



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0029793
(43) 공개일자 2025년03월05일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/775 (2006.01) A61K 47/68 (2017.01)
A61K 47/69 (2017.01) A61K 9/51 (2006.01)
C07K 14/55 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)
C12N 15/88 (2017.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 14/775 (2013.01)
A61K 47/6849 (2017.08)
- (21) 출원번호 10-2024-7041349
- (22) 출원일자(국제) 2023년05월24일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2024년12월12일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2023/063967
- (87) 국제공개번호 WO 2023/227682
국제공개일자 2023년11월30일
- (30) 우선권주장
2031977 2022년05월24일 네덜란드(NL)
(뒷면에 계속)

- (71) 출원인
바이오-트립 비.브이.
네덜란드 5641 에이엠 에인트호번 티 호프커 42
- (72) 발명자
판 데르 멜 로이
네덜란드 5612 디엑스 에인트호번 펜베르흐세몰런 97
펠더르 빌럼 제이 엠
네덜란드 5641 에이엠 에인트호번 티 호프커 42
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인코리아나

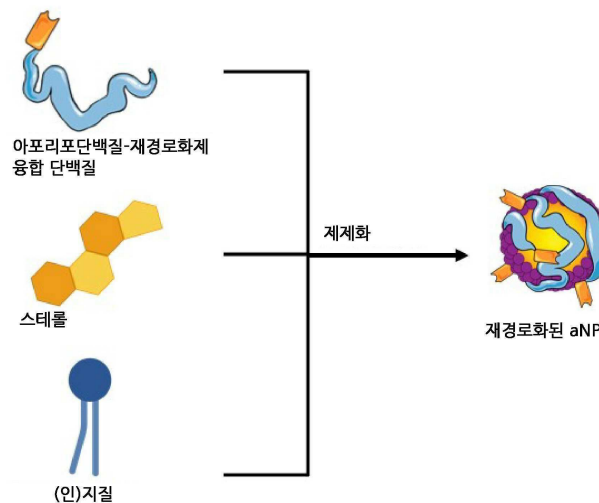
전체 청구항 수 : 총 36 항

(54) 발명의 명칭 지질 나노입자를 위한 표적화 바디를 갖는 변형된 아포리포단백질

(57) 요약

본 발명은 표적화 바디를 갖는 변형된 아포리포단백질에 관한 것이다. 표적화 바디는 예를 들어 특별한 세포, 조직 또는 장기의 표적화를 허용하는 항체 또는 항원 결합 단편일 수도 있다. 변형된 아포리포단백질은 지질 나노입자에 도입된 경우에 또는 그 자체로 페이로드를 위한 운반체로서 사용될 수 있다. 변형된 아포리포단백질은 질환의 치료 또는 예방에서, 또는 특별한 표적 부위로 페이로드의 표적화에서 사용된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 47/6929 (2017.08)
A61K 9/5123 (2013.01)
C07K 14/55 (2013.01)
C07K 16/2815 (2013.01)
C12N 15/88 (2013.01)
C07K 2317/569 (2013.01)
C07K 2319/00 (2013.01)

(72) 발명자

메르크스 마르틴

네덜란드 5612 에이이 에인트호번 더 흐룬 로퍼르
3 뫼더르 랩 씨/오

스레이버르 다피트 페페인

네덜란드 1073 제이제이 암스테르담 테레즈 슈바르
체스트라트 6-1

더 드뢰 안네

네덜란드 5708 제트이 헬몬트 미달란 48

호커 아일라 마르티너

네덜란드 5583 지알 발러 파런돈크 1

더 브라윈 쿤

네덜란드 3561 제이피 위트레흐트 케허드레프 15

(30) 우선권주장

PCT/EP2022/076593 2022년09월23일
유럽특허청(EPO)(EP)
23165273.6 2023년03월29일
유럽특허청(EPO)(EP)

명세서

청구범위

청구항 1

표적화 바디에 부착된 아포리포단백질, 아포리포단백질 유도체, 아포리포단백질 모방체 또는 아포리포단백질 모방체 유도체를 포함하는 변형된 아포리포단백질로서, 표적화 바디는 표적 세포의 세포 표면 상의 분자에 결합할 수 있는 분자인 것인 변형된 아포리포단백질.

청구항 2

제1항에 있어서, 표적화 바디는

- 항체 또는 항체의 항원 결합 단편,
- 단백질 리간드, 단백질 결합 도메인, 또는 이의 단백질 결합 단편,
- 펩티드,
- 펩티드 모방체, 또는
- 당 중합체

로부터 선택되는 것인 변형된 아포리포단백질.

청구항 3

제2항에 있어서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 Fab, Fab2, scFv, scFv-Fc, dAb-Fc, 유리 경쇄 항체, 절단 항체, 이중특이적 Fab2, Fab3, 삼중특이적 Fab3, 디아바디, 이중특이적 디아바디, 트리아바디, 삼중특이적 트리아바디, 미니바디, IgG, IgNAR, 1가 IgG, VhH, 나노바디, 또는 VNAR, 또는 이의 항원 결합 단편, 바람직하게는 나 타류 또는 상어 VhH 또는 이의 유도체 또는 이의 항원 결합 단편으로부터 선택되는 것인 변형된 아포리포단백질.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 하나의 항에 있어서, 표적화 바디는 림프성 세포, 골수성 세포, 종양 세포, 내피 세포, 조혈 줄기 및 전구체 세포 (HSPC), 조혈 줄기 세포 (HSC), 다능성 전구체 (MPP), 공통 골수 전구체 세포 (CMP)의 표면 상의 단백질에 결합하거나, 또는 표적화 바디는 박테리아, 바이러스, 진균 또는 기생충 단백질 또는 항원에 결합하고,

바람직하게는 림프성 또는 골수성 세포는 단핵구, 매크로파지, M1-유사 매크로파지, M2-유사 매크로파지, 호산구, 호염기구, 비만 세포, NK 세포, B 세포, 형질 세포, 조절 T 세포, 조혈 줄기 세포, 과립구, T 헬퍼 세포 예컨대 Th1, Th2, Th17 또는 Th22, 수지상 세포, 예컨대 형질세포양 수지상 세포, 일반적 DC 1 또는 일반적 DC 2, 또는 종양-연관 매크로파지로부터 선택되는 것인 변형된 아포리포단백질.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 하나의 항에 있어서, 표적화 바디는 CD1a, CD1b, CD1c, CD1d, CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD7, CD8, CD9, CD10, CD11a, CD11b, CD11c, CD11d, CDw12, CD13, CD14, CD15, CD15s, CD15u, CD16, CDw17, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD25, CD26, CD27, CD28, CD29, CD30, CD31, CD32, CD33, CD34, CD35, CD36, CD37, CD38, CD39, CD40, CD41, CD42a, CD42b, CD42c, CD42d, CD43, CD44, CD45, CD45RO, CD45RA, CD45RB, CD46, CD47, CD48, CD49a, CD49b, CD49c, CD49d, CD49e, CD49f, CD50, CD51, CD52, CD53, CD54, CD55, CD56, CD57, CD58, CD59, CD60a, CD60b, CD60c, CD61, CD62E, CD62L, CD62P, CD63, CD64, CD65, CD66a, CD66b, CD66c, CD66d, CD66e, CD66f, CD68, CD69, CD70, CD71, CD72, CD73, CD74, CD75, CD75s, CD77, CD79 α , CD79 β , CD80, CD81, CD82, CD83, CDw84, CD85, CD86, CD87, CD88, CD89, CD90, CD91, CD92, CD93, CD94, CD95, CD96, CD97, CD98, CD99, CD100, CD101, CD102, CD103, CD104, CD105, CD106, CD107a, CD107b, CD108, CD109, CD110, CD111, CD112, CD114, CD115, CD116, CD117, CD118, CD119, CD120a, CD120b, CD121a,

CDw121b, CD122, CD123, CD124, CD125, CD126, CD127, CDw128, CD129, CD130, CDw131, CD132, CD133, CD134, CD135, CDw136, CDw137, CD138, CD139, CD140a, CD140b, CD141, CD142, CD143, CD144, CD145, CD146, CD147, CD148, CD150, CD151, CD152, CD153, CD154, CD155, CD156a, CD156b, CD157, CD158, CD158a, CD158b, CD159a, CD160, CD161, CD162, CD162R, CD163, CD164, CD165, CD166, CD167a, CD168, CD169, CD170, CD171, CD172a, CD173, CD174, CD175, CD175s, CD176, CD177, CD178, CD179a, CD179b, CD180, CD183, CD184, CD195, CDw197, CD200, CD201, CD202b, CD203c, CD204, CD205, CD206, CD207 (CLEC4K), CD208, CD209 (CLEC4L), CDw210, CD212, CD213a1, CD213a2, CDw217, CD220, CD221, CD222, CD223, CD224, CD225, CD226, CD227, CD228, CD229, CD230, CD231, CD232, CD233, CD234, CD235a, CD235b, CD236, CD236R, CD238, CD239, CD240CE, CD240D, CD241, CD242, CD243, CD244, CD245, CD246, CD247, CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CXCR6, CXCR7, CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR7, CCR8, CCR9, CLEC1A, CLEC1B, CLEC2A, CLEC2B, CLEC3A, CLEC3B, CLEC4A, CLEC4C (CD303), CLEC4D, CLEC4J, CLEC4E, CLEC4F, CLEC4G, ASGR1 (CLEC4H1), ASGR2 (CLEC4H2), FCER2 (), CLEC4M, CLEC5A, CLEC6A, CLEC7A, OLR1 (CLEC8A), CLEC9A, CLEC10A, CLEC11A, CLEC12A, CLEC12B, CD302 (CLEC13A), LY75 (CLEC13B), PLA2R₁ (CLEC13C), MRC1 (CLEC13D), MRC2 (CLEC13E), CLEC14A, CLEC16A, CLEC17A, KLRA1, KLRB1 (CLEC5B), KLRC1, KLRC2, KLRC3, KLRC4, KLRD1, KLRF1 (CLEC5C), KLRG1 (CLEC15A), KLRG2 (CLEC15B), KLRK1, AGC1, ATRNL1, BCAN, CD248, CHODL, CL-K1-Ia, CL-K1-Ib, CL-K1-Ic, CLECSF5, COLEC10, COLEC11, COLEC12, CSPG3, FCER2, FREM1, HBXBP, LAYN, LOC348174, LOC728276, MAFA, MBL2, MGC34761, MICL, MRC1L1, PAP, PKD1, PKD1L2, PRG2, PRG3, REG1A, REG1B, REG3A, REG3G, REG4, SELE, SELL, SELP, SFTPA1, SFTPA2, SFTPA2B, SFTPD, SRCL, THBD, VCAN, 알파태아단백질 (AFP), 암배아 항원 (CEA), CA-125, MUC-1, 상피 종양 항원 (ETA), 티로시나제, 및 흑색종-연관 항원 (MAGE)으로부터 선택되고,

바람직하게 CD14, CD11b, CD357 (GITR), CD193, CD123, CD117, CD56, CD19, CD38, CD25, CD133, CXCR3, CCR3, CD196, CCR10, CD64, CD206, CLEC4C (CD303), CLEC9A, CD1c, CD163, 알파태아단백질 (AFP), 암배아 항원 (CEA), CA-125, MUC-1, 상피 종양 항원 (ETA), 티로시나제, 및 흑색종-연관 항원 (MAGE)으로부터 선택되는 단백질에 결합하는 것인 변형된 아포리포단백질.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 하나의 항에 있어서, 아포리포단백질, 아포리포단백질 유도체, 아포리포단백질 모방체 또는 아포리포단백질 모방체 유도체는 apoA1, apoA-1 밀라노, apoA2, apoA4, apoA5, apoB, apoB48, apoB100, apoC-I, apoC-II, apoC-III, apoC-IV, apoD, apoE, apoF, apoH, apoL, apoL1, apoL2, apoL3, apoL4, apoL5, apoL6, apoLD1, apoO, apoOL 및 apoM, 또는 이의 조합, 또는 이의 모방체 또는 유도체로부터 선택되고,

바람직하게 apoA1, apoA2, apoA4, apoA5, apoB48, apoB100, apoC-I, apoC-II, apoC-III, apoC-IV, apoD, apoE, apoF, apoH, apoL 및 apoM 또는 이의 모방체 또는 유도체로부터 선택되고,

보다 바람직하게 apoA1, apoA2, apoA4, apoA5, apoB100, apoC-I, apoC-II, apoC-III, apoC-IV 및 apoE 또는 이의 모방체 또는 유도체로부터 선택되고,

보다 더 바람직하게 apoA1, apoA4, apoA5, apoB100, apoC-III 및 apoE 또는 이의 모방체 또는 유도체로부터 선택되고,

가장 바람직하게 apoA1, apoB100 및 apoE 또는 이의 모방체 또는 유도체로부터 선택되는 것인 변형된 아포리포단백질.

청구항 7

외부층 및 코어를 포함하는 지질 나노입자로서, 외부층은

- 인지질;
- 스테롤; 및
- 제1항 내지 제6항 중 어느 하나의 항에 정의된 바와 같은 변형된 아포리포단백질을 포함하고,

코어는 지질, 양이온성 지질, 또는 다가 분자로부터 선택되는 적어도 하나의 코어 성분을 포함하는 것인 지질 나노입자.

청구항 8

제7항에 있어서, 나노입자는 페이로드를 더 포함하고, 바람직하게 페이로드는 코어, 인지질 층에 포함되거나 또는 페이로드는 외부층의 성분에 결합되는 것인 지질 나노입자.

청구항 9

제8항에 있어서, 페이로드는 핵산 또는 핵산 유사체, 치료제, 생물제제, 사이토카인, 케모카인, 호르몬, 성장 인자, 또는 이의 조합으로부터 선택되는 것인 지질 나노입자.

청구항 10

제9항에 있어서, 지질 나노입자는 핵산 및 양이온성 또는 이온화가능한 양이온성 지질을 포함하는 것인 지질 나노입자.

청구항 11

제10항에 있어서, 핵산 및 양이온성 또는 이온화가능한 양이온성 지질은 코어에 포함되고, 변형된 아포리포단백질 및 인지질은 외부층에 포함되는 것인 지질 나노입자.

청구항 12

외부층 및 코어를 포함하는 지질 나노입자로서, 외부층은

- 인지질;
- 스테롤; 및
- 제1항 내지 제6항 중 어느 하나의 항에 정의된 바와 같은 변형된 아포리포단백질을 포함하고, 코어는 핵산 및 양이온성 또는 이온화가능한 양이온성 지질을 포함하는 것인, 지질 나노입자.

청구항 13

제10항 내지 제12항 중 어느 하나의 항에 있어서, 나노입자 코어는 충전제를 더 포함하고, 바람직하게 충전제는 트리아실글리세리드 및 콜레스테롤 아실 에스테르, 또는 이의 조합으로부터 선택되고, 예컨대 트리아실글리세리드는 트리카프릴린이고/이거나, 콜레스테롤 아실 에스테르는 콜레스테릴 카프릴레이트 및/또는 콜레스테릴 올레에이트인 지질 나노입자.

청구항 14

제9항 내지 제13항 중 어느 하나의 항에 있어서, 핵산은 RNA, DNA 또는 핵산 유사체인 지질 나노입자.

청구항 15

제14항에 있어서, RNA는 마이크로RNA (miRNA), 소형 간섭 RNA (siRNA), 피위-상호작용 RNA (piRNA), 소형 핵 RNA (snRNA), 소형 핵소체 RNA (snoRNA), 전달 RNA (tRNA), tRNA-유래 소형 RNA (tsRNA), 소형 조절 RNA (srRNA), 메신저 RNA (mRNA), 변형된 mRNA, 리보솜 RNA (rRNA), 긴 비-코딩 RNA (lncRNA), 또는 가이드 RNA (gRNA), 또는 이의 조합 및/또는 이의 변형인 지질 나노입자.

청구항 16

제14항에 있어서, DNA는 단일 가닥 또는 이중 가닥 DNA인 지질 나노입자.

청구항 17

제9항 내지 제14항 중 어느 하나의 항에 있어서, 핵산은 안티센스 올리고뉴클레오티드이고, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 포스포디에스테르 골격 또는 2' 리보스의 변형을 함유하는 뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드 유사체로 이루어지는 단일 가닥 DNA 또는 RNA인 지질 나노입자.

청구항 18

제17항에 있어서, 뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드 유사체는 잠금 핵산 (LNA), 가교 핵산 (BNA), 모르폴리노 또는 펩티드 핵산 (PNA), 글리콜 핵산 (GNA), 트레오스 핵산 (TNA), 헥시톨 핵산 (HNA), 또는 이의 혼합물 또는

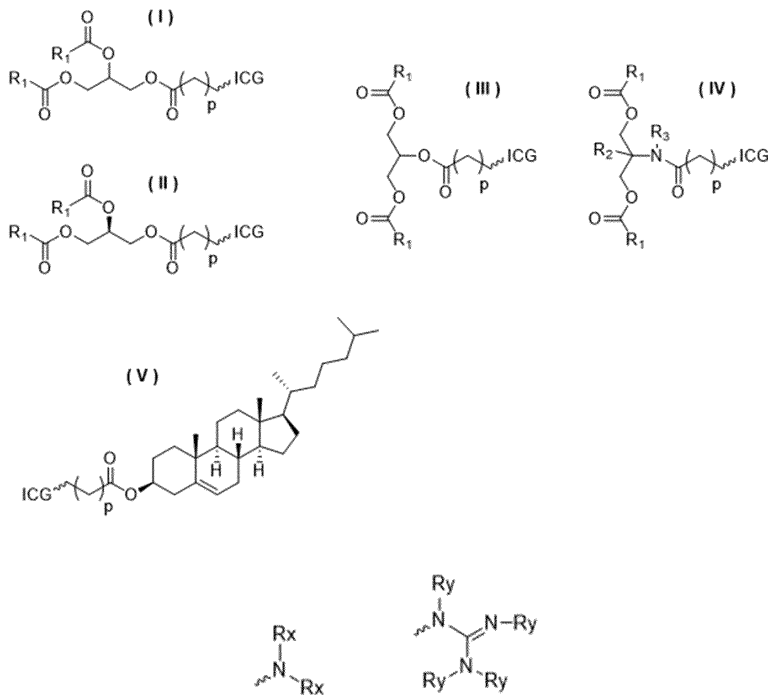
조합으로부터 선택되는 것인 지질 나노입자.

청구항 19

제10항 내지 제18항 중 어느 하나의 항에 있어서, 양이온성 또는 이온화가능한 양이온성 지질은 장쇄 알콜의 이온화가능한 양이온성 에스테르, 디글리세리드의 이온화가능한 양이온성 에스테르 또는 스테롤의 이온화가능한 양이온성 에스테르 또는 이의 조합으로부터 선택되는 것인 지질 나노입자.

청구항 20

제10항 내지 제19항 중 어느 하나의 항에 있어서, 이온화가능한 양이온성 지질은 하기 화학식 (I), (II), (III), (IV) 또는 (V) 중 어느 하나에 따른 분자, 또는 이의 회전이성질체, 호변이성질체, 입체이성질체 또는 위치이성질체인 지질 나노입자:



(상기 식에서, ICG는 $\text{---}(\text{CH}_2)_p\text{---}$ 이고, 물결선은 화학식 (I), (II), (III), (IV) 또는 (V)의 화합물에 대한 부착점을 표시하고;

p는 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 및 11로부터 선택되는 정수이고;

각각의 R₁은 선형 또는 분지형 C1-C19 알킬, 선형 또는 분지형 C1-C19 알케닐, 아릴, 아릴렌-알킬 및 알킬렌-아릴 기로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고, 상기 알킬 또는 알케닐 기는 임의로 0 및 N으로부터 독립적으로 선택되는 최대 5개 이중원자를 함유하고;

R₂는 수소, 메틸, 에틸 및 -CH₂-O-C(O)-R_{1a}로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R₃은 수소, 아릴, 아릴렌-알킬, 알킬렌-아릴 및 선형 C1-C6 알킬 기로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R_{1a}는 선형 또는 분지형 C1-C19 알킬, 선형 또는 분지형 C1-C19 알케닐, 아릴, 아릴렌-알킬 및 알킬렌-아릴 기로 이루어진 군으로부터 선택되고, 상기 알킬 또는 알케닐 기는 임의로 0 및 N으로부터 독립적으로 선택되는 최대 5개 이중원자를 함유하고;

각각의 R_x는 메틸, 에틸, 프로필 및 -CH₂-CH₂-OH로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;

각각의 R_y 기는 수소, 선형 또는 분지형 C1-C18 알킬, 아릴, 아릴렌-알킬 또는 알킬렌-아릴 기로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고, 상기 알킬 기는 임의로 0 및 N으로부터 독립적으로 선택되는 최대 5개 이중원자를 함유함).

청구항 21

제10항 내지 제19항 중 어느 하나의 항에 있어서,

변형된 아포리포단백질의 양 (둘 이상의 변형된 아포리포단백질의 경우에, 누계로)은 0.08 내지 2.0 몰%, 예컨대 0.10 내지 2.0 몰% 범위이고/이거나;

인지질의 양은 5 내지 90 몰%, 예컨대 15 내지 90 몰% 범위이고/이거나;

스테롤의 양은 2.5 내지 65 몰%, 예컨대 2.5 내지 50 몰% 범위이고/이거나;

양이온성 또는 이온화가능한 양이온성 지질의 양은 5.0 내지 80 몰%, 예컨대 8.0 내지 80 몰% 범위이고,

몰%는 오로지 지질 나노입자 중 변형된 아포리포단백질, 인지질, 스테롤 및 양이온성 또는 이온화가능한 양이온성 지질의 조합량을 기반으로 하는 것인 지질 나노입자.

청구항 22

제10항 내지 제21항 중 어느 하나의 항에 있어서,

변형된 아포리포단백질의 양 (둘 이상의 변형된 아포리포단백질의 경우에, 누계로)은 0.1 내지 90 중량% 범위이고;

핵산의 양은 0.01 내지 90 중량% 범위이고;

인지질의 양은 0.1 내지 95 중량% 범위이고;

스테롤의 양은 0.1 내지 95 중량% 범위이고/이거나;

양이온성 및/또는 이온화가능한 양이온성 지질의 양은 0.1 내지 95 중량% 범위이고,

이들 중량%는 변형된 아포리포단백질, 핵산, 인지질, 스테롤 및 양이온성 및/또는 이온화가능한 양이온성 지질의 조합량을 기반으로 하는 것인 지질 나노입자.

청구항 23

제10항 내지 제22항 중 어느 하나의 항에 있어서, 몰중량%를 기반으로 하는 변형된 아포리포단백질 (둘 이상의 변형된 아포리포단백질의 경우에, 누계로) 대 인지질의 비는 1:25와 1:400 사이, 보다 바람직하게 1:50과 1:200 사이, 보다 더 바람직하게 1:75와 1:150 사이인 지질 나노입자.

청구항 24

제10항 내지 제23항 중 어느 하나의 항에 있어서, 중량을 기반으로 하는 변형된 아포리포단백질 (둘 이상의 변형된 아포리포단백질의 경우에, 누계로) 대 인지질의 비는 2:1 내지 1:10, 보다 바람직하게 1:1 내지 1:5, 보다 더 바람직하게 1:1.5 내지 1:4인 지질 나노입자.

청구항 25

제7항 내지 제9항 중 어느 하나의 항에 정의된 바와 같은 지질 나노입자를 제조하는 방법으로서, 방법은

a1) 제1항 내지 제5항 중 어느 하나의 항에 정의된 바와 같은 변형된 아포리포단백질을 발현시키고 단리하여 단리된 변형된 아포리포단백질을 수득하는 단계; 및/또는

a2) 표적화 마디를 아포리포단백질 또는 아포리포단백질 모방체에 화학적으로 접합시켜서 변형된 아포리포단백질을 수득하고 변형된 아포리포단백질을 단리하는 단계;

b) 단계 a1 및/또는 단계 a2에서 수득된 단리된 변형된 아포리포단백질을 인지질, 스테롤 및 임의로 지질과 조합하여 지질 나노입자를 수득하는 단계

를 포함하는 것인 제조 방법.

청구항 26

제25항에 있어서, 단계 b)는

b1) 유기 용매 중 지질 성분을 수성 완충액 중 핵산과 혼합, 바람직하게 급속 혼합하여 나노입자를 생산하는 단계로서, 지질 성분은 인지질, 스테롤, 코어 성분, 및 임의로 지질을 포함하고, 수성 완충액은 5.5 이하의 pH, 바람직하게 5.0 이하의 pH를 갖는 것인 단계; 및

b2) 지질 나노입자를 변형된 아포리포단백질과 혼합, 바람직하게 급속 혼합하여 5.5와 9.0 사이의 pH, 바람직하게 6.0과 8.0 사이의 pH, 보다 바람직하게 6.5와 8.0 사이의 pH에서 나노입자를 생산하는 단계를 포함하는 것인 제조 방법.

청구항 27

지질 나노입자를 제조하는 방법으로서,

a) 유기 용매 중 지질 성분을 수성 완충액 중 핵산과 급속 혼합하여 지질 나노입자를 생산하는 단계로서, 지질 성분은 인지질, 스테롤, 양이온성 지질 또는 이온화가능한 양이온성 지질을 포함하고, 수성 완충액은 5.0 이하의 pH를 갖는 것인 단계; 및

b) 지질 나노입자를 제1항 내지 제6항 중 어느 하나의 항에 정의된 바와 같은 하나 이상의 변형된 아포리포단백질과 급속 혼합하여, 5.5와 8.0 사이의 pH, 바람직하게 6.0과 8.0 사이의 pH에서 지질 나노입자를 생산하는 단계

를 포함하는 것인 제조 방법.

청구항 28

의약으로서 사용을 위한 제1항 내지 제6항 중 어느 하나의 항에 따른 변형된 아포리포단백질 또는 제7항 내지 제24항 중 어느 하나의 항에 따른 지질 나노입자, 또는 제25항 내지 제27항 중 어느 하나의 항에 따른 방법으로 수득되거나 또는 수득가능한 지질 나노입자.

청구항 29

면역 관련 장애 예컨대 이식 거부, 이식편 대 숙주 질환 (GVH), 아테롬성 동맥 경화증, 감염, 염증, 자가면역, 알레르기, 암, 유전적 장애, 대사 장애, 신경학적 장애 또는 조직 외상의 치료 또는 예방에서 사용을 위한, 제1항 내지 제6항 중 어느 하나의 항에 따른 변형된 아포리포단백질 또는 제7항 내지 제24항 중 어느 하나의 항에 따른 지질 나노입자, 또는 제25항 내지 제27항 중 어느 하나의 항에 따른 방법으로 수득되거나 또는 수득가능한 지질 나노입자.

청구항 30

표적으로의 화합물의 전달에서 제1항 내지 제6항 중 어느 하나의 항에 따른 변형된 아포리포단백질 또는 제7항 내지 제24항 중 어느 하나의 항에 따른 지질 나노입자, 또는 제25항 내지 제27항 중 어느 하나의 항에 따른 방법으로 수득되거나 또는 수득가능한 지질 나노입자의 용도로서, 바람직하게 표적은 세포, 조직, 및/또는 장기이고, 보다 더 바람직하게 표적은 림프성 세포, 골수성 세포, 종양 세포, 내피 세포, 조혈 줄기 및 전구체 세포 (HSPC), 조혈 줄기 세포 (HSC), 다능성 전구체 (MPP), 공통 골수 전구체 세포 (CMP)이거나, 또는 표적화 바디는 박테리아, 바이러스, 진균 또는 기생충 단백질 또는 항원에 결합하고,

바람직하게 림프성 또는 골수성 세포는 단핵구, 매크로파지, M1-유사 매크로파지, M2-유사 매크로파지, 호산구, 호염기구, 비만 세포, NK 세포, B 세포, 형질 세포, 조절 T 세포, 조혈 줄기 세포, T 헬퍼 세포 예컨대 Th1, Th2, Th17 또는 Th22, 수지상 세포, 예컨대 형질세포양 수지상 세포, 일반적 DC 1 또는 일반적 DC 2, 또는 종양-연관 매크로파지로부터 선택되는 것인 용도.

청구항 31

시험관 내 또는 생체 외 세포에 핵산을 도입시키는 방법으로서, 방법은 제9항 내지 제24항 중 어느 하나의 항에 따른 지질 나노입자, 또는 제25항 내지 제27항 중 어느 하나의 항에 따른 방법으로 수득되거나 또는 수득가능한 지질 나노입자를 세포와 접촉시키는 단계를 포함하는 것인 도입 방법.

청구항 32

생체 내 세포에 핵산을 도입시키는 방법으로서, 방법은 제9항 내지 제24항 중 어느 하나의 항에 따른 지질 나노입자, 또는 제25항 내지 제27항 중 어느 하나의 항에 따른 방법으로 수득되거나 또는 수득가능한 지질 나노입자를 세포와 접촉시키는 단계를 포함하는 것인 도입 방법.

청구항 33

대상체에게 핵산의 생체 내 전달에서 사용을 위한, 제9항 내지 제24항 중 어느 하나의 항에 따른 지질 나노입자, 또는 제25항 내지 제27항 중 어느 하나의 항에 따른 방법으로 수득되거나 또는 수득가능한 지질 나노입자.

청구항 34

핵산의 생체 내 전달을 위한 방법으로서, 방법은 대상체에게 제9항 내지 제24항 중 어느 하나의 항에 따른 지질 나노입자, 또는 제25항 내지 제27항 중 어느 하나의 항에 따른 방법으로 수득되거나 또는 수득가능한 지질 나노입자를 투여하는 단계를 포함하는 것인 전달 방법.

청구항 35

질환 또는 장애를 이의 치료를 필요로 하는 대상체에서 치료하는 방법으로서, 방법은 대상체에게 제9항 내지 제24항 중 어느 하나의 항에 따른 지질 나노입자, 또는 제25항 내지 제27항 중 어느 하나의 항에 따른 방법으로 수득되거나 또는 수득가능한 지질 나노입자의 치료적 유효량을 투여하는 단계를 포함하는 것인 치료 방법.

청구항 36

제35항에 있어서, 질환은 면역 관련 장애 예컨대 이식 거부, 이식편 대 숙주 질환 (GVH), 아테롬성 동맥 경화증, 감염, 염증, 자가면역, 알레르기, 암, 유전적 장애, 대사 장애, 신경학적 장애 또는 조직 외상인 치료 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 장애의 치료 또는 예방에서 사용되는 변형된 아포리포단백질 분야에 관한 것이다. 보다 특히, 본 발명은 표적화 바디를 갖는 아포리포단백질, 아포리포단백질 유도체, 아포리포단백질 모방체 또는 아포리포단백질 모방체 유도체에 관한 것이다. 본 발명은 또한 변형된 아포리포단백질을 포함하는 지질 나노입자 및 이의 제조 방법에 관한 것이다. 마지막으로, 본 발명은 변형된 아포리포단백질 또는 이를 포함하는 지질 나노입자를 사용한 치료 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 도입

[0003] 많은 유망한 치료제들은 의도하는 표적 부위에 도달하지 못하거나, 또는 불충분하게 도달하거나, 또는 바람직하지 않은 표적-이탈 효과가 존재한다는 사실에 시달리고 있다. 추가로, 많은 요법들은 원치 않는 면역 반응을 촉발할 수도 있어서, 그 결과로 치료제의 분해 또는 바람직하지 않은 염증 반응을 초래한다. 그러므로, 치료제의 표적화를 위한 대안적인 방식을 개선하거나 또는 제공하고, 의도하는 표적으로 치료제를 전달하면서 면역 반응을 회피하기 위한 지속적인 요구가 존재한다.

[0004] 특히, 이들 문제는 첨부된 청구항에서 정의된 바와 같은 생산물 및 방법을 통해 해결된다.

발명의 내용

[0005] 본 발명은 아포리포단백질, 아포리포단백질 유도체, 아포리포단백질 모방체, 또는 아포리포단백질 모방체 유도체가 그들을 표적화 바디에 부착하여서, 특별한 세포, 조직 또는 장기를 표적화하도록 변형될 수도 있다는 발명자의 발견을 기반으로 하고, 표적화 바디는 표적 세포의 세포 표면 상의 분자에 결합할 수 있고, 이러한 변형된 아포리포단백질은 지질 나노입자의 일부로서가 아님을 의미하는 것인 그 자체로서 사용되는 경우에, 또는 지질 나노입자, 바람직하게 구형 지질 나노입자의 일부인 경우에, 치료제를 위한 운반체로서 사용될 수 있다.

- [0006] 게다가, 본 발명자는 아포리포단백질, 아포리포단백질 유도체, 아포리포단백질 모방체 또는 아포리포단백질 모방체 유도체에 대한 표적화 바디의 부착이 외부층 및 코어를 포함하는 지질 나노입자, 바람직하게 구형 지질 나노입자에 상기 표적화 바디를 쉽게 도입시킬 수 있고, 상기 지질 나노입자 주변의 환경에 상기 표적화 바디를 노출시킬 수 있게 한다는 것을 예상치 않게 발견하였다. 이러한 방식으로, 변형된 아포리포단백질은 그렇지 않으면 도달되지 않거나 또는 불충분하게 도달하게 되는 세포, 조직 또는 장기로 표적화될 수 있거나, 또는 표적-이탈 효과를 감소시키는데 사용할 수 있다.
- [0007] 제1 양태에서, 본 발명은 표적화 바디에 부착된 아포리포단백질, 아포리포단백질 유도체, 아포리포단백질 모방체 또는 아포리포단백질 모방체 유도체를 포함하는 변형된 아포리포단백질에 관한 것으로서, 표적화 바디는 표적 세포의 세포 표면 상의 분자에 결합할 수 있는 분자이다.
- [0008] 제2 양태에서, 본 발명은 외부층 및 코어를 포함하는 지질 나노입자에 관한 것으로서, 외부층은
- [0009] - 인지질;
- [0010] - 스테롤; 및
- [0011] - 본 명세서에 개시된 바와 같은 변형된 아포리포단백질을 포함하고;
- [0012] 코어는 지질, 양이온성 지질, 또는 다가 분자로부터 선택되는 적어도 하나의 코어 성분을 포함한다.
- [0013] 제3 양태에서, 본 발명은 외부층 및 코어를 포함하는 지질 나노입자에 관한 것으로서, 외부층은
- [0014] - 인지질;
- [0015] - 스테롤; 및
- [0016] - 본 명세서에 개시된 바와 같은 변형된 아포리포단백질을 포함하고;
- [0017] 코어는 핵산 및 양이온성 또는 이온화가능한 양이온성 지질을 포함한다.
- [0018] 제4 양태에서, 본 발명은 본 명세서에 개시된 바와 같은 지질 나노입자를 제조하는 방법에 관한 것으로서, 방법은
- [0019] a1) 본 명세서에 개시된 바와 같은 변형된 아포리포단백질을 발현시키고 단리하여 단리된 변형된 아포리포단백질을 수득하는 단계; 및/또는
- [0020] a2) 표적화 바디를 아포리포단백질 또는 아포리포단백질 모방체에 화학적으로 접합시켜서 변형된 아포리포단백질을 수득하고 변형된 아포리포단백질을 단리하는 단계;
- [0021] b) 단계 a1 및/또는 단계 a2에서 수득된 단리된 변형된 아포리포단백질을 인지질, 스테롤 및 임의로 지질과 조합하여 지질 나노입자를 수득하는 단계를 포함한다.
- [0022] 를 포함한다.
- [0023] 제5 양태에서, 본 발명은 지질 나노입자를 제조하기 위한 방법에 관한 것으로서, 방법은
- [0024] a) 유기 용매 중 지질 성분을 수성 완충액 중 핵산과 급속 혼합하여 지질 나노입자를 생산하는 단계로서, 지질 성분은 인지질, 스테롤, 양이온성 지질 또는 이온화가능한 양이온성 지질을 포함하고, 수성 완충액은 5.0 이하의 pH를 갖는 것인 단계; 및
- [0025] b) 지질 나노입자를 본 명세서에 개시된 바와 같은 하나 이상의 변형된 아포리포단백질과 급속 혼합하여, 5.5와 8.0 사이의 pH, 바람직하게 6.0과 8.0 사이의 pH에서 지질 나노입자를 생산하는 단계를 포함한다.
- [0026] 를 포함한다.
- [0027] 제6 양태에서, 본 발명은 의약으로서 사용을 위한 제1 양태에 따른 변형된 아포리포단백질 또는 제2 또는 제3 양태에 따른 지질 나노입자, 또는 본 발명의 제4 또는 제5 양태의 방법으로 수득되거나 또는 수득가능한 지질 나노입자에 관한 것이다.
- [0028] 제7 양태에서, 본 발명은 면역 관련 장애 예컨대 이식 거부, 이식편 대 숙주 질환 (GVH), 아테롬성 동맥 경화증, 감염, 염증, 자가면역, 알레르기, 암, 유전적 장애, 대사 장애, 신경학적 장애 또는 조직 외상의 치료 또는 예방에서 사용을 위한, 제1 양태에 따른 변형된 아포리포단백질 또는 제2 또는 제3 양태에 따른 지질 나노

입자, 또는 본 발명의 제4 또는 제5 양태의 방법으로 획득되거나 또는 획득가능한 지질 나노입자에 관한 것이다.

