(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0073303
(43) 공개일자 2025년05월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/51 (2006.01) *A61K 31/7105* (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) *C12N 15/88* (2017.01)
C12R 1/01 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 9/5123 (2013.01)
A61K 31/7105 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2025-7013043
(22) 출원일자(국제) 2023년09월21일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2025년04월21일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2023/076004
(87) 국제공개번호 WO 2024/062001
국제공개일자 2024년03월28일
(30) 우선권주장
22196901.7 2022년09월21일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
노보아크 게엠베하
오스트리아, 빈 1120 포텐도퍼 슈트라쎄 23-25, 4, 4-1
(72) 발명자
우름, 데이비드
오스트리아, 7350 오버폴렌도르프, 미텔가세 24
쿠에헨베르게르, 줄리안
오스트리아, 4300 장크트 발렌틴, 발터-헤라우트-슈트라세 5/14
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인지평

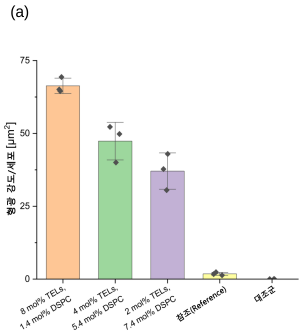
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 **핵산 카고를 갖는 지질 나노입자**

(57) 요 약

바람직하게는 메신저 리보핵산(messenger ribonucleic acid; mRNA)을 포함하는 핵산 카고를 캡슐화하는 지질 나노입자(lipid nanoparticle; LNP)가 개시된다. LNP는 적어도 양이온성 지질 분획, 및 안정화제 분획을 포함한다. 안정화제 분획은 바람직하게는 적어도 하나의 폴리에틸렌글리콜(PEG) 지질을 포함한다. 또한, LNP는, 예를 들어 선택적으로 다른 에테르 지질 중에서도 설포로부스(*Sulfolobus*) 속의 아르카에알(archaeal)로부터 얻어진, 적어도 하나의 글리세롤 디알킬 글리세롤 테트라에테르(GDGT) 지질을 포함한다. 또한, LNP, 예를 들어 mRNA 백신을 포함하는 약학 조성물이 개시된다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61K 48/0033 (2013.01)
C12N 15/88 (2013.01)
C12R 2001/01 (2021.05)
(72) 발명자
스파디우트, 올리버
오스트리아, 1070 빈 아폴로가세 30/10
세들메이어, 빅토르
오스트리아, 1020 빈, 노바라가세 19/18

명 세 서

청구범위

청구항 1

핵산 카고(nucleic acid cargo)를 캡슐화하는 지질 나노입자(lipid nanoparticle; LNP)로서,

상기 LNP는 적어도

- 양이온성 지질 분획(cationic lipid fraction), 및

- 안정화제 분획

을 포함하되;

상기 LNP는 적어도 하나의 글리세롤 디알킬 글리세롤 테트라에테르(glycerol dialkyl glycerol tetraether; GDGT) 지질을 포함하는, LNP.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 핵산 카고는 메신저 리보핵산(messenger ribonucleic acid; mRNA)을 포함하는, LNP.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 안정화제 분획은 적어도 하나의 폴리에틸렌글리콜(PEG) 지질을 포함하는, LNP.

청구항 4

제 1 항 내지 제 3 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 LNP는, 바람직하게는 콜레스테롤을 포함하는, 스테롤 지질 분획을 더 포함하는, LNP.

청구항 5

제 1 항 내지 제 4 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 LNP는 헬퍼 지질 분획(helper lipid fraction)을 더 포함하고; 바람직하게는 상기 헬퍼 지질 분획은 디스테아로일포스파티딜콜린(DSPC), 디올레오일포스파티딜에탄올아민(DOPE), 디팔미토일포스파티딜콜린(DOPC), 포스파티딜콜린(PC), 1,2-디리놀레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린(DLPC), 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포콜린(DMPC), 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포콜린(DPPC), 1,2-디운데카노일-sn-글리세로-3-포스포콜린(DUPC), 1-팔미토일-2-올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린(POPC), 및 이들의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택되는 헬퍼 지질을 포함하는, LNP.

청구항 6

제 1 항 내지 제 5 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 적어도 하나의 GDGT 지질은, 바람직하게는 비치환된 칼다르카에올(caldarchaeol), 포스파티딜이노시톨(PI)-칼다르카에올, 디헥소스(2Hex)-칼다르카에올 및 2Hex-PI-칼다르카에올, 헥소스(Hex)-칼다르카에올, 설포노-트리헥소스(3Hex)-칼다르카에올, 설포노-3Hex-PI-칼다르카에올, 및 이들의 임의의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택된, 적어도 하나의 칼다르카에올(caldarchaeol)을 포함하는, LNP.

청구항 7

제 1 항 내지 제 6 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 LNP는 적어도 하나의 추가의 에테르 지질, 바람직하게는 디에테르 지질, 특히 아르카에올(archaeol)을 포

함하는, LNP

청구항 8

제 1 항 내지 제 7 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 LNP는 적어도 하나의 GDGT 지질 및 적어도 하나의 추가의 에테르 지질을 포함하는 에테르 지질 분획을 포함하고; 바람직하게는 상기 에테르 지질 분획은 아르카에올 및 칼다르카에올을 포함하는, LNP.

청구항 9

제 8 항에 있어서,

상기 에테르 지질 분획은 아르카에알(archaeal) 배양물, 바람직하게는 설포로부스(*Sulfolobus*) 배양물, 보다 바람직하게는 설포로부스 아시도칼다리우스(*Sulfolobus acidocaldarius*) 배양물로부터의 추출에 의해 얻어질 수 있는 에테르 지질을 포함하는, LNP.

청구항 10

제 9 항에 있어서,

상기 전체 에테르 지질 분획은 상기 배양물로부터의 추출에 의해 얻어질 수 있는 것인, LNP.

청구항 11

제 1 항 내지 제 10 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 에테르 지질 분획은 총 지질의 1 mol% 내지 20 mol%, 바람직하게는 총 지질의 2 mol% 내지 15 mol%, 보다 더 바람직하게는 총 지질의 4 mol% 내지 12 mol%, 특히 총 지질의 6 mol% 내지 10 mol% 또는 심지어 총 지질의 7 mol% 내지 9 mol%를 차지하는, LNP.

청구항 12

제 1 항 내지 제 11 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 에테르 지질 분획 대 헬퍼 지질 분획의 몰비는 20:1 내지 1:20, 바람직하게는 15:1 내지 1:10, 보다 바람직하게는 12:1 내지 1:3, 보다 더 바람직하게는 8:1 내지 4:1, 특히 7:1 내지 5:1인, LNP.

청구항 13

제 1 항 내지 제 12 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 에테르 지질 분획 대 스테롤 지질 분획의 몰비는 0.25:1 내지 1:30, 바람직하게는 0.5:1 내지 1:20, 보다 바람직하게는 1:1 내지 1:10, 보다 더 바람직하게는 1:2 내지 1:6, 특히 1:3 내지 1:5인, LNP.

청구항 14

제 1 항 내지 제 13 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 LNP의 총 지질은:

(a) 40 mol% 내지 70 mol%의 양이온성 지질 분획,

(b) 5 mol% 내지 20 mol%의 헬퍼 지질 분획,

(c) 20 mol% 내지 40 mol%의 스테롤 지질 분획,

(d) 0.1 mol% 내지 4 mol%의 안정화제 분획, 및

(e) 1 mol% 내지 20 mol%의 에테르 지질 분획,

을 포함하는, LNP.

청구항 15

제 1 항 내지 제 14 항 중의 어느 한 항의 LNP를 포함하는 약학 조성물로서, 바람직하게는 상기 약학 조성물은 백신인, 약학 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명의 분야는 특히 메신저 리보핵산(messenger ribonucleic acid; mRNA) 백신에 사용되는 핵산 카고(nucleic acid cargo)를 갖는 지질 나노입자(lipid nanoparticles; LNP)에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 최근 수억명의 개체에게 SARS-CoV-2에 대한 LNP-기반 mRNA 백신(주로, Moderna Inc.에 의해 Spikevax®로 시판된 엘라소메란(elasomeran) 및 Biontech SE/Pfizer Inc.에 의해 Comirnaty®로 시판된 토진메라렌(tozinameran))이 투여되었기 때문에 LNP가 주목 받아 왔다. RNA-기반 백신을 위한 전달 시스템으로서 LNP는 일반적으로 문헌 [Aldosari 등, 2021]에서 검토되고 있다. mRNA 전달을 위한 LNP는 또한 문헌 [Hou 등, 2021]에서 상세히 논의되어 있다.

[0003] 일반적으로, 핵산 카고(또는 페이로드(payload))를 갖는 LNP는 지질층 뿐만 아니라 지질 및 캡슐화된 핵산의 마이크로도메인을 포함한다. 이들은 10 nm 내지 1000 nm의 중간 직경(예를 들어 동적 광 산란(DLS)에 의해 측정됨)을 가지며, 예를 들어 구형 또는 다면체(polyhedral) 형상을 채택할 수 있다. 이들은 이들의 특정 지질 조성에 따라 다층(multilamellar)일 수 있다. LNP는 양이온성 지질(특히 낮은 pH에서, 즉 엔도솜(endosome)에 있을 때 이온화가능한 지질로도 불리우는 양성자화된 지질)을 포함한다. 전형적으로, LNP는 LNP 응집을 감소시키는 안정화제 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 지질을 더 포함한다. 또한, LNP는 통상적으로 예를 들어 전달 효능(delivery efficacy), 내약성(tolerability) 또는 생체분포(biodistribution)와 같은 특성을 개선시키는 다른 유형의 지질(종종 "헬퍼 지질(helper lipids)"로 지칭됨), 예를 들어 포스파티딜콜린(hosphatidylcholines) 또는 포스파티딜에탄올아민(phosphatidylethanolamines)을 포함한다. 마지막으로, LNP는 막 완결성(membrane integrity) 및 강성(rigidity)을 조절하는 콜레스테롤 또는 다른 스테롤을 함유할 수 있다.

[0004] LNP는 또한 예를 들어 미국 특허 US 7,404,969, US 8,058,069, US 9,364,435 및 US 9,404,127에 개시되어 있다.

[0005] WO 2017/099823 A1은 양이온성 지질, 폴리에틸렌 글리콜(PEG)-지질, 스테롤, 및 헬퍼 지질을 포함하는 가속된-혈액-제거-비민감성(accelerated-blood-clearance-insensitive) LNP를 개시하되, 여기서 헬퍼 지질은 포스파티딜 콜린을 포함하지 않는다.

[0006] WO 2020/061284 A1은 또한 PEG 지질을 갖는 LNP에 관한 것이다.

[0007] WO 2020/219941 A1은 추가의 LNP 및 LNP를 함유하는 제형을 개시한다.

[0008] WO 2021/123332 A1은 양이온성 지질 및 살아있는 세포 내로 핵산의 전달에 유용한 상기 양이온성 지질을 포함하는 LNP에 관한 것이다.

[0009] 당해 분야에서의 최근의 진보에도 불구하고, 특히 저장 안정성 및/또는 형질전환(형질감염) 효율과 관련하여 개선된 LNP에 대한 필요성이 여전히 존재한다. 예를 들어 LNP-기반 SARS-CoV-2 백신 Comirnaty®는 일반적으로 -90℃ 내지 -60℃에서 저장되어야 한다(Summary of product characteristics, version of 13 September 2022, EMEA/H/C/005735 - II/0143, European Medicines Agency - EMA). 또한, 변환 효율의 증가는 더 낮은 투여량을 허용할 것이고, 그에 의해 잠재적인 부작용을 감소시킬 것이다.

발명의 내용

[0010] 따라서, 본 발명의 목적은 핵산 카고(예를 들어 mRNA 카고)를 갖는 개선된 LNP, 특히 비-냉장 온도(예를 들어 실온)에서 증가된 형질전환 효율 및/또는 더 높은 저장 안정성을 갖는 LNP를 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명은 핵산 카고를 캡슐화하는 LNP를 제공한다. LNP는 적어도 양이온성 지질 분획(바람직하게는 적어도 하나의 이온화가능한 지질을 포함함) 및 안정화제 분획(바람직하게는 PEG 지질을 포함함)을 포함한다. LNP는 적어도 하나의 글리세롤 디알킬 글리세롤 테트라에테르(GDGT) 지질을 포함한다.

[0012] 본 발명은 또한 LNP를 포함하는 약학 조성물(특히 백신)을 제공한다. 이러한 약학 조성물은 전형적으로 추가 부형제를 포함한다. 이는 바람직하게는 (인간) 환자에서의 질환 또는 병태의 예방 또는 치료에, 특히 감염성 질환과 같은 질환을 예방하기 위한 (또는 호전시키기 위한) 백신으로서 또는 암 백신으로서 사용하기 위한 것이다.

[0013] 본 발명의 과정에서, 선행 기술에 공지된 LNP(예를 들어 Comirnaty® mRNA 백신에 사용된 LNP)를 개선시키기 위한 실험을 수행하였다. 놀랍게도, LNP 제형에 대한 GDGT 지질의 첨가는 표적 세포에서 형질전환 효율 및 LNP의 저장 안정성 둘 모두가 증가된 것으로 밝혀졌다.

