



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0023373
(43) 공개일자 2025년02월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 39/39 (2006.01) A61K 31/4745 (2006.01)
A61K 38/45 (2006.01) A61K 39/12 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) A61P 31/04 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01) C12N 15/88 (2017.01)
C12N 9/12 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 39/39 (2013.01)
A61K 31/4745 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2024-7041462

(22) 출원일자(국제) 2023년05월12일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2024년12월13일

(86) 국제출원번호 PCT/US2023/066974

(87) 국제공개번호 WO 2023/220746

국제공개일자 2023년11월16일

(30) 우선권주장

63/341,987 2022년05월13일 미국(US)

(71) 출원인

코너 테라퓨틱스, 인크.

미국 02472 메사추세츠 워터타운 노스 비컨 스트리트 300 빌딩 39 스위트 202

(72) 발명자

고셀린, 에밀리

미국 02472 메사추세츠 워터타운 노스 비컨 스트리트 300 빌딩 39 스위트 202 코너 테라퓨틱스, 인크. 내

지바키, 다니아

미국 02472 메사추세츠 워터타운 노스 비컨 스트리트 300 빌딩 39 스위트 202 코너 테라퓨틱스, 인크. 내

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

양영준, 이상남

전체 청구항 수 : 총 68 항

(54) 발명의 명칭 구성적으로 활성인 시클릭 GMP-AMP 신타제를 코딩하는 mRNA 및 이를 위한 지질 전달 비히클

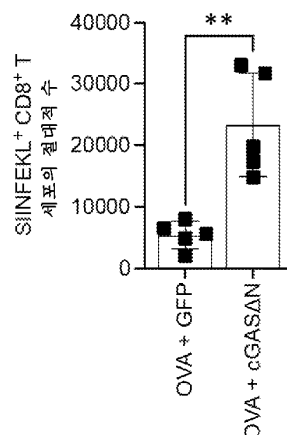
(57) 요약

본 개시내용은 포유동물 대상체의 세포에서의 구성적으로 활성인 시클릭 GMP-AMP 신타제의 발현을 위한 조성물 및 mRNA 백신의 면역원성을 증진시키기 위한 그의 용도에 관한 것이다. mRNA는 지질 나노입자 (LNP)에 캡슐화될 수 있거나 또는 지질과 복합체화될 수 있다 (RNA-리포플렉스). 본 개시내용은 또한 병원체 인식 수용체 효능제를 추가로 포함하는 조성물에 관한 것이다.

대표도

도 11D

맞춤형 지질 믹스 LNP



(52) CPC특허분류

A61K 38/45 (2013.01)
A61K 39/12 (2013.01)
A61K 48/0033 (2013.01)
A61P 31/04 (2018.01)
A61P 31/14 (2018.01)
A61P 35/00 (2018.01)
A61P 37/00 (2018.01)
C12N 15/88 (2013.01)
C12N 9/1241 (2013.01)

(72) 발명자

차우, 조나단

미국 02472 메사추세츠 워터타운 노스 비컨 스트리트 300 빌딩 39 스위트 202 코너 테라퓨틱스, 인크. 내

니키포로브, 아나스타사

미국 02472 메사추세츠 워터타운 노스 비컨 스트리트 300 빌딩 39 스위트 202 코너 테라퓨틱스, 인크. 내

생업타, 데브루프

미국 02472 메사추세츠 워터타운 노스 비컨 스트리트 300 빌딩 39 스위트 202 코너 테라퓨틱스, 인크. 내

명세서

청구범위

청구항 1

지질 나노입자 (LNP)에 캡슐화된 mRNA를 포함하는 조성물로서, 여기서 mRNA는 구성적으로 활성인 시클릭 GMP-AMP 신타제 (cGAS)의 코딩 영역을 포함하고, LNP는 인지질, 및 이온화가능한 지질, 폐길화 지질, 구조적 지질, 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 지질을 포함하는 것인 조성물.

청구항 2

지질 나노입자 (LNP)에 캡슐화된 제1 mRNA 및 제2 mRNA를 포함하는 조성물로서, 여기서 제1 mRNA는 구성적으로 활성인 시클릭 GMP-AMP 신타제 (cGAS)의 코딩 영역을 포함하고, 제2 mRNA는 항원의 코딩 영역을 포함하고; LNP는 인지질, 및 이온화가능한 지질, 폐길화 지질, 구조적 지질, 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 지질을 포함하는 것인 조성물.

청구항 3

지질 나노입자 (LNP)에 캡슐화된 mRNA를 포함하는 조성물로서, 여기서 mRNA는 2A-유사 서열에 의해 분리된 제1 코딩 영역 및 제2 코딩 영역을 포함하고, 여기서 제1 코딩 영역은 구성적으로 활성인 시클릭 GMP-AMP 신타제 (cGAS)의 코딩 영역이고 제2 코딩 영역은 항원의 코딩 영역이거나, 또는 제1 코딩 영역은 항원의 코딩 영역이고 제2 코딩 영역은 구성적으로 활성인 시클릭 GMP-AMP 신타제 (cGAS)의 코딩 영역이고, LNP는 인지질, 및 이온화가능한 지질, 폐길화 지질, 구조적 지질, 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 지질을 포함하는 것인 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 지질이 이온화가능한 지질, 폐길화 지질, 및 구조적 지질을 포함하는 것인 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 이온화가능한 지질이 하기를 포함하는 것인 조성물:

- i) 8-[(2-히드록시에틸)[6-옥소-6-(운데실옥시)헥실]아미노]-옥탄산, 1-옥틸노닐 에스테르 (SM-102) 또는 그의 유사체 또는 유도체; 및/또는
- ii) 6-((2-헥실데카노일)옥시)-N-(6-((2-헥실데카노일)옥시)헥실)-N-(4-히드록시부틸)헥산-1-아미늄 (ALC-0315) 또는 그의 유사체 또는 유도체; 및/또는
- iii) (6Z,9Z,28Z,31Z)-헵타트리아콘타-6,9,28,31-테트라엔-19-일 4-(디메틸아미노)부타노에이트 (DLin-MC3-DMA) 또는 그의 유사체 또는 유도체.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 폐길화 지질이 PEG-변형된 포스파티딜에탄올아민, PEG-변형된 포스파티드산, PEG-변형된 세라마이드, PEG-변형된 디알킬아민, PEG-변형된 디알킬글리세롤, PEG-변형된 디알킬글리세롤, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 폐길화 지질이 폴리에틸렌 글리콜 [PEG] 2000 디미리스토일 글리세롤 [DMG]을 포함하는 것인 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 구조적 지질이 콜레스테롤, 페코스테롤, 시토스테롤, 에르고스테롤,

캄페스테롤, 스티그마스테롤, 브라시카스테롤, 토마티딘, 우르솔산, 알파-토코페롤, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 조성물.

청구항 9

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 구조적 지질이 콜레스테롤을 포함하는 것인 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 인지질이 하기를 포함하는 것인 조성물:

- i) 포스파티딜 콜린, 포스파티딜 에탄올아민, 포스파티딜 글리세롤, 포스파티딜 세린, 포스파티드산, 2-리소포스파티딜 콜린, 및 스핑고미엘린으로 이루어진 군으로부터 선택되는 친수성 머리 모이어티; 및
- ii) 라우르산, 미리스트산, 미리스톨레산, 팔미트산, 팔미톨레산, 스테아르산, 올레산, 리놀레산, 알파-리놀렌산, 에루산, 아라키드산, 아라키돈산, 피탄산, 에이코사펜타엔산, 베헨산, 도코사펜타엔산, 및 도코사헥사엔산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 지방산 꼬리 모이어티.

청구항 11

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 인지질이 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 조성물:

- 1,2-디리놀레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (DLPC),
- 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-포스포콜린 (DMPC),
- 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (DOPC),
- 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (DPPC),
- 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (DSPC),
- 1,2-디운데카노일-sn-글리세로-포스포콜린 (DUPC),
- 1-팔미토일-2-올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (POPC),
- 1,2-디-O-옥타데세닐-sn-글리세로-3-포스포콜린,
- 1-올레오일-2-콜레스테릴헤미숙시노일-sn-글리세로-3-포스포콜린,
- 1,2-디리놀레노일-sn-글리세로-3-포스포콜린,
- 1,2-디아라키도노일-sn-글리세로-3-포스포콜린,
- 1,2-디도코사헥사에노일-sn-글리세로-3-포스포콜린,
- 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 (DOPE),
- 1,2-디피타노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민,
- 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민,
- 1,2-디리놀레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민,
- 1,2-디리놀레노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민,
- 1,2-디아라키도노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민,
- 1,2-디도코사헥사에노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민,
- 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포-rac-(1-글리세롤) 나트륨 염 (DOPG),
- 스핑고미엘린, 및
- 이들의 조합.

청구항 12

제11항에 있어서, 인지질이 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (DSPC)을 포함하는 것인 조성물.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물이 적어도 하나의 부형제를 추가로 포함하고, 임의로 여기서 부형제가 수크로스를 포함하는 것인 조성물.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물이 리소포스파티딜콜린 (LPC)을 포함하지 않고, 임의로 여기서 LPC가 단일 C13-C24 아실 쇄를 갖는 것인 조성물.

청구항 15

하나 이상의 지질과 복합체화된 mRNA (RNA-리포플렉스)를 포함하는 조성물로서;

여기서 mRNA는 구성적으로 활성인 시클릭 GMP-AMP 신타제 (cGAS)의 코딩 영역을 포함하고, 하나 이상의 지질은 제1 지질 및 제2 지질을 포함하는 것인 조성물.

청구항 16

하나 이상의 지질과 복합체화된 제1 mRNA 및 제2 mRNA (RNA-리포플렉스)를 포함하는 조성물로서;

여기서 제1 mRNA는 구성적으로 활성인 시클릭 GMP-AMP 신타제 (cGAS)의 코딩 영역을 포함하고, 제2 mRNA는 항원의 코딩 영역을 포함하고, 하나 이상의 지질은 제1 지질 및 제2 지질을 포함하는 것인 조성물.

청구항 17

하나 이상의 지질과 복합체화된 mRNA (RNA-리포플렉스)를 포함하는 조성물로서;

여기서 mRNA는 2A-유사 서열에 의해 분리된 제1 코딩 영역 및 제2 코딩 영역을 포함하고, 제1 코딩 영역은 구성적으로 활성인 시클릭 GMP-AMP 신타제 (cGAS)의 코딩 영역이고 제2 코딩 영역은 항원의 코딩 영역이거나, 또는 제1 코딩 영역은 항원의 코딩 영역이고 제2 코딩 영역은 구성적으로 활성인 시클릭 GMP-AMP 신타제 (cGAS)의 코딩 영역이고, 하나 이상의 지질은 제1 지질 및 제2 지질을 포함하는 것인 조성물.

청구항 18

제15항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 지질이 양이온성 지질이고, 제2 지질이 중성 또는 음이온성 지질인 조성물.

청구항 19

제18항에 있어서, 양이온성 지질이 하기 중 하나 또는 둘 다를 포함하는 것인 조성물:

- i) 1,2-디-0-옥타데세닐-3-트리메틸암모늄 프로판 (DOTMA) 또는 그의 유사체 또는 유도체; 및
- ii) 1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄 프로판 (DOTAP) 또는 그의 유사체 또는 유도체.

청구항 20

제18항 또는 제19항에 있어서, 중성 또는 음이온성 지질이 하기를 포함하는 것인 조성물:

- i) 1,2-디-(9Z-옥타데세노일)-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 (DOPE) 또는 그의 유사체 또는 유도체; 및/또는
- ii) 콜레스테롤 또는 그의 유사체 또는 유도체; 및/또는
- iii) 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (DOPC) 또는 그의 유사체 또는 유도체.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, TLR7/8 효능제를 추가로 포함하는 조성물.

청구항 22

제21항에 있어서, TLR7/8 효능제가 900 달톤 이하의 분자량을 갖는 소분자인 조성물.

청구항 23

제22항에 있어서, TLR7/8 효능제가 이미다조퀴놀린 화합물을 포함하는 것인 조성물.

청구항 24

제23항에 있어서, TLR7/8 효능제가 레시퀴모드 (R848)를 포함하는 것인 조성물.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, mRNA 또는 제1 mRNA 및 제2 mRNA가 5' 비번역 영역 (5'UTR) 및 3' 비번역 영역 (3'UTR)을 포함하는 것인 조성물.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, mRNA가 5' 캡 구조를 포함하는 것인 조성물.

청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, mRNA가 폴리A 꼬리를 포함하는 것인 조성물.

청구항 28

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, mRNA가 뉴클레오시드-변형된 mRNA인 조성물.

청구항 29

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 구성적으로 활성인 cGAS가 그의 야생형 대응물보다 더 큰 자기 DNA 반응성에 대한 경향성을 갖는 것인 조성물.

청구항 30

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, cGAS가 아미노-말단 포스포이노시티드-결합 도메인이 없는 말단절단된 cGAS (cGAS ΔN)인 조성물.

청구항 31

제30항에 있어서, cGAS ΔN이 서열식별번호: 1의 아미노산 서열 또는 서열식별번호: 1과 적어도 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인 조성물.

청구항 32

제31항에 있어서, cGAS ΔN이 하기를 포함하는 것인 조성물:

(i) 서열식별번호: 2, 서열식별번호: 3, 서열식별번호: 4, 서열식별번호: 5, 서열식별번호: 6, 서열식별번호: 7 또는 서열식별번호: 8의 아미노산 서열, 또는 서열식별번호: 2, 서열식별번호: 3, 서열식별번호: 4, 서열식별번호: 5, 서열식별번호: 6, 서열식별번호: 7 또는 서열식별번호: 8과 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열; 또는

(ii) 서열식별번호: 9의 컨센서스 아미노산 서열.

청구항 33

제31항에 있어서, cGAS ΔN이 서열식별번호: 17의 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 것인 조성물.

청구항 34

제30항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, cGAS ΔN의 코딩 영역이 시작 코돈 (ATG)과 작동가능한 조합으로 존재하는 것인 조성물.

청구항 35

제1항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 항원이 종양 항원인 조성물.

청구항 36

제35항에 있어서, 종양 항원이 종양-연관 항원인 조성물.

청구항 37

제35항에 있어서, 종양 항원이 신생항원인 조성물.

청구항 38

제1항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 항원이 미생물 항원을 포함하는 것인 조성물.

청구항 39

제38항에 있어서, 미생물 항원이 바이러스 항원, 박테리아 항원, 원충 항원, 또는 진균 항원을 포함하는 것인 조성물.

청구항 40

제1항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 항원이 병원체의 표면 단백질 또는 그의 단편을 포함하는 것인 조성물.

청구항 41

제40항에 있어서, 병원체가 인간 대상체에서 질환을 유발할 수 있는 것인 조성물.

청구항 42

제40항 또는 제41항에 있어서, 병원체가 바이러스인 조성물.

청구항 43

제42항에 있어서, 바이러스가 SARS-CoV-2인 조성물.

청구항 44

제43항에 있어서, 항원이 SARS-CoV-2의 스파이크 (S) 당단백질이고, 임의로 여기서 스파이크 당단백질이 융합전 안정화된 변이체인 조성물.

청구항 45

제1항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물이 리포폴리사카라이드 (LPS) 또는 모노포스포릴 지질 A (MPLA)를 포함하지 않는 것인 조성물.

청구항 46

제1항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물이 산화된 1-팔미토일-2-아라키도노일-sn-글리세로-3-포스포릴콜린 (oxPAPC) 또는 oxPAPC의 종을 포함하지 않는 것인 조성물.

청구항 47

제46항에 있어서, 조성물이 2-[[[(2R)-2-[(E)-7-카르복시-5-히드록시헵트-6-에노일]옥시-3-헥사데카노일옥시프로폭시]-히드록시포스포릴]옥시에틸-트리메틸아자늄 (HODiA-PC), [(2R)-2-[(E)-7-카르복시-5-옥소헵트-6-에노일]옥시-3-헥사데카노일옥시프로필] 2-(트리메틸아자늄일)에틸 포스페이트 (KODiA-PC), 1-팔미토일-2-(5-히드록시-8-옥소-옥테노일)-sn-글리세로-3-포스포릴콜린 (HOOA-PC), 2-[[[(2R)-2-[(E)-5,8-디옥소옥트-6-에노일]옥시-3-헥사데카노일옥시프로폭시]-히드록시포스포릴]옥시에틸-트리메틸아자늄 (KOOA-PC), [(2R)-3-헥사데카노일옥시-2-(5-옥소펜타노일옥시)프로필] 2-(트리메틸아자늄일)에틸 포스페이트 (POVPC), [(2R)-2-(4-카르복시부타노일

옥시)-3-헥사데카노일옥시프로필] 2-(트리메틸아자늄일)에틸 포스페이트 (PGPC), [(2R)-3-헥사데카노일옥시-2-[4-[3-[(E)-[2-[(Z)-옥트-2-에닐]-5-옥소시클로펜트-3-엔-1-일리텐]메틸]옥시란-2-일]부타노일옥시]프로필] 2-(트리메틸아자늄일)에틸 포스페이트 (PECPC), [(2R)-3-헥사데카노일옥시-2-[4-[3-[(E)-[3-히드록시-2-[(Z)-옥트-2-에닐]-5-옥소시클로펜틸리텐]메틸]옥시란-2-일]부타노일옥시]프로필] 2-(트리메틸아자늄일)에틸 포스페이트 (PEIPC) 및/또는 1-팔미토일-2-아젤라오일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (PAzePC)을 포함하지 않는 것인 조성물.

청구항 48

제1항 내지 제47항 중 어느 한 항의 조성물, 및 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 제약 제제.

청구항 49

과활성화된 수지상 세포의 생성 방법으로서, 수지상 세포를 제1항 내지 제47항 중 어느 한 항, 제21항 내지 제47항 중 어느 한 항의 조성물, 또는 제48항의 제제의 유효량과 접촉시켜 과활성화된 수지상 세포를 생성하는 것을 포함하고, 여기서 과활성화된 수지상 세포는 노출 약 48시간 이내에 세포 사멸을 겪지 않으면서 IL-1베타를 분비하는 것인 방법.

청구항 50

제49항에 있어서, 수지상 세포가

- (i) 생체내에서 조성물과 접촉되거나; 또는
- (ii) 생체외에서 조성물과 접촉되는 것인

방법.

청구항 51

제49항 또는 제50항에 있어서, 과활성화된 수지상 세포가

- (i) 비자극된 수지상 세포 또는 비어있는 LNP와 접촉된 수지상 세포보다 더 높은 수준의 RANTES, IP-10 및 IFN α 중 하나 이상을 분비하고/거나;
- (ii) 더 높은 수준의 CD40, CD86, CD69, MHC 부류 II, MHC 부류 I, CCR7, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 세포 표면 마커를 발현하는 것인

방법.

청구항 52

제49항 내지 제51항 중 어느 한 항의 방법에 의해 생성된 적어도 10^3 , 10^4 , 10^5 또는 10^6 개의 과활성화된 수지상 세포, 및 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 제약 제제.

청구항 53

항원에 대한 면역 반응을 자극하는 방법으로서, 제48항 또는 제52항의 제약 제제의 유효량을 이를 필요로 하는 개체에게 투여하여 항원에 대한 면역 반응을 자극하는 것을 포함하는 방법.

청구항 54

암을 치료하는 방법으로서, 제48항 또는 제52항의 제약 제제의 유효량을 이를 필요로 하는 개체에게 투여하여 암을 치료하는 것을 포함하는 방법.

청구항 55

비정상적 세포 증식을 억제하는 방법으로서, 제48항 또는 제52항의 제약 제제의 유효량을 이를 필요로 하는 개체에게 투여하여 비정상적 세포 증식을 억제하는 것을 포함하는 방법.

청구항 56

감염성 질환을 치료하거나 또는 예방하는 방법으로서, 제48항의 제약 제제의 유효량을 이를 필요로 하는 개체에 투여하여 감염성 질환을 치료하거나 또는 예방하는 것을 포함하는 방법.

청구항 57

제56항에 있어서, 감염성 질환이 바이러스성 질환인 방법.

청구항 58

제56항에 있어서, 감염성 질환이 박테리아성 질환인 방법.

청구항 59

제49항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 수지상 세포가 포유동물 세포인 방법 또는 제약 제제.

청구항 60

제59항에 있어서, 포유동물 세포가 인간 세포인 방법 또는 제약 제제.

청구항 61

제53항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서, 개체가 포유동물인 방법.

청구항 62

제61항에 있어서, 포유동물이 인간인 방법.

청구항 63

제61항에 있어서, 포유동물이 개 또는 고양이인 방법.

청구항 64

제1항 내지 제63항 중 어느 한 항에 있어서, 인지질이 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (DSPC)을 포함하고, 적어도 하나의 지질이 8-[(2-히드록시에틸)[6-옥소-6-(운데실옥시)헥실]아미노]-옥탄산, 1-옥틸노닐 에스테르 (SM-102) 또는 그의 유사체 또는 유도체, 및 콜레스테롤을 포함하는 것인 조성물, 제제, 또는 방법.

청구항 65

제64항에 있어서, 적어도 하나의 지질이 폐길화 지질을 추가로 포함하고, 임의로 여기서 폐길화 지질이 폴리에틸렌 글리콜 [PEG] 2000 디미리스토일 글리세롤 [DMG]을 포함하는 것인 조성물, 제제, 또는 방법.

청구항 66

제1항 내지 제65항 중 어느 한 항에 있어서, LNP가 약 250 나노미터 미만, 임의로 약 25 내지 약 250 나노미터, 임의로 약 50 내지 약 200 나노미터, 또는 임의로 약 75 내지 약 175 나노미터의 유효 직경을 갖는 것인 조성물, 제제, 또는 방법.

청구항 67

제66항에 있어서, LNP가 약 200 나노미터 미만의 유효 직경을 갖는 것인 조성물, 제제, 또는 방법.

청구항 68

제67항에 있어서, LNP가 약 150 나노미터 미만의 유효 직경을 갖는 것인 조성물, 제제, 또는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 2022년 5월 13일에 출원된 미국 가특허 출원 번호 63/341,987의 우선권을 주장하며, 이는 그 전문이

본원에 참조로 포함된다.

[0003] 전자 서열 목록에 대한 참조

[0004] 전자 서열 목록 (165532000540SEQLIST.xml; 크기: 22,326 바이트; 및 생성일: 2023년 5월 10일)의 내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0005] 분야

[0006] 본 개시내용은 포유동물 대상체의 세포에서의 구성적으로 활성인 시클릭 GMP-AMP 신타제의 발현을 위한 조성물 및 mRNA 백신의 면역원성을 증진시키기 위한 그의 용도에 관한 것이다. mRNA는 지질 나노입자 (LNP)에 캡슐화될 수 있거나 또는 지질과 복합체화될 수 있다 (RNA-리포플렉스(Lipoplex)). 본 개시내용은 또한 병원체 인식 수용체 효능제를 추가로 포함하는 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0007] mRNA 화학 및 전달 시스템의 진보는 몇 가지 효과적인 mRNA COVID-19 백신의 신속한 생산을 가능하게 하였다 (Hou et al., Nature Review Materials, 6:1078-1094, 2021). 그러나, 최근의 보고는 SARS-CoV-2 스파이크 단백질에 대한 T 세포 반응성이 사전 SARS-CoV-2 감염을 갖는 개체에서보다 백신접종된 비감염된 개체에서 상당히 더 낮음을 밝혀내었다 (Naranbhai et al., Cell, 185:1-11, 2022). 이는 더 높은 수준의 SARS-CoV-2-반응성 CD4+ 및 CD8+ T 세포 면역 반응이 더 경도의 COVID-19 질환과 연관되는 것으로 밝혀졌다는 점을 고려하면 우려스럽다 (Rydyznski Moderbacher et al., Cell, 183(4):996-1012, 2020).

[0008] 따라서, mRNA 백신에 의해 유발되는 세포성 면역 반응을 증진시키기 위한 제제가 관련 기술분야에 필요하다. 특히, 핵산-코딩된 항원에 대한 적응성 면역 반응을 증가시키기에 적합한 아주반트가 요망된다.

발명의 내용

[0009] 본 개시내용은 포유동물 대상체의 세포에서의 구성적으로 활성인 시클릭 GMP-AMP 신타제의 발현을 위한 조성물 및 mRNA 백신의 면역원성을 증진시키기 위한 그의 용도에 관한 것이다. mRNA는 지질 나노입자 (LNP)에 캡슐화될 수 있거나 또는 지질과 복합체화될 수 있다 (RNA-리포플렉스). 본 개시내용은 또한 병원체 인식 수용체 효능제를 추가로 포함하는 조성물에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

[0010] 도 1은 인간 (호모 사피엔스(*Homo sapiens*), 서열식별번호(SEQ ID NO): 1); 레서스 원숭이 (마카카 무라타(*Macaca mulatta*), 서열식별번호: 2); 올리브 개코원숭이 (파피오 아누비스(*Papio anubis*), 서열식별번호: 3); 북부 흰뺨 긴팔원숭이 (노마스쿠스 류코게니스(*Nomascus leucogenys*), 서열식별번호: 4); 보통 긴팔원숭이 (힐로바테스 라르(*Hylobates lar*), 서열식별번호: 5); 수마트라 오랑우탄 (퐁고 아벨리이(*Pongo abelii*), 서열식별번호: 6); 침팬지 (판 트로글로디테스(*Pan troglodytes*), 서열식별번호: 7); 서부 고릴라 (고릴라 고릴라(*Gorilla gorilla*), 서열식별번호: 8)를 포함하는 영장류 cGAS ΔN 단백질의 아미노산 서열; 및 cGAS ΔN 컨센서스 서열 (서열식별번호: 9)의 정렬이다.

도 2는 그의 아미노-말단 포스포이노시티드-결합 도메인의 제거에 의해 구성적으로 활성이도록 조작된 시클릭 GAMP-AMP 신타제 (cGAS)에 의한 인터페론 유전자 (STING) 선천성 면역 신호전달 경로의 자극제의 활성화를 도시하는 카툰이다. cGAS ΔN은 미토콘드리아에 국재화되며, 여기서 이는 DNA에 결합하여 cGAMP의 생성을 발생시킨다.

