



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0156933
(43) 공개일자 2022년11월28일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 A61K 39/00 (2006.01) A61K 39/12 (2006.01)
 A61K 39/39 (2006.01) A61K 47/02 (2006.01)
 A61K 47/26 (2017.01) A61K 47/44 (2017.01)
 A61K 49/18 (2006.01) A61K 9/107 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
 A61K 39/00 (2013.01)
 A61K 39/12 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2022-7036829
- (22) 출원일자(국제) 2021년02월22일
 심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2022년10월21일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2021/019103
- (87) 국제공개번호 WO 2021/194672
 국제공개일자 2021년09월30일
- (30) 우선권주장
 62/993,307 2020년03월23일 미국(US)
 63/054,754 2020년07월21일 미국(US)

- (71) 출원인
 에이치디티 바이오 코퍼레이션
 미국 워싱턴 98102 시애틀 이스트레이크 애비뉴
 이 1616 #280
- (72) 발명자
 칸다르, 아미트
 미국 워싱턴 98102 시애틀 이스트레이크 애비뉴
 이 1616 #280
 리드, 스티븐
 미국 워싱턴 98102 시애틀 이스트레이크 애비뉴
 이 1616 #280
 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인
 특허법인 광장리앤코

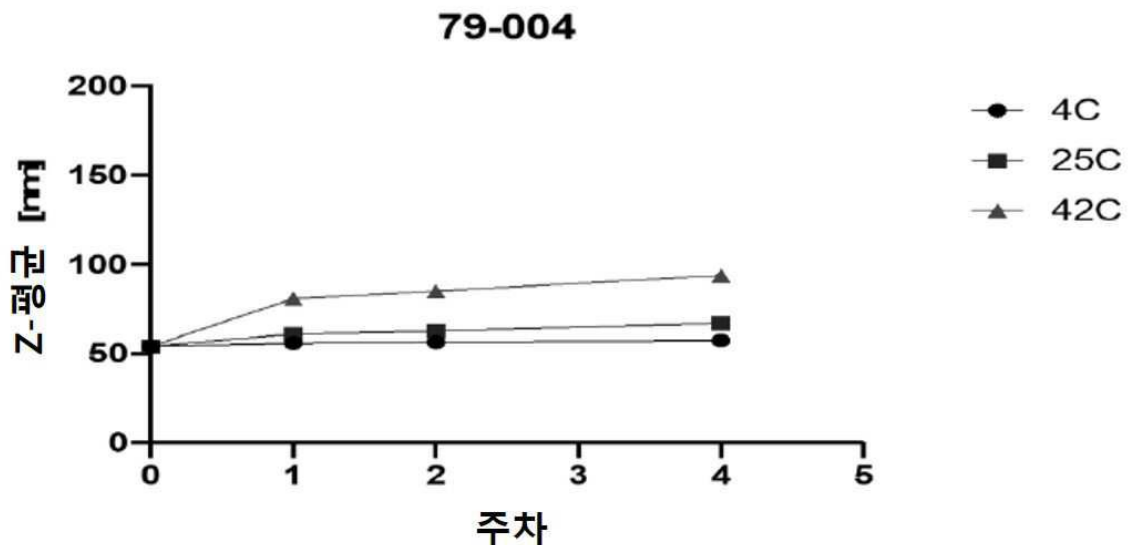
전체 청구항 수 : 총 25 항

(54) 발명의 명칭 RNA의 전달을 위한 조성물 및 방법

(57) 요약

본 개시내용은 나노에멀전 조성물 및 핵산과 같은 생물활성제를 대상에 전달하기 위한 그의 제조 및 사용 방법을 제공한다. 나노에멀전 조성물은 지질 나노입자에 무기 나노입자를 기반으로 하는 소수성 코어를 포함하여, 핵산을 전달할 뿐만 아니라 영상화할 수 있다. 치료 및 백신접종을 위해 이들 입자를 사용하는 방법이 또한 제공된다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

A61K 39/39 (2013.01)
A61K 47/02 (2013.01)
A61K 47/26 (2013.01)
A61K 47/44 (2013.01)
A61K 49/1806 (2013.01)
A61K 9/1075 (2013.01)
A61K 2039/53 (2013.01)
A61K 2039/5555 (2013.01)

(72) 발명자

두티, 말콤

미국 워싱턴 98102 시애틀 이스트레이크 애비뉴 이
1616 #280

에라스무스, 제시

미국 워싱턴 98102 시애틀 이스트레이크 애비뉴 이
1616 #280

카터, 대릭

미국 워싱턴 98102 시애틀 이스트레이크 애비뉴 이
1616 #280

베루브, 브라이언 제이.

미국 워싱턴 98102 시애틀 이스트레이크 애비뉴 이
1616 #280

명세서

청구범위

청구항 1

복수의 나노에멀전 입자를 포함하며, 각각의 나노에멀전 입자가 액체 오일 및 하나 이상의 무기 나노입자의 혼합물을 포함하는 소수성 코어; 하나 이상의 지질; 및 선택적으로 하나 이상의 계면활성제를 포함하는, 나노에멀전 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 각각의 나노에멀전 입자가 금속 염, 금속 산화물, 금속 수산화물, 금속 인산염 및 이들의 조합으로 이루어진 균으로부터 선택되는 하나 이상의 무기 나노입자 및 액체 오일의 혼합물을 포함하는 소수성 코어; 양이온성 지질; 소수성 계면활성제; 및 친수성 계면활성제를 포함하는, 나노에멀전 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 나노에멀전 입자가 액체 오일 약 0.2% 내지 약 40% w/v, 무기 고체 나노입자 약 0.001% 내지 약 10% w/v, 양이온성 지질 약 0.2% 내지 약 10% w/v, 소수성 계면활성제 약 0.25% 내지 약 5% w/v, 및 친수성 계면활성제 약 0.5% 내지 약 10% w/v를 포함하는, 나노에멀전 조성물.

청구항 4

제2항에 있어서, 양이온성 지질이 1,2-디올레오일옥시-3-(트리메틸암모늄)프로판(DOTAP); 3β -[N-(N',N'-디메틸아미노에탄)-카바모일]콜레스테롤(DC 콜레스테롤); 디메틸디옥타데실암모늄(DDA); 1,2-디미리스토일-3-트리메틸암모늄프로판(DMTAP), 디팔미토일(C16:0)트리메틸암모늄프로판(DPTAP); 디스테아로일트리메틸암모늄프로판(DSTAP); N-[1-(2,3-디올레일옥시)프로필]-N,N,N-트리메틸암모늄 클로라이드(DOTMA); N,N-디올레오일-N,N-디메틸암모늄 클로라이드(DODAC); 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-에틸포스포콜린(DOEPIC); 1,2-디올레오일-3-디메틸암모늄-프로판(DODAP); 및 1,2-디리놀레일옥시-3-디메틸아미노프로판(DLinDMA); 1,1'-((2-(4-(2-((2-(비스(2-히드록시도데실)아미노)에틸)(2-히드록시도데실)아미노)에틸)피페라진-1-일)에틸)아잔디일)비스(도데칸-2-올)(C12-200); 및 이들의 조합으로 이루어진 균으로부터 선택되는 것인, 나노에멀전 조

성물.

청구항 5

제2항에 있어서,

소수성 계면활성제가 소르비탄 에스테르이고, 친수성 계면활성제가 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르인, 나노에멀전 조성물.

청구항 6

제2항에 있어서,

각각의 나노에멀전 입자가

선택적으로 인산염-말단 지질, 인-말단 계면활성제, 카르복실산염-말단 계면활성제, 황산염-말단 계면활성제 또는 아민-말단 계면활성제로 코팅된 적어도 하나의 금속 산화물 나노입자를 함유하는 하나 이상의 무기 나노입자, 및

천연 또는 합성 스쿠알렌을 함유하는 액체 오일;

의 혼합물을 포함하는 소수성 코어;

양이온성 지질 DOTAP;

소르비탄 모노스테아레이트, 소르비탄 모노올레에이트 및 소르비탄 트리올레에이트로 이루어진 군으로부터 선택된 소르비탄 에스테르를 포함하는 소수성 계면활성제; 및

폴리소르베이트를 포함하는 친수성 계면활성제

를 포함하는, 나노에멀전 조성물.

청구항 7

제2항에 있어서,

각각의 나노에멀전 입자가

선택적으로 인산염-말단 지질, 인-말단 계면활성제, 카르복실산염-말단 계면활성제, 황산염-말단 계면활성제 또는 아민-말단 계면활성제로 코팅된, 적어도 하나의 금속 수산화물 또는 옥시수산화물 나노입자를 함유하는 하나 이상의 무기 나노입자, 및

천연 또는 합성 스쿠알렌을 함유하는 액체 오일;

의 혼합물을 포함하는 소수성 코어;

양이온성 지질 DOTAP;

소르비탄 모노스테아레이트, 소르비탄 모노올레에이트 및 소르비탄 트리올레에이트로 이루어진 군으로부터 선택된 소르비탄 에스테르를 포함하는 소수성 계면활성제; 및

폴리소르베이트를 포함하는 친수성 계면활성제

를 포함하는, 나노에멀전 조성물.

청구항 8

제2항에 있어서,

나노에멀전 입자의 동적 광 산란에 의해 측정된 z-평균 유체역학적 직경이 약 40nm 내지 약 80nm 범위이고 평균 다분산 지수는 약 0.2 내지 약 0.4 범위인, 나노에멀전 조성물.

청구항 9

(i) 각각의 나노에멀전 입자가

액체 오일 및 하나 이상의 무기 나노입자의 혼합물을 포함하는 소수성 코어;
 하나 이상의 지질; 및
 선택적으로 하나 이상의 계면활성제
 를 포함하는 복수의 나노에멀전 입자; 및
 (ii) 나노에멀전 입자와 복합체화된 생물활성제
 를 포함하는, 나노에멀전 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서,
 생물활성제가 RNA 또는 DNA인, 나노에멀전 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서,
 생물활성제가 mRNA, 종양분해 바이러스 RNA, 레플리콘 RNA 또는 비코딩 RNA인, 나노에멀전 조성물.

청구항 12

제10항에 있어서,
 생물활성제가 항원 또는 항원에 대한 항체를 코딩하는 RNA이고, 이때 항원이 박테리아 감염/질병, 바이러스 감염/질병, 원생동물 질병, 비전염성 질병, 암 또는 자가면역 질병으로부터 유래된 것인, 나노에멀전 조성물.

청구항 13

제10항에 있어서,
 항원이 RNA 바이러스로부터 유래된 것인, 나노에멀전 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서,
 RNA 바이러스가 간염 바이러스, 코로나 바이러스, 모기-매개 바이러스 및 HIV 바이러스로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 나노에멀전 조성물.

청구항 15

제10항에 있어서,
 질소 대 인산염(N:P) 몰비로 특징지어지는 나노에멀전 입자 대 생물활성제의 몰비가 약 1:1 내지 약 150:1 범위인, 나노에멀전 조성물.

청구항 16

제9항에 있어서,
 생물활성제가 보조제(adjuvant)인, 나노에멀전 조성물.

청구항 17

제10항에 있어서,
 생물활성제가 TLR 작용제, RIG-I 작용제, 사포닌, 펩타이드, 단백질, 탄수화물, 탄수화물 중합체, 접합된 탄수화물, 전체 바이러스 입자, 바이러스-유사 입자, 바이러스 단편, 세포 단편 또는 이들의 조합인, 나노에멀전 조성물.

청구항 18

제9항의 나노에멀전 조성물 및 약학상 허용가능한 담체를 포함하는, 약학 조성물.

청구항 19

제9항의 나노에멀전 조성물 및 선택적으로 하나 이상의 백신 보조제를 포함하고, 생물활성제는 항원 또는 항원을 코딩하는 핵산 분자인 것인, 백신 전달 시스템.

청구항 20

제9항의 나노에멀전 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에게 생물활성제를 전달하는 방법.

청구항 21

치료적 유효량의 제9항의 나노에멀전 조성물 및 선택적으로 보조제를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하며, 생물활성제는 항원 또는 항원을 코딩하는 핵산 분자인 것인, 대상체에서 면역 반응을 생성하는 방법.

청구항 22

치료적 유효량의 제9항의 나노에멀전 조성물 및 선택적으로 약학상 허용되는 담체를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 질병을 치료 또는 예방하는 방법.

청구항 23

제9항의 나노에멀전 조성물을 대상체에 투여하는 단계, 및

자기 공명 영상화로 나노에멀전 조성물을 검출하는 단계

를 포함하고,

무기 나노입자가 자기 공명 영상화를 통해 검출가능한 물질을 함유하는 것인, 대상체에서 생물활성제 전달을 영상화하고/하거나 추적하는 방법.

청구항 24

제23항에 있어서,

무기 나노입자가 산화철, 글루콘산철 및/또는 황산철로부터 형성되는 것인, 방법.

청구항 25

(a) 하나 이상의 무기 나노입자, 액체 오일, 하나 이상의 지질 및 선택적으로 소수성 계면활성제를 혼합하여 오일-상 혼합물을 형성하는 단계;

(b) 오일-상 혼합물을 친수성 계면활성제를 선택적으로 함유하는 수용액과 혼합하여 나노에멀전 입자를 형성하는 단계; 및

(c) 선택적으로, 나노에멀전 입자를 생물활성제를 함유하는 수용액과 혼합하여 생물활성제를 나노에멀전 입자와 복합체화시키는 단계

를 포함하는, 나노에멀전 조성물을 제조하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 이 출원은 2020. 3. 23. 출원된 미국 가출원 제62/993,307호 및 2020. 7. 21. 출원된 미국 가출원 제 63/054,754호에 대하여 우선권을 주장하며, 이 두 가지 출원은 그 전문이 본원에 참고로 포함된다.

[0002] 본 발명은 일반적으로 RNA 전달에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 입자 내부의 무기 리포터 (inorganic reporter)의 사용에 의해 영상화되는 능력을 또한 갖는 약제학적으로 허용되는 나노입자와 함께 RNA

의 나노입자-매개 전달에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] RNA 백신 및 치료제는 백신학 및 유전자 요법에 대한 증가하는 관심 분야이다. 백신 플랫폼에 대한 기초로서 핵산-코딩된 항원의 사용은 수많은 이점을 갖는다: 정제가 비교적 간단하고, RNA 작제물이 DNA 합성 기술을 사용하여 수일 내에 구축될 수 있고, 이어서 RNA 전사 및 캡핑이 이루어질 수 있다. 이는 새로운 병원체 위협에 대한 신속한 반응, 새로운 유행병에 적응하기 위한 제조에서의 선회 변화, 또는 다양한 질환에 대한 치료적 개입을 개인화하기 위한 변화를 허용한다. 이들 백신 및 요법이 큰 가능성을 보여주지만, 일부 경우에, 이들은 인간 시험에서 완전한 효능이 부족하고 - 단백질 백신과 같이 - 적응성 면역 반응을 유도하는 능력을 향상시키기 위한 방법이 필요할 수 있다.
- [0004] 몇몇 접근법이 시험되었고 개발 중이지만, 더 추가적이고 개선된 핵산 백신 및 치료제에 대한 필요성이 남아 있다.

발명의 내용

- [0005] 요컨대, 본 발명은 치료를 필요로 하는 대상에게 RNA를 결합하여 전달하는 무기화합물 기반의 나노입자를 제공한다. 이 시스템은 수많은 이점을 갖는다: 1) RNA가 그 자체로 제공되거나 나노구조 지지 담체와 같은 다른 담체 기술을 사용할 때보다 훨씬 더 효율적으로 전달된다; 2) 나노입자는 RNA를 안정화시키고 분해로부터 보호하는 양이온성 지질을 함유한다; 및 3) 나노입자는 체내 입자를 영상화하고 추적할 수 있게 하는 리포터 요소를 갖는다.
- [0006] 본 발명의 일 양태는 복수의 나노에멀전 입자를 포함하는 나노에멀전 조성물에 관한 것이다. 각각의 나노에멀전 입자는 다음을 포함한다:
- [0007] 액체 오일 및 하나 이상의 무기 나노입자의 혼합물을 포함하는 소수성 코어;
- [0008] 하나 이상의 지질 (예컨대 양이온성 지질); 및
- [0009] 선택적으로 하나 이상의 계면활성제.
- [0010] 본 발명의 일 양태는 (i) 복수의 나노에멀전 입자, 및 (ii) 나노에멀전 입자와 복합체화된 생물활성제를 포함하는 나노에멀전 조성물에 관한 것이다. 각각의 나노에멀전 입자는 다음을 포함한다:
- [0011] 액체 오일 및 하나 이상의 무기 나노입자의 혼합물을 포함하는 소수성 코어;
- [0012] 하나 이상의 지질 (예컨대 양이온성 지질); 및
- [0013] 선택적으로 하나 이상의 계면활성제.
- [0014] 본 발명의 또 다른 양태는 본원에 기재된 바와 같은 나노에멀전 입자 및 생물활성제, 및 선택적으로, 약제학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 포함하는 나노에멀전 조성물을 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다.
- [0015] 본 발명의 또 다른 양태는 본원에 기재된 바와 같은 나노에멀전 입자 및 생물활성제, 및 선택적으로 하나 이상의 백신 보조제를 포함하는 나노에멀전 조성물을 포함하는 백신 전달 시스템에 관한 것이며, 여기서 생물활성제는 항원 또는 항원을 코딩하는 핵산 분자이다.
- [0016] 본 발명의 또 다른 양태는 본원에 기재된 바와 같은 나노에멀전 입자 및 생물활성제를 포함하는 나노에멀전 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 생물활성제를 대상체에게 전달하는 방법에 관한 것이다.
- [0017] 본 발명의 또 다른 양태는 본원에 기재된 바와 같은 나노에멀전 입자 및 생물활성제, 및 선택적으로 보조제를 포함하는 나노에멀전 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 면역 반응을 생성하는 방법에 관한 것이며, 여기서 생물활성제는 항원 또는 항원을 코딩하는 핵산 분자이다.
- [0018] 본 발명의 또 다른 양태는, 본원에 기재된 바와 같은 나노에멀전 입자 및 생물활성제, 및 선택적으로 제약상 허용되는 담체를 포함하는 치료 유효량의 나노에멀전 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서의 감염 또는 질환을 치료 또는 예방하는 방법에 관한 것이다.
- [0019] 본 발명의 또 다른 양태는 대상체에서 생물활성제 전달을 영상화하고/하거나 추적하는 방법에 관한 것으로서, 다음을 포함한다:

- [0020] 본 명세서에 기재된 바와 같이, 나노에멀전 입자 및 생물활성제를 포함하는 나노에멀전 조성물을 대상체에게 투여하는 단계로서, 무기 나노입자는 자기 공명 영상화(magnetic resonance imaging)를 통해 검출가능한 물질을 함유하는 것인 단계; 및
- [0021] 자기 공명 영상화를 이용하여 나노에멀전 조성물을 검출하는 단계.
- [0022] 본 발명의 또 다른 양태는 나노에멀전 조성물의 제조 방법에 관한 것으로, 다음을 포함한다:
- [0023] (a) 하나 이상의 무기 나노입자, 액체 오일, 하나 이상의 지질 (예컨대 양이온성 지질), 및 선택적으로 소수성 계면활성제를 혼합하여 오일상 혼합물을 형성하는 단계;
- [0024] (b) 상기 오일상 혼합물을 선택적으로 친수성 계면활성제를 함유하는 수용액과 혼합하여 나노에멀전 입자를 형성하는 단계; 및
- [0025] (c) 선택적으로, 나노에멀전 입자를 생물활성제를 함유하는 수용액과 혼합함으로써, 생물활성제를 나노에멀전 입자와 복합체화하는 단계.

도면의 간단한 설명

- [0026] 도 1a-1c는 다양한 온도에서의 세 가지 예시적인 지질 무기 나노입자(LION) 제형의 입자 크기 및 안정성을 함수 시간으로 보여준다. 도 1a는 실시예 1에서 생산된 79-004로 표지된 LION을 보여준다. 도 1b는 실시예 1에서 생성된 79-006-A으로 표지된 LION을 보여준다. 도 1c는 실시예 1에서 생성된 79-006-B으로 표지된 LION을 보여준다.
- 도 2는 네이키드(비제형화) RNA와 비교하여, 15의 질소:인산염(N:P) 비로 RNA 분자와 복합된 예시적인 LION 제형(각각, 실시예 1에서 제조된 79-004, 79-006-A, 79-006-B 및 79-011로 표지된 LION)의 겔 전기영동을 보여주며, 이는 RNA를 RNase의 작용으로부터 보호하는 LION 제형의 능력을 입증한다.
- 도 3a는 연장된 기간에 걸쳐 LION 제형(실시예 1에서 제조된 바와 같이, 79-004로 표지된 LION)와 함께 제형화된 repRNA-코딩 SEAP를 근육내로 주사한 C57BL/6 마우스에서의 단백질 발현을 보여준다. 도 3b는 주사 후 수일에 걸쳐 다양한 SPIO 크기 (실시예 1에서 제조된 바와 같이 각각 79-004, 79-006-A 및 79-006-B으로 표지된 LION)를 갖는 다양한 LION 제형으로 제형화된 repRNA-코딩 SEAP와 함께 근육내로 주사된 C57BL/6 마우스에서의 단백질 발현을 보여준다. 도 3c는 주사 후 수일에 걸쳐 LION 제형 또는 대조군으로서 나노구조화된 지질 담체(nanostructured lipid carrier; NLC)와 함께 제형화된 repRNA-코딩 SEAP와 함께 근육내 주사된 C57BL/6 마우스에서의 단백질 발현을 보여준다. 도 3d는 주사 후 수일에 걸쳐 각각 400ng/ μ l 및 40ng/ μ l의 RNA 복합체 농도의 LION 제형으로 제형화된 repRNA-코딩 SEAP와 함께 근육내 주사된 C57BL/6 마우스에서의 단백질 발현을 보여준다. 도 3e는 LION 제형과 함께 제형화된 repRNA-코딩 SEAP (각각 0.5 μ g, 2.5 μ g, 및 12.5 μ g)를 근육내로 주사한 C57BL/6 마우스에서의 단백질 발현을 N:P 비의 함수로서 나타낸다. 데이터는 평균 및 SE로 표시된다.
- 도 4a는 LION/repRNA 복합체로부터 발현된 항원(10, 1 및 0.1 μ g의 srRNA의 투여량 수준에서)이 C57BL/6 마우스에서 SARS-CoV-2의 수용체-결합 도메인에 대한 면역 반응을 유도하였음을 보여준다. 도 4b는 항-스파이크 효소면역측정법(ELISA)에 의해 결정된, 다양한 SPIO 크기를 갖는 다양한 LION 제형(각각 LION-10, LION-15, LION-25, LION-5)와 함께 제형화된 repSARS-CoV2S로 근육내 주사된 C57BL/6 마우스의 혈청 중 항-S IgG 농도의 결과를 보여준다. 데이터는 평균 및 SE로 표시되고; n = 그룹당 5이다. 도 4c는 근육내 주사 후 14일째(각 그룹에 대한 첫 번째 막대) 또는 21일째(각 그룹에 대한 두 번째 막대)에 혼합 방향(LION을 RNA에 혼합하는 것 대 RNA를 LION에 혼합하는 것) 및 희석제(수크로스를 사용하여 1:200 희석(Suc) 대 텍스트로스를 사용하는 것(Dex))를 변화시킴으로써 다양한 LION 제형으로 제형화된 repSARS-CoV2S로 근육내 주사된 C57BL/6 마우스의 혈청에서 항-S IgG 농도의 결과를 보여주며, 항-스파이크 ELISA에 의해 측정되었다. 데이터는 평균 및 SE로 표시되고; n = 그룹당 5이다.
- 도 5a-5b는 LION 제형 중의 철 농도의 함수로서 T1(도 5a) 및 T2(도 5b) 이완 시간의 증가를 보여준다.
- 도 6a는 동물에서 LION-항체 서열 RNA 복합체 유도된 ZIKV-117 항체를 보여준다. 동물들은 면역화 후 7일에 채혈되었다. 도 6b 및 6c는 식염수로 근육내 경로로 면역화된 성인 암컷 임신 토끼에서의 항-BG505 SOSIP.664 IgG 항체의 크기 및 역학(도 6b) 또는 LION으로 제형화된 BG505 SOSIP.664 삼량체를 코딩하는 repRNA 의 크기 및 역학(도 6c)을 보여준다. 도 6d 및 6e는 식염수로 근육내 경로로 면역화된 성체 암컷 임신 토끼에서의 항-ZIKV E IgG 항체의 크기 및 역학(도 6d) 또는 LION으로 제형화된 ZIKV prM-E 항원을 코딩하는 repRNA의 크기 및 역학

(도 6e)을 보여준다. 1주째 무렵 그늘진 영역이 토끼가 번식한 시기를 나타내고 있다. 6주부터 7주 사이에 음영 처리된 영역은 새끼 토끼가 분만된 기간을 나타낸다. 화살표는 면역화 시점(0, 4 및 11주)을 표시한다. 도 6f 및 6g는 새끼 토끼로의 항-SOSIP IgG의 자궁내 전달 평가에 대한 결과를 보여준다. 도 6f는 분만 시 새끼 토끼에서 항-SOSIP IgG 반응을 나타낸다. 처리군당 각각의 한배새끼(litter)로부터 최소 2개의 새끼 토끼를 안락사시켜, 자궁항체 전달에서의 평가를 수행하였다. 도 6g는 토끼 세포에서 항체 수준과 상응하는 새끼 토끼 사이의 양의 상관 관계(피어슨 $r = 0.94$)를 나타내는 XY 플롯을 보여준다. 도 6h 및 6i는 기존에 존재하는 모체 항체와 관련한 백신 유도 반응을 보여준다. 혈청 항-SOSIP IgG 수준을 부스트 후 4주(새끼 토끼가 젖을 땀 후 3주)에 새끼 토끼에서 수집하였다. 식염수를 투여받은 암컷 토끼로부터의 새끼 토끼나, LION + RNA-prM/E를 투여받은 암컷 토끼로부터의 새끼 토끼는, BG505 SOSIP.664에 대한 기존의 모체 항체에 대해 음성(-)으로 그룹화된다. LION+RNA-SOSIP 또는 AddaVax 보조제 첨가된 제조합 BG505 SOSIP.664를 투여받은 암컷 토끼로부터의 새끼 토끼는, BG505 SOSIP.664에 대한 기존의 모체 항체에 대해 양(+)으로 그룹화한다. 통상적인 일방향 ANOVA 및 Tukey의 다중 비교 시험은 log10 변환된 데이터에 대해 수행하였다. (ns = 유의하지 않음(non significant)).

도 7은 시험관내에서 repRNA-CoV2S 특성을 나타낸다. 도 7a는 c-말단 v5 에피토프 태그에 융합된, SARS-CoV-2 단백질 Wuhan-Hu-1(GenBank: MN908947.3) 내의 위치 21,536 내지 25,384에 상응하는, S1-, S2-, 막관통- (TM) 및 세포질- (CD) 도메인을 포함하는 코돈-최적화된 전장 스파이크 (S) 오픈 리딩 프레임이 베네스웰라형 말 뇌염 바이러스, 균주 TC-83의 4 개의 비구조적 단백질(nsP1-4) 유전자를 코딩하는 알파바이러스 레플리콘으로 클로닝되었음을 보여준다. 도 7b 및 7c는 repRNA-COV2S를 BHK 세포로 형질감염시킨 후 24시간 후, 회복기 인간 혈청 또는 항-v5를 사용하여 항-v5 면역형광(도 7b) 및 웨스턴 블롯(도 7c)에 의한, 면역검출을 위한 세포의 분석 결과를 보여준다. 제조합 SARS-CoV2 스파이크 단백질(rCoV2-Spike) 및 repRNA-GFP를 각각 양성 및 음성 대조군으로 사용하였다. 도 7b 및 7c의 데이터는 두 가지 독립적인 실험을 대표한다.

도 8a-8e는 repRNA의 대표적인 지질 무기 나노입자(Lipid InOrganic Nanoparticle; LION) 제형을 보여준다. 도 8a는 대표적인 LION과 repRNA와의 혼합 후 백신 복합체 형성을 그래프로 나타낸 것이다. 도 8b는 4° C, 25° C 및 42° C에서 저장 후 동적 광산란 (DLS)에 의해 측정된 LION 입자 크기의 시간 진화를 나타낸 그래프이다. 도 8c는 LION과 repRNA의 혼합 후 크기 분포의 이동에 의한 복합체 형성의 확인을 보여주는 그래프이다. 도 8d는 농축 RNase 챌린지 후, LION으로부터 추출된 repRNA의 삼중 체형의 겔 전기영동 분석을 보여준다. 도 8e는 페놀-클로로포름 처리로 추출한 repRNA의 겔 전기영동을 보여준다. 도 8f는 복합체의 입자 크기를 나타낸다. 도 8b, 도 8e 및 도 8f의 데이터는 단일 실험에서 얻은 데이터인 반면, 도 8c 및 도 8d의 데이터는 3개의 독립적인 실험을 대표한다. 도 8b, 도 8d 및 도 8f의 데이터는 3개의 기술적 복제물(technical replicate)의 평균 \pm s. d.로 표시된다.