[0014] 중요하게는, (위에서 보다 상세히 기재된 바와 같이) LNP는 다른 지질-함유 전달 비히클, 예를 들어 리포솜, 리포(폴리)플렉스(lipo(poly)plexes) 또는 아르카에솜(archaeosomes)과 구별되며, 특히 mRNA를 패키징하는 맥락에서 고유한 이점 뿐만 아니라 도전과제를 제시한다. 예를 들어 문헌 [Midoux & Pichon, 2014]은 다양한 지질-기반 mRNA 백신 전달 시스템을 검토하고, 리포플렉스(lipoplexes), 리포폴리플렉스(lipopolyplexes), LNP 및 양이온성 나노에멀젼 사이를 구별한다. 보다 광범위하게, RNA 치료제(예를 들어 작은 간섭 RNA 및 mRNA)에 대한 약물 전달은 지질-기반 비히클, 예를 들어 미셀(micelles), 리포솜 및 LNP에 의해 가능해진다(Paunovska 등, 2022).

[0015] LNP와 대조적으로, 리포솜은 수성 공간(aqueous space)을 둘러싸는 구형 지질 이중층 소포(spherical lipid bilayer vesicles)(지질 에스테르)이다. 이들은 약물, 백신, 유전자, 단백질, 소분자, 항생제 및 영양소의 투여를 위한 담체이다. 리포솜은 인지질, 주로 포스파티딜콜린 및 콜레스테롤로 제조되지만, 또한 다른 지질, 예를 들어 포스파티딜에탄올아민을 포함할 수 있다. 리포솜은 다수의 상이한 방법(예를 들어 문헌 [van Hoogevest, 2017; Szoka 등, 1980]에 의해 검토됨), 예를 들어 수성 매질 중에 인지질을 분산시킴으로써, 예를 들어 기계적 처리(예를 들어 균질화기에서, 바람직하게는 고압 균질화에 의해) 또는 초음파처리에 의해 생성된다. 이들은 직경이 0.02 내지 10 ㎛로 다양하다.

[0016] 아르카에솜은 아르카에아(archaea)로부터 단리된 막 지질(membrane lipids)에 기반한 특정 부류의 리포솜을 나타낸다. 아르카에솜은 지질 에테르, 즉 디에테르 구조(예를 들어 아르카에올(archaeols)) 및 테트라에테르 구조(예를 들어 GDGT, 예를 들어 칼다르카에올(caldarchaeols))로 제조된다(예를 들어 문헌 [Kaur 등, 2016; Patel 등, 1999] 참조). 디에테르 구조는 전형적으로 sn-2,3 위치 상에 2개의 피타닐 쇄(phytanyl chains)(길이 20개 내지 40개의 탄소)를 갖는 글리세롤 모이어티로 구성된다. 테트라에테르 구조는 전형적으로 역평행 방식(antiparallel manner)(칼다르카에올) 또는 평행 방식(이소-칼다르카에올(iso-caldarchaeol)) 중의 어느 하나로 2개의 글리세롤 잔기에 연결된 2개의 디-피타닐 쇄를 보유한다. 또한, 하나 또는 몇몇의 사이클로펜탄 환이 발생할 수 있다.

[0017] 본원에서 사용되는 "칼다르카에올"은 0개 내지 8개의 사이클로펜탄 모이어티를 갖는 이소프레노이드(isoprenoid) GDGT 지질의 전체 기를 지칭한다. 특히, 문헌 [Schouten 등, 2013]에 의해 제안된 명명법이 본원에서 사용된다: GDGT-x"(여기서, x는 사이클로펜탄 모이어티의 수, 즉 GDGT-0, GDGT-1, GDGT-2, GDGT-3, GDGT-4, GDGT-5, GDGT-6, GDGT-7 및 GDGT-8을 나타냄). 이들 모두는 칼다르카에올의 기에 속한다.

[0018] 조성물(예를 들어 아르카에올 대 칼다르카에올의 양)에 따라, 아르카에솜의 지질 층은 단일- 또는 이중-층 또는 이들의 혼합물이다.

[0019] WO 2020/187526 A1은 주로 경구 급성 또는 경구 지연 전달용으로 의도된, 설포로부스(*Sulfolobus*) 세포 배양물로부터의 아르카에알 지질(archaeal lipids)을 포함하는 아르카에솜을 개시한다.

[0020] WO 2014/143806 A1은 산-안정성 리포솜 조성물에 관한 것이다. 이들 지질 제형은 이들의 안정성으로 인해 통상적인 리포솜보다 우수한 것으로 주장되며, 그에 의해 생활성제(bioactive agents)의 정맥내 전달에 대한 필요성을 회피한다.

[0021] 문헌 [Zavec 등, 2014]은 아르카에솜이 시험관내에서 상이한 유형의 카고(cargo)를 상피 세포 내로 효율적으로 전달할 수 있음을 개시한다.

[0022] 문헌 [Vishakarma 등, 2019]은 이들 중에서 림프 수송을 위한 다양한 지질-기반 담체, 리포솜 및 아르카에솜을 검토하고 있다.

[0023] 또한 아르카에솜과 관련하여, 문헌 [Daswani 등, 2021]은 설포로부스 아시도칼다리우스(*Sulfolobus acidocaldarius*)로부터의 극성 지질 분획 E가 테트라에테르/디에스테르 하이브리드 아르카에솜으로부터의 항혈관성 약물 콤브레타스타틴(antivascular drug combretastatin) a4 이나트륨 포스페이트의 누출을 감소시키기 위

한 리포솜 약물 안정화제로서 사용될 수 있음을 개시한다.

[0024] 아르카에솜과 대조적으로, LNP는 양이온성 지질(특히 이온화가능한 지질)을 함유한다.

[0025] 본 발명의 바람직한 구현예에서, 양이온성 지질은 이온화가능한 지질(즉, 엔도소멀(endosomal) pH, 예를 들어 5.0 내지 6.5, 예를 들어 pH 5.0, 5.5, 6 또는 6.5의 pH에서 전체 양전하를 보유하지만, 더 높은 pH, 예를 들어 pH 7.0에서 중성인 지질)이다.

[0026] 또 다른 바람직한 구현예에서, 양이온성 지질 분획은 [(4-하이드록시부틸)아잔디일]디(헥산-6,1-디일)비스(2-헥실데카노에이트)(ALC-0315), 헵타데칸-9-일 8-{(2-하이드록시에틸)[6-옥소-6-(운데실옥시)헥실]아미노}옥타노에이트(SM-102), 3-(디도데실아미노)-N1,N1,4-트리도데실-1-피페라진에탄아민(KL10), N1-[2-(디도데실아미노)에틸] N1,N4,N4-트리도데실-1,4-피페라진디에탄아민(KL22), 14,25-디트리데실-15,18,21,24-테트라아자-옥타트리아콘탄(KL25), 1,2-디리놀레일옥시-N,N-디메틸아미노프로판(DLin-DMA), 2,2-디리놀레일-4-디메틸아미노메틸-[1,3]-디옥솔란(DLin-K-DMA), 헵타트리아콘타-6,9,28,31-테트라엔-19-일-4-(디메틸아미노)부타노에이트(DLin-MC3-DMA), 2,2-디리놀레일-4-(2-디메틸아미노에틸)-[1,3]-디옥솔란(DLin-KC2-DMA), 1,2-디올레일옥시-N,N-디메틸아미노프로판(DODMA), 2-({8[(3β)-콜레스트-5-엔-3-일옥시]옥틸}옥시) N,N 디메틸-3-[(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디엔-1-일옥시]프로판-1-아민(옥틸-CLinDMA), (2R)-2-({8-[(3β)-콜레스트-5-엔-3-일옥시]옥틸}옥시)-N,N-디메틸-3-[(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디엔-1-일옥시]프로판-1-아민(옥틸-CLinDMA(2R)), (2S) 2-({8-[(3β)-콜레스트-5-엔-3-일옥시]옥틸}옥시)-N,N-디메틸-3-[(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디엔-1-일옥시]프로판-1-아민(옥틸-CLinDMA(2S)) 및 이들의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 양이온성 지질(예를 들어 이온화가능한 지질)을 포함한다. 대안적으로, 또는 그에 더하여, 양이온성 지질 분획은 바람직하게는 (20Z,23Z)-N,N-디메틸노나코사-20,23-디엔-10-아민, (17Z,20Z)-N,N-디메틸헥사코사-17,20-디엔-9-아민, (1Z,19Z)-N5N-디메틸펜타코사-16,19-디엔-8-아민, (13Z,16Z)-N,N-디메틸도코사-13,16-디엔-5-아민, (12Z,15Z)-N,N 디메틸헤니코사-12,15-디엔-4-아민, (14Z,17Z)-N,N-디메틸트리코사-14,17-디엔-6-아민, (15Z,18Z)-N,N-디메틸테트라코사-15,18-디엔-7-아민, (18Z,21Z)-N,N-디메틸헵타코사-18,21-디엔-10-아민, (15Z,18Z)-N,N-디메틸테트라코사-15,18-디엔-5-아민, (14Z,17Z)-N,N-디메틸트리코사-14,17-디엔-4-아민, (19Z,22Z)-N,N-디메틸헵타코사-19,22-디엔-9-아민, (18Z,21Z)-N,N-디메틸헵타코사-18,21-디엔-8-아민, (17Z,20Z)-N,N-디메틸헥사코사-17,20-디엔-7-아민, (16Z,19Z)-N,N-디메틸펜타코사-16,19-디엔-6-아민, (22Z,25Z)-N,N-디메틸헨트리아콘타-22,25-디엔-10-아민, (21Z,24Z)-N,N-디메틸트리아콘타-21,24-디엔-9-아민, (18Z)-N,N-디메틸헵타코사-18-엔-10-아민, (17Z)-N,N-디메틸헥사코사-17-엔-9-아민, (19Z,22Z)-N,N-디메틸옥타코사-19,22-디엔-7-아민, N,N-디메틸헵타코산-10-아민, (20Z,23Z)-N-에틸-N-메틸노나코사-20,23-디엔-10-아민, 1-(11Z,14Z)-1-노닐이코사-11,14-디엔-1-일피롤리딘, (20Z)-N,N-디메틸헵타코사-20-엔-10-아민, (15Z)-N,N-디메틸헵타코사-15-엔-10-아민, (14Z)-N,N-디메틸노나코사-14-엔-10-아민, (17Z)-N,N-디메틸노나코사-17-엔-10-아민, (24Z)-N,N-디메틸트리아콘타-24-엔-10-아민, (20Z)-N,N-디메틸노나코사-20-엔-10-아민, (22Z)-N,N-디메틸헨트리아콘타-22-엔-10-아민, (16Z)-N,N-디메틸펜타코사-16-엔-8-아민, (12Z,15Z)-N,N-디메틸-2-노닐헤니코사-12,15-디엔-1-아민, (13Z,16Z)-N,N-디메틸-3-노닐도코사-13,16-디엔-1-아민, N,N-디메틸-1-[(1S,2R)-2-옥틸사이클로프로필] 헵타데칸-8-아민, 1-[(1S,2R)-2-헥실사이클로프로필]-N,N-디메틸노나데칸-10-아민, N,N-디메틸-1-[(1S,2R)-2-옥틸사이클로프로필]노나데칸-10-아민, N,N-디메틸-1-[(1S,2R)-2-옥틸사이클로프로필]헤니코산-10-아민, N,N-디메틸-1-[(1S,2S)-2-{[(1R,2R)-2-펜틸사이클로프로필]메틸}사이클로프로필]노나데칸-10-아민, N,N-디메틸-1-[(1S,2S)-2-옥틸사이클로프로필]헥사데칸-8-아민, N,N-디메틸-3-{7-[(1S,2R)-2-옥틸사이클로프로필]헵틸}도데칸-1-아민, 1-[(1R,2S)-2-헵틸사이클로프로필]-N,N-디메틸옥타데칸-9-아민, 1-[(1S,2R)-2-데실사이클로프로필]-N,N-디메틸펜타데칸-6-아민, N,N-디메틸-1-[(1S,2R)-2-옥틸사이클로프로필]펜타데칸-8-아민, R-N,N-디메틸-1-[(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디엔-1-일옥시]-3-(옥틸옥시)프로판-2-아민, S-N,N-디메틸-1-[(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디엔-1-일옥시]-3-(옥틸옥시)프로판-2-아민, 1-{2-[(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디엔-1-일옥시]-1-[(옥틸옥시)메틸]에틸}피롤리딘, (2S)-N,N-디메틸-1-[(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디엔-1-일옥시]-3-[(5Z)-옥트-5-엔-1-일옥시]프로판-2-아민, 1-{2-[(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디엔-1-일옥시]-1-[(옥틸옥시)메틸]에틸}아제티딘, (2S)-1-(헥실옥시)-N,N-디메틸-3-[(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디엔-1-일]옥시프로판-2-아민, (2S)-1-(헵틸옥시)-N,N-디메틸-3-[(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디엔-1-일옥시]프로판-2-아민, N,N-디메틸-1-(노닐옥시)-3-[(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디엔-1-일옥시]프로판-2-아민, N,N-디메틸-1-[(9Z)-옥타데카-9-엔-1-일옥시]-3-(옥틸옥시)프로판-2-아민; (2S)-N,N-디메틸-1-[(6Z,9Z,12Z)-옥타데카-6,9,12-트리엔-1-일옥시]-3-(옥틸옥시)프로판-2-아민, (2S)-1-[(11Z,14Z)-이코사-11,14-디엔-1-일옥시]-N,N-디메틸-3-(펜틸옥시)프로판-2-아민, (2S)-1-(헥실옥시)-3-[(11Z,14Z)-이코사-11,14-디엔-1-일옥시]-N,N-디메틸프로판-2-아민, 1-[(11Z,14Z)-이코사-11,14-디엔-1-일옥시]-N,N-디메틸-3-(옥틸옥시)프로판-2-아민, 1-[(13Z,16Z)-도코사-13,16-디엔-1-일옥시]-