도 3A-3C는 GenVoy ILM™ 이온화가능한 지질 믹스 (프리시전 나노시스템즈(Precision NanoSystems))를 사용하여 생성된 지질 나노입자 (LNP)의 특징을 도시한다. 도 3A는 OVA, GFP, 또는 cGAS ΔN mRNA 중 어느 하나로 로딩된 LNP가 모두 200 nm 미만의 직경임을 제시한다. 도 3B는 OVA, GFP, 또는 cGAS ΔN mRNA 중 어느 하나로 로딩된 LNP가 모두 상대적으로 균일한 크기이며, 모두 0.3 미만의 다분산도 지수를 나타냄을 제시한다. 도 3C는 LNP가 유사한 수준의 효율로 OVA, GFP, 또는 cGAS ΔN mRNA로 로딩될 수 있음을 제시한다.

도 4A-4C는 무린 수지상 세포 (DC)가 cGAS ΔN을 코딩하는 mRNA로 로딩된 LNP (cGAS ΔN LNP)로의 처리에 반응하여 cGAS-STING 경로에 의해 자극된 염증성 시토카인을 분비함을 제시한다. 도 4A는 cGAS ΔN LNP로 자극된 골수-유래 수지상 세포 (BMDC)가 비어있는 LNP, 또는 단지 모델 항원을 코딩하는 mRNA로 로딩된 LNP로 처리된 세포보다 유의하게 더 높은 수준으로 RANTES를 생성함을 제시한다. 도 4B는 cGAS ΔN LNP로의 BMDC의 처리가 비어있

는 LNP, 또는 단지 모델 항원을 코딩하는 mRNA로 로딩된 LNP로의 처리보다 유의하게 더 높은 수준의 IP-10 분비를 발생시킴을 제시한다. 도 4C는 cGAS Δ N LNP로 처리된 BMDC가 비어있는 LNP, 또는 단지 모델 항원을 코딩하는 mRNA로 로딩된 LNP로 처리된 세포보다 유의하게 더 높은 수준으로 IFN α 를 생성함을 제시한다. 모든 3개의 플롯에 대한 X-축 표지는 도 4C에 대해 제시된 바와 같다. $P<0.05^*$, $p<0.01^{**}$, $p<0.001^{***}$, $p<0.0001^{****}$. 통계를 다중 비교를 위한 터키(Tukey) 사후 검정과 함께 1원 ANOVA를 사용하여 완료하였다. 데이터는 2회의 실험을 대표한다.

도 5A-5F는 cGAS Δ N을 코딩하는 mRNA로 로딩된 LNP (cGAS Δ N LNP)로의 처리가 무린 DC를 활성화시켜 다중 세포 표면 마커의 증가된 발현을 발생시킴을 제시한다. DC는 비어있는 LNP, 또는 단지 모델 항원을 코딩하는 mRNA로 로딩된 LNP로의 처리와 비교하여 cGAS Δ N LNP로의 처리 후 평균 형광 강도 (MFI)의 증가에 의해 제시된 바와 같이 유의하게 더 높은 수준의 공동-자극 분자 CD40 (도 5A), CD86 (도 5B), 및 CD69 (도 5C)를 발현하는 것으로 밝혀졌다. DC는 또한 비어있는 LNP, 또는 단지 모델 항원을 코딩하는 mRNA로 로딩된 LNP로의 처리와 비교하여 cGAS Δ N LNP로 처리된 경우 유의하게 더 높은 수준의 항원 제시 분자 MHC-II (도 5D) 및 H2kB (MHC-I) (도 5E)를 발현하는 것으로 밝혀졌다. 추가적으로, DC는 비어있는 LNP, 또는 단지 모델 항원을 코딩하는 mRNA로 로딩된 LNP로의 처리와 비교하여 cGAS Δ N LNP로 처리된 경우 더 높은 수준의 CCR7 이동성 분자 (도 5F)의 발현을 갖는 것으로 밝혀졌다. 모든 6개의 플롯에 대한 X-축 표지는 도 5E 및 도 5F에 제시된 바와 같다. $P<0.05^*$, $p<0.01^{**}$, $p<0.001^{***}$, $p<0.0001^{****}$. 통계를 다중 비교를 위한 터키 사후 검정과 함께 1원 ANOVA를 사용하여 완료하였다. 데이터는 2회의 실험을 대표한다.

도 6A-6C는 상이한 지질 제제로부터 제조되고 상이한 mRNA로 로딩된 LNP가 유사한 특징을 나타냄을 제시한다. 도 6A는 GenVoy ILM™ 이온화가능한 지질 믹스 (프리시전 나노시스템즈) 또는 맞춤형 지질 믹스로 제조된 LNP가 OVA, GFP, 또는 cGAS Δ N mRNA로 로딩된 경우 모두 150 nm 미만의 직경임을 제시한다. 도 6B는 GenVoy ILM™ 또는 맞춤형 지질 믹스로 제조된 LNP가 모두 상대적으로 균일한 크기이며, 다분산도 지수는 0.3 미만임을 제시한다. 도 6C는 GenVoy ILM™ 또는 맞춤형 지질 믹스로 제조된 LNP가 OVA, GFP, 및 cGAS Δ N mRNA의 효율적인 캡슐화를 허용함을 제시한다. 데이터는 3회의 실험을 대표한다.

도 7A-7F는 cGAS Δ N mRNA-함유 LNP가 인간 단핵구-유래 수지상 세포 (moDC)에서 cGAS-STING 염증성 경로를 활성화시킴을 제시한다. 인간 moDC를 OVA, GFP, cGAS Δ N mRNA로 로딩된 LNP 또는 LNP의 조합과 24시간 동안 배양한 후, 상청액을 수집하고, 시토카인 분비를 평가하였다. cGAS Δ N mRNA로 로딩된 LNP로 처리된 인간 moDC는 모델 항원을 코딩하는 mRNA로만 로딩된 LNP로 처리된 moDC보다 유의하게 더 많은 IL-6 (도 7A), 더 많은 TNF α (도 7B), 및 유의하게 더 많은 IP-10 (도 7C)를 생성하였다. 또한, moDC는 모델 항원을 코딩하는 mRNA로만 로딩된 LNP로 처리된 moDC보다 cGAS Δ N mRNA로 로딩된 LNP로 처리된 경우 유의하게 더 많은 IFN λ 1 (도 7D), 유의하게 더 많은 IFN β (도 7E), 및 더 많은 IFN α 2 (도 7F)를 분비하였다. 모든 6개의 플롯에 대한 X-축 표지는 도 7E 및 도 7F에 대해 제시된 바와 같다. $P<0.05^*$, $p<0.01^{**}$, $p<0.0001^{****}$. 통계를 다중 비교를 위한 터키 사후 검정과 함께 2원 ANOVA를 사용하여 완료하였다. 데이터는 2회의 실험을 대표한다. 원은 LNP가 없는 대조군 조건을 제시한다. 정사각형은 GenVoy ILM™을 사용하여 형성된 LNP를 포함하는 조건을 제시한다. 마름모는 맞춤형 지질 믹스를 사용하여 형성된 LNP를 포함하는 조건을 제시한다. 흰색 정사각형 및 흰색 마름모는 각각 GenVoy ILM™ 및 맞춤형 지질 믹스를 사용하여 형성된 cGAS Δ N mRNA-함유 LNP를 포함하는 조건을 제시한다.

도 8A-8D는 cGAS Δ N mRNA-함유 LNP로의 처리가 인간 moDC를 활성화시킴을 제시한다. 인간 moDC를 OVA, GFP, cGAS Δ N mRNA로 로딩된 LNP, 또는 LNP의 조합과 24시간 동안 배양한 후, 세포 표면 마커 발현을 측정하였다. CD83 (도 8A) 발현은 모델 항원을 코딩하는 mRNA로만 로딩된 LNP로의 처리와 비교하여 moDC를 cGAS Δ N mRNA로 로딩된 LNP로 처리한 경우 유의하게 증가하였다. 마찬가지로, T 세포 공동자극 분자 CD40 (도 8B) 및 CD80 (도 8C)의 발현은 모델 항원을 코딩하는 mRNA로만 로딩된 LNP로의 처리와 비교하여 moDC (전체 집단 및 단일 세포 수준에서 둘 다)를 cGAS Δ N mRNA로 로딩된 LNP로 처리한 경우 유의하게 증가하였다. 추가적으로, MHC 부류 II (HLA-DR) (도 8D) 발현은 모델 항원을 코딩하는 mRNA로만 로딩된 LNP로의 처리와 비교하여 moDC를 cGAS Δ N mRNA-함유 LNP로 처리한 경우 증가되었다. $P<0.05^*$, $p<0.01^{**}$. 통계를 다중 비교를 위한 터키 사후 검정과 함께 2원 ANOVA를 사용하여 완료하였다. 데이터는 2회의 실험을 대표한다. 원은 LNP가 없는 대조군 조건을 제시한다. 정사각형은 GenVoy ILM™을 사용하여 형성된 LNP를 포함하는 조건을 제시한다. 마름모는 맞춤형 지질 믹스를 사용하여 형성된 LNP를 포함하는 조건을 제시한다. 흰색 정사각형 및 흰색 마름모는 각각 GenVoy ILM™ 및 맞춤형 지질 믹스를 사용하여 형성된 cGAS Δ N mRNA-함유 LNP를 포함하는 조건을 제시한다.

도 9A-9B는 cGAS Δ N mRNA-함유 LNP가 인간 백혈병 단핵구성 세포주 (THP-1 세포)에서 염증성 경로를 활성화시킴을 제시한다. 간략하게, THP-1 세포를 OVA, GFP, cGAS Δ N mRNA로 로딩된 LNP, 또는 LNP의 조합과 24시간 동안

배양한 후, 상청액을 시토카인 분비의 측정을 위해 수집하고, 세포를 세포 표면 분자 발현의 평가를 위해 수집하였다. cGAS Δ N mRNA-함유 LNP로 처리된 THP-1 세포는 모델 항원을 코딩하는 mRNA로만 로딩된 LNP로 처리된 THP-1 세포보다 유의하게 더 많은 IP-10 (도 9A)을 분비하였다. THP-1 세포 상의 CD40 발현 (도 9B)은 모델 항원을 코딩하는 mRNA로만 로딩된 LNP와 비교하여 cGAS Δ N mRNA-함유 LNP로의 처리 후 증가하였다. $P<0.01^{**}$, $p<0.0001^{****}$. 통계를 다중 비교를 위한 터키 사후 검정과 함께 2원 ANOVA를 사용하여 완료하였다. 데이터는 2회의 실험을 대표한다. 원은 LNP가 없는 대조군 조건을 제시한다. 정사각형은 GenVoy ILM™을 사용하여 형성된 LNP를 포함하는 조건을 제시한다. 마름모는 맞춤형 지질 믹스를 사용하여 형성된 LNP를 포함하는 조건을 제시한다. 흰색 정사각형 및 흰색 마름모는 각각 GenVoy ILM™ 및 맞춤형 지질 믹스를 사용하여 형성된 cGAS Δ N mRNA-함유 LNP를 포함하는 조건을 제시한다.

도 10A-10B는 cGAS Δ N을 코딩하는 mRNA로 로딩된 LNP와 조합으로 R848로 moDC를 처리한 것이 DC가 생존가능하게 남아 있으면서 IL-1 β 를 분비하는 능력에 의해 정의되는 과활성화를 초래함을 제시한다. moDC를 비자극된 채 남겨 두거나 (PBS 처리됨), 또는 배지, R848, 또는 R848 및 MCC950의 존재 하에서 cGAS Δ N 또는 OVA를 코딩하는 mRNA로 로딩된 LNP로 처리하였다. 도 10A는 모든 처리 조건이 생존력에 기여하였음을 제시하며, 이는 세포가 임의의 처리 조건에 반응하여 피로토시스화하지 않았음을 지시한다. 도 10B는 R848과 조합으로 전달된 경우, cGAS Δ N을 코딩하는 mRNA로 로딩된 LNP로의 처리만이 moDC를 자극하여 IL-1 β 를 분비하였음을 제시한다. 선택적 NLRP3 인플라마솜 억제제 MCC950로 moDC를 처리한 것은 IL-1 β 생성을 제거하였으며, 이는 그렇게 하지 않았다면 R848과 조합으로 cGAS Δ N mRNA-로딩된 LNP로의 처리에 의해 IL-1 β 생성을 유도하였을 것이다. $P<0.0001^{****}$. 통계를 다중 비교를 위한 터키 사후 검정과 함께 2원 ANOVA를 사용하여 완료하였다.

도 11A-11D는 cGAS Δ N mRNA로 로딩된 LNP의 투여가 LNP를 통해 전달된 mRNA-코딩된 모델 항원에 대한 T 세포 반응을 증가시킴을 제시한다. 마우스를 1 mcg 또는 5 mcg cGAS Δ N mRNA로 로딩된 LNP 또는 1 mcg 또는 5 mcg 녹색 형광 단백질 (GFP) mRNA로 로딩된 LNP와 조합으로 전달된 오브알부민 (OVA)을 코딩하는 5 mcg mRNA로 로딩된 LNP로 2회 면역화하였다 (프라임 및 부스트 요법). 부스트 후 7일에 혈액을 수집하고, 후속적으로 T 세포에 대한 "SIINFEKL-사랑제"의 결합을 평가하였다. SIINFEKL은 OVA 내의 T 세포 에피토프의 아미노산 서열 (서열식별 번호: 17)이다. mRNA-코딩 OVA로 로딩된 LNP와 조합으로 cGAS Δ N mRNA로 로딩된 LNP로 마우스를 처리한 것은 GenVoy ILM™ 제제를 사용하여 제조된 LNP에서 OVA 및 GFP를 코딩하는 mRNA 또는 GFP 및 cGAS Δ N를 코딩하는 mRNA로 로딩된 LNP로의 처리와 비교하여 혈액에서 SIINFEKL-특이적 CD8 $^{+}$ T 세포의 빈도 (도 11A) 및 절대적 수 (도 11C) 둘 다를 유의하게 증가시켰다. 유사하게, mRNA-코딩 OVA로 로딩된 LNP와 조합으로 cGAS Δ N mRNA로 로딩된 LNP로 마우스를 처리한 것은 맞춤형 지질 믹스를 사용하여 제조된 LNP에서 OVA 및 GFP를 코딩하는 mRNA로 로딩된 LNP로의 처리와 비교하여 혈액에서 SIINFEKL-특이적 CD8 $^{+}$ T 세포의 빈도 (도 11B) 및 절대적 수 (도 11D) 둘 다를 유의하게 증가시켰다. $P<0.01^{**}$, $p<0.001^{***}$. GenVoy ILM™ 플롯에 대한 통계를 다중 비교를 위한 터키 사후 검정과 함께 2원 ANOVA를 사용하여 완료하였다. 맞춤형 지질 믹스에 대한 통계를 독립표본 t 검정을 사용하여 완료하였다.

도 12A-12F는 cGAS Δ N mRNA로 로딩된 LNP로의 처리가 총 IgG 반응에 영향을 미치지 않으면서 Th2 특이적 항체를 감소시킴을 제시한다. 마우스를 1 mcg 또는 5 mcg cGAS Δ N mRNA로 로딩된 LNP 또는 1 mcg 또는 5 mcg GFP mRNA로 로딩된 LNP로 전달된 5 mcg OVA mRNA로 로딩된 LNP로 2회 면역화하였다. 부스트 후 7일에 혈액을 수집하고, 혈청을 단리하여 항체 반응을 정량화하였다. OVA 및 cGAS Δ N mRNA로 로딩된 LNP로 처리된 마우스는 GenVoy ILM™ 제제를 사용하여 제조된 LNP에서 (도 12A) 및 맞춤형 지질 믹스를 사용하여 제조된 LNP에서 (도 12B) OVA mRNA 및 GFP mRNA로 로딩된 LNP로 처리된 마우스와 비교하여 OVA-특이적 총 IgG의 유의한 변화를 나타내지 않았다. 도 12C에 제시된 바와 같이, OVA-특이적 IgG1은 GenVoy ILM™ 제제를 사용하여 제조된 LNP에서 cGAS Δ N mRNA의 존재에 의해 유의하게 감소되었다 (1:500 및 1:2500 희석에 대해 $p<0.05$, 1 mcg 및 5 mcg cGAS Δ N mRNA-함유 LNP 대 GFP mRNA-함유 LNP. 도 12D에 제시된 바와 같이, OVA-특이적 IgG1 반응은 맞춤형 지질 믹스를 사용하여 제조된 cGAS Δ N mRNA-함유 LNP로 처리된 마우스에서 감소되었다 (5 mcg cGAS Δ N mRNA-함유 LNP 대 GFP mRNA-함유 LNP에서 1:500, 1:2500, 및 1:12500 희석에 대해 $p<0.05$. 대조적으로, OVA mRNA 함유 및 cGAS Δ N LNP로 처리된 마우스는 LNP가 GenVoy (E) 및 맞춤형 지질 믹스 (F) 제제로 제조된 경우 OVA + GFP LNP 처리와 비교하여 측정된 OVA-특이적 IgG2a의 유의한 변화를 나타내지 않았다. 상부의 범례는 모든 패널에 적용된다. 통계를 다중 비교를 위한 터키 사후 검정과 함께 2원 ANOVA를 사용하여 완료하였다.

도 13A는 본 개시내용의 지질-기반 mRNA 전달 비히클에 사용하기에 적합한 양이온성 및 이온화가능한 지질의 구조를 제시한다. 도 13B는 본 개시내용의 지질-기반 mRNA 전달 비히클에 사용하기에 적합한 다른 유형의 지질의 구조를 제시한다. 또한, 본원에 참조로 포함되는 문헌 [Hou et al., Nature Review Materials, 6:1078-1094,

2021]을 참조한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0011] 본 개시내용은 포유동물 대상체의 세포에서의 구성적으로 활성인 시클릭 GMP-AMP 신타제의 발현을 위한 조성물 및 mRNA 백신의 면역원성을 증진시키기 위한 그의 용도에 관한 것이다. mRNA는 지질 나노입자 (LNP)에 캡슐화될 수 있거나 또는 지질과 복합체화될 수 있다 (RNA-리포플렉스). 본 개시내용은 또한 병원체 인식 수용체 효능제를 추가로 포함하는 조성물에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 조성물은 단일 C13-C24 아실 쇄를 갖는 리소포스파티딜콜린 (LPC)을 포함하지 않는다.
- [0012] 면역요법 또는 백신접종을 위해서와 같이 염증 반응을 유도하는 것이 요망될 수 있다. COVID-19 mRNA 백신 (SARS-CoV-2 항원을 코딩하는 mRNA로 로딩된 LNP를 포함함)은 감염의 빈도 및 중증도를 감소시키는데 있어서 효과적인 것으로 입증되었다. 본원에 기술된 바와 같이, cGAS-STING 선천성 면역 경로를 유도하는 것은 예시적인 실시양태에서 오브알부민 (OVA)인 단백질 항원을 코딩하는 mRNA로 로딩된 LNP를 포함하는 조성물을 보조한다. STING 신호전달은 모든 가능한 선천성 면역 신호전달 경로 중에서 특히 흥미로운데, 이는 일부 다른 신호전달 경로와는 달리, cGAS-STING 활성화는 번역 억제를 유도하지 않기 때문이다.
- [0013] cGAS-STING 신호전달을 유도하기 위해, 구성적으로 활성이도록 그의 N-말단의 일부를 결여한 cGAS 돌연변이체가 디자인되었다 (cGAS Δ N). cGAS 돌연변이체를 코딩하는 mRNA를 세포 흡수 및 단백질 발현을 위해 LNP에 패키징하였다. cGAS Δ N을 코딩하는 LNP-패키징된 mRNA는 cGAS-STING 경로를 통해 면역 반응을 보조하는 능력을 갖는다. 중요하게는, 구성적으로 활성인 cGAS, 예컨대 cGAS Δ N을 코딩하는 mRNA의 포함은 염증성 신호를 증가시킴으로써 항원을 코딩하는 mRNA로 로딩된 LNP의 효력을 증가시킨다.
- [0014] **일반적 기술 및 정의**
- [0015] 본 개시내용의 실시는, 달리 지시되지 않는 한, 관련 기술분야의 기술 내인 분자 생물학 (제조합 기술 포함), 미생물학, 세포 생물학, 생화학 및 면역학의 통상적인 기술을 이용할 것이다.
- [0016] 본원에 및 첨부된 청구범위에 사용된 바와 같은 단수 형태는 달리 지시되지 않는 한, 복수 언급대상을 포함한다. 예를 들어, 부형제는 하나 이상의 부형제를 포함한다.
- [0017] 본원에 사용된 바와 같은 "포함하는"이라는 어구는 개방형이며, 이는 이러한 실시양태가 추가의 요소를 포함할 수 있음을 지시한다. 대조적으로, "이루어진"이라는 어구는 폐쇄형이며, 이는 이러한 실시양태가 추가의 요소 (미량의 불순물 제외)를 포함하지 않음을 지시한다. "본질적으로 이루어진"이라는 어구는 부분적으로 폐쇄형이며, 이는 이러한 실시양태가, 이러한 실시양태의 기본적인 특징을 실질적으로 변화시키지 않는 요소를 추가로 포함할 수 있음을 지시한다.
- [0018] 값에 관하여 본원에 사용된 바와 같은 "약"이라는 용어는 그 값의 90% 내지 110%를 포함한다 (예를 들어, 약 900 달톤의 분자량은 810 달톤 내지 990 달톤의 분자량을 지칭함).
- [0019] 물질의 "유효량" 또는 "충분한 양"은 임상적 결과를 포함하여 유익하거나 원하는 결과를 가져오기에 충분한 양이며, 따라서, "유효량"은 그것이 적용되고 있는 맥락에 좌우된다. 예를 들어, 항원 및 구성적으로 활성인 cGAS를 코딩하는 하나 이상의 mRNA를 포함하는 면역원성 조성물을 투여하는 맥락에서, 유효량은 항원에 대한 면역 반응 (예를 들어, 항원-반응성 항체 및/또는 세포성 면역 반응)을 자극하기 위한 충분한 mRNA를 함유한다.
- [0020] "개체" 및 "대상체"라는 용어는 포유동물을 지칭한다. "포유동물"은 인간, 비-인간 영장류 (예를 들어, 원숭이), 농장 동물, 스포츠 동물, 설치류 (예를 들어, 마우스 및 래트), 및 애완동물 (예를 들어, 개 및 고양이)을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 실시양태에서, 대상체는 인간 환자, 예컨대 암 및/또는 감염성 질환을 앓고 있는 인간 환자이다.
- [0021] 면역원성 조성물에 관하여 본원에 사용된 바와 같은 "용량"이라는 용어는 임의의 시간에 대상체가 복용한 (대상체에게 투여된 또는 대상체가 받은) 면역원성 조성물의 측정된 부분을 지칭한다.
- [0022] 본원에 사용된 바와 같은 "단리된" 및 "정제된"이라는 용어는 그것이 자연적으로 연관되는 적어도 하나의 성분으로부터 제거된 (예를 들어, 그의 원래 환경으로부터 제거된) 물질을 지칭한다. 예로서, 인지질에 관하여 사용되는 경우, 단리된 인지질은 박층 크로마토그래피, 또는 기체 크로마토그래피에 의해 결정된 바와 같이 적어도 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 순수하다. 추가의 예로서, 제조합 단백질에 관하여 사용되는 경우, 단리된 단백질은 단백질을 생성하는 숙주 세포의 배양 배지로부터 제거된 단백질을 지칭한다.

