(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0036873
(43) 공개일자 2020년04월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*C12N 15/88* (2017.01) *C12N 15/63* (2006.01)
*C12N 7/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
*C12N 15/88* (2013.01)
*C12N 15/63* (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-7004226
(22) 출원일자(국제) 2018년07월13일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2020년02월13일
(86) 국제출원번호 PCT/US2018/042136
(87) 국제공개번호 WO 2019/014623
국제공개일자 2019년01월17일
(30) 우선권주장
62/532,886 2017년07월14일 미국(US)
62/648,651 2018년03월27일 미국(US)

(71) 출원인
**온코루스, 인크.**
미국 02139 매사추세츠주 캠브리지 스위트 401 햄프셔 스트리트 50
(72) 발명자
**피너, 미첼 에이치.**
미국 02139 매사추세츠주 캠브리지 스위트 401 햄프셔 스트리트 50 온코루스, 인크. 내
**케네디, 에드워드**
미국 02139 매사추세츠주 캠브리지 스위트 401 햄프셔 스트리트 50 온코루스, 인크. 내
**레르너, 로레나**
미국 02139 매사추세츠주 캠브리지 스위트 401 햄프셔 스트리트 50 온코루스, 인크. 내
(74) 대리인
**양영준, 이상남**

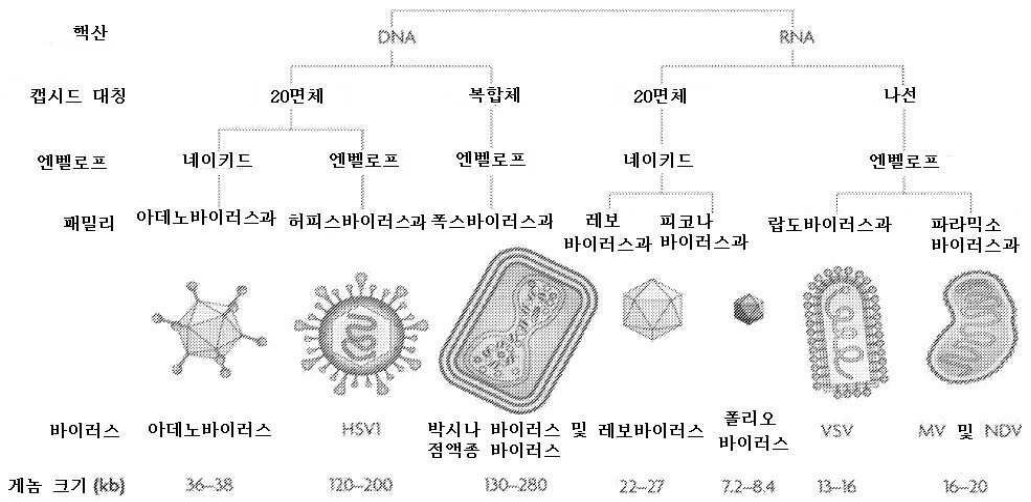
전체 청구항 수 : 총 152 항

(54) 발명의 명칭 **캡슐화된 폴리뉴클레오티드 및 사용 방법**

## (57) 요 약

본 개시내용은 복제 가능 바이러스 게놈을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드에 관한 것이며, 여기서 상기 폴리뉴클레오타이드는 비바이러스 전달 비히클에 의해서 세포 내에 도입되는 경우 복제 가능 바이러스를 생산할 수 있다. 본 개시내용은 추가로 폴리뉴클레오타이드의 캡슐화 및 암의 치료 및 예방을 위한 상기 폴리뉴클레오타이드 및/또는 입자의 용도에 관한 것이다.

*대 표 도* - 도1



(52) CPC특허분류
***C12N 7/00*** (2013.01)
*C12N 2770/32021* (2013.01)
*C12N 2770/32023* (2013.01)
*C12N 2770/32032* (2013.01)
*C12N 2770/32043* (2013.01)

# 명 세 서

## 청구범위

### 청구항 1

지질 나노입자(lipid nanoparticle: LNP)로서, 복제-가능 바이러스 게놈(replication-competent viral genome)을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 포함하되, 상기 폴리뉴클레오타이드 서열은 포유동물 RNA 중합효소 II(polymerase II: Pol II)에 결합할 수 있는 프로모터 서열에 작동 가능하게 연결되고, 3' 리보자임-암호화 서열(ribozyme-encoding sequence) 및 5' 리보자임-암호화 서열이 측접되며(flanked),

상기 복제-가능 바이러스 게놈을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 기원이 비바이러스성인, LNP.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 복제-가능 바이러스 게놈은 단일 가닥 RNA(single-stranded: ssRNA) 바이러스인, LNP.

### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 복제-가능 바이러스 게놈은 포저티브 센스(positive sense)((+)-센스) 또는 네거티브-센스(negative-sense)((-)-센스) ssRNA 바이러스인 단일 가닥 RNA(ssRNA) 바이러스인, LNP.

### 청구항 4

제3항에 있어서, 상기 복제-가능 바이러스 게놈은 (+)-센스 ssRNA 바이러스이되, 상기 (+)-센스 ssRNA 바이러스는 피코나바이러스(Picornavirus)인, LNP.

### 청구항 5

제4항에 있어서, 상기 피코나바이러스는 세네카 벨리 바이러스(Seneca Valley Virus: SVV) 또는 콕사키바이러스(Coxsackievirus)인, LNP.

### 청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 LNP와 세포의 접촉은 상기 세포에 의한 바이러스 입자의 생산을 초래하되, 상기 바이러스 입자는 감염성(infectious) 및 용해성(lytic)인, LNP.

### 청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 재조합 DNA 분자는 외인성 페이로드(payload) 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 더 포함하는, LNP.

### 청구항 8

제7항에 있어서, 상기 외인성 페이로드 단백질은 세포 표면 수용체에 결합할 수 있는 형광 단백질, 효소 단백질, 사이토카인, 케모카인 또는 항원-결합 분자인, LNP.

### 청구항 9

제8항에 있어서, 상기 사이토카인은 Flt3 리간드 및 IL-18로부터 선택되는, LNP.

### 청구항 10

제8항에 있어서, 상기 케모카인은 CXCL10 및 CCL4로부터 선택되는, LNP.

### 청구항 11

제8항에 있어서, 상기 항원-결합 분자는 면역 관문 수용체(immune checkpoint receptor)에 결합하여, 이를 저해

할 수 있는 것인, LNP.

**청구항 12**

제11항에 있어서, 상기 면역 관문 수용체는 PD1인, LNP.

**청구항 13**

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 마이크로 RNA(miRNA) 표적 서열(micro RNA target sequence: miR-TS) 카세트는 상기 복제-가능 바이러스 게놈을 암호화하는 핵산 서열 내에 삽입되되, 상기 miR-TS 카세트는 하나 이상의 miRNA 표적 서열을 포함하고, 그리고 세포에서 상기 상응하는 miRNA의 하나 이상의 발현은 상기 복제-가능 바이러스 게놈의 복제를 저해하는, LNP.

**청구항 14**

제13항에 있어서, 상기 하나 이상의 miRNA는 miR-124, miR-1, miR-143, miR-128, miR-219, miR-219a, miR-122, miR-204, miR-217, miR-137 및 miR-126으로부터 선택되는, LNP.

**청구항 15**

제14항에 있어서, 상기 miR-TS 카세트는 miR-124 표적 서열의 하나 이상의 카피, miR-1 표적 서열의 하나 이상의 카피 및 miR-143 표적 서열의 하나 이상의 카피를 포함하는, LNP.

**청구항 16**

제14항에 있어서, 상기 miR-TS 카세트는 miR-128 표적 서열의 하나 이상의 카피, miR-219a 표적 서열의 하나 이상의 카피 및 miR-122 표적 서열의 하나 이상의 카피를 포함하는, LNP.

**청구항 17**

제14항에 있어서, 상기 miR-TS 카세트는 miR-128 표적 서열의 하나 이상의 카피, miR-204 표적 서열의 하나 이상의 카피 및 miR-219 표적 서열의 하나 이상의 카피를 포함하는, LNP.

**청구항 18**

제14항에 있어서, 상기 miR-TS 카세트는 miR-217 표적 서열의 하나 이상의 카피, miR-137 표적 서열의 하나 이상의 카피 및 miR-126 표적 서열의 하나 이상의 카피를 포함하는, LNP.

**청구항 19**

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 재조합 DNA 분자는 상기 복제-가능 바이러스 게놈을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 플라스미드인, LNP.

**청구항 20**

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 LNP는 양이온성 지질, 콜레스테롤 및 중성 지질을 포함하는, LNP.

**청구항 21**

제20항에 있어서, 상기 양이온성 지질은 1,2-다이올레오일-3-트라이메틸암모늄-프로판(DOTAP)이고, 그리고 상기 중성 지질은 1,2-다이라우로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(DLPE) 또는 1,2-다이올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(DOPE)인, LNP.

**청구항 22**

제20항 또는 제21항에 있어서, 포스포지질-중합체 접합체를 더 포함하되, 상기 포스포지질-중합체 접합체는 1,2-다이스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-폴리(에틸렌 글리콜)(DSPE-PEG) 또는 1,2-다이스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[아미노(폴리에틸렌 글리콜)](DSPE-PEG-아민)인, LNP.

**청구항 23**

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 히알루로난(hyaluronan)이 상기 LNP의 표면에 접합된, LNP.

**청구항 24**

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 따른 복수의 지질 나노입자를 포함하는 치료 조성물로서, 상기 복수의 LNP는 약 150㎚ 내지 약 500㎚의 평균 크기를 갖는, 치료 조성물.

**청구항 25**

제24항에 있어서, 상기 복수의 LNP는 약 200㎚ 내지 약 500㎚, 약 300㎚ 내지 약 500㎚, 약 350㎚ 내지 약 500㎚, 약 400㎚ 내지 약 500㎚, 약 425㎚ 내지 약 500㎚, 약 450㎚ 내지 약 500㎚ 또는 약 475㎚ 내지 약 500㎚의 평균 크기를 갖는, 치료 조성물.

**청구항 26**

제24항 또는 제25항에 있어서, 상기 복수의 LNP는 약 -20㎷ 미만, 약 -30㎷ 미만, 약 35㎷ 미만 또는 약 -40㎷ 미만의 평균 제타-전위(zeta-potential)를 갖는, 치료 조성물.

**청구항 27**

제26항에 있어서, 상기 복수의 LNP는 약 -50㎷ 내지 약 - 20㎷, 약 -40㎷ 내지 약 -20㎷ 또는 약 -30㎷ 내지 약 -20㎷의 평균 제타-전위를 갖는, 치료 조성물.

**청구항 28**

제26항 또는 제27항에 있어서, 상기 복수의 LNP는 약 -30㎷, 약 -31㎷, 약 -32㎷, 약 -33㎷, 약 -34㎷, 약 -35㎷, 약 -36㎷, 약 -37㎷, 약 -38㎷, 약 -39㎷ 또는 약 -40㎷의 평균 제타-전위를 갖는, 치료 조성물.

**청구항 29**

제24항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체에 대한 상기 치료 조성물의 투여는 상기 재조합 DNA 폴리뉴클레오타이드를 상기 대상체의 표적 세포에 전달하되, 상기 재조합 DNA 폴리뉴클레오타이드는 상기 대상체의 상기 표적 세포를 용해시킬 수 있는 감염성 바이러스를 생산하는, 치료 조성물.

**청구항 30**

제29항에 있어서, 상기 조성물은 정맥내 또는 종양내로 전달되는, 치료 조성물.

**청구항 31**

제29항에 있어서, 상기 표적 세포는 암성 세포인, 치료 조성물.

**청구항 32**

암성 종양의 성장 저해를 필요로 하는 대상체에서 암성 종양의 성장을 저해하는 방법으로서, 암성 종양의 성장 저해를 필요로 하는 대상체에게 제24항 내지 제31항 중 어느 한 항에 따른 치료 조성물을 투여하는 단계를 포함하되, 상기 치료 조성물의 투여는 상기 종양의 성장을 저해하는, 암성 종양의 성장을 저해하는 방법.

**청구항 33**

제32항에 있어서, 상기 투여는 종양내 또는 정맥내인, 암성 종양의 성장을 저해하는 방법.

**청구항 34**

제32항 또는 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암은 폐암 또는 간암인, 암성 종양의 성장을 저해하는 방법.

**청구항 35**

재조합 DNA 분자로서, 복제-가능 바이러스 게놈을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하되, 상기 폴리

뉴클레오타이드 서열은 포유동물 RNA 중합효소 II(Pol II)에 결합할 수 있는 프로모터 서열에 작동 가능하게 연결되고, 3' 리보자임-암호화 서열 및 5' 리보자임-암호화 서열이 측접되며,

상기 복제-가능 바이러스 게놈을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 기원이 비바이러스성인, 재조합 DNA 분자.

**청구항 36**

제35항에 있어서, 상기 암호화된 바이러스는 단일 가닥 RNA(ssRNA) 바이러스인, 재조합 DNA 분자.

**청구항 37**

제36항에 있어서, 상기 ssRNA 바이러스는 포저티브 센스((+)-센스) 또는 네거티브-센스((-)-센스) ssRNA 바이러스인, 재조합 DNA 분자.

**청구항 38**

제37항에 있어서, 상기 (+)-센스 ssRNA 바이러스는 피코나바이러스인, 재조합 DNA 분자.

**청구항 39**

제38항에 있어서, 상기 피코나바이러스는 세네카 벨리 바이러스(SVV) 또는 콕사키바이러스인, 재조합 DNA 분자.

**청구항 40**

제35항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 비바이러스 전달 비히클에 의해서 세포에 도입되는 경우 상기 재조합 DNA 분자는 감염성이고 용해성인 바이러스를 생산할 수 있는, 재조합 DNA 분자.

**청구항 41**

제35항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 재조합 DNA 분자는 외인성 페이로드 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 더 포함하는, 재조합 DNA 분자.

**청구항 42**

제41항에 있어서, 상기 외인성 페이로드 단백질은 세포 표면 수용체에 결합할 수 있는 형광 단백질, 효소 단백질, 사이토카인, 케모카인 세포-표면 수용체에 대한 리간드 또는 항원-결합 분자인, 재조합 DNA 분자.

**청구항 43**

제42항에 있어서, 상기 사이토카인은 IL-18인, 재조합 DNA 분자.

**청구항 44**

제42항에 있어서, 상기 세포-표면 수용체에 대한 리간드는 Flt3 리간드인, 재조합 DNA 분자.

**청구항 45**

제42항에 있어서, 상기 케모카인은 CXCL10 및 CCL4로부터 선택되는, 재조합 DNA 분자.

**청구항 46**

제42항에 있어서, 상기 항원-결합 분자는 면역 관문 수용체에 결합하여, 이를 저해할 수 있는 것인, 재조합 DNA 분자.

**청구항 47**

제46항에 있어서, 상기 면역 관문 수용체는 PD1인, 재조합 DNA 분자

**청구항 48**

제35항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 마이크로 RNA(miRNA) 표적 서열(miR-TS) 카세트가 상기 복제-가능 바이러스 게놈을 암호화하는 핵산 서열 내에 삽입되되, 상기 miR-TS 카세트는 하나 이상의 miRNA 표적 서열을 포함하고, 그리고 상기 세포에서 상기 상응하는 miRNA의 하나 이상의 발현은 상기 암호화된 바이러스의 복

제를 저해하는, 재조합 DNA 분자.

**청구항 49**

제48항에 있어서, 상기 하나 이상의 miRNA는 miR-124, miR-1, miR-143, miR-128, miR-219, miR-219a, miR-122, miR-204, miR-217, miR-137 및 miR-126으로부터 선택되는, 재조합 DNA 분자.

**청구항 50**

제49항에 있어서, 상기 miR-TS 카세트는 miR-124 표적 서열의 하나 이상의 카피, miR-1 표적 서열의 하나 이상의 카피 및 miR-143 표적 서열의 하나 이상의 카피를 포함하는, 재조합 DNA 분자.

**청구항 51**

제49항에 있어서, 상기 miR-TS 카세트는 miR-128 표적 서열의 하나 이상의 카피, miR-219a 표적 서열의 하나 이상의 카피 및 miR-122 표적 서열의 하나 이상의 카피를 포함하는, 재조합 DNA 분자.

**청구항 52**

제49항에 있어서, 상기 miR-TS 카세트는 miR-128 표적 서열의 하나 이상의 카피, miR-204 표적 서열의 하나 이상의 카피 및 miR-219 표적 서열의 하나 이상의 카피를 포함하는, 재조합 DNA 분자.

**청구항 53**

제49항에 있어서, 상기 miR-TS 카세트는 miR-217 표적 서열의 하나 이상의 카피, miR-137 표적 서열의 하나 이상의 카피 및 miR-126 표적 서열의 하나 이상의 카피를 포함하는, 재조합 DNA 분자.

**청구항 54**

제35항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 재조합 DNA 분자는 상기 복제-가능 바이러스 게놈을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 플라스미드 또는 NanoV인, 재조합 DNA 분자.

**청구항 55**

복제-가능 바이러스 게놈을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자로서,

상기 복제-가능 바이러스를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열은 기원이 비바이러스성이고, 그리고

비바이러스 전달 비히클에 의해서 세포에 도입되는 경우 상기 재조합 DNA 분자는 복제-가능 바이러스를 생산할 수 있는, 재조합 DNA 분자.

**청구항 56**

제55항에 있어서, 상기 복제-가능 바이러스 게놈은 DNA 바이러스의 게놈 또는 RNA 바이러스의 게놈인, 재조합 DNA 분자.

**청구항 57**

제56항에 있어서, 상기 DNA 게놈 또는 RNA 게놈은 이중 가닥 또는 단일 가닥 바이러스인, 재조합 DNA 분자.

**청구항 58**

제57항에 있어서, 상기 단일 가닥 게놈은 포저티브 센스((+)-센스) 또는 네거티브 센스((-)-센스) 게놈인, 재조합 DNA 분자.

**청구항 59**

제55항에 있어서, 상기 세포는 포유동물 세포인, 재조합 DNA 분자.

**청구항 60**

제59항에 있어서, 상기 세포는 포유동물 대상체에 존재하는 포유동물 세포인, 재조합 DNA 분자.

**청구항 61**

제55항에 있어서, 상기 복제-가능 바이러스는 아데노바이러스, 콕사키 바이러스, 폴리오 바이러스, 세네카 벨리 바이러스, 말과 허피스 바이러스, 단순 포진 바이러스 1형(HSV-1), 라사 바이러스, 뮤린 백혈병 바이러스, 인플루엔자 A 바이러스, 인플루엔자 B 바이러스, 뉴캐슬병 바이러스, 홍역 바이러스, 파보바이러스, 레오바이러스, 신드비스 바이러스, 백시나 바이러스, 점액종 바이러스, 수포성 구내염 바이러스(vesicular stomatitis virus: VSV), 마라바 바이러스로 이루어진 군으로부터 선택되는, 재조합 DNA 분자.

**청구항 62**

제55항 내지 제61항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 복제-가능 바이러스 게놈을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 내에 삽입된 하나 이상의 마이크로 RNA(miRNA) 표적 서열(miR-TS) 카세트를 더 포함하되, 상기 miR-TS 카세트는 하나 이상의 miRNA 표적 서열을 포함하고, 그리고 상기 세포에서 상기 상응하는 miRNA의 하나 이상의 발현은 상기 암호화된 바이러스의 복제를 저해하는, 재조합 DNA 분자.

**청구항 63**

제62항에 있어서, 상기 하나 이상의 miR-TS 카세트는 하나 이상의 필수 바이러스 유전자의 5' 비번역 영역(untranslated region: UTR) 또는 3' UTR 내에 혼입되는, 재조합 DNA 분자.

**청구항 64**

제63항에 있어서, 상기 하나 이상의 필수 바이러스 유전자는 UL1, UL5, UL6, UL7, UL8, UL9, UL11, UL12, UL14, UL15, UL17, UL18, UL19, UL20, UL22, UL25, UL26, UL26.5, UL27, UL28, UL29, UL30, UL31, UL32, UL33, UL34, UL35, UL36, UL37, UL38, UL39, UL40, UL42, UL48, UL49, UL50, UL52, UL53, UL54, US1, US3, US4, US5, US6, US7, US8, US12, ICP0, ICP4, ICP22, ICP27, ICP47, PB, F, B5R, SERO-1, Cap, Rev, VP1-4, 핵단백질(N), 인단백질(P), 기질 단백질(M), 당단백질(G), 중합효소(L), E1, E2, E3, E3, VP1, VP2, VP3, VP4, 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C, 및 3D로 이루어진 군으로부터 선택되는, 재조합 DNA 분자.

**청구항 65**

제62항에 있어서, 상기 하나 이상의 miR-TS 카세트는 하나 이상의 비필수 바이러스 유전자의 5' 비번역 영역(UTR) 또는 3' UTR 내에 혼입되는, 재조합 DNA 분자.

**청구항 66**

제55항 내지 제65항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오타이드는 리플리콘, 플라스미드, 코스미드, 파지미드, 트랜스포존, 박테리아 인공 염색체, 효모 인공 염색체 또는 단부-폐쇄(end-closed) 선형 듀플렉스 종양 용해 바이러스(oncolytic virus: Ov) DNA 분자로부터 선택된 핵산 벡터 내에 삽입되는, 재조합 DNA 분자.

**청구항 67**

제55항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오타이드는 DNA 폴리뉴클레오타이드이고, 상기 복제-가능 바이러스 게놈을 암호화하는 핵산 서열의 5' 단부 상의 제1 AAV-유래된 반전 말단 반복부(inverted terminal repeat: ITR) 및 상기 복제-가능 바이러스 게놈을 암호화하는 핵산 서열의 3' 단부 상의 제2 AAV-유래된 ITR을 더 포함하는, 재조합 DNA 분자.

**청구항 68**

제55항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오타이드는 DNA 폴리뉴클레오타이드이고, 상기 복제-가능 바이러스 게놈을 암호화하는 핵산 서열에 대해 바로 3'에 제1 리보자임 암호화 서열 및 상기 복제-가능 바이러스 게놈을 암호화하는 핵산 서열에 대해 바로 5'에 제2 리보자임 암호화 서열을 더 포함하는, 재조합 DNA 분자.

**청구항 69**

제68항에 있어서, 상기 제1 리보자임 암호화 서열 및 제2 리보자임 암호화 서열은 귀상어(Hammerhead) 리보자임 또는 델타 간염 바이러스 리보자임을 암호화하는, 재조합 DNA 분자.

**청구항 70**

제55항에 있어서, 상기 프로모터 서열은 진핵생물 RNA 중합효소에 결합할 수 있는, 재조합 DNA 분자.

**청구항 71**

제55항에 있어서, 상기 프로모터 서열은 포유동물 RNA 중합효소에 결합할 수 있는, 재조합 DNA 분자.

**청구항 72**

제55항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오타이드는 DNA 폴리뉴클레오타이드이고, 상기 포유동물 중합효소는 감염성 복제-가능 RNA 바이러스의 전사를 유도하는, 재조합 DNA 분자.

**청구항 73**

제55항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오타이드는 DNA 폴리뉴클레오타이드이고, 상기 포유동물 중합효소는 감염성 복제-가능 DNA 바이러스의 전사를 유도하는, 재조합 DNA 분자.

**청구항 74**

제55항에 있어서, 상기 프로모터 서열은 암 세포에서 상기 폴리뉴클레오타이드의 전사를 선택적으로 유도하는, 재조합 DNA 분자.

**청구항 75**

제55항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 프로모터 서열은 hTERT, HE4, CEA, OC, ARF, CgA, GRP78, CXCR4, HMGB2, INSM1, 메소텔린(Mesothelin), OPN, RAD51, TETP, H19, uPAR, ERBB2, MUC1, Frz1 또는 IGF2-P4로 이루어진 군으로부터 선택된 유전자로부터 유래되는, 재조합 DNA 분자.

**청구항 76**

제55항 내지 제75항 중 어느 한 항에 있어서, 세포독성 폴리펩타이드, 사이토카인, 케모카인, 항원 결합 분자, 세포 표면 수용체에 대한 리간드, 가용성 수용체, 효소, 전갈 폴리펩타이드, 뱀 폴리펩타이드, 거미 폴리펩타이드, 벌 폴리펩타이드, 개구리 폴리펩타이드 및 치료용 핵산으로 이루어진 군으로부터 선택된 페이로드 분자를 암호화하는 핵산 서열을 더 포함하는, 재조합 DNA 분자.

**청구항 77**

제76항에 있어서, 하나 이상의 miR-TS 카세트는 상기 페이로드 분자를 암호화하는 핵산 서열의 상기 5' 비번역 영역(UTR) 또는 상기 3' UTR 서열 내에 혼입되는, 재조합 DNA 분자.

**청구항 78**

제76항에 있어서, 상기 세포독성 폴리펩타이드는 p53, 디프테리아 독소(diphtheria toxin: DT), 슈도모나스 외독소 A(Pseudomonas Exotoxin A: PEA), I형 리보솜 불활성화 단백질(Type I ribosome inactivating protein: RIP), II형 RIP 또는 쉬가-유사 독소 1(Shiga-like toxin: Slt1)로부터 선택되는, 재조합 DNA 분자.

**청구항 79**

제76항에 있어서, 상기 효소는 메탈로프로테이나제, 콜라게나제, 엘라스타제, 히알루로니다제, 카스파제, 젤라티나제, 또는 단순 포진 바이러스 티미딘 카이나제, 사이토신 데아미나제, 나이트로리덕타제, 카복시펩티다제 G2, 퓨린 뉴클레오사이드 포스포릴라제 또는 사이토크롬 P450으로부터 선택된 유전자 지시 효소 전구약물 요법(gene directed enzyme prodrug therapy: GDEPT) 시스템의 부분인 효소로부터 선택되는, 재조합 DNA 분자.

**청구항 80**

제79항에 있어서, 상기 젤라티나제는 섬유모세포 활성화 단백질(fibroblast activation protein: FAP)인, 재조합 DNA 분자.

**청구항 81**

제79항에 있어서, 상기 메탈로프로테이나제는 기질 메탈로프로테이나제(matrix metalloproteinase)(예를 들어, MMP9) 또는 ADAM17인, 재조합 DNA 분자.

**청구항 82**

제76항에 있어서, 상기 사이토카인은 오스테오폰틴(osteopontin), IL-13, TGFβ, IL-35, IL-18, IL-15, IL-2, IL-12, IFNα, IFNβ, IFNɣ로 이루어진 군으로부터 선택되는, 재조합 DNA 분자.

**청구항 83**

제76항에 있어서, 상기 케모카인은 CXCL10, CCL4, CCL5, CXCL9 및 CCL21로부터 선택되는, 재조합 DNA 분자.

**청구항 84**

제76항에 있어서, 상기 세포-표면 수용체에 대한 리간드는 NKG2D 리간드, 뉴로필린 리간드, Flt3 리간드, CD47 리간드인, 재조합 DNA 분자.

**청구항 85**

제76항에 있어서, 상기 항원-결합 분자는 PD-1, PDL-1, CTLA4, CCR4, OX40, CD200R, CD47, CSF1R, EphA2, CD19, EpCAM, CEA, PSMA, CD33, EGFR, CCR4, CD200, CD40, CD47, HER2, DLL3, 4-1BB, 17-1A, GD2 및 표 7에 열거된 종양 항원 중 임의의 하나 이상으로 이루어진 군으로부터 선택되는 세포-표면 항원에 결합하는, 재조합 DNA 분자.

**청구항 86**

제76항에 있어서, 상기 전갈 폴리펩타이드는 클로로톡신(chlorotoxin), BmKn-2, 네오플라딘(neopladine) 1, 네오플라딘 2 및 마우리포린(mauriporin)으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 재조합 DNA 분자.

**청구항 87**

제76항에 있어서, 상기 뱀 폴리펩타이드는 콘토르트로스타틴(contortrostatin), 아폭신-I, 보트롭스톡신(bothropstoxin)-I, BJcuL, OHAP-1, 로도스토민(rhodostomin), drCT-I, CTX-III, B1L 및 ACTX-6으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 재조합 DNA 분자.

**청구항 88**

제76항에 있어서, 상기 거미 폴리펩타이드는 라타신(latarcin) 및 히알루로니다제로 이루어진 군으로부터 선택되는, 재조합 DNA 분자.

**청구항 89**

제76항에 있어서, 상기 벌 폴리펩타이드는 멜리틴(melittin) 및 아파민(apamin)으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 재조합 DNA 분자.

**청구항 90**

제76항에 있어서, 상기 개구리 폴리펩타이드는 PsT-1, PdT-1 및 PdT-2로 이루어진 군으로부터 선택되는, 재조합 DNA 분자.

**청구항 91**

제76항 내지 제84항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 페이로드 단백질은 면역 세포에 대해서 작용하는, 재조합 DNA 분자.

**청구항 92**

제91항에 있어서, 상기 면역 세포는 T 세포, B 세포, 자연 살해(natural killer: NK) 세포, NKT 세포, 마크로파지 및/또는 수지상 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는, 재조합 DNA 분자.

**청구항 93**

제76항에 있어서, 상기 페이로드 폴리펩타이드는 인간 세포 표면 항원에 결합할 수 있는 제1 도메인 및 인간 종양 세포 항원에 결합할 수 있는 제2 도메인을 포함하는 이분 폴리펩타이드(bipartite polypeptide)인, 재조합 DNA 분자.

**청구항 94**

제93항에 있어서, 상기 이분 폴리펩타이드의 도메인 중 하나 또는 둘 다는 항체, 단일 쇄 가변 단편(single chain variable fragment: scFv), F(ab), 면역글로불린 중쇄 가변 도메인, 다이아바디(diabody), 플렉시바디(flexibody), DOCK-AND-LOCK(상표명) 항체 및 단클론성 항유전자형 항체(monoclonal anti-idiotypic antibody: mAb2)로 이루어진 군으로부터 선택되는 항원-결합 분자인, 재조합 DNA 분자.

**청구항 95**

제94항에 있어서, 상기 이분 폴리펩타이드는 이중-가변 도메인 항체(DVD-Ig(상표명)), 이중특이적 T 세포 인게이저(engager)(BiTE(상표명)), DuoBody(등록상표), 이중 친화성 재표적화(dual affinity retargeting: DART) 폴리펩타이드 또는 Tandab(등록상표)인, 재조합 DNA 분자.

**청구항 96**

제94항에 있어서, 상기 항체는 조작된 Fc 도메인을 갖는 IgG 항체인, 재조합 DNA 분자.

**청구항 97**

제76항에 있어서, 상기 치료용 핵산은 안타고머(antagomir), 짧은-헤어 핀 RNA(short-hair pin: shRNA), 리보자임 또는 압타머인, 재조합 DNA 분자.

**청구항 98**

제62항 내지 제97항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오타이드는 상기 miR-TS 카세트에 포함된 상기 miRNA 표적 서열에 결합하는 miRNA를 발현하는 세포에서 복제하지 않거나 또는 최소로 복제하는, 재조합 DNA 분자.

**청구항 99**

제98항에 있어서, 상기 miRNA는 표 3으로부터 선택되는, 재조합 DNA 분자.

**청구항 100**

제98항에 있어서, 상기 하나 이상의 miRNA는 miR-124, miR-1, miR-143, miR-128, miR-219, miR-219a, miR-122, miR-204, miR-217, miR-137 및 miR-126으로부터 선택되는, 재조합 DNA 분자.

**청구항 101**

제100항에 있어서, 상기 miR-TS 카세트는 miR-124 표적 서열의 하나 이상의 카피, miR-1 표적 서열의 하나 이상의 카피 및 miR-143 표적 서열의 하나 이상의 카피를 포함하는, 재조합 DNA 분자.

**청구항 102**

제100항에 있어서, 상기 miR-TS 카세트는 miR-128 표적 서열의 하나 이상의 카피, miR-219a 표적 서열의 하나 이상의 카피 및 miR-122 표적 서열의 하나 이상의 카피를 포함하는, 재조합 DNA 분자.

**청구항 103**

제100항에 있어서, 상기 miR-TS 카세트는 miR-128 표적 서열의 하나 이상의 카피, miR-204 표적 서열의 하나 이상의 카피 및 miR-219 표적 서열의 하나 이상의 카피를 포함하는, 재조합 DNA 분자.

**청구항 104**

제100항에 있어서, 상기 miR-TS 카세트는 miR-217 표적 서열의 하나 이상의 카피, miR-137 표적 서열의 하나 이상의 카피 및 miR-126 표적 서열의 하나 이상의 카피를 포함하는, 재조합 DNA 분자.

**청구항 105**

제55항 내지 제104항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 재조합 DNA 분자는 자기-복제(self-replicating) 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 플라스미드인, 재조합 DNA 분자.

**청구항 106**

재조합 DNA 분자로서,

(i) 바이러스 게놈의 센스 서열을 포함하는 제1 단일 가닥 DNA (ssDNA) 분자; 및

(ii) 상기 바이러스 게놈의 안티-센스 서열을 포함하는 제2 ssDNA 분자를 포함하되,

상기 제1 ssDNA 분자 및 제2 ssDNA 분자 각각은 3' 반전 말단 반복부 및 5' 반전 말단 반복부를 포함하고, 그리고 상기 센스 ssDNA 분자의 3' 단부는 안티-센스 ssDNA 분자의 5' 단부에 공유 결합되고, 그리고 상기 센스 ssDNA 분자의 5' 단부는 상기 안티-센스 ssDNA 분자의 3' 단부에 공유 결합되어 단부-폐쇄 선형 듀플렉스 종양용해 바이러스(Ov) DNA 분자를 형성하는, 재조합 DNA 분자.

**청구항 107**

제106항에 있어서, 상기 암호화된 바이러스는 네거티브-센스 또는 포저티브-센스 단일 가닥(ss) RNA 바이러스인, 재조합 DNA 분자.

**청구항 108**

제107항에 있어서, 상기 포저티브-센스 ssRNA 바이러스는 폴리오 바이러스(PV)인, 재조합 DNA 분자.

**청구항 109**

제107항에 있어서, 상기 네거티브-센스 ssRNA 바이러스는 수포성 구내염 바이러스(VSV) 게놈인, 재조합 DNA 분자.

**청구항 110**

제106항에 있어서, 상기 제1 ssDNA 분자 및 제2 ssDNA 분자 각각은 상기 바이러스 게놈 서열에 대해 바로 5'에 리보자임-암호화 서열 및 상기 바이러스 게놈 서열에 대해 바로 3'에 리보자임-암호화 서열을 더 포함하는, 재조합 DNA 분자.

**청구항 111**

제106항 내지 제110항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 바이러스 게놈은 하나 이상의 필수 바이러스 유전자 내에 삽입된 하나 이상의 마이크로-RNA(miRNA) 표적 서열을 포함하는, 재조합 DNA 분자.

**청구항 112**

제111항에 있어서, 상기 하나 이상의 miRNA 표적 서열은 상기 하나 이상의 필수 바이러스 유전자의 3' 비번역 영역(UTR) 및/또는 5' UTR 내에 삽입되는, 재조합 DNA 분자.

**청구항 113**

제111항 또는 제112항에 있어서, 상기 하나 이상의 miRNA 표적 서열은 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개 또는 그 초과의 필수 바이러스 유전자 내에 삽입되는, 재조합 DNA 분자.

**청구항 114**

제111항 내지 제113항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 2개, 적어도 3개 또는 적어도 4개의 miRNA 표적 서열은 하나 이상의 필수 바이러스 유전자 내에 삽입되는, 재조합 DNA 분자.

**청구항 115**

제114항에 있어서, 상기 적어도 2개, 적어도 3개 또는 적어도 4개의 miRNA 표적 서열은 하나의 miRNA에 대한 표적 서열을 포함하는, 재조합 DNA 분자.

**청구항 116**

제114항에 있어서, 상기 적어도 2개, 적어도 3개 또는 적어도 4개의 miRNA 표적 서열은 적어도 2개, 적어도 3개 또는 적어도 4개의 상이한 miRNA에 대한 표적 서열을 포함하는, 재조합 DNA 분자.

**청구항 117**

제106항에 있어서, 상기 바이러스 게놈은 VSV 게놈이고, 그리고 상기 하나 이상의 miRNA 표적 서열은 핵단백질(N), 인단백질(P), 기질 단백질(M), 당단백질(G) 및/또는 중합효소(L) 단백질을 암호화하는 유전자 중 하나 이상 내에 삽입되는, 재조합 DNA 분자.

**청구항 118**

제106항에 있어서, 상기 바이러스 게놈은 PV 게놈이고, 그리고 상기 하나 이상의 miRNA 표적 서열은 상기 VP1, VP2, VP3, VP4, 2A, 2B, 2C, 3A, 3B(VPg), 3C 또는 3D 단백질을 암호화하는 유전자 중 하나 이상 내에 삽입되는, 재조합 DNA 분자.

**청구항 119**

제106항 내지 제118항 중 어느 한 항에 있어서, 3' ITR 및 5' ITR은 AAV로부터 유래되는, 재조합 DNA 분자.

**청구항 120**

제119항에 있어서, 상기 AAV는 AAV2인, 재조합 DNA 분자.

**청구항 121**

조성물로서, 유효량의 제1항 내지 제120항 중 어느 한 항의 재조합 DNA 분자 및 포유동물 대상체에게 투여하기에 적합한 담체를 포함하는, 조성물.

**청구항 122**

제55항 내지 제120항 중 어느 한 항의 재조합 DNA 분자를 포함하는, 입자.

**청구항 123**

제122항에 있어서, 상기 입자는 생분해성인, 입자.

**청구항 124**

제123항에 있어서, 상기 입자는 나노입자, 엑소좀, 리포솜 및 리포플렉스로 이루어진 군으로부터 선택되는, 입자.

**청구항 125**

제124항에 있어서, 상기 엑소좀은 무손상 엑소좀 또는 빈(empty) 엑소좀으로부터 유래된 변형된 엑소좀인, 입자.

**청구항 126**

제124항에 있어서, 상기 나노입자는 양이온성 지질, 콜레스테롤 및 중성 지질을 포함하는 지질 나노입자(LNP)인, 입자.

**청구항 127**

제126항에 있어서, 상기 양이온성 지질은 1,2-다이올레오일-3-트라이메틸암모늄-프로판(DOTAP)이고, 그리고 상

기 중성 지질은 1,2-다이라우로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(DLPE) 또는 1,2-다이올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(DOPE)인, LNP.

**청구항 128**

제126항 또는 제127항에 있어서, 포스포지질-중합체 접합체를 더 포함하되, 상기 포스포지질-중합체 접합체는 1,2-다이스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-폴리(에틸렌 글리콜)(DSPE-PEG) 또는 1,2-다이스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[아미노(폴리에틸렌 글리콜)](DSPE-PEG-아민)인, LNP.

**청구항 129**

제126항 내지 제128항 중 어느 한 항에 있어서, 히알루로난이 상기 LNP의 표면에 접합된, LNP.

**청구항 130**

제126항 내지 제129항 중 어느 한 항에 따른 복수의 지질 나노입자를 포함하는 치료 조성물로서, 상기 복수의 LNP는 약 150nm 내지 약 500nm의 평균 크기를 갖는, 치료 조성물.

**청구항 131**

제130항에 있어서, 상기 복수의 LNP는 약 200nm 내지 약 500nm, 약 300nm 내지 약 500nm, 약 350nm 내지 약 500nm, 약 400nm 내지 약 500nm, 약 425nm 내지 약 500nm, 약 450nm 내지 약 500nm 또는 약 475nm 내지 약 500 nm의 평균 크기를 갖는, 치료 조성물.

**청구항 132**

제130항 또는 제131항에 있어서, 상기 복수의 LNP는 약 -20mV 미만, 약 -30mV 미만, 약 35mV 미만 또는 약 -40 mV 미만의 평균 제타-전위를 갖는, 치료 조성물.

**청구항 133**

제132항에 있어서, 상기 복수의 LNP는 약 -50mV 내지 약 - 20mV, 약 -40mV 내지 약 -20mV 또는 약 -30mV 내지 약 -20mV의 평균 제타-전위를 갖는, 치료 조성물.

**청구항 134**

제131항 또는 제132항에 있어서, 상기 복수의 LNP는 약 -30mV, 약 -31mV, 약 -32mV, 약 -33mV, 약 -34mV, 약 -35mV, 약 -36mV, 약 -37mV, 약 -38mV, 약 -39mV 또는 약 -40mV의 평균 제타-전위를 갖는, 치료 조성물.

**청구항 135**

제130항 내지 제134항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체에 대한 상기 조성물의 전달은 표적 세포에 상기 캡슐화된 DNA 발현 카세트를 전달하는 것이되, 상기 캡슐화된 DNA 발현 카세트는 상기 표적 세포를 용해시킬 수 있는 감염성 바이러스를 생산하는, 치료 조성물.

**청구항 136**

제135항에 있어서, 상기 조성물은 정맥내 또는 종양내로 전달되는, 치료 조성물.

**청구항 137**

제136항에 있어서, 상기 표적 세포는 암성 세포인, 치료 조성물.

**청구항 138**

제1항 내지 제120항 중 어느 한 항의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 무기 입자.

**청구항 139**

제138항에 있어서, 상기 무기 입자는 금 나노입자(gold nanoparticle: GNP), 금 나노 막대(gold nanorod: GNR), 자성 나노입자(magnetic nanoparticle: MNP), 자성 나노튜브(magnetic nanotube: MNT), 탄소 나노혼

(carbon nanohorn:CNH), 탄소 플러렌, 탄소 나노튜브(carbon nanotube: CNT), 인산칼슘 나노입자(calcium phosphate nanoparticle: CPNP), 메조포러스 실리카 나노입자(mesoporous silica nanoparticle: MSN), 실리카 나노튜브(silica nanotube: SNT), 또는 스타라이크 중공 실리카 나노입자(starlike hollow silica nanoparticle: SHNP)로 이루어진 군으로부터 선택되는, 입자.

**청구항 140**

제138항 또는 제139항의 입자를 포함하는 조성물로서, 상기 입자의 평균 직경은 약 500nm 미만, 약 250nm 내지 약 500nm 또는 약 350nm인, 조성물.

**청구항 141**

암성 세포를 사멸시키는 방법으로서, 상기 암성 세포를, 상기 암성 세포에 입자를 세포내로 전달하기에 적합한 조건 하에서, 제122항 내지 제140항 중 어느 한 항의 입자 또는 조성물에 노출시키는 단계를 포함하되, 상기 캡슐화된 폴리뉴클레오타이드에 의해서 생산된 상기 복제-가능 바이러스는 상기 암성 세포의 사멸을 초래하는, 암성 세포를 사멸시키는 방법.

**청구항 142**

제141항에 있어서, 상기 복제-가능 바이러스는 비암성 세포에서 생산되지 않는, 암성 세포를 사멸시키는 방법.

**청구항 143**

제141항 또는 제142항에 있어서, 상기 방법은 생체내, 시험관내 또는 생체외에서 수행되는, 암성 세포를 사멸시키는 방법.

**청구항 144**

대상체에서 암을 치료하는 방법으로서, 암을 앓고 있는 대상체에게 유효량의 제122항 내지 제140항 중 어느 한 항의 입자 또는 조성물 또는 이의 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 암을 치료하는 방법.

**청구항 145**

제144항에 있어서, 상기 입자 또는 이의 조성물은 정맥내로, 비강내로, 흡입제(inhalant)로서 투여되거나 또는 종양 내에 직접 주사되는, 암을 치료하는 방법.

**청구항 146**

제144항 또는 제145항에 있어서, 상기 입자 또는 이의 조성물은 상기 대상체에게 반복적으로 투여되는, 암을 치료하는 방법.

**청구항 147**

제144항 내지 제146항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체는 마우스, 래트, 토끼, 고양이, 강아지, 말, 비인간 영장류 또는 인간인, 암을 치료하는 방법.

**청구항 148**

제144항 내지 제147항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암은 폐암, 유방암, 난소암, 자궁경부암, 전립선암, 고환암, 결장직장암, 결장암, 췌장암, 간암, 위암, 두경부암, 갑상선암, 악성 뇌교종, 교모세포종, 흑색종, B-세포 만성 림프구성 백혈병, 미만성 거대 B-세포 림프종(diffuse large B-cell lymphoma: DLBCL) 및 변연부 림프종(marginal zone lymphoma: MZL)으로부터 선택되는, 암을 치료하는 방법.

**청구항 149**

제148항에 있어서, 상기 폐암은 소세포 폐암 또는 비소세포 폐암인, 암을 치료하는 방법.

**청구항 150**

제148항에 있어서, 상기 간암은 간세포 암종(hepatocellular carcinoma: HCC)인, 암을 치료하는 방법.

**청구항 151**

제35항 내지 제120항 중 어느 한 항의 재조합 DNA 분자를 생산하는 방법으로서,

a. 상기 재조합 DNA 분자를 제1 바이러스 발현 벡터 내에 삽입하는 단계로서, 상기 재조합 DNA 분자는 폴리뉴클레오타이드의 5' 아데노-연관 바이러스(adeno-associated virus: AAV)-유래된 반전 말단 반복부(ITR) 및 3' AAV-유래된 ITR 단부를 포함하는, 상기 삽입하는 단계;

b. ITR-매개된 복제에 필요한 AAV 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 제2 바이러스 발현 벡터 내에 삽입하는 단계; 및

c. 상기 제1 바이러스 발현 벡터 및 제2 바이러스 발현 벡터를 세포에 세포내로 전달하는 단계를 포함하되,

상기 재조합 DNA 분자는 상기 게놈 내에 안정적으로 통합되고, 상기 세포는 상기 ITR-측접 폴리뉴클레오타이드를 ITR의 부재 하에서 생산될 양보다 더 많은 양으로 생산하는, 재조합 DNA 분자를 생산하는 방법.

**청구항 152**

제144항에 있어서, 상기 바이러스 발현 벡터는 허피스 바이러스 또는 바큘로바이러스인, 암을 치료하는 방법.

## *발명의 설명*

### *기 술 분 야*

[0001] **관련 출원에 대한 상호 참고**

[0002] 본 출원은 2017년 7월 14일자로 출원된 미국 가출원 제62/532,886호 및 2018년 3월 27일자로 출원된 제62/648,651호에 대한 우선권을 주장하며, 이들 기초출원은 그들의 전문이 본 명세서에 참고로 원용된다.

[0003] **서열 목록에 대한 언급**

[0004] 본 출원과 연관된 서열 목록은 페이퍼 카피 대신에 텍스트 포맷으로 제공되며, 따라서 본 명세서에 참고로 포함된다. 서열 목록을 함유하는 텍스트 파일의 파일명은 ONCR_005_03WO_ST25.txt이다. 텍스트 파일은 23KB이고, 2018년 7월 13일에 생성되었으며, EFS-Web을 통해서 전자적으로 제출되어 있다.

[0005] **기술분야**

[0006] 본 개시내용은 일반적으로 면역학, 염증 및 암 치료제에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 개시내용은 복제-가능 바이러스 게놈(replication-competent viral genome)을 암호화하는 입자-캡슐화된 폴리뉴클레오타이드에 관한 것이다. 본 개시내용은 추가로 증식 장애, 예컨대, 암의 치료 및 예방에 관한 것이다.

### *배 경 기 술*

[0007] 종양용해 바이러스는 종양 세포를 감염시켜 용해시킬 수 있는 용해성 생애 주기(life-cycle)를 갖는 복제-가능 바이러스이다. 직접적인 종양 세포 용해는 세포사를 초래할 뿐만 아니라 국지적인 항원 제시 세포에 의해서 포집되고, 제시되는 종양 항원에 대한 적응 면역 반응을 생성한다. 따라서, 종양용해 바이러스는 직접적인 세포 용해를 통해서 그리고 바이러스 제거 후 항종양 반응을 유지시킬 수 있는 항원-특이적 적응 반응을 촉진시킴으로써 종양 세포 성장을 퇴치한다.

[0008] 그러나, 복제-가능 바이러스의 임상적 사용은 몇몇 도전을 갖는다. 일반적으로, 바이러스 노출은 선천 면역 경로를 활성화시켜서, 광범위한 비특이적 염증 반응을 초래한다. 환자가 바이러스에 이전에 노출되지 않은 경우, 이러한 초기 선천 면역 반응은 적응 항바이러스 반응의 발달 및 중화 항체의 생산으로 이어질 수 있다. 환자가 바이러스에 이전에 노출된 경우, 존재하는 중화 항바이러스 항체는 목적하는 용해성 효과를 예방할 수 있다. 두 예에서, 중화 항체의 존재는 표적 세포의 바이러스 용해를 예방할 뿐만 아니라, 바이러스 치료의 재투여를 효율적이지 않게 한다. 이러한 인자는 전이성 암의 치료에서 바이러스 치료의 사용을 제한하는데, 이러한 암의 치료에 필요한 반복적인 전신 투여의 효능은 자연적으로 발생하는 항바이러스 반응에 의해서 방해되기 때문이다. 이러한 장애가 없는 경우에도, 병에 걸리지 않은 세포에서의 후속 바이러스 복제는 주변 세포 및 조직에 실질적인 이차적인 질병외 손상을 초래할 수 있다.

[0009] 복제-가능 바이러스의 치료적 사용에 관련된 조성물 및 방법이 당업계에 오랫동안 충족되지 않은 요구로 남아있

다. 본 개시내용은 이러한 조성물 및 방법 등을 제공한다.

## 발명의 내용

[0010] 본 개시내용은 자기-복제(self-replicating) 폴리뉴클레오타이드를 암호화하는 DNA 폴리뉴클레오타이드 및 관련 조성물 및 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 복제-가능 바이러스 게놈을 암호화하는 핵산 서열을 포함하며, 여기서 폴리뉴클레오타이드는 비바이러스 전달 비히클에 의해서 세포 내에 도입되는 경우 복제-가능 바이러스를 생산할 수 있다.

[0011] 일 양상에서, 본 개시내용은 복제-가능 바이러스 게놈을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 포함하는 지질 나노입자(lipid nanoparticle: LNP)를 제공하며, 여기서 폴리뉴클레오타이드 서열은 포유동물 RNA 중합효소 II(polymerase II: Pol II)에 결합할 수 있는 프로모터 서열에 작동 가능하게 연결되고, 3' 리보자임-암호화 서열(ribozyme-encoding sequence) 및 5' 리보자임-암호화 서열이 측접되며(flanked), 여기서 복제-가능 바이러스 게놈을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 기원이 비바이러스성이다.

[0012] 실시형태에서, 복제-가능 바이러스 게놈은 단일 가닥 RNA(ssRNA) 바이러스이다.

[0013] 실시형태에서, 복제-가능 바이러스 게놈은 포저티브 센스(positive sense)((+)-센스) 또는 네거티브-센스(negative-sense)((-)-센스) ssRNA 바이러스인 단일 가닥 RNA(ssRNA) 바이러스이다.

[0014] 실시형태에서, 복제-가능 바이러스 게놈은 (+)-센스 ssRNA 바이러스이고, (+)-센스 ssRNA 바이러스는 피코나바이러스(Picornavirus)이다.

[0015] 실시형태에서, 피코나바이러스는 세네카 벨리 바이러스(Seneca Valley Virus: SVV) 또는 콕사키바이러스이다.

[0016] 실시형태에서, LNP와 세포의 접촉은 세포에 의한 바이러스 입자의 생산을 초래하고, 바이러스 입자는 감염성 및 용해성이다.

[0017] 실시형태에서, 재조합 DNA 분자는 외인성 페이로드(payload) 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 더 포함한다.

[0018] 실시형태에서, 외인성 페이로드 단백질은 세포 표면 수용체에 결합할 수 있는 형광 단백질, 효소 단백질, 사이토카인, 케모카인 또는 항원-결합 분자이다.

[0019] 실시형태에서, 사이토카인은 Flt3 리간드 및 IL-18로부터 선택된다.

[0020] 실시형태에서, 케모카인은 CXCL10 및 CCL4로부터 선택된다.

[0021] 실시형태에서, 항원-결합 분자는 면역 관문 수용체(immune checkpoint receptor)에 결합하여, 이를 저해할 수 있다.

[0022] 실시형태에서, 면역 관문 수용체는 PD1이다.

[0023] 실시형태에서, 마이크로 RNA(miRNA) 표적 서열(micro RNA target sequence: miR-TS) 카세트는 복제-가능 바이러스 게놈을 암호화하는 핵산 서열 내에 삽입되고, 여기서 miR-TS 카세트는 하나 이상의 miRNA 표적 서열을 포함하고, 세포에서 상응하는 miRNA의 하나 이상의 발현은 복제-가능 바이러스 게놈의 복제를 저해한다.

[0024] 실시형태에서, 하나 이상의 miRNA는 miR-124, miR-1, miR-143, miR-128, miR-219, miR-219a, miR-122, miR-204, miR-217, miR-137 및 miR-126으로부터 선택된다.

[0025] 실시형태에서, miR-TS 카세트는 miR-124 표적 서열의 하나 이상의 카피, miR-1 표적 서열의 하나 이상의 카피 및 miR-143 표적 서열의 하나 이상의 카피를 포함한다.

[0026] 실시형태에서, miR-TS 카세트는 miR-128 표적 서열의 하나 이상의 카피, miR-219a 표적 서열의 하나 이상의 카피 및 miR-122 표적 서열의 하나 이상의 카피를 포함한다.

[0027] 실시형태에서, miR-TS 카세트는 miR-128 표적 서열의 하나 이상의 카피, miR-204 표적 서열의 하나 이상의 카피 및 miR-219 표적 서열의 하나 이상의 카피를 포함한다.

[0028] 실시형태에서, miR-TS 카세트는 miR-217 표적 서열의 하나 이상의 카피, miR-137 표적 서열의 하나 이상의 카피 및 miR-126 표적 서열의 하나 이상의 카피를 포함한다.

[0029] 실시형태에서, 재조합 DNA 분자는 상기 복제-가능 바이러스 게놈을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함

하는 플라스미드이다.

[0030] 실시형태에서, LNP는 양이온성 지질, 콜레스테롤 및 중성 지질을 포함한다.

[0031] 실시형태에서, 양이온성 지질은 1,2-다이올레오일-3-트라이메틸암모늄-프로판(DOTAP)이고, 그리고 상기 중성 지질은 1,2-다이라우로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(DLPE) 또는 1,2-다이올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(DOPE)이다.

[0032] 실시형태에서, 포스포지질-중합체 접합체를 포함하고, 포스포지질-중합체 접합체는 1, 2-다이스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-폴리(에틸렌 글리콜)(DSPE-PEG) 또는 1,2-다이스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[아미노(폴리에틸렌 글리콜)](DSPE-PEG-아민)이다.

[0033] 실시형태에서, 히알루로난(hyaluronan)은 LNP의 표면에 접합된다.

[0034] 양상에서, 본 개시내용은 복수의 지질 나노입자를 포함하는 치료 조성물을 제공하고, 여기서 복수의 LNP는 약 150nm 내지 약 500nm의 평균 크기를 갖는다.

[0035] 실시형태에서, 복수의 LNP는 약 200nm 내지 약 500nm, 약 300nm 내지 약 500nm, 약 350nm 내지 약 500nm, 약 400nm 내지 약 500nm, 약 425nm 내지 약 500nm, 약 450nm 내지 약 500nm 또는 약 475nm 내지 약 500nm의 평균 크기를 갖는다.

[0036] 실시형태에서, 복수의 LNP는 약 -20mV 미만, 약 -30mV 미만, 약 35mV 미만 또는 약 -40mV 미만의 평균 제타-전위를 갖는다.