[0029] 제8 양태에서, 본 발명은 표적으로 화합물의 전달에서 제2 또는 제3 양태에 따른 변형된 아포리포단백질, 또는 본 발명의 제4 또는 제5 양태의 방법으로 획득되거나 또는 획득가능한 지질 나노입자의 용도에 관한 것으로서, 바람직하게 표적은 세포, 조직, 및/또는 장기이고, 보다 더 바람직하게 표적은 림프성 세포, 골수성 세포, 중앙 세포, 내피 세포, 조혈 줄기 및 전구체 세포 (HSPC), 조혈 줄기 세포 (HSC), 다능성 전구체 (MPP), 공통 골수 전구체 세포 (CMP)이거나, 또는 표적화 바디는 박테리아, 바이러스, 진균 또는 기생충 단백질 또는 항원에 결합하고,

[0030] 바람직하게 림프성 또는 골수성 세포는 단핵구, 매크로파지, M1-유사 매크로파지, M2-유사 매크로파지, 호산구, 호염기구, 비만 세포, NK 세포, B 세포, 형질 세포, 조절 T 세포, 조혈 줄기 세포, T 헬퍼 세포 예컨대 Th1, Th2, Th17 또는 Th22, 수지상 세포, 예컨대 형질세포양 수지상 세포, 일반적 DC 1 또는 일반적 DC 2, 또는 중앙-연관 매크로파지로부터 선택된다.

[0031] 제9 양태에서, 본 발명은 세포에서 핵산을 도입시키기 위한 시험관내 또는 생체의 방법에 관한 것으로서, 방법은 본 명세서에 개시된 바와 같은 지질 나노입자, 또는 본 명세서에 개시된 바와 같은 방법으로 획득되거나 또는 획득가능한 지질 나노입자를 세포와 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0032] 제10 양태에서, 본 발명은 세포에서 핵산을 도입시키기 위한 생체내 방법에 관한 것으로서, 방법은 본 명세서에 개시된 바와 같은 지질 나노입자, 또는 본 명세서에 개시된 바와 같은 방법으로 획득되거나 또는 획득가능한 지질 나노입자를 세포와 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0033] 제11 양태에서, 본 발명의 핵산의 생체내 전달을 위한 방법에 관한 것으로서, 방법은 대상체에게 본 명세서에 개시된 바와 같은 지질 나노입자, 또는 본 명세서에 개시된 바와 같은 방법으로 획득되거나 또는 획득가능한 지질 나노입자를 투여하는 단계를 포함한다.

[0034] 제12 양태에서, 본 발명은 질환 또는 장애를 이를 필요로 하는 대상체에서 치료하기 위한 방법에 관한 것으로서, 방법은 본 명세서에 개시된 바와 같은 지질 나노입자, 또는 본 명세서에 개시된 바와 같은 방법으로 획득되거나 또는 획득가능한 지질 나노입자의 치료적 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0035] **도 1**은 본 발명의 일 구현예를 도시하는 것으로서, 변형된 아포리포단백질 (이 경우에 아포리포단백질-재경로화제 융합 단백질, 및 보다 특히 아포리포단백질-나노바디 (VHH) 융합 단백질)은 지질 나노입자, 예컨대 구형 지질 나노입자에 포함된다. 아포리포단백질 나노입자 (aNP)의 주요 성분은 지질 (예를 들어, 인지질), 스테롤 (예를 들어, 콜레스테롤) 및 (변형된) 아포리포단백질이다.

도 2는 아포리포단백질 (예를 들어, 아포리포단백질 A1 (apoA1))-재경로화제 융합 단백질 나노입자 기술의 개략도이다. (A) 표적화 또는 재경로화 단백질은 표적 세포의 (세포 표면 상) 분자에 결합할 수 있는 분자이고, 항체 (단편), 단백질 리간드, 펩티드, 펩티드 모방체, 또는 당 중합체를 포함할 수 있다. (B) 아포리포단백질-재경로화제 융합 단백질은 표적화 바디, 및 보다 특히 재경로화 펩티드 또는 단백질에 부착된 아포리포단백질, 아포리포단백질 유도체, 아포리포단백질 모방체 또는 아포리포단백질 모방체 유도체를 포함하는 변형된 아포리포단백질이다. (C) 아포리포단백질-재경로화제 융합 단백질은 (인)지질, 스테롤을 포함하는, 지질 나노입자, 예컨대 구형 지질 나노입자에 쉽고 안정하게 도입된다. 다른 예에서, 아포리포단백질-재경로화제 융합 단백질은 (인)지질, 스테롤, 이온화가능한 양이온성 지질, 및 핵산 예컨대 소형 간섭 RNA 또는 메신저 RNA를 포함하는 치료적 페이로드를 포함하는 구형 지질 나노입자에 쉽고 안정하게 도입된다.

도 3은 Clearcoli 세포에서 VHHCD8-아포리포단백질 A1 (apoA1) 융합 단백질의 발현을 도시한다. 미량의 단백질 오염이 IMAC 정제 이후에 존재한다 [레인 E1]. 가장 현저한 밴드는 분자량이 43.3 kDa인 융합 단백질에 해당된다 (직사각형).

도 4는 마우스 비장세포에서 형광 표지된 VHHCD8-apoA1 및 apoA1의 평균 형광 강도 (MFI)를 도시한다 (상층 패널: 비장세포 유래 CD3+ T 세포; 하층 패널: 비장 유래 모든 세포).

도 5는 VHHCD8-apoA1 및 apoA1로 제제화되고 입자의 지질 구조 중에 형광 염료를 포함하는 아포리포단백질 나노입자 (aNP)의 마우스 비장세포에서의 평균 형광 강도 (MFI)를 도시한다.

도 6은 극저온 투과 전자 현미경 (저온-TEM)을 사용한 VHHCD8-apoA1 융합 단백질을 포함하는 구형 아포리포단백질 나노입자 (aNP)의 성공적인 제제화 (하단 패널) 및 동적 광산란 (DLS)을 사용한 14일 동안 나노입자 크기 및 다분산성 지수 (PDI)의 분석 (상단 패널)을 도시한다.

도 7은 VHHCD8-apoA1 융합 단백질을 포함하는 구형 아포리포단백질 나노입자 (aNP)에 대한 생체내 생체분포 연구 설정이다.

도 8은 생체 내에서 VHHCD8-아포리포단백질 A1 융합 단백질 나노입자의 세포 회합. 정맥내 투여 이후에 골수 (BM), 비장, 및 혈액에서 형광 아포리포단백질 A1 단백질 나노입자 (apoA1) 및 VHHCD8-아포리포단백질 A1 융합 단백질 나노입자 (VHHCD8) 골수성 세포 (A), CD8 T 세포 (B), CD4 T 세포 (C), CD3 T 세포 (D) 회합의 유세포측정 분석. MFI: 평균 형광 강도.

도 9는 생체 내에서 VHHCD8-아포리포단백질 A1 융합 단백질 나노입자의 세포 회합이다. 정맥내 투여 이후에 림프절에서 형광 아포리포단백질 A1 단백질 나노입자 (apoA1) 및 VHHCD8-아포리포단백질 A1 융합 단백질 나노입자 (VHHCD8) CD8 T 세포, CD4 T 세포 및 CD3 T 세포 회합의 유세포측정 분석. MFI: 평균 형광 강도.

도 10은 생체 내에서 VHHCD8-아포리포단백질 A1 융합 단백질 나노입자의 세포 회합이다. 정맥내 투여 이후에 골수 (BM), 혈액, 비장, 및 림프절에서 형광 아포리포단백질 A1 단백질 나노입자 (apoA1) 및 VHHCD8-아포리포단백질 A1 융합 단백질 나노입자 (VHHCD8) 세포 회합의 유세포측정 분석.

도 11은 VHHCD8-아포리포단백질 A1 융합 단백질 및/또는 IL-2-아포리포단백질 A1 융합 단백질을 함유하는 지질 나노입자의 FRET 어세이이다.

도 12는 생체 외 마우스 비장세포에서 기능적 리포터 유전자 발현이다. 형광 mCherry 단백질을 코딩하는 mRNA를 함유하는 apoA1 aNP, VHHCD8-apoA1 aNP, 및 VHHGFP-apoA1 aNP와 인큐베이션된 마우스 비장세포의 유세포측정 분석 (좌측 패널: CD3+ CD4- mCherry+ T 세포, 우측 패널: CD11b+ mCherry+ 골수성 세포).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0036] 본 발명의 목적을 위해서, 다음의 용어가 하기에 정의된다.
- [0037] 본 명세서에서 사용되는, 단수형 용어 "한", "일" 및 "그"는 내용에서 달리 명확하게 명시하지 않으면 다수 참조를 포함한다. 따라서, 예를 들어, "한 세포"에 대한 참조는 둘 이상의 세포의 조합 등을 포함한다.
- [0038] 본 명세서에서 사용되는 용어 "및/또는"은 하나 이상의 명시된 경우가 단독으로, 또는 모든 명시된 경우까지 적어도 하나의 명시된 경우와 조합되어 발생할 수도 있는 상황을 의미한다.
- [0039] 본 명세서에서 사용되는 용어 "항원"은 항체의 결합 부분이 결합할 수도 있는 물질을 의미한다. 항원 내 특별한 면역반응성 부위는 "에피토프" (또는 항원성 결정부)로서 알려져 있다. 항체, 또는 이의 항원-결합 부분에 대한 표적은 본 명세서에 정의된 바와 같은, 항원을 포함할 수도 있다.
- [0040] 본 명세서에서 사용되는 용어 "적어도" 특정 값은 특정 값 또는 그 이상을 의미한다. 예를 들어, "적어도 2"는 "2 이상", 즉, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 등과 같은 것으로 이해한다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "최대로" 특정 값은 특정 값 이하를 의미한다. 예를 들어, "최대로 5"는 "5 이하", 즉 5, 4, 3, ...-10, -11 등과 같은 것으로 이해한다.
- [0041] 본 명세서에서 사용되는, 단어 "포함하다" 또는 "이의 변형, 예컨대 "포함한다" 또는 "포함하는"은 명시된 요소, 정수 또는 단계, 또는 요소, 정수 또는 단계의 그룹을 포함하지만, 임의의 요소, 정수 또는 단계, 또는 요소, 정수 또는 단계의 그룹의 배제는 아니라는 것을 이해할 것이다. 동사 "포함하는"은 동사 "본질적으로 이루어지는" 및 "이루어지는"을 포함한다.
- [0042] 본 명세서에서 사용되는 용어 "통상적 기술"은 본 발명의 방법에서 사용되는 통상적 기술을 수행하는 방법이 당업자에게 자명하게 되는 상황을 의미한다. 분자 생물학, 생화학, 계산 화학, 세포 배양, 재조합 DNA, 생물정보학, 유전체학, 시퀀싱 및 관련 분야의 통상적 기술의 실행은 당업자에게 충분히 공지되어 있고, 예를 들어, 다음의 참조 문헌에 논의되어 있다: Sambrook et al., Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989; Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, 1987 및 주기적 업데이트; 및 the series Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego.

- [0043] 본 명세서에서 사용되는 용어 "동일성"은 뉴클레오티드 서열 또는 아미노산 서열의 동일성의 척도를 의미한다. 일반적으로, 서열은 최고 순서 일치가 얻어지도록 정렬된다. "동일성" 그 자체는 당분야에서 인식되는 의미를 가지며, 공개된 기술을 사용해 계산될 수 있다. 예를 들어, 다음의 문헌을 참조한다: (Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ED., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics And Genome Projects, Smith, D. W., ED., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis Of Sequence Data, Part I, Griffin, A. M., And Griffin, H. G., EDS., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis In Molecular Biology, Von Heinje, G., Academic Press, 1987; and Sequence Analysis Primer; Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991). 2개 뉴클레오티드 서열 또는 아미노산 서열 간 동일성을 측정하기 위한 다수의 방법이 존재하지만, 용어 "동일성"은 당업자에게 충분히 공지되어 있다 (Carillo, H., and Lipton, D., SIAM J. Applied Math (1988) 48:1073). 2개 서열 간 동일성 또는 유사성을 결정하는데 통상적으로 적용되는 방법은 하기 문헌에 개시된 것들을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다: Guide To Huge Computers, Martin J. Bishop, ed., Academic Press, San Diego, 1994, 및 Carillo, H., and Lipton, D., Siam J. Applied Math (1988) 48:1073. 동일성 및 유사성을 결정하기 위한 방법은 컴퓨터 프로그램으로 암호화되어 있다. 2개 서열 간 동일성 및 유사성을 결정하기 위한 바람직한 컴퓨터 프로그램 방법은 GCS 프로그램 패키지 (Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research (1984) 12(1):387), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, S. F. et al., J. Molec. Biol. (1990) 215:403)를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0044] 예시로서, 일정 서열의 폴리펩티드를 코딩하는 기준 뉴클레오티드 서열에 대해서 적어도, 예를 들어, 95% "동일성"을 갖는 뉴클레오티드 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드란, 폴리뉴클레오티드 서열이 기준 아미노산 서열의 각 100개 뉴클레오티드 당 최대 5개 점 돌연변이를 포함할 수도 있다는 것을 제외하고, 폴리뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열이 기준 서열과 동일하다는 것을 의도한다. 다른 말로, 기준 뉴클레오티드 서열과 적어도 95% 동일한 뉴클레오티드 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드를 수득하기 위해서, 기준 서열 중 뉴클레오티드의 최대 5%가 결실될 수도 있고/있거나 다른 뉴클레오티드로 치환될 수도 있고/있거나, 기준 서열 중 전체 뉴클레오티드의 최대 5% 까지 다수의 뉴클레오티드가 기준 서열에 삽입될 수도 있다. 기준 서열의 이들 돌연변이는 기준 뉴클레오티드 서열의 5' 또는 3' 말단 위치에서, 또는 기준 서열 내 뉴클레오티드 중에서 개별적으로 또는 기준 서열 내 하나 이상의 연속적인 그룹에 산재된, 이들 말단 위치 사이 어느 곳에서도 발생할 수도 있다.
- [0045] 유사하게, SEQ ID NO: X의 기준 아미노산 서열과 적어도, 예를 들어, 95% "동일성"을 갖는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드란 아미노산 서열이 SEQ ID NO: X의 기준 아미노산의 각 100개 아미노산 당 최대 5개 아미노산 변경을 포함할 수도 있다는 것을 제외하고, 폴리펩티드의 아미노산 서열이 동일하다는 것을 의도한다. 다른 말로, 기준 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 수득하기 위해서, 기준 서열 중 아미노산 잔기의 최대 5%는 결실될 수도 있거나 또는 다른 아미노산으로 치환될 수도 있거나, 또는 기준 서열 중 전체 아미노산 잔기의 최대 5% 까지 다수 아미노산이 기준 서열에 삽입될 수도 있다. 기준 서열의 이들 변경은 기준 아미노산 서열의 아미노 또는 카르복시 말단 위치에서, 또는 기준 서열의 잔기 중에서 개별적으로 또는 기준 서열 내 하나 이상의 연속적인 그룹에 산재된, 말단 위치 사이의 어느 곳에서도 발생할 수도 있다.
- [0046] 본 명세서에서 사용되는 용어 "시험관 내"는 그들 천연적 조건으로부터 단리된 유기체의 성분을 사용해 수행된 실험 또는 측정을 의미한다.
- [0047] 본 명세서에서 사용되는 용어 "생체 외"는 천연 조건의 최소 변경을 갖는 외부 환경에서 유기체 유래 조직 내 또는 조직 상에서 수행된 실험 또는 측정을 의미한다.
- [0048] 본 명세서에서 사용되는 용어 "핵산", "핵산 분자" 및 "폴리뉴클레오티드"는 DNA 분자 및 RNA 분자를 포함하고자 의도된다. 핵산 (분자)은 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수도 있지만, 바람직하게 이중 가닥 DNA 또는 단일 가닥 또는 이중 가닥 RNA이고, 보다 바람직하게 단일 가닥 또는 이중 가닥 RNA이다.
- [0049] 용어 "핵산", "핵산 분자" 및 "폴리뉴클레오티드"는 당분야에서 충분히 이해되고 있다. 추가 지침에 따라서, 이 용어는 전형적으로 뉴클레오시드 단위로 본질적으로 구성되는 임의 길이의 중합체 (바람직하게, 선형 중합체)를 의미한다. 뉴클레오시드 단위는 일반적으로 헤테로고리 염기 및 당 기를 포함한다. 헤테로고리 염기는 천연 발생 핵산, 다른 천연 발생 염기 (예를 들어, 잔틴, 이노신, 하이포잔틴)를 비롯하여, 화학적으로 또는 생화학적으로 변형된 (예를 들어, 메틸화), 비-천연 또는 유도체화된 염기에서 광범위하게 있는, 그 중에서도 푸린 및 피리미딘 염기 예컨대 아데닌 (A), 구아닌 (G), 시토신 (C), 티민 (T) 및 우라실 (U)을 포

함할 수도 있다. 예시적인 변형된 핵염기는 제한없이, 5-치환된 피리미딘, 6-아자피리미딘, 및 2-아미노프로필아데닌, 5-프로피닐우라실 및 5-프로피닐시토신을 포함한, N-2, N-6 및 O-6 치환된 푸린을 포함한다. 특히, 5-메틸시토신 치환은 핵산 듀플렉스 안정성을 증가시키는 것으로 확인되었다. 당 기는 그 중에서도 펜토스 (펜토피라노스) 기 예컨대 바람직하게 천연 발생 핵산에서 일반적인 리보스 및/또는 2-데옥시리보스, 또는 아라비노스, 2-데옥시아라비노스, 트레오스 또는 핵소스 당 기를 비롯하여, 변형 또는 치환된 당 기 (예컨대, 제한없이, 2'-O-알킬화, 예를 들어, 2'-O-메틸화 또는 2'-O-에틸화 당 예컨대 리보스; 2'-O-알킬옥시알킬화, 예를 들어, 2'-O-메톡시에틸화 당 예컨대 리보스; 또는 2'-O,4'-C-알킬렌-연결, 예를 들어, 2'-O,4'-C-메틸렌-연결 또는 2'-O,4'-C-에틸렌-연결 당 예컨대 리보스; 2'-플루오로-아라비노스 등)를 포함할 수도 있다.

뉴클레오시드 단위는 특히 천연 발생 핵산에서 일반적인 포스포디에스테르 연결, 및 추가로 변형된 포스페이트- 또는 포스포네이트-기반 연결 예컨대 포스포로티오에이트, 알킬 포스포로티오에이트 예컨대 메틸 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 알킬포스포네이트 예컨대 메틸포스포네이트, 알킬포스포노티오에이트, 포스포트리에스테르 예컨대 알킬포스포트리에스테르, 포스포르아미데이트, 포스포로피페라지데이트, 포스포모르폴리데이트, 가교 포스포르아미데이트, 가교 메틸렌 포스포네이트, 가교 포스포로티오에이트; 및 추가로 실록산, 카보네이트, 술폰메이트, 카르보알콕시, 아세타미데이트, 카바메이트 예컨대 3'-N-카바메이트, 모르폴리노, 보라노, 티오에테르, 3'-티오아세탈, 및 술폰 뉴클레오시드간 연결을 포함한, 수많은 기지의 뉴클레오시드간 연결 중 어느 하나에 의해서 서로 연결될 수도 있다. 바람직하게, 뉴클레오시드간 연결은 변형된 포스페이트-기반 연결, 예컨대 보다 바람직하게 포스포디에스테르, 포스포로티오에이트 또는 포스포로디티오에이트 연결 또는 이의 조합을 포함하는 포스페이트-기반 연결일 수도 있다. 용어 "핵산"은 또한 제한없이, 펩티드 핵산 (PNA), 포스페이트 기를 갖는 펩티드 핵산 (PHONA), 잠금 핵산 (LNA), 모르폴리노 포스포로디아미데이트-골격 핵산 (PMO), 시클로핵센 핵산 (CeNA), 트리시클로-DNA (tcDNA), 및 알킬 링커 또는 아미노 링커를 갖는 골격 부분을 갖는 핵산을 포함한, 핵산 모방체와 같은 중합체를 함유하는 임의의 다른 핵염기를 포괄한다 (참조: 예를 들어, Kurreck 2003 (Eur J Biochem 270: 1628-1644)). 본 문맥에서 사용되는 바와 같은 "알킬"은 특히 저급 탄화수소 모이어티, 예를 들어, C₁-C₄ 선형 또는 분지형, 포화 또는 불포화 탄화수소, 예컨대 메틸, 에틸, 에테닐, 프로필, 1-프로페닐, 2-프로페닐, 및 이소프로필을 포괄한다.

[0050] 본 명세서에서 의도되는 핵산은 천연 발생 뉴클레오시드, 변형된 뉴클레오시드 또는 이의 혼합물을 포함할 수도 있다. 변형된 뉴클레오시드는 변형된 헤테로고리 염기, 변형된 당 모이어티, 변형된 뉴클레오시드간 연결 또는 이의 조합을 포함할 수도 있다. 용어 "핵산"은 바람직하게 특히 hnRNA, 프리-mRNA, mRNA, cDNA, 게놈 DNA, 증폭 산물, 올리고뉴클레오티드, 및 합성 (예를 들어, 화학적으로 합성된) DNA, RNA 또는 DNA/RNA 하이브리드를 포함한, DNA, RNA 및 DNA/RNA 하이브리드 분자를 더 포괄한다. 핵산은 예를 들어, 자연계에 존재하거나 또는 그로부터 단리된, 천연 발생될 수 있고/있거나, 부분적으로 또는 전체적으로, 화학적으로 또는 생화학적으로 합성될 수 있다. "핵산"은 이중 가닥, 부분 이중 가닥, 또는 단일 가닥일 수 있다. 단일 가닥 경우에, 핵산은 센스 가닥 또는 안티센스 가닥일 수 있다. 또한, 핵산은 원형 또는 선형일 수 있다.

[0051] 뉴클레오티드, 또는 "핵산 서열", "뉴클레오티드 서열" 또는 "폴리뉴클레오티드 서열"을 언급할 때 본 명세서에서 사용되는 용어 "서열"은 핵산 및/또는 폴리뉴클레오티드 내에서, 또는 그의 뉴클레오티드의 순서를 의미한다. 본 발명의 문맥 내에서, 제1 핵산 서열은 추가 핵산 서열 내에 포함될 수도 있거나 또는 그와 중복될 수도 있다.

[0052] 본 명세서에서 사용되는 용어 "대상체" 또는 "개체" 또는 "동물" 또는 "환자" 또는 "포유동물"은 상호교환적으로 사용되고, 진단, 예후, 또는 요법을 원하는 임의의 대상체, 특히 포유동물 대상체를 의미한다. 포유동물 대상체는 인간, 가축, 농장 동물, 및 동물원 동물, 스포츠 동물 또는 반려 동물 예컨대 개, 고양이, 기니 피그, 토끼, 래트, 마우스, 말, 소, 암소, 곰 등을 포함한다. 본 명세서에 정의된 바와 같이, 대상체는 살아있을 수도 있거나 또는 죽었을 수도 있다. 샘플은 대상체 사후에, 즉 사망 후에 채취될 수 있고/있거나, 샘플은 살아있는 대상체로부터 채취할 수 있다.

[0053] 본 명세서에서 사용되는, 용어 "치료", "치료하는", "일시적 완화", "경감" 또는 "개선"은 상호교환적으로 사용되고, 치료적 이득을 포함하지만, 이에 제한되지 않는 유리하거나 또는 바람직한 결과를 얻기 위한 접근법을 의미한다. 치료적 이득이란 치료되는 기저 질환의 근절 또는 개선 또는 진행의 감소 (또는 지연)를 의미한다. 또한, 치료적 이득은 환자가 여전히 기저 질환을 앓고 있을 수 있음에도 불구하고, 호전 또는 둔화 또는 하락의 감소가 환자에서 관찰되도록 기저 질환과 연관된 생리적 증상 중 하나 이상의 근절 또는 개선 또는 진행의 감소 (또는 지연)에 의해 획득된다.

- [0054] 본 명세서에서 사용되는 용어 "벡터"는 수송할 수 있는 핵산 분자가 연결된 다른 핵산을 수송할 수 있는 핵산 분자를 의미한다. 한 유형의 벡터는 "플라스미드"로서, 추가적인 DNA 절편이 결합될 수도 있는 원형 이중 가닥 DNA 루프를 의미한다. 용어 "벡터"는 또한 관심 핵산을 함유하는 바이러스 입자 (즉, 바이러스 벡터)를 의미할 수도 있다.
- [0055] 본 발명의 일부는 저작권 보호를 받는 자료 (예컨대, 제한없이, 다이어그램, 장치 사진, 또는 저작권 보호가 임의의 관할권에서 이용가능하거나 또는 이용가능할 수도 있는 본 제출물의 임의의 다른 양태)를 함유한다. 저작권 소유자는 특허청 특허 파일 또는 기록에 나타난 특허 문서 또는 특허 발현을 누군가가 복사하는 것을 반대하지 않지만, 그외에는 모든 저작권을 보유한다.
- [0056] 본 발명의 방법, 조성물, 용도 및 다른 양태와 관련된 다양한 용어가 명세서 및 청구항 전반에서 사용된다. 이러한 용어는 달리 표시하지 않으면, 본 발명이 관련된 분야의 그들 통상의 의미를 제공하는 것이다. 다른 특별하게 정의된 용어는 본 명세서에 제공되는 바와 같은 정의와 일관적인 방식으로 해석되어야 한다. 바람직한 재료 및 방법이 본 명세서에서 설명되지만, 본 명세서에 기술된 것과 유사하거나 또는 동등한 임의의 방법 및 재료가 본 발명의 시험을 실시하는데 사용될 수 있다.
- [0057] 달리 정의하지 않으면, 본 명세서에서 사용되는 모든 기술 및 과학 용어는 당업자가 통상적으로 이해하는 바와 동일한 의미를 갖는다.
- [0058] 본 발명은 아포리포단백질이 특별한 세포, 조직, 장기 또는 병원체를 표적화하도록 변형될 수 있다는 발명자의 발견을 기반으로 한다. 본 발명자는 표적화 바디에 결합한 변형된 아포리포단백질이 이러한 변형된 아포리포단백질을 함유하는 지질 나노입자의 표적화를 허용한다는 것을 발견하였다. 지질 나노입자 (또는 변형된 아포리포단백질)는 페이로드 예컨대 약제가 로딩될 수 있으므로, 이것은 바람직한 표적 부위로 약제의 직접 표적화를 허용한다. 더 나아가서, 본 발명의 변형된 아포리포단백질은 또한 지질 나노입자를 제조할 수 있게 하며, 표적화 바디는 결과적으로, 상기 아포리포단백질 지질 나노입자 주변의 환경 (즉, 수성 환경)에 노출된다.
- [0059] 그러므로, 제1 양태에서, 본 발명은 표적화 바디에 부착된 아포리포단백질, 아포리포단백질 유도체, 아포리포단백질 모방체 또는 아포리포단백질 모방체 유도체를 포함하는 변형된 아포리포단백질에 관한 것으로서, 표적화 바디는 표적 세포의 세포 표면 상의 분자에 결합할 수 있는 분자이다.
- [0060] 변형된 아포리포단백질은 그 자체로 사용될 수도 있는데, 지질 나노입자의 일부가 아니라는 의미이다. 이러한 방식으로, 변형된 아포리포단백질은 표적 부위로 페이로드 (예를 들어, 치료제)를 전달하기 위한 운반체로서 제공될 수도 있다. 예를 들어, 페이로드는 예를 들어 공유 결합을 통해서 변형된 아포리포단백질에 결합할 수 있다. 표적화 바디는 특별한 부위, 예컨대 세포, 조직, 장기 또는 병원체로 변형된 아포리포단백질을 표적화하는데 사용될 수 있다.
- [0061] 본 명세서에서 사용되는 경우에, 변형된 아포리포단백질을 언급할 때 용어 부착된 안정적 또는 준안정적 회합, 예를 들어, 제한없이 공유 결합, 수소 결합 또는 반 데르 발스 힘, 또는 이의 조합을 의미할 수도 있지만, 이에 제한되지 않고, 예컨대 제한없이 펩티드 결합, 황 결합, 단백질-단백질 상호작용 또는 단백질 리간드 상호작용을 의미할 수도 있다.
- [0062] 표적화 바디
- [0063] 본 명세서에서 사용하는 경우에, 표적화 바디는 단백질 예컨대 아포리포단백질에 부착될 경우에, 단백질이 표적화 바디에 단백질이 융합되지 않은 경우에 결합하는 것과 상이한 표적 (또는 다른 말로, 본래 결합되는 것과 상이한 표적)에 결합하도록 허용하고/하거나, 더 높은 친화성으로 이의 의도되는 표적에 결합하도록 허용하는 분자를 의미한다.
- [0064] 특정 구현예에서, 표적화 바디는 상이한 표적, 예컨대 변형된 아포리포단백질에 의해서 정상적으로 결합되는 세포 세트의 특정 서브세트에 대한 결합을 포함하여, 표적 세포의 특정 서브세트에 결합하도록 허용할 수도 있다. 예를 들어, apoA1은 골수성 세포 상의 수용체에 결합하는 것으로 알려져 있고, 따라서, 표적화 바디는 골수성 세포의 특정 아형에 결합하는데 사용될 수도 있다. 예를 들어, 본 명세서의 다른 곳에 기술된 바와 같이, 표적화 바디로서 SIRP알파는 면역억제성 마크로파지를 표적화하도록 허용할 수도 있다. 표적화 바디의 비제한적인 예는 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 항체 단편, 재경로화 펩티드 또는 재경로화 단백질이고, 바람직하게 재경로화 펩티드 또는 재경로화 단백질은 표적에 존재하는 수용체의 리간드이다.

- [0065] 그러므로, 일 구현예에서 표적화 바디는
- [0066] - 항체 또는 항체의 항원 결합 단편,
- [0067] - 단백질 리간드, 단백질 결합 도메인, 또는 이의 단백질 결합 단편,
- [0068] - 펩티드,
- [0069] - 펩티드 모방체, 또는
- [0070] - 당 중합체
- [0071] 로부터 선택된다.
- [0072] 본 명세서에서 사용될 때 용어 표적은 변형된 아포리포단백질 또는 표적화 바디가 우선적으로 결합하는 객체를 의미한다. 표적은 수용체 또는 세포 표면 분자 예컨대 단백질 또는 프로테오글리칸, 지질, 인지질, 당, 당 중합체, 세포, 세포 유형, 조직 또는 조직 유형 또는 장기를 의미할 수도 있다.
- [0073] 아포리포단백질은 특별한 리간드에 결합한다는 것을 이해한다. 예를 들어, 상이한 지단백질 (예를 들어, HDL, LDL, VLDL 등)에서 발견되는 상이한 아포리포단백질은 지단백질의 표적화 및 결합 및 따라서 기능의 차이를 담당하는 것으로 여겨진다. 이론에 국한하고 싶지 않지만, 아포리포단백질의 일부는 양친매성 성질을 갖고, 인지질 및/또는 스테롤과 함께, 수성 환경에서 지질에 결합하는 역할을 하는 한편, 분자의 상이한 부분은 다른 분자와의 상호작용, 예를 들어, 단백질 수용체와 결합을 담당한다고 여겨진다. 또한 아포리포단백질은 또한 단백질로서 순환할 수도 있다고 추정되며, 이것은 지단백질로서가 아니라는 의미이다. 그러므로, (표적화 바디를 첨가하여서) 아포리포단백질의 결합 친화성을 변형시킬 가능성은 아포리포단백질의 표적화 또는 결합을 미세하게 조절할 수 있게 하므로, 흥미로운 기회를 제공한다. 이러한 변형된 아포리포단백질에 대해서 몇가지 적용분야가 고려된다:
- [0074] 첫째로, 표적화 바디는 단순하게, 예를 들어 지질 항상성에 변화를 주기 위해서, 아포리포단백질 또는 지단백질을 재경로화하는데 사용될 수도 있다. 예를 들어, 대상체의 혈액 중에서 LDL 또는 HDL 값이 표적화 바디와 조합된 아포리포단백질에 의해 변경될 수 있다는 것을 고려할 수 있다. 이것은 잠재적으로 높은 혈중 콜레스테롤 수준과 같은 지질 장애의 치료에 활용될 수도 있다.
- [0075] 둘째로, 사전 결정된 표적으로 페이로드를 갖는 지단백질 (지질 나노입자)을 재경로화하는데 사용될 수도 있다. 지단백질 또는 지질 나노입자는 페이로드 예컨대 약학 화합물을 운반하는 흥미로운 방법을 제공한다. 화합물이 지단백질/지질 나노입자의 지질 코어에 용해될 수도 있으므로, 혈액을 통한 친지성 화합물의 전달을 허용한다. 추가적인 장점은 지단백질이 천연 발생 화합물로 이루어지고, 따라서 면역계에 의해 천연적인 것으로 여겨져서, 약학 화합물에 의한 면역 반응의 촉발을 피한다는 것이다.
- [0076] 세번째로, 페이로드와 더 조합될 수도 있고, 이와 같이, 페이로드의 표적화를 허용할 수도 있다. 상기 기술된 바와 같이, 아포리포단백질은 본질적으로 페이로드를 위한 운반체로서 제공될 수 있다. 장점은 페이로드의 청소를 상당히 감소시켜서, 치료적 상황에서 혈액으로부터 쉽게 청소되는 페이로드 (예를 들어, 사이토카인)를 사용하는 것을 실현가능하게 만든다. 발생할 수도 있는 한가지 문제는 페이로드/아포리포단백질 조합이 페이로드에 대해 의도되는 표적 (즉, 이의 효과를 발현하도록 의도되는 부위, 세포, 조직 또는 장기)에 도달하지 못한다는 것이다. 이것은 표적화 바디를 더 포함하여 해결된다.
- [0077] 본 발명자가 생성한 데이터는 표적화 바디를 사용하여, 변형된 아포리포단백질이 상이한 표적으로 성공적으로 재경로화될 수 있다는 것을 시사한다. 그러므로, 일 구현예에서, 표적화 바디는 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 재경로화 펩티드 또는 재경로화 단백질로부터 선택되고, 바람직하게 재경로화 펩티드 또는 재경로화 단백질은 표적 상에 존재하는 수용체의 리간드이다.
- [0078] 일 구현예에서, 표적화 바디는 항체 또는 이의 항원 결합 단편일 수도 있다. 원칙적으로 임의 유형의 항원 결합 분자가 본 발명에 따른 변형된 아포리포단백질에서 표적화 바디로서 사용될 수 있다고 여겨진다.
- [0079] 특정 구현예에서, 표적화 바디는 골수성 세포에서 고도로 발현되거나 또는 독점적으로 존재하는 항원에 결합한다. 적합한 표적은 당분야에 공지되어 있고, 비제한적인 예에는 CD11b, CD11c, CD14 또는 공자극성 분자 예컨대 CD80, CD83, CD86, CD40 또는 HLA-DR이 있다. 그러므로, 일 구현예에서 표적화 바디는 CD11b, CD11c, CD14, CD80, CD83, CD86, CD40 또는 HLA-DR에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로부터 선택되는 골수

-표적화 펩티드 또는 단백질이다.