- [0023] "제약 제제" 및 "제약 조성물"이라는 용어는 활성 성분의 생물학적 활성이 유효한 것을 허용하도록 하는 형태이며, 제제 또는 조성물이 투여될 개체에게 허용가능하지 않게 독성인 추가의 성분을 함유하지 않는 조제물을 지칭한다. 이러한 제제 또는 조성물은 멸균성인 것으로 의도된다.
- [0024] 본원에 사용된 바와 같은 "부형제"는 이용되는 투여량 및 농도에서 그에 노출되는 세포 또는 포유동물에게 비독성인 제약상 허용되는 부형제, 담체, 비히클 또는 안정화제를 포함한다. 대개 생리학적으로 허용되는 부형제는 수성 pH 완충 용액이다.
- [0025] "항원"이라는 용어는 항체에 의해 또는 T 세포 항원 수용체에 의해 특이적으로 결합되고 인식되는 물질을 지칭한다. 항원은 펩티드, 폴리펩티드, 단백질, 당단백질, 폴리사카라이드, 복합 탄수화물, 당, 강글리오시드, 지질 및 인지질; 이들의 부분 및 이들의 조합을 포함할 수 있다. 본 개시내용의 맥락에서, "항원"이라는 용어는 전형적으로 mRNA 또는 DNA의 핵산 서열에 의해 코딩되는 폴리펩티드를 지칭한다. 폴리펩티드 항원은 바람직하게는 적어도 8개의 아미노산 잔기의 길이이고, 하나 이상의 번역후 변형을 포함할 수 있다.
- [0026] "효능제"라는 용어는 가장 넓은 의미에서 사용되며, 수용체를 통해 신호전달을 활성화시키는 임의의 분자를 포함한다. 일부 실시양태에서, 효능제는 수용체에 결합한다. 예를 들어, TLR8 효능제는 TLR8에 결합하고 TLR8-신호전달 경로를 활성화시킨다.
- [0027] "알킬"은 1가 포화 지방족 히드로카르빌 기를 지칭한다. C_x 알킬은 x개의 탄소 원자를 갖는 알킬 기를 지칭한다. C_x-C_y 알킬 또는 C_{x-y} 알킬은 x개 내지 y개의 탄소 원자 (경계값 포함)를 갖는 알킬 기를 지칭한다.
- [0028] "알킬렌"은 2가 포화 지방족 히드로카르빌 기를 지칭한다.
- [0029] "알케닐"은 적어도 하나의 이중 결합 (>C=C<)을 갖는 1가 히드로카르빌 기를 지칭한다. C_x 알케닐은 x개의 탄소 원자를 갖는 알케닐 기를 지칭한다. C_x-C_y 알케닐 또는 C_{x-y} 알케닐은 x개 내지 y개의 탄소 원자 (경계값 포함)를 갖는 알케닐 기를 지칭한다.
- [0030] 반응 또는 파라미터의 "자극"은 관심 파라미터를 제외하고 그렇지 않다면 동일한 조건과 비교할 경우, 또는 대안적으로, 또 다른 조건과 비교하여 반응 또는 파라미터를 유발하는 것 및/또는 증진시키는 것 (예를 들어, TLR 효능제의 부재와 비교하여 TLR 효능제의 존재 하에서의 TLR-신호전달의 증가)을 포함한다. 예를 들어, 면역 반응의 "자극"은 반응의 증가를 의미한다. 측정되는 파라미터에 따라, 증가는 2배 내지 2,000배, 또는 5배 내지 500배 또는 그 초과, 또는 2, 5, 10, 50, 또는 100배 내지 500, 1,000, 2,000, 5,000, 또는 10,000배일 수 있다.
- [0031] 반대로, 반응 또는 파라미터의 "억제"는 관심 파라미터를 제외하고 그렇지 않다면 동일한 조건과 비교할 경우, 또는 대안적으로, 또 다른 조건과 비교하여 반응 또는 파라미터를 감소시키는 것 및/또는 억제하는 것 (예를 들어, 위약 조성물의 투여 또는 치료 없음과 비교하여 본 개시내용의 조성물의 투여 후 비정상적 세포 증식의 감소)을 포함한다. 예를 들어, 면역 반응의 "억제"는 반응의 감소를 의미한다. 측정되는 파라미터에 따라, 감소는 2배 내지 2,000배, 또는 5배 내지 500배 또는 그 초과, 또는 2, 5, 10, 50, 또는 100배 내지 500, 1,000, 2,000, 5,000, 또는 10,000배일 수 있다.
- [0032] "더 높은" 및 "더 낮은"이라는 상대적 용어는 관심 파라미터를 제외하고 그렇지 않다면 동일한 조건과 비교할 경우, 또는 대안적으로, 또 다른 조건과 비교하여 반응 또는 파라미터의 각각 측정가능한 증가 또는 감소를 지칭한다. 예를 들어, "더 높은 수준의 DC 과활성화"는 대조군 조건의 결과로서의 DC 과활성화의 수준 위로 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10배인 처리 조건의 결과로서의 DC 과활성화의 수준을 지칭한다. 마찬가지로, "더 낮은 수준의 DC 과활성화"는 대조군 조건의 결과로서의 DC 과활성화의 수준 아래로 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10배인 처리 조건의 결과로서의 DC 과활성화의 수준을 지칭한다.
- [0033] 본원에 사용된 바와 같은 "면역화"라는 용어는 항원에 대한 포유동물 대상체의 면역 반응을 증가시키고 따라서 감염을 저항 또는 극복하고/거나 질환을 저항하는 그의 능력을 개선시키는 과정을 지칭한다.
- [0034] 본원에 사용된 바와 같은 "백신접종"이라는 용어는 포유동물 대상체의 신체 내로의 백신의 도입을 지칭한다.
- [0035] "아주반트"는 항원 또는 항원을 코딩하는 핵산을 포함하는 조성물에 첨가되는 경우, 노출 시 포유동물 수용자에서 항원에 대한 면역 반응을 증진시키거나 증강시키는 물질을 지칭한다.
- [0036] 질환을 "치료하는 것" 또는 질환의 "치료"라는 용어는 임상적 결과를 포함하여 개체에서 유익하거나 원하는 결과를 얻기 위한 노력으로, 하나 이상의 치료제를 개체 (인간 또는 다른 것)에게 투여하는 것을 포함할 수 있는

프로토콜을 실행하는 것을 지칭한다. 유익하거나 원하는 임상적 결과는 질환의 하나 이상의 징후 또는 증상의 경감 또는 개선, 질환의 정도의 감소, 질환의 안정화된 (즉, 악화되지 않는) 상태, 질환의 확산의 방지, 질환 진행의 지연 또는 감속, 질환 상태의 개선 또는 완화, 및 관해 (부분적이든 전체적이든)를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. "치료"는 또한 치료를 받지 않은 개체의 예상 생존과 비교하여 연장된 생존을 의미할 수 있다. 또한, "치료하는 것" 및 "치료"는 치료제 또는 치료제들의 하나의 용량의 투여에 의해 일어날 수 있거나, 또는 치료제 또는 치료제들의 일련의 용량의 투여 시 일어날 수 있다. "치료하는 것" 또는 "치료"는 징후 또는 증상의 완전한 경감을 요구하지 않고, 치유를 요구하지 않으며, 구체적으로 개체에서 완화 효과만을 갖는 프로토콜을 포함한다. 질환 또는 장애를 "완화시키는 것"은 예상되는 비치료된 결과와 비교하여, 질환 또는 장애의 정도 및/또는 바람직하지 않은 임상적 징후가 감소되고/거나 질환 또는 장애의 진행의 시간 과정이 감속되는 것을 의미한다.

[0037] cGAS에 관하여 본원에 사용된 바와 같은 "구성적으로 활성인"이라는 용어는 천연 cGAS가 효소적 활성을 거의 내지 전혀 갖지 않는 일부 조건 하에서도, 세포질에서 DNA에 결합하고 cGAMP 합성을 촉매하는 cGAS 변이체를 지칭한다. 일부 바람직한 실시양태에서, "구성적으로 활성인 cGAS"는 "말단절단된 cGAS", 예컨대 N-말단 이상 도메인의 부재 하에서 C-말단 DNA-결합, 효소적 도메인을 포함하는 cGAS ΔN이다. 즉, cGAS ΔN은 전장 cGAS의 N-말단 이상 도메인에 의해 제공된 효소 활성의 조절이 없는 구성적으로 활성인 cGAS이다.

I. 구성적으로 활성인 시클릭 GMP-AMP 신타제

[0039] 시클릭 GMP-AMP 신타제, 일명 cGAMP 신타제 또는 cGAS는 시토솔 DNA의 효소적 센서이다. cGAS는 그의 서열과 독립적으로 이중-가닥 DNA를 인식하여 이량체화, 액체-유사 액적의 형성 및 2차 전령 2'3' 시클릭 GMP-AMP (cGAMP)의 생성을 발생시키며, 이는 STING에 결합하고 이를 활성화시켜 인터페론 및 다른 염증성 매개인자의 발현을 발생시킨다. 구체적으로, STING 활성화는 신호전달 캐스케이드를 발생시키며, 이는 궁극적으로 IRF3 및 NF-κB 전사 인자를 활성화시킨다. IRF3 활성화는 항바이러스 면역 반응을 유도하는 IP-10 및 유형 I 인터페론과 같은 유전자의 발현을 초래한다. NF-κB 활성화는 염증성 면역 반응을 증진시키는 염증성 시토카인, 예컨대 IL-6의 발현을 유도한다.

[0040] 인간 cGAS는 N-말단 포스포이노시티드-결합 도메인 (잔기 1-59) 및 C-말단 DNA-결합 및 효소 도메인 (잔기 160-522)을 포함하여 522개의 아미노산의 길이이다 (Barnett et al., Cell, 176:1432-1446, 2019). 중요하게는, 인간 백혈병 단핵구성 세포주에서의 cGAS ΔN의 발현은 더 높은 수준의 인터페론 및 인터페론-자극된 유전자의 발현을 발생시키는 것으로 밝혀졌다 (Barnett, 상기 문헌, 2019).

[0041] 인간 cGAS의 아미노산 서열 (진뱅크(GenBank) 번호 NP_612450.2)은 다음과 같다:

[0042] MQPWHGKAMQRASEAGATAPKASARNARGAPMDPTESPAPEAALPKAGKFGPARKSGSRQKKSAPDTQERPPVRATGARAKKAPQRAQDTQPSDATSAPGA
EGLEPPAAREPALSRAGSCRQRGARCTKPRPPPGPWPDPSPGLPVSAPILVRRDAAPGASKLRVLEKLKLSRDDISTAAGMVGKGVVDHLLRLKCDLAFR
GVGLLNTGSSYYEHVKISAPNEFDVMFKLEVPRILQEEYSNTRAYYFVKFKRNPKNPLSQFLEGEILSASKMLSKFRKI IKEEINDIKDQTDVIMKRKRGGSP
AVTLLISEKISVDITLALESKSSWPASTQEGRLIQNWLSAKVRKQLRLKPFYLVPHAKEGNGFQEETWRLSFSHIEKEILNNHGKSKTCCENKEEKCCRKD
CLKLMKYLLQLKERFKDKKHLDFSSYHVKTAFHFVCTQNPQDSQWDRKDLGLCFDNCVTYFLQLRTEKLENYFIPEFNLFSNNLIDKRSKEFLTKQIEY
ERNNEFPVFDEF (서열식별번호: 10).

[0043] cGAS의 N-말단 도메인의 아미노산 서열은 다음과 같다:

[0044] MQPWHGKAMQRASEAGATAPKASARNARGAPMDPTESPAPEAALPKAGKFGPARKSGSRQKKSAPDTQERPPVRATGARAKKAPQRAQDTQPSDATSAPGA
EGLEPPAAREPALSRAGSCRQRGARCTKPRPPPGPWPDPSPGLPVSAPILVRRDAA (서열식별번호: 11).

[0045] cGAS (cGAS ΔN)의 C-말단 도메인의 아미노산 서열은 다음과 같다:

[0046] PGASKLRVLEKLKLSRDDISTAAGMVGKGVVDHLLRLKCDLAFRGVGLLNTGSSYYEHVKISAPNEFDVMFKLEVPRILQEEYSNTRAYYFVKFKRNPKNP
LSQFLEGEILSASKMLSKFRKI IKEEINDIKDQTDVIMKRKRGGSPAVTLLISEKISVDITLALESKSSWPASTQEGRLIQNWLSAKVRKQLRLKPFYLVPH
AKEGNGFQEETWRLSFSHIEKEILNNHGKSKTCCENKEEKCCRKDCLKLMKYLLQLKERFKDKKHLDFSSYHVKTAFHFVCTQNPQDSQWDRKDLGLCFD
NCVTYFLQLRTEKLENYFIPEFNLFSNNLIDKRSKEFLTKQIEYERNNEFPVFDEF (서열식별번호: 1).

[0047] 마우스 세포에서의 발현에 대해 코돈-최적화된 인간 cGAS ΔN을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 서열식별번호: 17로서 제시된다. 이 뉴클레오타이드 서열을 갖는 DNA 주형을 사용하여 LNP 내로 로딩된 인간 cGAS ΔN을 코딩하는 mRNA를 제조하고, 실시예 1, 2 및 3에 기술된 바와 같이 시험하였다.

[0048] 본 개시내용의 조성물 및 방법은 mRNA 백신에 의해 유발되는 적응성 면역 반응을 개선시키기 위한 촉매 아주반

트로서 구성적으로 활성인 cGAS를 코딩하는 핵산을 포함한다. 일부 바람직한 실시양태에서, 구성적으로 활성인 cGAS는 N-말단 포스포이노시티드-결합 도메인이 없는 말단절단된 cGAS (cGAS Δ N)이다. 일부 바람직한 실시양태에서, 구성적으로 활성인 cGAS는 C-말단 DNA-결합 및 효소 도메인을 포함하는 말단절단된 cGAS (cGAS Δ N)이다.

cGAS의 동족체는 동물계에 걸쳐 종에서 발견되며, cGAS 아미노산 서열은 고등 영장류에서 보존된다. 인간 cGAS의 c-말단 도메인의 아미노산 서열과 다중 비-인간 영장류 cGAS 단백질의 c-말단 도메인의 아미노산 서열의 정렬은 도 1에 제시된다.

표 I. 클러스탈(Clustal) 12.1[^]에 의해 생성된 퍼센트 동일성 매트릭스

#	종	1	2	3	4	5	6	7	8
1	엠._물라타	100.00	96.42	87.53	85.95	88.71	87.26	86.78	86.50
2	피._아누비스	96.42	100.00	87.53	86.23	88.98	88.09	87.88	87.33
3	엔._류코게니스	87.53	87.53	100.00	96.14	93.37	89.97	90.03	90.30
4	에이치._라르	85.95	86.23	96.14	100.00	92.31	88.92	88.98	88.71
5	피._아벨리이	88.71	88.98	93.37	92.31	100.00	93.07	93.39	92.84
6	피._트로글로디테스	87.26	88.09	89.97	88.92	93.07	100.00	97.51	96.95
7	에이치._사피엔스	86.78	87.88	90.03	88.98	93.39	97.51	100.00	98.35
8	지._코릴라	86.50	87.33	90.30	88.71	92.84	96.95	98.35	100.00

[^]이 표에서 수는 서열식별번호가 아니다.

일부 바람직한 실시양태에서, 구성적으로 활성인 cGAS는 N-말단 도메인이 없는 말단절단된 인간 cGAS이다 (서열식별번호: 11). 일부 바람직한 실시양태에서, 구성적으로 활성인 cGAS는 C-말단 도메인을 포함하는 말단절단된 인간 cGAS이다 (서열식별번호: 1). 일부 바람직한 실시양태에서, cGAS Δ N은 서열식별번호: 1의 아미노산 서열 또는 서열식별번호: 1과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 바람직한 실시양태에서, cGAS Δ N은 서열식별번호: 2, 서열식별번호: 3, 서열식별번호: 4, 서열식별번호: 5, 서열식별번호: 6, 서열식별번호: 7 또는 서열식별번호: 8의 아미노산 서열, 또는 서열식별번호: 2, 서열식별번호: 3, 서열식별번호: 4, 서열식별번호: 5, 서열식별번호: 6, 서열식별번호: 7 또는 서열식별번호: 8과 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 바람직한 실시양태에서, cGAS Δ N은 서열식별번호: 9의 컨센서스 아미노산 서열을 포함한다. 형질감염된 세포에서의 발현을 위해, cGAS Δ N을 코딩하는 핵산은 시작 코돈 (ATG)과 작동가능한 조합으로 존재한다.

기준 폴리펩티드 서열에 관하여 "퍼센트 (%) 서열 동일성"은 서열을 정렬하고, 필요한 경우 갭을 도입하여 최대 퍼센트 서열 동일성을 달성한 후, 및 임의의 보존적 치환을 서열 동일성의 일부로 간주하지 않고, 기준 폴리펩티드 서열에서의 아미노산 잔기와 동일한 후보 서열에서의 아미노산 잔기의 백분율로 정의된다. 퍼센트 아미노산 서열 동일성을 결정하는 목적을 위한 정렬은 관련 기술분야의 기술 내인 다양한 방식으로, 예를 들어, 공개적으로 입수가능한 컴퓨터 소프트웨어, 예컨대 BLAST, BLAST-2, ALIGN 또는 메컬라인(Megalign) (DNASTAR) 소프트웨어를 사용하여 달성될 수 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 비교되는 서열의 전장에 걸쳐 최대 정렬을 달성하는데 필요한 임의의 알고리즘을 포함하여 서열을 정렬하기 위한 적절한 파라미터를 결정할 수 있다. 예를 들어, 주어진 아미노산 서열 B에 대한, 그와의, 또는 그에 대한 주어진 아미노산 서열 A의 % 서열 동일성 (대안적으로 주어진 아미노산 서열 B에 대한, 그와의, 또는 그에 대한 특정 % 서열 동일성을 갖거나 포함하는 주어진 아미노산 서열 A로 표현될 수 있음)은 하기와 같이 계산된다: $100 \times \text{분율 } X/Y$, 여기서 X는 A 및 B의 그 프로그램의 정렬에서의 서열에 의한 동일한 매치로 점수화된 아미노산 잔기의 수이고, 여기서 Y는 B에서의 아미노산 잔기의 총 수이다. 아미노산 서열 A의 길이가 아미노산 서열 B의 길이와 동일하지 않은 경우, B에 대한 A의 % 서열 동일성은 A에 대한 B의 % 서열 동일성과 동일하지 않을 것임이 이해될 것이다.

II. 항원을 코딩하는 mRNA

본 개시내용의 조성물 및 방법은 항원을 코딩하는 mRNA를 포함할 수 있거나, 또는 다른 방식으로 항원을 코딩하는 mRNA를 포함하는 제제와 함께 사용하기에 적합하다. 일부 실시양태에서, 항원은 단백질성 항원이다. "폴리펩티드" 및 "단백질"이라는 용어는 적어도 8개의 아미노산의 길이인 펩티드쇄를 포함하는 항원에 관하여 본원에서 상호교환가능하게 사용된다. 일부 실시양태에서, 항원은 8 내지 1800개의 아미노산, 9 내지 1000개의 아미노산, 또는 10 내지 100개의 아미노산의 길이이다. 폴리펩티드는 예컨대 인산화, 히드록실화, 술폰화, 팔미토일화, 및/또는 글리코실화에 의해 번역후 변형될 수 있다.

일부 실시양태에서, 항원은 적어도 하나의 전장 단백질의 아미노산 서열 또는 그의 단편을 포함하는 종양 항원

이다. 일부 실시양태에서, 종양 항원은 종양단백질로부터의 아미노산 서열 또는 그의 단편을 포함한다. 일부 실시양태에서, 포유동물 항원은 신생항원이거나 또는 포유동물 대상체로부터의 정상 세포에 존재하는 유전자에 비해 돌연변이를 포함하는 유전자에 의해 코딩된다. 신생항원은 T 세포가 암 세포와 비-암 세포를 구별하는 것을 가능하게 하는데 특히 유용한 것으로 생각된다 (예를 들어, 문헌 [Schumacher and Schreiber, Science, 348:69-74, 2015] 참조). 다른 실시양태에서, 종양 항원은 바이러스 항원, 예컨대 암-유발 바이러스의 항원을 포함한다.

[0058] 일부 실시양태에서, 종양 항원은 2개 이상의 폴리펩티드를 포함하는 융합 단백질이고, 여기서 각각의 폴리펩티드는 상이한 종양 항원으로부터의 아미노산 서열 또는 동일한 종양 항원으로부터의 비-인접 아미노산 서열을 포함한다. 이들 실시양태의 일부에서, 융합 단백질은 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드를 포함하고, 여기서 각각의 폴리펩티드는 동일한 종양 항원으로부터의 비-인접 아미노산 서열을 포함한다.

[0059] 일부 실시양태에서, 항원은 미생물 항원이다. 일부 실시양태에서, 미생물 항원은 바이러스 항원, 박테리아 항원, 원충 항원, 진균 항원, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 미생물 항원은 미생물의 표면 단백질 또는 다른 항원성 서브유닛을 포함한다.

[0060] 일부 바람직한 실시양태에서, mRNA는 코딩 영역의 5' 단부에 5' 비번역 영역 (5'UTR) 및 코딩 영역의 3' 단부에 3' 비번역 영역 (3'UTR)을 포함한다. 일부 바람직한 실시양태에서, mRNA는 5' 캡 구조 및 폴리A 꼬리 중 하나 또는 둘 다를 포함한다.

[0061] 일부 실시양태에서, mRNA는 리보솜 스킵핑 서열, 예컨대 서열식별번호: 12로서 제시된 2A-유사 서열을 추가로 코딩한다. 추가적인 2AL 서열은 서열식별번호: 13, 서열식별번호: 14, 및 서열식별번호: 15에 제시된다. mRNA가 2개 이상의 코딩 영역을 포함하는 일부 실시양태에서, 코딩 영역은 2AL 서열에 의해 분리될 수 있다. 예를 들어, 2AL 서열은 구성적으로 활성인 시클릭 GMP-AMP 신타제 (cGAS)의 코딩 영역과 항원의 코딩 영역 사이에 위치할 수 있다 (예를 들어, cGAS Δ NS-2AL-항원 또는 항원-2AL-cGAS Δ N). 유사하게, mRNA가 2개 이상의 항원에 대한 코딩 영역을 포함하는 일부 실시양태에서, 코딩 영역은 2AL 서열에 의해 분리될 수 있다 (예를 들어, 항원 1-2AL-항원2). 본 개시내용의 mRNA에 사용하기 위한 추가적인 2AL 서열은 관련 기술분야에 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Luke et al., J. Gen. Virol, 89:1036-1042, 2008] 참조, 도 2의 2AL 서열은 본원에 참조로 포함됨).

[0062] III. 지질-기반 전달 비히클

[0063] 본 개시내용의 조성물 및 방법은 mRNA 백신을 위한 지질-기반 전달 비히클을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 비히클은 지질 나노입자 (LNP)이다. 다른 실시양태에서, 비히클은 mRNA와 복합체를 형성하는 지질이다 (RNA-리포플렉스).

[0064] 일부 실시양태에서, LNP는 이온화가능한 지질, 양이온성 지질, 인지질, 폐길화 지질, 구조적 지질, 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 지질을 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 지질은 이온화가능한 지질을 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 지질은 양이온성 지질을 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 지질은 인지질을 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 지질은 폐길화 지질을 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 지질은 구조적 지질을 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 지질은 이온화가능한 지질, 인지질, 폐길화 지질, 및 구조적 지질을 포함한다.

[0065] 일부 실시양태에서, RNA-리포플렉스의 지질 성분은 하나 이상의 지질을 포함한다. 일부 바람직한 실시양태에서, 하나 이상의 지질은 제1 지질 및 제2 지질을 포함하고, 여기서 제1 지질은 제2 지질과 별개이다. 일부 실시양태에서, 제1 지질은 양이온성 지질이고, 제2 지질은 중성 또는 음이온성 지질이다.

[0066] 본 개시내용의 지질-기반 mRNA 전달 비히클에 사용하기에 적합한 지질의 구조는 문헌 [Hou et al., Nature Review Materials, 6:1078-1094, 2021]의 도 2로부터 개조된 **도 13A** 및 **도 13B**에 도시된다.

[0067] IV. 병원체 인식 수용체 효능제

[0068] 본 개시내용의 조성물 및 방법은 추가의 병원체 인식 수용체 (PRR) 효능제를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, PRR 효능제는 톨-유사 수용체 (TLR), NOD-유사 수용체 (NLR), RIG-I-유사 수용체 (RLR), 또는 C-유형 렉틴 수용체 (CLR)의 효능제를 포함한다. 일부 실시양태에서, PRR 효능제는 TLR7/8 효능제를 포함한다.

[0069] A. TLR7/8 효능제

- [0070] 본원에 사용된 바와 같은 "TLR7/8 효능제"라는 용어는 TLR7 및/또는 TLR8의 효능제를 지칭한다. 한 측면에서, TLR7/8 효능제는 TLR7 효능제이다. 또 다른 측면에서, TLR7/8 효능제는 TLR8 효능제이다. 추가의 측면에서, TLR7/8 효능제는 TLR7 및 TLR8 둘 다의 효능제이다. 본 개시내용의 TLR7/8 효능제는 DAMP, 예컨대 oxPAPC 또는 PGPC의 존재 하에서 인간 수지상 세포를 과활성화시키기에 적합하다.
- [0071] 일부 측면에서, TLR7/8 효능제는 소분자이다. 일부 실시양태에서, TLR7/8 효능제는 900 달톤 이하의 분자량을 갖는 소분자, 또는 그의 염이다. 즉, 소분자 TLR7/8 효능제는 미국 FDA의 생물체제 평가 및 연구 센터에 의해 규제가능한 재조합 단백질 또는 합성 올리고뉴클레오타이드와 같은 대분자가 아니다. 오히려 소분자 TLR7/8 효능제는 FDA의 약물 평가 및 연구 센터에 의해 규제가능하다. 일부 실시양태에서, 소분자는 약 90 내지 약 900 달톤의 분자량을 갖는다. 일부 실시양태에서, TLR7/8 효능제는 이미다조퀴놀린 화합물을 포함한다. 일부 바람직한 실시양태에서, TLR7/8 효능제는 레시퀴모드 (R848)를 포함한다.
- [0072] **B. 다른 PRR 효능제**
- [0073] 일부 측면에서, 병원체 인식 수용체 (PRR) 효능제는 톨-유사 수용체 (TLR) 효능제를 포함하되, 단, TLR 효능제는 TLR7/8 효능제를 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, TLR 효능제는 TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR9 및 TLR13 중 하나 이상의 효능제를 포함한다. 일부 실시양태에서, PRR 효능제는 TLR2/6 효능제, 예컨대 Pam2CSK4이다. 다른 실시양태에서, TLR 효능제는 TLR4 효능제, 예컨대 모노포스포릴 지질 A (MPLA)이다. 그러나, 바람직한 실시양태에서, TLR 효능제는 TLR2, TLR4 및/또는 TLR9의 효능제가 아니다. 예를 들어, 바람직한 실시양태에서, TLR9 효능제는 TLR4 리간드, 예컨대 LPS (내독소)가 아니다.
- [0074] 다른 측면에서, PRR 효능제는 NOD-유사 수용체 (NLR) 효능제를 포함한다. 추가의 측면에서, PRR 효능제는 RIG-I-유사 수용체 (RLR) 효능제를 포함한다. 추가적인 측면에서, PRR 효능제는 C-유형 렉틴 수용체 (CLR) 효능제를 포함한다.
- [0075] **V. 제약 제제**
- [0076] 본 개시내용의 일부 조성물은 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 제약 제제이다. 본 개시내용의 제약 제제는 용액 또는 현탁액의 형태일 수 있다. 대안적으로, 제약 제제는 탈수된 고체 (예를 들어, 동결 건조된 또는 분무 건조된 고체)일 수 있다. 본 개시내용의 제약 제제는 바람직하게는 멸균성이고, 바람직하게는 본질적으로 내독소가 없다. "제약 제제"라는 용어는 본원에서 "의약품" 및 "의약"이라는 용어와 상호교환가능하게 사용된다. 일부 실시양태에서, 제약 제제는 제제의 의도된 목적에 기반하여 특정 비의 다양한 성분을 포함한다.
- [0077] 본 개시내용의 제약상 허용되는 부형제는 예를 들어, 용매, 완충제, 긴장성 조정제, 벌크화제, 및 보존제를 포함한다 (예를 들어, 문헌 [Pramanick et al., Pharma Times, 45:65-77, 2013] 참조). 일부 실시양태에서, 제약 제제는 용매, 완충제, 긴장성 조정제, 및 벌크화제 중 하나 이상으로서 기능하는 부형제를 포함할 수 있다 (예를 들어, 염수 중 염화나트륨은 수성 비히클 및 긴장성 조정제 둘 다로서 역할을 할 수 있음).
- [0078] 일부 실시양태에서, 제약 제제는 용매로서 수성 비히클을 포함한다. 적합한 비히클은 예를 들어 멸균수, 염수 용액, 포스페이트 완충 염수, 및 링거 용액을 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 등장성이다.
- [0079] 제약 제제는 완충제를 포함할 수 있다. 완충제는 pH를 제어하여 프로세싱, 저장 및 임의로 제구성 동안 활성제의 분해를 억제한다. 적합한 완충제는 예를 들어 아세테이트, 시트레이트, 포스페이트 또는 술페이트를 포함하는 염을 포함한다. 다른 적합한 완충제는 예를 들어 아미노산, 예컨대 아르기닌, 글리신, 히스티딘, 및 리신을 포함한다. 완충제는 염산 또는 수산화나트륨을 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 완충제는 조성물의 pH를 6 내지 9의 범위 내로 유지한다. 일부 실시양태에서, pH는 6, 7 또는 8 (하한) 초과이다. 일부 실시양태에서, pH는 9, 8, 또는 7 (상한) 미만이다. 즉, pH는 약 6 내지 9의 범위이며, 여기서 하한은 상한보다 작다.
- [0080] 제약 조성물은 긴장성 조정제를 포함할 수 있다. 적합한 긴장성 조정제는 예를 들어 텍스트로스, 글리세롤, 염화나트륨, 글리세린 및 만니톨을 포함한다.
- [0081] 제약 제제는 벌크화제를 포함할 수 있다. 벌크화제는 제약 조성물이 투여 전에 동결건조되는 경우 특히 유용하다. 일부 실시양태에서, 벌크화제는 동결 또는 분무 건조 동안 및/또는 저장 동안 안정화 및 활성제의 분해의 방지를 보조하는 보호제이다. 적합한 벌크화제는 당 (모노-, 디- 및 폴리사카라이드), 예컨대 수크로스, 락토스, 트레할로스, 만니톨, 소르비탈, 글루코스 및 라피노스이다.
- [0082] 제약 제제는 보존제를 포함할 수 있다. 적합한 보존제는 예를 들어 항산화제 및 항미생물제를 포함한다. 그러

나, 바람직한 실시양태에서, 제약 제제는 멸균 조건 하에서 제조되고 단일 사용 용기에 존재하며, 따라서 보존제의 포함을 필요로 하지 않는다.