N,N-디메틸-3-(옥틸옥시)프로판-2-아민, (2S)-1-[(13Z,16Z)-도코사-13,16-디엔-1-일옥시]-3-(헥실옥시)-N,N-디메틸프로판-2-아민, (2S)-1-[(13Z)-도코스-13-엔-1-일옥시]-3-(헥실옥시)-N,N-디메틸프로판-2-아민, 1-[(13Z)-도코스-13-엔-1-일옥시]-N,N-디메틸-3-(옥틸옥시)프로판-2-아민, 1-[(9Z)-헥사덱-9-엔-1-일옥시]-N,N-디메틸-3-(옥틸옥시)프로판-2-아민,
(2R)-N,N-디메틸-H(1-메토일옥틸)옥시]-3-[(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디엔-1-일옥시]프로판-2-아민, (2R)-1-[(3,7-디메틸옥틸)옥시]-N,N-디메틸-3-[(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디엔-1-일옥시]프로판-2-아민, N,N-디메틸-1-(옥틸옥시)-3-({8-[(1S,2S)-2-[(1R,2R)-2-펜틸사이클로프로필]메틸}사이클로프로필]옥틸}옥시)프로판-2-아민, N,N-디메틸-1-{[8-(2-옥틸사이클로프로필)옥틸]옥시}-3-(옥틸옥시)프로판-2-아민, (11E,20Z,23Z)-N,N-디메틸노나코사-11,20,2-트리엔-10-아민, 및 그들의 약학적으로 허용가능한 염 및 입체이성질체, 및 이들의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0027] 추가의 적합한 양이온성 지질(특히 이온화가능한 지질)은 예를 들어 문헌 [Hou 등, 2021], 미국 특허 US 7,404,969, US 8,058,069, US 9,364,435 및 US 9,404,127, WO 2017/099823 A1, WO 2020/061284 A1, WO 2020/219941 A1 및 WO 2021/123332 A1에 개시되어 있다. 이들 문헌은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0028] 심지어 추가의 적합한 양이온성 지질은 예를 들어 WO 2017/049245 A1, WO 2017/112865 A1, WO 2012/040184, WO 2011/153120 A1, WO 2011/149733 A1, WO 2011/090965 A1, WO 2011/043913 A1, WO 2011/022460 A1, WO 2012/061259 A1, WO 2012/054365 A1, WO 2012/044638 A1, WO 2010/080724 A1, WO 2010/21865 A1, WO 2008/103276 A1, WO 2013/086373 A1 및 WO 2013/086354 A1, 미국 특허 제7,893,302호, 제7,404,969호, 제8,283,333호, 및 제8,466,122호 및 미국 특허 공보 US20100036115, US20120202871, US20130064894, US20130129785, US20130150625, US20130178541, 및 US20130225836에 개시되어 있다. 이들 문헌은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다

[0029] 본 발명의 LNP의 안정화제 분획은 전형적으로, LNP 응집을 감소시키는 것, 평균 입자 크기 또는 유체역학적 반경을 증가시키는 것, 생체 내에서(예를 들어 인간에서, 특히 혈액 순환에서) LNP의 반감기를 증가시키는 것, 및 제타 전위를 변형시키는 것 중의 하나 이상을 달성하기에 적합하다.

[0030] 특히 바람직하게는, 안정화제 분획은 적어도 하나의 PEG 지질을 포함한다. 적합한 PEG 지질은 예를 들어 2-(폴리에틸렌 글리콜)-2000-N,N-디테트라데실아세트아미드(ALC-0159), 페길화된 디아실글리세롤 지질(PEG-DAG), 페길화된 세라마이드 지질(PEG-Cer), 페길화된 포스파티딜에탄올아민 지질(PEG-PE), 페길화된 석시네이트 디아실글리세롤 지질(PEG-S-DAG), 페길화된 디알콕시프로필카바메이트 지질, 1,2-디미리스토일-rac-글리세로-3-메톡시폴리에틸렌 글리콜("PEG-DMG" 또는 "DMG-PEG"), 특히 PEG2000-DMG, 1,2-디카프릴-rac-글리세로-3-메틸폴리옥시에틸렌 글리콜 (Ci_0-디아실글리세롤 PEG), N-옥타노일-스핑고신-1-{석시닐[메톡시(폴리에틸렌 글리콜)2000]}(N-옥타노일-D-에리트로-스핑고신(d18:1/8:0)을 포함함, 또한 PEG-세라마이드 8로 명명됨), 또는 WO 2018/126084 A1, WO 2020/093061 A1, 또는 WO 2020/219941 A1(3개의 참고문헌은 모두 그 전문이 본원에 참조로 포함됨)에 개시된 바와 같은 PEG 지질; 및 그들의 임의의 조합이다.

[0031] 적합한 추가의 적합한 PEG 지질은 예를 들어 문헌 [Hou 등, 2021], WO 2017/099823, WO 2020/061284 A1, WO 2020/219941 A1 및 WO 2021/123332 A1에 개시되어 있다. 이들 문헌 모두는 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0032] 대안적으로, 또는 그에 더하여, 안정화제 분획은 적어도 하나의 비-PEG 모이어티, 예를 들어 지질에 접합될 수 있거나 접합될 수 없는 XTEN 펩티드를 포함할 수 있다. XTEN 펩티드는 그의 친수성 특성으로 인해 LNP 주위에 수화된 쉘을 형성할 수 있다. 안정화제 분획이 결여된 (또는 없는) LNP와 비교하여, 이는 LNP의 반감기를 추가로 증가시키는 역할을 한다. XTEN 아미노산 서열은 관련 기술분야에 공지되어 있으며, 예를 들어 미국 특허 제9,062,299호(그 전문이 본원에 참조로 포함됨)에 보고된 것을 포함한다. 대안적으로, 또는 그에 더하여, 일부 구현예에서, 안정화제 분획은 비-PEG 모이어티, 예를 들어 PAS 펩티드(지질에 접합될 수 있거나 접합될 수 없음)를 포함할 수 있다. PAS 펩티드는 제한되지는 않지만 주로 프롤린, 알라닌 및 세린을 포함하는 펩티드이다. PEG 및 XTEN 펩티드와 같이, PAS 펩티드는 LNP 주위에 수화된 쉘을 형성할 수 있다. 안정화제 분획이 결여된 (또는 없는) LNP와 비교하여, 이는 또한 LNP의 반감기를 증가시키는 역할을 한다. PAS 아미노산 서열은 관련 기술분야에 공지되어 있으며, 예를 들어 WO 2008/155134 A1(그 전문이 본원에 참조로 포함됨)에 보고된 것을 포함한다.

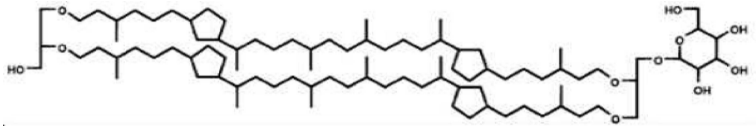
[0033] GDGT 지질(본원에서 "GDGT"로도 지칭됨)은 극지성 아르카에아의 막 지질로서 발견되었지만, 보다 최근에는 일부 박테리아의 막 성분으로서도 관찰되었다(문헌 [Schouten 등, 참조). 아르카에아 내의 많은 계통발생성 기는 GDGT를 합성한다. 이들은 세포막에서 이중층 대신에 단층을 형성한다. 본 발명의 과정에서, GDGT 지질은 뜻밖에

도 핵산 카고와 함께 LNP의 특성(예를 들어 저장 안정성 및 형질전환 효율)을 개선시키는데 매우 적합한 것으로 밝혀졌다.

[0034] 따라서, 상기 언급된 바와 같이, 본 발명의 LNP는 적어도 하나의 GDGT 지질을 포함한다. 이러한 GDGT 지질은 예를 들어 이소프레노이드 GDGT 지질 예를 들어 GDGT-0, GDGT-1, GDGT-2, GDGT-3, GDGT-4, GDGT-5, GDGT-6, GDGT-7 및 GDGT-8, 또는 크레나케올(crenarchaeol)(비치환된, 문헌 [Schouten 등, 2013] 참조, 도 1, 또는 치환된), 또는 분지형 GDGT, 예를 들어 GDGT-I, GDGT-II 또는 GDGT-III, 또는 그들의 임의의 혼합물일 수 있다. 특히, GDGT 지질은 문헌 [Schouten 등, 2013](특히 도 1), [Kaur 등, 2016](특히 도 2, 도 3 및 도 4), 및 WO 2020/187526 A1(모두 그 전문이 본원에 참조로 포함됨)에 개시된 GDGT 중의 임의의 것을 포함할 수 있다. GDGT는 (예를 들어 헥소스 모이어티 또는 포스파티딜이노시톨 모이어티로) 치환되거나 비치환될 수 있다.

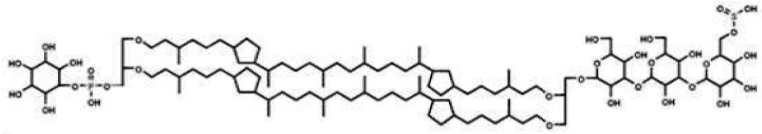
[0035] 칼다르카에올(예를 들어 설포로부스로부터 수득됨)은 본 발명에 특히 적합한 것으로 밝혀졌으며, 이는 LNP의 안정성 및 형질전환 효율을 둘 다 증가시킨다(또한 실시예 및 도면 참조). 바람직한 구현예에 따르면, (LNP의 에테르 지질 분획의) 적어도 하나의 GDGT 지질은 따라서 바람직하게는 비치환된 칼다르카에올, 포스파티딜이노시톨(PI)-칼다르카에올, 디헥소스(2Hex)-칼다르카에올 및 2Hex-PI-칼다르카에올(특히 WO 2020/187526 A1, 도 4에 개시된 바와 같음), 헥소스(Hex)-칼다르카에올 및 설포노-트리헥소스(3Hex)-칼다르카에올, 설포노-3Hex-PI-칼다르카에올, 및 그들의 임의의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 칼다르카에올을 포함한다.

[0036] 특히 바람직한 Hex-칼다르카에올은:

[0037] 

[0038] 이다.

[0039] 특히 바람직한 설포노-3Hex-PI-칼다르카에올은:

[0040] 

[0041] 이다.

[0042] 본 발명의 LNP는 RNA 카고에 특히 적합하다. 따라서, 바람직한 구현예에서, 핵산 카고는 적어도 하나의 (치료적) RNA를 포함한다. 적합한 RNA 페이로드의 구체예는 예를 들어 문헌 [Paunovska 등, 2022](특히 도 1)에 개시되어 있다. 구현예에서, 카고는 작은 간섭 RNA(siRNA), 안티센스 올리고뉴클레오티드, RNA(ADAR) 올리고뉴클레오티드 또는 mRNA에 작용하는 아데노신 데아미나제(adenosine deaminase)일 수 있다.

[0043] RNA는 예를 들어 그의 화학적 안정성을 개선시키기 위해 화학적으로 변형될 수 있다. 예를 들어 이는 뉴클레오시드 유사체 예를 들어 화학적으로 변형된 염기 또는 당을 갖는 유사체, 및 백본 변형을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, RNA는 뉴클레오시드 유사체(예를 들어 2-아미노아데노신, 2-티오티미딘, 이노신(inosine), 피롤로-피리미딘, 3-메틸 아데노신, 5-메틸시티딘, 2-아미노아데노신, C5-브로모우리딘, C5-플루오로우리딘, C5-요오도우리딘, C5-프로피닐-우리딘, C5-프로피닐-시티딘, C5-메틸-시티딘, 2-아미노아데노신, 7-데아자아데노신, 7-데아자구아노신, 8-옥소아데노신, 8-옥소구아노신, O(6)-메틸구아닌, 및 2-티오시티딘); 화학적으로 변형된 염기; 생물학적으로 변형된 염기(예를 들어 메틸화된 염기); 삽입된 염기; 변형된 당(예를 들어 2'-플루오로리보스, 리보스, 2'-데옥시리보스, 아라비노스, 및 헥소스); 및/또는 변형된 포스페이트 기(예를 들어 포스포로티오에이트 및 5'-N-포스포라미다이트 연결)를 포함할 수 있다. 추가의 변형은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있다. 적합한 변형은 예를 들어 WO 2017/099823 A1 및 WO 2020/061284 A1에 개시되어 있다(각각 그 전문이 참고로 포함됨).

[0044] 본 발명의 과정에서, GDPD 지질은 특히 mRNA 페이로드에 대해 LNP 특성을 개선시키는 것으로 밝혀졌다. 따라서, 특히 바람직한 구현예에 따르면, LNP의 핵산 카고는 mRNA를 포함한다. mRNA는 예를 들어 치료적 mRNA 또는 백신 항원을 암호화하는 mRNA일 수 있다. mRNA는 코돈-최적화될 수 있다. 적합한 mRNA의 구체예는 예를 들어 WO 2017/099823 A1 및 WO 2020/061284 A1(각각 그 전문이 본원에 참조로 포함됨), 특히 후자의 단락 [0023] 내지

[0024]에 제공되어 있다.

