



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0113580
(43) 공개일자 2023년07월31일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/127 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61K 47/26 (2017.01) A61K 48/00 (2006.01)
C12N 15/88 (2017.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 9/1271 (2013.01)
A61K 39/00 (2023.05)
- (21) 출원번호 10-2023-7021292
- (22) 출원일자(국제) 2021년11월24일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2023년06월23일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2021/060745
- (87) 국제공개번호 WO 2022/115547
국제공개일자 2022년06월02일
- (30) 우선권주장
63/118,243 2020년11월25일 미국(US)

- (71) 출원인
트랜슬레이트 바이오 인코포레이티드
미국 매사추세츠주 02451 월섬 웨스트 스트리트 200
- (72) 발명자
카르브, 쉬리랑
미국 02141 매사추세츠 케임브리지 워터 스트리트 450 사노피 페이턴트 디파트먼트 내
사로테, 아시쉬
미국 02141 매사추세츠 케임브리지 워터 스트리트 450 사노피 페이턴트 디파트먼트 내
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
양영준, 이상영

전체 청구항 수 : 총 47 항

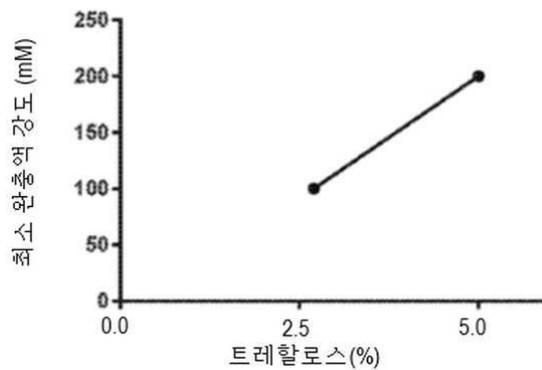
(54) 발명의 명칭 **안정한 액체 지질 나노입자 제형**

(57) 요약

본 발명은, -20℃에서 동결과 해동을 여러 번 거친 후 응집 및 mRNA 분해에 내성을 갖는, 펩티드 또는 폴리펩티드를 암호화하는 mRNA를 캡슐화하는 액체 지질 나노입자(LNP) 제형을 특히 제공한다.

대표도 - 도1a

pH 7.5에서의
안정성 요건



(52) CPC특허분류

A61K 47/26 (2013.01)

A61K 48/0041 (2013.01)

A61K 9/1272 (2013.01)

C12N 15/88 (2013.01)

A61K 2039/53 (2013.01)

(72) 발명자

마르가스 몬토야, 나탈리아

미국 02141 매사추세츠 케임브리지 워터 스트리트
450 사노피 페이턴트 디파트먼트 내

파텔, 프리알

미국 02141 매사추세츠 케임브리지 워터 스트리트
450 사노피 페이턴트 디파트먼트 내

데로사, 프랭크

미국 02141 매사추세츠 케임브리지 워터 스트리트
450 사노피 페이턴트 디파트먼트 내

명세서

청구범위

청구항 1

펩티드 또는 폴리펩티드를 암호화하는 mRNA를 캡슐화하고, 응집 및 mRNA 분해에 내성이 있는 액체 지질 나노입자(LNP)로서, 상기 LNP 제형은:

- a. 양이온성 지질, 비-양이온성 지질, PEG-변형 지질, 및 임의로 콜레스테롤을 포함하거나 이로 이루어진 지질 성분을 갖는 하나 이상의 LNP;
- b. 하나 이상의 지질 나노입자 내에 캡슐화되고, 펩티드 또는 폴리펩티드를 암호화하는 mRNA;
- c. 당 또는 당 알코올;
- d. pH가 6.0 내지 8.0인 LNP 제형;
- e. 최소 완충된 이온 강도에서 LNP 제형에 pH를 제공하는 pH 완충액;
- f. 임의로, LNP 제형에 이온 강도를 제공하는 하나 이상의 추가 제제를 포함하되,

(e)의 pH 완충액 및 임의로 (f)의 하나 이상의 추가 제제의 총 농도는, 최소 완충된 이온 강도보다 적어도 2배 더 큰 LNP 제형의 이온 강도를 제공하는, LNP 제형.

청구항 2

제1항에 있어서, -20°C 에서 동결과 재해동을 3회 거친 후에 LNP 제형은, 최소 완충된 이온 강도보다 적어도 2배 더 큰 이온 강도 대신에 LNP 제형 내에 최소 완충된 이온 강도만을 갖는 동일한 LNP 제형과 비교했을 때, (i) 더 적은 응집을 나타내거나, (ii) 캡슐화된 mRNA의 더 적은 분해를 나타내거나, (iii) (i) 및 (ii) 둘 다를 나타내는, LNP 제형.

청구항 3

제1항에 있어서, 비-양이온성 지질은 1,2-디에루코일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(DEPE), 디스테아로일포스파티딜콜린(DSPC), 디올레오일포스파티딜콜린(DOPC), 디팔미토일포스파티딜콜린(DPPC), 디올레오일포스파티딜글리세롤(DOPG), 디팔미토일포스파티딜글리세롤(DPPG), 디올레오일포스파티딜에탄올아민(DOPE), 팔미토일올레오일포스파티딜콜린(POPC), 팔미토일올레오일-포스파티딜에탄올아민(POPE), 디올레오일-포스파티딜에탄올아민 4-(N-말레이미도메틸)-시클로헥산-1-카복실레이트(DOPE-mal), 디팔미토일 포스파티딜 에탄올아민(DPPE), 디미리스토일포스포에탄올아민(DMPE), 디스테아로일-포스파티딜-에탄올아민(DSPE), 16-0-모노메틸 PE, 16-0-디메틸 PE, 18-1-트랜스 PE, 또는 1-스테아로일-2-올레오일-포스파티딜에탄올아민(SOPE)으로부터 선택되는, LNP 제형.

청구항 4

제3항에 있어서, 비-양이온성 지질은 디올레오일포스파티딜에탄올아민(DOPE)인, LNP 제형.

청구항 5

제4항에 있어서, DOPE는 10% 이상, 예를 들어 10%-30%의 지질 몰비로 존재하는, LNP 제형.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 양이온성 지질은 리피도이드이고, 임의로 리피도이드는 40%-60%, 예를 들어 40%-50%의 지질 몰비인, LNP 제형.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, mRNA는 대상체에서 결핍된 단백질을 암호화하는, LNP 제형.

청구항 8

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, mRNA는 백신 항원을 암호화하는, LNP 제형.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 당 또는 당 알코올은 텍스트로오스, 소르비톨, 트레할로스, 수크로오스, 라피노오스, 텍스트란, 및 이눌린으로 이루어진 군으로부터 선택되는, LNP 제형.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 당은 이당류인, LNP 제형.

청구항 11

제10항에 있어서, 이당류는 약 1%~20%의 농도로 존재하는, LNP 제형.

청구항 12

제11항에 있어서, 이당류는 약 2.5%~3.0%의 농도로 존재하는, LNP 제형.

청구항 13

제12항에 있어서, 이당류 대 완충액 비는 0.2~0.5인, LNP 제형.

청구항 14

제10항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 이당류는 트레할로스인, LNP 제형.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, pH는 약 6.0 내지 약 8.0, 예를 들어 6.0~7.0, 6.5~7.5, 또는 7.0~8.0인, LNP 제형.

청구항 16

제1항에 있어서, pH는 7.4인, LNP 제형.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, pH 완충액은 6.0 내지 8.2의 pKa를 갖는, LNP 제형.

청구항 18

제17항에 있어서, 완충액은 인산염 완충액, 구연산염 완충액, 이미다졸 완충액, 히스티딘 완충액, 및 굿즈 완충액(Good's buffer)으로 이루어진 군으로부터 선택되는, LNP 제형.

청구항 19

제18항에 있어서, 굿즈 완충액은 트리스 완충액 또는 HEPES 완충액인, LNP 제형.

청구항 20

제18항 또는 제19항에 있어서, pH 완충액은 인산염 완충액(예: 구연산염-인산염 완충액), 트리스 완충액, 또는 이미다졸 완충액인, LNP 제형.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 최소 완충된 이온 강도는 적어도 75 mM, 적어도 100 mM, 적어도 125 mM, 적어도 150 mM, 또는 적어도 200 mM인, LNP 제형.

청구항 22

제21항에 있어서, 최소 완충된 이온 강도는 약 75 mM~200 mM, 75 mM~150 mM, 75 mM~100 mM, 또는 100 mM~200 mM인, LNP 제형.

청구항 23

제22항에 있어서, 최소 완충된 이온 강도는 100 mM~200 mM인, LNP 제형.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 이온 강도를 제공하는 하나 이상의 제제는 염 또는 당을 포함하는, LNP 제형.

청구항 25

제24항에 있어서, 염은 NaCl, KCl, 및 CaCl₂로 이루어진 군으로부터 선택되고, 당은 트레할로스인, LNP 제형.

청구항 26

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 이온 강도를 제공하는 하나 이상의 추가 제제의 총 농도는 약 50~300 mM, 50~150 mM, 또는 75~125 mM인, LNP 제형.

청구항 27

제26항에 있어서, pH 완충액의 총 농도는 약 15~250 mM, 30~150 mM, 또는 40~50 mM인, LNP 제형.

청구항 28

제26항에 있어서, 이온 강도를 제공하는 pH 완충액 및 하나 이상의 추가 제제의 총 농도는 약 40 mM 트리스 완충액 및 약 50~200 mM NaCl; 약 50 mM 트리스 완충액 및 약 50 mM~200 mM NaCl; 약 100 mM 트리스 완충액 및 약 50 mM~200 mM NaCl; 약 40 mM 이미다졸 및 약 50 mM~200 mM NaCl; 약 50 mM 이미다졸 및 50 mM~200 mM NaCl; 약 100 mM 이미다졸 및 50 mM~200 mM NaCl; 약 40 mM 인산염 및 50 mM~200 mM NaCl; 약 50 mM 인산염 및 50~200 mM NaCl; 약 100 mM 인산염 및 50~200 mM NaCl로부터 선택되는, LNP 제형.

청구항 29

제1항 내지 28항 중 어느 한 항에 있어서, LNP 제형의 이온 강도는 최소 완충된 이온 강도보다 적어도 2.25배 더 크거나, 적어도 2.5배 더 크거나, 적어도 2.75배 더 크거나, 적어도 3배 더 크거나, 적어도 3.5배 더 크거나, 적어도 4배 더 크거나, 적어도 4.5배 더 크거나, 적어도 5배 더 큰, LNP 제형.

청구항 30

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, LNP 제형의 이온 강도는 최소 완충된 이온 강도의 20배 미만, 19배 미만, 18배 미만, 17배 미만, 16배 미만, 15배 미만, 14배 미만, 13배 미만, 12배 미만, 11배 미만, 10배 미만, 9배 미만, 8배 미만, 7배 미만, 6배 미만, 5배 미만, 4배 미만인, LNP 제형.

청구항 31

제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, LNP 제형의 이온 강도는 최소 완충된 이온 강도보다 적어도 2배 더 크고 20배 미만이며, 여기서 LNP 제형의 이온 강도는 약 150 mM~750 mM, 150 mM~500 mM, 150 mM~400 mM, 150 mM~300 mM, 150 mM~200 mM인, LNP 제형.

청구항 32

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, LNP 제형의 이온 강도는 최소 완충된 이온 강도보다 적어도 2배 더 크고 20배 미만이며, 여기서 LNP 제형의 이온 강도는 150 mM이거나 이보다 더 큰, LNP 제형.

청구항 33

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 더 적은 응집이 탁도 분석에 의해 결정되는, LNP 제형.

청구항 34

제1항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 캡슐화된 mRNA의 더 적은 분해가 탁도 분석에 의해 결정되는, LNP 제형.

청구항 35

제1항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, -20°C에서 동결과 재해동을 4회 이상 거친 후에 LNP 제형은, 최소 완충된 이온 강도보다 적어도 2배 더 큰 이온 강도 대신에 LNP 제형 내에 최소 완충된 이온 강도만을 갖는 동일한 LNP 제형과 비교했을 때, (i) 더 적은 응집을 나타내거나, (ii) 캡슐화된 mRNA의 더 적은 분해를 나타내거나, (iii) (i) 및 (ii) 둘 다를 나타내는, LNP 제형.

청구항 36

제1항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, LNP는 약 100 nm 미만의 직경을 갖는, LNP 제형.

청구항 37

제32항에 있어서, LNP는 약 70 nm~90 nm의 직경을 갖는, LNP 제형.

청구항 38

제1항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 지질 성분은 DMG-PEG-2000, cKK-E10, 콜레스테롤, 및 DOPE를 포함하거나 이로 구성되는, LNP 제형.

청구항 39

제1항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, N/P 비는 약 3~5인, LNP 제형.

청구항 40

제39항에 있어서, N/P 비는 약 4인, LNP 제형.

청구항 41

제1항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, mRNA는 약 0.05 mg/mL 내지 1.0 mg/mL의 최종 농도로 존재하는, LNP 제형.

청구항 42

제41항에 있어서, mRNA는 약 0.2 mg/mL 내지 0.5 mg/mL의 농도로 존재하는, LNP 제형.

청구항 43

제1항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, LNP는 -20° C에서 적어도 3개월, 6개월, 12개월, 또는 12개월을 초과하는 기간 동안 안정적인, LNP 제형.

청구항 44

제1항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, LNP 제형은 희석 후에 안정적인, LNP 제형.

청구항 45

제1항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 제형의 피하 또는 근육내 전달은, 농도가 300 mM 이하이고 pH가 약 7.0 내지 7.5인 완충액을 포함하지 않는 제형에 비해 통증이 감소되는, LNP 제형.

청구항 46

제45항에 있어서, 통증 감소는 10 cm 시각 아날로그 척도(VAS) 또는 6-항목 구두 평가 척도(VRS)에 의해 평가되는, LNP 제형.

청구항 47

LNP 분해 및/또는 응집을 감소시키는 방법으로서, 상기 방법은 제1항 내지 제46항 중 어느 한 항의 제형에 LNP를 보관하는 단계를 포함하는, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 2020년 11월 25일에 출원한 미국 특허 가출원 제63/118,243호에 대한 우선권과 이의 이익을 주장하며, 그 내용은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

배경 기술

[0003] 핵산 기반 기술은 전령 RNA 요법을 포함하되 이에 한정되지 않는 다양한 치료적 적용에 있어 그 중요성이 증가하고 있다. 핵산을 전달하기 위한 노력에는, 생체 내 전달 시 핵산을 분해로부터 보호하도록 제형된 조성물을 생성하는 것이 포함되었다. 핵산의 전달 비히클 중 한 가지 유형은 지질 나노입자였다. 전달 비히클로서 지질 나노입자를 성공적으로 사용하기 위해 고려해야 할 중요한 파라미터에는 지질 나노입자 형성, 지질 성분의 물리적 특성, 핵산 캡슐화 효율, 생체 내 핵산 방출 능력, 및 지질 나노입자의 독성이 포함된다.

[0004] 동결/해동 사이클에 내성이 있는 안정한 지질 나노입자를 생성하는 것은 여전히 어려운 문제로 당업계에 남아있다.

발명의 내용

[0005] 본 발명은, -20℃에서 동결과 해동을 여러 번 거친 후 응집 및/또는 mRNA 분해에 내성을 갖는, 펩티드 또는 폴리펩티드를 암호화하는 mRNA를 캡슐화하는 액체 지질 나노입자(LNP) 제형을 특히 제공한다. 본 발명자들은 놀랍게도, 높은 이온 강도를 갖는 LNP 제형이 여러 번의 동결과 해동을 거친 후 LNP의 응집 및/또는 mRNA 분해를 방지한다는 것을 발견하였다. 본 발명자들은 놀랍게도, 안정하면서 응집 및/또는 mRNA 분해에 내성이 있는 고 이온 강도 LNP 제형은, 더 높은 완충 강도 또는 높은 염 농도를 LNP 제형 내에 사용함으로써 달성될 수 있다는 것을 발견하였다.

[0006] 일부 양태에서, 펩티드 또는 폴리펩티드를 암호화하는 mRNA를 캡슐화하고 응집 및 mRNA 분해에 내성이 있는 액체 지질 나노입자(LNP) 제형이 제공되며, LNP 제형은: a. 양이온성 지질, 비-양이온성 지질, PEG-변형 지질, 및 임의로 콜레스테롤을 포함하거나 이로 이루어진 지질 성분을 갖는 하나 이상의 LNP; b. 하나 이상의 지질 나노입자 내에 캡슐화되고 펩티드 또는 폴리펩티드를 암호화하는 mRNA; c. 당류 또는 당알코올; d. pH가 6.0 내지 8.0인 LNP 제형; e. 최소 완충된 이온 강도에서 LNP 제형 pH를 제공하는 pH 완충액; f. 임의로, LNP 제형에 이온 강도를 제공하는 하나 이상의 추가 제제를 포함하되, (e)의 pH 완충액 및 임의로 (f)의 하나 이상의 제제의 총 농도는 최소 완충된 이온 강도보다 적어도 2배 더 큰 LNP 제형의 이온 강도를 제공하고; 상기 LNP 제형은, 최소 완충된 이온 강도보다 적어도 2배 큰 이온 강도 대신에 최소 완충된 이온 강도만을 LNP 제형 내에 갖는 동일한 LNP 제형과 비교했을 때, -20℃에서의 동결과 해동을 3회 거친 후 (i) 더 적은 응집을 나타내고, (ii) 캡슐화된 mRNA의 더 적은 분해를 나타내거나, (iii) (i) 및 (ii) 둘 다를 나타낸다.

[0007] 일부 구현예에서, LNP 제형은 하나 이상의 동결 보호제를 포함한다. 동결 보호제는 침투성 또는 비 침투성일 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 침투성 동결 보호제는 글리세롤, 에틸렌 글리콜, 트리-에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜, 또는 테트라-에틸렌 글리콜을 포함한다. 따라서, 일부 구현예에서, 침투성 동결 보호제는 글리세롤을 포함한다. 일부 구현예에서, 침투성 동결 보호제는 에틸렌 글리콜을 포함한다. 일부 구현예에서, 침투성 동결 보호제는 트리-에틸렌 글리콜을 포함한다. 일부 구현예에서, 침투성 동결 보호제는 프로필렌 글리콜을 포함한다. 일부 구현예에서, 침투성 동결 보호제는 테트라-에틸렌 글리콜을 포함한다.

[0008] 일부 구현예에서, 비 침투성 동결 보호제는 당류 및/또는 중합체로부터 선택된다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 비 침투성 동결 보호제는 다음 당류 중 하나 이상으로부터 선택된다: 텍스트로오스, 소르비톨, 트레할로스, 수크로오스, 라피노오스, 텍스트란, 또는 이눌린. 따라서, 일부 구현예에서, 비 침투성 동결 보호제는 텍스트로오스를 포함한다. 일부 구현예에서, 비 침투성 동결 보호제는 소르비톨을 포함한다. 일부 구현예에서, 비 침투성

동결 보호제는 트레할로스를 포함한다. 일부 구현예에서, 비 침투성 동결 보호제는 수크로오스를 포함한다. 일부 구현예에서, 비 침투성 동결 보호제는 라피노오스를 포함한다. 일부 구현예에서, 비 침투성 동결 보호제는 텍스트란을 포함한다. 일부 구현예에서, 비 침투성 동결 보호제는 이눌린을 포함한다.

- [0009] 일부 구현예에서, 비 침투성 동결 보호제는 다음 중합체 중 하나 이상으로부터 선택된다: PVP, PVA, 폴록사머, 또는 PEG. 따라서, 일부 구현예에서, 비 침투성 동결 보호제는 PVP로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 비 침투성 동결 보호제는 폴록사머로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 비 침투성 동결 보호제는 PEG로부터 선택된다.
- [0010] 일부 구현예에서, LNP에서 mRNA의 안정한 액체 용액을 제조하는 방법이 제공된다. 예를 들어, 일부 구현예에서, LNP에 캡슐화된 mRNA는 시험관내 전사(IVT)에 의해 생산된다. 일부 구현예에서, mRNA는 SP6 RNA 중합효소와 같은 RNA 적합한 중합효소에 의해 합성된다. 따라서, 일부 구현예에서, mRNA는 SP6 RNA 중합효소를 사용해 합성된다. LNP는, 예를 들어, 양이온성 지질, 비-양이온성 지질, PEG-변형 지질, 및 임의로 콜레스테롤을 포함한다.
- [0011] 일부 구현예에서, 비-양이온성 지질은 1,2-디에루코일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(DEPE), 디스테아로일포스파티딜콜린(DSPC), 디올레오일포스파티딜콜린(DOPC), 디팔미토일포스파티딜콜린(DPPC), 디올레오일포스파티딜글리세롤(DOPG), 디팔미토일포스파티딜글리세롤(DPPG), 디올레오일포스파티딜에탄올아민(DOPE), 팔미토일올레오일포스파티딜콜린(POPC), 팔미토일올레오일-포스파티딜에탄올아민(POPE), 디올레오일-포스파티딜에탄올아민 4-(N-말레이미도메틸)-시클로헥산-1-카복실레이트(DOPE-mal), 디팔미토일 포스파티딜 에탄올아민(DPPE), 디미리스토일포스포에탄올아민(DMPE), 디스테아로일-포스파티딜-에탄올아민(DSPE), 16-0-모노메틸 PE, 16-0-디메틸 PE, 18-1-트랜스 PE, 또는 1-스테아로일-2-올레오일-포스파티딜에탄올아민(SOPE)으로부터 선택된다.
- [0012] 일부 구현예에서, 비-양이온성 지질은 10% 초과인 몰비로 존재한다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 비-양이온성 지질은 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 또는 50%의 지질 몰비로 존재한다. 일부 구현예에서, 비-양이온성 지질은 약 15%의 지질 몰비로 존재한다. 일부 구현예에서, 비-양이온성 지질은 약 20%의 지질 몰비로 존재한다. 일부 구현예에서, 비-양이온성 지질은 약 25%의 지질 몰비로 존재한다. 일부 구현예에서, 비-양이온성 지질은 약 30%의 지질 몰비로 존재한다. 일부 구현예에서, 비-양이온성 지질은 약 35%의 지질 몰비로 존재한다. 일부 구현예에서, 비-양이온성 지질은 약 40%의 지질 몰비로 존재한다. 일부 구현예에서, 비-양이온성 지질은 약 45%의 지질 몰비로 존재한다. 일부 구현예에서, 비-양이온성 지질은 약 50%의 지질 몰비로 존재한다.
- [0013] 일부 구현예에서, 비-양이온성 지질은 디올레오일포스파티딜에탄올아민(DOPE)이다.
- [0014] 일부 구현예에서, DOPE는 10% 초과인 지질 몰비로 존재한다. 예를 들어, 일부 구현예에서, DOPE는 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 또는 50%의 지질 몰비로 존재한다. 일부 구현예에서, DOPE는 약 15%의 지질 몰비로 존재한다. 일부 구현예에서, DOPE는 약 20%의 지질 몰비로 존재한다. 일부 구현예에서, DOPE는 약 25%의 지질 몰비로 존재한다. 일부 구현예에서, DOPE는 약 30%의 지질 몰비로 존재한다. 일부 구현예에서, DOPE는 약 35%의 지질 몰비로 존재한다. 일부 구현예에서, DOPE는 약 40%의 지질 몰비로 존재한다. 일부 구현예에서, DOPE는 약 45%의 지질 몰비로 존재한다. 일부 구현예에서, DOPE는 약 50%의 지질 몰비로 존재한다. 일부 구현예에서, DOPE는 약 10% 내지 30%의 지질 몰비로 존재한다.
- [0015] 일부 구현예에서, 양이온성 지질은 리피도이드(lipidoid)이다. 일부 구현예에서, 리피도이드는, 예를 들어 약 40%~60%의 몰비로 존재한다. 일부 구현예에서, 리피도이드는 약 50%~60%의 몰비로 존재한다. 일부 구현예에서, 리피도이드는 약 40%의 몰비로 존재한다. 일부 구현예에서, 리피도이드는 약 50%의 몰비로 존재한다. 일부 구현예에서, 리피도이드는 약 60%의 몰비로 존재한다.
- [0016] 일부 구현예에서, mRNA는 대상체에서 결핍된 단백질을 암호화한다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 대상체에서 결핍된 단백질은 CFTR이다.
- [0017] 일부 구현예에서, mRNA는 백신 항원을 암호화한다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 백신 항원은 SARS-CoV-2 항원이다.
- [0018] 일부 구현예에서, 당은 이당류이다. 일부 구현예에서, 이당류는 트레할로스이다.
- [0019] 일부 구현예에서, 당 또는 당 알코올은 텍스트로오스, 소르비톨, 트레할로스, 수크로오스, 라피노오스, 텍스트

란, 및 이눌린으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 따라서, 일부 구현예에서, 당 또는 당 알코올은 텍스트로오스이다. 일부 구현예에서, 당 또는 당 알코올은 소르비톨이다. 일부 구현예에서, 당 또는 당 알코올은 트레할로스이다. 일부 구현예에서, 당 또는 당 알코올은 수크로오스이다. 일부 구현예에서, 당 또는 당 알코올은 라피노오스이다. 일부 구현예에서, 당 또는 당 알코올은 텍스트란이다. 일부 구현예에서, 당 또는 당 알코올은 이눌린이다.

- [0020] 일부 구현예에서, 트레할로스는 약 1%~20%의 농도로 존재한다. 일부 구현예에서, 트레할로스는 약 2.5%~3.0%의 농도로 존재한다. 일부 구현예에서, 트레할로스는 약 5.0%~15%의 농도로 존재한다. 일부 구현예에서, 트레할로스는 약 10%~20%의 농도로 존재한다.
- [0021] 일부 구현예에서, pH는 약 6.0 내지 약 8.0이다. 예를 들어, 일부 구현예에서, pH는 약 6.0~7.0, 6.5~7.5, 또는 7.0~8.0이다. 따라서, 일부 구현예에서, pH는 약 6.0~7.0이다. 일부 구현예에서, pH는 약 6.5~7.5이다. 일부 구현예에서, pH는 약 7.0~8.0이다. 일부 구현예에서, pH는 약 7.4이다. 일부 구현예에서, pH는 7.4이다.
- [0022] 일부 구현예에서, pH 완충액은 6.0 내지 8.2의 pKa를 갖는다. 따라서, 일부 구현예에서, pH 완충액은 약 6.2, 6.4, 6.6, 6.8, 7.0, 7.2, 7.4, 7.6, 7.8, 8.0, 또는 8.2의 pKa를 갖는다. 일부 구현예에서, pH 완충액은 약 6.2의 pKa를 갖는다. 일부 구현예에서, pH 완충액은 약 6.4의 pKa를 갖는다. 일부 구현예에서, pH 완충액은 약 6.6의 pKa를 갖는다. 일부 구현예에서, pH 완충액은 약 6.8의 pKa를 갖는다. 일부 구현예에서, pH 완충액은 약 7.0의 pKa를 갖는다. 일부 구현예에서, pH 완충액은 약 7.2의 pKa를 갖는다. 일부 구현예에서, pH 완충액은 약 7.4의 pKa를 갖는다. 일부 구현예에서, pH 완충액은 약 7.6의 pKa를 갖는다. 일부 구현예에서, pH 완충액은 약 7.8의 pKa를 갖는다. 일부 구현예에서, pH 완충액은 약 8.0의 pKa를 갖는다. 일부 구현예에서, pH 완충액은 약 8.2의 pKa를 갖는다.
- [0023] 일부 구현예에서, 완충액은 인산염 완충액, 구연산염 완충액, 이미다졸 완충액, 히스티딘 완충액, 및 굿즈 완충액(Good's buffer)으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 따라서, 일부 구현예에서, 완충액은 인산염 완충액이다. 일부 구현예에서, 완충액은 구연산염 완충액이다. 일부 구현예에서, 완충액은 이미다졸 완충액이다. 일부 구현예에서, 완충액은 히스티딘 완충액이다. 일부 구현예에서, 완충액은 굿즈 완충액이다. 일부 구현예에서, 굿즈 완충액은 Tris 완충액 또는 HEPES 완충액이다.
- [0024] 일부 구현예에서, pH 완충액은 인산염 완충액(예: 구연산염-인산염 완충액), Tris 완충액, 또는 이미다졸 완충액이다.
- [0025] 일부 구현예에서, 최소 완충된 이온 강도는 적어도 75 mM, 적어도 100 mM, 적어도 125 mM, 적어도 150 mM, 또는 적어도 200 mM이다. 따라서, 일부 구현예에서, 최소 완충된 이온 강도는 적어도 75 mM이다. 일부 구현예에서, 최소 완충된 이온 강도는 적어도 100 mM이다. 일부 구현예에서, 최소 완충된 이온 강도는 적어도 125 mM이다. 일부 구현예에서, 최소 완충된 이온 강도는 적어도 150 mM이다. 일부 구현예에서, 최소 완충된 이온 강도는 적어도 200 mM이다.
- [0026] 일부 구현예에서, 최소 완충된 이온 강도는 약 75 mM~200 mM, 75 mM~150 mM, 75 mM~100 mM, 또는 100 mM~200 mM이다. 따라서, 일부 구현예에서, 최소 완충된 이온 강도는 약 75 mM~200 mM이다. 일부 구현예에서, 최소 완충된 이온 강도는 약 75 mM~150 mM이다. 일부 구현예에서, 최소 완충된 이온 강도는 약 75 mM~100 mM이다. 일부 구현예에서, 최소 완충된 이온 강도는 약 100 mM~200 mM이다.
- [0027] 일부 구현예에서, 최소 완충된 이온 강도는 제형 내 완충액 농도를 증가시키고/시키거나 제형 내 염 농도를 증가시킴으로써 획득된다. 따라서, 일부 구현예에서, 최소 완충된 이온 강도는 완충액 농도를 증가시킴으로써 획득된다. 일부 구현예에서, 최소 완충된 이온 강도는 제형의 염 농도를 증가시킴으로써 획득된다. 일부 구현예에서, 최소 완충된 이온 강도는 제형 내 완충액 농도를 증가시키고 제형 내 염 농도를 증가시킴으로써 획득된다.
- [0028] 일부 구현예에서, 이당류 대 완충액의 비율은 0.1~0.9이다. 일부 구현예에서, 이당류 대 완충액의 비율은 0.1~0.7이다. 일부 구현예에서, 이당류 대 완충액의 비율은 0.2~0.7이다. 일부 구현예에서, 이당류 대 완충액의 비율은 0.2~0.5이다.
- [0029] 일부 구현예에서, 이온 강도를 제공하는 하나 이상의 제제는 염을 포함한다. 일부 구현예에서, 염은 NaCl, KCl, 및 CaCl₂로 이루어진 군으로부터 선택된다. 따라서, 일부 구현예에서, 염은 NaCl이다. 일부 구현예에서, 염은 KCl이다. 일부 구현예에서, 염은 CaCl₂이다.
- [0030] 일부 구현예에서, 이온 강도를 제공하는 하나 이상의 추가 제제의 총 농도는 약 50~500 mM, 100~400 mM, 또는

200~300 mM이다. 따라서, 일부 구현예에서, 하나 이상의 제제의 총 농도는 약 50~500 mM이다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 제제의 총 농도는 약 100~400 mM이다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 제제의 총 농도는 약 200~300 mM이다. 일부 구현예에서, 이온 강도를 제공하는 하나 이상의 추가 제제의 총 농도는 약 50~300 mM, 50~150 mM, 또는 75~125 mM이다. 일부 구현예에서, 이온 강도를 제공하는 하나 이상의 추가 제제의 총 농도는 약 50~300 mM이다. 일부 구현예에서, 이온 강도를 제공하는 하나 이상의 추가 제제의 총 농도는 약 50~150 mM이다. 일부 구현예에서, 이온 강도를 제공하는 하나 이상의 추가 제제의 총 농도는 약 75~125 mM이다.

