



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0035794
(43) 공개일자 2024년03월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/2809 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2024-7001508
(22) 출원일자(국제) 2022년07월13일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년01월15일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2022/069659
(87) 국제공개번호 WO 2023/285560
국제공개일자 2023년01월19일
(30) 우선권주장
PCT/EP2021/069869 2021년07월15일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
비온테크 에스이
독일 55131 마인츠 안 데어 골트그루베 12
(72) 발명자
사헌, 우구르
독일, 55131 마인츠, 안 데어 골트그루베 12, 비
온테크 에스이 내
스태들러, 크리스티안
독일, 55131 마인츠, 안 데어 골트그루베 12, 비
온테크 에스이 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 정안

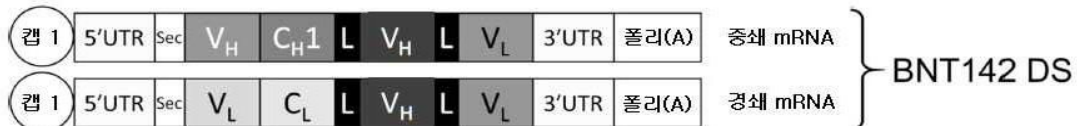
전체 청구항 수 : 총 126 항

(54) 발명의 명칭 CLDN6-양성 암을 치료하기 위한 CLDN6 및 CD3 결합 요소를 암호화하는 제제

(57) 요약

본 발명은 일반적으로 CD3 및 CLDN6에 대한 결합에 대해 적어도 이중특이적인, 즉 적어도 CD3 및 CLDN6에 결합할 수 있는 결합제에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 개체의 암 치료 또는 예방에 사용될 수 있는 이들 결합제를 암호화하는 RNA에 관한 것이다.

대표도



(52) CPC특허분류

C07K 16/28 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/31 (2013.01)
C07K 2317/56 (2013.01)
C12N 2310/335 (2013.01)
C12N 2800/22 (2013.01)
C12N 2830/50 (2013.01)

(72) 발명자

린데만, 클라우디아

독일, 55131 마인츠, 안 데어 골트그루베 12, 비온 테크 에스이 내

엘링하우스, 우르줄라

독일, 55131 마인츠, 안 데어 골트그루베 12, 비온 테크 에스이 내

베어-마무트, 하이아트

독일, 55131 마인츠, 안 데어 골트그루베 12, 비온 테크 에스이 내

피셔, 레일라

독일, 55131 마인츠, 안 데어 골트그루베 12, 비온 테크 에스이 내

차투르베디, 아누하르

독일, 55131 마인츠, 안 데어 골트그루베 12, 비온 테크 에스이 내

보로스, 가보르

독일, 55131 마인츠, 안 데어 골트그루베 12, 비온 테크 에스이 내

라인홀츠, 요나스

독일, 55131 마인츠, 안 데어 골트그루베 12, 비온 테크 에스이 내

베소노프, 세르게이

독일, 55131 마인츠, 안 데어 골트그루베 12, 비온 테크 에스이 내

카리코, 카탈린

독일, 55131 마인츠, 안 데어 골트그루베 12, 비온 테크 에스이 내

명세서

청구범위

청구항 1

조성물 또는 의약 제제에 있어서,

(i) CD3에 특이성을 갖는 면역글로불린으로부터 유래된 중쇄의 가변 영역 (VH(CD3)), CLDN6에 특이성을 갖는 면역글로불린으로부터 유래된 중쇄의 가변 영역 (VH(CLDN6)), 및 CLDN6에 특이성을 가진 면역글로불린으로부터 유래된 경쇄 가변 영역 (VL(CLDN6))을 포함하는 제1 폴리펩티드 사슬을 암호화하는 제1 RNA; 및

(ii) CD3에 특이성을 가진 면역글로불린으로부터 유래된 경쇄의 가변 영역 (VL(CD3)), CLDN6에 특이성을 가진 면역글로불린으로부터 유래된 중쇄 가변 영역 (VH(CLDN6)), 및 CLDN6에 특이성을 가진 면역글로불린으로부터 유래된 경쇄 가변 영역 (VL(CLDN6))을 포함하는 제2 폴리펩티드 사슬을 암호화하는 제2 RNA,

을 포함하는 조성물 또는 의약 제제.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 제1 폴리펩티드 사슬은 상기 제2 폴리펩티드 사슬과 상호작용하여 CD3에 특이성을 갖는 결합 도메인과 CLDN6에 특이성을 갖는 두 개의 결합 도메인을 형성하는 것인,

조성물 또는 의약 제제.

청구항 3

제1 또는 제2 청구항에 있어서,

상기 제1 폴리펩티드 사슬의 상기 VH(CD3)와 상기 제2 폴리펩티드 사슬의 상기 VL(CD3)은 상호작용하여 CD3에 특이성을 갖는 결합 도메인을 형성하며,

상기 제1 폴리펩티드 사슬의 상기 VH(CLDN6) 및 상기 VL(CLDN6)은 상호작용하여 CLDN6에 특이성을 갖는 결합 도메인을 형성하고,

상기 제2 폴리펩티드 사슬의 상기 VH(CLDN6) 및 상기 VL(CLDN6)은 상호작용하여 CLDN6에 특이성을 갖는 결합 도메인을 형성하는 것인,

조성물 또는 의약 제제

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제1 및 제2 폴리펩티드 사슬은 면역글로불린 또는 이의 기능적 변이체로부터 유래된 중쇄(CH1)의 불변 영역 1, 및 면역글로불린 또는 이의 기능적 변이체로부터 유래된 경쇄(CL)의 불변 영역을 포함하는 것인,

조성물 또는 의약 제제.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 면역글로불린은 IgG1인,

조성물 또는 의약 제제.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 IgG1은 인간 IgG1인 것인,
조성물 또는 의약 제제.

청구항 7

제4항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 제1 폴리펩티드 사슬의 상기 VH, 상기 VL, 상기 CH1은 N 말단에서 C 말단으로,
VH(CD3)-CH1-VH(CLDN6)-VL(CLDN6), 또는
VH(CD3)-CH1-VL(CLDN6)-VH(CLDN6)의 순서로 배열되는 것인,
조성물 또는 의약 제제.

청구항 8

제4항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 CH1은 펩티드 링커에 의해 VH(CLDN6) 또는 VL(CLDN6)에 연결되는 것인,
조성물 또는 의약 제제.

청구항 9

제8항에 있어서,
상기 펩티드 링커는 아미노산 서열 SGPGGGGRS(G₄S)₂ 또는 이의 기능적 변이체를 포함하는 것인,
조성물 또는 의약 제제.

청구항 10

제4항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 제2폴리펩티드 사슬의 상기 VH, 상기 VL, 상기 CL은 N 말단에서 C 말단으로, VL(CD3)-CL-VH(CLDN6)-
VL(CLDN6), 또는 VL(CD3)-CL-VL(CLDN6)-VH(CLDN6)의 순서로 배열되는 것인,
조성물 또는 의약 제제.

청구항 11

제4항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 CL은 펩티드 링커에 의해 상기 VH(CLDN6) 또는 VL(CLDN6)에 연결되는 것인,
조성물 또는 의약 제제.

청구항 12

제11항에 있어서,
상기 펩티드 링커는 아미노산 서열 DVPGGG 또는 이의 기능적 변이체를 포함하는 것인,
조성물 또는 의약 제제.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 VH(CLDN6) 및 상기 VL(CLDN6)은 펩티드 링커에 의해 서로 연결되는 것인,
조성물 또는 의약 제제.

청구항 14

제13항에 있어서,
상기 펩티드 링커는 아미노산 서열 $(G_4S)_x$ 또는 이의 기능적 변이체를 포함하며, 상기에서 x 는 2, 3, 4, 5 또는 6인 것인,
조성물 또는 의약 제제.

청구항 15

제14항에 있어서,
상기 펩티드 링커는 상기 아미노산 서열 $(G_4S)_4$ 또는 이의 기능적 변이체를 포함하는 것인,
조성물 또는 의약 제제.

청구항 16

제4항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 제1 폴리펩티드 사슬의 상기 CH1은 상기 제2 폴리펩티드 사슬의 상기 CL과 상호작용하는 것인,
조성물 또는 의약 제제.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 VH(CD3)는 서열번호 4의 아미노산 27 내지 145의 아미노산 서열의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 것인,
조성물 또는 의약 제제.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 VL(CD3)은 서열번호 6의 아미노산 27 내지 132의 아미노산 서열의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 것인,
조성물 또는 의약 제제.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 VH(CLDN6)은 서열번호 4의 아미노산 267 내지 383의 아미노산 서열의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 것인,
조성물 또는 의약 제제.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 VL(CLDN6)은 서열번호 4의 아미노산 404 내지 510의 아미노산 서열의 CDR1, CDR2 및 CDR3, 및 바람직하게 CDR1에 대한 위치 +15에 세린 잔기 및/또는 CDR2에 대한 위치 -3에 세린 잔기를 포함하는,
조성물 또는 의약 제제.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 VH(CD3)는 서열번호 4의 아미노산 27 내지 145의 아미노산 서열의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하고, 상기 VL(CD3)은 서열번호 6의 아미노산 27 내지 132의 아미노산 서열의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하며, 상기 VH(CLDN6)은 서열번호 4의 아미노산 267 내지 383의 아미노산 서열의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하고, 상기 VL(CLDN6)은 서열번호 4의 아미노산 404 내지 510의 아미노산 서열의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하며, 그리고

바람직하게는 상기 VL(CLDN6)은 CDR1에 대한 위치 +15에 세린 잔기 및/또는 CDR2에 대한 위치 -3에 세린 잔기를 포함하는 것인,

조성물 또는 의약 제제.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 VH(CD3)는 서열번호 4의 아미노산 27 내지 145의 아미노산 서열 또는 이의 기능적 변이체를 포함하고,

상기 VL(CD3)은 서열번호 6의 아미노산 27 내지 132의 아미노산 서열 또는 이의 기능적 변이체를 포함하고,

상기 VH(CLDN6)은 서열번호 4의 아미노산 267 내지 383의 아미노산 서열 또는 이의 기능적 변이체를 포함하고, 및/또는

상기 VL(CLDN6)은 서열번호 4의 아미노산 404 내지 510의 아미노산 서열 또는 이의 기능적 변이체를 포함하는 것인,

조성물 또는 의약 제제.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제1 폴리펩티드 사슬은 서열번호 4의 아미노산 서열 또는 이의 기능적 변이체를 포함하는 것인,

조성물 또는 의약 제제.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제2 폴리펩티드 사슬은 서열번호 6의 아미노산 서열 또는 이의 기능적 변이체를 포함하는 것인,

조성물 또는 의약 제제.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제1 폴리펩티드 사슬은 서열번호 4의 아미노산 서열 또는 이의 기능적 변이체를 포함하고, 상기 제2 폴리펩티드 사슬은 서열번호 6의 아미노산 서열 또는 이의 기능적 변이체를 포함하는 것인,

조성물 또는 의약 제제.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제1 폴리펩티드와 상기 제2 폴리펩티드 중 적어도 하나는 코돈-최적화된 코딩 서열 및/또는 야생형 코딩 서열에 비해 G/C 함량이 증가된 코딩 서열에 의해 암호화되며, 상기에서 상기 코돈-최적화 및/또는 상기 G/C 함량의 상기 증가는 바람직하게는 암호화된 아미노산 서열의 서열을 변화시키지 않는 것인,

조성물 또는 의약 제제.

청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제1 폴리펩티드 및 상기 제2 폴리펩티드 각각은 코돈-최적화된 코딩 서열 및/또는 야생형 코딩 서열에 비해 상기 G/C 함량이 증가된 코딩 서열에 의해 암호화되며, 상기에서 상기 코돈-최적화 및/또는 상기 G/C 함량의 상기 증가는 바람직하게는 상기 암호화된 아미노산 서열의 서열을 변화시키지 않는 것인,

조성물 또는 의약 제제.

청구항 28

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 RNA는 우리딘 대신에 변형된 뉴클레오시드를 포함하는 것인,
조성물 또는 의약 제제.

청구항 29

제28항에 있어서,
상기 변형된 뉴클레오시드는 슈도우리딘 (Ψ), N1-메틸-슈도우리딘 ($m1\Psi$) 및 5-메틸-우리딘 ($m5U$)으로부터 선택되는 것인,
조성물 또는 의약 제제.

청구항 30

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서,
적어도 하나의 RNA는 5' 캡 $m_2^{7,3'-0}Gppp(m_1^{2'-0})ApG$ 를 포함하는 것인,
조성물 또는 의약 제제.

청구항 31

제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서,
각각의 RNA는 상기 5' 캡 $m_2^{7,3'-0}Gppp(m_1^{2'-0})ApG$ 를 포함하는 것인,
조성물 또는 의약 제제.

청구항 32

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서,
적어도 하나의 RNA는 서열번호 8의 뉴클레오티드 서열, 또는 상기 서열번호 8의 뉴클레오티드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 5' UTR을 포함하는 것인,
조성물 또는 의약 제제.

청구항 33

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서,
각각의 RNA는 서열번호 8의 뉴클레오티드 서열, 또는 상기 서열번호 8의 뉴클레오티드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 5' UTR을 포함하는 것인,
조성물 또는 의약 제제.

청구항 34

제1항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서,
적어도 하나의 RNA는 서열번호 9의 뉴클레오티드 서열, 또는 상기 서열번호 9의 뉴클레오티드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 3' UTR을 포함하는 것인,

조성물 또는 의약 제제.

청구항 35

제1항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서,

각각의 하나의 RNA는 서열번호 9의 뉴클레오타이드 서열, 또는 상기 서열번호 9의 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 3' UTR을 포함하는 것인,

조성물 또는 의약 제제.

청구항 36

제1항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서,

적어도 하나의 RNA는 폴리-A 서열을 포함하는 것인,

조성물 또는 의약 제제.

청구항 37

제1항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서,

각각의 RNA는 폴리-A 서열을 포함하는 것인,

조성물 또는 의약 제제.

청구항 38

제36항 또는 제37항에 있어서,

상기 폴리-A 서열은 적어도 100개의 뉴클레오타이드를 포함하는 것인,

조성물 또는 의약 제제.

청구항 39

제36항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 폴리-A 서열은 서열번호 10의 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나 이로 이루어지는 것인,

조성물 또는 의약 제제.

청구항 40

제1항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서,

(i) 상기 제1 RNA와 상기 제2 RNA는 약 1.75:1 내지 약 1.25:1, 또는 약 1.5:1 내지 약 1.25:1, 또는 바람직하게는 약 1.5:1의 (w/w) 비율이고; 및/또는

(ii) 상기 제1 RNA와 상기 제2 RNA는 각 우리딘 대신에 변형된 뉴클레오시드를 포함하며; 및/또는

(iii) 상기 제1 RNA와 상기 제2 RNA는 각 우리딘 대신 변형된 뉴클레오시드를 포함하며, 상기에서 상기 변형된 뉴클레오시드는 슈도우리딘(ψ), N1-메틸-슈도우리딘($m1\psi$) 및 5-메틸-우리딘($m5U$)으로부터 독립적으로 선택되며; 및/또는

(iv) 상기 제1 RNA와 상기 제2 RNA는 5' 캡 $m_2^{7,3'-0}Gppp(m_1^{2'-0})ApG$ 를 포함하며; 및/또는

(v) 상기 제1 RNA와 상기 제2 RNA는 상기 서열번호 8의 뉴클레오타이드 서열, 또는 상기 서열번호 8의 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 5' UTR을 포함하며; 및/또는

(vi) 상기 제1 RNA와 상기 제2 RNA는 상기 서열번호 9의 뉴클레오타이드 서열, 또는 상기 서열번호 9의 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포

함하는 3' UTR을 포함하며; 및 /또는

(vii) 상기 제1 RNA와 상기 제2 RNA는 상기 서열번호 10의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리-A 꼬리를 포함하는 것인,

조성물 또는 의약 제제.

청구항 41

제1항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서,

(i) 상기 제1 폴리펩티드 사슬은 상기 서열번호 4의 아미노산 서열, 또는 상기 서열번호 4의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며; 및/또는

(ii) 상기 제1 RNA는 상기 서열번호 5의 뉴클레오티드 서열, 또는 상기 서열번호 5의 뉴클레오티드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인,

조성물 또는 의약 제제.

청구항 42

제1항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서,

(i) 상기 제2 폴리펩티드 사슬은 상기 서열번호 6의 아미노산 서열, 또는 상기 서열번호 6의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며; 및/또는

(ii) 상기 제2 RNA는 상기 서열번호 7의 뉴클레오티드 서열, 또는 상기 서열번호 7의 뉴클레오티드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인,

조성물 또는 의약 제제.

청구항 43

조성물 또는 의약 제제에 있어서,

(i) 서열번호 4의 아미노산 서열, 또는 상기 서열번호 4의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제1 폴리펩티드 사슬을 암호화하는 제1 RNA; 및

(ii) 서열번호 6의 아미노산 서열, 또는 상기 서열번호 6의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제2 폴리펩티드 사슬을 암호화하는 제2 RNA를 포함하는 것인,

조성물 또는 의약 제제.

청구항 44

제1항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제1 RNA는 상기 서열번호 5의 뉴클레오티드 서열, 또는 상기 서열번호 5의 뉴클레오티드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인,

조성물 또는 의약 제제.

청구항 45

제1항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제2 RNA는 상기 서열번호 7의 뉴클레오티드 서열, 또는 상기 서열번호 7의 뉴클레오티드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인,

조성물 또는 의약 제제.

청구항 46

제1항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 RNA는 mRNA인,
조성물 또는 의약 제제.

청구항 47

제1항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 RNA는 액체로 제형화되거나, 고체로 제형화되거나, 또는 이의 조합으로 제형화되는 것인,
조성물 또는 의약 제제.

청구항 48

제1항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 RNA가 제형화되거나 또는 주사 용도로 제형화 하기 위한 것인,
조성물 또는 의약 제제.

청구항 49

제1항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 RNA는 정맥내 투여용으로 제형화되거나 또는 제형화 하기 위한 것인,
조성물 또는 의약 제제.

청구항 50

제1항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 RNA는 입자로 제형화되거나 또는 제형화하기 위한 것인,
조성물 또는 의약 제제.

청구항 51

제50항에 있어서, 상기 입자는 지질 나노입자(LNP)인,
조성물 또는 의약 제제.

청구항 52

제51항에 있어서,
상기 LNP 입자는 ((3-히드록시프로필)아잔디일)비스(노난-9,1-디일)비스(2-부틸옥타노에이트), 2-[(폴리에틸렌 글리콜)-2000]-N,N-디테트라데실아세트아미드, 1,2-디스테아로일-sn- 글리세로-3-포스포콜린 및 콜레스테롤을 포함하는 것인,
조성물 또는 의약 제제.

청구항 53

제1항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 조성물 또는 의약 제제는 약학적 조성물이며,
상기 약학적 조성물은 바람직하게는 0.05 $\mu\text{g/kg}$ 이상, 또는 0.05 $\mu\text{g/kg}$ 내지 5mg/kg, 또는 0.05 $\mu\text{g/kg}$ 내지 500 $\mu\text{g/kg}$, 또는 0.5 $\mu\text{g/kg}$ 내지 500 $\mu\text{g/kg}$, 또는 1 $\mu\text{g/kg}$ 내지 50 $\mu\text{g/kg}$, 또는 5 $\mu\text{g/kg}$ 내지 150 $\mu\text{g/kg}$, 또는 15 $\mu\text{g/kg}$ 내지 150 $\mu\text{g/kg}$ 의 상기 제1 및 제2 폴리펩티드를 암호화하는 RNA 용량을 포함하며, 상기에서 kg은 치료받는 개체의 체중 kg을 의미하는 것인,
조성물 또는 의약 제제.

청구항 54

제53항에 있어서,
상기 약학적 조성물은 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체, 희석제 및/또는 부형제를 추가로 포함하는 것인,
조성물 또는 의약 제제.

청구항 55

제1항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 의약 제제는 키트인 것인,
조성물 또는 의약 제제.

청구항 56

제55항에 있어서,
상기 RNA 및 선택적으로 상기 입자 형성 성분은 별도의 바이알에 존재하는 것인,
조성물 또는 의약 제제.

청구항 57

제55항 또는 제56항에 있어서,
암을 치료 또는 예방하기 위한 조성물 또는 의약 제제의 사용 지침서를 추가로 포함하는 것인,
조성물 또는 의약 제제.

청구항 58

제1항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서,
약학적 용도를 위한 것인,
조성물 또는 의약 제제.

청구항 59

제58항에 있어서,
상기 약학적 용도는 질환 또는 장애에 대한 치료학적 또는 예방학적 치료를 포함하는 것인,
조성물 또는 의약 제제.

청구항 60

제59항에 있어서,
상기 질환 또는 장애의 상기 치료학적 또는 예방학적 치료는 암의 치료 예방을 포함하는 것인,
조성물 또는 의약 제제.

청구항 61

제59항 또는 제60항에 있어서,
상기 질환 또는 장애에 대한 상기 치료학적 또는 예방학적 치료는 추가적인 요법의 기술을 더 포함하는 것인,
조성물 또는 의약 제제.

청구항 62

제62항에 있어서,

상기 추가적인 요법은 (i) 종양을 적출, 절제 또는 축소하기 위한 수술, (ii) 방사선요법, 및 (iii) 화학요법으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상을 포함하는 것인,

조성물 또는 의약 제제.

청구항 63

제62항에 있어서,

추가적인 요법은 추가의 치료학적 물질의 투여를 포함하는 것인,

조성물 또는 의약 제제.

청구항 64

제63항에 있어서,

상기 추가의 치료학적 물질은 치료학적 항암 물질을 포함하는 것인,

성물 또는 의약 제제.

청구항 65

제1항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물 또는 의약 제제는 인간에게 투여하기 위한 것인,

조성물 또는 의약 제제.

청구항 66

개체에서 암을 치료하는 방법으로서,

(i) CD3에 특이성을 갖는 면역글로불린으로부터 유래된 중쇄의 가변 영역 (VH(CD3)), CLDN6에 특이성을 갖는 면역글로불린으로부터 유래된 중쇄의 가변 영역 (VH(CLDN6)), 및 CLDN6에 특이성을 가진 면역글로불린으로부터 유래된 경쇄의 가변 영역(VL(CLDN6))을 포함하는 제1 폴리펩티드 사슬을 암호화하는 제1 RNA; 및

(ii) CD3에 특이성을 가진 면역글로불린으로부터 유래된 경쇄의 가변 영역(VL(CD3)), CLDN6에 특이성을 가진 면역글로불린으로부터 유래된 중쇄의 가변 영역(VH(CLDN6)), 및 CLDN6에 특이성을 가진 면역글로불린으로부터 유래된 경쇄의 가변 영역(VL(CLDN6))을 포함하는 제2 폴리펩티드 사슬을 암호화하는 제2 RNA

를 상기 개체에 투여하는 것을 포함하는, 상기 개체에서 암을 치료하는 방법.

청구항 67

제66항에 있어서,

상기 제1 폴리펩티드 사슬은 상기 제2 폴리펩티드 사슬과 상호작용하여 CD3에 특이성을 갖는 결합 도메인과 CLDN6에 특이성을 갖는 두 개의 결합 도메인을 형성하는 것인,

방법.

청구항 68

제66항 또는 제67항에 있어서,

상기 제1 폴리펩티드 사슬의 상기 VH(CD3)와 상기 제2 폴리펩티드 사슬의 상기 VL(CD3)은 상호작용하여 CD3에 특이성을 갖는 결합 도메인을 형성하며,

상기 제1 폴리펩티드 사슬의 상기 VH(CLDN6) 및 상기 VL(CLDN6)은 상호작용하여 CLDN6에 특이성을 갖는 결합 도메인을 형성하고,

상기 제2 폴리펩티드 사슬의 상기 VH(CLDN6) 및 상기 VL(CLDN6)은 상호작용하여 CLDN6에 특이성을 갖는 결합 도메인을 형성하는 것인,

방법.

청구항 69

제66항 내지 제68항 중 어느 한 항에서,
상기 제1 및 제2 폴리펩티드 사슬은 면역글로불린 또는 이의 기능적 변이체로부터 유래된 중쇄(CH1)의 불변 영역 1, 및 면역글로불린로부터 또는 이의 기능적 변이체로부터 유래된 경쇄(CL)의 불변 영역을 포함하는 것인,
방법.

청구항 70

제66항 내지 제69항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 면역글로불린은 IgG1인 것인,
방법.

청구항 71

제70항에 있어서,
상기 IgG1은 인간 IgG1인 것인,
방법.

청구항 72

제69항 내지 제71항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 제1 폴리펩티드 사슬의 상기 VH, 상기 VL, 상기 CH1은 N 말단에서 C 말단으로,
VH(CD3)-CH1-VH(CLDN6)-VL(CLDN6), 또는
VH(CD3)-CH1-VL(CLDN6)-VH(CLDN6)의 순서로 배열되는 것인,
방법.

청구항 73

제69항 내지 제72항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 CH1은 펩티드 링커에 의해 VH(CLDN6) 또는 VL(CLDN6)에 연결되는 것인,
방법.

청구항 74

제73항에 있어서,
상기 펩티드 링커는 아미노산 서열 SGPGGGGRS(G₄S)₂ 또는 이의 기능적 변이체를 포함하는 것인,
방법.

청구항 75

제69항 내지 제74항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 제2폴리펩티드 사슬의 상기 VH, 상기 VL, 상기 CL은 N 말단에서 C 말단으로, VL(CD3)-CL-VH(CLDN6)-VL(CLDN6), 또는 VL(CD3)-CL-VL(CLDN6)-VH(CLDN6)의 순서로 배열되는 것인,
방법.

청구항 76

제69항 내지 제75항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 CL은 펩티드 링커에 의해 상기 VH(CLDN6) 또는 VL(CLDN6)에 연결되는 것인,
방법.

청구항 77

제76항에 있어서,
상기 펩티드 링커는 아미노산 서열 DVPGGG 또는 이의 기능적 변이체를 포함하는 것인,
방법.

청구항 78

제66항 내지 제77항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 VH(CLDN6) 및 상기 VL(CLDN6)은 펩티드 링커에 의해 서로 연결되는 것인,
방법.

청구항 79

제78항에 있어서,
상기 펩티드 링커는 아미노산 서열 $(G_4S)_x$ 또는 이의 기능적 변이체를 포함하며, 상기에서 x는 2, 3, 4, 5 또는 6인,
방법.

청구항 80

제79항에 있어서,
상기 펩티드 링커는 상기 아미노산 서열 $(G_4S)_4$ 또는 이의 기능적 변이체를 포함하는 것인,
방법.

청구항 81

제69항 내지 제80항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 제1 폴리펩티드 사슬의 상기 CH1은 상기 제2 폴리펩티드 사슬의 상기 CL과 상호작용하는 것인,
방법.

청구항 82

제66항 내지 제81항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 VL(CD3)은 서열번호 6의 아미노산 27 내지 145의 아미노산 서열의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 것인,
방법.

청구항 83

제66항 내지 제82항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 VL(CD3)은 서열번호 6의 아미노산 27 내지 132의 아미노산 서열의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 것인,
방법.

청구항 84

제66항 내지 제83항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 VH(CLDN6)은 서열번호 4의 아미노산 267 내지 383의 아미노산 서열의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 것인,

방법.

청구항 85

제66항 내지 제84항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 VL(CLDN6)은 서열번호 4의 아미노산 404 내지 510의 아미노산 서열의 CDR1, CDR2 및 CDR3, 및 바람직하게 CDR1에 대한 위치 +15에 세린 잔기 및/또는 CDR2에 대한 위치 -3에 세린 잔기를 포함하는 것인,

방법.

청구항 86

제66항 내지 제85항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 VH(CD3)는 서열번호 4의 아미노산 27 내지 145의 아미노산 서열의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하고, 상기 VL(CD3)은 서열번호 6의 아미노산 27 내지 132의 아미노산 서열의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하며, 상기 VH(CLDN6)은 서열번호 4의 아미노산 267 내지 383의 아미노산 서열의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하고, 상기 VL(CLDN6)은 서열번호 4의 아미노산 404 내지 510의 아미노산 서열의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하며, 그리고 바람직하게는 상기 VL(CLDN6)은 CDR1에 대한 위치 +15에 세린 잔기 및/또는 CDR2에 대한 위치 -3에 세린 잔기를 포함하는 것인,

방법.

청구항 87

제66항 내지 제86항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 VH(CD3)는 서열번호 4의 아미노산 27 내지 145의 아미노산 서열 또는 이의 기능적 변이체를 포함하고,

상기 VL(CD3)은 서열번호 6의 아미노산 27 내지 132의 아미노산 서열 또는 이의 기능적 변이체를 포함하고,

상기 VH(CLDN6)은 서열번호 4의 아미노산 267 내지 383의 아미노산 서열 또는 이의 기능적 변이체를 포함하고, 및/또는

상기 VL(CLDN6)은 서열번호 4의 아미노산 404 내지 510의 아미노산 서열 또는 이의 기능적 변이체를 포함하는 것인,

방법.

청구항 88

제66항 내지 제87항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제1 폴리펩티드 사슬은 서열번호 4의 아미노산 서열 또는 이의 기능적 변이체를 포함하는,

방법.

청구항 89

제66항 내지 제88항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제2 폴리펩티드 사슬은 서열번호 6의 아미노산 서열 또는 이의 기능적 변이체를 포함하는,

방법.

청구항 90

제66항 내지 제89항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제1 폴리펩티드 사슬은 서열번호 4의 아미노산 서열 또는 이의 기능적 변이체를 포함하고, 상기 제2 폴리펩티드 사슬은 서열번호 6의 아미노산 서열 또는 이의 기능적 변이체를 포함하는 것인, 방법.

청구항 91

제66항 내지 제90항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제1 폴리펩티드와 상기 제2 폴리펩티드 중 적어도 하나는 코돈-최적화된 코딩 서열 및/또는 야생형 코딩 서열에 비해 G/C 함량이 증가된 코딩 서열에 의해 암호화되며, 상기에서 상기 코돈-최적화 및/또는 상기 G/C 함량의 상기 증가는 바람직하게는 상기 암호화된 아미노산 서열의 서열을 변화시키지 않는 것인, 방법.

청구항 92

제66항 내지 제91항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제1 폴리펩티드 및 상기 제2 폴리펩티드 각각은 코돈-최적화된 코딩 서열 및/또는 야생형 코딩 서열에 비해 G/C 함량이 증가된 코딩 서열에 의해 암호화되며, 상기에서 상기 코돈-최적화 및/또는 상기 G/C 함량의 상기 증가는 바람직하게는 상기 암호화된 아미노산 서열의 서열을 변화시키지 않는 것인, 방법.

청구항 93

제66항 내지 제92항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 RNA는 우리딘 대신에 변형된 뉴클레오시드를 포함하는 것인, 방법.

청구항 94

제93항에 있어서,

상기 변형된 뉴클레오시드는 슈도우리딘 (Ψ), N1-메틸-슈도우리딘 ($m1\Psi$) 및 5-메틸-우리딘 ($m5U$)으로 부터 선택되는 것인, 방법.

청구항 95

제66항 내지 제94항 중 어느 한 항에 있어서,

적어도 하나의 RNA는 5' 캡 $m_2^{7,3'-0}Gppp(m_1^{2'-0})ApG$ 를 포함하는 것인,

방법.

청구항 96

제66항 내지 제95항 중 어느 한 항에 있어서,

각각의 RNA는 상기 5' 캡 $m_2^{7,3'-0}Gppp(m_1^{2'-0})ApG$ 를 포함하는 것인,

방법.

청구항 97

제66항 내지 제96항 중 어느 한 항에 있어서,

적어도 하나의 RNA는 서열번호 8의 뉴클레오티드 서열, 또는 상기 서열번호 8의 뉴클레오티드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 5' UTR을 포함하는 것인,

방법.

청구항 98

제66항 내지 제97항 중 어느 한 항에 있어서,

각각의 RNA는 서열번호 8의 뉴클레오티드 서열, 또는 상기 서열번호 8의 뉴클레오티드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 5' UTR을 포함하는 것인,

방법.

청구항 99

제66항 내지 제98항 중 어느 한 항에 있어서,

적어도 하나의 RNA는 서열번호 9의 뉴클레오티드 서열, 또는 상기 서열번호 9의 뉴클레오티드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 3' UTR을 포함하는 것인,

방법.

청구항 100

제66항 내지 제99항 중 어느 한 항에 있어서,

각각의 RNA는 서열번호 9의 뉴클레오티드 서열, 또는 상기 서열번호 9의 뉴클레오티드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 3' UTR을 포함하는 것인,

방법.

청구항 101

제66항 내지 제100항 중 어느 한 항에 있어서,

적어도 하나의 RNA는 폴리-A 서열을 포함하는 것인,

방법.

청구항 102

제66항 내지 제101항 중 어느 한 항에 있어서,

각각의 RNA는 폴리-A 서열을 포함하는 것인,

방법.

청구항 103

제101항 또는 제102항에 있어서,

상기 폴리-A 서열은 적어도 100개의 뉴클레오티드를 포함하는 것인,

방법.

청구항 104

제101항 내지 제103항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 폴리-A 서열은 서열번호 10의 뉴클레오티드 서열을 포함하거나 이로 이루어지는 것인,

방법.

청구항 105

제66항 내지 제104항 중 어느 한 항에 있어서,

- (i) 상기 제1 RNA 및 상기 제2 RNA는 약 1.75:1 내지 약 1.25:1, 또는 약 1.5:1 내지 약 1.25:1, 또는 바람직하게는 약 1.5:1의 (w/w) 비율이고; 및/또는
- (ii) 상기 제1 RNA와 상기 제2 RNA는 각 우리딘 대신에 변형된 뉴클레오시드를 포함하며; 및/또는
- (iii) 상기 제1 RNA 및 상기 제2 RNA는 각 우리딘 대신 변형된 뉴클레오시드를 포함하며, 상기에서 상기 변형된 뉴클레오시드는 슈도우리딘(ψ), N1-메틸-슈도우리딘($m1\psi$) 및 5-메틸-우리딘($m5U$)으로부터 독립적으로 선택되며; 및/또는
- (iv) 상기 제1 RNA와 상기 제2 RNA는 5' 캡 $m_2^{7,3'-O}Gppp(m_1^{2'-O})ApG$ 를 포함하며; 및/또는
- (v) 상기 제1 RNA와 상기 제2 RNA는 상기 서열번호 8의 뉴클레오티드 서열, 또는 상기 서열번호 8의 뉴클레오티드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 5' UTR을 포함하며; 및/또는
- (vi) 상기 제1 RNA와 상기 제2 RNA는 상기 서열번호 9의 뉴클레오티드 서열, 또는 상기 서열번호 9의 뉴클레오티드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 3' UTR을 포함하며; 및 /또는
- (vii) 상기 제1 RNA와 상기 제2 RNA는 상기 서열번호 10의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리-A 꼬리를 포함하는 것인,

방법.

청구항 106

제66항 내지 제105항 중 어느 한 항에 있어서,

- (i) 상기 제1 폴리펩티드 사슬은 상기 서열번호 4의 아미노산 서열, 또는 상기 서열번호 4의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며; 및/또는
- (ii) 상기 제1 RNA는 상기 서열번호 5의 뉴클레오티드 서열, 또는 상기 서열번호 5의 뉴클레오티드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인,

방법.

청구항 107

제66항 내지 제106항 중 어느 한 항에 있어서,

- (i) 상기 제2 폴리펩티드 사슬은 상기 서열번호 6의 아미노산 서열, 또는 상기 서열번호 6의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며; 및/또는
- (ii) 상기 제2 RNA는 상기 서열번호 7의 뉴클레오티드 서열, 또는 상기 서열번호 7의 뉴클레오티드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인,

방법.

청구항 108

개체에서 암을 치료하는 방법으로서,

- (i) 서열번호 4의 아미노산 서열, 또는 상기 서열번호 4의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제1 폴리펩티드 사슬을 암호화하는 제1 RNA;

및

(ii) 서열번호 6의 아미노산 서열, 또는 상기 서열번호 6의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제2 폴리펩티드 사슬을 암호화하는 제2 RNA를 상기 개체에 투여하는 것을 포함하는, 상기 개체에서 암을 치료하는 방법.

청구항 109

제66항 내지 제108항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제1 RNA는 상기 서열번호 5의 뉴클레오티드 서열, 또는 상기 서열번호 5의 뉴클레오티드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인, 방법.

청구항 110

제66항 내지 제109항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제2 RNA는 상기 서열번호 7의 뉴클레오티드 서열, 또는 상기 서열번호 7의 뉴클레오티드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인, 방법.

청구항 111

제66항 내지 제110항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 RNA는 mRNA인 것인,

방법.

청구항 112

제66항 내지 제111항 중 한 항에 있어서,

상기 RNA는 액체로 제형화되거나, 고체로 제형화되거나, 또는 이의 조합으로 제형화되는 것인, 방법.

청구항 113

제66항 내지 제112항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 RNA가 주사로, 바람직하게는 매주 1회 투여되는 것인,

방법.

청구항 114

제66항 내지 제113항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 RNA는 정맥 투여로 투여되는 것인,

방법.

청구항 115

제66항 내지 제114항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 RNA는 입자로 제형화되는 것인,

방법.

청구항 116

제115항에 있어서,
상기 입자는 지질 나노입자(LNP)인 것인,
방법.

청구항 117

제116항에 있어서,
상기 LNP 입자는 ((3-히드록시프로필)아잔디일)비스(노난-9,1-디일)비스(2-부틸옥타노에이트), 2-[(폴리에틸렌 글리콜)-2000]-N,N-디테트라데실아세트아미드, 1,2-디스테아로일-sn- 글리세로-3-포스포콜린 및 콜레스테롤을 포함하는 것인,
방법.

청구항 118

제66항 내지 제117항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 RNA는 약학적 조성물로 제형화 되며, 상기 약학적 조성물은 바람직하게는 0.05 $\mu\text{g/kg}$ 이상, 또는 0.05 $\mu\text{g/kg}$ 내지 5mg/kg, 또는 0.05 $\mu\text{g/kg}$ 내지 500 $\mu\text{g/kg}$, 또는 0.5 $\mu\text{g/kg}$ 내지 500 $\mu\text{g/kg}$, 또는 1 $\mu\text{g/kg}$ 내지 50 $\mu\text{g/kg}$, 또는 5 $\mu\text{g/kg}$ 내지 150 $\mu\text{g/kg}$, 또는 15 $\mu\text{g/kg}$ 내지 150 $\mu\text{g/kg}$ 의 상기 제1 및 제2 폴리펩티드를 암호화하는 RNA 용량을 포함하며, 상기에서 kg은 치료받는 개체의 체중 kg을 의미하는 것인,
방법.

청구항 119

제118항에 있어서,
상기 약학적 조성물은 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체, 희석제 및/또는 부형제를 추가로 포함하는 것인,
방법.

청구항 120

제66항 내지 제119항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 방법은 추가적인 요법을 투여하는 것을 더 포함하는 것인,
방법.

청구항 121

제120항에 있어서,
상기 추가적인 요법은 (i) 종양을 적출, 절제 또는 축소하기 위한 수술, (ii) 방사선요법, 및 (iii) 화학요법으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상을 포함하는 것인,
방법.

청구항 122

제121항에 있어서,
상기 추가적인 요법은 추가의 치료학적 물질의 투여를 포함하는 것인,
방법.

청구항 123

제122항에 있어서,
상기 추가의 치료학적 물질은 치료학적 항암 물질을 포함하는 것인,

방법.

청구항 124

제66항 내지 제123항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 개체는 인간인 것인,

방법.

청구항 125

제66항 내지 제124항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 암은 CLDN6 양성 암인 것인,

방법.

청구항 126

제66항 내지 제125항 중 어느 한 항의 방법에 사용하기 위한 제1항 내지 제65항 중 어느 한 항의 조성물 또는 의약 제제.

발명의 설명

기술 분야

배경 기술

- [0001] 암은 전 세계적으로 두 번째를 차지하는 주요 사망 요인으로, 2020년에는 천만명이 사망한 것으로 추산된다. 일반적으로, 고형 종양이 일단 전이되면, 생식 세포와 일부 유암종과 같은 몇 가지 예외를 제외하고는 5년 생존율이 25%를 넘는 경우가 거의 없다. 화학요법, 방사선요법, 수술 및 표적 요법과 같은 통례적인 요법과 최근 면역요법의 진보는 진행된 고형 종양을 가진 환자들에서 예후를 개선하였다. 과거 수년간, 식약청 (FDA) 및 유럽 의약청 (EMA)에서는 여러가지 암 타입들, 주로 고형 종양을 가진 환자를 치료하기 위한 체크포인트 저해제 8종을 승인하였다. 이러한 승인은 암 치료의 판도를 극적으로 바꾸었다.
- [0002] 전이되었거나 국소적으로 진행된 암의 나쁜 예후에는 추가적인 치료 방법의 필요성이 강조된다. 그러한 방법 중 하나에는 유망한 방식으로 끊임없이 진화하는 분야인 표적 치료법이 있다.
- [0003] CLDN6은 상피 및 내피 세포 시트에서 정단 밀착 복합체(apical tight-junction complex) 형성에 관여하는 테트라스판닌 막 단백질의 PMP-22/EMP/MP20/클라우딘 슈퍼패밀리(Pfam 데이터베이스 ID: PF00822)에 속하며, 세포 극성의 유지에 중요한 역할을 한다(Krause G. et al., Biochim Biophys Acta. 2008;1778(3):631-645). 중요하게도, 클라우딘 단백질의 발현은 세포 밀착 연결(cellular tight junction)으로 제한되며 표준 생리학적 조건 하에서 이온 수송을 위해서만 접근 가능하다(Krause G. et al., Biochim Biophys Acta. 2008;1778(3):631-645). 그외에는, CLDN6의 생체 내 기능에 대해 알려진 바가 거의 없다.
- [0004] CLDN6에는 N 말단과 C 말단이 세포질까지 뻗어 있는 4개의 막횡단 나선이 있다. CLDN6의 짧은 N-말단 서열 뒤에는 큰 세포외 루프(EL1), 짧은 세포내 루프, 두 번째 세포외 루프(EL2) 및 C-말단 세포질 꼬리가 이어진다(Colegio O.R. et al., Am J Physiol Cell Physiol.2002;283(1):C142-C147).
- [0005] CLDN6의 이소형은 지금까지 확인되지 않고 있다(Lal-Nag M. et al., Genome Biol. 2009;10(8):235). 클라우딘 패밀리 구성원인 CLDN3, CLDN4 및 CLDN9는 CLDN6과 서열 상동성을 공유한다. CLDN3 및 CLDN4는 폐, 간, 유방, 췌장, 신장 및 장의 정상 상피 세포에서 흔히 발현된다(Kwon M. et al., Int J Mol Sci. 2013;14(9):18148-18180). CLDN9 발현은 대다수의 정상 조직에는 존재하지 않는다. 그러나 CLDN9 유전자 절단과 인간의 청각 장애 사이의 연관성이 있었던 것처럼(Sineni C. et al., Humangenetics 2019;138(10):1071-1075), 마우스 내이의 달팽이관 및 전정에서 CLDN9 발현이 보고된 바 있다(Kitajiri S.I. et al., Hear Res. 2004;187(1-2):25-34;

Nakano Y. et al., PLoS Genet. 2009 ;5(8):e1000610).

[0006] 태아중양 단백질 CLDN6은 배아 줄기 세포에서 거의 독점적으로 발현되고, 이후 신경 또는 심장 계통으로의 분화 동안 급속히 하향조절되며 태반 이외의 정상 성인 조직에서는 발현되지 않는다(Assou S. et al., Stem Cells. 2007;25) (4):961-973; Ben-David U. et al., Nat Commun. 2013;4:1992; Reinhard K. et al., Science. 2020;367(6476):446-453). CLDN6은 고환암, 난소암, 자궁내막암 및 폐암을 비롯한 다양한 인간 암 유형에서 발현된다. 대표적인 연구에 따르면 모든 조직학적 아형의 고환암 중 약 93%가 염색 세기 $\geq 2+$ 로 정의되는 CLDN6에 대해 매우 진하게 염색된 것으로 나타났다. 더욱이, 난소암의 56%는 CLDN6에 대해 양성으로 염색되었으며, 그 중 20 내지 25%는 중양 세포의 50% 이상에서 높은($\geq 2+$) 세포막 염색을 나타냈다. 원발성 난소암과 비교하여, CLDN6-양성 샘플의 빈도는 전이 병변에서 상당히 증가했으며(72%, 데이터는 도시되지 않음), 이는 CLDN6 발현과 질병 진행을 연관시킨다. 자궁내막암종의 23%와 폐암종의 11%가 CLDN6에 대해 양성으로 염색되었으며, 그 중 10 내지 15%와 2 내지 5%는 각각 2+ 이상의 염색 세기를 나타내었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 CLDN6-양성 암 질환의 치료를 위한 신규 제제 및 방법을 제공하는 것이다.

[0008] 일부 구현예에서, 본 발명의 근본적인 문제 해결책은 암세포에 의해 발현되는 CLDN6에 특이적인 2개의 결합 도메인과 T 세포에 의해 발현되는 CD3에 특이적인 결합 도메인을 포함하는 결합제를 형성하는 폴리펩티드 사슬을 발현하기 위해, 환자의 세포에 의해 발현되는 RNA를 투여해서, 암세포에 T 세포의 세포독성 효과를 발휘할 수 있게 하는 개념에 기초한다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명은 일반적으로 CD3 및 CLDN6에 대한 결합에 대해 적어도 이중특이적인, 즉 적어도 CD3 및 CLDN6에 결합할 수 있는 결합제에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 개체의 암 치료 또는 예방에 사용될 수 있는 이들 결합제를 암호화하는 RNA에 관한 것이다. 특히, 본원에 개시된 결합제를 암호화하는 RNA는 (적절한 표적 세포에 의한 RNA의 발현 이후) CD3 및 CLDN6을 표적화하기 위한 결합제를 제공하기 위해 투여될 수 있다.

[0010] 따라서, 본원에 기재된 약제학적 조성물은 수용자의 세포에 들어갈 때 각각의 암호화된 폴리펩티드로 번역될 수 있는 활성 원리 단일 가닥 RNA를 포함할 수 있다. 결합제를 암호화하는 서열에 더하여, RNA는 안정성 및 번역 효율과 관련하여 RNA의 최대 효능을 위해 최적화된 하나 이상의 구조적 요소를 함유할 수 있다(5' 캡, 5' UTR, 3' UTR, 폴리(A)-꼬리). 일부 구현예에서, RNA는 이들 요소를 모두 포함한다.

[0011] 본원에 기재된 RNA는 단백질 및/또는 지질, 바람직하게는 지질과 복합화되어 투여용 RNA 입자를 생성할 수 있다. 상이한 RNA는 투여를 위한 RNA입자를 생성하기 위해 단백질 및/또는 지질과 함께 복합화되거나 개별적으로 복합화될 수 있다.

[0012] 일 측면에서, 본 발명은 조성물 또는 의약 제제를 제공하며, 상기 조성물 또는 의약 제제는,

[0013] (i) CD3에 특이성을 갖는 면역글로불린으로부터 유래된 중쇄의 가변 영역(VH(CD3)), CLDN6에 특이성을 갖는 면역글로불린으로부터 유래된 중쇄의 가변 영역(VH(CLDN6)), 및 CLDN6에 특이성을 갖는 면역글로불린으로부터 유래된 경쇄의 가변 영역(VL(CLDN6))을 포함하는 제1 폴리펩티드 사슬을 암호화하는 제1 RNA; 및

[0014] (ii) CD3에 특이성을 갖는 면역글로불린으로부터 유래된 경쇄의 가변 영역(VL(CD3)), CLDN6에 특이성을 갖는 면역글로불린으로부터 유래된 중쇄의 가변 영역(VH(CLDN6)), 및 CLDN6에 특이성을 갖는 면역글로불린으로부터 유래된 경쇄의 가변 영역(VL(CLDN6))을 포함하는 제2 폴리펩티드 사슬을 암호화하는 제2 RNA를 포함한다.

[0015] 일부 구현예에서, 상기 제1 폴리펩티드 사슬은 상기 제2 폴리펩티드 사슬과 상호작용하여 CD3에 특이성을 갖는 결합 도메인과 CLDN6에 특이성을 갖는 두 개의 결합 도메인을 형성한다.

[0016] 일부 구현예에서, 상기 제1 폴리펩티드 사슬의 상기 VH(CD3)와 상기 제2 폴리펩티드 사슬의 상기 VL(CD3)은 상호작용하여 CD3에 특이성을 갖는 결합 도메인을 형성하며,

[0017] 상기 제1 폴리펩티드 사슬의 상기 VH(CLDN6) 및 상기 VL(CLDN6)은 상호작용하여 CLDN6에 특이성을 갖는 결합 도메인을 형성하고,

- [0018] 상기 제2 폴리펩티드 사슬의 상기 VH(CLDN6) 및 상기 VL(CLDN6)은 상호작용하여 CLDN6에 특이성을 갖는 결합 도메인을 형성한다.
- [0019] 일 측면에서, 본 발명은 조성물 또는 의약 제제를 제공하며, 상기 조성물 또는 의약 제제는,
- [0020] (i) 가변 영역 VH(CD3), 가변 영역 VH(CLDN6) 및 가변 영역 VL(CLDN6)을 포함하는 제1 폴리펩티드 사슬을 암호화하는 제1 RNA; 및
- [0021] (ii) 가변 영역 VL(CD3), 가변 영역 VH(CLDN6) 및 가변 영역 VL(CLDN6)을 포함하는 제2 폴리펩티드 사슬을 암호화하는 제2 RNA를 포함하며,
- [0022] 상기에서, 상기 제1 폴리펩티드 사슬의 상기 VH(CD3)와 상기 제2 폴리펩티드 사슬의 상기 VL(CD3)은 상호작용하여 CD3에 특이성을 갖는 결합 도메인을 형성하고,
- [0023] 상기 제1 폴리펩티드 사슬의 상기 VH(CLDN6) 및 상기 VL(CLDN6)은 상호작용하여 CLDN6에 특이성을 갖는 결합 도메인을 형성하고,
- [0024] 상기 제2 폴리펩티드 사슬의 상기 VH(CLDN6) 및 상기 VL(CLDN6)은 상호작용하여 CLDN6에 특이성을 갖는 결합 도메인을 형성한다.
- [0025] 상기 제1 및 제2 폴리펩티드 사슬은 면역글로불린 또는 이의 기능적 변이체로부터 유래된 중쇄(CH1)의 불변 영역 1, 및 면역글로불린 또는 이의 기능적 변이체로부터 유래된 경쇄(CL)의 불변 영역을 포함한다.
- [0026] 일부 구현예에서, 상기 면역글로불린은 IgG1이다.
- [0027] 일부 구현예에서, 상기 IgG1은 인간 IgG1이다.
- [0028] 일부 구현예에서, 상기 제1 폴리펩티드 사슬의 상기 VH, 상기 VL, 상기 CH1은 N 말단에서 C 말단으로, VH(CD3)-CH1-VH(CLDN6)-VL(CLDN6), 또는 VH(CD3)-CH1-VL(CLDN6)-VH(CLDN6)의 순서로 배열된다.
- [0029] 일부 구현예에서 상기 CH1은 펩티드 링커에 의해 VH(CLDN6) 또는 VL(CLDN6)에 연결된다. 일부 구현예에서, 상기 펩티드 링커는 아미노산 서열 SGPGGGGRS(G₄S)₂ 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다.
- [0030] 일부 구현예에서, 상기 제2 폴리펩티드 사슬의 상기 VH, 상기 VL, 상기 CL은 N 말단에서 C 말단으로, VL(CD3)-CL-VH(CLDN6)-VL(CLDN6), 또는 VL(CD3)-CL-VL(CLDN6)-VH(CLDN6)의 순서로 배열된다.
- [0031] 일부 구현예에서, 상기 CL은 펩티드 링커에 의해 상기 VH(CLDN6) 또는 VL(CLDN6)에 연결된다. 일부 구현예에서, 상기 펩티드 링커는 아미노산 서열 DVPGGGS 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다.
- [0032] 일부 구현예에서, 상기 VH(CLDN6) 및 상기 VL(CLDN6)은 펩티드 링커에 의해 서로 연결된다. 일부 구현예에서, 상기 펩티드 링커는 아미노산 서열 (G₄S)_x 또는 이의 기능적 변이체를 포함하며, 상기에서 x는 2, 3, 4, 5 또는 6이다. 일 구현예에서, 상기 펩티드 링커는 상기 아미노산 서열 (G₄S)₄ 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다.
- [0033] 일부 구현예에서, 상기 제1 폴리펩티드 사슬의 상기 CH1은 상기 제2 폴리펩티드 사슬의 상기 CL과 상호작용한다.
- [0034] 일부 구현예에서, 상기 VH(CD3)는 서열번호 4의 아미노산 27 내지 145의 아미노산 서열의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함한다.
- [0035] 일부 구현예에서, 상기 VH(CD3)는 아미노산 서열 GYTFTRYT 또는 이의 기능적 변이체를 포함하는 CDR1, 아미노산 서열 INPSRGYT 또는 이의 기능적 변이체를 포함하는 CDR2, 및 아미노산 서열 ARYYDDHYSLDY 또는 이의 기능적 변이체를 포함하는 CDR3을 포함한다.
- [0036] 일부 구현예에서, 상기 VH(CD3)는 아미노산 서열 GYTFTRYT 또는 이의 기능적 변이체를 포함하는 CDR1, 아미노산 서열 INPSRGYT 또는 이의 기능적 변이체를 포함하는 CDR2, 및 아미노산 서열 ARYYDDHYCLDY 또는 이의 기능적 변이체를 포함하는 CDR3을 포함한다.
- [0037] 일부 구현예에서, 상기 VH(CD3)는 서열번호 4의 아미노산 27 내지 145의 아미노산 서열 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다.
- [0038] 일부 구현예에서, 상기 VL(CD3)은 서열번호 6의 아미노산 27 내지 132의 아미노산 서열의 CDR1, CDR2 및 CDR3을

포함한다.

- [0039] 일부 구현예에서, 상기 VL(CD3)은 아미노산 서열 SSVSY 또는 이의 기능적 변이체를 포함하는 CDR1, 아미노산 서열 DTS 또는 이의 기능적 변이체를 포함하는 CDR2, 및 아미노산 서열 QQWSSNPLT 또는 이의 기능적 변이체를 포함하는 CDR3을 포함한다.
- [0040] 일부 구현예에서, 상기 VL(CD3)은 서열번호 6의 아미노산 27 내지 132의 아미노산 서열 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다.
- [0041] 일부 구현예에서, 상기 VH(CLDN6)은 서열번호 4의 아미노산 267 내지 383의 아미노산 서열의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함한다.
- [0042] 일부 구현예에서, 상기 VH(CLDN6)은 아미노산 서열 GYSFTGYT 또는 이의 기능적 변이체를 포함하는 CDR1, 아미노산 서열 INPYNGGT 또는 이의 기능적 변이체를 포함하는 CDR2, 및 아미노산 서열 ARDYGFVLDY 또는 이의 기능적 변이체를 포함하는 CDR3을 포함한다.
- [0043] 일부 구현예에서, 상기 VH(CLDN6)은 서열번호 4의 아미노산 267 내지 383의 아미노산 서열 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다.
- [0044] 일부 구현예에서, 상기 VL(CLDN6)은 서열번호 4의 아미노산 404 내지 510의 아미노산 서열의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함한다.
- [0045] 일부 구현예에서, 상기 VL(CLDN6)은 서열번호 4의 아미노산 404 내지 510의 아미노산 서열의 CDR1, CDR2 및 CDR3, 및 CDR1에 대한 위치 +15 (서열번호 4의 위치 449에 해당)에 세린 잔기를 포함한다.
- [0046] 일부 구현예에서, 상기 VL(CLDN6)은 서열번호 4의 아미노산 404 내지 510의 아미노산 서열의 CDR1, CDR2 및 CDR3, 및 CDR2에 대한 위치 -3 (서열번호 4의 위치 449에 해당)에 세린 잔기를 포함한다.
- [0047] 일부 구현예에서, 상기 VL(CLDN6)은 서열번호 4의 아미노산 404 내지 510의 아미노산 서열의 CDR1, CDR2 및 CDR3, 서열번호 4의 아미노산 404 내지 510의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90 %, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 서열, 및 서열번호 4의 위치 449에 해당하는 위치에 세린 잔기를 포함한다.
- [0048] 일부 구현예에서, 상기 VL(CLDN6)은 아미노산 서열 SSVSY 또는 이의 기능적 변이체를 포함하는 CDR1, 아미노산 서열 STS 또는 이의 기능적 변이체를 포함하는 CDR2, 및 아미노산 서열 QQRSNYPWT 또는 이의 기능적 변이체를 포함하는 CDR3을 포함한다.
- [0049] 일부 구현예에서, 상기 VL(CLDN6)은 서열번호 4의 아미노산 404 내지 510의 아미노산 서열 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다.
- [0050] 일부 구현예에서, 상기 VH(CD3)는 서열번호 4의 아미노산 27 내지 145의 아미노산 서열의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하고, 상기 VL(CD3)은 서열번호 6의 아미노산 27 내지 132의 아미노산 서열의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하며, 상기 VH(CLDN6)은 서열번호 4의 아미노산 267 내지 383의 아미노산 서열의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하고, 상기 VL(CLDN6)은 서열번호 4의 아미노산 404 내지 510의 아미노산 서열의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하며, 그리고 바람직하게는 CDR1에 대한 위치 +15(서열번호 4의 위치 449에 해당)에 세린 잔기 및/또는 CDR2에 대한 위치 -3(서열번호 4의 위치 449에 해당)에 세린 잔기를 포함한다.
- [0051] 일부 구현예에서, 상기 VH(CD3)는 서열번호 4의 아미노산 27 내지 145의 아미노산 서열 또는 이의 기능적 변이체를 포함하고,
- [0052] 상기 VL(CD3)은 서열번호 6의 아미노산 27 내지 132의 아미노산 서열 또는 이의 기능적 변이체를 포함하고,
- [0053] 상기 VH(CLDN6)은 서열번호 4의 아미노산 267 내지 383의 아미노산 서열 또는 이의 기능적 변이체를 포함하고, 및/또는
- [0054] 상기 VL(CLDN6)은 서열번호 4의 아미노산 404 내지 510의 아미노산 서열 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다.
- [0055] 일부 구현예에서, 상기 제1 폴리펩티드 사슬은 서열번호 4의 아미노산 서열 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다.
- [0056] 일부 구현예에서, 상기 제2 폴리펩티드 사슬은 서열번호 6의 아미노산 서열 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다.

- [0057] 일부 구현예에서, 상기 제1 폴리펩티드 사슬은 서열번호 4의 아미노산 서열 또는 이의 기능적 변이체를 포함하고, 상기 제2 폴리펩티드 사슬은 서열번호 6의 아미노산 서열 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다.
- [0058] 일부 구현예에서, 상기 제1 폴리펩티드와 상기 제2 폴리펩티드 중 적어도 하나는 코돈-최적화된 암호화 서열 및/또는 야생형 암호화 서열에 비해 G/C 함량이 증가된 암호화 서열에 의해 암호화되며, 상기에서 상기 코돈-최적화 및/또는 상기 G/C 함량의 상기 증가는 바람직하게는 상기 암호화된 아미노산 서열의 서열을 변화시키지 않는다.
- [0059] 일부 구현예에서, 상기 제1 폴리펩티드 및 상기 제2 폴리펩티드 각각은 코돈-최적화된 암호화 서열 및/또는 야생형 암호화 서열에 비해 G/C 함량이 증가된 암호화 서열에 의해 암호화되며, 상기에서 상기 코돈-최적화 및/또는 상기 G/C 함량의 상기 증가는 바람직하게는 상기 암호화된 아미노산 서열의 서열을 변화시키지 않는다.
- [0060] 일부 구현예에서, 상기 RNA는 우리딘 대신에 변형된 뉴클레오시드를 포함한다. 이러한 경우에, 바람직하게는 상기 RNA 내 각각의 또는 본질적으로 각각의 우리딘 대신에 변형된 뉴클레오시드가 존재한다.
- [0061] 일부 구현예에서, 상기 변형된 뉴클레오시드는 슈도우리딘 (Ψ), N1-메틸-슈도우리딘 (m1 Ψ) 및 5-메틸-우리딘 (m5U)으로부터 선택된다.
- [0062] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 RNA는 5' 캡 $p m_2^{7,3'-0} Gppp(m_1^{2'-0})ApG$ 를 포함한다.
- [0063] 일부 구현예에서, 각각의 RNA는 5' 캡 $m_2^{7,3'-0} Gppp(m_1^{2'-0})ApG$ 를 포함한다.
- [0064] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 RNA는 서열번호 8의 뉴클레오티드 서열, 또는 상기 서열번호 8의 뉴클레오티드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 5' UTR을 포함한다.
- [0065] 일부 구현예에서, 각각의 RNA는 서열번호 8의 뉴클레오티드 서열, 또는 상기 서열번호 8의 뉴클레오티드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 5' UTR을 포함한다.
- [0066] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 RNA는 서열번호 9의 뉴클레오티드 서열, 또는 상기 서열번호 9의 뉴클레오티드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 3' UTR을 포함한다.
- [0067] 일부 구현예에서, 각각의 RNA는 서열번호 9의 뉴클레오티드 서열, 또는 상기 서열번호 9의 뉴클레오티드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 3' UTR을 포함한다.
- [0068] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 RNA는 폴리-A 서열을 포함한다.
- [0069] 일부 구현예에서, 각각의 RNA는 폴리-A 서열을 포함한다.
- [0070] 일부 구현예에서, 상기 폴리-A 서열은 적어도 100개의 뉴클레오티드를 포함한다.
- [0071] 일부 구현예에서, 상기 폴리-A 서열은 서열번호 10의 뉴클레오티드 서열을 포함하거나 이로 이루어진다.
- [0072] 일부 구현예에서:
- [0073] (i) 상기 제1 RNA 및 상기 제2 RNA는 약 1.75:1 내지 약 1.25:1, 또는 약 1.5:1 내지 약 1.25:1, 또는 바람직하게는 약 1.5:1의 (w/w) 비율이고; 및/또는
- [0074] (ii) 상기 제1 RNA와 상기 제2 RNA는 각 우리딘 대신에 변형된 뉴클레오시드를 포함하며; 및/또는
- [0075] (iii) 상기 제1 RNA 및 상기 제2 RNA는 각 우리딘 대신 변형된 뉴클레오시드를 포함하며, 상기에서 상기 변형된 뉴클레오시드는 슈도우리딘 (Ψ), N1-메틸-슈도우리딘(m1 Ψ) 및 5-메틸-우리딘(m5U)으로부터 독립적으로 선택되며; 및/또는
- [0076] (iv) 상기 제1 RNA와 상기 제2 RNA는 5' 캡 $m_2^{7,3'-0} Gppp(m_1^{2'-0})ApG$ 를 포함하며; 및/또는
- [0077] (v) 상기 제1 RNA와 상기 제2 RNA는 상기 서열번호 8의 뉴클레오티드 서열, 또는 상기 서열번호 8의 뉴클레오티드

드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 5' UTR을 포함하며; 및/또는

- [0078] (vi) 상기 제1 RNA와 상기 제2 RNA는 상기 서열번호 9의 뉴클레오타이드 서열, 또는 상기 서열번호 9의 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 3' UTR을 포함하며; 및 /또는
- [0079] (vii) 상기 제1 RNA와 상기 제2 RNA는 상기 서열번호 10의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 폴리-A 꼬리를 포함한다.
- [0080] 일부 구현예에서:
- [0081] (i) 상기 제1 RNA와 상기 제2 RNA는 약 1.75:1 내지 약 1.25:1, 또는 약 1.5:1 내지 약 1.25:1, 또는 바람직하게는 약 1.5:1의 (w/w) 비율이며;
- [0082] (ii) 상기 제1 RNA와 상기 제2 RNA는 각 우리딘 대신에 변형된 뉴클레오시드를 포함하며, 상기에서 상기 변형된 뉴클레오시드는 N1-메틸-슈도우리딘(m1Ψ)이며;
- [0083] (iii) 상기 제1 RNA와 상기 제2 RNA는 5' 캡 $m_2^{7,3'-0}Gppp(m_1^{2'-0})ApG$ 를 포함하며;
- [0084] (iv) 상기 제1 RNA와 상기 제2 RNA는 상기 서열번호 8의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 5' UTR을 포함하며;
- [0085] (v) 상기 제1 RNA와 상기 제2 RNA는 상기 서열번호 9의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 3' UTR을 포함하며; 그리고
- [0086] (vi) 상기 제1 RNA와 상기 제2 RNA는 상기 서열번호 10의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 폴리-A 꼬리를 포함한다.
- [0087] 일부 구현예에서:
- [0088] (i) 상기 제1 폴리펩티드 사슬은 상기 서열번호 4의 아미노산 서열, 또는 상기 서열번호 4의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며; 및/또는
- [0089] (ii) 상기 제1 RNA는 상기 서열번호 5의 뉴클레오타이드 서열, 또는 상기 서열번호 5의 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.
- [0090] 일부 구현예에서:
- [0091] (i) 상기 제2 폴리펩티드 사슬은 상기 서열번호 6의 아미노산 서열, 또는 상기 서열번호 6의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며; 및/또는
- [0092] (ii) 상기 제2 RNA는 상기 서열번호 7의 뉴클레오타이드 서열, 또는 상기 서열번호 7의 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.
- [0093] 일 측면에서, 본 발명은 조성물 또는 의약 제제를 제공하며, 상기 조성물 또는 의약 제제는,
- [0094] (i) 서열번호 4의 아미노산 서열, 또는 상기 서열번호 4의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제1 폴리펩티드 사슬을 암호화하는 제1 RNA; 및
- [0095] (ii) 서열번호 6의 아미노산 서열, 또는 상기 서열번호 6의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제2 폴리펩티드 사슬을 암호화하는 제2 RNA를 포함한다.
- [0096] 모든 측면의 일부 구현예에서, 상기 제1 RNA는 상기 서열번호 5의 뉴클레오타이드 서열, 또는 상기 서열번호 5의 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.
- [0097] 모든 측면의 일부 구현예에서, 상기 제2 RNA는 상기 서열번호 7의 뉴클레오타이드 서열, 또는 상기 서열번호 7의 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

- [0098] 일 측면에서, 본 발명은, 서열번호 35의 뉴클레오티드 서열, 또는 상기 서열번호 35의 뉴클레오티드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 제1 RNA, 및/또는 서열번호 36의 뉴클레오티드 서열, 또는 상기 서열번호 36의 뉴클레오티드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 제2 RNA를 포함하는 조성물 또는 의약 제제를 제공한다.
- [0099] 일 측면에서, 본 발명은 서열 번호 5의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 제1 RNA, 및 서열 번호 7의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 제2 RNA를 포함하며, 상기에서 상기 제1 RNA와 상기 제2 RNA는 약 1.5:1의 제1 RNA대 제2 RNA의 비율(w/w)로 존재하는 것인 조성물 또는 의약 제제를 제공한다.
- [0100] 모든 측면의 일부 구현예에서, 상기 RNA는 mRNA이다.
- [0101] 모든 측면의 일부 구현예에서, 상기 RNA는 액체로 제형화되거나, 고체로 제형화되거나, 또는 이의 조합으로 제형화된다.
- [0102] 모든 측면의 일부 구현예에서, 상기 RNA가 제형화되거나 또는 주사 용도로 제형화하기 위한 것이다.
- [0103] 모든 측면의 일부 구현예에서, 상기 RNA는 정맥내 투여용으로 제형화되거나 또는 제형화 하기 위한 것이다.
- [0104] 모든 측면의 일부 구현예에서, 상기 RNA는 입자로 제형화되거나 또는 제형화하기 위한 것이다.
- [0105] 일부 구현예에서, 상기 입자는 지질 나노입자(LNP)이다.
- [0106] 일부 구현예에서, 상기 LNP 입자는 ((3-히드록시프로필)아잔디일)비스(노난-9,1-디일)비스(2-부틸옥타노에이트), 2-[(폴리에틸렌 글리콜)-2000]-N,N-디테트라테실아세트아미드, 1,2-디스테아로일-sn- 글리세로-3-포스포콜린 및 콜레스테롤을 포함한다.
- [0107] 모든 측면의 일부 구현예에서, 상기 조성물 또는 의약 제제는 약학적 조성물이다.
- [0108] 일부 구현예에서, 상기 약학적 조성물은 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체, 희석제 및/또는 부형제를 추가로 포함한다.
- [0109] 모든 측면의 일부 구현예에서, 상기 조성물 의약 제제는 키트이다.
- [0110] 일부 구현예에서, 상기 RNA 및 선택적으로 상기 입자 형성 성분은 별도의 바이알에 존재한다.
- [0111] 일부 구현예에서, 상기 조성물 또는 의약 제제는 암을 치료 또는 예방하기 위한 조성물 또는 의약 제제의 사용 지침서를 추가로 포함한다.
- [0112] 일 측면에서, 본 발명은 약학적 용도를 위한 본원에 기술된 조성물 또는 의약 제제에 관한 것이다.
- [0113] 일부 구현예에서, 상기 약학적 용도는 질환 또는 장애에 대한 치료학적 또는 예방학적 치료를 포함한다.
- [0114] 일부 구현예에서, 상기 질환 또는 장애의 상기 치료학적 또는 예방학적 치료는 암의 치료 예방을 포함한다.
- [0115] 일부 구현예에서, 상기 질환 또는 장애에 대한 상기 치료학적 또는 예방학적 치료는 추가적인 요법의 시술을 더 포함한다.
- [0116] 일부 구현예에서, 상기 추가적인 요법은 (i) 종양을 적출, 절제 또는 축소하기 위한 수술, (ii) 방사선요법, 및 (iii) 화학요법으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상을 포함한다.
- [0117] 일부 구현예에서, 상기 추가적인 요법은 추가의 치료학적 물질의 투여를 포함한다
- [0118] 일부 구현예에서, 상기 추가의 치료학적 물질은 치료학적 항암 물질을 포함한다.
- [0119] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 조성물 또는 의약 제제는 인간에게 투여하기 위한 것이다.
- [0120] 일 측면에서, 본 발명은 개체에서 암을 치료하는 방법을 제공하며, 상기 방법은,
- [0121] (i) CD3에 특이성을 갖는 면역글로불린으로부터 유래된 중쇄의 가변 영역 (VH(CD3)), CLDN6에 특이성을 갖는 면역글로불린으로부터 유래된 중쇄의 가변 영역 (VH(CLDN6)), 및 CLDN6에 특이성을 가진 면역글로불린으로부터 유래된 경쇄의 가변 영역 (VL(CLDN6))을 포함하는 제1 폴리펩티드 사슬을 암호화하는 제1 RNA; 및
- [0122] (ii) CD3에 특이성을 가진 면역글로불린으로부터 유래된 경쇄의 가변 영역 (VL(CD3)), CLDN6에 특이성을 가진 면역글로불린으로부터 유래된 중쇄의 가변 영역 (VH(CLDN6)), 및 CLDN6에 특이성을 가진 면역글로불린으로부터 유

래된 경쇄의 가변 영역(VL(CLDN6))을 포함하는 제2 폴리펩티드 사슬을 암호화하는 제2 RNA를 투여하는 것을 포함한다.