- [0080] 다른 특정 구현예에서, 표적화 바디는 골수성 세포에서 발현되는 수용체 또는 인자에 결합하는 단백질 리간드일 수도 있고, 비제한적인 예에는 CD40L (CD154) 및 FC 도메인이 있지만, 당업자는 다른 적합한 리간드 또는 보조 인자를 알고 있다. 그러므로, 일 구현예에서, 표적화 바디는 골수-표적화 펩티드 또는 골수-표적화 단백질이고, 골수-표적화 단백질 또는 골수-표적화 펩티드는 CD40L (CD154) 및 FC 도메인으로부터 선택된다.
- [0081] 일 구현예에서, 표적화 바디는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이고, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 단편 항원-결합 영역 (Fab), Fab2, 단쇄 가변 단편 (scFv), scFv-Fc, dAb-Fc, 유리 경쇄 항체, 절반 항체, 이중특이적 Fab2, Fab3, 삼중특이적 Fab3, 디아바디, 이중특이적 디아바디, 트리아바디, 삼중특이적 트리아바디, 미니바디, IgG, 면역글로불린 신규 항원 수용체 (IgNAR), 1가 IgG, VhH, 나노바디, 또는 신규 항원 수용체의 가변 도메인 (VNAR), 또는 이의 항원 결합 단편, 바람직하게 낙타 또는 상어 VhH 또는 이의 유도체 또는 이의 항원 결합 단편으로부터 선택된다.
- [0082] 항체 또는 항원 결합 단편은 또한 설계된 항원 결합 단백질, 예컨대 아피바디, FN3 도메인, DARPins 또는 신규로 설계된 단백질 수용체일 수도 있지만, 이에 제한되지 않는다. 저분자량을 갖는 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 그들의 작은 크기로 인해서 바람직한 것으로 이해되고, 따라서, 바람직한 구현예에서 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 Fab, scFv, 단일 도메인 항체, V_hH 또는 VNAR이다.
- [0083] 일 구현예에서 표적화 바디는 재경로화 펩티드일 수도 있다. 재경로화 펩티드의 비제한적인 예는 수용체 결합 펩티드, 및/또는 리간드 모방 펩티드이다. 그러므로, 일 구현예에서, 재경로화 펩티드는 프로그램된 세포 사멸 단백질 1 (PD1) 또는 신호-조절 단백질 알파 (SIRPa)로부터 선택된다. 표적화 바디로서 SIRP알파는 면역억제성 마크로파지를 표적화하도록 허용할 수도 있다. 그러나, 세포 표면 수용체에 대한 결합 특이성을 갖는 임의의 펩티드는 표적화 바디로서 사용될 수 있다는 것을 이해한다.
- [0084] 일 구현예에서 표적화 바디는 단백질 예컨대 수용체 리간드, 수용체, 또는 상호작용 단백질일 수도 있다. 대안적으로, 표적화 바디는 단백질 예를 들어 단백질 또는 리간드 결합 도메인의 일부일 수도 있다. 그러므로, 일 구현예에서, 재경로화 단백질은 예를 들어 CD40L 또는 GP120으로부터 선택된다. CD40L은 CD40 수용체를 발현하는 세포를 표적화하는데 사용될 수 있다. GP120은 CD4 T-세포 공-수용체에 직접적으로 결합하는데 사용될 수 있다. 그러나, 세포 표면 수용체에 대한 결합 특이성을 갖는 임의의 단백질이 표적화 바디로서 사용될 수 있다는 것을 이해한다.
- [0085] 일 구현예에서 표적화 바디는 당 중합체일 수도 있다. 당 중합체는 특별한 부위 또는 수용체로 당중합체에 의해 변형된 아포리포단백질을 지정하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 아포리포단백질은 마크로파지, 수지상 세포, 및 내피 세포에서 일반적으로 발현되는, 만노스 수용체로 변형된 아포리포단백질을 지정하기 위해 만노스에 의해 변형될 수 있다. 당업자는 유사한 목적으로 사용될 수도 있는 다른 당 중합체 및 어떠한 세포가 이들에 의해 표적화될 수 있는가를 알게 될 것이다. 본 명세서에서 사용할 때 용어 당 중합체는 임의의 다당류, 따라서 적어도 2개 당류를 포함하는 임의 분자를 의미한다.
- [0086] 본 명세서에서 사용될 때 용어 지단백질은 수성 환경에서 분산되거나 또는 용해되는, 적어도 하나의 아포리포단백질 및 지질 분자의 입자, 일반적으로 나노입자를 의미한다.
- [0087] 본 명세서에서 사용될 때 용어 재경로화는 정상적으로 결합되는 것과 상이한 표적으로 변형된 아포리포단백질을 표적화하거나, 또는 변형된 아포리포단백질의 보통의 표적에 대한 결합을 감소시키거나, 또는 표적-이탈 결합을 방지하는 것을 의미한다. 예를 들어, 아포리포단백질 a1 (apoA1)은 골수성 세포 상의 수용체에 결합하는 것으로 알려져 있고, 따라서 표적화 바디는 상이한 세포에 결합하고, 골수성 세포 (예를 들어, 골수성 세포는 단핵구, 수지상 세포, 조직 마크로파지 또는 과립구일 수도 있음)의 결합을 감소시키는데 사용될 수도 있다.
- [0088] 일 구현예에서 표적화 바디는 림프성 세포, 골수성 세포, 종양 세포, 내피 세포, 조혈 줄기 및 전구체 세포 (HSPC), 조혈 줄기 세포 (HSC), 다능성 전구체 (MPP), 공통 골수 전구체 세포 (CMP)의 표면 상의 단백질에 결합하거나, 또는 표적화 바디는 박테리아, 바이러스, 진균 또는 기생충 단백질 또는 항원에 결합하고,
- [0089] 바람직하게 표적화 바디는 림프성 세포, 골수성 세포, 종양 세포의 표면 상의 단백질에 결합하거나, 또는 표적화 바디는 박테리아, 바이러스, 진균 또는 기생충 단백질 또는 항원에 결합하고,
- [0090] 바람직하게 림프성 또는 골수성 세포는 단핵구, 마크로파지, M1-유사 마크로파지, M2-유사 마크로파지, 호산구, 호염기구, 비만 세포, NK 세포, B 세포, 형질 세포, 조절 T 세포, 조혈 줄기 세포, 과립구, T 헬퍼 세포, 예컨

대 Th1, Th2, Th17 또는 Th22, 수지상 세포, 예컨대 형질세포양 수지상 세포, 일반적 DC 1 또는 일반적 DC 2, 또는 종양-연관 마크로파지로부터 선택되고,

- [0091] 보다 바람직하게 림프성 또는 골수성 세포는 단핵구, 마크로파지, M1-유사 마크로파지, M2-유사 마크로파지, 호산구, 호염기구, 비만 세포, NK 세포, B 세포, 형질 세포, 조절 T 세포, 조절 줄기 세포, T 헬퍼 세포, 예컨대 Th1, Th2, Th17 또는 Th22, 수지상 세포, 예컨대 형질세포양 수지상 세포, 일반적 DC 1 또는 일반적 DC 2, 또는 종양-연관 마크로파지로부터 선택된다.
- [0092] 특정 구현예에서, 골수성 세포는 과립구, 단핵구, 적혈구 또는 혈소판에 대한 전구체 세포로부터 유래되는 혈액 세포일 수도 있다.
- [0093] 일 구현예에서, 표적화 바디는 CD1a, CD1b, CD1c, CD1d, CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD7, CD8, CD9, CD10, CD11a, CD11b, CD11c, CD11d, CDw12, CD13, CD14, CD15, CD15s, CD15u, CD16, CDw17, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD25, CD26, CD27, CD28, CD29, CD30, CD31, CD32, CD33, CD34, CD35, CD36, CD37, CD38, CD39, CD40, CD41, CD42a, CD42b, CD42c, CD42d, CD43, CD44, CD45, CD45R0, CD45RA, CD45RB, CD46, CD47, CD48, CD49a, CD49b, CD49c, CD49d, CD49e, CD49f, CD50, CD51, CD52, CD53, CD54, CD55, CD56, CD57, CD58, CD59, CD60a, CD60b, CD60c, CD61, CD62E, CD62L, CD62P, CD63, CD64, CD65, CD66a, CD66b, CD66c, CD66d, CD66e, CD66f, CD68, CD69, CD70, CD71, CD72, CD73, CD74, CD75, CD75s, CD77, CD79 α , CD79 β , CD80, CD81, CD82, CD83, CDw84, CD85, CD86, CD87, CD88, CD89, CD90, CD91, CD92, CD93, CD94, CD95, CD96, CD97, CD98, CD99, CD100, CD101, CD102, CD103, CD104, CD105, CD106, CD107a, CD107b, CD108, CD109, CD110, CD111, CD112, CD114, CD115, CD116, CD117, CD118, CD119, CD120a, CD120b, CD121a, CDw121b, CD122, CD123, CD124, CD125, CD126, CD127, CDw128, CD129, CD130, CDw131, CD132, CD133, CD134, CD135, CDw136, CDw137, CD138, CD139, CD140a, CD140b, CD141, CD142, CD143, CD144, CD145, CD146, CD147, CD148, CD150, CD151, CD152, CD153, CD154, CD155, CD156a, CD156b, CD157, CD158, CD158a, CD158b, CD159a, CD160, CD161, CD162, CD162R, CD163, CD164, CD165, CD166, CD167a, CD168, CD169, CD170, CD171, CD172a, CD173, CD174, CD175, CD175s, CD176, CD177, CD178, CD179a, CD179b, CD180, CD183, CD184, CD195, CDw197, CD200, CD201, CD202b, CD203c, CD204, CD205, CD206, CD207 (CLEC4K), CD208, CD209 (CLEC4L), CDw210, CD212, CD213a1, CD213a2, CDw217, CD220, CD221, CD222, CD223, CD224, CD225, CD226, CD227, CD228, CD229, CD230, CD231, CD232, CD233, CD234, CD235a, CD235b, CD236, CD236R, CD238, CD239, CD240CE, CD240D, CD241, CD242, CD243, CD244, CD245, CD246, CD247, CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CXCR6, CXCR7, CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR7, CCR8, CCR9, CLEC1A, CLEC1B, CLEC2A, CLEC2B, CLEC3A, CLEC3B, CLEC4A, CLEC4C (CD303), CLEC4D, CLEC4J, CLEC4E, CLEC4F, CLEC4G, ASGR1 (CLEC4H1), ASGR2 (CLEC4H2), FCER2 (), CLEC4M, CLEC5A, CLEC6A, CLEC7A, OLR1 (CLEC8A), CLEC9A, CLEC10A, CLEC11A, CLEC12A, CLEC12B, CD302 (CLEC13A), LY75 (CLEC13B), PLA2R₁ (CLEC13C), MRC1 (CLEC13D), MRC2 (CLEC13E), CLEC14A, CLEC16A, CLEC17A, KLRA1, KLRB1 (CLEC5B), KLRC1, KLRC2, KLRC3, KLRC4, KLRD1, KLRF1 (CLEC5C), KLRG1 (CLEC15A), KLRG2 (CLEC15B), KLRK1, AGC1, ATRNL1, BCAN, CD248, CHODL, CL-K1-Ia, CL-K1-Ib, CL-K1-Ic, CLECSF5, COLEC10, COLEC11, COLEC12, CSPG3, FCER2, FREM1, HBXBP, LAYN, LOC348174, LOC728276, MAFA, MBL2, MGC34761, MICL, MRC1L1, PAP, PKD1, PKD1L2, PRG2, PRG3, REG1A, REG1B, REG3A, REG3G, REG4, SELE, SELL, SELP, SFTPA1, SFTPA2, SFTPA2B, SFTPD, SRCL, THBD, VCAN, 알파태아단백질 (AFP), 암배아 항원 (CEA), CA-125, MUC-1, 상피 종양 항원 (ETA), 티로시나제, 및 흑색종-연관 항원 (MAGE)으로부터 선택되고,
- [0094] 바람직하게 CD14, CD11b, CD357 (GITR), CD193, CD123, CD117, CD56, CD19, CD38, CD25, CD133, CXCR3, CCR3, CD196, CCR10, CD64, CD206, CLEC4C (CD303), CLEC9A, CD1c, CD163, 알파태아단백질 (AFP), 암배아 항원 (CEA), CA-125, MUC-1, 상피 종양 항원 (ETA), 티로시나제, 및 흑색종-연관 항원 (MAGE)으로부터 선택되는 단백질에 결합한다.
- [0095] 이들 표적은 특별한 세포 유형 또는 세포의 서브셋을 표적화하는데 사용될 수도 있다. 당업자는 어떠한 마커가 어떠한 세포 유형(들)에 적합할 수 있는가를 알고 있고, 예를 들어, 하기 단백질이 특별한 세포를 표적화하는데 사용될 수 있다:
- [0096] 선천적 면역계의 세포:
- [0097] - 단핵구: CD14
- [0098] - 마크로파지: CD11b

- [0099] - 선천적 림프성 세포: CD357 (GITR)
- [0100] - 호산구: CD193
- [0101] - 호염기구: CD123
- [0102] - 비만 세포: CD117
- [0103] 적응 면역계의 세포:
- [0104] - NK 세포: CD56
- [0105] - B 세포: CD19
- [0106] - 형질 세포: CD38
- [0107] - 조절 T 세포: CD25
- [0108] 면역 세포의 아형:
- [0109] - 골수성 전구체 세포:
- [0110] - 조혈 줄기 세포: CD133
- [0111] - T 헬퍼 세포 서브세트: Th1: CXCR3, Th2: CCR3, Th17: CD196, Th22: CCR10
- [0112] - 마크로파지 분극 상태 (M1-유사 또는 M2-유사): M1: CD64, M2: CD206 (만노스-수용체) (예를 들어, 수용체에 특이적인 나노바디가 결합된 아포리포단백질, 또는 만노스가 결합된 아포리포단백질에 의해 표적화됨)
- [0113] - 수지상 세포의 아형: 형질세포양 수지상 세포: CD303, 일반적 DC 1: CLEC9A, 일반적 DC 2: CD1c
- [0114] - 종양-연관 마크로파지: CD163 (또는 종양 항원에 대한 나노바디로 표적화됨).
- [0115] 특정 구현예에서, 표적화 바디는 비-골수성 세포, 예컨대 비-골수성 면역 세포, 바람직하게 비-골수성 백혈구, 보다 바람직하게 림프구, 보다 바람직하게 T 세포, 보다 더 바람직하게 CD8+ T 세포에 결합할 수 있다.
- [0116] 특정 구현예에서, 표적화 바디는 골수성 세포는 아니지만, 골수성 세포, 예컨대 조혈 줄기 및 전구체 세포 (HSPC), 예컨대 조혈 줄기 세포 (HSC), 다능성 전구체 (MPP), 또는 공통 골수 전구체 세포 (CMP)로 분화될 수도 있는 세포에 결합할 수 있다.
- [0117] 특정 구현예에서, 표적화 바디는 비-골수성 세포, 예컨대 비-골수성 면역 세포 또는 내피 세포에 결합할 수 있다. 내피 세포는 내피 세포의 표면 마커에 결합할 수 있는 표적화 바디의 사용을 통해서 표적화될 수도 있다. 예를 들어, 내피 세포는 인자 VIII-관련 항원 예컨대 인자 VIII에 결합할 수 있는 표적화 바디, CD31/PECAM-1 예컨대 CD31에 결합할 수 있는 표적화 바디, 안지오텐신-전환 효소 (ACE/CD143) 예컨대 안지오텐신에 결합할 수 있는 표적화 바디, CD34 예컨대 L-셀렉틴에 결합할 수 있는 표적화 바디, 또는 엔도글린 (CD105)에 결합할 수 있는 표적화 바디의 사용에 의해 표적화될 수도 있다.
- [0118] 특정 구현예에서, 비-골수성 세포는 림프구, 예컨대 T 세포, B 세포 또는 자연 살해 (NK) 세포이다. 바람직하게, 림프구는 T 세포, 보다 더 바람직하게 CD8+ T 세포이다.
- [0119] 특정 구현예에서, 표적화 바디는 CD8에 결합하는, 예를 들어, 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다.
- [0120] 특정 구현예에서, 표적 세포가 T 세포인 경우에, 표적화 바디는 CD8에 결합하는, 바람직하게 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편일 수도 있다. 예를 들어, 표적화 바디는 [Woodham A.W. et al., Nanobody-antigen conjugates elicit HPV-specific antitumor immune responses, Cancer Immunology Research, 2018, Vol. 6, issue 7]에 기술된 바와 같고, 상기 참조의 보충 표 1에 표시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 VHHCD8일 수도 있다.
- [0121] 예를 들어, 본 명세서에 기술된 바와 같은 CD8-표적화된 아포리포단백질 나노입자는 또한 생체 내에서 키메라 항원 수용체 (CAR) T 세포를 생성시키는데 사용될 수 있다. 특히, CD8-표적화된 아포리포단백질 나노입자는 생체 내에서 T 세포를 재프로그래밍하기 위한 설명을 코딩하는 플라스미드 DNA (pDNA), 선형 또는 원형 RNA (예를 들어, 선형 또는 원형 mRNA), 및/또는 유전자 편집 성분을 전달하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 표적

화된 뉴클레아제는 세포에서 핵산을 도입시키는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 표적화된 뉴클레아제는 전사 활성인자-유사 이펙터 뉴클레아제 (TALEN), 아연 핑거 뉴클레아제 (ZNF), CRISPR (clustered regulatory interspaced short palindromic repeats), CRISPR/Cas9, CRISPR/CPFL 및 이의 조합, 예컨대 예를 들어 단일 가이드 RNA 또는 다른 유전자 편집 성분, 예컨대 단일 가이드 RNA와 CRISPR/Cas의 사용을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 특정 예에서, 키메라 항원 수용체 (CAR)를 코딩하는 pDNA 또는 RNA는 그들을 인식할 수 있게 하고 동족 리간드를 갖는 종양 세포를 사멸시킬 수 있게 하는 T 세포로 전달될 수 있다. 다른 특정 예에서, 키메라 항원 수용체 (CAR)를 코딩하는 pDNA 또는 RNA는 그들을 인식할 수 있게 하고, 병리학적 세포 예컨대 섬유화 장애에서 활성화된 섬유아세포를 제거할 수 있게 하는 T 세포로 전달될 수 있다.

[0122] 본 명세서에 기술된 바와 같은 CD8-표적화된 아포리포단백질 나노입자는 또한 CD8+ T 세포 기능을 변형시키는데 사용될 수 있다. 예를 들어, CD8+ T 세포 기능은 T 세포에서 사이토카인 생산을 위한 설명을 코딩하는 상기 언급된 바와 같은 플라스미드 DNA (pDNA), 선형 또는 원형 RNA (예를 들어, 선형 또는 원형 mRNA), 및/또는 유전자 편집 성분을 전달하기 위해서 기술된 바와 같은 CD8-표적화된 아포리포단백질 나노입자를 사용하여 사이토카인-사이토카인 수용체 상호작용을 변형시키는 것을 통해서 변형될 수도 있다. 특정 예에서, 사이토카인 예컨대 IFN- γ , IL-2, IL-10, IL-12, IL-15를 코딩하는 pDNA 또는 mRNA는 T 세포로 전달될 수도 있어서 그들이 사이토카인을 분비할 수 있게 한다. 이것으로 면역억제성 종양 미세환경을 항-종양 표현형으로 재프로그래밍시킬 수도 있다. 다른 특정 예에서, 사이토카인 수용체 예컨대 IFN- γ R, IL-2R, IL-12R, 또는 IL-15R을 코딩하는 pDNA 또는 mRNA를 T 세포로 전달할 수도 있다. CD8+ T 세포 기능은 또한 면역 체크포인트의 조절을 통해서 변형될 수도 있고, 예를 들어, CD8+ T 세포 기능은 T 세포에서 면역 체크포인트를 하향조절하기 위한 설명을 코딩하는 상기 언급된 바와 같은 안티센스 올리고뉴클레오티드, 소형 간섭 RNA (siRNA), mRNA, 및/또는 유전자 편집 성분을 전달하기 위해서 기술된 바와 같은 CD8-표적화된 아포리포단백질 나노입자를 사용하여 면역 체크포인트의 하향조절을 통해 변형될 수도 있다. 특정 예에서, PD1, CTLA4, SHP-2, LAG3, 또는 TIM-3을 표적화하는 상기 언급된 바와 같은 siRNA 또는 유전자 편집 성분은 암에서 세포독성 T 세포 기능을 억제하는 체크포인트 분자의 하향조절을 위해 T 세포로 전달될 수도 있다.

[0123] 또 다른 예에서, 본 명세서에 기술된 바와 같은 CD8-표적화된 아포리포단백질 나노입자는 관용원성 표현형으로 자가면역에서 병원성 CD8+ T 세포의 재-분극화에 사용될 수 있다. 특히, CD8-표적화된 아포리포단백질 나노입자는 병원성 T 세포를 재분극화시키기 위한 설명을 코딩하는 상기 언급된 바와 같은 안티센스 올리고뉴클레오티드, 소형 간섭 RNA (siRNA), mRNA 또는 유전자 편집 성분을 전달하는데 사용될 수 있다. 특정 예에서, FOXP3를 코딩하는 mRNA는 조절 T 세포 (T reg)로 그들 표현형을 변경시키기 위해서 T 세포 전달될 수도 있다. 다른 특정 예에서, CD8+ IL17+ T 세포는 IL-17 또는 ROR γ t 전사 인자를 표적화하는 siRNA의 전달을 통해서 재-분극화될 수도 있다.

[0124] 일 구현예에서, 변형된 아포리포단백질은 VHH8CD8을 갖는 apoA1을 포함한다.

[0125] 일 구현예에서, VHHCD8-apoA1 변형된 아포리포단백질은 SEQ ID NO. 7 또는 1과 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함하거나 또는 그로 이루어지거나, 또는 SEQ ID NO. 8 또는 2와 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한 서열을 갖는 핵산에 의해 코딩되는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 그로 이루어진다.

[0126] 특정 구현예에서, 표적 세포는 T 및/또는 B 세포인 경우에, 표적화 바디는 PD1, CD40L 또는 GP120일 수도 있다.

[0127] 아포리포단백질

[0128] 아포리포단백질은 지질 예컨대 트리글리세리드 및 콜레스테롤에 결합하여 지단백질을 형성하는 단백질이다. 그들은 혈액, 뇌척수액 및 림프에서 지질 (및 지용성 비타민)을 수송한다. 지단백질의 지질 성분은 수불용성이다. 그러나, 그들 세제-유사 (양친매성) 성질 때문에, 아포리포단백질 및 다른 양친매성 분자 (예컨대 인지질)는 지질을 둘러싸서, 그 자체로 수용성인 지단백질 입자를 생성하고, 따라서 물-기반 순환 (즉, 혈액, 림프)을 통해서 운반될 수 있다. 지단백질 구조를 안정화시키고 지질 성분을 가용화시키는 것 이외에도, 아포리포단백질은 지단백질 수용체 및 지질 수송 단백질과 상호작용하여서, 지단백질 흡수 및 청소에 관여한다.

[0129] 지질 수송, 아포리포단백질은 지단백질 입자의 구조적 성분, 세포-표면 수용체 및 지질 수송 단백질에 대한 리간드, 및 효소의 보조인자로서 기능한다. 상이한 지단백질 입자는 그들 기능에 영향을 미치는, 아포리포단

백질의 상이한 부류를 함유한다. 예를 들어, 아포리포단백질 A1 (apoA1)은 고밀도 지단백질 (HDL)의 주요 구조 단백질 성분이지만, 다른 지단백질에 소량으로 존재하고, HDL은 다른 아포리포단백질을 포함한다.

- [0130] 본 발명은 특정 유형의 아포리포단백질에 제한되지 않고, 따라서 일 구현예에서, 아포리포단백질, 아포리포단백질 유도체, 아포리포단백질 모방체 또는 아포리포단백질 모방체 유도체는 apoA1, apoA-1 밀라노, apoA2, apoA4, apoA5, apoB, apoB48, apoB100, apoC-I, apoC-II, apoC-III, apoC-IV, apoD, apoE, apoF, apoH, apoL, apoL1, apoL2, apoL3, apoL4, apoL5, apoL6, apoLD1, apoO, apoOL 및 apoM, 또는 이의 조합, 또는 이의 모방체 또는 유도체로부터 선택되고,
- [0131] 바람직하게 apoA1, apoA2, apoA4, apoA5, apoB100, apoC-I, apoC-II, apoC-III, apoC-IV, apoD, apoE, apoF, apoH, apoL, 및 apoM, 또는 이의 모방체 또는 유도체로부터 선택되고,
- [0132] 보다 바람직하게 apoA1, apoA2, apoA4, apoA5, apoB100, apoC-I, apoC-II, apoC-III, apoC-IV 및 apoE 또는 이의 모방체 또는 유도체로부터 선택되고,
- [0133] 보다 더 바람직하게 apoA1, apoA4, apoA5, apoB100, apoC-III 및 apoE 또는 이의 모방체 또는 유도체로부터 선택되고,
- [0134] 가장 바람직하게 apoA1, apoB100 및 apoE 또는 이의 모방체 또는 유도체로부터 선택된다는 것을 고려한다.
- [0135] 특정 구현예에서, 변형된 아포리포단백질의 아포리포단백질 성분은 apoA1 또는 apoA1 돌연변이체이다.
- [0136] 특정 구현예에서, 아포리포단백질 성분은 또한 아포리포단백질 단편일 수도 있다. 바람직하게, 아포리포단백질 단편은 전체 길이 아포리포단백질의 생물학적 활성, 예컨대 지질 나노입자로 통합되거나 또는 골수 구획으로 표적화하는 아포리포단백질의 능력을 보유한다. 특정 구현예에서, 아포리포단백질 단편은 전체 길이 아포리포단백질의 적어도 ATP 결합 카세트 서브패밀리 A 구성원 1 (ABCA1), ATP 결합 카세트 서브패밀리 G 구성원 1 (ABCG1) 및/또는 스캐빈저 수용체 클래스 B 유형 1 (SR-BI) 결합 영역을 포함하여서, 골수성 세포에 대한 결합을 허용한다. 특정 구현예에서, 아포리포단백질 단편은 적어도 전체 길이 아포리포단백질의 알파 나선을 포함한다. 이들 나선은 한쪽 측면이 친수성 (수성 환경과 상호작용)이고 다른 측면은 소수성 (입자 내 지질과 상호작용)이다.
- [0137] 특정 구현예에서, 단편은 이것이 유래되는 전체 길이 펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질의 N-말단 및/또는 C-말단 절두된 형태일 수도 있다.
- [0138] 특정 구현예에서, 단편은 이것이 유래되는 상기 전체 길이 펩티드, 폴리펩티드, 또는 단백질의 아미노산 서열 길이의 적어도 약 30%, 예를 들어, 적어도 약 50% 또는 적어도 약 70%, 바람직하게 적어도 약 80%, 예를 들어, 적어도 약 85%, 보다 바람직하게 적어도 약 90%, 및 보다 더 바람직하게 적어도 약 95% 또는 심지어 약 99%를 포함할 수도 있다. 예를 들어, 전체 길이 펩티드, 폴리펩티드, 또는 단백질의 길이를 초과하지 않는 한, 단편은 상응하는 전체 길이 펩티드, 폴리펩티드, 또는 단백질의 ≥ 5 연속 아미노산, 또는 ≥ 10 연속 아미노산, 또는 ≥ 20 연속 아미노산, 또는 ≥ 30 연속 아미노산, 예를 들어, ≥ 40 연속 아미노산, 예컨대 예를 들어 ≥ 50 연속 아미노산, 예를 들어, ≥ 60 , ≥ 70 , ≥ 80 , ≥ 90 , ≥ 100 , 또는 ≥ 200 연속 아미노산의 서열을 포함할 수도 있다.
- [0139] 특정 구현예에서, 아포리포단백질 성분, 예컨대 아포리포단백질 단편은 전체 길이 아포리포단백질의 골수-결합 부분을 포함한다.
- [0140] 특정 구현예에서, 아포리포단백질 성분은 표적화 바디에 아포리포단백질의 화학적 접합을 허용하는 돌연변이를 포함하는 아포리포단백질 돌연변이체이고, 표적화 바디는 표적 세포의 세포 표면 상의 분자에 결합할 수 있는 분자이다. 특정 구현예에서, 아포리포단백질 성분은 또한 세린의 시스테인으로의 치환을 포함하는 아포리포단백질 돌연변이체, 예컨대 본 명세서의 다른 곳에 기술된 바와 같은 SEQ ID NO: 9, 10, 11 또는 12로 정의된 바와 같은 돌연변이체일 수도 있다.
- [0141] 본 명세서에 기술된 상이한 단백질에 대한 펩티드 서열, 또는 본 명세서에 기술된 상이한 단백질을 코딩하는 유전자에 대한 핵산 서열은 예를 들어 UCSC 게놈 브라우저 (<http://genome.ucsc.edu/>), Ensembl 게놈 브라우저 (<https://www.ensembl.org>) 및 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>)로부터 당업자가 쉽게 이용가능하다. 상이한 단백질 또는 유전자에 대한 공통 서열은 이들 출처로부터 쉽게 유래되지만, 제한없이, 유전자 변이 및 유전자의 다수 스플라이스 변이체로 인해서 일정 변이가 존재할 수도 있다는 것을 이해한다. 그러므로, 특정 단백질을 언급할 때, 유전자 변이 및 스플라이스 변이체로 인한 서열 변이를 포괄하도록 해석되어야

한다. 그러므로, 일정 단백질을 언급해서 본 명세서에서 사용되는 경우에, 이것은 Ensembl 게놈 브라우저에서 검색된 상응하는 공통 단백질 서열, 또는 Ensembl 게놈 브라우저에서 검색된 공통 핵산 (유전자) 서열, 또는 Ensembl 게놈 브라우저에서 검색된 상응하는 공통 단백질 서열과 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 단백질 서열, 또는 Ensembl 게놈 브라우저에서 검색된 상응하는 공통 유전자 서열과 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 유전자 서열, 또는 Ensembl 게놈 브라우저에서 검색된 상응하는 공통 단백질 서열과 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 단백질을 코딩하는 핵산 서열로서 해석되어야 한다.

[0142] 아포리포단백질 모방체는 아포리포단백질의 기능 또는 구조를 모방하는 합성 펩티드 또는 단백질이다. 몇몇 아포리포단백질 모방체가 공지되어 있고, 예를 들어 Wolska 등 (Cells. 2021 Mar; 10(3): 597., 이의 전체를 참조로 본 명세서에 편입시킴)은 문헌에 기술된 상이한 apoA1, apoE 및 apoC-II 모방체를 고찰한다. 예를 들어, aapoA1 모방체 펩티드는 주로 세포로부터 콜레스테롤을 이출시키는 그들 능력을 기반으로 설계되었다. 이러한 과정이 특정한 단백질-단백질 상호작용에 의존적인 것으로 확인되지 않았으므로, 대부분의 apoA1 모방체 펩티드는 단순히 단지 양친매성 나선이고, 사실, 많은 것들이 apoA1과 1차 아미노산 상동성을 갖지 않는다. 예시적인 aapoA1 모방체는 aapoA1 모방체 18A, aapoA1 모방체 2F 및 aapoA1 모방체 37pA이다.

[0143] 예를 들어, apoE는 몇몇 추정 동맥경화 보호 기능을 갖고, 많은 상이한 유형의 apoE-기반 펩티드가 보고되어 있다. 이들 펩티드의 설계에서 주요한 목표 중 하나는 apoB-함유 지단백질의 간 청소를 촉진하는 것이다. apoE는 지질에 결합했을 때에만 이의 수용체에 결합할 수 있으므로, 이들 펩티드는 일반적으로 apoE의 N-말단 도메인 유래의 수용체-결합 모티프뿐만 아니라, 또한 apoE 또는 일부 다른 서열의 C-말단 도메인을 기반으로 하는 지질-결합 영역을 갖는다.

[0144] 예를 들어 apoC-II 모방체는 apoC-II의 LPL-활성화 도메인에 연결된 단축된 제1 나선 (18A)을 기반으로 하거나, 또는 제1 및 제2 나선 둘 모두가 지단백질에 대한 이중나선 결합을 증강시키기 위한 아미노산 치환을 갖는 천연 apoC-II 나선을 기반으로 하는 것인 모방체로서 설명되었다.

[0145] 그러므로, 본 명세서에서 사용될 때, 아포리포단백질 모방체는 각각의 아포리포단백질과 구조적 및/또는 기능적 특성을 공유하는 합성 단백질 또는 펩티드를 의미한다. 예를 들어, 공유된 구조적 특성은 1차, 2차 또는 3차 펩티드 구조 예컨대 펩티드 서열, 알파 나선 또는 베타 시트와 같은 구조의 존재 또는 펩티드의 3차 구조일 수도 있거나, 또는 기능적 특성은 수용체와 같이 일정 표적에 대한 결합의 유사성일 수도 있다. 바람직하게 아포리포단백질은 상응하는 아포리포단백질과 유사한 방식으로, 지질에 결합할 수 있고, 보다 바람직하게 지질 입자를 형성할 수 있다.

[0146] 특정 구현예에서, 아포리포단백질 모방체는 각각의 아포리포단백질과 동일하거나 또는 유사한 정도로 골수성 세포에 결합할 수도 있다. 예를 들어, apoA1의 아포리포단백질 모방체는 바람직하게 apoA1과 동일하거나 또는 유사한 정도로 골수성 세포에 결합할 수 있다.

[0147] 일 구현예에서 변형된 아포리포단백질은 apoA1과 표적화 바디의 조합이다. 일 구현예에서 변형된 아포리포단백질은 apoA1 모방체와 표적화 바디의 조합이다. 일 구현예에서 변형된 아포리포단백질은 apoE와 표적화 바디의 조합이다.

[0148] 일 구현예에서 변형된 아포리포단백질은 아포리포단백질 성분 (예를 들어, apoA1 돌연변이체, 바람직하게 인간 apoA1 돌연변이체)과 표적화 바디의 조합이다. 일 구현예에서 변형된 아포리포단백질은 apoA1 모방체와 표적화 바디의 조합이다. 일 구현예에서 변형된 아포리포단백질은 apoE와 표적화 바디의 조합이다.

[0149] 예로서, 인간 apoA1 단백질 서열은 NCBI Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 등록 번호 NP_001304947.1 (이소폼 1 프리프로단백질), 및 Uniprot (www.uniprot.org) 등록 번호 P02647.1로 주석이 달린다.

