부 및 점막의 모세혈관 확장증	엔도글린(ENG), 상염색체 우성
고콜레스테롤혈증, 가족성(Hypercholesterolemia, familial)	저밀도 지단백질에 결합된 혈청 콜레스테롤의 상승, 피부에 축적 및 동맥 경화	저밀도 지단백질 수용체(LDLR), 아포지단백질 B(APOB), 상염색체 우성

[0262]

	증(arteriosclerosis)	
색소성 건피증(Xeroderma pigmentosa)	자외선 노출로 인한 피부 결함 및 흑색종	DNA 복구 결함, 상염색체 열성
남성형 탈모(Male pattern baldness)	피부에서 테스토스테론의 디하이드로테스토스테론으로의 전환 장애	5-α-리덕타제
유전성 간 질환		
아미노산 대사 장애	아미노산 티로신과 페닐알라닌을 분해하는 다단계 과정의 중단	FAH, TAT, HPD, 상염색체 열성
베타 지중해성빈혈 중간체(Beta-thalassemia intermedia)	성숙한 적혈구 부족	HBB, 상염색체 열성
크리글러-나자르 증후군(Crigler-Najjar syndrome)	빌리루빈이 물에 용해되는 글루쿠로니드화의 결핍	UGT1A1, 상염색체 열성
지방산 산화 장애(Fatty acid oxidation disorder)	무기력증(lethargy)과 저혈당증(hypoglycemia)을 초래하는 장쇄 지방산 및 매우 장쇄 지방산의 처리 결핍	HADHA, ACADVL 상염색체 열성
프럭토스 대사 장애(Fructose metabolism disorder)	저혈당증을 유발하는 글루코스생성 장애	FBP1, ALDOB, 상염색체 열성
갈락토스혈증(Galactosemia)	갈락토스 처리 결핍	GALT, GALK1, GALE, 상염색체 열성
글리코겐 저장 질환(Glycogen storage disease)	글루코스 6-포스페이트 및 글리코겐의 분해 장애는 글리코겐의 축적뿐만아니라 비정상적인 글리코겐 분자로 이어져 세포 손상을 유발한다	G6PC, SLC37A4, AGL, GBE1, 상염색체 열성
헴 생합성 장애(Heme biosynthesis disorder)	우로포르피리노겐 데카르복실라제의 감소는 포르피린이라는 화합물의 축적을	UROD 상염색체 우성, ALAS2 X-연관 우성, ALAD 상염색체 열성

[0263]

	초래하여 간에서 독성 수치를 유발한다.	
지질 대사(수송) 장애(Lipid metabolism (transport) disorder)	기능적 단백질의 부족, 이는 콜레스테롤 및 기타 지질의 이동을 방지하여 세포에 축적을 유도한다.	NPC1, NPC2 상염색체 열성, LDLR, 상염색체 우성
금속 대사 장애(Metal metabolism disorder)	철분과 구리의 저장 및 수송의 장애는 조직과 기관에의 축적을 초래한다	ATP7B, HAMP, HFE, HFE2, 상염색체 열성
유기산 장애(Organic acid disorder)(산뇨증(Aciduria)/산혈증(Acidemia))	여러 단백질 구성 요소(아미노산), 특정 지질 및 콜레스테롤의 분해 중단	BCKDHA, BCKDHB 및 DBT, PCCA 및 PCCB, MUT, MMAA, MMAB, MMADHC, MCEE, IVD, MCCC1 또는 MCCC2, 상염색체 열성
원발성 과옥살산뇨증 1형 (Primary hyperoxaluria type 1)	신장 손상으로 이어지는 글리옥실레이트의 분해 중단	AGXT, GRHPR, 상염색체 열성
진행성 가족성 간내 담즙정체증(Progressive familial intrahepatic cholestasis)	감 손상을 유발하는 간세포에 담즙산의 축적	ATP8B1, 상염색체 열성
혈소판 활동 장애 (Thrombocyte activity disorder)	효소 활동의 부족은 출혈과 응고 사이의 일반적인 균형을 파괴한다	ADAMTS13, 상염색체 열성
요소 주기 장애(Urea cycle disorder)	고암모니아혈증 (hyperammonemia)의 한 형태를 유발하는 요소 주기 장애	OTC(X-연관 장애), CPS1, ASS1 및 SLC25A13, ASL, 상염색체 열성

[0264]

[0265] 상기 **표 A**는 결함이 본 발명의 현탁액 제형 및 에어로졸에 존재할 수 있는 RNA, 바람직하게는 mRNA로 치료될 수 있는 질환을 유발하는 유전자의 예를 나타내며, 여기서 RNA, 바람직하게는 mRNA는 상기 개시된 결함 유전자의 단백질의 온전한 버전 또는 이의 기능적 단편을 인코딩하는 리보뉴클레오티드 서열을 포함한다. 특히 바람직한 구현예에서, 예를 들어, 폐에 영향을 미치는 유전성 질환, 예를 들어, SPB(계면활성제 단백질 B) 결핍, ABCA3 결핍, 낭포성 섬유증 및 α1-항트립신 결핍, 또는 혈장 단백질에 영향을 미치는 유전성 질환(예: 선천성 혈색소침착증(congenital hemochromatosis)(헵시딘 결핍), 혈전성 혈소판 감소성 자반증(thrompotic thrombocytopenic purpura; TPP, ADAMTS 13 결핍) 및 응고 결함(예: 혈우병 a 및 b) 및 보체 결함(예: 단백질 C 결핍), 면역 결함, 예를 들어, SCID(상이한 유전자, 예를 들어, RAG1, RAG2, JAK3, IL7R, CD45, CD3δ, CD3ε에서 돌연변이에 의해 유발됨) 또는 아데노신 데사미나제 부족으로 인한 결핍(예: ADA-SCID), 패혈성 육아종증(septic granulomatosis)(예: gp-91-phox 유전자, p47-phox 유전자, p67-phox 유전자 또는 p33-phox 유전자의 돌연변이에 의해 유발됨) 및 고셔병(Gaucher's disease), 파브리병(Fabry's disease), 크라베병(Krabbe's disease), MPS I, MPS II(헌터 증후군(Hunter syndrome)), MPS VI, 글리코겐 저장 질환 II형 또는 점액다당류증(mucopolysaccharidoses)과 같은 저장 질환을 일으키는 유전성 질환이 해결될 수 있다.

[0266] 본 발명의 RNA, 바람직하게는 mRNA가 유용할 수 있는 다른 장애는 SMN1 관련 척수성 근위축증(spinal muscular atrophy; SMA); 근위축성 측삭 경화증(ALS); GALT 관련 갈락토스혈증; 낭포성 섬유증(CF); 시스틴뇨증(cystinuria)을 포함한 SLC3A1 관련 장애; 알포트 증후군(Alport syndrome)을 포함한 COL4A5 관련 장애; 갈락토세레브로시다제 결핍(galactocerebrosidase deficiencies); X-연관 부신백질이영양증(X-linked adrenoleukodystrophy) 및 부신척수신경병증(adrenomyeloneuropathy); 프리드라이히 운동실조증; 펠리자에우스-메르츠바허병(Pelizaeus-Merzbacher disease); TSC1 및 TSC2 관련 결절성 경화증(tuberous sclerosis); 산필리포 B 증후군(Sanfilippo B syndrome)(MPS IIIB); CTNS 관련 시스틴증(cystinosis); 취약성 X 증후군, 취약성 X-관련 진전/운동실조 증후군 및 취약성 X 조기 난소 부전 증후군(Fragile X Premature Ovarian Failure Syndrome)을 포함하는 FMR1 관련 장애; 프라더-윌리 증후군; 유전성 출혈성 모세혈관확장증(AT); 니만-픽병 C1

형; 청소년 신경원성 세로이드 리포푸신증(Juvenile Neuronal Ceroid Lipofuscinosis; JNCL), 청소년 바텐병(Juvenile Batten disease), 산타부오리-할티아병(Santavuori-Haltia disease), 얀스키-비엘쇼스키병(Jansky-Bielschowsky disease), PTT-1 및 TPP1 결핍증을 포함한 신경원성 세로이드 리포푸신증 관련 질환; 중추신경계 저수초화(hypomyelination)/소실 백질(vanishing white matter)을 동반한 EIF2B1, EIF2B2, EIF2B3, EIF2B4 및 EIF2B5 관련 소아 운동실조증(childhood ataxia); CACNA1A 및 CACNB4 관련 에피소드성 운동실조증 2형; 고전적인 레트 증후군(Classic Rett Syndrome), MECP2 관련 중증 신생아 뇌병증(Severe Neonatal Encephalopathy) 및 PPM-X 증후군을 포함한 MECP2 관련 장애; CDKL5 관련 비정형 레트 증후군(Atypical Rett Syndrome); 케네디병(Kennedy's disease)(SBMA); 피질하 경색(subcortical infarct) 및 백질뇌병증(leukoencephalopathy)을 동반한 노치-3 관련 뇌 상염색체 우성 동맥병증(Notch-3 related cerebral autosomal dominant arteriopathy)(CADASIL); SCN1A 및 SCN1B 관련 발작 장애(seizure disorder); 알퍼스-후텐로처 증후군(Alpers-Huttenlocher syndrome), POLG 관련 감각 운동실조 신경병증(sensory ataxic neuropathy), 구음장애(dysarthria) 및 안근 마비(ophthalmoparesis), 및 미토콘드리아 DNA 결실이 있는 상염색체 우성 및 열성 진행성 외부 안근 마비(autosomal dominant and recessive progressive external ophthalmoplegia)를 포함하는 중합효소 G 관련 장애; X-연관 부신 저형성증(adrenal hypoplasia); X-연관 무감마글로불린혈증(agammaglobulinemia); 파브리병(Fabry disease); 및 윌슨병(Wilson's disease)을 포함한다.

[0267] 이러한 모든 질환에서, 결함 유전자 또는 이의 기능적 단편에 의해 인코딩된 단백질을 이용 가능하게 하는 본 발명의 상기 단백질 중 어느 하나를 인코딩하는 RNA, 바람직하게는 mRNA로 치료될 수 있는 단백질, 예를 들어, 효소는 결함이 있다. 전사체 대체 요법/단백질 대체 요법은 근본적인 유전적 결함에는 영향을 미치지 않지만, 대상체가 결핍된 단백질의 농도를 증가시킨다. 예로서, 폼페병의 경우, 전사체 대체 요법/효소 대체 요법은 결핍된 리소좀 효소 산 알파-글루코시다제(GAA)를 대체한다.

[0268] 따라서, 본 발명의 mRNA에 의해 인코딩될 수 있는 단백질의 비제한적인 예는 에리트로포이에틴(EPO), 성장 호르몬(소마토트로핀, hGH), 낭포성 섬유증 막관통 전도도 조절제(CFTR), 성장 인자, 예를 들어, GM-SCF, G-CSF, MPS, 단백질 C, 헵시딘, ABCA3 및 계면활성제 단백질 B이다. 본 발명에 따른 RNA로 치료될 수 있는 질환의 추가 예는 혈우병 A/B, 파브리병, CGD, ADAMTS13, 헐러병, X 염색체 매개 A-γ-글로불린혈증, 아데노신 데아미나제 관련 면역결핍증(immunodeficiency) 및 SP-B와 연관된 신생아의 호흡 곤란 증후군(respiratory distress syndrome)이 있다. 특히 바람직하게는, 본 발명에 따른 RNA, 바람직하게는 mRNA는 계면활성제 단백질 B(SP-B) 또는 에리트로포이에틴에 대한 코딩 서열을 함유한다. 본 발명에 따른 본 발명의 RNA, 바람직하게는 mRNA에 의해 인코딩될 수 있는 단백질의 추가 예는 인간 성장 호르몬 hGH, BMP-2 또는 혈관신생 인자와 같은 성장 인자이다.

[0269] 상기 구현예가 본 발명에 사용되는 나노입자에 존재할 수 있는 RNA, 바람직하게는 mRNA 분자의 맥락에서 기재되지만, 본 발명은 상기 언급된 바와 같이, RNA, 바람직하게는 mRNA의 사용으로 제한되지 않으며, DNA 분자와 같은 다른 핵산 분자를 사용할 수 있다.

[0270] 상기 DNA 분자는 상기 RNA, 바람직하게는 상기 mRNA를 인코딩할 수 있으며, 따라서 상응하게 전사된 RNA 분자에 대한 유전 정보를 보유할 수 있다.

[0271] 따라서, 바람직한 구현예와 관련하여, 본 발명에 사용된 나노입자에 존재할 수 있는 RNA 분자, 바람직하게는 mRNA 분자의 맥락에서 상기 및 아래에 제시된 본 발명의 DNA 분자에 동일한 내용이 준용하여 적용된다.

[0272] 대안적으로, RNA, 바람직하게는 mRNA는, 예를 들어, 대상체에게 면역을 부여하기 위해 치료 환경에서 사용될 수 있는 전장 항체 또는 더 작은 항체(예를 들어, 중쇄 및 경쇄 모두)를 인코딩하는 리보뉴클레오티드 서열을 함유할 수 있다. 상응하는 항체 및 이들의 치료적 적용(들)은 당업계에 공지되어 있다. 항체는 단일 mRNA 가닥 또는 하나 이상의 mRNA 가닥에 의해 인코딩될 수 있다.

[0273] 다른 구현예에서, RNA, 바람직하게는 mRNA는 생물학적 표적(예: 종양 괴사인자와 같은 자극성 사이토카인)을 표적화 및/또는 비활성화하는 데 유용할 수 있는 기능적 모노클로날 또는 폴리클로날 항체를 인코딩할 수 있다. 유사하게, RNA, 바람직하게는 mRNA 서열은, 예를 들어, 막 증식성 사구체신염 II형(membranoproliferative glomerulonephritis type II) 또는 급성 용혈성 요독 증후군(acute hemolytic uremic syndrome)의 치료에 유용한 기능적 항신증 인자 항체를 인코딩할 수 있거나, 또는 대안적으로 암과 같은 VEGF 매개 질환의 치료에 유용한 항-혈관 내피 성장 인자(VEGF) 항체를 인코딩할 수 있다.

[0274] 또 다른 구현예에서, RNA, 바람직하게는 mRNA는 바이러스 또는 바이러스 복제를 중화하거나 달리 억제하는 데

유용할 수 있는 기능적 모노클로날 또는 폴리클로날 항체를 인코딩할 수 있다.

[0275] 대안적으로, RNA, 바람직하게는 mRNA는 바람직하게는 예방적 또는 치료적 환경에서 사용될 수 있는 항원을 인코딩하는 리보뉴클레오티드 서열을 함유할 수 있다.

[0276] 또 다른 구현예에서, mRNA는 면역 조절을 유도할 수 있는 단백질 또는 단백질들, 예를 들어, 케모카인, 인터페론(예: 인터페론 람다), 인터류킨, 림포카인 및 종양 괴사 인자를 포함하는 사이토카인을 인코딩할 수 있다.

[0277] 또 다른 구현예에서, RNA, 바람직하게는 mRNA는 게놈 편집 기술에 사용될 수 있는 폴리펩티드 또는 단백질을 인코딩하는 리보뉴클레오티드 서열을 함유할 수 있다. 게놈 편집은 DNA가 뉴클레아제를 사용하여 유기체의 게놈에 삽입, 결실 또는 대체되는 유전 공학의 한 유형이다. 이러한 뉴클레아제는 게놈의 목적하는 위치에 부위 특이적 단절(site-specific break)을 생성한다. 유도된 단절은 비상동성 말단 결합 또는 상동성 재조합에 의해 복구되어 게놈에 표적 돌연변이를 초래하여 게놈을 "편집"한다. 단절은 단일 가닥 단절 또는 이중 가닥 단절(DSB)일 수 있지만, 이중 가닥 단절(DSB)이 바람직하다. 상이한 폴리펩티드 또는 단백질을 이용하는 다수의 게놈 편집 시스템, 즉, 예를 들어, CRISPR-Cas 시스템, 메가뉴클레아제, 아연 핑거 뉴클레아제(ZFN) 및 전사 활성화제 유사 이펙터 기반 뉴클레아제(TALEN)가 당업계에 공지되어 있다. 게놈 공학을 위한 방법은 문헌(Trends in Biotechnology, 2013, 31 (7), 397-405)에서 검토된다.

[0278] 따라서, 바람직한 구현예에서, RNA, 바람직하게는 mRNA는 Cas(CRISPR 관련 단백질) 단백질 계열의 폴리펩티드 또는 단백질, 바람직하게는 Cas9(CRISPR 관련 단백질 9)를 인코딩하는 리보뉴클레오티드 서열을 함유할 수 있다. Cas 단백질 계열의 단백질, 바람직하게는 Cas9는 CRISPR/Cas9 기반 방법 및/또는 CRISPR/Cas9 게놈 편집 기술에 사용될 수 있다. 게놈 편집, 조절 및 표적화를 위한 CRISPR-Cas 시스템은 문헌(Nat. Biotechnol., 2014, 32(4):347-355)에서 검토된다.

[0279] 또 다른 바람직한 구현예에서, RNA, 바람직하게는 mRNA는 메가뉴클레아제를 인코딩하는 리보뉴클레오티드 서열을 함유할 수 있다. 메가뉴클레아제는 "종래의" 엔도데옥시리보뉴클레아제와 대조적으로, 큰 인식 부위(예: 12 내지 40개 염기쌍의 이중 가닥 DNA 서열)를 인식하는 엔도데옥시리보뉴클레아제이다. 그 결과, 각각의 부위는 임의의 주어진 게놈에서 단지 몇 번, 바람직하게는 단 한 번만 발생한다. 따라서, 메가뉴클레아제는 가장 특이적인 천연 제한 효소로 간주되며, 따라서 게놈 편집 기술에 적합한 도구이다.

[0280] 또 다른 바람직한 구현예에서, RNA, 바람직하게는 mRNA는 아연 핑거 뉴클레아제(ZFN)를 인코딩하는 리보뉴클레오티드 서열을 함유한다. ZFN은 아연 핑거 DNA 결합 도메인을 DNA 절단 도메인에 융합시킴으로써 생성되는 인공 제한 효소이다. 아연 핑거 도메인은 특이적인 목적하는 DNA 서열을 표적화 하도록 조작될 수 있으며, 이를 통해 아연 핑거 뉴클레아제가 복잡한 게놈 내에서 고유한 서열을 표적화할 수 있다. 내인성 DNA 복구 기계를 활용함으로써, ZFN은 고등 유기체의 게놈을 정밀하게 변경하는 데 사용될 수 있고, 따라서 게놈 편집 기술에 적합한 도구이다.

[0281] 또 다른 바람직한 구현예에서, RNA, 바람직하게는 mRNA는 전사 활성화제 유사 이펙터 뉴클레아제(TALEN)를 인코딩하는 리보뉴클레오티드 서열을 함유할 수 있다. TALEN은 DNA의 특정 서열을 절단하도록 조작될 수 있는 제한 효소이다. TALEN은 TAL 이펙터 DNA 결합 도메인이 뉴클레아제의 DNA 절단 도메인에 융합된 융합 단백질이다. 전사 활성화제 유사 이펙터(TALE)는 거의 임의의 목적하는 DNA 서열에 결합하도록 조작될 수 있다. 따라서, 뉴클레아제와 결합될 때, DNA는 목적하는 특정 위치에서 절단될 수 있다.

[0282] 상기 구현예들은 RNA, 바람직하게는 mRNA 분자의 맥락에서 기재되었지만, 본 발명은, 상기 언급된 바와 같이, RNA, 바람직하게는 mRNA의 사용으로 제한될 뿐만 아니라 DNA 분자와 같은 임의의 핵산 분자를 사용할 수도 있다.

[0283] 상기 DNA 분자는 상기 RNA, 바람직하게는 상기 mRNA를 인코딩할 수 있으며, 따라서 상응하게 전사된 RNA 분자에 대한 유전 정보를 보유할 수 있다.

[0284] 따라서, 바람직한 구현예와 관련하여, 본 발명에 사용된 나노입자에 존재할 수 있는 RNA 분자, 바람직하게는 mRNA 분자의 맥락에서 상기 및 하기에 제시된 DNA 분자에 동일한 내용이 준용하여 적용된다.

[0285] 상기의 대안적으로, RNA는 단백질 또는 폴리펩티드로 발현되지 않는 리보뉴클레오티드 서열을 함유한다. 따라서, 용어 RNA는 세포에 도입될 경우 폴리펩티드/단백질 또는 이의 단편으로 번역될 수 있는 임의의 폴리뉴클레오티드 분자를 의미하는 것으로만 이해해서는 안 된다. 오히려, RNA가 단백질로 번역되지 않는 리보뉴클레오티드 서열을 함유하는 것도 또한 고려된다. 이러한 맥락에서, RNA는 바람직하게는 안티센스 RNA, siRNA 또는

miRNA 서열 또는 또 다른 목적하는 비코딩 리보뉴클레오티드 서열에 대한 유전 정보를 제공하는 리보뉴클레오티드 서열을 함유하는 것으로 예상된다.

[0286] 따라서, RNA는 안티센스 RNA, siRNA 또는 miRNA 서열일 수도 있다. 안티센스 RNA, siRNA 또는 miRNA 서열은 일부 단계에서 특정 RNA 분자의 효과를 침묵시키는 데 사용될 수 있다. 이는 특히 특정 의료 환경과 특정 질환의 치료, 특히 본원 상기 및 하기에 기재된 바와 같은 RNA 기반 요법에서 바람직하고 유용할 수 있다.

