(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0134324
(43) 공개일자 2024년09월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/51 (2006.01) *A61K 31/485* (2006.01)
A61K 31/5415 (2006.01) *A61K 38/00* (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01) *A61K 39/39* (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01) *A61K 48/00* (2006.01)
A61K 9/19 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C07K 14/55 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 9/5123 (2013.01)
A61K 31/485 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-7024391
(22) 출원일자(국제) 2022년12월20일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년07월19일
(86) 국제출원번호 PCT/US2022/053492
(87) 국제공개번호 WO 2023/122080
국제공개일자 2023년06월29일
(30) 우선권주장
63/291,686 2021년12월20일 미국(US)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
세일 바이오메디슨스, 인크.
미국, 메사추세츠 02140, 캠브릿지, 스위트 601, 퍼스트 스트리트 140
(72) 발명자
모사헵, 무니르
미국 02140 메사추세츠주 캠브릿지 스위트 300 아콘 파크 드라이브 20
파텔, 시다스
미국 02140 메사추세츠주 캠브릿지 스위트 300 아콘 파크 드라이브 20
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인더웨이브

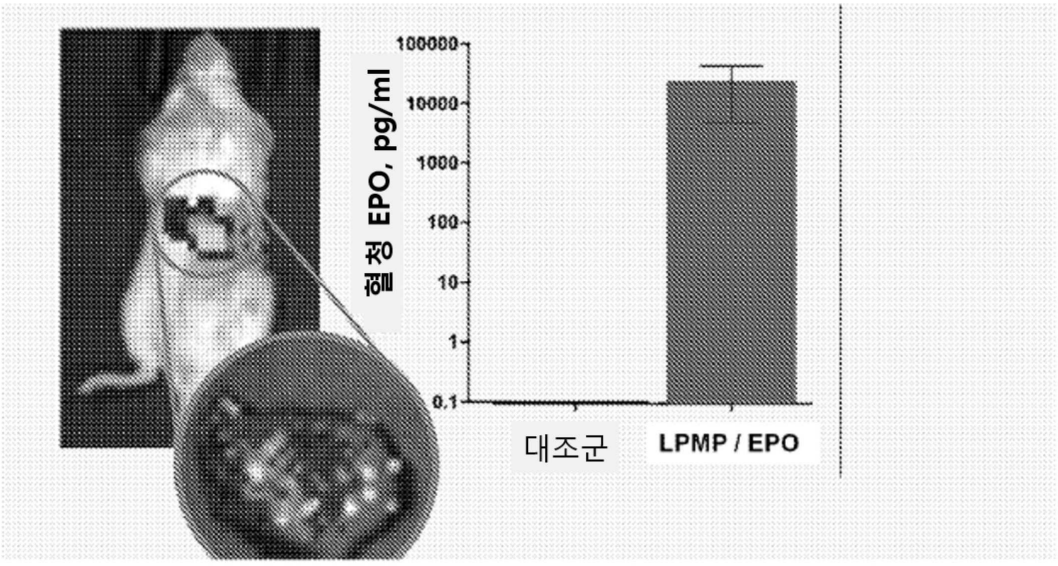
전체 청구항 수 : 총 95 항

(54) 발명의 명칭 **mRNA 치료 조성물**

(57) 요 약

하나 이상의 종양 항원성, 면역원성, 또는 신호 전달 폴리펩티드를 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 포함하고, 천연 지질 및 이온화 가능 지질을 포함하는 지질 재구성된 식물 전령 팩(LPMP) 내에 제형화된 mRNA 치료 조성물이 본원에 개시된다. 또한 본 개시는 mRNA 치료 조성물을 제조하는 방법을 포함하며, 상기 방법은 이온화 가능 지질의 존재 하에 정제된 PMP 지질을 포함하는 막을 재구성하여 이온화 가능 지질을 포함하는 LPMP를 생산하는 단계, 및 하나 이상의 종양 항원성 폴리펩티드 또는 면역원성 폴리펩티드를 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 LPMP에 로딩하는 단계를 포함한다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 31/5415 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)
A61K 39/0005 (2013.01)
A61K 39/39 (2013.01)
A61K 45/06 (2013.01)
A61K 48/0041 (2013.01)
A61K 9/19 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
(72) 발명자
클라크, 스테이시
미국 02140 메사추세츠주 캠브릿지 스위트 300 아콘 파크 드라이브 20
아라파, 에마드
미국 02140 메사추세츠주 캠브릿지 스위트 300 아콘 파크 드라이브 20
보고라드, 로만
미국 02140 메사추세츠주 캠브릿지 스위트 300 아콘 파크 드라이브 20

(30) 우선권주장
63/320,664 2022년03월16일 미국(US)
63/401,214 2022년08월26일 미국(US)

명 세 서

청구범위

청구항 1

mRNA 치료 조성물로서,

하나 이상의 항원성, 종양 항원성, 또는 신호 전달 폴리펩티드를 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 포함하고,

천연 지질 및 이온화 가능 지질을 포함하는 지질 재구성된 식물 전령 팩(LPMP) 내에 제형화되며, 상기 이온화 가능 지질은 아래에 열거된 특성 중 2개 이상을 갖는 mRNA 치료 조성물:

(i) 적어도 2개의 이온화 가능 아민;

(ii) 각각의 지질 꼬리의 길이가 적어도 6개의 탄소 원자인, 적어도 3개의 지질 꼬리;

(iii) 약 4.5 내지 약 7.5의 pKa;

(iv) 적어도 2개의 원자 사슬에 의해 분리된 이온화 가능 아민 및 이종유기기; 및

(v) 적어도 10의 N:P 비.

청구항 2

제1항에 있어서, 천연 지질은 레몬 또는 조류로부터 추출되는, mRNA 치료 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, LPMP는 스테롤 및 폴리에틸렌 글리콜(PEG)-지질 접합체를 추가로 포함하는, mRNA 치료 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, LPMP는 약 35:50:12.5:2.5의 몰비로 이온화 가능 지질:천연 지질:스테롤:PEG-지질을 포함하는, mRNA 치료 조성물.

청구항 5

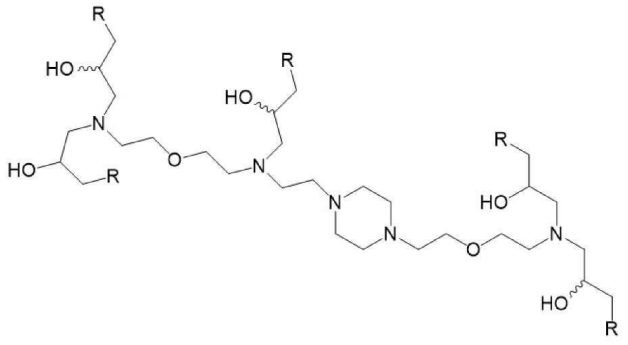
제3항에 있어서, LPMP는 약 35:20:42.5:2.5의 몰비로 이온화 가능 지질:천연 지질:스테롤:PEG-지질을 포함하는, mRNA 치료 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 이온화 가능 지질은 1,1'-((2-(4-(2-((2-(비스(2-히드록시도데실)아미노)에틸)(2-히드록시도데실)아미노)에틸)피페라진-1-일)에틸)아자네디일)비스(도데칸-2-올)(C12-200), MD1(cKK-E12), OF2, EPC, ZA3-Ep10, TT3, LP01, 5A2-SC8, 지질 5, SM-102(지질 H), 및 ALC-315로 이루어진 군으로부터 선택되는, mRNA 치료 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 이온화 가능 지질은



이고, 식 중 R은 C8-C14 알킬기인, mRNA 치료 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 폴리펩티드는 종양 특이적 항원, 종양 관련 항원, 종양 신항원, 또는 이들의 조합을 포함하는, mRNA 치료 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서, 폴리펩티드는 다음을 포함하는, mRNA 치료 조성물: p53, ART-4, BAGE, ss-카테닌/m, Bcr-abL CAMEL, CAP-1, CASP-8, CDC27/m, CDK4/m, CEA, CLAUDIN-12, c-MYC, CT, Cyp-B, DAM, ELF2M, ETV6-AML1, G250, GAGE, GnT-V, Gap 100, HAGE, HER-2/neu, HPV-E7, HPV-E6, HAST-2, hTERT(또는 hTRT), LAGE, LDLR/FUT, MAGE-A, 바람직하게는 MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A7, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11, 또는 MAGE-A12, MAGE-B, MAGE-C, MART-1/Melan-A, MC1R, 미오신/m, MUC1, MUM-1, -2, -3, NA88-A, NF1, NY-ESO-1, NY-BR-1, p190 마이너 BCR-abL, Plac-1, Pml/RARa, PRAME, 프로테이나제 3, PSA, PSM, RAGE, RU1 또는 RU2, SAGE, SART-1 또는 SART-3, SCGB3A2, SCP1, SCP2, SCP3, SSX, SURVIVIN, TEL/AML1, TPI/m, TRP-1, TRP-2, TRP-2/INT2, TPTE, WT, WT-1, 또는 이들의 조합.

청구항 10

제1항에 있어서, 폴리펩티드는 다음을 포함하는, mRNA 치료 조성물: CD2, CD3, CD4, CD8, CD11b, CD14, CD16, CD19, CD20, CD22, CD25, CD27, CD33, CD37, CD38, CD40, CD44, CD45, CD47, CD52, CD56, CD70, CD79, CD137, 4-IBB, 5T4, AGS-5, AGS-16, 안지오포이에틴 2, B7.1, B7.2, B7DC, B7H1, B7H2, B7H3, BT-062, BTLA, CAIX, 암배아 항원, CTLA4, 크립토, ED-B, ErbB1, ErbB2, ErbB3, ErbB4, EGFL7, EpCAM, EphA2, EphA3, EphB2, FAP, 피브로넥틴, 엽산 수용체, 강글리오시드 GM3, GD2, 글루코코르디코드유도TNF수용체(GITR), gp100, gpA33, GPNMB, HLA, HLA-DR, ICOS, IGF1R, 인테그린 av, 인테그린 αvɣ, LAG-3, 루이스 Y, 메소텔린, c-MET, MN 탄산 탈수효소 IX, MUC1, MUC16, 넥틴-4, KGD2, NOTCH, OX40, OX40L, PD-1, PDL1, PSCA, PSMA, RANKL, ROR1, ROR2, SLC44A4, 신데칸-1, TACI, TAG-72, 테나신, TIM3, TRAILR1, TRAILR2,VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, 및 이의 변이체.

청구항 11

제1항에 있어서, 폴리펩티드는 IL-2 펩티드, IL-2-Ra, tdTomato, Cre 재조합효소, GFP, eGFP, 항CD19, 항CD20, CAR-T, 항HER2, 에타너셉트(엔브렐), 휴미라, 에리스로포이에틴, 에포겐, 필그라스팀, 키트루다, 리툭시맙, 로미플로스팀, 살그라모스팀, 또는 이의 단편 또는 서브유닛인, mRNA 치료 조성물.

청구항 12

제1항에 있어서, 폴리뉴클레오티드는 표 I 내지 표 III 중 어느 하나에 제공된 IL-2 분자의 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 IL-2 분자를 암호화하는 mRNA인, mRNA 치료 조성물.

청구항 13

제1항에 있어서, 종양 항원성 폴리펩티드는 암종, 육종, 흑색종, 림프종, 백혈병, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 종양 항원을 포함하는, mRNA 치료 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서, 종양 항원성 폴리펩티드는 폐암 항원을 포함하는, mRNA 치료 조성물.

청구항 15

제1항에 있어서, 폴리뉴클레오티드는 mRNA이고, mRNA는 다음으로부터 유래되는, mRNA 치료 조성물:

(a) DNA 분자; 또는

(b) T가 U로 치환된 RNA 분자.

청구항 16

제15항에 있어서, DNA 분자는 프로모터를 추가로 포함하는, mRNA 치료 조성물.

청구항 17

제16항에 있어서, 프로모터는 5' UTR에 위치하는, mRNA 치료 조성물.

청구항 18

제15항에 있어서, 프로모터는 T7 프로모터, T3 프로모터, 또는 SP6 프로모터인, mRNA 치료 조성물.

청구항 19

제15항에 있어서, RNA 분자는 자가-복제 RNA 분자인, mRNA 치료 조성물.

청구항 20

제15항 또는 제19항에 있어서, RNA 분자는 5' 캡을 추가로 포함하는, mRNA 치료 조성물.

청구항 21

제20항에 있어서, 5' 캡은 캡 1 구조, 캡 1 (m6A) 구조, 캡 2 구조, 캡 3 구조, 캡 0 구조, 또는 이들의 임의의 조합을 갖는, mRNA 치료 조성물.

청구항 22

제12항에 있어서, IL-2 분자는 자연 발생 IL-2 분자, 자연 발생 IL-2 분자의 단편, 또는 이의 변이체를 포함하는, mRNA 치료 조성물.

청구항 23

제22항에 있어서, IL-2 분자는 자연 발생 IL-2 분자의 변이체, 또는 이의 단편을 포함하는, mRNA 치료 조성물.

청구항 24

제15항에 있어서, mRNA는 5' 미번역 영역(UTR) 및/또는 3' UTR을 포함하는, mRNA 치료 조성물.

청구항 25

제24항에 있어서, 5' UTR은 코작 서열을 포함하는, mRNA 치료 조성물.

청구항 26

제24항에 있어서, 3' UTR은 스플릿의 아미노-말단 인핸서(AES)로부터 유래된 서열을 포함하는, mRNA 치료 조성물.

청구항 27

제24항에 있어서, 3' UTR은 미토콘드리아 암호화된 12S rRNA(mtRNR1)로부터 유래된 서열을 포함하는, mRNA 치료 조성물.

청구항 28

제15항에 있어서, mRNA는 폴리(A) 서열을 포함하는, mRNA 치료 조성물.

청구항 29

제28항에 있어서, 폴리(A) 서열은 30개의 아데노신 잔기의 서열, 10개-뉴클레오티드 링커 서열, 및 70개의 아데노신 잔기의 서열로 이루어진 110개-뉴클레오티드 서열인, mRNA 치료 조성물.

청구항 30

제1항에 있어서, LPMP는 리포플렉스, 리포좀, 지질 나노입자, 중합체 기반 담체, 엑소좀, 층상체, 미셀, 및 유화액으로 이루어진 군으로부터 선택된 친유성 모이어티인, mRNA 치료 조성물.

청구항 31

제1항에 있어서, LPMP는 양이온성 리포좀, 나노리포좀, 프로테오리포좀, 단층 리포좀, 다층 리포좀, 세라마이드 함유 나노리포좀, 및 다포성 리포좀으로 이루어진 군으로부터 선택된 리포좀인, mRNA 치료 조성물.

청구항 32

제1항에 있어서, LPMP는 지질 나노입자인, mRNA 치료 조성물.

청구항 33

제1항에 있어서, LPMP의 크기는 약 200nm 미만인, mRNA 치료 조성물.

청구항 34

제33항에 있어서, LPMP의 크기는 약 150nm 미만인, mRNA 치료 조성물.

청구항 35

제33항에 있어서, LPMP의 크기는 약 100nm 미만인, mRNA 치료 조성물.

청구항 36

제32항에 있어서, 지질 나노입자의 크기는 약 55nm 내지 약 80nm인, mRNA 치료 조성물.

청구항 37

제3항에 있어서, PEG-지질 접합체는 PEG-DMG 또는 PEG-PE인, mRNA 치료 조성물.

청구항 38

제37항에 있어서, PEG-DMG는 PEG2000-DMG 또는 PEG2000-PE인, mRNA 치료 조성물.

청구항 39

제1항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, LPMP는 다음을 포함하는, mRNA 치료 조성물:

약 20 몰% 내지 약 50 몰%의 이온화 가능 지질,

약 20 몰% 내지 약 60 몰%의 천연 지질,

약 7 몰% 내지 약 20 몰%의 스테롤, 및

약 0.5 몰% 내지 약 3 몰%의 폴리에틸렌 글리콜(PEG)-지질 접합체.

청구항 40

제39항에 있어서, LPMP는 다음을 포함하는, mRNA 치료 조성물:

약 35 몰%의 이온화 가능 지질,

약 50 몰%의 천연 지질,

약 12.5 몰%의 스테롤, 및

약 2.5 몰%의 폴리에틸렌 글리콜(PEG)-지질 접합체.

청구항 41

제1항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, mRNA 치료 조성물은 약 50:1 내지 약 10:1의 총 지질:폴리뉴클레오티드 중량비를 갖는 mRNA 치료 조성물.

청구항 42

제41항에 있어서, mRNA 치료 조성물은 약 44:1 내지 약 24:1의 총 지질:폴리뉴클레오티드 중량비를 갖는 mRNA 치료 조성물.

청구항 43

제41항에 있어서, mRNA 치료 조성물은 약 40:1 내지 약 28:1의 총 지질:폴리뉴클레오티드 중량비를 갖는 mRNA 치료 조성물.

청구항 44

제41항에 있어서, mRNA 치료 조성물은 약 38:1 내지 약 30:1의 총 지질:폴리뉴클레오티드 중량비를 갖는 mRNA 치료 조성물.

청구항 45

제41항에 있어서, mRNA 치료 조성물은 약 37:1 내지 약 33:1의 총 지질:폴리뉴클레오티드 중량비를 갖는 mRNA 치료 조성물.

청구항 46

제1항에 있어서, 약 7.0 내지 약 8.5의 pH의 HEPES 또는 TRIS 완충액을 추가로 포함하는 mRNA 치료 조성물.

청구항 47

제46항에 있어서, HEPES 또는 TRIS 완충액은 약 7mg/mL 내지 약 15mg/mL의 농도인, mRNA 치료 조성물.

청구항 48

제46항 또는 제47항에 있어서, 약 2.0mg/mL 내지 약 4.0mg/mL의 NaCl을 추가로 포함하는 mRNA 치료 조성물.

청구항 49

제1항에 있어서, 하나 이상의 동결보호제를 추가로 포함하는 mRNA 치료 조성물.

청구항 50

제49항에 있어서, 하나 이상의 동결보호제는 수크로오스, 글리세롤, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는, mRNA 치료 조성물.

청구항 51

제50항에 있어서, mRNA 치료 조성물은 약 70mg/mL 내지 약 110mg/mL 농도의 수크로오스 및 약 50mg/mL 내지 약 70mg/mL 농도의 글리세롤의 조합을 포함하는 mRNA 치료 조성물.

청구항 52

제1항에 있어서, mRNA 치료제는 동결건조된 조성물인 mRNA 치료 조성물.

청구항 53

제52항에 있어서, 동결건조된 mRNA 치료 조성물은 하나 이상의 동결보호제를 포함하는, mRNA 치료 조성물.

청구항 54

제53항에 있어서, 동결건조된 mRNA 치료 조성물은 폴록사머, 소르브산칼륨, 수크로오스, 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는, mRNA 치료 조성물.

청구항 55

제54항에 있어서, 폴록사머는 폴록사머 188인, mRNA 치료 조성물.

청구항 56

제52항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 동결건조된 mRNA 치료 조성물은 약 0.01 내지 약 1.0% w/w의 폴리뉴클레오티드를 포함하는, mRNA 치료 조성물.

청구항 57

제52항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 동결건조된 mRNA 치료 조성물은 약 1.0 내지 약 5.0% w/w의 지질을 포함하는, mRNA 치료 조성물.

청구항 58

제52항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 동결건조된 mRNA 치료 조성물은 약 0.5 내지 약 2.5% w/w의 TRIS 완충액을 포함하는, mRNA 치료 조성물.

청구항 59

제52항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 동결건조된 mRNA 치료 조성물은 약 0.75 내지 약 2.75% w/w의 NaCl을 포함하는, mRNA 치료 조성물.

청구항 60

제52항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 동결건조된 mRNA 치료 조성물은 약 85 내지 약 95% w/w의 당을 포함하는, mRNA 치료 조성물.

청구항 61

제60항에 있어서, 당은 수크로오스인, mRNA 치료 조성물.

청구항 62

제52항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 동결건조된 mRNA 치료 조성물은 약 0.01 내지 약 1.0% w/w의 폴록사머를 포함하는, mRNA 치료 조성물.

청구항 63

제62항에 있어서, 폴록사머는 폴록사머 188인, mRNA 치료 조성물.

청구항 64

제52항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 동결건조된 mRNA 치료 조성물은 약 1.0 내지 약 5.0% w/w의 소르브산칼륨을 포함하는, mRNA 치료 조성물.

청구항 65

mRNA 치료 조성물을 제조하는 방법으로서, 다음을 포함하는 방법:

이온화 가능 지질의 존재 하에 정제된 PMP 지질을 포함하는 막을 재구성하여 이온화 가능 지질을 포함하는 지질 재구성된 식물 전령 팩(LPMP)을 생산하는 단계로서, 상기 이온화 가능 지질은 아래에 열거된 특성 중 2개 이상을 갖는, 단계:

(i) 적어도 2개의 이온화 가능 아민;

(ii) 각각의 지질 꼬리의 길이가 적어도 6개의 탄소 원자인, 적어도 3개의 지질 꼬리;

(iii) 약 4.5 내지 약 7.5의 pKa;

(iv) 적어도 2개의 원자 사슬에 의해 분리된 이온화 가능 아민 및 이종유기기; 및

(v) 적어도 10의 N:P 비, 및

하나 이상의 항원성, 종양 항원성, 또는 신호 전달 폴리펩티드를 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 LPMP 내로 로딩하는 단계.

청구항 66

대상체에서 mRNA 치료제를 전달하는 방법으로서, 다음을 포함하는 방법:

제1항 내지 제64항 중 어느 한 항의 mRNA 치료 조성물을 대상체에게 투여하는 단계.

청구항 67

대상체에서 면역 반응을 유도하는 방법으로서, 다음을 포함하는 방법:

제1항 내지 제64항 중 어느 한 항의 mRNA 치료 조성물을 대상체에게 투여하는 단계.

청구항 68

대상체에서 암을 치료하거나 예방하는 방법으로서, 다음을 포함하는 방법:

제1항 내지 제64항 중 어느 한 항의 mRNA 치료 조성물을 대상체에게 투여하는 단계.

청구항 69

제66항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, mRNA 치료 조성물은 경구, 정맥내, 피내, 근육내, 비강내, 안구내, 직장, 공장내, 종양내, 및/또는 피하 투여에 의해 투여되는, 방법.

청구항 70

제69항에 있어서, mRNA 치료 조성물은 경구, 정맥내, 근육내, 및/또는 피하 투여에 의해 투여되는, 방법.

청구항 71

제66항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, mRNA 치료 조성물은 약 0.006mg/kg 내지 약 0.5mg/kg의 폴리뉴클레오티드를 대상체에게 전달하기에 충분한 투여량 수준으로 투여되는, 방법.

청구항 72

제71항에 있어서, mRNA 치료 조성물은 약 0.01mg/kg, 약 0.05mg/kg 또는 약 0.1mg/kg의 폴리뉴클레오티드를 대상체에게 전달하기에 충분한 투여량 수준으로 투여되는, 방법.

[청구항 72]

제67항 또는 제68항에 있어서, mRNA 치료 조성물은 대상체에게 1회, 2회, 3회, 4회 또는 그 이상 투여되는, 방법.

청구항 73

제72항에 있어서, mRNA 치료 조성물은 대상체에게 1회 또는 2회 투여되는, 방법.

청구항 74

제66항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 다음을 추가로 포함하는 방법:

추가 치료제를 대상체에게 투여하는 단계.

청구항 75

제74항에 있어서, 추가 치료제는 항암 치료제인, 방법.

청구항 76

제75항에 있어서, 추가 치료제는 만성 통증을 치료 및/또는 예방하는 치료제인, 방법.

청구항 77

제76항에 있어서, 추가 치료제는 부프레노르핀, 멜록시캄 SR, 또는 이들의 조합인, 방법.

청구항 78

제74항에 있어서, 추가 치료제는 mRNA 치료 조성물을 투여하기 전, 투여와 동시에, 또는 투여한 후에 투여되는, 방법.

청구항 79

제72항에 있어서, mRNA 치료 조성물은 대상체에게 3회 또는 4회 투여되는, 방법.

청구항 80

제71항에 있어서, mRNA 치료 조성물은 약 0.006mg/kg, 약 0.02mg/kg, 약 0.2mg/kg, 약 0.4mg/kg, 또는 약 0.5mg/kg의 폴리뉴클레오티드를 대상체에게 전달하기에 충분한 투여량 수준으로 투여되는, 방법.

청구항 81

제71항에 있어서, mRNA 치료 조성물은 약 0.006mg/kg, 약 0.01mg/kg, 약 0.02mg/kg, 약 0.05mg/kg, 약 0.1mg/kg, 또는 약 0.4mg/kg의 폴리뉴클레오티드를 대상체에게 전달하기에 충분한 투여량 수준으로 투여되는, 방법.

청구항 82

제66항 내지 제68항에 있어서, mRNA 치료 조성물은 약 0.0003mg/kg 내지 약 0.002mg/kg의 폴리뉴클레오티드를 대상체에게 전달하기에 충분한 투여량 수준으로 투여되는, 방법.

청구항 83

제82항에 있어서, mRNA 치료 조성물은 약 0.0003mg/kg 내지 약 0.5mg/kg의 폴리뉴클레오티드를 대상체에게 전달하기에 충분한 투여량 수준으로 1회, 2회, 3회, 4회 또는 그 이상 대상체에게 투여되는, 방법.

청구항 84

제66항 내지 제68항에 있어서, 폴리뉴클레오티드는 표 9 또는 실시예 1 내지 실시예 9 중 어느 하나에 제공된 IL-15 분자의 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 IL-15 및/또는 IL-15Ra 분자를 암호화하는 mRNA인, mRNA 치료 조성물.

청구항 85

제84항에 있어서, IL-15 분자는 자연 발생 IL-15 분자, 자연 발생 IL-15 분자의 단편, 또는 이의 변이체를 포함하는, mRNA 치료 조성물.

청구항 86

제84항에 있어서, IL-15Ra 분자는 자연 발생 IL-15Ra 분자, 자연 발생 IL-15Ra 분자의 단편, 또는 이의 변이체를 포함하는, mRNA 치료 조성물.

청구항 87

제66항 내지 제68항에 있어서, mRNA 치료 조성물은 T 세포 및/또는 NK 세포의 증식 또는 활성화를 유도하는, 방

법.

청구항 88

제66항 내지 제68항에 있어서, mRNA 치료 조성물은 T 세포 및/또는 NK 세포의 증식 또는 활성화를 조절하는, 방법.

청구항 89

제88항에 있어서, mRNA 치료 조성물은 CD4 T 세포 및/또는 CD8 T 세포의 증식 또는 활성화를 조절하는, 방법.

청구항 90

제88항에 있어서, mRNA 치료 조성물은 혈액, 림프절, 비장, 또는 이들의 임의의 조합에서 T 세포 및/또는 NK 세포의 증식 또는 활성화를 조절하는, 방법.

청구항 91

제88항에 있어서, mRNA 치료 조성물은 기관에서 T 세포 및/또는 NK 세포의 증식 또는 활성화를 조절하는, 방법.

청구항 92

제88항에 있어서, mRNA 치료 조성물은 투여 후 6시간, 24시간, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 8일, 9일, 10일, 13일 또는 그 이상 동안 T 세포 및/또는 NK 세포의 증식 또는 활성화를 조절하는, 방법.

청구항 93

제66항 내지 제68항에 있어서, mRNA 치료 조성물은 그랜자임 B/퍼포린, CD25(IL-2Ra), TNF-알파, IL-15, IL-6, IL-8, IL-12, GM-CSF, G-CSF, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-8, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17, IL-33, PD-L1, CCL2, CCL3, CCL4, CXCL1, CXCL2, CXCL10(IP-10), CCL20, CD40, TNF-β, LAF, TCGF, BCGF, TRF, BAF, BDG, MP, LIF, OSM, TMF, PDGF, IFN-a, IFN-β, IFN-γ, 또는 이들의 임의의 조합의 활성 또는 발현을 조절하는, 방법.

청구항 94

제93항에 있어서, mRNA 치료 조성물은 투여 후 6시간, 24시간, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 8일, 9일, 10일, 13일, 15일, 20일 또는 그 이상 동안 면역 반응을 조절하는, 방법.

청구항 95

제94항에 있어서, mRNA 치료 조성물은 투여 후 혈액 또는 T 세포 및/또는 NK 세포에서 면역 반응의 활성 또는 발현을 조절하는, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련 출원에 대한 상호 참조**

[0002] 본 출원은 2021년 12월 20일에 출원된 미국 가출원 제63/291,686호; 2022년 3월 16일에 출원된 미국 가출원 제63/320,664호; 및 2022년 8월 26일에 출원된 미국 가출원 제63/401,214호에 대한 우선권의 이익을 주장하며, 동 문헌 모두는 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

배 경 기 술

[0003] 상업 백신 또는 개발 중인 백신(예를 들어, 암 백신)은 통상적으로 전체 미생물, 단백질 항원, 펩티드, 다당류 또는 데옥시리보핵산(DNA) 백신 및 이들의 조합에 기초한다. 치료제로서 RNA 폴리뉴클레오티드를 사용하는 것은 새롭게 부상하고 있는 분야이다.

[0004] 따라서, (암 백신과 같은) RNA 치료제의 보다 효과적이고 쉽게 확장 가능하며 안정적인 전달을 위해 향상된 RNA

전달 시스템을 개발할 필요성이 존재한다.

발명의 내용

[0005] 일 양태에서, 하나 이상의 항원성(예를 들어, 종양 항원성) 폴리펩티드, 또는 신호 전달 폴리펩티드를 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 mRNA 치료 조성물이 본원에 제공된다. 하나 이상의 폴리뉴클레오티드는 천연 지질 및 이온화 가능 지질을 포함하는 지질 재구성된 식물 전령 팩(LPMP) 내에 제형화된다. 이온화 가능 지질은 아래에 열거된 특성 중 2개 이상을 갖는다:

[0006] (i) 적어도 2개의 이온화 가능 아민;

[0007] (ii) 각각의 지질 꼬리의 길이가 적어도 6개의 탄소 원자인, 적어도 3개의 지질 꼬리;

[0008] (iii) 약 4.5 내지 약 7.5의 pKa;

[0009] (iv) 적어도 2개의 원자 사슬에 의해 분리된 이온화 가능 아민 및 이종유기기; 및

[0010] (v) 적어도 10의 N:P 비.

[0011] 또 다른 양태에서, mRNA 치료 조성물을 제조하는 방법이 본원에 제공된다. 상기 방법은 이온화 가능 지질의 존재 하에 정제된 PMP 지질을 포함하는 막을 재구성하여, 이온화 가능 지질을 포함하는 지질 재구성된 식물 전령 팩(LPMP)을 생성하는 단계를 포함한다. 이온화 가능 지질은 아래에 열거된 특성 중 2개 이상을 갖는다:

[0012] (i) 적어도 2개의 이온화 가능 아민;

[0013] (ii) 각각의 지질 꼬리의 길이가 적어도 6개의 탄소 원자인, 적어도 3개의 지질 꼬리;

[0014] (iii) 약 4.5 내지 약 7.5의 pKa;

[0015] (iv) 적어도 2개의 원자 사슬에 의해 분리된 이온화 가능 아민 및 이종유기기; 및

[0016] (v) 적어도 10의 N:P 비.

[0017] 상기 방법은 하나 이상의 항원성(예를 들어, 종양 항원성) 폴리펩티드 또는 신호 전달 폴리펩티드를 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 LPMP에 로딩하는 단계를 추가로 포함한다.

[0018] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 하나 이상의 야생형 항원 또는 조작된 항원(또는 항원에 대한 항체)을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 작제물이다. 항원은 종양, 예를 들어, 종양 특이적 항원, 종양 관련 항원, 종양 신항원, 또는 이들의 조합으로부터 유래될 수 있다.

[0019] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드에 의해 암호화된 폴리펩티드는 p53, ART-4, BAGE, ss-카테닌/m, Bcr-abL CAMEL, CAP-1, CASP-8, CDC27/m, CDK4/m, CEA, CLAUDIN-12, c-MYC, CT, Cyp-B, DAM, ELF2M, ETV6-AML1, G250, GAGE, GnT-V, Gap 100, HAGE, HER-2/neu, HPV-E7, HPV-E6, HAST-2, hTERT (또는 hTRT), LAGE, LDLR/FUT, MAGE- A, 바람직하게는 MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE- A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A7, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11, 또는 MAGE-A12, MAGE-B, MAGE-C, MART-1/Melan-A, MC1R, 미오신/m, MUC1, MUM-1, -2, -3, NA88-A, NF1, NY-ESO-1, NY-BR-1, p190 마이너 BCR-abL, Plac-1, Pml/RARa, PRAME, 프로테이나제 3, PSA, PSM, RAGE, RU1 또는 RU2, SAGE, SART-1 또는 S ART-3, SCGB3A2, SCP1, SCP2, SCP3, SSX, SURVIVIN, TEL/AML1, TPI/m, TRP-1, TRP-2, TRP-2/INT2, TPTE, WT, WT-1, 또는 이들의 조합을 포함하는 항원성(예를 들어, 종양 항원성) 폴리펩티드 또는 신호 전달 폴리펩티드이다.

[0020] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드에 의해 암호화된 폴리펩티드는 CD2, CD3, CD4, CD8, CD11b, CD14, CD16, CD19, CD20, CD22, CD25, CD27, CD33, CD37, CD38, CD40, CD44, CD45, CD47, CD52, CD56, CD70, CD79, CD137, 4- IBB, 5T4, AGS-5 , AGS-16, 안지오포이에틴 2, B7.1, B7.2, B7DC, B7H1, B7H2, B7H3, BT-062, BTLA, CAIX, 암배아 항원, CTLA4, 크립토, ED-B, ErbB1, ErbB2, ErbB3, ErbB4, EGFL7, EpCAM, EphA2, EphA3, EphB2, FAP, 피브로넥틴, 엽산 수용체, 강글리오시드 GM3, GD2, 글루코코르디코드유도TNF수용체(GITR), gp100, gpA33, GPNMB, HLA, HLA-DR, ICOS, IGF1R, 인테그린 av, 인테그린 αvβ, LAG-3, 루이스 Y, 메소텔린, c-MET, MN 탄산 탈수효소 IX, MUC1, MUC16, 넥틴-4, KGD2, NOTCH, OX40, OX40L, PD-1, PDL1, PSCA, PSMA, RANKL, ROR1, ROR2, SLC44A4, 신데칸-1, TACI, TAG-72, 테나신, TIM3, TRAILR1, TRAILR2, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, 및 이의 변이체를 포함하는 항원성(예를 들어, 종양 항원성) 폴리펩티드 또는 신호 전달 폴리펩티드이다.

[0021] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드에 의해 암호화된 폴리펩티드는 IL-1α, IL-1β, IL-1ra, IL-2, IL-3, IL-

4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL- 9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E, IL- 17F, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-28A/B, IL-29, IL-30, IL- 31, IL-32, IL-33, IL-35, TGF-β, GM-CSF, M-CSF, G-CSF, TNF-α, TNF-β, LAF, TCGF, BCGF, TRF, BAF, BDG, MP, LIF, OSM, TMF, PDGF, IFN-α, IFN-β, IFN-ɣ, 우테로글로빈, Foxp3, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL4, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCL14, CXCL15, CXCL16, CCL1, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL6, CCL7, CCL8, CCL9/10, CCL11, CCL12, CCL13, CCL14, CCL15, CCL16, CCL17, CCL18, CCL19, CCL20, CCL21, CCL22, CCL23, CCL24, CCL25, CCL26, CCL27, CCL28, XCL1, XCL2, CX3CL1 및 이의 변이체를 포함하는 항원성(예를 들어, 종양 항원성) 폴리펩티드 또는 신호 전달 폴리펩티드이다.

[0022] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드에 의해 암호화된 폴리펩티드는 IL-2 펩티드, IL-2-Ra, tdTomato, Cre 재조합효소, GFP, eGFP, 항CD19, 항CD20, CAR-T, 항HER2, 에타너셉트(엔브렐), 휴미라, 에리스로포이에틴, 에포겐, 필그라스팀, 키트루다, 리툭시맙, 로미플로스팀, 살그라모스팀, 또는 이의 단편 또는 서브유닛이다. 일 구현예에서, 폴리펩티드는 IL-2 펩티드, 또는 이의 단편 또는 서브유닛이다. 일 구현예에서, 폴리펩티드는 에리스로포이에틴 또는 에포겐, 또는 이의 단편 또는 서브유닛이다.

[0023] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드에 의해 암호화된 폴리펩티드는 IL-15 펩티드, IL-15-Ra, 또는 이의 단편 또는 서브유닛이다. 일 구현예에서, 폴리펩티드는 IL-15 펩티드, 또는 이의 단편 또는 서브유닛이다.

[0024] 일부 구현예에서, 종양 항원성 폴리펩티드는 암종, 육종, 흑색종, 림프종, 백혈병, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 종양 항원을 포함한다. 일 구현예에서, 종양 항원성 폴리펩티드는 폐암 항원을 포함한다.

[0025] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 mRNA, siRNA 또는 siRNA 전구체, 마이크로RNA(miRNA) 또는 miRNA 전구체, 플라스미드, 다이서 기질 짧은 간섭 RNA(dsiRNA), 짧은 헤어핀 RNA(shRNA), 비대칭 간섭 RNA(aiRNA), 펩티드 핵산(PNA), 모르폴리노, 잠김 핵산(LNA), 피위-상호작용 RNA(piRNA), 리보자임, 데옥시리보자임(DNAzyme), 압타머, 원형 RNA(circRNA), 가이드 RNA(gRNA), 또는 이들 RNA 중 어느 하나를 암호화하는 DNA 분자일 수 있다. 일 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 mRNA이다.

[0026] 일 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 표 I 내지 표 III 중 어느 하나에 제공된 IL-2 분자의 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, , 99% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 IL-2 분자를 암호화하는 mRNA이다.

[0027] 일 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 표 IV에 제공된 IL-15 분자의 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, , 99% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 IL-15 또는 IL-15RA 분자를 암호화하는 mRNA이다. 일 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 표 IV에 제공된 IL-15 또는 IL-15RA 분자의 핵산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, , 99% 또는 100% 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는 IL-15 분자를 암호화하는 mRNA이다.

[0028] 일부 구현예에서, mRNA는 다음으로부터 유래된다: (a) DNA 분자, 또는 (b) RNA 분자. mRNA에서, T는 U로 임의 치환된다.

[0029] 일부 구현예에서, mRNA는 DNA 분자로부터 유래된다. DNA 분자는 프로모터를 추가로 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 프로모터는 T7 프로모터, T3 프로모터, 또는 SP6 프로모터이다. 일부 구현예에서, 프로모터는 5' UTR에 위치한다.

[0030] 일부 구현예에서, mRNA는 RNA 분자로부터 유래된다. RNA 분자는 자가-복제 RNA 분자일 수 있다.

[0031] 일부 구현예에서, mRNA는 RNA 분자이다. RNA 분자는 5' 캡을 추가로 포함할 수 있다. 5' 캡은 캡 1 구조, 캡 1 (m6A) 구조, 캡 2 구조, 캡 3 구조, 캡 0 구조, 또는 이들의 임의의 조합을 가질 수 있다.

[0032] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 IL-2 분자를 암호화하는 mRNA이다. 일 구현예에서, IL-2 분자는 자연 발생 IL-2 분자, 자연 발생 IL-2 분자의 단편, 또는 이의 변이체를 포함한다. 일 구현예에서, IL-2 분자는 자연 발생 IL-2 분자의 변이체(예를 들어, 본원에 기술된 것과 같은 IL-2 변이체), 또는 이의 단편을 포함한다.

[0033] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 IL-15 분자를 암호화하는 mRNA이다. 일 구현예에서, IL-15 분자는 자연 발생 IL-15 분자, 자연 발생 IL-15 분자의 단편, 또는 이의 변이체를 포함한다. 일 구현예에서, IL-15 분자는 자연 발생 IL-15 분자의 변이체(예를 들어, 본원에 기술된 것과 같은 IL-15 변이체), 또는 이의 단편을 포함한다. 일 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 IL-15 초작용제, IL-15 분자, IL-15RA 분자, 또는 이들의 조합을 암호

화하는 mRNA이다.

[0034] 일부 구현예에서, mRNA는 5' 미번역 영역(UTR) 및/또는 3' UTR을 포함한다.

[0035] 일부 구현예에서, mRNA는 5' UTR을 포함한다. 5' UTR은 코작(Kozak) 서열을 포함할 수 있다.

[0036] 일부 구현예에서, mRNA는 3' UTR을 포함한다. 일부 구현예에서, 3' UTR은 스플릿의 아미노-말단 인핸서(AES)로부터 유래된 하나 이상의 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 3' UTR은 미토콘드리아 암호화된 12S rRNA(mtRNR1)로부터 유래된 서열을 포함한다.

[0037] 일부 구현예에서, mRNA는 폴리(A) 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 폴리(A) 서열은 30개의 아데노신 잔기의 서열, 10개-뉴클레오티드 링커 서열, 및 70개의 아데노신 잔기의 서열로 이루어진 110개-뉴클레오티드 서열이다.

[0038] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 지질 재구성된 식물 전령 팩(LPMP)에 의해 캡슐화된다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 LPMP의 표면에 매립된다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 LPMP의 표면에 접합된다.

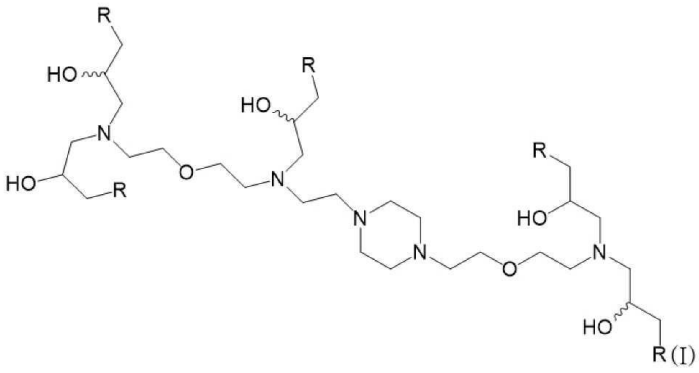
[0039] 일부 구현예에서, LPMP는 지질 압출을 포함하는 방법에 의해 생산된다. 일부 구현예에서, LPMP는 수성상을 포함하는 미세유체 장치에서 PMP의 지질 추출물을 포함하는 용액을 가공하여 LPMP를 생산하는 단계를 포함하는 방법에 의해 생산된다. 일부 구현예에서, 수성상은 폴리뉴클레오티드를 포함한다.

[0040] 일부 구현예에서, LPMP의 천연 지질은 레몬 또는 조류로부터 추출된다.

[0041] 일부 구현예에서, LPMP의 이온화 가능 지질은 1,1'-((2-(4-(2-((2-(비스(2-히드록시도데실)아미노)에틸)(2-히드록시도데실)아미노)에틸)피페라진-1-일)에틸)아자네디일)비스(도데칸-2-올)(C12-200), MD1 (cKK-E12), OF2, EPC, ZA3-Ep10, TT3, LP01, 5A2-SC8, 지질 5, SM-102(지질 H), 및 ALC-315로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0042] 일 구현예에서, 이온화 가능 지질은 C12-200이다.

[0043] 일부 구현예에서, 이온화 가능 지질은



[0044] 이고, 식 중 R은 C8-C14 알킬기이다.

[0045] 일부 구현예에서, 재구성은 스테롤의 존재 하에 수행됨으로써, 천연 지질, 이온화 가능 지질, 및 스테롤을 포함하는 LPMP를 생성한다. 일부 구현예에서, 스테롤은 콜레스테롤 또는 시토스테롤이다.

[0046] 일부 구현예에서, 재구성은 PEG화된 지질(또는 PEG-지질 접합체)의 존재 하에 수행됨으로써, 천연 지질, 이온화 가능 지질, 및 PEG-지질 접합체를 포함하는 LPMP를 생성한다. 일부 구현예에서, PEG-지질 접합체는 C14-PEG2k, C18-PEG2k, 또는 DMPE-PEG2k이다. 일부 구현예에서, PEG-지질 접합체는 PEG-DMG 또는 PEG-PE이다. 일부 구현예에서, PEG-DMG는 PEG2000-DMG 또는 PEG2000-PE이다.

[0047] 일부 구현예에서, LPMP는 스테롤 및 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)-지질 접합체를 추가로 포함한다.

[0048] 일부 구현예에서, LPMP는 다음을 포함한다:

[0049] 약 20 몰% 내지 약 50 몰%의 이온화 가능 지질,

[0050] 약 20 몰% 내지 약 60 몰%의 천연 지질,

[0051] 약 7 몰% 내지 약 20 몰%의 스테롤, 및

[0052] 약 0.5 몰% 내지 약 3 몰%의 폴리에틸렌 글리콜(PEG)-지질 접합체.

[0053] 일부 구현예에서, LPMP는 다음을 포함한다:

[0054] 약 35 몰%의 이온화 가능 지질,

[0055] 약 50 몰%의 천연 지질,

[0056] 약 12.5 몰%의 스테롤, 및

[0057] 약 2.5 몰%의 폴리에틸렌 글리콜(PEG)-지질 접합체.

[0058] 일 구현예에서, LPMP는 약 35:50:12.5:2.5의 몰비로 이온화 가능 지질:천연 지질:스테롤:PEG-지질을 포함한다. 일 구현예에서, LPMP는 약 35:20:42.5:2.5의 몰비로 이온화 가능 지질:천연 지질:스테롤:PEG-지질을 포함한다.

[0059] 일부 구현예에서, LPMP는 다음을 포함한다:

[0060] 레몬 또는 조류로부터 추출된 천연 지질,

[0061] C12-200,

[0062] 콜레스테롤, 및

[0063] DMPE-PEG2k.

[0064] 일 구현예에서, LPMP는 다음을 포함한다:

[0065] 레몬으로부터 추출된 천연 지질,

[0066] C12-200,

[0067] 콜레스테롤, 및

[0068] DMPE-PEG2k. LPMP는 C12-200:레몬 지질:콜레스테롤: DMPE-PEG2k를 약 35:50:12.5:2.5의 몰비로 포함할 수 있다.

[0069] 일 구현예에서, LPMP는 다음을 포함한다:

[0070] 조류로부터 추출된 천연 지질,

[0071] C12-200,

[0072] 콜레스테롤, 및

[0073] DMPE-PEG2k. LPMP는 C12-200:조류 지질:콜레스테롤: DMPE-PEG2k를 약 35:20:42.5:2.5의 몰비로 포함할 수 있다.

[0074] 일부 구현예에서, LPMP는 리포플렉스, 리포좀, 지질 나노입자, 중합체 기반 담체, 엑소좀, 층상체, 미셀, 및 유화액으로 이루어진 군으로부터 선택된 친유성 모이어티이다. 일 구현예에서, LPMP는 양이온성 리포좀, 나노리포좀, 프로테오리포좀, 단층 리포좀, 다층 리포좀, 세라마이드 함유 나노리포좀, 및 다포성 리포좀으로 이루어진 군으로부터 선택된 리포좀이다. 일 구현예에서, LPMP는 지질 나노입자이다.

[0075] 일부 구현예에서, LPMP의 크기는 약 200nm 미만이다. 일 구현예에서, LPMP의 크기는 약 150nm 미만이다. 일 구현예에서, LPMP의 크기는 약 100nm 미만이다. 일 구현예에서, LPMP의 크기는 약 55nm 내지 약 80nm이다.

[0076] 일부 구현예에서, mRNA 치료 조성물은 약 50:1 내지 약 10:1의 총 지질:폴리뉴클레오티드 중량비를 갖는다. 일 구현예에서, mRNA 치료 조성물은 약 44:1 내지 약 24:1의 총 지질:폴리뉴클레오티드 중량비를 갖는다. 일 구현예에서, mRNA 치료 조성물은 약 40:1 내지 약 28:1의 총 지질:폴리뉴클레오티드 중량비를 갖는다. 일 구현예에서, mRNA 치료 조성물은 약 38:1 내지 약 30:1의 총 지질:폴리뉴클레오티드 중량비를 갖는다. 일 구현예에서, mRNA 치료 조성물은 약 37:1 내지 약 33:1의 총 지질:폴리뉴클레오티드 중량비를 갖는다.

[0077] 일부 구현예에서, mRNA 치료 조성물, 예를 들어 수성상은 HEPES 또는 TRIS 완충액을 추가로 포함한다. HEPES 또는 TRIS 완충액의 pH는 약 7.0 내지 약 8.5일 수 있다. HEPES 또는 TRIS 완충액의 농도는 약 7mg/mL 내지 약 15mg/mL일 수 있다. 수성상은 약 2.0mg/mL 내지 약 4.0mg/mL의 NaCl을 추가로 포함할 수 있다.

[0078] 일부 구현예에서, mRNA 치료 조성물, 예를 들어 수성상은 물, PBS, 또는 구연산염 완충액을 포함한다. 일 구현예에서, 수성상은 pH가 약 3.2인 구연산염 완충액을 포함한다.

[0079] 일부 구현예에서, 수성상 및 지질 용액은 3:1 부피비로 혼합된다.

[0080] 일부 구현예에서, mRNA 치료 조성물은 하나 이상의 동결보호제를 추가로 포함한다. 하나 이상의 동결보호제는 수크로오스, 글리세롤, 또는 이들의 조합일 수 있다. 일 구현예에서, mRNA 치료 조성물은 약 70mg/mL 내지 약 110mg/mL 농도의 수크로오스 및 약 50mg/mL 내지 약 70mg/mL 농도의 글리세롤의 조합을 포함한다.

[0081] 일부 구현예에서, mRNA 치료 조성물은 동결건조된 조성물이다. 동결건조된 mRNA 치료 조성물은 하나 이상의 동결보호제를 포함할 수 있다. 동결건조된 mRNA 치료 조성물은 폴록사머, 소르브산칼륨, 수크로오스, 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 일 구현예에서, 동결건조된 mRNA 치료 조성물은 폴록사머, 예를 들어 폴록사머 188을 포함한다.

[0082] 일부 구현예에서, mRNA 치료 조성물은 동결건조된 조성물이다. 일 구현예에서, 동결건조된 mRNA 치료 조성물은 약 0.01 내지 약 1.0% w/w의 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일 구현예에서, 동결건조된 mRNA 치료 조성물은 약 1.0 내지 약 5.0% w/w의 지질을 포함한다. 일 구현예에서, 동결건조된 mRNA 치료 조성물은 약 0.5 내지 약 2.5% w/w의 TRIS 완충액을 포함한다. 일 구현예에서, 동결건조된 mRNA 치료 조성물은 약 0.75 내지 약 2.75% w/w의 NaCl을 포함한다. 일 구현예에서, 동결건조된 mRNA 치료 조성물은 약 85 내지 약 95% w/w의 당, 예를 들어 수크로오스 포함한다. 일 구현예에서, 동결건조된 mRNA 치료 조성물은 약 0.01 내지 약 1.0% w/w의 폴록사머, 예를 들어 폴록사머 188을 포함한다. 일 구현예에서, 동결건조된 mRNA 치료 조성물은 약 1.0 내지 약 5.0% w/w의 소르브산칼륨을 포함한다.

[0083] 또 다른 양태에서, 대상체에서 mRNA 치료제를 전달하는 방법이 본원에 제공되며, 상기 방법은 본 발명의 상기 양태에서 논의된 mRNA 치료 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0084] 또 다른 양태에서, 대상체에서 면역 반응을 유도하는 방법이 본원에 제공되며, 상기 방법은 본 발명의 상기 양태에서 논의된 mRNA 치료 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0085] 또 다른 양태에서, 대상체에서 암을 치료 또는 예방하는 방법이 본원에 제공되며, 상기 방법은 본 발명의 상기 양태에서 논의된 mRNA 치료 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0086] mRNA 치료제를 전달하는 방법, 면역 반응을 유도하는 방법, 및 암을 치료 또는 예방하는 방법에 관한 본 발명의 이들 양태에서, mRNA 치료 조성물은 경구, 정맥내, 피내, 근육내, 비강내, 안구내, 또는 직장 및/또는 피하 투여에 의해 투여될 수 있다. 소정의 구현예에서, mRNA 치료 조성물은 경구, 정맥내, 근육내, 및/또는 피하 투여에 의해 투여된다.

[0087] 일부 구현예에서, mRNA 치료 조성물은 약 0.001mg/kg 내지 약 0.5mg/kg(예를 들어, 약 0.005mg/kg 내지 약 0.5mg, 약 0.006mg/kg 내지 약 0.5mg/kg, 또는 0.01mg/kg 내지 약 0.4mg/kg)의 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)를 대상체에게 전달하기에 충분한 투여량 수준으로 투여된다. 일부 구현예에서, mRNA 치료 조성물은 약 0.006mg/kg, 약 0.01mg/kg, 약 0.02mg/kg, 약 0.03mg/kg, 약 0.04mg/kg, 약 0.05mg/kg, 약 0.06mg/kg, 약 0.07mg/kg, 약 0.08mg/kg, 약 0.09mg/kg, 약 0.1mg/kg, 약 0.2mg/kg, 약 0.3mg/kg, 또는 약 0.4mg/kg의 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)를 대상체에게 전달하기에 충분한 투여량 수준으로 투여된다. 일부 구현예에서, mRNA 치료 조성물은 약 0.0001mg/kg 내지 약 0.0005mg/kg(예를 들어, 약 0.0003mg/kg 내지 약 0.002mg/kg)의 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)를 대상체에게 전달하기에 충분한 투여량 수준으로 투여된다.

[0088] 일부 구현예에서, mRNA 치료 조성물은 대상체에게 1회, 2회, 3회, 4회, 또는 그 이상 투여된다. 일부 구현예에서, mRNA 치료 조성물은 대상체에게 1회 또는 2회 투여된다. 일부 구현예에서, mRNA 치료 조성물은 대상체에게 4회 투여된다.

[0089] 일부 구현예에서, 방법은 추가 치료제를 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다.

[0090] 일부 구현예에서, 추가 치료제는 항암 치료제이다.

[0091] 일부 구현예에서, 추가 치료제는 면역원성 치료제이다.

[0092] 일부 구현예에서, 추가 치료제는 신호 전달 치료제이다.

[0093] 일부 구현예에서, 추가 치료제는 만성 통증을 치료 및/또는 예방하는 치료제이다. 일 구현예에서, 추가 치료제는 부프레노르핀과 같은 오피오이드 진통제, 멜록시캄 SR과 같은 비스테로이드성 항염증제(NSAID), 또는 이들의 조합이다.

[0094] 일부 구현예에서, 추가 치료제는 mRNA 치료 조성물을 투여하기 전, 투여와 동시에, 또는 투여한 후에 투여된다.

[0095] ***정의***

[0096] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "유효량", "유효 농도", 또는 "유효한 농도"는 표적 유기체 내 또는 표적 유기체에 대하여, 인용된 결과에 영향을 미치거나 표적 수준(예를 들어, 미리 결정된 수준 또는 임계 수준)에 도달하기에 충분한 LPMP 또는 핵산 조성물의 양을 지칭한다.

[0097] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "치료제"는 동물, 예를 들어 포유동물(예를 들어, 인간), 동물 병원균, 또는 병원균 벡터, 예컨대 항진균제, 항균제, 바이러스 박멸제, 항바이러스제, 살충제(insecticidal agent 또는 nematicidal agent), 구충제, 또는 곤충 기피제에 작용할 수 있는 제제를 지칭한다.

[0098] 본원에서 정의된 바와 같이, 용어 "핵산" 및 "폴리뉴클레오티드"는 상호 교환 가능하며, 길이(예를 들어, 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 150, 200, 250, 500, 1000, 또는 그 이상의 핵산)에 관계없이 선형 또는 분지형, 단일 또는 이중 가닥, 또는 이들의 하이브리드인 RNA 또는 DNA를 지칭한다. 상기 용어는 또한 RNA/DNA 하이브리드를 포함한다. 뉴클레오티드는 통상적으로 포스포디에스테르 결합에 의해 핵산에 연결되지만, 용어 "핵산"은 또한 다른 유형의 결합 또는 골격(예를 들어, 무엇보다도, 포스포라미드, 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, O-메틸포스포로아미데이트, 모르폴리노, 잠김 핵산(LNA), 글리세롤 핵산(GNA), 트레오스 핵산(TNA), 및 펩티드 핵산(PNA) 결합 또는 골격)을 갖는 핵산 유사체를 포함한다. 핵산은 단일 가닥, 이중 가닥일 수 있거나, 단일 가닥 서열 및 이중 가닥 서열 둘 모두의 일부분을 함유할 수 있다. 핵산은 데옥시리보뉴클레오티드 및 리보뉴클레오티드의 임의의 조합뿐만 아니라, 예를 들어 아데닌, 티민, 시토신, 구아닌, 우라실, 및 변형 또는 비-정규 염기(예를 들어, 하이포크산틴, 크산틴, 7-메틸구아닌, 5,6-디하이드로우라실, 5-메틸시토신, 및 5-하이드록시메틸시토신을 포함함)를 포함하는 염기의 임의의 조합을 함유할 수 있다.

[0099] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "펩티드", "단백질," 또는 "폴리펩티드"는 길이(예를 들어, 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 40, 50, 100, 또는 그 이상의 아미노산), 번역 후 변형(예를 들어, 당질화 또는 인산화)의 여부, 또는, 예를 들어, 펩티드에 공유 결합되고, 예를 들어, 천연 단백질, 합성 또는 재조합 폴리펩티드 및 펩티드, 하이브리드 분자, 펩토이드, 또는 펩티드모방체를 포함하는 하나 이상의 비-아미노 아실기(예를 들어, 당, 지질 등)의 존재와 관계없이, 자연 발생 또는 비자연 발생 아미노산(D-아미노산 또는 L-아미노산)의 임의의 사슬을 포함한다.

[0100] 본원에서 사용되는 바와 같이, 2개의 서열 사이의 "백분율 동일성"은 BLAST 2.0 알고리즘에 의해 결정되고, 이는 Altschul 등(1990) *J. Mol. Biol.* 215:403~410에 기술되어 있다. BLAST 분석을 수행하기 위한 소프트웨어는 NCBI(National Center for Biotechnology Information)를 통해 공개적으로 이용 가능하다.

[0101] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "식물"은 전체 식물, 식물 기관, 식물 조직, 종자, 식물 세포, 종자 및 이들의 자손을 지칭한다. 식물 세포는, 제한 없이, 씨앗, 현탁액 배양물, 배아, 분열 영역, 캘러스 조직, 잎, 뿌리, 새싹, 배우체, 포자체, 화분, 및 미세포자로부터의 세포를 포함한다. 식물 부분은 다음을 포함하지만 이에 한정되지 않는 분화된 조직 및 미분화된 조직을 포함한다: 뿌리, 줄기, 새싹, 잎, 화분, 씨앗, 과일, 수확된 농산물, 종양 조직, 수액(예를 들어, 목부수액 및 사부수액), 및 다양한 형태의 세포 및 배양물(예를 들어, 단일 세포, 원형질체, 배아, 및 캘러스 조직). 식물 조직은 식물 또는 식물 기관, 조직, 또는 세포 배양물 내에 존재할 수 있다.

[0102] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "변형된 PMP" 또는 "변형된 LPMP"는, 미변형된 PMP 또는 LPMP에 비해 PMP 또는 LPMP 또는 이들의 일부 또는 구성물질의 세포 흡수(예를 들어, 동물 세포 흡수, 식물 세포 흡수, 박테리아 세포 흡수, 또는 진균 세포 흡수)를 증가시킬 수 있고; PMP 또는 LPMP에 의한 이종 작용제(예를 들어, 농업용 또는 치료제)의 세포로의 전달을 가능하게 하거나 증가시킬 수 있고/있거나, 이종 작용제(예를 들어, 농업용 또는 치료제)의 로딩(예를 들어, 로딩 효율 또는 로딩 용량)을 가능하게 하거나 증가시킬 수 있는 하나 이상의 이종 제제(예를 들어, 하나 이상의 외인성 지질, 예컨대 이온화 가능 지질, 예를 들어, 이온화 가능 지질 및 스테롤 및/또는 페길화된 지질을 포함하는 PMP 또는 LPMP)를 포함하는 복수의 PMP 또는 LPMP를 포함하는 조성물을 지칭한다. PMP 또는 LPMP는 시험관 내 또는 생체 내에서 변형될 수 있다.

[0103] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "미변형된 PMP" 또는 "미변형된 LPMP"는 PMP의 세포 흡수(예를 들어, 동물 세포 흡수, 식물 세포 흡수, 박테리아 세포 흡수, 또는 진균 세포 흡수)를 증가시킬 수 있는 이종 세포 흡수제가 결여된 복수의 PMP 또는 LPMP를 포함하는 조성물을 지칭한다.

[0104] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "세포 흡수"는 동물 세포, 식물 세포, 박테리아 세포, 또는 진균 세포와 같

은 세포에 의한 PMP 또는 LPMP 또는 이들의 일부 또는 구성성분(예를 들어, PMP 또는 LPMP에 의해 운반되는 폴리뉴클레오티드)의 흡수를 지칭한다. 예를 들어, 흡수는 세포외 환경으로부터, 세포막, 세포벽, 세포외 기질 내로 또는 이에 걸쳐, 또는 세포의 세포내 환경 내로 PMP(예를 들어, LPMP) 또는 이의 구성성분의 일부를 전달하는 것을 포함할 수 있다. PMP(예를 들어, LPMP)의 세포 흡수는 활성 또는 수동 세포 메커니즘을 통해 발생할 수 있다. 세포 흡수는 전체 PMP(예를 들어, LPMP)가 세포에 의해 흡수되는, 예를 들어 세포내이입에 의해 흡수되는 양태를 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 폴리뉴클레오티드는 세포내이입 및 엔도솜 탈출 후에 표적 세포의 세포질에 노출된다. 일부 구현예에서, 변형된 LPMP(예를 들어, 이온화 가능 지질을 포함하는 LPMP, 예를 들어, 이온화 가능 지질 및 스테롤 및/또는 PEG화된 지질을 포함하는 LPMP)는 미변형된 LPMP에 비해 증가된 엔도솜 탈출률을 갖는다. 또한 세포 흡수는 PMP(예를 들어, LPMP)가 표적 세포의 막과 융합되는 양태를 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 폴리뉴클레오티드는 막 융합 후에 표적 세포의 세포질에 노출된다. 일부 구현예에서, LPMP는 미변형된 LPMP에 비해, 증가된 표적 세포의 막과의 융합율을 갖는다(예를 들어, 보다 융합성임).

[0105] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "세포 투과제"는 제제와 접촉하지 않은 세포에 비해, 증가된 세포 흡수를 촉진하는 방식으로 세포(예를 들어, 동물 세포, 식물 세포, 박테리아 세포, 또는 진균 세포)의 세포 벽, 세포외 기질, 또는 세포막의 특성(예를 들어, 투과성)을 변경하는 제제를 지칭한다.

[0106] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "식물 세포외 소포", "식물 EV", 또는 "EV"는 식물에서 자연적으로 발생하는 밀폐된 지질-이중층 구조를 지칭한다. 임의적으로, 식물 EV는 하나 이상의 식물 EV 마커를 포함한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "식물 EV 마커"는 부록에 열거된 식물 EV 마커 중 어느 하나를 포함하지만 이에 한정되지 않는, 식물 단백질, 식물 핵산, 식물 소분자, 식물 지질, 또는 이들의 조합과 같은 식물과 자연적으로 연관된 성분을 지칭한다. 일부 경우에, 식물 EV 마커는 식물 EV의 식별 마커이지만 살충제는 아니다. 일부 경우에, 식물 EV 마커는 식물 EV 및 또한 살충제(예를 들어, 복수의 PMP 또는 LPMP와 연관되거나 이에 의해 캡슐화되거나, 복수의 PMP 또는 LPMP와 직접 연관되거나 이에 의해 캡슐화되지 않음)의 식별 마커이다.

[0107] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "식물 전령 팩" 또는 "PMP"는, 식물 공급원 또는 분절, 부분, 또는 이의 추출물과 연관되고 식물, 식물 부분, 또는 식물 세포로부터 농축, 단리 또는 정제된 지질 또는 비지질 성분(예를 들어, 펩티드, 핵산, 또는 소분자)을 포함하되 농축 또는 단리가 하나 이상의 오염물 또는 원치 않는 성분을 공급원 식물로부터 제거하는, 식물 공급원 또는 분절, 부분, 또는 이의 추출물로부터 유래(예를 들어, 이로부터 농축, 단리, 또는 정제됨)되고 직경이 약 5~2000nm(예를 들어, 적어도 5~1000nm, 적어도 5~500nm, 적어도 400~500nm, 적어도 25~250nm, 적어도 50~150nm, 또는 적어도 70~120nm)인 지질 구조(예를 들어, 지질 이중층, 단층 구조, 다층 구조; 예를 들어, 소포성 지질 구조)를 지칭한다. PMP는 자연 발생 EV의 고도로 정제된 제제일 수 있다. 바람직하게는, 공급원 식물의 오염물 또는 원치 않는 성분 중 적어도 1%가 제거된다(예를 들어, 공급원 식물, 예를 들어, 식물 세포 벽 성분; 펙틴; 식물 소기관(예를 들어, 미토콘드리아; 엽록체, 백색체, 또는 녹말체와 같은 색소체; 및 핵); 식물 염색질(예를 들어, 식물 염색체); 또는 식물 분자 응집체(예를 들어, 단백질 응집체, 단백질-핵산 응집체, 지단백질 응집체, 또는 지질-단백질 구조)의 하나 이상의 오염물 또는 원치 않는 성분 중 적어도 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 98%, 99%, 또는 100%). 바람직하게는, PMP는 중량(w/w), 스펙트럼 영상화(투과율(%)), 또는 전도도(S/m)에 의해 측정 시, 공급원 식물의 하나 이상의 오염물 또는 원치 않는 성분에 비해, 적어도 30% 순수(예를 들어, 적어도 40% 순수, 적어도 50% 순수, 적어도 60% 순수, 적어도 70% 순수, 적어도 80% 순수, 적어도 90% 순수, 적어도 99% 순수, 또는 100% 순수)하다.

[0108] 지질 재구성된 PMP(LPMP)가 본원에서 사용된다. 용어 "지질 재구성된 PMP" 및 "LPMP"는 식물 공급원으로부터 유래(예를 들어, 이로부터 농축, 단리, 또는 정제)된 지질 구조(예를 들어, 지질 이중층, 단층 구조, 다층 구조; 예를 들어, 소포성 지질 구조)로부터 유래된 PMP를 지칭하되, 지질 구조는 파괴(예를 들어, 지질 추출에 의해 파괴됨)되고, 표준 방법을 사용하여 액상(예를 들어, 물질을 함유하는 액상)에서 재조합되거나 재구성, 예를 들어, 지질 막 수화 및/또는 용매 주입을 포함하는 방법에 의해 재구성되어 본원에 기술된 바와 같은 LPMP를 생산한다. 상기 방법은, 원하는 경우, 초음파 처리, 동결/해동 처리, 및/또는 지질 압출을 추가로 포함하여, 예를 들어, 재구성된 LPMP의 크기를 감소시킬 수 있다. 대안적으로, LPMP는 미세유체 장치(예컨대 NanoAssemblr® IGNITE™ 미세유체 기기(Precision NanoSystems))를 사용하여 생산될 수 있다.

[0109] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "양이온성 지질"은 양이온성 기(예를 들어, 양이온성 헤드 기)를 함유하는, 양으로 하전된 양친매성 분자(예를 들어, 지질 또는 리피도이드)를 지칭한다.

[0110] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "이온화 가능 지질"은 주어진 조건(예를 들어, pH) 하에서, 이온화, 예를

들어, 해리되어 하나 이상의 전하를 띤 종을 생산할 수 있는 기(예를 들어, 헤드 기)를 함유하는 양친매성 분자(예를 들어, 지질 또는 리피도이드, 예를 들어, 합성 지질 또는 리피도이드)를 지칭한다. 예를 들어, 이온화 가능 지질은 생리학적 pH(예를 들어, 약 7.0의 pH)와 같은 선택된 pH에서 순양전하를 운반할 수 있다. 이러한 시나리오 하에서, 하전된 기(예를 들어, 양으로 하전된 지질, 즉 양이온성 지질)를 함유하는 분자는 이온화 가능 지질로서 간주될 수 있다.

[0111] 놀랍게도, 다수의 불포화 부위, 예를 들어, 적어도 2개 또는 3개의 불포화 부위를 갖는 알킬 사슬을 포함하는 이온화 가능 지질이 막 유동성이 증가된 지질 입자를 형성하는 데 특히 유용하다는 것이 밝혀졌다. 본원에 사용하기에 적합한 다수의 이온화 가능 지질 및 관련 유사체는 미국 특허 공개 제20060083780호 및 제20060240554호; 미국 특허 제5,208,036호; 제5,264,618호; 제5,279,833호; 제5,283,185호; 제5,753,613호; 및 제5,785,992호; 및 PCT 공개 WO 96/10390에 기술되어 있으며, 동 문헌의 개시 내용은 모든 목적을 위해 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

[0112] 일부 구현예에서, 이온화 가능 지질은 해리되어 pH에 따라 양전하 형태로 존재할 수 있도록 이온화될 수 있다. 이온화 가능 지질의 이온화는 상이한 pH 조건 하에서 이온화 가능 지질을 포함하는 지질 나노입자의 표면 전하에 영향을 미친다. 지질 나노입자의 표면 전하는 궁극적으로, 지질 나노입자의 혈장 단백질 흡수, 혈액 제거, 및 조직 분포(Semple, S.C., 등, Adv. Drug Deliv Rev 32:3~17(1998))에 영향을 미칠 수 있을 뿐만 아니라 핵산의 세포내 전달에 영향을 미칠 수 있는 체내 분해성 비-이중층 구조(Hafez, I.M., 등, Gene Ther 8: 1188~1196(2001))를 형성하는 지질 나노입자의 능력에 영향을 미칠 수 있다.

[0113] 일부 구현예에서, 이온화 가능 지질은, 예를 들어 생리학적 pH(예를 들어, pH 약 7)에서 일반적으로 중성이지만, 산성 pH 또는 염기성 pH에서 순 전하(들)를 운반할 수 있는 것들이다. 일 구현예에서, 이온화 가능 지질은 일반적으로 pH 약 7에서 중성이지만, 산성 pH에서 순 전하(들)를 운반할 수 있는 것들이다. 일 구현예에서, 이온화 가능 지질은 일반적으로 pH 약 7에서 중성이지만, 염기성 pH에서 순 전하(들)를 운반할 수 있는 것들이다.

[0114] 일부 구현예에서, 이온화 가능 지질은 일반적으로 생리학적 pH(예를 들어, pH 약 7)에서 순 전하(들)를 운반하는 양이온성 지질 또는 음이온성 지질을 포함하지 않는다.

[0115] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "리피도이드(lipidoid)"는 하나 이상의 지질 특성을 갖는 분자를 지칭한다.

[0116] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "안정한 LPMP 제형"은 일정 기간(예를 들어, 적어도 24시간, 적어도 48시간, 적어도 1주일, 적어도 2주일, 적어도 3주일, 적어도 4주일, 적어도 30일, 적어도 60일, 또는 적어도 90일)에 걸쳐, 임의로 정의된 온도 범위(예를 들어, 적어도 24℃의 온도(예를 들어, 적어도 24℃, 25℃, 26℃, 27℃, 28℃, 29℃, 또는 30℃), 적어도 20℃(예를 들어, 적어도 20℃, 21℃, 22℃, 또는 23℃), 적어도 4℃(예를 들어, 적어도 5℃, 10℃, 또는 15℃), 적어도 -20℃(예를 들어, 적어도 -20℃, -15℃, -10℃, -5℃, 또는 0℃), 또는 -80℃(예를 들어, 적어도 -80℃, -70℃, -60℃, -50℃, -40℃, 또는 -30℃))에서 LPMP 제형 내 LPMP의 수 (예를 들어, 생산 또는 제형화 시) 대비, 초기 LPMP(예를 들어, 용액의 mL 당 LPMP)의 수의 적어도 5%(예를 들어, 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100%)를 유지하거나; 임의로 정의된 온도 범위(예를 들어, 적어도 24℃의 온도(예를 들어, 적어도 24℃, 25℃, 26℃, 27℃, 28℃, 29℃, 또는 30℃), 적어도 20℃(예를 들어, 적어도 20℃, 21℃, 22℃, 또는 23℃), 적어도 4℃(예를 들어, 적어도 5℃, 10℃, 또는 15℃), 적어도 -20℃(예를 들어, 적어도 -20℃, -15℃, -10℃, -5℃, 또는 0℃), 또는 -80℃(예를 들어, 적어도 -80℃, -70℃, -60℃, -50℃, -40℃, 또는 -30℃))에서 LPMP의 (예를 들어, 생산 또는 제형화 시) 초기 활성 대비, LPMP의 활성(예를 들어, 세포 벽 투과 활성 및/또는 LPMP 내 제형화된 mRNA의 활성)의 적어도 5%(예를 들어, 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100%)를 유지하는 LPMP 조성물을 지칭한다.

도면의 간단한 설명

[0117] 도 1은 레몬으로부터 유래되고 Cre 재조합효소 mRNA를 포함하는 재구성된 LPMP(recPMP)로 경구 치료한 Ai9(Tomato 레드 loxP) 마우스의 혈청 중 pg/mL 단위의 에리스로포이에틴(EPO)의 수준을 보여주는 사진 및 막대 그래프이다. 사진은 마우스 내 마커의 형광을 보여준다.

도 2는 레몬으로부터 유래되고 CRE 재조합효소 mRNA를 포함하는 recLPMP; 지질 나노입자(LNP) 대조군; 또는 인산염 완충 식염수(PBS) 대조군으로 치료한 Ai9(Tomato 레드 loxP) 마우스의 비장으로부터 형질감염된 생체 내

면역 세포(CD-4 세포, CD-8 세포, 또는 B 세포)의 백분율을 보여주는 막대 그래프이다.

도 3a는 실시예 2의 지질 나노입자(LNP) 및 재구성된 LPMP(recPMP)의 크기(nm) 및 다분산성 지수(PDI)를 보여주는 막대 그래프이다. 도 3b는 실시예 2의 LNP 및 recPMP의 RNA 물질의 캡슐화 효율 백분율을 보여주는 막대 그래프이다.

도 4는 시노몰구스 마카크 원숭이에서 에리스로포이에틴(EPO) mRNA를 포함하는 재구성된 레몬 LPMP를 반복 투여한 후 혈청에서 EPO의 발현을 보여주는 그래프이다. 재구성된 레몬 LPMP는 1일 차에 0.1mg/kg의 투여량으로, 그리고 8일 차에 0.05mg/kg의 투여량으로 근육내(IM) 투여하였다. 투여 전 및 투여 후 6시간, 12시간, 및 24시간 차의 인간 에리스로포이에틴(hEPO)의 농도가 도시되어 있다.

도 5는 시노몰구스 마카크 원숭이에서 EPO mRNA를 포함하는 재구성된 레몬 LPMP를 반복 투여한 후 혈청에서 EPO의 발현을 보여주는 그래프이다. 재구성된 레몬 LPMP는 1일 차에 0.1mg/kg; 8일 차에 0.05mg/kg; 및 15일 차에 0.05mg/kg의 투여량으로 IM 투여하였다. 투여 전 및 투여 후 6시간, 12시간, 및 24시간 차의 hEPO의 농도가 도시되어 있다. 2차 및 3차 투여 전에 동물의 50%가 0.2mg/kg의 부프레노르핀 및 멜록시캄 SR(IV 주사)로 예비 투약되었다.

도 6은 시노몰구스 마카크 원숭이에서 EPO mRNA를 포함하는 재구성된 레몬 LPMP를 반복 투여한 후 혈청에서 EPO의 발현을 보여주는 그래프이다. 재구성된 레몬 LPMP는 1일 차에 0.1mg/kg; 8일 차에 0.05mg/kg; 및 15일 차에 0.01mg/kg의 투여량으로 IM 투여하였다. 투여 전 및 투여 후 6시간, 12시간, 및 24시간 차의 hEPO의 농도가 도시되어 있다. 2차 투여 전에 동물의 50%가 0.2mg/kg의 부프레노르핀 및 멜록시캄 SR(IV 주사)로 예비 투약되었고, 3차 투여 전에 동물의 90%가 예비 투약되었다.

도 7은 시노몰구스 마카크 원숭이에서 EPO mRNA를 포함하는 재구성된 레몬 LPMP를 반복 투여한 후 혈청에서 EPO의 발현을 보여주는 그래프이다. 재구성된 레몬 LPMP는 1일 차에 0.1mg/kg; 8일 차에 0.05mg/kg; 및 15일 차에 0.01mg/kg의 투여량으로 피하(SubQ) 투여하였다. 투여 전 및 투여 후 6시간, 12시간, 및 24시간 차의 hEPO의 농도가 도시되어 있다. 2차 투여 전에 동물의 50%가 0.2mg/kg의 부프레노르핀 및 멜록시캄 SR(IV 주사)로 예비 투약되었고, 3차 투여 전에 동물의 90%가 예비 투약되었다.

도 8은 시노몰구스 마카크 원숭이에서 EPO mRNA를 포함하는 재구성된 레몬 LPMP를 반복 투여한 후 혈청에서 EPO의 발현을 보여주는 그래프이다. 재구성된 레몬 LPMP는 1일 차에 0.1mg/kg; 8일 차에 0.05mg/kg; 및 15일 차에 0.05mg/kg의 투여량으로 SubQ 투여하였다. 투여 전 및 투여 후 6시간, 12시간, 및 24시간 차의 hEPO의 농도가 도시되어 있다. 2차 및 3차 투여 전에 동물의 50%가 0.2mg/kg의 부프레노르핀 및 멜록시캄 SR(IV 주사)로 예비 투약되었다.

도 9는 EPO mRNA를 포함하는 재구성된 레몬 LPMP를 마우스에게 경구 전달한 후 혈청에서 EPO의 발현을 보여주는 막대 그래프이다.

도 10은 Cre 재조합효소를 포함하는 재구성된 레몬 LPMP를 정맥내 투여(IV)하여 치료한 Tomato 레드 loxP 마우스 세포의 비장세포, 폐 세포, 및 골수 세포(순환 면역 세포 및 전구 세포)의 부모 집단에서 Tomato 레드 양성 세포(생체 내에서 형질감염된 면역 세포)의 빈도를 보여주는 막대 그래프 세트이다.

도 11은 GFP mRNA를 포함하는 재구성된 레몬 LPMP를 근육내 투여(IM; 상단 패널) 또는 피하 투여(SubQ; 하단 패널)하여 치료한 시노몰구스 마카크 원숭이에서 GFP-양성 면역 세포(CD4 T 세포, CD8 T 세포, 및 B 세포)의 백분율을 보여주는 한 쌍의 막대 그래프이다.

도 12a는 5μg의 recLemon LPMP/IL-2 mRNA 제형의 1차 및 2차 종양주위 투여 후, 마우스에서 MC38 종양 세포의 이식 후 며칠에 측정된 종양 부피를 보여준다. 도 12b는 recLemon LPMP/IL-2 mRNA 제형의 모든 4회 종양주위 투여 후, 마우스에서 MC38 종양 세포의 이식 후 며칠에 측정된 종양 부피를 보여준다. 도 12c는 완충액을 투여받은 마우스의 생존율 감소와 함께, recLemon LPMP/IL-2 mRNA 제형의 모든 4회 종양주위 투여 후, MC38 종양 세포의 이식 후 며칠의 마우스의 생존율을 보여준다.

도 13a는 5μg의 recLemon LPMP/IL-2 mRNA 제형 투여량의 4차 종양주위 투여 후 4시간 차의 마우스의 혈청 내 IL-2의 수준을 보여준다. 도 13b 내지 도 13g는 5μg의 recLemon LPMP/IL-2 mRNA 제형 투여량의 4차 종양주위 투여 후 4시간 차의 마우스의 혈청 내 IL4(도 13b), IL5(도 13c), IFNγ(도 13d), TNFα(도 13e), IL6(도 13f), 및 CXCL1(KC)(도 13g)의 수준을 보여준다.

도 14a 내지 도 14c는 5μg의 recLemon LPMP/IL-2 mRNA 제형 투여량의 2차 종양주위 투여 후 48시간 차의 마우

스의 혈청 내 IL6(도 14a), IFNɣ(도 14b), 및 TNFα(도 14c)의 수준을 보여준다.

도 15는 투여 후 6시간 차의 순환 인간 IL-2 수준을 보여준다. 근육내 주사; recLemon LPMP/mRNA= 0.4mg/kg(10μg의 IL-2와 동일); N = 투여 후 6시간에 대해 그룹 당 9마리 마우스 및 투여 후 2일에 대해 그룹 당 6마리 마우스.

도 16a 및 도 16b는 투여 후 6시간 차의 순환 항종양 사이토카인의 수준(도 16a) 및 투여 후 2일 차의 순환 항종양 사이토카인의 수준을 보여준다(도 16b). 근육내 주사; recLemon LPMP/mRNA= 0.4mg/kg(10μg의 IL-2와 동일); N = 투여 후 6시간에 대해 그룹 당 9마리 마우스 및 투여 후 2일에 대해 그룹 당 6마리 마우스.

도 17은 투여 후 6일 차의 T 세포 프로파일을 보여준다. 그래프는 recLemon LPMP/IL-2 mRNA 제형의 단일 투여량이 강력하며, 투여 후 6일 동안 지속되는 지속적인 T 세포 효과를 유도하였음을 보여준다. 근육내 주사; 0.4mg/kg의 recLemon LPMP/mRNA(10μg의 IL-2와 동일); N = 그룹 당 3마리 마우스.

도 18은 투여 후 IL-15 혈청 농도를 보여준다. 그래프는 전신 효과를 보여준다: recLemon LPMP/IL-15 mRNA 제형의 단일 근육내 투여량은 투여 후 최대 72시간까지 전신 단백질 수준을 증가시켰다. 근육내 주사; 0.4mg/kg의 recLemon LPMP/mRNA(10μg의 IL-15와 동일); N = 그룹 당 3마리 마우스.

도 19는 투여 후 6일 차에 혈중 사이토카인 및 T 세포 프로파일을 보여준다. 그래프는 사이토카인 효과를 보여준다: recLemon LPMP/IL-15 mRNA 제형의 단일 근육내 투여량은 투여 후 6일 차에 혈액에서 IFNɣ를 생성하는 T 세포의 빈도를 더 높였다. 근육내 주사; recLemon LPMP/mRNA = 0.4mg/kg(10μg의 IL-15와 동일); N = 그룹 당 3마리 마우스.

도 20은 투여 후 6일 차의 비장에서의 T 세포 프로파일을 보여준다. 그래프는 세포 효과를 보여준다: recLemon LPMP/IL-15 mRNA 제형의 단일 근육내 투여량은 투여 후 6일 차에 비장에서 T 세포 및 NK 세포의 수를 증가시켰다. 근육내 주사; recLemon LPMP/mRNA = 0.4mg/kg(10μg의 IL-15와 동일); N = 그룹 당 3마리 마우스.

도 21a 및 도 21b는 투여 후 4시간, 6시간, 24시간, 48시간, 및 72시간 차의 혈중 사이토카인/케모카인을 보여준다. 그래프는 사이토카인 효과를 보여준다: recLemon LPMP/IL-15 mRNA 제형의 단일 근육내 투여량은 투여 후 24시간 이내에 마우스의 혈액에서 전염증성 사이토카인 및 케모카인(IL-6 및 IP-10)의 빈도를 더 높였다. 근육내 주사; recLemon LPMP/mRNA = 0.4mg/kg(10μg의 IL-15와 동일); N = 그룹 당 3마리 마우스.

도 22a 및 도 22b는 마우스에서 recLemon LPMP/mRNA 제형(IL-15)의 단일 근육내 투여량이 투여 후 10일 차에 마우스의 비장에서 NK 세포(도 22a) 및 IFNɣ+ NK 세포(도 22b)에 대한 IL-2Ra 발현을 증가시킬 수 있었음을 보여준다. 근육내 주사; recLemon LPMP/mRNA = 0.4mg/kg(10μg의 IL-15와 동일); N = 그룹 당 3마리 마우스.

도 23은 NHP에서 recLemon LPMP/mRNA 제형(IL-15)의 단일 근육내 투여량이 투여 후 24시간 차(1일)에 NHP의 혈액에서 NK 세포 및 T 세포에 대한 IL-2Ra(CD25) 발현을 증가시킬 수 있었음을 보여준다. 근육내 주사; recLemon LPMP/mRNA = 0.02mg/kg IL-15; 0.006mg/kg IL-15; 0.006mg/kg IL-2; N = 그룹 당 3마리 NHP, 대조군(N = 1) 예외.

도 24는 recLemon LPMP/mRNA 제형(IL-15)의 단일 근육내 투여량이 투여 후 24시간 차(1일)에 NHP의 혈액 내 T 세포(도 24a) 및 NK 세포(도 24b)에서 그랜자임 B/퍼포린 및 IFNɣ 발현을 증가시킬 수 있었음을 보여준다. 근육내 주사; recLemon LPMP/mRNA = 0.02mg/kg IL-15; 0.006mg/kg IL-15; 0.006mg/kg IL-2; N = 그룹 당 3마리 NHP, 대조군(N = 1) 예외.

도 25는 recLemon LPMP/mRNA 제형(IL-15 및 IL-2)의 단일 근육내 투여량이 투여 후 4일 차에 NHP의 혈액에서 T 세포 및 NK 세포 증식을 초래하였음을 보여준다. 근육내 주사; recLemon LPMP/mRNA = 0.02mg/kg IL-15; 0.006mg/kg IL-15; 0.006mg/kg IL-2; N = 그룹 당 3마리 NHP, 대조군(N = 1) 예외.

도 26은 recLemon LPMP/mRNA 제형(IL-15 및 IL-2)의 단일 근육내 투여량이 투여 후 4일 차에 NHP의 혈액 내 T 세포(도 26a) 및 NK 세포(도 26b)에서 그랜자임 B/퍼포린 및 IFNɣ 발현의 수준을 증가시켰음을 보여준다. 근육내 주사; recLemon LPMP/mRNA = 0.02mg/kg IL-15; 0.006mg/kg IL-15; 0.006mg/kg IL-2; N = 그룹 당 3마리 NHP, 대조군(N = 1) 예외.

도 27은 recLemon LPMP/mRNA 제형(IL-15)의 단일 근육내 투여량이 투여 후 4일 차에 NHP의 혈액에서 NK 세포 및 T 세포에 대한 IL-2Ra(CD25) 발현을 증가시켰음을 보여준다. 근육내 주사; recLemon LPMP/mRNA = 0.02mg/kg IL-15; 0.006mg/kg IL-15; 0.006mg/kg IL-2; N = 그룹 당 3마리 NHP, 대조군(N = 1) 예외.

도 28a 및 도 28b는 recLemon LPMP/mRNA 제형(IL-15)의 단일 근육내 투여량이 투여 후 8일 차에 NHP의 혈액 내 T 세포(도 28a) 및 NK 세포(도 28b)에서 그랜자임 B/퍼포린 및 IFNɣ 발현의 수준을 증가시켰음을 보여준다. 근육내 주사; recLemon LPMP/mRNA = 0.02mg/kg IL-15; 0.006mg/kg IL-15; 0.006mg/kg IL-2; N = 그룹 당 3마리 NHP, 대조군(N = 1) 예외.

도 29는 recLemon LPMP/mRNA 제형(IL-15 및 IL-2)의 단일 근육내 투여량이 투여 후 8일 차에 NHP의 혈액에서 NK 세포에 대한 IL-2Ra(CD25)의 수준을 증가시켰음을 보여준다. 근육내 주사; recLemon LPMP/mRNA = 0.02mg/kg IL-15; 0.006mg/kg IL-15; 0.006mg/kg IL-2; N = 그룹 당 3마리 NHP, 대조군(N = 1) 예외.

도 30은 recLemon LPMP/mRNA 제형(IL-15)의 단일 근육내 투여량이 투여 후 8일 차에 NHP의 혈액에서 T 세포 및 NK 세포 증식을 초래하였음을 보여준다. 근육내 주사; recLemon LPMP/mRNA = 0.02mg/kg IL-15; 0.006mg/kg IL-15; 0.006mg/kg IL-2; N = 그룹 당 3마리 NHP, 대조군(N = 1) 예외.

도 31은 recLemon LPMP/mRNA 제형(IL-15 및 IL-2)의 단일 근육내 투여량이 투여 후 13일 차에 NHP의 혈액에서 T 세포 및 NK 세포 증식을 초래하였음을 보여준다. 근육내 주사; recLemon LPMP/mRNA = 0.02mg/kg IL-15; 0.006mg/kg IL-15; 0.006mg/kg IL-2; N = 그룹 당 3마리 NHP, 대조군(N = 1) 예외.

도 32는 recLemon LPMP/mRNA 제형(IL-15)의 단일 근육내 투여량이 투여 후 13일 차에 NHP의 혈액에서 T 세포 및 NK 세포에 대한 IL-2Ra(CD25)의 수준을 증가시켰음을 보여준다. 근육내 주사; recLemon LPMP/mRNA = 0.02mg/kg IL-15; 0.006mg/kg IL-15; 0.006mg/kg IL-2; N = 그룹 당 3마리 NHP, 대조군(N = 1) 예외.

도 33a 및 도 33b는 recLemon LPMP/mRNA 제형의 단일 근육내 투여 후 4시간, 6시간, 24시간, 4일(96시간), 8일(192시간), 및 13일(312시간) 차에 측정된 IL-15(도 33a) 및 IL-2(도 33b)의 혈중 사이토카인 수준을 도시하는 선 그래프이다. 근육내 주사; recLemon LPMP/mRNA = 0.02mg/kg IL-15; 0.006mg/kg IL-15; 0.006mg/kg IL-2; N = 그룹 당 3마리 NHP, 대조군(N = 1) 예외.

도 34는 투여 후 13일에 걸쳐 NHP의 혈액에서, recLemon LPMP/mRNA 제형(IL-15 및 IL-2)의 단일 근육내 투여 후 미처리 대조군과 비교하여 CD56+ NK 세포의 증식을 도시하는 선 그래프이다. 근육내 주사; recLemon LPMP/mRNA = 0.02mg/kg IL-15; 0.006mg/kg IL-15; 0.006mg/kg IL-2; N = 그룹 당 3마리 NHP, 대조군(N = 1) 예외.

도 35a 내지 도 35c는 각각 투여 후 4시간, 6시간, 24시간, 4일(96시간), 8일(192시간), 및 13일(312시간) 차에 측정된, IP-10(도 35a), IFNɣ(도 35b), 및 IL-6(도 35c)을 포함하는 전염증성 사이토카인의 혈중 사이토카인 수준을 도시하는 선 그래프이다. 근육내 주사; recLemon LPMP/mRNA = 0.02mg/kg IL-15; 0.006mg/kg IL-15; 0.006mg/kg IL-2; N = 그룹 당 3마리 NHP, 대조군(N = 1) 예외.