도 9a-9f는 LION/repRNA-CoV2S 복합체가 C57BL/6 마우스에서 Th1-편향성 및 중화 항체를 유도함을 보여준다. 6 내지 8주령 C57BL/6 마우스 (n = 5/군)는 근육내 경로를 통해 10, 1, 또는 0.1g LION/repRNA-CoV2S를 투여받았다. 프라이밍 면역화 후 14일 후, 혈청을 수확하였다. C57BL/6 마우스의 혈청 중 항S IgG 농도를 효소면역측정법 (ELISA)으로 확인한 결과를 도 9a에 나타내었다. 도 9b는 슈도바이러스(SARS-CoV-2 Wuhan-Hu-1 슈도타입) 중화 분석에 의해 결정된 C57BL/6 마우스의 혈청 중 50% 억제 농도(IC50)를 보여준다. 도 9c와 도 9d는 ELISA로 측정된 C57BL/6 마우스의 혈청에서 항-S IgG1 및 IgG2c 농도(도 9c)와 IgG2c:IgG1 농도비(도 9d)를 보여주고 있다. 28일째에 마우스는 추가 면역화를 받았고, 12일 후에 비장과 폐를 수확하였다. 도 9e 및 9f는 S 단백질을 포함하고 11개의 아미노산에 의해 중첩되는 15-mer로 구성된 10개의 펩티드 풀로 18시간 자극한 후, 효소-연결된 면역 흡수성 스팟(ELISpot)에 의해 측정된 비장 세포(도 9e) 및 폐 세포(도 9f)에서의 IFN-g 반응의 결과를 보여준다. 도 9a, 도 9c 및 도 9d의 데이터는 세 가지 독립적인 실험을 대표하는 반면, 도 9b, 도 9e 및 도 9f의 데이터는 단일 실험으로부터의 것이다. 모든 데이터는 평균 \pm s.d * $p < 0.05$ 뿐만 아니라 개별 값으로 표현되며, Tukey의 다중 비교 시험과 함께 단방향 ANOVA에 의해 결정된다.

도 10은 LION/repRNA-CoV2S 복합체가 노화된 BALB/C 마우스에서 Th1-편향 항체를 유도함을 보여준다. 2개월, 8개월 또는 17개월령 BALB/C 마우스 (n=5/군)는 근육내 경로를 통해 10 또는 1g LION/repRNA-CoV2S를 투여받았다. 프라이밍 면역화 후 14일 후, 혈청을 수확하였다. 도 10a, 10b 및 10c는 ELISA로 측정된 노화된 BALB/C 마우스의 혈청 내 항-S IgG 농도(도 10a), IgG1 농도 및 IgG2a 농도(도 10b) 및 IgG2a:IgG1 농도 비율(도 10c)의 결과를 나타낸 것으로, 17, 8 및 2개월령 BALB/Cs에 대한 데이터는 단일 실험에서 얻은 것이고, 2개월령 BALB/Cs에 대한 데이터는 2차 실험에서 복제한 것이다. 모든 데이터는 평균 \pm s.d * $p < 0.05$ 뿐만 아니라 개별 값으로 표현되며, 17개월령 동물과 8개월 또는 2개월령 동물 사이의 Tukey의 다중 비교 시험으로 단방향 ANOVA에 의해 측정되었다.

도 11a-11d는 LION/repRNA-CoV2S 복합체의 단일 용량이 돼지 꼬리 마카크(pigtailed macaques)에서 중화 항체 반응을 유도함을 보여준다. 도 11a는 돼지 꼬리 마카크를 근육내 경로를 통해 250g(n=3) 또는 50g(n=2) repRNA-CoV2-S 복합체로 백신접종하고, 혈액을 10, 14, 28 및 42일에 수집하고; 50g 그룹은 28일에 부스트 백신접종을 받고, 혈액을 14일 후에 수집하는 투여 요법을 나타낸다. 도 11b는 면역화 전 혈액 채취에 의해 확립된 기준선에 대해, 면역화 후 샘플에 대해 수행된 혈청 항-S IgG ELISA의 결과를 보여준다. 도 11c는 슈도바이러스(SARS-CoV-2 Wuhan-Hu-1 슈도타입) 중화 분석법에 의해 결정된 각 샘플의 면역화 전 혈액 채취에 의해 확립된 기준선에 대한 평균 50% 저해 농도(IC50)의 결과를 보여준다. 도 11d는 SARS-CoV2/WA/2020 단리물에 대한 80% 플라크-감소 중화 항체 역가(PRNT₈₀)를 코로나19 확진자로부터 채취한 7명의 회복기 인간 샘플로부터 혈청과 함께 28일과 42일에 측정된 것을 보여준다. 실험은 한 번 수행되었다. 도 11b와 도 11c의 각 선은 각 개별 동물을 나타낸다. 도 11d의 데이터는 평균 s.d ± s.d *p<0.05뿐만 아니라 개별 값으로 보고되며, 14일 및 28일에 250g 그룹을 비교하는 학생 t-테스트에 의해 측정되었다. Mann-Whitney U 테스트에 의해 측정된 바와 같이, 42일에 모든 5마리의 동물에서의 평균 PRNT₈₀ 역가와 7명의 회복기 인간으로부터의 혈청에서의 역가 사이에 유의한 차이(ns)가 없었다.

도 12는 LION 제형으로 제형화된 repRNA-SARS-CoV2S (각각 250 µg 및 10 µg 용량 수준에서)로 근육내 주사된 토끼에서의 항-스파이크 IgG 수준을 나타낸다. 토끼는 근육내 주사 후 일정한 간격으로 채혈하였으며, 단백질 발현은 항-스파이크 ELISA에 의해 IgG 농도를 분석함으로써 결정하였다. 데이터는 평균 및 SEM으로 표시되며, n = 그룹당 4이다.

도 13a는 LION 제형과 복합체화된 2.5 µg repRNA-RSV를 근육내로 주사한 C57B1/6 및 BALB/c 마우스에서의 항-F IgG 수준을 나타낸다. 도 13b는 LION 제형과 복합체화된 2.5 µg repRNA-RSV를 근육내 주사한 C57B1/6 및 BALB/c 마우스에서의 항-G (A2) IgG 수준을 나타낸다. 근육내 주사 28일 후에 혈액을 수집하고, 혈청을 제조하고 ELISA에 의해 평가하였다. 각각의 지점은 개별 동물로부터의 데이터를 나타내며, 위스커(whisker)는 최소에서 최대까지 나타내고, 박스는 사분위수 범위를 나타내고 수평 막대는 중앙값을 나타낸다.

도 14a-14b는 RNase 켈린지로부터 보호를 제공하는 LION 제형에 대한 PAMP의 결합을 보여준다. 도 14a는 다양한 N:P 복합체화 비율(각각 0.04, 0.2, 1, 5 및 25)에서의 PAMP-LION 복합체의 겔 전기영동 분석을 RNA 겔 상에서 수행하고 유리 RNA에 대해 평가하였다. 도 14b는 네이키드 PAMP (제형화되지 않은 PAMP)와 비교하여, RNase A로 시험한 후, PAMP-LION 복합체의 겔 전기영동 분석을 나타낸다. RNA를 LION으로부터 추출하고, 아가로스 겔 상에서 실행하여 RNA 분해를 평가하였다.

도 15는 PAMP-LION 복합체에 의해 상청액에서 SEAP 활성 및 루시페라제 활성에 의해 각각 측정된 IFN-β 프로모터 및 IFIT2의 활성화를 N:P 비의 함수로서 나타낸다. 점선은 PAMP 단독의 활성화 수준을 나타낸다.

도 16a 및 16b는 비제형화된 RNA와 비교하여 PAMP-LION 제형 또는 Riboxim-LION 제형에 의해 각각 상청액에서 SEAP 활성 및 루시페라제 활성에 의해 측정된 IFN-β 프로모터(도 16a) 및 IFIT2(도 16b)의 활성화를 보여준다. 점선은 미디어 대조군 웰의 OD₆₃₅ 판독값을 나타낸다. 도 16c는 Riboxim 용량 수준의 함수로서, 제형화되지 않은 Riboxim과 비교하여, Riboxim-LION 제형에 의한 IFIT2의 활성화를 보여준다. 도 16d는 나이브 대조군과 비교하여 처리된 마우스의 비강에서 선천성 면역 유전자의 용량 의존적 유도를 보여준다. 도 16e에서는 처리된 마우스의 폐에서 선천성 면역 유전자의 활성화를 보여준다. 도 16f는 마우스가 PAMP:LION 제형을 연속 3일 동안 비강내 투여했을 때 체중을 유지했음을 보여준다.

도 17은 LION 제형의 코어로서 SPIO(Fe-LION) 또는 TOPO-코팅된 옥시수산화알루미늄 나노입자(Al-LION)를 사용한, nLuc를 코딩하는 레플리콘 RNA를 갖는 예시적인 RNA:LION 복합체로부터의 시험관내 단백질 발현을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] 본 발명은 RNA의 담체로서 지질 무기 나노입자(Lipid InOrganic Nanoparticle; LION)의 용도를 제공한다. 특히, 완충제에 하전된 코팅을 갖는 지질 매트릭스 중의 고체 무기 코어가 개시된다. 이들 나노입자의 사용은 수많은 이점을 갖는다: RNA는 입자와 무관하게 복합체화될 수 있고, 입자는 MRI 또는 다른 영상화 기술에 사용 가능한 것과 같은 자기 신호를 갖도록 설계될 수 있다. RNA는 입자에 의해 보호되고, 이들은 세포 또는 살아있는 존재에 주어지는 경우 보호된 RNA로부터 항원을 비롯한 수많은 유형의 단백질의 발현을 유도한다.

[0028] 본 발명의 일 양태는 복수의 나노에멀전 입자를 포함하는 나노에멀전 조성물에 관한 것이다. 각각의 나노에멀전

입자는 다음을 포함한다:

- [0029] 액체 오일 및 하나 이상의 무기 나노입자의 혼합물을 포함하는 소수성 코어;
- [0030] 하나 이상의 지질 (예를 들어, 양이온성 지질); 및
- [0031] 선택적으로 하나 이상의 계면활성제.
- [0032] 본 발명의 또 다른 양태는 (i) 복수의 나노에멀전 입자, 및 (ii) 나노에멀전 입자와 복합체화된 생물활성제를 포함하는 나노에멀전 조성물에 관한 것이다. 각각의 나노에멀전 입자는 다음을 포함한다:
- [0033] 액체 오일 및 하나 이상의 무기 나노입자의 혼합물을 포함하는 소수성 코어;
- [0034] 하나 이상의 지질 (예를 들어, 양이온성 지질); 및
- [0035] 선택적으로 하나 이상의 계면활성제.
- [0036] **나노에멀전 입자**
- [0037] 나노에멀전 입자는 액체 오일과 하나 이상의 무기 고체 나노입자의 혼합물을 포함하는 소수성 코어를 갖는다. 나노에멀전 입자는 본 명세서에서 지질 무기 나노입자(Lipid InOrganic Nanoparticle; LION)로도 지칭될 수 있다.
- [0038] 상기 액체 오일은 상기 1종 이상의 무기 나노입자와 혼합되어 소수성 코어를 형성한다. 액체 오일은 전형적으로 대사가가능하다. 적합한 액체 오일은 식물성 오일, 동물성 오일, 또는 합성적으로 제조된 오일일 수 있다.
- [0039] 일부 실시양태에서, 액체 오일은 어유(fish oil)이다. 일부 실시양태에서, 액체 오일은 천연 또는 합성 테르페노이드이다.
- [0040] 일부 실시양태에서, 액체 오일은 스쿠알렌, 트리글리세리드(예컨대 카프릭/카프릴릭 트리글리세리드 또는 미리스트산 트리글리세리드), 비타민 E, 라우로일 폴리옥실글리세리드, 모노아실글리세롤, 대두 레시틴, 해바라기유, 대두유, 올리브유, 포도씨유, 또는 이들의 조합이다. 일 실시양태에서, 액체 오일은 스쿠알렌, 트리글리세리드 (예컨대 카프릭/카프릴릭 트리글리세리드 또는 미리스트산 트리글리세리드), 비타민 E, 라우로일 폴리옥실글리세리드, 모노아실글리세롤, 대두 레시틴, 또는 이들의 조합이다. 일 실시양태에서, 액체 오일은 스쿠알렌, 트라이글리세라이드(예컨대, 카프릭/카프릴릭 트라이글리세라이드 또는 미리스트산 트라이글리세라이드), 해바라기유, 대두유, 올리브유, 포도씨유, 또는 이들의 조합이다.
- [0041] 일부 실시양태에서, 액체 오일은 스쿠알렌(천연 또는 합성, 선택적으로 상기 열거된 액체 오일 중 임의의 것과 조합)이다.
- [0042] 무기 나노입자는 하나 이상의 동일하거나 상이한 금속(전이 금속을 포함하는 임의의 금속), 예컨대 금속 염, 금속 산화물, 금속 수산화물 및 금속 인산염으로부터 형성될 수 있다. 예는 이산화규소(SiO_2), 산화철(Fe_3O_4 , Fe_2O_3 , FeO , 또는 이들의 조합), 산화알루미늄(Al_2O_3), 옥시수산화알루미늄($\text{AlO}(\text{OH})$), 알루미늄 수산화인산염 ($\text{Al}(\text{OH})_x(\text{PO}_4)_y$), 칼슘 인산염($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), 칼슘 수산화아파타이트($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), 글루콘산철, 또는 황산철을 포함한다.
- [0043] 일부 실시양태에서, 무기 고체 나노입자는 금속 산화물, 예컨대 전이 금속 산화물이다. 일 실시양태에서, 무기 고체 나노입자는 산화철이며, 예를 들어, 마그네타이트(Fe_3O_4), 마그헤마이트($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), 뷔스티트(Wustite)(FeO), 헤마타이트($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$), 또는 이들의 조합이다.
- [0044] 일부 실시양태에서, 무기 고체 나노입자는 금속 수산화물, 예컨대 수산화알루미늄 또는 옥시수산화알루미늄이다.
- [0045] 무기 고체 나노입자는 체내에서 생성된 나노에멀전 입자를 영상화 및 추적할 수 있도록 영상화 방법을 통해 검출가능한 리포터 요소를 함유할 수 있다. 예를 들어, 무기 고체 나노입자는 상자성(paramagnetic), 초상자성(superparamagnetic), 페리자성(ferrimagnetic) 또는 강자성(ferromagnetic) 화합물과 같은 자기 공명 영상(MRI)을 통해 검출가능한 리포터 원소를 함유할 수 있다. MRI-검출가능한 예시적인 무기 고체 나노입자 물질은 산화철, 글루콘산철 및 황산철이다.
- [0046] 무기 고체 나노입자는 전형적으로 약 3nm 내지 약 50nm 범위의 평균 직경 (수 가중 평균 직경)을 갖는다. 예를

들어, 무기 고체 나노입자는 약 5nm, 약 10nm, 약 15nm, 약 20nm, 약 25nm, 약 30nm, 약 35nm, 약 40nm, 약 45nm, 또는 약 50nm의 평균 직경을 가질 수 있다.

- [0047] 무기 고체 나노입자는 액체 오일과 혼합되기 전에 표면 개질될 수 있다. 예를 들어, 무기 고체 나노입자의 표면이 친수성이라면, 무기 고체 나노입자는 나노에멀전 입자의 "오일" 상의 액체 오일과 무기 고체 나노입자의 혼화성을 용이하게 하기 위해 소수성 분자(또는 계면활성제)로 코팅될 수 있다. 무기 고체 나노입자의 표면 변형에는 인산염-말단 지질(예컨대 포스파티딜화 지질(phosphatidylated lipids)), 인-말단 계면활성제, 카르복실산염-말단 계면활성제, 황산염-말단 계면활성제 또는 아민-말단 계면활성제가 사용될 수 있다. 전형적인 인산염-말단 지질 또는 인-말단 계면활성제는 트리옥틸포스핀 옥사이드(TOPO) 또는 디스테아릴 포스파티드산(DSPA)이다. 전형적인 설페이트-중결된 계면활성제는 소듐 도데실 설페이트(SDS)를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 전형적인 카르복실산염-말단 계면활성제는 올레산을 포함한다. 전형적인 아민 중결된 계면활성제는 올레일아민을 포함한다.
- [0048] 일 실시양태에서, 무기 고체 나노입자는 산화철과 같은 금속 산화물이고, 올레산, 올레일아민, SDS, DSPA, 또는 TOPO와 같은 계면활성제는 소수성 코어를 형성하기 위해 액체 오일과 혼합되기 전에 무기 고체 나노입자를 코팅하는데 사용된다.
- [0049] 일 실시양태에서, 무기 고체 나노입자는 금속 수산화물, 예컨대 수산화알루미늄 또는 옥시수산화알루미늄이고, 무기 고체 나노입자를 코팅하기 위해 무기 고체 나노입자를 액체 오일과 혼합하여 소수성 코어를 형성하기 전에 인산염-말단 지질 또는 계면활성제, 예컨대 올레산, 올레일아민, SDS, TOPO 또는 DSPA가 사용된다.
- [0050] 나노에멀전 입자를 형성하는데 사용되는 지질은 양이온성 지질, 음이온성 지질, 중성 지질 또는 이들의 혼합물일 수 있다.
- [0051] 일부 실시양태에서, 사용되는 지질은 양이온성 지질이다. 예를 들어, 음으로 하전된 생물활성제(예컨대 DNA 또는 RNA)와 유리한 상호작용을 가질 수 있는 양으로 하전된 지질이 나노에멀전 조성물에 사용될 수 있다. 적합한 양이온성 지질은 1,2-디올레오일옥시-3-(트리메틸암모늄)프로판(DOTAP); 3β-N-(N',N'-디메틸아미노에탄)-카바모일콜레스테롤(DC 콜레스테롤); 디메틸디옥타데실암모늄(DDA); 1,2-디미리스토일-3-트리메틸암모늄프로판(DMTAP), 디팔미토일(C16:0)트리메틸암모늄 프로판(DPTAP); 디스테아로일트리메틸암모늄 프로판(DSTAP); N-[1-(2,3-디올레일옥시)프로필]-N,N,N-트리메틸암모늄 클로라이드(DOTMA); N,N-디올레오일-N,N-디메틸암모늄 클로라이드(DODAC); 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-에틸포스포콜린(DOEPIC); 1,2-디올레오일-3-디메틸암모늄-프로판(DODAP); 및 1,2-디리놀레일옥시-3-디메틸아미노프로판(DLinDMA); 1,1'-((2-(4-(2-((2-(비스(2-히드록시도데실)아미노)에틸)(2-히드록시도데실)아미노)에틸)피페라진-1-일)에틸)아잔디일)비스(도데칸-2-올)(C12-200); 및 이들의 조합을 포함한다. 전형적인 양이온성 지질은 DOTAP이다.
- [0052] 적합한 지질에 대한 다른 예는 포스파티딜콜린(PC), 예컨대 디스테아로일포스파티딜콜린(DSPC), 디올레오일 포스파티딜콜린(DOPC), 1-팔미토일-2-올레오일포스파티딜콜린(POPC), 디팔미토일포스파티딜콜린(DPPC), 디팔미토일포스파티딜콜린(DMPC) 등; 포스파티딜에탄올아민(PE), 예컨대 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(DSPE), 디올레오일포스파티딜에탄올아민(DOPE) 등; 포스파티딜글리세롤(PG); 및 상기 지질 중 임의의 것의 PEG화된 버전을 포함하는 PEG화된 지질(예를 들어, DSPE-PEG)을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0053] 나노에멀전 입자는 소수성 계면활성제 또는 친수성 계면활성제일 수 있는 하나 이상의 계면활성제를 추가로 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 나노에멀전 입자는 소수성 계면활성제를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 나노에멀전 입자는 친수성 계면활성제를 추가로 포함한다. 일 실시양태에서, 상기 나노에멀전 입자는 소수성 계면활성제 및 친수성 계면활성제를 추가로 포함한다.
- [0054] 적합한 소수성 계면활성제는 10 이하, 예를 들어, 5 이하, 1 내지 5, 또는 4 내지 5의 친수성-친유성 균형(HLB) 값을 갖는 것들을 포함한다. 예시적인 소수성 계면활성제는 소르비탄 에스테르(예컨대 소르비탄 모노에스테르 또는 소르비탄 트리에스테르)이다. 예를 들어, 소수성 계면활성제는 1 내지 5, 또는 4 내지 5의 HLB 값을 갖는 소르비탄 에스테르일 수 있다.
- [0055] 일부 실시양태에서, 소수성 계면활성제는 소르비탄 모노에스테르 또는 소르비탄 트리에스테르이다. 예시적인 소르비탄 모노에스테르는 소르비탄 모노스테아레이트 및 소르비탄 모노올레레이트를 포함한다. 예시적인 소르비탄 트리에스테르는 소르비탄 트리스테아레이트 및 소르비탄 트리올레레이트를 포함한다.
- [0056] 적합한 친수성 계면활성제는 폴리에틸렌 옥사이드계 계면활성제, 예를 들어 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르(폴리소르베이트)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 친수성 계면활성제는 폴리소르베이트이다. 예시적인 폴리소

르베이트는 폴리소르베이트 80(폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노올레에이트, 또는 Tween 80), 폴리소르베이트 60(폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노스테아레이트, 또는 Tween 60), 폴리소르베이트 40(폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노팔미테이트, 또는 Tween 40), 및 폴리소르베이트 20(폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노라우레이트, 또는 Tween 20)이다. 일 실시양태에서, 친수성 계면활성제는 폴리소르베이트 80이다.

- [0057] 나노에멀전 입자는 약 0.1:1 내지 약 20:1, 약 0.5:1 내지 약 12:1, 약 0.5:1 내지 약 9:1, 약 0.5:1 내지 약 5:1, 약 0.5:1 내지 약 3:1, 또는 약 0.5:1 내지 약 1:1 범위의 오일-대-계면활성제 몰비를 가질 수 있다.
- [0058] 나노에멀전 입자는 약 0.1:1 내지 약 2:1, 약 0.2:1 내지 약 1.5:1, 약 0.3:1 내지 약 1:1, 약 0.5:1 내지 약 1:1, 또는 약 0.6:1 내지 약 1:1 범위의 친수성 계면활성제-대-지질(예를 들어, 양이온성 지질) 비를 가질 수 있다.
- [0059] 나노에멀전 입자는 약 0.1:1 내지 약 5:1, 약 0.2:1 내지 약 3:1, 약 0.3:1 내지 약 2:1, 약 0.5:1 내지 약 2:1, 또는 약 1:1 내지 약 2:1 범위의 소수성 계면활성제-대-지질(예를 들어, 양이온성 지질) 비를 가질 수 있다.
- [0060] 나노에멀전 입자는 약 0.2% 내지 약 40% w/v 액체 오일, 약 0.001% 내지 약 10% w/v 무기 고체 나노입자, 약 0.2% 내지 약 10% w/v 지질(예를 들어, 양이온성 지질), 약 0.25% 내지 약 5% w/v 소수성 계면활성제(예를 들어, 소르비탄 에스테르), 및 약 0.5% 내지 약 10% w/v 친수성 계면활성제를 포함할 수 있다.
- [0061] 특정 실시양태에서, 나노에멀전 입자는 다음을 포함한다:
- [0062] 다음의 혼합물을 포함하는 소수성 코어:
- [0063] 선택적으로 인산염-말단 지질, 인-말단 계면활성제, 카르복실산염-말단 계면활성제, 황산염-말단 계면활성제, 또는 아민-말단 계면활성제로 코팅된 적어도 하나의 금속 산화물 나노입자를 포함하는 하나 이상의 무기 나노입자; 및
- [0064] 천연 또는 합성 스쿠알렌을 함유하는 액체 오일;
- [0065] DOTAP를 포함하는 양이온성 지질;
- [0066] 소르비탄 모노스테아레이트, 소르비탄 모노올레에이트 및 소르비탄 트리올레에이트로 이루어진 군으로부터 선택된 소르비탄 에스테르를 포함하는 소수성 계면활성제; 및
- [0067] 폴리소르베이트를 포함하는 친수성 계면활성제.
- [0068] 일 실시양태에서, 나노에멀전 입자는 하기를 포함한다:
- [0069] 다음의 혼합물을 포함하는 소수성 코어:
- [0070] 산화철 나노입자를 포함하는 하나 이상의 무기 나노입자; 및
- [0071] 천연 또는 합성 스쿠알렌을 함유하는 액체 오일;
- [0072] 양이온성 지질 DOTAP;
- [0073] 소르비탄 모노스테아레이트를 포함하는 소수성 계면활성제; 및
- [0074] 폴리소르베이트 80을 포함하는 친수성 계면활성제.
- [0075] 이 LION 조성물에서, LION 입자는 약 0.2% 내지 약 40% w/v 스쿠알렌, 약 0.001% 내지 약 10% w/v 산화철 나노입자, 약 0.2% 내지 약 10% w/v DOTAP, 약 0.25% 내지 약 5% w/v 소르비탄 모노스테아레이트, 및 약 0.5% 내지 약 10% w/v 폴리소르베이트 80을 포함할 수 있다.
- [0076] 일 실시양태에서, LION 입자는 약 2% 내지 약 6% w/v 스쿠알렌, 약 0.01% 내지 약 1% w/v 산화철 나노입자, 약 0.2% 내지 약 1% w/v DOTAP, 약 0.25% 내지 약 1% w/v 소르비탄 모노스테아레이트, 및 약 0.5% 내지 약 5% w/v 폴리소르베이트 80을 포함한다.
- [0077] 특정 실시양태에서, 나노에멀전 입자는 다음을 포함한다:
- [0078] 다음의 혼합물을 포함하는 소수성 코어:
- [0079] 선택적으로 인산염-말단 지질, 인-말단 계면활성제, 카르복실산염-말단 계면활성제, 황산염-말단 계면활성제,

또는 아민-말단 계면활성제로 코팅된 적어도 하나의 금속 수산화물 또는 옥시수산화물 나노입자를 포함하는 하나 이상의 무기 나노입자; 및

- [0080] 천연 또는 합성 스쿠알렌을 함유하는 액체 오일;
- [0081] DOTAP를 포함하는 양이온성 지질;
- [0082] 소르비탄 모노스테아레이트, 소르비탄 모노올레레이트 및 소르비탄 트리올레레이트로 이루어진 군으로부터 선택된 소르비탄 에스테르를 포함하는 소수성 계면활성제; 및
- [0083] 폴리소르베이트를 포함하는 친수성 계면활성제.
- [0084] 일 실시양태에서, 나노에멀전 입자는 하기를 포함한다:
- [0085] 다음의 혼합물을 포함하는 소수성 코어:
- [0086] 선택적으로 TOPO로 코팅된 수산화알루미늄 또는 옥시수산화알루미늄 나노입자를 포함하는 하나 이상의 무기 나노입자; 및
- [0087] 천연 또는 합성 스쿠알렌을 함유하는 액체 오일;
- [0088] 양이온성 지질 DOTAP;
- [0089] 소르비탄 모노스테아레이트를 포함하는 소수성 계면활성제; 및
- [0090] 폴리소르베이트 80을 포함하는 친수성 계면활성제.
- [0091] 이 LION 조성물에서, LION 입자는 약 0.2% 내지 약 40% w/v 스쿠알렌, 약 0.001% 내지 약 10% w/v 수산화알루미늄 또는 옥시수산화알루미늄 나노입자, 약 0.2% 내지 약 10% w/v DOTAP, 약 0.25% 내지 약 5% w/v 소르비탄 모노스테아레이트, 및 약 0.5% 내지 약 10% w/v 폴리소르베이트 80을 포함할 수 있다.
- [0092] 일 실시양태에서, LION 입자는 약 2% 내지 약 6% w/v 스쿠알렌, 약 0.01% 내지 약 1% w/v 수산화알루미늄 또는 옥시수산화알루미늄 나노입자, 약 0.2% 내지 약 1% w/v DOTAP, 약 0.25% 내지 약 1% w/v 소르비탄 모노스테아레이트, 및 약 0.5% 내지 약 5% w/v 폴리소르베이트 80을 포함한다.
- [0093] 나노입자 및 나노에멀전은 문헌에 기재되어 있고, 상기 용어는 1000 나노미터 미만의 크기를 갖는 입자를 지칭하기 위해 본원에서 사용된다.
- [0094] 나노에멀전 입자(LION)는 전형적으로 약 20nm 내지 약 200nm 범위의 평균 직경(동적 광 산란에 의해 측정된 z-평균 유효역학적 직경)을 갖는다. 일부 실시양태에서, LION 입자의 z-평균 직경은 약 20nm 내지 약 150nm, 약 20nm 내지 약 100nm, 약 20nm 내지 약 80nm, 약 20nm 내지 약 60nm의 범위이다. 일부 실시양태에서, LION 입자의 z-평균 직경은 약 40nm 내지 약 200nm, 약 40nm 내지 약 150nm, 약 40nm 내지 약 100nm, 약 40nm 내지 약 90nm, 약 40nm 내지 약 80nm, 또는 약 40nm 내지 약 60nm 범위이다. 일 실시양태에서, LION 입자의 z-평균 직경은 약 40nm 내지 약 80nm이다. 일 실시양태에서, LION 입자의 z-평균 직경은 약 40nm 내지 약 60nm이다.
- [0095] 나노에멀전 입자(LION)의 평균 다분산 지수(PDI)는 약 0.1 내지 약 0.5의 범위일 수 있다. 예를 들어, LION 입자의 평균 PDI는 약 0.2 내지 약 0.5, 약 0.1 내지 약 0.4, 약 0.2 내지 약 0.4, 약 0.2 내지 약 0.3, 또는 약 0.1 내지 약 0.3의 범위일 수 있다.
- [0096] **LION-생물활성제 복합체.**
- [0097] 나노에멀전 조성물은 나노에멀전 입자(LION)와 결합/복합체화되는 생물활성제를 추가로 함유할 수 있다. 생물활성제는 비공유 상호 작용을 통해 또는 가역적 공유 상호 작용을 통해 나노에멀전 입자와 결합/복합체화될 수 있다.
- [0098] 생물활성제는 단백질 또는 단백질을 코딩하는 생물활성제일 수 있다. 예를 들어, 생물활성제는 단백질 항원 또는 단백질 항원을 코딩하는 생물활성제일 수 있다. 항원은 감염, 암, 또는 자가면역 질환과 관련된 에피토프, 생체분자, 세포 또는 조직으로부터 유도되거나, 또는 이와 면역학적으로 교차-반응성일 수 있다.
- [0099] 일부 실시양태에서, 선천성 면역 반응을 조절하는 RNA, 단백질 또는 항원을 암호화하는 RNA, 침묵 RNA, 마이크로 RNA, tRNA, 자가 복제 RNA 등을 포함하는 다양한 RNA가 전달을 위해 LION 입자와 결합될 수 있다.
- [0100] 일 실시양태에서, 생물활성제는 mRNA이다. 일 실시양태에서, 생물활성제는 종양분해 바이러스 RNA이다. 일 실시

양태에서, 생물활성제는 레플리콘 RNA이다.