[0287] RNA 분자의 효과를 침묵시키는 것은 특정 RNA 서열에 상보적인 핵산 가닥을 사용하여 RNAi(RNA 간섭) 메커니즘을 사용함으로써 달성될 수 있다. 용어 "RNA 간섭" 또는 "억제성 RNA"(RNAi/iRNA)는 분해를 위한 특정 mRNA를 표적화하는 데 이중 가닥 RNA를 사용하여 번역을 침묵시키는 것을 기재한다. 바람직한 억제성 RNA 분자는 이중 가닥 RNA(dsRNA), siRNA, shRNA 및 stRNA로 구성된 그룹으로부터 선택될 수 있다. 유전자 서열과 일치하는 dsRNA는 시험관내에서 합성되어 세포 내로 도입될 수 있다. dsRNA는 또한 표적 유전자 서열을 센스 및 안티센스 배향으로 발현하는 벡터의 형태로, 예를 들어 헤어핀(hairpin) mRNA의 형태로 세포 내로 도입될 수도 있다. 센스 및 안티센스 서열은 또한 별도의 벡터로부터 발현될 수 있으며, 이에 따라 개별 안티센스 및 센스 분자는 발현시 이중 가닥 RNA를 형성한다. 일부 경우에, 센스 배향의 서열 또는 심지어 프로모터 서열의 발현은 세포내의 내부 증폭 메커니즘으로 인해 dsRNA를 생성하고 이어서 siRNA를 생성하기에 충분하다는 것이 당업계에 공지되어 있다. 따라서, 코딩 영역에 의해 인코딩된 폴리펩티드 또는 단백질의 활성의 감소를 초래하는 모든 수단 및 방법이 본 발명에 따라 사용되어야 한다. 예를 들어, 센스 작제물, 안티센스 작제물, 헤어핀 작제물, 센스 및 안티센스 분자 및 이들의 조합이 이러한 siRNA를 생성/도입하는 데 사용될 수 있다. dsRNA는 dsRNA 전구체 분자를 짧은 간섭성 RNA(siRNA)로 절단하는 고도로 보존된 뉴클레아제 다이서(dicer)를 포함한 자연적인 공정으로 공급된다. siRNA(들)의 생성 및 제조뿐만 아니라 표적 유전자의 발현을 억제하는 방법은 특히 문헌(WO 02/055693, Wei (2000) Dev. Biol. 15:239-255; La Count (2000) Biochem. Paras. 111:67-76; Baker (2000) Curr. Biol. 10:1071-1074; Svoboda (2000) Development 127:4147-4156 또는 Marie (2000) Curr. Biol. 10:289-292)에 기재되어 있다. 이어서, 이러한 siRNA는 침묵 유발제에 상동성인 메신저 RNA를 파괴하는 다중복합체 뉴클레아제 인 RNA 유도 침묵 복합체(RISC)의 서열 특정 부분을 구축한다). 문헌(Elbashir (2001) EMBO J. 20:6877-6888)은 21개의 뉴클레오티드 RNA 듀플렉스가 세포 배양에 사용되어 포유류 세포에서 유전자 발현을 간섭할 수 있음을 보여주었다.

[0288] siRNA를 추론하고 작제하는 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 문헌(Elbashir (2002) Methods 26:199-213), siRNA의 상업적 공급원의 인터넷 웹 사이트, 예를 들어, Qiagen GmbH (https://www1.qiagen.com/GeneGlobe/Default.aspx); Dharmacon (www.dharmacon.com); Xeragon Inc. (http://www.dharmacon.com/Default.aspx), 및 Ambion (www.ambion.com), 또는 Tom Tuschl의 연구 그룹의 웹 사이트(http://www.rockefeller.edu/labheads/tuschl/sirna.html)에 기재되어 있다. 또한, 주어진 mRNA 서열로부터 siRNA를 추론하는 프로그램은 온라인에서 이용 가능하다(예: http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html 또는 http://katahdin.cshl.org:9331/RNAi/html/rnai.html). 2-nt 3' 돌출부(overhang)의 우리딘 잔기는 활성의 손실 없이 2'데옥시티미딘으로 대체될 수 있으며, 이는 RNA 합성 비용을 현저히 줄이고 포유류 세포에 적용될 때 siRNA 듀플렉스의 내성을 또한 향상시킬 수 있다(Elbashir (2001) loc. cit). siRNA는 또한 T7 또는 다른 RNA 중합효소를 사용하여 효소적으로 합성될 수 있다(Donze (2002) Nucleic Acids Res 30:e46). 효과적인 RNA 간섭을 매개하는 짧은 RNA 듀플렉스(esiRNA)는 또한 에쉐리키아 콜리(Escherichia coli) RNase III에 의한 가수분해에 의해 생성될 수 있다(Yang (2002) PNAS 99:9942-9947). 또한, 발현 벡터는 진핵세포에서 작은 헤어핀 RNA 루프에 의해 연결된 이중 가닥 siRNA를 발현하기 위해 개발되었다(예: Brummelkamp (2002) Science 296:550-553). 이러한 모든 작제물은 상기 명명된 프로그램의 도움으로 개발될 수 있다. 또한, 서열 분석 프로그램에 통합되거나 별도로 판매되는 상업적으로 이용 가능한 서열 예측 도구, 예를 들어, www.oligoEngine.com(Seattle,WA)에 의해 제공되는 siRNA 설계 도구가 siRNA 서열 예측에 사용될 수 있다.

[0289] 마이크로RNA(miRNA)는 상기 기재된 작은 간섭성 RNA(siRNA)와 유사하다. 마이크로RNA(miRNA)는 식물, 동물 및 일부 바이러스에서 발견되는 작은 비코딩 RNA 분자(약 22개의 뉴클레오티드 함유)로, RNA 침묵 및 유전자 발현의 전사 후 조절에서 기능한다. miRNA는 mRNA 분자 내의 상보적인 서열과의 염기쌍을 통해 기능한다. 그 결과, 이들 mRNA 분자는 다음 과정 중 하나 이상에 의해 침묵된다: (1) mRNA 가닥의 두 조각으로의 절단, (2) 폴리(A) 꼬리의 단축을 통한 mRNA의 불안정화, 및 (3) 리보솜에 의한 mRNA의 단백질로의 덜 효율적인 번역. 언급된 바와 같이, miRNA는 스스로 역으로 접혀 짧은 헤어핀을 형성하는 RNA 전사체 영역에서 유래하는 반면, siRNA는 이중 가닥 RNA의 긴 영역에서 유래한다는 점을 제외하고는, miRNA는 RNA 간섭(RNAi) 경로의 작은 간섭

성 RNA(siRNA)와 유사하다.

[0290] 본 발명의 현탁액 제형 및 에어로졸에 사용되는 DNA 분자는 또한 상기 RNA, 예를 들어 상기 siRNA 또는 miRNA를 인코딩하는 것일 수 있으며, 이에 따라 상응하게 전사된 RNA 분자에 대한 유전 정보를 보유할 수 있다. 따라서, 바람직한 구현예와 관련하여, 본 발명에 사용되는 나노입자에 존재할 수 있는 RNA 분자, 바람직하게는 mRNA 분자의 맥락에서 상기 제시된 바와 같은 DNA 분자에 동일한 것이 준용하여 적용될 수 있다.

[0291] 본 발명의 맥락에서 나노입자는 단일 유형의 핵산, 바람직하게는 mRNA와 같은 RNA를 포함할 수 있지만, 대안적으로 2개 이상의 유형의 핵산, 바람직하게는 RNA의 조합을, 예를 들어, 2개 이상의 유형의 핵산, 바람직하게는 RNA를 단일 입자로 포함하는 입자의 형태 또는 그 안에 함유된 핵산, 바람직하게는 mRNA와 같은 RNA의 유형이 다른 입자의 블렌드의 형태로 포함할 수 있는 것으로 이해될 것이다.

[0292] 상기 설명된 바와 같이, 본 발명에 따른 수성 현탁액 제형의 나노입자 및 본 발명에 따른 에어로졸의 나노입자는 성분 (b)로서 이온화 가능한 지질 또는 이온화 가능한 리피도이드를 추가로 포함한다. 이는 나노입자가 상이한 이온화 가능한 지질의 조합, 상이한 이온화 가능한 리피도이드의 조합, 또는 하나 이상의 이온화 가능한 지질과 하나 이상의 이온화 가능한 리피도이드의 조합을 포함할 가능성을 포함하는 것으로 이해될 것이다. 본 발명의 맥락에서 사용되는 나노입자는 전형적으로 핵산(a)와 이온화 가능한 지질 또는 이온화 가능한 리피도이드(b)를 이들 성분의 혼합물 형태로 포함한다.

[0293] 용어 "이온화 가능한 지질" 및 "이온화 가능한 리피도이드"는 지질 나노입자 및 리피도이드 나노입자 분야에서 양이온 전하를 운반하도록 양성자화되거나 양이온 전하를 운반하도록 양성화자될 수 있는 지질 또는 리피도이드를 지칭하기 위해 사용된다. 따라서, 이온화 가능한 지질 및 리피도이드는 각각 "양성자화 가능한 지질" 및 "양성자화 가능한 리피도이드", 또는 각각 적정 가능한 지질 또는 적정 가능한 리피도이드로 지칭되기도 한다. 숙련된 독자에 의해 이해되는 바와 같이, "이온화 가능한 지질" 또는 "이온화 가능한 리피도이드"에 대한 참조는 양성자화 또는 비양성자화 형태의 이온화 가능한 지질 또는 리피도이드를 포함한다. 추가로 이해되는 바와 같이, 지질 또는 리피도이드의 양성자화 또는 비양성자화 상태는 일반적으로 지질 또는 리피도이드를 둘러싸는 매질의 pH 값, 예를 들어, 수성 현탁액 제형에 포함된 수성 비히클 용액 및 본 발명에 따른 에어로졸의 pH 값에 의해 결정된다.

[0294] 본 발명의 맥락에서 양전하를 띤 이온화 가능한 지질 또는 이온화 가능한 리피도이드의 양전하에 대한 반대이온(음이온)은 전형적으로 핵산에 함유된 음이온성 모이어티에 의해 제공된다. 양전하를 띤 그룹이 핵산 내의 음이온성 모이어티와 비교하여 과량으로 존재하는 경우, 양전하는 다른 약제학적으로 허용되는 음이온, 예를 들어, 클로라이드, 브로마이드 또는 요오디드, 황산염, 질산염, 인산염, 인산수소, 인산이수소, 탄산염 또는 탄산수소에 의해, 또는 나노입자에 임의 성분으로 존재할 수 있는, 핵산과 다른 폴리음이온 성분에 의해 균형을 이룰 수 있다.

[0295] 이온화 가능한 지질 및 이온화 가능한 리피도이드는 지질 나노입자 또는 리피도이드 나노입자의 성분으로 익히 공지되어 있다. 본 발명의 맥락에서, 나노입자에 함유된 이온화 가능한 지질 또는 이온화 가능한 리피도이드의 유형에 대해 부과되는 특별한 제한은 없다.

[0296] 일반적으로, 이온화 가능한 지질 또는 리피도이드는 각각 양성자 수용체로서 작용할 수 있고 따라서 양성자화되거나 비양성화될 수 있는 1급, 2급 또는 3급 아미노 그룹을 포함한다. 이온화 가능한 리피도이드는 일반적으로 복수의 이러한 아미노 그룹, 예를 들어, 2개 이상, 바람직하게는 3개 이상을 포함한다.

[0297] 바람직하게는, 본 발명에 따르는 현탁액 제형 및 에어로졸에 사용되는 나노입자에 의해 포함될 수 있는 이온화 가능한 지질은 양성자화 가능하거나 양성화된 그룹으로서 하나 이상의, 바람직하게는 하나의 1급, 2급 또는 3급 아미노 그룹(들)을 함유하는 양성자화 가능한 헤드 그룹, 및 헤드 그룹에 연결된 하나 이상의, 바람직하게는 하나 또는 2개의 소수성 모이어티를 포함하는 지질이다.

[0298] 이러한 바람직한 이온화 가능한 지질의 예는 다음과 같다:

[0299] i) 양성자화 가능하거나 양성화된 그룹으로서 하나 이상의, 바람직하게는 하나의 1급, 2급 또는 3급 아미노 그룹(들)을 함유하는 양성자화 가능한 헤드 그룹, 및 헤드 그룹에 연결된 하나의 소수성 모이어티를 포함하는 지질;

[0300] ii) 양성자화 가능하거나 양성화된 헤드 그룹으로서 하나의 2급 또는 3급 아미노 그룹, 및 헤드 그룹에 연결된 2개의 소수성 모이어티를 포함하는 지질.

[0301] 이러한 바람직한 지질에 포함된 소수성 모이어티는 바람직하게는 하나 이상의 선형 쇄 지방족 잔기, 예를 들어, 8 내지 18개의 탄소 원자를 포함하는 선형 쇄 잔기, 분지형 쇄 지방족 잔기, 예를 들어, 8 내지 18개의 탄소 원자를 포함하는 분지형 쇄 잔기, 또는 축합된 환 구조일 수 있는 지환식 환 구조, 예를 들어, 10 내지 18개의 탄소 원자를 포함하는 지환식 환 구조를 함유한다. 또한, 소수성 모이어티는 헤드 그룹에 대한 모이어티의 연결을 용이하게 하거나, 상기 지방족 잔기 중 둘 이상이 서로 결합되도록 하는 하나 이상의 연결 그룹을 포함할 수 있다. 또한, 모이어티의 소수성 특성이 유지되는 정도로 하나 이상의 치환체를 포함할 수 있다.

[0302] 바람직하게는, 본 발명에 따른 현탁액 제형 및 에어로졸에 사용되는 나노입자에 포함될 수 있는 이온화 가능한 리피도이드는 올리고아민, 더욱 바람직하게는 올리고알킬아민이며, 이는 양성자화 가능하거나 양성자화된 2급 및 3급 아미노 그룹으로부터 선택된 적어도 2개, 바람직하게는 적어도 3개의 아미노 그룹을 포함하며, 이들 각각은 그것에 부착된 소수성 모이어티를 운반할 수 있다. 소수성 잔기를 운반하는 아미노 그룹 이외에, 리피도이드는 1급, 2급 및 3급 아미노 그룹으로부터 선택된 양성자화 가능하거나 양성자화된 아미노 그룹을 추가로 포함할 수 있다. 바람직하게는, 아미노 그룹의 총 수는 3 내지 10, 더욱 바람직하게는 3 내지 6이다. 바람직하게는, 아미노 그룹에 부착된 소수성 모이어티의 총 수는 3 내지 6이다. 바람직하게는, 올리고알킬아민 중 아미노 그룹의 총 수에 대한 아미노 그룹에 부착된 소수성 모이어티의 수의 비율은 0.75 내지 1.5이다.

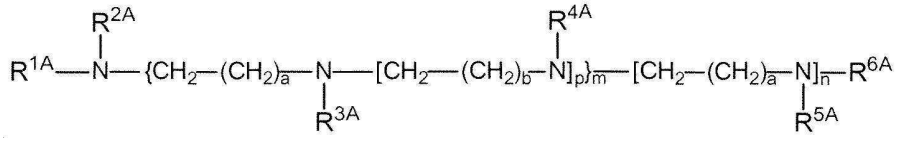
[0303] 이러한 바람직한 리피도이드에 포함된 소수성 모이어티는 바람직하게는 하나 이상의 선형 쇄 지방족 잔기, 예를 들어, 8 내지 18개의 탄소 원자를 포함하는 선형 쇄 잔기 및 분지형 쇄 지방족 잔기, 예를 들어, 8 내지 18개의 탄소 원자를 포함하는 분지형 쇄 잔기를 함유한다. 또한, 소수성 모이어티는 아미노 그룹에 대한 모이어티의 결합을 용이하게 하거나, 둘 이상의 상기 지방족 잔기가 서로 결합되도록 하는 하나 이상의 연결 그룹을 포함할 수 있다. 또한, 모이어티의 소수성 특성이 유지되는 정도로 하나 이상의 치환체를 포함할 수 있다.

[0304] 본 발명의 맥락에서 사용되는 나노입자에서 성분 (b1)로서 포함될 수 있는 적합한 예시적인 이온화 가능한 지질 또는 이온화 가능한 리피도이드는, 예를 들어, WO 2006/138380 A2, EP2476756 A1, US 2016/0114042 A1, US 8,058,069 B2, US 8,492,359 B2, US 8,822,668 B2, US 8,969,535, US 9,006,417 B2, US 9,018,187 B2, US 9,345,780 B2, US 9,352,042 B2, US 9,364,435 B2, US 9,394,234 B2, US 9,492,386 B2, US 9,504,651 B2, US 9,518,272 B2, DE 19834683 A1, WO 2010/053572 A2, US 9,227,917 B2, US 9,556,110 B2, US 8,969,353 B2, US 10,189,802 B2, WO 2012/000104 A1, WO 2010/053572, WO 2014/028487 또는 WO 2015/095351 또는 문헌(Akinc, A., et al., Nature Biotechnology, 26(5), 2008, 561-569; Sabnis, S. et al., Molecular Therapy, 26(6), 2018, Vol. 26 No 6 June 2018, 1509-1519; Kowalski, P.S., et al., Molecular Therapy, 27(4), 2019, 710-728; Kulkarni, J. A. et al, Nucleic Acid Therapeutics, 28(3), 2018, 146-157; 및 Li, B. et al., Nano Letters, 15, 2015, 8099-8107)에 개시되어 있다.

[0305] 바람직하게는, 나노입자의 성분 (b)는 다음 화학식 Ia의 이온화 가능한 리피도이드 또는 이의 양성자화된 형태를 포함하거나 더욱 바람직하게는 이로 이루어진다. 본 발명의 맥락에서 바람직한 성분 (b)로 사용될 수 있는 다음 화학식 Ia의 이온화 가능한 리피도이드 또는 이의 양성자화된 형태는 PCT 출원 WO 2014/207231 A1에 상세히 기재되어 있다.

[0306] 따라서, 성분 (b)는 바람직하게는 다음 화학식 b-1의 리피도이드 또는 화학식 I의 화합물에 함유된 질소 원자 중 하나 이상이 양성화되어 양전하를 띠는 화합물을 제공하는 이의 양성자화된 형태를 포함하거나 이로 이루어진다.

[0307] [화학식 b-1]

[0308] 

[0309] 상기 화학식 b-1에서, 변수 a, b, p, m, n 및 R^{1A} 내지 R^{6A}는 다음과 같이 정의된다:

[0310] a는 1이고 b는 2 내지 4의 정수이거나; a는 2 내지 4의 정수이고 b는 1이며,

[0311] p는 1 또는 2이고,

[0312] m은 1 또는 2이고; n은 0 또는 1이며, m+n은 ≥ 2이고;

[0313] R^{1A} 내지 R^{6A}는 서로 독립적으로 수소; $-CH_2-CH(OH)-R^{7A}$, $-CH(R^{7A})-CH_2-OH$, $-CH_2-CH_2-(C=O)-O-R^{7A}$, $-CH_2-CH_2-(C=O)-NH-R^{7A}$; $-CH_2-R^{7A}$; $-C(NH)-NH_2$; 폴리(에틸렌 글리콜) 쇄; 및 수용체 리간드로부터 선택되고; 여기서 R^{7A}는 C3-C18 알킬 및 하나의 C-C 이중 결합을 갖는 C3-C18 알케닐로부터 선택되고;

[0314] 단, R^{1A} 내지 R^{6A} 중 적어도 두 개의 잔기는 $-CH_2-CH(OH)-R^{7A}$, $-CH(R^{7A})-CH_2-OH$, $-CH_2-CH_2-(C=O)-O-R^{7A}$, $-CH_2-CH_2-(C=O)-NH-R^{7A}$ 및 $-CH_2-R^{7A}$로부터 선택되고, 여기서 R^{7A}는 C3-C18 알킬 및 하나의 C-C 이중 결합을 갖는 C3-C18 알케닐로부터 선택된다.

[0315] 바람직하게는, R^{1A} 내지 R^{6A}는 독립적으로 수소; 그룹 $-CH_2-CH(OH)-R^{7A}$, $-CH(R^{7A})-CH_2-OH$, $-CH_2-CH_2-(C=O)-O-R^{7A}$, $-CH_2-CH_2-(C=O)-NH-R^{7A}$; 및 $-CH_2-R^{7A}$로부터 선택되고; 여기서 R^{7A}는 C3-C18 알킬 및 하나의 C-C 이중 결합을 갖는 C3-C18 알케닐로부터 선택되고; 단, R^{1A} 내지 R^{6A} 중 적어도 두 개의 잔기, 더욱 바람직하게는 R^{1A} 내지 R^{6A} 중 적어도 세 개의 잔기, 더욱 더 바람직하게는 R^{1A} 내지 R^{6A} 중 적어도 네 개의 잔기는 $-CH_2-CH(OH)-R^{7A}$, $-CH(R^{7A})-CH_2-OH$, $-CH_2-CH_2-(C=O)-O-R^{7A}$, $-CH_2-CH_2-(C=O)-NH-R^{7A}$ 및 $-CH_2-R^{7A}$로부터 선택된 그룹이고, 여기서 R^{7A}는 C3-C18 알킬 및 하나의 C-C 이중 결합을 갖는 C3-C18 알케닐로부터 선택된다. 더욱 바람직하게는, R^{1A} 내지 R^{6A}는 독립적으로 수소 및 그룹 $-CH_2-CH(OH)-R^{7A}$로부터 선택되고, 여기서 R^{7A}는 C3-C18 알킬 및 하나의 C-C 이중 결합을 갖는 C3-C18 알케닐로부터 선택되고; 단, R^{1A} 내지 R^{6A} 중 적어도 두 개의 잔기, 더욱 바람직하게는 R^{1A} 내지 R^{6A} 중 적어도 세 개의 잔기, 더욱 더 바람직하게는 R^{1A} 내지 R^{6A} 중 적어도 네 개의 잔기는 그룹 $-CH_2-CH(OH)-R^{7A}$이고, 여기서 R^{7A}는 C3-C18 알킬 및 하나의 C-C 이중 결합을 갖는 C3-C18 알케닐로부터 선택된다.