- [0123] 일부 구현예에서, 상기 제1 폴리펩티드 사슬은 상기 제2 폴리펩티드 사슬과 상호작용하여 CD3에 특이성을 갖는 결합 도메인과 CLDN6에 특이성을 갖는 두 개의 결합 도메인을 형성한다.
- [0124] 일부 구현예에서, 상기 제1 폴리펩티드 사슬의 상기 VH(CD3)와 상기 제2 폴리펩티드 사슬의 상기 VL(CD3)은 상호작용하여 CD3에 특이성을 갖는 결합 도메인을 형성하며,
- [0125] 상기 제1 폴리펩티드 사슬의 상기 VH(CLDN6) 및 상기 VL(CLDN6)은 상호작용하여 CLDN6에 특이성을 갖는 결합 도메인을 형성하고,
- [0126] 상기 제2 폴리펩티드 사슬의 상기 VH(CLDN6) 및 상기 VL(CLDN6)은 상호작용하여 CLDN6에 특이성을 갖는 결합 도메인을 형성한다.
- [0127] 일 측면에서, 본 발명은 개체에서 암을 치료하는 방법을 제공하며, 상기 방법은,
- [0128] (i) 가변 영역 VH(CD3), 가변 영역 VH(CLDN6) 및 가변 영역 VL(CLDN6)을 포함하는 제1 폴리펩티드 사슬을 암호화하는 제1 RNA; 및
- [0129] (ii) 가변 영역 VL(CD3), 가변 영역 VH(CLDN6) 및 가변 영역 VL(CLDN6)을 포함하는 제2 폴리펩티드 사슬을 암호화하는 제2 RNA를 포함하며,
- [0130] 상기에서, 상기 제1 폴리펩티드 사슬의 상기 VH(CD3)와 상기 제2 폴리펩티드 사슬의 상기 VL(CD3)은 상호작용하여 CD3에 특이성을 갖는 결합 도메인을 형성하고,
- [0131] 상기 제1 폴리펩티드 사슬의 상기 VH(CLDN6) 및 상기 VL(CLDN6)은 상호작용하여 CLDN6에 특이성을 갖는 결합 도메인을 형성하고,
- [0132] 상기 제2 폴리펩티드 사슬의 상기 VH(CLDN6) 및 상기 VL(CLDN6)은 상호작용하여 CLDN6에 특이성을 갖는 결합 도메인을 형성한다.
- [0133] 일부 구현예에서, 상기 제1 및 제2 폴리펩티드 사슬은 면역글로불린 또는 이의 기능적 변이체로부터 유래된 중쇄(CH1)의 불변 영역 1, 및 면역글로불린 또는 이의 기능적 변이체로부터 유래된 경쇄(CL)의 불변 영역을 포함한다.
- [0134] 일부 구현예에서, 상기 면역글로불린은 IgG1이다.
- [0135] 일부 구현예에서, 상기 IgG1은 인간 IgG1이다.
- [0136] 일부 구현예에서, 상기 제1 폴리펩티드 사슬의 상기 VH, 상기 VL, 상기 CH1은 N 말단에서 C 말단으로, VH(CD3)-CH1-VH(CLDN6)-VL(CLDN6), 또는 VH(CD3)-CH1-VL(CLDN6)-VH(CLDN6)의 순서로 배열된다.
- [0137] 일부 구현예에서 상기 CH1은 펩티드 링커에 의해 VH(CLDN6) 또는 VL(CLDN6)에 연결된다. 일부 구현예에서, 상기 펩티드 링커는 아미노산 서열 SGPGGGRS(G₄S)₂ 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다.
- [0138] 일부 구현예에서, 상기 제2 폴리펩티드 사슬의 상기 VH, 상기 VL, 상기 CL은 N 말단에서 C 말단으로, VL(CD3)-CL-VH(CLDN6)-VL(CLDN6), 또는 VL(CD3)-CL-VL(CLDN6)-VH(CLDN6)의 순서로 배열된다.
- [0139] 일부 구현예에서, 상기 CL은 펩티드 링커에 의해 상기 VH(CLDN6) 또는 VL(CLDN6)에 연결된다. 일부 구현예에서, 상기 펩티드 링커는 아미노산 서열 DVPGGGS 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다.
- [0140] 일부 구현예에서, 상기 VH(CLDN6) 및 상기 VL(CLDN6)은 펩티드 링커에 의해 서로 연결된다. 일부 구현예에서, 상기 펩티드 링커는 아미노산 서열 (G₄S)_x 또는 이의 기능적 변이체를 포함하며, 상기에서 x는 2, 3, 4, 5 또는 6이다. 일 구현예에서, 상기 펩티드 링커는 상기 아미노산 서열 (G₄S)₄ 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다.
- [0141] 일부 구현예에서, 상기 제1 폴리펩티드 사슬의 상기 CH1은 상기 제2 폴리펩티드 사슬의 상기 CL과 상호작용한다.
- [0142] 일부 구현예에서, 상기 VH(CD3)는 서열번호 4의 아미노산 27 내지 145의 아미노산 서열의 CDR1, CDR2 및 CDR3를 포함한다.

- [0143] 일부 구현예에서, 상기 VH(CD3)는 아미노산 서열 GYTFTRYT 또는 이의 기능적 변이체를 포함하는 CDR1, 아미노산 서열 INPSRGYT 또는 이의 기능적 변이체를 포함하는 CDR2, 및 아미노산 서열 ARYYDDHYSLDY 또는 이의 기능적 변이체를 포함하는 CDR3을 포함한다.
- [0144] 일부 구현예에서, 상기 VH(CD3)는 아미노산 서열 GYTFTRYT 또는 이의 기능적 변이체를 포함하는 CDR1, 아미노산 서열 INPSRGYT 또는 이의 기능적 변이체를 포함하는 CDR2, 및 아미노산 서열 ARYYDDHYCLDY 또는 이의 기능적 변이체를 포함하는 CDR3을 포함한다.
- [0145] 일부 구현예에서, 상기 VL(CD3)은 서열번호 4의 아미노산 27 내지 145의 아미노산 서열 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다.
- [0146] 일부 구현예에서, 상기 VL(CD3)은 서열번호 6의 아미노산 27 내지 132의 아미노산 서열의 CDR1, CDR2 및 CDR3를 포함한다.
- [0147] 일부 구현예에서, 상기 VL(CD3)은 아미노산 서열 SSVSY 또는 이의 기능적 변이체를 포함하는 CDR1, 아미노산 서열 DTS 또는 이의 기능적 변이체를 포함하는 CDR2, 및 아미노산 서열 QQWSSNPLT 또는 이의 기능적 변이체를 포함하는 CDR3을 포함한다.
- [0148] 일부 구현예에서, 상기 VL(CD3)은 서열번호 6의 아미노산 27 내지 132의 아미노산 서열 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다.
- [0149] 일부 구현예에서, 상기 VH(CLDN6)은 서열번호 4의 아미노산 267 내지 383의 아미노산 서열의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함한다.
- [0150] 일부 구현예에서, 상기 VH(CLDN6)은 아미노산 서열 GYSFTGYT 또는 이의 기능적 변이체를 포함하는 CDR1, 아미노산 서열 INPYNGGT 또는 이의 기능적 변이체를 포함하는 CDR2, 및 아미노산 서열 ARDYGFVLDY 또는 이의 기능적 변이체를 포함하는 CDR3을 포함한다.
- [0151] 일부 구현예에서, 상기 VH(CLDN6)은 서열번호 4의 아미노산 267 내지 383의 아미노산 서열 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다.
- [0152] 일부 구현예에서, 상기 VL(CLDN6)은 서열번호 4의 아미노산 404 내지 510의 아미노산 서열의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함한다.
- [0153] 일부 구현예에서, 상기 VL(CLDN6)은 서열번호 4의 아미노산 404 내지 510의 아미노산 서열의 CDR1, CDR2 및 CDR3, 및 CDR1에 대한 위치 +15 (서열번호 4의 위치 449에 해당)에 세린 잔기를 포함한다.
- [0154] 일부 구현예에서, 상기 VL(CLDN6)은 서열번호 4의 아미노산 404 내지 510의 아미노산 서열의 CDR1, CDR2 및 CDR3, 및 CDR2에 대한 위치 -3 (서열번호 4의 위치 449에 해당)에 세린 잔기를 포함한다.
- [0155] 일부 구현예에서, 상기 VL(CLDN6)은 서열번호 4의 아미노산 404 내지 510의 아미노산 서열의 CDR1, CDR2 및 CDR3, 서열번호 4의 아미노산 404 내지 510의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90 %, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 서열, 및 서열번호 4의 위치 449에 해당하는 위치에 세린 잔기를 포함한다.
- [0156] 일부 구현예에서, 상기 VL(CLDN6)은 아미노산 서열 SSVSY 또는 이의 기능적 변이체를 포함하는 CDR1, 아미노산 서열 STS 또는 이의 기능적 변이체를 포함하는 CDR2, 및 아미노산 서열 QQRSNYPWT 또는 이의 기능적 변이체를 포함하는 CDR3을 포함한다.
- [0157] 일부 구현예에서, 상기 VL(CLDN6)은 서열번호 4의 아미노산 404 내지 510의 아미노산 서열 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다.
- [0158] 일부 구현예에서, 상기 VH(CD3)는 서열번호 4의 아미노산 27 내지 145의 아미노산 서열의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하고, 상기 VL(CD3)은 서열번호 6의 아미노산 27 내지 132의 아미노산 서열의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하며, 상기 VH(CLDN6)은 서열번호 4의 아미노산 267 내지 383의 아미노산 서열의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하고, 상기 VL(CLDN6)은 서열번호 4의 아미노산 404 내지 510의 아미노산 서열의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하며, 그리고 바람직하게는 CDR1에 대한 위치 +15(서열번호 4의 위치 449에 해당)에 세린 잔기 및/또는 CDR2에 대한 위치 -3(서열번호 4의 위치 449에 해당)에 세린 잔기를 포함한다.
- [0159] 일부 구현예에서, 상기 VH(CD3)는 서열번호 4의 아미노산 27 내지 145의 아미노산 서열 또는 이의 기능적 변이체를 포함하고,

- [0160] 상기 VL(CD3)은 서열번호 6의 아미노산 27 내지 132의 아미노산 서열 또는 이의 기능적 변이체를 포함하고,
- [0161] 상기 VH(CLDN6)은 서열번호 4의 아미노산 267 내지 383의 아미노산 서열 또는 이의 기능적 변이체를 포함하고, 및/또는
- [0162] 상기 VL(CLDN6)은 서열번호 4의 아미노산 404 내지 510의 아미노산 서열 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다.
- [0163] 일부 구현예에서, 상기 제1 폴리펩티드 사슬은 서열번호 4의 아미노산 서열 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다.
- [0164] 일부 구현예에서, 상기 제2 폴리펩티드 사슬은 서열번호 6의 아미노산 서열 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다.
- [0165] 일부 구현예에서, 상기 제1 폴리펩티드 사슬은 서열번호 4의 아미노산 서열 또는 이의 기능적 변이체를 포함하고, 상기 제2 폴리펩티드 사슬은 서열번호 6의 아미노산 서열 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다.
- [0166] 일부 구현예에서, 상기 제1 폴리펩티드와 상기 제2 폴리펩티드 중 적어도 하나는 코돈-최적화된 암호화 서열 및/또는 야생형 암호화 서열에 비해 G/C 함량이 증가된 암호화 서열에 의해 암호화되며, 상기에서 상기 코돈-최적화 및/또는 상기 G/C 함량의 상기 증가는 바람직하게는 상기 암호화된 아미노산 서열의 서열을 변화시키지 않는다.
- [0167] 일부 구현예에서, 상기 제1 폴리펩티드 및 상기 제2 폴리펩티드 각각은 코돈-최적화된 암호화 서열 및/또는 야생형 암호화 서열에 비해 G/C 함량이 증가된 암호화 서열에 의해 암호화되며, 상기에서 상기 코돈-최적화 및/또는 상기 G/C 함량의 상기 증가는 바람직하게는 상기 암호화된 아미노산 서열의 서열을 변화시키지 않는다.
- [0168] 일부 구현예에서, 상기 RNA는 우리딘 대신에 변형된 뉴클레오시드를 포함한다. 이러한 경우에, 바람직하게는 상기 RNA 내 각각의 또는 본질적으로 각각의 우리딘 대신에 변형된 뉴클레오시드가 존재한다.
- [0169] 일부 구현예에서, 상기 변형된 뉴클레오시드는 슈도우리딘 (Ψ), N1-메틸-슈도우리딘 (m1 Ψ) 및 5-메틸-우리딘 (m5U)으로부터 선택된다.
- [0170] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 RNA는 5' 캡 $m_2^{7,3'-0} \text{Gppp}(m_1^{2'-0})\text{ApG}$ 를 포함한다.
- [0171] 일부 구현예에서, 각각의 RNA는 5' 캡 $m_2^{7,3'-0} \text{Gppp}(m_1^{2'-0})\text{ApG}$ 를 포함한다.
- [0172] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 RNA는 서열번호 8의 뉴클레오티드 서열, 또는 상기 서열번호 8의 뉴클레오티드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 5' UTR을 포함한다.
- [0173] 일부 구현예에서, 각각의 RNA는 서열번호 8의 뉴클레오티드 서열, 또는 상기 서열번호 8의 뉴클레오티드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 5' UTR을 포함한다.
- [0174] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 RNA는 서열번호 9의 뉴클레오티드 서열, 또는 상기 서열번호 9의 뉴클레오티드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 3' UTR을 포함한다.
- [0175] 일부 구현예에서, 각각의 RNA는 서열번호 9의 뉴클레오티드 서열, 또는 상기 서열번호 9의 뉴클레오티드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 3' UTR을 포함한다.
- [0176] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 RNA는 폴리-A 서열을 포함한다.
- [0177] 일부 구현예에서, 각각의 RNA는 폴리-A 서열을 포함한다.
- [0178] 일부 구현예에서, 상기 폴리-A 서열은 적어도 100개의 뉴클레오티드를 포함한다.
- [0179] 일부 구현예에서, 상기 폴리-A 서열은 서열번호 10의 뉴클레오티드 서열을 포함하거나 이로 이루어진다.
- [0180] 일부 구현예에서:
- [0181] (i) 상기 제1 RNA 및 상기 제2 RNA는 약 1.75:1 내지 약 1.25:1, 또는 약 1.5:1 내지 약 1.25:1, 또는 바람직

하계는 약 1.5:1의 (w/w) 비율이고; 및/또는

- [0182] (ii) 상기 제1 RNA와 상기 제2 RNA는 각 우리딘 대신에 변형된 뉴클레오시드를 포함하며; 및/또는
- [0183] (iii) 상기 제1 RNA 및 상기 제2 RNA는 각 우리딘 대신 변형된 뉴클레오시드를 포함하며, 상기에서 상기 변형된 뉴클레오시드는 슈도우리딘(Ψ), N1-메틸-슈도우리딘(m1 Ψ) 및 5-메틸-우리딘(m5U)으로부터 독립적으로 선택되며; 및/또는
- [0184] (iv) 상기 제1 RNA와 상기 제2 RNA는 5' 캡 $m_2^{7,3'-0}Gppp(m_1^{2'-0})ApG$ 를 포함하며; 및/또는
- [0185] (v) 상기 제1 RNA와 상기 제2 RNA는 상기 서열번호 8의 뉴클레오티드 서열, 또는 상기 서열번호 8의 뉴클레오티드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 5' UTR을 포함하며; 및/또는
- [0186] (vi) 상기 제1 RNA와 상기 제2 RNA는 상기 서열번호 9의 뉴클레오티드 서열, 또는 상기 서열번호 9의 뉴클레오티드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 3' UTR을 포함하며; 및 /또는
- [0187] (vii) 상기 제1 RNA와 상기 제2 RNA는 상기 서열번호 10의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리-A 꼬리를 포함한다.
- [0188] 일부 구현예에서:
- [0189] (i) 상기 제1 RNA와 상기 제2 RNA는 약 1.75:1 내지 약 1.25:1, 또는 약 1.5:1 내지 약 1.25:1, 또는 바람직하게는 약 1.5:1의 (w/w) 비율이며;
- [0190] (ii) 상기 제1 RNA와 상기 제2 RNA는 각 우리딘 대신에 변형된 뉴클레오시드를 포함하며, 상기에서 상기 변형된 뉴클레오시드는 N1-메틸-슈도우리딘(m1 Ψ)이며;
- [0191] (iii) 상기 제1 RNA와 상기 제2 RNA는 5' 캡 $m_2^{7,3'-0}Gppp(m_1^{2'-0})ApG$ 를 포함하며;
- [0192] (iv) 상기 제1 RNA와 상기 제2 RNA는 상기 서열번호 8의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 5' UTR을 포함하며;
- [0193] (v) 상기 제1 RNA와 상기 제2 RNA는 상기 서열번호 9의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 3' UTR을 포함하며; 그리고
- [0194] (vi) 상기 제1 RNA와 상기 제2 RNA는 상기 서열번호 10의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리-A 꼬리를 포함한다.
- [0195] 일부 구현예에서:
- [0196] (i) 상기 제1 폴리펩티드 사슬은 상기 서열번호 4의 아미노산 서열, 또는 상기 서열번호 4의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며; 및/또는
- [0197] (ii) 상기 제1 RNA는 상기 서열번호 5의 뉴클레오티드 서열, 또는 상기 서열번호 5의 뉴클레오티드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.
- [0198] 일부 구현예에서:
- [0199] (i) 상기 제2 폴리펩티드 사슬은 상기 서열번호 6의 아미노산 서열, 또는 상기 서열번호 6의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며; 및/또는
- [0200] (ii) 상기 제2 RNA는 상기 서열번호 7의 뉴클레오티드 서열, 또는 상기 서열번호 7의 뉴클레오티드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.
- [0201] 일 측면에서, 본 발명은 개체에 암을 치료하는 방법을 제공하며, 상기 방법은,
- [0202] (i) 서열번호 4의 아미노산 서열, 또는 상기 서열번호 4의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제1 폴리펩티드 사슬을 암호화하는 제1 RNA; 및
- [0203] (ii) 서열번호 6의 아미노산 서열, 또는 상기 서열번호 6의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%,

95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제2 폴리펩티드 사슬을 암호화하는 제2 RNA를 상기 개체에 투여하는 것을 포함한다.

- [0204] 모든 측면의 일부 구현예에서, 상기 제1 RNA는 상기 서열번호 5의 뉴클레오티드 서열, 또는 상기 서열번호 5의 뉴클레오티드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.
- [0205] 모든 측면의 일부 구현예에서, 상기 제2 RNA는 상기 서열번호 7의 뉴클레오티드 서열, 또는 상기 서열번호 7의 뉴클레오티드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.
- [0206] 일 측면에서, 본 발명은 개체에서 암을 치료하는 방법을 제공하며, 상기 방법은, 서열번호 35의 뉴클레오티드 서열, 또는 상기 서열번호 35의 뉴클레오티드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 제1 RNA, 및/또는 서열번호 36의 뉴클레오티드 서열, 또는 상기 서열번호 36의 뉴클레오티드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 제2 RNA를 상기 개체에 투여하는 것을 포함한다.
- [0207] 일 측면에서, 본 발명은 개체에서 암을 치료하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 서열 번호 5의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 제1 RNA, 및 서열 번호 7의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 제2 RNA를 상기 개체에 투여하는 것을 포함하며, 상기에서 상기 제1 RNA와 상기 제2 RNA는 약 1.5:1의 제1 RNA대 제2 RNA의 비율(w/w)로 존재한다.
- [0208] 모든 측면의 일부 구현예에서, 상기 RNA는 mRNA이다.
- [0209] 모든 측면의 일부 구현예에서, 상기 RNA는 액체로 제형화되거나, 고체로 제형화되거나, 또는 이의 조합으로 제형화된다.
- [0210] 모든 측면의 일부 구현예에서, 상기 RNA가 주사로 투여된다.
- [0211] 모든 측면의 일부 구현예에서, 상기 RNA는 매주 1회 투여된다.
- [0212] 모든 측면의 일부 구현예에서, 상기 RNA는 정맥 투여로 투여된다.
- [0213] 모든 측면의 일부 구현예에서, 상기 RNA는 입자로 제형화된다.
- [0214] 일부 구현예에서, 상기 입자는 지질 나노입자(LNP)이다.
- [0215] 일부 구현예에서, 상기 LNP 입자는 ((3-(히드록시프로필)아잔디일)비스(노난-9,1-디일)비스(2-부틸옥타노에이트), 2-[(폴리에틸렌 글리콜)-2000]-N,N-디테트라데실아세트아미드, 1,2-디스테아로일-sn- 글리세로-3-포스포콜린 및 콜레스테롤을 포함한다.
- [0216] 모든 측면의 일부 구현예에서, 상기 RNA는 약학적 조성물로 제형화된다.
- [0217] 일부 구현예에서, 상기 약학적 조성물은 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체, 희석제 및/또는 부형제를 추가로 포함한다.
- [0218] 모든 측면의 일부 구현예에서, 상기 방법은 추가적인 요법을 투여하는 것을 더 포함한다.
- [0219] 일부 구현예에서, 상기 추가적인 요법은 (i) 종양을 적출, 절제 또는 축소하기 위한 수술, (ii) 방사선요법, 및 (iii) 화학요법으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상을 포함한다.
- [0220] 일부 구현예에서, 상기 추가적인 요법은 추가의 치료학적 물질의 투여를 포함한다
- [0221] 일부 구현예에서, 상기 추가의 치료학적 물질은 치료학적 항암 물질을 포함한다.
- [0222] 모든 측면의 일부 구현예에서, 상기 개체는 인간이다.
- [0223] 모든 측면의 일부 구현예에서, 상기 암은 CLDN6-양성 암이다.
- [0224] 일 측면에서, 본 발명은 본원에 개시된 방법에 사용하기 위한 본원에 개시된 조성물 또는 의약 제제를 제공한다.
- [0225] 일 측면에서, 본 발명은 본원에 개시된 방법에 사용하기 위한 본원에 개시된 제제 또는 조성물과 관련된다.

도면의 간단한 설명

도 1: RNA 약물 물질 BNT142의 일반 구조

5'-캡(여기서는 "캡 1"), 5'- 및 3'-UTR을 갖는 RNA 약물 물질의 일반적인 구조에 대한 개략도.

CH = 불변 중쇄 도메인; CL = 불변 경쇄 도메인; DS = 약물 물질; L = 링커; m = 메신저; Sec = 분비 신호 펩티드 서열; 폴리(A) = 폴리 아데닌 꼬리; RNA = 리보핵산; UTR = 비번역 영역; V_H = 가변 중쇄 도메인; V_L = 가변 경쇄 도메인.

도 2: RiboMab02.1은 인간 CD3 및 CLDN6에 특이적으로 결합하고 밀접하게 관련된 CLDN3, 4 및 9 또는 비인간 영장류 CD3에 대한 표적외 (off-target) 결합을 나타내지 않는다.

RiboMab02.1의 표적화 결합은 APC-표지된 염소 항-마우스 IgG(중쇄 및 경쇄 [H+L]) 2차 항체를 사용하는 유세포 분석 결합 검정에 의해 결정되었다. 세포가 먼저 싱글렛에 대해 게이팅된 후, 생존 림프구(PBMC) 또는 생존 HEK-293T-17 세포에 대해 게이팅되었다. 10 µg/mL 농도의 HEK-293T-17 상층액 중 RiboMab02.1이 사용되었다. 시노물구스 원숭이 또는 인간 PBMC 및 루시퍼라제(HEK-293T-17_mock), CLDN3, 4, 6 또는 9를 안정적으로 발현하는 HEK-293T-17 형질도입물은 표시된 대로 표적 세포 역할을 했다. 점선 수직선은 염색되지 않은 모집단의 피크 위치를 표시한다.

APC = 알로피코시아닌; CLDN = 클라우딘; HEK = 인간 배아 신장; PBMC = 말초 혈액 단핵 세포.

도 3: 마우스에서 발현된 RiboMab02.1은 다중 PBMC 공여자를 사용하여 시험관 내에서 용량 의존적 및 표적 특이적 종양 세포 용해를 매개한다.

8명의 건강한 공여자로부터 얻은 인간 PBMC를 루시퍼라제 발현 종양 세포와 공동 배양했다. CLDN6-양성 PA 1(A) 또는 OV 90(B) 세포주를 표적 세포로 사용하고, CLDN6-음성 MDA-MB-231(A, B) 세포주를 표적 특이성을 제어하기 위해 사용했다. 이 검정은 효과기 대 표적 세포 비율이 20:1인 384웰 플레이트 형식으로 수행되었다. 생존 종양 세포의 생물발광을 판독값으로 측정했다. 종양 세포 사멸의 특이적 용해 비율이 제시된다. RiboMab02.1 함유 마우스 혈청을 연속 희석(10배, 10포인트; 범위: 5.0×10^{-7} 내지 500ng/mL)하고 공동 배양물에 첨가한 후 (A) 24 시간 동안 PA 1 세포로 인큐베이션 하거나 또는 (B) 48시간 동안 OV 90 세포로 인큐베이션 했다. 각 라인은 개별 공여자의 PBMC 샘플을 사용한 종양 세포 용해를 나타낸다. 오차 막대는 평균(기술적 삼중)의 표준 편차(SD)를 나타낸다.

CDLN = 클라우딘; EC_{50} = 절반 최대 유효농도, PBMC = 말초 혈액 단핵 세포.

도 4: RiboMab02.1은 용량 의존적 및 표적 의존적 T 세포 증식을 유도한다.

세 명의 건강한 공여자로부터 얻은 CFSE 표지 인간 PBMC를 CLDN6-양성 PA 1 및 OV 90 표적 세포 또는 CLDN6-음성이지만 대조군 TAA 양성 NUGC-4 및 표적 음성 MDA-MB-231 대조군 세포와 12웰 배양 플레이트 형식으로 공동 배양했다. 10:1의 효과기 대 표적 세포 비율이 적용되었다. 또한, (-) 표적 세포가 없는 PBMC도 별도로 포함하였다. 100 및 1ng/mL의 RiboMab02.1(5개 컬럼의 각 블록의 1번째 및 2번째 컬럼)- 또는 대조군 RiboMab(5개 컬럼의 각 블록의 3번째 및 4번째 컬럼)-함유 HEK-293T-17 상층액이 표시된 대로 상기 공동 배양물에 첨가되었다. OKT3 항체(항-인간 CD3; 검은색 막대)는 표적 독립적 CD3 유도 T 세포 증식에 대한 양성 대조군 역할을 했다. 72시간 인큐베이션 후, 증식하는 T 세포의 백분율을 유세포 분석법으로 분석했다. 오차 막대는 세 명의 공여자 모두에 대한 평균의 표준 편차(SD)를 나타낸다.

CFSE = 카르복시플루오레세인 숙신이미딜 에스테르; PBMC = 말초 혈액 단핵 세포; w/o = 미포함.

도 5: RiboMab02.1은 고농도에서 낮은 표적 독립적 효과로 용량 의존적 T 세포 활성화를 매개한다.

3명의 건강한 공여자(효과기 세포)로부터의 인간 PBMC를 CLDN6-양성 PA1 세포(표적 세포)의 존재 및 부재 하에 10:1의 효과기 대 표적세포 비율로 배양하였다. RiboMab02.1-함유 마우스 혈청을 검정에 사용하기 전에 연속적으로 희석하였다 (10배, 10포인트; 범위: 4.0×10^{-6} 내지 4,000ng/mL). 48시간의 공동 배양 후, T 세포의 유세포 분석을 위해 세포를 항-CD5, 항-CD69 및 항-CD25 항체로 염색했다. 여기에는 Luc_RNA-LNP 처리 마우스의 모의 혈청과 함께 인큐베이션된 샘플로 표준화된 총 T 세포 활성화가 도시된다. 활성화된 T 세포의 백분율은 각 개별 공여자(좌측)와 세 공여자 모두(우측)에 대한 평균으로 표시된다. 채워진 기호는 표적 세포가 있으며 검은

색으로 나타내며, 채워지지 않은 기호는 표적 세포가 없음을 나타낸다. 오차 막대는 평균의 표준 편차(SD) (기술적 삼중[공여자별, 좌측 패널] 또는 생물학적 복제물[공여자 전체, 우측 패널])을 나타낸다.

EC₅₀ = 절반 최대 유효농도; w/o = 미포함.

도 6: BNT142 처리는 종양으로의 T 세포 방향전환(T-cell redirection)에 의해 PBMC 인간화 NSG 마우스에서 진행성 이종이식 종양을 제거한다.

OV-90 세포(처리 시작 시 평균 종양 부피 = 100mm³)의 진행된 SC 종양 이종이식편을 보유한 NSG 마우스에 IP 주사를 통해 효과기 세포로서 인간 PBMC를 이식했다. 종양 부피는 디지털 캘리퍼스를 사용하여 주당 2회 측정되었다. 마우스를 0.1 또는 1μg BNT142 또는 표적과 무관한 RiboMab 트리바디 (표적 특이성에 대한 음성 대조군)를 암호화하는 RNA-LNP 1μg, Luc_RNA-LNP 1μg, 재조합 정제된 CD3 x(CLDN6)₂ 트리바디 참조 단백질 100μg, 또는 비히클 대조군으로 DPBS(식염수)를 매주 5회 IV 볼루스 주사로 처리했다. (A) 처리 일정. (B) 지정된 시점에서 개별 마우스의 종양 부피. (C) 그룹당 중앙 종양 부피의 개요로서, 각 그룹은 연구 시작 시 13 내지 14마리의 마우스로 구성되고 마지막 데이터 지점에서는 최소 5마리의 마우스로 구성된다. 수직 점선은 검사/대조군 항목의 IV 투여 시점을 나타낸다. 모든 그룹의 마우스 4마리(0.1μg BNT142 그룹의 마우스 5마리)를 38일에 안락사시켜 생체의 검증을 위한 샘플을 얻었다. (D) 항-인간 CD3 항체를 사용한 면역조직화학적(IHC) 염색에 의해 결정된 이종이식 조직 mm²당 CD3-양성 세포의 수. 종양 이종이식편은 세 번째 처리 후 72시간 후에 해부되었다(38일째). 수평선은 평균을 나타낸다(n = 4 내지 5). (E) 항-인간 CLDN6 항체를 사용한 IHC 염색에 의해 결정된, 각각의 검사군 및 대조군으로부터의 마우스의 종양 이종이식편 내 CLDN6-양성 세포의 백분율. 종양 이종이식편은 연구 과정 동안 다양한 시점에서 해부되었다. 수평선은 평균을 나타낸다(n = 8 내지 10). (F) BNT142 처리된 OV-90 종양 이종이식편 및 세 번째 처리 72시간 후(38일째) 안락사시킨 대조군 마우스에서 인간 CD3(상부 패널) 및 CLDN6(하부 패널) 염색의 대표적인 IHC 사진. 적갈색 염색(흑백 도면에서 어두운 부분)은 양성 IHC 신호를 나타내고, 청자색 영역은 양성 염색이 없음(음성 IHC 신호)을 나타낸다. 스케일 바의 길이는 패널에 표시된 대로이다(BNT142 및 참조 단백질 그룹: 1,000 μm, 음성 대조군/Luc_RNA-LNP 및 식염수 그룹: 2,000 μm).

CD = 분화 클러스터; CLDN = 클라우딘; Ctrl = 제어; IP = 복강내; IV = 정맥내; LNP = 지질 나노입자; Luc = 루시페라제 암호화; neg. = 음성; NSG = NOD.Cg-Prkd^{scid} IL2rg^{tm1Wjl}/SzJ; PBMC = 말초 혈액 단핵 세포; RNA = 리보핵산; SC = 피하.

도 7: RiboMab02.1은 용량 및 표적 의존 방식으로 인간 사이토카인을 유도한다.

다양한 농도의 RiboMab02에 의해 구동되는 인간 사이토카인(IFNγ, TNFα, IL6, IL2, IL10 및 IL1β) 생산을 결정하기 위해, T 세포 활성화 검정(상기 도 5 참조)의 세포 배양 상층액이 맞춤형 멀티플렉스 ELISA 키트와 함께 사용되었다. 각 공여자에 대한 사이토카인 농도 값(기술적 삼중의 수단)이 표시된다. 채워진 기호는 표적 세포를 포함한 값을 나타내는 반면, 채워지지 않은 기호는 표적세포가 없는 값을 나타낸다.

IFN = 인터페론; IL = 인터루킨; TNF = 종양 괴사 인자; w/o = 미포함.

도 8: BNT142-처리된 PBMC-인간화 NSG 마우스에서 인간 사이토카인 방출을 유도하지 않는다.

피하 이종이식 종양이 있는 NSG/PBMC 마우스(상기 도 6 참조)의 혈청은, 표적 특이성 (음성. 대조군), 1μg Luc_RNA-LNP 대조군 또는 100μg CD3 x(CLDN6)₂ 트리바디 참조 단백질을 제어하기 위해, 0.1 또는 1μg BNT142, 표적-미관련 RiboMab 트리바디를 암호화하는 1μg의 RNA-LNP를 세 번째 주사한 후, 6시간 및 72시간 후에 추가로 평가되었다. 1μg BNT142를 투여한 추가적인 비종양 보유(종양 없음) 그룹이 포함되었다. (A) 6시간(n = 8) 및 72시간(n = 4) 시점에서 멀티플렉스 ELISA로 결정된 마우스 혈청 내 인간 사이토카인(IFN-γ, IL-6, IL-2, IL-10, TNF-α 및 IL-1β) 농도. 데이터는 각 시점의 식염수 투여 동물에 대해 정규화되었다. 수평선은 중앙값을 나타낸다. 쌍을 이루지 않은 샘플과 쌍을 이루는 샘플은 맨-휘트니U 검정 (Mann Whitney U test) 또는 윌콕슨 부호-순위 검정 (Wilcoxon signed-rank test)를 사용하여 각각 비교되었다. (B) 암호화된 치료 항체 RiboMab02.1의 혈청 농도. 수평선은 수단을 나타낸다.

***, p = 0.0002; Ctrl = 대조군; h = 시간; IFN = 인터페론; IL = 인터루킨; LNP = 지질 나노입자; Luc = 루시페라제 암호화; neg. = 음성; ns = 중요하지 않음; RNA = 리보핵산; TNF = 종양 괴사 인자; w/o = 미포함.

도 9: LNP 제형의 mRNA의 생체내 간 표적화

Balb/cJRj 마우스에 LNP 제형의 반딧불 루시퍼라제 mRNA를 IV 주사로 1회 투여하였다. 투여 후 6시간, 24시간, 48시간, 72시간 및 144시간 경과 시점에 생발광을 모니터링하였다. (A) 투여 후 6시간 경과 시점에 개개 마우스의 복부 위치(좌측)(n=5)에서, 동물 1번 및 2번의 하나의 장기(우측)에서의 생발광 사진을 도시한다. (B) 루시퍼라제 신호의 정량화(광자/초)는 모든 분석 시점에 표시된다(n = 5 또는 3, 평균).

IV = 정맥내; LN = 림프절; LNP = 지질 나노입자.

도 10: BNT142에 의해 암호화된 RiboMab02.1은 생체 내에서 효율적으로 발현된다.

암컷 Balb/cJRj 마우스(n = 3)에 마우스당 30 µg BNT142의 IV 볼루스 주사를 투여했다. 투여 후 2시간 및 6시간 후에 혈청을 수집했다. (A) ELISA에 의한 혈청 내 RiboMab02.1 농도의 정량화. 수평선은 평균을 나타낸다. (B) RiboMab02.1 함유 혈청 및 완충액 또는 스파이크된 Balb/cJRj 혈청 중 참조 단백질(단량체, HMW)의 웨스턴 블롯 분석이 비환원 조건 하에서 분석되었다. 혈청-단백질 정제 단계 후에 레인당 총 60ng의 단백질이 로딩되었다. 처리되지 않은 마우스의 혈청이 대조군으로 사용되었다. 웨스턴 블롯은 서양고추냉이 과산화효소 (horseradish peroxidase: HRP)-접합 염소-항-인간 IgG Fd 항체를 사용하여 수행되었다.

Ab = 항체; Ctrl = 대조군; Fd = 단편 검출가능; HMW = 고분자량; HPI = 주사 후 시간; ID = 식별번호; IgG = 면역글로불린 감마; kDa = 킬로달톤; MW = 분자량.

도 11: 마우스의 반복적인 BNT142 투여에 의한 지속가능한 RiboMab02.1 노출 및 용량 의존적 항약물 항체 반응

암컷 Balb/cJRj 마우스(n = 4)에게 대조군으로 10 또는 30 µg BNT142 또는 30 µg Luc_RNA-LNP를 매주 1회 IV 주사하여, 수평 점선으로 표시된 시점에 총 5회 투여했다. 마우스로부터의 혈액이 기준선(0시간), 각 BNT 142 또는 식염수 투여 후 6시간 시점(6, 174, 342, 510 및 678시간) 및 각 BNT 142 또는 식염수 투여 전 24시간 시점 (144, 312, 480 및 648시간)에 마우스로부터 혈액을 채취했다. 첫 번째 BNT142/식염수 투여 후 816시간 후에 최종 혈액 채취가 이루어졌다. 혈청 RiboMab02.1 농도는 ELISA에 의해 결정되었다. 오차 막대는 평균의 표준 편차(SD)를 나타낸다.

LNP = 지질 나노입자; Luc = 루시퍼라제; RNA = 리보핵산.

도 12: BNT142의 IV 주사 후 시노물구스 원숭이에서의 RiboMab02.1 노출

BNT142 용량 코호트 및 식염수 대조군은 각각 3마리의 시노물구스 원숭이로 구성되었으며, 이들로부터 혈액을 채취하여 ELISA에 의해 RiboMab02.1 농도를 평가하기 위한 혈청을 제조했다. 오차 막대는 평균(기술적 삼중)의 표준 편차(SD)를 나타낸다.

도 13: RiboMab02.1은 고도로 단량체이며 대체 리드 구조 후보인 RiboMab_712/711 C53W보다 마우스에서 더 낮은 ADA 반응을 유도한다.

암컷 Balb/cJRj에 RiboMab02.1 또는 RiboMab_712/711 또는 루시퍼라제(대조군)를 암호화하는 30 µg RNA-LNP를 IV 주사했다. (A) 주사 후 6시간 후 시점에 혈청을 채취했다. 50ng의 정제된 단백질 참조(단량체 및 HMW 참조)를 마우스 혈청에 첨가했다. 미처리(모의)의 루시퍼라제 RNA가 주입된(대조군) 또는 RiboMab RNA가 주입된 마우스의 5 µL 혈청과 스파이크된 참조가 멜론겔(Melon G) 정제하고, 4 내지 15%의 크리테리온 (Criterion)겔에서 비환원 조건 하에서 분리했다. HRP-접합 염소 항-인간 IgG Fd 항체를 사용하여 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다. 그룹당 하나의 대표 마우스 샘플이 표시된다. (B) ADA 분석을 위해 혈청을 표시된 시점에 샘플링했다. 혈청 샘플을 샌드위치 ELISA 검정을 통해 항-RiboMab ADA 함량에 대해 분석했다. ADA 반응(검은 선)은 시간 경과에 따른 RiboMab 단백질 농도(회색 점선)에 대해 표시된다. RiboMab_712/711 C53W 변형체(상단) 및 RiboMab02.1(하단)이 표시된다. 오차 막대는 평균의 표준 편차를 표시한다(n = 4).

Ab = 항체; ADA = 항약물 항체; C53S/W = 항-CLDN6 VL 모이어티의 위치 53에서 시스테인을 세린/트립토판으로 치환; Fd = 단편 디퍼컬트(fragment difficult); HMW = 고분자량; IgG = 면역글로불린 G; kDa = 킬로 달톤; MW = 분자량; RU = 상대 단위.

도 14: RiboMab02.1-암호화 약물 물질 중간체의 HC:LC 중량비는 RiboMab02.1의 발현 효율 및 단량체 함량에 영향을 미친다.

HEK-293T-17 세포를 각각 RiboMab02.1 중쇄(HC) 및 경쇄(LC)를 암호화하는 2개의 RiboMab02.1-암호화 약물 물질 중간체(RNA)의 표시된 중량(w/w) 비율로 전기천공했다. 세포 배양 상층액(SN)을 형질감염 48시간 후에 수확

했다. (A) 비환원 조건 하에서 RiboMab02.1-함유 SN 및 참조 단백질(단량체, HMW)의 웨스턴 블롯 분석. 형질감염되지 않은 세포의 SN은 음성 대조군(모의 SN)으로 사용되었다. 검출을 위해 HRP-접합 염소-항-인간 카파 경쇄(1:500)와 IgG Fd(1:2,000) 항체의 조합을 사용하여 웨스턴 블롯을 수행했다. (B) 2개의 독립적인 실험으로부터의 기술적 중복의 SN 샘플 내 평균 RiboMab02.1 농도를 ELISA로 분석하였다. 오차 막대는 평균의 표준 편차(SD)를 나타낸다.

Ab = 항체; Fd = 단편 검출 가능; HC = 중쇄-암호화 RNA; HMW = 고분자량; IgG = 면역글로불린 감마; kDa = 킬로달톤; MW = 분자량; LC = 경쇄-암호화 RNA; LMW = 저분자량; RNA = 리보핵산; SN = 상층액.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

서열 설명

다음 표 1은 본 명세서에 언급된 특정 서열의 목록을 제공한다.

표 1

서열 설명	
호설명	서열
클라우딘-6 (CLDN6)	
	MASAGMIILGVVLTLLGWVNLVSCALPMWKVTAFIGNSI VVAQVWVWGLWMSVQSTGQMCKVYDSLALPQDLQAARALCVIALLVALFGLLVYLAGAKCTTCVEEKDSKARLVLTSGIVFVISGVLTLIPVCWTAHAIRDFYNPLVAEAQKREL GASLYLGWAASGLLLGGGLLCTCPSGGSQGPSHYMARYSTSAPAI SRGPSEYPTKNYV
	MASAGMIILGVVLTLLGWVNLVSCALPMWKVTAFIGNSI VVAQVWVWGLWMSVQSTGQMCKVYDSLALPQDLQAARALCVIALLVALFGLLVYLAGAKCTTCVEEKDSKARLVLTSGIVFVISGVLTLIPVCWTAHAVIRDFYNPLVAEAQKREL GASLYLGWAASGLLLGGGLLCTCPSGGSQGPSHYMARYSTSAPAI SRGPSEYPTKNYV
CD3 엡실론	
	MQSGTHWRVLGLCLLSVGWVGQDGNEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNI GGDDEDDKNI GSDDEHLSLKEFSELEQSGYVVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMEMDMVSVATIVIVDICITGGLLLVYYWSKNRKAKAKPVTRGAGAGGRQGRQNKERPPPVPNPDIYPIRKGQRDLYSGLNQRRRI
RiboMab02.1 HC - 제1폴리펩티드(Fd)	
아미노산 서열	MRVMAPRTL ILLLSGALALTETWAGSQVQLQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVKQRPQGQLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYSLDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCSGPGGGRSGGGGSGGGGSEVQLQSGPELVKPGASMKISCKASGYSTFTGTMTNWVKQSHGKCLEWIGLINPYNGGTIYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSTLSEDSAVYYCARDYGFVLDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSIQLTQSPSISMSVSPGEKVTITCSASSSVSYMHWFQKPGTSPKLSIYSTSNLASGVPARFSGRSGTYSYSLTISRVAEDAATYYCQQRSNYPPTFGCGTKLEIK
mRNA 서열	AGAAUAAACUAGUAUUCUUCUGUCCCCACAGACUCAGAGAGAACCCGCCACCAUGAGAGUGAUGGCCCUAGAACACUGAUCCUGCUGCUGUCUGUGGCCUGGCUCUGACAGAAACAUUGGCCGGAUCUCAGGUGCAGCUCCAGCAAUUCUGGUGCCGAACUUGCUAGACCUUGCGGCCUCCGUGAAGAUGAGCUGUAAAACAGCGGCUCACACCUACACACGCUACACCAUGCAGUGGUGAACAGCAGAGGCCUGGACAGGGCCUUGAGUGGACUGGCUACAUCAACCCAGCGGGGCUACACCAACUACAACAGAGUUAAGGACAAAGGCCACACUGACCACCGACAAGAGCAGCAGCACAGCCUACAUGCAGCUGAGCAGCCUGACCAGCGAAGAUAGCGCCGUGUACUACUGCGCCCGUACUACGACGAUCACUACAGCCUGGAUUAUGGGGCCAGGGAACAACCCUGACAGUGUCUAGCGCCAGCACCAAGGGACCUAGCGUUUCCACUGGCUCUCCAGCAGCAAGAGCACAUUCUGUGGAACAGCCGCUUGGGCUGCCUGGUAAGGAUUAUCCCGAGCCUGUGACCGUGUCCUGGAAUUCUGGCGCUCUGACAAGCGGCGUGACACCUUCCAGCCGUGCUGAAAGCAGCGGCCUGUACUCUCUGAGCAGCGUGGUCACAGUGCCUAGCUCUAGCCUGGGCACCCAGACC UACAUCUGCAAUUGUGAACCACAAGCCUAGCAACACCAAGGUGGACAAGAGAGUGGAACCCAAAGAGCUGUUCUGGACCCGCGGAGGAAGAU CUGGCGGAGGCGGUUCUGGUGGCGGAGGAUCUGAAGUUCAGCUGCAACAGUCUGGCCCGAGCUGGUUAAGCCUGGGGCCUCUAUGAAGAU CUCCUGCAAGGCCUCCGGCUACAGCUUUAACGGCUACACAAGUAAUUGGUUAAGCAGUCCACGGCAAGUGCCUGGAUUGGAUUGGCCUG AUCAACCCUUAACAAGCGCGCACCAUCUAUAUACAAGAUUUAAGGCAAGGCUACCCUACCCGUGGACAAAGUCUAGCUCCACCGCCUACA UGGAACUGCUGAGCCUGACCUCUGAGGACUCCGCCGUGUAUUAUUGUGCCAGAGACUACGGCUUCUGUGGACUUAUUGGGACAGGGCAC UACACUGACUGUGUCCAGUGGCGGUGGUGGAGUGGCGGCGGAGGUAGCGGAGGUGGUAAGCGGAGGCGGAGGCUCUCAAUUGUGCUG ACACAGAGCCCCAGCAUAGAGCGUUAAGCCUGGCGAGAAAGUAGCAUACAUGCAGCGCCAGCUCCUGGUGCCUUAUAGCACUGGU UUCAGCAGAAGCCCGGCACAAGCCCCAAGCUGUCGAUCUACAGCACCAGCAACCUGGCCAGCGGAGUGCCUGCCAGAUUUUCUGGUAGAGG CAGCGGCACCAGCUACUCCUGACAAUCUAGAGUGGCCCGGAAGUAGCCGCCACCUACUACUGUCAGCAGCGGAGCAUUUACCCUCCU UGGACCUUUGGUGCGGCACCAAGCUGGAAUUAAGUGAUGAGGAUCCGUAUCUGGUACUGCAUGCAGCAUUGCUAGCUGCCCUUCCCG UCCUGGGUACCCCGAGUCUCCCCGACCUGGGUCCAGGUAGCUCCACCCUCCACUGCCACUACACCACCUUGCUAGUUCAGACA CCUCCCAAGCAGCAGCAUAGCAGCUAAAACGCUUAGCCUAGCCACACCCCCACGGGAAACAGCAGUGAUUAAACCUUUAAGCAUUAACGA AAGUUUAACUAGCUAUACUAAACCCAGGGUUGGUAUUUCUGGCCAGCCACACCCUCGAGCUAGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAGCAUUAUGACUAA
RiboMab02.1 LC - 제2 폴리펩티드 (L)	

아미노산 서열	MRVMAPRTL ILLLSGALALTETWAGSQIVLTQSPA IMSASPGKVTMTCRASSSVSYMNWYQKSGTSPKRW IYDTSKVASGVYPYRFSGSG SGTSYSLT IISMEADAATYYCQWSSNPLTFGAGTKLELKRTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESYTEQDSKDYSLSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC DVPGGSEVQLQQSGPELVKPGASMK I SCKASGYS FTGYTMNVWKQSHGKCLEWIGL INPYNGGT IYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELL SLTSEDSAVYYCARDYGFVLDYWGQGTTLTVSSGG GGSGGGSGGGSGGGSGSQIVLTQSPS IMSVSPGKVTITCSASSSVSYMHW FQKPGTSPKLSIYSTSNLASGVPARFSGRSGTSYSLT ISRVAEDAATYYCQQRSNYPPTFGCGTKLEIK
mRNA 서열	AGAAUAAACUAGUAUUCUUCUGGUCCCCACAGACUCAGAGAGAACCCGCCACCAUGAGAGUGAUGGCCCCUAGAACACUGAUCCUGUGCU GUCUGUGGCCUGGCUUCAGACAGAAACAUGGGCCGGAUUCAGAUUCGUGUGACACAGAGCCUGCCAUAUGAGUGCCUUCAGGCGAG AAAGUGACCAUGACCUGUAGAGCCAGCAGCAGCGUGUCCUACAUGAACUGGUUACAGCAGAAGUCCGGCACAAGCCCCAAGCGGUGGAUCU ACGAUACAAGCAAGGUGGCCAGCGGCGUGCCUACAGAUUUUCUGGCUUCGAGCGGCACCAGCUACAGCCUGACAUCAGCAGCAUGGA AGCCGAGGAUGCCGCCACCUACUACUGCCAGCAGUGGUCAGAAUCCCGUGACAUUUGGAGCCGCCACCAAGCUGGAACUGAAGCGGACA GUUGCCGCUCCUAGCGUGUUAUCUUCUCCACCUUCGACGAGCAGCUGAAGUCUGGAACAGCCAGCGUGUGUGCCUGUGAACAUUCU ACCCUGCGGAAGCAAGGUGCAGUGGAAGGUGGACAAGUCCUCCAGUCCGGCAACAGCCAAGAGAGCGUGACCCGAGCAGGACAGCAAGGA CUCCACCUAUAGCCUGAGCAGCACCCUGACACUGAGCAAGGCCGACUACGAGAAACAAGGUGUACGCCUGCGAAGUACCCACCGAGGA CUGUCUAGGCCUGUGACCAAGAGCUCAACAGAGGCGAGUGUGUGCGUGCGGCUUGAAGUUCAGCUCCAGCAGUCUGGACCCGAGC UGGUUAAGCCUGGCGCCUCCAUGAAGAUUCUUGCAAGGCCUCCGGCUACAGCUUACCCGGCUACACCAUGAAUUGGUGAACAGCAGGCCA CGGCAAGUGCCUGGAUUGGAGUCCGCCUGAUCAACCCUACAACGGCGGCACAUCUACAACCAGAAGUUAAGGGCAAGCCACACUGACC GUGGACAAGAGCAGCAGCACCGCCUUAUGGAACUGCUGAGCCUGACAGCGAGGACUCCGCCGUGUACUACUGCGCCAGAGAUUACGGCU UCGUGCUGGACUUAUUGGGGCCAGGGAACAACCCUGACAGUGUCUAGCGGAGGCGGAGGAGUUGUGGCGGAGGAAGUGCGGAGGCGGUUC UGGCGGUGGUGAUCUAAAUUGUCCUGACUCAGUCCCUAGCAUCAUGAGCGUGUACCCGGGGAGAAAGUGACAACUCCUGUCCGCC AGCUCUCCGUGUCCUACAUGCACUGGUUCCAGCAGAAGCCCGGACCUCCCAAGCUGUCCAUUACUCCACCUCAACUCCGCGGCCG GGGUGCCCGCCAGAUUCUGGCAGAGGCUCCGGCACCAAGCUACUCCUGACCAUUCUAGAGUGGCCCGAGGACGUGCCACAUUA UUGUCAGCAGCGGAGCAACUACCUCCUUGGACCUUUGGUGCGGGAACAAGCUGGAAUUAAGUGAUGAGGAUCCGAUCUGGUACUGCAU GCACGCAAGUCUAGCUGCCCUUUCUCCGUGGUAACCCGAGUCUCCCGGACCUCCGGUCCAGGUUAGCUCCACCUCCACCUCCGCCC CACUCACCACCUUCUAGUUCAGACACCUCCCAAGCAGCAGCAUAGCAGCUAAACGCUUAGCCUAGCCACACCCACACGGGAAACA GCAGUGAUUAACCUUAGCAUUAACGAAAGUUUAACUAAGCUUAACUAAACCCAGGGUUGGUAUUCUGUGCCAGCCACACCCUCGAGC UAGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCAUAGACUAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
5'-UTR (hAg-Kozak)	
5'-UTR	AACUAGUAUUCUUCUGGUCCCCACAGACUCAGAGAGAACCCGCCACC
3'-UTR (FI 요소)	
3'-UTR	CUGGUACUGCAUGCACGCAAUGCUAGCUGCCCUUUCUCCGUGGUAACCCGAGUCUCCCGGACCUCCGGUCCAGGUUAGCUCCAC CUCCACCUCCGACUACUCCACCUUGCUAGUUCAGACACCUCCCAAGCAGCAGCAUAGCAGCUAAACGCUUAGCCUAGCCACACCC CCACGGGAACAGCAGUGAUUAACCUUAGCAUUAACGAAAGUUUAACUAAAGCUUAACUAAACCCAGGGUUGGUAUUCUGUGCCAGCC ACACC
A30L70	
A30L70	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCAUAGACUAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
링커	
(Gly4Ser)2 링커	GGGSGGGGS
(Gly4Ser)3 링커	GGGSGGGSGGGGS
(Gly4Ser)4 링커	GGGSGGGSGGGSGGGGS
(Gly4Ser)5 링커	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS
(Gly4Ser)6 링커	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS
링커 1	SGPGGGRSGGGSGGGGS
링커 2	DVPGGS
CDRs	
VH(CD3)- CDR1	GYTFTRYT
VH(CD3)- CDR2	INPSRGYT
VH(CD3)- CDR3	ARYYDDHYSLDY
VH(CD3)- CDR3	ARYYDDHYCLDY
VL(CD3)- CDR1	SSVS
VL(CD3)- CDR2	DTS

VL (CD3)- CDR3	QQWSSNPLT
VH (CLDN6)- CDR1	GYSFTGYT
VH (CLDN6)- CDR2	INPYNGGT
VH (CLDN6)- CDR3	ARDYGFVLDY
VL (CLDN6)- CDR1	SSVS
VL (CLDN6)- CDR2	STS
VL (CLDN6)- CDR3	QQRSNYPPWT
RiboMab_712/711 HC - 제1 폴리펩티드 (Fd)	
아미노산 서열	MRVMAPRTLILLSSGALALTETWAGSQVLQQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVKQRPQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFK DKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYSLDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCSGPGGGRSGGGSGGGSEVQLQSS GPPELVKPGASMKISCKASGYSFTGYTMNWKQSHGKCLEWIGLINPYNGGTIYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYCAR DYGFVLDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGSIIVLTQSPSISMSVSPGKVTITCSASSSVSYMHWFQKPGTSPKLWIYSTSN LASGVPARFSGRSGTYSYSLTISRVAEDAATYYCQQRSNYPPTFGCGTKLEIK
mRNA 서열	AGAAUAAACUAGUUAUUCUUGGUCCCCACAGACUCAGAGAGAACCCGCCACCAUGAGAGUGAUGGCCCUAGAACACUGAUCCUGCUGCU GUCUGGUGCCUUGGUCUGACAGAAACAUUGGCCCGGAUCUCAGGUGCAGCUCCAGCAAUUCUGGUGCCGAACUUGCUAGACCUUGGCCCUCC GUGAAGAUAGAGCUGUAAAACAGCGGCUACACCUACACAGGUACACCAUGCAGGUGCAAGCAGAGCCUGACAGGCCUUGAGUGGA UCGGCUACAUAACCCAGCGGGGCUACACCAACUACAACAGAGUUAAGGACAAGGCCACACUGACCACCGACAAGAGCAGCAGCAC AGCCUACAUGCAGCUGAGCAGCCUGACCAGCGAAGAUAGCGCGGUGUACUACUGCGCCGGUACUACGACGAUCACUACAGCCUGGAUUAU UGGGGCCAGGGAACACCCUGACAGUGUCUAGCGCCAGCACAAGGGACCUAGCGUUUCCACUGGCUCCAGCAGCAAGAGCACAUUCUG GUGGAACAGCCGCUUGGCGUGCCUGGUAAGGAUUAUUCUCCGAGCCUGUAGCCGUGUCCUGGAUUAUUGGCGCUCUGACAGCGGCGU GCACACCUUCCAGCGUGCUGCAAAGCAGCGGCCUGUACUCUCUGAGCAGCGUGGUCACAGUGCCUAGCUCUAGCCUGGGCACCCAGACC UACAUCUGCAAUGUGAACCACAAGCCUAGCAACACCAAGGUGGACAAGAGAGUGGAACCCAGAGCUGUUCUGGACCCGGCGGAGGAAGAU CUGGCGGAGGCGGUUCUGUGGCGGAGGAUCUGAAGUUCAGCUGCAACAGUCUGGCCCGGAGCUGUUAAGCCUGGGGCUUAUGAAGAU CUCCUGCAAGGCCUCCGGCUACAGCUUUAACGGCUACACAAGAAUUGGGUUAAGCAGUCCACGGCAAGUGCCUGGAUUGAUCGCGCCUG AUCAACCCUUAACAAGCGGCGCACCAUCUAUAUACAAGUUAUAAAGCAAGGCUACCCUACCGUGGACAAGUCUAGCUCCACCGCCUACA UGGAACUGCUGAGCCUGACCUGAGGACUCCGCGGUGUAUUAUUGGCCAGAGACUACGGCUUCGUGCUGGACUAUUGGGGACAGGGCAC UACACUGACUGUCCAGUGGCGGUGGUGGAGUGGCGGCGGAGGUAAGCGGAGGUGGUGGAAGCGGAGGCGGAGGCUUCAAUUGUGCUG ACACAGAGCCCCAGCAUAGAGCGUUAAGCCUGGCGGAGAAUGAGCAUACAUGCAGCGCCAGCUCUCCUGUGCUUAUAGCAGCUGGU UUCAGCAGAAGCCCGCACAGCCCCAAGCUGUGGAUCUACAGCACCAGCAACCCUGGCCAGCGAGUGCCUGCCAGAUUUUUGGUAAGAGG CAGCGGCACACGUAUCUCCUGACAAUCUCUAGAGUGGCCCGGAAGUAGCCGCCACCUACUACUGCAGCAGCGGAGCAUUAACCCUCCU UGGACCUUUGGCGUGCGGCACCAAGCUGGAAUUAAGUAGUAGGGAUCCGUAUCUGGUACUGCAUGCAGCAUUGCAGUAGCUGCCCUUCCCG UCCUGGGUACCCCGAGUCUCCCCGACCUGGGUCCAGGUAUGCUCCACCUCUCCACUACACCACCUUGCUAGUUCAGACA CCUCCCAAGCAGCAGCAUAGCAGCUCUAAACGCUUAGCCUAGCCACACCCCCACGGGAAACAGCAGUUAUAAACCUUAGCAUAAACGA AAGUUUAACUAAGCUUAUACUAAACCCAGGGUUGGUAUUAUUGGCCAGCCACACCCUCGAGCUAGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAGCAUUAUGACUAAA
RiboMab_712/711 LC - 제2 폴리펩티드 (L)	
아미노산 서열	MRVMAPRTLILLSSGALALTETWAGSQIVLTQSPAISASPGKVTMTCRASSSVSYMNWYQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPIYRFSGSG SGTYSYSLTISMEEDAATYYCQWSSNPLTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECVDPGGSEVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYS FTGYTMNWKQSHGKCLEWIGLINPYNGGTIYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYCARDYGFVLDYWGQGTTLTVSSGG GGSGGGSGGGSGGGSGGGSIIVLTQSPSISMSVSPGKVTITCSASSSVSYMHWFQKPGTSPKLWIYSTSNLASGVPARFSGRSGTYSYSLT ISRVAEDAATYYCQQRSNYPPTFGCGTKLEIK

mRNA 서열	AGAAUAAACUAGUAUUCUUCUGGUGCCACAGACUCAGAGAGAACC CGCCACCAUGAGAGUGAUGGCCCUAGAACACUGAUCCUGCUGCU GUCUGGUGCCUGGUCUGACAGAAACAUUGGCGCGAUCUCAGAUCCUGCUGACACAGAGCCUGCCAUCAGAGUCCUCCAGGCGAG AAAGUAGCCAUAGACCUAGAGAGCCAGCAGCAGCGUGCCUACAUAGAACUGGUUACAGCAGAAAGUCCGGCACAAGCCCCAAGCGGUGGAUCU ACGAUACAAGCAAGGUGGCCAGCGGCGUGCCUACAGAUUUUCUGGUCUGGCGAGCGGCACAGCUACAGCCUGACAACAGCAGCAUGGA AGCCGAGGAUGCCGCCACCUACUACUGCCAGCAGUGGUCCAGCAAUCCCCUGACAUUUGGAGCCGCCACCAAGCUGGAACUGAAGCGGACA GUUGCCGUGCUAGAGGUGUUAUCUCCACCUCCGAGCAGCAAGUCCUGGAACAGCCAGCGUGUGCCUGGUAACCAACUUCU ACCCUGCGGGAAGCCAGGUGCAGUGGAAGGUGGACAAUGCCUCCAGUCCGGCAACAGCCAAAGAGAGCGUGUGCCUGGAGCAGGACAGGA CUCCACCUAUAGCCUGAGCAGCACCUGACACUGAGCAAGGCCGACUACGAGAAACACAAGGUGUACGCCUGCAAGUAGCCACCAGGGA CUGUCUAGCCUGUGACCAAGAGCUUACACAGAGGCGAGUGUGUGCCUGGCGGCUUGAAGUACGCUCCAGCAGUCUGGACCCGAGC UGGUUAGCCUGGCGCCUCCAUGAAGAUUCUUGCAAGGCCUCCGGCUACAGCUUACCGGCUACACCAUGAAUUGGUGCAAGCAGAGCCA CGGCAAGUGCCUGGAUUGGAUCCGCGUGAUCAACCCUACAACGGCGGCACAAUCUACAACCAGAAUGUACAAGGGCAAGCCACACUGACC GUGGACAAGAGCAGCAGCACCGCCUAUUGGAACUGCUGAGCCUGACCAGCGAGGACUCCGCCUGUACUACUGCGCCAGAGAUUACGGCU UCGUGCUGGACUUAUUGGGGCCAGGGAACAACCCUGACAGUGUCUAGCGGAGGCGGAGGAUCUGGUGGCGGAGGAAGUGGCGGAGGCGGUUC UGGCGGUGGUGUACUCAAUUGUCCUGACUCAGUCCCUUACAUCAUGAGCGUGUCACCCGGGGAAGGUGACAAUACACUAGCAGCGCC AGCUCCUCCGUGUCUUAUUGCAGUCCAGCAAAAGCCAGGAGCCUCCUAGCUUGGAUCUACAGCACCAGCAACCCUGGCCUCUG GCGUGCCAGCUAGAUUUCCGGUAGAGGCUCGCGCACCUCUACUCCUGACCAUCUCUAGAGUGGCCCGGAGGACGUCGCCACAUUUA UUGUCAGCAGCGGAGCAACUACCCUCCUUGGACCUUUGGUGCGGAACAAAGCUGGAAUACAAGUGAUGAGGAUCCGAUCUGUACUGCAU GCACGCAAGUCUAGCUGCCCUUUCGUGUCCGAGUCCCGGAGUCCUCCCGGACCUCCGGUCCAGGAUAGCUCCACCUCACCUGCCC CACUACACCACCUUGCUGAGUCCAGACACCUCCCAAGCAGCAGCAUAGCAGCUAAAACGCUUAGCCUAGCCACACCCCCACGGGAAACA CGAGUGAUUAAACUUUAGCAUAAACGAAAGUUUAACUAGCUAUACUAAACCCAGGGUUGGUAUUUUCUGGCCAGCCACACCCUCGAGC UAGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCAUUAUGACUAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
RiboMab02.1 RNA 암호화 서열	
RiboMab02.1 HC / 제1 폴리펩티드 암호화 서열 (개시 및 정지 코돈을 포함)	AUGAGAGUGAUGGCCCUAGAACACUGAUCCUGCUGCUGUGGUGCCUGGCUUGACAGAAACAUUGGCCGGAUCUCAGGUGCAGCUCC AGCAAUCUGGUGCCGAACUUGCUAGACCUUGGCGCCUCCGUGAAGUAGCUGUAAAACAGCGGCUACACCUACACGGUACACCAUGCA CUGGGUCAAGCAGAGGCCUGGACAGGCGCUUAGUGGAUCCGCUACAUCAACCCAGCGGGCUACACCAACUACAACCGAAGUUAAG GACAAGGCCACACUGACCACCGACAAGAGCAGCAGCAGCCUACAUAGCAGCUGAGCAGCCUGACCAGCGAAGAUAGCGCCGUGUACUACU GCGCCCGUACUACGACGUAUCUACAGCCUGGAUACUGGGGCCAGGGAACAACCCUGACAGUGUCUAGCGCCAGCACCAGGACCUGAG CGUUUCCACUGGCUCCAGCAGCAAGAGCACAUCUGGUGGAACAGCGCUCUGGGCUGCCUGGUAAGGAUUAUUUCCCGAGCCUGUG ACCGUGUCCUGGAUUCUGGCGCUCUGACAAGCGCGGUGACACCUUCCAGCGUGCUGCAAGCAGCGGCCUGUACUUCUGAGCAGCG UGGUCACAGUGCCUAGCUCUAGCCUGGCGACCCAGACCUACAUCUGAAUGUGAACCACAAGCCUAGCAACACCAAGGUGGACAAGAGAGU GGAACCCAAGAGCUGUUCUGGACCCGGCGGAGGAAGAUUGGCGGAGGCGGUUCUGGUGCGGAGGAUCUGAAGUUCAGCUGCAACAGUCU GGCCCCGAGCUGGUUAAGCCUGGCGCCUCUAUGAAGAUUCUCCUGCAAGGCCUCCGGCUACAGCUUUAACCGGCUACACAAUGAAUUGGUA AGCAGUCCACGGCAAGUGCCUGGAUUGGAGUCCGCCUGAUCAACCCUUAACAACGGCGGCACCAUCUUAUUAAGAGUUAUAAAGGCAGGC UACCCUACACGUGGACAAGUCUAGCUCCACCGCCUACAUGGAACUGCUGAGCCUGACCUCUGAGGACUCCCGCGUGUAUUUUGUGCCAGA GACUACGGCUUCUGUGCUGGACUUAUUGGGACAGGGCACUACAGCAGUGUCCAGUGGCGGUGGUGGAGUGGCGCGGAGGUGAGCGGAG GUGGUGGAAGCGGAGGCGGAGGCUCAAAUUGUGCUGACACAGAGCCUCCAGCAUACUGAGCGUUAAGCCUGGCGAGAAAGUAGCCAUAC AUGCAGCGCCAGCUCUCCUGUCCUUAUUGCAGUGGUUUCAGCAGAAGCCCGGCACAAGCCCAAGCUGUGCAUCUACAGCACCAGCAAC CUGGCCAGCGAGUGCCUGCCAGAUUUUUGGUGAGAGGAGCGGCACCAGCUACUCCUGACAAUCUCUAGAGUGGCGCGGAAGAUCCG CCACCUACUACUGCAGCAGCGGAGCAAUUACCCUCCUUGGACCUUUGGUGCGGCACCAAGCUGGAAUACAAGUGAUGA
RiboMab02.1 LC / 제2 폴리펩티드 암호화 서열 (개시 및 정지 코돈 포함)	AUGAGAGUGAUGGCCCUAGAACACUGAUCCUGCUGCUGUGGUGCCUGGCUUGACAGAAACAUUGGCCGGAUCUCAGAUCCUGCUGA CACAGAGCCUGGCCAUCAUGAGUGCCUUCAGGCGAGAAAGUGACCAUGACCUGUAGAGCCAGCAGCAGCGUCCUACAUGAACUGGUA UCAGCAGAAGUCCGGCACAAGCCCCAAGCGGUGGAUCUACGAUACAAGCAAGGUGGCCAGCGGCGUGCCUACAGAUUUUCUGGCUUGGC AGCGGCACACAGCUACAGCCUGACAACAGCAGCAUGGAAGCCGAGGAUGCCGCCACCUACUACUGCCAGCAGUGGUCCAGCAAUCCCCUGA CAUUGGAGCCGGCACCAAGCUGGAACUGAAGCGGACAGUUGCCGCUUACAGCGUGUUAUCUCCACCUUCCGAGCGAGAAAGUAGCCAUAC UGGAACAGCCAGCUGCUGUGCCUGCUGAACAACUUCUACCCUGGGAAGCCAAAGGUGCAGUGGAAGGUGGACAAGUCCUCCAGUCCGGC AACAGCCAAGAGAGCGUGACCGAGCAGGACAGCAAGGACUCCACCUUAUAGCCUGAGCAGCACCUGACACUGAGCAAGGCCGACUACGAGA AACACAAGGUGUACGCCUGCGAAGUGACCCACCAGGGACUGUCUAGCCUGUGACCAAGAGCUUACAACAGAGGCGAGUGAUGUGCCUGG CGGCUUGAAGUUCAGCUCAGCAGUUGGACCCGAGCUGGUUAGCCUUGGCGCCUCCAUGAAGAUUCUUGCAAGGCCUCCGGCUACAGC UUCACCGGCUACACCAUGAAUUGGUGAAGCAGAGCCACGGCAAGUGCCUGGAUUGGAUCCGCCUGAUCAACCCUACAACGGCGGCACAA UCUACAACAGAAUUAAGGGCAAGCCACACUGACCGUGGACAAGAGCAGCAGCACCGCCUUAUUGGAACUGCUGAGCCUGACCAGCGA GGACUCCGGCGUGUACUACUGCGCCAGAGAUUACGGCUUCGUGCUGGACUUAUUGGGGCCAGGGAACAACCCUGACAGUGUCUAGCGGAGGC GGAGGAUCUGGUGGCGGAGGAAGUGGCGGAGGCGGUUCUGGCGGUGGUGGAUCUCAAUUGUCCUGACUAGUCCCUAGCAUAGAGCG UGUACCCGGGAGAAAGUGACAAUACCCUGUCCGCCAGCUCCUCCUGUCCUACAUGCAGUCCUAGCAGAAAGCCGGCACCUCCCC CAAGCUGUCCAUACUCCACCUCUACCCUGGCCUCCGGCGUGCCCGCCAGAUUCUCUGGAGAGGCUCCGGCACAGCUACUCCUGACC AUCUCUAGAGUGGCGCGGAGGACGUGCCACAUAUUAUGUACAGCAGCGGAGCAACUACCCUCCUUGGACCUUUGGUGCGGAACAAAGC UGGAAUACAAGUGAUGA

[0230] 본 발명이 아래에서 상세히 설명되지만, 본 발명의 내용은 변경될 수 있으므로, 본 발명에 기술된 구체적인 방법, 프로토콜 및 시약으로 한정되지 않는 것으로 이해되어야 한다. 또한, 본 발명에 사용되는 용어들은 구체적인 구현예를 설명하기 위한 목적일 뿐, 첨부된 청구항에 의해서만 한정되는 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 의도되진 않는다. 달리 정의되지 않은 한, 본 발명에서 사용되는 모든 기술 용어 및 과학 용어들은 당해 기술 분야의 당업자가 통상적으로 이해하는 의미와 동일한 의미를 가진다.

[0231] 바람직하게는, 본원에서 사용되는 용어들은 "A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)", H.G.W. Leuenberger, B. Nagel, and H. Kolbl, Eds., Helvetica Chimica Acta, CH-4010

Basel, Switzerland, (1995)에 기술된 바와 같이 정의된다.