- [0101] 특정 실시양태에서, 생물활성제는 항원 또는 항체를 코딩하는 RNA이다. 상기 항원은 박테리아 질환, 바이러스 질환, 원생동물 질환, 비전염성 질환, 암 또는 자가면역 질환으로부터 유래된 것일 수 있다. 특정 실시양태에서, 항원은 RNA 바이러스, 예컨대 간염 바이러스, 코로나 바이러스, 모기-매개 바이러스(예를 들어, 베네스웰라형 말 뇌염(VEE) 바이러스, 또는 플라비바이러스, 예컨대 ZIKV 바이러스), 또는 HIV 바이러스로부터 유래된다. 특정 실시양태에서, 항원은 MERS 바이러스 및 SARS 바이러스(예컨대 SARS-CoV-2)로 이루어진 군으로부터 선택되는 코로나 바이러스로부터 유래된다.
- [0102] 특정 실시양태에서, 생물활성제는 비-코딩 RNA이다.
- [0103] 생물활성제는 또한 보조제일 수 있다. 적합한 보조제는 TLR 작용제, RIG-I 작용제, 사포닌, 펩티드, 단백질, 탄수화물, 탄수화물 중합체, 접합된 탄수화물, 전체 바이러스 입자, 바이러스-유사 입자, 바이러스 단편, 세포 단편, 및 이들의 조합을 포함한다.
- [0104] 특정 실시양태에서, 보조제는 TLR 작용제 또는 RIG-I 작용제이다. 예시적인 TLR 작용제는 TLR2, TLR3, TLR4, TLR7, TLR8, 또는 TLR9 작용제를 포함한다. 전형적인 TLR 작용제는 TLR3 작용제, 예컨대 리복솔, 폴리(LC), 또는 힐토놀(Hiltonol[®])이다.
- [0105] 특정 실시양태에서, 생물활성제는 이중-가닥 RNA이다.
- [0106] 특정 실시양태에서, 생물활성제는 면역 자극제인 RNA이다. 면역 자극제는 TLR3 작용제 (예를 들어, TLR2, TLR3, TLR4, TLR7, TLR8, 또는 TLR9 작용제) 또는 RIG-I 작용제 (예를 들어, PAMP)일 수 있다. 전형적인 TLR 작용제는 TLR3 작용제, 예컨대 리복솔, 폴리(LC), 또는 힐토놀(Hiltonol[®])이다.
- [0107] 항원으로서 RNA의 전달에 대한 대안으로서, 또는 이에 더하여, 조합물, 예를 들어, 선천성 면역 반응을 자극하는 RNA와 조합된 RNA 항원, 또는 종양분해 바이러스를 개시하는 RNA, 또는 생-약독화 바이러스를 사용할 수 있다.
- [0108] 특정 실시양태에서, 나노에멀전 조성물 중의 생물활성제는 선천성 면역 반응을 자극할 수 있거나 종양분해 바이러스 또는 생-약독화 바이러스를 개시할 수 있는 다른 RNA와 RNA-코딩된 항원의 조합을 포함할 수 있다. 대안적으로, RNA-코딩된 항원을 함유하는 나노에멀전 조성물은 선천성 면역 반응을 자극할 수 있거나, 종양분해 바이러스 또는 생-약독화 바이러스를 개시할 수 있는 또 다른 RNA를 함유하는 제형과 조합될 수 있다.
- [0109] 나노에멀전 조성물에서, (i) 나노에멀전 입자 (LION) 대 (ii) 생물활성제의 몰비는 질소-대-인산염 몰비로 특징지어질 수 있고, 이는 약 0.01:1 내지 약 1000:1, 예를 들어, 약 0.2:1 내지 약 500:1, 약 0.5:1 내지 약 150:1, 약 1:1 내지 약 150:1, 약 1:1 내지 약 125:1, 약 1:1 내지 약 100:1, 약 1:1 내지 약 50:1, 약 1:1 내지 약 50:1, 약 1:1 내지 약 50:1, 약 5:1 내지 약 50:1, 약 5:1 내지 약 25:1, 또는 약 10:1 내지 약 20:1의 범위일 수 있다. 생물활성제에 대한 나노에멀전 입자(LION)의 몰비는 생물활성제의 전달 효율을 증가시키고, 항원에 대한 면역 반응을 유도하는 생물활성제-운반 나노에멀전 조성물의 능력을 증가시키고, 대상에서 항원에 대한 항체 역가의 생성을 유도하는 생물활성제-운반 나노에멀전 조성물의 능력을 증가시키도록 선택될 수 있다. 특정 실시양태에서, 질소-대-인산염 (N:P) 몰비로 특징지어지는 나노에멀전 입자 (LION) 대 생물활성제의 몰비는 약 1:1 내지 약 150:1, 약 5:1 내지 약 25:1, 또는 약 10:1 내지 약 20:1 범위이다. 일 실시양태에서, 나노에멀전 조성물의 N:P 몰비는 약 15:1이다.
- [0110] 생물활성제와 복합체화함으로써, 나노에멀전 조성물은 생물활성제를 세포에 전달할 수 있다. 세포는 필요한 대상체에 있을 수 있다. 예를 들어, 생물활성제가 단백질 항원이거나 단백질 항원을 코딩하는 경우, 생물활성제를 보유하는 나노에멀전 조성물은 대상체에서 항원에 대한 면역 반응을 유도할 수 있다. 나노에멀전 조성물은 예를 들어, 대상체에서 중화 항체 역가를 유도함으로써 대상체에서 항원에 대한 항체 역가를 유도함으로써 그렇게 할 수 있다.
- [0111] 일 실시양태에서, LION을 함유하는 나노에멀전 조성물은, 대상체에게 유효량으로 투여될 때, 생물활성제가 LION 없이 대상체에게 투여될 때 유도되는 항원에 대한 면역 반응과 동일하거나 더 큰 면역 반응을 유도할 수 있다.
- [0112] 이론에 얽매이지 않고, 나노에멀전 조성물 내의 소수성 계면활성제는 생물활성제를 세포에 전달하는 나노에멀전 조성물의 능력을 증가시키거나, 또는 항원에 대해 대상체에서 면역 반응을 유도하는 생물활성제를 운반하는 나노에멀전 조성물의 능력을 증가시키는데 기여할 수 있다(생물활성제가 단백질 항원이거나 단백질 항원을 코딩하

는 경우). 예를 들어, 나노에멀전 조성물 내의 소수성 계면활성제는 나노에멀전 조성물이 생물활성제를 운반하는 능력을 증가시키는 데 기여할 수 있다.

[0113] 일 실시양태에서, 상기 소수성 계면활성제는 소르비탄 에스테르이고, 상기 소르비탄 에스테르 소수성 계면활성제가 없는 동일한 나노에멀전 조성물과 비교하여, 상기 나노에멀전 조성물이 세포(또는 대상체)에 생물활성제를 전달하는 능력을 증가시키기에 충분한 양으로 존재한다.

[0114] 일 실시양태에서, 소수성 계면활성제는 소르비탄 에스테르이고, 동일한 나노에멀전 조성물과 비교하여 항원에 대한 면역 반응을 유도하는 생물활성제-운반 나노에멀전 조성물의 능력을 증가시키기에 충분한 양으로 존재하지만, 소르비탄 에스테르 소수성 계면활성제는 없다.

[0115] 일 실시양태에서, 소수성 계면활성제는 소르비탄 에스테르이고, 유효량으로 대상에 투여될 때, 나노에멀전 조성물은 동일한 나노에멀전 조성물(단 소르비탄 에스테르 소수성 계면활성제가 없음)이 대상에 투여될 때 유도되는 항체 역가보다 더 높은 수준으로 항원에 대한 항체 역가를 유도한다.

[0116] 일 실시양태에서, 소수성 계면활성제는 소르비탄 에스테르이고, 유효량으로 대상에 투여될 때, 나노에멀전 조성물은 동일한 나노에멀전 조성물(그러나 소르비탄 에스테르 소수성 계면활성제가 없음)이 대상에 투여될 때 유도되는 중화 항체 역가보다 더 높은 수준으로 대상에서 중화 항체 역가를 유도한다.

[0117] **나노에멀전 조성물의 제조**

[0118] 본 발명의 또 다른 양태는 하기를 포함하는 나노에멀전 조성물의 제조 방법에 관한 것이다:

[0119] (a) 하나 이상의 무기 나노입자, 액체 오일, 하나 이상의 지질 (예를 들어, 양이온성 지질) 및 선택적으로 소수성 계면활성제를 혼합하여 오일상 혼합물을 형성하는 단계; 및

[0120] (b) 상기 오일-상 혼합물을 선택적으로 친수성 계면활성제를 함유하는 수용액과 혼합하여 나노에멀전 입자를 형성한다.

[0121] 상기 방법은 (c) 상기 나노에멀전 입자를 생물활성제를 함유하는 수용액과 혼합하여 상기 생물활성제를 상기 나노에멀전 입자와 복합체화하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0122] 생물활성제는 비공유 상호 작용을 통해 또는 가역적 공유 상호 작용을 통해 나노에멀전 입자와 결합/복합체화될 수 있다.

[0123] 나노에멀전 조성물, 나노에멀전 입자(액체 오일, 무기 나노입자, 양이온성 지질과 같은 지질, 소수성 계면활성제 및 친수성 계면활성제를 포함함), 및 나노에멀전 입자를 포함하는 나노에멀전 조성물에 관한 본 발명의 양태 및 나노에멀전 입자 및 생물활성제를 포함하는 나노에멀전 조성물에 관한 본 발명의 양태에서 상기 논의된 생물활성제에 관한 상기 모든 설명 및 모든 실시양태는 본 발명의 이러한 양태에 적용될 수 있다.

[0124] 생성된 나노에멀전 조성물은 희석되거나 농축된 형태로 제조될 수 있다.

[0125] 특정 실시양태에서, 나노에멀전 조성물은 약 1 내지 약 200배, 예를 들어, 약 1 내지 약 100배, 약 2 내지 약 50배, 약 2 내지 약 30배, 약 2 내지 약 20배, 약 2 내지 약 10배, 약 2 내지 약 5배로 (임의의 적합한 완충 용액에 의해) 희석될 수 있다. 일 실시양태에서, 나노에멀전 조성물은 2배로 희석된다.

[0126] 특정 실시양태에서, 나노에멀전 조성물은 약 1 내지 약 100배, 예를 들어, 약 2 내지 약 50배, 약 2 내지 약 30배, 약 2 내지 약 20배, 약 2 내지 약 10배, 약 2 내지 약 5배 농축될 수 있다.

[0127] 나노에멀전 조성물은 적어도 약 100 µg/ml의 생물활성제(예를 들어, RNA 또는 DNA와 같은 핵산)에 대한 로딩 용량을 가질 수 있다.

[0128] 나노에멀전 조성물 중의 생물활성제 (예를 들어, RNA 또는 DNA와 같은 핵산)의 투여 수준은 약 0.001 µg/ml 내지 약 1000 µg/ml, 예를 들어, 약 0.002 µg/ml 내지 약 500 µg/ml, 약 1 µg/ml 내지 약 500 µg/ml, 약 2 µg/ml 내지 약 400 µg/ml, 약 40 µg/ml 내지 약 400 µg/ml, 또는 약 10 µg/ml 내지 약 250 µg/ml의 범위일 수 있다.

[0129] **나노에멀전 조성물의 용도**

[0130] 본 발명의 다양한 양태는 또한, 예를 들어, 백신 전달 시스템으로서 약제학적 조성물에서, 세포 또는 대상에 생물활성제를 전달하고, 대상에서 면역 반응을 생성하고, 이를 필요로 하는 대상을 치료하는데 있어서, 나노에멀전 입자 및 생물활성제를 포함하는 나노에멀전 조성물의 용도에 관한 것이다.

- [0131] 일 양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 나노에멀전 입자 및 생물활성제를 포함하는 나노에멀전 조성물을 포함하는 제약 조성물을 제공한다. 선택적으로, 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 포함할 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "약제학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제"는 약제학적 투여와 양립할 수 있는 용매, 분산 매질, 코팅, 항균제 및 항진균제, 등장제 및 흡수 지연제 등을 포함한다.
- [0132] 또 다른 양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 나노에멀전 입자 및 생물활성제, 및 선택적으로 하나 이상의 백신 보조제를 포함하는 나노에멀전 조성물을 포함하는 백신 전달 시스템을 제공하며, 여기서 생물활성제는 항원 또는 항원을 코딩하는 핵산 분자이다.
- [0133] 나노에멀전 조성물, 나노에멀전 입자(액체 오일, 무기 나노입자, 양이온성 지질과 같은 지질, 소수성 계면활성제, 및 친수성 계면활성제를 포함함), 생물활성제, 및 나노에멀전 입자를 포함하는 나노에멀전 조성물에 관한 본 발명의 양태에서 상기 논의된 나노에멀전 조성물의 제조에 관한 상기 모든 설명 및 모든 실시양태, 나노에멀전 입자 및 생물활성제를 포함하는 나노에멀전 조성물에 관한 본 발명의 양태, 및 나노에멀전 조성물의 제조 방법에 관한 본 발명의 양태에서 상기 모든 설명은 약제학적 조성물 및 백신 전달 시스템에 관한 본 발명의 상기 두 양태에 적용가능하다.
- [0134] 약제학적 조성물 및 백신 전달 시스템은 경구 투여, 또는 비경구 투여, 예컨대 정맥내, 근육내, 피내, 피하, 안내(intraocular), 비강내, 폐(예를 들어, 흡입에 의해), 복강내, 또는 직장내 투여를 포함하는 다양한 투여 경로를 위해 제형화될 수 있다.
- [0135] 일 실시양태에서, 전달 경로는 폐 전달(pulmonary delivery)(예를 들어, 폐로)이며, 이는 분무화된(nebulized), 에어로졸화된(aerosolized), 미셀(micellular), 또는 건조 분말-기반 제형의 사용을 포함하는 상이한 접근법에 의해 달성될 수 있다. 일 실시양태에서, 약제학적 조성물 또는 백신 전달 시스템은 액체 분무기(liquid nebulizer), 에어로졸계 흡입기(aerosol-based inhaler), 및/또는 건조 분말 분산 장치에서 투여되도록 제형화된다.
- [0136] 본 발명의 일 양태는 본원에 기재된 바와 같은 나노에멀전 입자 및 생물활성제를 포함하는 나노에멀전 조성물과 세포를 접촉시키는 단계를 포함하는, 세포에 생물활성제를 전달하는 방법에 관한 것이다.
- [0137] 본 발명의 일 양태는 본원에 기재된 바와 같은 나노에멀전 입자 및 생물활성제를 포함하는 나노에멀전 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 생물활성제를 대상체에게 전달하는 방법에 관한 것이다.
- [0138] 나노에멀전 조성물, 나노에멀전 입자(액체 오일, 무기 나노입자, 양이온성 지질과 같은 지질, 소수성 계면활성제, 및 친수성 계면활성제를 포함함), 생물활성제, 및 나노에멀전 입자를 포함하는 나노에멀전 조성물에 관한 본 발명의 양태에서 상기 논의된 나노에멀전 조성물의 제조에 관한 상기 모든 설명 및 모든 실시양태 나노에멀전 입자 및 생물활성제를 포함하는 나노에멀전 조성물에 관한 본 발명의 양태, 및 나노에멀전 조성물의 제조 방법에 관한 본 발명의 양태에서 상기 모든 설명은 생물활성제를 전달하는 방법에 관한 본 발명의 상기 두 양태에 적용가능하다.
- [0139] 나노에멀전 입자에 의한 세포 또는 대상체로의 생물활성제의 전달의 능력 및 효율은 본원에 기재된 바와 같이, 나노에멀전 입자의 성분을 조정하고, 생물활성제에 대한 나노에멀전 입자(LION)의 몰비를 선택하고/하거나 생물활성제의 투여량을 선택함으로써 제어될 수 있다.
- [0140] 본 발명의 일 양태는 본원에 기재된 바와 같은 나노에멀전 입자 및 생물활성제, 및 선택적으로 보조제를 포함하는 나노에멀전 조성물을 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 면역 반응을 생성하는 방법에 관한 것이며, 여기서 생물활성제는 항원 또는 항원을 코딩하는 핵산 분자이다.
- [0141] 본 발명의 일 양태는 다음을 포함하는, 대상체에서 면역 반응을 생성하는 방법에 관한 것이다:
- [0142] (a) 대상체에게 단백질 항원을 코딩하는 치료학적 유효량의 종양분해 바이러스를 투여하는 단계; 및
- [0143] (b) 본원에 기재된 바와 같은 나노에멀전 입자 및 생물활성제, 및 선택적으로 보조제를 포함하는 치료 유효량의 나노에멀전 조성물을 대상에게 투여하는 단계로서, 생물활성제는 단백질 항원 또는 단백질 항원을 코딩하는 핵산 분자인 것인 단계.
- [0144] 나노에멀전 조성물, 나노에멀전 입자(액체 오일, 무기 나노입자, 지질, 예컨대 양이온성 지질, 소수성 계면활성제 및 친수성 계면활성제를 포함함), 생물활성제, 나노에멀전 조성물의 제조, 약제학적 조성물 및 백신 전달 시스템에 관한 본 발명의 양태에서 상기 논의된 나노에멀전 입자를 포함하는 나노에멀전 조성물에 관한 것, 나노

에멀전 입자 및 생물활성제를 포함하는 나노에멀전 조성물에 관한 것, 나노에멀전 조성물의 제조 방법에 관한 것, 약제학적 조성물에 관한 것 및 백신 전달 시스템에 관한 상기 모든 설명 및 모든 실시양태는 면역 반응을 생성하는 방법에 관한 본 발명의 이들 2개의 양태에 적용가능하다.

- [0145] 이들 방법에서의 투여 경로는 상기 약제학적 조성물 및 백신 전달 시스템의 투여에 대해 기재된 것과 동일하다.
- [0146] (a) 단계의 투여와 (b) 단계의 투여는 동시에 일어날 수 있다. 대안적으로, 단계 (a)의 투여 및 단계 (b)의 투여는 적어도 1주, 적어도 2주, 적어도 3주, 적어도 1개월, 적어도 6주, 적어도 2개월, 적어도 3개월, 적어도 6개월, 또는 적어도 1년 간격으로 발생할 수 있다.
- [0147] 본 발명의 일 양태는 또한, 본원에 기재된 바와 같은 나노에멀전 입자 및 생물활성제, 및 선택적으로 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 나노에멀전 조성물의 치료학적 유효량을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 감염 또는 질환을 치료 또는 예방하는 방법에 관한 것이다.
- [0148] 나노에멀전 조성물, 나노에멀전 입자(액체 오일, 무기 나노입자, 양이온성 지질과 같은 지질, 소수성 계면활성제, 및 친수성 계면활성제를 포함함), 생물활성제, 나노에멀전 조성물의 제조, 약제학적 조성물, 및 백신 전달 시스템에 관한 본 발명의 양태에서 상기 논의된 나노에멀전 입자를 포함하는 나노에멀전 조성물에 관한 것, 나노에멀전 입자 및 생물활성제를 포함하는 나노에멀전 조성물에 관한 것, 나노에멀전 조성물의 제조 방법에 관한 것, 약제학적 조성물에 관한 것, 및 백신 전달 시스템에 관한 모든 상기 설명 및 모든 실시양태는 감염 또는 질환을 치료 또는 예방하는 방법에 관한 본 발명의 이러한 양태에 적용가능하다.
- [0149] 이들 방법에서의 투여 경로는 상기 약제학적 조성물 및 백신 전달 시스템의 투여에 대해 기재된 것과 동일하다.
- [0150] 상기 감염 또는 치료하고자 하는 질환은 박테리아 감염/질환, 바이러스 감염/질환, 원생동물 질환, 비-전염성 질환, 암 또는 자가면역 질환일 수 있다. 일부 실시양태에서, 감염/질환은 RNA 바이러스에 의해 유발된 바이러스 감염/질환이다. 상기 RNA 바이러스는 간염 바이러스, 코로나 바이러스, 모기-매개 바이러스(예를 들어, 베네스웰라형 말라리아 (VEE) 바이러스, 또는 ZIKV 바이러스와 같은 플라비바이러스), 또는 HIV일 수 있다. 이러한 질병을 예방하거나 치료하기 위해, 나노에멀전 조성물의 생물활성제는 코로나 바이러스 계놈에서 유래된 항원 또는 항원을 코딩하는 핵산 분자일 수 있다.
- [0151] 특정 실시양태에서, RNA 바이러스는 MERS 바이러스 및 SARS 바이러스로 이루어진 군으로부터 선택된 코로나 바이러스이다. 일 실시양태에서, SARS 바이러스는 SARS-CoV-2이다.
- [0152] 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체에서 코로나 바이러스(예를 들면, SARS-CoV-2, "COVID-19")를 치료 또는 예방하는 것에 관한 것이고, 상기 방법은:
- [0153] 나노에멀전 입자 및 생물활성제, 및 선택적으로 보조제를 포함하는 치료 유효량의 나노에멀전 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 생물활성제는 선천적 작용제인 RNA, 또는 항원 또는 코로나 바이러스 계놈(예를 들어, SARS-CoV-2 계놈)으로부터 유래된 항원을 코딩하는 핵산 분자이다.
- [0154] 특정 실시양태에서, 생물활성제는 선천적 작용제인 RNA이다. 일 실시양태에서, RNA는 RIG-I 작용제, 예컨대 PAMP이다. 일 실시양태에서, RNA는 RIBOXOL, poly(LC) 또는 Hiltonol[®] 과 같은 TLR3 작용제이다.
- [0155] 특정 실시양태에서, 생물활성제는 코로나 바이러스 계놈(예를 들어, SARS-CoV-2 계놈)으로부터 유래된 항원을 코딩하는 RNA이다. 일 실시양태에서, RNA는 자가 복제된다. 일 실시양태에서, RNA는 스파이크 "S" 단백질의 전부 또는 일부를 코딩한다.
- [0156] 상기 논의된 바와 같이, 무기 고체 나노입자는, 영상화 방법을 통해 검출가능한 리포터 요소를 함유할 때, 나노에멀전 입자가 체내에 투여된 후에 생성된 나노에멀전 입자를 영상화하고 추적할 수 있다. 예를 들어, 무기 고체 나노입자는 상자성(paramagnetic), 초상자성(superparamagnetic), 페리자성(ferrimagnetic) 또는 강자성(ferromagnetic) 화합물과 같은 자기 공명 영상(MRI)을 통해 검출가능한 리포터 원소를 함유할 수 있다.
- [0157] 따라서, 본 발명의 일 양태는 또한 다음을 포함하는, 대상체에서 생물활성제 전달을 영상화하고/하거나 추적하는 방법에 관한 것이다:
- [0158] 본원에 기재된 바와 같이, 나노에멀전 입자 및 생물활성제를 포함하는 나노에멀전 조성물을 대상체에게 투여하는 단계로서, 무기 나노입자는 자기 공명 영상화(magnetic resonance imaging)를 통해 검출가능한 물질을 함유하는 것인 단계; 및

- [0159] 자기 공명 영상화를 이용한 나노에멀전 조성물의 검출.
- [0160] 일 실시양태에서, MRI-검출가능한 무기 고체 나노입자 물질은 산화철, 글루콘산철 및 황산철이다.
- [0161] 나노에멀전 조성물, 나노에멀전 입자(액체 오일, 무기 나노입자, 지질, 예컨대 양이온성 지질, 소수성 계면활성제, 및 친수성 계면활성제를 포함함), 생물활성제, 나노에멀전 조성물의 제조, 약제학적 조성물, 및 본 발명의 양태에서 상기 논의된 나노에멀전 입자를 포함하는 나노에멀전 조성물에 관한 것, 나노에멀전 입자 및 생물활성제를 포함하는 나노에멀전 조성물에 관한 것, 나노에멀전 조성물의 제조 방법에 관한 것, 약제학적 조성물에 관한 것, 및 백신 전달 시스템에 관한 모든 상기 설명 및 모든 실시양태는 생물활성제 전달의 영상화 및/또는 추적 방법에 관한 본 발명의 이러한 양태에 적용가능하다.
- [0162] 나노에멀전 조성물의 영상화 적용은 대상체에서 나노에멀전 조성물(LION 입자)에 의한 생물활성제의 전달을 실시간으로 추적할 수 있게 하므로 매우 유용하다. 따라서 LION은 치료법을 전달할 수 있을 뿐만 아니라, 영상화를 통해 질병과 치료법을 스스로 보고/추적할 수 있다.
- [0163] 본 발명은 본 명세서에서 광범위하고 일반적으로 설명되었다. 포괄적인 개시 내용에 속하는 더 좁은 종 및 아속(subgeneric) 군집들 각각은 또한 본 발명의 일부를 형성한다. 이는 절제된 물질이 본 명세서에 구체적으로 언급되는지 여부에 관계없이, 속으로부터 임의의 대상을 제거하는 단서 또는 부정적인 제한을 갖는 본 발명의 일반적인 설명을 포함한다. 충돌이 있는 경우, 용어들에 대한 설명을 포함하여 본 명세서가 이를 통제할 것이다. 게다가, 모든 물질, 방법 및 예는 예시적이며, 제한하는 것으로 의도되지 않는다.
- [0164] **실시예**
- [0165] 하기 실시예는 단지 예시적인 목적을 위한 것이며, 어떠한 방식으로든 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 의도되지 않는다.
- [0166] **실시예 1. 실시예에서 사용된 일반적인 제조 기술 및 재료**
- [0167] **재료.**
- [0168] 지질-무기 나노입자(LION)의 제조에 하기의 물질을 사용하였다. 클로로포름 중 25mgFe/ml의 산화철 나노입자 및 다양한 평균 직경 (5, 10, 15, 20, 25 및 30nm)을 오션 나노테크(Ocean Nanotech)(San Diego, CA)로부터 구입하였다. 스쿠알렌 및 Span[®] 60(소르비탄 모노스테아레이트)은 밀리포어 시그마(Millipore Sigma)로부터 구입하였다. Tween[®] 80(폴리에틸렌 글리콜 소르비탄 모노올레에이트) 및 나트륨 시트레이트 이수화물은 피셔 케미칼(Fisher Chemical)에서 구입하였다. 양이온성 지질 1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄-프로판(DOTAP 클로라이드)의 클로라이드 염을 Corden Pharma로부터 구입하였다. 초순수(18.2MΩ·cm 저항률)를 Milli-Q 물 정제 시스템(Millipore Sigma)으로부터 얻었다.
- [0169] **79-004로 표지된 지질 무기 나노입자(LION)의 제조.**
- [0170] 이들 LION은 37.5mg/ml 스쿠알렌, 37mg/ml 스팬(Span)[®] 60, 37mg/ml Tween[®] 80, 30mg/ml DOTAP 클로라이드, 0.1mg/ml 10nm 산화철 나노입자 및 10mM 시트르산나트륨 이수화물을 포함한다. LIONs는 다음과 같은 방법으로 제조하였다.
- [0171] 200ml 비이커에, 10nm의 수-가중 평균 직경을 갖는 클로로포름 중 25mgFe/ml의 산화철 나노입자 0.4ml를 첨가하였다. 클로로포름을 흡 후드(fume hood)에서 증발시켜 산화철 나노입자의 건식 코팅을 남기도록 하였다. 산화철 나노입자에 Span[®] 60 3.7g, 스쿠알렌 3.75g, DOTAP 클로라이드 3g을 넣어 '오일' 상을 제조하였다. 오일상은 60° C로 예열된 수조에서 30분 동안 초음파 처리되었다. 개별적으로, 1리터 유리병에서, Milli-Q 물로 제조된 10mM 나트륨 시트레이트 디하이드레이트 용액 1,000ml에 Tween[®] 80 39g을 첨가하여 "수성" 상을 제조하였다. 수성상을 30분 동안 교반하여 Tween[®] 80이 완전히 용해되도록 하였다. Tween[®] 80의 완전한 용해 후, 96ml의 수성상을 200ml 비이커로 옮기고, 60° C로 예열된 수조에서 인큐베이션하였다. 가열된 오일 상에 예열된 수성상 96ml를 첨가하였다. 상기 혼합물을 우유-유사 외형을 갖는 균질한 콜로이드가 생성될 때까지 VWR[®] 200 균질기(VWR International)를 사용하여 즉시 유회시켰다. 콜로이드는 후속적으로 유체를 20,000psi에서 LM10 마이크로 유회화기의 Y-형 상호작용 챔버를 통해 통과시킴으로써 가공되었다. 동적 광 산란(Malvern Zetasizer Nano S)에 의해 측정된 z-평균 유체역학적 직경이 0.2 다분산 지수를 갖는 54nm일 때까지 유체를 통과시켰다. 미세유회화

된 LION 샘플을 200nm 기공-크기 폴리에테르술폰(PES) 시린지 필터로 최종적으로 여과하였다.

