

**(19) 대한민국특허청(KR)**
(12) 공개특허공보(A)**(11) 공개번호** 10-2021-0022535
(43) 공개일자 2021년03월03일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 48/00 (2006.01) **A61K 47/10** (2017.01)
A61K 47/24 (2017.01) **A61K 47/28** (2017.01)
A61K 9/127 (2006.01) **A61P 11/00** (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 48/0033 (2013.01)
A61K 47/10 (2013.01)
- (21) 출원번호 **10-2020-7030470**
(22) 출원일자(국제) **2019년04월25일**
심사청구일자 **없음**
- (85) 번역문제출일자 **2020년10월22일**
(86) 국제출원번호 **PCT/EP2019/060644**
(87) 국제공개번호 **WO 2019/207060**
국제공개일자 **2019년10월31일**
- (30) 우선권주장
18169325.0 2018년04월25일
유럽특허청(EPO)(EP)
18189010.4 2018년08월14일
유럽특허청(EPO)(EP)
- (71) 출원인
에트리스 게엠베하
독일 폴라네그 제멜바이스슈트라쎄 3 (우: 82152)
- (72) 발명자
도넨, 크리스티안
독일, 81375 뮌헨, 부르크-엘츠-베그 1
미카일릭 올라
독일, 82147 올칭, 솔로슈트라쎄 88
- (74) 대리인
특허법인한얼

전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 RNA 전달용 지질 기반 제형**(57) 요약**

본 발명은 RNA 전달에 적합한 조성물을 제공하고, 이 조성물은 (i) 액체 상에 함유된 입자로서, 입자가 RNA 및 지질 조성물을 포함하는, 입자, (ii) 1,2-프로판디올을 포함한다. 지질 조성물은 (i-a) 콜레스테롤 유도체, (i-b) 포스포글리세라이드, 및 (i-c) 폐길화 포스포글리세라이드를 포함한다. 조성물의 제조 방법, 및 입자가 액체 상에 함유된 조성물을 동결시킴으로써 수득될 수 있는 고체 조성물이 추가로 제공된다.

(52) CPC특허분류

A61K 47/24 (2013.01)
A61K 47/28 (2013.01)
A61K 48/0075 (2013.01)
A61K 9/0043 (2013.01)
A61K 9/007 (2013.01)
A61K 9/1271 (2013.01)
A61K 9/1272 (2013.01)
A61P 11/00 (2018.01)
C12N 15/111 (2013.01)

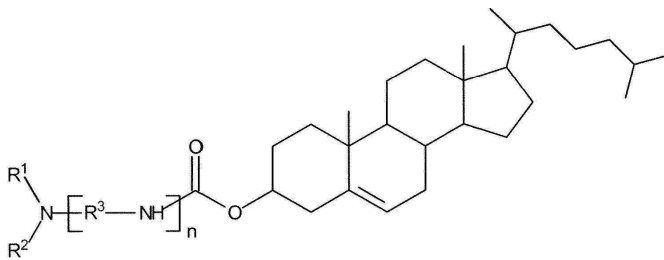
명세서

청구범위

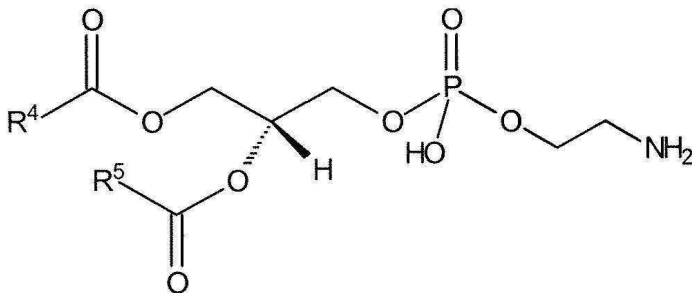
청구항 1

- (i) 액체 상에 함유된 입자로서, 입자가 RNA 및 지질 조성물을 포함하고, 지질 조성물이
- (i-a) 하기 화학식 I의 콜레스테롤 또는 이의 염;
- (i-b) 하기 화학식 II의 포스포글리세라이드 또는 이의 염; 및
- (i-c) 하기 화학식 III의 폐길화 포스포글리세라이드 또는 이의 염을 포함하는, 입자; 및
- (ii) 1,2-프로판디올을 포함하는 조성물:

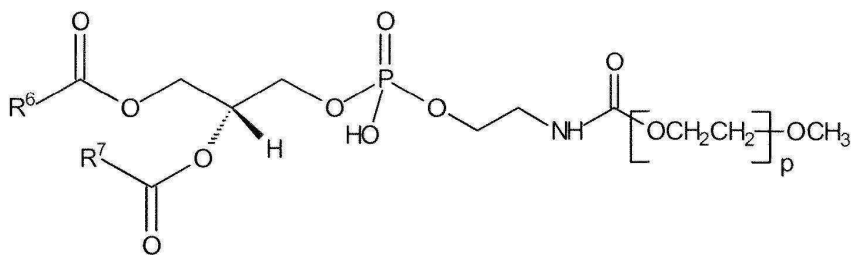
화학식 I



화학식 II



화학식 III



상기 화학식 I 내지 III에서,

n 은 0 또는 1, 바람직하게는 0이고,

R^1 은 그룹 $-(CH_2)_q-NH_2$ 또는 그룹 $-(CH_2)_r-NH-(CH_2)_s-NH_2$ 이고, 여기서 q , r 및 s 는 독립적으로 2 내지 6의 정수이고,

R^2 는 그룹 $-(CH_2)_t-NH_2$ 또는 그룹 $-(CH_2)_u-NH-(CH_2)_w-NH_2$ 이고, 여기서 t , u 및 w 는 독립적으로 2 내지 6의 정수이고,

R^3 은 1 내지 4개의 탄소 원자를 갖는 선형 알칸디일 그룹이고;

R^4 는 10 내지 24개의 탄소 원자를 갖는 선형 알킬 그룹 또는 1 내지 3개의 이중 결합과 10 내지 24개의 탄소 원자를 갖는 선형 알케닐 그룹이고;

R^5 는 10 내지 24개의 탄소 원자를 갖는 선형 알킬 그룹 또는 1 내지 3개의 이중 결합과 10 내지 24개의 탄소 원자를 갖는 선형 알케닐 그룹이고;

p는 5 내지 200, 바람직하게는 10 내지 170, 가장 바람직하게는 10 내지 140의 정수이고;

R^6 은 10 내지 20개의 탄소 원자를 갖는 선형 알킬 그룹 또는 1 내지 3개의 이중 결합과 10 내지 20개의 탄소 원자를 갖는 선형 알케닐 그룹이고;

R^7 은 10 내지 20개의 탄소 원자를 갖는 선형 알킬 그룹 또는 1 내지 3개의 이중 결합과 10 내지 20개의 탄소 원자를 갖는 선형 알케닐 그룹이다.

청구항 2

제1항에 있어서, RNA가 mRNA인, 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 화학식 I의 콜레스테롤 유도체가 GL67인, 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 화학식 II의 포스포글리세라이드가 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민인, 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 화학식 III의 폐결화 포스포글리세라이드가 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-PEG5000인, 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 지질 조성물 중 성분 (i-a):(i-b):(i-c)의 몰 비가 1:(0.5 내지 5):(0.01 내지 1)인, 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 입자가 1 내지 5000nm 범위의 평균 입자 직경을 갖는, 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 화학식 I의 콜레스테롤 유도체로부터 유도된 질소 원자 N의 수 대 RNA에서 포스페이트 그룹 P의 수의 N/P 비율이 1 내지 100의 범위내인, 조성물.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 1,2-프로판디올이, 조성물의 총 용적을 기준으로 하여, 0.1 내지 50% w/v의 농도로 함유되는, 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 입자가 함유된 액체 상이 물을 포함하는, 조성물.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따르는 조성물의 제조 방법으로서, 상기 방법이

- a) 지질 조성물의 성분을 유기 용매에서 용해 및 혼합한 다음, 지질 조성물을 동결 건조시키는 단계;
- b) 물을 첨가하여 동결 건조된 지질 조성물을 재수화(rehydrating)하는 단계;
- c) 재수화된 지질 조성물을 RNA의 수용액과 조합하여 액체 상에 함유된 RNA 및 지질 조성물을 포함하는 입자가 형성되도록 하는 단계; 및
- d) 1,2-프로판디올을 첨가하는 단계를 포함하는, 조성물의 제조 방법.

청구항 12

(i) RNA 및 지질 조성물을 포함하는 입자, 및

(ii) 1,2-프로판디올을 포함하는 고체 조성물로서,

고체 조성물이 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따르는 조성물을 동결시킴으로써 수득 가능한, 고체 조성물.

청구항 13

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, RNA 기반 요법을 통한 질환의 치료 또는 예방에 사용하기 위한, 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서, 치료되거나 예방될 질환이 폐 질환인, 조성물.

청구항 15

제13항 또는 제14항에 있어서, 치료 또는 예방이 기도로 또는 기도를 통한, 바람직하게는 폐 투여 또는 비강 투여를 통한 조성물의 투여를 포함하는, 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 RNA를 대상체에게 효율적으로 투여하는데 사용될 수 있는 지질 기반 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 환자의 신체로 전달되도록 하기 위해 핵산용 벡터로서 작용할 수 있는 다양한 지질 기반 제형이 당업계에 공지되어 있다[참조: A.C. Silva et al., Current Drug Metabolism, 16, 2015, 및 그 안에 언급된 문헌]. 흡입을 통해 pDNA 전달을 위해 임상 연구에서 성공적으로 시험된 제형은 GL67A이다(참조: E. Alton et al., Efficacy and Mechanism Evaluation, Vol. 3, Issue 5, July 2016). 제형 GL67A는 치료적 활성 핵산으로서 pDNA와 함께, GL67(또한 젠자임 지질 67로서 공지됨, 양이온 유도체화된 콜레스테롤), 1,2-디올레오일-*sn*-글리세로-3-포스포에탄올아민(DOPE) 및 1,2-디미리스토일-*sn*-글리세로-3-포스포에탄올아민-PEG5000(DMPE-PEG5000)을 함유한다.

[0003] 그러나, 제형은 제한된 안정성($t_{1/2}$: 6h)을 나타내어, 적용 직전에 제조되어야 했다. 더욱이, 지질 제형은 생체 내에서 RNA의 형질 감염에 비효과적인 것으로 밝혀졌다(참조: O. Andries et al., Molecular Pharmaceutics 2012, 9, 2136-2145). 이러한 문제를 고려하여, 유익한 독성학적 프로파일을 제공하면서 생체내 RNA 전달을 위한 효과적인 벡터로서 작용할 수 있는 제형에 대한 필요성이 잔류한다.

발명의 내용

[0004] 본 발명의 맥락에서, 1,2-프로판디올(또한, 프로필렌 글리콜로서 지칭됨)의 존재가 핵산으로서 RNA를 함유하는 GL67A에 사용된 유형의 지질 기반 제형의 형질 감염 효율을 현저하게 증가시키는 것으로 밝혀졌다.

[0005] 따라서, 제1 측면에 따라서, 본 발명은

[0006] (i) 액체 상에 함유된 입자로서, 입자가 RNA 및 지질 조성물을 포함하고, 지질 조성물이

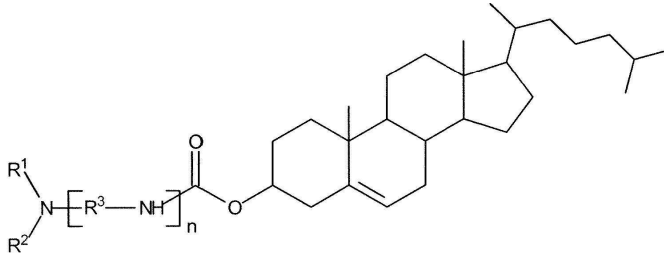
[0007] (i-a) 하기 화학식 I의 콜레스테롤 유도체 또는 이의 염;

[0008] (i-b) 하기 화학식 II의 포스포글리세라이드 또는 이의 염; 및

[0009] (i-c) 하기 화학식 III의 폐길화 포스포글리세라이드 또는 이의 염을 포함하는, 입자; 및

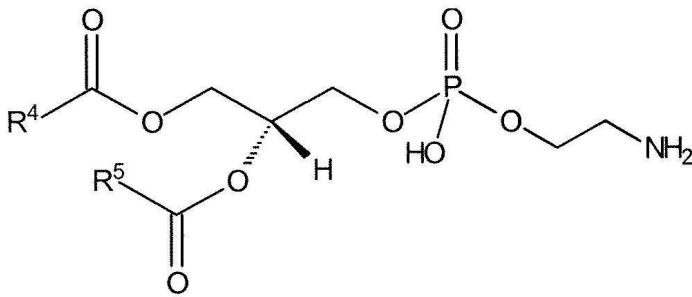
[0010] (ii) 1,2-프로판디올을 포함하는 조성물을 제공한다:

[0011] [화학식 I]



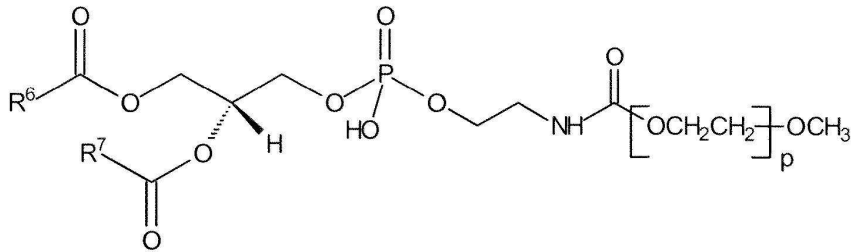
[0012]

[0013] [화학식 II]



[0014]

[0015] [화학식 III]



[0016]

[0017] 상기 화학식 I 내지 III에서,

[0018] n은 0 또는 1, 바람직하게는 0이고,

[0019] R¹은 그룹 -(CH₂)_q-NH₂ 또는 그룹 -(CH₂)_r-NH-(CH₂)_s-NH₂이고, 여기서 q, r 및 s는 독립적으로 2 내지 6의 정수이고,

[0020] R²는 그룹 -(CH₂)_t-NH₂ 또는 그룹 -(CH₂)_u-NH-(CH₂)_w-NH₂이고, 여기서 t, u 및 w는 독립적으로 2 내지 6의 정수이고,

[0021] R³은 1 내지 4개의 탄소 원자를 갖는 선형 알칸디일 그룹이고;

[0022] R⁴는 10 내지 20개의 탄소 원자를 갖는 선형 알킬 그룹 또는 1 내지 3개의 이중 결합과 10 내지 20개의 탄소 원자를 갖는 선형 알케닐 그룹이고;

[0023] R⁵는 10 내지 20개의 탄소 원자를 갖는 선형 알킬 그룹 또는 1 내지 3개의 이중 결합과 10 내지 20개의 탄소 원자를 갖는 선형 알케닐 그룹이고;

- [0024] p는 5 내지 200, 바람직하게는 10 내지 170, 가장 바람직하게는 10 내지 140의 정수이고;
- [0025] R^6 은 10 내지 20개의 탄소 원자를 갖는 선형 알킬 그룹 또는 1 내지 3개의 이중 결합과 10 내지 20개의 탄소 원자를 갖는 선형 알케닐 그룹이고;
- [0026] R^7 은 10 내지 20개의 탄소 원자를 갖는 선형 알킬 그룹 또는 1 내지 3개의 이중 결합과 10 내지 20개의 탄소 원자를 갖는 선형 알케닐 그룹이다.
- [0027] 본 발명의 제2 측면은 상기 기재된 제1 측면에 따르는 조성물의 제조 방법으로서, 방법이
- [0028] a) 지질 조성물의 성분을 유기 용매에서 용해 및 혼합한 다음 지질 조성물을 동결 건조시키는 단계;
- [0029] b) 물을 첨가하여 동결 건조된 지질 조성물을 재수화(rehydrating)하는 단계;
- [0030] c) 재수화된 지질 조성물을 RNA의 수용액과 조합하여 액체 상에 함유된 RNA 및 지질 조성물을 포함하는 입자가 형성되도록 하는 단계;
- [0031] d) 1,2-프로판디올을 첨가하는 단계를 포함하는, 제조 방법에 관한 것이다.
- [0032] 1,2-프로판디올의 첨가는, 예를 들어, 단계 b)에서 물과 함께 첨가하거나, 단계 b) 이후에 재수화된 지질 조성물에 첨가하거나, 단계 c)에서 RNA 수용액과 함께 첨가하거나, 단계 c) 이후에 액체 상에 첨가함으로써 편리하게 달성될 수 있고, 여기서 RNA 및 지질 조성물을 포함하는 입자가 함유된다. 첨가는 하나의 단계로 또는 여러 단계로, 예를 들어, 공정의 상이한 단계에서 수행될 수 있다.
- [0033] 더욱이, 예를 들어, 이러한 입자 제형이 저장 또는 취급을 위해 동결될 때, 1,2-프로판디올이 동결 동안 RNA의 입자 제형의 안정성을 향상시킬 수 있는 것으로 밝혀졌다. 즉, 1,2-프로판디올은 또한 RNA 및 지질 조성물을 포함하는 입자의 동결 방지제로서 기능할 수 있다.
- [0034] 따라서, 제3 측면에 따라서, 본 발명은
- [0035] (i) RNA 및 지질 조성물을 포함하는 입자, 및
- [0036] (ii) 1,2-프로판디올을 포함하는 고체 조성물을 제공하고,
- [0037] 이 고체 조성물은 상기 정의된 바와 같은 본 발명의 제1 측면에 따르는 조성물을 동결시킴으로써 수득 가능하다.
- [0038] 하기에서, 본 발명 및 상기 논의된 이의 측면에 대한 상세한 설명이 제공될 것이다. 이러한 맥락에서, 이러한 측면은 밀접하게 관련되어 있음이 인식될 것이다. 따라서, 한 측면의 특징과 관련하여 제공되는 상세한 정보는 달리 지시되지 않는 한 이 특징에 의존하는 다른 측면에도 또한 적용될 것임이 이해될 것이다.
- [0039] RNA
- [0040] 본 발명에 따르는 조성물 및 고체 조성물은 리보핵산(RNA), 보다 바람직하게는 단일 가닥 RNA를 포함하고, 가장 바람직하게는 mRNA이다.
- [0041] RNA와 관련하여, 원칙적으로, 임의의 유형의 RNA가 본 발명의 맥락에서 사용될 수 있다. 바람직한 구현예에서, RNA는 단일 가닥 RNA이다. 용어 "단일 가닥 RNA"는 2개 이상의 별도의 쇠가 별도의 쇠의 하이브리드화로 인해 이중 가닥 분자를 형성하는 RNA 분자와 대조적으로 리보뉴클레오타이드의 단일 연속 쇠를 의미한다. 용어 "단일 가닥 RNA"는 단일 가닥 분자가 그 자체로 2차(예: 루프 및 줄기-루프) 또는 3차 구조와 같은 이중 가닥 구조를 형성한다는 것을 배제하지 않는다.
- [0042] 용어 "RNA"는 아미노산 서열을 코딩하는 RNA뿐만 아니라 아미노산 서열을 코딩하지 않는 RNA를 포함한다. 게놈의 80% 이상이 단백질을 코딩하지 않는 기능적 DNA 요소를 함유한다는 것이 시사되었다. 이러한 비코딩 서열은 조절 DNA 요소(전사 인자, 조절자 및 공동 조절자 등의 결합 부위) 및 단백질로 번역되지 않는 전사체를 코딩하는 서열을 포함한다. 게놈에 의해 인코딩되고 RNA로 전사되지만 단백질로 번역되지 않는 이러한 전사체는 비코딩 RNA(ncRNA)라고 지칭된다. 따라서, 하나의 구현예에서, RNA는 비코딩 RNA이다. 바람직하게는, 비코딩 RNA는 단일 가닥 분자이다. 연구에 따르면, ncRNA가 유전자 조절, 게놈 완전성의 유지, 세포 분화 및 발달에 중요한 역할자이며, 그들은 다양한 인간 질환에서 잘못 조절된다는 것이 입증된다. 상이한 유형의 ncRNA: 짧은(20-50 nt), 중간(50-200 nt), 긴(> 200 nt) ncRNA가 존재한다. 짧은 ncRNA에는 microRNA(miRNA), 짧은 간섭성

RNA(siRNA), 피위-상호작용성 RNA(piRNA) 및 전사 개시 RNA(tiRNA)가 포함된다. 중간 ncRNA의 예에는 소형 핵 RNA(snRNA), 소형 핵인 RNA(snoRNA), 전달 RNA(tRNA), 전사 개시-부위-관련 RNA(TSSaRNA), 프로모터-관련 소형 RNA(PASR) 및 프로모터 업스트림 전사체(PROMPT)가 포함된다. 긴 비코딩 RNA(lncRNA)에는 긴 유전자간 비코딩 RNA(lincRNA), 안티센스-lncRNA, 인트론 lncRNA, 전사된 초보존(ultra-conserved) RNA(T-UCR) 및 기타가 포함된다(참조: Bhan A, Mandal SS, ChemMedChem. 2014 Mar 26. doi: 10.1002/cmdc.201300534). 상기 언급된 비코딩 RNA 중 siRNA만이 이중 가닥이다. 따라서, 바람직한 구현예에서, 비코딩 RNA가 단일 가닥이기 때문에, 비코딩 RNA가 siRNA가 아닌 것이 바람직하다. 또 다른 구현예에서, RNA는 코딩 RNA, 즉 아미노산 서열을 코딩하는 RNA이다. 이러한 RNA 분자는 또한 mRNA(메신저 RNA)라고 지칭되며, 단일 가닥 RNA 분자이다. RNA는 당업자에게 공지된 합성 화학 및 효소 방법론으로, 또는 제조합 기술의 사용으로 제조될 수 있거나, 천연 공급원으로부터 또는 이들의 조합에 의해 단리될 수 있다.