[0037] 실시형태에서, 복수의 LNP는 약 -50mV 내지 약 -20mV, 약 -40mV 내지 약 -20mV 또는 약 -30mV 내지 약 -20mV의 평균 제타-전위를 갖는다.

[0038] 실시형태에서, 복수의 LNP는 약 -30mV, 약 -31mV, 약 -32mV, 약 -33mV, 약 -34mV, 약 -35mV, 약 -36mV, 약 -37mV, 약 -38mV, 약 -39mV 또는 약 -40mV의 평균 제타-전위를 갖는다.

[0039] 실시형태에서, 대상체에 대한 치료 조성물의 투여는 재조합 DNA 폴리뉴클레오타이드를 대상체의 표적 세포에 전달하고, 재조합 DNA 폴리뉴클레오타이드는 대상체의 상기 표적 세포를 용해시킬 수 있는 감염성 바이러스를 생산한다.

[0040] 실시형태에서, 조성물은 정맥내 또는 종양내로 전달된다.

[0041] 실시형태에서, 표적 세포는 암성 세포이다.

[0042] 양상에서, 본 개시내용은 암성 종양의 성장 저해를 필요로 하는 대상체에서 암성 종양의 성장을 저해하는 방법을 제공하며, 이 방법은 암성 종양의 성장 저해를 필요로 하는 대상체에게 치료 조성물을 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 치료 조성물의 투여는 종양의 성장을 저해한다.

[0043] 실시형태에서, 투여는 종양내 또는 정맥내이다.

[0044] 암은 폐암 또는 간암이다.

[0045] 양상에서, 본 개시내용은 복제-가능 바이러스 게놈을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 제공하며, 여기서 폴리뉴클레오타이드 서열은 포유동물 RNA 중합효소 II(Pol II)에 결합할 수 있는 프로모터 서열에 작동 가능하게 연결되고, 3' 리보자임-암호화 서열 및 5' 리보자임-암호화 서열이 측접되며, 복제-가능 바이러스 게놈을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 기원이 비바이러스성이다.

[0046] 실시형태에서, 암호화된 바이러스는 단일 가닥 RNA(ssRNA) 바이러스이다.

[0047] 실시형태에서, ssRNA 바이러스는 포저티브 센스((+)-센스) 또는 네거티브-센스((-)-센스) ssRNA 바이러스이다.

[0048] 실시형태에서, (+)-센스 ssRNA 바이러스는 피코나바이러스이다.

[0049] 실시형태에서, 피코나바이러스는 세네카 벨리 바이러스(Seneca Valley Virus: SVV) 또는 콕사키바이러스이다.

[0050] 실시형태에서, 비바이러스 전달 비히클에 의해서 세포에 도입되는 경우 재조합 DNA 분자는 감염성이고 용해성인 바이러스를 생산할 수 있다.

[0051] 실시형태에서, 재조합 DNA 분자는 외인성 페이로드 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 더 포함한

다.

[0052] 실시형태에서, 외인성 페이로드 단백질은 세포 표면 수용체에 결합할 수 있는 형광 단백질, 효소 단백질, 사이토카인, 케모카인 세포-표면 수용체에 대한 리간드 또는 항원-결합 분자이다.

[0053] 실시형태에서, 사이토카인은 IL-18이다.

[0054] 실시형태에서, 세포-표면 수용체에 대한 리간드는 Flt3 리간드이다

[0055] 실시형태에서, 케모카인은 CXCL10 및 CCL4로부터 선택된다.

[0056] 실시형태에서, 항원-결합 분자는 면역 관문 수용체에 결합하여, 이를 저해할 수 있다.

[0057] 실시형태에서, 면역 관문 수용체는 PD1이다.

[0058] 실시형태에서, 마이크로 RNA(miRNA) 표적 서열(miR-TS) 카세트는 상기 복제-가능 바이러스 게놈을 암호화하는 핵산 서열 내에 삽입되며, 여기서 miR-TS 카세트는 하나 이상의 miRNA 표적 서열을 포함하고, 여기서 세포에서 상응하는 miRNA의 하나 이상의 발현은 암호화된 바이러스의 복제를 저해한다.

[0059] 실시형태에서, 하나 이상의 miRNA는 miR-124, miR-1, miR-143, miR-128, miR-219, miR-219a, miR-122, miR-204, miR-217, miR-137 및 miR-126으로부터 선택된다.

[0060] 실시형태에서, miR-TS 카세트는 miR-124 표적 서열의 하나 이상의 카피, miR-1 표적 서열의 하나 이상의 카피 및 miR-143 표적 서열의 하나 이상의 카피를 포함한다.

[0061] 실시형태에서, miR-TS 카세트는 miR-128 표적 서열의 하나 이상의 카피, miR-219a 표적 서열의 하나 이상의 카피 및 miR-122 표적 서열의 하나 이상의 카피를 포함한다.

[0062] 실시형태에서, miR-TS 카세트는 miR-128 표적 서열의 하나 이상의 카피, miR-204 표적 서열의 하나 이상의 카피 및 miR-219 표적 서열의 하나 이상의 카피를 포함한다.

[0063] 실시형태에서, miR-TS 카세트는 miR-217 표적 서열의 하나 이상의 카피, miR-137 표적 서열의 하나 이상의 카피 및 miR-126 표적 서열의 하나 이상의 카피를 포함한다.

[0064] 실시형태에서, 재조합 DNA 분자는 상기 복제-가능 바이러스 게놈을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 플라스미드이다.

[0065] 양상에서, 본 개시내용은 복제-가능 바이러스 게놈을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 제공하며, 여기서 복제-가능 바이러스를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열은 기원이 비바이러스성이고, 비바이러스 전달 비히클에 의해서 세포에 도입되는 경우 재조합 DNA 분자는 복제-가능 바이러스를 생산할 수 있다.

[0066] 실시형태에서, 복제-가능 바이러스 게놈은 DNA 바이러스의 게놈 또는 RNA 바이러스의 게놈이다.

[0067] 실시형태에서, DNA 게놈 또는 RNA 게놈은 이중 가닥 또는 단일 가닥 바이러스이다.

[0068] 실시형태에서, 단일 가닥 게놈은 포저티브 센스((+)-센스) 또는 네거티브 센스((-)-센스) 게놈이다.

[0069] 실시형태에서, 세포는 포유동물 세포이다.

[0070] 실시형태에서, 세포는 포유동물 대상체에 존재하는 포유동물 세포이다.

[0071] 실시형태에서, 복제-가능 바이러스는 아데노바이러스, 콕사키바이러스, 말과 허피스 바이러스, 단순 포진 바이러스, 인플루엔자 바이러스, 라사 바이러스, 마라바 바이러스, 홍역 바이러스, 뮤린 백혈병 바이러스, 점액종 바이러스, 뉴캐슬병 바이러스, 오쏘믹소바이러스(orthomyxovirus), 파보바이러스, 폴리오 바이러스(키메라 폴리오 바이러스, 예컨대, PVS-RIPO), 레오바이러스, 세네카 벨리 바이러스(예를 들어, 세네카 A), 신드비스 바이러스, 백시나 바이러스 및 수포성 구내염 바이러스로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0072] 실시형태에서, 재조합 DNA 폴리뉴클레오타이드는 복제-가능 바이러스 게놈을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 내에 삽입된 하나 이상의 마이크로 RNA(miRNA) 표적 서열(miR-TS) 카세트를 더 포함하고, 여기서 miR-TS 카세트는 하나 이상의 miRNA 표적 서열을 포함하고, 여기서 세포에서 상응하는 miRNA의 하나 이상의 발현은 암호화된 바이러스의 복제를 저해한다.

[0073] 실시형태에서, 하나 이상의 miR-TS 카세트는 하나 이상의 필수 바이러스 유전자의 5' 비번역 영역(untranslated

region: UTR) 또는 3' UTR 내에 혼입된다.

[0074] 실시형태에서, 하나 이상의 필수 바이러스 유전자는 UL1, UL5, UL6, UL7, UL8, UL9, UL11, UL12, UL14, UL15, UL17, UL18, UL19, UL20, UL22, UL25, UL26, UL26.5, UL27, UL28, UL29, UL30, UL31, UL32, UL33, UL34, UL35, UL36, UL37, UL38, UL39, UL40, UL42, UL48, UL49, UL50, UL52, UL53, UL54, US1, US3, US4, US5, US6, US7, US8, US12, ICP0, ICP4, ICP22, ICP27, ICP47, PB, F, B5R, SERO-1, Cap, Rev, VP1-4, 핵단백질(N), 인단백질(P), 기질 단백질(M), 당단백질(G), 중합효소(L), E1, E2, E3, E3, VP1, VP2, VP3, VP4, 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C, 및 3D로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0075] 실시형태에서, 하나 이상의 miR-TS 카세트는 하나 이상의 비필수 바이러스 유전자의 5' 비번역 영역(UTR) 또는 3' UTR 내에 혼입된다.

[0076] 실시형태에서, 상기 폴리뉴클레오타이드는 리플리콘, 플라스미드, 코스미드, 파지미드, 트랜스포존, 박테리아 인공 염색체, 효모 인공 염색체 또는 단부-폐쇄(end-closed) 선형 듀플렉스 종양용해 바이러스(oncolytic virus: Ov) DNA 분자로부터 선택된 핵산 벡터 내에 삽입된다.

[0077] 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 DNA 폴리뉴클레오타이드이고, 상기 복제-가능 바이러스 게놈을 암호화하는 핵산 서열의 5' 단부 상의 제1 AAV-유래된 반전 말단 반복부(inverted terminal repeat: ITR) 및 복제-가능 바이러스 게놈을 암호화하는 핵산 서열의 3' 단부 상의 제2 AAV-유래된 ITR을 더 포함한다.

[0078] 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 DNA 폴리뉴클레오타이드이고, 상기 복제-가능 바이러스 게놈을 암호화하는 핵산 서열에 대해 바로 3'에 제1 리보자임 암호화 서열 및 상기 복제-가능 바이러스 게놈을 암호화하는 핵산 서열에 대해 바로 5'에 제2 리보자임 암호화 서열을 더 포함한다.

[0079] 실시형태에서, 제1 리보자임 암호화 서열 및 제2 리보자임 암호화 서열은 귀상어 리보자임 또는 델타 간염 바이러스 리보자임을 암호화한다.

[0080] 실시형태에서, 프로모터 서열은 진핵생물 RNA 중합효소에 결합할 수 있다.

[0081] 실시형태에서, 프로모터 서열은 포유동물 RNA 중합효소에 결합할 수 있다.

[0082] 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 DNA 폴리뉴클레오타이드이고, 상기 포유동물 중합효소는 감염성 복제-가능 RNA 바이러스의 전사를 유도한다.

[0083] 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 DNA 폴리뉴클레오타이드이고, 상기 포유동물 중합효소는 감염성 복제-가능 DNA 바이러스의 전사를 유도한다.

[0084] 실시형태에서, 프로모터 서열은 암 세포에서 상기 폴리뉴클레오타이드의 전사를 선택적으로 유도한다.

[0085] 실시형태에서, 프로모터 서열은 hTERT, HE4, CEA, OC, ARF, CgA, GRP78, CXCR4, HMGB2, INSM1, 메소텔린(Mesothelin), OPN, RAD51, TETP, H19, uPAR, ERBB2, MUC1, Frz1 또는 IGF2-P4로 이루어진 군으로부터 선택된 유전자로부터 유래된다.

[0086] 실시형태에서, 재조합 DNA 폴리뉴클레오타이드는 세포독성 폴리펩타이드, 사이토카인, 케모카인, 항원 결합 분자, 세포 표면 수용체에 대한 리간드, 가용성 수용체, 효소, 전갈 폴리펩타이드, 뱀 폴리펩타이드, 거미 폴리펩타이드, 벌 폴리펩타이드, 개구리 폴리펩타이드 및 치료용 핵산으로 이루어진 군으로부터 선택된 페이로드 분자를 암호화하는 핵산 서열을 더 포함한다.

[0087] 실시형태에서, 하나 이상의 miR-TS 카세트는 상기 페이로드 분자를 암호화하는 핵산 서열의 상기 5' 비번역 영역(UTR) 또는 상기 3' UTR 서열 내에 혼입된다.

[0088] 실시형태에서, 세포독성 폴리펩타이드는 p53, 디프테리아 독소 (DT), 슈도모나스 외독소 A(PEA), I형 리보솜 불활성화 단백질(Type I ribosome inactivating protein: RIP), II형 RIP 또는 쉬가-유사 독소 1(Shiga-like toxin: Slt1)로부터 선택된다.

[0089] 실시형태에서, 효소는 메탈로프로테이나제, 콜라게나제, 엘라스타제, 히알루로니다제, 카스파제, 젤라티나제, 또는 단순 포진 바이러스 티미딘 카이나제, 사이토신 데아미나제, 나이트로리덕타제, 카복시펩티다제 G2, 퓨린 뉴클레오사이드 포스포릴라제 또는 사이토크롬 P450으로부터 선택된 유전자 지시 효소 전구약물 요법(gene directed enzyme prodrug therapy: GDEPT) 시스템의 부분인 효소로부터 선택된다.

[0090] 실시형태에서, 젤라티나제는 섬유모세포 활성화 단백질(fibroblast activation protein: FAP)이다.

[0091] 실시형태에서, 메탈로프로테이나제는 기질 메탈로프로테이나제(예를 들어, MMP9) 또는 ADAM17이다.

[0092] 실시형태에서, 사이토카인은 오스테오폰틴, IL-13, TGFβ, IL-35, IL-18, IL-15, IL-2, IL-12, IFNα, IFNβ, IFNɣ로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0093] 실시형태에서, 케모카인은 CXCL10, CCL4, CCL5, CXCL9 및 CCL21로부터 선택된다.

[0094] 실시형태에서, 세포-표면 수용체에 대한 리간드는 NKG2D 리간드, 뉴로필린 리간드, Flt3 리간드, CD47 리간드이다.

[0095] 실시형태에서, 항원-결합 분자는 PD-1, PDL-1, CTLA4, CCR4, OX40, CD200R, CD47, CSF1R, EphA2, CD19, EpCAM, CEA, PSMA, CD33, EGFR, CCR4, CD200, CD40, CD47, HER2, DLL3, 4-1BB, 17-1A, GD2 및 7에 열거된 종양 항원 중 임의의 하나 이상으로 이루어진 군으로부터 선택되는 세포-표면 항원에 결합한다.

[0096] 실시형태에서, 전갈 폴리펩타이드는 클로로톡신(chlorotoxin), BmKn-2, 네오플라딘(neopladine) 1, 네오플라딘 2 및 마우리포린(mauriporin)으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0097] 실시형태에서, 뱀 폴리펩타이드는 콘토르트로스타틴(contortrostatin), 아폭신-I, 보트롭스톡신(bothropstoxin)-I, BJcuL, OHAP-1, 로도스토민(rhodostomin), drCT-I, CTX-III, B1L 및 ACTX-6으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0098] 실시형태에서, 거미 폴리펩타이드는 라타신(latarcin) 및 히알루로니다제로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0099] 실시형태에서, 벌 폴리펩타이드는 멜리틴(melittin) 및 아파민(apamin)으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0100] 실시형태에서, 개구리 폴리펩타이드는 PsT-1, PdT-1 및 PdT-2로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0101] 실시형태에서, 페이로드 단백질은 면역 세포에 대해서 작용한다.

[0102] 실시형태에서, 면역 세포는 T 세포, B 세포, 자연 살해(natural killer: NK) 세포, NKT 세포, 마크로파지 및/또는 수지상 세포로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0103] 실시형태에서, 페이로드 폴리펩타이드는 인간 세포 표면 항원에 결합할 수 있는 제1 도메인 및 인간 종양 세포 항원에 결합할 수 있는 제2 도메인을 포함하는 이분 폴리펩타이드(bipartite polypeptide)이다.

[0104] 실시형태에서, 이분 폴리펩타이드의 도메인 중 하나 또는 둘 다는 항체, 단일 쇄 가변 단편(single chain variable fragment: scFv), F(ab), 면역글로불린 중쇄 가변 도메인, 다이아바디(diabody), 플렉시바디(flexibody), DOCK-AND-LOCK(상표명) 항체 및 단클론성 항유전자형 항체(monoclonal anti-idiotypic antibody: mAb2)로 이루어진 군으로부터 선택되는 항원-결합 분자이다.

[0105] 실시형태에서, 이분 폴리펩타이드는 이중-가변 도메인 항체(DVD-Ig(상표명)), 이중특이적 T 세포 인게이저(engager)(BiTE(상표명)), DuoBody(등록상표), 이중 친화성 재표적화(dual affinity retargeting: DART) 폴리펩타이드 또는 Tandab(등록상표)이다.

[0106] 실시형태에서, 항체는 조작된 Fc 도메인을 갖는 IgG 항체이다.

[0107] 실시형태에서, 치료용 핵산은 안타고머(antagomir), 짧은-헤어 핀 RNA(short-hair pin: shRNA), 리보자임 또는 압타머이다.

[0108] 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 상기 miR-TS 카세트에 포함된 상기 miRNA 표적 서열에 결합하는 miRNA를 발현하는 세포에서 복제하지 않거나 또는 최소로 복제한다.

[0109] 실시형태에서, miRNA는 표 3으로부터 선택된다.

[0110] 실시형태에서, 하나 이상의 miRNA는 miR-124, miR-1, miR-143, miR-128, miR-219, miR-219a, miR-122, miR-204, miR-217, miR-137 및 miR-126으로부터 선택된다.

[0111] 실시형태에서, miR-TS 카세트는 miR-124 표적 서열의 하나 이상의 카피, miR-1 표적 서열의 하나 이상의 카피 및 miR-143 표적 서열의 하나 이상의 카피를 포함한다.

[0112] 실시형태에서, miR-TS 카세트는 miR-128 표적 서열의 하나 이상의 카피, miR-219a 표적 서열의 하나 이상의 카피 및 miR-122 표적 서열의 하나 이상의 카피를 포함한다.

[0113] 실시형태에서, miR-TS 카세트는 miR-128 표적 서열의 하나 이상의 카피, miR-204 표적 서열의 하나 이상의 카피 및 miR-219 표적 서열의 하나 이상의 카피를 포함한다.

[0114] 실시형태에서, miR-TS 카세트는 miR-217 표적 서열의 하나 이상의 카피, miR-137 표적 서열의 하나 이상의 카피 및 miR-126 표적 서열의 하나 이상의 카피를 포함한다.

[0115] 실시형태에서, 재조합 DNA 분자는 자기-복제 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 플라스미드이다.

[0116] 양상에서, 본 개시내용은 바이러스 게놈의 센스 서열을 포함하는 제1 단일 가닥 DNA(ssDNA) 분자; 및 바이러스 게놈의 안티-센스 서열을 포함하는 제2 ssDNA 분자를 포함하는 재조합 DNA 분자를 제공하며, 여기서 제1 ssDNA 분자 및 제2 ssDNA 분자 각각은 3' 반전 말단 반복부 및 5' 반전 말단 반복부를 포함하고, 센스 ssDNA 분자의 3' 단부는 안티-센스 ssDNA 분자의 5' 단부에 공유 결합되고, 센스 ssDNA 분자의 5' 단부는 안티-센스 ssDNA 분자의 3' 단부에 공유 결합되어 단부-폐쇄 선형 듀플렉스 종양용해 바이러스(Ov) DNA 분자를 형성한다.

[0117] 실시형태에서, 암호화된 바이러스는 네거티브-센스 또는 포저티브-센스 단일 가닥(ss) RNA 바이러스이다.

[0118] 실시형태에서, 포저티브-센스 ssRNA 바이러스는 폴리오 바이러스(PV)이다.

[0119] 실시형태에서, 네거티브-센스 ssRNA 바이러스는 수포성 구내염 바이러스(VSV) 게놈이다.

[0120] 실시형태에서, 제1 ssDNA 분자 및 제2 ssDNA 분자 각각은 바이러스 게놈 서열에 대해 바로 5'에 리보자임-암호화 서열 및 상기 바이러스 게놈 서열에 대해 바로 3'에 리보자임-암호화 서열을 더 포함한다.

[0121] 실시형태에서, 바이러스 게놈은 하나 이상의 필수 바이러스 유전자 내에 삽입된 하나 이상의 마이크로-RNA(miRNA) 표적 서열을 포함한다.

[0122] 실시형태에서, 하나 이상의 miRNA 표적 서열은 상기 하나 이상의 필수 바이러스 유전자의 3' 비번역 영역(UTR) 및/또는 5' UTR 내에 삽입된다.

[0123] 실시형태에서, 하나 이상의 miRNA 표적 서열은 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개 또는 그 초과의 필수 바이러스 유전자 내에 삽입된다.

[0124] 실시형태에서, 적어도 2개, 적어도 3개 또는 적어도 4개의 miRNA 표적 서열은 하나 이상의 필수 바이러스 유전자 내에 삽입된다.

[0125] 실시형태에서, 적어도 2개, 적어도 3개 또는 적어도 4개의 miRNA 표적 서열은 하나의 miRNA에 대한 표적 서열을 포함한다.

[0126] 실시형태에서, 적어도 2개, 적어도 3개 또는 적어도 4개의 miRNA 표적 서열은 적어도 2개, 적어도 3개 또는 적어도 4개의 상이한 miRNA에 대한 표적 서열을 포함한다.

[0127] 실시형태에서, 바이러스 게놈은 VSV 게놈이고, 그리고 상기 하나 이상의 miRNA 표적 서열은 핵단백질(N), 인단백질(P), 기질 단백질(M), 당단백질(G) 및/또는 중합효소(L) 단백질을 암호화하는 유전자 중 하나 이상 내에 삽입된다.

[0128] 실시형태에서, 바이러스 게놈은 PV 게놈이고, 그리고 상기 하나 이상의 miRNA 표적 서열은 상기 VP1, VP2, VP3, VP4, 2A, 2B, 2C, 3A, 3B(VPg), 3C 또는 3D 단백질을 암호화하는 유전자 중 하나 이상 내에 삽입된다.

[0129] 실시형태에서, 3' ITR 및 5' ITR은 AAV로부터 유래된다.

[0130] 실시형태에서, AAV는 AAV2이다.

[0131] 양상에서, 본 개시내용은 유효량의 재조합 DNA 분자 및 포유동물 대상체에게 투여하기에 적합한 담체를 포함하는 조성물을 제공한다.

[0132] 양상에서, 본 개시내용은 본 개시내용의 임의의 재조합 DNA 분자를 포함하는 입자를 제공한다.

[0133] 실시형태에서, 입자는 생분해성이다.

[0134] 실시형태에서, 입자는 나노입자, 엑소좀, 리포솜 및 리포플렉스로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0135] 실시형태에서, 엑소좀은 무손상 엑소좀 또는 빈(empty) 엑소좀으로부터 유래된 변형된 엑소좀이다.

[0136] 실시형태에서, 나노입자는 양이온성 지질, 콜레스테롤 및 중성 지질을 포함하는 지질 나노입자(LNP)이다.

[0137] 실시형태에서, 양이온성 지질은 1,2-다이올레오일-3-트라이메틸암모늄-프로판(DOTAP)이고, 그리고 상기 중성 지질은 1,2-다이라우로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(DLPE) 또는 1,2-다이올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(DOPE)이다.

[0138] 실시형태에서, 포스포지질-중합체 접합체를 더 포함하고, 포스포지질-중합체 접합체는 1, 2-다이스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-폴리(에틸렌 글리콜)(DSPE-PEG) 또는 1,2-다이스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[아미노(폴리에틸렌 글리콜)](DSPE-PEG-아민)이다.

[0139] 실시형태에서, 히알루로난은 LNP의 표면에 접합된다.

[0140] 양상에서, 본 개시내용은 복수의 지질 나노입자를 포함하는 치료 조성물을 제공하고, 여기서 복수의 LNP는 약 150nm 내지 약 500nm의 평균 크기를 갖는다.

[0141] 실시형태에서, 복수의 LNP는 약 200nm 내지 약 500nm, 약 300nm 내지 약 500nm, 약 350nm 내지 약 500nm, 약 400nm 내지 약 500nm, 약 425nm 내지 약 500nm, 약 450nm 내지 약 500nm 또는 약 475nm 내지 약 500nm의 평균 크기를 갖는다.

[0142] 실시형태에서, 복수의 LNP는 약 -20mV 미만, 약 -30mV 미만, 약 35mV 미만 또는 약 -40mV 미만의 평균 제타-전위를 갖는다.

[0143] 실시형태에서, 복수의 LNP는 약 -50mV 내지 약 -20mV, 약 -40mV 내지 약 -20mV 또는 약 -30mV 내지 약 -20mV의 평균 제타-전위를 갖는다.

[0144] 실시형태에서, 복수의 LNP는 약 -30mV, 약 -31mV, 약 -32mV, 약 -33mV, 약 -34mV, 약 -35mV, 약 -36mV, 약 -37 mV, 약 -38mV, 약 -39mV 또는 약 -40mV의 평균 제타-전위를 갖는다.

[0145] 실시형태에서, 대상체에 대한 상기 조성물의 전달은 표적 세포에 상기 캡슐화된 DNA 발현 카세트를 전달하는 것이되, 상기 캡슐화된 DNA 발현 카세트는 상기 표적 세포를 용해시킬 수 있는 감염성 바이러스를 생산한다.

[0146] 실시형태에서, 조성물은 정맥내 또는 종양내에 전달된다.

[0147] 실시형태에서, 표적 세포는 암성 세포이다.

[0148] 양상에서, 본 개시내용은 본 개시내용의 임의의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 무기 입자를 제공한다.

[0149] 실시형태에서, 무기 입자는 금 나노입자(gold nanoparticle: GNP), 금 나노 막대(gold nanorod: GNR), 자성 나노입자(magnetic nanoparticle: MNP), 자성 나노튜브(magnetic nanotube: MNT), 탄소 나노혼(carbon nanohorn:CNH), 탄소 플러렌, 탄소 나노튜브(carbon nanotube: CNT), 인산칼슘 나노입자(calcium phosphate nanoparticle: CPNP), 메조포러스 실리카 나노입자(mesoporous silica nanoparticle: MSN), 실리카 나노튜브(silica nanotube: SNT), 또는 스타라이크 중공 실리카 나노입자(starlike hollow silica nanoparticle: SHNP)로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0150] 실시형태에서, 상기 입자의 평균 직경은 약 500nm 미만, 약 250nm 내지 약 500nm 또는 약 350nm이다.

[0151] 양상에서, 암성 세포를 사멸시키는 방법을 제공하며, 이 방법은 암성 세포를, 암성 세포에 입자를 세포내로 전달하기에 적합한 조건 하에서, 제122항 내지 제140항 중 어느 한 항의 입자 또는 조성물에 노출시키는 단계를 포함하거, 캡슐화된 폴리뉴클레오타이드에 의해서 생산된 복제-가능 바이러스는 암성 세포를 사멸을 초래한다.

[0152] 실시형태에서, 복제-가능 바이러스는 비암성 세포에서 생산되지 않는다.

[0153] 실시형태에서, 방법은 생체내, 시험관내 또는 생체외에서 수행된다.

[0154] 양상에서, 본 개시내용은 대상체에서 암을 치료하는 방법을 제공하며, 이 방법은 암을 앓고 있는 대상체에게 유효량의 제122항 내지 제140항 중 어느 한 항의 입자 또는 조성물 또는 이의 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.

[0155] 실시형태에서, 입자 또는 이의 조성물은 정맥내로, 비강내로, 흡입제(inhalant)로서 투여되거나 또는 종양 내에 직접 주사된다.

[0156] 실시형태에서, 입자 또는 이의 조성물은 대상체에게 반복적으로 투여된다.

[0157] 실시형태에서, 대상체는 마우스, 래트, 토끼, 고양이, 강아지, 말, 비인간 영장류 또는 인간이다.

[0158] 실시형태에서, 암은 폐암, 유방암, 난소암, 자궁경부암, 전립선암, 고환암, 결장직장암, 결장암, 췌장암, 간암, 위암, 두경부암, 갑상선암, 악성 뇌교종, 교모세포종, 흑색종, B-세포 만성 림프구성 백혈병, 미만성 거대 B-세포 림프종(diffuse large B-cell lymphoma: DLBCL) 및 변연부 림프종(marginal zone lymphoma: MZL)으로부터 선택된다.

[0159] 실시형태에서, 폐암은 소세포 폐암 또는 비소세포 폐암이다.

[0160] 실시형태에서, 간암은 간세포 암종(HCC)이다.

[0161] 양상에서, 본 개시내용은 청구항 중 임의의 것의 재조합 DNA 분자를 생산하는 방법을 제공하며, 이 방법은, 재조합 DNA 분자를 제1 바이러스 발현 벡터 내에 삽입하는 단계로서, 재조합 DNA 분자는 폴리뉴클레오타이드의 5' 아데노-연관 바이러스(adeno-associated virus: AAV)-유래된 반전 말단 반복부(ITR) 및 3' AAV-유래된 ITR 단부를 포함하는, 상기 삽입하는 단계; ITR-매개된 복제에 필요한 AAV 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 제2 바이러스 발현 벡터 내에 삽입하는 단계; 및 제1 바이러스 발현 벡터 및 제2 바이러스 발현 벡터를 세포에 세포내로 전달하는 단계를 포함하되, 상기 재조합 DNA 분자는 상기 게놈 내에 안정적으로 통합되고, 상기 세포는 상기 ITR-측접(ITR-flanked) 폴리뉴클레오타이드를 ITR의 부재 하에서 생산될 양보다 더 많은 양으로 생산한다.

[0162] 실시형태에서, 바이러스 발현 벡터는 허피스 바이러스 또는 바큘로바이러스이다.

## *도면의 간단한 설명*

[0163] 도 1은 폴리뉴클레오타이드 게놈이 유래될 수 있는 다양한 종의 DNA 또는 RNA 바이러스의 예를 도시한 도면.

도 2는 내부에 자기-복제 폴리뉴클레오타이드가 캡슐화된 글리코사미노글리칸(glycosaminoglycan: CAG) 히알루로난(HA)으로 코팅된 지질 기반 나노입자의 예를 도시한 도면(http://www.quietx.com).

도 3은 종양 표적화된 나노입자 내에 캡슐화된 자기-복제 폴리뉴클레오타이드로 암을 치료하는 예를 도시한 도면.

도 4A 및 도 4B는 트랜스로 발현되는 Rep 52 및 Rep 78과 함께 5' ITR 및 3' ITR을 포함하는 자기-복제 바이러스 게놈의 증식을 위한 복제 HSV 벡터의 예를 도시한 도면(도 4A) 및 내부 Rep 카세트와 함께 5' ITR 및 3' ITR을 포함하는 자기-복제 바이러스 게놈을 도시한 도면(도 4B). gB:NT = gB 유전자 내의 바이러스 유입-향상 이중 돌연변이; BAC = loxP-측접 클로람페니콜-내성 및 lacZ 서열; △조인트 = ICP4 유전자의 하나의 카피를 포함하는 완전 내부 반복 영역의 결실; ITR = AAV로부터 유래된 반전 말단 반복부; Pol IIp = 구성적 Pol II 프로모터; Rep 카세트 = ITR-측접 바이러스 게놈 DNA의 복제를 위해서 AAV Rep 52 및 Rep 78을 암호화하는 카세트; 대각선 해시 박스로 나타낸 선택적인 miRNA 약화(attenuation).

도 5A 및 도 5B는 트랜스로 발현되는 Rep 52 및 Rep 78과 함께 5' ITR 및 3' ITR을 포함하는 자기-복제 폴리뉴클레오타이드의 증식을 위한 비복제 HSV 벡터의 예를 도시한 도면(도 5A) 및 내부 Rep 카세트와 함께 5' ITR 및 3' ITR을 포함하는 자기-복제 바이러스 게놈을 도시한 도면(도 5B). gB:NT = gB 유전자 내의 바이러스 유입-향상 이중 돌연변이; BAC = loxP-측접 클로람페니콜-내성 및 lacZ 서열; △조인트 = ICP4 유전자의 하나의 카피를 포함하는 완전 내부 반복 영역의 결실; ITR = AAV로부터 유래된 반전 말단 반복부; Pol IIp = 구성적 Pol II 프로모터; Rep 카세트 = ITR-측접 바이러스 게놈 DNA의 복제를 위해서 AAV Rep 52 및 Rep 78을 암호화하는 카세트; 대각선 해시 박스로 나타낸 선택적인 miRNA 약화.

도 6A 및 도 6B는 포저티브 표준 RNA 폴리오 바이러스 타입 I 게놈을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 도면. 폴리뉴클레오타이드는 AAV-유래된 ITR에 의해서 5' 단부 및 3' 단부 상에 선택적으로 측접될 수 있다(도 6A 및 도 6B). 폴리뉴클레오타이드는 miRNA 약화를 위해서 하나 이상의 miRNA 표적 서열 카세트(miR TS 카세트)를 선택적으로 포함할 수 있다(도 6B).

도 7A 및 도 7B는 폴리오 바이러스 타입 I 게놈을 암호화하는 자기-복제 폴리뉴클레오타이드의 생산을 위한 복제 HSV 벡터의 예를 도시한 도면. 폴리오 바이러스 게놈은 miRNA-약화를 위해서 miRNA 표적 부위를 선택적으로 포함할 수 있다(대각선 해시 박스로 나타냄). 도 7B는 AAV-유래된 ITR에 의해서 5' 단부 및 3' 단부 상에 측접

된 폴리오 바이러스 타입 I 게놈을 암호화하는 자기-복제 폴리뉴클레오타이드의 생산을 위한 복제 HSV 벡터를 도시한 도면. gB:NT = gB 유전자 내의 바이러스 유입-향상 이중 돌연변이; BAC = loxP-측접 클로람페니콜-내성 및 lacZ 서열; △UL19 = 주 캡시드 단백질 VP5를 암호화하는 UL19 유전자의 결실; △조인트 = ICP4 유전자의 하나의 카피를 포함하는 완전 내부 반복 영역의 결실; ITR = AAV로부터 유래된 반전 말단 반복부; Pol IIp = 구성적 Pol II 프로모터; Rep 카세트 = ITR-측접 바이러스 게놈 DNA의 복제를 위해서 AAV Rep 52 및 Rep 78을 암호화하는 카세트; 폴리오 바이러스 게놈 카세트 = HSV 게놈의 유전자 사이의 유전자좌 내에 삽입됨, 그리고 전사에 의해서 생산되는 가닥 게놈; 대각선 해시 박스로 나타낸 선택적인 miRNA 약화.

도 8A 내지 도 8C는 특정 암, 예컨대, 비소세포 폐암(도 8A), 간세포 암종(도 8B) 및 전립선암(도 8C)의 치료를 위한 폴리오 바이러스 타입 I 폴리뉴클레오타이드 게놈의 예를 도시한 도면.

도 9A 및 도 9B는 수포성 구내염 바이러스(VSV) 게놈을 암호화하는 자기-복제 폴리뉴클레오타이드의 예를 도시한 도면. 폴리뉴클레오타이드는 AAV-유래된 ITR에 의해서 5' 단부 및 3' 단부 상에 선택적으로 측접될 수 있다(도 9B). 폴리뉴클레오타이드는 대각선 해시 박스로 나타낸, miRNA 약화를 위해서 하나 이상의 miRNA 표적 서열을 선택적으로 포함할 수 있다(도 9B).

도 10A 및 도 10B은 VSV 게놈 폴리뉴클레오타이드 게놈의 생산을 위한 복제 HSV 벡터의 예를 도시한, 도면. VSV 게놈은 miRNA-약화를 위해서 miRNA 표적부위를 선택적으로 포함할 수 있다(도 10A 및 도 10B). 도 10B는 AAV-유래된 ITR에 의해서 5' 단부 및 3' 단부 상에 측접된 VSV의 생산을 위한 복제 HSV 벡터를 도시한 도면. gB:NT = gB 유전자 내의 바이러스 유입-향상 이중 돌연변이; BAC = loxP-측접 클로람페니콜-내성 및 lacZ 서열; △조인트 = ICP4 유전자의 하나의 카피를 포함하는 완전 내부 반복 영역의 결실; △UL19 = 주 캡시드 단백질 VP5를 암호화하는 UL19 유전자의 결실; VSV 게놈 카세트 = 안티게놈성(antigenomic)(네거티브 가닥) VSV 게놈 및 HSV 게놈의 유전자 사이 유전자좌 내에 삽입된 필수 VSV 유전자 및 네거티브 가닥 VSV 게놈의 전사를 위해서 이방성 Pol II 프로모터(BD Pol IIp)를 갖는 필수 VSV 유전자, N, P 및 L을 암호화하는 포유동물 발현 카세트; 대각선 해시 박스로 표시된 선택적인 miRNA; Rep 카세트 = ITR-측접 바이러스 게놈 DNA의 복제를 위해서 AAV Rep 52 및 Rep 78을 암호화하는 카세트; Pol IIp = 구성적 Pol II 프로모터.

도 11A 내지 도 11C는 특정 암, 예컨대, 간세포 암종(도 11A), 전립선암(도 11B) 및 비소세포 폐암(도 11C)을 치료하기 위한 VSV 폴리뉴클레오타이드 게놈의 예를 도시한, 도면.

도 12A 및 도 12B는 아데노바이러스 폴리뉴클레오타이드 게놈의 예를 도시한, 도면. AAV 게놈은 대각선 해시 박스로 나타낸, miRNA-약화를 위한 miRNA 표적 부위를 선택적으로 포함할 수 있다(도 12B).

도 13A 내지 도 13C는 특정 암, 예컨대, 간세포 암종(도 13A), 전립선암(도 13B) 및 비소세포 폐암(도 13C)을 치료하기 위한 AAV 폴리뉴클레오타이드 게놈의 예를 도시한, 도면.

도 14는 CVB3 바이러스 게놈의 개략도. CVB3는 약 7.4kb의 게놈 크기를 갖는 + 센스, ssRNA 피코나바이러스이다.

도 15는 콕사키바이러스 A21 작제물의 개략도.

도 16은 세네카 벨리 바이러스(SVV) 작제물의 개략도.

도 17은 ITR-측접 종양용해 바이러스(OV) DNA 카세트 및 Rep 카세트를 포함하는 재조합 HSV-1, 박테리아 인공 염색체(BAC) 벡터를 도시한, 도면.

도 18은 Rep 카세트 및 A/C 이종이량체화제(hetero이량체izer), AP21967에 의한 Rep 발현의 제어를 나타낸, 도면.

도 19A 내지 도 19D는 도 17에 도시한 시스템에 의해서 생산되는 NanoV 작제물의 단량체 및 이량체를 도시한 도면. 도 19A는 NanoV 단량체 및 이량체의 구조 및 크기를 도시한 도면. 도 19B는 제한 효소 소화 후 예측된 단량체 및 이량체의 겔 분석을 도시한 도면. 도 19C는 내부 PCR 프라이머의 위치와 함께 NanoV 작제물의 개략도. 도 19D는 내부 프라이머를 사용한 NanoV의 PCR 증폭을 도시한 도면.

도 20A 내지 도 20C는 예측된 배향의 NanoV 콘카타머(concatamer)의 생산을 도시한, 도면. 도 20A는 NanoV 단량체 내의 AflII 절단 부위의 위치를 나타낸 도면. 도 20B는 AflII 절단 생성물의 가능한 콘카타머 배향 및 예측된 크기를 나타낸 도면. 도 20C는 AflII-소화된 NanoV DNA의 겔 분석을 도시한 도면.

도 21은 NanoV DNA 작제물로부터의 mCherry의 발현을 도시한 도면.

도 22는 3' 및 5' 리보자임 서열을 포함하는 피코나바이러스 작제물의 개략도.

도 23A 및 도 23B는 복제-가능 세네카 벨리 바이러스(SVV)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이의 설계 및 배양 프로토콜의 개략도. 도 23A는 포유동물 5' 및 3' UTR 서열, 귀상어 리보자임 및 델타 간염 리보자임을 포함하는 캡핑된 폴리아데닐화된 전사체를 도시한 도면. 도 23B는 감염성 SVV의 생산을 위한 배양 프로토콜의 개략도.

도 24는 SVV-리보자임(WT) 및 SVV-mCherry-리보자임을 암호화하는 293T 세포 형질주입된 dsDNA로부터 생산된 바이러스로부터의 단층의 용해를 예증하는 크리스탈 바이올렛 염색(crystal violet staining)을 도시한 도면.

도 25A 내지 도 25C는 도 23에 도시된 SVV 전사체로부터의 3종의 상이한 외인성 페이로드의 발현을 도시한 도면. 도 20A는 mCherry에 대한 광시야 및 형광 현미경 사진. 도 20B는 나노루시퍼라제 검정의 결과를 나타낸 도면. 도 25C는 CXCL10 발현을 나타낸 도면.

도 26은 SVV-암호화 플라스미드 작제물의 miRNA 약화를 나타낸 도면.

도 27A 및 도 27B는 종양내로 전달된 SVV-암호화 DNA 플라스미드에 의한 종양 성장의 저해 및 감염성 바이러스의 생체내 생산을 도시한 도면. 도 27A는 SVV-암호화 플라스미드의 종양내 투여 후 종양 성장의 저해를 나타낸 도면. 도 27B는 도 27A에 도시된 실험으로부터 수거된 분상 종양(pulverized tumor)으로부터의 살아있는 바이러스의 단리를 도시한 도면.

도 28A 및 도 28B는 종양내로 전달된 SVV-암호화 DNA 플라스미드에 의한 외인성 페이로드의 생체내 발현을 도시한 도면. 도 22A는 플라스미드 DNA의 종양내 주사 후 종양 용해물에서 검출된 평균 라디언스를 나타낸 도면. 도 22B는 플라스미드 DNA의 종양내 주사 후 종양 용해물에서 검출된 CXCL10 수준을 나타낸 도면.

도 29는 정맥내 전달 후 종양 부위로의 SVV-암호화 플라스미드의 전달을 도시한 도면.

도 30은LNP-캡슐화된 SVV-암호화 플라스미드 DNA의 정맥내 전달 후 종양 성장의 저해를 나타낸 도면.

도 31A는 SVV-암호화 플라스미드의 맵을 도시한 도면. 도 31B는 CVA21-암호화 플라스미드의 맵을 도시한 도면.

도 32A 및 도 32B는 구별되는 3' 및 5' 네이티브 단부를 갖는 + 센스 ssRNA 바이러스 게놈을 생산하기 위한 시스템.

## *발명을 실시하기 위한 구체적인 내용*

[0164] 일반 비암성 세포에 대한 부수적인 손상을 최소화하면서, 반복적으로 전신에 투여될 수 있고, 복제가 병이 걸린 세포에 제한될 수 있어서, 치료 효능을 최대화하는, 중화 항체의 존재 하에서 효과적인 자기-복제 바이러스 요법이 당업계에 필요하다. 본 개시내용은 이러한 장애를 극복하고, 비-면역원성 입자, 예컨대, 지질 나노입자, 중합체 나노입자 또는 엑소좀 내에 캡슐화될 수 있는 복제-가능 바이러스 게놈을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용은 복제-가능 바이러스를 암호화하는 재조합 DNA 분자 및 증식성 질환 및 장애(예를 들어, 암)의 치료 및 예방을 위한 사용 방법을 제공한다. 특정 실시형태에서, 재조합 DNA 분자는 치료 분자를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 더 포함한다. 본 개시내용은 광범위한 증식성 장애(예를 들어, 암)를 치료하기에 적합한 안전하고 효능있는 재조합 폴리뉴클레오타이드 벡터의 전신 전달을 가능하게 한다.

[0165] 본 명세서에 사용된 섹션 제목은 단지 조직적 목적을 위한 것이며 기재된 주제를 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다. 특허, 특허 출원, 기사, 서적 및 논문을 포함하지만 이에 제한되지 않는 본 명세서에 인용된 모든 문서 또는 문서의 일부는 임의의 목적을 위해 그 전체가 참고로 명백하게 포함된다. 포함된 문서 또는 문서의 부분 중 하나 이상이 본 출원에서의 용어의 정의와 모순되게 용어를 정의하는 경우에, 본 출원에 제시된 정의가 우선시된다. 그러나, 본 명세서에 인용된 임의의 참고 문헌, 기사, 간행물, 특허, 특허 공개 및 특허 출원에 대한 언급은 이들이 유효한 선행 기술을 구성하거나 전세계의 임의의 국가에서 공통된 일반적인 지식의 부분을 형성한다는 것을 인정 또는 제안하는 형태로 간주되어서는 안 된다.

[0166] **I. 정의**

[0167] 달리 제시되지 않는 한, 본 설명에서, 임의의 농도 범위, 백분율 범위, 비율 범위 또는 정수 범위는 언급된 범위 내의 임의의 정수의 값 및 적절한 경우 이들의 분율(예를 들어, 10분의 1 및 100분의 1)을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 단수는 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 달리 제시되지 않는 한 열거된 성분 중 "하나 이상"을 나타내는 것으로 이해되어야 한다. 대안(예를 들어, "또는")의 사용은 대안의 하나, 둘 다 또는 이들의

임의의 조합을 의미하는 것으로 이해되어야 한다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "포함한다" 및 "포함하다"는 동의어로 사용된다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "복수"는 하나 이상의 성분(예를 들어, 하나 이상의 miRNA 표적 서열)을 지칭할 수 있다. 본 출원에서, "또는"의 사용은 달리 언급되지 않는한 "및/또는"을 의미한다.

[0168] 본 출원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "약" 및 "대략적으로"는 동등한 것으로서 사용된다. 약/대략적으로와 함께 또는 그것 없이 본 출원에서 사용된 임의의 수치는 당업자에 의해서 인지되는 임의의 일반적인 변동을 포괄하는 의미이다. 특정 실시형태에서, 용어 "대략적으로" 또는 "약"은 달리 언급하거나 또는 그 문맥이 달리 입증하지 않는 한 언급된 참조값의 양방향(초과 또는 미만)으로의 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 또는 그 미만에 포함되는 다양한 값을 지칭한다(이러한 수치가 가능한 값의 100%를 초과하는 경우 제외).

[0169] "감소시키다" 또는 "감쇠시키다"는 참조값과 비교할 때 특정 값의 적어도 5%, 예를 들어, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 99 또는 100%의 감소 또는 감쇠를 지칭한다. 특정 값의 감소 또는 감쇠는 또한 참조값에 대한 그 값의 배수 변화, 예를 들어, 참조값과 비교할 때 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 500, 1000배 또는 그 초과의 감소로 표현될 수 있다.

[0170] "증가시키다"는 참조값과 비교할 때 특정 값의 적어도 5%, 예를 들어, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 99, 100, 200, 300, 400, 500% 또는 그 초과의 증가를 지칭한다. 특정 값의 증가는 또한 참조값에 대한 그 값의 배수 변화, 예를 들어, 참조값과 비교할 때 적어도 1배, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 500, 1000배 또는 그 초과의 증가로 표현될 수 있다.

[0171] 용어 "서열 동일성"은 동일하고, 동일한 위치에 존재하는 2개의 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드 서열 간의 염기 또는 아미노산의 백분율을 지칭한다. 이와 같이 하나의 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드 서열은 또 다른 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드 서열과 비교할 때 특정 서열 동일성을 갖는다. 서열 비교를 위해서, 전형적으로 하나의 서열은 참조 서열로서 작용하고, 이에 대해서 시험 서열을 비교한다. 용어 "참조 서열"은 시험 서열이 비교되는 분자를 지칭한다.

[0172] "상보성"은 자연 또는 비자연 발생(예를 들어, 상기에 기재된 바와 같이 변형됨) 염기(뉴클레오사이드) 또는 이의 유사체를 포함하는 2개의 서열 사이의 염기 적층 및 특정 수소 결합을 통해 쌍을 형성하는 능력을 지칭한다. 예를 들어, 핵산의 한 위치의 염기가 표적의 상응하는 위치의 염기와 수소 결합할 수 있는 경우, 염기는 그 위치에서 서로 상보성인 것으로 간주된다. 핵산은 범용 염기, 또는 수소 결합에 긍정적 또는 부정적 기여를 제공하지 않는 불활성 염기성 스페이서를 포함할 수 있다. 염기 짝지움은 표준 왓슨-크릭(Watson-Crick) 염기 짝지움 및 비-왓슨 크릭 염기 짝지움(예를 들어, 워블(Wobble) 염기 짝지움 및 후그스틴(Hoogsteen) 염기 짝지움)을 모두 포함할 수 있다. 상보성 염기쌍의 경우, 아데노신-유형 염기(A)는 티미딘-유형 염기(T) 또는 우라실-유형 염기(U)에 상보성이고, 사이토신-유형 염기(C)는 구아노신(G)-유형 염기에 상보성인 것으로 이해되고, 범용 염기, 예컨대, 3-나이트로피롤 또는 5-나이트로인돌은 임의의 A, C, U 또는 T에 혼성화될 수 있어서, 이에 상보성이라고 간주된다(Nichols *et al.*, Nature, 1994;369:492-493 및 Loakes *et al.*, Nucleic Acids Res., 1994;22:4039-4043). 이노신(I)은 또한 당업계에서 범용 염기로 간주되었고, 임의의 A, C, U 또는 T에 상보성인 것으로 간주된다(문헌[Watkins and SantaLucia, Nucl. Acids Research, 2005; 33 (19): 6258-6267] 참고).

[0173] "발현 카세트" 또는 "발현 작제물"은 프로모터에 작동 가능하게 연결된 DNA 폴리뉴클레오타이드 서열을 지칭한다. "작동 가능하게 연결된"은 설명된 성분이 의도된 방식으로 기능할 수 있도록 하는 관계에 있는 병치(juxtaposition)를 지칭한다. 예를 들어, 프로모터가 폴리뉴클레오타이드 서열의 전사 또는 발현에 영향을 주는 경우, 프로모터는 폴리뉴클레오타이드 서열에 작동 가능하게 연결되어 있다.

[0174] 용어 "대상체"는 동물, 예컨대, 포유동물을 포함한다. 일부 실시형태에서, 포유동물은 영장류이다. 일부 실시형태에서, 포유동물은 인간이다. 일부 실시형태에서, 대상체는 가축, 예컨대, 소, 양, 염소, 젖소, 돼지 등; 또는 애완동물, 예컨대, 개 및 고양이이다. 일부 실시형태에서(예를 들어, 특히 연구 문맥에서) 대상체는 설치류(예를 들어, 마우스, 래트, 햄스터), 토끼, 영장류 또는 돼지, 예컨대, 근친 교배 돼지 등이다. 용어 "대상체" 및 "환자"는 본 명세서에서 상호 교환 가능하게 사용된다.

[0175] "투여"는 본 명세서에서 대상체 내의 작용제 또는 조성물의 도입을 지칭한다.

[0176] "치료하는"은 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 생리학적 결과에 영향을 주기 위해서 작용제 또는 조성물을 대상체에게 전달하는 것을 지칭한다. 일부 실시형태에서, 치료는 세포의 집단(예를 들어, 변형된 면역 효과기 세포의 집단)을 대상체에게 전달하는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 치료하는은, 포유동물, 예를 들어, 인간에서 질환을 치료하는 것, 예를 들어, (a) 질환을 저해하는 것, 즉 질환 발달을 중단시키거나 질환 진행을 예방하는 것; (b) 질환을 완화시키는 것, 즉 질환 상태의 퇴행을 유발하는 것; 및 (c) 질환을 치유하는 것을 지칭한다.

[0177] 용어 "유효량"은 특정 생리학적 효과(예를 들어, 특정 생리학적 효과를 증가, 활성화 및/또는 향상시키는데 필요한 양)를 초래하는데 필요한 최소량의 작용제 또는 조성물을 지칭한다. 특정 작용제의 유효량은 작용제의 성질, 예를 들어, 질량/부피, 세포의 수/부피, 입자/부피, (작용제의 질량)/(대상체의 체중), 세포의 수/(대상체의 체중 또는 입자/(대상체의 체중)과 같은 다양한 방식으로 표현될 수 있다. 특정 작용제의 유효량은 또한 절반-최대 유효 농도($EC_{50}$)로 표현될 수 있으며, 이는 기준 수준과 최대 반응 수준 사이의 중간 방식인 특정 생리학적 반응의 크기를 초래하는 작용제의 농도를 지칭한다.

[0178] 세포의 "집단"은 1개를 초과하는 세포의 임의의 수를 지칭하지만, 바람직하게는 적어도 $1x10^3$ 세포, 적어도 $1x10^4$ 세포, 적어도 $1x10^5$ 세포, 적어도 $1x10^6$ 세포, 적어도 $1x10^7$ 세포, 적어도 $1x10^8$ 세포, 적어도 $1x10^9$ 세포, 적어도 $1x10^{10}$ 세포 또는 그 초과의 세포이다. 세포의 집단은 시험관내 집단(예를 들어, 배양물 내의 세포의 집단) 또는 생체내 집단, 예를 들어, 특정 조직에 존재하는 세포의 집단)을 지칭할 수 있다.

[0179] "효과기 기능"은 표적 세포 또는 표적 항원에 대한 면역 반응의 생성, 유지 및/또는 향상에 관련된 면역 세포의 기능을 지칭한다.

[0180] 용어 "마이크로RNA", "miRNA", 및 "miR"는 본 명세서에서 상호 교환 가능하게 사용되며, 절단 또는 전사 억압을 위해서 표적 메신저 RNA(mRNA)를 안내함으로써 유전자 발현을 조절하는 약 21 내지 25개 뉴클레오타이드 길이의 작은 비암호 내인성 RNA를 지칭한다.

[0181] 용어 "조성물"은 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 대상체 또는 세포에 투여 또는 전달될 수 있는 본 명세서에 기재된 자기-복제 폴리뉴클레오타이드 또는 입자-캡슐화된 자기-복제 폴리뉴클레오타이드를 지칭한다.

[0182] 구 "약제학적으로 허용 가능한"은 본 명세서에 타당한 이익/유해비에 상응하게, 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응 또는 다른 문제점 또는 합병증 없이, 타당한 의학적 판단 범위 내에서 과도한 인간 및 동물 조직과의 접촉에 사용하기에 적합한 화합물, 물질, 조성물 및/또는 투여 형태를 지칭하기 위해서 사용된다.

[0183] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 "약제학적으로 허용 가능한 담체, 희석제 또는 부형제"는 비제한적으로 임의의 아주반트, 담체, 부형제, 활택제, 감미료, 희석제, 보존제, 염료/착색제, 향미 증진제, 계면활성제, 습윤제, 분산제, 현탁화제, 안정화제, 등장제, 용매, 계면활성제 및/또는 유화제를 포함하며, 이것은 미국 식품의약국(United States Food and Drug Administration)에서 인간 및/또는 가축 동물에서 사용이 허용된 것으로 승인된 것이다.

[0184] 용어 "자기-복제 폴리뉴클레오타이드"는 추가적인 외인성 폴리뉴클레오타이드 또는 외인성 벡터의 부재 하에서 숙주 세포 내에서 복제할 수 있는 외인성 폴리뉴클레오타이드를 지칭한다.

[0185] 용어 "복제-가능 바이러스 게놈"은 바이러스 복제 및 감염성 바이러스 입자의 생산에 필요한 바이러스 유전자 모두를 암호화하는, 본 명세서에 기재된 자기-복제 폴리뉴클레오타이드에 의해서 암호화된 바이러스 게놈을 지칭한다.

[0186] 용어 "종양용해 바이러스"는 암 세포를 자연적으로 바람직하게는 우세하게 감염시키거나 또는 감염시키도록 변형된 바이러스를 지칭한다.

