

(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2019-0120233  
(43) 공개일자 2019년10월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
**A61K 39/00** (2006.01) **A61K 39/39** (2006.01)  
**A61K 45/06** (2006.01) **A61P 35/00** (2006.01)  
 (52) CPC특허분류  
**A61K 39/001164** (2018.08)  
**A61K 39/39** (2013.01)  
 (21) 출원번호 10-2019-7025539  
 (22) 출원일자(국제) 2017년10월26일  
 심사청구일자 없음  
 (85) 번역문제출일자 2019년08월30일  
 (86) 국제출원번호 PCT/US2017/058595  
 (87) 국제공개번호 WO 2018/144082  
 국제공개일자 2018년08월09일  
 (30) 우선권주장  
 62/453,444 2017년02월01일 미국(US)  
 (뒷면에 계속)

(71) 출원인  
**모더나티엑스, 인크.**  
 미국 02139 매사추세츠주 케임브리지 테크놀로지  
 스퀘어 200  
 (72) 발명자  
**벨리언트, 니콜라스**  
 미국 02139 매사추세츠주 캠브리지 노퍽 스트리트  
 70  
**애쉬번, 테드**  
 미국 02118 매사추세츠주 보스턴 넘버 1 워싱턴  
 스트리트 1688  
**홉슨, 크리스틴**  
 미국 02476 매사추세츠주 알링턴 애플턴 스트리트  
 331  
 (74) 대리인  
**양영준, 이상남**

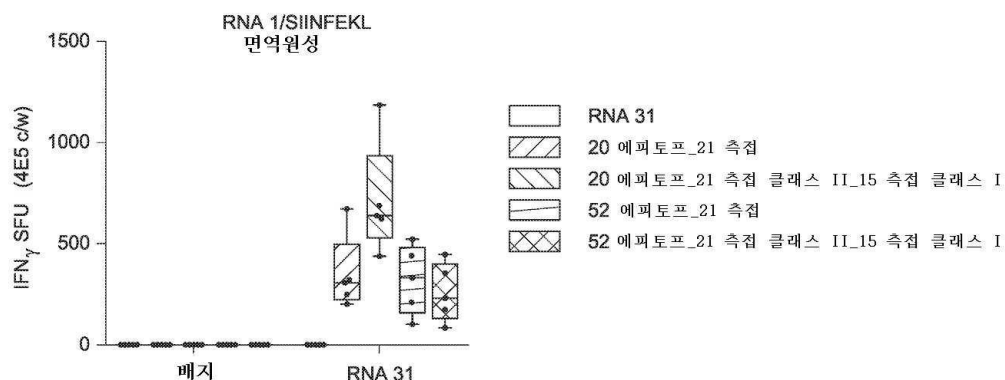
전체 청구항 수 : 총 130 항

(54) 발명의 명칭 RNA 압 백신

## (57) 요약

본 개시내용은 암 리보핵산(RNA) 백신뿐만 아니라 상기 백신을 이용하는 방법 및 상기 백신을 포함하는 조성물에 관한 것이다. 특히, 본 개시내용은 단일 mRNA 작제물 상에서 몇몇 암 에피토프를 암호화하는 연쇄동일서열 mRNA 압 백신, 즉, 폴리-에피토프 mRNA 작제물 또는 폴리-네오-에피토프 작제물에 관한 것이다. 본 개시내용은 추가로 p53 및 KRAS 돌연변이뿐만 아니라 면역 인핸서, 예컨대, STING, 예를 들어, 면역 자극제 또는 아쥬반트를 추가로 암호화하는 mRNA 작제물의 혼입에 관한 것이다. 본 개시내용은 추가로 향상된 면역 반응을 유발하기 위한 보편적 T 세포 에피토프, 예컨대 과산화물 또는 디프테리아 독소의 포함에 관한 것이다.

## 대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

**A61K 45/06** (2013.01)

**A61P 35/00** (2018.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

A61K 2039/53 (2013.01)

A61K 2039/54 (2013.01)

A61K 2039/545 (2013.01)

A61K 2039/55516 (2013.01)

A61K 2039/55555 (2013.01)

A61K 2039/585 (2013.01)

---

(30) 우선권주장

62/453,465 2017년02월01일 미국(US)

62/558,238 2017년09월13일 미국(US)

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

mRNA 암 백신으로서,

(a) 개인화된 암 항원(personalized cancer antigen)인 1 내지 500개의 펩타이드 에피토프를 암호화하는 하나 이상의 오픈 리딩 프레임 및 보편적 II형 T-세포 에피토프를 각각 갖는 하나 이상의 mRNA;

(b) 활성화 종양유전자 돌연변이 펩타이드를 암호화하는 오픈 리딩 프레임을 각각 갖는 하나 이상의 mRNA로서, 선택적으로 상기 mRNA는 보편적 II형 T-세포 에피토프를 더 포함하는, 상기 하나 이상의 mRNA;

(c) 암 항원 펩타이드 에피토프를 암호화하는 오픈 리딩 프레임을 각각 갖는 하나 이상의 mRNA로서, 상기 mRNA 암 백신은 5 내지 100개의 펩타이드 에피토프를 암호화하며 펩타이드 에피토프 중 적어도 둘은 개인화된 암 항원이되, 선택적으로 상기 mRNA는 보편적 II형 T-세포 에피토프를 더 포함하는, 상기 하나 이상의 mRNA; 및/또는

(d) 암 항원 펩타이드 에피토프를 암호화하는 오픈 리딩 프레임을 각각 갖는 하나 이상의 mRNA로서, 상기 mRNA 백신은 5 내지 100개의 펩타이드 에피토프를 암호화하고, 상기 펩타이드 에피토프 중 적어도 셋은 복잡한 변이체이고, 상기 펩타이드 에피토프 중 적어도 둘은 점 돌연변이이되, 선택적으로 상기 mRNA는 보편적 II형 T-세포 에피토프를 더 포함하는, 상기 하나 이상의 mRNA

중 하나 이상을 포함하는 지질 나노입자를 포함하는, mRNA 암 백신.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 mRNA 암 백신은 1 내지 20개의 보편적 II형 T-세포 에피토프를 암호화하는, mRNA 암 백신.

#### 청구항 3

제2항에 있어서, 상기 보편적 II형 T-세포 에피토프는 ILMQYIKANSKFIGI(과상풍 독소; 서열번호 226), FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE(과상풍 독소; 서열번호 227), QYIKANSKFIGITE(과상풍 독소; 서열번호 228) QSIALSSLMVAQAIP(디프테리아 독소; 서열번호 229) 및 AKFVAAWTLKAAA(pan-DR 에피토프; 서열번호 230)로 이루어진 군으로부터 선택되는, mRNA 암 백신.

#### 청구항 4

제1항 내지 제3항 중 하나에 있어서, 상기 보편적 II형 T-세포 에피토프는 상기 mRNA 전체적으로 동일한 보편적 II형 T-세포 에피토프인, mRNA 암 백신.

#### 청구항 5

제1항 내지 제3항 중 하나에 있어서, 상기 보편적 II형 T-세포 에피토프는 상기 mRNA에서 1 내지 20회 반복되는, mRNA 암 백신.

#### 청구항 6

제1항 내지 제3항 중 하나에 있어서, 상기 보편적 II형 T-세포 에피토프는 상기 mRNA 전체적으로 서로 상이한, mRNA 암 백신.

#### 청구항 7

제1항 내지 제3항 중 하나에 있어서, 상기 보편적 II형 T-세포 에피토프는 모든 암 항원 펩타이드 에피토프 사이에 위치되는, mRNA 암 백신.

#### 청구항 8

제1항 내지 제3항 중 하나에 있어서, 상기 보편적 II형 T-세포 에피토프는 모든 다른 암 항원 펩타이드 에피토프 사이에 위치되는, mRNA 암 백신.

#### 청구항 9

제1항 내지 제3항 중 하나에 있어서, 상기 보편적 II형 T-세포 에피토프는 모든 제3의 암 항원 펩타이드 에피토프 사이에 위치되는, mRNA 암 백신.

#### 청구항 10

제1항 내지 제9항 중 하나에 있어서, 다음의 조건 (i) 내지 (iv) 중 하나 이상이 충족되는, mRNA 암 백신:

- (i) 상기 활성화 종양유전자 돌연변이는 KRAS 돌연변이임;
- (ii) 상기 KRAS 돌연변이는 G12 돌연변이이되, 선택적으로 상기 G12 KRAS 돌연변이는 G12D, G12V, G12S, G12C, G12A 및 G12R KRAS 돌연변이로부터 선택됨;
- (iii) 상기 KRAS 돌연변이는 G13 돌연변이이되, 선택적으로 상기 G13 KRAS 돌연변이는 G13D KRAS 돌연변이임; 그리고/또는
- (iv) 상기 활성화 종양유전자 돌연변이는 H-RAS 또는 N-RAS 돌연변이임.

#### 청구항 11

제1항 내지 제10항 중 하나에 있어서, 다음의 조건 (A) 내지 (D) 중 하나 이상이 충족되는, mRNA 암 백신:

- (A) 상기 mRNA는 둘 이상의 활성화 종양유전자 돌연변이 펩타이드의 연쇄동일서열(concatemer)을 암호화하는 오픈 리딩 프레임을 가짐;
- (B) 상기 펩타이드 에피토프 중 적어도 둘은 단일 글리신에 의해 서로로부터 분리되되, 선택적으로 상기 펩타이드 에피토프 모두는 단일 글리신에 의해 서로로부터 분리됨;
- (C) 상기 연쇄동일서열은 3 내지 10개의 활성화 종양유전자 돌연변이 펩타이드를 포함함; 그리고/또는
- (D) 상기 펩타이드 에피토프 중 적어도 둘은 링커 없이 서로에 대해 직접적으로 연결됨.

#### 청구항 12

제1항 내지 제11항 중 하나에 있어서, 다음의 조건 (i) 내지 (v) 중 하나 이상을 충족하는, mRNA 암 백신:

- (i) 펩타이드 에피토프 중 적어도 하나는 전통적인 암 항원임;
- (ii) 펩타이드 에피토프 중 적어도 하나는 재발성 다형임;
- (iii) 상기 재발성 다형은 p53에서 재발성 체세포 암 돌연변이를 포함함;
- (iv) p53에서 재발성 체세포 암 돌연변이는:
  - (A) 에피토프 AVSPCISFVW(서열번호 233)(HLA-B\*57:01, HLA-B\*58:01), HPLASCQCFF(서열번호 234)(HLA-B\*35:01, HLA-B\*53:01), FVWNFGIPL(서열번호 235)(HLA-A\*02:01, HLA-A\*02:06, HLA-B\*35:01)을 함유하는 펩타이드 서열 TAKSVTCTVSCPEGLASMRLQCLAVSPCISFVWNFGIPLHPLASCQCFFIVYPLNV(서열번호 232)를 갖는 보유된 인트론을 유도하는, 코돈 p.T125에 이웃하는 정규 5' 스플라이스 부위에서의 돌연변이;
  - (B) 에피토프 LQVLSLGTYS(서열번호 237)(HLA-B\*15:01), FQSNTQNAV(서열번호 238)(HLA-B\*15:01)를 함유하는 펩타이드 서열 EYFTLQVLSLGTYSQVESFQSNTQNAVFFLTLPALGAFIRGQ(서열번호 236)를 갖는 보유된 인트론을 유도하는 코돈 p.331에 이웃하는 정규 5' 스플라이스 부위에서의 돌연변이;
  - (C) 에피토프 CTMFCQLAK(서열번호 240)(HLA-A\*11:01), KSVTCTMF(서열번호 241)(HLA-B\*58:01)를 함유하는 신규한 스페닝 펩타이드 서열 AKSVTCTMFCQLAK(서열번호 239)를 생성하는 모호한 대안의 엑손 3' 스플라이스 부위를 유도하는 코돈 p.126에 이웃하는 정규 3' 스플라이스 부위에서의 돌연변이; 및/또는
  - (D) 에피토프 VPYEPPEVW(서열번호 243)(HLA-B\*53:01, HLA-B\*51:01), LTVPPSTAW(서열번호 244)(HLA-B\*58:01, HLA-B\*57:01)를 함유하는 신규한 스페닝 펩타이드 서열 VPYEPPEVWLALTVPSTAWAA(서열번호 242)를 생성하는 모



호한 대안의 인트론 5' 스플라이스 부위를 유도하는, 코돈 p.224에 이웃하는 정규 5' 스플라이스 부위에서의 돌연변이

로 이루어진 군으로부터 선택되되,

상기 전사체 코돈 위치는 상기 양상블 v83 인간 게놈 주석(annotation)으로부터의 정규 전장 p53 전사체 ENST00000269305(서열번호 245)를 지칭함; 및/또는

(v) 상기 mRNA 압 백신은 안정제를 포함하지 않음.

### 청구항 13

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 mRNA는 면역 강화제를 암호화하는 오픈 리딩 프레임 더 포함하는, mRNA 압 백신.

### 청구항 14

제13항에 있어서, 상기 면역 강화제는 지질 나노입자로 제형화되는, mRNA 압 백신.

### 청구항 15

제13항에 있어서, 상기 면역 강화제는 별개의 지질 나노입자로 제형화되는, mRNA 압 백신.

### 청구항 16

제13항에 있어서, 상기 면역 강화제는 구성적으로 활성인 인간 STING 폴리펩타이드인, mRNA 압 백신.

### 청구항 17

제13항에 있어서, 상기 구성적으로 활성인 인간 STING 폴리펩타이드는 서열번호 1에 나타난 아미노산 서열을 포함하는, mRNA 압 백신.

### 청구항 18

제13항에 있어서, 상기 구성적으로 활성인 인간 STING 폴리펩타이드를 암호화하는 상기 mRNA는 서열번호 170에 나타난 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, mRNA 압 백신.

### 청구항 19

제13항에 있어서, 상기 구성적으로 활성인 인간 STING 폴리펩타이드를 암호화하는 상기 mRNA는 miR-122 마이크로RNA 결합 부위를 갖는 3'UTR을 포함하는, mRNA 압 백신.

### 청구항 20

제19항에 있어서, 상기 miR-122 마이크로RNA 결합 부위는 서열번호 175 나타낸 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, mRNA 압 백신.

### 청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 mRNA는 서열번호 176에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 5'UTR을 각각 포함하는, mRNA 압 백신.

### 청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 mRNA는 각각 폴리 A 꼬리를 포함하는, mRNA 압 백신.

### 청구항 23

제22항에 있어서, 폴리 A 꼬리는 약 100개의 뉴클레오타이드를 포함하는, mRNA 압 백신.

### 청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 mRNA는 각각 5' 캡 1 구조를 포함하는, mRNA 암 백신.

#### 청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 mRNA는 적어도 하나의 화학적 변형을 포함하는, mRNA 암 백신.

#### 청구항 26

제25항에 있어서, 상기 화학적 변형은 N1-메틸슈도유리딘인, mRNA 암 백신.

#### 청구항 27

제26항에 있어서, 상기 하나 이상의 mRNA는 N1-메틸슈도유리딘으로 완전히 변형되는, mRNA 암 백신.

#### 청구항 28

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 mRNA는 45 내지 55개의 개인화된 암 항원을 암호화하는, mRNA 암 백신.

#### 청구항 29

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 mRNA는 52개의 개인화된 암 항원을 암호화하는, mRNA 암 백신.

#### 청구항 30

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 개인화된 암 항원의 각각은 별개의 오픈 리딩 프레임에 의해 암호화되는, mRNA 암 백신.

#### 청구항 31

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 펩타이드 에피토프는 2 내지 100개의 펩타이드 에피토프를 포함한 연쇄동일서열 암 항원의 형태이되, 선택적으로 상기 연쇄동일서열 암 항원은 5 내지 100개의 펩타이드 에피토프를 포함하는, mRNA 암 백신.

#### 청구항 32

제31항에 있어서, 상기 연쇄동일서열 암 항원은 하기 중 하나 이상을 포함하는, mRNA 암 백신:

- a) 상기 2 내지 100개의 펩타이드 에피토프 또는, 선택적으로 5 내지 100개의 펩타이드 에피토프는 절단 민감 부위에 개재됨;
- b) 각각의 펩타이드 에피토프를 암호화하는 상기 mRNA는 링커 없이 서로 직접적으로 연결됨;
- c) 각각의 펩타이드 에피토프를 암호화하는 상기 mRNA는 단일 뉴클레오타이드 링커와 서로 연결됨;
- d) 각각의 펩타이드 에피토프는 25 내지 35개의 아미노산을 포함하고, 중심에 위치한 SNP 돌연변이를 포함함;
- e) 상기 펩타이드 에피토프의 적어도 30%는 대상체로부터의 클래스 I MHC 분자에 대해 가장 높은 친화도를 가짐;
- f) 상기 펩타이드 에피토프의 적어도 30%는 대상체로부터의 클래스 II MHC 분자에 대해 가장 높은 친화도를 가짐;
- g) 상기 적어도 펩타이드 에피토프의 50%는 HLA-A, HLA-B 및/또는 DRB1에 대해 IC<sub>50</sub> > 500nM의 예측된 결합 친화도를 가짐;
- h) 상기 mRNA는 45 내지 55개의 펩타이드 에피토프를 암호화함;
- i) 상기 mRNA는 52개의 펩타이드 에피토프를 암호화함;

- j) 상기 펩타이드 에피토프의 50%는 클래스 I MHC에 대한 결합 친화도를 갖고, 상기 펩타이드 에피토프의 50%는 클래스 II MHC에 대한 결합 친화도를 가짐;
- k) 상기 펩타이드 에피토프가 유사-에피토프를 최소화하기 위해 정돈되도록 상기 펩타이드 에피토프를 암호화하는 상기 mRNA가 배열됨,
- l) 상기 펩타이드 에피토프의 적어도 30%는 길이가 15개의 아미노산의 클래스 I MHC 결합 펩타이드임; 그리고/또는
- m) 상기 펩타이드 에피토프의 적어도 30%는 길이가 21개의 아미노산의 클래스 II MHC 결합 펩타이드임.

### 청구항 33

mRNA 암 백신으로서,

지질 나노입자에서 제형화된 개인화된 암 항원인 45 내지 55개의 펩타이드 에피토프를 암호화하는 하나 이상의 오픈 리딩 프레임들 각각 갖는 하나 이상의 mRNA를 포함하되; 선택적으로 상기 펩타이드 에피토프 중 적어도 하나는 활성화 종양유전자 돌연변이 펩타이드 또는 전통적인 암 항원이고, 그리고 선택적으로 상기 펩타이드 에피토프 중 적어도 셋은 복잡한 변이체이고, 펩타이드 에피토프 중 적어도 둘은 점 돌연변이인, mRNA 암 백신.

### 청구항 34

제33항에 있어서, 상기 하나 이상의 mRNA는 48 내지 54개의 개인화된 암 항원을 암호화하는, mRNA 암 백신.

### 청구항 35

제33항 또는 제34항에 있어서, 상기 하나 이상의 mRNA는 52개의 개인화된 암 항원을 암호화하는, mRNA 암 백신.

### 청구항 36

제33항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 상기 개인화된 암 항원은 별개의 오픈 리딩 프레임에 의해 암호화되는, mRNA 암 백신.

### 청구항 37

제33항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 펩타이드 에피토프는 2 내지 100개의 펩타이드 에피토프를 포함한 연쇄동일서열 암 항원의 형태이되, 선택적으로 상기 연쇄동일서열 암 항원은 5 내지 100개의 펩타이드 에피토프를 포함하는, mRNA 암 백신.

### 청구항 38

제37항에 있어서, 상기 연쇄동일서열 암 항원은 하기 중 하나 이상을 포함하는, mRNA 암 백신:

- a) 상기 2 내지 100개의 펩타이드 에피토프 또는, 선택적으로 5 내지 100개의 펩타이드 에피토프는 절단 민감 부위에 게재됨;
- b) 각각의 펩타이드 에피토프를 암호화하는 상기 mRNA는 링커 없이 서로 직접적으로 연결됨;
- c) 각각의 펩타이드 에피토프를 암호화하는 상기 mRNA는 단일 뉴클레오타이드 링커와 서로 연결됨;
- d) 각각의 펩타이드 에피토프는 25 내지 35개의 아미노산을 포함하고, 중심에 위치된 SNP 돌연변이를 포함함;
- e) 상기 펩타이드 에피토프의 적어도 30%는 대상체로부터의 클래스 I MHC 분자에 대해 가장 높은 친화도를 가짐;
- f) 상기 펩타이드 에피토프의 적어도 30%는 대상체로부터의 클래스 II MHC 분자에 대해 가장 높은 친화도를 가짐;
- g) 상기 펩타이드 에피토프의 적어도 50%는 HLA-A, HLA-B 및/또는 DRB1에 대해 IC > 500nM의 예측된 결합 친화도를 가짐;
- h) 상기 mRNA는 45 내지 55개의 펩타이드 에피토프를 암호화함;

- i) 상기 mRNA는 52개의 펩타이드 에피토프를 암호화함;
- j) 상기 펩타이드 에피토프의 50%는 클래스 I MHC에 대한 결합 친화도를 갖고, 상기 펩타이드 에피토프의 50%는 클래스 II MHC에 대한 결합 친화도를 가짐;
- k) 상기 펩타이드 에피토프가 유사-에피토프를 최소화하기 위해 정돈되도록 상기 펩타이드 에피토프를 암호화하는 상기 mRNA가 배열됨,
- l) 상기 펩타이드 에피토프의 적어도 30%는 길이가 15개의 아미노산의 클래스 I MHC 결합 펩타이드임; 및/또는
- m) 상기 펩타이드 에피토프의 적어도 30%는 길이가 21개의 아미노산의 클래스 II MHC 결합 펩타이드임.

#### 청구항 39

제33항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 펩타이드 에피토프 중 적어도 둘은 보편적 II형 T-세포 에피토프에 의해 서로로부터 분리되는, mRNA 암 백신.

#### 청구항 40

제33항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 펩타이드 에피토프 모두는 보편적 II형 T-세포 에피토프에 의해 서로로부터 분리되는, mRNA 암 백신.

#### 청구항 41

제33항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 mRNA 암 백신은 1 내지 20개의 보편적 II형 T-세포 에피토프를 암호화하는, mRNA 암 백신.

#### 청구항 42

제41항에 있어서, 상기 보편적 II형 T-세포 에피토프는 ILMQYIKANSKFIGI(파상풍 독소; 서열번호 226), FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE(파상풍 독소; 서열번호 227), QYIKANSKFIGITE(파상풍 독소; 서열번호 228) QSIALSSLMAQAIP(디프테리아 독소; 서열번호 229) 및 AKFVAAWTLKAAA(pan-DR 에피토프; 서열번호 230)로 이루어진 군으로부터 선택되는, mRNA 암 백신.

#### 청구항 43

제39항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 보편적 II형 T-세포 에피토프는 상기 mRNA 전체적으로 동일한 보편적 II형 T-세포 에피토프인, mRNA 암 백신.

#### 청구항 44

제39항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 보편적 II형 T-세포 에피토프는 상기 mRNA에서 1 내지 20회 반복되는, mRNA 암 백신.

#### 청구항 45

제39항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 보편적 II형 T-세포 에피토프는 상기 mRNA 전체적으로 서로 상이한, mRNA 암 백신.

#### 청구항 46

제39항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 보편적 II형 T-세포 에피토프는 모든 펩타이드 에피토프 사이에 위치되는, mRNA 암 백신.

#### 청구항 47

제39항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 보편적 II형 T-세포 에피토프는 모든 다른 펩타이드 에피토프 사이에 위치되는, mRNA 암 백신.

#### 청구항 48

제39항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 보편적 II형 T-세포 에피토프는 모든 제3의 펩타이드 에피토프

프 사이에 위치되는, mRNA 암 백신.

#### 청구항 49

제33항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 mRNA는 면역 강화제를 암호화하는 오픈 리딩 프레임에 더 포함하는, mRNA 암 백신.

#### 청구항 50

제38항에 있어서, 상기 면역 강화제는 지질 나노입자로 제형화되는, mRNA 암 백신.

#### 청구항 51

제38항에 있어서, 상기 면역 강화제는 별개의 지질 나노입자로 제형화되는, mRNA 암 백신.

#### 청구항 52

제38항에 있어서, 상기 면역 강화제는 구성적으로 활성인 인간 STING 폴리펩타이드인, mRNA 암 백신.

#### 청구항 53

제52항에 있어서, 상기 구성적으로 활성인 인간 STING 폴리펩타이드는 서열번호 1에 나타난 아미노산 서열을 포함하는, mRNA 암 백신.

#### 청구항 54

제52항에 있어서, 상기 구성적으로 활성인 인간 STING 폴리펩타이드를 암호화하는 상기 mRNA는 서열번호 170에 나타난 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, mRNA 암 백신.

#### 청구항 55

제33항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서, 다음의 조건 (i) 내지 (iv) 중 하나 이상이 충족되는, mRNA 백신:

- (i) 상기 활성화 종양유전자 돌연변이는 KRAS 돌연변이임;
- (ii) 상기 KRAS 돌연변이는 G12 돌연변이이되, 선택적으로 상기 G12 KRAS 돌연변이는 G12D, G12V, G12S, G12C, G12A 및 G12R KRAS 돌연변이로부터 선택됨;
- (iii) 상기 KRAS 돌연변이는 G13 돌연변이이되, 선택적으로 상기 G13 KRAS 돌연변이는 G13D KRAS 돌연변이임; 그리고/또는
- (iv) 상기 활성화 종양유전자 돌연변이는 H-RAS 또는 N-RAS 돌연변이임.

#### 청구항 56

제33항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 다음의 조건 (A) 내지 (D) 중 하나 이상이 충족되는, mRNA 백신:

- (A) 상기 mRNA는 둘 이상의 활성화 종양유전자 돌연변이 펩타이드의 연쇄동일서열을 암호화하는 오픈 리딩 프레임을 가짐;
- (B) 상기 펩타이드 에피토프 중 적어도 둘은 단일 글리신에 의해 서로로부터 분리되되, 선택적으로 상기 펩타이드 에피토프 모두는 단일 글리신에 의해 서로로부터 분리됨;
- (C) 상기 연쇄동일서열은 3 내지 10개의 활성화 종양유전자 돌연변이 펩타이드를 포함함; 그리고/또는
- (D) 상기 펩타이드 에피토프 중 적어도 둘은 링커 없이 서로에 대해 직접적으로 연결됨.

#### 청구항 57

제33항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서, 다음의 조건 (i) 내지 (v) 중 하나 이상이 충족되는, mRNA 암 백신:

- (i) 상기 펩타이드 에피토프 중 적어도 하나는 전통적인 암 항원임;

(ii) 상기 펩타이드 에피토프 중 적어도 하나는 재발성 다형임;

(iii) 상기 재발성 다형은 p53에서 재발성 체세포 암 돌연변이를 포함함;

(iv) p53에서 상기 재발성 체세포 암 돌연변이는:

(A) 에피토프 AVSPCISFVW(서열번호 233)(HLA-B\*57:01, HLA-B\*58:01), HPLASCQCFF(서열번호 234)(HLA-B\*35:01, HLA-B\*53:01), FVWNFGIPL(서열번호 235)(HLA-A\*02:01, HLA-A\*02:06, HLA-B\*35:01)을 함유하는 펩타이드 서열 TAKSVTCTVSCPEGLASMLQLAVSPCISFVWNFGIPLHPLASCQCFFIVYPLNV(서열번호 232)를 갖는 보유된 인트론을 유도하는, 코돈 p.T125에 이웃하는 정규 5' 스플라이스 부위에서의 돌연변이;

(B) 에피토프 LQVLSLGTSY(서열번호 237)(HLA-B\*15:01), FQSNTQNAV(서열번호 238)(HLA-B\*15:01)를 함유하는 펩타이드 서열 EYFTLQVLSLGTSYQVESFQSNTQNAVFFLTVPALGAFAIRGQ(서열번호 236)를 갖는 보유된 인트론을 유도하는 코돈 p.331에 이웃하는 정규 5' 스플라이스 부위에서의 돌연변이;

(C) 에피토프 CTMFCQLAK(서열번호 240)(HLA-A\*11:01), KSVTCTMF(서열번호 241)(HLA-B\*58:01)를 함유하는 신규한 스페닝 펩타이드 서열 AKSVTCTMFCQLAK(서열번호 239)를 생성하는 모호한 대안의 엑손 3' 스플라이스 부위를 유도하는 코돈 p.126에 이웃하는 정규 3' 스플라이스 부위에서의 돌연변이; 및/또는

(D) 에피토프 VPYEPPEVW(서열번호 243)(HLA-B\*53:01, HLA-B\*51:01), LTVPPSTAW(서열번호 244)(HLA-B\*58:01, HLA-B\*57:01)를 함유하는 신규한 스페닝 펩타이드 서열 VPYEPPEVWLALTVPSTAWAA(서열번호 242)를 생성하는 모호한 대안의 인트론 5' 스플라이스 부위를 유도하는, 코돈 p.224에 이웃하는 정규 5' 스플라이스 부위에서의 돌연변이

로 이루어진 군으로부터 선택되며,

상기 전사체 코돈 위치는 상기 양상블 v83 인간 게놈 주석으로부터의 정규 전장 p53 전사체 ENST00000269305(서열번호 245)를 지칭함; 및/또는

(v) 상기 mRNA 암 백신은 안정제를 포함하지 않음.

#### 청구항 58

mRNA 암 백신으로서,

(i) 개인화된 암 항원인 1 내지 500개의 펩타이드 에피토프를 암호화하는 하나 이상의 오픈 리딩 프레임에 각각 갖는 하나 이상의 mRNA, 및

(ii) 상기 개인화된 암 항원에 대한 면역 반응을 향상시키는 폴리펩타이드를 암호화하는 오픈 리딩 프레임을 갖는 mRNA

를 포함하는 지질 나노입자를 포함하되,

선택적으로 (i) 및 (ii)는 대략 5:1의 질량비로 존재하고; 선택적으로 상기 펩타이드 에피토프 중 적어도 하나는 활성화 종양유전자 돌연변이 펩타이드 또는 전통적인 암 항원이고, 그리고 선택적으로 상기 펩타이드 에피토프 중 적어도 셋은 복잡한 변이체이며, 상기 펩타이드 에피토프 중 적어도 둘은 점 돌연변이인, mRNA 암 백신.

#### 청구항 59

제58항에 있어서, 상기 면역 반응은

(i) I형 인터페론 경로 신호전달을 자극하는 것;

(ii) NFkB 경로 신호전달을 자극하는 것;

(iii) 염증 반응을 자극하는 것;

(iv) 사이토카인 생산을 자극하는 것; 또는

(v) 수지상 세포 발생, 활성화 또는 이동을 자극하는 것; 및

(vi) (i) 내지 (v) 중 임의의 조합

을 특징으로 하는 세포성 또는 체액성 면역 반응을 포함하는, mRNA 암 백신.

#### 청구항 60

제58항에 있어서, 상기 개인화된 암 항원에 대해 면역 반응을 향상시키는 상기 펩타이드 에피토프와 상기 폴리펩타이드를 둘 다 암호화하는 단일 mRNA 작제물을 포함하는, mRNA 암 백신.

#### 청구항 61

제58항 또는 제59항에 있어서, 상기 펩타이드 에피토프는 2 내지 100개의 펩타이드 에피토프를 포함하는 연쇄동일서열 암 항원의 형태이되, 선택적으로 상기 연쇄동일서열 암 항원은 5 내지 100개의 펩타이드 에피토프를 포함한, mRNA 암 백신.

#### 청구항 62

제61항에 있어서, 상기 연쇄동일서열 암 항원은 하기 중 하나 이상을 포함하는, mRNA 암 백신:

- a) 상기 2 내지 100개의 펩타이드 에피토프 또는, 선택적으로 5 내지 100개의 펩타이드 에피토프는 절단 민감 부위에 개재됨;
- b) 각각의 펩타이드 에피토프를 암호화하는 상기 mRNA는 링커 없이 서로 직접적으로 연결됨;
- c) 각각의 펩타이드 에피토프를 암호화하는 상기 mRNA는 단일 뉴클레오타이드 링커와 서로 연결됨;
- d) 각각의 펩타이드 에피토프는 25 내지 35개의 아미노산을 포함하고, 중심에 위치한 SNP 돌연변이를 포함함;
- e) 상기 펩타이드 에피토프의 적어도 30%는 대상체로부터의 클래스 I MHC 분자에 대해 가장 높은 친화도를 가짐;
- f) 상기 펩타이드 에피토프의 적어도 30%는 대상체로부터의 클래스 II MHC 분자에 대해 가장 높은 친화도를 가짐;
- g) 상기 펩타이드 에피토프의 적어도 50%는 HLA-A, HLA-B 및/또는 DRB1에 대해 IC<sub>50</sub> > 500nM의 예측된 결합 친화도를 가짐;
- h) 상기 mRNA는 45 내지 55개의 펩타이드 에피토프를 암호화함;
- i) 상기 mRNA는 52개의 펩타이드 에피토프를 암호화함;
- j) 상기 펩타이드 에피토프의 50%는 클래스 I MHC에 대한 결합 친화도를 갖고, 상기 펩타이드 에피토프의 50%는 클래스 II MHC에 대한 결합 친화도를 가짐;
- k) 상기 펩타이드 에피토프가 유사-에피토프를 최소화하기 위해 정돈되도록 상기 펩타이드 에피토프를 암호화하는 상기 mRNA가 배열됨,
- l) 상기 펩타이드 에피토프의 적어도 30%는 길이가 15개의 아미노산의 클래스 I MHC 결합 펩타이드임; 및/또는
- m) 상기 펩타이드 에피토프의 적어도 30%는 길이가 21개의 아미노산의 클래스 II MHC 결합 펩타이드임.

#### 청구항 63

제62항에 있어서, 각각의 펩타이드 에피토프는 상기 SNP 돌연변이의 각각의 측면 상에서 7 내지 15개의 측접 아미노산을 갖는 중심에 위치한 SNP 돌연변이를 포함하는, mRNA 암 백신.

#### 청구항 64

제58항 내지 제63항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체에서 적어도 하나의 개인화된 암 항원을 향상시키는 상기 폴리펩타이드는 구성적으로 활성인 인간 STING 폴리펩타이드인, mRNA 암 백신.

#### 청구항 65

제64항에 있어서, 상기 구성적으로 활성인 인간 STING 폴리펩타이드는 V147L, N154S, V155M, R284M, R284K, R284T, E315Q, R375A 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 돌연변이를 포함하는, mRNA 암 백신.

#### 청구항 66

제65항에 있어서, 상기 구성적으로 활성인 인간 STING 폴리펩타이드는 V155M 돌연변이를 포함하는, mRNA 암 백신.

#### 청구항 67

제65항에 있어서, 상기 구성적으로 활성인 인간 STING 폴리펩타이드는 돌연변이 R284M/V147L/N154S/V155M을 포함하는, mRNA 암 백신.

#### 청구항 68

제58항 내지 제67항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 mRNA는 상기 동일 또는 상이한 지질 나노입자에서 제형화되는, mRNA 암 백신.

#### 청구항 69

제68항에 있어서, 암 개인화된 암 항원을 암호화하는 각각의 mRNA는 상기 동일 또는 상이한 지질 나노입자에서 제형화되는, mRNA 암 백신.

#### 청구항 70

제69항에 있어서, 상기 개인화된 암 항원에 대해 면역 반응을 향상시키는 폴리펩타이드를 암호화하는 각각의 mRNA는 상기 동일 또는 상이한 지질 나노입자에서 제형화되는, mRNA 암 백신.

#### 청구항 71

제68항 내지 제70항 중 어느 한 항에 있어서, 개인화된 암 항원을 암호화하는 각각의 mRNA는 상기 동일한 지질 나노입자에서 제형화되고, 그리고 상기 개인화된 암 항원에 대해 면역 반응을 향상시키는 폴리펩타이드를 암호화하는 각각의 mRNA는 상이한 지질 나노입자에서 제형화되는, mRNA 암 백신.

#### 청구항 72

제68항 내지 제70항 중 어느 한 항에 있어서, 개인화된 암 항원을 암호화하는 각각의 mRNA는 상기 동일한 지질 나노입자에서 제형화되고, 그리고 상기 개인화된 암 항원에 대해 면역 반응을 향상시키는 폴리펩타이드를 암호화하는 각각의 mRNA는 개인화된 암 항원을 암호화하는 각각의 mRNA와 동일한 지질 나노입자에서 제형화되는, mRNA 암 백신.

#### 청구항 73

제68항 내지 제70항 중 어느 한 항에 있어서, 개인화된 암 항원을 암호화하는 각각의 mRNA는 상이한 지질 나노입자에서 제형화되고, 그리고 상기 개인화된 암 항원에 대해 면역 반응을 향상시키는 폴리펩타이드를 암호화하는 각각의 mRNA는 각각의 개인화된 암 항원을 암호화하는 각각의 mRNA와 동일한 지질 나노입자에서 제형화되는, mRNA 암 백신.

#### 청구항 74

제1항 내지 제73항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 펩타이드 에피토프는 T 세포 에피토프 및/또는 B 세포 에피토프인, mRNA 암 백신.

#### 청구항 75

제1항 내지 제73항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 펩타이드 에피토프는 T 세포 에피토프와 B 세포 에피토프의 조합을 포함하는, mRNA 암 백신.

#### 청구항 76

제1항 내지 제73항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 펩타이드 에피토프 중 적어도 1개는 T 세포 에피토프인, mRNA 암 백신.



#### 청구항 77

제1항 내지 제73항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 펩타이드 에피토프 중 적어도 1개는 B 세포 에피토프인, mRNA 암 백신.

#### 청구항 78

제1항 내지 제73항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 펩타이드 에피토프는 상기 대상체의 MHC에 대한 결합 강도에 대해 최적화되는, mRNA 암 백신.

#### 청구항 79

제78항에 있어서, 각각의 에피토프에 대한 TCR 면은 내인성 단백질에 대해 낮은 유사성을 갖는, mRNA 암 백신.

#### 청구항 80

제1항 내지 제73항 중 어느 한 항에 있어서, 회상 항원을 더 포함하는, mRNA 암 백신.

#### 청구항 81

제80항에 있어서, 상기 회상 항원은 감염성 질환 항원인, mRNA 암 백신.

#### 청구항 82

제1항 내지 제73항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 전통적인 암 항원을 암호화하는 오픈 리딩 프레임에 갖는 mRNA를 더 포함하는, mRNA 암 백신.

#### 청구항 83

제58항 내지 제82항 중 어느 한 항에 있어서, 다음의 조건 (i) 내지 (iv) 중 하나 이상이 충족되는, mRNA 암 백신:

(i) 상기 활성화 종양유전자 돌연변이는 KRAS 돌연변이임;

(ii) 상기 KRAS 돌연변이는 G12 돌연변이이되, 선택적으로 상기 G12 KRAS 돌연변이는 G12D, G12V, G12S, G12C, G12A 및 G12R KRAS 돌연변이로부터 선택됨;

(iii) 상기 KRAS 돌연변이는 G13 돌연변이이되, 선택적으로 상기 G13 KRAS 돌연변이는 G13D KRAS 돌연변이임; 및/또는

(iv) 상기 활성화 종양유전자 돌연변이는 H-RAS 또는 N-RAS 돌연변이임.

#### 청구항 84

제58항 내지 제83항 중 어느 한 항에 있어서, 다음의 조건 (A) 내지 (D) 중 하나 이상이 충족되는, mRNA 암 백신:

(A) 상기 mRNA는 둘 이상의 활성화 종양유전자 돌연변이 펩타이드의 연쇄동일서열을 암호화하는 오픈 리딩 프레임을 가짐;

(B) 상기 펩타이드 에피토프 중 적어도 둘은 단일 글리신에 의해 서로로부터 분리되되, 선택적으로 상기 펩타이드 에피토프 모두는 단일 글리신에 의해 서로로부터 분리됨;

(C) 상기 연쇄동일서열은 3 내지 10개의 활성화 종양유전자 돌연변이 펩타이드를 포함함; 그리고/또는

(D) 상기 펩타이드 에피토프 중 적어도 둘은 링커 없이 서로에 대해 직접적으로 연결됨.

#### 청구항 85

제58항 내지 제84항 중 어느 한 항에 있어서, 다음의 조건 (i) 내지 (v) 중 하나 이상이 충족되는, mRNA 암 백신:

(i) 상기 펩타이드 에피토프 중 적어도 하나는 전통적인 암 항원임;

(ii) 상기 펩타이드 에피토프 중 적어도 하나는 재발성 다형임;

(iii) 상기 재발성 다형은 p53에서 재발성 체세포 암 돌연변이를 포함함;

(iv) p53에서 상기 재발성 체세포 암 돌연변이는:

(A) 에피토프 AVSPCISFVW(서열번호 233)(HLA-B\*57:01, HLA-B\*58:01), HPLASCQCFF(서열번호 234)(HLA-B\*35:01, HLA-B\*53:01), FVWNFGIPL(서열번호 235)(HLA-A\*02:01, HLA-A\*02:06, HLA-B\*35:01)을 함유하는 펩타이드 서열 TAKSVTCTVSCPEGLASMRLQCLAVSPCISFVWNFGIPLHPLASCQCFFIVYPLNV(서열번호 232)를 갖는 보유된 인트론을 유도하는, 코돈 p.T125에 이웃하는 정규 5' 스플라이스 부위에서의 돌연변이;

(B) 에피토프 LQVLSLGTSY(서열번호 237)(HLA-B\*15:01), FQSNTQNAV(서열번호 238)(HLA-B\*15:01)를 함유하는 펩타이드 서열 EYFTLQVLSLGTSYQVESFQSNTQNAVFFLTPLPAIGAFAIRGQ(서열번호 236)를 갖는 보유된 인트론을 유도하는 코돈 p.331에 이웃하는 정규 5' 스플라이스 부위에서의 돌연변이;

(C) 에피토프 CTMFCQLAK(서열번호 240)(HLA-A\*11:01), KSVTCTMF(서열번호 241)(HLA-B\*58:01)를 함유하는 신규한 스페닝 펩타이드 서열 AKSVTCTMFCQLAK(서열번호 239)를 생성하는 모호한 대안의 엑손 3' 스플라이스 부위를 유도하는 코돈 p.126에 이웃하는 정규 3' 스플라이스 부위에서의 돌연변이; 및/또는

(D) 에피토프 VPYEPPEVW(서열번호 243)(HLA-B\*53:01, HLA-B\*51:01), LTVPPSTAW(서열번호 244)(HLA-B\*58:01, HLA-B\*57:01)를 함유하는 신규한 스페닝 펩타이드 서열 VPYEPPEVWLALTVPSTAWAA(서열번호 242)를 생성하는 모호한 대안의 인트론 5' 스플라이스 부위를 유도하는, 코돈 p.224에 이웃하는 정규 5' 스플라이스 부위에서의 돌연변이

로 이루어진 군으로부터 선택되며,

상기 전사체 코돈 위치는 상기 양상블 v83 인간 게놈 주석으로부터의 정규 전장 p53 전사체 ENST00000269305(서열번호 245)를 지칭함; 및/또는

(v) 상기 mRNA 암 백신은 안정제를 포함하지 않음.

#### 청구항 86

제1항 내지 제85항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 지질 나노입자는 약 20 내지 60% 이온화 가능한 아미노 지질: 5 내지 25% 중성 지질: 25 내지 55% 스테롤; 및 0.5 내지 15% PEG-변형 지질의 몰 비를 포함하되, 선택적으로 상기 이온화 가능한 아미노 지질은 양이온성 지질인, mRNA 암 백신.

#### 청구항 87

제86항에 있어서, 상기 지질 나노입자는 약 50% 화합물 25: 약 10% DSPC: 약 38.5% 콜레스테롤; 및 약 1.5% PEG-DMG의 몰비를 포함하는, mRNA 암 백신.

#### 청구항 88

제86항에 있어서, 상기 이온화 가능한 아미노 지질은, 예를 들어, 2,2-다이리놀레일-4-다이메틸아미노에틸-[1,3]-다이옥솔란(DLin-KC2-DMA), 다이리놀레일-메틸-4-다이메틸아미노뷰티레이트(DLin-MC3-DMA), 및 다이((Z)-논-2-엔-1-일) 9-((4-(다이메틸아미노)부탄오일)옥시)헵타데칸다이오에이트(L319)로 이루어진 군으로부터 선택되는, mRNA 암 백신.

#### 청구항 89

제1항 내지 제85항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 지질 나노입자는 화학식 (I)의 화합물을 포함하는, mRNA 암 백신.

#### 청구항 90

제89항에 있어서, 상기 화학식 (I)의 화합물은 화합물 25인, mRNA 암 백신.

#### 청구항 91

제1항 내지 제85항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 지질 나노 입자는 다분산도 값이 0.4 미만인, mRNA 암 백신.

#### 청구항 92

제1항 내지 제85항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 지질 나노입자는 중성 pH 값에서 순 중성 전하를 갖는, mRNA 암 백신.

#### 청구항 93

제1항 내지 제92항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 에피토프에 대한 TCR 면은 내인성 단백질에 대해 낮은 유사성을 갖는, mRNA 암 백신.

#### 청구항 94

제1항 내지 제93항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 mRNA는 면역관문 조절자를 암호화하는 오픈 리딩 프레임을 더 포함하는, mRNA 암 백신.

#### 청구항 95

제1항 내지 제93항 중 어느 한 항에 있어서, 추가적인 암 치료제를 더 포함하되; 선택적으로 상기 추가적인 암 치료제는 면역관문 조절자인, mRNA 암 백신.

#### 청구항 96

제93항 또는 제94항에 있어서, 상기 면역관문 조절자는 저해관문 폴리펩타이드인, mRNA 암 백신.

#### 청구항 97

제96항에 있어서, 상기 저해관문 폴리펩타이드는 PD1, PD-L1, CTLA4, TIM-3, VISTA, A2AR, B7-H3, B7-H4, BTLA, IDO, KIR, LAG3, 또는 이들의 조합을 저해하는, mRNA 암 백신.

#### 청구항 98

제97항에 있어서, 상기 관문 저해제 폴리펩타이드는 항체인, mRNA 암 백신.

#### 청구항 99

제98항에 있어서, 상기 저해관문 폴리펩타이드는 항-CTLA4 항체 또는 CTLA4에 특이적으로 결합하는 이의 항원-결합 단편, 항-PD1 항체 또는 PD1에 특이적으로 결합하는 이의 항원-결합 단편, 항-PD-L1 항체 또는 PD-L1에 특이적으로 결합하는 이의 항원-결합 단편, 및 이들의 조합으로부터 선택된 항체인, mRNA 암 백신.

#### 청구항 100

제99항에 있어서, 상기 관문 저해제 폴리펩타이드는 아테졸리주맙(atenzolizumab), 아벨루맙(avelumab) 또는 두르발루맙(durvalumab)으로부터 선택되는 항-PD-L1 항체인, mRNA 암 백신.

#### 청구항 101

제99항에 있어서, 상기 관문 저해제 폴리펩타이드는 트레멜리무맙(tremelimumab) 또는 이필리무맙(ipilimumab)으로부터 선택되는 항-CTLA-4 항체인, mRNA 암 백신.

#### 청구항 102

제99항에 있어서, 상기 관문 저해제 폴리펩타이드는 니볼루맙(nivolumab) 또는 펌브롤리주맙(pembrolizumab)으로부터 선택되는 항-PD1 항체인, mRNA 암 백신.

#### 청구항 103

제25항 내지 제102항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화학적 변형은 슈도유리딘, N1-메틸슈도유리딘, 2-티오유리딘, 4'-티오유리딘, 5-메틸사이토신, 2-티오-1-메틸-1-테아자-슈도유리딘, 2-티오-1-메틸-슈도유리딘, 2-티오-5-아자-유리딘, 2-티오-다이하이드로슈도유리딘, 2-티오-다이하이드로유리딘, 2-티오-슈도유리딘, 4-메톡시-2-티오-슈도유리딘, 4-메톡시-슈도유리딘, 4-티오-1-메틸-슈도유리딘, 4-티오-슈도유리딘, 5-아자-유리딘, 다이하이드로슈도유리딘, 5-메틸유리딘, 5-메틸유리딘, 5-메톡시유리딘 및 2'-O-메틸 유리딘으로 이루어진 군으로부터

터 선택되는, mRNA 암 백신.

#### 청구항 104

대상체의 백신접종 방법으로서,

암을 갖는 대상체에게 제1항 내지 제103항 중 어느 한 항의 상기 mRNA 암 백신을 투여하는 단계를 포함하는, 백신접종 방법.

#### 청구항 105

제104항에 있어서, 상기 mRNA 백신은 상기 대상체에게 10 $\mu$ g 내지 400 $\mu$ g의 상기 mRNA 백신을 전달하기에 충분한 투약량 수준으로 투여되는, 백신접종 방법.

#### 청구항 106

제105항에 있어서, 상기 mRNA 백신은 상기 대상체에게 0.033mg, 0.1mg, 0.2mg 또는 0.4mg을 전달하기에 충분한 투약량 수준으로 투여되는, 백신접종 방법.

#### 청구항 107

제104항 또는 제105항에 있어서, 상기 mRNA 백신은 상기 대상체에게 2회, 3회, 4회 이상 투여되는, 백신접종 방법.

#### 청구항 108

제107항에 있어서, 상기 mRNA 백신은 3주마다 1일 1회로 투여되는, 백신접종 방법.

#### 청구항 109

제104항 내지 제108항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 mRNA 백신은 진피내, 근육내 및/또는 피하 투여에 의해 투여되는, 백신접종 방법.

#### 청구항 110

제109항에 있어서, 상기 mRNA 백신은 근육내 투여에 의해 투여되는, 백신접종 방법.

#### 청구항 111

제104항 내지 제110항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 추가적인 암 치료제를 투여하는 단계를 더 포함하되; 선택적으로 상기 추가적인 암 치료제는 상기 대상체에 대한 면역관문 조절자인, 백신접종 방법.

#### 청구항 112

제111항에 있어서, 상기 면역관문 조절자는 저해관문 폴리펩타이드인, 백신접종 방법.

#### 청구항 113

제112항에 있어서, 상기 저해관문 폴리펩타이드는 PD1, PD-L1, CTLA4, TIM-3, VISTA, A2AR, B7-H3, B7-H4, BTLA, IDO, KIR, LAG3, 또는 이들의 조합을 저해하는, 백신접종 방법.

#### 청구항 114

제112항에 있어서, 상기 관문 저해제 폴리펩타이드는 항체인, 백신접종 방법.

#### 청구항 115

제114항에 있어서, 상기 저해관문 폴리펩타이드는 항-CTLA4 항체 또는 CTLA4에 특이적으로 결합하는 이의 항원-결합 단편, 항-PD1 항체 또는 PD1에 특이적으로 결합하는 이의 항원-결합 단편, 항-PD-L1 항체 또는 PD-L1에 특이적으로 결합하는 이의 항원-결합 단편, 및 이들의 조합으로부터 선택되는 항체인, 백신접종 방법.

#### 청구항 116

제115항에 있어서, 상기 관문 저해제 폴리펩타이드는 아테졸리주맙, 아벨루맙 또는 두르발루맙으로부터 선택되는 항-PD-L1 항체인, 백신접종 방법.

#### 청구항 117

제115항에 있어서, 상기 관문 저해제 폴리펩타이드는 트레멜리무맙 또는 이필리무맙으로부터 선택되는 항-CTLA-4 항체인, 백신접종 방법.

#### 청구항 118

제115항에 있어서, 상기 관문 저해제 폴리펩타이드는 니볼루맙 또는 펌브롤리주맙으로부터 선택되는 항-PD1 항체인, 백신접종 방법.

#### 청구항 119

제111항 내지 제118항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역관문 조절자는 상기 대상체에게 100 내지 300mg을 전달하기에 충분한 투약량 수준으로 투여되는, 백신접종 방법.

#### 청구항 120

제119항에 있어서, 상기 면역관문 조절자는 상기 대상체에게 200mg을 전달하기에 충분한 투약량 수준으로 투여되는, 백신접종 방법.

#### 청구항 121

제111항 내지 제120항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역관문 조절자는 정맥내 주입에 의해 투여되는, 백신접종 방법.

#### 청구항 122

제111항 내지 제121항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역관문 조절자는 상기 대상체에게 2회, 3회, 4회 이상으로 투여되는, 백신접종 방법.

#### 청구항 123

제111항 내지 제122항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역관문 조절자는 대상체에게 mRNA 백신 투여와 동일한 날에 투여되는, 백신접종 방법.

#### 청구항 124

제104항 내지 제123항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암은 하기로부터 선택된, 백신접종 방법:

(i) 비소세포 폐암(NSCLC), 소세포 폐암, 흑색종, 방광 요로 상피 암종, HPV-음성 두경부 편평세포 암종(HNSCC) 및 고빈도 미세부수체인 고형 악성 종양 (MSI H)/미스매치 수선(MMR) 결핍으로 이루어진 군; 및/또는

(ii) 췌장, 복막, 대장, 소장, 담관, 폐, 자궁내막, 난소, 생식관, 위장관, 자궁경부, 위, 요로, 결장, 직장, 및 조혈 및 림프구 조직의 암.

#### 청구항 125

제124항에 있어서, 상기 NSCLC는 EGFR 민감성 돌연변이 및/또는 ALK 전좌를 결여하는, 백신접종 방법.

#### 청구항 126

제125항에 있어서, 상기 고빈도 미세부수체(microsatellite high: MSI H)/미스매치 수선(mismatch repair: MMR) 결핍인 고형 악성 종양은 결장직장암, 위 선암종, 식도 선암종 및 자궁내막암으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 백신접종 방법.

#### 청구항 127

1000 내지 3000개의 뉴클레오타이드를 포함하는 연쇄동일서열 암 항원을 암호화하는 mRNA의 생산 방법으로서,

(a) 제1항 내지 제103항 중 어느 한 항의 암 항원을 암호화하는 오픈 리딩 프레임에 포함하는 제1 폴리뉴클레오타이드 및 5'-UTR을 포함하는 제2 폴리뉴클레오타이드를 고체 지지체에 접합된 폴리뉴클레오타이드에 결합시키는 단계;

(b) 적합한 조건 하에서 상기 제1 폴리뉴클레오타이드의 상기 5'-말단에 상기 제2 폴리뉴클레오타이드의 3'-말단을 결합시킴으로써 제1 결합 산물을 생산하는 단계로서, 상기 적합한 조건은 DNA 리가제를 포함하는, 상기 제1 결합 산물을 생산하는 단계;

(c) 적합한 조건 하에서 상기 제1 결합 산물의 상기 3'-말단에 3'-UTR을 포함하는 제3 폴리뉴클레오타이드의 5'말단을 결합시킴으로써 제2 결합 산물을 생산하는 단계로서, 상기 적합한 조건은 DNA 리가제를 포함하는, 상기 제2 결합 산물을 생산하는 단계; 및

(d) 상기 고체 지지체로부터 상기 제2 결합 산물을 방출시키는 단계

를 포함함으로써,

1000 내지 3000개의 뉴클레오타이드를 포함하는 상기 연쇄동일서열 암 항원을 암호화하는 mRNA를 생산하는, mRNA의 생산 방법.

#### 청구항 128

개인화된 mRNA 암 백신으로 대상체를 치료하는 방법으로서, 환자 특이적 악성변이체(mutanome)를 생산하는 네오에피토프의 세트를 동정하는 단계, MHC 결합 강도, MHC 결합 다양성, 예측된 정도의 면역원성, 낮은 자기 반응성 및/또는 T 세포 반응성에 기반하여 상기 악성변이체로부터 백신에 대한 네오에피토프 세트를 선택하는 단계, 상기 네오에피토프의 세트를 암호화하기 위해 mRNA 백신을 제조하는 단계, 및 상기 대상체로부터의 샘플을 분리시키고 2개월 내에 상기 대상체에 mRNA 백신을 투여하는 단계를 포함하는, 치료하는 방법.

#### 청구항 129

네오에피토프의 세트를 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드를 갖는 개인화된 mRNA 암 백신에서 사용하기 위한 네오에피토프의 세트를 동정하는 방법으로서,

(a) 환자 전사체 및 환자 엑솜을 분석함으로써 환자 특이적 악성변이체를 동정하는 단계,

(b) 환자 RNA-seq에서 유전자 또는 전사체-수준 발현의 평가; 변이체 호출 신뢰도 스코어; RNA-seq 대립유전자-특이적 발현; 보존적 대 비보존적 아미노산 치환; 점돌연변이의 위치(증가된 TCR 맞물림에 대한 센터링 스코어); 점돌연변이의 위치(차별적 HLA 결합에 대한 앵커링 스코어); 자성(Selfness): 환자 WES 데이터와 100% 미만의 코어 에피토프 상동성; 8량체 내지 11량체에 대한 HLA-A 및 -B IC50; 15량체 내지 20량체에 대한 HLA-DRB1 IC50; 난잡 스코어(promiscuity Score); 8량체-11량체에 대한 HLA-C IC50; 15량체 내지 20량체에 대한 HLA-DRB3-5 IC50; 15량체 내지 20량체에 대한 HLA-DQB1/A1 IC50; 15량체 내지 20량체에 대한 HLA-DPB1/A1 IC50; 클래스 I 대 클래스 II 비율; 다뤄지는 환자 HLA-A, -B 및 DRB1 알로타이프의 다양성; 점 돌연변이 대 복잡한 에피토프의 비율(예를 들어, 프레임시프트); 유사-에피토프 HLA 결합 스코어; RNAseq 관독의 존재 및/또는 존재비중 적어도 3가지에 기반한 네오에피토프에 대한 가중치 값을 이용하여 악성변이체로부터 15 내지 500개의 네오에피토프의 소집단을 선택하는 단계, 및

(c) 가장 높은 가중치 값에 기반하여 소집단으로부터 개인화된 mRNA 암 백신에서 사용하기 위한 네오에피토프의 세트를 선택하는 단계로서, 상기 네오에피토프의 세트는 15 내지 40개의 네오에피토프를 포함하는, 상기 네오에피토프의 세트를 선택하는 단계

를 포함하는, 네오에피토프의 세트를 동정하는 방법.

