



(19) 대한민국특허청(KR)
 (12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0020288
 (43) 공개일자 2015년02월25일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/48 (2006.01) *C12N 15/11* (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2014-7033746
- (22) 출원일자(국제) 2013년06월07일
 심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2014년12월01일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2013/061811
- (87) 국제공개번호 WO 2013/182683
 국제공개일자 2013년12월12일
- (30) 우선권주장
 61/657,344 2012년06월08일 미국(US)
- (71) 출원인
에트리스 게엠베하
 독일 82152 마르틴스리트 로흐하머스트라쎄 11
- (72) 발명자
가이거 요하네스
 독일 80939 뮌헨 키페른가르텐스트라쎄 5
아네자 마니쉬 쿠마르
 독일 81373 뮌헨 칠라탈스트라쎄 45a
루돌프 카르스텐
 독일 22301 함부르크 마리아 루이센스트라쎄 112
- (74) 대리인
하영욱

전체 청구항 수 : 총 25 항

(54) 발명의 명칭 **메신저 RNA의 폐전달**

(57) 요 약

본 발명은 폐에 있어서, RNA를 발현하는 방법에 관한 것이고, 여기서, 발현될 mRNA는 폴리에틸렌이민(PEI)과 결합하여 mRNA 및 PEI를 포함하는 결합체를 제공하고; 상기 mRNA 및 PEI를 포함하는 결합체는 폐로 투여되고, 이것이 폐세포로 들어가며; 상기 mRNA는 폐세포에서 발현된다.

특허청구의 범위

청구항 1

발현될 mRNA가 폴리에틸렌이민(PEI)과 결합되어 상기 mRNA 및 PEI를 포함하는 조합물을 제공하는 공정; 상기 mRNA 및 PEI를 포함하는 조합물이 폐로 투여되고, 이것이 폐세포로 들어가는 공정; 및 상기 mRNA가 폐세포에서 발현되는 공정을 포함하는 것을 특징으로 하는 폐에 있어서의 mRNA의 발현방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 폐는 인간 환자의 폐, 바람직하게는 폐 결함을 지닌 인간 환자의 폐, 특히 바람직하게는 서팩턴트 단백질 B(SPБ) 결핍증, ATP-결합 카셋트 서브페밀리 A 멤버 3(ABCA3) 결핍증, 낭포성 섬유증, 알파-1 안티트립신(A1AT) 결핍증, 폐암, 서팩턴트 단백질 C(SPC) 결핍증, 폐포단백질증, 사르코이도시스, 급성 및 만성 기관지염, 폐기종, 맥레오드 증후군, 만성 폐쇄성 폐질환(COPD), 기관지 천식, 기관지 확장증, 진폐증, 석면폐, 급성 호흡 곤란 증후군(ARDS), 유아 호흡 곤란 증후군(IRDS), 폐부종, 호산구성 폐렴, 뢰플러 폐렴, 함만 리치 증후군, 특발성 폐섬유증, 간질성 폐질환, 원발성 섬모운동 이상증, 폐동맥 고혈압(PAH) 및 STAT5b 결핍증; 혈액 응고 결함, 바람직하게는 혈우병 A 및 B; 보체 결함, 특히 단백질 C 결핍증, 혈전성 혈소판 감소성 자반증 및 선천성 혈색소 침착증, 특히 헵시딘 결핍증; 폐감염병, 특히 호흡기 세포융합 바이러스(RSV) 감염, 파라인플루엔자 바이러스(PIV) 감염, 인플루엔자 바이러스 감염, 리노바이러스 감염 및 중증 급성 호흡기 증후군(코로나 바이러스(SARS-CoV) 감염), 결핵, 슈도모나스 녹농균 감염, 버크홀데리아 세파시아 감염, 메티실린 내성 황색 포도상 구균(MRSA) 감염 및 해모필루스 인플루엔자 감염의 군에서 선택되는 폐 결함을 지닌 인간 환자의 폐인 것을 특징으로 하는 폐에 있어서의 mRNA의 발현방법.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 PEI의 분자량은 1kDa-1000kDa이고, 바람직하게는 10kDa-50kDa, 특히 바람직하게는 20kDa-30kDa인 것을 특징으로 하는 폐에 있어서의 mRNA의 발현방법.

청구항 4

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 PEI는 표적 리간드, 바람직하게는 IP1 리셉터 리간드, 더욱 바람직하게는 프로스타사이클린 유사체, 특히 일로프로스트(5-{(E)-(1S, 5S, 6R, 7R)-7-히드록시-6[(E)-(3S, 4RS)-3-히드록시-4-메틸-1-옥тен-6-이닐]-비-시클로[3.3.0]옥탄-3-일리텐}펜탄산) 또는 트레프로스티닐((1R, 2R, 3aS, 9aS)-[2,3,3a,4,9,9a-헥사히드로-2-히드록시-1-[(3S)-3-히드록시옥틸]-1H-벤즈[f]인덴-5-일]옥시]아세트산); 또는 β 2-아데론셉터 리간드, 특히 클렌부테롤, 락토페린, 우론산 또는 렉틴을 포함하는 것을 특징으로 하는 폐에 있어서의 mRNA의 발현방법.

청구항 5

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 mRNA는 낭포성 섬유증 막전위 조절 단백질(CFTR), 서팩턴트 단백질 B(SPБ), ATP-결합 카셋트 서브페밀리 A 멤버 3(ABCA3) 또는 알파-1 안티트립신(A1AT), 서팩턴트 단백질 C(SPC), 에리트로포이에틴, 인자 VIII, 인자 IX, 폰빌레브란트 인자, 과립구 매크로파지 콜로니 자극 인자, ADAMTS 13, 헵시딘, 엔지오텐신 전환 효소 II 또는 바이러스성 및 박테리아성 병원균의 항원을 인코딩하는 것을 특징으로 하는 폐에 있어서의 mRNA의 발현방법.

청구항 6

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 mRNA 및 PEI를 포함하는 조합물은 기관내로, 바람직하게는 에어로졸로서, 특히 바람직하게는 고압 분무에 의해 폐에 투여되는 것을 특징으로 하는 폐에 있어서의 mRNA의 발현방법.

청구항 7

폐에 있어서의 mRNA를 발현하는 방법에 사용되는 mRNA 및 PEI를 포함하는 것을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 8

제 7 항에 있어서,

폐 결함, 특히 서팩턴트 단백질 B(SPB) 결핍증, ATP-결합 카셋트 서브페밀리 A 멤버 3(ABCA3) 결핍증, 낭포성 섬유증, 알파-1 안티트립신(A1AT) 결핍증, 폐암, 서팩턴트 단백질 C(SPC) 결핍증, 폐포단백질증, 사르코이도시스, 급성 및 만성 기관지염, 폐기종, 맥레오드 증후군, 만성 폐쇄성 폐질환(COPD), 기관지 천식, 기관지 확장증, 진폐증, 석면폐, 급성 호흡 곤란 증후군(ARDS), 유아 호흡 곤란 증후군(IRDS), 폐부종, 호산구성 폐렴, 퇴플러 폐렴, 함만 리치 증후군, 특발성 폐섬유증, 간질성 폐질환, 원발성 섬모운동 이상증, 폐동맥 고혈압(PAH) 및 STAT5b 결핍증, 혈액 응고 결함, 특히 혈우병 A 및 B; 보체 결함, 특히 단백질 C 결핍증, 혈전성 혈소판 감소성 자반증 및 선천성 혈색소 침착증, 특히 헵시딘 결핍증; 폐감염병, 특히 호흡기 세포융합 바이러스(RSV) 감염, 파라인플루엔자 바이러스(PIV) 감염, 인플루엔자 바이러스 감염, 리노바이러스 감염 및 중증 급성 호흡기 증후군(코로나 바이러스(SARS-CoV) 감염), 결핵, 슈도모나스 녹농균 감염, 박테리아 세파시아 감염, 메티실린 내성 황색 포도상 구균(MRSA) 감염 및 헤모필루스 인플루엔자 감염의 군에서 선택되는 폐 결함의 치료를 위해 사용되는 것을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 9

제 7 항 또는 제 8 항에 있어서,

상기 PEI의 분자량은 1kDa~1000kDa이고, 바람직하게는 10kDa~50kDa, 특히 바람직하게는 20kDa~30kDa인 것을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 10

제 7 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 PEI는 표적 리간드, 바람직하게는 IP1 리셉터 리간드, 더욱 바람직하게는 프로스타사이클린 유사체, 특히 일로프로스트(5-{(E)-(1S, 5S, 6R, 7R)-7-히드록시-6[(E)-(3S, 4RS)-3-히드록시-4-메틸-1-옥тен-6-이닐]-비-시클로[3.3.0]옥탄-3-일리텐}펜坦산) 또는 트래프로스티닐((1R, 2R, 3aS, 9aS)-[[2,3,3a,4,9,9a-헥사하이드로-2-히드록시-1-(3S)-3-히드록시옥틸]-1H-벤즈[f]인덴-5-일]옥시]아세트산); 또는 β 2-아데론셉터 리간드, 특히 클렌부테롤, 락토페린, 우론산 또는 렉틴을 포함하는 것을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 11

제 7 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 mRNA는 낭포성 섬유증 막전위 조절 단백질(CFTR), 서팩턴트 단백질 B(SPB), ATP-결합 카셋트 서브페밀리 A 멤버 3(ABCA3) 또는 알파-1 안티트립신(A1AT), 서팩턴트 단백질 C(SPC), 에리트로포이에틴, 인자 VIII, 인자 IX, 폰빌레브란트 인자, 과립구 매크로파지 콜로니 자극 인자, ADAMTS 13, 헵시딘, 엔지오텐신 전환 효소 II 또는 바이러스성 및 박테리아성 병원균의 항원을 인코딩하는 것을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 12

제 7 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항에 있어서,

적어도 하나의 플루오로카본을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 13

제 7 항 내지 제 12 항 중 어느 한 항에 있어서,

에어로졸인 것을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 14

제 13 항에 있어서,

상기 에어로졸은 자분, 특히 직경이 5nm 이상-800nm 이하인 자분을 함유하는 것을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 15

제 14 항에 있어서,

상기 자분의 직경은 50nm 이상-750nm 이하, 바람직하게는 100nm 이상-700nm 이하, 보다 바람직하게는 150nm 이상-600nm 이하, 더욱 바람직하게는 200nm 이상-500nm 이하, 특히 바람직하게는 250nm 이상-450nm 이하, 가장 바람직하게는 300nm 이상-400nm 이하인 것을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 16

제 7 항 내지 제 15 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 PEI는 자분과 커플링되는 것을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 17

제 14 항 내지 제 16 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 자분은 금속 및/또는 그들의 산화물 및/또는 수산화물로 이루어지거나, 또는 금속 및/또는 그들의 산화물 및/또는 수산화물을 함유하는 것을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 18

제 17 항에 있어서,

상기 금속은 철, 코발트 또는 니켈로 이루어지는 군에서 선택되고; 상기 산화물 또는 수산화물은 Fe_3O_4 , 감마- Fe_2O_3 , 2가 또는 3가 철 이온과 Co^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Cr^{3+} , Gd^{3+} , Dy^{3+} 또는 Sm^3 의 복산화물 또는 복수산화물, 및 이들의 임의의 혼합물로 이루어지는 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 19

제 14 항 내지 제 18 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 자분을 함유하는 에어로졸은 치료될 기도 및/또는 폐의 영역의 표면상에 자기장에 의해 증착되는 것을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 20

제 19 항에 있어서,

상기 자기장의 전계 강도는 적어도 100mT(밀리테슬라), 적어도 200mT, 적어도 500mT 또는 적어도 1T(테슬라)인 것을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 21

제 19 항 또는 제 20 항에 있어서,

상기 자기장의 자기장 기울기는 $1\text{T}/\text{m}$ 초과 또는 $10\text{T}/\text{m}$ 초과인 것을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 22

제 19 항 내지 제 21 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 자기장은 맥동 자기장, 진동 자기장 또는 맥동-진동 자기장인 것을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 23

제 19 항 내지 제 22 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 자기장은 환자의 호흡에 따라서 동적으로 매칭되고, 흡기 및 호기의 흡기와 호기 사이의 휴지기 동안에만 작동하는 것을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 24

제 7 항 내지 제 23 항 중 어느 한 항에 있어서,

pH가 6.5 미만, 바람직하게는 3-6, 더욱 바람직하게는 4-5.5인 것을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 25

제 7 항 내지 제 24 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물의 25°C에서의 전도도는 10000 µS/cm 이하, 바람직하게는 1000 µS/cm 이하, 특히 100 µS/cm 이하인 것을 특징으로 하는 약제 조성물.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 폐에 있어서 mRNA를 발현하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 메신저 RNA(mRNA)는 중간 캐리어로서 세포핵 중의 DNA로부터의 유전 정보를 세포질로 가져오는 뉴클레오시드로서 아데노신, 시티딘, 우리딘 및 구아노신과 블록을 주로 구축하는 뉴클레오시드 포스페이트로 구성되는 폴리머이고, 이것이 단백질로 번역된다. 따라서 이들이 유전자 발현의 대안으로서 바람직하다.