[0150] 특정 구현예에서, 아포리포단백질 성분은 apoA1 (예를 들어, SEQ ID NO. 9로 정의된 바와 같은 apoA1의 인간 전구체로부터 유래됨, 이의 처음 18개 아미노산은 신호 펩티드를 형성함)이거나 또는 apoA1에서 유래된 아포리포단백질 성분 (예를 들어, SEQ ID NO. 10, 11 또는 12로 정의된 바와 같음)이다. 특정 구현예에서, 아포리포단백질 성분은 SEQ ID NO. 13으로 정의된 바와 같은 인간 apoA1이다.

[0151] 예를 들어, 아포리포단백질 성분을 표적화 바디에 화학적으로 접합시키기 위해서, 반응성 핸들이 사용될 수도 있다. 그러므로, 위치 147 (예를 들어, SEQ ID NO. 11로 정의된 바와 같음) 또는 279 (예를 들어, SEQ ID NO: 12로 정의된 바와 같음)의 세린 대신에 시스테인을 포함하는 apoA1로부터 유래된 아포리포단백질 성분은 변형된 아포리포단백질을 제조하는데 유용할 수 있다. 일 구현예에서, 아포리포단백질 성분은 SEQ ID NO. 9,

SEQ ID NO. 14, SEQ ID NO. 15, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11 또는 SEQ ID NO. 12와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열, 또는 SEQ ID NO. 17, SEQ ID NO. 18, SEQ ID NO. 19, SEQ ID NO. 20, SEQ ID NO. 21 또는 SEQ ID NO. 22와 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한 서열을 갖는 핵산에 의해 코딩되는 아미노산 서열을 포함하거나, 그로 본질적으로 이루어지거나 또는 그로 이루어진다.

[0152] SEQ ID NO. 14, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11 또는 SEQ ID NO. 12로 정의된 바와 같은 서열은 트롬빈 절단 부위인, 아미노산 서열 GLVPRGSIDD (SEQ ID NO. 16)을 N-말단에 포함한다는 것을 유의한다. 예를 들어, SEQ ID NO. 15로 정의된 바와 같은 서열은 6His 태그와 이어서 아미노산 서열 GLVPRGSIDD (SEQ ID NO. 16)을 N-말단에 포함한다. 여기서, 트롬빈 절단 부위는 펩티드로부터 N-말단 His 태그를 제거하는데 사용될 수 있다.

[0153] 일 구현예에서, 아포리포단백질 성분은 SEQ ID NO. 10과 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 그로 본질적으로 이루어지거나, 또는 그로 이루어지고, SEQ ID NO. 10은 SEQ ID NO. 10의 위치 7에 시스테인을 포함한다.

[0154] 일 구현예에서, 아포리포단백질 성분은 SEQ ID NO. 11과 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 그로 본질적으로 이루어지거나, 또는 그로 이루어지고, SEQ ID NO. 10은 SEQ ID NO. 11의 위치 150에 시스테인을 포함한다.

[0155] 일 구현예에서, 아포리포단백질 성분은 SEQ ID NO. 12와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 그로 본질적으로 이루어지거나, 또는 그로 이루어지고, SEQ ID NO. 10은 SEQ ID NO. 12의 위치 239에 시스테인을 포함한다.

[0156] 변형된 아포리포단백질을 언급하는 경우에, 본 명세서에서 사용되는, 용어 융합 단백질은 아포리포단백질 및 이에 공유적으로 부착된 표적화 바디로서 해석되어야 한다. 공유 부착은 융합 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열에 의한 펩티드 또는 단백질 서열의 프레임 내 코딩에 기인할 수도 있다. 대안적으로, 공유 부착은 예를 들어, 아포리포단백질의 시스테인 잔기에서 형성되는, 황 결합, 예컨대 티오에테르 결합을 통한, 아포리포단백질에 표적화 바디의 공유 연결에 기인할 수도 있다. 또한, 페이로드는 펩티드 또는 단백질인 경우에, 임의로 변형된 아포리포단백질과 융합 단백질일 수도 있다. 표적화 바디 및/또는 페이로드 및/또는 아포리포단백질 (또는 이의 모방체 또는 유도체)은 비-천연 아미노산 예컨대 파라-아니도페닐알라닌의 부위-특이적 도입을 포함할 수도 있고, 이것은 알킨 변형된 시약과 후속 (변형-촉진) "클릭" (접합) 반응에서 사용될 수 있다는 것을 이해한다.

[0157] 변형된 아포리포단백질은 아포리포단백질, 아포리포단백질 유도체, 아포리포단백질 모방체 또는 아포리포단백질 모방체 유도체 및 표적화 바디 사이에 링커, 예컨대 가요성 링커를 포함할 수도 있다. 링커는 글리신-세린 링커, 예컨대 (GGG)_n-링커 (여기서, n은 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10임), 바람직하게 (GGG)₄ (SEQ ID. 23)-링커일 수도 있다.

[0158] 특정 구현예에서, 변형된 아포리포단백질은 예컨대 변형된 아포리포단백질의 N-말단부 및/또는 C-말단부에, 하나 이상의 태그를 포함할 수도 있다. 하나 이상의 태그, 예컨대 6His-태그 또는 strep-태그는 변형된 아포리포단백질의 정제를 허용할 수도 있다.

[0159] 표적화 바디는 아포리포단백질, 아포리포단백질 유도체, 아포리포단백질 모방체 또는 아포리포단백질 모방체 유도체의 임의 부분에 공유적으로 부착될 수도 있다. 링커, 예컨대 가요성 링커는 이러한 공유 부착을 허용하는데 사용될 수도 있다.

[0160] 특정 구현예에서, 표적화 바디는 상기 변형된 아포리포단백질에서 상기 아포리포단백질, 아포리포단백질 유도체, 아포리포단백질 모방체 또는 아포리포단백질 모방체 유도체의 N-말단 또는 C-말단에 위치된다.

[0161] 본 명세서에서 사용될 때 면역 반응은 면역계에 의해서 유기체 내에서 발생하는 반응을 의미한다. 면역 반응은 선천성 면역 반응 또는 적응성 면역 반응 또는 보체 면역계일 수도 있다. 본 명세서에서 사용할 때 면

역 반응은 프로-염증성 분자의 분지; 항-염증성 분자의 분지; 식세포작용; 항체 생산, 제시 또는 분비; 항원 제시; 면역 세포의 활성화, 증식, 억제 또는 분화; 표적에 면역 세포의 결합, 또는 면역 관련 세포 신호전달 캐스캐이드의 개시를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0162] 페이로드

[0163] 일 구현예에서 변형된 아포리포단백질은 페이로드를 더 포함한다. 페이로드는 예를 들어 공유 결합을 통해서, 변형된 아포리포단백질에 결합할 수도 있다. 본 명세서에서 사용하는 경우에, 페이로드는 표적 부위에 전달하려는 분자를 의미한다. 비제한적인 예는 핵산 또는 핵산 유사체, 치료제, 생물제제, 사이토카인, 케모카인, 호르몬, 성장 인자, 또는 이의 조합이지만, 당업자는 추가 유형의 페이로드를 알 수도 있다. 페이로드는 면역조절 분자일 수도 있고, 선천성 면역 반응 또는 적응성 면역 반응 또는 보체 면역계를 방해하거나, 변화시키거나, 자극하거나, 또는 억제할 수도 있다. 페이로드는 단백질, 펩티드 또는 유기 화합물일 수도 있다. 페이로드는 천연 공급원으로부터 분리 또는 유래될 수도 있거나, 클로닝 또는 합성될 수도 있다.

[0164] 그러므로, 일 구현예에서 페이로드는 핵산 또는 핵산 유사체, 치료제, 생물제제, 사이토카인, 케모카인, 호르몬, 성장 인자, 또는 이의 조합으로부터 선택된다.

[0165] 일 구현예에서 페이로드는 사이토카인일 수도 있다. 사이토카인은 대략 5 내지 20 kDa의 소형 단백질인 것으로 당업자에게 알려져 있고, 세포 신호전달에서 중요하다. 예를 들어, 사이토카인은 4-알파-나선 번들 패밀리의 사이토카인, 예컨대 IL-2 서브패밀리, 인터페론 (IFN) 서브패밀리 또는 IL-10 서브패밀리; IL-1 패밀리; 시스테인 노트 사이토카인 예컨대 TGF베타 패밀리; IL-17 패밀리를 의미할 수도 있다. 그러므로, 사이토카인은 바람직하게 IL18, IL18BP, IL1A, IL1B, IL1F10, IL1F3/IL1RA, IL1F5, IL1F6, IL1F7, IL1F8, IL1RL2, IL1F9, IL33, BAFF, 4-1BBL, TNFSF8, CD40LG, CD70, CD95L/CD178, EDA-A1, TNFSF14, LTA/TNFB, LTB, TNF알파, TNFSF10, TNFSF11, TNFSF12, TNFSF13, TNFSF15, TNFSF4, IFNA1, IFNA10, IFNA13, IFNA14, IFNA2, IFNA4, IFNA7, IFNB1, IFNE, IFNG, IFNZ, IFNA8, IFNA5/IFNaG, IFN ω /IFNW1, CLCF1, CNTF, IL11, IL31, IL6, 렙틴, LIF, OSM, IL10, IL19, IL20, IL22, IL24, IL28B, IL28A, IL29, TGF-베타 1/TGFB1, TGF-베타 2/TGFB2, TGF-베타 3/TGFB3으로부터 선택된다. 바람직한 구현예에서 사이토카인은 IL-2 서브패밀리, 인터페론 서브패밀리, IL-10 서브패밀리, IL-1 패밀리, TGF베타 패밀리, 또는 IL-17 패밀리, 또는 이의 조합으로부터 선택되고, 보다 바람직하게 사이토카인은 IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-38, 또는 이의 조합으로부터 선택된다.

[0166] 일 구현예에서 변형된 아포리포단백질은 변형된 아포리포단백질과 IL-1B의 융합 단백질이다. IL-1B는 또한 IL1B, IL-1 β , IL1F2 또는 인터루킨 1 베타로도 알려져 있고, 인간에서 *IL1B* 유전자에 의해 코딩되는 사이토카인이다. 일 구현예에서 변형된 아포리포단백질은 IL-2와 변형된 아포리포단백질의 융합 단백질이다. IL-2는 또한 IL2 TCGF, 림포카인 또는 인터루킨 2로도 알려져 있고, 면역력을 담당하는 백혈구의 활성화를 조절하는 인터루킨이다. 일 구현예에서 변형된 아포리포단백질은 IL-4와 변형된 아포리포단백질의 융합 단백질이다. IL-4는 또한 BSF-1, IL4 또는 인터루킨 4로도 알려져 있고, 미경험 헬퍼 T 세포의 분화를 유도하는 사이토카인이다. 일 구현예에서 변형된 아포리포단백질은 IL-38과 변형된 아포리포단백질의 융합 단백질이다. IL-38은 또한 IL38, IL1F10 인터루킨 38, 인터루킨 1 패밀리 구성원 10 또는 IL1-세타로도 알려져 있고, 인간에서 IL1F10 유전자에 의해 코딩되는 단백질이다.

[0167] 일 구현예에서 페이로드는 케모카인일 수도 있다. 케모카인은 바람직하게 CCL1/TCA3, CCL11, CCL12/MCP-5, CCL13/MCP-4, CCL14, CCL15, CCL16, CCL17/TARC, CCL18, CCL19, CCL2/MCP-1, CCL20, CCL21, CCL22/MDC, CCL23, CCL24, CCL25, CCL26, CCL27, CCL28, CCL3, CCL3L3, CCL4, CCL4L1/LAG-1, CCL5, CCL6, CCL7, CCL8, CCL9, CX3CL1, CXCL1, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCL14, CXCL15, CXCL16, CXCL17, CXCL2/MIP-2, CXCL3, CXCL4, CXCL5, CXCL6, CXCL7/Ppbb, CXCL9, IL8/CXCL8, XCL1, XCL2, FAM19A1, FAM19A2, FAM19A3, FAM19A4 및 FAM19A5로부터 선택된다. 대안적인 구현예에서 케모카인은 CC 케모카인, CXC 케모카인, C 케모카인, CX₃C 케모카인 또는 이의 조합으로부터 선택된다.

[0168] 일 구현예에서 페이로드는 호르몬이다. 호르몬은 생리학 및 행동을 조절하기 위해 원위 장기로 수송되는, 다세포 유기체 내 신호전달 분자로 당업자에게 알려져 있다. 일 구현예에서 호르몬은 아드레날린 (에피네프린으로도 알려짐), 멜라토닌, 노르아드레날린 (노르에피네프린으로도 알려짐), 트리오도티로닌, 티록신, 도파민, 프로스타글란딘, 류코트리엔, 프로스타시클린, 트롬복산, 아밀린 (소도 아밀로이드 폴리펩티드로도 알려짐), 항-윌러관 호르몬 (윌러관-억제 인자/호르몬으로도 알려짐), 아디포넥틴, 부신겉질자극 호르몬 (코르티코트로핀으로도 알려짐), 안지오텐시노젠, 안지오텐신, 항이뇨 호르몬 (바소프레신, 아르기닌 바소프레신으로도 알려짐), 심방 나트륨이뇨 펩티드 (아트리오펩틴으로도 알려짐), 뇌 나트륨이뇨 펩티드, 칼시토닌, 콜레시스토

키닌, 코르티코트로핀-방출 호르몬, 코르티스타틴, 엔케팔린, 엔도텔린, 에리트르포이어틴, 난포-자극 호르몬, 갈라닌, 위 억제성 폴리펩티드, 가스트린, 그렐린, 글루카곤, 글루카곤-유사 펩티드-1, 고나도트로핀-방출 호르몬, 성장 호르몬-방출 호르몬, 헵시딘, 인간 용모막 고나도트로핀, 인간 태반 락토젠, 성장 호르몬, 인히빈, 인슐린, 인슐린-유사 성장 인자 (소마토메딘으로도 알려짐), 렙틴, 리포트로핀, 황체형성 호르몬, 멜라닌세포 자극 호르몬, 모틸린, 오렉신, 오스테오칼신, 옥시토신 (피토신으로도 알려짐), 췌장 폴리펩티드, 부갑상선 호르몬, 뇌하수체 아데닐레이트 시클라제-활성화 펩티드, 프로락틴 (백혈구 생성 호르몬으로도 알려짐), 프로락틴-방출 호르몬, 릴락신, 레닌, 세크레틴, 소마토스타틴 (성장 호르몬-억제 호르몬 또는 성장 호르몬 방출-억제 호르몬 또는 소마토트로핀 방출-억제 인자 또는 소마토트로핀 방출-억제 호르몬으로도 알려짐), 트롬보포이어틴, 갑상선-자극 호르몬 (티로트로핀으로도 알려짐), 티로트로핀-방출 호르몬, 혈관활성 장 펩티드, 구아닐린 또는 우로구아닐린으로부터 선택된다.

[0169] 일 구현예에서 페이로드는 성장 인자이다. 성장 인자는 세포 증식, 상처 치유, 및 때때로 세포 분화를 촉진할 수 있는 천연 발생 물질로서 당업자에게 알려져 있다. 일 구현예에서 성장 인자는 아드레노메둘린 (AM), 안지오펜이어틴 (Ang), 자가분비 운동 인자, 뼈 형태발생 단백질 (BMP), 섬모 신경영양 인자 (CNTF), 백혈병 억제 인자 (LIF), 인터루킨-6 (IL-6), 마크로파지 콜로니-자극 인자 (M-CSF), 과립구 콜로니-자극 인자 (G-CSF), 과립구 마크로파지 콜로니-자극 인자 (GM-CSF), 상피 성장 인자 (EGF), 에프린 A1, 에프린 A2, 에프린 A3, 에프린 A4, 에프린 A5, 에프린 B1, 에프린 B2, 에프린 B3, 에리트르포이어틴 (EPO), 섬유아세포 성장 인자 (FGF), 섬유아세포 성장 인자 1 (FGF1), 섬유아세포 성장 인자 2 (FGF2), 섬유아세포 성장 인자 3 (FGF3), 섬유아세포 성장 인자 4 (FGF4), 섬유아세포 성장 인자 5 (FGF5), 섬유아세포 성장 인자 6 (FGF6), 섬유아세포 성장 인자 7 (FGF7), 섬유아세포 성장 인자 8 (FGF8), 섬유아세포 성장 인자 9 (FGF9), 섬유아세포 성장 인자 10 (FGF10), 섬유아세포 성장 인자 11 (FGF11), 섬유아세포 성장 인자 12(FGF12), 섬유아세포 성장 인자 13(FGF13), 섬유아세포 성장 인자 14 (FGF14), 섬유아세포 성장 인자 15 (FGF15), 섬유아세포 성장 인자 16 (FGF16), 섬유아세포 성장 인자 17 (FGF17), 섬유아세포 성장 인자 18 (FGF18), 섬유아세포 성장 인자 19 (FGF19), 섬유아세포 성장 인자 20 (FGF20), 섬유아세포 성장 인자 21 (FGF21), 섬유아세포 성장 인자 22 (FGF22), 섬유아세포 성장 인자 23 (FGF23), 태아 소 소마토트로핀 (FBS), 신경아교세포주-유래 신경영양 인자 (GDNF), 뉴르투린, 퍼세핀, 아르테민, 성장 분화 인자-9 (GDF9), 간세포 성장 인자 (HGF), 간종양-유래 성장 인자 (HDGF), 인슐린, 인슐린-유사 성장 인자-1 (IGF-1), 인슐린-유사 성장 인자-2 (IGF-2), IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, 케라티노사이트 성장 인자 (KGF), 이동-자극 인자 (MSF), 간세포 성장 인자-유사 단백질 (HGFLP)로도 알려진, 마크로파지-자극 단백질 (MSP), 미오스타틴 (GDF-8), 뉴레굴린 1 (NRG1), 뉴레굴린 2 (NRG2), 뉴레굴린 3 (NRG3), 뉴레굴린 4 (NRG4), 뇌-유래 신경영양 인자 (BDNF), 신경 성장 인자 (NGF), 뉴로트로핀-3 (NT-3), 뉴로트로핀-4 (NT-4), 태반 성장 인자 (PGF), 혈소판-유래 성장 인자 (PDGF), 레날라제 (RNLS) - 항-아프토티시스 생존 인자, T-세포 성장 인자 (TCGF), 트롬보포이어틴 (TPO), 전환 성장 인자, 전환 성장 인자 알파 (TGF- α), 전환 성장 인자 베타 (TGF- β), 종양 괴사 인자-알파 (TNF- α), 혈관 내피 성장 인자 (VEGF), WNT1, WNT2, WNT2B, WNT3, WNT3A, WNT4, WNT5A, WNT5B, WNT6, WNT7A, WNT7B, WNT8A, WNT8B, WNT9A, WNT9B, WNT10A, WNT10B, WNT11 및 WNT16으로부터 선택된다. 바람직한 구현예에서 성장 인자는 VEGF, EGF, CNTF, LIF, 에프린, FGF, GDNF, HDF, HDGF, IGF, KGF, MSF, NRG, BDNF, NGF, 뉴로트로핀, PGF, PDGF, RNLS, TCGF, TGF, TNF, WNT 또는 이의 조합으로부터 선택된다.

[0170] 일 구현예에서 페이로드는 조혈 성장 인자이다. 일 구현예에서, 조혈 성장 인자는 IL-3, CSF-1 (M-CSF), GM-CSF, G-CSF, 인터루킨의 IL-12 패밀리의 구성원 또는 에리트르포이어틴 또는 이의 조합으로부터 선택된다.

[0171] 지질 나노입자

[0172] 본 명세서에 기술된 바와 같은 변형된 아포리포단백질은 단백질로서 또는 지질 나노입자로서 사용될 수도 있다는 것을 고려한다. 상기 기술된 바와 같이, 아포리포단백질은 그 자체로 (지단백질 또는 지질 나노입자에 도입되지 않았다는 의미임) 순환될 수도 있다. 이러한 적용은 페이로드, 예를 들어 사이토카인을 표적 부위로 전달하는데 적합할 수도 있다. 아포리포단백질은 단백질로서 순환될 수도 있지만, 또한 제자리에서 지단백질을 형성할 수도 있다는 것이 알려져 있다. 그러나, 또한 지질 나노입자에 변형된 아포리포단백을 포함하는 것이 유리할 수도 있다. 그러므로, 일 양태에서, 본 발명은 본 명세서에 기술된 바와 같은 하나 이상의 변형된 아포리포단백질을 포함하는 지질 나노입자에 관한 것이다. 임의의 가정에 국한하지 않고, 아포리포단백질, 아포리포단백질 유도체, 아포리포단백질 모방체 또는 아포리포단백질 모방체 유도체는 인지질, 및 스테롤과 함께 나노입자의 형성을 돕기 위한 스캐폴드로서 기능할 수도 있다고 여겨진다.

[0173] 아포리포단백질, 아포리포단백질 유도체, 아포리포단백질 모방체 또는 아포리포단백질 모방체 유도체는 지질 나

노입자 구조의 일부를 형성한다. 특정 구현예에서, 적어도 상기 변형된 아포리포단백질의 적어도 일부는 상기 지질 나노입자를 둘러싼 환경 (즉, 수성 환경)에 노출된다. 전형적으로, 아포리포단백질, 아포리포단백질 유도체, 아포리포단백질 모방체 또는 아포리포단백질 모방체 유도체의 일부는 상기 지질 나노입자를 둘러싼 환경에 노출된다 (예를 들어, 도 2 참조). 더 나아가서, 아포리포단백질, 아포리포단백질 유도체, 아포리포단백질 모방체 또는 아포리포단백질 모방체 유도체에 표적화 바디의 융합은 전형적으로 상기 표적화 바디를 상기 아포리포단백질 지질 나노입자를 둘러싼 환경에 전체적으로 노출될 수 있게 한다 (예를 들어, 도 2 참조).

다른 말로, 특정 구현예에서, 표적화 바디는 지질 나노입자 내에 내포되지 않는다. 이의 결과로서, 상기 표적화 바디는 자유롭게 움직일 수도 있고 이의 천연 기능(들), 예컨대 이의 세포 표적화 기능을 발휘할 수도 있다.

[0174] 특정 구현예에서, 지질 나노입자는 인지질 이중층이 아니다.

[0175] 특정 구현예에서, 인지질은 포스파티딜콜린 (PC), 포스파티딜에탄올아민 (PE), 포스파티딜세린 및 포스파티딜글리세롤 또는 이의 조합으로부터 선택된다. 추가의 특정 구현예에서, 인지질은 1,2-디피타노일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (PHPC), 디라우로일포스파티딜콜린 (DLPC), 디미리스토일포스파티딜콜린 (DMPC), 디팔미토일포스파티딜콜린 (DPPC), 디스테아로일포스파티딜콜린 (DSPC), 디올레오일포스파티딜콜린 (DOPC), 디라우로일포스파티딜글리세롤 (DLPG), 디미리스토일포스파티딜글리세롤 (DMPG), 디팔미토일포스파티딜글리세롤 (DPPG), 디스테아로일포스파티딜글리세롤 (DSPG), 디올레오일포스파티딜글리세롤 (DOPG), 디라우로일 포스파티딜에탄올아민 (DLPE), 디미리스토일 포스파티딜에탄올아민 (DMPE), 디팔미토일 포스파티딜에탄올아민 (DPPE), 디스테아로일 포스파티딜에탄올아민 (DSPE), 디라우로일 포스파티딜세린 (DLPS), 디미리스토일 포스파티딜세린 (DMPS), 디팔미토일 포스파티딜세린 (DPPS), 디스테아로일 포스파티딜세린 (DSPS), 1-팔미토일-2-올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (POPC), 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 (DOPE), 또는 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0176] 특정 구현예에서, 스테롤은 콜레스테롤, 데스모스테롤, 스티그마스테롤, β-시토스테롤, 에르고스테롤, 호파노이드, 히드록시스테로이드, 파이토스테롤, 스테로이드, 수소화 콜레스테롤, 캄페스테롤, 주스테롤, 또는 이의 조합으로부터 선택된다.

[0177] 변형된 아포리포단백질은 또한 페이로드에 결합될 수도 있다. 아포리포단백질은 또한 아포리포단백질 모방체 또는 유도체일 수도 있다. 전형적으로 2개 유형의 나노입자는 원반-유사 나노입자 및 구형 나노입자로 구분될 수 있다. 둘 모두는 본 명세서에 기술된 바와 같이 인지질, 스테롤 및 변형된 아포리포단백질의 외부층을 포함한다. 2개는 구형 나노입자가 실질적으로 수소성 코어를 더 포함하는데 반해서, 원반-유사 나노입자는 코어가 결여되고 결론적으로 원반-유사 형상을 형성한다는 점에서 상이하다. 코어는 전형적으로 지질을 포함할 수도 있지만, 반드시 그렇지 않다. 바람직하게, 지질 나노입자는 구형이다. 구형 나노입자는 예를 들어, 원반-유사 형상 나노입자에 비해서 크기에 의존하는 더 (많은) 융합 단백질의 연결을 가능하게 한다. 더 나아가서, 구형 나노입자는 원반-유사 나노입자와 비교하여, 더 큰 페이로드, 예컨대 mRNA 또는 유전자 편집 성분, 또는 더 많은 양의 페이로드 (예를 들어, 소형 분자 약물 또는 소형 친지성 페이로드의 경우)의 캡슐화를 촉진한다.

[0178] 특정 구현예에서, 지질 나노입자는 페이로드를 포함하고, 지질 나노입자는 표면층에 의해 둘러싸인 코어를 포함하며, 코어는 페이로드를 포함하고, 표면층은 아포리포단백질, 아포리포단백질 유도체, 아포리포단백질 모방체 또는 아포리포단백질 모방체 유도체, 인지질, 표적화 바디, 및 스테롤을 포함한다.

[0179] 일 구현예에서, 본 발명은 외부층 및 임의로 코어를 포함하는 지질 나노입자에 관한 것으로서, 외부층은

[0180] - 인지질;

[0181] - 스테롤; 및

[0182] - 전술한 청구항 중 어느 하나에 정의된 바와 같은 변형된 아포리포단백질을 포함하고, 존재하는 경우에, 코어는 지질, 양이온성 지질, 또는 다가 분자로부터 선택되는 적어도 하나의 코어 성분을 포함한다. 지질 나노입자의 외부층을 언급하는 경우에, 외부층은 본질적으로 추가 성분, 적어도 콜레스테롤 및 변형된 아포리포단백질을 포함하는 인지질 단일층이다.

[0183] 본 명세서에서 사용하는 경우에, 지질 나노입자는 수성 용액 중에서 용해되는 하나 이상의 아포리포단백질 및 스테롤 및 인지질의 조립체를 의미한다. 입자는 지질을 포함할 수도 있고, 이러한 경우에 지질은 인지질 및 스테롤에 의해 캡슐화된다. 나노입자는 추가 성분 예컨대 추가적인 단백질 또는 페이로드를 포함할 수도 있

다. 그러므로, 일 구현예에서 본 명세서에 정의된 바와 같은 지질 나노입자는 지질을 더 포함한다.

[0184] 특정 구현예에서, 지질 나노입자는 본 명세서에 기술된 바와 같은 변형된 아포리포단백질의 일부를 형성하는 아포리포단백질, 아포리포단백질 유도체, 아포리포단백질 모방체 또는 아포리포단백질 모방체 유도체 이외에도, 천연 (예를 들어, 비융합) 아포리포단백질, 아포리포단백질 유도체, 아포리포단백질 모방체 또는 아포리포단백질 모방체 유도체를 포함한다. 추가 구현예에서, 본 명세서에 정의된 바와 같은 지질 나노입자는 상기 본 명세서에 정의된 바와 같은 페이로드를 더 포함한다. 페이로드는 예를 들어 약학 화합물일 수도 있다. 지질 나노입자 코어는 친지성 페이로드로 특히 적합하지만, 양친매성 분자에 사용될 수도 있다. 약학 화합물은 유기 화합물, 펩티드, 단백질, 핵산 또는 핵산 유사체, 생물체제 또는 지질일 수도 있다. 그러므로, 일 구현예에서 지질 나노입자는 페이로드를 더 포함하고, 바람직하게 페이로드는 핵산 또는 핵산 유사체, 치료제, 생물체제 또는 이의 조합으로부터 선택된다. 대안적으로 페이로드는 지질 나노입자의 외부층, 예를 들어 (변형된) 아포리포단백질에 결합할 수도 있거나, 또는 페이로드는 인지질 층에 포함될 수도 있다.

[0185] 예를 들어, 페이로드는 핵산 또는 핵산 유사체일 수도 있다. 예는 mRNA, siRNA, sgRNA, miRNA, piRNA, snRNA, snoRNA, srRNA 또는 tsRNA일 수도 있지만, 이에 제한되지 않는다. 핵산 유사체는 펩티드 핵산 (PNA), 모르폴리노 및 잠금 핵산 (LNA)을 비롯하여, 글리콜 핵산 (GNA), 트레오스 핵산 (TNA) 및 핵시톨 핵산 (HNA), 또는 이의 혼합물 또는 조합일 수도 있다. 핵산 페이로드가 나노입자의 친지성 코어에 포함되는 경우에, 핵산의 하전된 골격은 예를 들어 양이온성 지질에 의해 중화되는 것이 필요하다는 것을 이해한다.

[0186] 일정 구현예에서, 지질 나노입자는 핵산 및 양이온성 또는 이온화가능한 양이온성 지질을 포함한다.

[0187] 일정 구현예에서, 핵산 및 양이온성 또는 이온화가능한 양이온성 지질은 코어에 포함되고, 변형된 아포리포단백질 및 인지질은 외부층에 포함된다.

[0188] 따라서, 본 발명은 또한 외부층 및 코어를 포함하는 지질 나노입자를 포괄하고, 외부층은

[0189] - 인지질;

[0190] - 스테롤; 및

[0191] - 본 명세서에 교시된 바와 같은 변형된 아포리포단백질을 포함하고,

[0192] 코어는 핵산 및 양이온성 또는 이온화가능한 양이온성 지질을 포함한다.

[0193] 이러한 종류의 아포리포단백질 입자를 함유하는 핵산은 WO/2022/268913에 기술되어 있고, 이의 전체 내용은 본 명세서에 참조로 편입된다. 나노입자는 소수성 나노입자 코어로 핵산을 유인하기 위한 헬퍼 분자를 사용하여, 자연계에서 친수성인, 핵산이 복합체화되도록 조작된다. 이러한 목적을 위해서, 양이온성 소수성 분자가 적용된다. 양이온성 기는 이온성 상호작용을 통해서 당 포스페이트 골격의 음이온성 포스페이트 기와 복합체화될 수 있다. 헬퍼 분자의 소수성 부분은 친수성 핵산 분자 주변에서 셸을 형성한다. 양이온성 헬퍼 분자는 영구적으로 하전되거나 또는 이온화가능할 수 있다. 그들은 상업적으로 입수가능하거나 또는 내부에서 합성되는 다양한 분자를 포함하지만, 그들은 다음의 2개 일반 기준을 준수할 필요가 있다: 1) 음으로 하전된 당 포스페이트 골격과 복합체화될 수 있는 양으로 하전된 기. 2) 소수성 셸을 형성할 수 있고 나노입자 코어에 통합될 수 있는 소수성 부분. 나노입자 체제 중에서 양이온성 재료의 함량은 양이온성 대 음이온성 비가 1:1 내지 25:1의 범위일 수도 있다. 종종 N/P (질소/포스페이트) 비라고 하는, 이러한 비는 (이온화가능한) 양이온성 지질 (종종 질소-기반) 중 양전하의 수 대 핵산 페이로드 (일반적으로 포스페이트) 중 음전하의 수를 기반으로 한다. 따라서, N/P 비는 양이온성 또는 이온화가능한 지질 성분(들) (N) 중 양이온성 및/또는 이온화가능한 기의 누적 몰량과 핵산 성분(들) (P) 중 포스페이트 기의 누적 몰량 간 비이다. 특정 구현예에서, 본 명세서에 교시된 바와 같은 나노입자의 N/P 비는 1 내지 25, 1 내지 20, 1 내지 15, 1 내지 12, 1 내지 9, 1 내지 6, 또는 1 내지 3이다. 예를 들어, 본 명세서에 교시된 바와 같은 N/P 비는 3, 6, 9 또는 12일 수도 있다.

[0194] 이론에 국한하지 않지만, 본 발명자는 본 명세서에 기술된 핵산-함유 나노입자가 주로 변형된 아포리포단백질, 인지질 및 선택적 스테롤을 포함하는 외부층, 및 양이온성 또는 이온화가능한 양이온성 지질 및 핵산을 포함하는 코어를 갖는다고 여긴다. 보다 특히, 나노입자의 코어는 (이온화가능한) 양이온성 지질과 상호작용하는 핵산의 조립체를 포함하고, 나노입자의 코어는 변형된 아포리포단백질, 인지질 및 선택적 스테롤을 포함하거나, 그로 본질적으로 이루어지거나, 또는 그로 이루어지는 지질 셸에 의해 둘러싸인다. 이러한 이해에 따라서, 핵산은 나노입자 내 (즉, 내부)에 위치되고, 나노입자의 외부 표면에 위치되지 않고/않거나 나노입자의 주변에

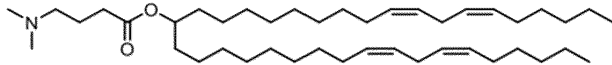
노출되지 않는다. 특정 구현예에서, 본 발명의 나노입자의 페이로드 (즉, 핵산)는 입자의 외부 (표면)에서 이온성 상호작용에 의해 결합되지 않는다. 입자의 외부 표면에 핵산의 결합은 핵산이 바로 주변에 노출된 채로 남아서, 아마도 입자를 보다 독성으로 만들뿐만 아니라 핵산 페이로드의 빠른 (생)분해를 초래하게 되므로 바람직하지 않다. 이러한 이해에 따라서, 변형된 아포리포단백질은 나노입자의 외부 표면에 위치되고/되거나 나노입자 주변에 노출된다.