#### 청구항 130

네오에피토프의 세트를 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드를 갖는 개인화된 mRNA 암 백신에서 사용하기 위한 네오에피토프의 세트를 동정하는 방법으로서,

(a) RNA-seq 관독의 세트를 생산하기 위해 환자 종양으로부터 RNA-seq 샘플을 생성하는 단계,

(b) 모든 RNA-seq 관독으로부터 뉴클레오타이드 서열의 전반적인 계수를 컴파일링(compiling)하는 단계,

- (c) 상기 종양 샘플과 상기 동일한 조직 유형의 정상 조직의 대응하는 데이터 베이스 사이의 서열 정보를 비교하는 단계, 및
- (d) 가장 높은 가중치 값에 기반하여 서브세트로부터 개인화된 mRNA 암 백신에서 사용하기 위한 네오에피토프의 세트를 선택하는 단계로서, 상기 네오에피토프의 세트는 15 내지 40개의 네오에피토프를 포함하는, 상기 네오에피토프의 세트를 선택하는 단계를 포함하는, 네오에피토프의 세트를 동정하는 방법.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001]

관련 출원

[0002]

본 출원은 미국 특허법(35 U.S.C. 119(e)) 하에 2017년 2월 1일자로 출원된 미국 가출원 특허 제62/453,444호(발명의 명칭: "RNA CANCER VACCINES")의, 2017년 2월 1일자로 출원된 미국 가출원 특허 제62/453,465호(발명의 명칭: "IMMUNOMODULATORY THERAPEUTIC MRNA COMPOSITIONS ENCODING ACTIVATING ONCOGENE MUTATION PEPTIDES")의, 그리고 2017년 9월 13일자로 출원된 미국 가출원 특허 제62/558,238호(발명의 명칭: "CONCATAMERIC RNA CANCER VACCINES")의 출원일의 이익을 주장하며, 이들 각각의 전문은 본 명세서에 참고로 편입된다.

### 배경 기술

[0003]

암 진화에서의 최근의 이론은 스트레스-유도 게놈 불안정, 집단 다양성 또는 이질성, 및 게놈-매개 대진화를 포함하는 이들 단계에 중점을 두었다. 상기 이론은 대부분의 공지된 분자 메커니즘이 아직 암에 기여할 수 있는 이유를 설명하며, 대다수의 임상 사례에 대한 단일의 지배적인 메커니즘은 없다. 그러나, 통상적인 메커니즘은 암 백신이 암 치료에서 보편적인 용액을 제공할 수 있다는 것을 시사한다.

[0004]

암 백신은 건강한 사람에서 암이 발생하는 것을 예방하도록 의도되는 방지적 또는 예방적 백신; 및 암에 대한 신체의 자연적 방어를 강화시킴으로써 존재하는 암을 치료하도록 의도되는 치료적 백신을 포함한다. 암 예방 백신은, 예를 들어, 감염성 질환이 암을 야기하는 것을 방지하기 위해 암을 야기하거나 또는 암의 진행에 기여하는 표적 감염제일 수 있다. 가다실(Gardasil)(등록상표) 및 서바릭스(Cervarix)(등록상표)는 상업적으로 입수 가능한 예방적 백신의 2가지 예이다. 각각의 백신은 HPV 감염에 대해 보호한다. 다른 예방적 암 백신은 장래에 암이 발생할 개체의 가능성을 증가시키는 것으로 예측되는 숙주 단백질 또는 단백을 표적화할 수 있다.

[0005]

대부분의 상업적 또는 진행중인 백신(예를 들어, 암 백신)은 전체 미생물, 단백질 항원, 펩타이드, 다당류 또는 데옥시리보핵산(DNA) 백신 및 그들의 조합에 기반한다. DNA 백신접종은 항원에 대한 체액성 및 세포성 면역 반응을 자극하기 위해 사용되는 하나의 기법이다. 살아있는 숙주내로의 유전자 조작된 DNA(예를 들어, 네이키드 플라스미드 DNA)의 직접적인 주사는 소수의 그의 세포가 항원을 직접적으로 생성하도록 하여, 보호 면역 반응을 야기한다. 그러나, 이 기법에 의해, 종양유전자의 활성화 또는 종양 억제 유전자의 저해를 야기할 수 있는 삽입 돌연변이유발 가능성을 비롯한, 백신의 게놈 내로의 DNA 통합의 잠재적 문제가 생긴다.

### 발명의 내용

[0006]

본 명세서에서 관심 대상의 거의 모든 암 단백질 또는 이의 단백을 생산하는 신체의 세포 기작을 안전하게 지시할 수 있는 RNA(예를 들어, 전령 RNA(mRNA))의 리보핵산(RNA) 암 백신이 제공된다. 일부 실시형태에서, RNA는 변형된 RNA이다. 본 개시내용의 RNA 백신은, 예를 들어, 삽입 돌연변이유발 가능성의 위험 없이, 세포성 면역과 체액성 면역을 둘 다 포함하는, 암에 대해 균형화된 면역 반응을 유도하는 데 사용될 수 있다.

[0007]

RNA 백신은 암의 유병률 또는 충족되지 않은 의학적 필요 정도 또는 수준에 따라서 다양한 상황에서 이용될 수 있다. RNA 백신은 다양한 병기 또는 전이 정도의 암을 치료하고/하거나 예방하는 데 이용될 수 있다. RNA 백신은 그들이 훨씬 더 큰 항체 역가를 생성하고 암 백신을 포함하는 대안의 항암 요법보다 더 조기의 반응을 생산한다는 점에서 우수한 특성을 가진다. 이론에 의해 구속되는 일 없이, mRNA 폴리뉴클레오타이드로서 RNA 백신은 RNA 백신이 천연 세포 기작을 끌어들이는 데 따라 번역 시 적절한 단백질 입체배치를 생성하도록 더 양호하게 설계

되는 것으로 여겨진다. 생체외에서 제조되고 원치않는 세포 반응을 촉발할 수 있는 전통적인 요법 및 백신과 달리, RNA 백신은 더 천연의 방식으로 세포 시스템에 제공된다.

- [0008] RNA 백신은 적어도 하나의 암 항원의 폴리펩타이드 또는 이의 면역원성 단편(예를 들어, 암에 대한 면역 반응을 유도할 수 있는 면역원성 단편)을 암호화하는 오픈 리딩 프레임 을 갖는 리보핵산(RNA) 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 다른 실시형태는 암에 대해 면역 반응을 유발할 수 있는 2 이상의 항원 또는 에피토프를 암호화하는 오픈 리딩 프레임을 갖는 적어도 하나의 리보핵산(RNA) 폴리뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0009] 본 발명은 일부 양상에서 지질 나노입자로 제형화된 암 항원 펩타이드 에피토프를 암호화하는 오픈 리딩 프레임을 각각 갖는 하나 이상의 mRNA, 및 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제의 mRNA 암 백신이되, mRNA 백신은 5 내지 100개의 펩타이드 에피토프를 암호화하고, 펩타이드 에피토프 중 적어도 둘은 개인화된 암 항원 (personalized cancer antigen)이다.
- [0010] 본 개시내용은, 일부 양상에서, 개인화된 암 항원인 1 내지 500개의 펩타이드 에피토프를 암호화하는 하나 이상의 오픈 리딩 프레임 및 보편적 II형 T-세포 에피토프를 각각 갖는 하나 이상의 mRNA를 포함하는 지질 나노입자를 포함하는 mRNA 암 백신을 제공한다.
- [0011] 본 개시내용은, 일부 양상에서, 다음 중 하나 이상을 포함하는 지질 나노입자를 포함하는 mRNA 암 백신을 제공한다: (a) 개인화된 암 항원인 1 내지 500개의 펩타이드 에피토프를 암호화하는 하나 이상의 오픈 리딩 프레임 및 보편적 II형 T-세포 에피토프를 각각 갖는 하나 이상의 mRNA; (b) 활성화 종양유전자 돌연변이 펩타이드를 암호화하는 오픈 리딩 프레임을 각각 갖는 하나 이상의 mRNA로서, 선택적으로 mRNA가 보편적 II형 T-세포 에피토프를 추가로 포함하는, 상기 하나 이상의 mRNA; (c) 암 항원 펩타이드 에피토프를 암호화하는 오픈 리딩 프레임을 각각 갖는 하나 이상의 mRNA로서, mRNA 백신이 5 내지 100개의 펩타이드 에피토프를 암호화하고 펩타이드 에피토프 중 적어도 둘은 개인화된 암 항원이되, 선택적으로 mRNA는 보편적 II형 T-세포 에피토프를 추가로 포함하는, 상기 하나 이상의 mRNA; 및/또는 (d) 암 항원 펩타이드 에피토프를 암호화하는 오픈 리딩 프레임을 각각 갖는 하나 이상의 mRNA로서, mRNA 백신이 5 내지 100개의 펩타이드 에피토프를 암호화하고, 펩타이드 에피토프 중 적어도 셋은 복잡한 변이체이고, 펩타이드 에피토프 중 적어도 둘은 점 돌연변이이되, 선택적으로 mRNA는 보편적 II형 T-세포 에피토프를 추가로 포함하는, 상기 하나 이상의 mRNA. 일부 실시형태에서, mRNA 암 백신은 1 내지 20개의 보편적 II형 T-세포 에피토프를 암호화한다. 다른 실시형태에서, 보편적 II형 T-세포 에피토프는 ILMQYIKANSKFIGI(파상풍 독소; 서열번호 226), FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE(파상풍 독소; 서열번호 227), QYIKANSKFIGITE(파상풍 독소; 서열번호 228) QSIALSSLMVAQAIP(디프테리아 독소; 서열번호 229) 및 AKFVAAWTLKAAA(pan-DR 에피토프; 서열번호 230)로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0012] 일부 실시형태에서, 보편적 II형 T-세포 에피토프는 mRNA 전체적으로 동일한 보편적 II형 T-세포 에피토프이다. 다른 실시형태에서, 보편적 II형 T-세포 에피토프는 mRNA에서 1 내지 20회 반복된다. 일 실시형태에서, 보편적 II형 T-세포 에피토프는 mRNA 전체적으로 서로 상이하다. 일부 실시형태에서, 보편적 II형 T-세포 에피토프는 모든 암 항원 펩타이드 에피토프 사이에 위치된다. 다른 실시형태에서, 보편적 II형 T-세포 에피토프는 모든 다른 암 항원 펩타이드 에피토프 사이에 위치된다. 일 실시형태에서, 보편적 II형 T-세포 에피토프는 모든 제3의 암 항원 펩타이드 에피토프 사이에 위치된다.
- [0013] 일부 실시형태에서, 다음의 조건 중 하나 이상의 충족된다: (i) 활성화 종양유전자 돌연변이는 KRAS 돌연변이이고; (ii) KRAS 돌연변이는 G12 돌연변이이되, 선택적으로 G12 KRAS 돌연변이는 G12D, G12V, G12S, G12C, G12A 및 G12R KRAS 돌연변이로부터 선택되며; (iii) KRAS 돌연변이는 G13 돌연변이이되, 선택적으로 G13 KRAS 돌연변이는 G13D KRAS 돌연변이이고; 그리고/또는 (iv) 활성화 종양유전자 돌연변이는 H-RAS 또는 N-RAS 돌연변이이다.
- [0014] 일부 실시형태에서, 다음의 조건 중 하나 이상의 충족된다: (A) mRNA는 둘 이상의 활성화 종양유전자 돌연변이 펩타이드의 연쇄동일서열(concatemer)을 암호화하는 오픈 리딩 프레임을 갖고; (B) 펩타이드 에피토프 중 적어도 둘은 단일 글리신에 의해 서로로부터 분리되되, 선택적으로 모든 펩타이드 에피토프는 단일 글리신에 의해 서로로부터 분리되며; (C) 연쇄동일서열은 3 내지 10개의 활성화 종양유전자 돌연변이 펩타이드를 포함하고; 그리고/또는 (D) 펩타이드 에피토프 중 적어도 둘은 링커 없이 서로에 대해 직접적으로 연결된다.
- [0015] 소정의 실시형태에서, 다음의 조건 중 하나 이상의 충족된다: (i) 펩타이드 에피토프 중 적어도 하나는 전통적인 암 항원이며; (ii) 펩타이드 에피토프 중 적어도 하나는 재발성 다형이고; (iii) 재발성 다형은 p53에서 재발성 체세포 암 돌연변이를 포함하며; (iv) p53에서 재발성 체세포 암 돌연변이는 (A) 에피토프 AVSPCISFVW(서



열번호 233)(HLA-B\*57:01, HLA-B\*58:01), HPLASCQCFF(서열번호 234)(HLA-B\*35:01, HLA-B\*53:01), FVWNFGIPL(서열번호 235)(HLA-A\*02:01, HLA-A\*02:06, HLA-B\*35:01)를 함유하는 펩타이드 서열 TAKSVTCTVSCPEGLASMRQLQCLAVSPCISFVWNFGIPLHPLASCQCFFIVYPLNV(서열번호 232)를 갖는 보유된 인트론을 유도하는, 코돈 p.T125에 이웃하는 정규 5' 스플라이스 부위에서의 돌연변이; (B) 에피토프 LQVLSLGTYSY(서열번호 237)(HLA-B\*15:01), FQSNTQNAVF(서열번호 238)(HLA-B\*15:01)를 함유하는 펩타이드 서열 EYFTLQVLSLGTYSYQVESFQSNTQNAVFFLTVLPAIGAFAIRGQ(서열번호 236)를 갖는 관련된 인트론을 유도하는, 코돈 p.331에 이웃하는 정규 5' 스플라이스 부위에서의 돌연변이; (C) 에피토프 CTMFCQLAK(서열번호 240)(HLA-A\*11:01), KSVTCTMF(서열번호 241)(HLA-B\*58:01)를 함유하는 신규한 스페닝 펩타이드 서열 AKSVTCTMFCQLAK(서열번호 239)를 생성하는 대안의 엑손 3' 스플라이스 부위를 유도하는 코돈 p.126에 이웃하는 정규 3' 스플라이스 부위에서의 돌연변이; 그리고/또는 (D) 에피토프 VPYEPPEVW(서열번호 243)(HLA-B\*53:01, HLA-B\*51:01), LTVPPSTAW(서열번호 244)(HLA-B\*58:01, HLA-B\*57:01)를 함유하는 신규한 스페닝 펩타이드 서열 VPYEPPEVWLALTVPSTAWAA(서열번호 242)를 생성하는 모호한 대안의 인트론 5' 스플라이스 부위를 유도하는, 코돈 p.224에 이웃하는 정규 5' 스플라이스 부위에서의 돌연변이로 이루어진 군으로부터 선택되되, 상기 전사체 코돈 위치는 앙상블(Ensembl) v83 인간 게놈 주석(annotation)으로부터의 정규 전장 p53 전사체 ENST00000269305(서열번호 245)를 지칭하고; 그리고/또는 (v) mRNA 암 백신은 안정제를 포함하지 않는다.

[0016] 일부 실시형태에서, 하나 이상의 mRNA는 면역 강화제를 암호화하는 오픈 리딩 프레임에 추가로 포함한다. 다른 실시형태에서, 면역 강화제는 지질 나노입자로 제형화된다. 일 실시형태에서, 면역 강화제는 별개의 지질 나노입자로 제형화된다. 일부 실시형태에서, 면역 강화제는 구성적으로 활성인 인간 STING 폴리펩타이드이다. 일 실시형태에서, 구성적으로 활성인 인간 STING 폴리펩타이드는 서열번호 1에 나타난 아미노산 서열을 포함한다. 다른 실시형태에서, 구성적으로 활성인 인간 STING 폴리펩타이드를 암호화하는 mRNA는 서열번호 170에 나타난 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 구성적으로 활성인 인간 STING 폴리펩타이드를 암호화하는 mRNA는 miR-122 마이크로RNA 결합 부위를 갖는 3'UTR을 포함한다. 일 실시형태에서, miR-122 마이크로RNA 결합 부위는 서열번호 175에 나타난 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0017] 일부 실시형태에서, 하나 이상의 mRNA는 각각 서열번호 176에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 5'UTR을 포함한다. 일 실시형태에서, 하나 이상의 mRNA는 각각 폴리 A 꼬리를 포함한다. 일 실시형태에서, 폴리 A 꼬리는 약 100개의 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 mRNA는 각각 5' 캡 1 구조를 포함한다.

[0018] 일부 실시형태에서, 하나 이상의 mRNA는 적어도 하나의 화학적 변형을 포함한다. 일 실시형태에서, 화학적 변형은 N1-메틸슈도유리딘이다. 다른 실시형태에서, 하나 이상의 mRNA는 N1-메틸슈도유리딘에 의해 완전히 변형된다.

[0019] 일부 실시형태에서, 하나 이상의 mRNA는 45 내지 55개의 개인화된 암 항원을 암호화한다. 일 실시형태에서, 하나 이상의 mRNA는 52개의 개인화된 암 항원을 암호화한다. 일부 실시형태에서, 개인화된 암 항원의 각각은 별개의 오픈 리딩 프레임에 의해 암호화된다. 다른 실시형태에서, 펩타이드 에피토프는 2 내지 100개의 펩타이드 에피토프를 포함하는 연쇄동일서열 암 항원의 형태이되, 선택적으로 연쇄동일서열 암 항원은 5 내지 100개의 펩타이드 에피토프를 포함한다.

[0020] 일부 실시형태에서, 연쇄동일서열 암 항원은 하기 중 하나 이상을 포함한다: a) 2 내지 100개의 펩타이드 에피토프, 또는 5 내지 100개의 펩타이드 에피토프는 절단 민감 부위 사이에 배치됨; b) 각각의 펩타이드 에피토프를 암호화하는 mRNA는 링커 없이 서로 직접적으로 연결됨; c) 각각의 펩타이드 에피토프를 암호화하는 mRNA는 단일 뉴클레오타이드 링커로 서로 연결됨; d) 각각의 펩타이드 에피토프는 25 내지 35개의 아미노산을 포함하고, 중심에 위치된 SNP 돌연변이를 포함함; e) 펩타이드 에피토프의 적어도 30%는 대상체로부터의 클래스 I MHC 분자에 대해 가장 높은 친화도를 가짐; f) 펩타이드 에피토프의 적어도 30%는 대상체로부터의 클래스 II MHC 분자에 대해 가장 높은 친화도를 가짐; g) 펩타이드 에피토프의 적어도 50%는 HLA-A, HLA-B 및/또는 DRB1에 대해 IC > 500nM의 예측된 결합 친화도를 가짐; h) mRNA는 45 내지 55개의 펩타이드 에피토프를 암호화함; i) mRNA는 52개의 펩타이드 에피토프를 암호화함; j) 펩타이드 에피토프의 50%는 클래스 I MHC에 대한 결합 친화도를 가지고, 펩타이드 에피토프의 50%는 클래스 II MHC에 대한 결합 친화도를 가짐; k) 유사-에피토프(유사-에피토프)를 최소화하기 위해 펩타이드 에피토프가 정돈되도록 펩타이드 에피토프를 암호화하는 mRNA가 배열됨, l) 펩타이드 에피토프의 적어도 30%는 길이가 15개의 아미노산의 클래스 I MHC 결합 펩타이드임; 및/또는 m) 펩타이드 에피토프의 적어도 30%는 길이가 21개의 아미노산의 클래스 II MHC 결합 펩타이드임.

- [0021] 일부 양상에서, 본 개시내용은 지질 나노입자로 제형화된 개인화된 암 항원인 45 내지 55개의 펩타이드 에피토프를 암호화하는 하나 이상의 오픈 리딩 프레임들 각각 갖는 하나 이상의 mRNA를 포함하는 mRNA 암 백신을 제공한다.
- [0022] 일부 양상에서, 본 개시내용은 지질 나노입자로 제형화된 개인화된 암 항원인 45 내지 55개의 펩타이드 에피토프를 암호화하는 하나 이상의 오픈 리딩 프레임들 각각 갖는 하나 이상의 mRNA를 포함하는 mRNA 암 백신을 제공한다; 선택적으로 펩타이드 에피토프 중 적어도 하나는 활성화 종양유전자 돌연변이 펩타이드 또는 전통적인 암 항원이고, 그리고 선택적으로 펩타이드 에피토프 중 적어도 셋은 복잡한 변이체이고, 펩타이드 에피토프 중 적어도 둘은 점 돌연변이이다.
- [0023] 일부 실시형태에서, 하나 이상의 mRNA는 48 내지 54개의 개인화된 암 항원을 암호화한다. 일 실시형태에서, 하나 이상의 mRNA는 52개의 개인화된 암 항원을 암호화한다. 일부 실시형태에서, 개인화된 암 항원의 각각은 별개의 오픈 리딩 프레임에 의해 암호화된다.
- [0024] 다른 실시형태에서, 펩타이드 에피토프는 2 내지 100개의 펩타이드 에피토프를 포함하는 연쇄동일서열 암 항원의 형태이되, 선택적으로 연쇄동일서열 암 항원은 5 내지 100개의 펩타이드 에피토프를 포함한다. 일부 실시형태에서, 연쇄동일서열 암 항원은 하기 중 하나 이상을 포함한다: a) 2 내지 100개의 펩타이드 에피토프, 또는 5 내지 100개의 펩타이드 에피토프는 절단 민감 부위에 의해 배치됨; b) 각각의 펩타이드 에피토프를 암호화하는 mRNA는 링커 없이 서로 직접적으로 연결됨; c) 각각의 펩타이드 에피토프를 암호화하는 mRNA는 단일 뉴클레오타이드 링커로 서로 연결됨; d) 각각의 펩타이드 에피토프는 25 내지 35개의 아미노산을 포함하고, 중심에 위치한 SNP 돌연변이를 포함함; e) 펩타이드 에피토프의 적어도 30%는 대상체로부터의 클래스 I MHC 분자에 대해 가장 높은 친화도를 가짐; f) 펩타이드 에피토프의 적어도 30%는 대상체로부터의 클래스 II MHC 분자에 대해 가장 높은 친화도를 가짐; g) 펩타이드 에피토프의 적어도 50%는 HLA-A, HLA-B 및/또는 DRB1에 대해 IC > 500nM의 예측된 결합 친화도를 가짐; h) mRNA는 45 내지 55개의 펩타이드 에피토프를 암호화함; i) mRNA는 52개의 펩타이드 에피토프를 암호화함; j) 펩타이드 에피토프의 50%는 클래스 I MHC에 대한 결합 친화도를 가지고, 펩타이드 에피토프의 50%는 클래스 II MHC에 대한 결합 친화도를 가짐; k) 유사-에피토프를 최소화하기 위해 펩타이드 에피토프가 정돈되도록 펩타이드 에피토프를 암호화하는 mRNA가 배열됨, l) 펩타이드 에피토프의 적어도 30%는 길이가 15개의 아미노산의 클래스 I MHC 결합 펩타이드임; 및/또는 m) 펩타이드 에피토프의 적어도 30%는 길이가 21개의 아미노산의 클래스 II MHC 결합 펩타이드임.
- [0025] 일부 실시형태에서, 펩타이드 에피토프 중 적어도 둘은 보편적 II형 T-세포 에피토프에 의해 서로로부터 분리된다. 일 실시형태에서, 모든 펩타이드 에피토프는 보편적 II형 T-세포 에피토프에 의해 서로로부터 분리된다. 다른 실시형태에서, mRNA 암 백신은 1 내지 20개의 보편적 II형 T-세포 에피토프를 암호화한다.
- [0026] 일부 실시형태에서, 보편적 II형 T-세포 에피토프는 ILMQYIKANSKFIGI(과상풍 독소; 서열번호 226), FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE(과상풍 독소; 서열번호 227), QYIKANSKFIGITE(과상풍 독소; 서열번호 228) QSIALSSLMVAQAIP(디프테리아 독소; 서열번호 229) 및 AKFVAAWTLKAAA(pan-DR 에피토프; 서열번호 230)로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0027] 일 실시형태에서, 보편적 II형 T-세포 에피토프는 mRNA 전체적으로 동일한 보편적 II형 T-세포 에피토프이다. 일부 실시형태에서, 보편적 II형 T-세포 에피토프는 mRNA에서 1 내지 20회 반복된다. 다른 실시형태에서, 보편적 II형 T-세포 에피토프는 mRNA 전체적으로 서로 상이하다. 일 실시형태에서, 보편적 II형 T-세포 에피토프는 모든 펩타이드 에피토프 사이에 위치된다. 일부 실시형태에서, 보편적 II형 T-세포 에피토프는 모든 다른 펩타이드 에피토프 사이에 위치된다. 일 실시형태에서, 보편적 II형 T-세포 에피토프는 모든 제3의 펩타이드 에피토프 사이에 위치된다.
- [0028] 일부 실시형태에서, 하나 이상의 mRNA는 면역 강화제를 암호화하는 오픈 리딩 프레임을 추가로 포함한다. 일 실시형태에서, 면역 강화제는 지질 나노입자로 제형화된다. 다른 실시형태에서, 면역 강화제는 별개의 지질 나노입자로 제형화된다. 일부 실시형태에서, 면역 강화제는 구성적으로 활성인 인간 STING 폴리펩타이드이다. 일 실시형태에서, 구성적으로 활성인 인간 STING 폴리펩타이드는 서열번호 1에 나타난 아미노산 서열을 포함한다. 다른 실시형태에서, 구성적으로 활성인 인간 STING 폴리펩타이드를 암호화하는 mRNA는 서열번호 170에 나타난 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.
- [0029] 일부 실시형태에서, 다음의 조건 중 하나 이상의 충족된다: (i) 활성화 종양유전자 돌연변이는 KRAS 돌연변이임; (ii) KRAS 돌연변이는 G12 돌연변이이되, 선택적으로 G12 KRAS 돌연변이는 G12D, G12V, G12S,

G12C, G12A, 및 G12R KRAS 돌연변이로부터 선택됨; (iii) KRAS 돌연변이는 G13 돌연변이이되, 선택적으로 G13 KRAS 돌연변이는 G13D KRAS 돌연변이임; 및/또는 (iv) 활성화 종양유전자 돌연변이는 H-RAS 또는 N-RAS 돌연변이임.

[0030] 소정의 실시형태에서, 다음의 조건 중 하나 이상의 충족된다: (A) mRNA는 둘 이상의 활성화 종양유전자 돌연변이 펩타이드의 연쇄동일서열을 암호화하는 오픈 리딩 프레임에 가짐; (B) 펩타이드 에피토프 중 적어도 둘은 단일 글리신에 의해 서로로부터 분리되되, 선택적으로 모든 펩타이드 에피토프는 단일 글리신에 의해 서로로부터 분리됨; (C) 연쇄동일서열은 3 내지 10개의 활성화 종양유전자 돌연변이 펩타이드를 포함함; 및/또는 (D) 펩타이드 에피토프 중 적어도 둘은 링커 없이 서로 직접적으로 연결됨.

[0031] 구체적 실시형태에서, 다음의 조건 중 하나 이상의 충족된다: (i) 펩타이드 에피토프 중 적어도 하나는 전통적인 암 항원임; (ii) 펩타이드 에피토프 중 적어도 하나는 재발성 다형임; (iii) 재발성 다형은 p53에서 재발성 체세포 암 돌연변이를 포함함; (iv) p53에서 재발성 체세포 암 돌연변이는 (A) 에피토프 AVSPCISFVW(서열번호 233)(HLA-B\*57:01, HLA-B\*58:01), HPLASCQCFF(서열번호 234)(HLA-B\*35:01, HLA-B\*53:01), FVWNFGIPL(서열번호 235)(HLA-A\*02:01, HLA-A\*02:06, HLA-B\*35:01)을 함유하는 펩타이드 서열 TAKSVTCTVSCPEGLASMRQLQCLAVSPCISFVWNFGIPLHPLASCQCFFIVYPLNV(서열번호 232)를 갖는 코돈 p.T125에 이웃하는 정규 5' 스플라이스 부위에서의 돌연변이; (B) 에피토프 LQVLSLGTYS(서열번호 237)(HLA-B\*15:01), FQSNTQNAVF(서열번호 238)(HLA-B\*15:01)를 함유하는 펩타이드 서열 EYFTLQVLSLGTYSQVESFQSNTQNAVFFLTVPALGAFAIRGQ(서열번호 236)를 갖는 보유했 인트론을 유도하는, 코돈 p.331에 이웃하는 정규 5' 스플라이스 부위에서의 돌연변이; (C) 에피토프 CTMFCQLAK(서열번호 240)(HLA-A\*11:01), KSVTCTMF(서열번호 241)(HLA-B\*58:01)를 함유하는 신규한 스페닝 펩타이드 서열 AKSVTCTMFCQLAK(서열번호 239)를 생성하는 모호한 대안의 엑손 3' 스플라이스 부위를 유도하는 코돈 p.126에 이웃하는 정규 3' 스플라이스 부위에서의 돌연변이; 그리고/또는 (D) 에피토프 VPYEPPEVW(서열번호 243)(HLA-B\*53:01, HLA-B\*51:01), LTVPSTAW(서열번호 244)(HLA-B\*58:01, HLA-B\*57:01)를 함유하는 신규한 스페닝 펩타이드 서열 VPYEPPEVWLALTVPSTAWAA(서열번호 242)를 생성하는 모호한 대안의 인트론 5' 스플라이스 부위를 유도하는 코돈 p.224에 이웃하는 정규 5' 스플라이스 부위에서의 돌연변이로 이루어진 군으로부터 선택되되, 전사체 코돈 위치는 앙상블 v83 인간 게놈 주석으로부터의 정규 전장 p53 전사체 ENST00000269305(서열번호 245)를 지칭함; 및/또는 (v) mRNA 암 백신은 안정제를 포함하지 않는다.

[0032] 본 개시내용의 다른 양상은 (i) 개인화된 암 항원인 1 내지 500개의 펩타이드 에피토프를 암호화하는 하나 이상의 오픈 리딩 프레임을 각각 갖는 하나 이상의 mRNA, 및 (ii) 개인화된 암 항원에 대한 면역 반응을 향상시키는 폴리펩타이드를 암호화하는 오픈 리딩 프레임을 갖는 mRNA를 포함하는 지질 나노입자를 포함하는 mRNA 암 백신 이되, 선택적으로 (i) 및 (ii)는 대략 5:1의 질량비로 존재한다.

[0033] 본 개시내용의 다른 양상은 (i) 개인화된 암 항원인 1 내지 500개의 펩타이드 에피토프를 암호화하는 하나 이상의 오픈 리딩 프레임을 각각 갖는 하나 이상의 mRNA, 및 (ii) 개인화된 암 항원에 대한 면역 반응을 향상시키는 폴리펩타이드를 암호화하는 오픈 리딩 프레임을 갖는 mRNA를 포함하는, 지질 나노입자를 포함하는 mRNA 암 백신 이되, 선택적으로 (i) 및 (ii)는 대략 5:1의 질량비로 존재하며; 선택적으로 펩타이드 에피토프 중 적어도 하나는 활성화 종양유전자 돌연변이 펩타이드 또는 전통적인 암 항원이고, 그리고 선택적으로 펩타이드 에피토프 중 적어도 셋은 복잡한 변이체이고, 펩타이드 에피토프 중 적어도 둘은 점 돌연변이이다.

[0034] 일부 실시형태에서, 면역 반응은, (i) I형 인터페론 경로 신호전달을 자극하는 것; (ii) NFκB 경로 신호전달을 자극하는 것; (iii) 염증 반응을 자극하는 것; (iv) 사이토카인 생산을 자극하는 것; 또는 (v) 수지상 세포 발생, 활성화 또는 이동을 자극하는 것; 및 (vi) (i) 내지 (v) 중 임의의 조합을 특징으로 하는 세포성 또는 체액성 면역 반응을 포함한다.

[0035] 일 실시형태에서, mRNA 암 백신은 펩타이드 에피토프와 개인화된 암 항원에 대한 면역 반응을 향상시키는 폴리펩타이드를 둘 다 암호화하는 단일 mRNA 작제물을 포함한다. 다른 실시형태에서, 펩타이드 에피토프는 2 내지 100개의 펩타이드 에피토프를 포함한 연쇄동일서열 암 항원의 형태이되, 선택적으로 연쇄동일서열 암 항원은 5 내지 100개의 펩타이드 에피토프를 포함한다.

[0036] 일부 실시형태에서, 연쇄동일서열 암 항원은 하기 중 하나 이상을 포함한다: a) 2 내지 100개의 펩타이드 에피토프, 또는 5 내지 100개의 펩타이드 에피토프는 절단 민감 부위 사이에 배치됨; b) 각각의 펩타이드 에피토프를 암호화하는 mRNA는 링커 없이 서로 직접적으로 연결됨; c) 각각의 펩타이드 에피토프를 암호화하는 mRNA는 단일 뉴클레오타이드 링커로 서로 연결됨; d) 각각의 펩타이드 에피토프는 25 내지 35개의 아미노산을 포함하고, 중심에 위치한 SNP 돌연변이를 포함함; e) 펩타이드 에피토프의 적어도 30%는 대상체로부터의 클래스

I MHC 분자에 대해 가장 높은 친화도를 가짐; f) 펩타이드 에피토프의 적어도 30%는 대상체로부터의 클래스 II MHC 분자에 대해 가장 높은 친화도를 가짐; g) 펩타이드 에피토프의 적어도 50%는 HLA-A, HLA-B 및/또는 DRB1에 대해 IC > 500nM의 예측된 결합 친화도를 가짐; h) mRNA는 45 내지 55개의 펩타이드 에피토프를 암호화함; i) mRNA는 52개의 펩타이드 에피토프를 암호화함; j) 펩타이드 에피토프의 50%는 클래스 I MHC에 대한 결합 친화도를 가지고, 펩타이드 에피토프의 50%는 클래스 II MHC에 대한 결합 친화도를 가짐; k) 유사-에피토프를 최소화하기 위해 펩타이드 에피토프가 정돈되도록 펩타이드 에피토프를 암호화하는 mRNA가 배열됨, l) 펩타이드 에피토프의 적어도 30%는 길이가 15개의 아미노산의 클래스 I MHC 결합 펩타이드임; 및/또는 m) 펩타이드 에피토프의 적어도 30%는 길이가 21개의 아미노산의 클래스 II MHC 결합 펩타이드임.

[0037] 일부 실시형태에서, 각각의 펩타이드 에피토프는 SNP 돌연변이의 각각의 측면 상에서 15개의 측접 아미노산을 갖는 중심에 위치된 SNP 돌연변이를 포함한다.

[0038] 일 실시형태에서, 대상체에서 적어도 하나의 개인화된 암 항원을 향상시키는 폴리펩타이드는 구성적으로 활성인 인간 STING 폴리펩타이드이다. 일 실시형태에서, 구성적으로 활성인 인간 STING 폴리펩타이드는 V147L, N154S, V155M, R284M, R284K, R284T, E315Q, R375A, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 돌연변이를 포함한다. 다른 실시형태에서, 구성적으로 활성인 인간 STING 폴리펩타이드는 V155M 돌연변이를 포함한다. 다른 실시형태에서, 구성적으로 활성인 인간 STING 폴리펩타이드는 돌연변이 R284M/V147L/N154S/V155M을 포함한다.

[0039] 일부 실시형태에서, 각각의 mRNA는 동일 또는 상이한 지질 나노입자로 제형화된다. 다른 실시형태에서, 암 개인화된 암 항원을 암호화하는 각각의 mRNA는 동일 또는 상이한 지질 나노입자로 제형화된다. 일부 실시형태에서, 개인화된 암 항원에 대해 면역 반응을 향상시키는 폴리펩타이드를 암호화하는 각각의 mRNA는 동일 또는 상이한 지질 나노입자로 제형화된다.

[0040] 일부 실시형태에서, 개인화된 암 항원을 암호화하는 각각의 mRNA는 동일한 지질 나노입자로 제형화되고, 개인화된 암 항원에 대한 면역 반응을 향상시키는 폴리펩타이드를 암호화하는 각각의 mRNA는 상이한 지질 나노입자로 제형화된다. 다른 실시형태에서, 개인화된 암 항원을 암호화하는 각각의 mRNA는 동일한 지질 나노입자로 제형화되고, 개인화된 암 항원에 대해 면역 반응을 향상시키는 폴리펩타이드를 암호화하는 각각의 mRNA는 개인화된 암 항원을 암호화하는 각각의 mRNA와 동일한 지질 나노입자로 제형화된다. 일부 실시형태에서, 개인화된 암 항원을 암호화하는 각각의 mRNA는 상이한 지질 나노입자로 제형화되고, 개인화된 암 항원에 대해 면역 반응을 향상시키는 폴리펩타이드를 암호화하는 각각의 mRNA는 각각의 개인화된 암 항원을 암호화하는 각각의 mRNA와 동일한 지질 나노입자로 제형화된다.

[0041] 일부 실시형태에서, 펩타이드 에피토프는 T 세포 에피토프 및/또는 B 세포 에피토프이다. 다른 실시형태에서, 펩타이드 에피토프는 T 세포 에피토프와 B 세포 에피토프의 조합을 포함한다. 일 실시형태에서, 펩타이드 에피토프 중 적어도 1개는 T 세포 에피토프이다. 다른 실시형태에서, 펩타이드 에피토프 중 적어도 1개는 B 세포 에피토프이다.

[0042] 일부 실시형태에서, 펩타이드 에피토프는 대상체의 MHC에 대한 결합 강도에 대해 최적화되었다. 다른 실시형태에서, 각각의 에피토프에 대한 TCR 면은 내인성 단백질에 대해 낮은 유사성을 가진다.

[0043] 다른 실시형태에서, mRNA 암 백신은 회상 항원(recall antigen)을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 회상 항원은 감염성 질환 항원이다.

[0044] 일 실시형태에서, mRNA 암 백신은 하나 이상의 전통적인 암 항원을 암호화하는 오픈 리딩 프레임에 갖는 mRNA를 추가로 포함한다.

[0045] 일 실시형태에서, 다음의 조건 중 하나 이상의 충족된다: (i) 활성화 종양유전자 돌연변이는 KRAS 돌연변이임; (ii) KRAS 돌연변이는 G12 돌연변이이되, 선택적으로 G12 KRAS 돌연변이는 G12D, G12V, G12S, G12C, G12A, 및 G12R KRAS 돌연변이로부터 선택됨; (iii) KRAS 돌연변이는 G13 돌연변이이되, 선택적으로 G13 KRAS 돌연변이는 G13D KRAS 돌연변이임; 및/또는 (iv) 활성화 종양유전자 돌연변이는 H-RAS 또는 N-RAS 돌연변이임.

[0046] 일 실시형태에서, 다음의 조건 중 하나 이상의 충족된다: (A) mRNA는 둘 이상의 활성화 종양유전자 돌연변이 펩타이드의 연쇄동일서열을 암호화하는 오픈 리딩 프레임을 가짐; (B) 펩타이드 에피토프 중 적어도 둘은 단일 글리신에 의해 서로로부터 분리되되, 선택적으로 모든 펩타이드 에피토프는 단일 글리신에 의해 서로로부터 분리됨; (C) 연쇄동일서열은 3 내지 10개의 활성화 종양유전자 돌연변이 펩타이드를 포함함; 및/또는 (D) 펩타이드



에피토프 중 적어도 둘은 링커 없이 서로에 대해 직접적으로 연결됨.

[0047] 일 실시형태에서, 다음의 조건 중 하나 이상의 충족된다: (i) 펩타이드 에피토프 중 적어도 하나는 전통적인 항원임; (ii) 펩타이드 에피토프 중 적어도 하나는 재발성 다형임; (iii) 재발성 다형은 p53에서 재발성 체세포 암 돌연변이를 포함함; (iv) p53에서 재발성 체세포 암 돌연변이는 (A) 에피토프 AVSPCISFVW(서열번호 233)(HLA-B\*57:01, HLA-B\*58:01), HPLASCQCFF(서열번호 234)(HLA-B\*35:01, HLA-B\*53:01), FVWNFGIPL(서열번호 235)(HLA-A\*02:01, HLA-A\*02:06, HLA-B\*35:01)를 함유하는 펩타이드 서열 TAKSVTCTVSCPEGLASMLQLAVSPCISFVWNFGIPLHPLASCQCFFIVYPLNV(서열번호 232)를 갖는 보유된 인트론을 유도하는, 코돈 p.T125에 이웃하는 정규 5' 스플라이스 부위에서의 돌연변이; (B) 에피토프 LQVLSLGTYS(서열번호 237)(HLA-B\*15:01), FQSNTQNAV(서열번호 238)(HLA-B\*15:01)를 함유하는 펩타이드 서열 YFTLQVLSLGTYSQVESFQSNTQNAVFFLTPLPAIGAFAIRGQ(서열번호 236)를 갖는 보유된 인트론을 유도하는, 코돈 p.331에 이웃하는 정규 5' 스플라이스 부위에서의 돌연변이; (C) 에피토프 CTMFCQLAK(서열번호 240)(HLA-A\*11:01), KSVTCTMF(서열번호 241)(HLA-B\*58:01)를 함유하는 신규한 스페닝 펩타이드 서열 AKSVTCTMFCQLAK(서열번호 239)를 생성하는 모호한 대안의 엑손 3' 스플라이스 부위를 유도하는, 코돈 p.126에 이웃하는 정규 3' 스플라이스 부위에서의 돌연변이; 그리고/또는 (D) 에피토프 VPYEPPEVW(서열번호 243)(HLA-B\*53:01, HLA-B\*51:01), LTVPPSTAW(서열번호 244)(HLA-B\*58:01, HLA-B\*57:01)를 함유하는 신규한 스페닝 펩타이드 서열 VPYEPPEVWLALTVPSTAWAA(서열번호 242)를 생성하는 모호한 대안의 인트론 5' 스플라이스 부위를 유도하는, 코돈 p.224에 이웃하는 정규 5' 스플라이스 부위에서의 돌연변이로 이루어진 군으로부터 선택되되, 전사체 코돈 위치는 양상블 v83 인간 게놈 주석으로부터의 정규 전장 p53 전사체 ENST00000269305(서열번호 245)를 지칭함; 및/또는 (v) mRNA 암 백신은 안정제를 포함하지 않음.

[0048] 일부 실시형태에서, 지질 나노입자는 약 20 내지 60% 이온화 가능한 아미노 지질: 5 내지 25% 중성 지질: 25 내지 55% 스테롤; 및 0.5 내지 15% PEG-변형 지질의 몰 비를 포함하되, 선택적으로 이온화 가능한 아미노 지질은 양이온성 지질이다. 일 실시형태에서, 지질 나노입자는 약 50% 화합물 25: 약 10% DSPC: 약 38.5% 콜레스테롤; 및 약 1.5% PEG-DMG의 몰비를 포함한다. 다른 실시형태에서, 이온화 가능한 아미노 지질은, 예를 들어, 2,2-다이리놀레일-4-다이메틸아미노에틸-[1,3]-다이옥솔란(DLin-KC2-DMA), 다이리놀레일-메틸-4-다이메틸아미노부티레이트(DLin-MC3-DMA), 및 다이((Z)-논-2-엔-1-일) 9-((4-(다이메틸아미노)부탄오일)옥시)헵타데칸다이오에이트(L319)로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 지질 나노입자는 화학식 (I)의 화합물을 포함한다. 일 실시형태에서, 화학식 (I)의 화합물은 화합물 25이다. 다른 실시형태에서, 지질 나노입자는 다분산도 값이 0.4 미만이다. 일부 실시형태에서, 지질 나노입자는 중성 pH 값에서 순 중성 전하를 가진다.

[0049] 일 실시형태에서, 각각의 에피토프에 대한 TCR 면은 내인성 단백질에 대해 낮은 유사성을 가진다.

[0050] 다른 실시형태에서, mRNA는 번역관문 조절자를 암호화하는 오픈 리딩 프레임에 추가로 포함한다. 일 실시형태에서, mRNA 암 백신은 추가적인 암 치료제를 추가로 포함하되; 선택적으로 추가적인 암 치료제는 번역관문 조절자이다. 다른 실시형태에서, 번역관문 조절자는 저해관문 폴리펩타이드이다. 일부 실시형태에서, 저해관문 폴리펩타이드는 PD1, PD-L1, CTLA4, TIM-3, VISTA, A2AR, B7-H3, B7-H4, BTLA, IDO, KIR, LAG3, 또는 이들의 조합을 저해한다.

[0051] 일부 실시형태에서, 관문 저해제 폴리펩타이드는 항체이다. 일 실시형태에서, 저해관문 폴리펩타이드는 항-CTLA4 항체 또는 CTLA4에 특이적으로 결합하는 이의 항원-결합 단편, 항-PD1 항체 또는 PD1에 특이적으로 결합하는 이의 항원-결합 단편, 항-PD-L1 항체 또는 PD-L1에 특이적으로 결합하는 이의 항원-결합 단편, 및 이들의 조합으로부터 선택된 항체이다. 일 실시형태에서, 관문 저해제 폴리펩타이드는 아테졸리주맵, 아벨루맵, 또는 두르발루맵으로부터 선택되는 항-PD-L1 항체이다. 다른 실시형태에서, 관문 저해제 폴리펩타이드는 트레멜리루맵 또는 이필리루맵으로부터 선택되는 항-CTLA-4 항체이다. 일부 실시형태에서, 관문 저해제 폴리펩타이드는 니볼루맵 또는 캄브롤리주맵으로부터 선택되는 항-PD1 항체이다.

[0052] 일부 실시형태에서, 화학적 변형은 슈도유리딘, N1-메틸슈도유리딘, 2-티오유리딘, 4'-티오유리딘, 5-메틸사이토신, 2-티오-1-메틸-1-데아자-슈도유리딘, 2-티오-1-메틸-슈도유리딘, 2-티오-5-아자-유리딘, 2-티오-다이하이드로슈도유리딘, 2-티오-다이하이드로유리딘, 2-티오-슈도유리딘, 4-메톡시-2-티오-슈도유리딘, 4-메톡시-슈도유리딘, 4-티오-1-메틸-슈도유리딘, 4-티오-슈도유리딘, 5-아자-유리딘, 다이하이드로슈도유리딘, 5-메틸유리딘, 5-메틸유리딘, 5-메톡시유리딘, 및 2'-O-메틸 유리딘으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0053] 본 개시내용은, 다른 양상에서, 암을 갖는 대상체에게 상기 기재한 mRNA 암 백신을 투여하는 단계를 포함하는, 대상체를 백신접종하는 방법을 제공한다.

- [0054] 일부 실시형태에서, mRNA 백신은 대상체에게 10 $\mu$ g 내지 400 $\mu$ g의 mRNA 백신을 전달하기에 충분한 투약 수준으로 투여된다. 일 실시형태에서, mRNA 백신은 대상체에게 0.033mg, 0.1mg, 0.2mg, 또는 0.4mg을 전달하기에 충분한 투약 수준으로 투여된다. 다른 실시형태에서, mRNA 백신은 대상체에게 2회, 3회, 4회 이상으로 투여된다. 일부 실시형태에서, mRNA 백신은 3주마다 1일 1회 투여된다. 일 실시형태에서, mRNA 백신은 진피내, 근육내 및/또는 피하 투여에 의해 투여된다. 다른 실시형태에서, mRNA 백신은 근육내 투여에 의해 투여된다.
- [0055] 일부 실시형태에서, 상기 방법은 추가적인 암 치료제를 투여하는 단계를 더 포함하되; 선택적으로 추가적인 암 치료제는 대상체에 대한 면역관문 조절자이다. 일 실시형태에서, 면역관문 조절자는 저해관문 폴리펩타이드이다. 다른 실시형태에서, 저해관문 폴리펩타이드는 PD1, PD-L1, CTLA4, TIM-3, VISTA, A2AR, B7-H3, B7-H4, BTLA, IDO, KIR, LAG3, 또는 이들의 조합을 저해한다. 일부 실시형태에서, 관문 저해제 폴리펩타이드는 항체이다. 다른 실시형태에서, 저해관문 폴리펩타이드는 항-CTLA4 항체 또는 CTLA4에 특이적으로 결합하는 이의 항원-결합 단편, 항-PD1 항체 또는 PD1에 특이적으로 결합하는 이의 항원-결합 단편, 항-PD-L1 항체 또는 PD-L1에 특이적으로 결합하는 이의 항원-결합 단편, 및 이들의 조합으로부터 선택된 항체이다. 일부 실시형태에서, 관문 저해제 폴리펩타이드는 아테졸리주맙, 아벨루맙, 또는 두르발루맙으로부터 선택되는 항-PD-L1 항체이다. 다른 실시형태에서, 관문 저해제 폴리펩타이드는 트레멜리주맙 또는 이필리주맙으로부터 선택되는 항-CTLA-4 항체이다. 다른 실시형태에서, 관문 저해제 폴리펩타이드는 니볼루맙 또는 펌브롤리주맙으로부터 선택되는 항-PD1 항체이다.
- [0056] 일 실시형태에서, 면역관문 조절자는 대상체에게 100 내지 300mg을 전달하기에 충분한 투약 수준으로 투여된다. 일부 실시형태에서, 면역관문 조절자는 대상체에게 200mg을 전달하기에 충분한 투약 수준으로 투여된다. 일부 실시형태에서, 면역관문 조절자는 정맥내 주입에 의해 투여된다. 일 실시형태에서, 면역관문 조절자는 대상체에게 2회, 3회, 4회 이상으로 투여된다. 일부 실시형태에서, 면역관문 조절자는 대상체에게 mRNA 백신 투여와 동일한 날에 투여된다.
- [0057] 일부 실시형태에서, 암은 비소세포 폐암(NSCLC), 소세포 폐암, 흑색종, 방광 요로 상피 암종, HPV-음성 두경부 편평세포 암종(HNSCC), 및 고빈도 미세부수체(microsatellite high: MSI H)/미스매치 수선(mismatch repair: MMR) 결핍인 고형 악성 종양으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일 실시형태에서, NSCLC는 EGFR 민감성 돌연변이 및/또는 ALK 전좌를 결여한다. 다른 실시형태에서, 고빈도 미세부수체인 고형 악성 종양(MSI H)/미스매치 수선(MMR) 결핍은 결장직장암, 위 선암종, 식도 선암종 및 자궁내막암으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 암은 췌장, 복막, 대장, 소장, 담관, 폐, 자궁내막, 난소, 생식관, 위장관, 자궁경부, 위, 요로, 결장, 직장, 및 조혈 및 림프구 조직의 암으로부터 선택된다.
- [0058] 본 발명은 일부 양상에서 지질 나노입자에서 제형화된 암 항원 펩타이드 에피토프를 암호화하는 오픈 리딩 프레임 각각 갖는 하나 이상의 mRNA 및 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제의 mRNA 암 백신이되, mRNA 백신은 5 내지 100개의 펩타이드 에피토프를 암호화하고, 펩타이드 에피토프 중 적어도 둘은 개인화된 암 항원이다.
- [0059] 다른 양상에서, 본 발명은 암 항원 펩타이드 에피토프를 암호화하는 오픈 리딩 프레임을 각각 갖는 하나 이상의 mRNA 및 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 갖는 mRNA 암 백신이되, mRNA 백신은 5 내지 100개의 펩타이드 에피토프를 암호화하고, 펩타이드 에피토프 중 적어도 셋은 복잡한 변이체이고, 펩타이드 에피토프 중 적어도 둘은 점 돌연변이이다.
- [0060] 일부 실시형태에서, 지질 나노입자는 약 20 내지 60%의 양이온성 지질: 5 내지 25%의 비-양이온성 지질: 25 내지 55%의 스테롤; 및 0.5 내지 15%의 PEG-변형 지질의 물비를 포함한다. 일부 실시형태에서, 양이온성 지질은, 예를 들어, 2,2-다이리놀레일-4-다이메틸아미노에틸-[1,3]-다이옥솔란(DLin-KC2-DMA), 다이리놀레일-메틸-4-다이메틸아미노뷰테레이트(DLin-MC3-DMA), 및 다이((Z)-비-2-엔-1-일) 9-((4-(다이메틸아미노)부탄오일)옥시)헵타데칸다이오에이트(L319)로 이루어진 군으로부터 선택된다. 다른 실시형태에서, 지질 나노입자는 화학식 (I)의 화합물을 포함한다. 일부 실시형태에서, 화학식 (I)의 화합물은 화합물 25이다.
- [0061] 일부 실시형태에서, 지질 나노입자는 다분산도 값이 0.4 미만이다. 일부 실시형태에서, 지질 나노입자는 중성 pH 값에서 순 중성 전하를 가진다.
- [0062] 일부 실시형태에서 백신은 5 내지 100개의 펩타이드 에피토프를 포함하는 연쇄동일서열 암 항원을 암호화하는 오픈 리딩 프레임을 갖는 mRNA이다. 다른 실시형태에서, 펩타이드 에피토프 중 적어도 둘은 단일 글리신에 의해 서로로부터 분리된다. 다른 실시형태에서 연쇄동일서열 암 항원은 20 내지 40개의 펩타이드 에피토프를 포함한다.

다. 일부 실시형태에서, 모든 펩타이드 에피토프는 단일 글리신에 의해 서로로부터 분리된다. 일부 실시형태에서, 펩타이드 에피토프 중 적어도 둘은 링커 없이 서로에 대해 직접적으로 연결된다.