- [0232] 본 발명의 실시는, 달리 언급되지 않은 한, 본 기술 분야의 문헌에 설명된 통상적인 화학, 생화학, 세포 생물학, 면역학 및 재조합 DNA 기법 방법을 채택할 것이다 (예, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, J. Sambrook et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 1989).
- [0233] 이하, 본 발명의 요소들을 설명한다. 이들 요소는 구체적인 구현예를 들어 기술되지만, 임의의 방식 및 임의의 수로 조합되어 추가적인 구현예를 만들 수 있는 것으로 이해되어야 한다. 다양하게 기술된 실시예 및 구현예들은 본 발명을 명시적으로 기술된 구현예들로 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다. 이러한 설명은 명시적으로 기술된 구현예들을 임의의 다수의 기술된 요소들과 조합하는 구현예들을 기술하고 포괄하는 것으로 이해되어야 한다. 아울러, 언급된 모든 요소들의 임의 치환 및 조합은 문맥상 달리 언급되지 않은 한 이러한 설명에 의해 개시되는 것으로 간주되어야 한다.
- [0234] 본원에서, 하나 이상의 대상 수치에 적용되는 용어 "대략" 또는 "약"은 명시된 참조 값과 유사한 값을 지칭한다. 일반적으로, 맥락에서 익숙한 당해 기술 분야의 당업자라면 문맥에서 "약" 또는 "대략"에 의해 망라되는 적절한 편차 수준을 알 것이다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 용어 "대략" 또는 "약"은 참조된 값에 대해 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 이하에 해당하는 수치 범위를 망라할 수 있다.
- [0235] 본 발명을 기술하는 문맥에서 (특히 청구항의 맥락에서) 사용되는 용어 정관사 및 부정관사 ("a" 및 "an" 및 "the") 및 비슷한 표현은, 본원에서 달리 명시되지 않거나 또는 문맥상 명확하게 상충되지 않은 한, 단수 및 복수를 모두 포괄하는 것으로 해석되어야 한다. 본원에서 수치 값들에 대한 범위 언급은 범위에 속하는 각각의 개별 값들을 각각 기술하는 약칭적인 방식으로 사용하는 것으로만 의도된다. 본원에서 달리 언급되지 않은 한, 각각의 개별 값은 본원에 각각 언급된 것처럼 명세서에 포함된다. 본원에 기재된 모든 방법들은, 본원에서 달리 언급되지 않거나 또는 문맥상 명확하게 상충되지 않은 한, 임의의 적절한 순서로 수행할 수 있다. 본원에 제공되는 임의 및 모든 예, 또는 예시적인 표현 (예, "와 같은")의 사용은 본 발명을 잘 예시하기 위한 것일 뿐, 청구항의 범위를 제한하는 것은 아니다. 명세서에서 어떠한 표현도 본 발명을 실시하는데 필수적인 임의의 청구되지 않은 요소들을 나타내는 것으로 해석되어서는 안 된다.
- [0236] 명확하게 달리 명시되지 않은 한, 용어 "포함하는"은 본 문서의 맥락에서 "포함하는"에 의해 나열되는 목록의 구성원들과 더불어 추가적인 구성원들이 선택적으로 존재할 수 있다는 것을 나타내기 위해 사용된다. 그러나, 본 발명의 구체적인 구현예로서 용어 "포함하는"은 추가적인 구성원들은 존재하지 않을 가능성도 포괄하는 것으로 고려되며, 즉 이러한 구현예의 경우 "포함하는"은 "로 이루어진" 또는 "로 본질적으로 이루어진"의 의미인 것으로 이해되어야 한다.
- [0237] 몇몇 문헌들이 본 명세서의 전체 내용에서 인용된다. 본원에 인용된 전술한 또는 후술한 각각의 문헌 (모든 특허, 특허 출원, 과학 간행물, 제조사의 명세서, 설명서 등)은 그 전체가 원용에 의해 본 명세서에 포함된다. 본원에서 어떠한 것도 본 발명이 이러한 기술 내용을 선행할 자격이 없다는 인정으로서 해석되어서는 안 된다.
- [0238] **정의**
- [0239] 이하, 본 발명의 모든 측면들에 적용되는 정의들을 제시한다. 아래 용어들은 달리 언급되지 않은 한 후술한 의미를 가진다. 정의되지 않은 임의의 용어는 당해 기술 분야에서 인지되는 의미를 가진다.
- [0240] 본원에서, "감소한다", "낮춘다", "저해한다" 또는 "손상시킨다"는, 수준 측면에서, 바람직하게는 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 50%, 적어도 75% 또는 그 이상의 전체적인 감소 또는 전체적인 감소를 유발하는 능력을 의미한다. 이러한 용어에는 완전한 또는 본질적으로 완전한 저해, 즉 0으로의 감소 또는 본질적으로 0으로의 감소가 포함된다.
- [0241] "증가시킨다", "강화한다" 또는 "초과한다"와 같은 용어들은 바람직하게는 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 80%, 적어도 100%, 적어도 200%, 적어도 500% 또는 그 이상의 증가 또는 강화를 의미한다.
- [0242] 본 발명에 따르면, 용어 "펩티드"는 올리고펩티드 및 폴리펩티드를 포함하고, 펩티드 결합으로 서로 연결된 연속적인 아미노산을 약 2개 이상, 약 3개 이상, 약 4개 이상, 약 6개 이상, 약 8개 이상, 약 10개 이상, 약 13개 이상, 약 16개 이상, 약 20개 이상, 그리고 최대 약 50개, 약 100개 또는 약 150개를 포함하는 물질을 지칭한다. 용어 "단백질" 또는 "폴리펩티드"는, 거대 펩티드, 구체적으로 적어도 약 151개의 아미노산을 가지는 펩티드를

지칭하나, 용어 "펩티드", "단백질" 및 "폴리펩티드"는, 본원에서 통상적으로 동의어로서 사용된다.

- [0243] 아미노산 서열 (펩티드 또는 단백질)과 관련하여, "단편"은 아미노산 서열의 일부를 의미하며, 즉, N-말단 및/또는 C-말단에서 잘려진 아미노산 서열을 나타내는 서열을 의미한다. C-말단에서 잘려진 단편 (N-말단 단편)은, 예를 들어, 오픈 리딩 프레임의 3'-말단이 결핍된 말단 절단된 (truncated) 오픈 리딩 프레임을 번역함으로써, 수득가능하다. N-말단에서 잘려진 단편 (C-말단 단편)은, 절단된 오픈 리딩 프레임이 번역 개시에 이용되는 개시 코돈을 포함하는 한, 예를 들어, 오픈 리딩 프레임의 5'-말단이 결핍된 말단 절단된 오픈 리딩 프레임을 번역함으로써, 수득가능하다. 아미노산 서열의 단편은, 예를 들어, 아미노산 서열로부터 유래한 아미노산 잔기들의 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%를 포함한다. 아미노산 서열의 단편은, 바람직하게는, 아미노산 서열로부터 유래하는 연속적인 아미노산을 적어도 6개, 특히 적어도 8개, 적어도 12개, 적어도 15개, 적어도 20개, 적어도 30개, 적어도 50개 또는 적어도 100개 포함한다.
- [0244] 본원에서 "변이체"란, 적어도 하나의 아미노산 변형에 의해 모 아미노산 서열과 다른 아미노산 서열질을 의미한다. 모 (parent) 아미노산 서열은 자연 생성 또는 야생형 (WT) 아미노산 서열일 수 있거나, 또는 야생형 아미노산 서열의 변형된 버전일 수 있다. 바람직하게는, 변이체 아미노산 서열은 모 아미노산 서열과 비교해 하나 이상의 아미노산 변형, 예를 들어 모 아미노산 서열과 비교해 1개 내지 약 20개, 바람직하게는 1개 내지 약 10개 또는 1개 내지 약 5개의 아미노산 변형을 가진다.
- [0245] 본원에서 "야생형" 또는 "WT" 또는 "천연 (native)"은 대립유전자 변이를 비롯해 자연계에서 발견되는 아미노산 서열을 의미한다. 야생형 아미노산 서열, 펩티드 또는 단백질은 의도적으로 변형되지 않은 아미노산 서열을 가진다.
- [0246] 본 발명의 목적에서, 아미노산 서열 (펩티드, 단백질 또는 폴리펩티드)의 "변이체"는 아미노산 삽입 변이체, 아미노산 부가 변이체, 아미노산 결손 변이체 및/또는 아미노산 치환 변이체를 포함한다. 용어 "변이체"는 돌연변이, 스플라이스 변이체, 번역 후 변형된 변이체, 입체형태(conformation), 이소형, 대립유전자 변이체, 종 변이체 및 종 상동체 (species homolog), 특히 자연적으로 생성되는 것을 모두 포괄한다. 용어 "변이체"는 특히 아미노산 서열의 단편을 포함한다.
- [0247] 아미노산 삽입 변이체는 특정 아미노산 서열에 하나 또는 둘 이상의 아미노산의 삽입을 포함한다. 삽입이 존재하는 아미노산 서열의 경우, 수득되는 산물에 대한 적절한 스크리닝을 이용한 무작위 삽입도 가능하지만, 아미노산 서열 내 특정 부위에 하나 이상의 아미노산 잔기를 삽입한다. 아미노산 부가 변이체는 하나 이상의 아미노산, 예를 들어 아미노산 1개, 2개, 3개, 5개, 10개, 20개, 30개, 50개 또는 그보다 많은 수의 아미노- 및/또는 카르복시-말단 융합체를 포함한다. 아미노산 결손 변이체는 서열에서 하나 이상의 아미노산의 제거, 예를 들어 아미노산 1개, 2개, 3개, 5개, 10개, 20개, 30개, 50개 또는 그 이상의 제거를 특징으로 한다. 결손은 단백질의 임의의 위치에 존재할 수 있다. 단백질의 N-말단 및/또는 C-말단에 결손을 포함하는 아미노산 결손 변이체는 N-말단 및/또는 C-말단 절단형 변이체 (truncation variant)로도 지칭된다. 아미노산 치환 변이체는 서열에서 하나 이상의 잔기를 제거하고 그 위치에 다른 잔기를 삽입하는 것을 특징으로 한다. 상동적인 단백질들 또는 펩티드들 간에 비-보존된 아미노산 서열 위치에 변형이 존재하거나, 및/또는 아미노산을 유사한 특성의 다른 아미노산으로 치환하는 것이 바람직하다. 일부 구현예에서, 펩티드 및 단백질 변이체에서 아미노산 변경은 보존적인 아미노산 변경, 즉 유사하게 하전 또는 비-하전 아미노산으로 치환하는 것이다. 보존적인 아미노산 변경은 자체의 측쇄와 관련된 아미노산들의 패밀리카에서의 치환을 포함한다. 자연 발생 아미노산은 일반적으로 4가지 패밀리로 나뉜다: 산성 아미노산 (아스파르트레이트, 글루타메이트), 염기성 아미노산 (라이신, 아르기닌, 히스티딘), 비-극성 아미노산 (알라닌, 발린, 루신, 이소루신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판), 및 비-하전 극성 아미노산 (글리신, 아스파라긴, 글루타민, 시스테인, 세린, 트레오닌, 티로신). 페닐알라닌, 트립토판 및 티로신은 때때로 방향족 아미노산으로 함께 분류된다. 일 구현예에서, 보존적 아미노산 치환은 다음과 같은 군들에서의 치환을 포함한다:
- [0248] 글리신, 알라닌;
- [0249] 발린, 이소루신, 루신;
- [0250] 아스파르트산, 글루탐산;
- [0251] 아스파라긴, 글루타민;
- [0252] 세린, 트레오닌;

- [0253] 리신, 아르기닌; 및
- [0254] 페닐알라닌, 티로신.
- [0255] 바람직하게는, 주어진 아미노산 서열과 주어진 아미노산 서열에 대한 변이체 (예를 들어, 기능성 변이체) 아미노산 서열 간의 유사성, 바람직하게는 동일성 정도는 적어도 약 60%, 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%일 것이다. 유사성 또는 동일성 정도는 바람직하게는 참조 아미노산 서열의 전장에 대해 적어도 약 10%, 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90% 또는 약 100%인 아미노산 영역에 대해 제공된다. 예를 들어, 참조 아미노산 서열이 아미노산 200개로 구성된다면, 유사성 또는 동일성 정도는 바람직하게는 적어도 약 20개, 적어도 약 40개, 적어도 약 60개, 적어도 약 80개, 적어도 약 100개, 적어도 약 120개, 적어도 약 140개, 적어도 약 160개, 적어도 약 180개 또는 약 200개 아미노산, 일부 구현예에서는 연속적인 아미노산에 대해 주어진다. 일부 구현예에서, 유사성 또는 동일성 정도는 참조 아미노산 서열의 전장에 대해 주어진다. 서열 유사성, 바람직하게는 서열 동일성을 결정하기 위한 정렬은 당해 기술 분야에 공지된 툴(tool)을 사용해, 바람직하게는 최적 서열 정렬, 예를 들어, Align을 사용해, 표준 설정 조건으로, 바람직하게는 EMBOSS::니들(needle), 매트릭스: Blosum62, 갭 오픈 (Gap Open) 10.0, 갭 연장 (Gap Extend) 0.5 하에 수행할 수 있다.
- [0256] "서열 유사성"은, 동일하거나 보존적 아미노산 치환을 나타내는 아미노산의 퍼센트(%)를 나타낸다. 아미노산 서열 2종 간의 "서열 동일성"은 서열들 간에 동일한 아미노산의 %를 나타낸다. 핵산 서열 2종 간의 "서열 동일성"은 서열들 간에 동일한 뉴클레오티드의 %를 나타낸다.
- [0257] 용어 "% 동일한", "동일성 %" 또는 유사 용어는 특히 비교할 서열을 최적으로 정렬하였을 때 동일한 뉴클레오티드 또는 아미노산의 %를 나타내는 것으로 의도된다. 이러한 %는 순전히 통계이며, 서열 2종 간의 차이는 비교할 서열의 전체 길이에 무작위로 분포할 수 있지만, 반드시 그런 것은 아니다. 서열 2종의 비교는 통상적으로, 대응되는 서열들의 국소 영역을 식별하기 위해, 분절 또는 "비교 창"과 관련하여, 최적으로 정렬한 후, 서열을 비교함으로써 수행된다. 비교하기 위한 최적의 정렬은 수동으로 또는 Smith and Waterman, 1981, *Adv. App. Math.* 2, 482에 따른 국소 상동성 알고리즘, Needleman 및 Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48, 443에 따른 국소 상동성 알고리즘, Pearson 및 Lipman, 1988, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 88, 2444에 따른 유사성 검색 알고리즘, 또는 이러한 알고리즘을 활용한 컴퓨터 프로그램 (GAP, BESTFIT, FASTA, BLAST P, BLAST N 및 TFASTA, Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.)을 보조적으로 이용해, 수행할 수 있다. 일부 구현예에서, 서열 2종의 동일성 %는 미국 국립 생물공학 정보 센터 (NCBI) 웹사이트에서 이용가능한 BLASTN 또는 BLASTP 알고리즘을 이용해 결정한다 (예를 들어, blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=blast2seq&LINK_LOC=align2seq). 일부 구현예에서, NCBI 웹사이트에서 BLASTN 알고리즘에 적용되는 알고리즘 매개변수는 (i) 예상 역치 10; (ii) 문자 크기 28; (iii) 질의 범위에서 최대 매칭 0; (iv) 매치/미스매치 스코어 1, -2; (v) 갭 코스트 선형 (Linear); 및 (vi) 저 복잡성 영역에 대한 필터 사용을 포함한다. 일부 구현예에서, NCBI 웹사이트에서 BLASTP 알고리즘에 적용되는 알고리즘 매개변수는 (i) 예상 역치 10; (ii) 문자 크기 3; (iii) 질의 범위에서 최대 매칭 0; (iv) 매트릭스 BLOSUM62; (v) 갭 코스트 존재: 11 연장: 1; 및 (vi) 조건부 조합 점수 매트릭스 조정 (conditional compositional score matrix adjustment)을 포함한다.
- [0258] 동일성 %는 비교 서열과 대응되는 동일 위치의 개수를 결정하고, 이를 비교한 위치의 수 (예를 들어 참조 서열에서의 위치 수)로 나눈 후 여기에 100을 곱하여 구한다.
- [0259] 일부 구현예에서, 유사성 또는 동일성 정도는 참조 서열의 전장의 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90% 또는 약 100%인 영역에 대해 주어진다. 예를 들어, 단일 참조 핵산 서열이 뉴클레오티드 200개로 이루어진다면, 동일성 정도는 적어도 약 100개, 적어도 약 120개, 적어도 약 140개, 적어도 약 160개, 적어도 약 180개 또는 약 200개 뉴클레오티드, 일부 구현예에서, 연속적인 뉴클레오티드에 대해 주어진다. 일부 구현예에서, 동일성 또는 유사성의 정도는 참조 서열의 전장에 대해 주어진다.
- [0260] 상동적인 아미노산 서열은 본원에 따르면 아미노산 잔기들에 대해 적어도 40%, 특히 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 동일성을 나타낸다.
- [0261] 본 발명에 기술된 아미노산 서열 변이체는 당해 기술 분야의 당업자에 의해, 예를 들어, 재조합 DNA 조작을 통

해 용이하게 제조할 수 있다. 치환, 부가, 삽입 또는 결손을 가진 펩티드 또는 단백질을 제조하기 위한 DNA 서열의 조작 방법은, 예를 들어, Sambrook et al. (1989)에 상세히 기술되어 있다. 또한, 본원에 기재된 펩티드 및 아미노산 변이체는, 예를 들어 고상 합성 및 유사 방법과 같이 공지된 펩티드 합성 기법을 보조적으로 이용해 용이하게 제조할 수 있다.

[0262] 일부 구현예에서, 아미노산 서열 (펩티드 또는 단백질)의 단편 또는 변이체는 바람직하게는 "기능성 단편" 또는 "기능성 변이체"이다. 아미노산 서열의 "기능성 단편" 또는 "기능성 변이체"라는 용어는 이것이 기원한 아미노산 서열과 동일한 또는 유사한 한가지 이상의 기능적 특성을 발휘하는 임의의 단편 또는 변이체를 의미하며, 즉 기능적 균등물이다. 결합체의 서열과 관련하여, 구체적인 한가지 기능은 단편 또는 변이체의 기원이 되는 아미노산 서열에 의해 구현되는 한가지 이상의 결합 활성이다. 본원에서, 용어 "기능성 단편" 또는 "기능성 변이체"는, 특히, 모 분자 또는 서열의 아미노산 서열과 비교해 하나 이상의 아미노산이 변경된 아미노산 서열을 포함하지만, 모 분자 또는 서열의 한가지 이상의 기능을 여전히 충족할 수 있는, 예를 들어 표적 분자에 대한 결합성을 여전히 발휘하는, 변이체 분자 또는 서열을 의미한다. 일부 구현예에서, 모 분자 또는 서열의 아미노산 서열 내 변형은 분자 또는 서열의 특징을 현저하게 바꾸거나 또는 영향을 미치지 않는다. 다른 구현예에서, 기능성 단편 또는 기능성 변이체의 기능이 저하될 수 있지만 여전히 현저한 수준으로 존재하며, 예를 들어, 기능성 변이체의 결합성이 모 분자 또는 서열에 대해 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80% 또는 적어도 90%일 수 있다. 그러나, 다른 구현예에서, 기능성 단편 또는 기능성 변이체의 결합성이 모 분자 또는 서열과 비교해 강화될 수도 있다.

[0263] 명시된 아미노산 서열 (펩티드, 단백질 또는 폴리펩티드)"로부터 유래한" 아미노산 서열 (펩티드, 단백질 또는 폴리펩티드)은 제1 아미노산 서열의 기원을 참조한다. 바람직하게는, 특정 아미노산 서열로부터 유래한 아미노산 서열은 이 특정 서열 또는 이의 단편과 동일한, 본질적으로 동일한 또는 상동적인 아미노산 서열을 가진다. 특정 아미노산 서열로부터 유래한 아미노산 서열은 이 특정 서열 또는 이의 단편의 변이체일 수 있다. 예를 들어, 당해 기술 분야의 당업자라면, 본원에서 이용하기 적합한 서열이, 이의 기원이 되는 자연 생성 또는 본래의 서열과 서열상 차이는 있지만 본래의 서열의 바람직한 활성을 유지하도록 변경될 수 있는 것임을, 이해할 것이다.

[0264] 예를 들어, 본 발명의 결합체의 폴리펩티드 사슬의 VH, VL, CH1 및 CL 도메인의 아미노산 서열은 면역글로불린의 VH, VL, CH1 및 CL 도메인의 아미노산 서열로부터 유래될 수 있지만, 이들이 유래된 도메인과 비교하여 변경될 수 있다. 예를 들어, 본 발명에 따르면, 면역글로불린으로부터 유래된 VH 또는 VL은 그것이 유래된 각각의 VH 또는 VL의 아미노산 서열과 동일할 수 있는 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 각각의 모 VH 또는 VL의 서열과 비교하여 하나 이상의 아미노산 위치가 다를 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 결합체의 VH 도메인은, 이것이 유래한 VH 도메인의 아미노산 서열과 비교하여 하나 이상의 아미노산 삽입, 아미노산 부가, 아미노산 결손 및/또는 아미노산 치환을 포함하는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 결합체의 VL 도메인은, 이것이 유래한 VL 도메인의 아미노산 서열과 비교하여 하나 이상의 아미노산 삽입, 아미노산 부가, 아미노산 결손 및/또는 아미노산 치환을 포함하는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 모 VH 또는 VL의 아미노산 서열의 기능성 변이체인 아미노산 서열을 갖는 VH 또는 VL은, 예를 들어 결합 특이성, 결합 세기 등의 관점에서, 모 VH 또는 VL의 아미노산 서열과 동일하거나 본질적으로 동일한 기능을 제공한다. 그러나 당업자가 인지할 바와 같이, 일부 구현예에서는 아미노산 서열, 예를 들어 모 분자의 아미노산 서열과 비교하여 특성이 변경된 VH 또는 VL의 기능성 변이체를 제공하는 것이 또한 바람직할 수 있다. 동일한 고려사항이 예를 들어 CDR의 아미노산 서열 및 기타 아미노산 서열, 예를 들어 CH1 및/또는 CL 도메인의 아미노산 서열에 적용된다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 CH1 및 CL 서열의 변이체는 상호작용하는 능력, 예를 들어 서로 결합하는 능력을 갖는다.

[0265] 본원에서, 본 발명의 조성물 및 방법의 유용성을 공지하기 위해 이용할 수 있는 "설명 자료" 또는 "설명서"는 출판물, 기록, 도표 또는 임의의 다른 표현 매체를 포괄한다. 본 발명의 키트의 설명 자료는, 예를 들어, 본 발명의 조성물이 담긴 용기에 고정되거나 또는 조성물이 담긴 용기와 함께 이송될 수 있다. 대안적으로, 설명 자료는 수령인이 조성물과 설명 자료를 함께 이용하고자 하는 의도로, 용기와는 별도로 이송될 수 있다.

[0266] 용어 "단리된"은, 자연 상태에서부터 변경 또는 분리된 경우를 의미한다. 예를 들어 살아있는 동물에 자연상 존재하는 핵산이나 펩티드는 "단리된" 것이 아니지만, 동일한 핵산 또는 펩티드가 자연 상태에서 그것과 공존하는 물질로부터 부분적으로나 완전히 분리되었다면 "단리된" 것이다. 단리된 핵산 또는 단백질은 실질적으로 정제된 형태로 존재할 수 있거나, 아니면 비-천연 환경, 예컨대 숙주 세포에 존재할 수 있다.

- [0267] 본 발명의 맥락에서 용어 "제조합"은, "유전자 조작을 통해 제조된"을 의미한다. 바람직하게 본 발명의 맥락에서 "제조합 대상", 예컨대 제조합 세포는 자연 발생한 것이 아니다.
- [0268] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "자연 발생"은, 대상이 자연에서 발견될 수 있다는 사실을 지칭한다. 예를 들어 유기체(바이러스 포함)내에 존재하고, 자연에 있는 공급원으로부터 단리될 수 있으며, 실험실에서 사람에 의해 의도적으로 변형되지 않은 펩티드 또는 핵산은 자연 발생한 것이다.
- [0269] 본원에서, "생리학적 pH"는 평균이 약 7.40인 pH 약 7.35 내지 약 7.45를 지칭한다.
- [0270] 용어 "유전자 변형" 또는 간단하게 "변형"은 세포를 핵산으로 형질감염하는 것을 포함한다. 용어 "형질감염"은 핵산, 특히 RNA를 세포에 도입하는 것을 의미한다. 본 발명의 목적에서, 용어 "형질감염"은 또한 세포에 핵산의 도입 또는 세포에 의한 핵산의 흡수를 포함하며, 여기서 세포는 개체, 예를 들어 환자에 존재할 수 있다. 따라서, 본 발명에 따르면, 본원에 기재된 핵산을 형질감염시키기 위한 세포는 시험관내 또는 생체내에 존재할 수 있으며, 예를 들어 세포는 환자의 장기, 조직 및/또는 유기체의 일부를 구성할 수 있다. 본 발명에 따라, 형질감염은 일시적이거나 또는 안정적인 수 있다. 형질감염의 일부 응용에서는, 형질감염된 유전 물질이 일시적으로 발현되는 것만으로도 충분하다. RNA는 이것이 암호화하는 단백질을 일시적으로 발현하도록 세포에 형질감염시킬 수 있다. 형질감염 공정으로 도입된 핵산은 통상적으로 핵 게놈에 통합되지 않으므로, 외래 핵산은 유사 분열을 통해 희석되거나 또는 분해될 것이다. 핵산의 에피솜 증폭을 허용하는 세포는 희석 속도를 크게 늦춘다. 형질감염된 핵산이 실제 그 세포와 이의 딸 세포의 게놈에 잔류하는 것이 바람직하다면, 안정적인 형질감염이 이루어져야 한다. 이러한 안정적인 형질감염은 바이러스-매개 시스템 또는 트랜스포존-매개 시스템을 형질감염에 이용함으로써 달성할 수 있다. 일반적으로, 결합체를 암호화하는 핵산을 세포에 일시적으로 형질감염시킨다. RNA는 이것이 암호화하는 단백질을 일시적으로 발현하도록 세포에 형질감염될 수 있다.
- [0271] **Claudin 6 (CLDN6)**
- [0272] 클라우딘은 밀착 연결의 가장 중요한 성분인 단백질들의 패밀리어며, 클라우딘은 이러한 밀착 연결에서 상피의 세포들 간의 세포간 공간의 분자 흐름을 제어하는 세포주위(paracellular) 장벽을 이룬다. 클라우딘은 N-말단 및 C-말단 둘 다가 세포질에 위치하는, 막을 4회 가로지르는 막관통 단백질이다. EC1 또는 ECL1라 명명되는 제1 세포의 루프는 평균 53개의 아미노산으로 이루어지고, EC2 또는 ECL2라 명명되는 제2 세포의 루프는 평균 24개의 아미노산으로 이루어진다.
- [0273] 용어 "클라우딘 6" 또는 "CLDN6"는 바람직하게는 인간 CLDN6 및 특히 서열목록의 서열번호 2 또는 서열번호 3의 아미노산 서열 또는 상기 아미노산 서열의 변이체를 포함하는, 바람직하게는 이로 이루어진 단백질에 관한 것이다. CLDN6의 제1 세포의 루프는 바람직하게는 서열번호 1에 나타난 아미노산 서열의 아미노산 28번 내지 80번 또는 29번 내지 81번, 보다 바람직하게는 아미노산 28번 내지 76번 또는 서열번호 2에 나타난 아미노산 서열을 포함한다. CLDN6의 제2 세포의 루프는 바람직하게는 서열번호 1에 나타난 아미노산 서열의 아미노산 138번 내지 160번, 바람직하게는 아미노산 141번 내지 159번, 보다 바람직하게는 아미노산 145번 내지 157번 또는 서열번호 2에 나타난 아미노산 서열을 포함한다. 상기 제1 세포의 루프 및 제2 세포의 루프는 바람직하게는 CLDN6의 세포 외 부분을 형성한다.
- [0274] CLDN6은 다양한 기원의 종양에서 발현되며, CLDN6을 발현하는 유일한 성인 정상 조직은 태반이다.
- [0275] CLDN6은 예를 들어 난소암, 폐암, 고환암, 자궁내막암, 위암, 유방암, 간암, 췌장암, 피부암, 흑색종, 두경부암, 육종, 담관암, 신장세포 암 및 방광암에서 발현되는 것으로 밝혀졌다. CLDN6은 난소암, 특히 난소 선암 및 난소 기형암종, 나팔관암 복막암, 소세포 폐암(SCLC) 및 비소세포 폐암(NSCLC)을 포함하는 폐암, 특히 편평 세포 폐암종 및 선암 또는 비편평형 비소세포 폐암 (NSCLC), 위암, 유방암, 간암, 췌장암, 피부암, 특히 기저 세포 암종 및 편평 세포 암종, 악성 흑색종, 두경부암, 특히 악성 다형 선종, 육종, 특히 활막 육종 및 암육종, 담관암, 방광의 암, 특히 이행세포 암종 및 유두상 암종, 신장암, 특히 투명세포 신세포 암종 및 유두상 신세포 암종을 포함하는 신세포 암종, 결장암, 회장의 암을 포함하는 소장암, 특히 소장 선암 및 회장의 선암, 고환 배아 암종, 태반 용모암종, 자궁경부암, 고환암, 특히 고환 정상피종, 고환 기형종 및 배아 고환암, 자궁암, 기형암종 또는 배아 암종과 같은 생식세포 종양, 특히 고환의 생식세포 종양 및 이의 전이성 형태의 예방 및/또는 치료에 특히 바람직한 표적이다. 일부 구현예에서, CLDN6 발현과 연관된 암 질환은 난소암, 폐암, 전이성 난소암 및 전이성 폐암으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 바람직하게는, 난소암은 암종 또는 선암이다. 바람직하게는, 폐암은 암종 또는 선암이고, 바람직하게는 세기관지 암종 또는 세기관지 선암과 같은 세기관지암이다.

- [0276] 본원에서 사용된, 용어 "클라우딘-양성 암"은 CLDN6를 발현하는 암 세포, 바람직하게는 상피 암 세포의 표면에서 CLDN6를 발현하는 암 세포를 포함하는 암과 관련된다.
- [0277] 본 발명에 따라, CLDN6은 그 발현 수준이 태반 세포 또는 태반 조직에서의 발현과 비교해 낮은 경우 세포에서 실질적으로 발현되지 않는다. 바람직하게는, 발현 수준은 태반 세포 또는 태반 조직에서의 발현의 10% 미만, 바람직하게는 5%, 3%, 2%, 1%, 0.5%, 0.1% 또는 0.05% 미만이거나 심지어 더 낮다. 바람직하게는, CLDN6은 그 발현 수준이 태반 이외의 비-암 조직에서의 발현 수준을 2배 이하, 바람직하게는 1.5배 이하만큼 초과하고, 바람직하게는 상피 비-암 조직에서의 발현 수준을 초과하지 않는 경우 세포에서 실질적으로 발현되지 않는다. 바람직하게는, CLDN6은 그 발현 수준이 검출 한계 미만인 경우 및/또는 그 발현 수준이 너무 낮아서 세포에 첨가된 CLDN6-특이적 항체에 의한 결합을 허용할 수 없는 경우, 세포에서 실질적으로 발현되지 않는다.
- [0278] 본 발명에 따라, CLDN6은 그 발현 수준이 태반 이외의 비-암 조직에서의 발현 수준을 2배 초과, 바람직하게는 10배, 100배, 1000배 또는 10000배 초과하는 경우, 세포에서 발현된다. 바람직하게는, CLDN6은 그 발현 수준이 검출 한계를 초과하는 경우 및/또는 그 발현 수준이 세포에 첨가된 CLDN6-특이적 항체에 의한 결합을 허용하기에 충분히 높은 경우 세포에서 발현된다. 바람직하게는, 세포에서 발현된 CLDN6은 상피 세포 표면에 발현되거나 노출된다.
- [0279] **분화3의 클러스터**
- [0280] 본원에 설명된 결합체의 제2 표적 분자는 CD3 (분화 3의 클러스터)이다.
- [0281] CD3 복합체는 T세포-특이적 항원이다. T 세포-특이적 항원은 T 세포 표면에 있는 항원이다.
- [0282] CD3 복합체는 다분자 T 세포 수용체(TCR) 복합체의 일부로서 성숙한 인간 T 세포, 흉선세포 및 내추럴 킬러 세포들의 서브셋에서 발현되는 항원을 표시한다.
- [0283] T 세포-공수용체(T-cell co-receptor)는 4가지 서로 다른 사슬들로 이루어진 단백질 복합체이다. 포유동물에 있어서, 이 복합체는 CD3 γ 사슬, CD δ 사슬, 및 2개의 CD3 ϵ 사슬을 함유한다. 이들 사슬은 T 세포 수용체(TCR)로서 알려져 있으며 ζ -사슬은 T 림프구에서 활성화 신호를 생성하는 것으로 알려져 있다. TCR, ζ -사슬 및 CD3 분자는 함께 TCR 복합체를 구성한다.
- [0284] 인간 CD3 엠실론은 GenBank 수탁번호 NM_000733로 표시되며 서열번호 3을 포함한다. 인간 CD3 감마는 GenBank 수탁번호 NM_000073으로 표시된다. 인간 CD3 델타는 GenBank 수탁번호 NM_000732로 표시된다. CD3은 TCR의 신호 형질도입에 책임이 있다. Lin 및 Weiss의 문헌[Journal of Cell Science 114, 243-244 (2001)]에 설명된 바와 같이, MHC-제시된 특이적 항원 에피토프의 결합에 의한 TCR 복합체의 활성화는, Src 패밀리 키나아제에 의한 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프(ITAMs)의 인산화를 야기하여, Ca^{2+} 방출을 비롯한 T 세포 활성화를 초래하는 추가적인 키나아제의 동원(recruitment)를 촉발한다. 예컨대 고정된 항CD3-항체에 의한 T 세포 상의 CD3의 클러스터링은 T 세포 수용체의 진입(engagement)과 유사한 T 세포 활성화를 유도하지만, 이의 클론에 전형적인 특이성과는 무관하다.
- [0285] 본원에서, "CD3"은 인간 CD3을 포함하며 다분자형 T 세포 수용체 복합체의 일부로서 인간 T 세포 상에서 발현되는 항원을 표시한다.
- [0286] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 결합체는 CD3의 엠실론-사슬을 인지하며, 특히 CD3 엠실론의 첫번째 27 N-말단 아미노산 또는 이 27 아미노산 스트레치의 기능성 단편에 대응하는 에피토프를 인지한다.
- [0287] **결합체**
- [0288] 본 발명은 적어도 CD3의 에피토프 및 CLDN6의 에피토프에 결합할 수 있는 이중특이적, 3가 결합체와 같은 결합체를 기술한다. 결합체는 적어도 3개의 결합 도메인을 포함하며, 여기서 제1 결합 도메인은 CD3에 결합할 수 있고, 제2 및 제3 결합 도메인은 CLDN6에 결합할 수 있고, 여기서 제2 및 제3 결합 도메인은 CLDN6의 동일하거나 다른 에피토프에 결합한다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 결합체의 제2 및 제3 결합 도메인은 CLDN6의 동일 에피토프에 결합한다. 일부 구현예에서, 제2 및 제3 결합 도메인의 서열은 동일하거나 본질적으로 동일하다.
- [0289] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 결합체는 재조합 분자이다.
- [0290] 용어 "에피토프"는 결합체에 의해 인지되는 CD3 및/또는 CLDN6과 같은 분자 또는 항원의 일부분 또는 단편을 의미한다. 예를 들어, 에피토프는 항체 또는 임의의 다른 결합 단백질에 의해 인지될 수 있다. 에피토프는 항원의

연속적인 부분 또는 비-연속적인 부분을 포함할 수 있으며, 아미노산 약 5개 내지 약 100개, 예를 들어 약 5개 내지 약 50개, 더 바람직하게 약 8개 내지 약 30개, 가장 바람직하게는 약 8개 내지 약 25개 길이일 수 있으며, 예를 들어, 에피토프는 바람직하게는 아미노산 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개 또는 25개 길이일 수 있다. 일부 구현예에서, 에피토프는 아미노산 약 10개 내지 약 25개 길이이다. 용어 "에피토프"는 구조 에피토프를 포함한다.

[0291] 용어 "면역글로불린"은 폴리펩티드 사슬 2 쌍, 즉 저 분자량 경(L)쇄 한 쌍과 중(H)쇄 한 쌍으로 구성되며 이 황화 결합에 의해 4개 모두 상호 연결된, 구조적으로 관련된 당단백질의 일 군(class)이다. 면역글로불린의 구조는 잘 규정되어 있다. 예를 들어, *Fundamental Immunology* Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989))을 참조한다. 간략하게는, 각 중쇄는 전형적으로 중쇄 가변 영역 (본원에서 V_H 또는 VH 로 약칭함) 및 중쇄 불변 영역 (본원에서 C_H 또는 CH 로 약칭함)으로 구성된다. 중쇄 불변 영역은 전형적으로 도메인 3종, 즉 $CH1$, $CH2$ 및 $CH3$ 로 구성된다. 힌지부는 중쇄의 $CH1$ 도메인과 $CH2$ 도메인 사이의 영역으로, 매우 유연하다. 힌지부에서 이황화 결합은 IgG 분자에서 중쇄 2개 간의 상호작용의 일부이다. 각 경쇄는 전형적으로 경쇄 가변 영역 (본원에서 V_L 또는 VL 로 약칭함) 및 경쇄 불변 영역 (본원에서 C_L 또는 CL 로 약칭함)으로 구성된다. 경쇄 불변 영역은 전형적으로 하나의 도메인, CL 로 구성된다. VH 영역 및 VL 영역은 프레임워크 영역 (FR)으로 지칭되는 더욱 보존적인 영역이 사이에 배치된 상보성 결정 영역 (complementarity determining regions: CDR)으로도 지칭되는 과변이 영역 (또는 구조적으로 정의된 루프 형태 및/또는 서열에서 추가변성일 수 있는 추가변성 영역)들로 추가적으로 세분될 수 있다. 각각의 VH 및 VL 은 전형적으로 CDR 3개와 FR 4개로 구성되며, 아미노 말단에서 카르복시 말단 방향으로 다음과 같은 순서로 배열된다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (또한 Chothia 및 Lesk J. *Mol. Biol.* 196, 901-917 (1987) 참조). 달리 언급되지 않은 한 또는 문맥상 상충하지 않은 한, 본 발명에서 불변 영역에서 아미노산 위치에 대한 언급은 EU-넘버링에 따른다 (Edelman et al., *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1969 May;63(1):78-85; Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition. 1991 NIH 공개번호 91-3242). 일반적으로, 본원에 기재된 CDR은 Kabat 정의에 따른다. 일부 구현예에서, 면역글로불린은 항체이다.

[0292] 본 문서 전반에 걸쳐, 중쇄(HC) 또는 경쇄(LC)에 대한 언급이 반드시 전체 중쇄(HC) 또는 경쇄(LC)의 존재를 의미하는 것은 아니지만, 중쇄(HC) 또는 경쇄(LC)의 적어도 관련되거나 구별되는 부분의 존재를 나타내기 위해 약칭으로 사용된다. 예를 들어, (Fab)-(scFv)₂ 기반 이중특이적 항체가 2개의 사슬을 갖고, 하나의 사슬은 scFv뿐만 아니라 모 면역글로불린으로부터 유래된 중쇄의 가변 영역을 포함하고, 다른 사슬은 모 면역글로불린뿐만 아니라 scFv로부터 유래된 경쇄의 가변 영역을 포함한다면, 두 사슬은 각각 중쇄(HC) 및 경쇄(LC)로 지칭될 수 있다. 이는 실제로 사슬 중 어느 것도 중쇄 또는 경쇄를 포함하지 않고 두 사슬 모두 scFv를 포함하는 경우라도 해당될 수 있다. 이는 둘 다 모 중쇄 및 모 경쇄로부터 유래된 요소를 포함한다는 것을 의미한다.

[0293] 본 발명의 맥락에서 용어 "항체" (Ab)는 항원에 대한 결합력, 바람직하게는 항원에 특이적으로 결합하는 결합력을 가진, 면역글로불린 분자, 면역글로불린 분자의 단편 또는 이의 유도체를 지칭한다. 일 구현예에서, 결합은 적어도 약 30분, 적어도 약 45분, 적어도 약 1시간, 적어도 약 2시간, 적어도 약 4시간, 적어도 약 8시간, 적어도 약 12시간, 약 24시간 이상, 약 48시간 이상, 약 3일, 4일, 5일, 6일, 7일 또는 그보다 긴 기간 등과 같이 상당한 시간 또는 임의의 기타 관련한 기능적으로 정의되는 기간 (예를 들어, 항체의 항원에의 결합과 관련한 생리학적 반응을 유도, 촉진, 강화 및/또는 조절하는데 충분한 시간)의 반감기로 전형적인 생리학적 조건에서 이루어진다. 면역글로불린 분자의 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 항원과 상호작용하는 결합 도메인을 가진다. 용어 "항원-결합 영역", "결합 영역" 또는 "결합 도메인"은, 본원에 사용된 바와 같이, 항원과 상호작용하는 영역 또는 도메인을 지칭하며, 전형적으로 VH 영역과 VL 영역 둘다 포함한다. 용어 항체는 본원에서 사용되는 경우 단일 특이성 항체뿐 아니라 서로 다른 항원-결합 영역을 복수개, 예를 들어 2종 이상, 예컨대 3종 이상 포함하는 다중 특이성 항체를 포괄한다. 항체 (Ab)의 불변 영역은 면역글로불린이 다양한 면역계 세포 (예, 효과기 세포) 및 고전적인 보체 활성화 경로의 제1 성분으로서 $C1q$ 와 같은 보체 시스템의 성분 등의 숙주 조직 또는 인자에 결합하는 것을 매개할 수 있다. 전술한 바와 같이, 용어 항체는 본원에 사용된 바와 같이, 달리 언급되지 않은 한 또는 문맥상 명확하게 상충하지 않은 한, 항원 결합 단편인, 즉 항원에 대한 특이적인 결합을 유지한 항체의 단편, 및 항체 유도체, 즉 항체로부터 유래한 구조체를 포함한다. 항체의 항원-결합 기능은 전장 항체의 단편에 의해 이행될 수 있는 것으로 알려져 있다. 용어 "항체"에 망라되는 항원 결합 단편에 대한 예로는, (i) VL , VH , CL 및 $CH1$ 도메인들로 구성되는 일가 단편인 Fab' 또는 Fab 단편 또는 또는 W02007059782(Genmab)에 기술된 1가 항체; (ii) 힌지부에서 이황화 결합에 의해 연결된 Fab 단편 2개를 포함하는 2가 단편, 즉 $F(ab')_2$

단편; (iii) VH 도메인과 CH 도메인으로 본질적으로 구성된 Fd 단편; (iv) 항체의 한쪽 팔(arm)의 VL 도메인과 VH 도메인으로 본질적으로 구성된 Fv 단편; (v) VH 도메인으로 본질적으로 구성되며, 또한 도메인 항체(Holt et al; Trends Biotechnol. 2003 Nov;21(11):484-90)로도 지칭되는, dAb 단편(Ward et al., Nature 341, 544-546 (1989)); (vi) 낙타과 또는 나노바디 분자(Revs et al; Expert Opin Biol Ther. 2005 Jan;5(1):111-24) 및 (vii) 단리된 상보성 결정 영역(CDR) 등이 있다. 아울러, Fv 단편의 도메인 2개, 즉 VL 및 VH는 개별 유전자들에 의해 암호화되지만, 이들은 VL 영역과 VH 영역이 쌍을 형성하여 일가 분자(단쇄 항체 또는 단쇄 Fv(scFv)로 알려짐, 예를 들어, Bird et al., Science 242, 423-426 (1988) and Huston et al., PNAS USA 85, 5879-5883 (1988)을 참조)를 형성하는 단백질 단쇄로 만들 수 있는 합성 링커에 의해, 재조합 방법을 이용해 서로 연결될 수 있다. 이러한 단쇄 항체는 달리 언급되거나 또는 문맥상 명확하게 상충하지 않은 한 용어 항체에 포함된다. 이러한 단편은 일반적으로 항체의 의미에 포함되지만, 이는 총괄적으로, 각각 독립적으로, 여러가지 생물학적 특성 및 유용성을 나타내는 본 발명의 고유한 특징이다. 본 발명의 맥락에서 이들 및 기타 유용한 항체뿐 아니라 이러한 단편의 이중 특이성 형태가 본원에서 추가로 논의된다. 또한, 용어 항체는, 달리 명시되지 않은 한, 다클론 항체, 단일클론 항체(mAb), 항체-유사 폴리펩티드, 예를 들어 키메라 항체 및 인간화된 항체, 및 효소학적 절단, 펩티드 합성 및 재조합 기법과 같은 임의의 공지된 기법에 의해 제공되는 항원에 대한 특이적인 결합력을 유지한 항체 단편(항원 결합 단편)을 포괄하는 것으로, 이해하여야 한다.

[0294] "단쇄 Fv" 또는 "scFv"라는 말은 통상적인 두 사슬 항체의 중쇄 가변 도메인과 경쇄 가변 도메인이 결합하여 하나의 사슬을 형성하는 항체를 지칭한다. 선택적으로, 링커(통상 펩티드)가 두 사슬 사이에 삽입되어 적절하게 접힐 수 있어 활성 결합 부위를 생성하게 된다.

[0295] 항체는 임의의 이소형을 가질 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "이소형"은 중쇄 불변 영역 유전자에 의해 암호화된 면역글로불린 군(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE 또는 IgM)을 지칭한다. 특정 이소형, 예를 들어 IgG1이 본원에 언급되는 경우, 이 용어는 특정한 이소형 서열, 예를 들어, 특별한 IgG1 서열로 한정되지 않으며, 항체가 서열상 그 이소형에 더 가까운, 예를 들어 다른 이소형에 비해 IgG1에 더 가까운 것을 나타내기 위해 사용된다. 따라서, 예를 들어, 본 발명의 IgG1 항체는 불변 영역 내 변형을 비롯하여 자연 생성 IgG1 항체의 서열 변이체일 수 있다.

[0296] 다양한 구현예에서, 항체는 IgG1 항체이며, 보다 구체적으로는 IgG1, 카파 또는 IgG1, 람다 이소형(즉, IgG1, κ , λ), IgG2a 항체(예, IgG2a, κ , λ), IgG2b 항체(예, IgG2b, κ , λ), IgG3 항체(예, IgG3, κ , λ) 또는 IgG4 항체(예, IgG4, κ , λ)이다.

[0297] 용어 "단일클론 항체"는, 본원에 사용된 바와 같이, 단일한 분자 조성의 항체 분자 조제물을 지칭한다. 단일클론 항체 조성은 특정 에피토프에 대해 단일한 결합 특이성과 친화성을 나타낸다. 따라서, 용어 "인간 단일클론 항체"는 인간 생식계열 면역글로불린 서열로부터 유래한 가변 영역과 불변 영역을 가진 단일한 결합 특이성을 나타내는 항체를 지칭한다. 인간 단일클론 항체는, 불멸화 세포와 융합된, 인간 중쇄 전이유전자와 경쇄 전이유전자를 포함하는 게놈을 가진 유전자이식(transgenic) 또는 염색체이식(transchromosomal) 비-인간 동물, 예를 들어 유전자이식 마우스로부터 수득한 B 세포를 함유한 하이브리도마에 의해 생산할 수 있다.

[0298] 용어 "키메라 항체"는 본원에 사용된 바와 같이 가변 영역은 비-인간 종으로부터 유래하고(예를 들어 설치류로부터 유래하고), 불변 영역은 인간과 같은 다른 종으로부터 유래하는, 항체를 지칭한다. 치료학적 용도를 위한 키메라 단일클론 항체는 항체 면역원성을 낮추기 위해 개발된다. 용어 "가변 영역" 또는 "가변성 도메인"은 키메라 항체 맥락에서 사용된 바와 같이 면역글로불린의 중쇄 및 경쇄 둘다의 CDR과 프레임워크 영역을 포함하는, 영역을 지칭한다. 키메라 항체는 Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning: A laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Ch. 15에 기술된 바와 같이 표준적인 DNA 기법을 이용해 제작할 수 있다. 키메라 항체는 유전학적으로 또는 효소학적으로 조작된 재조합 항체일 수 있다. 키메라 항체를 제작하는 것은 당업자의 지식 내이며, 따라서 본 발명에 따른 키메라 항체의 제작은 본원에 언급된 방법 외의 다른 방법에 의해 수행할 수도 있다.

[0299] 용어 "인간화 항체"는 본원에 사용된 바와 같이 인간 가변성 도메인에 대해 높은 수준의 서열 상동성을 가지도록 변형된 비-인간 가변성 도메인과 인간 항체 불변 도메인을 가진, 유전학적으로 조작된 비-인간 항체를 지칭한다. 이는, 함께 항원 결합부를 형성하는 비-인간 항체 상보성-결정 영역(CDR) 6종을 상동적인 인간 어셉터 프레임워크 영역(FR)에 이식함으로써 달성할 수 있다(WO92/22653 및 EP0629240 참조). 모 항체의 결합 친화성과 특이성을 완전히 재구성하기 위해, 모 항체(즉, 비-인간 항체)의 프레임워크 잔기를 인간 프레임워크 영역으로 치환(역-돌연변이)하여야 할 수 있다. 구조적 상보성 모델링은 프레임워크 영역에서 항체의 결합 특성에

중요한 아미노산 잔기들을 동정하는 것을 도울 수 있다. 따라서, 인간화 항체는 비-인간 CDR 서열, 주로 비-인간 아미노산 서열로의 아미노산 역-돌연변이 하나 이상을 포함하는 인간 프레임워크 영역, 및 완전한 인간 불변 영역을 포함할 수 있다. 선택적으로, 반드시 역-돌연변이인 것은 아닌 추가적인 아미노산 변형도 적용하여, 친화성 및 생화학적 특성과 같은 바람직한 특징을 가진 인간화 항체를 수득할 수 있다.

[0300] 용어 "인간 항체"는 본원에 사용된 바와 같이 인간 생식계열 면역글로불린 서열로부터 유래한 가변 영역과 불변 영역을 가진 항체를 지칭한다. 인간 항체는 인간 생식계열 면역글로불린 서열에 의해 암호화되지 않는 아미노산 잔기 (예를 들어, 시험관내 무작위 또는 부위-특이적인 돌연변이 유발에 의해 또는 생체내 체세포 돌연변이에 의해 도입된 돌연변이)를 함유할 수 있다. 그러나, 용어 "인간 항체"는 본원에 사용된 바와 같이 마우스 또는 랫트(rat)와 같은 다른 포유류 종의 생식계열로부터 유래한 CDR 서열이 인간 프레임워크 서열에 이식된 항체를 포괄하는 것으로 의도하는 것은 아니다. 인간 단일클론 항체는 통례적인 단일클론 항체 방법, 예를 들어 Kohler 및 Milstein, Nature 256: 495 (1975)의 표준적인 체세포 혼성화 기법 등의 다양한 기법을 통해 생산할 수 있다. 체세포 혼성화 공정이 바람직하지만, 기본적으로 단일클론 항체를 생산하는 다른 기법, 예를 들어 B-림프구의 바이러스 또는 종양유발성 형질전환 또는 인간 항체 유전자의 라이브러리를 이용한 파지 디스플레이 기법을 채택할 수도 있다. 인간 단일클론 항체를 분리하는 적절한 하이브리도마 생산 동물 시스템은 뮤라인 시스템이다. 마우스에서 하이브리도마의 구축은 매우 잘 확립된 절차이다. 면역화 프로토콜 및 면역화된 비장세포를 융합하기 위해 단리하는 기법들은 당해 기술 분야에 공지되어 있다. 또한, 융합 파트너 (예를 들어, 뮤라인 골수종 세포) 및 융합 공정 역시 공지되어 있다. 따라서, 인간 단일클론 항체는 예를 들어 마우스 또는 랫트 시스템보다는 인간 면역 시스템의 일부를 보유한 유전지이식 또는 염색체이식 마우스 또는 랫트를 이용해 구축할 수 있다. 따라서, 일 구현예에서, 인간 항체는 동물 면역글로불린 서열 대신 인간 생식계열 면역글로불린 서열을 가진 마우스 또는 랫트와 같은 유전지이식 동물로부터 수득한다. 이러한 구현예에서, 항체는 동물에 도입된 인간 생식계열 면역글로불린 서열로부터 기원하지만, 최종 항체 서열은 이러한 인간 생식계열 면역글로불린 서열이 체세포 과돌연변이에 의한 추가적인 변형 및 내인성 동물 항체 기구에 의한 친화성 성숙화를 거친 결과이며, 예를 들어 Mendez et al. 1997 Nat Genet. 15(2):146-56을 참조한다.

[0301] 용어 "전장"은 항체의 맥락에서 사용된 경우, 항체가 단편이 아니고, 천연적으로 그 이소형에서 보통 발견되는 특정 이소형의 도메인들을 모두, 예를 들어 IgG1 항체의 경우 VH, CH1, CH2, CH3, 힌지, VL 및 CL 도메인을 모두 가지는 것을 의미한다.

[0302] 본원에 사용된 경우, 문맥상 상충하지 않은 한, 용어 "Fc 영역"은 면역글로불린 중쇄의 Fc 서열 2개로 구성된 항체 영역을 지칭하며, 여기서 Fc 서열은 적어도 힌지부, CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함한다.

[0303] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "결합하는" 또는 "결합할 수 있는"은, 항체가 기결정된 항원 또는 에피토프에 결합하는 맥락에서, 전형적으로, 생물층 간섭측정 (Bio-Layer Interferometry: BLI)을 이용해 결정하거나 또는 예를 들어 BIAcore 3000 장치에서 리간드로서 항원과 분석물로서 결합제를 이용한 표면 플라즈몬 공명 (surface plasmon resonance: SPR) 기법을 이용해 결정하였을 경우, 또는 표적(CLDN6) 발현 세포를 "리간드"로 사용하는 수정 결정 미소저울 시스템(quartz crystal microbalance system)을 사용하여 측정할 경우, K_D 약 10^{-7} M 이하, 예를 들어 약 10^{-8} M 이하, 예컨대 약 10^{-9} M 이하, 약 10^{-10} M 이하 또는 약 10^{-11} M 또는 심지어 그 미만에 해당하는 친화성으로 결합하는 것을 지칭한다. 일부 구현예에서, 결합제는, 기결정된 항원 또는 밀접하게 연관된 항원 이외의 다른 비-특이적인 항원 (예를 들어, BSA, 카세인)에 대한 결합 친화성보다 적어도 10배 낮은, 예를 들어 적어도 100배 낮은, 예컨대 적어도 1,000배 낮은, 예로, 적어도 10,000배 낮은, 예를 들어, 적어도 100,000배 낮은 K_D 에 해당하는 친화성으로, 기결정된 항원에 결합한다. 친화성의 감소 정도는 결합제의 K_D 에 따라 결정되므로, 결합제의 K_D 가 매우 낮으면 (즉, 결합제가 고 특이성인 경우) 비-특이적인 항원에 대한 친화성 대비 항체에 대한 친화성의 감소 정도는 적어도 10,000배일 수 있다.

[0304] 용어 " k_d " (sec^{-1})는, 본원에 사용된 바와 같이, 특정한 결합제-항원 상호작용의 해리 속도 상수를 나타낸다. 이 수치는 k_{off} 값으로도 언급된다.

[0305] 용어 " K_D " (M)는, 본원에 사용된 바와 같이, 특정한 결합제-항원 상호작용의 해리 평형 상수를 나타낸다.

[0306] 또한, 본 발명은 본원에 기재된 VL 영역, VH 영역 또는 하나 이상의 CDR의 기능적인 변이체를 포함하는 결합제를 구상한다. 결합제의 맥락에서 사용되는 VL, VH 및 CDR의 기능적인 변이체는 결합제가 여전히 "참조" 또는 "

모" 결합제의 친화성 및/또는 특이성/선택성을 적어도 상당한 비율 (적어도 약 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 그 이상)로 유지하며, 일부 경우에는 이러한 결합제는 모 결합제와 비교해 더 높은 친화성, 선택성 및/또는 특이성을 동반할 수도 있다.

- [0307] 이러한 기능적 변이체는 통상적으로 모 서열에 대해 상당한 서열 동일성을 유지한다.
- [0308] 변이체의 예는 모 서열의 VH 및/또는 VL 및/또는 CDR 영역과 주로 보존적인 치환에 따른 차이가 있는 것을 포함하며; 예를 들어, 변이체에서 치환 최대 10개, 예를 들어 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1개는 보존적인 아미노산 잔기 치환이다.
- [0309] VL 영역 또는 VH 영역과 같이 본원에 기재된 서열의 기능적인 변이체 또는 VL 영역 또는 VH 영역과 같이 본원에 기재된 서열에 대해 특정 수준의 상동성 또는 동일성을 가진 서열의 기능적인 변이체는, 바람직하게는, 비-CDR 서열에 변형 또는 변이를 포함하지만, CDR 서열은 바람직하게는 변경 없이 유지된다.
- [0310] 예를 들어, 본원에 기재된 CDR 및/또는 특정 수준의 동일성의 변형을 포함하는, 본원에 기재된 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역 서열의 변이체를 포함하는 결합제는 항원, 예를 들어 CD3 및/또는 CLDN6에 대한 결합을 위해 또 다른 결합제, 예를 들어 본원에 기재된 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 결합제와 경쟁할 수 있으며, 또는 또 다른 결합제, 예를 들어 본원에 기재된 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 결합제의 항원에 대한 특이성을 가질 수 있다.
- [0311] 용어 "특이성"은 본원에 사용된 바와 같이 문맥상 상충하지 않은 한 다음과 같은 의미를 가지는 것으로 의도된다. 항체 2종이 동일한 항원 및 동일한 에피토프에 결합한다면, 이들은 "동일한 특이성"을 가지는 것이다.
- [0312] 용어 "경쟁한다" 및 "경쟁"은 제1 결합제와 제2 결합제가 동일한 항원에 대해 경쟁하는 것을 의미할 수 있다. 당해 기술 분야의 당업자라면, 항체와 같은 결합제가 표적 항원과의 결합에 대해 경쟁하는지를 검사하는 방법을 잘 알고 있다. 이러한 방법의 일 예는 소위 교차-경쟁 검정이며, 이는 예를 들어 ELISA로서 수행하거나 또는 유세포 분석(flow-cytometry)에 의해 수행할 수 있다. 대안적으로, 경쟁은 생물층 간섭측정(biolayer interferometry)으로 결정할 수 있다.
- [0313] 표적 항원과의 결합에 대해 경쟁하는 결합제는 항원 상의 여러 에피토프에 결합할 수 있으며, 여기서 에피토프는 하나의 에피토프에의 제1 결합제의 결합이 다른 에피토프에의 제2 결합제의 결합을 막을 만큼 서로 인접하게 위치한다. 그러나, 다른 경우에는, 서로 다른 결합제 2종이 항원 상의 동일 에피토프에 결합할 수 있으며, 경쟁적인 결합 검정에서 결합에 대해 경쟁할 것이다. 동일한 에피토프에 결합하는 이러한 결합제는 본원에서 동일한 특이성을 가진 것으로 간주한다. 따라서, 일 구현예에서, 동일한 에피토프에 결합하는 결합제는 표적 분자 상의 동일한 아미노산에 결합하는 것으로 간주한다. 결합제가 표적 항원 상의 동일 에피토프에 결합하는지는 표준적인 알라닌 스캐닝 실험 또는 당해 기술 분야의 당업자에게 공지된 항체-항원 결정화 실험에 의해 결정할 수 있다. 바람직하게는, 서로 다른 에피토프에 결합하는 결합제 또는 결합 도메인은 각각의 해당 에피토프에 대한 결합에 대해 서로 경쟁하지 않는다.
- [0314] 전술한 바와 같이, 다양한 항체 형태들이 당해 기술 분야에 알려져 있다. 본 발명의 결합제는 기본적으로 임의의 이소형 항체를 포함한다. 이소형의 예는 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4이다. 인간 경쇄 불변 영역, 카파 또는 람다 중 어느 하나를 이용할 수 있다. 일부 구현예에서, CH1 및 CL과 같은 본원에 기재된 결합제의 서열은 IgG1 이소형의 항체, 예를 들어 IgG1_k 항체로부터 유래된다.
- [0315] 바람직하게는, 항원-결합 영역 또는 도메인 각각이 중쇄 가변 영역 (VH)과 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하고, 상기 가변 영역은 각각 CDR 서열 3종, 즉 CDR1, CDR2 및 CDR3와, 프레임워크 서열 4종, 즉 FR1, FR2, FR3 및 FR4를 포함한다. 아울러, 바람직하게는, 본원에 기재된 결합제는 중쇄 불변 영역 (CH)와 경쇄 불변 영역 (CL)을 포함한다.
- [0316] 용어 "결합제"는 본 발명의 맥락에서 하나 이상의 원하는 항원, 예를 들어 CD3 및 CLDN6에 결합할 수 있는 임의의 제제를 지칭한다. 용어 "결합제"는 항체, 항체 단편 또는 임의의 다른 결합 단백질, 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다. 일부 구현예에서, 결합 단백질은 Fab 및 scFv와 같은 항체 단편을 포함한다.
- [0317] 자연 생성 항체는 일반적으로 단일 특이성이며, 즉 이는 하나의 항원에 결합한다. 본 발명은 (CD3 수용체와 결합함으로써) T 세포와 같은 세포독성 세포 및 (CLDN6과 결합함으로써) 암세포와 같은 표적 세포에 결합하는 결합제를 제공한다. 이러한 결합제는 적어도 이중 특이성이거나 또는 3중 특이성, 4중 특이성 등과 같이 다중 특이성이다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 결합제는 2종의 서로 다른 항체의 단편들 (2종의 서로 다른 항체의

단편이 3개의 결합 도메인을 형성함)로 구성되는, 인공 단백질일 수 있다.

- [0318] 본 발명에서, 이중특이적 결합제, 특히 이중특이적 단백질은 2개의 서로 다른 결합 특이성을 갖고 따라서 2개의 에피토프에 결합할 수 있는 분자이다. 구체적으로, 본원에 사용된 바와 같은 용어 "이중 특이성 항체"는 항원-결합 부위 3개, 즉 제1 에피토프에 대해 친화성을 가진 제1 결합 부위와 제1 에피토프와는 구분되는 제2 에피토프에 대해 결합 친화성을 가진 제2 및 3 결합 부위를 포함하는 항체 유래 분자를 포함한다.
- [0319] 본 발명의 맥락에서 용어 "이중 특이적"은 서로 다른 에피토프, 특히 서로 다른 항원, 예를 들어 CD3 및 CLDN6의 서로 다른 에피토프에 결합하는 2개의 서로 다른 항원 결합 영역을 포함하는 제제를 의미한다.
- [0320] "다중특이 결합제(Multispecific binding agents)"는 2개 보다 많은 상이한 결합 특이성을 갖는 분자들이다.
- [0321] 일부 구현예에서, CD3 및 CLDN6에 결합하는 본원에 기재된 결합제는 적어도 3가이다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "가(valent)", "결합가(valence 또는 valencies)", 또는 이의 다른 문법적 변형어는 결합제 내의 항원 결합 부위 또는 결합 도메인의 수를 의미한다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 결합제는 CD3에 대한 적어도 하나의 항원 결합 부위 또는 결합 도메인과 CLDN6에 대한 적어도 2개의 항원 결합 부위 또는 결합 도메인을 갖는다. 동일한 항원에 결합하는 항원 결합 부위는 동일한 에피토프 또는 상이한 에피토프를 인지할 수 있다.
- [0322] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 결합제는 Fab-scFv2 작제물 형태, 즉, CD3에 특이적인 Fab 단편에는 Fab 단편의 불변 영역의 C-말단에서 CLDN6에 특이적인 2개의 scFv 단편이 제공된다. 일부 구현예에서, 결합제는 바람직하게는 이황화 가교에 의해 서로 결합된 2개의 폴리펩티드 사슬로 구성된 이량체이며, 여기서 제1 폴리펩티드는 CH1 폴리펩티드 사슬을 통해 추가적인 VH 도메인에 연결된 scFv를 포함하고, 제2 폴리펩티드는 CL 폴리펩티드 사슬을 통해 추가적인 VL 도메인에 연결된 scFv를 포함한다. 이황화 가교는 바람직하게는 CH1 내의 Cys 잔기와 CL 내의 Cys 잔기 간에 형성되고, 이에 따라 제1 폴리펩티드의 추가적인 VL이 제2 폴리펩티드의 추가적인 VH와 항원-결합 입체형태로 회합하여 결합제는 전체적으로 3개의 항원-결합 도메인을 포함한다. 따라서, 일부 구현예에서, 상기 결합제는 이량체화될 수 있고 scFv 결합 도메인이 (바람직하게는 Fd/L의 C-말단에서) 혼입될 수 있는 Fab 단편의 중쇄(Fd 단편) 및 경쇄(L)를 포함한다. 일부 구현예에서, scFv 모이어티 내의 VH 도메인과 VL 도메인은 펩티드 링커에 의해 연결되고/되거나 Fab 사슬과 scFv는 펩티드 링커에 의해 연결된다. 일부 구현예에서, scFv 모이어티 내의 VH 도메인과 VL 도메인은 아미노산 서열 $(G_4S)_x$ 을 포함하는 펩티드 링커에 의해 연결되고, 여기서 x는 2, 3, 4, 5 또는 6이다. 일부 구현예에서, Fab 사슬과 scFv는 아미노산 서열 DVPG₂S 또는 SGPG₃RS(G₄S)₂를 포함하는 펩티드 링커에 의해 연결된다. 일부 구현예에서, 아미노산 서열 SGPG₃RS(G₄S)₂를 포함하는 링커는 scFv 결합 도메인을 Fd 단편에 연결시키고 아미노산 서열 DVPG₂S를 포함하는 링커는 scFv 결합 도메인을 L 단편에 연결시킨다. 일부 구현예에서, scFv 모이어티는 CLDN6에 결합하고 Fab 모이어티는 CD3에 결합한다.
- [0323] 용어 "링커"는 2개의 별개의 기능적 단위(예를 들어, 항원 결합 모이어티)를 연결시키는 작용을 하는 임의의 수단을 지칭한다. 링커의 유형에는 화학적 링커 및 폴리펩티드 링커가 포함되지만 이에 한정되지는 않는다. 폴리펩티드 링커의 서열은 한정되지 않는다. 일부 구현예에서, 폴리펩티드 링커는 바람직하게는 세린 및 글리신 서열을 포함하는 것들과 같이 비면역원성이고 유연하다. 특정 작제물에 따라, 링커는 길거나 짧을 수 있다.
- [0324] 일부 구현예에서, VH 도메인과 VL 도메인을 연결시켜 VH-VL 또는 VL-VH scFv 도메인을 형성하는 링커는 바람직하게는 글리신-세린 펩티드 링커와 같은 유연한 펩티드 링커를 포함한다. 일부 구현예에서, 링커는 아미노산 서열 $(G_4S)_x$ 를 포함하고, 여기서 x는 2, 3, 4, 5 또는 6이다. 일부 구현예에서, VH-VL 배향으로 VH 도메인과 VL 도메인을 포함하는 scFv 도메인의 경우에, 링커는 바람직하게는 아미노산 서열 $(G_4S)_4$ 를 포함한다. 일부 구현예에서, VL-VH 배향으로 VH 도메인과 VL 도메인을 포함하는 scFv 도메인의 경우에, 링커는 바람직하게는 아미노산 서열 $(G_4S)_5$ 를 포함한다.
- [0325] 일부 구현예에서, 바람직하게는 CH1의 C-말단에서 scFv 도메인과 Fd 도메인을 연결시키는 링커는 바람직하게는 아미노산 서열 DVPG₂S 또는 SGPG₃RS(G₄S)₂, 바람직하게는 SGPG₃RS(G₄S)₂를 포함한다. 일부 구현예에서, 바람직하게는 CL의 C-말단에서 scFv 도메인과 L 도메인을 연결시키는 링커는 바람직하게는 아미노산 서열 DVPG₂S 또는 SGPG₃RS(G₄S)₂, 바람직하게는 DVPG₂S를 포함한다.
- [0326] 결합제는 N-말단 분비 신호와 같은 분자의 분비를 용이하게 하기 위한 아미노산 서열 및/또는 분자의 결합, 정

제 또는 검출을 용이하게 하는 하나 이상의 에피토프 태그를 또한 포함할 수 있다.

- [0327] 일부 구현예에 따르면, 본원에 기재된 결합체의 폴리펩티드 사슬 각각은 신호 펩티드를 포함한다.
- [0328] 이러한 신호 펩티드는 일반적으로 약 15 내지 30 아미노산 길이를 나타내고 바람직하게는 폴리펩티드 사슬의 N-말단에 위치하나, 이에 제한되지는 않는다. 본원에 정의된 신호 펩티드는, 예를 들어 RNA에 의해 암호화된 폴리펩티드 사슬(들)의, 경계가 정해진 세포의 구획안으로, 바람직하게는 세포 표면, 소포체(ER) 또는 엔도솜-라이소솜(endosomal-lysosomal)구획 안으로의 수송을 가능하게 한다.
- [0329] 본원에 정의된 신호 펩티드 서열은 면역글로불린의 신호 펩티드 서열, 예를 들어 면역글로불린 중쇄 가변 영역의 신호 펩티드 서열 또는 면역글로불린 경쇄 가변 영역의 신호 펩티드 서열을 포함하지만 이에 제한되지는 않으며, 여기서 면역글로불린은 인간 면역글로불린일 수 있다. 일부 구현예에서, 신호 펩티드 서열은 MHC 분자, 예를 들어 MHC 클래스 I 분자의 신호 펩티드 서열이고, 여기서 MHC 분자는 인간 MHC 분자(HLA 분자)일 수 있다.
- [0330] 일부 구현예에서, 분비 신호는 분비 경로를 통한 충분한 통과 및/또는 결합체 또는 이의 폴리펩티드 사슬의 세포외 환경으로의 분비를 가능하게 하는 신호 서열(예를 들어, 서열번호 4의 아미노산 1 내지 26을 포함하는 아미노산 서열)이다. 일부 구현예에서, 분비 신호 서열은 절단가능하고 성숙한 결합체로부터 제거된다. 일부 구현예에서, 분비 신호 서열은 결합체가 생산되는 세포 또는 유기체와 관련하여 선택된다.
- [0331] 추가 구현예에서, 본원에 기재된 결합체는 사이토카인, 면역억제제 및/또는 면역자극 분자와 같은 하나 이상의 치료 모이어티에 연결되거나 접합된다.
- [0332] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 결합체는 제1 결합 도메인을 포함하는 Fab 항체 단편을 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 결합체는 제1 결합 도메인을 포함하는 Fab 항체 단편에 공유결합으로 연결된 제2 및 제3 결합 도메인을 포함하는 2개의 scFv 항체 단편을 포함한다. 일부 구현예에서, 결합체는 Fab 항체 단편의 각 사슬의 C-말단에 공유결합으로 연결된 scFv 항체 단편을 포함한다.
- [0333] 본원에 기재된 결합체의 CH1 서열 및 CL 서열은 각각 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 포함하지만 이에 제한되지 않는 임의의 이소형일 수 있고, 하나 이상의 돌연변이 또는 변형을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, CH1 서열 및 CL 서열 각각은 선택적으로 하나 이상의 돌연변이 또는 변형을 갖는 IgG1 이소형이거나 이로부터 유래된다.
- [0334] 본 발명의 일부 구현예에서, 본원에 기재된 결합체는 전장 항체를 포함하지 않는다. 본 발명의 일부 구현예에서, 본원에 기재된 결합체는 항체의 CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함하지 않는다. 본 발명의 일부 구현예에서, 본원에 기재된 결합체는 Fc 영역을 포함하지 않는다. 본 발명의 일부 구현예에서, 본원에 기재된 결합체는 효과기 기능을 발휘할 수 있는 Fc 서열을 포함하지 않는다.
- [0335] 본 발명의 문맥 상 용어 "효과기 기능"은 예를 들어 종양 세포와 같은 병든 세포의 살상 또는 종양의 전파 및 전이의 억제제를 비롯한, 종양 성장의 억제 및/또는 종양 발달의 억제를 초래하는 면역계의 성분에 의해 매개되는 임의의 기능을 포함한다. 바람직하게는, 본 발명의 문맥에서의 효과기 기능은 T 세포 매개된 효과기 기능이다. 이러한 기능은 ADCC, ADCP, 또는 CDC를 포함한다.
- [0336] 항체 의존적 세포 매개된 세포독성 (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity: ADCC)은 세포독성 과립의 내용물의 방출 또는 세포 사멸 유도 분자의 발현을 특징으로 하는 비식작용 과정을 통해 세포독성 효과기 세포에 의해 항체 암호화 표적 세포를 사멸시키는 것이다. ADCC는 또한 표적을 용해하지만 임의의 다른 세포를 필요로 하지 않는 면역 보체계와 독립적이다. ADCC는 면역글로불린(Ig)의 Fc 영역에 결합하는 효과기 세포 표면에 존재하는 당단백질인 특정 Fc 수용체(FcR)와 표적 결합 항체(IgG, IgA 또는 IgE 군에 속함)의 상호작용을 통해 촉발된다. ADCC를 매개하는 효과기 세포는 자연 살해(NK) 세포, 단핵구, 대식세포, 호중구, 호산구 및 수지상 세포를 포함한다. ADCC는 효능이 여러 매개변수(표적 세포 표면의 항원 밀도 및 안정성; 항체 친화성 및 FcR-결합 친화도)에 따라 달라지는 신속한 효과기 메커니즘이다. 치료 항체에 가장 많이 사용되는 IgG 서브군(subclass)인 인간 IgG1을 수반하는 ADCC는 Fc 부분의 글리코실화 프로파일 및 Fc γ 수용체의 다형성에 크게 의존한다.
- [0337] 항체 의존성 세포 포식작용(antibody-dependent cellular phagocytosis: ADCP)은 많은 항체 요법의 결정적인 작용 메커니즘 중 하나이다. 이는 항체가 그의 Fc 도메인을 식균 세포의 특정 수용체에 연결하고 포식작용을 유도함으로써 결합된 표적을 제거하는 고도로 조절된 과정으로 정의된다. ADCC와 달리, ADCP는 Fc γ RIIa, Fc γ RI, 및 Fc γ RIIIa를 통해 단핵구, 대식세포, 호중구 및 수지상 세포에 의해 매개될 수 있으며, 이 중 대식세포

상의 Fc γ RIIa(CD32a)가 우세한 경로를 나타낸다.