[0083] 본 개시내용의 제약 제제는 비경구 투여에 적합하다. 즉, 본 개시내용의 제약 제제는 장관 투여를 위해 의도되지 않는다 (예를 들어, 경구로, 위로, 또는 직장으로 의도되지 않음).

[0084] VI. 사용 방법

[0085] 일부 측면에서, 본 개시내용은 본원에 기술된 조성물 또는 제제 중 어느 하나의 사용 방법에 관한 것이다. 사용 방법은 면역 반응을 자극하는 것을 수반하는 복수의 용도에 적합하다. 일부 실시양태에서, 사용 방법은 암을 치료하는 방법을 포함한다. 일부 실시양태에서, 사용 방법은 비정상적 세포 증식을 억제하는 방법을 포함한다. 일부 실시양태에서, 사용 방법은 감염성 질환을 치료하거나 또는 예방하는 방법을 포함한다. 방법은 본원에 기술된 제제 또는 조성물의 유효량을 이를 필요로 하는 개체에게 투여하여 특정 결과를 달성하는 것을 포함한다. 개체는 포유동물 대상체, 예컨대 인간 환자이다. 다른 실시양태에서, 개체는 비-인간 환자이다. 일부 실시양태에서, 개체는 개 환자이다. 즉, 일부 실시양태에서, 사용 방법은 임상적 용도를 수반하는 반면, 다른 실시양태에서 사용 방법은 전임상 및/또는 수의학 용도를 수반한다. 전임상 용도를 위해, 포유동물 대상체는 비-인간 영장류 (예를 들어, 원숭이 또는 유인원) 또는 설치류 (예를 들어, 마우스 또는 래트)일 수 있다. 수의학 용도를 위해, 포유동물 대상체는 농장 동물 (예를 들어, 소), 스포츠 동물 (예를 들어, 말), 또는 애완동물 (예를 들어, 반려 동물, 예컨대 개 또는 고양이)일 수 있다.

[0086] A. 면역 반응의 자극

[0087] 간략하게, 본 개시내용은 개체에서 면역 반응을 자극하는 방법으로서, 본원에 기술된 조성물 또는 제제를 개체에서 면역 반응을 자극하기에 충분한 양으로 개체에게 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 면역 반응을 "자극하는 것" (면역 반응을 "유발하는 것"과 상호교환가능하게 사용됨)은 드 노보 면역 반응을 유발하는 것 (예를 들어, 초기 백신접종 요법의 결과로서) 또는 기존의 면역 반응을 증진시키는 것 (예를 들어, 부스터 백신접종 요법의 결과로서)으로부터 발생할 수 있는 면역 반응을 증가시키는 것을 의미한다. 일부 실시양태에서, 면역 반응을 자극하는 것은 다음으로 이루어진 군 중 하나 이상을 포함한다: 시토카인 생성을 자극하는 것; B 림프구 증식을 자극하는 것; 인터페론 경로-연관 유전자 발현을 자극하는 것; 화학유인물질-연관 유전자 발현을 자극하는 것; 및 수지상 세포 DC 성숙을 자극하는 것. 면역 반응의 자극을 측정하는 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있다.

[0088] 예를 들어, 본 개시내용은 본원에 기술된 조성물 또는 제제를 개체에서 항원-특이적 면역 반응을 유도하기에 충분한 양으로 개체에게 투여함으로써 개체에서 항원-특이적 면역 반응을 유도하는 방법을 제공한다. 바람직한 실시양태에서, 조성물 또는 제제는 항원을 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물 또는 제제는 항원을 포함하는 개체의 조직에 투여된다. 면역 반응은 항원-특이적 항체 반응, 항원-특이적 세포독성 T 림프구 (CTL) 반응, 및 항원-특이적 헬퍼 T (Th) 세포 반응 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 항원-특이적 항체 반응을 "유도하는 것"은 항원-특이적 항체의 역가를 역치 수준, 예컨대 투여전 기준선 역가 또는 혈청보호적 수준 초과로 증가시키는 것을 의미한다. 항원-특이적 CTL 반응을 "유도하는 것"은 말초 혈액에서 발견되는 항원-특이적 CTL의 빈도를 투여전 기준선 빈도 초과로 증가시키는 것을 의미한다. 항원-특이적 Th 세포 반응을 "유도하는 것"은 말초 혈액에서 발견되는 항원-특이적 Th 세포의 빈도를 투여전 기준선 빈도 초과로 증가시키는 것을 의미한다.

[0089] 면역 반응의 분석 (정성적 및 정량적 둘 다)은 항원-특이적 항체 생성 (특이적 항체 하위부류를 측정하는 것 포함), 림프구의 특정 집단, 예컨대 B 세포 및 헬퍼 T 세포의 활성화, 시토카인, 예컨대 IFN-알파, IFN-감마, IL-6, IL-12의 생성 및/또는 히스타민의 방출을 측정하는 것을 포함하지만 이에 제한되지 않는 관련 기술분야에 공지된 임의의 방법에 의한 것일 수 있다. 항원-특이적 항체 반응을 측정하는 방법은 효소-결합 면역흡착 검정 (ELISA)을 포함한다. 림프구의 특정 집단의 활성화는 증식 검정에 의해, 및 형광-활성화 세포 분류 (FACS)로 측정될 수 있다. 시토카인의 생성은 또한 ELISA에 의해 측정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 면역 반응을 자극하는 방법은 단핵구-유래 수지상 세포 또는 말초 혈액 단핵 세포에 의한 인터류킨-1베타 (IL-1 β) 분비, 인터페론-감마 (IFN- γ) 분비, 및/또는 종양 괴사 인자-알파 (TNF- α) 분비의 자극을 포함한다. 일부 바람직한 실시양태에서, 본 개시내용의 조성물과 접촉된 세포의 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70% 또는 75%는 접촉 후 40-56 시간 (또는 약 48시간)에서 생존가능하게 남아 있다.

[0090] 일부 실시양태에서, 방법은 항-종양 면역 반응을 자극하기에 적합하다. 다른 실시양태에서, 방법은 항-미생물 면역 반응을 자극하기에 적합하다. 일부 실시양태에서, 항-미생물 반응은 항-박테리아 면역 반응이다. 일부

실시양태에서, 항-미생물 반응은 항-진균 면역 반응이다. 일부 실시양태에서, 항-미생물 반응은 항-바이러스 면역 반응이다. 일부 실시양태에서, 항-미생물 반응은 항-원충 면역 반응이다.

[0091] B. 질환의 치료 또는 예방

[0092] 본 개시내용은 개체에서 질환을 치료하거나 또는 예방하는 방법으로서, 본원에 기술된 조성물 또는 제제를 개체에서 질환을 치료하거나 또는 예방하기에 충분한 양으로 개체에게 투여하는 것을 포함하는 방법을 추가로 제공한다. 일부 실시양태에서, 질환은 암이다. 일부 실시양태에서, 질환은 비정상적 세포 증식이다. 다른 실시양태에서, 질환은 감염성 질환이다.

[0093] 일부 실시양태에서, 방법은 개체에서 암을 치료하거나 또는 다른 방식으로 암을 갖는 포유동물 대상체를 치료하는 것을 수반한다. 일부 실시양태에서, 암은 혈액암, 예컨대 림프종, 백혈병, 또는 골수종이다. 다른 실시양태에서, 암은 비-혈액암, 예컨대 육종, 암종, 또는 흑색종이다. 일부 실시양태에서, 암은 악성이다.

[0094] 일부 실시양태에서, 방법은 개체에서 비정상적 세포 증식을 억제하는 것을 수반한다. "비정상적 세포 증식"은 양성 종양 또는 악성 종양의 증식을 지칭한다. 악성 종양은 전이성 종양일 수 있다.

[0095] 일부 실시양태에서, 방법은 개체에서 감염성 질환을 치료하거나 또는 예방하는 것을 수반한다. 일부 실시양태에서, 감염성 질환은 바이러스 감염에 의해 유발된다. 다른 실시양태에서, 감염성 질환은 박테리아 감염에 의해 유발된다. 추가의 실시양태에서, 감염성 질환은 진균 감염에 의해 유발된다. 또한 추가의 실시양태에서, 감염성 질환은 원충 감염에 의해 유발된다. 특히 중요한 것은 인간 뿐만 아니라 다른 동물, 예컨대 포유동물 또는 조류를 감염시키는 인수공통 병원체에 의해 유발되는 감염성 질환이다. 일부 실시양태에서, 인수공통 병원체는 중간 종 (백터)을 통해 인간에게 전염된다.

[0096] 열거된 실시양태

[0097] 이 섹션에서, 실시양태 1은 실시양태 1' 및 실시양태 1" 둘 다를 지칭한다.

[0098] 1'. 제1 지질 나노입자 (LNP)에 캡슐화된 제1 mRNA 및 제2 LNP에 캡슐화된 제2 mRNA를 포함하는 조성물로서,

[0099] 여기서 제1 mRNA는 구성적으로 활성인 시클릭 GMP-AMP 신타제 (cGAS)의 코딩 영역을 포함하고,

[0100] 여기서 제2 mRNA는 항원의 코딩 영역을 포함하고,

[0101] 여기서 제1 LNP 및 제2 LNP 둘 다는 인지질, 및 이온화가능한 지질, 폐길화 지질, 구조적 지질, 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 지질을 포함하는 것인

[0102] 조성물.

[0103] 1". 지질 나노입자 (LNP)에 캡슐화된 mRNA를 포함하는 조성물로서, 여기서 mRNA는 구성적으로 활성인 시클릭 GMP-AMP 신타제 (cGAS)의 코딩 영역을 포함하고, LNP는 인지질, 및 이온화가능한 지질, 폐길화 지질, 구조적 지질, 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 지질을 포함하고, 임의로 여기서 조성물은 추가의 지질 나노입자에 캡슐화된 추가의 mRNA를 추가로 포함하고, 추가의 mRNA는 관심 항원의 코딩 영역을 포함하고, LNP는 인지질, 및 이온화가능한 지질, 폐길화 지질, 구조적 지질, 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 지질을 포함하는 것인 조성물.

[0104] 2. 지질 나노입자 (LNP)에 캡슐화된 제1 mRNA 및 제2 mRNA를 포함하는 조성물로서, 여기서 제1 mRNA는 구성적으로 활성인 시클릭 GMP-AMP 신타제 (cGAS)의 코딩 영역을 포함하고, 제2 mRNA는 항원의 코딩 영역을 포함하고; LNP는 인지질, 및 이온화가능한 지질, 폐길화 지질, 구조적 지질, 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 지질을 포함하는 것인 조성물.

[0105] 3. 지질 나노입자 (LNP)에 캡슐화된 mRNA를 포함하는 조성물로서, 여기서 mRNA는 2A-유사 서열에 의해 분리된 제1 코딩 영역 및 제2 코딩 영역을 포함하고, 여기서 제1 코딩 영역은 구성적으로 활성인 시클릭 GMP-AMP 신타제 (cGAS)의 코딩 영역이고 제2 코딩 영역은 항원의 코딩 영역이거나, 또는 제1 코딩 영역은 항원의 코딩 영역이고 제2 코딩 영역은 구성적으로 활성인 시클릭 GMP-AMP 신타제 (cGAS)의 코딩 영역이고, LNP는 인지질, 및 이온화가능한 지질, 폐길화 지질, 구조적 지질, 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 지질을 포함하는 것인 조성물.

[0106] 4. 실시양태 1 내지 3 중 어느 하나에 있어서, 적어도 하나의 지질이 이온화가능한 지질, 폐길화 지질, 및 구조적 지질을 포함하는 것인 조성물.

- [0107] 5. 실시양태 1 내지 4 중 어느 하나에 있어서, 이온화가능한 지질이 하기를 포함하는 것인 조성물:
- [0108] i) 8-[(2-히드록시에틸)[6-옥소-6-(운데실옥시)헥실]아미노]-옥탄산, 1-옥틸노닐 에스테르 (SM-102) 또는 그의 유사체 또는 유도체; 및/또는
- [0109] ii) 6-((2-헥실데카노일)옥시)-N-(6-((2-헥실데카노일)옥시)헥실)-N-(4-히드록시부틸)헥산-1-아미늄 (ALC-0315) 또는 그의 유사체 또는 유도체; 및/또는
- [0110] iii) (6Z,9Z,28Z,31Z)-헵타트리아콘타-6,9,28,31-테트라엔-19-일 4-(디메틸아미노)부타노에이트 (DLin-MC3-DMA) 또는 그의 유사체 또는 유도체.
- [0111] 6. 실시양태 1 내지 5 중 어느 하나에 있어서, 폐길화 지질이 PEG-변형된 포스파티딜에탄올아민, PEG-변형된 포스파티드산, PEG-변형된 세라마이드, PEG-변형된 디알킬아민, PEG-변형된 디아실글리세롤, PEG-변형된 디알킬글리세롤, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 조성물.
- [0112] 7. 실시양태 1 내지 5 중 어느 하나에 있어서, 폐길화 지질이 폴리에틸렌 글리콜 [PEG] 2000 디미리스토일 글리세롤 [DMG]을 포함하는 것인 조성물.
- [0113] 8. 실시양태 1 내지 7 중 어느 하나에 있어서, 구조적 지질이 콜레스테롤, 페코스테롤, 시토스테롤, 에르고스테롤, 캄페스테롤, 스티그마스테롤, 브라시카스테롤, 토마티딘, 우르솔산, 알파-토코페롤, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 조성물.
- [0114] 9. 실시양태 1 내지 7 중 어느 하나에 있어서, 구조적 지질이 콜레스테롤을 포함하는 것인 조성물.
- [0115] 10. 실시양태 1 내지 9 중 어느 하나에 있어서, 인지질이 하기를 포함하는 것인 조성물:
- [0116] i) 포스파티딜 콜린, 포스파티딜 에탄올아민, 포스파티딜 글리세롤, 포스파티딜 세린, 포스파티드산, 2-리소포스파티딜 콜린, 및 스핑고미엘린으로 이루어진 군으로부터 선택되는 친수성 머리 모이어티; 및
- [0117] ii) 라우르산, 미리스트산, 미리스톨레산, 팔미트산, 팔미톨레산, 스테아르산, 올레산, 리놀레산, 알파-리놀렌산, 에루스산, 아라키드산, 아라키돈산, 피탄산, 에이코사펜타엔산, 베헨산, 도코사펜타엔산, 및 도코사헥사엔산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 지방산 꼬리 모이어티.
- [0118] 11. 실시양태 1 내지 9 중 어느 하나에 있어서, 인지질이 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 조성물:
- [0119] 1,2-디리놀레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (DLPC),
- [0120] 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (DMPC),
- [0121] 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (DOPC),
- [0122] 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (DPPC),
- [0123] 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (DSPC),
- [0124] 1,2-디운데카노일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (DUPC),
- [0125] 1-팔미토일-2-올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (POPC),
- [0126] 1,2-디-O-옥타데세닐-sn-글리세로-3-포스포콜린,
- [0127] 1-올레오일-2-콜레스테릴헤미숙시노일-sn-글리세로-3-포스포콜린,
- [0128] 1,2-디리놀레노일-sn-글리세로-3-포스포콜린,
- [0129] 1,2-디아라키도노일-sn-글리세로-3-포스포콜린,
- [0130] 1,2-디도코사헥사에노일-sn-글리세로-3-포스포콜린,
- [0131] 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 (DOPE),
- [0132] 1,2-디피타노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민,
- [0133] 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민,
- [0134] 1,2-디리놀레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민,

- [0135] 1,2-디리놀레노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민,
- [0136] 1,2-디아라키도노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민,
- [0137] 1,2-디도코사헥사에노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민,
- [0138] 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포-rac-(1-글리세롤) 나트륨 염 (DOPG),
- [0139] 스펡고미엘린, 및
- [0140] 이들의 조합.
- [0141] 12. 실시양태 11에 있어서, 인지질이 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (DSPC)을 포함하는 것인 조성물.
- [0142] 13. 실시양태 1 내지 12 중 어느 하나에 있어서, 조성물이 적어도 하나의 부형제를 추가로 포함하고, 임의로 여기서 부형제가 수크로스를 포함하는 것인 조성물.
- [0143] 14. 실시양태 1 내지 13 중 어느 하나에 있어서, 조성물이 리소포스파티딜콜린 (LPC)을 포함하지 않고, 임의로 LPC가 단일 C13-C24 아실 쇠를 갖는 것인 조성물.
- [0144] 15. 하나 이상의 지질과 복합체화된 mRNA (RNA-리포플렉스)를 포함하는 조성물로서;
- [0145] 여기서 mRNA는 구성적으로 활성인 시클릭 GMP-AMP 신타제 (cGAS)의 코딩 영역을 포함하고, 하나 이상의 지질은 제1 지질 및 제2 지질을 포함하는 것인 조성물.
- [0146] 16. 하나 이상의 지질과 복합체화된 제1 mRNA 및 제2 mRNA (RNA-리포플렉스)를 포함하는 조성물로서;
- [0147] 여기서 제1 mRNA는 구성적으로 활성인 시클릭 GMP-AMP 신타제 (cGAS)의 코딩 영역을 포함하고, 제2 mRNA는 항원의 코딩 영역을 포함하고, 하나 이상의 지질은 제1 지질 및 제2 지질을 포함하는 것인 조성물.
- [0148] 17. 하나 이상의 지질과 복합체화된 mRNA (RNA-리포플렉스)를 포함하는 조성물로서;
- [0149] 여기서 mRNA는 2A-유사 서열에 의해 분리된 제1 코딩 영역 및 제2 코딩 영역을 포함하고, 제1 코딩 영역은 구성적으로 활성인 시클릭 GMP-AMP 신타제 (cGAS)의 코딩 영역이고 제2 코딩 영역은 항원의 코딩 영역이거나, 또는 제1 코딩 영역은 항원의 코딩 영역이고 제2 코딩 영역은 구성적으로 활성인 시클릭 GMP-AMP 신타제 (cGAS)의 코딩 영역이고, 하나 이상의 지질은 제1 지질 및 제2 지질을 포함하는 것인 조성물.
- [0150] 18. 실시양태 15 내지 17 중 어느 하나에 있어서, 제1 지질이 양이온성 지질이고, 제2 지질이 중성 또는 음이온성 지질인 조성물.
- [0151] 19. 실시양태 18에 있어서, 양이온성 지질이 하기 중 하나 또는 둘 다를 포함하는 것인 조성물:
- [0152] i) 1,2-디-0-옥타데세닐-3-트리메틸암모늄 프로판 (DOTMA) 또는 그의 유사체 또는 유도체; 및
- [0153] ii) 1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄 프로판 (DOTAP) 또는 그의 유사체 또는 유도체.
- [0154] 20. 실시양태 18 또는 실시양태 19에 있어서, 중성 또는 음이온성 지질이 하기를 포함하는 것인 조성물:
- [0155] i) 1,2-디-(9Z-옥타데세노일)-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 (DOPE) 또는 그의 유사체 또는 유도체; 및/또는
- [0156] ii) 콜레스테롤 또는 그의 유사체 또는 유도체; 및/또는
- [0157] iii) 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (DOPC) 또는 그의 유사체 또는 유도체.
- [0158] 21. 실시양태 1 내지 20 중 어느 하나에 있어서, TLR7/8 효능제를 추가로 포함하는 조성물.
- [0159] 22. 실시양태 21에 있어서, TLR7/8 효능제가 900 달톤 이하의 분자량을 갖는 소분자인 조성물.
- [0160] 23. 실시양태 22에 있어서, TLR7/8 효능제가 이미다조퀴놀린 화합물을 포함하는 것인 조성물.
- [0161] 24. 실시양태 23에 있어서, TLR7/8 효능제가 레시퀴모드 (R848)를 포함하는 것인 조성물.
- [0162] 25. 실시양태 1 내지 24 중 어느 하나에 있어서, mRNA 또는 제1 mRNA 및 제2 mRNA가 5' 비번역 영역 (5'UTR) 및 3' 비번역 영역 (3'UTR)을 포함하는 것인 조성물.
- [0163] 26. 실시양태 1 내지 25 중 어느 하나에 있어서, mRNA가 5' 캡 구조를 포함하는 것인 조성물.

- [0164] 27. 실시양태 1 내지 26 중 어느 하나에 있어서, mRNA가 폴리A 꼬리를 포함하는 것인 조성물.
- [0165] 28. 실시양태 1 내지 27 중 어느 하나에 있어서, mRNA가 뉴클레오시드-변형된 mRNA인 조성물.
- [0166] 29. 실시양태 1 내지 28 중 어느 하나에 있어서, 구성적으로 활성인 cGAS가 그의 야생형 대응물보다 더 큰 자기 DNA 반응성에 대한 경향성을 갖는 것인 조성물.
- [0167] 30. 실시양태 1 내지 29 중 어느 하나에 있어서, cGAS가 아미노-말단 포스포이노시티드-결합 도메인이 없는 말단절단된 cGAS (cGAS Δ N)인 조성물.
- [0168] 31. 실시양태 30에 있어서, cGAS Δ N이 서열식별번호: 1의 아미노산 서열 또는 서열식별번호: 1과 적어도 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인 조성물.
- [0169] 32. 실시양태 31에 있어서, cGAS Δ N이 하기를 포함하는 것인 조성물:
- [0170] (i) 서열식별번호: 2, 서열식별번호: 3, 서열식별번호: 4, 서열식별번호: 5, 서열식별번호: 6, 서열식별번호: 7 또는 서열식별번호: 8의 아미노산 서열, 또는 서열식별번호: 2, 서열식별번호: 3, 서열식별번호: 4, 서열식별번호: 5, 서열식별번호: 6, 서열식별번호: 7 또는 서열식별번호: 8과 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열; 또는
- [0171] (ii) 서열식별번호: 9의 컨센서스 아미노산 서열.
- [0172] 33. 실시양태 31에 있어서, cGAS Δ N이 서열식별번호: 17의 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 것인 조성물.
- [0173] 34. 실시양태 30 내지 33 중 어느 하나에 있어서, cGAS Δ N의 코딩 영역이 시작 코돈 (ATG)과 작동가능한 조합으로 존재하는 것인 조성물.
- [0174] 35. 실시양태 1 내지 34 중 어느 하나에 있어서, 항원이 종양 항원인 조성물.
- [0175] 36. 실시양태 35에 있어서, 종양 항원이 종양-연관 항원인 조성물.
- [0176] 37. 실시양태 35에 있어서, 종양 항원이 신생항원인 조성물.
- [0177] 38. 실시양태 1 내지 34 중 어느 하나에 있어서, 항원이 미생물 항원을 포함하는 것인 조성물.
- [0178] 39. 실시양태 38에 있어서, 미생물 항원이 바이러스 항원, 박테리아 항원, 원충 항원, 또는 진균 항원을 포함하는 것인 조성물.
- [0179] 40. 실시양태 1 내지 34 중 어느 하나에 있어서, 항원이 병원체의 표면 단백질 또는 그의 단편을 포함하는 것인 조성물.
- [0180] 41. 실시양태 40에 있어서, 병원체가 인간 대상체에서 질환을 유발할 수 있는 것인 조성물.
- [0181] 42. 실시양태 40 또는 실시양태 41에 있어서, 병원체가 바이러스인 조성물.
- [0182] 43. 실시양태 42에 있어서, 바이러스가 SARS-CoV-2인 조성물.
- [0183] 44. 실시양태 43에 있어서, 항원이 SARS-CoV-2의 스파이크 (S) 당단백질이고, 임의로 여기서 스파이크 당단백질이 융합전 안정화된 변이체인 조성물.
- [0184] 45. 실시양태 1 내지 44 중 어느 하나에 있어서, 조성물이 리포폴리사카라이드 (LPS) 또는 모노포스포릴 지질 A (MPLA)를 포함하지 않는 것인 조성물.
- [0185] 46. 실시양태 1 내지 45 중 어느 하나에 있어서, 조성물이 산화된 1-팔미토일-2-아라키도노일-sn-글리세로-3-포스포틸콜린 (oxPAPC) 또는 oxPAPC의 중을 포함하지 않는 것인 조성물.
- [0186] 47. 실시양태 46에 있어서, 조성물이 2-[[(2R)-2-[(E)-7-카르복시-5-히드록시헵트-6-에노일]옥시-3-헥사데카노일옥시프로필]-히드록시포스포틸]옥시에틸-트리메틸아자늄 (HODiA-PC), [(2R)-2-[(E)-7-카르복시-5-옥소헵트-6-에노일]옥시-3-헥사데카노일옥시프로필] 2-(트리메틸아자늄일)에틸 포스페이트 (KODiA-PC), 1-팔미토일-2-(5-히드록시-8-옥소-옥테노일)-sn-글리세로-3-포스포틸콜린 (HOOA-PC), 2-[[(2R)-2-[(E)-5,8-디옥소옥트-6-에노일]옥시-3-헥사데카노일옥시프로필]-히드록시포스포틸]옥시에틸-트리메틸아자늄 (KOOA-PC), [(2R)-3-헥사데카노일옥시-2-(5-옥소펜타노일옥시)프로필] 2-(트리메틸아자늄일)에틸 포스페이트 (POVPC), [(2R)-2-(4-카르복시부타노일옥시)-3-헥사데카노일옥시프로필] 2-(트리메틸아자늄일)에틸 포

스페이트 (PGPC), [(2R)-3-헥사데카노일옥시-2-[4-[3-[(E)-[2-[(Z)-옥트-2-에닐]-5-옥소시클로펜트-3-엔-1-일리덴]메틸]옥시란-2-일]부타노일옥시]프로필] 2-(트리메틸아자늄일)에틸 포스페이트 (PECPC), [(2R)-3-헥사데카노일옥시-2-[4-[3-[(E)-[3-히드록시-2-[(Z)-옥트-2-에닐]-5-옥소시클로펜틸리덴]메틸]옥시란-2-일]부타노일옥시]프로필] 2-(트리메틸아자늄일)에틸 포스페이트 (PEIPC) 및/또는 1-팔미토일-2-아젤라오일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (PAzePC)을 포함하지 않는 것인 조성물.