[0043] 메신저 RNA(mRNA)는 주로 아데노신, 시티딘, 우리딘 및 구아노신을 뉴클레오타이드로서 사용하여 뉴클레오타이드 포스페이트 구성 요소로 구축된 공중합체로서, 이는 중간체 담체로서 세포핵의 DNA로부터 유전 정보를 세포 질로 가져오고, 여기서 단백질로 번역된다. 따라서, 그들은 유전자 발현의 대안으로 적합하다.

[0044] 본 발명의 맥락에서, mRNA는 세포 내로 들어 오는 경우, 단백질 또는 이의 단편의 발현에 적합하거나 단백질 또는 이의 단편으로 번역 가능한 임의의 폴리리보뉴클레오타이드 분자를 의미하는 것으로 이해되어야 한다. 여기서 용어 "단백질"은 임의의 종류의 아미노산 서열, 즉 각각 펩티드 결합을 통해 연결되고 펩티드 및 융합 단백질 또는 포함하는 2개 이상의 아미노산의 쇄를 포함한다.

[0045] mRNA는 세포에서 또는 세포 주변에서 기능이 필요하거나 유익한 단백질 또는 이의 단편, 예를 들어, 결핍 또는 결함 있는 형태가 질환 또는 질병의 유발자이고, 이의 제공이 질환 또는 질병을 완화하거나 예방할 수 있는 단백질, 또는 세포 또는 그 주변에서 신체에 유익한 과정을 촉진할 수 있는 단백질을 인코딩하는 리보뉴클레오타이드 서열을 함유한다. mRNA는 완전한 단백질 또는 이의 기능적 변이체에 대한 서열을 함유할 수 있다. 또한, 리보뉴클레오타이드 서열은 인자, 유도제, 조절제, 자극제 또는 효소로서 작용하는 단백질 또는 이의 기능적 단편을 인코딩할 수 있으며, 여기서 이 단백질은 기능이 장애, 특히 대사 장애를 치료하기 위해 또는 새로운 혈관, 조직 등의 형성과 같은 생체내 과정을 개시하기 위해 필요한 것이다. 여기서, 기능적 변이체는 세포에서 기능이 필요하거나 이의 결핍 또는 결함 있는 형태가 병원성인 단백질의 기능을 세포에서 수행할 수 있는 단편을 의미하는 것으로 이해된다. 또한, mRNA는 또한 추가의 기능적 영역 및/또는 3' 또는 5' 비코딩 영역을 가질 수 있다. 3' 및/또는 5' 비코딩 영역은 RNA의 안정화에 기여하는 단백질 인코딩 서열 또는 인공 서열에 자연적으로 인접하는 영역일 수 있다. 당업자는 각각의 경우에 일상적인 실험에 의해 이에 적합한 서열을 결정할 수 있다.

[0046] 바람직한 구현예에서, mRNA는 특히 번역을 개선하기 위해 3'-말단에서 5' 내지 5' 트리포스페이트 결합을 통해 mRNA에 연결된 m7GpppG 캡으로 이루어지는 5'-cap(5-프라임-cap; cap-0), mRNA의 5'-말단으로부터 페놀티메이트 뉴클레오타이드 위의 추가의 메틸 그룹(Cap-1, 항-반전 Cap 유사체(ARCA)) 및/또는 내부 리보솜 진입 부위(IRES) 및/또는 polyA-테일을 함유한다. mRNA는, 예를 들어, cap-2 구조 또는 히스톤 줄기-루프 구조와 같은 번역을 촉진시키는 추가의 영역을 가질 수 있다.

[0047] 상기 주어진 바와 같이, 특정 맥락에서 달리 지시되지 않는 한, 본원에서 사용된 용어 mRNA는 변형된 mRNA를 포함하며, 즉 mRNA는 변형된 mRNA일 수 있다.

[0048] 다른 구현예에서, mRNA는, 예를 들어, 동위원소 및/또는 형광 표지된 뉴클레오타이드와 같은 표지된 핵산(바람직하게는, 뉴클레오타이드 및/또는 리보뉴클레오타이드)을 함유한다. 표지된 mRNA 분자는, 예를 들어, RNA 및 DNA 분자의 세포내 입체 형태를 연구하는 데 중요한 역할을 한다.

[0049] 바람직한 구현예에서, RNA, 바람직하게는 mRNA는 변형된 뉴클레오타이드/리보뉴클레오타이드를 포함하는 분자이다. 4개의 고전적인 리보뉴클레오타이드, 즉 아데노신, 구아노신, 시티딘 및 우리딘 이외에, 이러한 핵염기 각각의 수많은 유사체가 존재한다. 때때로 문헌 전반에 걸쳐, 이들 유사체, 또는 이들 유사체 중 하나 이상을 포함하는 RNA/mRNA 분자는 본 발명의 관점에서 변형된 것(예: 변형된 뉴클레오타이드 또는 변형된 리보뉴클레오타이드)으로 지칭된다. 일부 유사체는 위의 표준 핵염기와 다르지만 자연에 존재할 수 있다. 다른 유사체는 자연적으로 발생하지 않는다. 두 가지 유형의 유사체가 고려된다.

[0050] 바람직한 변형이 하기 표(표 1)에 제시되어 있다:

표 1

[0051]

명칭	염기 변형 (5'-위치)	당 변형 (2'-위치)	mRNA에 자연적
우리딘			
5-메틸우리딘 5'-트리포스페이트 (m5U)	CH ₃	-	부재
5-요오도우리딘 5'-트리포스페이트 (I5U)	I	-	부재
5-브로모우리딘 5'-트리포스페이트 (Br5U)	Br	-	부재
2-티오우리딘 5'-트리포스페이트 (S4U)	S (2 위치에서)	-	부재
4-티오우리딘 5'-트리포스페이트 (S2U)	S (4 위치에서)	-	부재
2'-메틸-2'-데옥시우리딘 5'-트리포스페이트 (U2'm)	-	CH ₃	존재
2'-아미노-2'-데옥시우리딘 5'-트리포스페이트 (U2'NH ₂)	-	NH ₂	부재
2'-아지도-2'-데옥시우리딘 5'-트리포스페이트 (U2'N ₃)	-	N ₃	부재
2'-플루오로-2'-데옥시우리딘 5'-트리포스페이트 (U2'F)	-	F	부재
슈도우리딘 (ψ)	-	-	존재
N1-메틸-슈도우리딘 (N1mψ)	-	-	부재
시티딘			
5-메틸시티딘 5'-트리포스페이트 (m5C)	CH ₃	-	존재
5-요오도시티딘 5'-트리포스페이트 (I5U)	I	-	부재
5-브로모시티딘 5'-트리포스페이트 (Br5U)	Br	-	부재
2-티오시티딘 5'-트리포스페이트 (S2C)	S (2 위치에서)	-	부재
2'-메틸-2'-데옥시시티딘 5'-트리포스페이트 (C2'm)	-	CH ₃	존재
2'-아미노-2'-데옥시시티딘 5'-트리포스페이트 (C2'NH ₂)	-	NH ₂	부재
2'-아지도-2'-데옥시시티딘 5'-트리포스페이트 (C2'N ₃)	-	N ₃	부재
2'-플루오로-2'-데옥시시티딘 5'-트리포스페이트 (C2'F)	-	F	부재
아데노신			
N6-메틸아데노신 5'-트리포스페이트 (m6A)	CH ₃ (6 위치에서)	-	존재
N1-메틸아데노신 5'-트리포스페이트 (m1A)	CH ₃ (1 위치에서)	-	부재
2'-O-메틸아데노신 5'-트리포스페이트 (A2'm)	-	CH ₃	존재
2'-아미노-2'-데옥시아데노신 5'-트리포스페이트 (A2'NH ₂)	-	NH ₂	부재
2'-아지도-2'-데옥시아데노신 5'-트리포스페이트 (A2'N ₃)	-	N ₃	부재
2'-플루오로-2'-데옥시아데노신 5'-트리포스페이트 (A2'F)	-	F	부재
구아노신			
N1-메틸구아노신 5'-트리포스페이트 (m1G)	CH ₃ (1 위치에서)	-	부재
2'-O-메틸구아노신 5'-트리포스페이트 (G2'm)	-	CH ₃	존재
2'-아미노-2'-데옥시구아노신 5'-트리포스페이트 (G2'NH ₂)	-	NH ₂	부재
2'-아지도-2'-데옥시구아노신 5'-트리포스페이트 (G2'N ₃)	-	N ₃	부재
2'-플루오로-2'-데옥시구아노신 5'-트리포스페이트 (G2'F)	-	F	부재

[0052]

RNA, 바람직하게는 mRNA의 경우, 본 발명에 따르면, 모든 우리딘 뉴클레오타이드 및 시티딘 뉴클레오타이드는 각각 동일한 형태로 변형될 수 있거나, 그렇지 않으면 변형된 뉴클레오타이드의 혼합물이 각각에 사용될 수 있다. 변형된 뉴클레오타이드는 자연적으로 발생하거나 자연적으로 발생하지 않는 변형을 가질 수 있다. 다양한 변형된 뉴클레오타이드의 혼합물이 사용될 수 있다. 따라서, 예를 들어, 변형된 뉴클레오타이드의 한 부분은 자연적인 변형을 가질 수 있는 반면, 다른 부분은 자연적으로 발생하지 않는 변형을 갖거나, 자연적으로 발생하는 변형된 및/또는 자연적으로 발생하지 않는 변형된 뉴클레오타이드의 혼합물이 사용될 수 있다. 또한, 변형된 뉴클레오타이드의 일부는 염기 변형을 가질 수 있고, 다른 부분은 당 변형을 가질 수 있다. 동일한 방식으로, 모든 변형은 염기 변형이거나 모든 변형은 당 변형이거나 이들의 임의의 적합한 혼합물일 수 있다. 변형의 변화에 의해, 본 발명에 따르는 RNA, 바람직하게는 mRNA의 안정성 및/또는 작용 기간이 선택적으로 조정될 수 있다.

[0053]

본 발명의 하나의 구현예에서, 하나의 유형의 뉴클레오타이드에 대해 적어도 2개의 상이한 변형이 사용되며, 여

기서 한 유형의 변형된 뉴클레오타이드는 추가의 그룹이 부착될 수 있는 작용성 그룹을 갖는다. 상이한 그룹의 부착을 위한 결합 부위를 제공하기 위해 상이한 작용성 그룹을 갖는 뉴클레오타이드가 또한 사용될 수 있다. 따라서, 예를 들어, 변형된 뉴클레오타이드의 일부는 아지도 그룹, 아미노 그룹, 하이드록시 그룹, 티올 그룹 또는 소정의 조건하에서 반응에 적합한 일부 다른 반응성 그룹을 보유할 수 있다. 작용성 그룹은 또한 특정 조건하에서 결합할 수 있는 자연적으로 존재하는 그룹을 활성화시켜 기능을 갖는 분자가 결합될 수 있도록 할 수 있는 것일 수 있다. 결합 부위를 제공하도록 변형된 뉴클레오타이드는 또한 아데노신 또는 구아노신 변형으로 도입될 수 있다. 특별한 적합한 변형의 선택과 이용 가능하게 제조될 결합 부위의 선택은 어떤 그룹이 도입되는지와 이들이 제공되는 빈도에 따라 다르다. 따라서, 작용성 및/또는 활성화 그룹이 제공된 뉴클레오타이드의 함량은 결합될 그룹의 함량이 얼마나 높은지에 따라 달라지며, 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있다. 일반적으로, 작용성 및/또는 활성화 그룹으로 변형된 뉴클레오타이드의 함량은 존재하는 경우 변형된 뉴클레오타이드의 1 내지 25%이다. 당업자는 필요하다면 일상적인 실험을 통해 각각의 경우에 가장 적합한 그룹과 이의 최적의 함량을 결정할 수 있다.

[0054] 바람직한 구현예에서, 본 발명에 따르는 RNA, 바람직하게는 mRNA는 변형된 우리딘이 2-티오우리딘, 5-메틸우리딘, 슈도우리딘, 5-메틸우리딘 5'-트리포스페이트(m5U), 5-요오도우리딘 5'-트리포스페이트(I5U), 4-티오우리딘 5'-트리포스페이트(S4U), 5-브로모우리딘 5'-트리포스페이트(Br5U), 2'-메틸-2'-데옥시우리딘 5'-트리포스페이트(U2'm), 2'-아미노-2'-데옥시우리딘 5'-트리포스페이트(U2'NH₂), 2'-아지도-2'-데옥시우리딘 5'-트리포스페이트(U2'N₃) 및 2'-플루오로-2'-데옥시우리딘 5'-트리포스페이트(U2'F)로부터 선택된다는 것을 특징으로 한다.

[0055] 또 다른 바람직한 구현예에서, 본 발명에 따르는 RNA, 바람직하게는 mRNA는 변형된 시티딘이 5-메틸시티딘, 3-메틸시티딘, 2-티오-시티딘, 2'-메틸-2'-데옥시 시티딘 5'-트리포스페이트(C2'm), 2'-아미노-2'-데옥시 시티딘 5'-트리포스페이트(C2'NH₂), 2'-플루오로-2'-데옥시 시티딘 5'-트리포스페이트(C2'F), 5-요오도시티딘 5'-트리포스페이트(I5U), 5-브로모시티딘 5'-트리포스페이트(Br5U) 및 2'-아지도-2'-데옥시 시티딘 5'-트리포스페이트(C2'N₃)로부터 선택되는 것을 특징으로 한다.

[0056] 바람직한 구현예에서, mRNA는 변형된 뉴클레오타이드와 변형되지 않은 뉴클레오타이드의 조합을 함유하는 mRNA이다. 바람직하게는, 그것은 WO2011/012316에 기재된 바와 같이 변형된 뉴클레오타이드와 변형되지 않은 뉴클레오타이드의 조합을 함유하는 mRNA이다. 본원에 기재된 mRNA는 증가된 안정성과 감소된 면역원성을 나타내는 것으로 보고되어 있다. 바람직한 구현예에서, 이러한 변형된 mRNA에서 시티딘 뉴클레오타이드의 5 내지 50% 및 우리딘 뉴클레오타이드의 5 내지 50%가 변형된다. 아데노신- 및 구아노신 함유 뉴클레오타이드는 변형되지 않을 수 있다. 아데노신 및 구아노신 뉴클레오타이드는 변형되지 않거나 부분적으로 변형될 수 있으며, 그들은 바람직하게는 변형되지 않은 형태로 존재한다. 바람직하게는, 10 내지 35%의 시티딘 및 우리딘 뉴클레오타이드가 변형되고, 특히 바람직하게는 변형된 시티딘 뉴클레오타이드의 함량은 7.5 내지 25% 범위이고, 변형된 우리딘 뉴클레오타이드의 함량은 7.5 내지 25% 범위이다. 사실상 비교적 낮은 함량, 예를 들어, 각각 10%의 변형된 시티딘 및 우리딘 뉴클레오타이드만이 목적하는 특성을 달성할 수 있다는 것이 밝혀졌다. 변형된 시티딘 뉴클레오타이드가 5-메틸시티딘 잔기이고 변형된 우리딘 뉴클레오타이드가 2-티오우리딘 잔기인 것이 특히 바람직하다. 가장 바람직하게는, 변형된 시티딘 뉴클레오타이드의 함량 및 변형된 우리딘 뉴클레오타이드의 함량은 각각 25%이다.

[0057] 특정의 다른 구현예에서, 이러한 변형된 RNA, 바람직하게는 mRNA에서, 시티딘의 5 내지 50%는 C의 유사체이고, 우리딘의 5 내지 50%는 U의 유사체이다. 특정 구현예에서, 이러한 변형된 RNA, 바람직하게는 mRNA에서, 시티딘의 5 내지 40%는 C의 유사체이고 우리딘의 5 내지 40%는 U의 유사체이다. 특정 구현예에서, 이러한 변형된 RNA, 바람직하게는 mRNA에서, 시티딘의 5 내지 30%는 C의 유사체이고 우리딘의 5 내지 30%는 U의 유사체이다. 특정 구현예에서, 이러한 변형된 RNA, 바람직하게는 mRNA에서, 시티딘의 10 내지 30%는 C의 유사체이고, 우리딘의 10 내지 30%는 U의 유사체이다. 특정 구현예에서, 이러한 변형된 RNA, 바람직하게는 mRNA에서, 시티딘의 5 내지 20%는 C의 유사체이고, 우리딘의 5 내지 20%는 U의 유사체이다. 특정 구현예에서, 이러한 변형된 RNA, 바람직하게는 mRNA에서, 시티딘 뉴클레오타이드의 5 내지 10% 및 우리딘 뉴클레오타이드의 5 내지 10%가 변형된다. 특정 구현예에서, 이러한 변형된 RNA, 바람직하게는 mRNA에서, 시티딘 뉴클레오타이드의 25% 및 우리딘 뉴클레오타이드의 25%가 변형된다. 특정 구현예에서, 아데노신- 및 구아노신-함유 뉴클레오타이드는 변형되지 않을 수 있다. 특정 구현예에서, 아데노신 및 구아노신 뉴클레오타이드는 변형되지 않거나 부분적으로 변형될 수 있으며, 그들은 바람직하게는 변형되지 않은 형태로 존재한다.

[0058] 상기 주어진 바와 같이, 특정 구현예에서, U의 유사체는 단일 유형의 U의 유사체를 지칭한다. 특정 구현예에서, U의 유사체는 2종 이상의 U의 유사체를 지칭한다. 특정 구현예에서, C 유사체는 단일 유형의 C의

유사체를 지칭한다. 특정 구현예에서, C의 유사체는 2종 이상의 C의 유사체를 지칭한다.