- [0338] 보체 의존성 세포독성(complement-dependent cytotoxicity: CDC)은 항체에 의해 지시될 수 있는 또 다른 세포 사멸 방법이다. IgM은 보체 활성화에 가장 효과적인 이소형이다. IgG1 및 IgG3은 또한 전통적 보체 활성화 경로를 통해 CDC를 지시하는 데 매우 효과적이다. 바람직하게는, 이 캐스케이드에서, 항원-항체 복합체의 형성은 IgG 분자(C1q는 보체 C1의 3개의 하위 구성요소 중 하나임)와 같은 참여 항체 분자의 C_H2 도메인에서 매우 근접한 다중 C1q 결합 부위의 은폐를 해제한다. 바람직하게는 이러한 은폐되지 않은 C1q 결합 부위는 이전에 낮은 친화도의 C1q-IgG 상호작용을 높은 결합력의 하나로 전환시키며, 이는 일련의 다른 보체 단백질을 수반하는 이벤트의 캐스케이드를 촉발하고 효과기-세포 화학주성/활성화제 C3a 및 C5a의 단백질 분해 방출을 유도한다. 바람직하게는, 보체 캐스케이드는 막 공격 복합체의 형성에서 종료되며, 이는 세포 내로 및 밖으로의 물 및 용질의 자유 통과를 용이하게 하는 세포 막 내의 기공을 생성한다.
- [0339] 일부 구현예에서, 결합제는 CD3에 특이성을 갖는 결합 도메인 및 CLDN6에 특이성을 갖는 2개의 결합 도메인을 형성하는 2개의 폴리펩티드 사슬을 포함한다. 일부 구현예에서, 두 개의 폴리펩티드 사슬은 두 개의 RNA 분자에 의해 암호화된다. 일부 구현예에서, 결합제는 2개의 폴리펩티드 사슬로 구성된 이량체이고, 여기서 제1 폴리펩티드는 면역글로불린(CH1)의 중쇄의 불변 영역 1을 통해 추가의 VH 도메인에 연결된 CLDN6에 특이적인 scFv를 포함하며, 제2 폴리펩티드는 면역글로불린(CL) 경쇄의 불변 영역을 통해 추가 VL 도메인에 연결된 CLDN6에 특이적인 scFv를 포함한다. 일부 구현예에서, 두 개의 폴리펩티드 사슬은 이황화 가교에 의해 함께 결합된다. 이황화 가교는 바람직하게는 CH1 도메인의 Cys 잔기와 CL 도메인의 Cys 잔기 사이에 형성되어, 제1 폴리펩티드의 추가 VH 도메인이 CD3-결합 입체형태에서 제2 폴리펩티드의 추가 VL 도메인과 회합하여, 결합제는 전체적으로 3개의 항원-결합 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, CD3에 특이적인 결합 도메인은 Fab 단편으로 구성되고, CLDN6에 특이적인 결합 도메인은 각각 scFv로 구성된다. 일부 구현예에서, Fab 단편의 각 사슬은 하나의 scFv에 연결되고, scFv는 바람직하게는 Fab 단편의 C-말단에 연결된다. 본 발명에 따르면, scFv 모이어티의 VH 및 VL 도메인은 바람직하게는 아미노산 서열 (G₄S)₄를 포함하는 펩티드 링커와 같은 펩티드 링커에 의해 연결되고, Fab 사슬 및 scFv는 바람직하게는 아미노산 서열 SGPG₃RS(G₄S)₂ 또는 DVPG₂S를 포함하는 펩티드 링커와 같은 펩티드 링커에 의해 연결된다.
- [0340] 일부 구현예에서, 결합제는 (i) CD3에 특이성을 갖는 면역글로불린으로부터 유래된 중쇄의 가변 영역(VH(CD3)), CLDN6에 특이성을 갖는 면역글로불린으로부터 유래된 VH (VH(CLDN6)), 및 CLDN6에 특이성을 갖는 면역글로불린으로부터 유래된 경쇄의 가변 영역(VL(CLDN6))을 포함하는 제1 폴리펩티드 사슬; 및 (ii) CD3에 특이성을 갖는 면역글로불린으로부터 유래된 경쇄의 가변 영역(VL(CD3)), CLDN6에 특이성을 갖는 면역글로불린으로부터 유래된 VH(VH(CLDN6)), 및 CLDN6에 특이성을 갖는 면역글로불린으로부터 유래된 경쇄의 가변 영역(VL(CLDN6))을 포함하는 제2 폴리펩티드 사슬을 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 폴리펩티드 사슬은 제2 폴리펩티드 사슬과 상호작용하여 결합제를 형성한다. 일부 구현예에서, 제1 폴리펩티드 사슬의 VH(CD3)와 제2 폴리펩티드 사슬의 VL(CD3)은 상호작용하여 CD3에 특이성을 갖는 결합 도메인을 형성한다. 일부 구현예에서, 제1 폴리펩티드 사슬의 VH(CLDN6) 및 VL(CLDN6)은 상호작용하여 CLDN6에 특이성을 갖는 결합 도메인을 형성한다. 일부 구현예에서, 제2 폴리펩티드 사슬의 VH(CLDN6) 및 VL(CLDN6)은 상호작용하여 CLDN6에 특이성을 갖는 결합 도메인을 형성한다. 일부 구현예에서, 제1 및 제2 폴리펩티드 사슬은 면역글로불린 또는 이의 기능적 변이체로부터 유래된 중쇄(CH1)의 불변 영역 1 및 면역글로불린 또는 이의 기능적 변이체로부터 유래된 경쇄(CL)의 불변 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, 면역글로불린은 IgG1이다. 일부 구현예에서, IgG1은 인간 IgG1이다. 일부 구현예에서, 제1 폴리펩티드 사슬의 VH, VL 및 CH1은 N-말단에서 C-말단으로 VH(CD3)-CH1-VH(CLDN6)-VL(CLDN6), 또는 VH(CD3)-CH1-VL(CLDN6)-VH(CLDN6)의 순서로 배열된다.
- [0341] 일부 구현예에서, CH1은 펩티드 링커에 의해 VH(CLDN6) 또는 VL(CLDN6)에 연결된다. 일부 구현예에서, 펩티드 링커는 아미노산 서열 SGPGGGGRS(G₄S)₂ 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다.
- [0342] 일부 구현예에서, 제2 폴리펩티드 사슬의 VH, VL 및 CL은 N 말단에서 C 말단으로 VL(CD3)-CL-VH(CLDN6)-VL(CLDN6) 또는 VL(CD3)-CL-VL(CLDN6)-VH(CLDN6)의 순서로 배열된다.
- [0343] 일부 구현예에서, CL은 펩티드 링커에 의해 VH(CLDN6) 또는 VL(CLDN6)에 연결된다. 일부 구현예에서, 펩티드 링커는 아미노산 서열 DVPGGS 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다.
- [0344] 일부 구현예에서, VH(CLDN6) 및 VL(CLDN6)은 펩티드 링커에 의해 서로 연결된다. 일부 구현예에서, 펩티드 링커는 아미노산 서열 (G₄S)_x 또는 이의 기능적 변이체를 포함하며, 여기서 x는 2, 3, 4, 5 또는 6이다. 일부 구현예

에서, 펩티드 링커는 아미노산 서열(G_4S)₄ 또는 이의 기능적 변형체를 포함한다.

- [0345] 일부 구현예에서, 제1 폴리펩티드 사슬의 CH1은 제2 폴리펩티드 사슬의 CL과 상호작용한다.
- [0346] 일부 구현예에서, CH1은 서열번호 4의 아미노산 146 내지 248의 아미노산 서열 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다.
- [0347] 일부 구현예에서, CL은 서열번호 6의 아미노산 133 내지 239의 아미노산 서열 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다.
- [0348] 일부 구현예에서, VH(CD3)는 서열번호 4(각각 서열번호 18, 19 및 20)의 아미노산 27 내지 145의 아미노산 서열의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함한다. 일부 구현예에서, VH(CD3)는 아미노산 서열 GYTFTRYT 또는 이의 기능적 변이체를 포함하는 CDR1, 아미노산 서열 INPSRGYT 또는 이의 기능적 변이체를 포함하는 CDR2, 및 아미노산 서열 ARYYDDHYSLDY 또는 ARYYDDHYCLDY 또는 이의 기능적 변이체를 포함하는 CDR3을 포함한다. 일부 구현예에서, VH(CD3)는 서열번호 4의 아미노산 27 내지 145의 아미노산 서열 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다.
- [0349] 일부 구현예에서, VL(CD3)은 서열번호 6(각각 서열번호 22, 23 및 24)의 아미노산 27 내지 132의 아미노산 서열의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함한다. 일부 구현예에서, VL(CD3)은 아미노산 서열 SSVSY 또는 이의 기능적 변이체를 포함하는 CDR1, 아미노산 서열 DTS 또는 이의 기능적 변이체를 포함하는 CDR2, 및 아미노산 서열 QQWSSNPLT 또는 이의 기능적 변이체를 포함하는 CDR3을 포함한다. 일부 구현예에서, VL(CD3)은 서열번호 6의 아미노산 27 내지 132의 아미노산 서열 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다.
- [0350] 일부 구현예에서, VH(CLDN6)는 서열번호 4(각각 서열번호 25, 26 및 27)의 아미노산 267 내지 383의 아미노산 서열의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함한다. 일부 구현예에서, VH(CLDN6)은 아미노산 서열 GYSFTGYT 또는 이의 기능적 변이체를 포함하는 CDR1, 아미노산 서열 INPYNGGT 또는 이의 기능적 변이체를 포함하는 CDR2, 및 아미노산 서열 ARDYGFVLDY 또는 이의 기능적 변이체를 포함하는 CDR3을 포함한다. 일부 구현예에서, VH(CLDN6)은 서열번호 4의 아미노산 267 내지 383의 아미노산 서열 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다.
- [0351] 일부 구현예에서, VL(CLDN6)은 서열번호 4(각각 서열번호 28, 29 및 30)의 아미노산 404 내지 510의 아미노산 서열의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함한다. 일부 구현예에서, VL(CLDN6)은 아미노산 서열 SSVSY 또는 이의 기능적 변이체를 포함하는 CDR1, 아미노산 서열 STS 또는 이의 기능적 변이체를 포함하는 CDR2, 및 아미노산 서열 QQRSNYPWT 또는 이의 기능적 변이체를 포함하는 CDR3을 포함한다. 일부 구현예에서, VL(CLDN6)은 서열번호 4의 아미노산 404 내지 510의 아미노산 서열의 CDR1, CDR2 및 CDR3, 및 CDR1에 대한 위치 +15에 세린 잔기(서열번호 4의 위치 449에 해당)를 포함한다. 일부 구현예에서, VL(CLDN6)은 서열번호 4의 아미노산 404 내지 510의 아미노산 서열의 CDR1, CDR2 및 CDR3, 및 CDR2에 대한 위치 -3(서열번호 4의 위치 449에 해당함)에 세린 잔기를 포함한다. 일부 구현예에서, VL(CLDN6)은 서열번호 4의 아미노산 404 내지 510의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 지니는 서열, 및 서열번호 4의 위치 449에 해당하는 위치에 세린 잔기를 포함한다. 일부 구현예에서, VL(CLDN6)은 서열번호 4의 아미노산 404 내지 510의 아미노산 서열 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다.
- [0352] CDR1에 대한 위치 +15의 세린 잔기는 CDR1 말단 뒤의 15번째 아미노산 위치가 세린 잔기임을 의미한다. CDR2에 대한 위치 -3의 세린 잔기는 CDR2 시작 전의 세 번째 아미노산이 세린임을 의미한다. 이는 예를 들어 각각 다음(N에서C)으로 표시될 수 있다: XXXXX - Y₁₄ - S 및 S - Y₂ - ZZZ, 여기서 X는 CDR1 아미노산을 나타내고, Y는 CDRs 사이의 개재 아미노산을 나타내고, S는 세린 잔기를 나타내며, Z는 CDR2 아미노산을 나타낸다.
- [0353] 일부 구현예에서, VH(CD3)는 서열번호 4의 아미노산 27 내지 145의 아미노산 서열의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하고, VL(CD3)은 서열번호 6의 아미노산 서열 27 내지 132의 아미노산 서열의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하며, VH(CLDN6)는 서열번호 4의 아미노산 267 내지 383의 아미노산 서열의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하고, VL(CLDN6)은 서열번호 4의 아미노산 404 내지 510의 아미노산 서열의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하며, 그리고 바람직하게 VL(CLDN6)은 CDR1에 대한 위치 +15에 세린 잔기(서열번호 4의 위치 449에 해당) 및/또는 CDR2에 대한 위치 -3의 세린 잔기(서열번호 4의 위치 449에 해당)를 포함한다.
- [0354] 일부 구현예에서, VH(CD3)는 서열번호 4의 아미노산 27 내지 145의 아미노산 서열 또는 이의 기능적 변이체를 포함하고, VL(CD3)은 서열번호 6의 아미노산 27 내지 132의 아미노산 서열 또는 이의 기능적 변이체를 포함하며, VH(CLDN6)는 서열번호 4의 아미노산 267 내지 383의 아미노산 서열 또는 이의 기능적 변이체를 포함

하고, 및/또는 VL(CLDN6)은 서열번호 4의 아미노산 404 내지 510의 아미노산 서열 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다.

[0355] 일부 구현예에서, 제1 폴리펩티드 사슬은 서열번호 4의 아미노산 27 내지 510의 아미노산 서열, 서열번호 4의 아미노산 27 내지 510의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열, 또는 서열번호 4의 아미노산 27 내지 510의 아미노산 서열의 기능적 단편, 또는 서열번호 4의 아미노산 27 내지 510의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 폴리펩티드 사슬은 서열번호 4의 아미노산 27 내지 510의 아미노산 서열을 포함한다.

[0356] 상기 및 다른 구현예에서, 제1 폴리펩티드 사슬을 암호화하는 RNA는 서열번호 5의 뉴클레오티드 132 내지 1583의 뉴클레오티드 서열, 서열번호 5의 뉴클레오티드 132 내지 1583의 뉴클레오티드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열, 또는 서열번호 5의 뉴클레오티드 132 내지 1583의 뉴클레오티드 서열의 기능적 단편, 또는 서열번호 5의 뉴클레오티드 132 내지 1583의 뉴클레오티드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 폴리펩티드 사슬을 암호화하는 RNA는 서열번호 5의 뉴클레오티드 132 내지 1583의 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0357] 일부 구현예에서, 제2 폴리펩티드 사슬은 서열번호 6의 아미노산 27 내지 489의 아미노산 서열, 서열번호 6의 아미노산 27 내지 489의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열, 또는 서열번호 6의 아미노산 27 내지 489의 아미노산 서열의 기능적 단편, 또는 서열번호 6의 아미노산 27 내지 489의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 제2 폴리펩티드 사슬은 서열번호 6의 아미노산 27 내지 489의 아미노산 서열을 포함한다.

[0358] 상기 및 다른 구현예에서, 제2 폴리펩티드 사슬을 암호화하는 RNA는 서열번호 7의 뉴클레오티드 132 내지 1520의 뉴클레오티드 서열, 서열번호 7의 뉴클레오티드 132 내지 1520의 뉴클레오티드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열, 또는 서열번호 7의 뉴클레오티드 132 내지 1520의 뉴클레오티드 서열의 기능적 단편, 또는 서열번호 7의 뉴클레오티드 132 내지 1520의 뉴클레오티드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 제2 폴리펩티드 사슬을 암호화하는 RNA는 서열번호 7의 뉴클레오티드 132 내지 1520의 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0359] 일부 구현예에서, (i) 제1 폴리펩티드 사슬은 서열번호 4의 아미노산 27 내지 510의 아미노산 서열, 서열번호 4의 아미노산 27 내지 510의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열, 또는 서열번호 4의 아미노산 27 내지 510의 아미노산 서열의 기능적 단편, 또는 서열번호 4의 서열번호 27 내지 510의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다; 그리고 (ii) 제2 폴리펩티드 사슬은 서열번호 6의 아미노산 27 내지 489의 아미노산 서열을 포함하며, 서열번호 6의 아미노산 27 내지 489의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산서열, 또는 서열번호 6의 아미노산 27 내지 489의 아미노산 서열의 기능적 단편, 또는서열번호 6의 아미노산 27 내지 489의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 폴리펩티드 사슬은 서열번호 4의 아미노산 27 내지 510의 아미노산 서열을 포함하고, 제2 폴리펩티드 사슬은 서열번호 6의 아미노산 27 내지 489의 아미노산 서열을 포함한다.

[0360] 상기 및 다른 구현예에서, 제1 폴리펩티드 사슬을 암호화하는 RNA는 서열번호 5의 뉴클레오티드 132 내지 1583의 뉴클레오티드 서열, 서열번호 5의 뉴클레오티드 132 내지 1583의 뉴클레오티드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열, 또는 서열번호 5의 뉴클레오티드 132 내지 1583의 뉴클레오티드 서열의 기능적 단편, 또는 서열번호 5의 뉴클레오티드 132 내지 1583의 뉴클레오티드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 폴리펩티드 사슬을 암호화하는 RNA는 서열번호 5의 뉴클레오티드 132 내지 1583의 뉴클레오티드 서열을 포함하며, 그리고 제2 폴리펩티드 사슬을 암호화하는 RNA는 서열번호 7의 뉴클레오티드 132 내지 1520의 뉴클레오티드 서열, 서열번호 7의 뉴클레오티드 132 내지 1520의 뉴클레오티드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열, 또는 서열번호 7의

뉴클레오타이드 132 내지 1520의 뉴클레오타이드 서열의 기능적 단편, 또는 서열번호 7의 뉴클레오타이드 132 내지 1520의 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 폴리펩티드 사슬을 암호화하는 RNA는 서열번호 5의 뉴클레오타이드 132 내지 1583의 뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 제2 폴리펩티드 사슬을 암호화하는 RNA는 서열번호 7의 뉴클레오타이드 132 내지 1520의 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0361] 일부 구현예에 따르면, 신호 펩티드는 직접적으로 또는 링커를 통해 본원에 기재된 폴리펩티드 사슬에 융합된다. 따라서, 일부 구현예에서, 신호 펩티드는 상술한 아미노산 서열에 융합된다.

[0362] 일부 구현예에서, 신호 서열은 서열번호 4의 아미노산 1 내지 26의 아미노산 서열, 서열번호 4의 아미노산 1 내지 26의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열, 또는 서열번호 4의 아미노산 1 내지 26의 아미노산 서열의 기능적 단편, 또는 아미노산 서열 4의 서열번호 1 내지 26의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 신호 서열은 서열번호 4의 아미노산 1 내지 26의 아미노산 서열을 포함한다.

[0363] 상기 및 다른 구현예에서, 신호 서열을 암호화하는 RNA는 (i) 서열번호 5의 뉴클레오타이드 54 내지 131의 뉴클레오타이드 서열, 서열번호 5의 뉴클레오타이드 54 내지 131의 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열, 또는 서열번호 5의 뉴클레오타이드 54 내지 131의 뉴클레오타이드 서열의 기능적 단편, 또는 서열번호 5의 뉴클레오타이드 54 내지 131의 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 신호 서열을 암호화하는 RNA는 서열번호 5의 뉴클레오타이드 54 내지 131의 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0364] 일부 구현예에서, 제1 폴리펩티드 사슬은 서열번호 4의 아미노산 서열, 서열번호 4의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열, 또는 서열번호 4의 아미노산 서열의 기능적 단편, 또는 서열번호 4의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 폴리펩티드 사슬은 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함한다.

[0365] 상기 및 다른 구현예에서, 제1 폴리펩티드 사슬을 암호화하는 RNA는 서열번호 5의 뉴클레오타이드 54 내지 1583의 뉴클레오타이드 서열, 서열번호 5의 뉴클레오타이드 54 내지 1583의 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열, 또는 서열번호 5의 뉴클레오타이드 54 내지 1583의 뉴클레오타이드 서열의 기능적 단편, 또는 서열번호 5의 뉴클레오타이드 54 내지 1583의 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 폴리펩티드 사슬을 암호화하는 RNA는 서열번호 5의 뉴클레오타이드 54 내지 1583의 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0366] 추가 구현예에서, 제1 폴리펩티드 사슬을 암호화하는 RNA는 서열번호 5의 뉴클레오타이드 서열, 서열번호 5의 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열, 또는 서열번호 5의 뉴클레오타이드 서열의 기능적 단편, 또는 서열번호 5의 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 폴리펩티드 사슬을 암호화하는 RNA는 서열번호 5의 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0367] 일부 구현예에서, 제2 폴리펩티드 사슬은 서열번호 6의 아미노산 서열, 서열번호 6의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열, 또는 서열번호 6의 아미노산 서열의 기능적 단편, 또는 서열번호 6의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 제2 폴리펩티드 사슬은 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함한다.

[0368] 상기 및 다른 구현예에서, 제2 폴리펩티드 사슬을 암호화하는 RNA는 서열번호 7의 뉴클레오타이드 54 내지 1520의 뉴클레오타이드 서열, 서열번호 7의 뉴클레오타이드 54 내지 1520의 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열, 또는 서열번호 7의 뉴클레오타이드 54 내지 1520의 뉴클레오타이드 서열의 기능적 단편, 또는 서열번호 7의 뉴클레오타이드 54 내지 1520의 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

일부 구현예에서, 제2 폴리펩티드 사슬을 암호화하는 RNA는 서열번호 7의 뉴클레오티드 54 내지 1520의 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0369] 추가 구현예에서, 제2 폴리펩티드 사슬을 암호화하는 RNA는 서열번호 7의 뉴클레오티드 서열, 서열번호 7의 뉴클레오티드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열, 또는 서열번호 7의 뉴클레오티드 서열의 기능적 단편, 또는 서열번호 7의 뉴클레오티드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 제2 폴리펩티드 사슬을 암호화하는 RNA는 서열번호 7의 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0370] 일부 구현예에서, (i) 제1 폴리펩티드 사슬은 서열번호 4의 아미노산 서열, 서열번호 4의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열, 또는 서열번호 4의 아미노산 서열의 기능적 단편, 또는 서열번호 4의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다; 그리고 (ii) 제2 폴리펩티드 사슬은 서열번호 6 아미노산 서열을 포함하며, 서열번호 6의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산서열, 또는 서열번호 6의 아미노산 서열의 기능적 단편, 또는 서열번호 6의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 폴리펩티드 사슬은 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하고, 제2 폴리펩티드 사슬은 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함한다.

[0371] 상기 및 다른 구현예에서, (i) 제1 폴리펩티드 사슬을 암호화하는 RNA는 서열번호 5의 뉴클레오티드 132 내지 1583의 뉴클레오티드 서열, 서열번호 5의 뉴클레오티드 132 내지 1583의 뉴클레오티드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열, 또는 서열번호 5의 뉴클레오티드 132 내지 1583의 뉴클레오티드 서열의 기능적 단편, 또는 서열번호 5의 뉴클레오티드 132 내지 1583의 뉴클레오티드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하며, 그리고 (ii) 제2 폴리펩티드 사슬을 암호화하는 RNA는 서열번호 7의 뉴클레오티드 54 내지 1520의 뉴클레오티드 서열, 서열번호 7의 뉴클레오티드 54 내지 1520의 뉴클레오티드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열, 또는 서열번호 7의 뉴클레오티드 54 내지 1520의 뉴클레오티드 서열의 기능적 단편, 또는 서열번호 7의 뉴클레오티드 54 내지 1520의 뉴클레오티드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 폴리펩티드 사슬을 암호화하는 RNA는 서열번호 5의 뉴클레오티드 54 내지 1583의 뉴클레오티드 서열을 포함하며, 제2 폴리펩티드 사슬을 암호화하는 RNA는 서열번호 7의 뉴클레오티드 54 내지 1520의 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0372] 추가 구현예에서, (i) 제1 폴리펩티드 사슬을 암호화하는 RNA는 서열번호 5의 뉴클레오티드 서열, 서열번호 5의 뉴클레오티드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열, 또는 서열번호 5의 뉴클레오티드 서열의 기능적 단편, 또는 서열번호 5의 뉴클레오티드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하며, 그리고 (ii) 제2 폴리펩티드 사슬을 암호화하는 RNA는 서열번호 7의 뉴클레오티드 서열, 서열번호 7의 뉴클레오티드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열, 또는 서열번호 7의 뉴클레오티드 서열의 기능적 단편, 또는 서열번호 7의 뉴클레오티드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 제1 폴리펩티드 사슬을 암호화하는 RNA는 서열번호 5의 뉴클레오티드 서열을 포함하며, 제2 폴리펩티드 사슬을 암호화하는 RNA는 서열번호 7의 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0373] 일부 구현예에서, 결합체는 CLDN6의 세포외 도메인에 결합한다. 일부 구현예에서, 결합체는 살아있는 세포의 표면에 존재하는 CLDN6의 천연 에피토프에 결합한다. 일부 구현예에서, 결합체는 CLDN6의 제1 세포외 루프에 결합한다.

[0374] 본원에 개시된 결합체는 CLDN6에 특이적이다. 즉, 결합체는 CLDN6에 결합하는 능력, 즉 CLDN6에 존재하는 에피토프에 결합하는 능력, 바람직하게는 CLDN6의 세포외 도메인 내에 위치하는 에피토프, 특히 제1 세포외 루프, 바람직하게는 CLDN6의 아미노산 위치 28 내지 76 또는 29 내지 81에 존재하는 에피토프, 바람직하게는 CLDN6의 아미노산 위치 141 내지 159에 존재하는 에피토프에 결합하는 능력을 갖는다. 일부 구현예에서, CLDN6에 결합하는 능력을 갖는 물질은 CLDN9에는 존재하지 않는 CLDN6상의 에피토프에 결합한다.

[0375] 일부 구현예에서, CLDN6에 결합하는 능력이 있는 물질은 CLDN4 및/또는 CLDN3에는 존재하지 않는 CLDN6상의 에

피토프에 결합한다. 일부 구현예에서, CLDN6에 결합하는 능력이 있는 물질은, CLDN6 이외의 클라우딘 단백질에는 존재하지 않는 CLDN6상의 에피토프에 결합한다.

[0376] 일부 구현예에서, CLDN6에 결합하는 능력이 있는 물질은 바람직하게는 CLDN6에는 결합하지만 CLDN9에는 결합하지 않으며, 바람직하게는 CLDN4 및/또는 CLDN3에는 결합하지 않는다. 일부 구현예에서, CLDN6에 결합하는 능력이 있는 물질은 세포 표면에 발현된 CLDN6에 결합한다. 일부 구현예에서, CLDN6에 결합하는 능력이 있는 물질은 살아있는 세포 표면에 존재하는 CLDN6의 천연 에피토프에 결합한다.

[0377] 용어 "세포 표면 상에서 발현된", "세포 표면과 회합된" 은 항원과 같은 분자가 세포의 원형질막과 회합되고 위치하는 것을 의미하며, 여기서 분자의 적어도 일부는 상기 세포의 세포의 공간을 마주하고 상기 세포 외부로부터, 예를 들어 세포 외부에 위치한 항체에 의해 접근가능하다. 이러한 맥락에서, 일부는 바람직하게는 적어도 4개, 바람직하게는 적어도 8개, 바람직하게는 적어도 12개, 보다 바람직하게는 적어도 20개의 아미노산이다. 회합은 직접적이거나 간접적일 수 있다. 예를 들어, 회합은 하나 이상의 막횡단 도메인, 하나 이상의 지질 앵커에 의해, 또는 임의의 다른 단백질, 지질, 사카라이드, 또는 세포의 원형질 막의 외엽에서 발견될 수 있는 다른 구조와의 상호작용에 의해 이루어질 수 있다. 예를 들어, 세포 표면과 회합된 분자는 세포의 부분을 갖는 막횡단 단백질일 수 있거나, 막횡단 단백질인 다른 단백질과 상호작용함으로써 세포 표면과 회합된 단백질일 수 있다.

[0378] "세포 표면" 또는 "세포의 표면"은 당업계에서 통상적인 의미에 따라 사용되며, 따라서 단백질 및 기타 분자에 의해 결합에 접근 가능한 세포의 외부를 포함한다. 항원은 세포의 표면에 위치하고 예를 들어 세포에 첨가된 항원-특이적 항체에 의한 결합이 가능한 경우에 상기 세포의 표면에서 발현된다.

[0379] 본 발명의 맥락에서 용어 "세포의 부분" 또는 "엑소도메인"은 세포의 세포의 공간에 대면하고 바람직하게는 예를 들어, 세포의 외부에 위치한 항체와 같은 결합 분자에 의해 상기 세포의 외부로부터 접근가능한 단백질과 같은 분자의 일부를 지칭한다. 바람직하게는, 상기 용어는 하나 이상의 세포의 루프 또는 도메인 또는 이의 단편을 지칭한다.

[0380] **핵산**

[0381] 본원에 사용된 용어 "폴리뉴클레오타이드" 또는 "핵산"은 DNA 및 RNA, 예컨대 게놈 DNA, cDNA, mRNA, 재조합적으로 생성되고 화학적으로 합성된 분자를 포함하는 것으로 의도된다. 핵산은 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있다. RNA는 시험관내 전사된 RNA(IVT RNA) 또는 합성 RNA를 포함한다. 본 발명에 따라서, 폴리뉴클레오타이드는 바람직하게는 단리된다.

[0382] 핵산은 벡터에 포함될 수 있다. 본원에 사용된 용어 "벡터"는 플라스미드 벡터, 코스미드 벡터, 람다 파아지와 같은 파아지 벡터, 레트로바이러스와 같은 바이러스 벡터, 아데노바이러스 또는 바콜로바이러스 벡터, 또는 박테리아 인공 염색체 (BAC), 효모 인공 염색체 (YAC), 또는 P1 인공 염색체 (PAC)와 같은 인공 염색체 벡터를 비롯하여 당업자에게 알려진 임의의 벡터를 포함한다. 상기 벡터는 발현뿐만 아니라 클로닝 벡터를 포함한다. 발현 벡터는 플라스미드뿐만 아니라 바이러스 벡터를 포함하고 일반적으로 특정 숙주 유기체 (예를 들어, 박테리아, 효모, 식물, 곤충, 또는 포유동물)에서 또는 시험관 내 발현 시스템에서 작동가능하게 연결된 암호화 서열의 발현에 필요한 원하는 암호화 서열 및 적절한 DNA 서열을 함유한다. 클로닝 벡터는 일반적으로 원하는 특정 DNA 단편을 조작하고 증폭하는 데 사용되며 원하는 DNA 단편의 발현에 필요한 기능적 서열이 결합될 수 있다.

[0383] 본 발명의 모든 측면의 일부 구현예에서, 본원에 기재된 결합제, 예를 들어 이중특이적 또는 다중특이적 결합제를 암호화하는 RNA는 결합제를 제공하도록 처리된 개체의 세포 (예를 들어 간 세포)에서 발현된다.

[0384] 본원에 기재된 핵산은 재조합 및/또는 단리된 분자일 수 있다.

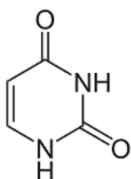
[0385] 본 기재에서, 용어 "RNA"는 리보뉴클레오타이드 잔기를 포함하는 핵산 분자와 관련이 있다. 바람직한 구현예에서, RNA는 리보뉴클레오타이드 잔기의 전부 또는 대부분을 함유한다. 본원에 사용된 바와 같이, "리보뉴클레오타이드"는 β -D-리보푸라노실 기의 2'-위치에 하이드록실 기를 갖는 뉴클레오타이드를 지칭한다. RNA는 이중 가닥 RNA, 단일 가닥 RNA, 부분적으로 정제된 RNA와 같은 단리된 RNA, 본질적으로 순수한 RNA, 합성 RNA, 재조합으로 생산된 RNA뿐만 아니라 하나 이상의 뉴클레오타이드의 추가, 결실, 치환 및/또는 변경에 의해 자연 발생 RNA와 다른 변형된 RNA를 비제한적으로 포괄한다. 이러한 변경은 내부 RNA 뉴클레오타이드 또는 RNA의 말단(들)에 비-뉴클레오타이드 물질의 부가를 지칭할 수 있다. 또한, RNA 내의 뉴클레오타이드는 화학적으로 합성된 뉴클레오타이드 또는 데옥시뉴클레오타이드와 같은 비표준 뉴클레오타이드일 수 있음이 본 명세서에서 고려된다. 본원의 경우, 이들 변경된 RNA는 자연 발생 RNA의 유사체로 간주된다.

[0386] 본원의 일부 구현예에서, RNA는 펩티드 또는 단백질을 암호화하는 RNA 전사체와 관련된 메신저 RNA(mRNA)이다. 당업계에서 확립된 바와 같이, mRNA는 일반적으로 5' 미변역 영역(5'-UTR), 펩티드 암호화 영역 및 3' 미변역 영역(3'-UTR)을 포함한다. 일부 구현예에서, RNA는 시험관내 전사 또는 화학적 합성에 의해 생성된다. 일부 구현예에서, mRNA는 DNA가 데옥시리보뉴클레오타이드를 함유하는 핵산을 지칭하는 DNA 주형을 사용하여 시험관내 전사에 의해 생성된다.

[0387] 본원의 일부 구현예에서, RNA는 "레플리콘 RNA" 또는 간단히 "레플리콘", 특히 "자기-복제성 RNA, 또는 "자기-증폭성 RNA"이다. 특히 바람직한 일 구현예에서, 레플리콘 또는 자기-복제성 RNA는 ssRNA 바이러스, 특히 알파바이러스와 같은 (+) 가닥 ssRNA 바이러스로부터 유래하는 인자들로부터 유래하거나 또는 이를 포함한다. 알파바이러스는 (+) 가닥 RNA 바이러스의 전형적인 예이다. 알파바이러스는 감염된 세포의 세포질에서 복제한다 (알파바이러스의 생활 주기에 대한 검토로, Jose et al., Future Microbiol., 2009, vol. 4, pp. 837-856을 참조함). 다수의 알파바이러스의 전체 게놈 길이는 전형적으로 뉴클레오타이드 11,000 내지 12,000개 범위이며, 게놈 RNA는 전형적으로 5'-캡과 3'-폴리(A) 꼬리를 가진다. 알파바이러스의 게놈은 (바이러스 RNA의 전사, 변형 및 복제 및 단백질 변형에 관여하는) 비-구조 단백질과 (바이러스 입자를 형성하는) 구조 단백질을 암호화한다. 전형적으로, 게놈에는 오픈 리딩 프레임 (ORF) 2개가 존재한다. 4개의 비-구조 단백질 (nsP1-nsP4)은 전형적으로 게놈의 5' 말단 근처에서 시작되는 제1 ORF에 함께 암호화되어 있으며, 알파바이러스 구조 단백질은 제1 ORF의 하류에서 발견되고 게놈의 3' 말단 근처까지 연장되는 제2 ORF에 함께 암호화되어 있다. 전형적으로, 제1 ORF는 제2 ORF보다 크고, 비율은 대략적으로 2:1이다. 알파바이러스에 감염된 세포의 경우, 비-구조 단백질을 암호화하는 핵산 서열만 게놈 RNA로부터 번역되고, 구조 단백질을 암호화하는 유전자 정보는 진핵생물 메신저 RNA와 비슷한 RNA 분자인 서브게놈 전사체로부터 번역가능하다 (mRNA; Gould et al., 2010, Antiviral Res., vol. 87 pp. 111-124). 감염 후, 즉, 바이러스 라이프 주기의 초기 단계에, (+) 가닥 게놈 RNA는 비-구조 폴리-단백질 (nsP1234)을 암호화하는 오픈 리딩 프레임을 번역하기 위해 메신저 RNA처럼 직접 작용한다. 알파바이러스-유래 벡터는 외래 유전자 정보를 표적 세포 또는 표적 유기체에 전달하기 위해 제안되었다. 단순한 방법으로, 알파바이러스 구조 단백질을 암호화하는 오픈 리딩 프레임을 대상 단백질을 암호화하는 오픈 리딩 프레임으로 치환한다. 알파바이러스-기반의 트랜스-복제 시스템은 2개의 개별 핵산 분자 상의 알파바이러스 뉴클레오타이드 서열 인자에 의존한다: 하나의 핵산 분자는 바이러스 레플리카제를 암호화하고, 다른 핵산 분자는 이 레플리카제에 의해 트랜스로 복제될 수 있다 (그래서, 트랜스-복제 시스템으로 지칭됨). 트랜스-복제를 위해서는 주어진 숙주 세포에 이들 핵산 분자가 모두 존재하여야 한다. 레플리카제에 의해 트랜스로 복제할 수 있는 핵산 분자는 알파바이러스 레플리카제에 의한 인지 및 RNA 합성을 허용하기 위해 특정 알파바이러스 서열 인자를 포함하여야 한다.

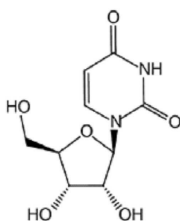
[0388] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 RNA는 변형된 뉴클레오타이드를 함유할 수도 있다. 일부 구현예에서, RNA는 적어도 하나의 (예를 들어, 모든) 우리딘 대신 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다.

[0389] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "우리실"은 RNA 핵산에서 생길 수 있는 핵염기 중 하나를 지칭한다. 우리실의 구조는 다음과 같다:



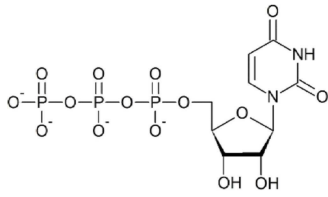
[0390]

[0391] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "우리딘"은 RNA에서 생길 수 있는 뉴클레오타이드 중 하나를 지칭한다. 우리딘의 구조는 다음과 같다:



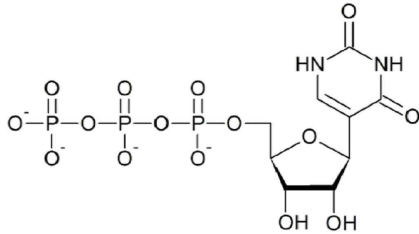
[0392]

[0393] UTP (우리딘 5'-트리포스페이트)는 하기 구조를 가진다:



[0394]

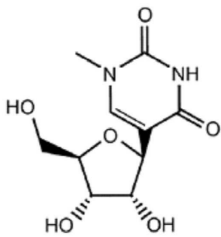
[0395] 슈도-UTP (슈도우리딘 5'-트리포스페이트)는 하기 구조를 가진다:



[0396]

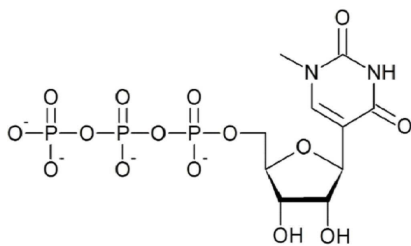
[0397] "슈도우리딘"은 우라실이 질소-탄소 글리코시드 결합 대신 탄소-탄소 결합을 통해 펜토스 고리에 결합된, 변형된 뉴클레오타이드, 즉 우리딘 이성질체의 일 예이다.

[0398] 변형된 뉴클레오타이드에 대한 다른 예는 하기 구조를 가진 N1-메틸-슈도우리딘 (m1Ψ)이다:



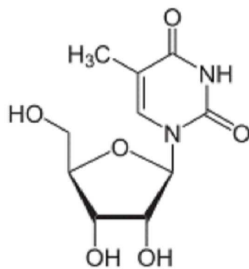
[0399]

[0400] N1-메틸-슈도-UTP는 하기 구조를 가진다:



[0401]

[0402] 변형된 뉴클레오타이드에 대한 또 다른 예는 하기 구조를 가지는 5-메틸-우리딘 (m5U)이다:



[0403]

[0404] 일부 구현예에서, 본원에 언급된 RNA에서 하나 이상의 우리딘이 변형된 뉴클레오타이드로 치환된다. 일부 구현예에서, 변형된 뉴클레오타이드는 변형된 우리딘이다.

[0405] 일부 구현예에서, RNA는 적어도 하나의 우리딘 대신 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 구현예에서, RNA는 각각의 우리딘 대신 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다.

[0406] 일부 구현예에서, 변형된 뉴클레오시드는 독립적으로 슈도우리딘 (Ψ), N1-메틸-슈도우리딘 ($m1\Psi$) 및 5-메틸-우리딘 ($m5U$)으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 변형된 뉴클레오시드는 슈도우리딘 (Ψ)을 포함한다. 일부 구현예에서, 변형된 뉴클레오시드는 N1-메틸-슈도우리딘 ($m1\Psi$)을 포함한다. 일부 구현예에서, 변형된 뉴클레오시드는 5-메틸-우리딘 ($m5U$)을 포함한다. 일부 구현예에서, RNA는 변형된 뉴클레오시드를 한 가지 타입 이상 포함할 수 있으며, 변형된 뉴클레오시드는 독립적으로 슈도우리딘 (Ψ), N1-메틸-슈도우리딘 ($m1\Psi$) 및 5-메틸-우리딘 ($m5U$)으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 변형된 뉴클레오시드는 슈도우리딘 (Ψ)과 N1-메틸-슈도우리딘 ($m1\Psi$)을 포함한다. 일부 구현예에서, 변형된 뉴클레오시드는 슈도우리딘 (Ψ)과 5-메틸-우리딘 ($m5U$)을 포함한다. 일부 구현예에서, 변형된 뉴클레오시드는 N1-메틸-슈도우리딘 ($m1\Psi$)과 5-메틸-우리딘 ($m5U$)을 포함한다. 일부 구현예에서, 변형된 뉴클레오시드는 슈도우리딘 (Ψ), N1-메틸-슈도우리딘 ($m1\Psi$) 및 5-메틸-우리딘 ($m5U$)을 포함한다.

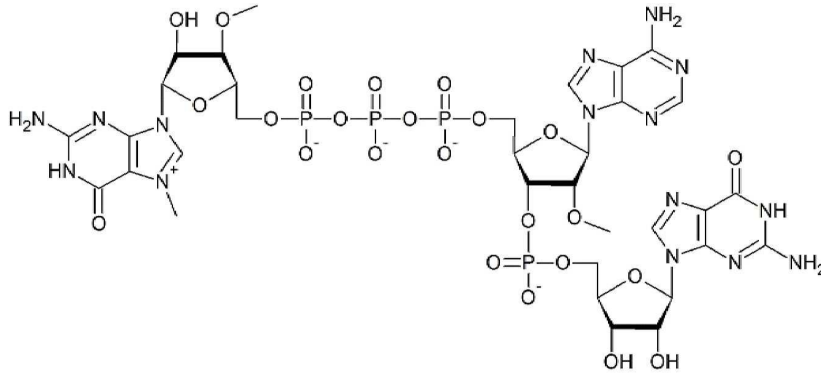
[0407] 일부 구현예에서, RNA에서 우리딘 하나 이상, 예를 들어 모든 우리딘을 치환하는 변형된 뉴클레오시드는 3-메틸-우리딘 (m^3U), 5-메톡시-우리딘 (mo^5U), 5-아자-우리딘, 6-아자-우리딘, 2-티오-5-아자-우리딘, 2-티오-우리딘 (s^2U), 4-티오-우리딘 (s^4U), 4-티오-슈도우리딘, 2-티오-슈도우리딘, 5-하이드록시-우리딘 (ho^5U), 5-아미노알릴-우리딘, 5-할로-우리딘 (예를 들어, 5-요오도-우리딘 또는 5-브로모-우리딘), 우리딘 5-옥시아세트산 (cmo^5U), 우리딘 5-옥시아세트산 메틸 에스테르 ($mcmo^5U$), 5-카르복시메틸-우리딘 (cm^5U), 1-카르복시메틸-슈도우리딘, 5-카르복시하이드록시메틸-우리딘 (chm^5U), 5-카르복시하이드록시메틸-우리딘 메틸 에스테르 ($mchm^5U$), 5-메톡시카르보닐메틸-우리딘 (mcm^5U), 5-메톡시카르보닐메틸-2-티오-우리딘 (mcm^5s^2U), 5-아미노메틸-2-티오-우리딘 (nm^5s^2U), 5-메틸아미노메틸-우리딘 (mnm^5U), 1-메틸-슈도우리딘, 5-메틸아미노메틸-2-티오-우리딘 (mnm^5s^2U), 5-메틸아미노메틸-2-셀레노-우리딘 (mnm^5se^2U), 5-카바모일메틸-우리딘 (ncm^5U), 5-카르복시메틸아미노메틸-우리딘 ($cmnm^5U$), 5-카르복시메틸아미노메틸-2-티오-우리딘 ($cmnm^5s^2U$), 5-프로피닐-우리딘, 1-프로피닐-슈도우리딘, 5-타우리노메틸-우리딘 (τm^5U), 1-타우리노메틸-슈도우리딘, 5-타우리노메틸-2-티오-우리딘 (τm^5s^2U), 1-타우리노메틸-4-티오-슈도우리딘, 5-메틸-2-티오-우리딘 (m^5s^2U), 1-메틸-4-티오-슈도우리딘 ($m^1s^4\Psi$), 4-티오-1-메틸-슈도우리딘, 3-메틸-슈도우리딘 ($m^3\Psi$), 2-티오-1-메틸-슈도우리딘, 1-메틸-1-데아자-슈도우리딘, 2-티오-1-메틸-1-데아자-슈도우리딘, 다이하이드로우리딘 (D), 다이하이드로슈도우리딘, 5,6-다이하이드로우리딘, 5-메틸-다이하이드로우리딘 (m^5D), 2-티오-다이하이드로우리딘, 2-티오-다이하이드로슈도우리딘, 2-메톡시-우리딘, 2-메톡시-4-티오-우리딘, 4-메톡시-슈도우리딘, 4-메톡시-2-티오-슈도우리딘, N1-메틸-슈도우리딘, 3-(3-아미노-3-카르복시프로필)우리딘 (acp^3U), 1-메틸-3-(3-아미노-3-카르복시프로필)슈도우리딘 ($acp^3\Psi$), 5-(이소펜테닐아미노메틸)우리딘 (inm^5U), 5-(이소펜테닐아미노메틸)-2-티오-우리딘 (inm^5s^2U), α -티오-우리딘, 2'-O-메틸-우리딘 (Um), 5,2'-O-다이메틸-우리딘 (m^5Um), 2'-O-메틸-슈도우리딘 ($\emptyset m$), 2-티오-2'-O-메틸-우리딘 (s^2Um), 5-메톡시카르보닐메틸-2'-O-메틸-우리딘 (mcm^5Um), 5-카바모일메틸-2'-O-메틸-우리딘 (ncm^5Um), 5-카르복시메틸아미노메틸-2'-O-메틸-우리딘 ($cmnm^5Um$), 3,2'-O-다이메틸-우리딘 (m^3Um), 5-(이소펜테닐아미노메틸)-2'-O-메틸-우리딘 (inm^5Um), 1-티오-우리딘, 데옥시티미딘, 2'-F-ara-우리딘, 2'-F-우리딘, 2'-OH-ara-우리딘, 5-(2-카르보메톡시비닐) 우리딘, 5-[3-(1-E-프로페닐아미노)우리딘, 또는 당해 기술 분야에 공지된 임의의 기타 변형된 우리딘 중 어느 하나 이상일 수 있다.

[0408] 일부 구현예에서, RNA는 다른 변형된 뉴클레오시드를 포함하거나, 또는 추가의 변형된 뉴클레오시드, 예를 들어 변형된 시티딘을 포함한다. 예를 들어, 일부 구현예에서, RNA에서 시티딘이 5-메틸시티딘으로 일부 또는 완전히, 바람직하게는 완전히 치환된다. 일부 구현예에서, RNA는 5-메틸시티딘, 및 슈도우리딘 (Ψ), N1-메틸-슈도우리딘 ($m1\Psi$) 및 5-메틸-우리딘 ($m5U$)으로부터 선택되는 하나 이상을 포함한다. 일부 구현예에서 RNA는 5-메틸시티딘 및 N1-메틸-슈도우리딘 ($m1\Psi$)을 포함한다. 일부 구현예에서, RNA는 각각의 시티딘 대신 5-메틸시티딘을 포함하고, 각 우리딘 대신 N1-메틸-슈도우리딘 ($m1\Psi$)을 포함한다.

[0409] 일부 구현예에서, 본원에 따른 RNA는 5'-캡 (cap)을 포함한다. 일부 구현예에서, 본원의 RNA는 캡이 달리지 않은 5'-트리포스페이트를 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, RNA는 5'-캡 유사체에 의해 변형될 수 있다. 용어 "5'-캡"은 mRNA 분자의 5'-말단에서 발견되는 구조를 지칭하는데, 이는 일반적으로 5' → 5' 트리포스페이트

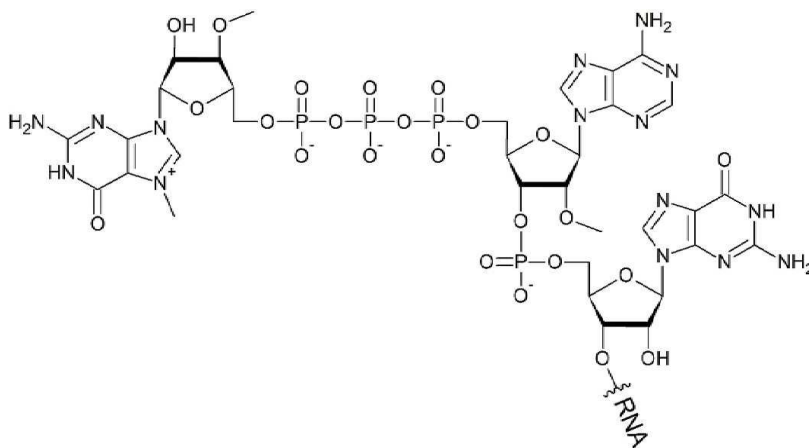
결합을 통해 mRNA에 연결된 구아노신 뉴클레오타이드로 구성된다. 일부 구현예에서, 이 구아노신은 7번 위치에서 메틸화된다. RNA에 5'-캡 또는 5'-캡 유사체의 부가, 5'-캡이 RNA 가닥으로 공동-전사를 통해 발현되는 시험관내 전사에 의해 달성되거나, 또는 캡핑 효소를 이용하여 전사 후 RNA에 부착될 수 있다.

[0410] 일부 구현예에서, RNA에 대한 빌딩 블록 캡은 하기 구조를 가진 $m_2^{7,3'-0}Gppp(m_1^{2'-0})ApG$ (때때로 $m_2^{7,3'-0}G(5')ppp(5')m_1^{2'-0}ApG$ 로 지칭됨)이다:



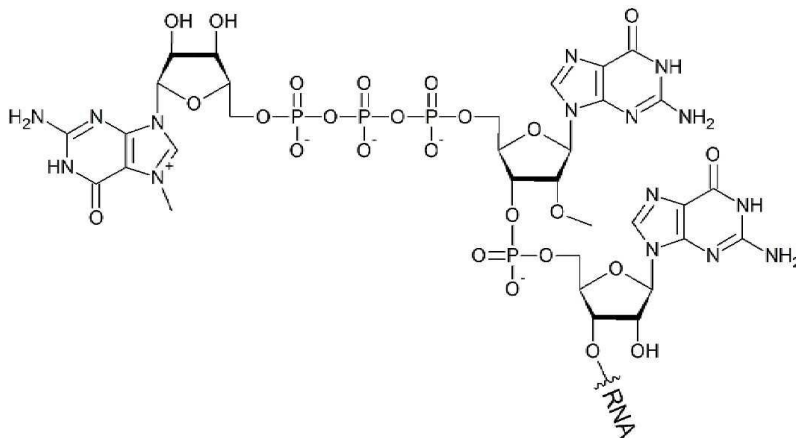
[0411]

[0412] RNA 및 $m_2^{7,3'-0}G(5')ppp(5')m_1^{2'-0}ApG$ 를 포함하는 Cap1 RNA에 대한 예는 다음과 같다:



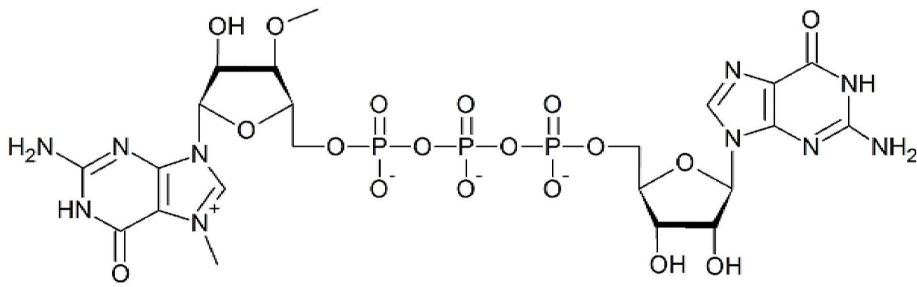
[0413]

[0414] (캡 유사체가 아닌) Cap1 RNA에 대한 다른 예는 다음과 같다:



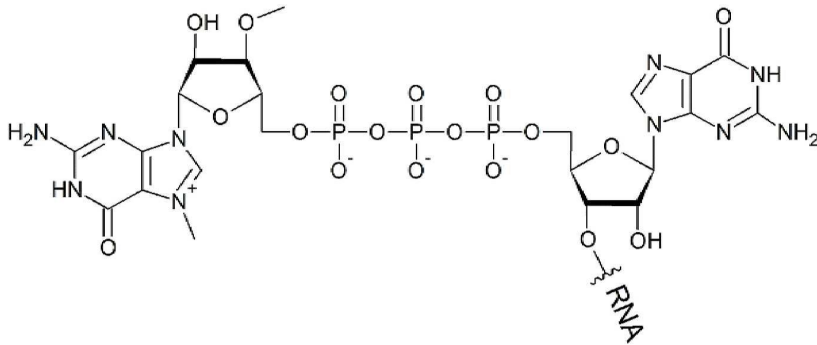
[0415]

[0416] 일부 구현예에서, RNA는, 일부 구현예에서, 하기 구조를 가진 캡 유사체 안티-리버스 캡 (ARCA Cap ($m_2^{7,3'-0}G(5')ppp(5')G$))을 이용해 "Cap0" 구조로 변형된다:



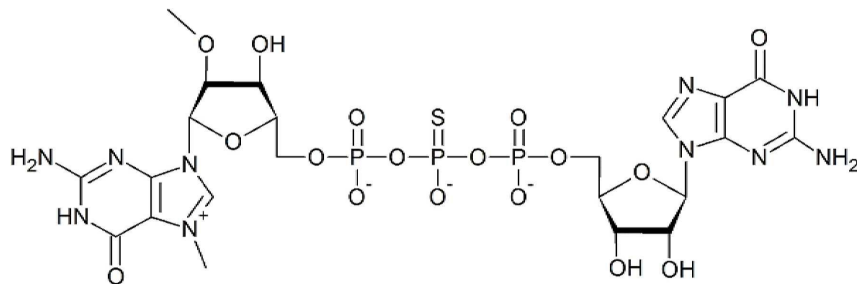
[0417]

RNA 및 $m_2^{7,3'}$ G(5')ppp(5')G를 포함하는 Cap0 RNA에 대한 예는 다음과 같다:



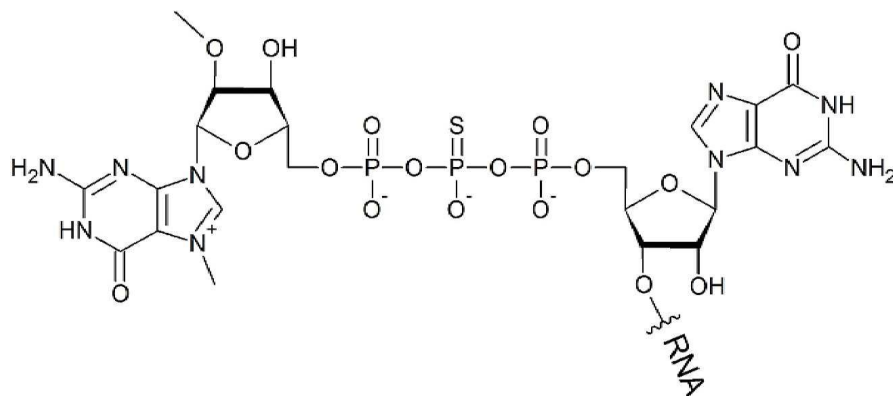
[0419]

일부 구현예에서, "Cap0" 구조는 하기 구조를 가진 캡 유사체 Beta-S-ARCA ($m_2^{7,2'}$ G(5')ppSp(5')G)를 이용해 만들어진:



[0421]

β -S-ARCA ($m_2^{7,2'}$ G(5')ppSp(5')G) 및 RNA를 포함하는 Cap0 RNA에 대한 예는 다음과 같다:



[0423]

β -S-ARCA 또는 " β -S-ARCA(D1)"의 "D1" 부분입체이성질체는 β -S-ARCA ($\hat{\alpha}$ -S-ARCA(D2))의 D2 부분입체이성질체와 비교해 HPLC 컬럼에서 처음에 용출되는 β -S-ARCA의 부분입체이성질체이며, 따라서 더 짧은 체류 시간을 나타낸다 (WO 2011/015347 참조, 원용에 의해 본원에 포함됨).

[0424]

- [0425] 특히 바람직한 캡은 $m_2^{7,3'-0}Gppp(m_1^{2'-0})ApG$ 이다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 RNA 서열(예를 들어, 서열번호 5 및/또는 7)은 $m_2^{7,3'-0}Gppp(m_1^{2'-0})ApG$ 로 캡핑된다. 일부 구현예에서, 캡의 ApG는 본원에 기재된 RNA 서열의 2개의 5' 뉴클레오타이드에 해당한다.
- [0426] 일부 구현예에서, 본원에 따른 RNA는 5'-UTR 및/또는 3'-UTR을 포함한다. 용어 "비-번역 영역" 또는 "UTR"은 DNA 분자에서 전사되지만 아미노산 서열로 번역되지 않는 영역, 또는 mRNA 분자와 같은 RNA 분자에서의 대응되는 영역을 의미한다. 비-번역 영역 (UTR)은 오픈 리딩 프레임의 5' (상류)(5'-UTR) 및/또는 오픈 리딩 프레임의 3' (하류)(3'-UTR)에 존재할 수 있다. 5'-UTR은, 존재한다면, 단백질-암호화 영역의 개시 코돈의 상류, 5'-말단에 위치한다. 5'-UTR은, (존재한다면) 5'-캡의 하류이며, 예를 들어 5'-캡에 바로 인접한다. 3'-UTR은, 존재한다면, 단백질-암호화 영역의 종결 코돈의 하류, 3' 말단에 위치하지만, 용어 "3'-UTR"은 바람직하게는 폴리(A) 서열을 포함하지 않는다. 따라서, 3'-UTR은 (존재한다면) 폴리(A) 서열의 상류이며, 예를 들어 폴리(A) 서열에 바로 인접하게 위치한다.
- [0427] 일부 구현예에서, RNA는 서열번호 8의 뉴클레오타이드 서열 또는 서열번호 8의 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일한 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 5'-UTR을 포함한다.
- [0428] 일부 구현예에서, RNA는 서열번호 9의 뉴클레오타이드 서열, 또는 서열번호 9의 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일한 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 3'-UTR을 포함한다.
- [0429] 특히 바람직한 5'-UTR은 서열번호 8의 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 특히 바람직한 3'-UTR은 서열번호 9의 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.
- [0430] 일부 구현예에서, 본원에 따른 RNA는 3'-폴리(A) 서열을 포함한다.
- [0431] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "폴리(A) 서열" 또는 "폴리-A 꼬리"는 전형적으로 RNA 분자의 3'-말단에 위치한 아데닐레이트 잔기로 구성된 불연속적인 또는 연속적인 서열을 지칭한다. 폴리(A) 서열은 당해 기술 분야의 당업자들에게 알려져 있으며, 본원에 기재된 RNA에서 3' UTR 다음에 올 수 있다. 연속적인 폴리(A) 서열은 연이은 아데닐레이트 잔기들로 특징된다. 사실상 연속적인 폴리(A) 서열이 정형적이다. 본원에 기재된 RNA는 전사 후 주형-독립적인 RNA 중합효소에 의해 RNA의 유리 3'-말단에 부착된 폴리(A) 서열을 가지거나, 또는 DNA에 의해 암호화되고 주형-의존적인 RNA 중합효소에 전사되는 폴리(A) 서열을 가질 수 있다.
- [0432] 뉴클레오타이드 A가 약 120개인 폴리(A) 서열이 형질감염된 진핵생물 세포에서 RNA 수준에서뿐 아니라 폴리(A) 서열의 상류(5')에 존재하는 오픈 리딩 프레임으로부터 번역되는 단백질 수준에서 유의한 효과를 가지는 것으로 입증되어 있다 (Holtkamp et al., 2006, Blood, vol. 108, pp. 4009-4017).
- [0433] 폴리(A) 서열은 임의 길이일 수 있다. 일부 구현예에서, 폴리(A) 서열은 A 뉴클레오타이드를 적어도 약 20개, 적어도 30개, 적어도 약 40개, 적어도 약 80개 또는 적어도 약 100개, 그리고 최대 약 500개, 최대 약 400개, 최대 약 300개, 최대 약 200개 또는 최대 약 150개 포함하며, 특히 A 뉴클레오타이드를 약 120개 포함한다. 이러한 맥락에서, "로 본질적으로 구성된다"는 폴리(A) 서열에서 대부분의 뉴클레오타이드, 전형적으로 폴리(A) 서열에서 뉴클레오타이드 개수 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%가 A 뉴클레오타이드인 것을 의미하지만, 나머지 뉴클레오타이드가 U 뉴클레오타이드 (우리딜레이트), G 뉴클레오타이드 (구아닐레이트) 또는 C 뉴클레오타이드 (시티딜레이트) 등의 A 뉴클레오타이드 이외의 다른 뉴클레오타이드인 경우도 허용한다. 이러한 맥락에서, "로 구성된다"는 폴리(A) 서열의 모든 뉴클레오타이드, 즉 폴리(A) 서열에서 뉴클레오타이드 개수 100%가 A 뉴클레오타이드인 것을 의미한다. 용어 "A 뉴클레오타이드" 또는 "A"는 아데닐레이트를 지칭한다.
- [0434] 일부 구현예에서, 폴리(A) 서열은 암호화 가닥에 상보적인 가닥에서 반복적인 dT 뉴클레오타이드 (데옥시시티딜레이트)를 포함하는 DNA 주형을 토대로, RNA 전사 중에, 예를 들어 시험관내 전사되는 RNA의 제조 중에 부착된다. 폴리(A) 서열을 암호화하는 DNA 서열 (암호화 가닥)은 폴리(A) 카세트로 지칭된다.
- [0435] 일부 구현예에서, 폴리(A) 카세트는 dA 뉴클레오타이드로 본질적으로 구성된 DNA의 암호화 가닥에 존재하지만, 뉴클레오타이드 4종 (dA, dC, dG 및 dT)의 무작위 서열이 사이에 산재한다. 이러한 무작위 서열은 뉴클레오타이드 5 내지 50개, 10 내지 30개 또는 10 내지 20개 길이일 수 있다. 이러한 카세트는 WO 2016/005324 A1에 개시되어 있으며, 이는 원용에 의해 본원에 포함된다. WO 2016/005324 A1에 개시된 임의의 폴리(A) 카세트 역시 본 발명에서 이용할 수 있다. 본질적으로 dA 뉴클레오타이드로 구성되지만 뉴클레오타이드 4종 (dA, dC, dG, dT)이 균등하게

분포하며 예를 들어 뉴클레오타이드 5 내지 50개 길이의 무작위 서열이 사이에 산재된, 폴리(A) 카세트는, DNA 수준에서, *E. coli*에서 플라스미드 DNA의 일정한 증폭성을 나타내며, RNA 수준에서도, RNA 안정성 및 번역 효율을 뒷받침하는 측면에서 유익한 특성과 여전히 연관되어 있다. 결과적으로, 일부 구현예에서, 본원에 기재된 RNA 분자에 함유된 폴리(A) 서열은 본질적으로 A 뉴클레오타이드로 구성되지만, 뉴클레오타이드 4종 (A, C, G, U)의 무작위 서열이 사이에 산재되어 있다. 이러한 무작위 서열은 뉴클레오타이드 5 내지 50개, 10 내지 30개 또는 10 내지 20개 길이일 수 있다.

[0436] 일부 구현예에서, 3' 말단에서 A 뉴클레오타이드 이외의 다른 뉴클레오타이드가 폴리(A) 서열 측면에 위치하지 않으며, 즉, 폴리(A) 서열은 3' 말단에서 A 이외의 다른 뉴클레오타이드에 의해 가려지거나 또는 후속되지 않는다.

[0437] 일부 구현예에서, 폴리(A) 서열은 뉴클레오타이드 A를 적어도 20개, 적어도 30개, 적어도 40개, 적어도 80개 또는 적어도 100개에서 최대 500개, 최대 400개, 최대 300개, 최대 200개 또는 최대 150개 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 폴리(A) 서열은 뉴클레오타이드 A 적어도 20개, 적어도 30개, 적어도 40개, 적어도 80개 또는 적어도 100개에서 최대 500개, 최대 400개, 최대 300개, 최대 200개 또는 최대 150개로 본질적으로 구성될 수 있다. 일부 구현예에서, 폴리(A) 서열은 뉴클레오타이드 A 적어도 20개, 적어도 30개, 적어도 40개, 적어도 80개 또는 적어도 100개에서 최대 500개, 최대 400개, 최대 300개, 최대 200개 또는 최대 150개로 구성될 수 있다. 일부 구현예에서, 폴리(A) 서열은 뉴클레오타이드 A를 적어도 100개 포함한다. 일부 구현예에서, 폴리(A) 서열은 뉴클레오타이드 A를 약 150개 포함한다. 일부 구현예에서, 폴리(A) 서열은 뉴클레오타이드 A를 약 120개 포함한다.

[0438] 일부 구현예에서, RNA는 서열번호 10의 뉴클레오타이드 서열, 또는 서열번호 10의 뉴클레오타이드 서열과 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일한 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 폴리(A) 서열을 포함한다.

[0439] 특히 바람직한 폴리(A) 서열은 서열번호 10의 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0440] 본원에 따라서, 결합체는 바람직하게는 RNA 투여 중인 개체의 세포로의 도입시 각각의 단백질로 번역되는 단일 가닥의 5'-캡이 달린 mRNA로서 투여된다. 바람직하게는, RNA는 안정성 및 번역 효율과 관련하여 RNA의 최대 효능을 위해 최적화된 구조 요소를 포함한다 (5'-캡, 5'-UTR, 3'-UTR, 폴리(A) 서열).

[0441] 일부 구현예에서, $m_2^{7,3'-0}Gppp(m_1^{2'-0})ApG$ 는 RNA의 5'-말단에서 특이적인 캡핑 구조로서 사용된다. 일부 구현예에서, 5'-UTR 서열은 인간 α 글로빈 mRNA로부터 유래하며, 선택적으로 번역 효율을 높이기 위해 최적화된 'Kozak 서열'을 가진다. 일부 구현예에서, 더 높은 최대 단백질 수준 및 mRNA의 연장된 잔류를 보장하기 위해, 암호화 서열과 폴리(A) 서열 사이에, "스플릿의 아미노 말단 인핸서 (amino terminal enhancer of split: AES)" mRNA (F로 지칭됨) 및 미토콘드리아에서 암호화된 12S 리보솜 RNA (I로 지칭됨)로부터 유래한 서열 요소 2종의 조합 (FI 요소)을 배치한다. 이는 생체의 선택 공정에 의해 RNA 안정성을 부여하며 전체 단백질 발현을 높이는 서열로 동정되어 있다 (WO 2017/060314를 참조하며, 이 문헌은 원용에 의해 본 명세서에 포함됨). 일부 구현예에서, 순차적으로 아데노신 잔기 30개, 뉴클레오타이드 10개 길이의 링커 서열 및 아데노신 잔기 70개로 이루어진 가닥으로 구성되는, 뉴클레오타이드 110개 길이인 폴리(A) 서열이 사용된다. 이러한 폴리(A) 서열은 RNA 안정성과 번역 효율을 강화하도록 설계된 것이다.

[0442] 본 발명의 모든 측면들에 대한 일부 구현예에서, 결합체를 암호화하는 RNA는 결합체를 제공하기 위해 처리된 개체의 세포, 예를 들어 암세포에서 발현된다. 본 발명의 모든 측면들에 대한 일부 구현예에서, RNA는 개체의 세포에서 일시적으로 발현된다. 본 발명의 모든 측면들에 대한 일부 구현예에서, RNA는 시험관내 전사된 RNA이다. 본 발명의 모든 측면들에 대한 일부 구현예에서, 결합체의 발현은 세포의 공간으로 이루어지며, 즉, 결합체가 분비된다. 본 발명의 모든 측면들에 대한 일부 구현예에서, 결합체의 발현은 혈류로 진행된다.

[0443] 본 발명의 맥락에서, 용어 "전사"는 DNA 서열에서 유전자 코드가 RNA로 전사되는 공정을 지칭한다. 이후, RNA는 펩티드 또는 단백질로 번역될 수 있다

[0444] 본 발명에 따르면, 용어 "전사"는 "시험관내 전사"를 포함하며, 여기서 용어 "시험관내 전사"는 RNA, 특히 mRNA가 무세포성 시스템에서, 바람직하게는 적절한 세포 추출물을 이용해 시험관내에서 합성되는 공정을 지칭한다. 바람직하게는, 클로닝 벡터가 전사체 제조를 위해 활용된다. 이들 클로닝 벡터는 일반적으로 전사 벡터로서 지칭되며, 본 발명에 따라 용어 "벡터"에 포함된다. 본 발명에 따르면, 본 발명에서 사용되는 RNA는 바람직하게는 시험관내 전사된 RNA (IVT-RNA)이고, 적절한 DNA 주형의 시험관내 전사에 의해 수득할 수 있다. 전사를 통제하기 위한 프로모터는 임의의 RNA 중합효소에 대한 임의의 프로모터일 수 있다. RNA 중합효소에 대한

구체적인 예는 T7, T3 및 SP6 RNA 중합효소이다. 바람직하게는, 본 발명에 따른 시험관내 전사는 T7 또는 SP6 프로모터에 의해 통제된다. 시험관내 전사용 DNA 주형은 핵산, 특히 cDNA를 클로닝한 다음 시험관내 전사용 적정 벡터에 도입함으로써 수득할 수 있다. cDNA는 RNA의 역 전사에 의해 수득할 수 있다.

[0445] RNA와 관련하여, 용어 "발현" 또는 "번역"은 mRNA 가닥이 아미노산 서열의 조립을 지시하여 펩티드 또는 단백질을 만드는, 세포의 리보솜에서의 공정을 지칭한다.

[0446] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 RNA 투여 후, 예를 들어 RNA 지질 입자로서 제형화하여 투여한 후, RNA의 적어도 일부를 표적 세포(예를 들어 간 세포)로 전달된다. 일부 구현예에서, RNA의 적어도 일부가 표적 세포의 세포질로 전달된다. 일 구현예에서, RNA는 표적 세포에 의해 번역되어 이것이 암호화하는 펩티드 또는 단백질이 만들어진다. 따라서, 본원은 또한 본원에 기재된 RNA 입자를 개체에게 투여하는 것을 포함하는 개체의 표적 세포에 RNA를 전달하는 방법에 관한 것이다. 일부 구현예에서, RNA는 표적 세포의 세포질로 전달된다. 일부 구현예에서, RNA는 표적 세포에 의해 번역되어 RNA에 의해 암호화된 펩티드 또는 단백질을 생성한다.

[0447] "암호화"는 정의된 뉴클레오타이드 서열 (즉, rRNA, tRNA 및 mRNA) 또는 정의된 아미노산 서열과 이로부터 기인한 생물학적 특성을 가진, 생물학적 과정에서 다른 폴리머 및 거대분자를 합성하기 위한 주형으로서 역할을 하는, 유전자, cDNA 또는 mRNA와 같은 폴리뉴클레오타이드에서 특정한 뉴클레오타이드 서열의 고유한 특성을 의미한다. 따라서, 세포 또는 다른 생물 시스템에서 유전자에 대응하는 mRNA의 전사 및 번역으로 단백질이 만들어진다면, 그 유전자가 단백질을 암호화하는 것이다. 뉴클레오타이드 서열이 mRNA 서열과 동일하고 통상적으로 서열 목록에 제공된 암호화 가닥과, 유전자 또는 cDNA를 전사하기 위한 주형으로서 사용되는 비-암호화 가닥 둘다, 그 유전자 또는 cDNA의 단백질 또는 기타 산물을 암호화하는 것으로서 언급할 수 있다.