[0172] **79-006-A으로 표지된 지질 무기 나노입자(LION)의 제조.**

[0173] 이들 LION은 37.5mg/ml 스쿠알렌, 37mg/ml Span[®] 60, 37mg/ml Tween[®] 80, 30mg/ml DOTAP 클로라이드, 0.2mg/ml 15nm 산화철 나노입자, 및 10mM 시트르산나트륨 이수화물을 포함한다. LIONs는 다음과 같은 방법으로 제조하였다.

[0174] 200ml 비이커에, 15nm의 수-가중 평균 직경을 갖는 클로로포름 중 25mgFe/ml의 산화철 나노입자 0.8ml를 첨가하였다. 클로로포름을 흡 후드(fume hood)에서 증발시켜 산화철 나노입자의 건식 코팅을 남기도록 하였다. 산화철 나노입자에 Span[®] 60 3.7g, 스쿠알렌 3.75g, DOTAP 클로라이드 3g을 넣어 '오일' 상을 제조하였다. 오일상은 60° C로 예열된 수조에서 30분 동안 초음파 처리되었다. 별도로, 1리터 유리병에서, Milli-Q 물로 제조된 10mm 시트르산나트륨 이수화물 용액 1,000ml에 39 그램의 Tween[®] 80을 첨가하여 "수성" 상을 제조하였다. 수성상을 30분 동안 교반하여 Tween[®] 80이 완전히 용해되도록 하였다. Tween[®] 80의 완전한 용해 후, 96ml의 수성상을 200ml 비이커로 옮기고, 60° C로 예열된 수조에서 인큐베이션하였다. 가열된 오일 상에 예열된 수성상 96ml를 첨가하였다. 상기 혼합물을 우유-유사 외형을 갖는 균질한 콜로이드가 생성될 때까지 VWR[®] 200 균질기(VWR International)를 사용하여 즉시 유화시켰다. 콜로이드는 후속적으로 유체를 20,000 psi에서 LM10 마이크로유동 화기의 Y-형 상호작용 챔버를 통해 통과시킴으로써 가공되었다. 동적 광 산란(Malvern Zetasizer Nano S)에 의해 측정된 z-평균 유체역학적 직경이 0.2 다분산 지수를 갖는 52nm일 때까지 유체를 통과시켰다. 미세유동화된 LION 샘플을 200nm 기공-크기 폴리에테르술폰(PES) 시린지 필터로 최종적으로 여과하였다.

[0175] **79-006-B으로 표지된 지질 무기 나노입자(LION)의 제조.**

[0176] 이들 LION은 37.5mg/ml 스쿠알렌, 37mg/ml Span[®] 60, 37mg/ml Tween[®] 80, 30mg/ml DOTAP 클로라이드, 0.2mg/ml 5nm 산화철 나노입자, 및 10mm 시트르산나트륨 이수화물을 포함한다. LIONs는 다음과 같은 방법으로 제조하였다.

[0177] 200ml 비이커에, 5nm의 수-가중 평균 직경을 갖는 클로로포름 중 25mgFe/ml의 산화철 나노입자 0.8ml를 첨가하였다. 클로로포름을 흡 후드(fume hood)에서 증발시켜 산화철 나노입자의 건식 코팅을 남기도록 하였다. 산화철 나노입자에 Span[®] 60 3.7g, 스쿠알렌 3.75g, DOTAP 클로라이드 3g을 넣어 '오일' 상을 제조하였다. 오일상은 60° C로 예열된 수조에서 30분 동안 초음파 처리되었다. 별도로, 1리터 유리병에서, Milli-Q 물로 제조된 10mm 시트르산나트륨 이수화물 용액 1,000ml에 39 그램의 Tween[®] 80을 첨가하여 "수성" 상을 제조하였다. 수성상을 30분 동안 교반하여 Tween[®] 80이 완전히 용해되도록 하였다. Tween[®] 80의 완전한 용해 후, 96ml의 수성상을 200ml 비이커로 옮기고, 60° C로 예열된 수조에서 인큐베이션하였다. 가열된 오일 상에 예열된 수성상 96ml를 첨가하였다. 상기 혼합물을 우유-유사 외형을 갖는 균질한 콜로이드가 생성될 때까지 VWR[®] 200 균질기(VWR International)를 사용하여 즉시 유화시켰다. 콜로이드는 후속적으로 유체를 20,000psi에서 LM10 마이크로유동 화기의 Y-형 상호작용 챔버를 통해 통과시킴으로써 가공되었다. 동적 광 산란(Malvern Zetasizer Nano S)에 의해 측정된 z-평균 유체역학적 직경이 0.2 다분산 지수를 갖는 59nm일 때까지 유체를 통과시켰다. 미세유동화된 LION 샘플을 200nm 기공-크기 폴리에테르술폰(PES) 시린지 필터로 최종적으로 여과하였다.

[0178] **79-011로 표지된 지질 무기 나노입자(LION)의 제조.**

[0179] 이들 LION은 9.4mg/ml 스쿠알렌, 9.3mg/ml Span[®] 60, 9.3mg/ml Tween[®] 80, 7.5mg/ml DOTAP 클로라이드, 0.05mg/ml 25nm 산화철 나노입자, 및 10mm 시트르산나트륨 이수화물을 포함한다. LIONs는 다음과 같은 방법으로 제조하였다.

[0180] 200ml 비이커에, 25nm의 수-가중 평균 직경을 갖는 클로로포름 중 25mgFe/ml의 산화철 나노입자 0.2ml를 첨가하였다. 클로로포름을 흡 후드(fume hood)에서 증발시켜 산화철 나노입자의 건식 코팅을 남기도록 하였다. 상기 산화철 나노입자에 Span[®] 60 0.93g, 스쿠알렌 0.94g, DOTAP 클로라이드 0.75g을 첨가하여 '오일' 상을 제조하였다. 오일상은 60° C로 예열된 수조에서 30분 동안 초음파 처리하였다(Sonicate). 별도로 1리터 유리병에, Milli-Q 물로 제조된 10mm 시트르산나트륨 이수화물 용액 1,000ml에 Tween[®] 80 10g을 첨가하여 "수성" 상을 제

조하였다. 수성상을 30분 동안 교반하여 Tween[®] 80이 완전히 용해되도록 하였다. Tween[®] 80의 완전한 용해 후, 99ml의 수성상을 200ml 비이커로 옮기고, 60° C로 예열된 수조에서 인큐베이션하였다. 가열된 오일 상에 예열된 수성상 96ml를 첨가하였다. 상기 혼합물을 우유-유사 외형을 갖는 균질한 콜로이드가 생성될 때까지 VWR[®] 200 균질기(VWR International)를 사용하여 즉시 유화시켰다. 콜로이드는 후속적으로 유체를 20,000psi에서 LM10 마이크로유동화기의 Y-형 상호작용 챔버를 통해 통과시킴으로써 가공되었다. 동적 광 산란(Malvern Zetasizer Nano S)에 의해 측정된 z-평균 유체역학적 직경이 0.2 다분산 지수를 갖는 60nm가 될 때까지 유체를 통과시켰다. 미세유동화된 LION 샘플을 200nm 기공-크기 폴리에테르술폰(PES) 시린지 필터로 최종적으로 여과하였다.

[0181] **79-014-A으로 표지된 지질 무기 나노입자(LION)의 제조.**

[0182] 이들 LION은 9.4mg/ml 스쿠알렌, 0.63mg/ml Dynasan[®] 114 (트리미리스틴), 9.3mg/ml 스팬[®] 60, 9.3mg/ml Tween[®] 80, 7.5mg/ml DOTAP 클로라이드, 0.05mg/ml 15nm 산화철 나노입자, 및 10mm 시트르산나트륨 이수화물을 포함한다. LIONs는 다음과 같은 방법으로 제조하였다.

[0183] 200ml 비이커에, 15nm의 수-가중 평균 직경을 갖는 클로로포름 중 25mgFe/ml의 산화철 나노입자 0.2ml를 첨가하였다. 클로로포름을 흡 후드(fume hood)에서 증발시켜 산화철 나노입자의 건식 코팅을 남기도록 하였다. 상기 산화철 나노입자에 Span[®] 60 0.93g, 스쿠알렌 0.94g, Dynasan[®] 114 0.063g, DOTAP 클로라이드 0.75g을 첨가하여 "오일" 상을 제조하였다. 오일상은 60° C로 예열된 수조에서 30분 동안 초음파 처리하였다(Sonicate). 별도로 1리터 유리병에, Milli-Q 물로 제조된 10mm 시트르산나트륨 이수화물 용액 1,000ml에 Tween[®] 80 10g을 첨가하여 "수성" 상을 제조하였다. 수성상을 30분 동안 교반하여 Tween[®] 80이 완전히 용해되도록 하였다. Tween[®] 80의 완전한 용해 후, 99ml의 수성상을 200ml 비이커로 옮기고, 60° C로 예열된 수조에서 인큐베이션하였다. 가열된 오일 상에 예열된 수성상 96ml를 첨가하였다. 상기 혼합물을 우유-유사 외형을 갖는 균질한 콜로이드가 생성될 때까지 VWR[®] 200 균질기(VWR International)를 사용하여 즉시 유화시켰다. 콜로이드는 후속적으로 유체를 20,000psi에서 LM10 마이크로유동화기의 Y-형 상호작용 챔버를 통해 통과시킴으로써 가공되었다. 동적 광 산란(Malvern Zetasizer Nano S)에 의해 측정된 z-평균 유체역학적 직경이 0.2 다분산 지수를 갖는 60nm가 될 때까지 유체를 통과시켰다. 미세유동화된 LION 샘플을 200nm 기공-크기 폴리에테르술폰(PES) 시린지 필터로 최종적으로 여과하였다.

[0184] **실시예 2. LION 제형의 안정성**

[0185] **LION 제형은 열안정적이다.**

[0186] 다양한 제형 (실시예 1에서 제조된 바와 같이, 각각 79-004, 79-006-A 및 79-006-B으로 표지된 LION)를 명시된 온도에서 안정성 챔버 내에 두었다. 안정성은 동적 광 산란을 이용한 입자 크기 측정에 의해 결정되었다. 결과는 LION 제형이 4, 25 및 42° C에서 저장될 때 안정한 콜로이드를 형성한다는 것을 보여준다. 도 1a-1c에서 입증된 바와 같이, LION 제형의 입자는 온도 범위 및 시간 경과에 따라 탁월한 안정성을 보여준다.

[0187] **LION 제형은 RNase로부터 RNA를 보호한다.**

[0188] 본 실시예는 LION 제형이 리보뉴클레아제(RNase)-촉매된 분해로부터 RNA를 보호한다는 것을 나타낸다. RNase 켈린지로부터의 보호는 겔 전기영동에 의해 특성화되었다. RNA 분자는 미리 결정된 질소:인산염(N:P) 비로 혼합함으로써 LION 제형과 복합체를 형성하였다. 다양한 LION 제형을 RNA에 결합시키고 복합체를 RNase에 노출시켰다.

[0189] 15의 N:P에서 LION 제형(각각 79-004, 79-006-A, 79-006-B, 및 79-011로 라벨링된 LION)와 복합체를 형성한 100 µl의 네이키드(제형화되지 않은) RNA 또는 RNA를 10mg/L로 희석된 RNase A 용액(Thermo Scientific, EN053L)과 함께 실온에서 30분 동안 인큐베이션한 후, 30분 후, 1mg/ml로 희석된 프로테이나제 K 용액(Thermo Scientific, E00491)을 첨가하고, 모든 샘플을 10분 동안 55° C로 가열하였다. RNA를 추출하기 위해, 0.12ml 페놀:클로로포름 용액(Invitrogen, 15593-031)을 모든 샘플에 첨가하고; 샘플을 15초 동안 볼텍싱하고, 13,300 rpm에서 15분 동안 원심분리하였다. 20 µl의 상등액을 추출하여 PCR 튜브로 옮기고, 각 튜브에 20 µl의 글리옥살 로드 염료(glyoxal load dye, Invitrogen, AM8551)를 첨가하였다. 모든 샘플을 50° C에서 20분 동안 가열하였다. 250ng의 RNA를 함유하는 샘플을 겔 전기영동 박스 내의 Northern Max Gly Gel Prep 러닝 버퍼(Ambion, AM8678)에 침지된 1% 아가로스 겔의 웰에 로딩하였다. 겔을 120 V에서 45분 동안 작동시키고, 겔 문서화 시스템

에서 영상화하였다. 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0190] 도 2는 네이키드(비제형화) RNA와 비교하여, 15의 질소:인산염(N:P) 비로 RNA 분자와 복합된 예시적인 LION 제형(실시에 1에서 제조된 각각 79-004, 79-006-A, 79-006-B 및 79-011로 표지된 LION)의 겔 전기영동을 보여준다. 도 2는 RNase의 작용에 대한 LION 제형에 의해 보호된 RNA의 안정성을 보여준다. 도 2에 나타낸 바와 같이, RNase로 처리된 네이키드 RNA(LION 제형과 복합체를 형성하지 않음)는 완전히 파괴된 반면, 모든 LION 제형은 복합체를 형성하는 RNA를 보호하였다.

[0191] **실시에 3. 단백질 발현을 위해 LION 제형 사용 - 분비된 배아 알칼리 포스파타제 "SEAP" 발현**

[0192] 본 실시예는 LION 제형이 높은 수준의 분비된 배아 알칼리성 포스파타제(Secreted Embryonic Alkaline Phosphatase; SEAP) 발현을 유도함을 입증한다. 관심 단백질을 코딩하는 메신저 RNA 분자를 LION 제형과 복합체 화시키고, 이를 유기체의 세포의 세포질에 전달하였다. 전령 RNA는 세포 내 번역을 수행하여 목적 단백질을 생산하였다. 약독화 복제 알파바이러스 베네스웰라형 말머염(VEE) 바이러스 TC-83의 서브게놈은 VEE 구조 단백질을 분비된 배아 알칼리성 포스파타제(SEAP)로 치환함으로써 변형되었다.

[0193] SEAP를 암호화하는 변형된 레플리콘 RNA(RNA-SEAP) 1 µg을 N:P 15에서 79-004(10nm, 실시예 1)로 표지된 LION 제형과 복합체화하고 C57BL/6 마우스(n = 3)에 근육내(50 µl)로 투여하였다. 마우스는 일정한 간격으로 채혈하고, 단백질 발현은 -1 일(주사 전), 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 및 20일에 SEAP에 대해 마우스 혈청을 분석하여 측정하였다. 주사 후 수일에 걸쳐 마우스에서 SEAP 발현의 결과는 도 3a에 나타내었다.

[0194] 도 3a는 메신저 RNA와 복합체화된 LION 제형이 연장된 시간(주사 후 20일)에 걸쳐 강력한 수준의 분비된 단백질을 발현할 수 있음을 보여준다.

[0195] **코어 무기 입자의 크기의 영향**

[0196] RepRNA 인코딩-SEAP (1 µg)를 79-004, 79-006-A, 또는 79-006-B (다양한 SPIO 크기를 가짐, 실시예 1 참조)로 표지된 LION 제형과 15의 N:P 비로 복합체화하고 C57BL/6 마우스 (n = 3/제형)에서 근육내 (50 µl)로 투여하였다. 마우스를 일정 간격으로 채혈하고, 4, 6, 8, 11, 13, 15 및 20일에 SEAP에 대해 마우스 혈청을 분석하여 단백질 발현을 결정하였다. 주사 후 수일에 걸친 마우스에서의 SEAP 발현의 결과는 도 3b에 나타내었다. 로그-변환된 데이터를 양방향 ANOVA 및 Tukey's 다중 비교 시험에 의해 분석하였다.

[0197] 도 3b는 다양한 평균 직경을 갖는 코어 무기 SPIO 나노입자를 갖는 LION 제형이 모두 연장된 기간에 걸쳐 생체 내에서 유사한 강건한 수준의 단백질 발현을 유도하도록 작용하였으며, 이들 제형 사이의 SEAP 발현에서 통계적으로 유의한 차이는 없었음을 보여준다. 따라서, SPIO 입자의 직경은 repRNA 분자를 전달하는 LION 제형의 능력 및 repRNA 분자로부터의 단백질 발현 수준에 영향을 미치는 것으로 보이지 않았다.

[0198] **LION 전달 대 NLC 전달**

[0199] 변형된 repRNA-코딩 SEAP(RNA-SEAP)(1 µg)를 N:P 15에서 79-004(10nm, 실시예 1)로 표지된 LION 제형 또는 대조군으로서 나노구조화된 지질 담체(NLC)와 복합체화하였다. 생성된 RNA-LION 제형을 C57BL/6 마우스 (n = 3)에서 근육내 (50 µl)로 투여하였다. 마우스를 일정한 간격으로 채혈하고, SEAP에 대해 마우스 혈청을 분석하여 단백질 발현을 결정하였다. 주사 후 수일에 걸친 마우스에서의 SEAP 발현의 결과는 도 3c에 나타내었다.

[0200] 대조군은 고체 지질(글리세릴 트리미리스테이트-다이아산)과 유화시 반결정질 코어를 형성하는 액체 오일(스쿠알렌)의 블렌드인 나노구조 지질 담체(NLC)이다. NLC에 대한 보다 상세한 설명은 그 전체 내용이 참고로 여기에 포함된 Erasmus et al. " A Nanostructured Lipid Carrier for Delivery of a Replicating Viral RNA Provides Single, Low-Dose Protection against Zika," Mol. Ther. 26(10):2507-22 (2018)을 참조한다.

[0201] 도 3c에 나타낸 바와 같이, LION 제형과 복합체화된 repRNA-코딩 SEAP는 NLC와 복합체화된 repRNA-코딩 SEAP와 비교하여 각 시점에서 더 높은 전체 수준의 SEAP 발현을 초래하였다. 이것은 NLC와 비교하여 LION 제형이 repRNA 분자에 대한 더 나은 전달 매개체 역할을 함을 나타낸다. 또한, 도 3c에 나타낸 바와 같이, SEAP 발현은 8일경에 최고조에 달했고, 21일에는 대조군 NLC 그룹에 대한 기준선으로, 그리고 LION 그룹에 대한 0.5 log의 기준선으로 되돌아갔다.

[0202] **RNA 복합체화 농도의 영향**

[0203] RepRNA 인코딩-SEAP는 복합체화 농도를 변화시키면서 15의 N:P 비로 LION 제형(15nm, 실시예 1의 79-006A와 유사)와 복합체화되었다. 생성된 RNA-LION 제형을 C57BL/6 마우스 (n = 5/제형)에서 근육내로 투여하였다. 마우스

는 근육주사 후 일정 간격으로 채혈하였으며, 마우스 혈청을 분석하여 단백질 발현을 확인하였다. 주사 후 수일에 걸친 마우스에서의 SEAP 발현의 결과는 도 3d에 나타내었다.

[0204] RNA 복합체 농도는 LION/repRNA 복합체의 크기에 영향을 미쳤다. 10배 더 높은 repRNA 농도(400 ng/μl 대 40 ng/μl)를 갖는 LION/repRNA 복합체는 약 41% 더 큰 LION/repRNA-SEAP 복합체 및 24% 더 넓은 크기 분포를 초래하였다.

[0205] 도 3d에 나타난 바와 같이, 400 ng/μl 대 40 ng/μl의 농도를 갖는 LION/repRNA 복합체에 대한 각 시점에서 평균 SEAP 농도(Mann-Whitney test 사용)에 유의한 차이가 없었으며, 이는 복합체 농도가 repRNA 전달 및 단백질 발현에 실질적인 영향을 미치지 않았음을 시사한다. repRNA 농도(400 ng/μl 대 40 ng/μl)에 대해, LION/repRNA-SEAP 제형으로 면역화된 마우스의 혈청에서의 SEAP 발현 농도는 근육내 주사 후 7일째에 최고조에 달했고, 21일째에 배경 수준으로 회복했다.

[0206] **N:P 및 RNA 용량의 영향**

[0207] RepRNA 인코딩-SEAP(각각 0.5 μg, 2.5 μg, 및 12.5 μg)를 N:P 비를 변화시키면서 LION 제형 (15nm, 실시예 1의 79-006A와 유사)와 복합체화하였다. 생성된 RNA-LION 제형을 C57BL/6 마우스 (n = 4/제형)에서 근육내로 투여하였다. 근육내 주사 7일 후 마우스를 채혈하고, 마우스 혈청을 분석하여 단백질 발현을 결정하였다. N:P 비의 함수로서 마우스에서의 SEAP 발현의 결과를 도 3e에 나타내었다.

[0208] 도 3e는 LION 제형화된 repRNA의 생물활성에 대한 N:P 비 및 RNA 용량의 영향을 보여준다.

[0209] **실시예 4. 백신 전달을 위해 LION 제형 사용**

[0210] 이 실시예는 LION-복합된 RNA로부터 발현된 항원이 매우 면역원성이고 항체를 유도한다는 것을 보여준다. 백신 항원을 코딩하는 RNA 분자를 LION 제형과 복합체화시키고, 이를 유기체의 세포의 세포질에 전달하였다. RNA는 세포내 번역을 거쳐 백신 항원을 생산하였다. 그 유기체는 항원에 대한 항체를 생성함으로써 면역 반응을 일으켰다.

[0211] 스파이크 "S" 단백질 전장 형태를 암호화하는 자가 복제 "sr" RNA 제형을 혼합하고 LION과 제형화하였다. 마우스를 근육 내로 10, 1, 및 0.1 μg의 srRNA의 투여량 수준으로 제형화된 시험 물품을 사용하여 한 번 면역화시켰다. 면역화 14일 후에, 동물을 채혈하고, 혈청을 제조하고, 사용할 때까지 -20° C에서 분취량으로 저장하였다. 폴리클로날 IgG 표준을 사용한 항원-특이적 IgG 농도를 절단된 수용체-결합 도메인 (RBD) 단백질 단편에 대해 결정하였다. 그 결과를 도 4a에 나타내었다. 도 4a에서 알 수 있는 바와 같이, 다양한 용량의 RNA(각각 10, 1, 및 0.1 μg)에서 LION/repRNA 제형으로부터 발현된 항원은 모두 SARS-CoV-2의 수용체 결합 도메인에 대해 강력한 면역 반응을 유도하였다. 매우 낮은 농도의 RNA(0.1 μg)에서도 견고한 역가가 관찰되었다.

[0212] **코어 무기 입자의 크기의 영향; LION 전달 대 NLC 전달**

[0213] 서로 다른 SPI0 크기의 다양한 LION 제형(각각 LION-10, LION-15, LION-25, LION-5) 또는 대조군으로서 나노구조화된 지질 담체(NLC)와 복합체화된 RepSARS-CoV2S RNA를 C57BL/6 마우스에서 근육내 투여하였다. LION-10, LION-15, LION-25 및 LION-5로 표지된 제형은 각각 79-004, 79-006-A, 79-006-B, 79-011, 79-014-A으로 표지된 LION 조성에 상응한다(하기 표 1 참조; 또한 실시예 1 참조). 마우스는 근육주사 후 일정 간격으로 채혈하였으며, 단백질 발현은 항-스파이크(anti-S) 효소면역측정법(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)으로 IgG 농도를 분석하여 확인하였다. 주사 후 수주에 걸친 C57BL/6 마우스의 혈청 중 항-S IgG 농도의 결과는 도 4b에 나타내었다.

[0214] 도 4b는 다양한 평균 직경을 갖는 코어 무기 SPI0 나노입자를 갖는 LION 제형이 모두 항원의 생물학적 활성을 유지하고 연장된 기간에 걸쳐 생체내에서 강력한 수준의 면역 반응을 유도하는 데 작용하였음을 보여준다. 또한, LION 제형과 복합체화된 모든 RepSARS-CoV2S RNA는 대조군 NLC와 복합체화된 반응보다 더 큰 반응을 생성하였다.

[0215] **혼합 방향 및 희석의 영향**

[0216] 혼합 방향을 다양하게 함으로써(LION을 RNA에 혼합하는 것 대 RNA를 LION에 혼합하는 것) 제조된 다양한 LION 제형과 복합체화된 RepSARS-CoV2S RNA 및 희석제(수크로스를 사용하여 1:200 희석(Suc) 대 텍스트로스를 사용하여 1:200 희석(Dex))를 C57BL/6 마우스에서 근육내 투여하였다. 근육내 주사 후 14일 (각 군에 대해 제1 막대) 또는 21일 (각 군에 대해 제2 막대)에 마우스를 채혈하고, 항-스파이크 ELISA에 의해 IgG 농도를 분석함으로써

단백질 발현을 결정하였다. 결과를 도 4c에 나타내었다.

[0217] 도 4c에 나타낸 바와 같이, 혼합 방향(LION을 RNA에 혼합하던 RNA를 LION에 혼합하던)은 항원의 생물학적 활성 및 RNA를 전달하는 LION 제형의 능력에 영향을 미치지 않았다. 더욱이, LION-RNA 제형의 다양한 희석제(텍스트로스 또는 수크로스)는 항원의 생물학적 활성에 영향을 미치지 않았다.

[0218] **실시예 5. LION 제형 영상화**

[0219] 이 실시예는 LION 제형이 MRI 영상화를 위한 신호를 방출할 수 있음을 보여준다. RNA 분자에 복합체화되거나 나노입자 표면에 분자 또는 지질 코어에 캡슐화된 분자와 접합된 LION 제형을 유기체에 투여하였다. 이어서, 유기체를 영상 기기에 넣고 전자기파에 노출시켰으며, LION 나노입자는 콘트라스트를 향상시키는 역할을 하였다. 그 결과를 도 5a-5b에 나타내었다.

[0220] 도 5a-5b는 LION 제형 중의 철 농도의 함수로서 T1(도 5a) 및 T2(도 5b) 이완 시간의 증가를 보여준다. 도 5a-5b에서 확인된 LION 제형의 조성물은, LION 조성물 중의 철 산화물의 농도가 도면의 X축에 기초하여 변하는 것을 제외하고는, 실시예 1에 따라 각각 79-004, 79-006-A, 79-006-B, 79-011, 79-014-A으로 표지된 LION 조성물 각각에 상응한다(하기 표 1 참조).

[0221] 도 5는 LION 입자 79-004, 79-006-A, 79-006-B, 79-011 및 79-014-A을 사용하여 자기 공명 영상(MRI)에서 T1 및 T2 콘트라스트를 모두 향상시키는 능력을 요약한 것이다. r1, r2 이완성 및 r2/r1 비율은 표 1에 요약되어 있다.

[0222] 표 1. 다양한 코어 직경을 갖는 산화철 코어를 함유하는 LION 제형의 MR 이완도 (r1 및 r2) 및 r2/r1 비.

제형	79-004	79-006-A	79-006-B	79-011	79-014-A
대체 명칭	LION-10	LION-15	LION-5	LION-25	LION/NLC-15
r1 [mM-1 s-1]	0.66	0.91	0.74	0.63	0.76
r2 [mM-1 s-1]	1.12	1.59	0.46	2.47	1.60
r2/r1	1.70	1.75	0.63	3.94	2.10

[0223]

[0224] **실시예 6. 항체 발현을 위한 LION 제형 사용**

[0225] 이 실시예는 항체가 LION-복합체 RNA로부터 발사될 수 있음을 보여준다. 항체를 코딩하는 RNA 분자를 LION 제형과 복합체화하고, 유기체의 세포의 세포질로 전달하였다. 메신저 RNA는 세포내 번역되어 항체를 생산하였다.