[0316] 바람직하게는, R^{7A}는 C8-C18 알킬 및 하나의 C-C 이중 결합을 갖는 C8-C18 알케닐로부터, 더욱 바람직하게는 C8-C12 알킬 및 하나의 C-C 이중 결합을 갖는 C8-C12 알케닐로부터 선택된다. 일반적으로, 알킬 그룹이 R^{7A}로서 알케닐 그룹보다 바람직하다.

[0317] 임의의 그룹 R^{1A} 내지 R^{6A}가, 예를 들어, WO2006/138380에 기재된 바와 같은 아미노 그룹에 대한 보호 그룹인 한, 이의 바람직한 구현예는 t-부톡시카보닐(Boc), 9-플루오레닐메톡시카보닐(Fmoc) 또는 카보벤질옥시(Cbz)이다.

[0318] 임의의 그룹 R^{1A} 내지 R^{6A}가 수용체 리간드인 한, 유용한 예는 문헌(Philipp and Wagner in "Gene and Cell Therapy - Therapeutic Mechanisms and Strategy", 3rd Edition, Chapter 15. CRC Press, Taylor & Francis Group LLC, Boca Raton 2009)에 제공된다. 폐 조직을 위한 바람직한 수용체 리간드는 문헌(Pfeifer et al. 2010, Ther Deliv. 1(1):133-48)에 기재되어 있다. 바람직한 수용체 리간드는 특정 세포 표면 구조 또는 특정 세포 유형에 결합하기 위한 스크리닝 펩티드 라이브러리에서 유래된 합성 사이클릭 또는 선형 펩티드, 사이클릭 또는 선형 RGD 펩티드, 합성 또는 천연 탄수화물, 예를 들어, 시알산, 갈락토스 또는 만노스 또는 탄수화물을, 예를 들어, 펩티드, 세포 표면 구조를 특이적으로 인식하는 항체, 엽산, 표피 성장 인자 및 이의 유래된 펩티드, 트랜스페린, 항-트랜스페린 수용체 항체, 나노바디 및 항체 단편 또는 공지된 세포 표면 분자에 결합하는 승인된 약물과 반응시킴으로써 유도된 합성 리간드를 포함한다.

[0319] 임의의 그룹 R^{1A} 내지 R^{6A}가 폴리(에틸렌 글리콜) 쇄인 한, 폴리(에틸렌 글리콜) 쇄의 바람직한 분자량은 100-20,000g/mol, 더욱 바람직하게는 1,000-10,000g/mol이고, 가장 바람직하게는 1,000-5,000g/mol이다.

[0320] 화학식 b-1의 변수 p는 바람직하게는 1이다.

[0321] 화학식 b-1에서, m은 1 또는 2이고; n은 0 또는 1이며, m+n은 ≥ 2이다. 즉, m이 1이면, n도 1이어야 하고, m이 2이면 n은 0 또는 1일 수 있다. n이 0이면 m은 2여야 한다. n이 1이면, m은 1 또는 2일 수 있다.

[0322] 화학식 b-1의 변수 n은 바람직하게는 1이다. m이 1이고 n이 1인 것이 더욱 바람직하다.

[0323] 따라서, p = 1, m = 1 및 n = 1의 조합도 마찬가지로 바람직하다.

[0324] 화학식 Ia의 변수 a와 b의 경우, a와 b 중 하나는 1이고 다른 하나는 2 또는 3인 것이 바람직하다. a가 1이고 b가 2이거나, a가 2이고 b가 1인 것이 보다 바람직하다. 가장 바람직하게는, a는 1이고 b는 2이다.

[0325] 상기의 관점에서, 화학식 b-1의 화합물은 화학식 b-1a의 화합물이고, 성분 (b)는 다음 화학식 b-1a의 리피도이드 또는 화학식 b-1a에 표시된 질소 원자 중 하나 이상이 양성자화되어 양전하를 띠는 화합물을 제공하는 이의 양성자화된 형태를 포함하거나 이로 구성되는 것이 더욱 바람직하다:

[0326] [화학식 b-1a]

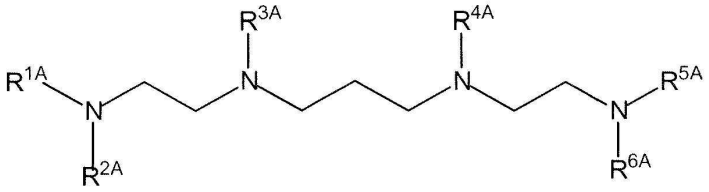
[0327] $R^{1A}-NR^{2A}-CH_2-(CH_2)_a-NR^{3A}-CH_2-(CH_2)_b-NR^{4A}-CH_2-(CH_2)_a-NR^{5A}-R^{6A}$

[0328] 상기 화학식 b-1a에서,

[0329] a, b 및 R^{1A} 내지 R^{6A}는 이의 바람직한 구현예를 포함하여 화학식 b-1에서와 같이 정의된다.

[0330] 추가의 바람직한 구현예에 따르면, 화학식 b-1의 화합물은 화학식 b-1b의 화합물이고, 성분 (b)는 다음 화학식 b-1b의 리피도이드 화합물 또는 화학식 b-1b에 표시된 질소 원자 중 하나 이상이 양성자화되어 양전하를 띠는 화합물을 제공하는 이의 양성자화된 형태를 포함하거나 이로 구성된다:

[0331] [화학식 b-1b]

[0332] 

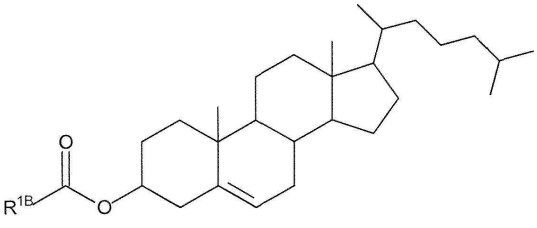
[0333] 상기 화학식 b-1b에서,

[0334] R^{1A} 내지 R^{6A}는 이의 바람직한 구현예를 포함하여 화학식 1a에서와 같이 정의된다.

[0335] 따라서, 특히 바람직한 구현예에 따르면, 성분 (b)는 상기 화학식 b-1b의 리피도이드 화합물 또는 이의 양성화된 형태를 포함하거나 이로 구성되고, R^{1A} 내지 R^{6A}는 독립적으로 수소 및 $-CH_2-CH(OH)-R^{7A}$로부터 선택되고, 여기서 R^{7A}는 C8-C18 알킬 및 하나의 C-C 이중 결합을 갖는 C8-C18 알케닐로부터 선택되고, 단, R^{1A} 내지 R^{6A} 중 적어도 두 개의 잔기는 $-CH_2-CH(OH)-R^{7A}$이고, 더욱 바람직하게는 R^{1A} 내지 R^{6A} 중 적어도 세 개의 잔기, 더욱 더 바람직하게는 R^{1A} 내지 R^{6A} 중 적어도 네 개의 잔기는 그룹 $-CH_2-CH(OH)-R^{7A}$이고, 여기서 R^{7A}는 C8-C18 알킬 및 하나의 C-C 이중 결합을 갖는 C8-C18 알케닐로부터 선택된다.

[0336] 추가의 예시적인 구현예에 따르면, 성분 (b)는 화학식 b-2의 이온화 가능한 지질 또는 R^{1B}에 의해 포함된 1급, 2급 또는 3급 아미노 그룹에 함유된 질소 원자 중 하나 이상이 양성자화되어 양전하를 띠는 화합물을 제공하는 이의 양성자화된 형태를 포함하거나 이로 구성된다:

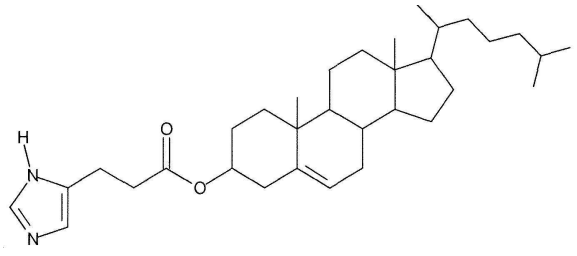
[0337] [화학식 b-2]

[0338] 

[0339] 상기 화학식 b-2에서,

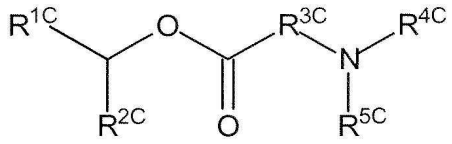
[0340] R^{1B}는 하나 이상의 1급, 2급 또는 3급 아미노 그룹을 포함하는 유기 그룹이다.

[0341] 바람직하게는, 화학식 b-2의 화합물은 다음과 같은 구조를 갖는다:

[0342] 

[0343] 또 다른 예시적인 구현예에 따르면, 성분 (b)는 화학식 b-3의 이온화 가능한 지질 또는 화학식 b-3의 화합물에 함유된 질소 원자 중 하나 이상이 양성자화되어 양전하를 띠는 화합물을 제공하는 이의 양성자화된 형태를 포함하거나 이로 구성된다:

[0344] [화학식 b-3]

[0345] 

[0346] 상기 화학식 b-3에서,

[0347] R^{1C} 및 R^{2C}는 C8-C18 알킬 그룹 및 C8-C18 알케닐 그룹, 바람직하게는 C12-C18 알킬 그룹 및 C12-C18 알케닐 그룹으로부터 독립적으로 선택되고,

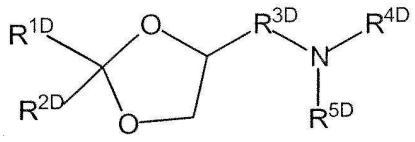
[0348] R^{3C}는 C1-C6 알칸디일 그룹, 바람직하게는 C2 또는 C3 알칸디일 그룹이고,

[0349] R^{4C} 및 R^{5C}는 독립적으로 수소 또는 C1-C3 알킬이며, 바람직하게는 메틸이다.

[0350] 화학식 b-3의 이온화 가능한 지질의 예로서, DLin-MC3-DMA(6Z,9Z,28Z,31Z)-헵타트리아콘트-6,9,28,31-테트라엔-19-일 4-(디메틸아미노)부타노에이트)를 참조할 수 있다.

[0351] 또 다른 예시적인 구현예에 따르면, 성분 (b)는 화학식 b-4의 이온화 가능한 지질 또는 화학식 b-4의 화합물에 함유된 질소 원자 중 하나 이상이 양성자화되어 양전하를 띠는 화합물을 제공하는 이의 양성자화된 형태를 포함하거나 이로 구성된다:

[0352] [화학식 b-4]

[0353] 

[0354] 상기 화학식 b-4에서,

[0355] R^{1D} 및 R^{2D}는 C8-C18 알킬 그룹 및 C8-C18 알케닐 그룹, 바람직하게는 C12-C18 알킬 그룹 및 C12-C18 알케닐 그룹으로부터 독립적으로 선택되고,

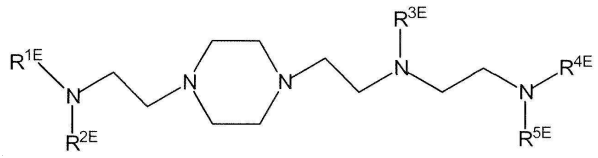
[0356] R^{3D}는 C1-C6 알칸디일 그룹, 바람직하게는 C2 알칸디일 그룹이고,

[0357] R^{4D} 및 R^{5D}는 독립적으로 수소 또는 C1-C3 알킬이며, 바람직하게는 메틸이다.

[0358] 또 다른 예시적인 구현예에 따르면, 성분 (b)는 화학식 b-5의 이온화 가능한 리피도이드 또는 화학식 b-5의 화합물에 함유된 질소 원자 중 하나 이상이 양성자화되어 양전하를 띠는 화합물을 제공하는 이의 양성자화된 형태

를 포함하거나 이로 구성된다:

[0359] [화학식 b-5]

[0360] 

[0361] 상기 화학식 b-5에서,

[0362] R^{1E} 내지 R^{5E}는 서로 독립적으로 수소, $-CH_2-CH(OH)-R^{7E}$, $-CH(R^{7E})-CH_2-OH$, $-CH_2-CH_2-(C=O)-O-R^{7E}$, $-CH_2-CH_2-(C=O)-NH-R^{7E}$ 및 $-CH_2-R^{7E}$로부터 선택되고, 여기서 R^{7E}는 C3-C18 알킬 또는 하나의 C-C 이중 결합을 갖는 C3-C18 알케닐로부터 선택되며, 단 R^{1E} 내지 R^{5E} 중 적어도 2개의 잔기는 $-CH_2-CH(OH)-R^{7E}$, $-CH(R^{7E})-CH_2-OH$, $-CH_2-CH_2-(C=O)-O-R^{7E}$, $-CH_2-CH_2-(C=O)-NH-R^{7E}$ 및 $-CH_2-R^{7E}$로부터 선택되고, 여기서 R^{7E}는 C3-C18 알킬 또는 하나의 C-C 이중 결합을 갖는 C3-C18 알케닐로부터 선택된다.

[0363] 화학식 b-5에서, R^{1E} 내지 R^{5E}는 바람직하게는 독립적으로 $-CH_2-CH(OH)-R^{7E}$이고, 여기서 R^{7E}는 C8-C18 알킬 또는 하나의 C-C 이중 결합을 갖는 C8-C18 알케닐로부터 선택된다.

[0364] 성분 (b)에 포함될 수 있고, 성분 (b)가 구성할 수 있는 본 발명에 사용하기에 적합한 또 다른 예시적인 이온화 가능한 지질은 본 문서의 104페이지에서 시작하고 본 문서에서 또한 논의된 이의 모든 특정 구현예를 포함하는 PCT 출원 WO 2012/000104 A1에서 "화학식 I의 양이온성 지질"로 개시된 이온화 가능한 지질이다.

[0365] 성분 (b)에 포함될 수 있고, 성분 (b)가 구성할 수 있는 본 발명에 사용하기에 적합한 추가의 예시적인 이온화 가능한 리피도이드는 본 문서의 4페이지의 발명의 요약에 제시된 모든 화학식의 화합물을 포함하고 나머지 출원에서 추가로 정의된 PCT 출원 WO 2010/053572 A2에서 "아미노알코올 리피도이드"로 개시되고 청구된 이온화 가능한 리피도이드이다.

[0366] 성분 (b)에 포함될 수 있고, 성분 (b)가 구성할 수 있는 본 발명에 사용하기에 적합한 추가의 예시적인 이온화 가능한 리피도이드는 이의 특정 구현예를 포함하여 PCT 출원 WO 2014/028487 A1에 화학식 I 내지 V의 아민 함유 리피도이드로 개시된 이온화 가능한 리피도이드이다.

[0367] 핵산 및 이온화 가능한 지질 또는 이온화 가능한 리피도이드 이외에 바람직한 임의 성분으로서, 본 발명의 수성 현탁액 제형 및 에어로졸 내의 나노입자는 다음 성분 (c1) 내지 (c6) 중 하나 이상을 포함할 수 있다:

[0368] (c1) 스테롤 구조를 갖는 비이온화 가능한 지질;

[0369] (c2) 포스포글리세라이드 지질;

[0370] (c3) PEG 접합 지질;

[0371] (c4) 폴리사르코신 접합 지질;

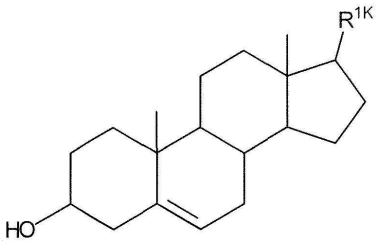
[0372] (c5) 파실화 지질; 및

[0373] (c6) 양이온성 중합체.

[0374] 성분 (c1)은 스테롤 구조를 갖는 지질이다. 이와 같이, 적합한 지질은 A-환의 3-위치에 하이드록실 그룹을 갖는 스테로이드 코어 구조를 갖는 화합물이다.

[0375] 성분 (c1)에 의해 포함될 수 있거나 성분 (c1)이 구성할 수 있는 스테롤 구조를 갖는 예시적인 비이온화 가능한 지질은 화학식 c1-1의 구조를 갖는다.

[0376] [화학식 c1-1]

[0377] 

[0378] 상기 화학식 c1-1에서,

[0379] R^{1K}는 C3-C12 알킬 그룹이다.

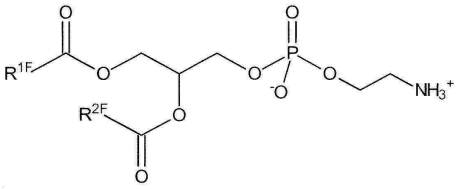
[0380] 성분 (c1)에 의해 포함될 수 있거나 성분 (c1)이 구성할 수 있는 스테롤 구조를 갖는 추가의 예시적인 비이온화 가능한 지질은 문헌(S. Patel et al., Naturally-occurring cholesterol analogues in lipid nanoparticles induce polymorphic shape and enhance intracellular delivery of mRNA, Nature Communications, 2020, 11:983)에 개시된 것들, 특히 공보의 도 2에 도시된 것들을 포함한다.

[0381] 바람직하게는, 성분 (c1)은 콜레스테롤을 포함하거나 이로 구성된다.

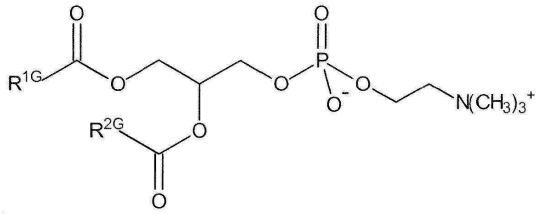
[0382] 성분 (c2)는 포스포글리세라이드이다.

[0383] 바람직하게는, 성분 (c2)는 화학식 c2-1의 화합물로부터 선택된 인지질 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염; 및 화학식 c2-2의 인지질 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하거나 이로 구성된다:

[0384] [화학식 c2-1]

[0385] 

[0386] [화학식 c2-2]

[0387] 

[0388] 상기 화학식 c2-1 및 c2-2에서,

[0389] R^{1F} 및 R^{2F}는 독립적으로 C8-C18 알킬 그룹 및 C8-C18 알케닐 그룹, 바람직하게는 C12-C18 알킬 그룹 및 C12-C18 알케닐 그룹으로부터 선택되고,

[0390] R^{1G} 및 R^{2G}는 독립적으로 C8-C18 알킬 그룹 및 C8-C18 알케닐 그룹, 바람직하게는 C12-C18 알킬 그룹 및 C12-C18 알케닐 그룹으로부터 선택된다.

[0391] 보다 바람직하게는, 성분 (c2)는 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포콜린(DPPC) 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하거나 이로 구성된다.

[0392] 화학식 c2-1의 화합물의 예시적인 염 형태는 산성 -OH 그룹과 염기에 의해 형성된 염 또는 아미노 그룹과 산에 의해 형성된 염을 포함한다. 염기로 형성된 염으로서, 알칼리 금속염, 예를 들어, 나트륨 또는 칼륨염; 알칼리 토금속염, 예를 들어, 칼슘 또는 마그네슘염 및 암모늄염이 언급될 수 있다. 산으로 형성된 예시적인 염으로서, 핵산의 산성 그룹으로 형성된 염을 언급할 수 있지만, 다른 염은 배제되지 않으며, 무기산 염, 예를

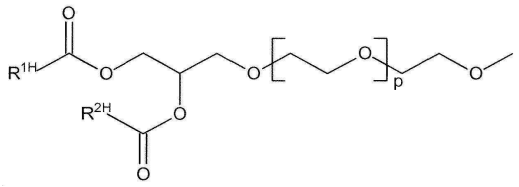
들어, 염화물, 브롬화물 또는 요오드화물, 황산염, 질산염, 인산염, 인산수소염 또는 인산이수소염, 탄산염 및 탄산수소염이 예로서 언급될 수 있다.

[0393] 화학식 c2-2의 화합물의 예시적인 염 형태는 P 원자에 부착된 산성 -OH 그룹과 염기에 의해 형성된 염 또는 4급 아미노 그룹과 음이온에 의해 형성된 염을 포함한다. 염기로 형성된 염으로서, 알칼리 금속 염, 예를 들어, 나트륨 또는 칼륨염; 알칼리 토금속 염, 예를 들어, 칼슘 또는 마그네슘염 및 암모늄염이 언급될 수 있다. 음이온으로 형성된 염의 예시적인 예로서, 핵산의 산성 그룹으로 형성된 염이 언급될 수 있지만, 다른 염은 배제되지 않고, 무기산 염, 예를 들어, 염화물, 브롬화물 또는 요오드화물, 황산염, 질산염, 인산염, 인산수소염 또는 인산이수소염, 탄산염 및 탄산수소염이 예로서 언급될 수 있다.