[0003] 세포에 있어서의 생화학 과정의 해명 및 인간 계놈의 해명은 결실 유전자와 질병간의 관련성을 증명하고 있다. 따라서, 유전자 치료에 의해 결실 유전자로 인한 질병을 치료하는 것이 오랫동안 요구되고 있다. 그 기대는 높아졌지만, 최초 시도는 실패했고, 최근의 진척만이 보고되고 있다. 첫번째 어프로치는 손상되지 않은 유전자의 발현을 달성하기 위해서, 결핍 또는 결실 유전자의 손상되지 않은 DNA를 벡터 중의 세포핵으로 가져오고, 이와 같이 손실 또는 결실된 단백질의 공급으로 이루어지는 유전자 치료이다. 상기 시도는 대부분 성공하지 못했고, 몇몇 성공한 시도는 상당한 부작용이 부담이 되고, 특히, 종양 발생이 증가되었다. 매우 최근에 더욱 유망한 결과가 보고되고 있지만, 여전히 승인에는 시간이 걸린다.

[0004] 또한, 유전자 결함에 기인하지 않는 단백질의 결여 또는 단백질 결함으로 인한 질병이 있다. 또한 이와 같은 경우에 있어서, DNA의 투여에 의해 체내에 관련 단백질을 생성하는 것에 대해서 고려되고 있다. 대사에 관여하고 병리적 또는 비병리적 원인을 파괴하거나 저해하는 인자의 제공은 부작용이 없거나 적은 핵산 치료에 의해 효과를 발휘할 수도 있다.

[0005] 또한, 질병을 야기하는 유전자 결함을 치료하기 위해서, 유전성 질병의 치료에 mRNA의 사용은 이미 제안되어 있다. 이것의 장점은 mRNA가 세포의 세포질로만 도입되어야 하고, 세포핵으로 전위되지 않아야 한다는 것이다. 세포핵으로의 전위는 어렵고 비효율적이고; 더불어 이들의 벡터 또는 일부가 계놈과 조합되는 경우, 염색체 DNA가 변화되는 상당한 위험 부담이 있다.

[0006] 실제로 인비트로 전사된 메신저 RNA가 포유류 조직에서 발현될 수 있지만, 질병의 치료를 위해 mRNA를 사용하려는 시도에 있어서, 다른 장애물이 발생한다는 것이 명백하게 나타나고 있다. 상기 mRNA의 안정성의 결여는 포유류 조직에 있어서, 목적의 단백질을 충분한 양으로 입수할 수 없게 하는데 영향을 준다. 다른 실질적인 단점은 mRNA가 상당한 면역 반응을 일으킨다는 사실로부터 얻어졌다. 이들의 강한 면역 반응은 TLR3, TLR7, TLR8 및 헬리카제 RIG-1 등의 톨형 리셉터와의 결합을 통해 발생한다고 추정된다.

[0007] 면역 반응을 억제하기 위해서, WO 2007/024708 A호 공보에서는 4개의 리보뉴클레오티드 중 하나가 수식 뉴클레오티드로 치환되어 있는 RNA를 사용하는 것이 제안되어 있었다. 특히, 우리딘이 슈도우리딘에 의해 모두 치환되는 경우, mRNA가 어떻게 거동하는지가 연구되고 있었다. 이와 같은 RNA 분자는 현저하게 면역성이 낮은 것이 확인되었다. 또한, 단백질 또는 단백질 단편을 인코딩하는 서열을 지닌 RNA를 사용하는 것이 제안되어 있고, 여기서, 상기 RNA는 5-50%의 우리딘 뉴클레오티드 및 5-50%의 시티딘 뉴클레오티드가 각각 수식 우리딘 뉴클레오티

드 및 수식 시티딘 뉴클레오티드인 수식 뉴클레오티드와 미수식 뉴클레오티드의 조합물을 함유하는 것이다. 이와 같은 RNA 분자는 면역성이 현저하게 낮고, 매우 안정하다는 것이 확인되었다. 또한, 이와 같은 RNA는 마우스에 반복된 기관내 에어로졸 적용에 의해 서팩턴트 단백질 B(SP-B) 결핍을 앓고 있는 마우스의 사망을 억제하는데 사용할 수 있다는 것을 제시하였다. 따라서, 이를 보고는 생명을 위협하는 유전적 폐질환 및 후천적 폐질환을 치료하기 위해 상기 RNA의 가능성을 설명하였고, 미충족 의료 수요(unmet medical need)가 높은 것을 다루고 있다. 그러나, 환자에게 적용하는 것에 대해서는 상기 출원 방법은 임상적으로 사용되는 표준 네뷸라이저를 사용한 RNA 분해 및 필요한 마취로 인하여 반복된 에어로졸 적용에 아직 적합하지 않았다.

[0008] 필수 단백질 또는 유익한 단백질을 신체의 폐에 제공할 수 있거나 RNA에 의해 손실 또는 결핍 단백질로 인한 질환을 치료할 수 있도록 하기 위해서, 환자의 반복 마취를 회피하는 시판의 반복 에어로졸 적용 방법을 갖는 것이 바람직하다. 그러나, 이 때, 상기 방법은 유의 범위로 RNA 효능의 감소를 야기하지 않아야 한다.

[0009] EP 1 173 224 B1에는 인비트로 트랜스펙션과 비교하여, 분무화 공정을 수반하는 종래의 반복 마취의 문제 및 효율성의 현저한 감소를 극복하는데 적합한 폐로의 유전자의 에어로졸 전달을 위하여 폴리에틸렌이민(PEI) 25kDa/DNA 포뮬레이션을 사용하는 것이 제안되어 있다. PEI/DNA 포뮬레이션은 제트 네뷸라이저 유도된 트랜스펙션 효율의 감소에 저항력이 있고, 제트 네뷸라이저에 의해 체내로 운반되는 경우, 종래의 최적화된 액상 포뮬레이션보다 우수하다. 구체적으로는 EP 1 173 224 B1에는 각각의 기도를 통해 작은 입자 에어로졸에 의하여 폴리에틸렌이민과 복합화된 유전자 거대분자의 수성 분산액을 운반하는 공정을 포함하는 기도를 통한 유전자 치료 등의 표적 치료의 방법이 기재되어 있다. 상기 발명의 방법에 따른 유전자 거대 분자의 대표예로는 DNA, RNA 및 기타 핵산종이 포함된다. 그러나, 상기 발명은 DNA 전달이 포함된 실시예만이 행해지고 있고, mRNA에 대해서는 언급되어 있지 않다. 또한, PEI와 목적의 유전자를 인코딩하는 플라스미드 DNA의 복합체는 PBS에 용해된 적당량의 PEI와 물에 용해된 플라스미드 DNA를 혼합함으로써 형성되었다. 그러나, Rudolph et al. (Mol Ther. 2005, 12: 493-501)은 마우스 폐에 있어서, 등장의 5% 글루코오스 또는 Hepes 완충 식염수 중의 것보다 저침투압 중류수에 회합되고 분무되는 경우의 PEI-DNA 복합체는 57배 및 185배 높은 발현도가 얻어진다고 기재되어 있다. 놀랍게도, PBS에서 회합되고 분무되는 경우의 PEI-DNA 복합체는 전부 효력이 없었다. 주로, 이것은 PBS에서 포뮬레이팅된 PEI 유전자 벡터는 동적으로 불안정한 큰 직경($848 \pm 142\text{nm}$)이 되어 침전을 초래한다는 사실에 기인했다. 또한, 기도부내 삽관을 통하여 마우스의 폐로 직접 가해진 동일 벡터의 140배 큰 투여량($50\mu\text{g}$) 보다 15배 큰 PEI(얻어진 트랜스펙션도)와 복합화된 나노그램량의 pDNA(350ng)가 에어로졸화된다는 것이 확인되었다.

[0010] 또한, Bettinger et al. (Nucleic Acid Res. 2001, 29:3882-91)은 폴리에틸렌이민(분기상 PEI 25 및 직쇄상 PEI 22kDa), 폴리(L-리신)(PLL, 54kDa) 또는 텐드리머에 기초한 리포플렉스이지만, 폴리플렉스가 아닌 것이 트랜스펙팅된 B16-F10의 mRNA의 효율적인 번역을 가능하게 한다고 설명하였다. 무세포 번역 분석에서의 PEI 25kDa/mRNA 또는 PLL 54kDa/mRNA에 의한 발현의 결핍 및 Rat 1세포로의 하기 세포질 주입은 이를 폴리플렉스가 너무 안정하여 mRNA를 방출하지 않는 것을 나타내었다. mRNA 및 트랜스펙션 작용제간의 정전 상호 작용의 강도가 열역학적으로 안정한 폴리플렉스 벡터, 예를 들면, PEI-mRNA가 mRNA 번역에 다소 적합하지 않으면서, 달성된 발현 레벨에 현저한 영향을 갖는다고 기재되어 있다. 보다 짧은 다가 양이온을 사용함으로써 캐리어 및 mRNA 간의 정전 상호 작용을 감소시키는 것은 저분자량 PEI 및 PLL을 사용하여 형성된 mRNA 폴리플렉스가 DOTAP/mRNA 보다 5배 큰 루시페라아제 발현도를 달성하면서, 주요 발현에서의 상승을 제공한다. 그러나, 저분자량 다가 양이온을 사용하여 형성된 폴리플렉스는 그들의 엔도소몰리티 활성을 상실하고 클로로퀸을 mRNA 발현을 가능하게 하는데 요구하였다. 엔도소몰리시스는 저분자량 PEI와 막활성 펩티드 멜리틴을 공액하여 회복시키고, 클로로퀸의 부재 하에 높은 mRNA 발현도가 증명되었다. 이를 관찰은 모두 양이온선 폴리머와 결합한 단쇄 mRNA가 pDNA 보다 대체로 강하다는 것을 설명한다. 또한, 이것은 핵진입, 전사 및 성공적인 트랜스진 발현의 전제 조건으로서 양이온성 폴리머로부터의 pDNA 방출에 있어서, 사이토솔릭 RNA가 포함된다는 것을 제창한 Huth 등(J. Gene Med. 2006, 8: 1416-1424)에 의해 확인되고 있었다. 결론적으로, 이를 견해는 PET 25kDa가 세포로 기능성 mRNA 전달을 중재할 수 없다는 것을 제시하였다.

[0011] 삽관법을 포함하는 연속 반복 치료가 삶의 질 요구와 양립할 수 없으므로, 본 발명을 기초로 한 과제는 mRNA에 의해 인코딩된 단백질의 폐 발현에서 얻어진 메신저 mRNA의 폐전달을 위한 유연하고 비침입성인 방법을 제공하였다.

[0012] 종래 기술은 mRNA의 폐전달을 위한 비침입성 방법이 결여되어 있었다.

발명의 내용

[0013] 따라서, 본 발명의 목적은 폐내에 인코딩된 단백질의 유효한 레벨의 제조로 얻어지는 비침입성 폐 적용을 통해

mRNA 치료제를 전달하는 방법을 제공하는 것이다.

[0014] 따라서, 본 발명은,

- 발현되는 mRNA는 폴리에틸렌이민(PEI)과 결합하여 상기 mRNA 및 PEI를 포함하는 조합물을 제공한다;

[0016] - 상기 mRNA 및 PEI를 포함하는 조합물은 폐에 투여되고, 이것은 폐세포로 들어간다.

[0017] - 상기 mRNA는 폐 세포에서 발현되는 폐에 있어서의 mRNA를 발현하는 방법을 제공한다.