- [0187] 48. 실시양태 1 내지 47 중 어느 하나의 조성물, 및 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 제약 제제.
- [0188] 49. 과활성화된 수지상 세포의 생성 방법으로서, 수지상 세포를 실시양태 1 내지 47 중 어느 하나, 실시양태 21 내지 47 중 어느 하나의 조성물, 또는 실시양태 48의 제제의 유효량과 접촉시켜 과활성화된 수지상 세포를 생성하는 것을 포함하고, 여기서 과활성화된 수지상 세포는 노출 약 48시간 이내에 세포 사멸을 겪지 않으면서 IL-1 베타를 분비하는 것인 방법.
- [0189] 50. 실시양태 49에 있어서, 수지상 세포가
- [0190] (i) 생체내에서 조성물과 접촉되거나; 또는
- [0191] (ii) 생체외에서 조성물과 접촉되는 것인
- [0192] 방법.
- [0193] 51. 실시양태 49 또는 실시양태 50에 있어서, 과활성화된 수지상 세포가
- [0194] (i) 비자극된 수지상 세포 또는 비어있는 LNP와 접촉된 수지상 세포보다 더 높은 수준의 RANTES, IP-10 및 IFN α 중 하나 이상을 분비하고/거나;
- [0195] (ii) 더 높은 수준의 CD40, CD86, CD69, MHC 부류 II, MHC 부류 I, CCR7, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 세포 표면 마커를 발현하는 것인
- [0196] 방법.
- [0197] 52. 실시양태 49 내지 51 중 어느 하나의 방법에 의해 생성된 적어도 10^3 , 10^4 , 10^5 또는 10^6 개의 과활성화된 수지상 세포, 및 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 제약 제제.
- [0198] 53. 항원에 대한 면역 반응을 자극하는 방법으로서, 실시양태 48 또는 실시양태 52의 제약 제제의 유효량을 이를 필요로 하는 개체에게 투여하여 항원에 대한 면역 반응을 자극하는 것을 포함하는 방법.
- [0199] 54. 암을 치료하는 방법으로서, 실시양태 48 또는 실시양태 52의 제약 제제의 유효량을 이를 필요로 하는 개체에게 투여하여 암을 치료하는 것을 포함하는 방법.
- [0200] 55. 비정상적 세포 증식을 억제하는 방법으로서, 실시양태 48 또는 실시양태 52의 제약 제제의 유효량을 이를 필요로 하는 개체에게 투여하여 비정상적 세포 증식을 억제하는 것을 포함하는 방법.
- [0201] 56. 감염성 질환을 치료하거나 또는 예방하는 방법으로서, 실시양태 48의 제약 제제의 유효량을 이를 필요로 하는 개체에게 투여하여 감염성 질환을 치료하거나 또는 예방하는 것을 포함하는 방법.
- [0202] 57. 실시양태 56에 있어서, 감염성 질환이 바이러스성 질환인 방법.
- [0203] 58. 실시양태 56에 있어서, 감염성 질환이 박테리아성 질환인 방법.
- [0204] 59. 실시양태 49 내지 55 중 어느 하나에 있어서, 수지상 세포가 포유동물 세포인 방법 또는 제약 제제.
- [0205] 60. 실시양태 59에 있어서, 포유동물 세포가 인간 세포인 방법 또는 제약 제제.
- [0206] 61. 실시양태 53 내지 59 중 어느 하나에 있어서, 개체가 포유동물인 방법.
- [0207] 62. 실시양태 61에 있어서, 포유동물이 인간인 방법.
- [0208] 63. 실시양태 61에 있어서, 포유동물이 개 또는 고양이인 방법.
- [0209] 64. 실시양태 1 내지 63 중 어느 하나에 있어서, 인지질이 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (DSPC)을 포함하고, 적어도 하나의 지질이 8-[(2-히드록시에틸)[6-옥소-6-(운데실옥시)헥실]아미노]-옥탄산, 1-옥틸노닐 에스테르 (SM-102) 또는 그의 유사체 또는 유도체, 및 콜레스테롤을 포함하는 것인 조성물, 제제, 또는 방법.

- [0210] 65. 실시양태 64에 있어서, 적어도 하나의 지질이 폐길화 지질을 추가로 포함하고, 임의로 여기서 폐길화 지질이 폴리에틸렌 글리콜 [PEG] 2000 디미리스토일 글리세롤 [DMG]을 포함하는 것인 조성물, 제제, 또는 방법.
- [0211] 66. 실시양태 1 내지 65 중 어느 하나에 있어서, LNP가 약 250 나노미터 미만, 임의로 약 25 내지 약 250 나노미터, 임의로 약 50 내지 약 200 나노미터, 또는 임의로 약 75 내지 약 175 나노미터의 유효 직경을 갖는 것인 조성물, 제제, 또는 방법.
- [0212] 67. 실시양태 66에 있어서, LNP가 약 200 나노미터 미만의 유효 직경을 갖는 것인 조성물, 제제, 또는 방법.
- [0213] 68. 실시양태 67에 있어서, LNP가 약 150 나노미터 미만의 유효 직경을 갖는 것인 조성물, 제제, 또는 방법.
- [0214] **실시예**
- [0215] 약어: BMDC (골수-유래 수지상 세포); CDS (시토졸 DNA 센서); 시클릭 GMP-AMP 신타제 (cGAS); CLR (C-유형 렉틴 수용체); DAMP (손상-연관 분자 패턴); DC (수지상 세포); dLN (배수 림프절); DLS (동적 광 산란); DMG-PEG-2000 (폴리에틸렌 글리콜 [PEG] 2000 디미리스토일 글리세롤 [DMG]; DSPC (1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린); ELSD (증발 광 산란 검출기); FLT3L (Fms-관련 티로신 키나제 3 리간드); GFP (녹색 형광 단백질); GV (GenVoy ILM™ 제제); (HODiA-PC (1-팔미토일-2-(5-히드록시-8-옥소-6-옥텐디오일)-sn-글리세로-3-포스파티딜콜린); HOOA-PC (1-팔미토일-2-(5-히드록시-8-옥소옥트-6-에노일)-sn-글리세로-3-포스포콜린); IFN γ (인터페론-감마); IL-1b/IL1-베타/IL-1 β (인터류킨-1베타); KODiA-PC (1-(팔미토일)-2-(5-케토-6-옥텐-디오일) 포스파티딜콜린); KOOA-PC (1-팔미토일-(5-케토-8-옥소-6-옥테노일)-sn-글리세로-3-포스포콜린); LNP (지질 나노입자); LPC/Lyso PC (리소포스파티딜콜린); Lyso PC(22:0) (1-베헤노일-2-히드록시-sn-글리세로-3-포스포콜린); LPS (리포폴리사카라이드); MC3 ((6Z,9Z,28Z,31Z)-헵타트리아콘타-6,9,28,31-테트라엔-19-일 4-(디메틸아미노)부타노에이트, 일명 DLin-MC3-DMA); mcg 또는 μ g (마이크로그램); moDC (단핵구-유래 수지상 세포); MPLA (모노포스포릴 지질 A); NLR (NOD-유사 수용체); OVA (오브알부민); oxPAPC (산화된 1-팔미토일-2-아라키도닐-sn-글리세로-3-포스포콜린); PAMP (병원체-연관 분자 패턴); PBMC (말초 혈액 단핵 세포); PGPc (1-팔미토일-2-글루타릴-sn-글리세로-3-포스포콜린); POVPC (1-팔미토일-2-(5'-옥소-발레로일)-sn-글리세로-3-포스포콜린); PRR (병원체 인식 수용체); RLR (RIG-I-유사 수용체); R848 (레스퀴모드); SC (피하로); STING (인터페론 유전자의 자극제); TNF α (종양 괴사 인자-알파); 및 TLR (톨-유사 수용체).
- [0216] 본 개시내용은 명확성 및 이해의 목적을 위해 예시 및 실시예에 의해 일부 상세하게 기술되었지만, 특정 변화 및 변형이 실시될 수 있음이 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백할 것이다. 따라서, 하기 실시예는 첨부된 청구범위에 의해 기술되는 본 개시내용의 범주를 제한하는 것으로 해석되지 않아야 한다.
- [0217] **실시예 1: 뮤린 DC는 cGAS Δ N mRNA를 함유하는 LNP에 의해 시험관내에서 활성화가능하다**
- [0218] **재료 & 방법**
- [0219] **재료.** GenVoy ILM™ 이온화가능한 지질 혼합물은 프리시전 나노시스템즈로부터 구입하였다. 120 잔기 폴리A 꼬리, 5-메톡시우리딘 염기 변형, 및 포유동물 시스템에서의 발현을 위한 코돈 최적화를 갖는 클린캡(CleanCap) OVA 및 GFP mRNA는 트리링크(Trilink)로부터 기성품으로 구입하였다. cGAS Δ N mRNA는 트리링크로부터 맞춤형 주문하였고, 선형화된 주형 DNA로부터 시험관내 전사를 통해 합성하였다. 인간 cGAS Δ N 서열의 뉴클레오티드 서열을 뮤린 세포에서의 발현을 위해 코돈 최적화하였으며, 합성 뉴클레오티드 서열은 서열식별번호: 17로서 제시된다. mRNA 서열을 N1-메틸슈도우리딘 염기 변형, 및 120 잔기 폴리A 꼬리를 갖도록 트리링크의 독점적 클린캡 mRNA 기술을 사용하여 캡핑하였다. 서열은 BbsI 제한 효소 부위를 함유한다. mRNA를 합성 후 포스파타제 처리하였다.
- [0220] **LNP 합성.** 지질 나노입자 (LNP)를 GenVoy ILM™ 이온화가능한 지질 혼합물 (프리시전 나노시스템즈)을 사용하여 제조하였다. OVA mRNA, GFP mRNA, 및 cGAS Δ N mRNA (트리링크)를 각각 시트르산나트륨 완충제, pH 4에서 0.17 mg/mL로 제조하였다. GenVoy ILM™을 12.5 mM로 사용하였다. LNP를 나노어셈블러 이그나이트(NanoAssemblr Ignite) 기기 (프리시전 나노시스템즈)를 사용하여 합성하였다. 에탄올 중 지질을 12 mL/분의 유속을 사용하여 mRNA 용액과 1:3 부피 비로 개별적으로 배합하였다. LNP를 10 부피의 포스페이트 완충 염수(PBS), pH 7.4에서 세척하여 잔류 에탄올을 제거하고, 이어서 아미콘(Amicon) 10K MWCO 원심분리 필터를 사용하여 농축시켰다. LNP를 사용 전에 0.2 μ m 필터를 통해 여과하였다.
- [0221] **LNP 특징규명.** LNP 내로의 mRNA의 로딩을 리보그린(RiboGreen) 검정 (써모피셔(ThermoFisher))을 사용하여 제

조업체의 프로토콜에 따라 정량화하였다. 샘플을 표준 곡선의 범위 내에 해당하도록 희석하였다. LNP를 트리톤(Triton) X-100을 사용하여 용해시켜 LNP 내로의 mRNA의 캡슐화를 평가하였다. 총 mRNA 및 캡슐화된 mRNA 둘 다를 정량화하였다. LNP의 크기를 나노브루크 옴니(NanoBrook Omni) (브루크하벤(Brookhaven)) 상에서 동적 광산란 (DLS)을 사용하여 평가하였다. LNP를 PBS에 1:10 희석한 후, DLS 상에서 실행하였다. 3회의 90초 측정을 각각의 샘플에 대해 기록하였다.

[0222] *류린 골수-유래 FLT3L-DC 생성.* 다리 대퇴골 및 경골을 마우스로부터 제거하고, 가위로 커팅하고, 멸균 튜브 내로 플러싱하였다. 골수 현탁액을 ACK 용해 완충제로 1분 동안 처리하고, 이어서 40 μ m 세포 여과기에 통과시켰다. 세포를 카운팅하고, 10% FBS, 페니실린 및 스트렙토마이신, 및 L-글루타민 및 피루브산나트륨의 보충물을 함유하는 완전 IMDM으로 이루어진 배지 (I10)에 재현탁시켰다. 이어서 세포를 P12 플레이트에 웰당 8×10^6 개의 골수 세포로 플레이팅하였다. 재조합 마우스 FLT3L (밀테니(Miltenyi))을 배양물에 200 ng/mL로 첨가하였다. 분화된 세포를 제8일에 후속 검정을 위해 사용하였다. 분화의 효율을 비디(BD) 심포니(Symphony) A3을 사용하여 유동 세포계측법에 의해 모니터링하였으며, $CD11c^+MHC-II^+$ 세포는 통상적으로 살아있는 세포의 80% 초과였다. 각각의 실험에 대해, 5 내지 15마리의 마우스를 사용하여 골수로부터 DC를 생성하였다.

[0223] *류린 FLT3L-DC 자극.* FLT3L-DC를 분화 후 8일에 수거하고, 카운팅하고, mRNA 함량에 기반하여 지질 나노입자 (LNP)로 처리하였다. 세포를 200 μ l 총 배지/웰 중 1 μ g/mL mRNA로 처리하였다. 인큐베이션 후 약 24시간에, 세포 및 배양 상청액을 하루 관독을 위해 사용하였다. 각각의 웰로부터의 150 mL의 세포 상청액을 수집하여 DC로부터의 시토카인 분비를 측정하였다. 레전드플렉스(LEGENDplex)TM 마우스 항-바이러스 반응 패널 (바이오레전드(Biolegend))을 제조업체의 프로토콜에 따라 사용하였다. 데이터를 비디 FACS 심포니를 사용하여 수집하고, 바이오레전드에 의해 제공된 클라우드-기반 소프트웨어를 사용하여 분석하였다. LNP 노출 후 DC 활성화를 평가하기 위해, FLT3L DC를 LNP 첨가 후 24시간에 수집하고, 염색하여 하기 세포 표면 마커의 발현을 측정하였다: CD11c, MHC-II, CD24, SIRP1a, CD40, CD86, CD69, 및 H2kb (MHC-I). 그래프는 삼중실험의 평균 및 SD를 나타낸다. 데이터는 2회의 실험을 대표한다.

[0224] **결과**

[0225] *cGAS Δ N을 코딩하는 mRNA로 로딩된 LNP (cGAS Δ N LNP)는 모델 항원을 코딩하는 mRNA로 로딩된 LNP와 유사한 사이징 및 로딩 프로파일을 나타낸다.* cGAS Δ N mRNA 로딩된 LNP는 모델 항원 mRNA - OVA 및 GFP로 로딩된 LNP와 유사한 크기 및 mRNA 로딩 프로파일을 나타내었다. 모든 mRNA-로딩된 LNP는 150 nm 미만의 평균 유효 직경을 가졌으며 (도 3A), 0.3 미만의 다분산도 지수에 의해 나타난 상대적으로 균일한 크기 프로파일을 가졌다 (도 3B). 측정된 mRNA 로딩을 갖는 GenVoy ILM LNP 내로 로딩된 모든 mRNA는 mRNA의 이론적으로 로딩된 양의 90-110%를 나타낸다 (도 3C).

[0226] *cGAS Δ N LNP는 류린 DC에서 IFN-I-의존적 반응을 유도한다.* FLT3L DC를 비어있는 LNP (mRNA 없음), 또는 GFP mRNA 또는 OVA mRNA 또는 cGAS Δ N mRNA 단독을 함유하는 LNP로 자극하였다. 대안적으로, DC를 OVA mRNA를 함유하는 LNP 플러스 비어있는 LNP 또는 OVA mRNA 플러스 cGAS Δ N을 함유하는 LNP 또는 cGAS Δ N을 함유하는 LNP 플러스 GFP mRNA를 함유하는 LNP로 자극하였다. LNP를 1 μ g/mL로 mRNA의 농도에 기반하여 세포 배양물에 첨가하였다. 자극 후 24시간에, 세포 상청액을 다중화 시토카인 비드 어레이 레전드플렉스 검정을 사용하여 시토카인의 존재에 대해 측정하였다. 흥미롭게도, 본 발명자들은 cGAS Δ N LNP 처리 시, BMDC가 mRNA 항원-로딩된 LNP 단독으로 처리된 경우보다 유의하게 더 높은 수준으로 RANTES, IP-10, 및 IFN α 를 분비하였음을 발견하였다 (도 4A, 도 4B, 도 4C). 이들 데이터는 구성적으로 활성인 cGAS Δ N이 성공적으로 발현되고 마우스 DC에서 기능적임을 지지하였다. IL-6 및 TNF α 를 포함하여 NFkB에 의존하는 염증유발성 시토카인은 분비되지 않았으며, 이는 구성적으로 활성인 cGAS Δ N이 특이적 세포 유형에서 NFkB 활성화를 유도함을 시사한다. 본 발명자들은 LNP 처리 시 이들 시토카인의 유도를 LPS 및 R848 PAMP로의 자극과 비교하였다. 흥미롭게도 IP-10, RANTES, 및 IFN α 는 더 높은 용량의 LPS 또는 R848과 비교하여 cGAS Δ N LNP 처리에 의해 더 강하거나 유사한 수준으로 발현되었으며, 이는 IRF3 경로가 구성적으로 활성인 cGAS Δ N의 발현에 의해 강하게 유도될 수 있음을 시사한다.

[0227] *cGAS Δ N LNP는 류린 DC 활성화를 유도한다.* DC 활성화를 평가하기 위해, LNP-처리된 DC를 총 cDC 뿐만 아니라 DC의 cDC1 및 cDC2 하위세트 상의 활성화 마커로의 처리 후 24시간에 염색하였다. T 세포 공동자극 표면 분자 CD40, CD86 및 CD69의 발현은 중위 형광 강도 (MFI)에 의해 평가한 경우, 세포를 cGAS Δ N LNP로 처리하였을 때는 증가하였지만, 비어있는 LNP 또는 GFP LNP 또는 OVA 함유 LNP로 처리한 경우는 그렇지 않았다 (도 5A, 도 5B, 도 5C). 이 경향은 또한 cDC1 하위세트에 대해서도 사실이었다. 또한, MHCII 및 H2kb 항원 제시 분자는 표준 mRNA 항원 LNP와 비교하여 이들을 cGAS Δ N LNP로 처리한 경우 cDC 상에서 증가되었다 (도 5D, 도 5E). 이

는 또한 cDC1 하위세트에 대해서도 사실이었다. 또한, DC가 LN으로 이동하는 잠재성을 지시하는 CCR7 표면 발현은 표준 mRNA 항원 LNP와 비교하여 이들을 cGAS Δ N LNP로 처리한 경우 cDC 상에서 증가되었다 (도 5F). 이 경향은 또한 cDC1 하위세트에 대해서도 사실이었다. 전체적으로, 이들 데이터는 cGAS Δ N LNP가 DC 내에서 cGAS-STING 경로 활성화를 유도하여 DC 활성화 상태 및 유형-I IFN의 생성을 초래함을 지시한다.

실시예 2: 인간 세포는 cGAS Δ N mRNA를 함유하는 LNP에 의해 시험관내에서 염증성 상태로 활성화가능하다

재료 & 방법

재료. LNP를 위한 지질은 카이만 케미칼스(Cayman Chemicals) (SM102) 또는 아반티(Avanti) (22:0 LPC, DSPC, DMG-PEG2000)로부터 구입하였다. 콜레스테롤은 시그마(Sigma)로부터 구입하였다. GenVoy ILM 지질은 프리시전 나노시스템즈로부터 구입하였다. 포유동물 시스템을 위해 최적화된 120 폴리A 꼬리 및 염기 변형 5-메톡시우리딘을 갖는 클린캡 OVA 및 GFP mRNA는 트리링크로부터 기성품으로 구입하였다. cGAS Δ N mRNA는 맞춤형 주문하고, 선형화된 주형 DNA로부터 시험관내 전사를 통해 합성하였다 (트리링크). 인간 cGAS Δ N 서열을 마우스에서 발현되도록 코돈 최적화하였다. 서열을 염기 변형 N1-메틸슈도우리딘 및 120 폴리A 꼬리를 갖도록 트리링크의 독점적 클린 캡 mRNA 기술을 사용하여 캡핑하였다. 서열은 Bbs1 제한 효소 부위를 함유한다. 서열 정보를 사용하여 플라스미드를 수립하고, 그로부터 mRNA를 합성적으로 합성하였다. mRNA를 합성 후 포스파타제 처리하였다.

LNP 합성. 지질 나노입자 (LNP)를 GenVoy ILM LNP 지질 믹스 (프리시전 나노시스템즈) 또는 맞춤형 LNP 지질 믹스를 사용하여 제조하였다 (표 2-1). OVA mRNA, GFP mRNA, 및 cGAS Δ N mRNA (트리링크)를 각각 시트르산나트륨 완충제, pH 4에서 0.17 mg/mL로 제조하였다. GenVoy ILM 및 맞춤형 LNP 지질 믹스를 12.5 mM로 사용하였다. LNP를 나노어셈블리 이그나이트 기기 (프리시전 나노시스템즈)를 사용하여 합성하였다. 에탄올 중 지질을 12 mL/분의 유속을 사용하여 mRNA 용액과 1:3 부피 비로 개별적으로 배합하였다. LNP를 10 부피의 포스페이트 완충 염수 (PBS), pH 7.4에서 세척하여 잔류 에탄올을 제거하고, 이어서 아미콘 10K MWCO 원심분리 필터를 사용하여 농축시켰다. LNP를 사용 전에 0.2 μ m 필터를 통해 여과하였다.

표 2-1. LNP 제제

지질	GenVoy ILM™	맞춤형 지질 믹스
이온화가능한 지질	독점적 지질 50%	SM102 40%
DSPC	10%	35%
콜레스테롤	37.5%	28.5%
안정화제 지질	독점적 지질 2.5%	DMG-PEG2000 1.5%

LNP 특징규명. LNP 내로의 mRNA의 로딩을 리보그린 검정 (썬모피서)을 사용하여 제조업체의 프로토콜에 따라 정량화하였다. 샘플을 표준 곡선의 범위 내에 해당하도록 희석하였다. LNP를 트리톤 X-100을 사용하여 용해시켜 LNP 내로의 mRNA의 캡슐화를 평가하였다. 총 mRNA 및 캡슐화된 mRNA 둘 다를 정량화하였다. LNP의 크기를 나노브루크 옴니 (브루크하벤) 상에서 동적 광 산란 (DLS)을 사용하여 평가하였다. LNP를 PBS에 1:10 희석한 후, DLS 상에서 실행하였다. 3회의 90초 측정을 각각의 샘플에 대해 기록하였다.

인간 단핵구 유래 수지상 세포 (moDC) 생성. 인간 단핵구를 스트레이트프롬 류코팩(StraightFrom Leukopak) CD14 마이크로비드 키트 (밀테니)를 사용하여 밀테니로부터 구입한 류코팩(Leukopak)으로부터 분리하였다. 단리를 제조업체의 지시서에 따라 완료하였다. 이어서 단핵구를 분취하고, 10% 디메틸 술폰을 함유하는 소태아 혈청에서 동결시켰다. 단핵구-유래 수지상 세포 (moDC) 배양물로의 연구를 위해, 단핵구를 해동시키고, 10% FBS, 50 단위/mL 페니실린, 50 mg/mL 스트렙토마이신, 2 mM L-글루타민, 1 mM 피루브산나트륨, 50 mM 베타-메르캅토에탄올, 10 mM HEPES, 및 깁코(Gibco) MEM 비-필수 아미노산을 함유하는 RPMI 배지 (R10 배지)에서 배양하였다. 단핵구를 moDC로 분화시키기 위해, 재조합 인간 GM-CSF (50 ng/mL) 및 IL-4 (25 ng/mL)를 R10 배지에 첨가하였다. 세포를 GM-CSF 및 IL-4와 6일 동안 배양하고, 제3일에 추가적인 세포를 GM-CSF 및 IL-4를 함유하는 R10 배지로 공급하였다. 분화 후 6일에, moDC를 수집하고, 카운팅하였다. 세포를 R10 배지에서 1E5개 세포/웰로 96-웰 평저 플레이트 내로 플레이팅하였다.

THP-1 세포 생성. THP1-Nu112 (인비보젠(Invivogen)) 세포를 해동시키고 10% 열-불활성화 FBS, 25mM HEPES, 100U/mL 페니실린/스트렙토마이신, 100 μ g/mL 노르모신을 함유하는 RPMI 배지에서 유지하고, 한 계대 걸러 100 μ g/mL 제오신으로 보충하였다. 세포를 T75 배양 플라스크에서 0.4-0.6x10⁶ 개 세포/mL로 주당 2회의 세포 계대

로 계대하였다. 세포는 계대 20까지 유지되며, 그 후 새로운 바이알을 해동시켰다. LNP로 처리하기 전에, THP1-Nu112 세포를 플라스크로부터 수집하고, 96-웰 평저 조직 배양 플레이트에서 100,000개 세포/웰로 10% 열-불활성화 FBS, 25mM HEPES, 및 100U/mL 페니실린/스트렙토마이신을 함유하는 RPMI 배지에 플레이팅하였다.