- [0195] 나노입자의 코어는 고체일 수도 있고 코어에 상당한 수성 공극 또는 저장소를 갖지 않거나 또는 보유하지 않는다. 특정 구현예에서, 나노입자의 코어는 비수성이다.
- [0196] 일정 구현예에서, 나노입자의 코어는 지질 이중층이 둘러싸지 않는데, 예컨대 수성 코어를 둘러싼 지질 이중층과 소포-유사 또는 리포솜 입자에 존재한다.
- [0197] 특정 구현예에서, 나노입자는 합성 (비-천연) 친수성 중합체 또는 이러한 중합체, 예컨대 가장 특히 폴리에틸렌-글리콜 (PEG)의 (지질) 접합체를 포함하지 않는다. 이의 결과로서, 이러한 나노입자는 특히 반복된 투여 시에, 원치않는 면역 반응을 유발하지 않는다.
- [0198] 일정 구현예에서, 나노입자 코어는 충전제, 바람직하게 트리아실글리세리드 및 콜레스테롤 아실 에스테르, 또는 이의 조합으로부터 선택되는 충전제를 더 포함하고, 예컨대 트리아실글리세리드는 트리카프릴린이고/이거나, 콜레스테롤 아실 에스테르는 콜레스테릴 카프릴레이트 및/또는 콜레스테릴 올레이트이다. 콜레스테릴 아세테이트는 또한 충전제 재료로서 적용될 수 있다. 적용될 수 있는 또 다른 재료는 C1-C18 카르복실산, 바람직하게 C6-C18 지방산으로부터 유래되는 디글리세리드 또는 트리글리세리드 또는 다른 에스테르이고, 이들 카르복실산 및 지방산은 포화될 수도 있거나 또는 불포화될 수도 있다. 바람직하게, 충전제는 C6-C18 지방산으로부터 유래된 트리글리세리드이고 이것이 바람직하다. 핵산 및 양이온성 헬퍼 분자 이외에도, 추가적인 소수성 충전제 분자는 나노입자 제제의 코어에 포함될 수 있다. 그들의 주요한 적용은 나노입자 물리화학적 성질을 변경시키고/시키거나 안정성을 개선시키는 것이다.
- [0199] 일정 구현예에서, 핵산은 RNA, DNA 또는 핵산 유사체이다.
- [0200] 일정 구현예에서, RNA는 마이크로RNA (miRNA), 소형 간섭 RNA (siRNA), 피위-상호작용 RNA (piRNA), 소형 핵 RNA (snRNA), 소형 핵소체 RNA (snoRNA), 전달 RNA (tRNA), tRNA-유래 소형 RNA (tsRNA), 소형 조절 RNA (srRNA), 메신저 RNA (mRNA), 변형된 mRNA, 리보솜 RNA (rRNA), 긴 비-코딩 RNA (lncRNA), 또는 가이드 RNA (gRNA), 또는 이의 조합 및/또는 이의 변형이다.
- [0201] 일정 구현예에서, DNA는 단일 가닥 또는 이중 가닥 DNA이다.
- [0202] 일정 구현예에서, 핵산은 안티센스 올리고뉴클레오티드이고, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 포스포디에스테르 골격 또는 2' 리보스의 변형을 함유하는 뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드 유사체로 이루어지는 단일 가닥 DNA 또는 RNA이다.
- [0203] 일정 구현예에서, 뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드 유사체는 잠금 핵산 (LNA), 가교 핵산 (BNA), 모르폴리노 또는 펩티드 핵산 (PNA), 글리콜 핵산 (GNA), 트레오스 핵산 (TNA), 헥시톨 핵산 (HNA), 또는 이의 혼합물 또는 조합으로부터 선택된다.
- [0204] 일정 구현예에서, 핵산은 접합되고, 핵산 접합체는 본 발명의 나노입자에 도입된다. 핵산 접합체는 예를 들어 인지질 또는 스테롤 예컨대 콜레스테롤 또는 소수성 알킬 사슬과의 지질 접합체를 포함한다. 핵산 접합체는 또한 올리고머 또는 중합체와의 접합체를 포함한다. 바람직하게, 이들 올리고머 또는 중합체는 소수성 성질이다.
- [0205] 일정 구현예에서, 핵산은 그대로 또는 나노입자 내에서 "그 자체로" 도입되며, 핵산이 접합되지 않는다는 것을 의미한다.
- [0206] 본 명세서에서 사용되는 용어 이온화가능한 양이온성 지질은 생리적 pH (예를 들어, pH 7 내지 7.5, 바람직하게 pH 7.3 내지 7.5, 예컨대 -pH 7.4)에서 중성 전하를 갖고 낮은 pH (예를 들어, pH 1 내지 5, 바람직하게 pH 1 내지 4, 예컨대 pH 4)에서 양자화되거나 또는 양으로 하전되는 지질을 의미한다. 이온화가능한 양이온성 지질은 그들이 낮은 pH에서 양자화될 수 있고, 따라서 친수성 핵산에 대한 결합을 촉진할 수도 있으므로 특히 유용하다는 것을 이해한다. 후속적으로 pH를 상승시켜서, 지질은 (부분적으로) 중성이 될 수 있고, 소수성 환경, 예를 들어 나노입자의 소수성 코어로의 포함을 더 촉진할 수도 있다. 대안적으로, 이론에 국한하지 않고, 이온화가능한 지질은 주변 수성 용액의 pH가 인지질, 임의로 스테롤, 및 변형된 아포리포단백질을 포함하는

나노입자의 표면층의 작용에 기인하고/하거나, 나노입자 내 비수성 환경에 기인하여서, 생리적 pH, 예컨대 약 7.4로 상승되었더라도, 나노입자 내에서 양으로 하전된 채로 남아있을 수도 있다. 또한, 이온화가능한 양이온성 지질은 표적 세포에서 핵산의 엔도솜 탈출을 촉진한다고 이론화되어 있는데, 낮은 pH로 인해서, 이온화가능한 양이온성 지질이 양자화될 것이다.

[0207] 이온화가능한 양이온성 지질의 비제한적인 예는 DLin-DMA (2-[2,2-비스(옥타데카-9,12-디에닐)-1,3-디옥솔란-4-일]-N,N-디메틸에탄아민), DLin-KC2-DMA (2-[2,2-비스[(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디에닐]-1,3-디옥솔란-4-일]-N,N-디메틸에탄아민) 및 하기 화학식 1로 표시되는 DLin-MC3-DMA ([[(6Z,9Z,28Z,31Z)-헵타트리아콘타-6,9,28,31-테트라엔-19-일] 4-(디메틸아미노)부타노에이트]이다:

[0208] 화학식 1

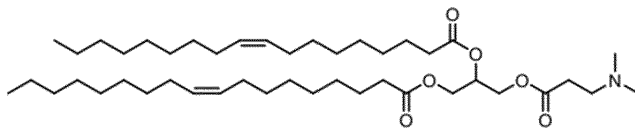


[0209]

[0210] 실제로, 다양한 일련의 이온화가능한 양이온성 지질이 개발되어서 문헌에 보고되어 있기 때문에, 광범위한 이온화가능한 양이온성 지질 (리피도이드 포함)이 본 발명의 나노입자를 제조하는데 적용될 수 있다. 추가의 비제한적인 예는 분자 cKK-E12, C12-200, L319, Acuitas-A9, Moderna-L5, TT3 및 ssPalmE (예를 들어, [Witzigmann et al., Advanced Drug Delivery Reviews 159 (2020) 344-363; doi.org/10.1016/j.addr.2020.06.026에 기술된 바와 같음)를 포함한다.

[0211] 이온화가능한 지질은 또한 이온화가능한 트리글리세리드일 수도 있다. 비제한적인 예는 하기 화학식 2로 표시되는 화합물이다:

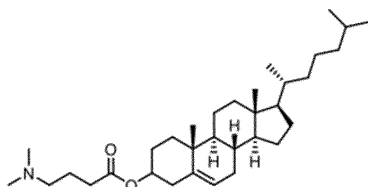
[0212] 화학식 2



[0213]

[0214] 이온화가능한 지질은 또한 콜레스테롤 에스테르 (콜레스테릴 에스테르라고도 함)일 수도 있다. 비제한적인 예는 하기 화학식 3으로 표시된다:

[0215] 화학식 3



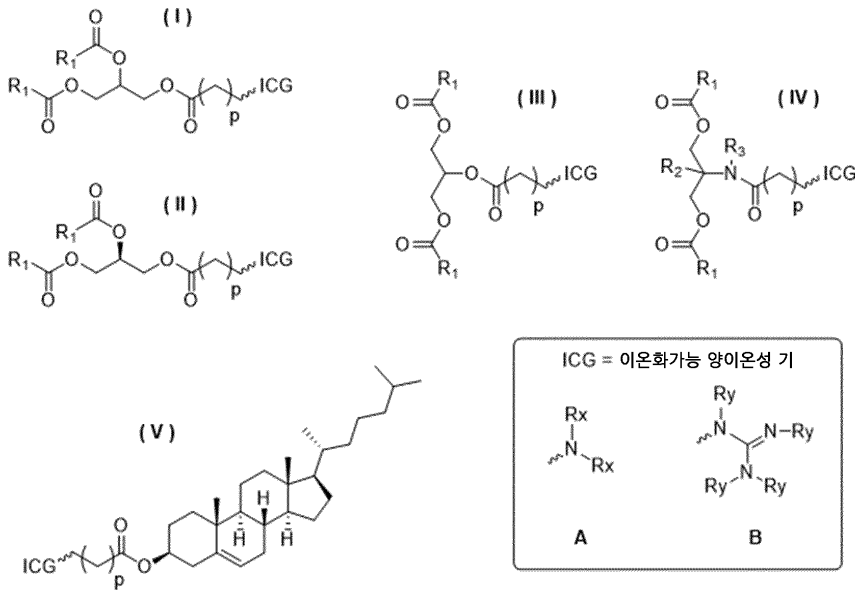
[0216]

[0217] 본 명세서에서 사용되는 경우에, 용어 양이온성 지질은 생리적 pH (예를 들어, pH 7.4)에서 양으로 하전된 지질을 의미한다. 양이온성 지질의 비제한적인 예에는 DOTMA (1,2-디-O-옥타데세닐-3-트리메틸암모늄 프로판), DOGS (2,5-비스(3-아미노프로필아미노)-N-[2-[디(헵타데실)아미노]-2-옥소에틸]펜탄아미드), DOSPA (2-[3-[4-(3-아미노프로필아미노)부틸아미노]프로필카바모일아미노]에틸-[2,3-비스[(Z)-옥타데크-9-에노일]옥시]프로필]-디메틸아자늄) 및 DOTAP (1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄-프로판)이 있다. 다른 예는 3차 아민 모이어티가 4차 암모늄 모이어티, 예를 들어 알킬화에 의해서, 예컨대 메틸화 (-Me), 에틸화 (-Et), 벤질화 (-Bn) 또는 에톡실화 (-CH₂CH₂-OH)에 의해서, 4차 암모늄 모이어티로 전환된 것인 임의의 이온화가능한 양이온성 지질 성분을 포함한다. 최종 4차 암모늄 분자는 영구적으로 양 (양이온성) 전하를 갖고, 따라서, 또한 반대 음이온, 예를 들어, 클로라이드 음이온을 보유한다.

[0218] 일 구현예에서, 단지 이온화가능한 양이온성 지질이 본 명세서에 교시된 바와 같은 핵산-함유 나노입자를 제조하는데 사용된다. 따라서, 일 구현예에서, 본 명세서에 교시된 바와 같은 나노입자는 양이온성 지질을 포함하지 않는다.

- [0219] 일 구현예에서, 단지 양이온성 지질이 본 명세서에 교시된 바와 같은 핵산-함유 나노입자를 제조하는데 사용된다. 따라서, 일 구현예에서, 본 명세서에 교시된 바와 같은 나노입자는 이온화가능한 양이온성 지질을 포함하지 않는다.
- [0220] 일 구현예에서, 이온화가능한 양이온성 지질 및 양이온성 지질의 조합이 본 명세서에 교시된 바와 같은 핵산-함유 나노입자를 제조하는데 사용된다.
- [0221] 본 명세서에 교시된 바와 같은 핵산-함유 나노입자를 언급할 때, 용어 "페이로드"는 특히 바람직하게 양이온성 및/또는 이온화가능한 양이온성 지질과 조합된, 핵산을 의미한다.
- [0222] 용어 "지질"은 당분야에 공지되어 있고, 본 명세서에서 사용시, 특히 양쪽 지질, 즉 천연 발생 소수성 생물분자 예컨대 예를 들어 지방산, 지방산의 모노-, 디- 또는 트리글리세리드, 스테롤 (유도체) 또는 인지질, 및 지질-유사 생물분자를 포괄하는 것으로 여겨질 수도 있다. 본 명세서에 기술된 양이온성 지질 또는 이온화가능한 양이온성 지질 (또는 리피도이드)은 전형적으로 이 용어의 가장 협소한 해석 내에서 지질, 즉 천연 발생 소수성 생물분자 예컨대 예를 들어 지방산, 지방산의 모노-, 디- 또는 트리글리세리드, 스테롤 (유도체) 또는 인지질은 아니지만, 지질 생물분자를 닮은 지질-유사 생물분자이며, 다시 말해 그들은 바람직하게 생체적합성 (예컨대, 예를 들어 에스테르 또는 아마이드)이고/이거나, 천연 발생 빌딩 블록 (예를 들어, 지방산, 글리세롤, 콜레스테롤)을 사용하여 구축되는 기를 함유한다는 것을 유의한다.
- [0223] 일정 구현예에서, 양이온성 또는 이온화가능한 양이온성 지질은 장쇄 알콜의 이온화가능한 양이온성 에스테르, 디글리세리드의 이온화가능한 양이온성 에스테르 또는 스테롤의 이온화가능한 양이온성 에스테르 또는 이의 조합으로부터 선택된다
- [0224] 장쇄 알콜의 이온화가능한 양이온성 에스테르는 예를 들어 화학식 $(CH_3)_2N(CH_2)_nCOOH$ (식에서, n은 1 이상의 정수이고, 예를 들어 n은 1 내지 12임)을 갖는 화합물과 같이 카르복실 기를 갖는 3차 아민의 에스테르일 수 있고; 예를 들어 3-디메틸아미노-프로피온산 또는 4-디메틸아미노-부티르산 또는 5-디메틸아미노-펜탄산일 수도 있다. 에스테르는 장쇄 알콜에 의해 형성된다. 장쇄 알콜은 바람직하게 8개 이상의 탄소 원자, 예를 들어 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20개 이상의 탄소 원자의 직쇄 또는 분지쇄 길이를 갖는 1차 또는 2차 알콜이다.
- [0225] 디글리세리드의 이온화가능한 양이온성 에스테르는 바람직하게 화학식 $(CH_3)_2N(CH_2)_nCOOH$ (식에서, n은 1 이상의 정수이고, 예를 들어 n은 1 내지 12임)을 갖는 화합물과 같이 카르복실 기를 갖는 3차 아민과 1 또는 2 위치에 커플링된 디아실 글리세롤 (즉, 디글리세리드)이고; 예를 들어 3-디메틸아미노-프로피온산 또는 4-디메틸아미노-부티르산 또는 5-디메틸아미노-펜탄산이다. 디아실 글리세롤은 중간쇄 또는 장쇄 포화 또는 불포화 지방산 또는 유도체 또는 이의 변형을 포함할 수도 있다.
- [0226] 스테롤의 이온화가능한 양이온성 에스테르는 바람직하게 화학식 $(CH_3)_2N(CH_2)_nCOOH$ (식에서, n은 1 이상의 정수이고, 예를 들어 n은 1 내지 12임)을 갖는 화합물과 같이 카르복실 기를 갖는 3차 아민과 히드록실 기에서 커플링된 스테롤의 에스테르이고; 예를 들어 3-디메틸아미노-프로피온산 또는 4-디메틸아미노-부티르산 또는 5-디메틸아미노-펜탄산이다. 스테롤은 콜레스테롤, 스티그마스테롤 또는 β -시토스테롤일 수도 있다.
- [0227] 상기에서, 카르복시 화합물은 화학식 $(CH_3)_2N(CH_2)_nCOOH$ 으로 표시되고, 식에서 n은 1 이상의 정수이다. 이러한 화합물 대신에, 대안적인 화합물은 화학식 $NH_2-(C=NH)-NH-(CH_2)_nCOOH$ 을 갖는 것이 적용될 수 있고, 식에서 n은 1 이상의 정수이고, 예를 들어 n은 1 내지 12이다. 이러한 카르복시 화합물은 3차 아민 기 대신에 구아니딘 기를 포함한다.

[0228] 이온화가능한 양이온성 지질은 예를 들어 하기 화학식 (I) 내지 (V)에 따른 분자로부터 선택될 수 있다.



[0229]

[0230] 화학식 (I)은 이온화가능한 양이온성 기 (ICG)가 1-위치에서 포함된 것인 트리글리세리드를 나타낸다.

[0231] 화학식 (II)는 분자가 천연 발생 입체형태에서 입체-특이적으로 정의되지만, 화학식 (I)로 표시되는 바와 같은 동일 유형의 트리글리세리드를 나타내는데, 다시 말해서, 인지질에서 처럼, ICG 기는 인지질에서 포스페이트 기와 동일한 위치에 있다.

[0232] 화학식 (III)은 이온화가능한 양이온성 기 (ICG)가 2-위치에 포함되는 것인 트리글리세리드를 나타낸다.

[0233] 화학식 (IV)는 이온화가능한 양이온성 기 (ICG)가 아마이드 작용성을 통해 연결된 것인 디-에스테르 (또는 트리-에스테르)를 나타낸다.

[0234] 화학식 (V)는 이온화가능한 양이온성 기 (ICG)가 에스테르 작용성을 통해서 연결된 것인 콜레스테릴 에스테르를 나타낸다.

[0235] 이온화가능한 양이온성 기 (ICG)는 임의의 화학식 (I) 내지 (V)에서 분자의 나머지에 물결선 결합을 통해 연결되며, ICG는 3차 아민 (ICG 유형 A, 또는 ICG-A)을 나타낼 수 있거나 또는 구아니딘 (ICG 유형 B, 또는 ICG-B)을 나타낼 수 있다.

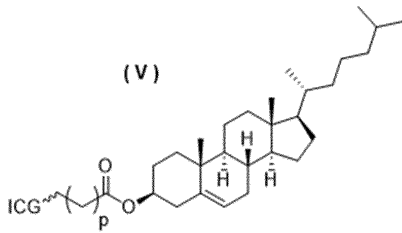
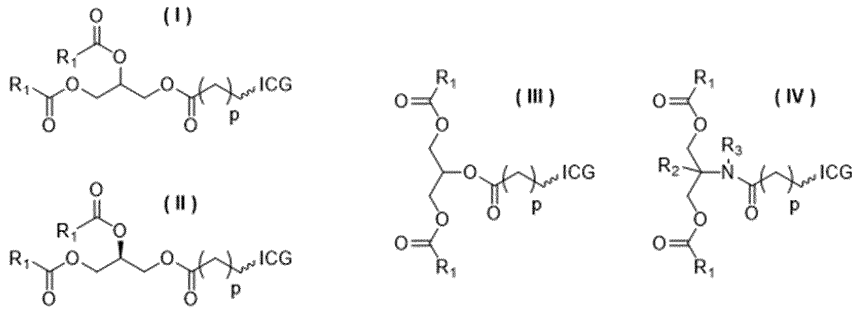
[0236] 화학식 (I) 내지 (IV)에서, R₁은 모든 위치에 대해 독립적으로 선택될 수 있고, 선형 또는 분지형 C1-C19 알킬, 선형 또는 분지형 C1-C19 알케닐, 아릴, 아릴렌-알킬 또는 알킬렌-아릴 기를 나타내며, 상기 알킬 또는 알케닐 기는 임의로 0 및 N으로부터 독립적으로 선택되는 5개 이중원자를 함유한다. 바람직하게, 화학식 (I) 내지 (IV)에 따라서는 따라서 특정 분자 내에서 모든 R₁-기는 동일한 R₁ 기이다. 바람직하게, R₁ 기는 선형 또는 분지형 C5-C19 알킬 기, 또는 선형 또는 분지형 C5-C19 알케닐 기이다. R₁이 알케닐 기일 때, 이 기는 바람직하게 오직 하나의 단일 이중 결합만을 갖는다. 보다 바람직하게, R₁ 기는 선형 또는 분지형 C9-C17 알킬 기 또는 선형 또는 분지형 C5-C17 알케닐 기이다. 바람직하게 R₁은 선형 C5-C15 알킬 기 또는 선형 C17-C19 알케닐이다. R₁로부터 유래되는 카르복실산, 즉 R₁-COOH는 바람직하게 천연 발생 지방산 분자 예컨대 카프르산, 라우르산, 미리스트산, 팔미트산, 스테아르산, 팔미트산, 올레산 또는 리놀레산이다. 바람직한 것인 C10-C16 포화 지방산을 비롯하여, 올레산 (C18, 불포화)이다.

[0237] 정수 p는 이산적 수이고 평균 값이 아니고, p는 0 내지 11일 수 있다. 바람직하게, p는 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 또는 9이다. 보다 바람직하게, p는 1, 2, 3 또는 4이다.

[0238] 화학식 (IV)에서 R₂ 기는 수소, 메틸, 에틸 및 -CH₂-O-C(O)-R_{1a} 기 (여기서, R_{1a}는 상기 정의된 R₁과 동일한 의미를 가짐)로부터 선택될 수 있다. 바람직하게, R₂는 수소, 메틸 또는 -CH₂-O-C(O)-R₁ 기이다. 보다 바람

직하게, R₂는 메틸이다.

- [0239] 화학식 (IV)에서 R₃ 기는 수소, 아릴, 아릴렌-알킬, 알킬렌-아릴 또는 선형 C1-C6 알킬 기로부터 선택될 수 있다. 바람직하게, R₃은 수소 또는 메틸이다. 보다 바람직하게, R₃은 수소이다.
- [0240] ICG-A에서 R_x 기는 모든 위치에 대해 독립적으로 선택될 수 있고, 메틸, 에틸, 프로필 및 에틸렌-히드록시 (-CH₂-CH₂-OH) 기로부터 선택되고, 바람직하게 메틸 기이다. 바람직하게, ICG-A에서 양쪽 R_x 기는 동일한 기이고, 바람직하게 그들은 메틸 기이다.
- [0241] ICG-B에서 R_y 기는 모든 위치에 대해서 수소, 선형 또는 분지형 C1-C18 알킬, 아릴, 아릴렌-알킬 또는 알킬렌-아릴 기로부터 독립적으로 선택될 수 있고, 상기 알킬 기는 임의로 0 및 N으로부터 독립적으로 선택되는 최대 5개 이중원자를 함유한다. 바람직하게, R_y 기는 수소 및 선형 C1-C6 알킬 기로부터 선택된다. 보다 더 바람직하게, R_y 기는 수소이다. 바람직하게, ICG-B에서 모든 4개 R_y-기는 동일한 기이고, 바람직하게 그들은 수소이다.
- [0242] 화학식 (I) 내지 (V), 화학식 (I), (II) 및 (IV)가 바람직하다. 보다 바람직하게는 화학식 (I) 및 (II)이다.
- [0243] ICG로서 ICG-A 및 ICG-B에서, ICG-A가 바람직한데, 다시 말해 3차 아민 이온화가능한 양이온성 지질이 바람직하다.
- [0244] 화학식 (I) 내지 (V) 중 어느 하나에 따른 이온화가능한 양이온성 지질 분자는 250 달톤 초과, 바람직하게 350 달톤 초과, 보다 바람직하게 450 달톤 초과인 분자량을 갖는다. 이것은 3000 달톤 미만, 바람직하게 1800 달톤 미만, 보다 바람직하게 1200 달톤 미만인 분자량을 갖는다.
- [0245] 화학식 (I) 내지 (V)로 표시되는 분자는 다양한 이성질체 형태, 예컨대 회전이성질체, 호변이성질체, 입체이성질체 또는 위치이성질체로 존재할 수도 있고, 이들 모두는 본 발명의 범주 내에 포함된다.
- [0246] 화학식 (I) 내지 (V) 중 어느 하나에 따른 이온화가능한 양이온성 지질은 바람직하게 단일 화합물이고, 다시 말해서 화합물의 혼합물이 아니다. 따라서, 화학식 (I) 내지 (V)의 이온화가능한 양이온성 지질의 순도는 바람직하게 50% 이상, 바람직하게 80% 이상, 보다 바람직하게 90% 이상, 가장 바람직하게 95% 이상이다. 이온화가능한 양이온성 지질이 화합물의 혼합물인 경우라면, 이것은 바람직하게 오직 분자 내 미정의된 입체-중심의 존재에 기인하는 것이다. 예에는 라세믹 기원인 이온화가능한 양이온성 지질에서 분지형 알킬 사슬의 사용이다. 다른 예는 트리글리세리드로서, 글리세롤 독립체 중 3개 히드록실-기에 대한 치환 패턴은 입체-특이적으로 정의되지 않는다.
- [0247] 따라서, 일정 구현예에서, 이온화가능한 양이온성 지질은 하기 화학식 (I), (II), (III), (IV) 또는 (V) 중 어느 하나에 따른 분자 또는 이의 회전이성질체, 호변이성질체 입체이성질체 또는 위치이성질체이다:



[0248]

[0249]

식에서, ICG는 또는 이고, 물결선은 화학식 (I), (II), (III), (IV) 또는 (V)의 화합물에 대한 부착 지점을 표시하고;

[0250]

p는 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 및 11로부터 선택되는 정수이고;

[0251]

각각의 R₁은 선형 또는 분지형 C₁-C₁₉ 알킬, 선형 또는 분지형 C₁-C₁₉ 알케닐, 아릴, 아릴렌-알킬 및 알킬렌-아릴 기로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고, 상기 알킬 또는 알케닐 기는 임의로 0 및 N으로부터 독립적으로 선택되는 최대 5개 이중원자를 함유하고;

[0252]

R₂는 수소, 메틸, 에틸 및 -CH₂-O-C(O)-R_{1a}로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0253]

R₃는 수소, 아릴, 아릴렌-알킬, 알킬렌-아릴 및 선형 C₁-C₆ 알킬 기로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0254]

R_{1a}는 선형 또는 분지형 C₁-C₁₉ 알킬, 선형 또는 분지형 C₁-C₁₉ 알케닐, 아릴, 아릴렌-알킬 및 알킬렌-아릴 기로 이루어진 군으로부터 선택되고, 상기 알킬 또는 알케닐 기는 임의로 0 및 N으로부터 독립적으로 선택되는 최대 5개 이중원자를 함유하고;

[0255]

각각의 R_x는 메틸, 에틸, 프로필 및 -CH₂-CH₂-OH로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;

[0256]

각각의 R_y 기는 수소, 선형 또는 분지형 C₁-C₁₈ 알킬, 아릴, 아릴렌-알킬 또는 알킬렌-아릴 기로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고, 상기 알킬 기는 임의로 0 및 N으로부터 독립적으로 선택되는 최대 5개 이중원자를 함유한다.

[0257]

용어 "알킬"은 그 자체로서 또는 다른 치환기의 일부로서 화학식 C_nH_{2n+1} (식에서, n은 1 이상의 수임)의 히드로카르빌 기를 의미한다. 알킬 기는 선형 또는 분지형일 수도 있고, 본 명세서에 표시된 바와 같이 치환될 수도 있다. 일반적으로, 본 발명의 알킬 기는 1 내지 18개 탄소 원자, 바람직하게 1 내지 17개 탄소 원자, 바람직하게 1 내지 15개 탄소 원자, 바람직하게 1 내지 6개 탄소 원자, 바람직하게 1 내지 5개 탄소 원자, 바람직하게 1 내지 4개 탄소 원자, 보다 바람직하게 1 내지 3개 탄소 원자, 여전히 보다 바람직하게 1 내지 2개 탄소 원자를 포함한다. 탄소 원자 뒤에 아래 첨자가 사용되는 경우에 첨자는 명명된 기가 함유할 수도 있는 탄소 원자의 수를 의미한다. 예를 들어, 기로서 또는 기의 일부로서, 용어 "C₁₋₆ 알킬"은 화학식 -C_nH_{2n+1} (식에서, n은 1 내지 6 범위의 수임)의 히드로카르빌 기를 의미한다. 따라서, 예를 들어, "C₁₋₆ 알킬"은 1개와 6개 사이의 탄소 원자를 갖는 모든 선형 또는 분지형 알킬 기를 포함하고, 따라서 메틸, 에틸, n-프로필, i-프로필,

부틸 및 이의 이성질체 (예를 들어, n-부틸, i-부틸 및 t-부틸); 펜틸 및 이의 이성질체, 헥실 및 이의 이성질체를 포함한다. 예를 들어, "C₁₋₅ 알킬"은 모두 1개와 5개 사이의 탄소 원자를 갖는 모든 선형 또는 분지형 알킬 기를 포함하고, 따라서, 메틸, 에틸, n-프로필, i-프로필, 부틸 및 이의 이성질체 (예를 들어, n-부틸, i-부틸 및 t-부틸); 펜틸 및 이의 이성질체를 포함한다. 예를 들어, "C₁₋₄ 알킬"은 1개와 4개 사이의 탄소 원자를 갖는 모든 선형 또는 분지형 알킬 기를 포함하고, 따라서 메틸, 에틸, n-프로필, i-프로필, 부틸 및 이의 이성질체 (예를 들어, n-부틸, i-부틸 및 t-부틸)를 포함한다. 예를 들어 "C₁₋₃ 알킬"은 1개와 3개 탄소 원자를 갖는 모든 선형 또는 분지형 알킬 기를 포함하고, 따라서 메틸, 에틸, n-프로필, i-프로필을 포함한다.

[0258] 접미사 "엔"이 알킬 기, 즉 "알킬렌"과 함께 사용되는 경우에, 이것은 다른 기에 대한 부착 지점으로서 2개 단일 결합을 갖는 본 명세서에 정의된 바와 같은 알킬 기를 의미하고자 한다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "C₁₋₆ 알킬렌"은 그 자체로 또는 다른 치환기의 일부로서, 2가, 즉 2개 다른 기에 부착을 위한 2개 단일 결합을 갖는 C₁₋₆ 알킬 기를 의미한다. 알킬렌 기는 선형 또는 분지형일 수도 있고, 본 명세서에 표시된 바와 같이 치환될 수도 있다. 알킬렌 기의 비제한적인 예는 메틸렌 (-CH₂-), 에틸렌 (-CH₂-CH₂-), 메틸메틸렌 (-CH(CH₃)-), 1-메틸-에틸렌 (-CH(CH₃)-CH₂-), n-프로필렌 (-CH₂-CH₂-CH₂-), 2-메틸프로필렌 (-CH₂-CH(CH₃)-CH₂-), 3-메틸프로필렌 (-CH₂-CH₂-CH(CH₃)-), n-부틸렌 (-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-), 2-메틸부틸렌 (-CH₂-CH(CH₃)-CH₂-CH₂-), 4-메틸부틸렌 (-CH₂-CH₂-CH₂-CH(CH₃)-), 펜틸렌 및 이의 사슬 이성질체, 헥실렌 및 이의 사슬 이성질체를 포함한다.

[0259] 기로서 또는 기의 일부로서 용어 "알케닐"은 하나 이상의 탄소-탄소 이중 결합을 포함하는, 선형 또는 분지형일 수도 있는 불포화 히드록아르빌 기를 의미한다. 본 명세서에서 탄소 원자 뒤에 아래 첨자가 사용되는 경우에, 첨자는 명명된 기가 함유할 수도 있는 탄소 원자의 수를 의미한다. 예를 들어, 용어 "C₂₋₆ 알케닐"은 하나 이상의 탄소-탄소 이중 결합을 포함하고, 2 내지 6개 탄소 원자를 포함하는 선형 또는 분지형일 수도 있는, 불포화 히드록아르빌 기를 의미한다. 예를 들어, C₂₋₄ 알케닐은 2 내지 4개 탄소 원자를 갖는 모든 선형 또는 분지형 알케닐 기를 포함한다. C₂₋₆ 알케닐 기의 예는 에테닐, 2-프로페닐, 2-부테닐, 3-부테닐, 2-펜테닐 및 이의 이성질체, 2-헥세닐 및 이의 이성질체, 2,4-펜타디에닐 등이다.

[0260] 기로서 또는 기의 일부로서, 용어 "아릴"은 전형적으로 6 내지 24개 탄소 원자, 바람직하게 6 내지 12개 원자; 바람직하게 6 내지 10개를 함유하는, 함께 융합 (예를 들어, 나프틸)되거나, 또는 공유적으로 연결된 다수의 방향족 고리 또는 단일 고리 (즉, 페닐)를 갖는 다중 불포화, 방향족 히드록아르빌 기를 의미하고, 적어도 하나의 고리는 방향족이다. 적합한 아릴의 예는 C₆₋₁₀아릴, 보다 바람직하게 C₆₋₈아릴을 포함한다. C₆₋₁₂아릴의 비제한적인 예는 페닐; 바페닐; 비페닐레닐; 또는 1- 또는 2-나프타릴; 1-, 2-, 3-, 4-, 5- 또는 6-테트라리닐 ("1,2,3,4-테트라히드로나프탈렌으로도 알려짐"); 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7- 또는 8-아줄레닐, 4-, 5-, 6 또는 7-인덴닐, 4- 또는 5-인다닐, 5-, 6-, 7- 또는 8-테트라히드로나프틸; 1,2,3,4-테트라히드로나프틸; 및 1,4-디히드로나프틸; 1-, 2-, 3-, 4- 또는 5-피레닐을 포함한다. 접미사 "엔"은 아릴 기, 즉 아릴렌과 함께 사용되는 경우에, 다른 기에 대한 부착 지점으로서 2개 단일 결합을 갖는 본 명세서에 정의된 바와 같은 아릴 기를 의미하고자 한다. 적합한 "C₆₋₁₂ 아릴렌" 기는 1,4-페닐렌, 1,2-페닐렌, 1,3-페닐렌, 바페닐렌, 나프틸렌, 인덴닐렌, 1-, 2-, 5- 또는 6-테트라리닐렌 등을 포함한다. 아릴 기의 적어도 하나의 탄소 원자가 이중원자로 치환되는 경우에, 최종 고리는 본 명세서에서 헤테로아릴 고리를 의미한다. 이중원자는 O, N, P 및 S; 바람직하게 O 또는 N으로 이루어진 군으로부터 선택될 수도 있다.

[0261] 기로서 또는 기의 일부로서 용어 "알킬렌-아릴"은 본 명세서에 정의된 바와 같은 알킬렌을 의미하고, 적어도 하나의 수소 원자는 본 명세서에 정의된 바와 같은 적어도 하나의 아릴로 치환된다. 알킬렌-아릴 기는 전형적으로 7 내지 25개 탄소 원자를 함유한다. 알킬렌-아릴 기의 비제한적인 예는 벤질, 펜에틸, 디벤질메틸, 메틸페닐메틸, 3-(2-나프틸)-부틸 등을 포함한다. 기로서 또는 기의 일부로서 용어 "아릴렌-알킬"은 본 명세서에 정의된 바와 같은 아릴렌을 의미하고, 적어도 하나의 수소 원자는 본 명세서에 정의된 바와 같은 적어도 하나의 알킬 기로 치환된다. 아릴렌-알킬 기는 전형적으로 7 내지 25개 탄소 원자를 함유한다.

[0262] 에스테르, 아마이드, 카르복실산 및 알콜 기가 하기에 정의되고, 여기서 Rp는 수소 원자 또는 환형, 선형 또는 분지형 알킬 또는 알킬렌 기를 나타낸다. 하나 초과 Rp 요소를 함유하는 기에서, 이들 요소는 독립적으로 선택될 수 있다. 이 문헌에 표시된 바와 같이 에스테르 (작용) 기 또는 모이어티는 화학식: -C(O)-O-에 따

른 기로서 이해되어야 한다. 이 문헌에 표시된 바와 같은 아미드 (작용) 기 또는 모이어티는 화학식: -NRp-C(O)-에 따른 기로서 이해되어야 한다. 이 문헌에 표시된 바와 같은 카르복실산 (작용) 기 또는 모이어티는 화학식: -C(O)OH에 따른 모이어티 또는 기로서 이해되어야 한다. 이 문헌에 표시된 바와 같은 알콜 (또는 히드록시) 작용기 또는 모이어티는 화학식: -OH에 따른 기로서 이해되어야 한다.