[0018] 특히, 본 발명은 인간 의약 용도에 적합하다. 따라서, 본 발명에 따라서 치료되는 폐는 인간 환자의 폐인 것이 바람직하고, 폐결합, 특히 서팩턴트 단백질 B(SP-B) 결핍증, ATP-결합 카셋트 서브페밀리 A 멤버 3(ABCA3) 결핍증, 낭포성 섬유증, 알파-1 안티트립신(A1AT) 결핍증, 폐암, 서팩턴트 단백질 C(SPC) 결핍증, 폐포단백질증, 사르코이도시스, 급성 및 만성 기관지염, 폐기종, 맥로오드 증후군, 만성 폐쇄성 폐질환(COPD), 기관지 천식, 기관지 확장증, 진폐증, 석면폐, 급성 호흡 곤란 증후군(ARDS), 유아 호흡 곤란 증후군(IRDS), 폐부종, 호산구 성 폐렴, 뢰플러 폐렴(Loeffler's pneumonia), 함만 리치 증후군(Hamman-Rich syndrome), 특발성 폐섬유증, 간질성 폐질환, 원발성 섬모운동 이상증, 폐동맥 고혈압(PAH), STAT5b 결핍증 군에서 선택되는 폐결합을 지닌 인간 환자가 바람직하다.

[0019] 또한, 인간 환자의 폐는 에리스로포이에틴, 혈우병 A 및 B 등의 응고 이상, 단백질 C 결핍증, 혈전성 혈소판 감소성 자반증(TTP, ADAMTS 13 결핍증) 및 선천성 혈색소증(예를 들면, 헵시딘 결핍증) 등의 보체 결합으로 폐 세포로부터 mRNA에 의해 발현되는 단백질을 분비하는 바이오 리액터의 역할을 한다.

[0020] 또한, 폐세포로부터의 mRNA의 발현은 호흡기 합포체 바이러스(RSV) 감염, 파라인플루엔자 바이러스(PIV) 감염, 인플루엔자 바이러스 감염, 리노바이러스 감염 및 중증 급성 호흡기 증후군(코로나 바이러스(SARS-CoV)) 감염과 같은 폐의 전염병, 결핵, 슈도모나스 녹농균 감염, 버크홀테리아 세파시아 감염, 메티실린 내성 황색 포도상 구균(MRSA) 감염 및 헤모필루스 인플루엔자 감염에 대한 백신 접종에 사용될 수도 있다. 이러한 백신 접종 용도를 위해서, 상기 전달된 mRNA는 하나 이상의 병원체의 항원을 인코딩한다.

[0021] 통상, 본 발명의 과정 중에 투여되는 PEI는 중요한 것은 아니지만(Morimoto et al., Mol. Ther. 7(2003), 254-261)), 본 발명의 공정내에서는 분자량 1kDa~1000kDa, 바람직하게는 10kDa~50kDa, 특히 바람직하게는 20~30kDa인 PEI를 사용하는 것이 바람직하다.

[0022] 본 발명의 바람직한 실시형태에 따라서, 상기 PEI는 표적 리간드, 바람직하게는 IP₁ 리셉터 리간드, 더욱 바람직하게는 프로스타사이클린 유사체, 특히 바람직하게는 일로프로스트(5-{(E)-(1S,5S,6R,7R)-7-히드록시-6[(E)-(3S, 4RS)-3-히드록시-4-메틸-1-옥坦-6-이닐]-비시클로[3.3.0]옥坦-3-일리덴}펜탄산) 또는 트레프로스티닐((1R, 2R, 3aS, 9aS)-[[2,3,3a,4,9,9a-헥사하이드로-2-히드록시-1-[{(3S)-3-히드록시옥틸}-1H-벤즈[f]인덴-5-일]옥시]아세트산); 또는 β₂-아드레노셉터 리간드, 특히 클렌부테롤(Elfinger et al., J. Control. Release 2009, 135: 234-241), 락토페린(Elfinger et al., Biomaterials 2007, 28: 3448-3455), 우론산(Weiss et al., Biomaterials 2006, 27: 2302-2312), 또는 헥틴(Bies et al., Adv. Drug Deliv. Rev. 2004, 56: 425-435)을 포함한다.

[0023] 폐세포, 특히 기관지 또는 폐포 상피 세포로 특정 표적의 PEI계 약제 포뮬레이션을 전달하기 위해서, IP₁ 리셉터 리간드, 더욱 바람직하게는 프로스타사이클린 유사체의 사용이 공지되어 있고, WO 2011/076391 A1에 의해 시판되고 있다.

[0024] 본 발명의 다른 방법에 의해, 의료 혜택을 갖는 폐세포로 mRNA, 특히 폐 또는 환자에 대하여 병원성 영향을 갖는 유전자를 치환, 전복, 상쇄 또는 억제하는 mRNA를 전달하는 것이 바람직하다. 특히, 폐세포 내의 결합 유전자를 치환하는 mRNA를 전달하는 것이 바람직하다. 따라서, 본 발명의 바람직한 실시형태는 mRNA를 낭포성 섬유증 막진위 조절 단백질(CFTR), 서팩턴트 단백질 B(SP-B), ATP-결합 카셋트 서브페밀리 A 멤버 3(ABCA3) 또는 알파-1 안티트립신(A1AT), 서팩턴트 단백질 C(SPC), 과립구 매크로파지 콜로니 자극 인자, 에리트로포이에틴, 인자 VIII, 인자 IX, 폰빌레브란트 인자, ADAMTS 13, 헵시딘, 엔지오텐신 전환 효소 II 또는 바이러스성 및 박테리아성 병원균의 항원을 인코딩하는 방법 및 조성물이다.

[0025] 또한, 본 발명은 폐에서 mRNA를 발현하는 방법에 사용되는 mRNA 및 PEI를 포함하는 약제 조성물에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명에 따른 약제 조성물은 폐결합, 특히 서팩턴트 단백질 B(SP-B) 결핍증, ATP-결합 카셋트 서브페밀리 A 멤버 3(ABCA3) 결핍증, 낭포성 섬유증, 알파-1 안티트립신(A1AT) 결핍증; 폐암, 서팩턴트 단백질

C(SPC) 결핍증, 폐포단백질증, 사르코이도시스, 급성 및 만성 기관지염, 폐기종, 맥레오드 증후군, 만성 폐쇄성 폐질환(COPD), 기관지 천식, 기관지 확장증, 진폐증, 석면폐, 급성 호흡 곤란 증후군(ARDS), 유아 호흡 곤란 증후군(IRDS), 폐부종, 호산구성 폐렴, 뇌풀러 폐렴, 함만 리치 증후군, 특발성 폐섬유증, 간질성 폐질환, 원발성 섬모운동 이상증, 폐동맥 고혈압(PAH) 및 STAT5b 결핍증 군에서 선택되는 폐결함, 혈액 응고 결함, 특히 혈우병 A 및 B; 보체 결함, 특히 단백질 C 결핍증, 혈전성 혈소판 감소성 자반증 및 선천성 혈색소 침착증, 특히 헵시딘 결핍증; 폐감염병, 특히 호흡기 세포융합 바이러스(RSV) 감염, 파라인플루엔자 바이러스(PIV) 감염, 인플루엔자 바이러스 감염, 리노바이러스 감염 및 중증 급성 호흡기 증후군(코로나 바이러스(SARS-CoV)) 감염, 결핵, 슈도모나스 녹농균 감염, 버크홀데리아 세파시아 감염, 메티실린 내성 황색 포도상 구균(MRSA) 감염 및 헤모필루스 인플루엔자 감염의 치료에 적합하다.

[0026] 또한, 본 발명에 따른 바람직한 약제 조성물은 적어도 하나의 플루오로카본을 포함한다. 일반적으로 퍼플루오로 카본을 갖는 에어로졸 치료는 퍼플루오로카본의 분자 구조 및 증기압으로부터 각각 개선된 가스 교환 및 감소된 폐 염증 반응을 나타낸다. 증기압 및 분자 구조의 차이가 최적의 복용 전략이 변경되는 것을 설명할 수 있지만, 에어로졸 치료를 위해서, 여러 다른 퍼플루오로카본, 주로 예를 들면 퍼플루오로시클로에테르(FC77), 퍼플루오로옥틸브로미드 또는 퍼플루오로트리부틸아민(FC43)이 바람직한 것이 확인되었다.

[0027] 따라서, 본 발명은 에어로졸로서 제공된다. 바람직한 실시형태에 있어서, 폐내 투여를 목적으로 하는 본 발명에 따른 약제 조성물은 퍼플루오로카본과 결합되고, 이것은 트랜스팩션 효율성을 증가시키기 위해서, 미리 투여되거나 또는 약제 조성물과 동시에 투여된다.

[0028] 바람직한 실시형태에 있어서, 본 발명에 따른 상기 mRNA/PEI 조합물은 예를 들면, 흡입에 의해 폐를 통하여 흡수하는데 적당한 형태로 제공된다. 이것을 위한 바람직한 제제는 당업자에게 있어서 공지이다. 이 경우, 조제는 예를 들면, 분무를 위한 액체 또는 분말로서 통상의 네뷸라이저 또는 흡입기를 통하여 기도로 도입될 수 있는 형태이다. 액체로서의 투여를 위한 장치는 공지이고, 노즐 제트 네뷸라이저에 비하여 낮은 전단력으로 작동되는 천공의 진동막을 지닌 네뷸라이저 또는 초음파 네뷸라이저가 바람직하다. 또한, 분말상 에어로졸이 바람직하다. PEI와 복합화된 mRNA는 호흡 가능한 크기로 분쇄되고, 생물학적 활성을 나타낼 수 있는 분말로서 당 수크로오스와 동결 건조된 후에 이용할 수 있다.

[0029] 상기 mRNA/PEI 조합물은 고압 분무에 의해 에어로졸로서 기관내에 투여되는 것이 바람직하다.

[0030] 본 발명의 구체적으로 바람직한 실시형태에 있어서, 약학 조제는 자분(magnetic particles)을 함유하는 에어로졸로서 제공되고, 특히, 상기 자분을 함유하는 에어로졸은 상기 mRNA/PEI 조합물과 함께 5nm 이상-800nm 이하의 직경을 갖는 조제이다(EP 1 924 244 A). 통상, 상기 자분의 직경은 50nm 이상-750nm 이하이고, 바람직하게는 100nm 이상-700nm 이하이고, 보다 바람직하게는 150nm 이상-600nm 이하이고, 더욱 바람직하게는 200nm 이상-500nm 이하이고, 특히 바람직하게는 250nm 이상-450nm 이하이고, 가장 바람직하게는 300nm 이상-400nm 이하이다.

[0031] 바람직한 실시형태에 따라서, 상기 PEI는 에어로졸의 자분과 결합된다.

[0032] 바람직하게는, 본 발명에 따른 자분을 함유하는 에어로졸은 금속 및/또는 이들의 산화물 및/또는 수산화물로 이루어지거나 이들을 포함한다. 바람직한 실시형태에 따라서, 상기 자분은 금속으로 이루어지거나 이들을 포함하고, 철, 코발트 또는 니켈, Fe_3O_4 , 감마- Fe_2O_3 등의 자철 산화물 또는 수산화물, 2가 또는 3가 철 이온과 Co^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Cr^{3+} , Gd^{3+} , Dy^{3+} 또는 Sm^{3+} 등의 다른 2 또는 3가 금속 이온의 복산화물 또는 복수산화물, 및 이들의 임의의 혼합물로 이루어지는 군에서 선택된다.

[0033] 자성 입자를 함유하는 상기 에어로졸을 적용함에 있어서, 상기 자성 입자를 함유하는 에어로졸은 치료될 기도 및/또는 폐의 영역의 표면 상에 자기장에 의해 증착될 수 있다. 바람직하게는 상기 자기장의 전계 강도는 적어도 100mT(밀리테슬라), 적어도 200mT, 적어도 500mT 또는 1T(테슬라)이다. 바람직하게는 상기 자기장의 자기장 기울기는 1T/m 보다 크거나 또는 10T/m 보다 크다. 본 방법의 바람직한 실시형태에 따라서, 상기 자기장은 맥동 자기장, 진동 자기장 또는 맥동-진동 자기장이다. 바람직하게는 상기 자기장은 환자의 호흡에 따라서 동적으로 매칭되고, 흡기 및 호기의 흡기와 호기 사이의 휴지기 동안에만 작동한다(EP 1 924 244 A).