- [0063] 실시형태에서 각각의 펩타이드 에피토프는 25 내지 35개의 아미노산을 포함하고, 중심에 위치한 SNP 돌연변이를 포함한다.
- [0064] 일부 실시형태에서, 펩타이드 에피토프의 적어도 30%는 대상체로부터의 클래스 I MHC 분자에 대해 가장 높은 친화도를 가진다. 다른 실시형태에서 펩타이드 에피토프의 적어도 30%는 대상체로부터의 클래스 II MHC 분자에 대해 가장 높은 친화도를 가진다. 또 다른 실시형태에서, 적어도 펩타이드 에피토프의 50%는 HLA-A, HLA-B 및/또는 DRB1에 대해 500nM 초과 IC의 예측된 결합 친화도를 가진다.
- [0065] 일부 실시형태에서, 본 발명의 하나 이상의 mRNA는 20개까지의 펩타이드 에피토프를 암호화한다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 하나 이상의 mRNA는 50개까지의 에피토프를 암호화한다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 하나 이상의 mRNA는 100개까지의 에피토프를 암호화한다.
- [0066] 다른 실시형태에 따르면 유사-에피토프를 최소화하기 위해 펩타이드 에피토프가 정돈되도록 펩타이드 에피토프를 암호화하는 mRNA가 배열된다.
- [0067] 각각의 펩타이드 에피토프는 31개의 아미노산을 포함할 수 있고, SNP 돌연변이의 각각의 측면 상에서 15개의 측접 아미노산을 갖는 중심에 위치한 SNP 돌연변이를 포함한다.
- [0068] 일부 실시형태에서, 각각의 에피토프에 대한 TCR 면은 내인성 단백질에 대해 낮은 유사성을 가진다.
- [0069] 또 다른 실시형태에서, mRNA는 회상 항원을 추가로 포함한다. 회상 항원은 감염성 질환 항원일 수 있다.
- [0070] 다른 실시형태에서, 펩타이드 에피토프 중 적어도 하나는 전통적인 암 항원이다. 백신은 일부 실시형태에서 하나 이상의 재발성 다형을 암호화하는 오픈 리딩 프레임에 갖는 mRNA를 포함한다. 하나 이상의 재발성 다형은 p53에서 재발성 체세포 암 돌연변이를 포함할 수 있다. p53에서 하나 이상의 재발성 체세포 암 돌연변이는 일부 실시형태에서: (A) 에피토프 AVSPCISFVW(서열번호 233)(HLA-B\*57:01, HLA-B\*58:01), HPLASCQCFF(서열번호 234)(HLA-B\*35:01, HLA-B\*53:01), FVWNFGIPL(서열번호 235)(HLA-A\*02:01, HLA-A\*02:06, HLA-B\*35:01)을 함유하는 펩타이드 서열 TAKSVTCTVSCPEGLASMRQLQCLAVSPCISFVWNFGIPLHPLASCQCFFIVYPLNV(서열번호 232)를 갖는 보유된 인트론을 유도하는, 코돈 p.T125에 이웃하는 정규 5' 스플라이스 부위에서의 돌연변이; (B) 에피토프 LQVLSLGTSY(서열번호 237)(HLA-B\*15:01), FQNTQNAVF(서열번호 238)(HLA-B\*15:01)를 함유하는 펩타이드 서열 EYFTLQVLSLGTSYQVESFQNTQNAVFFLTVLPAIGAFAIRGQ(서열번호 236)를 갖는 보유된 인트론을 유도하는 코돈 p.331에 이웃하는 정규 5' 스플라이스 부위에서의 돌연변이; (C) 에피토프 CTMFCQLAK(서열번호 240)(HLA-A\*11:01), KSVTCTMF(서열번호 241)(HLA-B\*58:01)를 함유하는 신규한 스페닝 펩타이드 서열 AKSVTCTMFCQLAK(서열번호 239)를 생성하는 모호한 대안의 엑손 3' 스플라이스 부위를 유도하는, 코돈 p.126에 이웃하는 정규 3' 스플라이스 부위에서의 돌연변이; 및/또는 (D) 에피토프 VPYEPPEVW(서열번호 243)(HLA-B\*53:01, HLA-B\*51:01), LTVPPSTAW(서열번호 244)(HLA-B\*58:01, HLA-B\*57:01)를 함유하는 신규한 스페닝 펩타이드 서열 VPYEPPEVWLALTVPSTAWAA(서열번호 242)를 생성하는 모호한 대안의 인트론 5' 스플라이스 부위를 유도하는, 코돈 p.224에 이웃하는 정규 5' 스플라이스 부위에서의 돌연변이로 이루어진 군으로부터 선택되, 전사체 코돈 위치는 양상블 v83 인간 게놈 주석으로부터의 정규 전장 p53 전사체 ENST00000269305(서열번호 245)를 지칭한다.
- [0071] 일부 실시형태에서, mRNA는 면역관문 조절자를 암호화하는 오픈 리딩 프레임을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, mRNA 암 백신은 면역관문 조절자를 포함한다. 일부 실시형태에서, 면역관문 조절자는 저해관문 폴리펩타이드이다. 일부 실시형태에서, 저해관문 폴리펩타이드는 PD-1, TIM-3, VISTA, A2AR, B7-H3, B7-H4, BTLA, CTLA-4, IDO, KIR 및 LAG3으로 이루어진 군으로부터 선택된 분자에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 단편이다. 일부 실시형태에서, 저해관문 폴리펩타이드는 항-CTLA4 또는 항-PD1 항체이다. 일부 실시형태에서, 항-PD1 항체는 펩트폴리주맵이다.
- [0072] 일부 실시형태에서, mRNA 암 백신은 안정화제를 포함하지 않는다.
- [0073] 일부 실시형태에서, mRNA는 적어도 하나의 화학적 변형을 포함한다. 화학적 변형은 슈도유리딘, N1-메틸슈도유리딘, 2-티오유리딘, 4'-티오유리딘, 5-메틸사이토신, 2-티오-1-메틸-1-데아자-슈도유리딘, 2-티오-1-메틸-슈도유리딘, 2-티오-5-아자-유리딘, 2-티오-다이하이드로슈도유리딘, 2-티오-다이하이드로유리딘, 2-티오-슈도유리딘, 4-메톡시-2-티오-슈도유리딘, 4-메톡시-슈도유리딘, 4-티오-1-메틸-슈도유리딘, 4-티오-슈도유리딘, 5-아자-유리딘, 다이하이드로슈도유리딘, 5-메틸유리딘, 5-메틸유리딘, 5-메톡시유리딘, 및 2'-O-메틸 유리딘으로 이

루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

- [0074] 다른 양상에서, 대상체를 백신접종하기 위한 방법이 제공된다. 상기 방법은 암을 갖는 대상체에게 본 명세서에 게시된 mRNA 백신을 투여하는 단계를 수반한다.
- [0075] 일부 실시형태에서, mRNA 백신은 대상체에게 10 $\mu$ g 내지 400 $\mu$ g의 mRNA 백신을 전달하기에 충분한 투약량 수준으로 투여된다. 일부 실시형태에서, mRNA 백신은 대상체에게 0.033mg, 0.1mg, 0.2mg 또는 0.4mg을 전달하기에 충분한 투약량 수준으로 투여된다. 일부 실시형태에서, mRNA 백신은 대상체에게 2회, 3회, 4회 이상으로 투여된다. 일부 실시형태에서, mRNA 백신은 3주마다 1일 1회로 투여된다.
- [0076] 일부 실시형태에서, mRNA 백신은 진피내, 근육내 및/또는 피하 투여에 의해 투여된다. 일부 실시형태에서, mRNA 백신은 근육내 투여에 의해 투여된다.
- [0077] 일부 실시형태에서, 상기 방법은 추가적인 암 치료제를 투여하는 단계를 더 포함하되; 선택적으로 추가적인 암 치료제는 대상체에 대한 면역관문 조절자이다. 일부 실시형태에서, 면역관문 조절자는 저해관문 폴리펩타이드이다. 일부 실시형태에서, 저해관문 폴리펩타이드는 PD-1, TIM-3, VISTA, A2AR, B7-H3, B7-H4, BTLA, CTLA-4, IDO, KIR 및 LAG3으로 이루어진 군으로부터 선택된 분자에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 단편이다. 일부 실시형태에서, 저해관문 폴리펩타이드는 항-PD1 항체이다. 일부 실시형태에서, 항-PD-1 항체는 펌브롤리주맵이다.
- [0078] 일부 실시형태에서, 면역관문 조절자는 대상체에게 100 내지 300mg을 전달하기에 충분한 투약량 수준으로 투여된다. 일부 실시형태에서, 면역관문 조절자는 대상체에게 200mg을 전달하기에 충분한 투약량 수준으로 투여된다.
- [0079] 일부 실시형태에서, 면역관문 조절자는 정맥내 주입에 의해 투여된다.
- [0080] 일부 실시형태에서, 면역관문 조절자는 대상체에게 2회, 3회, 4회 이상으로 투여된다. 일부 실시형태에서, 면역관문 조절자는 대상체에게 mRNA 백신 투여와 동일한 날에 투여된다.
- [0081] 일부 실시형태에서, 암은 비소세포 폐암(NSCLC), 소세포 폐암, 흑색종, 방광 요로 상피 암종, HPV-음성 두경부 편평세포 암종(HNSCC), 및 고빈도 미세부수체인 고형 악성 종양(MSI H)/미스매치 수선(MMR) 결핍으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, NSCLC는 EGFR 민감성 돌연변이 및/또는 ALK 전좌를 결여한다. 일부 실시형태에서, 고빈도 미세부수체인 고형 악성 종양(MSI H)/미스매치 수선(MMR) 결핍은 결장직장암, 위 선암종, 식도 선암종 및 자궁내막암으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 암은 췌장, 복막, 대장, 소장, 담관, 폐, 자궁내막, 난소, 생식관, 위장관, 자궁경부, 위, 요로, 결장, 직장 및 조혈 및 림프구 조직의 암으로부터 선택된다.
- [0082] 다른 양상에서 mRNA 암 백신의 제조 방법이 제공된다. 상기 방법은 대상체로부터 샘플을 분리시키는 단계, 샘플에서 복수의 암 항원을 동정하는 단계, 복수의 암 항원으로부터 면역원성 에피토프를 결정하는 단계, 암 항원을 암호화하는 오픈 리딩 프레임에 갖는 mRNA 암 백신을 제조하는 단계를 수반한다. 1000 내지 3000개의 뉴클레오타이드를 포함하는 연쇄동일서열 암 항원을 암호화하는 mRNA를 생성하는 방법은 본 발명의 다른 양상에서 제공된다. 상기 방법은
- [0083] (a) 앞의 항 중 어느 하나의 암 항원을 암호화하는 오픈 리딩 프레임에 포함하는 제1 폴리뉴클레오타이드 및 5'-UTR을 포함하는 제2 폴리뉴클레오타이드를 고체 지지체에 접합된 폴리뉴클레오타이드에 결합시키는 단계;
- [0084] (b) 적합한 조건 하에 제1 폴리뉴클레오타이드의 5'-말단에 제2 폴리뉴클레오타이드의 3'-말단을 결합시킴으로써, 제1 결합 산물을 생산하는 단계로서, 상기 적합한 조건은 DNA 결합효소를 포함하는, 상기 제1 결합 산물을 생산하는 단계;
- [0085] (c) 적합한 조건 하에서 제1 결합 산물의 3'-말단에 3'-UTR을 포함하는 제3 폴리뉴클레오타이드의 5' 말단을 결합시킴으로써, 제2 결합 산물을 생산하는 단계로서, 상기 적합한 조건은 RNA 리가제를 포함하는, 상기 제2 결합 산물을 생산하는 단계; 및
- [0086] (d) 고체 지지체로부터 제2 결합 산물을 방출시키는 단계
- [0087] 를 수반함으로써, 1000 내지 3000개의 뉴클레오타이드를 포함하는 연쇄동일서열 암 항원을 암호화하는 mRNA를 생성한다.



- [0088] 다른 양상에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 방법에 따라 제조 가능한 연쇄동일서열 암 항원을 포함하는 mRNA 암 백신이다.
- [0089] 개인화된 mRNA 암 백신으로 대상체를 치료하는 방법은 본 발명의 다른 양상에 따라 제공된다. 상기 방법은 환자 특이적 악성변이체(mutanome)를 생성하기 위해 샘플로부터의 환자 전사체 및/또는 환자 엑솜을 분석함으로써 네오에피토프 세트를 동정하는 단계, MHC 결합 강도, MHC 결합 다양성, 예측된 정도의 면역원성, 낮은 자기 반응성, 활성화 종양유전자 돌연변이의 존재, 및/또는 T 세포 반응성에 기반하여 악성변이체로부터의 백신에 대한 네오에피토프의 세트를 선택하는 단계, 네오에피토프의 세트를 암호화하는 mRNA 백신을 제조하는 단계, 대상체로부터 샘플을 분리하고 2개월 내에 대상체에 mRNA 백신을 투여하는 단계를 수반한다. 일부 실시형태에서, 동정하는 단계는 대상체로부터의 샘플로부터 환자 전사체 및/또는 환자 엑솜을 분석하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 대상체로부터의 샘플은 생물학적 샘플, 예를 들어, 생검이다. 일부 실시형태에서, 상기 방법은 대상체로부터의 샘플을 분리시키는 단계를 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 동정하는 단계는 이용 가능한 데이터베이스에서 조직-특이적 발현을 분석하는 단계를 포함한다.
- [0090] 네오에피토프의 세트를 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드를 갖는 개인화된 mRNA 암 백신에서 사용하기 위한 네오에피토프의 세트를 동정하는 방법이 본 발명의 다른 양상에서 제공된다. 상기 방법은 하기 단계들을 수반한다:
- [0091] a. 환자 전사체 및 환자 엑솜을 분석함으로써 환자 특이적 악성변이체를 동정하는 단계,
- [0092] b. 환자 RNA-seq에서 유전자 또는 전사체-수준 발현의 평가; 변이체 호출 신뢰도 스코어; RNA-seq 대립유전자-특이적 발현; 보존적 대 비보존적 아미노산 치환; 점돌연변이의 위치(증가된 TCR 맞물림에 대한 센터링 스코어); 점돌연변이의 위치(차별적 HLA 결합에 대한 앵커링 스코어); 자성(Selfness): 환자 WES 데이터와 100% 미만의 코어 에피토프 상동성; 8량체 내지 11량체에 대한 HLA-A 및 -B IC50; 15량체 내지 20량체에 대한 HLA-DRB1 IC50; 난잡 스코어(promiscuity Score)(즉, 결합하도록 예측된 환자 HLA의 수); 8량체-11량체에 대한 HLA-C IC50; 15량체 내지 20량체에 대한 HLA-DRB3-5 IC50; 15량체 내지 20량체에 대한 HLA-DQB1/A1 IC50; 15량체 내지 20량체에 대한 HLA-DPB1/A1 IC50; 클래스 I 대 클래스 II 비율; 다뤄지는 환자 HLA-A, -B 및 DRB1 알로타이프의 다양성; 점 돌연변이 대 복잡한 에피토프의 비율(예를 들어, 프레임시프트); 유사-에피토프 HLA 결합 스코어; RNAseq 판독의 존재 및/또는 존재비 중 적어도 3가지에 기반한 네오에피토프에 대한 가중치 값을 이용하여 악성변이체로부터 15 내지 500개의 네오에피토프의 소집단을 선택하는 단계, 및
- [0093] c. 가장 높은 가중치 값에 기반하여 소집단으로부터 개인화된 mRNA 암 백신에서 사용하기 위한 네오에피토프의 세트를 선택하는 단계로서, 네오에피토프의 세트는 15 내지 40개의 네오에피토프를 포함하는, 상기 네오에피토프의 세트를 선택하는 단계.
- [0094] 일부 양상에서 본 발명은 암 항원 펩타이드 에피토프를 암호화하는 오픈 리딩 프레임을 각각 갖는 하나 이상의 mRNA의 mRNA 암 백신이되, mRNA는 miRNA 결합 부위를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 백신은 5 내지 100개의 펩타이드 에피토프를 암호화한다.
- [0095] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 핵산 백신은 화학적으로 변형된다. 다른 실시형태에서 핵산 백신은 비변형된다.
- [0096] 또 다른 양상은 대상체에게 암 항원 에피토프를 암호화하는 오픈 리딩 프레임을 갖는 하나 이상의 RNA 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 핵산 백신을 투여하는 단계를 포함하는, 대상체를 백신접종하기 위한 조성물 및 방법을 제공하되, RNA 폴리뉴클레오타이드는 안정화 요소를 포함하지 않고, 아쥘반트(adjuvant)는 백신과 함께 공동제형화 또는 공동투여되지 않는다.
- [0097] 다른 양상에서, 본 발명은 대상체에게 제1 암 항원 에피토프를 암호화하는 오픈 리딩 프레임을 갖는 하나 이상의 RNA 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 핵산 백신을 투여하는 것을 포함하는 대상체를 백신접종하기 위한 조성물 또는 방법이되, 핵산 백신의 10 $\mu$ g/kg 내지 400 $\mu$ g/kg의 투약량이 대상체에게 투여된다. 일부 실시형태에서, RNA 폴리뉴클레오타이드의 투약량은 용량당 1 내지 5 $\mu$ g, 5 내지 10 $\mu$ g, 10 내지 15 $\mu$ g, 15 내지 20 $\mu$ g, 10 내지 25 $\mu$ g, 20 내지 25 $\mu$ g, 20 내지 50 $\mu$ g, 30 내지 50 $\mu$ g, 40 내지 50 $\mu$ g, 40 내지 60 $\mu$ g, 60 내지 80 $\mu$ g, 60 내지 100 $\mu$ g, 50 내지 100 $\mu$ g, 80-120 $\mu$ g, 40 내지 120 $\mu$ g, 40 내지 150 $\mu$ g, 50 내지 150 $\mu$ g, 50 내지 200 $\mu$ g, 80 내지 200 $\mu$ g, 100 내지 200 $\mu$ g, 120 내지 250 $\mu$ g, 150 내지 250 $\mu$ g, 180 내지 280 $\mu$ g, 200-300 $\mu$ g, 50 내지 300 $\mu$ g, 80 내지 300 $\mu$ g, 100 내지 300 $\mu$ g, 40 내지 300 $\mu$ g, 50 내지 350 $\mu$ g, 100 내지 350 $\mu$ g, 200 내지 350 $\mu$ g, 300 내지 350 $\mu$ g, 320 내지 400 $\mu$ g, 40 내지 380 $\mu$ g, 40 내지 100 $\mu$ g, 100 내지 400 $\mu$ g, 200 내지 400 $\mu$ g, 또는 300 내지 400 $\mu$ g이다. 일부 실시

형태에서, 핵산 백신은 대상체에게 진피내 또는 근육내 주사에 의해 투여된다. 일부 실시형태에서, 핵산 백신은 대상체에게 제0일에 투여된다. 일부 실시형태에서, 핵산 백신의 제2 용량은 대상체에게 제21일에 투여된다.

[0098] 일부 실시형태에서, RNA 폴리뉴클레오타이드의 25 마이크로그램의 투약량은 대상체에게 투여되는 핵산 백신에 포함된다. 일부 실시형태에서, RNA 폴리뉴클레오타이드의 100 마이크로그램의 투약량은 대상체에게 투여되는 핵산 백신에 포함된다. 일부 실시형태에서, RNA 폴리뉴클레오타이드의 50 마이크로그램의 투약량은 대상체에게 투여되는 핵산 백신에 포함된다. 일부 실시형태에서, RNA 폴리뉴클레오타이드의 75 마이크로그램의 투약량은 대상체에게 투여되는 핵산 백신에 포함된다. 일부 실시형태에서, RNA 폴리뉴클레오타이드의 150 마이크로그램의 투약량은 대상체에게 투여되는 핵산 백신에 포함된다. 일부 실시형태에서, RNA 폴리뉴클레오타이드의 400 마이크로그램의 투약량은 대상체에게 투여되는 핵산 백신에 포함된다. 일부 실시형태에서, RNA 폴리뉴클레오타이드의 200 마이크로그램의 투약량은 대상체에게 투여되는 핵산 백신에 포함된다. 일부 실시형태에서, RNA 폴리뉴클레오타이드는 원위 림프절에 비해 국소 림프절에서 100배 더 높은 수준으로 축적된다. 다른 실시형태에서 핵산 백신은 화학적으로 변형되고, 다른 실시형태에서 핵산 백신은 화학적으로 변형되지 않는다.

[0099] 일부 실시형태에서, 유효량은 1 내지 100 $\mu$ g의 총 용량이다. 일부 실시형태에서, 유효량은 100 $\mu$ g의 총 용량이다. 일부 실시형태에서, 유효량은 대상체에게 총 1 또는 2회 투여되는 25 $\mu$ g의 용량이다. 일부 실시형태에서, 유효량은 대상체에게 총 2회 투여되는 100 $\mu$ g의 용량이다. 일부 실시형태에서, 유효량은 1 $\mu$ g 내지 10 $\mu$ g, 1 $\mu$ g 내지 20 $\mu$ g, 1 $\mu$ g 내지 30 $\mu$ g, 5 $\mu$ g 내지 10 $\mu$ g, 5 $\mu$ g 내지 20 $\mu$ g, 5 $\mu$ g 내지 30 $\mu$ g, 5 $\mu$ g 내지 40 $\mu$ g, 5 $\mu$ g 내지 50 $\mu$ g, 10 $\mu$ g 내지 15 $\mu$ g, 10 $\mu$ g 내지 20 $\mu$ g, 10 $\mu$ g 내지 25 $\mu$ g, 10 $\mu$ g 내지 30 $\mu$ g, 10 $\mu$ g 내지 40 $\mu$ g, 10 $\mu$ g 내지 50 $\mu$ g, 10 $\mu$ g 내지 60 $\mu$ g, 15 $\mu$ g 내지 20 $\mu$ g, 15 $\mu$ g 내지 25 $\mu$ g, 15 $\mu$ g 내지 30 $\mu$ g, 15 $\mu$ g 내지 40 $\mu$ g, 15 $\mu$ g 내지 50 $\mu$ g, 20 $\mu$ g 내지 25 $\mu$ g, 20 $\mu$ g 내지 30 $\mu$ g, 20 $\mu$ g 내지 40 $\mu$ g, 20 $\mu$ g 내지 50 $\mu$ g, 20 $\mu$ g 내지 60 $\mu$ g, 20 $\mu$ g -70 $\mu$ g, 20 $\mu$ g 내지 75 $\mu$ g, 30 $\mu$ g 내지 35 $\mu$ g, 30 $\mu$ g 내지 40 $\mu$ g, 30 $\mu$ g 내지 45 $\mu$ g, 30 $\mu$ g 내지 50 $\mu$ g, 30 $\mu$ g 내지 60 $\mu$ g, 30 $\mu$ g 내지 70 $\mu$ g, 30 $\mu$ g 내지 75 $\mu$ g의 용량이며, 이는 대상체에게 총 1 또는 2회 이상으로 투여될 수 있다.

[0100] 본 발명의 양상은 제1 항원 폴리펩타이드를 암호화하는 오픈 리딩 프레임에 갖는 하나 이상의 RNA 폴리뉴클레오타이드 및 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 포함하는 핵산 백신을 제공하되, RNA 폴리뉴클레오타이드는 안정화 요소를 포함하지 않고, 아주반트는 백신에 포함되지 않는다. 일부 실시형태에서, 안정화 요소는 히스톤 줄기-루프이다. 일부 실시형태에서, 안정화 요소는 야생형 서열에 비해 증가된 GC 함량을 갖는 핵산 서열이다.

[0101] 양상은 적어도 하나의 화학적 변형을 포함하거나 또는 선택적으로 화학적 변형이 없는 오픈 리딩 프레임에 갖는 하나 이상의 RNA 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 핵산 백신을 제공하고, 상기 오픈 리딩 프레임은 제1 항원 폴리펩타이드를 암호화하되, 대상체에서 항원 발현 수준은 안정화 요소를 갖는 mRNA 백신에 의해 생성되거나 또는 아주반트와 함께 제형화되고 제1 항원 폴리펩타이드를 암호화하는 항원 발현 수준을 상당히 초과하도록 RNA 폴리뉴클레오타이드는 대상체에 대한 생체내 투여를 위한 제형에 존재한다.

[0102] 다른 양상은 적어도 하나의 화학적 변형을 포함하거나 또는 선택적으로 화학적 변형이 없는 오픈 리딩 프레임에 갖는 하나 이상의 RNA 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 핵산 백신을 제공하며, 오픈 리딩 프레임은 제1 항원 폴리펩타이드를 암호화하되, 상기 백신은 동등한 항체 역가를 생성하기 위해 비변형 mRNA 백신에 필요한 것보다 적어도 10배 더 적은 RNA 폴리뉴클레오타이드를 가진다.

[0103] 본 발명의 양상은 또한 적어도 하나의 화학적 변형을 포함하거나 또는 선택적으로 화학적 변형이 없는 오픈 리딩 프레임에 갖는 10 $\mu$ g 내지 400 $\mu$ g의 하나 이상의 RNA 폴리뉴클레오타이드 및 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 포함하는 백신 사용 단위를 제공하고, 인간 대상체에 대한 전달을 위해 제형화되며, 상기 오픈 리딩 프레임은 제1 항원 폴리펩타이드를 암호화한다. 일부 실시형태에서, 백신은 양이온성 지질 나노입자를 추가로 포함한다.

[0104] 본 발명의 양상은 본 명세서에 개시된 mRNA 암 백신을 포함하는 바이알을 포함하는 키트를 제공한다. 일부 실시형태에서, 바이알은 0.1mg 내지 1mg의 mRNA를 함유한다. 일부 실시형태에서, 바이알은 0.35mg의 mRNA를 함유한다. 일부 실시형태에서, mRNA의 농도는 1mg/ml이다.

[0105] 일부 실시형태에서, 바이알은 5 내지 15mg의 총 지질을 함유한다. 일부 실시형태에서, 바이알은 7mg의 총 지질을 함유한다. 일부 실시형태에서, 총 지질의 농도는 20mg/ml이다.

[0106] 일부 실시형태에서, mRNA 암 백신은 액체이다.

- [0107] 일부 실시형태에서, 키트는 주사기를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 주사기는 근육내 투여에 적합하다.
- [0108] 본 발명의 양상은 대상체를 백신접종하기 위한 유효량에 제1 항원 폴리펩타이드를 암호화하는 오픈 리딩 프레임 을 갖는 하나 이상의 RNA 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 핵산 백신의 25 $\mu$ g/kg 내지 400 $\mu$ g/kg의 핵산 백신의 단일 투약량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 대상체를 백신접종하는 방법을 제공한다.
- [0109] 본 발명은 일부 양상에서 항원으로서 활성화 종양유전자 돌연변이를 포함할 수 있는 mRNA 암 백신이다. 일부 실시형태에서, 활성화 종양유전자 돌연변이는 KRAS 돌연변이다. 일부 실시형태에서, KRAS 돌연변이는 G12 돌연변이다. 일부 실시형태에서, G12 KRAS 돌연변이는 G12D, G12V, G12S, G12C, G12A로부터 선택되고, 그리고 G12R KRAS 돌연변이, 예를 들어, G12 KRAS 돌연변이는 G12D, G12V, 및 G12S KRAS 돌연변이로부터 선택된다. 다른 실시형태에서, KRAS 돌연변이는 G13 돌연변이이고, 예를 들어, G13 KRAS 돌연변이는 G13D KRAS 돌연변이다. 일부 실시형태에서, 활성화 종양유전자 돌연변이는 H-RAS 또는 N-RAS 돌연변이다.
- [0110] 일부 실시형태에서, 당업자는 KRAS 돌연변이, HLA 하위유형 및 본 명세서에 제공된 가이드라인에 기반한 종양 유형을 선택할 것이고, 치료를 위한 KRAS 백신을 제조한다. 일부 실시형태에서, KRAS 돌연변이는 G12C, G12V, G12D, G13D로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, HLA 하위유형은 A\*02:01, C\*07:01, C\*04:01, C\*07:02로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 종양 유형은 결장직장, 췌장, 폐, 및 자궁내막양으로부터 선택된다.
- [0111] 일부 실시형태에서, HRAS 돌연변이는 코돈 12, 코돈 13 또는 코돈 61에서의 돌연변이다. 일부 실시형태에서, HRAS 돌연변이는 12V, 61L, 또는 61R 돌연변이다.
- [0112] 일부 실시형태에서, NRAS 돌연변이는 코돈 12, 코돈 13 또는 코돈 61에서의 돌연변이다. 일부 실시형태에서, NRAS 돌연변이는 12D, 13D, 61K, 또는 61R 돌연변이다.
- [0113] 본 개시내용의 일부 실시형태는 둘 이상의 활성화 종양유전자 돌연변이 펩타이드의 연쇄동일서열을 암호화하는 오픈 리딩 프레임을 갖는 mRNA를 포함하는 mRNA 암 백신을 제공한다. 일부 실시형태에서, 펩타이드 에피토프 중 적어도 둘 단일 글리신에 의해 서로로부터 분리된다. 일부 실시형태에서, 연쇄동일서열은 3 내지 10개의 활성화 종양유전자 돌연변이 펩타이드를 포함한다. 일부 이러한 실시형태에서, 모든 펩타이드 에피토프는 단일 글리신에 의해 서로로부터 분리된다. 다른 실시형태에서, 펩타이드 에피토프 중 적어도 둘은 링커 없이 서로에 대해 직접적으로 연결된다.
- [0114] 일부 실시형태에서, mRNA 암 백신은 암 치료제를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, mRNA 암 백신은 저해관문 폴리펩타이드를 추가로 포함한다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 저해관문 폴리펩타이드는 PD-1, TIM-3, VISTA, A2AR, B7-H3, B7-H4, BTLA, CTLA-4, IDO, KIR 및 LAG3으로 이루어진 군으로부터 선택된 분자에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 단편이다. 다른 실시형태에서, mRNA 암 백신은 회상 항원을 추가로 포함한다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 회상 항원은 감염성 질환 항원이다.
- [0115] 일부 실시형태에서, mRNA 암 백신은 안정화제를 포함하지 않는다.
- [0116] 일부 실시형태에서, mRNA는 지질 나노입자 담체, 예컨대 약 20 내지 60% 양이온성 지질: 5 내지 25% 비-양이온성 지질: 25 내지 55% 스테롤; 및 0.5 내지 15% PEG-변형 지질의 물 비를 포함하는 지질 나노입자 담체로 제형화된다. 양이온성 지질은, 예를 들어, 2,2'-다이리놀레일-4-다이메틸아미노에틸-[1,3]-다이옥솔란(DLin-KC2-DMA), 다이리놀레일-메틸-4-다이메틸아미노뷰티레이트(DLin-MC3-DMA), 및 다이((Z)-논-2-엔-1-일) 9-((4-(다이메틸아미노)부탄오일)옥시)헥사데칸다디오에이트(L319)로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0117] 일부 실시형태에서, mRNA는 적어도 하나의 화학적 변형을 포함한다. 화학적 변형은 슈도유리딘, N1-메틸슈도유리딘, 2'-티오유리딘, 4'-티오유리딘, 5-메틸사이토신, 2-티오-1-메틸-1-데아자-슈도유리딘, 2-티오-1-메틸-슈도유리딘, 2-티오-5-아자-유리딘, 2-티오-다이하이드로슈도유리딘, 2-티오-다이하이드로유리딘, 2-티오-슈도유리딘, 4-메톡시-2-티오-슈도유리딘, 4-메톡시-슈도유리딘, 4-티오-1-메틸-슈도유리딘, 4-티오-슈도유리딘, 5-아자-유리딘, 다이하이드로슈도유리딘, 5-메틸유리딘, 5-메틸유리딘, 5-메톡시유리딘, 및 2'-O-메틸 유리딘으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0118] 다른 양상에서, 대상체를 치료하는 방법이 제공된다. 상기 방법은 암을 갖는 대상체에게 앞서 언급한 실시형태 중 임의의 하나의 mRNA 암 백신을 투여하는 단계를 수반한다. 일부 실시형태에서, mRNA 암 백신은 암 치료제와 병용하여 투여된다. 일부 실시형태에서, mRNA 암 백신은 저해관문 폴리펩타이드와 병용하여 투여된다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, mRNA 암 백신은 PD-1, TIM-3, VISTA, A2AR, B7-H3, B7-H4, BTLA, CTLA-4, IDO, KIR 및 LAG3으로 이루어진 군으로부터 선택된 분자에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 단편이다.

- [0119] 본 명세서에 제공된 방법은 암을 갖는 대상체를 치료하기 위해 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 암은 췌장, 복막, 대장, 소장, 담관, 폐, 자궁내막, 난소, 생식관, 위장관, 자궁경부, 위, 요로, 결장, 직장, 및 조혈 및 림프구조직의 암으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 암은 결장직장암이다.
- [0120] 일부 실시형태에서, 대상체에게 투여되는 mRNA 암 백신의 투약량은 용량당 1 내지 5 $\mu$ g, 5 내지 10 $\mu$ g, 10 내지 15 $\mu$ g, 15 내지 20 $\mu$ g, 10 내지 25 $\mu$ g, 20 내지 25 $\mu$ g, 20 내지 50 $\mu$ g, 30 내지 50 $\mu$ g, 40 내지 50 $\mu$ g, 40 내지 60 $\mu$ g, 60 내지 80 $\mu$ g, 60 내지 100 $\mu$ g, 50 내지 100 $\mu$ g, 80 내지 120 $\mu$ g, 40 내지 120 $\mu$ g, 40 내지 150 $\mu$ g, 50 내지 150 $\mu$ g, 50 내지 200 $\mu$ g, 80 내지 200 $\mu$ g, 100 내지 200 $\mu$ g, 120 내지 250 $\mu$ g, 150 내지 250 $\mu$ g, 180 내지 280 $\mu$ g, 200 내지 300 $\mu$ g, 50 내지 300 $\mu$ g, 80 내지 300 $\mu$ g, 100 내지 300 $\mu$ g, 40 내지 300 $\mu$ g, 50 내지 350 $\mu$ g, 100 내지 350 $\mu$ g, 200 내지 350 $\mu$ g, 300 내지 350 $\mu$ g, 320 내지 400 $\mu$ g, 40 내지 380 $\mu$ g, 40 내지 100 $\mu$ g, 100 내지 400 $\mu$ g, 200 내지 400 $\mu$ g, 또는 300 내지 400 $\mu$ g이다. 일부 실시형태에서, mRNA 암 백신은 대상체에게 진피내 또는 근육내 주사에 의해 투여된다. 일부 실시형태에서, mRNA 암 백신은 대상체에게 제0일에 투여된다. 일부 실시형태에서, mRNA 암 백신의 제2 용량은 대상체에게 제21일에 투여된다.
- [0121] 일부 실시형태에서, 25 마이크로그램의 mRNA 암 백신의 투약량이 대상체에게 투여된다. 일부 실시형태에서, 100 마이크로그램의 mRNA 암 백신의 투약량이 대상체에게 투여된다. 일부 실시형태에서, 50 마이크로그램의 mRNA 암 백신의 투약량이 대상체에게 투여된다. 일부 실시형태에서, 75 마이크로그램의 mRNA 암 백신의 투약량이 대상체에게 투여된다. 일부 실시형태에서, 150 마이크로그램의 mRNA 암 백신의 투약량이 대상체에게 투여된다. 일부 실시형태에서, 400 마이크로그램의 mRNA 암 백신의 투약량이 대상체에게 투여된다. 일부 실시형태에서, 200 마이크로그램의 mRNA 암 백신의 투약량이 대상체에게 투여된다. 일부 실시형태에서, mRNA 암 백신은 원위 림프절에 비해 국소 림프절에서 100배 더 높은 수준으로 축적된다. 다른 실시형태에서, mRNA 암 백신은 화학적으로 변형되고, 다른 실시형태에서 mRNA 암 백신은 화학적으로 변형되지 않는다.
- [0122] 일부 실시형태에서, 유효량은 1 내지 100 $\mu$ g의 총 용량이다. 일부 실시형태에서, 유효량은 100 $\mu$ g의 총 용량이다. 일부 실시형태에서, 유효량은 총 1회 또는 2회로 대상체에게 투여된 25 $\mu$ g의 용량이다. 일부 실시형태에서, 유효량은 총 2회로 대상체에게 투여된 100 $\mu$ g의 용량이다. 일부 실시형태에서, 유효량은 1 $\mu$ g 내지 10 $\mu$ g, 1 $\mu$ g 내지 20 $\mu$ g, 1 $\mu$ g 내지 30 $\mu$ g, 5 $\mu$ g 내지 10 $\mu$ g, 5 $\mu$ g 내지 20 $\mu$ g, 5 $\mu$ g 내지 30 $\mu$ g, 5 $\mu$ g 내지 40 $\mu$ g, 5 $\mu$ g 내지 50 $\mu$ g, 10 $\mu$ g 내지 15 $\mu$ g, 10 $\mu$ g 내지 20 $\mu$ g, 10 $\mu$ g 내지 25 $\mu$ g, 10 $\mu$ g 내지 30 $\mu$ g, 10 $\mu$ g 내지 40 $\mu$ g, 10 $\mu$ g 내지 50 $\mu$ g, 10 $\mu$ g 내지 60 $\mu$ g, 15 $\mu$ g 내지 20 $\mu$ g, 15 $\mu$ g 내지 25 $\mu$ g, 15 $\mu$ g 내지 30 $\mu$ g, 15 $\mu$ g 내지 40 $\mu$ g, 15 $\mu$ g 내지 50 $\mu$ g, 20 $\mu$ g 내지 25 $\mu$ g, 20 $\mu$ g 내지 30 $\mu$ g, 20 $\mu$ g 내지 40 $\mu$ g, 20 $\mu$ g 내지 50 $\mu$ g, 20 $\mu$ g 내지 60 $\mu$ g, 20 $\mu$ g 내지 70 $\mu$ g, 20 내지 75 $\mu$ g, 30 $\mu$ g 내지 35 $\mu$ g, 30 $\mu$ g 내지 40 $\mu$ g, 30 $\mu$ g 내지 45 $\mu$ g, 30 $\mu$ g 내지 50 $\mu$ g, 30 $\mu$ g 내지 60 $\mu$ g, 30 $\mu$ g 내지 70 $\mu$ g, 30 $\mu$ g 내지 75 $\mu$ g의 용량이며, 이는 총 1 또는 2회 이상으로 대상체에게 투여될 수 있다.
- [0123] 본 발명의 양상은 1000 내지 3000개의 뉴클레오타이드를 포함하는 연쇄동일서열 암 항원을 암호화하는 mRNA를 생성하는 방법을 제공하되, 상기 방법은, (a) 제1항 내지 제103항 중 어느 한 항의 암 항원을 암호화하는 오픈리딩 프레임에 포함하는 제1 폴리뉴클레오타이드 및 5'-UTR을 포함하는 제2 폴리뉴클레오타이드를 고체 지지체에 접합한 폴리뉴클레오타이드에 결합시키는 단계; (b) 제1 폴리뉴클레오타이드 적합한 조건 하에서 5'-말단에 제2 폴리뉴클레오타이드의 3'-말단을 결합시킴으로써 제1 결합 산물을 생산하는 단계로서, 상기 적합한 조건은 DNA 리가제를 포함하는, 상기 제1 결합 산물을 생산하는 단계; (c) 적합한 조건 하에서 제1 결합 산물의 3'-말단에 3'-UTR을 포함하는 제3 폴리뉴클레오타이드의 5' 말단을 결합시킴으로써 제2 결합 산물을 생산하는 단계로서, 상기 적합한 조건은 RNA 리가제를 포함하는, 상기 제2 결합 산물을 생산하는 단계; 및 (d) 고체 지지체로부터 제2 결합 산물을 방출시킴으로써, 1000 내지 3000개의 뉴클레오타이드를 포함하는 연쇄동일서열 암 항원을 암호화하는 mRNA를 생성하는 단계를 포함한다.
- [0124] 본 발명의 양상은 환자 특이적 악성변이체를 생산하는 네오에피토프의 세트를 동정하는 단계, MHC 결합 강도, MHC 결합 다양성, 예측된 정도의 면역원성, 낮은 자기 반응성 및/또는 T 세포 반응성에 기반하여 악성변이체로부터 백신에 대한 네오에피토프 세트를 선택하는 단계, 네오에피토프의 세트를 암호화하기 위해 mRNA 백신을 제조하는 단계, 및 대상체로부터의 샘플을 분리시키고 2개월 내에 대상체에 mRNA 백신을 투여하는 단계를 포함하는, 개인화된 mRNA 암 백신으로 대상체를 치료하는 방법을 제공한다.
- [0125] 본 발명의 양상은 하기를 포함하는 네오에피토프의 세트를 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드를 갖는 개인화된 mRNA 암 백신에서 사용하기 위한 네오에피토프의 세트를 동정하는 방법을 제공한다: (a) 환자 전사체 및 환자 엑솜을 분석함으로써 환자 특이적 악성변이체를 동정하는 단계, (b) 환자 RNA-seq에서 유전자 또는 전사체-수준 발현의 평가; 변이체 호출 신뢰도 스코어; RNA-seq 대립유전자-특이적 발현; 보존적 대 비보존적 아



미노산 치환; 점돌연변이의 위치(증가된 TCR 맞물림에 대한 센터링 스코어); 점돌연변이의 위치(차별적 HLA 결합에 대한 앵커링 스코어); 자성: 환자 WES 데이터와 100% 미만의 코어 에피토프 상동성; 8량체 내지 11량체에 대한 HLA-A 및 -B IC50; 15량체 내지 20량체에 대한 HLA-DRB1 IC50; 난잡 스코어(즉, 결합하도록 예측된 환자 HLA의 수); 8량체-11량체에 대한 HLA-C IC50; 15량체 내지 20량체에 대한 HLA-DRB3-5 IC50; 15량체 내지 20량체에 대한 HLA-DQB1/A1 IC50; 15량체 내지 20량체에 대한 HLA-DPB1/A1 IC50; 클래스 I 대 클래스 II 비율; 다루지는 환자 HLA-A, -B 및 DRB1 알로타이프의 다양성; 점 돌연변이 대 복잡한 에피토프의 비율(예를 들어, 프레임시프트); 유사-에피토프 HLA 결합 스코어; RNAseq 관독의 존재 및/또는 존재비 중 적어도 3가지에 기반한 네오에피토프에 대한 가중치 값을 이용하여 악성변이체로부터 15 내지 500개의 네오에피토프의 소집단을 선택하는 단계, 및 (c) 가장 높은 가중치 값에 기반하여 소집단으로부터 개인화된 mRNA 암 백신에서 사용하기 위한 네오에피토프의 세트를 선택하는 단계로서, 네오에피토프의 세트는 15 내지 40개의 네오에피토프를 포함하는, 상기 네오에피토프의 세트를 선택하는 단계.

[0126] 본 발명의 양상은 하기 단계들을 포함하는 네오에피토프의 세트를 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드를 갖는 개인화된 mRNA 암 백신에서 사용하기 위한 네오에피토프 세트를 동정하는 방법을 제공한다: (a) RNA-seq 관독의 세트를 생산하기 위해 환자 종양으로부터 RNA-seq 샘플을 생성하는 단계, (b) 모든 RNA-seq 관독으로부터 뉴클레오타이드 서열의 전반적인 계수를 컴파일링(compiling)하는 단계, (c) 종양 샘플과 동일한 조직 유형의 정상 조직의 대응하는 데이터 베이스 사이의 서열 정보를 비교하는 단계, 및 (d) 가장 높은 가중치 값에 기반하여 서브세트로부터 개인화된 mRNA 암 백신에서 사용하기 위한 네오에피토프의 세트를 선택하는 단계로서, 네오에피토프의 세트는 15 내지 40개의 네오에피토프를 포함하는, 상기 네오에피토프의 세트를 선택하는 단계.

[0127] 본 발명의 다양한 실시형태의 상세한 설명을 이하의 설명에 제시한다. 본 발명의 다른 특징, 목적 및 이점은 설명 및 도면으로부터 그리고 청구범위로부터 명확하게 될 것이다.

### 도면의 간단한 설명

[0128] 앞서 언급한 그리고 다른 목적, 특징 및 이점은 유사한 참고 특징이 상이한 관점 전체적으로 언급되는 수반하는 도면에서 도시되는 바와 같이, 본 발명의 특정 실시형태의 다음의 설명으로부터 명확하게 될 것이다. 도면은 본 발명의 다양한 실시형태의 원칙을 설명할 때 놓이는 대신 반드시 일정한 비율로 강조하지는 않는다.

도 1은 연쇄체(concatamer)(SIINFEKL은 서열번호 231임)의 전체 번역초과(full read through)의 확인을 도시한 도면.

도 2는 작제물 둘 다에서 발견된 클래스 I 에피토프에 대한 항원-특이적 반응을 도시한 도면.

도 3은 52량체 작제물에서 배타적으로 발견되는 클래스 I 에피토프에 대한 항원-특이적 반응을 도시한 도면.

도 4는 작제물 둘 다에서 발견되는(좌) 그리고 52량체 작제물에서 배타적으로 발견되는(우) 클래스 II 에피토프에 대한 항원-특이적 반응을 도시한 도면.

도 5는 일부 실시형태가 실행될 수 있는 예시적 컴퓨터 시스템의 블록 다이어그램을 도시한 도면.

도 6은 항원과 STING 투약량 및 항원:STING 비를 달리하여 STING 면역강화제 mRNA와 조합한 52마리의 뮤린 에피토프(에피토프\_4a\_DX\_RX\_perm를 첨가)의 연쇄동일서열을 암호화하는 mRNA로 면역화한 마우스로부터의 항원-특이적 반응을 도시한 도면. 연쇄동일서열 내에서 암호화된 클래스 II 에피토프 RNA 2에 대응하는 펩타이드 서열에 의한 시험관내 재자극에 대한 데이터를 나타낸다.

도 7은 항원과 STING 투약량 및 항원:STING 비를 달리하여 STING 면역강화제 mRNA와 조합한 52마리의 뮤린 에피토프(에피토프\_4a\_DX\_RX\_perm를 첨가)의 연쇄동일서열을 암호화하는 mRNA로 면역화한 마우스로부터의 항원-특이적 반응을 도시한 도면. 연쇄동일서열 내에서 암호화된 클래스 II 에피토프 RNA 3에 대응하는 펩타이드 서열에 의한 시험관내 재자극에 대한 데이터를 나타낸다.

도 8은 항원과 STING 투약량 및 항원:STING 비를 달리하여 STING 면역강화제 mRNA와 조합한 52마리의 뮤린 에피토프(에피토프\_4a\_DX\_RX\_perm를 첨가)의 연쇄동일서열을 암호화하는 mRNA로 면역화한 마우스로부터의 항원-특이적 반응을 도시한 도면. 연쇄동일서열 내에서 암호화된 클래스 I 에피토프 RNA 7에 대응하는 펩타이드 서열에 의한 시험관내 재자극에 대한 데이터를 나타낸다.

도 9는 항원과 STING 투약량 및 항원:STING 비를 달리하여 STING 면역강화제 mRNA와 조합한 52마리의 뮤린 에피토프(에피토프\_4a\_DX\_RX\_perm를 첨가)의 연쇄동일서열을 암호화하는 mRNA로 면역화한 마우스로부터의 항원-특이

적 반응을 도시킨 도면. 연쇄동일서열 내에서 암호화된 클래스 I 에피토프 RNA 13에 대응하는 펩타이드 서열에 의한 **시험관내** 재자극에 대한 데이터를 나타낸다.

도 10은 항원과 STING 투약량 및 항원:STING 비를 달리하여 STING 면역강화제 mRNA와 조합한 52마리의 뮤린 에피토프(에피토프\_4a\_DX\_RX\_perm를 첨가)의 연쇄동일서열을 암호화하는 mRNA로 면역화한 마우스로부터의 항원-특이적 반응을 도시킨 도면. 연쇄동일서열 내에서 암호화된 클래스 I 에피토프 RNA 22에 대응하는 펩타이드 서열에 의한 **시험관내** 재자극에 대한 데이터를 나타낸다.

도 11은 항원과 STING 투약량 및 항원:STING 비를 달리하여 STING 면역강화제 mRNA와 조합한 52마리의 뮤린 에피토프(에피토프\_4a\_DX\_RX\_perm를 첨가)의 연쇄동일서열을 암호화하는 mRNA로 면역화한 마우스로부터의 항원-특이적 반응을 도시킨 도면. 연쇄동일서열 내에서 암호화된 클래스 II 에피토프 RNA 10에 대응하는 펩타이드 서열에 의한 **시험관내** 재자극에 대한 데이터를 나타낸다.

도 12는 표준 아췌반트에 비해, 또는 비제형화된(LNP에서 캡슐화되지 않음) STING 면역강화제 mRNA와 조합한 20마리의 뮤린 에피토프의 연쇄동일서열을 암호화하는 mRNA(RNA 31)로 면역화한 마우스로부터의 항원-특이적 IFN- $\gamma$  T 반응을 나타내는 막대 그래프를 도시킨 도면. 연쇄동일서열 내에서 암호화된 클래스 II 에피토프(RNA 2 및 RNA 3)에 의한 **시험관내** 펩타이드 재자극에 대한 데이터를 나타낸다.

도 13은 표준 아췌반트에 비해, 또는 비제형화된(LNP에서 캡슐화되지 않음) STING 면역강화제 mRNA와 조합한 20마리의 뮤린 에피토프의 연쇄동일서열을 암호화하는 mRNA(RNA 31)로 면역화한 마우스로부터의 항원-특이적 IFN- $\gamma$  T 반응을 나타내는 막대 그래프를 도시킨 도면. 연쇄동일서열 내에서 암호화된 클래스 I 에피토프(RNA 7, RNA 10, 및 RNA 13)에 의한 **시험관내** 펩타이드 재자극에 대한 데이터를 나타낸다.

도 14는 STING 면역강화제 mRNA와 조합한 20마리의 뮤린 에피토프의 연쇄동일서열을 암호화하는 mRNA(RNA 31)로 면역화한 마우스로부터의 항원-특이적 IFN- $\gamma$  T 반응을 나타내되, STING 작제물은 백신과 동시에, 24시간 후에 또는 48시간 후에 투여되는, 막대 그래프를 도시킨 도면. 연쇄동일서열 내에서 암호화된 클래스 II 에피토프(RNA 2 및 RNA 3) 또는 클래스 I 에피토프(RNA 7, RNA 10, RNA 13) 중 하나에 의한 **시험관내** 펩타이드 재자극에 대한 데이터를 나타낸다.

도 15는 COSMIC, 2012 데이터 세트에서 동정된 바와 같은 결장직장암에서의 KRAS 돌연변이를 도시킨 도면.

도 16은 HRAS에 대한 아이소폼-특이적 점 돌연변이 특이성을 도시킨 도면. 각각의 점 돌연변이를 갖는 종양의 총 수를 나타내는 데이터를 COSMIC v52 방출로부터 수집하였다. 각각의 아미노산 치환을 생성하는 단일 염기 돌연변이를 나타낸다. 각각의 암 유형에 대한 각각의 아이소폼에 대한 가장 빈번한 돌연변이는 회색 음영으로 강조한다. H/L: 조혈/림프구 조직. (Prior *et al.* Cancer Res. 2012 May 15; 72(10): 2457-2467).

도 17은 KRAS에 대한 아이소폼-특이적 점 돌연변이 특이성을 도시킨 도면. 각각의 점 돌연변이를 갖는 종양의 총 수를 나타내는 데이터를 COSMIC v52 방출로부터 수집하였다. 각각의 아미노산 치환을 생성하는 단일 염기 돌연변이를 나타낸다. 각각의 암 유형에 대한 각각의 아이소폼에 대한 가장 빈번한 돌연변이는 회색 음영으로 강조한다. H/L: 조혈/림프구 조직. (Prior *et al.* Cancer Res. 2012 May 15; 72(10): 2457-2467).

도 18은 NRAS에 대한 아이소폼-특이적 점 돌연변이 특이성을 도시킨 도면. 각각의 점 돌연변이를 갖는 종양의 총 수를 나타내는 데이터를 COSMIC v52 방출로부터 수집하였다. 각각의 아미노산 치환을 생성하는 단일 염기 돌연변이를 나타낸다. 각각의 암 유형에 대한 각각의 아이소폼에 대한 가장 빈번한 돌연변이는 회색 음영으로 강조한다. H/L: 조혈/림프구 조직. (Prior *et al.* Cancer Res. 2012 May 15; 72(10): 2457-2467).

도 19는 EGFR 차단 내성의 획득 후의 2차 KRAS 돌연변이를 도시킨 도면. (Diaz *et al.* The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectals cancers, Nature 486:537 (2012)).

도 20은 EGFR 차단 후에 2차 KRAS 돌연변이를 도시킨 도면. (Misale *et al.* Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer, Nature 486:532 (2012)).

도 21은 cBioPortal을 이용하여 동정한 바와 같은 결장직장암에서의 NRAS 및 KRAS 돌연변이 빈도를 도시킨 도면.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

본 개시내용의 실시형태는 암 항원을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 RNA(예를 들어, mRNA) 백신을

제공한다. 본 명세서에 제공된 바와 같은 암 RNA 백신은 DNA 백신접종과 관련된 다수의 위험 없이 세포성 및/또는 체액성 면역을 포함하는 균형화된 면역 반응을 유도하기 위해 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 백신은 암 항원을 암호화하는 오픈 리딩 프레임에 갖는 적어도 하나의 RNA(예를 들어, mRNA) 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 백신은 암 항원을 암호화하는 적어도 하나의 오픈 리딩 프레임 및 보편적 II형 T-세포 에피토프를 암호화하는 적어도 하나의 오픈 리딩 프레임에 갖는 적어도 하나의 RNA(예를 들어, mRNA) 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 다른 실시형태에서, 백신은 암 항원을 암호화하는 적어도 하나의 오픈 리딩 프레임 및 적어도 하나의 면역 강화제를 암호화하는 오픈 리딩 프레임(예를 들어, 아쥘란트)을 갖는 적어도 하나의 RNA(예를 들어, mRNA) 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 백신은 암 항원을 암호화하는 오픈 리딩 프레임에 갖는 적어도 하나의 RNA(예를 들어, mRNA) 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, 활성화 종양유전자 돌연변이 펩타이드)를 포함한다.

[0130] mRNA 암 백신을 포함하는, 기능성 RNA 백신을 생산하기 위한 시도를 하였지만, 이들 RNA 백신의 치료 효능은 아직 완전히 확립되지 않았다. 상당히 놀랍게도, 본 발명자들은 상당히 향상된 그리고 향상된 T 세포 반응을 비롯한 많은 면에서 상승된 면역 반응을 초래하는 mRNA 백신을 전달하기 위한 제형의 부류를 발견하였다. 본 발명의 백신은 전통적인 암 백신뿐만 아니라 개인화된 암 백신을 포함한다. 본 발명은, 일부 양상에서, 지질 나노입자 제형이 화학적으로 변형된 그리고 비변형된 mRNA 백신을 포함하는 mRNA 백신의 유효성을 상당히 향상시킨다는 놀라운 발견을 수반한다.

[0131] 본 명세서에 기재된 연구에서 사용되는 지질 나노입자는 동물 모델에서 뿐만 아니라 인간에서 siRNA를 전달하기 위해 이전에 사용되었다. 지질 나노입자 제형의 siRNA 전달과 관련한 관찰을 고려하여, 리포솜과 대조적으로 지질 나노입자가 암 백신에서 유용하다는 사실은 상당히 놀랍다. 지질 나노입자에서 제형화된 siRNA의 치료적 전달은 일시적 IgM 반응과 관련된 바람직하지 않은 염증 반응을 야기하여, 전형적으로 항원 생산의 감소 및 손상된 면역 반응을 야기한다는 것이 관찰되었다. siRNA에 의해 관찰된 발견과 대조적으로, 본 명세서에 기재된 지질 나노입자-mRNA 암 백신 제형은 일시적 IgM 반응보다는 예방적 및 치료적 방법에 충분한 향상된 IgG 수준을 생성한다는 것이 입증된다. 본 발명의 지질 나노입자는 리포솜이 아니다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 리포솜은 코어 내 핵산 페이로드가 있는 지질 이중층 또는 단일층 껍질을 갖는 지질 기반 구조이다.

[0132] 백신 개발에서 표적화된 폴리펩타이드 서열에 대해 목적하는 면역 반응(예를 들어, T-세포 반응)을 유발하는 암 항원의 생성은 도전적 작업으로 남아있다. 본 발명은 이러한 개발과 관련된 장애를 극복하는 기술과 연루된다. 본 발명의 기술을 사용하였지만, 적절한 T 또는 B 세포 암 에피토프를 선택함으로써 그리고 생체내에서 효과적인 전달을 위한 에피토프 또는 항원을 제형화함으로써 요망되는 면역 반응을 맞추는 것이 가능하다. 추가적으로 또는 대안적으로, 면역 반응은 적절한 T 및/또는 B 세포 암 에피토프 또는 항원에 추가로 전달될 하나 이상의 보편적 II형 T-세포 에피토프를 선택함으로써 추가로 증가될 수 있다.

[0133] 추가적으로 또는 대안적으로, mRNA 백신은 활성화 종양유전자 돌연변이 펩타이드(예를 들어, KRAS 돌연변이 펩타이드)를 포함할 수 있다. 사전의 연구는 종양유발성 돌연변이에 특이적인 T 세포를 상승시키는 제한된 능력을 나타내었다. 이 연구 중 대다수는 가장 통상적인 HLA 대립유전자(A2, 백인의 대략 50에서 생김)와 관련하여 행해졌다. 더 최근의 작업은 덜 통상적인 HLA 대립유전자(A11, C8)와 관련하여 점 돌연변이에 대해 특정 T 세포의 생성을 연구하였다. 이들 발견은 암 치료에 대한 상당한 연루를 가진다. 종양유전자 돌연변이는 다수의 암에서 통상적이다. 이들 돌연변이를 표적화하고, 종양을 사멸시키는 데 충분한 T 세포를 생성하는 능력은 암 요법에 대해 넓은 적용 가능성을 가진다. mRNA를 이용하는 항원의 전달은 펩타이드 백신의 전달 이상으로 이러한 상당한 이점을 가진다는 것이 상당히 놀랍다. 따라서, 본 발명은, 일부 양상에서, mRNA의 형태로 생체내에서 전달된 종양유발성 돌연변이를 활성화시키는 것이 암 요법의 유효성을 상당히 향상시킨다는 놀라운 발견을 수반한다.

[0134] HLA 클래스 I 분자는 두 폴리펩타이드 쇄(중쇄 및 경쇄)로 구성된 고도로 다형성의 막관통 당단백질이다. 인간 백혈구 항원, 즉, 인간에서 구조적 적합 복합체는 각각의 개체에 특이적이고, 유전적 특징을 가진다. 클래스 I 중쇄는 3가지 유전자에 의해 암호화된다: HLA-A, HLA-B 및 HLA-C. HLA 클래스 I 분자는 T 림프구에 내인성 항원을 제시함으로써 면역 반응을 확립하는 데 중요한데, 이는 세포독성 T 세포의 종양 세포 제거를 야기하는 면역 반응의 사슬을 개시한다. HLA 클래스 I 항원 생산의 변경된 수준은 악성 종양에서 널리 퍼진 현상이며, 항-종양 T 세포 기능의 상당한 저해를 수반한다. 이는 면역 감시를 피하기 위해 암 세포에 의해 사용되는 주요 메커니즘 중 하나를 나타낸다. HLA 클래스 I 항원의 하향 조절된 수준은 NSCLC 종양(n=65)의 90%에서 검출되었다. HLA의 감소 또는 상실은 췌장 종양 샘플(n=19)의 76%에서 검출되었다. 결장암에서 HLA 클래스 I 항원의 발현은 종양 샘플(n=25)의 96%에서 극적으로 감소되거나 또는 검출 가능하지 않았다.