- [0263] 화학식 (I) 내지 (V) 중 어느 하나에 따른 이온화가능한 양이온성 지질은 예컨대 제한없이 WO/2022/268913, 예컨대 특히 WO/2022/268913의 실시예 부분 및 특히 실시예 9에 기술된 바와 같은, 당분야에 공지된 합성 방법으로 제조될 수 있다.
- [0264] (이온화가능한) 양이온성 지질은 바람직하게 용액으로부터 처리될 수 있다. 따라서, (이온화가능한) 양이온성 지질은 바람직하게 극성이 다양한 용매 중에 용해가능하다. 그러므로, (이온화가능한) 양이온성 지질은 바람직하게 트리카프릴린, 에탄올 또는 이소-프로판올, 보다 바람직하게 3개의 이들 모든 용매 중에 용해가능하다. 가용성은 약 20 mg의 (이온화가능한) 양이온성 지질을 약 1 그램의 트리카프릴린, 에탄올 또는 이소-프로판올에서 교반시키고, 모든 재료가 자발적으로 용해되어서 약 2 w/w% 농도의 맑고/투명한 용액을 생성시키는 지 여부를 평가하여 검토될 수 있다. 시험은 약 20°C (실온) 또는 약 37°C에서 수행될 수 있다. 바람직하게, (이온화가능한) 양이온성 지질은 실온에서 용해된다.
- [0265] (이온화가능한) 양이온성 지질은 바람직하게 무독성이거나, 또는 이것은 본 명세서에 교시된 바와 같은 나노입자에서 어세이하거나, 또는 핵산과 함께 결합 또는 시험될 때, 또는 그 자체로, 제한되고 낮은 독성을 가질 수도 있다. 독성 세포 시험은 당분야에 공지된 방법을 통해서, 예컨대 예를 들어 세포 생존능 MTT 어세이를 통해서, 또는 유사하거나 또는 비슷한 시험을 통해서 실행될 수 있다.
- [0266] 일정 구현예에서,
- [0267] 변형된 아포리포단백질의 양, 특히 둘 이상의 변형된 아포리포단백질 경우에 누적량으로서 0.08 내지 2.0 몰%, 예컨대 0.10 내지 2.0 몰% 범위이고/이거나;
- [0268] 인지질의 양은 5 내지 90 몰%, 예컨대 15 내지 90 몰% 범위이고/이거나;
- [0269] 스테롤의 양은 2.5 내지 65 몰%, 예컨대 2.5 내지 50 몰% 범위이고/이거나;
- [0270] 양이온성 또는 이온화가능한 양이온성 지질의 양은 5.0 내지 80 몰% 범위, 예컨대 8.0 내지 80 몰% 범위이고,
- [0271] 물 백분율은 오로지 지질 나노입자 중 변형된 아포리포단백질, 인지질, 스테롤 및 양이온성 또는 이온화가능한 양이온성 지질의 조합량을 기반으로 한다.
- [0272] 나노입자가 둘 이상의 별도 아포리포단백질 성분, 예컨대 아포리포단백질 및 변형된 아포리포단백질, 또는 둘 이상의 변형된 아포리포단백질 및 임의로 하나 이상의 아포리포단백질 등을 포함하는 경우에, 나노입자의 다른 성분과 양적 관계가 논의될 때 이들 아포리포단백질 성분의 누적량이 고려된다.
- [0273] 본 명세서에 교시된 바와 같은 핵산-함유 나노입자의 일정 구현예에서, 변형된 아포리포단백질의 양 (둘 이상의 변형된 아포리포단백질의 경우에, 누계로)은 0.05 내지 2.0 몰%, 예컨대 0.10 내지 2.0 몰% 또는 0.08 내지 0.5 몰% 범위이고/이거나; 인지질의 양은 5 내지 90 몰%, 예컨대 15 내지 90 몰% 또는 8.0 내지 50 몰% 범위이고/이거나; 스테롤의 양은 2.5 내지 65 몰%, 예컨대 2.5 내지 50 몰% 또는 4 내지 65 몰% 범위이고/이거나; 양이온성 또는 이온화가능한 양이온성 지질의 양은 5.0 내지 80 몰%, 예컨대 8.0 내지 80 몰% 또는 5 내지 65 몰% 범위이고, 물 백분율은 오로지 나노입자 중 변형된 아포리포단백질, 인지질, 스테롤 및 양이온성 및/또는 이온화가능한 양이온성 지질의 조합량을 기반으로 한다. 이들 범위는 나노입자의 안정성 및 핵산을 도입하는 그들 능력에 긍정적으로 기여한다.
- [0274] 본 명세서에 교시된 바와 같은 핵산-함유 나노입자의 일정 구현예에서,
- [0275] 변형된 아포리포단백질 (둘 이상의 변형된 아포리포단백질의 경우에, 누계로)의 양은 0.01 내지 2.0 몰%, 예컨대 0.05 내지 1.0 몰%, 또는 0.05 내지 0.5 몰%, 또는 0.05 내지 0.4 몰%, 또는 0.05 내지 0.3 몰%, 또는 0.05 내지 0.2 몰%, 또는 0.05 내지 0.1 몰% 범위, 예컨대 약 0.06, 약 0.07, 약 0.08, 또는 약 0.09 몰%이고/이거나;
- [0276] 인지질의 양은 2 내지 90 몰%, 예컨대 2 내지 80 몰%, 또는 2 내지 70 몰%, 또는 2 내지 60 몰%, 또는 2 내지 50 몰%, 또는 2 내지 40 몰%, 또는 2 내지 30 몰%, 또는 2 내지 20 몰%, 예컨대 5 내지 10 몰% 범위, 예컨대 약 6, 약 7, 약 8, 또는 약 9 몰%이고/이거나;

- [0277] 스테롤의 양은 2.5 내지 65 몰%, 예컨대 2.5 내지 50 몰%, 또는 5 내지 50 몰%, 또는 5 내지 40 몰%, 또는 5 내지 30 몰%, 또는 10 내지 30 몰%, 예컨대 15 내지 25 몰% 범위, 예컨대 약 20, 또는 약 21, 또는 약 22 몰% 이고/이거나;
- [0278] 양이온성 또는 이온화가능한 양이온성 지질의 양은 5.0 내지 80 몰%, 예컨대 10 내지 80 몰%, 또는 10 내지 70 몰%, 또는 10 내지 60 몰%, 또는 10 내지 50 몰%, 또는 10 내지 40 몰%, 또는 10 내지 30 몰%, 또는 15 내지 25 몰% 범위, 예컨대 약 18, 또는 약 19 또는 약 21 몰%이고/이거나;
- [0279] 지질, 예컨대 바람직하게 트리글리세리드의 양은, 0 내지 95 몰%, 또는 0 내지 90 몰%, 예컨대 1 내지 95 몰%, 또는 1 내지 90 몰%, 예컨대 10 내지 90 몰%, 또는 20 내지 80 몰%, 또는 30 내지 70 몰%, 또는 40 내지 60 몰%, 또는 45 내지 55 몰% 범위, 예컨대 약 50, 또는 약 51, 또는 52 몰%이고/이거나;
- [0280] 핵산, 예컨대 바람직하게 RNA, 예를 들어, mRNA의 양은 0.01 내지 1.0 몰%, 예컨대 0.01 내지 0.1 몰%, 또는 0.01 내지 0.05 몰% 범위, 예컨대 약 0.02, 약 0.03, 또는 약 0.04 몰%이고;
- [0281] 물 백분율은 오로지 나노입자 중 변형된 아포리포단백질, 인지질, 스테롤, 양이온성 및/또는 이온화가능한 양이온성 지질, 지질, 예컨대 바람직하게 트리글리세리드, 및 핵산, 예컨대 바람직하게 RNA의 조합량을 기반으로 한다. 이들 범위는 나노입자의 안정성 및 핵산을 도입하는 그들 능력에 긍정적으로 기여한다.
- [0282] 본 명세서에 교시된 바와 같은 핵산 함유 나노입자의 일정 구현예에서,
- [0283] 변형된 아포리포단백질 (둘 이상의 변형된 아포리포단백질의 경우에, 누계로)의 양은 0.1 내지 90 중량% 범위이고/이거나;
- [0284] 핵산의 양은 0.01 내지 90 중량% 범위이고/이거나;
- [0285] 인지질의 양은 0.1 내지 95 중량% 범위이고/이거나;
- [0286] 스테롤의 양은 0.1 내지 95 중량% 범위이고/이거나;
- [0287] 양이온성 및/또는 이온화가능한 양이온성 지질의 양은 0.1 내지 95 중량% 범위이고,
- [0288] 이들 중량%는 변형된 아포리포단백질, 핵산, 인지질, 스테롤 및 양이온성 및/또는 이온화가능한 양이온성 지질의 조합량을 기반으로 한다.
- [0289] 본 명세서에 교시된 바와 같은 핵산 함유 나노입자의 일 구현예에서, 아포리포단백질 (둘 이상의 변형된 아포리포단백질의 경우에, 누계로)의 양은 0.2 내지 50 중량%, 예컨대 3 내지 20 중량% 또는 4 내지 20 중량%, 보다 바람직하게 0.5 내지 30 중량%, 보다 바람직하게 1 내지 20 중량% 범위이다.
- [0290] 본 명세서에 교시된 바와 같은 핵산 함유 나노입자의 일 구현예에서, 핵산의 양은 0.02 내지 30 중량%, 보다 바람직하게 0.05 내지 20 중량%, 보다 바람직하게 0.1 내지 15 중량%, 예컨대 0.5 내지 5 중량% 범위이다.
- [0291] 본 명세서에 교시된 바와 같은 핵산 함유 나노입자의 일 구현예에서, 인지질의 양은 0.2 내지 60 중량%, 보다 바람직하게 1 내지 50 중량%, 예컨대 10 내지 50 중량%, 보다 바람직하게 3 내지 40 중량%, 예컨대 10 내지 40 중량% 범위이다.
- [0292] 본 명세서에 교시된 바와 같은 핵산 함유 나노입자의 일 구현예에서, 스테롤의 양은 0.2 내지 90 중량%, 보다 바람직하게 0.5 내지 70 중량%, 예컨대 2 내지 65 중량%, 보다 바람직하게 1 내지 50 중량%, 예컨대 2 내지 45 중량%, 10 내지 45 중량% 또는 10 내지 20 중량% 범위이다.
- [0293] 본 명세서에 교시된 바와 같은 핵산 함유 나노입자의 일 구현예에서, 양이온성 및/또는 이온화가능한 양이온성 지질의 양은 0.2 내지 90 중량%, 보다 바람직하게 0.5 내지 80 중량%, 보다 바람직하게 1 내지 70 중량%, 예컨대 5 내지 60 중량%, 8 내지 60 중량%, 9 내지 60 중량%, 10 내지 60 중량%, 15 내지 25 중량%, 또는 20 내지 60 중량% 범위이다.
- [0294] 본 명세서에 교시된 바와 같은 핵산 함유 나노입자의 일 구현예에서, 선택적 충전제 또는 충전제 분자의 양은 0 내지 90 중량%, 보다 바람직하게 0 내지 80 중량%, 보다 바람직하게 0 내지 70 중량%, 예컨대 0 내지 65 중량% 범위이다.
- [0295] 본 명세서에 교시된 바와 같은 핵산 함유 나노입자의 특정 구현예에서, 선택적 충전제 또는 충전제 분자의 양은 20 내지 80 중량%, 보다 바람직하게 30 내지 70 중량%, 보다 더 바람직하게 30 내지 65 중량%, 예컨대 40 내지

65 중량%, 45 내지 55 중량% 또는 30 내지 60 중량% 범위이다.

- [0296] 상기 표시된 바와 같은 이들 중량%는 변형된 아포리포단백질, 핵산, 인지질, 스테롤 및 양이온성 및/또는 이온화가능한 양이온성 지질, 및 임의로 충전제 재료, 즉 이들 진술의 맥락에서 나노입자의 중량의 100%까지 첨가되는 이들 5개 또는 6개 성분의 조합량을 기반으로 한다. 이들 중량% 범위는 나노입자의 안정성 및 핵산을 도입하는 그들 능력에 긍정적으로 기여한다.
- [0297] 특정 구현예에서, 본 명세서에 교시된 바와 같은 나노입자는 충전제 또는 충전제 분자를 포함하지 않는다.
- [0298] 일정 구현예에서, 몰 중량%를 기반으로 하는 변형된 아포리포단백질 (둘 이상의 변형된 아포리포단백질의 경우에, 누계로) 대 인지질의 비는 1:25와 1:400 사이, 보다 바람직하게 1:50과 1:200 사이, 보다 더 바람직하게 1:75와 1:150 사이이다.
- [0299] 일정 구현예에서, 중량을 기반으로 변형된 아포리포단백질 (둘 이상의 변형된 아포리포단백질의 경우에, 누계로) 대 인지질의 비는 2:1 내지 1:10, 보다 바람직하게 1:1 내지 1:5, 보다 더 바람직하게 1:1.5 내지 1:4이다. 이들 범위는 나노입자의 안정성에 긍정적으로 기여한다.
- [0300] 대안적으로, 페이로드는 소형 유기 화합물 예컨대 소형 분자 약물일 수도 있다. 일반적으로, 소형 유기 화합물이 합성된다. 치료제는 예를 들어 항암 요법 예컨대 화학요법일 수도 있다. 대안적으로, 페이로드는 생물체제일 수도 있다. 본 명세서에서 사용될 때, 용어 생물체제는 생물(학적) 의약품으로도 알려진 생물약제를 의미하는데 사용되고, 생물학적 공급원에서 제조되거나, 그로부터 추출 또는 반합성되는 임의의 약학적 의약품일 수 있다. 생물체제는 당, 단백질, 핵산, 또는 이들 물질의 복합 조합물로 구성될 수 있거나, 또는 살아있는 세포 또는 조직일 수도 있다.
- [0301] 특정 구현예에서, 지질 나노입자는 10 내지 100 nm, 예컨대 30 내지 100 nm의 평균 크기를 갖는다.
- [0302] 특정 구현예에서, 몰중량 %를 기반으로 하는 변형된 아포리포단백질 (둘 이상의 변형된 아포리포단백질의 경우에, 누계로) 대 인지질의 비는 1:25와 1:400 사이, 보다 바람직하게 1:50과 1:200 사이, 보다 더 바람직하게 1:75와 1:150 사이이다. 특정 구현예에서, 몰중량%를 기반으로 하는 본 명세서에 교시된 바와 같은 변형된 아포리포단백질 (둘 이상의 변형된 아포리포단백질의 경우에, 누계로) 대 인지질의 비는 1:25와 1:400 사이, 보다 바람직하게 1:50과 1:200 사이, 보다 더 바람직하게 1:75와 1:150 사이이다.
- [0303] 특정 구현예에서, 중량을 기반으로 변형된 아포리포단백질 (둘 이상의 변형된 아포리포단백질의 경우에, 누계로) 대 인지질의 비는 3:1 내지 1:100이다. 특정 구현예에서, 중량을 기반으로 하는 본 명세서에 교시된 바와 같은 변형된 아포리포단백질 (둘 이상의 변형된 아포리포단백질의 경우에, 누계로) 대 인지질의 비는 3:1 내지 1:100이다.
- [0304] 일정 구현예에서, 본 명세서에 교시된 바와 같은 지질 나노입자, 예컨대 특히 제한없이, 핵산을 함유하지 않는 나노입자에서,
- [0305] 변형된 아포리포단백질 (둘 이상의 변형된 아포리포단백질의 경우에, 누계로)의 양은 0.05 내지 2.0 몰%, 예컨대 0.1 내지 1.0 몰%, 예를 들어 0.2 내지 0.7 몰%, 또는 0.2 내지 0.5 몰% 범위, 예컨대 바람직하게 약 0.3 몰%이고/이거나;
- [0306] 인지질의 양은 5 내지 90 몰%, 예컨대 10 내지 50 몰%, 예를 들어 10 내지 40 몰%, 10 내지 30 몰%, 또는 10 내지 20 몰% 범위, 예컨대 약 11, 약 12, 약 13, 약 14, 약 15, 약 16, 약 17, 약 18, 또는 약 19 몰%이고/이거나;
- [0307] 스테롤의 양은 2.5 내지 65 몰%, 예컨대 2.5 내지 60 몰%, 2.5 내지 50 몰%, 2.5 내지 40 몰%, 또는 2.5 내지 30 몰%, 또는 2.5 내지 20 몰%, 또는 2.5 내지 10 몰%, 예컨대 2.5 내지 5 몰% 범위, 예컨대 약 3.0 또는 약 4.0, 또는 약 5.0 몰%이고/이거나;
- [0308] 지질, 예컨대 바람직하게 트리글리세리드의 양은 1 내지 95 몰%, 예컨대 10 내지 95 몰%, 또는 20 내지 95 몰%, 또는 30 내지 95 몰%, 또는 40 내지 95 몰%, 또는 50 내지 95 몰%, 또는 60 내지 95 몰%, 예컨대 1 내지 90 몰%, 예컨대 10 내지 90 몰%, 또는 20 내지 90 몰%, 또는 30 내지 90 몰%, 또는 40 내지 90 몰%, 또는 50 내지 90 몰%, 또는 60 내지 90 몰%, 예컨대 60 내지 80 몰%, 또는 70 내지 80 몰% 범위, 예컨대 약 65, 약 70, 또는 약 75 몰%이고,
- [0309] 몰 백분율은 오로지 지질 나노입자 중 변형된 아포리포단백질, 인지질, 스테롤, 및 지질, 예컨대 바람직하게 트

리글리세리드의 조합량을 기반으로 한다.

- [0310] 추가 양태에서, 본 발명은 본 명세서에 기술된 바와 같은 지질 나노입자를 제조하는 방법에 관한 것으로서, 방법은
- [0311] a1) 본 명세서에 개시된 바와 같은 변형된 아포리포단백질을 발현시키고 단리하여 단리된 변형된 아포리포단백질을 수득하는 단계; 및/또는
- [0312] a2) 표적화 바디를 아포리포단백질 또는 아포리포단백질 모방체에 화학적으로 접합시켜서 변형된 아포리포단백질을 수득하고 변형된 아포리포단백질을 단리하는 단계;
- [0313] b) 단계 a1 및/또는 단계 a2에서 수득된 단리된 변형된 아포리포단백질을 인지질, 스테롤 및 임의로 지질과 배합하여 지질 나노입자를 수득하는 단계
- [0314] 를 포함한다.
- [0315] 일 구현예에서 단계 b)는
- [0316] b1) 유기 용매 중 지질 성분을 수성 완충액 중 핵산과 혼합, 바람직하게 급속 혼합하여 나노입자를 생산하는 단계로서, 지질 성분은 인지질, 스테롤, 코어 성분, 및 임의로 지질을 포함하고; 수성 완충액은 5.5 이하의 pH, 바람직하게 5.0 이하의 pH를 갖는 것인 단계; 및
- [0317] b2) 지질 나노입자를 변형된 아포리포단백질과 혼합, 바람직하게 급속 혼합하여 5.5와 9.0 사이의 pH, 바람직하게 6.0과 8.0 사이의 pH, 보다 바람직하게 6.5와 8.0 사이의 pH에서 나노입자를 생산하는 단계
- [0318] 를 포함한다.
- [0319] 변형된 아포리포단백질은 표적화 바디와 아포리포단백질의 키메라 융합 단백질로서 발현될 수 있거나, 또는 표적화 바디에 화학적으로 접합될 수 있거나, 또는 이들의 조합으로 생산될 수 있다는 것을 이해한다. 키메라 단백질의 발현은 당업자에게 공지되어 있고, 표적화 바디는 펩티드 또는 단백질일 때 사용될 수 있다. 아포리포단백질 (또는 모방체 또는 유도체) 코딩 서열과 인프레임으로, 예를 들어 뉴클레오티드를 코딩하는 C-말단 또는 N-말단 서열에서, 표적화 바디를 코딩하는 서열을 클로닝하여서, 이러한 단백질을 코딩하는 핵산을 생산하기 위한 분자적 기술을 사용하는 것은 당업자의 지식 내에서 충분하다. 키메라 단백질 발현을 사용하는 장점은 모든 발현된 단백질이 융합 단백질이라는 것이다.
- [0320] 대안적으로 화학적 접합이 사용될 수도 있다. 아포리포단백질 (또는 이의 모방체)에 표적화 바디의 화학적 접합을 위한 적합한 방법은 당분야에 공지되어 있다. 비제한적인 예는 변형 촉진 고리첨가, 아미노분해 반응, 및 마이클 유형 첨가이다. 예를 들어, 기존 또는 도입된 시스테인 잔기는 아포리포단백질 또는 표적화 바디에 대해 사용될 수도 있다. 시스테인 잔기의 도입은 코딩되는 뉴클레오티드 서열에서 뉴클레오티드의 점 돌연변이에 의해서, 또는 시스테인 코딩 코돈의 도입에 의해서 획득될 수도 있다. 화학적 접합의 장점은 펩티드 또는 단백질 서열의 사용에 제한되지 않지만, 임의 유형의 유기 분자에 적용될 수 있다.
- [0321] 변형된 아포리포단백질, 인지질, 스테롤 및 선택적 성분을 급속 혼합하여 지질 나노입자를 수득할 수도 있다는 것을 이해한다. 임의로는 본 명세서에 정의된 바와 같은 지질 및/또는 페이로드를 첨가할 수도 있다.
- [0322] 본 발명은 또한 지질 나노입자의 제조 방법을 포괄하고, 방법은
- [0323] a) 유기 용매 중 지질 성분과 수성 완충액 중 핵산을 급속 혼합하여 지질 나노입자를 생산하는 단계로서, 지질 성분은 인지질, 스테롤, 양이온성 지질 또는 이온화가능한 양이온성 지질을 포함하고, 수성 완충액은 5.0 이하의 pH를 갖는 것인 단계; 및
- [0324] b) 지질 나노입자를 본 명세서에 개시된 바와 같은 하나 이상의 변형된 아포리포단백질과 급속 혼합하여서, 5.5와 8.0 사이의 pH, 바람직하게 6.0과 8.0의 pH에서 지질 나노입자를 생산하는 단계
- [0325] 를 포함한다.
- [0326] 상기 방법에 따라서, 2-단계 방법이 수행되는데, 제1 단계에서, 핵산 함유 나노입자가 형성되고, 다음의 제2 단계에서, 변형된 아포리포단백질이 나노입자에 포함된다. 바람직하게, 제1 단계는 낮은 pH에서 수행되고, 제2 단계는 생리적 pH에서 수행된다.
- [0327] 유기 용매는 알콜, 에탄올, 이소-프로판올, 메탄올, 아세토니트릴, 디메틸 술폰(DMSO), 클로로포름

또는 이의 조합일 수도 있다. 바람직한 유기 용매는 수산화성 및 무독성이고, 예를 들어, 에탄올 및 DMSO, 또는 이의 조합이다.

- [0328] 예를 들어, 유기 용매는 96% 내지 100%의 에탄올, 바람직하게 100% 에탄올일 수도 있다.
- [0329] 급속 혼합이 당분야에 공지되어 있고, 예를 들어, 다음의 문헌에 기술되어 있다: Hirota et al. BIOTECHNIQUES VOL. 27, NO. 2, p286-289; Jeffs et al., Pharm Res 22, 362-372 (2005); Kulkarni et al., ACS Nano 2018, 12, 5, 4787-4795.
- [0330] 단계 a) 중 수성 완충액은 이온화가능한 양이온성 지질이 양으로 하전된 것을 보장하도록 낮은 pH를 가져서, 입자 중 핵산/양이온성 지질 복합체의 포함 및 그 내에서 결합을 허용한다. 예를 들어, 완충액은 5.0 이하의 pH, 예컨대 4.9, 4.8, 4.7, 4.6, 4.5, 4.4, 4.3, 4.2, 4.1, 4.0, 3.9, 3.8, 3.7, 3.6, 3.5 또는 그 이하의 pH를 가질 수도 있다. 수성 완충액은 핵산을 손상시키지 않는 임의의 완충액일 수도 있다. 예시적인 완충액은 pH 4.0의 소듐 아세테이트이다. 다음으로, 나노입자는 대략 6 내지 8의 pH, 바람직하게 7 내지 8의 pH, 보다 바람직하게 대략 7.4의 pH를 갖는 수성 완충액 중에 둔다. 이것은 예를 들어, 표시된 pH 범위에서 수성 완충액을 사용한 투석을 통해서 획득될 수도 있다. 이 단계에 적합한 수성 완충액의 비제한적인 예는 pH 7.4의 155 mM PBS이지만, 핵산을 손상시키지 않는 임의의 완충액이 사용될 수도 있다는 것을 이해한다.
- [0331] 단계 b)에서, 6과 8 사이의 pH, 바람직하게 7과 8 사이의 pH에서 수성 완충액 중 나노입자는 5.5와 8 사이의 pH, 바람직하게 6과 8 사이의 pH, 보다 바람직하게 7과 8 사이의 pH에 수성 완충액 중에서 변형된 아포리포단백질과 급속하게 혼합하여 나노입자를 수득한다.
- [0332] 본 명세서에 교시된 바와 같은 상기 기술된 2-단계 제제화 과정은 바람직하고 유리한 특징의 광범위한 세트 (안정성, 낮은 독성 또는 무-독성, 높은 핵산 체류, 핵산 활성 등)를 갖는 핵산-함유 나노입자를 생성한다. 그러나, 기술된 제제 방법은 다른 과정이 또한 유리한 특성을 갖는 나노입자를 야기할 수도 있으므로 비제한적이다.
- [0333] 본 발명의 추가 양태는 본 명세서에 교시된 바와 같은 변형된 아포리포단백질, 본 명세서에 교시된 바와 같은 핵산, 또는 본 명세서에 교시된 바와 같은 지질 나노입자, 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학 조성물을 제공한다.
- [0334] 추가 양태에서 본 발명은 의약으로서 사용을 위한 본 명세서에 정의된 바와 같은 변형된 아포리포단백질 또는 본 명세서에 정의된 바와 같은 지질 나노입자, 또는 본 명세서에 기술된 바와 같은 방법으로 수득되거나 또는 수득가능한 지질 나노입자, 또는 본 명세서에 정의된 바와 같은 핵산 또는 본 명세서에 정의된 바와 같은 약학 조성물에 관한 것이다. 변형된 아포리포단백질 (예를 들어, 부착된 페이로드의 작용에 의함) 또는 나노입자에 포함된 페이로드가 대상체에서 증상을 치료, 완화 또는 개선시키는데 사용될 수도 있다는 것을 고려한다. 그러므로, 일 구현예에서 면역 관련 장애 예컨대 이식 거부, 이식편 대 숙주 질환 (GVH), 아테롬성 동맥 경화증, 감염, 염증, 자가면역, 알레르기, 암, 유전적 장애, 대사 장애, 신경학적 장애 또는 조직 외상, 바람직하게 면역 관련 장애 예컨대 이식 거부, 아테롬성 동맥 경화증, 감염, 자가면역, 암, 유전적 장애, 대사 장애, 신경학적 장애 또는 조직 외상의 치료 또는 예방에서 사용을 위한, 제1 양태에 따른 변형된 아포리포단백질 또는 제2 양태에 따른 지질 나노입자, 또는 본 발명의 제3 양태의 방법에 의해 수득되거나 또는 수득가능한 지질 나노입자 또는 본 명세서에 정의된 바와 같은 핵산, 또는 본 명세서에 정의된 바와 같은 약학 조성물에 관한 것이다. 추가 구현예는 이를 필요로 하는 대상체에서 면역 관련 장애를 치료하는 방법에 관한 것으로, 상기 대상체에게 제1 양태에 따른 변형된 아포리포단백질 또는 제2 양태에 따른 지질 나노입자, 또는 본 발명의 제3 양태의 방법으로 수득되거나 또는 수득가능한 지질 나노입자 또는 본 명세서에 정의된 바와 같은 핵산, 또는 본 명세서에 정의된 바와 같은 약학 조성물의 치료적 유효량을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 또한 본 명세서는 대상체에서 면역 관련 장애의 치료를 위한 의약의 제조를 위한, 제1 양태에 따른 변형된 아포리포단백질 또는 제2 양태에 따른 지질 나노입자, 또는 본 발명의 제3 양태의 방법으로 수득되거나 또는 수득가능한 지질 나노입자 또는 본 명세서에 정의된 바와 같은 핵산, 또는 본 명세서에 정의된 바와 같은 약학 조성물의 용도를 제공한다.
- [0335] 본 명세서에서 사용되는 면역 관련 장애는 면역계가 질환 발생에서 역할을 하는 임의의 장애를 포함한다. 면역 관련 장애는 면역계가 억제되거나 또는 (과)활성화되는 장애를 의미할 수도 있다. 면역 관련 장애의 예는 암, 감염, 패혈증, 자가면역 질환, 및 심혈관 질환이다. 자가면역 질환의 예는 1형 당뇨병, 류마티스성 관절염 (RA), 건선/건선성 관절염, 다발성 경화증 (MS), 전신 홍반성 루푸스 (SLE), 염증성 장 질환 (IBD), 애

디슨병, 그레이브스병, 쇠그렌 증후군, 하시모토 갑상선염, 중증 근무력증, 자가면역 혈관염, 악성 빈혈, 및 셀 리악병이다. 일 구현예에서, 면역 관련 장애는 이식 거부, 이식편 대 숙주 질환 (GVH), 아테롬성 동맥 경화 증, 감염, 염증, 자가면역, 알레르기, 암, 유전적 장애, 대사 장애, 신경학적 장애 및 조직 외상, 바람직하게 이식 거부, 아테롬성 동맥 경화증, 감염, 자가면역, 암, 유전적 장애, 대사 장애, 신경학적 장애 또는 조직 외 상으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0336] 일 구현예에서 면역 관련 장애는 암, 감염, 패혈증, 1형 당뇨병, 류마티스성 관절염 (RA), 건선/건선성 관절염, 다발성 경화증 (MS), 전신 홍반성 루푸스 (SLE), 염증성 장 질환 (IBD), 애디슨병, 그레이브스병, 쇠그렌 증후 군, 하시모토 갑상선염, 중증 근무력증, 자가면역 혈관염, 악성 빈혈, 및 셀리아병으로 이루어진 군으로부터 선 택된다.

[0337] 추가 양태에서, 본 발명은 표적으로 페이로드 (예를 들어, 화합물)의 전달에서 본 명세서에 기술된 바와 같은 변형된 아포리포단백질 또는 본 명세서에 기술된 바와 같은 지질 나노입자, 또는 본 명세서에 기술된 바와 같은 방법으로 획득되거나 또는 획득가능한 지질 나노입자, 또는 본 명세서에 정의된 바와 같은 핵산, 또는 본 명세 서에 정의된 바와 같은 약학 조성물의 용도에 관한 것이고, 바람직하게 표적은 세포, 조직, 및/또는 장기이고, 보다 더 바람직하게 표적은 림프성 세포, 골수성 세포, 종양 세포이거나, 또는 표적화 바디는 박테리아, 바이러 스, 진균 또는 기생충 단백질 또는 항원에 결합하고, 바람직하게 림프성 또는 골수성 세포는 단핵구, 마크로파 지, M1-유사 마크로파지, M2-유사 마크로파지, 호산구, 호염기구, 비만 세포, NK 세포, B 세포, 형질 세포, 조 절 T 세포, 조절 줄기 세포, T 헬퍼 세포 예컨대 Th1, Th2, Th17 또는 Th22, 수지상 세포, 예컨대 형질세포양 수지상 세포, 일반적 DC 1 또는 일반적 DC 2, 또는 종양-연관 마크로파지로부터 선택된다. 일 구현예에서 용도는 생체 외 또는 시험관내 용도이다. 대안적인 구현예에서 용도는 생체 내 용도이다. 전형적으로, 아포리포단백질 또는 표적화 바디는 세포 표면 단백질, 예컨대 수용체에 결합하게 된다. 그러므로, 표적은 단백질 예컨대 수용체, 세포 또는 세포 유형 (상기 단백질을 발현), 조직 또는 조직 유형 (상기 단백질을 발현) 또는 장기 (상기 단백질을 발현)일 수도 있다. 표적화 바디를 선택 또는 조정하여서, 변형된 아포리포단백 질은 상이한 단백질로 표적화될 수 있다는 것을 이해한다. 예를 들어, 리간드의 수용체 결합 도메인은 특이 적 수용체를 표적화하는데 사용될 수 있다. 대안적으로, 세포 표면 단백질의 알려진 결합 파트너가 용합 단 백질 (즉, 변형된 아포리포단백질)을 재경로화하는데 사용될 수 있다.

[0338] 본 발명의 추가 양태는 시험관내 또는 생체외에서 세포에 핵산을 도입시키는 방법을 제공하고, 방법은 본 명세 서에 교시된 바와 같은 핵산-함유 지질 나노입자, 또는 본 명세서에 교시된 바와 같은 방법으로 획득되거나 또 는 획득가능한 핵산-함유 지질 나노입자를 세포와 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0339] 본 발명의 추가 양태는 생체내에서 세포에 핵산을 도입시키는 방법을 제공하고, 방법은 본 명세서에 교시된 바 와 같은 핵산-함유 지질 나노입자, 또는 본 명세서에 개시된 바와 같은 방법으로 획득되거나 또는 획득가능한 핵산-함유 지질 나노입자를 세포와 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0340] 본 발명의 추가 양태는 대상체에게 핵산의 생체내 전달에서 사용을 위한, 본 명세서에 교시된 바와 같은 핵산- 함유 지질 나노입자, 또는 본 명세서에 교시된 바와 같은 방법으로 획득되거나 또는 획득가능한 핵산-함유 지질 나노입자를 제공한다.

[0341] 본 발명의 추가 양태는 핵산의 생체내 전달을 위한 방법을 제공하고, 방법은 본 명세서에 교시된 바와 같은 핵 산-함유 지질 나노입자, 또는 본 명세서에 교시된 바와 같은 방법으로 획득되거나 또는 획득가능한 핵산-함유 지질 나노입자를 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0342] 본 발명의 추가 양태는 질환 또는 장애를 이를 필요로 하는 대상체에서 치료로 하는 방법을 제공하고, 방법은 본 명세서에 교시된 바와 같은 핵산-함유 지질 나노입자, 또는 본 명세서에 교시된 바와 같은 방법으로 획득되 거나 또는 획득가능한 핵산-함유 지질 나노입자의 치료적 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0343] 질환은 본 명세서에 논의된 바와 같은 임의의 질환, 예컨대 예를 들어 면역 관련 장애 예컨대 이식 거부, 이식 편 대 숙주 질환 (GVH), 아테롬성 동맥 경화증, 감염, 염증, 자가면역, 알레르기, 암, 유전적 장애, 대사 장애, 신경학적 장애 또는 조직 외상, 바람직하게 이식 거부, 아테롬성 동맥 경화증, 감염, 자가면역, 암, 유전적 장 애, 대사 장애, 신경학적 장애 또는 조직 외상일 수도 있다.

[0344] 본 명세서에 기술된 핵산-함유 나노입자의 목적은 핵산을 세포에게 전달하거나 또는 핵산 요법을 대상체에게 전 달하는 것이다. 핵산은 예를 들어 세포에서 발현시키려는 관심 펩티드 또는 단백질을 코딩하는 mRNA일 수 있거나, 또는 유전자 발현을 간섭 (예를 들어, 유전자 침묵화)하도록 의도된 짧은 핵산, 예컨대 siRNA, shRNA를

포함하거나, 또는 세포의 게놈에서 돌연변이를 유도하기 위한 CRISPR-Cas 또는 관련 유전자 편집 시스템 (예를 들어, gRNA)의 성분을 포함할 수도 있다. 그러므로, 일반적으로 핵산 (나노입자의 페이로드)의 작용 방식은 세포질 또는 핵에 있다. 그러므로, 나노입자는 바람직하게 적어도 하기 성질을 갖는다: 1) 의도하는 표적 세포의 표적화를 허용한다, 그리고 2) 이의 작용을 발휘할 수 있는 곳 (따라서, 대부분의 경우에 표적 세포의 세포질 또는 핵)으로 페이로드의 전달을 허용한다.

[0345] 나노입자를 포함하는 핵산 요법은 이를 필요로 하는 대상체에게 투여될 수 있다는 것을 이해한다. 표적 세포 또는 조직에 의존하여, 투여는 비경구, 예를 들어, 정맥내, 근육내 또는 피하일 수도 있다. 투여는 또한 경구, 설하, 국소, 직장, 비강 (흡입) 또는 질일 수도 있다. 또한 표적 조직 또는 세포의 표적화는 변형된 아포리포단백질의 적절한 선택을 통해 결정된다. 일 구현예에서, 나노입자 또는 조성물의 용도는 골수 구획 또는 비장으로 핵산의 전달을 포함한다. 이것은 예를 들어 정맥내 비경구 투여를 통해서 획득될 수도 있다.