도 36a 및 도 36b는 마우스(도 36a)와 비인간 영장류(도 36b) 간의 투여 후 6시간 차의 전신 IL-15 생산의 측정을 통한 투여량 및 동물 모델의 비교이다. 두 막대 그래프는 주어진 투여량에 기초하여 다양한 동물 모델 간에 유사한 IL-15 생산을 보여준다. 근육내 주사; recLemon LPMP/mRNA = 0.5mg/kg IL-15; 0.02mg/kg IL-15; 0.006mg/kg IL-15; N = 그룹 당 3마리의 NHP 또는 마우스.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0118] 신체의 세포 기계를 안전하게 유도하여 거의 모든 관심 암 단백질 또는 이의 단편을 생산할 수 있는 mRNA 치료 조성물(예를 들어, RNA의 핵산 암 백신, 예를 들어, mRNA)이 본원에 특징화된다. mRNA 치료 조성물은, 예를 들어, 삽입돌연변이유발 가능성의 위험 없이, 세포 및 체액 면역 둘 다를 포함하는 암에 대한 균형잡힌 면역 반응을 유도하는 데 사용될 수 있다. 이들 mRNA 치료 조성물은 하나 이상의 항원성(예를 들어, 종양 항원성) 폴리펩티드 또는 신호 전달 폴리펩티드를 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드(예를 들어, 전령 RNA(mRNA)와 같은 RNA)를 포함하고, 천연 지질 및 이온화 가능 지질을 포함하는 지질 재구성된 식물 전령 팩(LPMP) 내에 제형화된다. PMP는 식물 세포외 소포(EV), 또는 이의 분절, 부분, 또는 추출물로부터 전체적으로 또는 부분적으로 생산된 지질 조립체이다. LPMP는 지질 구조가 파괴되고 액상으로 재조립되거나 재구성되는 지질 구조로부터 유래된 PMP이다.

[0119] 또한 본 개시는 mRNA 치료 조성물을 제조하는 방법을 포함하며, 상기 방법은 이온화 가능 지질의 존재 하에 정제된 PMP 지질을 포함하는 막을 재구성하여 이온화 가능 지질을 포함하는 LPMP를 생산하는 단계, 및 하나 이상의 항원성(예를 들어, 종양 항원성) 폴리펩티드 또는 신호 전달 폴리펩티드를 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클

레오티드를 LPMP에 로딩하는 단계를 포함한다.

[0120] **지질 재구성된 식물 전령 팩(LPMP)**

[0121] *식물 전령 팩(PMP)*

[0122] PMP는 식물 EV, 또는 이의 분절, 부분, 또는 추출물(예를 들어, 지질 추출물)을 포함하는 지질(예를 들어, 지질 이중층, 단층, 또는 다층 구조) 구조이다. 식물 EV는 식물에서 자연적으로 발생하고 직경이 약 5nm 내지 2000nm인 밀폐된 지질-이중층 구조를 지칭한다. 식물 EV는 다양한 식물 생물발생 경로로부터 유래할 수 있다. 자연에서, 식물 EV는 식물 아포플라스트와 같은 식물의 세포내 및 세포외 구획, 원형질막 외부에 위치하고 세포벽의 연속체 및 세포외 공간에 의해 형성된 구획에서 발견될 수 있다. 대안적으로, PMP는 식물 세포로부터 분비 시 세포 배양 배지에서 발견되는 풍부한 식물 EV일 수 있다. 식물 EV는 식물로부터 분리될 수 있어 본원에서 추가로 설명되는 다양한 방법에 의해 PMP를 제공할 수 있다. 또한, PMP는 임의적으로 생체 내 또는 시험관 내 도입될 수 있는 치료제를 포함할 수 있다.

[0123] PMP는 식물 EV, 또는 이의 분절, 부분, 또는 추출물을 포함할 수 있다. 임의적으로, PMP는 또한 식물 EV로부터 유래된 지질 이외에 외인성 지질(예를 들어, 스테롤(예를 들어, 콜레스테롤 또는 시토스테롤), 이온화 가능 지질, 및/또는 페길화된 지질)을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 식물 EV는 직경이 약 5nm 내지 1000nm이다. 예를 들어, PMP는 평균 직경이 약 5~50nm, 약 50~100nm, 약 100~150nm, 약 150~200nm, 약 200~250nm, 약 250~300nm, 약 300~350nm, 약 350~400nm, 약 400~450nm, 약 450~500nm, 약 500~550nm, 약 550~600nm, 약 600~650nm, 약 650~700nm, 약 700~750nm, 약 750~800nm, 약 800~850nm, 약 850~900nm, 약 900~950nm, 약 950~1000nm, 약 1000~1250nm, 약 1250~1500nm, 약 1500~1750nm, 또는 약 1750~2000nm인 식물 EV, 또는 이의 분절, 부분, 또는 추출물을 포함할 수 있다. 일부 경우에, PMP는 평균 직경이 약 5~950nm, 약 5~900nm, 약 5~850nm, 약 5~800nm, 약 5~750nm, 약 5~700nm, 약 5~650nm, 약 5~600nm, 약 5~550nm, 약 5~500nm, 약 5~450nm, 약 5~400nm, 약 5~350nm, 약 5~300nm, 약 5~250nm, 약 5~200nm, 약 5~150nm, 약 5~100nm, 약 5~50nm, 또는 약 5~25nm인 식물 EV, 또는 이의 분절, 부분, 또는 추출물을 포함한다. 소정의 경우에, 식물 EV, 또는 이의 분절, 부분, 또는 추출물은 평균 직경이 약 50~200nm이다. 소정의 경우에, 식물 EV, 또는 이의 분절, 부분, 또는 추출물은 평균 직경이 약 50~300nm이다. 소정의 경우에, 식물 EV, 또는 이의 분절, 부분, 또는 추출물은 평균 직경이 약 200~500nm이다. 소정의 경우에, 식물 EV, 또는 이의 분절, 부분, 또는 추출물은 평균 직경이 약 30~150nm이다.

[0124] 일부 경우에, PMP는 평균 직경이 적어도 5nm, 적어도 50nm, 적어도 100nm, 적어도 150nm, 적어도 200nm, 적어도 250nm, 적어도 300nm, 적어도 350nm, 적어도 400nm, 적어도 450nm, 적어도 500nm, 적어도 550nm, 적어도 600nm, 적어도 650nm, 적어도 700nm, 적어도 750nm, 적어도 800nm, 적어도 850nm, 적어도 900nm, 적어도 950nm, 또는 적어도 1000nm인 식물 EV, 또는 이의 분절, 부분, 또는 추출물을 포함할 수 있다. 일부 경우에, PMP는 평균 직경이 1000nm 미만, 950nm 미만, 900nm 미만, 850nm 미만, 800nm 미만, 750nm 미만, 700nm 미만, 650nm 미만, 600nm 미만, 550nm 미만, 500nm 미만, 450nm 미만, 400nm 미만, 350nm 미만, 300nm 미만, 250nm 미만, 200nm 미만, 150nm 미만, 100nm 미만, 또는 50nm 미만인 식물 EV, 또는 이의 분절, 부분, 또는 추출물을 포함할 수 있다. 당업계의 표준인 다양한 방법(예를 들어, 동적 광 산란 방법)이 식물 EV, 또는 이의 분절, 부분 또는 추출물의 입자 직경을 측정하는 데 사용될 수 있다.

[0125] 일부 경우에, PMP는 평균 표면적이 $77nm^2$ 내지 $3.2x10^6nm^2$(예를 들어, $77~100nm^2$, $100~1000nm^2$, $1000~1x10^4nm^2$, $1x10^4-1x10^5nm^2$, $1x10^5~1x10^6nm^2$, 또는 $1x10^6~3.2x10^6nm^2$)인 식물 EV, 또는 이의 분절, 부분, 또는 추출물을 포함할 수 있다. 일부 경우에, PMP는 평균 부피가 $65nm^3$ 내지 $5.3x10^8nm^3$(예를 들어, $65~100nm^3$, $100~1000nm^3$, $1000~1x10^4nm^3$, $1x10^4-1x10^5nm^3$, $1x10^5~1x10^6nm^3$, $1x10^6~1x10^7nm^3$, $1x10^7~1x10^8nm^3$, $1x10^8~5.3x10^8nm^3$)인 식물 EV, 또는 이의 분절, 부분, 또는 추출물을 포함할 수 있다. 일부 경우에, PMP는 평균 표면적이 적어도 $77nm^2$(예를 들어, 적어도 $77nm^2$, 적어도 $100nm^2$, 적어도 $1000nm^2$, 적어도 $1x10^4nm^2$, 적어도 $1x10^5nm^2$, 적어도 $1x10^6nm^2$, 또는 적어도 $2x10^6nm^2$)인 식물 EV, 또는 이의 분절, 부분, 또는 추출물을 포함할 수 있다. 일부 경우에, PMP는 평균 부피가 적어도 65 nm^3(예를 들어, 적어도 $65nm^3$, 적어도 $100nm^3$, 적어도 $1000nm^3$, 적어도 $1x10^4nm^3$, 적어도 $1x10^5nm^3$, 적어도 $1x10^6nm^3$, 적어도 $1x10^7nm^3$, 적어도 $1x10^8nm^3$, 적어도 $2x10^8nm^3$, 적어도 $3x10^8nm^3$, 적어도

$4x10^{8}nm^{3}$, 또는 적어도 $5x10^{8}nm^{3}$)인 식물 EV, 또는 이의 분절, 부분, 또는 추출물을 포함할 수 있다.

[0126] 일부 경우에, PMP는 식물 EV, 또는 이의 분절, 추출물, 또는 부분과 동일한 크기를 가질 수 있다. 대안적으로, PMP는 PMP가 생산되는 초기 식물 EV와 상이한 크기를 가질 수 있다. 예를 들어, PMP는 직경이 약 5~2000nm인 직경을 가질 수 있다. 예를 들어, PMP는 평균이 직경이 약 5~50nm, 약 50~100nm, 약 100~150nm, 약 150~200nm, 약 200~250nm, 약 250~300nm, 약 300~350nm, 약 350~400nm, 약 400~450nm, 약 450~500nm, 약 500~550nm, 약 550~600nm, 약 600~650nm, 약 650~700nm, 약 700~750nm, 약 750~800nm, 약 800~850nm, 약 850~900nm, 약 900~950nm, 약 950~1000nm, 약 1000~1200nm, 약 1200~1400nm, 약 1400~1600nm, 약 1600~1800nm, 또는 약 1800~2000nm일 수 있다. 일부 경우에, PMP는 평균 직경이 적어도 5nm, 적어도 50nm, 적어도 100nm, 적어도 150nm, 적어도 200nm, 적어도 250nm, 적어도 300nm, 적어도 350nm, 적어도 400nm, 적어도 450nm, 적어도 500nm, 적어도 550nm, 적어도 600nm, 적어도 650nm, 적어도 700nm, 적어도 750nm, 적어도 800nm, 적어도 850nm, 적어도 900nm, 적어도 950nm, 적어도 1000nm, 적어도 1200nm, 적어도 1400nm, 적어도 1600nm, 적어도 1800nm, 또는 약 2000nm일 수 있다. 당업계의 표준인 다양한 방법(예를 들어, 동적 광 산란 방법)이 PMP의 입자 직경을 측정하는 데 사용될 수 있다. 일부 경우에, PMP의 크기는 치료제를 로딩한 후, 또는 PMP에 다른 변형이 이루어진 후에 결정된다.

[0127] 일부 경우에, PMP는 $77nm^{2}$ 내지 $1.3x10^{7}nm^{2}$(예를 들어, $77~100nm^{2}$, $100~1000nm^{2}$, $1000~1x10^{4}nm^{2}$, $1x10^{4}~1x10^{5}nm^{2}$, $1x10^{5}~1x10^{6}nm^{2}$, 또는 $1x10^{6}~1.3x10^{7}nm^{2}$)의 표면적을 가질 수 있다. 일부 경우에, PMP는 $65nm^{3}$ 내지 $4.2x10^{9}nm^{3}$(예를 들어, $65~100nm^{3}$, $100~1000nm^{3}$, $1000~1x10^{4}nm^{3}$, $1x10^{4}~1x10^{5}nm^{3}$, $1x10^{5}~1x10^{6}nm^{3}$, $1x10^{6}~1x10^{7}nm^{3}$, $1x10^{7}~1x10^{8}nm^{3}$, $1x10^{8}~1x10^{9}nm^{3}$, 또는 $1x10^{9}~4.2x10^{9}nm^{3}$)의 평균 부피를 가질 수 있다. 일부 경우에, PMP는 적어도 $77nm^{2}$(예를 들어, 적어도 $77nm^{2}$, 적어도 $100nm^{2}$, 적어도 $1000nm^{2}$, 적어도 $1x10^{4}nm^{2}$, 적어도 $1x10^{5}nm^{2}$, 적어도 $1x10^{6}nm^{2}$, 또는 적어도 $1x10^{7}nm^{2}$)의 평균 표면적을 갖는다. 일부 경우에, PMP는 적어도 $65nm^{3}$(예를 들어, 적어도 $65nm^{3}$, 적어도 $100nm^{3}$, 적어도 $1000nm^{3}$, 적어도 $1x10^{4}nm^{3}$, 적어도 $1x10^{5}nm^{3}$, 적어도 $1x10^{6}nm^{3}$, 적어도 $1x10^{7}nm^{3}$, 적어도 $1x10^{8}nm^{3}$, 적어도 $1x10^{9}nm^{3}$, 적어도 $2x10^{9}nm^{3}$, 적어도 $3x10^{9}nm^{3}$, 또는 적어도 $4x10^{9}nm^{3}$)의 평균 부피를 갖는다.

[0128] 일부 경우에, PMP는 온전한 식물 EV를 포함할 수 있다. 대안적으로, PMP는 식물 EV의 소포의 전체 표면적의 분절, 부분, 또는 추출물(예를 들어, 소포의 전체 표면적의 100% 미만(예를 들어, 90% 미만, 80% 미만, 70% 미만, 60% 미만, 50% 미만, 40% 미만, 30% 미만, 20% 미만, 10% 미만, 10% 미만, 5% 미만, 또는 1% 미만)을 포함하는 분절, 부분, 또는 추출물)을 포함할 수 있다. 분절, 부분, 또는 추출물은 원주형 분절, 구형 분절(예를 들어, 반구형), 곡선형 분절, 선형 분절, 또는 평평한 분절과 같은 임의의 형상일 수 있다. 분절이 소포의 구형 분절인 경우, 구형 분절은 한 쌍의 평행선을 따라 구형 소포를 분할함으로써 발생하는 것, 또는 한 쌍의 비평행선을 따라 구형 소포를 분할함으로써 발생하는 것을 나타낼 수 있다. 따라서, 복수의 PMP는 복수의 온전한 식물 EV, 복수의 식물 EV 분절, 부분, 또는 추출물, 또는 온전한 식물 EV와 식물 EV의 분절의 혼합물을 포함할 수 있다. 당업자는 온전한 식물 EV 대 분할된 식물 EV의 비가 사용된 특정 단리 방법에 따라 달라질 것임을 이해할 것이다. 예를 들어, 식물 또는 이의 일부를 분쇄하거나 배합하는 것은 진공 침윤과 같은 비파괴적인 추출 방법보다 높은 백분율의 식물 EV 분절, 부분, 또는 추출물을 함유하는 PMP를 생산할 수 있다.

[0129] PMP가 식물 EV의 분절, 부분, 또는 추출물을 포함하는 경우, EV 분절, 부분, 또는 추출물은 온전한 소포의 평균 표면적보다 작은 평균 표면적(예를 들어, $77nm^{2}$, $100nm^{2}$, $1000nm^{2}$, $1x10^{4}nm^{2}$, $1x10^{5}nm^{2}$, $1x10^{6}nm^{2}$, 또는 $3.2x10^{6}nm^{2}$ 미만의 평균 표면적)을 가질 수 있다. 일부 경우에, EV 분절, 부분, 또는 추출물은 $70nm^{2}$, $60nm^{2}$, $50nm^{2}$, $40nm^{2}$, $30nm^{2}$, $20nm^{2}$, 또는 $10nm^{2}$ 미만의 표면적을 갖는다. 일부 경우에, PMP는 온전한 소포의 평균 부피보다 작은 평균 부피(예를 들어, $65nm^{3}$, $100nm^{3}$, $1000nm^{3}$, $1x10^{4}nm^{3}$, $1x10^{5}nm^{3}$, $1x10^{6}nm^{3}$, $1x10^{7}nm^{3}$, $1x10^{8}nm^{3}$, 또는 $5.3x10^{8}nm^{3}$ 미만의 평균 부피)를 갖는 식물 EV, 또는 이의 분절, 부분, 또는 추출물을 포함할 수 있다.

[0130] PMP가 식물 EV의 추출물을 포함하는 경우, 예를 들어, PMP가 식물 EV로부터 (예를 들어, 클로로포름으로) 추출된 지질을 포함하는 경우, PMP는 적어도 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 또는 99% 초과의 식물 EV로부터 (예를 들어, 클로로포름으로) 추출된 지질을 포함할 수 있다. 복수의 PMP

는 식물 EV 분절 및/또는 식물 EV-추출 지질 또는 이들의 혼합물을 포함할 수 있다.

[0131] *PMP의 생산*

[0132] PMP는 식물 조직 또는 식물 세포를 포함하여 식물 또는 이의 부분에서 자연적으로 발생하는 식물 EV, 또는 이의 분절, 부분, 또는 추출물(예를 들어, 지질 추출물)로부터 생산될 수 있다. PMP를 생산하기 위한 예시적인 방법은 다음을 포함한다: (a) 식물 또는 이의 일부로부터 초기 시료를 제공하는 단계로서, 여기서 식물 또는 이의 일부는 EV를 포함하는, 단계; 및 (b) 초기 시료로부터 미정제 PMP 분획을 단리하는 단계로서, 여기서 미정제 PMP 분획은 초기 시료의 수준에 비해 식물 또는 이의 일부로부터 유래한 적어도 하나의 오염물 또는 원치 않는 성분의 수준이 감소된, 단계. 상기 방법은 다음을 포함하는 추가 단계를 추가로 포함할 수 있다: (c) 미정제 PMP 분획을 정제하여 복수의 순수 PMP를 생산하는 단계로서, 여기서 복수의 순수 PMP는 미정제 EV 분획의 수준에 비해 식물 또는 이의 일부로부터 유래한 적어도 하나의 오염물 또는 원치 않는 성분의 수준이 감소된, 단계. 각각의 생산 단계는 이하에서 더욱 상세히 논의된다. PMP의 단리 및 정제에 관한 예시적인 방법은, 예를 들어, Rutter 및 Innes의 문헌[*Plant Physiol.* 173(1): 728~741, 2017]; Rutter 등의 문헌[*Bio. Protoc.* 7(17): e2533, 2017]; Regente 등의 문헌[*J of Exp. Biol.* 68(20): 5485~5496, 2017]; Mu 등의 문헌[Mol. Nutr. Food Res., 58, 1561~1573, 2014], 및 Regente 등의 문헌[*FEBS Letters*. 583: 3363~3366, 2009]에서 확인되며, 동 문헌의 각각은 본원에 참조로서 통합된다.

[0133] 일부 경우에, 복수의 PMP는 다음의 단계를 포함하는 공정에 의해 식물로부터 단리될 수 있다: (a) 식물 또는 이의 일부로부터 초기 시료를 제공하는 단계로서, 여기서 식물 또는 이의 일부는 EV를 포함하는, 단계; 및 (b) 초기 시료로부터 미정제 PMP 분획을 단리하는 단계로서, 여기서 미정제 PMP 분획은 초기 시료의 수준에 비해 식물 또는 이의 일부로부터 유래한 적어도 하나의 오염물 또는 원치 않는 성분의 수준이 감소된(예를 들어, 적어도 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 98%, 99%, , 또는 100% 만큼 감소된 수준), 단계; 및 (c) 미정제 PMP 분획을 정제하여 복수의 순수 PMP를 생산하는 단계로서, 여기서 복수의 순수 PMP는 미정제 EV 분획의 수준에 비해 식물 또는 이의 일부로부터 유래한 적어도 하나의 오염물 또는 원치 않는 성분의 수준이 감소된(예를 들어, 적어도 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 98%, 99%, , 또는 100% 만큼 감소된 수준), 단계.

[0134] PMP는 다양한 식물로부터 생산된 식물 EV, 또는 이의 분절, 부분, 또는 추출물을 포함할 수 있다. PMP는 속씨식물(외떡잎 식물 및 쌍떡잎 식물), 겉씨식물, 양치류, 부처손속, 속새류, 고생솔잎난류, 석송, 조류(예를 들어, 단세포 또는 다세포, 예를 들어, 고세균), 또는 이끼류를 포함하지만 이에 한정되지 않는 임의의 속의 식물(혈관 또는 비혈관)로부터 생산될 수 있다. 소정의 경우에, PMP는 혈관 식물, 예를 들어 외떡잎 식물 또는 쌍떡잎 식물 또는 겉씨식물을 사용하여 생산될 수 있다. 예를 들어, PMP는 다음을 사용하여 생산될 수 있다: 알팔파, 사과, 애기장대, 바나나, 보리, 유채속 종(예를 들어, 애기장대 또는 유채식물), 카놀라, 피마자씨, 치커리, 국화, 클로버, 코코아, 커피, 목화, 목화씨, 옥수수, 겨자과 식물, 크랜베리, 오이, 덴드로븀, 구갑룡, 유칼립투스, 패스큐류, 아마, 글라디올러스, 백합과, 아마씨, 조, 머스크멜론, 겨자, 귀리, 기름야자나무, 지방종자, 파파야, 땅콩, 파인애플, 관상용 식물, 강낭콩속, 감자, 유채, 쌀, 호밀, 라이그라스류, 잇꽃, 참깨, 수수, 대두, 사탕무, 사탕수수, 해바라기, 딸기, 담배, 토마토, 잔디풀, 밀 또는 채소 작물 예컨대 상추, 셀러리, 브로콜리, 컬리플라워, 박과; 과일 및 견과류 나무, 예컨대 사과, 배, 복숭아, 오렌지, 자몽, 레몬, 라임, 아몬드, 피칸, 호두, 개암나무; 덩굴 식물, 예컨대 포도, 키위, 홉; 과일 관목 및 가시덤불, 예컨대 라즈베리, 블랙베리, 구스베리; 삼림수, 예컨대 물푸레나무, 소나무, 전나무, 단풍나무, 오크나무, 밤나무, 포플러나무; 및 알팔파, 카놀라, 피마자씨, 옥수수, 목화, 겨자과 식물, 아마, 아마씨, 겨자과 식물, 기름야자나무, 지방종자, 땅콩, 감자, 쌀, 잇꽃, 참깨, 대두, 사탕무, 해바라기, 담배, 토마토, 또는 밀.

[0135] PMP는 전체 식물(예를 들어, 전체 로제트 또는 묘목)을 사용하여 또는 대안적으로 하나 이상의 식물 부분(예를 들어, 잎, 씨앗, 뿌리, 과일, 식물, 수분, 체관부 수액, 또는 목질부 수액)으로부터 생산될 수 있다. 예를 들어, PMP는 새싹 식물 기관/구조(예를 들어, 잎, 줄기, 또는 관), 뿌리, 꽃, 및 꽃 기관/구조(예를 들어, 수분, 포, 꽃받침, 꽃잎, 수술, 심피, 꽃밥, 또는 밑씨), 씨앗(배아, 배젖, 또는 종피 포함함), 과일(원숙한 씨방), 수액(예를 들어, 체관부 수액 또는 목질부 수액), 식물 조직(예를 들어, 혈관 조직, 접지 조직, 조양 조직 등), 및 세포(예를 들어, 단일 세포, 원형질체, 배아, 캘러스 조직, 공변 세포, 알세포 등), 또는 이의 자손을 사용하여 생산될 수 있다. 예를 들어, 단리 단계는 (a) 식물 또는 이의 일부를 제공하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 예에서, 식물 부분은 애기장대 잎이다. 식물은 임의의 발달 단계에 있을 수 있다. 예를 들어, PMP는 묘목, 예를 들어, 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 7주, 또는 8주령 묘목(예를 들어, 애기장대 묘목)을 사용하여 생산될 수 있다. 다른 예시적인 PMP는 뿌리(예를 들어, 생강 뿌리), 과일 주스(예를 들어, 자몽 주스), 야채(예

를 들어, 브로콜리), 수분(예를 들어, 올리브 수분), 체관부 수액(예를 들어, 애기장대 체관부 수액), 또는 목질부 수액(예를 들어, 토마토 식물 목질부 수액)을 사용하여 생산된 PMP를 포함할 수 있다.

[0136] 일부 구현예에서, PMP는 조류 또는 레몬으로부터 생산된다.

[0137] PMP는 다양한 방법에 의해 식물 또는 이의 일부를 사용하여 생산될 수 있다. 식물의 EV 함유 발포성 분획, 또는 분비된 EV(예를 들어, 세포 배양 배지)를 포함하는 PMP를 함유하는 다른 세포외 분획의 방출을 허용하는 임의의 방법이 본 방법에 적합하다. EV는 파괴적인 방법(예를 들어, 식물 또는 임의의 식물 부분의 분쇄 또는 배합) 또는 비파괴적인 방법(식물 또는 임의의 식물 부분의 세척 또는 진공 침윤)에 의해 식물 또는 식물 부분으로부터 분리될 수 있다. 예를 들어, 식물 또는 이의 일부는 진공 침윤, 분쇄, 배합되거나, 이들의 조합이 되어 식물 또는 식물 부분으로부터 EV를 단리하여 PMP를 생산할 수 있다. 예를 들어, 단리 단계는 (예를 들어, 소포 단리 완충액으로) 식물을 진공 침윤시켜, 발포성 분획을 방출하고 수집하는 단계를 포함할 수 있다. 대안적으로, 단리 단계는 EV를 방출하여 PMP를 생산하기 위해 식물을 분쇄하거나 배합하는 단계를 포함할 수 있다.

[0138] 식물 EV를 단리하여 PMP를 생산할 때, PMP는 분리되거나 미정제 PMP 분획(예를 들어, 발포성 분획) 내로 수집될 수 있다. 예를 들어, 분리 단계는 원심분리(예를 들어, 차동 원심분리 또는 초원심분리) 및/또는 여과를 사용하여 복수의 PMP를 미정제 PMP 분획으로 분리하여 식물 조직 부스러기 또는 식물 세포를 포함하는 큰 오염물로부터 식물 PMP-함유 분획을 분리하는 단계를 포함할 수 있다. 이와 같이, 미정제 PMP 분획은 식물 또는 식물 부분으로부터의 초기 시료와 비교하여, 식물 조직 부스러기 또는 식물 세포를 포함하는 큰 오염물의 수가 감소될 것이다. 사용된 방법에 따라, 미정제 PMP 분획은 식물 또는 식물 부분으로부터의 초기 시료와 비교하여 감소된 수준의 식물 세포 소기관(예를 들어, 핵, 미토콘드리아, 또는 엽록체)을 추가로 포함할 수 있다.

[0139] 일부 경우에, 단리 단계는 원심분리(예를 들어, 차동 원심분리 또는 초원심분리) 및/또는 여과를 사용하여 복수의 PMP를 미정제 PMP 분획으로 분리하여 식물 세포 또는 세포 부스러기로부터 PMP-함유 분획을 분리하는 단계를 포함할 수 있다. 이러한 경우에, 미정제 PMP 분획은 공급원 식물 또는 식물 부분으로부터의 초기 시료와 비교하여 식물 세포 또는 세포 부스러기의 수가 감소될 것이다.

[0140] 미정제 PMP 분획은 추가적인 정제 방법에 의해 추가로 정제되어 복수의 순수 PMP를 생성할 수 있다. 예를 들어, 미정제 PMP 분획은, 예를 들어 밀도 구배(요오드산올 또는 수크로오스)를 사용하는 초원심분리 및/또는 응집된 성분을 제거하기 위한 다른 접근법(예를 들어, 침전 또는 크기 배제 크로마토그래피)의 사용에 의해 다른 식물 성분으로부터 분리될 수 있다. 생성된 순수 PMP는 이전의 분리 단계 동안 생성된 하나 이상의 분획에 비해 또는 미리 설정된 임계 수준, 예를 들어 상업용 출시 사양에 비해 공급원 식물로부터의 오염물 또는 다른 원치 않는 성분(예를 들어, 하나 이상의 비-PMP 성분, 예컨대 단백질 응집체, 핵산 응집체, 단백질-핵산 응집체, 유리 지단백질, 지질-단백질 구조, 핵, 세포 벽 성분, 세포 소기관, 또는 이들의 조합)의 수준이 감소할 수 있다. 예를 들어, 순수 PMP는 초기 시료의 수준에 비해 식물 소기관 또는 세포 벽 성분의 수준이 (예를 들어, 약 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 또는 100% 초과 만큼; 또는 약 2배, 4배, 5배, 10배, 20배, 25배, 50배, 75배, 100배, 또는 100배 초과 만큼) 감소할 수 있다. 일부 경우에, 순수 PMP는 하나 이상의 비-PMP 성분, 예컨대 단백질 응집체, 핵산 응집체, 단백질-핵산 응집체, 유리 지단백질, 지질-단백질 구조, 핵, 세포 벽 성분, 세포 소기관, 또는 이들의 조합이 실질적으로 없다(예를 들어, 검출 불가능한 수준임). PMP의 농도는, 예를 들어, $1x10^{9}$, $5x10^{9}$, $1x10^{10}$, $5x10^{10}$, $5x10^{10}$, $1x10^{11}$, $2x10^{11}$, $3x10^{11}$, $4x10^{11}$, $5x10^{11}$, $6x10^{11}$, $7x10^{11}$, $8x10^{11}$, $9x10^{11}$, $1x10^{12}$, $2x10^{12}$, $3x10^{12}$, $4x10^{12}$, $5x10^{12}$, $6x10^{12}$, $7x10^{12}$, $8x10^{12}$, $9x10^{12}$, $1x10^{13}$, 또는 $1x10^{13}$ PMP/mL일 수 있다.

[0141] 예를 들어, PMP로부터 단백질 응집체가 제거될 수 있다. 예를 들어, PMP는 용액 중 단백질 응집체를 침전시키기 위해 (예를 들어, pH 프로브를 사용하여 측정했을 때) 다양한 pH로 취해질 수 있다. pH는, 예를 들어 수산화나트륨 또는 염산을 첨가하여, 예를 들어, pH 3, pH 5, pH 7, pH 9, 또는 pH 11로 조정될 수 있다. 용액이 명시된 pH에 도달하면, 이를 여과하여 미립자를 제거할 수 있다. 대안적으로, PMP는 Polymin-P 또는 Praestol 2640과 같은 하전된 중합체의 첨가를 통해 응집될 수 있다. 간략하게, Polymin-P 또는 Praestol 2640을 용액에 첨가하고 임펠러로 혼합한다. 그런 다음, 용액을 여과하여 미립자를 제거할 수 있다. 대안적으로, 응집체는 염 농도를 증가시킴으로써 가용화될 수 있다. 예를 들어, NaCl은, 예를 들어 1mol/L가 될 때까지 PMP에 첨가될 수 있다. 그런 다음, 용액을 여과하여 PMP를 단리할 수 있다. 대안적으로, 응집체는 온도를 증가시킴으로써 가용화된다. 예를 들어, PMP는 용액이 5분 동안, 예를 들어 50℃의 균일한 온도에 도달할 때까지 혼합 하에 가열될 수 있다. 그런 다음, PMP 혼합물을 여과하여 PMP를 단리할 수 있다. 대안적으로, PMP 용액으로부터의 가용성 오염물은 표준 절차에 따라 크기 배제 크로마토그래피 컬럼에 의해 분리될 수 있으며, 여기서 PMP는 제1 분획에서 용리되는

반면, 단백질 및 리보핵단백질 및 일부 지단백질은 나중에 용리된다. 단백질 응집체 제거의 효율은 BCA/Bradford 단백질 정량화를 통해 단백질 응집체의 제거 전후 단백질 농도를 측정하고 비교함으로써 결정될 수 있다.

[0142] 본원에 기술된 임의의 생산 방법은 당업계에 공지된 임의의 정량적 또는 정성적 방법으로 보충되어 생산 공정의 임의의 단계에서 PMP를 특성화하거나 식별할 수 있다. PMP는 다양한 분석 방법에 의해 특성화되어 PMP 수율, PMP 농도, PMP 순도, PMP 조성, 또는 PMP 크기를 추정할 수 있다. PMP는 PMP의 시각화, 정량화, 또는 정성적 특성화(예를 들어, 조성물의 식별)를 가능하게 하는 당업계에 공지된 다수의 방법, 예컨대 현미경(예를 들어, 투과 전자 현미경), 동적 광 산란, 나노입자 추적, 분광법(예를 들어, 푸리에 변환 적외선 분석), 또는 질량 분광분석(단백질 및 지질 분석)에 의해 평가될 수 있다. 소정의 경우에, 방법(예를 들어, 질량 분광법)은 부록에 개시된 마커와 같이 PMP 상에 존재하는 식물 EV 마커를 식별하는 데 사용될 수 있다. PMP 분획의 분석 및 특성화를 돕기 위해, PMP는 추가로 표지되거나 염색될 수 있다. 예를 들어, PMP는 3,3'-디헥실옥사카르보시아닌 요오드화물($DIOC_6$), 형광 친유성 염료, PKH67(Sigma Aldrich); Alexa Fluor® 488(Thermo Fisher Scientific), 또는 DyLight™ 800(Thermo Fisher)으로 염색될 수 있다. 정교한 형태의 나노입자 추적이 없는 경우, 이러한 비교적 간단한 접근법은 총 막 함량을 정량화하고 PMP의 농도를 간접적으로 측정하는 데 사용될 수 있다(Rutter 및 Innes의 문헌[*Plant Physiol.* 173(1): 728~741, 2017]; Rutter 등의 문헌[*Bio. Protoc.* 7(17): e2533, 2017]) 보다 정확한 측정을 위해, 그리고 PMP의 크기 분포를 평가하기 위해, 나노입자 추적이 사용될 수 있다.

[0143] 생산 공정 동안, PMP는 임의적으로 PMP가 대조군 또는 초기 시료의 EV 수준에 비해 증가된 농도(예를 들어, 약 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 또는 100% 초과 만큼; 또는 약 2배, 4배, 5배, 10배, 20배, 25배, 50배, 75배, 100배, 또는 100배 초과 만큼)이도록 제조될 수 있다. PMP는 PMP 조성물의 약 0.1% 내지 약 100%, 예컨대 약 0.01% 내지 약 100%, 약 1% 내지 약 99.9%, 약 0.1% 내지 약 10%, 약 1% 내지 약 25%, 약 10% 내지 약 50%, 약 50% 내지 약 99%, 또는 약 75% 내지 약 100% 중 어느 하나로 PMP를 구성할 수 있다. 일부 경우에, 조성물은, (예를 들어, 형광 표지된 지질을 측정함으로써) 예를 들어, wt/vol, PMP 단백질 조성물 백분율, 및/또는 지질 조성물 백분율에 의해 측정됐을 때, 0.1%, 0.5%, 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 그 이상의 PMP 중 적어도 어느 하나를 포함한다. 일부 경우에, 농축된 제제는 상업적 생성물로서 사용되며, 예를 들어, 최종 사용자는 실질적으로 낮은 농도의 활성 성분을 갖는 희석된 제제를 사용할 수 있다. 일부 구현예에서, 조성물은 농업용 농축 제형, 예를 들어 초저 부피 농축 제형으로서 제형화된다.

[0144] *지질 재구성된 식물 전령 팩(LPMP)*

[0145] 지질 재구성된 PMP(LPMP)가 본원에서 사용된다. LPMP는 식물 공급원으로부터 유래(예를 들어, 이로부터 농축, 단리, 또는 정제)된 지질 구조(예를 들어, 지질 이중층, 단층 구조, 다층 구조; 예를 들어, 소포성 지질 구조)로부터 유래된 PMP를 지칭하되, 지질 구조는 파괴(예를 들어, 지질 추출에 의해 파괴됨)되고, 표준 방법을 사용하여 액상(예를 들어, 물질을 함유하는 액상)에서 재조합되거나 재구성, 예를 들어, 지질 막 수화 및/또는 용매 주입을 포함하는 방법에 의해 재구성되어 본원에 기술된 바와 같은 LPMP를 생산한다. 상기 방법은, 원하는 경우, 초음파 처리, 동결/해동 처리, 및/또는 지질 압출을 추가로 포함하여, 예를 들어, 재구성된 LPMP의 크기를 감소시킬 수 있다. 대안적으로, LPMP는 미세유체 장치(예컨대 NanoAssemblr® IGNITE™ 미세유체 기기(Precision NanoSystems))를 사용하여 생산될 수 있다.

[0146] 일부 구현예에서, LPMP는 다음 단계를 포함하는 공정에 의해 생산된다: (a) 복수의 정제된 PMP(예를 들어, 본원의 섹션 IA에 기술된 바와 같이 정제된 PMP)를 제공하는 단계; (b) 복수의 PMP를 처리하여 지질 막을 생성하는 단계; (c) 유기 용매 또는 용매 조합으로 지질 막을 재구성하여 지질 용액을 생성하는 단계; 및 (d) 수성 상을 포함하는 미세유체 장치에서 단계 (c)의 지질 용액을 처리하여 LPMP를 생산하는 단계.

[0147] 일부 경우에, 복수의 PMP를 처리하여 지질 막을 제조하는 단계는 복수의 PMP로부터 지질을 추출하는 단계, 예를 들어, Bligh-Dyer 방법(Bligh 및 Dyer의 문헌[J Biolchem Physiol, 37: 911~917, 1959])을 사용하여 지질을 추출하는 단계를 포함한다. 추출된 지질은 스톡 용액, 예를 들어 클로로포름:메탄올 중 용액으로서 제공될 수 있다. 지질 막을 생성하는 단계는, 예를 들어 불활성 가스(예를 들어, 질소) 스트림으로 용매를 증발시키는 것을 포함할 수 있다.

[0148] 천연 지질

[0149] LPMP는 식물 공급원(예를 들어, 레몬 또는 조류)으로부터의 지질 구조로부터 유래된 10% 내지 100%의 지질을 포함할 수 있고, 예를 들어, 식물 공급원으로부터의 지질 구조로부터 유래된 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 100%의 지질을 함유할 수 있다. LPMP는 식물 공급원(예를 들어, 레몬 또는 조류)으로부터의 지질 구조에 존재하는 지질 종의 전부 또는 분획을 포함할 수 있으며, 예를 들어, 식물 공급원으로부터의 지질 구조에 존재하는 지질 종의 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 100%를 함유할 수 있다. LPMP는 식물 공급원(예를 들어, 레몬 또는 조류)으로부터의 지질 구조에 존재하는 단백질 종을 전혀 포함하지 않거나, 이의 분획 또는 전부를 포함할 수 있고, 예를 들어, 식물 공급원(예를 들어, 레몬 또는 조류)으로부터의 지질 구조에 존재하는 단백질 종의 0%, 1% 미만, 5% 미만, 10% 미만, 15% 미만, 20% 미만, 30% 미만, 40% 미만, 50% 미만, 60% 미만, 70% 미만, 80% 미만, 90% 미만, 100% 미만, 또는 100%를 함유할 수 있다. 일부 경우에, LPMP의 지질 이중층은 단백질을 함유하지 않는다. 일부 경우에, LPMP의 지질 구조는 식물 공급원으로부터의 지질 구조에 비해 감소된 양의 단백질을 함유한다.

[0150] 일부 구현예에서, LPMP의 천연 지질은 레몬 또는 조류로부터 추출된다.

[0151] 외인성 지질

[0152] LPMP는 변형되어 미변형된 LPMP에 비해 세포 흡수(예를 들어, 동물 세포 흡수(예를 들어, 포유동물 세포 흡수(예를 들어, 인간 세포 흡수)) 식물 세포 흡수, 박테리아 세포 흡수, 또는 진균 세포 흡수)를 증가시킬 수 있는 이종 제제(예를 들어, 세포 투과제)를 포함할 수 있다. 예를 들어, 변형된 LPMP는 이온화 가능 지질과 같은 식물 세포 투과제를 포함(예를 들어, 이를 로딩(예를 들어 캡슐화하거나 이에 접합됨))하거나, 이와 함께 제형화(예를 들어, 이를 포함하는 용액에 현탁되거나 재현탁됨)될 수 있다. 변형된 LPMP 각각은 적어도 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 90% 초과의 이온화 가능 지질을 포함할 수 있다.

[0153] LPMP는 하나 이상의 외인성 지질, 예를 들어, 식물에 외인성인 지질(예를 들어, LPMP가 생산되는 식물 또는 식물 부분이 아닌 공급원으로부터 유래함)을 포함할 수 있다. LPMP의 지질 조성물은 0%, 1% 미만, 또는 적어도 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, , 또는 95% 초과의 외인성 지질을 포함할 수 있다. 일부 예에서, 외인성 지질(예를 들어, 이온화 가능 지질)을 제제 중 총 지질의 25% 또는 40%(w/w)의 양으로 첨가한다. 일부 예에서, 외인성 지질은 단계 (b) 이전에 제제에 첨가, 예를 들어 단계 (b) 이전에 추출된 PMP 지질과 혼합된다.

[0154] 예시적인 외인성 지질은 이온화 가능 지질을 포함한다.

[0155] 또한 외인성 지질은 양이온성 지질을 포함할 수 있다.

[0156] 일부 경우에, 외인성 지질은 다음으로부터 선택된 이온화 가능 지질 또는 양이온성 지질일 수 있다: 1,1'-((2-(4-(2-((2-(비스(2-히드록시도데실)아미노)에틸)(2-히드록시도데실)아미노)에틸)피페라진-1-일)에틸)아자네디일)비스(도데칸-2-올) (C12-200), DLin-MC3-DMA (MC3), 디올레오일-3-트리메틸암모늄 프로판 (DODAP), DC-콜레스테롤, DOTAP, 에틸 PC, GL67, DLin-KC2-DMA (KC2), MD1 (cKK-E12), OF2, EPC, ZA3-Ep10, TT3, LP01, 5A2-SC8, 지질 5 (Moderna), 양이온성 술폰아미드 아미노 지질, 양친매성 양성이온성 아미노 지질, DODAC, DOBAQ, YSK05, DOBAT, DOBAQ, DOPAT, DOMPAQ, DOAAQ, DMAP-BLP, DLinDMA, DODMA, DOTMA, DSDMA, DOSPA, DODAC, DOBAQ, DMRIE, DOTAP-콜레스테롤, GL67A, 및 98N12-5 또는 이들의 조합.

[0157] 일부 구현예에서, 외인성 지질은 다음으로부터 선택된 이온화 가능 지질 또는 양이온성 지질일 수 있다: C12-200, MC3, DODAP, DC-콜레스테롤, DOTAP, 에틸 PC, GL67, KC2, MD1, OF2, EPC, ZA3-Ep10, TT3, LP01, 5A2-SC8, 지질 5(Moderna), 양이온성 술폰아미드 아미노 지질, 및 양친매성 양성이온성 아미노 지질, 또는 이들의 조합. 일부 구현예에서, 이온화 가능 지질은 C12-200, MC3, DODAP, 및 DC-콜레스테롤, 또는 이들의 조합으로부터 선택된다. 일부 경우에, 이온화 가능 지질은 이온화 가능 지질이다. 일부 구현예에서, 이온화 가능 지질은 1,1'-((2-(4-(2-((2-(비스(2-히드록시도데실)아미노)에틸)(2-히드록시도데실)아미노)에틸)피페라진-1-일)에틸)아자네디일)비스(도데칸-2-올)(C12-200) 또는 (6Z,9Z,28Z,31Z)-헵타트리아콘타-6,9,28,31-테트라엔-19-일 4-(디메틸아미노)부타노에이트, DLin-MC3-DMA(MC3)이다. 일부 경우에, 외인성 지질은 양이온성 지질이다. 일부 구현예에서, 양이온성 지질은 DC-콜레스테롤 또는 디올레오일-3-트리메틸암모늄 프로판(DOTAP)이다.

[0158] 일부 경우에, LPMP는 적어도 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, , 또는 90% 초과의 이온화 가능 지질을 포함한다.

[0159] 일부 경우에, LPMP는 적어도 0.1%, 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% 80%, 85%, 90%, , 또는 90% 초과의 이온화 가능 지질, 예를 들어 1%-10%, 10%-20%, 20%-30%, 30%-40%, 40%-50%, 50%-60%, 60%-70%, 70%-80%, , 또는 80%~90%의 이온화 가능 지질, 예를 들어 약 30%~75%의 이온화 가능 지질(예를 들어, 약 30~75%의 이온화 가능 지질)의 몰비를 포함한다. 일부 구현예에서, LPMP는 25% C12-200을 포함한다. 일부 구현예에서, LPMP는 35% C12-200의 몰비를 포함한다. 일부 구현예에서, LPMP는 50% C12-200의 몰비를 포함한다. 일부 구현예에서, LPMP는 40% MC3을 포함한다. 일부 구현예에서, LPMP는 50% C12-200의 몰비를 포함한다. 일부 구현예에서, LPMP는 20% 또는 40% DC-콜레스테롤을 포함한다. 일부 구현예에서, LPMP는 25% 또는 40% DOTAP를 포함한다.

[0160] 제제는 전체적으로 LPMP의 흡수를 증가시킬 수 있거나, LPMP에 의해 운반되는 LPMP(예를 들어, mRNA 치료제)의 일부 또는 성분의 흡수를 증가시킬 수 있다. 세포 흡수가 증가되는 정도는 조성물이 전달되는 식물 또는 식물 부분, LPMP 제형, 및 LPMP에 이루어진 다른 변형에 따라 달라질 수 있다. 예를 들어, 변형된 LPMP는 미변형된 LPMP에 비해 적어도 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, , 또는 100%의 세포 흡수(예를 들어, 동물 세포 흡수, 식물 세포 흡수, 박테리아 세포 흡수, 또는 진균 세포 흡수)가 증가할 수 있다. 일부 경우에, 증가된 세포 흡수는 미변형된 LPMP에 비해 적어도 2배, 4배, 5배, 10배, 100배, 또는 1000배 증가된 세포 흡수이다.

[0161] 일부 구현예에서, 이온화 가능 지질로 변형된 LPMP는 이온화 가능 지질로 변형되지 않은 LPMP보다 음으로 하전된 폴리뉴클레오티드를 더 효율적으로 캡슐화한다. 일부 양태에서, 이온화 가능 지질로 변형된 LPMP는 이온화 가능 지질로 변형되지 않은 LPMP에 비해 생체분포를 변경하였다. 일부 양태에서, 이온화 가능 지질로 변형된 LPMP는 이온화 가능 지질로 변형되지 않은 LPMP에 비해 표적 세포의 엔도솜 막과의 융합을 변경(예를 들어, 증가)하였다.

[0162] *이온화 가능 지질*

[0163] 일부 구현예에서, 이온화 가능 지질은 아래에 열거된 특성 중 적어도 하나(예를 들어, 1개, 2개, 3개, 4개, 또는 5개 모두)를 갖는다:

[0164] (i) 적어도 2개의 이온화 가능 아민(예를 들어, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 또는 6개 초과의 이온화 가능 아민, 예를 들어, 2개, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, , 12개, 또는 12개 초과의 이온화 가능 아민);

[0165] (ii) 적어도 3개의 지질 꼬리(예를 들어, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 또는 6개 초과의 지질 꼬리, 예를 들어, 2개, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, , 12개, 또는 12개 초과의 지질 꼬리)로서, 여기서 각각의 지질 꼬리는 독립적으로 길이가 적어도 6개의 탄소 원자(예를 들어, 길이가 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개, 적어도 10개, 적어도 11개, 적어도 12개, 적어도 13개, 적어도 14개, 적어도 15개, 적어도 16개, 적어도 17개, 적어도 18개, 또는 18개 초과의 탄소 원자, 예를 들어 길이가 6개, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, , 25개, 또는 25개 초과의 탄소 원자)인 지질 꼬리;

[0166] (iii) 약 4.5 내지 약 7.5의 산 해리 상수(pKa)(예를 들어, 약 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 5.0, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7.0, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 또는 7.5의 pKa(예를 들어, 약 6.5 내지 약 7.5의 pKa(예를 들어, 약 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7.0, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 또는 7.5의 pKa)));

[0167] (iv) 이온화 가능 아민 및 이종유기기; 및

[0168] (v) 적어도 10의 N:P(이온화 가능 지질의 아민: mRNA의 인산염) 비;

[0169] 일부 구현예에서, 이온화 가능 지질은 1'-((2-(4-(2-((2-(비스(2-히드록시도데실)아미노)에틸)(2-히드록시도데실)아미노)에틸)피페라진-1-일)에틸)아자네디일)비스(도데칸-2-올) (C12-200), MD1 (cKK-E12), OF2, EPC, ZA3-Ep10, TT3, LP01, 5A2-SC8, 지질 5(Moderna), 및 98N12-5로부터 선택되지 않는다.

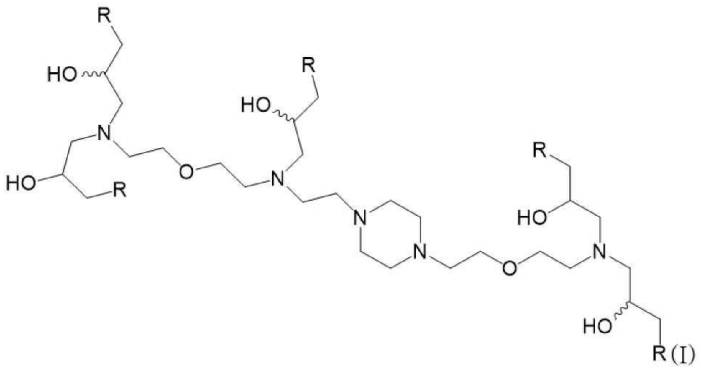
[0170] 일부 구현예에서, 이온화 가능 지질은 1,1'-((2-(4-(2-((2-(비스(2-히드록시도데실)아미노)에틸)(2-히드록시도데실)아미노)에틸)피페라진-1-일)에틸)아자네디일)비스(도데칸-2-올)(C12-200), MD1 (cKK-E12), OF2, EPC, ZA3-Ep10, TT3, LP01, 5A2-SC8, 지질 5, SM-102(지질 H), 및 ALC-315로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0171] 일부 구현예에서, 이온화 가능 지질은 이온화 가능 아민 및 이종유기기이다. 일부 구현예에서, 이종유기기는 히드록실이다. 일부 구현예에서, 이종유기기는 수소 결합 공여자를 포함한다. 일부 구현예에서, 이종유기기는 수

소 결합 수용체를 포함한다. 일부 구현예에서, 이종유기기는 -OH, -SH, -(CO)H, $-CO_2H$, $-NH_2$, $-CONH_2$, 임의 치환된 C_1-C_6 알콕시, 또는 불소이다.

[0172] 일부 구현예에서, 이온화 가능 지질은 이온화 가능 아민 및 적어도 2개의 원자 사슬에 의해 분리된 이종유기기이다.

[0173] 일부 구현예에서, 이온화 가능 지질은 다음 식 I로 표시된다:



R(I)

[0174] 식 중 R은 C_8-C_{14} 알킬기이다.

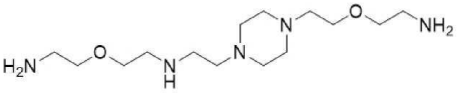
[0175] 일부 구현예에서, LPMP의 지질 막은 식 I 지질의 적어도 35%, 예를 들어 식 I 지질의 적어도 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% 80%, 85%, 90%, 또는 90% 초과, 예를 들어 식 I 지질의 35%~40%, 40%-50%, 50%-60%, 60%-70%, 70%-80%, 또는 80%~90%를 포함한다.

[0176] 일부 경우에, LPMP는 적어도 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, , 또는 90% 초과의 이온화 가능 지질을 포함한다.

[0177] 일부 경우에, LPMP는 적어도 0.1%, 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% 80%, 85%, 90%, 또는 90% 초과의 이온화 가능 지질, 예를 들어 1%~10%, 10%-20%, 20%-30%, 30%-40%, 40%-50%, 50%-60%, 60%-70%, 70%-80%, 또는 80%~90%의 이온화 가능 지질, 예를 들어 약 25%~75%의 이온화 가능 지질(예를 들어, 약 25%~75%의 이온화 가능 지질)의 몰비를 포함한다.

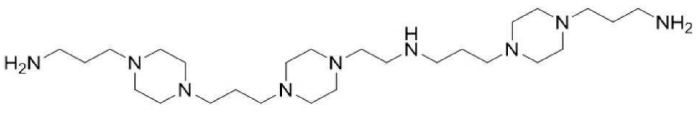
[0178] 본원에 기술된 이온화 가능 지질은 하나 이상의(예를 들어, 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 또는 6개의) 지질 꼬리로 치환된 본원에 기술된 아민 코어를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 이온화 가능 지질은 적어도 3개의 지질 꼬리를 포함한다. 지질 꼬리는 C_8-C_{18} 탄화수소(예를 들어, C_6-C_{18} 알킬 또는 C_6-C_{18} 알카노일)일 수 있다. 아민 코어는 질소 원자에서 하나 이상의 지질 꼬리로 치환될 수 있다(예를 들어, 질소 원자에 부착된 하나의 수소 원자는 지질 꼬리로 치환될 수 있음).

[0179] 일부 구현예에서, 아민 코어는 다음의 구조를 갖는다:



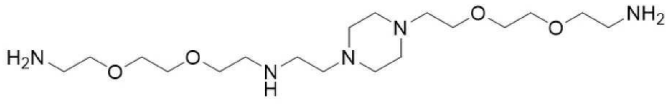
[0180] .

[0181] 일부 구현예에서, 아민 코어는 다음의 구조를 갖는다:



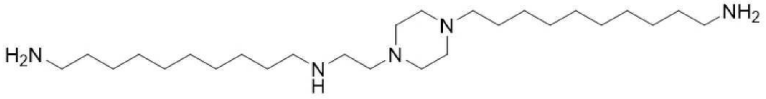
[0182] .

[0183] 일부 구현예에서, 아민 코어는 다음의 구조를 갖는다:

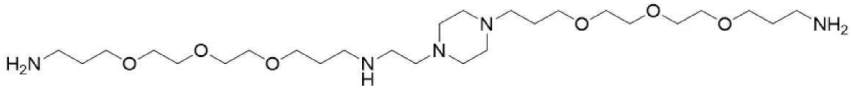


[0184] .

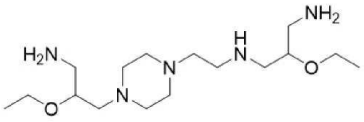
[0185] 일부 구현예에서, 아민 코어는 다음의 구조를 갖는다:

[0186] 
.

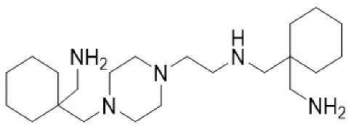
[0187] 일부 구현예에서, 아민 코어는 다음의 구조를 갖는다:

[0188] 
.

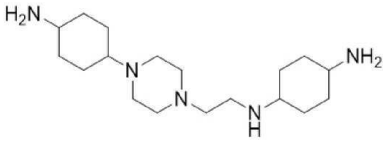
[0189] 일부 구현예에서, 아민 코어는 다음의 구조를 갖는다:

[0190] 
.

[0191] 일부 구현예에서, 아민 코어는 다음의 구조를 갖는다:

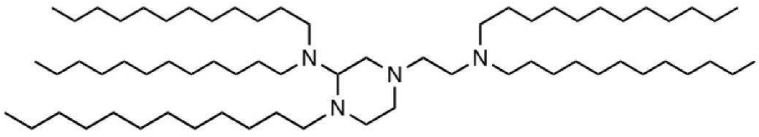
[0192] 
.

[0193] 일부 구현예에서, 아민 코어는 다음의 구조를 갖는다:

[0194] 
.

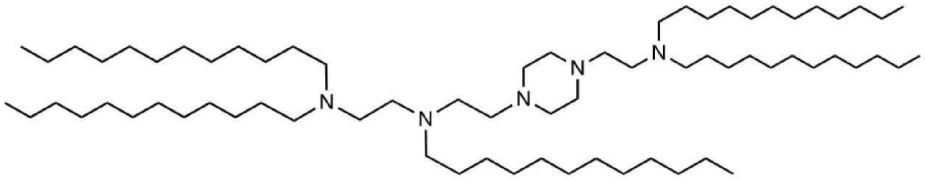
[0195] mRNA 치료 조성물에 사용하기에 적합한 다른 지질 및 이의 제조 및 사용 방법은 국제 특허 공개 WO 2016/118725에 기술된 것과 같은 지질을 포함하며, 동 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

[0196] 소정의 구현예에서, mRNA 치료 조성물 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:

[0197] 
, 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0198] mRNA 치료 조성물에 사용하기에 적합한 다른 지질 및 이의 제조 및 사용 방법은 국제 특허 공개 WO 2016/118724에 기술된 것과 같은 지질을 포함하며, 동 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

[0199] 소정의 구현예에서, mRNA 치료 조성물 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:

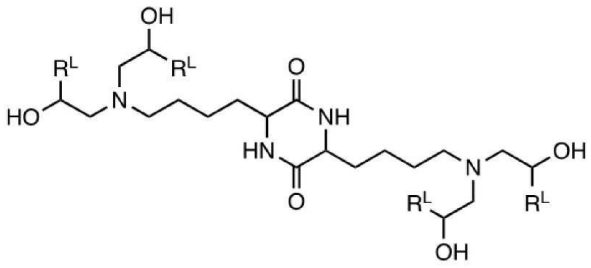
[0200] 
, 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0201] mRNA 치료 조성물에 사용하기에 적합한 다른 지질 및 이의 제조 및 사용 방법은 14,25-디트리데실 15,18,21,24-테트라아자-옥타트리아콘탄의 식을 갖는 지질 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0202] mRNA 치료 조성물에 사용하기에 적합한 다른 지질 및 이의 제조 및 사용 방법은 국제 특허 공개 WO 2013/063468

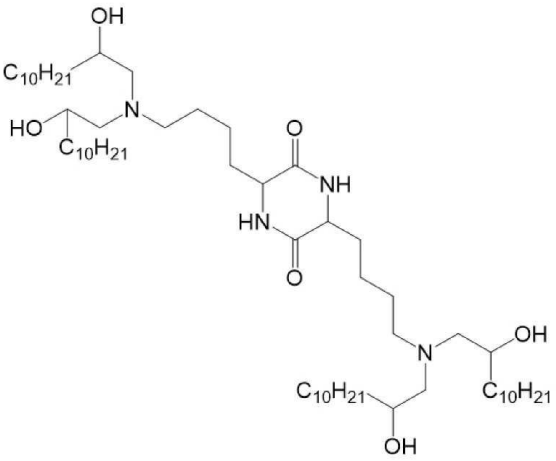
및 WO 2016/205691에 기술된 것과 같은 지질을 포함하며, 동 문헌의 각각은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

[0203] 일부 구현예에서, mRNA 치료 조성물 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음 식의 지질:



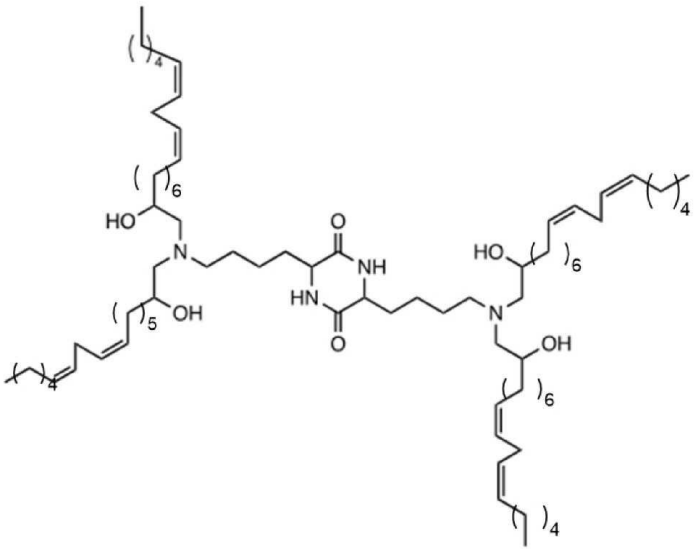
[0204] , 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하고, 여기서 R^L의 각각의 경우는 독립적으로 임의 치환된 C6-C40 알케닐이다.

[0205] 소정의 구현예에서, mRNA 치료 조성물 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:



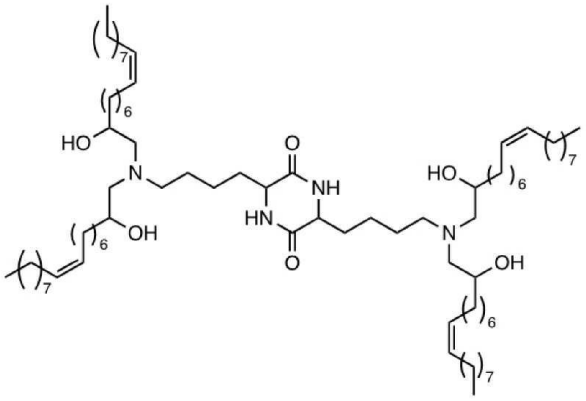
[0206] , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0207] 소정의 구현예에서, mRNA 치료 조성물 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:



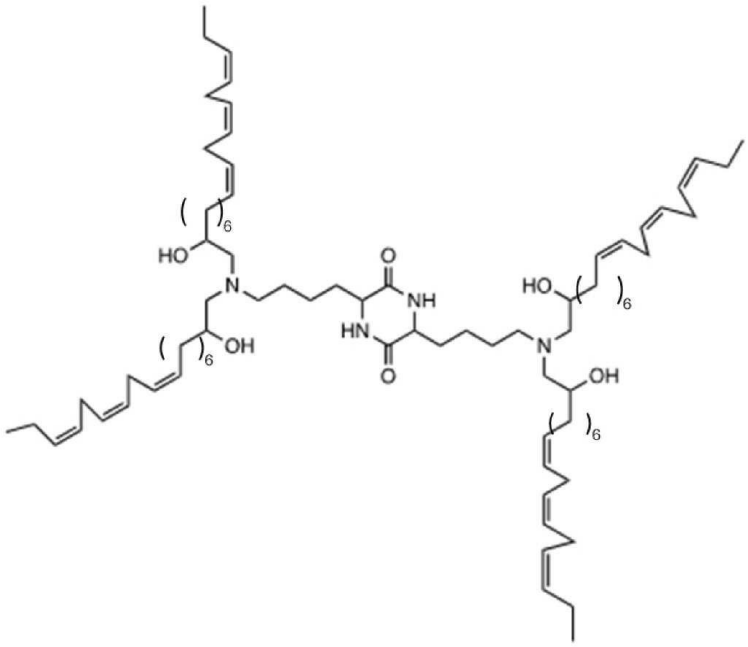
[0208] , 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0209] 소정의 구현예에서, mRNA 치료 조성물 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:



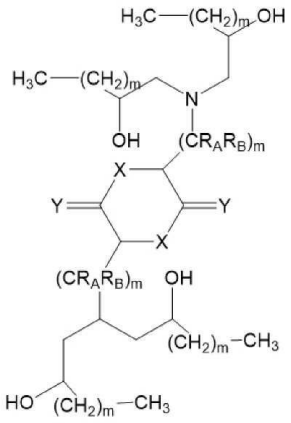
[0210] , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0211] 소정의 구현예에서, mRNA 치료 조성물 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:



[0212] , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

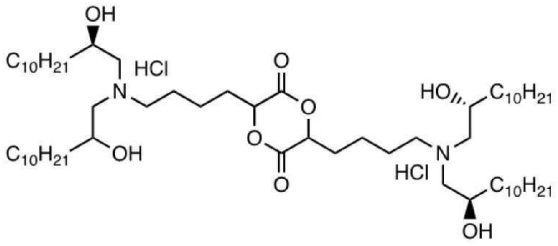
[0213] mRNA 치료 조성물에 사용하기에 적합한 다른 지질 및 이의 제조 및 사용 방법은 국제 특허 공개 WO 2015/184256에 기술된 것과 같은 지질을 포함하며, 동 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다. 일부 구현예에서, mRNA 치료 조성물 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음 식의 지질:



[0214] , 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하되, 여기서 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, 임의 치환된 C1-50 알킬, 임의 치환된 C2-50 알케닐, 임의 치환된 C2-50 알키닐, 임의 치환된 C3-10 카르보시클릴, 임의 치환된 3원 내지 14원 헤테로시클릴, 임의 치환된

C6-14 아릴, 임의 치환된 5원 내지 14원 헤테로아릴 또는 할로겐이고; 각각의 RB는 독립적으로 수소, 임의 치환된 C1-50 알킬, 임의 치환된 C2-50 알케닐, 임의 치환된 C2-50 알키닐, 임의 치환된 C3-10 카르보시클릴, 임의 치환된 3원 내지 14원 헤테로시클릴, 임의 치환된 C6-14 아릴, 임의 치환된 5원 내지 14원 헤테로아릴 또는 할로겐이다.

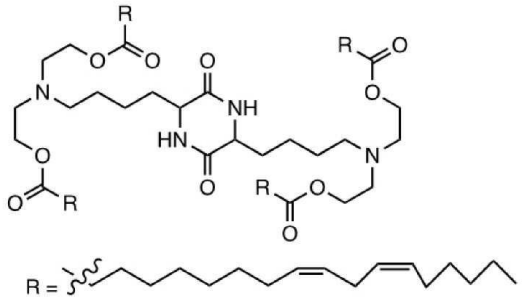
[0215] 소정의 구현예에서, mRNA 치료 조성물 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질("타겟 23"):



[0216] , (타겟 23) 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

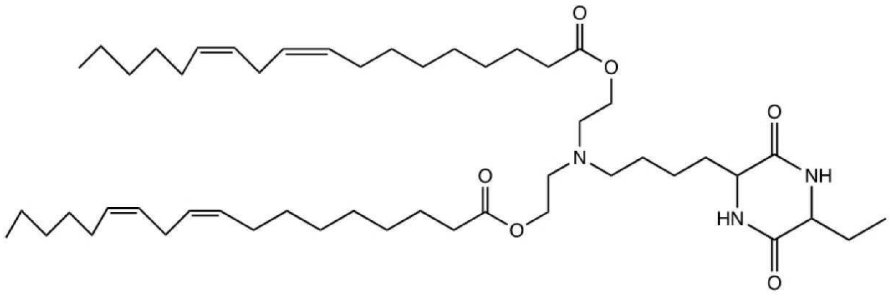
[0217] mRNA 치료 조성물에 사용하기에 적합한 다른 지질 및 이의 제조 및 사용 방법은 국제 특허 공개 WO 2016/004202에 기술된 것과 같은 지질을 포함하며, 동 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

[0218] 일부 구현예에서, mRNA 치료 조성물 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:



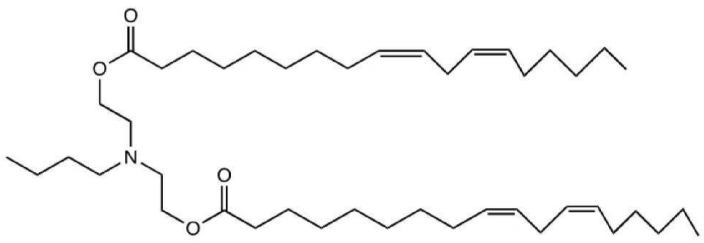
[0219] , 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0220] 일부 구현예에서, mRNA 치료 조성물 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:



[0221] , 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0222] 일부 구현예에서, mRNA 치료 조성물 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:

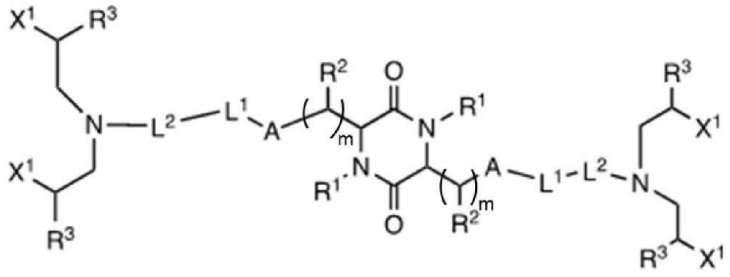


[0223] , 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

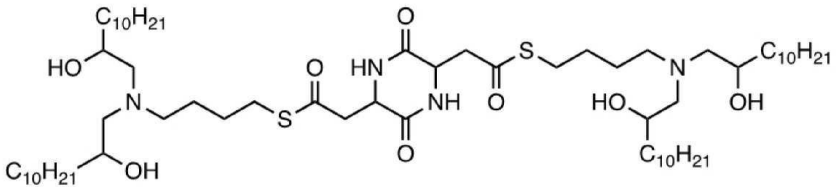
[0224] mRNA 치료 조성물에 사용하기에 적합한 다른 지질 및 이의 제조 및 사용 방법은 미국 특허 가출원 제62/758,179

호에 기술된 것과 같은 지질을 포함하며, 동 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

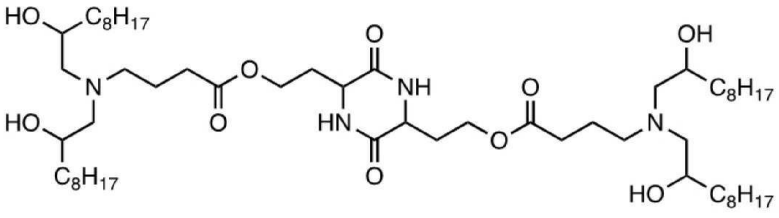
[0225] 일부 구현예에서, mRNA 치료 조성물 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음 식의 지질:

[0226] , 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하되, 각각의 R^1 및 R^2는 독립적으로 H 또는 C1-C6 지방족이고; 각각의 m은 독립적으로 1 내지 4의 값을 갖는 정수이고; 각각의 A는 독립적으로 공유 결합 또는 아릴렌이고; 각각의 L^1은 독립적으로 에스테르, 티오에스테르, 이황화물, 또는 무수물기이고; 각각의 L^2는 독립적으로 C2-C10 지방족이고; 각각의 X^1은 독립적으로 H 또는 OH이고; 각각의 R^3은 독립적으로 C6-C20 지방족이다.

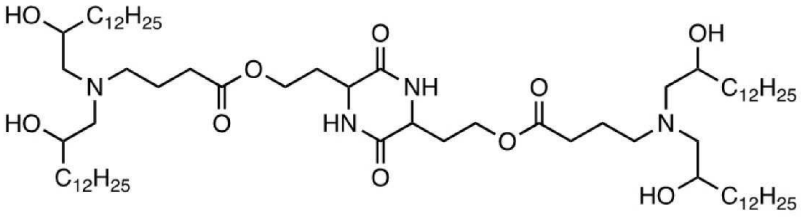
[0227] 일부 구현예에서, mRNA 치료 조성물 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음 식의 지질:

[0228]  (화합물 1), 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0229] 일부 구현예에서, mRNA 치료 조성물 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음 식의 지질:

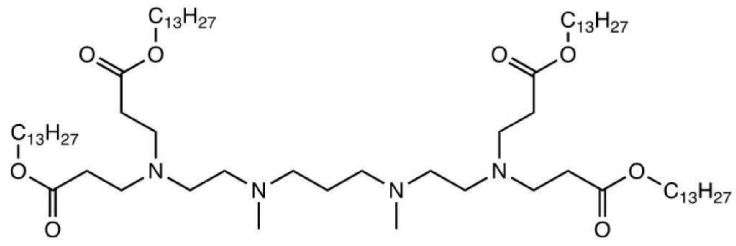
[0230]  (화합물 2), 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0231] 일부 구현예에서, mRNA 치료 조성물 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음 식의 지질:

[0232]  (화합물 3), 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

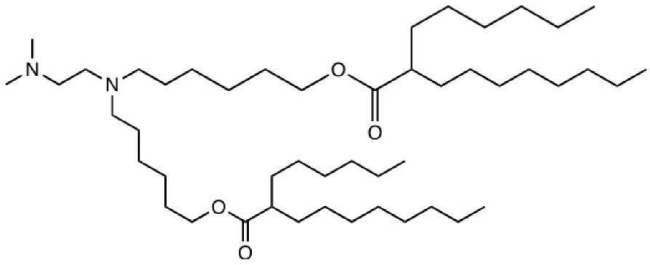
[0233] mRNA 치료 조성물에 사용하기에 적합한 다른 지질 및 이의 제조 및 사용 방법은 J. McClellan, M. C. King의 문헌[Cell 2010, 141, 210~217] 및 Whitehead 등의 문헌[Nature Communications(2014) 5:4277]에 기술된 것과 같은 지질을 포함하며, 동 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

[0234] 소정의 구현예에서, mRNA 치료 조성물의 지질 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:

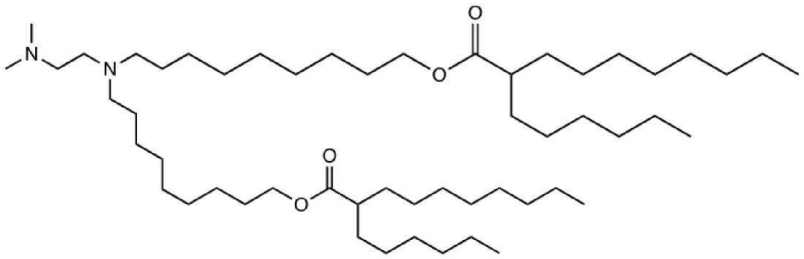
[0235]  , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0236] mRNA 치료 조성물에 사용하기에 적합한 다른 지질 및 이의 제조 및 사용 방법은 국제 특허 공개 WO 2015/199952에 기술된 것과 같은 지질을 포함하며, 동 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

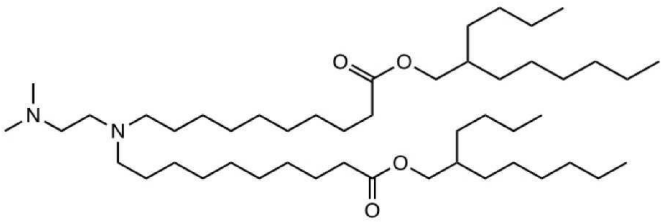
[0237] 일부 구현예에서, mRNA 치료 조성물 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:

[0238]  , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

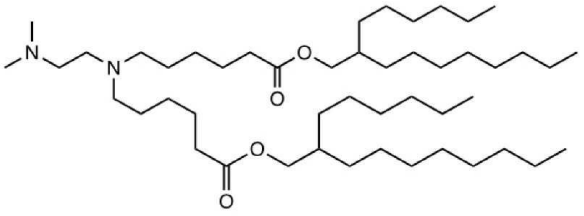
[0239] 일부 구현예에서, mRNA 치료 조성물 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:

[0240]  , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

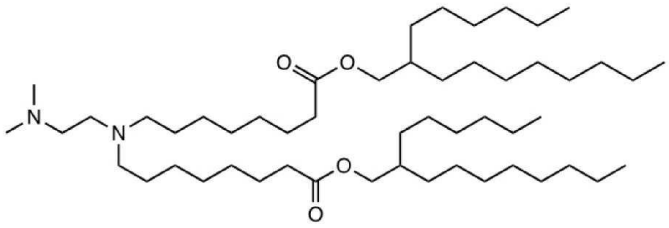
[0241] 일부 구현예에서, mRNA 치료 조성물 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:

[0242]  , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0243] 일부 구현예에서, mRNA 치료 조성물 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:

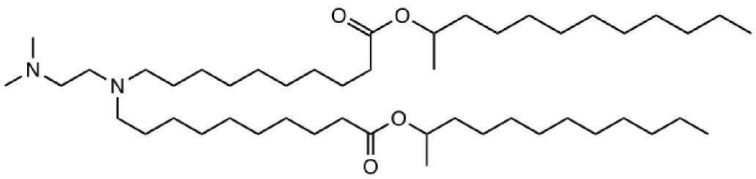
[0244]  , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0245] 일부 구현예에서, mRNA 치료 조성물 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:



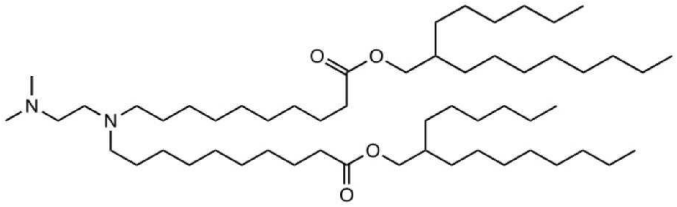
[0246] , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0247] 일부 구현예에서, mRNA 치료 조성물 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:



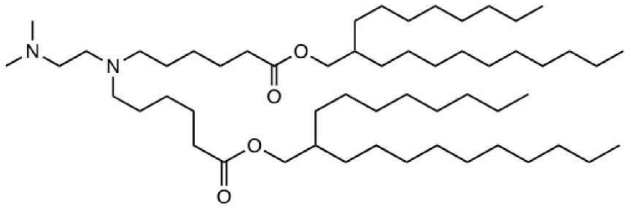
[0248] , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0249] 일부 구현예에서, mRNA 치료 조성물 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:



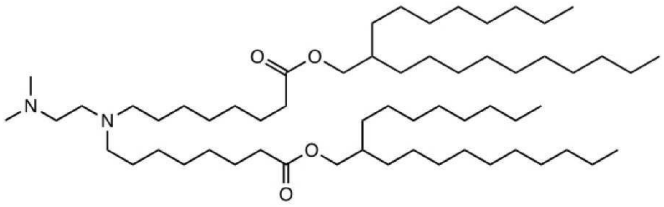
[0250] , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0251] 일부 구현예에서, mRNA 치료 조성물 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:



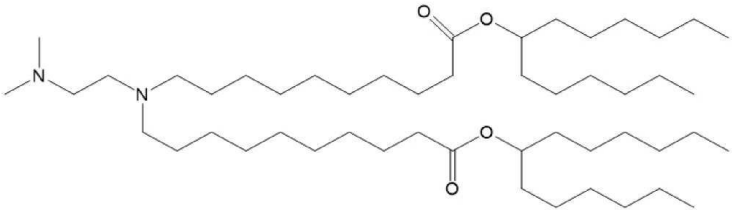
[0252] , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0253] 일부 구현예에서, mRNA 치료 조성물 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:



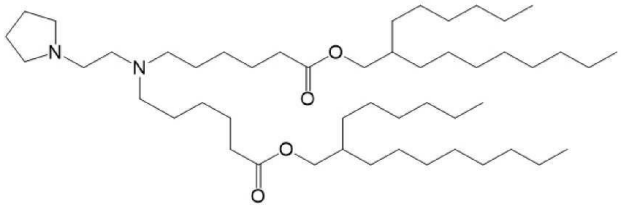
[0254] , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0255] 일부 구현예에서, mRNA 치료 조성물 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:

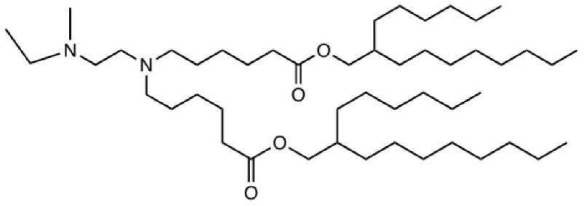


[0256] , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

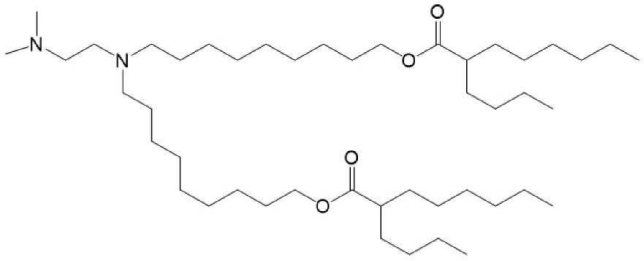
[0257] 일부 구현예에서, mRNA 치료 조성물 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:

[0258]  , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0259] 일부 구현예에서, mRNA 치료 조성물 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:

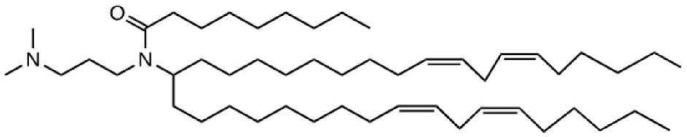
[0260]  , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0261] 일부 구현예에서, mRNA 치료 조성물 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:

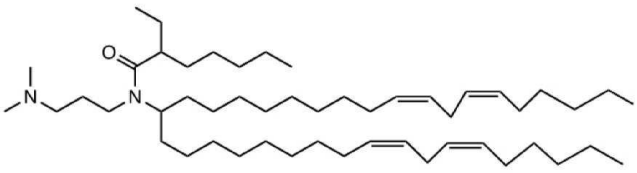
[0262]  , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0263] mRNA 치료 조성물에 사용하기에 적합한 다른 지질 및 이의 제조 및 사용 방법은 국제 특허 공개 WO 2017/004143에 기술된 것과 같은 지질을 포함하며, 동 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

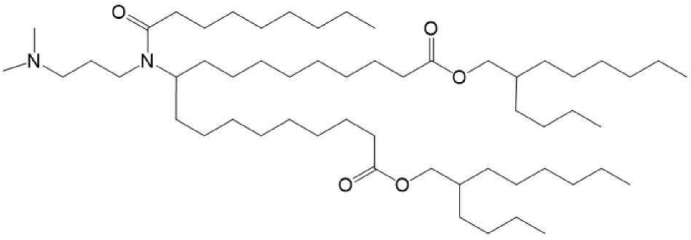
[0264] 일부 구현예에서, mRNA 치료 조성물 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:

[0265]  , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

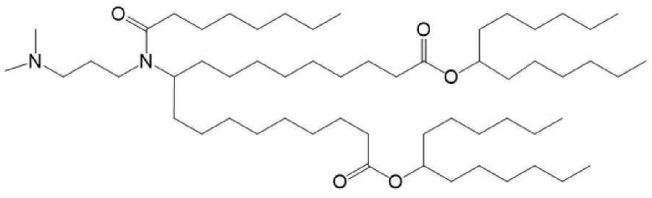
[0266] 일부 구현예에서, mRNA 치료 조성물 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:

[0267]  , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0268] 일부 구현예에서, mRNA 치료 조성물 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:

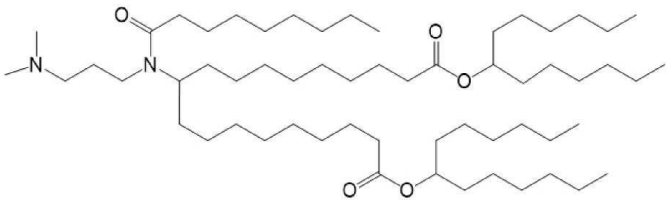
[0269]  , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0270] 일부 구현예에서, mRNA 치료 조성물 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:



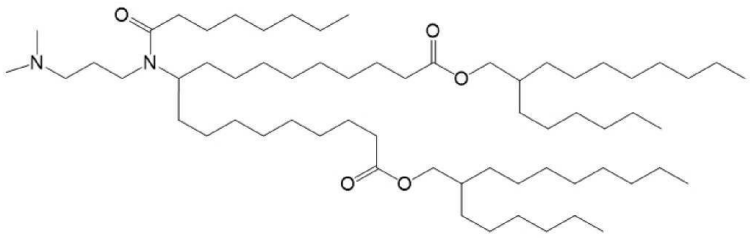
[0271] , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0272] 일부 구현예에서, mRNA 치료 조성물 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:



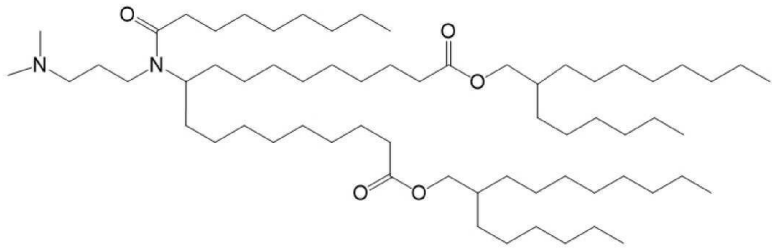
[0273] , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0274] 일부 구현예에서, mRNA 치료 조성물 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:



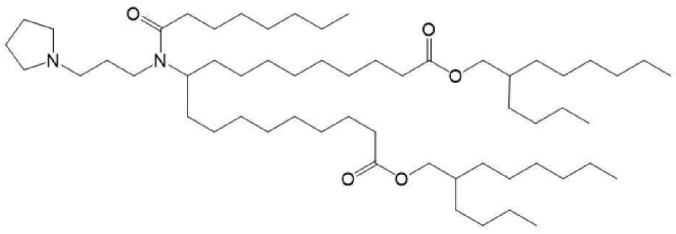
[0275] , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0276] 일부 구현예에서, mRNA 치료 조성물 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:



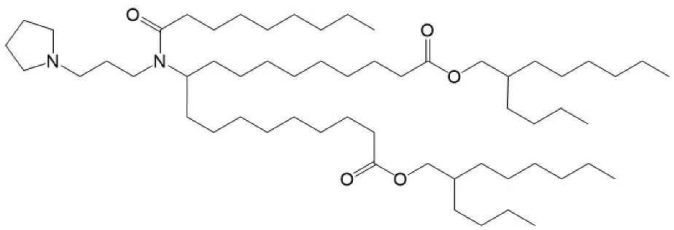
[0277] , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0278] 일부 구현예에서, mRNA 치료 조성물 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:

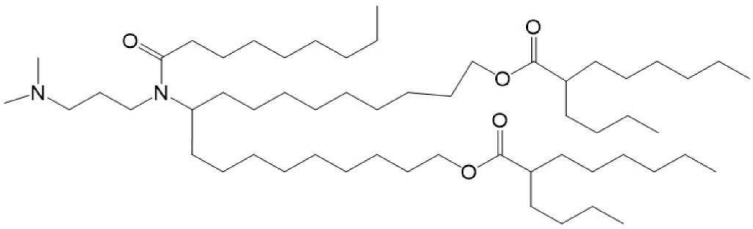


[0279] , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

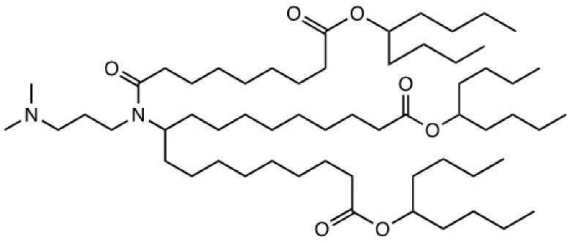
[0280] 일부 구현예에서, mRNA 치료 조성물 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:

[0281]  , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

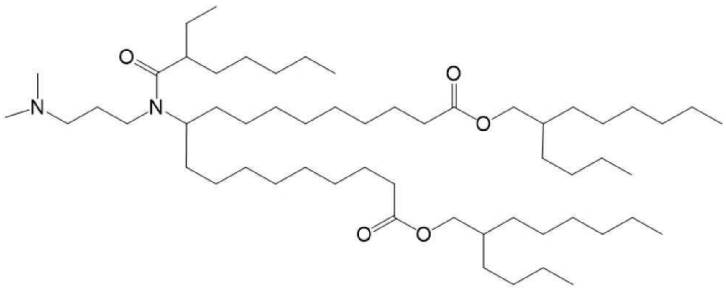
[0282] 일부 구현예에서, mRNA 치료 조성물 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:

[0283]  , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

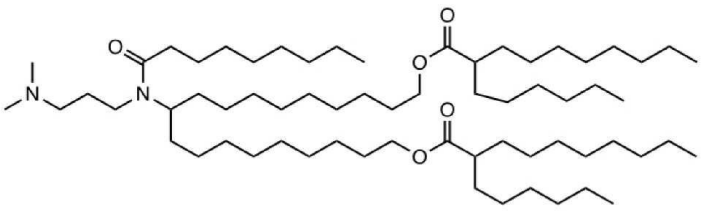
[0284] 일부 구현예에서, mRNA 치료 조성물 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:

[0285]  , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

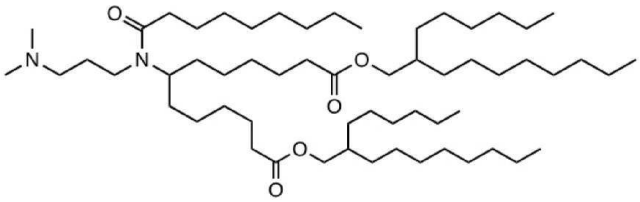
[0286] 일부 구현예에서, mRNA 치료 조성물 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:

[0287]  , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0288] 일부 구현예에서, mRNA 치료 조성물 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:

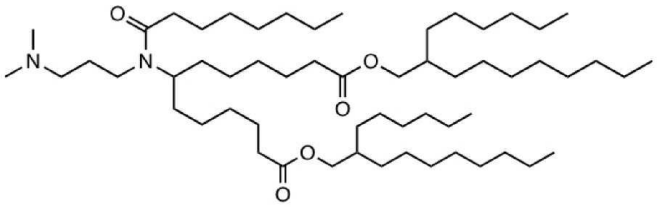
[0289]  , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0290] 일부 구현예에서, mRNA 치료 조성물 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:



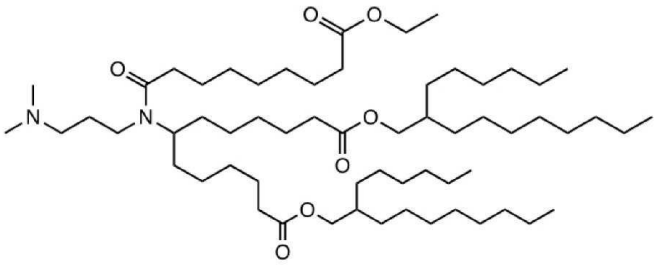
[0291] , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0292] 일부 구현예에서, mRNA 치료 조성물 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:



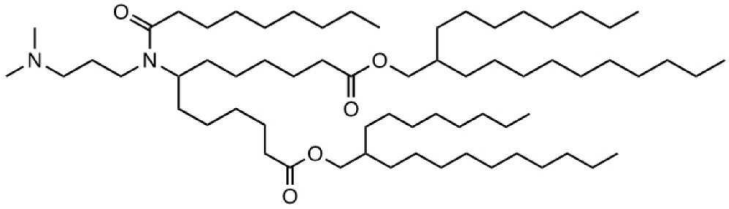
[0293]

[0294] 일부 구현예에서, mRNA 치료 조성물 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:



[0295] , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

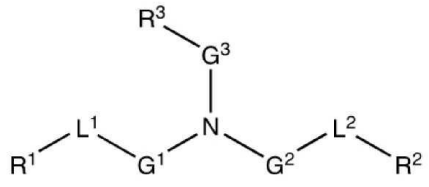
[0296] 일부 구현예에서, mRNA 치료 조성물 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:



[0297] , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0298] mRNA 치료 조성물에 사용하기에 적합한 다른 지질 및 이의 제조 및 사용 방법은 국제 특허 공개 WO 2017/075531에 기술된 것과 같은 지질을 포함하며, 동 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

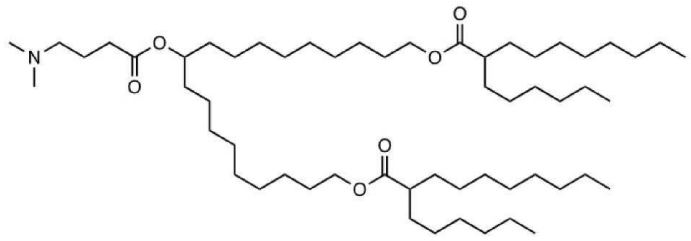
[0299] 일부 구현예에서, mRNA 치료 조성물 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음 식의 지질:



[0300] , 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하되, 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-, 또는 직접 결합이고; G^1 및 G^2는 각각 독립적으로 미치환된 C_1-C_{12} 알킬렌 또는 C_1-C_{12} 알케닐렌이고; G^3은 C_1-C_{24} 알킬렌, C_1-C_{24} 알케닐렌, C_3-C_8 시클로알킬렌, C_3-C_8 시클로알케닐렌이고; R^a는 H 또는 C_1-C_{12} 알킬이고;

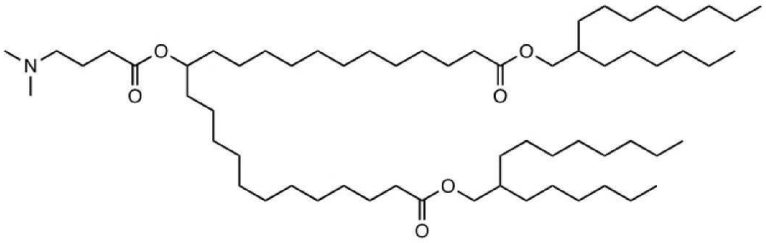
R^1 및 R^2는 각각 독립적으로 C_6-C_{24} 알킬 또는 C_6-C_{24} 알케닐이고; R^3은 H, OR^5, CN, -C(=O)OR^4, -OC(=O)R^4 또는 -NR^5C(=O)R^4이고; R^4는 C_1-C_{12} 알킬이고; R^5는 H 또는 C_1-C_6 알킬이고; x는 0, 1 또는 2이다.