[0034] 특히 바람직하게는 단백질 또는 단백질 단편을 인코딩하는 mRNA를 포뮬레이팅하는데 PEI 25kDa가 사용되고, 상기 포뮬레이션은 중류수로 제조되고, 제트 네뷸라이저를 사용하여 폐에 에어로졸로서 적용된다.

[0035] 구체적으로 본 발명의 바람직한 실시형태는 낮은 pH 및 낮은 전도도를 갖는 수성 베퍼 및 용제를 사용하여 제조

된다. PBS 버퍼의 pH는 7.4이고, 전도도는 $16,500 \pm 500 \mu\text{S}/\text{cm}$ (25°C)이다. 놀랍게도, 본 발명에 따른 조성물의 mRNA는 낮은 전도도 및/또는 낮은 pH의 용액이 사용되면, 안정성이 증가하는 것을 나타낸다. 예를 들면, 가압 살균된 초순수의 전도도는 $1 \pm 0.2 \mu\text{S}/\text{cm}$ 이고(미국 약전에서의 전도도의 상한은 25°C 에서 1.3을 요구한다), pH는 5.0-7.0이다. $0.2\text{ }\mu\text{m}$ 필터로 여과된 수돗물의 전도도는 $300 \pm 5 \mu\text{S}/\text{cm}$ 이다. 본 발명의 바람직한 실시형태에 있어서, PBS 버퍼 보다 낮은 pH 및 낮은 전도도를 지닌 수성 버퍼 및 용제가 사용된다. 따라서, 본 발명에 따른 약제 조성물의 pH는 6.5 미만, 바람직하게는 3-6, 더욱 바람직하게는 4-5.5이고, 25°C 에서의 전도도(즉, 25°C 전도도)는 $10000 \mu\text{S}/\text{cm}$ 이하, 바람직하게는 1000 이하, 특히 바람직하게는 100 이하이다. 구체적으로 예를 들면, 바람직한 실시형태는 미국 약전에서 규정하는 바와 같이, 약학적으로 허용 가능한 물(주사용 종류수)(PBS 등의 버퍼 대신에)을 함유한다.

[0036] 물론, 본 발명에 따른 약제는 약학적으로 허용 가능한 캐리어 및/또는 보조 화합물, 특히, 인간 폐로 전달되는 에어로졸 조성물에 일반적으로 제공되는 화합물을 더 함유할 수 있다.

[0037] 높은 트랜스펙션 효율성으로 인하여 유전자 치료 분야에 있어서, 복제 결핍 바이러스가 가장 성공적으로 사용되고 있다. 그러나, 소망하지 않는 면역 반응의 유도 및 삽입 돌연변이 생성의 위험성은 이들의 안전한 적용을 위해 여전히 매우 중요하게 남아 있다. 한편, 이들의 유전자 도입의 효율성이 바이러스 벡터보다는 수배 낮지만, 안전한 대안으로서 플라스미드 DNA(pDNA) 전달을 위해서 핵으로의 pDNA의 불충분한 수송에 현저하게 기여하고 있는 비바이러스 벡터가 예의 검토되고 있다. 최근, pDNA 대신에 메신저 RNA(mRNA)가 비바이러스 유전자 전달 분야에서 매력적이고 유망한 대안으로서 알려지고 있다. 상기 전략은 pDNA에 비하여 수개의 장점을 겸비하고 있다: i) mRNA가 세포질에 있어서 그 기능을 발휘하기 때문에 pDNA의 주된 장애물인 핵막이 회피될 수 있다; ii) 삽입 돌연변이 유발의 위험성이 배제될 수 있다; iii) 효율적인 프로모터의 결정 및 사용이 생략된다; iv) 반복 적용이 가능하다; v) mRNA가 비분열 세포에서도 효과적이다; vi) 벡터 유도된 면역원성이 억제될 수 있다.

[0038] mRNA에 기초한 유전자 도입 비하클은 유전자 질환의 잠재적 치료 또는 (항종양) 백신 접종을 위한 DNA로 이루어지는 비하클의 매력적인 대안으로서 부각되고 있다. 1단계에서 전체 항원의 모든 에피토프를 전달하고 정제 및 조작을 보다 용이하게 할 수 있으므로 암면역 요법에 있어서, 이들의 성공적 사용이 입증되고 있다. 또한, 이 전략은 mRNA가 계놈으로 통합되지 않고, 트랜스펙션이 일시적으로 잔존하기 때문에 약학 안전성의 관점에서 수개의 장점을 갖는다. 수지상 세포(DCs)로의 전달과 결합된 만능 항원을 인코딩한 mRNA는 암환자의 면역 반응을 유도하는데 확실하고 유망한 어프로치이다.

[0039] 종래, 플라스미드 DNA(pDNA)는 비바이러스성 유전자 도입에 주로 사용되고 있었다. 그러나, 분열하지 않은 포유류 세포로는 거의 트랜스펙팅할 수 없고, 게다가 박테리아성 비메틸화된 DNA CpG 모티프는 톤형 리셉터 9(TLR 9)를 통하여 강한 면역 반응을 유도한다. 예를 들면, 1-10%의 DCs만이 전기 천공법, 양이온 폴리머 또는 양이온 지질에 의해 트랜스펙팅된다. 한편, mRNA의 전기 천공법에 의한 트랜스펙션 효율성은 트랜스펙팅된 세포가 95% 까지 도달된다고 공지되어 있다. 이들 의견은 대부분의 mRNA가 핵으로 수송되지 않아야 하기 때문에 pDNA 운반에 비하여 상기 mRNA 운반이 매우 효과적이라고 주장한다. 따라서, 빠르고 매우 높은 단백질 발현이 보고되고 있다.

[0040] 비바이러스성 유전자 도입을 위한 mRNA의 사용에 대해 상술한 장점이 과장되었을지라도 mRNA는 진핵 세포에서 메틸화를 포함한 대략 13개의 다른 뉴클레오시드가 수식되고, 인비트로 전사 mRNA는 TLR3, TLR7 및 TLR8에 의해 영향을 받은 강한 면역 반응을 야기하고, 이것은 성공적인 인비보 적용을 위한 주요 과제를 나타내는 것임을 주목해야 한다. 그러나, 후술하는 바와 같이, 수식 뉴클레오시드는 이들 면역 자극 효과의 감소의 원인이 될 수 있다.

[0041] 진핵 세포에서의 성숙한 mRNA는 5개의 중요 부분으로 이루어진다: 캡 구조([m7Gp3N(N: 임의의 뉴클레오티드, 5'비해석 부위(5UTR), 오픈 리딩 프레임(ORF), 3' 비해석 부위(3'UTR), 및 100-250개 아데노신 잔기의 태일(폴리(A) 태일). 인비트로 전사된 mRNA는 T7, SP6 또는 T3 등의 박테리오파지 프로모터를 은닉하는 플라스미드 DNA로부터 얻어질 수 있다. 통상, 인비트로 전사는 시판의 키트를 사용하여 충분한 양의 기능성 mRNA를 얻는 기술이다. 종래, 실현 가능성 및 기술 개량이 매우 개선되고 있다.

[0042] 1/3-1/2의 상기 캡은 인비트로 전사 동안에 이들을 캡결합 단백질, 진핵 세포 개시 인자 4E(eIF4E)로 인식할 수 없도록 역배향으로 결합되는 것을 확인하였다. 정상의 캡 구조 대신에, 정상 캡의 3'OH기가 제거되거나 OCH₃로 치환된 안티 리버스 캡 유사체(ARCA), m₂^{7,3'} Gp₃G 및 m⁷3'dGp₃G 잘못된 배향에 있어서의 캡 결합을 회피할 수 있는 것을 발견하였다. 이어서, ARCA에 대한 다수의 수식이 보고되고 있다. 흥미롭게도, C3' 위치 및 C2' 위치에

서의 수식은 연결성을 억제한다는 것을 발견하였다. 또한, 테트라포스페이트 ARCA는 다른 캡 유사체보다 더욱 효율적으로 트랜스레이션을 촉진할 수 있다. 그 결과, 인비트로 ARCA-캡트 전사(ARCA-mRNA)는 토끼 망상 적혈구 용해질의 정상의 캡트 전사(CAP-mRNA)에 비하여 현저하게 높은 트랜스레이션 효율성을 나타내었다. 또한, α - β -연결기 또는 β - γ -연결기에서 가교 산소가 각각 메틸렌기로 치환된 $m_2^{7,3'}$ Gpp_{CH2}pG 또는 $m_2^{7,3'}$ Gp_{CH2}ppG는 인비트로 외피 제거 효소 중 하나인 Dcp2에 의해 내가수분해성이고, mRNA 안정성이 증가되는 것을 발견하여 보고되고 있다(Grudzien et al., 2006. J Biol Chem, 281, 1857-67). 그러나, $m_2^{7,3'}$ Gpp_{CH2}PG는 $m_2^{7,3'}$ Gp₃G에 비하여 eIF4E에 대해 52-68%의 친화성만이 나타났다. 최근, ARCA(S-ARCA)의 포스포로티오에이트는 안정화되었고, 트랜스레이션의 효율성이 개선되었다는 것이 보고되었다. ARCA, $m_2^{7,2'}$ Gpp_SpG(D2)의 β -포스페이트 부위에서의 비가교 산소의 황치환으로 캡핑된 루시페라아제(luc) mRNA는 정상 캡보다 더욱 효율적으로 5.1 배 트랜스레이팅되었다. 다른 부분 이성질체 형태(D1)는 2.8배 더 높은 트랜스레이션 효율성을 나타내었다. S-ARCA와 ARCA간의 트랜스레이션의 효율성에 유의한 차이는 없었다. 그러나, D2(257분)에서의 $t_{1/2}$ 은 정상 캡(86분) 또는 ARCA(155분)에 비하여 매우 연장되는 것이 확인되었다. 따라서, 상기 포스포로티오에이트는 내가 수분해성에 기여하는 것으로 생각된다.

[0043] 상기 폴리(A) 태일은 mRNA 트랜스레이션과 안정성 모두에 있어서 중요한 역할을 한다. 상기 폴리(A) 태일은 폴리아데노실 결합 단백질(PABP)과 연결된다. PABP는 eIF4G의 N-말단과 상호작용하고, 이것은 mRNA 환상화를 유도한다. 또한, 상기 폴리(A) 태일은 다수의 PABPs를 연결할 수 있고, 이것의 eIF4G와의 상호 작용은 상기 캡 구조에 대한 eIF4G의 친화성을 증가시킨다. 상기 캡-폴리(A) 상호 작용은 mRNA 5' 및 3' 말단간의 물리적 상호작용으로부터 협조적으로 얻어진다. 상기 폴리(A) 태일이 제거되거나 또는 12개 미만의 잔기로 단축화되면, mRNA의 분해는 5'캡 구조의 분열 및 5'-3' 엑소뉴클레오티드 소화 또는 5'-3' 분해를 통해 발생한다. 이들 결과는 상기 폴리(A) 태일은 mRNA의 분해뿐만 아니라 디캡핑을 억제하는데 매우 중요하다는 것을 설명한다. 인비트로 전사를 위해, 상기 템플릿 플라스미드 DNA는 폴리(d(A/T)) 태일을 함유하지만, 폴리(A) 폴리머라아제에 의해 포스트폴리아데닐화(post-polyadenylation)될 수 있다. 그러나, 이 경우, 폴리(A) 태일의 길이는 변동이 매우 낮게 유지되지만, 반응에서 반응으로, 또한 하나의 어프로치내에서 변동될 수 있다.

[0044] 흥미롭게, 캡핑된 폴리아데닐화 mRNA 트랜스레이션이 트랜스내의 외생 폴리(A)의 첨가에 의해 억제되었지만, 임의의 폴리(A) 농도하에서 캡핑된 논폴리아데닐화 mRNA의 트랜스레이션이 상당히 자극된다고 보고되고 있었다. 그러나, 토끼 망상 적혈구 용해질의 트랜스 중의 10-180개의 잔기로 이루어지는 외생 폴리(A)의 첨가는 100개의 아데노신 잔기 폴리(A) 태일 11배로 캡핑된 mRNA의 트랜스레이션을 자극하였다. 15-600개 잔기 범위의 폴리(A) 태일의 첨가는 리포트션을 사용한 ARCA-luc mRNA-A100의 코트랜스펙션에 의해 2.3배 자극의 단백질 발현이 얻어졌다.