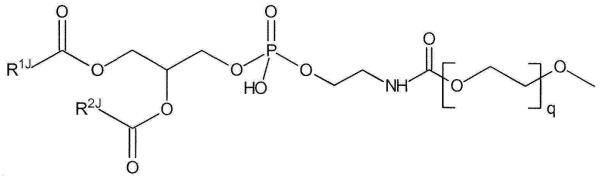
[0394] 성분 (c3)은 PEG 접합 지질, 즉 폴리에틸렌 글리콜 쇄와 공유 결합된 지질이다.

[0395] 바람직하게는, 성분 (c3)은 화학식 c3-1의 화합물 및 화학식 c3-2의 화합물로부터 선택된 PEG 접합 지질 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하거나 이로 이루어진다:

[0396] [화학식 c3-1]

[0397] 

[0398] [화학식 c3-2]

[0399] 

[0400] 상기 화학식 c3-1 및 화학식 c3-2에서,

[0401] R^{1H} 및 R^{2H}는 독립적으로 C8-C18 알킬 그룹 및 C8-C18 알케닐 그룹, 바람직하게는 C12-C18 알킬 그룹 및 C12-C18 알케닐 그룹으로부터 선택되고, p는 5 내지 200, 바람직하게는 10 내지 100, 더욱 바람직하게는 20 내지 60의 정수이고;

[0402] R^{1J} 및 R^{2J}는 독립적으로 C8-C18 알킬 그룹 및 C8-C18 알케닐 그룹, 바람직하게는 C12-C18 알킬 그룹 및 C12-C18 알케닐 그룹으로부터 선택되고, q는 5 내지 200, 바람직하게는 10 내지 100, 더욱 바람직하게는 20 내지 60의 정수이다.

[0403] 화학식 c3-2의 화합물의 예시적인 염 형태는 P 원자에 부착된 산성 -OH 그룹과 염기에 의해 형성된 염을 포함한다. 염기로 형성된 염으로서, 알칼리 금속염, 예를 들어, 나트륨 또는 칼륨염; 알칼리 토금속 염, 예를 들어, 칼슘 또는 마그네슘염 및 암모늄염이 언급될 수 있다.

[0404] 더욱 바람직하게는, 성분 (c3)은 1,2-디미리스토일-sn-글리세롤메톡시(폴리에틸렌 글리콜)(DMG-PEG)를 포함하거나 이로 구성되고, 더욱 바람직하게는 성분 (d)는 1,2-디미리스토일-sn-글리세롤메톡시(폴리에틸렌 글리콜)-2000(DMG-PEG2k)를 포함하거나 이로 구성된다.

[0405] 성분 (c4)는 폴리사르코신 접합 지질, 즉 화학식 c4-1의 중합체 모이어티와 공유 결합된 지질이다:

[0406] [화학식 c4-1]

[0407] $-[C(O)-CH_2-N(CH_3)]_r-$

[0408] 상기 화학식 c4-1에서,

[0409] r은 반복 단위의 수를 나타내며, 바람직하게는 10 내지 100이다.

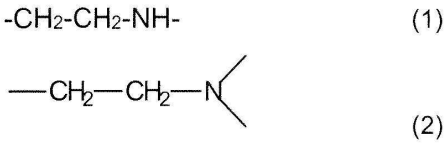
[0410] 성분 (c5)는 파실화 지질, 즉 프롤린(pro)/알라닌(ala)/세린(ser) 반복 잔기에 의해 형성된 중합체 모이어티와

공유 결합된 지질이다.

[0411] 성분 (c6)은 양이온성 중합체이다. 핵산을 포함하는 나노입자의 형성에 사용하기에 적합한 이러한 중합체는 당업계에 공지되어 있다. 예시적인 적합한 양이온성 중합체는 문헌(A.C. Silva et al., Current Drug Metabolism, 16, 2015, 3-16) 및 이에 언급된 문헌, 문헌(J.C. Kasper et al., J. Contr. Rel. 151 (2011), 246-255), WO 2014/207231 및 이에 언급된 문헌, 및 WO 2016/097377 및 이에 언급된 문헌에서 논의된다.

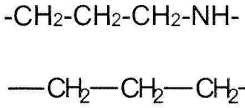
[0412] 적합한 양이온성 올리고머 또는 중합체는 특히 아미노 그룹이 함유된 복수의 단위를 포함하는 양이온성 중합체를 포함한다. 아미노 그룹은 양성자화되어 중합체의 양이온 전하를 제공할 수 있다.

[0413] 다음 (1), (2), (3) 및 (4)로부터 독립적으로 선택된 복수의 단위를 포함하는 중합체가 바람직하다:



(1)

(2)



(3)

(4)

[0414]

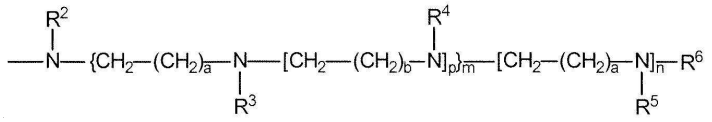
[0415] 여기서, 반복 단위 (1), (2), (3) 및/또는 (4)의 질소 원자 중 하나 이상이 양성자화되어 중합체의 양이온 전하를 제공할 수 있다.

[0416] 양이온성 중합체로서 특히 바람직한 것은 아미노 그룹이 함유되는 복수의 단위를 포함하는 다음 4가지 부류의 중합체이다.

[0417] 제1 바람직한 부류로서, 분지형 폴리(에틸렌 이민)("brPEI")을 포함하는 폴리(에틸렌 이민)("PEI")이 언급된다.

[0418] 제2 바람직한 부류의 양이온 중합체는 WO 2014/207231(출원인 ethris GmbH)에서 화학식 II의 그룹으로 개시된 바와 같이, 다음 화학식 c6-1의 복수의 그룹을 측쇄 및/또는 말단 그룹으로 포함하는 중합체이다:

[0419] [화학식 c6-1]



[0420]

[0421] 상기 화학식 c6-1에서,

[0422] 변수 a, b, p, m, n 및 R^2 내지 R^6은 복수의 이러한 그룹에서 화학식 c6-1의 각 그룹에 대해 독립적으로 다음과 같이 정의된다:

[0423] a는 1이고 b는 2 내지 4의 정수이거나, a는 2 내지 4의 정수이고 b는 1이고,

[0424] p는 1 또는 2이고,

[0425] m은 1 또는 2이고; n은 0 또는 1이며, m+n은 ≥ 2이고;

[0426] R^2 내지 R^5는 서로 독립적으로 수소; 그룹 $-CH_2-CH(OH)-R^7$, $-CH(R^7)-CH_2-OH$, $-CH_2-CH_2-(C=O)-O-R^7$, $-CH_2-CH_2-(C=O)-NH-R^7$ 또는 $-CH_2-R^7$(여기서, R^7은 C3-C18 알킬 또는 하나의 C-C 이중 결합을 갖는 C3-C18 알케닐로부터 선택된다); 아미노 그룹의 보호 그룹; 및 폴리(에틸렌 글리콜) 쇄로부터 선택되고;

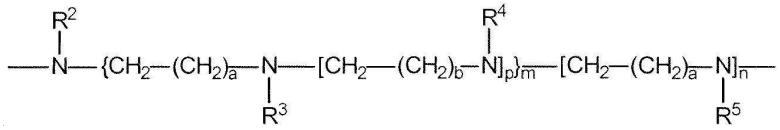
[0427] R^6은 수소; 그룹 $-CH_2-CH(OH)-R^7$, $-CH(R^7)-CH_2-OH$, $-CH_2-CH_2-(C=O)-O-R^7$, $-CH_2-CH_2-(C=O)-NH-R^7$ 또는 $-CH_2-R^7$(여기서, R^7은 C3-C18 알킬 또는 하나의 C-C 이중 결합을 갖는 C3-C18 알케닐로부터 선택된다); 아미노 그룹의 보호 그룹; $-C(NH)-NH_2$; 폴리(에틸렌 글리콜) 쇄; 및 수용체 리간드로부터 선택되고,

[0428] 화학식 c6-1에 표시된 질소 원자 중 하나 이상이 양성자화되어 화학식 c6-1의 양이온성 그룹을 제공할 수 있다.

[0429] 이들 중합체 및 상기 화학식 c6-1에 함유된 변수의 추가의 바람직한 정의와 관련하여, 화학식 II의 이의 그룹에 관한 WO 2014/207231의 각각의 개시내용은 또한 본원에 기재된 발명에 적용된다.

[0430] 제3의 바람직한 부류의 양이온성 중합체는 WO 2014/207231(출원인 ethris GmbH)에 화학식 III의 그룹으로 개시된 바와 같이 다음 화학식 c6-2의 복수의 그룹을 반복 단위로 포함하는 중합체이다:

[0431] [화학식 c6-2]

[0432] 

[0433] 상기 화학식 c6-2에서,

[0434] 변수 a, b, p, m, n 및 R^2 내지 R^6은 복수의 이러한 그룹에서 화학식 c6-2의 각 그룹에 대해 독립적으로 다음과 같이 정의된다:

[0435] a는 1이고 b는 2 내지 4의 정수이거나, a는 2 내지 4의 정수이고 b는 1이고,

[0436] p는 1 또는 2이고,

[0437] m은 1 또는 2이고; n은 0 또는 1이며, m+n은 ≥ 2이고;

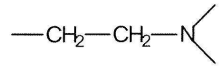
[0438] R^2 내지 R^5는 서로 독립적으로 수소; 그룹 $-CH_2-CH(OH)-R^7$, $-CH(R^7)-CH_2-OH$, $-CH_2-CH_2-(C=O)-O-R^7$, $-CH_2-CH_2-(C=O)-NH-R^7$ 또는 $-CH_2-R^7$(여기서, R^7은 C3-C18 알킬 또는 하나의 C-C 이중 결합을 갖는 C3-C18 알케닐로부터 선택된다); 아미노 그룹의 보호 그룹; $-C(NH)-NH_2$; 및 폴리(에틸렌 글리콜) 쇄로부터 선택되고;

[0439] 화학식 c6-2에 표시된 질소 원자 중 하나 이상이 양성자화되어 화학식 c6-2의 양이온성 그룹을 제공할 수 있다.

[0440] 이들 중합체 및 상기 화학식 c6-2에 함유된 변수의 추가의 바람직한 정의와 관련하여, 화학식 III의 이의 반복 단위에 관한 WO 2014/207231의 각각의 개시내용이 또한 본원에 기재된 발명에 적용된다.

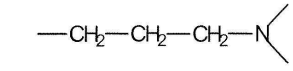
[0441] 제4의 바람직한 부류의 양이온성 중합체는 WO 2016/097377(출원인 ethris GmbH)에 개시된 바와 같이 통계적 공중합체에 의해 제공된다. 그것은 다음 화학식 (a1) 및 (a2)의 반복 단위로부터 독립적으로 선택된 복수의 반복 단위(a) 및 다음 화학식 (b1) 내지 (b4)의 반복 단위로부터 독립적으로 선택된 복수의 반복 단위 (b)를 포함하고:

[0442] $-CH_2-CH_2-NH-$ (a1)



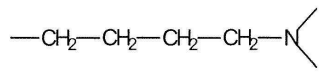
(a2)

$-CH_2-CH_2-CH_2-NH-$ (b1)



(b2)

$-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH-$ (b3)



[0443] (b4)

[0444] 반복 단위 (a)의 합 대 반복 단위 (b)의 합의 몰 비는 0.7/1.0 내지 1.0/0.7의 범위 내에 있고, 공중합체에 함유된 반복 단위 (a) 및/또는 (b)의 질소 원자 중 하나 이상이 양성자화되어 양이온성 공중합체를 제공할 수 있다.

[0445] 이 공중합체의 추가의 바람직한 정의와 관련하여, WO 2016/097377의 각 개시내용은 또한 본원에 기재된 본 발명

에 적용된다. 그 안에 언급된 바와 같이, 특히 바람직한 공중합체는 반복 단위 (a1) 및 (b1)을 포함하거나 반복 단위 (a1) 및 (b1)으로 구성되는 선형 공중합체이다.

[0446] 나노입자의 임의의 성분으로서, 핵산과 상이한 폴리음이온 성분이 또한 포함될 수 있다. 이러한 폴리이온의 예는 폴리글루탐산 및 콘드로이틴 설페이트이다. 핵산과 상이한 이러한 폴리음이온 성분이 나노입자에 사용되는 경우, 이의 양은 바람직하게는 폴리음이온 성분에 의해 제공되는 음이온 전하의 양이 핵산에 의해 제공되는 음이온 전하의 양보다 높지 않도록 제한된다.

[0447] 상기 설명된 바와 같이, 본 발명에 따른 현탁액 제형 및 에어로졸에 존재하는 지질 또는 리피도이드 나노입자는 (a) 핵산 및 (b) 이온화 가능한 지질 또는 이온화 가능한 리피도이드를 포함한다. 리피도이드가 포함되는 경우, 나노입자는 본원에서 리피도이드 나노입자로 지칭되어야 한다.

[0448] 바람직하게는, 나노입자는

[0449] 핵산(a),

[0450] 이온화 가능한 지질 또는 이온화 가능한 리피도이드(b),

[0451] 및 임의로 스테롤 구조를 갖는 비이온화 가능한 지질(c1);

[0452] 포스포글리세라이드 지질(c2);

[0453] PEG 접합 지질(c3);

[0454] 폴리사르코신 접합 지질(c4);

[0455] 파실화 지질(c5); 및

[0456] 양이온성 중합체(c6) 중 하나 이상을 포함하고, 더욱 바람직하게는 이들로 구성된다.

[0457] 본 발명의 맥락에서 사용하기에 또한 적합한, 상기 열거된 성분으로부터 형성된 나노입자를 포함하는 예시적인 현탁액 제형은 문헌(S. Patel et al., Naturally-occurring cholesterol analogues in lipid nanoparticles induce polymorphic shape and enhance intracellular delivery of mRNA, Nature Communications, 2020, 11:983)에 개시된 것들을 포함한다.

[0458] 나노입자의 성분, 특히 성분 (a) 및 (b), 및 임의로 (c1) 내지 (c6) 중 하나 이상이 전형적으로 나노입자 내에 혼합물로서 함유되는 것으로 이해될 것이다.

[0459] 이러한 성분의 양과 관련하여, 나노입자는

[0460] 핵산, 및

[0461] 30 내지 65mol%의 이온화 가능한 지질 또는 이온화 가능한 리피도이드(b),

[0462] 및 다음 성분:

[0463] 10 내지 50mol%의 스테롤 구조를 갖는 지질(c1),

[0464] 4 내지 50mol%의 포스포글리세라이드 지질(c2),

[0465] PEG 접합 지질(c3), 폴리사르코신 접합 지질(c4) 및 파실화 지질(c5) 중 하나 또는 이들의 임의의 조합의 0.5 내지 10mol%,

[0466] 0.5 내지 10mol%의 양이온성 중합체(c6) 중 하나 이상을 (b) 및 (c1) 내지 (c6)의 합이 100mol%에 달하도록 포함하고, 더욱 바람직하게는 이들로 이루어지는 것이 추가로 바람직하다. 이해되는 바와 같이, 성분 (c1) 내지 (c6)에 대한 몰 백분율은 이들 성분이 모두 나노입자 내에 존재할 필요는 없다는 단서 조항과 함께 표시된다. 따라서, 예를 들어, 양이온성 중합체는 본 바람직한 구현예의 맥락에서 존재하거나 부재할 수 있지만, 존재하는 경우, 0.5 내지 10mol%의 양으로 사용된다. 상기 추가로 나타낸 바와 같이, 본 바람직한 구현예의 맥락에서, 성분(들) (c1), (c2), (c3), (c4), (c5) 및/또는 (c6)의 양은 (b) 및 (c1) 내지 (c6)의 합이 100mol%에 달하도록 한다.

[0467] 나노입자는

[0468] 핵산(a),

[0469] 이온화 가능한 지질 또는 이온화 가능한 리피도이드(b),

[0470] 스테롤 구조를 갖는 비이온화 가능한 지질(c1),

[0471] 포스포글리세라이드 지질(c2), 및

[0472] PEG 접합 지질(c3)을 포함하거나, 이로 구성되는 것이 더욱 바람직하다.

[0473] 이러한 성분의 양과 관련하여, 나노입자는

[0474] 핵산(a),

[0475] 30 내지 65mol%의 이온화 가능한 지질 또는 이온화 가능한 리피도이드(b),

[0476] 10 내지 50mol%의 스테롤 구조를 갖는 지질(c1),

[0477] 4 내지 50mol%의 포스포글리세라이드 지질(c2), 및

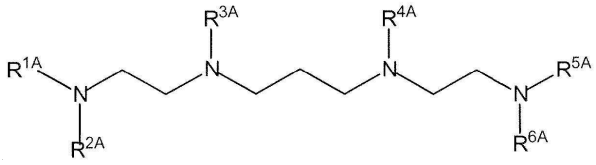
[0478] 0.5 내지 10mol%의 PEG 접합 지질(c3)을 (b)와 (c1) 내지 (c3)의 합이 100mol%에 달하도록 포함하고, 더욱 바람직하게는 이로 구성되는 것이 더욱 바람직하다.

[0479] 바람직한 핵산과 관련되고 핵산 이외의 지질 조성물의 바람직한 성분과 관련된 상기 정보에 따라, 본 발명에 따른 현탁액 제형 및 본 발명에 따른 에어로졸에 함유되는 지질 나노입자는 각각 바람직하게는

[0480] (a) 핵산으로서의 mRNA;

[0481] (b) 화학식 b-1b의 이온화 가능한 리피도이드 또는 화학식 b-1b에 표시된 질소 원자 중 하나 이상이 양성자화되어 양이온성 지질을 제공하는 이의 양성자화된 형태:

[0482] 화학식 b-1b

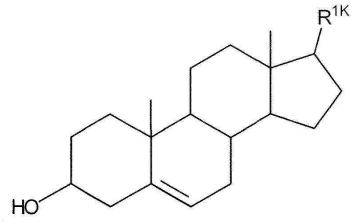
[0483] 

[0484] 상기 화학식 b-1b에서,

[0485] R^{1A} 내지 R^{6A}는 독립적으로 수소 및 $-CH_2-CH(OH)-R^{7A}$로부터 선택되고, 여기서 R^{7A}는 C8-C18 알킬 및 하나의 C-C 이중 결합을 갖는 C8-C18 알케닐로부터 선택되고, 단, R^{1A} 내지 R^{6A} 중 적어도 두 개의 잔기는 $-CH_2-CH(OH)-R^{7A}$이고, 더욱 바람직하게는 R^{1A} 내지 R^{6A} 중 적어도 네 개의 잔기는 그룹 $-CH_2-CH(OH)-R^{7A}$이고, 여기서 R^{7A}는 C8-C18 알킬 및 하나의 C-C 이중 결합을 갖는 C8-C18 알케닐로부터 선택되고;

[0486] (c1) 화학식 c1-1의 스테롤 구조를 갖는 비이온화 가능한 지질:

[0487] [화학식 c1-1]

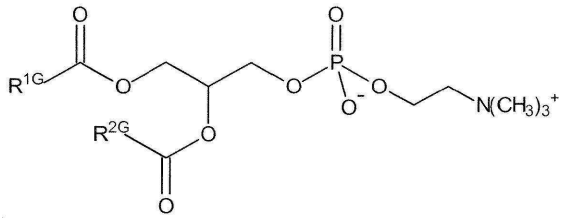
[0488] 

[0489] 상기 화학식 c1-1에서,

[0490] R^{1K}는 C3-C12 알킬 그룹이고;

[0491] (c2) 화학식 c2-2의 포스포글리세라이드 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염:

[0492] [화학식 c2-2]



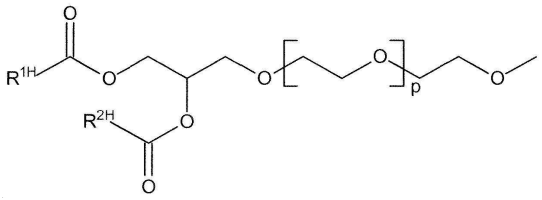
[0493]

[0494] 상기 화학식 c2-2에서,

[0495] R^{1G} 및 R^{2G}는 독립적으로 C8-C18 알킬 그룹 및 C8-C18 알케닐 그룹, 바람직하게는 C12-C18 알킬 그룹 및 C12-C18 알케닐 그룹으로부터 선택되고;

[0496] (c3) 화학식 c3-1의 PEG 접합 지질을 포함한다:

[0497] [화학식 c3-1]



[0498]

[0499] 상기 화학식 c3-1에서,

[0500] R^{1H} 및 R^{2H}는 독립적으로 C8-C18 알킬 그룹 및 C8-C18 알케닐 그룹, 바람직하게는 C12-C18 알킬 그룹 및 C12-C18 알케닐 그룹으로부터 선택되고, p는 5 내지 200, 바람직하게는 10 내지 100, 더욱 바람직하게는 20 내지 60의 정수이다.