[0301] mRNA 치료 조성물에 사용하기에 적합한 다른 지질 및 이의 제조 및 사용 방법은 국제 특허 공개 WO 2017/117528에 기술된 것과 같은 지질을 포함하며, 동 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다. 일부 구현예에서, mRNA 치료 조성물 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:



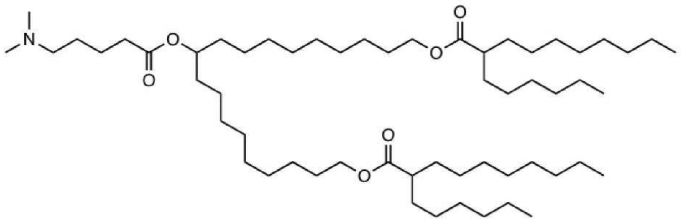
[0302] , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0303] 일부 구현예에서, mRNA 치료 조성물 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:



[0304] , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

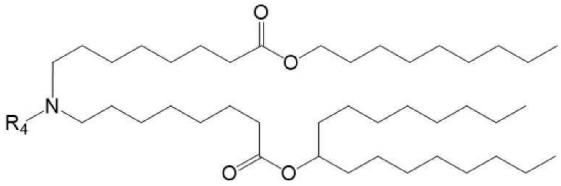
[0305] 일부 구현예에서, mRNA 치료 조성물 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:



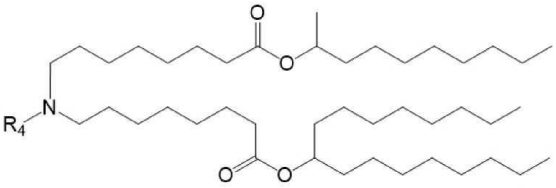
[0306] , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0307] mRNA 치료 조성물에 사용하기에 적합한 다른 지질 및 이의 제조 및 사용 방법은 국제 특허 공개 WO 2017/049245에 기술된 것과 같은 지질을 포함하며, 동 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

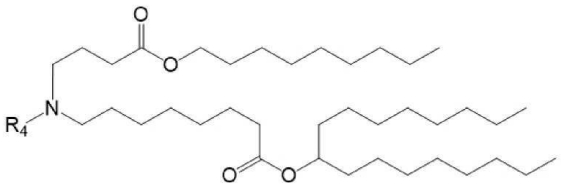
[0308] 일부 구현예에서, mRNA 치료 조성물의 지질 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음 식 중 하나의 화합물:

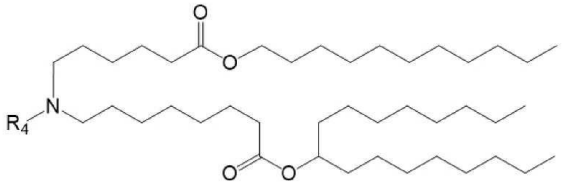


[0309]

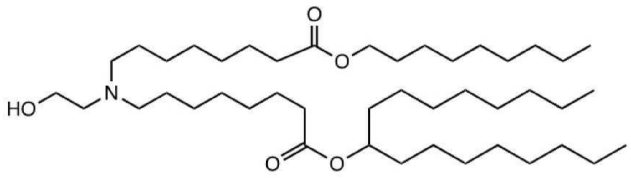


[0310]

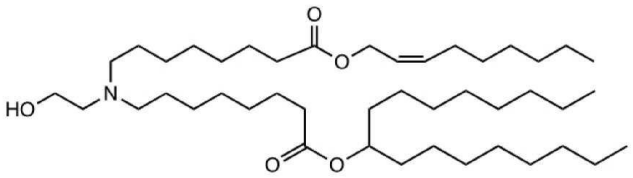
[0311] 

[0312] , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다. 이들 4개의 식 중 어느 하나의 경우, R_4는 독립적으로 $-(CH_2)_nQ$ 및 $-(CH_2)_nCHQR$로부터 선택되고; Q는 -OR, -OH, $-O(CH_2)_nN(R)_2$, -OC(O)R, $-CX_3$, -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 군으로부터 선택되고; n은 1, 2, 또는 3이다.

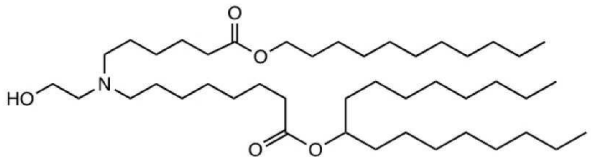
[0313] 소정의 구현예에서, mRNA 치료 조성물 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:

[0314] , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

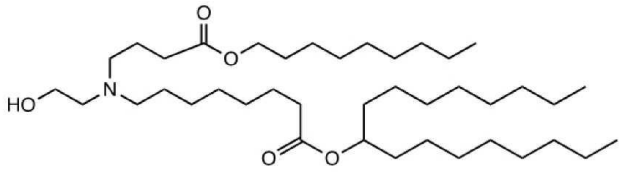
[0315] 소정의 구현예에서, mRNA 치료 조성물 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:

[0316] , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

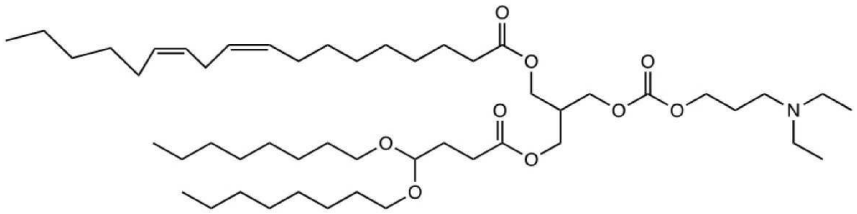
[0317] 소정의 구현예에서, mRNA 치료 조성물 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:

[0318] , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

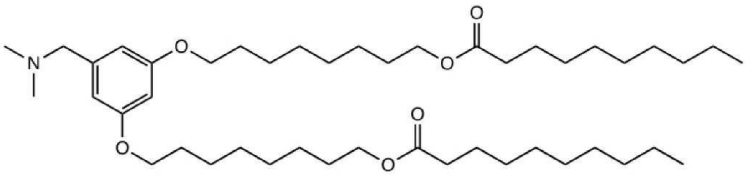
[0319] 소정의 구현예에서, mRNA 치료 조성물 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:

[0320] , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

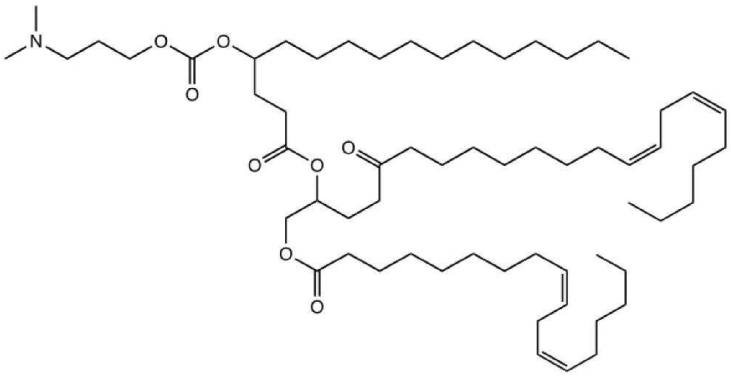
[0321] mRNA 치료 조성물에 사용하기에 적합한 다른 지질 및 이의 제조 및 사용 방법은 국제 특허 공개 WO 2017/173054 및 WO 2015/095340에 기술된 것과 같은 지질을 포함하며, 동 문헌 각각은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다. 소정의 구현예에서, mRNA 치료 조성물 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:

[0322]  , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

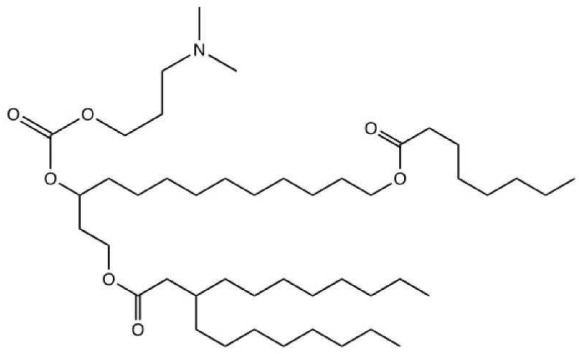
[0323] 소정의 구현예에서, mRNA 치료 조성물 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:

[0324]  , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0325] 소정의 구현예에서, mRNA 치료 조성물 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:

[0326]  , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0327] 소정의 구현예에서, mRNA 치료 조성물 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:

[0328]  , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0329] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 LPMP는 WO2016118724, WO2016118725, WO2016187531, WO2017176974, WO2018078053, WO2019027999, WO2019036030, WO2019089828, WO2019099501, WO2020072605, WO2020081938, WO2020118041, WO2020146805, 또는 WO2020219876에 기술된 것과 같은 이온화 가능 지질을 포함하거나, 이에 기술된 것과 같이 제형화되거나, 이에 기술된 것과 같은 조성물을 포함하거나 이에 의해 포함될 수 있으며, 동 문헌 각각은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

[0330] *기타 지질 및 기타 제제*

[0331] 외인성 지질은 세포 투과제일 수 있고, LPMP에 의한 세포로의 폴리펩티드의 전달을 증가시킬 수 있고/있거나 폴리펩티드의 로딩(예를 들어, 로딩 효율 또는 로딩 용량)을 증가시킬 수 있다. 추가의 예시적인 외인성 지질은 스테롤 및 PEG화된 지질을 포함한다.

[0332] LPMP는 다른 성분(예를 들어, 지질, 예를 들어, 스테롤, 예를 들어, 콜레스테롤; 또는 소분자)으로 변형되어 LPMP의 기능적 특성 및 구조적 특성을 추가로 변경할 수 있다. 예를 들어, LPMP는 LPMP의 안정성(예를 들어, 실온에서 적어도 하루 동안 및/또는 4℃에서 적어도 일주일 동안 안정적임)을 증가시키는 안정화 분자로 추가로 변형될 수 있다.

[0333] 일부 구현예에서, LPMP는 스테롤, 예를 들어 시토스테롤, 시토스타놀, β-시토스테롤, 7α-하이드록시콜레스테롤, 프레그네놀론, 콜레스테롤(예를 들어, 난소 콜레스테롤 또는 식물로부터 단리된 콜레스테롤), 스티그마스테롤, 캄페스테롤, 푸코스테롤, 또는 임의의 스테롤의 유사체(예를 들어, 글리코시드, 에스테르, 또는 펩티드)로 변형된다. 일부 예에서, 외인성 스테롤은 단계 (b) 이전에 제제에 첨가, 예를 들어 단계 (b) 이전에 추출된 PMP 지질과 혼합된다. 외인성 스테롤은, 예를 들어, 제제 중 총 지질 및 스테롤의 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, , 또는 90%(w/w)를 초과하는 양으로 첨가될 수 있다.

[0334] 일부 구현예에서, 스테롤은 콜레스테롤 또는 시토스테롤이다. 일부 경우에, LPMP는 적어도 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, , 또는 60% 초과의 스테롤(예를 들어, 콜레스테롤 또는 시토스테롤), 예를 들어, 1%~10%, 10%-20%, 20%-30%, 30%-40%, 40%-50%, , 또는 50%~60%의 스테롤의 몰비를 포함한다. 일부 구현예에서, LPMP는 약 35%~50%의 스테롤(예를 들어, 콜레스테롤 또는 시토스테롤), 예를 들어, 약 36%, 38.5%, 42.5%, 또는 46.5%의 스테롤의 몰비를 포함한다. 일부 구현예에서, LPMP는 약 20%~40%의 스테롤의 몰비를 포함한다.

[0335] 일부 구현예에서, 스테롤로 변형된 LPMP는 스테롤로 변형되지 않은 LPMP에 비해 안정성을 변경(예를 들어, 안정성을 증가)시킨다. 일부 양태에서, 스테롤로 변형된 LPMP는 스테롤로 변형되지 않은 LPMP에 비해 표적 세포의 막과 더 큰 융합율을 갖는다.

[0336] 일부 경우에, LPMP는 외인성 지질 및 외인성 스테롤을 포함한다.

[0337] 일부 구현예에서, LPMP는 PEG화된 지질로 변형된다. 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 길이는 1kDa 내지 10kDa로 다양할 수 있고; 일부 양태에서는, 2kDa의 길이를 갖는 PEG가 사용된다. 일부 구현예에서, 페길화된 지질은 C14-PEG2k, C18-PEG2k, 또는 DMPE-PEG2k이다. 일부 경우에, LPMP는 적어도 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 0.6%, 0.7%, 0.8%, 0.9%, 1%, 1.1%, 1.2%, 1.3%, 1.4%, 1.5%, 1.6%, 1.7%, 1.8%, 1.9%, 2%, 2.1%, 2.2%, 2.3%, 2.4%, 2.5%, 2.6%, 2.7%, 2.8%, 2.9%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 또는 50% 초과의 페길화된 지질(예를 들어, C14-PEG2k, C18-PEG2k, 또는 DMPE-PEG2k), 예를 들어 0.1%~0.5%, 0.5%~1%, 1%~1.5%, 1.5%~2.5%, 2.5%~3.5%, 3.5%~5%, 5%~10%, 10%~20%, 20%~30%, 30%~40%, 또는 30%~50%의 페길화된 지질의 몰비를 포함한다. 일부 구현예에서, LPMP는 약 0.1%~10%의 페길화된 지질(예를 들어, C14-PEG2k, C18-PEG2k, 또는 DMPE-PEG2k), 예를 들어 약 1%~3%의 페길화된 지질, 예를 들어 약 1.5% 또는 약 2.5%의 페길화된 지질의 몰비를 포함한다. 일부 구현예에서, 페길화된 지질로 변형된 LPMP는 페길화된 지질로 변형되지 않은 LPMP에 비해 안정성을 변경(예를 들어, 안정성을 증가)시킨다. 일부 구현예에서, 페길화된 지질로 변형된 LPMP는 페길화된 지질로 변형되지 않은 LPMP에 비해 입자 크기가 변경된다. 일부 구현예에서, 페길화된 지질로 변형된 LPMP는 페길화된 지질로 변형되지 않은 LPMP보다 식균될 가능성이 적다. 또한, 페길화 지질의 첨가는 GI 관의 안정성에 영향을 미치고 점액을 통한 입자 이동을 향상시킬 수 있다. PEG는 표적화 모이어티를 부착하는 방법으로서 사용될 수 있다.

[0338] 일부 구현예에서, LPMP는 이온화 가능 지질(예를 들어, C12-200 또는 MC3) 및 스테롤(예를 들어, 콜레스테롤 또는 시토스테롤) 및 PEG화된 지질(예를 들어, C14-PEG2k, C18-PEG2k, 또는 DMPE-PEG2k) 중 하나 또는 둘 모두로 변형된다.

[0339] 일부 구현예에서, 변형된 LPMP는 약 5%~50%의 LPMP 지질(예를 들어, 약 10%~20%의 LPMP 지질, 예를 들어 약 10%, 12.5%, 16%, 또는 20%의 LPMP 지질); 약 30%~75%의 이온화 가능 지질(예를 들어, 약 35% 또는 약 50%의 이온화 가능 지질); 약 35%~50%의 스테롤(예를 들어, 약 36%, 38.5%, 42.5%, 또는 46.5%의 스테롤); 및 약 0.1%~10%의 PEG화된 지질(예를 들어, 약 1%~3%의 PEG화된 지질, 예를 들어, 약 1.5% 또는 약 2.5%의 PEG화된 지질)의 몰비를 포함한다.

[0340] 일부 구현예에서, 변형된 LPMP는 5%~60%의 LPMP 지질(예를 들어, 약 10%~20%, 20%-30%, 30%-40%, 40%-50%, 또는 50%~60%의 LPMP 지질, 예를 들어, 약 10%, 12.5%, 16%, 20%, 30%, 40%, 50%, 또는 60%의 LPMP 지질); 약 25%~75%의 이온화 가능 지질(예를 들어, 약 35% 또는 약 50%의 이온화 가능 지질); 약 10%~50%의 스테롤(예를 들어, 약 10%, 12.5%, 14%, 16%, 18%, 20%, 36%, 38.5%, 42.5%, 또는 46.5%의 스테롤); 및 약 0.1%~10%의 PEG

화된 지질(예를 들어, 약 0.5%~5%의 PEG화된 지질, 예를 들어, 약 1%~3%의 PEG화된 지질, 또는 약 1.5% 또는 약 2.5%의 PEG화된 지질)의 몰비를 포함한다.

[0341] 일부 구현예에서, 이온화 가능 지질, LPMP 지질, 스테롤, 및 PEG화된 지질은 변형된 PMP 중 지질의 약 25%~75%, 약 20%~60%, 약 10%~45%, 및 약 0.5%~5%를 각각 포함한다.

[0342] 일부 구현예에서, 이온화 가능 지질, LPMP 지질, 스테롤, 및 PEG화된 지질은 변형된 PMP 중 지질의 약 30%~75%, 약 20%~50%, 약 10%~45%, 및 약 1%~5%를 각각 포함한다.

[0343] 일부 구현예에서, 이온화 가능 지질, LPMP 지질, 스테롤, 및 PEG화된 지질은 변형된 PMP 중 지질의 약 35%~75%, 약 20%~50%, 약 10%~45%, 및 약 1%~5%를 각각 포함한다.

[0344] 일부 구현예에서, 이온화 가능 지질, LPMP 지질, 스테롤, 및 PEG화된 지질은 약 35:50:12.5:2.5의 몰비로 제형화된다.

[0345] 일부 구현예에서, 이온화 가능 지질, LPMP 지질, 스테롤, 및 PEG화된 지질은 약 35:50:11.5:3.5의 몰비로 제형화된다.

[0346] 일부 구현예에서, 이온화 가능 지질, LPMP 지질, 스테롤, 및 PEG화된 지질은 약 35:20:42.5:2.5의 몰비로 제형화된다.

[0347] 일부 구현예에서, 이온화 가능 지질(및/또는 양이온성 지질) 및 스테롤 및/또는 PEG화된 지질로 변형된 LPMP는 이온화 가능 지질(및/또는 양이온성 지질) 및 스테롤 및/또는 PEG화된 지질로 변형되지 않은 LPMP보다 음으로 하전된 물질(예를 들어, 핵산)을 보다 효율적으로 캡슐화한다. 변형된 LPMP는 물질(예를 들어, 핵산(예를 들어 RNA 또는 DNA))에 대한 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, 또는 99% 초과인 캡슐화 효율, 예를 들어 5%~30%, 30%-50%, 50%-70%, 70%-80%, 80%-90%, 90%-95%, , 또는 95%~100%의 캡슐화 효율을 가질 수 있다.

[0348] 변형된 LPMP의 세포 흡수는 당업계에 공지된 다양한 방법에 의해 측정될 수 있다. 예를 들어, LPMP 또는 이의 성분은 단리된 세포에서 검출되어 흡수를 확인할 수 있는 마커(예를 들어, 형광 마커)로 표지될 수 있다.

[0349] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 LPMP 제형은 2개 이상의 상이한 변형된 LPMP를 포함하고, 예를 들어, 상이한 미변형된 LPMP(예를 들어, 2개 이상의 상이한 식물 공급원으로부터의 미변형된 LPMP)로부터 유래된 변형된 LPMP를 포함하고/하거나, 상이한 종 및/또는 상이한 비율의 이온화 가능 지질, 스테롤, 및/또는 페길화된 지질을 포함하는 변형된 LPMP를 포함한다.

[0350] 일부 경우에, 지질 막이 용해되는 유기 용매는 디메틸포름아미드:메탄올(DMF:MeOH)이다. 대안적으로, 유기 용매 또는 용매 조합은, 예를 들어, 아세토니트릴, 아세톤, 에탄올, 메탄올, 디메틸포름아미드, 테트라하이드로푸란, 1-부탄올, 디메틸 설폭시드, 아세토니트릴:에탄올, 아세토니트릴:메탄올, 아세톤:메탄올, 메틸 tert-부틸 에테르:프로판올, 테트라하이드로푸란:메탄올, 디메틸 설폭시드:메탄올, 또는 디메틸포름아미드:메탄올일 수 있다.

[0351] 수성 상은 임의의 적합한 용액, 예를 들어 구연산염 완충액(예를 들어, 약 3.2의 pH를 갖는 구연산염 완충액), 물, 또는 인산염 완충 식염수(PBS)일 수 있다. 수성 상은 핵산(예를 들어, siRNA 또는 siRNA 전구체(예를 들어, dsRNA), miRNA 또는 miRNA 전구체, mRNA, 또는 플라스미드(pDNA)) 또는 소분자를 추가로 포함할 수 있다.

[0352] 지질 용액 및 수성 상은 임의의 적절한 비율로 미세유체 장치에서 혼합될 수 있다. 일부 예에서, 수성 상 및 지질 용액은 3:1 부피비로 혼합된다.

[0353] LPMP는 임의적으로 추가 제제, 예를 들어, 세포 투과제, 치료제, 폴리뉴클레오티드, 폴리펩티드, 또는 소분자를 포함할 수 있다. LPMP는 다양한 방식으로 추가 제제를 운반하거나 이와 결합하여, 예를 들어 제제를 캡슐화하거나, 지질 이중층 구조 내에 제제를 삽입하거나, 지질 이중층 구조의 표면과 제제를 결합(예를 들어, 접합에 의해)시킴으로써 표적 식물로 제제를 전달할 수 있다. 핵산 분자는 생체 내(예를 들어, 식물 내) 또는 시험관 내(예를 들어, 조직 배양 내, 세포 배양 내, 또는 합성적으로 삽입됨) LPMP에 삽입될 수 있다.

[0354] *제타 전위*

[0355] 이온화 가능 지질(예를 들어, C12-200 또는 MC3) 및 임의로 양이온성 지질(예를 들어, DC-콜레스테롤 또는 DOTAP)을 포함하는 LPMP는, 예를 들어, 물질이 부재할 때 -30mV 초과의 제타 전위, 물질이 부재할 때 -20mV 초과, -5mV 초과, 0mV 초과, 또는 약 30mv의 제타 전위를 가질 수 있다. 일부 예에서, LPMP는 물질이 부재할 때

음의 제타 전위, 예를 들어 0mV 미만, -10mV 미만, -20mV 미만, -30mV 미만, -40mV 미만, 또는 -50mV 미만의 제타 전위를 갖는다. 일부 예에서, LPMP는 물질이 부재할 때 양의 제타 전위, 예를 들어 0mV 초과, 10mV 초과, 20mV 초과, 30mV 초과, 40mV 초과, 또는 50mV 초과의 제타 전위를 갖는다. 일부 예에서, LPMP는 약 0의 제타 전위를 갖는다.

[0356] LPMP의 제타 전위는 당업계에 공지된 임의의 방법을 사용하여 측정될 수 있다. 일반적으로 제타 전위는 간접적으로 측정, 예를 들어 당업계에 공지된 방법 및 기술, 예를 들어 전기영동 이동성 또는 동적 전기영동 이동성을 사용하여 수득된 데이터로부터 이론적 모델을 사용하여 계산된다. 통상적으로 전기영동 이동성은 마이크로 전기영동, 전기영동 광 산란, 또는 조정 가능한 저항 펄스 감지를 사용하여 측정된다. 전기영동 광 산란은 동적 광 산란에 기초한다. 통상적으로, 제타 전위는 광자 상관 분광법 또는 준탄성 광 산란으로도 알려진 동적 광 산란(DLS) 측정을 통해 접근 가능하다.

[0357] *식물 EV-마커*

[0358] mRNA 치료 조성물 내의 LPMP 및 이의 제조 및 사용 방법은 식물 EV를 사용하고/하거나 이의 분절, 부분, 또는 추출물을 포함하여 생산되고 있는 것으로서 LPMP를 식별하는 다양한 마커를 가질 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "식물 EV-마커"는 식물과 자연적으로 연관되고, 식물 단백질, 식물 핵산, 식물 소분자, 식물 지질, 또는 이들의 조합과 같은 식물 내에서 식물 EV 내로 또는 그 상으로 삽입되는 성분을 지칭한다. 식물 EV-마커의 예는, 예를 들어, Rutter 및 Innes의 문헌[*Plant Physiol.* 173(1): 728~741, 2017]; Raimondo 등의 문헌[*Oncotarget*. 6(23): 19514, 2015]; Ju 등의 문헌[*Mol. Therapy*. 21(7):1345~1357, 2013]; Wang 등의 문헌[*Molecular Therapy*. 22(3): 522~534, 2014]; 및 Regente 등의 문헌[*J of Exp. Biol.* 68(20): 5485~5496, 2017]에서 확인할 수 있고 각각의 동 문헌은 본원에 참조로서 통합된다.

[0359] 적합한 식물 EV-마커의 추가 예는 국제 특허 출원 공개 WO 2021/041301에 기재되고 열거된 것들을 포함하며, 동 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

[0360] *제제(예를 들어, 핵산)의 로딩*

[0361] LPMP는 치료제(예를 들어, 핵산 분자)를 포함하도록 변형되어 mRNA 치료 조성물을 형성한다. LPMP는 다양한 방식으로 이러한 제제를 운반하거나 이와 결합하여, 예를 들어 제제를 캡슐화하거나, 지질 이중층 구조 내에 성분을 삽입하거나, LPMP의 지질 이중층 구조의 표면과 성분을 결합(예를 들어, 접합에 의해)시킴으로써 표적 유기체(예를 들어, 표적 동물)로 제제를 전달할 수 있다. 일부 경우에, 제제는 본원에 기술된 바와 같이 LPMP 제형에 포함된다.

[0362] 제제는 LPMP와 제제 사이의 결합을 직접적으로 또는 간접적으로 허용하는, 당업계에 공지된 임의의 방법에 의해 LPMP 내에 또는 LPMP 상에 삽입되거나 로딩될 수 있다. 제제는 생체 내 방법에 의해 (예를 들어, 식물 내에서, 예를 들어, 제제를 포함하는 유전자이식 식물로부터의 LPMP의 생산을 통해), 또는 시험관 내 방법에 의해 (예를 들어, 조직 배양 내에서, 또는 세포 배양 내에서), 또는 생체 내 및 시험관 내 방법 둘 모두에 의해 LPMP에 삽입될 수 있다.

[0363] 일부 경우에, LPMP는 시험관 내에 로딩된다. 물질은 비제한적으로 물리적, 화학적, 및/또는 생물학적 방법(예를 들어, 조직 배양물 또는 세포 배양물)을 사용하여 LPMP 상에 또는 LPMP 내에 로딩될 수 있다(예를 들어, 이에 의해 캡슐화될 수 있음). 예를 들어, 제제는 전기천공, 초음파처리, 수동 확산, 교반, 지질 추출, 또는 압출 중 하나 이상에 의해 LPMP 내로 도입될 수 있다. 일부 경우에, 제제는 미세유체 장치를 사용하여, 예를 들어, LPMP 지질이 유기 상으로 제공되는 방법을 사용하여 LPMP에 삽입되고, 이종 작용제는 수성 상으로 제공되며, 유기 상 및 수성 상은 미세유체 장치에서 조합되어 이종 작용제를 포함하는 LPMP를 생성한다. 로딩된 LPMP는 (예를 들어, 소분자를 평가하는) HPLC, (예를 들어, 단백질을 평가하는) 면역블롯팅; 및/또는 (예를 들어, 뉴클레오티드를 평가하는) 정량적 PCR과 같은 다양한 방법을 사용하여 평가되어 로딩된 제제의 존재 또는 수준을 확인할 수 있다. 그러나, 당업자는 관심 물질을 LPMP에 로딩하는 것은 상기 예시된 방법에 한정되지 않는다는 것을 이해해야 한다.

[0364] 일부 경우에, 제제는 LPMP에 접합될 수 있으며, 여기서 제제는 LPMP에 간접적으로 또는 직접적으로 연결되거나 결합된다. 예를 들어, 하나 이상의 제제가 (예를 들어, 공유 결합 또는 이온 결합에 의해) LPMP의 지질 이중층에 직접 결합되도록 하나 이상의 제제가 LPMP에 화학적으로 연결될 수 있다. 일부 경우에, LPMP에 대한 다양한 제제의 접합은 먼저 하나 이상의 제제를 적절한 용매에서 적절한 가교제(예를 들어, 일반적으로 일차 아민과의 아미드 결합을 위한 카르복실 활성화제로서 사용되고 또한 인산염기와 반응하는 N-에틸카르보-디이미드("ED

C"))와 혼합함으로써 달성될 수 있다. 제제가 가교제에 부착될 수 있게 하기에 충분한 인큐베이션 기간 후, 가교제/제제 혼합물은 LPMP와 조합될 수 있고, 이어서 또 다른 인큐베이션 기간 후, 수크로오스 구배(및, 예를 들어 8, 30, 45, 및 60% 수크로오스 구배)를 수행하여 LPMP에 접합된 제제로부터 유리 제제 및 유리 LPMP를 분리할 수 있다. 혼합물을 수크로오스 구배와 조합하는 단계, 및 수반되는 원심분리 단계의 일부로서, 제제에 접합된 LPMP는 수크로오스 구배에서 밴드로서 보여지므로, 접합된 LPMP는 그런 다음 수집, 세척, 및 본원에 기술된 바와 같이 사용하기에 적합한 용액에 용해될 수 있다.

[0365] 일부 경우에, LPMP는, 예를 들어 식물로 LPMP 전달 전후에 제제와 안정적으로 결합된다. 다른 경우에, LPMP는, 예를 들어 식물로 LPMP 전달한 후에 제제가 LPMP로부터 해리되도록 제제와 결합된다.

[0366] LPMP는 특정 제제 또는 용도에 따라, 다양한 농도의 제제로 로딩되거나 이와 제형화될 수 있다. 예를 들어, 일부 경우에, 본원에 개시된 LPMP 제형이 약 0.001, 0.01, 0.1, 1.0, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 또는 95(또는 약 0.001 내지 95 사이의 임의의 범위) 또는 그 이상의 중량%의 제제를 포함하도록 LPMP가 로딩되거나 제형화된다. 일부 경우에, LPMP 제형이 약 95, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1.0, 0.1, 0.01, 0.001(또는 약 95 내지 0.001 사이의 임의의 범위) 또는 그 이하의 중량%의 제제를 포함하도록 LPMP가 로딩되거나 제형화된다. 예를 들어, LPMP 제형은 약 0.001 내지 약 0.01 중량%, 약 0.01 내지 약 0.1 중량%, 약 0.1 내지 약 1 중량%, 약 1 내지 약 5 중량%, 또는 약 5 내지 약 10 중량%, 약 10 내지 약 20 중량%의 제제를 포함할 수 있다. 일부 경우에, LPMP는 약 1, 5, 10, 50, 100, 200, 또는 500, 1,000, 2,000(또는 약 1 내지 2,000의 임의의 범위) 또는 그 이상의 μg/ml의 제제와 로딩될 수 있거나 이로 제형화된다. 본 발명의 LPMP는 약 2,000, 1,000, 500, 200, 100, 50, 10, 5, 1(또는 약 2,000 내지 1의 임의의 범위) 이하의 μg/ml의 제제와 로딩될 수 있거나 이로 제형화될 수 있다.

[0367] 일부 경우에, 본원에 개시된 LPMP 제형은 적어도 0.001 중량%, 적어도 0.01 중량%, 적어도 0.1 중량%, 적어도 1.0 중량%, 적어도 2 중량%, 적어도 3 중량%, 적어도 4 중량%, 적어도 5 중량%, 적어도 6 중량%, 적어도 7 중량%, 적어도 8 중량%, 적어도 9 중량%, 적어도 10 중량%, 적어도 15 중량%, 적어도 20 중량%, 적어도 30 중량%, 적어도 40 중량%, 적어도 50 중량%, 적어도 60 중량%, 적어도 70 중량%, 적어도 80 중량%, 적어도 90 중량%, 또는 적어도 95 중량%의 제제를 포함하도록 LPMP가 로딩되거나 제형화된다. 일부 경우에, LPMP는 적어도 1μg/ml, 적어도 5μg/ml, 적어도 10μg/ml, 적어도 50μg/ml, 적어도 100μg/ml, 적어도 200μg/ml, 적어도 500μg/ml, 적어도 1,000μg/ml, 적어도 2,000μg/ml의 제제와 로딩되거나 이와 제형화될 수 있다.

[0368] 일부 경우에, LPMP는 제제를 포함하거나 이로 이루어진 용액에 LPMP를 현탁, 예를 들어 격력한 혼합에 의해 LPMP를 현탁 또는 재현탁함으로써 제제와 제형화된다. 제제(예를 들어, 세포 투과제, 예를 들어 핵산, 효소, 세제, 이온성, 형광성, 또는 양성이온성 액체, 또는 이온화 가능 지질)는, 예를 들어, 용액의 1% 미만 또는 적어도 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 100%를 포함할 수 있다.

[0369] *약학적 제형*

[0370] 변형된 LPMP는, 예를 들어, 동물(예를 들어, 인간)에게 투여하기 위한 약학적 조성물(즉, mRNA 치료 조성물)로 제형화된다. 약학적 조성물은 약학적으로 허용 가능한 희석제, 담체, 및/또는 부형제와 함께 동물(예를 들어, 인간)에게 투여될 수 있다. 투여 방식 및 투여량에 따라, 본원에 기술된 방법의 약학적 조성물은 용이한 전달을 가능하게 하는 적절한 약학적 조성물로 제형화될 것이다. 단일 투여량은 필요에 따라 단위 투여량 형태일 수 있다.

[0371] LPMP/mRNA 치료 조성물은, 예를 들어, 동물에게 경구 투여, 정맥내 투여(예를 들어, 주사 또는 주입), 근육내 투여, 또는 피하 투여하기 위해 제형화될 수 있다. 주사 가능한 제형의 경우, 다양한 효과적인 약학적 담체가 당업계에 공지되어 있다(예를 들어, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 22판, (2012) 및 ASHP Handbook on Injectable Drugs, 18판, (2014) 참조함).

[0372] 적절한 약학적으로 허용 가능한 담체 및 부형제는 사용된 투여량 및 농도에서 수용자에게 무독성이다. 허용 가능한 담체 및 부형제는 인산염, 구연산염, HEPES, 및 TAE와 같은 완충액, 아스코르브산 및 메티오닌과 같은 항산화제, 헥사메토늄 염화물, 옥타데실디메틸벤질 염화암모늄, 레조르시놀, 및 염화벤잘코늄과 같은 보존제, 인간 혈청 알부민, 젤라틴, 덱스트란, 및 면역글로불린과 같은 단백질, 폴리비닐피롤리돈과 같은 친수성 중합체, 글리신, 글루타민, 히스티딘, 및 리신과 같은 아미노산, 및 포도당, 만노오스, 수크로오스, 및 소르비톨과 같은 탄수화물을 포함할 수 있다. LPMP/mRNA 치료 조성물은 종래의 약학적 관행에 따라 제형화될 수 있다. 제형 중 화합물의 농도는 투여될 활성제(예를 들어, LPMP 및 핵산)의 투여량, 및 투여 경로를 포함하는 다수의 인자에

따라 달라질 것이다.

[0373] 동물에게 경구 투여하기 위해 LPMP/mRNA 치료 조성물은 경구 제형의 형태로 제조될 수 있다. 경구 사용을 위한 제형은 약학적으로 허용 가능한 비독성 부형제와의 혼합물에 활성 성분(들)을 함유하는 정제, 캐플릿, 캡슐, 시럽, 또는 경구 액체 투여 형태를 포함할 수 있다. 이들 부형제는, 예를 들어, 불활성 희석제 또는 충전제(예를 들어, 수크로오스, 소르비톨, 당, 만니톨, 미정질 셀룰로오스, 감자 전분을 포함하는 전분, 탄산칼슘, 염화나트륨, 락토오스, 인산칼슘, 황산칼슘, 또는 인산나트륨); 과립화제 및 붕해제(예를 들어, 미정질 셀룰로오스를 포함하는 셀룰로오스 유도체, 감자 전분을 포함하는 전분, 크로스카멜로오스 나트륨, 알긴산염, 또는 알긴산); 결합제(예를 들어, 수크로오스, 포도당, 소르비톨, 아카시아, 알긴산, 알긴산 나트륨, 젤라틴, 전분, 전호화 전분, 미정질 셀룰로오스, 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨, 메틸셀룰로오스, 하이드록시프로필 메틸셀룰로오스, 에틸셀룰로오스, 폴리비닐피롤리돈, 또는 폴리에틸렌 글리콜); 및 윤활제, 활택제, 및 유착 방지제(예를 들어, 스테아린산마그네슘, 스테아린산 아연, 스테아르산, 실리카, 수소화된 식물성 오일, 또는 활석)일 수 있다. 다른 약학적으로 허용 가능한 부형제는 착색제, 향미제, 가소제, 습윤제, 완충제 등일 수 있다. 또한 경구 사용을 위한 제형은 씹을 수 있는 정제, 씹을 수 없는 정제, 캐플릿, 캡슐(예를 들어, 활성 성분이 불활성 고형 희석제와 혼합되는 경질 젤라틴 캡슐, 또는 활성 성분이 물 또는 오일 매질과 혼합되는 연질 젤라틴 캡슐)로서 단위 투여 형태로 제공될 수 있다. 또한 본원에 개시된 조성물은 즉시 방출형, 연장 방출형, 또는 지연 방출형 제형을 추가로 포함할 수 있다.

[0374] 동물에게 비경구 투여하기 위해 LPMP/mRNA 치료 조성물은 액체 용액 또는 현탁액의 형태로 제형화되고, 비경구 경로(예를 들어, 피하, 정맥내, 또는 근육내)에 의해 투여될 수 있다. 약학적 조성물은 주사용 또는 주입용으로 제형화될 수 있다. 비경구 투여용 약학적 조성물은 멸균 용액 또는 임의의 약학적으로 허용 가능한 액체를 비히클로서 사용하여 제형화될 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 비히클은 멸균수, 생리 식염수, 또는 세포 배양 배지(예를 들어, DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium), α-MEM(α-Modified Eagles Medium), 및 F-12 배지)를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 제형화 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어, Gibson 편집한 문헌[Pharmaceutical Preformulation and Formulation(2판) Taylor & Francis Group, CRC Press (2009)]을 참조한다.

[0375] **폴리뉴클레오티드**

[0376] LPMP/mRNA 치료 조성물은 하나 이상의 야생형 또는 조작된 단백질, 펩티드, 또는 폴리펩티드를 암호화하는 하나 이상의 핵산 분자, 예를 들어, 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 예시적인 폴리뉴클레오티드, 예를 들어 폴리뉴클레오티드 작제물은 RNA 폴리뉴클레오티드, 예를 들어 mRNA를 암호화하는 항원을 포함한다.

[0377] 본원에서 사용될 수 있는 폴리펩티드의 예는 효소(예를 들어, 대사 재조합효소, 헬리카아제, 인테그라아제, RNAse, DNAse, 또는 유비퀴틴화 단백질), 기공 형성 단백질, 신호 전달 리간드, 세포 침투 펩티드, 전사 인자, 수용체, 항체, 나노바디, 유전자 편집 단백질(예를 들어, CRISPR-Cas 시스템, TALEN, 또는 아연 핑거), 리보단백질, 단백질 압타머, 또는 샤페론을 포함할 수 있다.

[0378] 본원에 포함된 폴리펩티드는 자연 발생 폴리펩티드 또는 재조합적으로 생산된 변이체를 포함할 수 있다. 일부 경우에, 폴리펩티드는 기능적 단편 또는 이의 변이체(예를 들어, 효소적으로 활성인 단편 또는 이의 변이체)일 수 있다. 예를 들어, 폴리펩티드는, 예를 들어 특정 영역 또는 전체 서열에 걸쳐 본원에 기술된 폴리펩티드 또는 자연 발생 폴리펩티드의 서열과 적어도 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 본원에 기술된 폴리펩티드 중 어느 하나의 기능적 활성 변이체일 수 있다. 일부 경우에, 폴리펩티드는 관심 단백질과 적어도 50%(예를 들어, 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 99%, 또는 그 이상)의 동일성을 가질 수 있다.

[0379] LPMP/mRNA 치료 조성물은 임의의 수 또는 유형(예를 들어, 부류)의 폴리펩티드, 예컨대 1개의 폴리펩티드, 2개, 3개, 4개, 5개, 10개, 15개, 20개, 또는 그 이상의 폴리펩티드 중 적어도 약 하나를 포함할 수 있다. LPMP/mRNA 치료 조성물 중 각각의 폴리펩티드의 적절한 농도는 효능, 폴리펩티드의 안정성, 제형에서 구별되는 폴리펩티드의 수, 및 제형의 적용 방법과 같은 인자에 따라 달라진다. 일부 경우에, 액체 제형 내 각각의 폴리펩티드는 약 0.1ng/mL 내지 약 100mg/mL이다. 일부 경우에, 고형 제형 내 각각의 폴리펩티드는 약 0.1ng/g 내지 약 100mg/g이다.

[0380] *펩티드를 암호화하는 핵산*

[0381] 일부 경우에, LPMP/mRNA 치료 조성물은 폴리펩티드를 암호화하는 이종 핵산을 포함한다. 폴리펩티드를 암호화하는 핵산의 길이는 약 10개 내지 약 50,000개의 뉴클레오티드(nts), 약 25개 내지 약 100개의 nts, 약 50개 내지 약 150개의 nts, 약 100개 내지 약 200개의 nts, 약 150개 내지 약 250개의 nts, 약 200개 내지 약 300개의 nts, 약 250개 내지 약 350개의 nts, 약 300개 내지 약 500개의 nts, 약 10개 내지 약 1000개의 nts, 약 50개 내지 약 1000개의 nts, 약 100개 내지 약 1000개의 nts, 약 1000개 내지 약 2000개의 nts, 약 2000개 내지 약 3000개의 nts, 약 3000개 내지 약 4000개의 nts, 약 4000개 내지 약 5000개의 nts, 약 5000개 내지 약 6000개의 nts, 약 6000개 내지 약 7000개의 nts, 약 7000개 내지 약 8000개의 nts, 약 8000개 내지 약 9000개의 nts, 약 9000개 내지 약 10,000개의 nts, 약 10,000개 내지 약 15,000개의 nts, 약 10,000개 내지 약 20,000개의 nts, 약 10,000개 내지 약 25,000개의 nts, 약 10,000개 내지 약 30,000개의 nts, 약 10,000개 내지 약 40,000개의 nts, 약 10,000개 내지 약 45,000개의 nts, 약 10,000개 내지 약 50,000개의 nts, 또는 이들 사이의 임의의 범위일 수 있다.

[0382] 또한 LPMP/mRNA 치료 조성물은 관심 핵산 서열의 활성 변이체를 포함할 수 있다. 일부 경우에, 핵산의 변이체는, 예를 들어 특정 영역에 걸쳐 또는 전체 서열에 걸쳐 관심 핵산의 서열과 적어도 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는다. 일부 경우에, 본 발명은 본원에 기술된 바와 같은 핵산 변이체에 의해 암호화된 활성 폴리펩티드를 포함한다. 일부 경우에, 핵산 변이체에 의해 암호화된 활성 폴리펩티드는, 예를 들어 특정 영역에 걸쳐 또는 전체 아미노산 서열에 걸쳐 관심 폴리펩티드 서열 또는 자연 유래 폴리펩티드 서열과 적어도 70%, 또는 99%의 동일성을 갖는다.

[0383] 단백질을 암호화하는 핵산을 발현시키기 위한 특정 방법은 적절한 프로모터의 조절 하에 곤충, 효모, 식물, 박테리아, 또는 다른 세포를 포함하는 세포에서의 발현을 포함할 수 있다. 발현 벡터는 전사되지 않은 요소, 예컨대 복제 기원, 적절한 프로모터 및 인핸서, 및 다른 5' 또는 3' 측부 비 전사 서열, 및 5' 또는 3' 미번역 서열, 예컨대 필요한 리보솜 결합 부위, 폴리아데닐화 부위, 스플라이스 공여자 및 수용자 부위, 및 종결 서열을 포함할 수 있다. SV40 바이러스 게놈으로부터 유래된 DNA 서열, 예를 들어, SV40 기원, 초기 프로모터, 인핸서, 스플라이스, 및 폴리아데닐화 부위는 이종 DNA 서열의 발현에 필요한 다른 유전적 요소를 제공하는 데 사용될 수 있다. 박테리아, 진균, 효모 및 포유류 세포 숙주와 함께 사용하기 위한 적절한 클로닝 및 발현 벡터는 Green 등의 문헌[Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4판, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012]에 기술되어 있다.

[0384] 재조합 방법을 사용한 유전적 변형은 일반적으로 당업계에 공지되어 있다. 바람직한 유전자를 코딩하는 핵산 서열은 당업계에 공지된 재조합 방법을 사용하여, 예를 들어 유전자를 발현하는 세포로부터 라이브러리를 스크리닝함으로써, 이를 포함하는 것으로 알려진 벡터로부터 유전자를 유도함으로써, 또는 표준 기술을 사용하여 이를 함유하는 세포 및 조직으로부터 직접 단리함으로써 수득될 수 있다. 대안적으로, 관심 유전자는 클로닝되기보다는 합성적으로 생산될 수 있다.

[0385] 통상적으로 천연 핵산 또는 합성 핵산의 발현은 관심 유전자를 암호화하는 핵산을 프로모터에 작동 가능하게 연결하고 작제물을 발현 벡터에 삽입시킴으로써 달성된다. 발현 벡터는 박테리아에서의 복제 및 발현에 적합할 수 있다. 또한 발현 벡터는 진핵생물에서의 복제 및 통합에 적합할 수 있다. 통상적인 클로닝 벡터는 바람직한 핵산 서열의 발현에 유용한 전사 및 번역 종결자, 개시 서열, 및 프로모터를 함유한다.

[0386] 추가 프로모터 요소, 예를 들어 인핸서는 전사 개시의 빈도를 조절한다. 통상적으로, 이들은 시작 부위의 상류에 있는 영역 30~110 염기쌍(bp)에 위치하지만, 다수의 프로모터가 최근에 시작 부위의 하류에 기능적 요소 또한 함유하는 것으로 나타났다. 프로모터 요소 사이의 간격은 종종 가요성이어서, 요소가 서로에 대해 반전되거나 이동될 때 프로모터 기능이 보존된다. 티미딘 키나아제(tk) 프로모터에서, 프로모터 요소 사이의 간격은 활성이 감소하기 시작하기 전에 50bp까지 증가될 수 있다. 프로모터에 따라, 개별 요소는 전사를 활성화하기 위해 협력적으로 또는 독립적으로 기능할 수 있는 것으로 보인다.

[0387] 적절한 프로모터의 일례는 즉각적인 초기 거대세포바이러스(CMV) 프로모터 서열이다. 이러한 프로모터 서열은 작동 가능하게 연결된 임의의 폴리뉴클레오티드 서열의 높은 수준의 발현을 유도할 수 있는 강한 구성적 프로모터 서열이다. 적합한 프로모터의 또 다른 예는 신장성장인자-1α(EF-1α)이다. 그러나 다음을 포함하지만 이에 한정되지 않는 다른 구성 프로모터 서열이 또한 사용될 수 있다: 유인원 바이러스 40(SV40) 초기 프로모터, 마우스 유방 종양 바이러스(MMTV), 인간 면역 결핍 바이러스(HIV) 긴 말단 반복(LTR) 프로모터, MoMuLV 프로모터, 조류 백혈병 바이러스 프로모터, Epstein-Barr 바이러스 즉시 초기 프로모터, Rous 육종 바이러스 프로모터, 및

인간 유전자 프로모터, 예컨대 이에 한정되지는 않지만, 액틴 프로모터, 미오신 프로모터, 헤모글로빈 프로모터, 및 크레아틴 키나아제 프로모터.

[0388] 대안적으로, 프로모터는 유도성 프로모터일 수 있다. 유도성 프로모터의 사용은 이러한 발현이 바람직할 때 작동 가능하게 연결되는 폴리뉴클레오티드 서열의 발현을 발동시키거나, 발현이 바람직하지 않을 때 발현을 발동시키지 않는 분자 스위치를 제공한다. 유도성 프로모터의 예는 메탈로티오닌 프로모터, 글루코코르티코이드 프로모터, 프로게스테론 프로모터, 및 테트라사이클린 프로모터를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0389] 또한 도입될 발현 벡터는 선택성 마커 유전자 또는 리포터 유전자 또는 둘 모두를 함유하여 바이러스 벡터를 통해 형질감염되거나 감염되고자 하는 세포 집단으로부터 발현 세포의 식별 및 선택을 용이하게 할 수 있다. 다른 양태에서, 선택성 마커는 별도의 DNA 조각 상에서 운반될 수 있고 공동 형질감염 절차에 사용될 수 있다. 선택성 마커 및 리포터 유전자 둘 모두는 적절한 조절 서열이 측면에 위치하여 숙주 세포에서의 발현을 가능하게 할 수 있다. 유용한 선택성 마커는, 예를 들어 네오 등과 같은 항생제-저항성 유전자를 포함한다.

[0390] 리포터 유전자는 잠재적으로 형질전환된 세포를 식별하고 조절 서열의 기능을 평가하는 데 사용될 수 있다. 일반적으로, 리포터 유전자는 수용자 공급원에 존재하지 않거나 수용자 공급원에 의해 발현되지 않으며, 발현이 일부 쉽게 검출 가능한 특성, 예를 들어 효소 활성에 의해 나타나는 폴리펩티드를 암호화하는 유전자이다. 리포터 유전자의 발현은 DNA가 수용자 세포 내로 도입된 후 적절한 시간에 분석된다. 적절한 리포터 유전자는 루시페라아제, 베타-갈락토시다아제, 클로람페니콜 아세틸 트랜스퍼라아제, 분비된 알칼리 인산분해효소, 또는 녹색 형광 단백질 유전자를 암호화하는 유전자를 포함할 수 있다(예를 들어, Ui-Tei 등의 문헌[FEBS Letters 479:79~82, 2000]). 적절한 발현 시스템은 잘 알려져 있으며 공지된 기술을 사용하여 제조되거나 상업적으로 수득될 수 있다. 일반적으로, 리포터 유전자의 가장 높은 발현 수준을 보여주는 최소 5' 측부 영역을 갖는 작제물은 프로모터로서 식별된다. 이러한 프로모터 영역은 리포터 유전자에 연결될 수 있고, 프로모터 유도 전사를 조절하는 능력에 대해 제제를 평가하는 데 사용될 수 있다.

[0391] 일부 경우에, 유기체는 유전적으로 변형되어 하나 이상의 단백질의 변경할 수 있다. 하나 이상의 단백질의 발현은 특정 시간, 예를 들어 유기체의 발생 또는 분화 상태 동안 변형될 수 있다. 하나의 경우에, 하나 이상의 단백질, 예를 들어 활성, 구조, 또는 기능에 영향을 미치는 단백질의 발현을 변경하기 위한 조성물이 제공된다. 하나 이상의 단백질의 발현은 특정 위치(들)로 제한되거나 유기체 전체에 걸쳐 확산될 수 있다.

[0392] *mRNA*

[0393] LPMP/mRNA 치료 조성물은 mRNA 분자, 예를 들어 폴리펩티드를 암호화하는 mRNA 분자를 포함할 수 있다. mRNA 분자는 합성이며, (예를 들어, 화학적으로) 변형될 수 있다. mRNA 분자는 시험관 내에서 화학적으로 합성되거나 전사될 수 있다. mRNA 분자는 플라스미드, 예를 들어 바이러스 벡터, 박테리아 벡터, 또는 진핵생물 발현 벡터 상에 배치될 수 있다. 일부 예에서, mRNA 분자는 형질감염, 전기천공, 또는 형질도입(예를 들어, 아데노바이러스 또는 렌티바이러스 형질도입)에 의해 세포로 전달될 수 있다.

[0394] 일부 경우에, 본원에 기술된 변형된 관심 RNA 제제는 변형된 뉴클레오시드 또는 뉴클레오티드를 갖는다. 이러한 변형은 공지되어 있고, 예를 들어 WO 2012/019168에 기술되어 있다. 추가적인 변형은, 예를 들어 WO 2015/038892; WO 2015/038892; WO 2015/089511; WO 2015/196130; WO 2015/196118 및 WO 2015/196128 A2에 기술되어 있으며, 동 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

[0395] 일부 경우에, 관심 폴리펩티드를 암호화하는 변형된 RNA는 하나 이상의 말단 변형, 예를 들어, 5' 캡 구조 및/또는 (예를 들어, 100개 내지 200개 뉴클레오티드 길이의) 폴리-A 꼬리를 갖는다. 5' 캡 구조는 Cap0, Cap1, ARCA, 이노신, N1-메틸-구아노신, 2'플루오로-구아노신, 7-데아자-구아노신, 8-옥소-구아노신, 2-아미노-구아노신, LNA-구아노신, 및 2-아지도-구아노신으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 일부 경우에, 변형된 RNA는 또한 적어도 하나의 코작 서열을 포함하는 5' UTR 및 3' UTR을 함유한다. 이러한 변형은 공지되어 있고, 예를 들어 WO 2012/135805 및 WO 2013/052523에 기술되어 있으며, 동 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다. 추가적인 말단 변형은, 예를 들어 WO 2014/164253, 및 WO 2016/011306, WO 2012/045075, 및 WO 2014/093924에 기술되어 있으며, 동 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다. 적어도 하나의 화학적 변형을 포함할 수 있는 캡핑된 RNA 분자(예를 들어, 변형된 mRNA)를 합성하기 위한 키메라 효소는 WO 2014/028429에 기술되어 있으며, 동 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

[0396] 일부 경우에, 변형된 mRNA(mmRNA)는 고리화되거나 연쇄화(concatemerize)되어, 폴리-A 결합 단백질과 5'-말단 결합 단백질 사이의 상호작용을 보조하기 위한 번역 적격 분자를 생성할 수 있다. 고리화 또는 연쇄화

(concatemerization) 메커니즘은 적어도 3개의 상이한 경로를 통해 발생할 수 있다: 1) 화학적 경로, 2) 효소적 경로, 및 3) 리보자임 촉매된 경로. 새롭게 형성된 5'-/3'- 결합은 분자내 또는 분자간 발생할 수 있다. 이러한 변형은, 예를 들어 WO 2013/151736에 기술되어 있다.

[0397] 변형된 RNA를 제조하고 정제하는 방법은 당업계에 공지되고 개시되어 있다. 예를 들어, 변형된 RNA는 시험관 내 전사(IVT) 효소 합성만을 사용하여 제조된다. IVT 폴리뉴클레오티드를 제조하는 방법은 당업계에 공지되어 있고, WO 2013/151666, WO 2013/151668, WO 2013/151663, WO 2013/151669, WO 2013/151670, WO 2013/151664, WO 2013/151665, WO 2013/151671, WO 2013/151672, WO 2013/151667 및 WO 2013/151736에 기술되어 있으며, 동 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다. 정제 방법은, RNA 전사체가 표면에 결합하도록 하는 조건 하에서 복수의 티미딘 또는 이의 유도체 및/또는 복수의 우라실 또는 이의 유도체(폴리T/U)와 결합된 표면과 시료를 접촉시킴으로써 폴리A 꼬리를 포함하는 RNA 전사체를 정제하고 정제된 RNA 전사체를 표면으로부터 용리하는 단계(WO 2014/152031); 확장 가능한 방법을 통해 길이가 최대 10,000개의 뉴클레오티드인 더 긴 RNA를 분리시키는 이온(예를 들어, 음이온) 교환 크로마토그래피를 사용하는 단계(WO 2014/144767); 및 변형된 mRNA 시료를 DNAse 처리하는 단계(WO 2014/152030)를 포함한다.

[0398] 변형된 RNA의 제형은 공지되어 있고, 예를 들어 WO 2013/090648에 기술되어 있다. 예를 들어, 제형은 나노입자, 폴리(락트-코-글리콜산)(PLGA) 미소구체, 리피도이드, 리포플렉스, 리포좀, 중합체, 탄수화물(단리당 포함), 양이온성 지질, 피브린 겔, 피브린 하이드로겔, 피브린 글루, 피브린 밀봉제, 피브리노겐, 트롬빈, 신속하게 제거되는 지질 나노입자(reLNP) 및 이들의 조합일 수 있지만, 이에 한정되지 않는다.

[0399] 인간 질환, 항체, 바이러스, 및 다양한 생체 내 환경 분야에서 폴리펩티드를 암호화하는 변형된 RNA가 공지되어 있고, 예를 들어 국제 공개 번호 WO 2013/151666, WO 2013/151668, WO 2013/151663, WO 2013/151669, WO 2013/151670, WO 2013/151664, WO 2013/151665, WO 2013/151736; 의 표 6; 국제 공개 번호 WO 2013/151672의 표 6 및 표 7; 국제 공개 번호 WO 2013/151671의 표 6, 표 178, 및 표 179; 국제 공개 번호 WO 2013/151667의 표 6, 표 185, 및 표 186에 기술되어 있으며, 동 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다. 전술한 것 중 어느 하나는 IVT 폴리뉴클레오티드, 키메라 폴리뉴클레오티드 또는 원형 폴리뉴클레오티드로서 합성될 수 있고, 각각은 하나 이상의 변형된 뉴클레오티드 또는 말단 변형을 포함할 수 있다.

[0400] *억제 RNA*

[0401] 일부 경우에, LPMP/mRNA 치료 조성물은, 예를 들어 RNA 간섭(RNAi) 경로를 통해 작용하는 억제 RNA 분자를 포함한다. 일부 경우에, 억제 RNA 분자는 식물에서 유전자 발현 수준을 감소시키고/시키거나 식물에서 단백질의 수준을 감소시킨다. 일부 경우에, 억제 RNA 분자는 식물 유전자의 발현을 억제한다. 예를 들어, 억제 RNA 분자는 식물에서 유전자를 표적화하는 짧은 간섭 RNA 또는 이의 전구체, 짧은 헤어핀 RNA, 및/또는 마이크로RNA 또는 이의 전구체를 포함할 수 있다. 소정의 RNA 분자는 RNA 간섭(RNAi)의 생물학적 과정을 통해 유전자 발현을 억제할 수 있다. RNAi 분자는 통상적으로 15~50개의 염기쌍(예컨대, 약 18~25개의 염기쌍)을 함유하고 세포 내에서 발현된 표적 유전자의 코딩 서열과 동일하거나(또는 상보성) 거의 동일한(또는 실질적으로 상보성) 핵염기 서열을 갖는 RNA 또는 RNA-유사 구조를 포함한다. RNAi 분자는 짧은 간섭 RNA(siRNA), 이중 가닥 RNA(dsRNA), 짧은 헤어핀 RNA(shRNA), 중이중체, 다이서 기질, 및 다가 RNA 간섭(미국 특허 제8,084,599호, 제8,349,809호, 제8,513,207호, 및 제9,200,276호에 기술되어 있으며, 동 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다)을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 억제 RNA 분자는 시험관 내에서 화학적으로 합성되거나 전사될 수 있다.

[0402] 억제 RNA 분자의 추가 예시는 국제 특허 출원 공개 WO 2021/041301에 상세히 기술된 것들을 포함하며, 동 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

[0403] *유전자 편집*

[0404] 일부 경우에, LPMP/mRNA 치료 조성물은 유전자 편집 시스템의 성분을 포함할 수 있다. 예를 들어, 제제는 식물의 유전자에 변경(예를 들어, 삽입, 결실(예를 들어, 녹아웃), 전위, 반전, 단일 지점 돌연변이, 또는 다른 돌연변이)을 도입할 수 있다. 예시적인 유전자 편집 시스템은 징크 핑거 뉴클레아제(ZFN), 전사 활성화제-유사 효과기-기반 뉴클레아제(TALEN), 및 군집화된 조절 간격 짧은 회문 반복(CRISPR) 시스템을 포함한다. ZFN, TALEN, 및 CRISPR-기반 방법은, 예를 들어 Gaj 등의 문헌[Trends Biotechnol. 31(7):397~405, 2013]에 기술되어 있다.

[0405] 유전자 편집 시스템의 성분 및 프로세스에 대한 추가 설명은 국제 특허 출원 공개 WO 2021/041301에서 확인할 수 있으며, 동 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

[0406] **mRNA 치료제**

[0407] LPMP/mRNA 치료 조성물은 암을 예방하는 것과 같은 치료 목적을 위해 하나 이상의 항원성 폴리펩티드 또는 신호 전달 폴리펩티드를 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)를 포함한다. 하나 이상의 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)는 하나 이상의 항원성(예를 들어, 종양 항원성) 폴리펩티드 또는 신호 전달 폴리펩티드를 암호화한다.

[0408] *종양 항원 및 신호 전달 치료제*

[0409] 암 또는 종양은 신생물, 악성 종양, 전이, 또는 조절되지 않은 세포 성장을 특징으로 하여 암성으로 간주될 임의의 질환 또는 장애를 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 암은 원발성 또는 전이성 암일 수 있다. 본 발명에 따라 치료될 수 있는 특정 암은 아래에 열거된 것들을 포함하지만 이에 한정되지 않는다(이러한 장애의 검토를 위해 Fishman 등의 문헌(1985)[Medicine, 2d Ed., J.B. Lippincott Co., Philadelphia]을 참조함). 암은 다음을 포함하지만 이에 한정되지 않는다: 담도암; 방광암; 교모세포종 및 수모세포종을 포함하는 뇌암; 유방암; 자궁경부암; 융모암; 결장암; 자궁내막암; 식도암; 위암; 급성 림프구성 및 골수성 백혈병을 포함하는 혈액학적 종양; 다발성골수성; AIDS-연관 백혈병 및 성인 T-세포 백혈병 림프종; 보웬병 및 파제트병을 포함하는 상피내 신생물; 간암; 폐암; 호지킨병 및 림프구성림프종을 포함하는 림프종; 신경모세포종; 편평세포암종을 포함하는 구강암; 상피 세포, 간질 세포, 생식 세포 및 간엽 세포로부터 발생하는 것들을 포함하는 난소상피암; 췌장암; 전립선암; 직장암; 평활근육종, 횡문근육종, 지방육종, 섬유육종 및 골육종을 포함하는 육종; 흑색종, 카포시 육종, 기저세포암 및 편평세포암을 포함하는 피부암; 정상피종과 같은 배종양, 비정상피종, 기형종, 융모암을 포함하는 고환암; 간질종양 및 생식 세포 종양; 갑상선 선암종 및 수질암을 포함하는 갑상선암; 및 샘암종 및 윌름스종양을 포함하는 신장암. 흔히 발생하는 암은 유방암, 전립선암, 폐암, 난소암, 결장암, 및 뇌암을 포함한다.

[0410] 일부 구현예에서, 암은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된다: 비소세포폐암(NSCLC), 소세포폐암, 흑색종, 방광요로상피암종, HPV 음성 두경부 편평 세포 암종(HNSCC), 및 고-현미세부수체(MSI H)/불일치 복구(MMR) 결핍성인 고형 악성종양. 일부 구현예에서, NSCLC는 EGFR 감작 돌연변이 및/또는 ALK 전위가 결여되어 있다. 일부 구현예에서, 고-현미세부수체(MSI H)/불일치 복구(MMR) 결핍성인 고형 악성종양은 대장암, 위 선암종, 식도 선암종, 및 자궁내막암으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 암은 췌장암, 복막암, 대장암, 소장암, 담도암, 폐암, 자궁내막암, 난소암, 생식관암, 위장관암, 자궁경부암, 위암, 요로암, 결장암, 직장암, 및 조혈조직암 및 림프조직암으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 암은 대장암이다.

[0411] 일부 구현예에서, 항원성(예를 들어, 종양 항원성) 폴리펩티드 또는 신호 전달 폴리펩티드는 다음을 포함한다: p53, ART-4, BAGE, ss-카테닌/m, Bcr-abL CAMEL, CAP-1, CASP-8, CDC27/m, CDK4/m, CEA, CLAUDIN-12, c-MYC, CT, Cyp-B, DAM, ELF2M, ETV6-AML1, G250, GAGE, GnT-V, Gap 100, HAGE, HER-2/neu, HPV-E7, HPV-E6, HAST-2, hTERT (또는 hTRT), LAGE, LDLR/FUT, MAGE-A, 바람직하게는 MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE- A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A7, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11, 또는 MAGE-A12, MAGE-B, MAGE-C, MART-1/Melan-A, MC1R, 미오신/m, MUC1, MUM-1, -2, -3, NA88-A, NF1, NY-ESO-1, NY-BR-1, p190 마이너 BCR-abL, Plac-1, Pml/RARa, PRAME, 프로테이나제 3, PSA, PSM, RAGE, RU1 또는 RU2, SAGE, SART-1 또는 S ART-3, SCGB3A2, SCP1, SCP2, SCP3, SSX, SURVIVIN, TEL/AML1, TPI/m, TRP-1, TRP-2, TRP-2/INT2, TPTE, WT, WT-1, 또는 이들의 조합.

[0412] 일부 구현예에서, 종양 항원은 다음 항원 중 하나이다: CD2, CD3, CD4, CD8, CD11b, CD14, CD16, CD19, CD20, CD22, CD25, CD27, CD33, CD37, CD38, CD40, CD44, CD45, CD47, CD52, CD56, CD70, CD79, CD137, 4- IBB, 5T4, AGS-5 , AGS-16, 안지오포이에틴 2, B7.1, B7.2, B7DC, B7H1, B7H2, B7H3, BT-062, BTLA, CAIX, 암배아 항원, CTLA4, 크립토, ED-B, ErbB1, ErbB2, ErbB3, ErbB4, EGFL7, EpCAM, EphA2, EphA3, EphB2, FAP, 피브로넥틴, 엽산 수용체, 강글리오시드 GM3, GD2, 글루코코르디코드유도TNF수용체(GITR), gp100, gpA33, GPNMB, HLA, HLA-DR, ICOS, IGF1R, 인테그린 av, 인테그린 αvβ, LAG-3, 루이스 Y, 메소텔린, c-MET, MN 탄산탈수효소 IX, MUC1, MUC16, 넥틴-4, KGD2, NOTCH, OX40, OX40L, PD-1, PDL1, PSCA, PSMA, RANKL, ROR1, ROR2, SLC44A4, 신데칸-1, TACI, TAG-72, 테나신, TIM3, TRAILR1, TRAILR2, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, 및 이의 변이체.

[0413] 일부 구현예에서, 항원성, 종양 항원성, 또는 신호 전달 폴리펩티드는 IL-2 펩티드, IL-2-Ra, tdTomato, Cre 재조합효소, GFP, eGFP, 항CD19, 항CD20, CAR-T, 항HER2, 에타너셉트(엔브렐), 휴미라, 에리스로포이에틴, 에포겐, 필그라스팀, 키트루다, 리툭시맙, 로미플로스팀, 살그라모스팀, 또는 이의 단편 또는 서브유닛이다. 일 구

현예에서, 폴리펩티드는 IL-2 펩티드, 또는 이의 단편 또는 서브유닛이다. 일 구현예에서, 폴리펩티드는 에리스로포이에틴 또는 에포겐, 또는 이의 단편 또는 서브유닛이다.

[0414] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드에 의해 암호화된 폴리펩티드는 다음을 포함하는 항원성(예를 들어, 종양 항원성) 폴리펩티드는 또는 신호 전달 폴리펩티드이다: IL-1 α, IL-1β, IL-1ra, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL- 9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E, IL- 17F, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-28A/B, IL-29, IL-30, IL- 31, IL-32, IL-33, IL-35, TGF-β, GM-CSF, M-CSF, G-CSF, TNF-α, TNF-β, LAF, TCGF, BCGF, TRF, BAF, BDG, MP, LIF, OSM, TMF, PDGF, IFN-α, IFN-β, IFN-ɣ, 우테로글로빈, Foxp3, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL4, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCL14, CXCL15, CXCL16, CCL1, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL6, CCL7, CCL8, CCL9/10, CCL11, CCL12, CCL13, CCL14, CCL15, CCL16, CCL17, CCL18, CCL19, CCL20, CCL21, CCL22, CCL23, CCL24, CCL25, CCL26, CCL27, CCL28, XCL1, XCL2, CX3CL1 또는 이의 단편, 서브유닛, 또는 변이체.

[0415] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드에 의해 암호화된 폴리펩티드는 IL-15 펩티드, IL-15-Ra, 또는 이의 단편 또는 서브유닛이다. 일 구현예에서, 폴리펩티드는 IL-15 펩티드, 또는 이의 단편 또는 서브유닛이다.

[0416] 일부 구현예에서, 항원성, 종양 항원성, 또는 신호 전달 폴리펩티드는 암종, 육종, 흑색종, 림프종, 백혈병, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 종양 항원을 포함한다.

[0417] 일 구현예에서, 종양 항원성 폴리펩티드는 흑색종 종양 항원을 포함한다. 일 구현예에서, 종양 항원성 폴리펩티드는 전립선암 항원을 포함한다. 일 구현예에서, 종양 항원성 폴리펩티드는 HPV16 양성 두경부암 항원을 포함한다. 일 구현예에서, 종양 항원성 폴리펩티드는 유방암 항원을 포함한다. 일 구현예에서, 종양 항원성 폴리펩티드는 난소암 항원을 포함한다. 일 구현예에서, 종양 항원성 폴리펩티드는 폐암 항원을 포함한다. 일 구현예에서, 종양 항원성 폴리펩티드는 NSCLC 항원을 포함한다.

[0418] 일부 구현예에서, 항원은 자가 항원성 폴리펩티드 또는 면역원성 변이체 또는 이의 면역원성 단편이다. 일부 구현예에서, 자가 항원성 폴리펩티드는 통상적으로 세포에서 발현되고 면역 시스템에 의해 자가 항원으로 인식되는 항원을 포함한다. 일부 구현예에서, 자가 항원성 폴리펩티드는 다음을 포함한다: 다발성 경화증 항원성 폴리펩티드, 류마티스 관절염 항원성 폴리펩티드, 루푸스 항원성 폴리펩티드, 셀리악병 항원성 폴리펩티드, 쇼그렌 증후군 항원성 폴리펩티드, 또는 강직성 척추염 항원성 폴리펩티드, 또는 이들의 조합.

[0419] *면역 강화제 mRNA(Immune Potentiator mRNA)*

[0420] 일부 구현예에서, 하나 이상의 폴리뉴클레오티드는 하나 이상의 관심 암 항원에 대한 면역 반응을 자극하거나 향상시키는 폴리펩티드를 암호화하는 mRNA를 포함한다. 관심 암 항원(들)에 대한 면역 반응을 향상시키는 이러한 mRNA는 본원에서 화학적으로 변형된 mRNA(mmRNA)를 포함하여, 면역 강화제 mRNA 작제물 또는 면역 강화제 mRNA로서 지칭된다. 면역 강화제는 대상체에서 관심 항원에 대한 면역 반응을 향상시킨다. 향상된 면역 반응은 세포 반응, 체액 반응, 또는 둘 모두일 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "세포" 면역 반응은 T 세포를 포함하거나 이에 의해 매개되는 면역 반응을 포함하도록 의도되는 반면, "체액" 면역 반응은 B 세포를 포함하거나 이에 의해 매개되는 면역 반응을 포함하도록 의도된다. 면역 강화제는 예를 들어, 다음을 수행함으로써 면역 반응을 향상시킬 수 있다.

[0421] (i) I형 인터페론 경로 신호 전달을 자극;

[0422] (ii) NFkB 경로 신호 전달을 자극;

[0423] (iii) 염증 반응을 자극;

[0424] (iv) 사이토카인 생산을 자극; 또는

[0425] (v) 수지상 세포 발생, 활성, 또는 동원을 자극; 및

[0426] (vi) (i) 내지 (vi) 중 어느 하나의 조합.

[0427] 본원에서 사용되는 바와 같이, "I형 인터페론 경로 신호 전달의 자극"은 I형 인터페론 신호 전달 경로의 하나 이상의 성분을 활성화시키는 것(예를 들어, 이러한 성분의 인산화, 이량체화 등을 변형시킴으로써 경로를 활성화), 인터페론-민감성 반응 요소(interferon-sensitive response element, ISRE)로부터의 전사를 자극하는 것, 및/또는 I형 인터페론(예를 들어, IFN-a, IFN-β, IFN-ε, IFN-K 및/또는 IFN-co)의 생산 또는 분비를 자극하

는 것을 포함하도록 의도된다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "NFkB 경로 신호 전달의 자극"은 NFkB 신호 전달 경로의 하나 이상의 성분을 활성화시키는 것(예를 들어, 이러한 성분의 인산화, 이량체화 등을 변형시킴으로써 경로를 활성화), NFkB 부위로부터의 전사를 자극하는 것 및/또는 NFkB에 의해 발현이 조절되는 유전자산물의 생산을 자극하는 것을 포함하도록 의도된다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "염증 반응의 자극"은 염증성 사이토카인(I형 인터페론, IL-6 및/또는 TNFa를 포함하지만 이에 한정되지 않음)의 생산을 자극하는 것을 포함하도록 의도된다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "수지상 세포 발생, 활성, 또는 동원의 자극"은 직접 또는 간접적으로 수지상 세포 성숙, 증식 및/또는 기능적 활성을 자극하는 것을 포함하도록 의도된다.

[0428] 일부 구현예에서, mRNA는, 예를 들어, (예를 들어, I형 인터페론 생산을 자극함으로써) 적응 면역을 유도하고, 염증 반응을 자극하고, FkB 신호 전달을 자극하고/하거나, 대상체에서 수지상 세포(DC) 발생, 활성, 또는 동원을 자극함으로써, 이를 필요로 하는 대상체에서 면역 반응을 자극하거나 향상시키는(예를 들어, 대상체에서 면역 반응을 강화하는) 폴리펩티드를 암호화한다. 일부 구현예에서, 면역 강화제 mRNA를 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하면 대상체에서 세포 면역(예를 들어, T 세포 매개 면역), 체액 면역(예를 들어, B 세포 매개 면역) 또는 세포 면역 및 체액 면역 둘 모두가 향상된다. 일부 구현예에서, 면역 강화제 mRNA의 투여는 사이토카인 생산(예를 들어, 염증성 사이토카인 생산)을 자극하고, 암 항원-특이적 $CD8^+$ 효과기 세포 반응을 자극하고, 항원-특이적 $CD4^+$ 헬퍼 세포 반응을 자극하고, 효과기 기억 $CD62L^{10}$ T 세포 집단을 증가시키고, B 세포 활성을 자극하거나, 전술한 반응의 조합을 포함하여 항원-특이적 항체 생산을 자극한다. 일부 구현예에서, 면역 강화제 mRNA의 투여는 사이토카인 생산(예를 들어, 염증성 사이토카인 생산)을 자극하고, 항원-특이적 $CD8^+$ 효과기 세포 반응을 자극한다. 일부 구현예에서, 면역 강화제 mRNA의 투여는 사이토카인 생산(예를 들어, 염증성 사이토카인 생산)을 자극하고, 항원-특이적 $CD4^+$ 헬퍼 세포 반응을 자극한다. 일부 구현예에서, 면역 강화제 mRNA의 투여는 사이토카인 생산(예를 들어, 염증성 사이토카인 생산)을 자극하고, 효과기 기억 $CD62L^{10}$ T 세포 집단을 증가시킨다. 일부 구현예에서, 면역 강화제 mRNA의 투여는 사이토카인 생산(예를 들어, 염증성 사이토카인 생산)을 자극하고, B 세포 활성을 자극하거나 항원-특이적 항체 생산을 자극한다.

[0429] 일 구현예에서, 면역 강화제는 암 항원-특이적 $CD8^+$ 효과기 세포 반응(세포 면역)을 증가시킨다. 예를 들어, 면역 강화제는 CD8+ T 세포 증식 및 CD8+ T 세포 사이토카인 생산을 포함하지만 이에 한정되지 않는 항원-특이적 CD8+ 효과기 세포 활성의 하나 이상의 지표를 증가시킬 수 있다. 예를 들어, 일 구현예에서, 면역 강화제는 항원-특이적 CD8+ T 세포에 의한 IFN-ɣ, TNFa 및/또는 IL-2의 생산을 증가시킨다. 다양한 구현예에서, (면역 강화제가 없는 상태에서, CD8+ T 세포 사이토카인 생산과 비교하여) 면역 강화제는 항원에 반응하여 CD8+ T 세포 사이토카인 생산(예를 들어, IFN-ɣ, TNFa 및/또는 IL-2 생산)을 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 15% 또는 적어도 20% 또는 적어도 25% 또는 적어도 30% 또는 적어도 35% 또는 적어도 40% 또는 적어도 45% 또는 적어도 50%만큼 증가시킬 수 있다. 예를 들어, 치료된 대상체로부터 수득된 T 세포는 암 항원을 사용하여 시험관 내에서 자극될 수 있고, CD8+ T 세포 사이토카인 생산은 시험관 내에서 평가될 수 있다. CD8+ T 세포 사이토카인 생산은, (예를 들어, ELISA 또는 상청액 중 사이토카인의 양을 결정하기 위해 당업계에 공지된 다른 적절한 방법에 의한) 분비된 사이토카인 생산 수준의 측정 및/또는 사이토카인에 대한 세포내 염색(ICS)에 양성인 CD8+ T 세포의 백분율의 결정을 포함하지만 이에 한정되지 않는 당업계에 공지된 표준 방법에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, IFN-ɣ, TNFa 및/또는 JL-2의 발현을 위한 CD8+ T 세포의 세포내 염색(ICS)은 당업계에 공지된 방법에 의해 수행될 수 있다. 일 구현예에서, (면역 강화제가 없는 상태에서, ICS에 의해 사이토카인(들)에 대해 양성인 CD8+ T 세포의 백분율과 비교하여) 면역 강화제는 항원에 반응하여 ICS에 의해 하나 이상의 사이토카인(예를 들어, IFN-ɣ, TNFa 및/또는 IL-2)에 대해 양성인 CD8+ T 세포의 백분율을 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 15%> 또는 적어도 20% 또는 적어도 25% 또는 적어도 30%> 또는 적어도 35% 또는 적어도 40% 또는 적어도 45% 또는 적어도 50%만큼 증가시킨다.

[0430] 일 구현예에서, 면역 강화제가 없는 상태에서의 CD8+ T 세포의 백분율과 비교하여, 면역 강화제는 총 T 세포 집단(예를 들어, 비장 T 세포 및/또는 PBMC) 중 CD8+ T 세포의 백분율을 증가시킨다. 예를 들어, 면역 강화제가 없는 상태에서의 CD8+ T 세포의 백분율과 비교하여, 면역 강화제는 총 T 세포 집단 중 CD8+ T 세포의 백분율을 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 15% 또는 적어도 20% 또는 적어도 25% 또는 적어도 30% 또는 적어도 35% 또는 적어도 40% 또는 적어도 45% 또는 적어도 50%만큼 증가시킬 수 있다. 총 T 세포 집단 중 CD8+ T 세포의 총 백분율은 FACS(fluorescent activated cell sorting) 또는 MACS(magnetic activated cell sorting)를 포함하지만 이에 한정되지 않는 당업계에 공지된 표준 방법에 의해 결정될 수 있다.

[0431] 일 구현예에서, 면역 강화제가 없는 상태에서의 종양 부피와 비교하여, 면역 강화제는 면역 강화제의 존재 시 생체 내 종양 부피의 감소에 의해 결정할 때, 종양 특이적 면역 세포 반응을 증가시킨다. 예를 들어, 면역 강화제가 없는 상태에서의 종양 부피와 비교하여, 면역 강화제는 종양 부피를 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 15% 또는 적어도 20% 또는 적어도 25% 또는 적어도 30% 또는 적어도 35% 또는 적어도 40% 또는 적어도 45% 또는 적어도 50%만큼 감소시킬 수 있다. 종양 부피의 측정은 당업계에 잘 확립된 방법에 의해 결정될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 면역 강화제가 없는 상태에서의 항원-특이적 항체 생산과 비교하여, 면역 강화제는, 예를 들어, 항원-특이적 항체 생산의 양을 증가시킴으로써 B 세포 활성(체액 면역 반응)을 증가시킨다. 예를 들어, 면역 강화제가 없는 상태에서의 항원-특이적 항체 생산과 비교하여, 면역 강화제는 항원-특이적 항체 생산을 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 15% 또는 적어도 20% 또는 적어도 25% 또는 적어도 30%> 또는 적어도 35% 또는 적어도 40% 또는 적어도 45% 또는 적어도 50%만큼 증가시킬 수 있다. 일 구현예에서, 항원-특이적 IgG 생산이 평가된다. 항원-특이적 항체 생산은 시료(예를 들어, 혈청 시료)에서 항원-특이적 항체(예를 들어, IgG)의 수준을 측정하는, ELISA, RIA 등을 포함하지만 이에 한정되지 않는 당업계에 잘 확립된 방법에 의해 평가될 수 있다.

[0432] 일 구현예에서, 면역 강화제는 효과기 기억 $CD62L^{10}$ T 세포 집단을 증가시킨다. 예를 들어, 면역 강화제는 CD8+ T 세포 중 $CD62L^{10}$ T 세포의 총 백분율(%)을 증가시킬 수 있다. 기능 중에서 특히 효과기 메모리 $CD62L^{10}$ T 세포 집단은 림프구 수송에서 중요한 기능을 하는 것으로 나타났다(예를 들어, Schenkel, J.M. 및 Masopust, D.의 문헌(2014)[Immunity 41:886~897] 참조). 다양한 구현예에서, (면역 강화제가 없는 상태에서 CD8+ T 세포 집단 중 $CD62L^{10}$ T 세포의 총 백분율과 비교하여) 면역 강화제는 항원에 반응하여 CD8+ T 세포 중 효과기 기억 $CD62L^{10}$ T 세포의 총 백분율을 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 15% 또는 적어도 20% 또는 적어도 25% 또는 적어도 30% 또는 적어도 35% 또는 적어도 40% 또는 적어도 45% 또는 적어도 50%만큼 증가시킬 수 있다. CD8+ T 세포 중 효과기 기억 $CD62L^{10}$ T 세포의 총 백분율은 FACS(fluorescent activated cell sorting) 또는 MACS(magnetic activated cell sorting)를 포함하지만 이에 한정되지 않는 당업계에 공지된 표준 방법에 의해 결정될 수 있다.

[0433] 암 항원에 대한 면역 반응을 향상시키는 면역 강화제 mRNA의 능력은 당업계에 공지된 마우스 모델 시스템에서 평가될 수 있다. 일 구현예에서, 면역 적격 마우스 모델 시스템이 사용된다. 일 구현예에서, 마우스 모델 시스템은 C57/B16 마우스를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 마우스 모델 시스템은 (항원-특이적 항체 반응과 같은 B 세포 반응을 평가하기 위해) BalbC 마우스 또는 CD1 마우스를 포함한다. 일 구현예에서, 면역 강화제 폴리펩티드는 적어도 하나의 톨유사수용체(TLR)의 하류에서 기능하여 면역 반응을 향상시킨다. 따라서, 일 구현예에서, 면역 강화제는 TLR이 아닌, 수용체 자체로부터 하류에 있는 TLR 신호 전달 경로 내의 분자이다.

[0434] 일 구현예에서, 면역 강화제를 암호화하는 mRNA는 하나 이상의 변형된 핵염기를 포함할 수 있다. 적절한 변형이 이하에서 추가로 논의된다.

[0435] 일 구현예에서, 면역 강화제를 암호화하는 mRNA는 LPMP 제형으로 제형화된다. 일 구현예에서, mRNA는 암 항원을 암호화한다. 일 구현예에서, LPMP/mRNA 제형은 대상체에게 투여되어 대상체에서 암 항원에 대한 면역 반응을 향상시킨다.

[0436] *I형 인터페론을 자극하는 면역 강화제 mRNA*

[0437] 일부 구현예에서, 본 개시는 I형 인터페론 경로 신호 전달을 자극하거나 향상시켜 I형 인터페론(IFN) 생산을 자극하거나 향상시킴으로써 관심 항원에 대한 면역 반응을 자극하거나 향상시키는 폴리펩티드를 암호화하는 면역 강화제 mRNA를 제공한다.

[0438] STING, IRF1, IRF3, IRF5, IRF7, IRF8, 및 IRF9와 같은 인터페론 조절 인자, TBK1, IKKi, MyD88 및 TRAM을 포함하여 I형 IFN 경로 신호 전달에 관여하는 다수의 성분이 확립되었다. I형 IFN 경로 신호 전달에 관여하는 추가 성분은 TRAF3, TRAF6, IRAK-1, IRAK-4, TRIF, IPS-1, TLR-3, TLR-4, TLR-7, TLR-8, TLR-9, RIG-1, DAI, 및 IFI16을 포함한다.

[0439] 따라서, 일 구현예에서, 면역 강화제 mRNA는 I형 IFN 경로 신호 전달에 관여하는 전술한 성분 중 어느 하나를 암호화한다.

[0440] *항원 제시 세포의 촉진을 위한 제제*

[0441] 일부 구현예에서, LPMP/mRNA 치료 조성물은, 예를 들어, 비-항원 제시 세포(APC)를 슈도-APC로 전환시킴으로써

APC의 생산을 촉진하기 위한 제제와 조합될 수 있다. 항원 제시는 면역 반응의 개시, 증폭 및 지속기간의 주요 단계이다. 이 과정에서 항원의 단편은

[0442] 항원-특이적 면역 반응을 유도하는 T 세포에 대한 주요조직적합성복합체(MHC) 또는 인간백혈구항원(HLA)을 통해 제시된다. 면역 예방 및 면역 요법의 경우, 이러한 반응을 향상시키는 것이 개선된 효능에 중요하다. LPMP/mRNA 치료 조성물은 효율적인 항원 제시를 유도하도록 설계되거나 향상될 수 있다. APC 처리 및 제시를 향상시키기 위한 하나의 방법은 항원 제시 세포(APC)에 대한 LPMP/mRNA 치료 조성물의 보다 양호한 표적화를 제공하는 것이다. 또 다른 접근법은 면역-자극 제형 및/또는 성분으로 APC 세포를 활성화시키는 것을 포함한다. 대안적으로, 비-APC를 APC로 재프로그래밍하는 방법은 LPMP/mRNA 치료 조성물과 함께 사용될 수 있다. 중요한 것은, mRNA 제형을 흡수하고 이들의 치료 작용의 표적인 대부분의 세포는 APC가 아니다. 따라서, 이들 세포를 APC로 변환하는 방법을 설계하는 것이 효능에 유익할 것이다. LPMP/mRNA 치료 조성물, 예를 들어 mRNA 백신을 세포에 전달하면서 또한 APC로 비-APC로 변환하는 것을 촉진하기 위한 방법 및 접근법이 본원에 제공된다. 일부 구현예에서, APC 재프로그래밍 분자를 암호화하는 mRNA는 LPMP/mRNA 치료 조성물에 포함되거나 LPMP/mRNA 치료 조성물과 공동 투여된다.

[0443] 본원에서 사용되는 바와 같이, APC 재프로그래밍 분자는 비-APC 세포에서 APC-유사 표현형으로의 전이를 촉진하는 분자이다. APC-유사 표현형은 MHC 클래스 II 처리를 가능하게 하는 특성이다. 따라서, APC-유사 표현형을 갖는 APC 세포는 하나 이상의 외인성 분자를 갖지 않는 동일한 세포와 비교하여 향상된 MHC 클래스 II 처리 능력을 갖는 하나 이상의 외인성 분자(APC 재프로그래밍 분자)를 갖는 세포이다. 일부 구현예에서, APC 재프로그래밍 분자는 CUT A(MHC 클래스 II 발현의 중앙 조절자); CLIP, HLA-DO, HLA-DM 등과 같은 샤페론 단백질(MHC 클래스 II로의 항원 단편의 로딩 인핸서) 및/또는 CD40, CD80, CD86 등과 같은 공자극 분자(T 세포 항원 인식 및 T 세포 활성화의 인핸서)이다.

[0444] CIITA 단백질은 클래스 II 프로모터 영역과 연관된 보존된 DNA 결합 단백질 세트와 상호작용함으로써 MHC 클래스 II 유전자의 전사 활성화를 향상시키는 전달활성제이다(Steimle 등의 문헌(1993)[Cell 75: 135~146]). CIITA의 전사 활성화 기능은 아미노 말단 산성 도메인(아미노산 26~137)에 맵핑되었다. CIITA-상호작용 단백질 104(본원에서 CIP104로도 지칭됨)로 지칭되는, CIITA와 상호작용하는 단백질을 암호화하는 핵산 분자. CITTA 및 CIP104 둘 모두는 MHC 클래스 II 프로모터로부터의 전사를 향상시키는 것으로 나타났으므로, 본 발명의 APC 재프로그래밍 분자로서 유용하다. 일부 구현예에서, APC 재프로그래밍 분자는 전장 CIITA, CIP 104 또는 다른 관련 분자 또는 이의 활성 단편으로, 예컨대 CIITA의 아미노산 26~137 또는 이에 대해 적어도 80%의 서열 동일성을 갖고 MHC 클래스 II 유전자의 전사 활성화를 향상시키는 능력을 유지하는 아미노산이다.