[0187] 용어 "벡터"는 본 명세서에서 또 다른 핵산 분자를 전달 또는 수송할 수 있는 핵산 분자를 지칭하기 위해서 사용된다.

[0188] 분자 및 세포 생화학에서의 일반적인 방법은 표준 교과서, 예컨대 문헌[Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Ed. (Sambrook *et al.*, HaRBor Laboratory Press 2001); Short Protocols in Molecular Biology, 4th Ed. (Ausubel *et al.* eds., John Wiley & Sons 1999); Protein Methods (Bollag *et al.*, John Wiley & Sons 1996); Nonviral Vectors for Gene Therapy (Wagner *et al.* eds., Academic Press 1999); Viral Vectors

(Kaplift & Loewy eds., Academic Press 1995); Immunology Methods Manual (I. Lefkovits ed., Academic Press 1997); 및 Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology (Doyle & Griffiths, John Wiley & Sons 1998)]에서 찾아볼 수 있으며, 이의 본 개시내용은 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0189] **II. 자기-복제 폴리뉴클레오타이드**

[0190] 일부 실시형태에서, 본 개시내용은 비바이러스 전달 비히클에 의해서 세포에 도입되는 경우 감염성이고 용해성인 바이러스를 생산할 수 있는 복제-가능 바이러스 게놈을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 핵산 분자를 제공한다. 본 명세서에 기재된 자기-복제 폴리뉴클레오타이드는 감염성 바이러스를 복제 및 생산하기 위해서 추가적인 외인성 유전자 또는 단백질이 세포에 존재할 필요가 없다. 더욱이, 숙주 세포에서의 내인성 전사 기전은 초기 제1 라운드의 전사 또는 자기-복제 폴리뉴클레오타이드의 번역을 매개하여 복제-가능 바이러스 게놈을 생산한다. 자기-복제 폴리뉴클레오타이드에 의해서 암호화된 바이러스 게놈은 바이러스 게놈의 연속된 복제에 필요한 바이러스 단백질을 발현할 수 있고, 복제-가능 바이러스 게놈을 포함하는 감염성 바이러스 입자(이것은 캡시드 단백질, 엔벨로프 단백질 및/또는 막 단백질을 포함할 수 있음) 내에 조립할 수 있다. 이와 같이, 본 명세서에 기재된 자기-복제 폴리뉴클레오타이드에 의해서 암호화된 복제-가능 바이러스 게놈은 숙주 세포를 감염시킬 수 있는 바이러스를 생산할 수 있다.

[0191] 일부 실시형태에서, 재조합 핵산 분자는 복제-가능 바이러스 게놈을 암호화하는 DNA 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 DNA 분자이다. 일부 실시형태에서, 재조합 DNA 분자는 리플리콘, 플라스미드, 코스미드, 파지미드, 트랜스포존, 박테리아 인공 염색체 또는 효모 인공 염색체이다. 일부 실시형태에서, 재조합 DNA 분자는 자기-복제 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 플라스미드이다.

[0192] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 재조합 핵산 분자는 전사 조절 요소, 예컨대, 자기-복제 폴리뉴클레오타이드의 전사를 유도 또는 조절하는 프로모터에 작동 가능하게 연결된 자기-복제 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, 복제-가능 바이러스 게놈을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 전사 조절 요소는 포유동물 프로모터 서열이다. 일부 실시형태에서, 포유동물 프로모터 서열은 포유동물 RNA 중합효소에 결합할 수 있다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 포유동물 프로모터 서열은 RNA 중합효소 II(Pol II) 프로모터이다. 일부 실시형태에서, 포유동물 프로모터는 구성적 프로모터, 예컨대, CAG, UbC, EF1a 또는 PGK 프로모터이다. 일부 실시형태에서, 전사 조절 요소는 파지-유래된 프로모터 서열, 예컨대, T7 프로모터이다. 이러한 실시형태에서, T7 프로모터의 조절 하에서의 폴리뉴클레오타이드는 세포의 사이토졸에서 전사된다.

[0193] 일부 실시형태에서, 프로모터는 유도성 프로모터, 예컨대, 테트라사이클린-유도성 프로모터(예를 들어, TRE-Tight), 독시사이클린(doxycline)-유도성 프로모터, 온도-유도성 프로모터(예를 들어, Hsp70 또는 Hsp90-유래된 프로모터), 락토스-유도성 프로모터(예를 들어, pLac 프로모터)이다. 일부 실시형태에서, 프로모터 서열은 전사를 조절하는 하나 이상의 전사 인핸서 요소를 포함한다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 프로모터는 하나 이상의 하이폭시아 반응성 요소 또는 하나 이상의 방사선 반응성 요소를 포함한다. 일부 실시형태에서, 프로모터는 암 세포에 우세하게 자기-복제 폴리뉴클레오타이드를 유도한다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 전사 조절 요소는, 암 세포에서 발현이 증가된 유전자로부터 유도된 프로모터, 예컨대, hTERT, HE4, CEA, OC, ARF, CgA, GRP78, CXCR4, HMGB2, INSM1, 메소텔린, OPN, RAD51, TETP, H19, uPAR, ERBB2, MUC1, Frz1, IGF2- P4, Myc 또는 E2F이다.

[0194] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 재조합 핵산 분자는 복제-가능 바이러스 게놈을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하며, 여기서 폴리뉴클레오타이드는 반전 말단 반복부(ITR) 서열에 의해서 5' 및 3' 단부 상에 측접된다. 본 명세서에서, 용어 "반전 말단 반복부" 또는 "ITR"은 비상동 폴리뉴클레오타이드 서열(예를 들어, 복제-가능 바이러스 게놈을 암호화하는 핵산 서열)의 3' 및/또는 5' 말단 단부에 위치되고, 비회귀성 서열의 하나 이상의 스트레치에 의해서 분리된 회귀성 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 지칭한다. "회귀성" 서열은 둘 다가 5'에서 3' 방향으로 판독되는 경우 상보성 가닥과 동일한 핵산 서열을 지칭한다. ITR의 폴리뉴클레오타이드 서열은 회귀성 서열 사이의 상보성 염기쌍에 위해서 스템-루프 구조(예를 들어, 헤어-핀 루프)를 형성할 것이다. ITR 폴리뉴클레오타이드 서열은, 그 서열이 스템-루프 구조를 형성할 수 있는 한, 임의의 길이일 수 있다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 하기 구조를 포함한다:

[0195] 5' - ITR - 센스 바이러스 게놈 - ITR - 3'; 또는

[0196] 3' - ITR - 안티-센스 바이러스 게놈 - ITR - 5'.

[0197] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 ITR 서열은 최소한 스템-루프 구조, Rep-결합 부위 및 말단 레졸루션

부위(terminal resolution site)를 형성할 수 있는 회귀성 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 ITR은 아데노-연관 바이러스(AAV)로부터 유래된다. 이러한 실시형태에서, ITR은 임의의 공지된 항원형의 AAV(예를 들어, AAV1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 11)로부터 유래될 수 있다(예를 들어, 미국 특허 제9,598,703호 참고). 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 ITR은 파보바이러스로부터 유래될 수 있다(예를 들어, 미국 특허 제5,585,254호). 본 개시내용에 사용하기에 적합한 추가적인 반전 말단 반복부 서열은 국제 PCT 공개 제WO 2017/152149호 및 제WO 2016/172008호 및 미국 출원 공개 제2017-0362608호에 기재되어 있다.

[0198] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 재조합 핵산 분자는 2개의 ITR-측접 폴리뉴클레오타이드 분자를 포함하는데, 여기서 제1 분자의 5' ITR은 제2 분자의 3' ITR에 공유 결합되어 있고, 제1 분자의 3' ITR은 제2 분자의 5' ITR에 공유 결합되어 있다. 이러한 실시형태에서, 공유 결합된 ITR-측접 폴리뉴클레오타이드는 단부-폐쇄, 선형 듀플렉스 종양용해 바이러스 핵산 분자를 형성한다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 재조합 핵산 분자는 (i) 바이러스 게놈의 센스 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 제1 단일 가닥 DNA(ssDNA) 분자; 및 (ii) 바이러스 게놈의 안티-센스 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 제2 ssDNA 분자를 포함하고, 여기서 제1 ssDNA 분자 및 제2 ssDNA 분자 각각은 3' ITR 및 5' ITR을 포함하고, 여기서 제1 ssDNA 분자의 3' 단부는 제2 ssDNA 분자의 5' 단부에 공유 결합되고, 제1 ssDNA 분자의 5' 단부는 제2 ssDNA 분자의 3' 단부에 공유 결합되어 본 명세서에서 "NanoV 분자"로 지칭되는 단부-폐쇄 선형 듀플렉스 종양용해 바이러스(Ov) DNA 분자를 형성한다.

[0199] 일부 실시형태에서, 자기-복제 폴리뉴클레오타이드는 복제-가능 DNA 또는 RNA 바이러스 게놈을 암호화한다. 일부 실시형태에서, 복제-가능 바이러스 게놈은 단일 가닥 게놈(예를 들어, ssRNA 게놈 또는 ssDNA 게놈)이다. 이러한 실시형태에서, 단일 가닥 게놈은 포저티브 센스 또는 네거티브 센스 게놈일 수 있다. 일부 실시형태에서, 복제-가능 바이러스 게놈은 이중 가닥 게놈(예를 들어, dsRNA 게놈 또는 dsDNA 게놈)이다. 일부 실시형태에서, 자기-복제 폴리뉴클레오타이드는 복제-가능 종양용해 바이러스를 암호화한다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "종양용해 바이러스"는 암 세포를 자연적으로 바람직하게는 우세하게 감염시키거나 또는 감염시키도록 변형된 바이러스를 지칭한다. 종양용해 바이러스의 예는 공지되어 있으며, 이것은 비제한적으로 단순 포진 바이러스, 아데노바이러스, 폴리오 바이러스, 백시나 바이러스, 홍역 바이러스, 수포성 구내염 바이러스, 오쏘믹소바이러스, 파보바이러스, 마라바 바이러스 또는 콕사키바이러스를 포함한다.

[0200] 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드에 의해서 생산되는 복제-가능 바이러스는 아데노바이러스과의 임의의 바이러스, 예컨대, 아데노바이러스, 피코나바이러스과의 임의의 바이러스, 예컨대, 콕사키 바이러스, 폴리오 바이러스 또는 세네카 벨리 바이러스, 허피스바이러스과의 임의의 바이러스, 예컨대, 말과 허피스 바이러스 또는 단순 포진 바이러스 1형(HSV-1), 아레나바이러스과의 임의의 바이러스, 예컨대, 라사 바이러스, 레트로바이러스과의 임의의 바이러스, 예컨대, 뮤린 백혈병 바이러스, 오쏘믹소바이러스과의 임의의 바이러스, 예컨대, 인플루엔자 A 바이러스, 파리믹소바이러스과의 임의의 바이러스 예컨대, 뉴캐슬병 바이러스 또는 홍역 바이러스, 파보바이러스과의 임의의 바이러스, 레오바이러스과의 임의의 바이러스, 예컨대, 포유동물 오쏘레오바이러스, 토가바이러스과의 임의의 바이러스, 예컨대, 신드비스 바이러스, 폭스바이러스과의 임의의 바이러스, 예컨대, 백시나 바이러스 또는 점액종 바이러스, 또는 랍도바이러스과의 임의의 바이러스, 예컨대, 수포성 구내염 바이러스(VSV) 또는 마라바 바이러스이며, 이의 예는 도 1에 제시한다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드에 의해서 생산된 복제-가능 바이러스는 키메라 바이러스, 예컨대, 변형된 폴리오 바이러스(예를 들어, PVS-RIPO)이다.

[0201] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 재조합 핵산 분자는, 재조합 핵산 분자가 세포 내에 도입되는 경우, 세포의 내인성 중합효소(들)에 의해서 전사되어 감염성 바이러스 내에 조립될 수 있는 바이러스 게놈을 생산한다. 생산되는 감염성 바이러스의 양은 표적 세포 또는 표적 세포의 집단에 존재하거나 배양물에서 성장된 세포의 상청액 내에 존재하거나 또는 대상체의 조직 내에 존재하는 바이러스 RNA 또는 바이러스 DNA의 양을 정량하는 것을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 당업계에 공지된 방법에 의해서 측정될 수 있다. 이러한 실시형태에서, 총 DNA 또는 RNA를 표적 세포로부터 단리할 수 있고, 바이러스 게놈에 존재하는 RNA 또는 DNA 서열에 특이적인 프라이머를 사용하여 qPCR을 수행할 수 있다. 일부 실시형태에서, 표적 세포(예를 들어, 시험관내 샘플 또는 생체내 종양으로부터 단리된 샘플)의 집단에 도입된 재조합 핵산 중의 세포의 집단으로부터 생산되는 바이러스 입자의 수는 당업계에 공지된 방법에 의해서 정량될 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 제형은 50% 조직 배양 감염량(50% Tissue culture Infective Dose: $TCID_{50}$)이 적어도 약 $10^3$ 내지 $10^9$ $TCID_{50}$/㎖, 예를 들어, 적어도 약 $10^3$ $TCID_{50}$/㎖, 약 $10^4$ $TCID_{50}$/㎖, 약 $10^5$ $TCID_{50}$/㎖, 약 $10^6$ $TCID_{50}$/㎖, 약 $10^7$ $TCID_{50}$/㎖, 약 $10^8$ $TCID_{50}$/㎖

또는 약 $10^9$ $TCID_{50}$/㎖이다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 제형은 생체내에서 종양 성장을 유의하게 저해한다.

[0202] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 재조합 핵산 분자는 서열번호 1 내지 2와 적어도 약 75%, 약 76%, 약 77%, 약 78%, 약 79%, 약 80%, 약 81%, 약 82%, 약 83%, 약 84%, 약 85%, 약 86%, 약 87%, 약 88%, 약 89%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99% 또는 약 100% 동일한 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0203] ***A. 단일 가닥 RNA 바이러스***

[0204] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 자기-복제 폴리뉴클레오타이드는 단일 가닥 RNA(ssRNA) 바이러스 게놈을 암호화한다. 일부 실시형태에서, ssRNA 바이러스는 포저티브-센스, ssRNA(+ 센스 ssRNA) 바이러스 또는 네거티브-센스, ssRNA(- 센스 ssRNA) 바이러스이다.

[0205] *1. 포저티브-센스, 단일 가닥 RNA 바이러스*

[0206] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 자기-복제 폴리뉴클레오타이드는 포저티브-센스, 단일 가닥 RNA(+ 센스 ssRNA) 바이러스 게놈을 암호화한다. 예시적인 + 센스 ssRNA 바이러스는 피코나바이러스과(예를 들어, 콕사키바이러스, 폴리오바이러스, 및 세네카 벨리 바이러스(SVV), SVV-A 포함), 코로나바이러스과(예를 들어, 알파코로나바이러스, 예컨대, HCoV-229E 및 HCoV-NL63, 베타코로나바이러스, 예컨대, HCoV-HKU1, HCoV-OC3 및 MERS-CoV), 레트로바이러스과(예를 들어, 뮤린 백혈병 바이러스) 및 토가바이러스과(예를 들어, 신드비스 바이러스)의 구성원을 포함한다. 포저티브-센스, ssRNA 바이러스의 추가의 예시적인 속 및 종을 하기 표 4에 제시한다.

표 4

포저티브-센스 ssRNA 바이러스

| 과/아과 | 속 | 자연 숙주 | 종 |
|---|---|---|---|
| 피코나바이러스과 | 카디오바이러스 | 인간 | |
| | 코사바이러스 | 인간 | |
| | 엔테로바이러스 | 인간 | 콕사키바이러스 |
| | | 인간 | 폴리오바이러스 |
| | 헤파토바이러스 | 인간 | |
| | 코부바이러스 | 인간 | |
| | 파레코바이러스 | 인간 | |
| | 로사바이러스 | 인간 | |
| | 살리바이러스 | 인간 | |
| | 파시바이러스 | 돼지 | |
| | 세네카바이러스 | 돼지 | 세네카 벨리 바이러스 A |
| 칼리시바이러스과 | 사포바이러스 | 인간 | |
| | 노로바이러스 | 인간 | |
| | 네보바이러스 | 소 | |
| | 베시바이러스 | 고양이과/돼지과 | |
| 헤페바이러스과 | 오쏘헤페바이러스 | | |
| 아스트로바이러스과 | 마마스트로바이러스 | 인간 | |
| | 아바스트로바이러스 | 조류 | |
| 플라비바이러스과 | 헤파시바이러스 | 인간 | |
| | 플라비바이러스 | 절지동물 | |
| | 페기바이러스 | | |
| | 페스티바이러스 | 포유동물 | |
| 코로나바이러스과/코로바이러스아과 | 알파코로나바이러스 | | HCoV-229E |
| | | | HCoV-NL63 |
| | 베타코로나바이러스 | | HCoV-HKU1 |
| | | | HCoV-OC3 |
| | | | MERS-CoV |
| | 델타코로나바이러스 | | |
| | 감마코로나바이러스 | | |
| 코로나바이러스과/토로바이러스과 | 바피니바이러스 | | |
| | 토로바이러스 | | |
| 레트로바이러스과 | 감마레트로바이러스 | | 뮤린 백혈병 바이러스 |
| | | | |
| 토가바이러스과 | 알파바이러스 | | 신드비스 바이러스 |

[0207]

[0208] + 센스 ssRNA 바이러스의 게놈은 5' - 3' 배향의 ssRNA 분자를 포함하고, 숙주 세포에 의해서 바이러스 단백질로 직접 번역될 수 있다. 따라서, + 센스 ssRNA 바이러스를 암호화하는 자기-복제 폴리뉴클레오타이드는 감염성 바이러스를 생산하기 위해서 임의의 추가적인 바이러스 복제 단백질의 존재가 필요하지 않다.

[0209] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 폴리뉴클레오타이드에 의해서 암호화된 + 센스 ssRNA 복제-가능 바이러스 게놈은 바이러스에 대해서 네이티브인 구별된 5' 단부 및 3' 단부가 필요하다. 포유동물 RNA Pol II에 의해서 생산되는 mRNA 전사체는 포유동물 5' 및 3' UTR를 함유하고, 따라서 감염성 ssRNA 바이러스의 생산에 필요한 구별되는 네이티브 단부를 함유하지 않는다. 따라서, 일부 실시형태에서, 감염성 + 센스 ssRNA 바이러스(예를 들어, 표 5에 제시된 바이러스)는 바이러스 ssRNA 및 포유동물 mRNA 서열의 연결부에 Pol II-암호화된 바이러스 게놈 전사체의 전달이 가능한 추가적인 5' 및 3' 서열이 필요하여 비바이러스 RNA는 바이러스의 내인성 5' 및 3'의 구별되는 단부를 유지하기 위해서 전사체로부터 제거된다. 이러한 서열은 본 명세서에서 연결성 절단 서열(junctional cleavage sequence)로 지칭된다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 자가-폴리뉴클레오타이드는 하기 구조를 포함한다:

[0210] (a)5'- Pol II - 연결성 절단 - 센스 바이러스 게놈 - 연결성 절단 - 3';

[0211] (b)3'- Pol II- 연결성 절단 - 안티-센스 바이러스 게놈 - 연결성 절단 - 5'.

[0212] 연결성 절단 서열 및 바이러스 게놈 전사체로부터의 비바이러스 RNA의 제거는 다양한 방법에 의해서 달성될 수

있다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 연결성 절단 서열은 siRNA 표적 서열이고, 자기-복제 폴리뉴클레오타이드의 5' 및 3' 단부 내에 혼입된다. 이러한 실시형태에서, siRNA가 생성되어 RNA-유도된 침묵 복합체(RNA-induced silencing complex: RISC) 또는 아르고너트(Argonaute) 단백질에 의해서 바이러스 게놈 전사체의 전달을 매개할 수 있다. 예시적인 작제물 설계를 도 32A 및 도 32B에 도시한다. 일부 실시형태에서, 연결성 절단 서열은 전구체 miRNA(precursor miRNA: pri-miRNA)를 암호화하는 서열이고, 자기-복제 폴리뉴클레오타이드의 5' 및 3' 단부 내에 혼입된다. 이러한 실시형태에서, pri-miRNA 서열은 드로샤(Drosha)에 의해서 바이러스 게놈을 절단할 수 있는 헤어핀 루프를 형성한다. 일부 실시형태에서, 연결성 절단 서열은 가이드 RNA 표적 서열이고, 자기-복제 폴리뉴클레오타이드의 5' 및 3' 단부 내에 혼입된다. 이러한 실시형태에서, gRNA은 정확한 연결성 부위에서 바이러스 게놈 전사체의 절단을 매개하도록 설계되고, RNase 활성도를 갖는 Cas 엔도뉴클레아제와 함께 도입될 수 있다. 일부 실시형태에서, 연결성 절단 서열은 리보자임-암호화 서열이고, 바이러스 게놈을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열의 바로 5' 및 3'에 본 명세서에 기재된 자기-복제 폴리뉴클레오타이드 내에 혼입된다. 이어서, 암호화 리보자임이 바이러스 게놈 전사체의 절단을 매개하여 바이러스의 구별되는 네이티브 단부를 생산한다. 추가로, 당업계에 현재 공지되거나 미래에 정의될 특이적 부위에서 RNA 전사체를 절단하기 위한 임의의 시스템을 사용하여 본 명세서에 기재된 자기-복제 폴리뉴클레오타이드에 의해서 암호화되는 바이러스에 대해서 네이티브인 구별되는 단부를 생성할 수 있다.

[0213] 일부 실시형태에서, 자기-복제 폴리뉴클레오타이드는 바이러스 전사체의 구별되는 네이티브 단부를 생성하기 위해서 5' 및 3' 연결성 절단 서열을 포함하고, 5' 및 3' ITR가 측접된다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 자가-폴리뉴클레오타이드는 하기 구조를 포함한다:

[0214] **(a)**5' - ITR - Pol II - 연결성 절단 - 센스 바이러스 게놈 - 연결성 절단 - ITR - 3'; 또는

[0215] **(b)**3' - ITR - Pol II - 연결성 절단 - 안티-센스 바이러스 게놈 - 연결성 절단 - ITR - 5'.

[0216] 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 하기 구조를 포함한다:

[0217] **(a)**5' - Pol II - 리보자임 - 센스 바이러스 게놈 - 리보자임 - 3';

[0218] **(b)**3' - Pol II - 리보자임 - 안티-센스 바이러스 게놈 - 리보자임 - 5';

[0219] **(c)**5' - ITR - Pol II - 리보자임 - 센스 바이러스 게놈 - 리보자임 - ITR - 3'; 또는

[0220] **(d)**3' - ITR - Pol II - 리보자임 - 안티-센스 바이러스 게놈 - 리보자임 - ITR - 5'.

[0221] 일부 실시형태에서, 3' 리보자임-암호화 서열 및 5' 리보자임-암호화 서열은 동일한 리보자임을 암호화한다. 일부 실시형태에서, 리보자임-암호화 서열은 델타 간염 바이러스 리보자임 또는 귀상어 리보자임을 암호화한다. 일부 실시형태에서, 3' 리보자임-암호화 서열 및 5' 리보자임-암호화 서열은 상이한 리보자임을 암호화한다. 일부 실시형태에서, 3' 리보자임-암호화 서열은 델타 간염 바이러스 리보자임을 암호화하고, 5' 리보자임-암호화 서열은 귀상어 리보자임을 암호화한다.

[0222] *2. 네거티브-센스 ssRNA 바이러스*

[0223] 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 네거티브-센스, 단일 가닥 RNA(- 센스 ssRNA) 바이러스 게놈을 암호화한다. - 센스 ssRNA 바이러스의 게놈은 3' - 5' 배향의 ssRNA 분자를 포함하고, 단백질로 직접 번역될 수 없다. 더욱이, - 센스 ssRNA 바이러스의 게놈은 먼저 RNA 중합효소에 의해서 + 센스 mRNA 분자로 전사되어야 한다. 예시적인 - 센스 ssRNA 바이러스는 파리믹소바이러스과(예를 들어, 홍역 바이러스 및 뉴캐슬병 바이러스), 랍도바이러스과(예를 들어, 수포성 구내염 바이러스(VSV) 및 마바 바이러스), 아레나바이러스과(예를 들어, 라사 바이러스) 및 오쏘믹소바이러스과(예를 들어, 인플루엔자 바이러스 예컨대, 인플루엔자 A, 인플루엔자 B, 인플루엔자 C 및 인플루엔자 D)의 구성원을 포함한다.

[0224] 일부 실시형태에서, - 센스 ssRNA 바이러스 게놈을 암호화하는 자기-복제 폴리뉴클레오타이드는 - 센스 ssRNA 게놈의 복제를 위해서 요구되는 바이러스 단백질로 번역될 수 있는 mRNA 전사체를 암호화하는 제1 폴리뉴클레오타이드 서열 및 바이러스 게놈의 안티게놈성 서열을 포함하는 제2 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 및 제2 폴리뉴클레오타이드 서열은 진핵 세포에서 발현할 수 있는 프로모터, 예를 들어, 포유동물 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 일부 실시형태에서, 제1 및 제2 폴리뉴클레오타이드 서열은 양방향성 프로모터, 예컨대, 양방향성 Pol II 프로모터에 작동 가능하게 연결된다(예를 들어, 도 9, 도 10 및 도 11 참고).

[0225] 일부 실시형태에서, - 센스 ssRNA 게놈의 복제를 위해서 필요한 바이러스 유전자는 동일한 발현 카세트로부터 발현된다. 일부 실시형태에서, - 센스 ssRNA 게놈의 복제를 위해서 필요한 바이러스 유전자는 상이한 발현 카세트, 예를 들어, 2개 또는 3개의 발현 카세트, 각각의 유전자에 대한 발현 카세트 또는 3개의 유전자 중 2개를 갖는 하나의 발현 카세트와 제3 유전자를 갖는 또 다른 것으로부터 발현된다. - 센스 ssRNA 게놈의 복제를 위해서 필요한 바이러스 유전자는 동일한 오픈 리딩 프레임(open reading frame)으로부터 또는 2개 또는 3개의 상이한 오픈 리딩 프레임으로부터 번역될 수 있다. 실시형태에서, - 센스 ssRNA 게놈의 복제를 위해서 필요한 바이러스 유전자는 단일 오픈 리딩 프레임으로부터 공동 번역에 의해서 발현되고, 성숙 폴리펩타이드로 번역후 가공된다. 실시형태에서 - 센스 ssRNA 게놈의 복제를 위해서 필요한 바이러스 유전자는 2A 펩타이드 서열에 의해서 연결되어, 오픈 리딩 프레임으로부터 개별 폴리펩타이드로 번역되는 폴리펩타이드의 자기-절단을 초래한다. - 센스 ssRNA 게놈 유전자의 복제를 위해서 필요한 바이러스 유전자는 임의의 순서로 배열될 수 있다. 일부 실시형태에서, 발현 카세트는 - 센스 ssRNA 게놈의 복제를 위해서 필요한 바이러스 유전자 중 하나 이상의 기능성 변이체를 포함한다. 당업자는 특정 - 센스 ssRNA 바이러스를 위해서 필요한 유전 요소에 따른 상기 시스템의 적절한 변이체를 조작하는 방법을 인식할 것이다. 이러한 조작은 복제에 필수적인 추가 유전자를 첨가하는 형태를 취할 수 있다.

[0226] 일부 실시형태에서, 복제를 위해서 필요한 바이러스 단백질로 직접 번역될 수 있는 mRNA 전사체를 암호화하는 제1 폴리뉴클레오타이드 서열은 진핵 세포에서 발현할 수 있는 프로모터, 예를 들어, 포유동물 Pol II 프로모터에 작동 가능하게 연결되고, T7 중합효소에 대해서 추가로 암호화한다. 이러한 실시형태에서, 제2 폴리뉴클레오타이드 서열은 T7 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 예를 들어, 일부 실시형태에서 자기-복제 폴리뉴클레오타이드는 하기 구조를 포함한다:

[0227] (a)5' - [복제를 위해서 필요한 바이러스 유전자] - 양방향성 프로모터 - [안티게놈성 바이러스 게놈] - 3';

[0228] (b)5' - Pol II - [복제를 위해서 필요한 바이러스 유전자 + T7 pol] - T7 프로모터 - [안티게놈성 바이러스 게놈] - 3'.

[0229] 일부 실시형태에서, 예를 들어, - 센스 ssRNA 바이러스 게놈을 암호화하는 자기-복제 폴리뉴클레오타이드는 AAV-유래된 ITR에 의해서 5' 및 3' 단부 상에 측접된다:

[0230] (a)5' - ITR - [복제를 위해서 필요한 바이러스 유전자] - 양방향성 프로모터 - [안티게놈성 바이러스 게놈] - ITR - 3';

[0231] (b)5' - ITR - Pol II - [복제를 위해서 필요한 바이러스 유전자 + T7 pol] - T7 프로모터 - [안티게놈성 바이러스 게놈] - ITR - 3'.

[0232] ***B. 이중 가닥 RNA 바이러스***

[0233] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 자기-복제 폴리뉴클레오타이드는 이중 가닥 RNA(dsRNA) 바이러스 게놈을 암호화한다. 예시적인 dsRNA 바이러스는 아말가바이러스과(Amalgaviridae family), 버나바이러스과, 크리소바이러스과(Chrysoviridae family), 시스토바이러스과(Cystoviridae family), 엔도나바이러스과(Endornaviridae family), 하이포바이러스과, 메가버나바이러스과(Megabirnaviridae family), 파티티바이러스과(Partitiviridae family), 피코버나바이러스과(Picobirnaviridae family), 쿼드리바이러스과(Quadriviridae family), 레오바이러스과, 토티바이러스과의 구성원을 포함한다.

[0234] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 자기-복제 폴리뉴클레오타이드는 dsRNA 바이러스 게놈을 암호화한다. 일부 실시형태에서, dsRNA 바이러스 게놈은 네거티브 센스(상보성) 가닥에 대한 포저티브 센스 가닥 5'로서 암호화된다. 따라서, 일부 실시형태에서, dsRNA 바이러스 게놈은 DNA 폴리뉴클레오타이드의 동일한 가닥으로부터의 또 다른 것에 상보성인 2개의 RNA 분자로서 전사된다. 일부 실시형태에서, dsRNA 바이러스 게놈의 2개의 RNA 분자는 단일 RNA로서 전사되는데, 이것은 예를 들어, 리보자임, 엔도뉴클레아제, CRISPR-기반 시스템에 의해서 포저티브 센스 분자 및 네거티브 센스 분자로 절단된다.

[0235] 실시형태에서, dsRNA 바이러스 게놈은 공유된 dsDNA 주형에 측접한 프로모터에 작동 방식으로 연결된 공유된 dsDNA 주형으로부터 전사된다. 하나의 프로모터가 DNA 폴리뉴클레오타이드의 왓슨 가닥으로부터 전사를 유발하고, 이에 의해서 dsRNA 게놈의 포저티브 가닥을 생성시킨다. 나머지 프로모터가 DNA 폴리뉴클레오타이드의 크릭 가닥으로부터 전사를 유발하고, 이에 의해서 dsRNA 게놈의 네거티브 가닥을 생성시킨다. 일부 dsRNA 바이러스, 예를 들어, 레오바이러스는 분절화된 바이러스인데, 이는 이의 게놈이 다수의 RNA 분자, 일부 경우에 dsRNA와

ssRNA의 혼합물로 구성된다는 것을 의미한다. 본 개시내용은 DNA 폴리뉴클레오타이드가 분절 각각을 위한 전사 단위를 포함하는 실시형태를 제공한다. 일부 실시형태에서, 분절은 DNA 폴리뉴클레오타이드의 왓슨 가닥 및/또는 크릭 가닥 상의 몇몇 프로모터로부터 전사된다. 일부 실시형태에서, RNA 분절은 예를 들어, 리보자임, 엔도뉴클레아제, CRISPR-기반 시스템 등에 의해서 하나 이상의 RNA 분절의 전사후 절단에 의해서 생성된다. 일부 실시형태에서, 시스템의 프로모터 중 하나 이상은 T7 프로모터이고, 시스템은 T7 RNA 중합효소를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, T7 시스템의 사용은 dsRNA 바이러스 게놈의 하나 이상의 분절을 위한 네이티브 5' 말단을 생성시킨다. 일부 실시형태에서, 시스템의 프로모터 중 하나 이상은 진핵 활성 프로모터, 예를 들어, 포유동물 프로모터이다.

[0236] ***C. 단일 가닥 DNA 바이러스***

[0237] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 자기-복제 폴리뉴클레오타이드는 단일 가닥 DNA(ssDNA) 바이러스 게놈을 암호화한다. 예시적인 ssDNA 바이러스는 파보바이러스과(예를 들어, 아데노-연관 바이러스), 아넬로바이러스과, 비드나바이러스과(Bidnaviridae family), 씨코바이러스과, 제미니바이러스과, 제노모바이러스과, 이노바이러스과, 마이크로바이러스과, 나노바이러스과, 스마코바이러스과(Smacoviridae) 및 스피라바이러스과의 구성원을 포함한다. 실시형태에서, 자기-복제 폴리뉴클레오타이드는 파보바이러스를 암호화한다. 실시형태에서, 자기-복제 폴리뉴클레오타이드는 아데노-연관 바이러스(AAV)를 암호화한다.

[0238] ***D. 이중 가닥 DNA 바이러스***

[0239] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 자기-복제 폴리뉴클레오타이드는 이중 가닥 DNA(dsDNA) 바이러스 게놈을 암호화한다. 예시적인 dsDNA 바이러스는 미오바이러스과, 파도바이러스과, 시포바이러스과, 알로허피스바이러스과, 허피스바이러스과(예를 들어, HSV-1, HSV-1, 말과 허피스 바이러스), 폭스바이러스과(예를 들어, 백시나 바이러스 및 점액종 바이러스)의 구성원을 포함한다. 실시형태에서, 자기-복제 폴리뉴클레오타이드는 아데노바이러스를 암호화한다.

[0240] ***E. miRNA-약화***

[0241] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 자기-복제 폴리뉴클레오타이드는 하나 이상의 하나 이상의 필수 바이러스 유전자에 삽입된 마이크로 RNA(miRNA) 표적 서열을 포함하는 복제-가능 바이러스 게놈을 암호화한다. miR은 세포 증식 및 아포토시스의 제어에 관여되는 것을 비롯한, 다수의 단백질을 암호화하는 많은 전사체를 조절한다. miR에 의해서 조절되는 예시적인 단백질은 종래의 프로토-종양단백질(proto-oncoprotein) 및 종양 억제인자, 예컨대, Ras, Myc, Bcl2, PTEN 및 p53을 포함한다.

[0242] miRNA는 정상 세포 과정과 밀접하게 연관되며, 이의 이상 조절은 암을 비롯한 광범위한 질환에 기여한다. 중요하게는, miRNA는 정상 조직에 비해서 암 조직에서 구별되게 발현되며, 이는 miRNA 광범위한 암에서 표적화 기전으로서 작용하도록 한다. 암형성, 악성 형질전환, 또는 전이와 (긍정적으로 또는 부정적으로) 연관된 악성 miRNA는 "oncomiR"로 공지되어 있다. 표 2는 특정 암에서 oncomiR의 목록 및 이의 상대적인 발현을 제공한다.

[0243] 일부 양상에서, 특정 miRNA의 발현은 특정 암 및/또는 전이의 발달 및 유지와 긍정적으로 연관된다. 이러한 miR는 본 명세서에서 "종양원성 miRNA" 또는 "oncomiR"로 지칭된다. 일부 실시형태에서, 종양원성 miRNA의 발현은 비암성 대조군 세포(즉, 정상 또는 건강한 세포)에서 관찰되는 발현 수준에 비해서 암성 세포 또는 조직에서 증가되거나, 또는 상이한 암 유형으로부터 유래된 암성 세포에서 관찰되는 발현 수준에 비해서 증가된다. 예를 들어, 암성 세포에서 종양원성 miRNA의 발현은 상이한 암 유형으로부터 유래된 암성 세포 또는 비암성 대조군 세포에서의 종양원성 miRNA의 발현에 비해서 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400%, 500%, 1000% 또는 그 초과만큼 증가될 수 있다. 일부 양상에서, 암성 세포는 비암성 대조군 세포에서 발현되지 않는 종양원성 miRNA를 발현할 수 있다.

[0244] 일부 실시형태에서, 특정 oncomiR의 발현은 특정 암 및/또는 전이의 발달 및 유지와 부정적으로 연관된다. 이러한 oncomiR은 본 명세서에서 "종양-억제인자 miRNA" 또는 "종양-억제성 miRNA"로 지칭되는데, 그 이유는 이의 발현이 암의 발달을 예방 또는 억제하기 때문이다. 일부 실시형태에서, 종양-억제인자 miRNA의 발현은 비암성 대조군 세포(즉, 정상 또는 건강한 세포)에서 관찰되는 발현 수준에 비해서 암성 세포 또는 조직에서 감소되거나, 또는 상이한 암 유형으로부터 유래된 암성 세포에서 관찰되는 종양-억제인자 miRNA의 발현 수준에 비해서 감소된다. 예를 들어, 암성 세포에서 종양-억제인자 miRNA의 발현은 상이한 암 유형으로부터 유래된 암성 세포 또는 비-암성 대조군 세포에서의 종양-억제인자 miRNA의 발현과 비교할 때 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100% 감소될 수 있다. 일부 양상에서, 비-암성 대조군 세

포는 암성 세포에서 발현되지 않는 종양-억제인자 miRNA를 발현할 수 있다.

[0245] 전형적으로, 종양원성 대 종양 억제성 miRNA로서의 특정 miRNA의 명칭은 암의 유형에 따라서 달라질 것이다. 예를 들어, 하나의 miRNA의 발현은 특정 암에서 증가되거나 암의 발달과 연관될 수 있는 반면, 동일한 miRNA의 발현은 상이한 암에서 감소되거나 그 암의 발달의 예방과 연관될 수 있다. 그러나, 일부 miRNA는 암의 유형과 독립적으로 종양원성 miRNA로서 기능할 수 있다. 예를 들어, 일부 miRNA는 분해를 위해서 종양 억제인자 유전자의 mRNA 전사체를 표적으로 함으로써 종양 억제인자 단백질의 발현을 감소시킨다. 표 2는 몇몇 암의 목록 및 각각의 암 유형에서 관찰되는 "상향 조절되는" miRNA 및 "하향 조절되는" miRNA를 제공한다. 표 2에서, 상향 조절되는 miRNA는 특정 암에서 종양원성일 가능성이 있는 miRNA인 반면, 하향 조절되는 miRNA는 특정 암에서 종양-억제성일 가능성이 있다. 추가의 종양-억제성 miRNA의 목록을 표 3에 나타낸다. 표 1은 12종의 선택된 oncomiR(9종의 종양 억제인자 3종의 종양원성 miRNA)과 다수의 암 간의 관계의 관계를 나타낸다.

[0246] 일부 양상에서, 본 명세서에 기재된 폴리뉴클레오타이드에 의해서 생산된 바이러스의 복제는 바이러스 게놈 내의 하나 이상의 위치에 하나 이상의 miRNA 표적 서열을 혼입함으로써 종양 세포에 제한된다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 miRNA 표적 서열은 복제 가능 바이러스 게놈의 5' UTR 및/또는 3' UTR에 혼입된다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 miRNA 표적 서열은 필수 바이러스 유전자의 하나 이상의 유전자좌에 혼입된다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "필수 바이러스 유전자"는 바이러스 복제, 바이러스 유전자 생성물의 감염성 입자로의 조립에 필요하거나 또는 조립된 감염성 입자의 구조적 온전성을 유지시키는데 필요한 바이러스 유전자를 지칭한다. 일부 실시형태에서, 필수 바이러스 유전자는 UL1, UL5, UL6, UL7, UL8, UL9, UL11, UL12, UL14, UL15, UL17, UL18, UL19, UL20, UL22, UL25, UL26, UL26.5, UL27, UL28, UL29, UL30, UL31, UL32, UL33, UL34, UL35, UL36, UL37, UL38, UL39, UL40, UL42, UL48, UL49, UL50, UL52, UL53, UL54, US1, US3, US4, US5, US6, US7, US8, US12, ICP0, ICP4, ICP22, ICP27, ICP47, PB, F, B5R, SERO-1, Cap, Rev, VP1-4, 핵단백질(N), 인단백질(P), 기질 단백질(M), 당단백질(G), 중합효소(L), E1, E2, E3, E4, VP1, VP2, VP3, VP4, 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C 및 3D를 포함할 수 있다.

[0247] 일부 실시형태에서, 필수 바이러스 유전자의 하나 이상의 유전자좌에 삽입된 miRNA 표적 서열은 정상 비암성 세포에 의해서 발현되거나 암성 세포에서 발현되지 않거나 감소된 발현을 나타내는 miRNA에 상응한다. 정상(비암성) 세포에서 발현된 miRNA는 폴리뉴클레오타이드에서 상응하는 표적 서열에 결합하여, miRNA 표적 서열을 함유하는 바이러스 유전자의 발현을 억제할 것이고, 이에 의해서 바이러스 복제 및/또는 감염성 입자로의 구조적 조립이 예방된다. 따라서, miRNA 표적 서열의 삽입은 암호화된 바이러스의 용해성 효과로부터 정상 세포를 보호한다. 일부 실시형태에서, miRNA 표적 서열은 종양-억제성 miRNA(예를 들어, 표 3에 열거된 miRNA)에 대한 표적 서열이다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 8개 또는 적어도 10개의 필수 바이러스 유전자의 유전자좌 내에 삽입된 miRNA 표적 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 miRNA 표적 서열은 하나 이상의 필수 바이러스 유전자의 5' 비번역 영역(UTR) 및/또는 3' UTR 내에 혼입된다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 miRNA 표적 서열은 바이러스 게놈 내의 비필수 유전자(예를 들어, 감마 34.5)의 3' 또는 5' UTR 내에 혼입된다.

[0248] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 폴리뉴클레오타이드는 필수 바이러스 유전자의 유전자좌 내에 혼입된 miRNA 표적 서열을 포함한다. 일부 양상에서, 본 명세서에 기재된 자기-복제 폴리뉴클레오타이드는 하나 이상의 필수 바이러스 유전자 내에 혼입된 복수의 miRNA 표적 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 복수(예를 들어, 2개 이상)의 필수 바이러스 유전자의 유전자좌 내에 혼입된 miRNA 표적 서열을 포함한다. 예를 들어, 본 명세서에 기재된 폴리뉴클레오타이드는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 그 초과의 필수 바이러스 유전자 내에 삽입된 miRNA 표적 서열을 포함할 수 있다. 이러한 실시형태에서, 각각의 필수 바이러스 유전자는 하나의 miRNA 표적 서열을 포함할 것이고, 전체로서의 폴리뉴클레오타이드는 복수의 miRNA 표적 서열을 포함할 것이다. 이러한 실시형태에서, 복수의 miRNA 표적 서열은 동일한 miRNA에 상응할 수 있다. 예를 들어, 본 명세서에 기재된 폴리뉴클레오타이드는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 그 초과의 필수 바이러스 유전자 내에 삽입된 동일한 miRNA 표적 서열을 포함할 수 있다. 이러한 실시형태에서, 복수의 miRNA 표적 서열은 2개 이상의 상이한 miRNA에 상응할 수 있다. 예를 들어, 본 명세서에 기재된 폴리뉴클레오타이드는 제1 필수 바이러스 유전자 내에 삽입된 제1 miRNA에 상응하는 miRNA 표적 서열, 제2 필수 바이러스 유전자 내에 삽입된 제2 miRNA에 상응하는 miRNA 표적 서열, 제3 필수 바이러스 유전자 내에 삽입된 제 3miRNA에 상응하는 miRNA 표적 서열을 포함할 수 있다.

[0249] 일부 실시형태에서, miRNA 표적 서열의 복수의 카피는 필수 바이러스 유전자의 유전자좌 내에 혼입된다. 예를

들어, 일부 실시형태에서, miRNA 표적 서열의 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 그 초과의 카피가 필수 바이러스 유전자의 유전자좌 내에 삽입될 수 있다. 일부 실시형태에서, 필수 바이러스 유전자의 유전자좌 내에 삽입된 복수의 miRNA 표적 서열 각각은 동일한 miRNA에 상응한다. 일부 실시형태에서, 필수 바이러스 유전자의 유전자좌 내에 삽입된 복수의 miRNA 표적 서열 각각은 상이한 miRNA에 상응한다. 예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 그 초과의 상이한 miRNA에 상응하는 miRNA 표적 서열은 필수 바이러스 유전자의 유전자좌 내에 삽입될 수 있다.

[0250] 일부 실시형태에서, miRNA 표적 서열의 복수의 카피는 복수의 필수 바이러스 유전자의 유전자좌 내에 혼입된다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, miRNA 표적 서열의 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 그 초과의 카피가 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 그 초과의 필수 바이러스 유전자의 유전자좌 내에 삽입될 수 있다. 일부 실시형태에서, 특정 필수 바이러스 유전자 내에 삽입된 복수의 miRNA 표적 서열은 모두 동일한 miRNA에 상응할 수 있다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 제1 필수 바이러스 유전자는 제1 miRNA에 각각 상응하는 복수의 miRNA 표적 서열을 포함할 수 있고, 제2 필수 바이러스 유전자는 각각 제2 miRNA에 상응하는 복수의 miRNA 표적 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 자기-복제 폴리뉴클레오타이드는 각각 제3, 제4, 제5, 제6, 제7, 제8, 제9 또는 제10 miRNA 각각에 상응하는 복수의 miRNA 표적 서열을 포함하는 제3, 제4, 제5, 제6, 제7, 제8, 제9 또는 제10 필수 바이러스 유전자를 추가로 포함할 수 있다.

[0251] 일부 실시형태에서, 상이한 miRNA에 상응하는 복수의 miRNA 표적 서열이 복수의 필수 바이러스 유전자 유전자좌에 삽입된다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 제1 필수 바이러스 유전자는 2개 이상의 상이한 miRNA에 상응하는 복수의 miRNA 표적 서열을 포함할 수 있고, 제2 필수 바이러스 유전자는 2개 이상의 상이한 miRNA에 상응하는 복수의 miRNA 표적 서열을 포함할 수 있다. 이러한 실시형태에서, 제1 필수 바이러스 유전자 내의 miRNA 표적 서열은 제2 필수 바이러스 유전자 내의 miRNA 표적 서열과 동일하거나 상이할 수 있다. 일부 실시형태에서, 자기-복제 폴리뉴클레오타이드는 제3, 제4, 제5, 제6, 제7, 제8, 제9 또는 제10 필수 바이러스 유전자를 추가로 포함할 수 있는데, 이들 각각은 상이한 miRNA 각각에 상응하는 복수의 miRNA 표적 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1, 제2, 제3, 제4, 제5, 제6, 제7, 제8, 제9 또는 제10 필수 바이러스 유전자의 임의 중 하나에서의 miRNA 표적 서열은 다른 필수 바이러스 유전자 중 임의의 것의 miRNA 표적 서열과 동일할 수 있다. 일부 실시형태에서, 제1, 제2, 제3, 제4, 제5, 제6, 제7, 제8, 제9 또는 제10 필수 바이러스 유전자의 임의 중 하나에서의 miRNA 표적 서열은 다른 필수 바이러스 유전자 중 임의의 것의 miRNA 표적 서열과 상이할 수 있다.

[0252] 일부 실시형태에서 복수의 miRNA 표적 서열은 하나 이상의 필수 바이러스 유전자의 유전자좌에 탠덤으로 삽입되고 링커 서열 또는 스페이서 서열에 의해 서로 분리된다. 일부 실시형태에서, 링커 또는 스페이서 공간 서열은 4개 이상의 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 링커 또는 스페이서 공간 서열은 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 그 초과의 뉴클레오타이드를 포함한다. 일 실시형태에서, 링커 서열 또는 스페이서 서열은 적어도 4 내지 적어도 6개의 뉴클레오타이드를 포함한다.

[0253] 일부 실시형태에서, 하기 소단위 중 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 그 초과가 하나 이상의 필수 바이러스 유전자의 유전자좌 내에 탠덤으로 삽입된다: (a) 제1 miRNA에 대한 표적 서열 - 링커 또는 스페이서 서열 - 제1 miRNA에 대한 표적 서열; 또는 (b) 제1 miRNA에 대한 표적 서열 - 링커 또는 스페이서 서열 - 제2 miRNA에 대한 표적 서열. 일부 실시형태에서, miRNA 표적 서열은 표 3에 열거된 miRNA 중 임의의 하나 이상에 대한 표적 서열이다.

[0254] ***F. 페이로드 분자***

[0255] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 폴리뉴클레오타이드는 페이로드 분자를 암호화하는 핵산 서열을 포함한다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "페이로드 분자"("치료 분자"로도 지칭됨)는 본 명세서에 기재된 자기-복제 폴리뉴클레오타이드 또는 이의 감염성 입자에 의해서 암호화된 바이러스의 치료 효능을 추가로 향상시킬 수 있는 임의의 분자를 지칭한다. 본 개시내용에 사용하기에 적합한 페이로드 분자는 단백질 또는 펩타이드, 예컨대, 세포독성 펩타이드, 면역 조절성 펩타이드(예를 들어, 항원-결합 분자, 예컨대, 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 사이토카인, 케모카인, 가용성 수용체, 세포-표면 수용체 리간드, 이분 펩타이드 및 효소를 포함한다. 이러한 페이로드 분자는 또한 핵산(예를 들어, shRNA, siRNA, 안티센스 RNA, 안타고머, 리보자임 및 압타머)을 포함할 수 있다. 페이로드 분자의 특성은 질환 유형 및 목적하는 치료 결과에 따라서 달라질 것이다.

[0256] 일부 실시형태에서, 하나 이상의 miRNA 표적 서열은 페이로드 분자를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열의 3' 또는 5' UTR 내에 혼입된다. 이러한 실시형태에서, 페이로드의 번역 및 후속 발현은 상응하는 miRNA가 발현되는 세포에서 일어어나지 않거나, 또는 실질적으로 감소된다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 miRNA 표적 서열은

치료 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열의 3' 및/또는 5' UTR 내에 삽입된다.

[0257] 일부 실시형태에서, 치료 분자의 발현은 암 세포에서 비암성 세포에 비해서 치료 분자의 증가된 발현을 유도하는 전사 제어 요소에 의해서 추가로 조절될 수 있다(예를 들어, hTERT, HE4, CEA, OC, ARF, CgA, GRP78, CXCR4, HMGB2, INSM1, 메소텔린, OPN, RAD51, TETP, H19, uPAR, ERBB2, MUC1, Frz1, IGF2-P4, 또는 하이폭시아(hypoxia) (HRE) 및 방사선 반응 요소로부터 유래된 프로모터). 일부 실시형태에서, 페이로드 분자의 발현은 자기-복제 폴리뉴클레오타이드와 동일한 전사 조절 요소의 제어 하에 있다.

[0258] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 재조합 핵산 분자는 자기-복제 폴리뉴클레오타이드를 포함하고, 세포독성 펩타이드를 암호하하는 폴리뉴클레오타이드를 추가로 포함한다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "세포독성 펩타이드"는 숙주 세포에서 발현되는 경우에는 세포사를 그리고/또는 숙주 세포에 의해서 분비되는 경우에는 이웃 세포의 세포사를 유도할 수 있는 단백질을 지칭한다. 일부 실시형태에서, 세포독성 펩타이드는 카스파제, p53, 디프테리아 독소(DT), 슈도모나스 외독소 A(PEA), I형 리보솜 불활성화 단백질(RIP)(예를 들어, 사포린 및 젤로닌), II형 RIP(예를 들어, 리신), 쉬가-유사 독소 1(Slt1), 감광성 반응성 산소 종(예를 들어, 킬러-레드)이다. 특정 실시형태에서, 세포독성 펩타이드는 자살 유전자, 예컨대, 카스파제 유전자에 의해서 암호화되어, 아포토시스를 통한 세포사를 초래한다.

[0259] 일부 실시형태에서, 페이로드는 면역 조절성 펩타이드이다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "면역 조절성 펩타이드"는 특정 면역 수용체 및/또는 경로를 조절(예를 들어, 활성화 또는 저해)할 수 있는 펩타이드이다. 일부 실시형태에서, 면역 조절성 펩타이드는 면역 세포, 조직 세포 및 간질 세포에 대해서 작용할 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 면역 조절성 펩타이드는 면역 세포 예컨대, T 세포, NK 세포, NKT T 세포, B 세포, 수지상 세포, 마크로파지, 호염기, 비만 세포 또는 호산구에 작용한다. 예시적인 면역-조절성 펩타이드는 항원-결합 분자, 예컨대, 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 사이토카인, 케모카인, 가용성 수용체, 세포-표면 수용체 리간드, 이분 펩타이드 및 효소를 포함한다.

[0260] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 재조합 핵산 분자는 자기-복제 폴리뉴클레오타이드를 포함하고, 사이토카인, 예컨대, IL-1, IL-12, IL-15, IL-18, TNFα, IFNα, IFNβ 또는 IFNɣ를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 재조합 핵산 분자는 자기-복제 폴리뉴클레오타이드를 포함하고, 케모카인, 예컨대, CXCL10, CXCL9, CCL21, CCL4 또는 CCL5를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 재조합 핵산 분자는 자기-복제 폴리뉴클레오타이드를 포함하고, 세포-표면 수용체에 대한 리간드, 예컨대, NKG2D 리간드, 뉴로필린 리간드, Flt3 리간드, CD47 리간드(예를 들어, SIRP1α)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 재조합 핵산 분자는 자기-복제 폴리뉴클레오타이드를 포함하고, 가용성 수용체, 예컨대, 가용성 사이토카인 수용체(예를 들어, IL-13R, TGFβR1, TGFβR2, IL-35R, IL-15R, IL-2R, IL-12R 및 인터페론 수용체) 또는 가용성 선천 면역 수용체(예를 들어, 톨-유사 수용체, 보체 수용체 등)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 재조합 핵산 분자는 자기-복제 폴리뉴클레오타이드를 포함하고, 세포내 RNA 및/또는 DNA 감지에 관여되는 단백질의 우세한 효능제 돌연변이체(예를 들어, STING, RIG-1 또는 MDA-5의 우세한 효능제 돌연변이체)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 추가로 포함한다.

[0261] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 재조합 핵산 분자는 자기-복제 폴리뉴클레오타이드를 포함하고, 항원-결합 분자, 예컨대, 항체 또는 이의 항원 결합 단편(예를 들어, 단일 쇄 가변 단편(scFv), F(ab) 등)을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 항원-결합 분자는 세포 표면 수용체, 예컨대, 면역 관문 수용체(예를 들어, PD1, PDL1 및 CTLA4) 또는 세포 성장 및 활성화에 관여되는 추가적인 세포 표면 수용체(예를 들어, OX40, CD200R, CD47, CSF1R, 41BB, CD40 및 NKG2D)에 특이적으로 결합한다.

[0262] 일부 실시형태에서, 페이로드 분자는 전갈 폴리펩타이드, 예컨대, 클로로톡신, BmKn-2, 네오플라딘 1, 네오플라딘 2 및 마우리포린이다. 일부 실시형태에서, 치료 분자는 뱀 폴리펩타이드, 예컨대, 콘토르트로스타틴(contortrostatin), 아폭신-I, 보트롭스톡신(bothropstoxin)-I, BJcuL, OHAP-1, 로도스토민, drCT-I, CTX-III, B1L 및 ACTX-6이다. 일부 실시형태에서, 페이로드 분자는 거미 폴리펩타이드, 예컨대, 라타신 및 히알루로니다제이다. 일부 실시형태에서, 페이로드 분자는 벌 폴리펩타이드, 예컨대, 멜리틴 및 아파민이다. 일부 실시형태에서, 페이로드 분자는 개구리 폴리펩타이드, 예컨대, PsT-1, PdT-1 및 PdT-2이다.