[0045] 바람직한 추가 구현예에 따르면, LNP는 적어도 하나의 추가의 에테르 지질, 바람직하게는 디에테르 지질(특히 아르카에올)을 포함한다. 특히, 디에테르 지질은 문헌 [Kaur , 2016] 및 WO 2020/187526 A1에 개시된 디에테르 지질 중의 임의의 것을 포함할 수 있다(모두 그 전문이 본원에 참조로 포함됨). 디에테르 지질(특히 아르카에올)은 (예를 들어 헥소스 모이어티 또는 포스파티딜이노시톨 모이어티로) 치환되거나 비치환될 수 있다. 특히 바람직한 치환된 아르카에올은 포스파티딜 이노시톨-아르카에올(PI-Arc)이다.

[0046] 또 다른 바람직한 구현예에 따르면, LNP는 적어도 하나의 GDGT 지질(특히 상기 개시된 바와 같은 "적어도 하나의 GDGT 지질", 특히 칼다르카에올) 및 바람직하게는 적어도 하나의 추가의 에테르 지질(특히 상기 개시된 바와 같은 디에테르 지질)을 포함하는 에테르 지질 분획을 포함한다.

[0047] 에테르 지질 분획이 아르카에알 배양물, 바람직하게는 설포로부스(*Sulfolobus*) 배양물, 더욱 바람직하게는 설포로부스 아시도칼다리우스(*Sulfolobus acidocaldarius*) 배양물로부터의 추출에 의해 수득가능한 에테르 지질을 포함하는 경우가 특히 바람직하다. 적합한 성장 조건 및 추출 방법은 예를 들어 WO 2020/187526 A1(그 전문이 본원에 참조로 포함됨)에 개시되어 있다. 특히, 전체 에테르 지질 분획은 상기 배양물로부터의 추출에 의해 수득가능하다.

[0048] 구현예에서, 아르카에알 배양물은 또한 예를 들어 에스. 아시도칼다리우스(*S. acidocaldarius*), 엠. 헌가테이(*M. hungatei*), 엠. 볼타에(*M. voltae*), 엠. 콘실리이(*M. concilii*), 엠. 스미티이(*M. smithii*), 엠. 에스파놀라에(*M. espanolae*), 티. 아시도필룸(*T. acidophilum*), 엠. 마제이(*M. mazei*), 엠. 에스파놀라에(*M. espanole*), 티. 아시도필룸(*T. acidophilum*), 에이치. 살리나룸(*H. salinarum*), 엠. 스미티이(*M. smithii*), 엠. 스타드만나에(*M. stadtmanae*), 에이치. 할로븀(*H. halobium*), 에이치. 모르루아에(*H. morrhuae*), 엠. 야나쉬이(*M. jannaschii*), 에스. 이슬란디쿠스(*S. islandicus*), 에스. 솔파타리쿠스(*S. solfataricus*), 에스. 시바타에(*S. shibatae*), 에스. 토코다이이(*S. tokodaii*), 에스. 메탈리쿠스(*S. Metallicus*), 엠. 세둘라(*M. sedula*), 에이치. 히스파니카(*H. hispanica*) 또는 에이치. 볼카니이(*H. volcanii*)의 배양물, 또는 이들의 혼합물(공-배양물)일 수 있다.

[0049] 예를 들어 전체 아르카에알 지질은 클로로포름/메탄올/물을 사용하는 유기 용매 추출에 의해 예를 들어 동결건조된 또는 분무 건조된 바이오매스로부터 추출될 수 있다. 이어서, 극성 및 중성 지질은 아세톤을 이용한 침전에 의해 분리될 수 있다. 생성된 지질 추출물은 LNP 생산에 사용되는 에테르 지질 분획의 제조에 직접 사용될 수 있거나, 또는 LNP 생산에 사용될 특정 부류의 에테르 지질을 단리하기 위해 크로마토그래피에 의해 추가로 정제될 수 있다.

[0050] 아르카에알로부터 지질을 제조하거나 아르카에알을 배양하는 방법이 또한 예를 들어 US 2017/0152533 A1, US 6,316,260 B1, EP 1 999 137 B1, EP 0 883 624 B1, EP 2 109 459 B1, 문헌 [Siliakus 등, 2017], WO 2020/187526 A1, 문헌 [Jain 등, 2014]에 개시되어 있으며, 이들 각각은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0051] LNP 자체는 GDGT 지질을 포함하는 LNP 성분(분획)의 미세유체 혼합(microfluidic mixing)에 의해 제조될 수 있다(예를 들어 단리된 형태로 또는 여러 에테르 지질을 포함하는 에테르 지질 분획으로 존재함). 적합한 LNP 제조 방법은 예를 들어 WO 2017/099823 A1, WO 2020/061284 A1 및 WO 2021/123332 A1에 개시되어 있으며, 이들 각각은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. 추가의 LNP 제조 방법은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 이용가능하다.

[0052] 또 다른 바람직한 구현예에 따르면, LNP는 스테롤 지질 분획을 더 포함한다. LNP 내의 스테롤 지질의 혼입은 LNP 내의 다른 지질의 응집을 완화시킨다.

[0053] 스테롤 지질은 바람직하게는 콜레스테롤, 페코스테롤(fecosterol), 시토스테롤(sitosterol), 에르고스테롤(ergosterol), 캄페스테롤(campesterol), 스티그마스테롤(stigmasterol), 브라시카스테롤(brassicasterol), 피토스테롤(phytosterols) 및 이들의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택된다. 바람직한 정의에 따르면, "스테롤 지질(sterol lipids)"은 스테로이드 알콜로 구성되는 스테로이드의 전체 하위군(subgroup)을 포함한다.

[0054] 특히, 스테롤 지질 분획은 콜레스테롤을 포함한다.

[0055] 또 다른 바람직한 구현예에 따르면, LNP는 헬퍼 지질 분획(helper lipid fraction)을 더 포함한다. 본 발명에 유용한 헬퍼 지질은 비-양이온성 지질을 포함한다(바람직하게는 그로 구성된다). 특히, 헬퍼 지질은 인지질일 수 있다.

[0056] 바람직하게는, 헬퍼 지질은 디스테아로일포스파티딜콜린(DSPC), 디올레오일포스파티딜에탄올아민(DOPE), 디팔미토일포스파티딜콜린(DOPC), 포스파티딜콜린(PC) 및 이들의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택된다. 추가의 적합한 헬퍼 지질은 예를 들어 1,2-디리놀레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린(DLPC), 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포콜린(DMPC), 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포콜린(DPPC), 1,2-디운데카노일-sn-글리세로-3-포스포콜린(DUPC), 1-팔미토일-2-올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린(POPC), 1,2-디-O-옥타데세닐-sn-글리세로-3-포스포콜린(18:0 디에테르 PC), 1-올레오일-2-콜레스테릴헤미석시노일-sn-글리세로-3-포스포콜린(OChemsPC), 1-헥사데실-sn-글리세로-3-포스포콜린(C16 리소 PC), 1,2-디리놀레노일-sn-글리세로-3-포스포콜린, 1,2-디아라키도노일-sn-글리세로-3-포스포콜린, 1,2-디도코사헥사에노일-sn-글리세로-3-포스포콜린, 1,2-디피타노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(ME 16.0 PE), 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민, 1,2-디리놀레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민, 1,2-디리놀레노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민, 1,2-디아라키도노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민, 1,2-디도코사헥사에노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민, 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포-rac-(1-글리세롤) 나트륨 염(DOPG), 스핑고미엘린(sphingomyelin), 및 이들의 혼합물이다.

[0057] 추가의 적합한 헬퍼 지질 및 스테롤 지질은 예를 들어 WO 2017/099823 A1 및 WO 2020/061284 A1에 개시되어 있으며, 이는 본원에 참조로 포함된다.

[0058] LNP 조성물 중의 특정 (몰) 비는 특히 저장 안정성 및/또는 형질전환 효율과 관련하여 개선된 LNP를 달성하기에 특히 적합한 것으로 밝혀졌다:

[0059] 따라서, 에테르 지질 분획(상기 정의된 바와 같음)은 LNP의 1 mol% 내지 20 mol%의 총 지질, 바람직하게는 2 mol% 내지 15 mol%의 총 지질, 보다 더 바람직하게는 4 mol% 내지 12 mol%의 총 지질, 특히 6 mol% 내지 10 mol%의 총 지질 또는 심지어 7 mol% 내지 9 mol%의 총 지질을 차지하는 것이 바람직하다.

[0060] 대안적으로 또는 그에 더하여, 에테르 지질 분획 대 헬퍼 지질 분획의 몰비는 20:1 내지 1:20, 바람직하게는 15:1 내지 1:10, 보다 바람직하게는 12:1 내지 1:3, 보다 더 바람직하게는 8:1 내지 4:1, 특히 7:1 내지 5:1인 것이 바람직하다.

[0061] 추가로, 대안적으로 또는 그에 더하여, 에테르 지질 분획 대 스테롤 지질 분획의 몰비는 0.25:1 내지 1:30, 바람직하게는 0.5:1 내지 1:20, 보다 바람직하게는 1:1 내지 1:10, 보다 더 바람직하게는 1:2 내지 1:6, 특히 1:3 내지 1:5인 것이 바람직하다.

[0062] 특히 우수한 결과는 하기 LNP로 달성되었고, 따라서 본 발명의 또 다른 바람직한 구현예(LNP의 총 지질, 즉 100 mol%)를 형성한다:

[0063] (a) 40 mol% 내지 70 mol%의 양이온성 지질 분획,

[0064] (b) 5 mol% 내지 20 mol%의 헬퍼 지질 분획,

[0065] (c) 20 mol% 내지 40 mol%의 스테롤 지질 분획,

[0066] (d) 0.1 mol% 내지 4 mol%의 안정화제 분획, 및

[0067] (e) 1 mol% 내지 20 mol%의 에테르 지질 분획(특히 2 mol% 내지 15 mol%, 보다 더 바람직하게는 4 mol% 내지 12 mol%, 특히 6 mol% 내지 10 mol% 또는 심지어 7 mol% 내지 9 mol%).

[0068] 본원을 읽은 당업자에게 명백한 바와 같이, 상기 주어진 이들 비율 및 mol%는 LNP의 전체 집단(예를 들어 약학 조성물에 존재하는 모든 LNP)에 대한 평균 값으로서 관찰될 수 있다.

[0069] 본 발명의 약학 조성물(본 발명의 복수의 LNP를 포함함)은 바람직하게는 적어도 하나의 부형제와 함께 제공된다. 본 발명의 약학 조성물에 적합한 부형제는 본 명세서를 읽은 당업자에게 공지되어 있고, 예를 들어 물(특히 주사용수), 염수, 링거액, 덱스트로스 용액, 완충액(buffer), 행크 용액(Hank solution), 염수 중의 5% 덱스트로스, 등장성 및 화학적 안정성을 증진시키는 물질, 완충액 및 보존제이다. 이러한 약학 조성물(약물로서)은 이를 필요로 하는 환자 또는 개체(즉, 본원에서 언급된 질환 또는 병태를 갖거나 발병할 위험이 있는 환자 또는 개체)에게 (본 명세서를 읽은) 당업자에게 공지된 적절한 절차를 통해 투여될 수 있다. 상기 약학 조성물의 바람직한 투여 경로는 비경구 투여, 특히 복강내, 피하, 근육내 및/또는 정맥내 투여이다. 투여량 및 투여 방법은 치료될 개별 환자 또는 개체에 따라 달라진다. 상기 약학 조성물은 다른 생물학적 투여 요법으로부터 공지된 임의의 적합한 투여량으로 또는 구체적으로 평가되고 주어진 개체에 대해 최적화된 투여량으로 투여될 수 있다. 예를 들어 핵산 카고는 약학 조성물에 1 mg 내지 10 g, 바람직하게는 50 mg 내지 2 g, 특히

100 mg 내지 1 g의 양으로 존재할 수 있다. 통상적인 투여량은 또한 환자의 kg 체중을 기준으로 결정될 수 있으며, 예를 들어 바람직한 투여량은 0.1 mg 내지 100 mg/kg 체중, 특히 1 내지 10 mg/kg 체중(투여 기간당)의 범위이다. 투여는 예를 들어 매일 1회, 격일로 1회, 주당 1회 또는 2주마다 1회 일어날 수 있다. 본 발명의 약학 조성물의 바람직한 투여 방식은 비경구 투여이므로, 본 발명에 따른 약학 조성물은 바람직하게는 액체이거나 액체, 예를 들어 멸균, 탈이온수 또는 증류수 또는 멸균 등장성 포스페이트-완충 염수(PBS) 중에 용해될 준비가 되어 있다. 바람직하게는, 1000 μg(건조-중량)의 이러한 조성물은 0.1 내지 990 μg, 바람직하게는 1 내지 900 μg, 보다 바람직하게는 10 내지 200 μg의 화합물, 및 선택적으로 1 내지 500 μg, 바람직하게는 1 내지 100 μg, 보다 바람직하게는 5 내지 15 μg의 (완충액) 염(바람직하게는 최종 부피로 등장성 완충액을 수득하기 위함), 및 선택적으로 0.1 내지 999.9 μg, 바람직하게는 100 내지 999.9 μg, 보다 바람직하게는 200 내지 999 μg의 다른 부형제를 포함한다. 바람직하게는, 100 mg의 이러한 건조 조성물을 멸균, 탈이온화수/증류수 또는 멸균 등장성 포스페이트-완충된 염수(PBS) 중에 용해시켜서 0.1 내지 100 ml, 바람직하게는 0.5 내지 20 ml, 보다 바람직하게는 1 내지 10 ml의 최종 부피를 수득한다.