[0226] **지카 바이러스를 표적으로 하는 모노클로날 항체를 코딩하는 레플리콘 RNA를 갖는 LION 제형**

[0227] 도 6a는 다양한 SPIO 크기의 LION 제형(각각 LION-10, LION-15, LION-25, LION-5)의 LION/항체 서열 RNA(40 µg RNA에서) 제형으로 동물을 면역화시킨 후 생성되는 지카 바이러스를 인식하는 인간 모노클로날 항체(ZIKV-117)의 강력한 수준을 나타낸다. 동물들은 면역화 후 7일에 채혈되었다. 결과는 LION 제형이 살아있는 유기체에서 항체를 생산하는데 사용될 수 있음을 나타낸다. 대조군으로는 항체 서열 RNA로 제형화된 나노구조 지질전달체(NLC)를 사용하였다. 도 6a에 도시된 바와 같이, LION 제형과 복합체화된 항체 서열 RNA는 NLC와 복합체화된 항체 서열 RNA와 비교하여, 각각의 SPIO 크기로 ZIKV-117 발현의 더 높은 전체 수준을 초래하였다. 이는 NLC와 비교하여 LION 제형이 항체 서열 RNA에 대한 더 나은 전달 매개체 역할을 한다는 것을 나타낸다.

[0228] **토끼 모델에서 모체 면역화를 위한 HIV 및 ZIKV 백신 후보를 갖는 LION 제형**

[0229] 도 6b 및 6c는 식염수로 근육내 경로로 면역화된 성인 암컷 임신 토끼에서의 항-BG505 SOSIP.664 IgG 항체의 크기 및 역학(도 6b) 또는 LION으로 제형화된 BG505 SOSIP.664 삼량체를 코딩하는 repRNA(도 6c)를 보여준다. 도 6d 및 6e는 식염수로 근육내 경로로 면역화된 성체 암컷 임신 토끼에서의 항-ZIKV E IgG 항체의 크기 및 역학(도 6d) 또는 LION으로 제형화된 ZIKV prM-E 항원을 코딩하는 repRNA의 크기 및 역학(도 6e)를 보여준다. 1주째 무렵 그늘진 영역이 토끼가 번식한 시기를 나타내고 있다. 6주부터 7주 사이에 음영처리된 영역은 새끼 토끼가 분만된 기간을 나타낸다. 화살표는 면역화 시점(0, 4 및 11주)을 표시한다. 결과는 LION/repRNA 제형으로부터 발현된 항원이 강하고 강력한 면역 반응을 유도하고 LION/repRNA 제형 둘 모두에 대해 강한 수준의 항체를 생성하였음을 보여준다.

[0230] 도 6f와 6g는 암컷 토끼로부터 새끼 토끼로의 항-SOSIP IgG의 자궁내 전달에 대한 평가 결과를 보여준다. 도 6f

는 분만 시 새끼 토끼에서 항-SOSIP IgG 반응을 나타낸다. 처리군당 각각의 한배새끼(litter)로부터 최소 2개의 새끼 토끼를 안락사시켜, 자궁항체 전달에서의 평가를 수행하였다. 도 6g는 토끼 세포에서 항체 수준과 상응하는 새끼 토끼 사이의 양의 상관 관계(피어슨 $r = 0.94$)를 나타내는 XY 플롯을 보여준다. 이들 도면은 번식 토끼의 항체가 새끼 토끼로 물질 전달되는 것을 입증했다.

[0231] 도 6h와 6i는 기준에 존재하는 모체 항체와 관련한 백신 유도 반응을 보여준다. 혈청 항-SOSIP IgG 수준을 부스트 후 4주(새끼 토끼가 젖을 땀 후 3주)에 새끼 토끼에서 수집하였다. 식염수를 투여받은 암컷 토끼로부터의 새끼 토끼나, LION + RNA-prM/E를 투여받은 암컷 토끼로부터의 새끼 토끼는, BG505 SOSIP.664에 대한 기존의 모체 항체에 대해 음성 (-)으로 그룹화한다. LION+RNA-SOSIP 또는 AddaVax 보조제 첨가된 재조합 BG505 SOSIP.664를 투여받은 암컷 토끼로부터의 새끼 토끼는, BG505 SOSIP.664에 대한 기존의 모체 항체에 대해 양(+)으로 그룹화한다. 데이터는 기존 항체가 항체의 백신 매개 유도에 유의한 영향을 미치지 않았고, 새끼 토끼에서 수동적으로 전달된 항체는 새끼 토끼에서 항체의 백신-매개 유도에 부정적인 영향을 미치지 않았음을 보여준다.

[0232] **실시예 7. 비인간 영장류에서 백신 전달을 위해 LION 제형을 사용하는 것 - 단일 용량 복제 RNA 백신은 비인간 영장류에서 SARS-CoV-2에 대한 중화 항체를 유도한다**

[0233] 본 실시예는 백신 안정성, 전달 및 면역원성을 향상시키도록 설계된 신규한 지질 무기 나노입자 (LION)로 제형화된 RNA 레플리콘을 포함하는 안정적이고 고도로 면역원적인 백신 후보인 repRNA-CoV2S의 개발을 논의한다.

[0234] *백신 설계, 제조 및 특성화*

[0235] 중증급성호흡기증후군 코로나바이러스-2(SARS-CoV-2) 감염으로 인한 2019년 코로나19(COVID-19)가 전 세계적인 대유행으로 선포됐다. 코로나바이러스는 큰 게놈을 갖는 외피, 단일 가닥 양성 센스 RNA 바이러스 및 4가지 주요 구조 단백질: 스파이크 (S), 외피, 막 및 뉴클레오캡시드에 대한 오픈 리딩 프레임이다. S 단백질은 폐포 상피세포를 포함한 다양한 세포 종류의 표면에서 코로나바이러스와 안지오텐신 전환효소 2(ACE2)의 결합을 매개한다. 보호는 S 단백질에 대한 중화 항체에 의해 매개될 수 있는데, 관련 SARS-CoV에 대해 개발된 대부분의 실험 백신은 S 단백질, 또는 그의 수용체 결합 도메인(RBD)을 도입하였으며, 강력한 중화 반응을 유도할 목적으로 하였다. 이전의 보고는 인간 중화 항체가 SARS-CoV 및 중동호흡기증후군(MERS)-CoV로 시험감염된 마우스를 보호함을 보여주었으며, 이는 SARS-CoV-2에 대한 보호가 항-S 항체를 통해 매개될 수 있음을 시사한다. 추가로, 타입 2 T 헬퍼(Th2) 반응을 유도하는 SARS 백신은 SARS-CoV로 시험감염 후 증가된 폐 면역병리학과 연관되었고, 타입 1 T 헬퍼(Th1)-편향된 면역 반응을 갖는 백신은 면역병리학의 부재하에 증가된 보호와 연관되었다. 따라서, 효과적인 COVID-19 백신은 SARS-CoV-2-특이적 중화 항체를 포함하는 Th1-편향된 면역 반응을 유도할 필요가 있을 수 있다.

[0236] 핵산 백신은 표적 항원의 유전자 서열만을 필요로 하고 병원체 배양(불활성화 또는 생 약독화 백신) 또는 규모 재조합 단백질 생산에 대한 의존성을 제거하는 신속한 백신 설계를 위한 이상적인 양상으로 떠올랐다. 또한, 핵산 백신은 바이러스 벡터화 백신의 면역원성을 약화시킬 수 있는 기존의 면역을 피할 수 있다. 임상 시험은 지질 나노입자(LNP)와 함께 제형화된 메신저 RNA(mRNA) 백신 및 전기천공에 의해 전달된 DNA 백신으로 개시되었다. 그러나, mRNA 및 DNA 백신은 단일 면역화 후 인간에서 보호 효능을 유도할 수 없을 수 있는데, 그 이유는 불활성화 및 재조합 서브유닛 단백질 백신과 유사하게, 이들은 전형적으로 효과가 나타나기 위해 연장된 기간에 걸쳐 다수의 투여를 필요로 하기 때문이다.

[0237] 바이러스-유래 레플리콘 RNA(repRNA) 백신은 1989년에 처음 설명되었고 바이러스-유사 RNA 입자(VRP), 시험관내 전사된(IVT) RNA, 및 플라스미드 DNA의 형태로 전달되었다. repRNA에서 바이러스 RNA 중합효소 복합체(가장 일반적으로 Alphavirus 속)를 코딩하는 개방 관독 프레임은 손상되지 않았지만 구조적 단백질 유전자는 항원 코딩 유전자로 대체된다. 통상적인 mRNA 백신은 유입 RNA 분자로부터 직접 번역되지만, 세포로의 repRNA의 도입은 체액성 및 세포성 면역 반응을 현저하게 향상시키는 극적으로 증가된 발현 및 기간을 초래하는 항원-코딩 RNA의 진행중인 생합성을 개시한다. 또한, repRNA 백신은 바이러스-감지 스트레스 인자가 유발되고, 선천성 경로가 톨-유사 수용체(Toll-like receptors) 및 레티노산 유도성 유전자(RIG)-I를 통해 활성화되어 인터페론, 전-염증성 인자 및 항원-제시 세포의 화학주성을 생성할 뿐만 아니라 항원 교차-프라이밍을 촉진한다는 점에서 알파바이러스 감염을 모방한다. 그 결과, repRNA는 그 자신의 보조체로서 작용하여, 전형적으로 다중 및 1,000배 더 높은 용량을 요구하는 종래의 mRNA에 비해, 단일 용량 후 더 강건한 면역 반응을 유도한다.

[0238] 이에 따라, 코로나19와 같은 유행성 유행을 막기 위한 백신 후보물질로 repRNA 백신을 선택하게 된 것은, 몇몇 경험으로 연구되어 왔고, 효과를 위해서는 단일 투여만 필요한 경우가 많았으며, 적은 용량과 적은 용량으로 빠

르게 면역의 보호 수준을 유도하는 잠재력을 가지면서 동시에 규모의 제조 부하를 감소시킬 수 있기 때문이다.

[0239] 도 7a에 나타난 바와 같이, 전장 S(repRNA-CoV2S)를 포함하여 SARS-CoV-2 Spike(S) 단백질의 서열을 포함하는 repRNA가 생성되었다. c-말단 v5 에피토프 태그에 융합된, SARS-CoV-2 단리물 Wuhan-Hu-1(GenBank: MN908947.3) 내의 위치 21,536 내지 25,384에 상응하는, S1-, S2-, 막관통-(TM) 및 세포질-(CD) 도메인을 포함하는 코돈-최적화된 전장 스파이크 (S) 오픈 리딩 프레임, 베네스웰라형 말 뇌염 바이러스, 균주 TC-83의 4개의 비구조적 단백질(nsP1-4) 유전자를 코딩하는 알파바이러스 레플리콘 내로 클로닝하였다. RNA 전사 및 캡핑 후, repRNA-COV2S를 BHK 세포 내로 형질감염시켰다. 24시간 후, 세포를 각각 양성 및 음성 대조군으로서 재조합 SARS-CoV2 스파이크 단백질 (rCoV2-스�파이크) 및 repRNA-GFP를 사용하여, 회복성 인간 혈청 또는 면역검출을 위한 항-v5를 사용하는 항-v5 면역형광 및 웨스턴 블롯에 의해 분석하였다. 도 7b 및 7c의 결과는 BHK 세포에서 v5-태그된 S 단백질의 효율적인 발현을 나타낸다. 도 7c는 또한 면역검출시약으로 COVID-19의 발병 29일 후 수집된 회복기 혈청을 이용하여 천연 SARS-CoV-2 면역혈청과 반응성인 BHK 세포에서 S 단백질의 내인성 발현을 입증한다.

[0240] *LION을 이용한 repRNA-CoV2S의 제형*

[0241] 다음으로, repRNA-CoV2S는 백신 안정성 및 백신의 세포내 전달을 향상시키도록 설계된 예시적인 지질 무기 나노입자(LION)와 함께 제형화되었다. 항체 및 T 세포 반응을 신속하게 생성하는 LION/repRNA-CoV2S 제형의 능력을 마우스에서 평가하였다.

[0242] LION 조성물의 제조를 위한 일반적인 제조 기법 및 물질은 실시예 1에 개시된 것을 따랐다. 예시적인 LION은 소수성 오일상에 매립된 15nm 초상자성 산화철 (Fe₃O₄) 나노입자 (SPIO)를 갖는 매우 안정한 양이온성 스쿠알렌 에멀전이다. 도 8a는 예시적인 LION 및 LION과 repRNA를 혼합한 후 백신 복합체의 형성을 간략하게 도식화한 것이다. 스쿠알렌은 백신 보조제이다. SPIO 나노입자는 MRI 조영제 및 정맥내 철 대체 요법에서 임상적 용도를 가지며; SPIO의 독특한 비선형 자기 특성은 또한 광범위한 영상화, 표적화 및 요법 적용에서 신규한 용도를 가능하게 하였다. LION은 또한 양이온성 지질 1,2-디올레일-3-트리메틸암모늄 프로판(DOTAP)을 함유하였고, 이는 1:1 (v/v) 혼합 단계에 의해 조합될 때 RNA 분자와의 정전기적 결합을 가능하게 하였다. 실시예 1에 개시된 바와 같이, 이러한 예시적인 LION은 동적 광 산란(DLS)에 의해 측정된 52nm의 강도-가중 평균 직경(PDI = 0.2)을 가졌다. 도 8b에 표시된 바와 같이, 4 및 25° C에서 저장시 LION 제형은 적어도 3개월 동안 콜로이드적으로 안정하였다.

[0243] LION을 repRNA와 혼합할 때, LION의 표면 상의 양이온성 repRNA와 양이온성 DOTAP 분자 사이의 정전기적 결합은 즉각적인 복합체 형성을 촉진한다. DLS에 의해 검출된 90nm의 강도-가중 평균 직경으로의 입자 크기 증가에 의해 LION-repRNA 복합체 형성을 확인하였다(도 8c 참조). 도 8d에 나타난 바와 같이, 농축된 RNase 켈린지 후 페놀-클로로포름 처리에 의해 추출된 LION-제형화된 repRNA 분자의 겔 전기영동 분석은 제형화되지 않은 repRNA (네이키드)에 비해 RNase-촉매화된 분해로부터 실질적인 보호를 나타내었다. 제형화된 백신의 단기 안정성을 평가하기 위해, repRNA 완전성 및 복합체 안정성을 페놀-클로로포름 처리에 의해 추출된 repRNA의 겔 전기영동 및 복합체의 입자 크기에 의해 결정된 바와 같이, 4° C 및 25° C에서 혼합 및 저장 후 1, 4 및 7일에 평가하였다. 도 8e 및 8f에 나타난 바와 같이, LION은 repRNA 분자의 완전한 완전성을 유지하였고(도 8e), 복합체는 모든 시점에서 그의 크기(도 8f)를 유지하였고, 이는 제형화된 백신 복합체가 혼합 후 적어도 일주일 동안 안정하였음을 나타낸다.

[0244] *마우스에서의 LION/repRNA-CoV2S 전달*

[0245] LION/repRNA-CoV2S 복합체를 마우스에 투여하였다. 6 내지 8주령 C57BL/6 마우스 (n = 5/군)는 근육내 경로를 통해 10, 1, 또는 0.1mg LION/repRNA-CoV2S를 투여받았다. 프라임 면역화 후 14일 후, 혈청을 수확하였다. 도 9a에 나타난 바와 같이, 10 또는 1µg의 LION/repRNA-CoV2S를 사용한 C57BL/6 마우스의 단일 근육내 면역화는 면역화 후 14일까지 100% 혈청전환 및 평균 결합 역가가 각각 200 및 109µg/ml이고 부분 혈청전환(5 중 2)이 0.1µg 용량에서 일어나는 강력한 항-S IgG 수준을 유도하였다. 도 9b에 나타난 바와 같이, 10 및 1µg 프라임-온리 용량 둘 모두는 슈도바이러스 중화 검정 (SARS-CoV-2 Wuhan-Hu-1 슈도타입)에 의해 측정된 바와 같이 평균 50% 억제 농도 (IC50)가 각각 1:643 및 1:226인 중화 항체를 유도하였다. 모든 용량은 IgG1과 비교할 때 유의적으로 더 높은 IgG2c 반응으로 나타난 바와 같이 Th1 편중된 면역 반응을 유도하였지만(도 9c 참조), 더 높은 IgG2c:IgG1 비로 나타난 바와 같이 더 많은 Th1 편중된 반응을 유도하는 더 높은 용량을 향하는 경향이 있었다 (도 9d 참조).

- [0246] 특히 약화 항체 및 기억 B 세포 반응의 존재에서, SARS 및 MERS로 관찰되는 바와 같이, T 세포가 보호에 기여하는 잠재적인 역할을 고려하여, LION/repRNA-CoV2S에 대한 T 세포 반응을 마우스에서 평가하였다. 28일째에, 마우스의 이러한 동일한 코호트는 2차 면역화를 받았다. 12일 후, 비장 및 폐를 수거하고, S 단백질의 중첩 15-mer 펩티드 라이브러리 자극하고, IFN- γ 반응을 효소-연결된 면역 흡수 스팟(ELISpot) 분석으로 측정하였다. 도 9e에 나타난 바와 같이, 10, 1, 및 0.1 μg 프라임/부스터를 투여받은 마우스는 각각 1698, 650, 및 801의 평균 IFN- γ 스팟/106 세포를 갖는 강력한 비장 T 세포 반응을 나타내었다. 강력한 T 세포 반응도 폐에서 검출되었으며, 평균 IFN- γ 스팟/106 세포가 각각 756, 784 및 777인 그룹 사이에서 유사하였다(도 9f 참조).
- [0247] 노인은 코로나19에 가장 취약한 계층이지만 이 인구에서의 면역노쇠는 효과적인 예방접종에 장벽을 내밀고 있다. 면역원성에 대한 면역 노화의 효과를 평가하기 위해, 2-, 8-, 또는 17-개월령 BALB/C 마우스 (n=5/군)는 근육내 경로를 통해 10 또는 1mg LION/repRNA-CoV2S를 제공받았다. 프라임 면역화 후 14일 째에, 혈청을 수확하고, 항-S IgG 농도를 측정하였다. 도 10a에 도시된 바와 같이, 2- 및 8-개월 마우스와 비교할 때, 17-개월 마우스에서 양쪽 용량에서 유의하게 더 낮은 항체 역가가 관찰되었으며, 이는 충분한 면역성을 유도하기 위해 가장 면역-노쇠한 집단에서 더 높은 용량 및/또는 추가적인 부스터 용량이 필요할 수 있음을 시사한다. 2개월령 마우스와 8개월령 마우스 사이에는 차이가 관찰되지 않았다. BALB/C 마우스는 백신접종 후 더 많은 Th2 면역 편향된 반응을 발병하는 경향이 있지만, LION/repRNA-CoV2S는 BALB/C 마우스의 모든 연령군에서 1 초과와 IgG2a:IgG1의 비를 유도하였고(도 10b 및 10c 참조), 이는 Th1 편향된 면역 반응을 나타낸다. 중증, 생명을 위협하는 COVID-19가 T 헬퍼 반응의 유형에 관계없이 노인 개체들 사이에서 더 흔한 것으로 보이고, 중증 SARS가 부적절한 Th1 반응을 갖는 Th2 항체 프로파일을 향한 쏠림과 연관된다는 것을 고려하면, 8개월령 및 2개월령 마우스에서, 심지어 Th2-편향 BALB/c 균주에서, 강한 및 Th1-편향 반응을 유도하는 LION/repRNA-CoV2S의 능력은 이 백신 복합체의 안전성 및 면역원성에 관한 긍정적인 신호를 제공했다.
- [0248] *비인간 영장류에서의 LION/repRNA-CoV2S 전달*
- [0249] 마우스에서 LION/repRNA-CoV2S 복합체로 강력한 면역원성을 달성한 후에, 백신 복합체가 백신 접종에 대한 면역 반응에서 인간과 더 밀접하게 닮은 비인간 영장류 모델에서 강한 면역 반응을 유도할 수 있는지를 결정하기 위해 돼지꼬리 마카크(마카카 네메스트리나)의 면역화를 수행하였다.
- [0250] 도 11a에 나타난 투여 요법에서, 3마리의 마카크는 근육내 경로를 통해 제0주에 단일 250 μg 용량으로 LION/repRNA-CoV2S 복합체를 투여받았고, 2마리의 마카크는 근육내 경로를 통해 제0주에 50 μg 프라임 용량을 투여받고 제4주에 부스터 용량을 투여받았다. 백신 안전성 및 면역원성을 모니터링하기 위해 백신 접종 후 10, 14, 28 및 42일에 혈액을 수집하였다. 50 μg 그룹은 14일 후에 채혈되는 혈액과 함께, 28일째에 증가된 예방접종을 받았다. 백신 주사 부위에서 관찰된 반응이나 프라임 백신 접종 후 42일까지 동물에서 이상반응은 없었다.
- [0251] 도 11b에 나타난 바와 같이, 면역화 전 혈액 채취에 의해 확립된 기준선에 대해, 초기 면역화 후 10, 14, 28, 및 42일에 수집된 혈청의 ELISA 분석은, 250 μg 단일 용량으로 면역된 3마리의 마카크는 모두 10일째에 혈청 전환되었으며, 항-S IgG 농도는 이 3마리 동물에서 42일째까지 48, 51, 61 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 계속 증가하는 것으로 나타났다. 50 μg repRNA-CoV2S를 투여받은 양 마카크는 단일 투여 후 혈청전환되었지만, 동일한 시점에서 250 μg 그룹의 7, 20 및 45 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 비교하여, 28일까지 1 및 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 항-S IgG 농도를 갖는 항체 반응이 유의하게 감소하였다(도 11b 참조). 그러나, 추가 면역화 14일 후, 50 μg 그룹은 이 시점에서 250 μg 프라임-온리 그룹(48, 51, 및 61 $\mu\text{g}/\text{ml}$)과 유사한 수준의 항-S IgG 농도(18 및 37 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 나타내었다(도 11b 참조). 추가로, 도 11c에 나타난 바와 같이, 단지 단일 250 μg 용량 중화된 슈도바이러스 (SARS-CoV-2 Wuhan-Hu-1 슈도타입) 형질도입으로 시험관내에서 세포를 1:38, 1:20 및 1:47의 역 IC50 역가로 1:472, 1:108, 및 1:149로 28일까지 면역시킨 3마리의 마카크로부터의 혈청은 42일까지 1:218 및 1:358의 슈도바이러스 IC50 역가에 도달한 후에만 유사한 강력한 IC50 역가를 달성한 반면, 50 μg 군은 부스터 면역이 42일까지 1:218 및 1:358의 슈도바이러스 IC50 역가를 달성하였다.
- [0252] 백신접종 후 28일 및 42일에 수집된 혈청을 80% 플라크 감소 중화 시험(PRNT80)에 의한 야생형 SARS-CoV-2/WA/2020의 중화에 대해 추가로 분석하고, 자연 감염 후 15-64일에 수집된 회복기 인간으로부터의 혈청에서의 중화 역가와 비교하였다. 도 11d에 나타난 바와 같이, 50 및 250 μg 의 LION/repRNA-CoV2S를 사용한 단일 면역화는 28일까지 각각 1:32 및 1:66의 평균 PRNT80 역가를 유도하였다. 42일째에, 평균 PRNT80 역가는 50 μg 그룹에서는 부스터 면역화 후 1:176으로, 프라임-온리 250 μg 그룹에서는 1:211로 유의하게 증가하였다. 5마리의 마카크 모두는 7마리의 회복기 인간에서 측정된 역가와 동일한 범위 내의 PRNT80 역가를 발생시켰으며(1:20 내지 1:1280, 발병 후 15 내지 64일에 수집), 5마리의 백신접종된 마카크(1:197) 모두와 회복기 인간(1:518) 사이의

평균 중화 역가에는 유의한 차이가 없었다($P = 0.27$, 도 11d). 최근에, SARS-CoV-2를 50% 조직 배양 감염성 용량(TCID50)으로 중화시키는 IC50 역가로서 측정된 혈청 중화 역가가 불활성화된 SARS-CoV-2 백신으로 백신 접종 후 재감염되거나 첼린지된 붉은털 마카크에서 보고되었다. 전자의 보고에서는, 1:8만큼 낮은 IC50 역가가 재감염으로부터의 보호와 관련이 있었던 반면, 후자의 경우에는, 1:50만큼 낮은 IC50 역가가 감소된 바이러스 부하 및 폐 병리로부터의 보호와 관련이 있었다. 이들 데이터는 LION/repRNA-CoV2 백신을 사용한 250 µg 프라임-온리 또는 50 µg 프라임/부스트 면역화가 비인간 영장류를 감염 및 질병으로부터 보호하기에 충분한 중화 항체의 수준을 유도할 수 있을 것임을 시사한다.

[0253] 다양한 감염성 질환 및 암에 대한 repRNA 백신은 임상 시험에서 안전하고 효능이 있는 것으로 밝혀졌으며, repRNA의 무세포 및 잠재적으로 매우 확장가능한 제조 공정은 효과적인 합성 제형, 예컨대 LION과 함께 사용될 때 mRNA에 비해 추가의 이점을 제공하였다. 2바이알 접근법은 백신을 필요에 따라 현장에서 비축 및 조합할 수 있기 때문에 RNA를 캡슐화하는 LNP 제형에 비해 상당한 제조 및 분배 이점을 제공할 것이다. 추가로, LION/repRNA-CoV-2 복합체는 마우스에서 강력한 S-특이적 T 세포 반응을 유도하였다. 관련 SARS-CoV로 인간의 자연 감염 후, 일부 개체에서 중화 항체 및 기억 B 세포 반응은 단수명(~ 3년)인 것으로 보고되는 반면, 기억 T 세포는 적어도 6년(53)을 지속하며, 이는 특히 강한 기억 B 세포 반응이 없는 사람에서 장기간 반응에서 T 세포에 대한 잠재적 역할을 시사한다. 추가로, 관련된 SARS- 및 MERS-CoV에 대한 항-S T-세포 반응은 각각 SARS- 또는 MERS-CoV로 감염된 노화된 마우스 뿐만 아니라 정상에서의 바이러스 제거에 기여한다.

[0254] 요약하면, 이들 결과는 SARS-CoV-2 감염으로부터 신속한 면역 보호를 유도하기 위한 LION/repRNA-CoV2S, 복합체에 대한 큰 잠재력을 입증한다. SARS-CoV-2 감염에 대해 젊은 및 노화된 집단 모두에서 강력한 면역을 단일 샷으로 유도할 수 있는 확장가능하고 널리 분포된 백신은 유행병의 즉각적이고 효과적인 봉쇄를 제공할 것이다. 결정적으로, 백신은 젊은 및 노화된 마우스 둘 모두에서 Th1-편향된 항체 및 T 세포 반응을 유도하였고, 이는 SARS-CoV-2 감염된 환자에서 개선된 회복 및 더 순한 질환 결과와 관련된 특성이다. 비인간 영장류에서의 단일-용량 투여는 SARS-CoV-2를 강력하게 중화시키는 항체 반응을 유도하였다. 이들 데이터는 SARS-CoV-2 감염으로부터 보호하기 위한 백신으로서 LION/repRNA-CoV2S 복합체의 가능성을 지지한다.

[0255] **실시예 8. 토끼에서 백신 전달을 위해 LION 제형 사용**

[0256] 동물: 8 마리의 뉴질랜드 백색 토끼(오리옥토라구스 커니쿨러스), 4 마리의 수컷 및 4 마리의 암컷을 각각 2 마리의 수컷 및 암컷의 2 개의 그룹으로 분리하였다. 그룹 1은 고용량 LION-RNA 제형(LION 제형을 가진 250 µg repRNA)을 주사하였고, 그룹 2는 저용량 LION-RNA 제형(LION 제형을 가진 10 µg repRNA)을 주사하였다.

[0257] 백신 제조: LION 담체 및 repRNA-CoV2S를 10mm 시트르산나트륨 및 20% 수크로스 완충제에서 15의 질소-인산염 몰비로 복합체화하고, 2주 간격으로 3개의 0.5ml 근육내 투여량으로 연구 동물에 전달하였다.

[0258] ELISA: 포획 항원으로서 재조합 SARS-CoV-2S를 사용하는 ELISA에 의해 항원-특이적 IgG 반응을 검출하였다. ELISA 플레이트(Nunc, Rochester, NY)를 1 µg/ml 항원 또는 정제된 폴리클로날 IgG의 연속 희석액으로 코팅하여 0.1 M PBS 완충액에서 표준 곡선을 생성하고 0.2% BSA-PBS로 차단한 후, PBS/Tween으로 세척한 후, 연속적으로 희석된 혈청 샘플, 항-토끼 IgG-HRP(Southern Biotech, Birmingham, AL) 및 TMB 퍼옥시다제 기질을 플레이트에 첨가하고, HCl로 켄칭하였다. 플레이트를 405nm (ELX808, Bio-Tek Instruments Inc, Winooski, VT)에서 분석하였다. 각각의 혈청 희석점으로부터의 흡광도 값을 사용하여 역가를 산출하였다.

[0259] 도 12는 LION 제형으로 제형화된 repRNA-SARS-CoV2S (각각 250 µg 및 10 µg 용량 수준에서)로 근육내 주사된 토끼에서의 항-스파이크 IgG 수준을 나타낸다. 실시예에 나타난 바와 같이, 동물은 주입된 백신에 빠르게 면역 반응을 일으켰다. 양 용량 수준 모두에서 4주째에, 항체 역가는 거의 안정되었고, 6주 또는 8주째에 유의하게 증가하지 않았다.