[0263] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 재조합 핵산 분자는 자기-복제 폴리뉴클레오타이드를 포함하고, 효소를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 효소는 세포외 기질을 변경시키는 방식에 의해서 종양 미세환경을 조절할 수 있다. 이러한 실시형태에서, 효소는 기질 메탈로프로테아제(예를 들어,

MMP9), 콜라게나제, 히알루로니다제, 젤라티나제 또는 엘라스타제를 포함할 수 있지만 이들로 제한되지 않는다. 일부 실시형태에서, 효소는 유전자 지시 효소 전구약물 요법(GDEPT) 시스템의 부분, 예컨대, 단순 포진 바이러스 티미딘 카이나제, 사이토신 데아미나제, 나이트로리덕타제, 카복시펩티다제 G2, 퓨린 뉴클레오사이드 포스포릴라제 또는 사이토크롬 P450이다. 일부 실시형태에서, 효소는 표적 세포에서 세포사 경로를 유도하거나 또는 활성화시킬 수 있다(예를 들어, 카스파제).

[0264] 일부 실시형태에서, 페이로드 분자는 이분 펩타이드이다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "이분 펩타이드"는 비암성 효과기 세포 상에서 발현되는 세포 표면 항원에 결합할 수 있는 제1 도메인 및 표적 세포(예를 들어, 암성 세포, 종양 세포 또는 상이한 유형의 효과기 세포)에 의해서 발현되는 세포-표면 항원에 결합할 수 있는 제2 도메인으로 구성된 다량체 단백질을 지칭한다. 일부 실시형태에서, 이분 폴리펩타이드의 개별 폴리펩타이드 도메인은 항체 또는 이의 결합 단편(예를 들어, 단일 쇄 가변 단편(scFv) 또는 F(ab)) 전갈 폴리펩타이드, 다이아바디, 플렉시바디, DOCK-AND-LOCK(상표명) 항체, 또는 단클론성 항유전자형 항체(mAb2)를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 이분 폴리펩타이드의 구조는 이중-가변 도메인 항체 (DVD-Ig(상표명)), Tandab(등록상표), 이중특이적 T 세포 인게이저 (BiTE(상표명)), DuoBody(등록상표), 또는 이중 친화성 재표적화(DART) 폴리펩타이드일 수 있다. 일부 실시형태에서, 이분 폴리펩타이드는 BiTE이고, 표 6 및/또는 표 7에 제시된 항원에 특이적으로 결합하는 도메인을 포함한다. 예시적인 BiTE를 하기 표 5에 나타낸다.

*표 5*

**전임상 연구 및 임상 연구에서 사용되는 검증된 BiTE**

| 표적 | 명칭 | 표적 질환 | 임상적 상태 | 참고문헌 |
|---|---|---|---|---|
| CD19 | 블리나투모맙/MT-103/MEDI-538 | NHL, ALL | I/II/III상 | 1,2,3,4,5,6 |
| EpCAM | MT110 | 고형 종양 | I상 | 7, 8, 9, 10 |
| CEA | MT111/MEDI-565 | GI선암종 | I상 | 11,12 |
| PSMA | BAY2010112/AMG112 | 전립선 | I상 | 13 |
| CD33 | AMG330 | AML | 전임상 | 14,15 |
| EGFR | C-BiTE 및 P-BiTE 항체 | 결장직장암 | 전임상 | 16 |
| Her2 | FynomAb, COVA420, HER2-BsAb | 유방 및 위 암종 | 전임상 | 17,18 |
| EphA2 | bscEphA2xCD3 | 복수의 고형 종양 | 전임상 | 19 |
| MCSP | MCSP-BiTE | 흑색종 | 전임상 | 20 |
| ADAM17 | A300E | 전립선암 | 전임상 | 21 |
| PSCA | CD3-PSCA(MB1) | 전립선암 | 전임상 | 22 |
| 17-A1 | CD3/17-1A-이중특이적 | 결장직장암 | 전임상 | 23 |
| NKG2D 리간드 | scFv-NKG2D,huNKG2D-OKT3 | 복수의 고형 및 액상 종양 | 전임상 | 24,25 |
| DLL3 | AMG757 | 소세포폐암 | 임상 | 26. |

[0265]

[0266] 일부 실시형태에서, 효과기 세포 상에서 발현되는 세포-표면 항원은 하기 표 6으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 종양 세포 또는 효과기 세포 상에서 발현되는 세포-표면 항원은 하기 표 7로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 종양 세포 상에서 발현되는 세포-표면 항원은 종양 항원이다. 일부 실시형태에서, 종양 항원은 CD19, EpCAM, CEA, PSMA, CD33, EGFR, Her2, EphA2, MCSP, ADAM17, PSCA, 17-A1, NKGD2 리간드, CSF1R, FAP, GD2, DLL3 또는 뉴로필린으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 종양 항원은 표 7에 열거된 것으로부터 선택된다.

표 6

예시적인 효과기 세포 표적 항원

| T 세포 | | NKT 세포 | NK 세포 | 기타 |
|---|---|---|---|---|
| CD3 | CD30 | CD3 | CD16 | CD48 |
| CD3γ | CD38 | CD3γ | CD94/NKG2(예를 들어, NKG2D) | LIGHT |
| CD3δ | CD40 | CD3δ | NKp30 | CD44 |
| CD3ε | CD57 | CD3ε | NKp44 | CD45 |
| CD3ζ | CD69 | CD3ζ | NKp46 | IL-1R2 |
| CD2 | CD70 | 불변 TCR | KAR | IL-1Rα |
| CD4 | CD73 | | | IL-1Rα2 |
| CD5 | CD81 | | | IL-13Rα2 |
| CD6 | CD82 | | | IL-15Ra |
| CD7 | CD96 | | | CCR5 |
| CD8 | CD134 | | | CCR8 |
| CD16 | CD137 | | | |
| CD25 | CD152 | | | |
| CD27 | CD278 | | | |
| CD28 | | | | |

[0267]

표 7

예시적인 표적 세포 항원

| 표적 세포 항원 | | | |
|---|---|---|---|
| 8H9 | CRISP3 | 루이스(Lewis)-Y | SOX2 |
| GnT-V, β1,6-N | DC-SIGN | LIV-1 | STEAP1 |
| AFP | DHFR | 리빈(Livin) | SLITRK6 |
| ART1 | EGP40 | LAMP1 | NaPi2a |
| ART4 | EZH2 | MAGEA3 | SOX1 |
| ABCG2 | EpCAM | MAGEA4 | SOX11 |
| B7-H3 | EphA2 | MAGEB6 | SPANXA1 |
| B7-H4 | EphA2/Eck | MAGEA1 | SART-1 |
| B7-H6 | EGFRvIII | MART-1 | SSX4 |
| BCMA | E-카데린 | MCSP | SSX5 |
| B-사이클린 | EGP2 | MME | 서바이빈 |
| BMI1 | ETA | 메조톨린 | SSX2 |
| CA-125 | ERBB3 | MAPK1 | TAG72 |
| 카데린 | ERBB3/4 | MUC16 | TEM1 |
| CABYR | ERBB4 | MUC1 | TEM8 |
| CTAG2 | EPO | MRP-3 | TSGA10 |
| CA6 | FAR | MyoD-1 | TSSK6 |
| CAIX | FBP | NCAM | 티로글로불린 |
| CEA | FTHL17 | 넥틴 4 | 트랜스페린 수용체 |
| CEACAM5 | 태아 AchR | 네스틴 | TMEM97 |
| Cav-1 | FAP | NEP | TRP-2 |
| CD10 | FGFR3 | NY-ESO-1 | TULP2 |
| CD117 | FR-a | hHLA-A | TROP2 |
| CD123 | Fra-l/Fosl 1 | H60 | 타이로시나제 |
| CD133 | GAGE1 | OLIG2 | TRP1 |
| CD138 | GD2 | 5T4 | UPAR |
| CD15 | GD3 | p53 | VEGF |
| CD171 | Glil | P-카데린 | VEGF 수용체 |
| CD19 | GP100 | PB | VEGRR2 |
| CD20 | GPA33 | P-당단백질 | BRAF |
| CD21 | 글라이피칸-3 | PRAME | WT-1 |
| CD22 | HIV gp120 | PROX1 | XAGE2 |
| CD30 | HLA-A | PSA | ZNF165 |
| CD33 | HLA-A2 | PSCA | $\alpha_v\beta_6$ 인테그린 |
| CD38 | HLA-AI | PSMA | β-카테닌 |

[0268]

| 표적 세포 항원 | | | |
|---|---|---|---|
| CD44v6 | HLA-B | PSC1 | 카텝신 B |
| CD44v7/8 | HLA-C | Ras | CSAG2 |
| CD74 | HMW-MAA | ROR1 | CTAG2 |
| Cd79b | Her2/Neu | SART2 | EGFR |
| Ki-67 | u70/80 | SART3 | EGP40 |
| CSPG4 | LICAM | 피브로넥틴의 태아종양 변이체 | EZH2 |
| CALLA | ULBP1 | 테나신 | HIV sp120 |
| CSAG2 | ULBP2 | LICAM | 카파 경쇄 |
| COX-2 | ULBP3 | Rae-1α | LDHC |
| 람다 | MICA | Rae-1β | TRP-1 |
| LAYN | MICB | Rae-1δ | Fas-L |
| LeuM-1 | Her3 | Rae-1γ | |
| KDR | EGF | PDGF | |
| CD47 | SIRP1α | Fas | DLL3 |

[0269]

[0270] **III. 자기-복제 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 핵산 분자의 생산 방법**

[0271] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 재조합 핵산 분자는 하나 이상의 벡터를 사용하여 시험관내에서 생산된다. 용어 "벡터"는 본 명세서에서 또 다른 핵산 분자를 전달 또는 수송할 수 있는 핵산 분자를 지칭하기 위해서 사용된다. 전달된 핵산은 일반적으로 벡터 핵산 분자 내에 삽입된다. 벡터는 세포 내에서 자율적인 복제를 지시하는 서열을 포함할 수 있고/있거나 숙주 세포 DNA 내의 통합을 허용하기에 충분한 서열을 포함할 수 있다.

[0272] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 재조합 핵산 분자는 플라스미드 골격 내의 본 명세서에 기재된 자기-복제 폴리뉴클레오타이드의 삽입에 의해서 생산된다.

[0273] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 재조합 핵산 분자는 하나 이상의 바이러스 벡터를 사용하여 생산된다. 바이러스 벡터는 때로는 "재조합 바이러스" 또는 "바이러스"라 지칭될 수 있다. 일부 실시형태에서, 2-벡터 시스템이 사용된다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 자기-복제 폴리뉴클레오타이드는 AAV-유래된 ITR이 측접된다. 이어서 ITR-측접 폴리뉴클레오타이드는 제1 발현 벡터 내에 삽입되고, ITR-매개된 복제를 위해서 필요한 AAV 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, Rep78 및 Rep52)는 제2 발현 벡터 내에 삽입된다. 이러한 실시형태에서, 제1 벡터 및 제2 벡터는 (예를 들어, 형질주입, 형질도입, 전기천공법 등에 의해서) 적합한 숙주 세포(예를 들어, 곤충 세포주)에 전달되어, 세포를 생산하는데, 여기서 ITR-측접 폴리뉴클레오타이드는 숙주 세포의 게놈 내에 안정적으로 통합된다. 일부 실시형태에서, 제1 벡터 및 제2 벡터는 허피스 바이러스 발현 벡터이다. 일부 실시형태에서, 제1 벡터 및 제2 벡터는 바큘로바이러스 발현 벡터이다. 이러한 발현 시스템은 예를 들어, 문헌[Li *et al.*, Plos One, 8:8, 2013]에 기재되어 있다. 일부 실시형태에서, 숙주 세포는 ITR의 부재 하에서 생산되는 양을 초과하는 양으로 ITR-측접 자기-복제 폴리뉴클레오타이드를 생산한다. 일부 실시형태에서, ITR-측접 트랜스젠이 형질주입된 숙주 세포로부터의 ITR-측접 바이러스 게놈 DNA는 (예를 들어, 재조합 바큘로바이러스 감염을 통해서) ITR을 함유하지 않는 트랜스젠이 유사하게 형질주입된 것보다 4 내지 60배 더 많은 DNA를 생산할 수 있다(문헌[Li *et al*, PLoS One, 2013] 참고).

[0274] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 폴리뉴클레오타이드는 단일-벡터 발현 시스템을 사용하여 시험관내에서 생산된다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, AAV ITR이 측접된 본 명세서에 기재된 자기-복제 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현 카세트는 UL3과 UL4 유전자 사이에(예를 들어, 유전자 사이의 유전자좌 내에) 또는 재조합 HSV 게놈 골의 ICP4 유전자좌에 삽입된다(예를 들어, 도 4B 및 도 5B 참고). ITR-매개된 복제(예를 들어, Rep78 및 Rep52)를 위해서 필요한 AAV 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 제2 발현 카세트는 재조합 HSV 게놈 골격의 ICP0 또는 ICP4 유전자좌 내에 삽입된다. Rep 단백질의 발현은 단일 벡터로부터의 ITR-측접 폴리뉴클레오타이드의 효율적인 복제를 가능하게 한다. 일부 실시형태에서, Rep 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 조절성 또는 유도성 프로모터에 작동 가능하게 연결된다.

[0275] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 재조합 핵산 분자는 (예를 들어, 형질주입, 형질도입, 전기천공법 등에 의해서) 세포내에서 적합한 숙주 세포에서 ITR-측접 자기-복제 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현 카세트 및 ITR-매개된 복제를 위해서 필요한 AAV 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이를 포함하는 발현 카세트를 포함하는 HSV 벡터에서 생산된다. 적합한 숙주 세포는 곤충 세포주 및 포유동물 세포주를 포함한다. HSV 벡터를 포함하는 숙주-세포는 삽입된 발현 카세트의 발현 및 재조합 DNA 분자의 생산을 허용하는 적절한 시간 동안 배양된

다. 이어서, 재조합 DNA 분자는 숙주 세포 DNA로부터 단리되고, 치료 용도를 위해서 제형화된다(예를 들어, 입자 내에 캡슐화됨).

[0276] 일부 실시형태에서, 상기에 기재된 AAV-ITR 시스템에 의해서 생산된 재조합 DNA 분자는 각각의 말단에서 함께 공유 결합되는 2개의 단일 가닥 DNA 분자의 생산을 초래한다. 예를 들어, 제1 DNA 분자의 5' ITR은 제2 DNA 분자의 3' ITR에 공유 결합되고, 제1 DNA 분자의 3' ITR은 제2 DNA 분자의 5' ITR에 공유 결합된다. 이러한 실시형태에서, 공유 결합된 ITR-측접 폴리뉴클레오타이드는 본 명세서에서 NanoV 분자로 지칭되는 단부-폐쇄, 선형 듀플렉스 종양용해 바이러스 핵산 분자를 형성한다. 일부 실시형태에서, 단일 가닥 DNA 분자 각각은 단일 ITR-측접 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, NanoV 분자는 2개의 ssDNA 분자를 포함하며, 여기서 하나의 ssDNA 분자는 하기 구조를 포함하고: 5' - ITR - [자기-복제 폴리뉴클레오타이드의 센스 서열] - ITR - 3'; 여기서 하나의 ssDNA 분자는 하기 구조를 포함한다: 3' - ITR - [자기-복제 폴리뉴클레오타이드의 안티센스 서열] - ITR - 5'. 일부 실시형태에서, 단일 가닥 DNA 분자 각각은 2개 이상의 ITR-측접 폴리뉴클레오타이드(즉, ITR-측접 폴리뉴클레오타이드의 콘카타머(concantamer))를 포함한다. ITR-측접 폴리뉴클레오타이드의 콘카타머는 다양한 배향을 가질 수 있다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 콘카타머는 헤드-대-헤드 배향 또는 테일-대-테일 배향으로 형성된다.

[0277] **IV. 자기-복제 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 입자**

[0278] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 폴리뉴클레오타이드는 "입자" 내에 캡슐화된다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 입자는 비조직 유래된 물질의 조성물, 예컨대, 리포솜, 리포플렉스, 나노입자, 나노캡슐, 마이크로입자, 마이크로구체, 지질 입자, 엑소좀, 소포 등을 지칭한다. 특정 실시형태에서, 입자는 비단백질성 및 비면역원성이다. 이러한 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 폴리뉴클레오타이드의 캡슐화는 전신 항바이러스 면역 반응을 유도하지 않으면서 바이러스 페이로드의 전달을 가능하게 하고, 중화 항바이러스 항체의 효과를 완화시킨다. 추가로, 본 명세서에 기재된 폴리뉴클레오타이드의 캡슐화는 분해로부터 폴리뉴클레오타이드를 차폐하고, 폴리뉴클레오타이드가 표적 숙주 세포 내로 도입되는 것을 용이하게 한다.

[0279] 일부 실시형태에서, 입자는 대상체에서 생분해성이다. 이러한 실시형태에서, 입자의 다회 용량이 대상체에서 입자의 축적 없이 대상체에게 투여될 수 있다. 적합한 입자의 예는 폴리스타이렌 입자, 폴리(락트산-코-글리콜산) PLGA 입자, 폴리퀍타이드계 양이온성 중합체 입자, 사이클로덱스트린 입자, 키토산 입자, 지질계 입자, 폴리(β-아미노 에스터) 입자, 저분자량 폴리에틸렌이민 입자, 폴리포스포에스터 입자, 다이설파이드 가교 중합체 입자, 폴리아마이도아민 입자, 폴리에틸렌이민(PEI) 입자 및 PLURIONICS 안정화된 폴리프로필렌 설파이드 입자를 포함한다.

[0280] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 폴리뉴클레오타이드는 "무기 입자" 내에 캡슐화된다. 일부 실시형태에서, 무기 입자는 금 나노입자(GNP), 금 나노 막대(GNR), 자성 나노입자(MNP), 자성 나노튜브(MNT), 탄소 나노혼(CNH), 탄소 플러렌, 탄소 나노튜브(CNT), 인산칼슘 나노입자(CPNP), 메조포러스 실리카 나노입자(MSN), 실리카 나노튜브(SNT) 또는 스타라이크 중공 실리카 나노입자(SHNP)이다.

[0281] ***A. 엑소좀***

[0282] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 폴리뉴클레오타이드는 엑소좀 내에 캡슐화된다. 엑소좀은 모체 세포의 원형질막(예를 들어, 엑소좀이 방출된 세포, 명세서에서 공여자 세포로 지칭됨)과 다포체(multivesicular body)의 융합 후 세포외 환경으로 방출되는 식작용 기원의 작은 막 소포이다. 엑소좀의 표면은 모체 세포의 세포막으로부터 유래된 지질 이중층을 포함하고, 모체 세포 표면 상에서 발현되는 막 단백질을 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 엑소좀은 또한 모체 세포로부터의 사이토졸을 함유할 수 있다. 엑소좀은 상피 세포, B 및 T 림프구, 비만 세포(MC) 및 수지상 세포(DC)를 비롯한 다수의 상이한 유형에 의해서 생산되며, 혈장, 소변, 기관지폐포세척액(bronchoalveolar lavage fluid), 장 상피 세포 및 종양 조직에서 식별된다. 엑소좀의 조성은 그것이 유래된 모체 세포 유형에 좌우되기 때문에, "엑소좀-특이적" 단백질은 존재하지 않는다. 그러나, 다수의 엑소좀은 엑소좀이 모체 세포에서 기원한 세포내 소포와 연관된 단백질(예를 들어, 엔도솜 및 리소좀과 연관되고/되거나 이에 의해서 발현되는 단백질)을 포함한다. 예를 들어, 엑소좀은 항원 제시 분자, 예컨대, 주조직적합 복합체(major histocompatibility complex) I 및 II(MHC-I 및 MHC-II), 테트라스패닌(예를 들어, CD63), 몇몇 열 충격 단백질, 세포골격 성분, 예컨대, 액틴 및 튜불린, 세포내 막 융합에 관여되는 단백질, 세포-세포 상호작용(예를 들어, CD54), 신호 전달 단백질 및 사이토졸 효소에서 풍부할 수 있다.

[0283] 엑소좀은 엑소좀막과 표적 세포의 원형질막의 융합에 의해서 세포 단백질을 하나의 세포(예를 들어, 모체 세

포)로부터 표적 또는 수용자 세포로 전달하는 것을 매개할 수 있다. 이와 같이, 엑소좀에 의해서 캡슐화된 물질을 변형시키는 것은, 외인성 작용제, 예컨대, 본 명세서에 기재된 폴리뉴클레오타이드가 표적 세포에 도입될 수 있는 기전을 제공한다. 하나 이상의 외인성 작용제(예를 들어, 본 명세서에 기재된 폴리뉴클레오타이드)를 함유하도록 변형된 엑소좀은 본 명세서에서 "변형된 엑소좀"으로 지칭된다. 일부 실시형태에서, 변형된 엑소좀은 모체 세포에 도입된 외인성 작용제(예를 들어, 본 명세서에 기재된 폴리뉴클레오타이드)의 도입에 의해서 생산된다. 이러한 실시형태에서, 외인성 핵산은 모체 엑소좀-생산 세포에 도입되어 외인성 핵산 자체 또는 외인성 핵산의 전사체는 모체 세포로부터 생산된 변형된 엑소좀 내에 혼입되도록 한다. 외인성 핵산은 당업계에 공지된 수단, 예를 들어, 형질도입, 형질주입, 형질전환 및/또는 외인성 핵산의 미세주사에 의해서 모체 세포에 도입될 수 있다.

[0284] 일부 실시형태에서, 변형된 엑소좀은 본 명세서에 기재된 폴리뉴클레오타이드를 엑소좀에 직접 도입함으로써 생산된다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 폴리뉴클레오타이드는 무손상 엑소좀에 도입된다. "무손상 엑소좀"은 그것이 생산된 모체 세포로부터 유래된 단백질 및/또는 유전 물질을 포함하는 엑소좀을 지칭한다. 무손상 엑소좀을 얻는 방법은 당업계에 공지되어 있다(예를 들어, 문헌[Alvarez-Erviti L. *et al.*, Nat Biotechnol. 2011 Apr; 29(4):34-5; Ohno S, *et al.*, Mol Ther 2013 Jan; 21(1):185-91]; 및 유럽 특허 공개 제2010663호 참고).

[0285] 특정 실시형태에서, 외인성 작용제(예를 들어, 본 명세서에 기재된 폴리뉴클레오타이드)는 빈(empty) 엑소좀에 도입된다. "빈 엑소좀"은 모체 세포로부터 유래된 단백질 및/또는 유전 물질(예를 들어, DNA 또는 RNA)이 없는 엑소좀을 지칭한다. 빈 엑소좀(예를 들어, 모체 세포-유래된 유전 물질이 없는 것)을 생산하는 방법은, UV-노출, 엑소좀 내의 핵산의 로딩을 매개하는 내인성 단백질의 돌연변이/결실, 뿐만 아니라 전기천공법 및 내인성 유전 물질이 개방 기공을 통해서 엑소좀을 통과하도록 엑소좀 막에서 기공을 개방시키기 위한 화학적 처리를 비롯하여 당업계에 공지되어 있다. 일부 실시형태에서, 빈 엑소좀은 pH가 약 9 내지 약 14인 수성 용액으로의 처리에 의해서 엑소좀을 개방시켜 엑소좀 막을 얻고, 소포내 성분(예를 들어, 소포내 단백질 및/또는 핵산)을 제거하고, 엑소좀 막을 재조립하여 빈 엑소좀을 형성함으로써 생산된다. 일부 실시형태에서, 소포내 성분(예를 들어, 소포내단백질 및/또는 핵산)은 초원심분리 또는 밀도 구배 초원심분리에 의해서 제거된다. 일부 실시형태에서, 막은 초음파처리, 기계적 진동, 다공성 막을 통한 압출, 전류 또는 이들 기술의 하나 이상의 조합에 의해서 재조립된다. 특정 실시형태에서, 막은 초음파처리에 의해서 조립된다.

[0286] 일부 실시형태에서, 변형된 엑소좀을 생산하기 위해서 외인성 작용제(예를 들어, 본 명세서에 기재된 폴리뉴클레오타이드)를 무손상 또는 빈 엑소좀에 로딩하는 것은 통상적인 생물학 기술, 예컨대, 생체내 형질전환, 형질주입 및/또는 미세주사를 사용하여 달성될 수 있다. 일부 실시형태에서, 외인성 작용제(예를 들어, 본 명세서에 기재된 폴리뉴클레오타이드)는 전기천공법에 의해서 무손상 또는 빈 엑소좀 내에 도입된다. 일부 실시형태에서, 외인성 작용제(예를 들어, 본 명세서에 기재된 폴리뉴클레오타이드)는 리포펙션(예를 들어, 형질주입)에 의해서 무손상 또는 빈 엑소좀 내에 도입된다. 본 개시내용에 따른 엑소좀의 생산에 사용하기에 적합한 리포펙션 키트는 당업계에 공지되어 있고, 상업적으로 입수 가능하다(예를 들어, 로슈사(Roche)로부터의 FuGENE(등록상표) HD Transfection Reagent 및 인비트로젠사(Invitrogen)로부터의 LIPOFECTAMINE(상표명) 2000). 일부 실시형태에서, 외인성 작용제(예를 들어, 본 명세서에 기재된 폴리뉴클레오타이드)는 열 충격을 사용한 형질전환에 의해서 무손상 또는 빈 엑소좀 내에 도입된다. 이러한 실시형태에서, 엑소좀 막을 침투하기 위해서 모체 세포로부터 단리된 엑소좀을 2가 양이온, 예컨대, $Ca^{2+}$($CaCl_2$) 중에서 급랭시킨다. 이어서 엑소좀을 외인성 핵산과 함께 인큐베이션시키고, 간략하면 열 충격처리할 수 있다(예를 들어, 42℃에서 30 내지 120초 동안 인큐베이션시킴). 특정 실시형태에서, 열 충격 방법을 사용한 무손상 또는 빈 엑소좀의 형질전환은, 외인성 핵산이 환형 DNA 플라스미드인 경우 사용된다. 특정 실시형태에서, 빈 엑소좀에 외인성 작용제(예를 들어, 본 명세서에 기재된 폴리뉴클레오타이드)를 로딩하는 것은, 소포내 성분을 제거한 후 작용제와 엑소좀 막을 혼합하거나 공동 인큐베이션시킴으로써 달성될 수 있다. 따라서 엑소좀 막으로부터 재조립된 변형된 엑소좀은 외인성 작용제를 소포내 공간 내에 혼입할 것이다. 엑소좀 캡슐화된 핵산을 생산하기 위한 추가 방법은 당업계에 공지되어 있다(예를 들어, 미국 특허 제9,889,210호; 제9,629,929호; 및 제9,085,778호; 국제 PCT 공개 제WO 2017/161010호 및 제WO 2018/039119호 참고).

[0287] 엑소좀은 세포주, 골수 유래 세포 및 일차 환자 샘플로부터 유래된 세포를 비롯한 다수의 상이한 모체 세포로부터 얻을 수 있다. 모체 세포로부터 방출된 엑소좀은 당업계에 공지된 수단에 의해서 모체 세포 배양물의 상청액으로부터 단리될 수 있다. 예를 들어, 전하(예를 들어, 전기영동 분리), 크기(예를 들어, 여과액, 분자체 등),

밀도(예를 들어, 일반 또는 구배 원심분리) 및 스베드베리 상수(Svedberg constant)(예를 들어, 외부 힘의 존재 또는 부재 하에서의 침강 등) 기반 분리를 비롯하여, 엑소좀의 물성을 사용하여 엑소좀을 배지 또는 다른 공급원 물질로부터 분리할 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 단리는 하나 이상의 생물학적 특성에 기초할 수 있고, (예를 들어, 침전, 고체상에 대한 가역적 결합, FACS 분리, 특이적 리간드 결합, 비특이적 리간드 결합 등을 위한) 표면 마커를 사용할 수 있는 방법을 포함한다. 엑소좀 표면 단백질의 분석은 엑소좀-연관된 단백질, 예컨대, CD63에 대한 형광 표지된 항체를 사용하는 유세포 분석법에 의해서 결정될 수 있다. 엑소좀을 특징규명하기 위한 추가 마커는 국제 PCT 공개 제WO 2017/161010호에 기재되어 있다. 더 추가의 고려되는 방법에서, 엑소좀은 또한 PEG-유도 융합 및/또는 초음파 융합을 비롯한 화학적 방법 및/또는 물리적 방법을 사용하여 융합될 수 있다.

[0288] 일부 실시형태에서, 크기 배제 크로마토그래피를 사용하여 엑소좀을 단리시킬 수 있다. 일부 실시형태에서, 당업계에 일반적으로 공지된 바와 같이, 엑소좀을 크로마토그래피 분리 이후에 (하나 이상의 크로마토그래피 분획의) 원심분리 기술에 의해서 추가로 단리시킬 수 있다. 일부 실시형태에서, 엑소좀의 단리는 이미 기재된 바와 같은 차등 원심분리(문헌[Raposo, G. *et al.*, J. Exp. Med. 183, 1161-1172 (1996)] 참고), 초원심분리, 크기 기반 막 여과, 농도 및/또는 속도차 원심분리를 포함하지만 이에 제한되지 않는 방법의 조합을 포함할 수 있다.

[0289] 일부 실시형태에서, 엑소좀 막은 포스포지질, 당지질, 지방산, 스핑고지질, 포스포글리세리드, 스테롤, 콜레스테롤 및 포스파티딜세린 중 하나 이상을 포함한다. 또한, 막은 1종 이상의 폴리펩타이드 및 1종 이상의 다당류, 예컨대, 글리칸을 포함할 수 있다. 예시적인 엑소좀 막 조성물 및 1종 이상의 막 성분의 상대적인 양을 변형시키는 방법은 국제 PCT 공개 제WO 2018/039119호에 기재되어 있다.

[0290] 바람직하게는, 본 명세서에 기재된 입자는, 용해도를 향상시키기 위해서, 생체내에서의 응집에 의해서 유발되는 가능한 문제를 회피하기 위해서 그리고 음세포작용(pinocytosis)을 가능하게 하기 위해서, 나노규모 크기이다. 일부 실시형태에서, 입자는 약 1000nm 미만의 평균 직경을 갖는다. 일부 실시형태에서, 입자는 500nm 미만의 평균 직경을 갖는다. 일부 실시형태에서, 입자는 약 30 내지 약 100nm, 약 50 내지 약 100nm 또는 약 75 내지 약 100nm의 평균 직경을 갖는다. 일부 실시형태에서, 입자는 약 30 내지 약 75nm 또는 약 30 내지 약 50nm의 평균 직경을 갖는다. 일부 실시형태에서, 입자는 약 100 내지 약 500nm의 평균 직경을 갖는다. 일부 실시형태에서, 입자는 약 200 내지 약 400nm의 평균 직경을 갖는다. 일부 실시형태에서, 입자는 약 350nm의 평균 크기를 갖는다.

[0291] 일부 실시형태에서, 입자는 엑소좀이고, 약 30 내지 약 100nm, 약 30 내지 약 200nm 또는 약 30 내지 약 500nm의 직경을 갖는다. 일부 실시형태에서, 입자는 엑소좀이고, 약 10nm 내지 약 100nm, 약 20nm 내지 약 100nm, 약 30nm 내지 약 100nm, 약 40nm 내지 약 100nm, 약 50nm 내지 약 100nm, 약 60nm 내지 약 100nm, 약 70nm 내지 약 100nm, 약 80nm 내지 약 100nm, 약 90nm 내지 약 100nm, 약 100nm 내지 약 200nm, 약 100nm 내지 약 150nm, 약 150nm 내지 약 200nm, 약 100nm 내지 약 250nm, 약 250nm 내지 약 500nm 또는 약 10nm 내지 약 1000nm의 직경을 갖는다. 일부 실시형태에서, 입자는 엑소좀이고, 약 20nm 내지 300nm, 약 40nm 내지 200nm, 약 20nm 내지 250nm, 약 30nm 내지 150nm 또는 약 30nm 내지 100nm의 직경을 갖는다.

[0292] ***B. 지질 나노입자***

[0293] 특정 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 재조합 DNA 분자는 지질 나노입자(LNP) 내에 캡슐화된다. 특정 실시형태에서, LNP는 1종 이상의 지질, 예컨대, 예컨대, 트라이글리세리드(예를 들어, 트라이스테아린), 다이글리세리드(예를 들어, 글리세롤 베헤네이트(bahenate)), 모노글리세리드(예를 들어, 글리세롤 모노스테아레이트), 지방산(예를 들어, 스테아르산), 스테로이드(예를 들어, 콜레스테롤) 및 왁스(예를 들어, 세틸 팔미테이트)를 포함한다. 일부 실시형태에서, LNP는 양이온성 지질 및 하나 이상의 헬퍼 지질을 포함한다.

[0294] 양이온성 지질은 선택된 pH, 예컨대, 생리 pH에서 순 양전하를 보유하는 다수의 지질 종 중 임의의 것을 지칭한다. 이러한 지질은 1,2-다이리놀레일옥시-N,N-다이메틸아미노프로판(DLinDMA), 1,2-다이리놀렌일옥시-N,N-다이메틸아미노프로판(DLenDMA), 다이옥타데실다이메틸암모늄(DODMA), 다이스테아릴다이메틸암모늄(DSDMA), N,N-다이올레일-N,N-다이메틸암모늄 클로라이드(DODAC); N-(2,3-다이올레일옥시)프로필)-N,N,N-트라이메틸암모늄 클로라이드(DOTMA); N,N-다이스테아릴-N,N-다이메틸암모늄 브로마이드(DDAB); N-(2,3-다이올레오일옥시)프로필)-N,N,N-트라이메틸암모늄 클로라이드(DOTAP); 3-(N-(N',N'-다이메틸아미노에탄)-카바모일)콜레스테롤(DC-Chol) 및 N-(1,2-다이미리스틸옥시프로프-3-일)-N,N-다이메틸-N-하이드록시에틸 암모늄 브로마이드(DMRIE)를 포함하지만 이들로 제한되지 않는다. 예를 들어, 생리 pH 아래에서 양전하를 갖는 양이온성 지질은 DODAP, DODMA 및 DMDMA를 포함하지만 이들로 제한되지 않는다. 일부 실시형태에서, 양이온성 지질은 $C_{18}$ 알킬쇄, 헤드기와 알킬

기 사이에 링키지 및 0 내지 3개의 이중 결합을 포함한다. 이러한 지질은 예를 들어, DSDMA, DLinDMA, DLenDMA 및 DODMA를 포함한다. 양이온성 지질은 두 링키지 및 pH 적정 가능한 헤드기를 포함할 수 있다. 적합한 지질은 예를 들어, DODMA를 포함한다. 추가의 양이온성 지질은 본 명세서에 참고로 포함된 미국 특허 제7,745,651호; 제5,208,036호; 제5,264,618호; 제5,279,833호; 제5,283,185호; 제5,753,613호; 및 제5,785,992에 기재되어 있다.

[0295] 일부 실시형태에서, 양이온성 지질은 양성자화 가능한 3차 아민 헤드기를 포함한다. 이러한 지질은 본 명세서에서 이온화 가능한 지질로 지칭된다. 이온화 가능한 지질은 이온화 가능한 아민 헤드기를 포함하고, 전형적으로 약 7 미만의 pKa를 포함한는 지질 종을 지칭한다. 따라서, 산성 pH를 갖는 환경에서, 이온화 가능한 아민 헤드기는, 이온화 가능한 지질이 음으로 하전된 분자(예를 들어, 핵산, 예컨대, 본 명세서에 기재된 재조합 폴리뉴클레오타이드)와 우세하게 상호작용하여 나노입자 조립 및 캡슐화를 용이하게 하도록 양성자화된다. 이온화 가능한따라서, 일부 실시형태에서, 이온화 가능한 지질은 지질 나노입자 내의 핵산의 로딩을 증가시킬 수 있다. pH가 약 7(예를 들어, 생리 pH 약 7.4)을 초과하는 환경에서, 이온화 가능한 지질은 중성 전하를 포함한다. 이온화 가능한 지질을 포함하는 입자가 엔도솜의 pH 환경(예를 들어, pH 7 미만)에 유입되면, 이온화 가능한 지질은 다시 양성자화되고, 음이온성 엔도솜 막과 회합되어, 입자에 의해서 캡슐화된 내용물의 방출을 촉진시킨다.

[0296] 일부 실시형태에서, LNP는 하나 이상의 비-양이온성 헬퍼 지질을 포함한다. 예시적인 헬퍼 지질은 (1,2-다이라우로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민) (DLPE), 1,2-다이피탄오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(DiPPE), 1,2-다이스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린(DSPC), 1,2-다이팔미토일-sn-글리세로-3-포스포콜린(DPPC), 1,2-다이올레일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(DOPE), 1,2-다이팔미토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(DPPE), 1,2-다이미리스토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(DMPE), (1,2-다이올레오일-sn-글리세로-3- 포스포-(1'-rac-글리세롤) (DOPG), 1,2-다이스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(DSPE), 세라마이드, 스핑고마이엘린 및 콜레스테롤을 포함한다.

[0297] 바람직하게는 본 명세서에 개시된 화합물 및 지질 중 하나 이상과 조합하여, 본 명세서에 기재된 리포솜 및 약제학적 조성물 중에서의 폴리에틸렌 글리콜(PEG)-변형된 포스포지질 및 유도체화된 지질, 예컨대, 유도체화된 세라마이드(PEG-CER), 예컨대, N-옥탄오일-스핑고신-1-[석신일(메톡시 폴리에틸렌 글리콜)-2000](C8 PEG-2000 세라마이드)의 사용 및 이의 포함이 또한 고려된다.

[0298] 일부 실시형태에서, 지질 나노입자는 하나 이상의 C6-C20 알킬을 포함하는 지질에 공유 결합된 최대 5kDa 길이의 폴리(에틸렌)글리콜 쇄를 포함하는 하나 이상의 PEG-변형된 지질을 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, LNP는 1,2-다이스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-폴리(에틸렌 글리콜)(DSPE-PEG), 또는 1,2-다이스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[아미노(폴리에틸렌 글리콜)](DSPE-PEG-아민)을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, PEG-변형된 지질은 지질 나노입자 중의 총 지질 함량의 약 0.1% 내지 약 1%를 차지한다. 일부 실시형태에서, PEG-변형된 지질은 지질 나노입자 중의 총 지질 함량의 약 0.1%, 약 0.2% 약 0.3%, 약 0.4%, 약 0.5%, 약 0.6%, 약 0.7%, 약 0.8%, 약 0.9% 또는 약 1.0%를 차지한다.

[0299] 일부 실시형태에서, LNP는 양이온성 지질 및 하나 이상의 헬퍼 지질을 포함하고, 여기서 양이온성 지질은 DOTAP이다. 일부 실시형태에서, LNP는 양이온성 지질 및 하나 이상의 헬퍼 지질을 포함하고, 여기서 하나 이상의 헬퍼 지질은 콜레스테롤을 포함한다. 일부 실시형태에서, LNP는 양이온성 지질 및 하나 이상의 헬퍼 지질을 포함하고, 여기서 하나 이상의 헬퍼 지질은 DLPE를 포함한다. 일부 실시형태에서, LNP는 양이온성 지질 및 하나 이상의 헬퍼 지질을 포함하고, 여기서 하나 이상의 헬퍼 지질은 DOPE를 포함한다. 일부 실시형태에서, LNP는 양이온성 지질 및 적어도 2종의 헬퍼 지질을 포함하고, 적어도 2종의 헬퍼 지질은 콜레스테롤 및 DLPE를 포함한다. 일부 실시형태에서, 적어도 2종의 헬퍼 지질은 콜레스테롤 및 DOPE를 포함한다. 일부 실시형태에서, LNP는 양이온성 지질 및 적어도 3종의 헬퍼 지질을 포함하고, 적어도 3종의 헬퍼 지질은 콜레스테롤, DLPE 및 DSPE를 포함한다. 일부 실시형태에서, 적어도 3종의 헬퍼 지질은 콜레스테롤, DOPE 및 DSPE를 포함한다. 일부 실시형태에서, LNP는 DOTAP, 콜레스테롤 및 DLPE를 포함한다. 일부 실시형태에서, LNP는 DOTAP, 콜레스테롤 및 DOPE를 포함한다. 일부 실시형태에서, LNP는 DOTAP, 콜레스테롤, DLPE 및 DSPE를 포함한다. 일부 실시형태에서, LNP는 DOTAP, 콜레스테롤, DLPE 및 DSPE-PEG를 포함한다. 일부 실시형태에서, LNP는 DOTAP, 콜레스테롤, DOPE 및 DSPE를 포함한다. 일부 실시형태에서, LNP는 DOTAP, 콜레스테롤, DOPE 및 DSPE-PEG를 포함한다.

[0300] 일부 실시형태에서, LNP는 DOTAP, 콜레스테롤(Chol) 및 DLPE를 포함하고, 여기서 DOTAP:Chol:DLPE(총 지질 함량의 백분율로서)의 비는 약 50:35:15이다. 일부 실시형태에서, LNP는 DOTAP, 콜레스테롤(Chol) 및 DLPE를 포함하고, 여기서 DOTAP:Chol:DOP(총 지질 함량의 백분율로서)의 비는 약 50:35:15이다. 일부 실시형태에서, LNP는

DOTAP, 콜레스테롤(Chol), DLPE, DSPE-PEG를 포함하고, 여기서 DOTP:Chol:DLPE(총 지질 함량의 백분율로서)의 비는 약 50:35:15이고, 여기서 입자는 약 0.2%의 DSPE-PEG를 포함한다. 일부 실시형태에서, LNP는 이온화 가능한 지질, 예를 들어, 7.SS-절단 가능한 pH-반응성 지질 유사 물질(예컨대, COATSOME(등록상표) SS-Series)을 포함한다. 본 개시내용의 제형 및 방법에 적합한 양이온성 또는 이온화 가능한 지질의 추가 예는 예를 들어, WO2018089540A1, WO2017049245A2, US20150174261, US2014308304, US2015376115, WO201/199952 및 WO2016/176330에 기재되어 있다.

[0301] 일부 실시형태에서, 나노입자는 표적 세포에 의한 나노입자의 흡수를 조절 또는 가능하게 하기 위해서 글리코사미노글리칸(GAG)으로 코팅된다(도 2). GAG는 헤파린/헤파린 설페이트, 콘드로이틴 설페이트/더마탄 설페이트, 케라틴 설페이트 또는 히알루론산(HA)일 수 있다. 특정 실시형태에서, 나노입자의 표면은 HA로 코팅되고, 종양 세포에 의한 흡수를 위해서 입자를 표적화한다. 일부 실시형태에서, 지질 나노입자는 아르기닌-글리신-아스파테이트 트라이-펩타이드(RGD 펩타이드)로 코팅된다(문헌[Ruoslahti, Advanced Materials, 24, 2012, 3747-3756; 및 Bellis *et al.*, Biomaterials, 32(18), 2011, 4205-4210] 참고).

[0302] 일부 실시형태에서, LNP는 약 150nm 내지 약 500nm의 평균 크기를 갖는다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, LNP는 약 200nm 내지 약 500nm, 약 300nm 내지 약 500nm, 약 350nm 내지 약 500nm, 약 400nm 내지 약 500nm, 약 425nm 내지 약 500nm, 약 450nm 내지 약 500nm 또는 약 475nm 내지 약 500nm의 평균 크기를 갖는다.

[0303] 일부 실시형태에서, LNP는 약 -20mV 미만의 평균 제타-전위를 갖는다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, LNP는 약 -30mV 미만, 약 35mV 미만 또는 약 -40mV 미만의 평균 제타-전위를 갖는다. 일부 실시형태에서, LNP는 약 -50mV 내지 약 - 20mV, 약 -40mV 내지 약 -20mV 또는 약 -30mV 내지 약 -20mV의 평균 제타-전위를 갖는다. 일부 실시형태에서, LNP는 약 -30mV, 약 -31mV, 약 -32mV, 약 -33mV, 약 -34mV, 약 -35mV, 약 -36mV, 약 -37mV, 약 -38mV, 약 -39mV 또는 약 -40mV의 평균 제타-전위를 갖는다.

[0304] 일부 실시형태에서, 지질 나노입자는 본 명세서에 기재된 재조합 핵산 분자를 포함하고, 약 3:1(L:N)의 지질(L) 대 핵산(N)의 비를 포함한다. 일부 실시형태에서, 지질 나노입자는 본 명세서에 기재된 재조합 핵산 분자를 포함하고, 약 4:1, 약 5:1, 약 6:1 또는 약 7:1의 L:N 비를 포함한다. 일부 실시형태에서, 지질 나노입자는 본 명세서에 기재된 재조합 핵산 분자를 포함하고, 약 4.5:1, 약 4.6:1, 약 4.7:1, 약 4.8:1, 약 4.9:1, 약 5:1, 약 5.1:1, 약 5.2:1, 약 5.3:1, 약 5.4:1 또는 약 5.5:1의 L:N 비를 포함한다.

[0305] **VI. 치료 조성물 및 이의 용도**

[0306] 본 개시내용의 일 양상은 본 명세서에 기재된 재조합 핵산 분자를 포함하는 치료 조성물 또는 본 명세서에 기재된 재조합 핵산 분자를 포함하는 입자 및 암의 치료 방법에 관한 것이다. 본 명세서에 기재된 조성물은 목적하는 전달 경로에 적합한 임의의 방식으로 제형화될 수 있다. 전형적으로, 제형은 이의 유도체 또는 전구 약물, 용매화물, 입체이성질체, 라세미체 또는 호변이성질체와 임의의 약제학적으로 허용 가능한 담체, 희석제 및/또는 부형제를 포함하는 모든 생리학적으로 허용 가능한 조성물을 포함한다.

[0307] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 "약제학적으로 허용 가능한 담체, 희석제 또는 부형제"는 비제한적으로 임의의 아주반트, 담체, 부형제, 활택제, 감미료, 희석제, 보존제, 염료/착색제, 향미 증진제, 계면활성제, 습윤제, 분산제, 현탁화제, 안정화제, 등장제, 용매, 계면활성제 또는 유화제를 포함하며, 이것은 미국 식품의약국에서 인간 또는 가축 동물에서 사용이 허용된 것으로 승인된 것이다. 예시적인 약제학적으로 허용 가능한 담체는 당, 예컨대, 락토스, 글루코스 및 수크로스; 전분, 예컨대, 옥수수 전분 및 감자 전분; 셀룰로스 및 이의 유도체, 예컨대, 소듐 카복시메틸 셀룰로스, 에틸 셀룰로스 및 셀룰로스 아세테이트; 트라가칸트 분말; 말트; 젤라틴; 탤크; 코코아 버터, 왁스; 동물 지방 및 식물 지방, 파라핀, 실리콘, 벤토나이트, 실릭산, 산화아연; 오일, 예컨대, 땅콩 오일, 면실유, 홍화 오일, 참깨 오일, 올리브 오일, 옥수수 오일 및 대두 오일; 글리콜, 예컨대, 프로필렌 글리콜; 폴리올, 예컨대, 글리세린, 솔비톨, 만니톨 및 폴리에틸렌 글리콜; 에스터, 예컨대, 에틸 올레에이트 및 에틸 라우레이트; 아가; 완충제, 예컨대, 마그네슘 하이드록사이드 및 알루미늄 하이드록사이드; 알긴산; 발열원 제거 수(pyrogen-free water); 등장성 염수; 링거액; 에틸 알코올 및 인삼염 완충제 용액; 및 약제학적 제형에 사용되는 임의의 다른 상용성 물질을 포함하지만 이들로 제한되지 않는다.

[0308] "약제학적으로 허용 가능한 염"은 산부가염 및 염기부가염 둘 다를 포함한다. 약제학적으로-허용 가능한 염은 산부가염(단백질의 유리 아미노기와 함께 형성됨)을 포함하고, 이것은 무기산, 예컨대, 염화수소산, 브롬화수소산, 황산, 질산, 인산 등, 및 예컨대, 비제한적으로 아세트산, 2,2-다이클로로아세트산, 아디프산, 알긴산, 아스코르브산, 아스파트산, 벤젠설폰산, 벤조산, 4-아세트아미도벤조산, 캄포르산, 캄포-10-설폰산, 카프르산, 카

프로산, 카프릴산, 탄산, 신남산, 시트르산, 사이클람산, 도데실황산, 에탄-1,2-다이설폰산, 에탄설폰산, 2-하이드록시에탄설폰산, 폼산, 푸마르산, 갈락타르산, 겐티스산, 글루코헵톤산, 글루콘산, 글루쿠론산, 글루 탐산, 글루타르산, 2-옥소-글루타르산, 글리세로인산, 글리콜산, 히푸르산, 아이소부티르산, 락트산, 락토비온산, 라우르산, 말레산, 말산, 말론산, 말델산, 메탄설폰산, 점액산, 나프탈렌-1,5-다이설폰산, 나프탈렌-2-설폰산, 1-하이드록시-2-나프토산, 니코틴산, 올레산, 오로트산, 옥살산, 팔미트산, 파모산, 프로피온산, 피로글루탐산, 피루브산, 살리실산, 4-아미노살리실산, 세바스산, 스테아르산, 석신산, 타타르산, 티오시안산, p-톨루엔설폰산, 트라이플루오로아세트산, 운데실렌산 등으로 형성된다. 유리 카복실기로 형성되는 염이 또한 무기염, 예를 들어, 나트륨, 칼륨, 리튬, 암모늄, 칼슘, 마그네슘, 철, 아연, 구리, 망간, 알루미늄염 등으로부터 유래될 수 있다. 유기 염기로부터 유래된 염은 1차, 2차 및 3차 아민, 치환된 아민, 예컨대, 자연 발생된 치환된 아민, 환식 아민 및 염기성 이온 교환 수지, 예컨대, 암모니아, 아이소프로필아민, 트라이메틸아민, 다이에틸아민, 트라이에틸아민, 트라이프로필아민, 다이에탄올아민, 에탄올아민, 데칸올(deanol), 2-다이메틸아미노에탄올, 2-다이에틸아미노에탄올, 다이사이클로헥실아민, 라이신, 아르기닌, 히스티딘, 카페인, 프로카인, 하이드라브아민, 콜린, 베타인, 베네트아민, 벤자틴, 에틸렌다이아민, 글루코사민, 메틸글루카민, 테오브로민, 트라이에탄올아민, 트로메타민, 퓨린, 피페라진, 피페리딘, *N*-에틸피페리딘, 폴리아민 수지 등의 염을 포함하지만 이들로 제한되지 않는다. 특히 바람직한 유기 염기는 아이소프로필아민, 다이에틸아민, 에탄올아민, 트라이메틸아민, 다이사이클로헥실아민, 콜린 및 카페인이다.

[0309] 본 개시내용은 암성 세포 또는 표적 세포를 사멸시키는 방법을 제공하며, 이 방법은 세포를, 암성 세포에 대한 조성물의 세포내 전달에 충분한 조건 하에서, 본 명세서에 기재된 폴리뉴클레오타이드 또는 입자 또는 이의 조성물에 노출시키는 단계를 포함한다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "암성 세포" 또는 "표적 세포"는 본 명세서에 기재된 폴리뉴클레오타이드 또는 입자, 또는 본 명세서에 기재된 이의 조성물로의 치료 또는 투여를 위해서 선택된 포유동물 세포를 지칭한다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 "암성 세포를 사멸시키는"은 아포토시스 또는 괴사에 의한 암성 세포의 사멸을 구체적으로 지칭한다. 암성 세포의 사멸은 종양 크기 측정, 세포 계수치 및 세포사 마커, 예컨대, Annexin V의 검출 및 프로피듐 아이오다이드의 혼입에 대한 유세포 분석법을 포함하지만 이들로 제한되지 않는 당업계에 공지된 방법에 의해서 결정될 수 있다.

[0310] 본 개시내용은 암의 치료 또는 예방을 필요로 하는 대상체에서 암을 치료 또는 예방하는 방법을 추가로 제공하며, 여기서 본 명세서에 기재된 치료 조성물의 유효량이 대상체에게 투여된다. 투여 경로는 자연적으로, 위치에 따라서 그리고 치료하고자 하는 질환의 특성에 따라서 달라질 것이고, 예를 들어, 피내, 경피, 피하, 비경구, 비강, 정맥내, 근육내, 비강내, 피부하, 피부경유(percutaneous), 기관내, 복강내, 종양내, 관류, 세척, 직접 주사 및 경구 투여를 포함할 수 있다. 본 명세서에 기재된 캡슐화된 폴리뉴클레오타이드 조성물은 전이성 암의 치료에 특히 유용하며, 여기서 복수의 기관 및/또는 세포 유형에 조성물을 전달하기 위해서 전신 투여가 필요할 수 있다. 따라서, 특정 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 조성물은 전신으로 투여된다.

[0311] 본 명세서에서 상호 교환 가능하세 사용되는 "유효량" 또는 "유효 용량"은 질환 또는 병태의 증상의 개선 또는 치료를 초래하는 본 명세서에 기재된 조성물의 양 및 용량을 지칭한다. 개선은 질환 또는 병태 또는 질환 또는 병태의 증상의 임의의 개선 또는 치료이다. 개선은 관찰 가능한 또는 측정 가능한 개선이거나, 또는 대상체의 일반적인 웰빙 느낌의 개선일 수 있다. 따라서, 당업자는, 치료가 질환 상태를 개선시킬 수 있지만, 질환을 위한 완전한 치유가 아닐 수 있음을 인지할 것이다. 대상체에서의 개선은 종양 부담 감소, 종양 세포 증식 감소, 종양 세포사 증가, 면역 경로의 활성화, 종양 진행까지의 시간 증가, 암 통증의 감소, 생존 증가 또는 삶의 질의 개선을 포함할 수 있지만 이들로 제한되지 않는다.

[0312] 일부 실시형태에서, 유효 용량의 투여는 본 명세서에 기재된 조성물의 단일 용량의 투여로 달성될 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "용량"은 한 번에 전달되는 조성물의 양을 지칭한다. 일부 실시형태에서, 용량은 주어진 부피에서의 입자의 수(예를 들어, 입자/㎖)에 의해서 측정될 수 있다. 일부 실시형태에서, 용량은 각각의 입자에 존재하는 본 명세서에 기재된 폴리뉴클레오타이드의 게놈 카피 수(예를 들어, 입자의 수/㎖, 여기서 각각의 입자는 폴리뉴클레오타이드의 적어도 하나의 게놈 카피를 포함함)에 의해서 추가로 한정될 수 있다. 일부 실시형태에서, 유효 용량의 전달은 본 명세서에 기재된 조성물의 다회 용량의 투여가 필요할 수 있다. 이와 같이, 유효 용량의 투여는 본 명세서에 기재된 조성물의 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50회 또는 그 초과의 용량의 투여가 필요할 수 있다.