[0031] 일부 구현예에서, pH 완충액의 총 농도는 약 100~300 mM, 200~300 mM, 또는 250~300 mM이다. 따라서, 일부 구현예에서, pH 완충액의 총 농도는 약 100~300 mM이다. 일부 구현예에서, pH 완충액의 총 농도는 200~300 mM이다. 일부 구현예에서, pH 완충액의 총 농도는 250~300 mM이다. 일부 구현예에서, pH 완충액의 총 농도는 약 15~250 mM, 30~150 mM, 또는 40~50 mM이다. 따라서, 일부 구현예에서, pH 완충액의 총 농도는 약 15~250 mM이다. 일부 구현예에서, pH 완충액의 총 농도는 약 30~150 mM이다. 일부 구현예에서, pH 완충액의 총 농도는 약 40~50 mM이다.

[0032] 일부 구현예에서, 이온 강도를 제공하는 pH 완충액 및 하나 이상의 추가 제제의 총 농도는 약 40 mM 트리스 완충액 및 약 75~200 mM NaCl; 약 50 mM 트리스 완충액 및 약 75 mM~200 mM NaCl; 약 100 mM 트리스 완충액 및 약 75 mM~200 mM NaCl; 약 40 mM 이미다졸 및 약 75 mM ~200 mM NaCl; 약 50 mM 이미다졸 및 75 mM~200 mM NaCl; 및 약 100 mM 이미다졸 및 75 mM~200 mM; 약 40 mM 인산염 및 약 75~200 mM NaCl; 약 50 mM 인산염 및 약 75~200 mM NaCl; 및 약 100 mM 인산염 및 75~200 mM NaCl로부터 선택된다. 따라서, 일부 구현예에서, 이온 강도를 제공하는 pH 완충액 및 하나 이상의 추가 제제의 총 농도는 약 40 mM 트리스 완충액 및 약 75~200 mM NaCl이다. 일부 구현예에서, 이온 강도를 제공하는 pH 완충액 및 하나 이상의 추가 제제의 총 농도는 약 50 mM 트리스 완충액 및 약 75 mM~200 mM NaCl이다. 일부 구현예에서, 이온 강도를 제공하는 pH 완충액 및 하나 이상의 추가 제제의 총 농도는 약 100 mM 트리스 완충액 및 약 75 mM~200 mM NaCl이다. 일부 구현예에서, 이온 강도를 제공하는 pH 완충액 및 하나 이상의 추가 제제의 총 농도는 약 40 mM 이미다졸 및 약 75 mM~200 mM NaCl이다. 일부 구현예에서, 이온 강도를 제공하는 pH 완충액 및 하나 이상의 추가 제제의 총 농도는 50 mM 이미다졸 및 75 mM~200 mM NaCl이다. 일부 구현예에서, 이온 강도를 제공하는 pH 완충액 및 하나 이상의 추가 제제의 총 농도는 100 mM 이미다졸 및 75 mM~200 mM NaCl이다. 일부 구현예에서, 이온 강도를 제공하는 pH 완충액 및 하나 이상의 추가 제제의 총 농도는 약 40 mM 이미다졸, 약 75 mM~200 mM NaCl, 및 2.5~10% 트레할로스이다. 일부 구현예에서, 이온 강도를 제공하는 pH 완충액 및 하나 이상의 추가 제제의 총 농도는 50 mM 이미다졸, 약 75 mM~200 mM NaCl, 및 2.5~10% 트레할로스이다. 일부 구현예에서, 이온 강도를 제공하는 pH 완충액 및 하나 이상의 추가 제제의 총 농도는 100 mM 이미다졸, 약 75 mM~200 mM NaCl, 및 2.5~10% 트레할로스이다.

[0033] 일부 구현예에서, LNP 제형의 이온 강도는 최소 완충된 이온 강도보다 적어도 2.25배 더 크거나, 적어도 2.5배 더 크거나, 적어도 2.75배 더 크거나, 적어도 3배 더 크거나, 적어도 3.5배 더 크거나, 적어도 4배 더 크거나, 적어도 4.5배 더 크거나, 적어도 5배 더 크다. 따라서, 일부 구현예에서, LNP 제형의 이온 강도는 최소 완충된 이온 강도보다 적어도 2.25배 더 크다. 일부 구현예에서, LNP 제형의 이온 강도는 최소 완충된 이온 강도보다 적어도 2.5배 더 크다. 일부 구현예에서, LNP 제형의 이온 강도는 최소 완충된 이온 강도보다 적어도 2.75배 더 크다. 일부 구현예에서, LNP 제형의 이온 강도는 최소 완충된 이온 강도보다 적어도 3.0배 더 크다. 일부 구현예에서, LNP 제형의 이온 강도는 최소 완충된 이온 강도보다 적어도 3.5배 더 크다. 일부 구현예에서, LNP 제형의 이온 강도는 최소 완충된 이온 강도보다 적어도 4.0배 더 크다. 일부 구현예에서, LNP 제형의 이온 강도는 최소 완충된 이온 강도보다 적어도 4.5배 더 크다. 일부 구현예에서, LNP 제형의 이온 강도는 최소 완충된 이온 강도보다 적어도 5.0배 더 크다.

[0034] 일부 구현예에서, LNP 제형의 이온 강도는 최소 완충된 이온 강도의 20배 미만, 19배 미만, 18배 미만, 17배 미만, 16배 미만, 15배 미만, 14배 미만, 13배 미만, 12배 미만, 11배 미만, 10배 미만, 9배 미만, 8배 미만, 7배 미만, 6배 미만, 5배 미만, 4배 미만이다. 따라서, 일부 구현예에서, LNP 제형의 이온 강도는 최소 완충된 이온 강도의 20배 미만이다. 일부 구현예에서, LNP 제형의 이온 강도는 최소 완충된 이온 강도의 19배 미만이다. 일부 구현예에서, LNP 제형의 이온 강도는 최소 완충된 이온 강도의 18배 미만이다. 일부 구현예에서, LNP 제형의 이온 강도는 최소 완충된 이온 강도의 17배 미만이다. 일부 구현예에서, LNP 제형의 이온 강도는 최소 완충된 이온 강도의 16배 미만이다. 일부 구현예에서, LNP 제형의 이온 강도는 최소 완충된 이온 강도의 15배 미만이다. 일부 구현예에서, LNP 제형의 이온 강도는 최소 완충된 이온 강도의 14배 미만이다. 일부 구현예에서, LNP 제형의 이온 강도는 최소 완충된 이온 강도의 13배 미만이다. 일부 구현예에서, LNP 제형

의 이온 강도는 최소 완충된 이온 강도의 12배 미만이다. 일부 구현예에서, LNP 제형의 이온 강도는 최소 완충된 이온 강도의 11배 미만이다. 일부 구현예에서, LNP 제형의 이온 강도는 최소 완충된 이온 강도의 10배 미만이다. 일부 구현예에서, LNP 제형의 이온 강도는 최소 완충된 이온 강도의 9배 미만이다. 일부 구현예에서, LNP 제형의 이온 강도는 최소 완충된 이온 강도의 8배 미만이다. 일부 구현예에서, LNP 제형의 이온 강도는 최소 완충된 이온 강도의 7배 미만이다. 일부 구현예에서, LNP 제형의 이온 강도는 최소 완충된 이온 강도의 6배 미만이다. 일부 구현예에서, LNP 제형의 이온 강도는 최소 완충된 이온 강도의 5배 미만이다. 일부 구현예에서, LNP 제형의 이온 강도는 최소 완충된 이온 강도의 4배 미만이다.

[0035] 일부 구현예에서, LNP 제형의 이온 강도는 최소 완충된 이온 강도보다 적어도 2배 더 크고 20배 미만이며, 여기서 LNP 제형의 이온 강도는 약 150 mM~750 mM, 150 mM~500 mM, 150 mM~400 mM, 150 mM~300 mM, 150 mM~200 mM이다. 따라서, 일부 구현예에서, LNP 제형의 이온 강도는 최소 완충된 이온 강도보다 적어도 2배 더 크고 20배 미만이며, 여기서 LNP 제형의 이온 강도는 약 150 mM~750 mM이다. 일부 구현예에서, LNP 제형의 이온 강도는 최소 완충된 이온 강도보다 적어도 2배 더 크고 20배 미만이며, 여기서 LNP 제형의 이온 강도는 약 150 mM~500 mM이다. 일부 구현예에서, LNP 제형의 이온 강도는 최소 완충된 이온 강도보다 적어도 2배 더 크고 20배 미만이며, 여기서 LNP 제형의 이온 강도는 약 150 mM~400 mM이다. 일부 구현예에서, LNP 제형의 이온 강도는 최소 완충된 이온 강도보다 적어도 2배 더 크고 20배 미만이며, 여기서 LNP 제형의 이온 강도는 약 150 mM~300 mM이다. 일부 구현예에서, LNP 제형의 이온 강도는 최소 완충된 이온 강도보다 적어도 2배 더 크고 20배 미만이며, 여기서 LNP 제형의 이온 강도는 약 150 mM 내지 200 mM이다.

[0036] 일부 구현예에서, LNP 제형의 이온 강도는 최소 완충된 이온 강도보다 적어도 2배 더 크고 20배 미만이며, 여기서 LNP 제형의 이온 강도는 150 mM이거나 이보다 더 크다.

[0037] 일부 구현예에서, 더 적은 응집은 탁도 분석에 의해 결정된다. 일부 구현예에서, 캡슐화된 mRNA의 더 적은 분해는 탁도 분석에 의해 결정된다. 예를 들어 육안 분석 및/또는 분광분석을 사용하는 것을 포함하여, 탁도를 측정하는 다양한 방법이 사용될 수 있다.

[0038] 일부 구현예에서, -20°C에서 동결과 재해동을 4회 이상 거친 후의 LNP 제형은, 최소 완충된 이온 강도보다 적어도 2배 더 큰 이온 강도 대신에 LNP 제형 내에 최소 완충된 이온 강도만을 갖는 동일한 LNP 제형과 비교했을 때, (i) 더 적은 응집을 나타내거나, (ii) 캡슐화된 mRNA의 더 적은 분해를 나타내거나, (iii) (i) 및 (ii) 둘 다를 나타낸다.

[0039] 일부 구현예에서, LNP는 약 100 nm 미만의 직경을 갖는다. 일부 구현예에서, LNP는 약 70 nm~90 nm의 직경을 갖는다. 예를 들어, 일부 구현예에서, LNP는 약 70 nm~85 nm의 직경을 갖는다. 일부 구현예에서, LNP는 약 70 nm~80 nm의 직경을 갖는다. 일부 구현예에서, LNP는 약 70 nm~75 nm의 직경을 갖는다. 일부 구현예에서, LNP는 약 80 nm~90 nm의 직경을 갖는다. 일부 구현예에서, LNP는 약 85 nm~90 nm의 직경을 갖는다. 일부 구현예에서, LNP는 약 75 nm~90 nm의 직경을 갖는다. 일부 구현예에서, LNP는 약 75 nm~85 nm의 직경을 갖는다. 일부 구현예에서, LNP는 약 75 nm~80 nm의 직경을 갖는다.

[0040] 일부 구현예에서, 지질 성분은 DMG-PEG-2000, cKK-E10, 콜레스테롤, 및 DOPE를 포함하거나 이로 구성된다. 따라서, 일부 구현예에서, 지질 성분은 DMG-PEG-2000, cKK-E10, 콜레스테롤, 및 DOPE를 포함한다. 일부 구현예에서, 지질 성분은 DMG-PEG-2000, cKK-E10, 콜레스테롤, 및 DOPE로 구성된다.

[0041] 일부 구현예에서, N/P 비는 약 3~5이다. 예를 들어, 일부 구현예에서, N/P 비는 약 3이다. 일부 구현예에서, N/P 비는 약 4이다. 일부 구현예에서, N/P 비는 약 5이다.

[0042] 일부 구현예에서, mRNA는 약 0.05 mg/mL 내지 약 1.0 mg/mL의 최종 농도로 존재한다. 일부 구현예에서, mRNA는 약 0.05 mg/mL의 최종 농도로 존재한다. 일부 구현예에서, mRNA는 약 0.1 mg/mL의 최종 농도로 존재한다. 일부 구현예에서, mRNA는 약 0.1 mg/mL의 최종 농도로 존재한다. 일부 구현예에서, mRNA는 약 0.2 mg/mL의 최종 농도로 존재한다. 일부 구현예에서, mRNA는 약 0.3 mg/mL의 최종 농도로 존재한다. 일부 구현예에서, mRNA는 약 0.4 mg/mL의 최종 농도로 존재한다. 일부 구현예에서, mRNA는 약 0.5 mg/mL의 최종 농도로 존재한다. 일부 구현예에서, mRNA는 약 0.6 mg/mL의 최종 농도로 존재한다. 일부 구현예에서, mRNA는 약 0.7 mg/mL의 최종 농도로 존재한다. 일부 구현예에서, mRNA는 약 0.8 mg/mL의 최종 농도로 존재한다. 일부 구현예에서, mRNA는 약 0.9 mg/mL의 최종 농도로 존재한다. 일부 구현예에서, mRNA는 약 1.0 mg/mL의 최종 농도로 존재한다.

[0043] 일부 구현예에서, mRNA는 약 0.2 mg/mL 내지 약 0.5 mg/mL의 농도로 존재한다.

[0044] 일부 구현예에서, LNP는 -20°C에서 적어도 3개월, 6개월, 12개월, 또는 12개월 초과 동안 안정하다. 따라서, 일

부 구현예에서, LNP는 -20℃에서 적어도 3개월 동안 안정하다. 일부 구현예에서, LNP는 -20℃에서 적어도 6개월 동안 안정하다. 일부 구현예에서, LNP는 -20℃에서 적어도 12개월 동안 안정하다. 일부 구현예에서, LNP는 -20℃에서 12개월을 초과하는 기간 동안 안정하다.

- [0045] 일부 구현예에서, LNP 제형은 회석 후에 안정하다.
- [0046] 일부 구현예에서, 제형의 피하 또는 근육내 전달은, 농도가 300 mM 이하이고 pH가 약 7.0 내지 7.5인 완충액을 포함하지 않는 제형에 비해 통증이 감소된다.
- [0047] 일부 구현예에서, 통증의 감소는 10 cm 시각 아날로그 척도(VAS) 또는 6-항목 구두 평가 척도(VRS)에 의해 평가된다. 따라서, 일부 구현예에서, 통증의 감소는 10 cm 시각 아날로그 척도(VAS)에 의해 평가된다. 일부 구현예에서, 통증의 감소는 6-항목 구두 평가 척도(VRS)에 의해 평가된다.
- [0048] 일부 양태에서, LNP 분해 및/또는 응집을 감소시키는 방법이 제공되며, 상기 방법은 본원에 기술된 것과 같은 제형에 LNP를 저장하는 단계를 포함한다.
- [0049] 본원에서, 달리 명시되지 않는 한, “또는(or)”은 “및/또는(and/or)”을 의미한다. 본 개시에서 사용되는 바와 같이, 용어 “포함(comprise)” 및 이 용어의 다양한 형태, 예컨대 “포함하는(comprising) 및 포함하다(comprises)” 등은 다른 첨가물, 구성 요소, 정수 또는 단계를 배제하도록 의도되지 않는다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 “약(about)” 및 “대략(approximately)”은 동등하게 사용된다. 두 용어는 당업자가 이해하는 임의의 표준적인 변동폭을 포함하는 것으로 간주된다.
- [0050] 본 발명의 다른 특징, 목적 및 이점은 이어지는 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용, 도면 및 청구범위에서 자명해진다. 하지만, 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용, 도면 및 청구범위가 본 발명의 구현예를 나타내지만, 이는 제한을 위해서가 아니라 단지 예시를 위해 주어지는 것임을 이해해야 한다. 본 발명의 범주 내에서의 다양한 변형 및 수정이 이루어질 수 있음은 당업자에게 명백해질 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0051] 도면은 단지 예시적인 목적이며 제한하고자 하는 것이 아니다.
 - 도 1a는 pH 7.5에서 LNP의 안정성을, LNP 제형 내 트레할로스의 농도 증가 함수로서 보여주고 pH 7.5에서 LNP 안정성을 유지하는 데 필요한 최소 완충된 강도의 함수로서도 보여주는 그래프이다. 도 1b는 LNP 제형의 일정한 백분율(2.7%)로 트레할로스를 갖는 LNP 제형의 안정성을 pH의 변동의 함수로서 및 LNP 제형의 안정성을 유지하는 데 필요한 최소 완충된 강도의 함수로서 보여주는 그래프이다.
 - 도 2는 시험된 LNP 제형의 지질 pKa 의존성 거동을 보여주는 그래프이다. 이들 연구의 경우, LNP 제형은 2.7%의 트레할로스를 포함하였다.
 - 도 3a는 시험된 LNP 제형에 대한 다양한 조건을 도시한다. 표는 pH 7.5에서 지질의 몰 농도 및 트리스 완충액의 농도를 도시한다. 표의 체크 표시는 LNP 제형이 안정하였음을 나타낸다. “X”는 LNP 제형이 불안정하였음을 나타낸다. 도 3b는 동물 모델에서 투여 후 6시간 또는 24시간차에 인간 EPO mRNA를 캡슐화한 LNP로부터 유래된 인간 EPO 단백질의 발현을 보여주는 그래프이다. 다양한 LNP 구성 지질이 도시되어 있다.
 - 도 4a는 시험된 LNP 제형의 다양한 조성을 보여주는 일련의 표를 도시한다. 표는 시험된 완충액(트리스, 또는 이미다졸)의 몰 농도 및 평가된 다양한 LNP 제형에서 시험된 상응하는 염 농도(NaCl)를 도시한다. 표의 체크 표시는 LNP 제형이 안정하였음을 나타낸다. “X”는 LNP 제형이 불안정하였음을 나타낸다. 도 4b는 다양한 LNP 제형을 평가한 표를 도시한다. LNP 제형은 트리스 완충액 또는 인산염 완충액의 농도와 관련하여 다양하였다. 회석 후 LNP의 안정성을 평가하였다. 안정한 LNP는 체크 마크로 표시되는 반면, 안정하지 않은 LNP 제형은 “X”로 표시되어 있다.
 - 도 5a는 4℃에서 다양한 트레할로스 대 PBS 비율(예: 약 0.2~0.5)을 포함하는 LNP 제형의 캡슐화 효율의 백분율 그래프를 도시한다. 도 5b는 25℃에서 다양한 트레할로스 대 PBS 비율(예: 약 0.2 ~0.5)을 포함하는 LNP 제형의 캡슐화 효율 백분율의 그래프를 도시한다.
 - 도 6a는 4℃에서 다양한 트레할로스 대 PBS 비율(예: 약 0.2~0.5)을 포함하는 LNP 제형의 LNP 크기(나노미터 단위)의 그래프를 도시한다. 도 6b는 25℃에서 다양한 트레할로스 대 PBS 비율(예: 약 0.2~0.5)을 포함하는 LNP 제형의 LNP 크기(나노미터 단위)의 그래프를 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0052] 정의
- [0053] 본 발명을 보다 용이하게 이해하기 위하여, 우선적으로 특정 용어를 아래와 같이 정의한다. 다음의 용어들 및 기타 용어들에 대한 추가적인 정의가 본 명세서 전체를 통하여 설명된다. 본 발명의 배경기술을 기술하고 그의 실행에 관한 추가적인 자세한 사항을 제공하도록 본원에서 참조된 출판물 및 기타 다른 참고물은 참조로서 본원에 의해 포함된다.
- [0054] 대략 또는 약: 본원에서 사용되는 용어 “대략” 또는 “약”은 하나 이상의 관심 값에 적용되는 경우, 명시된 기준 값과 유사한 값을 지칭한다. 특정 구현예에서, 용어 “대략” 또는 “약”은 (이러한 숫자가 가능한 값의 100%를 초과하는 경우를 제외하고) 달리 진술되거나 달리 문맥으로부터 분명하지 않는 한, 진술된 기준 값의 어느 한 방향으로 (초과하거나 또는 미만인 방향으로) 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 또는 1% 이하에 포함되는 값의 범위를 지칭한다.
- [0055] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 “회분(batch)”는 한 번에 합성된, 예를 들어, 동일한 제조 사이클 동안 단일 제조 순서에 따라 생산된 mRNA의 수 또는 양을 지칭한다. 회분은, 한 세트의 조건 하에서 연속 합성을 위한 효소의 단일 분취액 및/또는 DNA 템플릿의 단일 분취액을 통해 발생하는 하나의 반응에서 합성된 mRNA의 양을 지칭할 수 있다. 일부 구현예에서, 회분은 반응이 진행될 때 모든 시약 및/또는 성분이 보충되고/되거나 별충되지 않는 반응으로 생성된 mRNA를 포함하게 될 것이다. 용어 “단일 회분이 아닌”은 원하는 양을 달성하기 위해 합쳐지는, mRNA가 상이한 시간에 합성되는 것을 의미하지는 않는다.
- [0056] 전달: 본원에서 사용되는 용어 “전달”은 국소적인 전달과 전신 전달 둘 다를 망라한다. 예를 들어, mRNA의 전달은 mRNA가 표적 조직에 전달되고 코딩된 단백질이 발현되고 표적 조직 내에 유지되는 상황(“국소 분포” 또는 “국소 전달”이라고도 함) 및 mRNA가 표적 조직에 전달되고 코딩된 단백질이 발현되고 환자의 순환계(예: 혈청)에 분비되며 전신에 분포되어 다른 조직에 의해 흡수된 상황(“전신 분포” 또는 “전신 전달”이라고도 함)을 망라한다. 일부 구현예에서, 전달은 예를 들어 분무화(nebulization)를 포함하는 폐 전달이다.
- [0057] 캡슐화: 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "캡슐화" 또는 이의 문법적으로 동등한 표현은 mRNA 분자를 나노입자 내에 혼입하는 프로세스를 지칭한다.
- [0058] 조작된 또는 돌연변이체:본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 “조작된” 또는 “돌연변이체”, 또는 문법적으로 동등한 표현은 자연 발생 서열과 비교해 뉴클레오티드 또는 단백질 서열이 하나 이상의 변형을 포함하는 것을 지칭하며, 하나 이상의 변형에는 이중 핵산 또는 아미노산의 결실, 삽입, 반전, 치환, 또는 이들의 조합이 포함되지만 이에 한정되지는 않는다.
- [0059] 발현: 본원에서 사용된 바와 같이, 아미노산 서열의 “발현”은 mRNA가 폴리펩티드로 번역되는 것, 다수의 폴리펩티드(예: 항체의 중쇄 또는 경쇄)가 온전한 단백질(예: 항체)로 조립되는 것, 및/또는 폴리펩티드 또는 완전히 조립된 단백질(예: 항체)가 번역 후 변형시키는 것을 지칭한다. 본 출원에서, 용어 “발현” 및 “생산” 및 문법적으로 동등한 표현은 상호교환적으로 사용된다.
- [0060] 기능적인: 본원에서 사용되는 바와 같이, “기능적인” 생물학적 분자는 해당 분자가 특징으로 하는 성질 및/또는 활성을 나타내는 형태를 가진 생물학적 분자이다.
- [0061] 반감기: 본원에서 사용되는 바, 용어 “반감기”는 핵산 또는 단백질 농도나 활성과 같은 양이 시작 시점에 측정된 수치의 절반으로 떨어지는 데 필요한 시간이다.
- [0062] 개선(improve), 증가(increase) 또는 감소(reduce): 본원에서 사용되는, 용어 “개선하다”, “증가하다” 또는 “감소하다” 또는 문법적으로 동등한 표현은 본원에 기술된 치료의 개시 이전에 동일한 개인에서의 측정치 또는 본원에 기술된 치료의 부재 시 대조군 대상체(또는 다수의 대조군 대상체)에서의 측정치와 같은 기준선 측정치(baseline measurement)와 관련된 값들을 나타낸다. “대조군 대상체”는 치료 받는 대상체와 동일한 형태의 질환에 걸린, 치료 받는 대상체와 거의 동일한 연령인 대상체이다.
- [0063] 불순물(impurities): 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 “불순물”은 구속된 양의 액체, 기체 또는 고체 내부에 있는 물질로서, 표적 물질 또는 화합물의 화학적 조성과 상이한 물질을 지칭한다. 불순물은 오염물로도 지칭된다.
- [0064] 시험관내(in vitro): 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 “생체외(in vitro)”는 다세포 유기체 내가 아니라

예컨대, 시험관 또는 반응 용기, 세포 배양 등과 같은 인공적인 환경에서 발생하는 사건을 말한다.

- [0065] **생체내(In Vivo):** 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 “생체내(*in vivo*)” 는 인간 및 비인간 동물과 같은 다세포 유기체 내에서 발생하는 사건을 말한다. 세포-기반 시스템의 맥락에서, 상기 용어는 (예를 들어, 생체의 시스템에 반대되는) 활세포 내에서 발생하는 사건을 지칭하도록 사용될 수 있다.
- [0066] **단리된(isolated):** 본원에서 사용되는 바, 용어 “분리된” 은 (1) 최초로 생산되었을 때(자연적이고/이거나 실험 환경이거나) 결합된 적어도 일부의 구성 성분으로부터 분리된 및/또는 (2) 사람의 손에 의해 생산, 제조 및/또는 제작된 물질 및/또는 엔티티(entity)를 말한다. 단리된 물질 및/또는 엔티티는 최초로 결합된 다른 구성 성분의 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99%, 또는 약 99% 초과로 분리될 수 있다. 일부 구현예에서, 단리된 체계는 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99%, 또는 약 99% 보다 높은 순도이다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 실질적으로 다른 성분이 없는 경우, 물질은 “순수” 하다. 본원에서 사용된 바와 같이, 단리된 물질 및/또는 엔티티의 순도 백분율의 계산에는 부형제(예컨대, 완충액, 용매, 물 등)가 포함되지 않아야 한다.).
- [0067] **전령 RNA (mRNA):** 본원에서 사용되는, 용어 “전령 RNA(mRNA)” 는 적어도 하나의 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 말한다. 본원에서 사용되는 mRNA는 변형 및 비변형 RNA 둘 다를 망라한다. mRNA는 하나 이상의 코딩 및 비코딩 영역을 함유할 수 있다. mRNA는 천연 원료로부터 정제되고, 재조합 발현 시스템을 사용하여 생산되고 임의로 정제되거나, 화학적으로 합성되는 것 등이 가능하다. 적절한 경우, 예컨대, 화학적으로 합성된 분자의 경우, mRNA는 화학적으로 변형된 염기 또는 당, 골격 변형 등을 갖는 유사체와 같은 뉴클레오시드 유사체를 포함할 수 있다. mRNA 서열은 달리 표시하지 않는 한, 5' 에서 3' 방향으로 제시된다.
- [0068] **핵산:** 본원에서 사용되는 바, 용어 “핵산” 은 가장 넓은 의미로 폴리뉴클레오티드 사슬에 혼입되거나 혼입될 수 있는 임의의 화합물 및/또는 물질을 말한다. 일부 구현예에서, 핵산은 인산디에스테르 연결을 통해 폴리뉴클레오티드 사슬에 혼입되거나 혼입될 수 있는 화합물 및/또는 물질이다. 일부 구현예에서, “핵산” 은 개별 핵산 잔기(예를 들어, 뉴클레오티드 및/또는 뉴클레오시드)를 지칭한다. 일부 구현예에서, “핵산” 은 개별 핵산 잔기를 포함하는 폴리뉴클레오티드 사슬을 지칭한다. 일부 구현예에서, “핵산” 은 RNA뿐만 아니라 단일 및/또는 이중 가닥 DNA 및/또는 cDNA를 망라한다. 또한, 용어 “핵산”, “DNA”, “RNA”, 및/또는 유사한 용어는 핵산 유사체, 즉, 포스포디에스테르 백본 이외의 것을 갖는 유사체를 포함한다. 예를 들어, 당업계에 공지되어 있고, 백본 내에 인산디에스테르 결합 대신에 펩티드 결합을 갖는, 소위 “펩티드 핵산”은 본 발명의 범위 내에 포함되는 것으로 간주된다. 용어 “아미노산 서열을 암호화하는 뉴클레오티드 서열” 은 서로의 축퇴형 버전(degenerate version)이고/이거나 동일한 아미노산 서열을 암호화하는 모든 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 단 백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열 및/또는 RNA는 인트론을 포함할 수 있다. 핵산은 천연 공급원으로부터 정제될 수 있고, 재조합 발현 시스템을 사용하여 생산될 수 있고, 선택적으로 정제될 수 있으며, 화학적으로 합성될 수 있다. 적절한 경우, 예컨대, 화학적으로 합성된 분자의 경우, 핵산은 화학적으로 변형된 염기 또는 당, 백본 변형체 등을 갖는 유사체와 같은 뉴클레오시드 유사체를 포함할 수 있다. 핵산 서열은 달리 표시하지 않는 한, 5' 에서 3' 방향으로 제시된다. 일부 구현예에서, 핵산은 천연 뉴클레오시드(예: 아데노신, 티미딘, 구아노신, 시티딘, 우리딘, 테옥시아데노신, 테옥시티미딘, 테옥시구아노신, 및 테옥시시티딘); 뉴클레오시드 유사체(예: 2-아미노아데노신, 2-티오티미딘, 이노신, 피롤로-피리미딘, 3-메틸 아데노신, 5-메틸시티딘, C-5 프로피닐-시티딘, C-5 프로피닐-우리딘, 2-아미노아데노신, C5-브로모우리딘, C5-플루오로우리딘, C5-아이오도우리딘, C5-프로피닐-우리딘, C5-프로피닐-시티딘, C5-메틸시티딘, 2-아미노아데노신, 7-테아자아데노신, 7-테아자구아노신, 8-옥소아데노신, 8-옥소구아노신, 0(6)-메틸구아닌, 및 2-티오시티딘); 화학적으로 변형된 염기; 생물학적으로 변형된 염기(예: 메틸화된 염기); 삽입된 염기; 변형된 당(예: 2' -플루오로리보스, 리보스, 2' -디옥시리보스, 아라비노오스 및 핵소오스); 및/또는 변형된 포스페이트기(예: 포스포로티오에이트 및 5' -N-포스포라미다이트 결합)이거나 이들을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 구체적으로는, 전달을 용이하게 하거나 전달을 달성하기 위해 화학적으로 변형되지 않은 핵산(예: 뉴클레오티드 및/또는 뉴클레오시드를 포함하는, 뉴클레오티드 및 잔기)를 의미하는 “비변형 핵산” 에 관한 것이다. 일부 구현예에서, 뉴클레오티드 T 및 U는 서열 설명에서 상호 교환적으로 사용된다.
- [0069] **환자:** 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 “환자” 또는 “대상체” 는 예컨대, 실험, 진단, 예방, 미용 및/또는 치료 목적을 위해 제공된 조성물이 투여될 수 있는 임의의 유기체를 지칭한다. 전형적인 환자는 동물(예컨대, 마우스, 랫트, 토끼, 비인간 영장류 및/또는 인간과 같은 포유동물)을 포함한다. 일부

구현예에서, 환자는 인간이다. 인간은 출생-전 및 출생-후 형태를 포함한다.