[0070] 특히 바람직하게는, 본 발명의 LNP는 특히 ISO 22412:2017에 따라 DLS에 의해 측정되는 10 nm 내지 900 nm, 바람직하게는 20 nm 내지 750 nm, 보다 바람직하게는 30 nm 내지 500 nm, 특히 40 nm 내지 250 nm 또는 심지어 50 nm 내지 150 nm의 z-평균 직경을 갖는다. ISO 22412-2017에 정의된 바와 같은 z-평균 직경은 큐물런트 방법(cumulants method)에 의해 결정되고, 산란된 광 강도-가중 고조파 평균 입자 직경을 수득한다. 예를 들어 문헌 [Markova 등, 2022]은 LNP의 z-평균 직경을 측정하는 방법을 상세히 개시한다.

[0071] 본 발명은 추가로 하기 구현예에 관한 것이다:

[0072] 구현예 1. 핵산 카고(nucleic acid cargo)를 캡슐화하는 LNP로서,

[0073] 상기 LNP는 적어도

[0074] - 바람직하게는 적어도 하나의 이온화가능한 지질을 포함하는 양이온성 지질 분획(cationic lipid fraction), 및

[0075] - 안정화제 분획;

[0076] 을 포함하고;

[0077] 상기 LNP는 적어도 하나의 GDGT 지질을 포함하는,

[0078] LNP.

[0079] 구현예 2. 구현예 1에 있어서,

[0080] 상기 핵산 카고는 mRNA를 포함하는, LNP.

[0081] 구현예 3. 구현예 1 또는 2에 있어서,

[0082] 상기 안정화제 분획은 적어도 하나의 PEG 지질을 포함하는, LNP.

[0083] 구현예 4. 구현예 1 내지 3 중의 어느 하나에 있어서,

[0084] 상기 LNP는, 바람직하게는 콜레스테롤을 포함하는, 스테롤 지질 분획을 더 포함하는, LNP.

[0085] 구현예 5. 구현예 1 내지 4 중의 어느 하나에 있어서,

[0086] 상기 LNP는 헬퍼 지질 분획(helper lipid fraction)을 더 포함하는, LNP.

[0087] 구현예 6. 구현예 1 내지 5 중의 어느 하나에 있어서,

[0088] 상기 적어도 하나의 GDGT 지질은 바람직하게는 비치환된 칼다르카에올, 포스파티딜이노시톨(PI)-칼다르카에올, 디헥소스(2Hex)-칼다르카에올 및 2Hex-PI-칼다르카에올, 헥소스(Hex)-칼다르카에올, 설포노-트리헥소스(3Hex)-칼다르카에올, 설포노-3Hex-PI-칼다르카에올, 및 이들의 임의의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택된, 적어도 하나의 칼다르카에올을 포함하는, LNP.

[0089] 구현예 7. 구현예 1 내지 6 중의 어느 하나에 있어서,

[0090] 상기 LNP는 적어도 하나의 추가의 에테르 지질, 바람직하게는 디에테르 지질, 특히 아르카에올을 포함하는, LNP.

[0091] 구현예 8. 구현예 1 내지 7 중 어느 하나에 있어서,

[0092] 상기 LNP는 적어도 하나의 GDGT 지질(바람직하게는 적어도 2개의 상이한 GDGT 지질, 보다 바람직하게는 적어도 3개의 상이한 GDGT 지질, 특히 적어도 4개의 상이한 GDGD 지질) 및 바람직하게는 적어도 하나의 추가의 에테르 지질을 포함하는 에테르 지질 분획을 포함하고; 특히 아르카에올 및 칼다르카에올을 포함하되, 바람직하게는 하기 표 1에 제시된 바와 같은 조성을 갖는, LNP.

[0093] 구현예 9. 구현예 8에 있어서,

[0094] 상기 에테르 지질 분획은 아르카에알(archaeal) 배양물, 바람직하게는 설포로부스(*Sulfolobus*) 배양물, 보다 바람직하게는 설포로부스 아시도칼다리우스(*Sulfolobus acidocaldarius*) 배양물로부터의 추출에 의해 얻어질 수 있는 에테르 지질을 포함하는, LNP.

[0095] 구현예 10. 구현예 9에 있어서,

[0096] 상기 전체 에테르 지질 분획은 상기 배양물로부터의 추출에 의해 얻어질 수 있는, LNP.

[0097] 구현예 11. 구현예 1 내지 10 중의 어느 하나에 있어서,

[0098] 상기 에테르 지질 분획은 총 지질의 1 mol% 내지 20 mol%, 바람직하게는 총 지질의 2 mol% 내지 15 mol%, 보다 더 바람직하게는 총 지질의 4 mol% 내지 12 mol%, 특히 총 지질의 6 mol% 내지 10 mol% 또는 심지어 총 지질의 7 mol% 내지 9 mol%를 차지하는, LNP.

[0099] 구현예 12. 구현예 1 내지 11 중의 어느 하나에 있어서,

[0100] 상기 에테르 지질 분획 대 헬퍼 지질 분획(특히 DSPC에 대해, 존재하는 경우)의 몰비는 20:1 내지 1:20, 바람직하게는 15:1 내지 1:10, 보다 바람직하게는 12:1 내지 1:3, 보다 더 바람직하게는 8:1 내지 4:1, 특히 7:1 내지 5:1인, LNP.

[0101] 구현예 13. 구현예 1 내지 12 중의 어느 하나에 있어서,

[0102] 상기 에테르 지질 분획 대 스테롤 지질 분획(특히 콜레스테롤에 대해, 존재하는 경우)의 몰비는 0.25:1 내지 1:30, 바람직하게는 0.5:1 내지 1:20, 보다 바람직하게는 1:1 내지 1:10, 보다 더 바람직하게는 1:2 내지 1:6, 특히 1:3 내지 1:5인, LNP.

[0103] 구현예 14. 구현예 1 내지 13 중의 어느 하나에 있어서,

[0104] 상기 LNP의 총 지질은:

[0105] (a) 40 mol% 내지 70 mol%의 양이온성 지질 분획,

[0106] (b) 5 mol% 내지 20 mol%의 헬퍼 지질 분획,

[0107] (c) 20 mol% 내지 40 mol%의 스테롤 지질 분획,

[0108] (d) 0.1 mol% 내지 4 mol%의 안정화제 분획, 및/또는

[0109] (e) 1 mol% 내지 20 mol%의 에테르 지질 분획,

[0110] 을 포함하는(바람직하게는 이들로 구성되는), LNP.

[0111] 구현예 15. 구현예 1 내지 14 중의 어느 하나에 있어서,

[0112] 상기 양이온성 지질 분획은 [(4-하이드록시부틸)아잔디일]디(헥산-6,1-디일)비스(2-헥실데카노에이트)(ALC-0315), 헵타데칸-9-일 8-{(2-하이드록시에틸)[6-옥소-6-(운데실옥시)헥실]아미노}옥타노에이트(SM-102), 3-(디도데실아미노)-N1,N1,4-트리도데실-1-피페라진에탄아민(KL10), N1-[2-(디도데실아미노)에틸] N1,N4,N4-트리도데실-1,4-피페라진디에탄아민(KL22), 14,25-디트리데실-15,18,21,24-테트라아자-옥타트리아콘탄(KL25), 1,2-디리놀레일옥시-N,N-디메틸아미노프로판(DLin-DMA), 2,2-디리놀레일-4-디메틸아미노메틸-[1,3]-디옥솔란(DLin-K-DMA), 헵타트리아콘타-6,9,28,31-테트라엔-19-일-4-(디메틸아미노)부타노에이트(DLin-MC3-DMA), 2,2-디리놀레일-4-(2-디메틸아미노에틸)-[1,3]-디옥솔란(DLin-KC2-DMA), 1,2-디올레일옥시-N,N-디메틸아미노프로판(DODMA), 2-({8[(3β)-콜레스트-5-엔-3-일옥시]옥틸}옥시) N,N 디메틸-3-[(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디엔-1-일옥시]프로판-1-아민(옥틸-CLinDMA), (2R)-2-({8-[(3β)-콜레스트-5-엔-3-일옥시]옥틸}옥시)-N,N-디메틸-3-[(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디엔-1-일옥시]프로판-1-아민(옥틸-CLinDMA(2R)), (2S) 2-({8-[(3β)-콜레스트-5-엔-3-일옥시]옥

틸}옥시)-N,N-디메틸-3-[(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디엔-1-일옥시]프로판-1-아민(옥틸-CLinDMA(2S)) 및 이들의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 양이온성 지질(예를 들어 이온화가능한 지질)을 포함한다. 대안적으로, 또는 그에 더하여, 양이온성 지질 분획은 바람직하게는 (20Z,23Z)-N,N-디메틸노나코사-20,23-디엔-10-아민, (17Z,20Z)-N,N-디메틸헥사코사-17,20-디엔-9-아민, (1Z,19Z)-N5N-디메틸펜타코사-16,19-디엔-8-아민, (13Z,16Z)-N,N-디메틸도코사-13,16-디엔-5-아민, (12Z,15Z)-N,N 디메틸헤니코사-12,15-디엔-4-아민, (14Z,17Z)-N,N-디메틸트리코사-14,17-디엔-6-아민, (15Z,18Z)-N,N-디메틸테트라코사-15,18-디엔-7-아민, (18Z,21Z)-N,N-디메틸헵타코사-18,21-디엔-10-아민, (15Z,18Z)-N,N-디메틸테트라코사-15,18-디엔-5-아민, (14Z,17Z)-N,N-디메틸트리코사-14,17-디엔-4-아민, (19Z,22Z)-N,N-디메틸헵타코사-19,22-디엔-9-아민, (18Z,21Z)-N,N-디메틸헵타코사-18,21-디엔-8-아민, (17Z,20Z)-N,N-디메틸헥사코사-17,20-디엔-7-아민, (16Z,19Z)-N,N-디메틸펜타코사-16,19-디엔-6-아민, (22Z,25Z)-N,N-디메틸헨트리아콘타-22,25-디엔-10-아민, (21Z,24Z)-N,N-디메틸트리아콘타-21,24-디엔-9-아민, (18Z)-N,N-디메틸헵타코사-18-엔-10-아민, (17Z)-N,N-디메틸헥사코사-17-엔-9-아민, (19Z,22Z)-N,N-디메틸옥타코사-19,22-디엔-7-아민, N,N-디메틸헵타코산-10-아민, (20Z,23Z)-N-에틸-N-메틸노나코사-20,23-디엔-10-아민, 1-(11Z,14Z)-1-노닐이코사-11,14-디엔-1-일피롤리딘, (20Z)-N,N-디메틸헵타코사-20-엔-10-아민, (15Z)-N,N-디메틸헵타코사-15-엔-10-아민, (14Z)-N,N-디메틸노나코사-14-엔-10-아민, (17Z)-N,N-디메틸노나코사-17-엔-10-아민, (24Z)-N,N-디메틸트리아콘타-24-엔-10-아민, (20Z)-N,N-디메틸노나코사-20-엔-10-아민, (22Z)-N,N-디메틸헨트리아콘타-22-엔-10-아민, (16Z)-N,N-디메틸펜타코사-16-엔-8-아민, (12Z,15Z)-N,N-디메틸-2-노닐헤니코사-12,15-디엔-1-아민, (13Z,16Z)-N,N-디메틸-3-노닐도코사-13,16-디엔-1-아민, N,N-디메틸-1-[(1S,2R)-2-옥틸사이클로프로필] 헵타데칸-8-아민, 1-[(1S,2R)-2-헥실사이클로프로필]-N,N-디메틸노나데칸-10-아민, N,N-디메틸-1-[(1S,2R)-2-옥틸사이클로프로필]노나데칸-10-아민, N,N-디메틸-1-[(1S,2R)-2-옥틸사이클로프로필]헤니코산-10-아민, N,N-디메틸-1-[(1S,2S)-2-{[(1R,2R)-2-펜틸사이클로프로필]메틸}사이클로프로필]노나데칸-10-아민, N,N-디메틸-1-[(1S,2S)-2-옥틸사이클로프로필]헥사데칸-8-아민, N,N-디메틸-3-{7-[(1S,2R)-2-옥틸사이클로프로필]헵틸}도데칸-1-아민, 1-[(1R,2S)-2-헵틸사이클로프로필]-N,N-디메틸옥타데칸-9-아민, 1-[(1S,2R)-2-데실사이클로프로필]-N,N-디메틸펜타데칸-6-아민, N,N-디메틸-1-[(1S,2R)-2-옥틸사이클로프로필]펜타데칸-8-아민, R-N,N-디메틸-1-[(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디엔-1-일옥시]-3-(옥틸옥시)프로판-2-아민, S-N,N-디메틸-1-[(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디엔-1-일옥시]-3-(옥틸옥시)프로판-2-아민, 1-{2-[(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디엔-1-일옥시]-1-[(옥틸옥시)메틸]에틸}피롤리딘, (2S)-N,N-디메틸-1-[(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디엔-1-일옥시]-3-[(5Z)-옥트-5-엔-1-일옥시]프로판-2-아민, 1-{2-[(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디엔-1-일옥시]-1-[(옥틸옥시)메틸]에틸}아제티딘, (2S)-1-(헥실옥시)-N,N-디메틸-3-[(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디엔-1-일]옥시프로판-2-아민, (2S)-1-(헵틸옥시)-N,N-디메틸-3-[(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디엔-1-일옥시]프로판-2-아민, N,N-디메틸-1-(노닐옥시)-3-[(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디엔-1-일옥시]프로판-2-아민, N,N-디메틸-1-[(9Z)-옥타데카-9-엔-1-일옥시]-3-(옥틸옥시)프로판-2-아민; (2S)-N,N-디메틸-1-[(6Z,9Z,12Z)-옥타데카-6,9,12-트리엔-1-일옥시]-3-(옥틸옥시)프로판-2-아민, (2S)-1-[(11Z,14Z)-이코사-11,14-디엔-1-일옥시]-N,N-디메틸-3-(펜틸옥시)프로판-2-아민, (2S)-1-(헥실옥시)-3-[(11Z,14Z)-이코사-11,14-디엔-1-일옥시]-N,N-디메틸프로판-2-아민, 1-[(11Z,14Z)-이코사-11,14-디엔-1-일옥시]-N,N-디메틸-3-(옥틸옥시)프로판-2-아민, 1-[(13Z,16Z)-도코사-13,16-디엔-1-일옥시]-N,N-디메틸-3-(옥틸옥시)프로판-2-아민, (2S)-1-[(13Z,16Z)-도코사-13,16-디엔-1-일옥시]-3-(헥실옥시)-N,N-디메틸프로판-2-아민, (2S)-1-[(13Z)-도코스-13-엔-1-일옥시]-3-(헥실옥시)-N,N-디메틸프로판-2-아민, 1-[(13Z)-도코스-13-엔-1-일옥시]-N,N-디메틸-3-(옥틸옥시)프로판-2-아민, 1-[(9Z)-헥사덱-9-엔-1-일옥시]-N,N-디메틸-3-(옥틸옥시)프로판-2-아민, (2R)-N,N-디메틸-H(1-메토일옥틸)옥시]-3-[(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디엔-1-일옥시]프로판-2-아민, (2R)-1-[(3,7-디메틸옥틸)옥시]-N,N-디메틸-3-[(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디엔-1-일옥시]프로판-2-아민, N,N-디메틸-1-(옥틸옥시)-3-({8-[(1S,2S)-2-[(1R,2R)-2-펜틸사이클로프로필]메틸}사이클로프로필]옥틸}옥시)프로판-2-아민,
N,N-디메틸-1-{[8-(2-옥틸사이클로프로필)옥틸]옥시}-3-(옥틸옥시)프로판-2-아민, (11E,20Z,23Z)-N,N-디메틸노나코사-11,20,2-트리엔-10-아민, 및 그들의 약학적으로 허용가능한 염 및 입체이성질체, 및 이들의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택되는, LNP.