- [0059] 특정 구현예에서, 시티딘 유사체인 RNA, 바람직하게는 mRNA 중의 시티딘의 백분율은 우리딘 유사체인 RNA, 바람직하게는 mRNA 중의 우리딘의 백분율과 동일하지 않다. 특정 구현예에서, 시티딘 유사체의 백분율은 우리딘 유사체의 백분율보다 낮다. 상기 주어진 바와 같이, 이것은 아데노신 및 구아노신 유사체의 존재 또는 부재하에 있을 수 있지만, 특정 구현예에서, 아데노신 유사체 및 구아노신 유사체의 부재하에 있다. 특정 구현예에서, 본 개시 내용의 RNA, 바람직하게는 mRNA는 아데노신 유사체, 구아노신 유사체 또는 둘 다의 15% 미만, 10% 미만, 5% 미만 또는 2% 미만을 포함한다.
- [0060] 특정 구현예에서, 본 발명의 RNA, 바람직하게는 mRNA는 시티딘 유사체 및 우리딘 유사체를 포함하고, 시티딘의 5 내지 20%는 시티딘 유사체이고, 우리딘의 25 내지 45%는 우리딘 유사체이다. 즉, RNA, 바람직하게는 mRNA는 변형된 시티딘 및 변형되지 않은 시티딘 및 변형된 우리딘 및 변형되지 않은 우리딘을 포함하고, 시티딘의 5 내지 20%는 시티딘 유사체를 포함하는 반면, 우리딘의 25 내지 45%는 우리딘 유사체를 포함한다. 다른 구현예에서, RNA, 바람직하게는 mRNA는 5 내지 10%의 시티딘 유사체 및 30 내지 40%의 우리딘 유사체, 예를 들어, 7 내지 9%의 시티딘 유사체, 예를 들어, 약 7, 7.5 또는 8% 및 32 내지 38%의 우리딘 유사체, 예를 들어, 약 33, 34, 35, 36%를 포함한다.
- [0061] 특정 구현예에서, 본원에 기재된 임의의 우리딘 유사체 및 시티딘 유사체가, 임의로 슈도우리딘을 제외하고 사용될 수 있다. 특정 구현예에서, 시티딘 유사체는 5-요오도시티딘을 포함하거나 이로 구성되고(예를 들어, 구성되는 경우, 그것은 사용된 단일 유사체 유형이다), 우리딘 유사체는 5-요오도우리딘을 포함하거나 이로 구성된다(예를 들어, 구성되는 경우, 그것은 사용된 단일 유사체 유형이다).
- [0062] 상기 중 임의의 것의 특정 구현예에서, 소정의 뉴클레오타이드의 유사체의 백분율은 입력 백분율(예: 시험관내 전사 반응에서의 출발과 같은 출발 반응에서 유사체의 백분율)을 지칭한다. 상기 중 임의의 것의 특정 구현예에서, 소정의 뉴클레오타이드의 유사체의 백분율은 출력 백분율(예: 합성된 또는 전사된 화합물에서의 백분율)이다. 두 옵션이 동일하게 고려된다.
- [0063] 본 발명의 RNA, 바람직하게는 mRNA는 당업자에게 공지된 방법에 의해 생체내 시스템에서 재조합적으로 생산될 수 있다.
- [0064] 대안적으로, 본 발명의 변형된 RNA, 바람직하게는 mRNA 분자는, 예를 들어, 당업자에게 공지된 시험관내 전사 시스템을 사용하여 시험관내 시스템에서 생산될 수 있다. RNA, 바람직하게는 mRNA를 생성할 수 있는 시험관내 전사 시스템은 본 발명의 목적하는 특성을 갖는 변형된 RNA, 바람직하게는 mRNA 분자를 생성하기 위해 변형된 및 비변형된 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 입력 혼합물을 필요로 한다. 특정 구현예에서, 시티딘의 5 내지 50%는 이러한 입력 혼합물에서 시티딘 유사체이고, 우리딘의 5 내지 50%는 이러한 입력 혼합물에서 우리딘 유사체이다. 특정 구현예에서, 시티딘의 5 내지 40%는 이러한 입력 혼합물에서 시티딘 유사체이고, 우리딘의 5 내지 40%는 이러한 입력 혼합물에서 우리딘 유사체이다. 특정 구현예에서, 5 내지 30%의 시티딘은 이러한 혼합물에서 시티딘 유사체이고, 5 내지 30%의 우리딘은 이러한 입력 혼합물에서 우리딘 유사체이다. 특정 구현예에서, 5 내지 30%의 시티딘은 이러한 혼합물에서 시티딘 유사체이고, 10 내지 30%의 우리딘은 이러한 혼합물에서 우리딘 유사체이다. 특정 구현예에서, 시티딘의 5 내지 20%는 이러한 입력 혼합물에서 시티딘 유사체이고, 5 내지 20%의 우리딘은 이러한 입력 혼합물에서 우리딘 유사체이다. 특정 구현예에서, 5 내지 10%의 시티딘은 이러한 입력 혼합물에서 시티딘 유사체이고, 5 내지 10%의 우리딘은 이러한 입력 혼합물에서 우리딘 유사체이다. 특정 구현예에서, 시티딘의 25%는 이러한 입력 혼합물에서 시티딘 유사체이고, 우리딘의 25%는 이러한 입력 혼합물에서 우리딘 유사체이다. 특정 구현예에서, 입력 혼합물은 아데노신 및/또는 구아노신 유사체를 포함하지 않는다. 다른 구현예에서, 임의로, 입력 혼합물은 아데노신 및/또는 구아노신의 하나 이상의 유사체를 포함한다(또는 둘 중 하나 또는 둘 다 포함하지 않음).
- [0065] 특정 구현예에서, 시티딘 유사체인 입력 혼합물에서 시티딘의 백분율은 우리딘 유사체인 입력 혼합물에서 우리딘의 백분율과 동일하지 않다. 특정 구현예에서, 입력 혼합물에서 시티딘 유사체의 백분율은 입력 혼합물에서 우리딘 유사체의 백분율보다 낮다. 상기 주어진 바와 같이, 이것은 입력 혼합물에서 아데노신 및 구아노신 유사체의 존재 또는 부재하에 있을 수 있지만, 특정 구현예에서, 입력 혼합물에서 아데노신 유사체 및 구아노신 유사체의 부재하에 있다.
- [0066] 특정 구현예에서, 본 발명의 RNA, 바람직하게는 mRNA를 생성하는 시험관내 전사 시스템을 위한 뉴클레오타이드의 입력 혼합물은 시티딘 유사체 및 우리딘 유사체를 포함하고, 입력 혼합물의 시티딘의 5 내지 20%는 시티딘

유사체이고, 입력 혼합물의 우리딘의 25 내지 45%는 우리딘 유사체이다. 즉, 입력 혼합물은 변형된 및 비변형된 시티딘 및 변형된 및 비변형된 우리딘을 포함하고, 입력 혼합물의 시티딘의 5 내지 20%는 시티딘 유사체를 포함하는 반면, 입력 혼합물의 우리딘의 25 내지 45%는 우리딘 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.

[0067] 특정 구현예에서, 본원에 기재된 임의의 우리딘 유사체 및 시티딘 유사체가 임의로 슈도우리딘을 제외하고 사용될 수 있다. 특정 구현예에서, 시티딘 유사체는 5-요오도시티딘을 포함하거나 이로 구성되고(예를 들어, 그것은 사용된 단일 C 유사체 유형이다), 우리딘 유사체는 5-요오도시티딘을 포함하거나 이로 구성된다(예를 들어, 그것은 사용된 단일 U 유사체 유형이다).

[0068] 예시적인 유사체는 상기 표에 기재되어 있다. 목적하는 폴리펩티드를 인코딩하는 변형된 폴리리보뉴클레오타이드(모듈 (a))의 경우, 유사체 및 변형 수준은 달리 지시되지 않는 한 5' 및 3' 비번역 영역을 포함하여 목적하는 폴리펩티드를 인코딩하는 전체 폴리리보뉴클레오타이드(모듈 (a))에 걸쳐 고려된다는 것이 이해되어야 한다(예를 들어, 변형 수준은 유사체가 전사되는 위치에 도입될 수 있도록 시험관내 전사 반응에서 유사체의 입력 비율에 기초한다).

[0069] 더욱이, 변형된 RNA, 바람직하게는 mRNA 분자는, 예를 들어, 고체 상 지지체 및 표준 기술을 사용하는 자동화된 뉴클레오타이드 서열 합성기에서 통상적인 화학적 합성에 의해 또는 각각의 DNA 서열의 화학적 합성 및 후속하는 이의 시험관내 또는 생체내 전사에 의해 화학적으로 합성될 수 있다.

[0070] 또 다른 바람직한 구현예에서, mRNA는 관련 세포에서만 목적하는 mRNA의 활성을 허용하기 위해 표적 결합 부위, 표적화 서열 및/또는 마이크로-RNA 결합 부위와 조합될 수 있다. 추가의 바람직한 구현예에서, RNA는 3' polyA 테일의 마이크로-RNA 또는 shRNA 다운스트림과 조합될 수 있다.

[0071] 일반적으로, 치료 효과는 리보핵산과 세포 분자 및 세포 소기관의 상호 작용에 의해 달성될 수 있다. 이러한 상호 작용만으로, 예를 들어, 특정 CpG 올리고뉴클레오타이드 및 돌연 및 다른 세포외 또는 세포내 수용체와 특이적으로 상호 작용하도록 설계된 서열의 경우와 같이 선천적 면역계를 활성화할 수 있다. 또한, 세포에서 리보핵산(바람직하게는 mRNA)의 흡수 또는 도입은 리보핵산(바람직하게는 mRNA)에 포함된 유전자와 같은 뉴클레오타이드 서열의 발현을 유도하도록 의도될 수 있으며, 도입된 외인성 핵산의 세포내 존재 결과로 내인성 유전자 발현의 하향 조절, 사일런싱 또는 녹다운을 의도할 수 있거나, 선택된 염기 또는 내인성 핵산 서열의 전체 스트레치의 복구, 절제, 삽입 또는 교환과 같은 내인성 핵산 서열의 변형을 의도할 수 있거나, 도입된 외인성 리보핵산(바람직하게는 mRNA)의 세포내 존재 및 상호 작용의 결과로 사실상 임의의 세포 과정에 의한 간섭을 의도할 수 있다. 도입된 외인성 리보핵산(바람직하게는 mRNA)의 과발현은, 특히 몇몇 예로 낭포성 섬유증, 혈우병 또는 근이영양증과 같은 많은 대사 및 유전성 질환이 있는 경우와 같이 내인성 유전자가 결함이 있거나 침묵하여 유전자 발현이 없거나, 불충분하거나, 결함이 있거나, 기능 장애가 있는 생성물을 유도하는 경우에 내인성 유전자 발현을 보상하거나 보완하도록 의도될 수 있다. 도입된 외인성 리보핵산(바람직하게는 mRNA)의 과발현은 또한 발현 생성물이 유전자 발현의 조절, 신호 전달 및 기타 세포 과정과 같은 임의의 내인성 세포 과정과 상호 작용하거나 간섭하도록 의도될 수 있다. 도입된 외인성 리보핵산(바람직하게는 mRNA)의 과발현은 또한 형질 감염되거나 형질 도입된 세포가 거주하거나 거주하도록 만들어진 유기체의 맥락에서 면역 반응을 일으키도록 의도될 수 있다. 예는 백신 접종 목적을 위한 항원을 제시하기 위해 수지상 세포와 같은 항원 제시 세포의 유전자 변형이다. 다른 예는 종양 특이적 면역 반응을 유도하기 위해 종양에서 사이토카인의 과발현이다. 또한, 도입된 외인성 리보핵산(바람직하게는 mRNA)의 과발현은 또한 변형된 T-세포 또는 전구체 또는 줄기 또는 재생 의학을 위한 다른 세포와 같은 세포 요법을 위해 일시적으로 유전자 변형된 세포를 생체내 또는 생체외에서 생성하도록 의도될 수 있다.

[0072] 치료 목적을 위한 내인성 유전자 발현의 하향 조절, 사일런싱 또는 녹다운은, 예를 들어, RNA 간섭(RNAi), 리보자임, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, tRNA, 이러한 하향 조절이 서열 특이적이거나 비특이적일 수 있고, 또한 긴 이중 가닥 RNA가 세포에 도입될 경우처럼 세포사를 유도할 수 있는 긴 이중 가닥 RNA에 의해 달성될 수 있다. 내인성 또는 기존의 유전자 발현의 하향 조절, 사일런싱 또는 녹다운은 바이러스 감염 및 암을 포함하는 후천성, 유전성 또는 자발적으로 발생하는 질환의 치료에 유용할 수 있다. 핵산의 세포로의 도입이, 예를 들어, 바이러스 감염 또는 신생물을 예방하기 위한 예방 조치로서 실행될 수 있다는 것도 예상될 수 있다. 내인성 유전자 발현의 하향 조절, 사일런싱 또는 녹다운은 전사 수준 및 번역 수준에서 발휘될 수 있다. 다수의

메커니즘이 당업자에게 공지되어 있으며, 예를 들어, 후성 유전적 변형, 염색질 구조의 변화, 도입된 핵산에 의한 전사 인자의 선택적 결합, 삼중 나선 형성과 같은 비통상적인 염기 쌍 메커니즘을 포함하는 염기 쌍에 의한 게놈 DNA, mRNA 또는 기타 RNA 종의 상보적 서열에 대한 도입된 핵산의 하이브리드화를 포함한다. 유사하게, 유전자 복구, 염기 또는 서열 변화는 엑손 스킵핑을 포함하는 게놈 수준 및 mRNA 수준에서 달성될 수 있다. 염기 또는 서열 변화는, 예를 들어, RNA 유도된 부위 특이적 DNA 절단, 트랜스-스플라이싱, 트랜스-스플라이싱 리보자임, 키메라플라스트, 스플라이코솜 매개된 RNA 트랜스-스플라이싱을 활용하는 절단 및 플라스트 메커니즘에 의해, 또는 그룹 II 또는 재표적화 인트론을 활용하거나, 바이러스에 의해 매개되는 삽입 돌연변이 유발을 활용하거나 원핵, 진핵 또는 바이러스 인테그라제 시스템을 사용하여 표적화 게놈 삽입을 활용함으로써 달성될 수 있다. 핵산은 살아 있는 시스템의 구축 계획의 담체이며 그들이 많은 세포 과정에 직접적 및 간접적인 방식으로 참여하기 때문에 이론적으로 임의의 세포 과정은 핵산을 외부에서 세포로 도입함으로써 영향을 받을 수 있다. 특히, 이러한 도입은 세포 또는 기관 배양에서 생체내 및 생체외에서 직접 수행될 수 있으며, 이어서 이렇게 변형된 기관 또는 세포를 수용자에게 이식할 수 있다. 치료적 활성제로서 핵산과 함께 본 발명의 맥락에서 사용하기 위한 입자는 상기한 모든 목적에 유용할 수 있다.

[0073] 상기 언급된 바와 같이, RNA, 바람직하게는 mRNA는 세포 또는 세포 근처에서 기능이 필요하거나 유익한 단백질을 또는 이의 단편, 예를 들어, 결핍 또는 결함 있는 형태가 질환 또는 질병의 유발자이고, 이의 제공이 질환 또는 질병을 완화 또는 예방할 수 있는 단백질, 또는 세포 또는 이의 근처에서 신체에 유익한 과정을 촉진할 수 있는 단백질을 인코딩하는 리보뉴클레오타이드 서열을 함유할 수 있다.

[0074] 실제로, 최근 몇 년 동안, RNA(특히, mRNA)는 새로운 약물 개체로서 점점 더 관련성이 높아지고 있다. DNA 기반 유전자 치료제와 대조적으로, mRNA는 핵으로 수송될 필요는 없지만 세포질에서 단백질로 직접 번역된다(참조: J Control Release, 2011, 150:238-247 및 Eur J Pharm Biopharm, 2009, 71:484-489).

[0075] 더욱이, 단일 유전자의 돌연변이에 의해 야기되는 수많은 유전적 장애가 공지되어 있으며, RNA, 바람직하게는 mRNA, 치료적 접근에 대한 후보이다. 낭포성 섬유증, 혈우병 및 기타 여러 가지와 같은 단일 유전자 돌연변이로 인한 장애는 특정 형질이 자손에게 나타날 가능성과 관련하여 우성이거나 열성일 수 있다. 우성 대립 유전자는 대립 유전자의 하나의 카피만을 갖는 개체에서 표현형을 나타내지 만, 열성 대립 유전자의 경우 개체는 2개의 카피를 가져야 하고, 각 부모로부터 하나씩 나타난다. 대조적으로, 다유전자성 장애는 둘 이상의 유전자에 의해 발생하며, 각 질환의 징후는 종종 유동적이고 환경 요인과 관련이 있다. 다유전자성 장애의 예로는 고혈압, 콜레스테롤 수치 상승, 암, 신경퇴행성 장애, 정신병 등이 있다. 또한, 이러한 경우에, 이들 유전자 중 하나 이상을 나타내는 치료용 RNA, 바람직하게는 mRNA가 이들 환자에게 유익할 수 있다. 또한, 유전적 장애는 부모의 유전자에서 물려받은 것이 아니라 새로운 돌연변이로 인해 발생할 수도 있다. 또한 이러한 경우, 올바른 유전자 서열을 나타내는 치료용 RNA, 바람직하게는 mRNA가 환자에게 유익할 수 있다.

[0076] 현재 이들 각각의 유전자 및 그들 표현형의 설명과 함께 인간 유전자 및 유전적 장애의 22,993개의 엔트리를 갖는 온라인 카탈로그는 ONIM(Online Mendelian Inheritance in Man) 웹 페이지(<http://onim.org>)에서 이용 가능하고, 각 서열은 Uniprot 데이터베이스(<http://www.uniprot.org>)로부터 이용 가능하다. 비제한적인 예로서, 다음 표 2는 일부 선천성 질환 및 상응하는 유전자(들)를 나열한다. 세포 신호 전달 경로의 고도의 상호작용으로 인해, 특정 유전자의 돌연변이는 병원성 증상의 증식을 유발하며, 그중 특징적인 것만이 표 2에 나열되어 있다.

[0077] 본 발명의 일부 구현예에서, 본 발명의 RNA, 바람직하게는 mRNA에 의해 인코딩되는 치료 단백질은 표 2에 나열된 세포 단백질로부터 선택된다. 따라서, 본 발명의 RNA, 바람직하게는 mRNA 분자는 치료 세포 단백질을 인코딩할 수 있으며, 여기서 인코딩된 치료 단백질은 표 2에 열거된 것 또는 이의 상동체이다.

[0078] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 본 발명의 RNA, 바람직하게는 mRNA에 의해 인코딩되는 치료 단백질은 표 2에 나열된 분비된 단백질로부터 선택된다. 따라서, 본 발명의 RNA, 바람직하게는 mRNA는 치료용 융합 단백질을 인코딩할 수 있으며, 여기서 인코딩된 치료 단백질 또는 이의 상동체는 표 2에 나열된 것이고, 제2 단백질은 치료 단백질의 분비를 허용하는 신호 펩티드이다. 신호 펩티드는 상기 치료 단백질의 N-말단에 존재하는 짧은, 전형적으로 5-30개 아미노산 길이의 아미노산 서열이며, 그것은 특정 세포 소기관(즉, 소포체, 골지체 또는 엔도솜)을 통해 세포의 분비 경로를 향해 융합 단백질을 유도한다. 따라서, 이러한 융합 단백질은 세포로부터 또는 세포 소기관으로부터 분비되거나 세포 구획 또는 세포 표면에서 세포막 (예: 다중 스팩닝 막 관통 단백질)으로 삽입된다.

[0079] 따라서, 본 발명의 바람직한 구현예에서, 본 발명의 RNA, 바람직하게는 mRNA는 질환을 유발하거나 약하게 하거나 이로부터 보호하는 유전자의 다음과 같은 단백질을 인코딩할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 치료될 (또

는 예방될) 수 있는 이러한 장애의 비제한적인 예는 상기 폴리펩티드, 단백질 또는 펩티드가 하기 표 2에 요약된 바와 같은 것들로 구성된 그룹으로부터 선택되는 것들을 포함한다.

[0080]

일부 구현예에서, 본 발명의 RNA, 바람직하게는 mRNA의 인코딩 서열은 천연 단백질의 수준 이상의 수준으로 세포 활성을 포함하는 부분적 또는 전장 단백질로 전사되고 번역될 수 있다. 일부 구현예에서, 본 발명의 RNA, 바람직하게는 mRNA는 치료 또는 예방 효과를 갖는 치료적 또는 약제학적 활성 폴리펩티드, 단백질 또는 펩티드를 인코딩하며, 여기서 상기 폴리펩티드, 단백질 또는 펩티드는 다음 표 2에 개요된 것들로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. RNA, 바람직하게는 mRNA, 보다 구체적으로 이의 인코딩 서열은 천연 단백질 수준 이하의 수준으로 세포 활성을 갖는 부분적 또는 전장 단백질을 발현하는데 사용될 수 있다. 이것은 RNA 분자의 투여가 지시될 수 있는 질환의 치료를 가능하게 할 수 있다.