- [0070] **약학적으로 허용 가능한(pharmaceutically acceptable):** 본원에서 사용된, 용어 “약학적으로 허용 가능한” 은 철저한 의학적 판단의 범주내에서 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응, 또는 다른 문제 또는 합병증 없이 인간과 동물의 조직과의 접촉에 있어 사용에 적합하고, 합리적인 유익성/위험성 비(benefit/risk ratio)에 상응하는 물질을 지칭한다.
- [0071] **안정한:** 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 “안정한” 단백질 또는 이의 문법적으로 동등한 표현은 단백질의 물리적 안정성 및/또는 생물학적 활성을 유지하는 단백질을 지칭한다. 일 구현예에서, 단백질 안정성은 분해된 (예: 단편화된) 및/또는 응집된 단백질의 낮은 백분율에서, 용액 중 단량체 단백질의 백분율에 기초하여 결정된다. 일 구현예에서, 안정한 조작된 단백질은 야생형 단백질과 비교했을 때 향상된 반감기를 유지하거나 나타낸다. 일 구현예에서, 안정한 조작된 단백질의 경우, 야생형 단백질과 비교했을 때, 가수분해로 이어지는 유비쿼틴화가 잘 일어나지 않는다.
- [0072] **대상체:** 본원에서 사용되는, 용어 “대상체” 는 인간 또는 임의의 비인간 동물(예컨대, 마우스, 랫트, 토끼, 개, 고양이, 소, 돼지, 양, 말 또는 영장류)를 지칭한다. 인간은 출생-전 및 출생-후 형태를 포함한다. 많은 구현예에서, 대상체는 인간이다. 대상체는 질환의 진단 또는 치료를 위해 의료 제공자에게 가는 인간을 지칭하는 것으로, 환자일 수 있다. 용어 “대상체” 는 본원에서 “개인” 또는 “환자” 와 상호교환적으로 사용된다. 대상체는 질환 또는 장애에 걸릴 수 있거나 취약하지만 질환 또는 장애의 증상을 보일 수 있거나 보이지 않을 수 있다.
- [0073] **실질적으로:** 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 “실질적으로” 는 관심있는 특징이나 특성의 전체 또는 거의 전체의 범위 또는 정도를 나타내는 정성적인 상태를 지칭한다. 생물학 분야의 당업자라면 생물학적 및 화학적 현상이 완전해지고/지거나, 진행되어 완전해지거나, 절대적인 결과를 달성하거나 회피하는 것은 (실사 있다 하더라도) 드물다는 것을 이해할 것이다. 따라서, 용어 “실질적으로” 는 많은 생물학적 현상 및 화학적 현상에 내재하는 완전함의 잠재적인 결여를 표현하기 위해 본원에서 사용된다.
- [0074] **치료:** 본원에서 사용되는, 용어 “치료하다”, “치료” 또는 “치료하는” 은 부분적으로 또는 완전하게 특정 질환, 장애 및/또는 병태의 하나 이상의 증상 또는 특징을 경감시키고, 개선시키고, 완화시키고, 억제하고, 예방하고, 발병을 지연시키고, 중증도를 감소시키고/시키거나 이의 발생 빈도를 감소시키는 임의의 방법을 지칭한다. 질환의 징후를 보이지 않고/않거나 질환의 초기 징후만을 보이는 대상에게 질환과 관련된 병상이 생길 위험을 감소시킬 목적으로 치료가 시행될 수 있다.
- [0075] **발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**
- [0076] 본 발명은 특히, mRNA를 캡슐화하는 안정한 LNP 제형으로서 다수의 동결/해동 사이클에 내성을 갖는 LNP 제형을 생산하는 개선된 방법 및 조성물을 제공한다. 다수의 동결/해동 사이클에 대한 이러한 내성은 적어도 1) 1회 이상의 동결/해동 사이클을 거친 후 LNP의 낮은 응집; 및 2) 캡슐화된 mRNA의 낮은 분해에 의해 나타난다.
- [0077] **안정한 지질 나노입자 제형**
- [0078] 펩티드 또는 폴리펩티드를 암호화하는 mRNA를 캡슐화하는 안정한 액체 지질 나노입자(LNP)를 위한 제형이 본원에 제공된다. 이러한 안정한 LNP는 1회 이상의 동결 해동 사이클을 거친 후 응집 및 mRNA 분해에 내성이 있다. 예를 들어, 안정한 LNP는 1, 2, 3, 4, 5회 또는 5회를 초과하는 동결 해동 사이클에 내성을 가지며, 여기서 mRNA를 캡슐화하는 LNP는 -20°C에서 보관된다. 일부 구현예에서, 안정한 LNP는 1, 2, 3, 4, 5회 또는 5회를 초과하는 동결 해동 사이클에 내성을 가지며, 여기서 mRNA를 캡슐화하는 LNP는 -20°C 이하에서 보관된다.
- [0079] 또한, 본원에 기술된 mRNA를 캡슐화하는 안정한 LNP 제형은 이를 필요로 하는 대상체에게 투여될 때 통증이 감소된다. 예를 들어, 기술된 LNP 제형은 본원에 기술된 것과 같은 특정 이온 강도를 갖지 않는 LNP 제형과 비교하여, 예를 들어 근육내 또는 피하 투여에 의해 투여될 때 통증이 감소된다.
- [0080] 일부 구현예에서, 이러한 안정한 LNP 제형은 다음을 포함한다: a) 양이온성 지질, 비-양이온성 지질, PEG-변형 지질 및, 임의로 콜레스테롤을 포함하는 지질 성분을 갖는 하나 이상의 LNP; b) 하나 이상의 지질 나노입자 내에 캡슐화되고 펩티드 또는 폴리펩티드를 암호화하는 mRNA; c) 당 또는 당 알코올; d) pH 6.0 내지 8.0의 LNP 제형; e) 최소 완충된 이온 강도에서 LNP 제형에 pH를 제공하는 pH 완충액; 및 임의로 f) LNP 제형에 이온 강도를 제공하는 하나 이상의 추가 제제. 안정한 LNP 제형은, 최소 완충된 이온 강도보다 적어도 2배 더 큰 LNP 제형의 이온 강도를 제공하는, (e)의 pH 완충액과 임의로 (f)의 하나 이상의 추가 제제의 총 농도를 갖는다. 1,

2, 3회 또는 그 이상의 동결과 해동을 거친 후, 기술된 LNP 제형은 최소 완충된 이온 강도보다 적어도 2배 더 큰 이온 강도 대신에 LNP 제형 내에 최소 완충된 이온 강도만을 갖는 동일한 LNP 제형과 비교했을 때, (i) 더 적은 응집을 갖거나, (ii) 캡슐화된 mRNA의 더 적은 분해를 갖거나, (iii) (i) 및 (ii) 둘 다를 갖는다.

[0081] 상기 (f)의 하나 이상의 추가 제제는 염, 완충제, 또는 염과 완충제의 조합일 수 있다. 예를 들어, (f)의 하나 이상의 추가 제제는, 예를 들어 NaCl, KCl, 및 CaCl₂를 포함할 수 있다. 완충액은, 예를 들어 인산염 완충액, 구연산염 완충액, 이미다졸 완충액, 히스티딘 완충액, 또는 굿즈 완충액을 포함한다. 다양한 종류의 굿즈 완충제는 당업계에서 공지되어 있으며, 예를 들어 MES, 비스-트리스 메탄, ADA, 비스-트리스 프로판, PIPES, ACES, POPSO, 콜라민 클로라이드, MOPS, BES, AMPB, TES, HEPES, DIPSO, MOBS, 아세트아미도글리신, TAPSO, TEA, POPSO, HEPPSO, EPS, HEPPS, 트리스, 글리신아미드, 글리실글리신, HEPBS, 바이신, TAPS, AMPB, CHES, CAPSO, AMP, CAPS, 및 CABS를 포함한다. 일부 구현예에서, 굿즈 완충액은 트리스 완충액 또는 HEPES 완충액이다.

[0082] 일부 구현예에서, 하나 이상의 추가 제제는 약 50~500 mM, 100~400 mM, 또는 200~300 mM의 농도를 갖는다. 본원에 기술된 LNP 제형의 pH 완충액은 약 100~300 mM, 200~300 mM, 또는 250~300 mM의 농도를 갖는다.

[0083] 본원에 기술된 바와 같이, mRNA를 캡슐화하는 안정적인 LNP 제형의 최소 완충된 이온 강도는, 예를 들어 적어도 15 mM, 적어도 25 mM, 적어도 50 mM, 적어도 75 mM, 적어도 100 mM, 적어도 125 mM, 적어도 150 mM, 또는 적어도 200 mM이다. 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같이 mRNA를 캡슐화하는 안정적인 LNP 제형은, 예를 들어 약 15 mM~200 mM, 50 mM~200 mM, 75 mM~200 mM, 15 mM~150 mM, 50 mM~150 mM, 75 mM~150 mM, 15 mM~100 mM, 50 mM~100 mM, 75 mM~100 mM, 또는 100 mM~200 mM이다. 최소 완충된 이온 강도는 다양한 방식으로 획득될 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 최소 완충된 이온 강도는 완충액 농도를 증가시킴으로써 획득된다. 대안적으로, 최소 완충된 이온 강도는 염 농도를 증가시킴으로써 획득된다. 일부 구현예에서, 최소 완충된 이온 강도는 완충액 농도 및 염 농도 둘 다를 증가시킴으로써 획득된다. 일부 구현예에서, 이온 강도를 제공하는 pH 완충액 및 하나 이상의 추가 제제의 총 농도는 약 40 mM 트리스 완충액 및 약 75~200 mM NaCl, 약 50 mM 트리스 완충액 및 약 75 mM~200 mM NaCl, 약 100 mM 트리스 완충액 및 약 75 mM~200 mM NaCl, 약 40 mM 이미다졸 및 약 75 mM~200 mM NaCl, 약 50 mM 이미다졸 및 75 mM~200 mM NaCl, 및 약 100 mM 이미다졸 및 75 mM~200 mM, 약 40 mM 인산염 및 약 75 mM~200 mM NaCl, 약 50 mM 인산염 및 약 75 mM~200 mM NaCl, 및 약 100 mM 인산염 및 75 mM~200 mM NaCl로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 이온 강도를 제공하는 pH 완충액 및 하나 이상의 추가 제제의 총 농도는 다음으로부터 선택된다: 40 mM 트리스 완충액, 약 75~200 mM NaCl, 및 약 2.5~10% 트레할로스; 약 50 mM 트리스 완충액, 약 75 mM~200 mM NaCl, 및 약 2.5~10% 트레할로스; 약 100 mM 트리스 완충액, 약 75 mM~200 mM NaCl, 및 약 2.5~10% 트레할로스; 약 40 mM 이미다졸, 약 75 mM~200 mM NaCl, 및 약 2.5~10% 트레할로스; 약 50 mM 이미다졸, 75 mM~200 mM NaCl, 및 약 2.5~10% 트레할로스; 약 100 mM 이미다졸, 75 mM~200 mM NaCl, 및 약 2.5~10% 트레할로스; 약 40 mM 인산염, 약 75 mM~200 mM NaCl, 및 약 2.5~10% 트레할로스; 약 50 mM 인산염, 75 mM~200 mM NaCl, 및 약 2.5~10% 트레할로스; 약 100 mM 인산염, 75 mM~200 mM NaCl, 및 약 2.5~10% 트레할로스.

[0084] 일부 구현예에서, 완충제는 상호 교환적으로 사용된다. 일부 구현예에서, 트리스 완충액은 이미다졸 완충액 또는 인산염 완충액으로 치환된다. 일부 구현예에서, 트리스 완충액은 이미다졸 완충액으로 치환된다. 일부 구현예에서, 트리스 완충액은 인산염 완충액으로 치환된다. 일부 구현예에서, 이미다졸 완충액은 인산염 완충액 또는 트리스 완충액으로 치환된다. 일부 구현예에서, 이미다졸 완충액은 인산염 완충액으로 치환된다. 일부 구현예에서, 이미다졸 완충액은 트리스 완충액으로 치환된다. 일부 구현예에서, 인산염 완충액은 트리스 완충액 또는 이미다졸 완충액으로 치환된다. 일부 구현예에서, 인산염 완충액은 트리스 완충액으로 치환된다. 일부 구현예에서, 인산염 완충액은 이미다졸 완충액으로 치환된다.

[0085] 일부 구현예에서, 트리스 완충액, 이미다졸 완충액, 또는 인산염 완충액은 높은 완충액 강도(예: 100 mM 이상)를 갖는다. 일부 구현예에서, 낮은 완충액 강도(예: 15~20 mM)의 트리스 완충액, 인산염 완충액, 또는 이미다졸 완충액이 높은 염 농도(예: 200 mM 이상의 NaCl)와 함께 사용된다. 일부 구현예에서, 중간 완충액 강도(예: 40~50 mM)의 트리스 완충액, 인산염 완충액, 또는 이미다졸 완충액이 중간 염 농도(예: 50~100 mM 이상의 NaCl)와 함께 사용된다.

[0086] 일부 구현예에서, 트리스 완충액, 인산염 완충액, 또는 이미다졸 완충액이 낮은 트레할로스 농도(예: 50~100 mM NaCl)와 함께 사용된다. 일부 구현예에서, LNP 제형 안정성은 당 대 완충액 비가 낮을 때 더 컸다. 일부 구현예에서, LNP 제형의 트레할로스 대 완충액 비가 낮은 것이 캡슐화의 감소를 예방하는 데 유익하였다. 일부 구현

예에서, 트레할로스 대 완충액 비가 더 낮은 것이 LNP 크기의 증가를 방지하였다.

[0087] 일부 구현예에서, LNP 제형은 최소 완충된 이온 강도보다 적어도 2.25배 더 크거나, 적어도 2.5배 더 크거나, 적어도 2.75배 더 크거나, 적어도 3배 더 크거나, 적어도 3.5배 더 크거나, 적어도 4배 더 크거나, 적어도 4.5배 더 크거나, 적어도 5배 더 큰 이온 강도를 갖는다. 일부 구현예에서, LNP 제형은 최소 완충된 이온 강도의 20배 미만, 19배 미만, 18배 미만, 17배 미만, 16배 미만, 15배 미만, 14배 미만, 13배 미만, 12배 미만, 11배 미만, 10배 미만, 9배 미만, 8배 미만, 7배 미만, 6배 미만, 5배 미만, 4배 미만의 이온 강도를 갖는다. 일부 구현예에서, LNP 제형의 이온 강도는 최소 완충된 이온 강도보다 적어도 2배 더 크고 20배 미만이며, 여기서 LNP 제형의 이온 강도는 약 150 mM~750 mM, 150 mM~500 mM, 150 mM~400 mM, 150 mM~300 mM, 150 mM~200 mM이다. 일부 구현예에서, LNP 제형의 이온 강도는 최소 완충된 이온 강도보다 적어도 2배 더 크고 20배 미만이며, 여기서 LNP 제형의 이온 강도는 150 mM이거나 이보다 더 크다. 전반적으로 언급된 최소 완충된 이온 강도는 적어도 75 mM, 적어도 100 mM, 적어도 125 mM, 적어도 150 mM, 또는 적어도 200 mM이다.

[0088] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 안정적인 LNP 제형은 하나 이상의 동결 보호제를 추가로 포함한다. 동결 보호제는 “침투성” 동결 보호제 또는 “비침투성” 동결 보호제로서 특성화할 수 있다. 본원에 기술된 LNP 제형에 적합한 동결 보호제는 침투성 동결 보호제 및/또는 비침투성 동결 보호제로부터 선택될 수 있다. 예시적인 비침투성 동결 보호제는, 예를 들어 텍스트로오스, 소르비톨, 트레할로스, 수크로오스, 라피노오스, 텍스트란, 및 이눌린과 같은 당류를 포함한다. 비침투성 동결 보호제의 다른 범주는, 예를 들어 PVP, PVA, 폴록사머, 및 PEG와 같은 중합체를 포함한다. 예시적인 침투성 동결 보호제는, 예를 들어 글리세롤, 에틸렌 글리콜, 트리-에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜, 테트라-에틸렌 글리콜을 포함한다. 기술된 동결 보호제 중 임의의 하나 이상은 본원에 기술된 안정적인 LNP 제형에 포함시키기에 적합하다. 일부 구현예에서, LNP 제형 내 동결 보호제는 트레할로스를 1% 내지 20%의 농도로 포함한다. 일부 구현예에서, LNP 제형 내 동결 보호제는 트레할로스를 2.5%~3.0%의 농도로 포함한다. 일부 구현예에서, LNP 제형 내 동결 보호제는 트레할로스를 2.5%의 농도로 포함한다. 일부 구현예에서, LNP 제형 내 동결 보호제는 트레할로스를 2.6%의 농도로 포함한다. 일부 구현예에서, LNP 제형 내 동결 보호제는 트레할로스를 2.7%의 농도로 포함한다. 일부 구현예에서, LNP 제형 내 동결 보호제는 트레할로스를 2.8%의 농도로 포함한다. 일부 구현예에서, LNP 제형 내 동결 보호제는 트레할로스를 2.9%의 농도로 포함한다. 일부 구현예에서, LNP 제형 내 동결 보호제는 트레할로스를 3.0%의 농도로 포함한다.

[0089] 다양한 비-양이온성 지질이 본원에 기술된 LNP 제형에 사용될 수 있다. 예를 들어, 본원에 기술된 LNP 제형에 적합한 비-양이온성 지질은 1,2-디에투코일-sn-글리세롤-3-포스포에탄올아민(DEPE), 디스테아로일포스파티딜콜린(DSPC), 디올레오일포스파티딜콜린(DOPC), 디팔미토일포스파티딜콜린(DPPC), 디올레오일포스파티딜글리세롤(DOPG), 디팔미토일포스파티딜글리세롤(DPPG), 디올레오일포스파티딜에탄올아민(DOPE), 팔미토일올레오일포스파티딜콜린(POPC), 팔미토일올레오일-포스파티딜에탄올아민(POPE), 디올레오일-포스파티딜에탄올아민 4-(N-말레이미도메틸)-시클로hex산-1-카복실레이트(DOPE-mal), 디팔미토일 포스파티딜 에탄올아민(DPPE), 디미리스토일포스포에탄올아민(DMPE), 디스테아로일-포스파티딜-에탄올아민(DSPE), 16-0-모노메틸 PE, 16-0-디메틸 PE, 18-1-트랜스 PE, 또는 1-스테아로일-2-올레오일-포스파티딜에탄올아민(SOPE)으로부터 선택될 수 있다. 일부 구현예에서, 비-양이온성 지질은 DOPE이다.

[0090] LNP 제형 내 비-양이온성 지질은 10% 초과 지질 몰비로 존재할 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 비-양이온성 지질은 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 또는 50%의 지질 몰비로 존재한다.

[0091] 일부 구현예에서, 양이온성 지질은 리피도이드(lipidoid)로부터 선택된다. 다양한 리피도이드가 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 리피도이드는, 참조로서 본원에 통합된 다음 문헌에 기술되어 있다: Goldberg M.의 문헌 [(2013) *Lipidoids: A Combinatorial Approach to siRNA Delivery*]; Howard K. (eds)의 문헌 [*RNA Interference from Biology to Therapeutics*. Advances in Delivery Science and Technology. Springer, Boston, MA.]. 일부 구현예에서, 리피도이드는 양이온성이다. 일부 구현예에서, 리피도이드는 최대 7개의 꼬리를 함유한다. 7개의 꼬리는, 예를 들어 아민 골격으로부터 생성될 수 있다. 일부 구현예에서, 리피도이드는 중성지방과 같은 천연 지질과 비교했을 때, 지방족 사슬에 대한 이의 에스테르 결합의 반전을 갖는다. 일부 구현예에서, 리피도이드는 중성지방과 같은 천연 지질과 비교했을 때, 지방족 사슬에 대한 이의 에스테르 결합의 반전을 갖지 않는다.

[0092] 일부 구현예에서, 리피도이드는 예를 들어 아미노알코올 리피도이드를 포함한다. 일부 구현예에서, 리피도이드

는 cKK-E10, OF-02, 또는 C12-200으로부터 선택된다. 따라서, 일부 구현예에서, 리피도이드는 cKK-E-10이다. 일부 구현예에서, 리피도이드는 OF-02이다. 일부 구현예에서, 리피도이드는 C12-200이다.

[0093] 본 발명의 LNP 제형은 약 6.0 내지 8.0의 pH를 가질 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, LNP 제형은 약 6.0~7.0의 pH를 가질 수 있다. 일부 구현예에서, LNP 제형은 약 6.5~7.5의 pH를 가질 수 있다. 일부 구현예에서, LNP 제형은 약 7.0~8.0의 pH를 가질 수 있다. 일부 구현예에서, LNP 제형은 약 7.4의 pH를 갖는다. 일부 구현예에서, LNP 제형은 생리학적 pH와 동등한 pH를 갖는다.

[0094] LNP 제형의 pH 완충액은 약 6.0 내지 8.2의 pKa를 가질 수 있다. 예를 들어, LNP 제형의 pH 완충액은 약 6.2, 6.4, 6.6, 6.8, 7.0, 7.2, 7.4, 7.6, 7.8, 8.0, 또는 8.2의 pKa를 갖는다. 일부 구현예에서, pH 완충액은 약 6.2의 pKa를 갖는다. 일부 구현예에서, pH 완충액은 약 6.4의 pKa를 갖는다. 일부 구현예에서, pH 완충액은 약 6.6의 pKa를 갖는다. 일부 구현예에서, pH 완충액은 약 6.8의 pKa를 갖는다. 일부 구현예에서, pH 완충액은 약 7.0의 pKa를 갖는다. 일부 구현예에서, pH 완충액은 약 7.2의 pKa를 갖는다. 일부 구현예에서, pH 완충액은 약 7.4의 pKa를 갖는다. 일부 구현예에서, pH 완충액은 약 7.6의 pKa를 갖는다. 일부 구현예에서, pH 완충액은 약 7.8의 pKa를 갖는다. 일부 구현예에서, pH 완충액은 약 8.0의 pKa를 갖는다. 일부 구현예에서, pH 완충액은 약 8.2의 pKa를 갖는다.

[0095] 전술한 바와 같이, 본원에 기술된 LNP 제형은 1회 이상의 동결 해동 사이클 후에 더 적은 응집을 갖는다. 당업계에는 LNP 응집을 결정하는 다양한 방법이 있으며, 여기에는 예를 들어, 동적 광 산란(DLS), 나노입자 추적 분석(NTA), 탁도 분석, 유동 현미경 분석, 유세포 분석, FTIR 현미경, 공명 질량 측정(RMM), 라만 현미경, 여과, 레이저 회절, 전자현미경, 원자력 현미경(AFM), 정적 광 산란(SLS), 다중 각도 정적 광 산란(MALS), 현장 유동 분획화(FFF), 또는 분석용 초원심분리(AUC) 중 하나 이상에 의한 결정이 포함된다. 이들 방법 중 임의의 하나 이상이 LNP 응집을 평가하는 데 사용될 수 있다.

[0096] 본원에 기술된 LNP 제형은 또한, 1회 이상의 동결 해동 사이클 후 더 적은 mRNA 분해를 갖는다. 당업계에는 mRNA 분해를 결정하는 다양한 방법이 있으며, 여기에는 예를 들어 동적 광 산란(DLS), 나노입자 추적 분석(NTA), 탁도 분석, 유동 현미경 분석, 유세포 분석, FTIR 현미경, 공명 질량 측정(RMM), 라만 현미경, 여과, 레이저 회절, 전자현미경, 원자력 현미경(AFM), 정적 광 산란(SLS), 다중 각도 정적 광 산란(MALS), 현장 유동 분획화(FFF), 및 분석용 초원심분리(AUC)가 있다. 이들 방법 중 임의의 하나 이상이 mRNA 분해를 평가하는 데 사용될 수 있다.

[0097] 본원에 기술된 LNP 제형은 100 nm 미만의 직경을 갖는다. 예를 들어, 일부 구현예에서, LNP는 약 70 nm~90 nm의 직경을 갖는다. 일부 구현예에서, LNP는 70 nm 미만의 직경을 갖는다.

[0098] 전반적으로 기술된 바와 같이, 다양한 종류의 지질 성분이 본원에 기술된 LNP에 적합하다. 일부 구현예에서, LNP 제형은 DMG-PEG-2000, cKK-E10, 콜레스테롤, 및 DOPE를 포함하는 지질 성분을 갖는다. 일부 구현예에서, LNP 제형은 DMG-PEG-2000, cKK-E10, 콜레스테롤, 및 DOPE로 이루어진 지질 성분을 갖는다.

[0099] LNP 제형은 약 3~5 범위의 N/P 비를 가질 수 있다. 일부 구현예에서, N/P 비는 약 3이다. 일부 구현예에서, N/P 비는 약 4이다. 일부 구현예에서, N/P 비는 약 5이다.

[0100] LNP 제형은 mRNA를 캡슐화한다. 임의의 mRNA가 본원에 기술된 LNP 제형에 의해 캡슐화될 수 있다. LNP 내에 캡슐화된 mRNA의 최종 농도는 약 0.05 mg/mL 내지 1.0 mg/mL의 범위일 수 있다. 일부 구현예에서, LNP 내에 캡슐화된 mRNA는 약 0.2 mg/mL 내지 약 0.5 mg/mL의 범위이다.

[0101] 본원에 기술된 LNP 제형은 -20°C, -80°C, 또는 -80°C 미만에서 보관될 때 안정하다. 따라서, 일부 구현예에서, 본원에 기술된 LNP 제형은 -20°C에서 보관될 때 안정하다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 LNP 제형은 -80°C에서 보관될 때 안정하다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 LNP 제형은 -80°C 미만에서 보관될 때 안정하다. 예를 들어, LNP 제형은 -20°C에서 보관될 때 적어도 3개월, 6개월, 12개월, 또는 12개월을 초과하는 동안 안정하다. 또한, LNP 제형은 회석 후 안정하다.

[0102] **mRNA의 합성**

[0103] 본 발명에 따른 mRNA는 알려진 다양한 방법 중 어느 하나에 따라 합성될 수 있다. 예를 들어, 본 발명에 따른 mRNA는 시험관 내 전사(IVT)를 통해 합성될 수 있다. 요약하면, IVT는 일반적으로 프로모터를 함유하는 선형 또는 원형 DNA 템플릿, 리보뉴클레오타이드 트리포스페이트의 풀, DTT 및 마그네슘 이온을 포함할 수 있는 완충액 시스템, 및 적합한 RNA 중합효소(예: T3, T7, 또는 SP6 RNA 중합효소), DNase I, 피로포스파타아제, 및/또는

RNAse 억제제로 수행된다. 정확한 조건은 특정 응용에 따라 달라질 것이다.

- [0104] 일부 구현예에서, 본 발명에 따른 mRNA의 제조를 위해, DNA 템플릿을 시험관 내에서 전사한다. 적절한 DNA 템플릿은 일반적으로, 시험관 내 전사를 위한 프로모터(예를 들어, T3, T7 또는 SP6 프로모터)를 가지며, 원하는 mRNA에 대한 원하는 뉴클레오티드 서열 및 종결 신호가 이어진다.
- [0105] *SP6 RNA 중합효소를 사용해 mRNA 합성하기*
- [0106] 일부 구현예에서, mRNA는 SP6 RNA 중합효소를 사용하여 생산된다. SP6 RNA 중합효소는 SP6 프로모터 서열에 대한 높은 서열 특이성을 갖는 DNA-의존성 RNA 중합효소이다. SP6 중합효소는 이의 프로모터로부터 하류에 있는 단일-가닥 DNA 또는 이중-가닥 DNA 상에서 5'에서 3' 방향으로 RNA의 시험관 내 합성을 촉매하고; 고유 리보뉴클레오티드 및/또는 변형된 리보뉴클레오티드 및/또는 표지된 리보뉴클레오티드를 중합된 전사체 내에 혼입한다. 이러한 표지된 리보뉴클레오티드의 예는 비오틴-, 플루오레세인-, 디곡시게닌-, 아미노알릴-, 및 동위원소-표지된 뉴클레오티드를 포함한다.
- [0107] 박테리오파지 SP6 RNA 중합효소에 대한 서열은 처음에는 다음의 아미노산 서열을 갖는 것으로 기술되었다 (GenBank: Y00105.1):
 MQDLHAIQLQLEEFMFGNGIRRFEDQQRQIAAGSESDTAWNRRLSELIAAPMAEGIQAYKEEYEGKKGRAPRALAFQLQCVENEVAAYITMKVMDMLNTDALTQAIAMSVAERIEDQVRFKLEGHAAKYFEKVKKSLKASRTKSYRHAHNVAVVAEKSVAEKDADFDRWEAWPKETQLQIGTTLLEILEGSVFYNGEPVFMRAMRTYGGKTIYYLQTSSESVGQWISAFKEHVAQLSPAYAPCVIPRPWPRTPFNGGFHTEKVASRIRLVKGNREHVRKLTQKQMPKVYKAINALQNTQWQINKDVLAVIEEVIRLDLGYGVPSPFKPLIDKENKPNPVPVEFQHLRGRELKEMLSPEQWQQFINWKGECARLYTAETKRGSKSAAVVRMGQARKYSAFESIYFVYAMDSRSRVYVQSSTLSPQSNDLGKALLRFTEGRPVNGVEALKWFCINGANLWGWDDKTFDVRVSNVLDEEFQDMCRDIAADPLTFTQWAKADAPYEFLAWCFEYAYQLDLVDEGRADEFRTHLPVHQDGCSCSGIQHYSAMLRDEVGAKAVNLKPSDAPQDIYGAVAQVVIKKNALYMDADDATFTSGSVTLSTGTELRAMASAWDSIGITRSLTKKPVMTLPYGSTRLTCRESVIDYIVDLEEKEAQKAVAEGRTANKVHPFEDDRQDYLTPGAAYNYMTALIWPSISEVVKAPIVAMKMI RQLARFAAKRNEGLMYTLPTGFILEQKIMATEMLRVRTCLMGDIKMSLQVETDIVDEAAMMGAAAPNFVHGHDAHLILTVCELVDKGVTSIAVIHDSFGTHADNTLTLRVALKGQMVAMYIDGNALQKLLLEEHEVRWMDVTGIEVPEQGEFDLNEIMDSEYVFA.
- [0108] 본 발명에 적합한 SP6 RNA 중합효소는 박테리오파지 SP6 RNA 중합효소와 실질적으로 동일한 중합효소 활성을 갖는 임의의 효소일 수 있다. 따라서, 일부 구현예에서, 본 발명에 적합한 SP6 RNA 중합효소는 서열번호 16으로부터 변형될 수 있다. 예를 들어, 적합한 SP6 RNA 중합효소는 하나 이상의 아미노산 치환, 결실, 또는 추가를 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 적합한 SP6 RNA 중합효소는 서열번호 16과 약 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89%, 88%, 87%, 86%, 85%, 84%, 83%, 82%, 81%, 80%, 75%, 70%, 65%, 또는 60% 동일하거나 상동성인 아미노산 서열을 갖는다. 일부 구현예에서, 적합한 SP6 RNA 중합효소는 (N-말단, C-말단, 또는 내부적으로) 절단되었지만 중합효소 활성을 유지하는 단백질일 수 있다. 일부 구현예에서, 적합한 SP6 RNA 중합효소는 융합 단백질이다.
- [0109] 본 발명에 적합한 SP6 RNA 중합효소는, 예를 들어 Aldevron, Ambion, New England Biolabs(NEB), Promega, 및 Roche로부터 상업적으로 이용가능한 제품일 수 있다. SP6은 본원에 기술된 것과 같은 서열번호 16의 아미노산 서열 또는 서열번호 16의 변이체에 따라 상업적 공급원 또는 비상업적 공급원에 주문 및/또는 맞춤 설계를 의뢰할 수 있다. SP6은 표준 충실도 중합효소이거나, RNA 중합효소 활성을 촉진하도록 변형된 (예를 들어 SP6 RNA 중합효소 유전자에서의 돌연변이 또는 SP6 RNA 중합효소 자체의 번역후 변형) 고-충실도/고효율/고용량 중합체일 수 있다. 변형된 이러한 SP6의 예는 Ambion의 SP6 RNA Polymerase-Plus™, NEB의 HiScribe SP6, 및 Promega의 RiboMAX™ 및 Riboprobe® 시스템을 포함한다.
- [0110] 일부 구현예에서, 적합한 SP6 RNA 중합효소는 융합 단백질이다. 예를 들어, SP6 RNA 중합효소는 단리, 정제, 또는 효소의 가용성을 촉진하는 하나 이상의 태그를 포함할 수 있다. 적합한 태그는 N-말단, C-말단, 및/또는 내부에 위치할 수 있다. 적합한 태그의 비제한적인 예는 칼모듈린-결합 단백질(CBP); 간질(Fasciola hepatica) 8-kDa 항원(Fh8); FLAG 태그 펩티드; 글루타티온-S-트랜스퍼라아제(GST); 히스티딘 태그(예를 들어, 헥사히스티딘 태그(His6)); 말토오스-결합 단백질(MBP); N-활용 물질(NusA); 작은 유비틴 관련 개질제(SUMO) 융합 태그; 스트렙트아비딘 결합 펩티드(STREP); 탠덤 친화도 정제(TAP); 및 티오레독신(TrxA)을 포함한다. 다른 태그가 본 발명에 사용될 수 있다. 이들 및 다른 융합 태그는, 예를 들어 그 전체가 참조로서 본원에 통합된 Costa 등의 문헌[Frontiers in Microbiology 5 (2014): 63] 및 PCT/US16/57044에 기술되어 있다. 소정의 구현예에서, His 태그는 SP6의 N-말단에 위치한다.
- [0111] *DNA 템플릿*