[0045] 또한, 캡 구조와 폴리(A) 태일은 모두 단백질 발현도에 각각 기여한다고 보고되어 있다. ARCA-luc mRNA-A64 또는 100의 루시페라아제 활성은 마우스 수지상 세포(JAWSII)의 리포트션을 사용한 CAP-luc mRNA-A64 또는 100보다 25배 및 50배 각각 높은 것을 나타냈다. 또한, ARCA-luc mRNA-A100은 CAP-luc mRNA-A64보다 700배 높은 루시페라아제 활성을 나타냈다. 따라서, 수식 캡 구조, ARCA와 결합된 긴 폴리(A) 태일은 수지상 세포에서의 발현 효율성이 크게 개선된다.

[0046] 이것은 루시페라아제 활성만이 단백질 발현도를 간접적으로 측정하는 효소 반응의 본질에 있고, 이것은 트랜스레이션 효율성에 대한 실질적인 효과가 측정되어야 하는 것을 의미한다. 폴리(A) 태일(A0, A20, A40, A60, A80 및 A100)의 길이가 수지상 세포 및 다른 세포 형태에서의 발현도에 영향을 미치는지의 여부를 실험하였다. 흥미롭게도, 상기 트랜스레이션 효율성이 A60 이하의 길이를 갖는 폴리(A) 태일을 사용하여 증가되었고, 이어서 UMR-106, 래트의 조골세포 유사 골육종 세포주에서의 폴리(A) 태일 길이가 증가함에 따라서 감소하는 것을 발견하였다. 따라서, 트랜스레이션에서의 폴리(A)의 길이의 영향은 세포 형태의 조건성일 수 있었다.

[0047] 또한, 수지상 세포의 안정성 및 번역 효율성에 대한 mRNA 수식의 영향이 조사되었다. i) 폴리(A)의 길이를 A120으로 연장; ii) 템플릿 플라스미드 벡터의 선형화를 행하는 경우, (A) 태일의 3' 말단에서의 오버행을 회피하고 프리엔딩 폴리(A) 태일을 얻도록 SapI 및 BpuI 등의 타입 IIS 제한 효소의 사용; (iii) ORF 및 폴리(A) 태일 사이에 클로닝된 인간 β -글로빈 유전자의 2개의 서열 3'UTR에 의해 mRNA의 안정성 및 번역 효율성을 증가시키도록 각종 중요 인자가 발견되었다.

[0048]

다양한 트랜스펙션 제제가 mRNA를 전달하는 그들의 능력에 대해 평가되었다. 현재, 대부분의 간행물은 mRNA 트랜스펙션을 위해 리포플렉스를 제안하고 있지만, 폴리에틸렌이민(PEI, 25 및 22kDa)에 기초한 폴리플렉스는 다소 열악한 결과를 초래한다. 그러나, DEAE-덱스트린, 폴리(L-리신) 및 텐드리머가 인비트로 세포로 mRNA를 트랜스펙팅할 수는 있지만, 다가 양이온의 사용은 문헌에 드물게 기재되어 있다.

[0049]

양이온성 지질을 사용한 포유류 세포에서의 mRNA 운반의 타당성은 1980년대 후반에 이미 설명되었다. 리포솜(리포펙틴)에 결합된 합성 양이온성 지질인 DOTMA는 인비트로에서 다른 세포주로 mRNA를 트랜스펙팅하는데 효율적으로 사용되고 있었다. 다른 양의 사용된 mRNA는 루시페라아제 활성의 선형 반응을 얻었다. 현재, DOTAP는 가장 효율적이고, 가장 널리 사용되는 양이온성 지질이고, 인비트로 및 인비보 모두에서의 mRNA 전달 용도에 있어서, 비교적 저렴하고 효율적인 것으로 여겨진다. 또한, 양이온성 폴리머는 mRNA 트랜스펙션에 사용되어도 좋다. 환원성 다가 양이온에 기초한 임의의 합성 벡터는 25kDa PEI의 mRNA 트랜스펙션 효율성을 훨씬 초과한다. 그러나, 이들 수식 벡터가 인비보를 위해 직접 사용될 수 있으면, 유전자 도입은 연구되어야 한다. 트랜스펙션 메카니즘에 대해서, 양이온성 폴리머 또는 지질간의 결합 강도가 mRNA 발현 효율성에 영향을 주는 주요 파라미터 중 하나를 나타내는 것을 발견하였다. 플라스미드 DNA 전달에 효과적이고, mRNA와 견고하게 결합되는 분기상 PEI 25kDa 및 직쇄상 PEI 22kDa 등의 양이온성 폴리머가 검지할 수 있는 발현은 얻어지지 않는 반면에, DOTAP와 유사한 화학적으로 연결된 멜라틴 또는 클로로퀸 등의 엔도소몰리티ック 작용제의 존재 하에 저분자량 PEI 2kDa는 mRNA를 다소 열악하게 결합하지만 고발현도를 유도한다. 이들 결과는 양이온성 폴리머와 결합한 단사 mRNA가 pDNA 결합보다 강한 것을 설명한다. 이것은 핵이행 및 전사에 대한 전제 조건으로서, 양이온성 폴리머로부터 방출된 pDNA에 시토졸 RNA가 포함된다는 것을 시사하였다. 따라서, mRNA 전달을 위한 신규한 양이온성 폴리머의 설계는 핵산 결합 강도를 주의 깊게 설명해야 하고, pDNA 전달을 위해 사용되는 유효한 양이온성 폴리머가 mRNA 전달에는 적합하지 않을 수 있다.

[0050]

폴리머 및 리포좀 벡터 시스템을 제외한, 최근에 유명하게 된 다른 주목을 끄는 주장은 전기 천공법의 사용이다. 인간 조혈성 세포 및 인간 배아 줄기 세포에서의 50-90% 트랜스펙션 효율성을 얻은 외생 RNA의 전달을 위한 프로토콜이 개발되고 있다. mRNA가 핵으로 들어갈 수 없기 때문에, 세포 독성을 감소시키는 약한 전기 펄스가 가해질 수 있다. 전기 천공법의 다른 장점은 RNA가 시토졸로 바로 이동되고, 따라서 미소망의 면역 반응을 초과할 수 있는 본래의 RNA 리셉터에 의해 감지될 가능성이 없다.

[0051]

박테리아성 DNA의 인비보 적용은 특히, 비메틸화 CpG 모티프를 통해 강한 면역 반응을 일으킨다고 공지되어 있다. 온화한 사이토카인 반응만을 유도하는 네이키드(naked) DNA에 대하여, 양이온성 지질을 지닌 그들의 복합체는 강한 사이토카인 반응을 일으킨다. 양이온성 지질의 투여 루트를 변경하는 것은 염증성 사이토 카인 발현을 현저하게 변경하지 않는 반면에, 정맥 주사 후 또는 에어로졸 전달 후 중 어느 하나의 PEI-DNA는 그들의 다른 엔도솜 흡수와 상술한 바와 같은 TLR9 리셉터와의 상호작용으로 인하여 양이온성 지질에 비하여 폐 사이토카인 레벨이 낮은 것으로 추정된다.

[0052]

RNA 전달에 대한 반응은 훨씬 적게 조사된다. DNA 및 RNA는 모두 톨형 리셉터(TLRs)의 활성화를 통하여 포유류의 선천적 면역 체계를 자극한다. 13개의 TLRs(간단히 TLR1-TLR13이라 함)는 인간과 마우스 모두에서 확인될 수 있고, 이들 중 다수의 등가 형태는 다른 포유류종에서 확인되고 있다. 놀랍게도, 다른 TLRs는 구조적으로 관계되지 않는 수개의 리간드를 인식할 수 있다. TLR 매개된 선천성 면역계는 각종 병원체 및 그들의 분자가 매우 작은 수의 리간드에 의해 나타내어지는 보우타이 아키텍쳐(bow-tie architecture)를 갖는다. 다른 TLRs의 세포 이하의 국소화는 그들 리간드의 분자 폐턴과 어느 정도 관련이 있다. 따라서, 핵산 유사 구조의 인식에 포함되는 TLR3, TLR7, TLR8 및 TLR9는 모두 세포내에서 국소화된다. TLR3은 dsRNA, siRNA 및 mRNA를 인식하는 반면에 TLR7 및 TLR8은 ssRNA를 결합하고, CpG DNA 모티프의 인식은 TLR9를 통하여 중재된다.

[0053]

DNA CpG 메틸화(TLR9에 의한 인식을 억제)에 따라서, RNA의 면역원성은 동일한 종류의 수식의 제어 하에 있는 것으로 생각된다. 인비트로 전사된 RNA는 포유류 대표 수식이 아닌 것을 나타내는 경우, 수지상 세포에 의해 강한 TNF-알파 반응이 얻어졌다. 흥미롭게도, 특이적 뉴클레오티드의 수식(예를 들면, N6-메틸아데노신 또는 슈도 우리딘)은 DCs의 활성화 및 TLR3, TLR7 및 TLR8 중재 사이토카인 분비를 매우 감소시켰다. 따라서, 인비트로 전사 반응으로 수식 NTPs를 도입함으로써 과장된 인비보 면역 반응을 감소시킬 수 있다. 25%의 우리딘 및 시티딘 만이 2-티오우리딘 및 5-메틸-시티딘으로 치환되는 것이 인간 말초 혈액 단핵 세포(PBMCs)에 있어서, TLR3, TLR7, TLR8 및 RIG-I 등의 폐던 인식 리셉터와 mRNA 결합을 상조적으로 감소시켰다. 세포 배양 상청액 및 마우스 혈청의 유동 세포 계측법 및 사이토카인 ELISA에 의해 설명되는 바와 같이, 배양된 인간 및 마우스 폐포 유형 II 상피 세포의 >80%의 지속적인 높은 세포 단백질 발현도를 고려하여 실질적으로 이들 수식은 인비트로 및 인비보의 선천성 면역계의 활성을 감소시켰고, mRNA의 안정성을 부수적으로 증가시켰다. 고유의 mRNA 면역원성

을 극복하는 것은 예를 들면, 유전성 및 대사성 질환의 치료를 위해 또는 재생 의학의 분야에 있어서, 반복된 투여가 요구되는 신규한 치료법을 가능하게 하는데 매우 중요한 것으로 생각된다.

[0054] 상술한 바와는 달리, RNA의 강한 면역활성화 작용은 치료 백신 접종에 사용된다. 특히, 항원 표출 세포(APCs)로서의 수지상 세포(DCs)는 백신 면역원에 의해 표적화되고, 이것은 항원 특이적 T 및 B세포의 활성화가 뒤따른다. 수개의 인비보 및 인비트로 연구는 mRNA에 의해 표적화된 DCs가 종양 면역성 또는 항종양 반응을 유도하는 것을 나타내었다. pDNA의 트랜스펙션과 비교하면, mRNA계 유전자 도입은 보다 높은 DCs의 종양 항원 부하를 유도하고, 세포독성 T림프구 반응을 자극하는데 보다 높은 잠재력을 가졌다. 항종양 어프로치 이외에, RNA-트랜스펙팅된 DCs를 사용하여 에이즈, C형 감염 또는 진균 감염과 같은 감염 질병을 치료 또는 예방하고자 하는 소망의 일어나고 있었다. RNA 백신 접종을 달성하기 위한 다른 정밀한 전략은 항원 및 RNA 레플리카제 모두를 코딩하는 비시스템론성의 복제성 RNA에 의해 표적 항원을 발현하여 알파 바이러스의 능력을 사용해서 다량의 바이러스 mRNA를 생성하는 것이다. 세포가 트랜스펙팅되면, RNA 레플리카제에 의해 다수의 게놈 RNA 포지티브 쇄의 합성을 위해 그 자체가 태그리를 나타내는 게놈 네가티브 쇄를 합성하는 레플리카제 복합체에 의해 상기 바이러스 mRNA가 증폭된다. 상기 어프로치는 마우스 모델에 이미 사용되어 내성을 해결해서 멜라노마에 대한 면역성을 제공한다.