표 2

[0081]

인간 유전자 및 유전적 장애의 비제한적인 예

질환	병리학	유전자, 유전
혈액 질환		
관코니 빈혈(Fanconi Anemia)	빈혈 및 호중구 감소증, DNA 복구 메커니즘이 영향을 받는다는 증거	FANCA, 상 염색체 열성
혈우병(Hemophilia)-A	비정상적인 출혈	응고 인자 VIII, X-염색체 열성
혈우병-B	비정상적인 출혈	응고 인자 IX, X-염색체 열성
유전성 구상 적혈구증(Hereditary Spherocytosis)(다양한 유형)	구형 적혈구(구형 적혈구)	안키린(ANK1)
발작성 야행성 혈색소뇨증(Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria)	빈혈 및 소변내 혈액 존재	PIG-A, X-염색체
만발성 피부 포르피린증(Porphyrria cutanea tarda)	헴의 과잉 생산, 철분 과부하	유로포르피리노젠 탈카복실라제(UROD), 상 염색체 열성
중증 복합 면역 결핍(SCID)	손상된 DNA 합성으로 인해 체액 및 세포 면역에 심각한 면역 결핍	아데노신 데아미나제, 상 염색체 열성, IL-2R- γ , JAK3, (IL-7R- α , RAG1/2, 아르테미스, CD3 δ , CD3 ϵ
겸상 적혈구 빈혈(Sickle-cell anemia)	비정상적인 헤모글로빈(HbS)	β -헤모글로빈(HB), 상 염색체 열성
지중해 빈혈(Thalassemia)(α -및 β 형태)	α -또는 β 헤모글로빈의 부족으로 빈혈 초래	HBA1 및/또는 HBA2의 결실
폰 빌레브란트병(Von Willebrand disease)(공지된 세 가지 유형, III형이 가장 심각함)	비정상적인 출혈, 혈우병 A 및 B와 유사한 출혈	상 염색체 우성 및 열성 형태
암		
악성 흑색종(Malignant melanoma)	P16 돌연변이는 섬유아세포의 조절되지 않은 증식을 유도한다	사이클 의존성 키나제 억제제 2(CDKN2)
신경섬유종증(Neurofibromatosis) (2개 유형)	청각 신경의 양성 종양은 난청을 유도한다	NF1, NF2, 상 염색체 우성
난청(Deafness)(귀)		
난청	청력 손실	난청-1A(DFNB1), 상 염색체 열성
펜드레드 증후군(Pendred syndrome)	청력 손실	펜드린(PDS), 상 염색체 열성
심장		
모세혈관 확장성 운동실조(Ataxia telangiectasia)	DNA 손상 복구 방해,	ATM,
아테롬성 동맥경화증(Atherosclerosis)	혈중 콜레스테롤의 증가	apoE,
LQT 증후군(긴 QT)	칼륨 채널 결함	LQT1 및 다른 유전자
폰-히펠 린다우 증후군(Von-Hippel Lindau Syndrome)	혈관의 비정상적인 성장은 암을 초래할 수 있다	VHL, 상 염색체 우성
윌리엄스 뷰렌 증후군(William's Beuren Syndrome)	엘라스틴의 결실은 혈관 결함, 대동맥관 상부 협착증을 초래한다	엘라스틴 및 LIM 키나제 유전자의 결실

대사 장애 및 글리코겐 저장 질환			
부신백질 (Adrenoleukodystrophy)	이영양증	교란된 지방산 수송 및 대사	ABCD1, X-염색체
알카톤뇨증(Alkaptonuria)		질소 대사 결함, 산소에 노출되면 소변이 짙어짐	호모겐티스산 옥시다제, 상 염색체 열성
당뇨병 I형		교란된 인슐린 생산	IDDM1, IDDM2, GCK, ...
갈락토스혈증(Galactosemia)		갈락토스 대사 장애	갈락토스-1-포스페이트 우리딜트랜스퍼라제 유전자(GALT), 상 염색체 열성
고슈병(Gauche disease)		지방 대사 장애	글루코세레브로시다제
글루코스 갈락토시다제 흡수 장애		장 내강의 교란된 글루코스 및 갈락토스 수송은 설사를 일으킨다	SGLT1, 상 염색체 열성
글리코겐 저장 질환 I형, 폰 기에르케병(Von-Gierke's disease)		간 및 신장에 글루코스의 축적	글루코스-6-포스파타제, 상 염색체 열성
글리코겐 저장 질환 II형, 폼페병(Pompe's disease)		간, 심장, 골격근, 심비대에 글리코겐의 축적	α -1-글루코시다제, 상 염색체 열성
글리코겐 저장 질환 III형, 코리병(Cori's disease)		간, 심장, 골격근, 간 비대에 글리코겐의 축적	탈분지화 효소, 상 염색체 열성
글리코겐 저장 질환 V형, 맥아들병(McArdle's disease)		근육 세포에서 글리코겐을 사용할 수 없음	근육 포스포릴라제, 상 염색체 열성
글루코스-6-포스페이트 데하이드로게나제		글루타티온을 유지하지 못하면 용혈성 빈혈을 초래한다	G6PD, X-염색체 열성
유전성 혈색소 침착증(Hereditary Hemochromatosis)(4개 유형)		장에서 과도한 철분 흡수로 인한 신체(특히, 간)에서 과도한 철분	혈색소 침착증(HFE)
호모시스틴뇨증(Homocystinuria)		질소 대사 결함	시스타티온 신세타제 결함, 상 염색체 열성
레쉬 니한 증후군(Lesh Nyhan Syndrome)		통풍, 요산 결석 및 근육 손실로 이어지는 요산의 축적	HPRT1, X-염색체
단풍당밀뇨증(Maple Syrup Urine Disease)		아미노산 대사 결함은 α -케토산의 축적 및 치료하지 않으면 첫 달에 사망을 초래한다	분지된-쇄-알파-데하이드로게나제(BCKDH)
멘케스 증후군(Menkes' Syndrome)		구리 흡수 능력 감소는 치료하지 않으면 유아기 사망을 초래한다	ATP7A, X-염색체 열성
비만(Obesity)		체중 증가	다유전자성, 상승된 렙틴 수준이 역할을 할 수 있다
페닐케톤뇨증(Phenylketonuria)		페닐알라닌을 티로신으로 분해하지 못하면 정신 지체를 초래한다	페닐알라닌 하이드록실라제 (PAH), 상 염색체 열성
탄지에르병(Tangier disease)		혈장 고밀도 지단백질 수준의 감소	ATP-결합 카세트-1 유전자 (ABCA1)
젤위거 증후군(Zellweger Syndrome)(유아기 사망 초래)		혈액 내 높은 수준의 철 및 구리	PXR1 (퍼옥시좀의 표면 상 수용체)
윌슨병(Wilsons Disease)		뇌 및 간에 구리 축적	ATP7B (P형 ATPase), 상 염색체 열성
근골격계			
연골무형성증(Achondroplasia)		연골 세포의 느린 증식으로 인해 큰 머리를 갖는 작은 키	섬유아세포 성장 인자 수용체 3 (FGF3R),
사르코-마리-투스 증후군(Charcot-Marie-Tooth Syndrome) 및 이의 더 심각한 형태인 데제린-소타스 증후군(Dejerine-Sottas Syndrome)		사지 근육의 퇴행	상당한 유전자 돌연변이로 인한 다양한 형태, 상 염색체 열성 및 X-염색체
코케이인 증후군(Cockayne syndrome) (2개 유형)		조기 성숙 및 작은 키, "즉석(on the fly)" DNA 복구의 손실	그룹 8 절제 복구 교차-보완 단백질(ERCC8)
연골외배엽 이형성증(Chondroectodermal dysplasia)		뼈의 기형 및 다지증	EVC, 상 염색체 열성
이영양성 형성 이상(Diastrophic dysplasia; DTD)		기형 손, 황산염 운반체 결함	DTDST 유전자

뒤센 근이영양증(Duchenne muscular dystrophy)	후속적 기능 상실로 인한 근육 조직의 비대	DMD, X-염색체 열성
진행성 골화성 섬유이형성증(Fibrodysplasia Ossificans Progressiva)	이소성 골 형성	NOG, BMP, 상 염색체 우성
프리드리히 운동 실조(Friedreich's ataxia)	심장 비대 및 근육 조정의 점진적 상실	프라탁신, 상 염색체 열성
저인산증(Hypophosphatasia)	광물화 과정에 영향을 미치는 알칼리성 포스파타제의 비정상적 버전의 생성	ALPL, 상 염색체 열성
마르판 증후군(Marfan Syndrome)	피브릴린 결핍으로 인한 결합 조직 장애	피브릴린 1 (FBN), 상 염색체 우성
근긴장성 이영양증(Myotonic dystrophy)(청년기 동안 발병)	골격근 세포에서 단백질 키나제 결합	근긴장성 이영양증 단백질 키나제 (DMPK), 상 염색체 우성
불완전 골형성증(Osteogenesis imperfect)(다양한 유형)	I형 콜라겐 형성의 결함은 출생 후 다발성 골절을 초래한다	COL1A1, COL1A2
프라더-윌리 증후군(Prader-Willi Syndrome)	감소된 근긴장도 및 정신 지체	염색체 15의 결실로 인해 결실된 SNRPN(소형 리비핵단백질 N)
뉴런 및 뇌		
알츠하이머병(Alzheimer disease)	아밀로이드 생성 증가, 사실을 기억하는 점진적 무능력	다유전자성, PS1, PS2, ...
근위축성 측삭 경화증(Amyotrophic lateral sclerosis; ALS)(다양한 형태)	운동 뉴런 세포의 점진적 퇴행 (슈퍼옥사이드 라디칼 제거의 결함)	슈퍼옥사이드 디스무타제1(SOD1), 관련된 다양한 유전자
안젤만 증후군(Angelman syndrome)	부적절한 웃음을 갖는 정신 지체	염색체 15의 계놈 각인
피루바트 데하이드로게나제	치료하지 않을 경우 신경학적 결함	피루바트 데하이드로게나제, 상 염색체 열성
레프섬병(Refsum disease)	피탄산의 축적은 말초 신경 병증을 초래한다	피타노일-CoA 하이드록실라제 (PHYH), 상 염색체 열성
레트 증후군(Rett's syndrome)	생후 6-18개월 사이에 발달 정지된 정신 지체	메틸-CpG-결합 단백질-2 (MECP2), X-염색체 우성
테이-삭스병(Tay-Sachs disease) (다양한 형태의 중증도)	GM2 강글리오사이드의 교란된 분해는 신경학적 손상을 초래한다	HEXA(β -헥소사미니다스 A), 상 염색체 열성
라포라병(LaFora Disease)	공격적인 형태의 간질	EPM2A, 상 염색체 열성
본태성 떨림(Essential tremor)(다양한 형태)	제어할 수 없는 흔들림	ETM1, ETM2, 상 염색체 우성
취약 X 증후군	FMR1 RNA 결함 단백질의 부족, 정신 지체	FMR1 유전자는 5'UTR 영역에서 CGG 증폭으로 인해 발현되지 않는다
헌팅턴병(Huntington's disease)	성인에게 발병한 진행성 치매	HTT(헌팅틴), 상 염색체 우성
장		
바터 증후군(Bartter's syndrome) (3개 유형)	신장 질환	신장 클로라이드 채널 B 유전자 (CLCNKB), 상 염색체 열성
다낭성 신장 질환(Polycystic kidney disease)(2개 유형)	신장 질환	PDK1, PDK2, 상 염색체 우성, 공지된 상 염색체 열성 형태(ARPKD)도 있다
폐		
알파-1-항트립신	엘라스타제의 제어되지 않은 방출로 인한 폐포 결함	SERPINA1, 상 염색체 공동 우성
천식(Asthma)	기도의 만성 염증성 장애	다유전자성
낭포성 섬유증(Cystic fibrosis)	결함 있는 Cl-이온 수송으로 인해 과도하게 점성인 점액질	CFTR (낭포성 섬유증 전도도 막 관통 조절제), 상 염색체 열성
계면활성제 대사 기능 장애(Surfactant metabolism dysfunction)(다양한 유형)	신생아는 정상 체중이지만, 모두 팽창하지 않는다	ATP-결합 카세트 트랜스포터 (ABCA3)
원발성 섬모 운동 이상증(Primary ciliary dyskinesia)	섬모 기능의 결함/결손으로 인해 과도하게 점성인 점액질	DNAI1, CCNO, CCDC40 등
리소좀 저장 질환		

파브리병(Fabry's disease)	그 밖에, 세라마이드 트리헥소사이드의 축적으로 인한 피부 병변	α-갈락토시다제 A, X-염색체 열성
고셔병 I형: 성인 형태(치료하에 정상 수명) II형: 유아기 형태(1세 이전 사망) III형: 유년기 형태(유아기 발병, II형보다 덜 심함)	글루코세레브로사이드(강글리오사이드, 스펅고지질)의 축적	글루코세레브로시다제, 상 염색체 열성,
헌터 증후군(Hunter's Syndrome)	점질다당류의 축적	L-이두로노설파트 설파타제, X-염색체 열성
헐러 증후군(Hurler's Syndrome) (10세까지 사망)	점질다당류의 축적	α-L-이두로나다제, 상 염색체 열성
니만-피크병(Niemann-Pick Disease)(3개의 다른 형태 A, B, C)	리소좀으로부터 콜레스테롤 방출의 결함, 스펅고미엘린의 축적	스핑고미엘리나제, 상 염색체 열성
테이-삭스병(4세까지 사망)	신경 세포에서 G _{M2} 강글리오사이드의 축적	헥소사미니다제 A, 상 염색체 열성
피부		
백색증(Albinism)	질소 대사 결함	티로시나제 결핍, 상 염색체 열성
백색증, 눈피부, II형	멜라닌 색소의 생합성 감소	OCA2, 상 염색체 열성
엘러스-단로스 증후군(Ehlers-Danlos Syndrome)(다양한 유형)	일반적인 횡격막 탈장, 망막 박리	콜라겐 합성의 다양한 결함
수포성 표피박리증(Epidermolysis bullosa)(단순성 EB, 연접부 EB, 이형양형 EB 및 킨들러 증후군을 포함하는 다양한 유형)	각질 세포 구조적 안정성의 유지 또는 각질 세포의 기저 진피에의 부착의 결함	수포성 표피박리증 황반 유형(EBM), 진행성 수포성 표피박리증 3(EBR3), 가성 접합부 수포성 표피박리증 4(EBR4), 데스모플라킨(DSP), 플라코필린-1(PKP1), 크레아틴(KRT5, KRT14), 플렉틴(PLEC), ITGA6, 인테그린 서브유닛(ITGB4), 라미닌 서브유닛(LAMA3, LAMP3, LAMB3, LAMC2), 콜라겐(COL17A1, COL7A1 (상 염색체 우성), FERMT1, 상 염색체 열성
하아트누프병(Hartnup's disease)	위장관, 광 민감성 피부에서 트립토판 흡수 결함	SLC6A19, 상 염색체 열성
유전성 출혈성 모세혈관 확장증(Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia), 오슬러-베버-렌두 증후군(Osler-Weber-Rendu Syndrome)	피부와 점막의 모세혈관 확장증	엔도글린(ENG), 상 염색체 우성
가족성 고콜레스테롤혈증(Hypercholesterolemia, familial)	저밀도 지단백질에 결합된 혈청 콜레스테롤의 상승, 피부 축적 및 아테롬성 동맥경화증	저밀도 지단백질 수용체(LDLR), 아포지단백질 B(APOB), 상 염색체 우성
색소성 피부건조증(Xeroderma pigmentosa)	자외선 노출로 인한 피부 결함 및 흑색종	DNA 복구 결함, 상 염색체 열성
남성형 대머리(Male pattern baldness)	피부에서 테스토스테론의 디하이드로테스토스테론으로의 교란된 전환	5-α-리덕타제
유전적 간 질환		
아미노산 대사 장애	아미노산 티로신과 페닐알라닌을 분해하는 다단계 공정의 중단	FAH, TAT, HPD, 상 염색체 열성
베타-지중해 빈혈 인터미디어	성숙한 적혈구 부족	HBB, 상 염색체 열성
크리글러-나자르 증후군(Crigler-Najjar syndrome)	빌리루빈이 물에 용해가능해지는 글루쿠론화의 결핍	UGT1A1, 상 염색체 열성
지방산 산화 장애	장쇄 지방산 및 매우 장쇄 지방산의 처리 부족으로 기면 및 저혈당증을 초래한다	HADHA, ACADVL 상 염색체 열성
프럭토스 대사 장애	저혈당증을 유발하는 글루코스 생성 장애	FBP1, ALDOB, 상 염색체 열성
갈락토스혈증(Galactosemia)	갈락토스 처리 부족	GALT, GALK1, GALE, 상 염색체 열성

글리코겐 저장 질환	글루코스 6-포스페이트 및 글리코겐의 교란된 쇠약은 세포 손상을 일으키는 비정상적인 글리코겐 분자뿐만 아니라 글리코겐의 축적을 초래한다	G6PC, SLC37A4, AGL, GBE1, 상 염색체 열성
헴 생합성 장애(Heme biosynthesis disorder)	유로포르피리노겐 탈카복실라제의 감소로 인해 포르피린이라는 화합물이 축적되어 간에 독성 수준을 유발한다	UROD 상 염색체 우성, ALAS2 X-연관 우성, ALAD 상 염색체 열성
지질 대사 (수송) 장애	콜레스테롤 및 기타 지질의 이동을 억제하여 세포에 축적되는 기능성 단백질의 부족	NPC1, NPC2 상 염색체 열성, LDLR, 상 염색체 우성
금속 대사 장애	철과 구리의 저장 및 수송 장애로 인해 조직과 기관에 축적을 초래한다	ATP7B, HAMP, HFE, HFE2, 상 염색체 열성
유기산 장애 (산뇨증(Acidurias)/산혈증(Acidemias))	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, 상 염색체 열성
1형 원발성 고옥살산뇨증(Primary hyperoxaluria type 1)	신장 손상으로 이어지는 글리옥실레이트의 분해 중단	AGXT, GRHPR, 상 염색체 열성
진행성 가족성 간내 담즙 정체증(Progressive familial intrahepatic cholestasis)	간 손상을 유발하는 간 세포에 담즙산의 축적	ATP8B1, 상 염색체 열성
혈소판 활동 장애(Thrombocyte activity disorder)	효소 활동 부족은 출혈과 응고 사이의 일반적인 균형을 방해한다	ADAMTS13, 상 염색체 열성
요소 순환 장애(Urea cycle disorders)	고암모니아혈증(hyperammonemia)의 형태를 유발하는 요소 순환 장애	OTC (X-연관 장애), CPS1, ASS1 and SLC25A13, ASL, 상 염색체 열성

[0082] 상기 표 2는 결함이 본 발명의 RNA, 바람직하게는 mRNA로 치료될 수 있는 질환을 유도하는 유전자의 예를 보여 주고, 여기서 본 발명의 RNA, 바람직하게는 mRNA는 상기 개시된 결함 있는 유전자의 단백질 또는 이의 기능적 단편의 온전한 버전을 인코딩하는 리보뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 특히 바람직한 구현예에서, 예를 들어, SPB(계면활성제 단백질 B) 결핍, ABCA3 결핍, 낭포성 섬유증 및 α1-항트립신 결핍과 같은 폐에 영향을 미치거나, 혈장 단백질에 영향을 미치고(예: 선천성 혈색소 침착증(헵시딘 결핍), 혈전성 혈소판 감소성 자반병(TPP, ADAMTS 13 결핍), 응고 결함(예: 혈우병 a 및 b) 및 보체 결함(예: 단백질 C 결핍), 면역 결함, 예를 들어, SCID(RAG1, RAG2, JAK3, IL7R, CD45, CD3 δ, CD3 ε 과 같은 상이한 유전자에서 돌연변이에 의해 유발됨)를 유발하거나, 아데노신 테사미나아제의 부족으로 인한 결핍, 예를 들어, (ADA-SCID), 패혈성 육아종증(예: gp-91-phox 유전자, p47-phox 유전자, p67-phox 유전자 또는 p33-phox 유전자의 돌연변이에 의해 유발됨) 및 고셔병, 파브리병, 크라베병, MPS I, MPS II(헌터 증후군), MPS VI, 글리코겐 저장 질환 II형 또는 점액다당류에 의해 유발되는 유전성 질환이 언급될 수 있다.