[0501] 본 발명에 따른 현탁액 제형 및 에어로졸에 함유된 나노입자에서, 나노입자의 조성은 바람직하게는 핵산 이외의 성분의 중량의 합 대 핵산의 중량의 나노입자 중의 중량 비율이 30:1 내지 1:1, 더욱 바람직하게는 20:1 내지 2:1, 가장 바람직하게는 15:1 내지 3:1의 범위 내이도록 한다.

[0502] N/P 비, 즉 이온화 가능한 지질 또는 이온화 가능한 리피도이드에 의해 제공되는 아민 질소 원자의 수 대 나노입자의 핵산에 의해 제공되는 포스페이트 그룹의 수의 비율은 바람직하게는 0.5 내지 20의 범위 내, 더욱 바람직하게는 0.5 내지 10의 범위 내이다.

[0503] 본 발명에 따른 현탁액 제형 및 에어로졸에 함유된 지질 또는 리피도이드 나노입자는 바람직하게는 10 내지 500nm 범위, 더욱 바람직하게는 10 내지 250nm 범위, 더욱 더 바람직하게는 20 내지 200nm 범위의 Z-평균 직경을 갖는다. 표시된 입자 직경은 동적 광 산란(DLS)에 의해 결정된 유체역학적 직경이다. 측정은 일반적으로 25℃에서 수행된다.

[0504] 본 발명에 따른 현탁액 제형 및 에어로졸에 함유된 나노입자의 다분산 지수는 바람직하게는 0.05 내지 0.4 범위 내, 더욱 바람직하게는 0.05 내지 0.2 범위 내이다. 다분산 지수는 동적 광 산란(DLS)에 의해 결정될 수 있다. 측정은 일반적으로 25℃에서 수행된다.

[0505] 상기 정의된 바와 같은 상이한 지질 또는 리피도이드 나노입자, 즉 성분이 다른 입자를 함유하는 현탁액 제형 또는 에어로졸을 제공하는 것이 가능하다. 그러나, 바람직하게는, 본 발명에 따른 현탁액 제형 또는 본 발명에 따른 에어로졸에 함유된 나노입자는 동일한 성분으로 구성된다.

[0506] 지질 나노입자는, 예를 들어, pH 4.5의 시트레이트 완충액과 같은 완충액을 함유하고 임의로 염화나트륨과 같은 염을 함유하는 수성 용매 중에서 핵산을 함유하는 용액 및, 예를 들어, 에탄올 중 이온화 가능한 지질 또는 이온화 가능한 리피도이드를 함유하는 용액을 혼합함으로써 편리하게 제조될 수 있다. 추가의 임의 성분은, 예를 들어, 두 용액 중 하나에 이들을 첨가함으로써 통합될 수 있다. 이러한 방식으로 생성된 지질 나노입자는 목적하는 액체 조성물 중 지질 나노입자를 수득하기 위해 크로마토그래피 및/또는 투석 및/또는 접선 유동 여과에 의해 추가로 처리될 수 있다. 이러한 다운스트림 처리 단계 전 또는 도중에, 추가의 부형제, 예를 들어, 동결

보호제 및 기타 부형제를 첨가하여 목적하는 약제학적 조성물을 수득할 수 있다. 나노입자가 접선 유동 여과에 적용되는 경우, 안정성상의 이유로 본원에서 비히클 용액의 성분으로 정의된 바와 같은 하나의 폴리(프로필렌 옥사이드) 블록과 2개의 폴리(에틸렌 옥사이드) 블록을 함유하는 트리블록 공중합체를 포함하는 나노입자의 현탁액 상에서 여과를 수행하는 것이 바람직하다.

[0507] 그 정도로, 본 발명은 수성 비히클 용액에 현탁된 지질 또는 리피도이드 나노입자를 포함하는 에어로졸 형성을 위한 수성 현탁액 제형의 제조 방법을 추가로 제공하며, 상기 방법은 핵산(a)를 함유하는 용액과 이온화 가능한 지질 또는 이온화 가능한 리피도이드(b)를 함유하는 용액을 혼합하여 지질 또는 리피도이드 나노입자를 포함하는 현탁액을 형성하는 단계를 포함한다. 추가 성분, 예를 들어, 성분 (c1) 내지 (c6) 중 하나 이상은, 예를 들어, 이온화 가능한 지질 또는 이온화 가능한 리피도이드를 함유하는 용액에 첨가함으로써 나노입자에 편리하게 혼입될 수 있다.

[0508] 바람직한 구현예로서, 본 발명은 수성 비히클 용액에 현탁된 지질 또는 리피도이드 나노입자를 포함하는 에어로졸 형성을 위한 수성 현탁액 제형의 제조 방법을 제공하며, 상기 방법은

[0509] 핵산(a)를 함유하는 용액과 이온화 가능한 지질 또는 이온화 가능한 리피도이드(b)를 함유하는 용액을 혼합하여 지질 또는 리피도이드 나노입자를 포함하는 현탁액을 형성하는 단계;

[0510] 본원에 정의된 바와 같은 하나의 폴리(프로필렌 옥사이드) 블록과 2개의 폴리(에틸렌 옥사이드) 블록을 함유하는 트리블록 공중합체를 현탁액에 첨가하는 단계; 및

[0511] 현탁액을 접선 유동 여과에 적용하여 본 발명에 따른 수성 현탁액 제형을 산출하는 단계를 포함한다.

[0512] 에어로졸 형성을 위한 수성 현탁액 제형은 상기 논의된 지질 또는 리피도이드 나노입자를 수성 비히클 용액과 함께 포함한다. 현탁액 제형에 대한 참조에 의해 표시된 바와 같이, 나노입자는 비히클 용액에 현탁되어 있다.

[0513] 비히클 용액은 수용액, 즉 용매(들)의 총 용적과 관련하여 주 용매가 물인 용액, 바람직하게는 (25℃의 온도에서) 비히클 용액에 함유된 용매(들)의 총 용적 중 물의 용적 백분율로 표시된 70% 이상의 물, 더욱 바람직하게는 90% 이상의 물을 용매로서 함유하는 용액이다. 가장 바람직하게는, 물은 비히클 용액에서 유일한 용매이다. 따라서, 비히클 용액은 실온(예: 25℃)에서 액체이다.

[0514] 조성물 중 비히클 용액 내 나노입자의 용적당 중량비는 바람직하게는 0.5g/L 내지 100g/L, 바람직하게는 10g/L 내지 100g/L, 더욱 바람직하게는 10g/L 내지 50g/L, 가장 바람직하게는 10g/L 내지 75g/L 범위 내이다.

[0515] 현탁액 제형에서 지질 또는 리피도이드 나노입자에 의해 제공된 핵산의 농도는 현탁액 제형의 총 용적에 기초하여 바람직하게는 0.01 내지 10mg/ml, 더욱 바람직하게는 0.02 내지 5mg/ml, 가장 바람직하게는 0.1 내지 5mg/ml 범위이다.

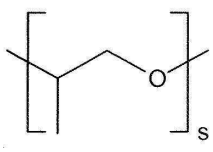
[0516] 상기 주시된 바와 같이, 본 발명에 따른 현탁액 제형 및 에어로졸에 함유된 지질 또는 리피도이드 나노입자는 바람직하게는 10 내지 500nm 범위, 더욱 바람직하게는 10 내지 250nm 범위, 더욱 더 바람직하게는 20 내지 200nm 범위의 Z-평균 직경을 갖는다. 표시된 입자 직경은 동적 광 산란(DLS)에 의해 결정된 입자의 유체역학적 직경이다. 측정은 일반적으로 25℃에서 수행된다.

[0517] 본 발명에 따른 현탁액 제형 및 에어로졸에 함유된 나노입자의 다분산 지수는 바람직하게는 0.05 내지 0.4 범위, 더욱 바람직하게는 0.05 내지 0.2 범위이다. 다분산 지수는 동적 광 산란(DLS)에 의해 결정될 수 있다. 측정은 일반적으로 25℃에서 수행된다.

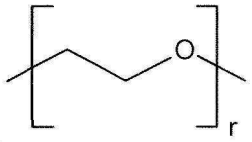
[0518] 비히클 용액은 하나의 폴리(프로필렌 옥사이드) 블록과 두 개의 폴리(에틸렌 옥사이드) 블록을 함유하는 트리블록 공중합체를 포함한다.

[0519] 바람직하게는, 트리블록 공중합체는 화학식 p-1의 폴리(프로필렌 옥사이드) 블록 B 1개와 화학식 p-2의 폴리(에틸렌 옥사이드) 블록 A 2개를 함유하는 A-B-A 트리블록 공중합체이다:

[0520] [화학식 p-1]

[0521] 

[0522] [화학식 p-2]

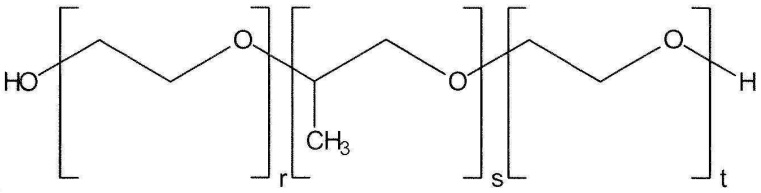
[0523] 

[0524] 상기 화학식 p-1 및 p-2에서,

[0525] s는 15 내지 67, 바람직하게는 20 내지 40의 정수이고,

[0526] r은 각 블록에 대해 독립적으로 2 내지 130, 바람직하게는 50 내지 100, 더욱 바람직하게는 60 내지 90의 정수이다.

[0527] 더욱 바람직하게는, 트리블록 공중합체는 다음 구조를 갖는다:

[0528] 

[0529] 상기 식에서,

[0530] r 및 t는 서로 독립적으로 2 내지 130, 바람직하게는 50 내지 100, 더욱 바람직하게는 60 내지 90의 정수이고,

[0531] s는 15 내지 67, 바람직하게는 20 내지 40의 정수이다.

[0532] 가장 바람직하게는, 폴록사머 P188이 트리블록 공중합체로서 사용된다.

[0533] 비히클 용액은 일반적으로 그 안에 용해된 트리블록 공중합체를 포함한다. 그러나, 숙련된 독자에 의해 인식되는 바와 같이, 이는 특정량의 공중합체 분자가 조성물에 함유된 지질 또는 리피도이드 나노입자에 흡착될 가능성을 배제하지 않는다.

[0534] 바람직하게는, 에어로졸 형성을 위한 조성물은 트리블록 공중합체를 조성물의 총 용적을 기준으로 하여 0.05 내지 5% w/v(즉, 100mL당 그램), 바람직하게는 0.1 내지 2%의 농도로 포함한다.

[0535] 트리블록 공중합체 이외에, 다른 부형제가 비히클 용액에 존재할 수 있다. 바람직하게는, 비히클 용액은 수크로스 및 NaCl 중 적어도 하나, 더욱 바람직하게는 수크로스 및 NaCl을 추가로 포함한다.

[0536] 본 발명에 따른 현탁액 제형은, 예를 들어, 트리블록 공중합체를 비히클 용액 및 지질 또는 리피도이드 나노입자를 포함하는 현탁액에 첨가하는 단계를 포함하는 방법, 또는 트리블록 공중합체를 포함하는 비히클 용액에 지질 또는 리피도이드 나노입자를 첨가하는 단계를 포함하는 방법에 의해 편리하게 제조될 수 있다.

[0537] 본 발명에 따른 에어로졸 형성을 위한 수성 현탁액 제형은 본 발명에 따른 에어로졸을 제공하기 위해 분무될 수 있다. 유리하게는, 수성 현탁액 제형에 함유된 나노입자 및 핵산에 대한 분무 단계의 부정적인 영향은 이러한 방식으로 최소화되거나 심지어 피할 수 있다. 또한, 분무는 주어진 투여량의 mRNA에 대해, 예를 들어, 60분 이하, 바람직하게는 30분 이하의 합리적인 시간 내에 효율적인 방식으로 달성될 수 있다.

[0538] 따라서, 본 발명에 따른 에어로졸 형성을 위한 수성 현탁액 제형의 분무에 의해 수득 가능한 에어로졸은 기체상에 분산된 에어로졸 소적을 포함한다. 에어로졸 소적은 이의 임의의 바람직한 구현예를 포함하여 상기 논의된 바와 같은 지질 또는 리피도이드 나노입자 및 나노입자를 위한 수성 비히클 용액을 포함한다. 수성 비히클 용액은 본 발명의 수성 현탁액 제형의 비히클 용액에 의해 제공되고 상기 이 맥락에서 논의된 하나의 폴리(프로필렌 옥사이드) 블록과 2개의 폴리(에틸렌 옥사이드) 블록을 함유하는 트리블록 공중합체를 포함한다.

[0539] 상기 설명된 바와 같이, 트리블록 공중합체의 존재가 분무 전에 상기 논의된 수성 현탁액 제형의 나노입자에 의해 나타난 유리한 나노입자 특성이 유지될 수 있도록 하는 것으로 밝혀졌다.

[0540] 따라서, 본 발명에 따른 에어로졸의 에어로졸 소적에 함유된 지질 또는 리피도이드 나노입자는 바람직하게는 10 내지 500nm의 범위, 더욱 바람직하게는 10 내지 250nm의 범위, 더욱 더 바람직하게는 20 내지 200nm의 범위의

Z-평균 직경을 갖는다. 표시된 입자 직경은 동적 광 산란(DLS)에 의해 결정된 입자의 유체역학적 직경이다. 측정은 일반적으로 25℃에서 수행된다.

[0541] 본 발명에 따른 에어로졸의 에어로졸 소적에 함유된 지질 또는 리피도이드 나노입자의 다분산 지수는 바람직하게는 0.05 내지 0.4의 범위, 더욱 바람직하게는 0.05 내지 0.2의 범위이다. 다분산 지수는 동적 광 산란(DLS)에 의해 결정될 수 있다. 측정은 일반적으로 25℃에서 수행된다.

[0542] 현탁액 제형으로부터 유래되는 에어로졸의 에어로졸 소적 내의 비히클 용액은 수용액, 즉 용매(들)의 총 용적과 관련하여 주 용매가 물인 용액이다. 바람직하게는, 비히클 용액은 용매로서 (25℃ 온도에서) 비히클 용액에 함유된 용매(들)의 총 용적 중 물의 용적 백분율로 표시된 70%의 물, 더욱 바람직하게는 90%의 물을 함유한다. 가장 바람직하게는, 물은 비히클 용액에서 유일한 용매이다.

[0543] 상기 주시된 바와 같이, 본 발명에 따른 에어로졸은 기체 상에 분산된, 전형적으로 공기 중에 분산된 소적을 포함한다. 소적은 본 발명에 따른 에어로졸 형성을 위한 조성물의 분무를 통해 수득 가능하다. 이들은 상기 상세히 기재된 조성물의 비히클 용액으로부터 유래된 액체 상, 및 지질 또는 리피도이드 나노입자를 포함한다. 전형적으로, 지질 또는 리피도이드 나노입자는 비히클 용액에 분산된다. 또한, 에어로졸 소적은 전형적으로 단일 소적으로 분산된 복수의 지질 또는 리피도이드 나노입자를 포함한다.

[0544] 상기 추가로 설명된 바와 같이, 본 발명에 따른 에어로졸은 대상체에게, 특히 대상체의 호흡기에 또는 호흡기를 통해, 바람직하게는 폐 투여 또는 비강 투여를 통해 투여될 수 있다. 전형적으로, 투여는 대상체에 의한 에어로졸의 흡입을 통해 달성된다.

[0545] 에어로졸 소적은 밀도와 모양을 고려하는 공기역학적 직경을 통해 특성화될 수 있다. 공기역학적 직경은 밀도가 $1g/cm^3$인 구형 입자 또는 소적의 직경으로 정의되며, 이는 고려 중인 소적과 동일한 공기 중 강하 속도(sinking speed in air)를 갖는다(Luftbeschaffenheit - Festlegung von Partikelgroßenverteilungen fur die gesundheitsbezogene Schwebstaubprobenahme, (1995); Vincent JH. Aerosol Sampling - Science, Standards, Instrumentation and Applications. Chichester, England: John Wiley & Sons, Ltd.; 2007). 공기역학적 직경의 크기 분포는 종종 질량 중앙값 공기역학적 직경(Mass Median Aerodynamic Diameter; MMAD), 즉 중앙값 질량 관련 공기역학적 직경을 통해 매개변수화된다. 따라서, MMAD는 이 값보다 작거나 큰 입자가 각각 전체 질량의 50%에 기여하는 직경이고, 따라서 입자의 평균 크기의 척도이다. MMAD는 캐스케이드 임팩터(cascade impactor) 또는 차세대 임팩터(next generation impactor)로 측정될 수 있다(Preparations for inhalation: Aerodynamic assessment of fine particles; European Pharmacopoeia 90; Volume I: EDQM Council of Europe; 2019). 에어로졸 소적의 질량 중앙값 공기역학적 직경(MMAD)은 에어로졸 입자가 호흡기 내 어디에 침착할 지에 영향을 미친다. MMAD가 10μm 이상인 입자는 관성(inertia)으로 인해 이미 목구멍에 침착되는(영향을 미치는) 경향이 있지만, 0.1μm 내지 1.0μm 사이의 입자는 너무 가벼운 경향이 있고, 브라운 운동(Brownian motion)으로 인한 확산 과정(diffusion process)으로 인해 다시 배출될 수 있다.

[0546] 본 발명에 따른 에어로졸의 에어로졸 소적은 바람직하게는 캐스케이드 임팩터 또는 차세대 임팩터를 사용하는 측정에 의해 결정된 2 내지 10μm, 더욱 바람직하게는 3 내지 8μm의 MMAD를 갖는다.

[0547] 비히클 용액에 함유된 입자를 포함하는 현탁액 제형으로부터 에어로졸을 형성하기 위한 분무 장치(네뷸라이저)는 당업계에 공지되어 있으며 상업적으로 이용 가능하다. 네블라이저는 액체를 기체 상에 분산된 미세한 소적의 미스트, 즉 흡입에 적합한 에어로졸로 변환하는 기기이다. 본 발명의 맥락에서 사용될 수 있는 에어로졸 생성을 위한 적합한 네뷸라이저의 예는 다음과 같다:

[0548] - 제트 네뷸라이저, 예를 들어, Pari Boy (Pari);

[0549] - 진동 메시 네뷸라이저, 예를 들어, Pari eFlow(Pari), Aeroneb(Aerogen), Fox(Vectura) 또는 Innospire GO(Philips);

[0550] - 수동적 메시 네뷸라이저, 예를 들어, MicroAir U22(Omron) 또는 Smarty(Flaem);

[0551] - 초음파 네뷸라이저, 예를 들어, My-520A(Fish) 또는 Aerosonic Combineb (Flores)

[0552] - 연무 흡입기, 예를 들어, Trachospray (MedSpray), Pulmospray (Medspray) 또는 Respimat(Boehriner Ingelheim).

[0553] 본 발명의 맥락에서, 에어로졸 형성을 위한 현탁액 제형은 바람직하게는 진동 메쉬 네뷸라이저 또는 연무 흡입

기, 더욱 바람직하게는 연무 흡입기를 사용하여 분무된다.

[0554] 추가의 양태에서, 본 발명은 상기 논의된 바와 같이 본 발명에 따른 에어로졸의 제조 방법을 제공하며, 상기 방법은 본 발명에 따른 에어로졸 형성을 위한 현탁액 제형을 분무하는 단계를 포함한다.

[0555] 본 발명에 따른 현탁액 제형은 현탁액 제형 및 에어로졸 소적에 함유된 나노입자의 품질 손실 없이(예를 들어, 입자의 응집에 의해) 장시간 동안 효과적이고 연속적으로 분무될 수 있음이 밝혀졌다. 따라서, 나노입자에 함유된 활성제로서 핵산의 유효량은 60분 이하, 바람직하게는 30분 이하와 같은 합리적인 시간 내에 에어로졸 형태로 제공 및 투여될 수 있다.

[0556] 본 발명의 맥락에서 사용되는 지질 또는 리피도이드 나노입자에 존재하는 핵산, 예를 들어, RNA, 바람직하게는 mRNA는 의료 환경 및 질환 및 장애의 치료, 특히 핵산 기반 요법에서 특히 유용하다. 따라서, 본 발명에 따른 에어로졸 형성을 위한 현탁액 제형 및 에어로졸은 일반적으로 의약 또는 약제학적 조성물로 제공되거나 사용된다.

[0557] 특히, 본 발명에 따른 에어로졸 형성을 위한 현탁액 제형 및 에어로졸은 대상체에게 투여하기에 적합하다. 이러한 방식으로, 현탁액 제형 및 에어로졸의 나노입자에 함유된 핵산, 예를 들어, RNA, 바람직하게는 mRNA도 대상체에게 투여될 수 있다. 본 조성물의 바람직한 투여 경로는 본 발명에 따른 현탁액 제형의 분무에 의해 제공되는 에어로졸의 호흡기에 또는 호흡기를 통한, 특히 폐 투여 또는 비강 투여를 통한 투여이다. 전형적으로, 에어로졸은 투여되는 대상체에 의해 흡입된다.

[0558] 대상체에 대한 투여를 통해, 지질 또는 리피도이드 나노입자 입자에 함유된 핵산은 호흡기 내 또는 호흡기를 통해 표적 세포로 전달될 수 있다. 용어 "표적 세포로 전달된"은 바람직하게는 핵산의 세포로의 전달을 의미한다.