[0113] 구현예 16. 구현예 1 내지 15 중의 어느 하나에 있어서,

[0114] 상기 헬퍼 지질 분획은, 디스테아로일포스파티딜콜린(DSPC), 디올레오일포스파티딜에탄올아민(DOPE), 디팔미토일포스파티딜콜린(DOPC), 포스파티딜콜린(PC), 1,2-디리놀레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린(DLPC), 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포콜린(DMPC), 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포콜린(DPPC), 1,2-디운데카노일-sn-글리세로-3-포스포콜린(DUPC), 1-팔미토일-2-올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린(POPC), 1,2-디-O-옥타데세닐-sn-글리세로-3-포스포콜린(18:0 디에테르 PC), 1-올레오일-2-콜레스테릴헤미석시노일-sn-글리세로-3-포스포

콜린(OChemsPC), 1-헥사데실-sn-글리세로-3-포스포콜린(C16 리소 PC), 1,2-디리놀레노일-sn-글리세로-3-포스포콜린, 1,2-디아라키도노일-sn-글리세로-3-포스포콜린, 1,2-디도코사헥사에노일-sn-글리세로-3-포스포콜린, 1,2-디피타노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(ME 16.0 PE), 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민, 1,2-디리놀레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민, 1,2-디리놀레노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민, 1,2-디아라키도노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민, 1,2-디도코사헥사에노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민, 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포-rac-(1-글리세롤) 나트륨 염(DOPG), 스핑고미엘린(sphingomyelin), 및 이들의 혼합물로부터 선택된 헬퍼 지질을 포함하는, LNP.

[0115] 구현예 17. 약학 조성물로서,

[0116] 구현예 1 내지 16 중의 어느 하나의 LNP 및 바람직하게는 적어도 하나의 부형제를 포함하는, 약학 조성물.

[0117] 구현예 18. 구현예 17에 있어서,

[0118] 상기 약학 조성물은 백신, 바람직하게는 mRNA 백신인, 약학 조성물.

[0119] 구현예 19. 구현예 17 또는 18에 있어서,

[0120] 환자의 질환 또는 병태의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 것인, 약학 조성물.

[0121] 구현예 20. 구현예 1 내지 19 중 어느 하나에 있어서,

[0122] 상기 LNP는 10 nm 내지 900 nm, 바람직하게는 20 nm 내지 750 nm, 보다 바람직하게는 30 nm 내지 500 nm, 특히 40 nm 내지 250 nm 또는 심지어 50 nm 내지 150 nm의 z-평균 직경(DLS에 의해, 특히 ISO 22412:2017에 따라 측정됨)을 갖는, LNP 또는 약학 조성물.

도면의 간단한 설명

[0123] 본 발명은 하기 도면 및 실시예에 의해 추가로 예시되지만, 이에 제한되지는 않는다.

도 1: GDGT는 EMA-승인된 SARS-CoV-2 mRNA 백신에 사용된 참조(reference) LNP 제형과 비교하여 30배 증가된 LNP의 세포 흡수를 나타내었다. (a) LNP 제형에서 헬퍼 지질 DSPC를 GDGT로 부분적으로 대체하는 것("TEL")은 LNP와 함께 인큐베이션 시 세포 내 증가된 로다민-지질 형광 신호(rhodamine-lipid fluorescence signal)를 유도한다. 참조는 9.6 mol%의 총 지질의 농도에서 DSPC를 가졌다. (b) LNP 제형에서 콜레스테롤("Chol")을 GDGT로 부분적으로 대체하는 것("TEL")은 LNP와 함께 인큐베이션 시 세포 내 증가된 로다민-지질 형광 신호를 유도한다. 참조는 42.6 mol%의 총 지질의 농도로 콜레스테롤을 가졌다. (c) 두 참조("A" 및 "B")를 사용하여 실험을 반복한 결과, LNP 제형에서 헬퍼 지질 DSPC를 GDGT로 부분적으로 대체하는 것("TEL")은 LNP와 함께 인큐베이션 시 세포 내 증가된 로다민-지질 형광 신호를 유도하고, 최적의 결과는 약 8 mol%의 GDGT("TEL")에서 달성되었음을 확인하였다.

도 2: GDGT는 EMA-승인된 SARS-CoV-2 mRNA 백신에 사용된 참조 LNP 제형과 비교하여 90배 증가된 LNP의 형질감염 효율을 나타내었다. LNP 제형에서 헬퍼 지질 DSPC를 GDGT로 부분적으로 대체하는 것("TEL")은 형광(임의 단위, y 축)에 의해 측정된 바와 같이, LNP(EGFP mRNA를 캡슐화함)와 함께 인큐베이션 시 세포 내 증가된 EGFP mRNA 발현을 유도한다. 참조는 9.6 mol%의 총 지질의 농도에서 DSPC를 가졌다.

도 3: GDGT-LNP는 실온(RT, 25℃)에서 안정하였다. 3개의 시험 제형 A, C 및 D의 경우, (a) 캡슐화 효율(EE), (b) 입자 직경 및 (c) 입자 농도는 시간에 따라 비교적 일정하게 유지되었고, 이는 우수한 저장 안정성을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0124] **실시예**

[0125] LNP의 제형

[0126] 지질 스톡 용액(GDPT를 포함하는 설포로부스 아시도칼다리우스로부터 수득된 아르카에알 막 지질(하기 표 1 참조; 또한 WO 2020/187526 A1 참조), DSPC, ALC-0315, ALC-0159, 콜레스테롤, 로다민)의 예시적인 제형을 0.2 ㎛의 폴리테트라플루오로에틸렌(PTFE) 필터를 통해 여과하고, 각각의 실험에 사용된 몰비에 따라 혼합하였다(하기 표 2 및 3 참조). 참조(reference) 제형에 대한 유기 용매는 에탄올인 반면, GDGT를 함유하는 제형에서와 같이, 디메틸 설폭사이드(DMSO) 및 2-프로판올(2:3)의 혼합물은 유기 용매로서 작용하였다. 수성 상을 10 mM 시트

레이트 완충액(pH = 4.0) 중에 폴리(A)(Carl Roth) 또는 EGFP를 암호화하는 mRNA(CleanCap, 5 moU)를 각각 용해시켜 제조하였다. LNP를 12 mL/분의 총 유량 및 3:1의 유량비(수성 상:유기 상)로 NanoAssemble® Ignite(Precision Nanosystems)를 사용하여 제형화하였다. 제형 직후, LNP를 10 mM PBS(pH = 7.4)에 1:2로 희석하였다. 유기 용매의 제거는 10 mM 포스페이트-완충된 염수(PBS) 완충액(pH = 7.4)에 대한 투석(SpectraPor, 6-8 kDa)을 통해 달성하였다. LNP의 생리화학적 특성화는 리보그린 검정(Ribogreen assay)(mRNA 함량) 및 제타사이저 분석(Zetasizer analysis)(크기, 다분산 지수(PDI), 제타 포텐셜(Zeta potential))을 통해 수행하였으며, 하기 표 4를 참조한다. 제타사이저는 영국 소재의 Malvern Panalytical Ltd로부터 입수가능하다.

[0127] GDGT-함유 아르카에알 막 지질 스톡 용액(즉, 에테르 지질 분획)에 대한 전형적인 지질 조성이 표 1에 제공되어 있다:

[0128] 표 1

지질 성분	에테르 지질 분획 내 상대적 풍부도 (mol%)
아르카에올	5-25%
비치환된 칼다르카에올	15-50%
Hex-칼다르카에올	8-14%
PI-칼다르카에올	3-10%
2Hex-칼다르카에올	10-22%
2Hex-PI-칼다르카에올	3-10%
설포노-3Hex-PI-칼다르카에올	0-5%

[0129]

[0130] 표 2는 헬퍼 지질 조성에서 시험된 변화를 제공한다:

[0131] 표 2

LNP 샘플	DSPC(mol%)	GDGT(mol%)	콜레스테롤 (mol%)
참조	9.4	0.0	42.6
1	1.4	8.0	42.6
3	5.4	4.0	42.6
5	7.4	2.0	42.6

[0132]

[0133] 표 3은 콜레스테롤 지질 조성에서 시험된 변화를 제공한다:

[0134] 표 3

LNP 샘플	DSPC(mol%)	GDGT(mol%)	콜레스테롤(mol%)
참조	9.4	0.0	42.6
2	9.4	8.0	34.6
4	9.4	4.0	38.6
6	9.4	2.0	40.6

[0135]

[0136] 표 4는 시험된 LNP의 특징(EE: 캡슐화 효율)을 나타내되, z-평균 직경은 DLS에 의해 측정되었다:

[0137] 표 4

LNP 샘플	EE (%)	PDI	Z-평균 (nm)
참조	81.2 ± 3.8	0.17	60.4 ± 1.5
1	86.4 ± 2.7	0.12	75.8 ± 0.8
3	84.5 ± 3.9	0.13	65.6 ± 0.9
5	86.9 ± 6.2	0.09	59.9 ±0.9
2	89.7 ± 2.8	0.11	63.1 ± 1.1
4	86.7 ± 5.5	0.15	63.7 ± 0.8
6	82.4 ± 2.2	0.13	58.3 ± 1.3

[0138]

[0139] LNP 샘플에 대해 높은 캡슐화 효율 및 낮은 PDI(즉, 단분산 분포)가 관찰되었다.

[0140] LNP의 흡수

[0141] 2회 계대 후, 카고-2 세포를 1 mL의 배지(둘베코 변형 이글 배지(Dulbecco's Modified Eagle Medium; DMEM) + L-글루타민, 10%의 소태아 혈청(FBS), 1%의 항생제 혼합물) 중에 10^5 세포/웰의 세포 밀도로 48 웰 플레이트에 시딩하였다. 24시간의 인큐베이션(37℃, 5% CO_2) 후, LNP를 5.2 ㎍의 폴리(A)/웰의 카고 농도로 웰에 첨가하였다. 24시간 동안 또 다른 인큐베이션 후, 세포를 500 μL의 10 mM PBS 완충액으로 2회 세척하여 상청액에 남아 있는 LNP를 제거하였다. 이어서 훽스트(Hoechst) 용액을 첨가하고 또 다른 인큐베이션 단계를 5분 동안 수행하였다. 500 μL의 10 mM PBS 완충액을 사용한 2회 세척 단계 후, LNP의 세포 흡수(여기/방출 = 570 nm/590 nm) 및 세포 핵의 수(여기/방출 = 460 nm/490 nm)를 공초점 현미경(confocal microscopy)(올림푸스(Olympus) IX83)으로 분석하였다.

[0142] GDGT는 EMA-승인된 SARS-CoV-2 mRNA 백신에 사용되는 참조 LNP 제형과 비교하여 LNP의 세포 흡수를 증가시켰다(도 1 참조).