- [0112] 일반적으로, DNA 템플릿은 전체적으로 이중-가닥이거나, 대부분이 단일-가닥이고 SP6 프로모터 서열이 이중-가닥일 수 있다.
- [0113] 선형화된 플라스미드 DNA(하나 이상의 제한 효소를 통해 선형화됨), 선형화된 게놈 DNA 단편(제한 효소 및/또는 물리적 수단을 통해 선형화됨), PCR 산물, 및/또는 합성 DNA 올리고뉴클레오티드가 전사될 DNA 서열의 상류에서 이중-가닥 SP6 프로모터를 함유하는 경우(및 올바른 배향으로 함유하는 경우), 이들은 시험관내 전사를 위한 템플릿으로서 SP6와 함께 사용될 수 있다.
- [0114] 일부 구현예에서, 선형화된 DNA 템플릿은 무딘 단부를 갖는다.
- [0115] 일부 구현예에서, 전사될 DNA 서열은 더 효율적인 전사 및/또는 번역을 용이하게 하도록 최적화될 수 있다. 예를 들어, DNA 서열은 시스 조절 요소(예를 들어 TATA 박스, 종결 신호, 및 단백질 결합 부위), 인공 재조합 부위, chi 부위, CpG 디뉴클레오티드 함량, 음성 CpG 섬, GC 함량, 중합효소 미끄러짐 부위, 및/또는 전사와 관련된 다른 요소에 관해 최적화될 수 있고; DNA 서열은 잠재 스플라이스 부위, mRNA 이차 구조, mRNA의 안정한 유리 에너지, 반복 서열, RNA 불안정성 모티프, 및/또는 mRNA 가공 및 안정성과 관련된 다른 요소에 관해 최적화될 수 있고; DNA 서열은 코돈 사용빈도 편향, 코돈 적응성, 내부 chi 부위, 리보솜 결합 부위(예: IRES), 조기 polyA 부위, 샤인-달가노(SD) 서열, 및/또는 번역과 관련된 다른 요소들에 관해 최적화될 수 있고/있거나; DNA 서열은 코돈 맥락, 코돈-항코돈 상호작용, 번역 중단 부위, 및/또는 단백질 접힘과 관련된 다른 요소들에 관해 최적화될 수 있다. 당업계에 공지된 최적화 방법, 예를 들어 미국 특허 제20110081708호에 기술된 ThermoFisher의 GeneOptimizer 및 OptimumGene™이 본 발명에 사용될 수 있으며, 상기 특허 문헌의 내용은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.
- [0116] 일부 구현예에서, DNA 템플릿은 5' 및/또는 3' 비번역 영역(UTR)을 포함한다. 일부 구현예에서, 5' 비번역 영역은 mRNA의 안정성이나 번역에 영향을 미치는 하나 이상의 요소, 예를 들어, 철 반응 요소를 포함한다. 일부 구현예에서, 5' 비번역 영역은 길이가 약 50 내지 500 뉴클레오티드일 수 있다.
- [0117] 일부 구현예에서, 3' 비번역 영역은 폴리아데닐화 신호, 세포 내 mRNA의 위치 안정성에 영향을 주는 단백질에 대한 결합 부위, 또는 miRNA에 대한 하나 이상의 결합 부위 중 하나 이상을 포함한다. 일부 구현예에서, 3' 비번역 영역은 길이가 50 내지 500 뉴클레오티드이거나 더 길 수 있다.
- [0118] 예시적인 3' 및/또는 5' UTR 서열은 센스 mRNA 분자의 안정성을 높이기 위해 안정한 mRNA 분자(예를 들어, 글로빈, 액틴, GAPDH, 튜불린, 히스톤, 또는 구연산 순환 효소)로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, 5' UTR 서열은 뉴클레아제 내성을 개선시키고/시키거나 폴리뉴클레오티드의 반감기를 개선하기 위해 CMV 극초기(immediate-early) 1(IE1) 유전자의 부분 서열 또는 이의 단편을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오티드를 더 안정시키기 위해 인간 성장 호르몬(hGH)을 암호화하는 서열 또는 이의 단편을 폴리뉴클레오티드(예컨대, mRNA)의 3' 말단 또는 비번역 영역에 포함하는 것도 고려된다. 일반적으로, 이러한 변형은 폴리뉴클레오티드의 안정성 및/또는 약동학적 성질(예컨대, 반감기)을 변형되지 않은 대응물에 비해 개선시키고, 예를 들어 생체내 뉴클레아제 소화에 대한 이러한 폴리뉴클레오티드의 내성을 개선시키도록 이루어진 변형을 포함한다.
- [0119] *대규모 mRNA 합성*
- [0120] 일부 구현예에서, 본 발명은 안정한 LNP에 캡슐화된 mRNA를 대규모로 생산하는 데 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 본 발명에 따른 방법은 적어도 100 mg, 150 mg, 200 mg, 300 mg, 400 mg, 500 mg, 600 mg, 700 mg, 800 mg, 900 mg, 1 g, 5 g, 10 g, 25 g, 50 g, 75 g, 100 g, 250 g, 500 g, 750 g, 1 kg, 5 kg, 10 kg, 50 kg, 100 kg, 1000 kg, 또는 그 이상의 mRNA를 단일 회분으로 합성한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 “회분(batch)”은 한 번에 합성된, 예를 들어 단일 제조 환경에 따라 생산된 mRNA의 수 또는 양을 지칭한다. 회분은 하나의 반응에서 합성된 mRNA의 양을 지칭할 수 있고, 상기 하나의 반응은 한 세트의 조건 하에서 연속 합성을 위한 효소의 단일 분취액 및/또는 DNA 템플릿의 단일 분취액을 통해 발생한다. 단일 회분에서 합성된 mRNA는 상기 시점에 합성되어 원하는 양을 달성하도록 합쳐지는 mRNA를 포함하지 않게 된다. 일반적으로, 반응 혼합물은 SP6 RNA 중합효소, 선형 DNA 템플릿, 및 RNA 중합효소 반응 완충액(리보뉴클레오티드를 포함하거나 리보뉴클레오티드의 첨가가 필요할 수 있음)을 포함한다.
- [0121] 본 발명에 따르면, 생산된 mRNA 1그램(g) 당 1~100 mg의 SP6 중합효소가 일반적으로 사용된다. 일부 구현예에서, 생산된 mRNA 1그램 당 약 1~90 mg, 1~80 mg, 1~60 mg, 1~50 mg, 1~40 mg, 10~100 mg, 10~80 mg, 10~60 mg, 10~50 mg의 SP6 중합효소가 사용된다. 일부 구현예에서, 약 5~20 mg의 SP6 중합효소가 약 1 그램의 mRNA를 생산하는 데 사용된다. 일부 구현예에서, 약 0.5~2 mg의 SP6 중합효소가 약 100 그램의 mRNA를 생산하는

데 사용된다. 일부 구현예에서, 약 5~20 mg의 SP6 중합효소가 약 1 킬로그램의 mRNA를 생산하는 데 사용된다. 일부 구현예에서, 적어도 5 mg의 SP6 중합효소가 적어도 1 그램의 mRNA를 생산하는 데 사용된다. 일부 구현예에서, 적어도 500 mg의 SP6 중합효소가 적어도 100 그램의 mRNA를 생산하는 데 사용된다. 일부 구현예에서, 적어도 5 그램의 SP6 중합효소가 적어도 1 킬로그램의 mRNA를 생산하는 데 사용된다. 일부 구현예에서, 생산된 mRNA 1그램 당 약 10 mg, 20 mg, 30 mg, 40 mg, 50 mg, 60 mg, 70 mg, 80 mg, 90 mg, 또는 100 mg의 플라스미드 DNA가 사용된다. 일부 구현예에서, 약 10~30 mg의 플라스미드 DNA가 약 1 그램의 mRNA를 생산하는 데 사용된다. 일부 구현예에서, 약 1~3 그램의 플라스미드 DNA가 약 100 그램의 mRNA를 생산하는 데 사용된다. 일부 구현예에서, 약 10~30 그램의 플라스미드 DNA가 약 1 킬로그램의 mRNA를 생산하는 데 사용된다. 일부 구현예에서, 적어도 10 mg의 플라스미드 DNA가 적어도 1 그램의 mRNA를 생산하는 데 사용된다. 일부 구현예에서, 약 1 mg의 플라스미드 DNA가 적어도 100 그램의 mRNA를 생산하는 데 사용된다. 일부 구현예에서, 적어도 10 그램의 플라스미드 DNA가 적어도 1 킬로그램의 mRNA를 생산하는 데 사용된다.

- [0122] 일부 구현예에서, 반응 혼합물 내 SP6 중합효소의 농도는 약 1 내지 100 nM, 1 내지 90 nM, 1 내지 80 nM, 1 내지 70 nM, 1 내지 60 nM, 1 내지 50 nM, 1 내지 40 nM, 1 내지 30 nM, 1 내지 20 nM, 또는 약 1 내지 10 nM 일 수 있다. 소정의 구현예에서, SP6 중합효소의 농도는 약 10 내지 50 nM, 20 내지 50 nM, 또는 30 내지 50 nM이다. 100 내지 10000 단위/ml 농도의 SP6 RNA 중합효소, 예를 들어, 100 내지 9000 단위/ml, 100 내지 8000 단위/ml, 100 내지 7000 단위/ml, 100 내지 6000 단위/ml, 100 내지 5000 단위/ml, 100 내지 1000 단위/ml, 200 내지 2000 단위/ml, 500 내지 1000 단위/ml, 500 내지 2000 단위/ml, 500 내지 3000 단위/ml, 500 내지 4000 단위/ml, 500 내지 5000 단위/ml, 500 내지 6000 단위/ml, 1000 내지 7500 단위/ml, 및 2500 내지 5000 단위/ml 농도의 SP6 RNA 중합효소가 사용될 수 있다.
- [0123] 반응 혼합물 중 각 리보뉴클레오티드(예를 들어, ATP, UTP, GTP, 및 CTP)의 농도는 약 0.1 mM 내지 약 10 mM, 예를 들어 약 1 mM 내지 약 10 mM, 약 2 mM 내지 약 10 mM, 약 3 mM 내지 약 10 mM, 약 1 mM 내지 약 8 mM, 약 1 mM 내지 약 6 mM, 약 3 mM 내지 약 10 mM, 약 3 mM 내지 약 8 mM, 약 3 mM 내지 약 6 mM, 약 4 mM 내지 약 5 mM이다. 일부 구현예에서, 각 리보뉴클레오티드는 반응 혼합물에서 약 5 mM의 농도이다. 일부 구현예에서, 반응에 사용된 rNTP(예를 들어 ATP, GTP, CTP, 및 합쳐진 UTP)의 총 농도는 1 mM 내지 40 mM 범위이다. 일부 구현예에서, 반응에 사용된 rNTP(예를 들어 ATP, GTP, CTP, 및 합쳐진 UTP)의 총 농도는 1 mM 내지 30 mM, 또는 1 mM 내지 28 mM, 또는 1 mM 내지 25 mM, 또는 1 mM 내지 20 mM 범위이다. 일부 구현예에서, 총 rNTP 농도는 30 mM 미만이다. 일부 구현예에서, 총 rNTP 농도는 25 mM 미만이다. 일부 구현예에서, 총 rNTP 농도는 20 mM 미만이다. 일부 구현예에서, 총 rNTP 농도는 15 mM 미만이다. 일부 구현예에서, 총 rNTP 농도는 10 mM 미만이다.
- [0124] RNA 중합효소 반응 완충액은 염/완충제, 예를 들어 트리스, HEPES, 황산암모늄, 중탄산나트륨, 구연산나트륨, 아세트산나트륨, 인산칼륨, 인산나트륨, 염화나트륨, 및 염화마그네슘을 일반적으로 포함한다.
- [0125] 반응 혼합물의 pH는 약 6 내지 8.5, 약 6.5 내지 8.0, 약 7.0 내지 7.5일 수 있고, 일부 구현예에서, pH는 7.5이다.
- [0126] 선형 또는 선형화된 DNA 템플릿(예를 들어 원하는 양의 RNA를 제공하기에 충분한 양/농도인, 전술한 바와 같은 DNA 템플릿), RNA 중합효소 반응 완충액, 및 SP6 RNA 중합효소를 합쳐 반응 혼합물을 형성한다. 반응 혼합물을 약 37°C 내지 약 42°C에서 30분 내지 6시간, 예를 들어 약 60분 내지 약 90분 동안 인큐베이션한다.
- [0127] 일부 구현예에서, 적합한 RNA 중합효소 반응 완충액 중의 약 5 mM NTP, 약 0.05 mg/mL SP6 중합효소, 및 약 0.1 mg/ml DNA 템플릿(약 7.5의 최종 반응 혼합물 pH)을 약 37°C 내지 약 42°C에서 60 내지 90분 동안 인큐베이션한다.
- [0128] 일부 구현예에서, 반응 혼합물은 SP6 중합효소-특이적 프로모터, SP6 RNA 중합효소, RNase 억제제, 피로포스파타아제, 29 mM NTP, 10 mM DTT, 및 반응 완충액(10x의 800 mM HEPES인 경우, 20 mM 스피리딘, 250 mM MgCl₂, pH 7.7)을 선형화된 이중 가닥 DNA 템플릿과 함께 함유하고, 원하는 반응 부피에 충분한 양(QS)의 RNA-무함유물을 함유하며; 그런 다음, 이 반응 혼합물을 37°C에서 60분 동안 인큐베이션한다. 그런 다음, DNase I 및 DNase I 완충액(10x의 100 mM 트리스-HCl인 경우, 5 mM MgCl₂ 및 25 mM CaCl₂, pH 7.6)을 첨가하여 중합효소 반응물을 급냉시켜, 정제를 위해 제제 중 이중 가닥 DNA 템플릿의 분해를 용이하게 한다. 이 구현예는 100 그램의 mRNA를 생산하기에 충분한 것으로 나타났다.
- [0129] 일부 구현예에서, 반응 혼합물은 1~10 mM 농도 범위의 NTP, 0.01~0.5 mg/ml 농도 범위의 DNA 템플릿, 및 0.01~0.1 mg/ml 농도 범위의 SP6 RNA 중합효소를 포함하며, 예를 들어 반응 혼합물은 5 mM 농도의 NTP, 0.1

레오티드, 적어도 900개의 아데노신 또는 시토신 뉴클레오티드, 적어도 950개의 아데노신 또는 시토신 뉴클레오티드, 또는 적어도 1kb의 아데노신 또는 시토신 뉴클레오티드를 일반적으로 포함한다. 일부 구현예에서, 폴리A 꼬리 또는 폴리C 꼬리는 각각 약 10 내지 800개의 아데노신 또는 시토신 뉴클레오티드(예: 약 10 내지 200개의 아데노신 또는 시토신 뉴클레오티드, 약 10 내지 300개의 아데노신 또는 시토신 뉴클레오티드, 약 10 내지 400개의 아데노신 또는 시토신 뉴클레오티드, 약 10 내지 500개의 아데노신 또는 시토신 뉴클레오티드, 약 10 내지 550개의 아데노신 또는 시토신 뉴클레오티드, 약 10 내지 600개의 아데노신 또는 시토신 뉴클레오티드, 약 50 내지 600개의 아데노신 또는 시토신 뉴클레오티드, 약 100 내지 600개의 아데노신 또는 시토신 뉴클레오티드, 약 150 내지 600개의 아데노신 또는 시토신 뉴클레오티드, 약 200 내지 600개의 아데노신 또는 시토신 뉴클레오티드, 약 250 내지 600개의 아데노신 또는 시토신 뉴클레오티드, 약 300 내지 600개의 아데노신 또는 시토신 뉴클레오티드, 약 350 내지 600개의 아데노신 또는 시토신 뉴클레오티드, 약 400 내지 600개의 아데노신 또는 시토신 뉴클레오티드, 약 450 내지 600개의 아데노신 또는 시토신 뉴클레오티드, 약 500 내지 600개의 아데노신 또는 시토신 뉴클레오티드, 약 10 내지 150개의 아데노신 또는 시토신 뉴클레오티드, 약 10 내지 100개의 아데노신 또는 시토신 뉴클레오티드, 약 20 내지 70개의 아데노신 또는 시토신 뉴클레오티드, 또는 약 20 내지 60개의 아데노신 또는 시토신 뉴클레오티드)일 수 있다. 일부 구현예에서, 꼬리 구조는 본원에서 설명된 다양한 길이를 갖는 폴리(A) 및 폴리(C) 꼬리의 조합을 포함한다. 일부 구현예에서, 꼬리 구조는 적어도 50%, 55%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 아데노신 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 꼬리 구조는 적어도 50%, 55%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 시토신 뉴클레오티드를 포함한다.

[0137] 본원에 기술된 바와 같이, 5' 캡 및/또는 3' 꼬리의 첨가는 시험관 내 합성 동안 생성된 불현 전사체의 검출을 용이하게 하는데, 이는 캡핑 및/또는 테일링이 없을 때, 조기 불현성 mRNA 전사체들의 크기가 너무 작아 검출될 수 없기 때문이다. 따라서, 일부 구현예에서, 5' 캡 및/또는 3' 꼬리가 합성된 mRNA에 첨가된 후, mRNA를 순도에 대해(예: mRNA에 존재하는 불현 전사체의 수준에 대해) 시험한다. 일부 구현예에서, 5' 캡 및/또는 3' 꼬리가 합성된 mRNA에 첨가된 후, mRNA가 본원에 기술된 것과 같이 정제된다. 다른 구현예에서, 5' 캡 및/또는 3' 꼬리가 합성된 mRNA에 첨가되기 전, mRNA가 본원에 기술된 것과 같이 정제된다.

[0138] 본 발명에 따라 합성된 mRNA는 추가 정제 없이 사용될 수 있다. 특히, 본 발명에 따라 합성된 mRNA는 쇼트머를 제거하는 단계 없이 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 본 발명에 따라 합성된 mRNA는 추가로 정제될 수 있다. 다양한 방법이 본 발명에 따라 합성된 mRNA를 정제하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, mRNA의 정제는 원심분리, 여과, 및/또는 크로마토그래피 방법을 사용하여 수행될 수 있다. 일부 구현예에서, 합성된 mRNA는 에탄올 침전 또는 여과 또는 크로마토그래피, 또는 겔 정제 또는 임의의 다른 적절한 수단에 의해 정제된다. 일부 구현예에서, mRNA는 HPLC에 의해 정제된다. 일부 구현예에서, mRNA는 당업자에게 잘 알려진 표준 펄스:클로로포름:이소아밀 알코올 용액에서 추출된다. 일부 구현예에서, mRNA는 접선 유동 여과를 사용하여 정제된다. 적합한 정제 방법은 미국 특허 출원 제2016/0040154호, 미국 특허 출원 제2015/0376220호, "METHODS FOR PURIFICATION OF MESSENGER RNA" 라는 명칭으로 2018년 2월 27일에 출원된 국제 특허 출원 PCT/US18/19954, 및 "METHODS FOR PURIFICATION OF MESSENGER RNA" 라는 명칭으로 2018년 2월 27일에 출원된 국제 특허 출원 PCT/US18/19978에 기술된 것들을 포함하며, 상기 문헌 모두는 참조로서 본원에 통합되고, 본 발명을 실시하는 데 사용될 수 있다.

[0139] 일부 구현예에서, mRNA는 캡핑 및 테일링 전에 정제된다. 일부 구현예에서, mRNA는 캡핑 및 테일링 후에 정제된다. 일부 구현예에서, mRNA는 캡핑 및 테일링 전 및 후 모두에서 정제된다.

[0140] 일부 구현예에서, mRNA는 캡핑 및 테일링 전 또는 후, 또는 전 및 후 모두에 원심분리에 의해 정제된다.

[0141] 일부 구현예에서, mRNA는 캡핑 및 테일링 전 또는 후, 또는 전 및 후 모두에 여과에 의해 정제된다.

[0142] 일부 구현예에서, mRNA는 캡핑 및 테일링 전 또는 후, 또는 전 및 후 모두에 접선 유동 여과(TFF)에 의해 정제된다.

[0143] 일부 구현예에서, mRNA는 캡핑 및 테일링 전, 또는 후, 또는 전과 후 모두에 크로마토그래피에 의해 정제된다.

[0144] **mRNA의 특성 분석**

[0145] mRNA의 전장 또는 불현 전사물은 당업계에서 이용 가능한 임의의 방법을 사용하여 검출하고 정량화할 수 있다. 일부 구현예에서, 합성된 mRNA 분자는 블롯팅, 모세관 전기영동, 크로마토그래피, 형광, 겔 전기영동, HPLC, 염색, 분광법, 자외선(UV), 또는 UPLC, 또는 이들의 조합을 사용해 검출된다. 당업계에 공지된 다른 검출 방법

이 본 발명에 포함된다. 일부 구현예에서, 합성된 mRNA 분자는 모세관 전기영동에 의해 분리된 UV 흡수 분광법을 사용하여 검출된다. 일부 구현예에서, mRNA는 겔 전기영동 이전에 글리옥살 염료에 의해 먼저 변성된다(“글리옥살 겔 전기영동”). 일부 구현예에서, 합성된 mRNA의 특성을 캡핑 또는 테일링 전에 분석한다. 일부 구현예에서, 합성된 mRNA의 특성을 캡핑 및 테일링 후에 분석한다.

[0146] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 방법에 의해 생성된 mRNA는 전장 mRNA 이외에 10% 미만, 9% 미만, 8% 미만, 7% 미만, 6% 미만, 5% 미만, 4% 미만, 3% 미만, 2% 미만, 1% 미만, 0.5% 미만, 0.1% 미만의 불순물을 포함한다. 불순물은 IVT 오염물, 예를 들어 단백질, 효소, 유리 뉴클레오티드, 및/또는 쇼트머를 포함한다.

[0147] 일부 구현예에서, 본 발명에 따라 생산된 mRNA는 쇼트머 또는 불현 전사물이 실질적으로 없다. 특히, 본 발명에 따라 생산된 mRNA는 모세관 전기영동 또는 글리옥살 겔 전기영동에 의해 검출 불가능한 수준으로 쇼트머 또는 불현 전사물을 함유한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 “쇼트머(shortmers)” 또는 “불현 전사물(abortive transcripts)”은 전장보다 짧은 임의의 전사물을 지칭한다. 일부 구현예에서, “쇼트머” 또는 “불현 전사물”은 길이가 100 뉴클레오티드 미만, 90 뉴클레오티드 미만, 80 뉴클레오티드 미만, 70 뉴클레오티드 미만, 60 뉴클레오티드 미만, 50 뉴클레오티드 미만, 40 뉴클레오티드 미만, 30 뉴클레오티드 미만, 20 뉴클레오티드 미만, 또는 10 뉴클레오티드 미만이다. 일부 구현예에서, 쇼트머는 5' -캡 및/또는 3' -폴리 A 꼬리를 첨가한 후에 검출되거나 정량화된다.

[0148] mRNA 용액

[0149] 일부 구현예에서, mRNA는 지질 용액과 혼합하기 위한 용액으로 제공될 수 있으므로, mRNA는 지질 나노입자로 캡슐화될 수 있다. 적절한 mRNA 용액은 다양한 농도로 캡슐화된 mRNA를 함유하는 임의의 수용액일 수 있다. 예를 들어, 적절한 mRNA 용액은 약 0.01 mg/ml, 0.05 mg/ml, 0.06 mg/ml, 0.07 mg/ml, 0.08 mg/ml, 0.09 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.15 mg/ml, 0.2 mg/ml, 0.3 mg/ml, 0.4 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.6 mg/ml, 0.7 mg/ml, 0.8 mg/ml, 0.9 mg/ml, 또는 1.0 mg/ml 이상의 농도로 mRNA를 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 적절한 mRNA 용액은 약 0.01~1.0 mg/ml, 0.01~0.9 mg/ml, 0.01~0.8 mg/ml, 0.01~0.7 mg/ml, 0.01~0.6 mg/ml, 0.01~0.5 mg/ml, 0.01~0.4 mg/ml, 0.01~0.3 mg/ml, 0.01~0.2 mg/ml, 0.01~0.1 mg/ml, 0.05~1.0 mg/ml, 0.05~0.9 mg/ml, 0.05~0.8 mg/ml, 0.05~0.7 mg/ml, 0.05~0.6 mg/ml, 0.05~0.5 mg/ml, 0.05~0.4 mg/ml, 0.05~0.3 mg/ml, 0.05~0.2 mg/ml, 0.05~0.1 mg/ml, 0.1~1.0 mg/ml, 0.2~0.9 mg/ml, 0.3~0.8 mg/ml, 0.4~0.7 mg/ml, 또는 0.5~0.6 mg/ml 범위의 농도로 mRNA를 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 적절한 mRNA 용액은 최대 약 5.0 mg/ml, 4.0 mg/ml, 3.0 mg/ml, 2.0 mg/ml, 1.0 mg/ml, .09 mg/ml, 0.08 mg/ml, 0.07 mg/ml, 0.06 mg/ml, 또는 0.05 mg/ml의 농도로 mRNA를 함유할 수 있다.

[0150] 일반적으로, 적절한 mRNA 용액은 완충제 및/또는 염을 함유할 수도 있다. 일반적으로, 완충제는 HEPES, 황산암모늄, 중탄산나트륨, 구연산나트륨, 아세트산나트륨, 인산칼륨 및 인산나트륨을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 완충제의 적절한 농도는 약 0.1 mM 내지 100 mM, 0.5 mM 내지 90 mM, 1.0 mM 내지 80 mM, 2 mM 내지 70 mM, 3 mM 내지 60 mM, 4 mM 내지 50 mM, 5 mM 내지 40 mM, 6 mM 내지 30 mM, 7 mM 내지 20 mM, 8 mM 내지 15 mM, 또는 9 내지 12 mM의 범위일 수 있다. 일부 구현예에서, 완충제의 적절한 농도는 약 0.1 mM, 0.5 mM, 1 mM, 2 mM, 4 mM, 6 mM, 8 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM, 45 mM, 또는 50 mM 이상이다.

[0151] 예시적인 염은 염화나트륨, 염화마그네슘, 및 염화칼륨을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, mRNA 용액 중 염의 적절한 농도는 약 1 mM 내지 500 mM, 5 mM 내지 400 mM, 10 mM 내지 350 mM, 15 mM 내지 300 mM, 20 mM 내지 250 mM, 30 mM 내지 200 mM, 40 mM 내지 190 mM, 50 mM 내지 180 mM, 50 mM 내지 170 mM, 50 mM 내지 160 mM, 50 mM 내지 150 mM, 또는 50 mM 내지 100 mM의 범위일 수 있다. 적절한 mRNA 용액 중 염 농도는 약 1 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM, 60 mM, 70 mM, 80 mM, 90 mM, 또는 100 mM 이상이다.

[0152] 일부 구현예에서, 적절한 mRNA 용액은 약 3.5~6.5, 3.5~6.0, 3.5~5.5, 3.5~5.0, 3.5~4.5, 4.0~5.5, 4.0~5.0, 4.0~4.9, 4.0~4.8, 4.0~4.7, 4.0~4.6, 또는 4.0~4.5 범위의 pH를 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 적절한 mRNA 용액은 약 3.5, 4.0, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 5.0, 5.2, 5.4, 5.6, 5.8, 6.0, 6.1, 6.3, 및 6.5 이하의 pH를 가질 수 있다.

[0153] 본 발명에 적절한 mRNA 용액은 다양한 방법을 사용하여 제조할 수 있다. 일부 구현예에서, mRNA는 본원에 기술된 완충액에 직접 용해될 수 있다. 일부 구현예에서, mRNA 용액은, 캡슐화를 위해 mRNA 용액을 지질 용액과 혼합하기 전에 mRNA 스톱 용액과 완충액을 혼합함으로써 생성할 수 있다. 일부 구현예에서, mRNA 용액은, 캡슐화

를 위해 mRNA 용액을 지질 용액과 혼합하기 직전에 mRNA 스톱 용액과 완충액을 혼합함으로써 생성할 수 있다. 예를 들어, 적절한 mRNA 스톱 용액은 물 중 mRNA를 약 0.2 mg/ml, 0.4 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.6 mg/ml, 0.8 mg/ml, 1.0 mg/ml, 1.2 mg/ml, 1.4 mg/ml, 1.5 mg/ml, 또는 1.6 mg/ml, 2.0 mg/ml, 2.5 mg/ml, 3.0 mg/ml, 3.5 mg/ml, 4.0 mg/ml, 4.5 mg/ml, 또는 5.0 mg/ml 이상의 농도로 함유할 수 있다.

[0154] 일부 구현예에서, mRNA 스톱 용액은 펌프를 사용하여 완충액과 혼합된다. 예시적인 펌프는 기어 펌프, 연동 펌프, 및 원심 펌프를 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다.

[0155] 일반적으로, 완충액은 mRNA 스톱 용액의 속도보다 더 높은 속도로 혼합된다. 예를 들어, 완충액은 mRNA 스톱 용액의 속도보다 적어도 1x, 2x, 3x, 4x, 5x, 6x, 7x, 8x, 9x, 10x, 15x, 또는 20x 더 높은 속도로 혼합될 수 있다. 일부 구현예에서, 완충액은 약 100 내지 6000 ml/분(예를 들어, 약 100 내지 300 ml/분, 300 내지 600 ml/분, 600 내지 1200 ml/분, 1200 내지 2400 ml/분, 2400 내지 3600 ml/분, 3600 내지 4800 ml/분, 4800 내지 6000 ml/분, 또는 60 내지 420 ml/분) 범위의 유속으로 혼합된다. 일부 구현예에서, 완충액은 약 60 ml/분, 100 ml/분, 140 ml/분, 180 ml/분, 220 ml/분, 260 ml/분, 300 ml/분, 340 ml/분, 380 ml/분, 420 ml/분, 480 ml/분, 540 ml/분, 600 ml/분, 1200 ml/분, 2400 ml/분, 3600 ml/분, 4800 ml/분, 또는 6000 ml/분 이상의 유속으로 혼합된다.