[0313] 본 명세서에 기재된 조성물의 다회 용량이 투여되는 실시형태에서, 각각의 용량은 동일한 액터(actor)에 의해서 그리고/또는 동일한 지리학적 위치에서 투여될 필요는 없다. 추가로, 투여는 미리 결정된 스케줄에 따라서 투여될 수 있다. 예를 들어, 미리 결정된 투여 스케줄은 본 명세서에 기재된 조성물의 용량을 일 단위로, 격일로,

주 단위로, 격주로, 월 단위로, 격월로, 년 단위로, 반년 단위 등으로 투여하는 것을 포함할 수 있다. 미리 결정된 투여 스케줄은 주어진 환자에 대해서 필요에 따라서 조정될 수 있다(예를 들어, 투여되는 조성물의 양은 증가 또는 감소될 수 있고/있거나 투여의 빈도는 증가 또는 감소될 수 있고/있거나 투여의 총 수는 증가 또는 감소될 수 있다).

[0314] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 "예방" 또는 "예방법"은 질환의 증상의 완전한 예방, 질환의 증상 발병의 지연 또는 후속으로 발달하는 질환 증상의 중증도의 경감을 의미할 수 있다.

[0315] 용어 "대상체" 또는 "환자"는 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 본 명세서에 기재된 조성물이 본 명세서에 기재된 방법에 따라서 투여되는 임의의 포유동물 대상체를 의미하도록 사용된다. 구체적인 실시형태에서, 본 개시내용의 방법은 인간 대상체를 치료하는 데 사용된다. 본 개시내용의 방법은 또한 비인간 영장류(예를 들어, 원숭이, 개코원숭이 및 침팬지), 마우스, 래트, 소, 말, 고양이, 개, 돼지, 토끼, 염소, 사슴, 양, 페럿, 모래쥐(gerbil), 기니피그, 햄스터, 박쥐, 조류(예를 들어, 닭, 칠면조, 오리), 어류 및 파충류를 치료하는 데 사용될 수 있다.

[0316] "암"은 본 명세서에서 전형적으로 조절되지 않는 세포 성장을 특징으로 하는 포유동물에서의 생리학적 병태를 지칭 또는 기재한다. 암의 예는 암종, 림프종, 아세포종, 육종(지방육종, 골육종, 혈관육종, 내피육종, 평활육종, 척색종, 림프관육종, 림프관내피육종(lymphangioendotheliosarcoma), 횡문근육종, 섬유육종, 점액육종 및 연골육종 포함), 신경내분비 종양, 중피종, 윤활막종, 신경초종, 수막종, 선암종, 흑색종 및 백혈병 또는 악성 림프종을 포함하지만 이들로 제한되지 않는다. 이러한 암의 보다 특별한 예는 편평 세포암(예를 들어, 상피 편평 세포암), 소세포 폐암, 비소세포 폐암을 비롯한 폐암, 폐의 선암종 및 폐의 편평세포 암종, 소세포 폐 암종, 복막의 암, 간세포암, 위장관암을 비롯한 위 또는 복부암, 췌장암, 교모세포종, 자궁경부암, 난소암, 간암, 방광암, 간세포암, 유방암, 결장암, 직장암, 결장직장암, 자궁내막 또는 자궁 암종, 침샘 암종, 신장 또는 신암, 전립선암, 외음부암, 갑상선암, 간 암종, 항문 암종, 음경 암종, 고환암, 식도암, 담관의 종양, 유잉 종양(Ewing's tumor), 기저 세포 암종, 선암종, 땀샘 암종, 피지선 암종, 유두상 암종, 유두상 선암종, 낭샘암종, 수질 암종, 기관지 암종, 신장세포 암종, 간세포암, 담관 암종, 융모막암종, 정상피종, 배아 암종, 빌름스 종양, 고환 종양, 폐 암종, 방광암종, 상피 암종, 신경교종, 성상세포종, 수모세포종, 두개인두종, 뇌실막세포종, 송과체종, 혈관모세포종, 청신경종, 핍지교종, 수막종, 흑색종, 신경모세포종, 망막모세포종, 백혈병, 림프종, 다발성 골수종, 발덴스트롬 마크로글로불린혈증, 골수이형성 질환, 중쇄 질환, 신경내분비 종양, 신경초종 또는 기타 암종뿐만 아니라 두경부암을 포함한다. 추가로, 양성 전립선 비대증(benign prostatic hypertrophy: BPH), 수막종, 신경초종, 신경섬유종증, 켈로이드, 근종 및 자궁 섬유증 및 그 밖의 것을 비롯한 양성(즉, 비암성) 과증식성 질환, 장애 및 병태가 또한 본 명세서에 개시된 본 개시내용을 사용하여 치료될 수 있다.

[0317] ***A. 예시적인 자기-복제 폴리뉴클레오타이드***

[0318] 당업자는 암호화된 바이러스의 특성이 다양할 것이고, 치료하고자 하는 질환 적응증에 좌우될 것이라는 것을 이해할 것이다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 폴리오 바이러스는 특정 암의 치료에 사용될 수 있다. 폴리오 바이러스 게놈은 단일 폴리단백질을 암호화하는 단일 가닥, 포저티브-센스 극성도 RNA 분자를 포함한다. 5' 비번역 영역(UTR)은 2개의 기능성 도메인, 클로버리프 및 내부 리보솜 유입 부위(internal ribosome entry site: IRES)를 보유하고, 바이러스 단백질, VPg에 공유 결합된다. 3'UTR은 폴리-아데닐화된다(예를 들어, 도 6A 참고). 일부 실시형태에서, 폴리오 바이러스 게놈은 AAV-유래된 ITR에 의해서 5' 단부 및 3' 단부 상에 측접된다(도 6A 참고).

[0319] 일부 실시형태에서, 하나 이상의 miRNA 표적 서열은 바이러스 유전자, 예를 들어, 필수 바이러스 유전자에 작동 가능하게 연결된다. 예를 들어, 폴리오 바이러스 게놈은 하기를 포함하지만 이에 제한되지 않는, 이러한 목적에 적합한 몇몇 유전자를 포함한다: 바이러스 RNA 게놈의 복수의 카피를 제조하는 기능을 하는 $3D^{pol}$, RNA 의존성 RNA 중합효소; 바이러스 폴리펩타이드 VPg(3B)(바이러스 RNA에 결합하고, 바이러스 포저티브 및 네거티브 가닥 RNA의 합성에 필수적인 단백질임)를 절단하는 포르테아제인 $2A^{pro}$ 및 $3C^{pro}$/$3CD^{pro}$; 바이러스 복제에 필요한 단백질 복합체를 포함하는 2BC, 2B, 2C(ATPase), 3AB, 3A, 3B 단백질; 바이러스 캡시드의 단백질인 VP2 및 VP4, VP1 및 VP3으로 추가로 절단되는 VP0. 일부 실시형태에서, miRNA-감소된 폴리오 바이러스 게놈은 폴리뉴클레오타이드 복제 및 핵 유입에 도움을 주기 위해서 AAV-유래된 ITR 서열이 측접된다(예를 들어, 도 6B 참고). 적절한 경우 다른 유전자가 선택될 수 있다. 일부 실시형태에서, miRNA 표적 서열은, 기능성 폴리펩타이드를 암호화하는 유전자의 능력을 유지하면서, miRNA 표적 서열의 전사를 초래하는 유전자 유전자좌 내의 위치에서 miRNA 표적 서열의 삽입에 의해서, 바이러스 유전자, 예를 들어, 필수 바이러스 유전자에 작동 가능하게 연결된다. 일

부 실시형태에서, miRNA 표적 서열은 바이러스 유전자의 5' UTR 또는 3' UTR 내에 삽입된다. 일부 실시형태에서, miRNA 표적 서열은 오픈 리딩 프레임 내에, 예를 들어, 2개의 폴리펩타이드의 암호 서열 사이 등에 삽입되어 miRNA 표적 서열은 폴리펩타이드가 2개 이상의 기능성 단백질로 번역 및 번역후 절단되는 것을 인프레임으로 허용한다. 예를 들어, miRNA 표적 서열은 2개의 2A 펩타이드 서열과, 폴리펩타이드 서열 하류(3')의 리딩 프레임을 miRNA 표적 서열의 삽입 부위로 보존하기 위해 필요에 따라 첨가되는 추가의 뉴클레오타이드드 사이에 삽입될 수 있다.

[0320] 일부 실시형태에서, 야생형 폴리오 바이러스 게놈은 하나 이상의 필수 폴리오 바이러스 유전자의 약화를 위해서 사량체 miR-124, miR-145, miR-34a 및 let7 표적 부위를 함유하는 miRNA 표적 서열 카세트를 3' UTR 내에 삽입함으로써 변형된다(도 8A). 일부 실시형태에서, 이러한 miRNA-감소된 폴리오 바이러스는 비소세포 폐암의 치료에 사용하기에 적합하다(도 8A). 일부 실시형태에서, 야생형 PV 게놈은 사량체 miR-122, miR-124, miR-34a 및 let7 표적 부위를 함유하는 miRNA 표적 서열 카세트를 하나 이상의 필수 폴리오 바이러스 유전자의 3' UTR 내에 삽입함으로써 변형된다(도 8B). 일부 실시형태에서, 이러한 miRNA-약화된(miRNA-attenuated) 폴리오 바이러스는 간세포 암종의 치료에 사용하기에 적합하다(도 8B). 일부 실시형태에서, 야생형 폴리오 바이러스 게놈은 하나 이상의 필수 폴리오 바이러스 유전자의 약화를 위해서 사량체 miR-124, miR-143, miR-145 및 let7 표적 부위를 함유하는 miRNA 표적 서열 카세트를 3' UTR 내에 삽입함으로써 변형된다(도 8C). 일부 실시형태에서, 이러한 miRNA-약화된 폴리오 바이러스는 전립선암의 치료에 사용하기에 적합하다(도 8C).

[0321] 일부 실시형태에서, VSV는 특정 암의 치료에 사용될 수 있다. VSV 게놈은 5종의 주요 단백질: 핵단백질(N), 인단백질(P), 기질 단백질(M), 당단백질(G) 및 중합효소(L)를 암호화하는 단일 가닥, 네거티브-센스 극성도 RNA 분자를 포함한다. 5종의 바이러스에 의해서 암호화된 단백질 각각에 대해서 하나의 모노시스트론성 mRNA가 존재한다. mRNA는 캡핑, 메틸화 및 폴리아데닐화된다. VSV는 세포질성 네거티브-센스 RNA 바이러스이기 때문에, mRNA 합성 및 변형을 위한 효소는 비리온에 패키징된다(도 9A). 일부 실시형태에서, VSV 게놈은 폴리뉴클레오타이드 복제 및 핵 유입에 도움을 주기 위해서 AAV-유래된 ITR 서열이 측접된다(도9A).

[0322] 일부 실시형태에서, 야생형 VSV 게놈은 VSV 게놈의 하나 이상의 필수 바이러스 유전자(예를 들어, N, P, M, G 또는 L 유전자 중 하나 이상)에 대한 유전자 유전자좌에 삽입된 하나 이상의 miRNA 표적 서열을 포함하는 miRNA 표적 서열 카세트의 삽입에 의해서 변형된다(도 9B). 일부 실시형태에서, miRNA 표적 서열은 유전자의 5' UTR 또는 3' UTR 내에 삽입된다. 일부 실시형태에서, 야생형 VSV 게놈은 사량체 miR-122, miR-124, miR-34a 및 let7 표적 부위를 포함하는 miRNA 표적 서열 카세트를 약화를 위한 5종의 바이러스에 의해서 암호화된 전사체 중 4개(예를 들어, N, P, M, G 또는 L 유전자 중 4개)의 3' UTR 내에 삽입함으로써 변형된다(도 11A). 일부 실시형태에서, 이러한 miRNA-약화된 VSV는 간세포 암종의 치료에 사용하기에 적합하다(도 11A). 일부 실시형태에서, 야생형 VSV 게놈은 사량체 miR-124, miR-143, miR-145 및 let7 표적 부위를 포함하는 miRNA 표적 서열 카세트를 약화를 위한 5종의 바이러스에 의해서 암호화된 전사체 중 4개(예를 들어, N, P, M, G 또는 L 유전자 중 4개)의 3' UTR 내에 삽입함으로써 변형된다(도 11B). 일부 실시형태에서, 이러한 miRNA-약화된 VSV는 전립선암의 치료에 사용하기에 적합하다(도 11B). 일부 실시형태에서, 야생형 VSV 게놈은 사량체 miR-124, miR-145, miR-34a 및 let7 표적 부위를 포함하는 miRNA 표적 서열 카세트를 약화를 위한 5종의 바이러스에 의해서 암호화된 전사체 중 4개(예를 들어, N, P, M, G 또는 L 유전자 중 4개)의 3' UTR 내에 삽입함으로써 변형된다(도 11C). 일부 실시형태에서, 이러한 miRNA-감소된 VSV는 비소세포 폐암의 치료에 사용하기에 적합하다(도 11C).

[0323] 일부 실시형태에서, 아데노바이러스는 특정 암의 치료에 사용될 수 있다. AAV 게놈은 24 내지 36개 단백질 암호 유전자를 암호화하는 이중 가닥 DNA 분자를 포함한다. E1A, E1B, E2A, E2B, E3 및 E4 전사 단위는 바이러스 생식 주기에서 초기에 전사된다(도 12A). 이러한 전사 단위 내의 유전자에 의해서 암호화된 단백질은 주로 바이러스 전사의 조절, 바이러스 DNA의 복제 및 감염에 대한 숙주 반응의 억제에 관연된다. 일부 실시형태에서, 아데노바이러스 게놈 게놈은 폴리뉴클레오타이드 복제 및 핵 유입에 도움을 주기 위해서 AAV-유래된 ITR 서열이 측접된다(도12A).

[0324] 일부 실시형태에서, 야생형 AAV 게놈은 AAV 게놈의 하나 이상의 필수 바이러스 유전자(예를 들어,E1A, E1B, E2A, E2B, E3 또는 E 4 중 하나 이상) 내에 삽입된 하나 이상의 miRNA 표적 서열을포함하는 miRNA 표적 서열 카세트의 삽입에 의해서 변형된다(도 12B). 일부 실시형태에서, 야생형 AAV 게놈은 사량체 miR-122, miR-124, miR-34a 및 let7 표적 부위를 포함하는 miRNA 표적 서열 카세트를 하나 이상의 필수 유전자(예를 들어, E1A, E1B, E2A, E2B, E3 또는 E4 중 하나 이상)의 3' UTR 내에 삽입함으로써 변형된다(도 13A). 일부 실시형태에서, 이러한 miRNA-약화된 아데노바이러스는 간세포 암종의 치료에 사용하기에 적합하다(도 13A). 일부 실시형태에서, 야생형 AAV 게놈은 사량체 miR-124, miR-143, miR-145 및 let7 표적 부위를 포함하는 miRNA 표

적 서열 카세트를 하나 이상의 필수 유전자(예를 들어, E1A, E1B, E2A, E2B, E3 또는 E4 중 하나 이상)의 3' UTR 내에 삽입함으로써 변형된다(도 13B). 일부 실시형태에서, 이러한 miRNA-약화된 아데노바이러스는 전립선암의 치료에 사용하기에 적합하다(도 13B). 일부 실시형태에서, 야생형 AAV 게놈은 사량체 miR-124, miR-145, miR-34a 및 let7 표적 부위를 포함하는 miRNA 표적 서열 카세트를 하나 이상의 필수 유전자(예를 들어, E1A, E1B, E2A, E2B, E3 또는 E4 중 하나 이상)의 3' UTR 내에 삽입함으로써 변형된다(도 13C). 일부 실시형태에서, 이러한 miRNA-감소된 아데노바이러스는 비소세포 폐암의 치료에 사용하기에 적합하다(도 13C).

[0325] **실시예**

[0326] 하기 실시예는 본 개시내용의 다양한 실시형태를 설명하는 목적을 위해서 제공되며,본 개시내용을 어떠한 방식으로도 제한하는 것을 의미하지 않는다. 본 실시예는 본 명세서에 기재된 방법과 함께 현재 바람직한 실시형태를 대표하고; 예시적이고; 본 개시내용의 범주에 대한 제한으로서 의도되지 않는다. 당업자는 청구범위의 범주에 의해서 정의된 바와 같은 본 개시내용의 사상에 포함되는 이의 변경 및 다른 사용을 행할 것이다.

[0327] 실시예 1: 복제-가능 바이러스 게놈을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 작제물의 조작

[0328] 본 명세서에 기재된 자기-복제 폴리뉴클레오타이드 작제물은 표준 분자 생물학 및 유전학 기술을 사용하여 조작 및 생산된다. 특정 바이러스를 암호화하는 예시적인 작제물 및 이러한 작제물을 사용하여 치료하기 위한 상응하는 암을 하기 표 13, 표 14 및 표 15에 기재한다. 그러나, 바이러스의 목적하는 특징 및 치료하고자 하는 암의 특징을 기초로 적절한 바이러스를 선택할 수 있다. 유사하게, miRNA 표적 서열 카세트(miR TS)를 바이러스 게놈 내의 하나 이상의 위치에 삽입하여, 암성 세포에서 복제를 허용하면서, 정상 비암성 세포에서 암호화된 바이러스 게놈의 복제를 제어할 수 있다. 예시적인 작제물을 본 개시내용 전체에게 기재한다. 제조된 작제물을 하기 표 8에 요약한다.

*표 8*

**복제-가능 바이러스 게놈을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 작제물**

[0329]

| 바이러스 | miR TS | miR TS 삽입 위치 | 페이로드 | 페이로드 삽입 위치 | 3' 및 5' 게놈 변형 |
|---|---|---|---|---|---|
| SVV | NA | NA | NA | NA | NA |
| SVV | NA | NA | NA | NA | 5' 귀상어 리보자임; 3' 델타 간염 바이러스 리보자임 |
| SVV | miR-1 및 miR-122 | 2A 와 2B 사이에서 인프레임 | NA | NA | 5' 귀상어 리보자임; 3' 델타 간염 바이러스 리보자임 |
| SVV | NA | NA | CXCL10 | 2A 와 2B 사이에서 인프레임 | 5' 귀상어 리보자임; 3' 델타 간염 바이러스 리보자임 |
| SVV | NA | NA | Nano-luc | 2A 와 2B 사이에서 인프레임 | 5' 귀상어 리보자임; 3' 델타 간염 바이러스 리보자임 |
| SVV | NA | NA | mCherry | 2A 와 2B 사이에서 인프레임 | 5' 귀상어 리보자임; 3' 델타 간염 바이러스 리보자임 |

[0330] 자기-복제 폴리뉴클레오타이드의 설계 후, 플라스미드 골격 내의 삽입에 의해서 또는 아데노-연관 바이러스(AAV)로부터 유래된 말단 반전 반복부(ITR)의 첨가에 의해서 전달을 위한 작제물을 조작한다. 이러한 특별한 두 유형의 전달 기전, 즉, 플라스미드 게놈 작제물 및 ITR-측접 Nano 바이러스(NanoV) 작제물의 설계를 위해서 프로토콜 및 방법을 개발하였고, 하기에 기재한다.

[0331] 실시예 2: 복제-가능 바이러스 게놈을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 작제물을 포함하는 플라스미드의 설계 및 생산

[0332] SVV 바이러스 DNA를 진스크립트사(Genscript)에서 합성하였고, 깁슨 어셈블리(Gibson assembly)를 기본 벡터에

삽입할 때 융합 PCR을 사용하여 폴리(A), 5' 귀상어 리보자임 및 3' 델타 간염 리보자임을 첨가하였다. 이러한 기본 벡터는 2.4kb 길이이고, 최소 복제 기점 및 포유동물 세포에서의 사용에 최적화된 카나마이신 내성 카세트를 함유한다(도 31A). 발현 카세트를 서열번호 1로 개시한다. 유사한 벡터를 콕사키바이러스(CVA21)에 대해서 작제하였고, 도 31B에 도시한다. CVA21 발현 카세트를 서열번호 2에 개시한다.

[0333] 실시예 3: ITR-측접 NanoV 작제물의 설계 및 생산

[0334] ITR-측접 NanoV 작제물의 생산을 위해서, 자기-복제 폴리뉴클레오타이드 작제물을, 테트라사이클린(Tet) 반응성 프로모터의 제어 하에서 AAV-유래된 ITR이 측접된 발현 카세트 내에 삽입한다. 도 17은 모델 NanoV 작제물의 개략도를 제공한다. 테트라사이클린 반응성 프로모터, TRE-tight는 mCherry의 발현을 유도하는데, 이것은 플레이스홀더(placeholder)로 사용되며, 적절한 바이러스 게놈 작제물로 대체될 수 있다(도 17에 OV로 도시함). 테트라사이클린-제어된 트랜스작용인자(transactivator)(tTA)의 발현은 도 17에 UbCP로서 도시된 구성적 프로모터에 의해서 제어된다. 이러한 NanoV 작제물을 Gateway 클로닝 시스템(써모 피셔사)(Thermo Fisher)을 사용하여 HSV-1의 UL3/4 유전자 사이 영역에 삽입하는데, 이것은 상이한 NanoV 카세트의 신속한 삽입을 가능하게 한다. 배양 배지에 테트라사이클린을 첨가하는 것은 tTA에 대한 Tet 결합을 초래하여, mCherry 작제물의 발현을 예방한다. 따라서 배양 배지로부터 Tet를 제거하는 것은 유도성 mCherry 발현을 허용한다. 추가로, 제2 구성적 프로모터(예를 들어, CMV)의 제어 하에서 iDimerize 카세트(타카라사(Takara))를 HSV-1 BAC 내의 UL50/51 유전자 사이 유전자좌 내에 삽입한다. iDimerize 카세트는 2개의 비상동 이량체화 도메인(DmrA 및 DmrC)을 포함하는데, 이것은 이종이량체화제-유도성 Rep78/52 발현을 조절한다. 배양 배지에 A/C 이종이량체화제 AP21967을 첨가하는 것은 iDimerize 카세트를 활성화시키고, Rep78/52 발현을 초래하는데, 이것은 ITR-측접 NanoV 작제물의 복제를 유도한다.

[0335] iDimerize 카세트에 의한 Rep 78/52 발현의 조절을 입증하기 위해서, 0.5㎚, 5㎚, 50㎚ 또는 500㎚에서 AP21967의 존재 하에서 Vero 세포에 iDimerize-Rep 카세트를 형질주입하였다. Rep 단백질을 암호화하는 플라스미드(pCDNA-Rep)를 양성 대조군으로서 사용하였다. 단백질을 형질주입 24시간 후에 세포로부터 추출하였고, α-Rep 또는 α-Actin 항체를 사용하여 SDS-PAGE/웨스턴 블롯에 적용하였다. 도 18에 도시된 바와 같이, 50㎚ 이상의 이종이량체화제가 iDimerize 카세트로부터 Rep78/52 발현을 유도하였고, 이종이량체화제의 첨가는 pCDNA-Rep 형질주입된 세포에서 Rep 발현 수준에 영향을 갖지 않았다.

[0336] NanoV 작제물의 생산을 입증하기 위해서, U2OS 세포를 도 17에 도시된 재조합 HSV-1 벡터로 감염시켰다. 감염 3일 후, 감염된 세포를 수거하고, Miniprep DNA 정제 키트(퀴아젠사)를 사용하여 DNA를 정제하였다. 이 시스템에 의해서 생산된 예측된 NanoV 단량체 및 이량체를 도 19A에 도시한다. NanoV DNA가 아닌 HSV DNA의 유리 단부를 노출시키고, 폐쇄 단부를 갖지 않는 DNA를 분해시키기 위해서 추출된 DNA를 NheI 및 ExoIII 소화에 적용하였다. 이어서, 소화된 DNA 단편을 아가로스겔 상에서 분석하여 NanoV 단량체 및 이량체의 존재를 결정하였다. 도 19B에 도시된 바와 같이, 단량체 및 이량체 단편(각각 3.7kb 및 7.4kb) 둘 다에 대해서 예측된 크기의 밴드가 보인다. DNA를 3.7kb 및 7.4kb 밴드 둘 다로부터 추출하고, 내부 mCherry 카세트에 대한 내부 특이성을 사용하여 후속 PCR 분석을 수행하였다(도 19C의 개략도 참고). 도 19D에 도시된 바와 같이, 이러한 PCR 반응은 3.7 및 7.4kb 밴드 둘 다로부터 추출된 DNA로부터 1.9kb의 앰플리콘을 생산하였는데, 이는, ITR에 대한 내부 폴리뉴클레오타이드 서열이 복제되었음을 입증한다.

[0337] NanoV 콘카타머의 배향을 결정하기 위해서, 3.7kb 단량체 및 7.4kb 이량체 둘 다로부터 추출된 DNA를 AflII로 소화시키고, 비환원 아가로스겔 전기영동에 의해서 분석하였다. AflII의 예측된 절단 부위는 UbC 프로모터이기 때문에, 도 20A에 도시된 바와 같이 단량체에서 1.2kb 및 2.5kb의 예측된 크기를 갖는 절단 생성물을 생성하였다. 콘카타머로부터의 예측된 생성물 크기는 이량체의 배향(예를 들어, 헤드-대-헤드, 테일-대-테일 또는 헤드-대-테일, 도 20B에 도시된 바와 같음)에 따라서 달라질 것이다. 도 18B로부터의 3.7kb 단편으로부터 추출된 DNA의 AflII 절단은 예측된 1.2kb 단편 및 2.5kb 단편을 생성시켰따(도 20C, 흰색 막대로 나타낸 밴드의 존재). 도 19B로부터의 7.4kb 단편으로부터 추출된 DNA의 AflII 절단은, 콘카타머의 테일-대-테일 배향을 나타내는 1.2kb 및 5kb의 단편 크기, 및 콘카타머의 헤드-대-헤드 배향을 나타내는 2.5kb 및 2.4 kb의 단편 크기를 생성시켰다.

[0338] 실시예 4: 플라스미드 게놈으로부터의 감염성 피코나바이러스 바이러스의 생산은 3' 리보자임 및 5' 리보자임이 필요하다

[0339] 포유동물 Pol II 프로모터의 제어 하에서 SVV-암호화 폴리뉴클레오타이드를 포함하는, 실시예 2로부터 생성된 플라스미드로부터 감염성 SVV 바이러스를 생산하는 능력을 평가하기 위해서 실험을 수행하였다. 포저티브-센스 단일 가닥 RNA 바이러스, 예컨대, SVV 및 콕사키바이러스는, 적절하게 복제하기 위해서 바이러스에 대해 네이티

브인 구별되는 5' 및 3' 단부가 필요한데, 이것은 포유동물 5' 및 3' UTR을 함유하는 포유동물 RNA Pol II 전사체에 의해서는 생산되지 않는다. 따라서, 감염성 + 센스 ssRNA 바이러스의 생산은, Pol II-암호화 SVV 전사체로부터 비바이러스 RNA의 제거를 촉매작용하고 복제-가능 및 감염성 SVV의 발현을 가능하게 한 5' 및 3' 리보자임 서열을 포함시키는 것이 필요하였다(도 22 및 도 23A의 일반적인 개략도).

[0340] 간략하면, 5' 및 3' 리보자임-암호화 서열을 삽입하고(SVV w/ R) 그리고 이를 삽입하지 않고(SVV w/o R) SVV 바이러스 게놈을 암호화하는 DNA 폴리뉴클레오타이드를 생성시켰다(도 23A). 이러한 작제물을 실시예 2에 기재된 바와 같이 DNA 플라스미드 내에 삽입하였다. 말단 리보자임 서열이 있는 SVV-암호화 플라스미드 및 말단 리보자임 서열이 없는 SVV-암호화 플라스미드의, 감염성 바이러스를 생산하는 능력을 시험하기 위해서, 293T 세포를 6-웰 플레이트에 $1x10^6$개 세포/웰로 시딩하였다. 시딩 24시간 후, 293T 세포에, Lipofectamine 3000 내의 상기에 기재된 SVV 플라스미드 작제물 1㎍을 4시간 동안 형질주입하였고, 이 때 완전 배지를 각각의 웰에 첨가하였다. 형질주입된 293T로부터의 상청액을 72시간 후에 수집하고, 0.45μM 필터를 사용하여 시린지 여과하고, H1299 세포에 대해서 연속 희석시켰다(도 23B의 개략적인 프로토콜 참고). 48시간 후, 상청액을 H1299 배양물로부터 제거하고, 세포를 크리스탈 바이올렛으로 염색하여 바이러스 감염성을 평가하였다. 도 24에 도시된 바와 같이, 크리스탈 바이올렛 염색에서 감소된 불투명도에 의해서 나타나는 바와 같이, 활성 용해성 SVV는 말단 리보자임을 포함하는 작제물로부터만 생산되었다. 따라서, 이러한 데이터는, 본 명세서에 기재된 폴리뉴클레오타이드 내에 리보자임-암호화 서열을 혼입하는 것이 감염성 SVV 바이러스의 생산에 필수적이라는 것을 나타낸다.

[0341] 실시예 5: SVV-암호화 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 DNA 플라스미드는 시험관내에서 페이로드 단백질을 발현할 수 있다

[0342] SVV-암호화 폴리뉴클레오타이드 내에 혼입된 페이로드-암호화 서열로부터 페이로드 단백질을 발현하는 실시예 2에 기재된 SVV 플라스미드의 능력을 평가하기 위해서 실험을 수행하였다. 3종의 페이로드: mCherry 리포터, 나노루시퍼라제 단백질 및 CXCL10을 시험하였다. 말단 리보자임 서열을 포함하는 SVV-암호화 플라스미드는 mCherry 단백질을 발현할 수 있는 반면, 말단 리보자임 서열이 없는 SVV-암호화 플라스미드는 이 단백질을 발현하지 않았다(도 25A). 또한, SVV-암호화 플라스미는 나노루시퍼라제를 발현할 수 있었다(도 25B). 더 추가로, SVV-암호화 플라스미드는 CXCL10을 발현할 수 있었다(도 25C). 이러한 데이터는, 감염성 SVV를 생산하는 것에 더하여, 이러한 플라스미드 작제물이 또한 형광 단백질(mCherry로 예시됨), 효소 단백질(나노루시퍼라제로 예시됨) 및 재조합 케모카인(CXCL10으로 예시됨)을 비롯한 다수의 상이한 유형의 페이로드 단백질을 발현할 수 있다는 것을 입증한다.

[0343] 실시예 6: SVV를 암호화하는 자기-복제 폴리뉴클레오타이드의 miRNA 약화

[0344] 실시예 2에 기재된 SVV-암호화 폴리뉴클레오타이드가 miRNA를 약화시킬 수 있는지를 결정하기 위해서 실험을 수행하였다. miR-1 및 miR-122 표적 서열을 갖는 miRNA 표적 카세트(miR-T)를 도 26 에 도시된 바와 같이 내인성 바이러스 2A와 합성 T2A 서열 사이에 SVV 바이러스 폴리단백질과 인 프레임으로 삽입하였다(또한 도 16 참고). miR-1 표적 서열은 근육 세포에서 바이러스 복제를 제어하는 것으로 예측되고, miR-122 표적 서열은 간 세포에서 바이러스 복제를 제어하는 것으로 예측된다. 실시예 4에 기재된 바와 같이 SVV-암호화 플라스미드가 형질주입된 293T 세포의 상청액으로부터의 바이러스의 단리에 의해서 miRNA-약화된 SVV 및 WT(대조군) SVV 바이러스를 생산하였다. 이 바이러스를 사용하여 miR-1 모방체 및 miR-122 모방체를 발현하는 허용(permissive) H1299 세포를 감염시켰다. 48시간 후, Cell Titer Glo 검정을 사용하여 H446 상청액에서 바이러스 역가를 평가함으로써 WT SVV와 비교한 SVV miR-T 작제물의 miRNA 약화를 결정하였다. 하기 표 9의 좌측 칼럼에 나타낸 바와 같이, 네거티브 대조군 모방체, miR-1 및 miR-122 $TCID_{50}/m\ell$는 동등하고, 따라서 동족 miRNA는 WT 바이러스의 경우에서 바이러스 복제에 대한 효과가 없었다. 그러나, SVV miR-T의 $IC_{50}$(우측 칼럼)은, miR-1 또는 miR-122 발현 세포가 SVV miR-T 작제물로 감염되는 경우 감염성 역가의 다중 log 감소가 관찰되는 것과 같이, 표적 세포에 miR-1 모방체 또는 miR-122 모방체를 형질주입했을 때, SVV WT 바이러스(좌측 칼럼)에 비해서 상당히 감소되었다. 이러한 데이터는, 본 명세서에 기재된 자기-복제 폴리뉴클레오타이드로부터 생산된 바이러스가 다중 조직 특이적 miRNA의 삽입에 의해서 약화될 수 있음을 입증한다.

*표 9*

**miRNA 모방체 사전 처리 후 $TCID_{50}$/mL 값**

| | SVV WT | SVV miR-T |
|---|---|---|
| 바이러스 인풋 | 7.94e03 | 3.16e03 |
| 네거티브 대조군 모방체 | 5.01e07 | 2.00e07 |
| miR-1 모방체 | 7.94e07 | 3.16e04 |
| miR-122 모방체 | 5.01e07 | 1.26e04 |

[0345]

[0346] 실시예 7: SVV-암호화 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 플라스미드는 생체내에서 감염성 바이러스를 생산한다

[0347] 생체내에서 H1299 이식 모델을 사용하여 감염성 바이러스를 생산하는, SVV-암호화 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 플라스미드의 능력을 결정하기 위해서 실험을 수행하였다. 간략하면, $5x10^6$개의 H1299 세포를 8주령의 암컷 무흉선 누드 마우스(찰스 리버 래보러토리즈사)의 우측 옆구리에 피하로 접종하였다. 종양 체적이 대략 100㎣의 체적에 도달했을 때, 마우스를 2개의 실험군에 무작위로 배정하고, 하기에 기재된 바와 같이 처리하였다.

[0348] 도 22에 예시된 SVV-암호화, 리보자임-가능(ribozyme-enabled) 발현 카세트를 포함하는 플라스미드(SVV w/ R) 및 비-리보자임 가능 카세트를 포함하는 플라스미드(SVV w/o R)를 Lipofectamine 3000과 함께 제형화하였다. 간략하면, 14㎍의 각각의 작제물을 1:1 비로 Lipofectamine 3000과 혼합하고, 보텍싱시키고, 이어서 10분 동안 인큐베이션시키고, 그 후 주사하였다. 14㎍/용량의 플라스미드 DNA 2회 용량을 접종 18일 및 20일 후에 종양내로 투여하였다. 전자 캘리퍼를 사용하여 주당 3회 종양 체적을 측정하였다. 20일, 22일 및 23일에, 감염성 바이러스의 평가를 위해서 종양을 수거하였다.

[0349] 도 27A에 도시된 바와 같이, 리보자임-가능 SVV-암호화 플라스미드로 처리된 마우스는, 비-리보자임 가능 SVV-암호화 플라스미드로 처리된 마우스와 비교할 때 종양 성장의 상당한 저해를 나타내었다. 각각의 군으로부터 수거된 종양으로부터 바이러스를 단리시키고, H1299 세포에 대해서 역가하고, 바이러스 용해를 크리스탈 바이올렛 염색에 의해서 평가하였다. 도 27B에 도시된 바와 같이, SVV w/ R 플라스미드로 처리된 마우스로부터 유래된 종양으로부터의 단리물은, SVV w/o R군으로부터 단리된 바이러스(좌측 패널, 도 27B)와 비교할 때 크리스탈 바이올렛 염색(우측 패널, 도 27B)에서의 감소된 불투명도에 의해서 입증되는 바와 같이, 활성 용해성 바이러스를 함유하였다. 이러한 데이터는, SVV-암호화, 리보자임-가능 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 플라스미드가 생체내에서 감염성이고 용해성인 바이러스를 생산하고, 종양내로 전달되는 경우 종양 성장을 저해한다는 것을 입증한다.

[0350] 실시예 8: SVV-암호화 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 플라스미드는 생체내에서 페이로드를 발현한다.

[0351] 생체내에 투여되는 경우 다양한 페이로드를 발현하는, SVV-암호화 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 플라스미드의 능력을 평가하기 위해서 실험을 수행하였다. 리보자임-가능 플라스미드 DNA 작제물을 제형화하고, 실시예 7에 기재된 바와 같이 H1299 이식 모델에서 종양내에 주사하였다. SVV-암호화 폴리뉴클레오타이드 서열에 더하여, 나노루시퍼라제(도 28A) 또는 CXCL10(도 28B)을 암호화하는 서열을 플라스미드 삽입물 내에 혼입시켰다. 2일(나노루시퍼라제) 또는 6일(CXCL10)에, 종양을 수거하고, 각각의 페이로드 단백질의 발현에 대해서 평가하였다. 도 28A 및 도 28B에 도시된 바와 같이, 루시퍼라제-암호화 폴리뉴클레오타이드를 갖는 SVV 플라스미드 또는 CXCL10-암호화 폴리뉴클레오타이드를 갖는 SVV 플라스미드의 종양내 투여는, 단리된 종양에서 각각의 페이로드의 검출을 초래하였다(도 28A는 향상된 발광을 나타내고, 도 28B는 CXCL10의 증가된 수준을 나타낸다). 이들 데이터는, 감염성 바이러스의 생산에 더하여, SVV-암호화 플라스미드가 생체내에서 외인성 효소 및 사이토카인 페이로드를 발현할 수 있음을 입증한다.

[0352] 실시예 9: SVV-암호화 플라스미드의 정맥내 전달을 위한 지질 나노입자의 제형

[0353] SVV-암호화 플라스미드를 플라스미드의 정맥내 전달을 위해서 지질 나노입자 중에서 제형화하였다.

[0354] *지질 나노입자 생산:*

[0355] *지질:*

[0356] 하기 지질을 지질 나노입자의 제형에서 사용하였다:

[0357] (a)N-[1-(2,3-다이올레오일옥시)프로필]-N,N,N-트라이메틸암모늄(DOTAP);

[0358] (b)콜레스테롤;

[0359] (c)1,2-다이라우로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(DLPE);

[0360] (d)1,2-다이스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[아미노(폴리에틸렌 글리콜)(PEG-DSPE 아민)

[0361] (e)1,2-다이스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-(폴리에틸렌 글리콜)(PEG-DSPE).

[0362] *제형:*

[0363] 지질을 에탄올 중에서 50:35:15(DOTAP:콜레스테롤:DLPE)로 제조하였다. 일부 예에서, 지질 나노입자를 또한 0.2% PEG-DSPE 또는 PEG-DSPE 아민과 함께 제형화하였다. 마이크로유체 마이크로 혼합물(프리시젼 나노시스템즈사(Precision NanoSystems), BC주 뱅쿠버 소재)을 사용하여 2㎖/min(에탄올의 경우 0.5㎖/min, 지질 믹스 및 수성 완충액의 경우 1.5㎖/min, 플라스미드 DNA)의 조합된 유량에서 입자를 제조하였다. 생성된 입자를 경사 유동 여과(TFF)에 의해서 Ca 및 Mg를 함유하는 PBS를 사용하여 세척하였다.

[0364] *HA 접합 절차:*

[0365] 고분자량 히알루로난(HA)(700KDa(라이프코어 바이오메디컬사(Lifecore Biomedical))을 0.2M MES 완충제(pH 5.5) 중에 5㎎/㎖의 최종 농도로 용해시켰다. HA 혼합물을 1-에틸-3-(3-다이메틸아미노프로필)카보다이이미드 염산염(EDC) 및 N-하이드록시설포석신이미드(설포-NHS), 1:1:6 (HA:EDC:설포-NHS)의 몰비로 활성화시켰다. 활성화 30분 후, 지질 입자를 첨가하고, pH를 7.4로 조정하였다. 용액을 실온에서 2시간 동안 인큐베이션시켰다.

[0366] 각각의 캡슐화 제형에 대한 생성된 파라미터를 하기 표 10에 나타낸다.

*표 10*

**캡슐화 제형 파라미터**

[0367]

| 제형 | DOTAP:Chol:DLPE | 0.2% PEG-DSPE | 지질:플라스미드 | HA 접합 |
|---|---|---|---|---|
| 52021-1.D | 50:35:15 | 아니오 | 5.33:1 | 예 |
| 52021-2.D | 50:35:15 | 예 | 5.33:1 | 예 |
| 52021-3.C | 50:35:15 | 예, NH2 사용 | 5.33:1 | 아니오 |
| 52021-4.D | 50:35:15 | | | 예 |

[0368] *입자 제형의 물리적 특징의 분석:*

[0369] 표 10에 기재된 생성된 입자 제형 각각에 대해서, Malvern Nano-ZS Zetasizer(말버린 인스트루먼츠사(Malvern Instruments Ltd), 영국 우스터셔 소재))를 사용한 광 산란에 의해서 입자 크기 분포 및 제타 전위측정치를 결정하였다. pH 7.4에서 HBS 중에서 크기 측정을 수행하였고, pH 7.4에서 0.01M HBS 중에서 제타 전위 측정을 수행하였다. HA 접합 전 그리고 TFF 전 및 후에 제형의 특징을 평가하였다. 이 평가의 결과를 하기 표 11에 제시한다.

*표 11*

**캡슐화 제형에 대한 Zetasizer 데이터**

[0370]

| | HA 와의 혼합 전 | | | TFF 전 | | | TFF 후 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 제형 | Z-Avg (d.nm) | PdI | ZP (mV) | Z-Avg (d.nm) | PdI | ZP (mV) | Z-Avg (d.nm) | PdI | ZP (mV) |
| 52021-1.D | 184.5 | 0.29 | 43.6 | 395.8 | 0.22 | -37.0 | 498.5 | 0.31 | -36.7 |
| 52021-2.D | 174.5 | 0.36 | 35.4 | 341.2 | 0.26 | -35.3 | 489.1 | 0.34 | -34.1 |
| 52021-3.C | 164.0 | 0.34 | 31.8 | | | | | | |
| 52021-4.D | | | | 337.1 | 0.25 | -31.9 | 437.6 | 0.44 | -32.0 |

[0371] *결과:*

[0372] 플라스미드 DNA를 세포에 성공적으로 전달하고, 감염성 바이러스를 생산하는, 제형 각각의 능력을 평가하기 위해서, 제형 각각을 H1299 세포에 형질주입시켰다. LIPOFECTAMINE으로 제형화된 플라스미드 DNA를 양성 대조군으로 사용하였고, LIPOFECTAMINE 단독을 음성 대조군으로 사용하였다. 형질주입 3일 후, 상청액을 수거하고, H466 세포에 대한 상청액의 적정 및 Cell Titer Glo 생존능 검정에 의해서 SVV $TCID_{50}/m\ell$를 계산하였다.

*표 12*

**캡슐화 제형의 시험관내 활성도**

[0373]

| 제형 | TCID50/mL |
|---|---|
| 52021-1.D | 5.01e07 |
| 52021-2.D | 7.94e07 |
| 52021-3.C | 5.01e07 |

[0374] 표 12에 제시된 바와 같이, 플라스미드 DNA의 지질 입자 제형은 플라스미드 DNA를 세포에 전달하여, 감염성 바이러스의 생산을 초래할 수 있었고, 상이한 제형에 대한 $TCID_{50}/m\ell$ 값은 감염성 바이러스의 생산을 입증한다.

[0375] 실시예 10: 플라스미드 DNA의 정맥내 주사는 종양 부위로의 전달 및 종양 성장의 저해를 초래한다.

[0376] *폐암 이식 모델에서의 정맥내 전달:*

[0377] 전신으로 투여되는 경우, SVV-암호화 플라스미드 DNA의 지질 입자 제형이 pDNA를 종양에 전달할 수 있는지를 결정하기 위해서 실험을 수행하였다. 실시예 9 및 표 10에 기재된 제형 52021-4D를 선택하고, 입자를 약 95% 활성 DNA 회수율 및 지질 캡슐화 효율을 갖는 PBS 중에 제형화하였다.

[0378] 종양 체적이 대략 150mm3에 도달했을 때, 100㎕(대략 27㎍의 DNA)의 LNP를 정맥내로 투여하였다. PBS를 비히클 대조군으로서 사용하였다. LNP 또는 비히클 대조군의 2회의 추가 용량을 총 3회 용량 동안 격일로 정맥내로 투여하였다. 마우스를 마지막 투여 48시간 후 희생시키고, 종양 조직을 수집하였다.

[0379] 도 29에 도시된 바와 같이, LNP로 처리된 마우스로부터 수거된 종양에서 SVV 플라스미드 DNA가 검출되었다. 따라서, LNP는 플라스미드 DNA를 종양 부위에 전달할 수 있다.

[0380] 실시예 7에 기재된 H1299 이식 모델에서 정맥내로 투여되는 경우 SVV-암호화 플라스미드 DNA의 지질 입자 제형이 종양 성장에 영향을 줄 수 있는지를 결정하기 위해서 실험을 수행하였다. 시험관내에서 표적화 모이어티 히알루론산 및 기능의 존재로 인해서, 실시예 9 및 표 10에 기재된 지질 나노입자(LNP) 제형 52021-2D를 추가 분석을 위해서 선택하였고, 입자를 약 95% 활성 DNA 회수율 및 지질 캡슐화 효율을 갖는 PBS 중에 제형화하였다.

[0381] 종양 체적이 대략 150mm3에 도달했을 때, 100㎕(대략 27㎍의 DNA)의 LNP를 정맥내로 투여하였다. PBS를 비히클 대조군으로서 사용하였다. LNP 또는 비히클 대조군의 3회의 추가 용량을 총 4회 용량 동안 격일로 정맥내로 투여하였다. 전자 캘리퍼를 사용하여 주당 적어도 2회 종양 체적을 측정하였다.

[0382] 도 30에 도시된 바와 같이, LNP 중에 제형화된 플라스미드 DNA의 정맥내 전달은 PBS 대조군에서 관찰된 성장과 비교할 때 시간에 따라서 종양 성장을 상당히 저해하였다(도 30, **** $p < 0.0001$, 본페로니 보정을 사용한 2측 ANOVA). 이 결과는, 감염성 바이러스를 암호화하는 플라스미드 DNA 가 비바이러스 비히클 중에서 정맥내로 전달될 수 있고, 이는 생체내에서 종양 성장을 상당히 저해할 수 있다.

[0383] *간세포 암종 이식 모델에서의 정맥내 전달:*

[0384] 간세포 암종의 뮤린 이식 모델에서 정맥내 LNP 전달의 효과를 평가하기 위해서 동일한 실험을 수행할 것이다. 간략하면, 마우스에게 $3x10^6$개의 HepG2 세포를 접종하고, 상기에 기재된 바와 같이 제형화된 LNP로 정맥내로 처

리할 것이다. 종양 성장을 시간에 따라서 측정할 것이고, 종양을 추가 분석을 위해서 실험 이후에 수거할 것이다. 이러한 실험은, 간세포 암종의 모델에서 종양 성장을 저해하는, 종양용해 바이러스를 암호화하는 정맥내 LNP-캡슐화된 작제물의 능력을 입증하는 것으로 예상된다.

[0385] 실시예 11: 바이러스 게놈을 암호화하는 LNP-캡슐화된 자기-복제 폴리뉴클레오타이드를 사용한, 암을 앓고 있는 환자의 치료

[0386] 암을 앓고 있는 환자를 치료하는 것에 대한, 본 명세서에 기재된 자기-복제 바이러스 게놈의 능력을 평가하기 위해서 실험을 수행할 수 있다. 이러한 실험에서, 자기-복제 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 바이러스 게놈을 실시예 1에 일반적으로 기재된 바와 같이 조작한다.

[0387] 이러한 자기-복제 폴리뉴클레오타이드를 플라스미드 골격 내의 혼입을 위해서 추가로 조작할 수 있다. 대안적으로, 자기-복제 폴리뉴클레오타이드의 큰 규모의 시험관내 증식을 위해서, AAV-ITR 서열은 폴리뉴클레오타이드 복제 및 핵 유입을 보조하기 위해서 NanoV 작제물을 생성시키도록 전체 바이러스 게놈 측면에 혼입될 수 있다. 전체 ITR-측접 게놈을 재조합 HSV 게놈 골격의 유전자 사이의 유전자좌 내에(도 4B, 도 7B) 또는 대안적으로 ICP4 유전자좌 내에(도 5B, 도 10B, ICP4 상보성 세포주에 의해서 트랜스로 제공된 ICP4) 삽입한다. AAV rep 유전자를 ICP0 내에 삽입하여 ITR-측접 바이러스 게놈 DNA의 효율적인 복제를 가능하게 한다(실시예 3 참고).

[0388] 플라스미드 게놈 또는 NanoV 게놈을 표준 분자 생물학 기술(예를 들어, Maxi-prep)을 사용하여 배양물로부터 정제하고, 이어서 동결건조된 히알루로난(HA) 표면-변형된 지질 나노입자(LNP) 내에 캡슐화한다(실시예 9 참고). 비캡슐화된 바이러스 게놈 DNA를 초원심분리에 의해서 제거하고, 나노입자 캡슐화된 바이러스 게놈을 qPCR에 의해서 정량한다. 암을 앓고 있는 환자에 대한 생체내 투여를 위해서, LNP를 약제학적으로 허용 가능한 안정화제와 함께 인산염 완충 용액(PBS) 중에서 제조한다. 환자를 1일에 정맥내 주입을 통해서 10㎖ 부피의 약제학적으로 허용 가능한 담체 중의 $10^{10}$ 벡터 게놈으로 처리한다. 환자를 암의 존재에 대한 표준 치유 절차를 사용하여 모니터링한다. 이러한 실험의 가능한 결과는 표준 치료 요법과 비교할 때 종양 성장의 부분적 또는 완전 저해, 종양 전이의 저해, 연장된 차도 시간 및/또는 감소된 재발율을 포함한다.

[0389] 실시예 12: 바이러스 게놈을 암호화하는 LNP-캡슐화된 자기-복제 폴리뉴클레오타이드를 사용한, 폐암을 앓고 있는 환자의 치료

[0390] 비소세포 폐암(NSCLC)을 앓고 있는 환자 또는 소세포 폐암(SCLC)을 앓고 있는 환자를 치료하는 것에 대한, 본 명세서에 기재된 자기-복제 바이러스 게놈의 능력을 평가하기 위해서 실시예 11에 따라서 실험을 수행할 수 있다.

[0391] LNP 중에 캡슐화될 수 있고, NSCLC 및 SCLC의 치료에 사용될 수 있는 예시적인 자기-복제 폴리뉴클레오타이드를 하기 표 13에 요약한다.

표 13

NSCLC 및 SCLC 의 치료를 위한 자기-복제 벡터의 요약

| 바이러스 | miR-T | miR-T 삽입 위치 | 페이로드 | 페이로드 삽입 위치 | 벡터 |
|---|---|---|---|---|---|
| 폴리오 바이러스 | miR-124<br>miR-145<br>miR-34a<br>let7 | 게놈의 3' UTR | +/- | | ITR-측접 NanoV 작제물 |
| VSV | miR-124<br>miR-143<br>miR-145<br>let7 | N, P M 및/또는 L | +/- | | ITR-측접 NanoV 작제물 |
| 아데노바이러스 | miR-124<br>miR-143<br>miR-145<br>let7 | E1, E2, E3 및/또는 E4 | +/- | | ITR-측접 NanoV 작제물 |
| 콕사키바이러스 (CVB3) | miR-124<br>miR-1 | 게놈의 3' UTR | +/- | 2A 와 2B 사이의 인 프레임 링커 | 리보자임-측접 게놈 플라스미드 |
| SVV | | | +/- | 2A 와 2B 사이의 인 프레임 링커 | 리보자임-측접 게놈 플라스미드 |
| 폴리오 바이러스 | miR-124<br>miR-145<br>miR-34a<br>let7 | 게놈의 3' UTR | +/- | | 게놈 플라스미드 |
| VSV | miR-124<br>miR-143<br>miR-145<br>let7 | N, P M 및/또는 L | +/- | | 게놈 플라스미드 |
| 아데노바이러스 | miR-124<br>miR-143<br>miR-145<br>let7 | E1, E2, E3 및/또는 E4 | +/- | | 게놈 플라스미드 |

[0392]

[0393] 실시예 13: 간세포 암종을 앓고 있는 환자의 치료.

[0394] 간세포 암종을 앓고 있는 환자를 치료하는 것에 대한, 본 명세서에 기재된 자기-복제 바이러스 게놈의 능력을 평가하기 위해서 실시예 11에 따라서 실험을 수행할 수 있다.

[0395] LNP 중에 캡슐화될 수 있고, 간세포 암종의 치료에 사용될 수 있는 예시적인 자기-복제 폴리뉴클레오타이드를 하기 표 14에 요약한다.

표 14

간세포 암종의 치료를 위한 자기-복제 벡터의 요약

| 바이러스 | miR-T | miR-T 삽입 위치 | 페이로드 | 페이로드 삽입 위치 | 벡터 |
|---|---|---|---|---|---|
| 폴리오 바이러스 | miR-124<br>miR-145<br>miR-34a<br>let7 | 게놈의 3' UTR | +/- | | ITR-측접 NanoV 작제물 |
| VSV | miR-122<br>miR-124<br>miR-34a<br>let7 | N, P M 및/또는 L | +/- | | ITR-측접 NanoV 작제물 |
| 아데노바이러스 | miR-122<br>miR-124<br>miR-34a<br>let7 | E1, E2, E3 및/또는 E4 | +/- | | ITR-측접 NanoV 작제물 |
| 콕사키바이러스 (CVB3) | | 게놈의 3' UTR | +/- | 2A 와 2B 사이의 인 프레임 링커 | 리보자임-측접 게놈 플라스미드 |
| SVV | | | +/- | 2A 와 2B 사이의 인 프레임 링커 | 리보자임-측접 게놈 플라스미드 |
| 폴리오 바이러스 | miR-124<br>miR-145<br>miR-34a<br>let7 | 게놈의 3' UTR | +/- | | 게놈 플라스미드 |
| VSV | miR-122<br>miR-124<br>miR-34a<br>let7 | N, P M 및/또는 L | +/- | | 게놈 플라스미드 |
| 아데노바이러스 | miR-122<br>miR-124<br>miR-34a<br>let7 | E1, E2, E3 및/또는 E4 | +/- | | 게놈 플라스미드 |

[0396]

[0397] 실시예 14: 전립선암을 앓고 있는 환자의 치료.

[0398] 전립선암을 앓고 있는 환자를 치료하는 것에 대한, 본 명세서에 기재된 자기-복제 바이러스 게놈의 능력을 평가하기 위해서 실시예 11에 따라서 실험을 수행할 수 있다.

[0399] LNP 중에 캡슐화될 수 있고, 전립선암의 치료에 사용될 수 있는 예시적인 자기-복제 폴리뉴클레오타이드를 하기 표 15에 요약한다.

*표 15*

**전립선암의 치료를 위한 자기-복제 벡터의 요약**

| 바이러스 | miR-T | miR-T 삽입 위치 | 페이로드 | 페이로드 삽입 위치 | 벡터 |
|---|---|---|---|---|---|
| 폴리오 바이러스 | miR-124<br>miR-143<br>miR-145<br>let7 | 게놈의 3' UTR | +/- | | ITR-측접 NanoV 작제물 |
| VSV | miR-124<br>miR-143<br>miR-145<br>let7 | N, P M 및/또는 L | +/- | | ITR-측접 NanoV 작제물 |
| 아데노바이러스 | miR-124<br>miR-145<br>miR-34a<br>let7 | E1, E2, E3 및/또는 E4 | +/- | | ITR-측접 NanoV 작제물 |
| 콕사키바이러스 (CVB3) | | 게놈의 3' UTR | +/- | 2A 와 2B 사이의 인 프레임 링커 | 리보자임-측접 게놈 플라스미드 |
| SVV | | | +/- | 2A 와 2B 사이의 인 프레임 링커 | 리보자임-측접 게놈 플라스미드 |
| 폴리오 바이러스 | miR-124<br>miR-143<br>miR-145<br>let7 | 게놈의 3' UTR | +/- | | 게놈 플라스미드 |
| VSV | miR-124<br>miR-143<br>miR-145<br>let7 | N, P M 및/또는 L | +/- | | 게놈 플라스미드 |
| 아데노바이러스 | miR-124<br>miR-145<br>miR-34a<br>let7 | E1, E2, E3 및/또는 E4 | +/- | | 게놈 플라스미드 |

[0400]

[0401] **참고문헌의 포함**

[0402] 본 명세서에 인용된 모든 참고문헌, 논문, 간행물, 특허, 특허 공보 및 특허 출원은 모든 목적을 위해서 이들의 전문이 참고로 포함된다. 그러나, 본 명세서에 인용된 임의의 참고 문헌, 기사, 간행물, 특허, 특허 공개 및 특허 출원에 대한 언급은 이들이 유효한 선행 기술을 구성하거나 전세계의 임의의 국가에서 공통된 일반적인 지식의 부분을 형성한다는 것을 인정 또는 제안하는 형태로 간주되어서는 안 된다.