[0055] 본 발명은 mRNA를 폐세포에 효율적으로 전달하고 이들 세포에서의 mRNA에 의해 인코딩된 단백질의 발현을 효율적으로 하게 하는 바람직한 방법을 가능하게 한다.

도면의 간단한 설명

[0056] 본 발명은 하기 실시예 및 첨부된 도면으로 더욱 상세히 설명되지만, 이들로 특별히 한정되는 것은 아니다.

도 1은 미치료된 마우스(w/o)와 비교하여 EPO mRNA 및 PEI 25kDa(EPO로 표시) 또는 화학적 수식된 EPO mRNA 및 PEI 25kDa(EPO 모드로 표시)를 포함하는 조합물에 의한 에어로졸 처리 24시간 후의 마우스 폐 용해물에서의 ELISA에 의해 측정된 EPO 발현의 결과를 나타낸다. EPO 레벨은 미치료된 마우스와 비교하면, 양 처리군 모두에 대해서 현저하게 증가하였다.

도 2는 화학적으로 수식된 MetLuc mRNA 및 PEI 25kDa(Met-Luc로 표시)를 포함하거나 또는 대조군으로서 제공되는 화학적으로 수식된 EGFP Luc mRNA 및 PEI 25kDa(EGFP-Luc로 표시)를 포함하는 조합물에 의한 에어로졸 치료 24시간 후의 마우스 폐 용해물에서의 발광 활성에 의해 측정된 메트리디아-루시페라아제 발현의 결과를 나타낸다. 메트리디아-루시페라아제 레벨은 화학적으로 수식된 EGFP Luc mRNA/PEI 25kDa로 치료된 대조군 마우스와 비교하는 경우, 화학적으로 수식된 MetLuc mRNA/PEI 25kDa로 치료된 마우스의 군에 대해서 현저하게 증가되었다.

도 3은 PEI 25kDa와의 조합물로서 폐 에어로졸 전달시에 화학적으로 수식된 Luc mRNA가 마우스의 폐세포에서 효율적으로 발현되는 것을 나타낸다(도 3a+b).

도 4는 루시페라아제 발현이 cap-1을 포함하는 화학적으로 수식된 Luc mRNA에 대해서 가장 높은 것을 나타낸다.

도 5는 분무수로 치료된 대조군 동물의 폐에 있어서, Luc 발현이 확인되지 않는 반면에(도 5a), PEI 25 kDa와의 조합물로서 폐 에어로졸 전달시에 피그의 폐세포에 있어서 화학적 수식된 Luc mRNA가 효율적으로 발현되는 것을 나타낸다(도 5b).

도 6은 주사용 물(WFI)이 PEI 포뮬레이션에 있어서 화학적으로 수식된 mRNA를 안정화하는 것을 나타낸다.

1 - 물 + 혼화된 세포에서의 수식 mRNA

2 - PBS + 혼화된 세포에서의 수식 mRNA

3 - pH 7.4의 PBS/물 + 혼화된 세포에서의 brPEI 25kDa/수식 mRNA(Densmore et al. EP 1 173 224 B1에 따른 방법)

4 - pH 7.4의 PBS + 혼화된 세포에서의 brPEI 25kDa/수식 mRNA(Ethris 방법)

5 - pH 7.4의 물 + 혼화된 세포에서의 brPEI 25kDa/수식 mRNA

6 - pH 6.0의 물 + 혼화된 세포에서의 brPEI 25kDa/수식 mRNA

7 - pH 5.0의 물 + 혼화된 세포에서의 brPEI 25kDa/수식 mRNA

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0057] 1. 마우스 폐에 대한 폴리에틸렌이민(PEI)으로 포뮬레이팅된 에리스로포이에틴(EPO) 및 메트리디아 루시페라아제(metLuc)를 인코딩하는 화학적으로 수식 및 미수식된 mRNA의 인비보 에어로졸 적용

약품

[0059] 분기상 PEI(평균 MW = 25kDa)는 Sigma-Aldrich(Schnelldorf, Germany)로부터 얻어졌고, 다른 정제 처리없이 사용되었다. PEI는 재증류수로 희석되었고, HCl을 사용하여 pH7로 조정되었다. 재증류된 엔도톡신 프리 물은 Delta Pharma(Boehringer Ingelheim, Germany)에서 시판하였다.

mRNA 제조

pVAXA120 벡터로의 뮤린 EPO(mEPO) cDNA의 클로닝

[0062] mEPO를 코딩하는 cDNA는 EcoRI 소화에 의해 pCR4EPO 플라스미드(Open Biosystems 시판, 카탈로그 넘버 MMM1013-99829153)로부터 절단되었고, 각각의 pVAXA120의 부위로 클로닝되었다. 클론은 PmeI 소화를 사용한 삽입 및 NheI(단일 소화) 및 SmaI-XbaI(이중 소화)를 사용한 배향을 위해 선별되었다, 상기 3개 소화 모두에 의해 보정된 클론이 RNA 제조에 사용되었다.

mEPO mRNA의 제조

[0064] 인비트로 전사를 위한 탬플릿을 생성하기 위해서, 플라스미드는 37°C에서 XbaI(Fermentas)에 의해 하룻밤 동안 소화를 통하여 폴리(A) 태일의 하류를 선형화하였고, Sambrook et al.(Sambrook, J., Fritsch, E. F., 및 Maniatis, T(1989), 분자 클로닝에 있어서: 실험실 매뉴얼. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y. Vol 1, 2, 3)에 의해 기재된 바와 같이, 클로로포름 추출 및 소디움 아세테이트 석출을 사용하여 정제하였다. 플라스미드 탬플릿의 완전한 선형화는 1% 아가로스 젤로 확인하였다.

[0065] 안티 리버스 캡 유사체(ARCA; P1-(5'-(3'-o-메틸)-7-메틸-구아노신)P3-(5' -(구아노신))트리포스페이트, 소디움 염, Jena Biosciences, Germany)를 사용한 상기 제조사의 프로토콜을 30°C 및 37°C에서 RiboMAX Large Scale RNA Production System - T7(Promega, Germany)에 의해 pVAXA120-mEPO의 인비트로 전사가 행해졌다. 화학적으로 수식된 mEPO mRNA(EPO Mod)의 인비트로 전사를 위하여, 25%의 시티딘-5'-트리포스페이트 및 우리딘-5'-트리포스페이트가 모두 5-메틸시티딘-5'-트리포스페이트(TruLink, USA) 및 2-티오우리딘-5'-트리포스페이트(TruLink, USA)로 치환되었다. mRNA의 정제는 PD-10 컬럼(GE Healthcare, Germany)으로 크기 배제 크로마토그래피 및 클로로포름 추출에 의해 행해졌다. 제조된 mRNA는 기관지 상피 세포주(BEAS-2B) 및 인간 배아 상피 신장 세포주(HEK 293)의 트랜스펙션에 의한 활성화 및 ELISA(R&D Systems, Germany)에 의한 mEPO량의 측정을 위해 선별되었다. 37°C에서 제조된 것에 비하여 30°C에서 제조된 mEPO mRNA로 트랜스펙팅된 BEAS-2B로부터 현저하게 다량인 mEPO가 정량화될 수 있었다.

pVAXA120 벡터로 메트리디아 루시페라아제(MetLuc) ORF의 클로닝

[0067] MetLuc(Clontech 서열)을 코딩한 ORF가 합성되었고, GeneArt AG(Germany)에 의해 pVAXA120의 BamHI/EcoRI 부위로 클로닝되었다. 수용된 pVAXA120-MetLuc 플라스미드는 인비트로 전사에 더 사용되었다.

화학적으로 수식된 MetLuc mRNA의 제조

[0069] 인비트로 전사를 위한 탬플릿을 생성하기 위해서, 플라스미드는 37°C에서 XbaI(Fermentas)에 의해 하룻밤 동안 소화를 통하여 폴리(A) 태일의 하류를 선형화하였고, Sambrook et al.(Sambrook, J., Fritsch, E. F., 및 Maniatis, T(1989), 분자 클로닝에 있어서: 실험실 매뉴얼. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y. Vol 1, 2, 3)에 의해 기재된 바와 같이, 클로로포름 추출 및 소디움 아세테이트 석출을 사용하여 정제하였다. 플라스미드 탬플릿의 완전한 선형화는 1% 아가로스 젤로 확인하였다.

[0070] 안티 리버스 캡 유사체(ARCA; P1-(5'-(3'-o-메틸)-7-메틸-구아노신)P3-(5' -(구아노신))트리포스페이트, 소디움 염, Jena Biosciences, Germany)를 사용한 상기 제조사의 프로토콜을 30°C에서 RiboMAX Large Scale RNA Production System - T7(Promega, Germany)에 의해 pVAXA120-MetLuc의 인비트로 전사가 행해졌다. 화학적으로 수식된 MetLuc mRNA의 인비트로 전사를 위하여, 25%의 시티딘-5'-트리포스페이트 및 우리딘-5'-트리포스페이트가 모두 5-메틸시티딘-5'-트리포스페이트(TruLink, USA) 및 2-티오우리딘-5'-트리포스페이트(TruLink, USA)로 치환되었다. mRNA의 정제는 PD-10 컬럼(GE Healthcare, Germany)으로 크기 배제 크로마토그래피 및 클로로포름 추출에 의해 행해졌다. 제조된 mRNA는 뮤린 섬유아세포주(NIH-3T3)의 트랜스펙션에 의한 활성 및 메트리디아 루시페라아제 리포터 분석을 사용한 MetLuc-활성의 측정을 위해 선별되었다.

[0071] **동물**

[0072] Janvier, Route Des Chenes SecsBP5, F-53940 Le Genest St. Isle, France로부터 6주-8주령의 암컷 BALB/c 마우스가 얻어졌고, 특정 병원체가 없는 조건하에 유지되었다. 마우스는 실험 전에 적어도 7일 동안 동물 보호 시설의 환경에 적응시켰다. 모든 동물 쳐치는 로컬 윤리 위원회에 의해 승인되었고 제어되었으며 동물 생태 보호의 독일법의 지침에 따라서 행해졌다.

[0073] **PEI-mRNA 폴리플렉스의 제조**

[0074] 폴리플렉스는 이하와 같이 포뮬레이팅되었다: mRNA 및 PEI는 250 µg/ml mRNA 및 326.3 µg/ml PEI의 농도로 각각 얻어진 4.0m1의 재증류수로 희석되었다(N/P 비율 10에 상응). 상기 mRNA 용액은 상하 피펫팅으로 혼합된 PET 용액에서 피펫으로 취해져 최종 mRNA 농도 125 µg/ml를 얻었다. 사용 전에 상기 복합체는 상온에서 20분 동안 인큐베이팅되었다. 특히, 복합체 형성을 위해 어떠한 버퍼없이 물만을 사용하는 것이 바람직하고, 그렇지 않으면 마우스 폐내의 나노 입자가 응집하거나 유효하지 않게 되기 때문인 것이 본 발명의 공정 중에서 확인되었다(Rudolph et al., J. Mol Ther. 2005, 12: 493-501).

[0075] **에어로졸 장치의 설계**

[0076] 전체 장치에 있어서, 네뷸리제이션 처리를 위해, 덜개로 밀봉할 수 있는 9.8×13.2×21.5cm 플라스틱 상자에 마우스를 놓았다. 상기 상자의 한쪽 협측에 4개의 작은 구멍이 에어로졸 유출구로서 위치된다. 반대쪽 협측 전체를 통하여, 상기 상자는 15.4cm 폭 × 41.5cm 길이의 플라스틱 실린더에 2.1cm 직경 연결부를 통하여 연결된다. 실린더의 바닥은 실린더의 다른 쪽에 연결된 제트 네뷸라이저(PARI BOY® LC plus, PARI GmbH)에 의해 제조되는 에어로졸을 건조시키기 위해 150g의 실리카겔(1-3mm, #85330; Fluka, Switzerland)로 군일하게 피복된다(Rudolph et al., J Gene Med. 2005, 7 : 59-66의 상세히 기재).