- [0135] 증가된 증거는 면역 감시를 탈출하기 위해 2가지의 일반적 전략이 종양 세포에 의해 이용된다는 것을 시사한다: 면역선택(불량하게 면역원성인 종양 세포 변이체) 및 면역과괴(immunosubversion)(면역계의 파괴). HLA 클래스 I 항원의 변화와 KRAS 코돈 12 돌연변이의 존재 사이의 상관관계가 입증되었는데, 이는 암 진행에서 HLA 클래스 I 항원에 대한 KRAS 코돈 12 돌연변이의 가능한 유도성 효과를 시사한다. 다수의 빈번한 암 돌연변이는 고친화도(IC50 ≤ 50 nM)로 HLA 클래스 I 대립유전자에 결합하도록 예측되며, 예방적 암 백신접종에 적합할 수 있다.
- [0136] 치료적 mRNA는 종양에 대해 상당히 향상된 면역 반응을 제공하기 위해 단독으로 또는 다른 암 치료제, 예컨대 관문 저해제와 조합하여 전달될 수 있다. 관문 저해제는 면역 반응을 촉진시키는 데 일부 장애를 제거함으로써 활성화 종양유발성 펩타이드를 암호화하는 mRNA의 효과를 향상시킬 수 있고, 따라서 활성화된 T 세포가 종양에 대한 면역 반응을 효율적으로 촉진시키도록 허용한다.
- [0137] 본 명세서에 기재된 mRNA 백신은 몇몇 방법에서 현재의 백신에 대해 우수하다는 것을 발견하였다. 처음에, 지질 나노입자(LNP) 전달은 문헌에 기재된 리포좀 또는 프로타민 기반 접근을 포함하는 다른 제형보다 우수하다. LNP의 사용은 화학적으로 변형된 또는 비변형된 mRNA 백신의 효과적인 전달을 가능하게 한다. 변형된 그리고 비변형된 LNP 제형화된 mRNA 백신은 둘 다 상당한 정도로 통상적인 백신보다 우수하다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 mRNA 백신은 적어도 10배, 20배, 40배, 50배, 100배, 500배 또는 1,000배만큼 통상적인 백신보다 우수하다.
- [0138] mRNA 백신 및 자기-복제성 RNA 백신을 포함하는 기능성 RNA 백신을 생산하기 위한 시도를 하였지만, 이들 RNA 백신의 치료적 효능은 아직 완전히 확립되지 않았다. 상당히 놀랍게도, 본 발명자들은 본 발명의 양상에 따라 상당히 향상된, 그리고 많은 면에서, 향상된 항원 생산 및 중화 능력을 갖는 기능성 항체를 포함하는 상승적, 면역 반응을 초래하는 생체내에서 mRNA 백신을 전달하기 위한 제형의 부류를 발견하였다. 지질 기반 제형의 다른 부류에서 사용되는 mRNA 용량에 비해 상당히 더 낮은 용량의 mRNA가 투여될 때조차 이들 결과는 달성될 수 있다. 본 발명의 제형은 예방적 및 치료적 제제로서 기능성 mRNA 백신의 효능을 확립하기에 충분한 상당히 예상치 못한 생체내 면역 반응을 입증하였다. 추가적으로, 자기-복제성 RNA 백신은 면역원성 반응을 생산하기 위해 세포에 충분한 RNA를 전달하는 바이러스 복제 경로에 의존한다. 본 발명의 제형은 강한 면역 반응을 초래하기 위해 충분한 단백질을 생산하는 데 바이러스 복제를 필요로 하지 않는다. 따라서, 본 발명의 mRNA는 자기-복제성 RNA가 아니며, 바이러스 복제에 필수적인 성분을 포함하지 않는다.
- [0139] 본 발명은, 일부 양상에서, 지질 나노입자(LNP) 제형은 화학적으로 변형된 mRNA 백신 및 비변형된 mRNA 백신을 포함하는, mRNA 백신의 유효성을 상당히 향상시킨다는 놀라운 발견을 수반한다. 더 나아가, 작제물 내에 함유된 에피토프의 총 수와 독립적으로 에피토프에 대한 면역원성은 유사하다는 것을 발견하였다. 52량체 작제물에 함유된 에피토프는 에피토프-특이적 IFN $\gamma$  반응에 의해 측정되는 바와 같은 20량체 작제물에 비교하여 유사한 면역원성을 가진다. 증가된 mRNA 길이가 에피토프의 면역원성에 대해 해로운 효과를 갖지 않는 것으로 입증된 것은 상당히 예상치 못하였다. 20량체 및 52량체에서 암호화된 최종 에피토프(SIINFEKL, 서열번호 231)는 비슷하였고, 이는 또한 연쇄체의 전체 번역초과를 나타낸다. 또한 놀랍게도, 백신이 구성적으로 활성인 면역 강화제와 함께 제형화될 때 클래스 I 에피토프에 대한 항원-특이적 반응이 증가된다는 것을 발견하였다.
- [0140] 본 명세서에 기재된 연구에서 사용되는 LNP는 다양한 동물 모델에서 뿐만 아니라 인간에서 siRNA를 전달하기 위해 이전에 사용하였다. LNP 제형의 siRNA 전달에 의해 이루어진 관찰을 고려하여, LNP가 백신에서 유용하다는 사실은 상당히 놀랍다. LNP에서 제형화된 siRNA의 치료적 전달은 일시적 IgM 반응과 관련된 바람직하지 않은 염증 반응을 야기하여, 전형적으로 항원 생산의 감소 및 손상된 면역 반응을 야기한다는 것을 관찰하였다. siRNA에 의해 관찰된 발견과 대조적으로, 본 발명의 LNP-mRNA 제형은 일시적 IgM 반응보다 예방적 및 치료적 방법에 충분한 향상된 IgG 수준을 생성하는 것으로 본 명세서에서 입증된다.
- [0141] mRNA 암 백신은 펩타이드 기반 또는 DNA 백신에 대한 독특한 치료적 대안을 제공한다. mRNA 암 백신이 세포에 전달될 때, mRNA는 세포내 기작에 의해 폴리펩타이드로 가공되고, 이어서, 종양에 대한 면역 반응을 자극할 수 있는 면역민감성 단편으로 폴리펩타이드를 가공할 수 있다.
- [0142] 일부 실시형태에서, mRNA 암 백신은 전통적인 암 백신을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는, 항-암 치료제와 함께 투여될 수 있다. mRNA 암 백신 및 항-암 치료제는 면역 치료 반응을 훨씬 더 향상시키도록 조합될 수 있다. mRNA 암 백신 및 다른 치료제는 동시에 또는 순차적으로 투여될 수 있다. 다른 치료제가 동시에 투여될 때, 그들은 동일한 또는 별개의 제형으로 투여될 수 있지만, 동시에 투여된다. 다른 치료제는 다른 치료제 및 mRNA 암 백신의 투여가 일시적으로 분리될 때 서로 순차적으로 그리고 mRNA 암 백신과 함께 투여된다. 이들 화합물의 투여 사이의 시간의 분리는 겨우 몇 분 일 수도 있고 또는 더 길게, 예를 들어, 몇 시간, 며칠, 몇 주, 몇 개월일 수도 있다. 다른 치료제는 항암 치료제, 아류반트, 사이토카인, 항체, 항원 등을 포함하지만, 이들로 제한되지



않는다.

- [0143] 본 명세서에 기재된 암 백신은 적어도 하나의 암 항원의 폴리펩타이드 또는 이의 면역원성 단편(예를 들어, 암에 대해 면역 반응을 유도할 수 있는 면역원성 단편)을 암호화하는 오픈 리딩 프레임에 갖는 적어도 하나의 리보핵산(RNA) 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 항원성 펩타이드는 개인화된 암 항원 에피토프 및/또는 재발성 항원일 수 있다. 일부 바람직한 실시형태에서, 백신은 각각의 상기의 혼합물의 다중 에피토프이다. 따라서, 암 백신은 전통적인 또는 개인화된 암 백신 또는 이들의 혼합물일 수 있다. 전통적인 암 백신은 일반적으로 암 또는 종양에서 또는 암 또는 종양의 특정 유형에서 발견되는 것으로 알려진 암 항원을 포함하는 백신이다. 종양 세포에서 또는 종양 세포에 의해 발현된 항원은 "종양 연관 항원"으로서 지칭된다. 특정 종양 연관 항원은 비암성 세포에서 발현될 수 있거나 또는 발현되지 않을 수도 있다. 다수의 종양 돌연변이는 당업계에 공지되어 있다.
- [0144] 놀랍게도 RNA 기반 다중에피토프 암 백신은 개개 에피토프로서 제형화되든 또는 연쇄동일서열로서 제형화되든, MHC 클래스 I 에피토프 및 MHC 클래스 II 에피토프의 조심스러운 균형을 통해 최적의 면역 자극을 생산할 수 있다는 것을 발견하였다. 성분을 둘 다 암호화하는 RNA 백신은 향상된 면역원성을 가진다.
- [0145] 예를 들어, 개인화된 백신은 종양에 특이적인 하나 이상의 공지된 암 항원 또는 네오에피토프 또는 대상체 특이적 에피토프 또는 항원(개인화된 항원으로서 지칭됨)으로서 지칭되는 각각의 대상체에 특이적인 암 항원에 대해 암호화하는 RNA를 포함할 수 있다. "대상체 특이적 암 항원"은 특정 환자의 종양에서 발현되는 것으로 동정된 항원이다. 대상체 특이적 암 항원은 전형적으로 종양 샘플에 일반적으로 존재할 수도 있고 존재하지 않을 수도 있다. 비암성 세포에서 발현되지 않거나 또는 거의 발현되지 않는 또는 비-암성 세포에서의 발현이 암성 세포에서의 발현에 비해 충분히 감소되고 백신접종 시 유도된 면역 반응을 유도한 종양 연관 항원은 네오에피토프로서 지칭된다. 종양 연관 항원과 같은 네오에피토프는 신체에 대해 완전히 이물질이며, 따라서 건강한 조직에 대한 면역 반응을 생성하지 않거나 또는 면역계의 보호 성분에 의해 가리움될 것이다. 일부 실시형태에서, 네오에피토프에 기반한 개인화된 백신은 이러한 백신 제형이 환자의 특정 종양에 대해 특이적으로 최대화되기 때문에 바람직하다. 돌연변이-유래 네오에피토프는 단백질에서 상이한 아미노산을 야기하는 점 돌연변이, 비-유사 돌연변이; C-말단에서 신규한 종양-특이적 서열을 갖는 더 긴 단백질의 번역을 야기하는, 정지 코돈이 변형되거나 또는 결실되는 번역초과 돌연변이; 성숙 mRNA에서 인트론의 봉입을 야기하고 그에 따라 독특한 종양-특이적 단백질 서열을 야기하는 스플라이스 부위 돌연변이; 2 단백질의 접합부(즉, 유전자 융합)에서 종양-특이적 서열을 갖는 키메라 단백질을 생기게 하는 염색체 재배열; 신규한 종양-특이적 단백질 서열을 갖는 새로운 오픈 리딩 프레임을 야기하는 프레임시프트 돌연변이 또는 결실; 및 전좌로부터 생길 수 있다. 따라서, 일부 실시형태에서 mRNA 암 백신은 프레임시프트 돌연변이 및 재조합 또는 본 명세서에 기재된 임의의 다른 돌연변이로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이를 포함하는, 적어도 2종의 암 항원을 포함한다.
- [0146] 개인화된 암 백신을 생성하는 방법은 일반적으로, 예를 들어, 딥(deep) 핵산 또는 단백질 서열분석 기법을 이용하는 돌연변이의 동정, 예를 들어 검증된 펩타이드-MHC 결합 예측 알고리즘의 적용 또는 환자 HLA 대립유전자에 결합할 수 있는 후보 T 세포 에피토프의 세트를 생성하기 위한 다른 분석 기법을 이용하는 네오에피토프의 동정을 수반하며, 종양에 존재하는 돌연변이, 선택된 네오에피토프에 대한 항원-특이적 T 세포의 최적의 입증 또는 후보 네오에피토프가 종양 표면 상의 HLA 단백질에 결합한다는 것의 입증 및 백신의 개발에 기반한다. 본 발명의 mRNA 암 백신은 단일 네오에피토프의 다중 복제물, 단일 유형의 돌연변이, 즉, 점 돌연변이에 기반한 다종의 상이한 네오에피토프, 다양한 돌연변이 유형에 기반한 다종의 상이한 네오에피토프, 네오에피토프 및 다른 항원, 예컨대 종양 연관 항원 또는 회상 항원을 포함할 수 있다.
- [0147] 돌연변이를 동정하기 위한 기법의 예는 동적 대립유전자-특이적 혼성화(DASH), 마이크로플레이트 어레이 사선 겔 전기영동(MADGE), 파이로시퀀싱, 올리고뉴클레오타이드-특이적 결합, TaqMan 시스템뿐만 아니라 다양한 DNA "칩" 기술, 즉, 애피메트릭스(Affymetrix) SNP 칩, 및 침습적 절단에 의한 작은 신호 분자의 생성에 기반한 방법 다음에 질량분석법 또는 고정된 페드락 프로브 및 롤링-서클 증폭을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.
- [0148] 딥 핵산 또는 단백질 서열분석 기법은 당업계에 공지되어 있다. 임의의 유형의 서열 분석이 사용될 수 있다. 핵산 서열분석은 전체 종양 게놈, 종양 엑손(단백질-암호화 DNA), 종양 전사체 또는 엑솜 상에서 수행될 수 있다. 실시간 단일 분자 합성에 의한 서열분석(sequencing-by-synthesis) 기술은 그들이 서열분석 중인 주형에 상보성인 DNA의 발생 가닥에 혼입됨에 따라 형광 뉴클레오타이드의 검출에 의존한다. 다른 빠른 고속대량 서열분석 방법이 또한 존재한다. 단백질 서열분석은 종양 프로테오믹스에서 수행될 수 있다. 추가적으로, 단백질 질량분석법은 종양 세포 상에서 MHC 단백질에 결합된 돌연변이된 펩타이드의 존재를 동정하거나 또는 확인하기 위해 사용될 수 있다. 펩타이드는 종양 세포로부터 또는 종양으로부터 면역침전된 HLA 분자로부터 산 용리될 수 있고, 이

어서, 질량분석법을 이용하여 동정될 수 있다. 서열분석 결과는 공지된 대조군 세트와 또는 환자의 정상 조직 상에서 수행된 서열분석과 비교될 수 있다.

[0149] 따라서, 본 발명은 항원의 네오에피토프를 동정하고/하거나 검출하는 방법에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 대상체에서 종양 특이적 면역 반응을 유도하는 데 유용한 종양 특이적 네오에피토프를 동정하고/하거나 검출하는 방법을 제공한다. 선택적으로 일부 이들 네오에피토프는 야생형 펩타이드보다 더 큰 친화도로 클래스 I HLA 단백질에 결합하고/하거나 항-종양 CD8 T 세포를 활성화시킬 수 있다. 다른 것은 클래스 II에 결합하고 CD4+ T 헬퍼 세포를 활성화시킨다. 클래스 I 항원이 백신에서 하는 중요한 역할은 인식되었지만, 본 명세서에서 클래스 I 및 클래스 II 항원의 균형으로 구성된 백신은 사실상 클래스 I 또는 클래스 II 단독에 기반한 백신보다 더 강한 면역 반응을 생성할 수 있다는 것이 발견되었다.

[0150] MHC 클래스 I의 단백질은 대부분의 종양 세포를 포함하는, 신체의 거의 모든 세포 표면 상에 존재한다. MHC 클래스 I의 단백질은 내인성 단백질로부터 또는 세포 내부에 존재하는 병원균으로부터 보통 유래되는 항원에 의해 부하되고, 이어서, 세포독성 T-림프구(CTL)에 제시된다. T-세포 수용체는 MHC 클래스 I의 분자에 복합체화된 결합 펩타이드를 인식할 수 있다. 각각의 세포독성 T-림프구는 특정 MHC/펩타이드 복합체에 결합할 수 있는 독특한 T-세포 수용체를 발현시킨다.

[0151] 컴퓨터 알고리즘을 이용하여, 잠재적 네오에피토프, 즉, 펩타이드-제시 복합체의 형태로 클래스 I 또는 클래스 II의 MHC 분자에 의해 결합되고, 이어서, 이 형태에서, T-림프구의 T-세포 수용체에 의해 인식되는 펩타이드 서열을 예측할 수 있다. MHC에 결합하는 펩타이드를 동정하는 데 유용한 프로그램의 예는, 예를 들어: 문헌[Lonza Epibase, SYFPEITHI (Rammensee *et al.*, Immunogenetics, 50 (1999), 213-219) 및 HLA\_BIND (Parker *et al.*, J. Immunol., 152 (1994), 163-175)]을 포함한다.

[0152] 일단 추정적 네오에피토프가 선택되면, 그들은 시험관내 및/또는 생체내 검정을 이용하여 추가로 검사될 수 있다. 통상적인 시험관내 실험실 검정, 예컨대 엘리스팟(Elispot) 검정은 알고리즘의 예측에 기반하여 선택된 네오에피토프의 목록을 개선하기 위해 각각의 환자로부터의 단리물과 함께 사용될 수 있다.

[0153] 본 발명의 mRNA 암 백신은 약제학적 조성물을 포함하는 조성물이다. 조성물은 또한 mRNA 암 백신의 선택, 설계, 제조, 제작, 제형화 및/또는 사용을 위한 방법을 포함한다. 또한 본 명세서에 기재된 mRNA 암 백신의 선택, 설계 및/또는 이용을 위한 시스템, 가공, 장치 및 키트가 제공된다.

[0154] 본 발명의 mRNA 백신은 한 가지 이상의 암 항원을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, mRNA 백신은 45가지 이상, 46가지 이상, 47가지 이상, 48가지 이상, 49가지 이상, 50가지 이상, 51가지 이상, 52가지 이상, 53가지 이상, 54가지 이상, 또는 55가지 이상의 항원으로 구성된다. 다른 실시형태에서, mRNA 백신은 3가지 이상, 4가지 이상, 5가지 이상, 6가지 이상, 7가지 이상, 8가지 이상, 또는 9가지 이상의 항원으로 구성된다. 다른 실시형태에서 mRNA 백신은 1000가지 미만, 900가지 미만, 500가지 미만, 100가지 미만, 75가지 미만, 50가지 미만, 40가지 미만, 30가지 미만, 20가지 미만 또는 100가지 미만의 암 항원으로 구성된다. 또 다른 실시형태에서, mRNA 백신은 3-100, 5-100, 10-100, 15-100, 20-100, 25-100, 30-100, 35-100, 40-100, 45-100, 50-100, 55-100, 60-100, 65-100, 70-100, 75-100, 80-100, 90-100, 5-50, 10-50, 15-50, 20-50, 25-50, 30-50, 35-50, 40-50, 45-50, 100-150, 100-200, 100-300, 100-400, 100-500, 50-500, 50-800, 50-1,000 또는 100-1,000가지의 암 항원을 가진다.

[0155] 일부 실시형태에서, mRNA 암 백신 및 백신접종 방법은 특정 돌연변이에 기반한 에피토프 또는 항원(네오에피토프) 및 암-생식계열 유전자에 의해 발현된 것(다중 환자에서 발견된 종양에 공통된 항원)을 포함한다.

[0156] 또한 본 명세서에서 사용되는 항원성 결정소로서 알려진 에피토프는 구체적으로 항체, B 세포 또는 T 세포에 의해 적절한 문맥에서 면역계에 의해 인식되는 항원의 일부이다. 에피토프는 B 세포 에피토프 및 T 세포 에피토프를 포함한다. B-세포 에피토프는 B-세포를 생산하는 특정 항체에 의한 인식에 필요한 펩타이드 서열이다. B 세포 에피토프는 항체에 의해 인식되는 항원의 특정 영역을 지칭한다. 에피토프에 결합하는 항체의 부분은 파라토프(paratope)로 불린다. 에피토프는 구조 및 파라토프와의 상호작용에 기반하여 입체배좌 에피토프 또는 선형 에피토프일 수 있다. 선형 또는 연속적, 에피토프는 단백질의 특정 영역의 1차 아미노산 서열에 의해 정해진다. 항체와 상호작용하는 서열은 단백질 상에서 서로 순차적으로 다음에 위치되고, 에피토프는 보통 단일 펩타이드에 의해 모방될 수 있다. 입체배좌 에피토프는 천연 단백질의 입체배좌 구조에 의해 정해진 에피토프이다. 이들 에피토프는 연속적 또는 불연속적일 수 있으며, 즉, 에피토프의 성분은 폴딩된 천연 단백질 구조에서 서로 밀접하게 된 단백질의 이질적 부분 상에 위치될 수 있다.

- [0157] T-세포 에피토프는 APC 상의 단백질과 함께 특정 T-세포에 의한 인식에 필요한 펩타이드 서열이다. T 세포 에피토프는 그들이 MHC 클래스 II 및 MHC 클래스 I을 포함하는 MHC 분자에 결합하는 경우, 세포내에서 가공되고 APC 의 표면 상에 제시된다. 펩타이드 에피토프는 에피토프를 초래하는 임의의 길이일 수 있다. 일부 실시형태에서, 펩타이드 에피토프는 9 내지 30개의 아미노산이다. 다른 실시형태에서, 길이는 9- 22, 9-29, 9-28, 9-27, 9-26, 9-25, 9-24, 9-23, 9-21, 9-20, 9-19, 9-18, 10-22, 10-21, 10-20, 11-22, 22-21, 11-20, 12-22, 12-21, 12-20, 13-22, 13-21, 13-20, 14-19, 15-18, 또는 16-17개의 아미노산이다.
- [0158] 일부 실시형태에서, 펩타이드 에피토프는 적어도 하나의 MHC 클래스 I 에피토프 및 적어도 하나의 MHC 클래스 II 에피토프를 포함한다. 일부 실시형태에서, 에피토프의 적어도 10%는 MHC 클래스 I 에피토프이다. 일부 실시 형태에서, 에피토프의 적어도 20%는 MHC 클래스 I 에피토프이다. 일부 실시형태에서, 에피토프의 적어도 30%는 MHC 클래스 I 에피토프이다. 일부 실시형태에서, 에피토프의 적어도 40%는 MHC 클래스 I 에피토프이다. 일부 실시 형태에서, 에피토프의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100%는 MHC 클래스 I 에피토프이다. 일부 실시 형태에서, 에피토프의 적어도 10%는 MHC 클래스 II 에피토프이다. 일부 실시형태에서, 에피토프의 적어도 20%는 MHC 클래스 II 에피토프이다. 일부 실시형태에서, 에피토프의 적어도 30%는 MHC 클래스 II 에피토프이다. 일부 실시형태에서, 에피토프의 적어도 40%는 MHC 클래스 II 에피토프이다. 일부 실시형태에서, 에피토프의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100%는 MHC 클래스 II 에피토프이다. 일부 실시형태에서, MHC 클래스 I 에피토프 대 MHC 클래스 II 에피토프의 비는 약 10%:약 90%; 약 20%:약 80%; 약 30%:약 70%; 약 40%:약 60%; 약 50 %:약 50%; 약 60%:약 40%; 약 70%:약 30%; 약 80%: 약 20%; 약 90%: 약 10% MHC 클래스 I: MHC 클래스 II 에피토프로부터 선택된 비이다. 일 실시형태에서, MHC 클래스 I:MHC 클래스 II 에피토프의 비는 3:1이다. 일부 실시 형태에서, MHC 클래스 II 에피토프 대 MHC 클래스 I 에피토프의 비는 약 10%:약 90%; 약 20%:약 80%; 약 30%: 약 70%; 약 40%:약 60%; 약 50%:약 50%; 약 60%:약 40%; 약 70%:약 30%; 약 80%: 약 20%; 약 90%: 약 10% MHC 클래스 II:MHC 클래스 I 에피토프로부터 선택된 비이다. 일 실시형태에서, MHC 클래스 II:MHC 클래스 I 에피토프의 비는 1:3이다. 일부 실시형태에서, 암 백신의 펩타이드 에피토프 중 적어도 하나는 B 세포 에피토프이다. 일부 실시형태에서, 암 백신의 T 세포 에피토프는 8 내지 11개의 아미노산을 포함한다. 일부 실시형태에서, 암 백신의 B 세포 에피토프는 13 내지 17개의 아미노산을 포함한다.
- [0159] 다른 양상에서, 본 발명의 암 백신은 하나 이상의 배치된 보편적 II형 T-세포 에피토프와 함께 배열된 다중 펩타이드 에피토프 항원을 암호화하는 mRNA 백신을 포함한다. 보편적 II형 T-세포 에피토프는 ILMQYIKANSKFIGI(파 상풍 독소; 서열번호 226), FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE(파상풍 독소; 서열번호 227), QYIKANSKFIGITE(파상풍 독소; 서열번호 228) QSIALSSLMVAQAIP(디프테리아 독소; 서열번호 229) 및 AKFVAAWTLKAAA(pan-DR 에피토프(PADRE); 서열번호 230)를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 일부 실시형태에서, mRNA 백신은 동일한 보편적 II형 T-세포 에피토프를 포함한다. 다른 실시형태에서, mRNA 백신은 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 또는 20개의 상 이한 보편적 II형 T-세포 에피토프를 포함한다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 보편적 II형 T-세포 에피토프(들)는 모든 암 항원 사이에 배치된다. 다른 실시형태에서, 하나 이상의 보편적 II형 T-세포 에피토프(들)는 모 든 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 또는 100개의 암 항원 사이에 배치된다.
- [0160] 본 발명의 암 백신은, 일부 양상에서 에피토프 사이의 단일 뉴클레오타이드 스페이서와 함께 배열되거나 또는 에피토프 사이에 스페이서 없이 서로에 대해 직접적으로 배열된 다중 펩타이드 에피토프 항원을 암호화하는 mRNA 백신을 포함한다. 다중 에피토프 항원은 MHC 클래스 I 에피토프와 MHC 클래스 II 에피토프의 혼합물을 포 함한다. 예를 들어, 다중 펩타이드 에피토프 항원은 하기 구조를 갖는 폴리펩타이드일 수 있으며:
- [0161] (X-G-X)<sub>1-10</sub> (G-Y-G-Y)<sub>1-10</sub>(G-X-G-X)<sub>0-10</sub>(G-Y-G-Y)<sub>0-10</sub>, (X-G)<sub>1-10</sub> (G-Y)<sub>1-10</sub>(G-X)<sub>0-10</sub>(G-Y)<sub>0-10</sub>, (X-G-X-G-X)<sub>1-10</sub> (G-Y-G-Y)<sub>1-10</sub>(X-G-X)<sub>0-10</sub>(G-Y-G-Y)<sub>0-10</sub>, (X-G-X)<sub>1-10</sub> (G-Y-G-Y-G-Y)<sub>1-10</sub>(X-G-X)<sub>0-10</sub>(G-Y-G-Y)<sub>0-10</sub>, (X-G-X-G-X-G-X)<sub>1-10</sub> (G-Y-G-Y)<sub>1-10</sub>(X-G-X)<sub>0-10</sub>(G-Y-G-Y)<sub>0-10</sub>, (X-G-X)<sub>1-10</sub> (G-Y-G-Y-G-Y-G-Y)<sub>1-10</sub>(X-G-X)<sub>0-10</sub>(G-Y-G-Y)<sub>0-10</sub>, (X)<sub>1-10</sub> (Y)<sub>1-10</sub> (X)<sub>0-10</sub>(Y)<sub>0-10</sub>, (Y)<sub>1-10</sub> (X)<sub>1-10</sub> (Y)<sub>0-10</sub>(X)<sub>0-10</sub>, (XX)<sub>1-10</sub> (Y)<sub>1-10</sub>(X)<sub>0-10</sub>(Y)<sub>0-10</sub>, (YY)<sub>1-10</sub>(XX)<sub>1-10</sub> (Y)<sub>0-10</sub> (X)<sub>0-10</sub>, (X)<sub>1-10</sub> (YY)<sub>1-10</sub>(X)<sub>0-10</sub>(Y)<sub>0-10</sub>, (XXX)<sub>1-10</sub> (YYY)<sub>1-10</sub>(XX)<sub>0-10</sub>(YY)<sub>0-10</sub>, (YYY)<sub>1-10</sub>(XXX)<sub>1-10</sub> (YY)<sub>0-10</sub>(XX)<sub>0-10</sub>, (XY)<sub>1-10</sub> (Y)<sub>1-10</sub>(X)<sub>1-10</sub>(Y)<sub>1-10</sub>, (YX)<sub>1-10</sub> (Y)<sub>1-10</sub>(X)<sub>1-10</sub>(Y)<sub>1-10</sub>(Y)<sub>1-10</sub>, (Y-G-Y)<sub>1-10</sub> (G-X-G-X)<sub>1-10</sub>(G-Y-G-Y)<sub>0-10</sub>(G-X-G-X)<sub>0-10</sub>, (Y-G)<sub>1-10</sub> (G-X)<sub>1-10</sub>(G-Y)<sub>0-10</sub>(G-X)<sub>0-10</sub>, (Y-G-Y-G-Y)<sub>1-10</sub> (G-X-G-X)<sub>1-10</sub>(Y-G-Y)<sub>0-10</sub>(G-X-G-X)<sub>0-10</sub>, (Y-G-Y)<sub>1-10</sub> (G-X-G-X-G-X)<sub>1-10</sub>(Y-G-Y)<sub>0-10</sub>(G-X-G-X)<sub>0-10</sub>, (Y-G-Y-G-Y-G-Y)<sub>1-10</sub> (G-X-G-X)<sub>1-10</sub>(Y-G-Y)<sub>0-10</sub>(G-X-G-X)<sub>0-10</sub>, (Y-G-Y)<sub>1-10</sub> (G-X-G-X-G-X-G-X)<sub>1-10</sub>(Y-G-Y)<sub>0-10</sub>(G-X-G-X)<sub>0-10</sub>, (XY)<sub>1-10</sub> (YX)<sub>1-10</sub> (XY)<sub>0-10</sub>(YX)<sub>0-10</sub>, (YX)<sub>1-10</sub> (XY)<sub>1-10</sub> (Y)<sub>0-10</sub>(X)<sub>0-10</sub>, (YY)<sub>1-10</sub> (X)<sub>1-10</sub>(Y)<sub>0-</sub>

$_{10}(X)_{0-10}, (XY)_{1-10}(XY)_{1-10} (X)_{0-10} (X)_{0-10}, (Y)_{1-10} (YX)_{1-10}(X)_{0-10}(Y)_{0-10}, (XYX)_{1-10} (YXX)_{1-10}(YX)_{0-10}(YY)_{0-10},$  또는  $(YYX)_{1-10}(XXY)_{1-10} (YX)_{0-10}(XY)_{0-10},$

[0162] X는 길이가 10 내지 40개인 아미노산의 MHC 클래스 I 에피토프이고, Y는 길이가 10 내지 40개인 아미노산의 MHC 클래스 II 에피토프이며, G는 글리신이다.

[0163] 본 발명의 암 백신은, 일부 양상에서, SNP 돌연변이의 각각의 측면 상에 측점 아미노산을 갖는 중심에 위치한 단일 뉴클레오타이드 다형(SNP) 돌연변이로 배열된 다중 펩타이드 에피토프 항원을 암호화하는 mRNA 백신을 포함한다. 일부 실시형태에서, 중심에 위치한 SNP 돌연변이의 각각의 측면 상의 측점 아미노산의 수는 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 24, 26, 28 또는 30이다. 일 실시형태에서, 암 백신의 에피토프는 2개의 클래스 I 서열에 의해 측정된 SNP를 포함하며, 각각의 서열은 7개의 아미노산을 포함한다. 다른 실시형태에서, 암 백신의 에피토프는 2개의 클래스 II 서열에 의해 측정된 SNP를 포함하며, 각각의 서열은 10개의 아미노산을 포함한다. 일부 실시형태에서, 에피토프는 중심에 위치한 SNP를 포함하고, 클래스 I 서열 둘 다, 클래스 II 서열 둘 다, 또는 하나의 클래스 I과 하나의 클래스 II 서열에 측정될 수 있다.

[0164] **면역 강화제 mRNA**

[0165] 본 개시내용의 일 양상은 관심 대상의 암 항원 중 하나 이상에 대해 면역 반응을 자극하거나 또는 향상시키는 폴리펩타이드를 암호화하는 mRNA에 관한 것이다. 관심 대상의 암 항원(들)에 대해 면역 반응을 향상시키는 이러한 mRNA는 화학적으로 변형된 mRNA(mmRNA)를 포함하는 면역 강화제 mRNA 작제물 또는 면역 강화제 mRNA로서 본 명세서에서 지칭된다. 본 개시내용의 면역 강화제는 대상체에서 관심 대상의 항원에 대해 면역 반응을 향상시킨다. 향상된 면역 반응은 세포성 반응, 체액성 반응 또는 둘 다를 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 "세포의" 면역 반응은 T 세포를 수반하거나 또는 이에 의해 매개되는 면역 반응을 포함하는 것으로 의도되는 반면, "체액성" 면역 반응은 B 세포를 수반하거나 또는 이에 의해 매개되는 면역 반응을 포함하는 것으로 의도된다. 면역 강화제는, 예를 들어, 하기에 의해 면역 반응을 향상시킬 수 있다,

[0166] (i) I형 인터페론 경로 신호전달을 자극하는 것;

[0167] (ii) NFkB 경로 신호전달을 자극하는 것;

[0168] (iii) 염증 반응을 자극하는 것;

[0169] (iv) 사이토카인 생산을 자극하는 것; 또는

[0170] (v) 수지상 세포 발생, 활성화 또는 이동을 자극하는 것; 및

[0171] (vi) (i) 내지 (vi) 중 임의의 조합.

[0172] 본 명세서에서 사용되는, "I형 인터페론 경로 신호전달을 자극하는 것"은 I형 인터페론 신호전달 경로의 하나 이상의 성분의 활성화(예를 들어, 이러한 성분의 인산화, 이량체화 등을 변형시킴으로써, 경로를 활성화함), 인터페론-민감 반응 요소(ISRE)로부터 전사를 자극하거나/하거나 I형 인터페론(예를 들어, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\epsilon$ , IFN- $\kappa$  및/또는 IFN- $\omega$ )의 생산 또는 분비를 자극 하는 것을 포함하는 것으로 의도된다. 본 명세서에 사용되는 바와 같은, "NFkB 경로 신호전달을 자극하는 것"은 NFkB 신호전달 경로의 하나 이상의 성분의 활성화(예를 들어, 이러한 성분의 인산화, 이량체화 등을 변형시킴으로써, 경로를 활성화함), NFkB 부위로부터 전사를 자극 하고/하거나 발현이 NFkB에 의해 조절되는 유전자 산물의 생산을 자극하는 것을 포함하는 것으로 의도된다. 본 명세서에 사용되는 바와 같은, "염증 반응을 자극하는 것"은 염증 사이토카인의 생산을 자극하는 것을 포함하는 것으로 의도된다(I형 인터페론, IL-6 및/또는 TNF $\alpha$ 를 포함하지만, 이들로 제한되지 않음). 본 명세서에 사용되는 바와 같은, "수지상 세포 발생, 활성화 또는 이동을 자극하는 것"은 수지상 세포 성숙, 증식 및/또는 기능성 활성을 직접적으로 또는 간접적으로 자극하는 것을 포함하는 것으로 의도된다.

[0173] 일부 양상에서, 본 개시내용은, 예를 들어, 대상체에서 적응 면역을 유도함으로써(예를 들어, I형 인터페론 생산을 자극함으로써), 염증 반응을 자극함으로써, NFkB 신호전달을 자극함으로써 그리고/또는 수지상 세포(DC) 발생, 활성화 또는 이동을 자극함으로써, 면역 반응의 자극 또는 향상이 필요한 대상체에서 면역 반응을 자극하거나 또는 향상시키는(예를 들어, 대상체에서 면역 반응을 강화하는) 폴리펩타이드를 암호화하는 mRNA를 제공한다. 일부 양상에서, 면역 강화제 mRNA가 필요한 대상체에 대한 이의 투여는 대상체에서 세포성 면역(예를 들어, T 세포-매개 면역), 체액성 면역(예를 들어, B 세포-매개 면역) 또는 세포성과 체액성 면역을 둘 다 향상시킨다. 일부 양상에서, 면역 강화제 mRNA의 투여는 사이토카인 생산(예를 들어, 염증 사이토카인 생산)을 자극



하거나, 암 항원-특이적 CD8<sup>+</sup> 효과기 세포 반응을 자극하거나, 항원-특이적 CD4<sup>+</sup> 헬퍼 세포 반응을 자극하거나, 효과기 기억 CD62L<sup>lo</sup> T 세포 집단을 증가시키거나, B 세포 활성을 자극하거나 또는 항원-특이적 항체 생산(앞서 언급한 반응의 조합을 포함)을 자극한다. 일부 양상에서, 면역 강화제 mRNA의 투여는 사이토카인 생산(예를 들어, 염증 사이토카인 생산)을 자극하고, 항원-특이적 CD8<sup>+</sup> 효과기 세포 반응을 자극한다. 일부 양상에서, 면역 강화제 mRNA의 투여는 사이토카인 생산(예를 들어, 염증 사이토카인 생산)을 자극하고, 항원-특이적 CD4<sup>+</sup> 헬퍼 세포 반응을 자극한다. 일부 양상에서, 면역 강화제 mRNA의 투여는 사이토카인 생산(예를 들어, 염증 사이토카인 생산)을 자극하고, B 세포 활성을 자극하거나 또는 항원-특이적 항체 생산을 자극한다.

[0174] 일 실시형태에서, 면역 강화제는 암 항원-특이적 CD8<sup>+</sup> 효과기 세포 반응(세포성 면역)을 증가시킨다. 예를 들어, 면역 강화제는 CD8<sup>+</sup> T 세포 증식 및 CD8<sup>+</sup> T 세포 사이토카인 생산을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는, 항원-특이적 CD8<sup>+</sup> 효과기 세포 활성의 하나 이상의 지표를 증가시킬 수 있다. 예를 들어, 일 실시형태에서, 면역 강화제는 항원-특이적 CD8<sup>+</sup> T 세포에 의해 IFN- $\gamma$ , TNF  $\alpha$  및/또는 IL-2의 생산을 증가시킨다. 다양한 실시형태에서, 면역 강화제는 (면역 강화제의 부재하의 CD8<sup>+</sup> T 세포 사이토카인 생산에 비해) 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 15% 또는 적어도 20% 또는 적어도 25% 또는 적어도 30% 또는 적어도 35% 또는 적어도 40% 또는 적어도 45% 또는 적어도 50%만큼 항원에 반응한 CD8<sup>+</sup> T 세포 사이토카인 생산(예를 들어, IFN- $\gamma$ , TNF  $\alpha$  및/또는 IL-2 생산)을 증가시킬 수 있다. 예를 들어, 치료된 대상체로부터 얻은 T 세포는 시험관내에서 암 항원에 의해 자극될 수 있고, CD8<sup>+</sup> T 세포 사이토카인 생산은 시험관내에서 평가될 수 있다. CD8<sup>+</sup> T 세포 사이토카인 생산은 사이토카인 생산의 분비된 수준의 측정(예를 들어, ELISA 또는 상청액 중의 사이토카인의 양을 결정하기 위해 당업계에 공지된 다른 적합한 방법에 의해) 및/또는 사이토카인에 대한 세포내 염색(ICS)에 양성인 CD8<sup>+</sup> T 세포의 백분율의 결정을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 당업계에 공지된 표준 방법에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, IFN- $\gamma$ , TNF  $\alpha$  및/또는 IL-2의 발현을 위한 CD8<sup>+</sup> T 세포의 세포내 염색(ICS)은 당업계에 공지된 방법(예를 들어, 실시예 참조)에 의해 수행될 수 있다. 일 실시형태에서, 면역 강화제는 (면역 강화제의 부재하의 사이토카인(들)에 대한 ICS에 의해 양성인 CD8<sup>+</sup> T 세포의 백분율에 비해) 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 15% 또는 적어도 20% 또는 적어도 25% 또는 적어도 30% 또는 적어도 35% 또는 적어도 40% 또는 적어도 45% 또는 적어도 50%만큼 항원에 반응한 하나 이상의 사이토카인(예를 들어, IFN- $\gamma$ , TNF  $\alpha$  및/또는 IL-2)에 대해 ICS에 의해 양성인 CD8<sup>+</sup> T 세포 백분율을 증가시킨다.

[0175] 또 다른 실시형태에서, 면역 강화제는 면역 강화제의 부재하의 CD8<sup>+</sup> T 세포의 백분율에 비해, 총 T 세포 집단(예를 들어, 비장 T 세포 및/또는 PBMC) 중에서 CD8<sup>+</sup> T 세포의 백분율을 증가시킨다. 예를 들어, 면역 강화제는 면역 강화제의 부재하의 CD8<sup>+</sup> T 세포의 백분율에 비해, 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 15% 또는 적어도 20% 또는 적어도 25% 또는 적어도 30% 또는 적어도 35% 또는 적어도 40% 또는 적어도 45% 또는 적어도 50%만큼 총 T 세포 집단 중의 CD8<sup>+</sup> T 세포의 백분율을 증가시킬 수 있다. 총 T 세포 집단 중의 CD8<sup>+</sup> T 세포의 총 백분율은 형광 활성화 세포 분류(FACS) 또는 자기 활성화 세포 분류(MACS)를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 당업계에 공지된 표준 방법에 의해 결정될 수 있다.

[0176] 다른 실시형태에서, 면역 강화제는 면역 강화제의 부재하의 종양 용적에 비해 면역 강화제의 존재하의 생체내 종양 용적의 감소에 의해 결정하여, 종양-특이적 면역 세포 반응을 증가시킨다. 예를 들어, 면역 강화제는 면역 강화제의 부재하의 종양 용적에 비해 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 15% 또는 적어도 20% 또는 적어도 25% 또는 적어도 30% 또는 적어도 35% 또는 적어도 40% 또는 적어도 45% 또는 적어도 50%만큼 종양 용적을 감소시킬 수 있다. 종양 용적의 측정은 당업계에 잘 확립된 방법에 의해 결정될 수 있다.

[0177] 다른 실시형태에서, 면역 강화제는 면역 강화제의 부재하의 항원-특이적 항체 생산에 비해, 예를 들어 항원-특이적 항체 생산의 양을 증가시킴으로써 B 세포 활성(체액성 면역 반응)을 증가시킨다. 예를 들어, 면역 강화제는 면역 강화제의 부재하의 항원-특이적 항체 생산에 비해 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 15% 또는 적어도 20% 또는 적어도 25% 또는 적어도 30% 또는 적어도 35% 또는 적어도 40% 또는 적어도 45% 또는 적어도 50%만큼 항원-특이적 항체 생산을 증가시킬 수 있다. 일 실시형태에서, 항원-특이적 IgG 생산이 평가된다. 항원-특이적 항체 생산은 샘플(예를 들어, 혈청 샘플)에서 항원-특이적 항체(예를 들어, IgG)의 수준을 측정하는 ELISA, RIA 등을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는, 당업계에 잘 확립된 방법에 의해 평가될 수 있다.

- [0178] 다른 실시형태에서, 면역 강화제는 효과기 기억 CD62L<sup>lo</sup> T 세포 집단을 증가시킨다. 예를 들어, 면역 강화제는 CD8+ T 세포 중에서 CD62L<sup>lo</sup> T 세포의 총 %를 증가시킬 수 있다. 다른 기능 중에서, 효과기 기억 CD62L<sup>lo</sup> T 세포 집단은 림프구 수송의 중요한 기능을 갖는 것으로 나타났다(예를 들어, 문헌[Schenkel, J.M. and Masopust, D. (2014) *Immunity* 41:886-897] 참조). 다양한 실시형태에서, 면역 강화제는 (면역 강화제의 부재하의 CD8+ T 세포 중의 CD62L<sup>lo</sup> T 세포의 총 백분율에 비해) 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 15% 또는 적어도 20% 또는 적어도 25% 또는 적어도 30% 또는 적어도 35% 또는 적어도 40% 또는 적어도 45% 또는 적어도 50%만큼 항원에 반응한 CD8+ T 세포 중의 효과기 기억 CD62L<sup>lo</sup> T 세포의 총 백분율을 증가시킬 수 있다. CD8+ T 세포 중의 효과기 기억 CD62L<sup>lo</sup> T 세포의 총 백분율은 형광 활성화 세포 분류(FACS) 또는 자기 활성화 세포 분류(MACS)를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 당업계에 공지된 표준 방법에 의해 결정될 수 있다.
- [0179] 암 항원에 대해 면역 반응을 향상시키는 면역 강화제 mRNA 작제물의 능력은 당업계에 공지된 마우스 모델 시스템에서 평가될 수 있다. 일 실시형태에서, 면역 적격 마우스 모델 시스템이 사용된다. 일 실시형태에서, 마우스 모델 시스템은 (예를 들어, 암 항원에 대한 항원-특이적 CD8+ T 세포 반응, 예컨대 실시예에 기재한 것을 평가하기 위해) C57/B16 마우스를 포함한다. 다른 실시형태에서, 마우스 모델 시스템은 (예를 들어, B 세포 반응, 예컨대 항원-특이적 항체 반응을 평가하기 위해) BalbC 마우스 또는 CD1 마우스를 포함한다.
- [0180] 일 실시형태에서, 본 개시내용의 면역 강화제 폴리펩타이드는 적어도 하나의 Toll-유사 수용체(TLR) 하류에서 작용하여 면역 반응을 향상시킨다. 따라서, 일 실시형태에서, 면역 강화제는 TLR이 아니지만, 수용체 그 자체로부터 하류의 TLR 신호전달 경로 내의 분자이다.
- [0181] 일 실시형태에서, 면역 강화제를 암호화하는 본 개시내용의 mRNA는 하나 이상의 변형된 핵염기를 포함할 수 있다. 적합한 변형을 이하에 추가로 논의한다.
- [0182] 일 실시형태에서, 면역 강화제를 암호화하는 본 개시내용의 mRNA는 지질 나노입자로 제형화된다. 일 실시형태에서, 지질 나노입자는 암 항원을 암호화하는 mRNA를 추가로 포함한다. 일 실시형태에서, 지질 나노입자는 대상체에서 암 항원에 대한 면역 반응을 향상시키기 위해 대상체에게 투여된다. 적합한 나노입자 및 사용 방법을 이하에 추가로 논의한다.
- [0183] *I형 인터페론을 자극하는 면역 강화제 mRNA*
- [0184] 일부 양상에서, 본 개시내용은 I형 인터페론 경로 신호전달을 자극하거나 또는 향상시켜, I형 인터페론(IFN) 생산을 자극하거나 또는 향상시킴으로써 관심 대상의 항원에 대한 면역 반응을 자극하거나 또는 향상시키는 폴리펩타이드를 암호화하는 면역 강화제 mRNA를 제공한다. 항-종양 또는 항-미생물 적응 면역의 성공적인 유도가 I형 IFN 신호전달을 필요로 한다는 것을 확립하였다(예를 들어, 문헌[Fuertes, M.B. *et al.* (2013) *Trends Immunol.* 34:67-73] 참조). I형 IFN(IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\epsilon$ , IFN- $\kappa$  및 IFN- $\omega$ 를 포함함)의 생산은 미생물 감염, 예컨대 바이러스 감염의 청소에서 어떤 역할을 한다. 또한 숙주 세포 DNA(예를 들어, 손상된 또는 사멸된 세포로부터 유래)가 I형 인터페론 생산을 유도할 수 있다는 것과 I형 IFN 신호전달 경로가 적응 항-종양 면역의 발생에서 어떤 역할을 한다는 것이 인식되었다. 그러나, 다수의 병원균 및 암세포는 I형 인터페론 반응을 감소시키거나 또는 저해하는 메커니즘을 진화시켰다. 따라서, 대상체에 대한 본 개시내용의 면역 강화제 mRNA를 생산함으로써 I형 IFN 신호전달 경로의 활성화가 필요한 대상체에서 이의 활성화(자극 및/또는 향상을 포함)는 암 및 병원균 감염의 치료를 포함하는 매우 다양한 임상 상황에서 뿐만 아니라 보호 면역을 제공하는 백신 반응을 강화함에 있어서 대상체에서 면역 반응을 자극하거나 또는 향상시킨다.
- [0185] I형 인터페론(IFN)은 전형적으로 바이러스 감염 시 다중 상이한 세포 유형에서 빠르게 생산되는 전염증 사이토카인이고, 매우 다양한 효과를 갖는 것으로 알려져 있다. 생체내 I형 IFN 생산의 정규 결과는 항미생물 세포 프로그램의 활성화 및 선천성 및 적응 면역 반응의 발생이다. I형 IFN은 감염제, 특히 바이러스 병원균의 확산을 제한하는 감염된 그리고 이웃하는 세포에서 세포-고유의 항미생물 상태를 유도한다. I형 IFN은 또한 항원 제시 및 자연 살해 세포 기능을 촉진하는 선천성 면역 세포 활성화(예를 들어, 수지상 세포의 성숙)를 조절한다. I형 IFN은 또한 고친화도 항원-특이적 T 및 B 세포 반응 및 면역학적 기억의 발생을 촉진시킨다(Ivashkiv and Donlin (2014) *Nat Rev Immunol* 14(1):36-49).
- [0186] I형 IFN은 수지상 세포(DC)를 활성화시키며, 자가분비 신호전달을 통해 그들의 T 세포 자극 능력을 촉진시킨다(Montoya *et al.*, (2002) *Blood* 99:3263-3271). I형 IFN 노출은 케모카인 수용체 및 접착 분자의 발현(예를 들어

어, 배수 림프절로의 DC 이동을 촉진시킴), 공자극 분자, 및 MHC 클래스 I 및 클래스 II 항원 제시의 증가를 통해 DC의 성숙을 용이하게 한다. I형 IFN 노출 후 성숙하는 DC는 보호 T 세포 반응을 효과적으로 촉진시킨다(Wijesundara *et al.*, (2014) *Front Immunol* 29(412) 및 그의 참고문헌).

- [0187] I형 IFN은 T 세포 수용체 신호전달에 비해 I형 IFN 신호전달의 시기에 대체로 의존하는 T 세포 활성화, 증식, 분화 및 생존을 촉진시키거나 또는 저해할 수 있다(Crouse *et al.*, (2015) *Nat Rev Immunol* 15:231-242). 초기의 연구는 MHC-I 발현은 최적의 T 세포 자극, 분화, 확장 및 세포용해 활성화에 대한 필요조건인 다중 세포 유형에서 I형 IFN에 대한 반응에서 상향조절된다는 것을 나타내었다(Lindahl *et al.*, (1976), *J Infect Dis* 133(Suppl):A66-A68; Lindahl *et al.*, (1976) *Proc Natl Acad Sci USA* 17:1284-1287). I형 IFN은 CD8 T 세포 상에서 강한 공자극 효과를 발휘하여, CD8 T 세포 증식 및 분화를 향상시킨다(Curtsinger *et al.*, (2005) *J Immunol* 174:4465-4469; Kolumam *et al.*, (2005) *J Exp Med* 202:637-650).
- [0188] T 세포에 대한 효과와 유사하게, I형 IFN 신호전달은 시기 및 노출량에 따라서 B 세포 반응에 대해 긍정적 효과와 부정적 효과를 둘 다 가진다(Braun *et al.*, (2002) *Int Immunol* 14(4):411-419; Lin *et al.*, (1998) 187(1):79-87). 미숙 B 세포의 생존 및 성숙은 I형 IFN 신호전달에 의해 저해될 수 있다. 미숙 B 세포와 대조적으로, I형 IFN 노출은 바이러스 감염 후 또는 실험 면역화 후 B 세포 활성화, 항체 생산 및 동형전환을 촉진시킨 것으로 나타났다(Le Bon *et al.*, (2006) *J Immunol* 176:4:2074-2078; Swanson *et al.*, (2010) *J Exp Med* 207:1485-1500).
- [0189] STING, 인터페론 조절 인자(Interferon Regulatory Factor), 예컨대 IRF1, IRF3, IRF5, IRF7, IRF8 및 IRF9, TBK1, IKKi, MyD88 및 TRAM을 포함하는 I형 IFN 경로 신호전달에 수반된 다수의 성분이 확립되었다. I형 IFN 경로 신호전달에 연루된 추가적인 성분은 TRAF3, TRAF6, IRAK-1, IRAK-4, TRIF, IPS-1, TLR-3, TLR-4, TLR-7, TLR-8, TLR-9, RIG-1, DAI 및 IFI16을 포함한다.
- [0190] 따라서, 일 실시형태에서, 면역 강화제 mRNA는 I형 IFN 경로 신호전달에 연루된 임의의 앞서 언급한 성분을 암호화한다.
- [0191] STING을 암호화하는 면역 강화제 mRNA
- [0192] 본 개시내용은 면역 강화제로서 STING의 구성적으로 활성인 형태를 포함하는 STING을 암호화하는 mRNA(mRNA를 포함)를 포함한다. STING(인터페론 유전자의 자극제(STimulator of INterferon Gene); 또한 막관통 단백질 173(TMEM173), IRF3 활성화의 매개체(MITA), 메티오닌-프롤린-타이로신-세린(MPYS), 및 ER IFN 자극제(ERIS)로서 알려짐)는 I형 IFN 및 전염증 사이토카인을 포함하는 면역 반응 유전자의 전사를 제어하는 신호전달 분자로서 작용하는 379개 아미노산의, 소포체(ER) 체류 막관통 단백질이다(Ishikawa & Barber, (2008) *Nature* 455:647-678; Ishikawa *et al.*, (2009) *Nature* 461:788-792; Barber (2010) *Nat Rev Immunol* 15(12):760-770).
- [0193] STING은 TBK1/IRF3/I형 IFN 신호전달 축에 대한 DNA의 사이토졸 검출을 연결하는 신호전달 어댑터로서 작용한다. STING의 신호전달 어댑터 작용은 환식 다이뉴클레오타이드(cyclic dinucleotide: CDN)의 직접적인 감지를 통해 활성화된다. CDN의 예는 환식 다이-GMP(구아노신 5'-모노포스페이트), 환식 다이-AMP(아데노신 5'-모노포스페이트) 및 환식 GMP-AMP(cGAMP)를 포함한다. 편재한 박테리아 2차 전령을 처음에 특성 규명하고, CDN은 이제 STING과의 직접적인 상호작용을 통해 TBK1/IRF3/I형 IFN 신호전달 축을 활성화시키는 병원균-연관 분자 패턴 분자(PAMP)의 부류를 구성하는 것으로 알려져 있다. STING은 박테리아로부터 그리고/또는 숙주 단백질 환식 GMP-AMP 신타제(cGAS)로부터 유래된 CDN을 포함하는 세포의 사이토졸에서 비정상 DNA 중 및/또는 CDN을 감지할 수 있다. cGAS 단백질은 사이토졸에서 DNA의 검출에 반응하여 cGAMP를 생산하는 DNA 센서이다(Burdette *et al.*, (2011) *Nature* 478:515-518; Sun *et al.*, (2013) *Science* 339:786-791; Diner *et al.*, (2013) *Cell Rep* 3:1355-1361; Ablasser *et al.*, (2013) *Nature* 498:380-384).
- [0194] CDN에 대한 결합 시, STING는 이량체화하며 TANK-결합 키나제 1(TBK1)와의 복합체 형성을 촉진시키는 입체배화 변화를 겪는다(Ouyang *et al.*, (2012) *Immunity* 36(6):1073-1086). 이 복합체는 핵주위 골지로 전위되어, TBK1의 엔도리소좀 구획에 대한 전달을 초래하는데, 여기서 이는 IRF3 및 NF- $\kappa$ B 전사 인자를 인산화시킨다(Zhong *et al.*, (2008) *Immunity* 29:538-550). 최근의 연구는 STING이 TBK1에 의한 IRF3의 인산화를 특이적으로 촉진시키기 위해 TBK1과 IRF3 둘 다에 대한 결합에 의해 스캐폴드로서 작용한다는 것을 나타내었다(Tanaka & Chen, (2012) *Sci Signal* 5(214):ra20). IRF3-, IRF7- 및 NF- $\kappa$ B-의존적 신호전달 경로의 활성화는 사이토카인 및 다른 면역 반응-관련 단백질, 예컨대 I형 IFN의 생산을 유도하는데, 이는 항-병원균 및/또는 항-종양 활성을 촉진



시킨다.