[0445] 일부 구현예에서, LPMP/mRNA 치료 조성물은 때때로 기억 항원으로도 지칭되는 리콜 항원을 포함할 수 있다. 리콜 항원은 개체가 이전에 접한 적이 있어 기존의 기억 림프구가 있는 항원이다. 일부 구현예에서, 리콜 항원은 인플루엔자 항원과 같이 개체가 접했을 가능성이 있는 감염성 질환 항원일 수 있다. 리콜 항원은 보다 강력한 면역 반응을 촉진하는 데 도움이 된다.

[0446] LPMP/mRNA 치료 조성물에 포함시키기 위해 선택된 항원 또는 네오에피토프(neoepitope)는 통상적으로 고친화성 결합 펩티드일 것이다. 일부 구현예에서, 항원 또는 네오에피토프는 야생형 펩티드보다 더 큰 친화도로 HLA 단백질에 결합한다. 항원 또는 네오에피토프의 IC50은, 일부 구현예에서, 적어도 5000nM 미만, 적어도 500nM 미만, 적어도 250nM 미만, 적어도 200nM 미만, 적어도 150nM 미만, 적어도 100nM 미만, 적어도 50nM 미만 또는 그 이하이다. 통상적으로, 예측된 IC50이 50nM 미만인 펩티드는 일반적으로 중간 내지 고친화성 결합 펩티드로 간주되고, HLA-결합의 생화학적 검정을 사용하여 이들의 친화도를 경험적으로 시험하기 위해 선택될 것이다.

[0447] 암 항원은 맞춤형 암 항원일 수 있다. LPMP/mRNA 치료 조성물은 네오에피토프 또는 대상체 특이적 에피토프 또는 항원으로서 지칭되는, 종양에 대해 특이적인 하나 이상의 공지된 암 항원 또는 각각의 대상체에 대해 특이적인 암 항원을 암호화하는 RNA를 포함할 수 있다. "대상체 특이적 암 항원"은 특정 환자의 종양에서 발현되는 것으로 식별된 항원이다. 일반적으로, 대상체 특이적 암 항원은 통상적으로 종양 시료에 존재할 수도 있고 존재하지 않을 수도 있다. 비암성 세포에서 발현되지 않거나 거의 발현되지 않는, 또는 비암성 세포에서의 발현이 암성 세포에서의 발현과 비교하여 충분히 감소되고 백신접종 시 유도된 면역 반응을 유도하는 종양 관련 항원은 네오에피토프로서 지칭된다. 종양 관련 항원과 같은 네오에피토프는 신체에 완전히 이질적이므로 건강한 조직에 대한 면역 반응을 생성하지 않거나 면역 시스템의 보호 성분에 의해 마스킹되지 않을 것이다. 일부 구현예에서, 네오에피토프에 기초한 LPMP/mRNA 치료 조성물은 이러한 백신 제형이 환자의 특정 종양에 대한 특이성을 최대화할 것이기 때문에 바람직하다. 돌연변이-유래 네오에피토프는 다음으로부터 발생할 수 있다: 점 돌연변이, 단백

질에서 상이한 아미노산을 초래하는 비유사 돌연변이; 정지 코돈이 변형되거나 결실되는, C-말단에서 신규한 종양-특이적 서열을 갖는 더 긴 단백질의 번역을 초래하는 검독-관통 돌연변이(read-through mutation); 성숙한 mRNA에 인트론을 포함시켜 고유한 종양-특이적 단백질 서열을 초래하는 스플라이스 부위 돌연변이; 2개의 단백질 접합부에서 종양-특이적 서열을 갖는 키메라 단백질을 형성하는 염색체 재배열(즉, 유전자 융합); 신규한 종양-특이적 단백질 서열을 갖는 새로운 개방 해독 프레임을 초래하는 구조이동돌연변이(frameshift mutation) 또는 결실; 및 전위.

[0448] 따라서, 일부 구현예에서, LPMP/mRNA 치료 조성물은 구조이동돌연변이 및 재조합 또는 본원에 기술된 임의의 다른 돌연변이로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이를 포함하여 적어도 1개의 암 항원을 포함한다. 일부 구현예에서, LPMP/mRNA 치료 조성물은 구조이동돌연변이 및 재조합 또는 본원에 기술된 임의의 다른 돌연변이로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이를 포함하여 적어도 1개의 면역원성 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구현예에서, LPMP/mRNA 치료 조성물은 구조이동돌연변이 및 재조합 또는 본원에 기술된 임의의 다른 돌연변이로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이를 포함하여 적어도 1개의 신호 전달 폴리펩티드를 포함한다.

[0449] *핵산 서열*

[0450] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 하나 이상의 야생형 항원 또는 조작된 항원(또는 항원에 대한 항체)을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 작제물이다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 항원성 폴리펩티드 또는 면역원성 변이체 또는 이의 면역원성 단편을 포함한다. 항원은 종양, 예를 들어, 종양 특이적 항원, 종양 관련 항원, 종양 신항원, 또는 이들의 조합으로부터 유래될 수 있다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 신호 전달 단백질 또는 항암 단백질, 예컨대 분비된 사이토카인, 사이토카인 수용체 복합체, 호르몬, 또는 면역 강화제를 포함한다.

[0451] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 mRNA, siRNA 또는 siRNA 전구체, 마이크로RNA(miRNA) 또는 miRNA 전구체, 플라스미드, 다이서 기질 짧은 간섭 RNA(dsiRNA), 짧은 헤어핀 RNA(shRNA), 비대칭 간섭 RNA(aiRNA), 펩티드 핵산(PNA), 모르폴리노, 잠김 핵산(LNA), 피위-상호작용 RNA(piRNA), 리보자임, 데옥시리보자임(DNAzyme), 압타머, 원형 RNA(circRNA), 가이드 RNA(gRNA), 또는 이들 RNA 중 어느 하나를 암호화하는 DNA 분자일 수 있다. 일 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 mRNA이다.

[0452] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 다음을 포함하는 폴리펩티드를 암호화한다: p53, ART-4, BAGE, ss-카테닌/m, Bcr-abL CAMEL, CAP-1, CASP-8, CDC27/m, CDK4/m, CEA, CLAUDIN-12, c-MYC, CT, Cyp-B, DAM, ELF2M, ETV6-AML1, G250, GAGE, GnT-V, Gap 100, HAGE, HER-2/neu, HPV-E7, HPV-E6, HAST-2, hTERT (또는 hTRT), LAGE, LDLR/FUT, MAGE- A, 바람직하게는 MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE- A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A7, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11, 또는 MAGE-A12, MAGE-B, MAGE-C, MART- 1/Melan-A, MC1R, 미오신/m, MUC1, MUM-1, -2, -3, NA88-A, NF1, NY-ESO-1, NY-BR-1, p190 마이너 BCR-abL, Plac-1, Pml/RARa, PRAME, 프로테이나제 3, PSA, PSM, RAGE, RU1 또는 RU2, SAGE, SART-1 또는 SART-3, SCGB3A2, SCP1, SCP2, SCP3, SSX, SURVIVIN, TEL/AML1, TPI/m, TRP-1, TRP-2, TRP-2/INT2, TPTE, WT, WT-1, 또는 이들의 조합.

[0453] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 IL-2 펩티드, IL-2-Ra, tdTomato, Cre 재조합효소, GFP, eGFP, 항CD19, 항CD20, CAR-T, 항HER2, 에타너셉트(엔브렐), 휴미라, 에리스로포이에틴, 에포겐, 필그라스팀, 키트루다, 리툭시맙, 로미플로스팀, 살그라모스팀, 또는 이의 변이체, 단편 또는 서브유닛을 암호화한다. 예시적인 서열은 표 9에 나타낸 것들을 포함한다.

[0454] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 IL-15 펩티드, IL-15-Ra, 또는 이의 단편 또는 서브유닛을 암호화한다. 일 구현예에서, 폴리펩티드는 IL-15 펩티드, 또는 이의 단편 또는 서브유닛이다. 예시적인 서열은 표 9에 나타낸 것들을 포함한다.

[0455] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 다음을 암호화한다: IL-1 α, IL-1β, IL-1ra,IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL- 9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E, IL- 17F, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-28A/B, IL-29, IL-30, IL- 31, IL-32, IL-33, IL-35, TGF-β, GM-CSF, M-CSF, G-CSF, TNF-α, TNF-β, LAF, TCGF, BCGF, TRF, BAF, BDG, MP, LIF, OSM, TMF, PDGF, IFN-α, IFN-β, IFN-ɣ, 우테로글로빈, Foxp3, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL4, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCL14, CXCL15, CXCL16, CCL1, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL6, CCL7, CCL8, CCL9/10, CCL11, CCL12, CCL13, CCL14, CCL15, CCL16, CCL17, CCL18, CCL19, CCL20, CCL21, CCL22, CCL23, CCL24, CCL25, CCL26, CCL27, CCL28,

XCL1, XCL2, CX3CL1, 또는 이의 단편, 서브유닛, 또는 변이체.

[0456] 항원 변이체 또는 다른 폴리펩티드 변이체는 이들의 아미노산 서열이 야생형, 천연, 또는 기준 서열과 상이한 분자를 지칭한다. 폴리펩티드 변이체는 천연 또는 기준 서열과 비교했을 때, 아미노산 서열 내의 소정의 위치에 치환, 결실, 및/또는 삽입을 가질 수 있다. 일반적으로, 변이체는 야생형, 천연, 또는 기준 서열과 적어도 50%의 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, 변이체는 야생형, 천연, 또는 기준 서열과 적어도 80% 또는 적어도 90%의 동일성을 공유한다.

[0457] 본 개시의 핵산에 의해 암호화된 변이체 폴리펩티드는, 예를 들어 대상체에서 면역원성을 향상시키고, 이들의 발현을 향상시키고/하거나, 이들의 안정성 또는 PK/PD 특성을 개선하는 다수의 바람직한 특성 중 어느 하나를 부여하는 아미노산 변화를 함유할 수 있다. 변이체 항원/폴리펩티드는 일상적인 돌연변이 유발 기술을 사용하여 제조될 수 있고, 적절하게 분석되어 이들이 바람직한 특성을 갖는지 여부를 결정할 수 있다. 발현 수준 및 면역원성을 결정하기 위한 검정은 당업계에 잘 알려져 있고, 예시적인 이러한 검정은 실시예 섹션에 제시되어 있다. 유사하게, 단백질 변이체의 PK/PD 특성은 당업계에서 인식되는 기술을 사용하여, 예를 들어 시간 경과에 따라 백신접종된 대상체에서 항원의 발현을 결정하고/하거나 유도된 면역 반응의 내구성을 조사함으로써 측정될 수 있다. 변이체 핵산에 의해 암호화된 단백질(들)의 안정성은 요소 변성 시 열 안정성 또는 안정성을 분석함으로써 측정될 수 있거나, 인실리코 예측을 사용하여 측정될 수 있다. 이러한 실험 및 인실리코 결정을 위한 방법은 당업계에 공지되어 있다.

[0458] 용어 "동일성"은 서열을 비교함으로써 결정할 때, 2개 이상의 폴리펩티드(예를 들어, 항원, 항암 단백질 또는 신호 전달 단백질) 또는 폴리뉴클레오티드(핵산)의 서열 사이의 관계를 지칭한다. 또한 동일성은 2개 이상의 아미노산 잔기 또는 핵산 잔기의 스트링 사이의 일치하는 수에 의해 결정했을 때, 서열 간의 또는 서열 사이의 서열 관련성의 정도를 지칭한다. 동일성은 특정 수학적 모델 또는 컴퓨터 프로그램(예를 들어, "알고리즘")에 의해 처리된 간격 정렬(존재하는 경우)을 갖는 2개 이상의 서열 중 더 작은 서열 사이의 동일한 일치율을 측정한다. 관련 항원, 단백질 또는 핵산의 동일성은 공지된 방법에 의해 용이하게 계산될 수 있다. 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드 서열에 적용되는 "동일성율(%)"은 최대 동일성율을 달성하기 위해, 서열을 정렬하고, 필요한 경우에 간격을 도입한 후, 제2 서열의 아미노산 서열 또는 핵산 서열의 잔기와 동일한 후보 아미노산 또는 핵산 서열에서의 잔기(아미노산 잔기 또는 핵산 잔기)의 백분율로서 정의된다. 정렬을 위한 방법 및 컴퓨터 프로그램은 당업계에 잘 알려져 있다. 동일성은 동일성율의 계산에 따라 달라지지만 계산에 도입된 간격 및 페널티로 인해 값이 상이할 수 있음을 이해할 것이다. 일반적으로, 특정 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드(예를 들어, 항원, 항암 단백질, 또는 신호 전달 단백질)의 변이체는 본원에 기술된 서열 정렬 프로그램 및 파라미터에 의해 결정되고 당업자에게 공지된 바와 같은 특정 기준 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드와 적어도 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 그러나 100% 미만의 서열 동일성을 갖는다. 이러한 정렬 툴은 BLAST 제품군의 것들을 포함한다(Stephen F. Altschul, 등의 문헌[(1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389~3402]). 또 다른 널리 사용되는 국소 정렬 기술은 Smith-Waterman 알고리즘에 기반한다(Smith, T.F. & Waterman, M.S의 문헌[(1981) "Identification of common molecular subsequences." J. Mol. Biol. 147:195~197]). 동적 프로그래밍에 기초한 일반적인 글로벌 정렬 기술은 Needleman-Wunsch 알고리즘이다(Needleman, S.B. & Wunsch, C.D의 문헌[(1970) "A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequences of two proteins." J. Mol. Biol. 48:443~453]). 보다 최근에는, Needleman-Wunsch 알고리즘을 포함하여 다른 최적 글로벌 정렬 방법보다 빠르게 뉴클레오티드 및 단백질 서열의 글로벌 정렬을 생성하는 것으로 알려진 고속 최적 글로벌 서열 정렬 알고리즘(FOGSAA, Fast Optimal Global Sequence Alignment Algorithm)이 개발되었다.

[0459] 이와 같이, 기준 서열, 특히 본원에 개시된 폴리펩티드(예를 들어, 항원 또는 신호 전달 단백질) 서열에 대해 치환, 삽입, 및/또는 첨가, 결실, 및 공유 변형을 함유하는 펩티드 또는 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 본 개시의 범주 내에 포함된다. 예를 들어, 하나 이상의 리신과 같은 서열 태그 또는 아미노산이 펩티드 서열에 (예를 들어, N-말단 또는 C-말단 말단에서) 첨가될 수 있다. 서열 태그는 펩티드 검출, 정제, 또는 국소화에 사용될 수 있다. 리신은 펩티드 용해도를 증가시키거나 비오티닐화를 허용하는 데 사용될 수 있다. 대안적으로, 펩티드 또는 단백질의 아미노산 서열의 카르복시 말단 영역 및 아미노 말단 영역에 위치한 아미노산 잔기는 절단된 서열을 제공하기 위해 임의로 결실될 수 있다. 대안적으로, 소정의 아미노산(예를 들어, C-말단 잔기 또는 N-말단 잔기)은, 예를 들어 가용성이거나 고형 지지체에 연결된 더 큰 서열의 일부로서 서열의 발현과 같은 서열의 사용에 따라 결실될 수 있다. 일부 구현예에서, 신호 서열, 종결 서열, 막관통 도메인, 링커, 다량체

화 도메인(예를 들어, 폴드온(foldon) 영역) 등을 위한 (또는 이를 암호화하는) 서열은 동일하거나 유사한 기능을 달성하는 대안적인 서열로 치환될 수 있다. 일부 구현예에서, 단백질의 코어 내의 공동은, 예를 들어 더 큰 아미노산을 도입함으로써 충진되어 안정성을 개선할 수 있다. 다른 구현예에서, 매립된 수소 결합 네트워크는 소수성 잔류물로 대체되어 안정성을 개선할 수 있다. 또 다른 구현예에서, 당질화 부위는 제거되고 적절한 잔기로 대체될 수 있다. 이러한 서열은 당업자에게 쉽게 식별 가능하다. 또한, 본원에 제공된 서열 중 일부는, 예를 들어 RNA(예를 들어, mRNA) 백신의 제조에 사용하기 전에 결실될 수 있는 서열 태그 또는 말단 펩티드 서열을 (예를 들어, N-말단 또는 C-말단 말단에) 함유한다는 것을 이해해야 한다.

[0460] 또한 당업자에 의해 인식되는 바와 같이, 단백질 단편, 기능성 단백질 도메인, 및 상동성 단백질은 관심 코로나바이러스 항원의 범위 내에 있는 것으로 간주된다. 예를 들어, 기준 단백질의 임의의 단백질 단편(기준 항원 서열보다 짧지만 그 외에는 동일한 적어도 하나의 아미노산 잔기를 갖는 폴리펩티드 서열을 의미함)이 면역원성이며 코로나바이러스에 대한 보호 면역 반응을 부여하는 경우, 해당 단편이 제공될 수 있다. 기준 단백질과 동일하지만 절단된 변이체에 더하여, 일부 구현예에서, 항원은 본원에 제공되거나 참조된 서열 중 어느 하나에 도시된 바와 같이, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 또는 그 이상의 돌연변이를 포함한다. 항원/항원성 폴리펩티드는 길이가 약 4개, 6개, 또는 8개 아미노산 내지 전장 단백질의 범위일 수 있다.

[0461] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 mRNA이다. 전령 RNA(mRNA)는 (적어도 하나의) 단백질(아미노산의 자연 발생, 비-자연 발생, 또는 변형된 중합체)을 암호화하고, 번역되어 시험관 내, 생체 내, 제자리, 또는 생체 외에서 암호화된 단백질을 생산할 수 있는 임의의 RNA이다. 당업자는 달리 언급되지 않는 한, 본 출원에 제시된 핵산 서열이 대표적인 DNA 서열에서 "T"를 인용할 수 있지만, 서열이 RNA(예를 들어, mRNA)를 나타내는 경우, "T"는 "U"로 치환될 것임을 이해할 것이다. 따라서, 본원에 개시되고 특정 서열 식별 번호에 의해 식별된 DNA 중 어느 하나는 또한 DNA에 상보적인 상응하는 RNA(예를 들어, mRNA) 서열을 개시하며, 여기서 DNA 서열 각각의 "T"는 "U"로 치환된다.

[0462] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)는 항원, 종양 항원, 또는 신호 전달 폴리펩티드를 암호화하는 개방 해독 프레임(ORF)을 갖는다. 개방 해독 프레임(ORF)은 시작 코돈(예를 들어, 메티오닌(ATG 또는 AUG))으로 시작하여 정지 코돈(예를 들어, TAA, TAG, 또는 TGA, 또는 UAA, UAG, 또는 UGA)으로 끝나는 DNA 또는 RNA의 연속적인 신장이다. 통상적으로 ORF는 단백질을 암호화한다. 서열은 추가 요소, 예를 들어 5' 및 3' UTR을 추가로 포함할 수 있다.

[0463] 일부 구현예에서, RNA(예를 들어, mRNA)는 5' UTR, 3' UTR, 폴리(A) 꼬리, 및/또는 5' 캡 유사체를 추가로 포함한다.

[0464] 일부 구현예에서, mRNA는 5' 미번역 영역(UTR) 및/또는 3' UTR을 포함한다.

[0465] 일부 구현예에서, mRNA는 (a) DNA 분자; 또는 (b) RNA 분자로부터 유래된다. mRNA에서, T는 U로 임의 치환된다.

[0466] 일부 구현예에서, mRNA는 DNA 분자로부터 유래된다. DNA 분자는 프로모터를 추가로 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 프로모터는 T7 프로모터, T3 프로모터, 또는 SP6 프로모터이다. 일부 구현예에서, 프로모터는 5' UTR에 위치한다.

[0467] 일부 구현예에서, mRNA는 RNA 분자이다. RNA 분자는 자가-복제 RNA 분자일 수 있다.

[0468] 일부 구현예에서, mRNA는 RNA 분자이다. RNA 분자는 5' 캡을 추가로 포함할 수 있다. 5' 캡은 캡 1 구조, 캡 1 (m6A) 구조, 캡 2 구조, 캡 3 구조, 캡 0 구조, 또는 이들의 임의의 조합을 가질 수 있다.

[0469] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 IL-2 분자를 암호화하는 mRNA이다. 일 구현예에서, IL-2 분자는 자연 발생 IL-2 분자, 자연 발생 IL-2 분자의 단편, 또는 이의 변이체를 포함한다. 일 구현예에서, IL-2 분자는 자연 발생 IL-2 분자의 변이체(예를 들어, 본원에 기술된 것과 같은 IL-2 변이체), 또는 이의 단편을 포함한다.

[0470] 일 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 표 I 내지 표 III 중 어느 하나에 제공된 IL-2 분자의 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, , 99% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 IL-2 분자를 암호화하는 mRNA이다.

[0471] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 IL-15 분자를 암호화하는 mRNA이다. 일 구현예에서, IL-15 분자는 자연 발생 IL-15 분자, 자연 발생 IL-15 분자의 단편, 또는 이의 변이체를 포함한다. 일 구현예에서, IL-15 분자는 자연 발생 IL-15 분자의 변이체(예를 들어, 본원에 기술된 것과 같은 IL-15 변이체), 또는 이의 단편을 포함한

다.

[0472] 일 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 표 IV에 제공된 IL-15 분자의 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, , 99% 또는 100%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 IL-15 분자를 암호화하는 mRNA이다.

[0473] 일부 구현예에서, mRNA는 5' 미번역 영역(UTR) 및/또는 3' UTR을 포함한다.

[0474] 일부 구현예에서, mRNA는 5' UTR을 포함한다. 5' UTR은 코작(Kozak) 서열을 포함할 수 있다.

[0475] 일부 구현예에서, mRNA는 3' UTR을 포함한다. 일부 구현예에서, 3' UTR은 스플릿의 아미노-말단 인핸서(AES)로부터 유래된 하나 이상의 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 3' UTR은 미토콘드리아 암호화된 12S rRNA(mtRNR1)로부터 유래된 서열을 포함한다.

[0476] 일부 구현예에서, mRNA는 폴리(A) 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 폴리(A) 서열은 30개의 아데노신 잔기의 서열, 10개-뉴클레오티드 링커 서열, 및 70개의 아데노신 잔기의 서열로 이루어진 110개-뉴클레오티드 서열이다.

[표 I]: 예시적인 IL-2 서열, 인간 혈청 알부민(HAS) 서열, 및 HAS-IL-2 서열

서열 번호	서열 정보	서열
1	인간 IL-2	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKF YMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLIS NINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
30	인간 IL-2	MYRMQLLSCIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLE EVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADET ATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
2	인간 IL-2 N88D	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKF YMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLIS **D**INVIVLELKGSETTFM**C**EYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
31	인간 IL-2 N88D	MYRMQLLSCIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLE EVLNLAQSKNFHLRPRDLIS**D**INVIVLELKGSETTFM**C**EYADET ATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
3	인간 IL-2 V69A, Q74P, N88D	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKF YMPKKATELKHLQCLEEELKPLEE**A**LNLA**P**SKNFHLRPRDLIS **D**INVIVLELKGSETTFM**C**EYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
32	인간 IL-2 V69A, Q74P, N88D	MYRMQLLSCIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLE E**A**LNLA**P**SKNFHLRPRDLIS**D**INVIVLELKGSETTFM**C**EYADET ATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
4	인간 IL-2, V91K	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKF YMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLIS NIN**K**IVLELKGSETTFM**C**EYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
33	인간 IL-2, V91K	MYRMQLLSCIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLE EVLNLAQSKNFHLRPRDLISNIN**K**IVLELKGSETTFM**C**EYADET ATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
5	인간 IL-2 V69A, Q74P, V91K	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKF YMPKKATELKHLQCLEEELKPLEE**A**LNLA**P**SKNFHLRPRDLIS NIN**K**IVLELKGSETTFM**C**EYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
34	인간 IL-2 V69A, Q74P, V91K	MYRMQLLSCIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLE E**A**LNLA**P**SKNFHLRPRDLISNIN**K**IVLELKGSETTFM**C**EYADET ATIVEFLNRWITFCQSIISTLT

[0477]

6	인간 IL-2 D20T	APTSSSTKKTQLQLEHLLLTLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKF YMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLIS NINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
35	인간 IL-2 D20T	MYRMQLLSCIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLTLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLE EVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADET ATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
7	인간 IL-2 mRNA 서열	AGUUCCCUAU CACUCUCUUU AAUCACUACU CACAGUAACC UCAACUCCUG CCACAAUGUA CAGGAUGCAA CUCCUGUCUU GCAUUGCACU AAGUCUUGCA CUUGUCACAA ACAGUGCACC UACUUCAAGU UCUACAAAGA AAACACAGCU ACAACUGGAG CAUUUACUGC UGGAUUUACA GAUGAUUUUG AAUGGAAUUA AUAAUUACAA GAAUCCCAAA CUCACCAGGA UGCUCACAUU UAAGUUUUAC AUGCCCAAGA AGGCCACAGA ACUGAAACAU CUUCAGUGUC UAGAAGAAGA ACUCAAACCU CUGGAGGAAG UGCUAAAUUU AGCUCAAAGC AAAAACUUUC ACUUAAGACC CAGGGACUUA AUCAGCAAUA UCAACGUAAU AGUUCUGGAA CUAAAGGGAU CUGAAACAAC AUUCAUGUGU GAAUAUGCUG AUGAGACAGC AACCAUUGUA GAAUUUCUGA ACAGAUGGAU UACCUUUUGU CAAAGCAUCA UCUCAACACU GACUUGAUAA UUAAGUGCUU CCCACUUAAA ACAUAUCAGG CCUUCUAUUU AUUUAAAUAU UUAAAUUUUA UAUUUAUUGU UGAAUGUAUG GUUUGCUACC UAUUGUAACU AUUAUUCUUA AUCUUAAAAC UAUAAAUAUG GAUCUUUUAU GAUUCUUUUU GUAAGCCCUA GGGGCUCUAA AAUGGUUUCA CUUAUUUAUC CCAAAAUAUU UAUUAUUAUG UUGAAUGUUA AAUAUAGUAU CUAUGUAGAU UGGUUAGUAA AACUAUUUAA UAAAUUUGAU AAAUAUAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AA
8	인간 혈청 알부민 (HSA)	AHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVN EVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGE MADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFH DNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQA ADKAACLLPKLDELRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKA WAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECAD DRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMP ADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDY SVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEP QNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVS

[0478]

		RNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPV SDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADI CTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFV EKCCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL
9	리더 – HAS – (G3S) – (인간 IL-2)	**MKWVTFISLLFLFSSAYSRGVFRRD**AHKSEVAHRFKDLGEEN FKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAEN CDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFL QHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARR HPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELRDE GKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAE VSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISS KLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVC KNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYETTLE KCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEY KFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEA KRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRR PCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTAL VELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKADDKETCFAE EGKKLVAASQAALGLGGGSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLE EVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADET ATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
10	리더 – HSA – (G3S) – (인간 IL-2 N88D)	**MKWVTFISLLFLFSSAYSRGVFRRD**AHKSEVAHRFKDLGEE NFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAE NCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECF LQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAR RHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELR DEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEF AEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSI SSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKD VCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYETT LEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLG EYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHP EAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVN RRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQT ALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKADDKETCF AEEGKKLVAASQAALGLGGGSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ MILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKP LEEVLNLAQSKNFHLRPRDLIS**D**INVIVLELKGSETTFM**C**EYAD ETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
11	리더 – HSA – (G3S) – (Human IL-2 V69A,	**MKWVTFISLLFLFSSAYSRGVFRRD**AHKSEVAHRFKDLGEEN FKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAEN CDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFL QHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARR

[0479]

[0480]

	Q74P, N88D)	HPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELRDE GKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAE VSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISS KLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVC KNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYETTLE KCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEY KFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEA KRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRR PCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTAL VELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKADDKETCFAE EGKKLVAASQAALGLGGGSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLE EALNLAPSKNFHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADET ATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
36	리더 - HSA – (G3S) – (인간 IL-2 V69A, Q74P, N88D) ORF mRNA 서열	AUGAAGUGGGUGACCUUCAUCAGCCUGCUGUUCCUGUUCA GCAGCGCCUACAGCAGAGGCGUGUUCAGAAGAGACGCCCA CAAGAGCGAGGUGGCCCACAGAUUCAAGGACCUGGGCGAG GAGAACUUCAAGGCCCUGGUGCUGAUCGCCUUCGCCCAGU ACCUGCAGCAGUGCCCUUUCGAGGACCACGUGAAGCUGGU GAACGAGGUGACCGAGUUCGCCAAGACCUGCGUGGCCGAC GAGAGCGCCGAGAACUGCGACAAGAGCCUGCACACCCUGU UCGGCGACAAGCUGUGCACCGUGGCCACCCUGAGAGAAAC UUACGGCGAGAUGGCCGACUGCUGCGCCAAGCAGGAGCCA GAGCGGAACGAGUGCUUCCUCCAGCACAAGGACGACAACC CUAACCUGCCUAGACUGGUAAGGCCUGAGGUGGACGUGAU GUGUACCGCCUUCCACGACAACGAGGAGACAUUCCUGAAG AAGUACCUGUACGAGAUCGCCAGAAGACACCCUUACUUCU ACGCCCCUGAGUUGCUGUUCUUCGCGAAGAGAUACAAGGC CGCCUUCACCGAGUGCUGCCAGGCCGCCGAUAAGGCCGCG UGCCUGCUGCCUAAGCUGGACGAGCUGAGAGACGAGGGCA AGGCAUCCAGCGCUAAGCAGAGACUGAAGUGCGCCAGCCU GCAGAAGUUCGGAGAGAGAGCUUUCAAGGCGUGGGCAGU GGCUAGAUUGAGCCAAAGAUUCCCUAAGGCAGAAUUCGCU GAGGUGAGCAAGCUCGUGACUGACCUGACCAAGGUGCAUA CAGAGUGCUGUCACGGCGACCUGCUGGAGUGCGCCGACGA CAGAGCCGACCUGGCCAAGUACAUCUGCGAGAACCAGGAC AGCAUCAGCAGCAAGCUGAAGGAGUGUUGUGAGAAGCCU CUAUUGGAGAAGAGUCACUGCAUUGCCGAGGUGGAGAAC GACGAGAUGCCUGCGGAUCUGCCAAGCUUGGCGGCCGACU UCGUGGAGAGCAAGGACGUGUGCAAGAACUACGCCGAGGC CAAGGACGUUUUCCUGGGCAUGUUCCUCUACGAGUACGCA CGCAGACAUCCAGACUACAGCGUGGUGCUGCUGCUGAGAC UGGCUAAGACAUACGAAACUACCCUGGAGAAGUGCUGCGC AGCGGCGGACCCUCACGAGUGUUACGCCAAGGUGUUCGAC GAGUUCAAGCCUCUGGUGGAGGAGCCUCAGAACCUGAUCA AGCAGAACUGUGAGCUGUUCGAGCAGCUCGGCGAGUACAA

		GUUCCAGAACGCCCUGUUGGUCCGCUACACCAAGAAGGUG CCUCAAGUAAGUACCCCUACCCUGGUAGAGGUUAGUAGAA ACCUGGGCAAGGUGGGCAGCAAGUGCUGUAAGCACCCAGA AGCUAAGAGGAUGCCUUGCGCCGAGGACUACCUGUCCGUU GUGCUGAACCAGCUGUGCGUGCUGCACGAGAAGACCCCUG UGAGCGACAGAGUGACAAAGUGUUGCACCGAGAGCUUAG UGAAUAGAAGACCUUGCUUCAGCGCCCUGGAAGUUGACGA AACUUACGUGCCUAAGGAGUUCAACGCCGAGACUUUCACA UUCCACGCCGACAUUUGCACUCUGAGCGAGAAGGAGAGAC AGAUCAAGAAGCAGACCGCCCUCGUAGAGUUGGUCAAGCA CAAGCCGAAGGCAACCAAGGAACAGCUUAAGGCCGUGAUG GACGACUUCGCAGCCUUCGUCGAGAAGUGUUGUAAGGCCG ACGACAAGGAGACUUGCUUCGCAGAGGAAGGCAAGAAGU UGGUAGCCGCCUCUCAGGCUGCCUUGGGACUCGGUGGCGG CAGCGCCCCUACCAGCAGCUCCACAAAGAAGACGCAGCUG CAGCUGGAGCACCUGCUACUAGACUUACAGAUGAUCCUGA ACGGCAUCAACAACUACAAGAACCCGAAGCUCACCAGAAU GCUGACAUUCAAGUUCUACAUGCCUAAGAAGGCCACUGAG CUGAAGCACCUUCAGUGCCUGGAGGAGGAACUUAAGCCAC UGGAAGAGGCCCUGAACCUGGCCCCUAGUAAGAAUUUCCA CCUCAGACCUCGCGACCUUAUUAGCGACAUCAACGUGAUC GUGCUCGAAUUAAAGGGCUCCGAGACAACAUUCAUGUGCG AAUACGCCGACGAGACAGCCACCAUCGUGGAGUUCCUGAA CCGCUGGAUCACCUUCUGCCAGAGCAUCAUCUCUACUCUG ACC
12	리더 - HSA – (G3S) – (인간 IL-2, V91K)	**MKWVTFISLLFLFSSAYSRGVFRRD**AHKSEVAHRFKDLGEE NFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAE NCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECF LQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAR RHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELR DEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEF AEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSI SSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKD VCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYETT LEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLG EYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHP EAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVN RRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQT ALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKADDKETCF AEEGKKLVAASQAALGLGGGSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ MILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKP LEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNIN**K**IVLELKGSETTFM**C**EYAD ETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
13	리더 - HSA – (G3S)	**MKWVTFISLLFLFSSAYSRGVFRRD**AHKSEVAHRFKDLGEE NFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAE

[0481]

[0482]

	– (인간 IL-2 V69A, Q74P, V91K)	NCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECF LQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAR RHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELR DEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEF AEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSI SSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKD VCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYETT LEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLG EYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHP EAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVN RRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQT ALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKADDKETCF AEEGKKLVAASQAALGLGGGSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ MILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKP LEEALNLAPSKNFHLRPRDLISNINKIVLELKGSETTFMCEYAD ETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT

[표 II] 예시적인 CTLA-4 결합제 서열 및 IL-2 CTLA-4 서열

서열 번호	서열 정보	서열
17	CTLA4_03 (HCAB 마우스로부터 유래된, CTLA4 에 대한 인간 중쇄 단독 항체 결합제)	EVQLVQTGGGLSQFGESLRLSCAVSGFNVSNNYM SWVRQAPGKGLEWVSIIYSGGGTHYADSVKGRFT ISRDNSKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCARAVPVP HGTDIWGQGTMVTVSS
18	리더 – *CTLA4.03* – (G4S)3 – HSA – (G3S) – (인간 IL-2) – V5 태그	**MPLLLLLPLLWAGALA***EVQLVQTGGGLSQFGESL RLSCAVSGFNVSNNYMSWVRQAPGKGLEWVSIIYSGG GTHYADSVKGRFTISRDNSKNTLFLQMNSLRAEDTAV YYCARAVPVPHGTDIWGQGTMVTVSS*GGGGSGGGG SGGGGSAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQ YLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCD KSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPE RNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDN EETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAF TECCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSK LVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICEN QDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADL PSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYA RRHPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHEC YAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQ NALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCC KHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSD RVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAET FTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATK EQLKAVMDDFAAFVEKCCKADDKETCFAEEGKK LVAASQAALGLGGGS*APTSSSTKKTQLQLEHLLL DLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNI NVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF CQSIISTLT*GKPIPNPLLGLDST
21	리더 – *CTLA4.03* – (G4S)3 – HSA – (G3S) – (인간 IL-2) – V5 태그	AUGCCUCUGUUACUGCUGCUCCCACUUCUGUGGGCC GGCGCUCUGGCUGAGGUGCAGCUUGUGCAGACCGGCGG AGGUCUGUCACAGUUCGGCGAAUCCCUAAGGCUCUCUU GCGCCGUGUCUGGUUUCAACGUGAGCAACAACUAUAUG AGUUGGGUUCGCCAGGCUCCAGGCAAGGGUCUGGAGUG GGUGUCCAUUAUCUAUUCCGGCGGUGGCACACAUUACG CCGACUCAGUCAAGGGUAGAUUCACUAUCAGUAGAGAC AACUCAAAGAACACUCUUUUCCUACAAAUGAACAGCUU GCGGGCAGAGGAUACGGCCGUGUAUUAUUGUGCCCGAG CUGUCCCAGUGCCUCACGGAACAGAUAUUUGGGGACAA GGUACAAUGGUGACCGUCUCUUCCGGCGGAGGAGGCUC UGGAGGCGGAGGAUCUGGCGGAGGCGGCAGCGCCCAUA

[0483]

		AGAGCGAGGUAGCCCAUAGAUUCAAGGACCUUGGCGAA GAGAACUUCAAGGCCUUAGUUCUCAUCGCCUUCGCCCA AUACUUGCAGCAGUGUCCAUUCGAAGAUCACGUUAAGC UUGUGAACGAGGUGACCGAAUUCGCUAAGACGUGCGUG GCCGACGAGUCCGCUGAGAAUUGUGAUAAGUCACUGCA CACUUUGUUCGGCGACAAGCUGUGCACCGUCGCCACCC UGCGCGAAACAUACGGCGAAAUGGCGGACUGUUGUGCU AAGCAGGAGCCAGAACGGAACGAGUGUUUCCUGCAGCA UAAGGACGACAAUCCAAACCUCCCUAGGUUGGUGCGCC CAGAAGUGGACGUCAUGUGUACCGCUUUCCACGAUAAC GAGGAGACAUUCCUUAAGAAGUAUCUGUACGAGAUUGC ACGGCGGCACCCUUACUUCUACGCCCCUGAGCUCCUGUU CUUCGCAAAGCGGUAUAAGGCUGCAUUCACCGAGUGUU GCCAGGCGGCAGACAAGGCCGCCUGCUUGCUCCCUAAG CUUGACGAACUUAGGGACGAGGGAAAGGCUAGUAGCGC CAAGCAGAGACUCAAGUGUGCAUCGCUACAGAAGUUCG GAGAGAGAGCUUUCAAGGCGUGGGCUGUCGCGCGCCUG UCCCAGAGGUUCCCAAAGGCCGAAUUCGCCGAGGUGAG CAAGUUAGUGACAGAUCUCACCAAGGUGCACACUGAGU GUUGCCACGGCGACUUAUUGGAGUGUGCAGACGAUCGG GCUGACUUGGCAAAGUACAUCUGUGAGAACCAGGACUC AAUUUCCAGUAAGCUGAAGGAGUGUUGCGAGAAGCCAC UCUUGGAGAAGUCCCAUUGUAUAGCCGAAGUGGAGAAC GACGAGAUGCCGGCUGACCUGCCGUCACUGGCAGCUGA UUUCGUAGAGUCGAAGGACGUGUGUAAGAACUACGCUG AAGCUAAGGACGUAUUCCUGGGAAUGUUCCUUUACGAG UACGCCCGACGGCAUCCAGACUACUCAGUAGUGCUGCU UCUGAGACUGGCCAAGACUUACGAGACUACCCUGGAGA AGUGUUGUGCAGCGGCCGAUCCACACGAGUGUUACGCC AAGGUGUUCGACGAAUUCAAGCCUCUGGUGGAGGAGCC GCAGAACCUGAUCAAGCAGAAUUGCGAACUGUUCGAGC AGUUGGGAGAAUAUAAGUUCCAGAACGCACUGCUAGUG CGGUAUACCAAGAAGGUCCCACAGGUAUCCACUCCGAC ACUGGUGGAAGUGUCCAGGAACCUCGGCAAGGUGGGAA GCAAGUGCUGUAAGCACCCGGAGGCUAAGCGGAUGCCG UGCGCCGAAGACUACCUCAGCGUGGUCCUUAAUCAGCU GUGCGUGCUGCACGAGAAGACCCCAGUAAGUGACCGGG UUACGAAGUGCUGUACUGAAUCACUUGUGAACAGAAGA CCUUGUUUCUCCGCCCUCGAGGUGGACGAAACGUACGU UCCGAAGGAAUUCAACGCCGAAACAUUCACCUUCCACG CUGACAUUUGUACGCUUUCCGAGAAGGAGAGACAAAUC AAGAAGCAGACUGCCCUGGUGGAAUUAGUGAAGCACAA GCCGAAGGCCACAAAGGAGCAGCUGAAGGCAGUUAUGG ACGACUUCGCUGCAUUCGUAGAGAAGUGCUGCAAGGCA GACGACAAGGAAACUUGCUUCGCAGAGGAGGGAAAGAA GCUCGUUGCUGCGUCUCAGGCGGCUCUGGGACUGGGAG GAGGAUCCGCUCCUACAAGCAGUUCCACAAAGAAGACC CAGCUCCAGCUUGAACAUCUGCUUCUCGACCUGCAAAU GAUCCUCAACGGUAUCAAUAAUUACAAGAAUCCUAAGU UGACUCGCAUGCUGACUUUCAAGUUCUAUAUGCCAAAG AAGGCCACUGAGUUGAAGCACCUGCAGUGCCUCGAGGA AGAACUGAAGCCUCUGGAGGAAGUCUUAAACCUGGCAC AAAGCAAGAACUUCCAUCUGAGGCCUAGGGACCUCAUU UCCAAUAUCAACGUUAUUGUGCUGGAGCUCAAGGGUAG CGAGACGACAUUCAUGUGCGAGUACGCAGACGAGACAG CGACUAUCGUCGAGUUCCUAAAUAGGUGGAUAACGUUC

[0484]

		UGCCAGUCAAUCAUCUCCACUCUGACCGGCAAGCCGAU CCCUAACCCGUUGCUUGGAUUGGAUUCUACA
19	리더 – *CTLA4.03* – (G4S)3 – HSA – (G3S) – (인간 IL-2 D20T) – V5 태그	**MPLLLLLPLLWAGALA***EVQLVQTGGGLSQFGES* *LRLSCAVSGFNVSNNYMSWVRQAPGKGLEWVSIIYSG* *GGTHYADSVKGRFTISRDNSKNTLFLQMNSLRAEDT* *AVYYCARAVPVPHGTDIWGQGTMVTVS*SGGGGSGG GGSGGGGSAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAF AQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAEN CDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQ EPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFH DNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKA AFTECCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASSAKQR LKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEV SKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYIC ENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPA DLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYE YARRHPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPH ECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYK FQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSK CCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVS DRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNA ETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKA TKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKADDKETCFAEEG KKLVAASQAALGLGGGSAPTSSSTKKTQLQLEHL LLTLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKAT ELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI SNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWI TFCQSIISTLTGKPIPNPLLGLDST
22	리더 – *CTLA4.03* – (G4S)3 – HSA – (G3S) – (인간 IL-2 D20T) – V5 태그	AUGCCUCUGCUGCUCUUACUGCCGCUGCUUUGGGCA GGAGCUCUGGCCGAGGUCCAGCUAGUGCAGACAGGCGG UGGACUCAGCCAGUUCGGUGAGUCACUGCGUCUAUCCU GCGCGGUUAGUGGCUUCAACGUGUCCAACAAUUAUAUG AGUUGGGUGAGACAAGCACCUGGCAAGGGCCUUGAGUG GGUGUCCAUUAUAUAUAGCGGUGGCGGCACCCACUACG CUGACUCGGUGAAGGGUCGAUUCACAAUUAGCAGAGAC AAUUCCAAGAAUACUCUGUUCCUGCAGAUGAACUCUCU CAGGGCGGAGGACACCGCCGUGUACUACUGUGCCCGUG CGGUGCCGGUCCCUCACGGUACAGACAUCUGGGGCCAG GGUACCAUGGUCACCGUGUCAUCCGGAGGAGGCGGUUC UGGUGGAGGAGGAAGUGGAGGCGGCGGCAGUGCACAUA AGAGCGAGGUGGCCCAUAGAUUCAAGGAUUUAGGAGAG GAGAACUUCAAGGCACUGGUCUUGAUCGCCUUCGCACA AUAUCUUCAGCAGUGUCCGUUCGAAGAUCACGUGAAGC UCGUCAACGAGGUGACUGAGUUCGCCAAGACCUGCGUG GCAGACGAGUCGGCUGAGAAUUGUGAUAAGAGUCUGCA CACCCUCUUCGGAGAUAAGCUGUGUACCGUGGCCACUC UGAGGGAGACAUACGGCGAGAUGGCUGACUGUUGUGCA

[0485]

		AAGCAGGAGCCAGAGAGGAACGAGUGUUUCUUGCAGCA UAAGGACGACAACCCAAAUCUGCCUCGUCUGGUUAGAC CUGAAGUGGACGUAAUGUGCACCGCUUUCCACGACAAC GAGGAGACGUUCCUGAAGAAGUAUCUGUACGAGAUUGC UAGAAGGCACCCAUACUUCUACGCACCAGAGCUGUUGU UCUUCGCUAAGAGAUACAAGGCCGCUUUCACCGAGUGC UGCCAAGCAGCAGACAAGGCUGCUUGCCUGCUCCCUAA GCUGGACGAGCUGAGAGACGAGGGUAAGGCUUCAUCAG CCAAGCAAAGAUUGAAGUGUGCAUCACUGCAGAAGUUC GGCGAAAGAGCAUUCAAGGCUUGGGCCGUCGCCAGGCU GUCUCAGAGGUUCCCGAAGGCCGAGUUCGCUGAAGUGU CUAAGUUAGUGACCGAUCUAACAAAGGUGCACACAGAG UGUUGCCACGGAGAUCUGCUUGAGUGCGCCGACGAUCG AGCCGAUCUUGCAAAGUACAUCUGUGAGAACCAGGAUU CCAUCUCCUCUAAGUUGAAGGAGUGCUGUGAGAAGCCA CUUCUCGAGAAGUCUCACUGCAUCGCAGAAGUCGAGAA CGACGAAAUGCCAGCUGACCUGCCGAGCUUGGCCGCAG AUUUCGUCGAGAGUAAGGACGUUUGCAAGAAUUACGCU GAGGCUAAGGACGUCUUCCUGGGCAUGUUCUUGUACGA AUACGCCAGGAGGCACCCGGAUUACUCAGUGGUACUUU UACUGCGACUGGCUAAGACCUACGAAACGACACUGGAG AAGUGCUGCGCAGCCGCCGAUCCUCACGAGUGCUACGC UAAGGUUUUCGACGAGUUCAAGCCGCUCGUGGAAGAAC CUCAGAACUUAAUCAAGCAGAAUUGUGAGCUAUUCGAA CAGCUCGGAGAGUAUAAGUUCCAGAACGCCCUCCUGGU GCGGUACACAAAGAAGGUUCCACAGGUCAGCACCCCGA CCCUCGUUGAGGUGAGCCGCAACCUCGGCAAGGUUGGC UCUAAGUGUUGUAAGCAUCCGGAAGCGAAGCGCAUGCC UUGUGCAGAAGAUUAUCUUUCAGUUGUGUUGAACCAGC UCUGUGUCCUGCACGAGAAGACCCCAGUUUCCGACCGC GUUACCAAGUGUUGCACAGAAAGCUUGGUCAACCGGAG GCCUUGCUUCAGCGCAUUGGAGGUAGACGAAACCUACG UCCCUAAGGAAUUCAACGCCGAAACAUUCACGUUCCAC GCGGACAUUUGCACACUCUCCGAGAAGGAACGCCAGAU UAAGAAGCAGACUGCCUUGGUUGAGCUGGUAAAGCACA AGCCUAAGGCGACUAAGGAGCAGCUAAAGGCAGUUAUG GACGACUUCGCUGCAUUCGUUGAGAAGUGCUGUAAGGC CGACGAUAAGGAAACCUGCUUCGCCGAGGAAGGAAAGA AGCUUGUUGCCGCUAGCCAGGCCGCACUGGGAUUGGGU GGAGGCAGCGCACCAACUUCCUCUAGCACCAAGAAGAC UCAAUUACAACUGGAACAUCUCUUACUAACACUCCAAA UGAUACUGAACGGCAUAAACAACUAUAAGAACCCGAAG UUGACCAGAAUGUUAACCUUCAAGUUCUACAUGCCUAA GAAGGCUACGGAACUGAAGCACCUUCAGUGCCUAGAGG AGGAGCUCAAGCCUCUCGAGGAGGUUCUGAACCUCGCA CAGAGUAAGAAUUUCCACCUGCGCCCAAGGGACCUGAU UUCCAAUAUUAACGUGAUCGUCCUUGAACUUAAGGGCA GCGAAACCACUUUCAUGUGCGAAUACGCGGACGAAACU GCUACCAUAGUUGAGUUCCUUAACCGCUGGAUCACAUU CUGCCAGUCAAUCAUCUCUACAUUGACCGGAAAGCCGA UUCCGAACCCACUCCUGGGACUUGAUAGCACA
20	리더 – *CTLA4.03* – (G4S)3 - HSA – (G3S) –	**MPLLLLLPLLWAGALA***EVQLVQTGGGLSQFGESL* *RLSCAVSGFNVSNNYMSWVRQAPGKGLEWVSIIYSGG*

[0486]

	(인간 IL-2 N88D) – V5 태그	*GTHYADSVKGRFTISRDNSKNTLFLQMNSLRAEDTAV YYCARAVPVPHGTDIWGQGTMVTVSS*GGGGSGGGG SGGGGSAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQ YLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCD KSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPE RNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDN EETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAF TECCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSK LVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICEN QDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADL PSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYA RRHPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHEC YAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQ NALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCC KHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSD RVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAET FTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATK EQLKAVMDDFAAFVEKCCKADDKETCFAEEGKK LVAASQAALGLGGGS*APTSSSTKKTQLQLEHLLL DLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLIS**DI** NVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF CQSIISTLTGKPIPNPLLGLDS
23	**리더** – *CTLA4.03* – (G4S)3 – HSA – (G3S) – (인간 IL-2 N88D) – V5 태그	AUGCCUCUGCUCCUGCUUCUUCCUCUGCUCUGGGCU GGCGCCCUAGCCGAGGUGCAGCUGGUGCAGACCGGCGG CGGCCUGAGCCAGUUCGGCGAGAGCCUGAGACUGAGCU GCGCCGUGAGCGGCUUCAACGUGAGCAACAACUACAUG AGCUGGGUGAGACAGGCCCCUGGCAAGGGCCUGGAGUG GGUGAGCAUCAUCUACAGUGGCGGAGGUACCCACUACG CCGACAGCGUGAAGGGCAGAUUCACCAUCAGCAGAGAC AACAGCAAGAACACCCUGUUCCUGCAGAUGAACAGCCU CAGGGCCGAGGACACCGCCGUGUACUACUGCGCCAGAG CCGUGCCUGUGCCUCACGGCACCGACAUCUGGGGCCAG GGCACCAUGGUGACCGUGAGUAGCGGUGGAGGCGGAAG CGGAGGCGGUGGCUCUGGAGGUGGCGGCAGCGCCCACA AGAGCGAGGUGGCCCACAGAUUCAAGGACCUGGGCGAG GAGAACUUCAAGGCCCUGGUGCUGAUCGCCUUCGCCCA GUACCUGCAGCAGUGCCCUUUCGAGGACCACGUGAAGC UGGUGAACGAGGUGACCGAGUUCGCCAAGACCUGCGUG GCCGACGAGAGCGCCGAGAACUGCGACAAGAGCCUGCA CACACUCUUCGGCGACAAGCUGUGCACCGUGGCCACCCU GAGAGAGACUUACGGCGAGAUGGCCGACUGCUGCGCCA AGCAGGAACCAGAGAGGAACGAGUGCUUCCUUCAGCAC AAGGACGACAACCCUAACCUGCCUAGACUGGUUCGGCC UGAGGUGGACGUGAUGUGCACUGCCUUCCACGACAACG AGGAGACGUUCCUGAAGAAGUACCUGUACGAGAUCGCC AGAAGACACCCUUACUUCUACGCCCCUGAGCUUCUGUU CUUCGCAAAGAGAUACAAGGCCGCCUUCACCGAGUGCU GCCAGGCCGCCGACAAGGCUGCCUGCCUCCUGCCAAAGC UGGACGAGCUGAGAGACGAGGGCAAGGCCAGCUCUGCG

[0487]

		AAGCAGAGGCUGAAGUGCGCCAGCCUGCAGAAGUUCGG AGAAAGAGCUUUCAAGGCCUGGGCCGUGGCCCGCUUGU CUCAAAGAUUCCCUAAGGCGGAGUUCGCAGAAGUGAGC AAGCUGGUCACCGACCUGACCAAGGUGCAUACUGAGUG UUGCCACGGCGACCUGCUGGAGUGCGCCGACGACAGAG CCGACCUGGCCAAGUACAUCUGCGAGAACCAGGACUCU AUUAGUAGCAAGUUGAAGGAGUGUUGCGAGAAGCCGCU ACUCGAGAAGAGUCACUGCAUUGCGGAGGUUGAGAACG ACGAGAUGCCUGCCGACCUCCCAAGCCUGGCAGCCGAU UUCGUGGAGAGCAAGGACGUGUGCAAGAAUUACGCUGA GGCUAAGGACGUUUUCCUGGGCAUGUUCUUAUACGAAU ACGCUAGACGGCACCCAGACUACAGCGUGGUCCUCCUCC UGCGGCUUGCAAAGACGUACGAAACUACCCUGGAGAAG UGCUGCGCGGCUGCUGACCCUCACGAGUGCUACGCCAA GGUGUUCGACGAGUUCAAGCCUCUCGUGGAGGAGCCUC AGAACCUGAUCAAGCAGAAUUGCGAGCUGUUCGAGCAG UUAGGUGAGUACAAGUUCCAGAACGCCCUGCUUGUGCG CUACACCAAGAAGGUGCCUCAGGUUUCCACCCCUACCCU GGUAGAGGUGUCCAGAAACCUGGGCAAGGUGGGCAGCA AGUGUUGCAAGCAUCCAGAAGCUAAGAGAAUGCCUUGC GCCGAAGAUUACCUGUCUGUCGUGCUGAACCAGCUGUG CGUGCUGCACGAGAAGACCCCUGUGAGCGACAGAGUGA CCAAGUGCUGUACAGAAUCCCUAGUAAAUAGAAGACCU UGCUUCUCCGCCCUAGAGGUGGACGAAACCUACGUGCC UAAGGAGUUCAACGCCGAGACUUUCACGUUCCACGCGG AUAUUUGUACACUCAGCGAGAAGGAGAGACAGAUCAAG AAGCAGACCGCACUUGUGGAGCUCGUCAAGCACAAGCC AAAGGCCACCAAGGAGCAACUCAAGGCCGUGAUGGACG ACUUCGCAGCCUUCGUCGAGAAGUGUUGUAAGGCUGAC GAUAAGGAAACCUGCUUCGCUGAGGAAGGCAAGAAGCU UGUGGCCGCCAGUCAGGCUGCUCUUGGUCUUGGCGGCG GAUCAGCACCUACCAGCAGCUCUACAAAGAAGACGCAG CUGCAACUGGAGCACUUGCUGCUUGAUCUGCAAAUGAU CCUGAACGGCAUCAACAAUUACAAGAACCCUAAGCUGA CCAGAAUGCUGACCUUCAAGUUCUACAUGCCUAAGAAG GCCACAGAGCUGAAGCAUUUACAGUGCCUGGAGGAGGA GCUUAAGCCACUUGAAGAGGUGCUCAAUCUGGCCCAGU CUAAGAACUUCCACCUCAGGCCUCGCGAUCUGAUUAGC GACAUCAACGUAAUCGUGCUGGAACUUAAGGGAUCUGA AACUACGUUCAUGUGCGAGUACGCCGACGAAACAGCCA CCAUCGUGGAGUUCCUGAACCGAUGGAUCACCUUCUGC CAGAGUAUUAUUUCAACCCUCACCGGCAAGCCUAUCCC UAACCCACUGCUCGGACUCGACAGCACC

[0488]

[표 III] 예시적인 IL-2 작제물 서열

참고: "G5"는 mRNA 내의 모든 우라실(U)이 N1-메틸슈도유라실로 치환됨을 나타낸다.

	mRNA 명칭	ORF 서열 (아미노산)	ORF 서열 (뉴클레오티드)	5′ UTR 서열	3′ UTR 서열	작제물 서열
서열 번호		11	25	26	27	28
	HSA-hsIL2.V69A.Q74P.N88D G5 캡: C1 폴리 A 꼬리: 100nt (서열번호 29)	MKWVTFISLLFLFSSAYS RGVFRRDAHKSEVAHR FKDLGEENFKALVLIAFA QYLQQCPFEDHVKLVN EVTEFAKTCVADESAEN CDKSLHTLFGDKLCTVA TLRETYGEMADCCAKQ EPERNECFLQHKDDNP NLPRLVRPEVDVMCTA FHDNEETFLKKYLYEIAR RHPYFYAPELLFFAKRYK AAFTECCQAADKAACL LPKLDELRDEGKASSAK QRLKCASLQKFGERAFK AWAVARLSQRFPKAEF AEVSKLVTDLTKVHTEC CHGDLLECADDRADLA KYICENQDSISSKLKECC EKPLLEKSHCIAEVENDE MPADLPSLAADFVESK DVCKNYAEAKDVFLGM FLYEYARRHPDYSVVLLL RLAKTYETTLEKCCAAA DPHECYAKVFDEFKPLV EEPQNLIKQNCELFEQL GEYKFQNALLVRYTKKV PQVSTPTLVEVSRNLGK VGSKCCKHPEAKRMPC AEDYLSVVLNQLCVLHE KTPVSDRVTKCCTESLV NRRPCFSALEVDETYVP KEFNAETFTFHADICTLS EKERQIKKQTALVELVK HKPKATKEQLKAVMDD	AUGAAGUGGGUGACC UUCAUCAGCCUGCUG UUCCUGUUCAGCAGC GCCUACAGCAGAGGC GUGUUCAGAAGAGAC GCCCACAAGAGCGAG GUGGCCCACAGAUUC AAGGACCUGGGCGAG GAGAACUUCAAGGCC CUGGUGCUGAUCGCC UUCGCCCAGUACCUG CAGCAGUGCCCUUUC GAGGACCACGUGAAG CUGGUGAACGAGGUG ACCGAGUUCGCCAAG ACCUGCGUGGCCGAC GAGAGCGCCGAGAAC UGCGACAAGAGCCUG CACACCCUGUUCGGC GACAAGCUGUGCACC GUGGCCACCCUGAGA GAAACUUACGGCGAG AUGGCCGACUGCUGC GCCAAGCAGGAGCCA GAGCGGAACGAGUGC UUCCUCCAGCACAAG GACGACAACCCUAACC UGCCUAGACUGGUAA GGCCUGAGGUGGACG UGAUGUGUACCGCCU UCCACGACAACGAGG AGACAUUCCUGAAGA AGUACCUGUACGAGA UCGCCAGAAGACACC	GGGAAA UAAGAG AGAAAA GAAGAG UAAGAA GAAAUA UAAGACC CCGGCGC CGCCACC	UGAUAA UAGGCU GGAGCC UCGGUG GCCUAGC UUCUUG CCCCUUG GGCCUCC CCCCAGC CCCUCCU CCCCUUC CUGCACC CGUACCC CCGUGG UCUUUG AAUAAA GUCUGA GUGGGC GGC	서열번호 28 은 5′ 말단에서 3′ 말단까지 이루어진다: 서열번호 26 의 5′ UTR, 서열번호 25 의 ORF 서열, 서열번호 27 의 3′ UTR 및 서열번호 29 의 폴리 A 꼬리

[0489]

[0490]

	mRNA 명칭	ORF 서열 (아미노산)	ORF 서열 (뉴클레오티드)	5′ UTR 서열	3′ UTR 서열	작제물 서열
		FAAFVEKCCKADDKETC FAEEGKKLVAASQAAL GLGGGSAPTSSSTKKTQ LQLEHLLLDLQMILNGI NNYKNPKLTRMLTFKFY MPKKATELKHLQCLEEE LKPLEEALNLAPSKNFHL RPRDLISDINVIVLELKG SETTFMCEYADETATIV EFLNRWITFCQSIISTLT	CUUACUUCUACGCCC CUGAGUUGCUGUUC UUCGCGAAGAGAUAC AAGGCCGCCUUCACC GAGUGCUGCCAGGCC GCCGAUAAGGCCGCG UGCCUGCUGCCUAAG CUGGACGAGCUGAGA GACGAGGGCAAGGCA UCCAGCGCUAAGCAG AGACUGAAGUGCGCC AGCCUGCAGAAGUUC GGAGAGAGAGCUUUC AAGGCGUGGGCAGUG GCUAGAUUGAGCCAA AGAUUCCCUAAGGCA GAAUUCGCUGAGGUG AGCAAGCUCGUGACU GACCUGACCAAGGUG CAUACAGAGUGCUGU CACGGCGACCUGCUG GAGUGCGCCGACGAC AGAGCCGACCUGGCC AAGUACAUCUGCGAG AACCAGGACAGCAUC AGCAGCAAGCUGAAG GAGUGUUGUGAGAA GCCUCUAUUGGAGAA GAGUCACUGCAUUGC CGAGGUGGAGAACGA CGAGAUGCCUGCGGA UCUGCCAAGCUUGGC GGCCGACUUCGUGGA GAGCAAGGACGUGUG CAAGAACUACGCCGA GGCCAAGGACGUUUU CCUGGGCAUGUUCCU CUACGAGUACGCACG CAGACAUCCAGACUA CAGCGUGGUGCUGCU GCUGAGACUGGCUAA			

	mRNA 명칭	ORF 서열 (아미노산)	ORF 서열 (뉴클레오티드)	5′ UTR 서열	3′ UTR 서열	작제물 서열
			GACAUACGAAACUAC CCUGGAGAAGUGCUG CGCAGCGGCGGACCC UCACGAGUGUUACGC CAAGGUGUUCGACGA GUUCAAGCCUCUGGU GGAGGAGCCUCAGAA CCUGAUCAAGCAGAA CUGUGAGCUGUUCGA GCAGCUCGGCGAGUA CAAGUUCCAGAACGC CCUGUUGGUCCGCUA CACCAAGAAGGUGCC UCAAGUAAGUACCCC UACCCUGGUAGAGGU UAGUAGAAACCUGGG CAAGGUGGGCAGCAA GUGCUGUAAGCACCC AGAAGCUAAGAGGAU GCCUUGCGCCGAGGA CUACCUGUCCGUUGU GCUGAACCAGCUGUG CGUGCUGCACGAGAA GACCCCUGUGAGCGA CAGAGUGACAAAGUG UUGCACCGAGAGCUU AGUGAAUAGAAGACC UUGCUUCAGCGCCCU GGAAGUUGACGAAAC UUACGUGCCUAAGGA GUUCAACGCCGAGAC UUUCACAUUCCACGC CGACAUCUGUACUCU GAGCGAGAAGGAGAG ACAGAUCAAGAAGCA GACCGCCCUCGUAGA GUUGGUCAAGCACAA GCCGAAGGCAACCAA GGAACAGCUUAAGGC CGUGAUGGACGACUU CGCAGCCUUCGUCGA			

[0491]

[0492]

	mRNA 명칭	ORF 서열 (아미노산)	ORF 서열 (뉴클레오티드)	5′ UTR 서열	3′ UTR 서열	작제물 서열
			GAAGUGUUGUAAGG CCGACGACAAGGAGA CUUGCUUCGCAGAGG AAGGCAAGAAGUUGG UAGCCGCCUCUCAGG CUGCCUUGGGACUCG GUGGCGGCAGCGCCC CUACCAGCAGCUCCAC AAAGAAGACGCAGCU GCAGCUGGAGCACCU GCUACUAGACUUACA GAUGAUCCUGAACGG CAUCAACAACUACAA GAACCCGAAGCUCAC CAGAAUGCUGACAUU CAAGUUCUACAUGCC UAAGAAGGCCACUGA GCUGAAGCACCUUCA GUGCCUGGAGGAGGA ACUUAAGCCACUGGA AGAGGCCCUGAACCU GGCCCCUAGUAAGAA UUUCCACCUCAGACC UCGCGACCUUAUUAG CGACAUCAACGUGAU CGUGCUCGAAUUAAA GGGCUCCGAGACAAC AUUCAUGUGCGAAUA CGCCGACGAGACAGC CACCAUCGUGGAGUU CCUGAACCGCUGGAU CACCUUCUGCCAGAG CAUCAUCUCUACUCU GACC			
서열 번호		11	36	26	27	37

	mRNA 명칭	ORF 서열 (아미노산)	ORF 서열 (뉴클레오티드)	5′ UTR 서열	3′ UTR 서열	작제물 서열
	HSA-hsIL2.V69A.Q74P.N88D G5 캡: C1 폴리 A 꼬리: 100nt (서열번호 29)	MKWVTFISLLFLFSSAYS RGVFRRDAHKSEVAHR FKDLGEENFKALVLIAFA QYLQQCPFEDHVKLVN EVTEFAKTCVADESAEN CDKSLHTLFGDKLCTVA TLRETYGEMADCCAKQ EPERNECFLQHKDDNP NLPRLVRPEVDVMCTA FHDNEETFLKKYLYEIAR RHPYFYAPELLFFAKRYK AAFTECCQAADKAACL LPKLDELRDEGKASSAK QRLKCASLQKFGERAFK AWAVARLSQRFPKAEF AEVSKLVTDLTKVHTEC CHGDLLECADDRADLA KYICENQDSISSKLKECC EKPLLEKSHCIAEVENDE MPADLPSLAADFVESK DVCKNYAEAKDVFLGM FLYEYARRHPDYSVVLLL RLAKTYETTLEKCCAAA DPHECYAKVFDEFKPLV EEPQNLIKQNCELFEQL GEYKFQNALLVRYTKKV PQVSTPTLVEVSRNLGK VGSKCCKHPEAKRMPC AEDYLSVVLNQLCVLHE KTPVSDRVTKCCTESLV NRRPCFSALEVDETYVP KEFNAETFTFHADICTLS EKERQIKKQTALVELVK HKPKATKEQLKAVMDD FAAFVEKCCKADDKETC FAEEGKKLVAASQAAL GLGGGSAPTSSSTKKTQ LQLEHLLLDLQMILNGI NNYKNPKLTRMLTFKFY MPKKATELKHLQCLEEE LKPLEEALNLAPSKNFHL	AUGAAGUGGGUGA CCUUCAUCAGCCUG CUGUUCCUGUUCA GCAGCGCCUACAGC AGAGGCGUGUUCA GAAGAGACGCCCAC AAGAGCGAGGUGG CCCACAGAUUCAAG GACCUGGGCGAGGA GAACUUCAAGGCCC UGGUGCUGAUCGC CUUCGCCCAGUACC UGCAGCAGUGCCCU UUCGAGGACCACGU GAAGCUGGUGAAC GAGGUGACCGAGU UCGCCAAGACCUGC GUGGCCGACGAGAG CGCCGAGAACUGCG ACAAGAGCCUGCAC ACCCUGUUCGGCGA CAAGCUGUGCACCG UGGCCACCCUGAGA GAAACUUACGGCGA GAUGGCCGACUGCU GCGCCAAGCAGGAG CCAGAGCGGAACGA GUGCUUCCUCCAGC ACAAGGACGACAAC CCUAACCUGCCUAG ACUGGUAAGGCCU GAGGUGGACGUGA UGUGUACCGCCUUC CACGACAACGAGGA GACAUUCCUGAAGA AGUACCUGUACGAG AUCGCCAGAAGACA	GGGAAA UAAGAG AGAAAA GAAGAG UAAGAA GAAAUA UAAGACC CCGGCGC CGCCACC	UGAUAA UAGGCU GGAGCC UCGGUG GCCUAGC UUCUUG CCCCUUG GGCCUCC CCCCAGC CCCUCCU CCCCUUC CUGCACC CGUACCC CCGUGG UCUUUG AAUAAA GUCUGA GUGGGC GGC	서열번호 37 은 5′ 말단에서 3′ 말단까지 이루어진다: 서열번호 26 의 5′ UTR, 서열번호 36 의 ORF 서열, 서열번호 27 의 3′ UTR 및 서열번호 29 의 폴리 A 꼬리

[0493]

[0494]

	mRNA 명칭	ORF 서열 (아미노산)	ORF 서열 (뉴클레오티드)	5′ UTR 서열	3′ UTR 서열	작제물 서열
		RPRDLISDINVIVLELKG SETTFMCEYADETATIV EFLNRWITFCQSIISTLT	CCCUUACUUCUACG CCCCUGAGUUGCUG UUCUUCGCGAAGA GAUACAAGGCCGCC UUCACCGAGUGCUG CCAGGCCGCCGAUA AGGCCGCGUGCCUG CUGCCUAAGCUGGA CGAGCUGAGAGACG AGGGCAAGGCAUCC AGCGCUAAGCAGAG ACUGAAGUGCGCCA GCCUGCAGAAGUUC GGAGAGAGAGCUU UCAAGGCGUGGGC AGUGGCUAGAUUG AGCCAAAGAUUCCC UAAGGCAGAAUUC GCUGAGGUGAGCA AGCUCGUGACUGAC CUGACCAAGGUGCA UACAGAGUGCUGU CACGGCGACCUGCU GGAGUGCGCCGACG ACAGAGCCGACCUG GCCAAGUACAUCUG CGAGAACCAGGACA GCAUCAGCAGCAAG CUGAAGGAGUGUU GUGAGAAGCCUCUA UUGGAGAAGAGUC ACUGCAUUGCCGAG GUGGAGAACGACGA GAUGCCUGCGGAUC UGCCAAGCUUGGCG GCCGACUUCGUGGA GAGCAAGGACGUG			

	mRNA 명칭	ORF 서열 (아미노산)	ORF 서열 (뉴클레오티드)	5′ UTR 서열	3′ UTR 서열	작제물 서열
			UGCAAGAACUACGC CGAGGCCAAGGACG UUUUCCUGGGCAU GUUCCUCUACGAGU ACGCACGCAGACAU CCAGACUACAGCGU GGUGCUGCUGCUG AGACUGGCUAAGAC AUACGAAACUACCC UGGAGAAGUGCUG CGCAGCGGCGGACC CUCACGAGUGUUAC GCCAAGGUGUUCG ACGAGUUCAAGCCU CUGGUGGAGGAGC CUCAGAACCUGAUC AAGCAGAACUGUGA GCUGUUCGAGCAGC UCGGCGAGUACAAG UUCCAGAACGCCCU GUUGGUCCGCUACA CCAAGAAGGUGCCU CAAGUAAGUACCCC UACCCUGGUAGAG GUUAGUAGAAACC UGGGCAAGGUGGG CAGCAAGUGCUGUA AGCACCCAGAAGCU AAGAGGAUGCCUU GCGCCGAGGACUAC CUGUCCGUUGUGC UGAACCAGCUGUGC GUGCUGCACGAGAA GACCCCUGUGAGCG ACAGAGUGACAAAG UGUUGCACCGAGA GCUUAGUGAAUAG			

[0495]

	mRNA 명칭	ORF 서열 (아미노산)	ORF 서열 (뉴클레오티드)	5′ UTR 서열	3′ UTR 서열	작제물 서열
			AAGACCUUGCUUCA GCGCCCUGGAAGUU GACGAAACUUACGU GCCUAAGGAGUUCA ACGCCGAGACUUUC ACAUUCCACGCCGA CAUUUGCACUCUGA GCGAGAAGGAGAG ACAGAUCAAGAAGC AGACCGCCCUCGUA GAGUUGGUCAAGC ACAAGCCGAAGGCA ACCAAGGAACAGCU UAAGGCCGUGAUG GACGACUUCGCAGC CUUCGUCGAGAAG UGUUGUAAGGCCG ACGACAAGGAGACU UGCUUCGCAGAGG AAGGCAAGAAGUU GGUAGCCGCCUCUC AGGCUGCCUUGGG ACUCGGUGGCGGCA GCGCCCCUACCAGC AGCUCCACAAAGAA GACGCAGCUGCAGC UGGAGCACCUGCUA CUAGACUUACAGAU GAUCCUGAACGGCA UCAACAACUACAAG AACCCGAAGCUCAC CAGAAUGCUGACAU UCAAGUUCUACAUG CCUAAGAAGGCCAC UGAGCUGAAGCACC UUCAGUGCCUGGA GGAGGAACUUAAG			

[0496]

	mRNA 명칭	ORF 서열 (아미노산)	ORF 서열 (뉴클레오티드)	5′ UTR 서열	3′ UTR 서열	작제물 서열
			CCACUGGAAGAGGC CCUGAACCUGGCCC CUAGUAAGAAUUU CCACCUCAGACCUC GCGACCUUAUUAGC GACAUCAACGUGAU CGUGCUCGAAUUAA AGGGCUCCGAGACA ACAUUCAUGUGCGA AUACGCCGACGAGA CAGCCACCAUCGUG GAGUUCCUGAACCG CUGGAUCACCUUCU GCCAGAGCAUCAUC UCUACUCUGACC			

[표 IV]: 예시적인 IL-15 및 IL-15RA 서열

서열 ID 번호	서열 ID 정보	서열
40	IL-15	MRISKPHLRS ISIQCYLCLL LNSHFLTEAG IHVFILGCFS AGLPKTEANW VNVISDLKKI EDLIQSMHID ATLYTESDVH PSCKVTAMKC FLLELQVISL ESGDASIHDT VENLIILANN SLSSNGNVTE SGCKECEELE EKNIKEFLQS FVHIVQMFIN TS
41	IL-15	ATGAGAATTTCGAAACCACATTTGAGAAGTATTTCCATCCAGTGC TACTTGTGTTTACTTCTAAACAGTCATTTTCTAACTGAAGCTGGCA TTCATGTCTTCATTTTGGGCTGTTTCAGTGCAGGGCTTCCTAAAAC AGAAGCCAACTGGGTGAATGTAATAAGTGATTTGAAAAAAATTG AAGATCTTATTCAATCTATGCATATTGATGCTACTTTATATACGGA AAGTGATGTTCACCCCAGTTGCAAAGTAACAGCAATGAAGTGCTT TCTCTTGGAGTTACAAGTTATTTCACTTGAGTCCGGAGATGCAAGT ATTCATGATACAGTAGAAAATCTGATCATCCTAGCAAACAACAGT TTGTCTTCTAATGGGAATGTAACAGAATCTGGATGCAAAGAATGT GAGGAACTGGAGGAAAAAAATATTAAAGAATTTTTGCAGAGTTTT GTACATATTGTCCAAATGTTCATCAACACTTCTTGA
42	IL-15RA	MAPRRARGCRTLGLPALLLLLLLRPPATRGITCPPPMSVEHADIWVKS YSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRD PALVHQRPAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNNTAATT AAIVPGSQLMPSKSPSTGTTEISSHESSHGTPSQTTAKNWELTASASH

[0497]

		QPPGVYPQGHSDTTVAISTSTVLLCGLSAVSLLACYLKSRQTPPLASV EMEAMEALPVTWGTSSRDEDLENCSHHL
43	IL-15RA	ATGGCCCCGCGGCGGGCGCGCGGCTGCCGGACCCTCGGTCTCCC GGCGCTGCTACTGCTGCTGCTGCTCCGGCCGCCGGCGACGCGGG GCATCACGTGCCCTCCCCCCATGTCCGTGGAACACGCAGACATCT GGGTCAAGAGCTACAGCTTGTACTCCAGGGAGCGGTACATTTGT AACTCTGGTTTCAAGCGTAAAGCCGGCACGTCCAGCCTGACGGA GTGCGTGTTGAACAAGGCCACGAATGTCGCCCACTGGACAACCC CCAGTCTCAAATGCATTAGAGACCCTGCCCTGGTTCACCAAAGGC CAGCGCCACCCTCCACAGTAACGACGGCAGGGGTGACCCCACA GCCAGAGAGCCTCTCCCCTTCTGGAAAAGAGCCCGCAGCTTCAT CTC CCAGCTCAAACAACACAGCGGCCACAACAGCAGCTATTGTCCCG GGCTCCCAGCTGATGCCTTCAAAATCACCTTCCACAGGAACCACA GAGATAAGCAGTCATGAGTCCTCCCACGGCACCCCCTCTCAGAC AACAGCCAAGAACTGGGAACTCACAGCATCCGCCTCCCACCAGC CGCCAGGTGTGTATCCACAGGGC CACAGCGACACCACTGTGGCTATCTCCACGTCCACTGTCCTGCTG TGTGGGCTGAGCGCTGTGTCTCTCCTGGCATGCTACCTCAAGTCA AGGCAAACTCCCCCGCTGGCCAGCGTTGAAATGGAAGCCATGGA GGCTCTGCCGGTGACTTGGGGGACCAGCAGCAGAGATGAAGACT TGGAAAACTGCTCTCACCACCT ATGA

[0498]

[0499] *안정화 요소*

[0500] 자연 발생 진핵 mRNA 분자는 5'-캡 구조 또는 3'-폴리(A) 꼬리와 같은 다른 구조적 특징에 더하여, 미번역 영역(UTR)을 포함하지만 이에 한정되지 않는 안정화 요소를 이들의 5'-말단(5' UTR) 및/또는 3'-말단(3' UTR)에서 함유할 수 있다. 통상적으로 5' UTR 및 3' UTR 둘 모두는 게놈 DNA로부터 전사되고 조기 성숙한 mRNA의 요소이다. 5'-캡 및 3'-폴리(A) 꼬리와 같은 성숙 mRNA의 특징적인 구조적 특징은 일반적으로 mRNA 처리 동안 전사된 (조기 성숙) mRNA에 첨가된다.

[0501] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 적어도 하나의 변형, 적어도 하나의 5' 말단 캡을 갖는 적어도 하나의 항원성, 종양 항원성, 또는 신호 전달 폴리펩티드를 암호화하는 개방 해독 프레임을 갖고, 지질 나노입자 내에 제형화된다. 폴리뉴클레오티드의 5'-캡핑은 다음의 화학적 RNA 캡 유사체를 사용한 시험관 내 전사 반응 동안 동시에 완료되어 제조사 프로토콜에 따른 5'-구아노신 캡 구조를 생성할 수 있다: 3'-O-Me-m7G(5')ppp(5') G [ARCA 캡];G(5')ppp(5')A; G(5')ppp(5')G; m7G(5')ppp(5')A; m7G(5')ppp(5')G (New England BioLabs, 매사추세츠주 입스위치 소재). 변형된 RNA의 5'-캡핑은 Vaccinia Vims 캡핑 효소를 사용하여 전사 후 완료되어 "캡 0" 구조를 생성할 수 있다: m7G(5')ppp(5')G (New England BioLabs, 매사추세츠주 입스위치). 캡 1 구조는 Vaccinia Vims 캡핑 효소 및 2'-O 메틸-전이효소 둘 다를 사용하여 생성되어 m7G(5')ppp(5')G-2'-O-메틸을 생성할 수 있다. 캡 2 구조는 캡 1 구조에서 생성된 후, 이어서 2'-O 메틸-전이효소를 사용하여 5'-끝에서 세번째(antepenultimate) 뉴클레오티드의 2'-O 메틸화에 의해 생성될 수 있다. 캡 3 구조는 캡 2 구조에서 생성된 후, 2'-O 메틸-전이효소를 사용하여 5'-끝에서 네번째(preantepenultimate) 뉴클레오티드의 2'-O 메틸화에 의해 생성될 수 있다. 효소는 재조합 공급원으로부터 유래할 수 있다.

[0502] 통상적으로 3'-폴리(A) 꼬리는 전사된 mRNA의 3' 말단에 첨가된 아데닌 뉴클레오티드의 신장된 부분이다. 일부 경우에, 이는 최대 약 400개의 아데닌 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 3'-폴리(A) 꼬리의 길이는 개별 mRNA의 안정성과 관련하여 필수 요소일 수 있다.

[0503] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 안정화 요소를 포함한다. 안정화 요소는, 예를 들어 히스톤 줄기-루프를 포함할 수 있다. 32kDa 단백질인 줄기-루프 결합 단백질(SLBP) 식별되었다. 이는 핵 및 세포질 모두에서 히스톤

메시지의 3'-말단에 있는 히스톤 줄기-루프와 연관된다. 이의 발현 수준은 세포 주기에 의해 조절되며; 이는 히스톤 mRNA 수준이 또한 상승할 때, S기 동안 피크에 도달한다. 단백질은 U7 snRNP에 의한 히스톤 mRNA 전구체의 효율적인 3'-말단 처리에 필수적인 것으로 나타났다. SLBP는 처리 후 줄기-루프와 계속해서 결합되고, 그런 다음 성숙한 히스톤 mRNA가 세포질의 히스톤 단백질로 번역되는 것을 자극한다. SLBP의 RNA 결합 도메인은 후생동물 및 원생동물을 통해 보존되며; 히스톤 줄기-루프에 대한 이의 결합은 루프의 구조에 의존한다. 최소 결합 부위는 줄기-루프에 대해 적어도 3개의 뉴클레오티드 5' 및 2개의 뉴클레오티드 3'를 포함한다.

[0504] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)는 코딩 영역, 적어도 하나의 히스톤 줄기-루프, 및 임의로 폴리(A) 서열 또는 폴리아데닐화 신호를 포함한다. 폴리(A) 서열 또는 폴리아데닐화 신호는 일반적으로 암호화된 단백질의 발현 수준을 향상시켜야 한다. 일부 구현예에서, 암호화된 단백질은 히스톤 단백질, 리포터 단백질(예를 들어, 루시페라아제, GFP, EGFP, b-갈락토시다아제, EGFP), 또는 마커 또는 선택 단백질(예를 들어, 알파-글로빈, 갈락토키나아제, 및 크산틴:구아닌 포스포리보실 전이효소(GPT))가 아니다.

[0505] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)는 폴리(A) 서열 또는 폴리아데닐화 신호 및 적어도 하나의 히스톤 줄기-루프의 조합을 포함하지만, 둘 모두가 자연에서의 대안적인 메커니즘을 나타내더라도 상승적으로 작용하여 개별 요소 중 어느 하나에서 관찰된 수준을 넘어서 단백질 발현을 증가시킨다. 폴리(A) 및 적어도 하나의 히스톤 줄기-루프의 조합의 상승 효과는 폴리(A) 서열의 요소의 순서 또는 길이에 의존하지 않는다. 일부 구현예에서, RNA(예를 들어, mRNA)는 히스톤 하류 요소(HDE)를 포함하지 않는다. "히스톤 하류 요소"(HDE)는 히스톤 mRNA 전구체를 성숙한 히스톤 mRNA로 가공하는 데 관여하는 U7 snRNA에 대한 결합 부위를 나타내는, 자연 발생 줄기-루프의 약 15개 내지 20개의 뉴클레오티드의 3'의 퓨린-풍부 폴리뉴클레오티드 신장을 포함한다. 일부 구현예에서, 핵산은 인트론을 포함하지 않는다.

[0506] 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)는 변형되거나 변형되지 않을 수 있거나 활성화되거나 불활성화될 수 있는 인핸서 및/또는 프로모터 서열을 함유하거나 함유하지 않을 수 있다. 일부 구현예에서, 히스톤 줄기-루프는 일반적으로 히스톤 유전자로부터 유래되고, 스페이서에 의해 분리된 2개의 이웃된 부분적 또는 전체적으로 역상보성인 서열 사이에 분자 내 염기 쌍형성을 포함하고, 이 스페이서는 구조의 루프를 형성하는 짧은 서열로 이루어진다. 통상적으로 쌍을 이루지 않은 루프 영역은 줄기 루프 요소 중 어느 하나와 염기 쌍을 이룰 수 없다. 이는 많은 RNA 이차 구조의 주요 성분이지만 단일 가닥 DNA에도 존재할 수 있는 것과 같이 RNA에서 더 자주 발생한다. 줄기-루프 구조의 안정성은 일반적으로 쌍을 이룬 영역의 길이, 불일치 또는 벌지(bulge)의 수, 및 염기 조성에 좌우한다. 일부 구현예에서, 워블 염기쌍(비-왓슨-크릭(Watson-Crick) 염기쌍)이 발생할 수 있다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 히스톤 줄기-루프 서열은 15개 내지 45개 뉴클레오티드의 길이를 포함한다.

[0507] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)는 제거된 하나 이상의 AU-풍부 서열을 갖는다. 때때로 AURES로 지칭되는 이들 서열은 3'UTR에서 발견되는 불안정화 서열이다. AURES는 RNA 백신으로부터 제거될 수 있다. 대안적으로, AURES는 RNA 백신에 남아 있을 수 있다.

[0508] *신호 펩티드*

[0509] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)는 코로나바이러스 항원에 융합된 신호 펩티드를 암호화하는 ORF를 갖는다. 통상적으로, 단백질의 N-말단 15~60개의 아미노산을 포함하는 신호 펩티드는 분비 경로 상의 막을 가로지르는 전위에 필요하므로, 따라서 분비 경로에 대한 진핵생물 및 원핵생물 모두에서 대부분의 단백질의 진입을 보편적으로 제어한다. 진핵생물에서, 초기 전구체 단백질(전-단백질)의 신호 펩티드는 리보솜을 거친 소포체(ER) 막으로 유도하고, 가공을 위해 성장하는 펩티드 사슬의 수송을 개시한다. ER 처리는 성숙한 단백질을 생산하며, 여기서 신호 펩티드는 통상적으로 숙주 세포의 ER-거주 신호 펩티다아제에 의해 전구체 단백질로부터 절단되거나, 이들은 절단되지 않은 상태로 유지되고 막 앵커로서 기능한다. 또한 신호 펩티드는 세포막에 대한 단백질의 표적화를 용이하게 할 수 있다. 신호 펩티드는 15~60개 아미노산의 길이를 가질 수 있다. 예를 들어, 신호 펩티드는 15~60개 아미노산의 길이를 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 신호 펩티드는 20~60개, 25~60개, 30~60개, 35~60개, 40~60개, 45~60개, 50~60개, 55~60개, 15~55개, 20~55개, 25~55개, 30~55개, 35~55개, 40~55개, 45~55개, 50~55개, 15~50개, 20~50개, 25~50개, 30~50개, 35~50개, 40~50개, 45~50개, 15~45개, 20~45개, 25~45개, 30~45개, 35~45개, 40~45개, 15~40개, 20~40개, 25~40개, 30~40개, 35~40개, 15~35개, 20~35개, 25~35개, 30~35개, 15~30개, 20~30개, 25~30개, 15~25개, 20~25개, 또는 15~20개 아미노산의 길이를 갖는다.

[0510] (자연에서 코로나바이러스 항원 이외의 유전자의 발현을 조절하는) 이종 유전자로부터의 신호 펩티드는 당업계에 공지되어 있고, 바람직한 특성에 대해 시험된 다음 본 개시의 핵산에 삽입될 수 있다. 일부 구현예에서, 신

호 펩티드는 WO 2021/154763에 기술된 것들을 포함할 수 있으며, 동 문헌은 그 전체가 참조로서 통합된다.

[0511] *융합 단백질*

[0512] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)는 항원성 융합 단백질을 암호화한다. 따라서, 암호화된 항원 또는 항원들은 함께 결합된 2개 이상의 단백질(예를 들어, 단백질 및/또는 단백질 단편)을 포함할 수 있다. 대안적으로, 단백질 항원이 융합되는 단백질은 그 자체에 대한 강한 면역 반응을 촉진하지 않고, 오히려 코로나바이러스 항원에 대한 강한 면역 반응을 촉진한다. 일부 구현예에서, 항원성 융합 단백질은 각각의 원래 단백질로부터 기능적 특성을 보유한다.

[0513] *스캐폴드(Scaffold) 모이어티*

[0514] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)는 스캐폴드 모이어티에 연결된 코로나바이러스 항원을 포함하는 융합 단백질을 암호화한다. 일부 구현예에서, 이러한 스캐폴드 모이어티는 본 개시의 핵산에 의해 암호화된 항원에 바람직한 특성을 부여한다. 예를 들어, 스캐폴드 단백질은, 예를 들어 항원의 구조를 변경하고, 항원의 흡수 및 처리를 변경하고/하거나, 항원이 결합 파트너에 결합하게 함으로써 항원의 면역원성을 개선할 수 있다.

[0515] 일부 구현예에서, 스캐폴드 모이어티는 면역계의 다양한 세포와의 최적의 상호작용을 위한 매우 적절한 크기 범위인 10~150nm의 직경을 갖는, 고도로 대칭적이고, 안정적이고, 구조적으로 구성된 단백질 나노입자로 자가 조립될 수 있는 단백질이다.

[0516] 일부 구현예에서, 박테리아 단백질 플랫폼이 사용될 수 있다. 이들 자가-조립 단백질의 비제한적인 예는 페리틴(ferritin), 루마진(lumazine), 및 엔캡슐린(encapsulin)을 포함한다.

[0517] 페리틴은 세포내 철분 축적이 주요 기능인 단백질이다. 페리틴은 24개의 서브유닛으로 제조되며, 각각은 4-알파-나선 다발로 구성되고, 이는 팔면체 대칭을 갖는 4차 구조로 자가-조립된다(Cho K.J. 등의 문헌[J Mol Biol. 2009; 390:83~98]). 페리틴의 여러 가지 고해상도 구조가 결정되어, 헬리코박터 파일로리 페리틴이 24개의 동일한 프로토머로 제조되는 반면, 동물에서는 단독으로 조립하거나 상이한 비율과 함께 24개의 서브유닛의 입자로 조합할 수 있는 페리틴 경쇄 및 중쇄가 존재한다(Granier T. 등의 문헌[J Biol Inorg Chem. 2003; 8:105~111]; Fawson D.M. 등의 문헌[Nature. 1991; 349:541~544]). 페리틴은 강력한 열 안정성 및 화학적 안정성을 갖는 나노입자로 자가-조립된다. 따라서, 페리틴 나노입자는 항원을 운반하고 노출시키는 데 매우 적합하다.

[0518] 또한 푸마진 합성효소(FS)는 항원 디스플레이를 위한 나노입자 플랫폼으로서 매우 적합하다. 리보플라빈의 생합성에서 끝에서 두 번째 촉매 단계를 담당하는 FS는 고세균류, 박테리아, 진균류, 식물, 및 유박테리아를 포함하는 광범위한 유기체에 존재하는 효소이다(Weber S.E의 문헌[Flavins and Flavoproteins. Methods and Protocols, Series: Methods in Molecular Biology. 2014]). FS 단량체는 150개 아미노산 길이이며, 베타-시트와 그 측면에 위치하는 직렬 알파-나선으로 구성된다. FS에 대해 다수의 상이한 4차 구조가 보고되었는데, 이는 호모펜타머(homopentamers)에서 150 A 직경의 캡시드를 형성하는 12개의 펜타머(pentamers)의 대칭 어셈블리에 이르기까지 형태학적 다양성을 예시한다. 심지어 100개를 초과하는 서브유닛의 FS 케이지가 기술되었다(Zhang X. 등[J Mol Biol. 2006; 362:753~770]).