[0083] 본 발명의 RNA, 바람직하게는 mRNA가 유용할 수 있는 다른 장애는 SMN1-관련 척추 근육 위축(SMN1-related spinal muscular atrophy; SMA); 근위축성 측삭 경화증(amyotrophic lateral sclerosis; ALS); GALT 관련 갈락토스혈증(galactosemia); 낭포성 섬유증(Cystic Fibrosis; CF); 시스틴뇨증(cystinuria)을 포함한 SLC3A1 관련 장애; 알포트 증후군(Alport syndrome)을 포함한 COL4A5 관련 장애; 갈락토세레브로시다제 결핍; X-연관 부신백질 이영양증(adrenoleukodystrophy) 및 부신 신경병증(adrenomyeloneuropathy); 프리드리히 운동 실조(Friedreich's ataxia); 펠리제우스-메르츠바하병(Pelizaeus-Merzbacher disease); TSC1 및 TSC2 관련 결절성 경화증(tuberous sclerosis); 산필리포 B 증후군(Sanfilippo B syndrome)(MPS IIIB); CTNS 관련 시스틴증(cystinosis); 취약 X 증후군, 취약 X-관련 떨림/운동 실조 증후군(Tremor/Ataxia Syndrome) 및 취약 X 조기 난소 부전 증후군(Premature Ovarian Failure Syndrome)을 포함하는 FMR1 관련 장애; 프라더-윌리 증후군(Prader-Willi syndrome); 유전성 출혈성 모세혈관 확장증(hereditary hemorrhagic telangiectasia)(AT); 니만-피크병(Niemann-Pick disease) 유형 C1; 청소년 신경 세로이드 리포푸스신증(Juvenile Neuronal Ceroid Lipofuscinosis; JNCL), 청소년 배튼병(Juvenile Batten disease), 산타보오리-할티아병(Santavuori-Haltia disease), 얀스키-빌쇼스키병(Jansky-Bielschowsky disease) 및 PTT-1 및 TPP1 결핍증을 포함하는 신경 세로이드 리포푸스신증 관련 질환; 중추 신경계 저수초화/백질 소실을 동반한 EIF2B1, EIF2B2, EIF2B3, EIF2B4 및

EIF2B5 관련 소아 운동 실조증; CACNA1A 및 CACNB4 관련 에피소드성 운동 실조 유형 2; 고전적 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 백혈병증(leukoencephalopathy)을 동반한 Notch-3 관련 대뇌 상 염색체 우성 동맥병증(cerebral autosomal dominant arteriopathy)(CADASIL); SCN1A 및 SCN1B 관련 발작 장애(seizure disorders); 알퍼스-후텐로처 증후군(Alpers-Huttenlocher syndrome), POLG 관련 감각 실조 신경병증(sensory ataxic neuropathy), 구음장애(dysarthria) 및 안근마비(ophthalmoparesis), 및 미토콘드리아 DNA 결실을 동반한 상 염색체 우성 및 열성 진행성 외부 안근마비를 포함하는 폴리머라제 G 관련 장애; X-연관 부신 저형성증(adrenal hypoplasia); X-연결 무감마글로불린혈증(agammaglobulinemia); 파브리병(Fabry disease); 및 윌슨병(Wilson's disease)과 같은 장애를 포함한다.

[0084] 이러한 모든 질환에서, 단백질을, 예를 들어, 효소는 결합이 있으며, 이는 본 발명의 임의의 상기 단백질을 인코딩하는 RNA, 바람직하게는 mRNA로 치료함으로써 치료될 수 있으며, 이는 결합 있는 유전자에 의해 인코딩된 단백질 또는 이의 기능적 단편을 이용 가능하게 한다. 전사체 대체 요법/효소 대체 요법은 근본적인 유전적 결함에 영향을 주지 않지만 환자가 결핍된 효소의 농도를 증가시킨다. 예로서, 폼페병에서 전사체 대체 요법/효소 대체 요법이 결핍된 리소좀 효소 산 알파-글루코시다제(GAA)를 대체한다.

[0085] 따라서, 본 발명의 mRNA에 의해 인코딩될 수 있는 단백질의 비제한적인 예는 에리트로포이에틴(EPO), 성장 호르몬(소마토트로핀, hGH), 낭포성 섬유증 막 관통 전도도 조절제(CFTR), 성장 인자, 예를 들어, GM-CSF, G-CSF, MPS, 단백질 C, 헤파딘, ABCA3 및 계면활성제 단백질 B이다. 본 발명에 따르는 RNA로 치료될 수 있는 질환의 추가 예는 혈우병 A/B, 파브리병, CGD, ADAMTS13, 헐러병(Hurler's disease), X 염색체-매개 A- γ -글로불린혈증, 아데노신 데아미나제 관련 면역결핍 및 SP-B와 관련된 신생아 호흡 곤란 증후군이다. 특히 바람직하게는, 본 발명에 따르는 RNA, 바람직하게는 mRNA는 계면활성제 단백질 B(SP-B) 또는 에리트로포이에틴의 코딩 서열을 함유한다. 본 발명에 따르는 본 발명의 RNA, 바람직하게는 mRNA에 의해 인코딩될 수 있는 단백질의 추가의 예는 성장 인자, 예를 들어, 인간 성장 호르몬 hGH, BMP-2 또는 혈관형성 인자이다.

[0086] 대안적으로, RNA, 바람직하게는 mRNA는, 예를 들어, 대상체에게 면역성을 부여하기 위해 치료 환경에 사용될 수 있는 전장 항체 또는 소형 항체(예: 중쇄 및 경쇄 모두)를 인코딩하는 리보뉴클레오타이드 서열을 함유할 수 있다. 상응하는 항체 및 그들의 치료적 적용(들)은 당업계에 공지되어 있다.

[0087] 또 다른 구현예에서, RNA, 바람직하게는 mRNA는 생물학적 표적(예: 종양 괴사 인자와 같은 자극성 사이토카인)을 표적화 및/또는 불활성화시키는 데 유용할 수 있는 기능적 모노클로날 또는 폴리클로날 항체를 인코딩할 수 있다. 유사하게, RNA, 바람직하게는 mRNA는, 예를 들어, 막증식성 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, 대안적으로 암과 같은 VEGF 매개 질환의 치료에 유용한 항혈관 내피 성장 인자(VEGF) 항체를 인코딩할 수 있다.

[0088] 대안적으로, RNA, 바람직하게는 mRNA는 바람직하게는 치료 환경에서 사용될 수 있는 항원을 인코딩하는 리보뉴클레오타이드 서열을 함유할 수 있다.

[0089] 다른 구현예에서, RNA, 바람직하게는 mRNA는 게놈 편집 기술에 사용될 수 있는 폴리펩티드 또는 단백질을 인코딩하는 리보뉴클레오타이드 서열을 함유할 수 있다. 게놈 편집은 뉴클레아제를 사용하여 유기체의 게놈에서 DNA가 삽입되거나, 결실되거나 대체되는 유전 공학의 한 유형이다. 이러한 뉴클레아제는 게놈의 목적하는 위치에서 부위 특이적 파손을 생성한다. 유도된 파손은 비상동성 말단 결합 또는 상동성 재조합에 의해 복구되어 게놈에서 표적화된 돌연변이를 유발하여 게놈을 "편집한다". 파손은 단일 가닥 파손 또는 이중 가닥 파손(DSB)일 수 있고, 이중 가닥 파손(DSB)이 바람직하다. 상이한 폴리펩티드 또는 단백질을 이용하는 수많은 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(참조: Trends in Biotechnology, 2013, 31 (7), 397-405)에서 검토된다.

[0090] 따라서, 바람직한 구현예에서, RNA, 바람직하게는 mRNA는 Cas(CRISPR 관련 단백질) 단백질 패밀리, 바람직하게는 Cas9(CRISPR 관련 단백질 9)의 폴리펩티드 또는 단백질을 인코딩하는 리보뉴클레오타이드 서열을 함유할 수 있다. Cas 단백질 패밀리, 바람직하게는 Cas9의 단백질은 CRISPR/Cas9 기반 방법 및/또는 CRISPR/Cas9 게놈 편집 기술에 사용될 수 있다. 게놈 편집, 조절 및 표적화를 위한 CRISPR-Cas 시스템은 문헌(참조: Nat. Biotechnol., 2014, 32(4):347-355)에서 검토된다.

고,

[0105] R^2 는 그룹 $-(CH_2)_t-NH_2$ 또는 그룹 $-(CH_2)_u-NH-(CH_2)_w-NH_2$ 이고, 여기서 t, u 및 w는 독립적으로 2 내지 6의 정수이고,

[0106] R^3 은 1 내지 4개의 탄소 원자를 갖는 선형 알칸디일 그룹이다.

[0107] 이 화학식의 화합물 및 이들의 제조는, 예를 들어, US 5,783,565에 기재되어 있다.

[0108] 화학식 I에서 정수 n은 바람직하게는 0이다.

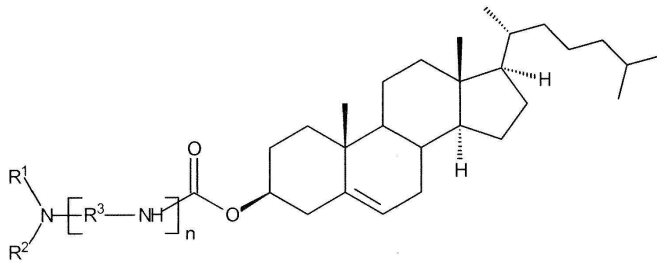
[0109] 정수 q, r, s, t, u 및 w는 바람직하게는 3 및 4로부터 독립적으로 선택된다.

[0110] R^1 이 그룹 $-(CH_2)_q-NH_2$ 이고, R^2 가 그룹 $-(CH_2)_t-NH_2$ 또는 그룹 $-(CH_2)_u-NH-(CH_2)_w-NH_2$ 이거나, R^2 가 그룹 $-(CH_2)_t-NH_2$ 이고, R^1 이 그룹 $-(CH_2)_q-NH_2$ 또는 그룹 $-(CH_2)_r-NH-(CH_2)_s-NH_2$ 인 것이 또한 바람직하다. 두 경우에, n은 또한 바람직하게는 0이다.

[0111] 화학식 I의 콜레스테롤 유도체의 염 형태는 화합물에 함유된 하나 이상의 아미노 그룹을 산으로 양성자화하여 화합물이 양전하를 동반하도록 함으로써 제공될 수 있다. 이해되는 바와 같이, 양성자화된 아미노 그룹은 양전하를 동반하는 4가 질소가 생성되도록 추가의 수소 원자가 아미노 그룹의 질소 원자에 결합된 것이다. 화학식 I의 화합물에서 적합한 질소 원자는 각각 그룹 $-N(R^1)(R^2)$ 에 함유된 질소 원자, 및 R^1 및 R^2 에 함유된 질소 원자이다. 임의의 양성자화된 아미노 그룹의 반대 이온으로서 작용하는 음이온은 일반적으로 생리학적으로 허용되는 음이온이라는 것이 이해될 것이다. 본 발명의 조성물에서, 화학식 I의 화합물은 전형적으로 RNA의 산성 그룹과 염을 형성할 것이다. 그러나, 다른 반대 이온은 배제되지 않으며, 예에는 클로라이드, 브로마이드, 요오디드, 황산염, 질산염, 인산염, 인산수소, 인산이 수소, 탄산염 및 탄산수소 음이온이 포함된다.

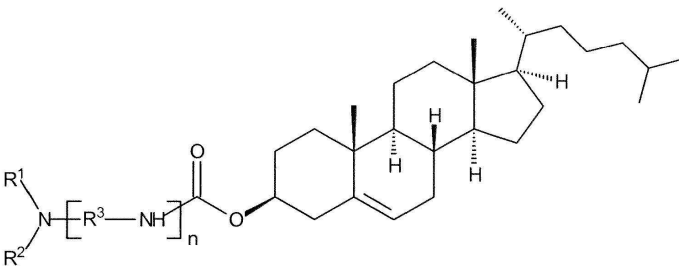
[0112] 숙련된 독자에 의해 이해되는 바와 같이, 콜레스테롤 유도체로서 화학식 I의 화합물은 바람직한 화학식 Ia, 더욱 바람직한 화학식 Ib로 예시될 수 있다:

[0113] [화학식 Ia]



[0114]

[0115] [화학식 Ib]



[0116]

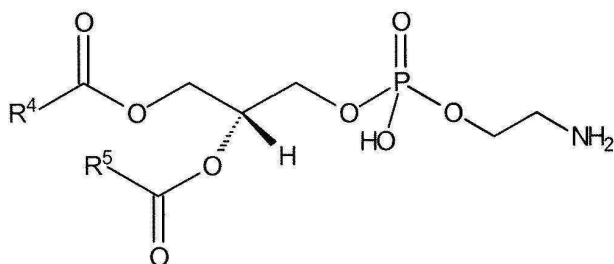
[0117] 화학식 Ia 및 Ib에서, 화학식 I과 관련하여 상기 제공된 R^1 , R^2 , R^3 및 n에 대한 정의 및 바람직한 정의가 계속 적용된다.

[0118] 지질 조성물의 성분 (i-a)로서 가장 바람직한 것은 GL67 또는 이의 염이고, 여기서, 화학식 I, Ia 및 Ib와 관련

하여, n 은 0이고, R^1 은 그룹 $-(CH_2)_3-NH_2$ 이고, R^2 는 그룹 $-(CH_2)_4-NH-(CH_2)_3-NH_2$ 이다.

[0119] 지질 조성물의 성분 (i-b)는 화학식 II의 포스포글리세라이드 또는 이의 염이다:

[0120] [화학식 II]



[0121]

[0122] 상기 화학식 II에서,

[0123] R^4 는 10 내지 24개의 탄소 원자를 갖는 선형 알킬 그룹 또는 1 내지 3개의 이중 결합과 10 내지 24개의 탄소 원자를 갖는 선형 알케닐 그룹이고;

[0124] R^5 는 10 내지 24개의 탄소 원자를 갖는 선형 알킬 그룹 또는 1 내지 3개의 이중 결합과 10 내지 24개의 탄소 원자를 갖는 선형 알케닐 그룹이다.

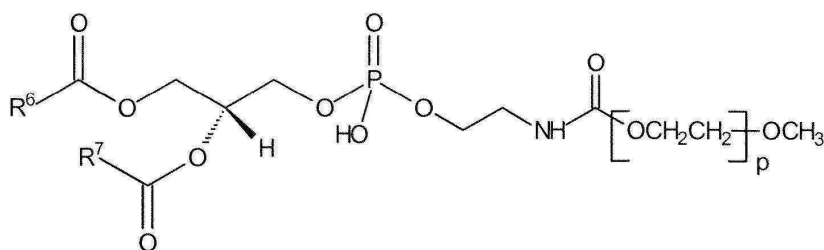
[0125] 바람직하게는, R^4 및 R^5 는 각각 14 내지 20개의 탄소 원자를 갖는 선형 알킬 그룹이거나, 각각 1개 또는 2개의 이중 결합과 14 내지 20개의 탄소 원자를 갖는 선형 알케닐 그룹이다. 보다 바람직하게는, R^4 및 R^5 는 각각 1개의 이중 결합과 14 내지 20개의 탄소 원자를 갖는 선형 알케닐 그룹이다.

[0126] 화학식 II의 화합물의 염 형태는 내부 염 형태를 포함하고, 여기서 화학식 II에 제시된 P 원자에 부착된 산성-OH 그룹의 양성자는 그 안에 제시된 아미노 그룹을 양성자화한다. 이러한 염 형태는 또한 염기와 함께 산성-OH 그룹에 의해 형성된 염, 또는 산과 함께 아미노 그룹에 의해 형성된 염을 포함한다. 다시, 염은 일반적으로 약 제학적으로 허용되는 염이라는 것이 이해될 것이다. 염기와 함께 형성된 염으로서, 알칼리 금속 염, 예를 들어, 나트륨 또는 칼륨 염; 알칼리 토금속 염, 예를 들어, 칼슘 또는 마그네슘 염 및 암모늄염이 언급될 수 있다. 산과 함께 형성된 예시적 염으로서, RNA의 산성 그룹으로 형성된 염이 언급될 수 있지만, 다른 염이 배제되지 않으며, 무기 산, 예를 들어, 클로라이드, 브로마이드 또는 요오디드, 황산염, 질산염, 인산염, 인산수소염 또는 인산이수소염, 탄산염 및 탄산수소염이 예로서 언급될 수 있다.

[0127] 지질 조성물의 성분 (i-b)로서 가장 바람직한 것은 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(DOPE), 또는 이의 염이다.

[0128] 지질 조성물의 성분 (i-c)는 화학식 III의 폐쇄화 포스포글리세라이드 또는 이의 염이다:

[0129] [화학식 III]



[0130]

[0131] 상기 화학식 III에서,

[0132] p 는 5 내지 200, 바람직하게는 10 내지 170, 가장 바람직하게는 10 내지 140의 정수이고;

[0133] R^6 은 10 내지 20개의 탄소 원자를 갖는 선형 알킬 그룹 또는 1 내지 3개의 이중 결합과 10 내지 20개의 탄소 원자를 갖는 선형 알케닐 그룹이고;

- [0134] R^7 은 10 내지 20개의 탄소 원자를 갖는 선형 알킬 그룹 또는 1 내지 3개의 이중 결합과 10 내지 20개의 탄소 원자를 갖는 선형 알케닐 그룹이다.
- [0135] 바람직하게는, R^6 및 R^7 은 각각 10 내지 20개의 탄소 원자를 갖는 선형 알킬 그룹이고, 보다 바람직하게는, R^6 및 R^7 은 각각 10 내지 16개의 탄소 원자를 갖는 선형 알킬 그룹이다.
- [0136] 따라서, 화학식 III에서, R^6 및 R^7 이 각각 10 내지 16개의 탄소 원자를 갖는 선형 알킬 그룹이고, p가 10 내지 140의 정수인 것이 또한 바람직하다.
- [0137] 화학식 III의 화합물의 염 형태는 일반적으로 약제학적으로 허용되는 염이다. 화학식 III의 화합물의 전형적인 염은 염기와 함께 형성된 염이고, 예를 들어, 알칼리 금속 염, 예를 들어, 나트륨 또는 칼륨 염; 알칼리 토금속 염, 예를 들어, 칼슘 또는 마그네슘 염 및 암모늄염을 언급할 수 있다.
- [0138] 지질 조성물의 성분 (i-c)로서 매우 바람직한 것은 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-PEG(DMPE-PEG) 또는 이의 염이고, 여기서 PEG(폴리에틸렌 글리콜) 잔기는 10 내지 140개의 반복 단위를 함유하고, 즉, 화학식 III과 관련하여, 이러한 매우 바람직한 구현예에서, R^6 및 R^7 은 각각 13개의 탄소 원자를 갖는 선형 알킬 그룹이고, p는 10 내지 140의 정수이다. 성분 (i-c)로서 가장 바람직한 것은 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-PEG5000(DMPE-PEG5000) 또는 이의 염이고, 여기서 5000은 p의 평균 값 약 113에 상응하는 PEG 잔기의 수 평균 분자량을 나타낸다.
- [0139] 따라서, 본 발명의 맥락에서 사용하기 위한 특히 바람직한 지질 조성물은 다음과 같은 것임을 이해할 것이다:
- [0140] 성분 (i-a)는 GL67 또는 이의 염이고,
- [0141] 성분 (i-b)는 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(DOPE) 또는 이의 염이고,
- [0142] 성분 (i-c)는 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-PEG(DMPE-PEG) 또는 이의 염이고, 여기서 PEG(폴리에틸렌 글리콜) 잔기는 10 내지 140개의 반복 단위를 포함하고, 더욱 바람직하게는 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-PEG5000(DMPE-PEG5000) 또는 이의 염이다.
- [0143] 본 조성물의 입자에 함유되는 지질 조성물에서, 성분 (i-a), (i-b) 및 (i-c)의 몰 비, 즉 (i-a):(i-b):(i-c)는 바람직하게는 1:(0.5 내지 5):(0.01 내지 1), 더욱 바람직하게는 1:(1 내지 5):(0.01 내지 0.5), 가장 바람직하게는 1:(1 내지 3):(0.02 내지 0.2)이다.
- [0144] 지질 조성물은 바람직하게는 유일한 지질 성분으로서 성분 (i-a), (i-b) 및 (i-c)를 함유한다.
- [0145] 상기와 일치하여, 본 발명의 제1 측면에 따르는 매우 바람직한 조성물은 다음을 포함하는 것이다:
- [0146] (i) 액체 상에 함유된 입자로서, 여기서 입자가 mRNA 및 지질 조성물을 포함하고, 지질 조성물이 성분 (i-a):(i-b):(i-c)의 몰 비 1:(1 내지 3):(0.02 내지 0.2)로
- [0147] (i-a) GL67 또는 이의 염,
- [0148] (i-b) 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(DOPE) 또는 이의 염, 및
- [0149] (i-c) 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-PEG(DMPE-PEG) 또는 이의 염으로서, PEG(폴리에틸렌 글리콜) 잔기가 10 내지 140개의 반복 단위를 함유하고, 보다 바람직하게는 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-PEG5000(DMPE-PEG5000) 또는 이의 염인, 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-PEG(DMPE-PEG) 또는 이의 염을 포함하는, 입자; 및
- [0150] (ii) 1,2-프로판디올.
- [0151] 유사하게, 본 발명의 제3 측면의 매우 바람직한 구현예는 (i) RNA 및 상기 매우 바람직한 지질 조성물을 포함하는 입자 및 (ii) 1,2-프로판디올을 포함하는 고체 조성물에 관한 것이며, 이 고체 조성물은 상기 매우 바람직한 지질 조성물을 동결시킴으로써 수득 가능하다.
- [0152] 입자
- [0153] 본 발명의 제1 측면에 따르는 조성물 및 본 발명의 제3 측면에 따르는 고체 조성물은 상기 논의된 바와 같은 RNA 및 지질 조성물을 포함하는 입자를 포함한다.