- [0195] 다수의 연구는 체액성 및 세포성 면역 반응을 유발하기 위한 잠재적 백신 아주반트 또는 면역조절제로서 STING의 CDN 작용제의 사용을 연구하였다(Dubensky *et al.*, (2013) *Ther Adv Vaccines* 1(4):131-143 및 그의 참고문헌). 초기의 연구는 CDN c-다이-GMP의 투여가 생체내에서 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 감염을 약화시켜, 마우스 감염 모델에서 회수된 박테리아 세포의 수 감소는 c-다이-GMP가 시험관내에서 박테리아 세포에 대한 관찰 가능한 저해 또는 살균 효과로 아직 관찰되지 않았다는 것을 입증하였는데, 이는 박테리아 세포의 감소가 숙주 면역계에 대한 효과에 기인한다는 것을 시사한다(Karaolis *et al.*, (2005) *Antimicrob Agents Chemother* 49:1029-1038; Karaolis *et al.*, (2007) *Infect Immun* 75:4942-4950). 최근의 연구는 과립구-대식세포 집락 자극 인자(GM-CSF)-생산 암 백신(STINGVAX로 칭함)으로 제형화된 합성 CDN 유도체 분자가 GM-CSF 백신 단독에 의한 면역화에 비해 암의 치료적 동물 모델에서 향상된 생체내 항종양 효과를 유발하였다는 것을 나타내었는데(Fu *et al.*, (2015) *Sci Transl Med* 7(283):283ra52), 이는 CDN이 강한 백신 아주반트라는 것을 시사한다.
- [0196] 기능의 획득 또는 구성적으로 활성인 표현형을 나타내는 인간 *TMEM173* 유전자로 맵핑된 다형으로부터 초래된 돌연변이체 STING 단백질이 기재되었다. 시험관내에서 발현될 때, 돌연변이체 STING 대립유전자는 I형 IFN의 유도를 강하게 자극하는 것으로 나타났다(Liu *et al.*, (2014) *N Engl J Med* 371:507-518; Jeremiah *et al.*, (2014) *J Clin Invest* 124:5516-5520; Dobbs *et al.*, (2015) *Cell Host Microbe* 18(2):157-168; Tang & Wang, (2015) *PLoS ONE* 10(3):e0120090; Melki *et al.*, (2017) *J Allergy Clin Immunol* In Press; Konig *et al.*, (2017) *Ann Rheum Dis* 76(2):468-472; Burdette *et al.* (2011) *Nature* 478:515-518).
- [0197] 본 명세서에서 본 명세서에 기재된 바와 같은 면역 강화제로서 사용하기 위한 돌연변이체 인간 STING 아이소폼을 포함하는 STING의 구성적으로 활성인 형태를 암호화하는 변형된 mRNA(mmRNA)가 제공된다. 돌연변이체 인간 STING 아이소폼을 포함하는 STING의 구성적으로 활성인 형태를 암호화하는 mmRNA는 본 명세서의 서열목록에 제시된다. 본 명세서에서 사용되는 돌연변이체 인간 STING 폴리펩타이드에 대한 아미노산 잔기 넘버링은 젠뱅크 수탁번호 NP\_938023으로서 당업계에서 이용 가능한 379개의 아미노산 잔기 야생형 인간 STING(아이소폼 1)에 대해 사용되는 것에 대응한다.
- [0198] 따라서, 일 양상에서, 본 개시내용은 아미노산 잔기 155에서 돌연변이, 특히 아미노산 치환, 예컨대 V155M 돌연변이를 갖는 돌연변이체 인간 STING 단백질을 암호화하는 mmRNA를 제공한다. 일 실시형태에서, mmRNA는 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열을 암호화한다. 일 실시형태에서, STING V155M 돌연변이체는 서열번호 199에 나타난 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된다. 일 실시형태에서, mmRNA는 miR122 결합 부위를 포함하는, 서열번호 209에 나타난 바와 같은 3'UTR 서열을 포함한다.
- [0199] 다른 양상에서, 본 개시내용은 아미노산 잔기 284에서 돌연변이, 특히 아미노산 치환을 갖는 돌연변이체 인간 STING 단백질을 암호화하는 mmRNA를 제공한다. 잔기 284 치환의 비제한적 예는 R284T, R284M 및 R284K를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 돌연변이체 인간 STING 단백질은 R284T 돌연변이를 갖고, 예를 들어, 서열번호 2에 제시된 아미노산 서열을 갖거나 또는 서열번호 200에 나타난 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된다. 소정의 실시형태에서, 돌연변이체 인간 STING 단백질은 R284M 돌연변이를 갖고, 예를 들어, 서열번호 3에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖거나 또는 서열번호 201에 나타난 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된다. 소정의 실시형태에서, 돌연변이체 인간 STING 단백질은 R284K 돌연변이를 가지며, 예를 들어, 서열번호 4 또는 224에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖거나, 또는 서열번호 202 또는 225에 나타난 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된다.
- [0200] 다른 양상에서, 본 개시내용은 아미노산 잔기 154에서 돌연변이, 예컨대 아미노산 치환, 예컨대 N154S 돌연변이를 갖는 돌연변이체 인간 STING 단백질을 암호화하는 mmRNA를 제공한다. 소정의 실시형태에서, 돌연변이체 인간 STING 단백질은 N154S 돌연변이를 가지며, 예를 들어 서열번호 5에 제시된 아미노산 서열을 갖거나 또는 서열번호 203에 나타난 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된다.
- [0201] 또 다른 양상에서, 본 개시내용은 아미노산 잔기 147에서 돌연변이, 예컨대 아미노산 치환, 예컨대 V147L 돌연변이를 갖는 돌연변이체 인간 STING 단백질을 암호화하는 mmRNA를 제공한다. 소정의 실시형태에서, V147L 돌연변이를 갖는 돌연변이체 인간 STING 단백질은 서열번호 6에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖거나 또는 서열번호 204에 나타난 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된다.
- [0202] 다른 양상에서, 본 개시내용은 아미노산 잔기 315에서 돌연변이, 예컨대 아미노산 치환, 예컨대 E315Q 돌연변이

를 갖는 돌연변이체 인간 STING 단백질을 암호화하는 mmRNA를 제공한다. 소정의 실시형태에서, E315Q 돌연변이를 갖는 돌연변이체 인간 STING 단백질은 서열번호 7에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖거나 또는 서열번호 205에 나타난 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된다.

[0203] 다른 양상에서, 본 개시내용은 아미노산 잔기 375에서 돌연변이, 예컨대 아미노산 치환, 예컨대 R375A 돌연변이를 갖는 돌연변이체 인간 STING 단백질을 암호화하는 mmRNA를 제공한다. 소정의 실시형태에서, R375A 돌연변이를 갖는 돌연변이체 인간 STING 단백질은 서열번호 8에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖거나 또는 서열번호 206에 나타난 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된다.

[0204] 다른 양상에서, 본 개시내용은 앞서 언급한 돌연변이 중 하나 이상 또는 2, 3, 4가지 이상의 조합을 갖는 돌연변이체 인간 STING 단백질을 암호화하는 mmRNA를 제공한다. 따라서, 일 양상에서, 본 개시내용은 V147L, N154S, V155M, R284T, R284M, R284K, E315Q 및 R375A, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 돌연변이를 갖는 돌연변이체 인간 STING 단백질을 암호화하는 mmRNA를 제공한다. 다른 양상에서, 본 개시내용은 V155M 및 R284T; V155M 및 R284M; V155M 및 R284K; V155M 및 V147L; V155M 및 N154S; V155M 및 E315Q; 및 V155M 및 R375A로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이의 조합을 갖는 돌연변이체 인간 STING 단백질을 암호화하는 mmRNA를 제공한다.

[0205] 다른 양상에서, 본 개시내용은 V155M 및 다음의 돌연변이: R284T; R284M; R284K; V147L; N154S; E315Q; 및 R375A 중 1, 2, 3개 이상을 갖는 돌연변이체 인간 STING 단백질을 암호화하는 mmRNA를 제공한다. 다른 양상에서, 본 개시내용은 V155M, V147L 및 N154S 돌연변이를 갖는 돌연변이체 인간 STING 단백질을 암호화하는 mmRNA를 제공한다. 다른 양상에서, 본 개시내용은 V155M, V147L, N154S 돌연변이, 및 선택적으로 아미노산 284에서 돌연변이를 갖는 돌연변이체 인간 STING 단백질을 암호화하는 mmRNA를 제공한다. 또 다른 양상에서, 본 개시내용은 V155M, V147L, N154S 돌연변이, 및 R284T, R284M 및 R284K로부터 선택된 아미노산 284에서의 돌연변이를 갖는 돌연변이체 인간 STING 단백질을 암호화하는 mmRNA를 제공한다. 다른 양상에서, 본 개시내용은 V155M, V147L, N154S 및 R284M 돌연변이를 갖는 돌연변이체 인간 STING 단백질을 암호화하는 mmRNA를 제공한다. 다른 양상에서, 본 개시내용은 V155M, V147L, N154S 및 R284K 돌연변이를 갖는 돌연변이체 인간 STING 단백질을 암호화하는 mmRNA를 제공한다.

[0206] 다른 실시형태에서, 본 개시내용은 아미노산 잔기 147, 154, 155 및, 선택적으로, 284에서의 돌연변이, 특히 아미노산 치환, 예컨대 V147L, N154S, V155M 및, 선택적으로, R284M의 조합을 갖는 돌연변이체 인간 STING 단백질을 암호화하는 mmRNA를 제공한다. 소정의 실시형태에서, 돌연변이체 인간 STING 단백질은 V147N, N154S 및 V155M 돌연변이, 예컨대 서열번호 9에 제시된 바와 같거나 또는 서열번호 207에 나타난 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 아미노산 서열을 가진다. 소정의 실시형태에서, 돌연변이체 인간 STING 단백질은 R284M, V147N, N154S 및 V155M 돌연변이, 예컨대 서열번호 10에 제시된 바와 같은 또는 서열번호 208에 나타난 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 아미노산 서열을 가진다.

[0207] 다른 실시형태에서, 본 개시내용은 전장 379 아미노산 야생형 단백질의 구성적으로 활성인 절단 형태, 예컨대 아미노산 137 내지 379로 이루어진 구성적으로 활성인 인간 STING 폴리펩타이드인 돌연변이체 인간 STING 단백질을 암호화하는 mmRNA를 제공한다.

#### [0208] 항원 제시 세포의 축진을 위한 제제

[0209] 일부 실시형태에서, RNA 백신은, 예를 들어, 비-APC를 유사-APC로 전환함으로써, 항원 제시 세포(APC)의 생산을 촉진하기 위한 제제와 조합될 수 있다. 항원 제시는 면역 반응의 개시, 증폭 및 지속기간에서 중요한 단계이다. 이 과정에서, 항원의 단편은 구조적 적합 복합체(MHC) 또는 인간 백혈구 항원(HLA)을 통해 항원-특이적 면역 반응을 유도하는 T 세포에 제시된다. 면역 예방 및 치료를 위해, 이 반응을 향상시키는 것은 개선된 효능에 중요하다. 본 발명의 RNA 백신은 효율적인 항원 제시를 유도하도록 설계되거나 또는 향상될 수 있다. APC 가공 및 제시를 향상시키기 위한 한 가지 방법은 항원 제시 세포(APC)에 대한 RNA 백신의 더 양호한 표적화를 제공하는 것이다. 항원 접근은 면역-자극 제형 및/또는 성분으로 APC 세포를 활성화시키는 것을 수반한다.

[0210] 대안적으로, 비-APC를 APC가 되도록 재프로그래밍하기 위한 방법은 본 발명의 RNA 백신에 의해 사용될 수 있다. 중요하게는, mRNA 제형을 취하고 그들의 치료 작용의 표적인 대부분의 세포는 APC가 아니다. 따라서, 이들 세포를 APC로 전환시키는 방법을 설계하는 것은 효능에 대해 유리할 것이다. RNA 백신, 예를 들어, mRNA 백신을 세포에 전달하는 한편, 또한 비-APC의 APC에 대한 이동을 촉진시키는 방법 및 접근이 본 명세서에 제공된다. 일부

실시형태에서, APC 재프로그래밍 분자를 암호화하는 mRNA는 RNA 백신에 포함되거나 또는 RNA 백신과 함께 공동 투여된다.

[0211] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 APC 재프로그래밍 분자는 APC-유사 표현형에 대한 비 APC 세포에서의 이행을 촉진시키는 분자이다. APC-유사 표현형은 MHC 클래스 II 가공을 가능하게 하는 특성이다. 따라서, APC-유사 표현형을 갖는 APC 세포는 하나 이상의 외인성 분자를 갖지 않는 동일한 세포에 비해 향상된 MHC 클래스 II 가공 능력을 갖는 하나 이상의 외인성 분자(APC 재프로그래밍 분자)를 갖는 세포이다. 일부 실시형태에서, APC 재프로그래밍 분자는 CIITA(MHC 클래스 II 발현의 중심 조절자); 샤페론 단백질, 예컨대 CLIP, HLA-DO, HLA-DM 등 (MHC 클래스 II에 대한 항원 단편의 부하의 인헨서) 및/또는 CD40, CD80, CD86 등과 같은 공자극 분자(T 세포 항원 인식 및 T 세포 활성화의 인헨서)이다.

[0212] CIITA 단백질은 클래스 II 프로모터 영역에 결합하는 DNA 결합 단백질의 보존된 세트와 상호작용함으로써 MHC 클래스 II 유전자 전사의 활성화를 향상시키는 트랜스작용인자이다(Steimle *et al.*, 1993, Cell 75:135-146). CIITA의 전사 활성화 작용은 아미노 말단의 산성 도메인(아미노산 26 내지 137)에 대해 맵핑되었다. CIITA와 상호작용하는 단백질을 암호화하는 핵산 분자는 CIITA-상호작용 단백질 104(또한 본 명세서에서 CIP104로서 지칭됨)로 칭해진다. CIITA와 CIP104는 둘 다 MHC 클래스 II 프로모터로부터 전사를 향상시키는 것으로 나타났고, 따라서 본 발명의 APC 재프로그래밍 분자로서 유용하다. 일부 실시형태에서, APC 재프로그래밍 분자는 전장 CIITA, CIP104 또는 다른 관련된 분자 또는 이의 활성 단편, 예컨대 CIITA의 아미노산 26 내지 137, 또는 이에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 갖고 MHC 클래스 II 유전자의 전사 활성화를 향상시키는 능력을 유지하는 아미노산이다.

[0213] 바람직한 실시형태에서, APC 재프로그래밍 분자는 대상체에게 APC 재프로그래밍 분자를 암호화하는 mRNA의 형태로 전달된다. 이렇게 해서 본 발명의 RNA 백신은 APC 재프로그래밍 분자를 암호화하는 mRNA를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, mRNA는 모노시트론성이다. 다른 실시형태에서 이는 다시트로성이다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 항원을 암호화하는 mRNA는 APC 재프로그래밍 분자를 암호화하는 mRNA와 별개의 제형이다. 다른 실시형태에서 하나 이상의 항원을 암호화하는 mRNA는 APC 재프로그래밍 분자를 암호화하는 mRNA와 동일한 제형이다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 항원을 암호화하는 mRNA는 대상체에게 APC 재프로그래밍 분자를 암호화하는 mRNA와 동시에 투여된다. 다른 실시형태에서 하나 이상의 항원을 암호화하는 mRNA는 대상체에게 APC 재프로그래밍 분자를 암호화하는 mRNA와 상이한 시간에 투여된다. 예를 들어, APC 재프로그래밍 분자를 암호화하는 mRNA는 하나 이상의 항원을 암호화하는 mRNA 전에 투여될 수 있다. APC 재프로그래밍 분자를 암호화하는 mRNA는 항원을 암호화하는 mRNA 직전에, 적어도 1시간 전에, 적어도 1일 전에, 적어도 1주 전에, 또는 적어도 하나의 1개월 전에 투여될 수 있다.

[0214] 대안적으로, APC 재프로그래밍 분자를 암호화하는 mRNA는 하나 이상의 항원을 암호화하는 mRNA 후에 투여될 수 있다. APC 재프로그래밍 분자를 암호화하는 mRNA는 항원을 암호화하는 mRNA 직후에, 적어도 1시간 후에, 적어도 1일 후에, 적어도 1주 후에 또는 적어도 1개월 후에 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 항원은 암 항원, 예컨대 환자 특이적 항원이다. 다른 실시형태에서 항원은 감염성 질환 항원이다.

[0215] 일부 실시형태에서, mRNA 백신은 또한 때때로 기억 항원으로서 지칭되는 회상 항원을 포함할 수 있다. 회상 항원은 개체에 의해 이전에 접한 그리고 기존의 기억 림프구가 있는 항원이다. 일부 실시형태에서, 회상 항원은 개체가 접할 가능성이 있는 감염성 질환 항원, 예컨대 인플루엔자 항원일 수 있다. 회상 항원은 더 강한 면역 반응을 촉진시키게 한다.

[0216] mRNA 백신에 포함을 위해 선택된 항원 또는 네오에피토프는 전형적으로 고친화도 결합 펩타이드일 것이다. 일부 양상에서, 항원 또는 네오에피토프는 야생형 펩타이드보다 더 큰 친화도로 HLA 단백질에 결합한다. 일부 실시형태에서, 항원 또는 네오에피토프는 IC50가 적어도 5000nM 미만, 적어도 500nM 미만, 적어도 250nM 미만, 적어도 200nM 미만, 적어도 150nM 미만, 적어도 100nM 미만, 적어도 50nM 미만이다. 전형적으로, 예측된 IC50 < 50nM 을 갖는 펩타이드는 일반적으로 고친화도 결합 펩타이드에 대해 중간으로 고려되고, HLA-결합의 생화학 검정을 이용하여 경험적으로 그들의 친화도를 검사하기 위해 선택될 것이다. 암 항원은 개인화된 암 항원일 수 있다. 개인화된 RNA 암 백신은, 예를 들어, 네오에피토프 또는 대상체 특이적 에피토프 또는 항원로서 지칭되는, 종양에 특이적인 하나 이상의 공지된 암 항원 또는 각각의 대상체에 특이적인 암 항원에 대해 암호화하는 RNA를 포함할 수 있다. "대상체 특이적 암 항원"은 특정 환자의 종양에서 발현되는 바와 같은 동정된 항원이다. 대상체 특이적 암 항원은 전형적으로 종양 샘플에서 일반적으로 존재할 수도 있고 또는 존재하지 않을 수도 있다. 비-암성 세포에서 발현되지 않거나 또는 거의 발현되지 않은 종양 연관 항원, 또는 비-암성 세포에서 발현이 암성



세포에서의 발현에 비해 충분히 감소된 종양 연관 항원 및 백신접종 시 유도된 면역 반응을 유도한 종양 연관 항원은 네오에피토프로서 지칭된다. 종양 연관 항원과 같은 네오에피토프는 신체에 대해 완전히 외래물질이며, 따라서 건강한 조직에 대해 면역 반응을 생산하지 않거나 또는 면역계의 보호 성분에 의해 가리움된다. 일부 실시형태에서, 네오에피토프에 기반한 개인화된 RNA 압 백신은 이러한 백신 제형이 환자의 특정 종양에 대해 특이성을 최대화하기 때문에 바람직하다. 돌연변이-유도 네오에피토프는 단백질에서 상이한 아미노산을 야기하는 점 돌연변이, 비-동의(non-synonymous) 돌연변이; C-말단에서 신규한 종양-특이적 서열을 갖는 긴 단백질의 번역을 야기하는 정지 코돈이 변형되거나 또는 결실된 번역초과 돌연변이; 성숙 mRNA에서 인트론 그리고 그에 따라 독특한 종양-특이적 단백질 서열의 봉입을 야기하는 스플라이스 부위 돌연변이; 2개 단백질의 접합부(즉, 유전자 융합)에서 종양-특이적 서열을 갖는 키메라 단백질을 생기게 하는 염색체 재배열; 신규한 종양-특이적 단백질 서열을 갖는 새로운 오픈 리딩 프레임 야기하는 프레임시프트 돌연변이 또는 결실; 및 전좌로부터 생기게 할 수 있다. 따라서, 일부 실시형태에서 RNA 압 백신은 프레임시프트 돌연변이 및 재조합 또는 본 명세서에 기재된 임의의 다른 돌연변이로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이를 포함하는 적어도 1가지의 압 항원을 포함한다.

[0217] 개인화된 RNA 압 백신을 생성하는 방법은 일반적으로, 예를 들어, 딥 핵산 또는 단백질 서열분석 기법을 이용하는 돌연변이의 동정, 예를 들어, 확인된 펩타이드-MHC 결합 예측 알고리즘의 적용 또는 환자 HLA 대립유전자에 결합할 수 있는 그리고 종양에 존재하는 돌연변이에 기반한 후보 T 세포 에피토프의 세트를 생성하기 위한 다른 분석 기법을 이용하는 네오에피토프의 동정, 선택된 네오에피토프에 대한 항원-특이적 T 세포의 최적의 입증 또는 후보 네오에피토프가 종양 표면 상에서 HLA 단백질에 결합된다는 입증 및 백신의 개발을 수반한다. 본 발명의 RNA 압 백신은 단일 네오에피토프의 다중 복제물, 단일 유형의 돌연변이, 즉, 점 돌연변이에 기반한 다중 상이한 네오에피토프, 다양한 돌연변이 유형에 기반한 다중 상이한 네오에피토프, 네오에피토프 및 다른 항원, 예컨대 종양 연관 항원 또는 회상 항원을 포함할 수 있다.

[0218] 돌연변이를 동정하기 위한 기법의 예는 동적 대립유전자-특이적 혼성화(DASH), 마이크로플레이트 어레이 사선 겔 전기영동(MADGE), 파이로시퀀싱, 올리고뉴클레오타이드-특이적 결합, TaqMan 시스템뿐만 아니라 다양한 DNA "칩" 기술, 즉, 애피메트릭스 SNP 칩, 및 침습적 절단에 의한 작은 신호 분자의 생성에 기반한 방법 다음에 질량분석법 또는 고정된 패드라 프로브 및 롤링-서클 증폭을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0219] 딥 핵산 또는 단백질 서열분석 기법은 당업계에 공지되어 있다. 임의의 유형의 서열 분석이 사용될 수 있다. 핵산 서열분석은 전체 종양 게놈, 종양 엑손(단백질-암호화 DNA), 종양 전사체 또는 엑솜 상에서 수행될 수 있다. 실시간 단일 분자 합성에 의한 서열분석(sequencing-by-synthesis) 기술은 그들이 서열분석 중인 주형에 상보성인 DNA의 발생 가닥에 혼입됨에 따라 형광 뉴클레오타이드의 검출에 의존한다. 다른 빠른 고속대량 서열분석 방법이 또한 존재한다. 단백질 서열분석은 종양 프로테오믹스 상에서 수행될 수 있다. 추가적으로, 단백질 질량분석법은 종양 세포 상에서 MHC 단백질에 결합된 돌연변이된 펩타이드의 존재를 동정하거나 또는 확인하기 위해 사용될 수 있다. 펩타이드는 종양 세포로부터 또는 종양으로부터 면역침전된 HLA 분자로부터 산 용리될 수 있고, 이어서, 질량분석법을 이용하여 동정될 수 있다. 서열분석 결과는 공지된 대조군 세트와 또는 환자의 정상 조직 상에서 수행된 서열분석과 비교될 수 있다.

[0220] 따라서, 본 발명은 항원의 네오에피토프, 예컨대 T-세포 에피토프를 동정하고/하거나 검출하는 방법에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 대상체에서 종양 특이적 면역 반응을 유도하는 데 유용한 종양 특이적 네오에피토프를 동정하고/하거나 검출하는 방법을 제공한다. 선택적으로 이들 네오에피토프는 야생형 펩타이드보다 더 큰 친화도로 클래스 I HLA 단백질에 결합하고/하거나 항-종양 CD8 T 세포를 활성화시킬 수 있다. 임의의 특정 유전자에서 동일한 돌연변이는 종양에 걸쳐 거의 발견되지 않는다.

[0221] MHC 클래스 I의 단백질은 대부분의 종양 세포를 포함하는 신체의 거의 모든 세포 표면 상에 존재한다. MHC 클래스 I의 단백질은 보통 내인성 단백질로부터 또는 세포 내부에 존재하는 병원균으로부터 유래된 항원이 부하되며, 이어서, 세포독성 T-림프구(CTL)에 제시된다. T-세포 수용체는 MHC 클래스 I의 분자와 복합체화된 결합 펩타이드를 인식할 수 있다. 각각의 세포독성 T-림프구는 특정 MHC/펩타이드 복합체에 결합할 수 있는 독특한 T-세포 수용체를 발현시킨다.

[0222] 컴퓨터 알고리즘을 이용하여, 잠재적 네오에피토프, 예컨대 T-세포 에피토프, 즉, 펩타이드-제시 복합체의 형태로 클래스 I 또는 클래스 II의 MHC 분자에 의해 결합되고, 이어서, 이 형태에서, T-림프구의 T-세포 수용체에 의해 인식되는 펩타이드 서열을 예측할 수 있다. MHC에 결합하는 펩타이드를 동정하는 데 유용한 프로그램의 예는, 예를 들어: 문헌[Lonza Epibase, SYFPEITHI (Rammensee *et al.*, Immunogenetics, 50 (1999), 213-219) 및 HLA\_BIND (Parker *et al.*, J. Immunol., 152 (1994), 163-175)]을 포함한다.

- [0223] 일단 추정적 네오에피토프가 선택되면, 그들은 시험관내에서 그리고/또는 생체내 검정을 이용하여 추가로 검사될 수 있다. 통상적인 시험관내 실험 검정, 예컨대 엘리스팟 검정은 알고리즘의 예측에 기반하여 선택된 네오에피토프의 목록을 개선시키기 위해 각각의 환자로부터의 단리물과 함께 사용될 수 있다. 네오에피토프 백신, 이의 사용 방법 및 제조 방법은 모두 본 명세서에 전문이 참고로 편입된 PCT/US2016/044918에 기재되어 있다.
- [0224] RNA 암 백신에 포함을 위해 선택된 활성화 종양유전자 돌연변이 펩타이드는 전형적으로 고친화도 결합 펩타이드일 것이다. 일부 양상에서, 활성화 종양유전자 돌연변이 펩타이드는 야생형 펩타이드보다 더 큰 친화도로 HLA 단백질에 결합한다. 활성화 종양유전자 돌연변이 펩타이드는, 일부 실시형태에서, IC<sub>50</sub>이 적어도 5000nM 미만, 적어도 500nM 미만, 적어도 250nM 미만, 적어도 200nM 미만, 적어도 150nM 미만, 적어도 100nM 미만, 적어도 50nM 미만이다. 전형적으로, 예측된 IC<sub>50</sub> < 50nM을 갖는 펩타이드는 일반적으로 중간 내지 고친화도 결합 펩타이드로 고려되고, 경험적으로 HLA-결합의 생화학 검정을 이용하여 그들의 친화도를 검정하기 위해 선택될 것이다.
- [0225] 개인화된 암 백신에서, 대상체 특이적 암 항원은 환자의 샘플에서 동정될 수 있다. 예를 들어, 샘플은 조직 샘플 또는 종양 샘플일 수 있다. 예를 들어, 하나 이상의 종양 세포의 샘플은 대상체 특이적 암 항원의 존재에 대해 시험될 수 있다. 종양 샘플은 대상체 특이적 암 항원을 동정하기 위해 전체 게놈, 엑손 또는 전사체 분석을 이용하여 시험될 수 있다.
- [0226] 대안적으로 대상체 특이적 암 항원은 대상체의 엑소솜에서 동정될 수 있다. 백신에 대한 항원이 대상체의 엑소솜에서 동정될 때, 이러한 항원은 대상체의 엑소솜 항원을 나타내는 것으로 언급된다.
- [0227] 엑소솜은 전형적으로 직경이 대략 30 내지 100nm인 세포에 의해 보관되는 작은 미세포소포이다. 엑소솜은 고전적으로 안쪽의 함입 및 후기 엔도솜 막의 핀치오프로부터 형성되어, 작은 지질 이중층 소수포를 갖는 다소포체(multivesicular body: MVB)의 형성을 야기하며, 이들 각각은 모 세포의 세포질의 샘플을 함유한다. 세포막과 MVB의 융합은 세포로부터 이들 엑소솜의 방출, 및 그들의 혈액, 소변, 뇌척수액, 또는 다른 체액에 대한 전달을 초래한다. 엑소솜은 추가 분석을 위한 임의의 이들 생물학적 유체로부터 회수될 수 있다.
- [0228] 엑소솜 내의 핵산은 종양 항원에 대한 바이오마커로서의 역할을 가진다. 대상체 특이적 암 항원을 동정하기 위해 엑소솜을 분석하는 것의 이점은 상기 방법이 샘플에 대한 필요를 피한다는 것이다. 이는 환자가 암 항원의 동정을 포함하는 요법의 몇몇 라운드 및 백신접종을 가질 필요가 있을 때 특히 유리할 수 있다.
- [0229] 생물학적 샘플로부터 엑소솜을 단리시키는 다수의 방법은 당업계에 기재되어 있다. 예를 들어, 다음의 방법이 사용될 수 있다: 차별적 원심분리, 저속 원심분리, 음이온 교환 및/또는 겔 투과 크로마토그래피, 수크로스 밀도 구배 또는 세포소기관 전기영동, 자기 활성화 세포 분류(MACS), 나노막 한외여과 농축, 퍼콜(Percoll) 구배 단리 및 미소유체 장치를 이용. 예시적인 방법은, 예를 들어, 미국 특허 공개 제2014/0212871에 기재되어 있다.
- [0230] 용어 "생물학적 샘플"은 생물학적 물질, 예컨대 DNA, RNA 및 단백질을 함유하는 샘플을 지칭한다. 일부 실시형태에서, 생물학적 샘플은 대상체로부터의 체액을 적합하게 포함할 수 있다. 체액은, 예를 들어, 혈액, 혈장, 혈청, 소변, 가래, 척수액, 뇌척수액, 흉수, 유두 흡입물, 림프액, 호흡기의 유체, 장, 및 비뇨생식기, 눈물, 타액, 모유, 림프계로부터의 유체, 정액, 뇌척수액, 기관계내 유체, 복수, 종양 낭액, 양수 및 이들의 조합물을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는, 대상체의 신체의 어느 곳, 바람직하게는 말초 부분으로부터 단리된 유체일 수 있다.
- [0231] 일부 실시형태에서, 암의 진행은 발현된 항원에서의 변화를 동정하도록 모니터링될 수 있다. 따라서, 일부 실시형태에서 상기 방법은 또한 암 mRNA 백신의 투여후 적어도 1개월에, 암 항원의 제2 세트를 생산하기 위해 대상체로부터의 샘플로부터 적어도 2가지의 암 항원을 동정하는 단계, 및 대상체에게 암 항원의 제2 세트를 암호화하는 오픈 리딩 프레임을 갖는 mRNA 백신을 투여하는 단계를 수반한다. 항원의 제2 세트를 암호화하는 오픈 리딩 프레임을 갖는 mRNA 백신은, 일부 실시형태에서, 대상체에게 암 항원의 제1 세트를 암호화하는 오픈 리딩 프레임을 갖는 mRNA 백신 후에 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 8개월, 10개월, 또는 1년에 투여된다. 다른 실시형태에서 항원의 제2 세트를 암호화하는 오픈 리딩 프레임을 갖는 mRNA 백신은 대상체에게 암 항원의 제1 세트를 암호화하는 오픈 리딩 프레임을 갖는 mRNA 백신 후에 1½, 2, 2½, 3, 3½, 4, 4½, 또는 5년에 투여된다.
- [0232] *신생항원으로서 핫스팟 돌연변이*
- [0233] 암의 집단 분석에서, 우연히 예상되는 것보다 더 높은 백분율의 환자에서 소정의 돌연변이가 생긴다. 이들 "재

발성" 또는 "핫스팟" 돌연변이는 종종 종양 개시, 유지 또는 전이에 중요한 암 세포 기능에서 일부 변화를 생성하는 종양에서 "드라이버" 역할을 갖는 것으로 나타났고, 따라서 종양의 진화에서 선택된다. 종양 생물학 및 요법에서 그들의 중요성에 추가로, 재발성 돌연변이는 돌연변이된 단백질 그 자체의 표적화를 포함하지만, 이것으로 제한되지 않는 특정 요법에 반응할 가능성이 더 많은 그룹으로 환자 집단이 계층화되는, 정밀 의학에 대한 기회를 제공한다.

[0234] 재발성 돌연변이에 대한 많은 노력 및 연구는 비-동의(또는 "미스센스") 단일 뉴클레오타이드 변이체(SNV)에 중점을 두었지만, 집단 분석은 다양한 더 많은 복합체(비-SNV) 변이체 부류, 예컨대 동의(synonymous)(또는 "침묵"), 스플라이스 부위, 다중-뉴클레오타이드 변이체, 삽입 및 결실이 또한 높은 빈도로 일어날 수 있다는 것을 나타내었다.

[0235] p53 유전자(공식 기호 TP53)는 인간 암에서 임의의 다른 유전자보다 더 빈번하게 돌연변이된다. 거대 코호트 연구는, 대부분의 p53 돌연변이에 대해, 게놈 위치가 한 명의 또는 단지 소수의 환자에 대해 독특하고, 돌연변이는 환자의 특정 집단에 대해 설계된 치료 백신에 대해 재발성 네오펙틴으로서 사용될 수 있다는 것을 나타내었다. 그러나, 놀랍게도, p53 좌위의 작은 소집단은 유전자 내 몇몇 위치가 상대적으로 높은 빈도로 돌연변이되는 "핫스팟" 패턴을 나타낸다. 현저하게, 이들 재발성으로 돌연변이된 영역의 대부분은 엑손-인트론 경계 근처에서 일어나서, mRNA 스플라이싱 기작에 의해 인식되는 정규 뉴클레오타이드 서열 모티프를 붕괴시킨다. 스플라이싱 모티프의 돌연변이는 국소 아미노산 서열에 대한 변화가 예측되지 않는다고 해도(즉, 동의 또는 인트론 돌연변이에 대해) 최종 mRNA 서열을 변경시킬 수 있다. 따라서, 이들 돌연변이는, 그들이 예측가능하지 않은 방법으로 mRNA 스플라이싱을 변경시키고 번역된 단백질에 대한 심각한 기능적 영향을 발휘한다고 해도, 통상적인 주석 도구에 의해 종종 "비암호화"로서 주석이 달리고 추가적인 분석에 대해 무시된다. 대안적으로 생성된 아이소폼이 인프레임 서열 변화를 생성한다면(즉, PTC가 생성되지 않음), NMD에 의한 고갈을 탈출할 수 있고, HLA 시스템에 의한 세포 표면 상에서 용이하게 발현되고, 가공되고 제시될 수 있다. 추가로, 돌연변이-유래 대안의 스플라이싱은 보통 "모호"하며, 즉, 정상 조직에서 발현되지 않으며, 따라서 비-자기 신생항원으로서 T-세포에 의해 인식될 수 있다.

[0236] 일부 양상에서, 본 발명은 미스센스 SNV로 제한되지 않는 p53에서의 소정의 재발성 체세포 암 돌연변이로부터 초래되고, 종종 치료적 백신접종에 대한 표적으로서 사용하기 위한 대안의 스플라이싱을 초래하는 신생항원 펩타이드 서열을 제공한다. 일부 실시형태에서, 돌연변이, mRNA 스플라이싱 사건, 얻어진 신생항원 펩타이드 및/또는 HLA-제한된 에피토프는 에피토프 AVSPCISFVW(서열번호 233)(HLA-B\*57:01, HLA-B\*58:01), HPLASCQCFF(서열번호 234)(HLA-B\*35:01, HLA-B\*53:01), FVWNFGIPL(서열번호 235)(HLA-A\*02:01, HLA-A\*02:06, HLA-B\*35:01)을 함유하는 펩타이드 서열 TAKSVTCTVSCPEGLASMLQCLAVSPCISFVWNFGIPLHPLASCQCFFIVYPLNV(서열번호 232)를 갖는 보유된 인트론을 유도하는, 코돈 p.T125에 이웃하는 정규 5' 스플라이스 부위에서의 돌연변이를 포함한다.

[0237] 일부 실시형태에서, 돌연변이, mRNA 스플라이싱 사건, 얻어진 신생항원 펩타이드 및/또는 HLA-제한된 에피토프는 에피토프 LQVLSLGTYS(서열번호 237)(HLA-B\*15:01), FQSNQTQNAV(서열번호 238)(HLA-B\*15:01)를 함유하는 펩타이드 서열 EYFTLQVLSLGTYSQVESFQSNQTQNAVFLTLVPAIGAFAIRGQ(서열번호 236)를 갖는 보유된 인트론을 유도하는 코돈 p.331에 이웃하는 정규 5' 스플라이스 부위에서의 돌연변이를 포함한다.

[0238] 일부 실시형태에서, 돌연변이, mRNA 스플라이싱 사건, 얻어진 신생항원 펩타이드, 및/또는 HLA-제한된 에피토프는 에피토프 CTMFCQLAK(서열번호 240)(HLA-A\*11:01), KSVTCTMF(서열번호 241)(HLA-B\*58:01)를 함유하는 신규한 스페닝 펩타이드 서열 AKSVTCTMFCQLAK(서열번호 239)를 생성하는 모호한 대안의 엑손 3' 스플라이스 부위를 유도하는, 코돈 p.126에 이웃하는 정규 3' 스플라이스 부위에서의 돌연변이를 포함한다.

[0239] 일부 실시형태에서, 돌연변이, mRNA 스플라이싱 사건, 얻어진 신생항원 펩타이드, 및/또는 HLA-제한된 에피토프는 에피토프 VPYEPPEVW(서열번호 243)(HLA-B\*53:01, HLA-B\*51:01), LTVPPSTAW(서열번호 244)(HLA-B\*58:01, HLA-B\*57:01)를 함유하는 신규한 스페닝 펩타이드 서열 VPYEPPEVWLALTVPSTAWAA(서열번호 242)를 생성하는 모호한 대안의 인트론 5' 스플라이스 부위를 유도하는 코돈 p.224에 이웃하는 정규 5' 스플라이스 부위에서의 돌연변이를 포함한다.

[0240] 앞서 언급한 서열에서, 전사체 코돈 위치는 양상블 v83 인간 게놈 주석으로부터의 정규 전장 p53 전사체 ENST00000269305(서열번호 245)를 지칭한다.

[0241] 돌연변이는 전형적으로 선행 기술 펩타이드 백신에 대한 네오-에피토프를 유도하기 위해 환자의 DNA 서열분석 데이터로부터 얻어진다. 그러나, mRNA 발현은 가능한 네오-에피토프의 전반적 공간의 더 직접적인 측정이다. 예



를 들어, 일부 종양-특이적 네오-에피토프는 스플라이싱 변화, 삽입/결실(InDel)로부터 생겨서 프레임시프트, 대안의 프로모터, 또는 엑손 서열분석만을 이용하여 용이하게 동정되지 않는 후성적 변형을 초래할 수 있다. 신생항원 백신에 대한 복잡한 돌연변이의 이들 유형을 동정함에 있어서 이용되지 않은 값이 있는데, 그들이 환자의 독특한 HLA 알로타입에 결합할 수 있는 에피토프 수를 증가시킬 것이기 때문이다. 게다가, 복잡한 변이체는 더 면역원성일 것이고, 단일 아미노산 변화로부터 초래된 변이체에 비해 자기 단백질로부터의 그들의 차이에 기인하여 종양에 대해 더 효과적인 면역 반응을 야기할 가능성이 있다.

[0242] 일부 양상에서, 본 발명은 환자 특이적인 복잡한 돌연변이를 동정하고, 이들 돌연변이를 효과적인 개인화된 mRNA 백신으로 제형화하는 방법을 수반한다. 상기 방법은 짧은 판독 RNA-Seq의 사용을 수반한다. RNA-seq에 대해 짧은 판독을 이용하는 것에 고유한 주된 도전은 다중 mRNA 전사체 아이소폼이 대안의 스플라이싱 및 다른 메커니즘에 기인하여 동일한 게놈 좌위로부터 얻어진다는 사실이다. 서열분석 판독은 전장 mRNA 전사체보다 훨씬 더 짧기 때문에, 공지된 유전자 주석 모델 내에서 정확한 대응하는 아이소폼에 대해 다시 판독 세트를 맵핑하는 것은 어렵게 된다. 그 결과, 공지된 유전자 주석(암에서 공통됨)으로부터 갈라지는 복잡한 변이체는 표준 접근에 의해 발견하는 것이 어려울 수 있다. 그러나, 본 발명은 전장 전사체의 정확한 엑손 조성물보다 짧은 펩타이드의 동정을 수반한다. 이들 복잡한 돌연변이를 나타낼 짧은 펩타이드를 동정하는 방법은 복잡한 변이체의 네오-에피토프 예측에 대한 짧은 k-량체 계수화 접근을 수반한다.

[0243] 전형적인 차세대 서열분석 판독은 암호화 영역을 포획한다면, 50개 코돈 또는 길이 9(27개 뉴클레오타이드)의 41개의 별개의 펩타이드 에피토프를 해결할 수 있는 150개의 염기쌍이다. 따라서, RNA-seq 샘플로부터 모든 27-량체를 계수화하는 간단한, 컴퓨터로 측정 가능한 작업을 이용하여, 상기 결과는 정상 조직의 RNA-seq는 동일한 샘플로부터의 정상 조직에 대해 또는 정상 조직의 RNA-seq로부터의 27-량체의 사전 컴퓨터화된 데이터베이스(예를 들어, GTEX)에 비교될 수 있다.

[0244] RNA-seq 데이터로부터 예측된 네오-에피토프를 함유하는 mRNA 백신이 생성될 수 있고, 이에 의해 1) 모든 가능한 27-량체는 종양 샘플로부터의 모든 RNA-seq 판독으로부터 계수화되고, 2) 각각의 판독에 대한 오픈 리딩 프레임은 전체 판독의 임의의 부분을 전사체에 정렬함으로써 예측되며, 그리고 3) 27-량체 계수는 매칭된 정상 샘플 및/또는 동일한 조직 유형으로부터의 정상 조직의 데이터베이스의 대응하는 27량체 계수에 비교되고, 그리고 4) 동일한 유전자에서 발견된 체세포 돌연변이가 있다면, 동일한 종양으로부터의 DNA-seq 데이터를 사용하여 네오-에피토프 예측에 대한 신뢰도를 추가하였다. 점(4)에 관해, 종종 돌연변이는 돌연변이 그 자체로부터 직접적으로 예측 가능하지 않은 mRNA 서열의 변화를 초래하는 전사 또는 스플라이싱 변화를 야기할 수 있다. 예를 들어, 스플라이스 부위 돌연변이는 엑손 스킵을 야기하도록 예측될 수 있지만, 하류의 엑손이 그 자리에서 스플라이싱 기작에 의해 선택되는 확실성을 아는 것이 가능하지 않다.

[0245] 일 실시형태에서, 본 발명은 신생항원 펩타이드 1 내지 4에 대해 오픈 리딩 프레임(ORF)을 함유하는 연속동일서열 폴리펩타이드 작제물 또는 개개 에피토프 작제물의 세트를 포함하는 mRNA 백신을 제공한다.

[0246] 일 실시형태에서, 본 발명은 임의의 상기 돌연변이를 함유하는 환자 종양에 기반하여 펩타이드 1 내지 4를 함유하거나 또는 이를 암호화하는 백신의 선택적 투여를 제공한다.

[0247] 일 실시형태에서, 본 발명은 1) 임의의 상기 돌연변이를 함유하는 환자의 종양 및 2) 얻어진 신생항원에 결합하는 것으로 예측된 대응하는 HLA 대립유전자를 함유하는 환자의 정상 HLA 유형의 이중 기준에 기반한 백신의 선택적 투여를 제공한다.

[0248] 본 명세서에 기재된 mRNA 백신은 몇몇 방법에서 현재의 백신보다 우수하다는 것이 발견되었다. 첫째로, 지질 나노입자(LNP) 전달은 문헌에 기재된 접근에 기반하여 리포좀 또는 프로타민을 포함하는 다른 제형보다 우수하고, 추가적인 아유반트가 필요하지 않다. LNP의 사용은 화학적으로 변형된 또는 비변형된 mRNA 백신의 효과적인 전달을 가능하게 한다. 변형된 그리고 비변형된 LNP 제형화 mRNA 백신은 둘 다 상당한 정도로 통상적인 백신보다 우수하다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 mRNA 백신은 통상적인 백신보다 적어도 10배, 20배, 40배, 50배, 100배, 500배 또는 1,000배만큼 우수하다.

[0249] mRNA 백신 및 자기-복제 RNA 백신을 포함하는 기능성 RNA 백신을 생성하기 위한 시도를 하였지만, 이들 RNA 백신의 치료 효능은 아직 완전히 확립되지 않았다. 상당히 놀랍게도, 본 발명자들은 본 발명의 양상에 따라 상당히 향상된, 그리고 다수의 면에서 중화 능력을 갖는 향상된 항원 생성 및 기능적 항체 생산을 포함하는 상승적 면역 반응을 초래하는 생체내 mRNA 백신을 전달하기 위한 제형의 부류를 발견하였다. 이들 결과는 지질 기반 제형의 다른 부류에서 사용되는 mRNA 용량에 비해 상당히 더 적은 용량의 mRNA가 투여될 때조차 달성될 수 있다.



본 발명의 제형은 예방적 제제 및 치료제로서 기능성 mRNA 백신의 효능을 확립하기에 충분한 상당한 예상치 못한 생체내 면역 반응을 입증하였다. 추가적으로, 자기-복제성 RNA 백신은 면역원성 반응을 생산하기 위해 세포에 충분한 RNA를 전달하는 바이러스 복제 경로에 의존한다. 본 발명의 제형은 강한 면역 반응을 초래하기 위해 충분한 단백질을 생산하는 바이러스 복제를 필요로 하지 않는다. 따라서, 본 발명의 mRNA는 자기-복제성 RNA가 아니며, 바이러스 복제에 필수적인 성분을 포함하지 않는다.

[0250] 본 발명은, 일부 양상에서, 지질 나노입자(LNP) 제형이 화학적으로 변형된 mRNA 백신 및 비변형된 mRNA 백신을 포함하는 mRNA 백신의 유효성을 상당히 향상시킨다는 놀라운 발견을 수반한다. LNP에서 제형화된 mRNA 백신의 효능은 몇몇 별개의 중앙 항원을 이용하여 생체내에서 시험되었다. 향상된 면역 반응을 제공하는 것에 추가로, 본 발명의 제형은 시험한 다른 백신보다 더 적은 용량의 항원에 의해 더 빠른 면역 반응을 생성한다. 본 발명의 mRNA-LNP 제형은 또한 상이한 담체에서 제형화된 백신보다 정량적으로 그리고 정성적으로 더 양호한 면역 반응을 생성한다. 추가적으로, 본 발명의 mRNA-LNP 제형은 mRNA의 용량이 다른 백신보다 더 낮을 때조차 다른 백신보다 더 우수하다.

[0251] 본 명세서에 기재된 연구에서 사용되는 LNP는 다양한 동물 모델에서 뿐만 아니라 인간에서 siRNA를 전달하기 위해 이전에 사용되었다. LNP 제형의 siRNA 전달과 관련하여 만들어진 관찰을 고려하여, LNP가 백신에서 유용하다는 사실은 상당히 놀랍다. LNP에서 제형화된 siRNA의 치료적 전달이 일시적 IgM 반응과 관련된 바람직하지 않은 염증 반응을 야기하여, 전형적으로 항원 생산의 감소 및 손상된 면역 반응을 야기한다는 것이 관찰되었다. siRNA에 의해 관찰된 발견과 대조적으로, 본 발명의 LNP-mRNA 제형은 일시적 IgM 반응보다는 예방적 및 치료적 반응에 충분한 향상된 IgG 수준을 생성하는 것으로 본 명세서에서 입증된다.

[0252] 핵산/폴리뉴클레오타이드

[0253] 본 명세서에서 제공되는 암 백신은 적어도 하나의 암 항원의 폴리펩타이드를 암호화하는 오픈 리딩 프레임을 갖는 적어도 하나의(하나 이상의) 리보핵산(RNA) 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 가장 넓은 의미에서 용어 "핵산"은 뉴클레오타이드의 중합체를 포함하는 임의의 화합물 및/또는 물질을 포함한다. 이들 중합체는 폴리뉴클레오타이드로서 지칭된다.

[0254] 핵산(또한 폴리뉴클레오타이드로서 지칭됨)은, 예를 들어, 리보핵산(RNA), 데옥시리보핵산(DNA), 트레오스 핵산(TNA), 글리콜 핵산(GNA), 펩타이드 핵산(PNA), 잠금 핵산(LNA,  $\beta$ -D-리보 입체배치를 갖는 LNA,  $\alpha$ -L-리보 입체배치를 갖는  $\alpha$ -LNA(LNA의 부분입체이성질체), 2'-아미노 작용기화를 갖는 2'-아미노-LNA, 및 2'-아미노 작용기화를 갖는 2'-아미노- $\alpha$ -LNA를 포함함), 에틸렌 핵산(ENA), 사이클로헥센일 핵산(CeNA) 또는 키메라 또는 이들의 조합일 수 있거나 또는 이들을 포함할 수 있다.

[0255] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 폴리뉴클레오타이드는 전령 RNA(mRNA)로서 작용한다. "전령 RNA"(mRNA)는 (적어도 하나의) 폴리펩타이드(천연 유래, 비천연 유래, 또는 아미노산의 변형된 중합체)를 암호화하는 임의의 폴리뉴클레오타이드를 지칭하고, 시험관내, 생체내, 동소 또는 생체외에서 암호화된 폴리펩타이드를 생산하도록 절단될 수 있다.

[0256] mRNA 분자의 기본 성분은 전형적으로 적어도 하나의 암호화 영역, 5' 비번역 영역(UTR), 3'UTR, 5' 캡 및 폴리-A 꼬리를 포함한다. 본 개시내용의 폴리뉴클레오타이드는 mRNA로서 작용할 수 있지만, 핵산 기반 치료제를 이용하여 효과적인 폴리펩타이드의 기존의 문제에 작용하는 그들의 기능적 및/또는 구조적 설계 특징에서 야생형 mRNA와 구별될 수 있다.

[0257] 일부 실시형태에서, 암 백신의 RNA 폴리뉴클레오타이드는 2-10, 2-9, 2-8, 2-7, 2-6, 2-5, 2-4, 2-3, 3-10, 3-9, 3-8, 3-7, 3-6, 3-5, 3-4, 4-10, 4-9, 4-8, 4-7, 4-6, 4-5, 5-10, 5-9, 5-8, 5-7, 5-6, 6-10, 6-9, 6-8, 6-7, 7-10, 7-9, 7-8, 8-10, 8-9 또는 9-10개의 항원성 폴리펩타이드를 암호화한다. 일부 실시형태에서, 암 백신의 RNA 폴리뉴클레오타이드는 적어도 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 또는 100개의 항원 폴리펩타이드를 암호화한다. 일부 실시형태에서, 암 백신의 RNA 폴리뉴클레오타이드는 적어도 100 또는 적어도 200개의 항원성 폴리펩타이드를 암호화한다. 일부 실시형태에서, 암 백신의 RNA 폴리뉴클레오타이드는 1-10, 5-15, 10-20, 15-25, 20-30, 25-35, 30-40, 35-45, 40-50, 55-65, 60-70, 65-75, 70-80, 75-85, 80-90, 85-95, 90-100, 1-50, 1-100, 2-50 또는 2-100개의 항원성 폴리펩타이드를 암호화한다.

[0258] 일부 실시형태에서, 암 백신의 RNA 폴리뉴클레오타이드는 2-10, 2-9, 2-8, 2-7, 2-6, 2-5, 2-4, 2-3, 3-10, 3-9, 3-8, 3-7, 3-6, 3-5, 3-4, 4-10, 4-9, 4-8, 4-7, 4-6, 4-5, 5-10, 5-9, 5-8, 5-7, 5-6, 6-10, 6-9, 6-8, 6-7, 7-10, 7-9, 7-8, 8-10, 8-9 또는 9-10 활성화 종양유전자 돌연변이 펩타이드를 암호화한다. 일부 실시형태

에서, 암 백신의 RNA 폴리뉴클레오타이드는 적어도 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 또는 100개의 활성화 종양유전자 돌연변이 펩타이드를 암호화한다. 일부 실시형태에서, 암 백신의 RNA 폴리뉴클레오타이드는 적어도 100개 또는 적어도 200개의 활성화 종양유전자 돌연변이 펩타이드를 암호화한다. 일부 실시형태에서, 암 백신의 RNA 폴리뉴클레오타이드는 1-10, 5-15, 10-20, 15-25, 20-30, 25-35, 30-40, 35-45, 40-50, 55-65, 60-70, 65-75, 70-80, 75-85, 80-90, 85-95, 90-100, 1-50, 1-100, 2-50 또는 2-100개의 활성화 종양유전자 돌연변이 펩타이드를 암호화한다.

[0259] 본 개시내용의 폴리뉴클레오타이드는, 일부 실시형태에서, 코돈 최적화된다. 코돈 최적화 방법은 당업계에 공지되어 있고, 본 명세서에 제공된 바와 같이 사용될 수 있다. 코돈 최적화는, 일부 실시형태에서, 적절한 폴딩을 보장하기 위해 표적 및 숙주 유기체에서 코돈 빈도를 매칭하거나; mRNA 안정성을 증가시키거나 또는 2차 구조를 감소시키기 위해 GC 함량을 편향시키거나; 유전자 작제 또는 발현을 손상시킬 수 있는 탠덤 반복부 코돈 또는 염기 실행을 최소화하거나; 전사 및 번역 제어 영역을 제작하거나; 단백질 수송 서열을 삽입 또는 제거하거나; 암호화된 단백질 내 번역 후 변형 부위(예를 들어, 글리코실화 부위)를 제거/첨가하거나; 단백질 도메인을 첨가, 제거 또는 서플링하거나; 제한 부위를 삽입 또는 결실시키거나; 리보솜 결합 부위 및 mRNA 분해 부위를 변형시키거나; 단백질의 다양한 도메인이 적절하게 폴딩되는 것을 허용하기 위해 번역 속도를 조절하거나; 또는 폴리뉴클레오타이드 내의 문제있는 2차 구조를 감소시키거나 또는 제거하기 위해 사용될 수 있다. 코돈 최적화 도구, 알고리즘 및 서비스는 당업계에 공지되어 있고 - 비제한적 예는 진아트(GeneArt)로부터의 서비스(라이프 테크놀로지스(Life Technologies)), DNA2.0(캘리포니아주 멘로 파크) 및/또는 소유권이 있는 방법을 포함한다. 일부 실시형태에서, 오픈 리딩 프레임(ORF) 서열은 최적화 알고리즘을 이용하여 최적화된다.

[0260] 일부 실시형태에서, 코돈 최적화된 서열은 천연 유래 또는 야생형 서열(예를 들어, 관심 대상의 폴리펩타이드 또는 단백질(예를 들어, 항원성 단백질 또는 폴리펩타이드)을 암호화하는 천연 유래 또는 야생형 mRNA 서열)에 대해 95% 미만의 서열 동일성을 공유한다. 일부 실시형태에서, 코돈 최적화된 서열은 천연 유래 또는 야생형 서열(예를 들어, 관심 대상의 폴리펩타이드 또는 단백질(예를 들어, 항원성 단백질 또는 폴리펩타이드)을 암호화하는 천연 유래 또는 야생형 mRNA 서열)에 대해 90% 미만의 서열 동일성을 공유한다. 일부 실시형태에서, 코돈 최적화된 서열은 천연 유래 또는 야생형 서열(예를 들어, 관심 대상의 폴리펩타이드 또는 단백질(예를 들어, 항원성 단백질 또는 폴리펩타이드)을 암호화하는 천연 유래 또는 야생형 mRNA 서열)에 대해 85% 미만의 서열 동일성을 공유한다. 일부 실시형태에서, 코돈 최적화된 서열은 천연 유래 또는 야생형 서열(예를 들어, 관심 대상의 폴리펩타이드 또는 단백질(예를 들어, 항원성 단백질 또는 폴리펩타이드)을 암호화하는 천연 유래 또는 야생형 mRNA 서열)에 대해 80% 미만의 서열 동일성을 공유한다. 일부 실시형태에서, 천연 유래 또는 야생형 서열(예를 들어, 관심 대상의 폴리펩타이드 또는 단백질(예를 들어, 항원성 단백질 또는 폴리펩타이드)을 암호화하는 천연 유래 또는 야생형 mRNA 서열)에 대해 75% 미만의 서열 동일성을 공유한다.

[0261] 일부 실시형태에서, 코돈 최적화된 서열은 천연 유래 또는 야생형 서열(예를 들어, 관심 대상의 폴리펩타이드 또는 단백질(예를 들어, 항원성 단백질 또는 폴리펩타이드)을 암호화하는 천연 유래 또는 야생형 mRNA 서열)에 대해 65% 내지 85%(예를 들어, 약 67% 및 약 85% 또는 약 67% 및 약 80%) 서열 동일성을 공유한다. 일부 실시형태에서, 코돈 최적화된 서열은 천연 유래 또는 야생형 서열(예를 들어, 항원성 단백질 또는 폴리펩타이드)을 암호화하는 천연 유래 또는 야생형 mRNA 서열)에 대해 65% 내지 75% 또는 약 80% 서열 동일성을 공유한다.

[0262] 일부 실시형태에서, 코돈 최적화된 RNA는, 예를 들어, G/C 수준이 향상된 것일 수 있다. 핵산 분자의 G/C-함량은 RNA의 안정성에 영향을 미칠 수 있다. 증가된 양의 구아닌(G) 및/또는 사이토신(C) 잔기를 갖는 RNA는 다량의 아데닌(A) 및 티민(T) 또는 유라실(U) 뉴클레오타이드를 함유하는 핵산보다 기능적으로 더 안정할 수 있다. W002/098443은 번역된 영역에서의 서열 변형에 의해 안정화된 mRNA를 함유하는 약제학적 조성물을 개시한다. 유전자 암호에 대한 축퇴에 기인하여, 변형은 얻어진 아미노산을 바꾸는 일 없이 기존의 코돈을 더 큰 RNA 안정성을 촉진시키는 것으로 치환함으로써 작동된다. 접근은 RNA의 암호화 영역으로 제한된다.

[0263] 항원/항원성 폴리펩타이드

[0264] 일부 실시형태에서, 암 폴리펩타이드(예를 들어, 활성화 종양유전자 돌연변이 펩타이드)는 5개의 아미노산보다 길고, 50개의 아미노산보다 더 짧다. 일부 실시형태에서, 암 폴리펩타이드는 25개의 아미노산보다 길고, 50개의 아미노산보다 더 짧다. 따라서, 폴리펩타이드는 유전자 산물, 천연 유래 폴리펩타이드, 합성 폴리펩타이드, 상동체, 오솔로그, 파라로그, 단편 및 다른 동등물, 앞서 언급한 것의 변이체 및 유사체를 포함한다. 폴리펩타이드는 단일 분자일 수 있거나 또는 다분자 복합체, 예컨대 이량체, 삼량체 또는 사량체일 수 있다. 폴리펩타이드는 또한 단일쇄 또는 다중쇄 폴리펩타이드, 예컨대 항체 또는 인슐린을 포함할 수 있고, 회합 또는 연결될 수

있다. 가장 통상적으로는, 이황화결합은 다중쇄 폴리펩타이드에서 발견된다. 용어 폴리펩타이드는 또한 적어도 하나의 아미노산 잔기가 대응하는 천연 유래 아미노산의 인공 화학적 유사체인 아미노산 중합체에 적용될 수 있다.