[0260] **실시예 9. 백신 전달에 LION 제형 사용 - RSV 백신**

[0261] LION 제형과 복합체화된 RSV repRNA (2.5 µg)를 C57B1/6 및 BALB/c 마우스에 근육내 투여하였다. 근육 주사 28 일 후에 마우스 혈액을 수집하고, ELISA에 의해 항-F IgG 농도를 분석하여 단백질 발현을 결정하였다. C57B1/6 및 BALB/c 마우스의 혈청에서의 항-F IgG 수준의 결과는 도 13a에 제시되어 있다. 도 13a에 제시된 바와 같이, RSV G 단백질-특이적 반응은 C57BL/6 및 BALB/c 마우스 둘 다에서 레플리콘 646에 의해 유도되었다.

[0262] LION 제형과 복합체화된 RSV repRNA(2.5 µg)를 C57B1/6 및 BALB/c 마우스에 근육내 투여하였다. 마우스 혈액을 근육내 주사 28일 후에 수집하고, ELISA에 의해 항-G(A2) IgG 농도를 분석함으로써 단백질 발현을 결정하였다. C57B1/6 및 BALB/c 마우스의 혈청에서의 항-G(A2) IgG 수준의 결과는 도 13b에 제시되어 있다. 도 13b에 제시된

바와 같이, RVS G A2 균주 단백질-특이적 반응은 BALB/c 마우스에서만 레플리콘 645에 의해 유도되었다.

- [0263] **실시예 10. 면역조절 RNA의 전달을 위한 LION 제형 사용**
- [0264] **LION 제형은 RNase로부터 면역조절 RNA PAMP를 보호한다**
- [0265] RIG-I 작용제, PAMP는 예시적인 LION 제형(15nm, 실시예 1에서의 79-006A와 유사)와 함께 제형화되었다. LION 조성물의 제조를 위한 일반적인 제조 기법 및 물질은 실시예 1에 개시된 것을 따랐다.
- [0266] 도 14Aa-14b는 RNase 켈린지로부터 보호를 제공하는 LION 제형에 대한 PAMP의 결합을 보여준다. 도 14a는 PAMP-LION 복합체의 다양한 N:P 복합체화 비율(각각 0.04, 0.2, 1, 5 및 25)에서의 겔 전기영동 분석을 RNA 겔에 대해 수행하고 유리 RNA에 대해 평가하였다. 도 14a에 도시된 바와 같이, 유리 RNA는 1, 5 및 25의 N:P 비율에서 PAMP-LION 제형에 대해 존재하지 않았다. 도 14b는 네이키드 PAMP (제형화되지 않은 PAMP)와 비교하여, RNase A로 시험한 후, PAMP-LION 복합체의 겔 전기영동 분석을 나타낸다. RNA를 LION으로부터 추출하고, 아가로스 겔 상에서 실행하여 RNA 분해를 평가하였다. 결과는 비제형화된 RNA(네이키드)와 비교하여, PAMP의 LION으로의 복합체화가 RNase-촉매화된 분해로부터 RNA를 보호함을 보여준다.
- [0267] **LION에 의해 전달된 RIG-I 작용제, PAMP의 면역 자극**
- [0268] 본 실시예는 PAMP-LION 복합체가 A549-이중 세포에 첨가된 경우, LION 제형에 의해 전달된 RIG-I 작용제, PAMP의 면역 자극을 예시한다. A549-이중 세포는 2개의 리포터 구축물: SEAP의 발현을 유도하는 IFN- β 프로모터, 및 루시페라제의 발현을 유도하는 IFIT2 프로모터를 함유한다.
- [0269] PAMP는 다양한 N:P 복합체화 비율(0.5, 1.5, 4.5, 13.5, 40.5, 및 121.5)로 LION 제형으로 제형화되었고, 3.7 ng PAMP/LION이 A549-이중 세포에 첨가되었다. 도 15는 PAMP-LION 복합체에 의해 상청액에서 SEAP 활성 및 루시페라제 활성에 의해 각각 측정된 IFN- β 프로모터 및 IFIT2의 활성화를 N:P 비의 함수로서 나타낸다. 결과는 IFN- β 프로모터 및 IFIT2 프로모터 둘 다에 대해 모든 N:P 비로 PAMP-LION 제형에 의해 전달된 RIG-I 작용제, PAMP의 선천적 면역 자극을 보여주지만, 4.5 내지 40.5에서의 N:P 비는 IFN- β 프로모터에 대해 더 양호한 면역 자극을 제공하는 것으로 나타났다.
- [0270] **LION에 의해 전달된 RIG-I 작용제 및 TLR3 작용제의 면역 자극**
- [0271] 본 실시예는 RNA-LION 복합체가 A549-이중 세포에 첨가된 경우, RIG-I 작용제, PAMP, 및 LION 제형에 의해 전달된 TLR3 작용제, Riboxim의 면역 자극을 예시한다.
- [0272] PAMP(RIG-I 작용제) 또는 Riboxim(TLR3 작용제), 비제형화(네이키드 대조군) 또는 LION 제형과 함께 8의 N:P 비로 제형화하였고, 이를 A549-이중 세포에 첨가하였다. 도 16a 및 16b는 비제형화된 RNA와 비교하여 PAMP-LION 제형 또는 Riboxim-LION 제형에 의해 각각 상청액에서 SEAP 활성 및 루시페라제 활성에 의해 측정된 IFN- β 프로모터 (도 16a) 및 IFIT2 (도 16b)의 활성화를 보여준다. 결과는 RIG-I 작용제, PAMP, 및 TLR3 작용제, Riboxim 둘 다의 선천성 면역 자극을 보여주며, LION 제형과의 복합체화에 의해 전달된 것은 선천성 면역 활성화를 유도하여, 이들의 비제형화된 네이키드 대조군과 비교하여 강력한 수준의 리포터 단백질 발현을 촉발한다.
- [0273] 도 16c는 제형화되지 않은 Riboxim과 비교하여, Riboxim-LION 제형에 의한 IFIT2의 활성화를 Riboxim 용량 수준의 함수로서 나타낸다. 결과는, 모든 시험된 용량 수준에서, Riboxim과 복합체화된 LION 제형이 그의 비제형화된 네이키드 대조군과 비교하여 더 높은 수준의 IFIT2 활성화를 유도하였지만, 더 높은 용량 수준을 갖는 Riboxim-LION 제형은 더 강한 IFIT2 활성화를 유도하였음을 보여준다.
- [0274] 본 실시예는 PAMP-LION 복합체가 C57BL/6 마우스에 비강내로 전달될 때, LION 제형에 의해 전달된 RIG-I 작용제, PAMP의 면역 자극을 예시한다. PAMP는 N:P 비가 8인 LION 제형으로 제형화되었고, 0.2, 1, 또는 5 μ g PAMP/LION은 C57BL/6 마우스의 콧구멍으로 전달되었다. 8시간 후 마우스의 비강과 폐를 제거하고 즉시 동결시킨 후 RNA를 추출하고 다양한 표적 유전자에 대한 PCR을 수행하였다.
- [0275] 도 16d는 나이브 대조군과 비교하여 처리된 마우스의 비강에서 선천성 면역 유전자의 용량 의존적 유도를 보여준다. 도 16e에서는 처리된 마우스의 폐에서 선천성 면역 유전자의 활성화를 보여준다. 도 16f는 마우스가 PAMP:LION 제형을 연속 3일 동안 비강내 투여했을 때 체중을 유지했음을 보여준다.
- [0276] 이들 결과는 LION이 비내 접촉에 의해 생물활성 PAMP의 전달을 지지한다는 것을 입증한다; 모든 시험된 용량 수준에서, PAMP와 복합된 LION 제형은 제형이 마우스에 비내로 전달될 때 비강 및 폐에서 단백질 발현을 상향조절하였다.

[0277] 실시예 11. 수산화알루미늄 코어가 108-011로 표지된 지질 무기 나노입자(LION)의 제조.

[0278] 이들 LION은 1mg Al/ml의 표적 농도의 스쿠알렌, 37.5mg/ml Span[®] 60, 37mg/ml Tween[®] 80, 30mg/ml DOTAP 클로라이드, TOPO-코팅된 Al(OOH)(Alhydrogel[®] 2%) 입자 및 10mm 시트르산나트륨 이수화물을 포함한다. LION 입자는 다음과 같은 과정을 이용하여 제조하였다.

[0279] 50ml 원심분리 튜브에 10ml의 Alhydrogel[®]을 가하고 300rpm에서 3분간 원심분리하였다. 상등액을 제거하고 동량의 메탄올로 교체하였다. 입자를 다시 300rpm에서 3분 동안 원심분리하고 메탄올 상등액을 제거하고 동량의 메탄올로 교체하였다. 이 절차를 추가로 2회 반복하여 잔류 물을 제거하고 Alhydrogel[®] 입자를 10ml의 메탄올 중에 재현탁시켰다. 메탄올 중에 분산된 Alhydrogel[®]의 제타 전위는 +11.5 mV였다. 이 분산액에, 1ml의 250mg/ml 트리옥틸포스핀 옥시드(TOPO)를 첨가하고, 혼합물을 37° C 및 분당 250 회전으로 유지된 오비탈 진탕기에서 밤새 방치하였다. 이는 리간드 교환 반응에 의해 Alhydrogel[®]의 표면에 TOPO의 층을 코팅하기 위해 수행되었다. 분산액 중 과량의 TOPO를 메탄올로 세척함으로써 제거하였다. TOPO-코팅된 Al(OOH) 입자의 제타 전위는 +5 mV인 것으로 기록되었다. 제타 전위의 감소는 TOPO를 사용한 Alhydrogel[®]의 표면 개질이 성공적이었음을 나타낸다. 이 과정은 Alhydrogel[®]의 친수성 표면을 소수성으로 전환시켜 LION의 '오일' 상에서 Alhydrogel[®]의 혼화성을 촉진시키기 위해 수행되었다. TOPO 코팅된 Al(OOH) 분산액 중의 메탄올을 폼 후드 내에서 45분 동안 55° C에서 증발시켜 TOPO-Al(OOH) 입자의 건조 코트를 남겼다. 건조된 TOPO-Al(OOH) 입자에 3.7g의 Span[®] 60, 3.75g의 스쿠알렌 및 3.0g의 DOTAP 클로라이드를 첨가하여 "오일" 상을 제조하였다. 오일상을 65° C로 예열된 수조에서 45분 동안 초음파처리하였다.

[0280] 별도로 1리터 유리병에 Milli-Q 물로 제조한 10mm 시트르산나트륨 이수화물 용액 500ml에 Tween[®] 80 19.5g을 첨가하여 "수성" 상을 제조하였다. 수성상을 30분 동안 교반하여 Tween[®] 80이 완전히 용해되도록 하였다. Tween[®] 80의 완전한 용해 후, 92ml의 수성상을 200ml 비이커로 옮기고, 65° C로 예열된 수조에서 인큐베이션하였다.

[0281] 가열된 오일상에, 92ml의 예열된 수성상을 첨가하였다. 상기 혼합물을 우유-유사 외형을 갖는 균질한 콜로이드가 생성될 때까지 VWR[®] 200 균질기(VWR International)를 사용하여 즉시 유화시켰다. 콜로이드는 후속적으로 30,000psi에서 M110-P 마이크로유동화기의 Y-형 상호작용 챔버를 통해 유체를 통과시킴으로써 가공되었다. 동적 광 산란(Malvern Zetasizer Ultra)에 의해 측정된 z-평균 유체역학적 직경이 0.24 다분산 지수로 61.9nm가 될 때까지 유체를 17회 계대배양하였다. 미세유동화된 LION 샘플을 200nm 기공-크기 폴리테트라플루오로에틸렌(PES) 시린지 필터로 최종적으로 여과하였다.

[0282] 표 2는 알파바이러스-유래 레플리콘 RNA 분자와 복합체화하기 전과 후의 생성된 Alum-LION 나노입자의 크기 및 PDI를 요약한다. 하기 표 3은 생성된 Alum-LION 나노입자의 특성을 요약한 것이다.

[0283] 표 2. 알파바이러스-유래 레플리콘 RNA 분자와 복합체화하기 전과 후의 Alum-LION의 크기 및 PDI. 아래 값은 3개의 기술 복제본(technical replicate) 평균을 나타낸다.

복합체화 전 Alum-LION의 크기		복합체화 후 Alum-LION의 크기		복합체화 전 Alum-LION의 PDI		복합체화 후 Alum-LION의 PDI	
크기(nm)	SD	크기(nm)	SD	PDI	SD	PDI	SD
61.92	0.488	95.48	2.129	0.241	0.003	0.271	0.009

[0284]

[0285] 표 3. Alum-LION 제형의 특성화.

특성	방법	값
입자 크기 (Z-평균)	동적 광 산란; 3개의 기술적 복제물(technical replicates)의 평균 ± SD	61.92 ± 0.5 nm
크기 분포 (PDI)	동적 광 산란; 3개의 기술적 복제물의 평균 ± SD	0.241 ± 0.003
제타 전위	동적 광 산란; 5개의 기술적 복제물의 평균 ± SD	34.98 ± 2.47 mV
알루미늄 농도	유도 결합 플라즈마-광학 방출 분광법; 3개의 샘플 복제물(sample replicate)의 평균 ± SD	598 ± 14 µg/ml
DOTAP 농도	역상-고성능 액체 크로마토그래피; 3개의 샘플 복제물의 평균 ± SD	20.37 ± 0.57 mg/ml
스쿠알렌 농도	역상-고성능 액체 크로마토그래피; 3개의 샘플 복제물의 평균 ± SD	26.38 ± 0.60 mg/ml

[0286]

[0287] 실시예 12. 예시적인 LION 제형을 이용한 RNA 전달

[0288] 서브게놈 내에 nLuc 서열을 함유하는 VEE 레플리콘 RNA를 6.4 ng/µL로 희석하고, 얼음 상에서 30분 동안 15의 N:P 비로 LION에 복합체화하였다. 2가지 유형의 LION 제형을 사용하였다: 하나는 15-nm 산화철(Fe₃O₄) 나노입자(SPIO)를 코어로 갖고(실시예 1에 따라 제조된 79-006A와 유사함), 다른 하나는 TOPO-코팅된 옥시수산화알루미늄 나노입자를 코어로 갖고, 이는 실시예 11에 따라 제조되었다.

[0289] RNA:LION 복합체를 완충액(10% 수크로스, 5mm NaCitrate) 중에서 1:10으로 희석하고, 50 µl(16ng RNA)를 150 µl Optimem 중의 A549-이중 세포(Invivogen)를 함유하는 96-웰 플레이트의 웰에 첨가하였다. 세포를 4시간 동안 트랜스펙션시키고, 배지를 완전 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)(10% 우태아 혈청, L-글루타민, 및 페니실린/스트렙토마이신 함유)로 대체하고, 37° C에서 밤새 5% CO₂와 인큐베이션하였다. 다음날, 배지를 제거하고 nLuc 발현을 제조자의 지시에 따라 Nano-Glo Luciferase Assay System(Promega)을 사용하여 평가하였다. 플레이트를 Spectramax i3 플레이트 판독기(Molecular Devices)를 사용하여 판독하였다.

[0290] 도 17은 SPIO(Fe-LION) 또는 TOPO-코팅된 옥시수산화알루미늄 나노입자(Al-LION)를 LION 제형의 코어로서 사용하여 nLuc를 코딩하는 레플리콘 RNA와 RNA:LION 복합체로부터 생성된 시험관내 단백질 발현을 보여준다. 이 도면은, RNA가 LION 제형과 복합체화될 때, 코어로서 산화철 나노입자 또는 옥시수산화알루미늄 나노입자 중 어느 하나를 함유하는 LION 제형 둘 모두가 nLuc 레플리콘의 성공적인 시험관내 전달을 제공하였음을 입증한다.

[0291] 특허 참조문헌 및 비-특허 참조문헌을 포함하는 본원에 개시된 모든 참조문헌은 각각 개별적으로 통합된 것처럼 그 전체가 참조문헌으로 본원에 통합된다.

[0292] 본원에서 사용한 용어는 단지 특정한 실시양태를 설명하기 위해 사용된 것으로, 본 발명을 한정하려는 의도가 아니다. 본원에서 특별히 정의되지 않는 한, 본원에서 사용되는 용어는 관련 분야에서 공지된 바와 같이 그것의 전통적인 의미로 이해되어야 한다.

[0293] 본 명세서 전반에 걸쳐 "일 실시양태" 또는 "한 실시양태" 및 그 변형예들에 대한 언급은 실시양태와 관련하여 설명된 특정 특징, 구조 또는 특징이 적어도 하나의 실시양태에 포함된다는 것을 의미하며, 반드시 모두 동일한 실시양태를 지칭하는 것은 아니다. 또한, 특정 특징들, 구조들, 또는 특성들은 하나 이상의 실시양태들에서 임의의 적절한 방식으로 조합될 수 있다. 약어 "e.g"는 본 명세서에서 비 제한적인 예를 나타내기 위해 사용되며, 용어 "예를 들어"와 동의어이다.

[0294] 본 명세서 및 첨부된 청구범위에서 사용되는 바와 같이, 단수 형태 "a", "an" 및 "the"는 복수의 참조, 즉 하나 이상을 포함하고, 명사 다음의 문자 "s"는 내용 및 문맥이 명백하게 달리 지시하지 않는 한, 그 명사의 복수 및 단수 형태 둘 다를 지정한다. 또한, "및" 및 "또는"이라는 연결 용어들은 일반적으로 "및/또는"을 포함하는 가장 넓은 의미로 사용되며, 이는 콘텐츠 및 문맥이 경우에 따라 포괄성 또는 배타성을 명확하게 지시하지 않는

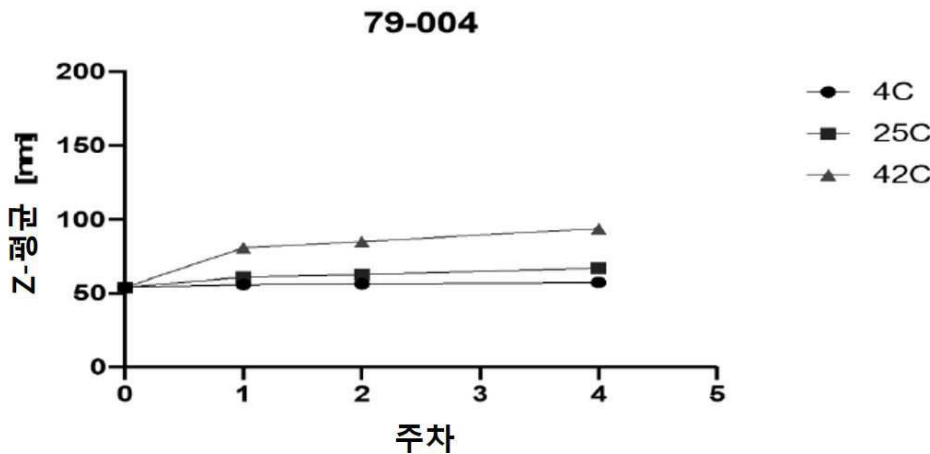
한, 연관된 아이템들 또는 아이디어들 전부를 포함하는 실시양태 및 연관된 아이템들 또는 아이디어들 전부보다 적은 것을 포함하는 하나 이상의 다른 대안적인 실시양태들을 포함하도록 의도된다는 점에 유의해야 한다.

[0295] 또한, 본 발명의 특징 또는 양태가 마쿠쉬 그룹(Markush group)의 관점에서 기술되는 경우, 본 발명은 마쿠쉬 그룹의 임의의 개별 구성원 및 임의의 하위그룹(subgroup of members)의 관점에서 포용되고 이에 의해 또한 기술되는 것으로 의도되며, 출원인은 마쿠쉬 그룹의 임의의 개별 구성원 또는 임의의 하위그룹을 구체적으로 지칭하기 위해 출원 또는 청구항들을 수정할 권리를 보유한다.

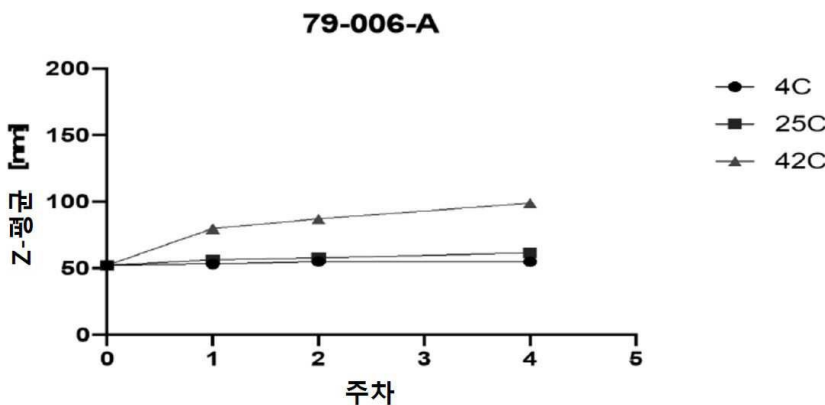
[0296] 값들의 범위가 본원에 제공되는 경우, 문맥상 명백하게 달리 지시하지 않는 한, 그 범위의 상한과 하한 사이 및 그 언급된 범위 내의 임의의 다른 언급된 또는 개재된 값의 각각의 개재 값이 본 발명 내에 포함되는 것으로 이해된다. 이들 더 작은 범위의 상한 및 하한은 독립적으로 더 작은 범위에 포함될 수 있으며, 언급된 범위에서 임의의 구체적으로 배제된 한계를 조건으로 본 발명 내에 또한 포함된다. 언급된 범위가 한계들 중 하나 또는 둘 다를 포함하는 경우, 그러한 포함된 한계들 중 하나 또는 둘 다를 제외한 범위들이 또한 본 발명에 포함된다. 예를 들어, 본 명세서에 제공된 임의의 농도 범위, 백분율 범위, 비율 범위, 또는 정수 범위는 인용된 범위 내의 임의의 정수의 값, 및 적절한 경우, 달리 지시되지 않는 한, 그의 분율(예컨대 정수의 10분의 1 및 100분의 1)을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 또한, 폴리머 서브유닛, 크기 또는 두께와 같은 임의의 물리적 특징과 관련하여 본 명세서에 인용된 임의의 수 범위는, 달리 지시되지 않는 한, 인용된 범위 내의 임의의 정수를 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "약"은 달리 지시되지 않는 한 지시된 범위, 값 또는 구조의 ± 20%를 의미한다.