[0519] 또한, 열친매성 써모토가 마리티마(Thermotoga maritima)로부터 단리된 신규한 단백질 케이지 나노입자인 엔캡슐린은 자가-조립 나노입자의 표면에 항원을 제시하는 플랫폼으로서 사용될 수 있다. 엔캡슐린은 각각 20nm 및 24nm의 내경 및 외경을 갖는 얇고 정20면체대칭 T=1 대칭 케이지 구조를 갖는 동일한 31kDa 단량체의 60개 사본으로부터 조립된다(Sutter M. 등[Nat Struct Mol Biol. 2008, 15: 939~947]). T. 마리티마에서의 엔캡슐린의 정확한 기능은 아직 명확하게 이해되지 않았지만, 최근에 이의 결정 구조가 해결되었고, 그 기능은 산화 스트레스 반응에 관여하는 DyP(다이 탈색 퍼옥시다아제) 및 Flp(페리틴 유사 단백질)와 같은 단백질을 캡슐화하는 세포 구획으로서 가정되었다(Rahmanpour R. 등[FEBS J. 2013, 280: 2097~2104]).

[0520] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 폴드온 도메인에 융합된 코로나바이러스 항원(예를 들어, SARS-CoV-2 S 단백질)을 암호화한다. 폴드온 도메인은, 예를 들어 박테리오파지 T4 피브리틴으로부터 수득될 수 있다(예를 들어, Tao Y, 등의 문헌[Structure. 1997 Jun 15; 5(6):789~98] 참조함).

[0521] *링커 및 절단성 펩티드*

[0522] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)는 본원에서 융합 단백질로서 지칭되는 하나 초과의 폴리펩티드를 암호화한다. 일부 구현예에서, mRNA는 융합 단백질의 적어도 하나 또는 각각의 도메인 사이에 위치한

링커를 추가로 암호화한다. 링커는, 예를 들어 절단성 링커 또는 프로테아제-민감성 링커일 수 있다. 일부 구현예에서, 링커는 F2A 링커, P2A 링커, T2A링커, E2A 링커, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 2개의 A 펩티드로서 지칭되는 이러한 자가-절단 펩티드 링커 계열은 당업계에 기술되어 있다(예를 들어, Kim, J.H. 등의 문헌[(2011) PLoS ONE 6:e18556] 참조함). 일부 구현예에서, 링커는 F2A 링커이다. 일부 구현예에서, 융합 단백질은 다음의 구조를 갖는 개재 링커를 갖는 3개의 도메인을 함유한다: 도메인-링커-도메인-링커-도메인.

[0523] 당업계에 공지된 절단성 링커는 본 개시와 관련하여 사용될 수 있다. 예시적인 이러한 링커는 F2A 링커, T2A 링커, P2A 링커, E2A 링커를 포함한다(예를 들어, WO2017/127750 참조하고, 동 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합됨). 당업자는 당업계에서 인식된 다른 링커가 본 개시의 작제물에 사용하기에 적합할 수 있음을 이해할 것이다(예를 들어, 본 개시의 핵산에 의해 암호화됨). 당업자는 마찬가지로, 다른 폴리시스트론 작제물(동일한 분자 내에서 하나 초과의 항원/폴리펩티드를 별도로 암호화하는 mRNA)이 본원에 제공된 바와 같이 사용하기에 적합할 수 있음을 이해할 것이다.

[0524] *서열 최적화*

[0525] 일부 구현예에서, 본 개시의 항원, 종양 항원, 신호 전달 또는 항암 단백질을 암호화하는 ORF는 코돈 최적화된다. 코돈 최적화 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 본원에 제공된 서열 중 임의의 하나 이상의 ORF는 코돈 최적화될 수 있다. 일부 구현예에서, 코돈 최적화는 표적 유기체 및 숙주 유기체에서 코돈 빈도를 일치시키는 데 사용되어 적절한 접힘을 보장할 수 있고; GC 함량을 편향시키는 데 사용되어 mRNA 안정성을 증가시키거나 이차 구조를 감소시킬 수 있고; 유전자 구성 또는 유전자 발현을 손상시킬 수 있는 직렬 반복 코돈 또는 염기 런(run)을 최소화하는 데 사용될 수 있고; 전사 및 번역 조절 영역을 맞춤화하는 데 사용될 수 있고; 단백질 수송 서열을 삽입하거나 제거하는 데 사용될 수 있고; 암호화된 단백질 내 번역 전 변형 부위(예를 들어, 당질화 부위)를 제거/첨가하는 데 사용될 수 있고; 단백질 도메인을 첨가, 제거, 또는 셔플하는 데 사용될 수 있고; 제한 부위를 삽입하거나 삭제하는 데 사용될 수 있고; 리보솜 결합 부위 및 mRNA 분해 부위를 변형하는 데 사용될 수 있고; 번역률을 조절하는 데 사용되어 다양한 단백질 도메인이 적절하게 접힐 수 있도록 할 수 있거나; 폴리뉴클레오티드 내 문제 이차 구조를 감소시키거나 제거하는 데 사용될 수 있다. 코돈 최적화 도구, 알고리즘, 및 서비스는 당업계에 공지되어 있으며, 비제한적인 예는 GeneArt(Life Technologies), DNA2.0(Menlo Park CA), 및/또는 독점적인 방법으로부터의 서비스를 포함한다. 일부 구현예에서, 개방 해독 프레임(ORF) 서열은 최적화 알고리즘을 사용하여 최적화된다.

[0526] 일부 구현예에서, 코돈 최적화된 서열은 자연 발생 서열 ORF 또는 야생형 서열 ORF(예를 들어, 코로나바이러스 항원을 암호화하는 자연 발생 mRNA 서열 또는 야생형 mRNA 서열)와 95% 미만의 서열 동일성을 공유한다. 일부 구현예에서, 코돈 최적화된 서열은 자연 발생 서열 또는 야생형 서열(예를 들어, 코로나바이러스 항원을 암호화하는 자연 발생 mRNA 서열 또는 야생형 mRNA 서열)과 90% 미만의 서열 동일성을 공유한다. 일부 구현예에서, 코돈 최적화된 서열은 자연 발생 서열 또는 야생형 서열(예를 들어, 코로나바이러스 항원을 암호화하는 자연 발생 mRNA 서열 또는 야생형 mRNA 서열)과 85% 미만의 서열 동일성을 공유한다. 일부 구현예에서, 코돈 최적화된 서열은 자연 발생 서열 또는 야생형 서열(예를 들어, 코로나바이러스 항원을 암호화하는 자연 발생 mRNA 서열 또는 야생형 mRNA 서열)과 80% 미만의 서열 동일성을 공유한다. 일부 구현예에서, 코돈 최적화된 서열은 자연 발생 서열 또는 야생형 서열(예를 들어, 코로나바이러스 항원을 암호화하는 자연 발생 mRNA 서열 또는 야생형 mRNA 서열)과 75% 미만의 서열 동일성을 공유한다.

[0527] 일부 구현예에서, 코돈 최적화된 서열은 자연 발생 서열 또는 야생형 서열(예를 들어, 코로나바이러스 항원을 암호화하는 자연 발생 mRNA 서열 또는 야생형 mRNA 서열)과 65% 내지 85%(예를 들어, 약 67% 내지 약 85% 또는 약 67% 내지 약 80%)의 서열 동일성을 공유한다. 일부 구현예에서, 코돈 최적화된 서열은 자연 발생 서열 또는 야생형 서열(예를 들어, 코로나바이러스 항원을 암호화하는 자연 발생 mRNA 서열 또는 야생형 mRNA 서열)과 65% 내지 75% 또는 약 80%의 서열 동일성을 공유한다.

[0528] 일부 구현예에서, 코돈 최적화된 서열은 코돈 최적화되지 않은 서열에 의해 암호화된 코로나바이러스 항원만큼 면역원성이거나 이보다 면역원성이 더 큰 항원(예를 들어, 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 100%, 또는 적어도 200% 이상)을 암호화한다. 포유류 숙주 세포 내로 형질감염될 때, 변형된 mRNA는 12~18시간, 또는 18시간 초과, 예를 들어, 24시간, 36시간, 48시간, 60시간, 72시간, 또는 72시간 초과의 안정성을 가지며, 포유류 숙주 세포에 의해 발현될 수 있다.

[0529] 일부 구현예에서, 코돈 최적화된 RNA는 G/C의 수준이 향상된 것일 수 있다. 핵산 분자(예를 들어, mRNA)의 G/C

함량은 RNA의 안정성에 영향을 미칠 수 있다. 증가된 양의 구아닌(G) 및/또는 시토신(C) 잔기를 갖는 RNA는 다량의 아데닌(A) 및 티민(T) 또는 우라실(U) 뉴클레오티드를 함유하는 RNA보다 기능적으로 더 안정적일 수 있다. 예로서, WO02/098443은 번역된 영역에서 서열 변형에 의해 안정화된 mRNA를 함유하는 약학적 조성물을 개시한다. 유전자 코드의 퇴행으로 인해, 변형은 생성된 아미노산을 변화시키지 않으며 더 큰 RNA 안정성을 촉진하는 것들에 대해 기존의 코돈을 치환함으로써 작용한다. 접근법은 RNA의 코딩 영역으로 제한된다.

[0530] *화학적으로 변형되지 않은 뉴클레오티드*

[0531] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)는 화학적으로 변형되지 않으며, 아데노신, 구아노신, 시토신, 및 우리딘으로 이루어진 표준 리보뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)의 뉴클레오티드 및 뉴클레오시드는 전사된 RNA에 존재하는 것들(예를 들어, A, G, C, 또는 U)과 같은 표준 뉴클레오시드 잔기를 포함한다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)의 뉴클레오티드 및 뉴클레오시드는 DNA에 존재하는 것들(예를 들어, dA, dG, dC, 또는 dT)과 같은 표준 데옥시리보뉴클레오시드를 포함한다.

[0532] *화학적 변형*

[0533] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)는 코로나바이러스 항원을 암호화하는 개방 해독 프레임을 갖는 RNA를 포함하되, 핵산은 표준(미변형)이거나 당업계에 공지된 바와 같이 변형될 수 있는 뉴클레오티드 및/또는 뉴클레오시드를 포함한다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)의 뉴클레오티드 및 뉴클레오시드는 변형된 뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드를 포함한다. 이러한 변형된 뉴클레오티드 및 뉴클레오시드는 변형된 자연 발생 뉴클레오티드 및 뉴클레오시드일 수 있거나 변형된 비자연 발생 뉴클레오티드 및 뉴클레오시드일 수 있다. 이러한 변형은 당업계에서 인식되는 바와 같이 뉴클레오티드 및/또는 뉴클레오시드의 당, 골격, 또는 핵염기 부분에 있는 것들을 포함할 수 있다.

[0534] 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)의 핵산은 표준 뉴클레오티드 및 뉴클레오시드, 자연 발생 뉴클레오티드 및 뉴클레오시드, 비자연 발생 뉴클레오티드 및 뉴클레오시드, 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다.

[0535] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드의 핵산(예를 들어, DNA 핵산 및 RNA 핵산, 예컨대 mRNA 핵산)은 다양한(하나 초과의) 상이한 유형의 표준 및/또는 변형된 뉴클레오티드 및 뉴클레오시드를 포함한다. 일부 구현예에서, 핵산의 특정 영역은 하나, 둘 이상의 (임의적으로 상이한) 유형의 표준 및/또는 변형된 뉴클레오티드 및 뉴클레오시드를 함유한다.

[0536] 일부 구현예에서, 세포 또는 유기체 내로 도입된 변형된 RNA 핵산(예를 들어, 변형된 mRNA 핵산)은 표준 뉴클레오티드 및 뉴클레오시드를 포함하는 변형되지 않은 핵산에 비해 세포 또는 유기체에서 감소된 분해를 각각 보여준다.

[0537] 일부 구현예에서, 세포 또는 유기체 내로 도입된 변형된 RNA 핵산(예를 들어, 변형된 mRNA 핵산)은 표준 뉴클레오티드 및 뉴클레오시드를 포함하는 변형되지 않은 핵산에 비해 세포 또는 유기체에서 각각 감소된 면역원성(예를 들어, 감소된 선천적 반응)을 보여줄 수 있다.

[0538] 일부 구현예에서, 핵산(예를 들어, mRNA 핵산과 같은 RNA 핵산)은 핵산의 합성 또는 합성 후 동안 도입되어 바람직한 기능 또는 특성을 달성하는 비천연 변형된 뉴클레오티드를 포함한다. 변형은 뉴클레오티드간 결합, 퓨린 또는 피리미딘 염기, 또는 당에 존재할 수 있다. 변형은 화학적 합성으로 또는 사슬의 말단 또는 사슬의 다른 곳에서 중합효소 효소로 도입될 수 있다. 핵산의 영역 중 어느 하나는 화학적으로 변형될 수 있다.

[0539] 본 개시는 핵산(예를 들어, mRNA 핵산과 같은 RNA 핵산)의 변형된 뉴클레오시드 및 뉴클레오티드를 제공한다. "뉴클레오시드"는 당 분자(예를 들어, 펜토스 또는 리보오스) 또는 이의 유도체를 유기 염기(예를 들어, 퓨린 또는 피리미딘) 또는 이의 유도체(본원에서 "핵염기"로도 지칭됨)와 조합하여 함유하는 화합물을 지칭한다. "뉴클레오티드"는 인산염기를 포함하는 뉴클레오시드를 지칭한다. 변형된 뉴클레오티드는, 예를 들어 화학적으로, 효소적으로, 또는 재조합적으로와 같은 임의의 유용한 방법에 의해 합성되어 하나 이상의 변형된 또는 비천연 뉴클레오시드를 포함할 수 있다. 핵산은 연결된 뉴클레오시드의 영역 또는 영역들을 포함할 수 있다. 이러한 영역은 가변 백본 결합을 가질 수 있다. 결합은 표준 인산디에스테르 결합일 수 있으며, 이러한 경우 핵산은 뉴클레오티드의 영역을 포함할 것이다.

[0540] 변형된 뉴클레오티드 염기 쌍형성은 표준 아데노신-티민, 아데노신-우라실, 또는 구아노신-시토신 염기쌍 뿐만 아니라, 비표준 또는 변형된 염기를 포함하는 뉴클레오티드 및/또는 변형된 뉴클레오티드 사이에 형성된 염기쌍

을 포함하되, 예를 들어, 적어도 하나의 화학적 변형을 갖는 핵산에서 수소 결합 공여자 및 수소 결합 수용자의 배열은 비표준 염기와 표준 염기 사이 또는 2개의 상보적 비표준 염기 구조 사이의 수소 결합을 허용한다. 이러한 비표준 염기 쌍형성의 일례는 변형된 뉴클레오티드 이노신과 아데닌, 시토신, 또는 우라실 간의 염기 쌍형성이다. 염기/당 또는 링커의 임의의 조합은 본 개시의 핵산에 통합될 수 있다.

[0541] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)는 핵산의 하나 이상의 또는 모든 우리딘 위치에서 우리딘을 포함한다. 일부 구현예에서, mRNA는 특정 변형에 대해 균일하게 변형(예를 들어, 완전히 변형, 전체 서열에 걸쳐 변형)된다. 예를 들어, 핵산은 1-메틸-슈도우리딘으로 균일하게 변형될 수 있으며, 이는 mRNA 서열 내의 모든 우리딘 잔기가 1-메틸-슈도우리딘으로 대체됨을 의미한다. 유사하게, 핵산은 서열에 존재하는 임의의 유형의 뉴클레오시드 잔기에 대해 전술한 것들과 같은 변형된 잔기로 치환함으로써 균일하게 변형될 수 있다.

[0542] 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)의 핵산은 분자의 전체 길이를 따라 부분적으로 또는 완전히 변형될 수 있다. 예를 들어, 하나 이상 또는 전부 또는 주어진 유형의 뉴클레오티드(예를 들어, 퓨린 또는 피리미딘, 또는 A, G, U, C 중 임의의 하나 또는 전부)는 본 개시의 핵산에서, 또는 이의 소정의 서열 영역에서(예를 들어, 폴리(A) 꼬리를 포함하거나 배제하는 mRNA에서) 균일하게 변형될 수 있다. 일부 구현예에서, 본 개시의 핵산(또는 이의 서열 영역)에서의 모든 뉴클레오티드 X는 변형된 뉴클레오티드이며, 여기서 X는 뉴클레오티드 A, G, U, C 중 어느 하나, 또는 조합 A+G, A+U, A+C, G+U, G+C, U+C, A+G+U, A+G+C, G+U+C, 또는 A+G+C 중 어느 하나일 수 있다.

[0543] 핵산은 (전체 뉴클레오티드 함량과 관련하여, 또는 하나 이상 유형의 뉴클레오티드와 관련하여, 즉, A, G, U, 또는 C 중 임의의 하나 이상) 약 1% 내지 약 100%의 변형된 뉴클레오티드 또는 임의의 중간 백분율(예를 들어, 1% 내지 20%, 1% 내지 25%, 1% 내지 50%, 1% 내지 60%, 1% 내지 70%, 1% 내지 80%, 1% 내지 90%, 1% 내지 95%, 10% 내지 20%, 10% 내지 25%, 10% 내지 50%, 10% 내지 60%, 10% 내지 70%, 10% 내지 80%, 10% 내지 90%, 10% 내지 95%, 10% 내지 100%, 20% 내지 25%, 20% 내지 50%, 20% 내지 60%, 20% 내지 70%, 20% 내지 80%, 20% 내지 90%, 20% 내지 95%, 20% 내지 100%, 50% 내지 60%, 50% 내지 70%, 50% 내지 80%, 50% 내지 90%, 50% 내지 95%, 50% 내지 100%, 70% 내지 80%, 70% 내지 90%, 70% 내지 95%, 70% 내지 100%, 80% 내지 90%, 80% 내지 95%, 80% 내지 100%, 90% 내지 95%, 90% 내지 100%, 및 95% 내지 100%)을 함유할 수 있다. 임의의 잔여 백분율은 변형되지 않은 A, G, U, 또는 C의 존재에 의해 설명되는 것으로 이해될 것이다.

[0544] mRNA는 적어도 1% 내지 최대 100%의 변형된 뉴클레오티드, 또는 임의의 중간 백분율, 예컨대 적어도 5%의 변형된 뉴클레오티드, 적어도 10%의 변형된 뉴클레오티드, 적어도 25%의 변형된 뉴클레오티드, 적어도 50%의 변형된 뉴클레오티드, 적어도 80%의 변형된 뉴클레오티드, 또는 적어도 90%의 변형된 뉴클레오티드를 함유할 수 있다. 예를 들어, 핵산은 변형된 우라실 또는 시토신과 같은 변형된 피리미딘을 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 핵산 중 우라실의 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 25%, 적어도 50%, 적어도 80%, 적어도 90% 또는 100%가 변형된 우라실(예를 들어, 5-치환된 우라실)로 치환된다. 변형된 우라실은 단일 고유 구조를 갖는 화합물로 대체될 수 있거나, 상이한 구조(예를 들어, 2개, 3개, 4개 이상의 고유 구조)를 갖는 복수의 화합물로 대체될 수 있다. 일부 구현예에서, 핵산 중 시토신의 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 25%, 적어도 50%, 적어도 80%, 적어도 90% 또는 100%가 변형된 시토신(예를 들어, 5-치환된 시토신)으로 치환된다. 변형된 시토신은 단일 고유 구조를 갖는 화합물로 대체될 수 있거나, 상이한 구조(예를 들어, 2개, 3개, 4개 이상의 고유 구조)를 갖는 복수의 화합물로 대체될 수 있다.

[0545] *미번역 영역(UTR)*

[0546] 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)는 미번역 영역으로서 작용하거나 기능하는 하나 이상의 영역 또는 부분을 포함할 수 있다. mRNA가 적어도 하나의 관심 단백질을 암호화하도록 설계된 경우, 폴리뉴클레오티드는 이들 미번역 영역(UTR) 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 핵산 서열의 야생형 미번역 영역은 전사되지만 번역되지는 않는다. mRNA에서, 5' UTR은 전사 시작 부위에서 시작하여 시작 코돈까지 계속되지만, 시작 코돈을 포함하지 않는 반면, 3' UTR은 정지 코돈 바로 다음부터 시작되어 전사 종결 신호까지 계속된다. 핵산 분자의 안정성 및 번역의 관점에서, UTR에 의해 수행되는 조절 역할에 대한 증거가 증가하고 있다. UTR의 조절 특징은 본 개시의 폴리뉴클레오티드에 삽입되어 무엇보다도 분자의 안정성을 향상시킬 수 있다. 또한 특정 특징들이 추가되어, 전사체가 바람직하지 않은 기관 부위로 잘못 전달되는 경우에 전사체의 제어된 하향 조절을 보장할 수 있다. 다양한 5' UTR 서열 및 3' UTR 서열이 당업계에 공지되어 있고 이용 가능하다.

[0547] 5' UTR은 시작 코돈(리보솜에 의해 번역된 mRNA 전사체의 제1 코돈)으로부터 바로 상류(5')에 있는 mRNA의 영역이다. 5' UTR은 단백질을 암호화하지 않는다(비암호화임). 천연 5' UTR은 번역 개시에 역할을 하는 특징을 갖는

다. 이들은 일반적으로 리보솜이 많은 유전자의 번역을 개시하는 과정에 관여하는 것으로 알려진 코작 서열과 같은 시그니처를 보유한다. 코작 서열은 컨센서스 CCR(A/G)CCAUGG를 가지며, 여기서 R은 시작 코돈(AUG)의 상류에 있는 퓨린(아데닌 또는 구아닌) 3개의 염기이며, 이어서 또 다른 'G'가 이어진다. 또한 5' UTR은 신장 인자 결합에 관여하는 이차 구조를 형성하는 것으로 알려져 있다.

[0548] 일부 구현예에서, 5' UTR은 이종 UTR, 즉 상이한 ORF와 연관된 자연에서 발견되는 UTR이다. 다른 구현예에서, 5' UTR은 합성 UTR, 즉 자연에서 발생하지 않는다. 합성 UTR은 이들의 특성을 개선하도록 돌연변이된 UTR, 예를 들어 유전자 발현을 증가시키는 UTR 뿐만 아니라 완전히 합성인 UTR을 포함한다. 예시적인 5' UTR은 제노푸스 또는 인간 유래 a-글로빈 또는 b-글로빈(8278063; 9012219), 인간 시토크롬 b-245 폴리펩티드, 및 히드록시스테로이드(17b) 탈수소효소, 및 담배 에칭 바이러스(U.S.8278063, 9012219, 동 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합됨)를 포함한다. CMV 즉시-조기 1(IE1) 유전자(US2014/0206753, WO2013/185069, 동 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합됨), 서열 GGGAUCCUACC(WO2014/144196)가 또한 사용될 수 있다. 또 다른 구현예에서, TOP 유전자의 5' UTR은 5' TOP 모티프(올리고피리미딘 관)(예를 들어, WO/2015/101414, WO2015/101415, WO/2015/062738, WO2015/024667, WO2015/024667)가 결여된 TOP 유전자의 5' UTR이고; 리보솜 단백질 대형 32(L32) 유전자(WO/2015/101414, WO2015/101415, WO/2015/062738)로부터 유래된 5' UTR 요소, 히드록시스테로이드(17-b) 탈수소효소 4 유전자(HSD17B4)의 5' UTR로부터 유래된 5' UTR 요소(WO2015/024667), 또는 ATP5A1의 5' UTR로부터 유래된 5' UTR 요소(WO2015/024667)가 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 5' UTR 대신에 내부 리보솜 진입 부위(IRES)가 사용된다.

[0549] 3' UTR은 정지 코돈(번역의 종결을 신호하는 mRNA 전사체의 코돈)으로부터 바로 하류(3')에 있는 mRNA의 영역이다. 3' UTR은 단백질을 암호화하지 않는다(비암호화임). 천연 3' UTR 또는 야생형 3' UTR은 내장된 아데노신 및 우리딘의 신장을 갖는 것으로 알려져 있다. 이들 AU 풍부 시그니처는 높은 전환율을 갖는 유전자에서 특히 흔하다. 이들의 서열 특징 및 기능적 특성에 기초하여, AU 풍부 요소(ARE)는 3개의 부류로 분리될 수 있다(Chen 등의 문헌(1995)): 클래스 I ARE는 U-풍부 영역 내에 AUUUA 모티프의 여러 분산된 사본을 함유한다. C-Myc 및 MyoD는 클래스 I ARE를 포함한다. 클래스 II ARE는 둘 이상의 중첩된 UUAUUUA(U/A)(U/A) 9량체를 갖는다. 이러한 유형의 ARE를 함유하는 분자는 GM-CSF 및 TNF-α를 포함한다. 클래스 III ARE는 덜 잘 정의되어 있다. 이들 U 풍부 영역은 AUUUA 모티프를 함유하지 않는다. c-Jun 및 미오게닌은 이 부류의 2개의 잘 연구된 예이다.

[0550] ARE에 결합하는 대부분의 단백질은 전령을 불안정하게 하는 것으로 알려져 있는 반면, ELAV 계열의 구성원, 가장 주목할 만한 HuR은 mRNA의 안정성을 증가시키는 것으로 문서화되어 있다. HuR은 모든 세 가지 부류의 ARE에 결합한다. HuR 특이적 결합 부위를 핵산 분자의 3' UTR로 조작하는 것은 HuR 결합으로 이어져 생체 내에서 메시지를 안정화시킬 것이다.

[0551] 3' UTR AU 풍부 요소(ARE)의 도입, 제거, 또는 변형은 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)의 안정성을 조절하는 데 사용될 수 있다. 특이적 핵산을 조작할 때, ARE의 하나 이상의 사본이 도입되어 본 개시의 핵산을 덜 안정하게 하여, 이에 따라 번역을 제한하고 생성된 단백질의 생산을 감소시킬 수 있다. 마찬가지로, ARE는 식별되고 제거되거나 돌연변이되어 세포내 안정성을 증가시키고, 이에 따라 생성된 단백질의 번역 및 생산을 증가시킬 수 있다. 형질감염 실험은 본 개시의 핵산을 사용하여 관련 세포주에서 수행될 수 있고, 단백질 생산은 형질감염 후 다양한 시점에 분석될 수 있다. 예를 들어, 세포는 상이한 ARE-조작 분자와 함께, 관련 단백질에 대한 ELISA 키트를 사용하고 형질감염 후 6시간, 12시간, 24시간, 48시간 및 7일차에 생성된 단백질을 분석함으로써 형질감염될 수 있다.

[0552] 3' UTR은 이종 또는 합성일 수 있다.

[0553] 당업자는 이종 또는 합성인 5' UTR이 임의의 바람직한 3' UTR 서열과 함께 사용될 수 있음을 이해할 것이다. 예를 들어, 이종 5' UTR은 이종 3' UTR을 갖는 합성 3' UTR과 함께 사용될 수 있다.

[0554] 또한 비UTR 서열은 핵산 내의 영역 또는 하위 영역으로서 사용될 수 있다. 예를 들어, 인트론 또는 인트론 서열의 일부는 본 개시의 핵산 서열의 영역에 삽입될 수 있다. 인트론 서열의 삽입은 단백질 생산뿐만 아니라 핵산 수준을 증가시킬 수 있다.

[0555] 특징부의 조합은 측부 영역에 포함될 수 있고, 다른 특징부 내에 포함될 수 있다. 예를 들어, ORF는 강력한 코작 번역 개시 신호를 함유할 수 있는 5' UTR 및/또는 폴리-A 꼬리의 템플릿화된 첨가를 위한 올리고(dT) 서열을 포함할 수 있는 3' UTR이 측면에 위치할 수 있다. 5' UTR은 미국 특허 출원 공개 제2010/0293625호 및 PCT/US2014/069155에 기술된 5' UTR과 같이, 동일하고/하거나 상이한 유전자로부터의 제1 폴리뉴클레오티드 단

편 및 제2 폴리뉴클레오티드 단편을 포함할 수 있으며, 동 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다. 임의의 유전자로부터의 임의의 UTR은 핵산 서열의 영역에 삽입될 수 있음을 이해해야 한다. 또한, 임의의 공지된 유전자의 다수의 야생형 UTR이 사용될 수 있다. 또한, 야생형 영역의 변이체가 아닌 인공 UTR을 제공하는 것 본 개시의 범주 내에 있다. 이들 UTR 또는 이의 일부는 이들이 선택된 전사체와 동일한 배향으로 배치될 수 있거나 배향 또는 위치에서 변경될 수 있다. 따라서, 5' UTR 또는 3' UTR은 반전, 단축, 연장될 수 있고, 하나 이상의 다른 5' UTR 또는 3' UTR로 제조될 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, UTR 서열에 관한 용어 "변경된"은 UTR이 기준 서열과 관련하여 어떤 방식으로든 변경되었음을 의미한다. 예를 들어, 3' UTR 또는 5' UTR은 전술한 바와 같은 배향 또는 위치의 변화에 의해 야생형 UTR 또는 천연 UTR에 대해 변경될 수 있거나, 추가 뉴클레오티드의 포함, 뉴클레오티드의 결실, 뉴클레오티드의 교환 또는 전위에 의해 변경될 수 있다. "변경된" UTR(3' 또는 5')을 생성하는 이들 변화 중 어느 하나는 변이체 UTR을 포함한다.

[0556] 일부 구현예에서, 5' UTR 또는 3' UTR과 같은 이중, 삼중, 또는 사중 UTR이 사용될 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "이중" UTR은 동일한 UTR의 2개의 사본이 직렬로 또는 실질적으로 직렬로 인코딩되는 것이다. 예를 들어, 이중 베타-글로빈 3' UTR은 미국 특허 공개 제2010/0129877호에 기술된 바와 같이 사용될 수 있으며, 동 문헌의 내용은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

[0557] 또한, 패터닝된 UTR을 갖는 것이 본 개시의 범주 내에 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "패터닝된 UTR"은 반복 또는 교번 패턴을 반영하는 UTR, 예컨대 ABABAB 또는 AABBAABBAABB 또는 ABCABCABC 또는 이의 변이체가 1회, 2회, 또는 3회를 초과하여 반복되는 UTR이다. 이들 패턴에서, 각각의 문자, A, B, 또는 C는 뉴클레오티드 수준에서 상이한 UTR을 나타낸다.

[0558] 일부 구현예에서, 인접 영역은 단백질이 공통 기능, 구조, 특징부, 또는 특성을 공유하는 전사체의 계열로부터 선택된다. 예를 들어, 관심 폴리펩티드는 특정 세포, 조직에서 발현되거나 발생 중 어느 시점에 발현되는 단백질 계열에 속할 수 있다. 이들 유전자 중 어느 하나의 UTR은 동일하거나 상이한 단백질 계열의 임의의 다른 UTR과 교환되어 새로운 폴리뉴클레오티드를 생성할 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "단백질 계열"은 적어도 하나의 기능, 구조, 특징부, 국소화, 기원, 또는 발현 패턴을 공유하는 2개 이상의 관심 폴리펩티드의 군을 지칭하기 위해 가장 넓은 의미로 사용된다.

[0559] 또한 미번역 영역은 번역 인핸서 요소(TEE)를 포함할 수 있다. 비제한적인 예로서, TEE는 그 전체가 참조로서 본원에 통합된 미국 출원 제2009/0226470호에 기술된 것들 및 당업계에 공지된 것들을 포함할 수 있다. 본원에 기술된 폴리뉴클레오티드를 암호화하는 RNA cDNA의 시험관 내 전사는 시험관 내 전사(IVT) 시스템을 사용하여 전사될 수 있다. RNA의 시험관 내 전사는 당업계에 공지되어 있으며 국제 공개 WO 2014/152027에 기술되어 있고, 동 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다. 일부 구현예에서, 본 개시의 RNA는 WO 2018/053209 및 WO 2019/036682에 기술된 방법 중 임의의 하나 이상에 따라 제조되며, 동 문헌의 각각은 참조로서 본원에 통합된다.

[0560] 일부 구현예에서, RNA 전사체는 시험관 내 전사 반응에서 증폭되지 않은 선형화된 DNA 템플릿을 사용하여 생성되어 RNA 전사체를 생성한다. 일부 구현예에서, 템플릿 DNA는 단리된 DNA이다. 일부 구현예에서, 템플릿 DNA는 cDNA이다. 일부 구현예에서, cDNA는 RNA 폴리뉴클레오티드, 예를 들어, 비제한적으로 코로나바이러스 mRNA의 역전사에 의해 형성된다. 일부 구현예에서, 세포, 예를 들어 박테리아 세포, 예를 들어 대장균, 예를 들어 DH-1 세포는 플라스미드 DNA 템플릿으로 형질감염된다. 일부 구현예에서, 형질감염된 세포는 플라스미드 DNA를 복제하도록 배양된 다음, 단리되고 정제된다. 일부 구현예에서, DNA 템플릿은 RNA 중합효소 프로모터, 예를 들어, 관심 유전자의 5'에 위치하고 이에 작동 가능하게 연결된 T7 프로모터를 포함한다.

[0561] 일부 구현예에서, 시험관 내 전사 템플릿은 5' 미번역(UTR) 영역을 암호화하고, 개방 해독 프레임을 함유하고, 3' UTR 및 폴리(A) 꼬리를 암호화한다. 특정 핵산 서열 조성물 및 시험관 내 전사 템플릿의 길이는 템플릿에 의해 암호화된 mRNA에 따라 달라질 것이다.

[0562] "5' 미번역 영역"(UTR)은 폴리펩티드를 암호화하지 않는 시작 코돈(즉, 리보솜에 의해 번역된 mRNA 전사체의 제1 코돈)으로부터 바로 상류(즉, 5')에 있는 mRNA의 영역을 지칭한다. RNA 전사체가 생성될 때, 5' UTR은 프로모터 서열을 포함할 수 있다. 이러한 프로모터 서열은 당업계에 공지되어 있다. 이러한 프로모터 서열은 본 개시의 백신에 존재하지 않을 것임을 이해해야 한다.

[0563] "3' 미번역 영역"(UTR)은 폴리펩티드를 암호화하지 않는 정지 코돈(즉, 번역의 종결을 신호하는 mRNA 전사체의 코돈)으로부터 바로 하류(즉, 3')에 있는 mRNA의 영역을 지칭한다.

[0564] "개방 해독 프레임"은 시작 코돈(예를 들어, 메티오닌(ATG))으로 시작하여 정지 코돈(예를 들어, TAA, TAG, 또는 TGA)으로 끝나는 DNA의 연속 신장이며 폴리펩티드를 암호화한다.

[0565] "폴리(A) 꼬리"는 다수의 연속적인 아데노신 일인산염을 함유하는 3' UTR로부터 하류에, 예를 들어 바로 하류(즉, 3')에 있는 mRNA의 영역이다. 폴리(A) 꼬리는 10개 내지 300개의 아데노신 일인산염을 함유할 수 있다. 예를 들어, 폴리(A) 꼬리는 10개, 20개, 30개, 40개, 50개, 60개, 70개, 80개, 90개, 100개, 110개, 120개, 130개, 140개, 150개, 160개, 170개, 180개, 190개, 200개, 210개, 220개, 230개, 240개, 250개, 260개, 270개, 280개, 290개 또는 300개의 아데노신 일인산염을 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 폴리(A) 꼬리는 50개 내지 250개의 아데노신 일인산염을 함유한다. 관련 생물학적 환경(예를 들어, 세포 내, 생체 내)에서, 폴리(A) 꼬리는, 예를 들어 세포질에서의 효소 분해로부터 mRNA를 보호하는 기능을 하며, 전사 종결 및/또는 핵으로부터의 mRNA의 내보내기 및 번역을 돕는다.

[0566] 일부 구현예에서, 핵산은 200개 내지 3,000개의 뉴클레오티드를 포함한다. 예를 들어, 핵산은 200개 내지 500개, 200개 내지 1000개, 200개 내지 1500개, 200개 내지 3000개, 500개 내지 1000개, 500개 내지 1500개, 500개 내지 2000개, 500개 내지 3000개, 1000개 내지 1500개, 1000개 내지 2000개, 1000개 내지 3000개, 1500개 내지 3000개, 또는 2000개 내지 3000개의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0567] 통상적으로 시험관 내 전사 시스템은 전사 완충액, 뉴클레오티드 트리포스페이트(NTP), RNase 억제제 및 중합효소를 포함한다.

[0568] NTP는 자체적으로 제조될 수 있거나, 공급업체로부터 선택될 수 있거나, 본원에 기술된 바와 같이 합성될 수 있다. NTP는 천연 및 비천연(변형된) NTP를 포함하는 본원에 기술된 것들로부터 선택될 수 있지만, 이에 한정되지 않는다.

[0569] 임의의 수의 RNA 중합효소 또는 변이체가 본 개시의 방법에 사용될 수 있다. 중합효소는 파지 RNA 중합효소, 예를 들어 T7 RNA 중합효소, T3 RNA 중합효소, SP6 RNA 중합효소, 및/또는 비제한적으로 화학적으로 변형된 핵산 및/또는 뉴클레오티드 포함하여 변형된 핵산 및/또는 변형된 뉴클레오티드를 삽입할 수 있는 중합효소와 같은 돌연변이 중합효소로부터 선택될 수 있지만, 이에 한정되지 않는다. 일부 구현예는 DNase의 사용을 배제한다.

[0570] 일부 구현예에서, RNA 전사체는 효소 캡핑을 통해 캡핑된다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)는 5' 말단 캡, 예를 들어 7mG(5')ppp(5')NlmpNp를 포함한다.

[0571] *화학적 합성*

[0572] 고체상 화학 합성. 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)는 고체상 기술을 사용하여 전체적으로 또는 부분적으로 제조될 수 있다. 핵산의 고체상 화학 합성은 분자가 고체 지지체 상에 고정되고 반응물 용액에서 단계별로 합성되는 자동화된 방법이다. 고체상 합성은 핵산 서열에서 화학적 변형의 부위 특이적 도입에 유용하다.

[0573] 액상 화학 합성. 단량체 빌딩 블록의 순차적 첨가에 의한 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)의 합성은 액상으로 수행될 수 있다.

[0574] 합성 방법의 조합. 위에서 논의된 합성 방법은 각각 자체적인 장점 및 한계를 갖는다. 한계를 극복하기 위해 이들 방법을 조합하는 시도들이 수행되었다. 이러한 방법의 조합은 본 개시의 범위 내에 있다. 효소 결찰과 조합하여 고체상 또는 액상 화학적 합성을 사용하면 화학적 합성만으로는 수득할 수 없는 장쇄 핵산을 생성하는 효율적인 방법을 제공한다.

[0575] *핵산 영역 또는 하위 영역의 결찰*

[0576] 또한 리가아제에 의한 핵산 조립이 사용될 수 있다. DNA 또는 RNA 리가아제는 포스포디에스테르 결합의 형성을 통해 폴리뉴클레오티드 사슬의 5' 말단 및 3' 말단의 분자간 결찰을 촉진한다. 키메라 폴리뉴클레오티드 및/또는 원형 핵산과 같은 핵산은 하나 이상의 영역 또는 하위 영역의 결찰에 의해 제조될 수 있다. DNA 단편은 리가아제-촉매 반응에 의해 결합되어 상이한 기능을 갖는 재조합 DNA를 생성할 수 있다. 하나는 5' 포스포릴기를 갖고 또 다른 하나는 유리 3' 히드록실기를 갖는 2개의 올리고데옥시뉴클레오티드는 DNA 리가아제에 대한 기질로서 작용한다.

[0577] *정제*

[0578] 본원에 기술된 핵산의 정제는 핵산 세정, 품질 보증, 및 품질 관리를 포함할 수 있지만, 이에 한정되지 않는다. 세정은 당업계에 공지된 방법, 예컨대 비제한적으로 AGENCOURT® 비드(Beckman Coulter Genomics, Danvers,

MA), 폴리-T 비드, LNATM 올리고-T 포획 프로브(EXIQON® Inc, Vedbaek, Denmark), 또는 HPLC 기반 정제 방법, 예컨대 비제한적으로 강한 음이온 교환 HPLC, 약한 음이온 교환 HPLC, 역상 HPLC(RP-HPLC), 및 소수성 상호작용 HPLC(HIC-HPLC)에 의해 수행될 수 있다. 용어 "정제된"은 "정제된 핵산"과 같은 핵산과 관련하여 사용될 때 적어도 하나의 오염물로부터 분리된 것을 지칭한다. "오염물"은 부적합하거나, 불순하거나, 열등하게 하는 또 다른 임의의 물질이다. 따라서, 정제된 핵산(예를 들어, DNA 및 RNA)은 자연에서 발견되는 것과 상이한 형태 또는 환경, 또는 처리 방법 또는 정제 방법을 거치게 하기 전에 존재하는 것과 상이한 형태 또는 환경에서 존재한다.

[0579] 품질 보증 및/또는 품질 관리 점검은 겔 전기영동, UV 흡광도, 또는 분석 HPLC와 같은 방법을 사용하여 수행될 수 있지만, 이에 한정되지 않는다.

[0580] 일부 구현예에서, 핵산은 역전사효소-PCR을 포함하지만 이에 한정되지 않는 방법에 의해 시퀀싱될 수 있다.

[0581] *정량화*

[0582] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)는 엑소좀에서 또는 하나 이상의 체액으로부터 유래될 때 정량화될 수 있다. 체액은 말초 혈액, 혈청, 혈장, 복수, 소변, 뇌척수액(CSF), 가래, 타액, 골수, 윤활액, 방수, 양수, 귀지, 모유, 기관지 폐포 세척액, 정액, 전립선액, 쿠퍼액 또는 사정 전 체액, 땀, 배설물, 모발, 눈물, 낭종액, 흉막액 및 복막액, 심낭액, 림프, 유미즙(chyme, chyle), 담즙, 간질액, 월경, 고름, 피지, 구토, 질 분비물, 점막 분비물, 대변수, 췌장액, 부비강으로부터의 세정액, 기관지폐 흡인물, 포배 공동 유체, 및 제대혈을 포함한다. 대안적으로, 엑소좀은 폐, 심장, 췌장, 위, 장, 방광, 신장, 난소, 고환, 피부, 결장, 유방, 전립선, 뇌, 식도, 간, 및 태반으로 이루어진 군으로부터 선택된 기관으로부터 회수될 수 있다.

[0583] 검정은 작제물 특이적 프로브, 세포 계측법, qRT-PCR, 실시간 PCR, PCR, 유세포 계측법, 전기영동, 질량 분광분석, 또는 이들의 조합을 사용하여 수행될 수 있는 반면, 엑소좀은 효소 결합 면역흡착 검정(ELISA) 방법과 같은 면역조직화학적 방법을 사용하여 단리될 수 있다. 또한 엑소좀은 크기 배제 크로마토그래피, 밀도 구배 원심분리, 차등 원심분리, 나노막 한외여과, 면역흡수성 포획, 친화도 정제, 미세유체 분리, 또는 이들의 조합에 의해 단리될 수 있다.

[0584] 이들 방법은 연구원에게 남아 있거나 전달된 핵산의 수준을 실시간으로 모니터링할 수 있는 능력을 제공한다. 일부 구현예에서, 이는 본 개시의 핵산이 구조적 변형 또는 화학적 변형으로 인해 내인성 형태와 상이하기 때문에 가능하다.

[0585] 일부 구현예에서, 핵산은 자외선 가시 분광법(UV/Vis)과 같은 방법을 사용하여 정량화될 수 있지만, 이에 한정되지 않는다. UV/Vis 분광계의 비제한적인 예는 NANODROP® 분광계(ThermoFisher, Waltham, MA)이다. 정량화된 핵산은 핵산의 크기가 적절한지 여부를 결정하고, 핵산의 분해가 발생하지 않았음을 확인하기 위해 분석될 수 있다. 핵산의 분해는 아가로오스 겔 전기영동, HPLC 기반 정제 방법, 예컨대 비제한적으로 강한 음이온 교환 HPLC, 약한 음이온 교환 HPLC, 역상 HPLC(RP-HPLC), 및 소수성 상호작용 HPLC(HIC-HPLC), 액체 크로마토그래피-질량 분광분석(LCMS), 모세관 전기영동(CE), 및 모세관 겔 전기영동(CGE)과 같은 방법에 의해 확인될 수 있지만, 이에 한정되지 않는다.

[0586] *치료 방법*

[0587] 인간 및 다른 포유동물에서 암을 예방 및/또는 치료하기 위한 조성물(예를 들어, 약학적 조성물), 방법, 키트 및 시약이 본원에 제공된다. LPMP/mRNA 제형은 치료적 제제 또는 예방적 제제로서 사용될 수 있다. 이들은 암을 예방 및/또는 치료하기 위한 의약에 사용될 수 있다.

[0588] 일 구현예에서, LPMP/mRNA 치료 조성물은 암으로부터의 예방적 보호를 제공하는 데 사용된다. 암으로부터의 예방적 보호는 (백신으로서) LPMP/mRNA 치료 조성물을 투여한 후에 달성될 수 있다. 백신은 1회, 2회, 3회, 4회 또는 그 이상 투여될 수 있지만, 백신을 1회(임의적으로 단일 추가접종이 이어짐) 투여하는 것으로 충분할 수 있다. 치료 반응을 달성하기 위해 암을 가진 개체에게 백신을 투여하는 것이 보다 바람직하다. 그에 따라 투여량을 조정해야 할 수 있다.

[0589] 일부 구현예에서, (백신으로서) LPMP/mRNA 치료 조성물은 최대 2개월, 최대 3개월, 최대 4개월, 최대 5개월, 최대 6개월, 최대 7개월, 최대 8개월, 최대 9개월, 최대 10개월, 최대 11개월, 최대 1년, 최대 1년 1/2년, 최대 2년, 최대 3년, 또는 최대 4년의 일정으로 투여된다. 일정은 동일하거나 변경될 수 있다. 일부 구현예에서, 일정은 첫 3주 동안은 매주이고, 그 후에는 매월이다.

[0590] (백신으로서) LPMP/mRNA 치료 조성물은 임의의 경로로 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 백신은 EVI 또는 IV

경로에 의해 투여된다.

[0591] 치료의 임의의 시점에서 환자를 검사하여 백신의 돌연변이가 여전히 적절한지 여부를 결정할 수 있다. 그 분석에 기초하여, 백신은 하나 이상의 상이한 돌연변이를 포함하거나 하나 이상의 돌연변이를 제거하도록 조정되거나 재구성될 수 있다.

[0592] *치료 및 예방적 조성물*

[0593] 인간 및 다른 포유동물에서 암을 예방, 치료 또는 진단하기 위한 조성물(예를 들어, 약학적 조성물), 방법, 키트 및 시약이 본원에 제공된다,

[0594] 일부 구현예에서, (백신으로서) LPMP/mRNA 치료 조성물은 예를 들어 생체 외 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 활성화시키기 위해 면역 효과기 세포의 프라이밍에 사용될 수 있고, 이는 이어서 대상체에게 주입(재주입)된다.

[0595] 예시적인 구현예에서, LPMP/mRNA 치료 조성물은 대상체(예를 들어, 인간 대상체와 같은 포유류 대상체)에게 투여될 수 있고, RNA 폴리뉴클레오티드는 생체 내에서 번역되어 항원성 폴리펩티드를 생산한다.

[0596] LPMP/mRNA 치료 조성물은 세포, 조직 또는 유기체에서 폴리펩티드(예를 들어, 항원, 종양 항원, 또는 신호 전달 단백질)의 번역을 위해 유도될 수 있다. 예시적인 구현예에서, 이러한 번역은 생체 내에서 발생하지만, 이러한 번역이 생체 외, 배양물 내 또는 시험관 내에서 발생하는 구현예가 고려될 수 있다. 예시적인 구현예에서, 세포, 조직 또는 유기체는 항원성(예를 들어, 종양 항원성) 폴리펩티드 또는 신호 전달 폴리펩티드를 암호화하는 적어도 하나의 번역 가능 영역을 갖는 폴리뉴클레오티드를 함유하는 LPMP/mRNA 치료 조성물을 함유하는 조성물의 유효량과 접촉한다.

[0597] LPMP/mRNA 치료 조성물의 "유효량"은 적어도 부분적으로 표적 조직, 표적 세포 유형, 투여 수단, 폴리뉴클레오티드의 물리적 특성(예를 들어, 변형된 뉴클레오시드의 크기 및 정도) 및 LPMP/mRNA 치료 조성물의 다른 성분, 및 다른 결정인자에 기초하여 제공된다. 일반적으로, LPMP/mRNA 치료 조성물의 유효량은 세포에서 항원 또는 폴리펩티드 생산의 함수로서, 바람직하게는 동일한 항원 또는 폴리펩티드를 암호화하는 상응하는 미변형 폴리뉴클레오티드를 함유하는 조성물보다 더 효율적인 유도되거나 증강된 면역 반응을 제공한다. 항원 생산의 증가는 세포 형질감염의 증가(LPMP/mRNA 치료 조성물로 형질감염된 세포의 백분율), 폴리뉴클레오티드로부터의 단백질 번역의 증가, 핵산 분해의 감소(예를 들어, 변형된 폴리뉴클레오티드로부터의 단백질 번역의 지속 시간 증가로 입증됨), 또는 숙주 세포의 변경된 치료적 또는 항원 특이적 면역 반응에 의해 입증될 수 있다.

[0598] 일부 구현예에서, LPMP/mRNA 치료 조성물은 암의 치료에 사용될 수 있다.

[0599] LPMP/mRNA 치료 조성물은 활성 면역화 계획의 일부로서 건강한 개체에게 예방적으로 또는 치료적으로 투여되거나, 암의 초기에 또는 증상 발병 후 활동성 암 동안 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포, 조직, 또는 대상체에게 제공된 LPMP/mRNA 치료 조성물의 양은 면역 예방에 효과적인 양일 수 있다.

[0600] LPMP/mRNA 치료 조성물은 다른 예방적 화합물 또는 치료 화합물과 함께 투여될 수 있다. 비제한적인 예로서, 예방적 화합물 또는 치료 화합물은 면역 강화제, 보조제 또는 부스터일 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 백신과 같은 조성물을 지칭할 때, 용어 "부스터"는 예방적(백신) 조성물의 추가 투여를 지칭한다. 부스터(또는 부스터 백신)는 예방적 조성물의 조기 투여 후에 투여될 수 있다. 예방적 조성물의 초기 투여와 부스터의 초기 투여 사이의 투여 시간은 1분, 2분, 3분, 4분, 5분, 6분, 7분, 8분, 9분, 10분, 15분, 20분, 35분, 40분, 45분, 50분, 55분, 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 7시간, 8시간, 9시간, 10시간, 11시간, 12시간, 13시간, 14시간, 15시간, 16시간, 17시간, 18시간, 19시간, 20시간, 21시간, 22시간, 23시간, 1일, 36시간, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 1주, 10일, 2주, 3주, 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 10개월, 11개월, 1년, 18개월, 2년, 3년, 4년, 5년, 6년, 7년, 8년, 9년, 10년, 11년, 12년, 13년, 14년, 15년, 16년, 17년, 18년, 19년, 20년, 25년, 30년, 35년, 40년, 45년, 50년, 55년, 60년, 65년, 70년, 75년, 80년, 85년, 90년, 95년, 또는 99년 초과일 수 있지만, 이에 한정되지 않는다. 예시적인 구현예에서, 예방적 조성물의 초기 투여와 부스터의 초기 투여 사이의 투여 시간은 1주, 2주, 3주, 1개월, 2개월, 3개월, 6개월, 또는 1년일 수 있지만, 이에 한정되지 않는다.

[0601] 일부 구현예에서, LPMP/mRNA 치료 조성물은 당업계에 공지된 백신의 투여와 유사하게 근육내 또는 피내 투여될 수 있다.

[0602] LPMP/mRNA 치료 조성물은 암의 중증도 또는 충족되지 않은 의학적 요구의 정도 또는 수준에 따라 다양한 환경에서 사용될 수 있다. 비제한적인 예로서, LPMP/mRNA 치료 조성물은 암의 임의의 단계를 치료하는 데 사용될 수

있다. LPMP/mRNA 치료 조성물은 상업적으로 이용 가능한 항암 백신보다 훨씬 더 큰 항체 역가, T 세포 반응을 생성하고 반응을 조기에 생성한다는 점에서 우수한 특성을 갖는다. 이론에 구속되고자 하지는 않지만, 본 발명가들은 mRNA로서 LPMP/mRNA 치료 조성물이 천연 세포 기구를 공동으로 사용하므로, LPMP/mRNA 치료 조성물이 번역 시 적절한 단백질 형태를 생성하도록 더 잘 설계되었다는 가설을 세웠다. 생체 외에서 제조되고 원치 않는 세포 반응을 촉발할 수 있는 전통적인 백신과 달리, LPMP/mRNA 치료 조성물은 보다 자연적인 방식으로 세포 시스템에 제시된다.

[0603] LPMP/mRNA 치료 조성물이 치료할 수 있는 암의 비제한적인 목록이 아래에 제시되어 있다. 퓝티드 에피토프 또는 항원은 이들 암 또는 종양의 임의의 항원으로부터 유래될 수 있다. 이러한 에피토프는 암 또는 종양 항원으로서 지칭된다. 암세포는 종양이 진행되는 상이한 단계 동안 세포 표면 분자를 상이하게 발현할 수 있다. 예를 들어, 암세포는 양성 상태에서 세포 표면 항원을 발현할 수 있지만, 전이 시 특정 세포 표면 항원을 하향 조절할 수 있다. 이와 같이, 종양 또는 암 항원은 암 진행의 임의의 단계 동안 생성된 항원을 포함할 수 있는 것으로 예상된다. 본 발명의 방법은 이들 변화를 포함하도록 조정될 수 있다. 예를 들어, 특정 환자에 대해 여러 상이한 LPMP/mRNA 치료 조성물이 생성될 수 있다. 예를 들어, 제1 백신은 치료 시작 시 사용될 수 있다. 이후 시점에, 새로운 LPMP/mRNA 치료 조성물이 생성되어 상이한 항원이 발현되는 것을 설명하기 위해 환자에게 투여될 수 있다.

[0604] 임의적으로 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 부형제와 조합하여 LPMP/mRNA 치료 조성물을 포함하는 약학적 조성물이 본원에 제공된다.

[0605] LPMP/mRNA 치료 조성물은 단독으로 또는 하나 이상의 다른 성분과 함께 제형화되거나 투여될 수 있다. 예를 들어, LPMP/mRNA 치료 조성물은 면역 강화제(예를 들어, 보조제)를 포함하지만 이에 한정되지 않는 다른 성분을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, LPMP/mRNA 치료 조성물은 면역 강화제 또는 보조제를 포함하지 않는다(즉, 이들은 면역 강화제 또는 보조제가 없음).

[0606] 다른 구현예에서, LPMP/mRNA 치료 조성물은 환자를 치료하는 데 유용한 임의의 다른 요법과 조합될 수 있다. 예를 들어, 환자는 LPMP/mRNA 치료 조성물 및 항암제로 치료될 수 있다. 따라서, 일 구현예에서, 본 발명의 방법은 하나 이상의 암 치료제와 함께, 예를 들어 항암 치료제, 전통적인 암 백신, 화학요법, 방사선요법 등과 함께(예를 들어, 동시에, 또는 전체 치료 절차의 일부로서) 사용될 수 있다. 상이할 수 있는 암 치료의 파라미터는 투여량, 투여 시점 또는 지속 기간 또는 요법을 포함하지만 이에 한정되지 않으며; 암 치료는 투여량, 시점 또는 지속 기간에 있어서 상이할 수 있다. 암의 또 다른 치료법은 수술이며, 이는 단독으로 또는 이전 치료 방법 중 어느 하나와 조합하여 사용될 수 있다. 유용한 것으로 알려져 있거나, 암을 예방 또는 치료하는 데 사용되었거나 현재 사용되고 있는 임의의 제제 또는 요법(예를 들어, 전통적인 암 백신, 화학요법, 방사선 요법, 수술, 호르몬 요법, 및/또는 생물학적 요법/면역 요법)이 본원에 기술된 본 발명에 따른 본 발명의 조성물과 조합하여 사용될 수 있다. 의학 분야의 당업자는 대상체를 위한 적절한 치료를 결정할 수 있다.

[0607] 이러한 제제(즉, 항암 치료제)의 예는 다음을 포함하지만 이에 한정되지 않는다: 알킬화제(예를 들어, 질소 머스타드, 예를 들어, 클로람부실, 시클로포스파미드, 이소파미드, 메클로레타민, 멜팔란, 우라실 머스타드; 티오테파와 같은 아지리딘; 부설판과 같은 메탄설포네이트 에스테르; 카무스틴, 로무스틴, 스트렙토조신과 같은 니트로소우레아; 시스플라틴, 카보플라틴과 같은 백금 복합체; 미토마이신, 프로카르바진, 다카르바진, 및 알트레타민과 같은 식물환원성 알킬화제))를 포함하지만 이에 한정되지 않는 DNA-상호작용제; DNA 가닥 절단제, 예를 들어, 블레오마이신; 삽입성 토포이소머라아제 II 억제제, 예를 들어, 암사크린, 닥티노마이신, 다우노루비신, 독소루비신, 이다루비신, 미톡산트론과 같은 삽입제, 및 에토포시드 및 테니포시드와 같은 비삽입제; 비삽입성 토포이소머라아제 II 억제제, 예를 들어, 에토포시드 및 테니포시드; 및 DNA MGB(minor groove binder), 예를 들어, 플리카미딘; 다음을 포함하지만 이에 한정되지 않는 대사길항제: 메토트렉세이트 및 트리메트렉세이트와 같은 엽산 길항제; 플루오로유라실, 플루오로데옥시우리딘, CB3717, 아자시티딘 및 플록수리딘과 같은 피리미딘 길항제; 메르캅토퓨린, 6-티오구아닌, 펜토스타틴과 같은 퓨린 길항제; 시타라빈 및 플루다라빈과 같은 당 변형 유사체; 및 히드록시우레아 같은 리보뉴클레오티드 환원효소 억제제; 콜키신, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 두 알칼로이드, 파클리탁셀, 및 시톡산을 포함하지만 이에 한정되지 않는 튜블린 상호작용제; 다음을 포함하지만 이에 한정되지 않는 호르몬제: 에스트로겐, 결합에스트로겐, 에티닐 에스트라디올, 디에틸스틸베스트롤, 클로트리아니센, 및 이데네스트롤; 하이드록시프로게스테론 카프로에이트, 메드록시프로게스테론, 메게스트롤과 같은 프로게스틴; 및 테스토스테론, 테스토스테론 프로피오네이트과 같은 안드로겐; 플루옥시메스테론, 메틸테스토스테론; 부신 코르티코스테로이드, 예를 들어, 프레드니손, 덱사메타손, 메틸프레드니솔론, 프레드니솔론; 황체형성호르몬방출호르몬제 또는 성선자극호르몬방출 호르몬 길항제, 예를 들어, 류프롤리드 아세테이트

및 고세렐린 아세테이트; 다음을 포함하지만 이에 한정되지 않는 항호르몬 항원: 타목시펜과 같은 항에스트로겐제, 플루타미드와 같은 항안드로겐제; 및 미토탄과 아미노글루테티미드와 같은 항부신제; 다음을 포함하지만 이에 한정되지 않는 사이토카인: IL-1 알파, IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL- 9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-18, TGF-β, GM-CSF, M-CSF, G-CSF, TNF-a, TNF-β, LAF, TCGF, BCGF, TRF, BAF, BDG, MP, LIF, OSM, TMF, PDGF, IFN-a, IFN-β, IFN-.ɣ, 및 우테로글로빈(미국 특허 번호 제5,696,092호); 다음을 포함하지만 이에 한정되지 않는 항혈관신생제: VEGF를 억제하는 제제(예를 들어, 기타 중화항체), 가용성 수용체 작제물, 티로신 키나아제 억제제, 안티센스 전략, VEGF 또는 VEGF 수용체에 대한 RNA 압타머 및 리보자임, 면역독소 및 응고제, 종양 백신, 및 항체. 이러한 제제(즉, 항암 치료제)의 또 다른 예는 IL-15 또는 재조합 IL-15를 포함하지만 이에 한정되지 않는 사이토카인을 포함한다.

[0608] 항암 치료제의 특정 예는 다음을 포함하지만 이에 한정되지 않는다: 아시비신; 아클라루비신; 아코다졸 염산염; 아크로닌; 아도젤레신; 알데스류킨; 알트레타민; 암보마이신; 아메탄트론 아세테이트; 아미노글루테티미드; 암사크린; 아나스트로졸; 안트라마이신; 아스파라기나제; 아스퍼린; 아자시티딘; 아제테파; 아조토마이신; 바티마스타트; 벤조데파; 비칼루타마이드; 비산트렌 염산염; 비나파이드 디메실레이트; 비젤레신; 블레오마이신 황산염; 브레퀴나르 나트륨; 브로피리민; 부설판; 악티노마이신; 칼루스테론; 카라세미드; 카비타이머; 카르보플라틴; 카르무스틴; 카루비신 염산염; 카르젤레신; 세데핀골; 클로람부실; 시롤레마이신; 시스플라틴; 클라드리빈; 크리스나톨 메실레이트; 시클로포스파미드; 시타라빈; 다카르바진; 닥티노마이신; 다우노루비신 염산염; 데시타빈; 덱소르마플라틴; 데자구아닌; 데자구아닌 메실레이트; 디아지콘; 도세탁셀; 독소루비신; 독소루비신 염산염; 드롤록시펜; 드롤록시펜 시트레이트; 드로모스타놀론 프로피오네이트; 두아조마이신; 에다트렉세이트; 에플로미틴 염산염; 엘사미트루신; 엔로플라틴; 엔프로메이트; 에피프로피딘; 에피루비신 염산염; 에르불로졸; 에소루비신 염산염; 에스트라무스틴; 에스트라무스틴 인산염 나트륨; 에타니다졸; 에토포시드; 에토포시드 인산염; 에토프린; 파드로졸 염산염; 파자라빈; 펜레티나이드; 플록수리딘; 플루다라빈 인산염; 플루오로우라실; 플루로시타빈; 포스퀴돈; 포스트리에신 나트륨; 젬시타빈; 젬시타빈 염산염; 수산화요소; 이다루비신 염산염; 이포스파미드; 일모포신; 인터류킨 II(재조합 인터류킨 II 또는 rIL-2 포함), 인터페론 알파-2a; 인터페론 알파-2b; 인터페론 알파-n1; 인터페론 알파-n3; 인터페론 베타-Ia; 인터페론 감마-Ib; 이프로플라틴; 이리노테칸 염산염; 란레오타이드 아세테이트; 레트로졸; 류프롤리드 아세테이트; 리아로졸 염산염; 로메트렉솔 나트륨; 로무스틴; 로속산트론 염산염; 마소프로콜; 메이탄신; 메클로레타민 염산염; 메게스트롤 아세테이트; 멜렌게스트롤 아세테이트; 멜팔란; 메노가릴; 메르캅토퓨린; 메토트렉세이트; 메토트렉세이트 나트륨; 메토프린; 메츄레데파; 미틴도마이드; 미토카르신; 미토크로민; 미토길린; 미토말신; 미토마이신; 미토스퍼; 미토탄; 미톡산트론 염산염; 마이코페놀산; 노코다졸; 노갈라마이신; 오르마플라틴; 옥시란; 파클리탁셀; 페가스파가제; 펠리오마이신; 펜타무스틴; 페플로마이신 황산염; 퍼포스파미드; 피포브로만; 피포설판; 피록산트론 염산염; 플리카마이신; 플로메스탄; 포르피머 나트륨; 포르피로마이신; 프레드니무스틴; 프로카르바진 염산염; 퓨로마이신; 푸로마이신 염산염; 피라조푸린; 리보프린; 로글레티미드; 사핑골; 사핑골 염산염; 세무스틴; 심트라젠; 스파포세이트 나트륨; 스파소마이신; 스피로게르마늄 염산염; 스피로무스틴; 스피로플라틴; 스트렙토니그린; 스트렙토조신; 설로페누르; 탈리소마이신; 테코갈란 나트륨; 테가푸르; 텔록산트론 염산염; 테모포르핀; 테니포시드; 테록시론; 테스토락톤; 티아미프린; 티오구아닌; 티오테파; 티아조푸린; 티라파자민; 토레미펜 시트레이트; 트레스토론 아세테이트; 트리시리빈 인산염; 트리메트렉세이트; 트리메트렉세이트 글루쿠로네이트; 트립토렐린; 튜불로졸 염산염; 우라실 머스타드; 우레데파; 바프레타이드; 베르테포르핀; 빈블라스틴 황산염; 빈크리스틴 황산염; 빈데신; 빈데신 황산염; 바네피딘 황산염; 빈데신; 빈데신 황산염; 바네피딘 황산염; 비닐시네이트 황산염; 빈류로신 황산염; 비노렐빈 타르트레이트; 빈로시딘 황산염; 빈졸리딘 황산염; 보로졸; 제니플라틴; 지노스타틴; 및 조루비신 염산염.

[0609] 다른 항암 약물을 다음을 포함하지만 이에 한정되지 않는다: 20-epi-1,25 디하이드록시비타민 D3; 5-에티닐우라실; 혈관생성 억제제; 항등화 형태발생 단백질-1; ara- CDP-DL-PTBA; BCR/ABL 길항제; CaRest M3; CARN 700; 카세인 키나아제 억제제(ICOS); 클로트리마졸; 콜리스마이신 A; 콜리스마이신 B; 콤브레타스타틴 A4; 크램베시딘 816; 크립토피신 8; 큐라신 A; 디히드로디뎀닌 B; 디뎀닌 B; 디하이드로-5-아자시티딘; 디하이드로탁솔, 듀오카마이신 SA; 카할랄라이드 F; 라멜라린-N 트리아세테이트; 류프롤리드+에스트로겐+프로게스테론; 리소클린아미드 7; 모노포스포릴 지질 A+마이코박테리아 세포벽 sk; N-아세틸디날린; N-치환 벤즈아미드; O6-벤질구아닌; 플라세틴 A; 플라세틴 B; 백금 복합체; 백금 화합물; 백금-트리아민 복합체; 레늄 Re 186 에티드로네이트; RII 레티나미드; 루비기논 B 1; SarCNU; 사르코피톨 A; 사르그라모스팀; 노화세포 유래 억제제 1; 스피카마이신 D; 탈리무스틴; 5-플루오로우라실; 트롬보포이에틴; 티모트리난; 갑상선 자극 호르몬; 바리올린 B; 탈리도마이드; 벨라레솔; 베라민; 베르딘; 베르테포르핀; 비노렐빈; 빈살틴; 비탁신; 자노테론; 제니플라틴; 및 질라스코르브.

[0610] 본 발명은 또한 X선, 감마선, 및 암세포를 파괴하기 위한 다른 방사선 공급원의 사용을 포함하는 방사선 요법과 조합하여 LPMP/mRNA 치료 조성물을 포함하는 조성물을 투여하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 방사선 치료는 방사선이 원격 공급원으로부터 유도되는 외부 빔 방사선 또는 원격 요법으로서 투여된다. 다른 구현예에서, 방사선 치료는 방사성 공급원이 암세포 또는 종양 덩어리에 가깝도록 신체 내부에 배치되는 내부 요법 또는 근접치료로서 투여된다.

[0611] 특정 구현예에서, 적절한 항암 요법은 암의 유형에 따라 선택된다. 예를 들어, 난소암 환자는 LPMP/mRNA 치료 조성물을 포함하는 조성물의 예방적 또는 치료적 유효량을 다음을 포함하지만 이에 한정되지 않는 난소암 요법에 유용한 하나 이상의 다른 제제의 예방적 또는 치료적 유효량과 조합하여 투여받을 수 있다: P32 요법과 같은 복강내 방사선 요법, 복부 및 골반 전체 방사선 치료, 시스플라틴, 파클리탁셀(택솔) 또는 도세탁셀(탁소텔)과 시스플라틴 또는 카보플라틴의 조합, 시클로포스파미드와 시스플라틴의 조합, 시클로포스파미드와 카보플라틴의 조합, 5-FU와 류코보린의 조합, 에토포시드, 리포솜 독소루비신, 젬시타빈 또는 토포테칸. 암 요법 및 이의 투여량, 투여 경로 및 권장 용도는 당업계에 공지되어 있으며, [Physician's Desk Reference (제56판, 2002)]과 같은 문헌에 기술되어 있다.

[0612] 일부 구현예에서, LPMP/mRNA 치료 조성물은 면역 관문 조절제와 같은 T 세포 활성화제와 함께 투여된다. 면역 관문 조절제는 자극 관문 분자 및 억제 관문 분자, 즉 항CTLA4 및 항PD1 항체 둘 다를 포함한다. 자극 관문 억제제는 관문 프로세스를 촉진함으로써 기능한다. 몇몇 자극 관문 분자는 종양괴사인자(TNF) 수용체 상과(CD27, CD40, OX40, GITR 및 CD137)의 구성원인 반면, 다른 자극 관문 분자는 B7-CD28 상과(CD28 및 ICOS)에 속한다. OX40(CD134)은 효과기 및 기억 T 세포의 증식에 관여한다. 항OX40 단클론 항체는 진행성 암을 치료하는 데 효과적인 것으로 나타났다. MEDI0562는 인간화 OX40 작용제이다. 글루코코르티코이드 유도 TFR 계열 관련 유전자인 GITR은 T 세포 증식에 관여한다. GITR에 대한 여러 항체는 항종양 반응을 촉진하는 것으로 나타났다. 유도성 T 세포 공자극제인 ICOS는 T 세포 효과기 기능에 중요하다. CD27은 미처리 T 세포의 항원-특이적 증식을 지원하며, T 세포 기억 및 B 세포 기억의 생성에 관여한다. 여러 작용성 항CD27 항체가 개발 중이다. CD122는 인터류킨-2 수용체 베타 서브유닛이다. KTR-214는 CD122-편향 면역-자극 사이토카인이다.

[0613] 억제 관문 분자는 PD-1, TEVI-3, VISTA, A2AR, B7-H3, B7-H4, BTLA, CTLA-4, IDO, KIR 및 LAG3, PDL1, PDL2, B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, TIM3, GAL9, LAG3, VISTA, KIR, 2B4, CD160, CGEN-15049, CHK 1, CHK2, A2aR, B-7 계열 리간드 또는 이들의 조합을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 관문 단백질의 리간드는 CTLA-4, PDL1, PDL2, PD1, B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, TIM3, GAL9, LAG3, VISTA, KIR, 2B4, CD 160, CGEN-15049, CHK 1, CHK2, A2aR, 및 B-7 계열 리간드를 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 일부 구현예에서, 항PD-1 항체는 BMS-936558(니볼루맙)이다. 다른 구현예에서, 항CTLA-4 항체는 이필리무맙(상표명은 Yervoy으로, 이전에 MDX-010 및 MDX-101로 알려짐)이다.

[0614] LPMP/mRNA 치료 조성물 및 항암 치료제는 면역 치료 반응을 더욱 향상시키도록 조합될 수 있다. LPMP/mRNA 치료제 조성물 및 다른 치료제는 동시에 또는 순차적으로 투여될 수 있다. 다른 치료제가 동시에 투여되는 경우, 이들은 동일하거나 별도의 제형으로 투여될 수 있지만, 동시에 투여된다. 다른 치료제 및 LPMP/mRNA 치료 조성물의 투여가 일시적으로 분리되는 경우, 다른 치료제는 서로 순차적으로 투여되며 LPMP/mRNA 치료 조성물과 순차적으로 투여된다. 이들 화합물의 투여 사이의 시간적 분리는 몇 분이거나, 이보다 더 긴, 예를 들어, 몇 시간, 며칠, 몇 주, 몇 개월일 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 이들 화합물의 투여 사이의 시간 분리는 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 8시간, 12시간, 24시간 또는 그 이상이다. 일부 구현예에서, 이들 화합물의 투여 사이의 시간적 분리는 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 또는 7일 또는 그 이상이다. 일부 구현예에서, LPMP/mRNA 치료 조성물은 항암 치료 전에 투여된다. 일부 구현예에서, LPMP/mRNA 치료 조성물은 항암 치료 후에 투여된다.

[0615] 다른 치료제는 항암 치료제, 보조제, 사이토카인, 항체, 항원 등을 포함하지만 이에 한정되지 않는다.

[0616] 치료제는 또한 만성 통증 및/또는 만성 통증의 증상을 치료 및/또는 예방할 수 있는 것들을 포함할 수 있으며, 치료제는 다음을 포함하지만 이에 한정되지 않는다:

[0617] (i) 모르핀, 헤로인, 하이드로모르폰, 옥시모르폰, 레보르파놀, 레발로판, 메타돈, 메페리딘, 펜타닐, 코카인, 코데인, 디하이드로코데인, 옥시코돈, 하이드로코돈, 프로폭시펜, 날메펜, 날로르핀, 날록손, 날트렉손, 부프레노르핀, 부토르파놀, 날부핀 또는 펜타조신과 같은 오피오이드 진통제,

[0618] (ii) 아스피린, 디클로페낙, 디플루시날, 에토돌락, 펜부펜, 페노프로펜, 플루페니살, 플루르비프로펜, 이부프

로펜, 인도메타신, 케토프로펜, 케토롤락, 메클로페남산, 메페남산, 나부메톤, 나프록센, 옥사프로진, 페닐부타존, 피록시캄, 설린닥, 톨메틴 또는 조메피락, 모빅(멜록시캄 SR), 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염과 같은 비스테로이드성 항염증제(NSAID)

[0619] (iii) 아모바비탈, 아프로바비탈, 부타바비탈, 부탈비탈, 메토바비탈, 메탈비탈(metalbital), 메토헥시탈, 펜토바비탈, 페노바비탈, 세코바비탈, 탈부탈, 티아마릴 또는 티오펜탈 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염과 같은 바르비투르산염 진통제,

[0620] (iv) 클로르디아제폭시드, 클로라제픽산, 디아제팜, 플루라제팜, 로라제팜, 옥사제팜, 테마제팜 또는 트리아졸람 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염과 같은 진통성 활성을 갖는 벤조디아제핀;

[0621] (v) 진통성 활성을 갖는 H1 길항제, 예를 들어 디펜히드라민, 피릴아민, 프로메타진, 클로르페니라민 또는 클로르시클리딘 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염;

[0622] (vi) 진통제, 예를 들어, 글루테티미드, 메프로바메이트, 메타칼론(methacalone) 또는 디클로랄페나존 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염;

[0623] (vii) 골격근 이완제, 예를 들어, 바클로펜, 카리소프로돌, 클로르족사존, 시클로벤자프린, 메토카르바몰 또는 오프레나진 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염;

[0624] (viii) 덱스트로메토르판((+)-3-하이드록시-N-메틸모르피난) 또는 이의 대사산물 덱스트로르판((+)-3-하이드록시-N-메틸모르피난), 케타민, 메만틴, 피롤로퀴놀린 퀴논 또는 시스-4-(포스포노메틸)-2-피페리딘 카르복시산 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염과 같은 NMDA 수용체 길항제,

[0625] (ix) 독사조신, 탐설로신, 클로니딘 또는 4-아미노-6,7-디메톡시-2-(5-메탄설폰아미드-1,2,3,4-테트라하이드로이소퀴놀-2-)Yl)-5-(2-피리딜)퀴나졸린과 같은 α-아드레날린성 제제,

[0626] (x) 데시프라민, 이미프라민, 아미트립틸린 또는 노르트립틸린과 같은 삼환계 항우울제,

[0627] (xi) 카르바마제핀 또는 발프로에이트와 같은 항경련제,

[0628] (xii) 타키키닌(NK) 길항제, 특히 NK-3, NK-2 또는 NK-1 길항제, 예를 들어 (αR, 9R)-7-[3,5-비스(트리플루오로메틸)벤질]-8,9,10,11-테트라하이드로-9-메틸-5-(4-메틸페닐)-7H-[1,4]디아조시노[2,1-g][1,7]나프톨리딘-6-13-디온(TAK-637), 5-[[(2R,3S)-2-[(1R)-1-[3,5-비스(트리플루오로메틸)페닐]에톡시-3-(4-플루오로페닐)-4-)모르폴리닐]메틸]-1,2-디하이드로-3H-1,2,4-트리아졸-3-온(MK-869), 레나피탄트, 다피탄트 또는 3-[[2-메톡시-5-(트리플루오로메톡시)페닐]메틸 에이미]-2-페닐- 피페리딘(2S,3S),

[0629] (xiii) 무스카린 길항제, 예를 들어 옥시부틴, 톨테로딘, 프로피베린, 트로스피움 염화물 또는 다리페나신,

[0630] (xiv) COX-2 억제제, 예를 들어 셀레콕시브, 로페콕시브 또는 발데콕시브,

[0631] (xv) 비선택적 COX 억제제, 바람직하게는 니트로플루르비프로펜(HCT-1026)과 같은 GI 보호 기능이 있는 억제제,

[0632] (xvi) 콜타르 진통제, 특히 파라세타몰,

[0633] (xvii) 드로페리돌과 같은 신경이완제,

[0634] (xviii) 바닐로이드 수용체 작용제(예를 들어, 레시니페라독신) 또는 길항제(예를 들어, 캡사제핀),

[0635] (xix) 프로프라놀롤과 같은 베타-아드레날린성 제제,

[0636] (xx) 멜실레틴과 같은 국소마취제,

[0637] (xxi) 코르티코스테로이드, 예를 들어 덱사메타손,

[0638] (xxii) 세로토닌 수용체 작용제 또는 길항제,

[0639] (xxiii) 콜린성(니코틴성) 진통제,

[0640] (xxiv) 트라마돌TM,

[0641] (xxv) 실데나필, 바데나필 또는 타다라필과 같은 PDEV 억제제,

[0642] 일부 구현예에서, 제공된 방법은 LPMP/mRNA 치료 조성물을 면역 관문 조절제와 조합하여 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 면역 관문 조절제, 예를 들어 항PD-1 항체와 같은 관문 억제제는 100~300mg을 대상체에

게 전달하기에 충분한 투여량 수준으로 투여된다. 일부 구현예에서, 면역 관문 조절제, 예를 들어 항PD-1 항체와 같은 관문 억제제는 200mg을 대상체에게 전달하기에 충분한 투여량 수준으로 투여된다. 일부 구현예에서, 면역 관문 조절제, 예를 들어 항PD-1 항체와 같은 관문 억제제는 정맥내 주입에 의해 투여된다. 일부 구현예에서, 면역 관문 조절제는 대상체에게 2회, 3회, 4회 또는 그 이상 투여된다. 일부 구현예에서, 면역 관문 조절제는 LPMP/mRNA 치료 조성물을 투여한 날과 동일한 날에 대상체에게 투여된다.

[0643] LPMP/mRNA 치료 조성물은 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 부형제와 조합하여 제형화되거나 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, LPMP/mRNA 치료 조성물은, 예를 들어 치료 활성 물질, 예방 활성 물질 또는 이들의 조합과 같은 적어도 하나의 추가 활성 물질을 포함한다. LPMP/mRNA 치료 조성물은 멸균 상태이거나, 발열원이 없거나, 멸균 상태이며 발열원이 없을 수 있다. 백신 조성물과 같은 약학적 제제의 제형 및/또는 제조에서의 일반적인 고려 사항은, 예를 들어, 다음의 문헌에서 확인할 수 있다: Remington의 문헌 [The Science and Practice of Pharmacy 제21판, Lippincott Williams & Wilkins, 2005](그 전체가 참조로서 본원에 통합됨).

[0644] 일부 구현예에서, LPMP/mRNA 치료 조성물은 인간, 인간 환자, 또는 대상체에게 투여된다. "활성 성분"이라는 문구는 일반적으로 LPMP/mRNA 치료 조성물 또는 그 안에 함유된 폴리뉴클레오티드, 예를 들어 항원성 폴리펩티드 또는 치료 폴리펩티드를 암호화하는 RNA 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA 폴리뉴클레오티드)를 지칭한다.

[0645] 본원에 기술된 LPMP/mRNA 치료 조성물의 제형은 약리학 분야에서 공지되거나 이후에 개발되는 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. 일반적으로, 이러한 제조 방법은 활성 성분(예를 들어, mRNA 폴리뉴클레오티드)을 부형제 및/또는 하나 이상의 다른 보조 성분과 결합시킨 다음, 필요하고/하거나 바람직한 경우, 생성물을 원하는 단일 또는 다회 투여 단위로 분할, 성형 및/또는 포장하는 단계를 포함한다.

[0646] LPMP/mRNA 치료 조성물은 하나 이상의 부형제를 사용하여 제형화되어 (1) 안정성을 증가시키고; (2) 세포 형질감염을 증가시키고; (3) (예를 들어, 데포 제형으로부터) 서방형 또는 지연 방출을 허용하고; (4) 생체분포를 변경하고(예를 들어, 특정 조직 또는 세포 유형을 표적화); (5) 암호화된 단백질의 생체 내 번역을 증가시키고/시키거나; (6) 암호화된 단백질(항원)의 생체 내 방출 프로파일을 변경할 수 있다. 임의의 용매 및 모든 용매와 같은 전통적인 부형제 이외에, 분산 매질, 희석제, 또는 다른 액체 비히클, 분산 또는 현탁 보조제, 표면 활성제, 등장화제, 증점제 또는 유화제, 보존제, 부형제는 다음을 포함할 수 있다: 비제한적으로, 리피도이드, 리포좀, 지질 나노입자, 중합체, 리포플렉스, 코어-쉘 나노입자, 펩티드, 단백질, (예를 들어, 대상체에게 이식하기 위해) 암 RNA 백신으로 형질감염된 세포, 히알루로니다아제, 나노입자 모방체 및 이들의 조합.

[0647] **키트**

[0648] 또한 본 발명은 본원에 기술된 mRNA 치료 조성물을 갖는 용기를 포함하는 키트를 제공한다. 키트는 본 발명의 방법에 따라 mRNA 치료 조성물을 대상체에게 적용하거나 전달하기 위한 지침 자료를 추가로 포함할 수 있다. 당업자는 본 발명의 방법의 mRNA 치료 조성물을 적용하기 위한 지침이 임의의 형태의 지시일 수 있음을 이해할 것이다. 이러한 지침은 서면 지침 자료(라벨, 소책자, 팜플릿 등), 구두 지침 자료(오디오 카세트 또는 CD 등), 또는 영상 지침(비디오 테이프 또는 DVD 등)을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0649] 구현예 1. mRNA 치료 조성물로서,

[0650] 하나 이상의 항원성(예를 들어, 종양 항원성) 폴리펩티드, 또는 신호 전달 폴리펩티드를 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 포함하고,

[0651] 천연 지질 및 이온화 가능 지질을 포함하는 지질 재구성된 식물 전령 팩(LPMP) 내에 제형화되며, 상기 이온화 가능 지질은 아래에 열거된 특성 중 2개 이상을 갖는 mRNA 치료 조성물:

[0652] (i) 적어도 2개의 이온화 가능 아민;

[0653] (ii) 각각의 지질 꼬리의 길이가 적어도 6개의 탄소 원자인, 적어도 3개의 지질 꼬리;

[0654] (iii) 약 4.5 내지 약 7.5의 pKa;

[0655] (iv) 적어도 2개의 원자 사슬에 의해 분리된 이온화 가능 아민 및 이종유기기; 및

[0656] (v) 적어도 10의 N:P 비.

[0657] 구현예 2. 구현예 1에 있어서, 천연 지질은 레몬 또는 조류로부터 추출되는, mRNA 치료 조성물.

[0658] 구현예 3. 구현예 1에 있어서, LPMP는 스테롤 및 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)-지질 접합체를 추가로 포함하는,

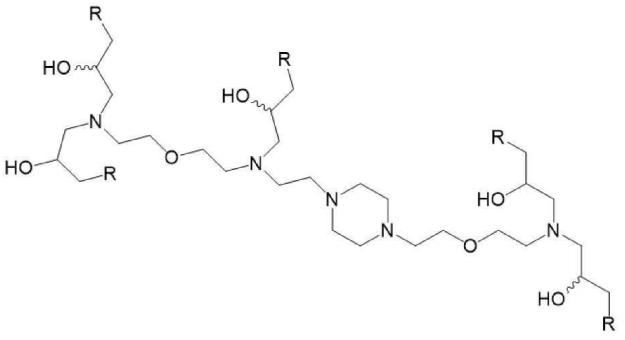
mRNA 치료 조성물.

[0659] 구현예 4. 구현예 3에 있어서, LPMP는 약 35:50:12.5:2.5의 몰비로 이온화 가능 지질:천연 지질:스테롤:PEG-지질을 포함하는, mRNA 치료 조성물.

[0660] 구현예 5. 구현예 3에 있어서, LPMP는 약 35:20:42.5:2.5의 몰비로 이온화 가능 지질:천연 지질:스테롤:PEG-지질을 포함하는, mRNA 치료 조성물.

[0661] 구현예 6. 구현예 1에 있어서, 이온화 가능 지질은 1,1'-((2-(4-(2-((2-(비스(2-히드록시도데실)아미노)에틸)(2-히드록시도데실)아미노)에틸)피페라진-1-일)에틸)아자네디일)비스(도데칸-2-올)(C12-200), MD1(cKK-E12), OF2, EPC, ZA3-Ep10, TT3, LP01, 5A2-SC8, 지질 5, SM-102(지질 H), 및 ALC-315로 이루어진 군으로부터 선택되는, mRNA 치료 조성물.

[0662] 구현예 7. 구현예 1에 있어서, 이온화 가능 지질은



[0663] 이고, 식 중 R은 C8-C14 알킬기인, mRNA 치료 조성물.

[0664] 구현예 8. 구현예 1에 있어서, 폴리펩티드는 종양 특이적 항원, 종양 관련 항원, 종양 신항원, 또는 이들의 조합을 포함하는, mRNA 치료 조성물.

[0665] 구현예 9. 구현예 1에 있어서, 폴리펩티드는 다음을 포함하는, mRNA 치료 조성물: p53, ART-4, BAGE, ss-카테닌/m, Bcr-abL CAMEL, CAP-1, CASP-8, CDC27/m, CDK4/m, CEA, CLAUDIN-12, c-MYC, CT, Cyp-B, DAM, ELF2M, ETV6-AML1, G250, GAGE, GnT-V, Gap 100, HAGE, HER-2/neu, HPV-E7, HPV-E6, HAST-2, hTERT (또는 hTRT), LAGE, LDLR/FUT, MAGE- A, 바람직하게는 MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE- A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A7, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11, 또는 MAGE-A12, MAGE-B, MAGE-C, MART- 1/Melan-A, MC1R, 미오신/m, MUC1, MUM-1, -2, -3, NA88-A, NF1, NY-ESO-1, NY-BR-1, p190 마이너 BCR-abL, Plac-1, Pml/RARa, PRAME, 프로테이나제 3, PSA, PSM, RAGE, RU1 또는 RU2, SAGE, SART-1 또는 SART-3, SCGB3A2, SCP1, SCP2, SCP3, SSX, SURVIVIN, TEL/AML1, TPI/m, TRP-1, TRP-2, TRP-2/INT2, TPTE, WT, WT-1, 또는 이들의 조합.

[0666] 구현예 10. 구현예 1에 있어서, 폴리펩티드는 다음을 포함하는, mRNA 치료 조성물: CD2, CD3, CD4, CD8, CD11b, CD14, CD16, CD19, CD20, CD22, CD25, CD27, CD33, CD37, CD38, CD40, CD44, CD45, CD47, CD52, CD56, CD70, CD79, CD137, 4- IBB, 5T4, AGS-5 , AGS-16, 안지오포이에틴 2, B7.1, B7.2, B7DC, B7H1, B7H2, B7H3, BT-062, BTLA, CAIX, 암배아 항원, CTLA4, 크립토, ED-B, ErbB1, ErbB2, ErbB3, ErbB4, EGFL7, EpCAM, EphA2, EphA3, EphB2, FAP, 피브로넥틴, 엽산 수용체, 강글리오시드 GM3, GD2, 글루코코르디코드유도TNF수용체(GITR), gp100, gpA33, GPNMB, HLA, HLA-DR, ICOS, IGF1R, 인테그린 av, 인테그린 αvβ, LAG-3, 루이스 Y, 메소텔린, c-MET, MN 탄산탈수효소 IX, MUC1, MUC16, 넥틴-4, KGD2, NOTCH, OX40, OX40L, PD-1, PDL1, PSCA, PSMA, RANKL, ROR1, ROR2, SLC44A4, 신데칸-1, TACI, TAG-72, 테나신, TIM3, TRAILR1 , TRAILR2,VEGFR- 1 , VEGFR-2, VEGFR-3, 및 이의 변이체.

[0667] 구현예 11. 구현예 1에 있어서, 폴리펩티드는 IL-2 펩티드, IL-2-Ra, tdTomato, Cre 재조합효소, GFP, eGFP, 항CD19, 항CD20, CAR-T, 항HER2, 에타너셉트(엔브렐), 휴미라, 에리스로포이에틴, 에포겐, 필그라스팀, 키트루다, 리툭시맙, 로미플로스팀, 살그라모스팀, 또는 이의 단편 또는 서브유닛인, mRNA 치료 조성물.

[0668] 구현예 12. 구현예 1에 있어서, 폴리뉴클레오티드는 표 I 내지 표 III 중 어느 하나에 제공된 IL-2 분자의 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, , 99% 또는 100%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 IL-2 분자를 암호화하는 mRNA인, mRNA 치료 조성물.

[0669] 구현예 13. 구현예 1에 있어서, 종양 항원성 폴리펩티드는 암종, 육종, 흑색종, 림프종, 백혈병, 및 이들의 조

합으로 이루어진 군으로부터 선택된 종양 항원을 포함하는, mRNA 치료 조성물.

[0670] 구현예 14. 구현예 13에 있어서, 종양 항원성 폴리펩티드는 폐암 항원을 포함하는, mRNA 치료 조성물.

[0671] 구현예 15. 구현예 1에 있어서, 폴리뉴클레오티드는 mRNA이고, mRNA는 다음으로부터 유래되는, mRNA 치료 조성물:

[0672] (a) DNA 분자; 또는

[0673] (b) T가 U로 치환된 RNA 분자.

[0674] 구현예 16. 구현예 15에 있어서, DNA 분자는 프로모터를 추가로 포함하는, mRNA 치료 조성물.

[0675] 구현예 17. 구현예 16에 있어서, 프로모터는 5' UTR에 위치하는, mRNA 치료 조성물.

[0676] 구현예 18. 구현예 15에 있어서, 프로모터는 T7 프로모터, T3 프로모터, 또는 SP6 프로모터인, mRNA 치료 조성물.

[0677] 구현예 19. 구현예 15에 있어서, RNA 분자는 자가-복제 RNA 분자인, mRNA 치료 조성물.

[0678] 구현예 20. 구현예 15 또는 구현예 19에 있어서, RNA 분자는 5' 캡을 추가로 포함하는, mRNA 치료 조성물.

[0679] 구현예 21. 구현예 20에 있어서, 5' 캡은 캡 1 구조, 캡 1 (m6A) 구조, 캡 2 구조, 캡 3 구조, 캡 0 구조, 또는 이들의 임의의 조합을 갖는, mRNA 치료 조성물.

[0680] 구현예 22. 구현예 12에 있어서, IL-2 분자는 자연 발생 IL-2 분자, 자연 발생 IL-2 분자의 단편, 또는 이의 변이체를 포함하는, mRNA 치료 조성물.