- [0265] 용어 "폴리펩타이드 변이체"는 그들의 아미노산 서열이 천연 또는 기준 서열과 상이한 분자를 지칭한다. 아미노산 서열 변이체는 천연 또는 기준 서열에 비해 아미노산 서열 내에서 소정의 위치에서 치환, 결실 및/또는 삽입을 가질 수 있다. 보통, 변이체는 천연 또는 기준 서열에 대해 적어도 50% 동일성을 가진다. 일부 실시형태에서, 변이체는 천연 또는 기준 서열에 대해 적어도 80%, 또는 적어도 90% 동일성을 공유한다.
- [0266] 일부 실시형태에서, "변이체 모방체"가 제공된다. 본 명세서에 사용되는 바와 같은, 용어 "변이체 모방체"는 활성화된 서열을 모방하는 적어도 하나의 아미노산을 함유하는 것이다. 예를 들어, 글루타메이트는 포스포로-트레오닌 및/또는 포스포로-세린에 대한 모방체로서 작용할 수 있다. 대안적으로, 변이체 모방체는 비활성화 또는 모방체를 함유하는 비활성화된 산물을 초래할 수 있고, 예를 들어, 페닐알라닌은 타이로신의 비활성화 치환으로서 작용할 수 있거나; 또는 알라닌은 세린의 비활성화 치환으로서 작용할 수 있다.
- [0267] "오솔로그"는 중분화에 의해 공통 조상 유전자로부터 진화된 상이한 종에서의 유전자를 지칭한다. 정상적으로, 오솔로그는 진화 과정에서 동일한 기능을 보유한다. 오솔로그의 동정은 새로 서열분석된 계통에서 유전자 기능의 신뢰 가능한 예측에 중요하다.
- [0268] "유사체"는 하나 이상의 아미노산 변경, 예를 들어, 모 또는 시작 폴리펩타이드의 특성 중 하나 이상을 여전히 유지하는 아미노산 잔기의 치환, 첨가 또는 결실에 의해 상이한 폴리펩타이드 변이체를 포함하는 것을 의미한다.
- [0269] 본 개시내용은 변이체 및 유도체를 포함하는 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드 기반인 몇몇 유형의 조성물을 제공한다. 이들은, 예를 들어, 치환, 삽입, 결실 및 공유 변이체 및 유도체를 포함한다. 용어 "유도체"는 용어 "변이체"와 동의어로 사용되지만, 일반적으로 기준 분자 또는 시작 분자에 대해 임의의 방법으로 변형 및/또는 변화된 분자를 지칭한다.
- [0270] 이렇게 해서, 기준 서열, 특히 본 명세서에 개시된 폴리펩타이드 서열에 대해 치환, 삽입 및/또는 첨가, 결실 및 공유 변형을 함유하는 펩타이드 또는 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 본 개시내용의 범주 내에 포함된다. 예를 들어, 서열 태그 또는 아미노산, 예컨대 하나 이상의 라이신은 (예를 들어, N-말단 또는 C-말단 단부에서) 펩타이드 서열에 첨가될 수 있다. 서열 태그는 펩타이드 검출, 정제 또는 국소화를 위해 사용될 수 있다. 라이신은 펩타이드 가용성을 증가시키기 위해 또는 바이오틴일화를 허용하기 위해 사용될 수 있다. 대안적으로, 펩타이드 또는 단백질의 아미노산 서열의 카복시 및 아미노 말단 영역에 위치한 아미노산 잔기는 선택적으로 결실되어 절단된 서열을 제공할 수 있다. 소정의 아미노산(예를 들어, C-말단의 또는 N-말단의 잔기)은 대안적으로, 서열의 사용, 예를 들어, 가용성이거나 또는 고체 지지체에 연결된 더 큰 서열의 부분으로서 서열의 발현에 따라서 결실될 수 있다.
- [0271] 폴리펩타이드를 언급할 때 "치환 변이체"는 제거된 천연 또는 시작 서열에서 적어도 하나의 아미노산 잔기 및 동일한 위치에서 그 자리에 삽입된 상이한 아미노산을 갖는 것이다. 치환은 분자 내 하나의 아미노산만이 치환된 단일일 수도 있고, 또는 그들은 둘 이상의 아미노산이 동일한 분자에서 치환된 다중일 수도 있다.
- [0272] 본 명세서에서 사용되는 용어 "보존적 아미노산 치환"은 서열에 정상적으로 존재하는 아미노산의 유사한 크기, 전하 또는 극성의 상이한 아미노산으로의 치환을 지칭한다. 보존적 치환의 예는 비극성(소수성) 잔기, 예컨대 아이소류신, 발린 및 류신의 다른 비극성 잔기로의 치환을 포함한다. 마찬가지로, 보존적 치환의 예는 하나의 극성(친수성) 잔기의 다른 것으로의 치환, 예컨대 알기닌과 라이신 사이, 글루타민과 아스파라긴 사이, 및 글리신과 세린 사이의 치환을 포함한다. 추가적으로, 염기성 잔기, 예컨대 라이신, 알기닌 또는 히스티딘의 다른 것으로의 치환, 또는 하나의 산성 잔기, 예컨대 아스파르트산 또는 글루탐산의 다른 산성 잔기로의 치환은 보존적 치환의 추가적인 예이다. 비보존적 치환의 예는 극성(친수성) 잔기, 예컨대 시스테인, 글루타민, 글루탐산 또는 라이신의 비극성(소수성) 아미노산 잔기, 예컨대 아이소류신, 발린, 류신, 알라닌, 메티오닌으로의 치환 및/또는 비극성 잔기의 극성 잔기로의 치환을 포함한다.
- [0273] 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드를 언급할 때 "특징"은 각각 분자의 별개의 아미노산 서열-기반 또는 뉴클레오타이드-기반 성분으로서 정의된다. 폴리뉴클레오타이드에 의해 암호화된 폴리펩타이드의 특징은 표면 징후, 국소 입체배치 형상, 폴드, 루프, 절반-루프, 도메인, 절반-도메인, 부위, 말다 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다.



- [0274] 폴리펩타이드를 언급할 때 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "도메인"은 하나 이상의 동정 가능한 구조적 또는 기능성 특징 또는 특성(예를 들어, 단백질-단백질 상호작용을 위한 부위로서 작용하는 결합 능력)을 갖는 폴리펩타이드의 모티프를 지칭한다.
- [0275] 폴리펩타이드를 언급할 때 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 "부위"는 아미노산 기반 실시형태에 관한 것이라면, "아미노산 잔기" 및 "아미노산 측쇄"와 동의어로 사용된다. 폴리뉴클레오타이드를 언급할 때 본 명세서에서 사용되는 용어 "부위"는 그것이 뉴클레오타이드 기반 실시형태라면 "뉴클레오타이드"와 동의어로 사용된다. 부위는 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드 기반 분자 내에서 변형되거나, 조작되거나, 변경되거나, 유도체화되거나 또는 변화될 수 있는 펩타이드 또는 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드 내의 위치를 나타낸다.
- [0276] 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드를 언급할 때 본 명세서에서 사용되는 용어 "말단" 또는 "말단의"는 각각 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드의 극단을 지칭한다. 이러한 극단은 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드의 처음 또는 마지막 부위만으로 제한되지 않지만, 말단 영역에서 추가적인 아미노산 또는 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 폴리펩타이드 기반 분자는 N-말단(유리 아미노기( $\text{NH}_2$ )를 갖는 아미노산에 의해 종결됨)과 C-말단(유리 카복실기( $\text{COOH}$ )를 갖는 아미노산에 의해 종결됨)을 둘 다 갖는 것을 특징으로 할 수 있다. 단백질은 이황화 결합에 의해 또는 비공유적 힘에 의해 함께 합쳐지는 다중 폴리펩타이드(다량체, 올리고머)로 구성된다. 이들 단백질은 다중 N-말단 및 C-말단을 가진다. 대안적으로, 폴리펩타이드의 말단은 그들이 경우에 따라 비-폴리펩타이드 기반 모이어티, 예컨대 유기 접합체로 시작되거나 또는 종결되도록 변형될 수 있다.
- [0277] 당업자가 인식하는 바와 같이, 단백질 단편, 기능성 단백질 도메인 및 상동성 단백질은 또한 관심 대상의 폴리펩타이드 범주 내인 것으로 고려된다. 예를 들어, 본 명세서에서 길이가 100개의 아미노산보다 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100개 이상의 기준 단백질의 임의의 단백질 단편(기준 폴리펩타이드 서열보다 적어도 하나의 아미노산 잔기가 더 짧지만 다른 것은 동일한 폴리펩타이드 서열을 의미함)이 제공된다. 다른 예에서, 본 명세서에 기재된 임의의 서열과 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 100% 동일한 10, 20, 30, 40, 50 또는 100개의 아미노산의 신장을 포함하는 임의의 단백질이 본 개시내용에 따라 이용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 폴리펩타이드는 본 명세서에 제공되거나 또는 언급된 임의의 서열에 나타난 바와 같은 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 이상의 돌연변이를 포함한다. 다른 예에서, 본 명세서에 기재된 임의의 서열과 80% 초과, 90%, 95% 또는 100% 동일한 20, 30, 40, 50 또는 100개의 아미노산의 신장을 포함하는 임의의 단백질은 본 개시내용에 따라 이용될 수 있되, 상기 단백질은 본 명세서에 기재된 임의의 서열과 80%, 75%, 70%, 65% 또는 60% 미만으로 동일한 5, 10, 15, 20, 25 또는 30개의 아미노산의 신장을 가진다.
- [0278] 본 개시내용의 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드는 기준 분자(예를 들어, 기준 폴리펩타이드 또는 기준 폴리뉴클레오타이드)와, 예를 들어, 당업계에 기재된 분자(예를 들어, 조작되거나 또는 설계된 분자 또는 야생형 분자)와 소정의 정도의 서열 유사성 또는 동일성을 공유할 수 있다. 당업계에 공지된 바와 같은 용어 "동일성"은 서열을 비교함으로써 결정되는 2 이상의 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드 서열 사이의 관계를 지칭한다. 당업계에서, 동일성은 또한 2 이상의 아미노산 잔기 또는 핵산 잔기의 가닥 사이의 매치 수에 의해 결정되는 바와 같은 이들 사이의 서열 관련성 정도를 의미한다. 동일성은 특정 수학적 모델 또는 컴퓨터 프로그램(예를 들어, "알고리즘")에 의해 처리되는 (만약에 있다면) 갭 정렬에 의한 2 이상의 서열 중 더 작은 것 사이의 동일한 매치의 백분율을 측정한다. 관련된 펩타이드의 동일성은 공지된 방법에 의해 용이하게 계산될 수 있다. "동일성 %"는 그것이 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드 서열에 적용된다면, 필요하다면 최대 동일성 백분율을 달성하기 위해 서열을 정렬하고 갭을 도입한 후에, 제2 서열의 아미노산 서열 또는 핵산 서열 내 찬기와 동일한 후보 아미노산 또는 핵산 서열에서의 잔기(아미노산 잔기 또는 핵산 잔기)의 백분율로서 정의된다. 정렬을 위한 방법 및 컴퓨터 프로그램은 당업계에 잘 공지되어 있다. 동일성은 백분율 동일성의 계산에 의존하지만, 계산에서 도입된 갭 및 페널티에 기인하여 값이 상이할 수 있다는 것이 이해된다. 일반적으로, 특정 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드의 변이체는 본 명세서에 기재되고 당업자에게 공지된 서열 정렬 프로그램 및 매개변수에 의해 결정하여 특정 기준 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드에 대해 적어도 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 그러나 100% 미만의 서열 동일성을 갖는다. 정렬을 위한 이러한 도구는 BLAST 스위트의 도구를 포함한다(Stephen F. Altschul, et al (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402). 다른 대중적인 국소 정렬 기법은 스미스-워터만(Smith-Waterman) 알고리즘에 기반한다(Smith, T.F. & Waterman, M.S. (1981) "Identification of common molecular subsequences." J. Mol. Biol. 147:195-197). 동적 프로그래밍에 기반한 일반적인 전반적 정렬 기법은 니들만-원시(Needleman-Wunsch) 알고리즘이다(Needleman, S.B. & Wunsch, C.D. (1970) "A general method applicable to the search for

similarities in the amino acid sequences of two proteins." J. Mol. Biol. 48:443-453.). 더 최근에 알려진 바에 의하면 니들만-벤시 알고리즘을 포함하는 최적의 전반적 정렬 방법 이외의 뉴클레오타이드 및 단백질 서열의 전반적 정렬을 생성하는 빠른 최적의 전반적 서열 정렬 알고리즘(Fast Optimal Global Sequence Alignment Algorithm: FOGSAA)이 개발되었다. 다른 도구가 본 명세서에서, 구체적으로는 이하의 "동일성"의 정의에 기재된다.

[0279] 본 명세서에 사용되는 바와 같은, 용어 "상동성"은 중합체 분자 사이의, 예를 들어, 핵산 분자(예를 들어, DNA 분자 및/또는 RNA 분자) 사이의 그리고/또는 폴리펩타이드 분자 사이의 전반적 관계를 지칭한다. 매칭 잔기의 정렬에 의해 결정되는 유사성 또는 동일성의 역치 수준을 공유하는 중합체 분자(예를 들어, 핵산 분자(예를 들어, DNA 분자 및/또는 RNA 분자) 및/또는 폴리펩타이드 분자)는 상동으로 칭해진다. 상동성은 분자 사이의 관계를 기재하고 정량적 유사성 또는 동일성에 기반할 수 있는 정량적 용어이다. 유사성 또는 동일성은 두 비교 서열 사이의 서열 매치 정도를 정하는 정량적 용어이다. 일부 실시형태에서, 중합체 분자는 그들의 서열이 적어도 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99% 동일 또는 유사하다면, 서로에 대해 "상동"인 것으로 고려된다. 용어 "상동"은 필수적으로 적어도 두 서열(폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드 서열) 사이의 비교를 지칭한다. 두 폴리뉴클레오타이드 서열은 그들이 암호화하는 폴리펩타이드가 적어도 20개의 아미노산 중 적어도 하나의 신장에 대해 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 심지어 99%라면, 상동인 것으로 고려된다. 일부 실시형태에서, 상동성 폴리뉴클레오타이드 서열은 적어도 4 내지 5개의 독특하게 구체화된 아미노산의 신장을 암호화하는 능력을 특징으로 한다. 길이가 60개 미만의 뉴클레오타이드인 폴리뉴클레오타이드 서열에 대해, 상동성은 적어도 4 내지 5개의 독특하게 구체화된 아미노산의 신장을 암호화하는 능력에 의해 결정된다. 단백질이 적어도 20개의 아미노산의 적어도 하나의 신장에 대해 적어도 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90% 동일하다면, 두 단백질 서열은 상동성으로 고려된다.

[0280] 상동성은 비교되는 서열이 공통 유래로부터의 진화에서 분기된다는 것을 나타낸다. 용어 "상동체"는 공통 조상 서열로부터의 후손에 의해 제2 아미노산 서열 또는 핵산 서열과 관련된 제1 아미노산 서열 또는 핵산 서열(예를 들어, 유전자(DNA 또는 RNA) 또는 단백질 서열)을 지칭한다. 용어 "상동체"는 종분화 사건에 의해 분리되는 유전자 및/또는 단백질 사이의 관계 또는 유전자 중복 사건에 의해 분리되는 유전자 및/또는 단백질 사이의 관계에 적용될 수 있다. "오솔로그"는 종분화에 의해 공통 조상 유전자(또는 단백질)로부터 진화된 상이한 종에서의 유전자(또는 단백질)이다. 전형적으로, 오솔로그는 진화 과정에서 동일한 기능을 보유한다. "파라로그"는 계통 내에서 중복에 의해 관련된 유전자(또는 단백질)이다. 오솔로그는 진화 과정에서 동일한 기능을 보유하는 반면, 파라로그는 이들이 본래의 것과 관련된다면 새로운 기능으로 진화된다.

[0281] 용어 "동일성"은 중합체 분자 사이, 예를 들어, 폴리뉴클레오타이드 분자(예를 들어, DNA 분자 및/또는 RNA 분자) 사이 그리고/또는 폴리펩타이드 분자 사이의 전반적 관련성을 지칭한다. 두 폴리핵산 서열의 동일성 백분율의 계산은, 예를 들어, 최적의 비교 목적을 위해 두 서열을 정렬함으로써 수행될 수 있다(예를 들어, 갭은 최적의 정렬을 위해 제1 핵산 서열과 제2 핵산 서열 중 하나 또는 둘 다에 도입될 수 있고, 비-동일 서열은 비교 목적을 위해 무시될 수 있다). 소정의 실시형태에서, 비교 목적을 위해 정렬되는 서열의 길이는 기준 서열 길이의 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 100%이다. 이어서, 대응하는 뉴클레오타이드 위치에서 뉴클레오타이드가 비교된다. 제1 서열 내 위치가 제2 서열 내 대응하는 위치와 동일한 뉴클레오타이드에 의해 점유된다면, 분자는 해당 위치에서 동일하다. 두 서열 사이의 동일성 백분율은 서열에 의해 공유되는 동일한 위치의 수의 함수이며, 두 서열의 최적의 정렬을 위해 도입될 것이 필요로 되는 갭의 수, 및 각각의 갭의 길이를 고려한다. 서열의 비교 및 두 서열 사이의 동일성 백분율의 결정은 수학적 알고리즘을 이용하여 달성될 수 있다. 예를 들어, 두 핵산 서열 사이의 동일성 백분율은 문헌[Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; 및 Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991]에 기재된 것과 같은 방법을 이용하여 결정될 수 있고; 이들 각각은 본 명세서에 참고로 편입된다. 예를 들어, 두 핵산 서열 사이의 동일성 백분율은 PAM120 가중치 잔기 표, 12의 갭 길이 페널티 및 4의 갭 페널티를 이용하여 ALIGN 프로그램(버전 2.0)에 편입된, 마이어스(Meyers) 및 밀러(Miller)의 알고리즘(CABIOS, 1989, 4:11-17)을 이용하여 결정될 수 있다. 두 핵산 서열 사이의 동일성 백분율은, 대안적으로, NWSgapdna.CMP 매트릭스를 이용하는 GCG 소프트웨어 패키지에서 GAP 프로그램을 이용하여 결정될 수 있다. 서열 사이의 동일성 백분율을 결정하기 위해 흔히 사용되는 방법은 본 명세서에 참고로 편입된 문헌[Carillo, H., and Lipman, D., SIAM J

Applied Math., 48:1073 (1988)]에 개시된 것을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 동일성을 결정하기 위한 기법은 공공연하게 이용 가능한 컴퓨터 프로그램에서 체계화된다. 두 서열 사이의 상동성을 결정하기 위한 예시적 컴퓨터 소프트웨어는 GCG 프로그램 패키지, 문헌[Devereux, J., *et al.*, *Nucleic Acids Research*, 12(1), 387 (1984)], BLASTP, BLASTN 및 FASTA Altschul, 문헌[S. F. *et al.*, *J. Molec. Biol.*, 215, 403 (1990)]을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0282] 화학적 변형

[0283] 에피토프 항원을 암호화하는 변형된 뉴클레오타이드 서열

[0284] 본 개시내용의 RNA(예를 들어, mRNA) 백신은, 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 호흡기 세포융합 바이러스(RSV) 항원 폴리펩타이드를 암호화하는 오픈 리딩 프레임에 갖는 적어도 하나의 리보핵산(RNA) 폴리뉴클레오타이드를 포함하되, 상기 RNA는 적어도 하나의 화학적 변형을 포함한다.

[0285] 용어 "화학적 변형" 및 "화학적으로 변형된"은 그들의 위치, 패턴, 백분율 또는 집단 중 적어도 하나에서 아데노신(A), 구아노신(G), 유리딘(U), 티미딘(T) 또는 사이티딘(C) 리보뉴클레오타이드 또는 데옥시리보뉴클레오타이드에 대한 변형을 지칭한다. 일반적으로, 이들 용어는 천연 유래 5'-말단의 mRNA 캡 모이어티에서의 리보뉴클레오타이드 변형을 지칭하지 않는다.

[0286] 폴리뉴클레오타이드의 변형은, 본 명세서에 기재된 것을 포함하지만, 이들로 제한되지 않으며, 화학적 변형을 포함하는 해당 변형으로 명확하게 제한되지 않는다. 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, RNA 폴리뉴클레오타이드, 예컨대 mRNA 폴리뉴클레오타이드)는 천연 유래, 비천연 유래인 변형을 포함할 수 있거나 또는 폴리뉴클레오타이드는 천연 유래와 비-천연 유래 변형의 조합을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는, 예를 들어 (예를 들어, 연결 인산염에 대한, 포스포다이에스터 연결에 대한 또는 포스포다이에스터 골격에 대한) 당, 핵염기 또는 뉴클레오타이드간 연결의 임의의 유용한 변형을 포함할 수 있다.

[0287] 폴리펩타이드에 대해, 용어 "변형"은 정규 세트 20개의 아미노산에 대한 변형을 지칭한다. 본 명세서에 제공되는 바와 같은 폴리펩타이드는 또한 그들이 아미노산 치환, 삽입 또는 치환과 삽입의 조합을 함유한다면 "변형된" 것으로 고려된다.

[0288] 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, RNA 폴리뉴클레오타이드, 예컨대 mRNA 폴리뉴클레오타이드)는, 일부 실시형태에서, 다양한(1개 초과) 상이한 변형을 포함한다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드의 특정 영역은 1, 2 개 이상(선택적으로 상이한) 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드 변형을 함유한다. 일부 실시형태에서, 세포 또는 유기체에 도입된 변형된 RNA 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, 변형된 mRNA 폴리뉴클레오타이드)는 비변형 폴리뉴클레오타이드에 비해 각각 세포 또는 유기체에서 감소된 분해를 나타낸다. 일부 실시형태에서, 세포 또는 유기체에 도입된 변형된 RNA 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, 변형된 mRNA 폴리뉴클레오타이드)는 각각 세포 또는 유기체에서 감소된 번역원성(예를 들어, 감소된 선천성 반응)을 나타낼 수 있다.

[0289] 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, RNA 폴리뉴클레오타이드, 예컨대 mRNA 폴리뉴클레오타이드)는, 일부 실시형태에서, 목적하는 기능 또는 특성을 달성하기 위해 폴리뉴클레오타이드의 합성 동안 또는 합성 후 도입되는 비천연 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다. 변형은 뉴클레오타이드간 결합, 퓨린 또는 피리미딘 염기 또는 당에 존재할 수 있다. 변형은 화학적 합성에 의해 또는 쉘 말단에서 중합효소에 의해 또는 쉘의 다른 곳에서 도입될 수 있다. 폴리뉴클레오타이드의 임의의 영역은 화학적으로 변형될 수 있다.

[0290] 일부 실시형태에서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, RNA, 예를 들어, mRNA)는 화학적으로 변형된 핵염기를 포함한다. 본 발명은 본 명세서에 기재된 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, 하나 이상의 암 에피토프 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드)를 포함하는 변형된 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 변형된 폴리뉴클레오타이드는 화학적으로 변형된 그리고/또는 구조적으로 변형될 수 있다. 본 발명의 폴리뉴클레오타이드가 화학적으로 그리고/또는 구조적으로 변형될 때, 폴리뉴클레오타이드는 "변형된 폴리뉴클레오타이드"로서 지칭될 수 있다.

[0291] 본 개시내용은 하나 이상의 암 에피토프 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, RNA 폴리뉴클레오타이드, 예컨대 mRNA 폴리뉴클레오타이드)의 변형된 뉴클레오타이드 및 뉴클레오타이드를 제공한다. "뉴클레오타이드"는 유기 염기(예를 들어, 퓨린 또는 피리미딘) 또는 이의 유도체(또한 본 명세서에서 "핵염기"로서 지칭됨)와 조합한 당 분자(예를 들어, 펜토스 또는 리보스) 또는 이의 유도체를 함유하는 화합물을 지칭한다. "뉴클레오타이드"는 포스포에이트기를 포함하는 뉴클레오타이드를 지칭한다. 변형된 뉴클레오타이드는 임의의 유용한 방법에 의해, 예컨대 화학적으로, 효소적으로 또는 재조합적으로 합성된 하나 이상의 변형된 또



는 비천연 뉴클레오사이드를 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 연결된 뉴클레오사이드의 영역 또는 영역들을 포함할 수 있다. 이러한 영역은 가변 골격 결합을 가질 수 있다. 결합은 표준 포스포다이에스터 결합일 수 있고, 이 경우에 폴리뉴클레오타이드는 뉴클레오타이드의 영역을 포함한다.

[0292] 본 명세서에 개시된 변형된 폴리뉴클레오타이드는 다양한 별개의 변형을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 변형된 폴리뉴클레오타이드는 1, 2개 이상의(선택적으로 상이한) 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드 변형을 함유한다. 일부 실시형태에서, 세포에 도입된 변형된 폴리뉴클레오타이드는 하나 이상의 바람직한 특성, 예를 들어, 비변형 폴리뉴클레오타이드에 비해 세포에서 개선된 단백질 발현, 감소된 면역원성 또는 감소된 분해를 나타낼 수 있다.

[0293] 일부 실시형태에서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, 하나 이상의 암 에피토프 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드)는 구조적으로 변형된다. 본 명세서에 사용되는 바와 같은, "구조적" 변형은 2 이상의 연결된 뉴클레오사이드가 뉴클레오타이드 그 자체에 대한 상당한 화학적 변형 없이 폴리뉴클레오타이드에서 삽입되거나, 결실되거나, 중복되거나, 역위되거나 또는 무작위화된 것이다. 구조적 변형을 달성하기 위해 화학적 결합이 필수적으로 파괴되고 재형성되기 때문에, 구조적 변형은 화학적 특성을 가지며, 따라서 화학적 변형이다. 그러나, 구조적 변형은 뉴클레오타이드의 상이한 서열을 초래할 것이다. 예를 들어, 폴리뉴클레오타이드 "ATCG"는 "AT-5meC-G"로 화학적으로 변형될 수 있다. 동일한 폴리뉴클레오타이드는 "ATCG"로부터 "ATCCCG"로 구조적으로 변형될 수 있다. 본 명세서에서, 다이뉴클레오타이드 "CC"가 삽입되어 폴리뉴클레오타이드에 대한 구조적 변형을 초래한다.

[0294] 일부 실시형태에서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 화학적으로 변형된다. 폴리뉴클레오타이드와 관련하여 본 명세서에서 사용되는 용어 "화학적 변형" 또는 적절하다면, "화학적으로 변형된"은 아데노신(A), 구아노신(G), 유리딘(U), 또는 사이티딘(C) 리보- 또는 데옥시리보뉴클레오사이드에 대해 그들의 위치, 패턴, 백분율 또는 집단 중 하나 이상에서의 변형을 지칭한다. 일반적으로, 본 명세서에서, 이들 용어는 천연 유래 5' 말단의 mRNA 캡 모이어티에서의 리보뉴클레오타이드 변형을 지칭하는 것으로 의도되지 않는다.

[0295] 일부 실시형태에서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 모든 또는 임의의 동일한 뉴클레오사이드 유형의 균일한 화학적 변형 또는 모든 또는 임의의 동일한 뉴클레오사이드 유형에서 동일한 시작 변형의 단지 하방 적정(downward titration)에 의해 생성된 변형의 집단, 또는 모든 임의의 동일한 뉴클레오사이드의 그러나 무작위 편입이 있는(예컨대 모든 유리딘이 유리딘 유사체, 예를 들어, 슈도유리딘 또는 5-메톡시유리딘으로 대체되는 경우) 화학적 변형의 측정된 백분율을 가질 수 있다. 다른 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 전체 폴리뉴클레오타이드 전체적으로 동일한 뉴클레오사이드 유형 중 2, 3 또는 4개의 균일한 화학적 변형을 가질 수 있다(예컨대 모든 유리딘 및 모든 사이토신 등이 동일한 방법으로 변형됨).

[0296] 변형된 뉴클레오타이드 염기쌍은 표준 아데노신-티민, 아데노신-유라실, 또는 구아노신-사이토신 염기쌍뿐만 아니라 뉴클레오타이드 및/또는 비표준 또는 변형된 염기를 포함하는 변형된 뉴클레오타이드 사이에 형성된 염기쌍을 포함하되, 수소 결합 공여자 및 수소 결합 수용자의 배열은, 예를 들어, 적어도 하나의 화학적 변형을 갖는 해당 폴리뉴클레오타이드에서 비-표준 염기와 표준 염기 사이 또는 두 상보적 비표준 염기구조 사이에 수소 결합을 허용한다. 이러한 비-표준 염기쌍의 한 가지 예는 변형된 뉴클레오타이드 이노신과 아데닌, 사이토신 또는 유라실 사이의 염기쌍이다. 염기/당 또는 링커의 임의의 조합은 본 개시내용의 폴리뉴클레오타이드 내로 혼입될 수 있다.

[0297] 당업자는 달리 언급되는 경우를 제외하고, 본 출원에 제시된 폴리뉴클레오타이드 서열이 대표적 DNA 서열에서 "T"를 인용하지만, 서열이 RNA를 나타내는 경우 "T"는 "U"로 치환된다는 것을 인식할 것이다.

[0298] 본 개시내용의 조성물, 백신, 방법 및 합성 과정에 유용한 화학적 변형을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, RNA 폴리뉴클레오타이드, 예컨대 mRNA 폴리뉴클레오타이드)의 변형은 다음을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다: 균일하게 뉴클레오타이드, 뉴클레오사이드, 및 핵염기: 2-메틸티오-N6-(시스-하이드록시아이소펜텐일)아데노신; 2-메틸티오-N6-메틸아데노신; 2-메틸티오-N6-트레오닐 카바모일아데노신; N6-글리신일카바모일아데노신; N6-아이소펜텐일아데노신; N6-메틸아데노신; N6-트레오닐카바모일아데노신; 1,2'-O-다이메틸아데노신; 1-메틸아데노신; 2'-O-메틸아데노신; 2'-O-리보실아데노신(포스페이트); 2-메틸아데노신; 2-메틸티오-N6 아이소펜텐일아데노신; 2-메틸티오-N6-하이드록시노르발릴 카바모일아데노신; 2'-O-메틸아데노신; 2'-O-리보실아데노신(포스페이트); 아이소펜텐일아데노신; N6-(시스-하이드록시아이소펜텐일)아데노신; N6,2'-O-다이메틸아데노신; N6,2'-O-다이메틸아데노신; N6,N6,2'-O-트라이메틸아데노신; N6,N6-다이메틸아데노신; N6-아세틸아데노신; N6-하이드록시노르발릴카바모일아데노신; N6-메틸-N6-트레오닐카바모일아데노신; 2-메

틸아데노신; 2-메틸티오-N6-아이소펜텐일아데노신; 7-데아자-아데노신; N1-메틸-아데노신; N6,N6-(다이메틸)아데닌; N6-시스-하이드록시-아이소펜텐일-아데노신; α-티오-아데노신; 2-(아미노)아데닌; 2-(아미노프로필)아데닌; 2-(메틸티오)-N6-(아이소펜텐일)아데닌; 2-(알킬)아데닌; 2-(아미노알킬)아데닌; 2-(아미노프로필)아데닌; 2-(할로)아데닌; 2-(할로)아데닌; 2-(프로필)아데닌; 2'-아미노-2'-데옥시-ATP; 2'-아지도-2'-데옥시-ATP; 2'-데옥시-2'-a-아미노아데노신 TP; 2'-데옥시-2'-a-아지도아데노신 TP; 6-(알킬)아데닌; 6-(메틸)아데닌; 6-(알킬)아데닌; 6-(메틸)아데닌; 7-(데아자)아데닌; 8-(알켄일)아데닌; 8-(알킨일)아데닌; 8-(아미노)아데닌; 8-(티오알킬)아데닌; 8-(알켄일)아데닌; 8-(알킬)아데닌; 8-(알킨일)아데닌; 8-(아미노)아데닌; 8-(할로)아데닌; 8-(하이드록실)아데닌; 8-(티오알킬)아데닌; 8-(티올)아데닌; 8-아지도-아데노신; 아자아데닌; 데아자 아데닌; N6-(메틸)아데닌; N6-(아이소펜텐일)아데닌; 7-데아자-8-아자-아데노신; 7-메틸아데닌; 1-데아자아데노신 TP; 2'플루오로-N6-Bz-데옥시아데노신 TP; 2'-OMe-2'-아미노-ATP; 2'-O-메틸-N6-Bz-데옥시아데노신 TP; 2'-a-에틴일아데노신 TP; 2-아미노아데닌; 2-아미노아데노신 TP; 2-아미노-ATP; 2'-a-트라이플루오로메틸아데노신 TP; 2-아지도아데노신 TP; 2'-b-에틴일아데노신 TP; 2-브로모아데노신 TP; 2'-b-트라이플루오로메틸아데노신 TP; 2-클로로아데노신 TP; 2'-데옥시-2',2'-다이플루오로아데노신 TP; 2'-데옥시-2'-a-머캅토아데노신 TP; 2'-데옥시-2'-a-티오메톡시아데노신 TP; 2'-데옥시-2'-b-아미노아데노신 TP; 2'-데옥시-2'-b-아지도아데노신 TP; 2'-데옥시-2'-b-브로모아데노신 TP; 2'-데옥시-2'-b-클로로아데노신 TP; 2'-데옥시-2'-b-플루오로아데노신 TP; 2'-데옥시-2'-b-아이오도아데노신 TP; 2'-데옥시-2'-b-머캅토아데노신 TP; 2'-데옥시-2'-b-티오메톡시아데노신 TP; 2-플루오로아데노신 TP; 2-아이오도아데노신 TP; 2-머캅토아데노신 TP; 2-메톡시-아데닌; 2-메틸티오-아데닌; 2-트라이플루오로메틸아데노신 TP; 3-데아자-3-브로모아데노신 TP; 3-데아자-3-클로로아데노신 TP; 3-데아자-3-플루오로아데노신 TP; 3-데아자-3-아이오도아데노신 TP; 3-데아자아데노신 TP; 4'-아지도아데노신 TP; 4'-탄소환식 아데노신 TP; 4'-에틴일아데노신 TP; 5'-호모-아데노신 TP; 8-아자-ATP; 8-브로모-아데노신 TP; 8-트라이플루오로메틸아데노신 TP; 9-데아자아데노신 TP; 2-아미노퓨린; 7-데아자-2,6-다이아미노퓨린; 7-데아자-8-아자-2,6-다이아미노퓨린; 7-데아자-8-아자-2-아미노퓨린; 2,6-다이아미노퓨린; 7-데아자-8-아자-아데닌; 7-데아자-2-아미노퓨린; 2-티오사이티딘; 3-메틸사이티딘; 5-폼일사이티딘; 5-하이드록시메틸사이티딘; 5-메틸사이티딘; N4-아세틸사이티딘; 2'-O-메틸사이티딘; 2'-O-메틸사이티딘; 5,2'-O-다이메틸사이티딘; 5-폼일-2'-O-메틸사이티딘; 라이시딘; N4,2'-O-다이메틸사이티딘; N4-아세틸-2'-O-메틸사이티딘; N4-메틸사이티딘; N4,N4-다이메틸-2'-OMe-사이티딘 TP; 4-메틸사이티딘; 5-아자-사이티딘; 슈도-아이소-사이티딘; 피롤로-사이티딘; α-티오-사이티딘; 2-(티오)사이토신; 2'-아미노-2'-데옥시-CTP; 2'-아지도-2'-데옥시-CTP; 2'-데옥시-2'-a-아미노사이티딘 TP; 2'-데옥시-2'-a-아지도사이티딘 TP; 3-(데아자) 5-(아자)사이토신; 3-(메틸)사이토신; 3-(알킬)사이토신; 3-(데아자)-5-(아자)사이토신; 3-(메틸)사이티딘; 4,2'-O-다이메틸사이티딘; 5-(할로)사이토신; 5-(메틸)사이토신; 5-(프로필)사이토신; 5-(트라이플루오로메틸)사이토신; 5-(알킬)사이토신; 5-(알킨일)사이토신; 5-(할로)사이토신; 5-(프로필)사이토신; 5-(트라이플루오로메틸)사이토신; 5-브로모-사이티딘; 5-아이오도-사이티딘; 5-프로필일 사이토신; 6-(아조)사이토신; 6-아자-사이티딘; 아자 사이토신; 데아자 사이토신; N4 (아세틸)사이토신; 1-메틸-1-데아자-슈도아이소사이티딘; 1-메틸-슈도아이소사이티딘; 2-메톡시-5-메틸-사이티딘; 2-메톡시-사이티딘; 2-티오-5-메틸-사이티딘; 4-메톡시-1-메틸-슈도아이소사이티딘; 4-메톡시-슈도아이소사이티딘; 4-티오-1-메틸-1-데아자-슈도아이소사이티딘; 4-티오-1-메틸-슈도아이소사이티딘; 4-티오-슈도아이소사이티딘; 5-아자-제불라린; 5-메틸-제불라린; 피롤로-슈도아이소사이티딘; 제불라린; (E)-5-(2-브로모-비닐)사이티딘 TP; 2,2'-안하이드로-사이티딘 TP 하이드로클로라이드; 2'플루오르-N4-Bz-사이티딘 TP; 2'플루오르-N4-아세틸-사이티딘 TP; 2'-O-메틸-N4-아세틸-사이티딘 TP; 2'-O-메틸-N4-Bz-사이티딘 TP; 2'-a-에틴일사이티딘 TP; 2'-a-트라이플루오로메틸사이티딘 TP; 2'-b-에틴일사이티딘 TP; 2'-b-트라이플루오로메틸사이티딘 TP; 2'-데옥시-2',2'-다이플루오로사이티딘 TP; 2'-데옥시-2'-a-머캅토사이티딘 TP; 2'-데옥시-2'-a-티오메톡시사이티딘 TP; 2'-데옥시-2'-b-아미노사이티딘 TP; 2'-데옥시-2'-b-아지도사이티딘 TP; 2'-데옥시-2'-b-브로모사이티딘 TP; 2'-데옥시-2'-b-클로로사이티딘 TP; 2'-데옥시-2'-b-플루오로사이티딘 TP; 2'-데옥시-2'-b-아이오도사이티딘 TP; 2'-데옥시-2'-b-머캅토사이티딘 TP; 2'-데옥시-2'-b-티오메톡시사이티딘 TP; 2'-O-메틸-5-(1-프로필일)사이티딘 TP; 3'-에틴일사이티딘 TP; 4'-아지도사이티딘 TP; 4'-탄소환식 사이티딘 TP; 4'-에틴일사이티딘 TP; 5-(1-프로필일)아라-사이티딘 TP; 5-(2-클로로-페닐)-2-티오사이티딘 TP; 5-(4-아미노-페닐)-2-티오사이티딘 TP; 5-아미노알릴-CTP; 5-사이아노사이티딘 TP; 5-에틴일아라-사이티딘 TP; 5-에틴일사이티딘 TP; 5'-호모-사이티딘 TP; 5-메톡시사이티딘 TP; 5-트라이플루오로메틸-사이티딘 TP; N4-아미노-사이티딘 TP; N4-벤조일-사이티딘 TP; 슈도아이소사이티딘; 7-메틸구아노신; N2,2'-O-다이메틸구아노신; N2-메틸구아노신; 와이오신; 1,2'-O-다이메틸구아노신; 1-메틸구아노신; 2'-O-메틸구아노신; 2'-O-리보실구아노신(포스페이트); 2'-O-메틸구아노신; 2'-O-리보실구아노신(포스페이트); 7-아미노메틸-7-데아자구아노신; 7-사이아노-7-데아자구아노신; 아케오신; 메틸와이오신; N2,7-다이메틸구아노신; N2,N2,2'-O-트라이메

틸구아노신; N2,N2,7-트라이메틸구아노신; N2,N2-다이메틸구아노신; N2,7,2'-O-트라이메틸구아노신; 6-티오-구아노신; 7-데아자-구아노신; 8-옥소-구아노신; N1-메틸-구아노신; α-티오-구아노신; 2-(프로필)구아닌; 2-(알킬)구아닌; 2'-아미노-2'-데옥시-GTP; 2'-아지도-2'-데옥시-GTP; 2'-데옥시-2'-a-아미노구아노신 TP; 2'-데옥시-2'-a-아지도구아노신 TP; 6-(메틸)구아닌; 6-(알킬)구아닌; 6-(메틸)구아닌; 6-메틸-구아노신; 7-(알킬)구아닌; 7-(데아자)구아닌; 7-(메틸)구아닌; 7-(알킬)구아닌; 7-(데아자)구아닌; 7-(메틸)구아닌; 8-(알킬)구아닌; 8-(알킬일)구아닌; 8-(할로)구아닌; 8-(티오알킬)구아닌; 8-(알켄일)구아닌; 8-(알킬)구아닌; 8-(알킬일)구아닌; 8-(아미노)구아닌; 8-(할로)구아닌; 8-(하이드록실)구아닌; 8-(티오알킬)구아닌; 8-(티올)구아닌; 아자 구아닌; 데아자 구아닌; N-(메틸)구아닌; N-(메틸)구아닌; 1-메틸-6-티오-구아노신; 6-메톡시-구아노신; 6-티오-7-데아자-8-아자-구아노신; 6-티오-7-데아자-구아노신; 6-티오-7-메틸-구아노신; 7-데아자-8-아자-구아노신; 7-메틸-8-옥소-구아노신; N2,N2-다이메틸-6-티오-구아노신; N2-메틸-6-티오-구아노신; 1-Me-GTP; 2'-플루오로-N2-아이스뷰틸-구아노신 TP; 2'-O-메틸-N2-아이스뷰틸-구아노신 TP; 2'-a-에틸일구아노신 TP; 2'-a-트라이플루오로메틸구아노신 TP; 2'-b-에틸일구아노신 TP; 2'-b-트라이플루오로메틸구아노신 TP; 2'-데옥시-2',2'-다이플루오로구아노신 TP; 2'-데옥시-2'-a-머캅토구아노신 TP; 2'-데옥시-2'-a-티오메톡시구아노신 TP; 2'-데옥시-2'-b-아미노구아노신 TP; 2'-데옥시-2'-b-아지도구아노신 TP; 2'-데옥시-2'-b-브로모구아노신 TP; 2'-데옥시-2'-b-클로로구아노신 TP; 2'-데옥시-2'-b-플루오로구아노신 TP; 2'-데옥시-2'-b-아이오도구아노신 TP; 2'-데옥시-2'-b-머캅토구아노신 TP; 2'-데옥시-2'-b-티오메톡시구아노신 TP; 4'-아지도구아노신 TP; 4'-탄소환식 구아노신 TP; 4'-에틸일구아노신 TP; 5'-호모-구아노신 TP; 8-브로모-구아노신 TP; 9-데아자구아노신 TP; N2-아이스뷰틸-구아노신 TP; 1-메틸이노신; 이노신; 1,2'-O-다이메틸이노신; 2'-O-메틸이노신; 7-메틸이노신; 2'-O-메틸이노신; 에폭시케오신; 갈락토실-케오신; 만노실케오신; 케오신; 알릴아미노-티미딘; 아자 티미딘; 데아자 티미딘; 데옥시-티미딘; 2'-O-메틸유리딘; 2-티오유리딘; 3-메틸유리딘; 5-카복시메틸유리딘; 5-하이드록시유리딘; 5-메틸유리딘; 5-타우리노메틸-2-티오유리딘; 5-타우리노메틸유리딘; 다이하이드로유리딘; 슈도유리딘; (3-(3-아미노-3-카복시프로필)유리딘; 1-메틸-3-(3-아미노-5-카복시프로필)슈도유리딘; 1-메틸슈도유리딘; 1-에틸-슈도유리딘; 2'-O-메틸유리딘; 2'-O-메틸슈도유리딘; 2'-O-메틸유리딘; 2-티오-2'-O-메틸유리딘; 3-(3-아미노-3-카복시프로필)유리딘; 3,2'-O-다이메틸유리딘; 3-메틸-슈도-유리딘 TP; 4-티오유리딘; 5-(카복시하이드록시메틸)유리딘; 5-(카복시하이드록시메틸)유리딘 메틸 에스터; 5,2'-O-다이메틸유리딘; 5,6-다이하이드로-유리딘; 5-아미노메틸-2-티오유리딘; 5-카바모일메틸-2'-O-메틸유리딘; 5-카바모일메틸유리딘; 5-카복시하이드록시메틸유리딘; 5-카복시하이드록시메틸유리딘 메틸 에스터; 5-카복시메틸아미노메틸-2'-O-메틸유리딘; 5-카복시메틸아미노메틸-2-티오유리딘; 5-카복시메틸아미노메틸-2-티오유리딘; 5-카복시메틸아미노메틸유리딘; 5-카복시메틸아미노메틸유리딘; 5-카바모일메틸유리딘 TP; 5-메톡시카보닐메틸-2'-O-메틸유리딘; 5-메톡시카보닐메틸-2-티오유리딘; 5-메톡시카보닐메틸유리딘; 5-메틸유리딘, 5-메톡시유리딘; 5-메틸-2-티오유리딘; 5-메틸아미노메틸-2-셀레노유리딘; 5-메틸아미노메틸-2-티오유리딘; 5-메틸아미노메틸유리딘; 5-메틸다이하이드로유리딘; 5-옥시아세트산-유리딘 TP; 5-옥시아세트산-메틸 에스터-유리딘 TP; N1-메틸-슈도-유라실; N1-에틸-슈도-유라실; 유리딘 5-옥시아세트산; 유리딘 5-옥시아세트산 메틸 에스터; 3-(3-아미노-3-카복시프로필)-유리딘 TP; 5-(아미노-펜텐일아미노메틸)-2-티오유리딘 TP; 5-(아미노-펜텐일아미노메틸)-2'-O-메틸유리딘 TP; 5-(아미노-펜텐일아미노메틸)유리딘 TP; 5-프로판일 유라실; α-티오-유리딘; 1-(아미노알킬아미노-카보닐에틸엔일)-2(티오)-슈도유라실; 1-(아미노알킬아미노카보닐에틸엔일)-2,4-(다이티오)슈도유라실; 1-(아미노알킬아미노카보닐에틸엔일)-4(티오)슈도유라실; 1-(아미노알킬아미노카보닐에틸엔일)-슈도유라실; 1-(아미노카보닐에틸엔일)-2(티오)-슈도유라실; 1-(아미노카보닐에틸엔일)-2,4-(다이티오)슈도유라실; 1-(아미노카보닐에틸엔일)-4(티오)슈도유라실; 1-치환된 2-(티오)-슈도유라실; 1-치환된 2,4-(다이티오)슈도유라실; 1-치환된 4-(티오)슈도유라실; 1-치환된 슈도유라실; 1-(아미노알킬아미노-카보닐에틸엔일)-2-(티오)-슈도유라실; 1-메틸-3-(3-아미노-3-카복시프로필) 슈도유리딘 TP; 1-메틸-3-(3-아미노-3-카복시프로필)슈도-UTP; 1-메틸-슈도-UTP; 1-에틸-슈도-UTP; 2-(티오)슈도유라실; 2'-데옥시유리딘; 2'-플루오로유리딘; 2-(티오)유라실; 2,4-(다이티오)슈도유라실; 2'-메틸, 2'-아미노, 2'-아지도, 2'-플루오로-구아노신; 2'-아미노-2'-데옥시-UTP; 2'-아지도-2'-데옥시-UTP; 2'-아지도-데옥시유리딘 TP; 2'-O-메틸슈도유리딘; 2'-데옥시유리딘; 2'-플루오로유리딘; 2'-데옥시-2'-a-아미노유리딘 TP; 2'-데옥시-2'-a-아지도유리딘 TP; 2-메틸슈도유리딘; 3-(3-아미노-3 카복시프로필)유라실; 4-(티오)슈도유라실; 4-(티오)슈도유라실; 4-(티오)유라실; 4-티오유라실; 5-(1,3-다이아졸-1-알킬)유라실; 5-(2-아미노프로필)유라실; 5-(아미노알킬)유라실; 5-(다이메틸아미노알킬)유라실; 5-(구아니디늄알킬)유라실; 5-(메톡시카보닐메틸)-2-(티오)유라실; 5-(메톡시카보닐-메틸)유라실; 5-(메틸) 2-(티오)유라실; 5-(메틸) 2,4-(다이티오)유라실; 5-(메틸)-4-(티오)유라실; 5-(메틸아미노메틸)-2-(티오)유라실; 5-(메틸아미노메틸)-2,4-(다이티오)유라실; 5-(메틸아미노메틸)-4(티오)유라실; 5-(프로판일)유라실; 5-(트라이플루오로메틸)유라실; 5-(2-아미노프로필)유라실; 5-(알킬)-2-(티오)슈도유라실; 5-(알킬)-2,4-

(다이티오)슈도유라실; 5-(알킬)-4-(티오)슈도유라실; 5-(알킬)슈도유라실; 5-(알킬)유라실; 5-(알킬일)유라실; 5-(알릴아미노)유라실; 5-(사이아노알킬)유라실; 5-(다이알킬아미노알킬)유라실; 5-(다이메틸아미노알킬)유라실; 5-(구아니디늄알킬)유라실; 5-(할로)유라실; 5-(1,3-다이아졸-1-알킬)유라실; 5-(메톡시)유라실; 5-(메톡시카보닐메틸)-2-(티오)유라실; 5-(메톡시카보닐-메틸)유라실; 5-(메틸)-2-(티오)유라실; 5-(메틸)-2,4-(다이티오)유라실; 5-(메틸)-4-(티오)유라실; 5-(메틸)-2-(티오)슈도유라실; 5-(메틸)-2,4-(다이티오)슈도유라실; 5-(메틸)-4-(티오)슈도유라실; 5-(메틸)슈도유라실; 5-(메틸아미노메틸)-2-(티오)유라실; 5-(메틸아미노메틸)-2,4-(다이티오)유라실; 5-(메틸아미노메틸)-4-(티오)유라실; 5-(프로핀일)유라실; 5-(트라이플루오로메틸)유라실; 5-아미노알릴-유리딘; 5-브로모-유리딘; 5-아이오도-유리딘; 5-유라실; 6-(아조)유라실; 6-(아조)유라실; 6-아자-유리딘; 알릴아미노-유라실; 아자 유라실; 데아자 유라실; N3-(메틸)유라실; 슈도-UTP-1-2-에탄산; 슈도유라실; 4-티오-슈도-UTP; 1-카복시메틸-슈도유리딘; 1-메틸-1-데아자-슈도유리딘; 1-프로핀일-유리딘; 1-타우리노메틸-1-메틸-유리딘; 1-타우리노메틸-4-티오-유리딘; 1-타우리노메틸-슈도유리딘; 2-메톡시-4-티오-슈도유리딘; 2-티오-1-메틸-1-데아자-슈도유리딘; 2-티오-1-메틸-슈도유리딘; 2-티오-5-아자-유리딘; 2-티오-다이하이드로슈도유리딘; 2-티오-다이하이드로유리딘; 2-티오-슈도유리딘; 4-메톡시-2-티오-슈도유리딘; 4-메톡시-슈도유리딘; 4-티오-1-메틸-슈도유리딘; 4-티오-슈도유리딘; 5-아자-유리딘; 다이하이드로슈도유리딘; (±)1-(2-하이드록시프로필)슈도유리딘 TP; (2R)-1-(2-하이드록시프로필)슈도유리딘 TP; (2S)-1-(2-하이드록시프로필)슈도유리딘 TP; (E)-5-(2-브로모-비닐)아라-유리딘 TP; (E)-5-(2-브로모-비닐)유리딘 TP; (Z)-5-(2-브로모-비닐)아라-유리딘 TP; (Z)-5-(2-브로모-비닐)유리딘 TP; 1-(2,2,2-트라이플루오로에틸)-슈도-UTP; 1-(2,2,3,3,3-펜타플루오로프로필)슈도유리딘 TP; 1-(2,2-다이메톡시에틸)슈도유리딘 TP; 1-(2,4,6-트라이메틸벤질)슈도유리딘 TP; 1-(2,4,6-트라이메틸-벤질)슈도-UTP; 1-(2,4,6-트라이메틸-페닐)슈도-UTP; 1-(2-아미노-2-카복시에틸)슈도-UTP; 1-(2-아미노-에틸)슈도-UTP; 1-(2-하이드록시에틸)슈도유리딘 TP; 1-(2-메톡시에틸)슈도유리딘 TP; 1-(3,4-비스-트라이플루오로메톡시벤질)슈도유리딘 TP; 1-(3,4-다이메톡시벤질)슈도유리딘 TP; 1-(3-아미노-3-카복시프로필)슈도-UTP; 1-(3-아미노-프로필)슈도-UTP; 1-(3-사이클로프로필-프로프-2-인일)슈도유리딘 TP; 1-(4-아미노-4-카복시뷰틸)슈도-UTP; 1-(4-아미노-벤질)슈도-UTP; 1-(4-아미노-뷰틸)슈도-UTP; 1-(4-아미노-페닐)슈도-UTP; 1-(4-아지도벤질)슈도유리딘 TP; 1-(4-브로모벤질)슈도유리딘 TP; 1-(4-클로로벤질)슈도유리딘 TP; 1-(4-플루오로벤질)슈도유리딘 TP; 1-(4-아이오도벤질)슈도유리딘 TP; 1-(4-메탄설폰일벤질)슈도유리딘 TP; 1-(4-메톡시벤질)슈도유리딘 TP; 1-(4-메톡시-벤질)슈도-UTP; 1-(4-메톡시-페닐)슈도-UTP; 1-(4-메틸벤질)슈도유리딘 TP; 1-(4-메틸-벤질)슈도-UTP; 1-(4-나이트로벤질)슈도유리딘 TP; 1-(4-나이트로-벤질)슈도-UTP; 1-(4-나이트로-페닐)슈도-UTP; 1-(4-티오메톡시벤질)슈도유리딘 TP; 1-(4-트라이플루오로메톡시벤질)슈도유리딘 TP; 1-(4-트라이플루오로메틸벤질)슈도유리딘 TP; 1-(5-아미노-펜틸)슈도-UTP; 1-(6-아미노-헥실)슈도-UTP; 1,6-다이메틸-슈도-UTP; 1-[3-(2-(2-(2-아미노에톡시)-에톡시)-에톡시)-프로피온일]슈도유리딘 TP; 1-[3-(2-(2-아미노에톡시)-에톡시)-프로피온일] 슈도유리딘 TP; 1-아세틸슈도유리딘 TP; 1-알킬-6-(1-프로핀일)-슈도-UTP; 1-알킬-6-(2-프로핀일)-슈도-UTP; 1-알킬-6-알릴-슈도-UTP; 1-알킬-6-에틸일-슈도-UTP; 1-알킬-6-호모알릴-슈도-UTP; 1-알킬-6-비닐-슈도-UTP; 1-알릴슈도유리딘 TP; 1-아미노메틸-슈도-UTP; 1-벤조일슈도유리딘 TP; 1-벤질옥시메틸슈도유리딘 TP; 1-벤질-슈도-UTP; 1-바이오틴일-PEG2-슈도유리딘 TP; 1-바이오틴일슈도유리딘 TP; 1-뷰틸-슈도-UTP; 1-사이아노메틸슈도유리딘 TP; 1-사이클로뷰틸메틸-슈도-UTP; 1-사이클로뷰틸-슈도-UTP; 1-사이클로헥실메틸-슈도-UTP; 1-사이클로헥실-슈도-UTP; 1-사이클로옥틸메틸-슈도-UTP; 1-사이클로옥틸-슈도-UTP; 1-사이클로펜틸메틸-슈도-UTP; 1-사이클로펜틸-슈도-UTP; 1-사이클로프로필메틸-슈도-UTP; 1-사이클로프로필-슈도-UTP; 1-에틸-슈도-UTP; 1-헥실-슈도-UTP; 1-호모알릴슈도유리딘 TP; 1-하이드록시메틸슈도유리딘 TP; 1-아이소-프로필-슈도-UTP; 1-Me-2-티오-슈도-UTP; 1-Me-4-티오-슈도-UTP; 1-Me-알파-티오-슈도-UTP; 1-메탄설폰일메틸슈도유리딘 TP; 1-메톡시메틸슈도유리딘 TP; 1-메틸-6-(2,2,2-트라이플루오로에틸)슈도-UTP; 1-메틸-6-(4-몰폴리노)-슈도-UTP; 1-메틸-6-(4-티오몰폴리노)-슈도-UTP; 1-메틸-6-(치환된 페닐)슈도-UTP; 1-메틸-6-아미노-슈도-UTP; 1-메틸-6-아지도-슈도-UTP; 1-메틸-6-브로모-슈도-UTP; 1-메틸-6-뷰틸-슈도-UTP; 1-메틸-6-클로로-슈도-UTP; 1-메틸-6-사이아노-슈도-UTP; 1-메틸-6-다이메틸아미노-슈도-UTP; 1-메틸-6-에톡시-슈도-UTP; 1-메틸-6-에틸카복실레이트-슈도-UTP; 1-메틸-6-에틸-슈도-UTP; 1-메틸-6-플루오로-슈도-UTP; 1-메틸-6-폼일-슈도-UTP; 1-메틸-6-하이드록시아미노-슈도-UTP; 1-메틸-6-하이드록시-슈도-UTP; 1-메틸-6-아이오도-슈도-UTP; 1-메틸-6-아이소-프로필-슈도-UTP; 1-메틸-6-메톡시-슈도-UTP; 1-메틸-6-메틸아미노-슈도-UTP; 1-메틸-6-페닐-슈도-UTP; 1-메틸-6-프로필-슈도-UTP; 1-메틸-6-tert-뷰틸-슈도-UTP; 1-메틸-6-트라이플루오로메톡시-슈도-UTP; 1-메틸-6-트라이플루오로메틸-슈도-UTP; 1-몰폴리노메틸슈도유리딘 TP; 1-펜틸-슈도-UTP; 1-페닐-슈도-UTP; 1-피발로일슈도유리딘 TP; 1-프로가길슈도유리딘 TP; 1-프로필-슈도-UTP; 1-프로핀일-슈도유리딘; 1-p-톨릴-슈도-UTP; 1-tert-뷰틸-슈도-UTP; 1-티오메톡시메틸