[0403] 본 개시내용의 바람직한 실시형태가 본 명세서에 제시되고 기술되어 있지만, 이러한 실시형태는 단지 예의 방식에 의해서 제공됨은, 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 자명할 것이다. 이제 다수의 변경, 변화 및 치환이 본 개시내용으로부터 벗어나지 않으면서 당업자에게 일어날 것이다. 본 명세서에 기술된 본 개시내용의 실시형태에 대한 다양한 대안이 본 개시내용을 실시하는 데 사용될 수 있음을 이해해야 한다. 하기 청구범위는 본 개시내용의 범주를 한정하고, 청구범위 및 이의 등가물의 범주 내의 방법 및 구조는 이에 의해서 포함되도록 의도된다.

표 1

12 종의 선택된 oncomiR(9 종의 종양억제인자 3 종의 종양원성 miRNA)과 각종 암 간의 관계의 요약

| | 하향 조절됨 | | | | | | | | 상향 조절됨 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 악성 | let-7 | miR-15a | miR-16 | miR-29a | miR-34a | miR-98 | miR-101 | miR-124 | miR-202 | miR-17 | miR-21 | miR-155 |
| 급성 림프아구성백혈병 | X | | | | | | | X | | | | |
| 급성 골수성 백혈병 | X | | | X | | | | | | X | | X |
| 급성 전골수구 백혈병 | X | | | | | | | | | | | |
| 부신 피질 암종 | | | | | | | | | | | X | |
| 역형성 성상세포종 | | | | | | | | X | | | | |
| 역형성 거대-세포림프종 | | | | | | | | | | | | X |
| 성상세포종 | | | | | | | | X | | | | |
| B세포 림프종 | | | | | X | | | | | X | | |
| 방광암 | | | X | | X | | X | X | | X | | X |
| 유방암 | X | X | X | X | X | X | | X | | X | | X |
| 유방 암종 | | | | | | | | | | X | | |
| 기관지 폐포 암종 | X | | | | | X | | | | | | |
| 자궁경부암 | | | | | | | | X | | X | | X |
| 자궁경부 암종 | | X | X | | X | | X | | | | | |
| 자궁경부 편평 세포암종 | | | | X | | | | X | | | | |
| 담관암종 | | | | | X | | X | | | X | | |
| 연골육종 | X | | | | | | | | | | | |
| 척색종 | | | | | X | | | | | | | |
| 융모막암종 | | | | | X | | | | | | | |
| 만성 림프구성 백혈병 | | X | X | | | | | | | | | X |
| 만성 골수성 백혈병 | | | X | | | | | | | | | X |
| 투명 세포 신장세포 암 | | | | | X | | | | | | | X |
| 결장암 | X | | | | X | X | X | | | | | X |
| 결장직장암 | X | X | X | X | X | | X | X | X | X | | X |
| 결장직장암종 | | | | | | | | | | X | | X |
| 피부 T세포 림프종 | | | | | | | | | | | | X |
| 미만성 거대 B세포 림프종 | | | | | | | | | | | | X |
| 자궁내막 암 | | | | | X | | X | | | | | X |
| 상피 난소암 | | | | | | | | X | | | | |
| 식도암 | | X | | | | | X | X | | | | |
| 식도 편평 세포암종 | X | | X | | X | X | X | | | X | | |
| 간장외 담관암종 | | | | | X | | | | | | | |
| 소포성 림프종 | | | | | | | | | X | | | |
| 담낭 암종 | | | | | | | | | | | | X |
| 위암 | X | | | X | X | X | X | X | X | X | | X |
| 교모세포종 | X | | | | X | | X | X | | | | |

[0404]

| | 하향 조절됨 | | | | | | | | | 상향 조절됨 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 악성 | let-7 | miR-15a | miR-16 | miR-29a | miR-34a | miR-98 | miR-101 | miR-124 | miR-202 | miR-17 | miR-21 | miR-155 |
| 신경교종 | X | | X | | X | X | | X | | X | | X |
| 두경부암 | | | | | | | | | | | | |
| 두경부 편평 세포 암종 | X | | X | X | X | | | | | | X | |
| 간세포 암종 | X | | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 하인두 편평 세포 암종 | | | | | | | | | | | X | |
| 신장암 | | | | | | | | | | | X | |
| 후두 암종 | | | X | | | | | | | | X | |
| 후두 편평 세포암종 | | | | | | | X | | | | X | |
| 간암 | | | | | | | X | | | | X | X |
| 폐 선암종 | | | X | | | | | | | | | X |
| 폐암 | X | X | X | | X | X | X | | | X | X | X |
| 악성 흑색종 | X | | | | X | X | X | | | X | X | X |
| 말트림프종 | | | | | | | | | | | | X |
| 외투세포림프종 | | | | X | | | | X | | X | | X |
| 수모세포종 | | | | | | | | X | | X | | |
| 간충직 암 | | | | X | | | | | | | | |
| 단핵구성 백혈병 | | | | X | | | | | | | | |
| 다발성 골수종 | | | | | | | | | | | X | |
| 비인두암 | | | | | | | | | | X | | |
| 비인두암종 | X | | | | | X | X | X | | | X | X |
| 신경모세포종 | X | X | X | X | X | X | | X | | | | |
| 비소세포 폐암 | X | X | X | X | X | | X | X | | X | X | X |
| 구강암 | X | | | | X | | | | | | X | |
| 구강 편평 세포암종 | | | | X | | | | X | | | X | X |
| 골육종 | X | X | X | | X | | X | X | X | X | X | |
| 난소암 | X | | | | X | X | | X | | | X | X |
| 난소 암종 | | | | | | | X | | | | | |
| 췌장 선암종 | | | | | X | | | | | | X | |
| 췌장암 | | X | | | | | X | X | | X | X | |
| 췌관 선암종 | X | X | X | | X | X | | | | | X | |
| 갑상선 유두 암종 | X | | X | | X | | X | | | | X | X |
| 뇌하수체 암종 | | | | | | | | | | X | | |
| 전립선암 | X | X | X | | X | | X | X | | | X | |
| 직장암 | | | | | X | | | | | | X | X |
| 신장세포 암종 | X | | X | | X | | | | | | X | |
| 신장투명 세포 암종 | X | | | | | | | | | | | X |
| 망막모세포종 | | | | | X | | X | | | | X | |

[0405]

| | 하향 조절됨 | | | | | | | | | 상향 조절됨 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 악성 | let-7 | miR-15a | miR-16 | miR-29a | miR-34a | miR-98 | miR-101 | miR-124 | miR-202 | miR-17 | miR-21 | miR-155 |
| 편평세포 암종 | | X | X | | X | | | | | | X | X |
| T세포 림프모구림프종 | | | | | | | | | | X | | |
| 포도막 흑색종 | | | | | X | | | | | | | |

[0406]

표 2

**oncomiR 및 암의 요약**

| 악성 | 하향 조절되는 miR | 상향 조절되는 miR |
|---|---|---|
| 유방암 | let-7a, let-7a-1, let-7a-2, let-7a-3, let-7b, let-7c, let-7d, let-7e, let-7f-1, let-7f-2, let-7g, let-7i, mir-100, mir-107, mir-10a, mir-10b, mir-122, mir-124, mir-1258, mir-125a-5p, mir-125b, mir-126, mir-127, mir-129, mir-130a, mir-132, mir-133a, mir-143, mir-145, mir-146a, mir-146b, mir-147, mir-148a, mir-149, mir-152, mir-153, mir-15a, mir-16, mir-17-5p, mir-181a, mir-1826, mir-183, mir-185, mir-191, mir-193a-3p, mir-193b, mir-195, mir-199b-5p, mir-19a-3p, mir-200a, mir-200b, mir-200c, mir-205, mir-206, mir-211, mir-216b, mir-218, mir-22, mir-26a, mir-26b, mir-300, mir-30a, mir-31, mir-335, mir-339-5p, mir-33b, mir-34a, mir-34b, mir-34c, mir-374a, mir-379, mir-381, mir-383, mir-425, mir-429, mir-450b-3p, mir-494, mir-495, mir-497, mir-502-5p, mir-517a, mir-574-3p, mir-638, mir-7, mir-720, mir-7515, mir-92a, mir-98, mir-99a, mmu-mir-290-3p, mmu-mir-290-5p | mir-10b, mir-125a, mir-135a, mir-140, mir-141, mir-142, mir-150, mir-155, mir-181a, mir-181b, mir-182, mir-18a, mir-18b, mir-191, mir-196a, mir-197, mir-19a, mir-19b, mir-200a, mir-200b, mir-200c, mir-203, mir-205, mir-20a, mir-20b, mir-21, mir-217, mir-221, mir-224, mir-23a, mir-24, mir-24-2-5p, mir-24-3p, mir-27a, mir-29a, mir-29b-1, mir-29b-2, mir-29c, mir-373, mir-378, mir-423, mir-429, mir-495, mir-503, mir-510, mir-520c, mir-526b, mir-96 |
| 연골육종 | let-7a, mir-100, mir-136, mir-145, mir-199a, mir-222, mir-30a, mir-335, mir-376a | |
| 결장직장암 | let-7a, mir-1, mir-100, mir-101, mir-124, mir-125a, mir-126, mir-129, mir-1295b-3p, mir-1307, mir-130b, mir-132, mir-133a, mir-133b, mir-137, mir-138, mir-139, mir-139-5p, mir-140-5p, mir-143, mir-145, mir-148a, mir-148b, mir-149, mir-150-5p, mir-154, mir-15a, mir-15b, mir-16, mir-18a, mir-191, mir-192, mir-193a-5p, mir-194, mir-195, mir-196a, mir-198, mir-199a-5p, mir-200c, mir-203, mir-204-5p, mir-206, mir-212, mir-215, mir-218, mir-22, mir-224, mir-24-3p, mir-26b, mir-27a, mir-28-3p, | let-7a, mir-103, mir-106a, mir-10b, mir-1179, mir-1229, mir-1246, mir-125b-2*, mir-1269a, mir-130b, mir-133b, mir-135a, mir-135a-1, mir-135a-2, mir-135b, mir-139-3p, mir-145, mir-150, mir-150*, mir-155, mir-17, mir-181a, mir-182, mir-183, mir-18a, mir-191, mir-196a, mir-196b, mir-19a, mir-19b, mir-200b, mir-200c, mir-203, mir-204-5p, mir-20a, mir-20a-5p, mir-21, mir-210, mir-211, mir-221, mir-223, |

[0407]

| 악성 | 하향 조절되는 miR | 상향 조절되는 miR |
|---|---|---|
| | mir-28-5p, mir-29b, mir-30a-3p, mir-30b, mir-320a, mir-328, mir-338-3p, mir-342, mir-345, mir-34a, mir-34a-5p, mir-361-5p, mir-375, mir-378, mir-378a-3p, mir-378a-5p, mir-409-3p, mir-422a, mir-4487, mir-483, mir-497, mir-498, mir-518a-3p, mir-551a, mir-574-5p, mir-625, mir-638, mir-7, mir-96-5p | mir-224, mir-23a, mir-25, mir-27a, mir-29a, mir-301a, mir-31, mir-32, mir-320b, mir-326, mir-424, mir-429, mir-494, mir-497, mir-499-5p, mir-592, mir-630, mir-7-5p, mir-892a, mir-92, mir-92a, mir-93, mir-95, mir-96 |
| 식도 편평 세포암종 | let-7a, let-7a-1, let-7a-2, let-7a-3, let-7b, let-7c, let-7d, let-7e, let-7f-1, let-7f-2, let-7g, let-7i, mir-1, mir-100, mir-101, mir-126, mir-1294, mir-133a, mir-133b, mir-138, mir-143, mir-145, mir-150, mir-185, mir-195, mir-200b, mir-203, mir-21, mir-210, mir-214, mir-218, mir-22, mir-27a, mir-29b, mir-29c, mir-302b, mir-34a, mir-375, mir-494, mir-518b, mir-655, mir-98, mir-99a | mir-100, mir-1179, mir-1290, mir-130b, mir-145, mir-16, mir-17, mir-183, mir-18a, mir-19a, mir-19b, mir-208, mir-20a, mir-21, mir-218, mir-223, mir-25, mir-30a-5p, mir-31, mir-330-3p, mir-373, mir-9, mir-92a, mir-942 |
| 위암 | let-7a, let-7b, let-7g, mir-1, mir-101, mir-103a, mir-10a, mir-10b, mir-1207-5p, mir-122, mir-1228*, mir-124, mir-124-3p, mir-125a-3p, mir-126, mir-1266, mir-1271, mir-129-1-3p, mir-129-2-3p, mir-129-3p, mir-129-5p, mir-133a, mir-133b, mir-137, mir-141, mir-143, mir-144, mir-145, mir-146a, mir-146a-5p, mir-148a, mir-148b, mir-149, mir-152, mir-155, mir-155-5p, mir-181a, mir-181b, mir-182, mir-183, mir-185, mir-194, mir-195, mir-197, mir-199a-3p, mir-200b, mir-200c, mir-202-3p, mir-204, mir-204-5p, mir-205, mir-206, mir-210, mir-212, mir-217, mir-218, mir-22, mir-23b, mir-24, mir-26a, mir-29a, mir-29a-3p, mir-29b, mir-29b-1, mir-29b-2, mir-29c, mir-30a-5p, mir-30b, mir-31, mir-328, mir-329, mir-331-3p, mir-335-5p, mir-338, mir-338-3p, mir-34a, mir-34b, mir-34c, mir-361-5p, mir-367, mir-375, mir-378, mir-409-3p, mir-410, mir-429, mir-433, mir-449, mir-449a, mir-490-3p, mir- | mir-100, mir-103, mir-106a, mir-106b, mir-107, mir-10a, mir-10b, mir-1259, mir-125b, mir-126, mir-1274a, mir-1303, mir-130b*, mir-135a-5p, mir-135b, mir-138, mir-143, mir-146a, mir-147, mir-148a, mir-150, mir-17, mir-17-5p, mir-181a, mir-181a-2*, mir-181a-5p, mir-181c, mir-183, mir-185, mir-18a, mir-191, mir-192, mir-196a, mir-196a*, mir-196a-5p, mir-196b, mir-199a, mir-199a-3p, mir-199a-5p, mir-19a, mir-19b, mir-200b, mir-20a, mir-21, mir-214, mir-215, mir-221, mir-221*, mir-222, mir-223, mir-224, mir-23a, mir-23b, mir-27a, mir-27b, mir-296-5p, mir-301a, mir-302f, mir-337-3p, mir-340*, mir-34a, mir-362-3p, mir-370, mir-374a, mir-377, mir-421, mir-425, mir-500, mir-520c-3p, mir-544, |

[0408]

| 악성 | 하향 조절되는 miR | 상향 조절되는 miR |
|---|---|---|
| | 494, mir-497, mir-503, mir-506, mir-513b, mir-520d-3p, mir-542-3p, mir-622, mir-625, mir-638, mir-663, mir-7, mir-765, mir-9 | mir-575, mir-601, mir-616*, mir-650, mir-92, mir-98, mir-99a |
| 신경교종 | let-7a, let-7f, mir-106a, mir-107, mir-122, mir-124, mir-124-5p, mir-124a, mir-125b, mir-128, mir-136, mir-137, mir-139, mir-143, mir-145, mir-146a, mir-146b, mir-146b-5p, mir-152, mir-15b, mir-16, mir-181a, mir-181a-1, mir-181a-2, mir-181b, mir-181b-1, mir-181b-2, mir-181c, mir-181d, mir-184, mir-185, mir-195, mir-199a-3p, mir-200a, mir-200b, mir-203, mir-204, mir-205, mir-218, mir-219-5p, mir-23b, mir-26b, mir-27a, mir-29c, mir-320, mir-326, mir-328, mir-34a, mir-34c-3p, mir-34c-5p, mir-375, mir-383, mir-451, mir-452, mir-483-5p, mir-495, mir-584, mir-622, mir-656, mir-7, mir-98 | mir-106b, mir-106b-5p, mir-10b, mir-125b, mir-132, mir-155, mir-17, mir-181a, mir-182, mir-183, mir-193b, mir-19a, mir-19b, mir-20a, mir-210, mir-214, mir-221, mir-222, mir-224, mir-23a, mir-24, mir-24-3p, mir-25, mir-26a, mir-27a-3p, mir-27b, mir-30a-5p, mir-30e, mir-30e*, mir-328, mir-335, mir-33a, mir-372, mir-486, mir-494, mir-497, mir-566, mir-603, mir-650, mir-675, mir-9, mir-92b, mir-93, mir-96 |
| 비인두암종 | let-7a, let-7a-1, let-7a-2, let-7a-3, let-7b, let-7c, let-7d, let-7e, let-7f-1, let-7f-2, let-7g, let-7i, mir-1, mir-101, mir-124, mir-138, mir-143, mir-145, mir-148a, mir-200b, mir-204, mir-216b, mir-29c, mir-320a, mir-324-3p, mir-34c, mir-375, mir-378, mir-451, mir-506, mir-9, mir-98 | mir-10b, mir-144, mir-149, mir-155, mir-18a, mir-21, mir-214, mir-24, mir-421, mir-663, mir-7-5p, mir-93 |
| 비소세포 폐암 | let-7a, let-7c, mir-1, mir-100, mir-101, mir-106a, mir-107, mir-124, mir-125a-3p, mir-125a-5p, mir-126*, mir-129, mir-133a, mir-137, mir-138, mir-140, mir-143, mir-145, mir-146a, mir-146b, mir-148a, mir-148b, mir-149, mir-152, mir-153, mir-154, mir-155, mir-15a, mir-16, mir-17-5p, mir-181a-1, mir-181a-2, mir-181b, mir-181b-1, mir-181b-2, mir-181c, mir-181d, mir-184, mir-186, mir-193b, mir-195, mir-199a, mir-204, mir-212, mir-221, mir-224, mir-26b, mir-27a, mir-27b, mir-29a, mir-29b, mir-29c, mir-30a, mir-30b, mir-30c, mir-30d, mir-30d-5p, mir-30e-5p, mir-32, mir- | mir-10b, mir-125a-5p, mir-1280, mir-136, mir-140, mir-141, mir-142-3p, mir-145, mir-146a, mir-150, mir-18a, mir-196a, mir-19a, mir-200a, mir-200c, mir-205, mir-205-5p, mir-21, mir-212, mir-22, mir-221, mir-222, mir-24, mir-25, mir-29c, mir-31, mir-328, mir-330-3p, mir-339, mir-34a, mir-375, mir-494, mir-675-5p, mir-9, mir-92b, mir-93, mir-95 |

[0409]

| 악성 | 하향 조절되는 miR | 상향 조절되는 miR |
|---|---|---|
| | 335, mir-338-3p, mir-340, mir-342-3p, mir-34a, mir-34b, mir-361-3p, mir-365, mir-373, mir-375, mir-429, mir-449a, mir-4500, mir-451, mir-4782-3p, mir-497, mir-503, mir-512-3p, mir-520a-3p, mir-526b, mir-625*, mir-96, mir-99a | |
| 골육종 | let-7a, mir-1, mir-100, mir-101, mir-122, mir-124, mir-125b, mir-126, mir-127-3p, mir-132, mir-133a, mir-141, mir-142-3p, mir-142-5p, mir-143, mir-144, mir-145, mir-153, mir-16, mir-183, mir-194, mir-195, mir-199a-3p, mir-204, mir-212, mir-217, mir-218, mir-22, mir-23a, mir-24, mir-26a, mir-26b, mir-29b, mir-32, mir-320, mir-335, mir-33b, mir-340, mir-34a, mir-34b, mir-34c, mir-375, mir-376c, mir-382, mir-3928, mir-424, mir-429, mir-449a, mir-451, mir-454, mir-503, mir-519d, mir-646 | mir-128, mir-151-3p, mir-17, mir-181a, mir-181b, mir-181c, mir-18a, mir-191, mir-195-5p, mir-199a-3p, mir-19a, mir-19b, mir-20a, mir-21, mir-210, mir-214, mir-221, mir-27a, mir-300, mir-320a, mir-374a-5p, mir-720, mir-9, mir-92a |
| 췌관 선암종 | let-7a, let-7a-1, let-7a-2, let-7a-3, let-7b, let-7c, let-7d, let-7e, let-7f-1, let-7f-2, let-7g, let-7i, mir-126, mir-135a, mir-143, mir-144, mir-145, mir-148a, mir-150, mir-15a, mir-16, mir-200a, mir-200b, mir-200c, mir-217, mir-218, mir-337, mir-375, mir-494, mir-615-5p, mir-98 | mir-10b, mir-186, mir-18a, mir-192, mir-194, mir-196a, mir-198, mir-203, mir-21, mir-212, mir-30b-5p, mir-31, mir-34a, mir-369-5p, mir-376a, mir-541 |
| 신장세포 암종 | let-7a, let-7d, mir-1, mir-106a*, mir-126, mir-1285, mir-129-3p, mir-1291, mir-133a, mir-133b, mir-135a, mir-138, mir-141, mir-143, mir-145, mir-182-5p, mir-199a-3p, mir-200a, mir-205, mir-218, mir-28-5p, mir-30a, mir-30c, mir-30d, mir-34a, mir-378, mir-429, mir-509-3p, mir-509-5p, mir-646 | mir-100, mir-1233, mir-1260b, mir-146a, mir-146b, mir-16, mir-193a-3p, mir-203a, mir-21, mir-210, mir-27a, mir-362, mir-572, mir-7 |
| 기관지 폐포 암종 | let-7a-1, let-7a-2, let-7a-3, let-7b, let-7c, let-7d, let-7e, let-7f-1, let-7f-2, let-7g, let-7i, mir-98 | |
| 결장암 | let-7a-1, let-7a-2, let-7a-3, let-7b, let-7c, let-7d, let-7e, let-7f-1, let-7f-2, let-7g, let-7i, mir-100, mir-101, mir- | mir-1290, mir-145, mir-155, mir-181a, mir-18a, mir-200c, mir-31, mir-675 |

[0410]

| 악성 | 하향 조절되는 miR | 상향 조절되는 miR |
|---|---|---|
| | 126, mir-142-3p, mir-143, mir-145, mir-192, mir-200c, mir-21, mir-214, mir-215, mir-25, mir-302a, mir-320, mir-320a, mir-34a, mir-34c, mir-365, mir-373, mir-424, mir-429, mir-455, mir-484, mir-502, mir-503, mir-93, mir-98 | |
| 간세포 암종 | let-7a-1, let-7a-2, let-7a-3, let-7b, let-7c, let-7d, let-7e, let-7f, let-7f-1, let-7f-2, let-7g, let-7i, mir-1, mir-100, mir-101, mir-105, mir-122, mir-122a, mir-1236, mir-124, mir-125b, mir-126, mir-127, mir-1271, mir-128-3p, mir-129-5p, mir-130a, mir-130b, mir-133a, mir-134, mir-137, mir-138, mir-139, mir-139-5p, mir-140-5p, mir-141, mir-142-3p, mir-143, mir-144, mir-145, mir-146a, mir-148a, mir-148b, mir-150-5p, mir-15b, mir-16, mir-181a-5p, mir-185, mir-188-5p, mir-193b, mir-195, mir-195-5p, mir-197, mir-198, mir-199a, mir-199a-5p, mir-199b, mir-199b-5p, mir-200a, mir-200b, mir-200c, mir-202, mir-203, mir-204-3p, mir-205, mir-206, mir-20a, mir-21, mir-21-3p, mir-211, mir-212, mir-214, mir-217, mir-218, mir-219-5p, mir-22, mir-26a, mir-26b, mir-29a, mir-29b-1, mir-29b-2, mir-29c, mir-302b, mir-302c, mir-30a, mir-30a-3p, mir-335, mir-338-3p, mir-33a, mir-34a, mir-34b, mir-365, mir-370, mir-372, mir-375, mir-376a, mir-377, mir-422a, mir-424, mir-424-5p, mir-433, mir-4458, mir-448, mir-450a, mir-451, mir-485-5p, mir-486-5p, mir-497, mir-503, mir-506, mir-519d, mir-520a, mir-520b, mir-520c-3p, mir-582-5p, mir-590-5p, mir-610, mir-612, mir-625, mir-637, mir-675, mir-7, mir-877, mir-940, mir-941, mir-98, mir-99a | mir-106b, mir-10b, mir-122, mir-1228, mir-1269, mir-128a, mir-130a, mir-130b, mir-146a, mir-153, mir-155, mir-17-5p, mir-181a, mir-181a-1, mir-181a-2, mir-181b, mir-181b-1, mir-181b-2, mir-181c, mir-181d, mir-182, mir-183, mir-184, mir-190b, mir-191, mir-20a, mir-20b, mir-21, mir-210, mir-214, mir-215, mir-216a, mir-217, mir-221, mir-222, mir-223, mir-224, mir-23a, mir-24, mir-25, mir-27a, mir-301a, mir-30d, mir-31, mir-3127, mir-32, mir-331-3p, mir-362-3p, mir-371-5p, mir-372, mir-373, mir-423, mir-429, mir-452, mir-483-3p, mir-483-5p, mir-485-3p, mir-490-3p, mir-494, mir-495, mir-500, mir-501-5p, mir-519d, mir-520g, mir-574-3p, mir-590-5p, mir-630, mir-650, mir-657, mir-664, mir-885-5p, mir-9, mir-92a, mir-96 |
| 폐암 | let-7a-1, let-7a-2, let-7a-3, let-7b, let-7c, let-7d, let-7e, let-7f-1, let-7f-2, let-7g, let-7i, mir-1, mir-101, mir- | mir-10b, mir-135b, mir-150, mir-155, mir-17, mir-182, mir-183-3p, mir-18a, mir-197, mir- |

[0411]

| 악성 | 하향 조절되는 miR | 상향 조절되는 miR |
|---|---|---|
| | 133b, mir-138, mir-142-5p, mir-144, mir-145, mir-1469, mir-146a, mir-153, mir-15a, mir-15b, mir-16-1, mir-16-2, mir-182, mir-192, mir-193a-3p, mir-194, mir-195, mir-198, mir-203, mir-217, mir-218, mir-22, mir-223, mir-26a, mir-26b, mir-29c, mir-33a, mir-34a, mir-34b, mir-34c, mir-365, mir-449a, mir-449b, mir-486-5p, mir-545, mir-610, mir-614, mir-630, mir-660, mir-7-5p, mir-9500, mir-98, mir-99b | 19a, mir-19b, mir-205, mir-20a, mir-21, mir-210, mir-24, mir-30d, mir-4423, mir-5100, mir-570, mir-663, mir-7, mir-92a |
| 신경모세포종 | let-7a-1, let-7a-2, let-7a-3, let-7b, let-7c, let-7d, let-7e, let-7f-1, let-7f-2, let-7g, let-7i, mir-124, mir-137, mir-145, mir-181c, mir-184, mir-200a, mir-29a, mir-335, mir-338-3p, mir-34a, mir-449a, mir-885-5p, mir-98 | mir-125b, mir-15a, mir-15b, mir-16-1, mir-16-2, mir-18a, mir-195, mir-19a, mir-23a, mir-421, mir-92 |
| 전립선암 | let-7a-3p, let-7c, mir-100, mir-101, mir-105, mir-124, mir-128, mir-1296, mir-130b, mir-133a-1, mir-133a-2, mir-133b, mir-135a, mir-143, mir-145, mir-146a, mir-154, mir-15a, mir-187, mir-188-5p, mir-199b, mir-200b, mir-203, mir-205, mir-212, mir-218, mir-221, mir-224, mir-23a, mir-23b, mir-25, mir-26a, mir-26b, mir-29b, mir-302a, mir-30a, mir-30b, mir-30c-1, mir-30c-2, mir-30d, mir-30e, mir-31, mir-330, mir-331-3p, mir-34a, mir-34b, mir-34c, mir-374b, mir-449a, mir-4723-5p, mir-497, mir-628-5p, mir-642a-5p, mir-720, mir-940 | mir-125b, mir-141, mir-153, mir-155, mir-181a-1, mir-181a-2, mir-181b, mir-181b-1, mir-181b-2, mir-181c, mir-181d, mir-182, mir-182-5p, mir-183, mir-18a, mir-204, mir-20a, mir-21, mir-221, mir-223-3p, mir-31, mir-429, mir-96 |
| 급성 림프아구성백혈병 | let-7b, mir-124a, mir-142-3p | mir-128 |
| 악성 흑색종 | let-7b, mir-101, mir-125b, mir-1280, mir-143, mir-146a, mir-146b, mir-155, mir-17, mir-184, mir-185, mir-18b, mir-193b, mir-200c, mir-203, mir-204, mir-205, mir-206, mir-20a, mir-211, mir-218, mir-26a, mir-31, mir-33a, mir-34a, mir-34c, mir-376a, mir-376c, mir-573, mir-7, mir-9, mir-98 | mir-126, mir-141, mir-15b, mir-17, mir-17-5p, mir-182, mir-18a, mir-193b, mir-200a, mir-200b, mir-200c, mir-20a, mir-21, mir-210, mir-214, mir-221, mir-222, mir-429, mir-455-5p, mir-532-5p, mir-638, mir-92a |

[0412]

| 악성 | 하향 조절되는 miR | 상향 조절되는 miR |
|---|---|---|
| 신장투명 세포 암종 | let-7b, let-7c, mir-138, mir-141, mir-200c, mir-204, mir-218, mir-335, mir-377, mir-506 | mir-122, mir-155, mir-630 |
| 급성 골수성 백혈병 | let-7c, mir-17, mir-181a, mir-20a, mir-223, mir-26a, mir-29a, mir-30c, mir-7 | mir-125b, mir-126-5p, mir-128, mir-155, mir-29a, mir-32, mir-331, mir-370, mir-378 |
| 급성 전골수구 백혈병 | let-7c, mir-107, mir-342 | mir-181a, mir-181b, mir-92a |
| 두경부 편평 세포암종 | let-7d, mir-1, mir-107, mir-128, mir-133a, mir-138, mir-149, mir-200c, mir-205, mir-218, mir-27a*, mir-29a, mir-29b-1, mir-29b-2, mir-29c, mir-300, mir-34a, mir-363, mir-375, mir-874 | mir-106b, mir-134, mir-16, mir-184, mir-196a, mir-21, mir-25, mir-30a-5p, mir-31, mir-372, mir-93 |
| 구강암 | let-7d, mir-218, mir-34a, mir-375, mir-494 | mir-10b, mir-196a-1, mir-196a-2, mir-196b, mir-21 |
| 갑상선 유두 암종 | mir-101, mir-130b, mir-138, mir-146a, mir-16, mir-195, mir-199a-3p, mir-204-5p, mir-219-5p, mir-26a, mir-34b, mir-613 | let-7e, mir-146b, mir-146b-5p, mir-151-5p, mir-155, mir-181a-1, mir-181a-2, mir-181b-1, mir-181b-2, mir-181c, mir-181d, mir-182, mir-183, mir-199b-5p, mir-21, mir-221, mir-222, mir-339-5p, mir-34a |
| 교모세포종 | let-7g-5p, mir-100, mir-101, mir-106a, mir-124, mir-124a, mir-125a, mir-125a-5p, mir-125b, mir-127-3p, mir-128, mir-129, mir-136, mir-137, mir-139-5p, mir-142-3p, mir-143, mir-145, mir-146b-5p, mir-149, mir-152, mir-153, mir-195, mir-21, mir-212-3p, mir-219-5p, mir-222, mir-29b, mir-31, mir-3189-3p, mir-320, mir-320a, mir-326, mir-330, mir-331-3p, mir-340, mir-342, mir-34a, mir-376a, mir-449a, mir-483-5p, mir-503, mir-577, mir-663, mir-7, mir-744 | mir-10b, mir-125b, mir-127-3p, mir-148a, mir-18a, mir-196a, mir-196a-1, mir-196a-2, mir-196b, mir-21, mir-210, mir-210-3p, mir-223, mir-340, mir-576-5p, mir-626, mir-92b |
| 난소암 | let-7i, mir-100, mir-124, mir-125b, mir-129-5p, mir-130b, mir-133a, mir-137, mir-138, mir-141, mir-145, mir-148a, mir-152, mir-153, mir-155, mir-199a, mir-200a, mir-200b, mir-200c, mir-212, mir-335, mir-34a, mir-34b, mir-34c, mir-409-3p, mir-411, mir-429, mir-432, mir-449a, mir-494, | mir-106a, mir-141, mir-148b, mir-181b, mir-182, mir-200a, mir-200c, mir-205, mir-20a, mir-21, mir-210, mir-214, mir-221, mir-224-5p, mir-23b, mir-25, mir-26a, mir-27a, mir-27b, mir-346, mir-378, mir-424, mir-503, mir-572, mir-9, |

[0413]

[0414]

| 악성 | 하향 조절되는 miR | 상향 조절되는 miR |
|---|---|---|
| | mir-497, mir-498, mir-519d, mir-655, mir-9, mir-98 | mir-96 |
| 방광암 | mir-1, mir-101, mir-1180, mir-1236, mir-124-3p, mir-125b, mir-126, mir-1280, mir-133a, mir-133b, mir-141, mir-143, mir-144, mir-145, mir-155, mir-16, mir-18a, mir-192, mir-195, mir-200a, mir-200b, mir-200c, mir-203, mir-205, mir-214, mir-218, mir-23b, mir-26a, mir-29c, mir-320c, mir-34a, mir-370, mir-409-3p, mir-429, mir-451, mir-490-5p, mir-493, mir-576-3p, mir-99a | mir-103a-3p, mir-10b, mir-135a, mir-137, mir-141, mir-155, mir-17-5p, mir-182, mir-182-5p, mir-183, mir-185, mir-19a, mir-203, mir-205, mir-210, mir-221, mir-222, mir-223, mir-23a, mir-23b, mir-26b, mir-639, mir-96 |
| 척색종 | mir-1, mir-222, mir-31, mir-34a, mir-608 | mir-140-3p, mir-148a |
| 신장암 | mir-1, mir-145, mir-1826, mir-199a, mir-199a-3p, mir-203, mir-205, mir-497, mir-508-3p, mir-509-3p | mir-183, mir-21, mir-210, mir-223 |
| 자궁경부 암종 | mir-100, mir-101, mir-15a, mir-16, mir-34a, mir-886-5p, mir-99a, mir-99b | mir-133b, mir-21, mir-25, mir-373 |
| 간충직 암 | mir-100, mir-141, mir-199b-5p, mir-200a, mir-200b, mir-200c, mir-29a, mir-29b-1, mir-29b-1-5p, mir-29b-2, mir-29c, mir-335, mir-429, mir-99a | mir-125b-1-3p, mir-182 |
| 구강 편평 세포암종 | mir-100, mir-124, mir-1250, mir-125b, mir-126, mir-1271, mir-136, mir-138, mir-145, mir-147, mir-148a, mir-181a, mir-206, mir-220a, mir-26a, mir-26b, mir-29a, mir-32, mir-323-5p, mir-329, mir-338, mir-370, mir-410, mir-429, mir-433, mir-499a-5p, mir-503, mir-506, mir-632, mir-646, mir-668, mir-877, mir-9 | mir-125b, mir-126, mir-146a, mir-146b, mir-155, mir-181b, mir-196a-1, mir-196a-2, mir-196b, mir-21, mir-221, mir-222, mir-24, mir-27b, mir-31, mir-345 |
| 난소 암종 | mir-100, mir-101, mir-34b, mir-34c, mir-532-5p | mir-148b, mir-182 |
| 담관암종 | mir-101, mir-144, mir-200b, mir-200c | mir-17, mir-18a, mir-19a, mir-19b, mir-20a, mir-21, mir-26a, mir-92a |
| 자궁내막 암 | mir-101, mir-130a, mir-130b, mir-134, mir-143, mir-145, mir-152, mir-205, mir-223, mir-301a, mir-301b, mir-30c, mir-34a, mir-34c, mir-424, mir-449a, mir-543 | mir-106a, mir-145, mir-155, mir-182, mir-200b, mir-200c, mir-205, mir-21, mir-222-3p, mir-25, mir-93 |

| 악성 | 하향 조절되는 miR | 상향 조절되는 miR |
|---|---|---|
| 식도암 | mir-124, mir-126, mir-140, mir-197, mir-203, mir-218, mir-223, mir-30b, mir-375, mir-454, mir-486, mir-574-3p | mir-101, mir-10b, mir-130a, mir-141, mir-143, mir-146b, mir-15a, mir-183, mir-196b, mir-200a, mir-203, mir-205, mir-21, mir-210, mir-221, mir-27a, mir-28-3p, mir-31, mir-452, mir-96, mir-99b |
| 간암 | mir-101, mir-122, mir-132, mir-140-5p, mir-145, mir-148b, mir-31, mir-338-3p, mir-433 | mir-1301, mir-155, mir-21, mir-221, mir-27a, mir-525-3p |
| 췌장암 | mir-101, mir-1181, mir-124, mir-1247, mir-133a, mir-141, mir-145, mir-146a, mir-148a, mir-148b, mir-150*, mir-150-5p, mir-152, mir-15a, mir-198, mir-203, mir-214, mir-216a, mir-29c, mir-335, mir-34a, mir-34b, mir-34c, mir-373, mir-375, mir-410, mir-497, mir-615-5p, mir-630, mir-96 | mir-10a, mir-10b, mir-132, mir-15a, mir-17-5p, mir-181a, mir-18a, mir-191, mir-196a, mir-21, mir-212, mir-214, mir-222, mir-27a, mir-301a, mir-301a-3p, mir-367, mir-424-5p, mir-7, mir-92, mir-99a |
| 망막모세포종 | mir-101, mir-183, mir-204, mir-34a, mir-365b-3p, mir-486-3p, mir-532-5p | mir-181b, mir-21 |
| 자궁경부 편평 세포암종 | mir-106a, mir-124, mir-148a, mir-214, mir-218, mir-29a, mir-375 | mir-205 |
| 투명 세포 신장세포 암 | mir-106a-5p, mir-135a-5p, mir-206 | mir-142-5p, mir-155, mir-21-5p |
| 후두 암종 | | mir-106b, mir-16, mir-21, mir-27a, mir-423-3p |
| 수모세포종 | mir-124, mir-128a, mir-199b-5p, mir-206, mir-22, mir-31, mir-383 | mir-106b, mir-17, mir-18a, mir-19a, mir-19b, mir-20a, mir-30b, mir-30d, mir-92 |
| 뇌하수체 암종 | | mir-106b, mir-122, mir-20a, mir-493 |
| 전립선 암종 | mir-107 | |
| 자궁경부암 | mir-143, mir-145, mir-17-5p, mir-203, mir-214, mir-218, mir-335, mir-342-3p, mir-372, mir-424, mir-491-5p, mir-497, mir-7, mir-99a, mir-99b | mir-10a, mir-155, mir-181a, mir-181b, mir-196a, mir-19a, mir-19b, mir-205, mir-20a, mir-21, mir-215, mir-224, mir-31, mir-494, mir-590-5p, mir-92a, mir-944 |
| 만성 골수성 백혈병 | mir-10a, mir-146a, mir-150, mir-151, mir-155, mir-2278, mir-26a, mir-30e, mir-31, mir-326, mir-564 | mir-424, mir-96 |
| 위장관 암 | mir-122a, mir-148a, mir-152 | |
| 역형성 성상세포종 | mir-124, mir-137 | |

[0415]

[0416]

| 악성 | 하향 조절되는 miR | 상향 조절되는 miR |
|---|---|---|
| 성상세포종 | mir-124-3p, mir-181b-5p, mir-200b, mir-3189-3p | mir-335 |
| 상피 난소암 | mir-124a, mir-192, mir-193a, mir-7 | mir-372, mir-373 |
| 외투 세포 림프종 | mir-142-3p, mir-142-5p, mir-150, mir-223, mir-29a, mir-29b, mir-29c | mir-124a, mir-155, mir-17, mir-18a, mir-19a, mir-19b, mir-20a, mir-92a |
| 만성 림프구성 백혈병 | mir-125b, mir-138, mir-15a, mir-15b, mir-16, mir-16-1, mir-16-1-3p, mir-16-2, mir-181a, mir-181b, mir-195, mir-223, mir-29b, mir-34b, mir-34c, mir-424 | mir-150, mir-155 |
| 소포성 암 | NA | mir-125b |
| 악성 중피종 | mir-126 | |
| 소세포 폐암 | mir-126, mir-138, mir-27a | mir-25 |
| 수막종 | mir-128, mir-200a | mir-224, mir-335 |
| 후두 편평 세포암종 | mir-129-5p, mir-203, mir-205, mir-206, mir-24, mir-370, mir-375 | mir-21, mir-9, mir-93 |
| 갑상선 수질 암종 | mir-129-5p | mir-183 |
| 폐 선암종 | mir-1297, mir-141, mir-145, mir-16, mir-200a, mir-200b, mir-200c, mir-29b, mir-381, mir-409-3p, mir-429, mir-451, mir-511, mir-99a | mir-150, mir-155, mir-31 |
| 췌장 암종 | mir-132, mir-375 | mir-301b |
| 폐 편평 세포암종 | mir-133a, mir-218 | |
| 다발성 골수종 | mir-137, mir-197, mir-214 | mir-21 |
| 편평세포 암종 | mir-15a, mir-16, mir-203, mir-205, mir-375 | mir-137, mir-155, mir-184, mir-196a, mir-203, mir-21, mir-221, mir-27a, mir-34a |
| 포도막 흑색종 | mir-137, mir-144, mir-145, mir-182, mir-34a, mir-34b, mir-34c, mir-9 | NA |
| 역형성 갑상선 암종 | mir-138 | mir-146b, mir-221, mir-222 |
| 결장직장암종 | mir-139, mir-143, mir-145, mir-202-3p, mir-30a, mir-338-3p, mir-429, mir-451, mir-93 | mir-17, mir-182, mir-191, mir-21, mir-95 |
| 말트 림프종 | | mir-142-5p, mir-155 |
| 갑상선암 | mir-144, mir-886-3p | |
| 원발성 cns 림프종 | mir-145, mir-193b, mir-199a, mir-214 | |
| 소포성 갑상선 암종 | mir-199b | mir-146b, mir-183, mir-197, mir-221, mir-346 |

| 악성 | 하향 조절되는 miR | 상향 조절되는 miR |
|---|---|---|
| 담낭 암종 | mir-146b-5p | mir-155, mir-182 |
| 성인 t-세포 백혈병 | | mir-150 |
| 역형성 거대-세포 림프종 | | mir-155 |
| 피부 t-세포 림프종 | | mir-155 |
| 미만성 거대 B-세포 림프종 | | mir-155, mir-21 |
| 직장암 | | mir-155, mir-200c, mir-21-5p, mir-34a |
| 설암 | mir-15b, mir-200b | |
| b-세포 림프종 | mir-34a | mir-17, mir-18a, mir-19a, mir-19b, mir-20a, mir-92a |
| 유방 암종 | | mir-17, mir-18a, mir-19a, mir-19b, mir-20a, mir-24, mir-92a |
| 비인두암 | mir-218, mir-223, mir-29c | mir-17, mir-20a |
| 위 선암종 | mir-181b, mir-182, mir-200a, mir-302b, mir-449a, mir-9 | mir-23a, mir-27a, mir-373 |
| 결장직장 선암종 | | mir-182 |
| 결장 암종 | mir-186, mir-30a-5p | mir-221, mir-23a |
| 부신 피질 암종 | mir-195, mir-1974, mir-335, mir-497 | mir-21, mir-210, mir-483-3p, mir-483-5p |
| 식도 선암종 | mir-203 | mir-196a, mir-199a-3p, mir-199a-5p, mir-199b-3p, mir-200a, mir-223 |
| 위장관 간질 종양 | mir-218, mir-221, mir-222 | mir-196a |
| 자궁 근종 | mir-197 | |
| 융모막암종 | mir-199b, mir-218, mir-34a | |
| 소포성 림프종 | mir-202 | |
| 기저 세포 암종 | mir-203 | |
| 하인두 암 | | mir-203 |
| 췌장 선암종 | | mir-203, mir-301a |
| 횡문근육종 | mir-203 | |
| 두경부암 | NA | mir-21 |
| 하인두 편평 세포암종 | mir-451a, mir-504 | mir-21 |
| t-세포 림프종 | mir-22 | |
| 갑상선 암종 | | mir-221, mir-222 |
| 비장 변연부 림프종 | mir-223 | |
| 후두 암 | | mir-23a |

[0417]

| 악성 | 하향 조절되는 miR | 상향 조절되는 miR |
|---|---|---|
| 원발성 갑상선 림프종 | mir-26a | |
| 급성 백혈병 | mir-27a | |
| 단핵구성 백혈병 | mir-29a, mir-29b | |
| 구강암종 | mir-375 | mir-31 |
| 원발성 담낭 암종 | mir-335 | |
| 자궁내막 장액성선암종 | mir-34b | |
| 식도암종 | mir-451 | |
| 간모세포종 | | mir-492 |
| 결장 선암종 | mir-627 | |

[0418]

표 3

**예시적인 종양 억제성 miR**

| 암 | 하향 조절되는 종양 억제성 miR |
|---|---|
| 급성 백혈병 | mir-27a |
| 급성 림프아구성 백혈병 | let-7b, mir-124a, mir-142-3p |
| 급성 골수성 백혈병 | let-7c, mir-17, mir-181a, mir-20a, mir-223, mir-26a, mir-29a, mir-30c, mir-720 |
| 급성 전골수구 백혈병 | let-7c, mir-107, mir-342 |
| 부신 피질 암종 | mir-195, mir-1974, mir-335, mir-497 |
| 역형성 성상세포종 | mir-124, mir-137 |
| 역형성 갑상선 암종 | mir-138 |
| 성상세포종 | mir-124-3p, mir-181b-5p, mir-200b, mir-3189-3p |
| 기저 세포 암종 | mir-203 |
| b-세포 림프종 | mir-34a |
| 방광암 | mir-1, mir-101, mir-1180, mir-1236, mir-124-3p, mir-125b, mir-126, mir-1280, mir-133a, mir-133b, mir-141, mir-143, mir-144, mir-145, mir-155, mir-16, mir-18a, mir-192, mir-195, mir-200a, mir-200b, mir-200c, mir-203, mir-205, mir-214, mir-218, mir-23b, mir-26a, mir-29c, mir-320c, mir-34a, mir-370, mir-409-3p, mir-429, mir-451, mir-490-5p, mir-493, mir-576-3p, mir-99a |
| 유방암 | let-7a, let-7a-1, let-7a-2, let-7a-3, let-7b, let-7c, let-7d, let-7e, let-7f-1, let-7f-2, let-7g, let-7i, mir-100, mir-107, mir-10a, mir-10b, mir-122, mir-124, mir-1258, mir-125a-5p, mir-125b, mir-126, mir-127, mir-129, mir-130a, mir-132, mir-133a, mir-143, mir-145, mir-146a, mir-146b, mir-147, mir-148a, mir-149, mir-152, mir-153, mir-15a, mir-16, mir-17-5p, mir-181a, mir-1826, mir-183, mir-185, mir-191, mir-193a-3p, mir-193b, mir-195, mir-199b-5p, mir-19a-3p, mir-200a, mir-200b, mir-200c, mir-205, mir-206, mir-211, mir-216b, mir-218, mir-22, mir-26a, mir-26b, mir-300, mir-30a, mir-31, mir-335, mir-339-5p, mir-33b, mir-34a, mir-34b, mir-34c, mir-374a, mir-379, mir-381, mir-383, mir-425, mir-429, mir-450b-3p, mir-494, mir-495, mir-497, mir-502-5p, mir-517a, mir-574-3p, mir-638, mir-7, mir-720, mir-873, mir-874, mir-92a, mir-98, mir-99a, mmu-mir-290-3p, mmu-mir-290-5p |
| 기관지 폐포 암종 | let-7a-1, let-7a-2, let-7a-3, let-7b, let-7c, let-7d, let-7e, let-7f-1, let-7f-2, let-7g, let-7i, mir-98 |
| 자궁경부암 | mir-143, mir-145, mir-17-5p, mir-203, mir-214, mir-218, mir-335, mir-342-3p, mir-372, mir-424, mir-491-5p, mir- |

[0419]

| 암 | 하향 조절되는 종양 억제성 miR |
|---|---|
| | 497, mir-7, mir-99a, mir-99b |
| 자궁경부 암종 | mir-100, mir-101, mir-15a, mir-16, mir-34a, mir-886-5p, mir-99a, mir-99b |
| 자궁경부 편평 세포암종 | mir-106a, mir-124, mir-148a, mir-214, mir-218, mir-29a, mir-375 |
| 담관암종 | mir-101, mir-144, mir-200b, mir-200c |
| 연골육종 | let-7a, mir-100, mir-136, mir-145, mir-199a, mir-222, mir-30a, mir-335, mir-376a |
| 척색종 | mir-1, mir-222, mir-31, mir-34a, mir-608 |
| 융모막암종 | mir-199b, mir-218, mir-34a |
| 만성 림프구성 백혈병 | mir-125b, mir-138, mir-15a, mir-15b, mir-16, mir-16-1, mir-16-1-3p, mir-16-2, mir-181a, mir-181b, mir-195, mir-223, mir-29b, mir-34b, mir-34c, mir-424 |
| 만성 골수성 백혈병 | mir-10a, mir-138, mir-146a, mir-150, mir-151, mir-155, mir-16, mir-2278, mir-26a, mir-30e, mir-31, mir-326, mir-564 |
| 투명 세포 신장세포 암 | mir-106a-5p, mir-135a-5p, mir-206 |
| 결장암 | let-7a-1, let-7a-2, let-7a-3, let-7b, let-7c, let-7d, let-7e, let-7f-1, let-7f-2, let-7g, let-7i, mir-100, mir-101, mir-126, mir-142-3p, mir-143, mir-145, mir-192, mir-200c, mir-21, mir-214, mir-215, mir-22, mir-25, mir-302a, mir-320, mir-320a, mir-34a, mir-34c, mir-365, mir-373, mir-424, mir-429, mir-455, mir-484, mir-502, mir-503, mir-93, mir-98 |
| 결장 암종 | mir-186, mir-30a-5p |
| 결장 선암종 | mir-627 |
| 결장직장암 | let-7a, mir-1, mir-100, mir-101, mir-124, mir-125a, mir-126, mir-129, mir-1295b-3p, mir-1307, mir-130b, mir-132, mir-133a, mir-133b, mir-137, mir-138, mir-139, mir-139-5p, mir-140-5p, mir-143, mir-145, mir-148a, mir-148b, mir-149, mir-150-5p, mir-154, mir-15a, mir-15b, mir-16, mir-18a, mir-191, mir-192, mir-193a-5p, mir-194, mir-195, mir-196a, mir-198, mir-199a-5p, mir-200c, mir-203, mir-204-5p, mir-206, mir-212, mir-215, mir-218, mir-22, mir-224, mir-24-3p, mir-26b, mir-27a, mir-28-3p, mir-28-5p, mir-29b, mir-30a-3p, mir-30b, mir-320a, mir-328, mir-338-3p, mir-342, mir-345, mir-34a, mir-34a-5p, mir-361-5p, mir-375, mir-378, mir-378a-3p, mir-378a-5p, mir-409-3p, mir-422a, mir-4487, mir-483, mir-497, mir-498, mir-518a-3p, mir-551a, mir-574-5p, mir-625, mir-638, mir-7, mir-96-5p |
| 결장직장암종 | mir-139, mir-143, mir-145, mir-202-3p, mir-30a, mir-338-3p, mir-429, mir-451, mir-93 |
| 자궁내막 암 | mir-101, mir-130a, mir-130b, mir-134, mir-143, mir-145, |

[0420]

| 암 | 하향 조절되는 종양 억제성 miR |
|---|---|
| | mir-152, mir-205, mir-223, mir-301a, mir-301b, mir-30c, mir-34a, mir-34c, mir-424, mir-449a, mir-543 |
| 자궁내막 장액성선암종 | mir-34b |
| 상피 난소암 | mir-124a, mir-192, mir-193a, mir-7 |
| 식도 선암종 | mir-203 |
| 식도암 | mir-124, mir-126, mir-140, mir-197, mir-203, mir-218, mir-223, mir-30b, mir-375, mir-454, mir-486, mir-574-3p |
| 식도암종 | mir-451 |
| 식도 편평 세포암종 | let-7a, let-7a-1, let-7a-2, let-7a-3, let-7b, let-7c, let-7d, let-7e, let-7f-1, let-7f-2, let-7g, let-7i, mir-1, mir-100, mir-101, mir-126, mir-1294, mir-133a, mir-133b, mir-138, mir-143, mir-145, mir-150, mir-185, mir-195, mir-200b, mir-203, mir-21, mir-210, mir-214, mir-218, mir-22, mir-27a, mir-29b, mir-29c, mir-302b, mir-34a, mir-375, mir-494, mir-518b, mir-655, mir-98, mir-99a |
| 소포성 림프종 | mir-202 |
| 소포성 갑상선 암종 | mir-199b |
| 담낭 암종 | mir-146b-5p |
| 위 선암종 | mir-181b, mir-182, mir-200a, mir-302b, mir-449a, mir-9 |
| 위암 | let-7a, let-7b, let-7g, mir-1, mir-101, mir-103a, mir-10a, mir-10b, mir-1207-5p, mir-122, mir-1228*, mir-124, mir-124-3p, mir-125a-3p, mir-126, mir-1266, mir-127, mir-1271, mir-129-1-3p, mir-129-2-3p, mir-129-3p, mir-129-5p, mir-133a, mir-133b, mir-137, mir-141, mir-143, mir-144, mir-145, mir-146a, mir-146a-5p, mir-148a, mir-148b, mir-149, mir-152, mir-155, mir-155-5p, mir-181a, mir-181b, mir-182, mir-183, mir-185, mir-194, mir-195, mir-197, mir-199a-3p, mir-200b, mir-200c, mir-202-3p, mir-204, mir-204-5p, mir-205, mir-206, mir-210, mir-212, mir-217, mir-218, mir-22, mir-23b, mir-24, mir-26a, mir-29a, mir-29a-3p, mir-29b, mir-29b-1, mir-29b-2, mir-29c, mir-30a-5p, mir-30b, mir-31, mir-328, mir-329, mir-331-3p, mir-335-5p, mir-338, mir-338-3p, mir-34a, mir-34b, mir-34c, mir-361-5p, mir-367, mir-375, mir-378, mir-409-3p, mir-410, mir-429, mir-433, mir-449, mir-449a, mir-490-3p, mir-494, mir-497, mir-503, mir-506, mir-513b, mir-520d-3p, mir-542-3p, mir-622, mir-625, mir-638, mir-663, mir-7, mir-874, mir-9 |
| 위장관 암 | mir-122a, mir-148a, mir-152 |
| 위장관 간질 종양 | mir-218, mir-221, mir-222 |
| 교모세포종 | let-7g-5p, mir-100, mir-101, mir-106a, mir-124, mir-124a, mir-125a, mir-125a-5p, mir-125b, mir-127-3p, mir-128, mir-129, mir-136, mir-137, mir-139-5p, mir-142-3p, mir- |