[0448] 일부 구현예에서, 본 발명에 따라 투여할 결합제를 암호화하는 RNA는 비-번역원성이다.

[0449] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "비-번역원성 RNA"는, 예를 들어 포유류에 투여시 번역 시스템에 의한 반응을 유도하지 않거나, 또는 비-번역원성 RNA를 비-번역원성으로 만드는 변형 또는 처리를 거치지 않은 점에서만 차이가 있는 동일한 RNA에 의해 유도되는 것보다, 즉, 표준 RNA (stdRNA)에 의해 유발되는 것보다 약하게 반응을 유도하는, RNA를 지칭한다. 바람직한 일 구현예에서, 본원에서 변형된 RNA (modRNA)로도 지칭되는 비-번역원성 RNA는 선천적인 번역 수용체를 RNA로 RNA-매개 활성화되는 것을 억제하는 변형된 뉴클레오타이드를 병합하고 이중 가닥 RNA (dsRNA)를 제거함으로써, 비-번역원성으로 된다.

[0450] 변형된 뉴클레오타이드의 병합에 의해 비-번역원성 RNA를 제공하기 위해, RNA의 번역원성을 낮추거나 또는 억제하는 한 임의의 변형된 뉴클레오타이드를 이용할 수 있다. 선천적인 번역 수용체의 RNA-매개 활성화를 억제하는 변형된 뉴클레오타이드가 특히 바람직하다. 일 구현예에서, 변형된 뉴클레오타이드는 하나 이상의 우리딘을 변형된 핵염기 (modified nucleobase)를 포함하는 뉴클레오타이드로 치환하는 것을 포함한다. 일 구현예에서, 변형된 핵염기는 변형된 우라실이다. 일 구현예에서, 변형된 핵염기를 포함하는 뉴클레오타이드는 3-메틸-우리딘 (m^3U), 5-메톡시-우리딘 (mo^5U), 5-아자-우리딘, 6-아자-우리딘, 2-티오-5-아자-우리딘, 2-티오-우리딘 (s^2U), 4-티오-우리딘 (s^4U), 4-티오-슈도우리딘, 2-티오-슈도우리딘, 5-하이드록시-우리딘 (ho^5U), 5-아미노알릴-우리딘, 5-할로-우리딘 (예를 들어, 5-요오도-우리딘 또는 5-브로모-우리딘), 우리딘 5-옥시아세트산 (cmo^5U), 우리딘 5-옥시아세트산 메틸 에스테르 ($mcmo^5U$), 5-카르복시메틸-우리딘 (cm^5U), 1-카르복시메틸-슈도우리딘, 5-카르복시하이드록시메틸-우리딘 (chm^5U), 5-카르복시하이드록시메틸-우리딘 메틸 에스테르 ($mchm^5U$), 5-메톡시카르보닐메틸-우리딘 (mcm^5U), 5-메톡시카르보닐메틸-2-티오-우리딘 (mcm^5s^2U), 5-아미노메틸-2-티오-우리딘 (nm^5s^2U), 5-메틸아미노메틸-우리딘 (mnm^5U), 1-에틸-슈도우리딘, 5-메틸아미노메틸-2-티오-우리딘 (mnm^5s^2U), 5-메틸아미노메틸-2-셀레노-우리딘 (mnm^5se^2U), 5-카바모일메틸-우리딘 (ncm^5U), 5-카르복시메틸아미노메틸-우리딘 (cmm^5U), 5-카르복시메틸아미노메틸-2-티오-우리딘 (cmm^5s^2U), 5-프로피닐-우리딘, 1-프로피닐-슈도우리딘, 5-타우리노메틸-우리딘 (τm^5U), 1-타우리노메틸-슈도우리딘, 5-타우리노메틸-2-티오-우리딘 (τm^5s^2U), 1-타우리노메틸-4-티오-슈도우리딘), 5-메틸-2-티오-우리딘 (m^5s^2U), 1-메틸-4-티오-슈도우리딘 (m^1s^4U), 4-티오-1-메틸-슈도우리딘, 3-메틸-슈도우리딘 (m^3U), 2-티오-1-메틸-슈도우리딘, 1-메틸-1-테아자-슈도우리딘, 2-티오-1-메틸-1-테아자-슈도우리딘, 다이하이드로우리딘 (D), 다이하이드로슈도

우리딘, 5,6-다이하이드로우리딘, 5-메틸-다이하이드로우리딘 (m^5D), 2-티오-다이하이드로우리딘, 2-티오-다이하이드로슈도우리딘, 2-메톡시-우리딘, 2-메톡시-4-티오-우리딘, 4-메톡시-슈도우리딘, 4-메톡시-2-티오-슈도우리딘, N1-메틸-슈도우리딘, 3-(3-아미노-3-카르복시프로필)우리딘 (acp^3U), 1-메틸-3-(3-아미노-3-카르복시프로필)슈도우리딘 ($acp^3\Psi$), 5-(이소펜테닐아미노메틸)우리딘 (inm^5U), 5-(이소펜테닐아미노메틸)-2-티오-우리딘 (inm^5s^2U), 알파-티오-우리딘, 2'-O-메틸-우리딘 (Um), 5,2'-O-다이메틸-우리딘 (m^5Um), 2'-O-메틸-슈도우리딘 (Ψm), 2-티오-2'-O-메틸-우리딘 (s^2Um), 5-메톡시카르보닐메틸-2'-O-메틸-우리딘 (mcm^5Um), 5-카바모일메틸-2'-O-메틸-우리딘 (ncm^5Um), 5-카르복시메틸아미노메틸-2'-O-메틸-우리딘 ($cmnm^5Um$), 3,2'-O-다이메틸-우리딘 (m^3Um), 5-(이소펜테닐아미노메틸)-2'-O-메틸-우리딘 (inm^5Um), 1-티오-우리딘, 데옥시티미딘, 2'-F-ara-우리딘, 2'-F-우리딘, 2'-OH-ara-우리딘, 5-(2-카르보메톡시비닐) 우리딘, 및 5-[3-(1-E-프로페닐아미노)우리딘으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 바람직한 일 특정 구현예에서, 변형된 핵염기를 포함하는 뉴클레오시드는 슈도우리딘 (Ψ), N1-메틸-슈도우리딘 ($m1\Psi$) 또는 5-메틸-우리딘 ($m5U$)이며, 특히 N1-메틸-슈도우리딘이다.

[0451] 일 구현예에서, 하나 이상의 우리딘을 변형된 핵염기를 포함하는 뉴클레오시드로 바꾸는 치환은 우리딘의 적어도 1%, 적어도 2%, 적어도 3%, 적어도 4%, 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 25%, 적어도 50%, 적어도 75%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 치환을 포함한다.

[0452] T7 RNA 중합효소를 이용한 시험관내 전사 (IVT)에 의해 mRNA를 합성하는 동안, 효소의 독특한 활성으로 인해, 이중 가닥 RNA (dsRNA) 등의 부적절한 산물이 상당량 만들어진다. dsRNA는 염증성 사이토카인을 유도하고 효과기 효소를 활성화하여, 단백질 합성 저해로 이어진다. dsRNA는 IVT RNA와 같은 RNA로부터, 예를 들어, 무공성 또는 다공성 C-18 폴리스티렌-다이비닐벤젠 (PS-DVB) 매트릭스를 이용한 이온-쌍 역상 HPLC에 의해 제거할 수 있다. 대안적으로, dsRNA를 특이적으로 가수분해하지만 ssRNA는 가수분해하지 않으므로 IVT RNA 조제물로부터 dsRNA 오염물질을 제거하는, E. coli RNaseIII를 이용한 효소 기반의 방법을 이용할 수도 있다. 아울러, 셀룰로스 물질을 이용해 ssRNA로부터 dsRNA를 분리할 수 있다. 일 구현예에서, RNA 조제물은 셀룰로스 물질과 접촉시키고, dsRNA가 셀룰로스 물질에 결합되도록 허용하지만 ssRNA는 셀룰로스 물질에 결합하지 않도록 하는 조건 하에 셀룰로스 물질로부터 ssRNA를 분리한다.

[0453] 본 발명에서 사용되는 바와 같이, 용어 "제거한다" 또는 "제거"는 비-면역원성 RNA와 같은 제1 물질 집단이 dsRNA와 같은 제2 물질 집단의 근접성으로부터 분리되는 특성을 지칭하며, 여기서 제1 물질 집단에 반드시 제2 물질이 결합되는 것은 아니고, 제2 물질 집단에 반드시 제1 물질이 결합되는 것은 아니다. 그러나, 제2 물질 집단의 제거를 특징으로 하는 제1 물질 집단은 제1 물질 및 제2 물질의 비-분리 혼합물과 비교해 제2 물질의 함량이 측정가능하게 더 적다.

[0454] 일 구현예에서, 비-면역원성 RNA로부터 dsRNA의 제거는, 비-면역원성 RNA 조성물에서 RNA의 10% 미만, 5% 미만, 4% 미만, 3% 미만, 2% 미만, 1% 미만, 0.5% 미만, 0.3% 미만, 0.1% 미만 또는 0.01% 미만이 dsRNA이도록, dsRNA를 제거하는 것을 포함한다. 일 구현예에서, 비-면역원성 RNA에는 dsRNA가 없거나 또는 본질적으로 없다. 일부 구현예에서, 비-면역원성 RNA 조성물은 단일 가닥의 뉴클레오시드 변형된 RNA의 정제된 조제물을 포함한다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 단일 가닥의 뉴클레오시드 변형된 RNA의 정제된 조제물에는 이중 가닥 RNA (dsRNA)이 실질적으로 존재하지 않는다. 일부 구현예에서, 정제된 조제물은 다른 모든 핵산 분자 (DNA, dsRNA, 등)와 비교해 단일 가닥의 뉴클레오시드 변형된 RNA가 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5% 또는 적어도 99.9%이다.

[0455] 일 구현예에서, 비-면역원성 RNA는 서열이 동일한 표준 RNA보다 더 효율적으로 세포에서 번역된다. 일 구현예에서, 번역은 비변형된 카운터파트와 비교해 2배 비율로 강화된다. 일 구현예에서, 번역은 3배 비율로 강화된다. 일 구현예에서, 번역은 4배 비율로 강화된다. 일 구현예에서, 번역은 5배 비율로 강화된다. 일 구현예에서, 번역은 6배 비율로 강화된다. 일 구현예에서, 번역은 7배 비율로 강화된다. 일 구현예에서, 번역은 8배 비율로 강화된다. 일 구현예에서, 번역은 9배 비율로 강화된다. 일 구현예에서, 번역은 10배 비율로 강화된다. 일 구현예에서, 번역은 15배 비율로 강화된다. 일 구현예에서, 번역은 20배 비율로 강화된다. 일 구현예에서, 번역은 50배 비율로 강화된다. 일 구현예에서, 번역은 100배 비율로 강화된다. 일 구현예에서, 번역은 200배 비율로 강화된다. 일 구현예에서, 번역은 500배 비율로 강화된다. 일 구현예에서, 번역은 1000배 비율로

강화된다. 일 구현예에서, 번역은 2000배 비율로 강화된다. 일 구현예에서, 이러한 비율은 10-1000배이다. 일 구현예에서, 이러한 비율은 10-100배이다. 일 구현예에서, 이러한 비율은 10-200배이다. 일 구현예에서, 이러한 비율은 10-300배이다. 일 구현예에서, 이러한 비율은 10-500배이다. 일 구현예에서, 이러한 비율은 20-1000배이다. 일 구현예에서, 이러한 비율은 30-1000배이다. 일 구현예에서, 이러한 비율은 50-1000배이다. 일 구현예에서, 이러한 비율은 100-1000배이다. 일 구현예에서, 이러한 비율은 200-1000배이다. 일 구현예에서, 번역이 임의의 다른 유의한 수준 또는 수준 범위로 강화된다.

[0456] 일 구현예에서, 비-면역원성 RNA는 서열이 동일한 표준 RNA와 비교해 선천적인 면역원성을 현저하게 낮게 나타낸다. 일 구현예에서, 비-면역원성 RNA는 비-변형 카운터파트와 비교해 2배 낮은 선천적인 면역 반응을 나타낸다. 일 구현예에서, 선천적인 면역 반응이 3배 비율로 감소한다. 일 구현예에서 선천적인 면역원성이 4배 비율로 감소한다. 일 구현예에서 선천적인 면역원성이 5배 비율로 감소한다. 일 구현예에서 선천적인 면역원성이 6배 비율로 감소한다. 일 구현예에서 선천적인 면역원성이 7배 비율로 감소한다. 일 구현예에서 선천적인 면역원성이 8배 비율로 감소한다. 일 구현예에서 선천적인 면역원성이 9배 비율로 감소한다. 일 구현예에서 선천적인 면역원성이 10배 비율로 감소한다. 일 구현예에서 선천적인 면역원성이 15배 비율로 감소한다. 일 구현예에서 선천적인 면역원성이 20배 비율로 감소한다. 일 구현예에서 선천적인 면역원성이 50배 비율로 감소한다. 일 구현예에서 선천적인 면역원성이 100배 비율로 감소한다. 일 구현예에서 선천적인 면역원성이 200배 비율로 감소한다. 일 구현예에서 선천적인 면역원성이 500배 비율로 감소한다. 일 구현예에서 선천적인 면역원성이 1000배 비율로 감소한다. 일 구현예에서 선천적인 면역원성이 2000배 비율로 감소한다.

[0457] 용어 "선천적인 면역원성을 현저하게 낮게 나타낸다"는 선천적인 면역원성의 검출가능한 수준의 감소를 의미한다. 일 구현예에서, 이 용어는 비-면역원성 RNA의 유효량이 검출가능한 선천적인 면역 반응을 촉발하지 않으면서 투여할 수 있는, 감소를 의미한다. 일 구현예에서, 이 용어는 비-면역원성 RNA에 의해 암호화된 단백질의 생산을 검출가능하게 낮추기에 충분한 선천적인 면역 반응을 유발하지 않으면서 비-면역원성 RNA를 반복 투여할 수 있는, 감소를 의미한다. 일 구현예에서, 감소는, 비-면역원성 RNA에 의해 암호화된 단백질의 생산을 검출가능하게 소거하기에 충분한 선천적인 면역 반응을 유발하지 않으면서 비-면역원성 RNA를 반복 투여할 수 있는 것이다.

[0458] "면역원성"은 RNA와 같은 외래 물질이 인간 또는 기타 동물의 신체에서 면역 반응을 일으키는 유발 능력이다. 선천적인 면역 시스템은 비교적 비-특이적이고 즉발적인 면역 시스템의 구성 요소이다. 이는 적응 면역 시스템과 더불어 척추동물 면역 시스템의 주요 구성 요소 2종 중 하나이다.

[0459] 본원에 사용된 바와 같이 "내인성"은 임의 물질이 유기체, 세포, 조직 또는 시스템으로부터 파생되거나 또는 내부에서 생성되는 것을 의미한다.

[0460] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "외인성"은 임의 물질이 유기체, 세포, 조직 또는 시스템으로 도입되거나 또는 그 외부에서 생성되는 것을 의미한다.

[0461] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "발현"은 특정 뉴클레오타이드 서열의 전사 및/또는 번역으로서 정의된다.

[0462] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "연결된", "융합된" 또는 "융합"은 상호 호환적으로 사용된다. 이들 용어는 2 이상의 요소 또는 구성성분 또는 도메인이 서로 연결되는 것을 의미한다.

[0463] 코돈 최적화/ G/C 함량 증가

[0464] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 결합체의 아미노산 서열은 코돈-최적화되고 및/또는 야생형 암호화 서열과 비교해 G/C 함량이 증가된 암호화 서열에 의해 암호화된다. 이는 또한 암호화 서열의 하나 이상의 서열 영역이 코돈-최적화되고 및/또는 야생형 암호화 서열의 대응되는 서열 영역과 비교해 G/C 함량이 증가된, 구현예를 포함한다. 일부 구현예에서, 코돈-최적화 및/또는 G/C 함량 증가는 바람직하게는 암호화된 아미노산 서열을 변경하지 않는다.

[0465] 용어 "코돈-최적화된"은 바람직하게는 핵산 분자에 의해 암호화되는 아미노산 서열은 바꾸지 않으면서 숙주 유기체의 전형적인 코돈 용법을 반영하기 위한 핵산 분자의 암호화 영역내 코돈의 변형을 지칭한다. 본 발명의 맥락에서, 암호화 영역은 바람직하게는 본원에 기재된 RNA 분자를 이용해 치료할 개체에서 최적 발현을 위해 코돈-최적화된다. 코돈-최적화는, 번역 효율이 세포에서 tRNA의 차별적인 발생 빈도에 의해 결정된다는 사실에 기반한다. 따라서, RNA 서열은, "드문 코돈" 대신 빈도가 높은 tRNA를 이용가능한 코돈으로 삽입하여 변형할 수 있다.

- [0466] 본 발명의 일부 구현예에서, 본원에 기재된 암호화 영역의 구아노신/시토신 (G/C) 함량은 야생형 RNA의 대응되는 암호화 서열의 G/C 함량과 비교해 증가시키고, RNA에 의해 암호화된 아미노산 서열은 바람직하게는 야생형 RNA에 의해 암호화된 아미노산 서열과 비교해 변경되지 않는다. RNA 서열의 변형은, 번역할 임의의 RNA 서열이 mRNA의 효율적인 번역에 중요하다는 사실에, 기반한다. G (구아노신)/C (시토신) 함량이 증가된 서열은 A (아데노신)/U (우라실) 함량이 증가된 서열보다 더 안정적이다. 코돈 여러개가 하나의 동일한 아미노산을 암호한다는 코드 (소위 유전자 코드의 축중) 사실에 비추어, 안정성 측면에서 가장 유익한 코돈을 결정할 수 있다 (소위 대안적인 코돈 용법). RNA에 의해 암호화할 아미노산에 따라, RNA 서열은 이의 야생형 서열과 비교해 변형 가능성이 여러개 존재한다. 특히, A 및/또는 U 뉴클레오티드를 가진 코돈은 이 코돈을 동일한 아미노산을 암호화하지만 A 및/또는 U를 함유하지 않거나 또는 A 및/또는 U 뉴클레오티드 함량을 낮게 포함하는 다른 코돈으로 치환함으로써 변형할 수 있다.
- [0467] 다양한 구현예들에서, 본원에 기재된 RNA의 암호화 영역의 G/C 함량은 야생형 RNA의 암호화 영역의 G/C 함량과 비교해 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 55% 또는 심지어 그 보다 높은 수준으로 높다.
- [0468] **핵산 함유 입자**
- [0469] 결합제를 암호화하는 RNA와 같은 본원에 기재된 핵산은 입자로 제형화하여 투여할 수 있다.
- [0470] 본 발명의 맥락에서, 용어 "입자"는 분자 또는 분자 복합체에 의해 형성된 구조화된 물질을 지칭한다.
- [0471] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 입자는 나노입자이다. 용어 "나노입자"는 입자의 3가지 외부 치수 모두가 나노 크기, 즉 약 1 nm 이상 약 1,000 nm 미만인 나노 크기 입자에 관한 것이다. 바람직하게는 입자의 크기는 입자의 직경이다.
- [0472] 일부 구현예에서, 핵산 입자는, 핵산 분자의 분자 매개변수가 몰 질량 또는 분자 구조, 캡핑, 암호화 영역 또는 기타 특징 등의 기본적인 구조 요소들 측면에서 서로 비슷하거나 또는 다를 수 있는, 하나 이상의 유형의 핵산 분자를 포함한다.
- [0473] RNA, 예를 들어 제1 RNA 및 제2 RNA를 포함하는 미립자 제형에서, 각 RNA 종은 개별 미립자 제형으로서 별도로 제형화되는 것이 가능하다. 이 경우, 각각의 개별 미립자 제형은 하나의 RNA 종을 포함하게 된다. 개별 미립자 제형은 별개의 실체로서, 예를 들어 별도의 용기에서 존재할 수 있다. 이러한 제형은 각각의 RNA 종을 개별적으로 (전형적으로 각각 RNA 함유 용액의 형태로) 입자 형성 제제와 함께 제공하여, 입자의 형성을 가능하게 함으로써 수득할 수 있다. 각각의 입자는 입자가 형성될 때 제공되는 특정 RNA 종을 독점적으로 함유할 것이다 (개별 미립자 제형). 일부 구현예에서, 약학적 조성물과 같은 조성물은 하나 이상의 개별적인 입자 제형을 포함한다. 각각의 약학적 조성물은 혼합된 미립자 제형으로 지칭된다. 본 발명에 따른 혼합된 미립자 제형은 개별 미립자 제형을 개별적으로 형성한 후, 개별 미립자 제형을 혼합하는 단계를 거쳐 얻을 수 있다. 혼합 단계에 의해, RNA-함유 입자가 혼합된 집단을 포함하는 하나의 제형이 수득 가능하다. 개별 미립자 집단은 개별 미립자 제형의 혼합된 집단을 포함한 하나의 용기 내에 함께 있을 수 있다. 대안적으로, 약학적 조성물의 모든 RNA 종이 조합된 미립자 제형으로서 함께 제형화될 수 있다. 이러한 제형은 모든 RNA 종의 조합된 제형 (전형적으로 조합된 용액)를 입자-형성 제제와 함께 제공하여, 입자의 형성을 가능하게 함으로써 수득할 수 있다. 혼합된 미립자 제형과는 대조적으로, 조합된 미립자 제형은 전형적으로 하나 이상의 RNA 종을 포함하는 입자를 포함할 것이다. 조합된 미립자 조성물에서, 상이한 RNA 종이 전형적으로 단일 입자 내에 함께 존재한다.
- [0474] 핵산 입자"는 핵산을 대상 표적 부위 (예를 들어, 세포, 조직, 장기 등)로 전달하기 위해 이용할 수 있다. 핵산 분자는 적어도 하나의 양이온성 또는 양이온으로 이온화가능한 지질 또는 지질-유사 물질, 적어도 하나의 양이온성 폴리머, 예를 들어 프로타민, 또는 이들의 혼합물과 핵산으로부터 만들어질 수 있다. 폴리머 및 지질과 같이 양으로 하전된 분자와 음으로 하전된 핵산 간의 정전기적 상호작용이 입자 형성에 관여한다. 그 결과 복합체가 형성되고, 핵산 입자가 자발적으로 형성된다. 임의 이론으로 결부시키고자 하는 것은 아니지만, 양이온성 또는 양이온으로 이온화 가능한 지질 또는 지질-유사 물질 및/또는 양이온성 폴리머가 핵산과 함께 조합되어 응집체를 형성하고, 이러한 응집으로 안정적인 콜로이드 입자가 만들어지는 것으로 보인다. 핵산 입자는 지질 나노입자 (LNP)-기반의 제형 및 리포플렉스 (LPX)-기반의 제형을 포함한다.
- [0475] 본원에 사용된 바와 같이 용어 "콜로이드"는 분산된 입자가 침강되지 않은 균질한 혼합물 유형을 지칭한다. 혼합물에서 불용성 입자는 1과 1000 nm사이의 입자 크기로 미세하다. 이 혼합물은 콜로이드 또는 콜로이드 현탁물로 지칭할 수 있다. 때로는, 용어 "콜로이드"는 혼합물 중의 입자만을 지칭하는 것이고 현탁액 전체를 지칭하는

것은 아니다.

- [0476] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 입자는 양이온성 또는 양이온으로 이온화 가능한 지질 또는 지질-유사 물질 이외의 다른 적어도 하나의 지질 또는 지질-유사 물질, 양이온성 폴리머 이외의 다른 적어도 하나의 폴리머 또는 이들의 혼합물을 추가로 포함한다.
- [0477] 본원에 기재된 핵산 입자는, 일부 구현예에서, 약 30 nm 내지 약 1000 nm, 약 50 nm 내지 약 800 nm, 약 70 nm 내지 약 600 nm, 약 90 nm 내지 약 400 nm, 또는 약 100 nm 내지 약 300 nm 범위의 평균 직경을 가질 수 있다.
- [0478] 용어 "평균 직경"은 동적 광 산란 (dynamic laser light scattering: DLS)과 소위 누적 알고리즘에 의한 측정 시 입자의 평균 유체역학적 직경을 의미하며, 이는 결과로서 길이 치수를 가진 $Z_{\text{평균}}$ 과 치수가 없는 다분산 지수 (PI)를 제공해준다 (Koppel, D., J. Chem. Phys. 57, 1972, pp 4814-4820, ISO 13321). 여기서, 입자의 "평균 직경", "직경" 또는 "크기"는 $Z_{\text{평균}}$ 값과 동의어로 사용된다.
- [0479] 본원에 개시된 핵산 입자 약 0.5 미만, 약 0.4 미만, 약 0.3 미만 또는 약 0.2 미만의 다분산 지수를 나타낼 수 있다. 예를 들어, 핵산 입자는 약 0.1 내지 약 0.3 또는 약 0.2 내지 약 0.3 범위의 다분산 지수를 나타낼 수 있다.
- [0480] 용어 "다분산 지수"는 "평균 직경"의 정의에서 언급한 바와 같이 소위 누적 분석을 통해 동적 광 산란 측정값을 기반으로 계산한다. 특정 전제 조건에서는, 이는 나노입자 전체의 크기 분포의 측정값으로서 획득할 수 있다.
- [0481] N/P 비율은 핵산, 예를 들어 RNA에서 포스페이트 기의 개수에 대한 지질의 질소 기의 비율을 나타낸다. 이는 (pH에 따라) 질소 원소는 통상 양으로 하전되고 포스페이트 기는 음으로 하전되므로, 전하 비율과 연관성이 있다. N/P 비율은, 전하 평형이 존재하는 경우, pH에 의존한다. 지질 제형은, 양으로 하전된 나노입자가 형질감염에 우호적인 것으로 간주되므로, 흔히 N/P 비율이 4 초과 최대 12이도록 형성한다. 이러한 경우, RNA는 나노입자에 완전히 결합하는 것으로 간주된다.
- [0482] 핵산 함유 입자의 여러가지 유형들이 핵산을 미립자 형태로 전달하기에 적합한 것으로 이전에 개시된 바 있다 (예, Kaczmarek, J. C. et al., 2017, Genome Medicine 9, 60). 비-바이러스 핵산 전달 비히클의 경우, 핵산의 나노입자 캡슐화는 핵산을 분해로부터 물리적으로 보호하고, 특이적인 화학 특성에 따라 세포 흡수 및 엔도솜 탈출을 보조할 수 있다.
- [0483] 본원은 핵산, 적어도 하나의 양이온성 또는 양이온으로 이온화 가능한 지질 또는 지질-유사 물질, 및/또는 적어도 하나의 양이온성 폴리머를 포함하는 입자를 기술하며, 이는 핵산과 회합하여 핵산 입자와 이러한 입자를 포함하는 조성물을 형성한다. 핵산 입자는 입자에 대한 비-공유적 상호작용에 의해 상이한 형태로 복합체를 형성한 핵산을 포함할 수 있다. 본원에 기재된 입자는 바이러스 입자, 특히 감염성 바이러스 입자가 아니며, 즉 이는 세포를 바이러스로 감염시키지 않는다.
- [0484] 적합한 양이온성 또는 양이온으로 이온화 가능한 지질 또는 지질-유사 물질 및 양이온성 폴리머는 핵산 입자를 형성하는 것이며, 용어 "입자를 형성하는 구성성분" 또는 "입자를 형성하는 물질"에 포함된다. 용어 "입자를 형성하는 구성성분" 또는 "입자를 형성하는 물질"은 핵산과 회합하여 핵산 입자를 형성하는 임의의 구성성분을 지칭한다. 이러한 구성성분은 핵산 입자의 일부일 수 있는 임의의 구성성분을 포함한다.
- [0485] **양이온성 폴리머**
- [0486] 더 높은 수준의 화학적 유연성을 감안해, 나노입자-기반의 전달에 통상적으로 사용되는 물질은 폴리머이다. 전형적으로, 양이온성 폴리머를 이용해, 음으로 하전된 핵산을 나노입자로 정전기적으로 압축한다. 이러한 양으로 하전된 기들은 흔히 엔도솜을 파괴하는 이온 불균형을 일으키는 것으로 간주되는, pH 5.5 내지 7.5 범위에서 양성자화 상태가 달라지는 아민으로 구성된다. 폴리-L-라이신, 폴리아미도아민, 프로타민 및 폴리에틸렌아민과 같은 폴리머뿐 아니라 키토산과 같은 자연 생성 폴리머 모두 핵산 전달에 이용된 바 있으며, 본원에서 양이온성 폴리머로서 적합하다. 아울러, 일부 연구자들은 핵산 전달용으로 폴리머를 특수 합성한 바 있다. 특히, 폴리(β -아미노 에스테르)가 이의 용이한 합성 및 생분해성으로 인해 핵산 전달용으로 널리 사용되고 있다. 이러한 합성 폴리머는 또한 본원에서 양이온성 폴리머로서 적합하다.
- [0487] 본원에 사용된 바와 같이, "폴리머"는 일반적인 의미로 제공되며, 즉 공유 결합에 의해 연결된 하나 이상의 반복 단위 (단량체)를 포함하는 분자 구조를 의미한다. 이러한 반복 단위는 모두 동일할 수 있거나, 또는 일부 경우에는 한 가지 타입 이상의 반복 단위가 폴리머에 존재할 수 있다. 일부 경우에, 폴리머는 생물학적으로 유래

한 것이며, 즉 단백질과 같은 바이오폴리머이다. 일부 경우에, 폴리머에 부가적인 모이어티도 존재할 수 있으며, 예를 들어 본원에 언급된 것과 같은 표적화 모이어티가 존재할 수 있다.

[0488] 폴리머에 한 가지 타입 이상의 반복 단위가 존재한다면, 이러한 폴리머는 "코폴리머"라 지칭한다. 본원에서 채택되는 폴리머는 코폴리머일 수 있는 것으로 이해되어야 한다. 코폴리머를 형성하는 반복 단위는 임의 방식으로 정렬될 수 있다. 예를 들어, 반복 단위는 무작위 순서로, 교대로 배치되는 순서로 또는 "블록" 코폴리머로서, 즉 각각 제1 반복 단위 (예, 제1 블록)를 포함하는 하나 이상의 영역과 각각 제2 반복 단위 (예, 제2 블록) 등을 포함하는 하나 이상의 영역 등을 포함하는 "블록" 코폴리머로서 정렬될 수 있다. 블록 코폴리머는 별개의 블록을 2개 (다이블록 코폴리머), 3개 (트리블록 코폴리머) 또는 그 이상의 개수로 가질 수 있다.

[0489] 일부 구현예에서, 폴리머는 생체적합한 것이다. 생체적합한 폴리머는 전형적으로 적당한 농도에서 현저한 세포 사멸을 유발하지 않는 폴리머이다. 일부 구현예에서, 생체적합한 폴리머는 생분해성이며, 즉 폴리머는 체내에서와 같은 생리학적 환경에서 화학적으로 및/또는 생물학적으로 분해될 수 있다.

[0490] 일부 구현예에서, 폴리머는 프로타민 또는 폴리알킬렌이민일 수 있으며, 특히 프로타민일 수 있다.

[0491] 용어 "프로타민"은, 아르기닌이 풍부한 비교적 저 분자량의 다양한 임의의 강 염기성 단백질을 지칭하며, 이는 다양한 동물 (어류와 같이)의 정자 세포에서 체세포 히스톤 대신 DNA에 특히 결합된 상태로 발견된다. 구체적으로, 용어 "프로타민"은 강 염기성이며, 수 용해성이고, 열에 의해 응집되지 않고, 가수분해시 주로 아르기닌이 생성되는, 어류 정자에서 발견되는 단백질을 지칭한다. 이는, 정제된 형태로는 인슐린의 장기 작용 제형에 이용되며, 해파린의 항-응집 효과를 중화한다.

[0492] 본 발명에 따르면, 용어 "프로타민"은, 본원에 사용된 바와 같이, 자연 또는 생물학적 원료로부터 수득 또는 유래하는 임의의 프로타민 아미노산 서열을, 이의 단편 및 상기한 아미노산 서열 또는 이의 단편의 다량체 형태뿐 아니라 특수 목적으로 특별히 인공적으로 설계된, 천연적인 또는 생물학적 원료로부터 분리할 수 없는 (합성) 폴리펩티드를 비롯하여, 망라하는 것을 의미한다.

[0493] 일부 구현예에서, 폴리알킬렌이민은 폴리에틸렌이민 및/또는 폴리프로필렌이민을 포함하고, 바람직하게는 폴리에틸렌이민을 포함한다. 바람직한 폴리알킬렌이민은 폴리에틸렌이민 (PEI)이다. PEI의 평균 분자량은 바람직하게는 $0.75 \cdot 10^2$ 내지 10^7 Da, 바람직하게는 1000 내지 10^5 Da, 더 바람직하게는 10000 내지 40000 Da, 더 바람직하게는 15000 내지 30000 Da, 더욱 더 바람직하게는 20000 내지 25000 Da이다.

[0494] 본원에서는 선형 폴리에틸렌이민 (PEI)과 같은 선형 폴리알킬렌이민이 바람직하다.

[0495] 본 발명에서 사용이 고려되는 (다가양이온 폴리머를 비롯한) 양이온성 폴리머는 핵산에 정전기적으로 결합할 수 있는 임의의 양이온성 폴리머를 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명에서 사용이 고려되는 양이온성 폴리머는, 예를 들어 핵산과 복합체를 형성함으로써 또는 핵산이 봉입 또는 캡슐화된 소낭을 형성함으로써, 핵산과 조합될 수 있는, 임의의 양이온성 폴리머를 포함한다.

[0496] 본원에 기재된 입자는 또한 양이온성 폴리머 이외의 다른 폴리머, 즉 비-양이온성 폴리머 및/또는 음이온성 폴리머를 포함할 수 있다. 통틀어 음이온성 폴리머 및 중성 폴리머는 본원에서 비-양이온성 폴리머로 지칭된다.

[0497] 지질 및 지질-유사 물질

[0498] 용어 "지질" 및 "지질-유사 물질"은 하나 이상의 소수성 모이어티 또는 기를 포함하고, 선택적으로 하나 이상의 친수성 모이어티 또는 기를 포함하는 분자로서, 광의적인 의미로 본원에서 정의된다. 소수성 모이어티와 친수성 모이어티를 포함하는 분자는 또한 양친매성으로 종종 언급된다. 지질은 통상 수 난용성이다. 양친매성 특성은 수성 환경에서 분자가 조직화된 구조로 자기-조직하여 여러가지 상을 형성할 수 있게 해준다. 이들 상은 수성 환경에서 소낭, 다층/단일층 리포솜 또는 막으로 존재하므로, 이들 상 중 하나는 지질 이중층을 구성한다. 소수성은, 비-제한적으로, 장쇄 포화 및 불포화 지방족 탄화수소 기, 그리고 방향족, 지환족 또는 헤테로사이클릭 기(들) 중 하나 이상으로 치환된 상기한 기를 포함하여, 무극성 기를 함유함으로써 부여될 수 있다. 친수성 기는 극성 및/또는 하전된 기를 포함할 수 있으며, 탄수화물, 포스페이트 기, 카르복시 기, 설페이트 기, 아미노 기, 설프하이드릴 기, 니트로 기, 하이드록시 기 및 기타 유사 기를 함유할 수 있다.

[0499] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "양친매성"은 극성 부분 및 비-극성 부분을 모두 가진 분자를 지칭한다. 종종, 양친매성 화합물은 긴 소수성 꼬리가 달린 극성 헤드를 가진다. 일부 구현예에서, 극성 부분은 수 용해성인 반면, 비-극성 부분은 수 불용성이다. 또한, 극성 부분은 형식 양 전하 (formal positive charge) 또는 형식 음

전하를 가질 수 있다. 대안적으로, 극성 부분은 형식 양 전하 및 음전하 둘다를 가질 수 있으며, 양쪽성 이온 또는 내부 염 (inner salt)일 수 있다. 본 발명의 목적에서, 양친매성 화합물은 천연성 또는 비-천연성 지질 및 지질-유사 화합물 하나 또는 복수개일 수 있으나, 이들로 제한되는 것은 아니다.

[0500] 용어 "지질-유사 물질", "지질-유사 화합물" 또는 "지질-유사 분자"는 지질과 구조적으로 및/또는 기능적으로 관련성이 있지만 엄밀한 의미에서는 지질로 간주할 수 없는 물질을 의미한다. 예를 들어, 이 용어는 수성 환경에서 소낭, 다층/단일층 리포솜 또는 막에 존재하므로, 양친매성 층을 형성할 수 있는 화합물을 포함하며, 계면활성제 또는 친수성 및 소수성 모이어티를 모두 가진 합성 화합물을 망라한다. 일반적으로 말해, 이 용어는 지질과 비슷하거나 또는 비슷하지 않을 수 있는, 소수성 및 친수성 모이어티를 여러가지 구조적 구성으로 포함하는, 분자를 지칭한다. 세포막에 자발적으로 통합될 수 있는 지질 유사 화합물의 예에는 합성 기능-스페이서-지질 작제물(synthetic function-spacer-lipid construct: FSL), 합성 기능-스페이서-스테롤 작제물(synthetic function-spacer-sterol construct: FSS)과 같은 기능성 지질 작제물뿐만 아니라 인공 양친매성 분자가 포함된다. 지질은 일반적으로 원통형이다. 두 개의 알킬 사슬이 차지하는 면적은 극성 머리 그룹이 차지하는 면적과 유사하다. 지질은 단량체로서 낮은 용해도를 가지며 물에 녹지 않는 평면 이중층으로 응집되는 경향이 있다. 전통적인 계면활성제 모노머는 일반적으로 원뿔 모양이다. 친수성 머리 그룹은 선형 알킬 사슬보다 더 많은 분자 공간을 차지하는 경향이 있다. 계면활성제는 수용성인 구형 또는 타원형 미셀로 응집되는 경향이 있다. 지질은 계면활성제와 동일한 일반 구조(극성 친수성 머리 그룹 및 비극성 소수성 꼬리)를 가지지만, 지질은 단량체 모양, 용액에서 형성된 응집체 유형 및 응집에 필요한 농도 범위에서 계면활성제와 다르다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "지질"은 본원에서 달리 지시되지 않은 한 또는 문맥상 명확하게 상충하지 않은 한 지질 및 지질-유사 물질 둘다를 망라하는 것으로 해석하여야 한다.

[0501] 양친매성 층에 함유될 수 있는 양친매성 화합물에 대한 구체적인 예로는 포스포리피드, 아미노리피드 및 스핑고리피드 등이 있으나, 이들로 제한되는 것은 아니다.

[0502] 특정 구현예에서, 양친매성 화합물은 지질이다. 용어 "지질"은 물에 불용성이나 다수의 유기 용매에는 용해성인 것을 특징으로 하는 일군의 유기 화합물을 지칭한다. 일반적으로, 지질은 8가지 범주로 나눌 수 있다: 지방산, 글리세로지질, 글리세로인지질, 스핑고리피드, 사카로지질, (케토아실 서브유닛의 축합으로 유래되는) 폴리케티드, 스테롤 지질 및 (이소프렌 서브유닛의 축합으로 유래되는) 프레놀 지질. 용어 "지질"은 종종 지방과 동의어로 사용되지만, 지방은 트리글리세라이드로 지칭되는 지질의 하위군이다. 또한, 지질은 지방산 및 이의 유도체(트리-글리세라이드, 다이-글리세라이드, 모노-글리세라이드 및 포스포리피드)와 같은 분자뿐 아니라 콜레스테롤과 같은 스테롤-함유 대사산물을 망라한다.

[0503] 지방산 또는 지방산 잔기는 카르복시산 기로 끝나는 탄화수소 사슬로 만들어진 다양한 분자 군으로서; 이러한 배열은 수 불용성인 비-극성 소수성 말단과 극성 친수성 말단을 가진 분자를 제공한다. 이 탄소 사슬, 전형적으로 탄소수 4 내지 24 길이의 탄소 사슬은 포화되거나 또는 불포화될 수 있으며, 산소, 할로젠, 질소 및 황을 함유한 관능기가 부착될 수 있다. 지방산이 이중 결합을 가진다면, 분자의 배위에 현저한 영향을 미치는 시스 또는 트랜스 기하 이성질 현상 (isomerism)이 존재할 수 있다. 시스-이중 결합은 사슬에 더 많은 이중 결합들이 결합되는 효과로서, 지방산쇄가 만곡되게 한다. 지방산 범주에서 다른 주요 지질 계열은 지방 에스테르와 지방아미드이다.

[0504] 글리세로지질은 가장 잘 알려진 글리세롤의 지방산 트리에스테르로서 단일-치환된 글리세롤, 이중-치환된 글리세롤 및 삼중-치환된 글리세롤로 구성된다. 용어 "트리아실글리세롤"은 때때로 "트리글리세라이드"와 동의어로 사용된다. 이들 화합물의 경우, 글리세롤의 하이드록시 기 3개가 각각 에스테르화 되며, 전형적으로 서로 다른 지방산으로 에스테르화 된다. 글리세로리피드의 부가적인 하위군은 글리코시드 결합을 통해 글리세롤이 부착된 하나 이상의 당 잔기의 존재를 특징으로 하는 글리코실글리세롤이다.

[0505] 글리세로인지질은, 글리세롤 코어가 지방산-유래 "꼬리" 2개와 에스테르 결합으로, 그리고 "머리" 기 하나와 포스페이트 에스테르 결합으로 결합된, (소수성 부분과 친수성 부분을 모두 함유한) 양친매성 분자이다. 통상적으로, (스핑고마이엘린 역시 인지질로 분류되지만) 인지질로 언급되는 글리세로인지질의 예는 포스파티딜콜린 (PC, GPCho 또는 레시틴으로도 알려짐), 포스파티딜에탄올아민 (PE 또는 GPEtn) 및 포스파티딜세린 (PS 또는 GPSe)이다.

[0506] 스핑고리피드는 공통적인 구조 특징으로서 스핑고이드 염기 백본을 공유한 화합물들로 구성된 복합체 계열이다. 포유류에서 주요 스핑고이드 염기는 일반적으로 스핑고신으로 지칭된다. 세라마이드 (N-아실-스핑고이드 염기)는 아미드-연결된 지방산을 가진 스핑고이드 염기 유도체의 주요 하위군이다. 지방산은 전형적으로 탄소수 16

내지 26의 사슬 길이를 가진 포화 또는 단일-불포화된 형태이다. 포유류의 주요 포스포스핑고리피드는 스펡고마 이엘린 (세라마이드 포스포콜린)이지만, 곤충은 주로 세라마이드 포스포에탄올아민을 함유하고 있으며, 진균은 피토세라마이드 포스포이노시톨 및 만노스-함유 헤드 기를 가지고 있다. 글리코스핑고리피드는 스펡고이드 염기에 글리코시드 결합을 통해 연결된 하나 이상의 당 잔기로 구성되는 다양한 분자 계열이다. 이에 대한 예로는 세레브로시드 및 강글리오시드와 같은 단순한 글리코스핑고리피드와 복잡한 글리코스핑고리피드가 있다.

[0507] 콜레스테롤 및 이의 유도체, 또는 토크페롤 및 이의 유도체와 같은 스테롤 지질은, 글리세로인지질 및 스펡고마 이엘린과 더불어, 막 지질의 중요한 성분이다

[0508] 사카로지질은, 지방산이 당 백본에 직접 결합되어 막 이중층과 양립가능한 구조를 형성하는, 화합물이다. 사카 로지질에서, 단당류가 글리세로지질 및 글리세로인지질에 존재하는 글리세롤 백본을 치환한다. 가장 친숙한 사카로지질은 그람 음성 박테리아에서 지질다당류의 지질 A 구성성분의 아실화된 글루코사민 전구체이다. 전형 적인 지질 A 분자는 많게는 7개의 지방-아실 사슬로 유도체화된 글루코사민 이당류이다. *E. coli*에서 증식에 필수적인 최소 지질다당류는 Kdo2-지질 A, 즉 3-데옥시-D-만노-옥톨로소닉 산 (Kdo) 잔기 2개로 당화된 글루코 사민의 핵사-아실화된 이당류이다.

[0509] 폴리케티드는 고전적인 효소뿐 아니라 지방산 합성효소와 기전 특징을 공유한 반복적인 다중 모듈형 효소에 의 한, 아세틸과 프로피오닐 서브유닛들의 중합을 통해 합성된다. 이는 동물, 식물, 세균, 진균 및 해양 원료로부터 유래되는 2차 대사산물과 천연 산물을 다수 포함하며, 상당한 구조 다양성을 가진다. 다수의 폴리케티드가 당화, 메틸화, 하이드록시화, 산화 또는 기타 공정에 의해 종종 추가적으로 변형된 백본을 가진 고리형 분자이 다.

[0510] 본원에서, 지질 및 지질-유사 물질은 양이온성, 음이온성 또는 중성일 수 있다. 중성 지질 또는 지질-유사 물질 은 선택 pH에서 하전되지 않거나 또는 중성의 양쪽성 형태로 존재한다.

[0511] **양이온성 또는 양이온으로 이온화가능한 지질 또는 지질-유사 물질**

[0512] 본원에 기재된 핵산 입자는 하나 이상의 양이온성 또는 양이온으로 이온화 가능한 지질 또는 지질-유사 물질을 입자 형성제로서 포함할 수 있다. 본 발명에서 사용이 고려되는 양이온성 또는 양이온으로 이온화가능한 지질 또는 지질-유사 물질로는 핵산에 정전기적으로 결합할 수 있는, 임의의 양이온성 또는 양이온으로 이온화가능한 지질 또는 지질-유사 물질 등이 있다. 일부 구현예에서, 본 발명에서 사용이 고려되는 양이온성 또는 양이온으 로 이온화가능한 지질 또는 지질-유사 물질은, 예를 들어, 핵산이 봉입 또는 캡슐화된 소낭을 형성하거나 또는 핵산과 복합체를 형성함으로써, 핵산과 회합될 수 있다.

[0513] 본원에 사용된 바와 같이, "양이온성 지질" 또는 "양이온성 지질-유사 물질"은 순 양의 전하 (net positive charge)를 가진 지질 또는 지질-유사 물질을 의미한다. 양이온성 지질 또는 지질-유사 물질은 정전기적 상호작 용을 통해 음으로 하전된 핵산에 결합한다. 일반적으로, 양이온성 지질은 스테롤, 아실 사슬, 다이아실 또는 그 이상의 아실 사슬 등의 친지성 모이어티를 가지고 있으며, 지질의 머리 기는 전형적으로 양 전하를 띤다.

[0514] 일부 구현예에서, 양이온성 지질 또는 지질-유사 물질은 특정 pH, 특히 산성 pH에서만 순 양전하를 갖는 반면, 이는 바람직하게는 순 양전하를 갖지 않고, 바람직하게는 전하를 갖지 않으며, 즉 다른, 바람직하게는 생리학적 pH와 같은 더 높은 pH에서 중성이다. 이러한 이온화 거동은 엔도솜 탈출을 돕고 생리학적 pH에서 양이온성으로 잔류하는 입자와 비교해 독성을 낮춤으로써 효과를 강화하는 것으로 보인다.

[0515] 본 발명의 목적에서, 이러한 "양이온으로 이온화 가능한" 지질 또는 지질-유사 물질은, 상황에 따라 상충하지 않은 한, 용어 "양이온성 지질 또는 지질-유사 물질"에 포함된다.

[0516] 일부 구현예에서, 양이온성 또는 양이온으로 이온화 가능한 지질 또는 지질-유사 물질은 양으로 하전되거나 또 는 양성자화될 수 있는 하나 이상의 질소 원자 (N)를 가진 머리 기를 포함한다.

[0517] 양이온성 지질에 대한 예로는 1,2-다이올레오일-3-트리메틸암모늄 프로판 (DOTAP); N,N-다이메틸-2,3-다이올레 일옥시프로필아민 (DODMA), 1,2-다이-O-옥타데세닐-3-트리메틸암모늄 프로판 (DOTMA), 3-(N-(N',N'-다이메틸아 미노에탄)-카바모일)콜레스테롤 (DC-Chol), 다이메틸다이옥타데실암모늄 (DDAB); 1,2-다이올레오일-3-다이메틸 암모늄-프로판 (DODAP); 1,2-다이아실옥시-3-다이메틸암모늄 프로판; 1,2-다이알킬옥시-3-다이메틸암모늄 프로 판; 다이옥타데실다이메틸 암모늄 클로라이드 (DODAC), 1,2-다이스테아릴옥시-N,N-다이메틸-3-아미노프로판 (DSDMA), 2,3-다이(테트라데코시)프로필-(2-하이드록시에틸)-다이메틸아자늄 (DMRIE), 1,2-다이미리스토일-sn-글리세로-3-에틸포스포콜린 (DMEPC), 1,2-다이미리스토일-3-트리메틸암모늄 프로판 (DMTAP), 1,2-다이올레일

옥시프로필-3-다이메틸-하이드록시에틸 암모늄 브로마이드 (DORIE), 및 2,3-다이올레오일옥시-N-[2(스페르민 카르복사미드)에틸]-N,N-다이메틸-1-프로판아미늄 트리플루오로아세테이트 (DOSPA), 1,2-다이리놀레일옥시-N,N-다이메틸아미노프로판 (DLinDMA), 1,2-다이리놀레일옥시-N,N-다이메틸아미노프로판 (DLenDMA), 다이옥타데실아미도글리실 스페르민 (DOGS), 3-다이메틸아미노-2-(콜레스트-5-en-3-β-옥시부탄-4-옥시)-1-(cis,cis-9,12-옥타데카다이엔옥시)프로판 (CLinDMA), 2-[5'-(콜레스트-5-en-3-β-옥시)-3'-옥사헥톡시]-3-다이메틸-1-(cis,cis-9',12'-옥타데카다이엔옥시)프로판 (CpLinDMA), N,N-다이메틸-3,4-다이올레일옥시벤질아민 (DMOBA), 1,2-N,N'-다이올레일카르브아밀-3-다이메틸아미노프로판 (DOcarbDAP), 2,3-다이리놀레오일옥시-N,N-다이메틸프로필아민 (DLinDAP), 1,2-N,N'-다이리놀레일카르브아밀-3-다이메틸아미노프로판 (DLincarbDAP), 1,2-다이리놀레오일카르브아밀-3-다이메틸아미노프로판 (DLinCDAP), 2,2-다이리놀레일-4-다이메틸아미노메틸-[1,3]-다이옥솔란 (DLin-K-DMA), 2,2-다이리놀레일-4-다이메틸아미노에틸-[1,3]-다이옥솔란 (DLin-K-XTC2-DMA), 2,2-다이리놀레일-4-(2-다이메틸아미노에틸)-[1,3]-다이옥솔란 (DLin-KC2-DMA), 헵타트리아콘타-6,9,28,31-테트라엔-19-일-4-(다이메틸아미노)부타노에이트 (DLin-MC3-DMA), N-(2-하이드록시에틸)-N,N-다이메틸-2,3-비스(테트라데실옥시)-1-프로판아미늄 브로마이드 (DMRIE), (±)-N-(3-아미노프로필)-N,N-다이메틸-2,3-비스(cis-9-테트라데세닐옥시)-1-프로판아미늄 브로마이드 (GAP-DMORIE), (±)-N-(3-아미노프로필)-N,N-다이메틸-2,3-비스(도데실옥시)-1-프로판아미늄 브로마이드 (GAP-DLRIE), (±)-N-(3-아미노프로필)-N,N-다이메틸-2,3-비스(테트라데실옥시)-1-프로판아미늄 브로마이드 (GAP-DMRIE), N-(2-아미노에틸)-N,N-다이메틸-2,3-비스(테트라데실옥시)-1-프로판아미늄 브로마이드 (βAE-DMRIE), N-(4-카르복시벤질)-N,N-다이메틸-2,3-비스(올레오일옥시)프로판-1-아미늄 (DOBAQ), 2-(8-[(3β)-콜레스트-5-en-3-일옥시]옥틸)옥시)-N,N-다이메틸-3-[(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-다이엔-1-일옥시]프로판-1-아민 (옥틸-CLinDMA), 1,2-다이미리스토일-3-다이메틸암모늄-프로판 (DMDAP), 1,2-다이팔미토일-3-다이메틸암모늄-프로판 (DPDAP), N1-[2-((1S)-1-[(3-아미노프로필)아미노]-4-[다이(3-아미노-프로필)아미노]부틸 카르복사미드)에틸]-3,4-다이[올레일옥시]-벤즈아미드 (MVL5), 1,2-다이올레오일-sn-글리세로-3-에틸포스포콜린 (DOEPC), 2,3-비스(도데실옥시)-N-(2-하이드록시에틸)-N,N-다이메틸프로판-1-암모늄 브로마이드 (DLRIE), N-(2-아미노에틸)-N,N-다이메틸-2,3-비스(테트라데실옥시)프로판-1-아미늄 브로마이드 (DMORIE), 다이((Z)-non-2-en-1-일) 8,8'-(((2(다이메틸아미노)에틸)티오)카르보닐)아잔다이일)다이옥타노에이트 (ATX), N,N-다이메틸-2,3-비스(도데실옥시)프로판-1-아민 (DLDMA), N,N-다이메틸-2,3-비스(테트라데실옥시)프로판-1-아민 (DMDMA), 다이((Z)-non-2-en-1-일)-9-((4-(다이메틸아미노부타노일)옥시)헵타데칸다이오에이트 (L319), N-도데실-3-((2-도데실카바모일-에틸)-2-[2-(2-도데실카바모일-에틸)-2-((2-도데실카바모일-에틸)-[2-(2-도데실카바모일-에틸)아미노]-에틸]-아미노)-에틸아미노)프로피온아미드 (리피도이드 98N₁₂-5), 1-[2-[비스(2-하이드록시도데실)아미노]에틸]-2-[4-[2-[비스(2-하이드록시도데실)아미노]에틸]피페라진-1-일]에틸]아미노]도데칸-2-올 (리피도이드 C12-200)을 포함하지만, 이들로 제한되는 것은 아니다.

[0518] 일부 구현예에서, 양이온성 지질은 입자에 존재하는 전체 지질 중 약 10 mol% 내지 약 100 mol%, 약 20 mol% 내지 약 100 mol%, 약 30 mol% 내지 약 100 mol%, 약 40 mol% 내지 약 100 mol%, 또는 약 50 mol% 내지 약 100 mol%를 차지할 수 있다.

[0519] **부가적인 지질 또는 지질-유사 물질**

[0520] 본원에 기재된 입자는, 양이온성 또는 양이온으로 이온화가능한 지질 또는 지질-유사 물질 이외에도, 다른 지질 또는 지질-유사 물질, 즉 비-양이온성 지질 또는 지질-유사 물질 (비-양이온으로 이온화 가능한 지질 또는 지질-유사 물질 포함)을 또한 포함할 수 있다. 본원에서는 음이온성 및 중성 지질 또는 지질-유사 물질을 총괄적으로 비-양이온성 지질 또는 지질-유사 물질로 지칭한다. 이온화 가능한/양이온성 지질 또는 지질-유사 물질과 더불어, 콜레스테롤 및 지질과 같은 기타 소수성 모이어티의 부가에 의한 핵산 입자의 제형 최적화는 입자 안정성 및 핵산 전달 효율을 강화할 수 있다.

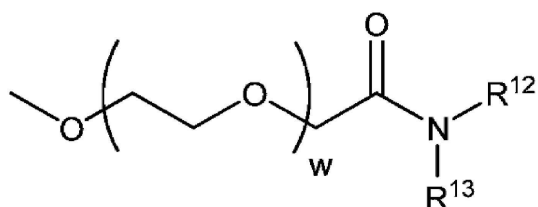
[0521] 핵산 입자의 총 전하에 영향을 미치거나 또는 영향을 미치지 않을 수 있는 부가적인 지질 또는 지질-유사 물질이 병합될 수도 있다. 일부 구현예에서, 부가적인 지질 또는 지질-유사 물질은 비-양이온성 지질 또는 지질-유사 물질이다. 비-양이온성 지질은 예를 들어, 하나 이상의 음이온성 지질 및/또는 중성 지질을 포함할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, "음이온성 지질"은 선택 pH에서 음으로 하전되는 임의의 지질을 지칭한다. 본원에 사용된 바와 같이, "중성 지질"은 선택한 pH에서 비-하전된 또는 중성의 양쪽성 형태로 존재하는 다수의 임의 지질 중을 지칭한다. 바람직한 구현예에서, 부가적인 지질은 다음과 같은 중성 지질 성분들 중 하나를 포함한다: (1) 인지질, (2) 콜레스테롤 또는 그 유도체; 또는 (3) 인지질 및 콜레스테롤 또는 그 유도체의 혼합물. 콜레스테롤 유도체에 대한 예로는 콜레스타놀, 콜레스타논, 콜레스테논, 코프로스타놀, 콜레스테릴-2'-하이드록시에틸 에테르, 콜레스테릴-4'-하이드록시부틸 에테르, 토크페롤 및 그 유도체 및 이들의 혼합물 등이 있으나, 이들로

제한되는 것은 아니다.

- [0522] 사용가능한 구체적인 인지질로는 포스파티딜콜린, 포스파티딜에탄올아민, 포스파티딜글리세롤, 포스파티드산, 포스파티딜세린 또는 스핑고마이엘린 등이 있으나, 이들로 제한되는 것은 아니다. 이들 인지질은 특히 다이아실 포스파티딜콜린, 예를 들어 다이스테아로일포스파티딜콜린 (DSPC), 다이올레오일포스파티딜콜린 (DOPC), 다이미리스토일포스파티딜콜린 (DMPC), 다이펜타데카노일포스파티딜콜린, 다이라우로일포스파티딜콜린, 다이팔미토일포스파티딜콜린 (DPPC), 다이아라키도닐포스파티딜콜린 (DAPC), 다이베헤노일포스파티딜콜린 (DBPC), 다이트리코사노일포스파티딜콜린 (DTPC), 다이리그노세로일포티딜콜린 (DLPC), 팔미토일올레오일-포스파티딜콜린 (POPC), 1,2-다이-0-옥타데세닐-sn-글리세로-3-포스포콜린 (18:0 다이에테르 PC), 1-올레오일-2-콜레스테릴헤미숙시노일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (OChemSPC), 1-헥사데실-sn-글리세로-3-포스포콜린 (C16 Lyso PC) 및 포스파티딜에탄올아민, 특히 다이아실포스파티딜에탄올아민, 예를 들어 다이올레오일포스파티딜에탄올아민 (DOPE), 다이스테아로일-포스파티딜에탄올아민 (DSPE), 다이팔미토일-포스파티딜에탄올아민 (DPPE), 다이미리스토일-포스파티딜에탄올아민 (DMPE), 다이라우로일-포스파티딜에탄올아민 (DLPE), 다이피타노일-포스파티딜에탄올아민 (DPyPE), 및 여러가지 소수성 쇄를 가진 추가의 포스파티딜에탄올아민 지질을 포함한다.
- [0523] 바람직한 특정 구현예에서, 부가적인 지질은 DSPC 또는 DSPC 및 콜레스테롤이다.
- [0524] 일부 구현예에서, 핵산 입자는 양이온성 지질과 부가적인 지질 둘다 포함한다.
- [0525] 이론으로 결부시키고자 하는 것은 아니나, 적어도 하나의 부가적인 지질의 함량 대비 적어도 하나의 양이온성 지질의 함량은 핵산의 전하, 입자 크기, 안정성, 조직 선택성 및 생활성과 같은 핵산 입자의 중요한 특징에 영향을 미칠 수 있다. 따라서, 일부 구현예에서, 적어도 하나의 양이온성 지질 대 적어도 하나의 부가적인 지질의 몰 비는 약 10:0 내지 약 1:9, 약 4:1 내지 약 1:2, 또는 약 3:1 내지 약 1:1이다.
- [0526] 일부 구현예에서, 비-양이온성 지질, 특히 중성 지질 (예를 들어, 하나 이상의 인지질 및/또는 콜레스테롤)은 입자에 존재하는 전체 지질에 대해 약 0 mol% 내지 약 90 mol%, 약 0 mol% 내지 약 80 mol%, 약 0 mol% 내지 약 70 mol%, 약 0 mol% 내지 약 60 mol% 또는 약 0 mol% 내지 약 50 mol%를 차지할 수 있다.
- [0527] **폴리머-접합 지질**
- [0528] 입자는 적어도 하나의 폴리머-접합 지질을 포함할 수 있다. 중합체-접합 지질은 전형적으로 지질 부분 및 이에 접합된 중합체 부분을 포함하는 분자이다. 일부 구현예에서, 폴리머-접합 지질은 PEG-접합 지질, 또는 본원에서 폐길화된 지질 또는 PEG-지질로도 지칭된다.
- [0529] 일부 구현예에서, PEG-접합 지질은 소수성 지질 층을 숨기는 보호성 친수성 층을 형성함으로써 지질 입자를 입체적으로 안정화하도록 설계된다. 일부 구현예에서, PEG-접합 지질은, 이러한 지질 입자를 생체내 투여하였을 경우, 혈청 단백질과의 결합 및/또는 달성되는 세망내피 시스템에 의한 흡수를 낮출 수 있다.
- [0530] 다양한 PEG-접합 지질들이 당해 기술 분야에 공지되어 있으며, 비-제한적으로 폐길화된 다이아실글리세롤 (PEG-DAG), 예를 들어 1-(모노메톡시-폴리에틸렌글리콜)-2,3-다이미리스토일글리세롤 (PEG-DMG), 폐길화된 포스파티딜에탄올로아민 (PEG-PE), PEG 숙시네이트 다이아실글리세롤 (PEG-S-DAG), 예를 들어 4-O-(2',3'-다이(테트라데카노일옥시)프로필)-1-O-(ω -메톡시(폴리에톡시)에틸)부탄다이오에이트 (PEG-S-DMG), 폐길화된 세라마이드 (PEG-cer) 또는 PEG 다이알콕시프로필카바메이트, 예를 들어 ω -메톡시(폴리에톡시)에틸-N-(2,3-다이(테트라데카노시)프로필)카바메이트 또는 2,3-다이(테트라데카노시)프로필-N-(ω -메톡시(폴리에톡시)에틸)카바메이트 등을 포함한다.
- [0531] 일부 구현예에서, 입자는 WO 2017/075531 및 WO 2018/081480에 기술된 바와 같이 하나 이상의 PEG-접합 지질 또는 폐길화된 지질을 포함할 수 있으며, 이들 각각의 문헌은 본원에 기재된 목적으로 그 전체가 원용에 의해 본 명세서에 포함된다.
- [0532] **리포플렉스 입자**
- [0533] 본원의 일부 구현예에서, 본원에 기재된 RNA는 RNA 리포플렉스 입자로 존재할 수 있다.
- [0534] 리포플렉스(LPX)는 일반적으로 미리 형성된 양이온성 지질 리포솜과 음이온성 RNA를 혼합하여 형성되는 정전기 복합체이다. 형성된 리포플렉스는 리포솜 구조에서 소형 RNA-리포플렉스로의 변형으로 인해 발생하는 분자의 뚜렷한 내부 배열을 가지고 있다. 이들 제형은 일반적으로 핵산의 빈약한 캡슐화 및 핵산의 불완전한 포획을 특징으로 한다.

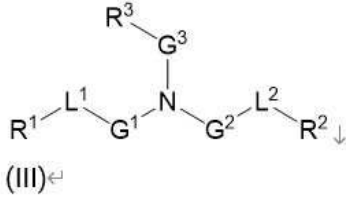
- [0535] 리포솜은 수성 코어를 둘러싸는 단층 또는 다층 인지질 이중층을 포함하는 구형 소포이다. 이는 극성 머리(친수성) 그룹과 비극성 꼬리(소수성) 그룹을 보유한 물질로 제조된다. 이들 그룹 사이의 상호작용은 소포의 형성을 유도한다. 핵산 전달을 위해 설계된 리포솜을 제형화하는 데 사용되는 양이온성 지질은 본질적으로 양친매성이며 글리세롤을 통해 탄화수소 사슬 또는 콜레스테롤 유도체에 연결된 양전하(양이온성) 아민 머리 그룹으로 구성된다.
- [0536] 양으로 하전된 리포솜은 일반적으로 DOTMA와 같은 양이온성 지질 및 DOPE와 같은 추가 지질을 사용하여 합성될 수 있다. 일부 구현예에서, RNA 리포플렉스 입자는 나노입자이다.
- [0537] 일부 구현예에서, RNA 리포플렉스 입자는 양이온성 지질과 부가적인 지질을 둘다 포함한다. 예시적인 구현예에서, 양이온성 지질은 DOTMA이고, 부가적인 지질은 DOPE이다.
- [0538] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 양이온성 지질 대 적어도 하나의 부가적인 지질의 몰 비는 약 10:0 내지 약 1:9, 약 4:1 내지 약 1:2, 또는 약 3:1 내지 약 1:1이다. 특정 구현예에서, 상기한 몰 비는 약 3:1, 약 2.75:1, 약 2.5:1, 약 2.25:1, 약 2:1, 약 1.75:1, 약 1.5:1, 약 1.25:1, 또는 약 1:1일 수 있다. 예시적인 구현예에서, 적어도 하나의 양이온성 지질 대 적어도 하나의 부가적인 지질의 몰 비는 약 2:1이다.
- [0539] 본 발명에 기재된 RNA 리포플렉스 입자는, 일 구현예에서, 약 200 nm 내지 약 1000 nm, 약 200 nm 내지 약 800 nm, 약 250 내지 약 700 nm, 약 400 내지 약 600 nm, 약 300 nm 내지 약 500 nm, 또는 약 350 nm 내지 약 400 nm 범위의 평균 직경을 가진다. 특정 구현예에서, RNA 리포플렉스 입자는 평균 직경이 약 200 nm, 약 225 nm, 약 250 nm, 약 275 nm, 약 300 nm, 약 325 nm, 약 350 nm, 약 375 nm, 약 400 nm, 약 425 nm, 약 450 nm, 약 475 nm, 약 500 nm, 약 525 nm, 약 550 nm, 약 575 nm, 약 600 nm, 약 625 nm, 약 650 nm, 약 700 nm, 약 725 nm, 약 750 nm, 약 775 nm, 약 800 nm, 약 825 nm, 약 850 nm, 약 875 nm, 약 900 nm, 약 925 nm, 약 950 nm, 약 975 nm, 또는 약 1000 nm이다. 일 구현예에서, RNA 리포플렉스 입자는 평균 직경이 약 250 nm 내지 약 700 nm 범위이다. 다른 구현예에서, RNA 리포플렉스 입자는 평균 직경이 약 300 nm 내지 약 500 nm 범위이다. 예시적인 구현예에서, RNA 리포플렉스 입자는 평균 직경이 약 400 nm이다.
- [0540] RNA 리포플렉스 입자는 에탄올 중의 지질 용액을 물 또는 적절한 수성 상에 주입함으로써 수득할 수 있는 리포솜을 이용해 제조할 수 있다. 일부 구현예에서, 수성 상은 산성 pH를 가진다. 일부 구현예에서, 수성 상은 아세트산을, 예를 들어, 약 5 mM 함량으로 포함한다. 리포솜은, 리포솜을 RNA와 혼합함으로써 RNA 리포플렉스 입자 제조에 이용할 수 있다.
- [0541] 일부 구현예에서, 리포솜 및 RNA 리포플렉스 입자는 적어도 하나의 양이온성 지질과 적어도 하나의 부가적인 지질을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 양이온성 지질은 1,2-다이-0-옥타데세닐-3-트리메틸암모늄 프로판 (DOTMA) 및/또는 1,2-다이올레오일-3-트리메틸암모늄-프로판 (DOTAP)을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 부가적인 지질은 1,2-다이-(9Z-옥타데세노일)-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 (DOPE), 콜레스테롤 (Chol) 및/또는 1,2-다이올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (DOPC)을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 양이온성 지질은 1,2-다이-0-옥타데세닐-3-트리메틸암모늄 프로판 (DOTMA)을 포함하고, 적어도 하나의 부가적인 지질은 1,2-다이-(9Z-옥타데세노일)-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 (DOPE)을 포함한다. 일부 구현예에서, 리포솜 및 RNA 리포플렉스 입자는 1,2-다이-0-옥타데세닐-3-트리메틸암모늄 프로판 (DOTMA)과 1,2-다이-(9Z-옥타데세노일)-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 (DOPE)을 포함한다.
- [0542] 지질 나노입자(LNP)
- [0543] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 RNA는 지질 나노입자 (LNP)의 형태로 존재한다. LNP는 하나 이상의 핵산 분자가 부착되거나 또는 하나 이상의 핵산 분자가 캡슐화된, 입자를 형성할 수 있는 임의의 지질을 포함할 수 있다.
- [0544] LNP는 전형적으로 구성성분 4종을 포함한다: 이온화가능한 양이온성 지질, 인지질과 같은 중성 지질, 콜레스테롤과 같은 스테로이드, 및 PEG-지질과 같은 폴리머 접합 지질. LNP는 에탄올 중에 용해한 지질을 핵산과 수성 완충제에서 혼합함으로써 제조할 수 있다.
- [0545] 본원에 개시된 RNA LNP에서 mRNA는 LNP의 중심 코어를 차지하는 이온화 가능한 지질에 의해 결합된다. PEG 지질은 인지질과 함께 LNP의 표면을 형성한다. 일부 구현예에서, 표면은 이중층으로 구성된다. 일부 구현예에서, 하전된 형태와 비하전된 형태의 콜레스테롤 및 이온화 가능한 지질은 LNP 전체에 분포될 수 있다.
- [0546] 일부 구현예에서, LNP는 하나 이상의 양이온성 지질과 하나 이상의 안정화 지질을 포함한다. 안정화 지질은 중성 지질 및 폐길화 지질을 포함한다.