슈도유리딘 TP; 1-티오폐닐폴리노메틸슈도유리딘 TP; 1-트라이플루오로아세틸슈도유리딘 TP; 1-트라이플루오로메틸-슈도-UTP; 1-비닐슈도유리딘 TP; 2,2'-안하이드로-유리딘 TP; 2'-브로모-데옥시유리딘 TP; 2'-F-5-메틸-2'-데옥시-UTP; 2'-OMe-5-Me-UTP; 2'-OMe-슈도-UTP; 2'-a-에틴일유리딘 TP; 2'-a-트라이플루오로메틸유리딘 TP; 2'-b-에틴일유리딘 TP; 2'-b-트라이플루오로메틸유리딘 TP; 2'-데옥시-2',2'-다이플루오로유리딘 TP; 2'-데옥시-2'-a-머캅토유리딘 TP; 2'-데옥시-2'-a-티오펜톡시유리딘 TP; 2'-데옥시-2'-b-아미노유리딘 TP; 2'-데옥시-2'-b-아지도유리딘 TP; 2'-데옥시-2'-b-브로모유리딘 TP; 2'-데옥시-2'-b-클로로유리딘 TP; 2'-데옥시-2'-b-플루오로유리딘 TP; 2'-데옥시-2'-b-아이오도유리딘 TP; 2'-데옥시-2'-b-머캅토유리딘 TP; 2'-데옥시-2'-b-티오펜톡시유리딘 TP; 2-메톡시-4-티오-유리딘; 2-메톡시유리딘; 2'-O-메틸-5-(1-프로핀일)유리딘 TP; 3-알킬-슈도-UTP; 4'-아지도유리딘 TP; 4'-탄소환식 유리딘 TP; 4'-에틴일유리딘 TP; 5-(1-프로핀일)아라-유리딘 TP; 5-(2-퓨란일)유리딘 TP; 5-사이아노유리딘 TP; 5-다이메틸아미노유리딘 TP; 5'-호모-유리딘 TP; 5-아이오도-2'-플루오로-데옥시유리딘 TP; 5-페닐에틴일유리딘 TP; 5-트라이뷰테로메틸-6-뷰테로유리딘 TP; 5-트라이플루오로메틸-유리딘 TP; 5-비닐아라유리딘 TP; 6-(2,2,2-트라이플루오로에틸)-슈도-UTP; 6-(4-몰폴리노)-슈도-UTP; 6-(4-티오폐닐폴리노)-슈도-UTP; 6-(치환된-페닐)-슈도-UTP; 6-아미노-슈도-UTP; 6-아지도-슈도-UTP; 6-브로모-슈도-UTP; 6-뷰틸-슈도-UTP; 6-클로로-슈도-UTP; 6-사이아노-슈도-UTP; 6-다이메틸아미노-슈도-UTP; 6-에톡시-슈도-UTP; 6-에틸카복실레이트-슈도-UTP; 6-에틸-슈도-UTP; 6-플루오로-슈도-UTP; 6-폼일-슈도-UTP; 6-하이드록시아미노-슈도-UTP; 6-하이드록시-슈도-UTP; 6-아이오도-슈도-UTP; 6-아이소-프로필-슈도-UTP; 6-메톡시-슈도-UTP; 6-메틸아미노-슈도-UTP; 6-메틸-슈도-UTP; 6-페닐-슈도-UTP; 6-페닐-슈도-UTP; 6-프로필-슈도-UTP; 6-tert-뷰틸-슈도-UTP; 6-트라이플루오로메톡시-슈도-UTP; 6-트라이플루오로메틸-슈도-UTP; 알파-티오-슈도-UTP; 슈도유리딘 1-(4-메틸벤젠설포산) TP; 슈도유리딘 1-(4-메틸벤조산) TP; 슈도유리딘 TP 1-[3-(2-에톡시)]프로피온산; 슈도유리딘 TP 1-[3-(2-(2-(2-(2-에톡시)-에톡시)-에톡시)-에톡시)]프로피온산; 슈도유리딘 TP 1-[3-(2-(2-(2-{2(2-에톡시)-에톡시}-에톡시)-에톡시)-에톡시)]프로피온산; 슈도유리딘 TP 1-[3-(2-(2-(2-에톡시)-에톡시)]프로피온산; 슈도유리딘 TP 1-[3-(2-(2-에톡시)-에톡시)] 프로피온산; 슈도유리딘 TP 1-메틸포스포산; 슈도유리딘 TP 1-메틸포스포산 다이에틸 에스터; 슈도-UTP-N1-3-프로피온산; 슈도-UTP-N1-4-부탄산; 슈도-UTP-N1-5-펜탄산; 슈도-UTP-N1-6-헥산산; 슈도-UTP-N1-7-헵탄산; 슈도-UTP-N1-메틸-p-벤조산; 슈도-UTP-N1-p-벤조산; 와이부토신; 하이드록시와이부토신; 아이소와이오신; 페록시와이부토신; 변형이 덜 된 하이드록시와이부토신; 4-데메틸와이오신; 2,6-(다이아미노)퓨린; 1-(아자)-2-(티오)-3-(아자)-페녹사진-1-일; 1,3-(다이아자)-2-(옥소)-펜티아진-1-일; 1,3-(다이아자)-2-(옥소)-페녹사진-1-일; 1,3,5-(트리아자)-2,6-(다이옥사)-나프탈렌; 2-(아미노)퓨린; 2,4,5-(트라이메틸)페닐; 2'-메틸, 2'-아미노, 2'-아지도, 2'-플루오로-사이티딘; 2'-메틸, 2'-아미노, 2'-아지도, 2'-플루오로-아데닌; 2'-메틸, 2'-아미노, 2'-아지도, 2'-플루오로-유리딘; 2'-아미노-2'-데옥시리보스; 2-아미노-6-클로로-퓨린; 2-아자-이노신일; 2'-아지도-2'-데옥시리보스; 2'-플루오로-2'-데옥시리보스; 2'-플루오로-변형된 염기; 2'-O-메틸-리보스; 2-옥소-7-아미노피리도피리미딘-3-일; 2-옥소-피리도피리미딘-3-일; 2-피리딘온; 3-나이트로피롤; 3-(메틸)-7-(프로핀일)아이소카보스타이릴일; 3-(메틸)아이소카보스타이릴일; 4-(플루오로)-6-(메틸)벤지미다졸; 4-(메틸)벤지미다졸; 4-(메틸)인돌릴; 4,6-(다이메틸)인돌릴; 5-나이트로인돌; 5-치환된 피리미딘; 5-(메틸)아이소카보스타이릴일; 5-나이트로인돌; 6-(아자)피리미딘; 6-(아조)티민; 6-(메틸)-7-(아자)인돌릴; 6-클로로-퓨린; 6-페닐-피롤로-피리미딘-2-온-3-일; 7-(아미노알킬하이드록시)-1-(아자)-2-(티오)-3-(아자)-펜티아진-1-일; 7-(아미노알킬하이드록시)-1-(아자)-2-(티오)-3-(아자)-페녹사진-1-일; 7-(아미노알킬하이드록시)-1,3-(다이아자)-2-(옥소)-페녹사진-1-일; 7-(아미노알킬하이드록시)-1,3-(다가아자)-2-(옥소)-페녹사진-1-일; 7-(아자)인돌릴; 7-(구아니디늄알킬하이드록시)-1-(아자)-2-(티오)-3-(아자)-페녹사진-일; 7-(구아니디늄알킬하이드록시)-1-(아자)-2-(티오)-3-(아자)-펜티아진-1-일; 7-(구아니디늄알킬하이드록시)-1-(아자)-2-(티오)-3-(아자)-페녹사진-1-일; 7-(구아니디늄알킬하이드록시)-1,3-(다이아자)-2-(옥소)-페녹사진-1-일; 7-(구아니디늄알킬-하이드록시)-1,3-(다가아자)-2-(옥소)-펜티아진-1-일; 7-(구아니디늄알킬하이드록시)-1,3-(다이아자)-2-(옥소)-페녹사진-1-일; 7-(프로핀일)아이소카보스타이릴일; 7-(프로핀일)아이소카보스타이릴일, 프로핀일-7-(아자)인돌릴; 7-데아자-이노신일; 7-치환된 1-(아자)-2-(티오)-3-(아자)-페녹사진-1-일; 7-치환된 1,3-(다이아자)-2-(옥소)-페녹사진-1-일; 9-(메틸)-이미다조피리딘일; 아미노인돌릴; 안트라센일; 비스-오쏘-(아미노알킬하이드록시)-6-페닐-피롤로-피리미딘-2-온-3-일; 비스-오쏘-치환된-6-페닐-피롤로-피리미딘-2-온-3-일; 다이플루오로톨릴; 하이포크산틴; 이미다조피리딘일; 이노신일; 아이소카보스타이릴일; 아이소구아니신; N2-치환된 퓨린; N6-메틸-2-아미노-퓨린; N6-치환된 퓨린; N-알킬화된 유도체; 나프탈렌일; 나이트로벤즈이미다졸릴; 나이트로이미다졸릴; 나이트로인다졸릴; 나이트로피라졸릴; 누볼라린; O6-치환된 퓨린; O-알킬화된 유도체; 오쏘-(아미노알킬하이드록시)-6-페닐-피롤로-피리미딘-2-온-3-일; 오쏘-치환된-6-페닐-피롤로-피리미딘-2-온-3-일; 옥스포마이신 TP; 파라-(아미노알킬하이드록시)-6-페닐-피롤로

-피리미딘-2-온-3-일; 파라-치환된-6-페닐-피롤로-피리미딘-2-온-3-일; 펜타센일; 페난트라센일; 페닐; 프로펜  
일-7-(아자)인돌일; 피렌일; 피리도피리미딘-3-일; 피리도피리미딘-3-일,  
2-옥소-7-아미노-피리도피리미딘-3-일; 피롤로-피리미딘-2-온-3-일; 피롤로피리미딘일; 피롤로피리진일; 스틸벤  
질; 치환된 1,2,4-트리아졸; 테트라센일; 투베르시딘; 잔틴; 잔토신-5'-TP; 2-티오-제불라린; 5-아자-2-티오-  
제불라린; 7-테아자-2-아미노-퓨린; 피리딘-4-온 리보뉴클레오사이드; 2-아미노-리보사이드-TP; 포마이신 A TP;  
포마이신 B TP; 피롤로신 TP; 2'-OH-아라-아데노신 TP; 2'-OH-아라-사이티딘 TP; 2'-OH-아라-유리딘 TP; 2'-  
OH-아라-구아노신 TP; 5-(2-카보메톡시비닐)유리딘 TP; 및 N6-(19-아미노-펜타옥사소나데실)아데노신 TP.

[0299] 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, RNA 폴리뉴클레오타이드, 예컨대 mRNA 폴리뉴클레오타이드)는 앞서 언급한 변형된 핵염기 중 적어도 둘(예를 들어, 2, 3, 4개 이상)의 조합을 포함한다.

[0300] 일부 실시형태에서, mRNA는 적어도 하나의 화학적으로 변형된 뉴클레오사이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 화학적으로 변형된 뉴클레오사이드는 슈도유리딘( $\psi$ ), 2-티오유리딘(s2U), 4'-티오유리딘, 5-메틸사이토신, 2-티오-1-메틸-1-테아자-슈도유리딘, 2-티오-1-메틸-슈도유리딘, 2-티오-5-아자-유리딘, 2-티오-다이하이드로슈도유리딘, 2-티오-다이하이드로유리딘, 2-티오-슈도유리딘, 4-메톡시-2-티오-슈도유리딘, 4-메톡시-슈도유리딘, 4-티오-1-메틸-슈도유리딘, 4-티오-슈도유리딘, 5-아자-유리딘, 다이하이드로슈도유리딘, 5-메틸유리딘, 5-메톡시유리딘, 2'-O-메틸 유리딘, 1-메틸-슈도유리딘(m1 $\psi$ ), 1-에틸-슈도유리딘(e1 $\psi$ ), 5-메톡시-유리딘(mo5U), 5-메틸-사이티딘(m5C),  $\alpha$ -티오-구아노신,  $\alpha$ -티오-아데노신, 5-사이아노 유리딘, 4'-티오 유리딘 7-테아자-아데닌, 1-메틸-아데노신(m1A), 2-메틸-아데닌(m2A), N6-메틸-아데노신(m6A), 및 2,6-다이아미노퓨린, (I), 1-메틸-이노신(m1I), 와이오신(imG), 메틸와이오신(mimG), 7-테아자-구아노신, 7-사이아노-7-테아자-구아노신(프레Q0), 7-아미노메틸-7-테아자-구아노신(프레Q1), 7-메틸-구아노신(m7G), 1-메틸-구아노신(m1G), 8-옥소-구아노신, 7-메틸-8-옥소-구아노신, 2,8-다이메틸아데노신, 2-게라닐티오유리딘, 2-라이시딘, 2-셀레노유리딘, 3-(3-아미노-3-카복시프로필)-5,6-다이하이드로유리딘, 3-(3-아미노-3-카복시프로필)슈도유리딘, 3-메틸슈도유리딘, 5-(카복시하이드록시메틸)-2'-O-메틸유리딘 메틸 에스터, 5-아미노메틸-2-게라닐티오유리딘, 5-아미노메틸-2-셀레노유리딘, 5-아미노메틸유리딘, 5-카바모일하이드록시메틸유리딘, 5-카바모일메틸-2-티오유리딘, 5-카복시메틸-2-티오유리딘, 5-카복시메틸아미노메틸-2-게라닐티오유리딘, 5-카복시메틸아미노메틸-2-셀레노유리딘, 5-사이아노메틸유리딘, 5-하이드록시사이티딘, 5-메틸아미노메틸-2-게라닐티오유리딘, 7-아미노카복시프로필-테메틸와이오신, 7-아미노카복시프로필와이오신, 7-아미노카복시프로필와이오신 메틸 에스터, 8-메틸아데노신, N4,N4-다이메틸사이티딘, N6-폼일아데노신, N6-하이드록시메틸아데노신, 아그마티딘, 환식 N6-트레오닐카바모일아데노신, 글루타밀-케신, 메틸화된 변형이 덜 된 하이드록시와이부토신, N4,N4,2'-O-트라이메틸사이티딘, 게라닐화된 5-메틸아미노메틸-2-티오유리딘, 게라닐화된 5-카복시메틸아미노메틸-2-티오유리딘, 큐베이스(Qbase), 프레Q0베이스, 프레Q1베이스 및 이들 중 2 이상의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 화학적으로 변형된 뉴클레오사이드는 슈도유리딘, 1-메틸-슈도유리딘, 1-에틸-슈도유리딘, 5-메틸사이토신, 5-메톡시유리딘, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, RNA 폴리뉴클레오타이드, 예컨대 mRNA 폴리뉴클레오타이드)는 앞서 언급한 변형된 핵염기 중 적어도 둘(예를 들어, 2, 3, 4 이상)의 조합을 포함한다.

[0301] 일부 실시형태에서, mRNA는 하나 이상의 암 에피토프 폴리펩타이드를 암호화하는 ORF를 포함하는 유라실-변형된 서열이되, mRNA는 화학적으로 변형된 핵염기, 예를 들어, 5-메톡시유라실을 포함한다. 본 발명의 소정의 양상에서, 5-메톡시유라실 염기가 리보스 당에 연결될 때, 그것이 폴리뉴클레오타이드에 있기 때문에, 얻어진 변형된 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드는 5-메톡시유리딘으로서 지칭된다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드 내 유라실은 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 약 100%가 5-메톡시유라실이다. 일 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드 내 유라실은 적어도 95%가 5-메톡시유라실이다. 다른 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드 내 유라실은 100%가 5-메톡시유라실이다.

[0302] 폴리뉴클레오타이드 내 유라실이 적어도 95%가 5-메톡시유라실인 실시형태에서, mRNA가 적합한 단백질 발현 수준을 제공하는 한편, 면역 반응을 거의 내지 전혀 유도하지 않도록 전반적인 유라실 함량이 조절될 수 있다. 일부 실시형태에서, ORF의 유라실 함량은 대응하는 야생형 ORF 중의 이론적 최소 유라실 함량의 약 105% 내지 약 145%, 약 105% 내지 약 140%, 약 110% 내지 약 140%, 약 110% 내지 약 145%, 약 115% 내지 약 135%, 약 105% 내지 약 135%, 약 110% 내지 약 135%, 약 115% 내지 약 145%, 또는 약 115% 내지 약 140%(Utm%)이다. 다른 실시형태에서, ORF의 유라실 함량은 약 117% 내지 약 134% 또는 118% 내지 132%의 UTM%이다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 암 에피토프 폴리펩타이드를 암호화하는 ORF의 유라실 함량은 약 115%, 약 120%, 약 125%, 약



130%, 약 135%, 약 140%, 약 145%, 또는 약 150%의 Utm%이다. 이와 관련하여, 용어 "유라실"은 5-메톡시유라실 및/또는 천연 유래 유라실을 지칭할 수 있다.

[0303] 일부 실시형태에서, 본 발명의 하나 이상의 암 에피토프 폴리펩타이드를 암호화하는 mRNA의 ORF에서 유라실 함량은 ORF에서 총 핵염기 함량의 약 50%, 약 40%, 약 30%, 약 20%, 약 15%, 또는 약 12% 미만이다. 일부 실시형태에서, ORF에서 유라실 함량은 ORF에서 총 핵염기 함량의 약 12% 및 약 25%이다. 다른 실시형태에서, ORF에서 유라실 함량은 ORF에서 총 핵염기 함량의 약 15% 내지 약 17%이다. 일 실시형태에서, 하나 이상의 암 에피토프 폴리펩타이드를 암호화하는 mRNA의 ORF에서 유라실 함량은 오픈 리딩 프레임에서 총 핵염기 함량의 약 20% 미만이다. 이와 관련하여, 용어 "유라실"은 5-메톡시유라실 및/또는 천연 유래 유라실을 지칭할 수 있다.

[0304] 추가 실시형태에서, 본 발명의 하나 이상의 암 에피토프 폴리펩타이드를 암호화하는 mRNA의 ORF는 5-메톡시유라실을 포함하고, 하나 이상의 암 에피토프 폴리펩타이드를 암호화하는 대응하는 야생형 뉴클레오타이드 서열보다 더 적은 유라실 쌍(UU) 및/또는 유라실 삼중물(UUU) 및/또는 유라실 사중물(UUUU)을 함유하는 조절된 유라실 함량을 가진다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 하나 이상의 암 에피토프 폴리펩타이드를 암호화하는 mRNA의 ORF는 유라실 쌍 및/또는 유라실 삼중물 및/또는 유라실 사중물을 함유하지 않는다. 일부 실시형태에서, 유라실 쌍 및/또는 유라실 삼중물 및/또는 유라실 사중물은 감소된 소정의 역치 미만, 예를 들어, 하나 이상의 암 에피토프 폴리펩타이드를 암호화하는 mRNA의 ORF에서 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20 이하의 발생이 있다. 특정 실시형태에서, 본 발명의 하나 이상의 암 에피토프 폴리펩타이드를 암호화하는 mRNA의 ORF는 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1개 미만의 비-페닐알라닌 유라실 쌍 및/또는 삼중물을 함유한다. 다른 실시형태에서, 하나 이상의 암 에피토프 폴리펩타이드를 암호화하는 mRNA의 ORF는 비-페닐알라닌 유라실 쌍 및/또는 삼중물을 함유하지 않는다.

[0305] 추가 실시형태에서, 본 발명의 하나 이상의 암 에피토프 폴리펩타이드를 암호화하는 mRNA의 ORF는 5-메톡시유라실을 포함하고, 하나 이상의 암 에피토프 폴리펩타이드를 암호화하는 대응하는 야생형 뉴클레오타이드 서열보다 더 적은 유라실-풍부 클러스터를 함유하는 조절된 유라실 함량을 가진다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 하나 이상의 암 에피토프 폴리펩타이드를 암호화하는 mRNA의 ORF는 하나 이상의 암 에피토프 폴리펩타이드를 암호화하는 대응하는 야생형 뉴클레오타이드 서열에서 대응하는 유라실-풍부 클러스터보다 길이가 더 짧은 유라실-풍부 클러스터를 함유한다.

[0306] 추가 실시형태에서, 대안의 더 낮은 빈도 코돈이 사용된다. 5-메톡시유라실-포함 mRNA의 하나 이상의 암 에피토프 폴리펩타이드-암호화 ORF에서 코돈의 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 99%, 또는 100%는 대안의 코돈으로 치환되며, 각각의 대안의 코돈은 동의 코돈 세트에서 치환된 코돈의 코돈 빈도보다 더 낮은 코돈 빈도를 갖는다. ORF는 또한 상기 기재한 바와 같이 유라실 함량이 조절되었다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 암 에피토프 폴리펩타이드를 암호화하는 mRNA의 ORF에서 적어도 하나의 코돈은 동의 코돈 세트에서 치환된 코돈의 코돈 빈도보다 더 낮은 코돈 빈도를 갖는 대안의 코돈으로 치환된다.

[0307] 일부 실시형태에서, 5-메톡시유라실-포함 mRNA의 하나 이상의 암 에피토프 폴리펩타이드-암호화 ORF의 조절된 유라실 함량은 대응하는 야생형 mRNA로부터 하나 이상의 암 에피토프 폴리펩타이드의 발현 수준보다 더 높은 포유류 세포에 투여될 때 하나 이상의 암 에피토프 폴리펩타이드의 발현 수준을 나타낸다. 다른 실시형태에서, 포유류 세포에 투여될 때 하나 이상의 암 에피토프 폴리펩타이드의 발현 수준은 적어도 95%의 5-메톡시유라실을 함유하고 이론적 최소값의 약 160%, 약 170%, 약 180%, 약 190%, 또는 약 200%의 유라실 함량을 갖는 대응하는 mRNA에 비해 증가된다. 또 다른 실시형태에서, 포유류 세포에 투여될 때 하나 이상의 암 에피토프 폴리펩타이드의 발현 수준은 대응하는 mRNA에 비해 증가되되, 유라실의 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 또는 약 100%는 1-메틸슈도유라실 또는 슈도유라실이다. 일부 실시형태에서, 포유류 세포는 마우스 세포, 래트 세포, 또는 토끼 세포이다. 다른 실시형태에서, 포유류 세포는 원숭이 세포 또는 인간 세포이다. 일부 실시형태에서, 인간 세포는 HeLa 세포, BJ 섬유아세포, 또는 말초 혈액 단핵구 세포(PBMC)이다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 암 에피토프 폴리펩타이드는 mRNA가 생체내에서 포유류 세포에 투여될 때 발현된다. 일부 실시형태에서, mRNA는 마우스, 토끼, 원숭이 또는 인간에게 투여된다. 일 실시형태에서, 마우스는 널(nu11) 마우스이다. 일부 실시형태에서, mRNA는 약 0.01mg/kg, 약 0.05mg/kg, 약 0.1mg/kg, 또는 약 0.15 mg/kg의 양으로 마우스에게 투여된다. 일부 실시형태에서, mRNA는 정맥내로 또는 근육내로 투여된다. 다른 실시형태에서, 하나 이상의 암 에피토프 폴리펩타이드는 mRNA가 시험관내에서 포유류 세포에 투여될 때 발현된다.

일부 실시형태에서, 발현은 적어도 약 2배, 적어도 약 5배, 적어도 약 10배, 적어도 약 50배, 적어도 약 500배, 적어도 약 1500배, 또는 적어도 약 3000배만큼 증가된다. 다른 실시형태에서, 발현은 적어도 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90%, 또는 약 100%만큼 증가된다.

[0308] 일부 실시형태에서, 조절된 유라실 함량, 5-메톡시유라실-포함 mRNA의 하나 이상의 암 에피토프 폴리펩타이드-암호화 ORF는 증가된 안정성을 나타낸다. 일부 실시형태에서, mRNA는 동일한 조건하에서 대응하는 야생형 mRNA의 안정성에 비해 세포에서 증가된 안정성을 나타낸다. 일부 실시형태에서, mRNA는 뉴클레아제에 대한 내성, 열 안정성, 및/또는 2차 구조의 증가된 안정화를 포함하는, 증가된 안정성을 나타낸다. 일부 실시형태에서, mRNA에 의해 나타나는 증가된 안정성은 mRNA의 반감기를 결정함으로써(예를 들어, 혈장, 세포 또는 조직 샘플에서) 그 리고/또는 시간에 따라 mRNA의 단백질 발현의 곡선하면적(AUC)을 결정함으로써(예를 들어, 시험관내에서 또는 생체내에서) 측정된다. 반감기 및/또는 AUC가 동일 조건 하에서 대응하는 야생형 mRNA의 반감기 및/또는 AUC보다 더 크다면, mRNA는 증가된 안정성을 갖는 것으로 동정된다.

[0309] 일부 실시형태에서, 본 발명의 mRNA는 동일 조건 하에서 대응하는 야생형 mRNA에 의해 유도되는 면역 반응에 비해 검출 가능하게 더 낮은 면역 반응(예를 들어, 선천성 또는 후천성)을 유도한다. 다른 실시형태에서, 본 개시내용의 mRNA는 하나 이상의 암 에피토프 폴리펩타이드에 대해 암호화하는 mRNA에 의해 유도되지만 동일 조건 하에서 5-메톡시유라실을 포함하지 않는 면역 반응에 비해, 또는 하나 이상의 암 에피토프 폴리펩타이드에 대해 암호화하고, 5-메톡시유라실을 포함하지만 동일 조건 하에서 조절된 유라실 함량을 갖지 않는 mRNA에 의해 유도되는 면역 반응에 비해 검출 가능하게 더 낮은 면역 반응(예를 들어, 선천성 또는 후천성)을 유도한다. 선천성 면역 반응은 전염증 사이토카인의 증가된 발현, 세포내 PRR(RIG-I, MDA5 등)의 활성화, 세포사, 및/또는 단백질 번역의 종결 또는 감소에 의해 나타날 수 있다. 일부 실시형태에서, 선천성 면역 반응의 감소는 1형 인터페론(예를 들어, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\kappa$ , IFN- $\delta$ , IFN- $\epsilon$ , IFN- $\tau$ , IFN- $\omega$ , 및 IFN- $\zeta$ )의 발현 또는 활성 수준 또는 인터페론-조절 유전자, 예컨대 toll-유사 수용체(예를 들어, TLR7 및 TLR8)의 발현에 의해, 그리고/또는 세포 내로 본 발명의 mRNA의 1회 이상의 투여 후 감소된 세포사에 의해 측정될 수 있다.

[0310] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 mRNA에 반응한 포유류 세포에 의한 1형 인터페론의 발현은 대응하는 야생형 mRNA에 비해, 하나 이상의 암 에피토프 폴리펩타이드를 암호화하지만 5-메톡시유라실을 포함하지 않는 mRNA에 비해, 또는 하나 이상의 암 에피토프 폴리펩타이드를 암호화하고 5-메톡시유라실을 포함하지만 유라실 함량이 조절되지 않은 mRNA에 비해 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 99.9%, 또는 99.9% 초과만큼 감소된다. 일부 실시형태에서, 인터페론은 IFN- $\beta$ 이다. 일부 실시형태에서, 포유류 세포에 대한 본 개시내용의 mRNA의 투여에 의한 사례의 세포사 빈도는 대응하는 야생형 mRNA, 하나 이상의 암 에피토프 폴리펩타이드에 대해 암호화하지만 5-메톡시유라실을 포함하지 않는 mRNA, 또는 하나 이상의 암 에피토프 폴리펩타이드에 대해 암호화하고 5-메톡시유라실을 포함하지만 유라실 함량이 조절되지 않은 mRNA에 의해 관찰된 세포사 빈도보다 10%, 25%, 50%, 75%, 85%, 90%, 95%, 또는 95% 초과인 수 미만이다. 일부 실시형태에서, 포유류 세포는 BJ 섬유아세포이다. 다른 실시형태에서, 포유류 세포는 비장세포이다. 일부 실시형태에서, 포유류 세포는 마우스 또는 래트의 세포이다. 다른 실시형태에서, 포유류 세포는 인간의 세포이다. 일 실시형태에서, 본 개시내용의 mRNA는 mRNA가 도입된 포유류 세포의 선천성 면역 반응을 실질적으로 유도하지 않는다.

[0311] 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 하나 이상의 암 에피토프 폴리펩타이드를 암호화하는 ORF를 포함하는 mRNA이되, mRNA에서 유라실은 적어도 약 95%가 5-메톡시유라실이고, ORF의 유라실 함량은 대응하는 야생형 ORF에서 이론적 최소값 유라실 함량의 약 115% 내지 약 135%이고, 하나 이상의 암 에피토프 폴리펩타이드를 암호화하는 ORF에서 유라실 함량은 ORF에서 총 핵염기 함량의 약 23% 미만이다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 암 에피토프 폴리펩타이드를 암호화하는 ORF는 대응하는 야생형 ORF에 비해 적어도 40%만큼 ORF의 G/C 함량(절대적 또는 상대적)을 감소시키도록 추가로 변형된다. 또 다른 실시형태에서, 하나 이상의 암 에피토프 폴리펩타이드를 암호화하는 ORF는 20개 미만의 비-페닐알라닌 유라실 쌍 및/또는 삼중물을 함유한다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 암 에피토프 폴리펩타이드를 암호화하는 mRNA의 ORF에서 적어도 하나의 코돈은 동의 코돈 세트에서 치환된 코돈의 코돈 빈도보다 더 낮은 코돈 빈도를 갖는 대안의 코돈으로 추가로 치환된다. 일부 실시형태에서, mRNA에 의해 암호화된 하나 이상의 암 에피토프 폴리펩타이드의 발현은 ORF를 포함하되, mRNA에서 유라실은 적어도 약 95%가 5-메톡시유라실이고, ORF의 유라실 함량은 대응하는 야생형 ORF에서 이론적 최소값 유라실의 약 115% 내지 약 135%이며, 대응하는 야생형 mRNA로부터의 하나 이상의 암 에피토프 폴리펩타이드의 발현에 비교할 때 적어도 약 10배만큼 증가된다. 일부 실시형태에서, mRNA는 개방 ORF를 포함하되, mRNA에서 유라실은 적어도 약 95%가 5-메톡시유라실이고, ORF의 유라실 함량은 대응하는 야생형 ORF에서 이론적 최소 유라실 함량의 약 115% 내지 약 135%이고, mRNA는 mRNA가 도입된 포유류 세포의 선천성 면역 반응을 실질적으로 유도하지 않는다.

- [0312] 소정의 실시형태에서, 화학적 변형은 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, RNA 폴리뉴클레오타이드, 예컨대 mRNA 폴리뉴클레오타이드)에서 핵염기에 있다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, RNA 폴리뉴클레오타이드, 예컨대 mRNA 폴리뉴클레오타이드)에서 변형된 핵염기는 1-메틸-슈도유리딘(m1 $\psi$ ), 1-에틸-슈도유리딘(e1 $\psi$ ), 5-메톡시-유리딘(mo5U), 5-메틸-사이티딘(m5C), 슈도유리딘( $\psi$ ),  $\alpha$ -티오-구아노신 및  $\alpha$ -티오-아데노신으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 화학적 변형을 포함하지만, 이것으로 제한되지 않는 앞서 언급한 변형된 핵염기 중 적어도 둘(예를 들어, 2, 3, 4개 이상)의 조합을 포함한다.
- [0313] 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, RNA 폴리뉴클레오타이드, 예컨대 mRNA 폴리뉴클레오타이드)는 슈도유리딘( $\psi$ ) 및 5-메틸-사이티딘(m5C)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, RNA 폴리뉴클레오타이드, 예컨대 mRNA 폴리뉴클레오타이드)는 1-메틸-슈도유리딘(m1 $\psi$ )을 포함한다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, RNA 폴리뉴클레오타이드, 예컨대 mRNA 폴리뉴클레오타이드)는 1-에틸-슈도유리딘(e1 $\psi$ )을 포함한다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, RNA 폴리뉴클레오타이드, 예컨대 mRNA 폴리뉴클레오타이드)는 1-메틸-슈도유리딘(m1 $\psi$ ) 및 5-메틸-사이티딘(m5C)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, RNA 폴리뉴클레오타이드, 예컨대 mRNA 폴리뉴클레오타이드)는 1-에틸-슈도유리딘(e1 $\psi$ ) 및 5-메틸-사이티딘(m5C)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, RNA 폴리뉴클레오타이드, 예컨대 mRNA 폴리뉴클레오타이드)는 2-티오유리딘(s2U)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, RNA 폴리뉴클레오타이드, 예컨대 mRNA 폴리뉴클레오타이드)는 2-티오유리딘 및 5-메틸-사이티딘(m5C)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, RNA 폴리뉴클레오타이드, 예컨대 mRNA 폴리뉴클레오타이드)는 메톡시-유리딘(mo5U)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, RNA 폴리뉴클레오타이드, 예컨대 mRNA 폴리뉴클레오타이드)는 5-메톡시-유리딘(mo5U) 및 5-메틸-사이티딘(m5C)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, RNA 폴리뉴클레오타이드, 예컨대 mRNA 폴리뉴클레오타이드)는 2'-O-메틸 유리딘을 포함한다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, RNA 폴리뉴클레오타이드, 예컨대 mRNA 폴리뉴클레오타이드)는 2'-O-메틸 유리딘 및 5-메틸-사이티딘(m5C)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, RNA 폴리뉴클레오타이드, 예컨대 mRNA 폴리뉴클레오타이드)는 N6-메틸-아데노신(m6A)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, RNA 폴리뉴클레오타이드, 예컨대 mRNA 폴리뉴클레오타이드)는 N6-메틸-아데노신(m6A) 및 5-메틸-사이티딘(m5C)을 포함한다.
- [0314] 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, RNA 폴리뉴클레오타이드, 예컨대 mRNA 폴리뉴클레오타이드)는 특정 변형에 대해 균일하게(예를 들어, 완전히 변형된, 전체 서열 전체적으로 변형된) 변형된다. 예를 들어, 폴리뉴클레오타이드는 5-메틸-사이티딘(m5C)으로 균일하게 변형될 수 있는데, 이는 mRNA 서열에서 모든 사이토신 잔기가 5-메틸-사이티딘(m5C)으로 대체된다는 것을 의미한다. 다른 예로서, 폴리뉴클레오타이드는 1-메틸-슈도유리딘으로 균일하게 변형될 수 있는데, 이는 mRNA 서열 내 모든 유리딘 잔기가 1-메틸-슈도유리딘으로 대체된다는 것을 의미한다. 유사하게, 폴리뉴클레오타이드는 변형된 잔기, 예컨대 상기 제시한 임의의 것에 의해 대체에 의해 서열에 존재하는 임의의 유형의 뉴클레오타이드 잔기에 대해 균일하게 변형될 수 있다.
- [0315] 일부 실시형태에서, 오픈 리딩 프레임에서 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드는 유리딘, 아데닌, 사이토신, 구아닌, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0316] 일부 실시형태에서, 변형된 핵염기는 변형된 사이토신이다. 변형된 사이토신을 갖는 예시적인 핵염기 및 뉴클레오타이드 N4-아세틸-사이티딘(ac4C), 5-메틸-사이티딘(m5C), 5-할로-사이티딘(예를 들어, 5-아이오도-사이티딘), 5-하이드록시메틸-사이티딘(hm5C), 1-메틸-슈도아이소사이티딘, 2-티오-사이티딘(s2C) 및 2-티오-5-메틸-사이티딘을 포함한다.
- [0317] 일부 실시형태에서, 변형된 핵염기는 변형된 유리딘이다. 변형된 유리딘을 갖는 예시적인 핵염기는 1-메틸-슈도유리딘(m1 $\psi$ ), 1-에틸-슈도유리딘(e1 $\psi$ ), 5-메톡시 유리딘, 2-티오 유리딘, 5-사이아노 유리딘, 2'-O-메틸 유리딘 및 4'-티오 유리딘을 포함한다.
- [0318] 일부 실시형태에서, 변형된 핵염기는 변형된 아데닌이다. 변형된 아데닌을 갖는 예시적인 핵염기 및 뉴클레오타이드는 7-테아자-아데닌, 1-메틸-아데노신(m1A), 2-메틸-아데닌(m2A), N6-메틸-아데노신(m6A) 및 2,6-다이아미노퓨린을 포함한다.
- [0319] 일부 실시형태에서, 변형된 핵염기는 변형된 구아닌이다. 변형된 구아닌을 갖는 예시적인 핵염기 및 뉴클레오타이드는 이노신(I), 1-메틸-이노신(m1I), 와이오신(imG), 메틸와이오신(mimG), 7-테아자-구아노신, 7-사이아노-7-테아자-구아노신(프레Q0), 7-아미노메틸-7-테아자-구아노신(프레Q1), 7-메틸-구아노신(m7G), 1-메틸-구아노신

(m1G), 8-옥소-구아노신, 7-메틸-8-옥소-구아노신을 포함한다.

- [0320] 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, RNA 폴리뉴클레오타이드, 예컨대 mRNA 폴리뉴클레오타이드)에서 핵염기 변형된 뉴클레오타이드는 5-메톡시유리딘이다.
- [0321] 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, RNA 폴리뉴클레오타이드, 예컨대 mRNA 폴리뉴클레오타이드)는 변형된 핵염기 중 적어도 둘(예를 들어, 2, 3, 4개 이상)의 조합을 포함한다.
- [0322] 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, RNA 폴리뉴클레오타이드, 예컨대 mRNA 폴리뉴클레오타이드)는 5-메톡시유리딘(5mo5U) 및 5-메틸-사이티딘(5mC)을 포함한다.
- [0323] 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, RNA 폴리뉴클레오타이드, 예컨대 mRNA 폴리뉴클레오타이드)는 특정 변형에 대해 균일하게 변형된다(예를 들어, 완전히 변형, 전체 서열 전체적으로 변형됨). 예를 들어, 폴리뉴클레오타이드는 5-메톡시유리딘으로 균일하게 변형될 수 있는데, 이는 mRNA 서열에서 실질적으로 모든 유리딘 잔기가 5-메톡시유리딘으로 대체된다는 것을 의미한다. 유사하게, 폴리뉴클레오타이드는 변형된 잔기, 예컨대 상기 제시한 임의의 것으로 대체에 의해 서열에 존재하는 임의의 유형의 뉴클레오타이드 잔기에 대해 균일하게 변형될 수 있다.
- [0324] 일부 실시형태에서, 변형된 핵염기는 변형된 사이토신이다.
- [0325] 일부 실시형태에서, 변형된 핵염기는 변형된 유라실이다. 변형된 유라실을 갖는 예시적 핵염기 및 뉴클레오사이드는 5-메톡시유라실을 포함한다.
- [0326] 일부 실시형태에서, 변형된 핵염기는 변형된 아데닌이다.
- [0327] 일부 실시형태에서, 변형된 핵염기는 변형된 구아닌이다.
- [0328] 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 뉴클레오사이드 사이에 임의의 유용한 링커를 포함할 수 있다. 본 개시내용의 조성물에서 유용한 골격 변형을 포함하는 이러한 링커는 다음을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다: 3'-알킬렌 포스포네이트, 3'-아미노 포스포르아미데이트, 알켄 함유 골격, 아미노알킬포스포르아미데이트, 아미노알킬포스포트라이에스테르, 보라노포스포네이트,  $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-$ , 카이랄 포스포네이트, 카이랄 포스포로티오에이트, 폼아세틸 및 티오폴아세틸 골격, 메틸렌 (메틸이미노), 메틸렌 폼아세틸 및 티오폴아세틸 골격, 메틸렌이미노 및 메틸렌하이드라지노 골격, 몰폴리노 결합,  $-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ , 헤테로원자 뉴클레오사이드간 결합을 갖는 올리고뉴클레오사이드, 포스포네이트, 포스포르아미데이트, 포스포로다이티오네이트, 포스포로티오네이트 뉴클레오사이드간 결합, 포스포로티오에이트, 포스포트라이에스테르, PNA, 실록산 골격, 설파메이트 골격, 설파이드 설폭사이드 및 설폰 골격, 설포네이트 및 설폰아마이드 골격, 티오노알킬포스포네이트, 티오노알킬포스포트라이에스테르 및 티오노포스포르아미데이트.
- [0329] 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, 본 명세서에 기재된 바와 같은 RNA 또는 mRNA)에 혼입될 수 있는 변형된 뉴클레오사이드 및 뉴클레오타이드(예를 들어, 빌딩 블록 분자)는 리보핵산의 당 상에서 변형될 수 있다. 예를 들어, 2'-하이드록실기(OH)는 다수의 상이한 치환으로 변형되거나 또는 대체될 수 있다. 2'-위치에서 예시적인 치환은 H, 할로, 선택적으로 치환된  $\text{C}_{1-6}$  알킬; 선택적으로 치환된  $\text{C}_{1-6}$  알콕시; 선택적으로 치환된  $\text{C}_{6-10}$  아릴옥시; 선택적으로 치환된  $\text{C}_{3-8}$  사이클로알킬; 선택적으로 치환된  $\text{C}_{3-8}$  사이클로알콕시; 선택적으로 치환된  $\text{C}_{6-10}$  아릴옥시; 선택적으로 치환된  $\text{C}_{6-10}$  아릴- $\text{C}_{1-6}$  알콕시, 선택적으로 치환된  $\text{C}_{1-12}$  (헤테로사이클릴)옥시; 당(예를 들어, 리보스, 펜토스, 또는 본 명세서에 기재된 임의의 것); 폴리에틸렌글리콜(PEG),  $-\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OR}$ , 여기서, R은 H 또는 선택적으로 치환된 알킬이며, n은 0 내지 20의 정수임(예를 들어, 0 내지 4, 0 내지 8, 0 내지 10, 0 내지 16, 1 내지 4, 1 내지 8, 1 내지 10, 1 내지 16, 1 내지 20, 2 내지 4, 2 내지 8, 2 내지 10, 2 내지 16, 2 내지 20, 4 내지 8, 4 내지 10, 4 내지 16, 및 4 내지 20); "잠금" 핵산(LNA) 이때 2'-하이드록실은 동일하나 리보스당의 4'-탄소에 대한  $\text{C}_{1-6}$  알킬렌 또는  $\text{C}_{1-6}$  헤테로알킬렌 브리지에 의해 연결되며, 여기서 예시적인 브리지는 메틸렌, 프로필렌, 에터, 또는 아미노 브리지를 포함함; 본 명세서에 정의된 바와 같은 아미노알킬; 본 명세서에 정의된 바와 같은 아미노알콕시; 본 명세서에 정의된 바와 같은 아미노; 및 본 명세서에 정의된 바와 같은 아미노산을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.
- [0330] 일반적으로, RNA는 산소를 갖는 5'-원 고리인 당기 리보스를 포함한다. 예시적인, 비제한적 변형된 뉴클레오타이드는 리보스 내 산소의 대체(예를 들어, S, Se 또는 알킬렌, 예컨대 메틸렌 또는 에틸렌으로); 이중 결합의 첨



가(예를 들어, 리보스를 사이클로펜텐일 또는 사이클로헥센일로 대체); 리보스의 고리 수축(예를 들어, 사이클로부탄 또는 옥세탄의 4-원 고리를 형성); 리보스의 고리 확장(예컨대 또한 포스포르아미데이트 골격을 갖는 안하이드로헥시톨, 알트리톨, 만니톨, 사이클로헥산일, 사이클로헥센일, 및 몰폴리노에 대해, 예를 들어, 추가적인 탄소 또는 헤테로원자를 갖는 6- 또는 7-원 고리를 형성하기 위해); 다환식 형태(예를 들어, 트라이사이클로; 및 "비잡금" 형태, 예컨대 글리콜 핵산(GNA)(예를 들어, R-GNA 또는 S-GNA, 여기서, 리보스는 포스포다이에스터 결합에 부착된 글리콜 단위에 의해 대체됨), 트레오스 핵산(TNA, 여기서, 리보스는 α-L-트레오파노실-(3'→2') 및 펩타이드 핵산으로 대체된다(PNA, 여기서, 2-아미노-에틸-글리신 결합은 리보스 및 포스포다이에스터 골격으로 대체됨)을 포함한다. 당기는 또한 리보스 내 대응하는 탄소와 반대의 입체화학적 입체배치를 갖는 하나 이상의 탄소를 함유할 수 있다. 따라서, 폴리뉴클레오타이드 분자는 당으로서, 예를 들어, 아라비노스를 함유하는 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 이러한 당 변형은 국제 특허 출원 공개 W02013052523 및 W02014093924에 교시되어 있으며, 이들 각각의 내용은 본 명세서에 그의 전문이 참고로 편입된다.

[0331] 본 발명의 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, 하나 이상의 암 에피토프 폴리펩타이드 또는 이의 기능성 단편 또는 변이체를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드)는 당, 핵염기 및/또는 뉴클레오사이드간 결합에 대한 변형의 조합을 포함한다. 이들 조합은 본 명세서에 기재된 임의의 하나 이상의 변형을 포함할 수 있다.

[0332] 본 개시내용의 폴리뉴클레오타이드는 분자의 전체 길이를 따라서 부분적으로 또는 완전히 변형될 수 있다. 예를 들어, 하나 이상의 또는 모든 또는 주어진 유형의 뉴클레오타이드(예를 들어, 퓨린 또는 피리미딘, 또는 A, G, U, C 중 임의의 하나 또는 모두)는 본 발명의 폴리뉴클레오타이드에서, 또는 이의 주어진 사전결정된 서열 영역에서(예를 들어, 폴리A 꼬리를 포함하거나 또는 제외하는 mRNA에서) 균일하게 변형될 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 폴리뉴클레오타이드에서(또는 이의 주어진 서열 영역에서) 모든 뉴클레오타이드 X는 변형된 뉴클레오타이드이되, X는 뉴클레오타이드 A, G, U, C 중 임의의 하나, 또는 조합 A+G, A+U, A+C, G+U, G+C, U+C, A+G+U, A+G+C, G+U+C 또는 A+G+C 중 임의의 하나일 수 있다.

[0333] 폴리뉴클레오타이드는 약 1% 내지 약 100% 변형된 뉴클레오타이드(전반적인 뉴클레오타이드 함량에 관해, 또는 뉴클레오타이드 중 하나 이상의 유형에 관해, 즉, A, G, U 또는 C 중 임의의 하나 이상) 또는 임의의 개재 백분율(예를 들어, 1% 내지 20%, 1% 내지 25%, 1% 내지 50%, 1% 내지 60%, 1% 내지 70%, 1% 내지 80%, 1% 내지 90%, 1% 내지 95%, 10% 내지 20%, 10% 내지 25%, 10% 내지 50%, 10% 내지 60%, 10% 내지 70%, 10% 내지 80%, 10% 내지 90%, 10% 내지 95%, 10% 내지 100%, 20% 내지 25%, 20% 내지 50%, 20% 내지 60%, 20% 내지 70%, 20% 내지 80%, 20% 내지 90%, 20% 내지 95%, 20% 내지 100%, 50% 내지 60%, 50% 내지 70%, 50% 내지 80%, 50% 내지 90%, 50% 내지 95%, 50% 내지 100%, 70% 내지 80%, 70% 내지 90%, 70% 내지 95%, 70% 내지 100%, 80% 내지 90%, 80% 내지 95%, 80% 내지 100%, 90% 내지 95%, 90% 내지 100%, 및 95% 내지 100%)를 함유할 수 있다. 임의의 남아있는 백분율은 비변형 A, G, U 또는 C의 존재를 설명한다는 것이 이해될 것이다.

[0334] 폴리뉴클레오타이드는 최소 1%로 그리고 최대 100%로 변형된 뉴클레오타이드, 또는 임의의 개재 백분율, 예컨대 적어도 5%의 변형된 뉴클레오타이드, 적어도 10%의 변형된 뉴클레오타이드, 적어도 25%의 변형된 뉴클레오타이드, 적어도 50%의 변형된 뉴클레오타이드, 적어도 80%의 변형된 뉴클레오타이드, 또는 적어도 90% 변형된 뉴클레오타이드를 함유할 수 있다. 예를 들어, 폴리뉴클레오타이드는 변형된 피리미딘, 예컨대 변형된 유라실 또는 사이토신을 함유할 수 있다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드 내 유라실의 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 25%, 적어도 50%, 적어도 80%, 적어도 90% 또는 100%는 변형된 유라실(예를 들어, 5-치환된 유라실)로 대체된다. 변형된 유라실은 단일의 독특한 구조를 갖는 화합물로 대체될 수 있거나, 또는 상이한 구조를 갖는 복수의 화합물(예를 들어, 2, 3, 4개 이상의 독특한 구조)로 대체될 수 있다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드 내 사이토신의 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 25%, 적어도 50%, 적어도 80%, 적어도 90% 또는 100%는 변형된 사이토신(예를 들어, 5-치환된 사이토신)으로 대체된다. 변형된 사이토신은 단일의 독특한 구조를 갖는 화합물로 대체될 수 있거나, 또는 상이한 구조를 갖는 복수의 화합물(예를 들어, 2, 3, 4개 이상의 독특한 구조)로 대체될 수 있다.

[0335] 따라서, 일부 실시형태에서, RNA 백신은 5'UTR 요소, 선택적으로 코돈 최적화된 오픈 리딩 프레임, 및 3'UTR 요소, 폴리(A) 서열 및/또는 폴리아데닐화 신호를 포함하되, RNA는 화학적으로 변형되지 않는다.

[0336] 일부 실시형태에서, 변형된 핵염기는 변형된 유라실이다. 변형된 유라실을 갖는 예시적인 핵염기 및 뉴클레오타이드는 슈도유리딘( $\psi$ ), 피리딘-4-온 리보뉴클레오사이드, 5-아자-유리딘, 6-아자-유리딘, 2-티오-5-아자-유리딘, 2-티오-유리딘( $s^2U$ ), 4-티오-유리딘( $s^4U$ ), 4-티오-슈도유리딘, 2-티오-슈도유리딘, 5-하이드록시-유리딘



( $ho^5U$ ), 5-아미노알릴-유리딘, 5-할로-유리딘(예를 들어, 5-아이오도-유리딘or 5-브로모-유리딘), 3-메틸-유리딘( $m^3U$ ), 5-메톡시-유리딘( $mo^5U$ ), 유리딘 5-옥시아세트산( $cmo^5U$ ), 유리딘 5-옥시아세트산 메틸 에스터( $mcmo^5U$ ), 5-카복시메틸-유리딘( $cm^5U$ ), 1-카복시메틸-슈도유리딘, 5-카복시하이드록시메틸-유리딘( $chm^5U$ ), 5-카복시하이드록시메틸-유리딘 메틸 에스터( $mchm^5U$ ), 5-메톡시카보닐메틸-유리딘( $mcm^5U$ ), 5-메톡시카보닐메틸-2-티오-유리딘( $mcm^5s^2U$ ), 5-아미노메틸-2-티오-유리딘( $nm^5s^2U$ ), 5-메틸아미노메틸-유리딘( $mnm^5U$ ), 5-메틸아미노메틸-2-티오-유리딘( $mnm^5s^2U$ ), 5-메틸아미노메틸-2-셀레노-유리딘( $mnm^5se^2U$ ), 5-카바모일메틸-유리딘( $ncm^5U$ ), 5-카복시메틸아미노메틸-유리딘( $cmnm^5U$ ), 5-카복시메틸아미노메틸-2-티오-유리딘( $cmnm^5s^2U$ ), 5-프로펜일-유리딘, 1-프로펜일-슈도유리딘, 5-타우리노메틸-유리딘( $\tau m^5U$ ), 1-타우리노메틸-슈도유리딘, 5-타우리노메틸-2-티오-유리딘( $\tau m^5s^2U$ ), 1-타우리노메틸-4-티오-슈도유리딘, 5-메틸-유리딘( $m^5U$ ), 즉, 핵염기 데옥시티민을 가짐), 1-메틸-슈도유리딘( $m^1\psi$ ), 1-에틸-슈도유리딘( $e1\psi$ ), 5-메틸-2-티오-유리딘( $m^5s^2U$ ), 1-메틸-4-티오-슈도유리딘( $m^1s^4\psi$ ), 4-티오-1-메틸-슈도유리딘, 3-메틸-슈도유리딘( $m^3\psi$ ), 2-티오-1-메틸-슈도유리딘, 1-메틸-1-데아자-슈도유리딘, 2-티오-1-메틸-1-데아자-슈도유리딘, 다이하이드로유리딘(D), 다이하이드로슈도유리딘, 5,6-다이하이드로유리딘, 5-메틸-다이하이드로유리딘( $m^5D$ ), 2-티오-다이하이드로유리딘, 2-티오-다이하이드로슈도유리딘, 2-메톡시-유리딘, 2-메톡시-4-티오-유리딘, 4-메톡시-슈도유리딘, 4-메톡시-2-티오-슈도유리딘, N1-메틸-슈도유리딘, 3-(3-아미노-3-카복시프로필)유리딘( $acp^3U$ ), 1-메틸-3-(3-아미노-3-카복시프로필)슈도유리딘( $acp^3\psi$ ), 5-(아이소펜텐일아미노메틸)유리딘( $inm^5U$ ), 5-(아이소펜텐일아미노메틸)-2-티오-유리딘( $inm^5s^2U$ ),  $\alpha$ -티오-유리딘, 2'-O-메틸-유리딘( $Um$ ), 5,2'-O-다이메틸-유리딘( $m^5Um$ ), 2'-O-메틸-슈도유리딘( $\psi m$ ), 2-티오-2'-O-메틸-유리딘( $s^2Um$ ), 5-메톡시카보닐메틸-2'-O-메틸-유리딘( $mcm^5Um$ ), 5-카바모일메틸-2'-O-메틸-유리딘( $ncm^5Um$ ), 5-카복시메틸아미노메틸-2'-O-메틸-유리딘( $cmnm^5Um$ ), 3,2'-O-다이메틸-유리딘( $m^3Um$ ), 및 5-(아이소펜텐일아미노메틸)-2'-O-메틸-유리딘( $inm^5Um$ ), 1-티오-유리딘, 데옥시티미딘, 2'-F-아라-유리딘, 2'-F-유리딘, 2'-OH-아라-유리딘, 5-(2-카보메톡시비닐)유리딘, 및 5-[3-(1-E-프로펜일아미노)]유리딘을 포함한다.

[0337]

일부 실시형태에서, 변형된 핵염기는 변형된 사이토신이다. 변형된 사이토신을 갖는 예시적인 핵염기 및 뉴클레오사이드는 5-아자-사이티딘, 6-아자-사이티딘, 슈도아이소사이티딘, 3-메틸-사이티딘( $m^3C$ ), N4-아세틸-사이티딘( $ac^4C$ ), 5-폼일-사이티딘( $f^5C$ ), N4-메틸-사이티딘( $m^4C$ ), 5-메틸-사이티딘( $m^5C$ ), 5-할로-사이티딘(예를 들어, 5-아이오도-사이티딘), 5-하이드록시메틸-사이티딘( $hm^5C$ ), 1-메틸-슈도아이소사이티딘, 피콜로-사이티딘, 피콜로-슈도아이소사이티딘, 2-티오-사이티딘( $s^2C$ ), 2-티오-5-메틸-사이티딘, 4-티오-슈도아이소사이티딘, 4-티오-1-메틸-슈도아이소사이티딘, 4-티오-1-메틸-1-데아자-슈도아이소사이티딘, 1-메틸-1-데아자-슈도아이소사이티딘, 제불라린, 5-아자-제불라린, 5-메틸-제불라린, 5-아자-2-티오-제불라린, 2-티오-제불라린, 2-메톡시-사이티딘, 2-메톡시-5-메틸-사이티딘, 4-메톡시-슈도아이소사이티딘, 4-메톡시-1-메틸-슈도아이소사이티딘, 라이시딘( $k_2C$ ),  $\alpha$ -티오-사이티딘, 2'-O-메틸-사이티딘( $Cm$ ), 5,2'-O-다이메틸-사이티딘( $m^5Cm$ ), N4-아세틸-2'-O-메틸-사이티딘( $ac^4Cm$ ), N4,2'-O-다이메틸-사이티딘( $m^4Cm$ ), 5-폼일-2'-O-메틸-사이티딘( $f^5Cm$ ), N4,N4,2'-O-트라이메틸-사이티딘( $m^4_2Cm$ ), 1-티오-사이티딘, 2'-F-아라-사이티딘, 2'-F-사이티딘 및 2'-OH-아라-사이티딘을 포함한다.