- [0154] 입자는 전형적으로 RNA 및 지질 조성물을 포함하는 나노 입자 또는 RNA 및 지질 조성물을 포함하는 미세입자를 포함한다. 숙련된 독자에 의해 이해되는 바와 같이, "또는"은 본 맥락에서 구체적으로 달리 지시되지 않는 한 비배타적인 방식으로 사용된다. 따라서, 나노입자 또는 미세입자에 대한 참조는 나노 입자를 함유하는 조성물, 미세입자를 함유하는 조성물, 및 나노 입자와 미세입자를 모두 함유하는 조성물을 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 나노 입자는 일반적으로 나노미터 크기 범위의 직경, 즉, 1nm 이상, 1000nm 미만의 직경을 갖는 입자를 지칭한다. 용어 미세입자는 일반적으로 마이크로미터 크기 범위의 직경, 즉 1000nm 이상, 100 μ m 이하의 직경을 갖는 입자를 지칭한다. 바람직하게는, 입자는 RNA 및 지질 조성물을 포함하는 나노 입자 또는 RNA 및 지질 조성물을 포함하는 미세입자로 구성된다.
- [0155] 본 발명에 따르는 조성물에 함유된 입자는 바람직하게는 1 내지 5000nm, 보다 바람직하게는 10 내지 4000nm, 가장 바람직하게는 50 내지 3000nm 범위의 평균 입자 직경을 나타낸다.
- [0156] 본 발명에 따르는 조성물에서 단일 입자의 직경에 대한 상한치는 바람직하게는 20 μ m, 더욱 바람직하게는 10 μ m, 가장 바람직하게는 5 μ m이다. 따라서, 상기로부터 이해되는 바와 같이, 매우 바람직한 입자 제형은 50 내지 3000nm 범위의 평균 입자 직경을 갖는 것 및 5 μ m의 최대 입자 직경을 갖는 입자일 것이다.
- [0157] 본원에서 언급된 나노 입자 또는 미세입자 제형의 입자 직경 및 평균 입자 직경은 동적 광 산란(DLS)을 통해 편리하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 본원에서 언급된 직경 및 평균 직경은 동적 광 산란을 통해 결정된 현탁된 상태의 입자의 유체역학적 직경으로 지시된다. 결과를 보고할 때, 온도의 영향이 측정 장비(예: Malvern ZetaSizer)에 의해 고려되기 때문에, 측정된 직경은 일반적으로 온도 의존적이지 않다. 그러나, 측정은 전형적으로 실온(25 $^{\circ}$ C)에서 수행된다. DLS 측정용 현탁 매질로서, 예를 들어, 물 또는 1,2-프로판디올을 함유하는 물이 적절하게 사용될 수 있다. 동결된 고체 조성물의 경우, 입자 직경은 전형적으로 조성물을 해동한 후에 결정된다. 평균 입자 크기 또는 평균 입자 직경이 지시된 경우, 평균은 달리 지시되지 않는 한, 전형적으로 z-평균이다.
- [0158] 본 발명에 따르는 조성물에 함유되는 입자에서, RNA의 산성 그룹은 전형적으로 지질 제형에 함유된 아미노 그룹을 양성자화하여 음이온성 RNA 분자와 양이온성 지질 분자가 상호작용하여 바람직하게는 RNA 분자와 지질 분자 사이에 복합체를 형성하도록 할 수 있다.
- [0159] 지질 조성물에서 화학식 I의 콜레스테롤 유도체로부터 유도된 질소 원자 N의 개수 대 RNA 중 포스페이트 그룹 P의 수의 N/P 비율은 바람직하게는 1 내지 100, 보다 바람직하게는 1 내지 30, 가장 바람직하게는 2 내지 20의 범위이다.
- [0160] 바람직하게는, 입자는 리포솜 또는 지질 나노 입자의 형태를 갖는다.
- [0161] 상기와 일치하여, 본 발명의 제1 측면에 따르는 매우 바람직한 조성물은 다음을 포함하는 것이다:
- [0162] (i) 액체 상에 함유된 나노 입자 또는 미세입자로서, 여기서 나노 입자 또는 미세입자가 mRNA 및 지질 조성물을 포함하며, 지질 조성물이 성분 (i-a):(i-b):(i-c)의 몰 비 1:(1 내지 3):(0.02 내지 0.2)로,
- [0163] (i-a) GL67 또는 이의 염,
- [0164] (i-b) 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(DOPE) 또는 이의 염, 및
- [0165] (i-c) 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-PEG(DMPE-PEG) 또는 이의 염으로서, 여기서 PEG (폴리에틸렌 글리콜) 잔기가 10 내지 140개의 반복 단위를 함유하고, 보다 바람직하게는 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-PEG5000(DMPE-PEG5000) 또는 이의 염인, 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-PEG(DMPE-PEG) 또는 이의 염을 포함하고,
- [0166] 지질 조성물에서 화학식 I의 콜레스테롤 유도체로부터 유도된 질소 원자 N의 수 대 mRNA 중 포스페이트 그룹 P의 수의 N/P 비율이 2 내지 20인, 나노입자 또는 미세입자; 및
- [0167] (ii) 1,2-프로판디올.
- [0168] 유사하게, 본 발명의 제3 측면의 매우 바람직한 구현예는 (i) RNA 및 선행 단락에서 언급된 지질 조성물을 포함하는 나노 입자 또는 미세입자, 및 (ii) 1,2-프로판디올을 포함하는 고체 조성물에 관한 것으로서, 이 고체 조성물은 상기 매우 바람직한 조성물을 동결시킴으로써 수득 가능하다.
- [0169] RNA 및 지질 조성물 이외에, 본 발명에 따르는 조성물의 입자는 하나 이상의 추가 성분, 예를 들어, 전형적으로

약제학적으로 허용되는 성분인 부형제 또는 첨가제를 포함할 수 있다. 예를 들어, 이러한 추가 성분은 특정 부위로의 수송을 촉진시키거나, 입자가 환자에게 투여된 후 특정 부위로의 추가 흡수를 촉진시킬 수 있거나, 입자 또는 그 안에 함유된 치료적 활성제를 안정화시키는 데 도움을 줄 수 있다.

[0170] RNA 및 지질 조성물 이외에, 본 발명의 제1 및 제3 측면에 따르는 조성물에 함유된 입자는 임의의 첨가제로서 또는 임의의 첨가제들로서 세포에 및 세포내로 치료제의 전달 동안, 바람직하게는 치료제로서 리보핵산의 전달 동안 이펙터 기능을 발휘하는 하나 이상의 성분을 포함할 수 있다. 이러한 성분은 폴리음이온, 추가의 지질, 차폐성 올리고머 또는 중합체, 폴록사머(또한, 플루로닉으로서 공지됨), 폴록사민, 표적화 리간드, 엔도솜 용해제, 세포 침투 및 신호 펩티드, 자기 및 비자성 나노입자, RNase 억제제, 형광 염료, 방사성 동위 원소 또는 의료 영상용 조영제일 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 용어 "이펙터 기능"은 생물학적 표적에서 또는 표적 중에서 또는 생물학적 표적 주위에서 조성물의 치료적 활성제의 의도된 생물학적 효과를 달성하는 것을 지지하는 임의의 기능을 포함한다. 예를 들어, 핵산 전달용 조성물은 스터퍼 물질로서 비코딩 핵산 또는 비핵산 폴리음이온을 포함하도록 제형화된다(참조: Kichler et al. 2005, J Gene Med, 7, 1459-1467). 이러한 스터퍼 물질은 이러한 스터퍼 물질의 부재하에 더 높은 핵산 용량에서 수득된 효과의 크기 또는 정도를 유지하면서 의도된 생물학적 효과를 갖는 핵산의 용량을 감소시키는데 적합하다. 비핵산 폴리음이온은 또한 감소된 독성에서 연장된 생체내 유전자 발현을 수득하기 위해 사용되었다(참조: Uchida et al. 2011, J Control Release, 155, 296-302).

[0171] 리보핵산과 양이온성 부형제의 복합체를 포함하는 입자 제형에 유용한 성분일 수 있는 문헌에 기재된 다른 예시적인 차폐성 중합체는 하이드록시에틸 전분(HES; Noga et al. Journal of Controlled Release, 2012, 159(1)):92-103), PAS-/PA-폴리펩티드(Pro, Ala, Ser (또는 Pro, Ala) 폴리펩티드: Schlapsch et al. Protein Eng Des Sel. 2013 Aug;26(8):489-501) 또는 폴리스아르코신(Psar,: Heller et al. Macromol Biosci 2014; 14:1380-1395)을 포함한다.

[0172] 표적화 리간드는, 예를 들어, 표적 세포의 우선적이고 개선된 형질 감염을 위한 리보핵산 전달용 입자 제형에 유용할 수 있다(참조: 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). 표적화 리간드는 본 발명의 조성물에 직접적 또는 간접적인 방식으로 표적 인식 및/또는 표적 결합 기능을 부여하는 임의의 화합물일 수 있다. 예시적인 표적화 리간드는 WO 2011/076391에 개시된 프로스타사이클린 유사체, 예를 들어, 일로프로스트 또는 트레프로스티닐이다. 항체는 또한 표적화 리간드로서 작용할 수 있다. 입자용 리간드로서, 염산 및 N-아세틸 갈락토사민이 언급될 수 있다. 가장 일반적인 용어로, 표적은 표적화 리간드가 분자 상호작용을 통해 특이적으로 결합할 수 있고, 이러한 결합이 표적 조직 중에서 및/또는 표적 세포에서 또는 표적 세포 중에서 조성물에 포함된 치료제, 예를 들어, 핵산의 우선적 축적을 궁극적으로 유도하는 뚜렷한 생물학적 구조이다. 표적화 리간드는, 예를 들어, 차폐성 중합체의 말단에 결합될 수 있다.

[0173] 또한, 엔도솜 용해제, 예를 들어, 엔도솜 용해 펩티드(참조: Plank et al. 1998, Adv Drug Deliv Rev, 34, 21-35) 또는 세포내 이입 핵산의 엔도솜 방출을 향상시키는 데 적합한 임의의 다른 화합물은 본 발명의 조성물의 유용한 성분이다. 유사하게, 세포 침투 펩티드(다른 맥락에서, 단백질 형질 도입 도메인으로서 공지되기도 함)(참조: Lindgren et al. 2000, Trends Pharmacol Sci, 21, 99-103)는 핵산의 세포내 전달을 매개하기 위해 본 발명의 조성물의 유용한 성분일 수 있다. 소위 TAT 펩티드는 이 부류에 속하며, 핵 국소화 기능을 또한 갖는다(참조: Rudolph et al. 2003, J Biol Chem, 278, 11411-11418).

[0174] 바람직하게는, 입자는, 치료적 활성제로서 RNA의 중량 대 입자 제형 중 입자의 총 중량으로서 표현된, 0.1 내지 95% (w/w), 더욱 바람직하게는 0.5 내지 80% (w/w), 가장 바람직하게는 1 내지 50% (w/w) 범위의 활성 부하를 갖는다.

[0175] 입자 및 1,2-프로판디올을 포함하는 조성물

[0176] 본 발명의 제1 측면에 따르는 조성물 및 본 발명의 제3 측면에 따르는 고체 조성물은 1,2-프로판디올과 함께 RNA 및 지질 조성물을 포함하는 입자를 포함한다. 이해되는 바와 같이, RNA, 지질 조성물 및 이들을 포함하는 입자의 적합하고 바람직한 구현예에 관한 상기 정보는 다음 논의의 맥락에서 계속 적용된다.

[0177] 본 발명의 제1 측면에 따르는 조성물이 치료적 활성제로서 RNA를 함유하고 치료적 활성제를 환자에게 투여하는 데 적합하기 때문에, 그것은 치료적 조성물 또는 약제학적 조성물로서 지칭될 수 있다.

[0178] 액체 상에 RNA 및 지질 조성물을 포함하는 입자를 포함하는 본 발명의 제1 측면에 따르는 조성물에서, RNA 및

지질 조성물을 포함하는 입자는 바람직하게는 액체 상에 분산된다. 용어 "분산된"에 의해 암시된 바와 같이, 입자는 이 경우에 연속 액체 상에서 불연속 상을 형성한다. 일반적으로, 분산액은 하나의 연속 액체 상과 그 안에 불연속 상으로 분산된 RNA 및 지질 조성물을 포함하는 입자를 갖는 2상 분산액으로 제공되는 것이 바람직하다.

- [0179] RNA 및 지질 조성물을 포함하는 입자가 액체 상에 함유되는 본 발명의 제1 측면에 따르는 조성물은 바람직하게는 입자에 함유된 RNA를 조성물의 총 용적을 기준으로 하여 0.01 내지 50mg/ml, 보다 바람직하게는 0.02 내지 30mg/ml, 가장 바람직하게는 0.05 내지 10mg/ml의 농도로 제공하기 위한 양으로 입자를 포함한다.
- [0180] 전형적으로, 1,2-프로판디올은 본 발명의 제1 측면에 따르는 조성물의 액체 상에 추가 성분으로서 함유되며, 여기서 RNA 및 지질 조성물을 포함하는 입자가 함유되고, 바람직하게는 현탁된다. 1,2-프로판디올은 바람직하게는 액체 상에 용해된다. 그러나, 그것은 또한 액체 상에 함유된 입자와 부분적으로 연관될 수도 있다.
- [0181] 액체 상에 함유된 입자를 포함하는 본 발명의 제1 측면에 따르는 조성물에서, 1,2-프로판디올은 바람직하게는 0.1 내지 50% w/v, 보다 바람직하게는 0.2 내지 30% w/v, 가장 바람직하게는 0.3 내지 20% w/v의 농도로 존재하며, 여기서 백분율 값은 조성물의 총 용적 100ml 당 1,2-프로판디올의 중량(g)을 나타낸다.
- [0182] 입자가 함유된, 바람직하게 분산된 액체 상은 전형적으로 용매로서 물을 함유한다. 바람직하게는, 50용적% 이상, 보다 바람직하게는 70용적% 이상(20℃에서 액체 상의 총 용적을 기준으로 하여)이 물에 의해 제공된다. 더욱 바람직하게는, 물 및 1,2-프로판디올은 액체 상에 함유된 유일한 용매이다.
- [0183] 액체 상의 예시적인 추가의 임의의 첨가제로서, 염, 당, 유기 용매 및 완충액으로부터 선택된 하나 이상이 언급될 수 있다. 약제학적 또는 생물학적 적용에 통상적으로 사용되는 완충액이 사용될 수 있다.
- [0184] 본 발명의 제3 측면에 따르는 고체 조성물은 고체 조성물을 수득하기 위해 동결될 수 있는 조성물과 동일한 성분을 함유한다. 따라서, RNA, 지질 조성물, RNA와 지질 조성물을 포함하는 입자, 1,2-프로판디올, 및 상기 제공된 이의 성분의 적합하고 바람직한 구현예에 대한 정보는 액체 상을 포함하는 조성물 및 고체 조성물에 동일하게 적용된다. 그러나, 숙련된 독자에 의해 이해되는 바와 같이, 액체 상은 고체 조성물에서 고화된다. 그 정도로, 고체 조성물은 바람직하게는 동결된 액체의 고체 연속 상에 치료제의 입자 제형의 분산액을 함유한다. 상기와 일치하여, 1,2-프로판디올은 바람직하게는 입자 제형이 분산된 연속 상에 함유된다.
- [0185] 상기와 일치하여, 본 발명의 제1 측면에 따르는 매우 바람직한 조성물은
- [0186] (i) 용매로서 물을 포함하는 액체 상에 분산된 나노 입자 또는 미세입자로서, 여기서 나노 입자 또는 미세입자가 mRNA 및 지질 조성물을 포함하며, 지질 조성물이 성분 (i-a):(i-b):(i-c)의 물 비 1:(1 내지 3):(0.02 내지 0.2)로,
- [0187] (i-a) GL67 또는 이의 염,
- [0188] (i-b) 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(DOPE) 또는 이의 염, 및
- [0189] (i-c) 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-PEG(DMPE-PEG) 또는 이의 염으로서, 여기서 PEG (폴리에틸렌 글리콜) 잔기가 10 내지 140개의 반복 단위를 함유하고, 보다 바람직하게는 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-PEG5000(DMPE-PEG5000) 또는 이의 염인, 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-PEG(DMPE-PEG) 또는 이의 염을 포함하고,
- [0190] 지질 조성물에서 화학식 I의 콜레스테롤 유도체로부터 유도된 질소 원자 N의 수 대 mRNA 중 포스페이트 그룹 P의 수의 N/P 비율이 2 내지 20인, 나노입자 또는 미세입자; 및
- [0191] (ii) 나노 입자 또는 미세입자가 현탁된 액체 상의 추가 성분으로서 1,2-프로판디올을 포함하고;
- [0192] 조성물이 1,2-프로판디올을 조성물의 총 용적을 기준으로 하여 0.3 내지 20% w/v의 1,2-프로판디올의 양으로 함유하는 것이다.
- [0193] 유사하게, 본 발명의 제3 측면의 매우 바람직한 구현예는 (i) 선행 단락에서 언급된 RNA 및 지질 조성물을 포함하는 나노 입자 또는 미세입자, 및 (ii) 1,2-프로판디올을 포함하는 고체 조성물에 관한 것으로서, 이 고체 조성물은 상기 매우 바람직한 조성물을 동결시킴으로써 수득 가능하다.
- [0194] *약제학적 적용*
- [0195] 상기에서 이미 언급된 바와 같이, 상기 정의된 바와 같은 본 발명에 따르는 조성물에 존재하는 RNA 분자, 바람

직하게는 mRNA 분자는 의료 환경 및 특정 질환의 치료에, 특히 RNA 기반 요법에 특히 유용하다. 따라서, RNA 분자를 포함하는 본 발명에 따르는 조성물은 약제학적 조성물로서 적합하다.