[0681] 구현예 23. 구현예 22에 있어서, IL-2 분자는 자연 발생 IL-2 분자의 변이체, 또는 이의 단편을 포함하는, mRNA 치료 조성물.

[0682] 구현예 24. 구현예 15에 있어서, mRNA는 5' 미번역 영역(UTR) 및/또는 3' UTR을 포함하는, mRNA 치료 조성물.

[0683] 구현예 25. 구현예 24에 있어서, 5' UTR은 코작 서열을 포함하는, mRNA 치료 조성물.

[0684] 구현예 26. 구현예 24에 있어서, 3' UTR은 스플릿의 아미노-말단 인핸서(AES)로부터 유래된 서열을 포함하는, mRNA 치료 조성물.

[0685] 구현예 27. 구현예 24에 있어서, 3' UTR은 미토콘드리아 암호화된 12S rRNA(mtRNR1)로부터 유래된 서열을 포함하는, mRNA 치료 조성물.

[0686] 구현예 28. 구현예 15에 있어서, mRNA는 폴리(A) 서열을 포함하는, mRNA 치료 조성물.

[0687] 구현예 29. 구현예 28에 있어서, 폴리(A) 서열은 30개의 아데노신 잔기의 서열, 10개-뉴클레오티드 링커 서열, 및 70개의 아데노신 잔기의 서열로 이루어진 110개-뉴클레오티드 서열인, mRNA 치료 조성물.

[0688] 구현예 30. 구현예 1에 있어서, LPMP는 리포플렉스, 리포좀, 지질 나노입자, 중합체 기반 담체, 엑소좀, 층상체, 미셀, 및 유화액으로 이루어진 군으로부터 선택된 친유성 모이어티인, mRNA 치료 조성물.

[0689] 구현예 31. 구현예 1에 있어서, LPMP는 양이온성 리포좀, 나노리포좀, 프로테오리포좀, 단층 리포좀, 다층 리포좀, 세라마이드 함유 나노리포좀, 및 다포성 리포좀으로 이루어진 군으로부터 선택된 리포좀인, mRNA 치료 조성물.

[0690] 구현예 32. 구현예 1에 있어서, LPMP는 지질 나노입자인, mRNA 치료 조성물.

[0691] 구현예 33. 구현예 1에 있어서, LPMP의 크기는 약 200nm 미만인, mRNA 치료 조성물.

[0692] 구현예 34. 구현예 33에 있어서, LPMP의 크기는 약 150nm 미만인, mRNA 치료 조성물.

[0693] 구현예 35. 구현예 33에 있어서, LPMP의 크기는 약 100nm 미만인, mRNA 치료 조성물.

[0694] 구현예 36. 구현예 32에 있어서, 지질 나노입자의 크기는 약 55nm 내지 약 80nm인, mRNA 치료 조성물.

[0695] 구현예 37. 구현예 3에 있어서, PEG-지질 접합체는 PEG-DMG 또는 PEG-PE인, mRNA 치료 조성물.

[0696] 구현예 38. 구현예 37에 있어서, PEG-DMG는 PEG2000-DMG 또는 PEG2000-PE인, mRNA 치료 조성물.

[0697] 구현예 39. 구현예 1 내지 구현예 38 중 어느 하나에 있어서, LPMP는 다음을 포함하는, mRNA 치료 조성물:

[0698] 약 20 몰% 내지 약 50 몰%의 이온화 가능 지질,

[0699] 약 20 몰% 내지 약 60 몰%의 천연 지질,

[0700] 약 7 몰% 내지 약 20 몰%의 스테롤, 및

[0701] 약 0.5 몰% 내지 약 3 몰%의 폴리에틸렌 글리콜(PEG)-지질 접합체.

[0702] 구현예 40. 구현예 39에 있어서, LPMP는 다음을 포함하는, mRNA 치료 조성물:

[0703] 약 35 몰%의 이온화 가능 지질,

[0704] 약 50 몰%의 천연 지질,

[0705] 약 12.5 몰%의 스테롤, 및

[0706] 약 2.5 몰%의 폴리에틸렌 글리콜(PEG)-지질 접합체.

[0707] 구현예 41. 구현예 1 내지 구현예 40 중 어느 하나에 있어서, mRNA 치료 조성물은 약 50:1 내지 약 10:1의 총 지질:폴리뉴클레오티드 중량비를 갖는 mRNA 치료 조성물.

[0708] 구현예 42. 구현예 41에 있어서, mRNA 치료 조성물은 약 44:1 내지 약 24:1의 총 지질:폴리뉴클레오티드 중량비를 갖는 mRNA 치료 조성물.

[0709] 구현예 43. 구현예 41에 있어서, mRNA 치료 조성물은 약 40:1 내지 약 28:1의 총 지질:폴리뉴클레오티드 중량비를 갖는 mRNA 치료 조성물.

[0710] 구현예 44. 구현예 41에 있어서, mRNA 치료 조성물은 약 38:1 내지 약 30:1의 총 지질:폴리뉴클레오티드 중량비를 갖는 mRNA 치료 조성물.

[0711] 구현예 45. 구현예 41에 있어서, mRNA 치료 조성물은 약 37:1 내지 약 33:1의 총 지질:폴리뉴클레오티드 중량비를 갖는 mRNA 치료 조성물.

[0712] 구현예 46. 구현예 1에 있어서, 약 7.0 내지 약 8.5의 pH의 HEPES 또는 TRIS 완충액을 추가로 포함하는 mRNA 치료 조성물.

[0713] 구현예 47. 구현예 46에 있어서, HEPES 또는 TRIS 완충액은 약 7mg/mL 내지 약 15mg/mL의 농도인, mRNA 치료 조성물.

[0714] 구현예 48. 구현예 46 또는 구현예 47에 있어서, 약 2.0mg/mL 내지 약 4.0mg/mL의 NaCl을 추가로 포함하는 mRNA 치료 조성물.

[0715] 구현예 49. 구현예 1에 있어서, 하나 이상의 동결보호제를 추가로 포함하는 mRNA 치료 조성물.

[0716] 구현예 50. 구현예 49에 있어서, 하나 이상의 동결보호제는 수크로오스, 글리세롤, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는, mRNA 치료 조성물.

[0717] 구현예 51. 구현예 50에 있어서, mRNA 치료 조성물은 약 70mg/mL 내지 약 110mg/mL 농도의 수크로오스 및 약 50mg/mL 내지 약 70mg/mL 농도의 글리세롤의 조합을 포함하는 mRNA 치료 조성물.

[0718] 구현예 52. 구현예 1에 있어서, mRNA 치료제는 동결건조된 조성물인, mRNA 치료 조성물.

[0719] 구현예 53. 구현예 52에 있어서, 동결건조된 mRNA 치료 조성물은 하나 이상의 동결보호제를 포함하는, mRNA 치료 조성물.

[0720] 구현예 54. 구현예 53에 있어서, 동결건조된 mRNA 치료 조성물은 폴록사머, 소르브산칼륨, 수크로오스, 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는 mRNA 치료 조성물.

[0721] 구현예 55. 구현예 54에 있어서, 폴록사머는 폴록사머 188인, mRNA 치료 조성물.

[0722] 구현예 56. 구현예 52 내지 구현예 55 중 어느 하나에 있어서, 동결건조된 mRNA 치료 조성물은 약 0.01 내지 약 1.0% w/w의 폴리뉴클레오티드를 포함하는, mRNA 치료 조성물.

[0723] 구현예 57. 구현예 52 내지 구현예 55 중 어느 하나에 있어서, 동결건조된 mRNA 치료 조성물은 약 1.0 내지 약

5.0% w/w의 지질을 포함하는, mRNA 치료 조성물.

[0724] 구현예 58. 구현예 52 내지 구현예 55 중 어느 하나에 있어서, 동결건조된 mRNA 치료 조성물은 약 0.5 내지 약 2.5% w/w의 TRIS 완충액을 포함하는, mRNA 치료 조성물.

[0725] 구현예 59. 구현예 52 내지 구현예 55 중 어느 하나에 있어서, 동결건조된 mRNA 치료 조성물은 약 0.75 내지 약 2.75% w/w의 NaCl을 포함하는, mRNA 치료 조성물.

[0726] 구현예 60. 구현예 52 내지 구현예 55 중 어느 하나에 있어서, 동결건조된 mRNA 치료 조성물은 약 85 내지 약 95% w/w의 당을 포함하는, mRNA 치료 조성물.

[0727] 구현예 61. 구현예 60에 있어서, 당은 수크로오스인, mRNA 치료 조성물.

[0728] 구현예 62. 구현예 52 내지 구현예 55 중 어느 하나에 있어서, 동결건조된 mRNA 치료 조성물은 약 0.01 내지 약 1.0% w/w의 폴록사머를 포함하는, mRNA 치료 조성물.

[0729] 구현예 63. 구현예 62에 있어서, 폴록사머는 폴록사머 188인, mRNA 치료 조성물.

[0730] 구현예 64. 구현예 52 내지 구현예 55 중 어느 하나에 있어서, 동결건조된 mRNA 치료 조성물은 약 1.0 내지 약 5.0% w/w의 소르브산칼륨을 포함하는, mRNA 치료 조성물.

[0731] 구현예 65. mRNA 치료 조성물을 제조하는 방법으로서, 다음을 포함하는 방법:

[0732] 이온화 가능 지질의 존재 하에 정제된 PMP 지질을 포함하는 막을 재구성하여 이온화 가능 지질을 포함하는 지질 재구성된 식물 전령 팩(LPMP)을 생산하는 단계로서, 상기 이온화 가능 지질은 아래에 열거된 특성 중 2개 이상을 갖는, 단계:

[0733] (i) 적어도 2개의 이온화 가능 아민;

[0734] (ii) 각각의 지질 꼬리의 길이가 적어도 6개의 탄소 원자인, 적어도 3개의 지질 꼬리;

[0735] (iii) 약 4.5 내지 약 7.5의 pKa;

[0736] (iv) 적어도 2개의 원자 사슬에 의해 분리된 이온화 가능 아민 및 이종유기기; 및

[0737] (v) 적어도 10의 N:P 비, 및

[0738] 하나 이상의 항원성(예를 들어, 종양 항원성) 폴리펩티드 또는 신호 전달 폴리펩티드를 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 LPMP에 로딩하는 단계.

[0739] 구현예 66. 대상체에서 mRNA 치료제를 전달하는 방법으로서, 다음을 포함하는 방법:

[0740] 구현예 1 내지 구현예 64 중 어느 하나의 mRNA 치료 조성물을 대상체에게 투여하는 단계.

[0741] 구현예 67. 대상체에서 면역 반응을 유도하는 방법으로서, 다음을 포함하는 방법:

[0742] 구현예 1 내지 구현예 64 중 어느 하나의 mRNA 치료 조성물을 대상체에게 투여하는 단계.

[0743] 구현예 68. 대상체에서 암을 치료하거나 예방하는 방법으로서, 다음을 포함하는 방법:

[0744] 구현예 1 내지 구현예 64 중 어느 하나의 mRNA 치료 조성물을 대상체에게 투여하는 단계.

[0745] 구현예 69. 구현예 66 내지 구현예 68 중 어느 하나에 있어서, mRNA 치료 조성물은 경구, 정맥내, 피내, 근육내, 비강내, 안구내, 직장, 공장내, 종양내, 및/또는 피하 투여에 의해 투여되는, 방법.

[0746] 구현예 70. 구현예 69에 있어서, mRNA 치료 조성물은 경구, 정맥내, 근육내, 및/또는 피하 투여에 의해 투여되는, 방법.

[0747] 구현예 71. 구현예 66 내지 구현예 68 중 어느 하나에 있어서, mRNA 치료 조성물은 약 0.006mg/kg 내지 약 0.5mg/kg의 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)를 대상체에게 전달하기에 충분한 투여량 수준으로 투여되는, 방법.

[0748] 구현예 72. 구현예 71에 있어서, mRNA 치료 조성물은 약 0.01mg/kg, 약 0.05mg/kg 또는 약 0.1mg/kg의 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)를 대상체에게 전달하기에 충분한 투여량 수준으로 투여되는, 방법.

[0749] 구현예 72. 구현예 67 또는 구현예 68에 있어서, mRNA 치료 조성물은 대상체에게 1회, 2회, 3회, 4회 또는 그

이상 투여되는, 방법.

[0750] 구현예 73. 구현예 72에 있어서, mRNA 치료 조성물은 대상체에게 1회 또는 2회 투여되는, 방법.

[0751] 구현예 74. 구현예 66 내지 구현예 68 중 어느 하나에 있어서, 다음을 추가로 포함하는 방법:

[0752] 추가 치료제를 대상체에게 투여하는 단계.

[0753] 구현예 75. 구현예 74에 있어서, 추가 치료제는 항암 치료제인, 방법.

[0754] 구현예 76. 구현예 75에 있어서, 추가 치료제는 만성 통증을 치료 및/또는 예방하는 치료제인, 방법.

[0755] 구현예 77. 구현예 76에 있어서, 추가 치료제는 부프레노르핀, 멜록시캄 SR, 또는 이들의 조합인, 방법.

[0756] 구현예 78. 구현예 74에 있어서, 추가 치료제는 mRNA 치료 조성물을 투여하기 전, 투여와 동시에, 또는 투여한 후에 투여되는, 방법.

[0757] 구현예 79. 구현예 72에 있어서, mRNA 치료 조성물은 대상체에게 3회 또는 4회 투여되는, 방법.

[0758] 구현예 80. 구현예 71에 있어서, mRNA 치료 조성물은 약 0.006mg/kg, 약 0.02mg/kg, 약 0.2mg/kg, 약 0.4mg/kg 또는 약 0.5mg/kg의 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)를 대상체에게 전달하기에 충분한 투여량 수준으로 투여되는, 방법.

[0759] 구현예 81. 구현예 71에 있어서, mRNA 치료 조성물은 약 0.006mg/kg, 약 0.01mg/kg, 약 0.02mg/kg, 약 0.05mg/kg, 약 0.1mg/kg 또는 약 0.4mg/kg의 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)를 대상체에게 전달하기에 충분한 투여량 수준으로 투여되는, 방법.

[0760] 구현예 82. 구현예 66 내지 구현예 68에 있어서, mRNA 치료 조성물은 약 0.0003mg/kg 내지 약 0.002mg/kg의 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)를 대상체에게 전달하기에 충분한 투여량 수준으로 투여되는, 방법.

[0761] 구현예 83. 구현예 82에 있어서, mRNA 치료 조성물은 약 0.0003mg/kg 내지 약 0.5mg/kg의 폴리뉴클레오티드를 대상체에게 전달하기에 충분한 투여량 수준으로 1회, 2회, 3회, 4회 또는 그 이상 대상체에게 투여되는, 방법.

[0762] 구현예 84. 구현예 66 내지 구현예 68에 있어서, 폴리뉴클레오티드는 표 9 또는 실시예 1 내지 실시예 9 중 어느 하나에 제공된 IL-15 분자의 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 IL-15 및/또는 IL-15Ra 분자를 암호화하는 mRNA인, mRNA 치료 조성물.

[0763] 구현예 85. 구현예 84에 있어서, IL-15 분자는 자연 발생 IL-15 분자, 자연 발생 IL-15 분자의 단편, 또는 이의 변이체를 포함하는, mRNA 치료 조성물.

[0764] 구현예 86. 구현예 84에 있어서, IL-15Ra 분자는 자연 발생 IL-15Ra 분자, 자연 발생 IL-15Ra 분자의 단편, 또는 이의 변이체를 포함하는, mRNA 치료 조성물.

[0765] 구현예 87. 구현예 66 내지 구현예 68에 있어서, mRNA 치료 조성물은 T 세포 및/또는 NK 세포의 증식 또는 활성화를 유도하는, 방법.

[0766] 구현예 88. 구현예 66 내지 구현예 68에 있어서, mRNA 치료 조성물은 T 세포 및/또는 NK 세포의 증식 또는 활성화를 조절하는, 방법.

[0767] 구현예 89. 구현예 88에 있어서, mRNA 치료 조성물은 CD4 T 세포 및/또는 CD8 T 세포의 증식 또는 활성화를 조절하는, 방법.

[0768] 구현예 90. 구현예 88에 있어서, mRNA 치료 조성물은 혈액, 림프절, 비장, 또는 이들의 임의의 조합에서 T 세포 및/또는 NK 세포의 증식 또는 활성화를 조절하는, 방법.

[0769] 구현예 91. 구현예 88에 있어서, mRNA 치료 조성물은 특정 기관, 예를 들어 폐, 장 또는 피부에서 T 세포 및/또는 NK 세포의 증식 또는 활성화를 조절하는, 방법.

[0770] 구현예 92. 구현예 88에 있어서, mRNA 치료 조성물은 투여 후 6시간, 24시간, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 8일, 9일, 10일, 13일 또는 그 이상 동안 T 세포 및/또는 NK 세포의 증식 또는 활성화를 조절하는, 방법.

[0771] 구현예 93. 구현예 66 내지 구현예 68에 있어서, mRNA 치료 조성물은 그랜자임 B/퍼포린, CD25(IL-2Ra), TNF-알파, IL-15, IL-6, IL-8, IL-12, GM-CSF, G-CSF, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-8, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17, IL-33, PD-L1, CCL2, CCL3, CCL4, CXCL1, CXCL2, CXCL10 (IP-10), CCL20, CD40, TNF-β, LAF, TCGF,

BCGF, TRF, BAF, BDG, MP, LIF, OSM, TMF, PDGF, IFN-a, IFN-β, IFN-γ 또는 이들의 임의의 조합의 활성 또는 발현을 조절하는, 방법.

[0772] 구현예 94. 구현예 93에 있어서, mRNA 치료 조성물은 투여 후 6시간, 24시간, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 8일, 9일, 10일, 13일, 15일, 20일 또는 그 이상 동안 면역 반응을 조절하는, 방법.

[0773] 구현예 95. 구현예 94에 있어서, mRNA 치료 조성물은 투여 후 혈액 또는 T 세포 및/또는 NK 세포에서 면역 반응의 활성 또는 발현을 조절하는, 방법.

[0774] 실시예

[0775] 이제 본 발명은 일반적으로 설명될 것이며, 이는 단지 본 발명의 소정의 양태 및 구현예를 예시하기 위한 목적으로만 포함되고 본 발명을 한정하려는 의도가 아닌 다음의 실시예를 참조하여 보다 쉽게 이해될 것이다.

[0776] **실시예 1: LPMP의 제조 및 변형 및 mRNA를 갖는 LPMP 제형화**

[0777] 식물 전령 팩(PMP)의 제조, 지질 재구성된 식물 전령 팩(LPMP)을 제조하기 위한 PMP의 변형, 및 mRNA를 갖는 PMP 및 LPMP의 제형화는 그 전체가 참조로서 본원에 통합되는 국제 특허 출원 공개 WO 2021/041301에 개시된 방법을 사용하여 달성될 수 있다.

[0778] 특히, 그 전체가 참조로서 본원에 통합되는 국제 특허 출원 공개 WO 2021/041301의 실시예 1 내지 17에 개시된 모든 실험 프로토콜은 다음을 포함한다: 실시예 1. 식물로부터 식물 전령 팩의 단리; 실시예 2. 정제된 식물 전령 팩(PMP)의 생산; 실시예 3. 식물 전령 팩 특성화; 실시예 4. 식물 전령 팩 안정성의 특성화; 실시예 5. 카르고와 함께 PMP 로딩; 실시예 6. 이온성 액체와 함께 PMP의 제형화에 의한 PMP 세포 흡수 증가; 실시예 7. 이온화 가능 지질을 사용한 PMP의 변형; 실시예 8. 미세유체가 포함된 LPMP의 제형화; 실시예 9. 이온화 가능 지질을 사용하여 지질 재구성된 PMP 내로 mRNA 로딩 및 전달; 실시예 10. 이온화 가능 지질 변형을 동반하거나 동반하지 않은 자연 PMP 및 재구성된 PMP의 세포 흡수; 실시예 11. 양이온성 지질을 갖는 PMP의 제형화에 의한 PMP 세포 흡수 증가; 실시예 12. 양이온성 지질을 사용한 PMP의 변형; 실시예 13. 양이온성 지질을 사용한 지질 재구성된 PMP 내로 mRNA 로딩 및 전달; 실시예 14. 양이온성 지질 변형을 동반하거나 동반하지 않은 자연 PMP 및 재구성된 PMP의 세포 흡수; 실시예 15. 양이온성 지질 GL67 및 에틸 PC를 사용한 로딩 개선; 실시예 16. mRNA 로딩을 위한 지질 비율의 최적화; 및 실시예 17. 플라스미드 로딩을 위한 지질 비율의 최적화.

[0779] **실시예 2: mRNA 치료 조성물의 제조**

[0780] ***폴리뉴클레오티드의 제조 및 특성 분석***

[0781] 폴리뉴클레오티드 및/또는 이의 부분 또는 영역의 제조는 국제 특허 출원 공개 WO 2014/152027에 교시된 방법을 사용하여 달성될 수 있고, 동 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다. 정제 방법은 국제 특허 출원 공개 WO2014/152030 및 WO2014/152031에 교시된 방법을 포함할 수 있고, 동 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다. 폴리뉴클레오티드의 검출 방법 및 특성화 방법은 국제 특허 출원 공개 WO2014/144039에 교시된 바와 같이 수행될 수 있고, 동 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다. 폴리뉴클레오티드의 특성화는 폴리뉴클레오티드 맵핑, 역전사효소 시퀀싱, 전하 분포 분석, RNA 불순물의 검출, 또는 전술한 것 중 2개 이상의 임의의 조합을 사용하여 달성될 수 있다. "특성화"는, 예를 들어 RNA 전사체 서열의 결정, RNA 전사체 순도의 결정, 또는 RNA 전사체의 전하 이질성의 결정을 포함한다. 이러한 방법은, 예를 들어 국제 특허 출원 공개 WO2014/144711 및 WO2014/144767에 교시되어 있고, 동 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

[0782] mRNA 설계 및 변형에 대한 추가적인 세부 사항은 WO 2021/154763 및 WO 2021/188969에서 확인할 수 있고, 동 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

[0783] ***mRNA를 갖는 LPMP의 제형***

[0784] 일반 프로토콜 및 실험 설계

[0785] 식물 전령 팩(PMP)의 제조, 및 지질 재구성된 식물 전령 팩(LPMP)을 제조하기 위한 PMP의 변형, 및 mRNA를 갖는 PMP 및 LPMP의 제형의 프로토콜 및 상세한 실험 절차는 실시예 1에서 논의되었으며, 이는 국제 특허 출원 공개 WO 2021/041301의 실시예 1 내지 17에 개시된 모든 실험 프로토콜을 열거하며, 동 문헌 모두는 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다. 본 실시예에서 mRNA와 함께 제형화된 PMP, LPMP, 및 PMP, 또는 LPMP를 제조할 때 이들 프로토콜 및 상세한 실험 절차를 따랐다.

[0786] 간략하게, 레몬 및 조류로부터 미정제 식물 전령 팩(PMP)의 단리 및 정제, 및 이들 PMP의 특성 분석은 다음 실시예에 기술된 식물 공급원에 대한 실험 설계 및 프로토콜을 따랐다: 실시예 1: 식물로부터 식물 전령 팩의 단리; 실시예 2: 정제된 식물 전령 팩(PMP)의 생산; 실시예 3: 식물 전령 팩 특성 분석; 및 실시예 4: 식물 전령 팩 안정성의 특성 분석, 그리고 국제 특허 출원 공개 WO 2021/041301의 전체를 따랐으며, 동 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

[0787] 콜레스테롤 및 PEG-지질을 갖는 천연 PMP 또는 재구성된 레몬 LPMP 또는 조류 LPMP의 변형은 다음 실시예에 기술된 식물 공급원에 대한 실험 설계 및 프로토콜을 따랐다: 실시예 6: 이온성 액체와 함께 PMP의 제형화에 의한 PMP 세포 흡수 증가; 실시예 7: 이온화 가능 지질을 사용한 PMP의 변형; 실시예 10: 이온화 가능 지질 변형을 동반하거나 동반하지 않은 천연 PMP 및 재구성된 PMP의 세포 흡수; 실시예 11: 양이온성 지질을 갖는 PMP의 제형화에 의한 PMP 세포 흡수 증가; 실시예 12: 양이온성 지질을 사용한 PMP의 변형; 및 실시예 14: 양이온성 지질 변형을 동반하거나 동반하지 않는 천연 PMP 및 재구성된 PMP의 세포 흡수, 그리고 국제 특허 출원 공개 WO 2021/041301호의 전체를 따랐으며, 동 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

[0788] mRNA를 갖는 PMP 및 레몬-지질-재구성된 LPMP 또는 조류-지질-재구성된 LPMP의 제형화는 다음 실시예에 기술된 핵산 로딩에 대한 실험 설계 및 프로토콜을 따랐다: 실시예 5: 물질과 PMP 로딩; 실시예 8: 미세유체가 포함된 LPMP의 제형화; 실시예 9: 이온화 가능 지질을 사용하여 지질-재구성된 PMP 내로 mRNA 로딩 및 전달; 실시예 13: 양이온성 지질을 사용하여 지질-재구성된 PMP 내로 mRNA 로딩 및 전달; 실시예 15: 양이온성 지질 GL67 및 에틸 PC를 사용한 로딩 개선; 실시예 16: mRNA 로딩을 위한 지질 비율의 최적화; 및 실시예 17: 플라스미드 로딩을 위한 지질 비율의 최적화, 그리고 국제 특허 출원 공개 WO 2021/041301의 전체를 따랐으며, 동 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

[0789] 예시적인 LPMP 조성물

[0790] 지질 재구성된 식물 전령 팩(LPMP)에 대한 예시적인 조성물은 다음과 같다:

[0791] ● 93~97%의 (레몬, 조류 또는 울피아(Wolffia))로부터 추출된 지질

[0792] ● 0.5~2.0%의 PEG-PE

[0793] ● 2.5~5% 콜레스테롤 또는 시토스테롤

[0794] ● 3:1 비의 지질 및 인슐린

[0795] 종래의 LNP와 비교하여, 레몬(recLemon LPMP)으로부터 유래된 지질 재구성된 식물 전령 팩(LPMP)에 대한 예시적인 조성물이 표 1에 제공되어 있다.

[표 1]

지질	몰비	
	LNP	recLemon
C12-200	35	35
DOPE	16	-
레몬 지질	-	50
콜레스테롤	46.5	12.5
DMPE-PEG2k	2.5	2.5

[0796]

[0797] LPMP/mRNA용 제형

[0798] 본 실시예는 LPMP/mRNA 제형을 위해 mRNA를 캡슐화하기 위해 이온화 가능 지질, 스테롤 및 PEG 지질로 제형화된 레몬 지질 재구성된 LPMP 및 조류 지질 재구성된 LPMP의 제형을 기술한다. 예를 들어, 아래 표 2에 도시된 바와 같이, 레몬 지질 재구성된 LPMP를 갖는 LPMP/mRNA 제형은 통상적으로 A로 지칭되고, 조류 지질 재구성된 LPMP를 갖는 LPMP/mRNA 제형은 통상적으로 B로 지칭된다.

[0799] 본 실시예에서, 레몬 PMP 지질 및 조류 PMP 지질을 PMP 천연 지질로서 사용하였고; C12-200 [1,1'-((2-(4-(2-((2-(비스(2-히드록시도데실)아미노)에틸)(2-히드록시도데실)아미노)에틸)피페라진-1-일)에틸)아자네디일)비스(도데칸-2-올)]을 이온화 가능 지질로서 사용하였고; 콜레스테롤(14:0)을 스테롤로서 사용하였고; DMPE-PEG2k를 PEG화된 지질 모델로서 사용하였다.

[0800] **LNP 제형.** 대조군으로서 LNP(지질 나노입자) 제형을 제조하여 이온화 가능 지질:구조적 지질:스테롤:PEG-지질

(C12-200:DOPE:콜레스테롤(14:0):DMPE-PEG2k)을 각각 35:16:46.5:2.5의 몰비로 생성하였다. 이러한 제형을 제조하기 위해, 상기 지질을 에탄올에 용해시키고, 상기 몰비로 혼합하고, 에탄올(유기상)에 희석하여 5.5mM의 총 지질 농도를 수득하였다. mRNA 용액(수성상)을 RNAse-무함유 물 및 100mM 구연산염 완충액 pH 3으로 제조하여 50mM 구연산염 완충액의 최종 농도를 수득하였다. 제형을 15:1의 이온화 가능 지질 질소:mRNA 인산염(N:P) 비로 이온화 가능 지질 대 mRNA로 유지시켰다.

[0801] **LPMP 제형.** 재구성된 레몬(recLemon) LPMP 제형을 제조하여 이온화 가능 지질:천연 지질:스테롤:PEG-지질(C12-200:레몬 지질:콜레스테롤(14:0):DMPE-PEG2k)을 각각 35:50:12.5:2.5의 몰비로 생성하였다. 이러한 제형을 제조하기 위해, 상기 지질을 에탄올에 용해시켰고, 단 레몬 지질은 예외로서 4:1 DMF:메탄올에 용해시켰다. 그런 다음, 지질을 상기 몰비로 혼합하고, 희석하여 5.5mM의 총 지질 농도를 수득하였다. mRNA 용액(수성상)을 RNAse-무함유 물 및 100mM 구연산염 완충액 pH 3으로 제조하여 50mM 구연산염 완충액의 최종 농도를 수득하였다.

[0802] 재구성된 조류(recAlgae) LPMP 제형을 제조하여 이온화 가능 지질:천연 지질:스테롤:PEG-지질(C12-200:조류 지질:콜레스테롤(14:0):DMPE-PEG2k)을 각각 35:20:42.5:2.5의 몰비로 생성하였다. 이러한 제형을 제조하기 위해, 상기 지질을 에탄올에 용해시켰고, 단 조류 지질은 예외로서 4:1 DMF:메탄올에 용해시켰다. 그런 다음, 지질을 상기 몰비로 혼합하고, 희석하여 5.5mM의 총 지질 농도를 수득하였다. mRNA 용액(수성상)을 RNAse-무함유 물 및 100mM 구연산염 완충액 pH 3으로 제조하여 50mM 구연산염 완충액의 최종 농도를 수득하였다.

[0803] 지질 혼합물 및 mRNA 용액을 NanoAssemblr Ignite(Precision Nanosystems) 상에서 각각 1:3 부피비로 9mL/분의 총 유속으로 혼합하였다. 그런 다음, 생성된 제형을 Slide-A-Lyzer G2 투석 카세트(10k MWCO) 내로 로딩하고, 4시간 동안 실온에서 부드럽게 교반하면서 1xPBS의 샘플 부피의 200배로 투석하였다. PBS 용액을 새로 갈고, 제형을 4℃에서 적어도 14시간 동안 부드럽게 교반하면서 추가로 투석하였다. 그런 다음, 투석된 제형을 수집하고 3000xg(Amicon Ultra 원심분리 필터, 100k MWCO)에서 원심분리하여 농축시켰다.

[0804] 농축된 입자는 Zetasizer Ultra(Malvern Panalytical)를 사용하여 크기, 다분산성, 및 입자 농도에 대해 특성 분석되었다. mRNA 캡슐화 효율이 Quant-iT RiboGreen RNA 검정 키트(ThermoFisher Scientific)에 의해 특성 분석되었다. 입자를 바람직한 mRNA 농도로 희석하여 PBS 중 최종 10% 수크로오스 용액을 수득하였다. 그런 다음, 제형을 액체 질소에서 급속 냉동시켰다.

[0805] mRNA를 포함하여 생성된 제형이 표 2에 도시되어 있다.

[표 2] mRNA 를 갖는 통상적인 LPMP 제형의 특성 분석

제형	이온화 가능: 구조적: 스테롤: PEG-지질 몰비	이온화 가능 지질	구조적 지질	스테롤	PEG-지질	물질	N:P	크기 (nm)	PDI	캡슐화 효율 백분율(%)
LNP	*35:16:46.5:2.5*	C12-200	DOPE	콜레스테롤	DMPE-PEG2k	mRNA	15:1	78.47	0.126	94.4
LPMP / mRNA A (recPMP1)	*35:50:12.5:2.5*	C12-200	천연 유래 레몬 지질	콜레스테롤	DMPE-PEG2k	mRNA		96.49	0.300	94.8
LPMP / mRNA B (recPMP2)	*35:20:42.5:2.5*	C12-200	천연 유래 조류 지질	콜레스테롤	DMPE-PEG2k	mRNA		93.96	0.206	96.3

[0806]

[0807] **실시예 3. 마우스에서의 LPMP/mRNA 제형의 투여**

[0808] 명시되지 않은 경우, LPMP/mRNA 제형을 실시예 2에 기술된 바에 따라 제조하였다. 본 실시예에서 사용된 EPO mRNA의 코딩 부분은 다음과 같다:

[0809] AUGGGCGUGCACGAGUGCCCCGCCUGGCUGUGGCUGCUGCUGAGCCUGCUGAGCCUGCCCCUGGGCCUGCCCGUGCUGGGCGCCCCCCCCCGGCUGAUCUGC
GACAGCCGGGUGCUGGAGCGGUACCUGCUGGAGGCCAAGGAGGCCGAGAACAUCACCACCGGCUGCGCCGAGCACUGCAGCCUGAACGAGAACAUCACCGUG
CCCGACACCAAGGUGAACUUCUACGCCUGGAAGCGGAUGGAGGUGGGCCAGCAGGCCGUGGAGGUGUGGCAGGGCCUGGCCCUGCUGAGCGAGGCCGUGCUG
CGGGGCCAGGCCCUGCUGGUGAACAGCAGCCAGCCCUGGGAGCCCCUGCAGCUGCACGUGGACAAGGCCGUGAGCGGCCUGCGGAGCCUGACCACCCUGCUG
CGGGCCCUGGGCGCCCAGAAGGAGGCCAUCAGCCCCCCCGACGCCGCCAGCGCCGCCCCCCUGCGGACCAUCACCGCCGACACCUUCCGGAAGCUGUUCCGG
GUGUACAGCAACUUCCUGCGGGGCAAGCUGAAGCUGUACACCGGCGAGGCCUGCCGGACCGGCGACCGGUGA

[0810] 도 1은 레몬으로부터 유래되고 Cre 재조합효소 mRNA를 포함하는 재구성된 LPMP(recPMP)로 경구 치료한 Ai9(Tomato 레드 loxP) 마우스의 혈청 중 pg/mL 단위의 에리스로포이에틴(EPO)의 발현 수준을 보여준다. Ai9 마우스는 적색 형광 단백질 tdTomato의 전사를 방지하는 loxP 측면 정지 카세트(loxP-flanked STOP cassette)를 포함한다. 이들 마우스는 Cre 리포터 균주로서 사용된다: tdTomato 형광은 Cre-매개된 재조합 후에 보일 수 있다. 따라서, 형광은 Cre mRNA가 전달되었음을 나타낸다.

[0811] 도 2는 레몬으로부터 유래되고 CRE 재조합효소 mRNA를 포함하는 recLPMP로 치료한 Ai9(Tomato 레드 loxP) 마우스의 비장으로부터 형질감염된 생체 내 면역 세포(CD-4 세포, CD-8 세포, 또는 B 세포)의 백분율을 보여준다. 대조군: 대조군으로서의 지질 나노입자(LNP); 또는 인산염 완충 식염수(PBS).

[0812] 도 9는 재구성된 레몬 LPMP/EPO mRNA를 마우스에게 경구(공장내) 전달한 후 혈청에서 EPO의 발현을 보여준다. 재구성된 레몬 LPMP/EPO mRNA 제형의 경구 투여는 광범위한 단백질에 대해 요구되는 치료 투여량을 초과하는 수준에서 단백질을 강력하게 발현하였다.

[0813] 도 10은 Cre 재조합효소 mRNA를 포함하는 재구성된 레몬 LPMP를 정맥내 투여(IV)하여 치료한 Tomato 레드 loxP 마우스 세포의 비장세포, 폐 세포, 및 골수 세포(순환 면역 세포 및 전구 세포)의 부모 집단에서 Tomato 레드 양성 세포(생체 내에서 형질감염된 면역 세포)의 빈도를 보여준다. Cre 재조합효소 mRNA의 정맥내 투여는 전례 없는 비율로 생체 내에서 마우스의 비장, 폐 및 골수의 면역 세포 및 상주 세포를 형질감염시켰다. 또한, 높은 수준의 형질감염이 수지상 세포, 대식세포, 공간 내 면역 세포(폐포 대식세포) 및 비면역 세포(내피, 기질, 상피 세포)에서 관찰되었다.

[0814] **실시예 4. 비인간 영장류에서의 LPMP/EPO mRNA 제형의 근육내 투여 및 피하 투여**

[0815] ***투여 요법***

[0816] EPO mRNA를 포함하는 재구성된 레몬 LPMP의 근육내 투여 및 피하 투여의 효능을 시험하는 비말단 비인간 영장류(NHP) 연구를 위한 투여 요법이 표 3~5에 제공되어 있다. 시노몰구스 마카크 원숭이에서 연구를 수행하였다. 투여 전 약물은 1회 투여량의 부프레노르핀(0.03mg/kg/IM) 및 1회 투여량의 멜록시캄 SR(0.6mg/kg, SC)을 포함한다.

[표 3] 1 차 투여

그룹	동물 수	시험 제형	투여량 수준 mg	명시된 투여량	농도 μg/mL	투여량 부피	투여 경로	샘플 채취	투여 전 약물
1	3	LNP	0.9	0.2mg/kg GFP mRNA 0.1mg/kg EPO mRNA	1800	주사 당 500μL	1 일 차 피하 주사	혈액: 투여 전, 각각의 투여 후 6 시간, 12 시간 및 24 시간 생검: 15 일 차 투여 후 약 24 시간 차의 주사 부위	———
2	3	recLemon	0.9	0.2mg/kg GFP mRNA 0.1mg/kg EPO mRNA	1800				———

[0817]

3	3	LNP	0.9	0.2mg/kg GFP mRNA 0.1mg/kg EPO mRNA	1800		1 일 차 근육내 주사		———
4	3	recLemon	0.9	0.2mg/kg GFP mRNA 0.1mg/kg EPO mRNA	1800				———

[0818]

[표 4] 2 차 투여

그룹	동물 수	시험 제형	투여량 수준 mg	명시된 투여량	농도 μg/mL	투여량 부피	투여 경로	샘플 채취	투여 전 약물
1	3	recLemon	0.45	0.1mg/kg GFP mRNA 0.05mg/kg EPO mRNA	1800	주입 당 250μL	8 일 차 피하 주사	혈액: 투여 전, 각각의 투여 후 6 시간, 12 시간 및 24 시간 생검: 15 일 차 투여 후 약 24 시간 차의 주사 부위	사전 투약
2	3	recLemon	0.45	0.1mg/kg GFP mRNA 0.05mg/kg EPO mRNA	1800				———
3	3	recLemon	0.45	0.1mg/kg GFP mRNA 0.05mg/kg EPO mRNA	1800		8 일 차 근육내 주사		사전 투약
4	3	recLemon	0.45	0.1mg/kg GFP mRNA 0.05mg/kg EPO mRNA	1800				———

[0819]

[표 5] 3 차 투여

그룹	동물 수	시험 제형	투여량 수준 mg	명시된 투여량	농도 μg/mL	투여량 부피	투여 경로	샘플 채취	투여 전 약물
1	3	recLemon	0.45	0.05mg/kg EPO mRNA only	1800	주입 당 250μL	15 일 차 피하 주사	혈액: 투여 전, 각각의 투여 후 6 시간, 12 시간 및 24 시간	사전 투약
2	3	recLemon	0.09	0.02mg/kg GFP mRNA 0.01mg/kg EPO mRNA	360				———

[0820]

3	3	recLemon	0.45	0.05mg/kg EPO mRNA only	1800		15 일 차 근육내 주사	생검: 15 일 차 투여 후 약 24 시간 차의 주사 부위	사전 투약
4	3	recLemon	0.09	0.02mg/kg GFP mRNA 0.01mg/kg EPO mRNA	360				———

[0821]

[0822] ***제형 및 특성 분석***

[0823] 본 실시예는 LPMP/mRNA 제형을 위해 mRNA를 캡슐화(예를 들어, 2:1 eGFP:EPO)하기 위해 이온화 가능 지질, 스테롤 및 PEG 지질로 제형화된 레몬 지질 재구성된 LPMP의 제형을 기술한다.

[0824] 이온화 가능 지질:구조적 지질:스테롤:PEG-지질(C12-200:DOPE:콜레스테롤:14:0 PEG2000 PE)이 각각 35:16:46.5:2.5의 몰비로 구성된 지질 나노입자(LNP) 제형을 실시예 2에 따라 제조하였다. 지질을 에탄올에 용해시켰다. 이들 지질을 표시한 몰비로 혼합하고 에탄올(유기상)에서 12.5mM 총 지질 농도로 희석하고, mRNA 용

액(수성상)을 RNAse-무함유 물 및 100mM 구연산염 완충액 pH 3으로 제조하여 50mM 구연산염 완충액의 최종 농도를 수득하였다. 제형을 15:1의 이온화 가능 지질 대 mRNA N:P 비로 유지시켰다.

[0825] 이온화 가능 지질:천연 지질:스테롤:PEG-지질(C12-200:레몬 지질:콜레스테롤:14:0 PEG2000 PE)이 각각 35:50:12.5:2.5의 몰비로 구성된 재구성된 레몬 LPMP(recPMP1)를 실시예 2에 따라 제조하였다. 4:1 DMF:메탄올에 용해된 레몬 지질을 제외하고 지질은 에탄올에 용해되었다. 그런 다음, 제형을 상기와 같이 취급하였다.

[0826] 지질 혼합물 및 mRNA 용액을 9mL/분의 총 유속으로 NANOASSEMBLR® IGNITE™(Precision Nanosystems) 상에서 각각 1:3 부피비로 혼합하였다. 그런 다음, 생성된 제형을 Slide-A-Lyzer G2 투석 카세트(10k MWCO)에 로딩하고, 실온에서 2시간 동안 1x PBS에 대해 투석하였다. PBS를 새로 갈고, 제형을 4℃에서 적어도 14시간 동안 부드럽게 교반하면서 추가로 투석하였다. 그런 다음, 투석된 제형을 수집하고, 150ml/분의 고정 공급 유량으로 Sartorius VIVAFLOW® 50R 카세트(100k MWCO)를 사용하여 접선 유동 여과(TFF)로 농축시켰다. 그런 다음, TFF 농축된 제형을 AMICON® Ultra 원심분리 필터(100k MWCO)를 사용하여 3000xg에서 원심분리하여 농축시켰다. 농축된 제형을 Zetasizer Ultra(Malvern Panalytical)를 사용하여 크기, 다분산성, 및 입자 농도에 대해 특성 분석하고, QUANT-IT™ RIBOGREEN® RNA 검정 키트(ThermoFisher Scientific)를 사용하여 mRNA 캡슐화 효율에 대해 특성 분석하였다.

[0827] 입자 특성 분석 데이터는 도 3a 및 도 3b 및 표 6에 도시되어 있다.

[표 6]

[0828]

	이온화 가능 지질:구조적 지질:스테롤:PEG-지질	mRNA 물질	크기(nm)	PDI	캡슐화 효율 백분율(%)
LNP	35:16:46.5:2.5	2:1 eGFP:EPO	90.63	0.093	92.4
recPMP1	35:50:12.5:2.5	2:1 eGFP:EPO	113.20	0.273	90.0

[0829] 투여량의 투여

[0830] 투여량은 표 3~5에 따라 투여되었다. 투여량은 가장 최근에 수집된 체중을 기준으로 하였고, 투여량이 1mL 이상인 경우 가장 가까운 0.1mL로 반올림하고, 투여량이 1mL 미만인 경우 가장 가까운 0.01mL로 반올림하였다. 투여량을 투여하는 시간은 샘플 수집 시점의 목표 시간을 결정하는 데 사용된다.

[0831] 에리스로포이에틴(EPO) 및 사이토카인/케모카인에 대한 처리 및 분석

[0832] 혈장을 표지된 초저온 튜브에 넣고, 분석 시까지 명목상 -80℃에서 보관하였다. MSD를 통해 샘플을 에리스로포이에틴(EPO) 및 사이토카인/케모카인에 대해 분석하였다.

[0833] -NHP 전염증성 패널 6개의 사이토카인의 경우, V-plex 멀티플렉스 키트: IFN-γ, IL-113, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10 (복제).

[0834] -NHP 케모카인 패널 10개의 케모카인의 경우, V-plex 멀티플렉스 키트: 에오탁신-3, IL-8, IL-8 (HA), IP-10, MCP-1, MCP-4, MDC, MIP-1α, MIP-113, TARC (복제).

[0835] 유세포 분석을 위한 처리 및 분석

[0836] 2mL의 혈액을 채취하고 유세포 분석을 위해 처리하였다. 전혈 샘플이 유세포 분석 염색 절차를 거쳤다. 표 7에 나타낸 항체로 샘플을 염색하였다.

[표 7]

[0837]

자외선 (N)		보라색 (V)		청색 (B)			황색 (Y)		적색 (R)	
BUV395	BUV661	BV421	BV510	FITC	PE CF594	PerCP-Cy5.5	PE	PE-Cy7	APC	APC-Cy7
CD45	HLA-DR	CD20	CD8	GFP	CD11b	CD4	CD16	CD14	CD3	살아있음/죽음

[0838] 염색 후, 샘플의 절반을 CytoFLEX LX 유세포 분석기 상에서 미고정 상태로 즉시 실행하였다. 다음의 파라미터에 대해 데이터를 분석하였다: CD4 T 세포 (CD3+ CD4+ CD16-), CD8 T 세포 (CD3+ CD8+ CD16-), NKT 세포 (CD3+ CD16+), NK 세포 (CD3- CD16+ CD14+), B 세포 (CD20+ CD8+ CD3-), DCs (HLA-DR+ CD11b+ CD14+)/(HLA-DR+ CD11b+ CD14- CD16+), 단핵구 (HLA-DR-CD16- CD14-), 및 호중구 (CD11b+ HLA-DR- CD16- CD14-).

[0839] 염색된 샘플의 나머지 절반을 BD 고정 완충액 또는 2% PFA를 사용하여 빛이 닿지 않는 얼음 위에 20분 동안 고정시키고, PBS로 세척하고, PBS에 재현탁하고, 5±3℃에서 보관하였다.

[0840] 결과

[0841] EPO mRNA를 포함하는 재구성된 레몬 LPMP의 근육내 투여 및 피하 투여는 비인간 영장류에서 광범위한 단백질에 대한 치료 투여량을 초과하는 발현 수준을 달성하였다. 중요하게는, 이들 결과는 비-전신 투여 경로를 통해 달성되었다.

[0842] 도 4는 NHP에서 EPO mRNA를 포함하는 재구성된 레몬 LPMP를 반복 투여한 후 혈청에서의 에리스로포이에틴(EPO)의 발현을 보여주며, 여기서 재구성된 레몬 LPMP는 1일 차에 0.1mg/kg 및 8일 차에 0.05mg/kg의 투여량으로 근육내(IM) 투여되었다. 투여 전 및 투여 후 6시간, 12시간, 및 24시간 차의 인간 에리스로포이에틴(hEPO)의 농도가 도시되어 있다.

[0843] 도 5 및 도 6은 NHP에서 EPO mRNA를 포함하는 재구성된 레몬 LPMP를 반복 투여한 후 혈청에서의 EPO의 발현을 보여주며, 여기서 재구성된 레몬 LPMP는 1일 차에 0.1mg/kg; 8일 차에 0.05mg/kg; 및 15일 차에 0.05mg/kg의 투여량으로 근육내(IM) 투여되었거나(도 5), 1일 차에 0.1mg/kg; 8일 차에 0.05mg/kg; 및 15일 차에 0.01mg/kg의 투여량으로 근육내(IM) 투여되었다(도 6).

[0844] 도 7은 EPO mRNA를 포함하는 재구성된 레몬 LPMP를 반복 투여한 후 EPO의 발현을 보여주며, 여기서 재구성된 레몬 LPMP는 1일 차에 0.1mg/kg, 8일 차에 0.05mg/kg, 및 15일 차에 0.01mg/kg의 투여량으로 피하(SubQ) 투여되었다. 혈청 중 hEPO의 농도는 투여 전 및 투여 후 6시간, 12시간, 및 24시간 차에 나타났다.

[0845] 도 8은 EPO를 포함하는 재구성된 레몬 LPMP를 반복 투여한 후 EPO mRNA의 발현을 측정한 NHP 연구의 결과를 보여주며, 여기서 재구성된 레몬 LPMP는 1일 차에 0.1mg/kg, 8일 차에 0.05mg/kg, 및 15일 차에 0.05mg/kg의 투여량으로 SubQ 투여되었다. 혈청 중 hEPO의 농도는 투여 전 및 투여 후 6시간, 12시간, 및 24시간 차에 나타났다.

[0846] **실시예 5. 생체 내 면역 세포를 형질감염시킨 recLemon LPMP/GFP mRNA 제형의 근육내 전달 및 피하 전달**

[0847] 도 11은 GFP mRNA를 포함하는 재구성된 레몬 LPMP를 근육내 투여(IM; 상단 패널) 또는 피하 투여(SubQ; 하단 패널)하여 치료한 시노몰구스 마카크 원숭이에서 GFP-양성 면역 세포(CD4 T 세포, CD8 T 세포, 및 B 세포)의 백분율을 보여준다.

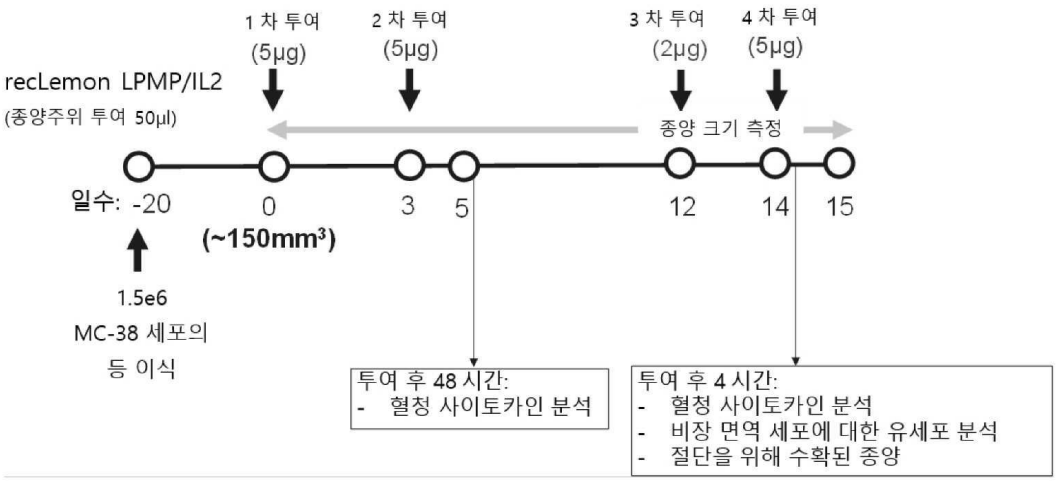
[0848] **실시예 6. recLemon LPMP/mRNA 제형을 사용한 MC-38 종양에 대한 항종양 반응의 IL-2 유도**

[0849] 본 실시예는 mRNA(예를 들어, IL-2에 대한 mRNA)를 캡슐화하기 위해, 이온화 가능 지질(C12-200), 스테롤(콜레스테롤), 및 PEG 지질(DMPE-PEG2k)로 재구성된 레몬 지질을 포함하는 recLemon LPMP/mRNA 제형을 기술한다. 본 실시예에서 시험된 recLemon LPMP/mRNA 제형은 실시예 2에 따라 제조되었다. 본 실시예에서 사용된 IL-2 mRNA의 코딩 부분은 다음과 같다:

[0850] MYRMQLLSCI ALSLALVTNS APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFCQSIIS TLT

[0851] ***치료 일정***

[0852] recLemon LPMP/mRNA 제형의 항종양 반응을 결장 선암종 쥣과 모델(MC38)에서 평가하였다. recLemon LPMP/mRNA 제형의 피하 전달 설계 및 평가가 반응식 1에 나타나 있다.



[0853] 반응식 1

[0854] 반응식 1에 도시된 바와 같이, MC38 종양 세포를 플라스크에서 증식시킨 다음, 50μl 당 $1.5x10^6$개의 세포로 마우스(C57B16J 마우스 야생형 마우스)의 등 영역에 피하 이식하기 위해 수확하였다. 약 $150mm^3$이 될 때까지 종양을 성장시켰으며, 이는 약 20일이 걸렸다. 마우스(25g의 마우스)에게 1차 및 2차 투여에서 5μg, 3차 투여에서 2μg, 및 4차 투여에서 5μg을 종양 주위 투여(종양 옆 피하 투여)하였다.

[0855] ***종양 측정 및 생존율***

[0856] MC38 종양 세포를 이식한 후 7일 차에 종양 부피를 측정한 다음, 이후에 격일로 측정하였다.

[0857] 도 12a는 5μg의 recLemon LPMP/IL-2 mRNA 제형의 1차 및 2차 종양주위 투여 후, 마우스에서 MC38 종양 세포의 이식 후 며칠 동안 측정된 종양 부피를 보여준다. 도 12a에 도시된 바와 같이, recLemon LPMP/IL-2 mRNA 제형의 종양주위 전달의 첫 2회 투여는 이른 시기에 종양 퇴행을 유도하였으며 종양 성장을 유의하게 감소시켰다. 도 12b는 recLemon LPMP/IL-2 mRNA 제형의 모든 4회 종양주위 투여 후, 마우스에서 MC38 종양 세포의 이식 후 며칠 동안 측정된 종양 부피를 보여준다. 도 12c는 recLemon LPMP/IL-2 mRNA 제형의 모든 4회 종양주위 투여 후, MC38 종양 세포의 이식 후 며칠 동안의 마우스의 생존율을 보여준다. 전반적으로, 도면은 마우스에 대한 recLemon LPMP/IL-2 mRNA 제형의 종양주위 전달이 종양 성장을 감소시키고 생존을 증가시킴으로써 마우스에서 결장 선암종 종양을 감소시켰음을 보여준다.

[0858] ***투여 후 4시간 차의 혈청 사이토카인/케모카인 분석***

[0859] 혈청 프로파일은 상응하는 ELISA 키트에 의해 4차 투여 후 4시간 차에 케모카인, 전염증성 및 Th1 사이토카인 반응쪽으로 편향되었다.

[0860] 도 13a는 5μg의 recLemon LPMP/IL-2 mRNA 제형 투여량의 4차 종양주위 투여 후 4시간 차의 마우스의 혈청 내 IL-2의 수준을 보여준다. 도 13b 내지 도 13g는 5μg의 recLemon LPMP/IL-2 mRNA 제형 투여량의 4차 종양주위 투여 후 4시간 차의 마우스의 혈청 내 IL4(도 13b), IL5(도 13c), IFNγ(도 13d), TNFα(도 13e), IL6(도 13f), 및 CXCL1(KC)(도 13g)의 수준을 보여준다. 결과는 recLemon LPMP/IL-2 mRNA 제형이 전신적으로 IL-2 수준을 증가시키고 주사 후 4시간 차에 항종양 사이토카인 프로파일을 유도하였음을 나타낸다. Th2 사이토카인(IL4, IL5)은 더 적었다. IL17의 차등 발현은 검출되지 않았다.

[0861] ***투여 후 48시간 차의 혈청 사이토카인/케모카인 분석***

[0862] 혈청 프로파일은 상응하는 ELISA 키트에 의해 2차 투여 후 48시간 차에 사이토카인 반응쪽으로 편향되었다.

[0863] 도 14a 내지 도 14c는 5μg의 recLemon LPMP/IL-2 mRNA 제형 투여량의 2차 종양주위 투여 후 48시간 차의 마우스의 혈청 내 IL6(도 14a), IFNγ(도 14b), 및 TNFα(도 14c)의 수준을 보여준다. 결과는 recLemon LPMP/IL-2 mRNA 제형이 주사 후 2일 동안 지속되는 항종양 사이토카인 프로파일을 유도하였음을 나타낸다.

[0864] 본 실시예는 사이토카인을 코딩하는 mRNA를 국소적으로 전달하고 기능적 전신 수준에 도달하는 데 사용되는 LPMP/mRNA 제형의 능력을 예시한다. recLemon LPMP/IL-2 mRNA 제형은 생체 내에서 IL-2의 생산을 유도하였고(전신 수준 포함), 항종양 면역 반응을 유발하여 종양 성장을 감소시켰다. 특히, 낮은 투여량의 recLemon

LPMP/IL-2 mRNA 제형은 종양 성장을 감소시켰다. recLemon LPMP/IL-2 mRNA 제형은 종양을 보유 중인 숙주에서 면역 세포 동원을 촉진하고 항종양 반응에 유리한 사이토카인 프로파일을 유도하였다.

[0865] **실시예 7. LPMP/mRNA 제형을 이용한 미처리 마우스에서의 IL-2 발현 지속성**

[0866] 실시예 6에서, 종양을 보유 중인 마우스 모델에서 recLemon LPMP/mRNA 제형(0.2mg/kg)의 3회 투여량이 생체 내 IL-2를 발현하여 투여 후 4시간 차에 전신 수준에 도달할 수 있었으며, 벤치마크와 비교하여 IFNɣ, TNFα 및 IL-6을 포함하여 IL-2 신호 전달의 바로 하류에서 유의하게 더 높은 수준으로 사이토카인의 높은 수준을 유도할 수 있었고, 종양 크기를 감소시켜 치료된 마우스에서 생존율을 증가시킬 수 있었음을 보여주었다.

[0867] 본 실시예에서, recLemon LPMP/mRNA 제형은 실시예 6에 따라 제조되었다.

[0868] 본 실시예는 종양을 보유 중이지 않은 마우스 모델에서 recLemon LPMP/mRNA 제형(0.4mg/kg)의 1회 투여량이 생체 내 IL-2를 발현하여 투여 후 최대 48시간 동안 IL-2 단백질과 비교하여 높은 전신 수준에 도달할 수 있었고; IL-2 신호 전달(IFNɣ, TNFα)의 바로 하류에서 높은 수준의 사이토카인 및, 더 적은 정도로 T 세포 항염증성 사이토카인을 유도할 수 있었고; 표면 IL-2Rα의 증가(IFNɣ를 분비할 준비가 된 T 세포 및 CD8 T 세포가 약 10M 더 많음)와 함께 적어도 6일 동안 지속되는 T 세포에 대한 지속 효과를 가졌음을 입증하였다.

[0869] 이들 결론은 도 15, 도 16a 및 도 16b, 및 도 17에 도시되어 있다.

[0870] **실시예 8. LPMP/mRNA 제형에 로딩하기 위한 추가 mRNA 설계**

[0871] LPMP/mRNA 제형에 로딩하기 위한 추가 mRNA 설계가 아래 반응식 2에 나타나 있으며, 이는 페이로드를 암호화하는 서열을 포함한다.



판독	유형	국소화	크기 (bp)
	리포터	세포액	1431
	리포터	분비됨	1491
	리포터	막	1473
	리포터	세포액	720
	사이토카인	분비됨	462
	사이토카인	분비됨	462
	사이토카인	분비됨	972
	항체	막	2286
	항체	분비됨	1404 + 696

[0872] 반응식 2

[0873] 추가 페이로드 및 관련 질환이 표 8에 도시되어 있다.

[표 8]

페이로드	질병 관련성	클래스	유전자 길이	경로
에타너셉트(엔브렐)	TNF 억제제	융합	1404 bp	SubQ
휴미라	TNF 억제제	항체	1356 + 645 bp	SubQ
에포겐	조혈	사이토카인	501 bp	IV, SubQ
필그라스팀	조혈	당단백질	525 bp	IV, SubQ
키트루다	항-PD1	항체	1344 + 657 bp	IV
리툭시맙	항 CD20	항체	1356 + 642 bp	IV
로미플로스팀	ITP	융합	807 bp	SubQ
살그라모스팀	G-CSF	사이토카인	304 bp	IV, SubQ
	항 CD19 (쥣과)	항체		

[0874]

[0875] 페이로드의 예시적인 서열이 표 9에 도시되어 있다.

[표 9]

페이로드	서열
tdTomato 세포액	ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGTCATCAAAGAGTTCATGCGCTTCAAGGTGCGCATGGAGGGCTC CATGAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCCCCTACGAGGGCACCCAG ACCGCCAAGCTGAAGGTGACCAAGGGCGGCCCCCTGCCCTTCGCCTGGGACATCCTGTCCCCCCA GTTCATGTACGGCTCCAAGGCGTACGTGAAGCACCCCGCCGACATCCCCGATTACAAGAAGCTGTC CTTCCCCGAGGGCTTCAAGTGGGAGCGCGTGATGAACTTCGAGGACGGCGGTCTGGTGACCGTGA CCCAGGACTCCTCCCTGCAGGACGGCACGCTGATCTACAAGGTGAAGATGCGCGGCACCAACTTC CCCCCCGACGGCCCCGTAATGCAGAAGAAGACCATGGGCTGGGAGGCCTCCACCGAGCGCCTGTA CCCCCGCGACGGCGTGCTGAAGGGCGAGATCCACCAGGCCCTGAAGCTGAAGGACGGCGGCCAC TACCTGGTGGAGTTCAAGACCATCTACATGGCCAAGAAGCCCGTGCAACTGCCCGGCTACTACTAC GTGGACACCAAGCTGGACATCACCTCCCACAACGAGGACTACACCATCGTGGAACAGTACGAGCG CTCCGAGGGCCGCCACCACCTGTTCCTGGGGCATGGCACCGGCAGCACCGGCAGCGGCAGCTCCG GCACCGCCTCCTCCGAGGACAACAACATGGCCGTCATCAAAGAGTTCATGCGCTTCAAGGTGCGCA TGGAGGGCTCCATGAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCCCCTACGA GGGCACCCAGACCGCCAAGCTGAAGGTGACCAAGGGCGGCCCCCTGCCCTTCGCCTGGGACATCC TGTCCCCCCAGTTCATGTACGGCTCCAAGGCGTACGTGAAGCACCCCGCCGACATCCCCGATTACA AGAAGCTGTCCTTCCCCGAGGGCTTCAAGTGGGAGCGCGTGATGAACTTCGAGGACGGCGGTCTG GTGACCGTGACCCAGGACTCCTCCCTGCAGGACGGCACGCTGATCTACAAGGTGAAGATGCGCGG CACCAACTTCCCCCCCGACGGCCCCGTAATGCAGAAGAAGACCATGGGCTGGGAGGCCTCCACCG AGCGCCTGTACCCCCGCGACGGCGTGCTGAAGGGCGAGATCCACCAGGCCCTGAAGCTGAAGGA CGGCGGCCGCTACCTGGTGGAGTTCAAGACCATCTACATGGCCAAGAAGCCCGTGCAACTGCCCG GCTACTACTACGTGGACACCAAGCTGGACATCACCTCCCACAACGAGGACTACACCATCGTGGAAC AGTACGAGCGCTCCGAGGGCCGCCACCACCTGTTCCTGTACGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA
tdTomato 분비됨	ATGTGGTGGCGCCTGTGGTGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGTGGCCCATGGTGTGGGCCGTG AGCAAGGGCGAGGAGGTCATCAAAGAGTTCATGCGCTTCAAGGTGCGCATGGAGGGCTCCATGAA CGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCCCCTACGAGGGCACCCAGACCGCC AAGCTGAAGGTGACCAAGGGCGGCCCCCTGCCCTTCGCCTGGGACATCCTGTCCCCCCAGTTCATG TACGGCTCCAAGGCGTACGTGAAGCACCCCGCCGACATCCCCGATTACAAGAAGCTGTCCTTCCCC GAGGGCTTCAAGTGGGAGCGCGTGATGAACTTCGAGGACGGCGGTCTGGTGACCGTGACCCAGGA CTCCTCCCTGCAGGACGGCACGCTGATCTACAAGGTGAAGATGCGCGGCACCAACTTCCCCCCCGA CGGCCCCGTAATGCAGAAGAAGACCATGGGCTGGGAGGCCTCCACCGAGCGCCTGTACCCCCGCG ACGGCGTGCTGAAGGGCGAGATCCACCAGGCCCTGAAGCTGAAGGACGGCGGCCACTACCTGGT GGAGTTCAAGACCATCTACATGGCCAAGAAGCCCGTGCAACTGCCCGGCTACTACTACGTGGACAC CAAGCTGGACATCACCTCCCACAACGAGGACTACACCATCGTGGAACAGTACGAGCGCTCCGAGG GCCGCCACCACCTGTTCCTGGGGCATGGCACCGGCAGCACCGGCAGCGGCAGCTCCGGCACCGCC TCCTCCGAGGACAACAACATGGCCGTCATCAAAGAGTTCATGCGCTTCAAGGTGCGCATGGAGGG CTCCATGAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCCCCTACGAGGGCACC CAGACCGCCAAGCTGAAGGTGACCAAGGGCGGCCCCCTGCCCTTCGCCTGGGACATCCTGTCCCC CCAGTTCATGTACGGCTCCAAGGCGTACGTGAAGCACCCCGCCGACATCCCCGATTACAAGAAGCT GTCCTTCCCCGAGGGCTTCAAGTGGGAGCGCGTGATGAACTTCGAGGACGGCGGTCTGGTGACCG TGACCCAGGACTCCTCCCTGCAGGACGGCACGCTGATCTACAAGGTGAAGATGCGCGGCACCAAC TTCCCCCCCGACGGCCCCGTAATGCAGAAGAAGACCATGGGCTGGGAGGCCTCCACCGAGCGCCT

[0876]

	GTACCCCCGCGACGGCGTGCTGAAGGGCGAGATCCACCAGGCCCTGAAGCTGAAGGACGGCGGC CGCTACCTGGTGGAGTTCAAGACCATCTACATGGCCAAGAAGCCCGTGCAACTGCCCGGCTACTAC TACGTGGACACCAAGCTGGACATCACCTCCCACAACGAGGACTACACCATCGTGGAACAGTACGA GCGCTCCGAGGGCCGCCACCACCTGTTCCTGTACGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA
tdTomato 막	ATGGGCTGCGTGTGCAGCAGCAACCCCGAGAACAACAACAACATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGG TCATCAAAGAGTTCATGCGCTTCAAGGTGCGCATGGAGGGCTCCATGAACGGCCACGAGTTCGAG ATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCCCCTACGAGGGCACCCAGACCGCCAAGCTGAAGGTGACCA AGGGCGGCCCCCTGCCCTTCGCCTGGGACATCCTGTCCCCCCAGTTCATGTACGGCTCCAAGGCGT ACGTGAAGCACCCCGCCGACATCCCCGATTACAAGAAGCTGTCCTTCCCCGAGGGCTTCAAGTGGG AGCGCGTGATGAACTTCGAGGACGGCGGTCTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTCCCTGCAGGAC GGCACGCTGATCTACAAGGTGAAGATGCGCGGCACCAACTTCCCCCCCGACGGCCCCGTAATGCA GAAGAAGACCATGGGCTGGGAGGCCTCCACCGAGCGCCTGTACCCCCGCGACGGCGTGCTGAAG GGCGAGATCCACCAGGCCCTGAAGCTGAAGGACGGCGGCCACTACCTGGTGGAGTTCAAGACCAT CTACATGGCCAAGAAGCCCGTGCAACTGCCCGGCTACTACTACGTGGACACCAAGCTGGACATCA CCTCCCACAACGAGGACTACACCATCGTGGAACAGTACGAGCGCTCCGAGGGCCGCCACCACCTG TTCCTGGGGCATGGCACCGGCAGCACCGGCAGCGGCAGCTCCGGCACCGCCTCCTCCGAGGACAA CAACATGGCCGTCATCAAAGAGTTCATGCGCTTCAAGGTGCGCATGGAGGGCTCCATGAACGGCC ACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCCCCTACGAGGGCACCCAGACCGCCAAGCT GAAGGTGACCAAGGGCGGCCCCCTGCCCTTCGCCTGGGACATCCTGTCCCCCCAGTTCATGTACGG CTCCAAGGCGTACGTGAAGCACCCCGCCGACATCCCCGATTACAAGAAGCTGTCCTTCCCCGAGG GCTTCAAGTGGGAGCGCGTGATGAACTTCGAGGACGGCGGTCTGGTGACCGTGACCCAGGACTCC TCCCTGCAGGACGGCACGCTGATCTACAAGGTGAAGATGCGCGGCACCAACTTCCCCCCCGACGG CCCCGTAATGCAGAAGAAGACCATGGGCTGGGAGGCCTCCACCGAGCGCCTGTACCCCCGCGACG GCGTGCTGAAGGGCGAGATCCACCAGGCCCTGAAGCTGAAGGACGGCGGCCGCTACCTGGTGGA GTTCAAGACCATCTACATGGCCAAGAAGCCCGTGCAACTGCCCGGCTACTACTACGTGGACACCAA GCTGGACATCACCTCCCACAACGAGGACTACACCATCGTGGAACAGTACGAGCGCTCCGAGGGCC GCCACCACCTGTTCCTGTACGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA
eGFP	ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGA CGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTG ACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTG ACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCC GCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGAC CCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACT TCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTAT ATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGA CGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGC TGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGAT CACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAG TAA
IL-2	ATGTACAGGATGCAACTCCTGTCTTGCATTGCACTAAGTCTTGCACTTGTCACAAACAGTGCACCCA CCAGCAGCAGCACCAAGAAGACCCAGCTGCAGCTGGAGCACCTGCTGCTGGACCTGCAGATGATC CTGAACGGCATCAACAACTACAAGAACCCCAAGCTGACCAGAATGCTGACCTTCAAGTTCTACATG CCCAAGAAGGCCACCGAGCTGAAGCACCTGCAGTGCCTGGAGGAGGAGCTGAAGCCCCTGGAGG

[0877]

	AGGTGCTGAACCTGGCCCAGAGCAAGAACTTCCACCTGAGACCCAGAGACCTGATCAGCAACATC AACGTGATCGTGCTGGAGCTGAAGGGCAGCGAGACCACCTTCATGTGCGAGTACGCCGACGAGAC CGCCACCATCGTGGAGTTCCTGAACAGATGGATCACCTTCAGCCAGAGCATCATCAGCACCCTGAC CTGA
IL-2 합계	ATGTACAGGATGCAACTCCTGTCTTGCATTGCACTAAGTCTTGCACTTGTCACAAACAGTGCACCCA CCAGCAGCAGCACCAAGAAGACCCAGCTGCAGCTGGAGCACCTGCTGCTGGACCTGCAGATGATC CTGAACGGCATCAACAACTACAAGAACCCCAAGCTGACCAGAATGCTGACCGCCAAGTTCTACATG CCCAAGAAGGCCACCGAGCTGAAGCACCTGCAGTGCCTGGAGGAGGAGCTGAAGCCCCTGGAGG AGGTGCTGAACCTGGCCCAGAGCAAGAACTTCCACTTCGACCCCAGAGACGTGGTGAGCAACATC AACGTGTTCGTGCTGGAGCTGAAGGGCAGCGAGACCACCTTCATGTGCGAGTACGCCGACGAGAC CGCCACCATCGTGGAGTTCCTGAACAGATGGATCACCTTCAGCCAGAGCATCATCAGCACCCTGAC CTGA
IL-2 + IL-2-Ra	ATGTACAGGATGCAACTCCTGTCTTGCATTGCACTAAGTCTTGCACTTGTCACAAACAGTAGCAAGA ACTTCCACCTGAGACCCAGAGACCTGATCAGCAACATCAACGTGATCGTGCTGGAGCTGAAGGGC AGCGAGACCACCTTCATGTGCGAGTACGCCGACGAGACCGCCACCATCGTGGAGTTCCTGAACAG ATGGATCACCTTCAGCCAGAGCATCATCAGCACCCTGACCGGCGGCAGCAGCAGCACCAAGAAGA CCCAGCTGCAGCTGGAGCACCTGCTGCTGGACCTGCAGATGATCCTGAACGGCATCAACAACTACA AGAACCCCAAGCTGACCAGAATGCTGACCTTCAAGTTCTACATGCCCAAGAAGGCCACCGAGCTG AAGCACCTGCAGTGCCTGGAGGAGGAGCTGAAGCCCCTGGAGGAGGTGCTGAACCTGGCCCAGG GCAGCGGCGGCGGCAGCGAGCTGTGCGACGACGACCCCCCCGAGATCCCCCACGCCACCTTCAA GGCCATGGCCTACAAGGAGGGCACCATGCTGAACTGCGAGTGCAAGAGAGGCTTCAGAAGAATCA AGAGCGGCAGCCTGTACATGCTGTGCACCGGCAACAGCAGCCACAGCAGCTGGGACAACCAGTGC CAGTGCACCAGCAGCGCCACCAGAAACACCACCAAGCAGGTGACCCCCCAGCCCGAGGAGCAGA AGGAGAGAAAGACCACCGAGATGCAGAGCCCCATGCAGCCCGTGGACCAGGCCAGCCTGCCCGG CCACTGCAGAGAGCCCCCCCCCTGGGAGAACGAGGCCACCGAGAGAATCTACCACTTCGTGGTGG GCCAGATGGTGTACTACCAGTGCGTGCAGGGCTACAGAGCCCTGCACAGAGGCCCCGCCGAGAGC GTGTGCAAGATGACCCACGGCAAGACCAGATGGACCCAGCCCCAGCTGATCTGCACCGGCTGA
항 CD19 & 항 CD20 CAR-T	ATGCTGCTGCTGGTGACCAGCCTGCTGCTGTGCGAGCTGCCCCACCCCGCCTTCCTTTTGATTCCAG AGGTGCAATTACAGCAAAGCGGTGCAGAACTCGTGAAGCCAGGCGCTTCAGTAAAAATGTCCTGC AAAGCTTCCGGCTACACATTCACTAGCTACAACATGCATTGGGTTAAACAAACACCTGGCCAGGGA TTGGAGTGGATCGGGGCTATATATCCGGGTAACGGTGACACTAGTTACAATCAGAAATTCAAGGGA AAGGCCACGCTTACAGCAGACAAGAGTAGCAGTACCGCCTATATGCAACTCAGCAGCTTGACCAG CGAAGACAGCGCAGATTATTACTGTGCCAGATCCAACTATTACGGCTCAAGCTACTGGTTCTTTGAC GTGTGGGGCGCCGGAACCACTGTTACTGTCAGCAGCGGAGGCGGTGGGAGTGGCGGCGGTGGTT CCGGCGGGGGCGGGTCAGATATTGTGTTGACGCAATCCCCCGCAATCCTGTCCGCGTCCCCAGGC GAAAAAGTGACAATGACATGCCGGGCCAGCTCAAGCGTGAATTACATGGATTGGTATCAGAAGAA ACCCGGGAGCAGCCCCAAGCCGTGGATCTATGCGACGAGTAACCTGGCTTCCGGCGTCCCCGCCC GATTCAGCGGGTCCGGCAGCGGCACTAGTTACAGTTTAACCATCAGCAGGGTGGAGGCTGAAGAC GCGGCAACCTATTATTGCCAGCAGTGGTCATTTAATCCTCCCACGTTTGGCGGCGGCACCAAGCTG GAGATAAAGGGCGGGGGGGGCAGTGGAGGCGGAGGTAGCGGCGGAGGAGGATCAGGAGGGGG GGGTAGCGGAGGAGGGGGTTCAGACATACAGATGACACAGACAACCTCGAGCCTGAGCGCATCC CTGGGGGACCGAGTCACCATCTCATGTAGAGCATCGCAGGACATCAGCAAATATCTCAACTGGTAC CAGCAAAAACCCGATGGTACAGTGAAACTCTTAATTTACCACACATCCCGGTTACATAGCGGAGTC

[0878]

	CCAAGCCGCTTTAGCGGATCCGGAAGCGGGACCGACTACTCCCTCACGATCAGCAACCTCGAACA GGAGGATATAGCCACTTATTTCTGCCAGCAGGGTAACACCCTGCCGTATACATTTGGCGGGGGCAC AAAACTAGAAATCACAGGCAGTACAAGTGGTAGTGGGAAGCCCGGTAGCGGAGAAGGTAGCACG AAAGGCGAGGTTAAACTTCAGGAATCAGGCCCAGGCCTAGTTGCCCCTTCACAAAGTCTAAGCGTC ACGTGTACCGTGTCCGGCGTAAGCCTGCCAGATTATGGAGTCAGCTGGATTAGGCAGCCTCCACGG AAGGGACTGGAGTGGCTGGGCGTGATTTGGGGGTCGGAGACCACCTATTATAACAGCGCGCTGAA ATCGCGGCTGACTATTATTAAGGATAATAGCAAGTCACAGGTGTTTCTTAAGATGAATAGCCTGCAG ACTGATGACACTGCGATATACTACTGTGCCAAGCACTACTACTACGGAGGGTCATATGCTATGGATT ACTGGGGGCAGGGAACCTCCGTGACTGTAAGTTCCGCCGCCGCTACTACAACCCCTGCCCCACGTC CCCCGACCCCAGCACCTACTATCGCATCCCAGCCCCTTTCCCTTCGCCCTGAGGCCTGCAGGCCTG CAGCTGGAGGAGCCGTTCACACCAGGGGCCTCGACTTTGCATGCGATATTTACATCTGGGCCCCAC TGGCTGGCACCTGCGGCGTCTTGCTGCTGAGCCTCGTGATCACCCTCTATTGTAAGAGGGGGCGAA AAAAGCTCCTGTACATTTTCAAACAGCCTTTCATGAGACCTGTGCAGACAACACAGGAAGAGGACG GTTGCTCCTGTAGGTTTCCGGAGGAAGAAGAGGGAGGGTGTGAATTGCGTGTAAAGTTCTCCAGAT CAGCTGATGCCCCAGCCTATCAACAAGGACAGAATCAGCTGTACAACGAGCTTAATTTGGGGCGGA GAGAGGAATACGATGTCTTGGACAAGAGACGGGGGCGCGACCCCGAGATGGGCGGGAAGCCTAG AAGGAAGAACCCTCAGGAGGGGCTGTATAATGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCCGAAGCTTACA GCGAGATCGGGATGAAAGGAGAGCGCCGCCGCGGAAAAGGCCATGATGGGTTATACCAGGGCCT TAGCACCGCCACTAAGGACACTTACGACGCTCTACACATGCAGGCTCTCCCACCCCGATGA
항-HER2 줄새	ATGAGGGCTTGGATCTTCTTTCTGCTCTGCCTGGCCGGGCGCGCCTTGGCCGAAGTTCAACTGGTAG AGAGTGGAGGTGGGCTTGTGCAACCAGGCGGATCCTTGCGACTGTCCTGCGCCGCTTCAGGCTTCA ACATCAAGGACACCTACATCCATTGGGTCCGCCAGGCACCAGGAAAAGGTCTTGAATGGGTGGCC AGAATCTACCCTACTAACGGTTACACCAGATATGCAGACTCCGTTAAGGGGCGATTTACCATTTCAG CAGACACCTCTAAGAACACCGCTTACCTGCAGATGAACTCACTTCGAGCTGAGGACACCGCCGTTT ACTATTGCAGCAGATGGGGCGGTGACGGCTTCTACGCTATGGATTACTGGGGACAGGGGACTTTGG TAACTGTGAGTAGTGCATCTACAAAGGGGCCAAGCGTGTTCCCACTTGCCCCATCTTCTAAAAGCAC CTCAGGAGGGACTGCAGCCTTGGGTTGCTTGGTTAAAGATTATTTTCCAGAGCCTGTAACTGTATCC TGGAATAGTGGGGCCCTCACAAGCGGAGTACATACTTTCCCTGCAGTATTGCAGTCTAGTGGACTCT ACTCTCTCAGCAGTGTAGTGACCGTACCTTCCAGTTCACTTGGAACACAGACCTATATTTGCAATGT GAATCATAAGCCATCTAATACTAAAGTGGATAAGAAAGTGGAGCCTAAATCTTGTGACAAGACTCA TACATGCCCTCCCTGCCCTGCCCCTGAACTGTTGGGAGGGCCCTCTGTATTTCTCTTCCCCCCTAAAC CAAAGGACACCCTGATGATCAGTCGAACTCCTGAGGTGACTTGTGTGGTTGTTGACGTGTCACATG AGGATCCCGAAGTGAAATTCAACTGGTACGTCGATGGAGTAGAGGTACACAATGCAAAGACAAAA CCTAGGGAGGAACAGTATAATTCTACCTATAGAGTGGTGTCTGTTCTCACAGTTCTCCATCAAGACT GGTTGAACGGTAAAGAATATAAATGCAAAGTCTCCAATAAGGCTTTGCCCGCTCCCATTGAAAAAA CAATCAGTAAAGCCAAAGGCCAGCCACGCGAACCACAGGTCTACACCCTTCCACCATCTCGCGAA GAAATGACTAAGAATCAAGTGTCACTCACATGCCTCGTCAAGGGCTTTTACCCTTCTGATATTGCAG TTGAATGGGAGTCTAACGGGCAGCCCGAGAATAATTACAAGACTACCCCCCCCGTCCTTGACTCTG ATGGCAGCTTTTTCCTGTACTCAAAATTGACTGTGGACAAGTCTCGATGGCAACAGGGTAATGTTTT CTCCTGTAGCGTAATGCACGAGGCCCTTCATAACCATTATACCCAAAAATCTCTTTCATTGTCCCCTG GAAAATGA
항-HER2 경새	ATGAGGGCTTGGATCTTCTTTCTGCTCTGCCTGGCCGGGCGCGCCTTGGCCGATATTCAGATGACTC AGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCTAGCGTTGGGGATAGAGTCACTATAACATGTCGGGCTTCCCAGG

[0879]

	ATGTGAATACTGCTGTCGCTTGGTATCAACAGAAGCCCGGCAAGGCACCAAAACTGCTGATATATA GTGCCTCTTTCCTTTACTCCGGGGTTCCCAGTCGATTCTCTGGAAGCCGCAGCGGCACTGATTTCAC ACTTACTATAAGTAGTCTGCAACCTGAGGACTTTGCTACATACTACTGCCAGCAGCACTATACAACA CCCCCAACTTTCGGGCAAGGCACTAAGGTAGAAATTAAAAGGACCGTTGCTGCTCCATCCGTCTTTA TTTTTCCACCATCTGATGAACAGTTGAAGAGTGGAACAGCAAGCGTCGTTTGTCTCCTGAACAATTTT TACCCACGAGAGGCAAAAGTTCAATGGAAGGTAGACAATGCCCTTCAGAGCGGCAATTCCCAGGA GAGCGTAACCGAGCAGGATAGCAAAGACTCTACATACTCTTTGAGTTCAACCCTTACCCTGAGCAA GGCTGATTACGAAAAACACAAGGTGTACGCTTGCGAGGTAACCCATCAGGGATTGTCATCCCCAGT CACAAAATCATTCAATAGGGGCGAGTGCTGA
키트루다	AUGGAAUUUGGACUGUCUUGGGUUUUUCUGGUAGCUCUGUUUCGUGGAGUGCAAUGCCAGG UUCAGUUGGUCCAGUCGGGUGUGGAGGUUAAAAAGCCCGGCGCCUCUGUGAAGGUUAGCUGC AAGGCUAGCGGAUAUACUUUCACCAAUUACUACAUGUAUUGGGUGAGGCAGGCUCCAGGGCA GGGACUCGAGUGGAUGGGAGGCAUCAACCCGUCCAACGGCGGCACCAACUUCAAUGAGAAGU UCAAAAAUAGAGUGACUCUCACCACUGAUAGUUCCACGACAACCGCAUACAUGGAACUGAAAA GUCUGCAAUUCGAUGACACCGCCGUGUAUUACUGCGCCCGCAGAGACUACCGGUUUGACAUG GGAUUUGAUUACUGGGGUCAGGGCACCACAGUGACAGUCUCAUCCGCCUCUACCAAAGGACCC UCGGUUUUUCCACUCGCACCUUGCUCCCGAAGCACCUCAGAGUCCACCGCGGCCCUUGGGUGU CUGGUGAAAGAUUAUUUCCCCGAACCAGUGACCGUGUCAUGGAAUUCAGGGGCACUGACAAG UGGGGUCCACACGUUCCCAGCGGUGCUGCAGUCCUCCGGGCUGUAUAGCCUUAGCUCUGUAG UCACUGUCCCGUCCAGUUCCCUGGGGACUAAGACUUACACAUGUAACGUAGAUCACAAACCUA GUAACACCAAGGUGGACAAGCGCGUGGAGUCAAAGUACGGACCUCCAUGUCCCCCAUGUCCCG CCCCCGAAUUUUUGGGAGGACCUUCAGUGUUCCUGUUCCCUCCAAAACCUAAAGACACACUGA UGAUAAGCAGGACACCCGAGGUCACCUGCGUCGUGGUCGACGUAAGCCAGGAAGAUCCAGAG GUACAGUUCAACUGGUACGUCGACGGUGUAGAGGUCCAUAAUGCCAAGACAAAGCCCAGGGA GGAGCAGUUUAACUCAACAUAUCGUGUUGUGUCUGUGUUGACGGUUCUACAUCAAGACUGGC UAAACGGCAAGGAGUAUAAAUGCAAGGUUAGUAAUAAGGGCCUCCCCAGCUCUAUUGAGAAA ACUAUCAGCAAAGCUAAGGGCCAGCCUCGGGAACCACAAGUUUACACUUUACCGCCCAGCCAG GAGGAAAUGACGAAGAAUCAGGUGAGCCUGACAUGUCUUGUCAAGGGGUUUUACCCCUCUGA UAUCGCUGUAGAAUGGGAAUCCAAUGGUCAACCUGAAAACAACUACAAGACCACCCCGCCUGU GCUCGACUCUGACGGCAGCUUUUUCCUGUAUUCGAGACUUACAGUGGAUAAAAGCCGGUGGC AGGAGGGCAAUGUGUUUUCCUGCAGUGUGAUGCACGAAGCAUUACACAACCAUUAUACUCAA AAAUCACUCAGUUUGUCUCUGGGGAAG
에포겐	AUGGGGGUCCACGAAUGCCCGGCAUGGCUGUGGUUACUGCUAUCGCUGCUCAGCCUGCCACU GGGCCUGCCCGUACUUGGCGCCCCUCCACGCCUCAUCUGUGACUCCCGGGUCCUGGAGCGGUA CCUUUUGGAGGCCAAAGAAGCAGAGAAUAUCACUACAGGCUGCGCUGAGCACUGUAGUUUGA ACGAAAAUAUAACAGUACCUGACACAAAGGUGAAUUUUUACGCCUGGAAAAGAAUGGAGGUG GGCCAACAGGCAGUGGAAGUGUGGCAGGGUCUCGCUUUACUUAGCGAGGCCGUGCUGCGAGG UCAGGCACUCCUAGUUAACUCCAGCCAGCCCUGGGAGCCACUCCAGUUGCAUGUGGAUAAGGC CGUCUCUGGACUAAGAUCCCUCACCACCCUGCUGAGGGCAUUGGGAGCGCAAAAGGAGGCUA UUUCACCUCCCGAUGCCGCUAGUGCUGCGCCCCUUCGCACUAUCACCGCCGACACGUUCCGUA AGCUGUUCAGGGUUUAUUCAAACUUUCUCCGGGGGAAGCUGAAACUGUAUACUGGGGAAGCC UGCAGAACCGGAGAUAGG

[0880]

[0881]

엔브렐	AUGAAAUGGGUUACGUUCAUCUCCUUGCUGUUCCUGUUCUCUUCCGCUUACUCCCUGCCAGC CCAGGUCGCUUUCACGCCAUACGCUCCUGAACCAGGUAGCACUUGUCGUCUACGGGAAUACUA UGACCAGACUGCACAGAUGUGCUGUUCCAAGUGCUCUCCUGGCCAACAUGCCAAAGUGUUUU GCACUAAGACUAGCGAUACAGUGUGCGAUAGCUGCGAGGAUUCUACAUAUACCCAGCUCUGG AACUGGGUUCCCGAGUGUCUCAGCUGUGGCAGCCGGUGUAGUAGCGACCAGGUGGAGACCCA GGCCUGCACACGAGAGCAGAACCGGAUCUGCACAUGUAGACCCGGGUGGUACUGUGCGUUGA GUAAACAGGAGGGAUGUAGACUCUGCGCCCCUCUUAGGAAGUGCCGCCCAGGGUUUGGAGUC GCACGCCCAGGCACAGAAACCAGUGACGUCGUCUGCAAGCCGUGUGCCCCGGGCACAUUCUCC AACACUACCUCAAGUACAGAUAUUUGUAGACCUCAUCAGAUCUGCAAUGUCGUGGCAAUUCCC GGUAACGCCUCGAUGGAUGCCGUGUGCACCUCUACGUCGCCCACUAGGUCCAUGGCCCCAGGA GCAGUACACUUACCUCAGCCUGUUAGCACACGCUCCCAGCACACGCAACCCACCCCUGAGCCU UCCACUGCACCGUCCACCAGCUUCCUGCUGCCCAUGGGCCCAAGUCCUCCAGCGGAGGGCAGC ACAGGGGACGAGCCAAAGUCCUGCGACAAAACCCAUACUUGUCCCCCUUGCCCCGCACCCGAA CUCCUUGGGGGACCAUCAGUAUUCUUGUUUCCCCCCAAGCCAAAGGACACAUUAAUGAUUUC UAGGACUCCGGAGGUGACUUGCGUCGUUGUUGACGUGAGCCACGAAGACCCAGAGGUGAAAU UCAACUGGUAUGUGGAUGGAGUCGAAGUUCACAAUGCGAAAACCAAACCUCGAGAGGAACAG UACAACUCAACCUAUAGGGUAGUGAGUGUUCUGACCGUGCUGCACCAGGACUGGCUCAAUGG GAAGGAAUACAAGUGUAAGGUAUCCAAUAAAGCCCUGCCUGCCCCUAUCGAAAAGACAAUAAG CAAGGCUAAGGGGCAACCUCGCGAACCCCAGGUGUACACGCUGCCACCAAGCAGAGAGGAGAU GACAAAAAACCAAGUGUCACUGACCUGCCUGGUGAAAGGCUUUUACCCGAGCGAUAUCGCUG UGGAGUGGGAGUCAAACGGACAACCCGAGAAUAACUAUAAAACCACGCCCCCCGUGCUGGAUU CAGACGGUUCUUUCUUCCUUUAUUCCAAGUUGACCGUGGACAAGUCUCGGUGGCAGCAGGGC AAUGUCUUUUCCUGUAGUGUCAUGCACGAAGCUCUACACAAUCAUUACACCCAAAAAAGCCUG UCACUCUCUCCCGGUAAA
펠그라스팀	AUGGCAGGCCCAGCUACGCAGAGCCCAAUGAAACUGAUGGCACUGCAGCUCCUGUUAUGGCAC AGCGCCCUGUGGACCGUCCAGGAAGCAACACCCCUCGGGCCUGCGUCCAGUCUCCCCCAGAGC UUUCUACUUAAAUGUCUAGAGCAGGUGCGGAAGAUCCAAGGAGACGGGGCCGCACUGCAGGA GAAGCUCUGCGCUACAUACAAGCUUUGUCACCCAGAGGAACUGGUGCUGUUAGGCCAUUCAC UGGGAAUCCCUUGGGCCCCUUUGUCUAGUUGCCCGUCCCAGGCUUUACAGUUGGCCGGCUGC CUGAGCCAGCUGCACUCCGGACUAUUUCUGUAUCAGGGACUUUUGCAGGCCCUGGAGGGUAU UUCCCCUGAGCUCGGGCCGACUCUGGAUACACUGCAGCUUGAUGUCGCCGACUUUGCUACUA CCAUAUGGCAACAAAUGGAGGAACUCGGUAUGGCCCCAGCGCUGCAACCCACCCAGGGGGCCA UGCCCGCUUUCGCGUCUGCCUUCCAGCGCAGAGCAGGCGGCGUGUUGGUGGCCUCACAUCUC CAAUCGUUCCUGGAAGUUUCUUACCGAGUACUCAGGCACUUGGCACAGCCC
휴미라	AUGGAAUUUGGACUGUCUUGGGUUUUUCUGGUAGCUCUGUUUCGUGGAGUGCAAUGCGAGG UUCAGCUUGUCGAGAGCGGCGGCGGUCUCGUGCAACCCGGACGGAGUCUGAGACUCAGCUGU GCUGCUUCAGGAUUUACCUUCGACGAUUAUGCGAUGCAUUGGGUGCGGCAGGCUCCUGGCAA AGGAUUAGAAUGGGUGAGCGCAAUUACAUGGAACUCUGGCCACAUCGACUACGCCGAUUCAG UGGAGGGCAGGUUCACCAUUAGCAGAGAUAAUGCUAAGAAUAGCUUAUACUUGCAGAUGAAC AGCCUGCGCGCCGAGGAUACUGCGGUGUACUAUUGCGCCAAGGUCAGUUAUCUGUCCACCGC CAGCUCCCUAGAUUAUUGGGGGCAGGGAACCUUGGUGACAGUCAGUUCCGCAAGCACGAAAG GGCCCAGCGUUUUCCCUCUCGCACCCUCUUCAAAAUCCACUUCAGGGGGGACAGCUGCACUGG GAUGUCUUGUCAAGGAUUACUUCCCCGAACCUGUGACCGUCUCAUGGAAUUCCGGUGCCUUG