[0143] LNP를 사용한 형질감염

[0144] 2회 계대 후, 카고-2 세포를 950 μL의 배지(DMEM + L-글루타민, 10% FBS, 1% 항생제 혼합물) 중에 10^5 세포/웰의 세포 밀도로 48 웰 플레이트에 시딩하였다. 24시간의 인큐베이션(37℃, 5% CO_2) 후, 500 μL의 고갈된 배지(depleted medium)를 새로운 배지로 대체하였다. 후속적으로, LNP를 EGFP/웰을 암호화하는 6.4 ㎍의 mRNA의 농도로 웰에 첨가하였다. 세포를 60시간 동안 인큐베이션하고, 형광 강도(여기/방출 = 488 nm/509 nm)를 공초점 현미경(올림푸스 IX83)을 사용하여 17, 24, 36, 48, 60시간 후에 측정하였다.

[0145] GDGT는 EMA-승인된 SARS-CoV-2 mRNA 백신에 사용되는 참조 LNP 제형과 비교하여 LNP의 형질감염 효율을 증가시켰다(도 2 참조).

[0146] LNP의 저장

[0147] 제형화 후, LNP를 각각 4℃ 및 25℃(실온)에서 2 mL의 에펜도르프 튜브(Eppendorf tubes)에 저장하였다. 리보그린 검정 및 제타사이저 분석을 통한 생리화학적 특성화는 6주의 기간에 걸쳐 특정 시간 간격으로 수행하였다.

[0148] GDGT-LNP는 심지어 실온에서도 안정한 것으로 밝혀졌다(도 3 참조).

[0149] 비-특허 참고문헌

[0150] Aldosari, Basmah N., et al. "Lipid nanoparticles as delivery systems for RNA-based vaccines." Pharmaceutics 13.2 (2021): 206.

[0151] Daswani, Varsha P., et al. "The Polar Lipid Fraction E from Sulfolobus acidocaldarius Can Be Used as Liposomal Drug Stabilizing Agents to Reduce the Leakage of the Antivascular Drug Combretastatin A4 Disodium Phosphate from Tetraether/Diester Hybrid Archaeosomes." Biophysica 1.4 (2021): 474-486.

[0152] Hou, Xucheng, et al. "Lipid nanoparticles for mRNA delivery." Nature Reviews Materials 6.12 (2021): 1078-1094.

[0153] Jain, Samta, et al. "Biosynthesis of archaeal membrane ether lipids." Frontiers in microbiology 5

(2014): 641.

[0154] Kaur, Gurmeet, et al. "Archaeosomes: an excellent carrier for drug and cell delivery." Drug delivery 23.7 (2016): 2497-2512.

[0155] Markova, Natalia, et al. "Biophysical Characterization of Viral and Lipid-Based Vectors for Vaccines and Therapeutics with Light Scattering and Calorimetric Techniques." Vaccines 10.1 (2021): 49.

[0156] Midoux, Patrick, et al. "Lipid-based mRNA vaccine delivery systems." Expert review of vaccines 14.2 (2015): 221-234.

[0157] Patel, Girishchandra B., et al. "Archaeobacterial ether lipid liposomes (archaeosomes) as novel vaccine and drug delivery systems." Critical reviews in biotechnology 19.4 (1999): 317-357.

[0158] Paunovska, Kalina, et al. "Drug delivery systems for RNA therapeutics." Nature Reviews Genetics 23.5 (2022): 265-280.

[0159] Schouten, Stefan, et al. "The organic geochemistry of glycerol dialkyl glycerol tetraether lipids: A review." Organic geochemistry 54 (2013): 19-61.

[0160] Siliakus, Melvin F., et al. "Adaptations of archaeal and bacterial membranes to variations in temperature, pH and pressure." Extremophiles 21.4 (2017): 651-670.

[0161] Szoka Jr, Frank, et al. "Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes)." Annual review of biophysics and bioengineering 9.1 (1980): 467-508.

[0162] van Hoogevest, Peter. "Review-an update on the use of oral phospholipid excipients." European journal of pharmaceutical sciences 108 (2017): 1-12.

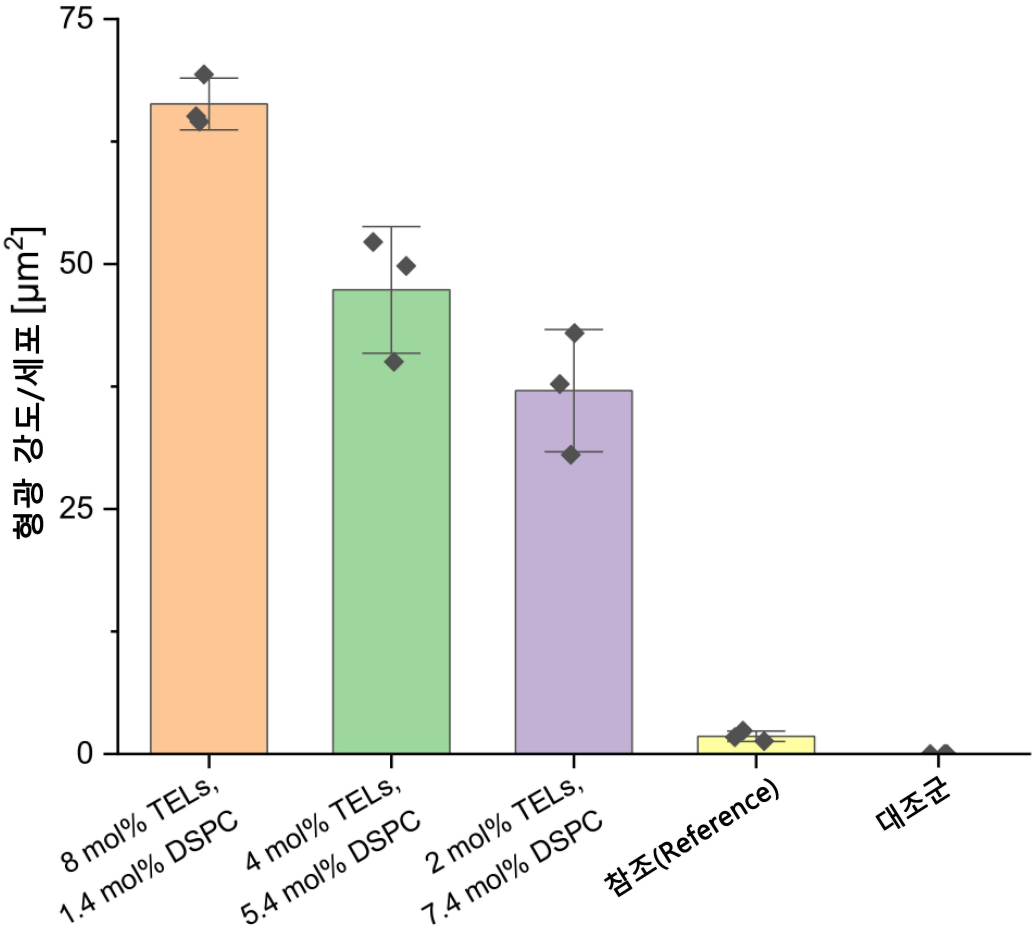
[0163] Vishwakarma, Nikhar, et al. "Lipid-based nanocarriers for lymphatic transportation." AAPS PharmSciTech 20.2 (2019): 1-13.

[0164] Zavec, Apolonija Bedina, et al. "Archaeosomes can efficiently deliver different types of cargo into epithelial cells grown in vitro." Journal of Biotechnology 192 (2014): 130-135.

도면

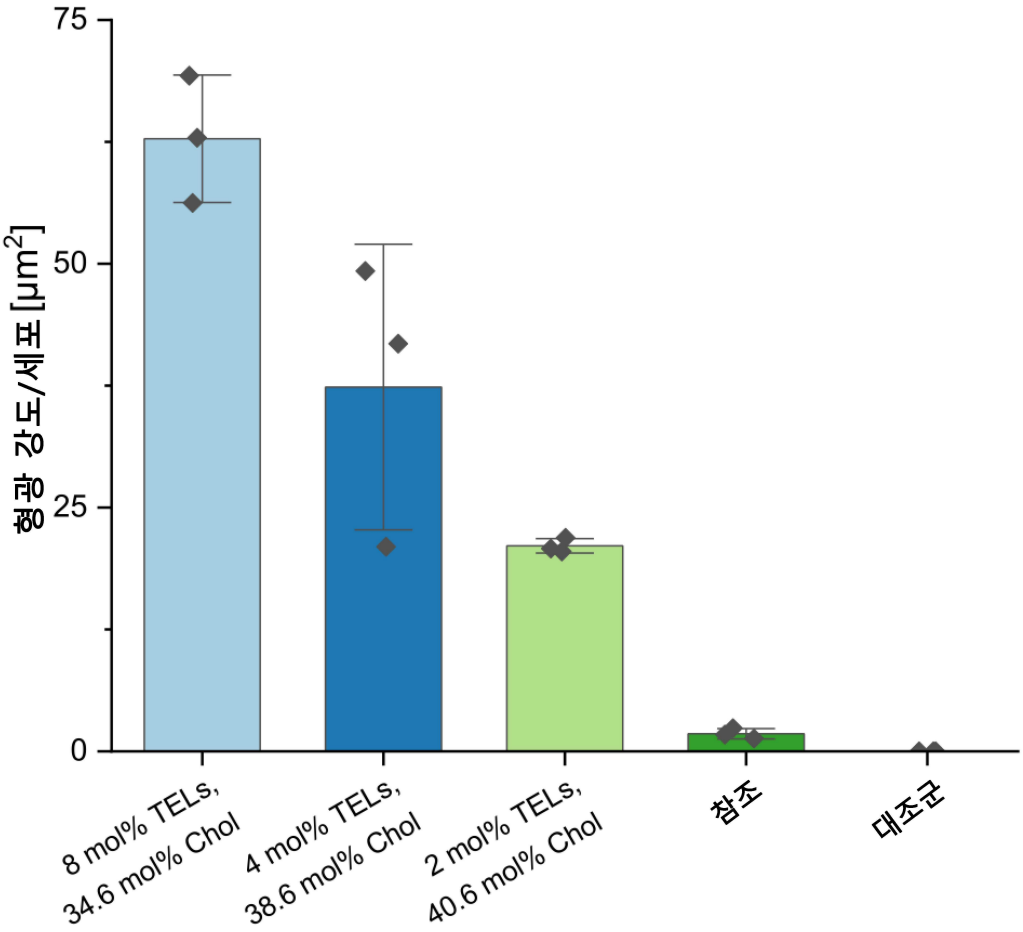
도면1a

(a)

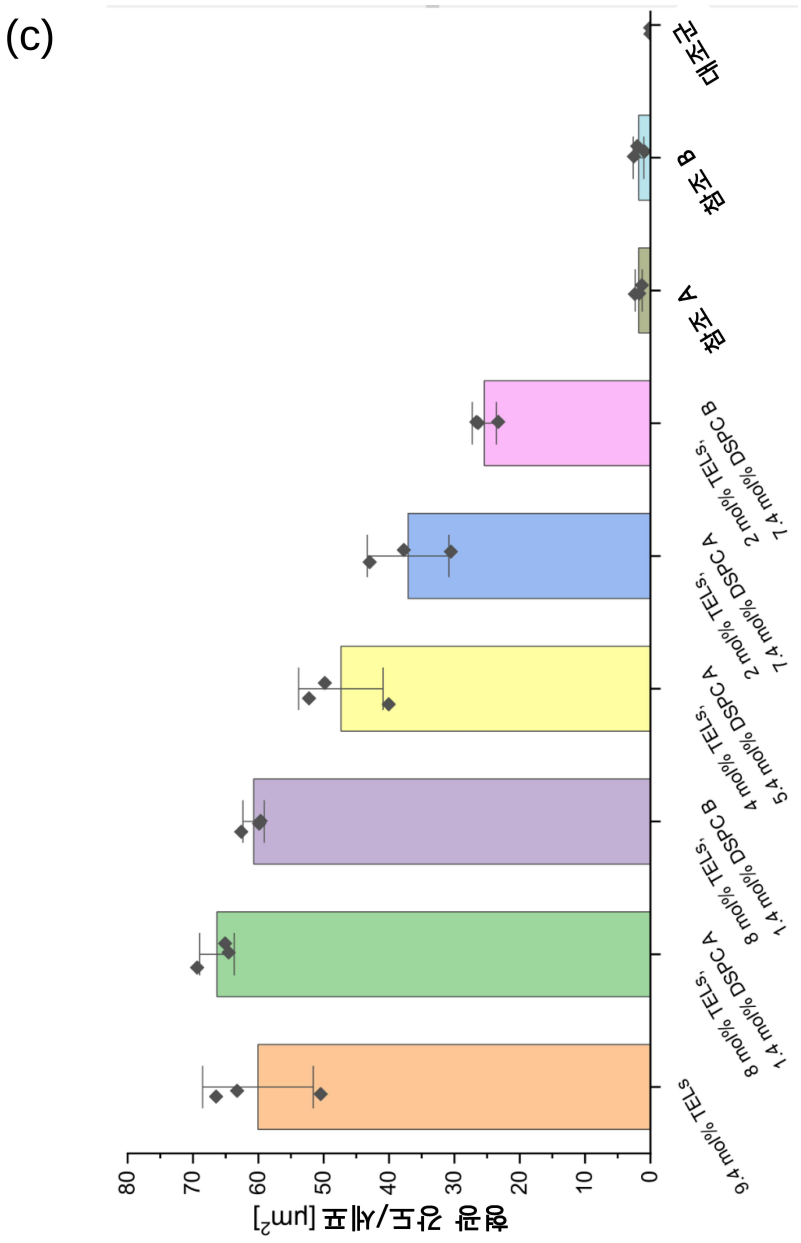

75
50
25
0
형광 강도/세포 [μm²]
8 mol% TELs,
1.4 mol% DSPC
4 mol% TELs,
5.4 mol% DSPC
2 mol% TELs,
7.4 mol% DSPC
참조(Reference)
대조군