[0346] 본 발명의 일정 구현예의 나노입자는 전신 주사 이후에, 면역 세포의 존재와 연관된 조직 (비장, 골수)을 표적화할 수 있다.

[0347] 일정 구현예에서, 본 명세서에 교시된 바와 같은 핵산-함유 나노입자, 또는 본 명세서에 교시된 바와 같은 조성물은 면역요법에 사용을 위한 것이다.

[0348] 일 양태에서, 본 발명은 선천성 면역 반응을 자극하거나 또는 억제하여 질환의 치료에서 사용을 위한 본 명세서에 교시된 바와 같은 핵산 함유 나노입자를 포함한, 나노입자, 또는 그들을 포함하는 조성물에 관한 것이고, 바람직하게 상기 질환은 대상체에서 선천성 면역 반응의 자극 또는 억제로부터 이득을 얻게 되는 질환, 예컨대 결합성 선천성 면역 반응을 특징으로 하는 질환이고, 보다 바람직하게 치료하려는 상기 질환은 암, 심혈관 질환, 자가면역 장애 또는 이종이식 거부이다. 그러므로, 나노입자는 면역계와 관련된 임의의 질환 예컨대 임의의 면역 장애의 치료에서, 또는 면역 반응의 조절이 실행가능한 치료 선택안인 임의의 질환 또는 장애의 치료를 위해 사용될 수도 있다.

[0349] 추가 양태에서, 본 발명은 본 명세서에 정의된 바와 같은 융합 단백질 (즉, 변형된 아포리포단백질)을 코딩하는 핵산에 관한 것이다. 핵산은 벡터 예컨대 세포에서 안정한 통합을 위한 바이러스 벡터, 또는 일시적 발현을 가능하게 하는 발현 벡터에 포함될 수도 있다.

[0350] 수많은 변이 및/또는 변형이 본 발명의 광범위한 일반 범주를 벗어나지 않고, 상기 기술된 양태 및/또는 구현예에 만들어질 수 있다는 것을 당업자는 이해할 것이다. 그러므로, 본 양태 및/또는 구현예는 모든 측면에서 제한적이지 아니라 예시적인 것으로 간주되어야 한다. 본 발명은 하기 비제한적인 실시예를 포함한다.

[0351] 실시예

[0352] **실시예 1. 세포 마커 특이적 아포리포단백질-나노바디 융합 단백질의 생성**

[0353] aNP는 외부 표면을 덮는 아포리포단백질 및 소수성 코어를 갖는 지질-기반 나노-크기 (직경 ~30-200 nm)이다. 아포리포단백질은 그들의 양친매성 특징으로 인해 지질층에 대해 고유한 친화성을 갖는 나선 단백질이다. 몇가지 부류의 아포리포단백질이 존재하고, 모두 aNP 제제에 대한 구조적 성분으로서 사용될 수 있다. 아포리포단백질의 존재는 aNP의 생물학적 거동을 조절한다. 예를 들어, 아포리포단백질 A1은 스캐빈저 수용체 부류 B 유형 1 (SRB1) 및 ATP-결합 카세트 수송체 ABCA1을 통해서 세포와 상호작용한다. 이것은 림프 기관에서 골수성 세포와 aNP의 상호작용을 증가시킨다. 그러나, 치료적으로 작용화된 aNP는 이들 언급된 수용체없이 면역 세포 유형에 대한 효과가 거의 없는 것으로 확인되었다. 추가로, 골수 구획 내에서 증가된 표적화 특이성은 또한 치료제의 효율을 증가시킬 수 있다. 그러므로, 특별한 세포 유형으로 aNP의 재경로화는 이러한 모듈형 플랫폼의 능력을 증가시킨다.

[0354] 나노바디는 낙타류에서 발견되는 중쇄 단독 항체의 중쇄 (VH 도메인)의 가변 도메인으로 이루어지는 단일 항원 특이적 폴리펩티드이고, VH 도메인 또는 단일-도메인 항체 (sdAb)라고도 한다. 나노바디는 복잡성이 낮고 매우 안정하고 가용성이어서, 인간 항체 등과 비교하여 더 큰 치료적 잠재성을 제공한다. 그들은 β-시트의 보존된 프레임워크, 및 3개 가변 상보성 결정 영역 (CDR)으로 이루어진다. 나노바디의 특이성은 이들 CDR 루프의 변이로부터 발생된다. 나노바디는 VH 및 VL 도메인 간 상호작용을 증가시키도록 인간 항체의 프레임워크에 존재하는 소수성 패치가 결여된다. 나노바디는 그들 안정성 및 가용성에 대한 핵심인 이러한 영역 중 4개 특징적 돌연변이를 갖는다. 보존된 프레임워크는 면역원성을 제한하도록 나노바디를 인간화시키기 위한 점 돌연변이를 사용해 변형될 수 있다.

[0355] 아포리포단백질-나노바디 융합 단백질은 나노바디의 표적화 능력과 아포리포단백질의 입자 형성 능력을 조합한다. 융합 단백질은 아포리포단백질 및 나노바디 사이에 충분한 공간을 허용하기 위해 적절한 아미노산 링커와 융합되는, 아포리포단백질 및 나노바디에 대한 유전자의 분자적 클로닝을 통해 생성된다. 융합 단백질은 후속하여 이. 콜라이에서 재조합적으로 발현되고, 히스티딘 태그와 같은 정제 태그를 사용해 정제된다. aNP 생산 동안 융합 단백질의 포함은 세포-유형 특이적 aNP를 생성시킨다. 표적화된 세포 유형은 바람직한 세포 마커에 특이적인 것으로 나노바디 서열을 변화시켜서 쉽게 결정될 수 있다.

[0356] 바람직한 세포 마커에 특이적인 나노바디는 효모 표면 디스플레이 방법 및 유도 진화를 통해 조작된다. 기계-학습-유도된 생성 모델링은 이들 표적에 대해 보다 큰 친화성을 갖는 나노바디 서열을 생성시키기 위해서 유도 진화 과정에서 변이를 도입시키는데 사용된다. 이러한 과정은 서열이 바람직한 결합 친화성에 따라 선택될 때까지 반복된다.

[0357] **실시예 2. 재경로화된 aNP 평가**

[0358] 세포-특이적 aNP의 시험관내 평가는 aNP-세포 상호작용을 분석하기 위해 수행된다. aNP는 인간 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)와 인큐베이션하고 유세포측정을 사용해 면역 세포에 대한 aNP 결합을 평가한다. 치료제 화합물의 도입 이후에, aNP의 치료적 효능을 시험관내에서 평가한다.

[0359] 후속하여, 재경로화된 aNP에 의한 세포 표적화의 생체내 효율은 인간화된 면역계를 갖는 마우스에서 평가된다. 장기-특이적 및 세포-특이적 생체분포를 비롯하여, aNP의 독성학 및 치료적 효능을 조사한다.

[0360] **실시예 3. 구현**

[0361] 재경로화된 aNP는 바람직한 면역 세포 유형으로 치료적 화합물을 특이적으로 전달하는 잠재성을 가져서, 면역 반응을 조절한다. 재경로화된 aNP 플랫폼 기술의 주요 장점은 나노바디 및 치료적 페이로드를 쉽게 교환하는 가능성이다. 그러므로, 재경로화된 aNP는 예를 들어 자가면역 질환을 치료하거나 또는 장기 이식 동안 면역 반응을 약화시키기 위해서, 또는 예를 들어, 암 또는 감염성 질환을 치료하기 위해서 면역 반응을 촉진하는 면역요법으로서 구현될 수 있다.

[0362] **실시예 4. 재경로화 단백질 또는 펩티드 (표적화 바디)에 융합된 아포리포단백질의 융합 단백질 및 지질 나노입자로 이의 도입**

[0363] **재료 및 방법**

[0364] VHHC8-apoA1 융합 단백질의 발현 및 정제: pET20b-VHHC8-apoA1 플라스미드 및 pDiscoTune 플라스미드로 형질 전환된 ClearColi 세포의 소규모 배양이 100 µg/mL 아피실린이 존재하는 LB 배지에서 시작되었다. 다음 날에, 40 mL의 소규모 배양을 1 리터의 2YT 배지에 희석하여 대규모 배양을 시작하였고, 람노스를 50 µM의 최종 농도로 첨가하여 pDiscoTune 플라스미드에서 T7 리소자임을 유도하였다. 배양은 37°C 및 150 rpm에서 0.6-0.8의 OD600까지 성장시킨 다음에, 이소프로필 β-D-1-티오갈락토포라노시드 (IPTG)는 0.1 mM의 최종 농도로 첨가하여 발현을 유도하였다. 유도된 배양을 18°C 및 150 rpm에서 밤새 인큐베이션하였다. 유도된 박테리아 배양을 펠렛화하였고 세포를 용해 완충액 (20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 7.9)에 재현탁하였다. 50 mL 세포 현탁액 당 벤조나제 뉴클레아제 (Merck Millipore) 및 1개 cOmplete™ EDTA-무함유 프로테아제 억제제 카테일 정제 (Roche)를 첨가하였고, 세포 현탁액을 교반하면서 4°C에서 인큐베이션하였다. 현탁액을 후속하여 15000-20000 psi에서 Avestin Emulsiflex C3를 사용하여 3회 균질화되었다. 세포 용해물을 항상 얼음에 유지시켰다. 용해 후에, 세포 용해물을 원심분리하여 불용성 세포 찌꺼기를 펠렛화하였고, 상청액은 고정화된 니켈 이온을 함유하는 고정화된 금속 킬레이트 친화성 크로마토그래피 (IMAC) 컬럼을 통해 통과시켰다. 컬럼은 8 컬럼 부피의 완충액 A (20 mM Tris, 500 mM NaCl, 10 mM 이미다졸, pH 7.9)에 이어서, 8 컬럼 부피의 완충액 A50 (20 mM Tris, 500 mM NaCl, 50 mM 이미다졸, pH 7.9)으로 세척되었다. VHHC8-apoA1을 용리기 위해서, 8 컬럼 부피의 완충액 A500 (20 mM Tris, 500 mM NaCl, 500 mM 이미다졸, pH 7.9)을 컬럼에 적용하였다. 정제 단계의 모든 분획을 수집하였고, SDS-PAGE로 분석하였다. 정제된 VHHC8-apoA1을 함유하는 분획의 완충액은 Amicon 초원심분리 필터 (Amicon)를 사용해 PBS로 바꿔주었다. VHHC8-apoA1을 저장하기 위해서, 분취액을 액체 질소에 급속 냉각시켰고, -70°C에 저장하였다.

[0365] VHHC8-apoA1 융합 단백질은 SEQ ID NO: 1로 정의되는 바와 같은 서열을 갖거나, 또는 시스테인을 포함하는 VHHC8 및 apoA1 간에 링커를 포함하는, SEQ ID NO: 2로 정의된 바와 같은 서열에 의해 코딩된다.

SEQ ID NO:1

MTGQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFDDYAIGWFRQAPGKEREGVSCINN
SDGSGYVADSVKGRFTISSDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVVYCAAAGDGGCYYGLDY
WGKGTQVTVSSGLECKLSGSGSGSDDPPQSPWDRVKDLATVYVDVLKDSGRDYVS
QFEGSALGKQLNLKLLDNWDSVTSTFSKLRQLGQVTFEWDNLEKETEGLRQEMSK
DLEEVKAKVQPYLDDFQKKWQEEMELYRQKVEPLRAELQEGARQKLHELQEKLSPLG
EEMRDRARAHVDALRTHLAPYSDELQRRLAARLEALKENGGARLAEYHAKATEHLSTL
SEKAKPALEDLRQGLLPVLESFKVSFLSALEEYTKKLNTQGDHHHHHH

SEQ ID NO:2

ATGACCGGTCAGGTTACAGGAGTCCGGTGGGGGACTGGTGCAGGCCGGG
GGTTCTCTGCGCCTTAGCTGCGCTGCCTCCGTTTACCTTCGATGATTACGCTAT
TGGCTGGTTCCGTCAGGCTCCTGGCAAGGAGCGTGAAGGAGTATCCTGTATCAAC
AATTCGGACGGGAGTGGGTATGTAGCGGACAGTGTTAAAGGTGCGTTTACGATTC
CTCCGACAACGCCAAGAACCCTGCTACCTTCAAATGAACTCCCTGAAGCCAGAAG
ATACCGCTGTTTATTACTGTGCCGAGCGGGTACGGTGGTTGTTACTACGGCTTG
GACTACTGGGGTAAAGGAACCCAGGTTACTGTCTCATCCGGGGGACTGGAATGCA
AGCTTTCAGGGTCAGGTAGTGGATCTGATGATCCGCCGACAGTCCATGGGATCG
CGTGAAGGACCTGGCCACTGTGTACGTGGATGTGCTCAAAGACAGCGGCAGAGAC
TATGTGTCTCAGTTTGAAGGATCCGCCTTGGGCAAACAATTGAACCTTAAGCTGCT

[0366]

GGACAACCTGGGACAGCGTGACGTCCACCTTCAGCAAGCTGCGCGAACAGCTCGG
CCCTGTGACCCAGGAATTCTGGGATAACCTGGAAAAGGAGACAGAGGGCCTGCGC
CAGGAGATGAGCAAGGATCTGGAGGAGGTGAAGCCAAGGTGCAGCCGTACCTG
GACGACTTCCAGAAGAAGTGGCAGGAGGAGATGGAGCTTACCGCCAGAAGGTG
GAGCCGCTGCGCGCAGAGCTGCAGGAGGGCGCGGCCAGAAGCTGCACGAGCT
GCAAGAGAAGCTGAGCCCACTGGGCGAGGAGATGCGCGACCGCGCGCGCCCC
ATGTGACGCGCTGCGCACGCATCTGGCGCCGTACAGCGACGAGCTGCGCCAGC
GCTTAGCGGCGCGCCTTGAGGCTCTCAAGGAGAACGGCGGGGCCCGCCTGGCCG
AGTACCACGCCAAGGCCACCGAGCATCTGAGCACGCTCAGCGAGAAGGCCAAGC
CGGCGCTCGAGGACCTGCGCCAAGGCCTGCTGCCGGTGTGAGAGCTTCAAGG
TCAGTCTCTGAGCGCTCTGGAAGAGTACACTAAGAAGCTTAACACCCAGGGTGAT
CATCATCATCATCATCATTA

[0367]

[0368]

aNP 제제: 모든 인지질은 Avanti Polar Lipids Inc에서 구매하였다. 원반형 지질 나노입자 경우: 클로로포름 중 원액 용액 (10 mg/mL)으로부터, DMPC (128 μ l), 콜레스테롤 (Sigma-Aldrich) (7.5 μ l), 및 구형 지질 나노입자 경우: POPC (66.5 μ l), PHPC (17.5 μ l), 콜레스테롤 (4.5 μ l), 및 트리카프릴린 (Sigma-Aldrich) (0.956 g/mL 원액에서 2.8 μ l)을 유리 바이알에서 배합하였고 진공 하에 건조하였다. 최종 필름을 아세트니트릴/메탄올 혼합물 (95:5 중량%, 900 μ l 총 부피)에 채용해시켰다. 별도로, PBS 중 VHHCD8-아포리포단백질 A1 단백질의 용액 (6.5 mL, 0.14 mg/mL)을 2회 제조하였다. 양쪽 용액은 지질 용액 경우 0.8 mL/분의 유속 및 아포리포단백질 A1 용액 경우 6 mL/분의 유속으로 Zeonor 헤링본 믹서 (Microfluidic Chipshop)에 미세유체 펌프 퓨전 100 (Chemyx Inc)을 사용해 동시에 주입되었다. 수득된 용액은 원반형 경우에 10 kDa MWCO 및 구형 aNP 경우에 50 kDa MWCO의 Vivaspın 튜브를 4000 rpm에서 사용한 원심분리 여과를 통해 농축하여 1 mL 부피를 수득하였다. PBS (5 mL)를 첨가하였고, 용액을 1 mL로 농축하였고, 이것을 2회 반복하였다. 세척된 용액을 대략 1.5 mL로 농축하였고, 0.22 μ m PES 시린지 필터를 통해 여과하여서 최종적인 VHHCD8-아포리포단백질 A1-함유 나노입자를 수득하였다.

[0369]

DLS: PBS 중 VHHCD8-아포리포단백질 A1-함유 나노입자 제제는 0.22 μ m PES 시린지 필터를 통해 여과시켰고, Malvern Zetasizer Nano ZS 분석기에서 동적 광산란으로 분석하였다. 값은 평균 수평균 크기 분포로서 기록된다.

[0370]

저온-TEM: 첫째로, 200-메쉬 레이시 탄소 지지된 구리 그리드 (Electron Microscopy Sciences)의 표면에

Cressington 208 탄소 코터를 사용하여 40초 동안 플라즈마 처리되었다. 후속하여, 3 μl 의 VHHCD8-아포리포 단백질 A1-함유 나노입자 (~1 mg 단백질/ml)를 그리드에 적용하였고, 자동화 로봇 (FEI Vitrobot Mark IV)을 사용하여 액체 에탄 중에서 플린지 유리화를 통해 얇은 필름으로 유리화하였다. 저온-TEM 영상화는 전계 방사 총 (FEG), 포스트-컬럼 Gatan 영상화 필터 (모델 2002) 및 포스트-GIF 2k x 2k Gatan CCD 카메라 (model 794)가 장착된 cryoITAN (Thermo Fisher Scientific)에서 수행되었다. 영상은 6,500x (1.64 전자/A2·s의 선량률) 또는 24,000X 배율 (11.8 전자/A2·s의 선량률), 및 1초 획득 시간에 영-손실 에너지 여과와 명시야 TEM 방식으로 300 kV 가속 전압에서 획득되었다.

[0371] 마우스 비장세포에서 VHHCD8-apoA1의 시험관내 결합:

[0372] 비장을 마우스로부터 수득하여, 조각으로 절단하고, 70 μm 스트레이너 (Corning)를 통해 다수회 염색해서 비장 세포 현탁액을 수득하였다. 세포를 1500 rpm에서 10분 동안 스핀 다운하고, 상청액을 제거하였고, 세포를 2 mL 1X 적혈 세포 용해 완충액 (Thermofisher)에 용해하였다. 현탁액을 실온에서 5분 동안 인큐베이션하였고, 10 mL의 Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 배지 (Thermofisher)를 첨가하였고, 세포를 다시 1500 rpm에서 10분 동안 스핀 다운하였다. 다음으로 세포를 RPMI 배지에서 재용해하였고, 96웰 플레이트에 150,000 세포/웰로 도말하였다.

[0373] 단백질을 디메틸 술폭시드 (DMSO) 중 술포-시아닌5-말레이미드 (Lumiprobe)를 5x 몰 과량으로 첨가하여 표지하였다. 이러한 혼합물을 실온에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 과량의 염료는 PD minitrap G-25 탈염 컬럼 (Cytiva)을 사용해 제거하였다. 형광 표지 aNP는 원반형 제제 경우 6.4 μg DiI 및 구형 제제 경우 21 μg DiI을 첨가하여 제제화되었다. 형광 표지 용합 단백질 또는 aNP 및 대조군을 웰에 첨가하였고, 30분 동안 4°C (단백질 경우)에서 또는 37°C (aNP 경우)에서 인큐베이션하였고, 이후에 세포를 수확하고, 세척하였고, CD3 및 CD4에 대해 염색하고, Cytoflex (Beckman Coulter Inc.)에서 측정하였다. 유세포측정 데이터는 FlowJo 소프트웨어 (BD)를 사용해 분석하였다.

[0374] **결과**

[0375] VHHCD8-apoA1 용합 단백질은 Clearcoli 세포에서 성공적으로 발현되었다. 미량의 단백질 오염물이 IMAC 정제 후에 존재하였다 [레인 E1] (도 3). 가장 두드러진 밴드는 43.3 kDa의 분자량을 갖는 용합 단백질에 상응한다 (도 3). 올바른 질량은 이후에 질량 분광법을 통해서 확인하였다 (데이터 미도시).

[0376] 원반형 아포리포단백질 나노입자는 VHHCD8-apoA1을 도입시켜서 제제화되었다. 동적 광산란 (DLS)을 사용하여, 입자의 크기 및 다분산성 지수 (PDI)를 결정하였다. 입자의 크기는 7일 동안 안정하게 남아있었다 (데이터 미도시). 14일에, 크기는 약간 증가되었다 (데이터 미도시). PDI는 14일 동안 안정하게 유지되었다 (데이터 미도시). 나노입자의 저온-TEM 영상은 예상되는 원반형 형상을 보였다 (데이터 미도시).

[0377] VHHCD8-apoA1 및 apoA1은 형광 표지되었고, 이후에 마우스 비장세포에 첨가되었다. VHHCD8-apoA1 용합 단백질 경우에, 평균 형광 강도 (MFI)의 용량 의존적 증가가 관찰되어서, CD8 수용체에 대한 용합 단백질의 결합을 의미하였다 (도 4; 하층 패널). apoA1 조건은 이러한 용량 의존적 거동을 보이지 않았고, 대조군 샘플과 유사한 MFI를 가졌다.

[0378] 원반형 및 구형 aNP는 VHHCD8-apoA1 및 apoA1에 의해 제제화되었다. 형광 염료는 입자의 지질 구조에 통합되었다. 마우스 비장세포는 나노입자와 인큐베이션되었다. 양쪽 VHHCD8-apoA1 입자는 MFI의 용량 의존적 증가를 보여서, CD8 수용체에 대한 나노입자의 결합을 의미하였다 (도 5). 원반형 나노입자는 구형 나노입자에 비해서 더 큰 증가를 보였다. MFI의 증가가 apoA1 나노입자 조건에서는 관찰되지 않았다.

[0379] 실시예 5. 재경로화 단백질 또는 펩티드에 용합된 아포리포단백질의 용합 단백질을 포함하는 지질 나노입자의 생체내 생체분포

[0380] **재료 및 방법**

[0381] 구형 VHHCD8-aNP의 제제화

[0382] 모든 인지질은 Avanti Polar Lipids Inc에서 구매하였다. 구형 aNP 경우에, POPC (66.5 μl), PHPC (17.5 μl), 콜레스테롤 (4.5 μl), 및 트리카프릴린 (Sigma-Aldrich) (0.956 g/mL 원액에서 2.8 μl)은 유리 바이알에서 배합하였고 진공 하에서 건조하였다. 최종 필름을 아세토니트릴/메탄올 혼합물 (95:5%, 900 μl 총부피)에 재용해하였다.

[0383] 별도로, PBS 중 VHHCD8-apoA1 단백질 (SEQ ID NO:1)의 용액 (6.5 mL, 0.14 mg/mL)을 2회 제조하였다.

[0384] 양쪽 용액은 지질 용액 경우 0.8 mL/분의 유속 및 apoA1 용액 경우에 6 mL/분의 유속으로 Zeonor 헤딩본 믹서 (Microfluidic Chipshop)에 미세유체 펌프 퓨전 100 (Chemyx Inc)을 사용해 동시에 주입되었다. 수득된 용액을 구형 aNP 경우 50 kDa MWCO Vivaspin 튜브를 4000 rpm에서 사용한 원심분리 여과를 통해 농축하여 1 mL의 부피를 수득하였다. PBS (5 mL)를 첨가하였고, 용액을 1 mL로 농축하였고, 이를 2회 반복하였다. 세척된 용액을 대략 1.5 mL로 농축하였고, 0.22 µm PES 시린지 필터를 통해 여과하여 최종적인 aNP를 수득하였다.

[0385] 표 1. VHHCD8-아포리포단백질 A1 융합 단백질 나노입자 조성 (몰%). DiR: 1,1-디옥타데실-3,3,3-테트라메틸인도트리카르보시아닌; Lyso-PC: 1-팔미토일-2-히드록시-sn-글리세로-3-포스포콜린; POPC: 1-팔미토일-2-올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린.

	몰%
POPC	12.4%
Lyso-PC	4.9%
트리글리세리드	76.1%
콜레스테롤	4.3%
DiR	2%
단백질	0.3%

[0386]

[0387] *마우스에서 VHHCD8-apoA1의 생체내 생체분포 (도 7)*

[0388] 2 몰% DiR (1,1'-디옥타데실-3,3,3',3'-테트라메틸인도트리카르보시아닌 요오다이드)을 갖는 구형 VHHCD8-aNP는 C57BL/6 마우스에게 1 mg/kg DiR의 용량으로 정맥내 주사되었다. 24시간 후에, 마우스를 희생시켰고, 혈액을 얻고, PBS 관류 후에, 다른 관심 조직 (골수, 비장, 및 림프절)을 수확하였다. 조직은 단일 세포 현탁액으로 균질화하였고, 골수 (CD115, F4/80, Ly6C, CD11b, CD45, Ly6G, CD11c), 림프구 (CD45, CD11b, CD3, CD19, CD4, CD8a), 및 전구체 (CD117, CD34, Ly-6A/E, CD135, CD16/32, CD48, CD41, CD150, CD3, CD11b, CD45R/B220, Ly-76, Ly6G, Ly6C) 세포 마커에 대해 염색하고, Cytotflex (Beckman Coulter Inc.)에서 분석하였다. 유세포측정 분석은 FlowJo 소프트웨어 (BD)를 사용해 분석되었다.

[0389] **결과**

[0390] VHHCD8-아포리포단백질 A1을 함유하는 구형 지질 나노입자는 그들 유체역학 크기 (수평균) 및 다분산 지수 (Pdi)를 결정하기 위해 DLS를 사용해 특징규명되었고, 극저온 전자현미경을 사용하여 그들 크기 및 형상을 결정하였다 (도 6).

[0391] 생체내 생체분포 데이터는 VHHCD8-아포리포단백질 A1 융합 단백질 나노입자가 대조군 아포리포단백질 A1 단백질 나노입자와 비교했을 때 골수, 비장 및 혈액에서 유의하게 더 적은 골수성 세포와 회합된 것으로 확인된다 (도 8A). VHHCD8-아포리포단백질 A1 융합 단백질 나노입자는 대조군 아포리포단백질 A1 단백질 나노입자와 비교했을 때 골수, 비장 및 혈액에서 유의하게 더 많은 CD8+ T 세포와 회합되었다 (도 8B). VHHCD8-아포리포단백질 A1 융합 단백질 나노입자는 대조군 아포리포단백질 A1 단백질 나노입자와 비교했을 때 골수, 비장 및 혈액에서 더 적은 CD4+ T 세포와 회합되었다 (도 8C). 또한, VHHCD8-아포리포단백질 A1 융합 단백질 나노입자는 대조군 아포리포단백질 A1 단백질 나노입자와 비교했을 때 골수, 비장 및 혈액에서 더 많은 CD3+ T 세포와 회합되었다 (도 8D). 림프절에서, VHHCD8-아포리포단백질 A1 융합 단백질 나노입자는 대조군 아포리포단백질 A1 단백질 나노입자와 비교했을 때 더 많은 CD8+ 또는 CD3+와 회합되었고, VHHCD8-아포리포단백질 A1 융합 단백질 나노입자는 대조군 아포리포단백질 A1 단백질 나노입자와 비교했을 때 림프절에서 더 적은 CD4+ T 세포와 회합되었다 (도 9).

[0392] VHHCD8-아포리포단백질 A1 융합 단백질 나노입자는 대조군 아포리포단백질 A1 단백질 나노입자와 비교했을 때 골수, 혈액, 비장, 및 림프절에서 더 많은 CD8+ T 세포와 회합되었다 (도 10). 처리 그룹 간에 CD4+ T 세포 관여의 차이는 없었다 (도 10).

[0393] **실시예 6. 재경로화 펩티드 또는 단백질에 융합된 아포리포단백질의 융합 단백질 및/또는 면역조절 생물분자에 융합된 아포리포단백질의 융합 단백질을 포함하는 지질 나노입자**

[0394] **재료 및 방법**

[0395] ApoA1-IL-2는 1 mM DTT 중에 실온에서 2시간 동안 인큐베이션하여서 단백질의 시스테인 간 디설피드 결합이 파괴되도록 환원되었다. ApoA1-IL-2 및 VHHCD8-apoA1은 실시예 4에 기술된 바와 같은, 각각 cy3 및 cy5로 형

광 표시되었다.

[0396] apoA1-IL-2 융합 단백질은 SEQ ID NO: 3 또는 5에 의해 정의되는 바와 같은 서열을 갖거나, 또는 SEQ ID NO: 4 또는 6에 의해 정의되는 바와 같은 서열에 의해 코딩된다.

[0397]

S E Q I D N O :	서열
3	MDDPPQSPWDRVKDLATVYVDVLKDSGRDYVSQFEGSALGKQLNLKLLDNWDSVTSTF SKLREQLGPVVTQEFWDNLEKETEGLRQEMSKDLEEVKAKVQPYLDDFQKKWQEEMELY RQKVEPLRAELQEGARQKLHELQEKLSPLGEEMRDRARAHVDALRTHLAPYSDELQRRL AARLEALKENGARLAEYHAKATEHLSTLSEKAKPALEDLRQGLLPVLESFKVSFLSALEE YTKKLNLTQGSQSGSGSGSGTAPTSSSTKKTQLQLEHLLDLQMLNGINNYKNPKLTRML

4	TFKFYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETT FMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLTGSGSGSGSGSGASHHHHHH ATGGATGATCCACCTCAAAGTCCATGGGATCGCGTGAAGGACCTGGCCACTGTGTAC GTGGATGTGCTCAAAGACAGCGGCAGAGACTATGTGTCTCAGTTTGAAGGATCCGCC TTGGGCAAACAATTGAACCTTAAGCTGCTGGACAACCTGGACAGCGTGACGTCCACC TTCAGCAAGCTGCGCGAACAGCTCGGCCCTGTGACCCAGGAATTCTGGGATAACCTG GAAAAGGAGACAGAGGGCCTGCGCCAGGAGATGAGCAAGGATCTGGAGGAGGTGAA GGCCAAGGTGACGCCGTACCTGGACGACTTCCAGAAGAAGTGGCAGGAGGAAATGG AGTTATATCGCCAAAAGGTGAGCCGCTGCGCGCAGAGCTGCAGGAGGGCGCGCGC CAGAAGCTGCACGAGCTGCAAGAGAAGCTGAGCCATTAGGTGAAGAAATGCGTGA CCGCGCGCGCGCACATGTCGACGCATTACGCACACATTTAGCGCCGTACTCTGACG AGCTGCGCCAGCGCTTAGCGGCGCGCCTTGAGGCTCTCAAGGAGAACGGTGGAGCT CGCTTAGCAGAATATCACGCCAAGGCCACCGAGCATCTGAGCACGCTCAGCGAGAA GGCCAAGCCGGCGCTCGAGGACCTGCGCCAAGGCCCTGCTGCCGGTGTGGAGAGC TTCAAGGTCAGCTTCTGAGCGCTCTGGAAGAGTACACTAAGAAGCTTAACACCCAG GGTTCTGGTAGCGGCTCTGGTTCTGGTTCTGGTACCGCGCCGACCAGCAGCAGCAC CAAGAAGACCCAGCTGCAACTGGAACACCTGCTGCTGGACCTGCAAAATGATTCTGAA CGGTATCAACAACACTACAAGAACCCGAAACTGACCCGATGCTGACCTTCAAGTTTTAT ATGCCGAAGAAAGCGACCGAGCTGAAGCACCTGCAATGCCTGGAGGAAGAGCTGAA ACCGCTGGAAGAGGTGCTGAACCTGGCGCAAAGCAAGAACTTCCACCTGCGTCCGC GTGACCTGATCAGCAACATTAACGTGATCGTTCTGGAAGTGAAGGCAGCGAGACCA CCTTTATGTGCGAATATGCGGATGAGACCGCGACCATTTGTTGAGTTCCTGAACCGTT GGATCACCTTTTGGCAGAGCATCATTAGCACCCCTGACCGGCTCTGGTAGCGGCTCTG GTTCTGTTCTGGTGTAGCCATCACCATCACCATCATTA
5	MDDPPQSPWDRVKDLATVYVDVLKDSGRDYVSQFEGSALGKQLNLKLLDNWDSVTSTF SKLREQLGPVVTQEFWDNLEKETEGLRQEMSKDLEEVKAKVQPYLDDFQKKWQEEMELY RQKVEPLRAELQEGARQKLHELQEKLSPLGEEMRDRARAHVDALRTHLAPYSDELQRRL AARLEALKENGARLAEYHAKATEHLSTLSEKAKPALEDLRQGLLPVLESFKVSFLSALEE YTKKLNLTQGSQSGSGSGSGTAPTSSSTKKTQLQLEHLLDLQMLNGINNYKNPKLTRML TAKFAMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETT FMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLTGSGSGSGSGSGASHHHHHH
6	ATGGATGATCCACCTCAAAGTCCATGGGATCGCGTGAAGGACCTGGCCACTGTGTAC GTGGATGTGCTCAAAGACAGCGGCAGAGACTATGTGTCTCAGTTTGAAGGATCCGCC TTGGGCAAACAATTGAACCTTAAGCTGCTGGACAACCTGGACAGCGTGACGTCCACC TTCAGCAAGCTGCGCGAACAGCTCGGCCCTGTGACCCAGGAATTCTGGGATAACCTG GAAAAGGAGACAGAGGGCCTGCGCCAGGAGATGAGCAAGGATCTGGAGGAGGTGAA GGCCAAGGTGACGCCGTACCTGGACGACTTCCAGAAGAAGTGGCAGGAGGAAATGG AGTTATATCGCCAAAAGGTGAGCCGCTGCGCGCAGAGCTGCAGGAGGGCGCGCGC CAGAAGCTGCACGAGCTGCAAGAGAAGCTGAGCCATTAGGTGAAGAAATGCGTGA CCGCGCGCGCGCACATGTCGACGCATTACGCACACATTTAGCGCCGTACTCTGACG AGCTGCGCCAGCGCTTAGCGGCGCGCCTTGAGGCTCTCAAGGAGAACGGTGGAGCT CGCTTAGCAGAATATCACGCCAAGGCCACCGAGCATCTGAGCACGCTCAGCGAGAA GGCCAAGCCGGCGCTCGAGGACCTGCGCCAAGGCCCTGCTGCCGGTGTGGAGAGC TTCAAGGTCAGCTTCTGAGCGCTCTGGAAGAGTACACTAAGAAGCTTAACACCCAG GGTTCTGGTAGCGGCTCTGGTTCTGGTTCTGGTACCGCGCCGACCAGCAGCAGCAC CAAGAAGACCCAGCTGCAACTGGAACACCTGCTGCTGGACCTGCAAAATGATTCTGAA CGGTATCAACAACACTACAAGAACCCGAAACTGACCCGATGCTGACCGCGAAGTTTgct ATGCCGAAGAAAGCGACCGAGCTGAAGCACCTGCAATGCCTGGAGGAAGAGCTGAA ACCGCTGGAAGAGGTGCTGAACgggCGCGCAAAGCAAGAACTTCCACCTGCGTCCGCG TGACCTGATCAGCAACATTAACGTGATCGTTCTGGAAGTGAAGGCAGCGAGACCAC CCTTTATGTGCGAATATGCGGATGAGACCGCGACCATTTGTTGAGTTCCTGAACCGTTG GATCACCTTTgcccCAGAGCATCATTAGCACCCCTGACCGGCTCTGGTAGCGGCTCTGGT TCTGTTCTGGTGTAGCCATCACCATCACCATCATTA

[0398]

[0399] 원반형 aNP는 513 μ g apoA1-IL-2 및 467 μ g VHHCD8-apoA1와 함께 제제화되었다. 구형 aNP는 2개 크기로 제제화되었는데, 단지 트리글리세리드 함량만 가변적이었다. 대형 구형을 실시예 5에 기술된 바와 같이 제제화하였고, 소형 구형은 대형 구형의 트리글리세리드 함량의 절반으로 제제화되었다. 단지 apoA1-IL-2 (도너)만을 갖는 구형은 1025 μ g의 apoA1-IL-2를 함유하였다. 단지 VHHCD8-apoA1 (억셉터)만을 갖는 구형은 921 μ g의 VHHCD8-apoA1를 함유하였다. 도너 및 억셉터의 1:1 믹스를 갖는 대형 및 소형 구형은 513 μ g의

apoA1-IL-2 및 467 μg 의 VHHCD8-apoA1을 함유하였다.