[0237]

인간 세포 활성화. THP-1 세포 및 moDC를 mRNA 함량의 농도에 기반하여 지질 나노입자 (LNP)로 처리하였다. 세포를 200 μ L/웰의 총 자극 부피로 LNP에서 전달된 0.2 μ g/mL mRNA로 처리하였다. 밤새 인큐베이션 후, 세포 및 배양 상청액을 하류 관독을 위해 사용하였다. 155 마이크로리터의 세포 상청액을 수집하였다. LNP 첨가 후 1일에, THP-1 배양물로부터의 세포 및 상청액을 수집하여 IL-6 (프로메가(Promega)에 의한 루미트(Lumit) 검정) 및 IP-10 (바이오레전드로부터의 ELISA 키트) 시토카인을 측정하였다. THP-1 세포를 유동 세포계측법 분석을 위한 활성화 마커를 염색하기 위해 사용하였다. moDC로부터의 시토카인 분비를 측정하기 위해, 레전드플렉스 항-바이러스 반응 패널 (바이오레전드)을 제조업체의 프로토콜에 따라 사용하였다. 데이터를 비디 FACS 심포니를 사용하여 수집하고, 바이오레전드에 의해 제공된 클라우드-기반 소프트웨어를 사용하여 분석하였다. moDC 및 THP-1 세포 둘 다를 LNP 첨가 후 1일에 수집하고, 염색하여 하기 세포 표면 활성화 마커의 발현을 측정하였다: CD11c, CD209, CD40, CD80, CD83, CD86, HLA-ABC, 및 HLA-DR. 2가지 상이한 인간 공여자 샘플에 대해 및 THP-1 세포에 대해 연구를 수행하였으며, 각각의 생물학적 조건을 삼중으로 시험하였다. 그래프는 2가지 인간 샘플 또는 THP-1 세포로부터의 데이터를 제시한다. 데이터는 2회의 실험을 대표한다.

[0238]

HEK-블루(Blue) IL-1 β 리포터 검정. moDC를 mRNA 함량의 농도에 기반하여 지질 나노입자 (LNP)로 처리하였다. 세포를 200 μ L/웰의 총 자극 부피로 LNP에서 전달된 1 μ g/mL OVA mRNA, 1 μ g/mL cGAS Δ N mRNA, 또는 0.2 μ g/mL mRNA로 처리하였다. LNP를 배지, R848, 또는 R848 + MCC950 (NLRP3 인플라마솜의 억제제)로 전달하였다. MCC950의 존재 하에서, IL-1 β 는 인플라마솜 의존적 방식으로 분비되지 않을 것이다. HEK-블루 IL-1 β 리포터 세포 (인비보젠)를 사용하여 48시간 동안 cGAS Δ N LNP로의 처리에 반응하여 인간 moDC에 의해 분비된 기능적 IL-1 β 를 평가하였다. HEK-블루 IL-1 β 리포터 세포는 HEK293 세포로부터 유래되고, NK-kB/AP-1 유도성 SEAP (분비된 배아 알칼리성 포스파타제) 리포터를 발현하며, 이는 IL-1 β 수용체가 성숙 IL-1 β 에 직면하면 SEAP 생성을 촉발시킨다. SEAP 생성은 콰нти-블루(QUANTI-Blue) 용액을 사용하여 색상 변화에 의해 모니터링된다. HEK-블루 IL-1 β 리포터 세포를 해동시키고, 10% 열-불활성화 FBS, 2mM L-글루타민, 100U/mL 페니실린, 100 μ g/mL 스트렙토마이신, 100 μ g/mL 노르모신을 함유하는 DMEM 배지에서 유지하고, 한 계대 걸러 100 μ g/mL 체오신으로 보충하였다. 세포를 T75 배양 플라스크에서 0.4-0.6 $\times 10^6$ 개 세포/mL로 주당 2회의 세포 계대로 계대하였다. 세포는 계대 20까지 유지되며, 그 후 새로운 바이알을 해동시켰다. LNP로 처리하기 전에, HEK-블루 IL-1 β 리포터 세포를 플라스크로부터 수집하고, 96-웰 평저 조직 배양 플레이트에서 50,000개 세포/웰로 10% 열-불활성화 FBS, 2 mM L-글루타민, 100U/mL 페니실린, 및 100 μ g/mL 스트렙토마이신을 함유하는 DMEM 배지에 플레이팅하였다. cGAS Δ N 활성화된 moDC로부터의 배지 50 μ L, 또는 표준 곡선을 작성하기 위한 공지된 농도의 재조합 인간 IL-1 β 를 함유하는 배지 50 μ L를 HEK-블루 IL-1 β 리포터 세포를 함유하는 웰에 첨가하였다. 세포를 밤새 인큐베이션한 후, 인큐베이션된 샘플로부터의 SEAP-함유 상청액 20 μ L를 180 μ L의 콰нти-블루 용액과 혼합하였다. 이 반응을 37C에서 1시간 동안 실행한 후, 630 nm에서의 흡광도를 분광광도법에 의해 측정하였다.

[0239]

결과

[0240]

cGAS Δ N LNP가 표준 LNP보다 더 큰 세포 활성화를 허용할 것인지를 결정하기 위해, Ova 항원을 코딩하는 mRNA 또는 구성적으로 활성인 cGAS Δ N을 코딩하는 mRNA를 함유하는 LNP를 합성하였다. 실험 대조군으로서, GFP를 코딩하는 mRNA를 갖는 LNP를 제조하였다. 이들 LNP를 개별적으로 또는 THP-1 세포 (인간 골수양 세포주) 및 1차 인간 moDC와 조합으로 시험하였다. 2가지 지질 제제: GenVoy (프리시전 나노시스템즈) 및 맞춤형 지질 믹스는 활성이 LNP-제제 의존적인지를 결정하기 위해 포함되었다. LNP를 0.2 μ g/mL로 mRNA의 농도에 기반하여 세포 배양물에 첨가하였다.

[0241]

cGAS Δ N LNP는 모델 항원으로 로딩된 LNP와 유사한 사이징 및 로딩 프로파일을 나타낸다. cGAS Δ N mRNA 로딩된 LNP는 모델 항원 mRNA - OVA 및 GFP로 로딩된 LNP와 유사한 크기 및 mRNA 로딩 프로파일을 나타내었다. 모든 mRNA-로딩된 LNP는 150 nm 미만의 평균 유효 직경을 가졌으며 (도 6A), 0.3 미만의 다분산도 지수에 의해 나타난 상대적으로 균일한 크기 프로파일을 가졌다 (도 6B). GenVoy ILM LNP 내로 로딩된 모든 mRNA는 LNP에 캡슐화된 mRNA의 이론적으로 로딩된 양의 70-90%를 가졌다 (도 6C). GenVoy 및 맞춤형 지질 믹스 둘 다는 유사한 크기로 LNP 생성을 허용하였지만, 최적화된 GenVoy 제제는 더 낮은 다분산도 지수에 의해 제시된 바와 같이 증가된 크기 균일성을 나타내었다 (도 6B). GenVoy 및 맞춤형 지질 믹스 둘 다는 모든 mRNA에 대해 유사한 로딩 수준을 허용하였으며, GenVoy 제제는 약간 더 효율적으로 mRNA를 캡슐화하였다.

- [0242] *cGASΔN* LNP는 인간 *moDC*에서 염증성 경로를 활성화시킨다. 2명의 공여자로부터의 동결된 단핵구를 해동시키고, GM-CSF 및 IL-4를 사용하여 *moDC*로 분화시켰다. 세포를 0.2 μg/mL의 mRNA 로딩으로 LNP로 처리하였다. 다중화 시토카인 비드 어레이 검정을 사용하여, 다중 염증성 시토카인은 조절되지 않는 것으로 밝혀졌다. *cGASΔN* LNP 처리 시, IL-6 (도 7A), TNFα (도 7B), IP-10 (도 7C), IFNλ1 (도 7D), IFNβ (도 7E), 및 IFNα2 (도 7F)는 모델 항원으로 로딩된 LNP로의 처리와 비교하여 1일 이내에 상승된 수준에서 검출가능하였다. IL-6의 발현은 구성적으로 활성인 *cGAS*가 NF-κB 활성화를 유도할 수 있으며 아마도 세포 유형 의존적임을 시사하였다. 흥미롭게도 IP-10, IFNλ1, 및 IFNβ는 세포를 양성 대조군으로서 역할을 한 10 μg/mL LPS로 처리한 경우보다 *cGASΔN* LNP 처리에 의해 더 강하게 발현되었으며, 이는 IRF3 경로가 구성적으로 활성인 *cGAS*의 발현에 의해 강하게 유도될 수 있음을 시사한다.
- [0243] LNP-처리된 *moDC*를 처리 후 1일에 염색하여 활성화 마커의 발현을 정량화하였다. 중위 형광 강도 (MFI)의 측정 에 의해, CD83 발현은 표준 LNP와 비교하여 세포를 *cGASΔN* LNP로 처리한 경우 증가하였다 (도 8A). T 세포 공동자극 분자의 발현을 또한 측정하였다. 이들을 *cGASΔN* LNP로 처리한 경우 *moDC*의 전체 집단에서 및 또한 단일 세포 수준에서 CD40, CD80 발현이 증가하였다 (도 8B, 도 8C). HLA-DR은 거의 모든 *moDC*에 의해 발현되었지만, MFI 측정은 *moDC*를 *cGASΔN* LNP로 처리한 경우 MHC 부류 II 분자가 개별 세포 상에서 증가되었음을 드러내었다 (도 8D). MHC 부류 I 분자의 경우, HLA-ABC 염색은 임의의 *cGASΔN* LNP-의존적 변화를 드러내지 않았다.
- [0244] *cGASΔN* LNP는 THP-1에서 염증성 경로를 활성화시킨다. 1일의 인큐베이션 후, THP-1 세포 상청액을 NF-κB 또는 IRF3 활성화에 의존적인 시토카인, 즉, 각각 IL-6 및 IP-10의 존재에 대해 측정하였다. 둘 다의 시점에서, IL-6은 *cGAS* LNP로 처리된 THP-1 세포에 의해 차등적으로 발현되지 않았으며, 이는 NF-κB가 활성화되지 않음을 시사한다. 대조적으로, IRF3에 의해 제어되는 유전자인 IP-10은 *cGAS* LNP 처리 1일 이내에 발현되었다 (도 9A). *cGAS* LNP는 IP-10 발현을 유도한 반면, 다른 대조군 LNP는 IP-10을 거의 내지 전혀 유도하지 않았다. 검출가능한 IP-10은 구성적으로 활성인 *cGAS*의 전사체를 LNP 내로 패키징하는 것이 선천성 면역계를 활성화시키는 방법 일 수 있음을 지시하였다.
- [0245] *cGAS* LNP가 선천성 면역 신호전달을 활성화시킴을 추가로 입증하기 위해, THP-1 세포를 인큐베이션 시작 후 1일에 수집하여 활성화 마커의 세포 표면 발현을 위해 염색하였다. THP-1 샘플은 살아있는 단일-세포 사건에 게이트되었다. CD40 발현은 *cGAS* LNP로의 세포 처리 후 증가하는 것으로 관찰된 반면, GFP 또는 Ova 전사체를 갖는 다른 대조군 LNP는 그렇지 않았다 (도 9B). CD40은 그의 동종체 리간드와의 세포-세포 상호작용을 통해 면역 반응을 증강시키는 수용체이다.
- [0246] *cGASΔN* LNP + R848로의 처리는 *moDC* 과활성화를 발생시킨다. *moDC*를 R848 및 *cGASΔN*으로 자극하여 NF-κB 자극 및 *cGAS*-STING 경로 활성화의 조합이 더 강력한 염증성 활성을 허용할 것인지를 결정하였다. 구체적으로, 이 조합에 의해 과활성화되는 *moDC*의 능력을 시험하였다. 과활성화는 DC가 생존가능하게 남아 있으면서 IL-1β를 분비하는 능력을 특징으로 하였다. *moDC*를 비자극된 채 남겨 두거나 (PBS 처리됨), 또는 배지, R848, 또는 R848 및 MCC950의 존재 하에서 *cGASΔN* LNP 또는 OVA LNP로 처리하였다. MCC950은 NLRP3 인플라마솜 억제제이며, 따라서 MCC950으로 처리된 세포는 IL-1β를 인플라마솜 의존적 방식으로 생성할 수 없다. 중요하게는, LNP로 처리된 모든 세포는 PBS 단독으로 처리된 *moDC*와 유사한 생존력을 나타내었으며, 이는 어떠한 세포도 LNP 처리에 반응하여 피로토시스화하지 않았음을 지시한다 (도 10A). R848 및 *cGASΔN*으로의 처리에 반응하여 이들 세포에 의해 임의의 활성 IL-1β가 생성되었는지를 결정하기 위해, *moDC* 배양물로부터의 상청액을 IL-1β에 반응하여 SEAP를 생성하는 HEK-블루 IL-1β 리포터 세포에 첨가하였다. 예상된 바와 같이, PBS, R848, 또는 R848 + MCC950으로 처리된 *moDC*는 IL-1β를 생성하지 않았다 (도 10B). 과활성화가 LNP 지질 조성물에 의존적이었는지를 결정하기 위해, OVA를 함유하는 LNP를 R848 (IL-1β 생성을 허용하지 않은 조건)과 배양하였다. 흥미롭게도, *cGASΔN*으로 로딩된 LNP는, R848과 조합으로 전달되는 경우, *moDC*에서 IL-1β 분비를 자극하였다 (도 10B). 이 반응은 MCC950으로의 처리가 IL-1β 생성을 제거하였기 때문에, NLRP3 인플라마솜 의존적이었다.
- [0247] 종합하면, THP-1 및 인간 *moDC*를 LNP로 처리한 것으로부터 수집된 데이터는 몇 가지 결론을 초래하였다. 먼저, LNP는 성공적으로 합성되었다. 추가적으로, 구성적으로 활성인 *cGAS*의 발현은 제제-독립적 방식으로 *cGAS*-STING 경로와 연관된 유전자의 상향조절을 발생시켰다. 염증성 시토카인이 발현되었고, 활성화 마커의 상향조절이 세포 표면 상에 관찰되었다. mRNA로서 코딩되고 LNP에 패키징된 구성적으로 활성인 *cGAS*는 표적화된 세포에서 선천성 면역 신호전달을 개시하여 염증 반응을 촉진시키는데 성공적으로 이용될 수 있다. 마지막으로, R848과 조합으로 구성적으로 활성인 *cGAS*는 *moDC* 과활성화를 허용하였으며, IL-1β 분비는 살아있는 DC에서 발생하였다.

[0248] 실시예 3: 무린 세포는 cGAS Δ N mRNA를 함유하는 LNP에 의해 생체내에서 활성화가능하다

[0249] 재료 & 방법

[0250] 재료. LNP를 위한 지질은 카이만 케미칼스 (SM102) 또는 아반티 (22:0 LPC, DSPC, DMG-PEG2000)로부터 구입하였다. 콜레스테롤은 시그마로부터 구입하였다. GenVoy ILM 지질은 프리시전 나노시스템즈로부터 구입하였다. 포유동물 시스템을 위해 최적화된 120 폴리A 꼬리 및 염기 변형 5-메톡시우리딘을 갖는 클린캡 OVA 및 GFP mRNA는 트리링크로부터 기성품으로 구입하였다. cGAS Δ N mRNA는 맞춤형 주문하고, 선형화된 주형 DNA로부터 시험관 내 전사를 통해 합성하였다 (트리링크). 인간 cGAS Δ N 서열을 마우스에서 발현되도록 코돈 최적화하였다. 서열을 염기 변형 N1-메틸슈도우리딘 및 120 폴리A 꼬리를 갖도록 트리링크의 독점적 클린 캡 mRNA 기술을 사용하여 캡핑하였다. 서열은 BbsI 제한 효소 부위를 함유한다. 서열 정보를 사용하여 플라스미드를 수립하고, 그로부터 mRNA를 합성적으로 합성하였다. mRNA를 합성 후 포스파타제 처리하였다.

[0251] LNP 합성. 지질 나노입자 (LNP)를 실시예 2에서와 같이 GenVoy ILM LNP 지질 믹스 (프리시전 나노시스템즈) 또는 전형적인 LNP 지질 믹스를 사용하여 제조하였다 (표 2-1, 실시예 2). OVA mRNA, GFP mRNA, 및 cGAS Δ N mRNA (트리링크)를 각각 시트르산나트륨 완충제, pH 4에서 0.17 mg/mL로 제조하였다. GenVoy ILM 및 전형적인 LNP 지질 믹스를 12.5 mM로 사용하였다. LNP를 나노어셈블러 이그나이트 기기 (프리시전 나노시스템즈)를 사용하여 합성하였다. 에탄올 중 지질을 12 mL/분의 유속을 사용하여 mRNA 용액과 1:3 부피 비로 개별적으로 배합하였다. LNP를 10 부피의 포스페이트 완충 염수 (PBS), pH 7.4에서 세척하여 잔류 에탄올을 제거하고, 이어서 아미콘 10K MWCO 원심분리 필터를 사용하여 농축시켰다. LNP를 사용 전에 0.2 μ m 필터를 통해 여과하였다.

[0252] LNP 특징규명. LNP 내로의 mRNA의 로딩을 실시예 2에서와 같이 리보그린 검정 (써모피셔)을 사용하여 제조업체의 프로토콜에 따라 정량화하였다. 샘플을 표준 곡선의 범위 내에 해당하도록 희석하였다. LNP를 트리톤 X-100을 사용하여 용해시켜 LNP 내로의 mRNA의 캡슐화를 평가하였다. 총 mRNA 및 캡슐화된 mRNA 둘 다를 정량화하였다. LNP의 크기를 나노브루크 옴니 (브루크하벤) 상에서 동적 광 산란 (DLS)을 사용하여 평가하였다. LNP를 PBS에 1:10 희석한 후, DLS 상에서 실행하였다. 3회의 90초 측정을 각각의 샘플에 대해 기록하였다.

[0253] cGAS Δ N mRNA 및 OVA 항원 mRNA를 함유하는 LNP로의 생체내 면역화. BL6 마우스를 하기 표 (표 3-1)에 따라 LNP로 피하로 면역화하였다. 항원을 OVA mRNA-로딩된 LNP, 뿐만 아니라 아주반트 cGAS Δ N mRNA 또는 비-아주반트화 GFP mRNA 중 어느 하나를 함유하는 LNP를 사용하여 전달하였다. 마우스에게 표에 지시된 mRNA 용량을 투여하였다. OVA mRNA 용량은 5 μ g/마우스로 고정된 반면, 아주반트 mRNA는 1 μ g/마우스 내지 10 μ g/마우스로 다양하였다. 마우스 (n = 5/그룹)에게 제0일에 1차 면역화를 제공하고, 제7일에 동일한 용량의 부스트 면역화를 제공하였다. 부스트 후 7일에, 혈액을 항체 및 T 세포 반응을 위해 수집하였다. 혈청을 혈청 분리 튜브를 사용하여 혈액으로부터 수집한 반면, 세포 분석을 위한 혈액은 K2EDTA 튜브를 사용하여 수집하였다. 혈액 수집 후, 마우스를 안락사시키고, 배수 림프절 및 비장을 수집하고, 단일 세포 현탁액으로 프로세싱하였다.

[0254] 표 3-1. cGAS Δ N LNP에 대한 T 및 B 세포 반응의 생체내 평가에 사용된 LNP

그룹	OVA를 코딩하는 mRNA	GFP 및/또는 cGAS Δ N을 코딩하는 mRNA	제제
1	없음	없음	PBS
2	없음	GFP (5 μ g/마우스) + cGAS Δ N (5 μ g/마우스)	GV
3	OVA (5 μ g/마우스)	GFP (1 μ g/마우스)	GV
4	OVA (5 μ g/마우스)	GFP (5 μ g/마우스)	GV
5	OVA (5 μ g/마우스)	cGAS Δ N (1 μ g/마우스)	GV
6	OVA (5 μ g/마우스)	cGAS Δ N (5 μ g/마우스)	GV
7	OVA (5 μ g/마우스)	GFP (5 μ g/마우스)	맞춤형
8	OVA (5 μ g/마우스)	cGAS Δ N (5 μ g/마우스)	맞춤형

[0255]

[0256] OVA-특이적 T 세포 사랑체 평가. OVA LNP 면역화를 받은 마우스의 혈액 중의 OVA-특이적 T 세포를 부스트 후 7일에 평가하였다. OVA MHC-I 에피토프인 SIINFEKL (서열식별번호: 16)에 대해 특이적인 CD8+ T 세포를 사랑체 분석을 사용하여 혈액에서 정량화하였다. 간략하게, 혈액 중의 적혈구를 RBC 용해 완충제를 사용하여 용해시켰으며, 혈액에서 임의의 RBC를 완전히 제거하기 위해 용해를 2회 완료하였다. 세포를 세척하고, 이어서 생존력 (살아있는/죽은), SIINFEKL-사랑체 결합 (MBL), 및 CD3, CD4, 및 CD8 발현을 위해 염색하였다. 세포를 4% 파라포름알데히드로 고정시키고, 카운팅 비드를 첨가한 후, 총 세포 카운트를 허용하기 위해 실행하였다. 데이터

를 비디 FACS 심포니를 사용하여 수집하고, 플로우조(Flowjo) (비디)를 사용하여 분석하였다.

[0257] OVA-특이적 항체 평가. OVA LNP 면역화를 받은 마우스의 혈청 중의 OVA-특이적 항체를 부스트 후 7일에 평가하였다. OVA-특이적 총 IgG, IgG1, 및 IgG2b를 ELISA를 사용하여 평가하였다. 간략하게, ELISA 플레이트를 10 µg/mL 엔도핏(Endofit) 오브알부민 (인비보젠)으로 밤새 코팅하고, 이어서 세척하고, 2% 소 혈청 알부민으로 차단하였다. 플레이트를 다시 세척하고, 이어서 혈청을 플레이트에 1:500 희석, 이어서 1:5 희석으로 첨가하여 시험된 총 7회의 혈청 희석에 대해 완료하였다. 샘플을 세척하고, 이어서 HRP (서던 바이오테크(Southern Biotech))에 결합된 IgG, IgG1, 또는 IgG2b에 대해 특이적인 검출 항체와 인큐베이션하여 각각 총, Th2 또는 Th1 사행 OVA-특이적 항체를 검출하였다. 플레이트를 세척하고, 이어서 TMB와 인큐베이션하고, 색상 전개가 완료되면 정지 용액을 첨가하였다.

[0258] 결과

[0259] cGAS ΔN LNP가 생체내에서 더 큰 항원 특이적 T 및 B 세포 반응을 유도할 것인지를 결정하기 위해, 마우스를 상이한 용량의 cGAS ΔN 또는 GFP mRNA로 cGAS ΔN LNP 또는 GFP LNP와 조합으로 OVA LNP로 면역화하였다 (표 3-1). 마우스를 면역화하고, 이어서 1주 후에 부스팅하였다. 혈액을 부스트 후 1주에 항체 및 T 세포 사량체 분석을 위해 수집하였다. 2가지 지질 제제: GenVoy (프리시전 나노시스템즈) 및 맞춤형 지질 믹스는 활성이 LNP-제제 의존적인지를 결정하기 위해 포함되었다.

[0260] cGAS ΔN LNP는 모델 항원으로 로딩된 LNP와 유사한 사이징 및 로딩 프로파일을 나타낸다. cGAS ΔN mRNA 로딩된 LNP를 실시예 2에 따라 제조하였으며, 특징규명은 도 6A-6C에 제시된 경향을 따랐다. 모든 LNP는 모델 항원 mRNA - OVA 및 GFP로 로딩된 LNP와 유사한 크기 및 mRNA 로딩 프로파일을 나타내었다. 모든 mRNA-로딩된 LNP는 150 nm 미만의 평균 유효 직경을 가졌으며, 0.3 미만의 다분산도 지수에 의해 나타난 상대적으로 균일한 크기 프로파일을 가졌다. GenVoy ILM LNP 내로 로딩된 모든 mRNA는 LNP에 캡슐화된 mRNA의 이론적으로 로딩된 양의 70-90%를 가졌다.

[0261] OVA LNP 및 cGAS ΔN LNP로의 처리는 OVA-특이적 CD8+ T 세포를 증가시킨다. cGAS ΔN LNP (1 또는 5 µg mRNA/마우스) 또는 대조군 GFP LNP (1 또는 5 µg mRNA/마우스)로 전달된 OVA LNP (5 µg mRNA/마우스)로의 2회의 면역화 후 (표 3-1), 혈액 중의 OVA-특이적 T 세포 존재를 분석하였다. 혈액을 부스트 후 7일에 수집하고, 프로세싱하여 적혈구를 제거하고, 이어서 살아있는/죽은 CD3, CD8, CD4, 및 SIINFEKL-사량체 반응성 (서열식별번호: 16으로서 제시된 OVA-특이적 CD8+ T 세포 에피토프)에 대해 염색하였다. 살아있는 CD8+ T 세포 중에서 SIINFEKL-특이적 세포의 빈도 뿐만 아니라, 혈액에서 수집된 SIINFEKL-특이적 CD8+ T 세포의 절대적 총 수를 결정하였다. 마우스를 GenVoy LNP - cGAS ΔN 또는 GFP LNP (1 또는 5 µg mRNA)와 함께 OVA LNP (5 µg mRNA)로 처리한 경우, SIINFEKL-특이적 (OVA-특이적) CD8+ T 세포의 빈도는 OVA에 추가적으로 GFP mRNA가 전달된 경우와 비교하여 OVA에 추가적으로 cGAS ΔN mRNA가 전달된 경우 유의하게 증가하였다 (도 11A). OVA LNP를 받지 않은 마우스는 SIINFEKL-특이적 CD8+ T 세포를 갖지 않았다. 이 경향은, 맞춤형 지질 믹스로 제조된 OVA LNP (5 µg mRNA) 및 cGAS ΔN (5 µg mRNA)을 받은 마우스가 OVA LNP + GFP LNP (5 µg mRNA)를 받은 마우스보다 유의하게 더 높은 혈액 중 SIINFEKL-특이적 T 세포의 빈도를 가졌기 때문에, 제제 특이적이 아니었다 (도 11B). 이 경향은 또한 GenVoy (도 11C) 또는 맞춤형 지질 믹스 (도 11D) 중 어느 하나로 제조된 경우, SIINFEKL-특이적 CD8+ T 세포의 절대적 수에 대해서도 사실이었다. 흥미롭게도, cGAS ΔN mRNA의 용량을 저하시키는 것은 OVA-특이적 T 세포의 빈도에 큰 영향을 주는 것으로 보이지 않았으며, 이는 항원 mRNA를 함유하는 표준 지질 제제와 조합으로 소량의 이 cGAS ΔN mRNA가 항원-특이적 T 세포 반응을 유의하게 부스팅하기에 충분할 수 있음을 시사한다.