[0156] 일부 구현예에서, mRNA 스톱 용액은 약 10~600 ml/분(예를 들어, 약 5~50 ml/분, 약 10~30 ml/분, 약 30~60 ml/분, 약 60~120 ml/분, 약 120~240 ml/분, 약 240~360 ml/분, 약 360~480 ml/분, 또는 약 480~600 ml/분) 범위의 유속으로 혼합된다. 일부 구현예에서, mRNA 스톱 용액은 약 5 ml/분, 10 ml/분, 15 ml/분, 20 ml/분, 25 ml/분, 30 ml/분, 35 ml/분, 40 ml/분, 45 ml/분, 50 ml/분, 60 ml/분, 80 ml/분, 100 ml/분, 200 ml/분, 300 ml/분, 400 ml/분, 500 ml/분, 또는 600 ml/분 이상의 유속으로 혼합된다.

[0157] **전달 비히클**

[0158] 본원에 기술된 안정한 지질 나노입자 제형은 mRNA에 대한 전달 비히클로서 적합하다.

[0159] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 “전달 비히클”, “수송 비히클”, “나노입자” 또는 문법적으로 동등한 용어는 상호 교환적으로 사용된다.

[0160] 전달 비히클은 하나 이상의 추가적인 핵산, 담체, 표적 리간드, 또는 안정화 시약과 조합하여 제형화되거나, 적합한 부형제와 혼합된 약학적 조성물로 제형화될 수 있다. 약물의 제형화 및 투여를 위한 기술은 문헌[“Remington's Pharmaceutical Sciences”, Mack Publishing Co., Easton, Pa.,] 최신판에서 확인할 수 있다. 특정 전달 비히클은 핵산을 표적 세포에 형질감염시키는 것을 용이하게 하는 능력에 기초하여 선택된다.

[0161] **리포솜 전달 비히클**

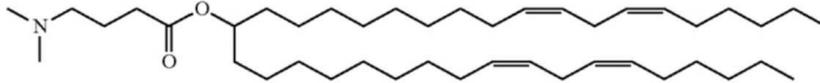
[0162] 일부 구현예에서, 적합한 전달 운반체는 지질 나노입자와 같은 리포솜 전달 운반체이다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 지질 나노입자와 같은 리포솜 전달 운반체는 보통 하나 이상의 이중층 막에 의해 외부 매질로부터 격리된 내부의 수성(aqua) 공간을 가지는 미세 소낭(microscopic vesicles)으로서 특징지어진다. 리포솜의 이중층 막은 공간적으로 분리된 친수성 및 소수성 도메인을 포함하는 합성 또는 천연 유래의 지질과 같은 양친매성 분자에 의해 전형적으로 형성된다(Lasic, Trends Biotechnol., 16: 307-321, 1998). 리포솜의 이중층 막은 양쪽 친매성(amphiphilic) 중합체 및 계면활성제(예: 폴리머즘, 니오즘 등)에 의해 형성될 수도 있다. 본 발명의 맥락에서, 리포솜 전달 운반체는 전형적으로 원하는 mRNA를 표적 세포 또는 조직으로 수송하는 역할을 한다. 일부 구현예에서, 나노입자 전달 비히클은 리포솜이다. 일부 구현예에서, 리포솜은 하나 이상의 양이온성 지질, 하나 이상의 비-양이온성 지질, 하나 이상의 콜레스테롤계 지질, 및 하나 이상의 PEG-변형 지질을 포함한다. 일부 구현예에서, 리포솜은 3개 이하의 구별되는 지질 성분을 포함한다. 일부 구현예에서, 하나의 구별되는 지질 성분은 스테롤계 양이온성 지질이다.

[0163] **양이온성 지질**

[0164] 본원에서 사용되는 바와 같이, “양이온성 지질” 이란 문구는 생리적인 pH와 같은 선택된 pH에서 순 양전하를 띠는 다수의 지질 중 중 어느 하나를 지칭한다.

[0165] 본 발명의 조성물 및 방법에서 사용하기 적합한 양이온성 지질은 본원에 참조로서 포함되는 국제 특허 공개 WO 2010/144740호에 기재된 양이온성 지질을 포함한다. 소정의 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 양이온성 지질, (6Z,9Z,28Z,31Z)-헵타트리아코타-6,9,28,31-테트라엔-19-일 4-(디메틸아미노)

부타노에이트:



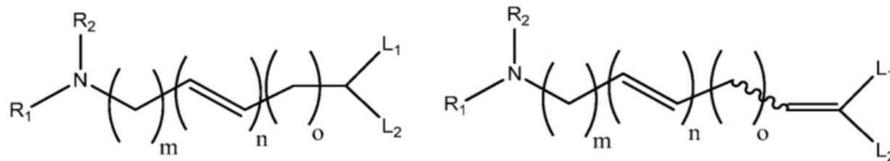
[0166]

[0167]

[0168]

및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

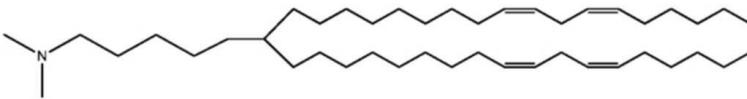
본 발명의 조성물 및 방법에서 사용하기 적합한 기타 양이온성 지질은 본원에 참조로서 포함되는, 국제 특허 공개 WO 2013/149140호에 기재된 이온화(ionizable) 양이온성 지질을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 다음의 화학식 중 하나의 양이온성 지질 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하며:



[0169]

[0170]

식 중, R₁ 및 R₂는 각각 독립적으로 수소, 선택적으로 치환된 가변 포화 또는 불포화 C₁-C₂₀ 알킬, 및 선택적으로 치환된 가변 포화 또는 불포화 C₆-C₂₀ 아실로 이루어진 군에서 선택되고, L₁ 및 L₂는 각각 독립적으로 수소, 선택적으로 치환된 C₁-C₃₀ 알킬, 선택적으로 치환된 가변 불포화 C₁-C₃₀ 알케닐, 및 선택적으로 치환된 C₁-C₃₀ 알킬닐로 이루어진 군에서 선택되며, m 및 o는 각각 독립적으로 0 및 임의의 양의 정수(예를 들어, m은 3)로 이루어진 군에서 선택되고, n은 0이거나 임의의 양의 정수(예를 들어, n은 1)이다. 특정 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 양이온성 지질 (15Z, 18Z)-N,N-디메틸-6-(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디엔-1-일) 테트라코사-15,18-디엔-1-아민(“HGT5000”):



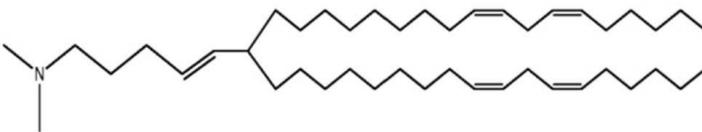
[0171]

[0172]

(HGT-5000)

[0173]

및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다. 소정의 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 양이온성 지질, (15Z, 18Z)-N,N-디메틸-6-((9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디엔-1-일) 테트라코사-4,15,18-트리엔-1-아민(“HGT5001”):



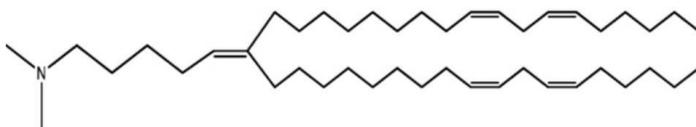
[0174]

[0175]

(HGT-5001)

[0176]

및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다. 소정의 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 양이온성 지질, (15Z,18Z)-N,N-디메틸-6-((9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디엔-1-일) 테트라코사-5,15,18-트리엔-1-아민(“HGT5002”):



[0177]

[0178]

(HGT-5002)

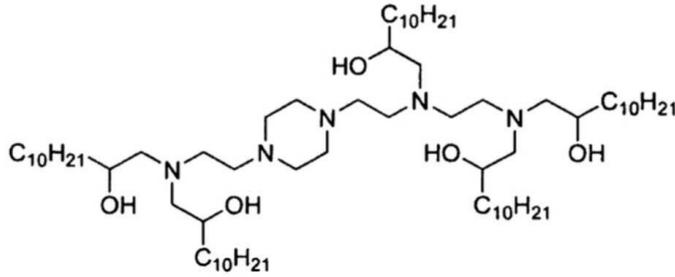
[0179]

및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0180]

본 발명의 조성물 및 방법에서 사용하기 적합한 기타 양이온성 지질은 본원에 참조로서 포함되는, 국제 특허 공개 WO 2010/053572호에 아미노 알코올 리피도이드로 기재된 양이온성 지질을 포함한다. 소정의 구현예에서, 본

발명의 조성물 및 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 양이온성 지질:



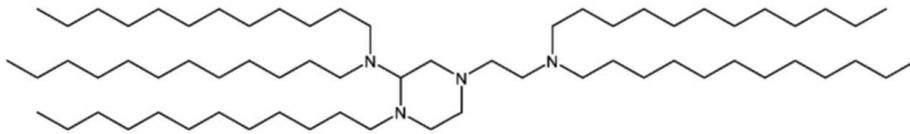
[0181]

[0182]

및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0183]

본 발명의 조성물 및 방법에서 사용하기 적합한 기타 양이온성 지질은 본원에 참조로서 포함되는, 국제 특허 공개 WO 2016/118725호에 기재된 양이온성 지질을 포함한다. 소정의 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 양이온성 지질:



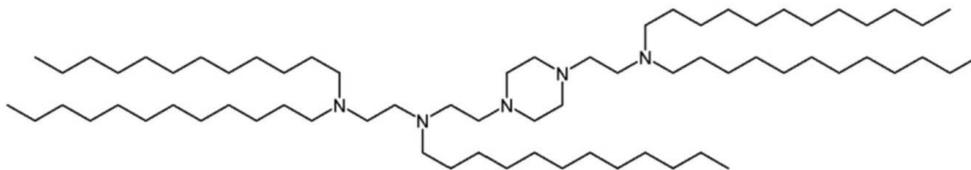
[0184]

[0185]

및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0186]

본 발명의 조성물 및 방법에서 사용하기 적합한 기타 양이온성 지질은 본원에 참조로서 포함되는, 국제 특허 공개 WO 2016/118724호에 기재된 양이온성 지질을 포함한다. 소정의 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 양이온성 지질:



[0187]

[0188]

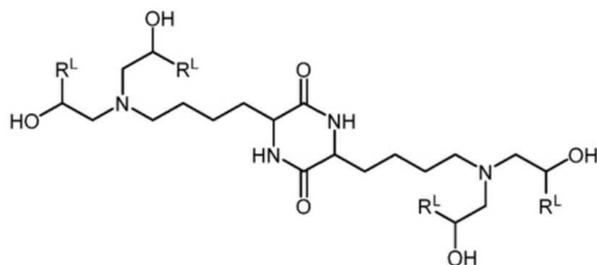
및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0189]

본 발명의 조성물 및 방법에서 사용하기 적합한 기타 양이온성 이온은 14,25-디트리데실 15,18,21,24-테트라아자-옥타트리akon탄의 화학식을 갖는 양이온성 지질 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0190]

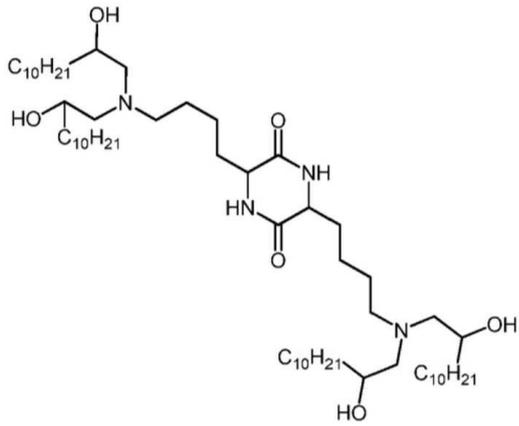
본 발명의 조성물 및 방법에서 사용하기 적합한 기타 양이온성 지질은 둘 다 본원에 참조로서 포함되는 국제 특허 공개 WO 2013/063468호 및 WO 2016/205691호에 기재된 양이온성 지질을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 다음 식의 양이온성 지질:



[0191]

[0192]

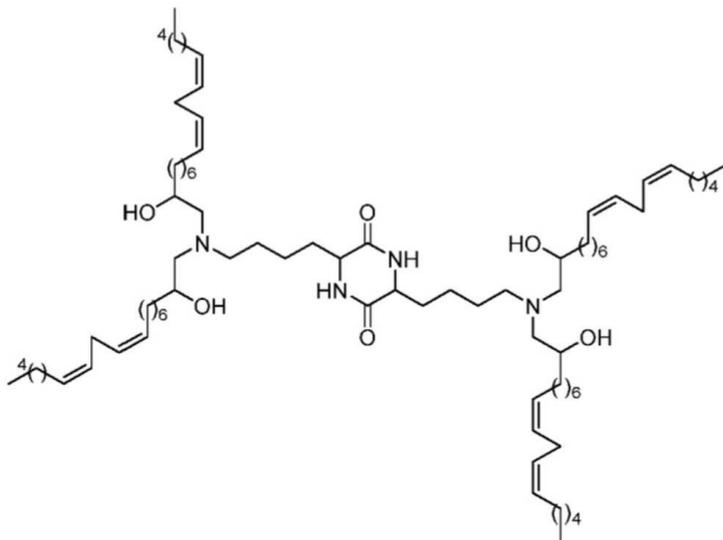
식 중, R¹의 각 인스턴스는 독립적으로 임의 치환된 C₆-C₄₀ 알케닐이다. 소정의 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 양이온성 지질:



[0193]

[0194]

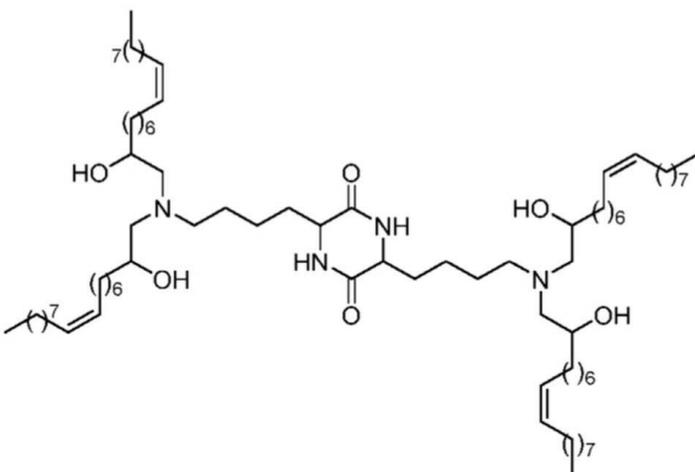
및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다. 소정의 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 양이온성 지질:



[0195]

[0196]

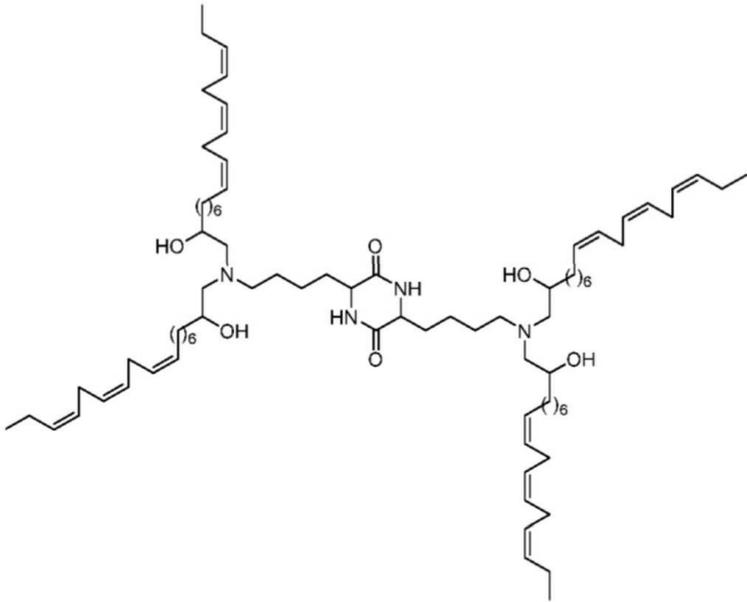
소정의 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 양이온성 지질:



[0197]

[0198]

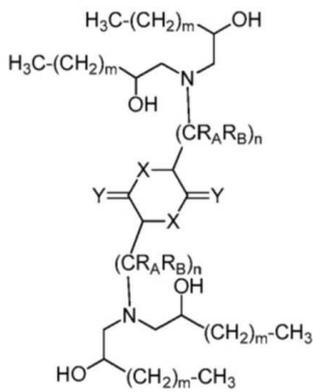
소정의 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 양이온성 지질:



[0199]

[0200]

본 발명의 조성물 및 방법에서 사용하기 적합한 기타 양이온성 지질은 본원에 참조로서 포함되는, 국제 특허 공개 WO 2015/184256호에 기재된 양이온성 지질을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 다음 식의 양이온성 지질:



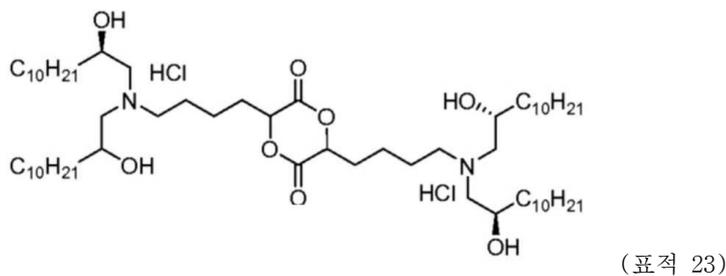
[0201]

[0202]

식 중, 각각의 X는 독립적으로 O 또는 S이고, 각각의 Y는 독립적으로 O 또는 S이고, 각각의 m은 독립적으로 0 내지 20이고, 각각의 n은 독립적으로 1 내지 6이고, 각각의 R_A는 독립적으로 수소, 임의로 치환된 C1-50 알킬, 임의로 치환된 C2-50 알케닐, 임의로 치환된 C2-50 알키닐, 임의로 치환된 C3-10 카보시클릴(carbocyclyl), 임의로 치환된 3-14원 헤테로시클릴(heterocyclyl), 임의로 치환된 C6-14 아릴, 임의로 치환된 5-14원 헤테로아릴 또는 할로겐이고, 각각의 R_B는 독립적으로 수소, 임의로 치환된 C1-50 알킬, 임의로 치환된 C2-50 알케닐, 임의로 치환된 C2-50 알키닐, 임의로 치환된 C3-10 카보시클릴, 임의로 치환된 3-14원 헤테로시클릴, 임의로 치환된 C6-14 아릴, 임의로 치환된 5-14원 헤테로아릴 또는 할로겐이다. 소정의 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 양이온성 지질, 즉 다음의 화합물 구조를 갖는 “표적 23” 및 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함한다:

[0203]

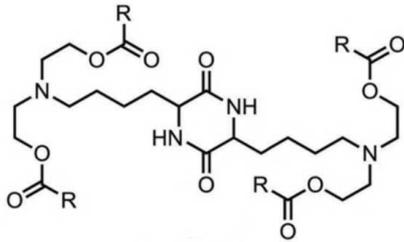
[0204]



(표적 23)

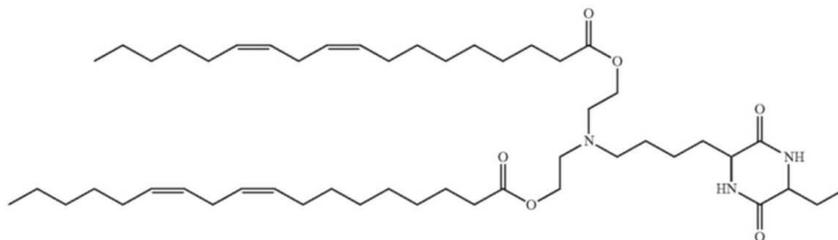
및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0205] 본 발명의 조성물 및 방법에서 사용하기 적합한 기타 양이온성 지질은 본원에 참조로서 포함되는, 국제 특허 공개 WO 2016/004202호에 기재된 양이온성 지질을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 양이온성 지질:



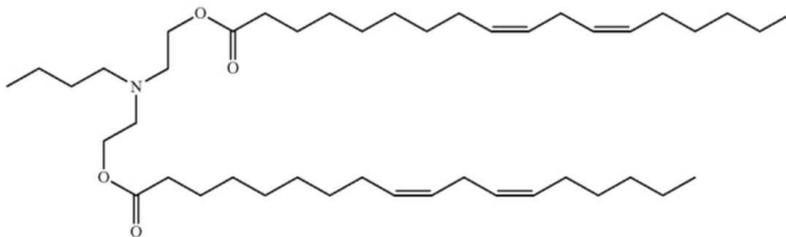
[0206]

[0207] 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 양이온성 지질:



[0208]

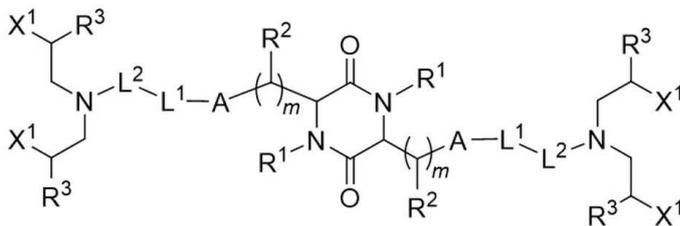
[0209] 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 양이온성 지질:



[0210]

[0211] 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 제공한다.

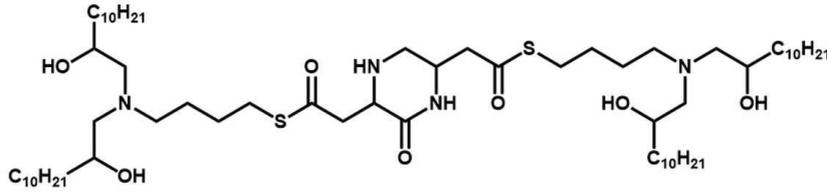
[0212] 본 발명의 조성물 및 방법에 사용하기 적합한 기타 양이온성 지질은 본원에 참조로서 통합되는, 미국 특허 가출원 제62/758,179호에 기재된 양이온성 지질을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 다음 식의 양이온성 지질:



[0213]

[0214] 식 중 각각의 R^1 및 R^2 는 독립적으로 H 또는 C_1-C_6 지방족이고; 각각의 m 은 독립적으로 1 내지 4의 값을 갖는 정수이고; 각각의 A는 독립적으로 공유 결합 또는 아릴렌이고; 각각의 L^1 은 독립적으로 에스테르 기, 티오에스테르 기, 이황화 기 또는 무수물 기이고; 각각의 L^2 는 독립적으로 C_2-C_{10} 지방족이고; 각각의 X^1 은 독립적으로 H 또는 OH이며; 각각의 R^3 은 독립적으로 C_6-C_{20} 이다. 일부 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 다음 화학식의 양이

온성 지질 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다:



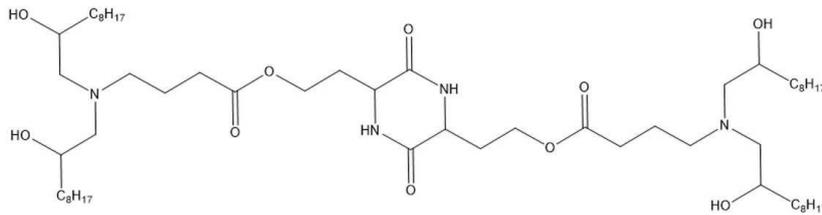
[0215]

[0216]

(화합물 1)

[0217]

또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 다음 화학식의 양이온성 지질 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다:



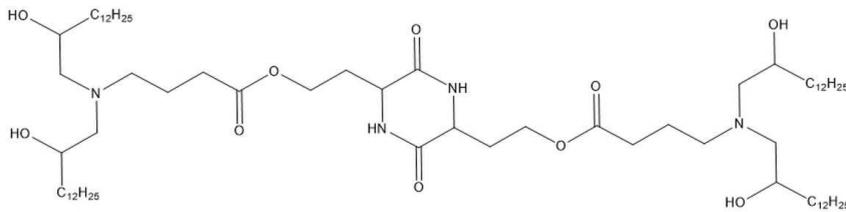
[0218]

[0219]

(화합물 2)

[0220]

또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 다음 화학식의 양이온성 지질 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다:



[0221]

[0222]

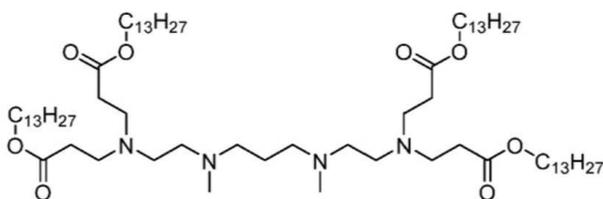
(화합물 3)

[0223]

또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 제공한다.

[0224]

본 발명의 조성물 및 방법에서 사용하기 적합한 기타 양이온성 지질은 본원에 참조로서 통합된 J. McClellan, M. C. King의 문헌[Cell 2010, 141, 210-217] 및 Whitehead 등의 문헌[Nature Communications (2014) 5:427 7]에 기술된 것과 같은 양이온성 지질을 포함한다. 소정의 구현예에서, 본 발명의 양이온성 지질은 다음의 화합물 구조를 갖는 양이온성 지질 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다:

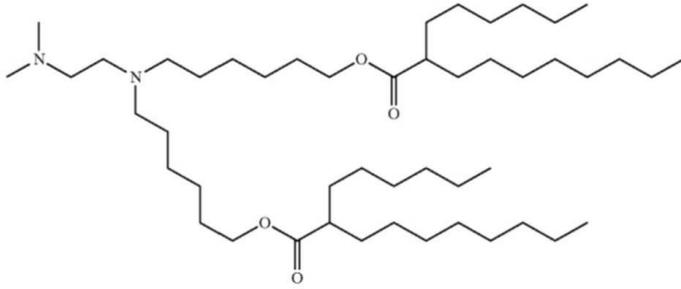


[0225]

[0226]

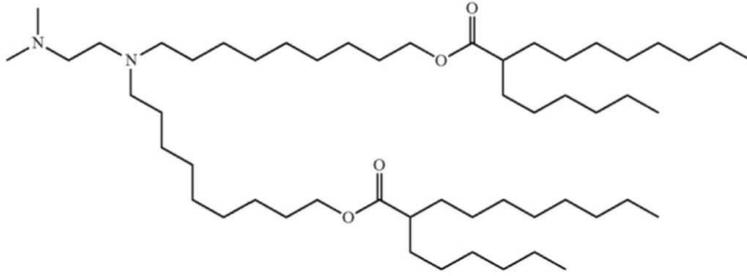
[0227]

본 발명의 조성물 및 방법에서 사용하기 적합한 기타 양이온성 지질은 본원에 참조로서 포함되는, 국제 특허 공개 WO 2015/199952호에 기재된 양이온성 지질을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 양이온성 지질:



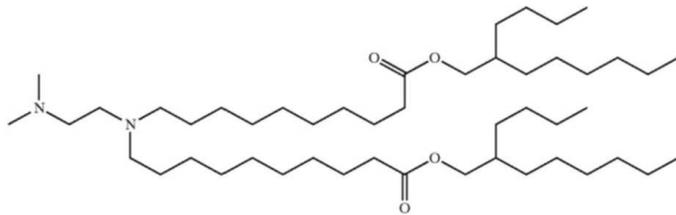
[0228]

[0229] 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 양이온성 지질:



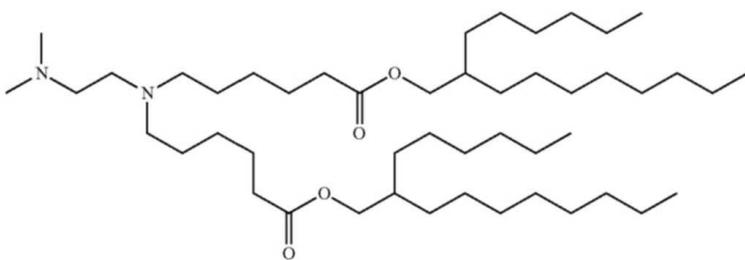
[0230]

[0231] 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 양이온성 지질:



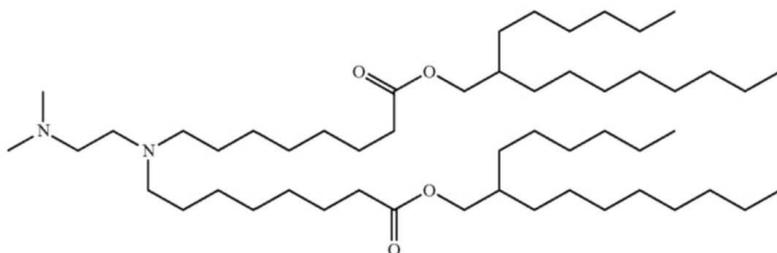
[0232]

[0233] 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 양이온성 지질:



[0234]

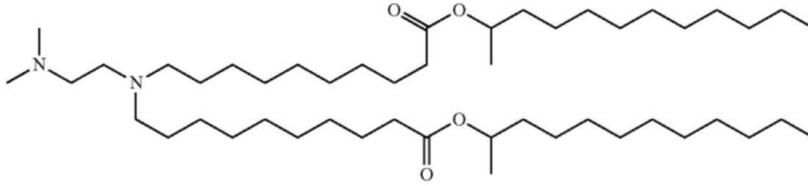
[0235] 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 양이온성 지질:



[0236]

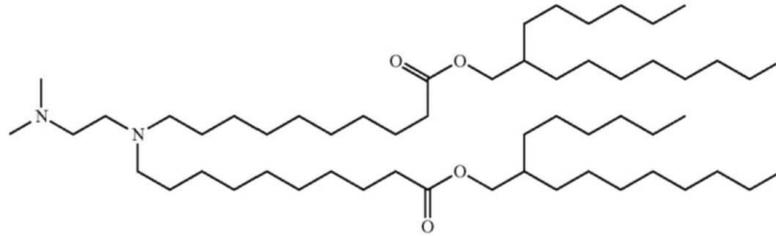
[0237] 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 다음의 화합물

구조를 갖는 양이온성 지질:



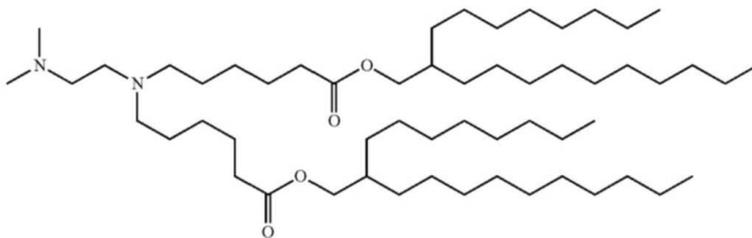
[0238]

[0239] 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 양이온성 지질:



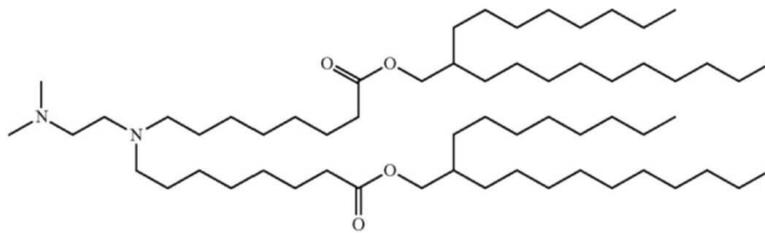
[0240]

[0241] 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 양이온성 지질:



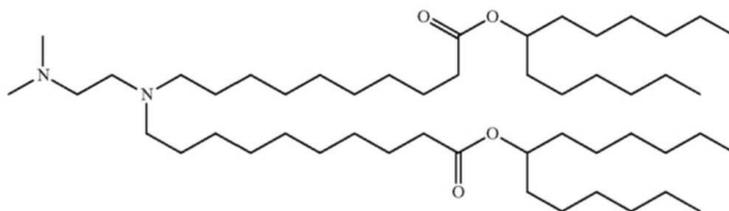
[0242]

[0243] 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 양이온성 지질:



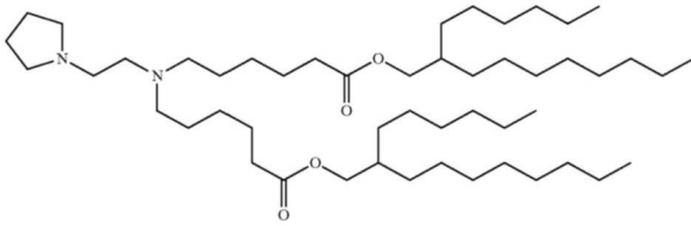
[0244]

[0245] 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 양이온성 지질:



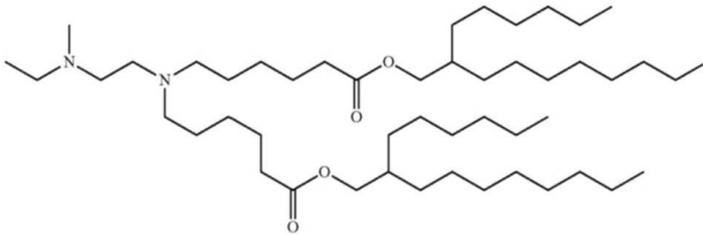
[0246]

[0247] 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 양이온성 지질:



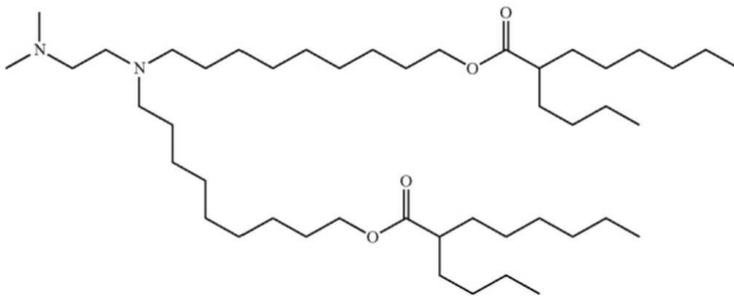
[0248]

[0249] 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 양이온성 지질:



[0250]

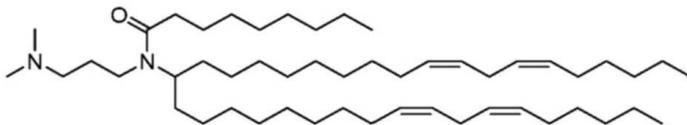
[0251] 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 양이온성 지질:



[0252]

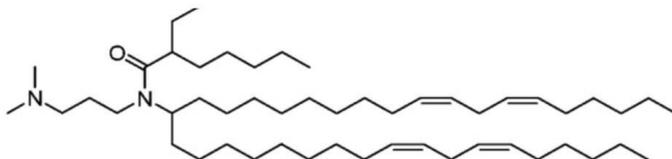
[0253] 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0254] 본 발명의 조성물 및 방법에서 사용하기 적합한 기타 양이온성 지질은 본원에 참조로서 포함되는, 국제 특허 공개 WO 2017/004143호에 기재된 양이온성 지질을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 양이온성 지질:



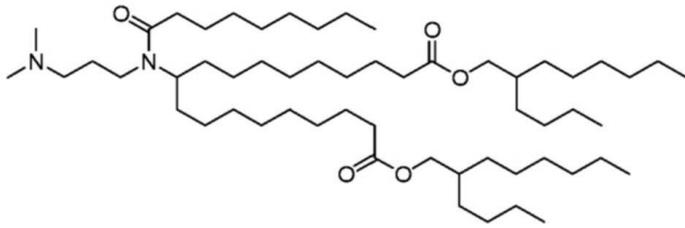
[0255]

[0256] 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 양이온성 지질:



[0257]

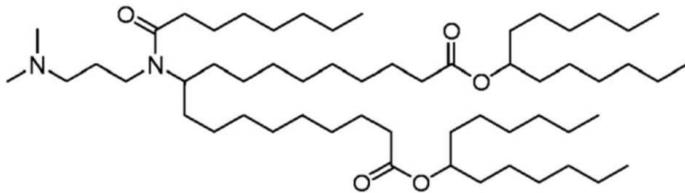
[0258] 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 양이온성 지질:



[0259]

[0260]

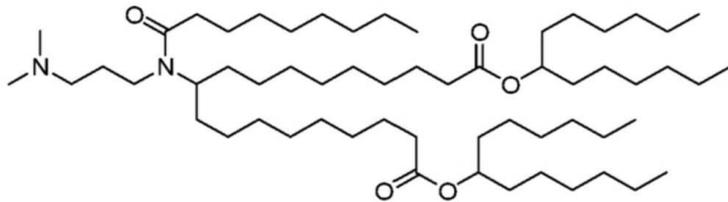
및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 양이온성 지질:



[0261]

[0262]

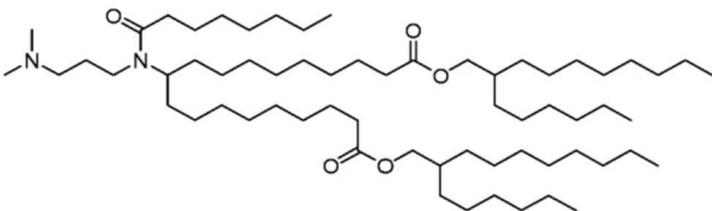
및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 양이온성 지질:



[0263]

[0264]

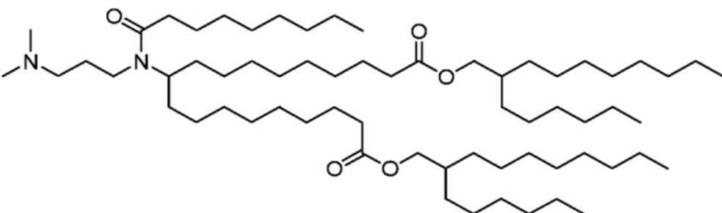
및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 양이온성 지질:



[0265]

[0266]

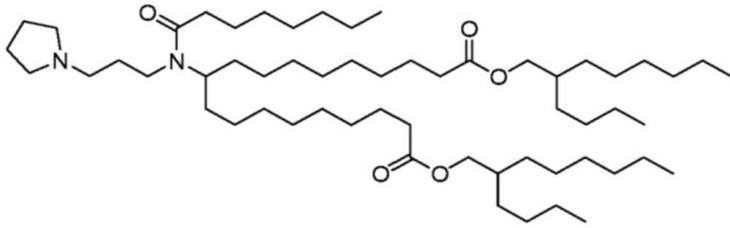
및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 양이온성 지질:



[0267]

[0268]

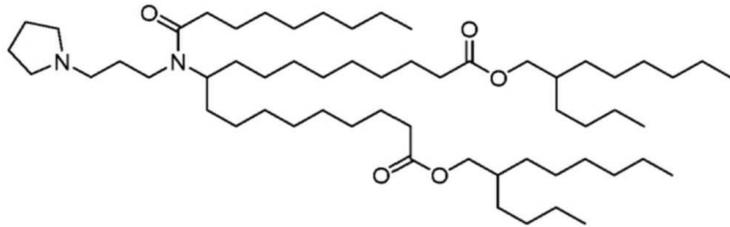
및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 양이온성 지질:



[0269]

[0270]

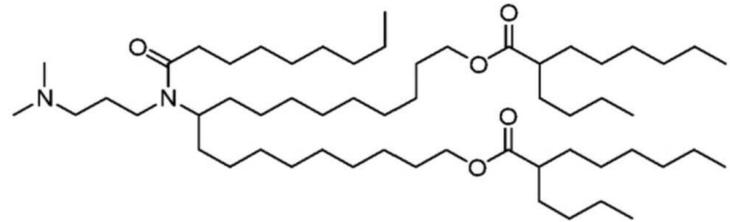
및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 양이온성 지질:



[0271]

[0272]

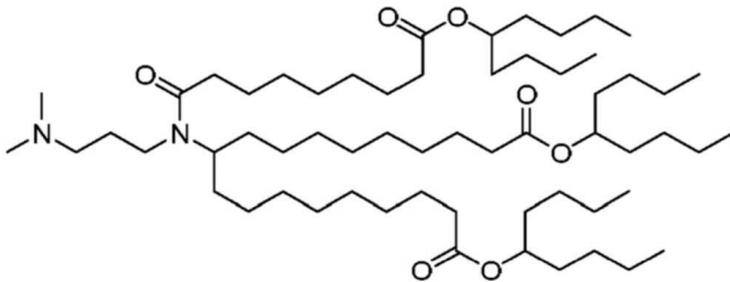
및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 양이온성 지질:



[0273]

[0274]

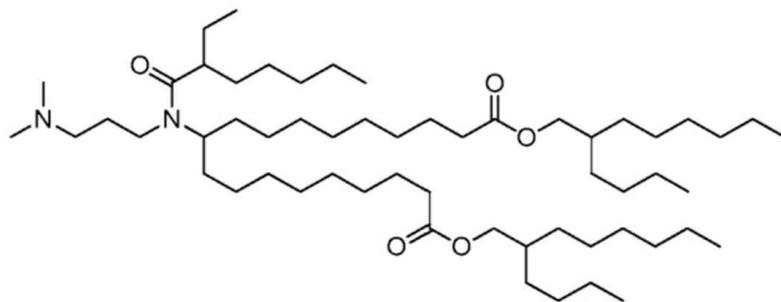
및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 양이온성 지질:



[0275]

[0276]

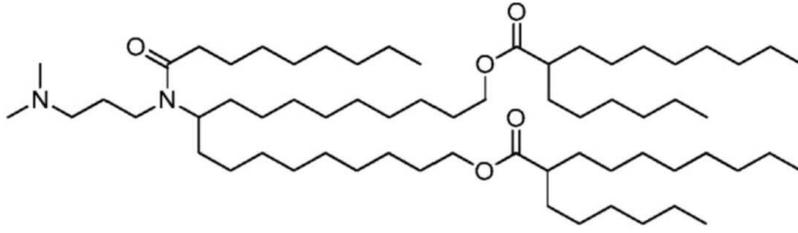
및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 양이온성 지질:



[0277]

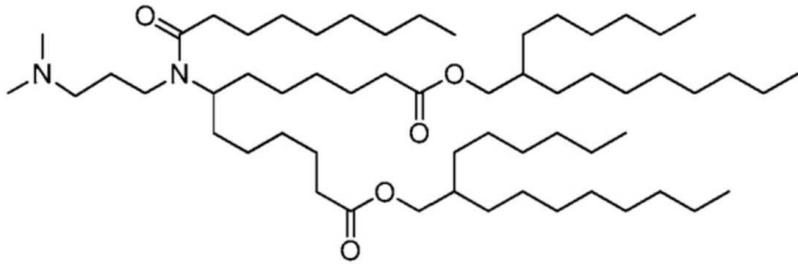
[0278]

및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 양이온성 지질:



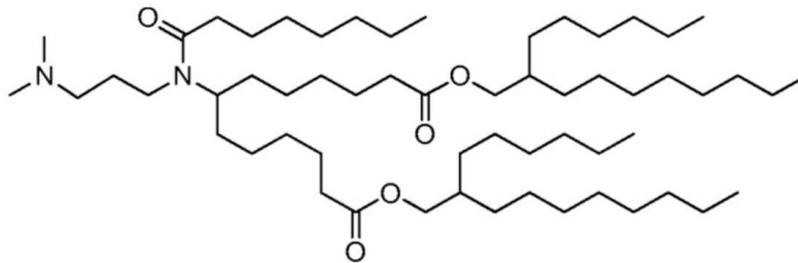
[0279]

[0280] 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 양이온성 지질:



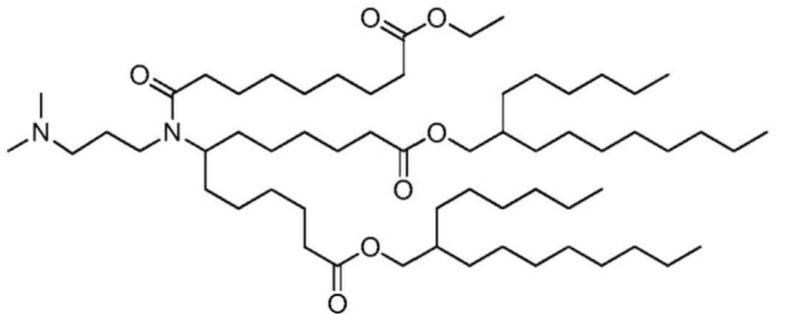
[0281]

[0282] 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 양이온성 지질:



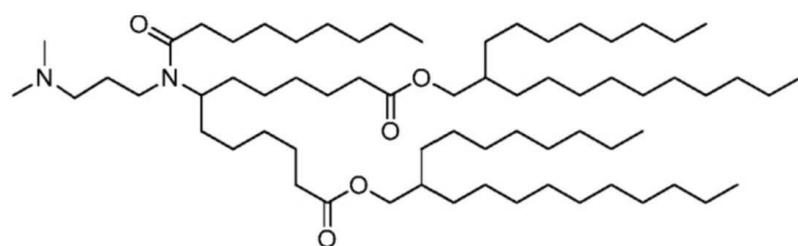
[0283]

[0284] 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 양이온성 지질:



[0285]

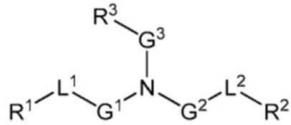
[0286] 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 양이온성 지질:



[0287]

[0288] 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

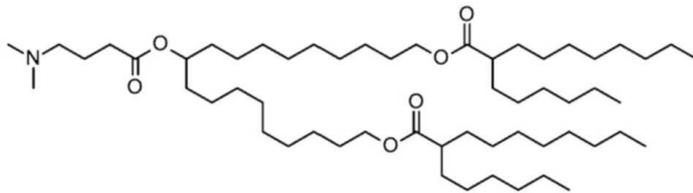
[0289] 본 발명의 조성물 및 방법에서 사용하기 적합한 기타 양이온성 지질은 본원에 참조로서 포함되는, 국제 특허 공개 WO 2017/075531호에 기재된 양이온성 지질을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 다음의 양이온성 지질:



[0290]

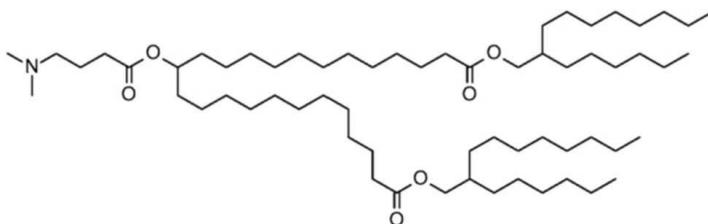
[0291] 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하며, 식 중, L^1 또는 L^2 중 하나는 $-O(C=O)-$, $-(C=O)O-$, $-C(=O)-$, $-O-$, $-S(O)_x$, $-S-S-$, $-C(=O)S-$, $-SC(=O)-$, $-NR^aC(=O)-$, $-C(=O)NR^a-$, $NR^aC(=O)NR^a-$, $-OC(=O)NR^a-$, 또는 $-NR^aC(=O)O-$ 이고, L^1 또는 L^2 중 다른 하나는 $-O(C=O)-$, $-(C=O)O-$, $-C(=O)-$, $-O-$, $-S(O)_x$, $-S-S-$, $-C(=O)S-$, $SC(=O)-$, $-NR^aC(=O)-$, $-C(=O)NR^a-$, $-NR^aC(=O)NR^a-$, $-OC(=O)NR^a-$ 또는 $-NR^aC(=O)O-$ 이거나 직접 결합이고, G^1 및 G^2 는 각각 독립적으로 치환되지 않은 C_1-C_{12} 알킬렌 또는 C_1-C_{12} 알케닐렌이고, G^3 는 C_1-C_{24} 알킬렌, C_1-C_{24} 알케닐렌, C_3-C_8 시클로알킬렌, C_3-C_8 시클로알케닐렌이고, R^a 는 H 또는 C_1-C_{12} 알킬이고, R^1 및 R^2 는 각각 독립적으로 C_6-C_{24} 알킬 또는 C_6-C_{24} 알케닐이고, R^3 은 H, OR^5 , CN, $-C(=O)OR^4$, $-OC(=O)R^4$ 또는 $-NR^5C(=O)R^4$ 이고, R^4 는 C_1-C_{12} 알킬이고, R^5 는 H 또는 C_1-C_6 알킬이고, x는 0, 1 또는 2이다.

[0292] 본 발명의 조성물 및 방법에서 사용하기 적합한 기타 양이온성 지질은 본원에 참조로서 포함되는, 국제 특허 공개 WO 2017/117528호에 기재된 양이온성 지질을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 양이온성 지질:



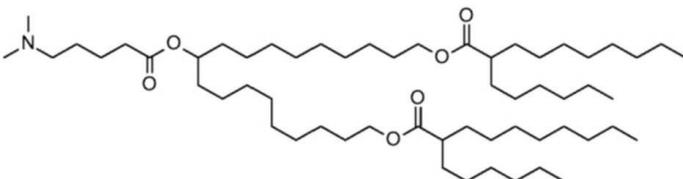
[0293]

[0294] 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 양이온성 지질:



[0295]

[0296] 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 양이온성 지질:

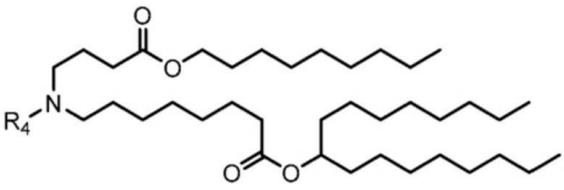
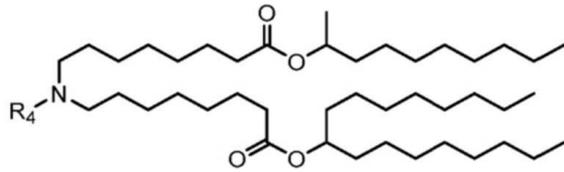
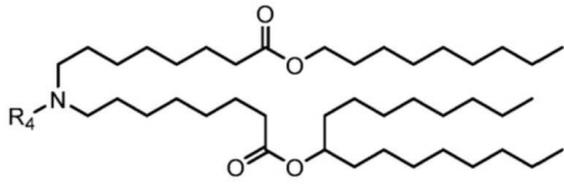


[0297]

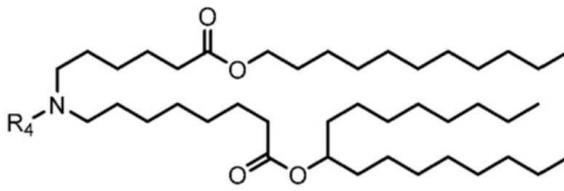
[0298] 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0299] 본 발명의 조성물 및 방법에서 사용하기 적합한 기타 양이온성 지질은 본원에 참조로서 포함되는, 국제 특허 공

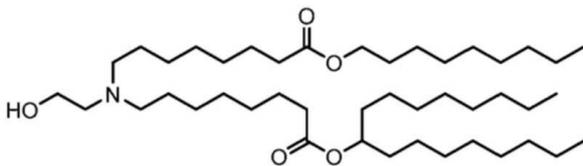
개 WO 2017/049245호에 기재된 양이온성 지질을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법의 양이온성 지질은 다음의 식 중 하나의 화합물:



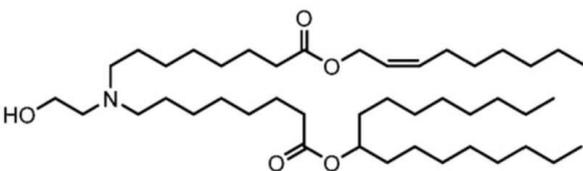
[0303] , 및



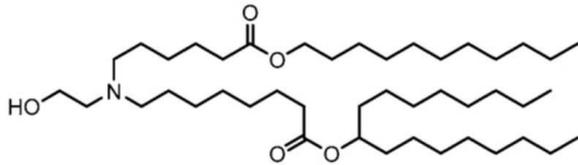
[0305] 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다. 이들 네 개의 화학식 중 어느 하나에 있어서, R₄는 -(CH₂)_nQ 및 -(CH₂)_nCHQR에서 독립적으로 선택되고, Q는 -OR, -OH, -O(CH₂)_nN(R)₂, -OC(O)R, -CX₃, -CN, -N(R)C(O)R, -N(H)C(O)R, -N(R)S(O)₂R, -N(H)S(O)₂R, -N(R)C(O)N(R)₂, -N(H)C(O)N(R)₂, -N(H)C(O)N(H)(R), -N(R)C(S)N(R)₂, -N(H)C(S)N(R)₂, -N(H)C(S)N(H)(R) 및 헤테로고리로 이루어진 군에서 선택되며, n은 1, 2, 또는 3이다. 소정의 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 양이온성 지질:



[0307] 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다. 소정의 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 양이온성 지질:

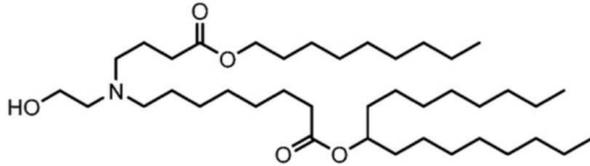


[0309] 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다. 소정의 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 양이온성 지질:



[0310]

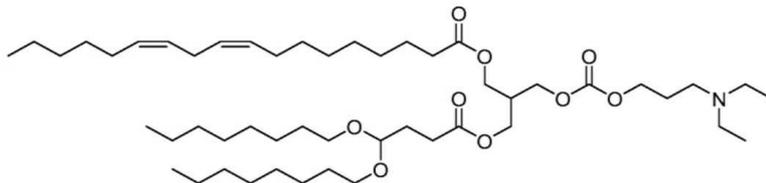
[0311] 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다. 소정의 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 양이온성 지질:



[0312]

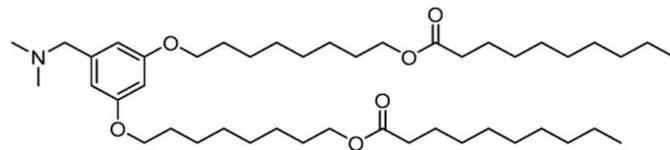
[0313] 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0314] 본 발명의 조성물 및 방법에서 사용하기 적합한 기타 양이온성 지질은 둘 다 본원에 참조로서 포함되는, 국제 특허 공개 WO 2017/173054호 및 WO 2015/095340호에 기술된 양이온성 지질을 포함한다. 소정의 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 양이온성 지질:



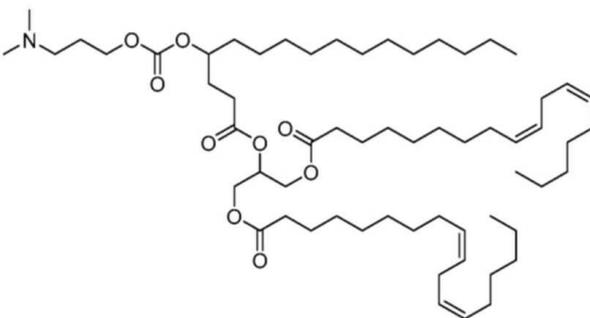
[0315]

[0316] 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다. 소정의 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 양이온성 지질:



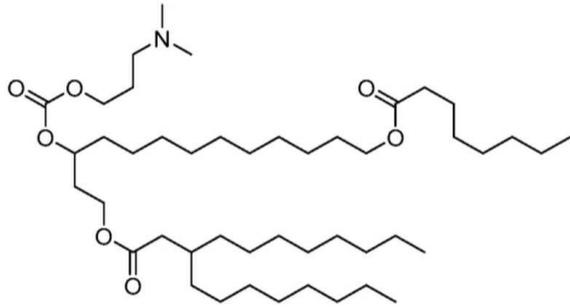
[0317]

[0318] 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다. 소정의 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 양이온성 지질:



[0319]

[0320] 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다. 소정의 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 양이온성 지질:



[0321]

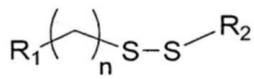
[0322]

및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0323]

본 발명의 조성물 및 방법에 사용하기 적합한 기타 양이온성 지질은 본원에 참조로서 포함되는, 국제 특허 공개 WO 2012/170889호에 기재된 절단 가능한 양이온성 지질을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 다음 식의 양이온성 지질을 포함하며:

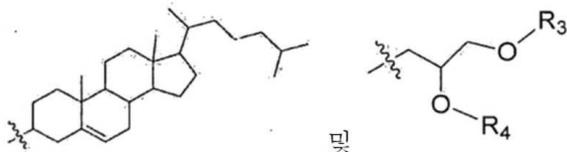
[0324]



[0325]

식 중, R₁은 이미다졸, 구아니디늄, 아미노, 이민, 엔아민, 선택적으로 치환된 알킬 아미노(예: 디메틸아미노와 같은 알킬 아미노) 및 피리딜로 이루어진 군으로부터 선택되고, R₂는 다음의 두 화학식 중 하나로 이루어진 군으로부터 선택되며:

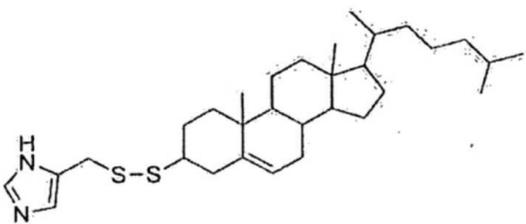
[0326]



[0327]

식 중, R₃ 및 R₄는 선택적으로 치환된 가변 포화 또는 불포화 C₆-C₂₀ 알킬, 및 선택적으로 치환된 가변 포화 또는 불포화 C₆-C₂₀ 아실로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택되고; n은 0 또는 임의의 양의 정수(예: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 또는 그 이상)이다. 소정의 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 양이온성 지질 “HGT4001”:

[0328]



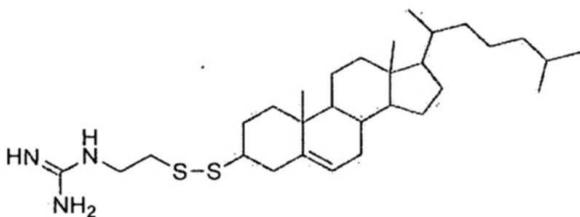
[0329]

(HGT4001)

[0330]

및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다. 소정의 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 다음 화합물 구조를 갖는 양이온성 지질 “HGT4002” (본원에서 “Guan-SS-Chol” 로도 지칭됨):

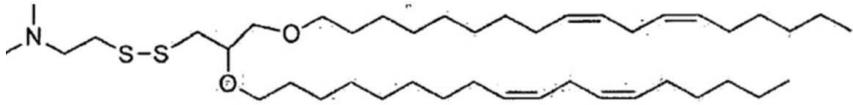
[0331]



[0332]

(HGT4002)

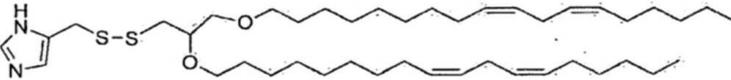
[0333] 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다. 소정의 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 양이온성 지질, 즉 다음의 화합물 구조를 갖는 양이온성 지질, “HGT4003” :



[0334]

[0335] (HGT4003)

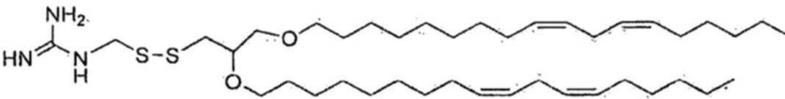
[0336] 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다. 소정의 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 양이온성 지질, “HGT4004” :



[0337]

[0338] (HGT4004)

[0339] 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다. 소정의 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 양이온성 지질, 즉 다음의 화합물 구조를 갖는 양이온성 지질, “HGT4005” :

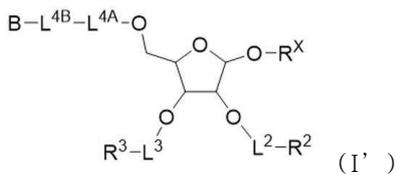


[0340]

[0341] (HGT4005)

[0342] 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0343] 본 발명의 조성물 및 방법에 사용하기 적합한 다른 양이온성 지질은 2018년 5월 16일에 출원된 미국 특허 가출원 제62/672,194호에 기술된 것과 같은 절단성 양이온성 지질을 포함하며, 동 문헌은 참조로서 본원에 통합된다. 소정의 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 미국 특허 가출원 제62/672,194호에 기술된 일반 식 중 어느 하나 또는 구조 (1a)~(21a) 및 (1b)~(21b) 및 (22)~(237) 중 어느 하나인 양이온성 지질을 포함한다. 소정의 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 식 (I')에 따른 구조를 갖는 양이온성 지질 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하며:



[0344]

[0345] 식 중,

[0346] R^{X} 는 독립적으로 -H, $-\text{L}^1\text{-R}^1$, 또는 $-\text{L}^{5\text{A}}\text{-L}^{5\text{B}}\text{-B}'$ 이고;

[0347] 각각의 L^1 , L^2 , 및 L^3 은 독립적으로 공유 결합, $-\text{C}(\text{O})-$, $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$, $-\text{C}(\text{O})\text{S}-$, 또는 $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^{\text{L}}-$ 이고;

[0348] 각각의 $\text{L}^{4\text{A}}$ 및 $\text{L}^{5\text{A}}$ 는 독립적으로 $-\text{C}(\text{O})-$, $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$, 또는 $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^{\text{L}}-$ 이고;

[0349] 각각의 $\text{L}^{4\text{B}}$ 및 $\text{L}^{5\text{B}}$ 는 독립적으로 $\text{C}_1\text{-C}_{20}$ 알킬렌, $\text{C}_2\text{-C}_{20}$ 알케닐렌, 또는 $\text{C}_2\text{-C}_{20}$ 알키닐렌이고;

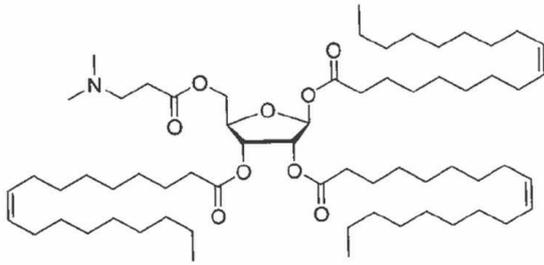
[0350] 각각의 B 및 B' 은 NR^4R^5 또는 5-원 내지 10-원 질소 함유 헤테로아릴이고;

[0351] 각각의 R^1 , R^2 , 및 R^3 은 독립적으로 $\text{C}_6\text{-C}_{30}$ 알킬, $\text{C}_6\text{-C}_{30}$ 알케닐, 또는 $\text{C}_6\text{-C}_{30}$ 알키닐이고;

[0352] 각각의 R^4 , 및 R^5 는 독립적으로 $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ 알킬, $\text{C}_2\text{-C}_{10}$ 알케닐, 또는 $\text{C}_2\text{-C}_{10}$ 알키닐이며;

[0353] 각각의 R¹은 독립적으로 수소, C₁-C₂₀ 알킬, C₂-C₂₀ 알케닐, 또는 C₂-C₂₀ 알키닐이다.