[0400] PBS 중 aNP는 검은색 96웰 플레이트 (Thermo Fisher Scientific-Nunc)에 웰 당 100 μl 로 피펫팅하였다. 도너 단독 구형 및 억셉터 단독 구형의 1:1 믹스 경우에, 50 μl 의 각각의 제제를 웰에 넣었다. 형광 표지된 apoA1-IL-2 및 VHHCD8-apoA1의 1:1 믹스 (몰비)는 대조군으로서 포함되었다. 샘플은 520 nm에서 여기되었고, 방출은 Spark 플레이트 판독기 (Tecan)에서 5 nm의 스텝 크기로 560 nm와 780 nm 사이에서 검출되었다. 데이터는 각 과정에서 1개 샘플의 강도를 565 (도너 방출 최대치)에서 그 샘플의 강도로 나누어서 정규화되었다.

[0401] **결과**

[0402] FRET 결과는 VHHCD8-아포리포단백질 A1 및 IL-2-아포리포단백질 A1 융합 단백질 둘 모두는 1개 지질 나노입자 제제로 쉽고 안정하게 도입될 수 있다는 것을 의미한다 (도 11).

[0403] **실시예 6. mRNA를 함유하는 CD8+ T 세포 표적화 아포리포단백질 나노입자의 생산, 분석, 및 평가**

[0404] **재료 및 방법**

[0405] **아포리포단백질 나노입자 생산**

[0406] CD8-aNP-mRNA는 T-접합 믹서를 통한 급속 혼합으로 제조된다. 양이온성 이온화가능한 지질 ALC-0315, 디미리스토폴로스파티딜콜린 (DMPC), 콜레스테롤, 및 트리카프릴린은 10 mM의 전체 지질의 최종 농도까지 적절한 몰비 (표 2)에서 에탄올에 용해된다. mRNA는 pH 4.0의 25 mM 소듐 아세테이트 완충액에 용해되어서 0.0278 (N/P 6)의 정의된 핵산 대 지질 중량/ μmol 비를 갖는 최종 혼합물이 수득되었다. 제1 혼합 단계에서, 유기 및 수성 용액은 1:3 (v:v)의 흐름 비 및 28 mL/분의 전체 유속으로 혼합된다. 최종 혼합물은 1000배 부피의 포스페이트-완충 염수 (PBS) pH 7.4에 대해서 밤새 투석된다. 제2 혼합 단계에서, mRNA를 함유하는 지질 나노입자 및 CD8VHH-아포리포단백질 A1 융합 단백질은 1:3 (v:v)의 흐름 비 및 28 mL/분의 전체 유속으로 혼합된다. 최종 CD8-aNP-mRNA는 평균 여과 (0.2 μm)되고, 원심분리 흐름 여과를 사용해 농축되었다.

[0407] 표 2. CD8-aNP-mRNA 조성 (몰비)

DMPC	ALC-0315	콜레스테롤	CD8-아포리포단백질	mRNA	트리카프릴린
9	19	21	0.08	0.03	51

[0408] **아포리포단백질 나노입자 물리화학적 분석**

[0410] CD8-aNP-mRNA는 동적 광산란에 의한 크기 분포, 레이저 도플러 전기영동에 의한 제타 전위, Ribogreen 어세이에 의한 mRNA 캡슐화 효율, 및 전용 비색 어세이를 사용한 콜레스테롤/인지질 함량에 따라서 특징규명된다.

[0411] **아포리포단백질 나노입자 생체의 평가**

[0412] 비장을 마우스에서 얻고, 조각으로 절단하여, 70 μm 스트레이너 (Corning)를 통해 다수회 걸러서 비장세포 현탁액을 얻는다. 세포를 1500 rpm에서 10분 동안 스핀 다운하고, 상청액을 제거하였으며, 세포를 2 mL 1X 적혈 세포 용해 완충액 (Thermofisher)에 용해한다. 세포 현탁액을 실온에서 5분 동안 인큐베이션하였고, 10 mL RPMI 배지 (Thermofisher)를 첨가하고, 세포를 다시 1500 rpm에서 10분 동안 스핀 다운한다. 다음으로 세포를 RPMI 배지에 재용해하고, 96웰 플레이트에 150,000 세포/웰로 도말한다. mCherry를 코딩하는 CD8-aNP-mRNA 및 대조군 제제를 적절한 농도로 웰에 첨가하고 6시간 동안 37°C에서 인큐베이션하고, 이후에 세포를 수확하고, 세척하며, CD3 및 CD4에 대해 염색하고, Cytoflex (Beckman Coulter Inc.)에서 측정한다. 유세포 측정 데이터는 FlowJo 소프트웨어 (BD)를 사용해 분석된다.

[0413] **아포리포단백질 나노입자 생체내 평가**

[0414] mCherry를 코딩하는 CD8-aNP-mRNA 및 대조군 제제는 C57BL/6 마우스에서 0.5 mg/kg mRNA의 용량으로 정맥내 주사된다. 6시간 후에, 마우스를 희생시키고, 혈액을 수확하고, PBS 관류 이후 다른 관심 조직 (골수, 비장 및 림프절)을 수확한다. 조직을 단일 세포 현탁액으로 균질화하고, 골수구 (CD115, F4/80, Ly6C, CD11b, CD45, Ly6G, CD11c), 림프구 (CD45, CD11b, CD3, CD19, CD4, CD8a), 및 전구체 (CD117, CD34, Ly-6A/E, CD135, CD16/32, CD48, CD41, CD150, CD3, CD11b, CD45R/B220, Ly-76, Ly6G, Ly6C) 세포 마커에 대해 염색하고, Cytoflex (Beckman Coulter Inc.)에서 분석한다. 유세포 측정 데이터는 FlowJo 소프트웨어 (BD)를 사용해 분석된다.

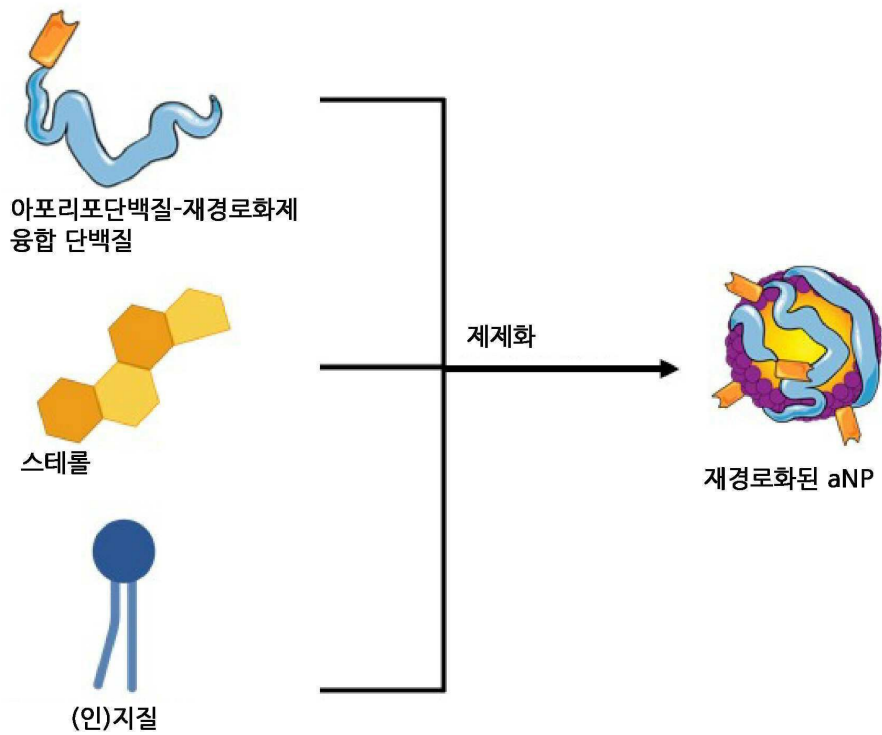
를 사용해 분석된다.

[0415] **결과**

[0416] 형광 mCherry 단백질을 코딩하는 mRNA를 함유하는 apoA1 aNP, VHHCD8-apoA1 aNP, 및 VHHGFP-apoA1 aNP와 생체 외에서 인큐베이션된 마우스 비장세포의 유세포측정 분석은 도 12에 도시된다 (좌측 패널: CD3+ CD4- mCherry+ T 세포, 우측 패널: CD11b+ mCherry+ 골수성 세포). 결과는 VHHCD8-apoA1 aNP가 apoA1 aNP, VHHGFP-apoA1 aNP 및 리포펙타민 대조군과 비교했을 때 유의하게 더 많은 CD3+ CD4- T 세포에서 기능성 mCherry 리포터 유전자 발현을 유도한다는 것을 보여준다. ApoA1 aNP는 VHHCD8-apoA1 aNP, VHHGFP-apoA1 aNP 및 리포펙타민 대조군과 비교했을 때 유의하게 더 많은 CD11b+ 골수성 세포에서 기능성 mCherry 리포터 유전자 발현을 유도한다. 이들 결과는 apoA1 aNP가 골수성 세포와 상호작용하는 자연적 경향을 가지며, 이들 aNP는 아포리포단백질 및 표적화 모이어티의 융합 단백질을 도입하여 다른 면역 세포 (예컨대, CD8+ T 세포)로 재경로화될 수 있다는 것을 의미한다.

도면

도면1

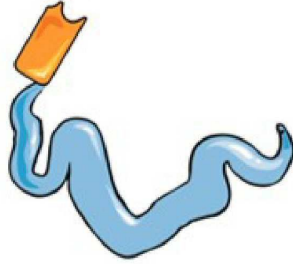


도면2

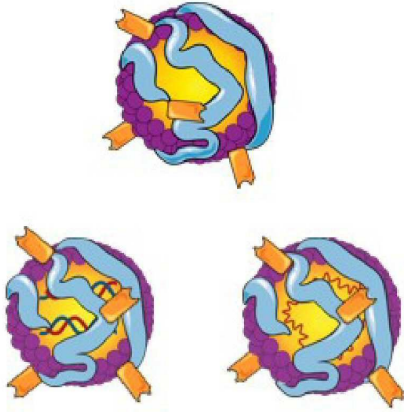
A 재경로화 단백질



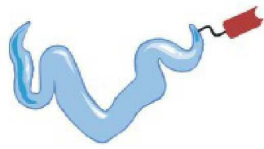
B 아포리포단백질-재경로화제 융합 단백질



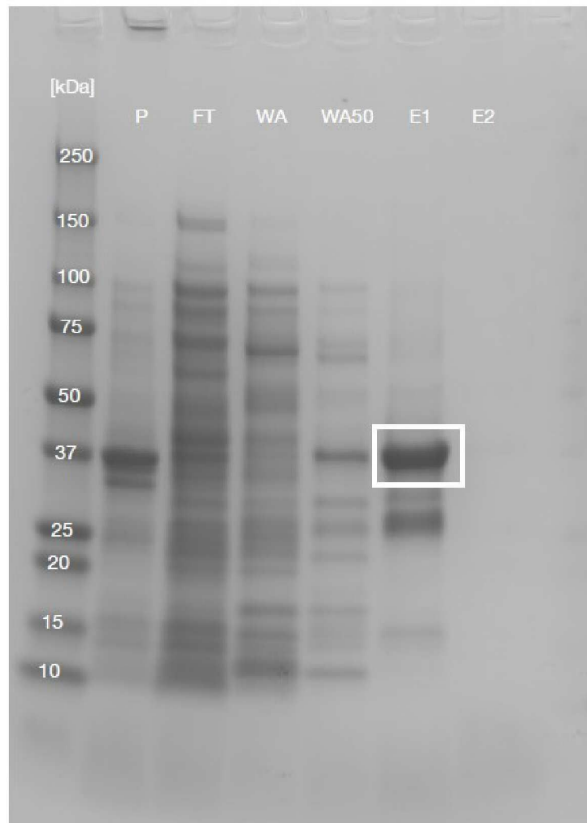
C 아포리포단백질-재경로화제 융합 단백질 나노입자



도면3



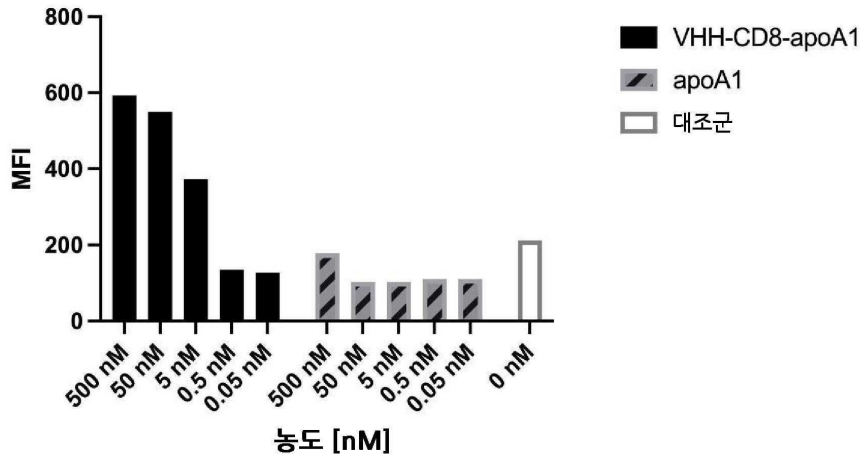
VHHCD8-apoA1
융합 단백질



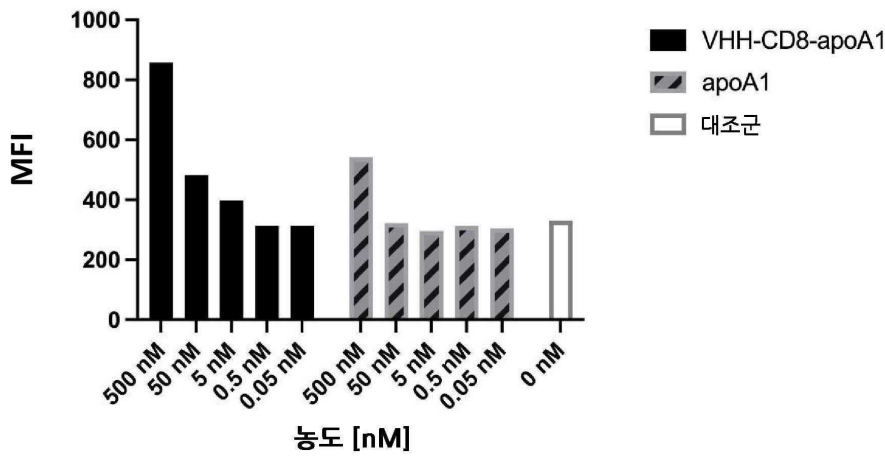
도면4



CD3+ T 세포의 MFI APC (CD8+)



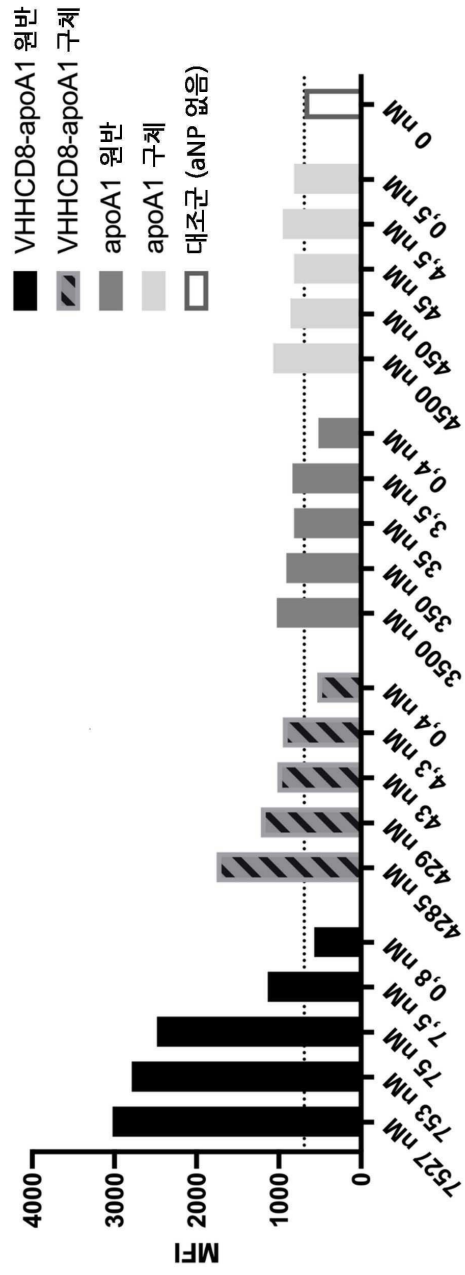
생 비장세포의 MFI APC (CD8+)



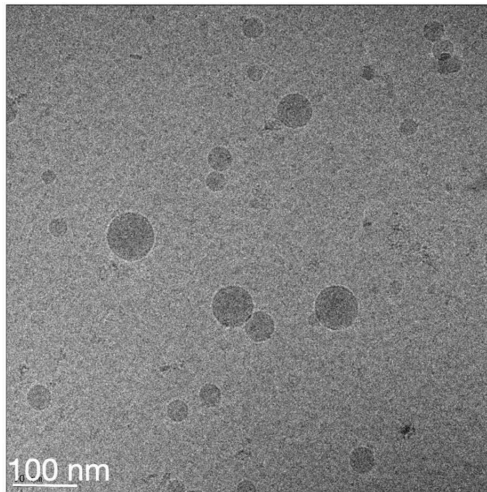
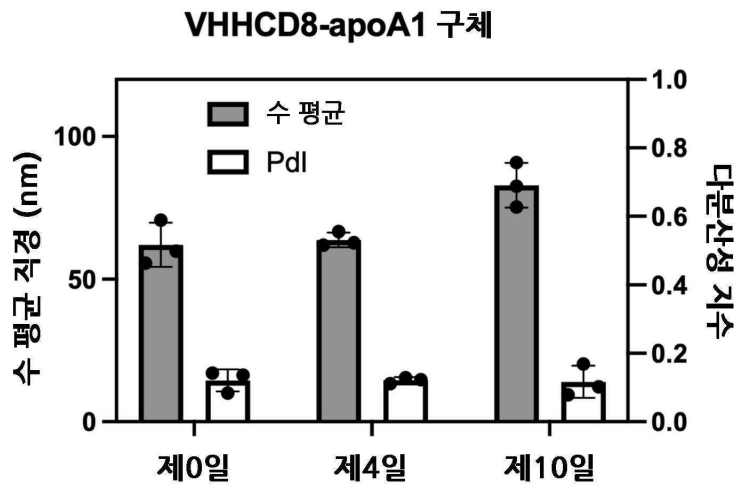
도면5



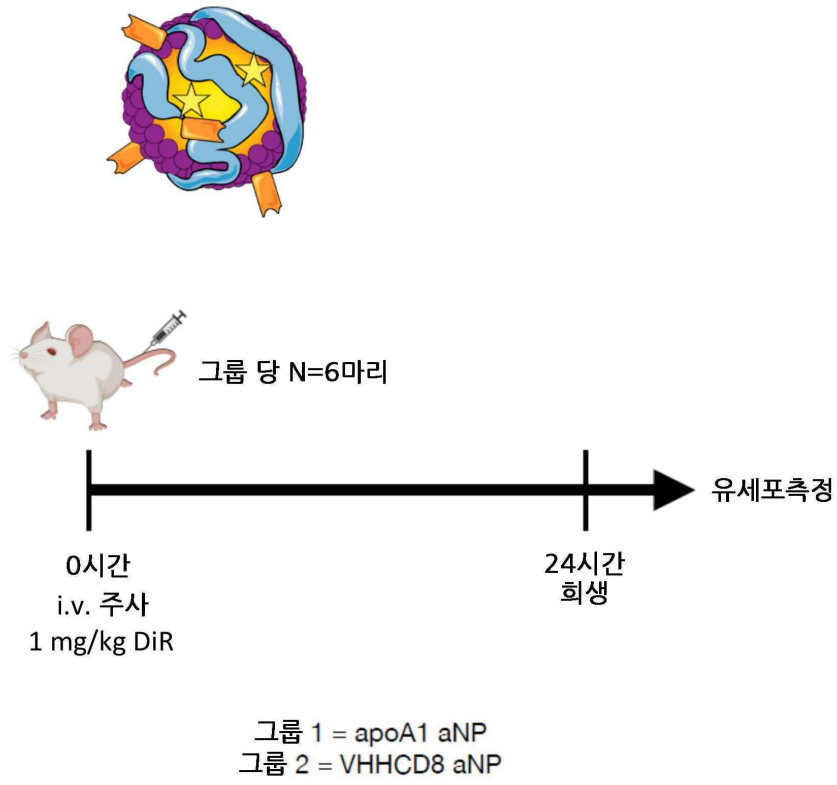
생 비장세포의 MFI aNP (Dil)



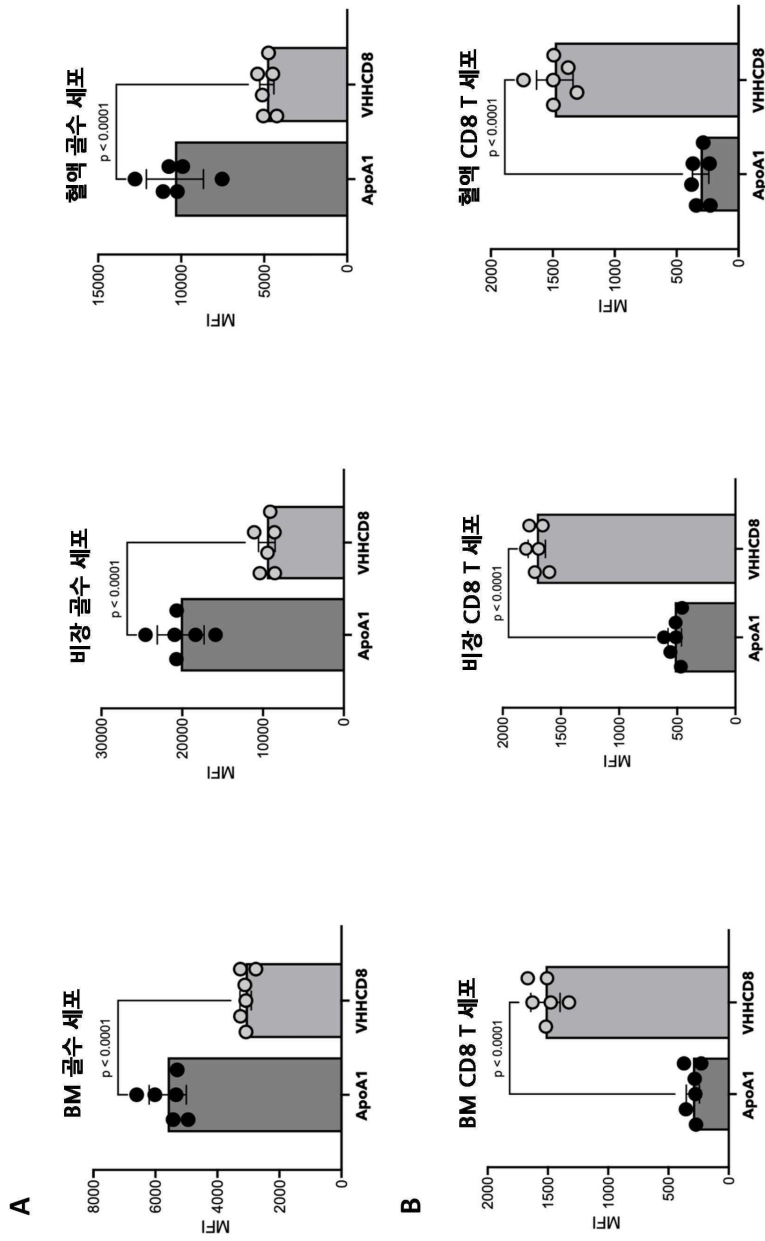
도면6



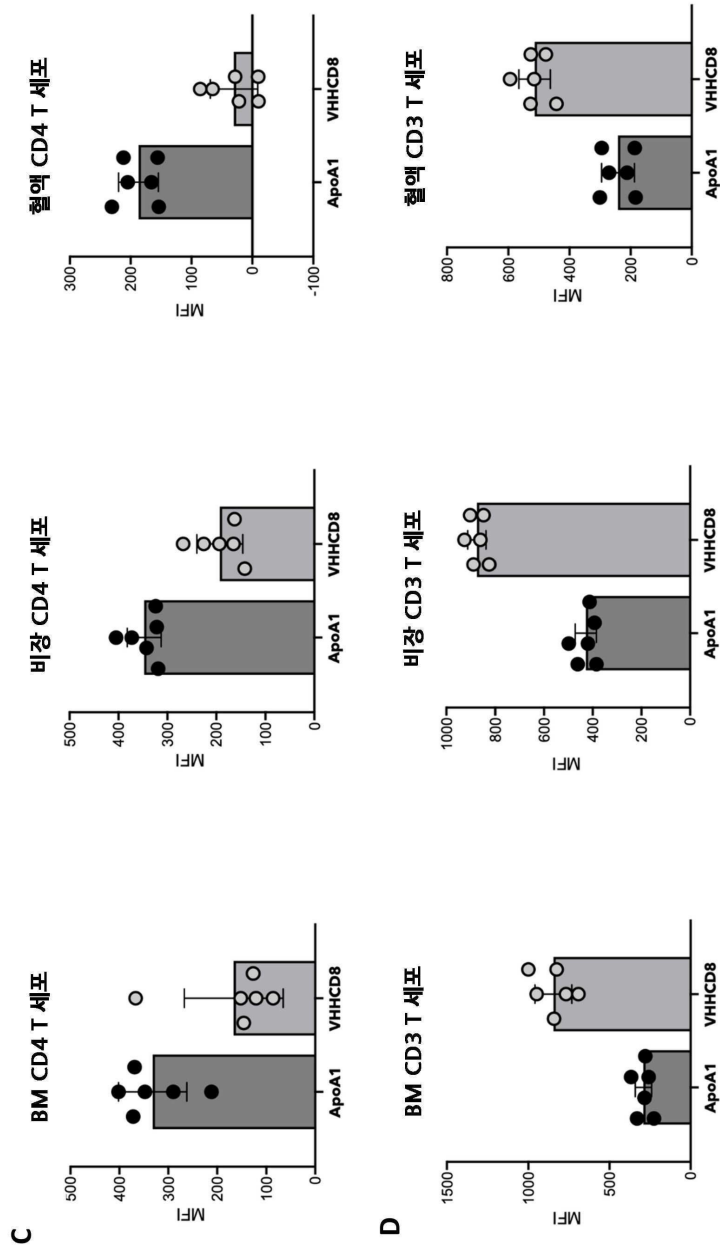
도면7



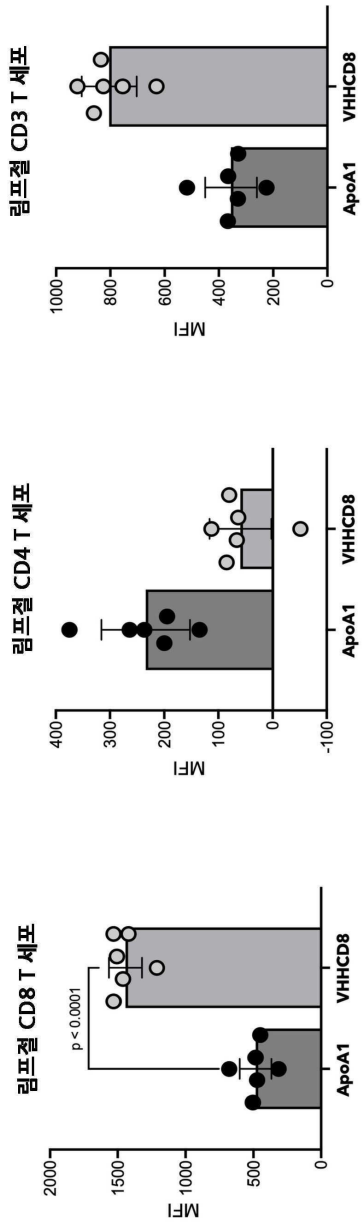
도면8a



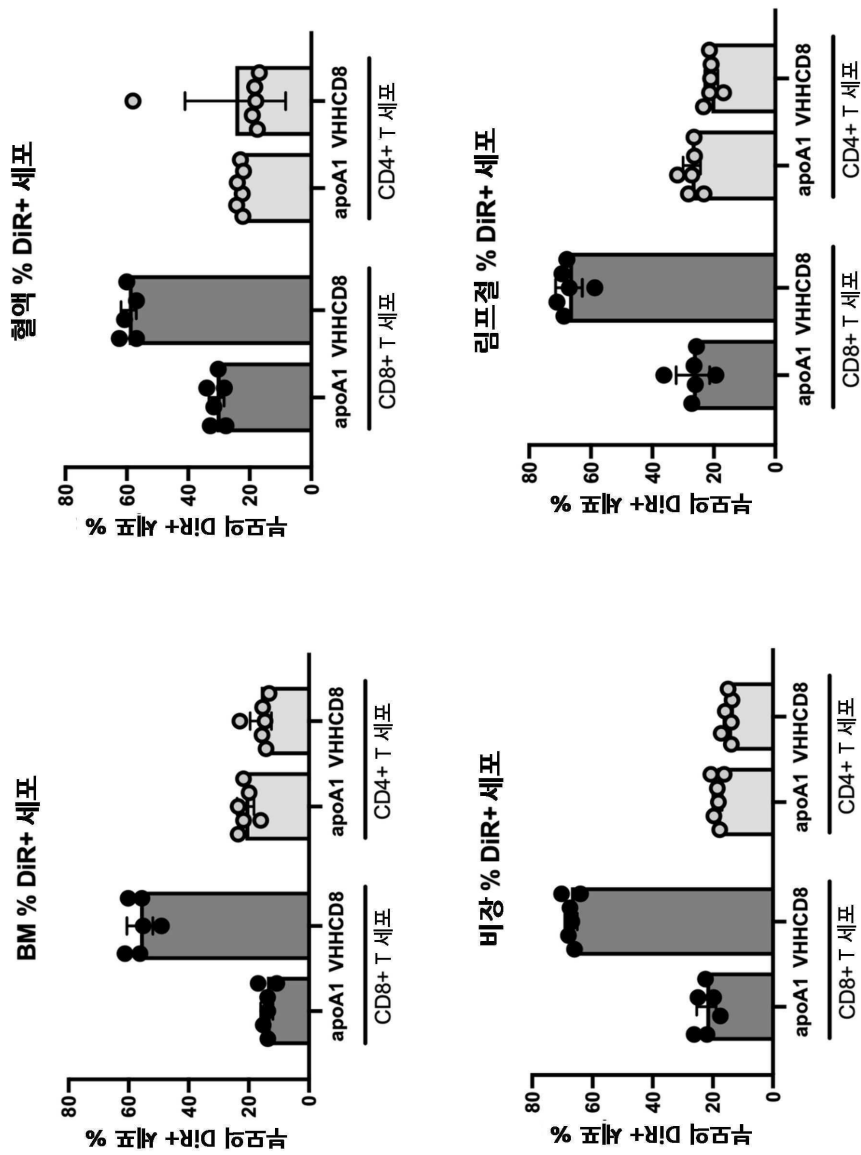
도면8b



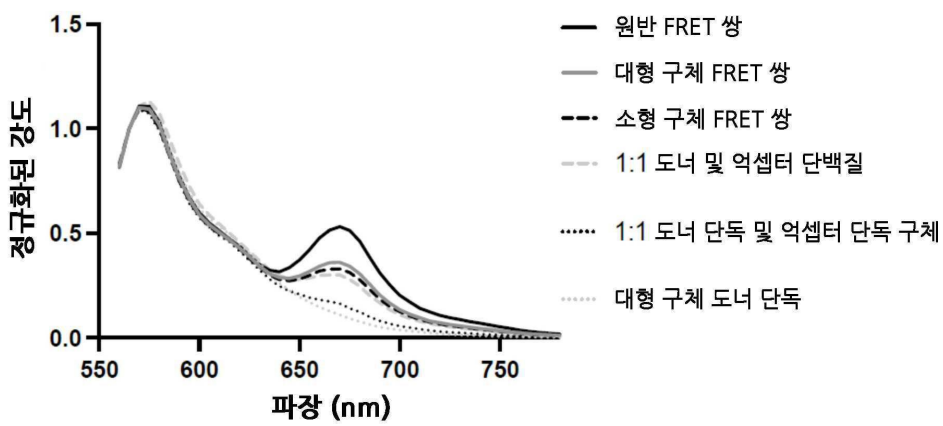
도면9



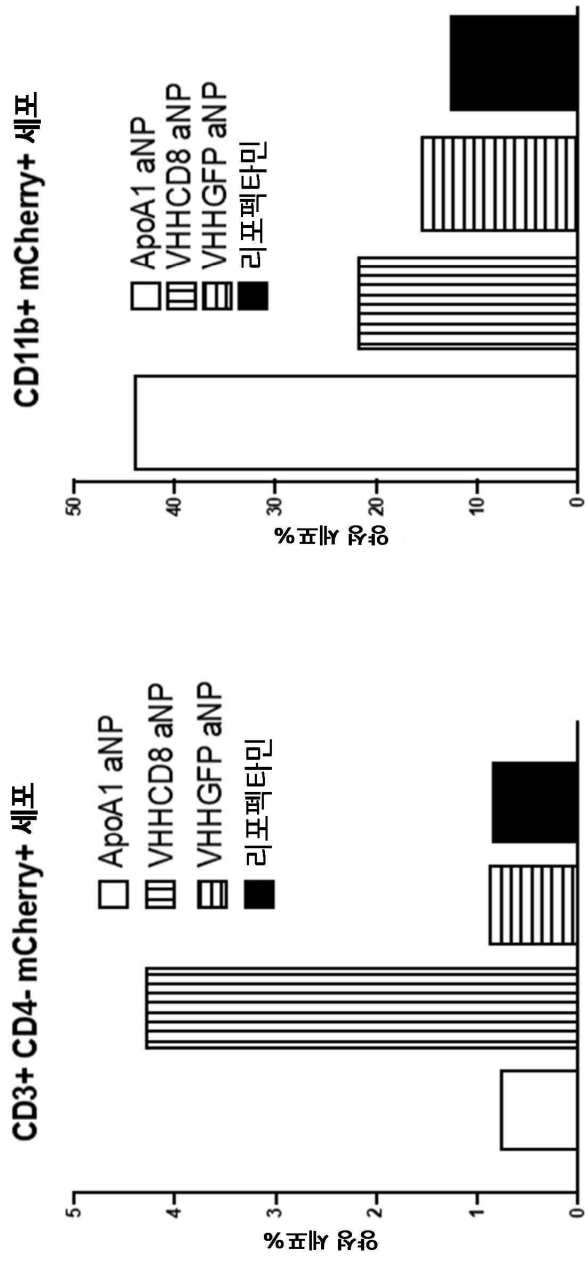
도면10



도면11



도면12



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.