[0421]

| 암 | 하향 조절되는 종양 억제성 miR |
|---|---|
| | 143, mir-145, mir-146b-5p, mir-149, mir-152, mir-153, mir-195, mir-21, mir-212-3p, mir-219-5p, mir-222, mir-29b, mir-31, mir-3189-3p, mir-320, mir-320a, mir-326, mir-330, mir-331-3p, mir-340, mir-342, mir-34a, mir-376a, mir-449a, mir-483-5p, mir-503, mir-577, mir-663, mir-7, mir-7-5p, mir-873 |
| 신경교종 | let-7a, let-7f, mir-106a, mir-107, mir-122, mir-124, mir-124-5p, mir-124a, mir-125b, mir-128, mir-136, mir-137, mir-139, mir-143, mir-145, mir-146a, mir-146b, mir-146b-5p, mir-152, mir-15b, mir-16, mir-181a, mir-181a-1, mir-181a-2, mir-181b, mir-181b-1, mir-181b-2, mir-181c, mir-181d, mir-184, mir-185, mir-195, mir-199a-3p, mir-200a, mir-200b, mir-203, mir-204, mir-205, mir-218, mir-219-5p, mir-23b, mir-26b, mir-27a, mir-29c, mir-320, mir-326, mir-328, mir-34a, mir-34c-3p, mir-34c-5p, mir-375, mir-383, mir-451, mir-452, mir-483-5p, mir-495, mir-584, mir-622, mir-656, mir-7, mir-98 |
| 두경부 편평 세포암종 | let-7d, mir-1, mir-107, mir-128, mir-133a, mir-138, mir-149, mir-200c, mir-205, mir-218, mir-27a*, mir-29a, mir-29b-1, mir-29b-2, mir-29c, mir-300, mir-34a, mir-363, mir-375, mir-874 |
| 간세포 암종 | let-7a-1, let-7a-2, let-7a-3, let-7b, let-7c, let-7d, let-7e, let-7f, let-7f-1, let-7f-2, let-7g, let-7i, mir-1, mir-100, mir-101, mir-105, mir-122, mir-122a, mir-1236, mir-124, mir-125b, mir-126, mir-127, mir-1271, mir-128-3p, mir-129-5p, mir-130a, mir-130b, mir-133a, mir-134, mir-137, mir-138, mir-139, mir-139-5p, mir-140-5p, mir-141, mir-142-3p, mir-143, mir-144, mir-145, mir-146a, mir-148a, mir-148b, mir-150-5p, mir-15b, mir-16, mir-181a-5p, mir-185, mir-188-5p, mir-193b, mir-195, mir-195-5p, mir-197, mir-198, mir-199a, mir-199a-5p, mir-199b, mir-199b-5p, mir-200a, mir-200b, mir-200c, mir-202, mir-203, mir-204-3p, mir-205, mir-206, mir-20a, mir-21, mir-21-3p, mir-211, mir-212, mir-214, mir-217, mir-218, mir-219-5p, mir-22, mir-223, mir-26a, mir-26b, mir-29a, mir-29b-1, mir-29b-2, mir-29c, mir-302b, mir-302c, mir-30a, mir-30a-3p, mir-335, mir-338-3p, mir-33a, mir-34a, mir-34b, mir-365, mir-370, mir-372, mir-375, mir-376a, mir-377, mir-422a, mir-424, mir-424-5p, mir-433, mir-4458, mir-448, mir-450a, mir-451, mir-485-5p, mir-486-5p, mir-497, mir-503, mir-506, mir-519d, mir-520a, mir-520b, mir-520c-3p, mir-582-5p, mir-590-5p, mir-610, mir-612, mir-625, mir-637, mir-675, mir-7, mir-877, mir-940, mir-941, mir-98, mir-99a |
| 하인두 편평 세포암종 | mir-451a, mir-504 |

[0422]

[0423]

| 암 | 하향 조절되는 종양 억제성 miR |
|---|---|
| 신장암 | mir-1, mir-145, mir-1826, mir-199a, mir-199a-3p, mir-203, mir-205, mir-497, mir-508-3p, mir-509-3p |
| 후두 편평 세포암종 | mir-129-5p, mir-203, mir-205, mir-206, mir-24, mir-370, mir-375 |
| 간암 | mir-101, mir-122, mir-132, mir-140-5p, mir-145, mir-148b, mir-31, mir-338-3p, mir-433 |
| 폐 선암종 | mir-1297, mir-141, mir-145, mir-16, mir-200a, mir-200b, mir-200c, mir-29b, mir-381, mir-409-3p, mir-429, mir-451, mir-511, mir-99a |
| 폐암 | let-7a-1, let-7a-2, let-7a-3, let-7b, let-7c, let-7d, let-7e, let-7f-1, let-7f-2, let-7g, let-7i, mir-1, mir-101, mir-133b, mir-138, mir-142-5p, mir-144, mir-145, mir-1469, mir-146a, mir-153, mir-15a, mir-15b, mir-16-1, mir-16-2, mir-182, mir-192, mir-193a-3p, mir-194, mir-195, mir-198, mir-203, mir-217, mir-218, mir-22, mir-223, mir-26a, mir-26b, mir-29c, mir-33a, mir-34a, mir-34b, mir-34c, mir-365, mir-449a, mir-449b, mir-486-5p, mir-545, mir-610, mir-614, mir-630, mir-660, mir-7515, mir-9500, mir-98, mir-99b |
| 폐 편평 세포암종 | mir-133a, mir-218 |
| 악성 흑색종 | let-7b, mir-101, mir-125b, mir-1280, mir-143, mir-146a, mir-146b, mir-155, mir-17, mir-184, mir-185, mir-18b, mir-193b, mir-200c, mir-203, mir-204, mir-205, mir-206, mir-20a, mir-211, mir-218, mir-26a, mir-31, mir-33a, mir-34a, mir-34c, mir-376a, mir-376c, mir-573, mir-7-5p, mir-9, mir-98 |
| 악성 중피종 | mir-126 |
| 외투 세포 림프종 | mir-142-3p, mir-142-5p, mir-150, mir-223, mir-29a, mir-29b, mir-29c |
| 갑상선 수질 암종 | mir-129-5p |
| 수모세포종 | mir-124, mir-128a, mir-199b-5p, mir-206, mir-22, mir-31, mir-383 |
| 수막종 | mir-128, mir-200a |
| 간충직 암 | mir-100, mir-141, mir-199b-5p, mir-200a, mir-200b, mir-200c, mir-29a, mir-29b-1, mir-29b-1-5p, mir-29b-2, mir-29c, mir-335, mir-429, mir-99a |
| 단핵구성 백혈병 | mir-29a, mir-29b |
| 다발성 골수종 | mir-137, mir-197, mir-214 |
| 비인두암 | mir-218, mir-223, mir-29c |
| 비인두암종 | let-7a, let-7a-1, let-7a-2, let-7a-3, let-7b, let-7c, let-7d, let-7e, let-7f-1, let-7f-2, let-7g, let-7i, mir-1, mir-101, mir-124, mir-138, mir-143, mir-145, mir-148a, mir-200b, mir-204, mir-216b, mir-223, mir-29c, mir-320a, mir-324-3p, mir-34c, mir-375, mir-378, mir-451, mir-506, mir-9, mir-98 |

| 암 | 하향 조절되는 종양억제성 miR |
|---|---|
| 신경모세포종 | let-7a-1, let-7a-2, let-7a-3, let-7b, let-7c, let-7d, let-7e, let-7f-1, let-7f-2, let-7g, let-7i, mir-124, mir-137, mir-145, mir-181c, mir-184, mir-200a, mir-29a, mir-335, mir-338-3p, mir-34a, mir-449a, mir-885-5p, mir-98 |
| 비소세포 폐암 | let-7a, let-7c, mir-1, mir-100, mir-101, mir-106a, mir-107, mir-124, mir-125a-3p, mir-125a-5p, mir-126, mir-126*, mir-129, mir-133a, mir-137, mir-138, mir-140, mir-143, mir-145, mir-146a, mir-146b, mir-148a, mir-148b, mir-149, mir-152, mir-153, mir-154, mir-155, mir-15a, mir-16, mir-17-5p, mir-181a-1, mir-181a-2, mir-181b, mir-181b-1, mir-181b-2, mir-181c, mir-181d, mir-184, mir-186, mir-193b, mir-195, mir-199a, mir-204, mir-212, mir-221, mir-224, mir-26b, mir-27a, mir-27b, mir-29a, mir-29b, mir-29c, mir-30a, mir-30b, mir-30c, mir-30d, mir-30d-5p, mir-30e-5p, mir-32, mir-335, mir-338-3p, mir-340, mir-342-3p, mir-34a, mir-34b, mir-361-3p, mir-365, mir-373, mir-375, mir-429, mir-449a, mir-4500, mir-451, mir-4782-3p, mir-497, mir-503, mir-512-3p, mir-520a-3p, mir-526b, mir-625*, mir-96, mir-99a |
| 구강암 | let-7d, mir-218, mir-34a, mir-375, mir-494 |
| 구강암종 | mir-375 |
| 구강 편평 세포암종 | mir-100, mir-124, mir-1250, mir-125b, mir-126, mir-1271, mir-136, mir-138, mir-145, mir-147, mir-148a, mir-181a, mir-206, mir-220a, mir-26a, mir-26b, mir-29a, mir-32, mir-323-5p, mir-329, mir-338, mir-370, mir-410, mir-429, mir-433, mir-499a-5p, mir-503, mir-506, mir-632, mir-646, mir-668, mir-877, mir-9 |
| 골육종 | let-7a, mir-1, mir-100, mir-101, mir-122, mir-124, mir-125b, mir-126, mir-127-3p, mir-132, mir-133a, mir-141, mir-142-3p, mir-142-5p, mir-143, mir-144, mir-145, mir-153, mir-16, mir-183, mir-194, mir-195, mir-199a-3p, mir-204, mir-212, mir-217, mir-218, mir-22, mir-23a, mir-24, mir-26a, mir-26b, mir-29b, mir-32, mir-320, mir-335, mir-33b, mir-340, mir-34a, mir-34b, mir-34c, mir-375, mir-376c, mir-382, mir-3928, mir-424, mir-429, mir-449a, mir-451, mir-454, mir-503, mir-519d, mir-646 |
| 난소암 | let-7i, mir-100, mir-124, mir-125b, mir-129-5p, mir-130b, mir-133a, mir-137, mir-138, mir-141, mir-145, mir-148a, mir-152, mir-153, mir-155, mir-199a, mir-200a, mir-200b, mir-200c, mir-212, mir-335, mir-34a, mir-34b, mir-34c, mir-409-3p, mir-411, mir-429, mir-432, mir-449a, mir-494, mir-497, mir-498, mir-519d, mir-655, mir-9, mir-98 |
| 난소 암종 | mir-100, mir-101, mir-34b, mir-34c, mir-532-5p |
| 췌장암 | mir-101, mir-1181, mir-124, mir-1247, mir-133a, mir-141, |

[0424]

| 암 | 하향 조절되는 종양 억제성 miR |
|---|---|
| | mir-145, mir-146a, mir-148a, mir-148b, mir-150*, mir-150-5p, mir-152, mir-15a, mir-198, mir-203, mir-214, mir-216a, mir-29c, mir-335, mir-34a, mir-34b, mir-34c, mir-373, mir-375, mir-410, mir-497, mir-615-5p, mir-630, mir-96 |
| 췌장 암종 | mir-132, mir-375 |
| 췌관 선암종 | let-7a, let-7a-1, let-7a-2, let-7a-3, let-7b, let-7c, let-7d, let-7e, let-7f-1, let-7f-2, let-7g, let-7i, mir-126, mir-135a, mir-143, mir-144, mir-145, mir-148a, mir-150, mir-15a, mir-16, mir-200a, mir-200b, mir-200c, mir-217, mir-218, mir-337, mir-375, mir-494, mir-615-5p, mir-98 |
| 갑상선 유두 암종 | mir-101, mir-130b, mir-138, mir-146a, mir-16, mir-195, mir-199a-3p, mir-204-5p, mir-219-5p, mir-26a, mir-34b, mir-613 |
| 원발성 cns 림프종 | mir-145, mir-193b, mir-199a, mir-214 |
| 원발성 담낭 암종 | mir-335 |
| 원발성 갑상선 림프종 | mir-26a |
| 전립선암 | let-7a-3p, let-7c, mir-100, mir-101, mir-105, mir-124, mir-128, mir-1296, mir-130b, mir-133a-1, mir-133a-2, mir-133b, mir-135a, mir-143, mir-145, mir-146a, mir-154, mir-15a, mir-187, mir-188-5p, mir-199b, mir-200b, mir-203, mir-205, mir-212, mir-218, mir-221, mir-224, mir-23a, mir-23b, mir-25, mir-26a, mir-26b, mir-29b, mir-302a, mir-30a, mir-30b, mir-30c-1, mir-30c-2, mir-30d, mir-30e, mir-31, mir-330, mir-331-3p, mir-34a, mir-34b, mir-34c, mir-374b, mir-449a, mir-4723-5p, mir-497, mir-628-5p, mir-642a-5p, mir-765, mir-940 |
| 전립선 암종 | mir-107 |
| 신장세포 암종 | let-7a, let-7d, mir-1, mir-106a*, mir-126, mir-1285, mir-129-3p, mir-1291, mir-133a, mir-135a, mir-138, mir-141, mir-143, mir-145, mir-182-5p, mir-199a-3p, mir-200a, mir-205, mir-218, mir-28-5p, mir-30a, mir-30c, mir-30d, mir-34a, mir-378, mir-429, mir-509-3p, mir-509-5p, mir-646 |
| 신장투명 세포 암종 | let-7b, let-7c, mir-138, mir-141, mir-200c, mir-204, mir-218, mir-335, mir-377, mir-506 |
| 망막모세포종 | mir-101, mir-183, mir-204, mir-34a, mir-365b-3p, mir-486-3p, mir-532-5p |
| 횡문근육종 | mir-203 |
| 소세포 폐암 | mir-126, mir-138, mir-27a |
| 비장 변연부 림프종 | mir-223 |
| 편평세포 암종 | mir-15a, mir-16, mir-203, mir-205, mir-375 |
| t-세포 림프종 | mir-22 |

[0425]

| 암 | 하향 조절되는 종양 억제성 miR |
|---|---|
| 갑상선암 | mir-144, mir-886-3p |
| 설암 | mir-15b, mir-200b |
| 자궁 근종 | mir-197 |
| 포도막 흑색종 | mir-137, mir-144, mir-145, mir-182, mir-34a, mir-34b, mir-34c, mir-9 |

[0426]

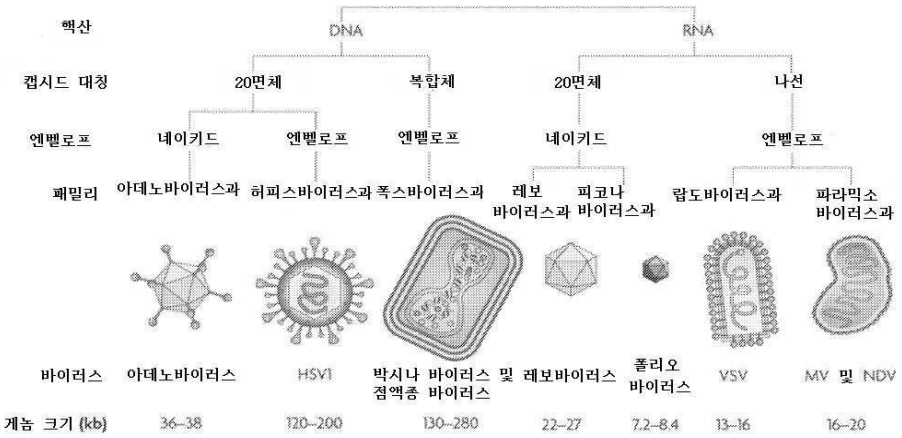
## 참고문헌

1. Loffler A *et al.*, Blood. 2000;95:2098–2103
2. Bargou R *et al.*, Science. 2008;321:974–977
3. Klinger M *et al.*, Blood. 2012;119:6226–6233
4. Topp MS *et al.*, J Clin Oncol. 2011;29:2493–2498.
5. Loffler A *et al.*, Leukemia. 2003;17:900–909
6. Topp MS *et al.*, Blood. 2012;120:5185–5187
7. Brischwein K *et al.*, Mol Immunol. 2006;43:1129–1143
8. Herrmann I *et al.*, PLoS ONE. 2010;5:e13474.
9. Cioffi M *et al.*, Clin Cancer Res. 2012;18:465–474
10. Witthauer J *et al.*, 2009;117:471–481
11. Osada T *et al.*, Br J Cancer. 2010;102:124–133
12. Lutterbuese R *et al.*, J Immunother. 2009;32:341–352.
13. Friedrich M *et al.*, Molecular Cancer Therapeutics. 2012;11:2664–2673
14. Laszlo GS *et al.*, Blood. 2014;123:554–561
15. Friedrich M *et al.*, Mol Cancer Ther. 2014;13:1549–1557
16. Lutterbuese R *et al.*, PNAS, 2010;107:12605–12610
17. Wuellner U et al., Antibodies 2015, 4, 426-440
18. Lopez-Albaitero A, Xu H, Guo H, et al. Oncoimmunology, 2017;6(3):e1267891
19. Hammond SA *et al.*, Cancer Research. 2007;67:3927–3935
20. Torisu-Itakura H *et al.*, J Immunother. 2011;34:597–605
21. Yamamoto K *et al.*, Biochem J. 2012;445:135–144
22. Feldmann A *et al.*, The Journal of Immunology. 2012;189:3249–3259
23. Mack M *et al.*, PNAS. 1995;92:7021–7025
24. Zhang T *et al.*, Cancer Research. 2011;71:2066–2076
25. Godbersen C et al., Mol Cancer Ther. 2017 Jul;16(7):1335-1346
26. Ross SL et al., PLoS One, 2017; e0183390

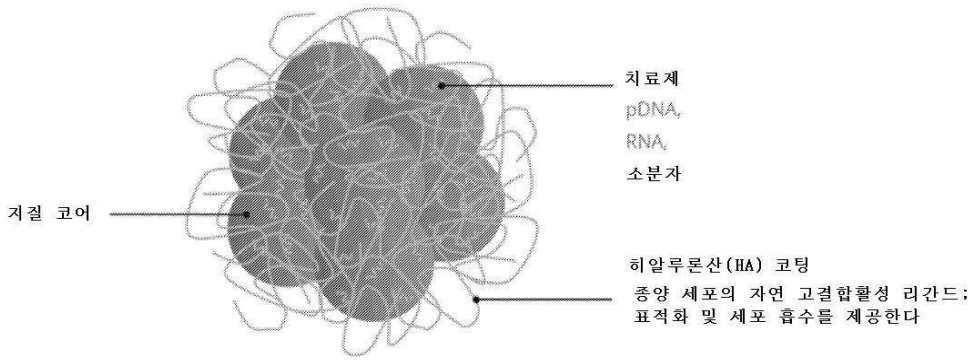

[0427]

## 도면

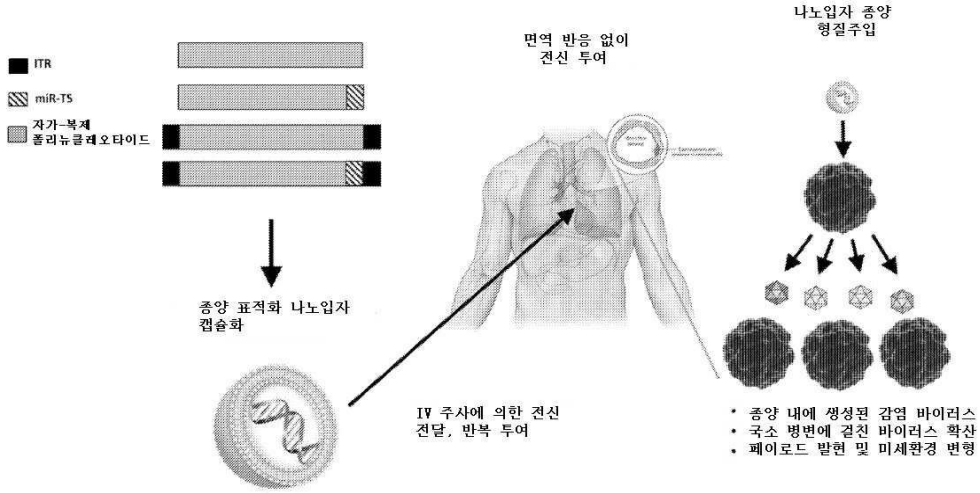
### 도면1



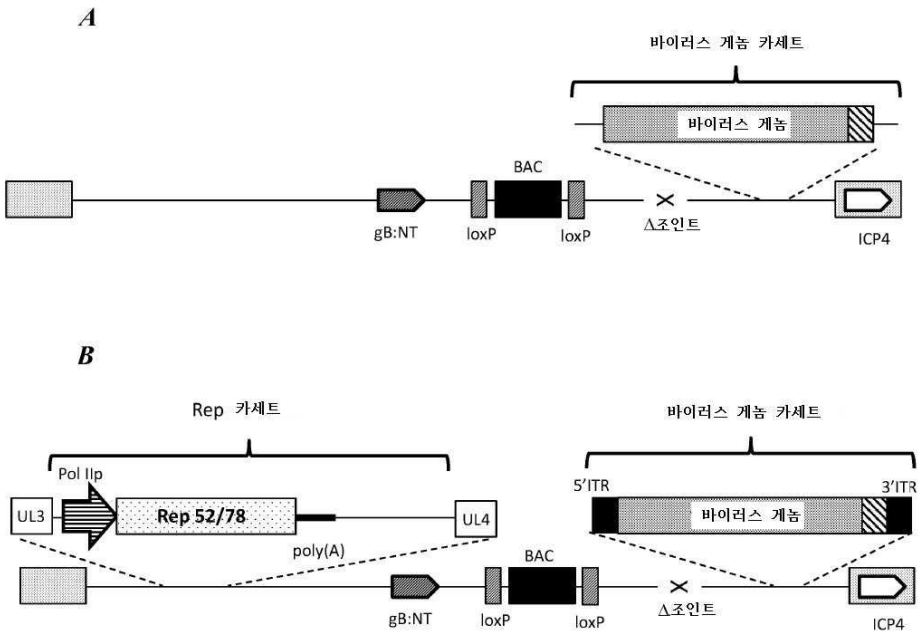
도면2


치료제
pDNA,
RNA,
소분자
지질 코어
히알루론산(HA) 코팅
종양 세포의 자연 고결합활성 리간드;
표적화 및 세포 흡수를 제공한다

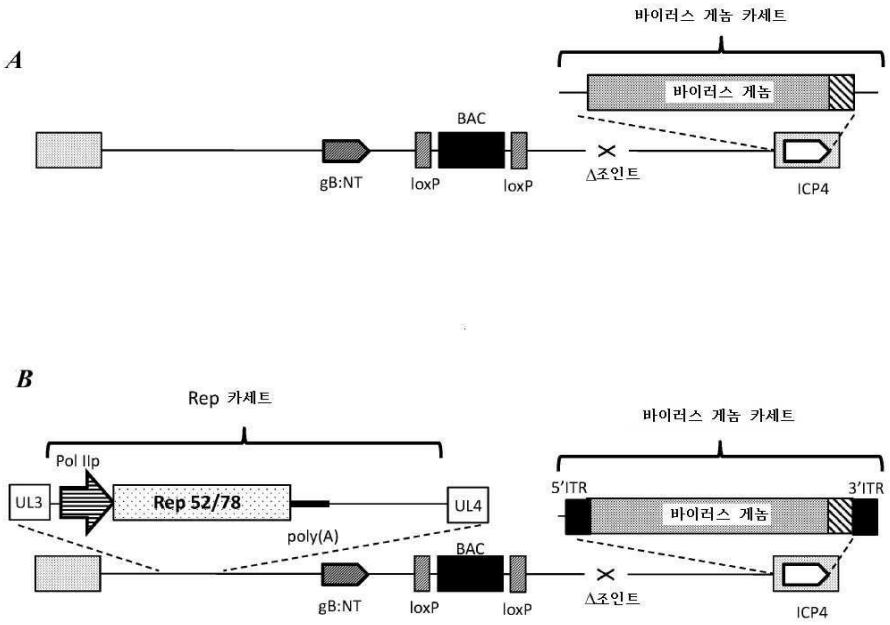
도면3


ITR
miR-T5
자가-복제
폴리뉴클레오타이드
종양 표적화 나노입자
캡슐화
면역 반응 없이
전신 투여
나노입자 종양
형질주입
IV 주사에 의한 전신
전달, 반복 투여
• 종양 내에 생성된 감염 바이러스
• 국소 병변에 걸친 바이러스 확산
• 페이로드 발현 및 미세환경 변형

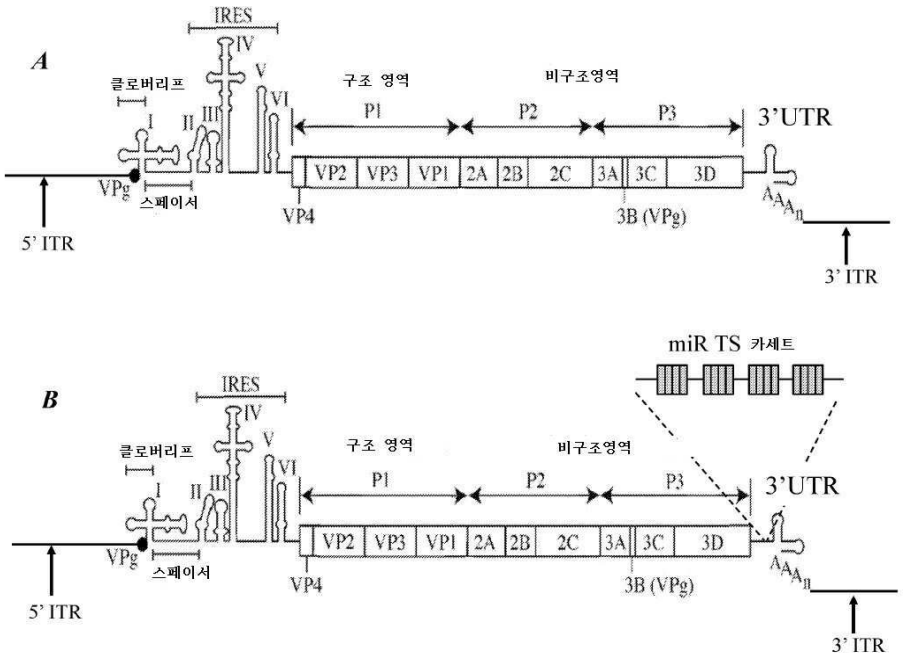
도면4


A
바이러스 게놈 카세트
바이러스 게놈
BAC
gB:NT
loxP
loxP
Δ조인트
ICP4
B
Rep 카세트
Pol IIp
UL3
Rep 52/78
UL4
poly(A)
바이러스 게놈 카세트
5'ITR
3'ITR
바이러스 게놈
BAC
gB:NT
loxP
loxP
Δ조인트
ICP4

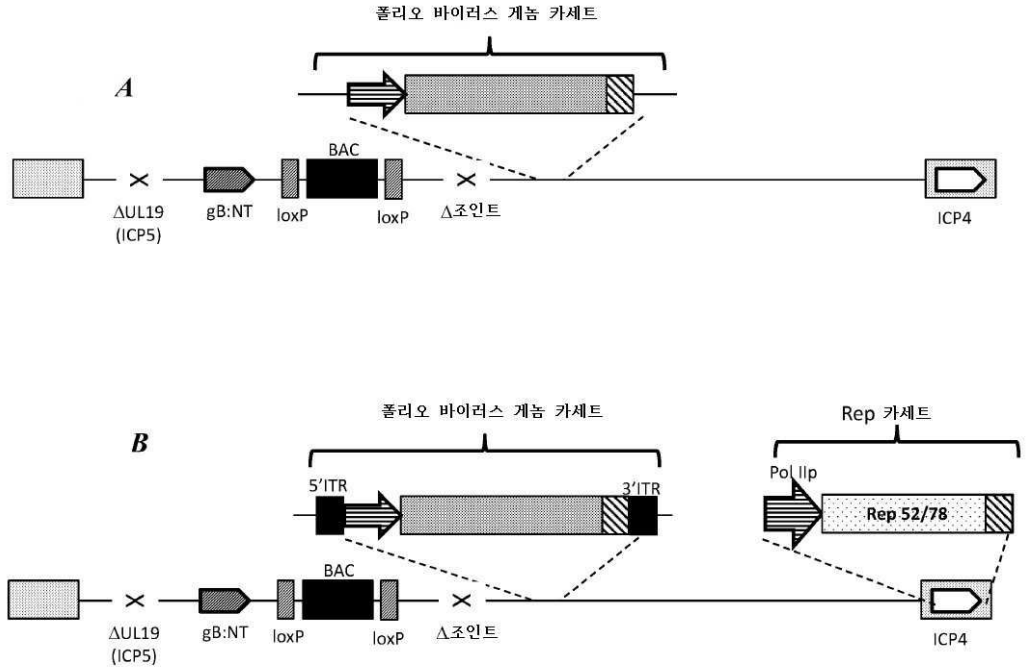
도면5


A
바이러스 게놈 카세트
바이러스 게놈
BAC
gB:NT
loxP
loxP
Δ조인트
ICP4
B
Rep 카세트
Pol IIp
UL3
Rep 52/78
UL4
poly(A)
바이러스 게놈 카세트
5'ITR
3'ITR
바이러스 게놈
BAC
gB:NT
loxP
loxP
Δ조인트
ICP4

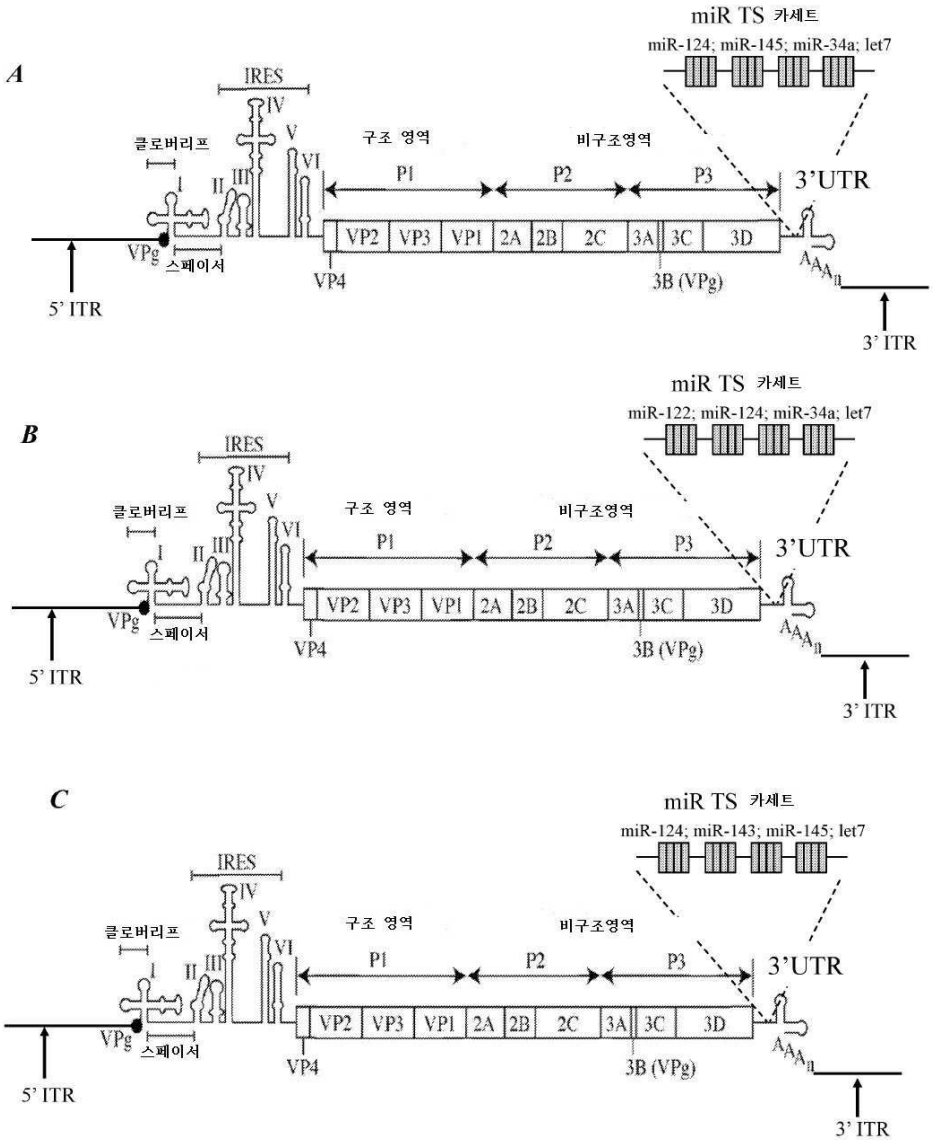
도면6


A
IRES
IV
V
VI
클로버리프
I
II
III
구조 영역
비구조영역
P1
P2
P3
3'UTR
VPg
스페이서
VP2
VP3
VP1
2A
2B
2C
3A
3C
3D
VP4
3B (VPg)
AAAn
5' ITR
3' ITR
B
miR TS 카세트
IRES
IV
V
VI
클로버리프
I
II
III
구조 영역
비구조영역
P1
P2
P3
3'UTR
VPg
스페이서
VP2
VP3
VP1
2A
2B
2C
3A
3C
3D
VP4
3B (VPg)
AAAn
5' ITR
3' ITR

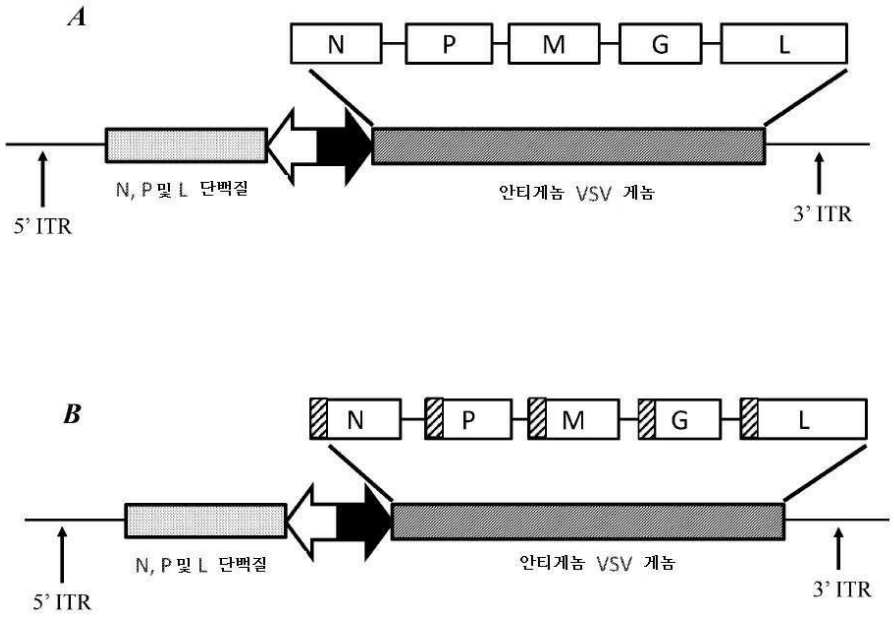
도면7


폴리오 바이러스 게놈 카세트
A
BAC
ΔUL19
(ICP5)
gB:NT
loxP
loxP
Δ조인트
ICP4
폴리오 바이러스 게놈 카세트
Rep 카세트
B
5'ITR
3'ITR
Pol IIp
Rep 52/78
BAC
ΔUL19
(ICP5)
gB:NT
loxP
loxP
Δ조인트
ICP4

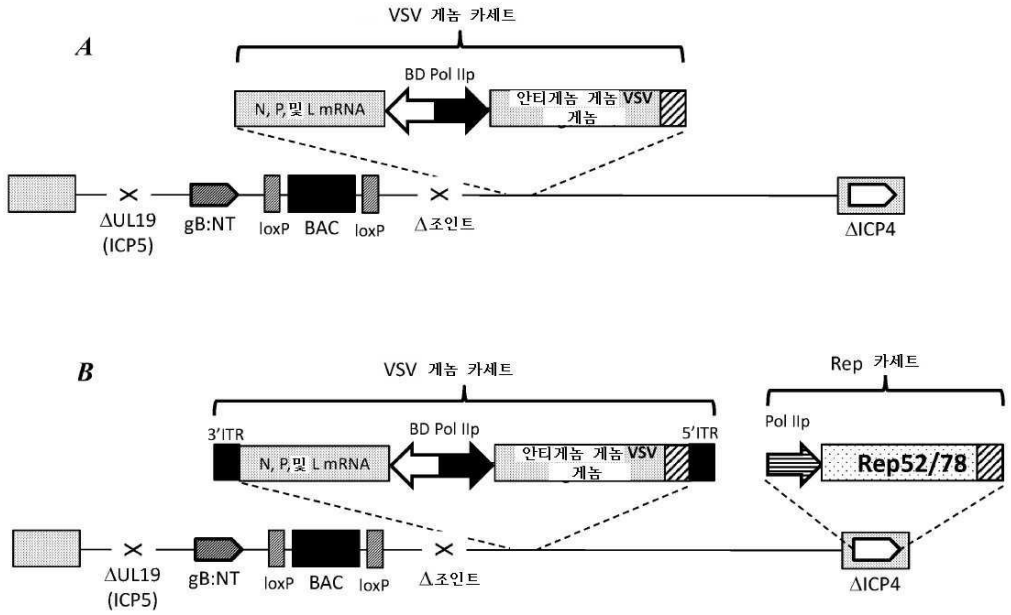
도면8


A
miR TS 카세트
miR-124; miR-145; miR-34a; let7
IRES
IV
V
VI
클로버리프
I
II
III
구조 영역
비구조영역
P1
P2
P3
3'UTR
VPg
스페이서
VP2
VP3
VP1
2A
2B
2C
3A
3C
3D
VP4
3B (VPg)
AAAn
5' ITR
3' ITR
B
miR TS 카세트
miR-122; miR-124; miR-34a; let7
IRES
IV
V
VI
클로버리프
I
II
III
구조 영역
비구조영역
P1
P2
P3
3'UTR
VPg
스페이서
VP2
VP3
VP1
2A
2B
2C
3A
3C
3D
VP4
3B (VPg)
AAAn
5' ITR
3' ITR
C
miR TS 카세트
miR-124; miR-143; miR-145; let7
IRES
IV
V
VI
클로버리프
I
II
III
구조 영역
비구조영역
P1
P2
P3
3'UTR
VPg
스페이서
VP2
VP3
VP1
2A
2B
2C
3A
3C
3D
VP4
3B (VPg)
AAAn
5' ITR
3' ITR

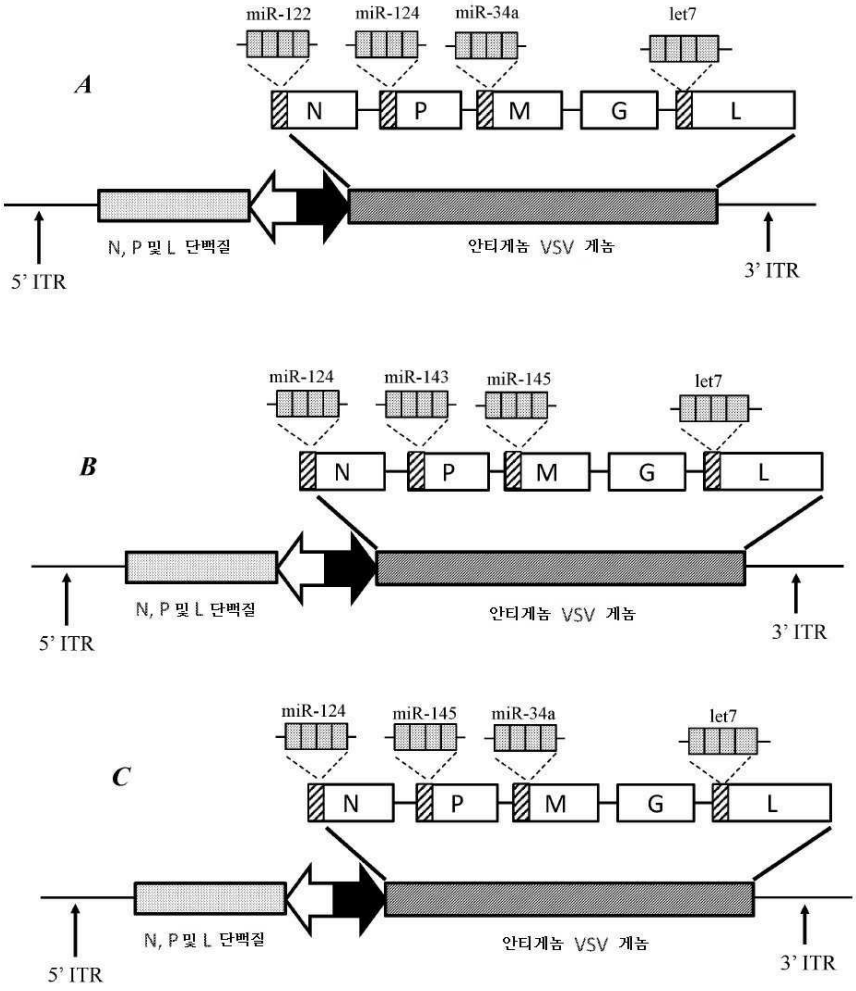
도면9


A
N
P
M
G
L
N, P 및 L 단백질
안티게놈 VSV 게놈
5' ITR
3' ITR
B
N
P
M
G
L
N, P 및 L 단백질
안티게놈 VSV 게놈
5' ITR
3' ITR

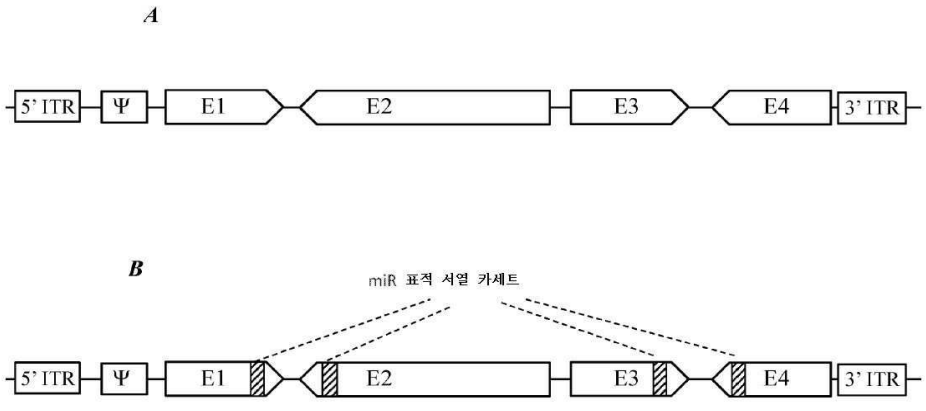
도면10


A
VSV 게놈 카세트
BD Pol IIp
N, P, 및 L mRNA
안티게놈 게놈 VSV 게놈
ΔUL19 (ICP5)
gB:NT
loxP
BAC
loxP
Δ조인트
ΔICP4
B
VSV 게놈 카세트
Rep 카세트
3'ITR
BD Pol IIp
5'ITR
Pol IIp
N, P, 및 L mRNA
안티게놈 게놈 VSV 게놈
Rep52/78
ΔUL19 (ICP5)
gB:NT
loxP
BAC
loxP
Δ조인트
ΔICP4

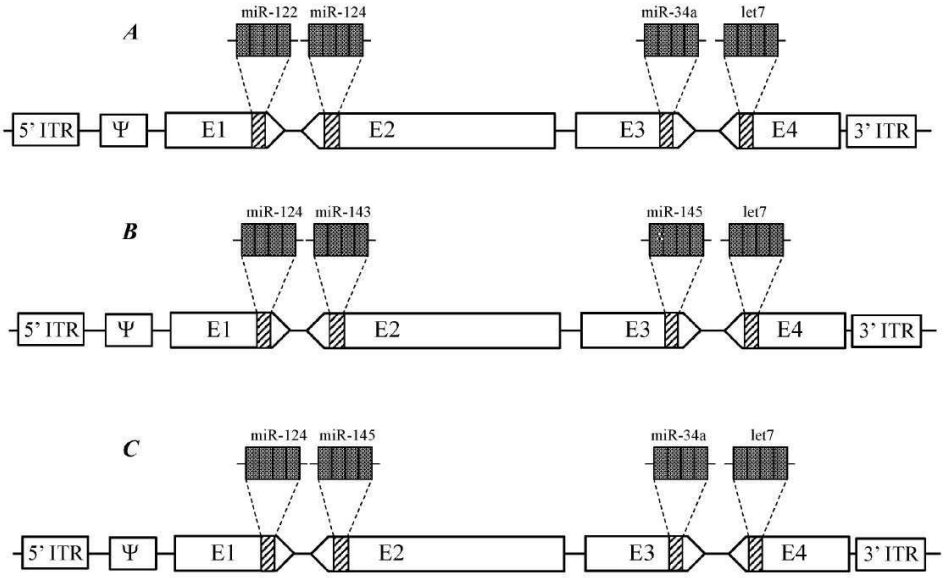
도면11


A
miR-122
miR-124
miR-34a
let7
N
P
M
G
L
N, P 및 L 단백질
안티게놈 VSV 게놈
5' ITR
3' ITR
B
miR-124
miR-143
miR-145
let7
N
P
M
G
L
N, P 및 L 단백질
안티게놈 VSV 게놈
5' ITR
3' ITR
C
miR-124
miR-145
miR-34a
let7
N
P
M
G
L
N, P 및 L 단백질
안티게놈 VSV 게놈
5' ITR
3' ITR

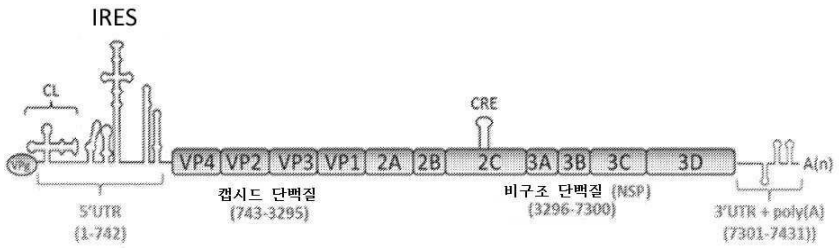
도면12


A
5' ITR
Ψ
E1
E2
E3
E4
3' ITR
B
miR 표적 서열 카세트
5' ITR
Ψ
E1
E2
E3
E4
3' ITR

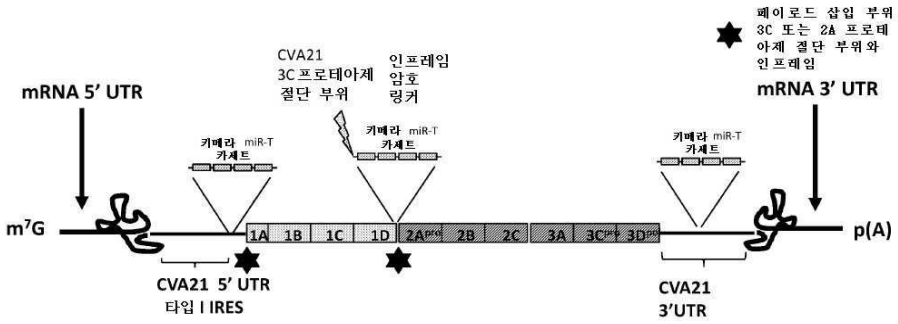
도면13



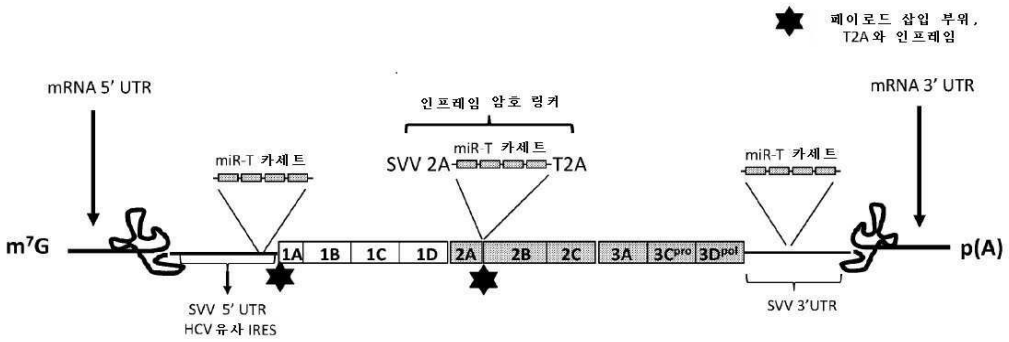

도면14



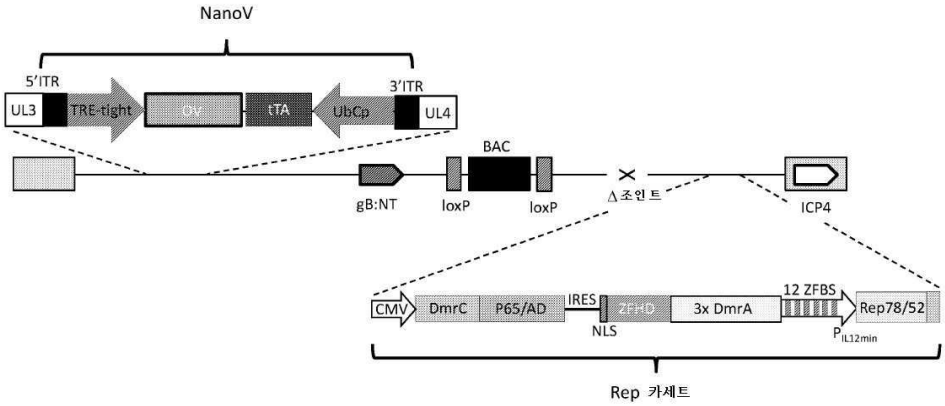

도면15



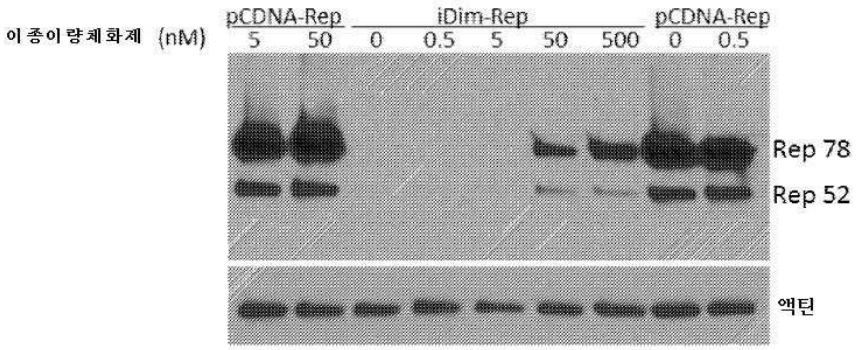
도면16



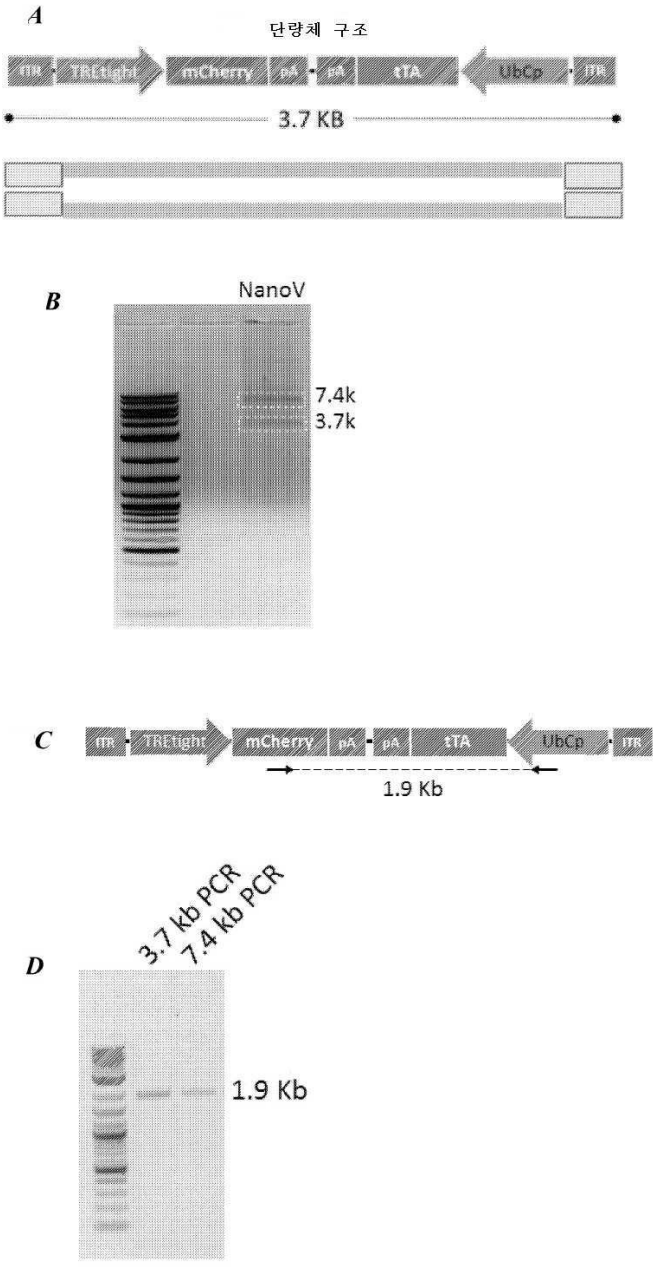

도면17



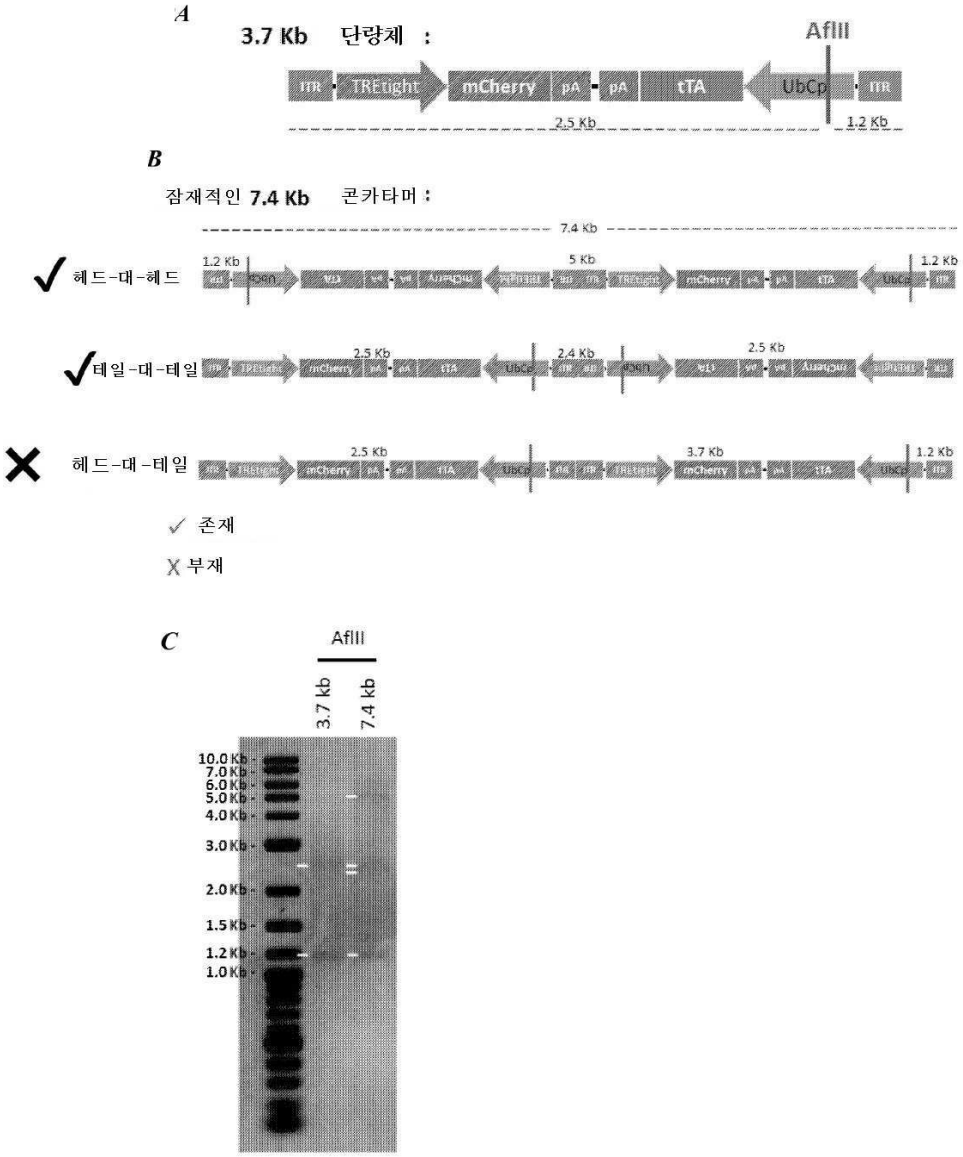

도면18



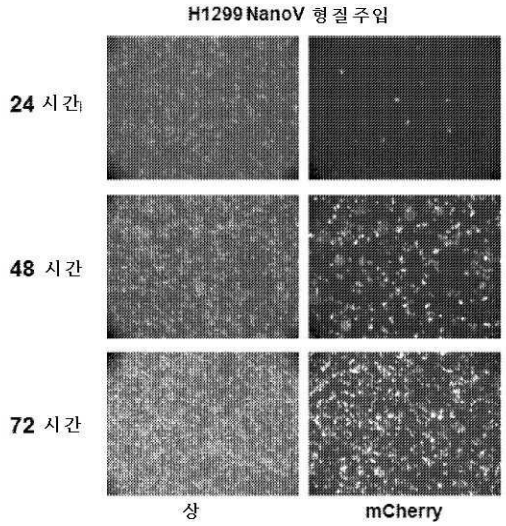
도면19


A
단량체 구조
ITR
TREtight
mCherry
pA
pA
tTA
UbCp
ITR
3.7 KB
B
NanoV
7.4k
3.7k
C
ITR
TREtight
mCherry
pA
pA
tTA
UbCp
ITR
1.9 Kb
D
3.7 kb PCR
7.4 kb PCR
1.9 Kb