[0354] 소정의 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 양이온성 지질, 즉 62/672,194의 화합물 (139)를 포함한다:

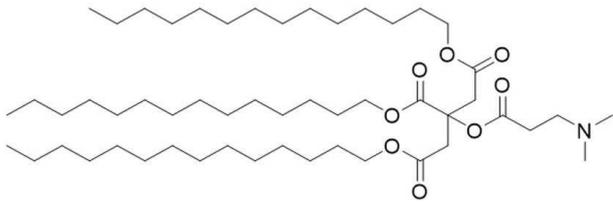


[0355] (“18:1 탄소 꼬리-리보스 지질”).

[0357] 일부 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 양이온성 지질, 즉 N-[1-(2,3-디올레일옥시)프로필]-N,N,N-트리메틸암모늄 클로라이드(“DOTMA”)를 포함한다. (본원에 참조로서 통합된 Feigner 등의 문헌[Proc. Nat’ l Acad. Sci. 84, 7413 (1987)]; 미국 특허 제4,897,355호 참조). 본 발명의 조성물 및 방법에 적합한 기타 양이온성 지질은 예를 들어, 5-카복시스페르밀글리신디옥타데실아미드(“DOGS”); 2,3-디올레일옥시-N-[2(스페르민-카복사아미도에틸)-N,N-디메틸-1-프로판아미늄(“DOSPA”)](Behr 등의 문헌[Proc. Nat.’ l Acad. Sci. 86, 6982 (1989)]; 미국 특허 제5,171,678호; 미국 특허 제5,334,761호); 1,2-디올레오일-3-디메틸암모늄-프로판(“DODAP”); 1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄-프로판(“DOTAP”)을 포함한다.

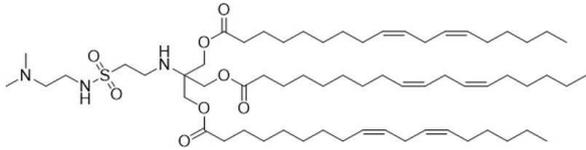
[0358] 본 발명의 조성물 및 방법에 적합한 추가의 예시적인 양이온성 지질은 다음을 또한 포함한다: 1,2-디스테아릴옥시-N,N-디메틸-3-아미노프로판(“DSDMA”); 1,2-디올레일옥시-N,N-디메틸-3-아미노프로판(“DODMA”); 1,2-디리놀레일옥시-N,N-디메틸-3-아미노프로판(“DLinDMA”); 1,2-디리놀레일옥시-N,N-디메틸-3-아미노프로판(“DLinDMA”); N-디올레일-N,N-디메틸암모늄 클로라이드(“DODAC”); N,N-디스테아릴-N,N-디메틸암모늄 브로마이드(“DDAB”); N-(1,2-디미리스틸옥시프로프-3-일)-N,N-디메틸-N-하이드록시에틸 암모늄 브로마이드(“DMRIE”); 3-디메틸아미노-2-(콜레스트-5-엔-3-베타-옥시부탄-4-옥시)-1-(시스,시스-9,12-옥타데카다이엔옥시)프로판(“CLinDMA”); 2-[5'-(콜레스트-5-엔-3-베타-옥시)-3'-옥사펜톡시]-3-디메틸 1-1-(시스,시스-9', 1-2'-옥타데칸다이엔옥시)프로판(“CpLinDMA”); N,N-디메틸-3,4-디올레일옥시벤질아민(“DMOBA”); 1,2-N,N'-디올레일카바미드-3-디메틸아미노프로판(“DOcarbDAP”); 2,3-디리놀레오일옥시-N,N-디메틸프로필아민(“DLinDAP”); 1,2-N,N'-디리놀레일카바미드-3-디메틸아미노프로판(“DLincarbDAP”); 1,2-디리놀레오일카바미드-3-디메틸아미노프로판(“DLinCDAP”); 2,2-디리놀레일-4-디메틸아미노메틸-[1,3]-디옥솔란(“DLin-K-DMA”); 2-((8-[(3P)-콜레스트-5-엔-3-일옥시]옥틸)옥시)-N,N-디메틸1-3-[(9Z, 12Z)-옥타데카-9,12-다이엔-1-일옥시]프로판-1-아민(“옥틸-CLinDMA”); (2R)-2-((8-[(3베타)-콜레스트-5-엔-3-일옥시]옥틸)옥시)-N, N-디메틸1-3-[(9Z, 12Z)-옥타데카-9,12-디엔-1-일옥시]프로판-1-아민(“옥틸-CLinDMA (2R)”); (2S)-2-((8-[(3P)-콜레스트-5-엔-3-일옥시]옥틸)옥시)-N, fsl-dimethy3-[(9Z, 12Z)-옥타데카-9, 12-디엔-1-일옥시]프로판-1-아민(“Octyl-CLinDMA (2S)”); 2,2-디리놀레일-4-디메틸아미노에틸-[1,3]-디옥솔란(“DLin-K-XTC2-DMA”); 및 2-(2,2-디((9Z,12Z)-옥타데카-9,1 2-디엔-1-일)-1,3-디옥솔란-4-일)-N,N-디메틸에탄아민(“DLin-KC2-DMA”)(본원에 참조로서 포함되는 WO 2010/042877; Semple 등의 문헌[Nature Biotech. 28: 172-176 (2010)] 참조). (Heyes, J. 등의 문헌[J Controlled Release 107: 276-287 (2005)]; Morrissey, DV. 등의 문헌[Nat. Biotechnol. 23(8): 1003-1007 (2005)]; 국제 특허 공개 WO 2005/121348). 일부 구현예에서, 양이온성 지질 중 하나 이상은 이미다졸, 디알킬아미노, 또는 구아니디늄 모이어티 중 적어도 하나를 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법에 적합한 하나 이상의 양이온성 지질은 2,2-디리놀레일-4-디메틸아미노에틸-[1,3]-디옥솔란(“XTC”); (3aR,5s,6aS)-N,N-디메틸-2,2-디((9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디에틸)테트라하이드로-3aH-시클로펜타[d] [1,3]디옥솔-5-아민(“ALNY-100”) 및/또는 4,7,13-트리스(3-옥소-3-(운데실아미노)프로필)-N1,N16-디운데실-4,7,10,13-테트라아자헥사데칸-1,16-디아미드(“NC98-5”)를 포함한다.

[0359] 일부 구현예에서, 본 발명의 약학적 조성물 및 방법에 적합한 하나 이상의 양이온성 지질은 다음의 화합물 구조를 갖는 양이온성 지질, 즉 TL1-04D-DMA를 포함한다:



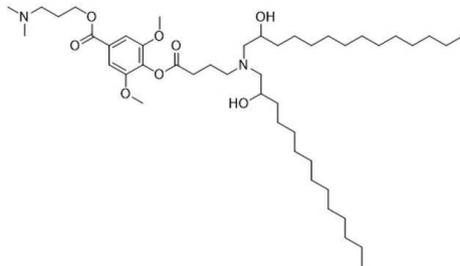
[0360] (“TL1-04D-DMA”).

[0361] 일부 구현예에서, 본 발명의 약학적 조성물 및 방법에 적합한 하나 이상의 양이온성 지질은 다음의 화합물 구조를 갖는 양이온성 지질, 즉 GL-TES-SA-DME-E18-2를 포함한다:



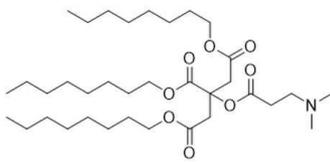
[0362] (“GL-TES-SA-DME-E18-2”).

[0363] 일부 구현예에서, 본 발명의 약학적 조성물 및 방법에 적합한 하나 이상의 양이온성 지질은 다음의 화합물 구조를 갖는 양이온성 지질, 즉 SY-3-E14-DMAPr을 포함한다:



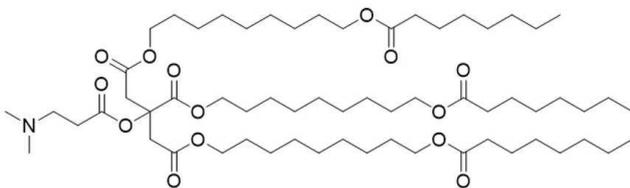
[0364] (“SY-3-E14-DMAPr”).

[0365] 일부 구현예에서, 본 발명의 약학적 조성물 및 방법에 적합한 하나 이상의 양이온성 지질은 다음의 화합물 구조를 갖는 양이온성 지질, 즉 TL1-01D-DMA를 포함한다:



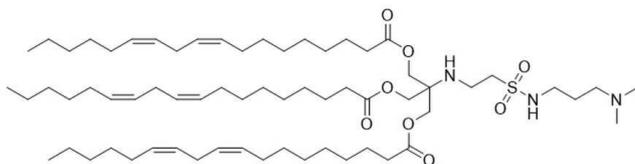
[0366] (“TL1-01D-DMA”).

[0367] 일부 구현예에서, 본 발명의 약학적 조성물 및 방법에 적합한 하나 이상의 양이온성 지질은 다음의 화합물 구조를 갖는 양이온성 지질, 즉 TL1-10D-DMA를 포함한다:



[0368] (“TL1-10D-DMA”).

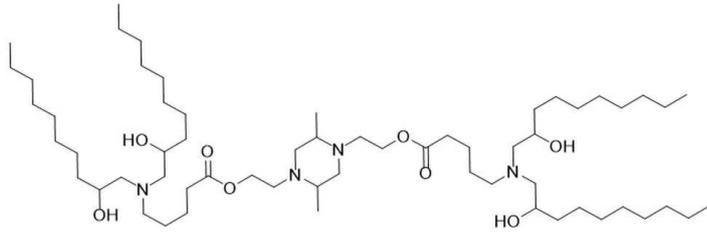
[0369] 일부 구현예에서, 본 발명의 약학적 조성물 및 방법에 적합한 하나 이상의 양이온성 지질은 다음의 화합물 구조를 갖는 양이온성 지질, 즉 GL-TES-SA-DMP-E18-2를 포함한다:



[0370] (“GL-TES-SA-DMP-E18-2”).

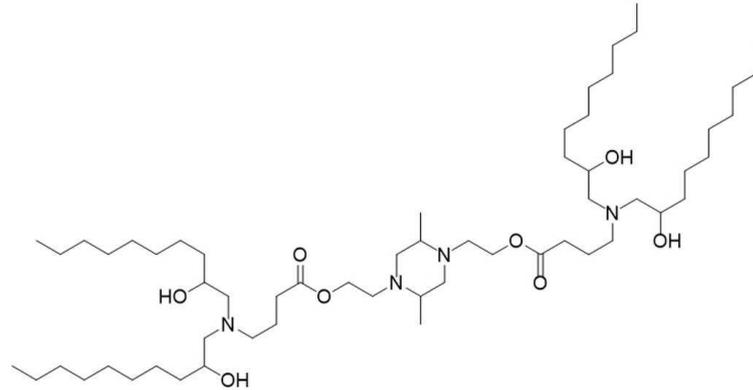
[0372] 일부 구현예에서, 본 발명의 약학적 조성물 및 방법에 적합한 하나 이상의 양이온성 지질은 다음의 화합물 구조

를 갖는 양이온성 지질, 즉 HEP-E4-E10을 포함한다:



("HEP-E4-E10").

일부 구현예에서, 본 발명의 약학적 조성물 및 방법에 적합한 하나 이상의 양이온성 지질은 다음의 화합물 구조를 갖는 양이온성 지질, 즉 HEP-E3-E10을 포함한다:



("HEP-E3-E10").

일부 구현예에서, 본 발명의 조성물은, 조성물 중 총 지질 함량, 예컨대 지질 나노입자의 적어도 약 5 중량%, 10 중량%, 20 중량%, 30 중량%, 35 중량%, 40 중량%, 45 중량%, 50 중량%, 55 중량%, 60 중량%, 65 중량%, 또는 70 중량%를 구성하는 하나 이상의 양이온성 지질을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 조성물은 조성물(예: 지질 나노입자) 중 총 지질 함량의 적어도 약 5 mol%, 10 mol%, 20 mol%, 30 mol%, 35 mol%, 40 mol%, 45 mol%, 50 mol%, 55 mol%, 60 mol%, 65 mol%, 또는 70 mol%를 구성하는 하나 이상의 양이온성 지질을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 조성물은 조성물(예: 지질 나노입자) 중 총 지질 함량의 약 30~70 중량%(예: 약 30~65 중량%, 약 30~60 중량%, 약 30~55 중량%, 약 30~50 중량%, 약 30~45 중량%, 약 30~40 중량%, 약 35~50 중량%, 약 35~45 중량%, 또는 약 35~40 중량%)를 구성하는 하나 이상의 양이온성 지질을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 조성물은 조성물(예: 지질 나노입자) 중 총 지질 함량의 약 30~70 mol%(예: 약 30~65 mol%, 약 30~60 mol%, 약 30~55 mol%, 약 30~50 mol%, 약 30~45 mol%, 약 30~40 mol%, 약 35~50 mol%, 약 35~45 mol%, 또는 약 35~40 mol%)를 구성하는 하나 이상의 양이온성 지질을 포함한다.

비-양이온성 지질/헬퍼 지질

일부 구현예에서, 제공된 리포솜은 하나이상의 비-양이온("보조") 지질을 함유한다. 본원에서 사용되는 용어 "비양이온성 지질" 은 임의의 중성, 쌍성(zwitterionic) 또는 음이온성 지질을 말한다. 본원에서 사용되는 바, 용어 "음이온성 지질" 은 생리적인 pH와 같은 선택된 pH에서 순 음전하(net negative charge)를 띠는 임의의 많은 지질 종을 말한다. 비양이온성 지질은 디스테아로일포스파티딜콜린(distearoylphosphatidylcholine, DSPC), 디올레오일포스파티딜콜린(dioleoylphosphatidylcholine, DOPC), 디팔미토일포스파티딜콜린(dipalmitoylphosphatidylcholine, DPPC), 디올레오일포스파티딜글리세롤(dioleoylphosphatidylglycerol, DOPG), 디팔미토일포스파티딜글리세롤(dipalmitoylphosphatidylglycerol, DPPG), 디올레오일포스파티딜에탄올아민(dioleoylphosphatidylethanolamine, DOPE), 팔미토일올레오일포스파티딜콜린(palmitoyl-oleoylphosphatidylcholine, POPC), 팔미토일올레오일-포스파티딜에탄올아민(palmitoyl-oleoyl-phosphatidylethanolamine, POPE), 디올레오일-포스파티딜에탄올아민 4-(N-말레이미도메틸)-시클로헥산-1-카복실레이트(dioleoyl-phosphatidylethanolamine 4-(N-maleimidomethyl)-cyclohexane-1-carboxylate, DOPE-mal), 디팔미토일 포스파티딜 에탄올아민(dipalmitoyl phosphatidyl ethanolamine, DPPE), 디미리스토일포스포에탄올아민(dimyristoylphosphoethanolamine, DMPE), 디스테아로일-포스파티딜-에탄올아민(distearoyl-phosphatidyl-ethanolamine, DSPE), 포스파티딜세린(phosphatidylserine), 스펅고지질(sphingolipid), 세레브로시드

(cerebroside), 강글리오시드(ganglioside), 16-O-모노메틸 PE(16-O-monomethyl PE), 16-O-디메틸 PE(16-O-dimethyl PE), 18-1-트랜스 PE(18-1-trans PE), 1-스테아로일-2-올레오일-포스파티딜에탄올아민(1-stearoyl-2-oleoyl-phosphatidylethanolamine, SOPE), 또는 이들의 혼합물을 포함하지만 이들로 한정되지는 않는다.

[0380] 일부 구현예에서, 이와 같은 비양이온성 지질은 단독으로 사용될 수 있지만, 바람직하게는 기타 지질 예를 들어, 양이온성 지질과 조합하여 사용된다. 일부 구현예에서, 비-양이온성 지질은 리포솜에 존재하는 총 지질의 약 5% 내지 약 90%, 또는 약 10% 내지 약 70%의 물비를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 비양이온성 지질은 중성 지질, 즉 본 조성물이 제형화되고/되거나 투여되는 조건하에서 순전하(net charge)를 띠지 않는 지질이다. 일부 구현예에서, 리포솜 내 비-양이온성 지질의 백분율은 5% 초과, 10% 초과, 20% 초과, 30% 초과 또는 40% 초과일 수 있다.

[0381] 콜레스테롤계 지질

[0382] 일부 구현예에서, 제공된 리포솜은 하나 이상의 콜레스테롤-기반 지질을 포함한다. 예를 들어, 적합한 콜레스테롤-기반 양이온 지질은 예컨대, DC-Choi(N,N-디메틸-N-에틸카복사미도콜레스테롤), 1,4-비스(3-N-올레일아미노-프로필)피페라진(Gao, et al. Biochem. Biophys. Res. Comm. 179, 280 (1991); Wolf et al. BioTechniques 23, 139 (1997); U.S. Pat. No. 5,744,335) 또는 ICE를 포함한다. 일부 구현예에서, 콜레스테롤계 지질은 리포솜에 존재하는 총 지질의 약 2% 내지 약 30%, 또는 약 5% 내지 약 20%의 물비를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 지질 나노입자 중 콜레스테롤계 지질의 백분율은 5% 초과, 10% 초과, 20% 초과, 30% 초과 또는 40% 초과일 수 있다.

[0383] PEG-변형 지질

[0384] 폴리에틸렌 글리콜(PEG)-변형 인지질, 및 N-옥타노일-스핑고신-1-[숙시닐(메톡시 폴리에틸렌 글리콜)-2000](C8 PEG-2000 세라미드)를 포함하는 유도된 세라미드(PEG-CER)와 같은 유도된 지질을 단독으로 사용하거나 바람직하게는 수송 비히클(예컨대, 지질 나노입자)을 포함하는 기타 지질 제형과 함께 조합하여 사용하는 것도 본 발명에서 고려된다. 고려된 PEG-변형 지질은 이에 제한되지 않지만, C₆-C₂₀ 길이의 알킬 사슬(들)을 갖는 지질에 공유 결합된 길이가 최대 5 kDa인 폴리에틸렌 글리콜 사슬을 포함한다. 이와 같은 성분을 첨가함으로써 복합체 응집을 예방할 수 있고, 또한 순환 수명을 늘리고 표적 조직에 대한 지질-핵산 조성물의 전달을 증가시키는 수단을 제공할 수 있거나(Klibanov 등의 (1990) FEBS Letters, 268 (1): 235-237 참조), 이들 성분은 생체 내에서 제형으로부터 신속하게 교환되도록 선택될 수 있다(미국 특허 제5,885,613호 참조). 특히 유용한 교환 가능한 지질은 더 짧은 아실 사슬(예: C14 또는 C18)을 갖는 PEG-세라미드이다. 본 발명의 PEG-변형 인지질 및 유도된 지질은 리포솜 수송 비히클에 존재하는 총 지질의 약 0% 내지 약 20%, 약 0.5% 내지 약 20%, 약 1% 내지 약 15%, 약 4% 내지 약 10%, 또는 약 2%의 물비를 포함할 수 있다.

[0385] 여러가지 구현예에 따르면, 지질 나노입자뿐만 아니라 서로에 대한 이러한 지질의 상대적인 물비를 포함하는 양이온 지질, 비-양이온 지질 및/또는 PEG-변형 지질의 선택은 선택된 지질(들)의 특성, 의도된 표적 세포의 성질, 전달되는 MCNA의 특성을 기초로 한다. 추가적인 고려 사항은, 예를 들어, 알킬 사슬의 포화뿐만 아니라 선택된 지질(들)의 크기, 전하, pH, pKa, 융해성(fusogenicity) 및 독성을 포함한다. 따라서 물비는 적절하게 조정될 수 있다.

[0386] 중합체

[0387] 일부 구현예에서, 적합한 전달 비히클은 담체로서 폴리머를 단독으로 사용하거나 본원에 기술된 여러 가지 지질을 포함하는 다른 담체들과 조합하여 사용함으로써 제형화된다. 따라서, 일부 구현예에서, 본원에서 사용되는 리포솜 전달 비히클은 또한 폴리머를 포함하는 나노입자를 망라한다. 적합한 폴리머는 예를 들어, 폴리아크릴레이트, 폴리알킬시아노아크릴레이트, 폴리락타이드, 폴리락타이드-폴리글리콜라이드(polyglycolide) 코폴리머, 폴리카프로락톤, 텍스트란, 알부민, 젤라틴, 아르기네이트, 콜라겐, 키토산, 시클로덱스트린, 프로타민(protamine), PEG화 프로타민, PLL, PEG화 PLL 및 폴리에틸렌민(PEI)을 포함할 수 있다. PEI가 존재하는 경우, 예컨대, 25 kDa 분지형 PEI(Sigma #408727)와 같이 10 내지 40 kDa 범위의 분자량의 PEI가 분지될 수 있다.

[0388] 본 발명에 사용하기에 적합한 리포솜

[0389] 본 발명에 적합한 리포솜은 본원에 기술된 양이온성 지질, 비-양이온성 지질, 콜레스테롤 지질, PEG-변형 지질 및/또는 폴리머 중 임의의 것 하나 이상을 다양한 비율로 포함할 수 있다. 비제한적인 예로서, 적합한 리포솜

제형은 cKK-E12, DOPE, 콜레스테롤 및 DMG-PEG2K; C12-200, DOPE, 콜레스테롤 및 DMG-PEG2K; HGT4003, DOPE, 콜레스테롤 및 DMG-PEG2K; ICE, DOPE, 콜레스테롤 및 DMG-PEG2K; 또는 ICE, DOPE, 및 DMG-PEG2K에서 선택된 조합을 포함할 수 있다.

- [0390] 다양한 구현예에서, 양이온성 지질(예컨대, cKK-E12, C12-200, ICE, 및/또는 HGT4003)은 몰비로 리포솜의 약 30~60%(예컨대, 약 30~55%, 약 30~50%, 약 30~45%, 약 30~40%, 약 35~50%, 약 35~45%, 또는 약 35~40%)를 구성한다. 일부 구현예에서, 양이온성 지질(예컨대, cKK-E12, C12-200, ICE, 및/또는 HGT4003)의 백분율은 몰비로 리포솜의 약 30% 이상, 약 35% 이상, 약 40% 이상, 약 45% 이상, 약 50% 이상, 약 55% 이상, 또는 약 60% 이상이다.
- [0391] 일부 구현예에서, 양이온성 지질(들) 대 비-양이온성 지질(들) 대 콜레스테롤계 지질(들) 대 PEG-변형 지질(들)의 비는 각각 약 30~60:25~35:20~30:1~15 사이에 있을 수 있다. 일부 구현예에서, 양이온성 지질(들) 대 비-양이온성 지질(들) 대 콜레스테롤계 지질(들) 대 PEG-변형 지질(들)의 비는 각각 대략 40:30:20:10이다. 일부 구현예에서, 양이온성 지질(들) 대 비-양이온성 지질(들) 대 콜레스테롤계 지질(들) 대 PEG-변형 지질(들)의 비는 각각 대략 40:30:25:5이다. 일부 구현예에서, 양이온성 지질(들) 대 비-양이온성 지질(들) 대 콜레스테롤계 지질(들) 대 PEG-변형 지질(들)의 비는 각각 대략 40:32:25:3이다. 일부 구현예에서, 양이온성 지질(들) 대 비-양이온성 지질(들) 대 콜레스테롤계 지질(들) 대 PEG-변형 지질(들)의 비는 대략 50:25:20:5이다.
- [0392] 특정 구현예에서, 본 발명과 함께 사용하기 위한 리포솜은 양이온성 지질, 비-양이온성 지질(예: DOPE 또는 DEPE), PEG-변형 지질(예: DMG-PEG2K), 및 임의로 콜레스테롤로 이루어진 지질 성분을 포함한다. 이러한 리포솜에 포함시키기에 특히 적합한 양이온 지질은 GL-*TES*-*SA*-*DME*-*E18-2*, *TL1-01D-DMA*, *SY-3-E14-DMA**Pr*, *TL1-10D-DMA*, *HGT4002* (본원에서 *Guan-SS-Chol*로도 지칭됨), *GL-*TES*-*SA*-*DMP*-*E18-2**, *HEP-E4-E10*, *HEP-E3-E10*, 및 *TL1-04D-DMA*를 포함한다. 이들 양이온성 지질은 분무화를 통한 폐 전달을 통해 투여되는 리포솜에 사용하기에 특히 적합한 것으로 밝혀졌다. 이들 중, *HEP-E4-E10*, *HEP-E3-E10*, *GL-*TES*-*SA*-*DME*-*E18-2**, *GL-*TES*-*SA*-*DMP*-*E18-2**, *TL1-01D-DMA*, 및 *TL1-04D-DMA*의 성능이 특히 우수하였다.
- [0393] 예시적인 리포솜은 *GL-*TES*-*SA*-*DME*-*E18-2**, *TL1-01D-DMA*, *SY-3-E14-DMA**Pr*, *TL1-10D-DMA*, *GL-*TES*-*SA*-*DMP*-*E18-2**, *HEP-E4-E10*, *HEP-E3-E10*, 및 *TL1-04D-DMA* 중 하나를 양이온성 지질 성분으로서 포함하고, DOPE를 비-양이온성 지질 성분으로서 포함하고, 콜레스테롤을 헬퍼 지질 성분으로서 포함하고, DMG-PEG2K를 PEG-변형 지질 성분으로서 포함한다. 일부 구현예에서, 양이온성 지질 대 비-양이온성 지질 대 콜레스테롤 대 PEG-변형 지질의 몰비는 각각 약 30~60:25~35:20~30:1~15일 수 있다. 일부 구현예에서, 양이온성 지질 대 비-양이온성 지질 대 콜레스테롤 대 PEG-변형 지질의 몰비는 각각 약 40:30:20:10이다. 일부 구현예에서, 양이온성 지질 대 비-양이온성 지질 대 콜레스테롤 대 PEG-변형 지질의 몰비는 각각 약 40:30:25:5이다. 일부 구현예에서, 양이온성 지질 대 비-양이온성 지질 대 콜레스테롤 대 PEG-변형 지질의 몰비는 각각 약 40:32:25:3이다. 일부 구현예에서, 양이온성 지질 대 비-양이온성 지질 대 콜레스테롤 대 PEG-변형 지질의 몰비는 각각 약 50:25:20:5이다.
- [0394] 일부 구현예에서, 폐 전달에 특히 적합한 리포솜의 지질 성분은 *HGT4002*(본원에서 *Guan-SS-Chol*로도 지칭됨), DOPE, 및 DMG-PEG2K로 이루어진다. 일부 구현예에서, 양이온성 지질 대 비-양이온성 지질 대 PEG-변형 지질의 몰비는 약 60:35:5이다.
- [0395] *구별되는 지질 성분의 비*
- [0396] 지질 나노입자가 3개 및 3개 미만의 구별되는 지질 성분을 포함하는 구현예에서, 총 지질 함량의 비(즉, 지질 성분(1):지질 성분(2):지질 성분(3)의 비)는 $x:y:z$ 로 표시될 수 있으며, 여기서
- [0397] $(y + z) = 100 - x$ 이다.
- [0398] 일부 구현예에서, “x”, “y”, 및 “z”의 각각은 3개의 구별되는 지질 성분의 몰 백분율을 나타내며, 비는 몰비이다.
- [0399] 일부 구현예에서, “x”, “y”, 및 “z”의 각각은 3개의 구별되는 지질 성분의 중량%를 나타내며, 비는 중량비이다.
- [0400] 일부 구현예에서, 변수 “x”로 표시된 지질 성분(1)은 스테롤계 양이온 지질이다.
- [0401] 일부 구현예에서, 변수 “y”로 표시된 지질 성분(2)은 헬퍼 지질이다.
- [0402] 일부 구현예에서, 변수 “z”로 표시된 지질 성분(3)은 PEG 지질이다.

- [0403] 일부 구현예에서, 지질 성분(1)(예: 스테롤계 양이온 지질)의 몰 백분율을 나타내는 변수 “x”는 적어도 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 55%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 또는 약 95%이다.
- [0404] 일부 구현예에서, 지질 성분(1)(예: 스테롤계 양이온 지질)의 몰 백분율을 나타내는 변수 “x”는 약 95%, 약 90%, 약 85%, 약 80%, 약 75%, 약 70%, 약 65%, 약 60%, 약 55%, 약 50%, 약 40%, 약 30%, 약 20%, 또는 약 10% 이하이다. 구현예에서, 변수 “x”는 약 65%, 약 60%, 약 55%, 약 50%, 또는 약 40% 이하이다.
- [0405] 일부 구현예에서, 지질 성분(1)(예: 스테롤계 양이온 지질)의 몰 백분율을 나타내는 변수 “x”는: 약 50% 이상 및 약 95% 미만; 약 50% 이상 및 약 90% 미만; 약 50% 이상 및 약 85% 미만; 약 50% 이상 및 약 80% 미만; 약 50% 이상 및 약 75% 미만; 약 50% 이상 및 약 70% 미만; 약 50% 이상 및 약 65% 미만; 또는 약 50% 이상 및 약 60% 미만이다. 구현예에서, 변수 “x”는 적어도 약 50% 내지 약 70%; 적어도 약 50% 내지 약 65%; 또는 적어도 약 50% 내지 약 60%이다.
- [0406] 일부 구현예에서, 지질 성분(1)(예: 스테롤계 양이온 지질)의 중량%를 나타내는 변수 “x”는 적어도 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 55%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 또는 약 95%이다.
- [0407] 일부 구현예에서, 지질 성분(1)(예: 스테롤계 양이온 지질)의 중량%를 나타내는 변수 “x”는 약 95%, 약 90%, 약 85%, 약 80%, 약 75%, 약 70%, 약 65%, 약 60%, 약 55%, 약 50%, 약 40%, 약 30%, 약 20%, 또는 약 10% 이하이다. 구현예에서, 변수 “x”는 약 65%, 약 60%, 약 55%, 약 50%, 또는 약 40% 이하이다.
- [0408] 일부 구현예에서, 지질 성분(1)(예: 스테롤계 양이온 지질)의 중량%를 나타내는 변수 “x”는: 약 50% 이상 및 약 95% 미만; 약 50% 이상 및 약 90% 미만; 약 50% 이상 및 약 85% 미만; 약 50% 이상 및 약 80% 미만; 약 50% 이상 및 약 75% 미만; 약 50% 이상 및 약 70% 미만; 약 50% 이상 및 약 65% 미만; 또는 약 50% 이상 및 약 60% 미만이다. 구현예에서, 변수 “x”는 적어도 약 50% 내지 약 70%; 적어도 약 50% 내지 약 65%; 또는 적어도 약 50% 내지 약 60%이다.
- [0409] 일부 구현예에서, 지질 성분(3)(예: PEG 지질)의 몰 백분율을 나타내는 변수 “z”는 약 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 또는 25% 이하이다. 구현예에서, 지질 성분(3)(예: PEG 지질)의 몰 백분율을 나타내는 변수 “z”는 약 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%이다. 구현예에서, 지질 성분(3)(예: PEG 지질)의 몰 백분율을 나타내는 변수 “z”는 약 1% 내지 약 10%, 약 2% 내지 약 10%, 약 3% 내지 약 10%, 약 4% 내지 약 10%, 약 1% 내지 약 7.5%, 약 2.5% 내지 약 10%, 약 2.5% 내지 약 7.5%, 약 2.5% 내지 약 5%, 약 5% 내지 약 7.5%, 또는 약 5% 내지 약 10%이다.
- [0410] 일부 구현예에서, 지질 성분(3)(예: PEG 지질)의 중량%를 나타내는 변수 “z”는 약 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 또는 25% 이하이다. 구현예에서, 지질 성분(3)(예: PEG 지질)의 중량%를 나타내는 변수 “z”는 약 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%이다. 구현예에서, 지질 성분(3)(예: PEG 지질)의 중량 백분율을 나타내는 변수 “z”는 약 1% 내지 약 10%, 약 2% 내지 약 10%, 약 3% 내지 약 10%, 약 4% 내지 약 10%, 약 1% 내지 약 7.5%, 약 2.5% 내지 약 10%, 약 2.5% 내지 약 7.5%, 약 2.5% 내지 약 5%, 약 5% 내지 약 7.5%, 또는 약 5% 내지 약 10%이다.
- [0411] 3개 및 단 3개의 구별되는 지질 성분을 갖는 조성물의 경우, 변수 "x", "y", 및 "z"는 3개 변수의 합이 총 지질 함량의 100%가 되는 한 임의의 조합일 수 있다.
- [0412] mRNA를 캡슐화하는 리포솜의 형성
- [0413] 본 발명의 조성물에서 사용하기 위한 리포솜 수송 비히클은 당해 기술분야에서 현재 알려져 있는 여러가지 기법에 의해 제조될 수 있다. 제공된 조성물에서 사용되기 위한 리포솜은 당해 기술분야에서 현재 알려져있는 여러가지 기법에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 다층 소낭(MLV)이 예컨대, 선택된 지질을 적합한 용기 또는 베슬(vessel)의 내벽 상에 침전시키고 적절한 용매에 지질을 용해시킨 후 용매를 증발시켜 베슬의 내부 상에 박막을 남기거나 분무 건조시키는 것과 같은 종래의 기법에 따라 제조될 수 있다. 그런 다음 소용돌이 운동으로 수성 상을 용기에 첨가하여 MLV를 형성할 수 있다. 그런 다음 단층 소낭(ULV)이 다층 소낭의 균질화, 초음파처리 또는 압출에 의해 형성될 수 있다. 추가적으로, 단층 소낭은 세제 제거 기법에 의해 형성될 수 있다.
- [0414] 특정 구현예에서, 제공된 조성물은 리포솜을 포함하되, mRNA는 리포솜의 양 표면 상에 결합되어 동일한 리포솜 내에 캡슐화된다. 예를 들어, 본 발명의 조성물을 제조하는 동안, 양이온성 리포솜은 정전기적 상호작용을 통해

mRNA와 결합할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 조성물을 제조하는 동안, 양이온성 리포솜은 정전기적 상호작용을 통해 mRNA와 결합할 수 있다.