[0559] 따라서, 본 발명은 또한 의약으로 사용하기 위한 수성 현탁액 제형을 제공하며, 여기서 현탁액 제형은 분무되고, 분무에 의해 제공되는 에어로졸은 대상체에게 투여되어야 한다. 마찬가지로, 본 발명은 의약으로 사용하기 위한 본 발명에 따른 에어로졸을 제공한다.

[0560] 수성 현탁액 제형 또는 에어로졸은 적절한 투여량으로 대상체에게 투여될 수 있다. 용량 섭생은 주치의와 임상적 요인에 의해 결정될 것이다. 의학계에서 익히 공지된 바와 같이, 임의의 한 대상체에 대한 용량은 대상체의 크기, 체표면적, 연령, 투여될 특정 화합물, 성별, 투여 시간 및 경로, 일반적인 건강 상태, 및 동시에 투여되는 다른 약물을 포함한 많은 요인에 따라 달라진다. 치료적 활성 물질의 전형적인 투여량은 1ng 내지 수 g의 범위 내일 수 있다. 발현 또는 발현의 억제를 위한 핵산의 용량은 이 범위에 상응해야 하지만; 특히 상기 언급된 요인을 고려할 때 이 예시적인 범위보다 낮거나 높은 투여량이 예상된다. 일반적으로, 약제학적 조성물의 규칙적인 투여로서의 섭생은 하루에 체중 킬로그램당 0.01μg 내지 10mg 단위의 범위 내여야 한다. 진행은 주기적인 평가로 모니터링될 수 있다. 용량은 가변적이지만, 본 발명의 조성물의 성분으로서 핵산을 투여하기 위한 바람직한 용량은 핵산 분자의 약 10^{10} 내지 10^{19} 카피이다.

[0561] 또한, 본 발명에 따른 수성 현탁액 제형의 분무 및 대상체의 호흡기에 또는 호흡기를 통한, 바람직하게는 폐 투여 또는 비강 투여를 통한 분무에 의해 제공된 에어로졸의 투여를 포함하는 치료 방법이 본 발명에 의해 이용 가능해 진다. 따라서, 상기 현탁액 제형에 함유된 핵산은 예방 또는 치료 효과를 유발할 수 있다. 특히, 용어 "대상체"는 동물과 인간을 포함한다. 마찬가지로, 본 발명은 대상체의 호흡기에 또는 호흡기를 통해, 바람직하게는 폐 투여 또는 비강 투여를 통해 대상체에게 본 발명에 따른 에어로졸의 투여를 포함하는 치료 방법을 제공한다. 상기 주시된 바와 같이, 에어로졸은 전형적으로 투여되는 대상체에 의해 흡입된다.

[0562] 본 발명의 수성 현탁액 제형 또는 에어로졸을 대상체에게 투여함으로써, 질환 또는 장애가 치료 또는 예방될 수 있다. 용어 "질환"은 본 발명의 수성 현탁액 제형 또는 에어로졸을 사용하여 치료, 예방 또는 백신 접종될 수 있는 임의의 구상가능한 병리학적 상태를 지칭한다. 바람직하게는, 치료 또는 예방될 질환은 폐 질환(pulmonary disease)이다. 상기 질환은, 예를 들어, 유전성, 후천성, 감염성 또는 비감염성, 연령 관련, 심혈관, 대사, 장, 신생물(특히 암) 또는 유전적일 수 있다. 질환은 또한, 예를 들어, 유기체의 유전적 장치, 화학물질 또는 방사선에의 노출과 같은 거동적, 사회적 또는 환경적 요인에 기초할 수 있는 유기체 내의 생리적 과정, 분자 과정, 생화학 반응의 불규칙성을 기반으로 할 수 있다.

[0563] 따라서, 본 발명은 핵산 기반 요법을 통한 질환 또는 장애의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 본 발명의 수성 현탁액 제형을 추가로 제공하며, 여기서 치료 또는 예방은 현탁액 제형의 분무 및 호흡기에 또는 호흡기를

통한, 바람직하게는 폐 투여 또는 비강 투여를 통한 분무에 의해 제공된 에어로졸의 투여를 포함한다. 마찬가지로, 본 발명은 핵산 기반 요법을 통해 질환 또는 장애의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 본 발명의 에어로졸을 제공하며, 여기서 치료 또는 예방은 호흡기에 또는 호흡기를 통한, 바람직하게는 폐 투여 또는 비강 투여를 통한 에어로졸의 투여를 포함한다. 상기 주시된 바와 같이, 에어로졸은 전형적으로 투여되는 대상체에 의해 흡입된다.

[0564] 바람직한 구현예에서, 본 발명은 폐 질환의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 본 발명의 수성 현탁액 제형을 추가로 제공하며, 여기서 치료 또는 예방은 현탁액 제형의 분무 및 호흡기에 또는 호흡기를 통한, 바람직하게는 폐 투여 또는 비강 투여를 통한 분무에 의해 제공된 에어로졸의 투여를 포함한다. 마찬가지로, 본 발명은 폐 질환의 치료 또는 예방에 사용하기 위한, 이의 바람직한 구현예를 포함하여 상기 개시된 바와 같은 에어로졸을 제공하며, 여기서 치료 또는 예방은 호흡기에 또는 호흡기를 통한, 바람직하게는 폐 투여 또는 비강 투여를 통한 에어로졸의 투여를 포함한다. 상기 주시된 바와 같이, 에어로졸은 전형적으로 투여되는 대상체에 의해 흡입된다.

[0565] 본원에 사용된 용어 "치료" 또는 "치료하는"은 일반적으로 인간 또는 동물의 신체에서 목적하는 약리학적 및/또는 생리적 효과를 수득함을 의미한다. 따라서, 본 발명의 치료는 특정 질환의 (급성) 상태의 치료와 관련될 수 있지만, 질환 또는 이의 증상을 완전히 또는 부분적으로 예방하는 측면에서의 예방 치료와 관련될 수도 있다. 바람직하게는, 용어 "치료"는 질환 및/또는 질환으로 인한 부작용 및/또는 증상을 부분적으로 또는 완전히 치료하는 측면에서 치료적인 것으로 이해되어야 한다. 이 점에서, "급성"은 대상체가 질환의 증상을 보이는 것을 의미한다. 즉, 치료될 대상체는 실제로 치료가 필요한 상태이며, 본 발명의 맥락에서 용어 "급성 치료"는 질환의 발병 또는 질환의 발발(breakout) 후 실제로 질환을 치료하기 위해 취해진 조치와 관련이 있다. 치료는 또한 예방적 또는 예방적 치료, 즉 감염 및/또는 질환의 발병을 예방하기 위해 질환 예방을 위해 취해진 조치일 수도 있다. 치료적 진행은 주기적인 평가로 모니터링될 수 있다.

[0566] 일반적으로, 핵산은 본 발명에 따른 현탁액 제형 및 에어로졸에 유효량으로 포함된다. 용어 "유효량"은 약제학적 조성물이 투여될 대상체에서 검출 가능한 치료 반응을 유도하기에 충분한 양을 지칭한다. 상기에 따라, 핵산의 함량은 상기 기재된 바와 같은 치료에 유용한 한 제한되지 않는다. 상기 주시된 바와 같이, 핵산을 포함하는 입자가 함유된 에어로졸 형성을 위한 조성물 또는 에어로졸은 바람직하게는 입자에 함유된 핵산을, 조성물의 총 용적을 기준으로 하여, 0.01 내지 50mg/ml, 더욱 바람직하게는 0.02 내지 30mg/ml, 가장 바람직하게는 0.05 내지 10mg/ml의 농도로 제공하기 위한 양으로 입자를 포함한다.

[0567] 예시적인 대상체는 포유동물, 예를 들어, 개, 고양이, 돼지, 소, 양, 말, 설치류, 예를 들어, 래트, 마우스 및 기니피그 또는 영장류, 예를 들어, 고릴라, 침팬지 및 인간을 포함한다. 가장 바람직한 구현예에서, 대상체는 인간이다.

[0568] 상기 주시된 바와 같이, 본 발명에 따른 현탁액 제형 및 에어로졸은 핵산 기반 요법을 통한 치료 또는 예방에 사용하기 위한 것일 수 있다. 예를 들어, 핵산 기반 요법은 상기 **표 A**에 인용된 바와 같은 질환 또는 장애의 치료 또는 예방을 위한 것이다.

[0569] 본 발명의 현탁액 제형 및 에어로졸은 특히 폐 질환의 치료 또는 예방에 사용하기에 적합하다. 예시적인 질환으로서, 천식, 계면활성제 대사 기능 장애, 계면활성제 단백질 B(SPB) 결핍, ATP 결합 카세트 서브-패밀리 A 구성원 3(ABCA3) 결핍, 낭포성 섬유증, 알파-1 항트립신(A1AT) 결핍; 폐암, 계면활성제 단백질 C(SPC) 결핍, 폐포단백증(alveolar proteinosis), 유육종증(sarcoidosis), 급성 및 만성 기관지염(acute and chronic bronchitis), 폐기종(emphysema), 맥레오드 증후군(McLeod-Syndrom), 만성 폐쇄성 폐질환(chronic obstructive pulmonary disease; COPD), 기관지 천식(asthma bronchiale), 기관지 확장증(bronchiectasis), 진폐증(pneumoconiosis), 석면폐증(asbestosis), 급성 호흡 곤란 증후군(Acute Respiratory Distress Syndrome; ARDS), 영아 호흡 곤란 증후군(Infant respiratory distress syndrome; IRDS), 폐부종(pulmonary oedema), 폐 호산구 증가증(pulmonary eosinophilia), 로플러 폐렴(Loffler's pneumonia), 햄만-리치 증후군(Hamman-Rich syndrome), 특발성 폐섬유증(idiopathic pulmonary fibrosis), 간질성 폐 질환(interstitial pulmonary diseases), 원발성 섬모 운동 이상증(primary ciliary dyskinesia), 폐동맥 고혈압(pulmonary arterial hypertension; PAH) 및 STAT5b 결핍, 응고 결함, 특히 혈우병 A 및 B; 보체 결함, 특히 단백질 C 결핍, 혈전성 혈소판 감소성 자반증(thrombotic thrombocytopenic purpura) 및 선천성 혈색소 침착증(congenital hemochromatosis), 특히 헵시딘 결핍(Hepcidin deficiency); 폐 감염성 질환(pulmonary infectious diseases), 바람직하게는 호흡기 세포융합 바이러스(respiratory syncytial virus; RSV) 감염, 파라 인플루엔자 바이러스

(parainfluenza virus; PIV) 감염, 인플루엔자 바이러스 감염(influenza virus infection), 리노바이러스 감염(rhinoviruses infection), 중증 급성 호흡기 증후군, 코로나 바이러스(severe acute respiratory syndrome, corona virus; SARS-CoV) 감염, 결핵(tuberculosis), 슈도모나스 아에루기노사 감염(Pseudomonas aeruginosa infection), 부르크홀데리아 세파시아 감염(Burkholderia cepacia infection), 메티실린 내성 스타필로코쿠스 아우레우스(Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus; MRSA) 감염 및 헤모필루스 인플루엔자 감염(Haemophilus influenzae infection)이 언급될 수 있다.

[0570] 그러나, 에어로졸 형성을 위한 수성 현탁액 제형은 호흡기 조직으로부터 신체의 다른 조직 또는 기관으로 전위될 수 있고, 상기 원거리 조직 또는 기관의 세포를 형질감염시킬 수 있다는 것이 이해될 것이다. 유사하게, 에어로졸 형성을 위한 현탁액 제형에 포함된 mRNA에 의해 인코딩된 단백질(들)은 호흡기 조직으로부터 신체의 다른 조직 또는 기관으로 전위될 수 있고, 상기 원거리 조직 또는 기관에서 치료 효과를 가질 수 있다.

[0571] 다른 예시적인 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 에어로졸은 고셔병, 파브리병, MPS I, MPS II(헌터 증후군), MPS VI 및 글리코겐 저장 질환, 예를 들어, 글리코겐 저장 질환 I형(폰 기에레케병), II형(폼페병), III형(코리병), IV형(앤더슨병), V형(맥아들병), VI형(허스병(Hers disease)), VII형(타우리병(Tauri's disease)), VII형, IX형, X형, XI형(판코니-비켈 증후군(Fanconi-Bickel syndrome)), XI형 또는 0형과 같은 리소좀 질환의 치료 또는 예방에서 핵산 기반 요법에 사용될 수 있다. 전사체 대체 요법/효소 대체 요법은 유리하게는 근본적인 유전적 결함에는 영향을 미치지 않지만, 대상체가 결핍된 효소의 농도를 증가시킨다. 예로서, 폼페병의 경우, 전사체 대체 요법/효소 대체 요법은 결핍된 리소좀 효소 산 알파-글루코시다제(GAA)를 대체한다.

[0572] 추가의 예에 따라, 본 발명에 따른 핵산 기반 요법은 암, 심혈관 질환(cardiovascular disease), 바이러스 감염(viral infection), 면역 기능 장애(immune dysfunction), 자가 면역 질환(autoimmune disease), 신경학적 장애(neurologic disorder), 유전성 대사 장애(inherited metabolic disorder) 또는 유전적 장애 또는 세포에서 생성된 단백질 또는 단백질 단편이 환자에 대한 유익한 효과를 가질 수 있는 임의의 질환을 치료하는 데 사용될 수 있다. 암의 예로는 두경부암(head and neck cancer), 유방암(breast cancer), 신장암(renal cancer), 방광암(bladder cancer), 폐암(lung cancer), 전립선암(prostate cancer), 골암(bone cancer), 뇌암(brain cancer), 자궁경부암(cervical cancer), 항문암(anal cancer), 결장암(colon cancer), 결장직장암(colorectal cancer), 맹장암(appendix cancer), 안암(eye cancer), 위암(gastric cancer), 백혈병(leukemia), 림프종(lymphoma), 간암(liver cancer), 피부암(skin cancer), 난소암(ovarian cancer), 음경암(penile cancer), 췌장암(pancreatic cancer), 고환암(testicular cancer), 갑상선암(thyroid cancer), 질암(vaginal cancer), 외음부암(vulvar cancer), 자궁내막암(endometrial cancer), 심장암(cardiac cancer) 및 육종(sarcoma)을 포함한다. 심혈관 질환의 예로는 죽상 동맥 경화증(atherosclerosis), 관상 동맥 심장 질환(coronary heart disease), 폐 심장 질환(pulmonary heart disease) 및 심근병증(cardiomyopathy)을 포함한다. 면역 기능 장애 및 자가 면역 질환의 예로는 류마티스 질환(rheumatic diseases), 다발성 경화증(multiple sclerosis) 및 천식을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 바이러스 감염의 예로는 인간 면역 결핍 바이러스(human immunodeficiency virus), 단순 포진 바이러스(herpes simplex virus), 인간 유두종 바이러스(human papillomavirus), B형 및 C형 간염 바이러스(hepatitis B and C virus) 감염을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 신경학적 장애의 예는 파킨슨병(Parkinson's disease), 다발성 경화증 및 치매(dementia)를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 유전성 대사 장애의 예는 고셔병(Gaucher's disease) 및 페닐케톤뇨증(Phenylketonuria)을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0573] 본 명세서에는 특허 출원 및 제조업체 매뉴얼을 포함한 다수의 문서가 인용되어 있다. 이러한 문서의 개시내용은 본 발명의 특허성과 관련이 없는 것으로 간주되지만, 그 전체가 참조로 본원에 포함된다. 보다 구체적으로, 참조된 모든 문서는 각 개별 문서가 구체적이고 개별적으로 참조로 포함되는 것으로 표시된 것과 동일한 정도로 참조로 포함된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0574] **실시예**

[0575] **약어설명**

[0576] LNP 지질 나노입자 또는 리피도이드 나노입자

[0577] mRNA 메신저 리보핵산

[0578] N/P 담체 아민 질소 대 mRNA 포스페이트 비율

[0579] P188 폴록사머 188

[0580] RT 실온

[0581] SNIM®RNA 안정화된 비면역원성 메신저 리보핵산

[0582] w/o 없이

[0583] PdI 다분산 지수

[0584] eGFP 강화된 녹색 형광 단백질

[0585] 1. 실험 1 - 상이한 부형제에 대한 분무 후 나노입자 품질

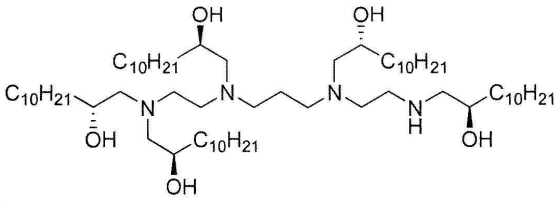
[0586] 1.1 재료 및 방법

[0587] *1.1.1 나노입자 제조*

[0588] 리피도이드 나노입자는 각각 8/5.29/4.41/0.88의 몰 비로 양이온성 리피도이드(dL_05(R), 반응식 1), 헬퍼 지질 DPPC(1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포콜린), Avanti Polar Lipids) 및 콜레스테롤(Avanti Polar Lipids) 및 PEG 지질 DMG-PEG2k(1,2-디미리스토일-sn-글리세롤메톡시(폴리에틸렌 글리콜)-2000, Avanti Polar lipids)로부터 제형화되었다. 각각 50, 20, 20 및 20mg/mL 농도의 HPLC 등급 에탄올 중 적절한 용적의 지질 스톡 용액을 결합시켰다. 제형화 공정은 빠른 용매 교환으로 수행되었다. 에탄올 중 지질 혼합물을 시트레이트 완충액(10mM 시트르산, 150mM NaCl, pH 4.5) 중의 mRNA와 1:4의 용적 비율로 NanoAssemblr 벤치탑(Precision NanoSystems)을 사용하여 결합시켰다. 생성된 제형은 8의 N/P 비율과 함께 0.2mg/mL의 mRNA 농도를 가졌다. RT에서 30분 배양 후, 제형은 50mM NaCl을 희석 및 정용여과 완충액으로 갖는 50kDa 필터 모듈(mPES, Repligen)을 사용하여 접선 유동 여과(KR2i TFF 시스템, Repligen)로 정제 및 농축시켰다. 생물학적 부담 감소 및 최종 멸균 여과는 0.8μm 및 0.2μm 주사기 필터를 사용하여 수행했다.

[0589] [반응식 1]

[0590] dL_05(R)의 화학 구조

[0591] 

[0592] *1.1.2나노입자와 부형제의 혼합*

[0593] 이 실험에 사용된 부형제는 표 3에 나열되어 있다. 부형제의 희석액은 10%(w/v) 수크로스, 50mM NaCl 중 2%(w/v) 부형제로 제조되었다. 수크로스/NaCl 완충액에서 후속적 연속 희석으로 0.2%, 0.02% 및 0.002%(w/v)의 부형제 농도를 산출하였다. 나노입자는 분무 직전에 각 부형제와 동일한 용적으로 혼합하였다.

[0594] [표 1]

스크리닝 실험에 사용된 부형제 목록.

재료	공급원
트윈 20	시그마(머크)
트윈 80	시그마(머크)
폴록사머 188(플루로닉 F-68)	시그마-알드리치
틸록사폴	시그마(머크)
VitE-PEG1000(D-α-토코페롤 폴리에틸렌 글리콜 1000 석시네이트)	시그마(머크)

[0595]

[0596] *1.1.3분무*

[0597] 나노입자 분무는 eFlow 네뷸라이저(Pari)로 수행되었다. 완전한 분무는 RT 및 완전한 분무가 측정될 때까지의 시간에 수행했다. 에어로졸은 실온에서 샘플 튜브에서 응축을 허용하여 수집하였다.

[0598] *1.1.4복합체 크기 및 PdI의 측정*

[0599] 나노입자의 유체역학적 직경(Z.평균, 크기) 및 다분산 지수(PdI)는 자동 감쇠기가 장착된 Zetasizer Nano-ZS(Malvern Instruments)를 사용하여 동적 광 산란(DLS)으로 측정하였고 강도 입자 크기 분포로서 보고되었다. 샘플은 25℃에서 희석되지 않은 상태로 측정되었다.

[0600] 1.2 결과

[0601] 이 실험 세트는 분무 후 나노입자의 입자 품질을 개선하는 능력에 대한 상이한 부류의 첨가제를 비교하는 것을 목표로 했다. 참조 데이터(부형제 없이 도 1 "w/o")로, 나노입자의 분무가 목적하지 않는 증가된 크기(유체역학적 직경, Z.평균)와 다분산 지수(PdI)를 초래한다는 것을 입증한다. 입자의 전체 크기 및 PdI의 유의한 개선은 특정 부형제의 첨가를 통해 달성되었다. 도 1은 1% 부형제, 10%(w/v) 수크로스, 50mM NaCl 중 0.5mg/mL의 mRNA 농도에서 1mL 분무 전 및 후의 나노입자 제형의 크기 및 PdI를 보여준다.

[0602] 2. 실험 2 - 부형제 존재하에 나노입자 안정성

[0603] 2.1 재료 및 방법

[0604] *2.1.1나노입자 제조*

[0605] 1.1.1 참조

[0606] *2.1.2나노입자와 부형제의 혼합*

[0607] 이 실험에 사용된 부형제는 표 4에 나열되어 있다. 부형제의 희석액은 10%(w/v) 수크로스, 50mM NaCl 중의 20%(w/v) 부형제로 제조했다.