- [0196] 특히, 본 발명의 제1 측면에 따르는 조성물은 대상체에게 투여하기에 적합하다. 따라서, 그 안에 함유된 RNA, 바람직하게는 mRNA도 또한 대상체에게 전달될 수 있다. 조성물의 바람직한 투여 경로는 기도에 또는 기도를 통한 투여, 폐 투여 또는 비강 투여이다.
- [0197] 그러나, 본 발명의 제1 측면에 따르는 조성물은 또한 분산액 형태로 정맥내 투여와 같은 치료적 활성제의 입자 제형에 대해 당업계에 공지된 다른 투여 경로를 통해 투여될 수 있다는 것이 숙련된 독자에 의해 이해될 것이다.
- [0198] 액체에 함유된 입자를 포함하는 조성물로부터 에어로졸을 형성하거나 이러한 조성물을 분무하기 위한 장치는 당업계에 공지되어 있고, 시판되고 있다. 그들은 기도로 또는 기도를 통한 본 발명의 제1 측면에 따르는 조성물의 투여, 특히 폐 투여를 달성하기 위해 사용될 수 있다. 코를 통한 투여의 경우, 예를 들어, 비강 분무 장치 또는 비강 주입이 사용될 수 있다.
- [0199] 따라서, 본 발명의 추가의 측면은 액체에 함유된 미립자 조성물로부터 에어로졸을 형성하거나 이러한 조성물을 분무하기 위한 장치에 관한 것으로서, 이 장치는 본 발명에 따르는 제1 측면에 따르는 조성물을 포함한다. 장치는 바람직하게 계량된 용량 흡입기, 분무기 및 비강 분무 장치로부터 선택된 흡입기이다.
- [0200] 대상체에게 이러한 투여를 통해, 입자에 함유된 RNA는 기도에 또는 기도를 통해 표적 세포로 전달될 수 있다. 용어 "표적 세포로 전달된"은 바람직하게는 RNA, 바람직하게는 mRNA와 같은 단일 가닥 RNA의 세포로의 이동을 의미한다.
- [0201] 조성물은 적절한 용량으로 대상체에게 투여될 수 있다. 투여량 섭생은 주치의 및 임상 요인에 의해 결정될 것이다. 의학 분야에서 익히 공지되어 있는 바와 같이, 임의의 한 대상체에게 대한 투여량은 대상체의 크기, 체표면적, 연령, 투여될 특정 화합물, 성별, 투여 시간 및 경로, 일반적인 건강 및 동시에 투여되는 다른 약물을 포함하는 많은 요인에 따라 달라진다. 치료적 활성 물질의 전형적인 용량은, 예를 들어, 1ng 내지 수 g의 범위일 수 있다. 발현 또는 발현 억제를 위한 (m)RNA의 투여량은 이 범위에 상응해야 하지만, 특히 전술한 요인을 고려할 때 이 예시적인 범위 이하 또는 이상의 용량이 예상된다. 일반적으로, 약제학적 조성물의 규칙적인 투여로서의 섭생은 0.01 μ g 내지 10mg 단위/체중 kg/일의 범위여야 한다. 섭생이 연속 주입인 경우, 그것은 또한 각각 1 μ g 내지 10mg 단위/체중 kg의 범위여야 한다. 진행은 주기적인 평가로 모니터링될 수 있다. 투여량은 다양하지만, 본 발명의 조성물의 성분으로서 (m)RNA의 투여에 바람직한 투여량은 (m)RNA의 분자의 약 10^6 내지 10^{19} 카피이다.
- [0202] 또한 본 발명에 의해 이용 가능한 것은 본 발명의 제1 측면에 따르는 조성물을, 바람직하게는 기도로 또는 기도를 통한 투여를 통해, 바람직하게는 폐 투여 또는 비강 투여를 통해 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 치료 방법이다. 따라서, 상기 조성물에 함유된 RNA는 예방 또는 치료 효과를 야기할 수 있다. 특히, 용어 "환자"는 동물 및 인간을 포함한다.
- [0203] 본 발명의 조성물, 특히 본 발명의 제1 측면을 대상체에게 투여함으로써 질환이 치료되거나 예방될 수 있다. 용어 "질환"은 본 발명의 조성물을 사용함으로써 치료되고, 예방되거나 백신화될 수 있는 임의의 인식가능한 병리학적 상태를 지칭한다. 상기 질환은, 예를 들어, 선천적, 후천적, 감염성 또는 비감염성, 연령 관련, 심혈관, 대사, 장, 종양성(특히 암) 또는 유전적일 수 있다. 질환은, 예를 들어, 생리학적 과정, 분자 과정, 차례로, 예를 들어, 유기체의 유전 장비, 거동적, 사회적 또는 환경적 요인, 예를 들어, 화학 물질 또는 방사선에의 노출에 기반할 수 있는 유기체 내의 생화학적 반응의 불규칙성에 기반할 수 있다.
- [0204] 본원에 사용된 용어들 "치료" 또는 "치료하는"은 일반적으로 목적하는 약리학적 및/또는 생리학적 효과를 수득함을 의미한다. 따라서, 본 발명의 치료는 특정 질환의 (급성) 상태의 치료에 관련될 수 있을뿐만 아니라 질환 또는 이의 증상을 완전히 또는 부분적으로 예방하는 측면에서 예방적 치료와 관련될 수도 있다. 바람직하게는, 용어 "치료"는 질환 및/또는 질환에 기인되는 부작용 및/또는 증상을 부분적으로 또는 완전히 치료하는 측면에서 치료적인 것으로 이해되어야 한다. 이와 관련하여, "급성"은 대상체가 질환의 증상을 나타냄을 의미한다. 다시 말해서, 치료될 대상체는 실제로 치료가 필요하고, 본 발명의 맥락에서 용어 "급성 치료"는 질환의 발병 또는 질환의 발발 후 질환을 실제로 치료하기 위해 취해진 조치에 관한 것이다. 치료는 또한 예방적 또는 예방적 치료, 즉, 예를 들어, 감염 및/또는 질환의 발병을 예방하기 위해 질환 예방을 위해 취해지는 조치일 수 있

다. 치료 과정은 주기적인 평가를 통해 모니터링될 수 있다.

- [0205] 일반적으로, RNA, 바람직하게는 mRNA은 본 발명에 따르는 조성물에 유효량으로 포함된다. 용어 "유효량"은 약제학적 조성물이 투여될 대상체에서 검출 가능한 치료 반응을 유도하기에 충분한 양을 지칭한다. 상기에 따르면, 약제학적 조성물에서 본 발명의 상기 제1 측면에 따르는 RNA, 바람직하게는 mRNA의 함량은 상기 기재된 바와 같은 치료에 유용한 한 제한되지 않는다. 상기 주시된 바와 같이, RNA 및 지질 조성물을 포함하는 입자가 액체 상에 함유된 본 발명의 제1 측면에 따르는 조성물은 바람직하게는 입자를 입자에 함유된 RNA를, 조성물의 총 용적에 기준으로 하여, 0.01 내지 50mg/ml, 보다 바람직하게는 0.02 내지 30mg/ml, 가장 바람직하게는 0.05 내지 10mg/ml의 농도로 제공하기 위한 양으로 포함한다.
- [0206] 본 발명에 따르면, 용어 "약제학적 조성물"은 대상체에게 투여하기 위한 본 발명에 따르는 조성물, 특히 본 발명의 제1 측면에 따르는 조성물에 관한 것이다. 예시적인 대상체는 포유동물, 예를 들어, 개, 고양이, 돼지, 소, 양, 말, 설치류, 예를 들어, 쥐, 마우스 및 기니피그, 또는 영양류, 예를 들어, 고릴라, 침팬지 및 인간을 포함한다. 가장 바람직한 구현예에서, 대상체는 인간이다.
- [0207] 본 발명의 약제학적 조성물은 RNA 기반 요법에 사용될 수 있다. 상기 언급된 바와 같이, RNA 분자, 바람직하게는 mRNA 분자는 단백질을 인코딩하는 서열을 포함하고, 따라서 RNA 기반 요법에 사용될 수 있고, 여기서 RNA, 바람직하게는 mRNA는 치료 또는 예방 효과를 갖는 치료적 또는 약제학적 활성 폴리펩티드 또는 단백질을 인코딩한다. 따라서, 바람직한 구현예에서, 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 표 2에서 인용된 질환의 치료 또는 예방에서 RNA 기반 요법에 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명에 따르는 RNA 기반 요법은 상기 표 2에 인용된 바와 같은 질환의 치료 또는 예방에 사용될 수 있다.
- [0208] 따라서, 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 표 2에 기재된 유전자 결함이 이어서 본 발명의 RNA 분자, 바람직하게는 mRNA 분자를 사용하여 전사체 대체 요법/효소 대체 요법에 의해 치료 또는 예방될 수 있는 질환을 유도하는 경우에 RNA 기반 요법에 사용될 수 있고, 여기서 RNA 분자는 개시된 결함 있는 유전자를 보상하는 온전한 버전의 단백질 또는 이의 기능적 단편을 인코딩한다.
- [0209] 다른 구현예에서, 본 발명의 약제학적 조성물은 본 발명에 따르는 RNA-기반 요법에 사용될 수 있으며, 여기서 RNA, 바람직하게는 mRNA는 치료 또는 예방 효과를 갖는 치료적 또는 약제학적 활성 폴리펩티드, 단백질 또는 펩티드를 인코딩하고, 상기 폴리펩티드, 단백질 또는 펩티드는 표 2에 요약된 유전자에 의해 인코딩된 그룹으로부터 선택된다.
- [0210] 본 발명의 약제학적 조성물은 폐 질환의 치료 또는 예방에서 RNA 기반 요법에 사용하기에 특히 적합하다. 예시적인 질환으로서, 상기 표 2에 인용된 알파-1-항트립신, 천식(asthma), 낭포성 섬유증(cystic fibrosis), 계면활성제 대사 기능 장애(Surfactant metabolism dysfunction) 또는 원발성 섬모 운동 이상증(Primary ciliary dyskinesia)이 언급될 수 있다.
- [0211] 다른 예시적인 구현예에서, 본 발명의 약제학적 조성물은 고셔병(Gaucher disease), 파브리병(Fabry disease), MPS I, MPS II(헌터 증후군), MPS VI 및 글리코겐 저장 질환, 예를 들어, 글리코겐 저장 질환 I형(폰 기에르케병(von Giercke's disease)), II형(폼페병(Pompe's disease)), III형(코리병(Cori's disease)), IV형(안데르센병(Andersen's disease)), V형(맥아들병(McArdle's disease)), 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 RNA-기반 요법에 사용될 수 있다. 전사체 대체 요법/효소 대체 요법은 근본적인 유전적 결함에 유익하게 영향을 미치지 않지만, 환자가 결핍된 효소의 농도를 증가시킨다. 예로서, 폼페병에서 전사체 대체 요법/효소 대체 요법은 결핍된 리소좀 효소 산 알파-글루코시다제(GAA)를 대체한다.
- [0212] 추가의 예에 따르면, 본 발명에 따르는 RNA-기반 요법은 암(cancer), 심혈관 질환(cardiovascular disease), 바이러스 감염(viral infection), 면역 장애(immune dysfunction), 자가면역 질환(autoimmune disease), 신경학적 장애(neurologic disorder), 유전적 대사 장애(inherited metabolic disorders) 또는 유전적 장애(genetic disorder) 또는 세포에서 생성된 단백질 또는 단백질 단편이 환자에 유익한 영향을 미칠 수 있는 임의의 질환을 치료하는데 사용될 수 있다. 암의 예는 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), 충수암(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), 자궁 내막암(endometrial cancer), 심장암(cardiac cancer) 및 육종(sarcoma)을 포함한다. 심혈관 질환의 예는 아테롬성 동맥경화증(atherosclerosis), 관상 동맥 심장 질환(coronary heart disease), 폐 심장 질환(pulmonary heart disease) 및 심근병증(cardiomyopathy)을 포함한다. 면역 장애 및 자가면역 질환의 예는 류마티스성 질환(rheumatic diseases), 다발성 경화증(multiple sclerosis) 및 천식(asthma)을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 바이러스 감염의 예는 인간 면역결핍 바이러스(human immunodeficiency virus), 단순 포진 바이러스(herpes simplex virus), 인간 유두종 바이러스(human papillomavirus) 뿐만 아니라 B형 및 C형 간염 바이러스(hepatitis B and C virus)에 의한 감염을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 신경학적 장애의 예는 파킨슨병(Parkinson's disease), 다발성 경화증, 및 치매(dementia)를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 유전적 대사 장애의 예는 고셔병(Gaucher's disease) 및 페닐케톤뇨증(Phenylketonuria)을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0213] 제조 방법

[0214] 액체 상에 핵산 및 지질 조성물을 포함하는 입자를 제공하기 위한 적합한 기술은 당업자에게 이용 가능하며, 입자가 상기 논의된 지질 조성물과 함께 RNA를 포함하는 본 발명의 제1 측면에 따르는 조성물을 제공하기 위해 개조될 수 있다.

[0215] 예를 들어, RNA 및 지질 조성물을 포함하는 입자와 같은 리포솜은 지질 조성물의 재수화, 예를 들어, 지질 필름의 재수화에 이어, 필요할 경우, 초음파 처리 또는 압출과 같은 균질화 기술에 의해 편리하게 제공될 수 있다. 대안적인 접근법은 유기 용매에 용해된 지질 조성물의 물 또는 수용액으로의 주입이다. 예를 들어, 지질 나노 입자의 형성을 위해 의존할 수 있는 예시적인 방법으로서, 용매 치환법이 언급될 수 있다.

[0216] 입자가 액체 상에 함유된 본 발명에 따르는 조성물을 제공하기 위한 대안적인 방법으로서, 입자의 나노 침전과 같은 침전 방법이 언급될 수 있다.

[0217] 1,2-프로판디올은 RNA 및 지질 조성물을 포함하는 입자가 함유되어 있거나 입자가 제공되는 액체 상에 편리하게 첨가될 수 있다. 1,2-프로판디올의 액체 상에의 첨가는 RNA 및 지질 조성물을 포함하는 입자를 액체 상에 제공 전, 제공 동안 또는 제공 후에 하나 이상의 다양한 단계로 달성될 수 있다.

[0218] 따라서, 상기 주어진 바와 같이, 본 발명의 추가 측면은 본 발명의 제1 측면에 따르는 조성물의 제조 방법으로서, 방법이

[0219] a) 지질 조성물의 성분을 유기 용매에서 용해 및 혼합한 다음, 지질 조성물을 동결 건조시키는 단계;

[0220] b) 물을 첨가하여 동결 건조된 지질 조성물을 재수화하는 단계;

[0221] c) 재수화된 지질 조성물을 RNA의 수용액과 조합하여 액체 상에 함유된 RNA 및 지질 조성물을 포함하는 입자가 형성되도록 하는 단계; 및

[0222] d) 1,2-프로판디올을 첨가하는 단계를 포함하는, 제조 방법에 관한 것이다.

[0223] 1,2-프로판디올의 첨가는, 예를 들어, 단계 b)에서 물과 함께 첨가하고, 단계 b) 이후에 재수화된 지질 조성물에 첨가하고, 단계 c)에서 RNA의 수용액과 함께 첨가하거나, 단계 c) 이후에 액체 상에 첨가함으로써 편리하게 달성될 수 있고, 여기서 RNA 및 지질 조성물을 포함하는 입자가 함유된다. 첨가는 한 단계로 또는 여러 단계로, 예를 들어, 공정의 상이한 단계에서 수행될 수 있음이 이해될 것이다.

[0224] 본 발명의 제3 측면에 따르는 고체 조성물은

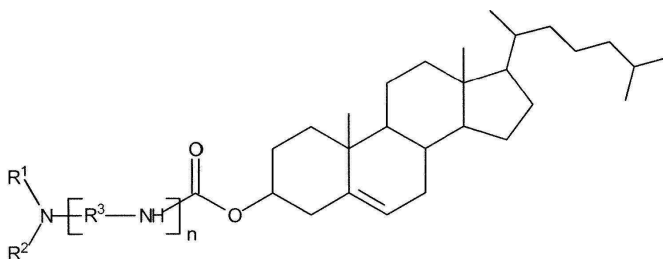
[0225] a) 지질 조성물의 성분을 유기 용매에서 용해 및 혼합한 다음, 지질 조성물을 동결 건조시키는 단계;

[0226] b) 물을 첨가하여 동결 건조된 지질 조성물을 재수화하는 단계;

[0227] c) 재수화된 지질 조성물을 RNA의 수용액과 조합하여 액체 상에 함유된 RNA 및 지질 조성물을 포함하는 입자가 형성되도록 하는 단계; 및

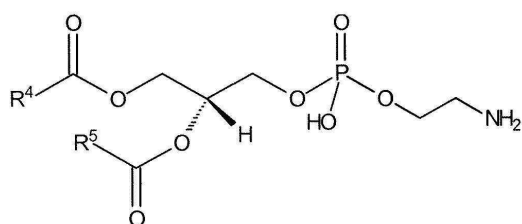
[0228] d) 1,2-프로판디올을 첨가하는 단계를 포함하는 공정에 의해 상기 제1 측면에 따르는 조성물을 제조하는 제1 단계; 및

- [0229] 상기 제1 단계에서 수득된 조성물을 동결시키는 제2 단계를 포함하는 방법에 의해 제조될 수 있다.
- [0230] 또한, 이 공정에서, 1,2-프로판디올의 첨가는, 예를 들어, 단계 b)에서 물과 함께 첨가하고, 단계 b) 이후에 재수화된 지질 조성물에 첨가하고, 단계 c)에서 RNA의 수용액과 함께 첨가하거나, 단계 c) 이후에 액체 상에 첨가함으로써 편리하게 달성될 수 있고, 여기서 RNA 및 지질 조성물을 포함하는 입자가 함유된다. 첨가는 한 단계로 또는 여러 단계로, 예를 들어, 공정의 상이한 단계에서 수행될 수 있음이 이해될 것이다.
- [0231] 제2 단계로서의 동결 단계는 전형적으로 적합한 용기에서 현탁액 조성물을 충분히 저온(예: -10°C 이하, 바람직하게는 -20°C 이하)에 적용함으로써 달성된다. 냉각 매질로서, 예를 들어, 차가운 공기 또는 차가운 액체가 사용될 수 있다.
- [0232] 부수적으로, 상기 설명된 바와 같이, 본 발명의 제3 측면에 따르는 고체 조성물은 RNA를 포함하는 입자가 저장되도록 하는 조성물이다. 그 정도로, 본 발명의 제1 측면에 따르는 조성물이 또한 고체 조성물을 해동시킴으로써 본 발명의 제3 측면에 따르는 고체 조성물로부터 회수될 수 있음이 이해될 것이다.
- [0233] 따라서, 추가의 측면으로서, 본 발명은 또한 상기 제1 측면에 따르는 조성물을 제조 방법으로서, 방법이
- [0234] a) 지질 조성물의 성분을 유기 용매에서 용해 및 혼합한 다음, 지질 조성물을 동결 건조시키는 단계;
- [0235] b) 물을 첨가하여 동결 건조된 지질 조성물을 재수화하는 단계;
- [0236] c) 재수화된 지질 조성물을 RNA의 수용액과 조합하여 액체 상에 함유된 RNA 및 지질 조성물을 포함하는 입자가 형성되도록 하는 단계; 및
- [0237] d) 1,2-프로판디올을 첨가하는 단계를 포함하는 공정에 의해 상기 제1 측면에 따르는 조성물을 제조하는 제1 단계;
- [0238] 상기 제1 단계에서 수득된 조성물을 동결시키는 제2 단계; 및
- [0239] 상기 제2 단계에서 수득된 동결된 조성물을 해동하는 제3 단계를 포함하는, 제조 방법을 제공한다.
- [0240] 본 발명의 중요한 측면의 요약이 다음 항목에 제공된다. 이들 항목은 본 발명의 일반적인 개시 내용의 일부를 형성하여, 예를 들어, 추가의 바람직한 구현에 또는 선택적 특징과 관련하여 명세서의 앞부분에 제공된 정보가 다음 항목에도 적용되도록 한다는 것이 이해될 것이다.
- [0241] 1. (i) 액체 상에 함유된 입자로서, 상기 입자가 RNA 및 지질 조성물을 포함하고, 상기 지질 조성물이
- [0242] (i-a) 하기 화학식 I의 콜레스테롤 또는 이의 염;
- [0243] (i-b) 하기 화학식 II의 포스포글리세라이드 또는 이의 염; 및
- [0244] (i-c) 하기 화학식 III의 폐길화 포스포글리세라이드 또는 이의 염을 포함하는, 입자; 및
- [0245] (ii) 1,2-프로판디올을 포함하는 조성물:
- [0246] [화학식 I]



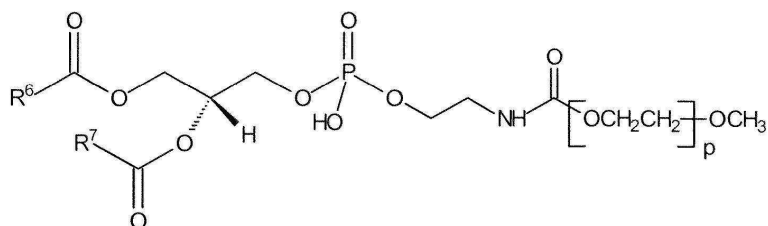
[0247]

[0248] [화학식 II]



[0249]

[0250] [화학식 III]



[0251]

[0252] 상기 화학식 I 내지 III에서,

[0253] n은 0 또는 1, 바람직하게는 0이고,

[0254] R¹은 그룹 -(CH₂)_q-NH₂ 또는 그룹 -(CH₂)_r-NH-(CH₂)_s-NH₂이고, 여기서 q, r 및 s는 독립적으로 2 내지 6의 정수이고,

[0255] R²는 그룹 -(CH₂)_t-NH₂ 또는 그룹 -(CH₂)_u-NH-(CH₂)_w-NH₂이고, 여기서 t, u 및 w는 독립적으로 2 내지 6의 정수이고,

[0256] R³은 1 내지 4개의 탄소 원자를 갖는 선형 알칸디일 그룹이고;

[0257] R⁴는 10 내지 24개의 탄소 원자를 갖는 선형 알킬 그룹 또는 1 내지 3개의 이중 결합과 10 내지 24개의 탄소 원자를 갖는 선형 알케닐 그룹이고;

[0258] R⁵는 10 내지 24개의 탄소 원자를 갖는 선형 알킬 그룹 또는 1 내지 3개의 이중 결합과 10 내지 24개의 탄소 원자를 갖는 선형 알케닐 그룹이고;

[0259] p는 5 내지 200, 바람직하게는 10 내지 170, 가장 바람직하게는 10 내지 140의 정수이고;

[0260] R⁶은 10 내지 20개의 탄소 원자를 갖는 선형 알킬 그룹 또는 1 내지 3개의 이중 결합과 10 내지 20개의 탄소 원자를 갖는 선형 알케닐 그룹이고;

[0261] R⁷은 10 내지 20개의 탄소 원자를 갖는 선형 알킬 그룹 또는 1 내지 3개의 이중 결합과 10 내지 20개의 탄소 원자를 갖는 선형 알케닐 그룹이다.