도면

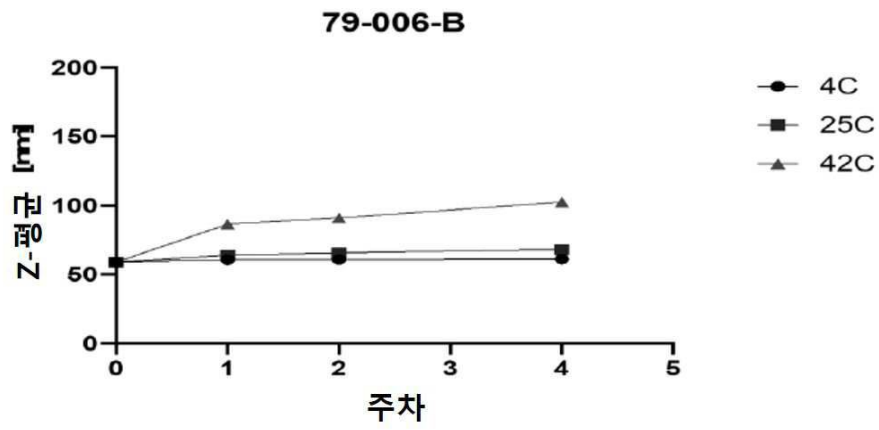
도면1a



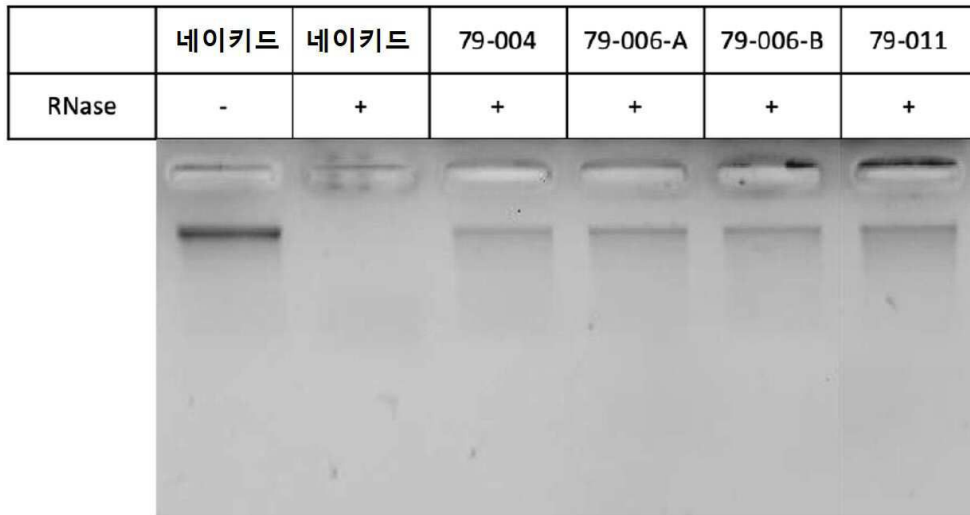
도면1b



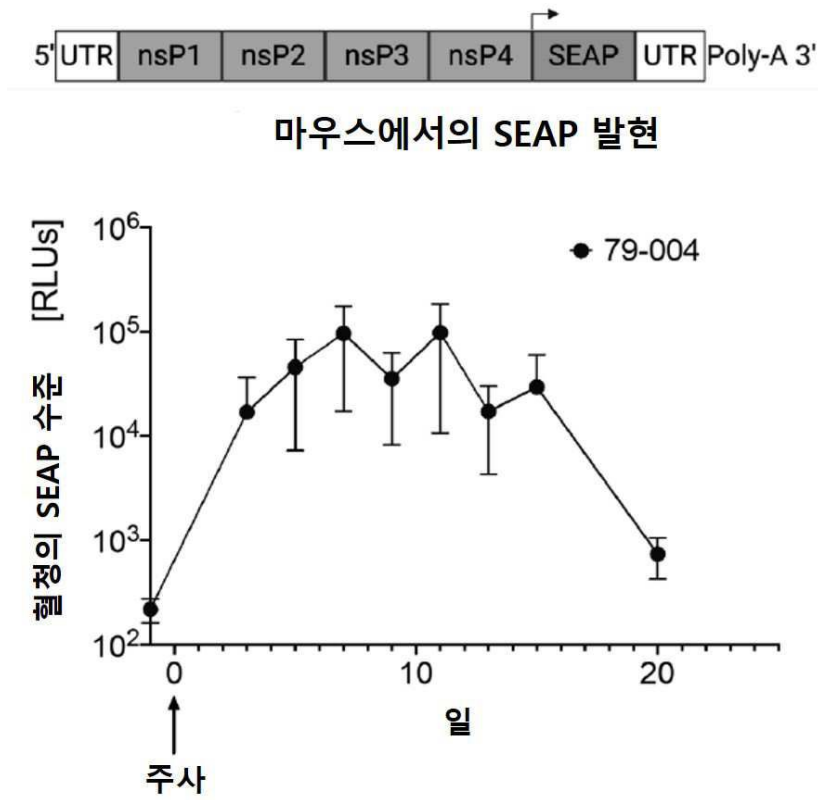
도면1c



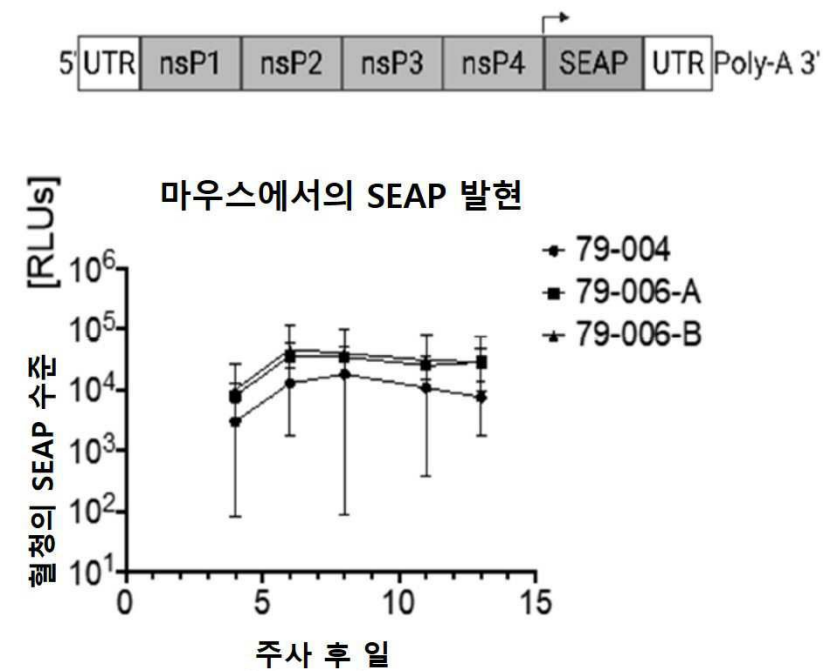
도면2



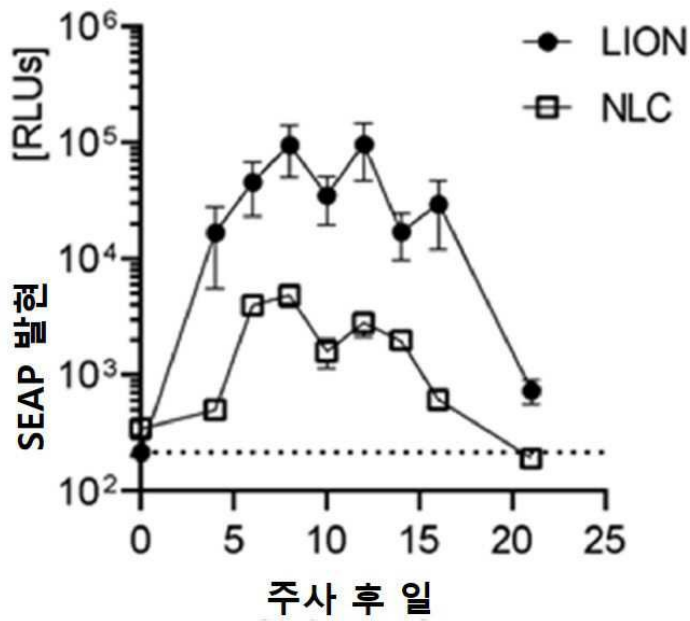
도면3a



도면3b

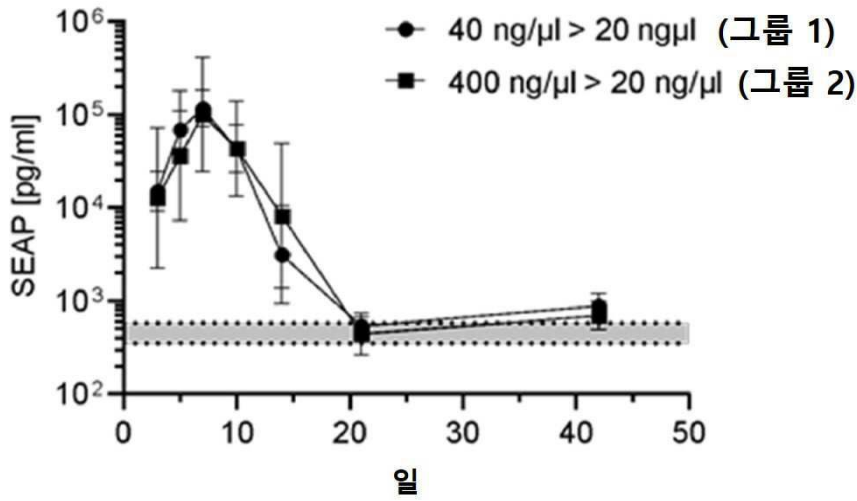


도면3c

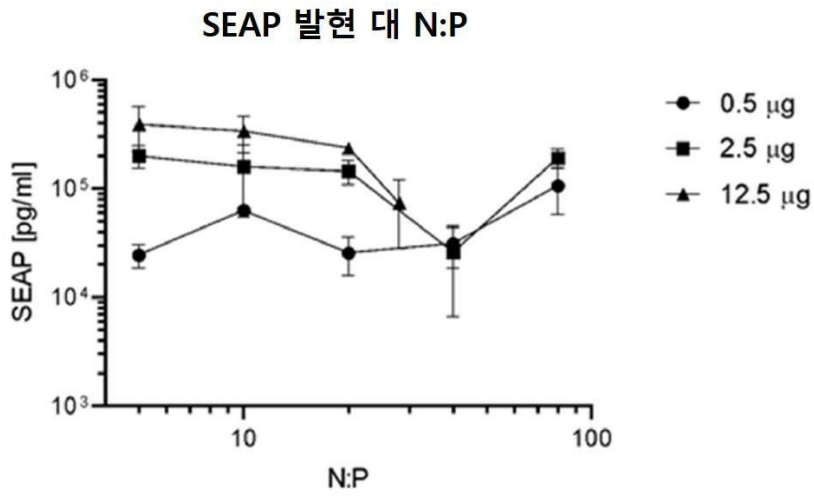


도면3d

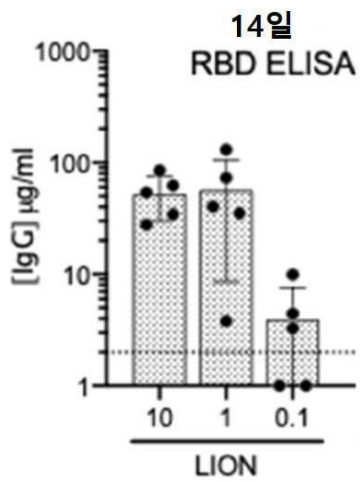
복합체화 농도의 영향



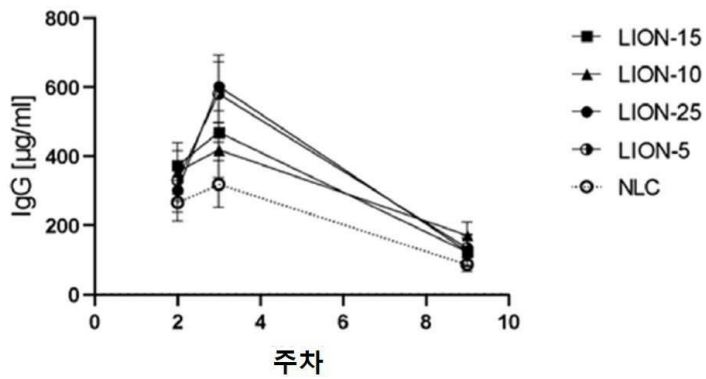
도면3e



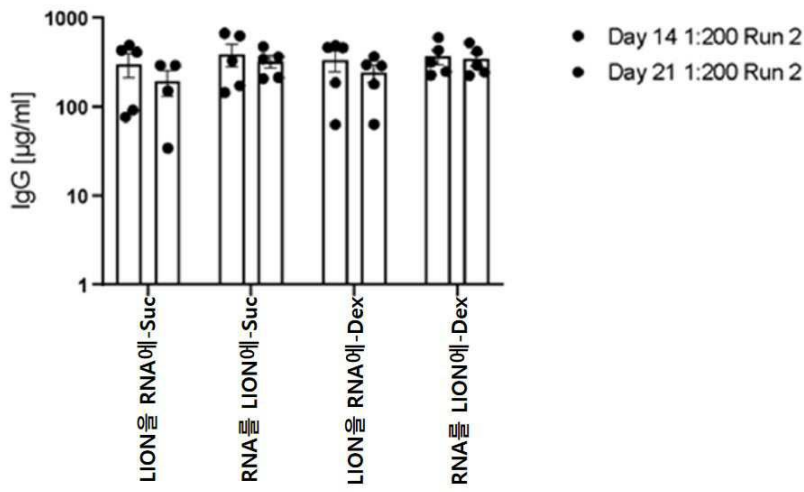
도면4a



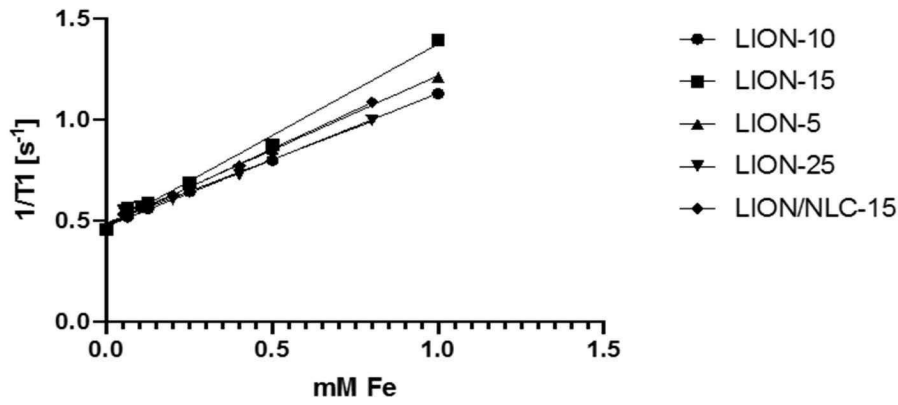
도면4b



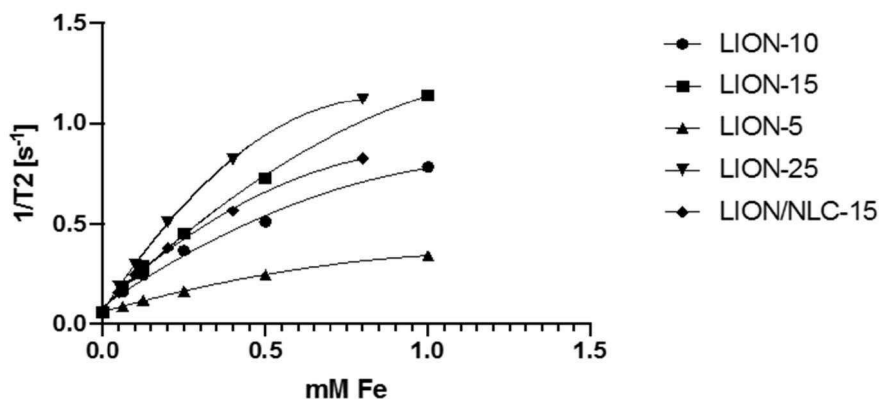
도면4c



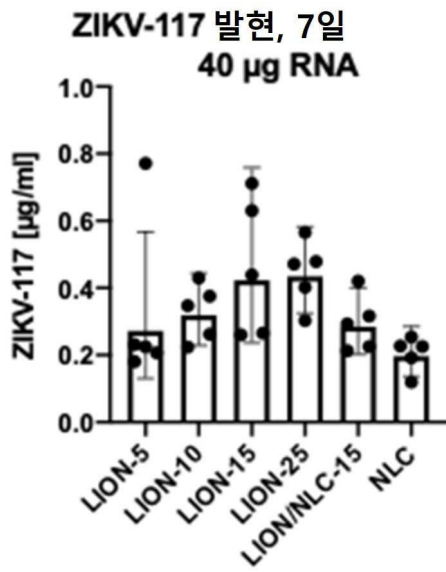
도면5a



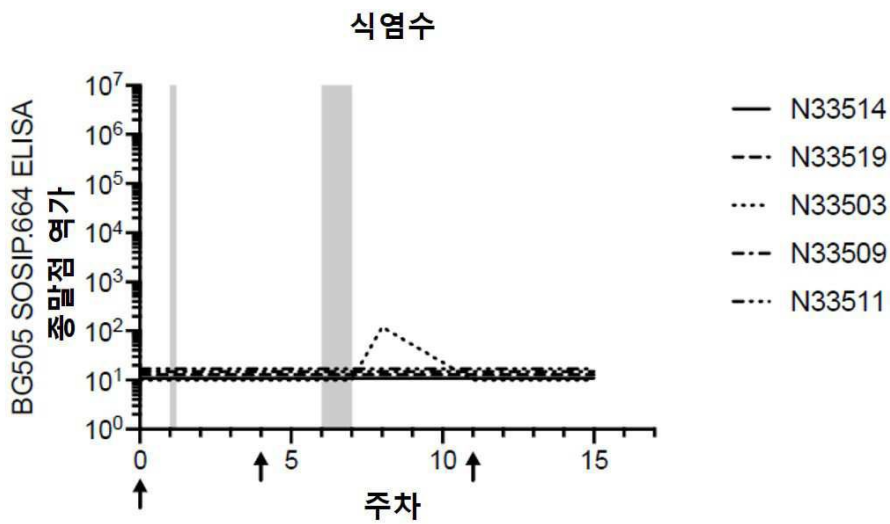
도면5b



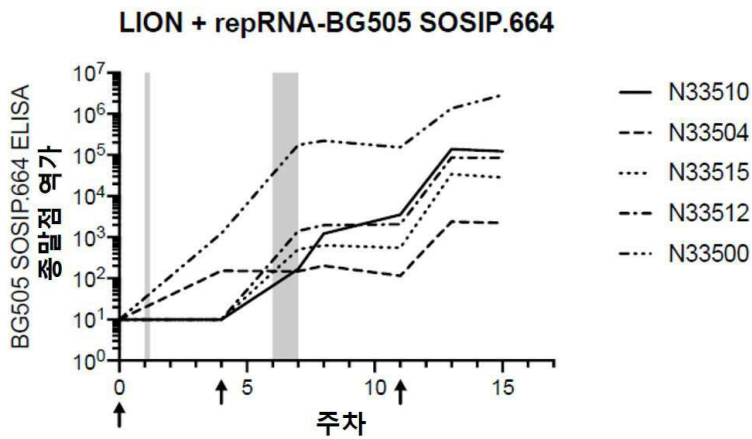
도면6a



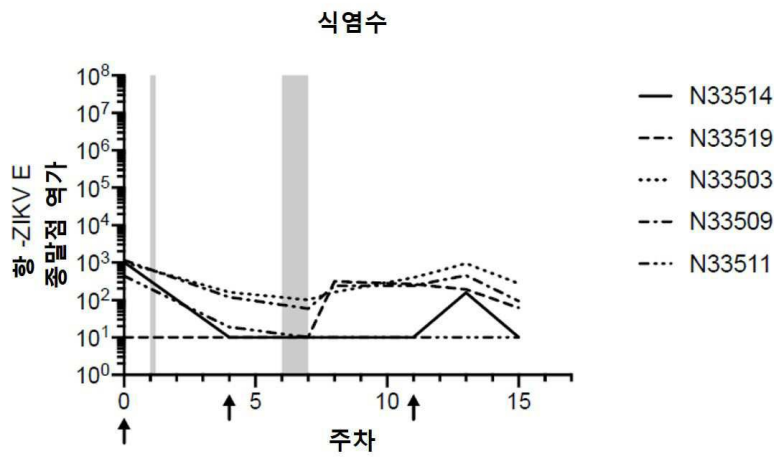
도면6b



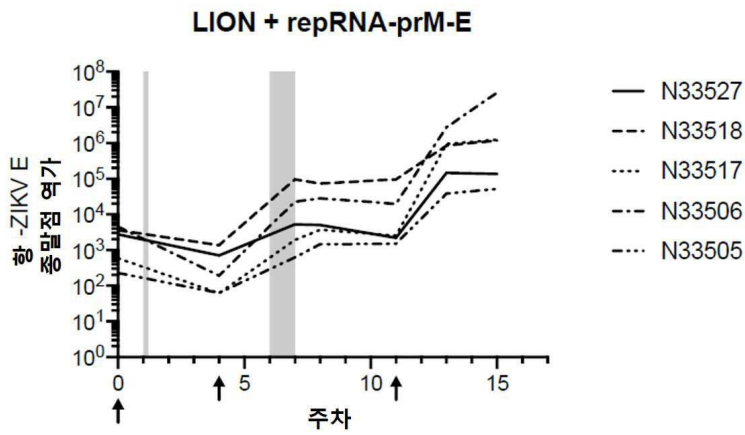
도면6c



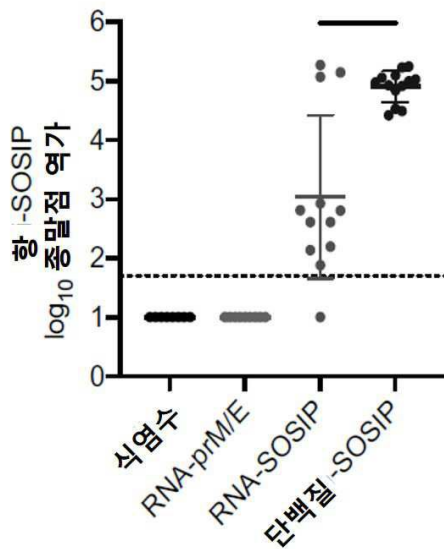
도면6d



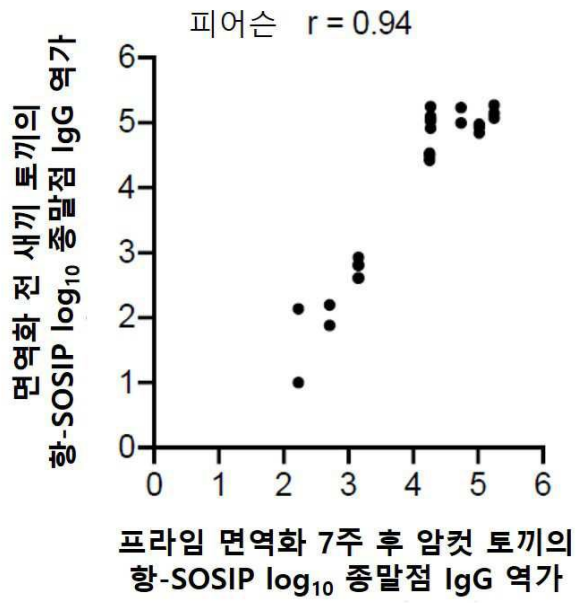
도면6e



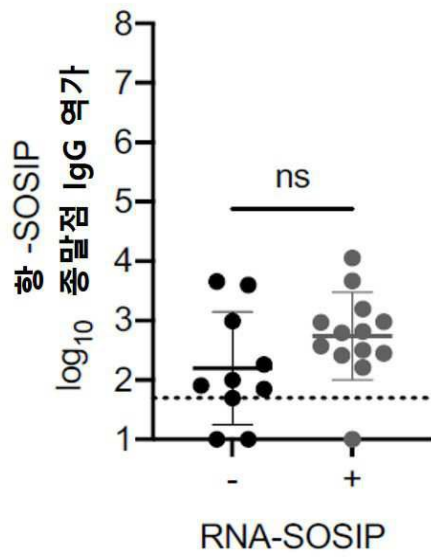
도면6f



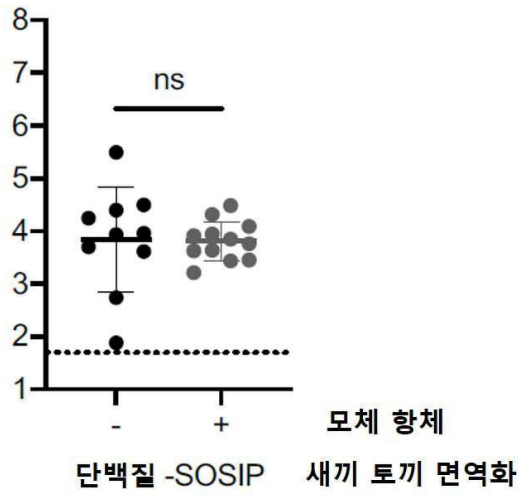
도면6g



도면6h



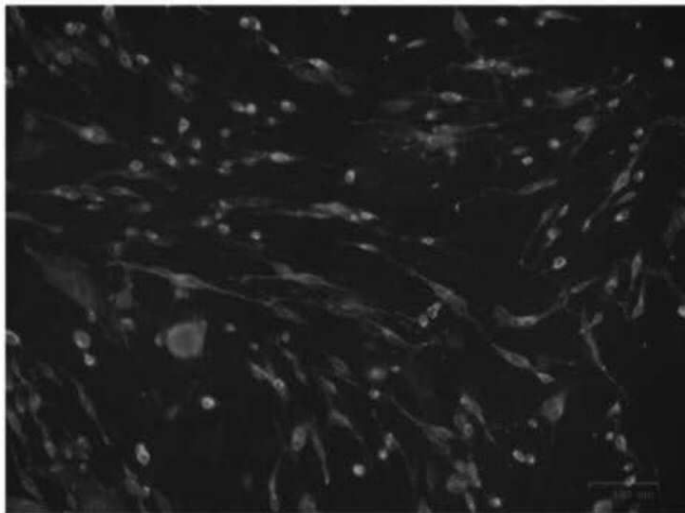
도면6i



도면7a

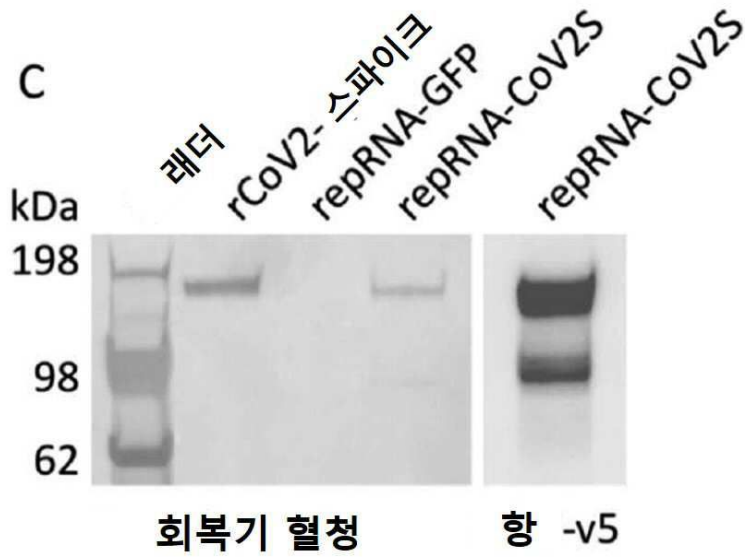


도면7b

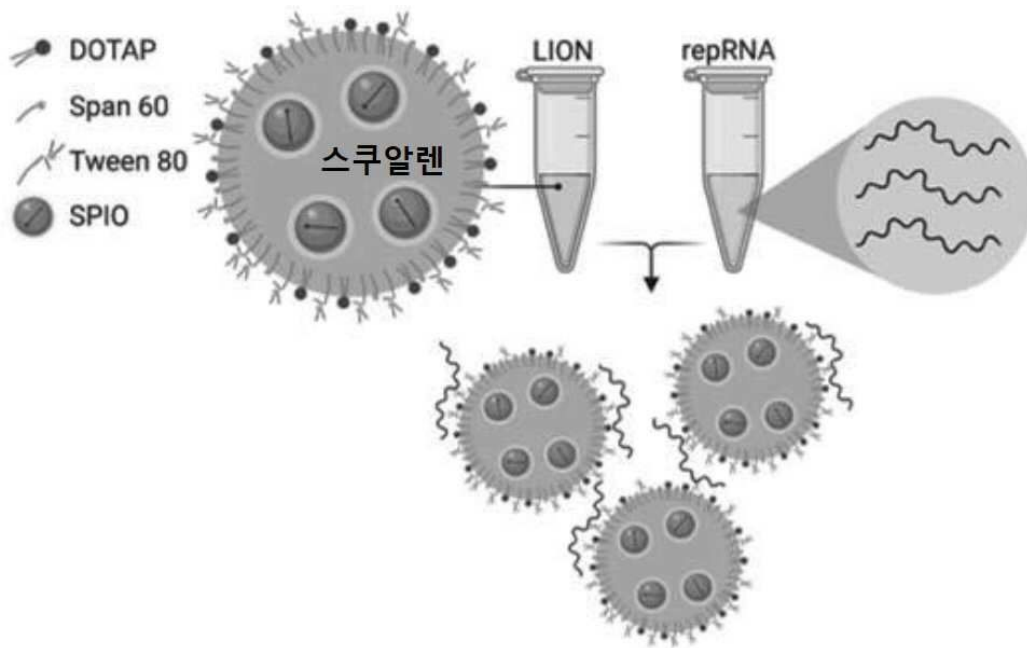


항 -v5

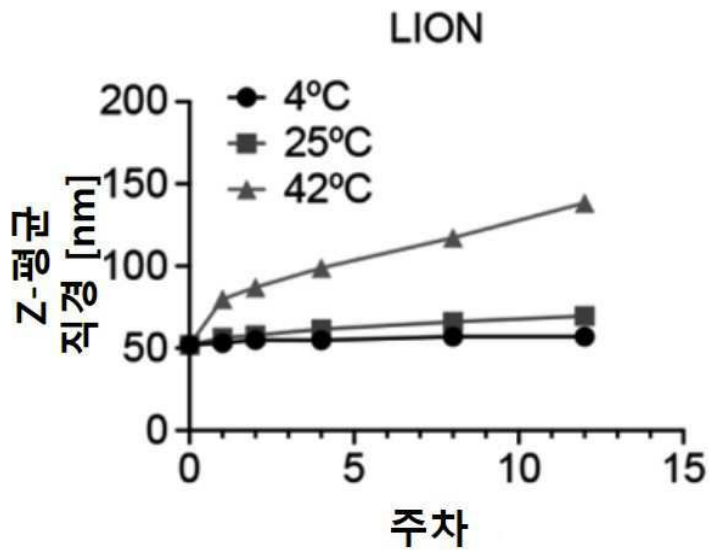
도면7c



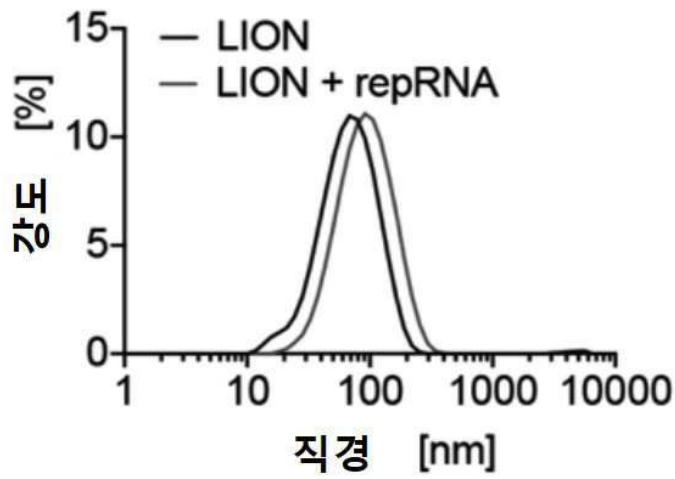
도면8a



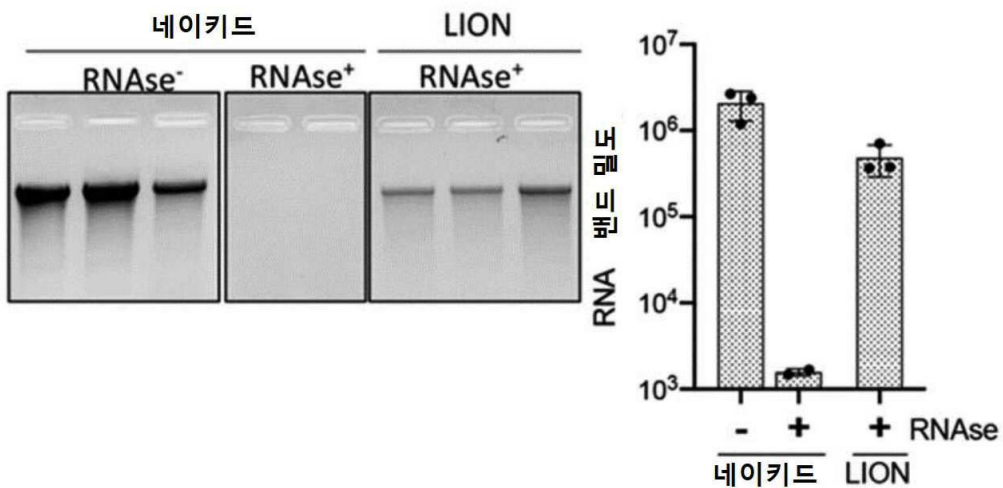
도면8b