[0608] [표 2]

부형제 목록.

재료	공급원
트윈 20	시그마(머크)
트윈 80	시그마(머크)
폴록사머 188(플루로닉 F-68)	시그마-알드리치
틸록사폴	시그마(머크)
VitE-PEG1000(D-α-토코페롤 폴리에틸렌 글리콜 1000 석시네이트)	시그마(머크)

[0609]

[0610] *2.1.3캡슐화 효율의 측정*

[0611] 캡슐화 효율을 결정하기 위해, 모든 샘플을 주입용수에 4μg/mL로 희석하였다. "처리된 샘플"의 경우, 50μL의 각 샘플과 블랭크 대조군으로서의 물을 2%(v/v) 트리톤-X-100 중의 2.67mg/mL 헤파린과 함께 96웰 플레이트에서 70℃에서 15분 동안 배양한 후 RT로 냉각시켰다. "미처리 샘플"의 경우, 50μL의 각 샘플과 블랭크 대조군으로서의 물을 50μL의 주입용수로 희석시켰다. 1x TE 완충액(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 디에틸피로카보네이트(DEPC) 처리수 중 pH 7.5) 중의 100μL의 100배 희석된 RiboGreen(Quant-iT™ RiboGreen® RNA 검정 키트, ThermoFisher) 시약을 각 웰에 첨가하고, RT에서 5분 동안 광 보호 배양하였다. 형광 강도는 각각 785/535nm의 여기/발광 파장에서 Tecan 플레이트 판독기에서 측정하였다. 캡슐화 효율은 (100% - (([방출 "미처리 샘플"]-[방출 "미처리 블랭크"])/([방출 "처리 샘플"]-[방출 "처리 블랭크"]))*100%)로 표현되었다.

[0612] 2.2 결과

[0613] 분무 공정의 안정화제로서 부형제의 사용을 허용하기 위해, 나노입자 자체에 부정적인 영향을 미치지 않아야 한다. 이를 테스트하기 위해, 상이한 부형제 농도의 존재하에 사용 중 안정성 연구를 수행하였다. 이를 위해, 현탁액을 RT에서 6시간 동안 저장하였다. 입자 완전성을 나타내는 캡슐화 효율을 측정했다. 데이터는 도 2에 제시되어 있으며, 이는 x%(w/v) 부형제, 10%(w/v) 수크로스, 50mM NaCl에서 2.5mg/mL의 mRNA 농도에서 나노입자 제형의 캡슐화 효율을 보여준다. 데이터는 혼합 6시간 후에 기록되었다.

[0614] 2.3 토론 및 결론

[0615] 틸록사폴, 트윈-20 및 트윈-80의 존재하에, 캡슐화 효율은 부형제 농도가 증가함에 따라 감소하며, 이는 나노입자 완전성의 손실을 나타낸다. 대조적으로, 폴록사머는 제형에 의해 잘 수용된다. 입자는 테스트된 모든 폴록사머 농도에서 6시간 동안 온전한 상태로 유지된다.

[0616] 3. 실험 3 - 폴록사머의 존재하에 2.5mg/mL로 나노입자 분무

[0617] 3.1 재료 및 방법

[0618] *3.1.1나노입자 제조*

[0619] 섹션 1.1.10 참조.

[0620] *3.1.2 부형제의 첨가*

[0621] 폴록사머는 분무 직전에 첨가했다(스톡 농도: 50mM NaCl 중의 10%(w/v) 수크로스 중 20%(w/v) P188).

[0622] *3.1.3분무*

[0623] 섹션 1.1.3 참조.

[0624] *3.1.4복합체 크기 및 PdI의 측정*

[0625] 섹션 1.1.4 참조

[0626] *3.1.5캡슐화 효율의 측정*

[0627] 섹션 2.1.3 참조

[0628] *3.1.6mRNA 완전성의 측정*

[0629] 나노입자 내 mRNA의 완전성은 단편 분석기(Agilent Technologies)를 사용하여 모세관 겔 전기영동(capillary gel electrophoresis)을 통해 결정하였다. 나노입자에서 mRNA의 방출은 6μg/μL 헤파린(시그마-알드리치), 0.2%(v/v) 트리톤-X-100, 50%(v/v) 포름아미드에서 0.05mg/mL의 mRNA 농도에서 수행하였다. 샘플을 70℃, 300rpm(Thermomixer, Eppendorf)에서 15분 배양했다. mRNA 참조가 따라서 처리되었다. 샘플 분석을 위해, 처리된 나노입자 및 mRNA를 희석 마커(표준 감도 RNA 희석 마커(15nt), Agilent technologies)에서 1:4로 희석했다.

[0630] 3.2 결과

[0631] 실험 1에서, 1%(w/v)의 부형제가 분무 동안 나노입자를 안정화시킬 수 있음이 입증되었다. 실험 2는 다른 테스트된 부형제와 대조적으로 폴록사머가 나노입자 안정성에 부정적인 영향을 미치지 않음을 나타냈다. 이 실험에서, 2.5mg/mL의 mRNA 농도를 갖는 나노입자 용액의 안정화에 필요한 폴록사머 농도를 평가하여 1 내지 5%(w/v) 범위의 P188 농도를 테스트했다. 그 목적을 위해, 1mL 샘플을 각 농도로 제조하고, eFlow 네뷸라이저(Pari)를 통해 분무하고 동일한 농도의 미처리 샘플과 비교했다. 도 3은 상이한 폴록사머 농도로 분무 전(미처리) 및 후 2.5mg/mL로 나노입자 현탁액 1mL의 생물물리학적 특성을 보여준다: (a) 크기, (b): 캡슐화 효율, (c) 상대적 mRNA 완전성.

[0632] 3.3 토론 및 결론

[0633] 결과는 폴록사머가 1 내지 5%(w/v) 부형제의 광범위한 농도 범위에 걸쳐 2.5mg/mL의 핵산 농도에서 제형을 안정화시킨다. 가장 중요한 세 가지 품질 특성으로서 입자 크기, 캡슐화 효율 및 mRNA 완전성은 분무 공정에 의해 영향을 받지 않고 잔류한다.

[0634] 4. 실험 4 - 25mg의 분무

[0635] 4.1 재료 및 방법

[0636] *4.1.1 나노입자 제조*

[0637] 섹션 1.1.1 참조.

[0638] *4.1.2 폴록사머의 첨가*

[0639] 섹션 3.1.2 참조.

[0640] *4.1.3분무*

[0641] 섹션 1.1.3 참조.

[0642] *4.1.4 복합체 크기 및 PdI의 측정*

[0643] 섹션 1.1.4 참조.

[0644] *4.1.5캡슐화 효율의 측정*

[0645] 섹션 2.1.3 참조.

[0646] *4.1.6mRNA 완전성의 측정*

[0647] 섹션 3.1.6 참조

[0648] 4.2 결과

[0649] 이 실험 동안, 약물 분무에 대한 추가의 도전인 더 큰 용적의 나노입자 용액의 분무가 테스트되었다. 2.5mg/mL 농도로 10mL 용적(장치의 최대 충전량)의 제형화된 mRNA를 5%(w/v)의 폴록사머 농도로 분무했다. 에어로졸을 수집하고 5분마다 분획화했다. 분획은 생물물리학적 특성에 대해 분석했다. 용적은 약 0.3mL/분의 평균 출력 속도로 분무시켰다. 마지막으로, 약 500μL의 제형은 네블라이저의 저장소에 유지시켰다. 도 4는 5% 폴록사머(완충액: 5% (w/v) P188, 10% (w/v) 수크로스, 50mM NaCl)의 존재하에 2.5mg/mL의 mRNA 농도에서 10mL 제형의

분획화된 에어로졸의 생물물리학적 특성화 결과를 보여준다: 분무 시간에 따른, (a) 크기, (b) PdI, (c) 캡슐화 효율 및 (d) 상대적 mRNA 완전성.

[0650] 4.3 토론 및 결론

[0651] 수집된 분획에서, 입자 크기 및 PdI는 안정하게 유지되었다(도 4a 및 b). 캡슐화 효율은 일정하게 95% 이상이었으며(도 4c), mRNA 완전성은 영향을 받지 않고 유지되었다(도 4d). 따라서, 5%(w/v) 폴록사머의 첨가는 30분 이내에 10mL 농축 제형(2.5mg/mL)의 분무를 가능하게 할 수 있었으며, 이는 폴록사머 없이는 달성 가능하지 않았다.

[0652] 5. 실험 5 - 에어로졸 제형의 시험관내 작용성에 대한 폴록사머의 영향

[0653] 5.1 재료 및 방법

[0654] *5.1.1 나노입자 제조*

[0655] mRNA를 인코딩하는 eGFP 사용하는 섹션 1.1.1. 참조

[0656] *5.1.2 폴록사머의 첨가*

[0657] 섹션 3.1.2 참조.

[0658] *5.1.3 분무*

[0659] 섹션 1.1.3 참조.

[0660] *5.1.4 복합체 크기 및 PdI의 측정*

[0661] 섹션 1.1.4 참조.

[0662] *5.1.5 캡슐화 효율의 측정*

[0663] 섹션 2.1.3 참조.

[0664] *5.1.6mRNA 완전성의 측정*

[0665] 섹션 3.1.6 참조.

[0666] *5.1.7세포 배양 및 형질감염*

[0667] 16HBE14o- 세포는 37℃, 5% CO_2에서 열 불활성화된 태아 소 혈청(FBS, Thermo Fisher Scientific) 및 페니실린/스트렙토마이신(Pen/Strep, Gibco™, Thermo Fisher Scientific)이 보충된 MEM + (Thermo Fisher Scientific) GlutaMax™(Gibco™, Thermo Fisher Scientific)에서 콜라겐 타입 I(Corning) 코팅 플라스크(corning)에서 배양하였다. 공기 액체 계면 배양물(ALI) 생성을 위해, 세포를 24웰 플레이트에서 콜라겐 타입 I(Corning) 코팅 삽입물의 정단면에 250 µL($2.4x10^5$ 세포/mL)로 시딩했다. 기저면에 500 µL 배지를 첨가하고, 세포를 72시간 동안 배양하여 부착을 허용했다. 형질감염 24시간 전에, 기저 웰 중 배지를 교환하고, 정단면의 배지는 제거했다. 형질감염은 주입용수로 세척한 후, ALI 배양물의 정단면에 25 µL의 각 LNP 투여량을 첨가하고 37℃, 5% CO_2에서 6시간 동안 배양한 후 수행했다. 형질감염 완료 후, 세포 층을 200 µL PBS(-/-, Gibco™, Thermo Fisher Scientific)로 세척하고 ALI 배양물로 추가로 유지시켰다.

[0668] *5.1.8 ALI 용해물에서 eGFP의 정량화*

[0669] 형질감염 24시간 후, 세포를 세포내 EGFP의 정량화를 위해 용해시켰다. ALI 삽입물을 200 µL PBS(-/-, Gibco™, Thermo Fisher Scientific)로 정단면으로부터 세척하고, 기저 측면으로부터 500 µL로 세척하였다. PBS를 흡인시키고 프로테아제 억제제(cOmplete™, EDTA 부재 프로테아제 억제제 칵테일, Roche)로 보충된 100 µL 트리톤 X-100 용해 완충액(0.25M TRIS-HCl(Carl Roth), 1% 트리톤-X-100(Sigma-Aldrich), pH 7.8)으로 교체했다. 삽입물은 600rpm에서 진탕 플랫폼에서 RT로 20분 동안 배양했다. 용해물을 위아래로 여러 번 피펫팅하여 수집하고 분석까지 -80℃에서 저장했다. 세포 용해물에서 eGFP 수준을 정량화하기 위해 GFP SimpleStep ELISA® 키트(Abcam ab171581)를 사용했다.

[0670] 5.2 결과

[0671] 나노입자의 안정화를 위한 부형제로서, 부형제는 인코딩된 단백질의 발현을 초래하는 세포 내로 mRNA의 수송에 대한 이의 효율에 부정적인 영향을 미치지 않아야 한다. 따라서, 나노입자의 형질감염 효율은 분무 전 및 후에 폴록사머 및 트윈-80의 존재하에 테스트했다. eGFP 단백질을 인코딩하는 mRNA는 제형에 사용되어 생산된 단백질의 정량화를 허용하였다. 결과는 도 5에 제시되어 있으며, 5%(w/v) 부형제(폴록사머 또는 트윈-80)의 존재하에 분무 전(미처리됨) 및 분무 후 eGFP mRNA를 캡슐화하는 나노입자로 16HBEo- ALI의 형질감염 24시간 후 세포 용해물 중 eGFP 수준을 나타낸다. 점선: 부형제 없이 나노입자로 형질감염 후의 참조 eGFP 수준.

[0672] 5.3 토론 및 결론

[0673] 분무를 위한 부형제로서 트윈-80의 첨가는 형질감염 효율의 강력한 감소를 초래한다. 이 효과는 분무 공정과 무관하고, 따라서 부형제 자체의 존재에 기인할 수 있다. 대조적으로, 폴록사머의 첨가는 형질감염 효율에 영향을 미치지 않는다. 분무 전후의 단백질 수준은 부형제 부재하에 동일한 나노입자로 형질감염 후 수준에 필적할 만하다.

[0674] 6. 실험 6 - mRNA 나노입자의 생체내 효율에 대한 폴록사머의 영향

[0675] 6.1 재료 및 방법

[0676] *6.1.1 나노입자 제조*

[0677] 섹션 1.1.1 참조.

[0678] *6.1.2폴록사머의 첨가*

[0679] 섹션 3.1.2 참조.

[0680] *6.1.3분무*

[0681] 섹션 1.1.3 참조.

[0682] *6.1.4복합체 크기 및 PdI의 측정*

[0683] 섹션 3.1.4 참조.

[0684] *6.1.5캡슐화 효율의 측정*

[0685] 섹션 2.1.3 참조.

[0686] *6.1.6 mRNA 완전성의 측정*

[0687] 섹션 3.1.6 참조.

[0688] *6.1.7동물 사육*

[0689] 마우스는 특정 병원체 부재 조건하(2017년 연례 보건 위생 조사에 따라 임의의 FELASA 나열 병원체에 대해 음성 판정을 받은 시설)에 일주기 빛 주기(오전 7시부터 오후 7시까지 불 켜짐)에 따라 개별적으로 환기되는 케이지에 사육시켰다. 음식과 식수는 임의로 제공되었다. 도착 후, 동물은 연구에 참여할 때까지 순응을 위해 적어도 7일이 주어졌다.

[0690] 6.1.8 기관내 점적 주입

[0691] 동물은 4% 이소플루란(Isothesia, Henry Shine)을 함유하는 순수 산소의 흡입으로 마취시켰다. 의식이 없는 동물은 37㎜로 단축된 20 G 카테터를 사용하여 삽관하였다. 최종 용적 50㎕의 제형을 난관의 근위 끝에 한 방울로 적용하여 동물의 생리적 흡기 운동 동안 흡인시켰다. 마지막으로, 150㎕의 공기를 적용하여 카테터를 완전히 비웠다.

[0692] 6.1.9 안락사 및 부검

[0693] 동물은 펜타닐/미다졸람/메데토미딘(0.05/5.0/0.5mg/kg bw)의 복강내 주사를 통해 완전 마취하에 설정되었다. 후속적으로, 마우스를 자궁 경부 탈구에 의해 사멸시켰다. 복강은 중앙 축에서 개방시켰다. 폐 이식을 위해, 작은 순환은 우심실을 통해 5mL PBS의 주입을 통해 플러싱하였다. 후속적으로, 심장은 심장-폐 블록으로부터 해부되었다. 폐를 이식하고, 드라이아이스에서 스냅 냉동시켰다.

[0694] 6.1.10 폐 균질액에서 eGFP의 정량화

[0695] eGFP의 정량화를 위해, 냉동된 폐를 칭량하고, 전체 기관을 균질화했다. 500μL의 용해 완충액(0.25M TRIS(Carl Roth), 0.1% 트리톤 X-100(Carl Roth), pH 7.8)이 충전된 용해 매트릭스 D(MP Biomedicals) 균질화 튜브를 사용했다. 균질화는 조직 균질화기(MP FastPrep-24 조직 및 세포 균질화기)에서 3x 20초 동안 수행하였다. 후속적으로, 용해물을 얼음 위에서 10분 동안 배양하고, 20.000 x g에서 4℃에서 10분 동안 원심분리시켰다(Mikro 22R 원심분리기, Hettich Zentrifugen). GFP SimpleStep ELISA® 키트(Abcam ab171581)를 사용하여 eGFP를 정량화했다. eGFP의 수준은 폐 중량과 상관관계가 있으며, ng 단백질/g 조직 단위로 보고되었다.

[0696] 6.2 결과

[0697] 약물로 사용되는 나노입자의 안정화를 위한 부형제로서 역할을 하기 위해, 부형제는 생체내에서 나노입자의 형질감염 효율에 부정적인 영향을 미치지 않아야 한다. 이 연구 동안, 부형제의 존재하에 형질감염 효율은 마우스에서 i.t. 적용 후에 측정되었다. 효율은 치료 24시간 후 mRNA 인코딩된 eGFP의 정량화를 통해 결정되었다. 도 6은 폴록사머의 존재 및 부재하에 3개의 상이한 투여량에 의한 치료 결과, 특히 부형제 부재(w/o) 및 존재하에 10%(w/v) 수크로스, 50mM NaCl 중 나노입자의 i.t. 점적주입시 eGFP 수준을 보여준다.

[0698] 6.3 토론 및 결론

[0699] 마우스 폐에서 측정된 eGFP 수준은 각 투여량 수준에서 폴록사머의 존재하 및 부재하에 동일했다. 생성된 데이터의 분석은 폴록사머가 생체내에서 나노입자의 형질감염 효율에 부정적인 영향을 미치지 않는다는 결론으로 이어진다.

[0700] 7. 실험 7 - 나노입자 다운스트림 처리 중 폴록사머의 첨가는 나노입자 품질을 향상시킨다

[0701] 7.1 재료 및 방법

[0702] *7.1.1 나노입자 제조*

[0703] 섹션 1.1.1 참조

[0704] *7.1.2 복합체 크기 및 PdI의 측정*

[0705] 섹션 1.1.4 참조.

[0706] 7.2 결과

[0707] 용매 교환을 통한 복합체 형성 후, 이 단계에 필요한 완충액 성분(EtOH 및 시트르산)은 제거되어야 한다. 이 단계뿐만 아니라 제형의 농도 조정을 위한 표준 절차는 접선 유동 여과이다. 이 치료 동안, 나노입자는 스트레스 조건을 겪어 입자 품질의 손실(예: 응집)을 초래한다. 이 실험 동안, 폴록사머를 사용하여 이 공정 단계 동안 나노입자를 안정화시켰다. 그 목적을 위해, 나노입자를 표준 조건하에 제형화하였다. 한 세트에서, 폴록사머는 TFF 처리 전에 0.5%(w/v)의 농도로 첨가되었다. 입자의 품질은 혼합 후 및 처리 후 입자 크기의 측정을 통해 결정되었다. 도 7은 폴록사머의 존재 또는 부재하에 분무 처리 전 및 후의 나노입자 제형의 크기 및 PdI를 보여준다.

[0708] 7.3 토론 및 결론

[0709] 도 7에 도시된 바와 같이, 입자 크기뿐만 아니라 다분산성은 폴록사머의 부재하에 TFF 처리 중에 증가하여 입자 응집을 나타낸다. 폴록사머의 존재하에, 입자 크기뿐만 아니라 다분산성은 처리 동안 안정하게 유지된다. 따라서, 폴록사머의 첨가는 나노입자의 처리 동안 입자 품질을 명백하게 향상시킨다.

[0710] 8. 실험 8 - 폴록사머의 부재하 및 존재하에 분무 후 ICE 기반 나노입자의 나노입자 품질

[0711] 8.1 재료 및 방법

[0712] *8.1.1 나노입자 제조*

[0713] 지질 나노입자는 각각 60/35/5의 몰 비로 양이온성 지질(ICE(이미다졸 콜레스테롤 에스테르)), 헬퍼 지질 DOPE(1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민, Avanti Polar Lipids) 및 PEG 지질 DMG-PEG2k(1,2-디미리스토일-sn-글리세롤메톡시(폴리에틸렌 글리콜)-2000, Avanti Polar lipids)로부터 제형화하였다. 10mg/mL에서 HPLC 등급 에탄올 중 적정 용적의 지질 스톡 용액을 결합시켰다. 제형화 공정은 빠른 용매 교환으로 수행되었다. 에탄올 중 지질 혼합물을 시트레이트 완충액(10mM 시트르산, 150mM NaCl, pH 4.5) 중의 mRNA와

NanoAssemblr 벤치탑(Precision NanoSystems)을 사용하여 1:4의 용적 비율로 결합시켰다. 생성되는 제형은 N/P 비율 4와 함께 0.2mg/mL의 mRNA 농도를 가졌다. RT에서 30분 배양 후, 희석 및 정용여과 완충액으로서 25mM NaCl을 갖는 100kDa 필터 모듈(mPES, Repligen)을 사용하여 접선 유동 여과(KR2i TFF 시스템, Repligen)로 정제 및 농축시켰다. 생물학적 부담 감소 및 최종 멸균 여과는 0.8μm 및 0.2μm 주사기 필터를 사용하여 수행하였다.