[0077] **폐 호모지네이트에서의 EPO 및 MetLuc 활성의 측정**

[0078] 투여 24시간 후의 마우스가 메데토미딘(11.5 µg/kg BW), 미다졸람(115 µg/kg BW) 및 펜테닐(1.15 µg/kg BW)의 복강내 주사에 의해 마취되었고, 중앙 절개에 의해 개복되었다. 중앙 절개에 의한 개복 후, 동물로부터 폐가 절개되었고, PBS로 관류되었다. 폐는 액체 질소로 순간 동결되었고, 유발 및 유봉에 의해 동결 상태에서 군집화되었다. 25mM 트리스 pH 7.4, 0.1% 트리톤 X-100 및 캠플릿 프로테아제 억제제(Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany)를 함유하는 400µl의 라이시스 버퍼(lysis buffer)의 첨가 후, 빙상에서 샘플이 20분 동안 인큐베이팅되었다. 단백질 용해물이 5분 동안 10,000rcf으로 원심분리되었다. 상청액에서의 EPO 활성은 ELISA(R&D Biosystems)에 의해 측정되었고, Honig et al., Biomacromolecules 2010, 11: 1802-1809에 기재된 바와 같은 코엘린테라진의 첨가시에 발광 활성을 측정함으로써 MetLuc 활성이 분석되었다.

[0079] **결과:**

[0080] 첫번째 실험은 미수식 EPO mRNA 및 화학적으로 수식된 EPO mRNA가 PEI 25kDa를 지닌 조합물로서 폐의 에어로졸 전달시에 동물의 폐세포에서 효율적으로 발현되는 것을 나타낸다. 이것은 폐로의 전달 방법은 mRNA의 화학 조성 물과는 독립적임을 나타낸다. 두번째 실험은 PEI 25kDa를 지닌 조합물로서 폐의 에어로졸 전달시에 동물의 폐 세포에 있어서, 메트리디아 루시페라아제가 효율적으로 발현되는 것을 나타낸다. 이것은 폐로의 전달을 위한 방법이 단일 코딩 mRNA에 한정되지 않고, mRNA를 코딩하는 서열과는 독립적임을 나타낸다. 상기 결과는 모두 본 발명에 따른 방법 및 약제에 의해 본 발명의 목적을 적절하게 설명할 수 있음을 나타낸다.

[0081] **2. 마우스 폐에 대한 폴리에틸렌이민(PEI)으로 포뮬레이팅된 반딧물이 루시페라아제(Luc)를 인코딩하는 화학적으로 수식된 mRNA의 인비보 에어로졸 적용**

[0082] **약품**

[0083] 분기상 PEI(평균 MW =25kDa)는 Sigma-Aldrich(Schnelldorf, Germany)로부터 얻어졌고, 다른 정제 처리없이 사용되었다. PEI는 주사용 물로 희석되었고, HCl을 사용하여 pH7.4로 조정되었다. 엔도톡신 프리 물은 B.Braun(Melsungen, Germany)에서 시판하였다.

[0084] **화학적으로 수식된 Luc mRNA의 제조**

[0085] 인비트로 전사(IVT)를 위한 탬플릿을 생성하기 위해서, 플라스미드 pVAXA120-Luc는 Not I에 의한 제한 소화에 의해 선형화되었다. 탬플릿은 클로로포름-에탄올-석출에 의해 더 정제되었다. 탬플릿의 품질은 네이티브 아가로스

겔 전기 영동에 의해 결정되었다. IVT는 리보뉴클레오티드 트리포스페이트, 안티리버스 캡 유사체(ARCA, m^{7,3'-G}GpppG) 및 T7 RNA 폴리머라아제를 함유하는 쇄상 IVT 혼합물로 행해졌다. 수식은 25%의 5-메틸-시티딘-5'-트리포스페이트 및 25%의 2-티오-우리딘-5'-트리포스페이트를 사용하여 도입되었다. ARCA는 소망의 배향에 있어서 캡만이 결합되도록 사용되었다. 포스트 캡핑 처리를 사용한 cap-0 또는 cap-1을 함유하는 mRNA를 생성하기 위해서, 어떠한 캡 유사체가 5'단말 트리포스페이트를 함유하는 mRNA를 야기하지 않고 IVT가 행해졌다. 캡핑은 메틸 도너로서 S-아데노실 메티오닌(SAM), rGTP 및 백시니아 바이러스 캡핑 엔자임을 사용하여 행해서 mRNA의 5단말에 7-메틸구아닐레이트 cap-0 구조(m7GpppG)를 첨가하였다. 포스트 캡핑으로부터 얻은 mRNA의 5'단말에 cap-0 구조와 인접한 첫번째 뉴클레오티드의 2'-o 위치에 메틸기를 첨가하기 위해서, mRNA cap 2'-o-메틸트랜스페라아제 및 SAM이 사용되었다. 상기 메틸화는 mRNA 캡의 cap-1 구조(m7GpppGm)가 얻어졌다. mRNA의 정제는 암모늄 아세테이트 석출에 의해 행해졌다. 수식된 Luc RNA는 인젝트어빌리어 수용액에 재현탁되었고, NIH3T3 세포에서의 트랜스펙션, 네이티브 아가로스 겔 전기 영동 및 UV 측정을 사용하여 품질 관리가 행해졌다.

[0086] 동물

Janvier, Route Des Chenes SecsBP5, F-53940 Le Genest St. Isle, France로부터 6주-8주령의 암컷 BALB/c 마우스가 얻어졌고, 특정 병원체가 없는 조건하에 유지되었다. 마우스는 실험 전에 적어도 7일 동안 동물 보호 시설의 환경에 적응시켰다. 모든 동물 처치는 로컬 윤리 위원회에 의해 승인되었고 제어되었으며 동물 생태 보호의 독일법의 지침에 따라서 행해졌다.

[0088] PEI-mRNA 폴리플렉스의 제조

폴리플렉스는 이하와 같이 포뮬레이팅되었다: mRNA 및 PEI는 250 μg/ml mRNA 및 326.3 μg/ml PEI의 농도로 각각 얻어진 4.0ml의 재증류수로 희석되었다(N/P 비율 10에 상응). 상기 mRNA 용액은 상하 피펫팅으로 혼합된 PET 용액에서 피펫으로 취해져 최종 mRNA 농도 125 μg/ml를 얻었다. 사용 전에 상기 복합체는 상온에서 20분 동안 인큐베이팅되었다. 특히, 복합체 형성을 위해 어떠한 버퍼없이 물만을 사용하는 것이 바람직하고, 그렇지 않으면 마우스 폐내의 나노 입자가 응집하거나 유효하지 않게 되기 때문인 것이 본 발명의 공정 중에서 확인되었다(Rudolph et al., J. Mol Ther. 2005, 12: 493-501).

[0090] 에어로졸 장치의 설계

전체 장치에 있어서, 네뷸리제이션 처리를 위해, 덮개로 밀봉할 수 있는 9.8×13.2×21.5cm 플라스틱 상자에 마우스를 놓았다. 상기 상자의 한쪽 협측에 4개의 작은 구멍이 에어로졸 유출구로서 위치된다. 반대쪽 협측 전체를 통하여, 상기 상자는 15.4cm 폭 × 41.5cm 길이의 플라스틱 실린더에 2.1cm 직경 연결부를 통하여 연결된다. 상기 실린더의 바닥은 실린더의 다른 쪽에 연결된 제트 네뷸라이저(PARI BOY® LC plus, PARI GmbH)에 의해 제조되는 에어로졸을 전조시키기 위해 150g의 실리카 겔(1-3mm, #85330; Fluka, Switzerland)로 균일하게 피복된다(Rudolph et al., J Gene Med. 2005, 7 : 59-66의 상세히 기재).

[0092] 인비보 생체 발광 활성을 사용한 쥐 폐에서의 Luc 활성의 측정

투여 24시간 후의 마우스가 메데토미딘(11.5 μg/kg BW), 미다졸람(115 μg/kg BW) 및 펜테닐(1.15 μg/kg BW)의 복강내 주사에 의해 마취되었다. 비강내 루트를 통해 D-루시페린 기질(마우스 당 3 mg/50μl PBS)이 적용되었다(Buckley SM, Howe SJ, Wong SP, Buning H, McIntosh J, et al.(2008)). 비강내 백터 전달 후의 루시페린 검출은 복강내 루시페린 투여 보다 비강내 투여에 의해 개선된다. 생체 발광은 IVIS 100 활성 시스템(Xenogen, Alameda, USA) 및 카메라 설정: 10개 시야, f1 f-스텝, 고해상도 비닝 및 노출시간 10분을 사용하여 10분 후에 측정되었다. Living Image Software version 2.50(Xenogen, Alameda, USA)을 사용하여 신호가 수량화되었고 분석되었다.

[0094] 결과:

상기 실험은 화학적으로 수식된 mRNA가 PEI 25kDa를 지닌 조합체로서 폐의 에어로졸 전달시에 마우스의 폐세포에서 효율적으로 발현하는 것을 나타낸다(도 3). 루시페라아제 발현은 cap-1을 포함하는 화학적으로 수식된 Luc mRNA에서 가장 높았다(도 4). 이것은 모두 본 발명에 따른 방법 및 약제에 의해 본 발명의 목적을 타당하게 설명할 수 있음을 나타낸다.

3. 피그의 폐에 대한 폴리에틸렌이민(PEI)으로 포뮬레이팅된 반딧물이 루시페라아제(Luc)를 인코딩하는 화학적으로 수식된 mRNA의 인비보 에어로졸 적용

[0097] 약품

[0098] 상기 실시예 2를 참조

[0099] 화학적으로 수식된 Luc mRNA의 제조

[0100] 상기 실시예 2를 참조

[0101] 실험 공정

[0102] 진정된 상태의 피그가 아자페론 2mg/체중kg, 케타민 15 mg/체중kg, 아트로핀 0.1 mg/체중kg으로 예비 투약이 개시되었고, 이어서 측면 귀 정맥에 정맥 라인이 삽입되었다. 피그는 필요에 따라서 프로포폴 3-5 mg/체중kg의 정맥내 투여에 의해 마취되었다. 마취는 필요에 따라서 1% 프로포콜의 연속 정맥내 투입으로 유지되었다. 환기 파라미터는 호기 이산화탄소에 따르고, 필요에 따라서 조정되었다. 마취, 호흡 및 심혈관 파라미터는 폴스 산소 측정법, 카프노그래피, 직장 온도 프로브 및 리플렉스 상태를 사용하여 연속 모니터링하였다. 피그는 10ml/kg/h의 균형잡인 전해질 용액의 투여를 받았다. 마취 기간은 대략 80-120분이었다. 피그는 에어로졸 적용이 종료(에어로냅 메쉬 네뷸라이저)된 후 안정 후에 측면 귀 정맥을 통해 페노바르비탈 100mg/체중kg의 볼루스 투여로 죽게 되었다. 폐는 추출되었고, 다양한 폐 영역으로부터 수집된 대략 1cm 두께 조직 시료가 절단되었고, 이어서 인큐베이터 중에서 37°C에서 24시간 동안 세포 배양 배지(5% 이산화탄소)에서 인큐베이션되었다. 루시페라아제 활성의 측정을 위해, 30분 동안 37°C에서 PBS(100 µg/ml)의 D-루시페란 기질을 포함하는 배지 배스에서 조직 시료가 인큐베이팅되었고, 생체 외 루시페라아제 생체 발광 측정(IVIS 100, Xenogen, Alameda, USA)을 실시했다.

[0103] PEI-mRNA 폴리플렉스의 제조

[0104] 폴리플렉스는 2개 채널의 시린지 펌프(KDS-210-CE, KD Scientific)를 사용하여 형성되었다. mRNA 및 PEI는 500 µg/ml mRNA 및 650 µg/ml PEI의 농도로 각각 얻어진 12.0ml의 재증류수로 희석되었다(N/P 비율 10에 상응). 양 용액은 5mL/분의 속도로 시린지 펌프의 인출 기능을 사용하여 별도의 20mL 시린지로 채워졌다. 양 샘플을 혼합하기 위해, 두개의 시린지가 튜브(Safeflow Extension Set, B.Braun)를 통해 t-피스로 연결되었다. 혼합은 40mL/분의 속도로 시린지 펌프의 투입 기능을 사용하여 행해졌다. 사용 전에 상기 복합체는 상온에서 30분 동안 인큐베이팅되었다. 특히, 복합체 형성을 위해 어떠한 베포없이 물만을 사용하는 것이 바람직하고, 그렇지 않으면 마우스 폐내의 나노 입자가 응집하거나 유효하지 않게 되기 때문인 것이 본 발명의 공정 중에서 확인되었다(Rudolph et al., J. Mol Ther. 2005, 12: 493-501).