- [0547] 일부 구현예에서, LNP는 양이온성 지질, 중성 지질, 스테로이드, 폴리머 접합 지질; 및 지질 나노입자 안에 캡슐화되거나 또는 이와 조합된 RNA를 포함한다.
- [0548] 일부 구현예에서, LNP는 양이온성 지질을 40 내지 55 mol%, 41 내지 50 mol%, 42 내지 50 mol%, 43 내지 50 mol%, 44 내지 50 mol%, 45 내지 50 mol%, 46 내지 50 mol%, 46 내지 49 mol%, 또는 47 또는 48 mol%로 포함한다. 일부 구현예에서, LNP는 양이온성 지질을 약 46.0, 46.1, 46.2, 46.3, 46.4, 46.5, 46.6, 46.7, 46.8, 46.9, 47.0, 47.1, 47.2, 47.3, 47.4, 47.5, 47.6, 47.7, 47.8, 47.9, 48.0, 48.1, 48.2, 48.3, 48.4, 48.5, 48.6, 48.7, 48.8, 48.9, or 49 mol%로 포함한다.
- [0549] 일부 구현예에서, 중성 지질이 5 내지 15 mol%, 7 내지 13 mol% 또는 9 내지 11 mol% 범위의 농도로 존재한다. 일부 구현예에서, 중성 지질은 약 10 mol% 농도로 존재한다.
- [0550] 일부 구현예에서, 스테로이드가 30 내지 50 mol%, 35 내지 45 mol% 또는 38 내지 43 mol% 범위의 농도로 존재한다. 일부 구현예에서, 스테로이드가 약 41 mol% 농도로 존재한다.
- [0551] 일부 구현예에서, LNP는 폴리머-접합 지질을 1 내지 10 mol%, 1 내지 5 mol%, 또는 1 내지 2.5 mol%로 포함한다. 일부 구현예에서, 폴리머-접합 지질은 약 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9 또는 2.0 mol%의 농도로 존재한다.
- [0552] 일부 구현예에서, LNP는 양이온성 지질을 45 내지 50 mol%로; 중성 지질을 5 내지 15 mol%로; 스테로이드를 35 내지 45 mol%로; 폴리머-접합 지질을 1 내지 5 mol%로; 그리고, 지질 나노입자 안에 캡슐화되거나 또는 이와 조합된 RNA를 포함한다.
- [0553] 일부 구현예에서, mol%는 지질 나노입자에 존재하는 지질의 총 mol을 기준으로 하여 결정된다. 일부 구현예에서, mol %는 지질 나노입자에 존재하는 양이온성 지질, 중성 지질, 스테로이드 및 폴리머-접합 지질의 총 몰을 기준으로 결정된다.
- [0554] 일부 구현예에서, 중성 지질은 DSPC, DPPC, DMPC, DOPC, POPC, DOPE, DOPG, DPPG, POPE, DPPE, DMPE, DSPE 및 SM으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 중성 지질은 DSPC, DPPC, DMPC, DOPC, POPC, DOPE 및 SM으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 중성 지질은 DSPC이다.
- [0555] 일부 구현예에서, 스테로이드는 콜레스테롤이다.
- [0556] 일부 구현예에서, 폴리머 접합 지질은 폐길화 지질이다. 일부 구현예에서, 폐길화 지질은 하기 구조를 가지거나, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염, 호변이성질체 또는 입체이성질체이



다:

- [0557] 상기 식에서, R^{12} 및 R^{13} 은 각각 독립적으로 탄소수 10 내지 30의 포화 또는 불포화된 알킬 직쇄 또는 분지쇄이고, 여기서 알킬 사슬은 선택적으로 하나 이상의 에스테르 결합이 사이에 존재하고; w 는 30 내지 60 범위의 평균 값을 가진다. 일부 구현예에서, R^{12} 및 R^{13} 은 각각 독립적으로 탄소수 12 내지 16의 포화된 알킬 직쇄이다. 일부 구현예에서, w 는 40 내지 55 범위의 평균 값을 가진다. 일부 구현예에서, 평균 w 는 약 45이다. 일부 구현예에서, R^{12} 및 R^{13} 은 각각 독립적으로 탄소수 약 14의 포화된 알킬 직쇄이고, w 는 약 45의 평균 값을 가진다.
- [0558] 일부 구현예에서, 폐길화된 지질은 2-[(폴리에틸렌 글리콜)-2000]-N,N-디테트라데실아세트아미드이거나 또는 이를 포함한다.
- [0559] 일부 구현예에서, LNP의 양이온성 지질 성분은 화학식 (III)의 구조를 갖거나, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염, 호변 이성질체, 전구약물 또는 입체 이성질체이다:



[0560]

[0561]

[0562]

상기 식에서,
 L^1 또는 L^2 중 하나는 $-O(C=O)-$, $-(C=O)O-$, $-C(=O)-$, $-O-$, $-S(O)_x-$, $-S-S-$, $-C(=O)S-$, $SC(=O)-$, $-NR^aC(=O)-$, $-C(=O)NR^a-$, $NR^aC(=O)NR^a-$, $-OC(=O)NR^a-$ 또는 $-NR^aC(=O)O-$ 이고, L^1 또는 L^2 중 다른 하나는 $-O(C=O)-$, $-(C=O)O-$, $-C(=O)-$, $-O-$, $-S(O)_x-$, $-S-S-$, $-C(=O)S-$, $SC(=O)-$, $-NR^aC(=O)-$, $-C(=O)NR^a-$, $NR^aC(=O)NR^a-$, $-OC(=O)NR^a-$ 또는 $-NR^aC(=O)O-$ 이거나 또는 직접 결합이고;

[0563]

G^1 및 G^2 는 각각 독립적으로 비-치환된 C_1-C_{12} 알킬렌 또는 C_1-C_{12} 알케닐렌이고;

[0564]

G^3 는 C_1-C_{24} 알킬렌, C_1-C_{24} 알케닐렌, C_3-C_8 사이클로알킬렌, C_3-C_8 사이클로알케닐렌이고;

[0565]

R^a 는 H 또는 C_1-C_{12} 알킬이고;

[0566]

R^1 및 R^2 는 각각 독립적으로 C_6-C_{24} 알킬 또는 C_6-C_{24} 알케닐이고;

[0567]

R^3 는 H, OR^5 , CN, $-C(=O)OR^4$, $-OC(=O)R^4$ 또는 $-NR^5C(=O)R^4$ 이고;

[0568]

R^4 는 C_1-C_{12} 알킬이고;

[0569]

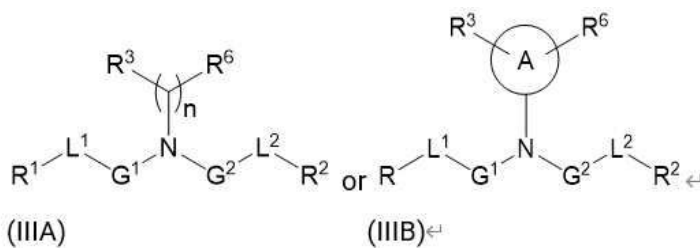
R^5 는 H 또는 C_1-C_6 알킬이고; 및

[0570]

x는 0, 1 또는 2이다.

[0571]

상기 식 (III)에 대한 일부 구현예에서, 지질은 하기 구조 (IIIA) 또는 (IIIB) 중 하나를 가진다:



[0572]

[0573]

상기 식에서,

[0574]

A는 3 내지 8원성 사이클로알킬 또는 사이클로알킬렌 고리이고;

[0575]

R^6 는, 각각의 경우에, 독립적으로 H, OH 또는 C_1-C_{24} 알킬이고;

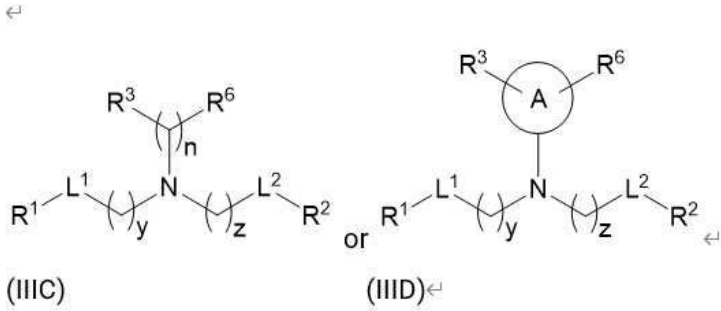
[0576]

n은 1 내지 15 범위의 정수이다.

[0577]

상기 식 (III)에 대한 일부 구현예에서, 지질은 구조 (IIIA)를 가지고, 다른 구현예에서 지질은 구조 (IIIB)를 가진다.

[0578] 식 (III)에 대한 다른 구현예에서, 지질은 하기 구조 (IIIC) 또는 (IIID) 중 하나를 가진다:

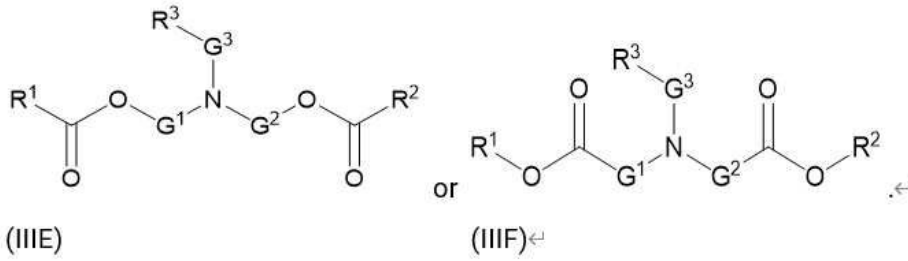


[0579]

[0580] 상기 식에서, y 및 z는 각각 독립적으로 1 내지 12 범위의 정수이다.

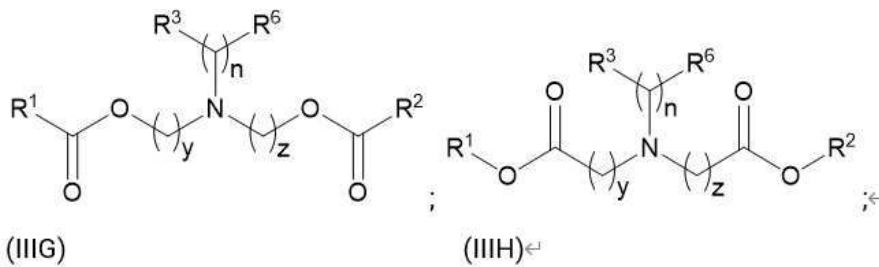
[0581] 상기 (III)에 대한 임의의 구현예에서, L^1 또는 L^2 중 하나는 $-O(C=O)-$ 이다. 예를 들어, 일부 구현예에서, L^1 및 L^2 는 각각 $-O(C=O)-$ 이다. 전술한 임의의 구현예에 대한 일부 다른 구현예에서, L^1 및 L^2 는 각각 독립적으로 $-(C=O)O-$ 또는 $-O(C=O)-$ 이다. 예를 들어, 일부 구현예에서, L^1 및 L^2 는 각각 $-(C=O)O-$ 이다.

[0582] 식 (III)에 대한 일부 다른 구현예에서, 지질은 하기 구조 (IIIE) 또는 (IIIF) 중 하나를 가진다:

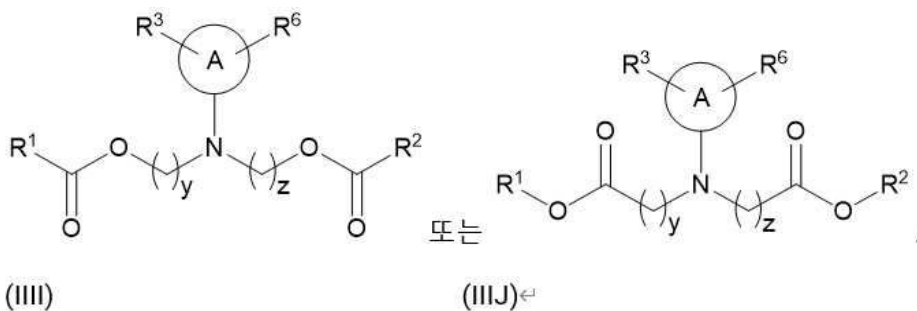


[0583]

[0584] 식 (III)에 대한 일부 다른 구현예에서, 지질은 하기 구조 (IIIG), (IIIH), (IIII) 또는 (IIIJ) 중 하나를 가진다:



[0585]



[0586]

[0587] 상기 식 (III) 구현예들 중 일부 구현예에서, n은 2 내지 12, 예를 들어, 2 내지 8 또는 2 내지 4 범위의 정수이다. 예를 들어, 일부 구현예에서, n은 3, 4, 5 또는 6이다. 일부 구현예에서, n은 3이다. 일부 구현예에서, n은 4이다. 일부 구현예에서, n은 5이다. 일부 구현예에서, n은 6이다.

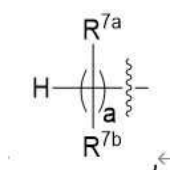
[0588] 상기 식 (III) 구현예들 중 일부 다른 구현예에서, y 및 z는 각각 독립적으로 2 내지 10 범위의 정수이다. 예를

들어, 일부 구현예에서, y 및 z 는 각각 독립적으로 4 내지 9 또는 4 내지 6 범위의 정수이다.

[0589] 상기 식 (III) 구현예들 중 일부 구현예에서, R^6 는 H이다. 전술한 구현예들 중 다른 구현예에서, R^6 는 C_1-C_{24} 알킬이다. 다른 구현예에서, R^6 는 OH이다.

[0590] 식 (III)에 대한 일부 구현예에서, G^3 는 비-치환된다. 다른 구현예에서, G^3 는 치환된다. 다양한 다른 구현예들에서, G^3 는 선형의 C_1-C_{24} 알킬렌 또는 선형의 C_1-C_{24} 알케닐렌이다.

[0591] 상기 식 (III) 구현예들 중 일부 다른 구현예에서, R^1 또는 R^2 , 또는 이 둘다는 C_6-C_{24} 알케닐이다. 예를 들어, 일부 구현예에서, R^1 및 R^2 는 각각 독립적으로 하기 구조를 가진다:



[0592]

상기 식에서,

[0593]

R^{7a} 및 R^{7b} 는, 각각의 경우에, 독립적으로 H 또는 C_1-C_{12} 알킬이고; 및

[0594]

a 는 2 내지 12의 정수이고,

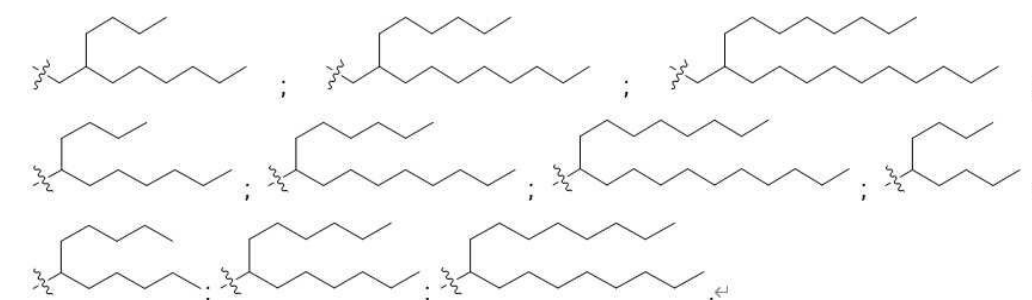
[0595]

R^{7a} , R^{7b} 및 a 는 각각, R^1 및 R^2 가 각각 독립적으로 탄소 원자 6 내지 20개를 포함하도록 선택된다. 예를 들어, 일부 구현예에서, a 는 5 내지 9 또는 8 내지 12 범위의 정수이다.

[0596]

[0597] 상기 식 (III) 구현예들 중 일부 구현예에서, R^{7a} 적어도 하나는 H이다. 예를 들어, 일부 구현예에서, R^{7a} 는 각 경우에 H이다. 전술한 내용에 대한 다른 여러가지 구현예들에서, R^{7b} 하나 이상은 C_1-C_8 알킬이다. 예를 들어, 일부 구현예에서, C_1-C_8 알킬은 메틸, 에틸, n-프로필, iso-프로필, n-부틸, iso-부틸, tert-부틸, n-헥실 또는 n-옥틸이다.

[0598] 식 (III)에 대한 여러가지 구현예들에서, R^1 또는 R^2 , 또는 이 둘다는 하기 구조들 중 하나를 가진다:



[0599]

[0600] 상기 식 (III) 구현예들 중 일부 구현예에서, R^3 는 OH, CN, $-C(=O)OR^4$, $-OC(=O)R^4$ 또는 $-NHC(=O)R^4$ 이다. 일부 구현예에서, R^4 는 메틸 또는 에틸이다.

[0601]

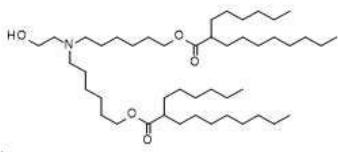
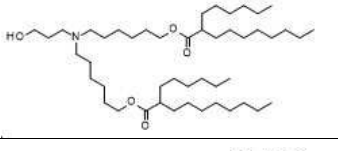
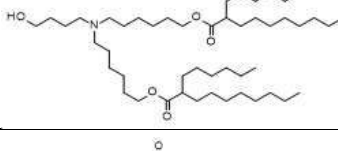
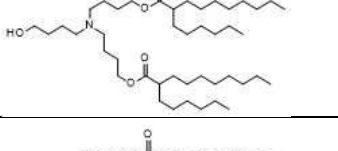
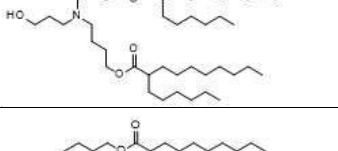
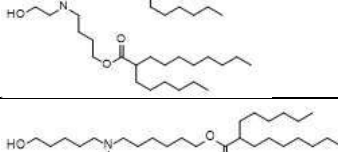
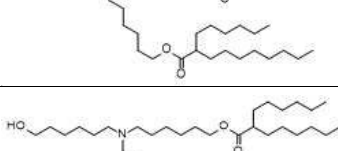
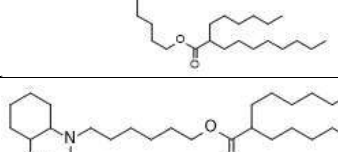
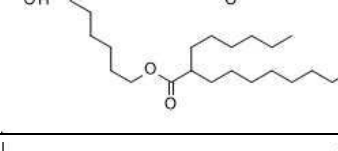
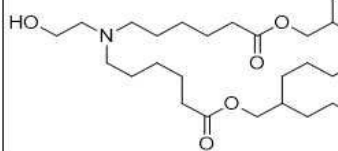
[0602] 다양한 여러가지 구현예들에서, 식 (III)의 양이온성 지질은 하기 표 2에 나타난 구조들 중 하나를 가진다.

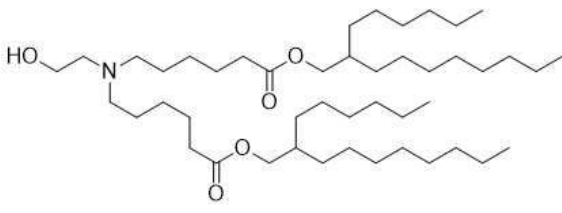
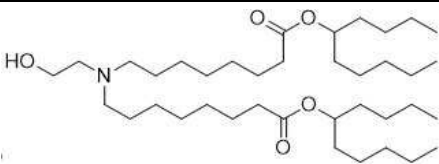
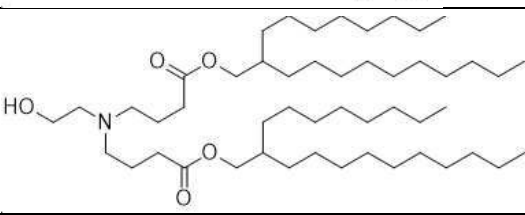
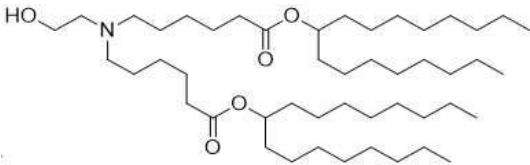
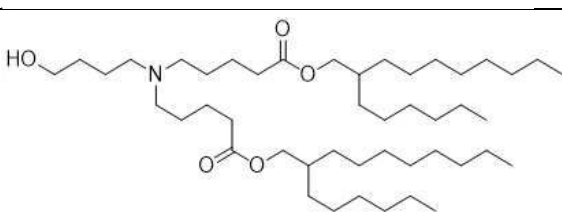
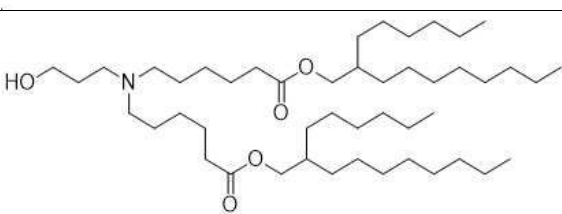
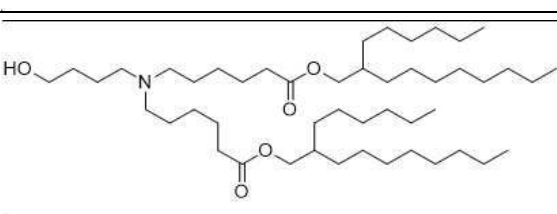
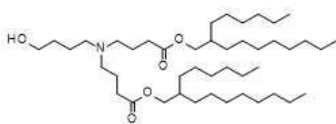
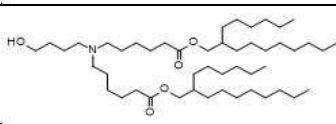
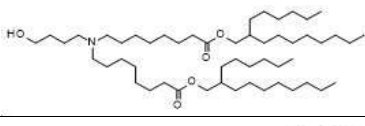
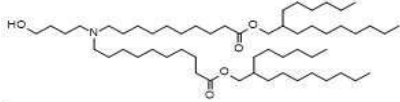
[0602]

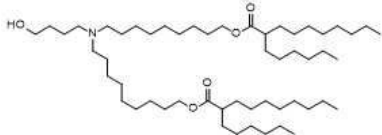
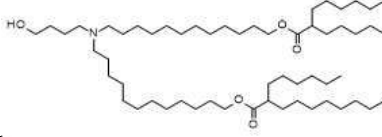
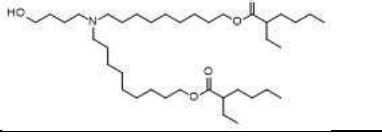
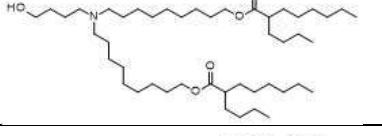
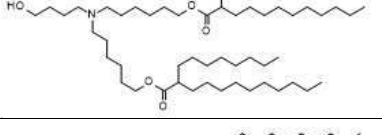
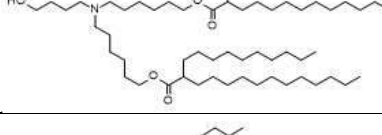
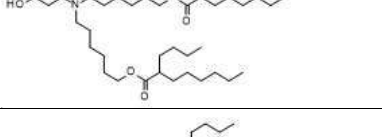
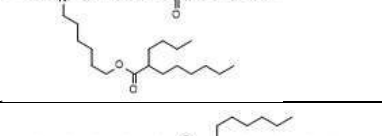
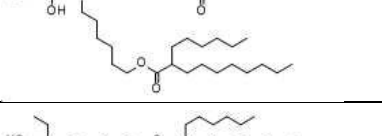
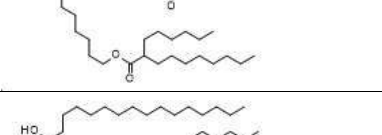
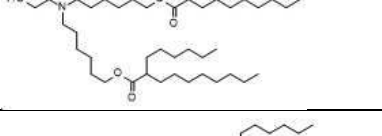
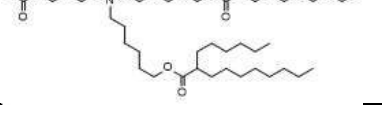
식 (III)의 대표적인 화합물.

표 2

[0603]

번호	구조
III-1	
III-2	
III-3	
III-4	
III-5	
III-6	
III-7	
III-8	
III-9	
III-10	

III-11	
III-12	
III-13	
III-14	
III-15	
III-16	
III-17	
III-18	
III-19	
III-20	
III-21	

III-22	
III-23	
III-24	
III-25	
III-26	
III-27	
III-28	
III-29	
III-30	
III-31	
III-32	
III-33	

III-34	
III-35	
III-36	
III-37	
III-38	
III-39	
III-40	
III-41	
III-42	
III-43	
III-44	
III-45	
III-46	

를 포함한다. 일부 구현예에서, modRNA에는 우리딘 대신 1-메틸-슈도우리딘이 포함되어 있다. 일부 구현예에서, 5'-cap 구조는 $m_2^{7,3'-0}Gppp(m_1^{2'-0})ApG$ 이다. 일부 구현예에서, 5'-UTR 및 3'-UTR은 각각 서열번호 8의 뉴클레오티드 서열 및 서열번호 9의 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 폴리(A)-테일은 서열번호 10의 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 시험관내 전사 반응 동안 생성된 dsRNA 오염물을 감소시키기 위해 modRNA에 대해 추가적인 정제 단계가 적용된다.

[0615] 제1 RNA 및 제2 RNA의 일부 구현예는 아래에 설명되어 있다. 해당 요소를 설명할 때 사용되는 특정 용어는 다음과 같은 의미를 갖는다:

[0616] 5'UTR: 번역 효율을 높이기 위해 최적화된 Kozak 서열을 가지는 인간 α -글로빈 mRNA의 5'-UTR 서열.

[0617] sec: sec는 초기 폴리펩티드 사슬이 소포체로 전위되도록 안내하는 분비 신호 펩티드(sec)에 해당한다.

[0618] 3'UTR: 3'-UTR은 "아미노 말단 분할 인핸서"(amino terminal enhancer of split: AES) mRNA(F로 지칭됨)와 미토콘드리아에서 암호화된 12S 리보솜 RNA(I로 지칭됨)에서 유래한 2종의 서열 요소의 조합이다. 이들은 RNA 안정성을 부여하고 총 단백질 발현을 증가시키는 서열에 대한 생체의 선택 과정에 의해 확인되었다.

[0619] 폴리A: 수지상 세포에서 RNA 안정성과 번역 효율을 향상시키도록 설계된, 30개 아데노신 잔기의 스트레치에 이어 10개 뉴클레오티드 링커 서열 및 또 다른 70개 아데노신 잔기로 구성된, 길이가 110개 뉴클레오타이드인 폴리(A)-테일(poly(A)-tail).

[0620] VH(aCD3): CD3에 특이성을 갖는 면역글로불린 중쇄의 가변 영역

[0621] VL(aCD3): CD3에 특이성을 갖는 면역글로불린 경쇄의 가변 영역

[0622] CH1: 면역글로불린 중쇄의 불변 영역 1

[0623] CL: 면역글로불린의 경쇄 불변 영역

[0624] VH(aCLDN6): CLDN6에 특이성을 갖는 면역글로불린 중쇄의 가변 영역

[0625] VL(aCLDN6): CLDN6에 특이성을 갖는 면역글로불린 경쇄의 가변 영역

[0626] RBP022.1 (서열번호 4; 서열번호 5) - "제1 RNA"의 구현예

[0627] $CAP1(m_2^{7,3'-0}Gppp(m_1^{2'-0})ApG)-5'UTR-sec-VH(aCD3)-CH1-VH(aCLDN6)-VL(aCLDN6)-3'UTR-PolyA$

[0628] RBP021.1 (서열번호 6; 서열번호 7) - "제2 RNA"의 구현예

[0629] $CAP1(m_2^{7,3'-0}Gppp(m_1^{2'-0})ApG)-5'UTR-sec-VL(aCD3)-CL-VH(aCLDN6)-VL(aCLDN6)-3'UTR-PolyA$

[0630] RBP022.1 and RBP021.1의 뉴클레티드 서열

[0631] 뉴클레오티드 서열은 굵은 글자로 표시된 개별 서열 요소와 함께 표시된다. 또한, 번역된 단백질의 서열은 암호화 뉴클레오티드 서열 아래에 이탤릭체로 표시된다(* = 정지 코돈).

[0632] RBP022.1

[0633] 10 20 30 40 50 53

[0634] AGAAYAAACY AGYAYCYYC YGGYCCCCAC AGACYCAGAG AGAACCCGCC ACC

[0635] **hAg-Kozak**

[0636] 63 73 83 93 103 113

[0637] AYGAGAGYGA YGGCCCCYAG AACACYGAYC CYGCGYGYGY CYGGYGCCCY GGCYCYGACA

[0638] *M R V M A P R T L I L L L S G A L A L T*

[0639] **sec**

[0640] 123 131

[0641]	GAAACAYGGG CCGGAYCY					
[0642]	<i>E T W A G S</i>					
[0643]	sec					
[0644]	141	151	161	171	181	191
[0645]	CAGGYGCAGC YCCAGCAAYC YGGYGCCGAA CYYGCYAGAC CYGGCGCCYC CGYGAAGAYG					
[0646]	<i>Q V Q L Q Q S G A E L A R P G A S V K M</i>					
[0647]	aCD3_{VH}					
[0648]	201	211	221	231	241	251
[0649]	AGCYGYAAAA CCAGCGGCYA CACCYYCACA CGGYACACCA YGCACYGGGY CAAGCAGAGG					
[0650]	<i>S C K T S G Y T F T R Y T M H W V K Q R</i>					
[0651]	aCD3_{VH}					
[0652]	261	271	281	291	301	311
[0653]	CCYGGACAGG GCCYYGAGYG GAYCGGCYAC AYCAACCCCA GCCGGGGCYA CACCAACYAC					
[0654]	<i>P G Q G L E W I G Y I N P S R G Y T N Y</i>					
[0655]	aCD3_{VH}					
[0656]	321	331	341	351	361	371
[0657]	AACCAGAAGY YCAAGGACAA GGCCACACYG ACCACCGACA AGAGCAGCAG CACAGCCYAC					
[0658]	<i>N Q K F K D K A T L T T D K S S S T A Y</i>					
[0659]	aCD3_{VH}					
[0660]	381	391	401	411	421	431
[0661]	AYGCAGCYGA GCAGCCYGAC CAGCGAAGAY AGCGCCGYGY ACYACYGCGC CCGGYACYAC					
[0662]	<i>M Q L S S L T S E D S A V Y Y C A R Y Y</i>					
[0663]	aCD3_{VH}					
[0664]	441	451	461	471	481	488
[0665]	GACGAYCACY ACAGCCYGGA YYACYGGGGC CAGGGAACAA CCCYGACAGY GYCYAGC					
[0666]	<i>D D H Y S L D Y W G Q G T T L T V S S</i>					
[0667]	aCD3_{VH}					
[0668]	498	508	518	528	538	548
[0669]	GCCAGACCA AGGGACCYAG CGYYYYCCCA CYGGCYCCCA GCAGCAAGAG CACAYCYGGY					
[0670]	<i>A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G</i>					
[0671]	C_H 1					
[0672]	558	568	578	588	598	608
[0673]	GGAACAGCCG CYCYGGGCGY CCYGGYCAAG GAYYACYYYC CCGAGCCYGY GACCGYGYCC					
[0674]	<i>G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S</i>					

[0675]	C _H 1																			
[0676]	618	628	638	648	658	668														
[0677]	YGGAAYYCYG	GCGCYCYGAC	AAGCGGCGYG	CACACCYYYC	CAGCCGYGCV	GCAAAGCAGC														
[0678]	W	N	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S
[0679]	C _H 1																			
[0680]	678	688	698	708	718	728														
[0681]	GGCCYGYACY	CYCYGAGCAG	CGYGGYCACA	GYGCCYAGCV	CYAGCCYGGG	CACCCAGACC														
[0682]	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T
[0683]	C _H 1																			
[0684]	738	748	758	768	778	782														
[0685]	YACAYCYGCA	AYGYGAACCA	CAAGCCYAGC	AACACCAAGG	YGGACAAGAG	AGYG														
[0686]	Y	I	C	N	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	R	V		
[0687]	C _H 1																			
[0688]	792	802	812	822	832	842														
[0689]	GAACCCAAGA	GCYGYCYGG	ACCCGGCGGA	GGAAGAYCV	GCGGAGGCGG	YYCYGGYGGC														
[0690]	E	P	K	S	C	S	G	P	G	G	G	R	S	G	G	G	G	S	G	G
[0691]	링커																			
[0692]	851																			
[0693]	GGAGGAYCV																			
[0694]	G	G	S																	
[0695]	링커																			
[0696]	861	871	881	891	901	911														
[0697]	GAAGYYCAGC	YGCAACAGYC	YGGCCCCGAG	CYGGYYAAGC	CYGGGGCCYC	YAYGAAGAYC														
[0698]	E	V	Q	L	Q	Q	S	G	P	E	L	V	K	P	G	A	S	M	K	I
[0699]	aCLDN6 _{VH}																			
[0700]	921	931	941	951	961	971														
[0701]	YCCYGCAAGG	CCYCCGGCYA	CAGCYYYACC	GGCYACACAA	YGAAYYGGGY	YAAGCAGYCC														
[0702]	S	C	K	A	S	G	Y	S	F	T	G	Y	T	M	N	W	V	K	Q	S
[0703]	aCLDN6 _{VH}																			
[0704]	981	991	1001	1011	1021	1031														
[0705]	CACGGCAAGY	GCCYGGAAYG	GAYCGGCCYG	AYCAACCCYY	ACAACGGCGG	CACCAYCYAY														
[0706]	H	G	K	C	L	E	W	I	G	L	I	N	P	Y	N	G	G	T	I	Y
[0707]	aCLDN6 _{VH}																			
[0708]	1041	1051	1061	1071	1081	1091														

[0709]	AAYCAGAAGY YYAAAGGCAA GGCYACCCYC ACCGYGGACA AGYCYAGCYC CACCGCCYAC					
[0710]	<i>N Q K F K G K A T L T V D K S S S T A Y</i>					
[0711]	aCLDN6 _{VH}					
[0712]	1101	1111	1121	1131	1141	1151
[0713]	AYGGAACYGC YGAGCCYGAC CYCYGAGGAC YCCGCCGYGY AYYAYYGYGC CAGAGACYAC					
[0714]	<i>M E L L S L T S E D S A V Y Y C A R D Y</i>					
[0715]	aCLDN6 _{VH}					
[0716]	1161	1171	1181	1191	1201	1202
[0717]	GGCYCYGYGC YGGACYAAYG GGGACAGGGC ACYACACYGA CYGYGYCCAG Y					
[0718]	<i>G F V L D Y W G Q G T T L T V S S</i>					
[0719]	aCLDN6 _{VH}					
[0720]	1212	1222	1232	1242	1252	1262
[0721]	GGCGGYGGYG GCAGYGGCGG CGGAGGYAGC GGAGGYGGYG GAAGCGGAGG CGGAGGCYCY					
[0722]	<i>G G G G S G G G G S G G G G S G G G S</i>					
[0723]	링커					
[0724]	1272	1282	1292	1302	1312	1322
[0725]	CAAAYYGYGC YGACACAGAG CCCCAGCAYC AYGAGCGYYA GCCCYGGCGA GAAAGYGACC					
[0726]	<i>Q I V L T Q S P S I M S V S P G E K V T</i>					
[0727]	aCLDN6 _{VL}					
[0728]	1332	1342	1352	1362	1372	1382
[0729]	AYCACAYGCA GCGCCAGCYC CYCCGYGYCC YAYAYGCACY GGYYYCAGCA GAAGCCCGGC					
[0730]	<i>I T C S A S S S V S Y M H W F Q Q K P G</i>					
[0731]	aCLDN6 _{VL}					
[0732]	1392	1402	1412	1422	1432	1442
[0733]	ACAAGCCCCA AGCYGYCGAY CYACAGCACC AGCAACCYGG CCAGCGGAGY GCCYGCCAGA					
[0734]	<i>T S P K L S I Y S T S N L A S G V P A R</i>					
[0735]	aCLDN6 _{VL}					
[0736]	1452	1462	1472	1482	1492	1502
[0737]	YYYYCYGGYA GAGGCAGCGG CACCAGCYAC YCCCYGACAA YCYCYAGAGY GGCCGCCGAA					
[0738]	<i>F S G R G S G T S Y S L T I S R V A A E</i>					
[0739]	aCLDN6 _{VL}					
[0740]	1512	1522	1532	1542	1552	1562
[0741]	GAYGCCGCCA CCYACYACYG YCAGCAGCGG AGCAAYYACC CYCCYYGGAC CYYYGGCYGC					
[0742]	<i>D A A T Y Y C Q Q R S N Y P P W T F G C</i>					

[0743]	aCLDN6 _{VL}					
[0744]	1572	1582	1589			
[0745]	GGCACCAAGC	YGGAAYCAA	GYGAYGA			
[0746]	<i>G T K L E I K * *</i>					
[0747]	aCLDN6 _{VL}					
[0748]	1599	1609	1619	1629	1639	1649
[0749]	GGAYCCGAYC	YGGYACYGCA	YGCACGCAAY	GCYAGCYGCC	CCYYCCCCGY	CCYGGGYACC
[0750]	FI 요소					
[0751]	1659	1669	1679	1689	1699	1709
[0752]	CCGAGYCYCC	CCCACCCYCG	GGYCCCAGGY	AYGCTCCAC	CYCCACCYGC	CCCACYCACC
[0753]	FI 요소					
[0754]	1719	1729	1739	1749	1759	1769
[0755]	ACCYCYGCTA	GYCCAGACA	CCYCCCAAGC	ACGCAGCAAY	GCAGCTAAA	ACGCTYAGCC
[0756]	FI 요소					
[0757]	1779	1789	1799	1809	1819	1829
[0758]	YAGCCACACC	CCCACGGGAA	ACAGCAGYGA	YYAACCTYYA	GCAAYAAACG	AAAGCTTAAAC
[0759]	FI 요소					
[0760]	1839	1849	1859	1869	1879	1887
[0761]	YAAGCTYATC	YACCCCAGG	GYGGCTAAY	YCTGCTCCAG	CCACCCCTC	GAGCTAGC
[0762]	FI 요소					
[0763]	1897	1907	1917	1927	1937	1947
[0764]	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA	GCATATGACT	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA
[0765]	폴리(A)					
[0766]	1957	1967	1977	1987	1997	
[0767]	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA	
[0768]	폴리(A)					
[0769]	RBP021.1					
[0770]	10	20	30	40	50	53
[0771]	AGAAATATCT	AGTATCTCTC	YGGTCCCCAC	AGATCTAGAG	AGATCCCGCC	ACC
[0772]	hAg-Kozak					
[0773]	63	73	83	93	103	113
[0774]	ATGAGATYGA	YGGCCCCYAG	AACATCTATC	CTGCTGCTGY	CTGGYCCCCY	GGCTCTGACA
[0775]	<i>M R V M A P R T L I L L L S G A L A L T</i>					
[0776]	sec					
[0777]	123	131				

[0778]	GAAACAYGGG CCGGAYCY					
[0779]	<i>E T W A G S</i>					
[0780]	sec					
[0781]	141	151	161	171	181	191
[0782]	CAGAYCGYGC YGACACAGAG CCCYGCCAYC AYGAGYGCCY CYCCAGGCCA GAAAGYGACC					
[0783]	<i>Q I V L T Q S P A I M S A S P G E K V T</i>					
[0784]	aCD3 _{VL}					
[0785]	201	211	221	231	241	251
[0786]	AYGACCYGYA GAGCCAGCAG CAGCGYGYCC YACAYGAACY GGYAYCAGCA GAAGYCCGGC					
[0787]	<i>M T C R A S S S V S Y M N W Y Q Q K S G</i>					
[0788]	aCD3 _{VL}					
[0789]	261	271	281	291	301	311
[0790]	ACAAGCCCCA AGCGGYGGAY CYACGAYACA AGCAAGGYGG CCAGCGGCGY GCCCYACAGA					
[0791]	<i>T S P K R W I Y D T S K V A S G V P Y R</i>					
[0792]	aCD3 _{VL}					
[0793]	321	331	341	351	361	371
[0794]	YYYYCYGGCY CYGGCAGCGG CACCAGCYAC AGCCYGACAA YCAGCAGCAY GGAAGCCGAG					
[0795]	<i>F S G S G S G T S Y S L T I S S M E A E</i>					
[0796]	aCD3 _{VL}					
[0797]	381	391	401	411	421	431
[0798]	GAYGCCGCCA CCYACYACYG CCAGCAGYGG YCCAGCAAYC CCCYGACAYY YGGAGCCGGC					
[0799]	<i>D A A T Y Y C Q Q W S S N P L T F G A G</i>					
[0800]	aCD3 _{VL}					
[0801]	441	449				
[0802]	ACCAAGCYGG AACYGAAG					
[0803]	<i>T K L E L K</i>					
[0804]	aCD3 _{VL}					
[0805]	459	469	479	489	499	509
[0806]	CGGACAGYYG CCGCYCCYAG CGYGYYCAYC YYCCCACCYY CCGACGAGCA GCYGAAGYCY					
[0807]	<i>R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S</i>					
[0808]	C _L					
[0809]	519	529	539	549	559	569
[0810]	GGAACAGCCA GCGYCGYGYG CCYGCYGAAC AACYYCYACC CYCGGGAAGC CAAGGYGCAG					
[0811]	<i>G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q</i>					

[0812]	C_L					
[0813]	579	589	599	609	619	629
[0814]	YGGAAGGYGG	ACAAYGCCCY	CCAGYCCGGC	AACAGCCAAG	AGAGCGYGAC	CGAGCAGGAC
[0815]	<i>W</i>	<i>K</i>	<i>V</i>	<i>D</i>	<i>N</i>	<i>A</i>
[0816]	C_L					
[0817]	639	649	659	669	679	689
[0818]	AGCAAGGACY	CCACCYAYAG	CCYGAGCAGC	ACCCYGACAC	YGAGCAAGGC	CGACYACGAG
[0819]	<i>S</i>	<i>K</i>	<i>D</i>	<i>S</i>	<i>T</i>	<i>Y</i>
[0820]	C_L					
[0821]	699	709	719	729	739	749
[0822]	AAACACAAGG	YGYACGCCYG	CGAAGYGACC	CACCAGGGAC	YGYCYAGCCC	YGYGACCAAG
[0823]	<i>K</i>	<i>H</i>	<i>K</i>	<i>V</i>	<i>Y</i>	<i>A</i>
[0824]	C_L					
[0825]	759	769	770			
[0826]	AGCIYCAACA	GAGGCGAGYG	Y			
[0827]	<i>S</i>	<i>F</i>	<i>N</i>	<i>R</i>	<i>G</i>	<i>E</i>
[0828]	780	788				
[0829]	GAYGYGCCYG	GCGGCYCY				
[0830]	<i>D</i>	<i>V</i>	<i>P</i>	<i>G</i>	<i>G</i>	<i>S</i>
[0831]	링크					
[0832]	798	808	818	828	838	848
[0833]	GAAGYYCAGC	YCCAGCAGYC	YGGACCCGAG	CYGGYYAAGC	CYGGCGCCYC	CAYGAAGAYC
[0834]	<i>E</i>	<i>V</i>	<i>Q</i>	<i>L</i>	<i>Q</i>	<i>Q</i>
[0835]	aCLDN6_{VH}					
[0836]	858	868	878	888	898	908
[0837]	YCIYGC AAGG	CCYCCGGCYA	CAGCIYCACC	GGCYACACCA	YGAAYYGGGY	CAAGCAGAGC
[0838]	<i>S</i>	<i>C</i>	<i>K</i>	<i>A</i>	<i>S</i>	<i>G</i>
[0839]	aCLDN6_{VH}					
[0840]	918	928	938	948	958	968
[0841]	CACGGCAAGY	GCCYGGAAYG	GAYCGGCCYG	AYCAACCCCY	ACAACGGCGG	CACAAYCYAC
[0842]	<i>H</i>	<i>G</i>	<i>K</i>	<i>C</i>	<i>L</i>	<i>E</i>
[0843]	aCLDN6_{VH}					
[0844]	978	988	998	1008	1018	1028
[0845]	AACCAGAAGY	YCAAGGGCAA	AGCCACACYG	ACCGYGGACA	AGAGCAGCAG	CACCGCCYAY

[0846]	N Q K F K G K A T L T V D K S S S T A Y											
[0847]	aCLDN6 _{VH}											
[0848]	1038	1048	1058	1068	1078	1088						
[0849]	AYGGAACYGC YGAGCCYGAC CAGCGAGGAC YCCGCCGYGY ACYACYGCGC CAGAGAYYAC											
[0850]	M E L L S L T S E D S A V Y Y C A R D Y											
[0851]	aCLDN6 _{VH}											
[0852]	1098	1108	1118	1128	1138	1139						
[0853]	GGCYYCGYGC YGGACYAYYG GGGCCAGGGA ACAACCCYGA CAGYGYCYAG C											
[0854]	G F V L D Y W G Q G T T L T V S S											
[0855]	aCLDN6 _{VH}											
[0856]	1149	1159	1169	1179	1189	1199						
[0857]	GGAGGCGGAG GAYCYGGYGG CGGAGGAAGY GCGGAGGCG GYCYGGCGG YGGYGGAYCY											
[0858]	G G G G S G G G G S G G G G S G G G S											
[0859]	링커											
[0860]	1209	1219	1229	1239	1249	1259						
[0861]	CAAAYYGYCC YGACYCAGYC CCCYAGCAYC AYGAGCGYGY CACCCGGGGA GAAAGYGACA											
[0862]	Q I V L T Q S P S I M S V S P G E K V T											
[0863]	aCLDN6 _{VL}											
[0864]	1269	1279	1289	1299	1309	1319						
[0865]	AYCACCYGY YCGCCAGCYC CYCCGYGYCC YACAYGCACY GGYCCAGCA GAAGCCCGGC											
[0866]	I T C S A S S S V S Y M H W F Q Q K P G											
[0867]	aCLDN6 _{VL}											
[0868]	1329	1339	1349	1359	1369	1379						
[0869]	ACCYCCCCA AGCYGYCCAY CYACYCCACC YCCAACCYGG CCYCCGGCGY GCCCGCCAGA											
[0870]	T S P K L S I Y S T S N L A S G V P A R											
[0871]	aCLDN6 _{VL}											
[0872]	1389	1399	1409	1419	1429	1439						
[0873]	YYCYCYGGCA GAGGCYCCGG CACCAGCYAC YCCCYGACCA YCYCYAGAGY GGCCGCCGAG											
[0874]	F S G R G S G T S Y S L T I S R V A A E											
[0875]	aCLDN6 _{VL}											
[0876]	1449	1459	1469	1479	1489	1499						
[0877]	GACGCYGCCA CAYAYYAYYG YCAGCAGCGG AGCAACYACC CYCCYYGGAC CYYYGGCYGC											
[0878]	D A A T Y Y C Q Q R S N Y P P W T F G C											
[0879]	aCLDN6 _{VL}											

[0880] 1509 1519 1526

[0881] GGAACAAAGC YGAAAYCAA GYGAYGA

[0882] G T K L E I K * *

[0883] aCLDN6_{VL}

[0884] 1536 1546 1556 1566 1576 1586

[0885] GGAYCCGAYC YGGYACYGCA YGCACGCAAY GCYAGCYGCC CCYYCCCGY CCYGGGYACC

[0886] **FI 요소**

[0887] 1596 1606 1616 1626 1636 1646

[0888] CCGAGYCYCC CCCGACCYCG GGYCCCAGGY AYGCYCCCAC CYCCACCYGC CCCACYCACC

[0889] **FI 요소**

[0890] 1656 1666 1676 1686 1696 1706

[0891] ACCYCYGCTA GYYCCAGACA CCYCCCAAGC ACGCAGCAAY GCAGCYCAA ACGCYYAGCC

[0892] **FI 요소**

[0893] 1716 1726 1736 1746 1756 1766

[0894] YAGCCACACC CCCACGGGAA ACAGCAGYGA YYAACCYYA GCAAYAAACG AAAGYYAAC

[0895] **FI 요소**

[0896] 1776 1786 1796 1806 1816 1824

[0897] YAAGCYAYAC YAACCCAGG GYYGGYCAAY YYCGYGCCAG CCACCCCYC GAGCYAGC

[0898] **FI 요소**

[0899] 1834 1844 1854 1864 1874 1884

[0900] AAAAAAAAA AAAAAAAAA AAAAAAAAA GCAYAYGACY AAAAAAAAA AAAAAAAAA

[0901] **폴리(A)**

[0902] 1894 1904 1914 1924 1934

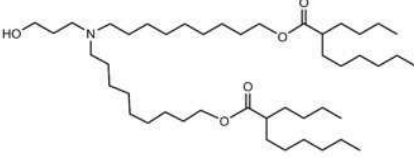
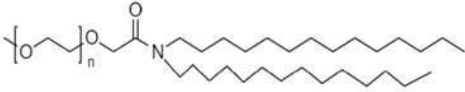
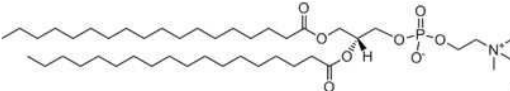
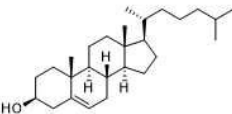
[0903] AAAAAAAAA AAAAAAAAA AAAAAAAAA AAAAAAAAA AAAAAAAAA

[0904] **폴리(A)**

[0905] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 제1 RNA는 서열번호 5의 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 개시된 제2 RNA는 서열번호 7의 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0906] 본원에 개시된 RNA는 바람직하게는 지질 나노입자(LNP)로 제형화된다. 일부 구현예에서, LNP는 양이온성 지질, 중성 지질, 스테로이드, 중합체 접합 지질, 및 상기 RNA를 포함한다. 일부 구현예에서, 양이온성 지질은 ALC-0366, 중성 지질은 DSPC, 스테로이드는 콜레스테롤, 폴리머 접합 지질은 ALC-0159이다. 바람직한 투여 방식은 정맥내 투여이다.

[0907] 일부 구현예에서, 의약품은 하기에 표시된 성분을 포함한다.

지질	분자량	화학명 및 구조
ALC-0366	724 Da	((3-Hydroxypropyl)azanediy)bis(nonane-9,1-diyl)bis(2-butyloctanoate) 
ALC-0159	~2400 -2600 Da	2-[(폴리에틸렌 글리콜)-2000]-N,N-디테트라데실아세트아미드 
DSPC	790 Da	1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린 
콜레스테롤	387 Da	콜레스트-5-en-3-β-올 

[0908]

[0909] 일부 구현예에서, 의약품은 아래에 표시된 성분을 바람직하게는 아래에 표시된 비율 또는 농도로 포함한다:

표 3

[0910]

구성성분	품질기준	기능	농도 (mg/mL)
BNT142 DS	내부	활성	1.00
ALC-0366	내부	기능적 지질	10.64
ALC-0159	내부	기능적 지질	1.35
DSPC	내부	구조적 지질	2.43
콜레스테롤, 합성	Ph. Eur.	구조적 지질	4.96
수크로스	USP-NF/Ph. Eur.	동결방지제	102.69
NaCl	USP-NF/Ph. Eur.	완충제	6.00
KCl	USP-NF/Ph. Eur.	완충제	0.15
Na ₂ HPO ₄	USP-NF/Ph. Eur.	완충제	1.08
KH ₂ PO ₄	USP-NF/Ph. Eur.	완충제	0.15
주사용수	Ph. Eur.	용제/비히클	q.s.

[0911]

ALC-0366, ((3-히드록시프로필)아잔디일)비스(노난-9,1-디일)비스(2-부틸옥타노에이트); ALC-0159, 2-[(폴리에틸렌 글리콜)-2000]-N,N-디테트라데실아세트아미드; DSPC = 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린; DS = 약물 물질; Ph. Eur. = 유럽 약전(Pharmacopoea Europaea); q.s. = 적당량 (충분할 정도로); USP-NF = 미국 약전과 국민의약품집(United States Pharmacopeia and National Formulary).

[0912]

일부 구현예에서, 총 지질에 대한 mRNA의 비율(N/P)은 6.0 내지 6.5, 예를 들어 약 6.0 또는 약 6.3이다.

- [0913] **약학적 조성물**
- [0914] 본원에 개시된 물질은 약학적 조성물 또는 약제로 투여할 수 있으며, 임의의 적합한 약학적 조성물의 형태로 투여할 수 있다.
- [0915] 일부 구현예에서 약제학적 조성물이 본원에 개시된 바와 같은 제1 RNA 및 제2 RNA를 포함하는 경우, 이러한 제1 RNA 및 제2 RNA는 약 3:1 내지 약 1:3의 몰비로 존재할 수 있거나, 일부 구현예에서 약 2:1 내지 약 1:2의 몰비로, 또는 일부 구현예에서 약 1.5:1 내지 약 1:1.5의 몰비로 존재할 수 있다. 일부 구현예에서, 이러한 제1 RNA 및 제2 RNA는 약 3:1 내지 약 1:1의 몰비로 존재할 수 있거나, 일부 구현예에서 약 2:1 내지 약 1:1의 몰비로 존재할 수 있거나, 또는 일부 구현예에서 약 1.5:1의 몰비로 존재한다.
- [0916] 일부 구현예에서 약학적 조성물이 본원에 개시된 바와 같은 제1 RNA 및 제2 RNA를 포함하는 경우, 이러한 제1 RNA 및 제2 RNA는 약 3:1 내지 약 1:3의 중량(w/w) 비율로 존재할 수 있거나, 또는 일부 구현예에서 약 2:1 내지 약 1:2의 중량(w/w) 비율로, 또는 일부 구현예에서 약 1.5:1 내지 약 1:1.5의 중량(w/w) 비율로 존재할 수 있다. 일부 구현예에서, 이러한 제1 RNA 및 제2 RNA는 약 3:1 내지 약 1:1의 중량(w/w) 비율로 존재할 수 있거나, 또는 일부 구현예에서 약 2:1 내지 약 1:1의 중량(w/w) 비율로, 또는 일부 구현예에서 약 1.75:1 내지 약 1.25:1의 중량(w/w) 비율로, 또는 일부 구현예에서 약 1.75:1 내지 약 1.5:1의 중량(w/w) 비율로, 또는 일부 구현예에서 약 1.5:1 내지 약 1.25:1의 중량(w/w) 비율로, 또는 일부 바람직한 실시예에서는 약 1.5:1의 중량(w/w) 비율로 존재한다.
- [0917] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 약제학적 조성물은 개체에서 암을 치료하기 위한 조성물이다.
- [0918] 본 발명의 모든 측면들에 대한 일부 구현예에서, 결합제를 암호화하는 RNA와 같은 본원에 기재된 구성성분은, 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하고 선택적으로 하나 이상의 보강제, 안정화제 등을 포함할 수 있는, 약학적 조성물 형태로 투여할 수 있다. 일부 구현예에서, 약학적 조성물은 치료학적 또는 예방학적 치료를 위한 것이며, 예를 들어 암을 치료 또는 예방하는데 사용하기 위한 것이다
- [0919] 용어 "약학적 조성물"은 치료학적으로 유효한 물질을, 바람직하게는 약제학적으로 허용가능한 담체, 희석제 및/또는 부형제와 함께 포함하는 제형에 관한 것이다. 이러한 약학적 조성물은, 약학적 조성물을 개체에 투여함으로써 질환 또는 장애를 치료하거나, 방지하거나 또는 중증도를 낮추기 위해 사용가능하다. 약학적 조성물은 또한 약학적 제형으로서 당해 기술 분야에 공지되어 있다.
- [0920] 본원에 따른 약학적 조성물은 일반적으로 "약제학적 유효량"으로, "약제학적으로 허용가능한 조제물(pharmaceutically acceptable preparation)"로 적용된다.
- [0921] 용어 "약제학적으로 허용가능한"은 물질이 약학적 조성물의 활성 성분의 작용과 상호작용하지 않는 무독성임을 의미한다.
- [0922] 용어 "약제학적 유효량" 또는 "치료학적 유효량"은 단독으로 또는 추가 용량과 함께 원하는 반응 또는 원하는 효과를 달성하는 양을 의미한다. 특정 질환을 치료하는 경우, 원하는 반응은 바람직하게는 질환의 진행 저해를 의미한다. 이는 질환의 진행 속도를 늦추는 것을 포함하며, 구체적으로 질환의 진행을 중단시키거나 또는 역전시키는 것을 포함한다. 질환의 치료에서 원하는 반응은 또한 이러한 질환 또는 병태의 개시 지연 또는 개시 방지될 수 있다. 본원에 개시된 조성물의 유효량은 치료할 병태, 질환의 중증도, 나이, 생리학적 상태, 신체 크기와 체중 등의 환자의 개별 매개변수, 치료 기간, (존재하는 경우) 동반되는 요법의 유형, 구체적인 투여 경로 및 유사 인자에 따라 결정될 것이다. 따라서, 본원에 개시된 조성물의 투여 용량은 이러한 다양한 매개변수에 따라 결정될 수 있다. 환자에서 반응이 1차 투여로 충분하지 않을 경우, 이보다 고 용량 (또는 효과적으로는 다른, 보다 국지적인 투여 경로에 의해 달성되는 더 높은 용량)을 사용할 수 있다.
- [0923] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 약학적 조성물의 각각의 용량 또는 누적 용량은 0.05 $\mu\text{g/kg}$ 이상의 양, 예를 들어 0.05 $\mu\text{g/kg}$ 내지 5mg/kg, 또는 0.05 $\mu\text{g/kg}$ 내지 500 $\mu\text{g/kg}$, 또는 0.5 $\mu\text{g/kg}$ 내지 500 $\mu\text{g/kg}$, 또는 1 $\mu\text{g/kg}$ 내지 50 $\mu\text{g/kg}$, 또는 5 $\mu\text{g/kg}$ 내지 150 $\mu\text{g/kg}$, 또는 15 $\mu\text{g/kg}$ 내지 150 $\mu\text{g/kg}$ 범위 내의 CLDN6-표적화 결합제를 암호화하는 RNA 용량을 포함할 수 있으며, 여기서 kg은 치료받는 개체의 체중 kg을 의미한다.
- [0924] 당업자에게 명백한 바와 같이, 본원에 개시된 결합제는 각각 별개의 RNA에 의해 코딩되는 2개의 폴리펩티드를 포함하므로, 표시된 양은 제1 및 제2 폴리펩티드 사슬을 암호화하는 RNA의 누적량에 관한 것이다. 바람직하게는 각각의 용량 또는 누적 용량은 5 $\mu\text{g/kg}$ 내지 150 $\mu\text{g/kg}$, 또는 15 $\mu\text{g/kg}$ 내지 150 $\mu\text{g/kg}$ 의 총량으로 제1 및 제2 폴리펩티드 사슬을 코딩하는 RNA의 혼합물 용량을 포함한다.

- [0925] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 약학적 조성물은 CLDN6에 대한 결합제를 암호화하는 본원에 개시된 RNA(예를 들어 mRNA)를 전달하여 약 0.05ng/mL 이상의 결합제 수준(예를 들어 혈장 수준 및/또는 조직 수준)을 달성하기 위해 투여된다.
- [0926] 일부 구현예에서, 투여는 단일 투여만 수반할 수 있다. 일부 구현예에서, 투여는 용량을 고정된 횟수로 적용하는 것을 수반할 수 있다. 일부 구현예에서, 투여는 간헐적인 (예를 들어, 시간 간격으로 분리하여 수회 투여) 및/또는 주기적인 (예를 들어, 동일한 시간 간격으로 개별 투여) 투여인 투여를 수반할 수 있다. 일부 구현예에서, 투여는 적어도 선정된 기간 동안 연속 투여 (예를 들어, 관류)를 수반할 수 있다.
- [0927] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 약학적 조성물은 CLDN6-양성 암, 예를 들어 CLDN6-양성 고형 종양을 앓고 있는 개체에 투여 사이클 1회 이상 (예를 들어, 적어도 2회, 적어도 3회, 적어도 4회, 적어도 5회, 적어도 6회, 적어도 7회, 적어도 8회 또는 그보다 많은 횟수 등)으로 투여된다. 일부 구현예에서, 각 투여 사이클은 3주로 이루어진 투여 사이클일 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 개시된 약학적 조성물은 투여 사이클 당 적어도 1회로 투여한다. 일부 구현예에서, 투여 사이클은 정해진 투여 횟수 및/또는 패턴의 투여를 수반하며; 일부 구현예에서, 투여 사이클은 정해진 누적 용량을 예를 들어 특정 기간 동안에 걸쳐, 선택적으로 다회 투여를 통해 투여하는 것을 수반할 수 있으며, 이는 예를 들어 정해진 패턴에 따라 및/또는 정해진 간격(들)으로 투여할 수 있다.
- [0928] 당업자는 암 치료제가 종종 투여 주기에 따라 투여된다는 것을 알고 있다. 일부 구현예에서, 본원에 개시된 약학적 조성물은 하나 이상의 투여 사이클로 투여된다.
- [0929] 일부 형태예에서, 한 번의 투여 사이클은 적어도 3일 이상(예를 들어, 적어도 4일, 적어도 5일, 적어도 6일, 적어도 7일, 적어도 8일, 적어도 9일, 적어도 10일, 적어도 11일, 적어도 12일, 적어도 13일, 적어도 14일, 적어도 15일, 적어도 16일, 적어도 17일, 적어도 18일, 적어도 19일, 적어도 20일, 적어도 21일, 적어도 22일, 적어도 23일, 적어도 24일, 적어도 25일, 적어도 26일, 적어도 27일, 적어도 28일, 적어도 29일, 적어도 30일을 포함함)이다.
- [0930] 일부 구현예에서, 한 번의 투여 사이클에는 예를 들어 패턴에 따라 여러 번의 투여가 포함될 수 있다, 예를 들어, 투여량이 한 사이클 내에서 매일 투여될 수 있거나 또는 한 사이클 내에서 투여량이 2일마다, 3일마다, 4일마다, 5일마다, 6일마다, 7일마다 투여될 수 있다.
- [0931] 일부 구현예에서, 다수의 사이클로 투여될 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 적어도 2번의 사이클 (예를 들어, 적어도 3번의 사이클, 적어도 4번의 사이클, 적어도 5번의 사이클, 적어도 6번의 사이클, 적어도 7번의 사이클, 적어도 8번의 사이클, 적어도 9번의 사이클, 적어도 10번의 사이클 혹은 그 이상의 사이클을 포함)로 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 적어도 3 내지 8번의 투여 사이클로 투여될 수 있다.
- [0932] 일부 구현예에서, 사이클 사이에 "휴식 기간"이 있을 수 있다; 일부 구현예에서, 사이클 사이에 휴식 기간이 없을 수 있다. 일부 구현예에서, 때로는 사이클 사이에 일정 기간 휴식 기간이 있을 수 있고 때로는 사이클 사이에 휴식 기간이 없을 수도 있다.
- [0933] 본원의 약학적 조성물은 염, 완충제, 보존제, 그리고 선택적으로 다른 치료학적 물질을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 본원의 약학적 조성물은 하나 이상의 약제학적으로 허용가능한 담체, 희석제 및/또는 부형제를 포함한다.
- [0934] 본원의 약학적 조성물에 사용하기 적합한 보존제로는 벤즈알코늄 클로라이드, 클로로부탄올, 파라벤 및 티메로살 등이 있으나, 이로 한정되는 것은 아니다.
- [0935] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "부형제"는 본원의 약학적 조성물에 존재할 수 있지만 활성 성분이 아닌 물질을 지칭한다. 부형제에 대한 예로는 담체, 바인더, 희석제, 윤활제, 증점제, 계면활성제, 보존제, 안정화제, 유효제, 완충제, 착향제 또는 착색제 등이 있으나, 이들로 제한되는 것은 아니다.
- [0936] 용어 "희석제"는 희석하는 물질 및/또는 묽게 하는 물질을 의미한다. 또한, 용어 "희석제"는 유체, 액체 또는 고체 현탁물 및/또는 혼합 매질 중 어느 하나를 포함한다. 적합한 희석제에 대한 예로는 에탄올, 글리세롤 및 물 등이 있다.
- [0937] 용어 "담체"는 약학적 조성물의 투여를 쉽게 만들거나, 강화하거나 또는 투여를 수행할 수 있게 하기 위해 활성 성분과 조합되는 천연, 합성, 유기, 무기성일 수 있는 성분을 지칭한다. 본원에 사용된 바와 같이, 담체는, 개체에 투여하기 적합한, 하나 이상의 혼용가능한 고체 또는 액체 충전제, 희석제 또는 캡슐화 물질일 수 있다. 적합한 담체로는 멸균수, 링거, 링거 락테이트, 멸균 염화나트륨 용액, 등장성 식염수, 폴리알킬렌 글리콜, 수

소화 나프탈렌, 특히, 생체적합한 락티드 폴리머, 락티드/글리콜라이드 코폴리머 또는 폴리옥시에틸렌/폴리옥시-프로필렌 코폴리머 등이 있으나, 이들로 제한되는 것은 아니다. 일 구현예에서, 본원의 약학적 조성물은 등장성 식염수를 포함한다.

[0938] 치료학적 용도에서 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제는 약학 분야에 잘 알려져 있으며, 예를 들어 Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R Gennaro edit. 1985)에 기술되어 있다.

[0939] 약학적 담체, 부형제 또는 희석제는 의도한 투여 경로 및 표준 약제학 실무에 따라 선택할 수 있다.

[0940] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 약학적 조성물은 하나 이상의 첨가제, 예를 들어 일부 구현예에서 특정 조건 하에서 이러한 조성물의 안정성을 향상시킬 수 있는 하나 이상의 첨가제를 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 약학적 조성물은 동결 방지제(예를 들어, 수크로스) 및/또는 완충 수용액을 추가로 포함할 수 있으며, 이는 일부 구현예에서 하나 이상의 염(예를 들어, 나트륨 염)을 포함할 수 있다.

[0941] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 약학적 조성물은 정맥내, 동맥내, 피하, 진피내 또는 근육내로 투여할 수 있다. 일부 구현예에서, 약학적 조성물은 국소 또는 전신 투여용으로 제형화된다. 전신 투여는 위장관을 통한 흡수를 수반하는 장 투여 또는 비경구 투여를 포함할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, "비경구 투여"는 정맥내 주사 등의 위장관을 통해 이루어지는 것 이외의 다른 임의의 방식으로 투여하는 것을 의미한다. 일부 구현예에서, 약학적 조성물은 전신 투여용, 예를 들어 정맥내 투여용으로 제형화된다.

[0942] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "공동-투여"는 여러가지 화합물 또는 조성물을 동일한 환자에게 투여하는 공정을 의미한다. 여러가지 화합물 또는 조성물은 동시에, 본질적으로 동일 시기에 또는 순차적으로 투여할 수 있다.

[0943] **본원에 개시된 제제 및 치료법의 효과**

[0944] 본원에 개시된 치료는 표적 세포의 사멸을 초래할 수 있는 표적 세포에 대한 면역 효과기 기능, 예를 들어 T 세포 매개 효과기 기능을 초래할 수 있다. 일부 구현예에서, 본 발명의 문맥 상에서 효과기 기능은 세포독성 CD4+ 및/또는 CD8+ 림프구(CTL)의 활성화, 및 표적 세포, 즉, 항원 발현을 특징으로 하는 세포, 즉, CLDN6를, 예를 들어 세포사멸 또는 퍼포린 매개 세포사멸 및 세포 용해, IFN- γ 및 TNF- α 와 같은 사이토카인 생성, 및 항원-발현 표적 세포의 특정한 세포독성을 통해, 제거하는 것을 포함한다.

[0945] 활성화시, 세포독성 림프구는 표적세포의 파괴를 유발한다. 예를 들어, 세포독성 T 세포는 다음과 같은 방법 중 하나 또는 모두로 표적세포의 파괴를 유발한다. 첫째로, 활성화 T 세포는 퍼포린, 그랜자임 및 그라눌리신(granulysin)과 같은 세포 독소를 방출한다. 퍼포린과 그라눌리신은 표적세포에서 세공을 만들고, 그랜자임은 세포로 들어가고 세포의 세포사멸(프로그램된 세포 사멸)을 유도하는 세포질에서 카스파제 캐스케이드를 유발한다. 둘째로, T 세포와 표적 종양 세포 간의 Fas-Fas 리간드 상호작용을 통해 세포사멸을 유도할 수 있다.

[0946] 일부 구현예에서, 암 세포에 의해 발현되는 CLDN6에 특이적인 2개의 결합 도메인과 T 세포에 의해 발현되는 CD3에 특이적인 결합 도메인을 포함하는 본원에 개시된 결합제는 CLDN6을 발현하는 암세포에 대해 CD3을 발현하는 T 세포의 세포독성 효과를 표적으로 한다. 일부 구현예에서, 결합제가 T 세포 상의 CD3에 결합하면 T 세포의 증식 및/또는 활성화가 발생한다. 일부 구현예에서, T 세포는 세포독성 인자, 예를 들어, 퍼포린과 그랜자임을 방출하며, 암세포의 세포용해와 세포사멸을 개시한다. 일부 구현예에서, 결합제는 CLDN6을 발현하는 암세포에 대해 T 세포 매개 세포독성을 유도한다. 일부 구현예에서, 결합제는 본원에 개시된 바와 같이 면역 효과기 기능을 유도한다. 일부 구현예에서, 상기 면역 효과기 기능은 표면에 종양 관련 항원 CLDN6을 운반하는 세포에 대한 것이다.

[0947] 일부 구현예에서, 상기 암세포(들)은 방광암, 난소암, 특히 난소 선암종 및 난소 기형암종, 소세포 폐암 (SCLC) 및 비소세포 폐암(NSCLC)을 비롯한 폐암, 특히 편평세포 폐암종 및 선암종, 또는 비편평형 비소세포폐암(NSCLC), 위암, 유방암, 간암, 췌장암, 피부암, 특히 기저세포 암종 및 편평세포 암종, 악성 흑색종, 두경부암, 특히 악성 다형 선종, 육종, 특히 활막 육종 및 암육종, 담관암, 방광의 암, 특히 이행세포암종 및 유두암종, 신장암, 특히 투명세포 신장세포 암종 및 유두상 신장세포 암종을 비롯한 신장세포 암종, 결장암, 회장의 암을 비롯한 소장암, 특히 소장 선암종 및 회장의 선암종, 배아 고환암종, 태반 용모막암종, 자궁경부암, 고환암, 특히 고환 정상피종, 고환 기형암 및 배아 고환암, 자궁암, 생식세포 종양 예컨대 기형암종 또는 배아암종, 특히 고환의 생식세포 종양, 및 이들의 전이형태로 이루어진 군으로부터 선택된 암의 암세포이다.

[0948] 본원에 사용된 바와 같이, "면역 반응"은 항원 또는 항원을 발현하는 세포에 대해 일체화된 신체 반응을 지칭하

며, 이는 세포성 면역 반응 및/또는 체액성 면역 반응을 지칭한다. 면역체계는 척추동물의 1차 선천면역체계와 획득 또는 적응면역체계로 나누어지며, 각각 체액성 및 세포성 성분을 포함하고 있다.

[0949] "세포-매개 면역" 또는 "세포성 면역", "세포 면역 반응", 또는 이와 유사한 용어는 특히 클래스 I MHC 또는 클래스 II MHC로 항원의 제시를 특징으로 하는, 항원의 발현으로 특징화되는 세포에 대한 세포성 반응을 포함하도록 의미한다. 세포성 반응은 면역 효과기 세포, 특히 '헬퍼' 또는 '킬러'로서 작용하는 T 세포 또는 T-림프구라고 하는 세포에 관한 것이다. 헬퍼 T 세포(또한, $CD4^+$ T 세포라고도 한다)는 면역반응을 조절함으로써 중추적 역할을 하고, 킬러 세포(또한, 세포독성 T 세포, 세포용해성 T 세포 라고도 한다)는 바이러스에 감염된 세포와 같은 병든 세포를 사멸시켜, 더 많은 병든 세포의 생산을 방지한다.

[0950] 본 발명의 문맥에서 용어 "면역 효과기 세포" 또는 "면역 반응성 세포"는 면역반응 동안 효과기 기능을 발휘하는 세포에 관한 것이다. 예를 들어, 면역 효과기 세포는 T 세포 (세포독성 T 세포, 헬퍼 T 세포, 종양 침윤 T 세포), B 세포, 자연 살해 세포, 호중구, 대식세포, 및 수지상 세포를 포함한다. 바람직하게, 본 발명의 맥락에서, "면역 효과기 세포"는 T 세포, 바람직하게는 $CD4^+$ 및/또는 $CD8^+$ T 세포, 가장 바람직하게는 $CD8^+$ T 세포이다. 본 발명에 따르면, 용어 "면역 효과기 세포"는 또한 적당한 자극을 이용하여 면역 세포 (예를 들어 T 세포, 특히 T 헬퍼 세포, 또는 세포살해 T 세포)로 성숙될 수 있는 세포를 포함한다. 면역 효과기 세포는 $CD34^+$ 조혈모세포, 미성숙 및 성숙 T 세포 및 미성숙 및 성숙 B 세포를 포함한다. T 세포 전구체의 세포살해 T 세포로의 분화는, 항원에 노출되었을 때, 면역계의 클론 선택과 유사하다.

[0951] 용어 "T 세포" 및 "T 림프구"는 본원에서 상호교환적으로 사용되며, 세포용해성 T 세포를 포함하는 세포독성 T 세포(CTL) 및 T 헬퍼 세포($CD4^+$ T 세포)를 포함하지만, 이로 제한되지는 않는다.

[0952] T 세포는 림프구로 알려진 백혈구 세포 그룹에 속하며 세포 매개 면역에 중심적인 역할을 한다. 이들은 T 세포 수용체(TCR)라고 불리는 세포 표면의 특별한 수용체의 존재에 의해 다른 림프구 유형, 예컨대 B 세포 및 자연살생세포와 구별될 수 있다. 흉선은 T 세포의 성숙을 담당하는 주요 기관이다. 몇몇 서로 다른 T 세포의 서브세트가 각기 다른 기능이 있는 것으로 발견되고 있다.

[0953] T 헬퍼 세포는 다른 기능들 중에서 B 세포의 형질세포로의 성숙 및 세포독성 T 세포 및 대식세포의 활성화를 비롯한 면역학적 과정에서 다른 백혈구 세포를 돕는다. 또한, 이들 세포들은 이들 표면에 $CD4$ 당단백질을 발현하기 때문에 $CD4^+$ T 세포로도 알려져 있다. 헬퍼 T 세포는 항원-제시 세포(APC)의 표면 상에 발현되는 MHC 클래스 II 분자에 의해 펩티드 항원으로 제시될 때 활성화된다. 일단 활성화되면, 신속히 분열하여 활성 면역반응을 조절하거나 돕는 사이토카인이라는 작은 단백질을 분비한다.

[0954] 세포독성 T 세포는 바이러스 감염 세포와 종양 세포를 파괴하며 이식 거부에도 영향을 미친다. 또한, 이들 세포는 이들의 표면에 $CD8$ 당단백질을 발현하기 때문에 $CD8^+$ T 세포로도 알려져 있다. 이들 세포는 신체의 거의 모든 세포 표면에 존재하는 MHC 클래스 I과 관련된 항원에 결합함으로써 표적을 인지한다.