[0415] 일부 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 리포솜 내에 캡슐화된 mRNA를 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 mRNA 종은 동일한 리포솜 내에 캡슐화될 수 있다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 mRNA 종은 상이한 리포솜 내에 캡슐화될 수 있다. 일부 구현예에서, mRNA는 지질 조성, 지질 성분의 몰비, 크기, 전하(제타 전위), 표적 리간드 및/또는 이들의 조합이 다른 하나 이상의 리포솜 내에 캡슐화된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 리포솜은 스테롤계 양이온 지질, 중성 지질, PEG-변형된 지질 및/또는 이들의 조합의 상이한 조성을 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 리포솜은 리포솜을 생성하는 데 사용된 콜레스테롤계 양이온성 지질, 중성 지질, 콜레스테롤, 및 PEG-변형 지질의 상이한 몰비를 가질 수 있다.

[0416] 원하는 mRNA를 리포솜 내에 통합시키는 과정을 종종 “로딩(loading)” 이라 부른다. 예시적인 방법들은 본원에 참조로서 통합된 Lazorthes 등의 문헌[FEBS Lett., 312: 255-258, 1992]에 기술되어 있다. 리포솜-통합 핵산은 리포솜의 내부 공간, 리포솜의 이중층 막 내부에 완전히 또는 부분적으로 위치할 수 있거나 리포솜 막의 외부 표면과 결합할 수 있다. 리포솜 내로 핵산을 통합하는 것을 또한 본원에서 “캡슐화” 라고 지칭하며, 여기서 핵산은 리포솜의 내부 공간에 완전히 포함된다. 리포솜과 같은 수송 운반체 내로 mRNA를 통합하는 목적은 종종 핵산을 분해하는 효소 또는 화학물질 및/또는 핵산의 급속한 분비를 야기하는 시스템 또는 수용체를 포함할 수 있는 환경으로부터 핵산을 보호하기 위한 것이다. 따라서, 일부 구현예에서, 적합한 전달 비허클은 내부에 포함된 mRNA의 안정성을 강화시킬 수 있고/있거나 표적 세포 또는 조직으로 mRNA의 전달을 용이하게 할 수 있다.

[0417] 본 발명에 따른 적합한 리포솜은 다양한 크기로 만들어질 수 있다. 일부 구현예에서, 제공된 리포솜은 이전에 공지된 mRNA 캡슐화 리포솜보다 더 작게 만들어질 수 있다. 일부 구현예에서, 리포솜의 크기 감소는 mRNA의 더 효율적인 전달과 연관된다. 적절한 리포솜 크기의 선택은 표적 세포 또는 조직의 부위 및 리포솜의 제작 용도를 어느 정도 고려할 수 있다.

[0418] 일부 구현예에서, 리포솜의 적절한 크기는 mRNA가 코딩하는 항체의 전신 분포를 촉진시키도록 선택된다. 일부 구현예에서, 특정 세포 또는 조직에 mRNA의 형질 주입을 제한하는 것이 바람직할 수 있다. 예를 들어, 간세포를 표적하기 위하여, 리포솜의 치수가 간에서 간동양혈관(hepatic sinusoids)의 내벽을 이루는 내피층(endothelial layer)의 구멍보다 더 작도록 리포솜의 크기가 조정될 수 있고; 이러한 경우 리포솜은 쉽게 이와 같은 내피 구멍을 통과하여 표적 간세포에 도달할 수 있다.

[0419] 대안적으로 또는 추가적으로, 리포솜의 치수가 특정 세포 또는 조직으로의 분포를 제한하거나 분명히 피하기에 충분한 직경이 되도록 리포솜의 크기가 조정될 수 있다.

[0420] 당업계에 알려진 다양한 대안적 방법이 리포솜 개체군의 크기 조정을 위해 사용될 수 있다. 하나의 이와 같은 크기 조정 방법이 미국 특허 제4,737,323호에 기술되어 있고, 이는 본원에 참조로서 포함된다. 배스(bath) 또는 프로브(probe) 초음파처리기에 의해 리포솜 현탁액을 초음파처리함으로써 직경을 약 0.05 마이크로 미만의 작은 ULV로 점차 크기를 줄이게 된다. 균질화는 큰 리포솜을 보다 작은 리포솜으로 세분화하는 전단 에너지에 의존하는 또 다른 방법이다. 전형적인 균질화 과정은, 일반적으로 약 0.1 내지 0.5 마이크로 미터의 선택된 리포솜 크기가 관찰될 때까지, MLV를 표준 예멸전 균질화기(homogenizer)를 통해 재순환시킨다. 리포솜의 크기는 본원에 참조로서 포함되는 Bloomfield, Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 10:421-150 (1981)에 기술된 바와 같이 준탄성 광산란(quasi-electric light scattering, QELS)에 의해 결정될 수 있다. 평균 리포솜 직경은 형성된 리포솜의 초음파처리에 의해 줄어들 수 있다. 간헐적인 초음파 처리 사이클은 효율적인 리포솜 합성을 유도하기 위해 QELS 평가와 교대로 할 수 있다.

[0421] 조성물의 치료적 용도

[0422] 일 양태에서, 본 발명은 특히, 치료 목적에 유용한 mRNA를 캡슐화하는 LNP 제형을 제공한다. 예를 들어, 일부 구현예에서, LNP에 캡슐화된 mRNA는 대상체에서 결핍된 단백질을 암호화한다. 예를 들어, mRNA는 방광염 섬유증을 치료하기 위한 CFTR을 암호화할 수 있다. CFTR을 암호화하는 적절한 mRNA는, 예를 들어 WO 2020/106946 및 PCT/US20/44158에 기술되어 있으며, 이들 문헌 각각은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다. 다른 예로서, mRNA는, 예를 들어 WO 2017/218524(그 내용은 그 전체가 참조로서 본원에 통합됨)에 기술된 오르니틴 트랜스카르바밀라아제 결핍증을 치료하기 위한 OTC를 암호화할 수 있다.

[0423] 일부 구현예에서, LNP에 캡슐화된 mRNA는 SARS-CoV-2 항원과 같은 백신 항원을 암호화하는 단백질을 암호화한다. 이러한 SARS-CoV-2 항원은 미국 특허 제63/021,319호에 기술되어 있으며, 그 내용은 참조로서 본원

에 통합된다.

- [0424] 일부 구현예에서, mRNA는 코돈 최적화된다. 다양한 코돈 최적화 방법이 당업계에 공지되어 있다.
- [0425] **유전자 요법**
- [0426] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 LNP 제형은 치료를 필요로 하는 대상체의 치료에 사용되는 단백질을 암호화하는 코돈 최적화된 핵산을 포함하는 약학적 조성물로 적합하다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 rAAV 벡터를 포함하는 약학적 조성물은 이를 필요로 하는 대상체를 치료하는 데 사용된다. 본 발명의 rAAV 벡터 또는 입자를 함유하는 약학적 조성물은 약학적으로 허용 가능한 부형제, 희석제, 또는 담체를 함유한다. 적합한 약학적 담체의 예는 당업계에 잘 알려져 있으며, 인산염 완충 식염수 용액, 물, 유화액(예: 수중유 유화액), 및 다양한 유형의 습윤제, 멸균 용액 등을 포함한다. 약학적 조성물은 동결 건조된 형태일 수 있다. 이러한 담체는 종래의 방법에 의해 제형화될 수 있고, 치료적 유효량으로 대상체에게 투여된다.
- [0427] rAAV 벡터는 적절한 경로를 통해 이를 필요로 하는 대상체에게 투여된다. 일부 구현예에서, rAAV 벡터는 정맥내, 복강내, 피하, 또는 피부내 경로에 의해 투여된다. 일 구현예에서, rAAV 벡터는 정맥내 투여된다. 구현예에서, 피내 투여는 “유전자총” 또는 바이오리스틱 입자 전달 시스템(biolistic particle delivery system)을 사용하는 투여를 포함한다. 일부 구현예에서, rAAV 벡터는 비-바이러스 지질 나노입자를 통해 투여된다. 예를 들어, rAAV 벡터를 포함하는 조성물은 하나 이상의 희석제, 완충액, 리포솜, 지질, 지질 복합체를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, rAAV 벡터는 미소구체 또는 나노입자, 예컨대 지질 나노입자 또는 무기 나노입자 내에 포함된다.
- [0428] 일부 구현예에서, rAAV는 위형화된다. 위형화된 rAAV는 AAV 캡시드 단백질 및 rAAV 게놈의 임의의 조합을 포함하는 감염성 바이러스이다. 위형화된 rAAV는 rAAV의 조직 또는 세포 특이성을 변경하는 데 유용하며, 단독으로 사용되거나 하나 이상의 유전자를 세포(예: 포유류 세포)에 전달하기 위해 위형화되지 않은 rAAV와 함께 사용될 수 있다. 예를 들어, 위형화된 rAAV는 위형화되지 않은 rAAV에 대한 면역 반응이 나타난 포유동물에게 위형화되지 않은 rAAV를 투여한 후에 사용될 수 있다. 임의의 AAV 혈청형에서 유래된 캡시드 단백질은, 상이한 혈청형을 가진 야생형 AAV 게놈으로부터 유래되거나 이로부터 수득될 수 있는 rAAV 게놈과 함께 사용되거나; 2개 이상의 상이한 혈청형에서 유래된 AAV DNA로부터 형성된 키메라 게놈, 예를 들어 2개의 ITR(각각의 ITR은 상이한 혈청형에서 유래된 것이거나 키메라 ITR임)을 갖는 키메라 게놈인 rAAV 게놈과 함께 사용될 수 있다. 키메라 게놈, 예컨대 2개의 AAV 혈청형에서 유래된 ITR 또는 키메라 ITR을 포함하는 것들을 사용하면 재조합을 유도할 수 있으며, 이는 전사 활성 분자간 연쇄체(concatamer)의 생산을 추가로 향상시킬 수 있다. 따라서, 본 발명의 rAAV 벡터 내의 5' 및 3' ITR은 상동성 ITR(동일한 혈청형에서 유래됨), 이종 ITR(상이한 혈청형에서 유래됨), 또는 키메라 ITR(둘 이상의 AAV 혈청형에서 유래된 ITR 서열을 가짐)일 수 있다.
- [0429] 일부 구현예에서, rAAV 벡터는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, 또는 AAV11 벡터이다. 일부 구현예에서, rAAV 벡터는 AAV1이다. 일부 구현예에서, rAAV 벡터는 AAV2이다. 일부 구현예에서, rAAV 벡터는 AAV3이다. 일부 구현예에서, rAAV 벡터는 AAV4이다. 일부 구현예에서, rAAV 벡터는 AAV5이다. 일부 구현예에서, rAAV 벡터는 AAV6이다. 일부 구현예에서, rAAV 벡터는 AAV7이다. 일부 구현예에서, rAAV 벡터는 AAV8이다. 일부 구현예에서, rAAV 벡터는 AAV9이다. 일부 구현예에서, rAAV 벡터는 AAV10이다. 일부 구현예에서, rAAV 벡터는 AAV11이다. 일부 구현예에서, rAAV 벡터는 서열 최적화된다. 일부 구현예에서, rAAV 캡시드는 변형된다. 예를 들어, 일부 구현예에서, rAAV8 캡시드는 변형된다.
- [0430] **실시예**
- [0431] 본원에서 기술된 본 발명의 특정 화합물, 조성물 및 방법은 특정 구현예와 관련하여 특정적으로 기술되며, 다음의 실시예들은 단지 본 발명의 화합물을 예시하는 역할을 하며 본 발명을 제한하는 것은 아니다.
- [0432] **실시예 1. LNP 안정성에 당, 완충액 비, 및 pH가 미치는 효과**
- [0433] 다양한 양의 당(여기서는 트레할로스), 다양한 완충액 강도, 및/또는 다양한 pH 수준이 존재하는 가운데 LNP의 안정성을 평가하기 위한 분석을 수행하였다. 종합적으로, 이들 연구의 데이터는 pH 수준이 낮을수록 안정성을 유지하기 위해 더 높은 최소 완충 강도가 필요함을 보여준다. 또한, 결과는, 당(트레할로스)이 제형 내에서 일정한 백분율로 유지되는 경우, 제형의 pH가 상승할 때, LNP 안정성을 유지하는 데 필요한 최소 완충액 강도가 감소한다는 것도 보여주었다.
- [0434] 도 1a는 pH 7.5에서, LNP 제형 내 당(트레할로스)의 백분율을 증가시키면, LNP 제형에서 필요한 최소 완충액 강

도가 동시에 증가한다는 것을 보여주는 그래프이다. 도 1b는, 트레할로스가 일정한 백분율(2.7%)로 유지되는 경우, pH 수준이 증가할 때 최소 완충액 강도가 감소한다는 것을 보여주는 그래프이다.

[0435] 이들 데이터가 보여준 것은 특정 pH에서는 더 낮은 당/완충액 비가 요구된다는 것이다. 또한, 데이터는 LNP 제형 내 pH가 낮을수록, 특정 당 농도에서 LNP를 안정화하는 데 더 높은 완충액 강도가 필요하다는 것도 보여준다. 예를 들어, 당 농도가 일정하게 유지되는 경우, pH 수준이 낮을수록, LNP 안정성을 유지하는 데 필요한 완충액 강도는 더 높다.

[0436] **실시예 2. 완충액 강도를 낮추면 지질의 pKa 미만으로 안정성이 높아진다**

[0437] 지질 pKa 의존성 거동을 평가하기 위한 연구를 수행하였다. 이들 연구를 위해, 2.7% 트레할로스를 포함하고 구연산 완충액을 사용하여 pH 4.5를 갖도록 제형화한 LNP 제형을 분석하였다. 이들 분석이 보여준 것은, 완충액 강도를 낮추면 LNP의 안정성이 지질의 pKa 미만으로 더 높아졌다는 것이다. 구체적으로, LNP 안정성은 시험된 완충액 강도를 1, 10, 20, 50, 75, 100 mM까지 증가시키기에 따라 감소하는 것으로 관찰되었다. 이는 도 2에 그래프 형식으로 도시되어 있다.

[0438] 이들 데이터는, 샘플을 희석한 후 완충액 강도가 LNP 제형을 안정화하는 데 더 양호함을 나타낸다. 예를 들어, 안정성을 시나리오에 따라 시각적으로 관찰하였다: 1) 2.7% 트레할로스 + 100 mM 트리스 pH 7.5(용액의 관찰 - 맑음); 2) 2.7% 트레할로스 + 20 mM 트리스 pH 7.5 + 100 mM NaCl(용액의 관찰 - 부스러기/흐림); 3) 2.7% 트레할로스 + 16 mM 트리스 pH 7.5 + 220 mM NaCl(용액의 관찰 - 맑음).

[0439] 종합적으로, 이들 데이터로부터, LNP 응집을 방지하고 생성된 mRNA 안정성을 위해 더 높은 이온 강도를 유지하는 것이 바람직하다는 결론을 내렸다. 이는 다음과 같은 다양한 방식으로 달성될 수 있는 것으로 추론하였다: 1) 높은 완충액 강도(예: 100 mM 이상)를 갖고; 2) 낮은 완충액 강도(예: 15~20 mM)를 높은 염 농도(예: 200 mM 이상)와 합치거나; 중간 완충액 강도(예: 40~50 mM)를 중간 염 농도(예: 50~100 mM)와 합침.

[0440] **실시예 3. 효능 대 안정성**

[0441] 매우 강력한 LNP는 더 많은 양의 LNP 응집과 이어지는 mRNA 분해와 관련이 있다는 것은 이미 관찰된 것이 있다. 본원에 기술된 LNP 제형을 조사하여, 응집과 이어지는 mRNA 분해에 내성을 갖는 LNP에 캡슐화된 mRNA를 수득하는 능력에 이들 제형이 어떠한 영향을 미치는지 여부를 결정하였다.

[0442] 인간 에리트르포이에틴(EPO) mRNA를 캡슐화하는 다양한 LNP 제형을 6시간 및 25시간차의 안정성에 대해 시험하였다. 시험된 LNP 제형은 잘 응집하는 것으로 이전에 확인된 것이다. 도 3a 및 3b에 도시된 바와 같이, 본원에 기술된 LNP 제형을 사용했을 때 응집에 내성이 있는 바람직하고 매우 강력한 LNP를 성공적으로 제형화할 수 있었다.

[0443] 시험된 상이한 LNP 제형은 도 3a 및 도 3b에 도시되어 있다. 도 3b의 데이터는, 기술된 LNP 제형을 마우스에게 투여한 후 6시간 또는 24시간차에 분석한 생체 내 연구의 데이터이다. 데이터는, 예를 들어 높은 농도의 DOPE와 함께 리피도이드를 포함하는 매우 강력한 지질을 사용했을 때, 6시간차와 24시간차 모두에서 인간 EPO 단백질의 발현을 보여준다.

[0444] 도 4a는 LNP 제형 내 시험된 완충액 및 염 농도의 다양한 조합, 및 이로 인한 다양한 LNP 제형과 연관된 희석 후 안정성을 보여준다. 데이터는 실시예 2에서 제시된 결과, 즉 LNP 응집을 예방하고, 결과적으로 mRNA 안정성을 위해 서는 더 높은 이온 강도가 바람직하다는 결과와 일치한다. 특히, 이들 데이터를 통해 중간 완충액 강도(예: 40~50 mM)를 중간 염 농도(예: 50~125 mM)와 합치면 희석 후에도 안정한 LNP 제형이 유지된다는 것을 확인하였다.

[0445] 도 4b는 희석 후 LNP 제형의 안정성을 요약한 표를 보여준다. 이들 검정의 경우, LNP는 트리스 또는 인산염 완충액의 농도만 달리하였다. 이 연구에의 LNP 모두는 트리스 또는 인산염 완충액 및 2.7% 트레할로스에서 제형화하였다. 데이터가 보여주는 바와 같이, 제형 pH는 20 mM 완충액 강도에 도달하였지만, 이들 LNP 제형은 안정하지 않았다. LNP 제형은 완충액 강도가 100 mM 이상에 도달할 때 안정하였다. 데이터는 실시예 2에서 제시된 결과, 즉 LNP 응집을 예방하고, 결과적으로 mRNA 안정성을 위해 서는 더 높은 이온 강도가 바람직하다는 결과와 일치한다.

[0446] **실시예 4. 당 대 완충액 비가 캡슐화 효율 및 지질 나노입자의 크기에 미치는 효과**

[0447] 당 대 완충액 비가 -20°C에서 제형의 안정성에 미치는 효과를 평가하기 위한 연구를 수행하였다. 이들 연구를

위해, 0.9 mg/ml 내지 1.6 mg/ml의 mRNA 출발 농도로 제형화하고, 0.19 내지 0.47의 예시적인 트레할로스 대 PBS 비를 포함하는 LNP 제형을 분석하였다(표 1). 캡슐화 효율(도 5a 및 도 5b) 및 지질 나노입자의 크기(도 6a 및 도 6b)를 4°C 및 25°C에서 다양한 트레할로스 대 PBS 비의 LNP 제형에서 평가하였다. 이들 분석이 보여준 것은, LNP 제형의 트레할로스 대 PBS 비가 더 낮을수록 캡슐화의 감소 및 LNP 크기의 증가를 방지하는데 유익하고, LNP 제형의 안정성을 더 높인다는 것이었다. 전체적으로, LNP 제형 안정성은 당 대 완충액 비가 낮을 때 더 컸다. 이는 당 대 완충액 비가 캡슐화 효율(도 5a 및 도 5b) 및 LNP 크기(도 6a 및 도 6b)에 미치는 효과를 보여주는 그래프 형식으로 도시되어 있다.

표 1

다양한 트레할로스 대 PBS 비의 LNP 제형							
예시적인 제형 번호	출발 mRNA (mg/ml)	출발 트레할로스(%)	출발 PBS (X)	최종 mRNA (mg/ml)	최종 트레할로스(%)	최종 PBS (X)	트레할로스(mM)/PBS(mM) 비
1.	1	10	2	0.3	3	1.4	0.413217
2.	1	10	2	0.27	3	1.5	0.38567
3.	1	10	2.2	0.3	2.7	1.46	0.356612
4.	1	10	2.2	0.27	2.7	1.6	0.325409
5.	1.6	10	2	0.3	1.89	1.6	0.227786
6.	1.6	10	2	0.27	1.69	1.7	0.191701
7.	0.9	10	2	0.3	3.3	1.34	0.474892

[0448]

[0449] 캡슐화 효율을 다양한 예시적인 시점(0시간, 1시간, 3시간, 6시간, 및 24시간차)에 평가하였고, 4°C(도 5a) 및 25°C(도 5b)에 관찰된 캡슐화 효율 백분율을 그래프로 도시하였다. 결과는, 트레할로스 대 PBS 비가 증가하는 LNP 제형에서, 캡슐화의 감소가 관찰되었음을 보여주었는데, 이는 안정성이 감소함을 나타낸다. 결과는 4°C에서 두드러졌지만, 유사한 경향이 25°C에서 관찰되었다.

[0450]

LNP 크기를 다양한 예시적인 시점(0시간, 1시간, 3시간, 6시간, 및 24시간차)에 측정하였으며, 관찰된 LNP 크기(나노미터 단위)는 4°C(도 6a) 및 25°C(도 6b)에 그래프로 도시되어 있다. 결과는, 트레할로스 대 PBS 비가 증가하는 LNP 제형에서, 캡슐화의 감소가 관찰되었음을 보여주었는데, 이는 안정성이 감소함을 나타낸다. 결과는 25°C에서 두드러졌지만, 유사한 경향이 4°C에서 관찰되었다.

[0451]

전반적으로, 이들 연구의 결과는, 트레할로스 대 PBS 비가 낮은 것이 캡슐화를 증가시키고 LNP 크기를 줄이는데 유리함을 나타냈는데, 이는 LNP의 더 높은 안정성에 상응한다.

[0452]

본원에 언급된 모든 간행물, 특허 출원, 특허, 및 기타 참조 문헌은 그 전체가 참조로서 통합된다. 또한, 물질, 방법 및 예시는 예시적인 것에 불과하며 제한하도록 의도되지 않는다. 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용되는 모든 기술적 및 과학적 용어 및 문구는 당업자가 공통적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기술된 것과 유사하거나 동등한 방법 및 물질이 본 발명의 실시와 시험에 사용될 수 있지만, 예시적인 방법 및 물질이 본원에 기술된다.

[0453]

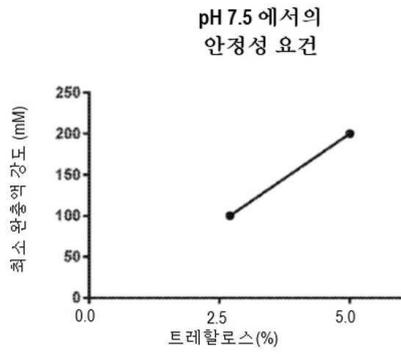
균등물

[0454]

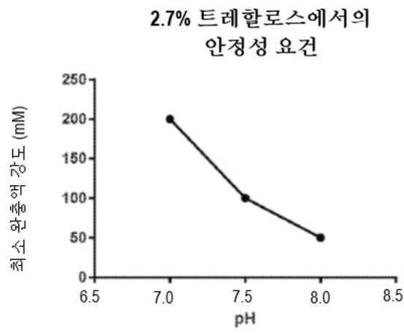
당업자는 일상적인 실험만을 이용하여, 본원에서 설명되는 발명의 특정 구현예에 대한 다수의 균등물을 인지하거나, 또는 확인할 수 있을 것이다. 본 발명의 범주는 전술된 설명에 한정되는 것으로 의도되는 것이 아니라, 오히려 첨부된 청구범위에서 설명되는 바와 같다.

도면

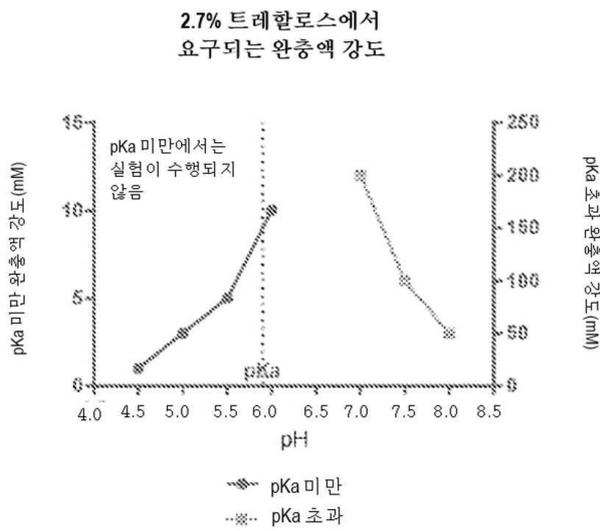
도면1a



도면1b



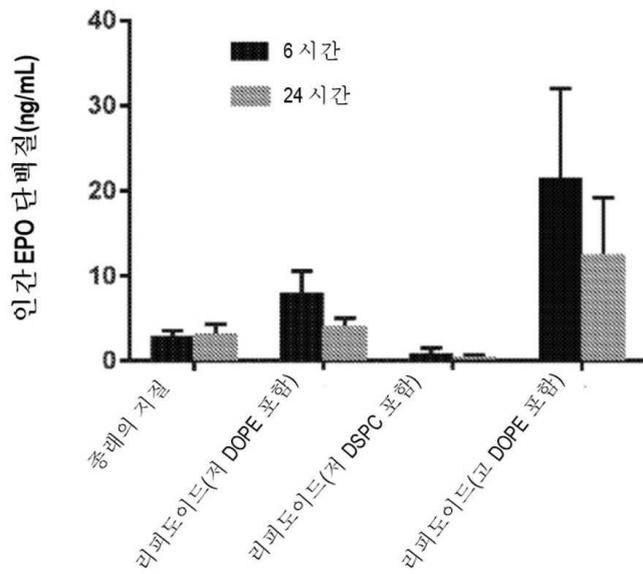
도면2



도면3a

#	몰%				트리스 pH 7.5	
	총래의 지질	지질	DSPC	DOPE	25 mM	100 mM
1	40		30		✓	✓
2	40			30	✓	✓
3	50		10		✓	✓
4	50			10	✓	✓
5		40	30		✓	✓
6		40		30	X	✓
7		50	10		✓	✓
8		50		10	✓	✓

도면3b



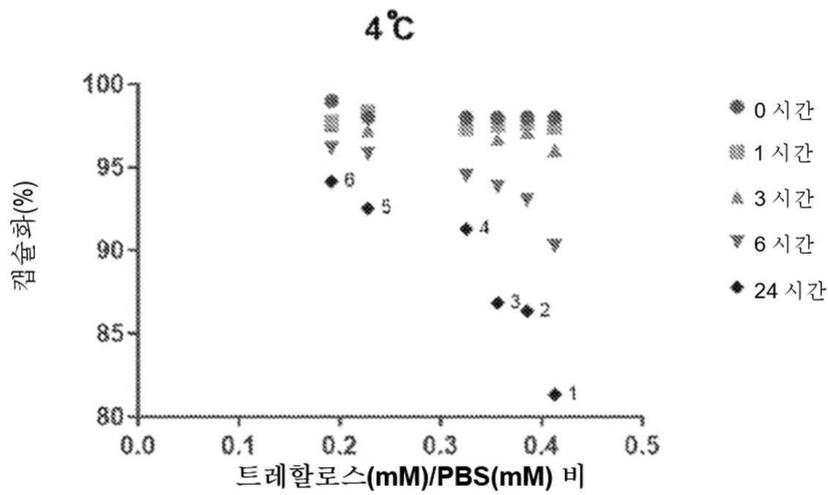
도면4a

#	농도(M)		희석 후 안정성	#	농도(M)		희석 후 안정성
	트리스	NaCl			이미다졸	NaCl	
1	20	100	X	1	40	0	X
2	40	0	X	2		50	X
3		50	X	3		75	X
4		75	√	4		100	√
5		100	√	5		125	√
6		125	√	6	50	0	X
7	0	X	7	40		X	
8	40	X	8	50		X	
9	50	√	9	75		√	
10	75	√	10	100		√	
11	100	√	11				

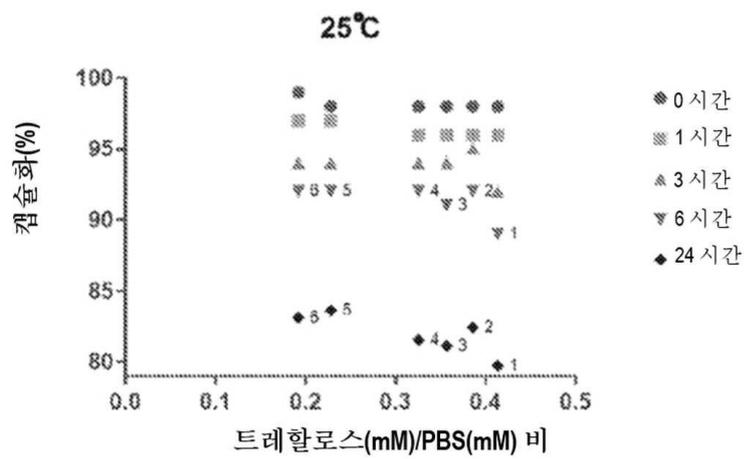
도면4b

#	pH 7.5 에서 트리스 또는 인산염 농도(mM)		희석 후 안정성
	트리스	인산염	
1	5	5	X
2	10	10	X
3	20	20	X
4	40	40	X
7	50	50	X
8	75	75	X
9	100	100	√
10	150	150	√
11	200	200	√

도면5a



도면5b



도면6a