도면1b

(b)

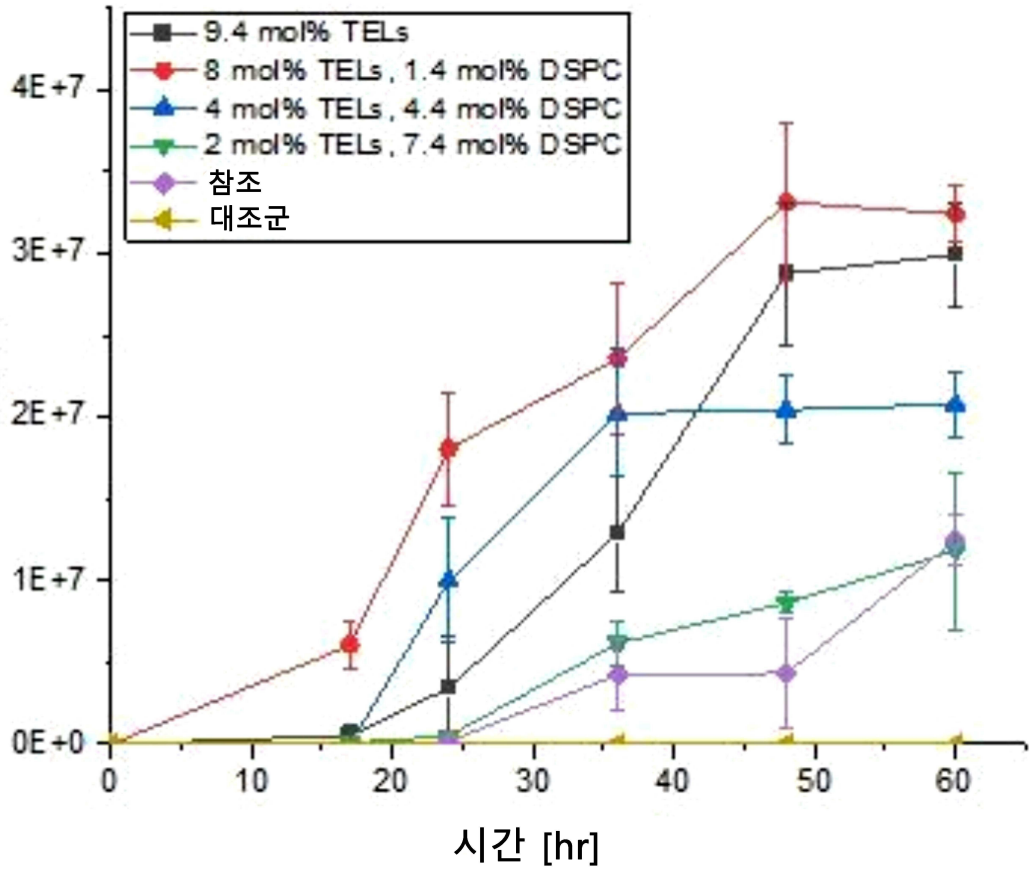

75
50
25
0
형광 강도/세포 [μm²]
8 mol% TELs, 34.6 mol% Chol
4 mol% TELs, 38.6 mol% Chol
2 mol% TELs, 40.6 mol% Chol
참조
대조군

도면1c


(c)
형광 강도/세포 [μm²]
0
10
20
30
40
50
60
70
80
9.4 mol% TELs
8 mol% TELs, 1.4 mol% DSPC A
8 mol% TELs, 1.4 mol% DSPC B
4 mol% TELs, 5.4 mol% DSPC A
2 mol% TELs, 7.4 mol% DSPC A
2 mol% TELs, 7.4 mol% DSPC B
양성 A
양성 B
음성대조

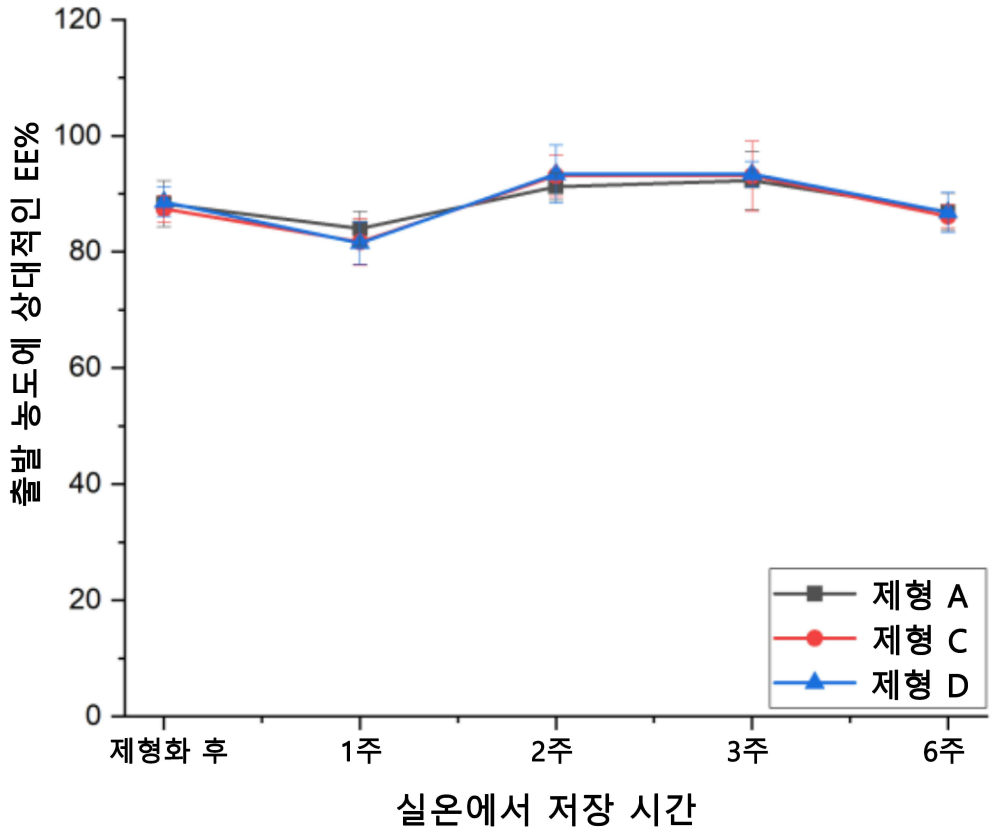
도면2

(a)


9.4 mol% TELs
8 mol% TELs, 1.4 mol% DSPC
4 mol% TELs, 4.4 mol% DSPC
2 mol% TELs, 7.4 mol% DSPC
참조
대조군
4E+7
3E+7
2E+7
1E+7
0E+0
0
10
20
30
40
50
60
시간 [hr]

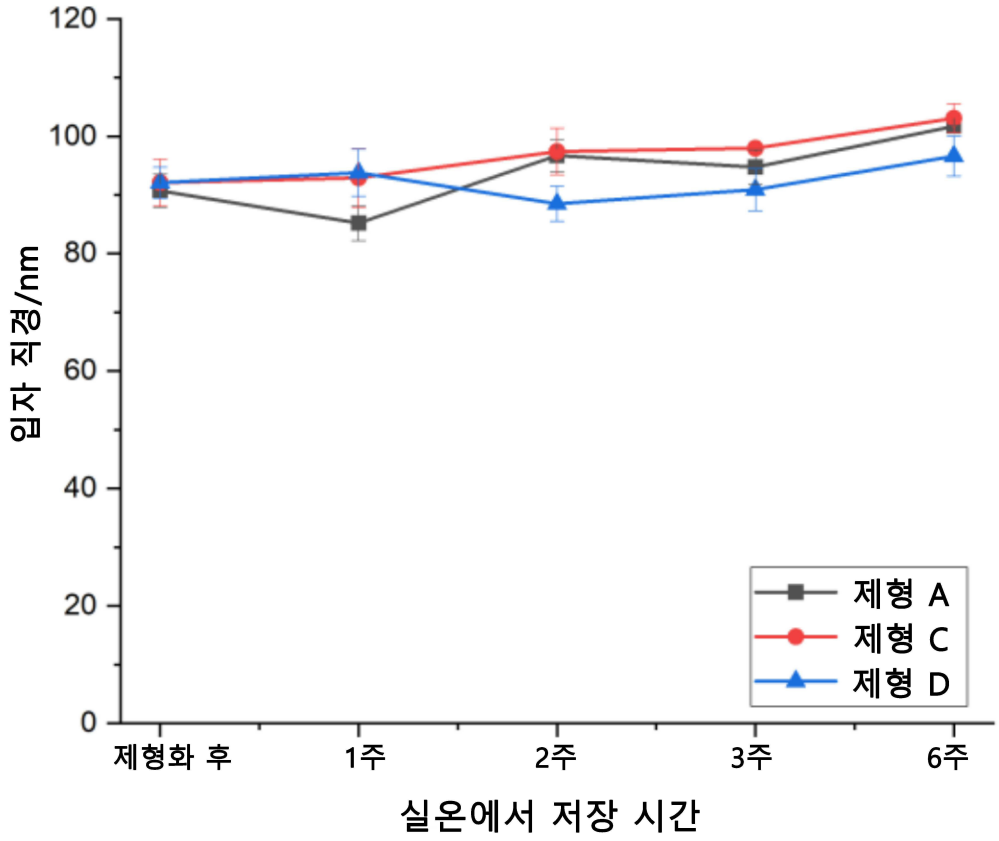
도면3a

(a)


120
100
80
60
40
20
0
출발 농도에 상대적인 EE%
제형화 후
1주
2주
3주
6주
실온에서 저장 시간
제형 A
제형 C
제형 D

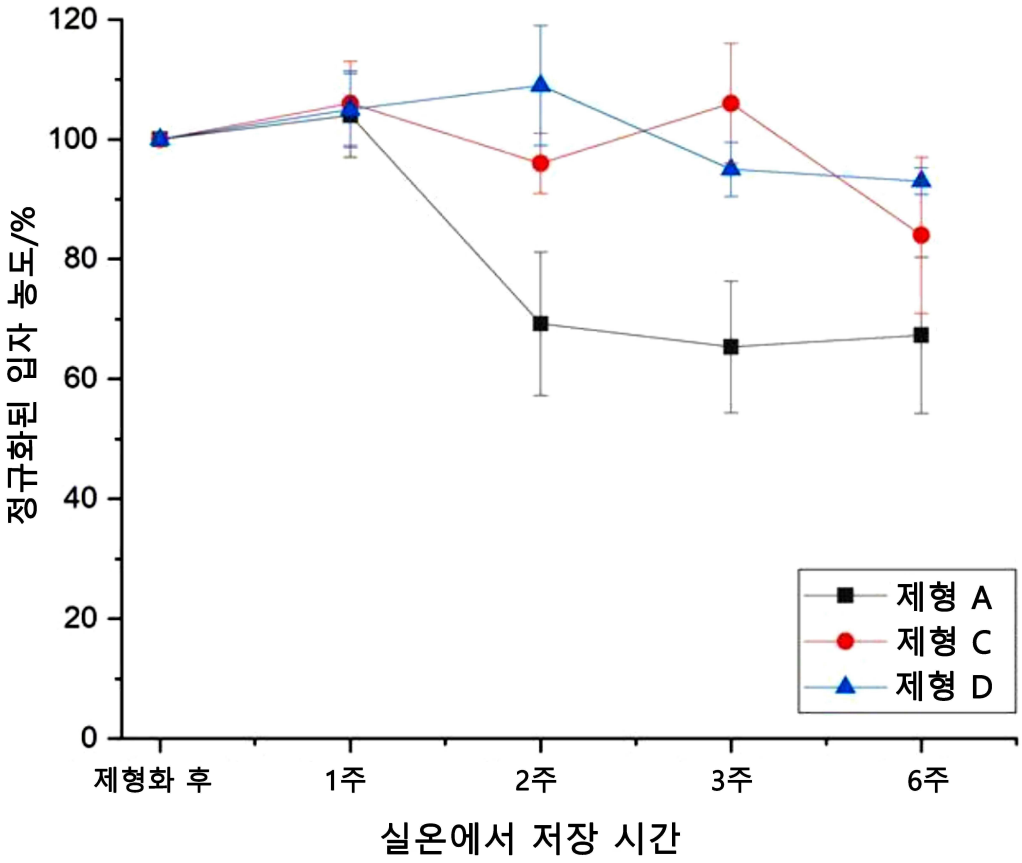
도면3b

(b)


120
100
80
60
40
20
0
입자 직경/nm
제형화 후
1주
2주
3주
6주
실온에서 저장 시간
제형 A
제형 C
제형 D

도면3c

(c)


120
100
80
60
40
20
0
정규화된 입자 농도/%
제형화 후
1주
2주
3주
6주
실온에서 저장 시간
제형 A
제형 C
제형 D