	ACCUCAGGGGUGCAUACCUUCCCCGCAGUCCUUCAGAGUUCUGGACUCUACUCCCUGAGUUC UGUGGUAACAGUCCCUUCUAGCUCCCUCGGGACACAGACCUACAUUUGCAAUGUGAACCAUAA ACCGAGUAACACUAAAGUGGACAAAAAAGUAGAACCCAAAAGCUGCGAUAAGACCCACACGUG CCCCCCGUGUCCGGCCCCCGAGCUUCUGGGCGGCCCUUCGGUGUUCCUGUUUCCACCUAAGCC CAAAGACACACUGAUGAUCUCUCGCACUCCUGAAGUAACAUGCGUGGUGGUCGACGUGAGCC ACGAAGAUCCAGAAGUUAAGUUCAAUUGGUAUGUUGACGGGGUGGAGGUGCACAACGCCAAG ACUAAGCCAAGGGAGGAGCAAUACAAUUCCACAUACCGAGUUGUCAGCGUACUUACGGUUCU GCACCAAGACUGGCUAAAUGGUAAAGAGUACAAGUGUAAGGUGUCUAACAAAGCCCUGCCAG CGCCGAUAGAAAAGACUAUCUCAAAAGCAAAGGGCCAGCCCAGAGAACCUCAGGUGUACACCU UGCCACCAUCAAGGGACGAGCUCACCAAGAAUCAGGUUAGUCUCACCUGUCUGGUGAAGGGG UUCUAUCCAUCCGACAUCGCCGUGGAGUGGGAGAGUAACGGCCAGCCCGAAAACAAUUACAAG ACGACACCACCAGUCUUGGAUAGCGACGGUUCUUUCUUUCUAUAUUCGAAGCUCACUGUCGA CAAGUCGCGGUGGCAGCAGGGCAACGUAUUUAGCUGCUCCGUCAUGCAUGAGGCCCUGCACA ACCACUAUACUCAAAAAUCCCUGUCCUUAUCUCCUGGCAAG
리툭시맙	AUGAAGUAUCUACUGCCUACCGCUGCAGCUGGGCUGUUGCUUCUGGCUGCUCAACCAGCCAU GGCUCAGAUCGUGCUCUCCCAGUCCCCCGCGAUUUUGAGCGCAUCCCCAGGCGAGAAGGUAAC AAUGACGUGCCGCGCGAGCAGUUCAGUGUCUUACAUCCACUGGUUCCAGCAAAAGCCAGGCUC UAGCCCCAAGCCCUGGAUUUACGCAACCAGCAAUCUUGCCAGUGGCGUCCCGGUGAGGUUCUC GGGGUCUGGAAGCGGUACAUCUUAUAGUCUCACCAUAAGCAGGGUAGAGGCCGAGGACGCCG CUACUUACUAUUGCCAGCAGUGGACCUCUAACCCACCCACCUUCGGCGGUGGAACCAAGCUGG AAAUCAAACGAACAGUCGCCGCCCCGUCCGUGUUUAUCUUCCCUCCUUCUGACGAGCAGCUGA AAUCCGGGACCGCAUCCGUCGUUUGUCUACUGAACAACUUUUACCCCCGGGAAGCAAAAGUCC AGUGGAAGGUUGAUAACGCCCUCCAAAGUGGAAAUAGCCAGGAAUCAGUGACUGAGCAAGAU UCCAAAGAUAGUACUUACAGCUUAUCAAGCACGCUCACUCUGUCCAAAGCCGACUAUGAAAAA CACAAGGUGUACGCCUGUGAGGUGACACAUCAGGGGCUGUCAUCACCUGUUACAAAGUCGUU UAAUAGAGGCGAAUGC
로미플로스팀	AUGAAAUGGGUUACGUUCAUCUCCUUGCUGUUCCUGUUCUCUUCCGCUUACUCCGAUAAAAC ACAUACCUGUCCCCCAUGUCCCGCCCCCGAGCUCCUCGGCGGUCCCAGUGUGUUUCUGUUUCC ACCAAAACCCAAGGACACUCUCAUGAUAAGCCGCACGCCCGAGGUUACAUGCGUCGUCGUCGA CGUCUCCCACGAGGAUCCGGAGGUGAAAUUUAACUGGUAUGUAGAUGGCGUGGAAGUGCACA ACGCAAAAACCAAGCCCCGUGAAGAACAAUACAACUCCACAUACAGGGUCGUGAGCGUGCUGA CUGUACUCCAUCAGGAUUGGUUAAAUGGCAAGGAGUAUAAGUGUAAGGUGAGUAAUAAGGCC CUACCUGCACCUAUUGAAAAGACAAUUAGCAAAGCCAAGGGCCAGCCGAGGGAGCCACAGGUG UAUACACUGCCACCCAGCCGGGAUGAGUUAACAAAGAAUCAGGUUUCACUCACCUGCCUUGUA AAAGGUUUUUACCCAUCAGACAUCGCUGUGGAAUGGGAGUCUAACGGACAGCCUGAAAACAA CUAUAAAACCACUCCUCCUGUGCUGGACUCUGACGGAUCGUUCUUCUUGUACUCAAAACUAAC CGUGGACAAGAGUAGAUGGCAGCAGGGAAAUGUUUUCUCAUGCAGCGUCAUGCACGAGGCCC UGCAUAAUCACUACACCCAGAAGAGUUUGUCUCUGAGCCCGGGUAAGGGAGGCGGCGGGGGC AUCGAAGGGCCUACUCUGAGACAAUGGCUGGCAGCCCGGGCUGGCGGGGGUGGAGGGGGGG AGGCAUCGAGGGGCCAACCCUUCGCCAAUGGCUUGCGGCGCGAGCC
살그라모스팀	AUGUGGCUGCAAUCCCUGCUGCUGCUUGGCACAGUGGCAUGCUCCAUCAGCGCUCCUGCCCG AUCUCCCUCACCCAGCACACAACCCUGGGAGCAUGUCAAUGCGAUACAGGAGGCCCUCCGGCU CUUAAAUCUCUCGCGCGAUACUGCAGCUGAGAUGAACGAAACCGUGGAAGUGAUCAGUGAAA

[0882]

	UGUUCGAUCUGCAGGAACCCACCUGUCUGCAGACCAGGCUAGAGUUGUACAAACAGGGCUUG AGAGGAUCACUAACUAAACUUAAGGGGCCUCUGACGAUGAUGGCCUCCCACUAUAAGCAGCAC UGUCCACCAACUCCAGAAACAAGUUGCGCCACACAGAUCAUUACCUUUGAGAGCUUUAAGGAG AACUUAAAAGACUUCCUCCUGGUUAUUCCUUUCGACUGCUGGGAGCCGGUACAGGAG
할CD19	AUGGGUGUCCCUACCCAGCUCCUGGGACUGCUCCUGCUGUGGAUCACCGACGCCAUCUGCGAC AUCCAGAUGACCCAGAGCCCUGCCAGCCUGUCUACCAGCCUGGGCGAGACAGUGACCAUCCAG UGUCAGGCCAGCGAGGACAUCUACUCUGGCCUGGCUUGGUAUCAGCAGAAGCCCGGCAAGAG CCCUCAGCUGCUGAUCUACGGCGCCAGCGACCUGCAGGACGGCGUGCCUAGCAGAUUCAGCGG CAGCGGCUCCGGAACCCAGUACAGCCUGAAGAUCACCAGCAUGCAGACCGAGGACGAGGGCGU GUACUUCUGCCAGCAAGGCCUGACCUACCCUAGAACCUUCGGAGGAGGCACCAAGCUGGAACU GAAGGGCGGAGGCGGAAGUGGAGGCGGAGGAUCUGGCGGCGGAGGCUCUGAAGUGCAGCUGC AGCAGUCUGGCGCUGAACUGGUCCGGCCUGGCACUAGCGUGAAGCUGUCCUGCAAGGUGUCC GGCGACACCAUCACCUUCUACUACAUGCACUUCGUGAAGCAGAGGCCAGGACAGGGCCUGGAA UGGAUCGGCAGAAUCGACCCUGAGGACGAGAGCACCAAGUACAGCGAGAAGUUCAAGAACAAG GCCACCCUGACCGCCGACACCAGCAGCAACACCGCCUACCUGAAGCUGUCUAGCCUGACCUCC GAGGACACCGCCACCUACUUUUGCAUCUACGGCGGCUACUACUUCGACUACUGGGGCCAGGGC GUGAUGGUCACCGUGUCCAGCAUCGAGUUCAUGUACCCCCCUCCCUACCUGGACAACGAGAGA AGCAACGGCACCAUCAUCCACAUCAAAGAAAAGCACCUGUGCCACACCCAGAGCAGCCCCAAGC UGUUCUGGGCCCUGGUGGUGGUGGCCGGCGUGCUGUUCUGUUACGGCCUGCUGGUCACAGU GGCCCUGUGCGUGAUCUGGACCAACAGCAGAAGAAACAGAGGCGGCCAGAGCGACUACAUGAA CAUGACCCCCAGAAGGCCAGGCCUGACCAGAAAGCCCUACCAGCCCUACGCCCCUGCCAGAGAC UUCGCCGCCUACAGACCCAGAGCCAAGUUCAGCAGAUCCGCCGAGACAGCCGCCAACCUGCAG GAUCCCAACCAGCUGUUCAACGAGCUGAACCUGGGCAGACGGGAGGAAUUCGACGUGCUGGA AAAGAAGAGAGCCAGGGACCCCGAGAUGGGCGGCAAGCAGCAGAGAAGAAGAAACCCUCAGGA AGGCGUCUACAACGCCCUGCAGAAAGACAAGAUGGCCGAGGCCUACAGCGAGAUCGGCACCAA GGGCGAGAGAAGAAGGGGCAAGGGCCACGAUGGCCUGUUCCAGGGCCUGUCCACCGCCACCAA GGACACCUUCGACGCCCUGCACAUGCAGACCCUGGCCCCCAGA
IL-15	MRISKPHLRS ISIQCYLCLL LNSHFLTEAG IHVFILGCFS AGLPKTEANW VNVISDLKKI EDLIQSMHID ATLYTESDVH PSCKVTAMKC FLLELQVISL ESGDASIHDT VENLIILANN SLSSNGNVTE SGCKECEELE EKNIKEFLQS FVHIVQMFIN TS
IL-15	ATGAGAATTTCGAAACCACATTTGAGAAGTATTTCCATCCAGTGCTACTTGTGTTTACTTCTAAACAG TCATTTTCTAACTGAAGCTGGCATTCATGTCTTCATTTTGGGCTGTTTCAGTGCAGGGCTTCCTAAAA CAGAAGCCAACTGGGTGAATGTAATAAGTGATTTGAAAAAAATTGAAGATCTTATTCAATCTATGCA TATTGATGCTACTTTATATACGGAAAGTGATGTTCACCCCAGTTGCAAAGTAACAGCAATGAAGTGC TTTCTCTTGGAGTTACAAGTTATTTCACTTGAGTCCGGAGATGCAAGTATTCATGATACAGTAGAAAA TCTGATCATCCTAGCAAACAACAGTTTGTCTTCTAATGGGAATGTAACAGAATCTGGATGCAAAGAA TGTGAGGAACTGGAGGAAAAAAATATTAAAGAATTTTTGCAGAGTTTTGTACATATTGTCCAAATGT TCATCAACACTTCTTGA
IL-15RA	MAPRRARGCRTLGLPALLLLLLLRPPATRGITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSL TECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRDPALVHQRPAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNNTAAT TAAIVPGSQLMPSKSPSTGTTEISSHESSHGTPSQTTAKNWELTASASHQPPGVYPQGHSDTTVAISTST VLLCGLSAVSLLACYLKSRQTPPLASVEMEAMEALPVTWGTSSRDEDLENCSHHL

[0883]

IL-15RA	ATGGCCCCGCGGCGGGCGCGCGGCTGCCGGACCCTCGGTCTCCCGGCGCTGCTACTGCTGCTGCT GCTCCGGCCGCCGGCGACGCGGGGCATCACGTGCCCTCCCCCCATGTCCGTGGAACACGCAGACA TCTGGGTCAAGAGCTACAGCTTGTACTCCAGGGAGCGGTACATTTGTAACTCTGGTTTCAAGCGTAA AGCCGGCACGTCCAGCCTGACGGAGTGCGTGTTGAACAAGGCCACGAATGTCGCCCACTGGACAA CCCCCAGTCTCAAATGCATTAGAGACCCTGCCCTGGTTCACCAAAGGCCAGCGCCACCCTCCACAG TAACGACGGCAGGGGTGACCCCACAGCCAGAGAGCCTCTCCCCTTCTGGAAAAGAGCCCGCAGCT TCATCTCCCAGCTCAAACAACACAGCGGCCACAACAGCAGCTATTGTCCCGGGCTCCCAGCTGATG CCTTCAAAATCACCTTCCACAGGAACCACAGAGATAAGCAGTCATGAGTCCTCCCACGGCACCCCC TCTCAGACAACAGCCAAGAACTGGGAACTCACAGCATCCGCCTCCCACCAGCCGCCAGGTGTGTAT CCACAGGGCCACAGCGACACCACTGTGGCTATCTCCACGTCCACTGTCCTGCTGTGTGGGCTGAGC GCTGTGTCTCTCCTGGCATGCTACCTCAAGTCAAGGCAAACTCCCCCGCTGGCCAGCGTTGAAATG GAAGCCATGGAGGCTCTGCCGGTGACTTGGGGGACCAGCAGCAGAGATGAAGACTTGGAAAACTG CTCTCACCACCTATGA

[0884]

[0885] **실시예 9. LPMP/mRNA 제형을 이용한 미처리 마우스에서의 IL-15 발현**

[0886] 본 실시예는 mRNA(예를 들어, IL-15에 대한 mRNA)를 캡슐화하기 위해, 이온화 가능 지질(C12-200), 스테롤(콜레스테롤), 및 PEG 지질(DMPE-PEG2k)로 재구성된 레몬 지질을 포함하는 recLemon LPMP/mRNA 제형을 기술한다. 본 실시예에서 시험된 recLemon LPMP/mRNA 제형은 실시예 2에 따라 제조되었다. 본 실시예에서 사용된 IL-15 mRNA의 코딩 부분은 다음과 같다:

[0887] MRISKPHLRS ISIQCYLCLL LNSHFLTEAG IHVFILGCFS AGLPKTEANW VNVISDLKKI EDLIQSMHID ATLYTESDVH PSCKVTAMKC FLLELQVISL ESGDASIHDT VENLIILANN SLSSNGNVTE SGCKECEELE EKNIKEFLQS FVHIVQMFIN TS

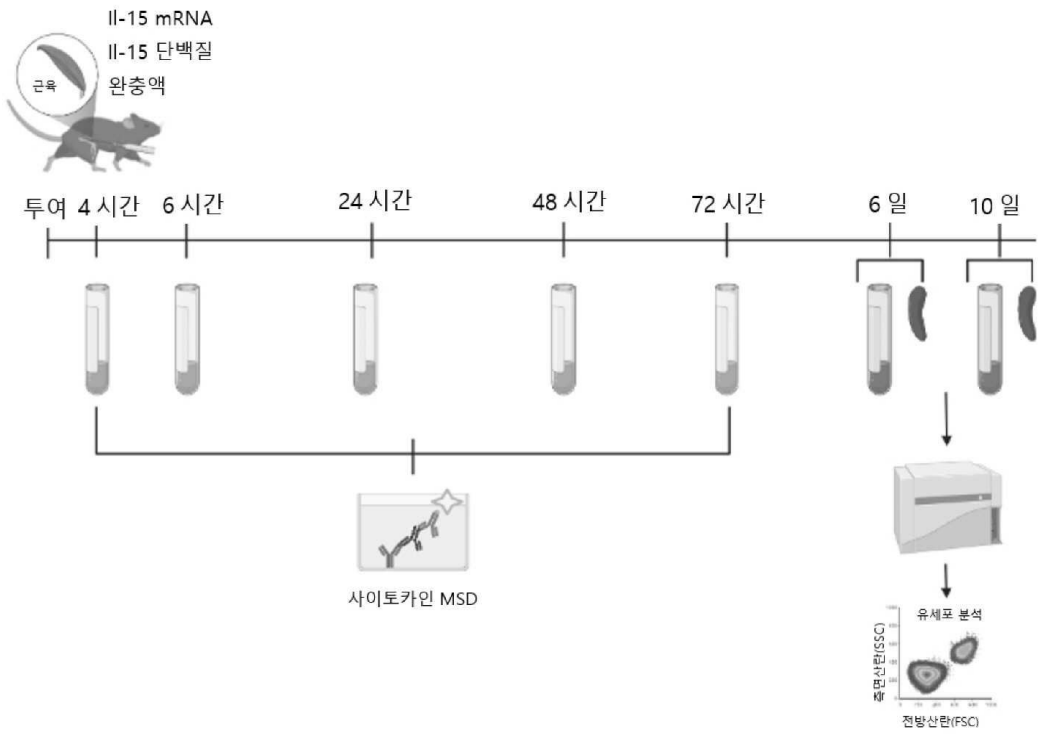
[0888] 또는

[0889] ATGAGAATTTCGAAACCACATTTGAGAAGTATTTCCATCCAGTGCTACTTGTGTTTACTTCTAAACAGTCATTTTCTAACTGAAGCTGGCATTCATGTCTTC ATTTTGGGCTGTTTCAGTGCAGGGCTTCCTAAAACAGAAGCCAACTGGGTGAATGTAATAAGTGATTTGAAAAAAATTGAAGATCTTATTCAATCTATGCAT ATTGATGCTACTTTATATACGGAAAGTGATGTTCACCCCAGTTGCAAAGTAACAGCAATGAAGTGCTTTCTCTTGGAGTTACAAGTTATTTCACTTGAGTCC GGAGATGCAAGTATTCATGATACAGTAGAAAATCTGATCATCCTAGCAAACAACAGTTTGTCTTCTAATGGGAATGTAACAGAATCTGGATGCAAAGAATGT GAGGAACTGGAGGAAAAAAATATTAAAGAATTTTTGCAGAGTTTTGTACATATTGTCCAAATGTTCATCAACACTTCTTGA

[0890] 본 실시예에서, recLemon LPMP/mRNA 제형(10㎍의 IL-15 mRNA)의 근육내 투여 시 IL-15의 생체 내 수준 및 전신 사이토카인에 미치는 영향을 측정하였으며; recLemon LPMP/mRNA 제형(10㎍ IL-15 mRNA)의 근육내 전달이 T 세포 및 NK 세포 생체 내 증식 및 세포 내 사이토카인 생성(근육내 투여 후 6일 및 10일 차의 CD8 T 세포, CD4 T 세포, 및 NK 세포의 수)에 미치는 영향을 평가하였다. 연구는 BotaMouse_212에서 수행되었다. 치료 일정은 아래 차트에 도시되어 있으며 반응식 3에 예시되어 있다.

[0891]

그룹	치료	동물 수	투여량 농도
A	IL-15 mRNA	6	10ug/20ul; IM (0.4mg/kg)
B	IL-15 단백질	6	
C	완충액	6	



[0892]

[0893] 반응식 3

[0894] 본 실시예는 마우스에서 recLemon LPMP/mRNA 제형(IL-15)의 단일 투여량이 생체 내 IL-15를 발현하여 투여 후 최대 72시간 동안 높은 전신 수준에 도달할 수 있었고; T 세포 사이토카인 IFNɣ의 방출을 유도할 수 있었음을 입증하여 면역 반응을 강화하는 역할을 강조할 수 있고; 혈청에서 전염증성 사이토카인 및 케모카인의 생성을 유도할 수 있었고; 비장에서 NK 세포뿐만 아니라 CD4+ 및 CD8+ T 세포 둘 모두의 절대 수를 증가시켰음을 입증하였다. 마우스에서 recLemon LPMP/mRNA 제형(IL-15)의 단일 근육내 투여량은 투여 후 10일 차에 비장의 NK 세포로부터 IL-2Ra 발현 및 IFNɣ 생성을 증가시킬 수 있었다.

[0895] 이러한 결론은 도 18 내지 도 22에 도시되어 있다.

[0896] **실시예 10. LPMP/mRNA 제형을 이용한 미처리 NHP에서의 IL-15 및 IL-2 발현**

[0897] 본 실시예는 mRNA(예를 들어, IL-15 또는 IL-2에 대한 mRNA)를 캡슐화하기 위해, 이온화 가능 지질(C12-200), 스테롤(콜레스테롤), 및 PEG 지질(DMPE-PEG2k)로 재구성된 레몬 지질을 포함하는 recLemon LPMP/mRNA 제형을 기술한다. 본 실시예에서 시험된 recLemon LPMP/mRNA 제형은 실시예 2에 따라 제조되었다. 본 실시예에서 사용된 IL-2 mRNA의 코딩 부분은 다음과 같다:

[0898] MYRMQLLSCI ALSLALVTNS APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFCQSIIS TLT

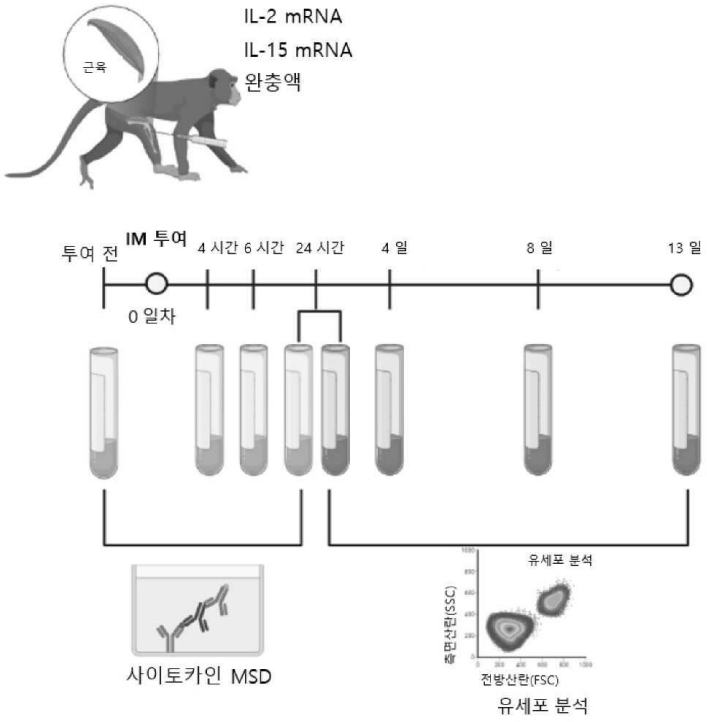
[0899] 본 실시예에서 사용된 IL-15 mRNA의 코딩 부분은 다음과 같다:

[0900] MRISKPHLRS ISIQCYLCLL LNSHFLTEAG IHVFILGCFS AGLPKTEANW VNVISDLKKI EDLIQSMHID ATLYTESDVH PSCKVTAMKC FLLELQVISL ESGDASIHDT VENLIILANN SLSSNGNVTE SGCKECEELE EKNIKEFLQS FVHIVQMFIN TS

[0901] 본 실시예에서, recLemon LPMP/mRNA 제형(IL-15 mRNA 또는 IL-2 mRNA)의 근육 내 투여의 효과를 측정하였다. 연구는 비인간 영장류(NHP)를 대상으로 수행하였다. 치료 일정은 아래 차트에 도시되어 있으며 반응식 4에 예시되어 있다.

군	치료	입자	투여량 및 RoA
1 (N=3)	IL-15 mRNA	Lm; C12-200	IM; 100ug (0.02mg/kg)
2 (N=3)	IL-15 mRNA	Lm; C12-200	IM; 30ug (0.006mg/kg)
3 (N=3)	IL-2 mRNA	Lm; C12-200	IM; 30ug (0.006mg/kg)

[0902]



[0903] 반응식 4

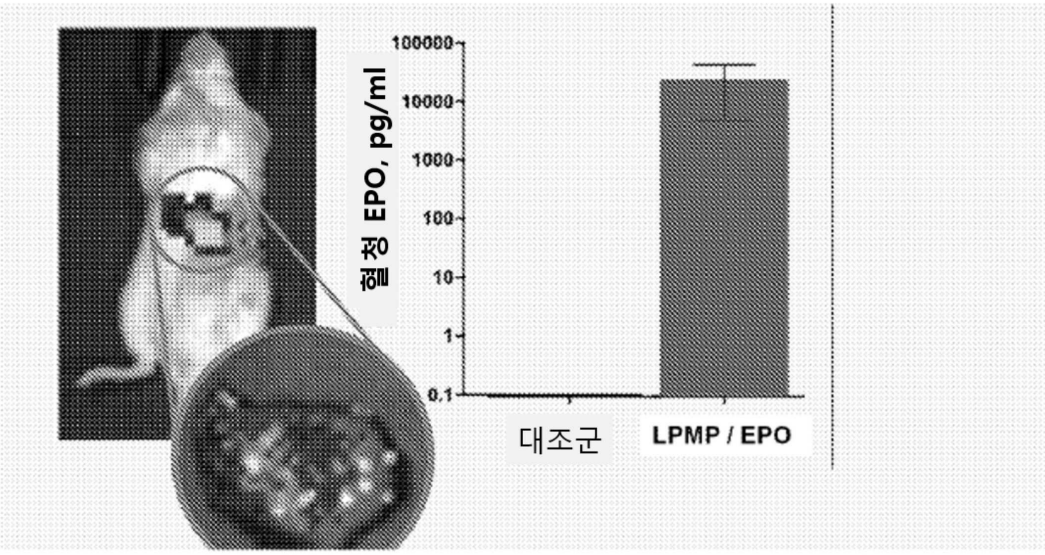
[0904] 본 실시예는 NHP에서 recLemon LPMP/mRNA 제형(IL-15)의 단일 근육내 투여량이 T 세포 및 NK 세포에서 IL-2Ra(CD25)의 수준을 상승시키고, 투여 후 24시간 차(1일 차)에 혈액에서 그랜자임 B/퍼포린 및 IFNɣ를 생산하는 CD8 T 세포 및 NK 세포의 빈도를 증가시킨다는 것을 입증하였다. 투여 4일 후에, recLemon LPMP/mRNA 제형(IL-15 및 IL-2)의 단일 근육내 투여량이 혈액 내 T 세포 및 NK 세포에서 그랜자임 B 및 IFNɣ의 수준을 상승시킬 뿐만 아니라, 이들 세포의 증식을 증가시켰다. 투여 4일 후에, recLemon LPMP/mRNA 제형(IL-15)의 단일 근육내 투여량이 혈액 내 T 세포 및 NK 세포에서 IL-2Ra(CD25)를 증가시켰다. 투여 8일 후에, recLemon LPMP/mRNA 제형(IL-15 및 IL-2)의 단일 근육내 투여량이 그랜자임 B/퍼포린을 생산하는 순환 CD8 T 세포 및 NK 세포의 빈도를 증가시키고, 혈액 내 NK 세포에서 IL-2Ra(CD25)의 발현을 증가시킨다. recLemon LPMP/IL-15에 반응하여 투여 후 8일 차에 CD8 T 세포에서 IFNɣ의 빈도가 증가하고 혈액 내 CD8 T 세포 및 NK 세포의 더 높은 빈도가 확인되었다. 투여 13일 후에, recLemon LPMP/mRNA 제형(IL-15 및 IL-2)의 단일 근육내 투여량에 반응하여 순환 T 세포 및 NK 세포의 수 증가가 검출되었으며, 이는 면역 세포의 장기 지속적인 증식을 나타낸다. recLemon LPMP/mRNA 제형(IL-15)의 단일 근육내 투여량에 반응하여 T 세포 및 NK 세포에서 IL-2Ra(CD25)의 발현 증가가 투여 후 13일 차에 혈액에서 확인되었으며, 이는 면역 세포의 장기 지속적인 활성화를 나타낸다. 4시간, 6시간, 24시간, 4일(96시간), 8일(192시간), 및 13일(312시간) 차에 측정된 IL-15 및 IL-2의 사이토카인 수준은

recLemon LPMP/mRNA 제형(**IL-15 및 IL-2**)의 단일 근육내 투여량이 각각의 면역 사이토카인의 전신 발현을 증가시키며, **IL-15 mRNA**는 수일 동안 IL-15의 장기 지속적인 발현 증가를 생성함을 나타낸다(도 33a). recLemon LPMP/mRNA 제형(IL-15 및 IL-2)의 단일 근육내 투여 후 13일에 걸친 CD56+ NK 세포의 증식은 NHP의 혈액에서 투여 후 4일 차에 피크를 보여준다. 4시간, 6시간, 24시간, 4일(96시간), 8일(192시간) 및 13일(312시간) 차에 측정된 전염증성 사이토카인(IP-10, IFNγ, IL-6)의 전신 수준은 recLemon LPMP/mRNA 제형(**IL-15 및 IL-2**)의 단일 근육내 투여량이 면역 반응을 나타내는 수준은 증가시켰지만 독성을 나타내는 발현 수준은 증가시키지 않았음을 보여준다(도 35). 투여 후 6시간 차에 측정된 IL-15 생산의 전신 수준은 쥣과 모델에서의 투여량에 기초한 기대 수준(도 36a)이 비인간 영장류 모델에서의 투여량에 기초한 유사한 수준에 상응함을 보여주며, 이는 다양한 투여량 및 동물 모델에 걸쳐 일관성을 나타낸다.

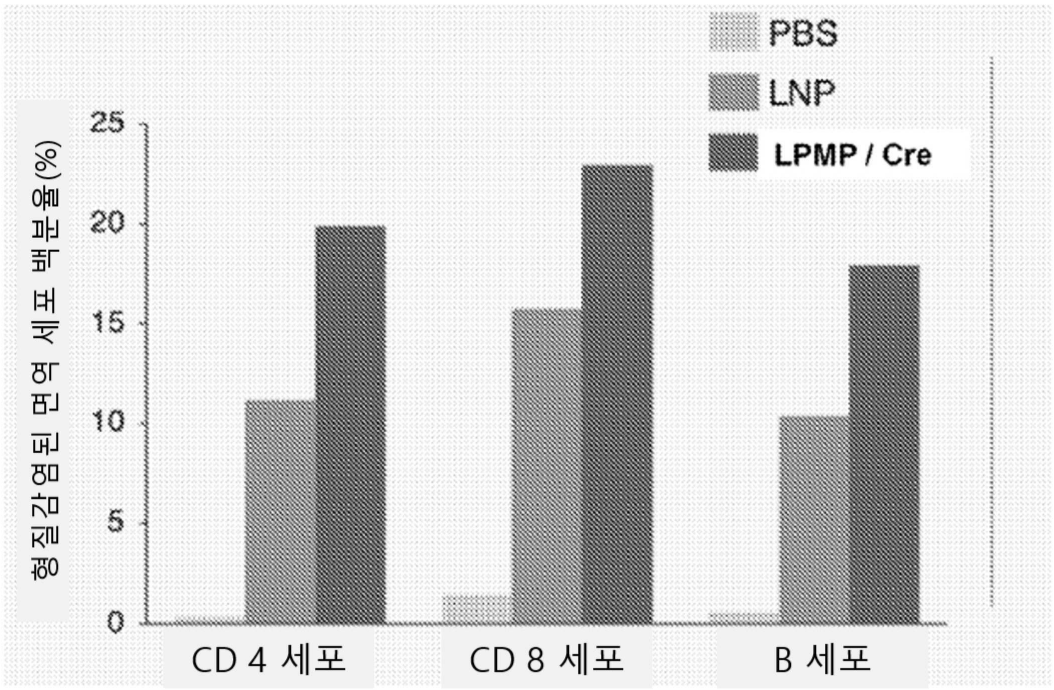
[0905] 전술한 발명이 이해의 명확성을 위해 예시 및 실시예에 의해 일부 상세히 설명되었지만, 설명 및 실시예는 본 발명의 범주를 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다. 본원에 인용된 모든 특허 및 과학 문헌의 개시는 명시적으로 그 전체가 참조로서 통합된다. 다른 구현예들은 청구범위 내에 속한다.

도면

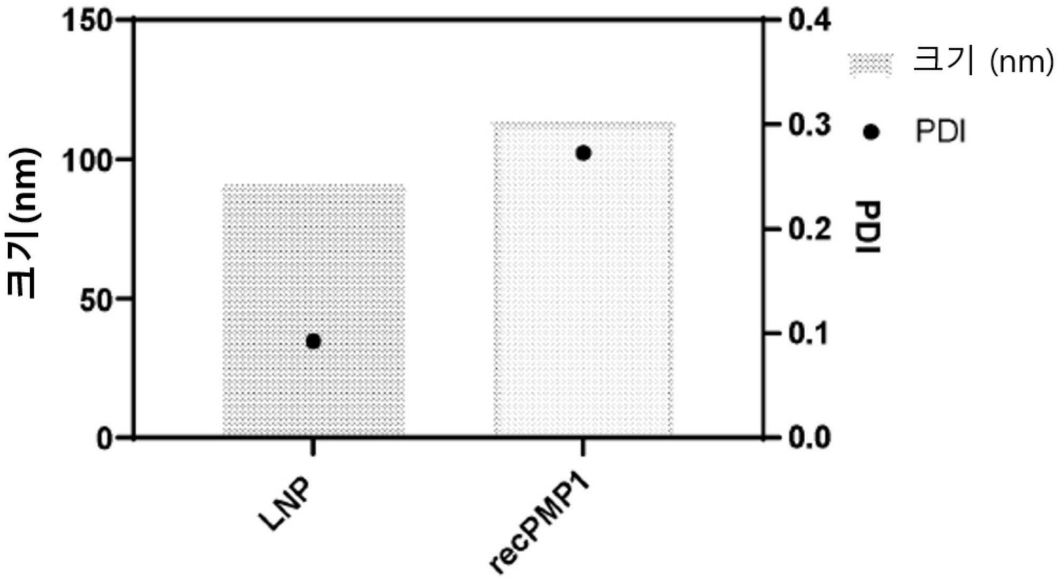
도면1



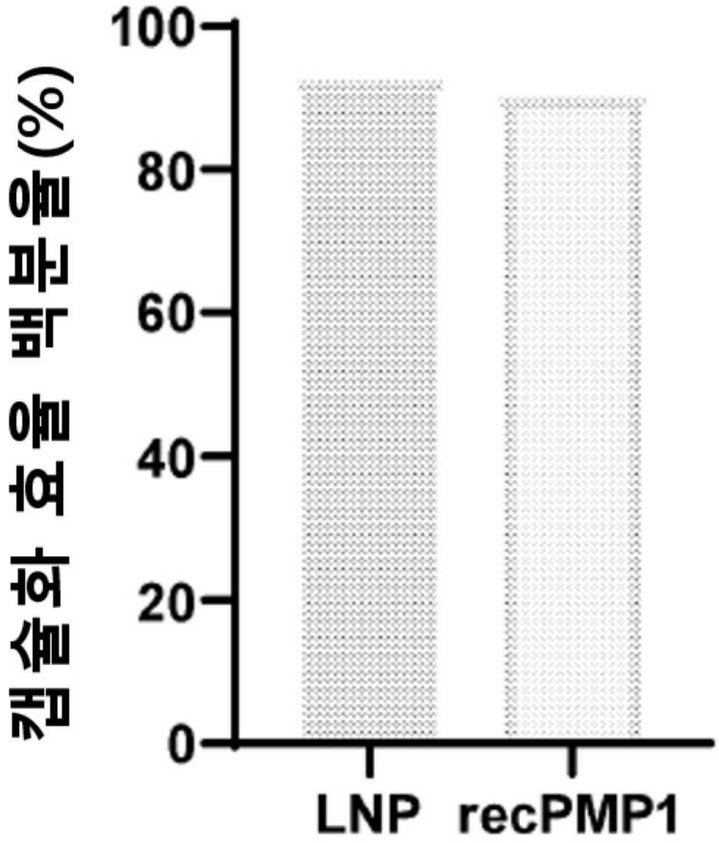
도면2


PBS
LNP
LPMP / Cre
형질감염된 면역 세포 백분율(%)
25
20
15
10
5
0
CD 4 세포
CD 8 세포
B 세포

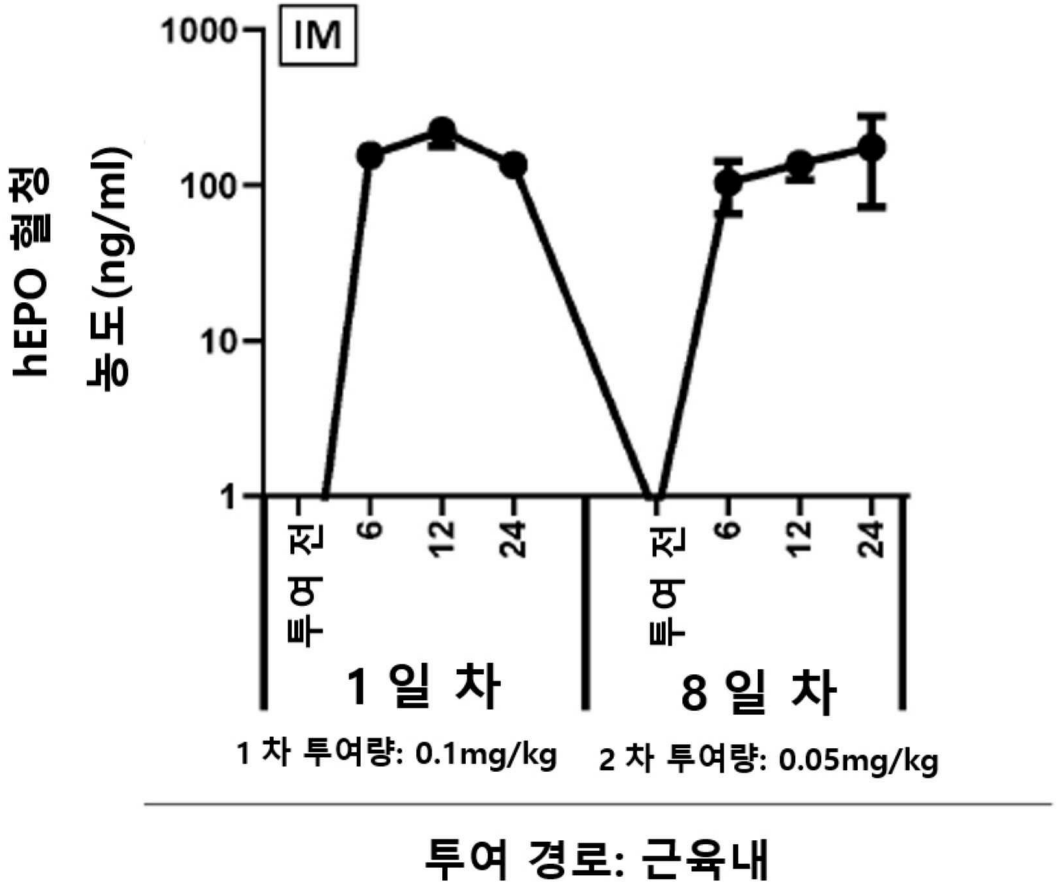
도면3a


150
100
50
0
크기(nm)
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
PDI
크기 (nm)
PDI
LNP
recPMP1

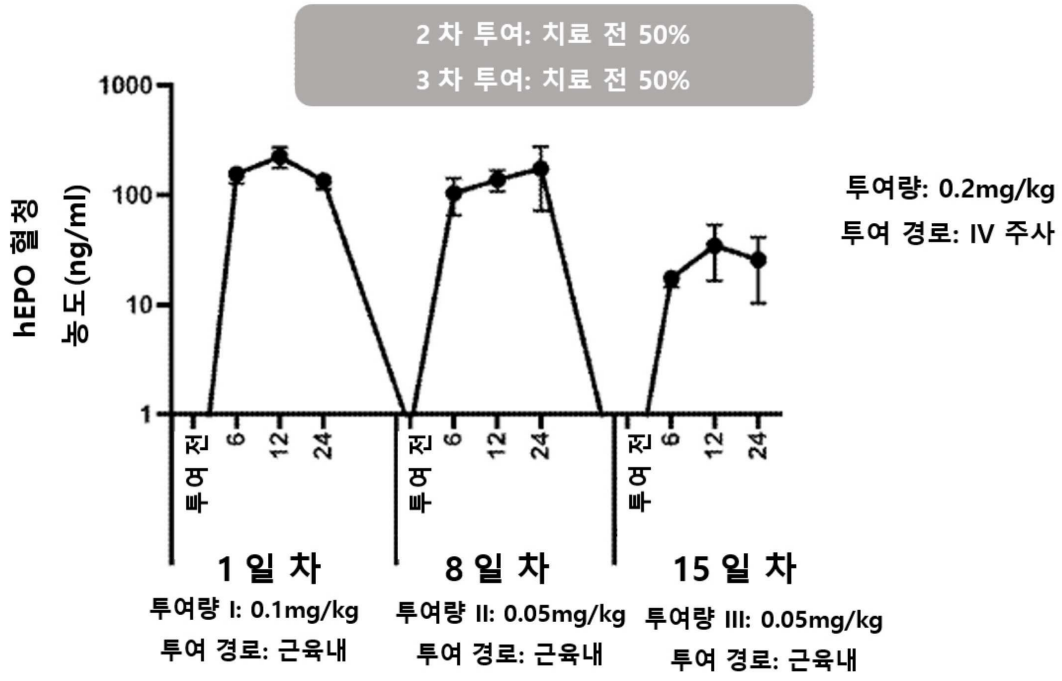
도면3b



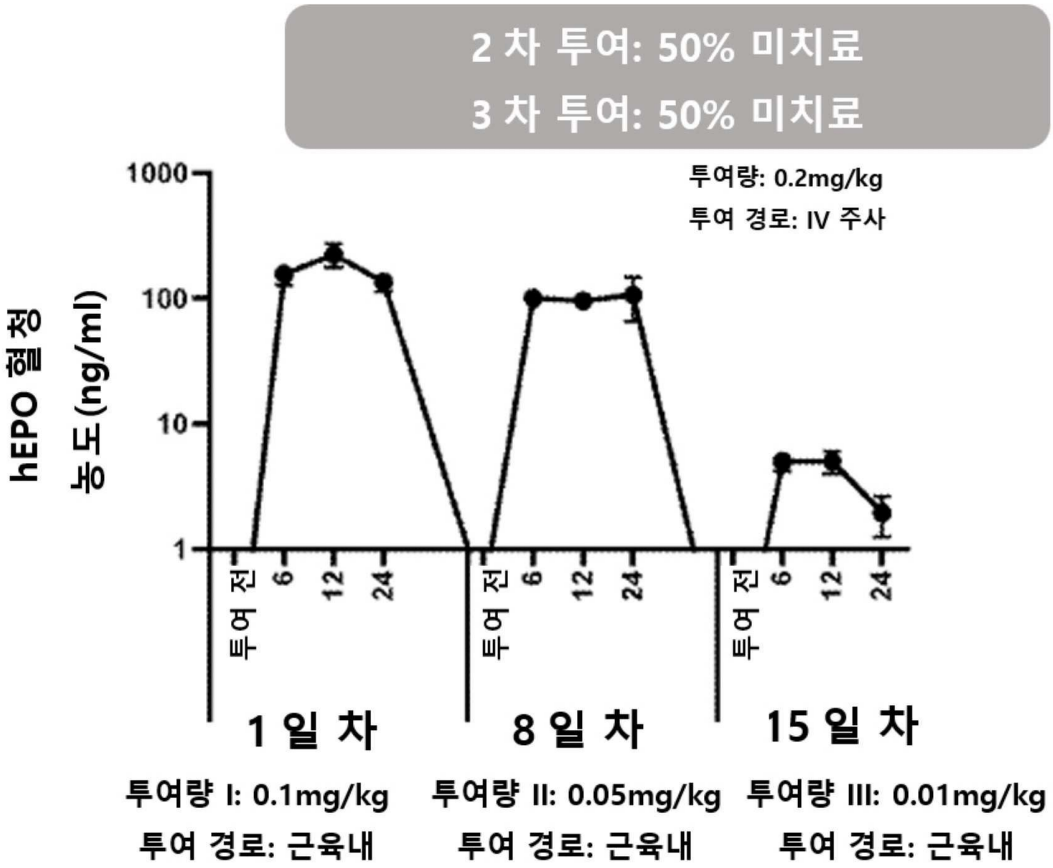
도면4


IM
hEPO 혈청 농도(ng/ml)
1000
100
10
1
투여 전
6
12
24
1 일 차
8 일 차
1 차 투여량: 0.1mg/kg
2 차 투여량: 0.05mg/kg
투여 경로: 근육내

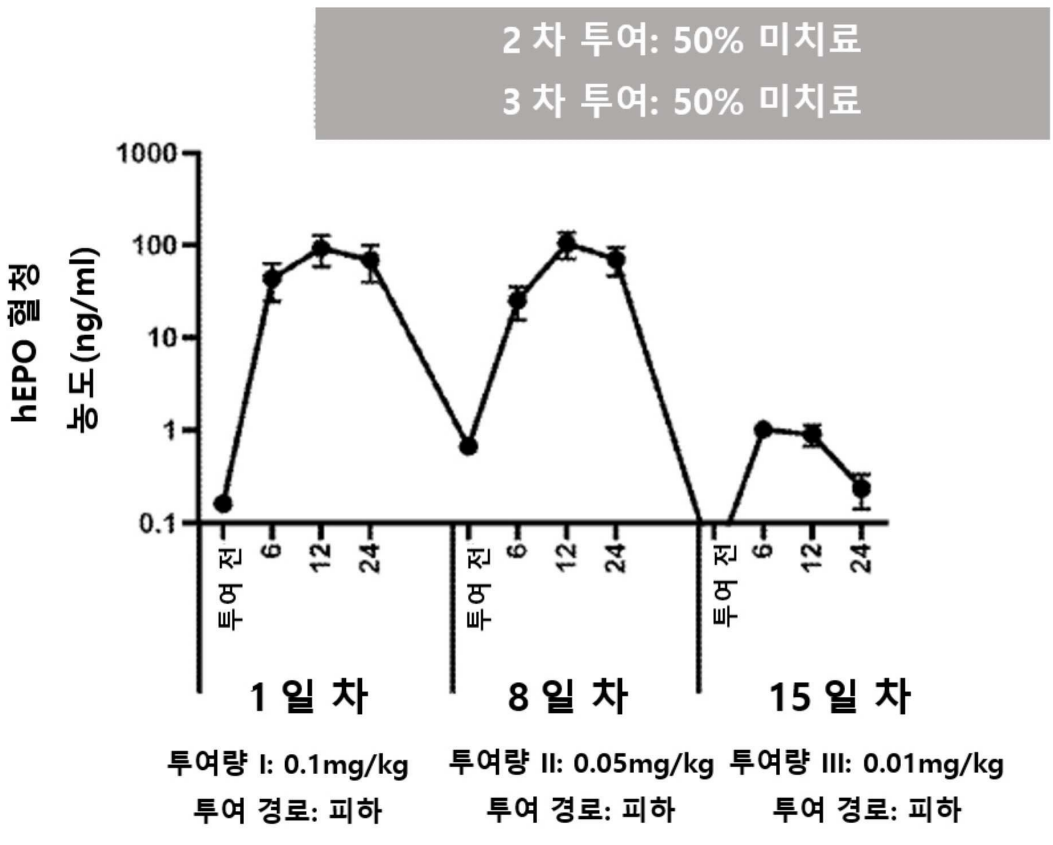
도면5


2 차 투여: 치료 전 50%
3 차 투여: 치료 전 50%
hEPO 혈청 농도(ng/ml)
1000
100
10
1
투여 전
6
12
24
1 일 차
8 일 차
15 일 차
투여량 I: 0.1mg/kg
투여 경로: 근육내
투여량 II: 0.05mg/kg
투여 경로: 근육내
투여량 III: 0.05mg/kg
투여 경로: 근육내
투여량: 0.2mg/kg
투여 경로: IV 주사

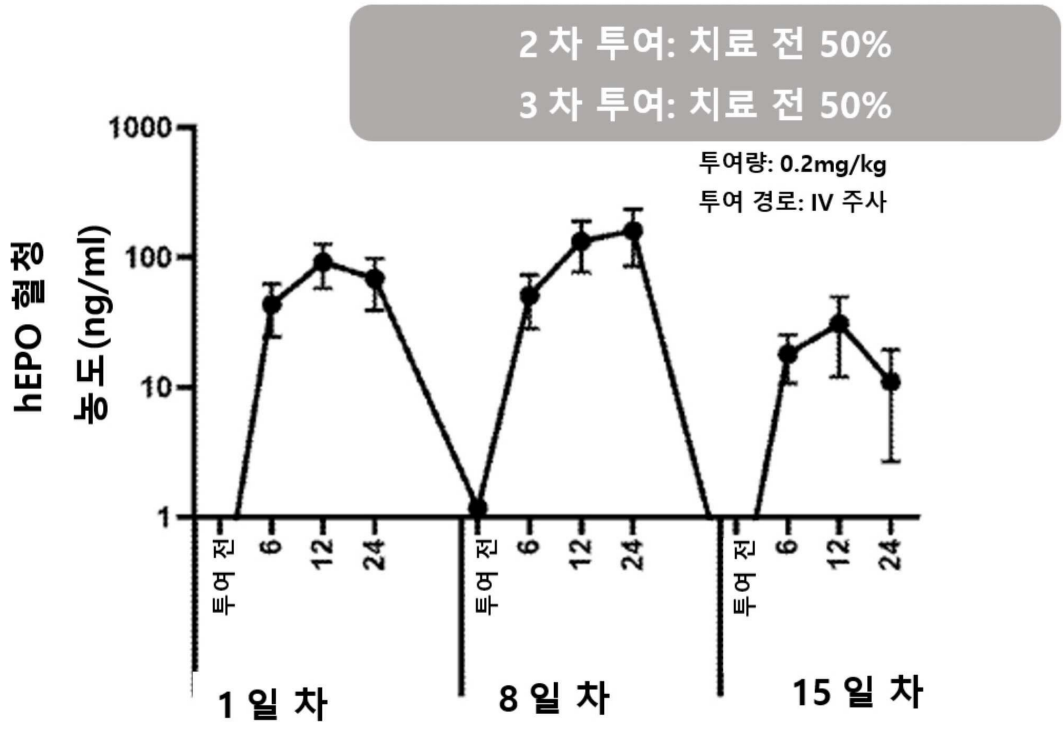
도면6


2 차 투여: 50% 미치료
3 차 투여: 50% 미치료
투여량: 0.2mg/kg
투여 경로: IV 주사
hEPO 혈청 농도(ng/ml)
1000
100
10
1
투여 전
6
12
24
1 일 차
8 일 차
15 일 차
투여량 I: 0.1mg/kg
투여 경로: 근육내
투여량 II: 0.05mg/kg
투여 경로: 근육내
투여량 III: 0.01mg/kg
투여 경로: 근육내

도면7


2 차 투여: 50% 미치료
3 차 투여: 50% 미치료
hEPO 혈청 농도(ng/ml)
1000
100
10
1
0.1
투여 전
6
12
24
1 일 차
8 일 차
15 일 차
투여량 I: 0.1mg/kg
투여 경로: 피하
투여량 II: 0.05mg/kg
투여 경로: 피하
투여량 III: 0.01mg/kg
투여 경로: 피하

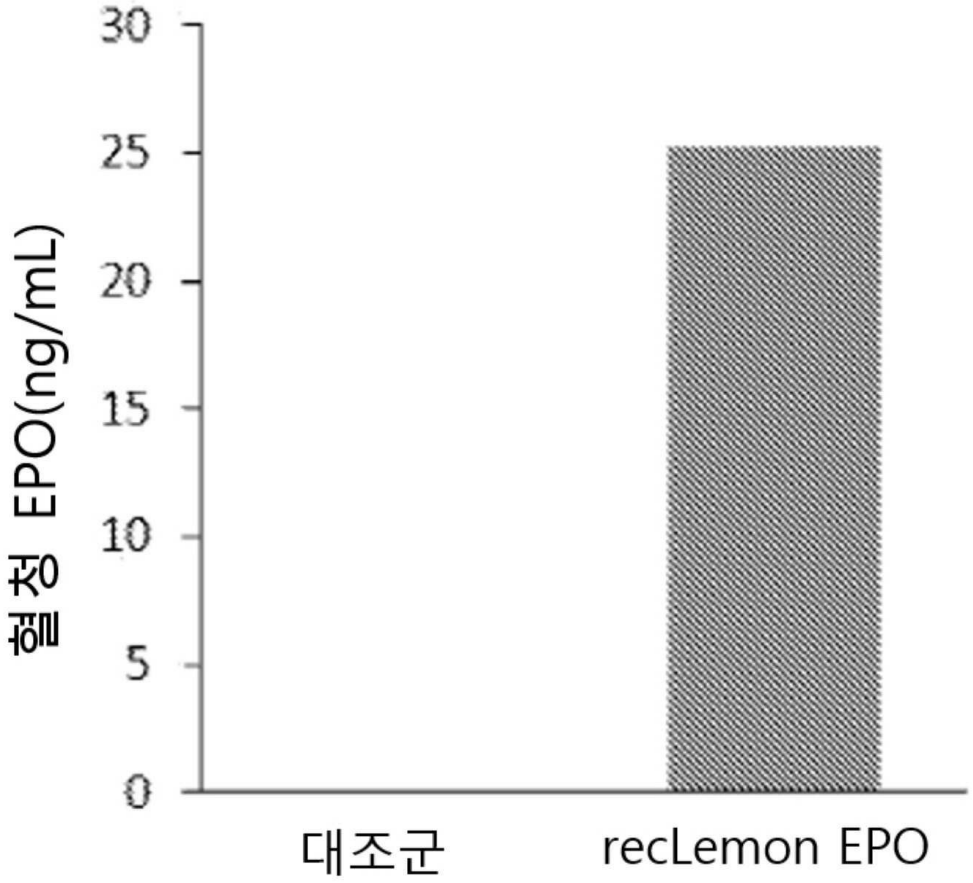
도면8



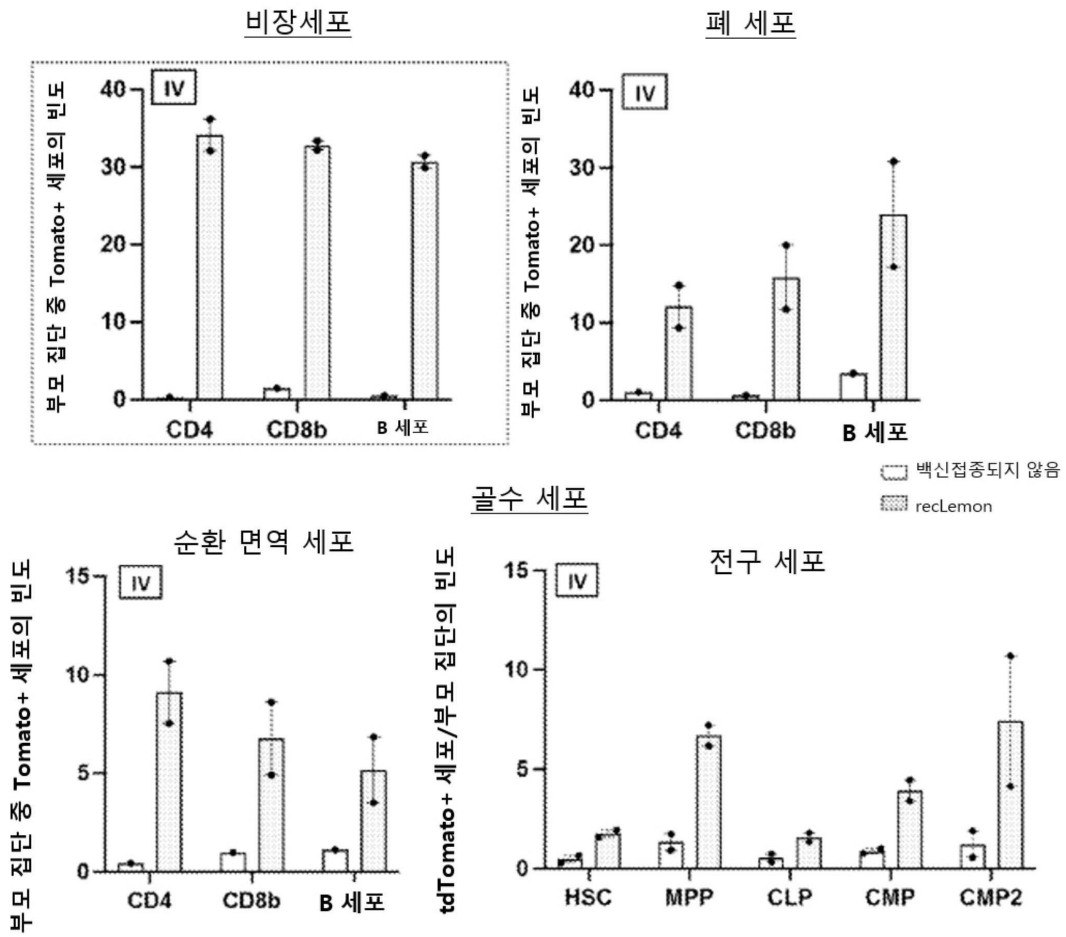
투여량 I: 0.1mg/kg 투여량 II: 0.05mg/kg 투여량 III: 0.05mg/kg

투여 경로: 피하 투여 경로: 피하 투여 경로: 피하

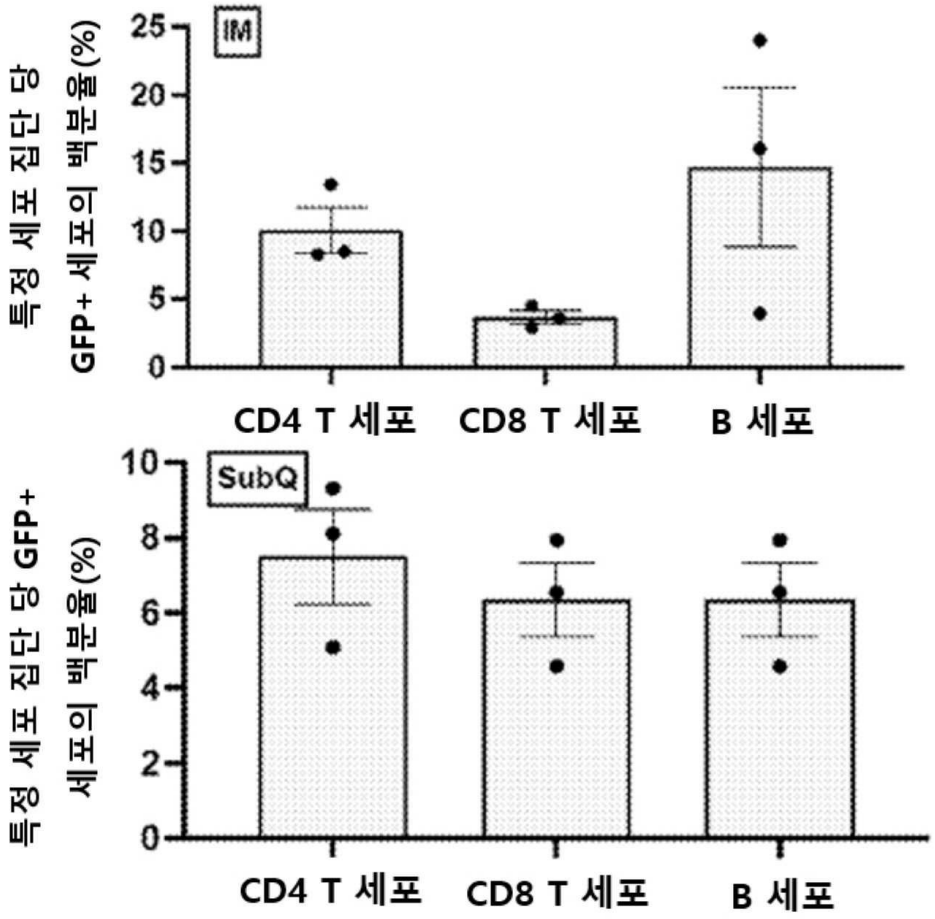
도면9



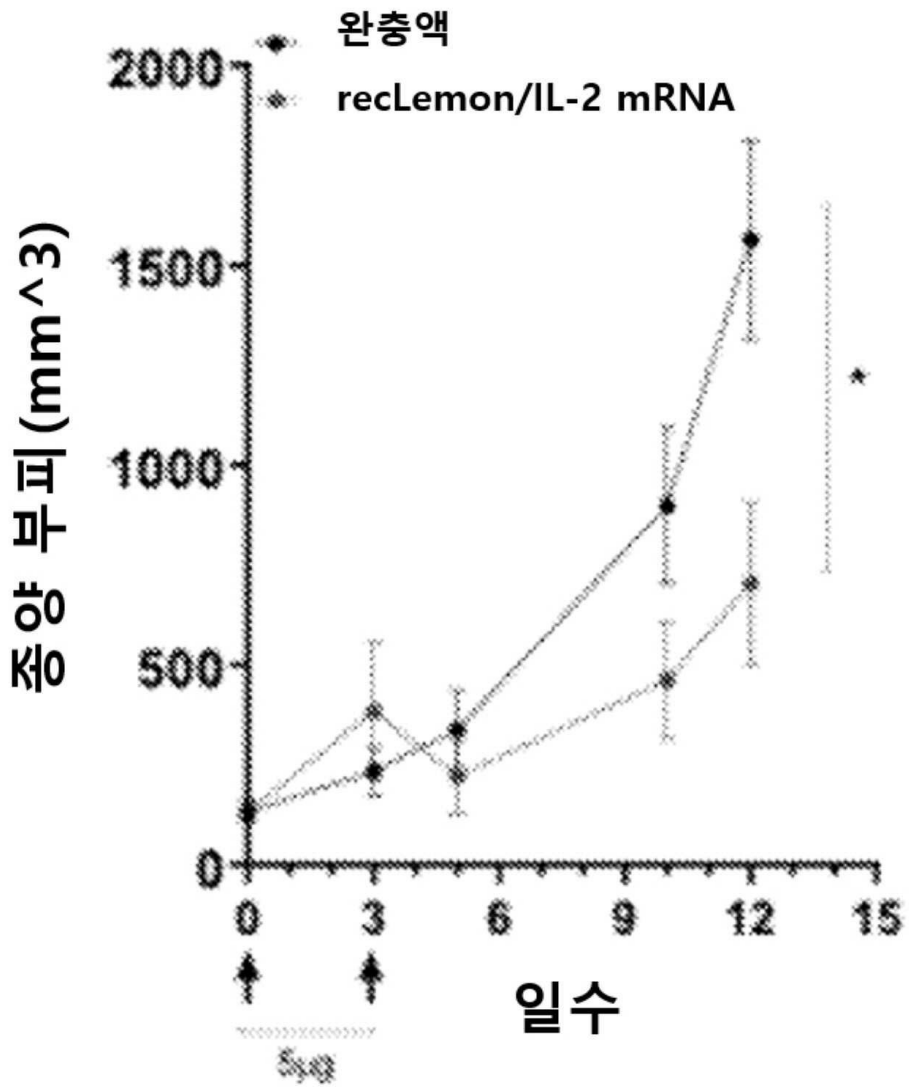
도면10


비장세포
폐 세포
골수 세포
순환 면역 세포
전구 세포
부모 집단 중 Tomato+ 세포의 빈도
tdTomato+ 세포/부모 집단의 빈도
IV
CD4
CD8b
B 세포
HSC
MPP
CLP
CMP
CMP2
백신접종되지 않음
recLemon

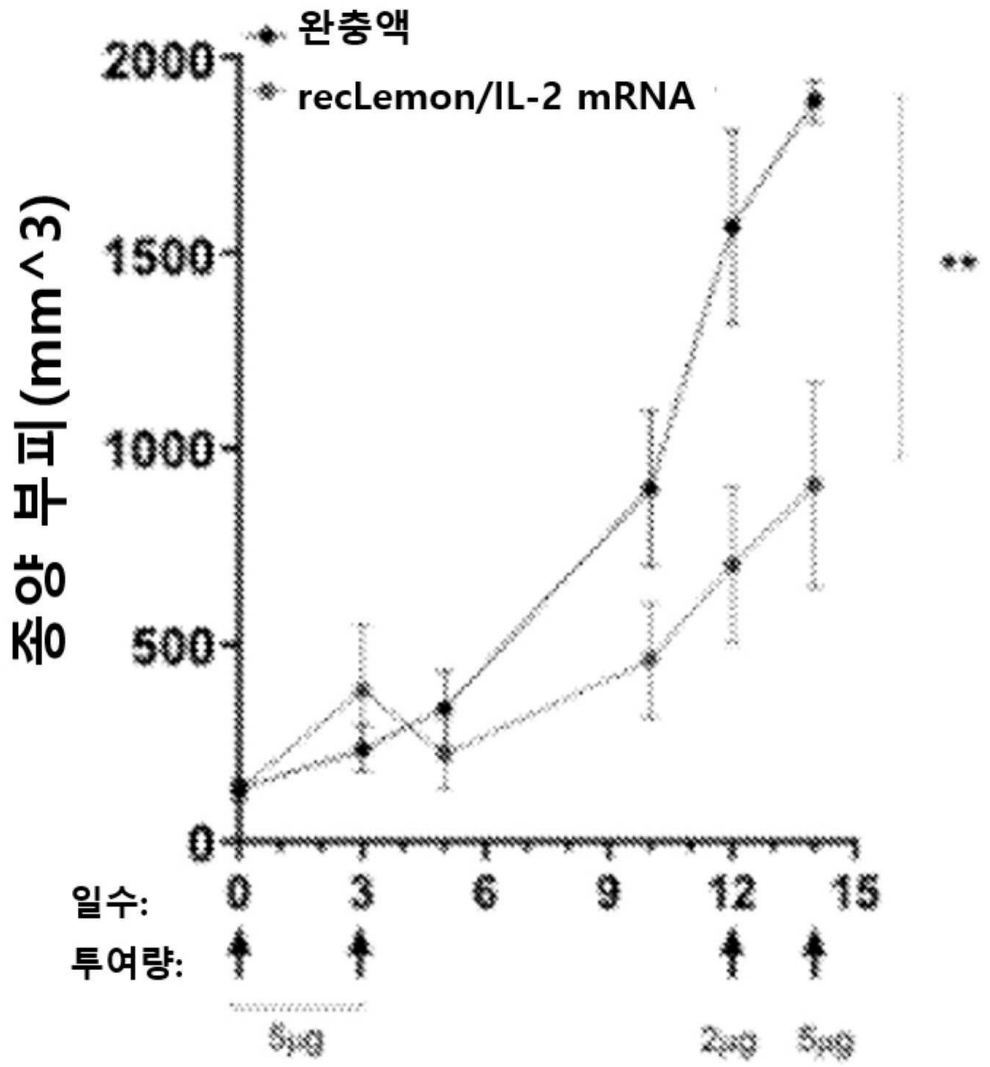
도면11


IM
특정 세포 집단 당
GFP+ 세포의 백분율(%)
25
20
15
10
5
0
CD4 T 세포
CD8 T 세포
B 세포
SubQ
특정 세포 집단 당 GFP+
세포의 백분율(%)
10
8
6
4
2
0
CD4 T 세포
CD8 T 세포
B 세포

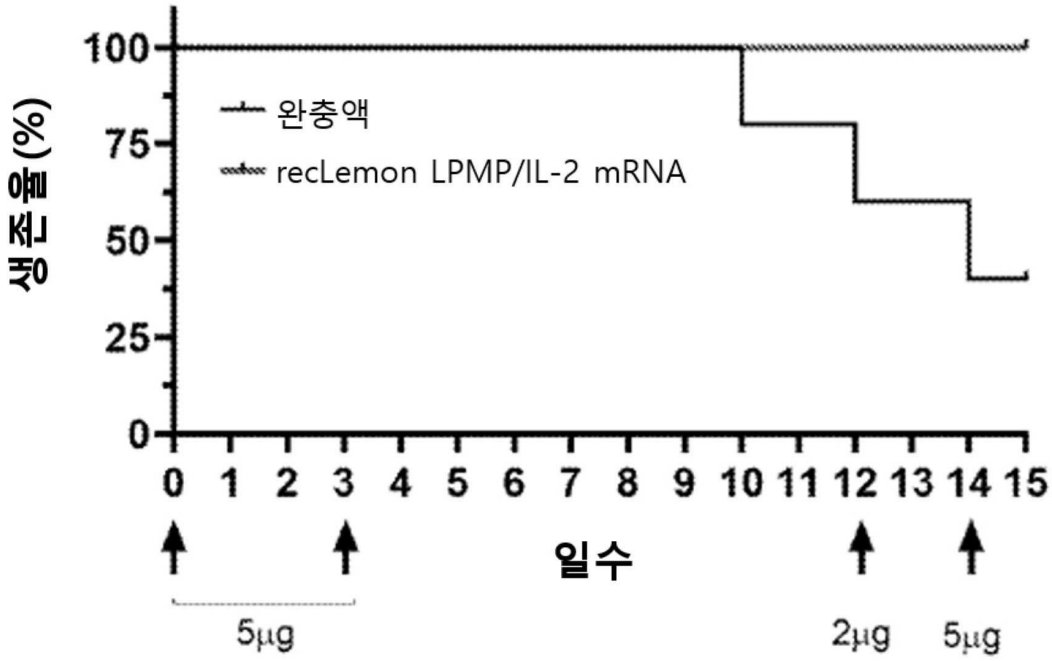
도면12a


완충액
recLemon/IL-2 mRNA
종양 부피(mm^3)
2000
1500
1000
500
0
0
3
6
9
12
15
일수
5μg

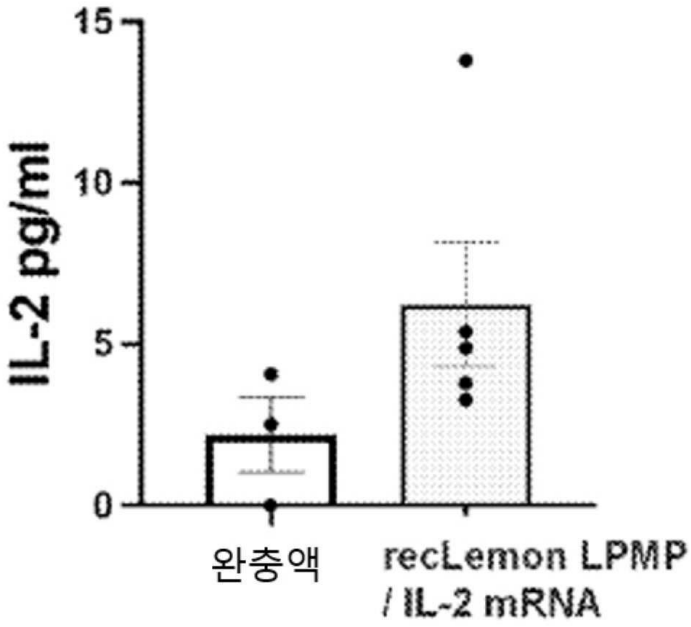
도면12b


완충액
recLemon/IL-2 mRNA
종양 부피 (mm^3)
2000
1500
1000
500
0
**
일수:
0
3
6
9
12
15
투여량:
5μg
2μg
5μg

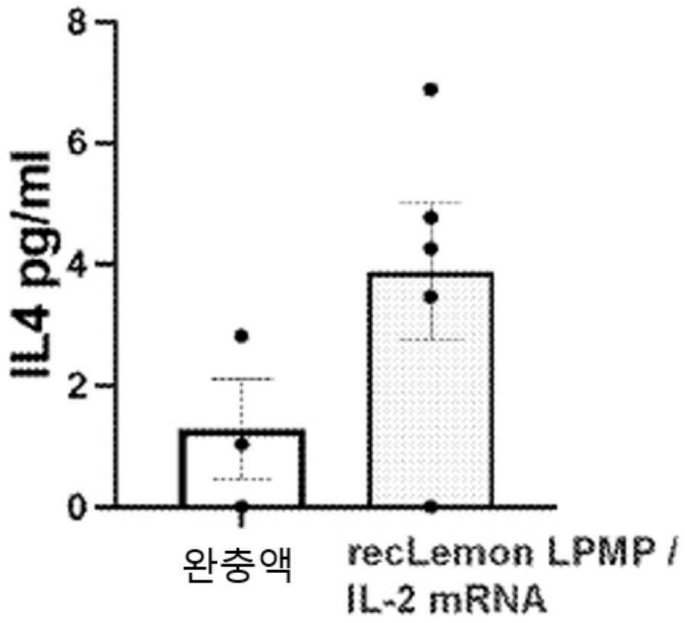
도면12c


100
75
50
25
0
생존율(%)
완충액
recLemon LPMP/IL-2 mRNA
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
일수
5μg
2μg
5μg

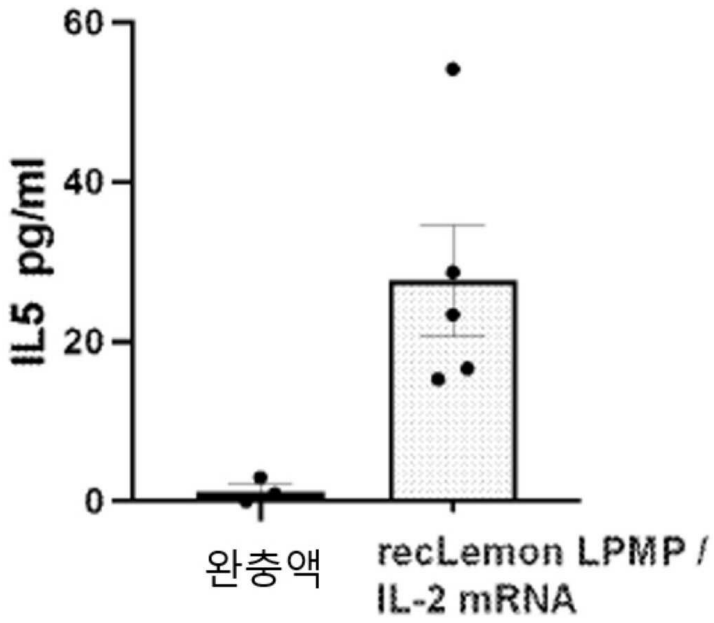
도면13a


15
10
5
0
IL-2 pg/ml
완충액
recLemon LPMP
/ IL-2 mRNA

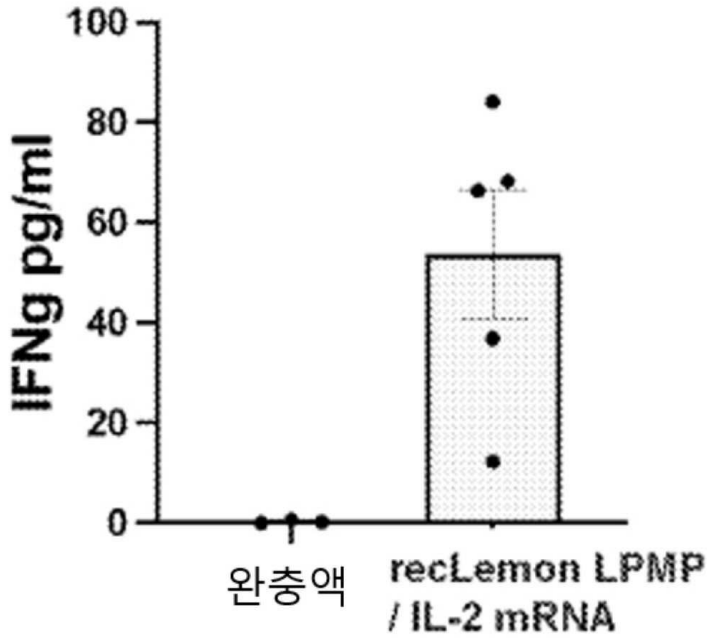
도면13b


IL4 pg/ml
8
6
4
2
0
완충액
recLemon LPMP / IL-2 mRNA

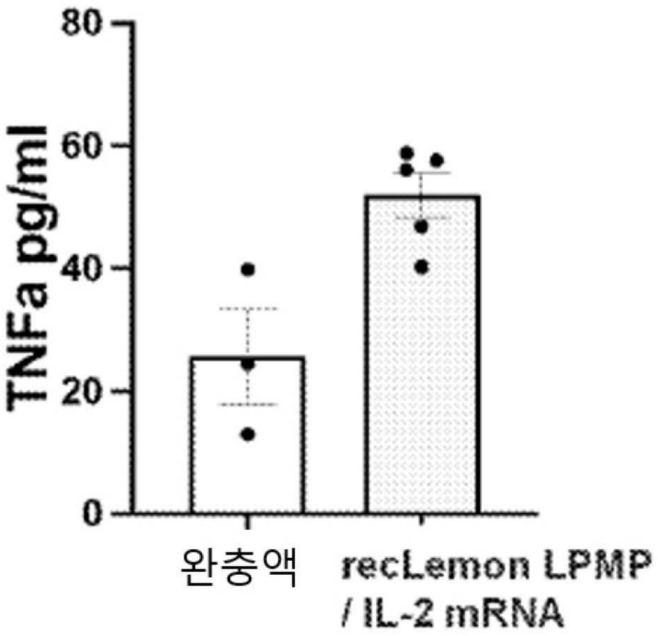
도면13c


IL5 pg/ml
60
40
20
0
완충액
recLemon LPMP / IL-2 mRNA

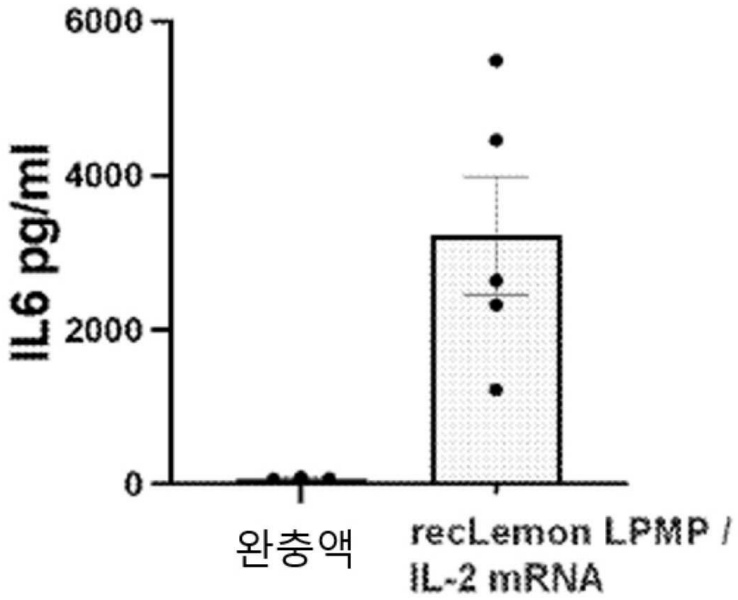
도면13d


100
80
60
40
20
0
IFNg pg/ml
완충액
recLemon LPMP
/ IL-2 mRNA

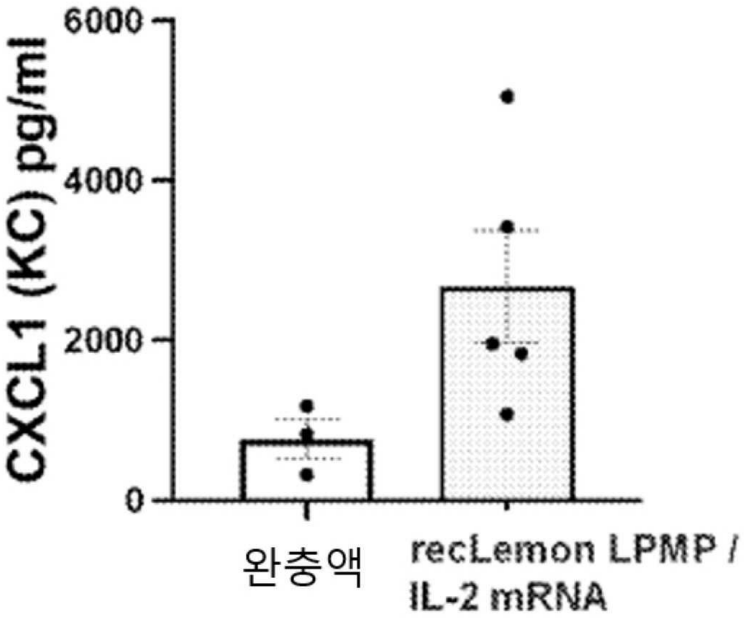
도면13e


80
60
40
20
0
TNFa pg/ml
완충액
recLemon LPMP
/ IL-2 mRNA

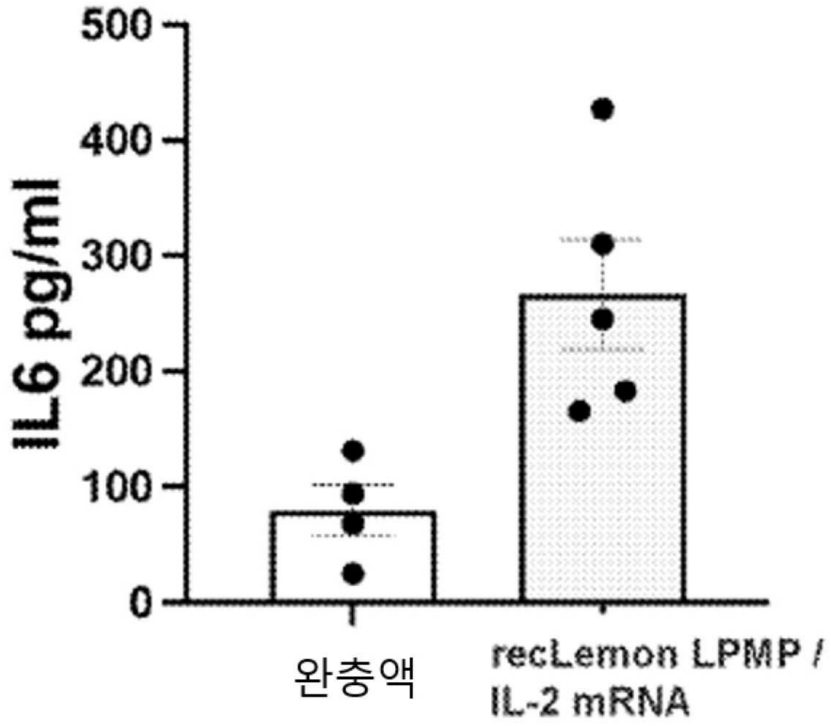
도면13f


6000
4000
2000
0
IL6 pg/ml
완충액
recLemon LPMP /
IL-2 mRNA

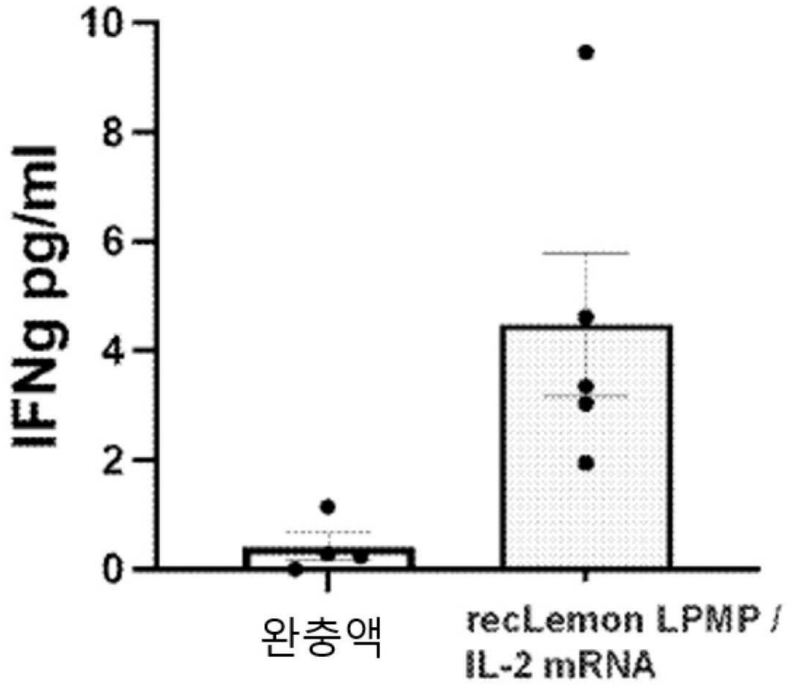
도면13g


6000
4000
2000
0
CXCL1 (KC) pg/ml
완충액
recLemon LPMP /
IL-2 mRNA

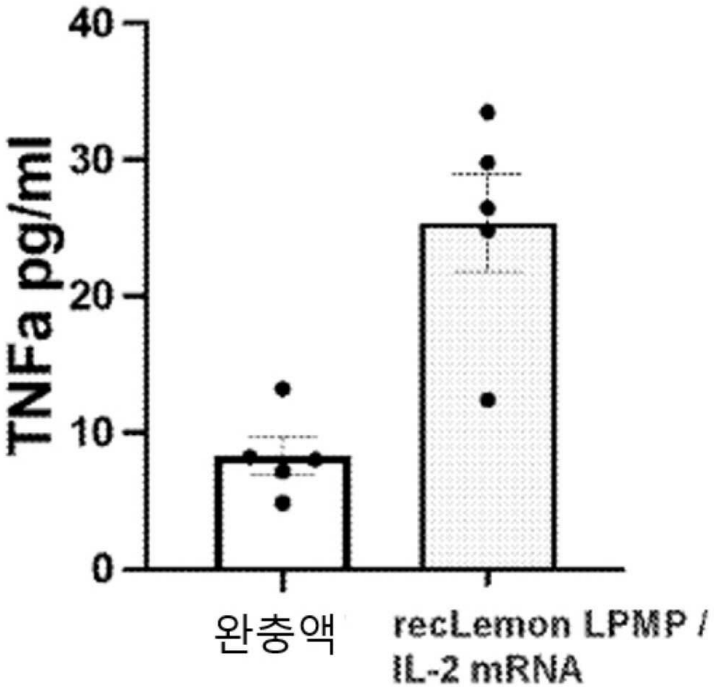
도면14a


500
400
300
200
100
0
IL6 pg/ml
완충액
recLemon LPMP /
IL-2 mRNA

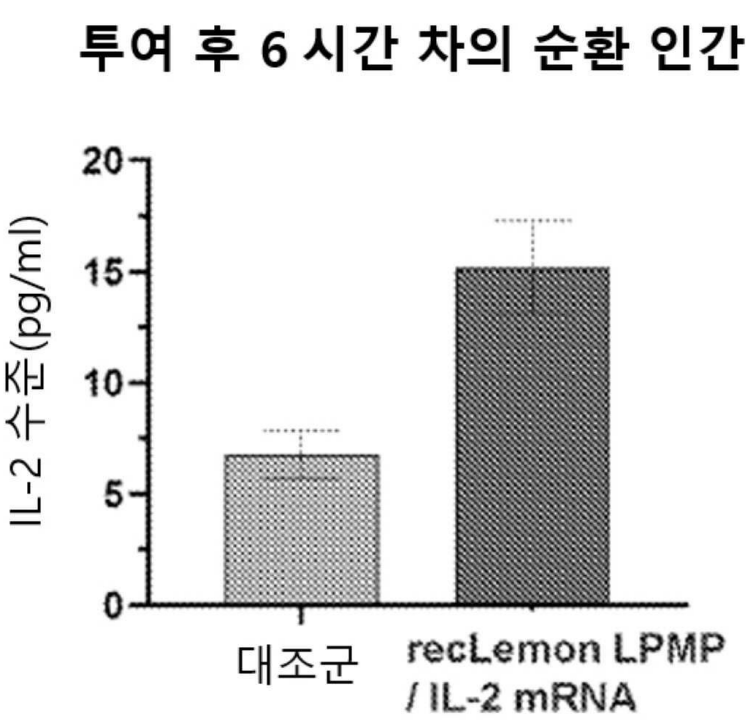
도면14b


10
8
6
4
2
0
IFNg pg/ml
완충액
recLemon LPMP /
IL-2 mRNA

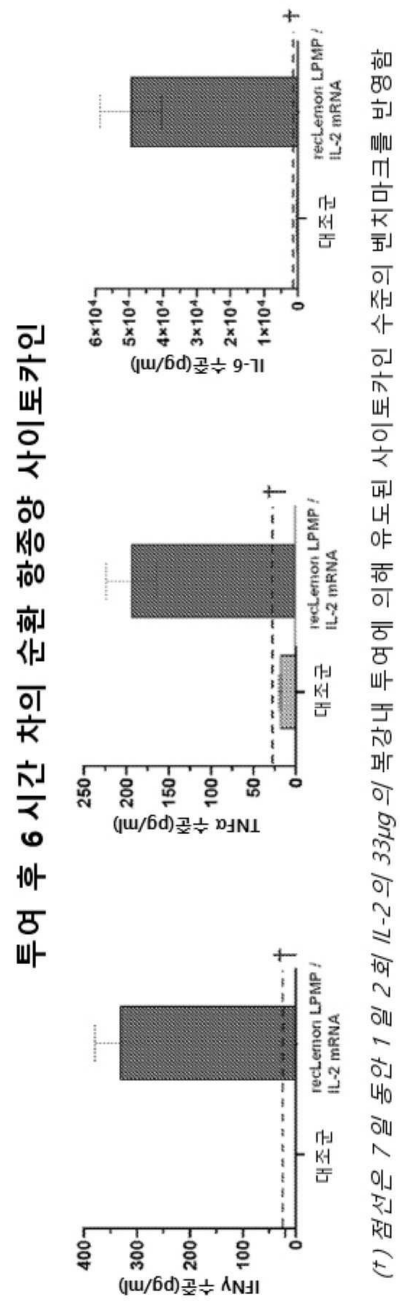
도면14c


TNFa pg/ml
40
30
20
10
0
완충액
recLemon LPMP / IL-2 mRNA

도면15

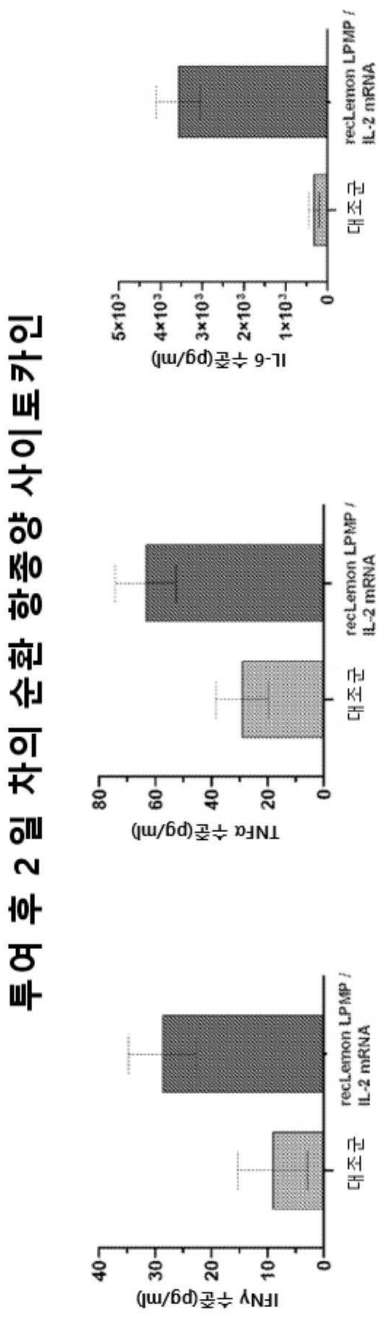

투여 후 6 시간 차의 순환 인간 IL-2 수준
IL-2 수준(pg/ml)
20
15
10
5
0
대조군
recLemon LPMP / IL-2 mRNA