[0955] 대다수의 T 세포에는 여러 단백질의 복합체로 존재하는 T 세포 수용체(TCR)가 있다. T 세포의 TCR은 주 조직적합성 복합체 (MHC) 분자에 결합하고 표적 세포의 표면에 제시된 면역성 펩티드 (에피토프)와 상호 작용할 수 있다. TCR의 특이적 결합은 T 세포 내의 신호 캐스케이드를 유발하여 성숙한 효과기 T 세포로의 증식 및 분화를 유도한다. 실제 T 세포 수용체는 독립적인 T 세포 수용체 알파 및 베타($TCR\alpha$ 및 $TCR\beta$) 유전자로부터 생산되며 α -TCR 및 β -TCR 사슬이라고 불리는 두개의 개별적인 펩티드 사슬로 이루어진다. $\gamma\delta$ T 세포(감마 델타 T 세포)는 표면에 뚜렷한 T 세포 수용체(TCR)를 가지고 있는 T 세포의 작은 서브세트를 나타낸다. 그러나, $\gamma\delta$ T 세포에서, TCR은 하나의 γ -사슬과 하나의 δ 사슬로 이루어진다. 이 T 세포 그룹은 $\alpha\beta$ T 세포보다 덜 흔하다 (전체 T 세포의 2%).

[0956] "체액성 면역" 또는 "체액성 면역 반응"은 분비된 항체, 보체 단백질 및 소정의 항균 펩티드와 같은 세포의 유체에 발견되는 거대분자에 의해 매개되는 면역 반응의 측면이다. 이는 세포 매개 면역과 대조된다. 항체와 관련된 측면을 종종 항체 매개된 면역이라고 한다.

[0957] 용어 "대식 세포"는 단핵구의 분화에 의해 만들어진 식세포의 하위군을 지칭한다. 염증, 면역 사이토카인 또는 미생물 산물에 의해 활성화된 대식 세포는 비-특이적으로 탐식 작용을 수행하여, 수소분해성 및 산화성 공격에 의해 대식 세포 내 외인성 병원체를 사멸시켜 병원체를 분해한다. 분해된 단백질로부터 유래된 펩티드는 대식 세포의 세포 표면 상에 제시되고, 이는 T 세포에 의해 인지될 수 있으며, B 세포 표면 상의 항체와 직접 상호작용하여, T 세포 및 B 세포를 활성화하고 면역 반응을 추가적으로 자극할 수 있다. 대식 세포는 항원-제시 세포

클래스에 속한다. 일부 구현예에서, 대식 세포는 비장 대식 세포이다.

- [0958] 용어 "수지상 세포" (DC)는 항원 제시 세포 클래스에 속하는 식세포의 다른 하위종을 지칭한다. 일 구현예에서, 수지상 세포는 조혈 골수 전구 세포로부터 유래된다. 이들 전구 세포는 먼저 미성숙 수지상 세포로 변환된다. 이들 미성숙 세포는 높은 탐식 활성과 낮은 T 세포 활성화 가능성을 특징으로 한다. 미성숙 수지상 세포는 바이러스 및 박테리아 등의 병원체에 대해 주변 환경을 계속적으로 샘플링한다. 미성숙 수지상 세포가 제시가능한 항원과 접촉하게 되면, 그 세포는 성숙한 수지상 세포로 활성화되어, 비장 또는 림프절로의 이동하게 된다. 미성숙 수지상 세포는 병원체를 탐식하여, 이의 단백질을 작은 조각으로 분해하고, 성숙화되면 이들 조각들을 MHC 분자를 이용해 세포 표면에 제시한다. 동시에, 이들 세포는 CH80, CH86 및 CH40과 같은 T 세포 활성화에서 공동-수용체로서 작용하는 세포-표면 수용체를 상향 조절하여, 이의 T 세포 활성화 능력을 크게 강화한다. 이들 세포는 또한 수지상 세포가 혈류를 통해 비장으로 이동하거나 또는 림프 시스템을 통해 림프절로 이동하게 유도하는 주화성 수용체인 CCR7을 상향 조절한다. 여기서, 이들 세포는 항원-제시 세포로 작용하며, 비-항원 특이적인 공동-자극 신호와 동시에, 헬퍼 T 세포 및 살상 T 세포뿐 아니라 항원 제시에 의해 B 세포를 활성화한다. 따라서, 수지상 세포는 T 세포-관련 면역 반응 또는 B 세포-관련 면역 반응을 활성화적으로 유도할 수 있다. 일부 구현예에서, 수지상 세포는 비장의 수지상 세포이다.
- [0959] 용어 "항원 제시 세포" (APC)는 세포의 표면 상에 (또는 표면 상에서) 적어도 하나의 항원 또는 항원 단편을 나열, 획득 및/또는 제시할 수 있는 다양한 세포이다. 항원-제시 세포는 전문적 항원 제시 세포 및 비-전문적 항원 제시 세포로 구분될 수 있다.
- [0960] 용어 "전문적 항원 제시 세포"는 나이브 T 세포와의 상호작용에 필요한 주 조직적합성 복합체 클래스 II (MHC 클래스 II) 분자를 구성적으로 발현하는 항원 제시 세포이다. T 세포가 항원 제시 세포의 막 상에 MHC 클래스 II 분자 복합체와 상호작용하면, 항원 제시 세포는 T 세포의 활성화를 유도하는 공동-자극성 분자를 생산하게 된다. 전문적 항원 제시 세포는 수지상 세포 및 대식 세포를 포함한다.
- [0961] 용어 "비-전문적 항원 제시 세포"는 인터페론- γ 와 같은 특정 사이토카인에 의한 자극시 MHC 클래스 II 분자를 구성적으로 발현하지 않는 항원 제시 세포를 지칭한다. 예를 들어, 비-전문적 항원 제시 세포는 섬유모세포, 흥선 상피 세포, 갑상선 상피 세포, 신경교 세포, 췌장 베타 세포 또는 혈관 내피 세포를 포함한다.
- [0962] "항원 가공 처리"는 항원을 가공 처리 산물로 분해하는 것을 의미하며, 처리 산물은 항원의 단편 (예, 단백질의 펩티드로의 분해) 및 특정 T 세포에 대한 항원 제시 세포와 같이 세포에 의해 제시하기 위한 MHC 분자와 이들 하나 이상의 단편의 (예, 결합을 통한) 조합물이다.
- [0963] 본원에서 사용된 바와 같이, "활성화" 또는 "자극"은 검출가능한 세포 증식을 유도하기에 충분히 자극받은 T 세포와 같은 면역 효과기 세포의 상태를 나타낸다. 또한, 활성화는 신호전달 경로의 개시, 유도된 사이토카인 생산 및 검출가능한 효과기 기능과 관련있을 수 있다. 용어 "활성화된 면역 효과기 세포"는 다른 것에 비해 세포 분열 중인 면역 효과기 세포를 의미한다.
- [0964] 용어 "감작화(priming)"는 T 세포와 같은 면역 효과기 세포가 이의 특이적인 항원과 최초로 접촉하여 효과기 T 세포와 같은 효과기 세포로의 분화를 유발하는 것을 의미한다.
- [0965] 용어 "클론 증폭" 또는 "증폭"은 특정 실체가 증폭되는 과정을 의미한다. 본 발명의 맥락에서, 이 용어는 바람직하게는 면역 효과기 세포가 자극되어, 증식되고, 특정 면역 효과기 세포가 증폭되는 면역학적 반응 맥락에서 사용된다. 바람직하게는, 클론 증폭은 면역 효과기 세포의 분화로 이어진다.
- [0966] **치료**
- [0967] 본 발명은 개체에서 본원에 개시된 질환 또는 장애, 특히 CLDN6 발현과 관련된 질환, 예를 들어 CLDN6-양성 암을 치료 또는 예방하기 위한 방법 및 제제를 제공한다. 본원에 개시된 방법은 본원에 개시된 결합제를 암호화하는 RNA를 포함하는 유효량의 조성물을 투여하는 것을 포함할 수 있다.
- [0968] 항원을 언급할 때 용어 "발현과 관련된 질환"은 항원과 관련된 모든 질환, 예를 들어 항원의 존재를 특징으로 하는 질환을 의미한다. 항원은 종양 관련 항원, 예를 들어 CLDN6과 같은 질환 관련 항원일 수 있다. 일부 구현예에서, 항원의 발현과 관련된 질환은 바람직하게는 세포 표면에서 항원을 발현하는 세포와 관련된 질환이다.
- [0969] 발명의 치료 화합물 또는 조성물은 질환 또는 장애를 앓고 있거나 발생의 위험이 있는(또는 발생한 것으로 의심되는) 개체에게 예방적으로(즉, 질환 또는 장애를 예방하기 위하여) 또는 치료적으로(즉, 질환 또는 장애를 치료하기 위하여) 투여될 수 있다. 이러한 개체는 표준 임상 방법을 사용하여 확인될 수 있다. 본 발명의 맥락에

서, 예방적 투여는 질환의 명백한 임상 증상이 나타나기 전에 발생하여, 질환 또는 장애가 예방되거나 또는 대안으로 그것의 진행이 지연된다. 의학 분야의 맥락에서, 용어 "예방"은 질병으로부터의 사망률 또는 이환율의 부담을 감소시키는 임의의 활동을 포함한다. 예방은 일차, 이차 및 삼차 예방 수준에서 발생할 수 있다. 일차 예방이 질환의 발생을 피하는 것인 한편, 이차 및 삼차 수준의 예방은 질환의 진행 및 증상의 출현을 방지하는 것뿐만 아니라 이미 확립된 질환의 부정적 영향을 기능을 복원시키고 질환-관련 합병증을 감소시킴으로써 감소시키는 것을 목적으로 하는 활동을 포함한다.

[0970] 일부 구현예에서, 본 발명의 제제 또는 조성물의 투여는 단일 투여에 의해 수행되거나 다중 투여에 의해 강화될 수 있다.

[0971] 용어 "질환"은 개체의 신체에 영향을 미치는 비-정상적인 상황을 지칭한다. 질환은 종종 특정 증상 및 징후와 관련있는 의학적인 상태로서 해석된다. 질환은 감염성 질환과 같은 외부 원인으로부터 기원한 인자에 의해 유발될 수 있거나, 또는 자가면역 질환과 같은 내부 기능부전에 의해 유발될 수도 있다. 인간에서, "질환"은 더 넓은 의미에서 개체와 접촉시 질병에 걸린 개체에서 통증, 기능부전, 괴로움, 사회적 문제 또는 사망 또는 비슷한 문제를 유발하는 임의의 상황을 지칭하기 위해 종종 사용된다. 더 넓은 의미에서, 이는 때때로 상해, 불능, 장애, 증후군, 감염, 고립된 증상, 일탈 행위 및 구조적 및 기능적인 비정형성 변형을 포함하며, 다른 맥락 및 다른 목적에서, 이는 구분가능한 범주로 간주될 수 있다. 다수의 질환과 접촉 및 생활하는 것이 삶에 대한 관점과 개인의 성격을 바꿀 수 있으므로, 질환은 일반적으로 개체에 신체적으로뿐만 아니라 감정적으로도 영향을 미친다.

[0972] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "질병"은 암, 특히 본원에 기재된 형태의 암을 포함한다. 암 또는 암의 특정 형태에 대한 본원에서의 언급은 이의 암 전이도 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 따라 치료되는 질환은 CLDN6를 발현하는 세포와 관련된다.

[0973] "CLDN6를 발현하는 세포와 관련된 질환" 또는 이와 유사한 표현은 본 발명에 따라 CLDN6이 병든 조직 또는 기관의 세포에서 발현된다는 것을 의미한다. 일부 구현예에서, 병든 조직 또는 기관의 세포에서 CLDN6의 발현은 건강한 조직 또는 기관의 상태에 비해 증가된다. 증가란 적어도 10% 증가, 특히 적어도 20%, 적어도 50%, 적어도 100%, 적어도 200%, 적어도 500%, 적어도 1000%, 적어도 10000% 또는 심지어 더 증가하는 것을 의미한다. 일부 구현예에서 발현은 병든 조직에서만 오직 발견되는 반면, 건강한 조직 내 발현은 억제된다. 본 발명에 따르면, CLDN6를 발현하는 세포와 관련된 질환은 암 질환을 포함한다. 또한, 본 발명에 따르면, 암 질환은, 바람직하게는 암세포가 CLDN6를 발현하는 질환이다.

[0974] 본 명세서에 사용되는 "암 질환" 또는 "암"은 비정상적으로 조절되는 세포 성장, 증식, 분화, 부착 및/또는 이동에 의해 특징 지워지는 질환을 포함한다. "암 세포"는 빠르고 통제되지 않은 세포 증식에 의하여 성장하고, 새로운 성장을 개시하는 신호 중단 후에도 성장을 계속하는 비정상적인 세포를 의미한다. 바람직하게는, "암 질환"은 CLDN6를 발현하는 세포로 특징되며, 암세포는 CLDN6를 발현한다. CLDN6를 발현하는 세포는 바람직하게는 암 세포, 바람직하게는 본원에 기술된 암 중 하나이다.

[0975] 본 발명에 있어서, 용어 "암"은 백혈병, 정낭피종 (seminomas), 흑색종, 기형종 (teratomas), 림프종, 신경아세포종, 신경아교종 (gliomas), 직장암, 자궁내막암, 신장암, 부신암, 갑상선암, 혈액암, 피부암, 뇌암, 자궁 경부암, 소장암, 간암, 결장암, 위암, 창자암 (intestinal cancer), 두경부암, 위장관암, 림프절암, 식도암, 결장직장암, 췌장암, 이비인후 (ENT) 암, 유방암, 전립선암, 자궁암, 난소암 및 폐암 및 이들의 전이를 포함한다. 이들의 예로는 폐 암종, 유방 암종, 전립선 암종, 결장 암종, 신장 세포 암종, 자궁 경부 암종 또는 전술한 종양 또는 암 유형의 전이가 있다. 본 발명에 있어서, 암이라는 용어는 암 전이도 역시 포함한다.

[0976] 본 발명에 따르면, "암종"은 상피 세포로부터 유래하는 악성 종양이다. 이 그룹은 대부분 유방암, 전립선암, 폐암 및 결장암의 흔한 형태를 비롯한 가장 흔한 암이다.

[0977] "선암"은 샘 조직에서 발생하는 암이다. 이 조직은 또한 상피 조직으로 알려진 더 큰 조직 카테고리의 일 부분이다. 상피 세포는 피부, 샘 및 몸의 체강 및 기관에 정렬하는 다양한 다른 조직을 포함한다. 상피층은 발생학상으로 외배엽, 내배엽 및 중배엽으로부터 유래한다. 선암으로서 분류되기 위해서 세포가 분비 성질을 가지는한, 샘의 일부일 필요는 없다. 이러한 악성 종양의 형태는 인간을 포함하는 몇몇 고등 포유류에서 발생할 수 있다. 잘 분화된 선암은 그들이 유래한 샘 조직을 닮는 경향이 있는 반면에, 잘 분화되지 못한 것은 그러하지 아니하다. 생검으로부터 세포를 염색하는 것에 의하여, 병리학자들은 종양이 선암인지 또는 다른 형태의 암인지 결정할 것이다. 선암은 몸체의 도처에 위치하는 샘의 특성상 신체의 많은 조직에서 발생할 수 있다. 각각

의 샘은 동일한 물질을 분비하지 않을 수도 있는 반면, 세포에 외분비 기능이 있는 한 이는 샘으로 여겨지며, 따라서 이의 악성 형태를 선암으로 명명한다. 악성 선암은 다른 조직을 침범하고, 그렇게 하기에 충분한 시간이 주어지는 경우 종종 전이된다. 난소 선암은 가장 흔한 난소 악성 종양의 형태이다. 이는 장액 및 점액소의 선암, 투명세포 선암 및 자궁내막양 선암을 포함한다.

[0978] "전이"라 함은 암이 그 원래 위치로부터 체내의 다른 부분으로 퍼지는 것을 의미한다. 전이의 형성은 매우 복잡한 과정이며 일차 종양으로부터 악성 세포의 탈리, 세포외 매트릭스 침입, 체강 및 혈관으로 유입하기 위한 내피 기저막 침투, 및 이어서 혈액에 의한 전달 후, 표적 장기로의 침습에 의존한다. 마지막으로, 표적 부위에서의 새로운 종양의 성장은 혈관신생에 의존한다. 종양 세포 또는 성분은 일차 종양 제거 후에도 남아있을 수 있고 전이 가능성이 있으므로, 종양 전이가 흔히 발생한다. 일부 구현예에서, 본 발명에 따른 "전이"라는 용어는 일차 종양 및 국소 림프절 시스템과 멀리 떨어진 전이와 관련된 "원발성 전이"와 관련되어 있다. 일부 구현예에서, 본 발명에 따른 용어 "전이"는 림프절 전이에 관한 것이다. 본 발명의 치료법으로 치료가능한 전이의 한 가지 특별한 형태는 원발 부위로서 위암으로부터 기원하는 전이이다. 바람직한 구체예에서 이러한 위암 전이는 크루켄베르그 종양, 복막 전이 및/또는 림프절 전이이다.

[0979] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "절제불가한 종양"은, 전형적으로, 적절한 의학적 판단에 따라, 종양을 수술에 의해 안전하게 (예를 들어, 개체에 과도하게 유해하지 않게) 제거할 수 없거나, 및/또는 적절한 의료 전문가의 판단에 따라 개체의 종양 제거 위험성이 이러한 제거와 관련한 이점보다 높다는 의미로 간주되는, 한가지 이상의 특징에 의해 특징되는 종양을 의미한다. 일부 구현예에서, 절제불가한 종양은 (재건가능하지 않을 수 있는 혈관을 비롯한) 필수 장기 또는 조직을 수반하거나 또는 이에 증식된, 및/또는 하나 이상의 다른 중요한 또는 (혈관을 비롯한) 필수 장기 및/또는 조직에 대한 지나친 손상 위험 없이 외과적으로 쉽게 접근하지 못하는 위치에 존재하는, 종양을 지칭한다. 일부 구현예에서, 종양의 "절제불가능성"은 가장자리-음성 (RO) 절제를 달성할 가능성을 나타낸다. 췌장암의 경우, 상장간막동맥 (SMA) 또는 복강 축, 문맥 정맥 폐쇄 및 복강 또는 대동맥 주위 림프절병증의 존재와 같이 주요 혈관이 종양에 의해 덮인 것은 일반적으로 RO 수술 불가능 소견으로서 인정된다. 당해 기술 분야의 당업자는 종양이 절제불가하거나 또는 그렇지 않은 지를 결정하는 매개변수를 이해할 것이다.

[0980] "표적세포"는 암세포 등 바람직하지 않은 모든 세포를 의미한다. 바람직한 구현예에서, 표적 세포는 CLDN6을 발현한다.

[0981] 일부 구현예에서, CLDN6-양성 암은 CLDN6-양성 진행성 고형 종양을 포함한다.

[0982] 일부 구현예에서, a CLDN6-양성 암은 진행성/전이성 CLDN6-양성 난소암, 비편평형 비소세포폐암(NSCLC), 자궁내막암 및 고환암, 특히 임상적 이점을 제공할 가능성이 있는 이용 가능한 표준 치료법이 없는 경우로 구성된 군에서 선택된다. 일부 구현예에서, CLDN6-양성 암에는 회귀 종양 및 알려지지 않은 원발성 암을 포함하는 별도로 지정되지 않은(Not Otherwise Specified: NOS) 종양이 포함된다. 이러한 암은 CLDN6 발현에 대해 검사될 수 있다.

[0983] 일부 구현예에서, 일부 구현예에서 CLDN6-양성 암은 방광암, 난소암, 특히 난소 선암종 및 난소 기형암종, 소세포 폐암 (SCLC) 및 비소세포 폐암(NSCLC)을 비롯한 폐암, 특히 편평세포 폐암종 및 선암종, 또는 비편평형 비소세포폐암(NSCLC), 위암, 유방암, 간암, 췌장암, 피부암, 특히 기저세포 암종 및 편평세포 암종, 악성 흑색종, 두경부암, 특히 악성 다형 선종, 육종, 특히 활막 육종 및 암육종, 담관암, 방광의 암, 특히 이행세포암종 및 유두암종, 신장암, 특히 투명세포 신장세포 암종 및 유두상 신장세포 암종을 비롯한 신장세포 암종, 결장암, 회장의 암을 비롯한 소장암, 특히 소장 선암종 및 회장의 선암종, 배아 고환암종, 태반 용모막암종, 자궁경부암, 고환암, 특히 고환 정상피종, 고환 기형암 및 배아 고환암, 자궁암, 생식세포 종양 예컨대 기형암종 또는 배아암종, 특히 고환의 생식세포 종양, 및 이들의 전이형태로 이루어진 군으로부터 선택된 암이다.

[0984] 본 발명의 맥락에서, 용어 "치료", "치료하는" 또는 "치료학적 개입"은 질환 또는 장애와 같은 병태를 퇴치할 목적으로 개체를 관리 및 돌보는 것을 의미한다. 이 용어는 증상 또는 합병증을 완화하거나, 질환, 장애 또는 병태의 진행을 지연시키거나, 증상 및 합병증을 완화하거나, 및/또는 질환, 장애 또는 병태를 치유 또는 해소하거나, 아울러 병태를 방지하기 위해, 치료학적으로 유효한 화합물의 투여 등의, 병을 앓고 있는 개체로부터 소정의 병태에 대한 전 범위 치료를 포괄하는 것으로 의도되며, 이때 방지하는 질환, 병태 또는 장애와 싸우기 위한 목적으로 개체를 관리 및 돌보는 것으로서 이해되어야 하며, 증상 또는 합병증의 개시를 방지하기 위한 활성 화합물의 투여를 포함한다.

[0985] 용어 "치료학적 치료"는 개체의 건강 상태를 개선하거나 및/또는 개체의 수명을 연장(증가)하는 임의의 치료를 의미한다. 이러한 치료는 개체에서 질환의 소거, 개체에서 질환 진행의 정지 또는 서행, 개체에서 질환 진행의 저해 또는 서행, 개체에서 증상의 빈도 또는 중증도 감소, 및/또는 질환을 현재 앓고 있거나 이전에 걸린 적 있는 개체에서 재발 감소일 수 있다.

[0986] 용어 "예방학적 치료" 또는 "예방적 치료"는 개체에서 질환 발생을 방지하고자 의도하는 모든 처리를 의미한다. 용어 "예방학적 치료" 또는 "예방적 치료"는 본원에서 상호 호환적으로 사용된다.

[0987] 용어 "개인" 및 "개체"는 본원에서 상호 호환적으로 사용된다. 이들 용어는, 질환 또는 장애에 걸릴 수 있거나 또는 취약할 수 있으나, 질환 또는 장애에 걸렸거나 또는 걸리지 않았을 수 있는, 인간 또는 기타 포유류 (예, 마우스, 랫트, 토끼, 개, 고양이, 소, 돼지, 양, 말 또는 영양류)를 의미한다. 다수의 구현예에서, 개체는 인간이다. 달리 명시되지 않은 한, 용어 "개인" 및 "개체"는 특정 연령을 지정하지 않으며, 따라서 성인, 노인, 어린이 및 신생아를 망라한다. 본원의 구현예에서, "개인" 또는 "개체"는 "환자"이다.

[0988] 용어 "환자"는 치료하고자 하는 개인 또는 개체, 구체적으로 질환에 걸린 개인 또는 개체를 의미한다.

[0989] 본원에 참조된 문헌 및 실험에 대한 인용은 임의의 전술한 내용이 선행 기술 분야와 관련 있다는 인정으로서 의도되는 것은 아니다. 이들 문헌의 내용에 대한 모든 언급은 출원에 이용가능한 정보를 기반으로 하며, 이들 문헌의 내용에 대한 정확성에 관한 어떠한 인정으로도 간주되지 않는다.

[0990] 후술한 내용은 당해 기술 분야의 당업자가 다양한 구현예를 구성 및 이용할 수 있게 하기 위해 제공된다. 구체적인 장치, 기법 및 이용에 관한 설명은 단지 예로서 제공된다. 본 발명에 기술된 예에 대한 다양한 변형이 당해 기술 분야의 당업자들에게 용이하게 자명할 것이며, 본원에 정의된 일반적인 원리는 다양한 구현예의 사상 및 범위로부터 이탈하지 않으면서 다른 예 및 활용으로 적용될 수 있다. 따라서, 다양한 구현예들은 본원에 기술된 예들로 한정하고자 하는 것은 아니며, 청구항과 일치하는 범위에 부합하는 것으로 의도된다.

[0991] 실시예

[0992] 실시예 1: BNT142의 물리적, 화학적, 약학적 특성.

[0993] 약물 물질

[0994] BNT142 약물 물질은 CLDN6 및 CD3에 대한 항원 결합 단편(Fab)-(scFv)₂ 기반 이중특이적 항체(또는 트리바디)의 중쇄(HC) 및 경쇄(LC)를 암호화하는 RNA 혼합물이며, 이하에서는 RiboMab02.1이라 한다. RiboMab02.1은 CLDN6 및 CD3 앵실론(ϵ) 사슬의 형태적 에피토프를 인지한다. 약물 물질의 활성 성분은, 각각의 단백질 하위 단위로 번역되어 표적 세포에서 완전한 이중특이적 항체를 형성하는, 두 개의 단일 가닥, 5' 캡핑 및 N1 메틸슈도우리딘 변형 RNA의 혼합물이다. 도 1은 시험관 내 RNA 전사를 위한 주형으로 사용되는 선형화된 플라스미드 테옥시 리보핵산(DNA)의 각 뉴클레오티드 서열에 의해 결정되는 단백질 암호화 RNA의 일반적인 구조에 대한 개략도를 보여준다. HC 및 LC를 암호화하는 서열 외에도, 각 RNA에는 안정성 및 번역 효율성과 관련하여 최대 효능에 최적화된 공통 구조 요소(5'-캡, 5'-비번역 영역[UTR], 3'-UTR 및 폴리[A]-테일)가 포함된다.

[0995] 의약품

[0996] 의약품에 대한 설명

[0997] 의약품은 IV 투여용 수성 완충액에 멸균된 RNA-LNP 분산액이다. 의약품 제조에는 특수 지질 성분으로 구성된 나노 규모 지질 입자에 RNA를 캡슐화하는 과정이 포함된다. LNP로 제형화되면, RNA 약물 물질은 혈청 내 분해로부터 보호된다. LNP 제형은 RNA가 엔도솜 구획에서 기능성 단백질로 번역될 수 있는 세포질로 빠져나가는 것을 가능하게 한다. BNT142 의약품의 조성은 표 4와 같다.

[0998] 표 4: BNT142 의약품의 구성

표 4

구성성분	품질기준	기능	농도 (mg/mL)
BNT142 DS	사내	활성	1.0
ALC-0366	사내	기능성 지질	10.64
ALC-0159	사내	기능성 지질	1.35
DSPC	사내	구조적 지질	2.43
콜레스테롤, 합성	Ph. Eur.	구조적 지질	4.96

수크로스	USP-NF/Ph. Eur.	동결방지제	102.69
NaCl	USP-NF/Ph. Eur.	완충제	6.00
KCl	USP-NF/Ph. Eur.	완충제	0.15
Na ₂ HPO ₄	USP-NF/Ph. Eur.	완충제	1.08
KH ₂ PO ₄	USP-NF/Ph. Eur.	완충제	0.15
주사 용수	Ph. Eur.	용제/비히클	q.s.

- [1000] ALC-0366, ((3-히드록시프로필)아잔다일)비스(노난-9,1-디일)비스(2-부틸옥타노에이트); ALC-0159, 2-[(폴리에틸렌 글리콜)-2000]-N,N-디테트라데실아세트아미드;
- [1001] DSPC = 1,2-디스테아로일-sn- 글리세로-3-포스포콜린; DS = 약물 물질; Eur. = 유럽 약전(Pharmacopoea Europaea); q.s. = 적당량 (충분할 정도로); USP-NF = 미국 약전과 국민의약품집(United States Pharmacopeia and National Formulary).
- [1002] 의약품 pH 및 삼투압 농도는 일반적으로 각각 pH 6.9 내지 7.9 및 425 내지 625mOsmol/kg 범위이다. 동적 광 산란(DLS)으로 측정된 LNP 입자 크기는 약 50 내지 100nm 범위이며, 다분산 지수는 0.2 이하이다. 의약품의 입자 크기는 표적 조직에 도달하는 능력, 약물 로딩 용량 및 제품 안전성을 최적화하기 위해 선택되었다.
- [1003] 표적 세포에 흡수되면, 중쇄와 경쇄를 암호화하는 RNA가 각각의 단백질로 번역되고 접힌 다음 조립되어 완전한 이중특이적 항체를 형성하고 이후에 분비된다. 이 항체는 세포독성 T 세포를 종양 세포에 모집하고 표적 의존적 다클론 T 세포 활성화 및 종양 세포 용해를 유도함으로써 CLDN6을 발현하는 종양 세포에 특이적으로 작용하는데 체계적으로 이용 가능하다.
- [1004] BNT142 의약품은 RNA-LNP로 제형화된 1mg/mL의 RNA(1.5:1의 중량비로 제1 RNA와 제2 RNA를 모두 포함)를 함유하는 일회용 유리 바이알에 주사용 동결 농축 현탁액으로 제공된다. 해동 후, 의약품을 시판되는 등장성 NaCl 용액(0.9%)에 희석하고 인-라인 필터로 여과한다. IMP는 IV 투여를 통해 환자에게 투여된다.
- [1005] 실시예 2: 비임상 연구
- [1006] BNT142 비임상 패키지는 1차 PD 연구, RiboMab02.1의 개념 증명 확립 및 작용 방식 평가뿐만 아니라 2차 PD 연구, 표적 외(off-target) 프로파일링의 예측 및 RiboMab02에 의한 비특이적 T 세포 활성화 및 사이토카인 방출의 조사를 포함한다. 또한, RiboMab02.1의 CLDN6 결합 부분의 조직 교차 반응성이 GLP-준수 연구에서 연구되었다. BNT142는 기술적으로 해당 범위에 속하지 않지만, 국제 의약품 규제조화 협의회(ICH) 지침 S6, S7A/B 및 S9와 CD3 결합 T 세포 참여자에 대한 FDA 권장 사항을 따랐다.
- [1007] 상기 가이드라인은 의약품(RNA-LNP)의 안전성 측면을 평가할 때도 고려되었다. 여기서는 안전성 약리학 및 (면역)독성 연구에 플랫폼 접근 방식이 사용되었다. 이전에 입증된 바와 같이, RNA 플랫폼과 사용된 LNP에 내재된 안전성 측면은 RNA 서열이나 길이에 대체로 독립적이지만, 오히려 RNA 및/또는 LNP의 용량과 유형에 따라 달라진다. 이러한 이유로 인해, 안전성 약리학 관독을 포함한 단일 투여 및 GLP-준수 반복 투여의 독성 연구가 RNA-LNP 플랫폼 연구로 수행되었다. 이러한 생체 내 연구에 면역독성학 관독값을 포함하는 것 외에도 의약품 매개 면역독성도 시험관 내에서 다루어졌다.
- [1008] PK 연구는 제품의 다양한 측면을 다룬다. 첫째, 암호화된 RiboMab02.1의 PK 프로파일은 다양한 종에서 특성화되어, BNT142의 용량 노출을 설명한다. 둘째, 대리(surrogate) RNA를 사용하여 LNP의 생체분포 및 단백질 발현과 같은 플랫폼 특성이 다루어졌다. 또한, ALC-0366 및 ALC-0159의 대사를 시험관 내, ALC-0159에 대해서는 생체 내에서도, 이 지질의 혈장 및 간 PK 프로파일을 특징으로 하는 연구의 랫트 혈장, 소변, 대변 및 간 샘플에서 평가되었다.
- [1009] **2.1 비임상 약리학**
- [1010] **1차 약력학**
- [1011] 1차 PD 연구는 BNT142 약물 물질의 단백질로의 번역 및 치료 표적 인간 CD3 및 CLDN6과 관련하여 암호화된 이중 특이적 단백질 RiboMab02.1의 원하는 작용 방식과 같은 효과를 조사하는 시험관 내 및 생체 내 연구이다.
- [1012] RiboMab02.1은 인간 CD3 및 종양태아 항원 CLDN6에 특이적으로 결합한다.
- [1013] CLDN6 및 인간 CD3에 대한 RiboMab02.1의 표적 특이성을 결정하기 위해, BNT142로 형질감염된 HEK-293T-17 생

산자 세포에서 발현된 RiboMab02.1을 함유하는 세포 배양 상청액을 사용하여 유세포 분석 결합 검정을 수행하였다. 인간 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)는 RiboMab02.1 CD3-결합 팔에 대한 표적 세포 역할을 한 반면, 시노물구스 원숭이 유래 PBMC는 종 대조군 역할을 했다. 안정한 단백질 발현을 위해 CLDN6으로 형질도입된 HEK-293T-17 세포를 2개의 RiboMab02.1 CLDN6-결합 팔에 대한 표적 세포로 사용했다. 밀접하게 관련된 클라우딘 CLDN3, CLDN4 및 CLDN9에 대한 RiboMab02.1의 교차 반응성을 평가하기 위해, 각각 CLDN 분자 중 하나를 이중 발현하는 HEK-293T-17 안정한 형질도입체에 대한 RiboMab02.1의 결합을 검사했다. RiboMab02.1은 CLDN3, CLDN4 또는 CLDN9가 아닌 CLDN6에 특별히 결합되었다. 마찬가지로, RiboMab02.1은 인간 CD3만 인지하고 유인원 CD3은 인지하지 못했다(도 2).

[1014] 생체 내에서 생성된 RiboMab02.1은 용량 의존적 및 표적 특이적 종양 세포 용해를 매개한다.

[1015] BNT142-투여된 Balb/cJrj 마우스에서 생산된 RiboMab02.1의 생체활성은 T 세포 매개 세포독성 검정에서 세포독성 잠재력을 분석함으로써 생체외에서 평가되었다. 생물발광 기반 세포독성 검정은 루시퍼라제 발현 세포주를 사용하여 수행되었다. 양성 인간 난소암 세포주 PA-1 및 OV-90은 표적 의존적 용해 효율을 결정하는 역할을 한 반면, 표적 음성 인간 유방암 세포주 MDA-MB-231은 표적 특이적 용해를 확인하기 위한 음성 대조군으로 사용되었다. 8명의 서로 다른 건강한 공여자로부터 얻은 인간 PBMC를 효과기 세포로 사용하여 인간 T 세포 반응의 공여자 의존적 이질성을 반영했다. 표적 양성 세포주의 배가 시간(doubling time)에 따라 PA-1 함유 검정(assay)을 24시간 동안 배양하고 OV-90 함유 검정을 48시간 동안 배양했다. 이에 따라 대조군을 인큐베이션했다. Balb/cJrj 마우스에서 생성된 RiboMab02.1은, 공여자 PBMC의 활성에 따라, PA-1의 경우 0.004 내지 0.200ng/mL(0.04 내지 2.00pM) 범위, OV-90의 경우 0.07 내지 2.07ng/mL (0.7 내지 20.7 pM) 범위의 EC₅₀ 값으로 표적 특이적 및 용량 의존적 세포 독성을 효율적으로 매개했다(각각 도 3 A 및 도 3B). RiboMab02.1 함유 마우스 혈청은 CLDN6-음성 MDA-MB-231 세포주를 사용하여 표적 독립적(비특이적) 용해를 유도하지 않았다(도 3).

[1016] 시험관 내에서 발현된 RiboMab02.1은 용량 의존적 및 표적 특이적 T 세포 증식을 유도한다.

[1017] HEK-293T-17 생산자 세포를 BNT142 또는 대조군 RiboMab-암호화 RNA로 형질감염시켰다. RiboMab02.1 또는 대조군 RiboMab(관련 없는 TAA에 특이적)를 함유하는 상청액을 검사 항목으로 사용했다. 두 가지 농도(100 또는 1ng/mL)의 RiboMab 함유 상청액을 카르복시플루오레세인 숙신이미딜 에스테르(CFSE) 표지 인간 PBMC와 표적-양성 세포 또는 표적-음성 세포의 공동 배양물에 첨가했다. PA-1 또는 OV-90은 CLDN6-양성 세포로, MDA-MB-231은 표적 음성 세포로 사용되었다. CLDN6-음성 NUGC-4 세포(관련 없는 TAA를 발현)뿐만 아니라 임의의 표적 세포가 없는 PBMC도 추가 특이성 대조군으로 포함되었다. 3명의 건강한 공여자로부터 얻은 PBMC를 이 검정에서 비교했다. 72시간 인큐베이션 후, T 세포를 유동 세포측정법으로 분석하여 표적 의존적 증식을 결정하였다. PA-1 세포가 있는 경우, 100 ng/mL 및 1 ng/mL RiboMab02.1에 의해 각각 약 58 ± 2% 및 44 ± 7%의 T 세포 증식이 유도된 반면, OV-90 세포의 경우에는 24 ± 3% 및 2 ± 3%의 T 세포 증식이 유도되었다(도 4). 대조적으로, RiboMab02.1에 의해 유도된 T 세포 증식은 NUGC-4 또는 MDA-MB-231 세포와 공동 배양된 PBMC에서나 임의의 표적 세포의 부재에서도 관찰되지 않았다(도 4). T 세포 활성화를 위한 양성 대조군으로 사용되는 인간 CD3 특이적 항체 OKT3는 표적 세포가 있을 때와 없을 때 모두 강력한 활성화를 유도했다.

[1018] RiboMab02.1은 EC₅₀보다 훨씬 높은 용량에서만 표적 독립적 T 세포 활성화를 유도한다.

[1019] RiboMab02.1에 대한 표적 특이적 생활성 범위를 결정하기 위해, 1차적 작용 방식인 T 세포 활성화를 판독값으로 사용했다. RiboMab02.1 함유 및 모의 혈청 샘플을 BNT142 또는 RNA-LNP를 암호화하는 루시퍼라제(Luc_RNA-LNP; 모의)가 투여된 마우스로부터 획득했다. 3명의 건강한 공여자로부터 얻은 인간 PBMC를 효과기 세포로 사용했다. 혈청 샘플을 4,000ng/mL부터 시작하여 연속 희석(10배, 10포인트)하고 단독으로 또는 CLDN6-양성 PA 1 표적 세포와 함께 배양된 PBMC에 효과기 대 표적 세포 비율 10:1로 첨가했다. 48시간 동안 인큐베이션한 후, T 세포를 유동 세포측정법으로 각각 초기 및 후기 활성화 마커인 CD69 및 CD25의 표면 발현에 대해 분석했다. 최대 40ng/mL RiboMab02.1까지 공여자로부터의 PBMC 중에서는 표적 외 T 세포 활성화가 관찰되지 않았다. 400 및 4,000 ng/mL의 두 가지 가장 높은 RiboMab02.1 농도는 각각 2 내지 6% 및 6 내지 19%의 표적 외 T 세포 활성화(배경 수준 초과)를 초래했다(도 5의 왼쪽). 3명의 공여자 모두의 평균 EC₅₀ 값(도 5의 오른쪽)은 표적 세포 존재 시 0.026 ng/mL(0.3pM)로 측정되었었다. OKT3 양성 대조군은 표적 세포 유무에 관계없이 50%보다 높은 T 세포 활성화를 유도했다(데이터는 표시되지 않음). T 세포에서 CD69의 상향 조절은 CD25의 상향조절보다 높았으며; CD25-양성 세포는 거의 독점적으로 CD69 이중-양성이었으며 이는 초기 활성화 상태를 나타낸다(데이

터는 표시되지 않음).

[1020] 결론적으로 RiboMab02.1은 EC₅₀ 값보다 1,500배 높은 농도까지 T 세포의 표적 의존적 활성화를 매개한다.

[1021] **정맥 내로 투여된 BNT142는 T 세포를 종양으로 리디렉션하여 마우스의 이종이식 종양 제거를 증대한다.**

[1022] 생체 내에서 BNT142의 항종양 효능을 확인하기 위해 CLDN6-양성 인간 난소 암종(OV-90) 이종이식 마우스 모델을 사용했다. 간략하게 말하면, 면역결핍 수컷 및 암컷 NOD.Cg-Prkd^{scid} IL2rg^{tm1Wjl}/SzJ(NSG) 마우스에 인간 OV-90 난소 암종 세포를 피하(SC) 접종하였다. 확립된 종양(평균 크기 $\geq 30 \text{ mm}^3$)을 가진 마우스에 건강한 공여자의 인간 PBMC를 복강 내(IP) 이식했다(그 결과 NSG/PBMC로 주석이 달린 마우스 모델). 7일 후, BNT142 또는 대조군 항목을 매주 5회 단일 IV 볼루스 주사로 구성된 치료 요법이 시작되었다. BNT142는 마우스당 0.1 또는 1 μg (~0.004 및 0.04mg/kg)의 용량으로 투여되었다. 표적 특이성 대조군으로서, 관련 없는 TAA x CD3 결합 트리바디 단백질을 암호화하는 1 μg 대조군 RNA-LNP를 적용했다Dulbecco의 인산염 완충 식염수(DPBS, 식염수) 단독 및 1 μg Luc_RNA-LNP는 음성 대조군으로 사용되었으며, 제조합 정제 CD3 x(CLDN6)₂ 트리바디 참조 단백질(동물당 100 μg , ~4 mg/kg)은 양성 대조군으로 사용되었다. (도 6A).

[1023] 두 번째 처리 후에 1 μg BNT142를 사용하고 세 번째 처리 후에 0.1 μg BNT142 또는 100 μg 의 참조 단백질을 사용하면 종양 부피가 줄어들기 시작했다. 실험이 끝날 때까지 꾸준한 감소가 유지되었다 (도 6의 B, C). 일반적으로 음성 대조군 중 어느 것도 종양 부피 감소를 나타내지 않았다.

[1024] 이종 이식 종양의 종양 침윤 림프구(TIL)를 검정하기 위해 그룹당 4마리의 마우스(0.1 μg BNT142 그룹의 경우에 만 5마리)를 세 번째 주사 후 72시간에 안락사시켰다. 평균적으로 각각 0.1 및 1 μg BNT142로 처리한 마우스에서 이종이식 종양 조직 mm²당 1,310 및 1,797 TIL이 관찰되었다 (도 6의 D 및 F). 참조 단백질 처리에서는 mm² 종양 조직당 평균 1,542 TIL이 발생한 반면, 음성 대조군은 mm² 조직당 139 내지 410 TIL을 나타냈다. 종양 조직 내 CLDN6-양성 세포의 백분율을 OV-90 접종 후 38일 후 여러 시점에서 여러 마우스에 대해 분석했다. CLDN6-양성 세포의 가장 낮은 비율(종양 세포 사멸/제거 증가를 나타냄)은 1 μg BNT142, 이어서 참조 단백질 및 0.1 μg BNT142 처리로 처리한 마우스의 종양 이종이식편에서 발견되었다 (도 6의 E 및 F).

[1025] 종합하면, BNT142 및 참조 단백질 처리 그룹의 마우스는 음성 대조군과 달리 이종이식 종양에서 더 높은 T 세포 침윤 및 더 낮은 CLDN6-양성과 함께 상당한 종양 감소를 나타냈다.

[1026] 2차 약력학

[1027] 2차 PD 연구는 치료 표적 CLDN6과 관련되지 않은 암호화된 이종특이적 단백질 RiboMab02.1의 작용 방식 및 효과를 조사하는 시험관내 및 생체내 연구로 정의된다.

[1028] RiboMab02.1은 시험관 내에서 인간 전염증성 사이토카인의 표적 의존적 방출을 유도한다.

[1029] T 세포 활성화 검정으로부터 얻은 세포 배양 상청액을 분석하여 표적 내 및 표적 외 사이토카인 방출의 RiboMab02.1 의존적 유도를 조사했다. 인간 전염증성 사이토카인 IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-10 및 TNF- α 의 수준은 맞춤형 다중 ELISA 키트를 사용하여 측정되었다. RiboMab02.1은 용량 의존적 및 공여자 의존적 방식으로 표적 세포의 존재 하에 모든 사이토카인의 방출을 유도했다. 1명의 공여자 및 최고 농도의 RiboMab02.1에서 관찰된 IL 6의 낮은 유도를 제외하고, CLDN6-양성 PA- 1 표적 세포가 없는 경우 사이토카인 유도가 관찰되지 않았다 (도 7). 양성 대조군 OKT3는 표적 세포의 존재 및 부재 하에서 사이토카인 방출을 유도한 반면, 모의 혈청(Luc_RNA-LNP 투여 마우스로부터)은 어떠한 사이토카인 생성도 유도하지 않았다(데이터는 표시되지 않음).

[1030] **PBMC 인간화 마우스에 대한 BNT142의 생체 내 투여는 인간 전염증성 사이토카인 방출을 유도하지 않는다.**

[1031] 인간 전염증성 사이토카인 IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-10 및 TNF- α 는 세 번째 BNT142 투여 6시간 및 72 시간 후에 얻은 OV-90 인간 이종이식 종양 보유 NSG/PBMC 마우스의 혈청 샘플에서 측정되었다 (위를 참조). 종양이 없는 NSG/PBMC 마우스의 추가 그룹을 1 μg BNT142로 처리했다. 평가된 어느 시점에서든 BNT142가 처리된 그룹 또는 대조군 그룹에서는 사이토카인 유도가 관찰되지 않은 반면 (도 8A), 참조 단백질 그룹의 마우스는 6 시간 시점에서 6개 사이토카인 모두의 일시적이지만 유의미한 상승을 나타냈다. 데이터는 각 시점에서 식염수 대조군을 사용하여 얻은 값으로 정규화되었다. 활성 약물 RiboMab02.1(1 μg BNT142로 암호화됨)과 참조 단백질을 전신 이용 가능성은 비슷했다 (도 8B).

[1032] GLP-준수 조직 교차 반응성 연구

[1033] RiboMab02.1의 잠재적인 비특이적 결합을 조사하기 위해, 세 가지 농도(10, 5, 1 $\mu\text{g/mL}$)에서 모 키메라 IgG 항체 IMAB206-C46S(동일한 항-CLDN6 CDR을 공유함)를 사용한 전체 인간 조직 교차 반응성(tissue cross reactivity:TCR) 연구는 GLP를 준수하여 수행되었다. 분석된 성인 정상 인간 조직(FDA 1997)과 그 결과는 표 5에 요약되어 있다.

[1034] 표 5: GLP-준수 TCR 연구 결과

표 5

[1035]

관찰	조직(번호, 양성 샘플/검사된 샘플)
세 가지 농도의 모 항체 IMAB206-C46S(RiboMab02.1과 동일한 항-CLDN6 CDR을 공유함)가 양성 결합을 확인하고 대조군은 결합하지 않은 조직	부신 (내분비 세포 1/3), 태반(융모 1/3)
모든 농도의 모 항체에서 결합이 확인되지 않은 조직	혈액(3/3), 유방(3/3), 자궁경부(3/3), 눈(3/3), 나팔관(3/3), 심장(3/3), 신장(3/3), 폐(3/3), 림프절(3/3), 난소(3/3), 췌장(3/3), 부갑상선(3/3), 전립선(3/3), 비장(3/3), 가로무늬근(3/3), 편도선(3/3), 자궁-자궁내막(3/3)
하나 이상의 농도의 모 항체와 대조군에서 결합이 관찰된 조직	소뇌(백질 3/3), 대뇌피질(백질 3/3), 간(간세포 2/3), 말초신경(섬유 2/3), 뇌하수체 후엽(신경부(pars novosa) 1/3), 침샘(관 1/3), 척수(신경조직 3/3), 고환(정액관 2/3), 갑상선(여포 상피 1/3), 요관(요로상피 1/3), 방광(요로상피 2/3), 결장(대식세포 2/3), 회장(대식세포 3/3), 위(대식세포 3/3), 흉선(대식세포 2/3), 십이지장(상피점막 1/3), 피부(상피 1/3)

[1036] 요약하면, 모든 검사 조직 중 부신의 내분비 세포와 태반의 융모만이, 적용된 검사 항목의 세 가지 농도 모두에서 1/3의 기증자에서 양성으로 염색되었다. 막 염색은 검출되지 않았으며, 관찰된 모든 결합은 세포질 특성이었다. 세포질 결합은 절개 과정에서 세포 구획이 인위적으로 노출되어, 검사 항목에 접근할 수 있기 때문에 가능하다. 이러한 상황은 생체 내에서는 발생하지 않으므로, 세포질 결합은 관련성이 있는 것으로 간주되지 않는다. 다른 교차 반응이나 비특이적 결합은 관찰되지 않았다.

- [1037] **표적 외 결합 검정(비-GLP)**
- [1038] RiboMab02.1의 잠재적인 비특이적 표적을 조사하기 위해 트리바디 참조 단백질(RiboMab02.1과 서열이 동일함)을 사용한 세포 마이크로어레이 스크리닝을 수행했다. 트리바디는 고정된 인간 HEK293 세포에 대한 결합에 대해 스크리닝되었으며, 개별적으로 6,239개의 서로 다른 전장 인간 원형질막 단백질과 371개의 이중이량체를 포함하여 세포 표면에 고정된 인간 분비형 단백질을 과발현했다.
- [1039] 트리바디 참조 단백질은 CD3 δ 또는 CD3 γ 및 CLDN6과 이중이량체로 발현될 때 주요 표적인 CD3 ϵ 와 특이적인 상호작용을 보여주었다. 그럼에도 불구하고, CLDN9와의 추가적인 약한 표적 외 상호작용이 관찰되었다. 다른 결합은 관찰되지 않았다.
- [1040] **안전성 약리학**
- [1041] ICH 가이드라인 S7A는 임의의 약학적 제품을 인간에 노출하기 전에 수행하여야 하는 안전성 약리학 연구의 핵심 배터리를 수행해야 함을 개시하고 있다. 중추신경계(CNS) 및 호흡기계에 대한 최대 ~5mg/kg RNA-LNP의 잠재적 효과는 마우스에서 수행된 GLP-준수 반복 투여 독성 연구의 일부로 평가되었다. 또한, 심혈관 안전성 평가변수(혈압, 심박수 및 심전도 매개변수)에 대한 최대 0.15mg/kg의 BNT142의 효과는 시노물구스 원숭이를 대상으로 한 비-GLP 연구에서 평가되었다. 마우스 연구에는 빈 LNP로 처리된 대조군이 포함되었다.
- [1042] **호흡기 안정성**
- [1043] RNA-LNP의 호흡 안전성은 Balb/c 마우스에서 수행된 GLP-준수 반복 투여 독성 연구에 포함된 위성 동물을 대상으로 평가되었다. 매주 4회 주사를 투여하고, 투여 전, 두 번째 및 네 번째 주사 후 4시간 및 24시간에 전신 체적맥파측정을 수행했다.
- [1044] 마우스를 4개의 그룹으로 나누어, 각 그룹에는 수컷 4마리, 암컷 4마리로 구성했다. 그룹 1과 2는 대조군으로, 식염수를 투여한 그룹(그룹 1)과 RNA가 없지만 지질 함량이 ~5 mg/kg인 그룹과 동등한 빈 LNP를 투여한 그룹(그룹 2)이다. 치료 그룹은 RNA-LNP를 ~1.5 mg/kg의 용량으로 투여한 그룹(그룹 3)과 ~5 mg/kg의 용량으로 투여한 그룹(그룹 4)이다. 혈량측정에서는 검사 항목과 관련된 효과가 없는 것으로 나타났다.
- [1045] **CNS 안정성**
- [1046] RNA-LNP에 의해 유도된 신경학적, 행동적 및 자율신경적 효과는 GLP에 따라 Balb/c 마우스에서 두 가지 용량 수준(~1.5mg/kg 및 ~5mg/kg)에서 연구되었다.
- [1047] 본 연구는 호흡기 안전성 연구에 사용된 것과 동일한 동물(동일한 RNA-LNP 투여군 및 대조군)을 대상으로 수행되었다. 40가지 신경약리학적 매개변수에 대한 RNA-LNP의 영향을 첫 번째 투여 전과 48시간 후, 그리고 네 번째 투여 전과 48시간 후에 조사했다.
- [1048] 뒷다리 악력의 검사 항목 관련 일시적인 감소(~ -37%)는 수컷 동물에서 ~5mg/kg의 첫 번째 투여 후 나타났다. 이 효과는 같은 그룹의 암컷 동물에서도 나타났다(~ -4%). 네 번째 투여 전이나 후에 뒷다리 악력에서 검사 항목 관련 차이가 관찰되지 않았기 때문에, 감소는 가역적이었다. 모든 검사 시점에서 앞다리 악력의 변화는 관찰되지 않았으며, 근육이나 좌골 신경의 거시적 또는 미시적 변화도 감지되지 않았으며, 이는 뒷다리 악력의 일시적인 감소가 근육이나 신경 손상으로 인해 발생하지 않았음을 나타낸다. 다른 검사 항목 관련 효과는 관찰되지 않았다.
- [1049] **심혈관 안정성**
- [1050] BNT142 투여의 잠재적인 심혈관 효과에 대한 조사는 시노물구스 원숭이를 대상으로 한 비-GLP PK 및 내약성 연구에 포함되었다.
- [1051] 본 연구에서는, 시노물구스 원숭이를 4개의 그룹으로 할당했으며, 각 그룹은 3마리의 암컷 동물을 포함했다. 그룹 1에는 식염수를 투여한 반면, 그룹 2, 3, 4에는 BNT142 0.015, 0.05, 0.15 mg/kg을 각각 1회 투여했다. 혈압 측정은 치료 시작 전과 동물로의 투여 후 6시간 및 24시간에 수행되었다. 말초 동맥 수축기 혈압과 확장기 혈압 및 그에 따른 평균 혈압은 검사 항목으로 처리된 동물에서 정상적인 생리학적 한계 내에 있었다. 또한, 투여 전부터 투여 후 적어도 20시간까지 심전도(ECG)를 기록했다. 이 기간 동안 심박수와 ECG 정량적, 정성적 매개변수는 BNT142 투여에 영향을 받지 않았다.
- [1052] **비임상 약리학 - 결론**

- [1053] 1차 및 2차 시험관 내 및 생체 내 PD 연구에서, BNT142로 암호화된 RiboMab02.1은 용량 및 표적 의존적 작용 방식을 입증했다. EC₅₀ (26 pg/mL)보다 1,500배 높은 RiboMab02.1 농도에 의한 시험관 내 비특이적 T 세포 활성화의 시작은 광범위한 치료 창을 가리킨다.
- [1054] RiboMab02.1의 안전성은 GLP-준수 조직 교차 반응성 연구(동일한 항-CLDN6 CDR을 갖는 대리 IgG 사용)에서 먼저 검사되었으며, 그 결과 비특이적 결합이 확인되지 않았다. RiboMab02.1 참조 단백질을 사용한 후속 세포 마이크로어레이 연구에서는 CLDN6과 밀접하게 관련된 CLDN9에만 약한 표적 외 결합이 관찰되었다. 내이(inner ear)의 밀착 연결에서의 발현을 제외하고 대부분의 정상 조직에서는 CLDN9 발현이 없기 때문에, 원치 않는 표적 외 효과는 예상되지 않았다.
- [1055] 종합하면, CLDN6 및 CD3 이외의 표적에 대한 RiboMab02.1의 결합은 가능성이 없는 것으로 간주된다.
- [1056] 안전성 약리학 평가에서는 심혈관 매개변수(시노물구스 원숭이) 또는 호흡 매개변수(마우스)에 아무런 영향이 없는 것으로 나타났다. 마우스에 ~5 mg/kg RNA-LNP를 처음 투여한 후 48시간 후에 뒷다리 약력의 일시적인 감소가 관찰되었다. 이 효과는 일시적이었으며, 3회의 후속 RNA-LNP 투여 후에는 감지되지 않았다. 조직의 병리학적 검사 동안 신경학적 또는 근육 이상은 발견되지 않았는데, 이는 이러한 효과가 신경독성과 구별된다는 것을 시사한다.
- [1057] 종합적으로 말하자면, 이들 데이터는 BNT142로 암호화된 RiboMab02.1이 생체 내 및 시험관 내 비임상 모델에서 표적 제한이 있고 생물학적 활성이 있음을 시사한다. 최대 ~0.15mg/kg 이상의 예상 임상 용량 범위를 포괄하는 최대 ~5mg/kg RNA-LNP의 용량에서는 마우스의 생리학적 기능에 대한 검사 항목 매개 효과가 관찰되지 않았다.
- [1058] **2.2 비임상 약동학 연구**
- [1059] BNT142의 PK는 두 부분으로 나눌 수 있다. 첫째, IV 주입 후 RNA-LNP는 전신적으로 분포되어 RNA 전달대상물을 의도한 표적 기관인 간에 전달한다. 둘째, LNP에 의해 형질감염된 간 세포는 RNA를 번역하고 암호화된 단백질 RiboMab02.1을 전신 순환계로 분비한다.
- [1060] 첫 번째 부분을 평가하기 위해 마우스의 여러 기관에서 방사성 표지된 LNP의 생체 분포를 분석했다. 두 번째 부분의 평가를 위해 LNP에 제형화된 반딧불이 루시페라제를 암호화하는 변형된 RNA를 활용하여 생체 내에서 번역된 RNA의 간 표적화 및 동역학을 평가했다. 또한, 분비된 RiboMab02.1의 생체내 PK 프로파일은 단일 IV 투여 후 마우스 및 시노물구스 원숭이(NHP 모델)에서 특성화되었다.
- [1061] LNP에서 PEG 지질 부형제(ALC-0159)의 PK 프로파일링과 ALC-0159의 대사 평가를 생체내 및 시험관내에서 평가했다. 생체 내에서 ALC-0159는 혈장에서 간으로 빠르게 분포하는 반면, ALC-0159의 대사는 시험관 내 및 생체 내에서 천천히 일어나는 것으로 보인다. ALC-0159는 각각 에스테르 및 아마이드 작용기의 가수분해 대사에 의해 대사되며, 이러한 가수분해 대사는 평가된 모든 검사 종(마우스, 랫트, 원숭이, 인간)에서 관찰된다. 소변에서 검출 가능한 지질 배출은 없었지만, 대변에서 변화 없이 배출된 용량의 비율은 ALC-0159의 경우 ~50%였다. 아미노 지질 ALC-0366의 안정성은 시험관 내 대사 연구를 사용하여 평가되었다. ALC-0366은 모든 종에서 간 마이크로솜, S9 분획에서는 120분 이상, 간세포에서는 240분 이상 안정했다.
- [1062] **분포**
- [1063] 생체 내 LNP의 생체분포는 BNT142와 동일한 LNP 제형을 갖지만 다른 RNA를 갖는 RNA-LNP를 사용하여 연구되었다. 방사성 표지된 RNA-LNP를 마우스에 IV 투여했다. 쥐 조직의 LNP 분포는 액체 섬광 분광법을 통해 정량화되었다. LNP의 장기 표적화 및 mRNA를 암호화하는 루시페라제의 후속 발현을 생물발광 영상화를 통해 연구했다.
- [1064] **방사성 표지 LNP의 분포**
- [1065] LNP의 조직 분포 프로파일은 1 mg/kg(RNA 함량 기준)의 단일 IV 볼루스 주사 후 CD-1 마우스(n = 4/성별/시점)에서 조사되었다. 이 연구를 위해, RNA 함유 LNP는 지질 입자의 분포를 모니터링하기 위해 교환 불가능, 대사 불가능한 지질 마커인 [³H]-콜레스테릴 헥사데실 에테르([³H]-CHE)로 표지되었다. 마우스를 안락사시키고 혈액, 혈장 및 조직을 투여 후 0.083(5분), 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 및 24시간에 수집했다. 모든 샘플의 방사능은 표준 액체 섬광 계수에 의해 결정되었으며 결과 값은 총 지질 등가물(lipid_{eq}) 농도와 다양한 조직에 주입된 용량의 백분율을 계산하는 데 사용되었다.

- [1066] LNP는 마우스의 혈액 및 혈장에서, 혈액/혈장 농도의 빠른 초기 감소와 느린 제거 단계로 이어지는 2상 동역학을 나타냈다. 수컷 및 암컷 마우스에서 유사한 혈액/혈장 농도-시간 프로파일이 관찰되었다. LNP의 조직 내 분포는 일반적으로 빨랐으며, 주사 후 4시간 이전에 대부분의 조직에서 최고 수준이 발생하거나 안정 상태에 도달했다. 간은 주요 분포 기관이었으며, 주사 후 4시간에 수컷과 암컷 마우스의 평균 농도는 각각 282 및 355 $\mu\text{g Lipid}_{\text{eq}}/\text{g}$ 조직으로, 이는 주사 용량의 약 70% 내지 74%였다. LNP는 또한 투여 후 4시간까지 비장에 분포되어 투여 후 4시간에 61.7 내지 77.1 μg 의 $\text{lipid}_{\text{eq}}/\text{g}$ 조직(주사된 투여량의 0.84% 내지 1.15%)의 수준을 나타냈다. 다른 조직에서는 분포가 최소화되거나 전혀 관찰되지 않았다. 이 연구는 LNP 분포의 주요 기관을 확인하기 위해 수행되었으며, 투여된 LNP의 총 질량 균형을 설명하지는 않는다.
- [1067] 요약하자면, LNP는 빠르고 일차적으로 간으로 분포된다.
- [1068] 생체 내 번역된 RNA의 간 표적화 및 동역학
- [1069] 단백질 발현의 생체분포는 간 표적화 및 생체내 번역된 mRNA의 동역학을 평가하기 위해 LNP로 제형화된 반딧불이 루시페라제를 암호화하는 변형된 mRNA를 사용하여 평가되었다. IV 투여 후, 루시페라제 단백질은 주로 간에 위치한 높은 생물발광 신호로 시간 의존적 번역을 보여주었다 (도 9). 2차 분포 기관인 비장은 간에 비해 10배 낮은 생물발광 신호를 나타냈다. 심장, 폐, 신장 및 림프절에서 약한 발광 신호가 감지되었다.
- [1070] 지질 부형제(ALC-0159)의 약동학
- [1071] BNT142는 나노입자에 PEG 지질 부형제 ALC-0159를 함유하고 있다. Wistar Han 랫트에게 유사한 지질 조성(다른 아미노 지질)을 갖는 LNP로 제형화된 루시페라제 암호화 RNA를 1.96 mg ALC-0159/kg으로 단일 IV 투여한 후, ALC-0159의 혈장 농도는 초기 $t_{1/2}$ 값이 1.72시간으로 급격히 감소했다. ALC-0159는 이후 72.7시간의 말단 소실 $t_{1/2}$ 로 혈장에서 제거되었다. 간에 분포된 지질 용량의 추정 비율은 ~20%였다.
- [1072] RiboMab02.1 생체 내 약동학
- [1073] RiboMab02.1은 마우스에 BNT142를 투여한 후 효율적으로 번역, 조립 및 분비된다.
- [1074] 다음 연구는 생체 내에서 BNT142 흡수 후 RiboMab02.1의 번역, 조립 및 분비를 확인한다(Balb/cJRj 마우스). 분비된 RiboMab02.1을 함유하는 혈청은 30 μg BNT142의 단일 IV 투여 후 2시간 및 6시간 후에 수집되었다. 혈청을 ELISA(도 10A) 및 웨스턴 블롯(도 10B)으로 분석하여 생체 내에서 완전히 조립되고 구조적으로 안정한(단량체) RiboMab02.1의 생성을 확인했다.
- [1075] 마우스에서 BNT142의 반복 투여 PK 연구
- [1076] RiboMab02.1의 전신 수준이 BNT142의 매주 투여에 의해 지속되는지 여부를 평가하기 위해 Balb/cJRj 마우스에서 반복 투여 PK 연구를 수행했다. 처리 그룹은 매주 간격으로 10 또는 30 μg BNT142(각각 약 0.4 및 1.2mg/kg) 또는 30 μg Luc_RNA-LNP의 5회 IV 볼루스 주사를 투여받았다. 각 BNT142 투여 후 6시간(t_{max}) 및 BNT142 투여 전(마지막 검출 가능한 농도[C_{trough}]) 24시간에 동물로부터 채취한 혈액으로부터 혈청 샘플을 준비했다. 시점은 각각 첫 번째 BNT142 또는 Luc-RNA-LNP 대조군 주입 후 6, 174, 342, 510 및 678시간(C_{max}) 또는 144, 312, 480 및 648시간(C_{trough})에 해당한다. 마지막 혈액 샘플은 첫 번째 주사 후 816시간(34일)에 채취되었다. ELISA에 의해 결정된 바와 같이, 최대 7.4 $\mu\text{g/mL}$ 및 46 $\mu\text{g/mL}$ 의 RiboMab02.1 피크 수준(C_{max})은 각각 10 μg 및 30 μg BNT142를 마지막으로 주입한 지 6시간 후에 도달했다. 항체 농도는 각 주사 후 7일 이내에 급격히 감소했으며, C_{trough} 값은 C_{max} 값보다 약 130배 낮았다. 중요한 것은, BNT142용량의 후속 주사 간에 RiboMab02.1 번역의 손실이 관찰되지 않았다는 것이다 (도 11).
- [1077] 시노물구스 원숭이에서 BNT142의 단일 용량 PK 연구
- [1078] 단일 용량 PK 연구는 그룹당 3마리의 동물을 대상으로 암컷 시노물구스 원숭이에서 수행되었다. 처리 그룹은 예상되는 임상 용량 범위(0.150, 0.05 및 0.015mg/kg)를 포괄하는 BNT142의 단일 IV 볼루스 용량을 투여받았거나 대조군으로 식염수를 투여받았다. 용량 노출을 평가하기 위해 다양한 시점(주사 후 0, 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72, 168 및 336시간)에 수집된 혈청 샘플에서 RiboMab02.1의 농도를 ELISA로 분석했다. RiboMab02.1 피크 농도(C_{max})는 모든 그룹에서 BNT142 투여 후 6시간(중앙값 t_{max})에 도달했다(평균값[중앙값 t_{max}]: 0.015 mg/kg 그룹 = 7.3ng/mL; 0.050mg/kg 그룹 = 27.5ng/mL; 0.150 mg/kg 그룹 = 155.0ng/mL). RiboMab02.1 수준은 0.015 mg/kg

그룹에서 BNT142 투여 후 3시간부터 최대 72시간까지, 0.15 mg/kg 및 0.05 mg/kg 그룹에서는 최대 168시간(7일)까지 검출 가능했다(도 12 및 표 4). RiboMab02.1의 유효 반감기는 27 내지 37시간인 것으로 결정되었다. 그러나, 2개의 저용량 그룹에서 RiboMab02.1 반감기 측정은 ELISA 정량 방법의 정량 하한(lower limit of quantification: LLOQ)이 0.1ng/mL인 것으로 인해 제한되었다. 식염수 대조군 샘플에서 또는 BNT142 투여 후 336시간(14일)에는 신호가 검출되지 않았다(검출은 잠재적으로 LLOQ에 의해 제한됨). 개별 동물에 대한 PK 매개변수 및 평균/중앙값은 표 6에 요약되어 있다.

요약하면, 세 가지 BNT142 용량 모두 시노물구스 원숭이에서 생물학적 활성 RiboMab02.1의 치료 범위 내에서 역가를 나타냈으며, 중앙값 C_{max} 는 주사 후 6시간에 나타났다. RiboMab02.1 농도의 개인간 변동성이 관찰되었으며, C_{max} 에서 가장 낮은 용량 그룹에서는 2 내지 7배, 중간 용량 그룹에서는 1 내지 2배, 가장 높은 용량 그룹에서는 2배의 차이가 있었다.

표 6: BNT142의 단일 정맥내 볼루스 투여 후 시노물구스 원숭이 혈청에서의 RiboMab02.1의 PK 매개변수

표 6

BNT142 용량 (mg/kg)	개체 ID	t_{max} (h)	C_{max} (ng/mL)	C_{trough} (ng/mL)	t_{last} (h)	말단 $t_{1/2}$ (h)	유효 $t_{1/2}^a$ (h)
0.015	2501	6	7.3	1.5	72	NR	NR
	2502	12	2.2	1.1	24	NC	NC
	2503	6	12.4	2.2	72	25.1	26.5
	n	3	3	3	3	1	1
	Mean ^b	6	7.3	1.6	72	25.1	26.5
	SD	N/A	5.1	0.6	N/A	N/A	N/A
0.050	3501	6	32.8	0.6	168	27.7	28.1
	3502	6	19.1	4.8	72	NR	NR
	3503	12	30.7	5.6	72	26.0	28.1
	n	3	3	3	3	2	2
	Mean ^b	6	27.5	3.6	72	26.8	28.1
	SD	N/A	7.4	2.7	N/A	N/A	N/A
0.150	4501	12	242.0	15.1	168	42.1	40.1
	4502	6	107.0	4.8	168	39.6	37.9
	4503	6	117.0	3.0	168	32.7	31.8
	n	3	3	3	3	3	3
	Mean ^b	6	155.0	7.6	168	38.1	36.6
	SD	N/A	75.4	6.6	N/A	4.8	4.3

a. MRT_{0-inf} (약물 평균 체류 시간 0 에서 무한대)를 사용하여 유효 $t_{1/2}$ 를 계산함.

b. t_{max} 및 t_{last} 의 중앙값.

C_{max} = 최대 관찰 농도; C_{trough} = 마지막으로 관찰가능한 농도; h = 시간; n = 개수; N/A = 적용 불가능; NC = 계산 불가능; NR = 보고 불가능 (결정 계수가 0.8 미만임); SD = 표준 편차; t = 시간; $t_{1/2}$ = 반감기; t_{last} = 마지막으로 측정 가능한 농도의 시간; t_{max} = 관찰된 최대 농도까지의 시간.

대사와 배출

N1-메틸슈도우리딘 변형 mRNA를 포함한 RNA는 세포 RNase에 의한 분해에 민감하며 핵산 대사의 적용된다. 뉴클레오티드 대사는 세포 내에서 지속적으로 발생하며, 뉴클레오티드는 분해되어 배출되거나 뉴클레오티드 합성을 위해 재활용된다.

LNP 제형에서 부형제로 사용되는 4가지 지질 중 2가지(콜레스테롤 및 DSPC)는 자연적으로 발생하며 내인성 지질과 마찬가지로 대사되고 배출된다. 비천연 지질(ALC-0366 및 ALC-0159)의 대사 및 배출은 시험관 내에서 연구되

었으며 ALC-0159의 경우 생체 내에서도 연구되었다.