[0262] cGAS ΔN LNP로의 처리는 Th1 특이적 IgG 반응에 영향을 미치지 않으면서 Th2 특이적 OVA-특이적 항체를 감소시킨다. cGAS ΔN LNP (1 또는 5 µg mRNA/마우스) 또는 대조군 GFP LNP (1 또는 5 µg mRNA/마우스)로 전달된 OVA LNP (5 µg mRNA/마우스)로의 2회의 면역화 후 (표 3-1), 혈액 중의 OVA-특이적 항체를 정량화하였다. 혈액을 부스트 후 7일에 수집하고, 혈청을 단리한 후, 총 IgG, IgG1 (Th2 반응과 연관됨), 및 IgG2a (Th1 반응과 연관됨)를 분석하였다. 전통적으로, mRNA 항원 로딩된 LNP로의 면역화는 강한 항체 반응을 발생시키며, 따라서 항체 반응을 평가하여 처리에서 cGAS ΔN LNP의 첨가가 예상된 반응을 감소시킬 것인지를 결정하였다. 흥미롭게도, GenVoy 제제를 사용하여 제조된 OVA 및 cGAS ΔN LNP로 처리된 마우스는 OVA + GFP LNP 처리와 비교하여 측정된 OVA-특이적 총 IgG의 유의한 변화를 나타내지 않았다 (도 12A). OVA LNP를 받지 않은 마우스는 OVA-특이적 항체를 생성하지 않았다. 이는 제제 특이적 반응이 아니었다: 측정된 OVA-특이적 총 IgG는 맞춤형 지질 믹스를 사용하여 제조된 LNP 중의 cGAS ΔN의 존재에 의해 유의하게 영향을 받지 않았다 (도 12B). IgG1은 전형적으로 Th2 면역 반응과 연관되기 때문에, OVA-특이적 IgG1을 또한 평가하였다. OVA-특이적 IgG1은 GenVoy 제제

를 사용하여 제조된 LNP 중의 cGAS ΔN의 존재에 의해 유의하게 감소되었다 (1 ug 및 5 ug cGAS ΔN 대 GFP LNP 둘 다에서 1:500 및 1:2500 희석에 대해 $p < 0.05$) (도 12C). 이 감소된 OVA-특이적 IgG1 반응을 또한 맞춤형 지질 믹스를 사용하여 제조된 cGAS ΔN LNP로 처리된 마우스에서 측정하였다 (5 ug cGAS ΔN 대 GFP LNP에서 1:500, 1:2500, 및 1:12500 희석에 대해 $p < 0.05$) (도 12D). IgG2a는 보다 강한 염증성 Th1 반응과 연관되기 때문에, IgG2a 수준을 또한 평가하였다. 중요하게는, GenVoy 제제 (도 12E) 또는 맞춤형 지질 믹스 (도 12F)를 사용하여 제조된 OVA 및 cGAS ΔN LNP로 처리된 마우스는 OVA + GFP 처리된 마우스와 비교하여 OVA-특이적 IgG2a의 유의한 변화를 나타내지 않았다.

[0263]

종합하면, 생체내 면역화 실험으로부터 수집된 데이터는 마우스를 항원 LNP와 조합으로 cGAS ΔN LNP로 처리하는 것이 항원 특이적 적응성 면역 반응을 유의하게 개선시킴을 제시한다. cGAS ΔN LNP를 받은 마우스는 항체 반응을 희생시키지 않으면서 항원-특이적 T 세포의 수의 유의한 증가를 나타내었다. 사실, 총 항원-특이적 IgG 수준에 영향을 미치지 않으면서 항원-특이적 IgG1의 감소는 Th1 연관 면역 반응을 향한 사행을 나타내며, 이는 보호적 면역 반응을 유도하는데 유익하다 (면역요법을 위해 필요함). 종합하면, 이들 데이터는 낮은 용량의 cGAS ΔN LNP를 표준 항원 LNP 제제에 첨가하는 것이 LNP 백신에 대한 훨씬 더 강력한 면역 반응을 발생시킬 수 있음을 시사한다.

서열

SEQ ID NO:1
>인간
PGASKLRVLEKLLSRDDISTAAGMVKGVDHLLRLKCDSAFRGVGLLN
TGSYYEHVKISAPNEFDVMFKLVPRIQLEEYSNTRAYYFVKFKRNPKNPLSQFLEGEILSASKMLSKE
RKIIKEEINDIKDQDVMIMKRKRGGSPAVTLLISEKISVDITLAELESKSSWPASTQEGRLIQNWLSAKVRK
QLRLKPFYLVPHKAKEGNGFQEETWRLSFSHIEKEILNNHGKSKTCCENKEEKCCRKDCLKLMKYLLLEQL
KERFKDKKHLDFSSYHVKTAFHFVCTQNPQDSQWDRKDLGLCFDNCVTYFLQCLRTEKLENYFIPEFNL
FSSNLIDKRSKEFLTKQIEYERNNEFPVFDEF

SEQ ID NO:2
>엔. _물라타
PGARKLRVLEKLLRSHQDISKAAKVVNGVVGHLRLRLKCEPEFGGVEQLH
TGSYYEHVKISAPNEFDVMFKLVPRIQLEEYSNTRAYYFVKFKRNPKNPLSLFLEGEILSASKMLSKE
RKIIKEEINNIDQDQDVMIMKRKRGGSPAVTLLINKEISVDITLAELEKTSWPASTQEGRLAIKNWLSA
KVRQQLRLKPFYLVPHKAKEGNGFQEETWRLSFSHIEKEILSNHGKSKTCCENKEMKCCRKDCLKLMKYLL
LEQLKEKFKDKKHLDFSSYHVKTAFHFLCTENPQDSQWDPKDLGLCFDNCVTYFLECLRTEQLKNYFIP
GFNLFSSNLIDKTSKEFLSKQIEYERNNEFPVFGEF

SEQ ID NO:3
>파. _아누비스
PGARKLRVLEKLLRSHQDISKAAKVVNGVVGHLRLRLKCESEFEGVEQLH
TGSYYEHVKISAPNEFDVMFKLVPRIQLEEYSNTRAYYFVKFKRNPKNPLSQFLEGEILSASKMLSKE
RKIIKEEINNIDQDQDVMIMKRKRGGSPAVTLLINKEISVDITLAELEKTSWPASTQEGRLAIKNWLSA
KVRQQLRLKPFYLVPHKAKEGNGFQEETWRLSFSHIEKEILSNHGKSKTCCENKEMKCCRKDCLKLMKYLL
LEQLKEKFKDKKHLDFSSYHVKTAFHFLCTENPQDSQWDPKDLGLCFDNCVTYFLECLRTEQLKNYFIP
GFNLFSSNLIDKTSKEFLSKQIEYERNNEFPVFGEF

SEQ ID NO:4
>엔. _류코게니스
PGARKLRVLEKLLSRQEISEAEEVNGVVDHLLRLQKCDSEFRGVGLLRTGSSYYEH
VKISAPNEFDVMFKLEVPRIQLEEYSNTRAYYFVKFKRNPKNPLSQFLEGEILSASKMLSKEFRKIIEE
INNIDQDQDVMIMKRKRGGSPAVTLLISEKISVDITLAELESNSNWPASTQEGLPIDWLSGKVRRLRLKP
FYLVPHKAKEGNGFQEETWRLSFSHIEKEILNNHGKTKTCCENKNVCCRKDCLKLMKYLLLEQLKERFKD
KKHLDFSSYHVKTAFHFVCTENPQDSQWDPKDLGLCFDNCVTYFLQCLRTEQLGNYFIPGFNLFSSNLI
DKRSKEFLSKQIEYERNNEFPVFGEF

SEQ ID NO:5
>에이치 _라르
PGARKLPVLEKLLSRQ
EICEAAEVNGVVDHLLRLQKCDSEFRGVGLLRTGSSYYEHVKISAPNEFDVMFKLEVPRIQLEEYSNTG
AYYFVKFKRNPKNPLCQFLEGEILSASKMLSKEFRKIIEEINNIDQDQDVMIMKRKRGGSPAVTLLISEK
ISVDITLAELESKSSWPASTQEGLPIDWLSGKVRTQLRLKPFYLVPHKAKEGNGFQEETWRLSFSHIEKE
ILNNHGETKTCENKKNVCCRKDCLKLMKYLLLEQLKERFKDKKHLDFSSYHVKTAFHFVCTENPKDSQW
DPKDLGLCFDNCVTYFLQCLSTEQLGNYFIPGFNLFSSNLIDKRSKEFLSKQIEYERNNEFPVFGEF

[0264]

SEQ ID NO:6
>피. _아벨리이
PGASKLRRAVLEKLLSRLEISKAAEVVNRVVDHLLRRLQKYNSEFRGVGLLRT
GSYYEHVKISAPNEFDVMFKLEVPRIQLEEYSNTGAYYFVKFKRNPKNPLSQFLEGEILSASKMLSKFR
KIIKEEINNIKDTDVIMKRKRGGS PAVTLLISEEISVDITLALESKSSWPASTQEGLPIKNWLSAKVRKQ
LRLKPFYLVPHAKEGNGFQEEWRLSFSHIEKEILNNHGKSKTCCEDKEVKCCRKDCLKLMKYLLEQLK
ERFKDKKHLDFSSYHVKTAF FHVCTQNPQDSQWDPKDLGLCFDNCVTYFLQCLRTEQLGNYFI PGFNLF
SSNLIDKRSKEFLTKQIEYERNNEFPVFDEF

SEQ ID NO:7
>피. _트로글로니테스
PGASKLRRAVLEKLLSRDDISTAAGMVKGVDHLLRLKCDSAFRGVGLLN
TGSYYEHVKISAPNEFDVMFKLEVPRIQLEEYSNTRAYYFVKFKRNPKNPLSQFLEGEILSASKMLSKF
RKIIKEEINNIKDVIMKRKRGGS PAVTLLISEKISVDITLALESKSSWPASTQEGLPIKNWLSAKVRKQ
LRLKPFYLVPHAKEGNGFQEEWRLSFSHIEKEILNNHGKSKTCC EIKEAKCCRKDCLKLMKYLLEQLKE
KFKDKKHLDFSSYHVKTAF FHVCTENPQDSQWDRKDLGLCFDNCVTYFLQCLRIEKLNYFIPEFNLF
SDLIDKRSKEFLTKQIEYERNNEFPVFDEF

SEQ ID NO:8
>지. _고릴라
PGASKLRRAVLEKLLSRDDISTAAGMVKGVDHLLRLKCDSAFRGVGLLN
TGSYYEHVKISAPNEFDVMFKLEVPRIQLEEYSNTRAYYFVKFKRNPKNPLSQFLEGEILSASKMLSKF
RKIIKEEINNIKDTDVIMKRKRGGS PAVTLLISEKISVDITLALESKSSWPASTQEGLRIQNWLSAKVRR
QLRLKPFYLVPHAKEGNGFQEEWRLSFSHIEKEILNNHGKSKTCCENKEAKCCRKDCLKLMKYLLEQL
KERFKDKKHLDFSSYHVKTAF FHVCTQNPQDSQWDRKDLGLCFDNCVTYFLQCLRTERLENYFIPEFNLF
FSRNLIDKRSKEFLTKQIEYERNNEFPVFDEF

SEQ ID NO:9
>CGAS_N 컨센서스
PGAXKLXAVLEKLLSX_{XXXX}IXXAAXVXVXVXHLLXRLXXXXXFXGVXXLX
TGSYYEHVKISAPNEFDVMFKLVPRIQLEEYSXTXAYYFVKFKRNPXXNPLXXFLEXEILSASKMLSXF
RKIIKEEINXI_{XXXXXX}DXIXKRKRGGS PAVTLLIXXXISVDITLALEX_{XXXX}SWPASTQEGLXIXXWLS
XKVRXQLRLKPFYLVPHAKEGNGFQEEWRLSFSHIEKEILXNHGXXKTCC EX_{XXXX}KCCRKDCLKLMKY
LLEQLKEXFKDKKHLDFSSYHVKTAF FHXCTXNPXDSQWDXKXLGXCFDXCVTXFLXCLXXEXLXNYFI
FXFNLF_{SXX}LIDKXSKEFLXKQIEYERNNEFPVF_{XXX}

SEQ ID NO:10
>인간CGAS_전장
MQPWHGKAMQ_RASEAGATAPKASARNARGAPMDPTESPAAPEAALPKAGKFGPARKSGSRQKKSAPDTQE
RPPVRATGARAKKAPQRAQDTQPSDATSAPGAEGLEPPAAREPALS RAGSCRQRGARCSTKPRPPPGPWD
VPSPLPV_SAPILVRRDAAPGASKLRRAVLEKLLSRDDISTAAGMVKGVDHLLRLKCDSAFRGVGLLN
TGSYYEHVKISAPNEFDVMFKLEVPRIQLEEYSNTRAYYFVKFKRNPKNPLSQFLEGEILSASKMLSKF
RKIIKEEINDIKDTDVIMKRKRGGS PAVTLLISEKISVDITLALESKSSWPASTQEGLRIQNWLSAKVRK
QLRLKPFYLVPHAKEGNGFQEEWRLSFSHIEKEILNNHGKSKTCCENKEEKCCRKDCLKLMKYLLEQL
KERFKDKKHLDFSSYHVKTAF FHVCTQNPQDSQWDRKDLGLCFDNCVTYFLQCLRTEKLENYFIPEFNLF
FSSNLIDKRSKEFLTKQIEYERNNEFPVFDEF

SEQ ID NO:11
>인간CGAS_N-말단

[0265]

MQPWHGKAMQRASEAGATAPKASARNARGAPMDPTESPAAPEAALPKAGKFGPARKSGSRQKKSAPDTQE
RPPVVRATGARAKKAPQRAQDTQPSDATSAPGAEGLEPPAAREPALSRAGSCRQRGARCSTKPRPPPGPWD
VPSPGLPVSAPILVRRDAA

SEQ ID NO:12
>토세아 아시그나 바이러스 T2A 리보솜-스키펡 펩티드
[GSG]EGRGSLLTCDVEENPGP

SEQ ID NO:13
>웨이 테스코바이러스-1 P2A 리보솜-스키펡 펩티드
[GSG]ATNFSLLKQAGDVEENPGP

SEQ ID NO:14
>말 A형 비염 바이러스 E2A 리보솜-스키펡 펩티드
[GSG]QCTNYALLKLAGDVESNPGP

SEQ ID NO:15
>구제역 바이러스 F2A 리보솜-스키펡 펩티드
[GSG]VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP

SEQ ID NO:16
>갈루스 갈루스 오브알부민 펩티드
SIINFEKL

SEQ ID NO:17
>합성 CGASΔN
ATGCCCGGGCGCCAGCAAGCTGAGGGCCGTGCTGGAGAAGCTGAAGCTGAGCAGGGACGACATCA
GCACCGCCCGCCGGCATGGTGAAGGGCGTGGTGGACCACCTGCTGCTGAGGCTGAAGTGCACAG
CGCCTTCAGGGGCGTGGGCCCTGCTGAACACCGGCAGCTACTACGAGCAGCTGAAGATCAGCGCC
CCCAACGAGTTTCGACGTGATGTTCAAGCTGGAGGTGCCAGGATCCAGCTGGAGGAGTACAGCA
ACACCAGGGCCTACTACTTCGTGAAGTTCAAGAGGAACCCCAAGGAGAACCCCTGAGCCAGTT
CCTGGAGGGCGAGATCCTGAGCGCCAGCAAGATGCTGAGCAAGTTCAAGGAAGATCATCAAGGAG
GAGATCAACGACATCAAGGACACCGACGTGATCATGAAGAGGAAGAGGGGCGGCAGCCCCGCCG
TGACCCTGCTGATCAGCGAGAAGATCAGCGTGGACATCACCTGGCCCTGGAGAGCAAGAGCAG
CTGGCCCGCCAGCACCCAGGAGGGCCTGAGGATCCAGAACTGGCTGAGCGCCAAGGTGAGGAAG
CAGCTGAGGCTGAAGCCCTTCTACCTGGTGCCCAAGCACGCCAAGGAGGGCAACGGCTTCCAGG
AGGAGACCTGGAGGCTGAGCTTCAGCCACATCGAGAAGGAGATCCTGAACAACACGGCAAGAG
CAAGACCTGCTGCGAGAACAAGGAGGAGAAGTGCTGCAGGAAGGACTGCCTGAAGCTGATGAAG
TACCTGCTGGAGCAGCTGAAGGAGAGGTTCAAGGACAAGAAGCACCTGGACAAGTTTCAGCAGCT
ACCACGTGAAGACCGCCTTCTTCCACGTGTGCACCCAGAACCCCAAGGACAGCCAGTGGGACAG
GAAGGACCTGGGCCTGTGCTTCGACAACTGCGTGACCTACTTCTGCACTGCCTGAGGACCGAG
AAGCTGGAGAATACTTCATCCCCGAGTTCAACCTGTTTCAGCAGCAACCTGATCGACAAGAGGA
GCAAGGAGTTCTTGACCAAGCAGATCGAGTACGAGAGGAACAACGAGTTCCCCGTGTTTCGACGA
GTTCTAATGA

[0266]

도면

도면1i

엔.올라바	PGARKLRVLEKLRSLSHQDISKAAPVNVGVGHLLRLRK-CEPEFGGVQLHTGSYYEYHV	59
엔.아누바	PGARKLRVLEKLRSLSHQDISKAAPVNVGVGHLLRLRK-CESEFEGVEQLHTGSYYEYHV	59
엔.류코게니	PGARKLRVLEKLRSLSRQIEIAEAENVNVGDHLLRLRKQCDSEFRGVGLLTGSGYYEYHV	60
에이치.라르	PGARKLPVLEKLRSLSRQIECEAAENVNVGDHLLRLRKQCDSEFRGVGLLTGSGYYEYHV	60
엔.아라비	PGASKLRVLEKLRSLRLEISKAAEVNVVRVGDHLLRLRKQYNSEFRGVGLLTGSGYYEYHV	60
엔.트름로디데스	PGASKLRVLEKLRSLRDDISTAAGMVKGVDHLLRLRK-CDSAFRGVGLLNTGSGYYEYHV	59
지.코일라	PGASKLRVLEKLRSLRDDISTAAGMVKGVDHLLRLRK-CDSAFRGVGLLNTGSGYYEYHV	59
에이치.사피엘스	PGASKLRVLEKLRSLRDDISTAAGMVKGVDHLLRLRK-CDSAFRGVGLLNTGSGYYEYHV	59
	*** ** ** ** **	
컨셀서	PGAXKLxAVLEKLRxLxxxxlxzAAxxVxxVxHLLxLRxLxxxxx *FGVxxLxTGSYYEYHV	

엔.올라타	KISAPNEFDVMFKLVPRIQLEEYSNTGAYYVFVKFRNPKNPLSQFLEGEILSASKMLS	11.9
엔.아누비스	KISAPNEFDVMFKLVPRIQLEEYSNTGAYYVFVKFRNPKNPLSQFLEGEILSASKMLS	11.9
엔.큐게니스	KISAPNEFDVMFKLEVPRIQLEEYSNTGAYYVFVKFRNPKNPLSQFLEGEILSASKMLS	12.0
에이치.라르	KISAPNEFDVMFKLEVPRIQLEEYSNTGAYYVFVKFRNPKNPLSQFLEGEILSASKMLS	12.0
엔.아틀라티	KISAPNEFDVMFKLEVPRIQLEEYSNTGAYYVFVKFRNPKNPLSQFLEGEILSASKMLS	12.0
제.트루로드티스	KISAPNEFDVMFKLEVPRIQLEEYSNTRAYYVFVKFRNPKNPLSQFLEGEILSASKMLS	11.9
지.코릴라	KISAPNEFDVMFKLEVPRIQLEEYSNTRAYYVFVKFRNPKNPLSQFLEGEILSASKMLS	11.9
에이치.사비엘스	KISAPNEFDVMFKLEVPRIQLEEYSNTRAYYVFVKFRNPKNPLSQFLEGEILSASKMLS	11.9

컨센서스	KISAPNEFDVMFKLVPRIQLEEYSNTxAYYVFVKFRNPxxNPLxqFLEGEILSASKMLS	

엘-올라타	KFRKIIKEEINNIKDVPQADVIMKKRRGSPAVTLLINKIEISVDITLAELELK-TSWFAS	178
피-아누비시	QFRKIIKEEINNIKD---TDVIMKKRRGGSPAVTLLINKIEISVDITLAELELK-TSWFAS	179
엘-퓨르게니시	KFRKIIKEEINNIKD---TDVIMKKRRGGSPAVTLLISEKISVDITLALESNSNWSWAS	176
에이치-라르	KFRKIIKEEINNIKD---TDVIMKKRRGGSPAVTLLISEKISVDITLALESKSSSWAS	176
피-아메리키	KFRKIIKEEINNIKD---TDVIMKKRRGGSPAVTLLISEEISVDITLALESK--SSWAS	175
피-트루로드데스	KFRKIIKEEINNIK-----DVMIMKKRRGGSPAVTLLISEKISVDITLALESK--SSWAS	172
지-코발라	KFRKIIKEEINNIKD---TDVIMKKRRGGSPAVTLLISEKISVDITLALESK--SSWAS	174
에이치-사파엘스	KFRKIIKEEINDIKD---TDVIMKKRRGGSPAVTLLISEKISVDITLALESK--SSWAS	174
	* * * * *	
컨센서스	xFRKIIKEEINI KxxxxxxDVJxKKRRgSPAVTLLIxxxISVDITLAEExxxxSWFAS	

엔.올라타	TQEGLAIKNWLSAKVRQQLRLKPFYLVPKHAKENGNGFQEBTWRLSFSHIEKEILSNHGKS	238
엔.아베르	TQEGLAIKNWLSAKVRQQLRLKPFYLVPKHAKENGNGFQEBTWRLSFSHIEKEILSNHGKS	239
엔.류코게니스	TQEGLIPKDWLSGGKVRQQLRLKPFYLVPKHAKENGNGFQEBTWRLSFSHIEKILNNHGKT	236
에이치.라르	TQEGLIPKDWLSGGKVRTQLRLKPFYLVPKHAKENGNGFQEBTWRLSFSHIEKILNNHGKT	237
엔.아베르	TQEGLIPKNWLSAKVRQQLRLKPFYLVPKHAKENGNGFQEBTWRLSFSHIEKILNNHGKS	235
피.트름도르디데스	TQEGLIPKNWLSAKVRQQLRLKPFYLVPKHAKENGNGFQEBTWRLSFSHIEKILNNHGKS	232
지.코릴라	TQEGLRIQNWLSAKVRQQLRLKPFYLVPKHAKENGNGFQEBTWRLSFSHIEKILNNHGKS	233
에이치.사르엘스	TQEGLRIQNWLSAKVRQQLRLKPFYLVPKHAKENGNGFQEBTWRLSFSHIEKILNNHGKS	234
컨센시스	TQEGLIXIXWLSGXKVRGXQLRLKPFYLVPKHAKENGNGFQEBTWRLSFSHIEKILXNHGXGX	

도면1ii

엔_물라바	KTCCENKEMKCCCRKDKCLMKMYLLEQLKEKFKDKKHLDKFSSYHVKTAFHHCTENPQDS	298
프_아누바	KTCCENKEMKCCCRKDKCLMKMYLLEQLKEKFKDKKHLDKFSSYHVKTAFHHCTENPQDS	299
엔_루코넬스	KTCCENKNVCCCRKDKCLMKMYLLEQLKERFKDKKHLDKFSSYHVKTAFHHCTENPQDS	296
에이치_라르	KTCCENKNVCCCRKDKCLMKMYLLEQLKERFKDKKHLDKFSSYHVKTAFHHCTENPQDS	296
프_아누바	KTCCEDKVKCCCRKDKCLMKMYLLEQLKEKFKDKKHLDKFSSYHVKTAFHHCTQNPQDS	295
프_트르클로디테스	KTCCETKEAKCCCRKDKCLMKMYLLEQLKEKFKDKKHLDKFSSYHVKTAFHHCTENPQDS	292
지_고필라	KTCCENKEAKCCCRKDKCLMKMYLLEQLKEKFKDKKHLDKFSSYHVKTAFHHCTQNPQDS	294
에이치_사피엘스	KTCCENKEEKCCCRKDKCLMKMYLLEQLKERFKDKKHLDKFSSYHVKTAFHHCTQNPQDS	294

컨센서스	KTCCExKxxKCCCRKDKCLMKMYLLEQLKExFKDKKHLDKFSSYHVKTAFHHCTxNPxDS	

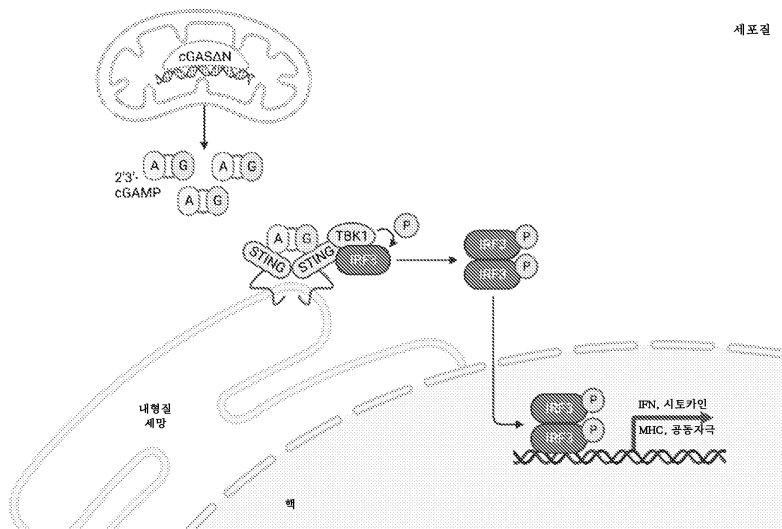
원.올라비	QWDPKDLGLCFDNCVTFYFLQCLRTEQLKNYFIPGFNLFSSNLLDKRSKEFLSKQIEYERN	358
원.아누비	QWDPKDLGLCFDNCVTFYFLQCLRTEKLANYFIPGFNLFSSNLLDKSSKEFLSKQIEYERN	354
원.유르키니	QWDPKDLGLCFDNCVTFYFLQCLRTEQLGNYFIPGFNLFSSNLLDKRSKEFLSKQIEYERN	356
레이치.라르	QWDPKDLGLCFDNCVTFYFLQCLRTEQLGNYFIPGFNLFSSNLLDKRSKEFLSKQIEYERN	356
원.아메리	QWDPKDLGLCFDNCVTFYFLQCLRTEQLGNYFIPGFNLFSSNLLDKRSKEFLTKQIEYERN	355
피트.프록로디텍스	QWDRKDLGLCFDNCVTFYFLQCLRTEKLENYFIPGFNLFSSDLIDKRSKEFLTKQIEYERN	352
지.코라트	QWDRKDLGLCFDNCVTFYFLQCLRTEKLENYFIPGFNLFSSNLLDKRSKEFLTKQIEYERN	354
레이치.사라엘스	QWDRKDLGLCFDNCVTFYFLQCLRTEKLENYFIPGFNLFSSNLLDKRSKEFLTKQIEYERN	354