[0105] 결과:

[0106] 상기 실험은 분무된 물로 치료된 대조군 동물의 폐에서는 Luc 발현이 확인되지 않는 것(도 5a)을 나타내는 반면에, 화학적으로 수식된 Luc mRNA가 PEI 25kDa를 지닌 조합물로서 폐의 에어로졸 전달시에 피그의 폐세포에서 효율적으로 발현하는 것을 나타낸다(도 5b). 이것은 모두 본 발명에 따른 방법 및 약제에 의해 본 발명의 목적을 타당하게 설명할 수 있음을 나타낸다.

4. PEI 포뮬레이션에 있어서의 화학적으로 수식된 mRNA를 안정화시키는 주사용 물(WFI)

[0108] mRNA 안정성에 대해서 PBS와 비교하여 주사용 물의 효과가 아가로스 겔 전기 영동에 의해 실험되었다(도 6). 한편, PBS에 있어서, PEI와 복합화된 mRNA는 분해된 mRNA 생성물의 오염에 의해 나타내는 바와 같이, 빠르면 실온에서 4시간 인큐베이팅 후에 mRNA 분해를 야기하는 반면에, WFI에 있어서, PEI/mRNA 포뮬레이션은 mRNA 분해 생성물이 적고(도 5), 주요 mRNA 생성물의 밴드 강도가 큰 것으로 나타내어지는 바와 같이 현저하게 안정된다. 상기 효과는 보다 짧은 Luc mRNA 보다 CFTR mRNA 등의 큰 mRNA에 대해서 더욱 현저해지고, 24시간 동안 실온에서 인큐베이팅 후에 한층 더 명확하게 된다. 중요한 것은 mRNA 분해는 pH를 감소시킴에 따라서 감소되고, 최소 pH=5에 도달한다. 상기 결과는 WFI가 일반적으로 pH=5의 값으로 산성 pH이기 때문에, PEI 포뮬레이션에 있어서, mRNA 에어로졸 전달을 위한 WFI를 사용할 필요성 및 가장 바람직한 성능을 설명하고, 따라서 수성 PEI 포뮬레이션에 있어서의 분해에 대해 mRNA는 본질적으로 안정하다.

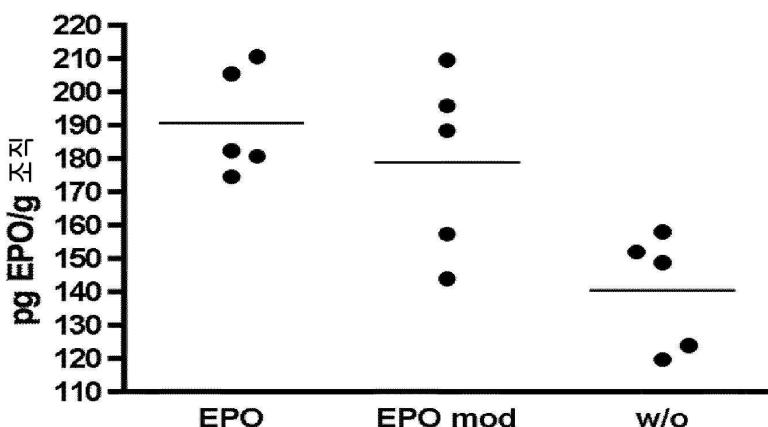
[0109] 실험 과정

- [0110] mRNA-PEI 폴리플렉스의 제조. 분기쇄 PEI 25kDa(Sigma-Aldrich, Schnelldorf) 모액이 Auqa ad Injectabilia(WFI, B.Braun, Melsungen) 또는 Dulbecco's PBS(Life technologies, Darmstadt) 중 어느 하나에 있어서 10mg/ml 및 5 mg/ml로 제조되었고, pH는 HCl에 의해 pH 7.4, pH 6.0 또는 pH 5.0으로 조절되었다.
- [0111] 25 μ l 수식 mRNA(1 μ g/ μ l) 및 3.3 μ l의 PEI 모액(10mg/ml)가 0.5 μ g/ μ l mRNA 및 0.66 μ g/ μ l PEI의 농도로 각각 얹어지는 50 μ l WFI 또는 D-PBS에 희석되었다(N/P비 10에 상응). 환자에 따라서(EP 1173224 B1), D-PBS(5mg/ml)에서의 6.6 μ l의 PEI 모액 및 25 μ l 수식 mRNA(1 μ g/ μ l)가 50 μ l WFI에 희석되었다. 상기 PEI 용액은 서서히 교반되었고, 상기 DNA 용액이 첨가되어 최종 100 μ l의 체적이 되었다. 상기 혼합물은 사용 전에 20분 동안 실온에서 방치되었다.
- [0112] 본래의 아가로스겔 전기 영동법을 사용한 방출 분석을 위하여 1 μ l의 폴리플렉스 용액이 4 μ l의 해파린 용액에 첨가되었다(WFI에서 40mg/ml). 상기 혼합물은 10분 동안 실온에서 인큐베이팅되었다. 인큐베이팅 후, 5 μ l의 2X RNA 부하 염료(Thermo Fisher)가 첨가되었고, 샘플이 10분 동안 70°C에서 인큐베이팅되었다. 이어서, 상기 샘플은 2분 동안 냉장에 위치되었고, 이어서 1% 아가로스겔 상으로 로딩되었다. 상기 겔은 Intas Gel Documentation System을 사용하여 가시화되었고, 1-1.5시간 동안 180V로 가동되었다.

도면

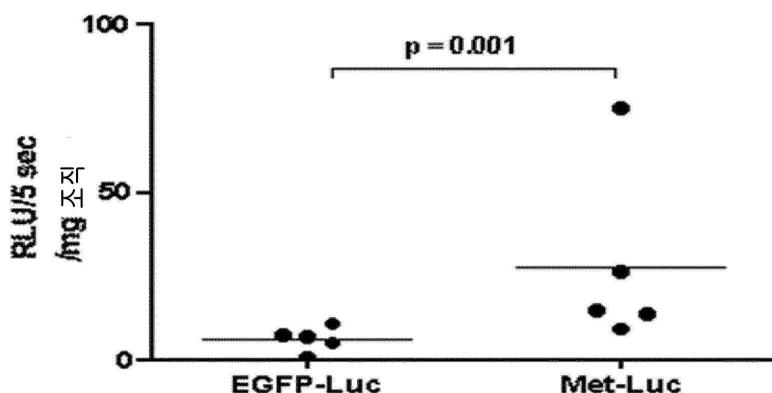
도면1

EPO Elisa 폐 용해물



도면2

생체외 메트리디아-루시페라아제 분석



도면3

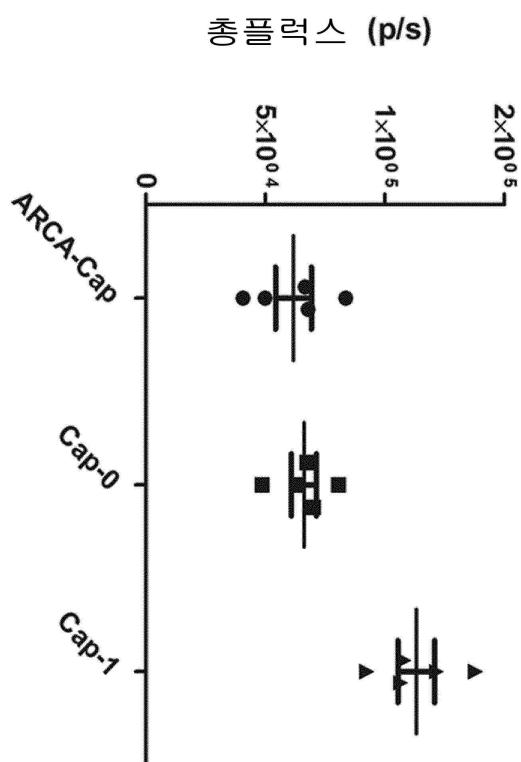


a

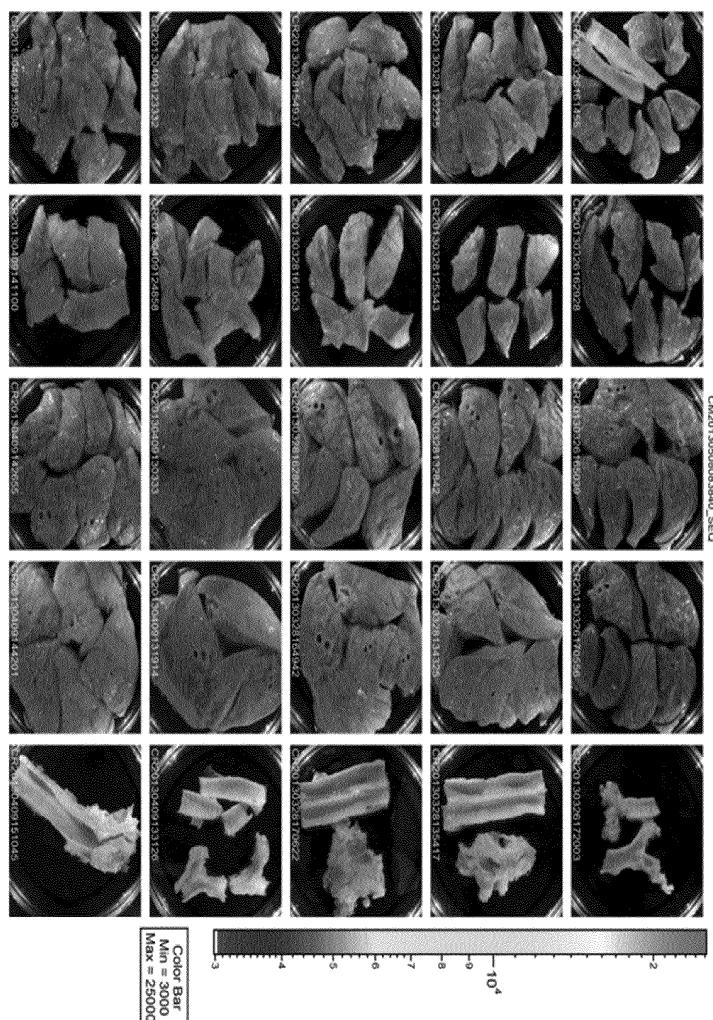


b

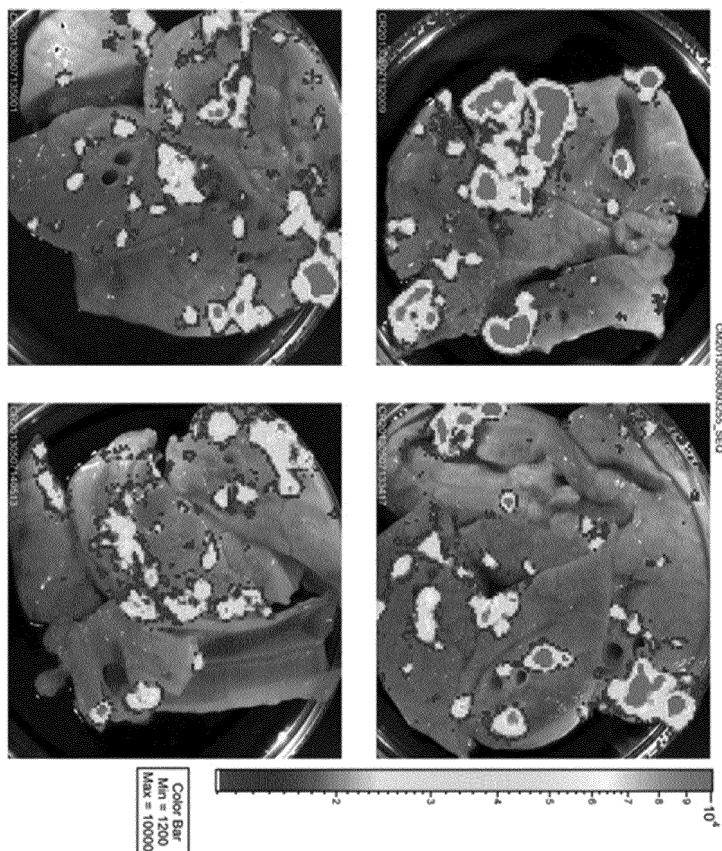
도면4



도면5a



도면5b



도면6