[0714] *8.1.2 부형제의 첨가*

[0715] 폴록사머를 분무 직전에 첨가하여(스톡 농도: 25mM NaCl 중 20% (w/v) 폴록사머 188) 5% (w/v) 폴록사머 188, 25mM NaCl 중 0.5mg/mL mRNA 농도를 초래하였다.

[0716] *8.1.3 분무*

[0717] 섹션 1.1.3 참조

[0718] *8.1.4 복합체 크기 및 PdI의 측정*

[0719] 섹션 1.1.4 참조

[0720] 8.2 결과

[0721] 실험 1 및 3은 폴록사머가 분무 동안 양이온성 리피도이드 dL_05(R)을 기반으로 하는 나노입자를 안정화시킨다는 것을 나타냈다. 이 실험 세트는 폴록사머의 첨가가 또한 분무 동안 상이한 양이온성 지질(ICE)을 기반으로 하여 다른 일반적으로 사용되는 나노입자의 입자 품질도 보존할 수 있는지 여부를 테스트하는 것을 목표로 했다. 참조 데이터(부형제 없이 도 8 "w/o")는 나노입자의 분무가 크기(유체역학적 직경, Z.평균)와 다분산 지수(PdI)의 증가로 이어진다는 것을 입증한다. 5%(w/v) 폴록사머의 첨가는 이러한 효과를 방지하고 입자 품질을 보존한다. 도 8은 폴록사머를 포함하거나 포함하지 않고 분무 전 및 후에 0.5mg/mL의 mRNA 농도에서 1mL 나노입자 현탁액의 크기와 PdI를 보여준다.

[0722] 8.3 토론 및 결론

[0723] 폴록사머의 존재는 또한 분무 동안 양이온성 지질 ICE를 기반으로 지질 나노입자를 안정화시키고, 크기(유체역학적 직경, Z.평균) 및 다분산 지수(PdI)의 증가를 방지한다.

[0724] 9. 실험 9 - 폴록사머의 부재하 및 존재하에 분무 후 DLin-MC3-DMA 기반 나노입자의 나노입자 품질

[0725] 9.1 재료 및 방법

[0726] *9.1.1 나노입자 제조*

[0727] 지질 나노입자는 각각 50/10/38.5/1의 몰 비로 양이온성 지질(DLin-MC3-DMA), 헬퍼 지질 DSPC(1,2-디스테아릴-sn-글리세로-3-포스포콜린, Avanti Polar Lipids) 및 콜레스테롤(Avanti Polar Lipids) 및 PEG 지질 DMPE-PEG2k(1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-폴리에틸렌 글리콜 2000, Avanti Polar lipids)로부터 제형화하였다. 10mg/mL에서 HPLC 등급 에탄올 중 적정 용적의 지질 스톡 용액을 결합시켰다. 제형화 공정은 빠른 용매 교환으로 수행되었다. 에탄올 중 지질 혼합물을 시트레이트 완충액(50mM 시트르산, 160mM NaCl, pH 3) 중의 mRNA와 NanoAssemblr 벤치탑(Precision NanoSystems)을 사용하여 1:3의 용적 비율로 결합시켰다. 생성되는 제형은 N/P 비율 3과 함께 0.2mg/mL의 mRNA 농도를 가졌다. RT에서 30분 배양 후, 제형은 희석 및 정용여과 완충액으로서 PBS를 갖는 100kDa 필터 모듈(mPES, Repligen)을 사용하여 접선 유동 여과(KR2i TFF 시스템, Repligen)로 정제 및 농축시켰다. 생물학적 부담 감소 및 최종 멸균 여과는 0.8μm 및 0.2μm 주사기 필터를 사용하여 수행하였다.

[0728] *9.1.2 부형제의 첨가*

[0729] 폴록사머를 분무 직전에 첨가하여(스톡 농도: PBS 중 20% (w/v) 폴록사머 188) PBS 중 5% (w/v) 폴록사머 188 중 0.5mg/mL의 농도를 초래하였다.

[0730] *9.1.3 분무*

[0731] 섹션 1.1.3 참조

[0732] *9.1.4 복합체 크기 및 PdI의 측정*

[0733] 섹션 1.1.4 참조

[0734] 9.2 결과

[0735] 실험 1 및 3은 폴록사머가 분무 동안 양이온성 리피도이드 dL_05(R)을 기반으로 하는 나노입자를 안정화시킨다는 것을 나타냈다. 이 실험 세트는 폴록사머의 첨가가 또한 분무 동안 다른 일반적으로 사용되는 나노입자의 입자 품질도 보존할 수 있는지 여부를 테스트하는 것을 목표로 했다. 양이온성 지질 DLin-MC3-DMA를 기반으로 한 충분히 기재된 나노입자가 모델로서 선택되었다. 부형제의 부재하(폴록사머 없이, 도 9 "w/o")에, 나노입자의 분무는 크기(유체역학적 직경, Z.평균)와 다분산 지수(PdI)의 증가로 이어진다. 5%(w/v) 폴록사머의 첨가는 이러한 효과를 방지하고 입자 품질을 보존한다. 도 9는 폴록사머를 포함하거나 포함하지 않고 분무 전 및 후에 0.5mg/mL에서 1mL 나노입자 현탁액의 크기와 PdI를 보여준다.

[0736] 9.3 토론 및 결론

[0737] 폴록사머의 존재는 분무 동안 양이온성 지질 DLin-MC3-DMA를 기반으로 지질 나노입자를 안정화시킨다. 폴록사머의 첨가는 크기(유체역학적 직경, Z.평균) 및 다분산 지수(PdI)의 증가를 방지한다.

[0738] [도면의 간단한설명]

[0739] 도 1은 1% 부형제, 10%(w/v) 수크로스, 50mM NaCl 중 0.5mg/mL의 mRNA 농도에서 1mL의 분무 전 및 후의 나노입자 제형의 크기 및 PdI를 보여준다.

[0740] 도 2는 x%(w/v) 부형제, 10%(w/v) 수크로스, 50mM NaCl 중 2.5mg/mL의 mRNA 농도에서 나노입자 제형의 캡슐화 효율을 보여준다. 데이터는 혼합 6시간 후에 기록되었다.

[0741] 도 3은 상이한 폴록사머 농도로 분무 전(미처리됨) 및 분무 후 2.5mg/mL에서 1mL 나노입자 현탁액의 생물물리학적 특성을 보여준다: (a) 크기, (b): 캡슐화 효율, (c) 상대적 mRNA 완전성.

[0742] 도 4는 5% 폴록사머(완충액: 5% (w/v) P188, 10% (w/v) 수크로스, 50mM NaCl)의 존재하에 2.5mg/mL의 mRNA 농도에서 10mL 제형의 분획화된 에어로졸의 생물물리학적 특성화 결과를 보여준다: 분무 시간에 따른 (a) 크기, (b) PdI, (c) 캡슐화 효율 및 (d) 상대적 mRNA 완전성.

[0743] 도 5는 5%(w/v) 부형제(폴록사머 또는 트윈-80)의 존재하에 분무 전(미처리됨) 및 후에 eGFP mRNA를 캡슐화하는 나노입자로 16HBEo- ALI의 형질감염 24시간 후 세포 용해물에서 eGFP 수준을 보여준다. 점선: 부형제 없이 나노입자로 형질감염 후 참조 eGFP 수준.

[0744] 도 6은 부형제 부재하(w/o) 및 존재하에 10%(w/v) 수크로스, 50mM NaCl 중 나노입자의 i.t. 점적주입시 eGFP 수준을 보여준다.

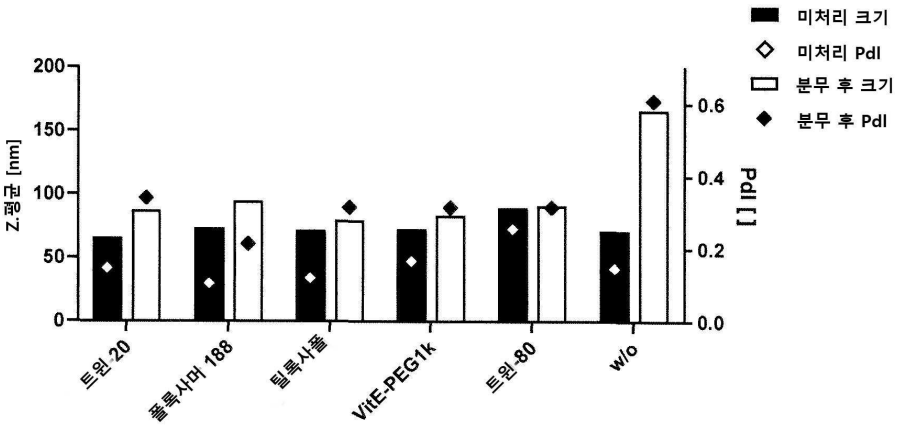
[0745] 도 7은 폴록사머의 존재하 또는 부재하에 분무 처리 전 및 후의 나노입자 제형의 크기 및 PdI를 보여준다.

[0746] 도 8은 5%(w/v) 폴록사머의 존재하 또는 부재하에 0.5mg/mL의 mRNA 농도에서 1mL의 분무 전 및 후의 나노입자 제형(양이온성 지질로서 ICE 포함)의 크기 및 PdI를 보여준다.

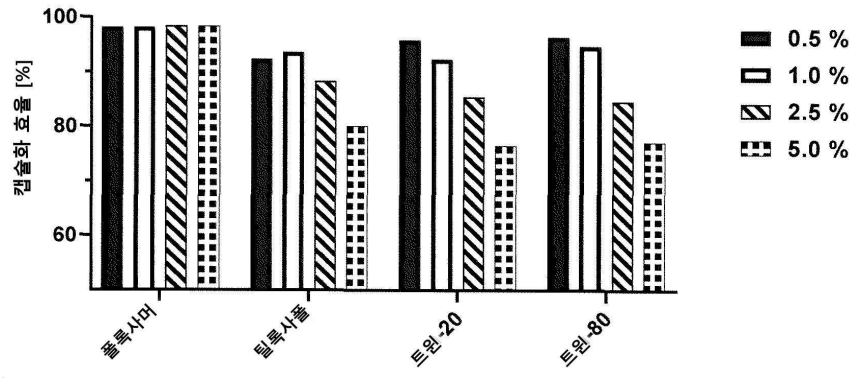
[0747] 도 9는 5%(w/v) 폴록사머의 존재하 또는 부재하에 0.5mg/mL의 mRNA 농도에서 1mL의 분무 전 및 후의 나노입자 제형(양이온성 지질로서 DLin-MC3-DMA 포함)의 크기 및 PdI를 보여준다.

도면

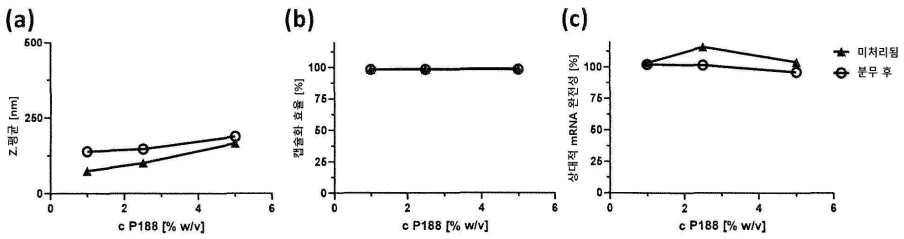
도면1



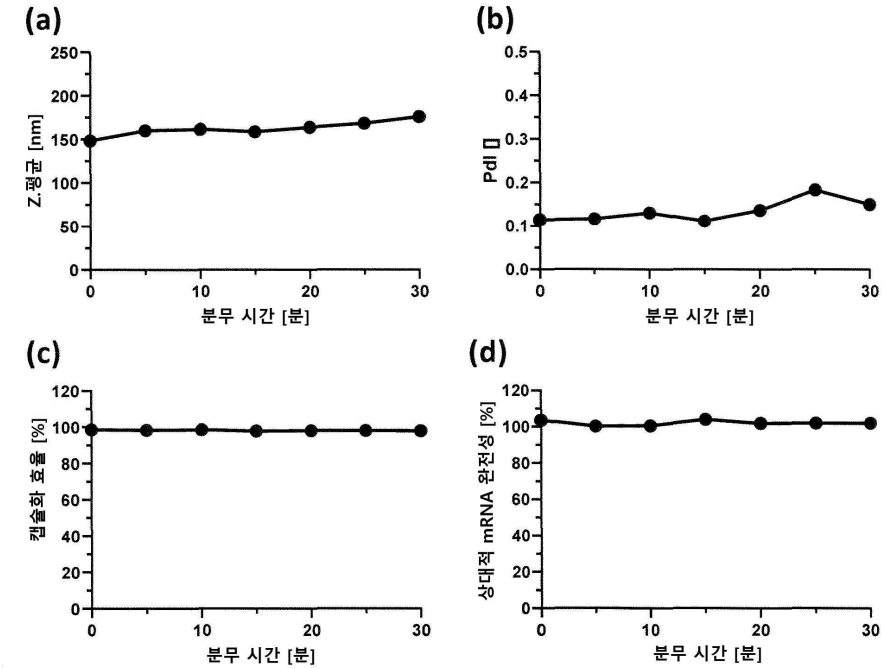
도면2



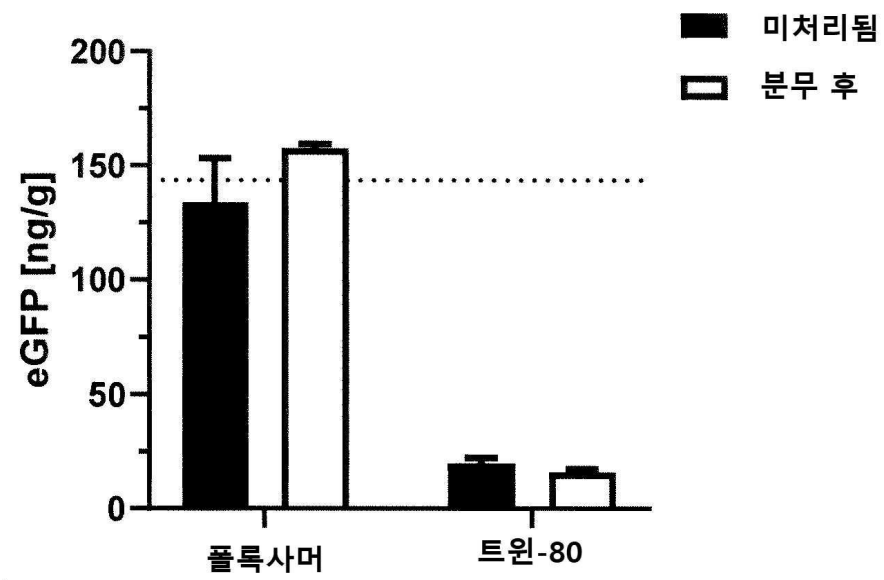
도면3



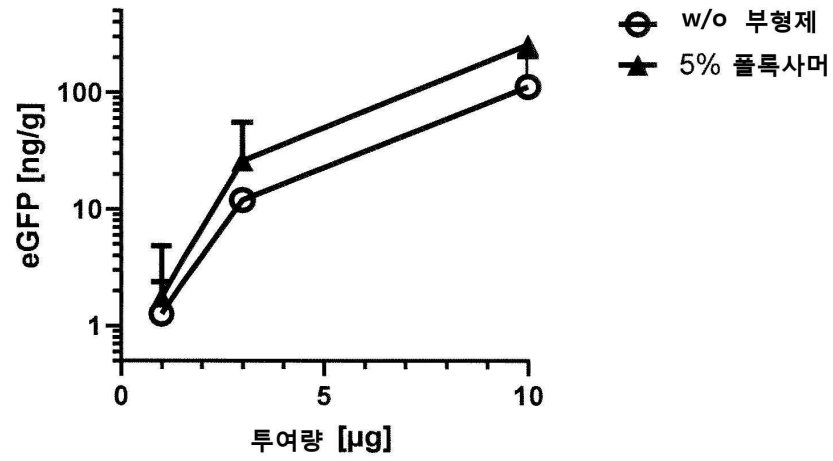
도면4


(a)
Z-평균 [nm]
250
200
150
100
50
0
0
10
20
30
분무 시간 [분]
(b)
PdI □
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
0
10
20
30
분무 시간 [분]
(c)
캡슐화 효율 [%]
120
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
분무 시간 [분]
(d)
상대적 mRNA 완전성 [%]
120
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
분무 시간 [분]

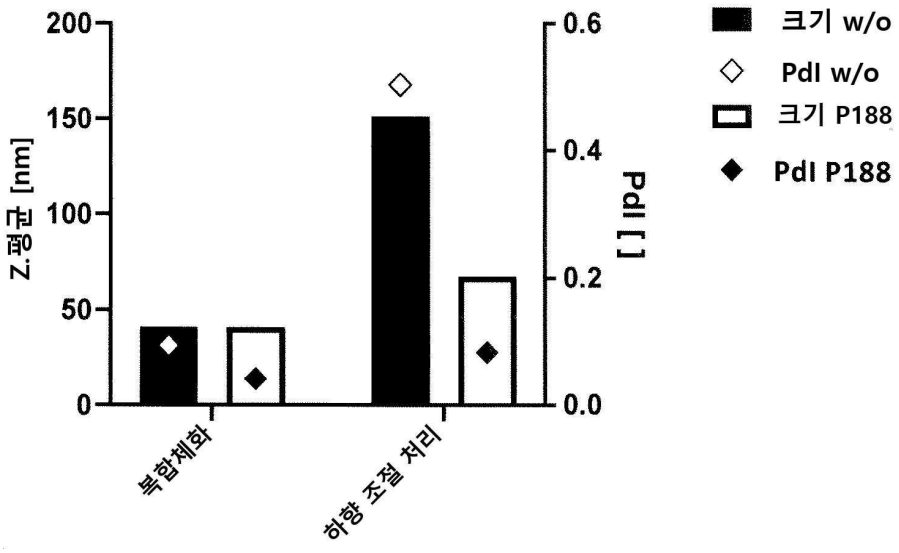
도면5


미처리됨
분무 후
eGFP [ng/g]
200
150
100
50
0
폴록사머
트윈-80

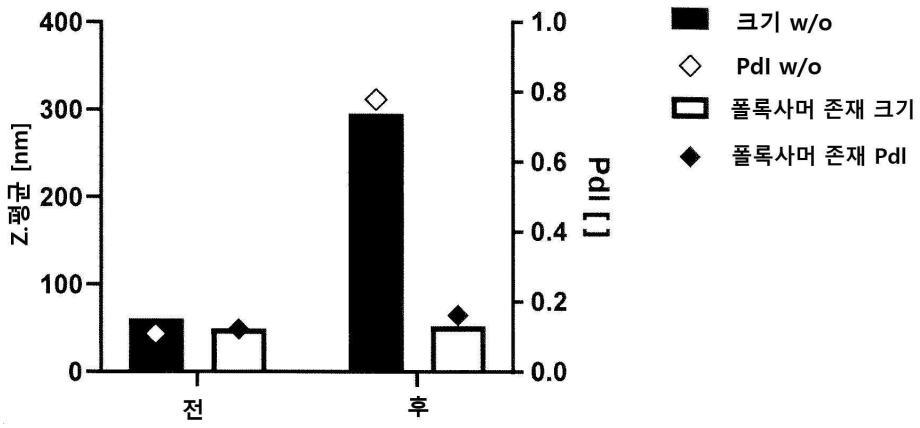
도면6


w/o 부형제
5% 폴록사머
eGFP [ng/g]
100
10
1
0
5
10
투여량 [μg]

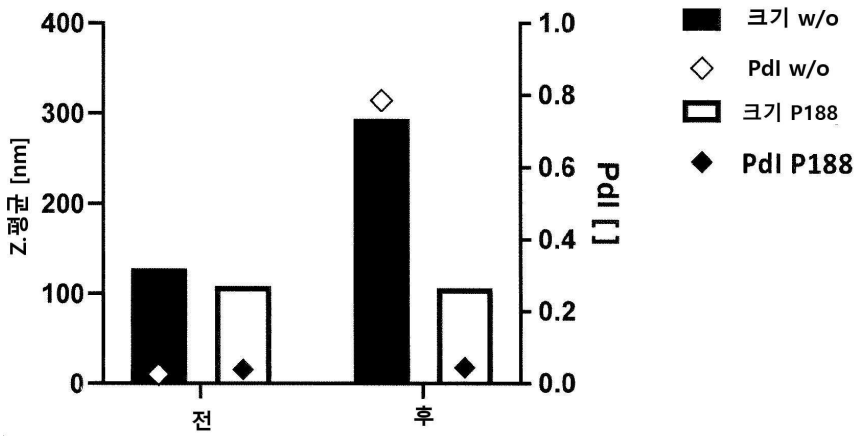
도면7


크기 w/o
PdI w/o
크기 P188
PdI P188
Z.평균 [nm]
200
150
100
50
0
0.6
0.4
0.2
0.0
PdI [ ]
복합체화
하향 조절 처리

도면8


크기 w/o
PdI w/o
폴록사머 존재 크기
폴록사머 존재 PdI
Z.평균 [nm]
400
300
200
100
0
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
PdI [ ]
전
후

도면9


400
300
200
100
0
Z.평균 [nm]
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
PdI [ ]
전
후
크기 w/o
PdI w/o
크기 P188
PdI P188