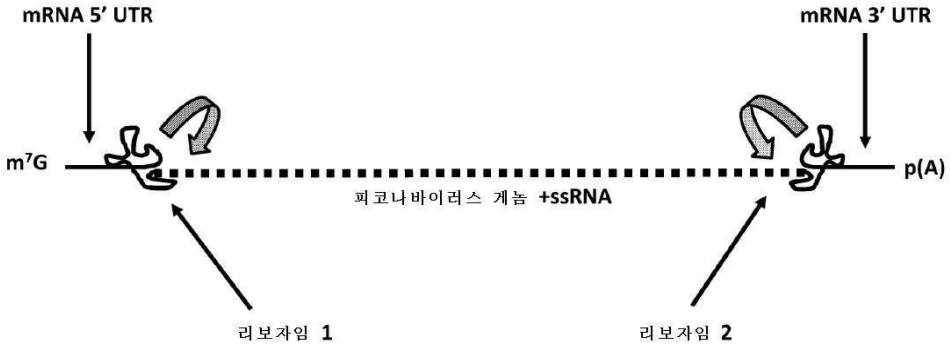
도면20


A
3.7 Kb 단량체 :
AflII
ITR
TREtight
mCherry
pA
pA
tTA
UbCp
ITR
2.5 Kb
1.2 Kb
B
잠재적인 7.4 Kb 콘카타머 :
7.4 Kb
✓ 헤드-대-헤드
1.2 Kb
5 Kb
1.2 Kb
✓ 테일-대-테일
2.5 Kb
2.4 Kb
2.5 Kb
✗ 헤드-대-테일
2.5 Kb
3.7 Kb
1.2 Kb
✓ 존재
✗ 부재
C
AflII
3.7 kb
7.4 kb
10.0 Kb
7.0 Kb
6.0 Kb
5.0 Kb
4.0 Kb
3.0 Kb
2.0 Kb
1.5 Kb
1.2 Kb
1.0 Kb

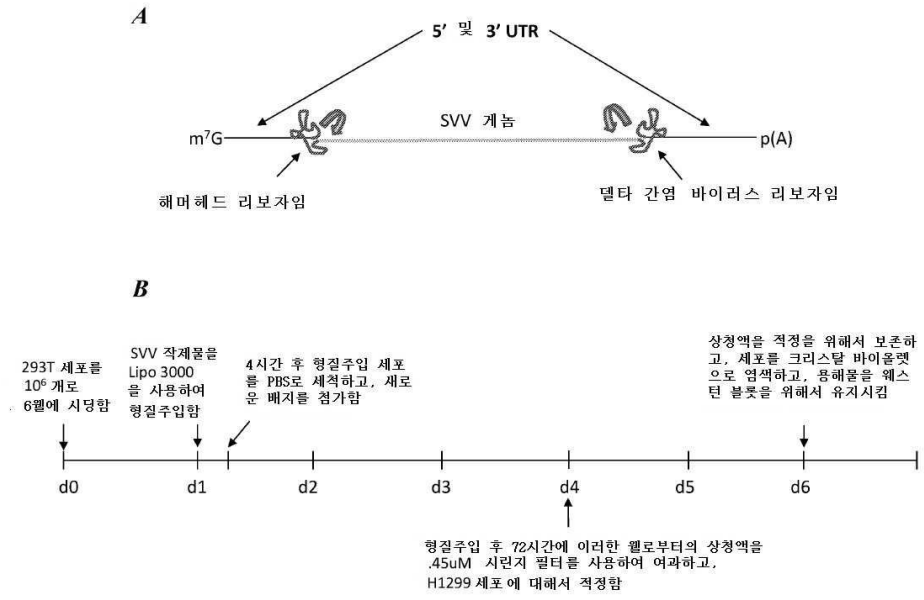
도면21



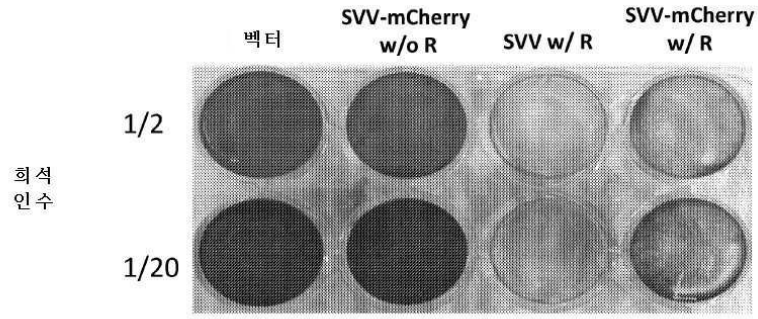

도면22



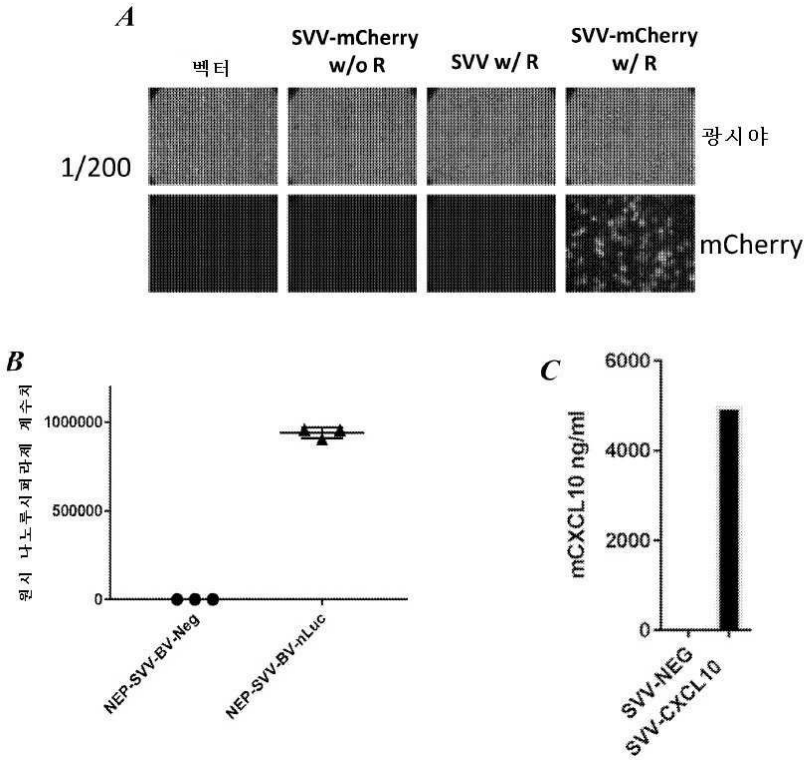

도면23



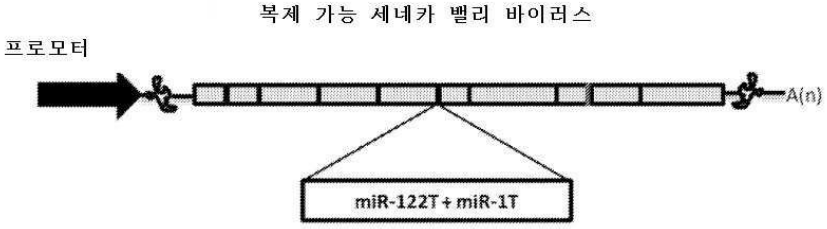
도면24



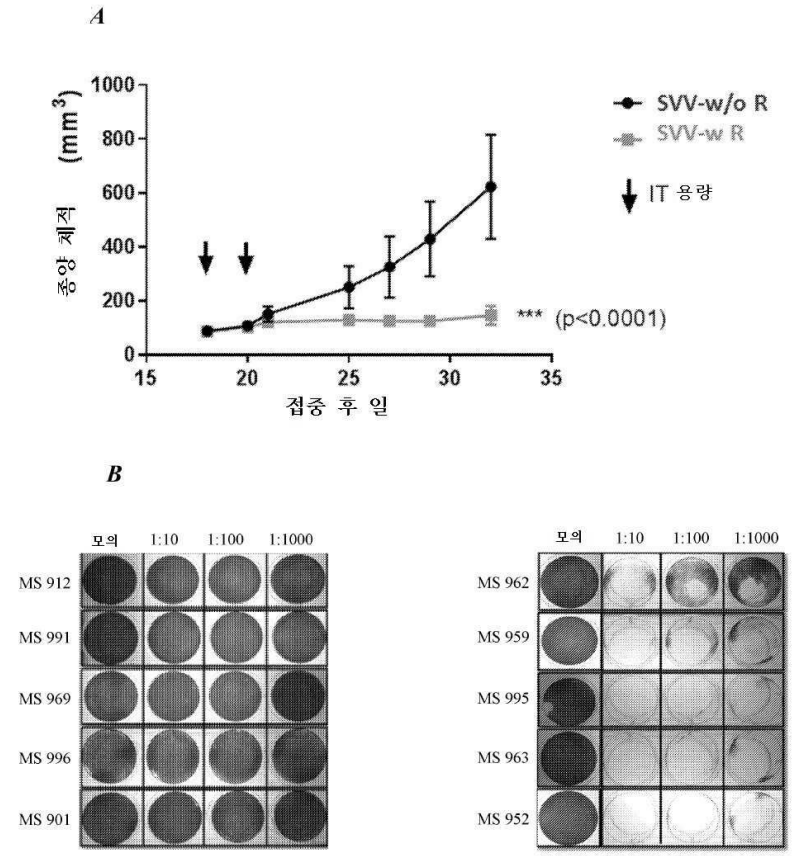

도면25



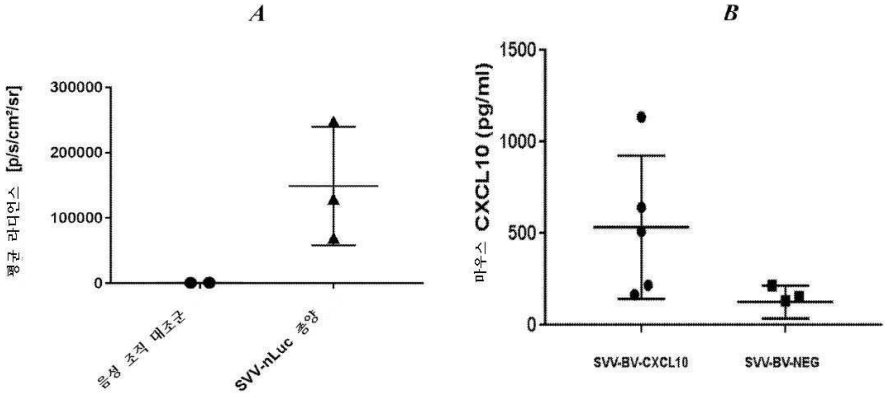

도면26



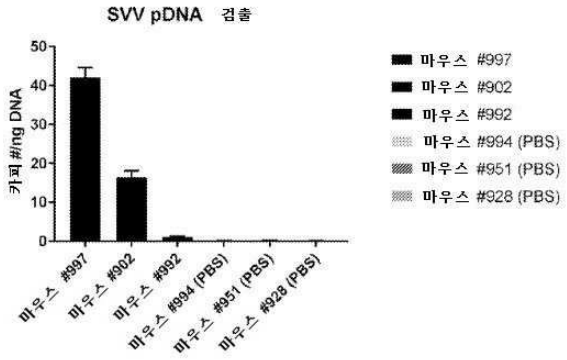
도면27


A
종양 체적 (mm3)
1000
800
600
400
200
0
15
20
25
30
35
접종 후 일
SVV-w/o R
SVV-w R
IT 용량
*** (p<0.0001)
B
모의
1:10
1:100
1:1000
MS 912
MS 991
MS 969
MS 996
MS 901
모의
1:10
1:100
1:1000
MS 962
MS 959
MS 995
MS 963
MS 952

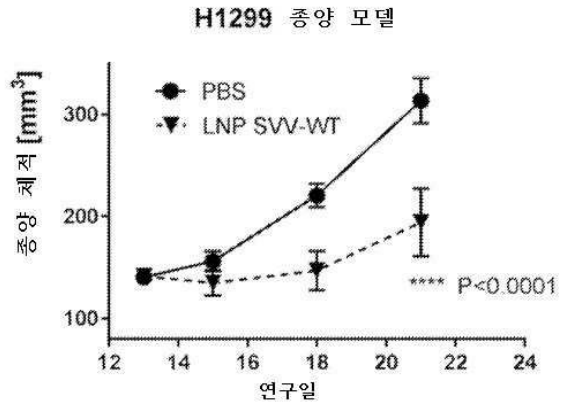
도면28


A
평균 라디언스 [p/s/cm²/sr]
300000
200000
100000
0
음성 조직 대조군
SVV-nLuc 종양
B
마우스 CXCL10 (pg/ml)
1500
1000
500
0
SVV-BV-CXCL10
SVV-BV-NEG

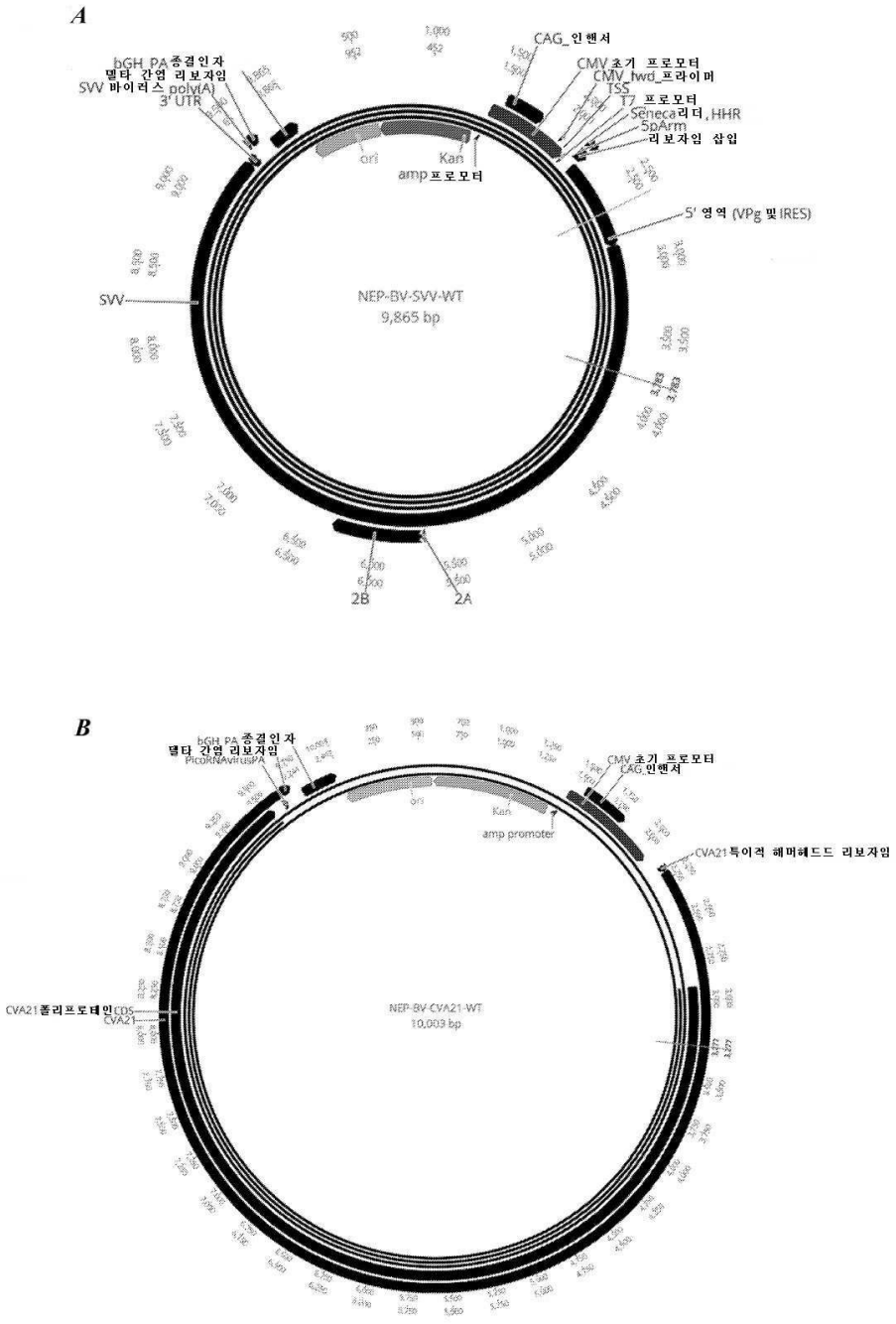
도면29


SVV pDNA 검출
카피#/ng DNA
50
40
30
20
10
0
마우스 #997
마우스 #902
마우스 #992
마우스 #994 (PBS)
마우스 #951 (PBS)
마우스 #928 (PBS)

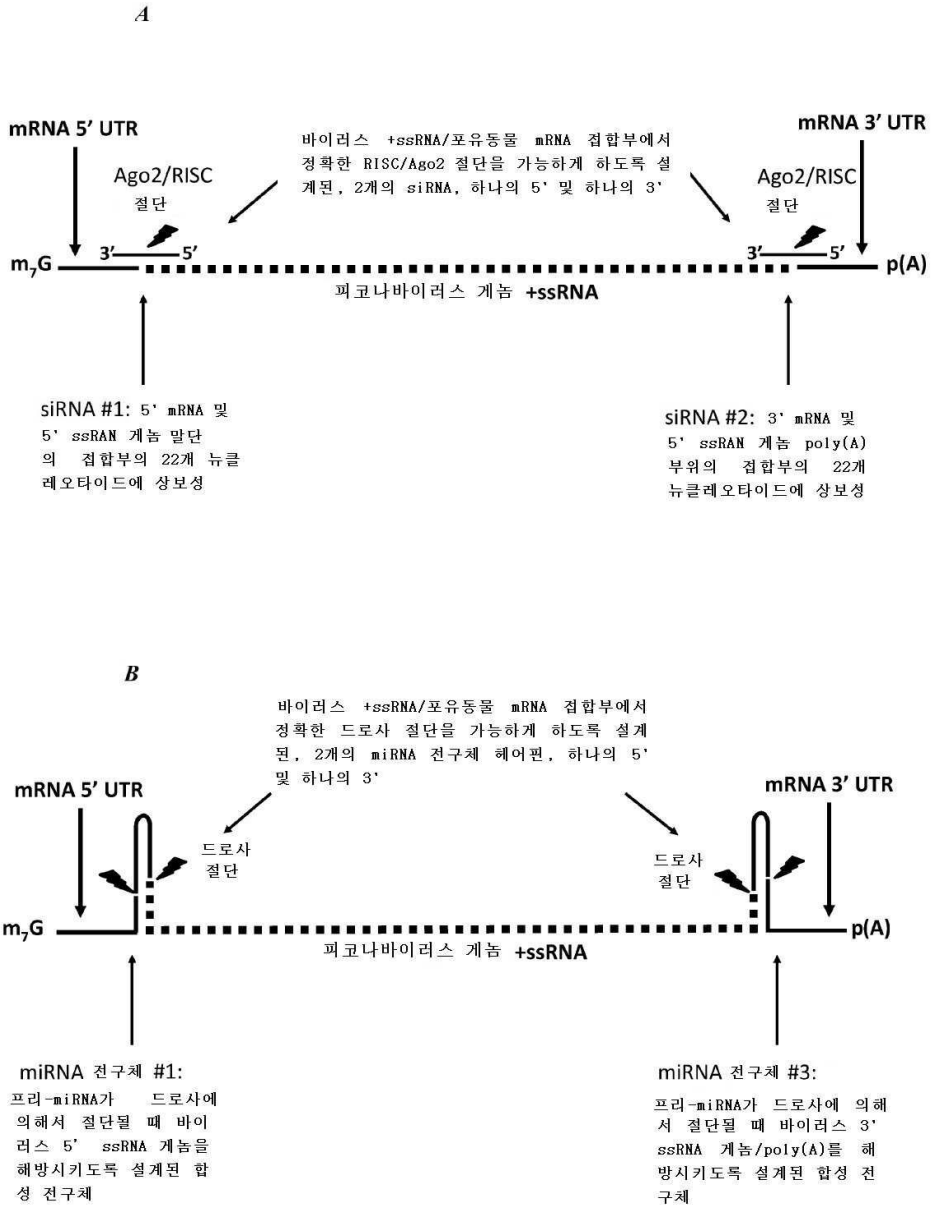
도면30


H1299 종양 모델
종양 체적 [mm3]
PBS
LNP SVV-WT
300
200
100
**** P<0.0001
12
14
16
18
20
22
24
연구일

도면31


A
CAG_인핸서
CMV 초기 프로모터
CMV_fwd_프라이머
TSS
T7 프로모터
Seneca리더, HHR
5pArm
리보자임 삽입
bGH_PA 종결인자
델타 간염 리보자임
SVV 바이러스 poly(A)
3' UTR
ori
Kan
amp 프로모터
5' 영역 (VPg 및 IRES)
SVV
NEP-BV-SVV-WT
9,865 bp
2B
2A
B
bGH_PA 종결인자
델타 간염 리보자임
CMV 초기 프로모터
CAG_인핸서
ori
Kan
amp promoter
CVA21 특이적 해머헤드드 리보자임
CVA21 폴리프로테인 CDS
CVA21
NEP-BV-CVA21-WT
10,003 bp

도면32




## 서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Oncorus, Inc.

Finer, Mitchell H

Kennedy, Edward

Lerner, Lorena

<120> ENCAPSULATED POLYNUCLEOTIDES AND METHODS OF USE

<130> ONCR-005/03WO 324865-2077

<150> US 62/648,651

<151> 2018-03-27

<150> US 62/532,886

<151> 2017-07-14

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 8385

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - SVV Expression cassette

<400> 1

acattgatta ttgactagtt attaatagta atcaattacg gggtcattag ttcatagccc 60

atatatggag ttccgcgtta cataacttac ggtaaatggc ccgcctggct gaccgcccaa 120

cgacccccgc ccattgacgt caataatgac gtatgttccc atagtaacgc caatagggac 180

tttccattga cgtcaatggg tggagtattt acggtaaact gcccacttgg cagtacatca 240

agtgtatcat atgccaagta cgcccccctat tgacgtcaat gacggtaaat ggcccgcctg 300

gcattatgcc cagtacatga ccttatggga ctttcctact tggcagtaca tctacgtatt 360

agtcatcgct attaccatgg tgatgcggtt ttggcagtac atcaatgggc gtggatagcg 420

gtttgactca cggggatttc caagtctcca ccccattgac gtcaatggga gtttgttttg 480

gcaccaaaat caacgggact ttccaaaatg tcgtaacaac tccgccccat tgacgcaaat 540

gggcggtagg cgtgtacggt gggaggtcta tataagcaga gctctctggc taactagaga 600

acccactgct tactggctta tcgaaattaa tacgactcac tatagggaga cccaagctgg 660

ctagcgttta aacttaagct tggtacctta tcaaactgat gagtccgtga ggacgaaacg 720

agtaagctcg tctttgaaat ggggggctgg gccctgatgc ccagtccttc ctttcccctt 780

ccgggggggtt aaccggctgt gtttgctaga ggcacagagg ggcaacatcc aacctgcttt 840

tgcggggaac ggtgcggctc cgattcctgc gtcgccaaag gtgttagcgc acccaaacgg 900

cgcacctacc aatgttattg gtgtggtctg cgagttctag cctactcgtt tctcccccga 960

ccattcactc acccacgaaa agtgtgttgt aaccataaga tttaaccccc gcacgggatg 1020

tgcgataacc gtaagactgg ctcaagcgcg gaaagcgctg taaccacatg ctgttagtcc 1080

ctttatggct gcaagatggc tacccacctc ggatcactga actggagctc gaccctcctt 1140

agtaagggaa ccgagaggcc ttcgtgcaac aagctccgac acagagtcca cgtgactgct 1200

accaccatga gtacatggtt ctcccctctc gacccaggac ttctttttga atatccacgg 1260

ctcgatccag agggtggggc atgaccccta gcatagcgag ctacagcggg aactgtagct 1320

aggccttagc gtgccttgga tactgcctga tagggcgacg gcctagtcgt gtcggttcta 1380

taggtagcac atacaaatat gcagaactct catttttctt tcgatacagc ctctggcacc 1440

tttgaagatg taaccggaac aaaagtcaag atcgttgaat accccagatc ggtgaacaat 1500

ggtgtttacg attcgtctac tcatttggag atactgaacc tacagggtga aattgaaatt 1560

ttaaggtctt tcaatgaata ccaaattcgc gccgccaaac aacaactcgg actggacatc 1620

gtgtacgaac tacagggtaa tgttcagaca acgtcaaaga atgattttga ttcccgtggc 1680

aataatggta acatgacctt caattactac gcaaacactt atcagaattc agtagacttc 1740

tcgacctcct cgtcggcgtc aggcgccgga cctgggaact ctcggggcgg attagcgggt 1800

ctcctcacaa atttcagtgg aatcttgaac cctcttggct acctcaaaga tcacaacacc 1860

gaagaaatgg aaaactctgc tgatcgagtc acaacgcaaa cggcgggcaa cactgccata 1920

aacacgcaat catcattggg tgtgttgtgt gcctacgttg aagacccgac caaatctgat 1980

cctccgtcca gcagcacaga tcaacccacc accactttca ctgccatcga caggtggtac 2040

actggacgtc tcaattcttg gacaaaagct gtaaaaacct tctcttttca ggccgtcccg 2100

cttcccggtg cctttctgtc taggcaggga ggcctcaacg gaggggcctt cacagctacc 2160

ctacatagac acttttgat gaagtgcggg tggcaggtgc aggtccaatg taatttgaca 2220

caattccacc aaggcgctct tcttgttgcc atggttcctg aaaccaccct tgatgtcaag 2280

cccgacggta aggcaaagag cttacaggag ctgaatgaag aacagtgggt ggaaatgtct 2340

gacgattacc ggaccgggaa aaacatgcct tttcagtctc ttggcacata ctatcggccc 2400

cctaactgga cttggggtcc caatttcatc aacccctatc aagtaacggt tttcccacac 2460

caaattctga acgcgagaac ctctacctcg gtagacataa acgtcccata catcggggag 2520

acccccacgc aatcctcaga gacacagaac tcctggaccc tcctcgttat ggtgctcgtt 2580

cccctagact ataaggaagg agccacaact gacccagaaa ttacattttc tgtaaggcct 2640

acaagtccct acttcaatgg gcttcgcaac cgctacacgg ccgggacgga cgaagaacag 2700

gggcccattc ctacggcacc cagagaaaat tcgcttatgt ttctctcaac cctccctgac 2760

gacactgtcc ctgcttacgg gaatgtgcgt acccctcctg tcaattacct ccctggtgaa 2820

ataaccgacc ttttgcaact ggcccgcata cccactctca tggcatttga gcgggtgcct 2880

gaacccgtgc ctgcctcaga cacatatgtg ccctacgttg ccgttcccac ccagttcgat 2940

gacaggcctc tcatctcctt cccgatcacc ctttcagatc ccgtctatca gaacaccctg 3000

gttggcgcca tcagttcaaa tttcgccaat taccgtgggt gtatccaaat cactctgaca 3060
ttttgtggac ccatgatggc gagagggaaa ttcctgctct cgtattctcc cccaaatgga 3120
acgcaaccac agactctttc cgaagctatg cagtgcacat actctatttg ggacataggc 3180
ttgaactcta gttggacctt cgtcgtcccc tacatctcgc ccagtgacta ccgtgaaact 3240
cgagccatta ccaactcggt ttactccgct gatggttggt ttagcctgca caagttgacc 3300
aaaattactc taccacctga ctgtccgcaa agtccctgca ttctcttttt cgcttctgct 3360
ggtgaggatt acactctccg tctccccgtt gattgtaatc cttcctatgt gttccactcc 3420

accgacaacg ccgagaccgg ggttattgag gcgggtaaca ctgacaccga tttctctggt 3480
gaactggcgg ctcctggctc taaccacact aatgtcaagt tcctgtttga tcgatctcga 3540
ttattgaatg taatcaaggt actggagaag gacgccgttt tcccccgccc tttccctaca 3600
caagaaggtg cgcagcagga tgatggttac ttttgtcttc tgacccccg cccaacagtc 3660
gcttcccgac ccgccactcg tttcggcctg tacgccaatc cgtccggcag tggtgttctt 3720
gctaacactt cactggactt caatttttat agcttggcct gtttcactta ctttagatcg 3780
gaccttgagg ttacggtggt ctcactagag ccggatctgg aatttgctgt agggtggttt 3840

ccttctggca gtgaatacca ggcttccagc tttgtctacg accagctgca tgtgcccttc 3900
cactttactg ggcgcactcc ccgcgctttc gctagcaagg gtgggaaggt atctttcgtg 3960
ctcccttgga actctgtctc gtctgtgctc cccgtgcgct gggggggggc ttccaagctc 4020
tcttctgcta cgcggggtct accggcgcat gctgattggg ggactattta cgcctttgtc 4080
ccccgtccta atgagaagaa aagcaccgct gtaaaacacg tggccgtgta cattcggtac 4140
aagaacgcac gtgcctggtg ccccagcatg cttccctttc gcagctacaa gcagaagatg 4200
ctgatgcaat ctggcgatat cgagaccaat cccgggcctg cttctgacaa cccaattttg 4260

gagtttcttg aagcagaaaa tgatctagtc actctggcct ctctctggaa gatggtgcac 4320
tctgttcaac agacctggag aaagtatgtg aagaacgatg atttttggcc caatttactc 4380
agcgagctag tgggggaagg ctctgtcgcc ttggccgcca cgctatccaa ccaagcttca 4440
gtaaaggctc ttttgggcct gcactttctc tctcgggggc tcaattacac tgacttttac 4500
tctttactga tagagaaatg ctctagtttc tttaccgtag aaccacctcc tccaccagct 4560
gaaaacctga tgaccaagcc ctcagtgaag tcgaaattcc gaaaactgtt taagatgcaa 4620
ggacccatgg acaaagtcaa agactggaac caaatagctg ccggcttgaa gaattttcaa 4680

tttgttcgtg acctagtcaa agaggtggtc gattggctgc aggcctggat caacaaagag 4740

aaagccagcc ctgtcctcca gtaccagttg gagatgaaga agctcgggcc tgtggccttg 4800

gctcatgacg ctttcatggc tggttccggg ccccctctta gcgacgacca gattgaatac 4860

ctccagaacc tcaaatctct tgccctaaca ctggggaaga ctaatttggc ccaaagtctc 4920

accactatga tcaatgccaa acaaagttca gcccaacgag ttgaacccgt tgtggtggtc 4980

cttagaggca agccgggatg cggcaagagc ttggcctcta cgttgattgc ccaggctgtg 5040

tccaagcgcc tctatggctc ccaaagtgta tattctcttc ccccagatcc agatttcttc 5100

gatggataca aaggacagtt cgtgaccttg atggatgatt tgggacaaaa cccggatgga 5160

caagatttct ccacctttg tcagatggtg tcgaccgccc aatttctccc caacatggcg 5220

gaccttgcag agaaagggcg tccctttacc tccaatctca tcattgcaac tacaaatctc 5280

ccccacttca gtcctgtcac cattgctgat ccttctgcag tctctcgccg tatcaactac 5340

gatctgactc tagaagtatc tgaggcctac aagaaacaca cacggctgaa ttttgacttg 5400

gctttcaggc gcacagacgc ccccccccatt tatccttttg ctgcccatgt gccctttgtg 5460

gacgtagctg tgcgcttcaa aaatggtcac cagaatttta atctcctaga gttggtcgat 5520

tccatttgta cagacattcg agccaagcaa caaggtgccc gaaacatgca gactctggtt 5580

ctacagagcc ccaacgagaa tgatgacacc cccgtcgacg aggcgttggg tagagttctc 5640

tcccccgctg cggtcgatga ggcgcttgtc gacctcactc cagaggccga cccggttggc 5700

cgtttggcta ttcttgccaa gctaggtctt gccctagctg cggtcacccc tggtctgata 5760

atcttggcag tgggactcta caggtacttc tctggctctg atgcagacca agaagaaaca 5820

gaaagtgagg gatctgtcaa ggcacccagg agcgaaaatg cttatgacgg cccgaagaaa 5880

aactctaagc cccctggagc actctctctc atggaaatgc aacagcccaa cgtggacatg 5940

ggctttgagg ctgcggtcgc taagaaagtg gtcgtcccca ttaccttcat ggttcccaac 6000

agaccttctg ggcttacaca gtccgctctt ctggtgaccg gccggacctt cctaatcaat 6060

gaacatacat ggtccaatcc ctcctggacc agcttcacaa tccgcggtga ggtacacact 6120

cgtgatgagc ccttccaaac ggttcatttc actcaccacg gtattcccac agatctgatg 6180

atggtacgtc tcggaccggg caattctttc cctaacaatc tagacaagtt tggacttgac 6240

cagatgccgg cacgcaactc ccgtgtggtt ggcgtttcgt ccagttacgg aaacttcttc 6300

ttctctggaa atttcctcgg atttgttgat tccatcacct ctgaacaagg aacttacgca 6360

agactcttta ggtacagggt gacgacctac aaaggatggt gcggctcggc cctggtctgt 6420

gaggccggtg gcgtccgacg catcattggc ctgcattctg ctggcgccgc cggtatcggc 6480

gccgggacct atatctcaaa attaggacta atcaaagccc tgaaacacct cggtgaacct 6540

ttggccacaa tgcaaggact gatgactgaa ttagagcctg gaatcaccgt acatgtaccc 6600

cggaaatcca aattgagaaa gacgaccgca cacgcggtgt acaaaccgga gtttgagcct 6660

gctgtgttgt caaaatttga tcccagactg aacaaggatg ttgacttgga tgaagtaatt 6720

tggtctaaac acactgccaa tgtcccttac caacctcctt tgttctacac atacatgtca 6780

gagtacgctc atcgagtctt ctccttcttg gggaaagaca atgacattct gaccgtcaaa 6840

gaagcaattc tgggcatccc cggactagac cccatggatc cccacacagc tccgggtctg 6900

ccttacgcca tcaacggcct tcgacgtact gatctcgtcg attttgtgaa cggtacagta 6960

gatgcggcgc tggctgtaca aatccagaaa ttcttagacg gtgactactc tgaccatgtc 7020

ttccaaactt ttctgaaaga tgagatcaga ccctcagaga aagtccgagc gggaaaaacc 7080

cgcattgttg atgtgccctc cctggcgcat tgcattgtgg gcagaatgtt gcttgggcgc 7140

tttgctgcca agtttcaatc ccatcctggc tttctcctcg gctctgctat cgggtctgac 7200

cctgatgttt tctggaccgt cataggggct caactcgagg ggagaaagaa cacgtatgac 7260

gtggactaca gtgcctttga ctcttcacac ggcactggct ccttcgaggc tctcatctct 7320

cacttttca ccgtggacaa tggttttagc cctgcgctgg gaccgtatct cagatccctg 7380

gctgtctcgg tgcacgctta cggcgagcgt cgcatcaaga ttaccggtgg cctcccctcc 7440

ggttgtgccg cgaccagcct gctgaacaca gtgctcaaca atgtgatcat caggactgct 7500

ctggcattga cttacaagga atttgaatat gacatggttg atatcatcgc ctacggtgac 7560

gaccttctgg ttggcacgga ttacgatctg gacttcaatg aggtggcacg acgcgctgcc 7620

aagttggggt ataagatgac tcctgccaac aagggttctg tcttccctcc gacttcctct 7680

ctttccgatg ctgtttttct aaagcgcaaa ttcgtccaaa acaacgacgg cttatacaaa 7740

ccagttatgg atttaaagaa tttggaagcc atgctctcct acttcaaacc aggaacacta 7800

ctcgagaagc tgcaatctgt ttctatgttg gctcaacatt ctggaaaaga agaatatgat 7860

agattgatgc acccttcgc tgactacggt gccgtaccga gtcacgagta cctgcaggca 7920

agatggaggg ccttgttcga ctgacccaga tagcccaagg cgcttcggtg ctgccggcga 7980

ttctgggaga actcagtcgg aacagaaaag ggaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 8040

aaggccggca tggtcccagc ctcctcgctg gcgccggctg ggcaacatgc ttcggcatgg 8100

cgaatgggac gcggccgctc gagtctagag ggcccgttta aacccgctga tcagcctcga 8160

ctgtgccttc tagttgccag ccatctgttg tttgcccctc ccccgtgcct tccttgaccc 8220

tggaaggtgc cactcccact gtcctttcct aataaaatga ggaaattgca tcgcattgtc 8280

tgagtaggtg tcattctatt ctgggggggtg gggtggggca ggacagcaag ggggaggatt 8340

gggaagacaa tagcaggcat gctggggatg cggtgggctc tatgg 8385

<210> 2

<211> 8523

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - CVA21 Expression cassette

<400> 2

acattgatta ttgactagtt attaatagta atcaattacg gggtcattag ttcatagccc 60

atatatggag ttccgcgtta cataacttac ggtaaatggc ccgcctggct gaccgcccaa 120

cgacccccgc ccattgacgt caataatgac gtatgttccc atagtaacgc caatagggac 180

tttccattga cgtcaatggg tggagtattt acggtaaact gcccacttgg cagtacatca 240

agtgtatcat atgccaagta cgccccctat tgacgtcaat gacggtaaat ggcccgcctg 300

gcattatgcc cagtacatga ccttatggga ctttcctact tggcagtaca tctacgtatt 360

agtcatcgct attaccatgg tgatgcggtt ttggcagtac atcaatgggc gtggatagcg 420

gtttgactca cggggatttc caagtctcca ccccattgac gtcaatggga gtttgttttg 480

gcaccaaaat caacgggact ttccaaaatg tcgtaacaac tccgccccat tgacgcaaat 540

gggcggtagg cgtgtacggt gggaggtcta tataagcaga gctctctggc taactagaga 600

acccactgct tactggctta tcgaaattaa tacgactcac tatagggaga cccaagctgg 660

ctagcgttta aacttaagct tggtaccgtt taaacttaag cttgtttaac tgatgagtcc 720

gtgaggacga aacgagtaag ctcgtcttaa aacagcctgt gggttgttcc caccccagag 780

gcccacgtgg cggctagtac tctggtatta cggtaccttt gtacgcctgt tttgtatccc 840

ttcccccgta actttagaag cttatcaaaa gttcaatagc aggggtacaa accagtacct 900

ctacgaacaa gcacttctgt ttccccggtg atatcacata gactgtaccc acggtcaaaa 960

gtgattgatc cgttatccgc ttgagtactt cgagaagcct agtatcacct tggaatcttc 1020

gatgcgttgc gctcaacact ctgccccgag tgtagcttag gctgatgagt ctgggcactc 1080

cccaccggcg acggtggccc aggctgcgtt ggcggcctac ccatggctga tgccgtggga 1140

cgctagttgt gaacaaggtg tgaagagcct attgagctac tcaagagtcc tccggccccc 1200

gaatgcggct aatcctaacc acggagcaac cgctcacaac ccagtgagta ggttgtcgta 1260

atgcgtaagt ctgtggcgga accgactact ttgggtgtcc gtgtttccct ttatattcat 1320

actggctgct tatggtgaca atttacaaat tgttaccata tagctattgg attggccacc 1380

cagtattgtg caatatattt gagtgtttct ttcataagcc ttattaacat cacattttta 1440

atcacaataa acagtgcaaa tgggggctca agtttcaacg caaaagaccg gtgcgcacga 1500

gaatcaaaac gtggcagcca atggatccac cattaattac actactatca actattacaa 1560

agacagtgcg agtaattccg ctactagaca agacctctcc caagatccat caaaattcac 1620

agaaccggtt aaggacttaa tgttgaaaac agcaccagct ctaaactcgc ctaacgtgga 1680

agcatgtggg tacagtgacc gtgtgaggca aatcacttta ggcaactcga ctattactac 1740

acaagaagca gccaatgcta ttgttgctta cggtgaatgg cccacttaca taaatgattc 1800

agaagctaat ccggtagatg cacccactga gccagacgtt agtagcaacc ggttttacac 1860

cctagaatcg gtgtcttgga agaccacttc aaggggatgg tggtggaagt taccagattg 1920

tttgaaggac atgggaatgt ttggtcagaa tatgtactat cactacttgg ggcgctctgg 1980

ttacaccatt catgtccagt gcaacgcttc aaaatttcac caaggggcgt taggagtttt 2040

tctgatacca gagtttgtca tggcttgcaa cactgagagt aaaacgtcat acgtttcata 2100

catcaatgca aatcctggtg agagaggcgg tgagtttacg aacacctaca atccgtcaaa 2160

tacagacgcc agtgagggca gaaagtttgc agcattggat tatttgctgg gttctggtgt 2220

tctagcagga aacgcctttg tgtacccgca ccagatcatc aacctacgta ccaacaacag 2280

tgcaacaatt gtggtgccat acgtaaactc acttgtgatt gattgtatgg caaaacacaa 2340

taactggggc attgtcatat taccactggc acccttggcc tttgccgcaa catcgtcacc 2400

acaggtgcct attacagtga ccattgcacc catgtgtaca gaattcaatg ggttgagaaa 2460

catcaccgtc ccagtacatc aagggttgcc gacaatgaac acacctggtt ccaatcaatt 2520

ccttacatct gatgacttcc agtcgccctg tgccttacct aattttgatg ttactccacc 2580

aatacacata cccggggaag taaagaatat gatggaacta gctgaaattg acacattgat 2640

cccaatgaac gcagtggacg ggaaggtgaa cacaatggag atgtatcaaa taccattgaa 2700

tgacaatttg agcaaggcac ctatattctg tttatcccta tcacctgctt ctgataaacg 2760

actgagccgc accatgttgg gtgaaatcct aaattattac acccattgga cggggtccat 2820

caggttcacc tttctatttt gtggtagtat gatggccact ggtaaactgc tcctcagcta 2880

ttccccaccg ggagctaaac caccaaccaa tcgcaaggat gcaatgctag gcacacacat 2940

catctgggac ctagggttac aatccagttg ttccatggtt gcaccgtgga tctccaacac 3000

agtgtacaga cggtgtgcac gtgatgactt cactgagggc ggatttataa cttgcttcta 3060

tcaaactaga attgtggtac ctgcttcaac ccctaccagt atgttcatgt taggctttgt 3120

tagtgcgtgt ccagacttca gtgtcagact gcttagggac actccccata ttagtcaatc 3180

gaaactaata ggacgtacac aaggcattga agacctcatt gacacagcga taaagaatgc 3240

cttaagagtg tcccaaccac cctcgaccca gtcaactgaa gcaactagtg gagtgaatag 3300

ccaggaggtg ccagctctaa ctgctgtgga aacaggagca tctggtcaag caatccccag 3360
tgatgtggtg gaaactaggc acgtggtaaa ttacaaaacc aggtctgaat cgtgtcttga 3420
gtcattcttt gggagagctg cgtgtgtcac aatcctatcc ttgaccaact cctccaagag 3480
cggagaggag aaaaagcatt tcaacatatg gaatattaca tacaccgaca ctgtccagtt 3540
acgcagaaaa ttagagtttt tcacgtattc caggtttgat cttgaaatga cttttgtatt 3600
cacagagaac tatcctagta cagccagtgg agaagtgcga aaccaggtgt accagatcat 3660
gtatattcca ccaggggcac cccgcccatc atcctgggat gactacacat ggcaatcctc 3720

ttcaaaccct tccatcttct acatgtatgg aaatgcacct ccacggatgt caattcctta 3780
cgtagggatt gccaatgcct attcacactt ctacgatggc tttgcacggg tgccacttga 3840
gggtgagaac accgatgctg gcgacacgtt ttacggttta gtgtccataa atgattttgg 3900
agttttagca gttagagcag taaaccgcag taatccacat acaatacaca catctgtgag 3960
agtgtacatg aaaccaaaac acattcggtg ttggtgcccc agacctcctc gagctgtatt 4020
atacagggga gagggagtgg acatgatatc cagtgcaatt ctacctctga ccaaggtaga 4080
ctcaattacc acttttgggt ttggtcatca gaacaaagca gtgtacgttg ccggttacaa 4140

gatttgcaac taccacctag caaccccaag tgatcacttg aatgcaatta gtatgttatg 4200
ggacagggat ttaatggtgg tggaatctag agcccaggga actgatacca tcgccagatg 4260
tagttgcagg tgtggagttt actattgtga atctaggagg aagtactacc ctgtcacttt 4320
tactggccca acgtttcgat tcatggaagc aaacgactac tatccagcaa gataccagtc 4380
tcacatgctg atagggtgcg gatttgcaga acccggggac tgcggtggga tactgaggtg 4440
cactcatggg gtaattggta tcattactgc aggaggtgaa ggggtagtag cctttgctga 4500
cattagagac ctctgggtgt atgaagagga ggccatggaa cagggaataa caagctacat 4560

cgaatctctc ggcacagcct ttggcgcagg gttcacccac acaatcagtg agaaagtgac 4620
tgaattgaca acaatggtta ccagcactat cacagaaaaa ctactgaaaa acttggtgaa 4680
aatagtgtcg gctctagtga ttgttgtgag aaattatgag gacactacca cgatccttgc 4740
aacactagca ctactcgggt gtgatatatc tccttggcaa tggttgaaga agaaggcatg 4800
tgacttacta gagattcctt atgtgatgcg ccaaggtgat gggtggatga agaaattcac 4860
agaggcgtgc aatgcagcta aaggcttaga gtggattagc aacaaaattt ccaagtttat 4920
agattggttg aagtgtaaaa ttatcccaga cgctaaggac aaggtggaat ttctcaccaa 4980

gttgaaacag ctagacatgt tggaaaatca aattgcaacc atccaccaat cttgccccag 5040

ccaagaacaa caagagattc ttttcaacaa tgtgagatgg ctagcagtcc agtcccgtcg 5100

gtttgcacca ttatacgctg tggaggcacg ccgaattaac aaaatggaga gcacaataaa 5160

caattatata cagttcaaga gcaaacaccg tattgaacca gtatgtatgc tcattcatgg 5220

gtcaccaggg acgggtaaat ctatagctac ttcattaata ggtagagcaa tagcagagaa 5280

ggaaagcaca tcagtctatt caatgccacc tgacccatct cactttgatg gctataaaca 5340

acaaggggta gtgattatgg acgacctaaa ccaaaacccc gatggtatgg acatgaaact 5400

gttttgccaa atggtatcaa cagtggagtt tattcctcca atggcctcat tagaggagaa 5460

gggcattttg tttacatctg attatgtcct ggcttctacc aactctcatt caattgtacc 5520

acccacagtg gctcacagtg atgccttaac cagacgattt gcatttgatg tggaggttta 5580

cacgatgtct gaacattcag tcaaaggcaa actgaatatg gccacggcca ctcaattgtg 5640

taaggattgt ccaacacctg caaattttaa aaagtgttgc cctctcgttt gtggaaaggc 5700

cttgcaatta atggacaggt acaccagaca aaggttcact gtagatgaga ttaccacatt 5760

aatcatgaat gagaaaaaca gaagggccaa tatcggcaat tgcatggaag ccttgtttca 5820

aggaccatta aggtataaag atttgaagat cgatgtgaag acagttcccc cccctgagtg 5880

catcagtgat ttgttacaag cagtggattc tcaagaggtt agggattact gtgagaagaa 5940

aggctggatc gttaacgtta ctagccagat tcaactagaa aggaacatca atagggccat 6000

gactatactc caagctgtta ccacattcgc agcagtcgca ggagtagtgt atgtaatgta 6060

caaactcttc gccggtcaac agggtgcata cactggcttg ccaaacaaaa aacccaatgt 6120

ccctactatc agagtcgcta aagtccaggg gccaggattt gactacgcag tggcaatggc 6180

aaaaagaaac atagttactg caaccaccac caagggtgaa tttaccatgc taggggtgca 6240

tgataatgta gcaatattgc caacccatgc cgctccagga gaaaccatta ttattgatgg 6300

gaaagaagta gagatcctag atgccagagc cttagaagat caagcgggaa ccaatcttga 6360

gatcaccatt attactctaa aaagaaatga gaagtttaga gacatcagat cacatattcc 6420

cacccaaatt actgaaacta acgatggagt gttgatcgtg aacactagca agtaccccaa 6480

tatgtatgtc cccgttggtg ctgtgaccga acagggatat cttaatctca gtggacgtca 6540

aactgctcgc actttaatgt acaactttcc aacaagggca ggccagtgcg gaggaatcat 6600

cacttgtact ggcaaagtca ttgggatgca tgttggcggg aacggttcac atgggtttgc 6660

agcagccctc aagcgatcat acttcactca aaatcagggc gaaatccagt ggatgaggtc 6720

atcaaaagaa gtggggtacc ccattataaa tgccccatcc aagacaaagt tagaacccag 6780

tgctttccac tatgtttttg aaggtgttaa ggaaccagct gtactcacta agaatgaccc 6840

cagactaaaa acagattttg aagaagccat cttttctaaa tatgtgggga acaaaattac 6900

tgaagtggac gagtacatga aagaagcagt ggatcactat gcaggacagt taatgtcact 6960

ggatatcaac acagaacaga tgtgcctgga ggatgccatg tacggcaccg atggtcttga 7020

ggccctggat cttagcacta gtgctggata tccttatgtt gcaatgggga aaaagaaaag 7080

agacattcta gataaacaga ccagagatac taaggagatg cagagacttt tagataccta 7140

tggaatcaat ctaccattag tcacgtacgt gaaagatgaa ctcaggtcaa agactaaagt 7200

ggaacaagga aagtcaagat tgattgaagc ttccagcctt aatgattcag ttgcaatgag 7260

aatggccttt ggcaatcttt acgcagcttt ccacaagaat ccaggtgtgg tgacaggatc 7320

agcagttggt tgtgacccag atttgttttg gagtaagata ccagtgctaa tggaagaaaa 7380

actcttcgct tttgactaca cagggtatga tgcctcactc agccctgctt ggtttgaagc 7440

tcttaaaatg gtgttagaaa aaattggatt tggcagtaga gtagactata tagactacct 7500

gaaccactct caccaccttt acaaaaacaa gacttattgt gtcaaaggcg gcatgccatc 7560

cggctgctct ggcacctcaa ttttcaactc aatgattaac aacctgatca ttaggacgct 7620

tttactgaga acctacaagg gcatagactt ggaccattta aaaatgattg cctatggtga 7680

tgacgtgata gcttcctacc cccatgaggt tgacgctagt ctcctagccc aatcaggaaa 7740

agactatgga ctaaccatga ctccagcaga taaatcagta acctttgaaa cagtcacatg 7800

ggagaatgta acatttctga aaagattttt cagagcagat gagaagtatc cattcctggt 7860

gcatccagtg atgccaatga aagaaattca cgaatcaatc agatggacca aggaccctag 7920

aaacacacag gatcacgtac gctcgttgtg cctattagct tggcacaacg gtgaagaaga 7980

atacaataaa tttttagcta aaatcagaag tgtgccaatc ggaagagctt tattgctccc 8040

agagtactct acattgtacc gccgatggct cgactcattt tagtaaccct acctcagtcg 8100

gattggattg ggttatactg ttgtaggggt aaatttttct ttaattcgga gaaaaaaaaa 8160

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aggccggcat ggtcccagcc tcctcgctgg cgccggctgg 8220

gcaacatgct tcggcatggc gaatgggacg ctcgagtcta gagggcaggg cccgtttaaa 8280

cccgctgatc agcctcgact gtgccttcta gttgccagcc atctgttgtt tgcccctccc 8340

ccgtgccttc cttgaccctg gaaggtgcca ctcccactgt cctttcctaa taaaatgagg 8400

aaattgcatc gcattgtctg agtaggtgtc attctattct gggggggtggg gtggggcagg 8460

acagcaaggg ggaggattgg gaagacaata gcaggcatgc tggggatgcg gtgggctcta 8520

tgg 8523