- [1088] ALC-0366(아미노지질)의 시험관 내 대사 안정성은 마우스, 랫트, 원숭이 및 인간 간 마이크로솜, S9 분획 및 간 세포에서 평가되었다. ALC-0366은 모든 종 및 검사 시스템에서 간 마이크로솜(잔류 ALC-0366>89%) 및 S9 분획(잔류 ALC-0366>88%)에서 120분 이상 안정적이었고 간세포(잔류 ALC-0366 >94%)에서는 240분 이상 안정적이었다.
- [1089] ALC-0159의 대사는 마우스, 랫트, 원숭이 및 인간 모두로부터의 혈액, 간 S9 분획 및 간세포를 사용하여 시험관 내에서 검사되었으며, PK 연구로부터의 랫트 혈장, 소변, 대변 및 간에서 생체 외 검사되었다. 이들 연구는 ALC-0159가 아미드 결합 가수분해에 의해 비교적 천천히 대사되어 N,N-디테트라데실아민을 생성한다는 것을 결정했다. 이러한 가수분해 대사는 평가된 종 전체에서 관찰되었다.
- [1090] 랫트 PK 연구에서, RNA-LNP의 IV 투여 후 소변에서 ALC-0159의 검출 가능한 배출은 없었다. 그러나 ALC-0159의 ~50%는 대변에서 변화 없이 제거되었다.
- [1091] **• 비임상 약동학 및 대사 - 요약 및 결론**
- [1092] BNT142의 PK는 두 부분으로 나눌 수 있다:
- [1093] • BNT142의 PK: IV 주사 후 RNA-LNP는 4시간 이내에 전신적으로 분포되어 RNA 전달대상물을 의도한 표적 기관인 간으로 전달한다.
- [1094] • BNT142 암호화 이중특이적 항체 RiboMab02.1의 PK: 간 세포로 전달된 후 RNA가 번역되고 암호화된 RiboMab02.1 단백질이 순환계로 방출된다.
- [1095] 첫 번째 부분을 조사하기 위해 방사성 표지 지질을 함유한 LNP가 있는 마우스에서 생체분포 연구를 수행했다. LNP의 분포는 일반적으로 빨랐으며, 주사 후 4시간 이전에 대부분의 조직에서 최고 수준에 도달했다. 간은 주요 분포 기관이었고 그 다음이 비장이었으며, 여기서 LNP의 일부만 분포되어 있었고 다른 조직에는 분포가 최소화되거나 전혀 관찰되지 않았다. 간에서의 표적화된 RNA 번역은 마우스에 LNP-제형 루시페라제(Luc)-암호화 RNA를 투여한 후 생체내 영상화를 통해 나타났다. 주사 후 최대 144시간 동안 간에서 Luc 번역(생물발광)이 관찰된 반면, 비장은 10배 낮은 신호 강도를 나타냈다.
- [1096] 랫트 IV PK 연구에서, 2주 연구 동안 혈장 내 PEG 지질(ALC-0159)의 농도가 약 8,000배 감소했다. 혈장 내 겔보 기 말단 $t_{1/2}$ 은 ALC-0159의 경우 72.7시간이었고, 이는 처음에 LNP를 제거하기 위해 혈장으로 다시 흡수한 조직으로부터의 지질 재분배를 나타내는 것으로 보이며, 대부분 대변에서는 변하지 않았다. 시험관 내에서 ALC-0159는 아미드 작용기의 가수분해 대사에 의해 천천히 대사되는 반면, 비천연 아미노 지질(ALC-0366)에 대한 시험관 내 대사 연구는 모든 종과 검사 시스템에서 안정성을 나타냈다.
- [1097] BNT142 암호화 이중특이적 항체 RiboMab02.1의 PK 매개변수는 마우스에서의 반복 투여 연구 및 혈청 내 번역된 RiboMab02.1의 정량화를 통한 NHP에서의 단일 투여 연구를 통해 결정되었다.
- [1098] BNT142를 매주 투여한 마우스에서 용량 의존적 RiboMab02.1 혈청 농도가 검출가능했다. 30 μ g(~1.2mg/kg) 용량 코호트에서 5차 투여 후 46 μ g/mL의 C_{max} 에 도달하여 RiboMab02.1 노출 회복이 확인되었다.
- [1099] NHP에 대한 단일 투여 PK 연구에서, RiboMab02.1은 투여 후 6시간에 중앙값 t_{max} (마우스에서 관찰됨) 및 0.15mg/kg BNT142(검사된 최고 용량)를 투여 후 평균 C_{max} 가 155ng/mL인 용량 의존적 발현을 나타냈다. RiboMab02.1은 투여 후 7일의 연구가 끝날 때까지 NHP에서 검출 가능했다.
- [1100] 요약하면, 마우스 및 NHP에서의 PK 데이터는 BNT142 용량 의존적이지만 용량 비례적이지는 않은 RiboMab02.1의 노출을 입증했다. 피크 RiboMab02.1 농도는 투여 후 6시간에 도달했고, 그 이후에는 감소했다. RiboMab02.1의 비임상 유효 반감기는 27 내지 37시간이므로 인체에서 항체가 완전히 제거되는 데는 약 5번의 반감기(~135 내지 185시간 또는 6 내지 8일)가 소요될 것으로 예상된다. 따라서, 매주 투여는 q1w 임상 치료 간격 전체에 걸쳐 생물학적 활성을 부여하는 RiboMab02.1 혈장 수준을 유지하게 도울 것이다.
- [1101] 2.3 독성
- [1102] RNA-LNP 매개 효과를 평가하는 비임상(면역) 독성학 프로그램은 인간 세포와 혈액 성분을 사용한 시험관 내 연구, 마우스와 시노물구스 원숭이를 대상으로 한 생체 내 연구 등 플랫폼 접근 방식을 사용했다.

- [1103] 마우스를 대상으로 한 비-GLP 단일 용량 독성 연구에서, 최대 4mg/kg의 RNA-LNP 용량이 허용되었다.
- [1104] 연구 결과에는, 임상 관찰(입모 및 탈수), 최소 체중 감소 및 체중 증가 지연, 간 트랜스아미나제의 적은 증가, 비장 중량 증가, 최소 내지 경미한 간의 혼합 백혈구 침윤(간 손상 최소화화 및 일치), 경미한 염증 반응이 포함되었다. 모든 효과는 28일 이내에 되돌릴 수 있었다.
- [1105] 반복 투여 독성 연구에서 최대 ~5 mg/kg의 RNA-LNP 투여량은 마우스에게 허용되었다. 연구 결과에는 음식 섭취의 소폭 감소, 총 백혈구의 일시적인 감소, 일시적인 알칼리성 포스파타제 및 간 효소 상승이 포함되었다. 또한, 5 mg/kg 용량에서 간의 가역적인 미세한 변화와 함께 신장 및 간 중량의 증가가 관찰되었으며, 비장의 골수의 조혈 및 동맥주위 림프초의 림프 증식도 나타났으며, 이는 또한 비장 중량의 증가와 관련이 있었다. 이러한 변화는 개선되었으며 대부분의 경우 2주간의 회복 기간 후에 완전히 역전되었다.
- [1106] 최대 0.15 mg/kg BNT142의 단일 용량을 검사한 NHP의 비-GLP PK/내약성 연구에서 어떤 매개변수에서도 변화가 관찰되지 않았다.
- [1107] 면역독성 평가에서, ~1.5 mg/kg 및 ~5 mg/kg RNA-LNP는 마우스에 투여 후 6시간 동안 사이토카인(IFN- α , IFN- γ , IL-6 및 TNF- α)의 일시적인 상승을 유도했는데, 이는 반복 투여 후에 덜 두드러졌다. 최대 0.15 mg/kg의 단일 투여 후 사이노몰거스 원숭이의 생체 내에서 BNT142로 유발된 사이토카인 상승이 관찰되지 않았다. 인간 전혈을 사용한 시험관 내 연구에서, $\geq 4 \mu\text{g/mL}$ (인간 등가 용량 $\geq 0.32 \text{ mg/kg}$) 농도의 BNT142는 IFN- γ , IL-1 β -, IL-2, IL-6, IL-8 및 TNF- α 의 분비를 유도했다. 보체 시스템의 RNA-LNP 활성화는 최대 40 $\mu\text{g/mL}$ (3.2mg/kg의 인간 등가 용량)의 농도에 대해 시험관 내에서 관찰되지 않았다.
- [1108] **RiboMab02.1의 안전성 연구를 위한 관련 종의 선택**
- [1109] ICH S6(R1)에 따르면 관련 종은 검사 물질이 약리학적으로 활성을 갖는 종이다. RiboMab02.1 이중특이적 항체의 약리학적 활성은 각 종의 T 세포에 대한 CD3 수용체의 결합과 종양 표적 에피토프(CLDN6)의 발현을 필요로 한다. 그러나 RiboMab02.1의 항-CD3 부분은 인간 영양류를 제외한 다른 종의 CD3에 교차 반응하지 않는다.
- [1110] RiboMab02.1의 안전성 프로파일을 적절하게 포착할 수 있는 적합한 검사 종이 없기 때문에, 항체에 대한 동물에서의 안전성 연구는 수행되지 않았다. 대신, 상술한 시험관 내 안전성 연구는 CLDN6 모 항체 IMAB206-C46S 또는 RiboMab02.1과 동일한 재조합 참조 단백질을 사용하여 수행되었다.
- [1111] **RNA-LNP 의약품의 비임상 안전성 평가**
- [1112] 일부 RNA-LNP 안전성 연구에서는 BNT142와 LNP 지질 조성은 동일하지만 RNA가 다른 의약품이 사용되었다. RNA 서열이나 길이에서의 차이가 RNA-LNP 매개 안전성 프로파일에 큰 영향을 미칠 것으로 예상되지 않기 때문에, 그 결과는 BNT142의 RNA-LNP 매개 독성을 대표하는 것으로 간주된다. 이 플랫폼 독성 평가 접근 방식은 이전에 승인되었다.
- [1113] **단일 용량 독성**
- [1114] 비-GLP 단일 용량 독성 연구가 수컷 및 암컷 CD-1 마우스에서 수행되었다. 이 연구는 1 내지 4mg/kg의 RNA-LNP 용량의 잠재적 독성을 특성화하고, RNA-LNP의 독성을 각 대조 항목(즉, 빈 LNP)과 비교하여 LNP 매개 독성을 확인하고, 4주간의 관찰 기간(29일에 종료) 후에 RNA-LNP의 가역성, 진행 및/또는 잠재적인 지연 효과를 평가했다.
- [1115] 마우스는 1일차에 단일 IV 용량의 RNA-LNP 또는 대조 항목(식염수 또는 빈 LNP)을 투여받았다. 동물은 3일차(주 동물) 또는 29일차(회복 동물)에 안락사되었다. 연구 엔드포인트는 사망률, 임상 관찰, 체중 변화, 임상 병리학, 부검 관찰, 장기 중량 및 조직병리학(간, 비장 및 위)을 포함했다.
- [1116] 수컷 및 암컷 CD-1 마우스에서는 최대 4mg/kg의 RNA-LNP의 단일 용량이 허용되었다. 연구 결과에는 임상 관찰(입모 및 탈수), 최소 체중 감소 및 체중 증가 지연이 포함되었다. 3일차에 간 트랜스아미나제(알라닌 트랜스아미나제[ALT] 및/또는 아스파르테이트 트랜스아미나제[AST])의 적은 증가, 비장 중량 증가, 4mg/kg을 투여받은 단일 암컷의 간이 창백해지고, 최소한의 간의 혼합 백혈구 침윤(간 손상 최소화화 및 일치), 및 가벼운 염증 반응이 감지되었다. 성별에 따른 조사 결과에는 차이가 없었다. 모든 효과는 29일에 전체 또는 부분 회복의 증거를 보여줬는데, 이는 간의 혼합 백혈구 침윤으로 입증되었으며, 이는 경미한 염증 반응이 지속적으로 해결되었음을 나타낸다.

[1117] 반복 투여 독성

[1118] LNP 및 RNA 매개 독성을 평가하는 GLP-준수 플랫폼 반복 투여 독성 연구가 수컷 및 암컷 Balb/cJrj 마우스에서 수행되었다. 이 연구에서는 ~1.5 및 ~5mg/kg의 4주 간격 RNA-LNP 용량의 잠재적 독성을 특성화하고, RNA-LNP의 독성을 각 대조 항목(즉, 빈 LNP)과 비교하여 LNP 매개 독성을 확인하고, 2주 관찰 기간 후 RNA-LNP의 가역성, 진행 및/또는 잠재적인 지연 효과를 평가했다. 검사된 RNA-LNP 용량(최대 5mg/kg)은 예상되는 임상 용량(0.00005mg/kg 내지 0.15mg/kg)을 30 내지 30,000배 초과한다. GLP-준수 마우스 독성 연구에서 최고 용량(100 µg/동물은 ~5mg/kg에 해당)은 IV로 전달될 수 있는 최대 실행 가능 용량 및 농도를 기준으로 최대 실행 가능 용량으로 간주되었다.

[1119] 매주 4회 RNA LNP의 IV 주사 처리가 마우스에서 동물당 30 및 100 µg(각각 ~1.5 및 ~5mg/kg)의 용량으로 허용되었다. 고용량 그룹에서 동물은 일시적으로 음식 섭취를 감소한 것으로 나타났다(수컷의 경우 -8.2%, 암컷의 경우 -13.6%). 그러나 이러한 음식 섭취의 변화가 체중 감소로 이어지지는 않았다. 치료기간이나 회복기간 동안 사망은 관찰되지 않았다.

[1120] 주요 연구 동물의 경우 세 번째 투여(검사 16일차) 24시간 후, 회복 동물의 경우 마지막 처치(검사 30일차) 1주 후 혈액학적 매개변수를 평가했다. 30 µg(~1.5mg/kg) 또는 100 µg(~5mg/kg) RNA LNP로 처리하면 검사 16일차에 총 백혈구가 감소했다(수컷에서는 각각 -59% 또는 -62%, 그리고 암컷에서는 각각 -67% 또는 -74%). 이는 주로 림프구의 상당한 감소에 기인하였다(수컷의 경우 각각 -67% 또는 -72%, 암컷의 경우 각각 -74% 또는 -79%).

[1121] 빈 LNP로 처리한 동물에서도 백혈구(수컷 -24.1%, 암컷 -37.4%)와 림프구(수컷 37.2%, 암컷 48.7%)에서 절대적인 수의 감소가 나타났다. 모든 변화가 가역적임을 나타내는 회복 동물에서는 혈액학적 매개변수의 검사 항목 관련 차이가 발견되지 않았다.

[1122] 마지막 투여 24시간 후(검사 23일차) 및 회복 기간 종료 시(검사 37일차)에 임상 화학을 평가했다. 검사 23일차에 30 µg(~1.5mg/kg)을 처리한 암컷 마우스에서 간 효소 ALT(+51%), AST(+45%) 및 젖산탈수소효소(LDH)(+69%)의 완전히 가역적인 상승이 관찰되었다. 이 용량 그룹에서는 생화학적 매개변수에 대한 다른 검사 항목 관련 차이가 나타나지 않았다. 고용량(100 µg, ~5mg/kg RNA LNP)에서는 처리된 암컷에서 간 효소(ALT, AST) 및 LDH의 상승이 관찰되었다(각각 +8,170%, +4,992% 및 +2,787%). 빈 LNP로 처리된 암컷에서도 간 효소 활성(ALT, AST) 및 LDH의 증가가 나타났다(+274%, +44% 및 +40%). 또한, 알칼리성 포스파타제(ALP)의 경우 이 그룹의 성별 모두에서 증가가 관찰되었다(남성 +39%, 여성 +93%). 회복 기간 내내 수준은 감소했지만 연구가 끝날 때 실험실 정상보다 여전히 상승했다(남성, +19%, 여성 +21%).

[1123] 또한, 검사 23일차에 수컷(+31%)과 암컷(+36%)의 글로불린 농도가 증가했다. 이에 따라 수컷(-15%)과 암컷(-21%)에서 알부민/글로불린 비율이 감소한 것으로 나타났다. 이러한 변화는 회복 기간이 끝날 무렵 진정되었다.

[1124] 4차 투여 약 24시간 후인 검사 23일차에 주요 연구 동물을 해부했다. 모든 회복 동물의 부검은 검사 37일차에 수행되었다. 주요 연구 종료 시, 두 용량 그룹의 일부 암컷 동물에서 비장이 비대해졌다. 이 효과는 비장 무게의 증가(수컷의 경우 +68%, 암컷의 경우 +99%)와 관련이 있다. 또한 부검 결과 한 암컷의 경우 창백한 간이 나타났고 다른 암컷의 경우 부분적으로 창백한 간이 나타났는데, 두 암컷 모두에게는 100 µg이 투여되었다. 이 고용량 그룹에서는 암컷 수컷 모두에서 간 증가(수컷 +17%, 암컷 +34%)와 신장 중량(수컷 +15%, 암컷 +18%)도 나타났다. 비장 및 간의 무게에 대한 영향은 회복 중에 완전히 보상되지 않았지만 다른 모든 영향은 사라졌다.

[1125] 조직병리학적 변화는 본 연구 종료 시 암컷의 간에서만 발견되었다(세포질 변화, 단핵 염증 세포 침윤, 다핵 거대 세포 및 괴사). 이러한 결과는 회복 기간 이후 하나의 암컷을 제외한 모든 암컷에서 완전히 가역적이었다. 암컷의 비장에서 골수외 조혈, 충혈, 색소 침착 및 동맥주위 림프초의 림프 증식을 포함하는 저용량 및 고용량 그룹 모두에서 완전히 가역적인 조직병리학 소견이 관찰되었다. 어느 시점에서든 수컷 동물에서는 조직병리학적 관찰이 이루어지지 않았다.

[1126] 시노물구스 원숭이를 대상으로 한 BNT142의 단일 투여 약동학 및 내약성 연구

[1127] 연구의 목적은 시노물구스 원숭이에게 1회 용량의 IV 투여 후 BNT142의 PK 및 내약성에 대한 정보를 획득하는 것이었다.

[1128] IV 볼루스 주사에 의한 BNT142의 단일 투여는 원숭이에서 최대 0.15 mg/kg의 용량까지 허용되었다. BNT142 투여와 관련된 조산, 체중의 임상 관찰 또는 변화, 체온, 혈압, 안과, 청각 검사, 심혈관 평가, 임상 병리학 매개변수(혈액학, 응고, 임상 화학 및 요검사) 또는 사이토카인의 변화가 없었다.

[1129] 면역독성 연구

[1130] 면역독성학적 매개변수는 2개의 독립형 연구(이하에서 설명됨)와 마우스의 GLP-준수 반복 투여 독성 연구 및 NHP의 단일 투여 PK 연구의 일부로 평가되었다. 마우스에서, 사이토카인 분석은 첫 번째 투여 후 6, 24, 48시간(검사 1, 2, 3일차)과 세 번째 투여 후 6, 24, 48시간(검사 15, 16, 17일차)에 수행되었다. IFN- α , IFN- γ , IL-6 및 TNF- α 는 검사 1일차 및 검사 15일차에 두 용량 그룹(~1.5 mg/kg 및 ~5 mg/kg)의 수컷 및 암컷 동물에서 투여 후 6시간에 일시적으로 상승했다. 반복 투여(검사 15일차) 후 상승 정도가 감소했다. IL-6 및 TNF- α 의 수준은 투여 후 24시간까지 완전히 감소한 반면, IFN- α 및 IFN- γ 의 수준은 투여 후 48시간까지 기준선으로 돌아왔다. IL-1 β , IL-2, IL-10 또는 IL-12p70의 상승은 어느 그룹에서도 관찰되지 않았다. NHP에서는 검사된 사이토카인 중에서 최대 0.15mg/kg을 투여한 후 6, 24 또는 48시간 후에 검사 항목과 관련된 사이토카인의 상승이 관찰되지 않았다. 전신 면역독성을 나타내는 임상 징후는 관찰되지 않았다.

[1131] 인간 혈청의 시험관 내 보체 활성화

[1132] 시험관 내에서 인간 보체를 활성화하는 의약품의 잠재력은 RNA-LNP 농도가 0.04 내지 40 μ g/mL(대표적인 용량은 ~0.003 내지 ~3.2 mg/kg)인 정상 인간 혈청의 인큐베이션을 통해 평가되었으며, 이는 예상되는 임상 노출을 포함한다. RNA-LNP와 함께 인큐베이션한 후에는 보체 활성화가 관찰되지 않았다.

[1133] BNT142에 의한 전혈 사이토카인 방출

[1134] BNT142를 전혈과 함께 인큐베이션한 후 전염증성 사이토카인(IFN- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-12p70, IP-10 및 TNF- α)의 분비를 평가했다. 검사된 희석 범위(0.0625 내지 64 μ g/mL)는 예상되는 의약품 농도(0.005 내지 5.12 mg/kg 용량과 동일)를 대표하며 이를 초과한다. 2 μ g/mL(인체 등가 용량 0.16mg/kg) 농도까지 검사 항목 관련 사이토카인 분비가 검출되지 않았다. 그 외에도 BNT142는 ≥ 4 μ g/mL 농도(인간 등가 용량 ≥ 0.32 mg/kg)의 농도에서 IL-1 β , IL-6, IL-8을 유도하고 ≥ 32 μ g/mL 농도(인간 등가 용량 ≥ 2.56 mg/kg)에서 IFN- γ , IL-2, TNF- α 분비를 유도했다.

[1135] 독성학 - 결론

[1136] BNT142의 독성 평가는 두 부분으로 나누어졌다. 한 부분은 암호화된 항체 RiboMab02.1의 시험관 내 안전성을 평가하는 부분으로, 이 화합물이 활성을 나타내는 약리학적 관련 종이 없기 때문이다. 대신 RNA-LNP는 여러 생체 내 및 시험관 내 연구에서 검사되었으며, 그 중 일부는 동일한 유형의 변형된 mRNA를 사용하지만 다른 서열(예: 루시퍼라제 암호화)을 사용하는 대리자를 사용했다. 이 접근 방식은 다른 경우에도 신뢰할 수 있는 것으로 입증되었다.

[1137] RNA-LNP의 안전성은 마우스와 원숭이를 대상으로 한 세 가지 생체 내 독성/내약성 연구에서 평가되었다. BNT142의 예상되는 상위 임상 용량 범위(0.015 내지 0.15mg/kg)에서는 NHP 내약성 연구에서 RNA-LNP 관련 효과가 관찰되지 않았지만, 마우스에서의 더 높은 단일 또는 다중 용량의 RNA-LNP(1 내지 ~5mg/kg)는 주로 용량 의존 방식으로 임상 병리학 매개변수, 장기 중량 및 조직병리학적 변화에 영향을 미쳤다. 이러한 효과는 종종 암컷 동물에서만 나타나거나 더 두드러졌다.

[1138] 암컷 수컷 모두에서 ~1.5 또는 ~5 mg/kg RNA-LNP를 반복적으로 투여한 후 림프구 수(따라서 백혈구 수)가 감소하고 글로불린 농도가 증가했다. 2mg/kg(암컷) 및 4mg/kg(남녀 모두)의 단일 용량은 최소한의 ALT 및 AST 상승을 유도했으며, 이는 ~1.5mg/kg 또는 ~5 mg/kg RNA-LNP의 다중 용량을 투여받은 암컷에서 반복 투여 후 LDH 상승과 함께 더욱 두드러지고 관찰되었다. 따라서 이러한 효과는 간 조직병리학(세포질 변화, 단핵 염증 세포 침윤, 다핵 거대 세포(들) 및 괴사)의 최소-경미(단일 투여) 또는 최소-현저한(반복 투여) 변화와 관련이 있었다. ~1.5mg/kg 또는 ~5mg/kg RNA-LNP를 반복적으로 투여한 암컷의 비장에서는 충혈, 골수외 조혈, 동맥주위 림프절 증식 또는 색소 침착과 같은 현미경적 변화도 나타났다. 수컷과 암컷 동물에서 간, 비장 및 신장의 중량 증가가 관찰되었으나, 다른 조직병리학적 관찰은 이루어지지 않았다. 상술한 효과의 대부분은 2 내지 3주 이내에 완전히 회복되었으나, 두 용량 그룹 모두에서 여전히 약간 상승한 ALP 수준과 더 높은 용량(단일 용량으로 ~4 mg/kg 또는 4회 연속 투여로 ~5mg/kg)으로 처리된 암컷에서의 일부 병리학적 변화가 예외였으나, 이것도 회복이 끝날 때까지 개선을 보였다.

[1139] 시험관 내에서 RNA-LNP의 면역독성학적 평가에서는 ~3.2 mg/kg의 인간 등가 용량까지 인간 보체의 활성화가 나타나지 않았지만, 0.3 mg/kg 이상의 인간 등가 용량에서는 의약품 농도 의존성 사이토카인 방출이 나타났다. 이러한 발견을 뒷받침하는 것은 GLP 독성 연구에서 마우스에 ~1.5 또는 ~5 mg/kg RNA-LNP를 투여한 후 가역적인

사이토카인 상승이 나타났지만, 반복 투여 후 사이토카인 상승 정도는 더 낮다는 것이다. NHP 내약성 연구에서는 상위 임상 용량 범위인 0.015 내지 0.15mg/kg BNT142를 단회 투여한 후에도 사이토카인 상승이 나타나지 않았다.

- [1140] 요약하면, 상기 논의된 비임상 독성 결과에 기초하여, 인간에게 처음으로 투여하는 용량 0.00005mg/kg(0.05 μ g/kg)은 합리적으로 안전한 것으로 간주되는 동시에 인간에서 RiboMab02.1의 약리학적으로 관련된 노출을 생성할 것으로 예상된다.
- [1141] **실시예 3: 생체내 발현된 RiboMab02.1은 고도로 단량체성이고 대체 리드 구조 후보 RiboMab_712/711 C53W보다 마우스에서 더 낮은 ADA 반응을 유도한다.**
- [1142] 모 항-CLDN6 VL(IMGT 번호매김에 따른 위치 53(C53)의 VL(CLDN6))의 유리 시스테인은, RiboMab02.1(각각 서열 번호 5 및 7의 mRNA 서열에 의해 암호화된 서열 번호 4 및 6)의 세린(C53S)으로 또는 RiboMab_712/711(각각 서열번호 32 및 34의 mRNA 서열에 의해 암호화된 서열번호 31 및 33)에서 트립토판(C53W)으로 치환되었다. 모 항-CLDN6 VL의 위치 53은 서열 번호 4 및 31의 위치 449에 해당하고, 서열번호 6 및 33의 위치 428에 해당한다. 또한 이는 VL(CLDN6)의 CDR1에 대해 위치 +15 및/또는 VL(CLDN6)의 CDR2에 대해 위치 -3에 해당한다.
- [1143] 리드 구조 변이체를 암호화하는 CD3x(CLDN6)₂ 둘 다가 단백질 응집 및 RiboMab 특이적 항-약물 항체(anti-drug antibody: ADA)의 유도와 관련하여 마우스에서 비교되었다.
- [1144] 4마리의 암컷 Balb/cJrj 마우스는 마우스당 30 μ g RNA-LNP(~1.4mg/kg)의 IV 단일 용량을 투여받았다. 혈청은 투여 전 그리고 투여 후 6, 24, 48, 96, 168, 216, 265 및 528시간(0.25 내지 22일)에 샘플링되었다.
- [1145] 주사 후 6시간에 얻은 혈청 샘플을 비환원 조건 하에서 웨스턴 블롯 분석으로 분석했다(도 13A; 각 그룹의 마우스 #4의 대표적인 웨스턴 블롯 이미지). 동일한 양의 Melon G 정제 혈청을 사용했다. C53W 치환을 보유하는 RiboMab_712/711은 발현 수준에 비해 C53S 변이체(RiboMab02.1)보다 더 많은 양의 HMW 종의 생산을 유도했다. RiboMab02.1에 대한 HMW는 생체 내에서 거의 검출되지 않았다. 약물 HMW 형성은 종종 증가된 면역원성과 상관관계가 있기 때문에 이는 중요한 차이점이다.
- [1146] 마우스 혈청 내 항-RiboMab02.1 및 항-RiboMab_712/711 약물 항체(ADA)는 Gyros Protein Technologies AB의 Gyros xPandome XPA1025 ELISA 장치를 사용하여 결정되었다. 샌드위치 면역분석법은 Gyrolab Bioaffy 200 CD에서 처리되었다.
- [1147] Anti-RiboMab ADA는 100 μ g/mL 비오틴화된 약물 항체를 사용하여 포착되었다. 혈청 ADA 수준은 25nM Alexa Fluor 647-접합 AffiniPure 염소 항-마우스 IgG, Fc 단편 특이적 항체를 사용하여 검출되었다. 데이터는 200-3W-002-A 방법을 사용하여 생성되었으며, 그 결과는 Gyrolab Evaluator 소프트웨어를 사용하여 분석되었다.
- [1148] 양성의 ADA 반응은 부동 컷 포인트에 따라 결정되었다. 따라서 컷 포인트는 음성 혈청(사전 출혈)의 반응과 정규화 인자(NF) + 평균 음성 대조군(NC)의 공식을 사용하여 계산되었다.
- [1149] NF = 음성 샘플의 X*SD; X = 1.645; SD = 음성 혈청(사전 채혈)의 표준 편차; NC = 3개의 음성 대조군(폴딩된 음성 혈청).
- [1150] 데이터(도 13B)는 RiboMab02.1의 더 높은 단량체 함량(도 13A)과 일치하여, RiboMab_712/711에 비해 마우스에서 RiboMab02.1의 더 낮은 면역원성 잠재력을 나타낸다. 면역원성은 발현 수준과 긴밀한 상관관계가 없기 때문에, 낮은 면역원성은 발현 수준의 차이로 설명할 수 없다.
- [1151] 결론적으로, RiboMab02.1 서열 모두에서와 같이 유리 시스테인 C53을 세린으로 치환하면, RiboMab_712/711의 두 서열에서와 같이 트립토판으로의 치환과 비교하여 더 낮은 수준의 HMW 형성 및 ADA 유도가 발생한다.
- [1152] **실시예 4: RiboMab02.1-암호화 약물 물질 중간체의 1.5:1의 HC:LC 중량비는 고단량체 RiboMab02.1의 효율적인 발현을 가져온다.**
- [1153] HEK-293T-17 생산자 세포를 1:1, 1.25:1, 1.5:1, 1.75:1, 2:1, 2.25:1, 2.5:1 및 2.75:1(총 RNA 농도: 100 μ g/mL RNA; 총 부피: 250 μ L)의 HC:LC 중량비로 HC- 및 LC-암호화 약물 물질 중간체(RNA)로 전기천공하여 형질감염시켰다. 본 실시예에 사용된 HC- 및 LC-암호화 약물 물질 중간체(RNA)(각각 서열번호 5 및 7)는 RiboMab02.1 서열번호 4 및 6의 두 개의 폴리펩티드를 암호화한다. 두 개의 폴리펩티드는 각각 CD3을 표적으로 하는 모 항체의 중쇄 및 경쇄로부터 유래된 가변 영역을 포함하기 때문에 여기서 HC 및 LC로 지칭된다. RiboMab02.1의 폴리

펩티드 중 어느 것도 항체의 전체 중쇄 또는 경쇄를 포함하지 않는다.

[1154] 세포 배양 상청액(SN) 샘플을 웨스턴 블롯(WB)에 적용하고 형질감염 48시간 후 ELISA 분석을 수행했다 (도 14).

[1155] WB 분석(도 14A)의 경우, SN 샘플을 단백질 변성을 위해 열처리한 후 비환원 조건 하에서 SDS-PAGE를 수행했다. 참조 트리바디 단백질의 두 가지 제제가 양성 대조군으로 사용되었다: 하나는 0.23% 고분자량(HMW; 단량체 참조) 중을 포함하고 다른 하나는 96.5% HMW(HMW 참조) 중을 포함한다. SDS-PAGE에 의해 분리된 단백질을 밴드를 니트로셀룰로오스 막에 블롯팅하고 각각 카파 경쇄 또는 IgG Fd 영역을 표적으로 하는 두 개의 HRP-접합 염소 항-인간 검출 항체의 조합과 함께 배양했다. 이어서, 블롯팅된 막을 화학발광 시약으로 현상하고, 4초 동안 노출시켰다. 이후 이미지를 소프트웨어로 분석하여 개별 밴드의 신호 강도와 백분율 비율을 정량화했다 (표 5). 저분자량(LMW) 중을 특징으로 하는 유리 LC 형태는 검사된 모든 SN 샘플에서 일관되게 낮았다. 단량체 함량은 전체적으로 높았으며(>90%) HMW 중(주로 200kDa의 HC 이량체)은 검사된 HC:LC RNA 비율에서 2.4%에서 9.1% 사이로 다양했다.

[1156] 샌드위치 면역검정에 의한 RiboMab02.1 정량을 위해, 2개의 독립적인 실험에서 얻은 기술적 중복의 SN 샘플을 각각 포획 및 검출을 위해 비오티닐화 또는 AlexaFlour647-접합 염소 항-마우스 IgG 항체를 사용하는 Gyros xPand™ XPA1025 ELISA 장치를 사용하여 분석했다. 검정은 Gyrolab Bioaffy 20 HC CD에서 수행되었다. 데이터는 Gyrolab huIgG - High Titer 방법 v2를 사용하여 생성되었으며, 그 결과는 Gyrolab Evaluator 소프트웨어를 사용하여 평가되었다.

[1157] 결과(도 14B)는 HC-암호화 RNA 함량이 ELISA에 의해 검출된 단량체 RiboMab의 양과 역의 상관관계에 있음을 보여준다. 따라서, 1.25:1 및 1.5:1의 HC:LC RNA 비율은 SN에서 가장 높은 RiboMab 농도(~3.5 µg/mL)를 산출했으며, 용량 의존 방식에서는 2.75:1의 HC:LC 비율은 가장 낮은 농도의 RiboMab02.1(~2.0 µg/mL)를 산출했다. 1.5:1의 HC:LC RNA 비율은 가장 유리한 RiboMab02.1 수율-HMW 함량을 나타내기 때문에 RiboMab02.1-암호화 약물 물질 및 약물 제품의 다운스트림 개발을 위해 선택되었다 (표 7).

[1158] **표 7: 다양한 RiboMab02.1-암호화 약물 물질 중간 비율의 형질감염 후 RiboMab2.1 농도 및 단량체 함량**

표 7

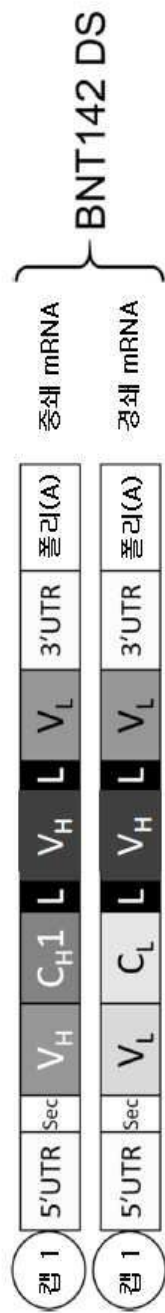
[1159]

RiboMab02.1-암호화 HC:LC RNA 중량비	RiboMab02.1			
	농도, 평균 ± SD (µg/µL)	단량체 (%)	HMW (%)	LMW (%)
1:1	3.21 ± 0.11	90.7	9.1	0.3
1.25:1	3.45 ± 0.34	93.4	6.3	0.3
1.5:1	3.52 ± 0.48	94.8	4.9	0.3
1.75:1	2.86 ± 0.44	94.8	4.8	0.4
2:1	2.53 ± 0.36	96.0	3.7	0.3
2.25:1	2.06 ± 0.11	96.6	3.1	0.3
2.5:1	2.07 ± 0.19	96.6	3.1	0.3
2.75:1	1.74 ± 0.07	97.3	2.4	0.3

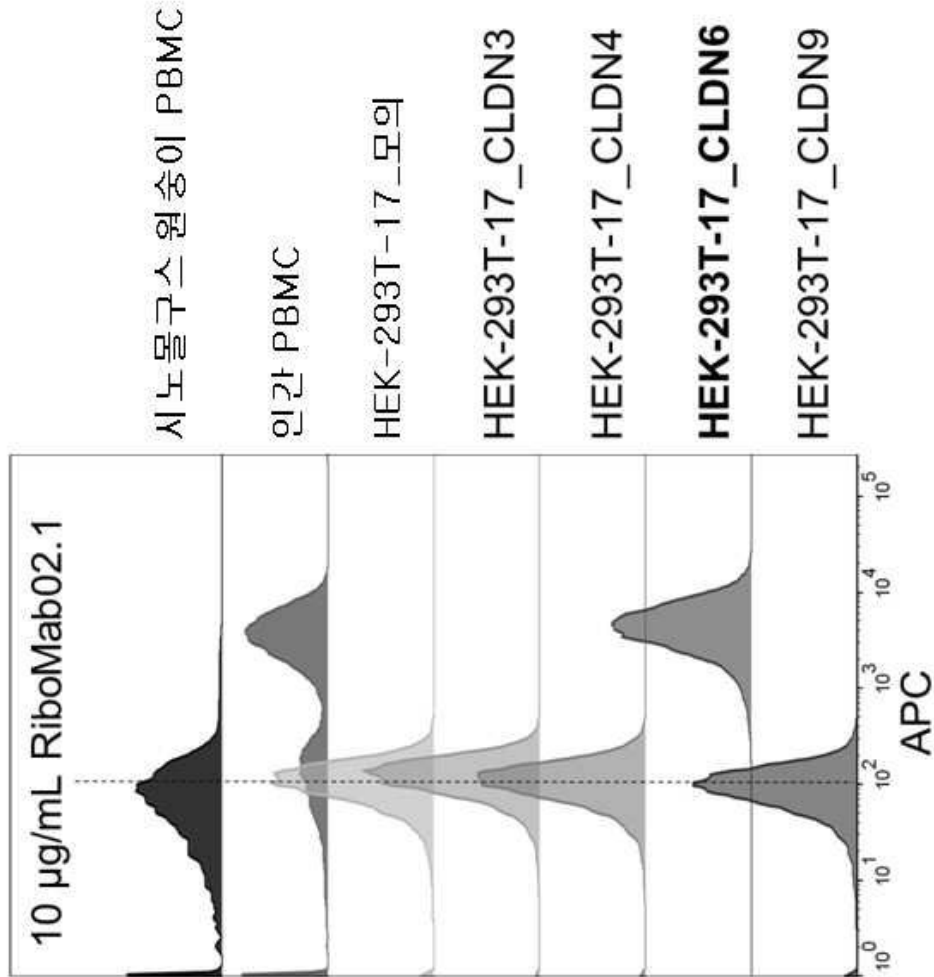
[1160] 추가 개발을 위해 선택된 HC:LC RNA 비율은 굵은 문자로 표시된다. LC = 경쇄; LMW = 저분자량; HC = 중쇄; HMW = 고분자량; SD = 표준편차

도면

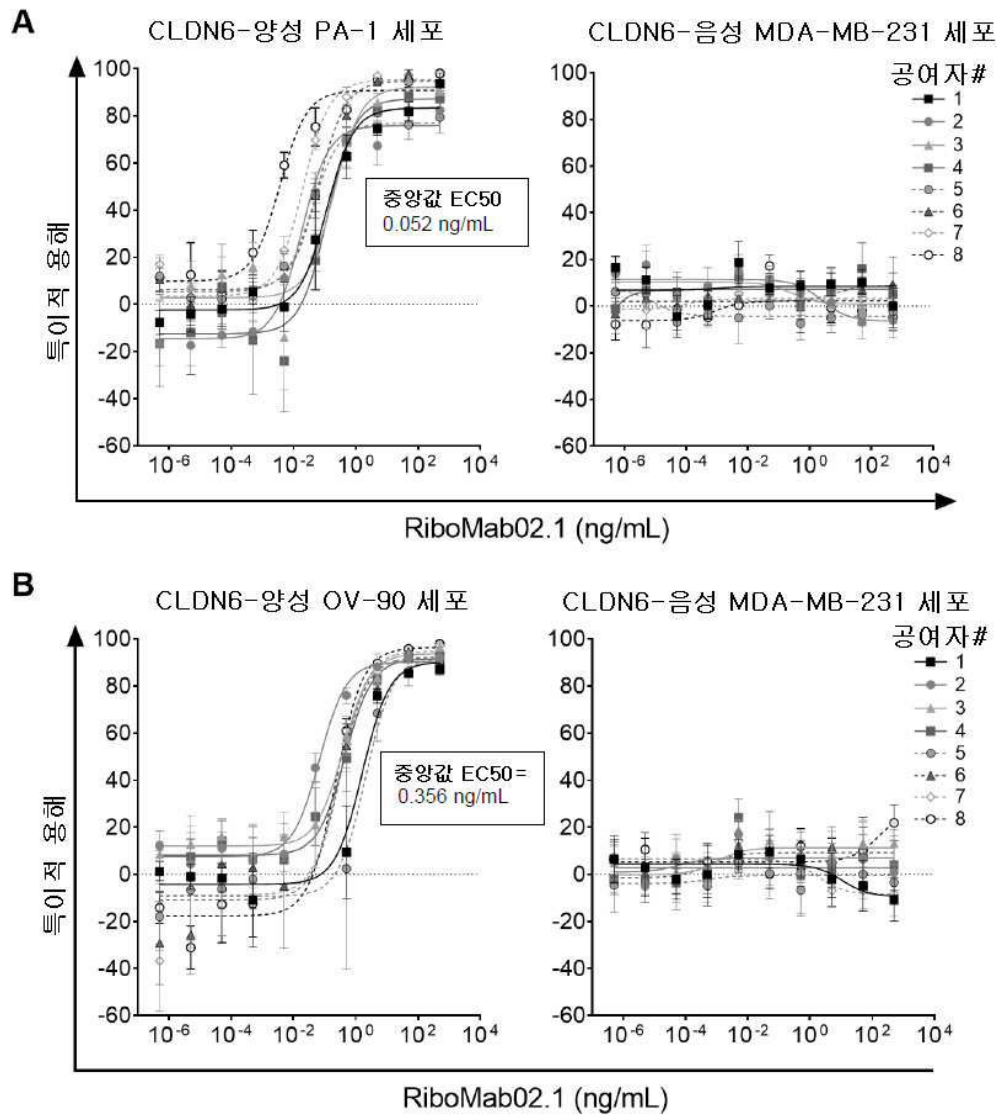
도면1



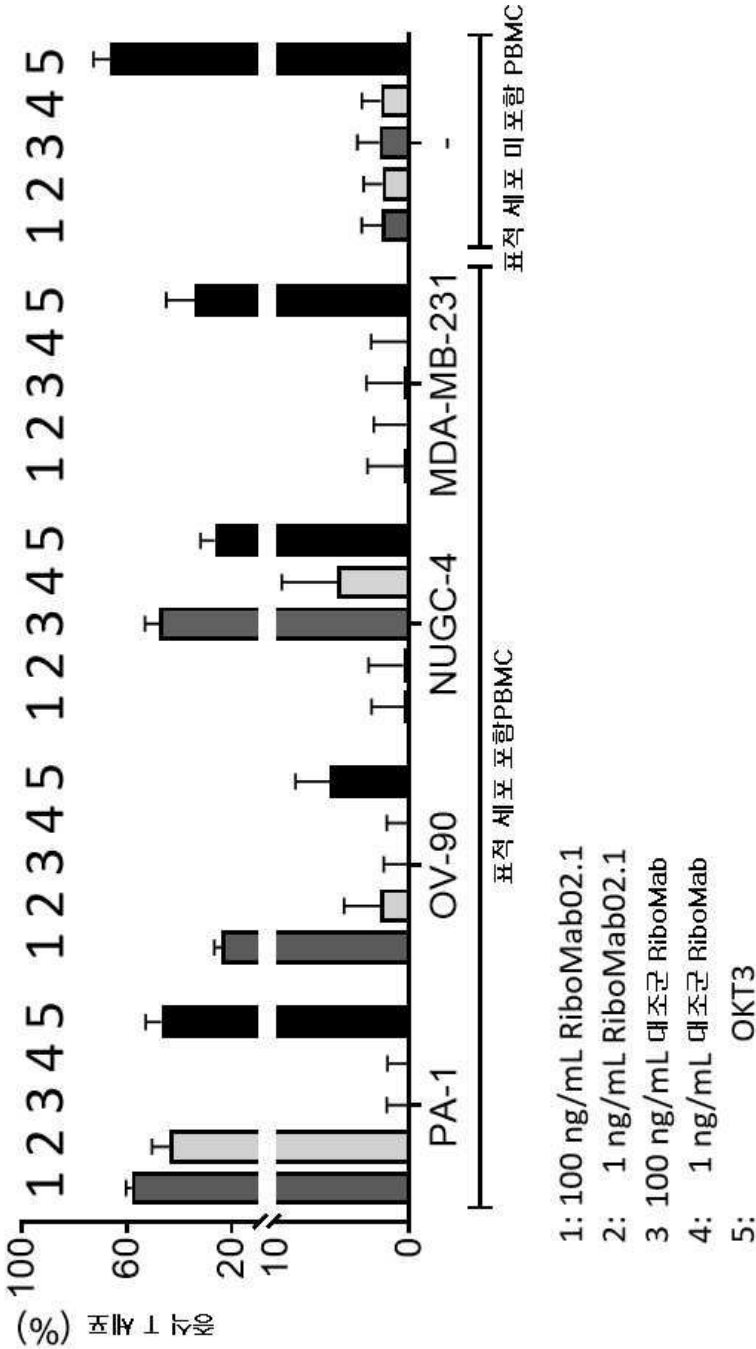
도면2



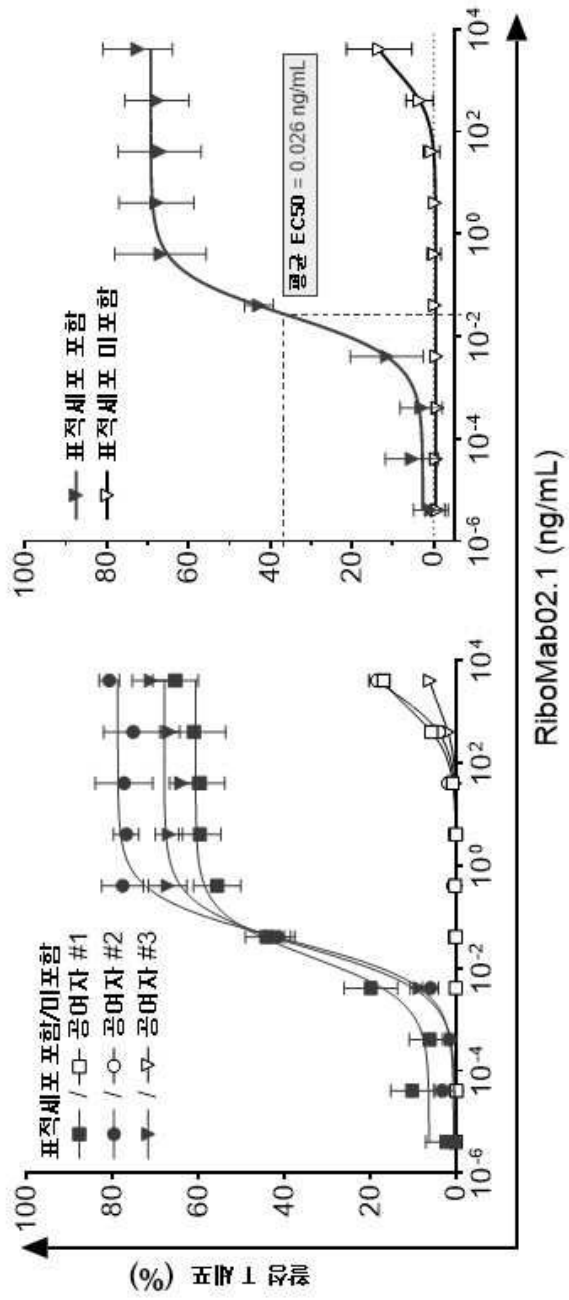
도면3



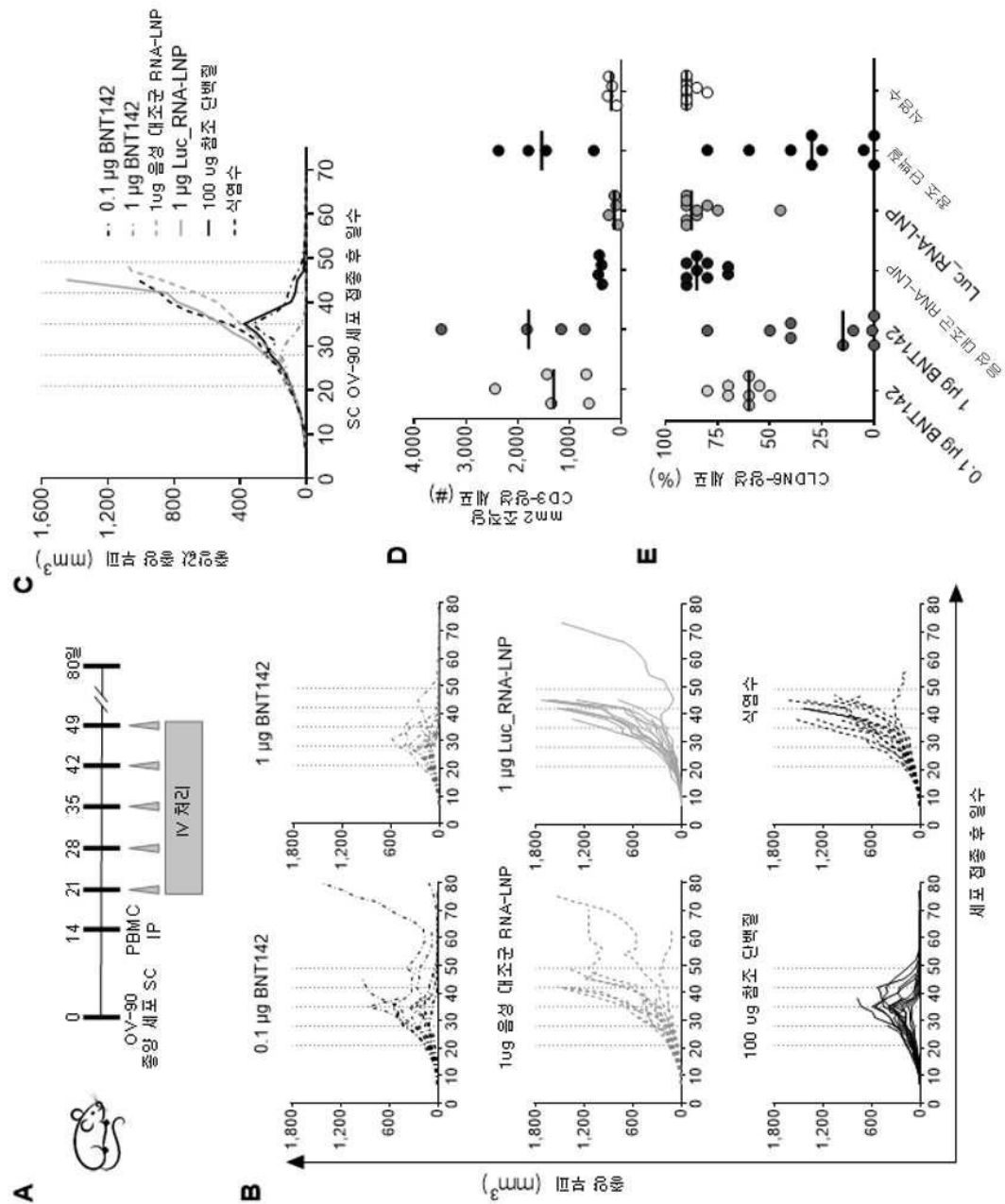
도면4



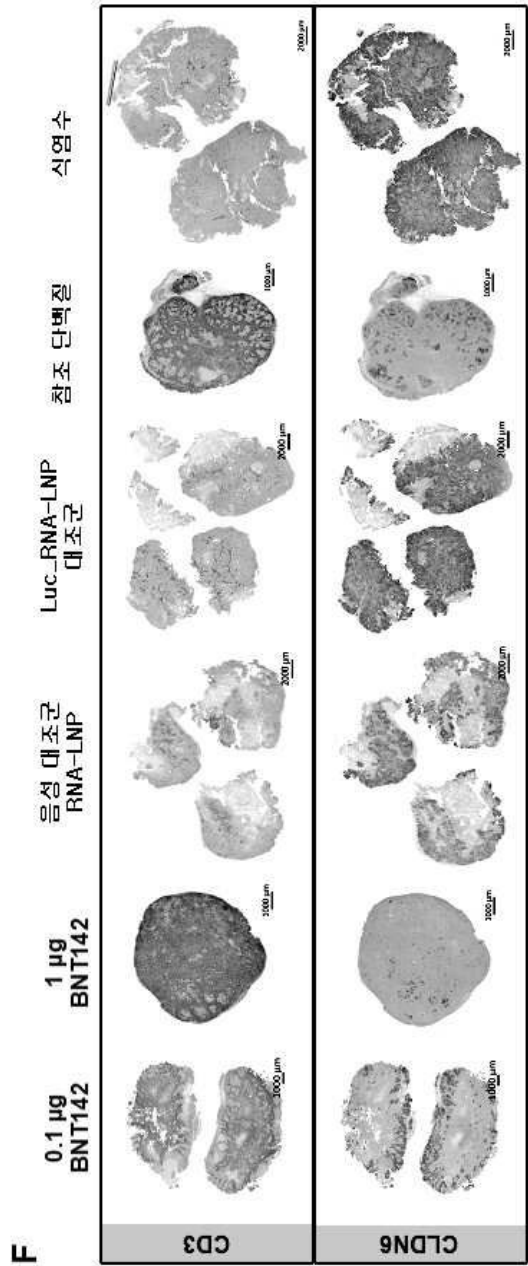
도면5



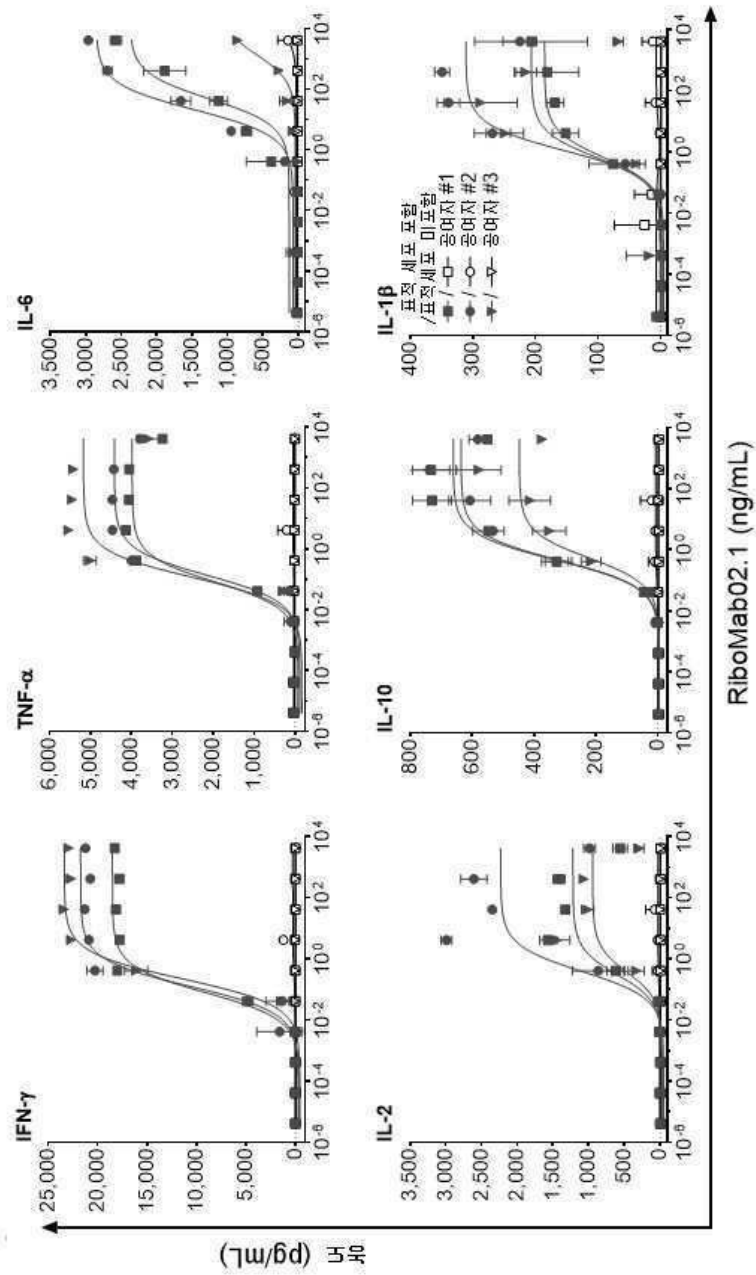
도면6a



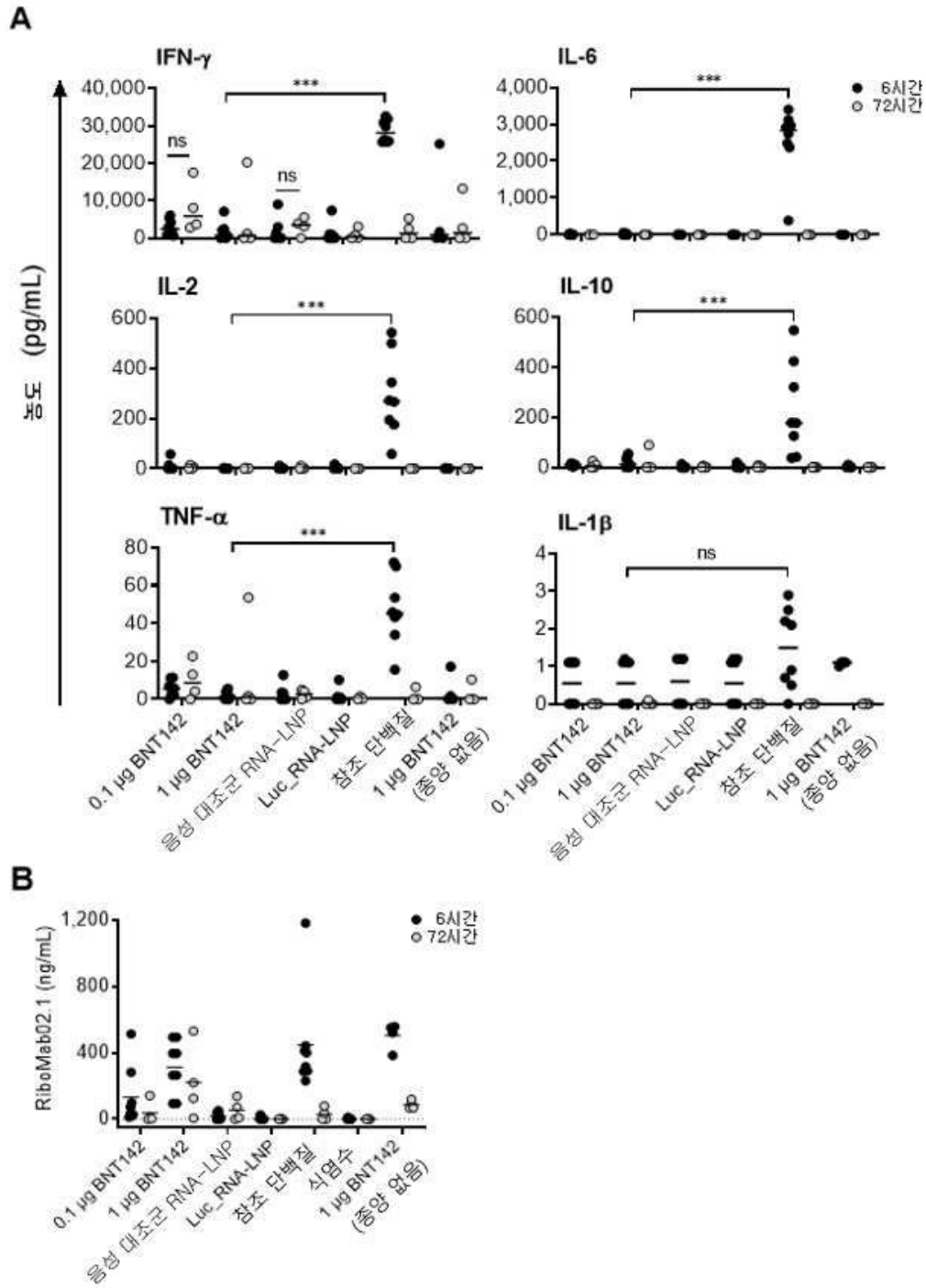
도면6b



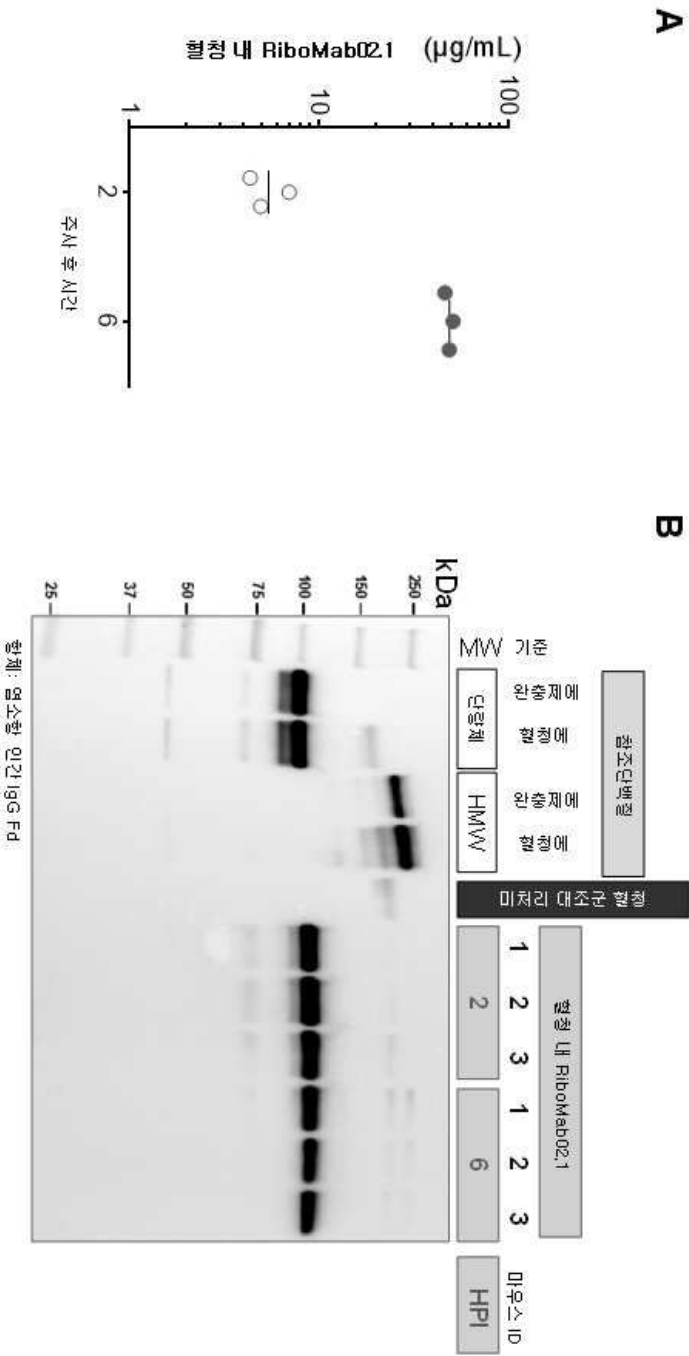
도면7



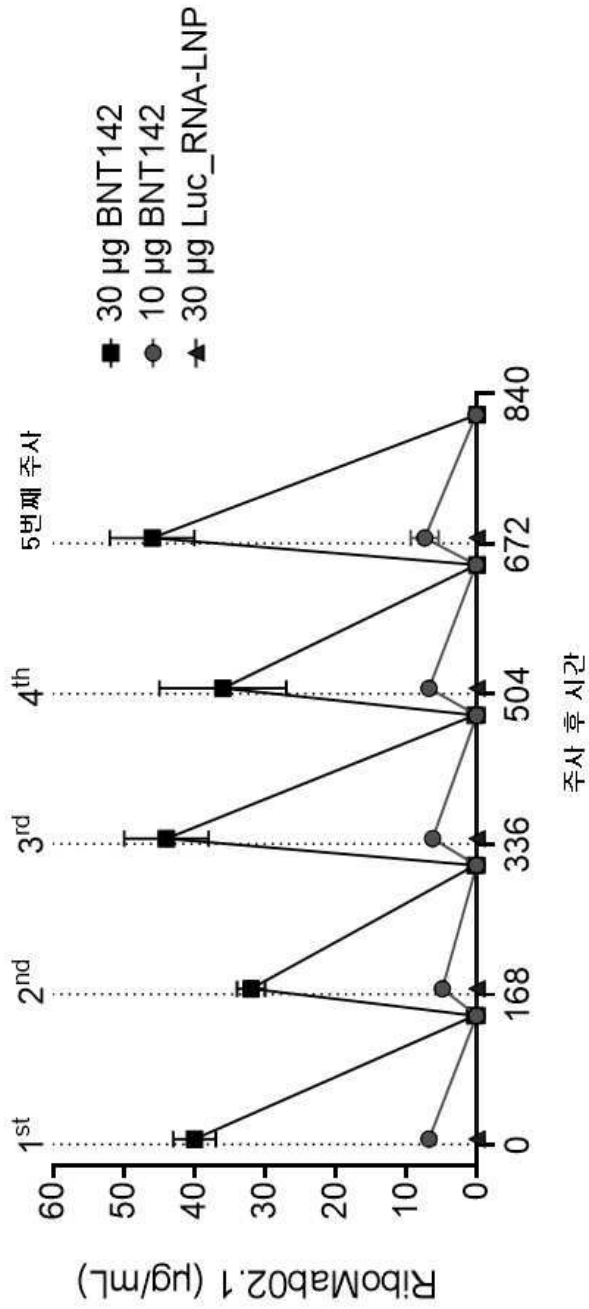
도면8



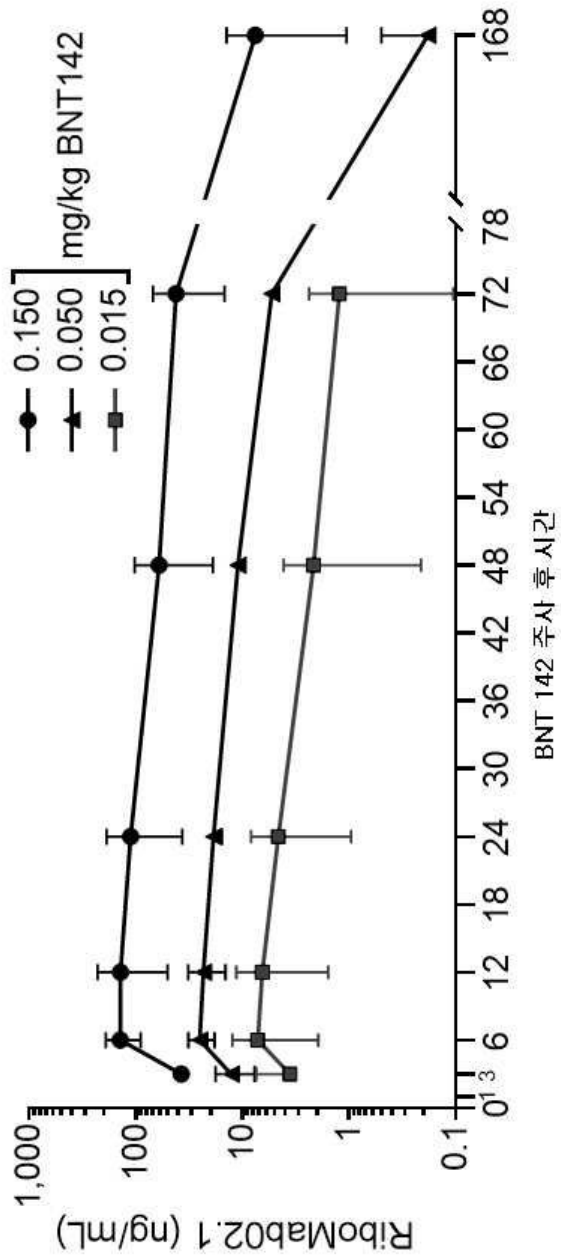
도면10



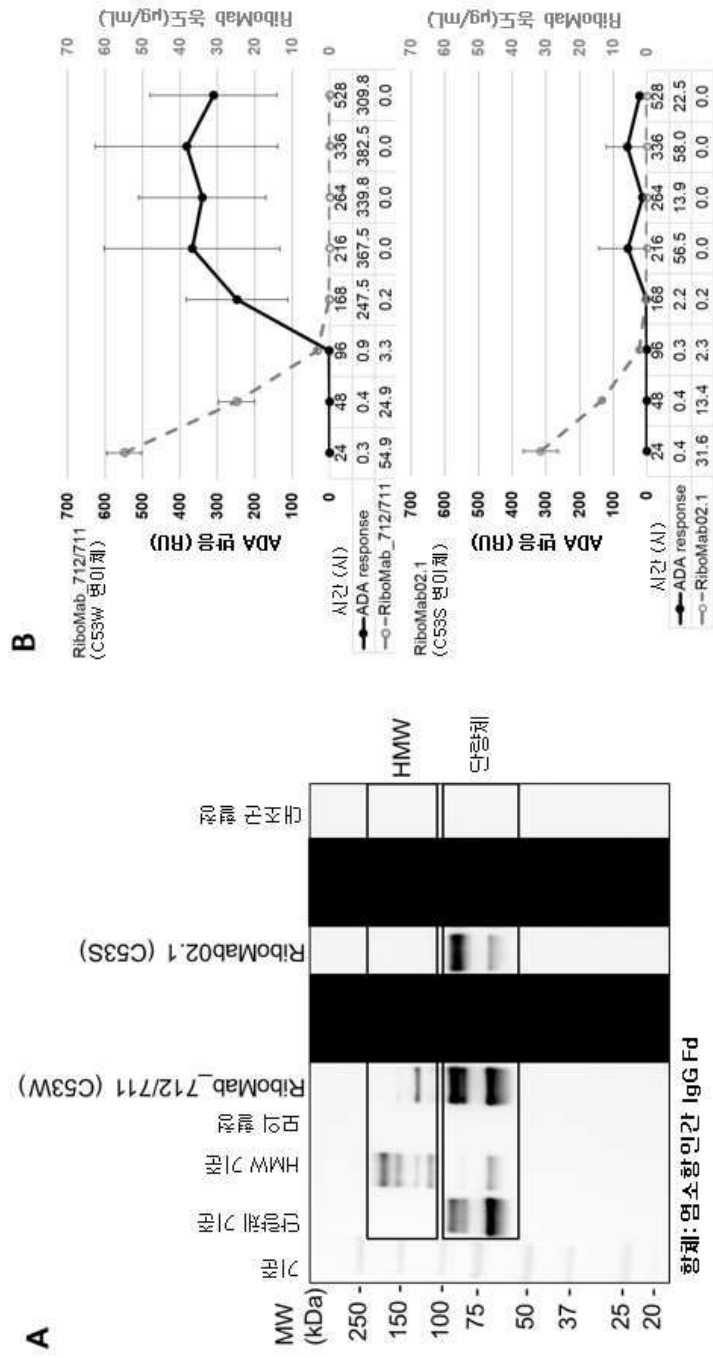
도면11



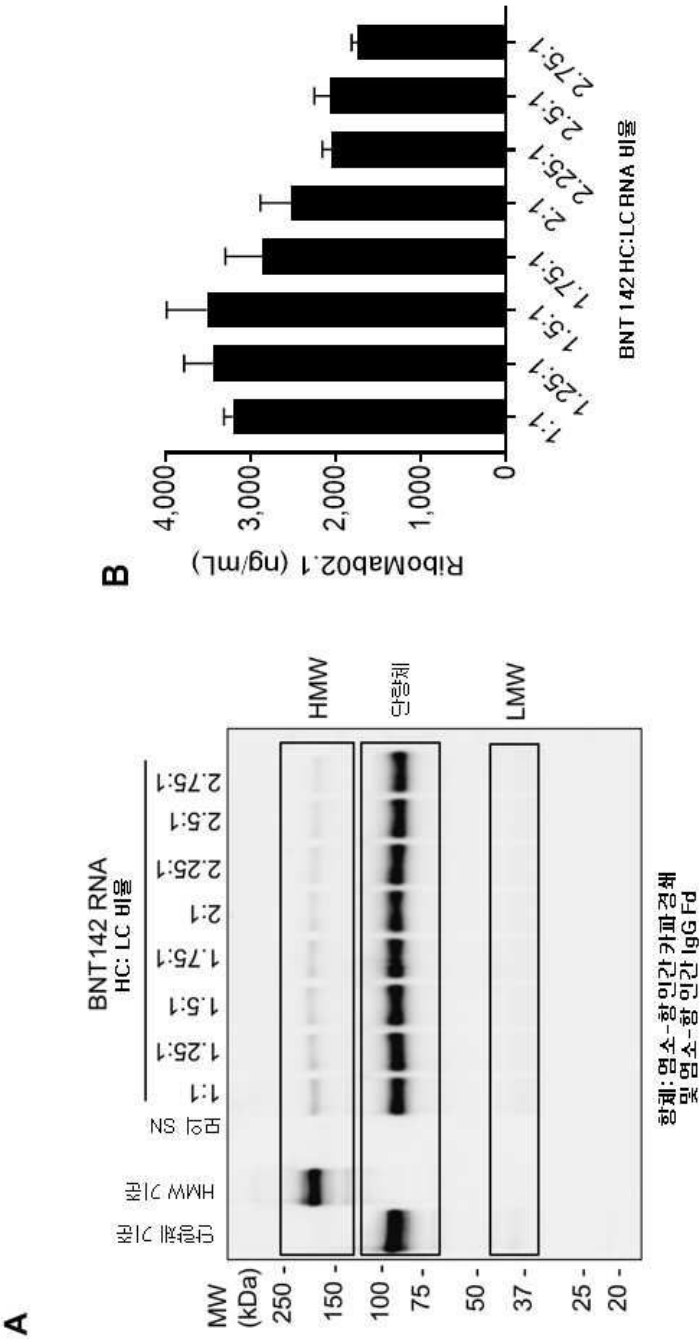
도면12



도면13



도면14



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

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