도면16a

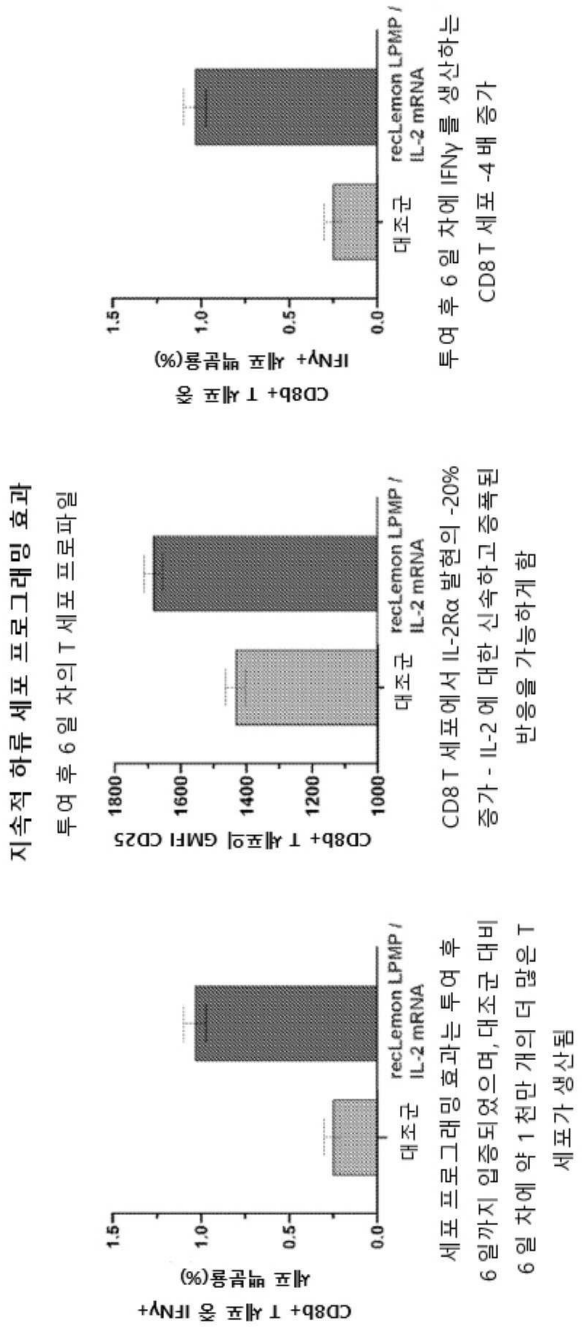


(†) 점선은 7 일 동안 1 일 2 회 IL-2 의 33μg 의 복강내 투여에 의해 유도된 사이토카인 수준의 벤치마크를 반영함

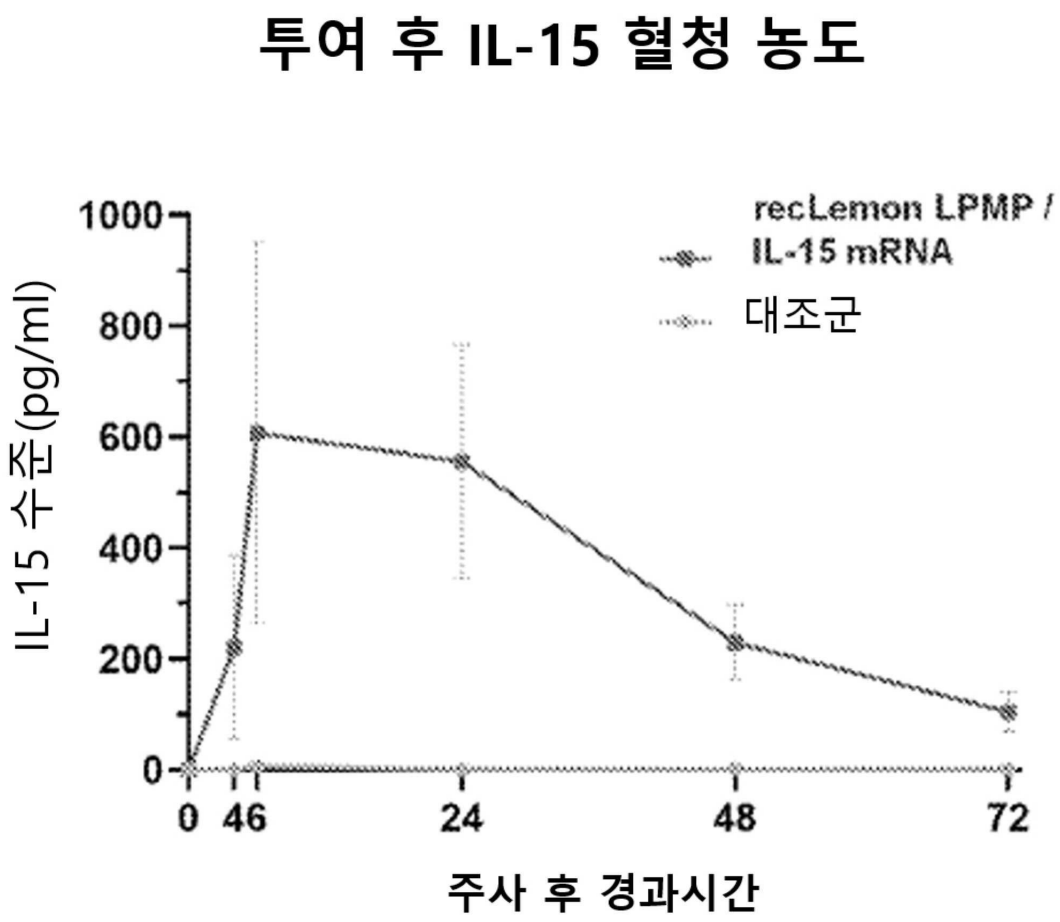
도면16b


투여 후 2 일 차의 순환 항종양 사이토카인
IFNγ 수준(pg/ml)
0
10
20
30
40
대조군
recLemon LPMP / IL-2 mRNA
TNFα 수준(pg/ml)
0
20
40
60
80
대조군
recLemon LPMP / IL-2 mRNA
IL-6 수준(pg/ml)
0
1×10³
2×10³
3×10³
4×10³
5×10³
대조군
recLemon LPMP / IL-2 mRNA

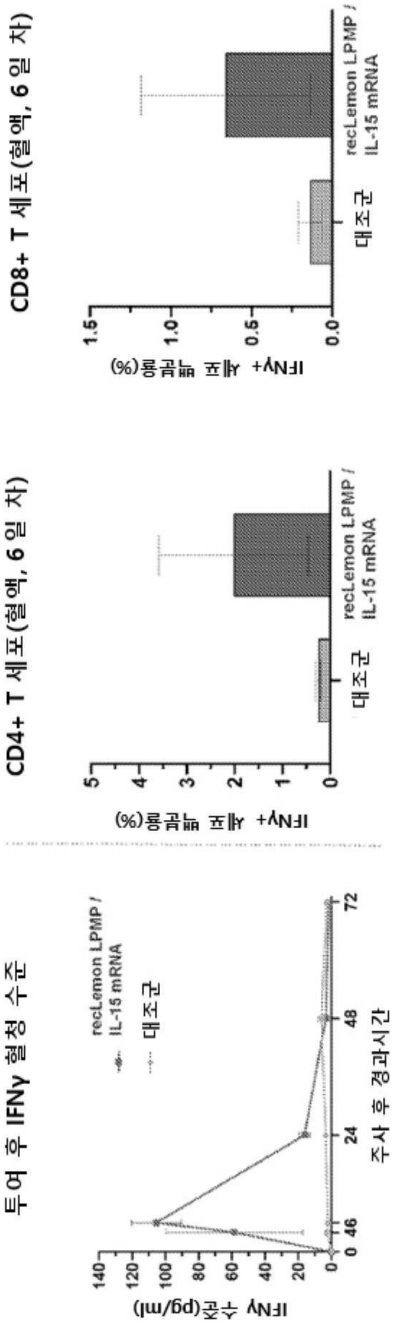
도면17


지속적 하류 세포 프로그래밍 효과
투여 후 6 일 차의 T 세포 프로파일
CD8b+ T 세포 중 IFNγ+ 세포 백분율(%)
1.5
1.0
0.5
0.0
대조군
recLemon LPMP / IL-2 mRNA
세포 프로그래밍 효과는 투여 후 6 일까지 입증되었으며, 대조군 대비 6 일 차에 약 1 천만 개의 더 많은 T 세포가 생산됨
CD8b+ T 세포의 GMFI CD25
1800
1600
1400
1200
1000
대조군
recLemon LPMP / IL-2 mRNA
CD8 T 세포에서 IL-2Rα 발현의 ~20% 증가 - IL-2 에 대한 신속하고 증폭된 반응을 가능하게 함
CD8b+ T 세포 중 IFNγ+ 세포 백분율(%)
1.5
1.0
0.5
0.0
대조군
recLemon LPMP / IL-2 mRNA
투여 후 6 일 차에 IFNγ 를 생산하는 CD8 T 세포 ~4 배 증가

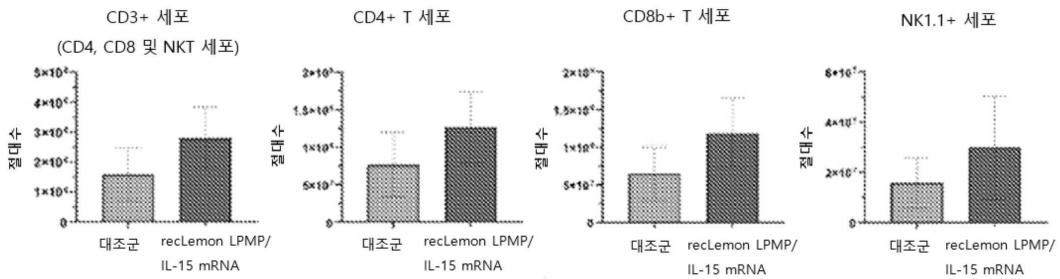
도면18


투여 후 IL-15 혈청 농도
recLemon LPMP / IL-15 mRNA
대조군
IL-15 수준(pg/ml)
1000
800
600
400
200
0
0
46
24
48
72
주사 후 경과시간

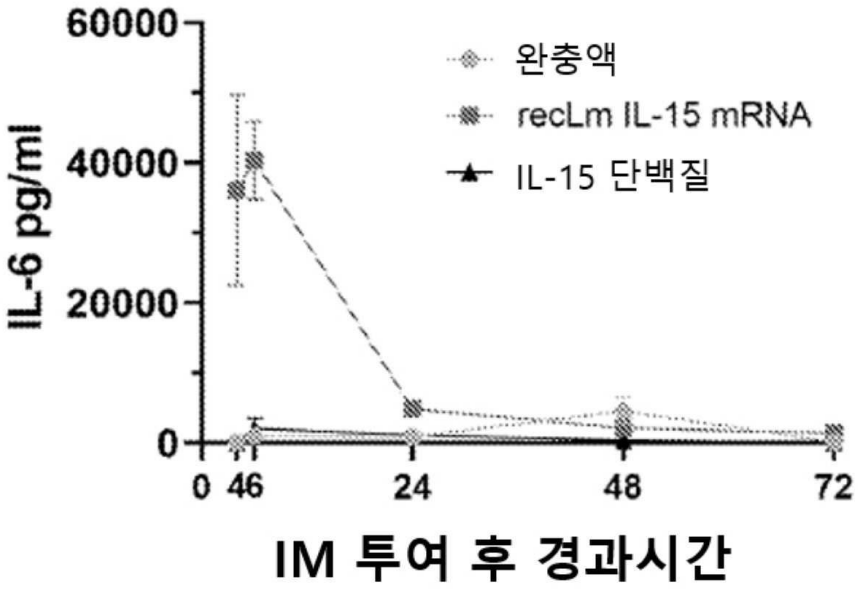
도면19


CD8+ T 세포(혈액, 6 일 차)
IFNγ+ 세포 백분율(%)
대조군
recLemon LPMP / IL-15 mRNA
CD4+ T 세포(혈액, 6 일 차)
IFNγ+ 세포 백분율(%)
대조군
recLemon LPMP / IL-15 mRNA
투여 후 IFNγ 혈청 수준
IFNγ 수준(pg/ml)
주사 후 경과시간
대조군
recLemon LPMP / IL-15 mRNA

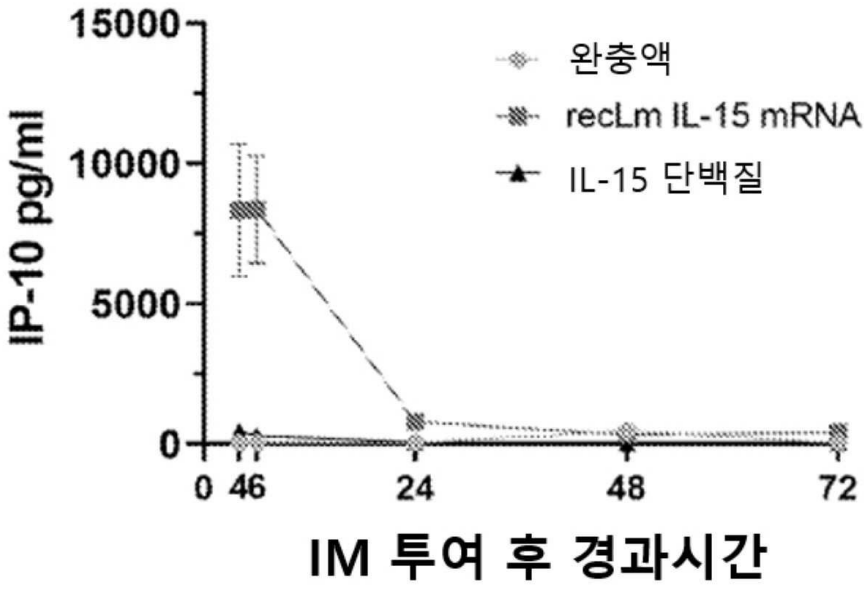
도면20


CD3+ 세포
(CD4, CD8 및 NKT 세포)
CD4+ T 세포
CD8b+ T 세포
NK1.1+ 세포
절대수
대조군
recLemon LPMP/
IL-15 mRNA

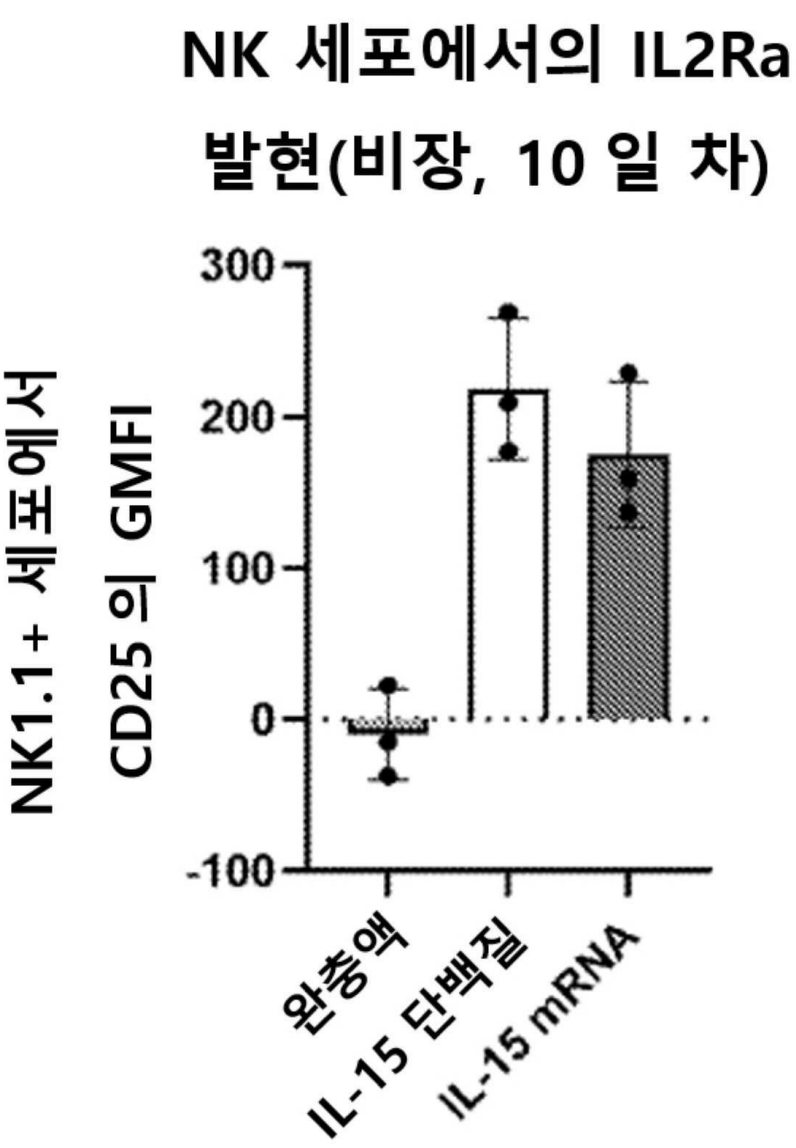
도면21a


60000
40000
20000
0
IL-6 pg/ml
완충액
recLm IL-15 mRNA
IL-15 단백질
0 46
24
48
72
IM 투여 후 경과시간

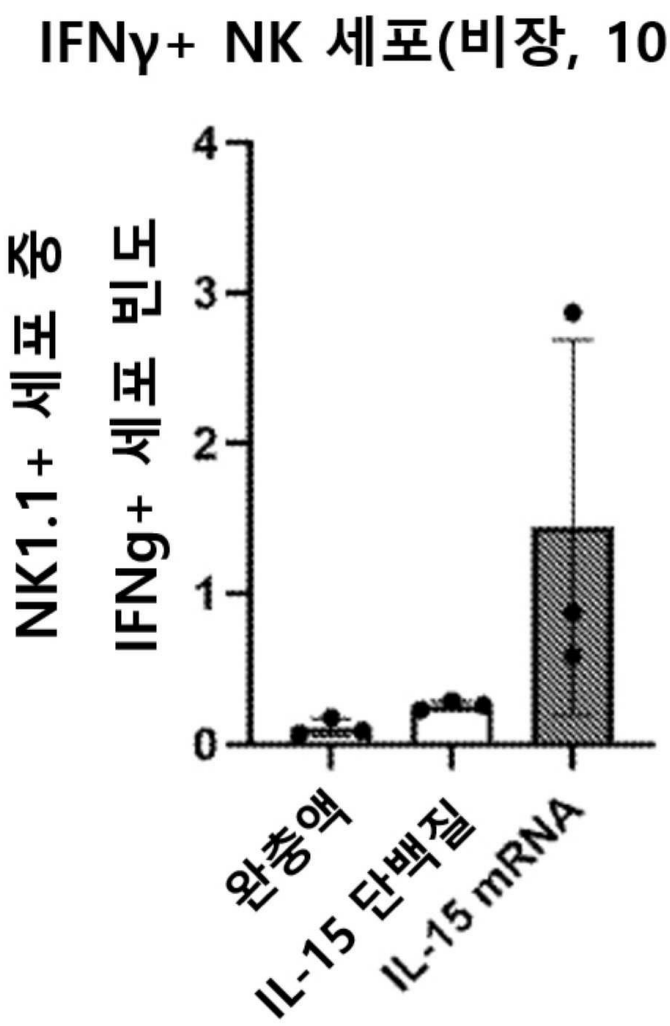
도면21b


15000
10000
5000
0
IP-10 pg/ml
완충액
recLm IL-15 mRNA
IL-15 단백질
0 46
24
48
72
IM 투여 후 경과시간

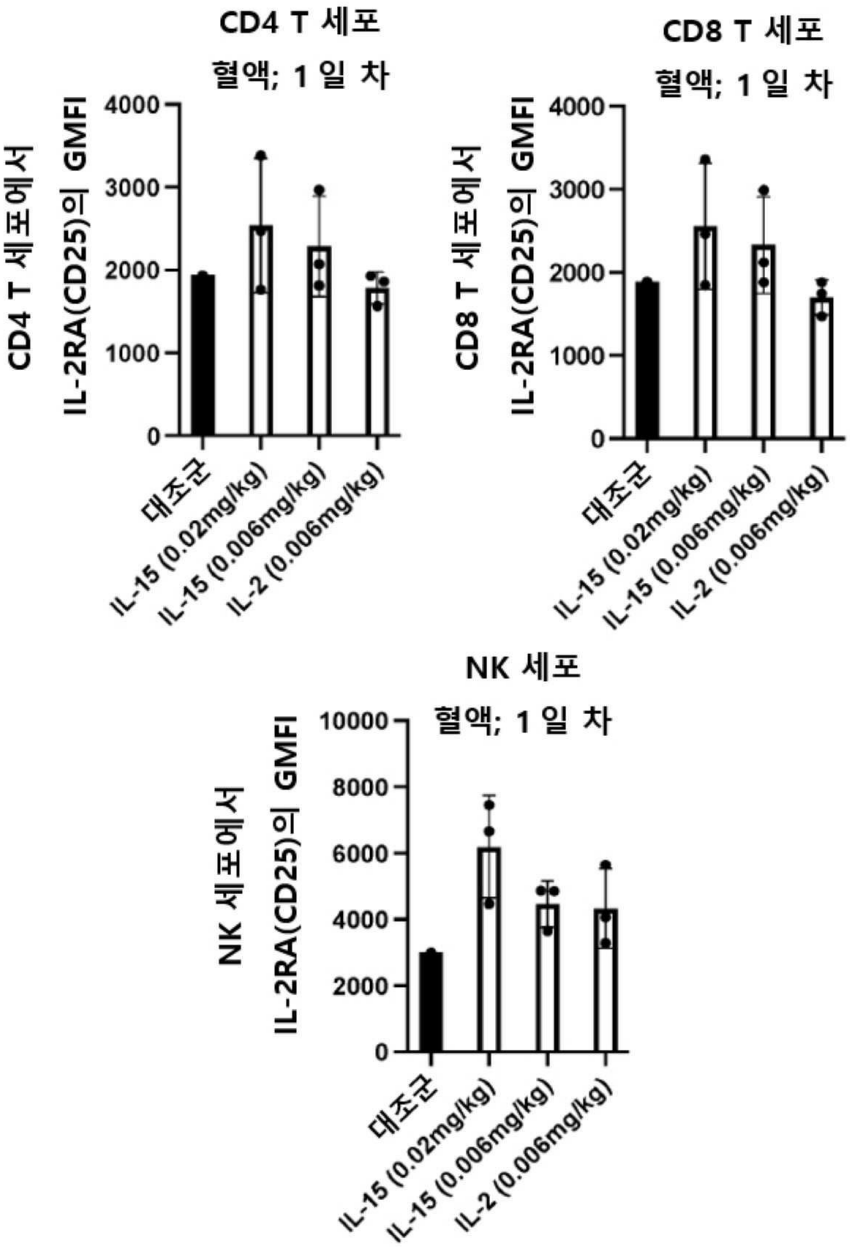
도면22a


NK 세포에서의 IL2Ra
발현(비장, 10 일 차)
NK1.1+ 세포에서
CD25 의 GMFI
300
200
100
0
-100
완충액
IL-15 단백질
IL-15 mRNA

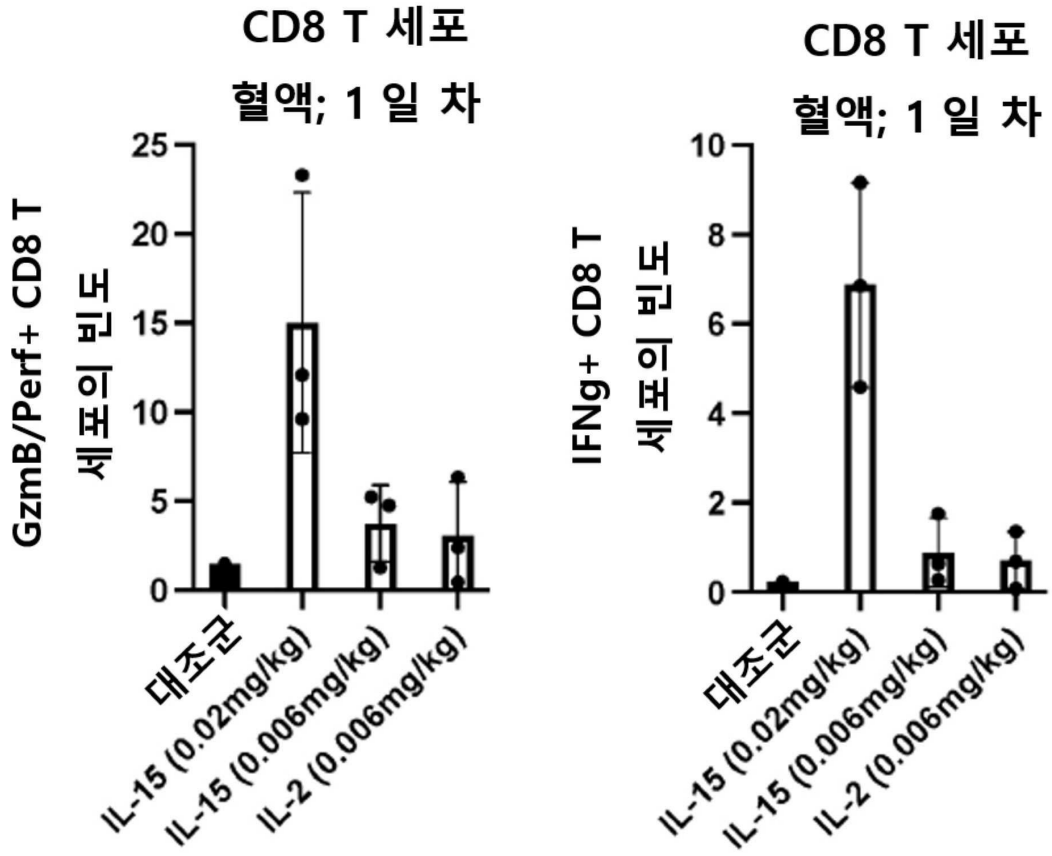
도면22b


IFNγ+ NK 세포(비장, 10 일 차)
NK1.1+ 세포 중 IFNg+ 세포 빈도
4
3
2
1
0
완충액
IL-15 단백질
IL-15 mRNA

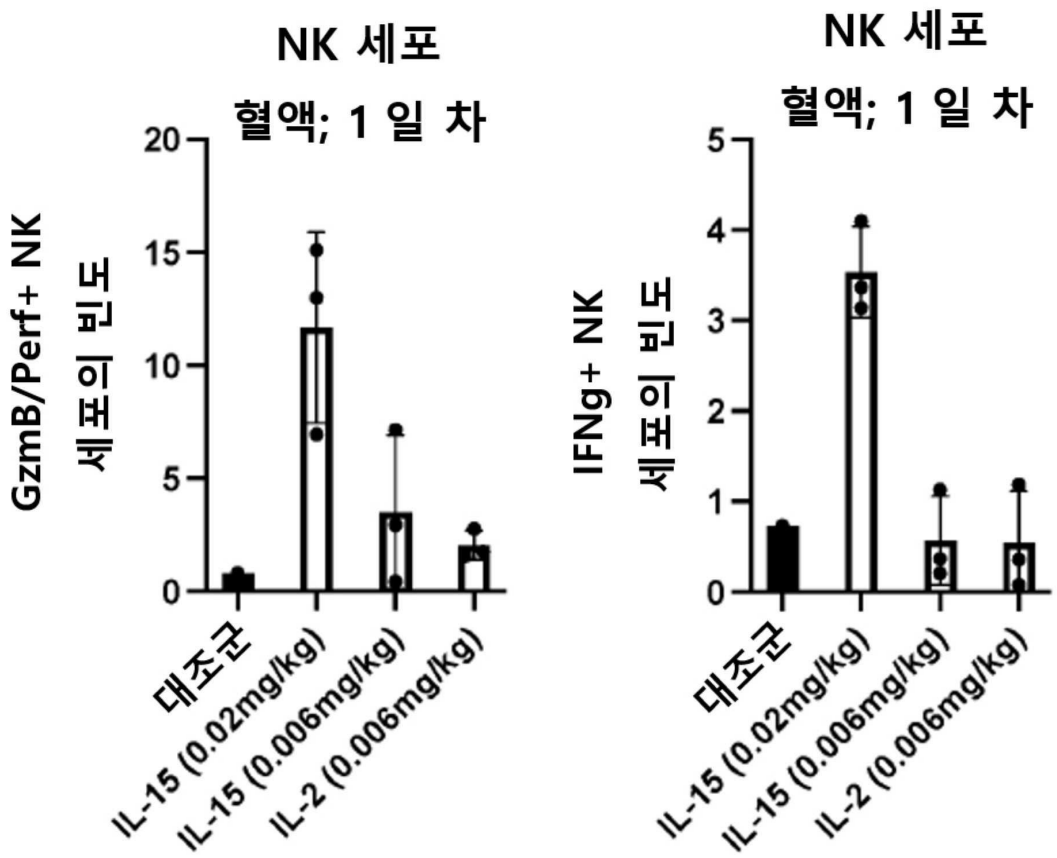
도면23


CD4 T 세포
혈액; 1 일 차
CD4 T 세포에서
IL-2RA(CD25)의 GMFI
4000
3000
2000
1000
0
대조군
IL-15 (0.02mg/kg)
IL-15 (0.006mg/kg)
IL-2 (0.006mg/kg)
CD8 T 세포
혈액; 1 일 차
CD8 T 세포에서
IL-2RA(CD25)의 GMFI
4000
3000
2000
1000
0
대조군
IL-15 (0.02mg/kg)
IL-15 (0.006mg/kg)
IL-2 (0.006mg/kg)
NK 세포
혈액; 1 일 차
NK 세포에서
IL-2RA(CD25)의 GMFI
10000
8000
6000
4000
2000
0
대조군
IL-15 (0.02mg/kg)
IL-15 (0.006mg/kg)
IL-2 (0.006mg/kg)

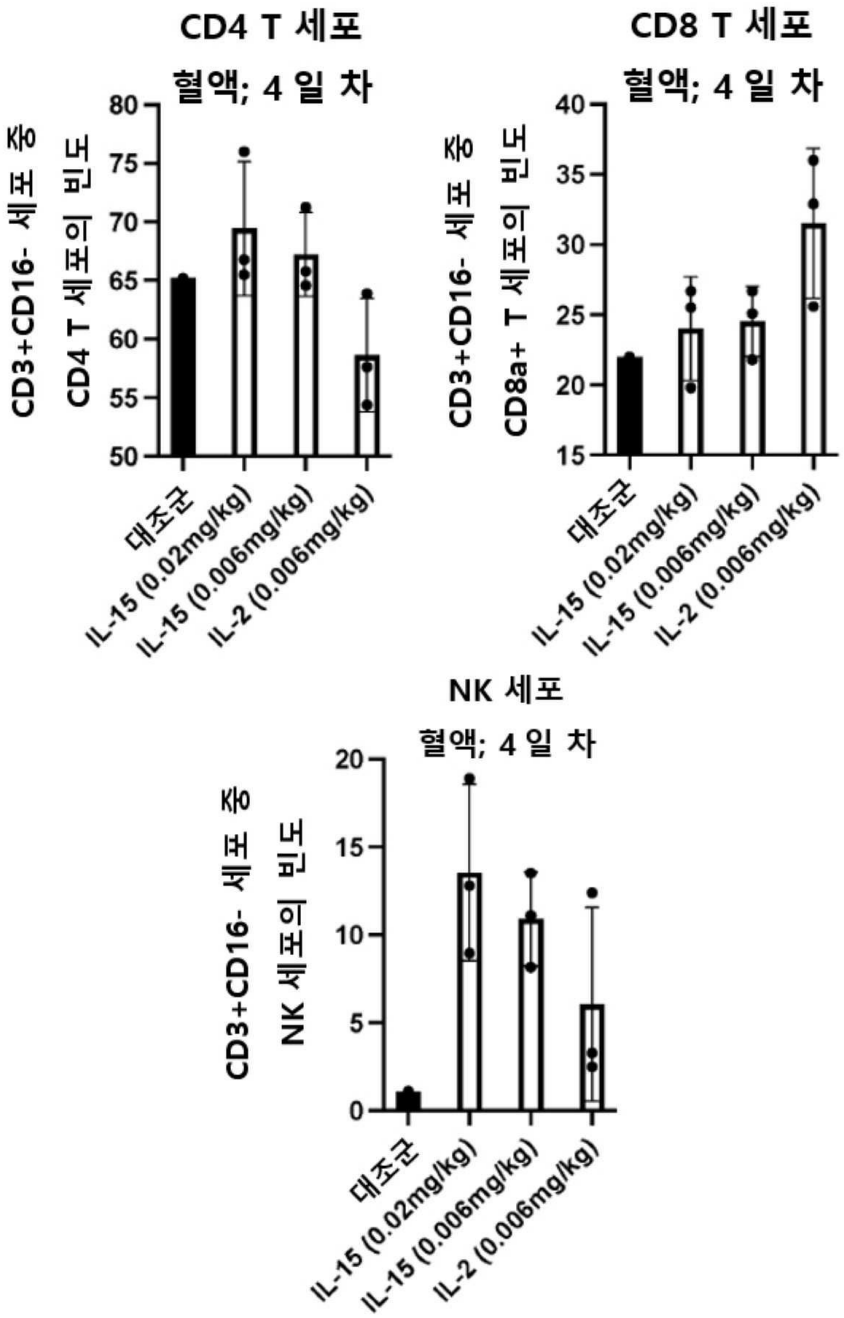
도면24a


CD8 T 세포
혈액; 1 일 차
GzmB/Perf+ CD8 T 세포의 빈도
25
20
15
10
5
0
대조군
IL-15 (0.02mg/kg)
IL-15 (0.006mg/kg)
IL-2 (0.006mg/kg)
CD8 T 세포
혈액; 1 일 차
IFNg+ CD8 T 세포의 빈도
10
8
6
4
2
0
대조군
IL-15 (0.02mg/kg)
IL-15 (0.006mg/kg)
IL-2 (0.006mg/kg)

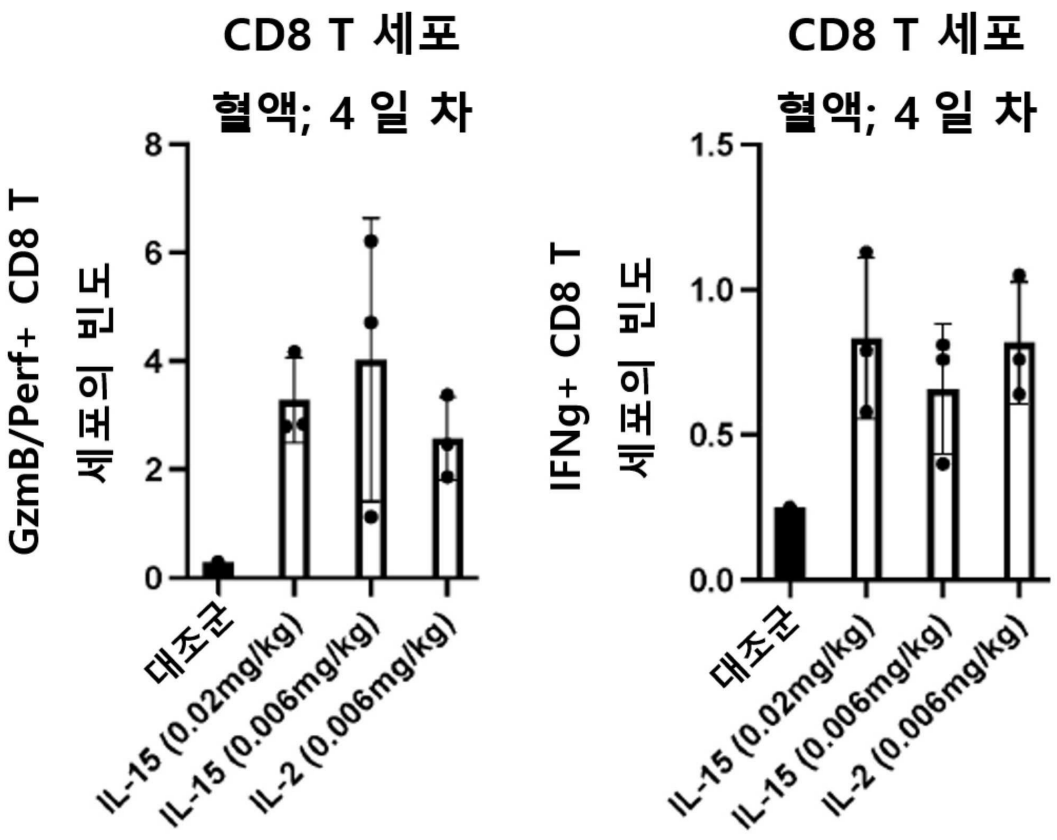
도면24b


NK 세포
혈액; 1 일 차
GzmB/Perf+ NK 세포의 빈도
20
15
10
5
0
대조군
IL-15 (0.02mg/kg)
IL-15 (0.006mg/kg)
IL-2 (0.006mg/kg)
NK 세포
혈액; 1 일 차
IFNg+ NK 세포의 빈도
5
4
3
2
1
0
대조군
IL-15 (0.02mg/kg)
IL-15 (0.006mg/kg)
IL-2 (0.006mg/kg)

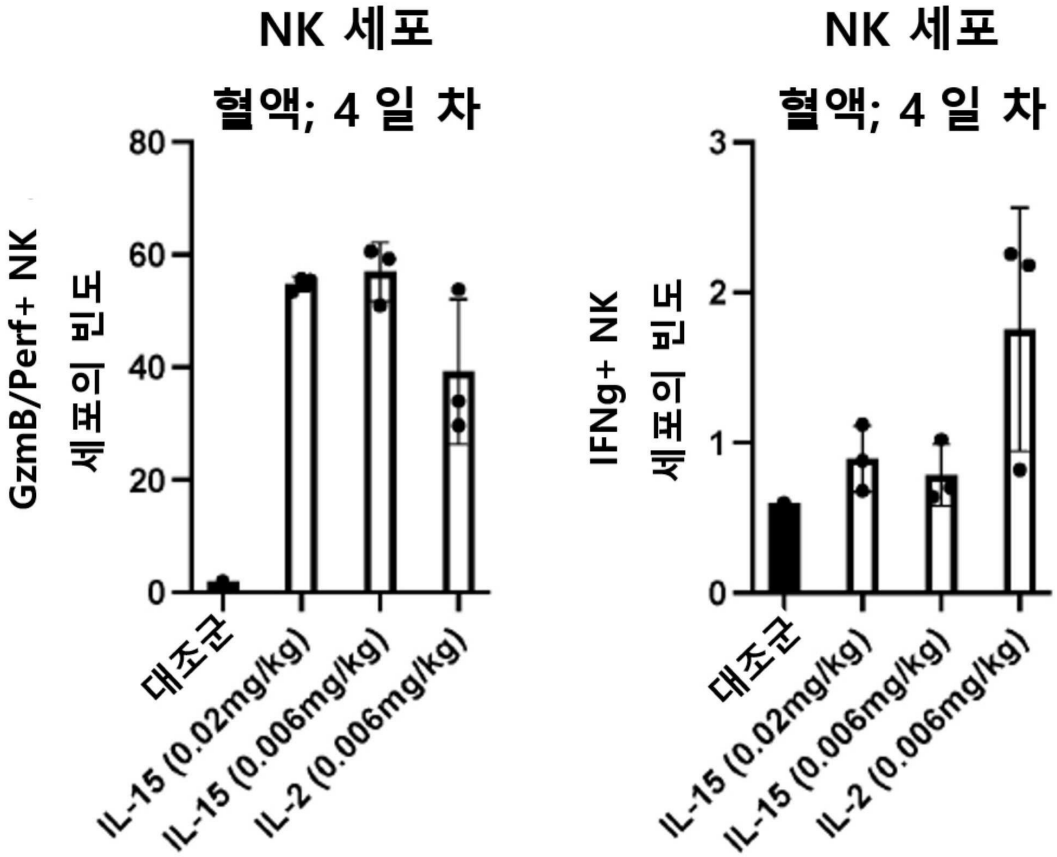
도면25


CD4 T 세포
혈액; 4 일 차
CD3+CD16- 세포 중
CD4 T 세포의 빈도
80
75
70
65
60
55
50
대조군
IL-15 (0.02mg/kg)
IL-15 (0.006mg/kg)
IL-2 (0.006mg/kg)
CD8 T 세포
혈액; 4 일 차
CD3+CD16- 세포 중
CD8a+ T 세포의 빈도
40
35
30
25
20
15
대조군
IL-15 (0.02mg/kg)
IL-15 (0.006mg/kg)
IL-2 (0.006mg/kg)
NK 세포
혈액; 4 일 차
CD3+CD16- 세포 중
NK 세포의 빈도
20
15
10
5
0
대조군
IL-15 (0.02mg/kg)
IL-15 (0.006mg/kg)
IL-2 (0.006mg/kg)

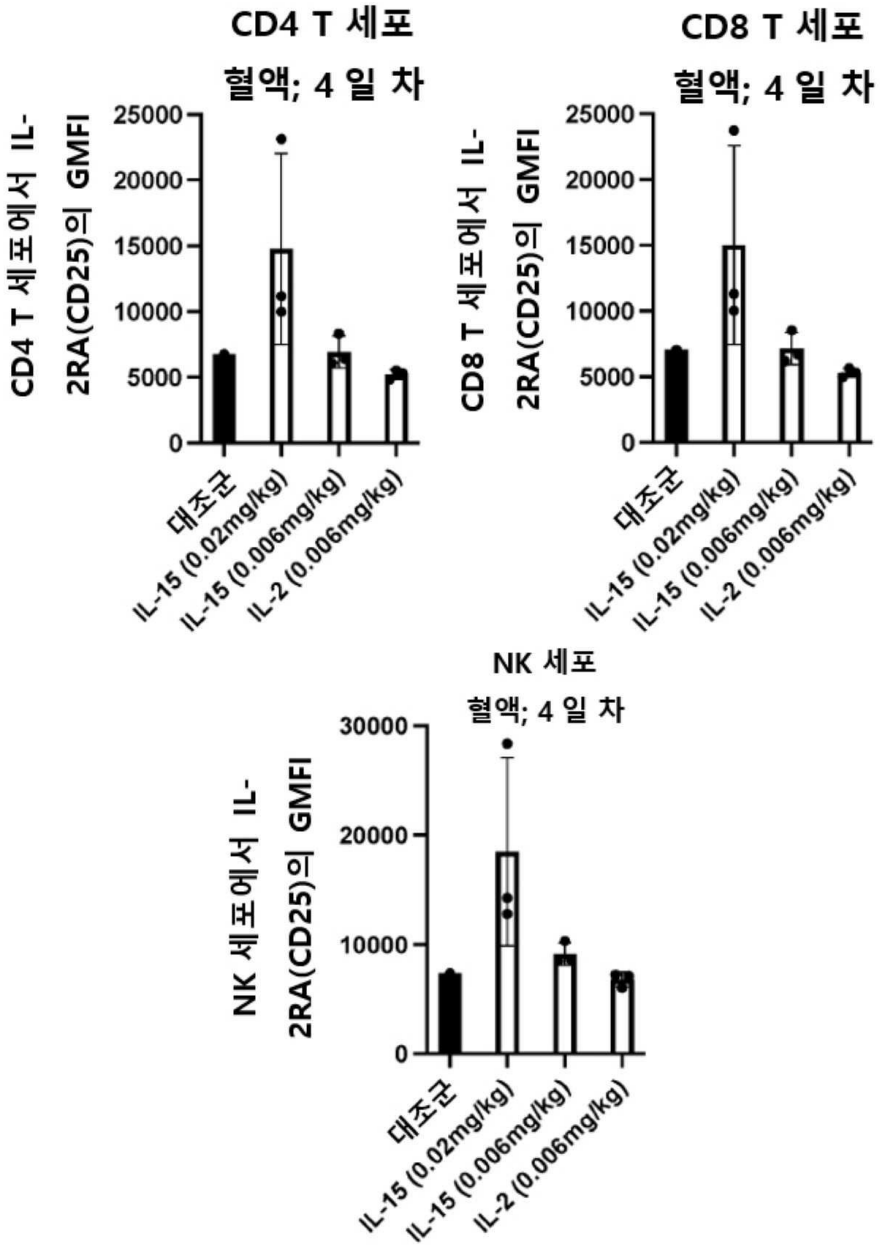
도면26a


CD8 T 세포
혈액; 4 일 차
GzmB/Perf+ CD8 T 세포의 빈도
8
6
4
2
0
대조군
IL-15 (0.02mg/kg)
IL-15 (0.006mg/kg)
IL-2 (0.006mg/kg)
CD8 T 세포
혈액; 4 일 차
IFNg+ CD8 T 세포의 빈도
1.5
1.0
0.5
0.0
대조군
IL-15 (0.02mg/kg)
IL-15 (0.006mg/kg)
IL-2 (0.006mg/kg)

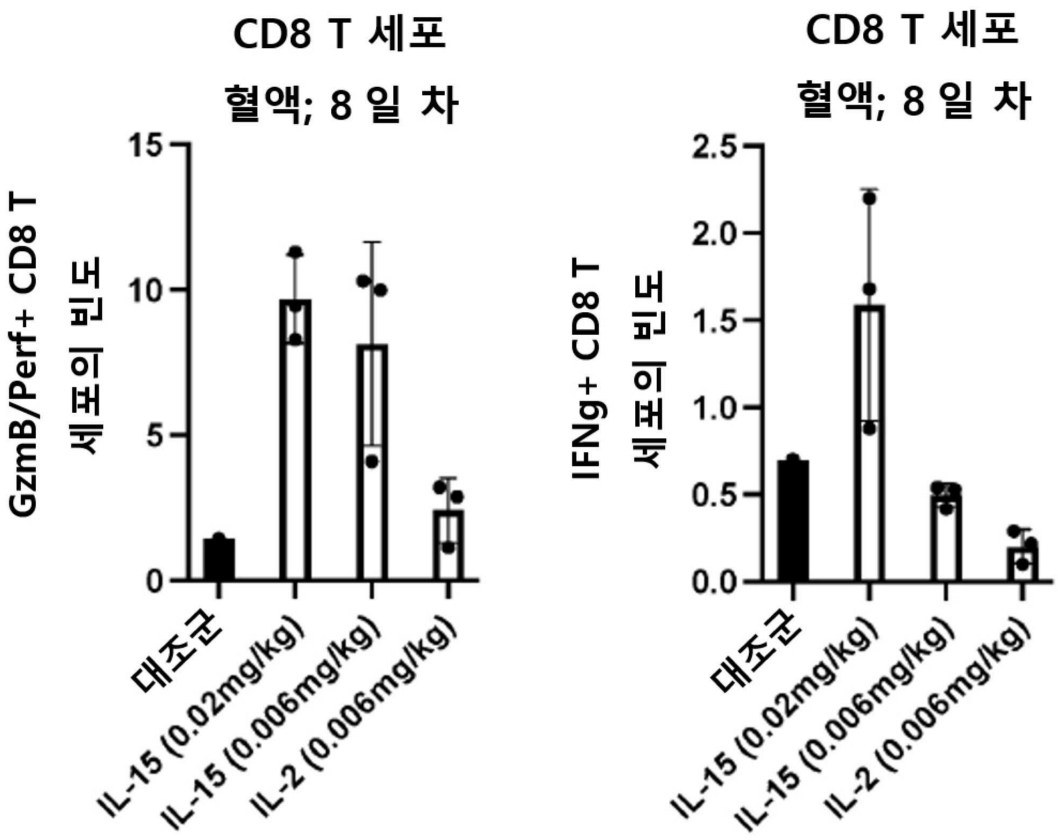
도면26b


NK 세포
혈액; 4 일 차
GzmB/Perf+ NK 세포의 빈도
80
60
40
20
0
대조군
IL-15 (0.02mg/kg)
IL-15 (0.006mg/kg)
IL-2 (0.006mg/kg)
NK 세포
혈액; 4 일 차
IFNg+ NK 세포의 빈도
3
2
1
0
대조군
IL-15 (0.02mg/kg)
IL-15 (0.006mg/kg)
IL-2 (0.006mg/kg)

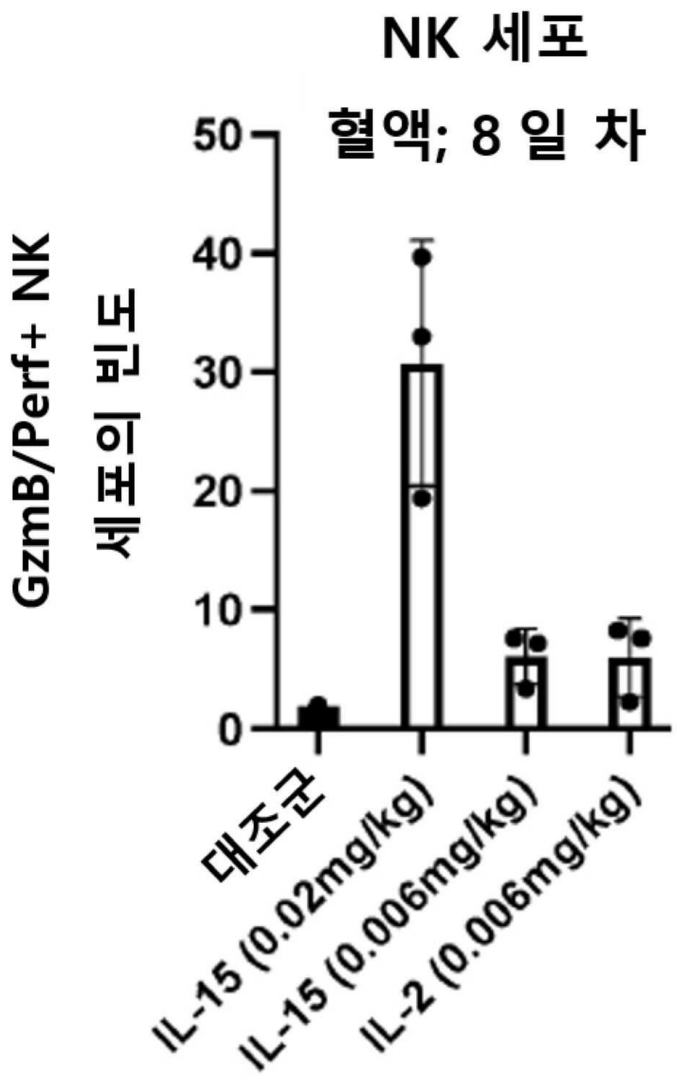
도면27


CD4 T 세포
혈액; 4 일 차
CD4 T 세포에서 IL-2RA(CD25)의 GMFI
25000
20000
15000
10000
5000
0
대조군
IL-15 (0.02mg/kg)
IL-15 (0.006mg/kg)
IL-2 (0.006mg/kg)
CD8 T 세포
혈액; 4 일 차
CD8 T 세포에서 IL-2RA(CD25)의 GMFI
25000
20000
15000
10000
5000
0
대조군
IL-15 (0.02mg/kg)
IL-15 (0.006mg/kg)
IL-2 (0.006mg/kg)
NK 세포
혈액; 4 일 차
NK 세포에서 IL-2RA(CD25)의 GMFI
30000
20000
10000
0
대조군
IL-15 (0.02mg/kg)
IL-15 (0.006mg/kg)
IL-2 (0.006mg/kg)

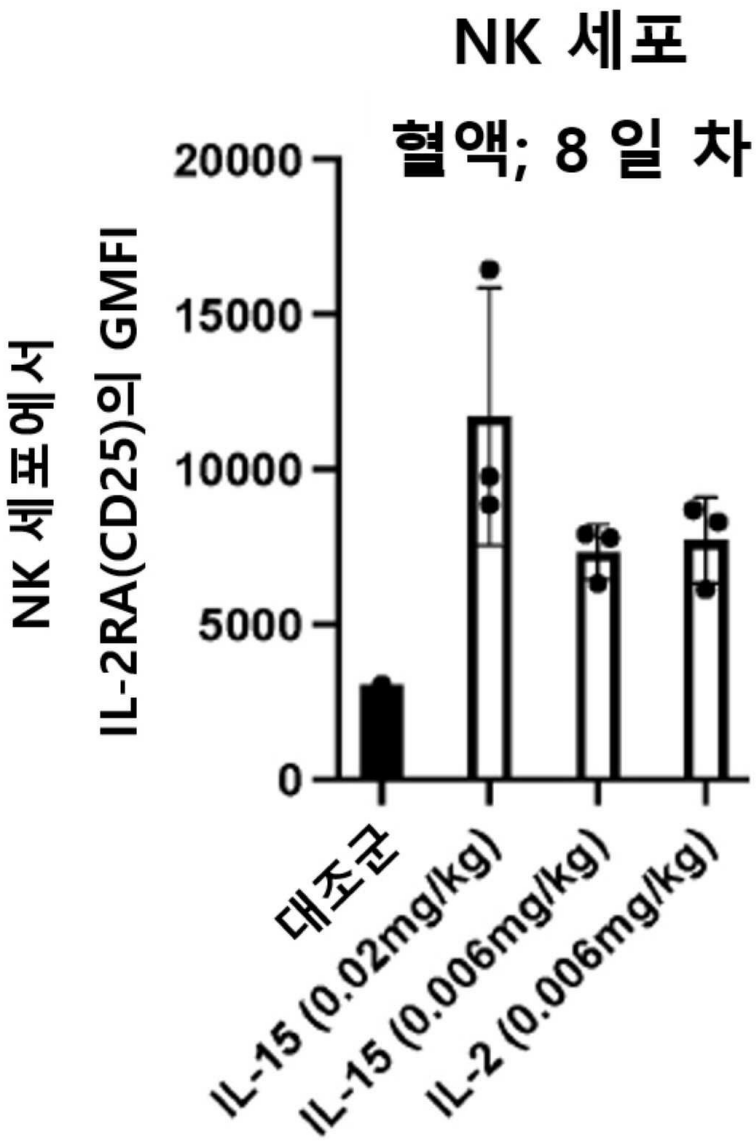
도면28a


CD8 T 세포
혈액; 8 일 차
GzmB/Perf+ CD8 T 세포의 빈도
15
10
5
0
대조군
IL-15 (0.02mg/kg)
IL-15 (0.006mg/kg)
IL-2 (0.006mg/kg)
CD8 T 세포
혈액; 8 일 차
IFNg+ CD8 T 세포의 빈도
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
대조군
IL-15 (0.02mg/kg)
IL-15 (0.006mg/kg)
IL-2 (0.006mg/kg)

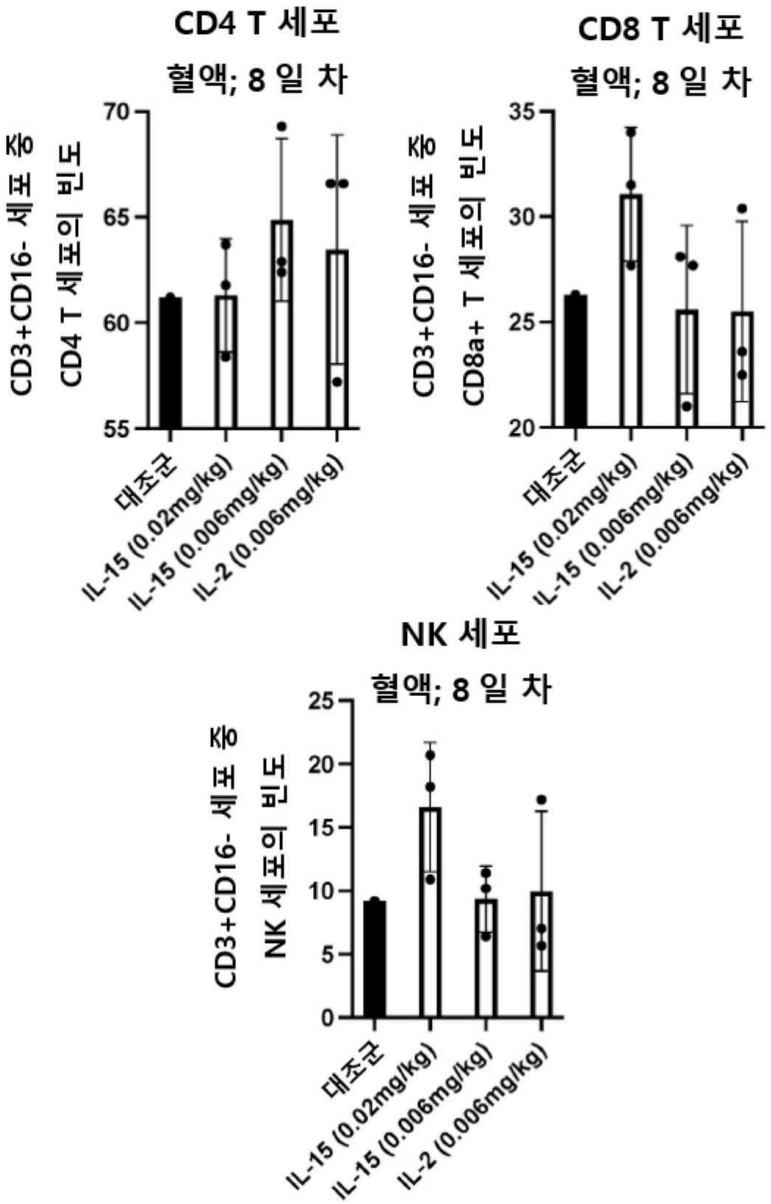
도면28b


NK 세포
혈액; 8 일 차
GzmB/Perf+ NK 세포의 빈도
50
40
30
20
10
0
대조군
IL-15 (0.02mg/kg)
IL-15 (0.006mg/kg)
IL-2 (0.006mg/kg)

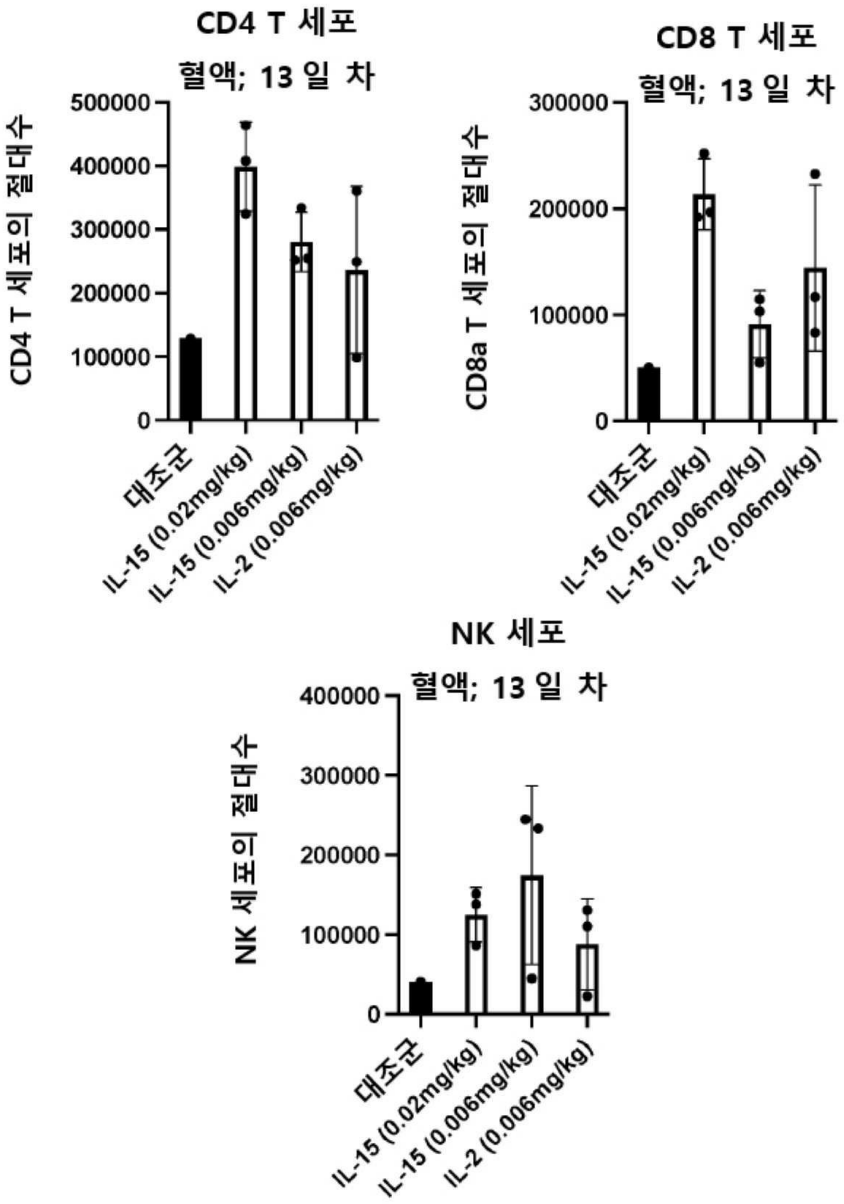
도면29


NK 세포
혈액; 8 일 차
NK 세포에서
IL-2RA(CD25)의 GMFI
20000
15000
10000
5000
0
대조군
IL-15 (0.02mg/kg)
IL-15 (0.006mg/kg)
IL-2 (0.006mg/kg)

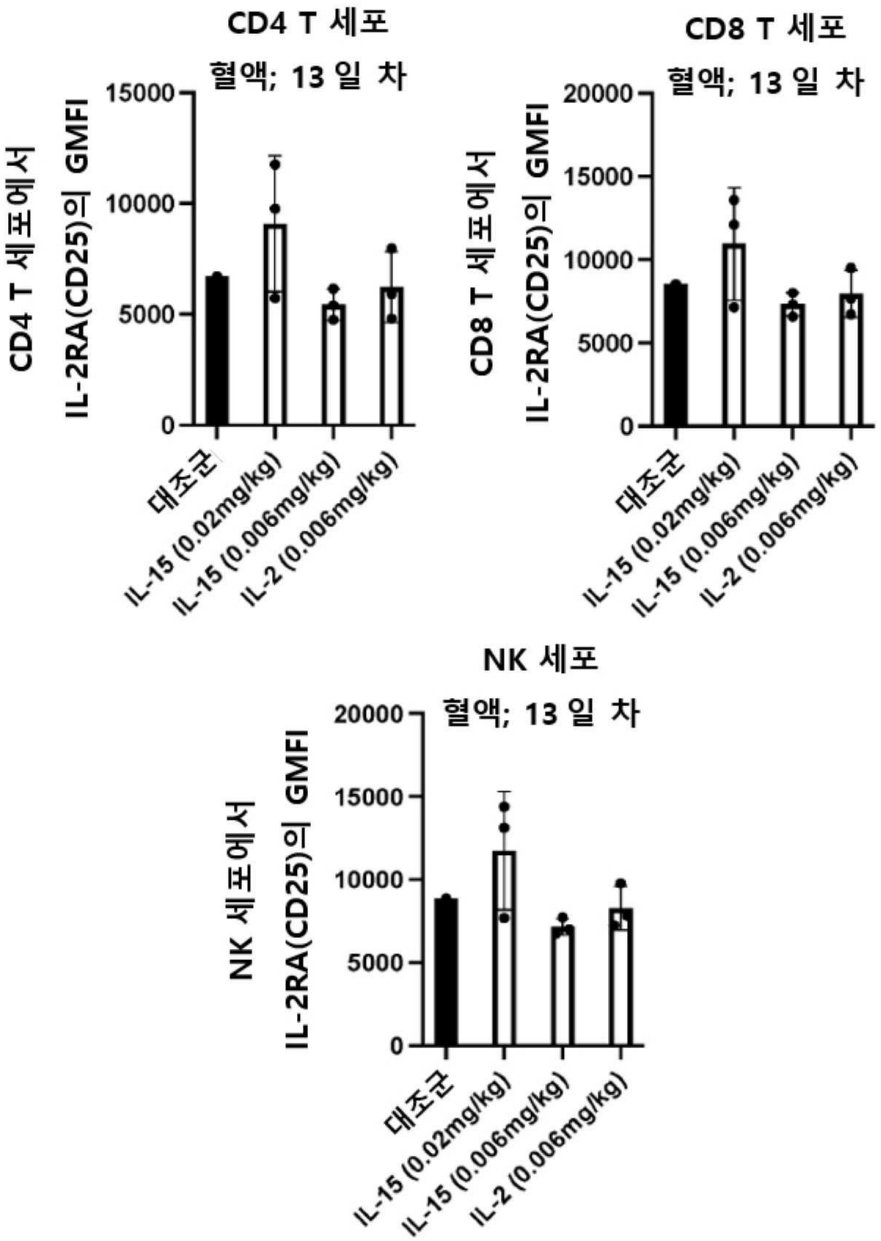
도면30


CD4 T 세포
혈액; 8 일 차
CD3+CD16- 세포 중
CD4 T 세포의 빈도
70
65
60
55
대조군
IL-15 (0.02mg/kg)
IL-15 (0.006mg/kg)
IL-2 (0.006mg/kg)
CD8 T 세포
혈액; 8 일 차
CD3+CD16- 세포 중
CD8a+ T 세포의 빈도
35
30
25
20
대조군
IL-15 (0.02mg/kg)
IL-15 (0.006mg/kg)
IL-2 (0.006mg/kg)
NK 세포
혈액; 8 일 차
CD3+CD16- 세포 중
NK 세포의 빈도
25
20
15
10
5
0
대조군
IL-15 (0.02mg/kg)
IL-15 (0.006mg/kg)
IL-2 (0.006mg/kg)

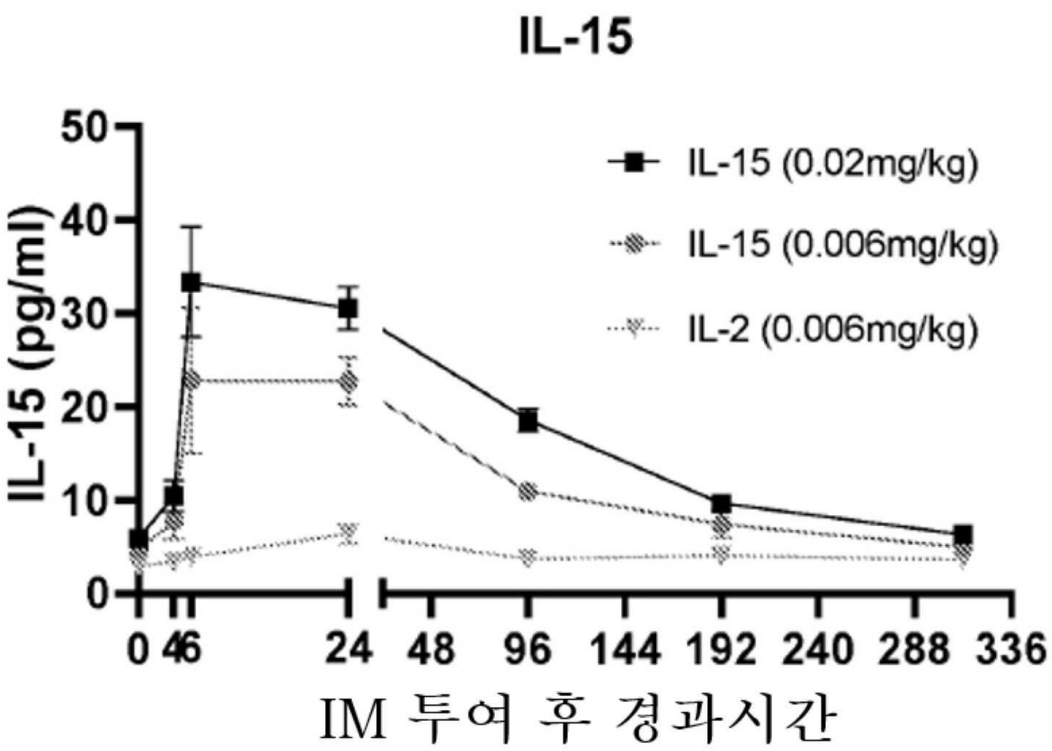
도면31


CD4 T 세포
혈액; 13 일 차
CD4 T 세포의 절대수
500000
400000
300000
200000
100000
0
대조군
IL-15 (0.02mg/kg)
IL-15 (0.006mg/kg)
IL-2 (0.006mg/kg)
CD8 T 세포
혈액; 13 일 차
CD8a T 세포의 절대수
300000
200000
100000
0
대조군
IL-15 (0.02mg/kg)
IL-15 (0.006mg/kg)
IL-2 (0.006mg/kg)
NK 세포
혈액; 13 일 차
NK 세포의 절대수
400000
300000
200000
100000
0
대조군
IL-15 (0.02mg/kg)
IL-15 (0.006mg/kg)
IL-2 (0.006mg/kg)

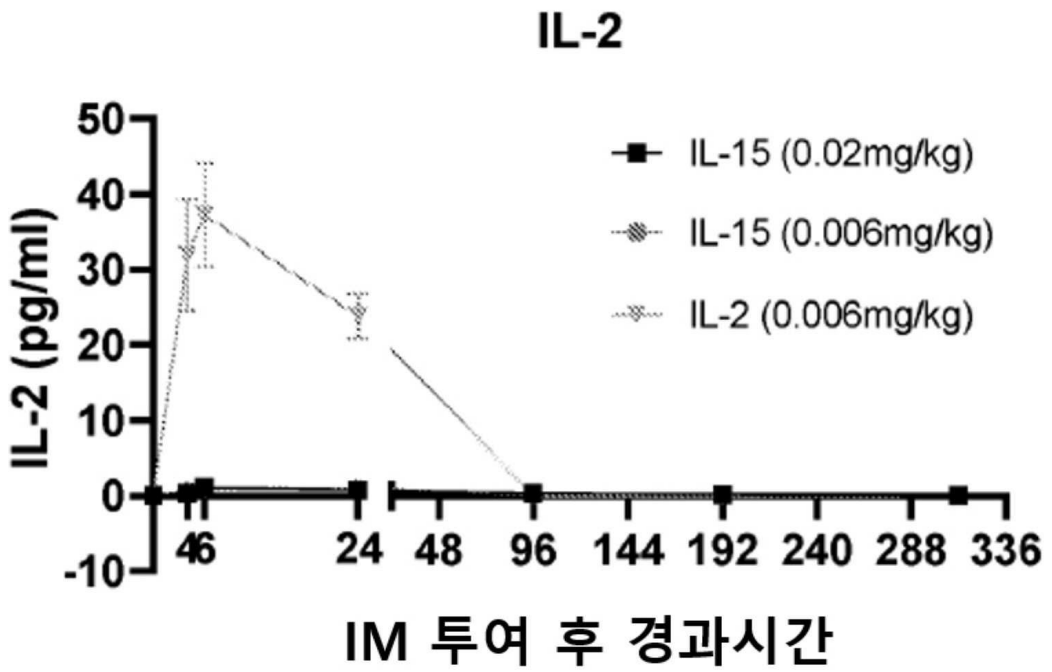
도면32


CD4 T 세포
혈액; 13 일 차
CD4 T 세포에서
IL-2RA(CD25)의 GMFI
15000
10000
5000
0
대조군
IL-15 (0.02mg/kg)
IL-15 (0.006mg/kg)
IL-2 (0.006mg/kg)
CD8 T 세포
혈액; 13 일 차
CD8 T 세포에서
IL-2RA(CD25)의 GMFI
20000
15000
10000
5000
0
대조군
IL-15 (0.02mg/kg)
IL-15 (0.006mg/kg)
IL-2 (0.006mg/kg)
NK 세포
혈액; 13 일 차
NK 세포에서
IL-2RA(CD25)의 GMFI
20000
15000
10000
5000
0
대조군
IL-15 (0.02mg/kg)
IL-15 (0.006mg/kg)
IL-2 (0.006mg/kg)

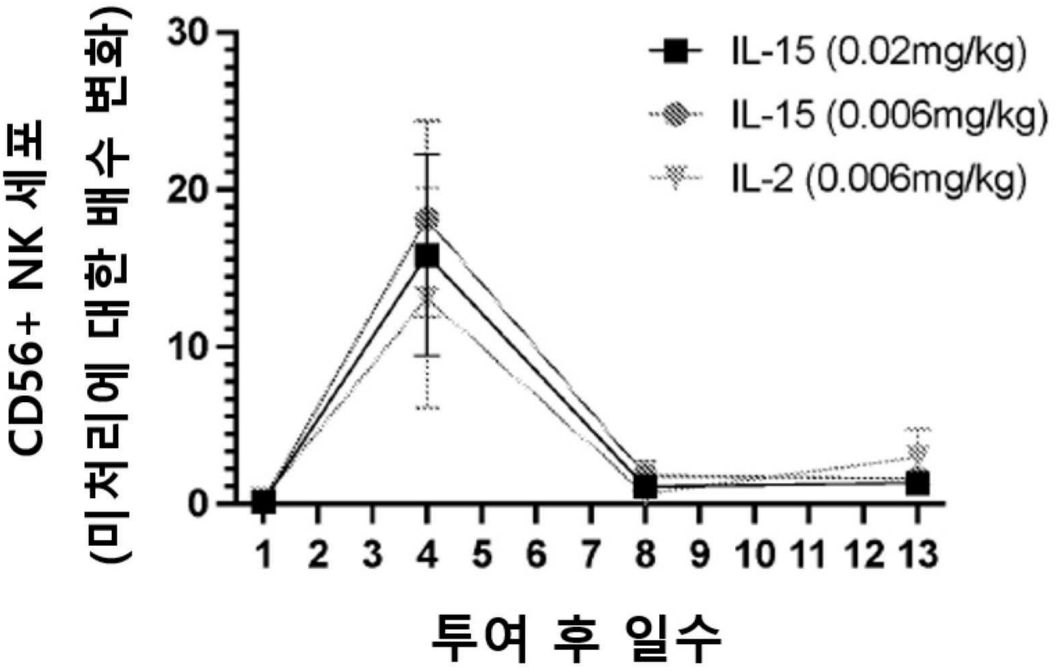
도면33a


IL-15
IL-15 (pg/ml)
50
40
30
20
10
0
IL-15 (0.02mg/kg)
IL-15 (0.006mg/kg)
IL-2 (0.006mg/kg)
0 46
24
48
96
144
192
240
288
336
IM 투여 후 경과시간

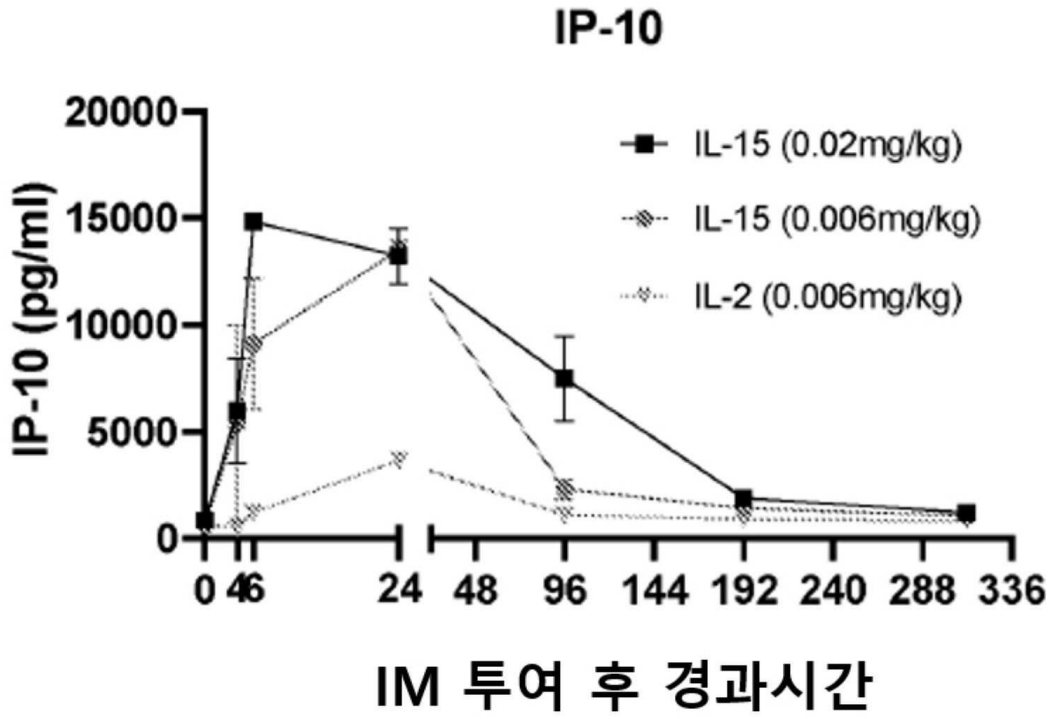
도면33b


IL-2
IL-2 (pg/ml)
50
40
30
20
10
0
-10
IL-15 (0.02mg/kg)
IL-15 (0.006mg/kg)
IL-2 (0.006mg/kg)
46
24
48
96
144
192
240
288
336
IM 투여 후 경과시간

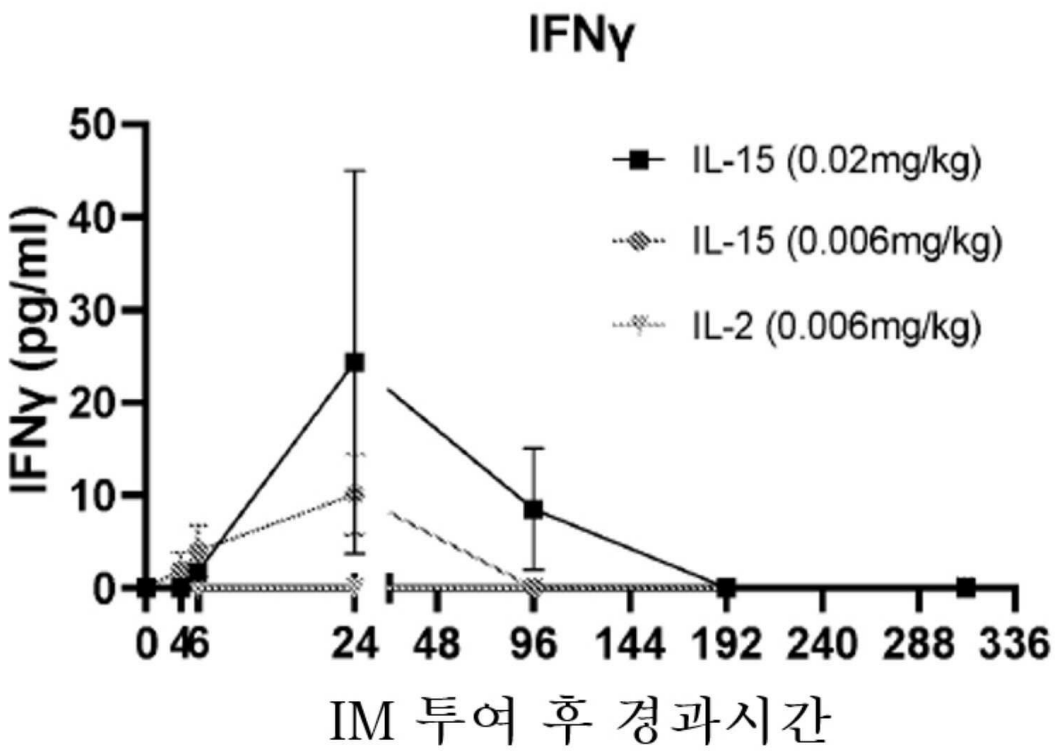
도면34


CD56+ NK 세포
(미처리에 대한 배수 변화)
30
20
10
0
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13
투여 후 일수
IL-15 (0.02mg/kg)
IL-15 (0.006mg/kg)
IL-2 (0.006mg/kg)

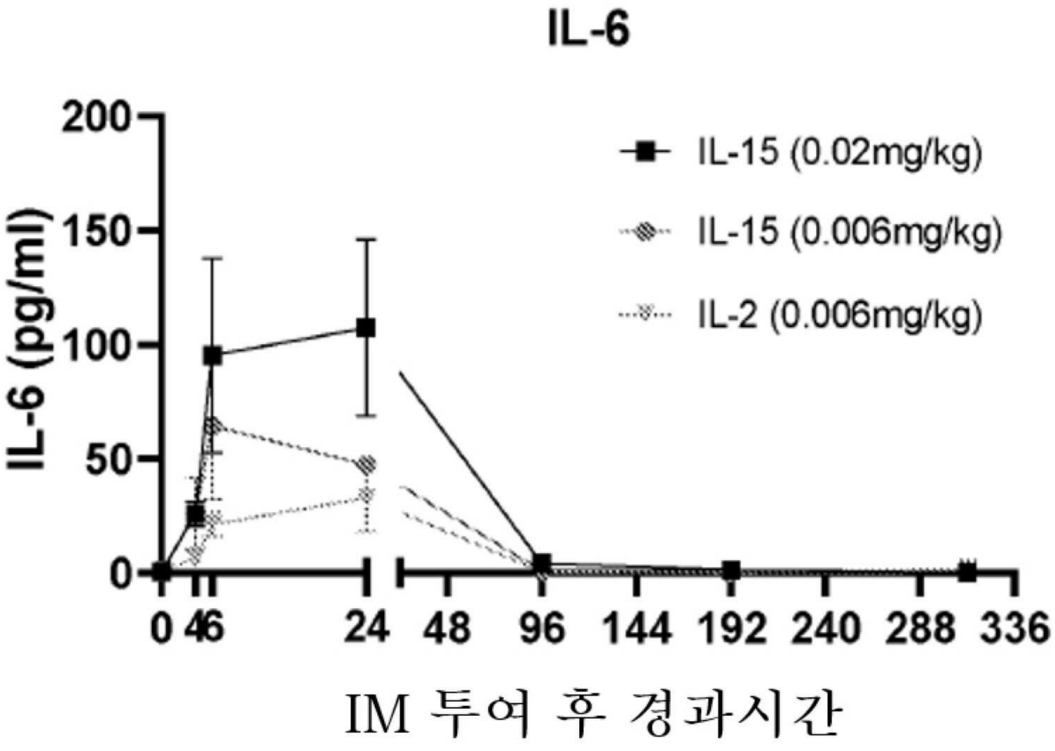
도면35a


IP-10
IP-10 (pg/ml)
20000
15000
10000
5000
0
0 4 6 24 48 96 144 192 240 288 336
IM 투여 후 경과시간
IL-15 (0.02mg/kg)
IL-15 (0.006mg/kg)
IL-2 (0.006mg/kg)

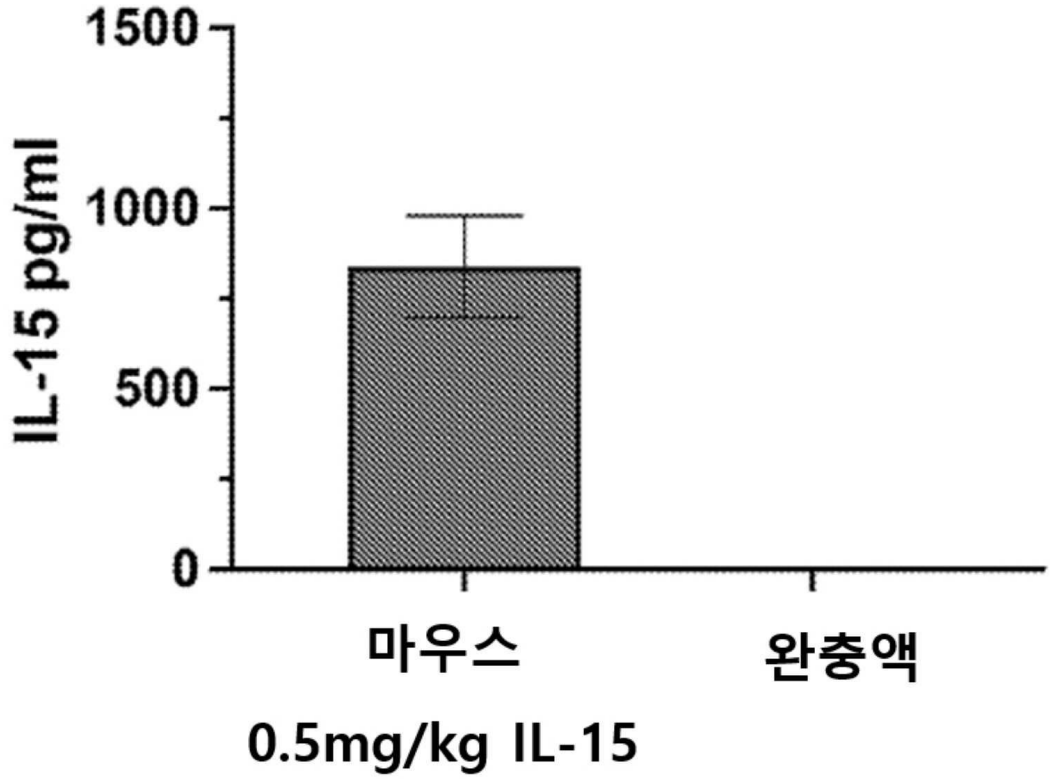
도면35b


IFNγ
IFNγ (pg/ml)
50
40
30
20
10
0
IL-15 (0.02mg/kg)
IL-15 (0.006mg/kg)
IL-2 (0.006mg/kg)
0 4 6
24
48
96
144
192
240
288
336
IM 투여 후 경과시간

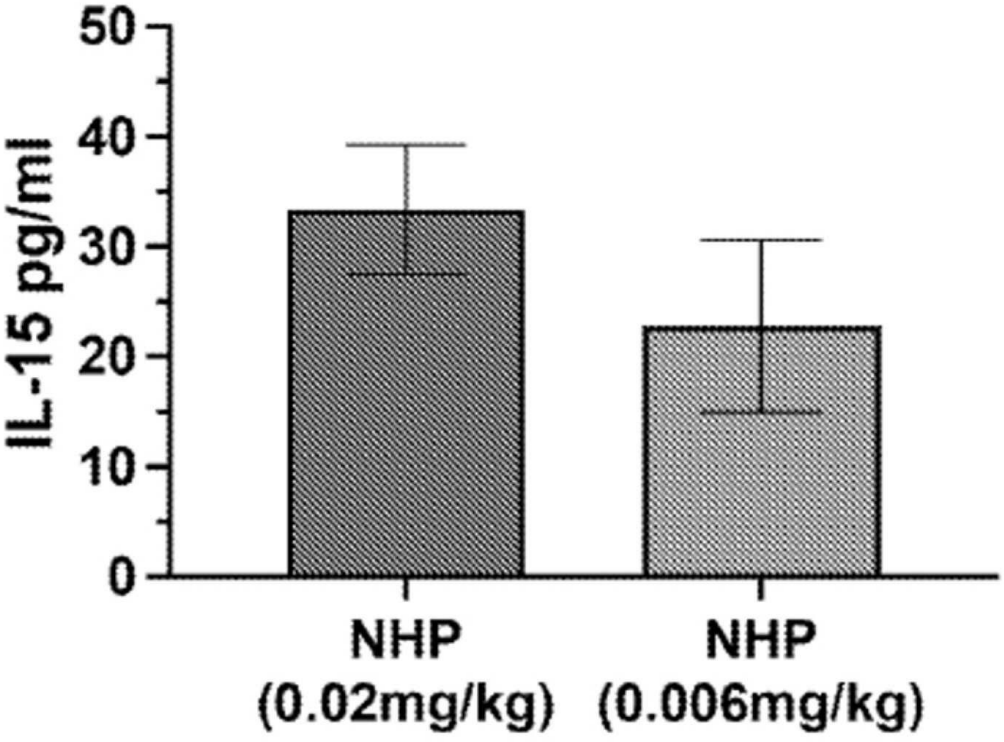
도면35c


IL-6
IL-6 (pg/ml)
200
150
100
50
0
IL-15 (0.02mg/kg)
IL-15 (0.006mg/kg)
IL-2 (0.006mg/kg)
0 4 6
24
48
96
144
192
240
288
336
IM 투여 후 경과시간

도면36a


1500
1000
500
0
IL-15 pg/ml
마우스
완충액
0.5mg/kg IL-15

도면36b


50
40
30
20
10
0
IL-15 pg/ml
NHP
(0.02mg/kg)
NHP
(0.006mg/kg)