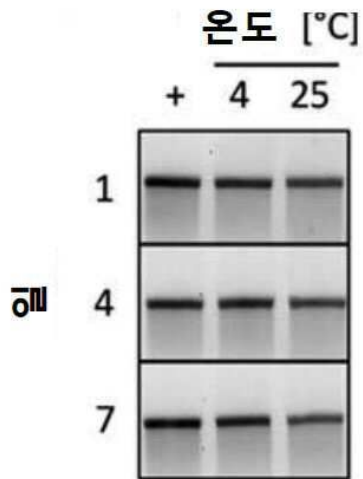
도면8c



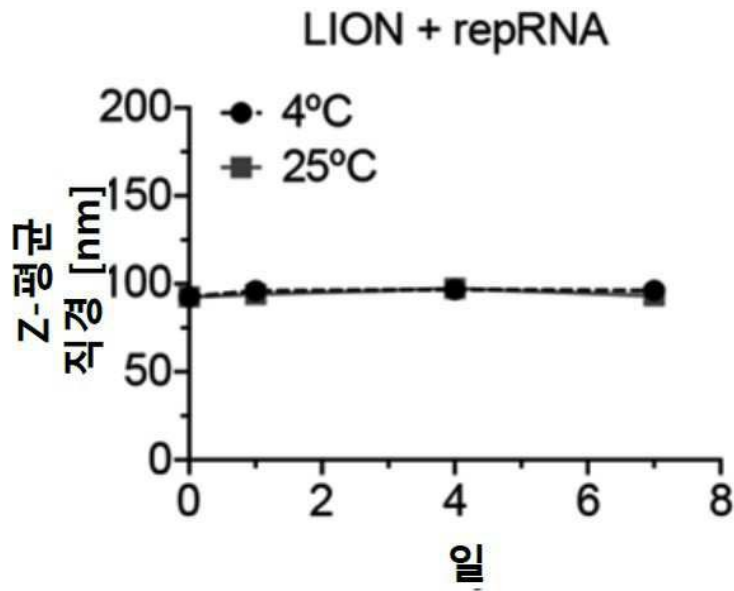
도면8d



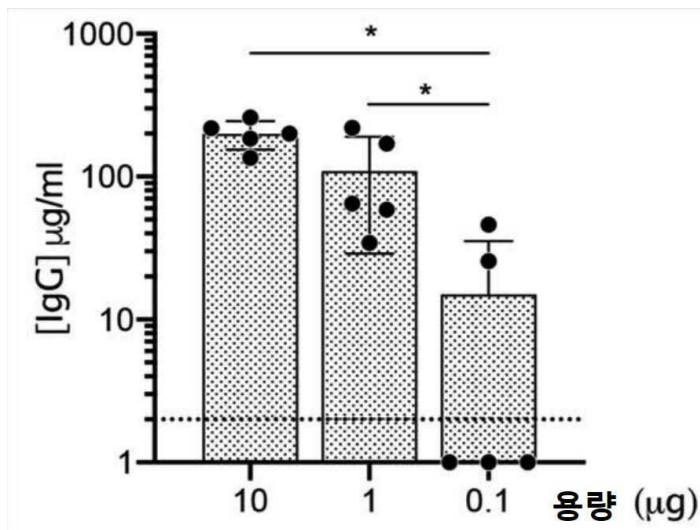
도면8e



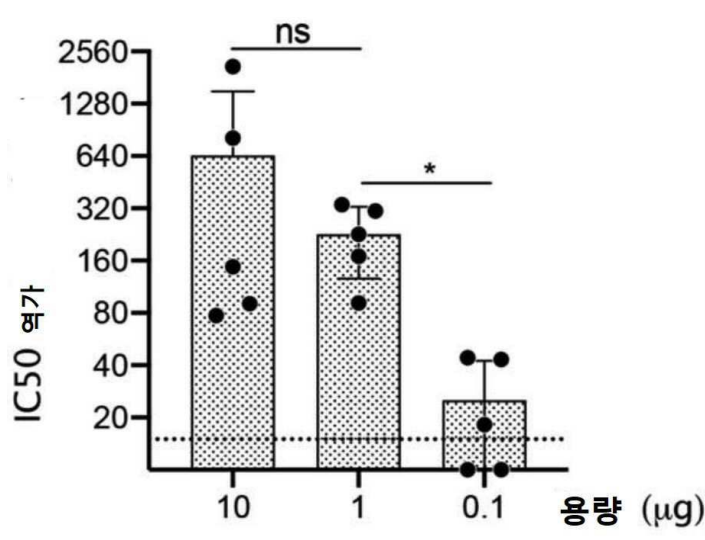
도면8f



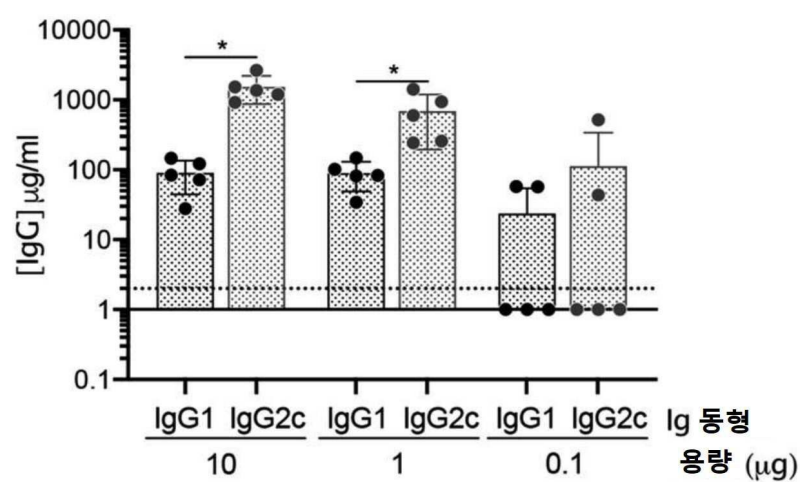
도면9a



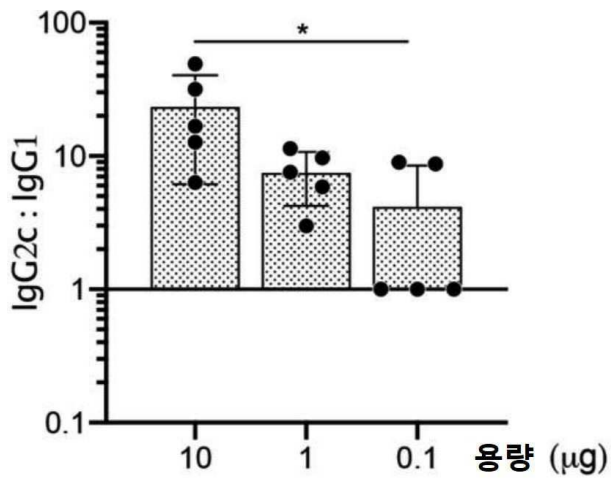
도면9b



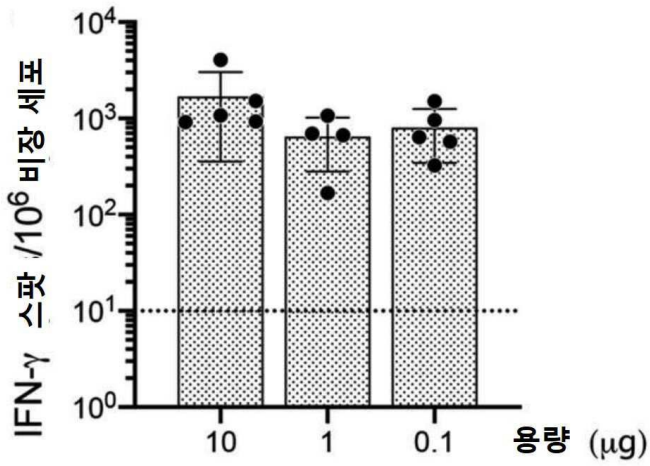
도면9c



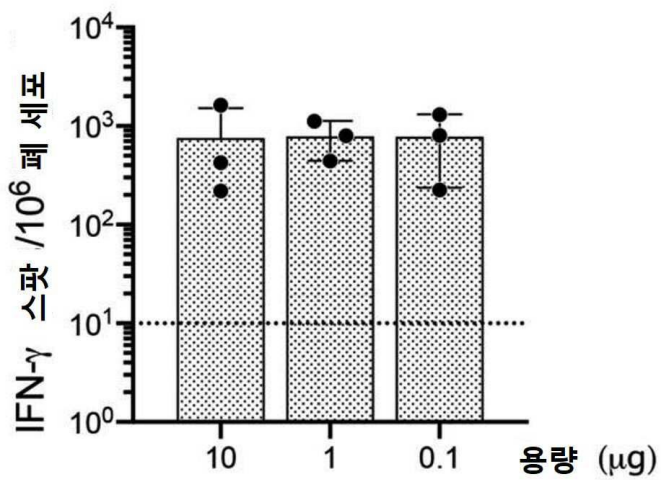
도면9d



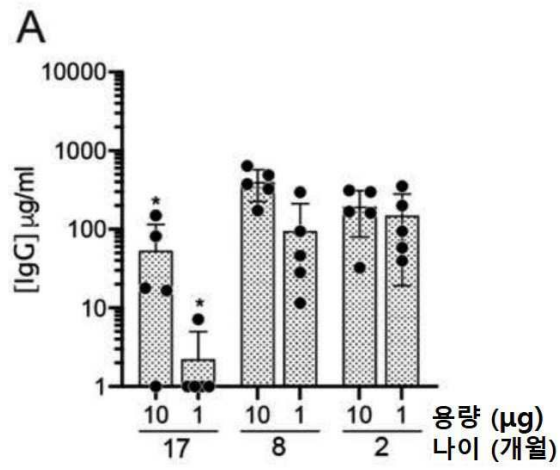
도면9e



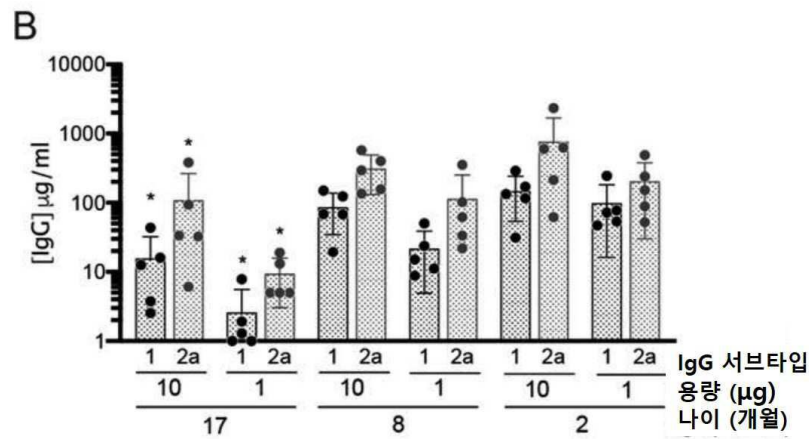
도면9f



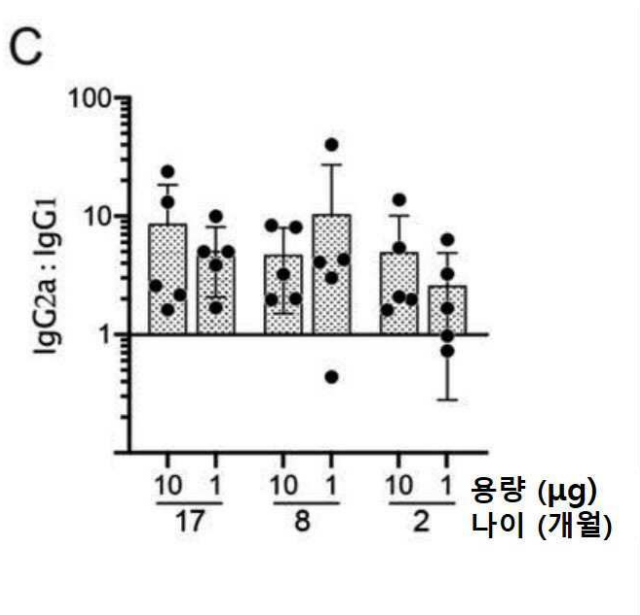
도면10a



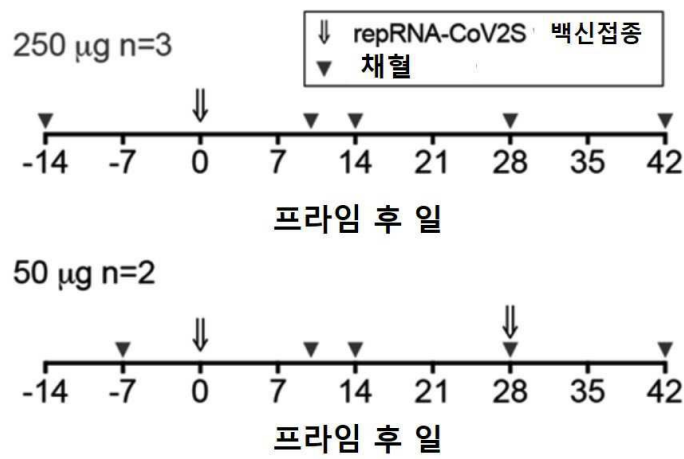
도면10b



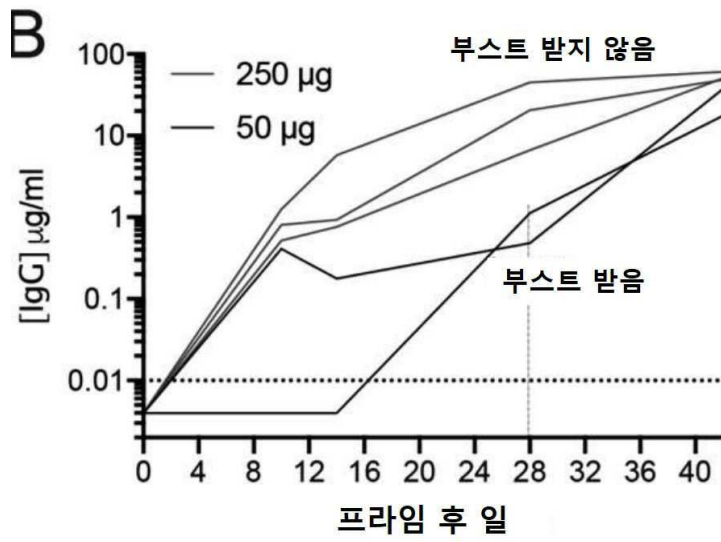
도면10c



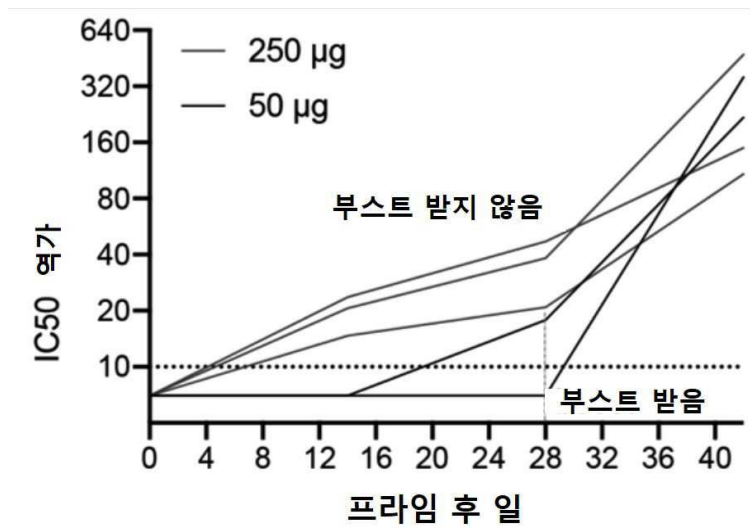
도면11a



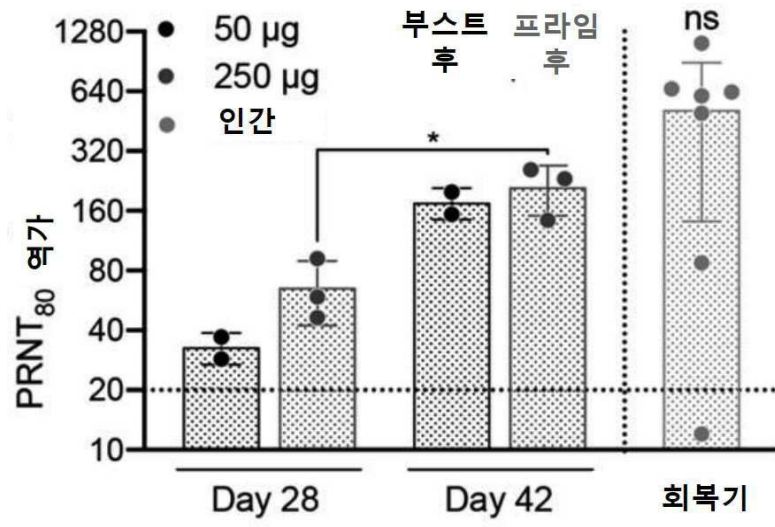
도면11b



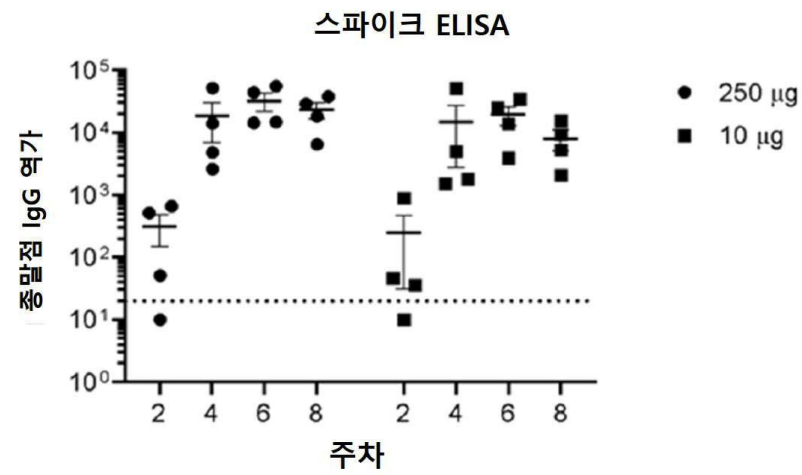
도면11c



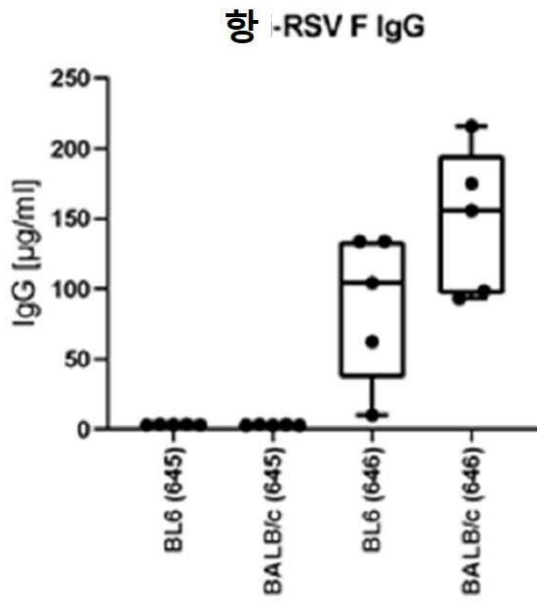
도면11d



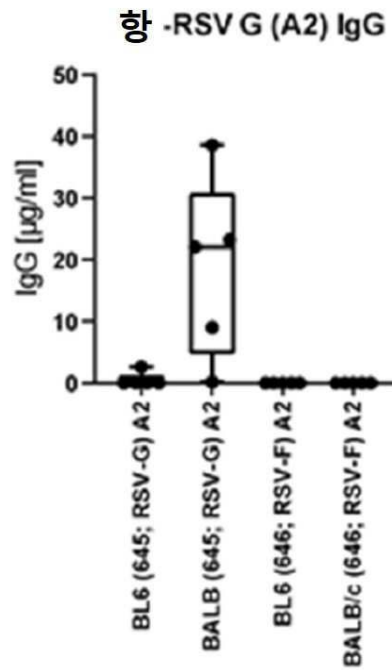
도면12



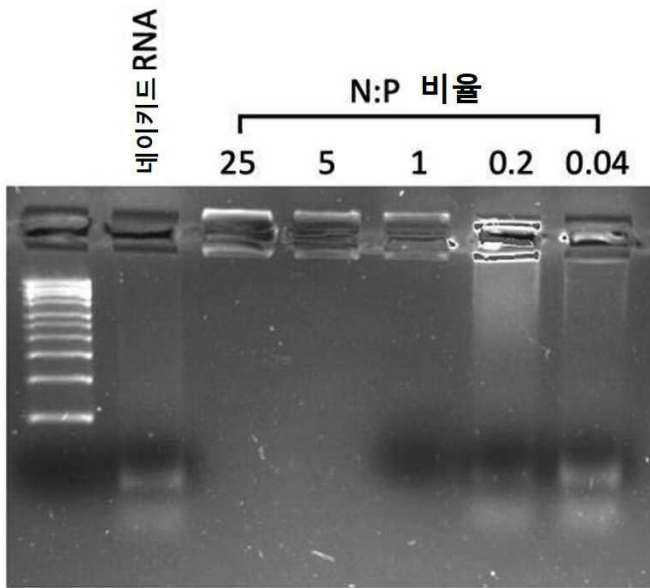
도면13a



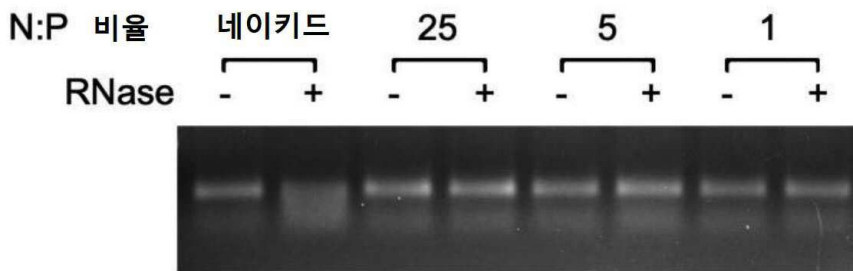
도면13b



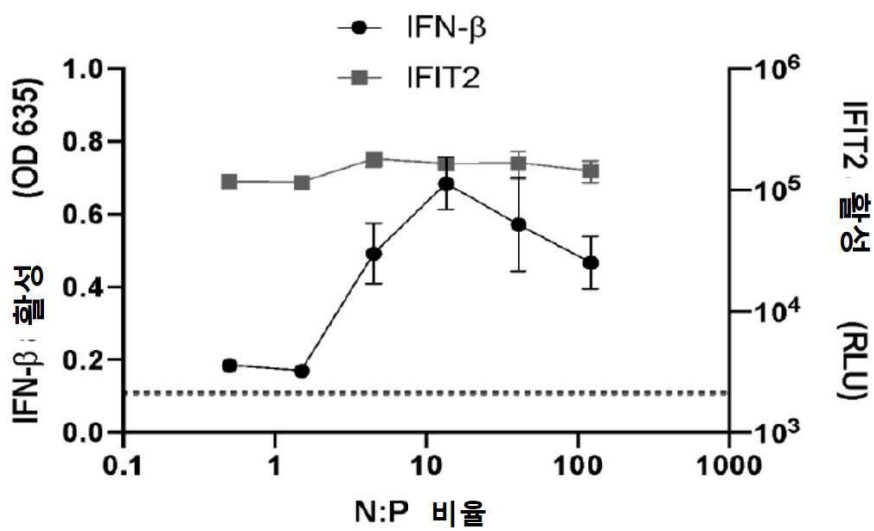
도면14a



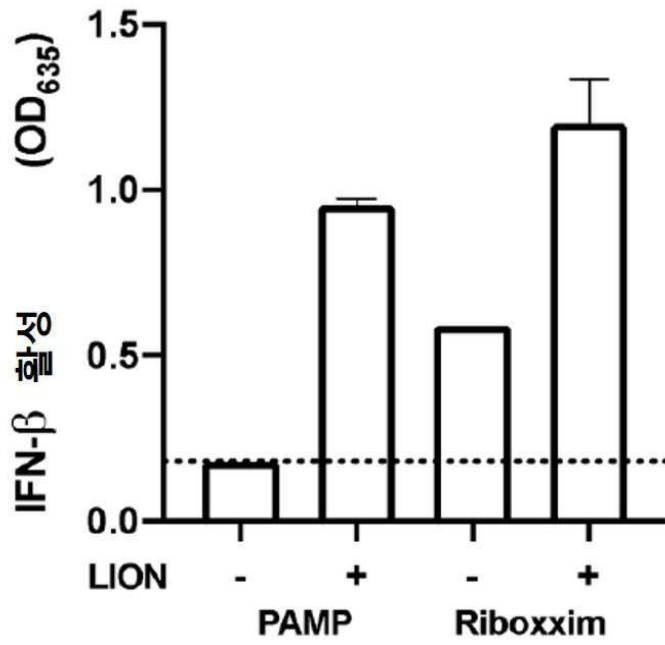
도면14b



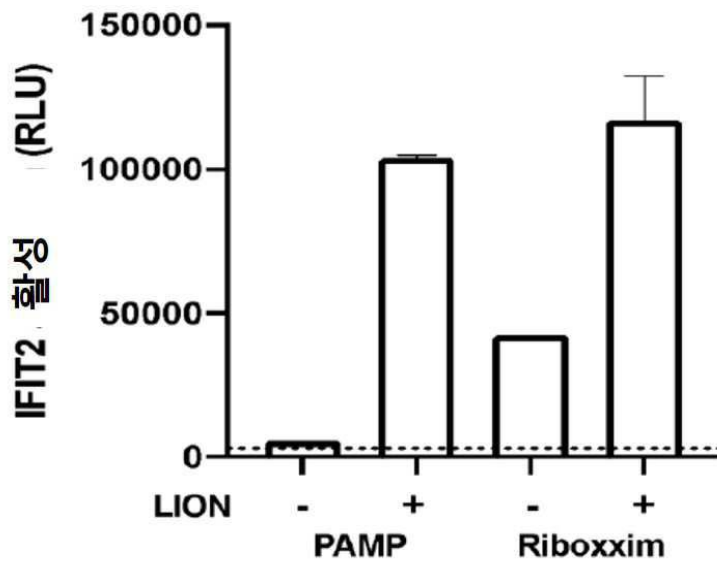
도면15



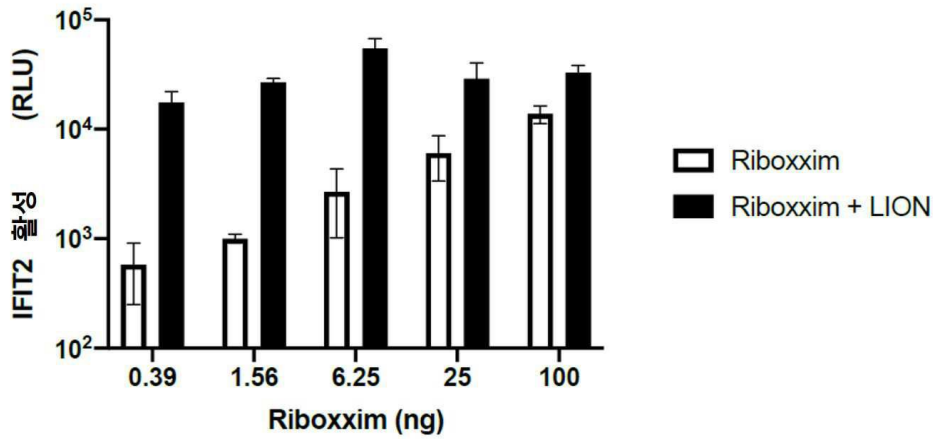
도면16a



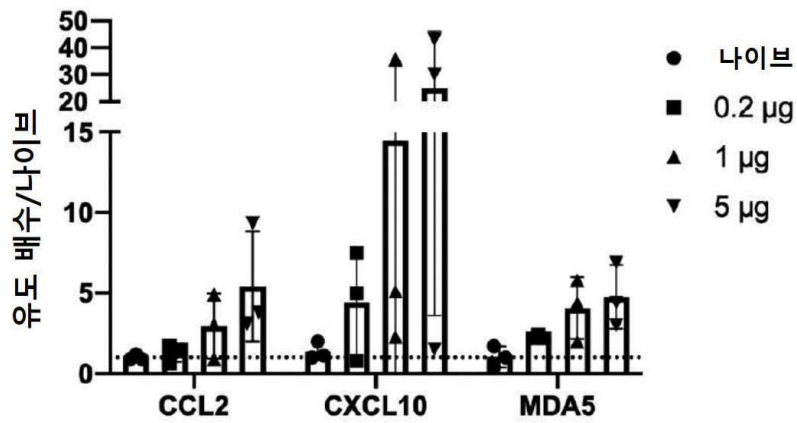
도면16b



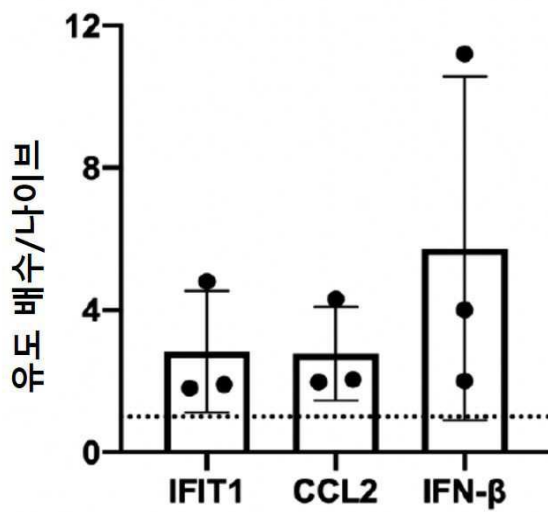
도면16c



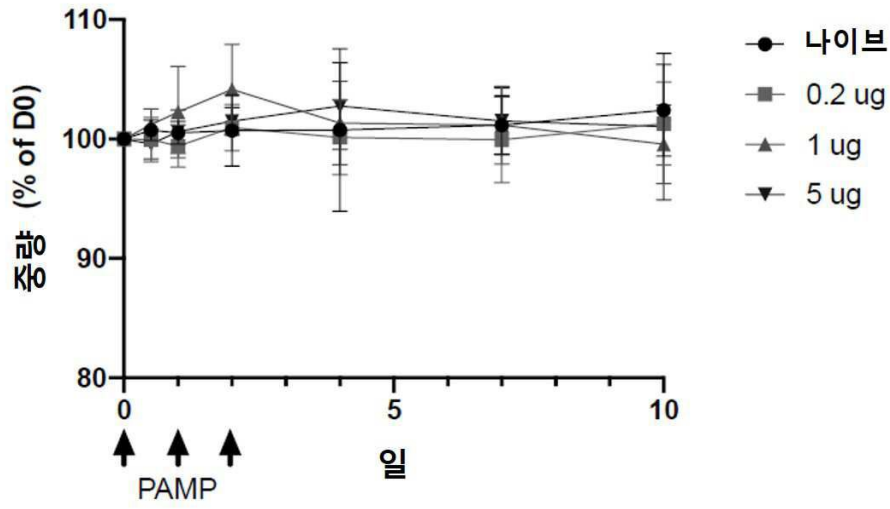
도면16d



도면16e



도면16f



도면17