[0262] 2. 항목 1에 있어서, RNA가 mRNA인, 조성물.

[0263] 3. 항목 1 또는 2에 있어서, 화학식 I에서, n이 0이고, R¹이 그룹 -(CH₂)₃-NH₂이고, R²가 그룹 -(CH₂)₄-NH-(CH₂)₃-NH₂인, 조성물.

[0264] 4. 항목 1 또는 2에 있어서, 화학식 I의 콜레스테롤 유도체가 GL67인, 조성물.

[0265] 5. 항목 1 내지 4 중 어느 한 항목에 있어서, 화학식 II에서, R⁴ 및 R⁵가 각각 하나의 이중 결합과 14 내지 20개의 탄소 원자를 갖는 선형 알케닐 그룹인, 조성물.

[0266] 6. 항목 1 내지 4 중 어느 한 항목에 있어서, 화학식 II의 포스포글리세라이드가 1,2-디올레오일-sn-글리세로-

3-포스포에탄올아민(DOPE)인, 조성물.

- [0267] 7. 항목 1 내지 6 중 어느 한 항목에 있어서, 화학식 III에서, R^6 및 R^7 이 각각 10 내지 16개의 탄소 원자를 갖는 선형 알킬 그룹이고, p는 10 내지 140의 정수인, 조성물.
- [0268] 8. 항목 1 내지 6 중 어느 한 항목에 있어서, 화학식 III의 폐길화 포스포글리세라이드가 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-PEG(DMPE-PEG)이고, 여기서 PEG 잔기는 10 내지 140개의 반복 단위를 함유하고, 더욱 바람직하게는 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-PEG5000(DMPE-PEG5000)인, 조성물.
- [0269] 9. 항목 1 내지 8 중 어느 한 항목에 있어서, 지질 조성물 중 성분 (i-a):(i-b):(i-c)의 몰 비가 1:(0.5 내지 5):(0.01 내지 1), 더욱 바람직하게는 1:(1 내지 5):(0.01 내지 0.5), 가장 바람직하게는 1:(1 내지 3):(0.02 내지 0.2)인, 조성물.
- [0270] 10. 항목 1 내지 9 중 어느 한 항목에 있어서, 입자가 나노 입자 또는 미세입자인, 조성물.
- [0271] 11. 항목 10에 있어서, 입자가 1 내지 5000nm, 더욱 바람직하게는 10 내지 4000nm, 가장 바람직하게는 50 내지 3000nm 범위의 평균 입자 직경을 갖는, 조성물.
- [0272] 12. 항목 1 내지 11 중 어느 한 항목에 있어서, 입자가 20 μ m, 더욱 바람직하게는 10 μ m, 가장 바람직하게는 5 μ m의 최대 입자 직경을 갖는, 조성물.
- [0273] 13. 항목 1 내지 12 중 어느 한 항목에 있어서, 화학식 I의 콜레스테롤 유도체로부터 유도된 질소 원자 N의 수 대 RNA에서 포스페이트 그룹 P의 수의 N/P 비율이 1 내지 100, 더욱 바람직하게는 1 내지 30, 가장 바람직하게는 2 내지 20의 범위내인, 조성물.
- [0274] 14. 항목 1 내지 13 중 어느 한 항목에 있어서, 입자가, RNA의 중량 대 입자의 총 중량으로 표현된, 0.1 내지 95%, 더욱 바람직하게는 0.5 내지 80%, 가장 바람직하게는 1 내지 50% 범위의 활성 부하를 갖는, 조성물.
- [0275] 15. 항목 1 내지 14 중 어느 한 항목에 있어서, RNA를, 조성물의 총 용적을 기준으로 하여, 0.01 내지 50mg/ml, 보다 바람직하게는 0.02 내지 30mg/ml, 가장 바람직하게는 0.05 내지 10mg/ml의 농도로 제공하기 위한 양으로 RNA 및 지질 조성물을 포함하는 입자를 포함하는, 조성물.
- [0276] 16. 항목 1 내지 15 중 어느 한 항목에 있어서, RNA 및 지질 조성물을 포함하는 입자가 액체 상에 분산되는, 조성물.
- [0277] 17. 항목 1 내지 16 중 어느 한 항목에 있어서, 1,2-프로판디올이 입자가 함유된 액체 상에 함유되는, 조성물.
- [0278] 18. 항목 1 내지 17 중 어느 한 항목에 있어서, 1,2-프로판디올이, 조성물의 총 용적을 기준으로 하여, 0.1 내지 50% w/v, 보다 바람직하게는 0.2 내지 30% w/v, 가장 바람직하게는 0.3 내지 20% w/v의 농도로 함유되는, 조성물.
- [0279] 19. 항목 1 내지 18 중 어느 한 항목에 있어서, 입자가 함유된 액체 상이 물을 포함하는, 조성물.
- [0280] 20. 항목 19에 있어서, 액체 상의 총 용적을 기준으로 하여, 50용적% 이상, 보다 바람직하게는 70용적% 이상이 물에 의해 제공되는, 조성물.
- [0281] 21. 항목 1 내지 20 중 어느 한 항목에 있어서, 물 및 1,2-프로판디올이 액체 상에 함유된 유일한 용매인, 조성물.
- [0282] 22. 항목 1 내지 21 중 어느 한 항목에 있어서, 입자가 함유된 액체 상이 완충액을 포함하는, 조성물.
- [0283] 23. 항목 1 내지 22 중 어느 한 항목에 따르는 조성물의 제조 방법으로서, 상기 방법이
- [0284] a) 지질 조성물의 성분을 유기 용매에서 용해 및 혼합한 다음, 지질 조성물을 동결 건조시키는 단계;
- [0285] b) 물을 첨가하여 동결 건조된 지질 조성물을 재수화하는 단계;
- [0286] c) 재수화된 지질 조성물을 RNA의 수용액과 조합하여 액체 상에 함유된 RNA 및 지질 조성물을 포함하는 입자가

형성되도록 하는 단계; 및

d) 1,2-프로판디올을 첨가하는 단계를 포함하는, 제조 방법.

24. (i) RNA 및 지질 조성물을 포함하는 입자, 및

(ii) 1,2-프로판디올

을 포함하는 고체 조성물로서,

고체 조성물이 항목 1 내지 22 중 어느 한 항목에 따르는 조성물을 동결시킴으로써 수득 가능한, 고체 조성물 .

25. 항목 1 내지 22 중 어느 한 항목에 있어서, RNA 기반 요법을 통한 질환의 치료 또는 예방에 사용하기 위한, 조성물.

26. 항목 25에 있어서, 치료되거나 예방될 질환이 폐 질환인, 조성물.

27. 항목 25 또는 26에 있어서, 치료 또는 예방이 기도로 또는 기도를 통한, 바람직하게는 폐 투여 또는 비강 투여를 통한 조성물의 투여를 포함하는, 조성물.

28. 항목 1 내지 22 중 어느 한 항목에 따르는 조성물을, 바람직하게는 기도로 또는 기도를 통한 투여, 더욱 바람직하게는 폐 투여 또는 비강 투여를 통해 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 치료 방법.

29. 항목 28에 있어서, 폐 질환을 치료하기 위한 방법.

30. 액체에 함유된 미립자 조성물로부터 에어로졸을 형성하거나, 이러한 조성물을 분무하기 위한 장치로서, 이 장치가 항목 1 내지 22 중 어느 한 항목에 따르는 조성물을 포함하는, 장치.

31. 항목 30에 있어서, 장치가 계량된 용량 흡입기, 분무기 및 비강 분무 장치로부터 선택된 흡입기인, 장치.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

실시예

약어

약어설명

RT 실온

mRNA 메신저 리보핵산

FLuc 반딧불이 루시페라제

w/o 없이

cmRNA 화학적으로 변형된 리보핵산

FLuc 반딧불이 루시페라제

PG 1,2-프로판디올, 프로필렌 글리콜

N/P 화학식 I의 콜레스테롤 유도체의 질소 원자의 수 대 mRNA의 포스페이트 그룹의 수

실시예 I: ALI 배양물에 복합체의 적용

방법:

N/P5 (및 N/P3)에서 RNA-지질 복합체의 제형:

GL67, DOPE 및 DMPE-PEG5000의 저장 용액은 t-부탄올과 물의 9:1 혼합물에서 각각 10 내지 20mg/mL의 농도로 생성되었다. 지질을 1:2:0.05(GL67:DOPE:DMPE-PEG5000)의 물 비로 5mg의 총 지질 질량으로 혼합하고, 밤새 -80°C에서 동결시키고, 적어도 96시간 동안 동결 건조시켰다. 사용 전에 무수 지질 혼합물을 400 µL 5% (v/v) 프로필렌 글리콜을 첨가하여 재수화한 다음(총 지질 농도 12.5mg/mL를 초래함), 실온에서 30분 동안 진탕 없이 배양하고, 10초 동안 와동시킨 후, 수욕에서 37°C에서 10분 동안 초음파 처리하였다. 생성된 리포솜-혼합물을 mRNA와의 복합체 화를 위해 희석시켰다. 이 목적을 위해 69.65 µL(N/P3의 경우 87.69 µL)의 물을 10.24 µL의 프로필렌 글리콜과 혼합하고, 3초 동안 와동시켰다. 45.10 µL(N/P3의 경우 27.06 µL) 리포솜-혼합물을 첨가하

고, 혼합물을 10초 동안 와동시키고, 39℃에서 3분 동안 평형화했다. 물 중 125 μL mRNA 용액(c: 0.5mg/mL)을 39℃에서 3분 동안 평형화했다. 복합체 조립을 위해 mRNA 희석액을 미세한 바늘 주사기(BD Micro-Fine 인슐린 주사기 0.5mL U40 8 mm, 07468060 Becton Dickinson)에 침지시키고, 리포솜 희석액에 신속하게 주입하고, 즉시 10초 동안 와동시키고, 복합체 조립을 위해 실온에서 10분 동안 배양했다. 이어서, 복합체를 얼음 위에 저장했다.

[0314] ALI 배양물의 치료

[0315] MucilAir™-ALI는 Epithelix(프랑스)에서 구입했다. 형질 감염 5일 전에 점액 세척을 수행하여 정점 표면에 축적된 점액을 제거했다. 200 μL의 PBS^{-/-}를 정점 측면에 첨가하고, 37℃에서 20분 동안 배양했다. 정점 표면으로부터 점액을 분리하기 위해, 피펫을 사용하여 정점 액체에서 100 μL로 3회 앞뒤 운동을 수행했다. MucilAir™의 정점 표면으로부터 PBS^{-/-}는 상피를 손상시키지 않고 부드러운 흡인으로 제거하였다. 형질 감염 당일에 ALI 배양물을 다시 200 μL의 PBS^{-/-}로 세척한 다음, mRNA 복합체(물 또는 5% 프로필렌 글리콜)의 상응하는 희석액 200 μL로 세척 단계를 수행했다. 희석액은 상피를 손상시키지 않고 부드러운 흡인으로 ALI 배양물의 정점 표면으로부터 즉시 제거했다. 이어서, 각 웰을 50 μL 용적으로 3 μg의 총 복합체화된 mRNA로 형질 감염시켰다. 제형을 상응하는 희석액으로 희석시키고, ALI-배양물의 정점 표면에 첨가하고, 37℃ 및 5% CO₂에서 6시간 동안 배양했다. 이후 복합체 용액을 제거하고, 세포 층을 PBS^{-/-}로 세척하고, 37℃ 및 5% CO₂에서 24시간 동안 ALI 배양물로서 유지시켰다.

[0316] 형광 현미경을 통한 tdTomato의 검출:

[0317] 형광 이미징을 사용하여 형질 감염 24시간 후 양성 tdTomato 신호를 검출했다. 각 웰에 대해 다음과 같은 설정으로 대표적인 사진을 제조했다: 노출: 500ms, 증가: 1.5, 강도: 30%.

[0318] 결과:

[0319] ALI 배양물의 처리를 위해, tdTomato를 인코딩하는 mRNA가 사용되었다. 처리된 웰을 처리 24시간 후에 tdTomato 단백질에 대해 분석하였다. 도 1에, 예시적인 사진이 도시된다.

[0320] 도 1에 도시된 바와 같이, 프로필렌 글리콜의 첨가는 세포로 전달되고 단백질로 번역되는 mRNA의 수준을 상당히 증가시킨다. 이 효과는 N/P 3뿐만 아니라 N/P 5에서 관찰될 수 있다.

[0321] 실시예 II: 복합체의 비강 적용

[0322] 방법:

[0323] RNA-지질 복합체의 제형:

[0324] 복합체를 실시예 I에서 이미 기재된 바와 같이 형성시켰다.

[0325] 동물의 치료:

[0326] Balb/c 마우스(Charles River Laboratories)는 10 μg/40 μL의 mRNA 용량으로 복합체로 처리하였다. 용액을 이소플루란(Isothesia, Henry Shine, Germany) 흡입 마취 동안 동물의 비공에 하나의 액적으로서 적용했다.

[0327] 코 조직에서 루시페라제 수준의 검출:

[0328] 적용 5시간 후에, 50 μL PBS에 용해된 1.5mg D-루시페린을 각 동물의 콧구멍에 비내 적용했다(스니핑 방법). 생체 발광 이미징은 IVIS 100 생체내 이미징 시스템(Perkin Elmer, USA)을 사용하여 수행되었다. 이미징 직후, 동물은 자궁 경부 탈구로 희생시켰다. 사진은 관심있는 설정 영역(ROI)에서 광휘의 측정을 통해 Living Image 소프트웨어(Perkin Elmer, USA)를 사용하여 분석되었다. 값은 평균 광휘[p/s/cm²/sr]로 표시된다.

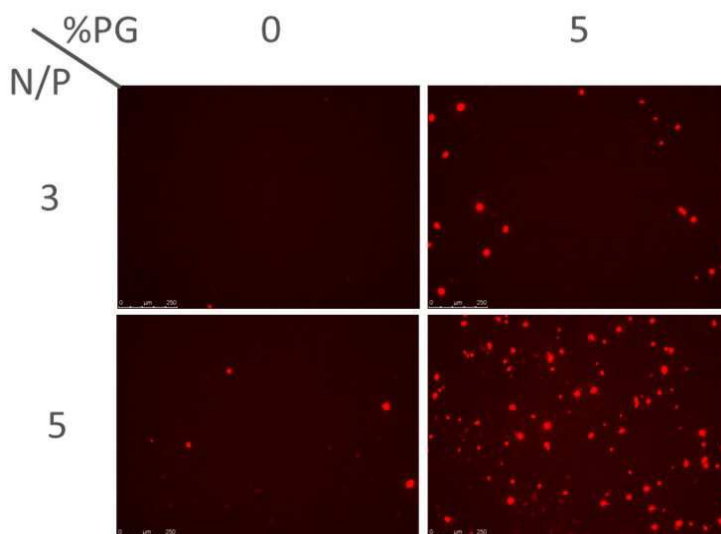
[0329] 결과:

[0330] 코로의 스니핑을 통한 Balb/c 마우스의 치료를 위해, N/P 5에서 복합체화된 반딧불이 루시페라제를 인코딩하는 mRNA가 사용되었다. 치료 5시간 후 루시페라제 활성에 대한 코 조직의 분석 결과(도 2)는 5% 프로필렌 글리콜 용액 중의 복합체가 프로필렌 글리콜 부재하(0% PG, 물)의 동일한 복합체와 비교하여 코 조직에서 더 높은 리포터 단백질 활성을 초래함을 보여준다.

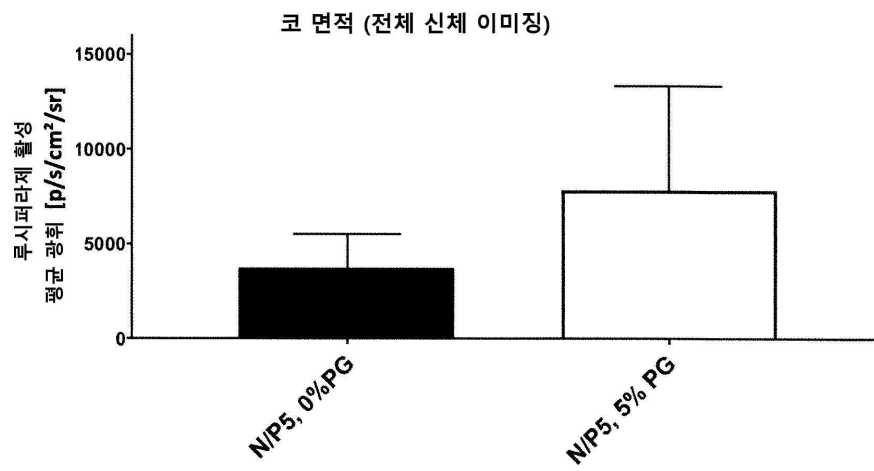
- [0331] 실시예 III: 1회 동결-해동 주기 동안 입자 크기의 안정화
- [0332] 방법:
- [0333] 입자 제형:
- [0334] 입자는 실시예 I에 기재된 바와 같이 형성되었다.
- [0335] 입자 용액의 동결:
- [0336] 제형화 후, 입자를 -20℃에서 적어도 16시간 동안 저장하여 동결시켰다.
- [0337] 크기 측정:
- [0338] 입자의 유체역학적 직경은 ZetaSizer Nano ZS(Malvern Instruments)를 사용하여 동적 광산란에 의해 측정하였다. 정확한 측정을 위해, 용액 점도를 계산하는 소프트웨어에 의해 사용되는 완충액 조성물은, 적용 가능하면, 1,2-프로판디올 함유 용액으로 조정되었다.
- [0339] 결과:
- [0340] 입자를 제형화했다. 제형화 후, 신선한 입자의 입자 크기는 1,2-프로판디올의 존재 또는 부재하에 용액에서 측정하였다. 입자를 -20℃에서 16시간 동안 동결시키고, 실온에서 배양에 의해 해동시켰다. 해동된 용액에서 입자 크기를 다시 측정했다. 활성을 유지하기 위해, 동결 전 및 해동 후 입자 크기의 편차는 최소화해야 한다. 도 3에 도시된 바와 같이, 1,2-프로판디올 없는 용액에서 동결된 입자는 동결 동안 응집 과정으로 인해 크기를 상당히 증가시킨다. 1,2-프로판디올의 존재하에, 입자 크기는 동결 해동 주기 후 안정하게 유지된다.
- [0341] [도면의 간단한 설명]
- [0342] 도 1은 N/P 3 및 5에서 상이한 부형제 용액(물(0% 프로필렌 글리콜) 또는 5% 프로필렌 글리콜)에서 GL67-복합체로 형질 감염 후 tdTomato의 수준을 도시한다.
- [0343] 도 2는 물 또는 5% 프로필렌 글리콜 용액에서 GL67 복합체에 의한 처리 5시간 후 Balb/c 마우스의 코에서 루시퍼라제 활성을 도시한다.
- [0344] 도 3은 1,2-프로판디올의 존재 또는 부재하에서 동결 전 및 해동 후의 입자 크기를 도시한다.

도면

도면1



도면2



도면3