퀸켄셀	QWDXKXLGXCFDXCVTFXFLXCLXEXLXNYFIPXFNLFSSXLLDKXSEFLXKQIEYERN	

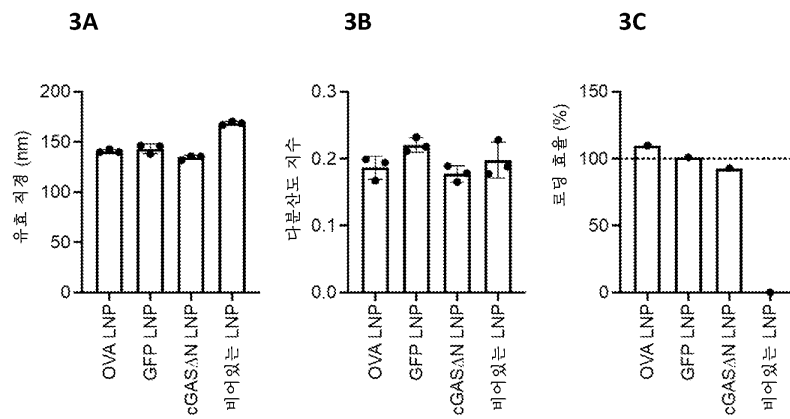
엔_올라타	NEFFVVFGEF	367
페_아누비스	NEFFVVFGEF	363
엔_큐크제니스	NEYPVFGEF---	363
에이치_라르	NEYPVFGKC	365
페_아벨리	NEFFVVFDEF	364
제_트르모로디테스	NEFFVVFDEF	361
지_코필라	NEFFVVFDEF	363
에이치_사피엘스	NEFFVVFDEF	363
	:	
컨센서스	NEXPVFxxxx	

컨센서스 NEXPVFxxx

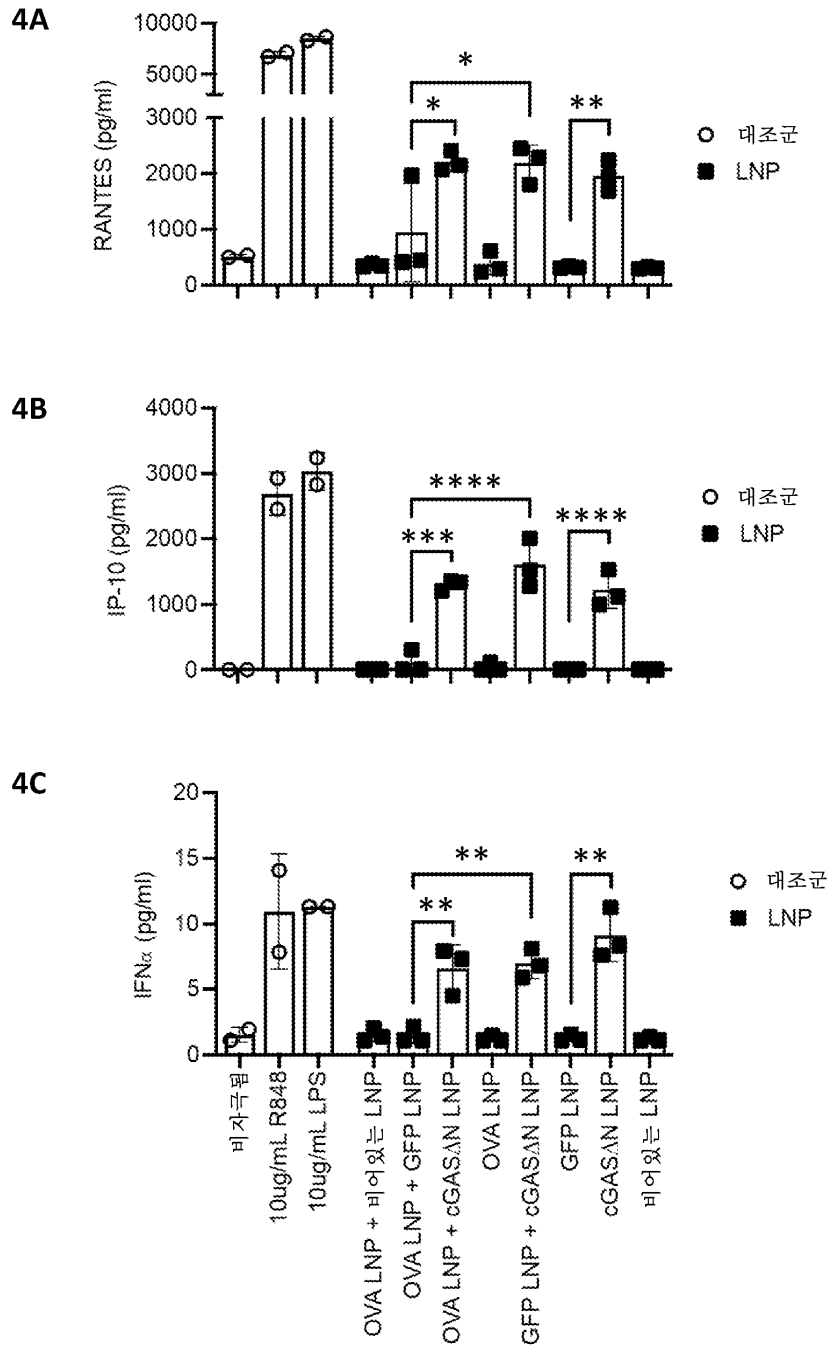
도면2



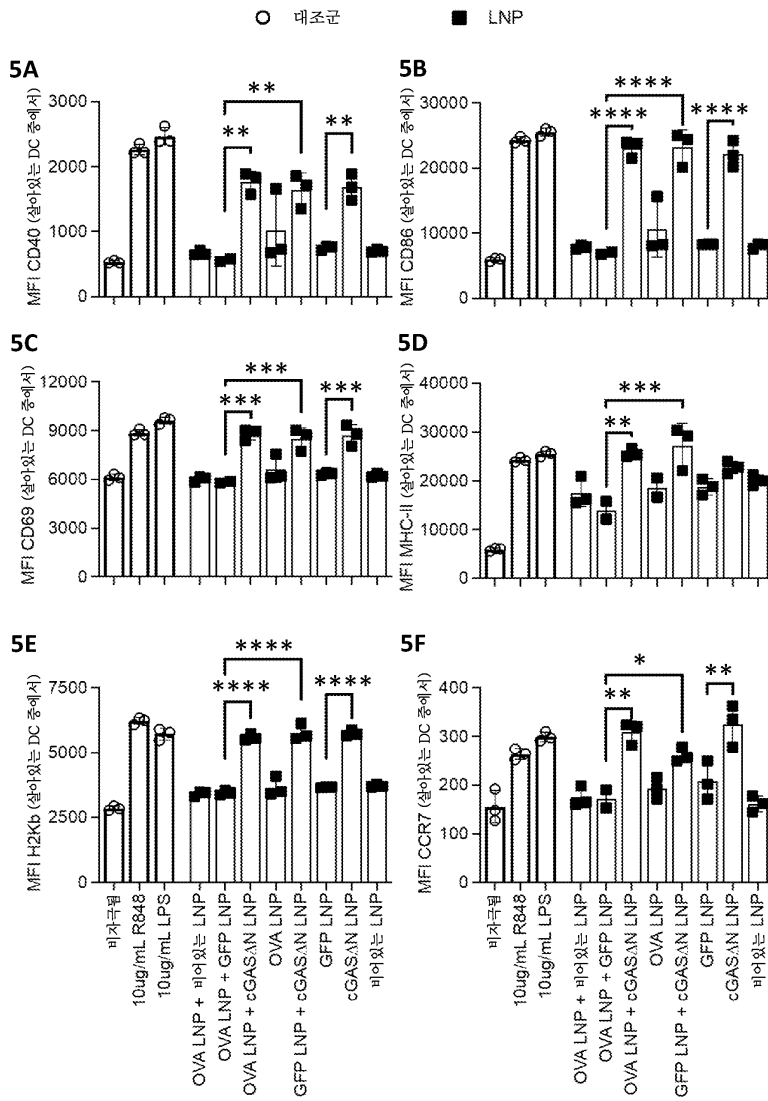
도면3



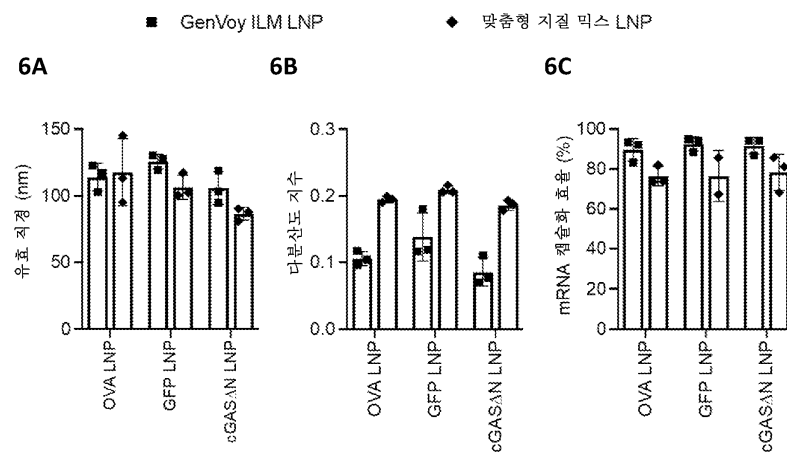
도면4



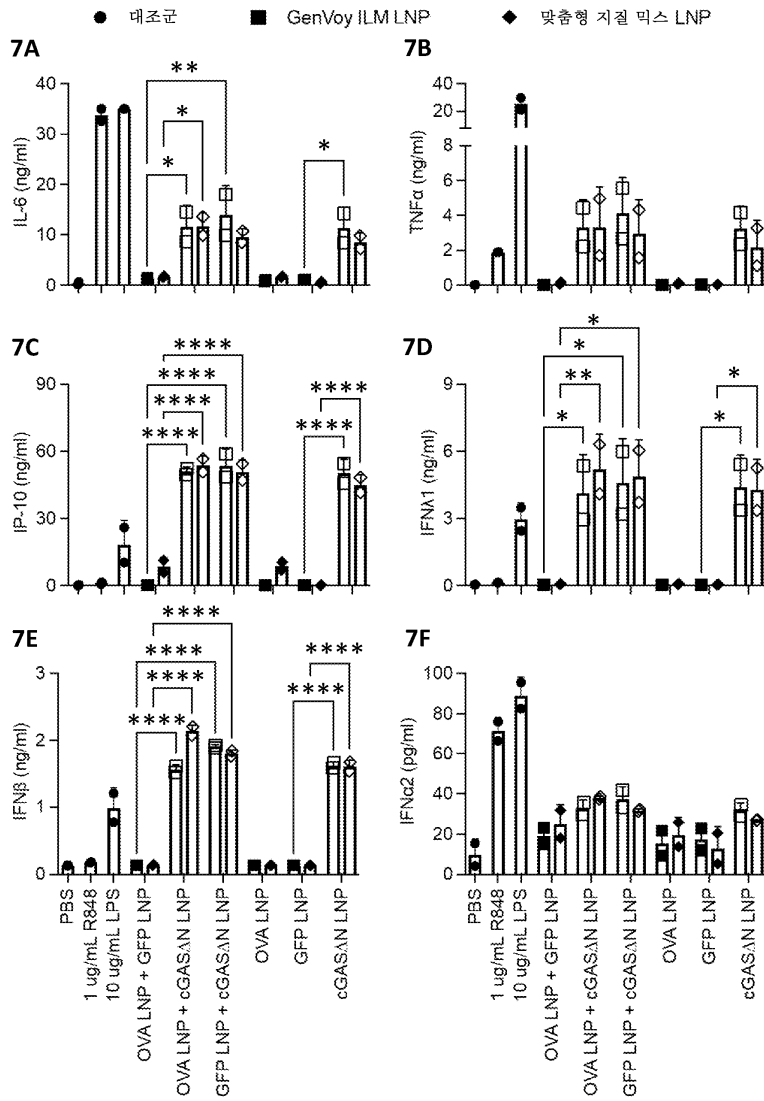
도면5



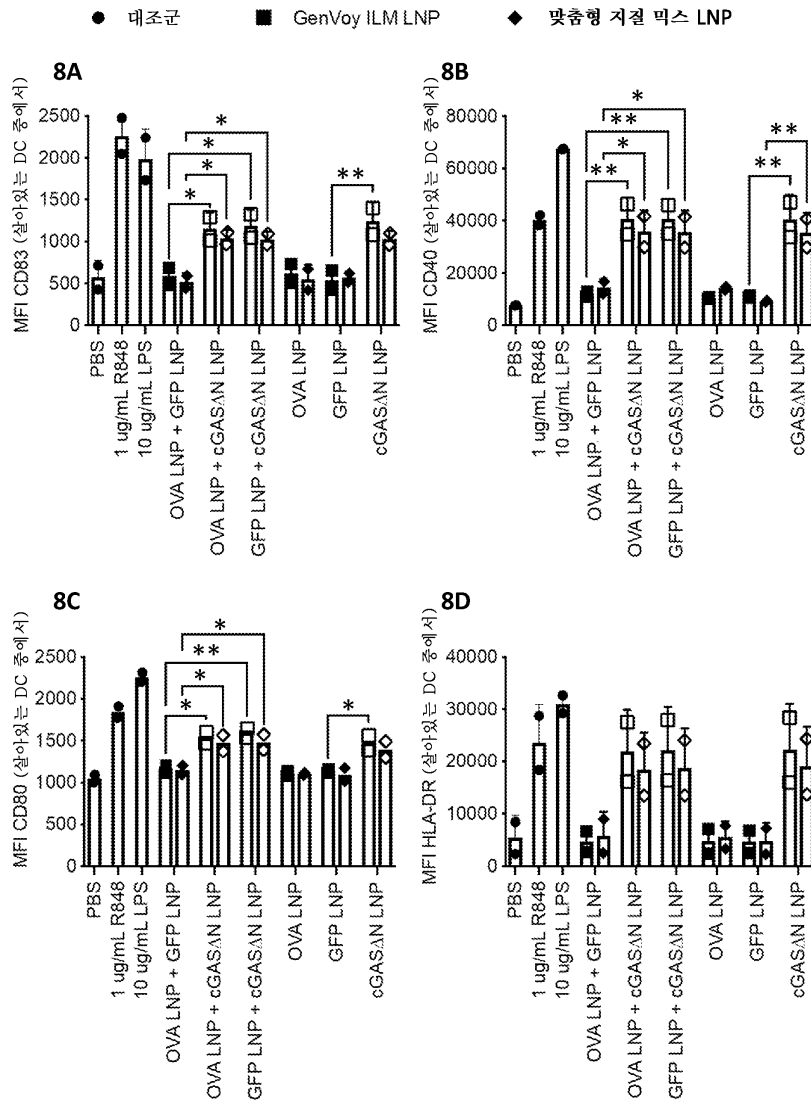
도면6



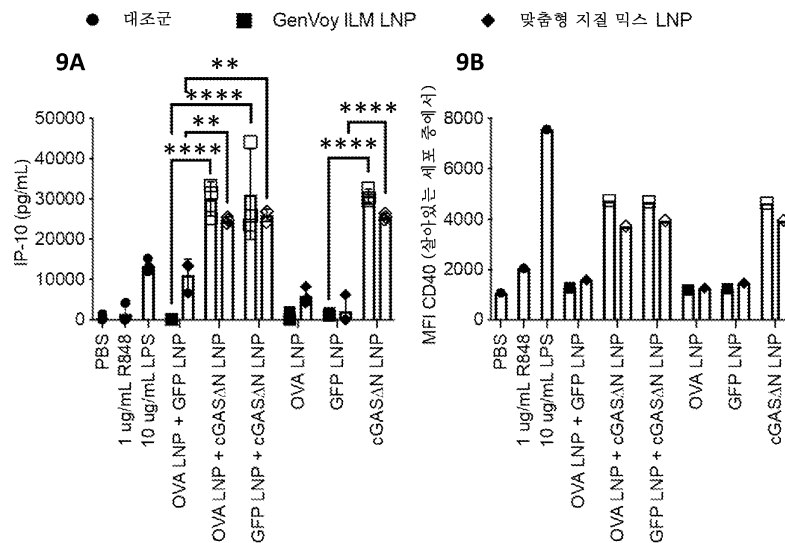
도면7



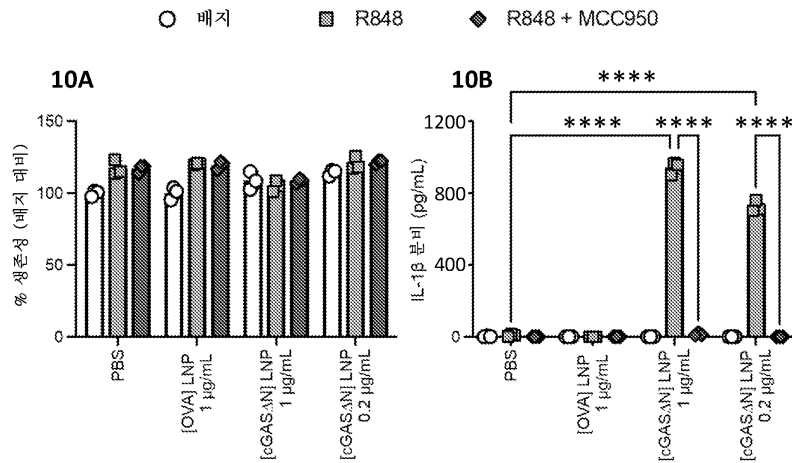
도면8



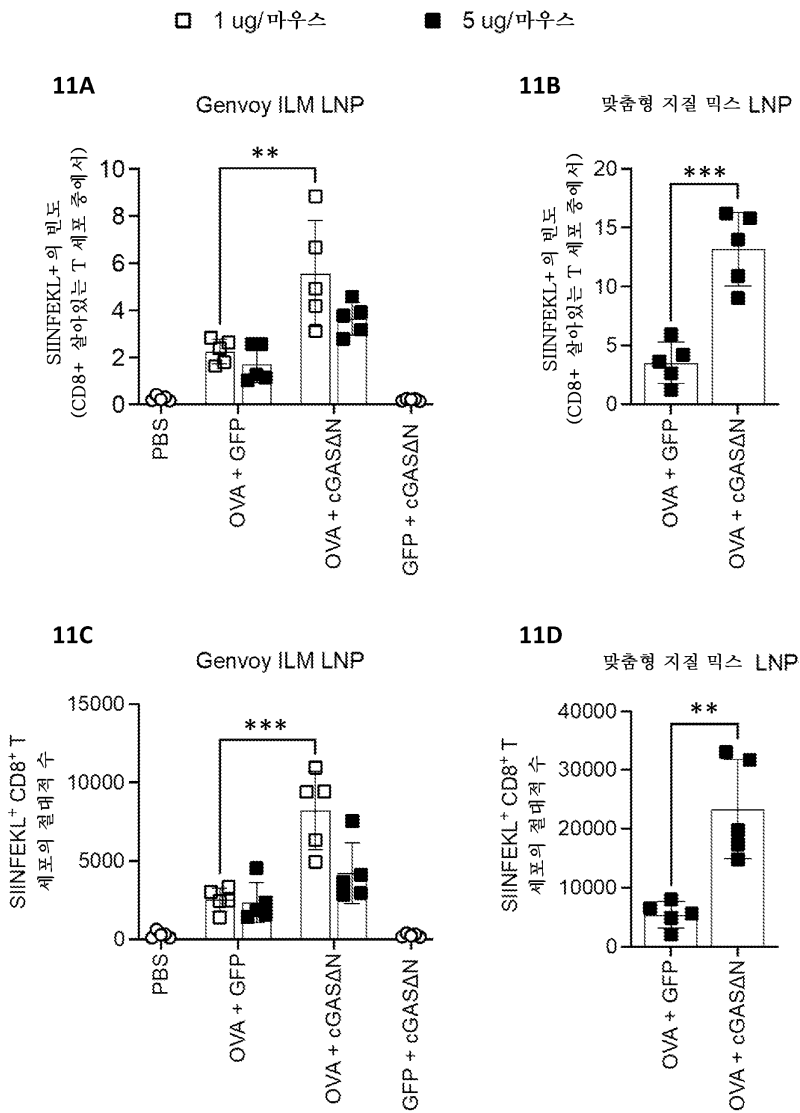
도면9



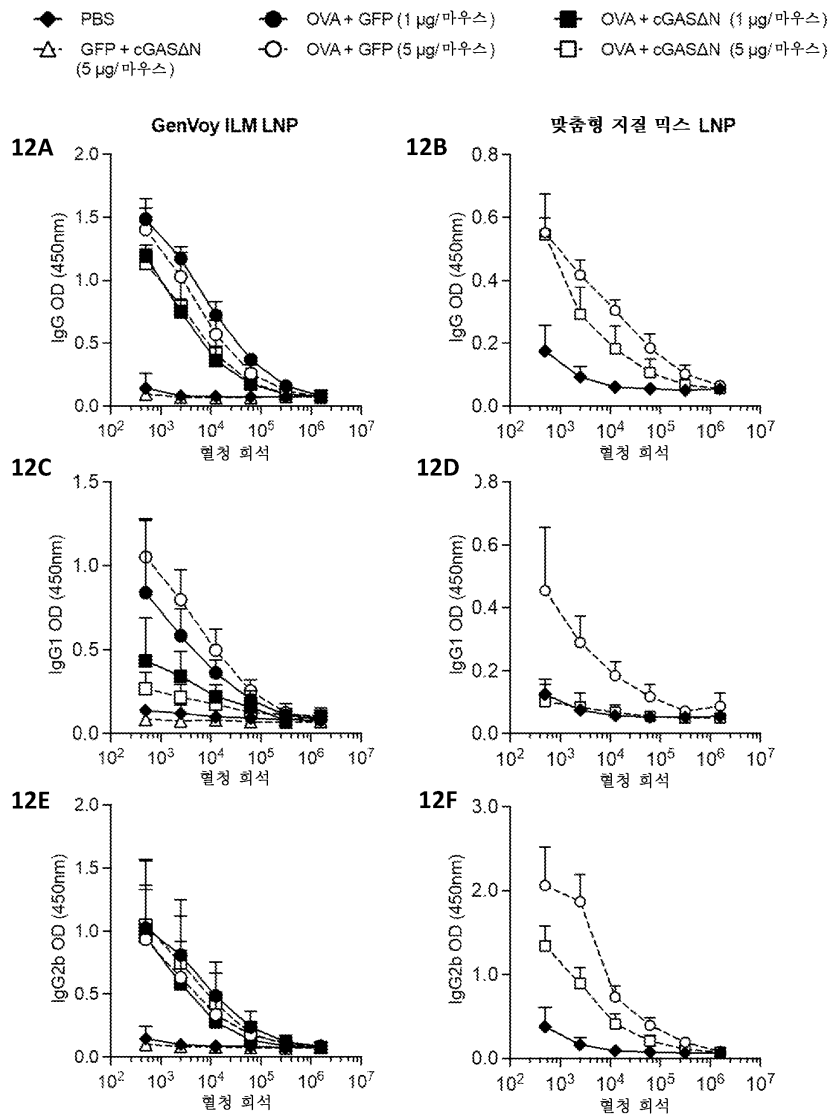
도면10



도면11



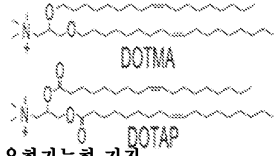
도면12



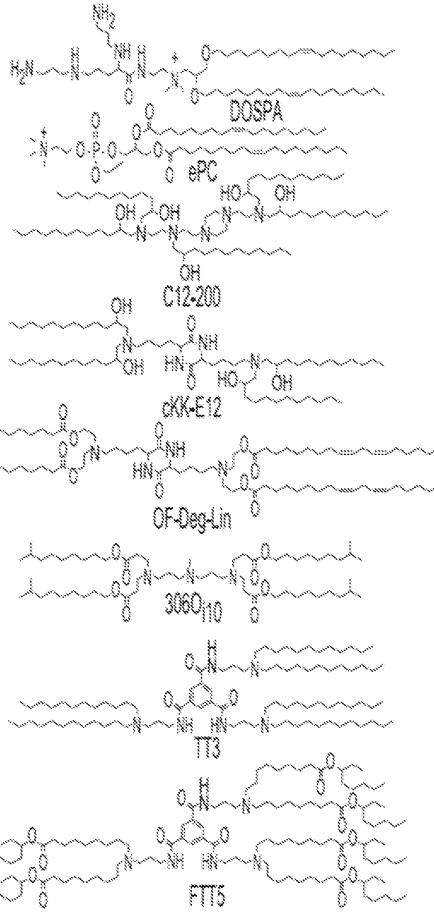
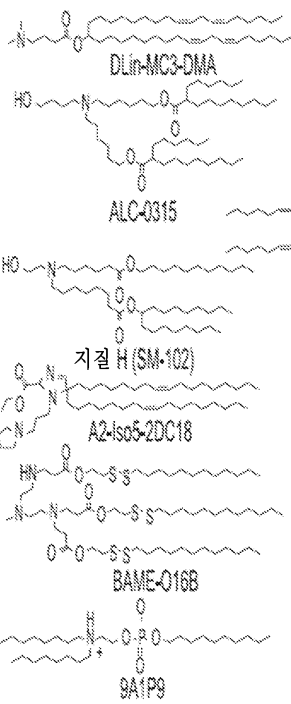
도면13i

13A

양이온성 지질



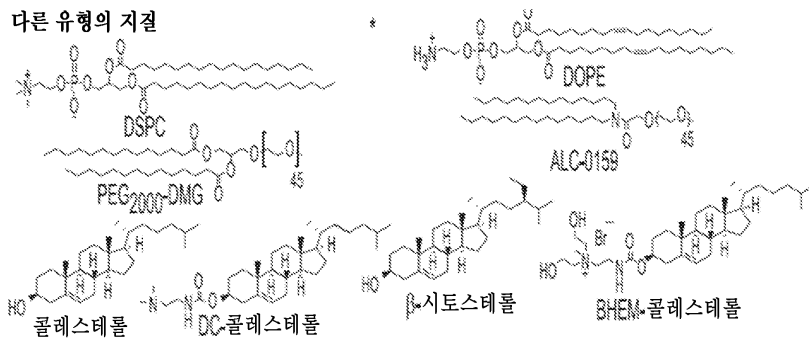
이온화가능한 지질



도면13ii

13B

다른 유형의 지질



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.