[0338]

일부 실시형태에서, 변형된 핵염기는 변형된 아데닌이다. 변형된 아데닌을 갖는 예시적인 핵염기 및 뉴클레오사이드는 2-아미노-퓨린, 2, 6-다이아미노퓨린, 2-아미노-6-할로-퓨린 (예를 들어, 2-아미노-6-클로로-퓨린), 6-할로-퓨린 (예를 들어, 6-클로로-퓨린), 2-아미노-6-메틸-퓨린, 8-아지도-아데노신, 7-데아자-아데닌, 7-데아자-8-아자-아데닌, 7-데아자-2-아미노-퓨린, 7-데아자-8-아자-2-아미노-퓨린, 7-데아자-2,6-다이아미노퓨린, 7-데아자-8-아자-2,6-다이아미노퓨린, 1-메틸-아데노신( $m^1A$ ), 2-메틸-아데닌( $m^2A$ ), N6-메틸-아데노신( $m^6A$ ), 2-메틸티오-N6-메틸-아데노신( $ms^2m^6A$ ), N6-아이소펜텐일-아데노신( $i^6A$ ), 2-메틸티오-N6-아이소펜텐일-아데노신( $ms^2i^6A$ ), N6-(시스-하이드록시아이소펜텐일)아데노신( $io^6A$ ), 2-메틸티오-N6-(시스-하이드록시아이소펜텐일)아데노신

(ms<sup>2</sup>io<sup>6</sup>A), N6-글리신일카바모일-아데노신(g<sup>6</sup>A), N6-트레오닐카바모일-아데노신(t<sup>6</sup>A), N6-메틸-N6-트레오닐카바모일-아데노신(m<sup>6</sup>t<sup>6</sup>A), 2-메틸티오-N6-트레오닐카바모일-아데노신(ms<sup>2</sup>g<sup>6</sup>A), N6,N6-다이메틸-아데노신(m<sup>6</sup><sub>2</sub>A), N6-하이드록시노르발릴카바모일-아데노신(hn<sup>6</sup>A), 2-메틸티오-N6-하이드록시노르발릴카바모일-아데노신(ms<sup>2</sup>hn<sup>6</sup>A), N6-아세틸-아데노신(ac<sup>6</sup>A), 7-메틸-아데닌, 2-메틸티오-아데닌, 2-메톡시-아데닌, α-티오-아데노신, 2'-O-메틸-아데노신(Am), N6,2'-O-다이메틸-아데노신(m<sup>6</sup>Am), N6,N6,2'-O-트라이메틸-아데노신(m<sup>6</sup><sub>2</sub>Am), 1,2'-O-다이메틸-아데노신(m<sup>1</sup>Am), 2'-O-리보실아데노신(포스페이트)(Ar(p)), 2-아미노-N6-메틸-퓨린, 1-티오-아데노신, 8-아지도-아데노신, 2'-F-아라-아데노신, 2'-F-아데노신, 2'-OH-아라-아데노신, 및 N6-(19-아미노-펜타옥사노나데실)-아데노신을 포함한다.

[0339] 일부 실시형태에서, 변형된 핵염기는 변형된 구아닌이다. 변형된 구아닌을 갖는 예시적인 핵염기 및 뉴클레오사이드는 이노신(I), 1-메틸-이노신(m<sup>1</sup>I), 와이오신(imG), 메틸와이오신(mimG), 4-데메틸-와이오신(imG-14), 아이소와이오신(imG2), 와이부토신(yW), 페록시와이부토신(o<sub>2</sub>yW), 하이드록시와이부토신(OhyW), 변형이 덜 된 하이드록시와이부토신(OhyW\*), 7-데아자-구아노신, 케오신(Q), 에폭시케오신(oQ), 갈락토실-케오신(galQ), 만노실-케오신(manQ), 7-사이아노-7-데아자-구아노신(프레Q<sub>0</sub>), 7-아미노메틸-7-데아자-구아노신(프레Q<sub>1</sub>), 아케오신(G<sup>+</sup>), 7-데아자-8-아자-구아노신, 6-티오-구아노신, 6-티오-7-데아자-구아노신, 6-티오-7-데아자-8-아자-구아노신, 7-메틸-구아노신(m<sup>7</sup>G), 6-티오-7-메틸-구아노신, 7-메틸-이노신, 6-메톡시-구아노신, 1-메틸-구아노신(m<sup>1</sup>G), N2-메틸-구아노신(m<sup>2</sup>G), N2,N2-다이메틸-구아노신(m<sup>2</sup><sub>2</sub>G), N2,7-다이메틸-구아노신(m<sup>2,7</sup>G), N2, N2,7-다이메틸-구아노신(m<sup>2,2,7</sup>G), 8-옥소-구아노신, 7-메틸-8-옥소-구아노신, 1-메틸-6-티오-구아노신, N2-메틸-6-티오-구아노신, N2,N2-다이메틸-6-티오-구아노신, α-티오-구아노신, 2'-O-메틸-구아노신(Gm), N2-메틸-2'-O-메틸-구아노신(m<sup>2</sup>Gm), N2,N2-다이메틸-2'-O-메틸-구아노신(m<sup>2</sup><sub>2</sub>Gm), 1-메틸-2'-O-메틸-구아노신(m<sup>1</sup>Gm), N2,7-다이메틸-2'-O-메틸-구아노신(m<sup>2,7</sup>Gm), 2'-O-메틸-이노신(Im), 1,2'-O-다이메틸-이노신(m<sup>1</sup>Im), 2'-O-리보실구아노신(포스페이트)(Gr(p)), 1-티오-구아노신, O6-메틸-구아노신, 2'-F-아라-구아노신, 및 2'-F-구아노신을 포함한다.

[0340] RNA(예를 들어, mRNA)의 **시험관내 전사**

[0341] 본 개시내용의 암 백신은 적어도 하나의 RNA 폴리뉴클레오타이드, 예컨대 mRNA(예를 들어, 변형된 mRNA)를 포함한다. mRNA는, 예를 들어, "**시험관내 전사 주형**"으로서 지칭되는 주형 DNA로부터 **시험관내**에서 전사된다. 일부 실시형태에서, 시험관내 전사 주형은 5' 비번역(UTR) 영역을 암호화하고, 오픈 리딩 프레임에 함유하며, 3'UTR 및 폴리A 꼬리를 암호화한다. 특정 핵산 서열 조성물 및 **시험관내 전사** 주형의 길이는 주형에 의해 암호화된 mRNA에 의존할 것이다.

[0342] 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 200 내지 3,000개의 뉴클레오타이드를 포함한다. 예를 들어, 폴리뉴클레오타이드는 200 내지 500, 200 내지 1000, 200 내지 1500, 200 내지 3000, 500 내지 1000, 500 내지 1500, 500 내지 2000, 500 내지 3000, 1000 내지 1500, 1000 내지 2000, 1000 내지 3000, 1500 내지 3000, 또는 2000 내지 3000개의 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

[0343] 다른 양상에서, 본 발명은 IVT 방법에 의해 mRNA 암 백신을 제조하는 방법에 관한 것이다. **시험관내 전사**(IVT) 방법은 대부분의 임의의 서열의 RNA 분자의 주형-관련 합성을 허용한다. IVT 방법을 이용하여 합성될 수 있는 RNA 분자의 크기는 짧은 올리고뉴클레오타이드로부터 수천개 염기의 긴 핵산 중합체까지의 범위이다. IVT 방법은 다량의 RNA 전사체의 합성을 허용한다(예를 들어, 마이크로그램 내지 밀리그램의 양)(Beckert *et al.*, Synthesis of RNA by *in vitro* transcriptio, *Methods Mol Biol.* 703:29-41(2011); Rio *et al.* RNA: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2011, 205-220.; Cooper, Geoffery M. The Cell: A Molecular Approach. 4th ed. Washington D.C.: ASM Press, 2007. 262-299). 일반적으로, IVT는 관심 대상의 서열 상류의 프로모터 서열을 특징으로 하는 DNA 주형을 이용한다. 프로모터 서열은 가장 흔하게는 박테리오파지 유래(예를 들어, T7, T3 또는 SP6 프로모터 서열)이지만, 드노보로 설계된 것을 포함하는 다수의 다른 프로모터 서열이 용인될 수 있다. DNA 주형의 전사는 전형적으로 특정 박테리오파지 프로모터 서열에 대응하는 RNA 중합효소를 이용함으로써 가장 잘 달성된다. 예시적인 RNA 중합효소는 특히 T7 RNA 중

합효소, T3 RNA 중합효소 또는 SP6 RNA 중합효소를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. IVT는 일반적으로 dsDNA에서 개시되지만, 단일 가닥 상에서 진행될 수 있다.

[0344] 본 개시내용의 mRNA 백신, 예를 들어, 암 항원을 암호화하는 mRNA 또는 예를 들어, 활성화 종양유전자 돌연변이 펩타이드는 임의의 적절한 합성 방법을 이용하여 생성될 수 있다는 것이 인식될 것이다. 예를 들어, 일부 실시 형태에서, 본 개시내용의 mRNA 백신은 주형으로서 단일 하부 가닥 DNA로부터의 IVT 및 프로모터로서 작용하는 상보적 올리고뉴클레오타이드를 이용하여 생성된다. 단일 하부 가닥 DNA는 RNA의 시험관내 전사에 대한 DNA 주형으로서 작용할 수 있고, 예를 들어, 플라스미드, PCR 산물 또는 화학적 합성으로부터 얻을 수 있다. 일부 실시 형태에서, 단일 하부 가닥 DNA는 원형 주형으로부터 선형화된다. 단일 하부 가닥 DNA 주형은 IVT를 용이하게 하기 위해 일반적으로 프로모터 서열, 예를 들어, 박테리오파지 프로모터 서열을 포함한다. 단일 하부 가닥 DNA 및 상부 가닥 프로모터 상보성 올리고뉴클레오타이드를 이용하는 RNA의 제조방법은 당업계에 공지되어 있다. 예시적인 방법은 상부 가닥 프로모터 상보성 올리고뉴클레오타이드(예를 들어, T7 프로모터 상보성 올리고뉴클레오타이드, T3 프로모터 상보성 올리고뉴클레오타이드, 또는 SP6 프로모터 상보성 올리고뉴클레오타이드)로 DNA 하부 가닥 주형을 어닐링한 다음에, 프로모터 서열에 대응하는 RNA 중합효소, 예를 들어, T7 RNA 중합효소, T3 RNA 중합효소, 또는 SP6 RNA 중합효소를 이용하는 IVT를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0345] IVT 방법은 또한 이중-가닥 DNA 주형을 이용하여 수행될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시 형태에서, 이중-가닥 DNA 주형은 당업계에서 이용 가능한 가닥 연장 기법을 이용하여 상보성 DNA 가닥을 생성하기 위해 상보성 올리고뉴클레오타이드를 연장시킴으로써 생성된다. 일부 실시 형태에서, 프로모터 서열 및 관심 대상의 하나 이상의 에피토프를 암호화하는 서열을 함유하는 단일 하부 가닥 DNA 주형은 상부 가닥 프로모터 상보성 올리고뉴클레오타이드로 어닐링되고, 상부 가닥을 연장시키도록 PCR-유사 공정 처리되어 이중-가닥 DNA 주형을 생성한다. 대안적으로 또는 추가적으로, 하부 가닥 프로모터 서열에 상보성이고 관심 대상의 하나 이상의 에피토프를 암호화하는 서열에 상보성인 서열을 함유하는 상부 가닥 DNA는 하부 가닥 프로모터 올리고뉴클레오타이드로 어닐링되고, 하부 가닥을 연장시키도록 PCR-유사 공정 처리되어 이중-가닥 DNA 주형을 생성한다. 일부 실시 형태에서, PCR-유사 주기의 수는 1 내지 20주기, 예를 들어, 3 내지 10 주기의 범위이다. 일부 실시 형태에서, 이중-가닥 DNA 주형은 화학적 합성 방법에 의해 전체적으로 또는 부분적으로 합성된다. 이중-가닥 DNA 주형은 본 명세서에 기재된 바와 같은 시험관내 전사 처리될 수 있다.

[0346] 다른 양상에서, 본 개시내용의 mRNA 백신, 예를 들어, 암 항원 또는 에피토프를 암호화하는 mRNA는 그들의 서열의 중복 부분에 걸쳐 상보성인 2개의 DNA 가닥을 이용하여 생성되어, 상보성 부분이 어닐링될 때 단일-가닥 돌출부(즉, 점착성 말단)를 남긴다. 이들 단일-가닥 돌출부는 주형으로서 다른 가닥을 이용하여 연장시킴으로써 이중 가닥 DNA를 생성하여 이중 가닥이 만들어질 수 있다. 일부 경우에, 이런 프라이머 연장 방법은 상부 가닥 DNA 합성 방법에 의해 얻어진 주형 DNA 서열에 혼입된 크기에 비해 더 큰 ORF가 주형 DNA 서열에 혼입되는 것을 허용할 수 있다. 프라이머 연장 방법에서, 제1 가닥의 3'-단부의 일부는(5'-3' 방향으로) 제2 가닥의 3'-단부의 일부에 대해(3'-5' 방향으로) 상보성이다. 일부 이러한 실시 형태에서, 단일 제1 가닥 DNA는 프로모터(예를 들어, T7, T3 또는 SP6)의 서열, 선택적으로 5'-UTR 및 ORF의 일부 또는 모두(예를 들어, ORF의 5'-단부의 일부)를 포함할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 단일 제2 가닥 DNA는 ORF의 일부 또는 모두에 대해 상보성인 서열(예를 들어, ORF의 3'-단부에 상보성인 부분), 및 선택적으로 3'-UTR, 중단 서열, 및/또는 폴리(A) 꼬리를 포함할 수 있다. 두 합성 DNA 가닥을 이용하여 RNA를 생성하는 방법은 중복 상보성 부분을 갖는 두 가닥의 어닐링, 다음에 이중 가닥 DNA 주형을 생성하기 위해 가닥을 연장시키는 하나 이상의 PCR-유사 주기를 이용하는 프라이머 연장을 포함할 수 있다. 일부 실시 형태에서, PCR-유사 주기의 수는 1 내지 20 주기, 예를 들어, 3 내지 10 주기의 범위이다. 이러한 이중-가닥 DNA에 본 명세서에 기재된 바와 같은 시험관내 전사가 실시될 수 있다.

[0347] 다른 양상에서, 본 개시내용의 mRNA 백신은, 예를 들어, 암 항원 또는 에피토프를 암호화하는 mRNA는 이중-가닥 DNA 주형으로서 합성 이중-가닥 선형 DNA 분자, 예컨대 gBlock(등록상표)(아이오와주 코럴빌에 소재한 인테그레이티드 DNA 테크놀로지(Integrated DNA Technologies))를 이용하여 생성될 수 있다. 이러한 합성 이중-가닥 선형 DNA 분자에 대한 이점은 그들이 mRNA를 생성하는 더 긴 주형을 제공하는 것이다. 예를 들어, gBlock(등록상표)는 크기가 45 내지 1000(예를 들어, 125 내지 750개의 뉴클레오타이드) 범위일 수 있다. 일부 실시 형태에서, 합성 이중-가닥 선형 DNA 주형은 전장 5'-UTR, 전장 3'-UTR, 또는 둘 다를 포함한다. 전장 5'-UTR은 길이가 100개까지의 뉴클레오타이드, 예를 들어, 약 40 내지 60개의 뉴클레오타이드를 포함한다. 전장 3'-UTR은 길이가 300개까지의 뉴클레오타이드, 예를 들어, 약 100 내지 150개의 뉴클레오타이드일 수 있다.

[0348] 더 긴 작제물의 생성을 용이하게 하기 위해, 3' 가닥 상의 중복 서열로 설계된 2 이상의 이중-가닥 선형 DNA 분자 및/또는 유전자 단편은 당업계에 공지된 방법을 이용하여 함께 조립될 수 있다. 예를 들어, Gibson 어셈블리

(Gibson Assembly)(상표명) 방법(캘리포니아주 라호야에 소재한 신테틱 게노믹스 인코포레이티드(Synthetic Genomics, Inc.))은 이중 가닥 DNA 단편의 5'-단부로부터 염기를 절단하는 중온성 엑소뉴클레아제의 사용, 다음에 새로 형성된 상보성 단일 가닥 3'-단부의 어닐링, 임의의 단일-가닥 겹에서 채워지는 중합효소-의존적 연장, 및 최종적으로, DNA 리가제에 의한 DNA 세그먼트의 공유 결합에 의해 수행될 수 있다.

[0349] 다른 양상에서, 본 개시내용의 mRNA 백신, 예를 들어, 암 항원 또는 에피토프를 암호화하는 mRNA는 RNA의 화학적 합성을 이용하여 생성될 수 있다. 방법은, 예를 들어, 폴리펩타이드를 암호화하는 오픈 리딩 프레임에 포함하는 제1 폴리뉴클레오타이드 및 고체 지지체에 접합된 상보성 폴리뉴클레오타이드에 대해 5'-UTR을 포함하는 제2 폴리뉴클레오타이드의 어닐링을 수반한다. 이어서, 제2 폴리뉴클레오타이드의 3'-말단은 적합한 조건 하에서 제1 폴리뉴클레오타이드의 5'-말단에 결합된다. 적합한 조건은 DNA 리가제의 사용을 포함한다. 결합 반응은 제1 결합 산물을 생산한다. 이어서, 3'-UTR을 포함하는 제3 폴리뉴클레오타이드의 5' 말단은 적합한 조건 하에서 제1 결합 산물의 3'-말단에 결합된다. 제2 결합 반응에 대한 적합한 조건은 RNA 리가제를 포함한다. 제2 결합 산물은 제2 결합 반응에서 생산된다. 제2 결합 산물은 관심 대상의 폴리펩타이드를 암호화하는 mRNA를 생성하기 위해 고체 지지체로부터 방출된다. 일부 실시형태에서, mRNA는 30 내지 1000개의 뉴클레오타이드이다.

[0350] 관심 대상의 폴리펩타이드를 암호화하는 mRNA는 또한 고체 지지체에 접합된 상보성 폴리뉴클레오타이드에 대해 3'-UTR을 포함하는 제2 폴리뉴클레오타이드에 폴리펩타이드를 암호화하는 오픈 리딩 프레임에 포함하는 제1 폴리뉴클레오타이드를 결합시킴으로써 제조될 수 있다. 제2 폴리뉴클레오타이드의 5'-말단은 적합한 조건하에서 제1 폴리뉴클레오타이드의 3'-말단에 결합된다. 적합한 조건은 DNA 리가제를 포함한다. 상기 방법은 제1 결합 산물을 생산한다. 5'-UTR을 포함하는 제3 폴리뉴클레오타이드는 적합한 조건 하에서 제1 결합 산물에 결합되어 제2 결합 산물을 생산한다. 적합한 조건은 RNA 리가제, 예컨대 T4 RNA를 포함한다. 제2 결합 산물은 관심 대상의 폴리펩타이드를 암호화하는 mRNA를 생성하기 위해 고체 지지체로부터 방출된다.

[0351] 일부 실시형태에서, 제1 폴리뉴클레오타이드는 5'-트라이포스페이트 및 3'-OH를 특징으로 한다. 다른 실시형태에서 제2 폴리뉴클레오타이드는 3'-OH를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 제3 폴리뉴클레오타이드는 5'-트라이포스페이트 및 3'-OH를 포함한다. 제2 폴리뉴클레오타이드는 또한 5'-캡 구조를 포함할 수 있다. 상기 방법은 또한 제3 폴리뉴클레오타이드의 3'-말단에서 폴리-A 영역을 포함하는 제4 폴리뉴클레오타이드를 결합시키는 추가적인 단계를 수반할 수 있다. 제4 폴리뉴클레오타이드는 5'-트라이포스페이트를 포함할 수 있다.

[0352] 상기 방법은 역상 정제를 포함할 수도 있고 또는 포함하지 않을 수도 있다. 상기 방법은 또한 세척 단계를 포함할 수 있되, 고체 지지체는 비반응 폴리뉴클레오타이드를 제거하기 위해 세척된다. 고체 지지체는, 예를 들어, 포획 수지일 수 있다. 일부 실시형태에서, 상기 방법은 dT 정제를 수반한다.

[0353] 본 개시내용에 따르면, 본 개시내용의 mRNA 백신을 암호화하는 주형 DNA는 하나 이상의 암 에피토프를 암호화하는 오픈 리딩 프레임(ORF)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 주형 DNA는 1000개까지의 뉴클레오타이드, 예를 들어, 약 10 내지 350, 30 내지 300개의 뉴클레오타이드 또는 약 50 내지 250개의 뉴클레오타이드의 ORF를 포함한다. 일부 실시형태에서, 주형 DNA는 약 150개의 뉴클레오타이드의 ORF를 포함한다. 일부 실시형태에서, 주형 DNA는 약 200개의 뉴클레오타이드의 ORF를 포함한다.

[0354] 일부 실시형태에서, IVT 전사체는 반응이 일어난 후에 IVT 반응 혼합물의 성분으로부터 정제된다. 예를 들어, 조질의 IVT 혼합은 본래의 주형을 분해하기 위해 무 RNase(RNase-free) DNase로 처리될 수 있다. mRNA는 유기용매를 이용하는 침전 또는 칼럼 기반 정제 방법을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 당업계에 공지된 방법을 이용하여 정제될 수 있다. RNA를 정제하기 위해 상업적 키트, 예를 들어, 메가클리어(MEGACLEAR)(상표명) 키트(텍사스주 오스틴에 소재한 앰비온(Ambion))를 이용 가능하다. 상업적으로 이용 가능한 기기, 예를 들어, 나노드롭(NanoDrop)을 포함하지만, 이것으로 제한되지 않는, 당업계에 공지된 방법을 이용하여 mRNA가 정량화될 수 있다. RNA가 적절한 크기라는 것을 확인하기 위해 그리고/또는 RNA의 분해가 일어나지 않았다는 것을 확인하기 위해, 예를 들어, 아가로스 겔 전기영동에 의해 정제된 mRNA가 분석될 수 있다.

[0355] 비번역 영역(UTR)

[0356] 비번역 영역(UTR)은 개시 코돈(5'UTR) 전에 그리고 번역되지 않은 중지 코돈(3'UTR) 후에 폴리뉴클레오타이드의 핵산 부분이다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 암 항원 또는 에피토프를 암호화하는 오픈 리딩 프레임(ORF)을 포함하는 본 발명의 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, 리보핵산(RNA), 예를 들어, 전령 RNA(mRNA))는 추가로 UTR(예를 들어, 5'UTR 또는 이의 기능성 단편, 3'UTR 또는 기능성 단편 또는 이들의 조합)을 포함한다.

[0357] UTR은 폴리뉴클레오타이드에서 암호화 영역에 대해 상동성 또는 이종성일 수 있다. 일부 실시형태에서, UTR은



하나 이상의 암 에피토프 폴리펩타이드를 암호화하는 ORF에 대해 상동성이다. 일부 실시형태에서, UTR은 하나 이상의 암 에피토프 폴리펩타이드를 암호화하는 ORF에 대해 이종성이다. 일부 실시형태에서, 폴리펩타이드는 2 이상의 5'UTR 또는 이의 기능성 단편을 포함하며, 이들 각각은 동일 또는 상이한 뉴클레오타이드 서열을 가진다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 2 이상의 3'UTR 또는 이의 기능성 단편을 포함하며, 이들 각각은 동일 또는 상이한 뉴클레오타이드 서열을 가진다.

[0358] 일부 실시형태에서, 5'UTR 또는 기능성 단편, 3'UTR 또는 기능성 단편 또는 이들의 임의의 조합이 최적화된다.

[0359] 일부 실시형태에서, 5'UTR 또는 기능성 단편, 3'UTR 또는 기능성 단편 또는 이들의 임의의 조합은 적어도 하나의 화학적으로 변형된 핵염기, 예를 들어, 5-메톡시우라실을 포함한다.

[0360] UTR은 조절 역할, 예를 들어, 증가된 또는 감소된 안정성, 국소화 및/또는 번역 효율을 제공하는 특징을 가질 수 있다. UTR을 포함하는 폴리뉴클레오타이드는 세포, 조직 또는 유기체에 투여될 수 있고, 그리고 하나 이상의 조절 특징은 일상적인 방법을 이용하여 측정될 수 있다. 일부 실시형태에서, 5'UTR 또는 3'UTR의 기능성 단편은 각각 전장 5' 또는 3'UTR의 하나 이상의 조절 특징을 포함한다.

[0361] 천연 5'UTR은 번역 개시에서 어떤 역할을 하는 특징을 보유한다. 그들은 리보솜이 다수 유전자의 번역을 개시하는 과정에 연루되는 것으로 통상적으로 알려진 코작 서열과 같은 서명을 보유한다. 코작(Kozak) 서열은 개시 코돈(AUG)(다른 'G'가 이어짐) 상류에 3개 염기가 있는 공통 CCR(A/G)CCAUGG(서열번호 246)(여기서, R은 퓨린(아데닌 또는 구아닌)임)을 가진다. 5'UTR은 연장 인자 결합에 연루된 2차 구조를 형성하는 것으로 알려져 있다.

[0362] 특정 표적 기관의 흔히 발현되는 유전자에서 전형적으로 발견된 특징을 조합함으로써, 폴리뉴클레오타이드의 안정성 및 단백질 생산을 향상시킬 수 있다. 예를 들어, 간 발현된 mRNA, 예컨대 알부민, 혈청 아밀로이드 A, 아포지질단백질 A/B/E, 트랜스페린, 알파 태아단백질, 에리스로포이에틴, 또는 인자 VIII의 5'UTR 도입은 간 세포 주 또는 간에서 폴리뉴클레오타이드를 향상시킬 수 있다. 마찬가지로, 해당 조직에서 발현을 개선시키기 위한 다른 조직-특이적 mRNA의 5'UTR의 사용은 근육에 대해(예를 들어, MyoD, 마이오신, 마이오글로빈, 마이오게닌, 허큘린), 내피세포에 대해(예를 들어, Tie-1, CD36), 골수성 세포에 대해(예를 들어, C/EBP, AML1, G-CSF, GM-CSF, CD11b, MSR, Fr-1, i-NOS), 백혈구에 대해(예를 들어, CD45, CD18), 지방조직에 대해(예를 들어, CD36, GLUT4, ACRP30, 아디포넥틴) 및 폐 상피세포에 대해(예를 들어, SP-A/B/C/D) 가능하다.

[0363] 일부 실시형태에서, UTR은 단백질이 통상적인 기능, 구조, 특징 또는 특성을 공유하는 전사체의 패밀리로부터 선택된다. 예를 들어, 암호화된 폴리펩타이드는 단백질의 패밀리에 속할 수 있으며(즉, 적어도 하나의 기능, 구조, 특징, 국소화, 유래 또는 발현 패턴을 공유), 이는 특정 세포, 조직에서, 또는 발생 동안 일정 시간에 발현된다. 임의의 유전자 또는 mRNA로부터의 UTR은 새로운 폴리뉴클레오타이드를 생성하기 위해 단백질의 동일 또는 상이한 패밀리의 임의의 다른 UTR로 전환될 수 있다.

[0364] 일부 실시형태에서, 5'UTR 및 3'UTR은 이종성일 수 있다. 일부 실시형태에서, 5'UTR은 3'UTR과 상이한 종으로부터 유래될 수 있다. 일부 실시형태에서, 3'UTR은 5'UTR과 상이한 종으로부터 유래될 수 있다.

[0365] 공동 소유된 국제 특허 출원 PCT/US2014/021522(공개 번호 WO/2014/164253, 본 명세서에 그의 전문이 참고로 편입됨)는 ORF에 대한 측정 영역으로서 본 발명의 폴리뉴클레오타이드에서 이용될 수 있는 예시적인 UTR의 목록을 제공한다.

[0366] 본 출원의 예시적인 UTR은 글로빈, 예컨대  $\alpha$ - 또는  $\beta$ -글로빈(예를 들어, 제노푸스(*Xenopus*), 마우스, 토끼 또는 인간 글로빈); 강한 코작 번역 개시 신호 CYBA(예를 들어, 인간 사이토크롬 b-245  $\alpha$  폴리펩타이드); 알부민(예를 들어, 인간 알부민7); HSD17B4(하이드록시스테로이드(17- $\beta$ ) 탈수소효소); 바이러스(예를 들어, 담배 식각 바이러스(TEV), 베네수엘라 말 뇌염 바이러스(VEEV), 뎅기열 바이러스, 거대세포 바이러스(CMV)(예를 들어, CMV 급초기 1(IE1)), 간염 바이러스(예를 들어, B형 간염 바이러스), 신드비스 바이러스, 또는 PAV 보리 황화 위축 바이러스); 열 충격 단백질(예를 들어, hsp70); 번역 개시 인자 (예를 들어, eIF4G); 글루코스 수송체(예를 들어, hGLUT1(인간 글루코스 수송체 1)); 액틴(예를 들어, 인간  $\alpha$  또는  $\beta$  액틴); GAPDH; 튜불린; 히스톤; 시트르산 주기 효소; 토포아이스오머라제(예를 들어, 5' TOP 모티프를 결합하는 TOP 유전자의 5'UTR(올리고페리미딘 관)); 리보솜 단백질 거대 32(L32); 리보솜 단백질(예를 들어, 인간 또는 마우스 리보솜 단백질, 예를 들어, rps9); ATP 신타제(예를 들어, ATP5A1 또는 미토콘드리아  $H^+$ -ATP 신타제의  $\beta$  서브유닛); 성장 호르몬 e(예를 들어, 소(bGH) 또는 인간(hGH)); 연장 인자(예를 들어, 연장 인자 1 $\alpha$ 1(EEF1A1)); 망간과산화물 디스무타제(MnSOD); 근세포 인핸서 인자 2A(MEF2A);  $\beta$ -F1-ATPase, 크레아틴 키나제, 마이오글로빈, 과립구-집락 자극 인자(G-CSF); 콜라겐(예를 들어, 콜라겐 I형, 알파 2(Co11A2), 콜라겐 I형, 알파 1(Co11A1), 콜라겐 VI형, 알파



2(Co16A2), 콜라겐 VI형, 알파 1(Co16A1)); 리보포린(예를 들어, 리보포린 I(RPNI)); 저밀도 지질단백질 수용체-관련 단백질(예를 들어, LRP1); 카디오트로핀-유사 사이토카인 인자(예를 들어, Nnt1); 칼레티쿨린(Calr); 프로콜라겐-라이신, 2-옥소글루타레이트 5-다이옥시세나제 1(Plod1); 및 뉴클레오바인딘(예를 들어, Nucb1)의 핵산 서열로부터 유래된 하나 이상의 5'UTR 및/또는 3'UTR을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0367]

다른 예시적인 5' 및 3'UTR은 문헌[Karikó *et al.*, Mol. Ther. 2008 16(11):1833-1840; Karikó *et al.*, Mol. Ther. 2012 20(5):948-953; Karikó *et al.*, 핵산 Res. 2011 39(21):e142; Strong *et al.*, Gene Therapy 1997 4:624-627; Hansson *et al.*, J. Biol. Chem. 2015 290(9):5661-5672; Yu *et al.*, Vaccine 2007 25(10):1701-1711; Cafri *et al.*, Mol. Ther. 2015 23(8):1391-1400; Andries *et al.*, Mol. Pharm. 2012 9(8):2136-2145; Crowley *et al.*, Gene Ther. 2015 Jun 30, doi:10.1038/gt.2015.68; Ramunas *et al.*, FASEB J. 2015 29(5):1930-1939; Wang *et al.*, Curr. Gene Ther. 2015 15(4):428-435; Holtkamp *et al.*, Blood 2006 108(13):4009-4017; Kormann *et al.*, Nat. Biotechnol. 2011 29(2):154-157; Poleganov *et al.*, Hum. Gen. Ther. 2015 26(11):751-766; Warren *et al.*, Cell Stem Cell 2010 7(5):618-630; Mandal and Rossi, Nat. Protoc. 2013 8(3):568-582; Holcik and Liebhaver, PNAS 1997 94(6):2410-2414; Ferizi *et al.*, Lab Chip. 2015 15(17):3561-3571; Thess *et al.*, Mol. Ther. 2015 23(9):1456-1464; Boros *et al.*, PLoS One 2015 10(6):e0131141; Boros *et al.*, J. Photochem. Photobiol. B. 2013 129:93-99; Andries *et al.*, J. Control. Release 2015 217:337-344; Zinckgraf *et al.*, Vaccine 2003 21(15):1640-9; Garneau *et al.*, J. Virol. 2008 82(2):880-892; Holden and Harris, Virology 2004 329(1):119-133; Chiu *et al.*, J. Virol. 2005 79(13):8303-8315; Wang *et al.*, EMBO J. 1997 16(13):4107-4116; Al-Zoghaibi *et al.*, Gene 2007 391(1-2):130-9; Vivinus *et al.*, Eur. J. Biochem. 2001 268(7):1908-1917; Gan and Rhoads, J. Biol. Chem. 1996 271(2):623-626; Boado *et al.*, J. Neurochem. 1996 67(4):1335-1343; Knirsch and Clerch, Biochem. Biophys. Res. Commun. 2000 272(1):164-168; Chung *et al.*, Biochemistry 1998 37(46):16298-16306; Izquierdo and Cueva, Biochem. J. 2000 346 Pt 3:849-855; Dwyer *et al.*, J. Neurochem. 1996 66(2):449-458; Black *et al.*, Mol. Cell. Biol. 1997 17(5):2756-2763; Izquierdo and Cueva, Mol. Cell. Biol. 1997 17(9):5255-5268]; 미국 특허 제8278036호; 미국 특허 제8748089호; 미국 특허 제8835108호; 미국 특허 제9012219호; 미국 특허 제2010/0129877호; 미국 특허 제2011/0065103호; 미국 특허 제2011/0086904호; 미국 특허 제2012/0195936호; 미국 특허 제2014/020675호; 미국 특허 제2013/0195967호; 미국 특허 제2014/029490호; 미국 특허 제2014/0206753호; WO2007/036366; WO2011/015347; WO2012/072096; WO2013/143555; WO2014/071963; WO2013/185067; WO2013/182623; WO2014/089486; WO2013/185069; WO2014/144196; WO2014/152659; 2014/152673; WO2014/152940; WO2014/152774; WO2014/153052; WO2014/152966, WO2014/152513; WO2015/101414; WO2015/101415; WO2015/062738; 및 WO2015/024667에 기재된 것을 포함하지만, 이들로 제한되지 않으며; 이들 각각의 내용은 그들의 전문이 본 명세서에 참고로 편입된다.

[0368]

일부 실시형태에서, 5'UTR은  $\beta$ -글로빈 5'UTR; 강한 코작 번역 개시 신호를 함유하는 5'UTR; 사이토크롬 b-245  $\alpha$  폴리펩타이드(CYBA) 5'UTR; 하이드록시스테로이드(17- $\beta$ ) 탈수소효소(HSD17B4) 5'UTR; 담배 식물 바이러스 (TEV) 5'UTR; 베네수엘라 말 뇌염 바이러스(TEEV) 5'UTR; 비구조적 단백질을 암호화하는 루벨라 바이러스(RV) RNA의 5' 근위 오픈 리딩 프레임; 뎅기열 바이러스(DEN) 5'UTR; 열 충격 단백질 70(Hsp70) 5'UTR; eIF4G 5'UTR; GLUT1 5'UTR; 이들의 기능성 단편 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0369]

일부 실시형태에서, 3'UTR은  $\beta$ -글로빈 3'UTR; CYBA 3'UTR; 알부민 3'UTR; 성장 호르몬(GH) 3'UTR; VEEV 3'UTR; B형 간염 바이러스(HBV) 3'UTR;  $\alpha$ -글로빈 3'UTR; DEN 3'UTR; PAV 보리 황화 위축 바이러스(BYDV-PAV) 3'UTR; 연장 인자 1  $\alpha$ 1(EEF1A1) 3'UTR; 망간 과산화물 디스무타제(MnSOD) 3'UTR; 미토콘드리아 H(+)-ATP 신타제의  $\beta$  서브유닛( $\beta$ -mRNA) 3'UTR; GLUT1 3'UTR; MEF2A 3'UTR;  $\beta$ -F1-ATPase 3'UTR; 이의 기능성 단편 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0370]

다른 예시적 UTR은 전문이 본 명세서에 참고로 편입된 WO2014/164253에 개시된 UTR의 임의의 조합을 포함하는 하나 이상의 UTR을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 각각의 내용이 본 명세서에 참고로 편입된 미국 가출원 특허 제61/775,509호의 표 21에 그리고 미국 가출원 특허 제61/829,372호의 표 22에 5'UTR 및 3'UTR에 대한 개시 및 중단 부위 목록을 나타낸다. 표 21에서, 각각의 5'UTR(5'-UTR-005 내지 5'-UTR 68511)은 그의 천연 또는 야생형(상동성) 전사체(ENST; ENSEMBL 데이터베이스에서 사용되는 식별자)에 비해 그의 개시 그리고 중단 부위에 의해 동정된다.

[0371] 임의의 유전자 또는 mRNA로부터 유래된 야생형 UTR은 본 발명의 폴리뉴클레오타이드에 혼입될 수 있다. 일부 실시형태에서, UTR은 변이체 UTR을 생성하기 위해 야생형 또는 천연 UTR에 대해, 예를 들어, ORF에 대해 UTR의 배향 또는 위치를 변화시킴으로써; 또는 추가적인 뉴클레오타이드의 포함, 뉴클레오타이드의 결실, 뉴클레오타이드의 전환 또는 전위에 의해 변경될 수 있다. 일부 실시형태에서, 5' 또는 3'UTR의 변이체, 예를 들어, 야생형 UTR의 돌연변이체, 또는 변이체가 이용될 수 있되, 하나 이상의 뉴클레오타이드는 UTR의 말단에 첨가되거나 또는 이로부터 제거된다.

[0372] 추가적으로, 하나 이상의 합성 UTR은 하나 이상의 비-합성 UTR과 조합하여 사용될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Mandal and Rossi, Nat. Protoc. 2013 8(3):568-82], 및 [www.addgene.org/Derrick\\_Rossi/](http://www.addgene.org/Derrick_Rossi/)에서 이용 가능한 서열을 참조하며, 각각의 내용은 본 명세서에 전문이 참고로 편입된다. UTR 또는 이의 부분은 그들이 선택되거나 또는 배향 또는 위치에서 변경될 수 있는 전사체에서와 동일한 배향으로 위치될 수 있다. 따라서, 5' 및/또는 3'UTR은 역위, 단축, 신장되거나 또는 다른 5'UTR 또는 3'UTR과 조합될 수 있다.

[0373] 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 다중 UTR, 예를 들어, 이중, 삼중 또는 사중 5'UTR 또는 3'UTR을 포함한다. 예를 들어, 이중 UTR은 연속해서 또는 실질적으로 연속해서 동일한 UTR의 두 복제물을 포함한다. 예를 들어, 이중 베타-글로빈 3'UTR이 사용될 수 있다(미국 특허 제2010/0129877호, 이의 내용은 본 명세서에 그의 전문이 참고로 편입됨).

[0374] 소정의 실시형태에서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 본 명세서에 개시된 임의의 UTR로부터 선택된 5'UTR 및/또는 3'UTR을 포함한다. 일부 실시형태에서, 5'UTR 및/또는 3'UTR은 하기를 포함한다:

명칭	서열번호
5'UTR-001 (상류의 UTR)	247
5'UTR-002 (상류의 UTR)	248
5'UTR-003 (상류의 UTR)	249
5'UTR-004 (상류의 UTR)	250
5'UTR-005 (상류의 UTR)	251

[0375]

명칭	서열번호
5'UTR-006 (상류의 UTR)	252
5'UTR-007 (상류의 UTR)	253
5'UTR-008 (상류의 UTR)	254
5'UTR-009 (상류의 UTR)	255
5'UTR-010 (상류의 UTR)	256
5'UTR-011 (상류의 UTR)	257
5'UTR-012 (상류의 UTR)	258
5'UTR-013 (상류의 UTR)	259
5'UTR-014 (상류의 UTR)	260
5'UTR-015 (상류의 UTR)	261
5'UTR-016 (상류의 UTR)	262
5'UTR-017 (상류의 UTR)	263
5'UTR-018 (상류의 UTR)	264
142-3p 5'UTR-001 (miR142-3p 결합 부위를 포함하는 상류의 UTR)	265
142-3p 5'UTR-002 (miR142-3p 결합 부위를 포함하는 상류의 UTR)	266
142-3p 5'UTR-003 (miR142-3p 결합 부위를 포함하는 상류의 UTR)	267
142-3p 5'UTR-004 (miR142-3p 결합 부위를 포함하는 상류의 UTR)	268
142-3p 5'UTR-005 (miR142-3p 결합 부위를 포함하는 상류의 UTR)	269
142-3p 5'UTR-006 (miR142-3p 결합 부위를 포함하는 상류의 UTR)	270
142-3p 5'UTR-007 (miR142-3p 결합 부위를 포함하는 상류의 UTR)	271
3'UTR은 3'UTR-001 (크레아틴 키나제 UTR)를 포함함	272
3'UTR-002 (마이오글로빈 UTR)	273
3'UTR-003 ( $\alpha$ -액틴 UTR)	274
3'UTR-004 (알부민 UTR)	275
3'UTR-005 ( $\alpha$ -글로빈 UTR)	276
3'UTR-006 (G-CSF UTR)	277
3'UTR-007 (Col1a2; 콜라겐, I형, 알파 2UTR)	278
3'UTR-008 (Col6a2; 콜라겐, VI형, 알파 2UTR)	279
3'UTR-009 (RPN1; 리보포린 I UTR)	280
3'UTR-010 (LRP1; 저밀도 지질단백질 수용체-관련 단백질 1 UTR)	281
3'UTR-011 (Nnt1; 카디오토로핀-유사 사이토카인 인자 1 UTR)	282

[0376]

명칭	서열번호
3'UTR-012 (Col6a1; 콜라겐, VI형, 알파 1 UTR)	283
3'UTR-013 (Calr; 칼레티쿨린 UTR)	284
3'UTR-014 (Colla1; 콜라겐 I형, 알파 1 UTR)	285
3'UTR-015 (Plod1; 프로콜라겐-라이신, 2-옥소글루타레이트 5-다이옥시게나제 1 UTR)	286
3'UTR-016 (Nucb1; 뉴클레오바인딘 1 UTR)	287
3'UTR-017 ( $\alpha$ -글로빈)	288
3'UTR-018	289
miR 142-3p 결합 부위를 갖는 3'UTR	290
miR 126-3p 결합 부위를 갖는 3'UTR	291
miR 142-3p 및 miR 126-3p 결합 부위를 갖는 3'UTR	292
3 miR 142-3p 결합 부위를 갖는 3'UTR	293
miR 142-5p 결합 부위를 갖는 3'UTR	294
3 miR 142-5p 결합 부위를 갖는 3'UTR	295
2 miR 142-5p 결합 부위 및 1 miR 142-3p 결합 부위를 갖는 3'UTR	296
miR 142-3p 결합 부위를 갖는 3'UTR, P1 삽입	297
miR 142-3p 결합 부위를 갖는 3'UTR, P2 삽입	298
miR 142-3p 결합 부위를 갖는 3'UTR, P3 삽입	299
miR 155-5p 결합 부위를 갖는 3'UTR	300
3 miR 155-5p 결합 부위를 갖는 3'UTR	301
2 miR 155-5p 결합 부위 및 1 miR 142-3p 결합 부위를 갖는 3'UTR	302

[0377]

[0378]

소정의 실시형태에서, 본 발명의 5'UTR 및/또는 3'UTR 서열은 서열번호 247 내지 271 중 임의의 것을 포함하는 5'UTR 서열 및/또는 서열번호 272 내지 302 중 임의의 것을 포함하는 3'UTR 서열, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 대해 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 약 100% 동일한 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0379]

본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 특징의 조합을 포함할 수 있다. 예를 들어, ORF는 강한 코작 번역 개시 신호를 포함하는 5'UTR 및/또는 폴리-A 꼬리의 주형 첨가에 대한 올리고(dT) 서열을 포함하는 3'UTR에 의해 측정될 수 있다. 5'UTR은 동일 및/또는 상이한 UTR로부터의 제1 폴리뉴클레오타이드 단편 및 제2 폴리뉴클레오타이드 단편을 포함할 수 있다(예를 들어, 본 명세서에 전문이 참고로 편입된 특허 제2010/0293625호).

[0380]

또한 패턴화된 UTR에 대한 본 발명의 범주 내에 있다. 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "패턴화된 UTR"은 1회, 2회, 또는 3회 이상 반복된 반복 또는 교번의 패턴, 예컨대 ABABAB 또는 AABBAABBAABB 또는 ABCABCABC 또는 이의 변이체를 포함한다. 이들 패턴에서, 각각의 글자, A, B 또는 C는 상이한 UTR 핵산 서열을 나타낸다.

[0381]

다른 비-UTR 서열은 본 발명의 폴리뉴클레오타이드의 영역 또는 하위영역으로서 사용될 수 있다. 예를 들어, 인트론 또는 인트론 서열의 일부는 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 내로 혼입될 수 있다. 인트론 서열의 혼입은 단백질 생산뿐만 아니라 폴리뉴클레오타이드 발현 수준을 증가시킬 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 UTR 대신에 또는 이에 추가로 내부 리보솜 유입 부위(IRES)를 포함한다(예를 들어, 문헌[Yakubov *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 2010 394(1):189-193]을 참조하며, 이의 내용은 그의 전문이 본 명세서에 참고로 편입됨). 일부 실시형태에서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 RV RNA 암호화 비구조적 단백질의 5' 근위 오픈 리딩 프레임에 포함하는, 각각 루벨라 바이러스(RV) 게놈 RNA의 5' 및/또는 3' 단부와 결합된 5' 및/또는 3' 서열, 또는 이의 결실 유도체를 포함한다(예를 들어, 문헌[Pogue *et al.*, J. Virol. 67(12):7106-7117]을 참조하며, 이의 내용은 본 명세서에 전문이 참고로 편입됨). 바이러스 캡시드 서열은 또한

번역 인핸서, 예를 들어, 캡시드 서열의 5'-부분으로서 사용될 수 있다(예를 들어, 문헌[Sjöberg *et al.*, Biotechnology (NY) 1994 12(11):1127-1131, 및 Frolov and Schlesinger J. Virol. 1996 70(2):1182-1190]에

기재된 바와 같은 샘플리 삼립열 바이러스 및 신드비스 바이러스 캡시드 RNA, 이들 각각의 내용은 그들의 전문이 본 명세서에 참고로 편입됨). 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 5'UTR 서열 대신에 IRES를 포함한다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 ORF 및 바이러스 캡시드 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 비-합성 3'UTR과 조합하여 합성 5'UTR을 포함한다.

[0382] 일부 실시형태에서, UTR은 또한 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드로부터 생산된 단백질의 양을 증가시키는 핵산 서열을 지칭하는 적어도 하나의 번역 인핸서 폴리뉴클레오타이드, 번역 인핸서 요소, 또는 번역 인핸서 요소들(총괄적으로, "TEE")를 포함할 수 있다. 비제한적 예로서, TEE는 본 명세서에 전문이 참고로 편입된 미국 특허 제2009/0226470호에 기재된 것 및 당업계에 공지된 다른 것을 포함할 수 있다. 비제한적 예로서, TEE는 전사 프로모터와 개시 코돈 사이에 위치된다. 일부 실시형태에서, 5'UTR은 TEE를 포함한다.

[0383] 일 양상에서, TEE는 핵산의 번역 활성, 예컨대 이하로 제한되는 것은 아니지만, 캡-의존적 또는 캡-독립적 번역을 촉진시킬 수 있는 UTR에서 보존된 요소이다. 이들 서열의 보존은 인간을 포함하는 14가지 종에 걸쳐 나타났다. 예를 들어, 문헌[Panek *et al.*, "An evolutionary conserved pattern of 18S rRNA sequence complementarity to mRNA 5'UTRs and its implications for eukaryotic gene translation regulation," Nucleic Acids Research 2013, doi:10.1093/nar/gkt548]을 참조하며, 이는 본 명세서에 그의 전문이 참고로 편입된다.

[0384] 하나의 비제한적 예에서, TEE는 Gtx 호메오도메인 단백질의 5'-리더에서 TEE 서열을 포함한다. 문헌[Chappell *et al.*, PNAS 2004 101:9590-9594]은 본 명세서에 그의 전문이 참고로 편입된다.

[0385] 다른 비제한적 예에서, TEE는 미국 특허 제2009/0226470호, 미국 특허 제2013/0177581호, 및 W02009/075886의 서열번호 1 내지 35; W02012/009644의 서열번호 1 내지 5 및 7 내지 645; 및 서열번호 1 W01999/024595, 미국 특허 제6310197호 및 미국 특허 제6849405호의 서열 중 하나 이상을 갖는 TEE를 포함하며; 이들 각각의 내용은 그들의 전문이 본 명세서에 참고로 편입된다.

[0386] 일부 실시형태에서, TEE는 내부 리보솜 유입 부위(IRES), HCV-IRES, 또는 IRES 요소, 예컨대, 이하로 제한되는 것은 아니지만, 미국 특허 제7468275호, 미국 특허 제2007/0048776호, 미국 특허 제2011/0124100, W02007/025008, 및 W02001/055369에 기재된 것이며; 이들 각각의 내용은 본 명세서에 그들의 전문이 참고로 편입된다. IRES 요소는 문헌[Chappell *et al.*, PNAS 2004 101:9590-9594, Zhou *et al.*, PNAS 2005 102:6273-6278], 미국 특허 제2007/0048776호, 미국 특허 제2011/0124100호, 및 W02007/025008에 의해 기재된 바와 같은 Gtx 서열(예를 들어, Gtx9-nt, Gtx8-nt, Gtx7-nt)을 포함할 수 있지만, 이들로 제한되지 않으며; 이들 각각의 내용은 그들의 전문이 본 명세서에 참고로 편입된다.

[0387] "번역 인핸서 폴리뉴클레오타이드" 또는 "번역 인핸서 폴리뉴클레오타이드 서열"은 본 명세서에 제공되고/되거나 당업계에 공지된 TEE 중 하나 이상을 포함하는 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, 미국 특허 제6310197호, 미국 특허 제6849405호, 미국 특허 제7456273호, 미국 특허 제7183395호, 미국 특허 제2009/0226470호, 미국 특허 제2007/0048776호, 미국 특허 제2011/0124100호, 미국 특허 제2009/0093049호, 미국 특허 제2013/0177581호, W02009/075886, W02007/025008, W02012/009644, W02001/055371, W01999/024595, 유럽 특허 제2610341A1호 및 유럽 특허 제2610340A1호를 참조하며; 이들 각각의 내용은 그들의 전문이 본 명세서에 참고로 편입됨), 또는 그들의 변이체, 상동체 또는 기능성 유도체를 지칭한다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 TEE 중 하나 또는 다중 복제물을 포함한다. 번역 인핸서 폴리뉴클레오타이드에서 TEE는 하나 이상의 서열 세그먼트에서 조직화될 수 있다. 서열 세그먼트는 본 명세서에 제공된 TEE 중 하나 이상을 보유할 수 있고, 각각의 TEE는 하나 이상의 복제물에 존재한다. 다중 서열 세그먼트가 번역 인핸서 폴리뉴클레오타이드에 존재할 때, 그들은 상동성 또는 이종성일 수 있다. 따라서, 번역 인핸서 폴리뉴클레오타이드에서 다중 서열 세그먼트는 본 명세서에 제공된 동일한 또는 상이한 유형의 TEE, 동일한 또는 상이한 수의 각각의 TEE 및/또는 동일한 또는 각각의 서열 세그먼트 내에서 상이한 조직화의 TEE를 보유할 수 있다. 일 실시형태에서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 번역 인핸서 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0388] 일부 실시형태에서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드의 5'UTR 및/또는 3'UTR은 W01999/024595, W02012/009644, W02009/075886, W02007/025008, W01999/024595, W02001/055371, 유럽 특허 제2610341A1호, 유럽 특허 제2610340A1호, 미국 특허 제6310197호, 미국 특허 제6849405호, 미국 특허 제7456273호, 미국 특허 제7183395호, 미국 특허 제2009/0226470호, 미국 특허 제2011/0124100호, 미국 특허 제2007/0048776호, 미국 특허 제2009/0093049호 또는 미국 특허 제2013/0177581호에 개시된 적어도 하나의 TEE 또는 이의 일부를 포함하며, 각각의 내용은 그들의 전문이 본 명세서에 참고로 편입된다.



- [0389] 일부 실시형태에서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드의 5'UTR 및/또는 3'UTR은 미국 특허 제2009/0226470호, 미국 특허 제2007/0048776호, 미국 특허 제2013/0177581호, 미국 특허 제2011/0124100, W01999/024595, W02012/009644, W02009/075886, W02007/025008, 유럽 특허 제2610341A1호, 유럽 특허 제2610340A1호, 미국 특허 제6310197호, 미국 특허 제6849405호, 미국 특허 제7456273호, 미국 특허 제7183395호, 문헌[Chappell *et al.*, PNAS 2004 101:9590-9594, Zhou *et al.*, PNAS 2005 102:6273-6278] 및 문헌[Wellensiek *et al.*, "Genome-wide profiling of human cap-independent translation-enhancing elements," Nature Methods 2013, DOI:10.1038/NMETH.2522]의 보충적 표 1 및 보충적 표 2에 개시된 TEE에 대해 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한 TEE를 포함하며; 이들 각각의 내용은 그들의 전문이 본 명세서에 참고로 편입된다.
- [0390] 일부 실시형태에서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드의 5'UTR 및/또는 3'UTR은 미국 특허 제2009/0226470호, 미국 특허 제2007/0048776호, 미국 특허 제2013/0177581호, 미국 특허 제2011/0124100호, W01999/024595, W02012/009644, W02009/075886, W02007/025008, 유럽 특허 제2610341A1호, 유럽 특허 제2610340A1호, 미국 특허 제6310197, 미국 특허 제6849405호, 미국 특허 제7456273호, 미국 특허 제7183395호, 문헌[Chappell *et al.*, PNAS 2004 101:9590-9594, Zhou *et al.*, PNAS 2005 102:6273-6278] 및 문헌[Wellensiek *et al.*, "Genome-wide profiling of human cap-independent translation-enhancing elements," Nature Methods 2013, DOI:10.1038/NMETH.2522]의 보충적 표 1 및 보충적 표 2에 개시된 TEE 서열의 5 내지 30개의 뉴클레오타이드 단편, 5 내지 25개의 뉴클레오타이드 단편, 5 내지 20개의 뉴클레오타이드 단편, 5 내지 15개의 뉴클레오타이드 단편 또는 5 내지 10개의 뉴클레오타이드 단편(5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30개의 뉴클레오타이드의 단편을 포함)로부터 선택된 TEE를 포함한다.
- [0391] 일부 실시형태에서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드의 5'UTR 및/또는 3'UTR은 미국 특허 제7456273호, 미국 특허 제7183395호, 미국 특허 제2009/0093049호 및 W02001/055371 중 어떤 것에 기재된 전사 조절 요소인 TEE를 포함하며, 이들 각각의 내용은 그들의 전문이 본 명세서에 참고로 편입된다. 전사 조절 요소는 당업계에 공지된 방법, 예컨대, 이하로 제한되는 것은 아니지만, 미국 특허 제7456273호, 미국 특허 제7183395호, 미국 특허 제2009/0093049호 및 W02001/055371에 기재된 방법에 의해 동정될 수 있다.
- [0392] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 적어도 하나의 TEE를 포함하는 5'UTR 및/또는 3'UTR은 단시트론성 서열, 예컨대, 이하로 제한되는 것은 아니지만, 벡터 시스템 또는 핵산 벡터에 혼입될 수 있다. 비제한적 예로서, 벡터 시스템 및 핵산 벡터는 미국 특허 제7456273호, 미국 특허 제7183395호, 미국 특허 제2007/0048776호, 미국 특허 제2009/0093049호, 미국 특허 제2011/0124100호, W02007/025008 및 W02001/055371에 기재된 것을 포함할 수 있다.
- [0393] 일부 실시형태에서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드의 5'UTR 및/또는 3'UTR은 본 명세서에 기재된 TEE 또는 이의 일부를 포함한다. 일부 실시형태에서, 3'UTR에서 TEE는 5'UTR에 위치한 TEE와 동일하고/하거나 상이할 수 있다.
- [0394] 일부 실시형태에서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드의 5'UTR 및/또는 3'UTR은 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 11, 적어도 12, 적어도 13, 적어도 14, 적어도 15, 적어도 16, 적어도 17, 적어도 18 적어도 19, 적어도 20, 적어도 21, 적어도 22, 적어도 23, 적어도 24, 적어도 25, 적어도 30, 적어도 35, 적어도 40, 적어도 45, 적어도 50, 적어도 55개 또는 60개 이상의 TEE 서열을 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, 본 발명의 5'UTR의 폴리뉴클레오타이드는 1-60, 1-55, 1-50, 1-45, 1-40, 1-35, 1-30, 1-25, 1-20, 1-15, 1-10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1개의 TEE 서열을 포함할 수 있다. 본 발명의 폴리뉴클레오타이드의 5'UTR에서 TEE 서열은 동일 또는 상이한 TEE 서열일 수 있다. 본 발명의 폴리뉴클레오타이드의 5'UTR에서 상이한 TEE 서열의 조합은 임의의 상이한 TEE 서열의 하나 초과와 복제물이 혼입되는 조합을 포함할 수 있다. TEE 서열은 1, 2, 3회, 또는 3회 초과로 반복된 패턴, 예컨대 ABABAB 또는 AABBAABBAABB 또는 ABCABCABC 또는 이들의 변이체일 수 있다. 이들 패턴에서, 각각의 글자, A, B 또는 C는 상이한 TEE 뉴클레오타이드 서열을 나타낸다.
- [0395] 일부 실시형태에서, 5'UTR 및/또는 3'UTR은 두 TEE 서열을 분리시키기 위해 스페이서를 포함한다. 비제한적 예로서, 스페이서는 15개의 뉴클레오타이드 스페이서 및/또는 당업계에 공지된 다른 스페이서일 수 있다. 다른 비제한적 예로서, 5'UTR 및/또는 3'UTR은 각각 5'UTR 및/또는 3'UTR에서 적어도 1회, 적어도 2회, 적어도 3회, 적

어도 4회, 적어도 5회, 적어도 6회, 적어도 7회, 적어도 8회, 적어도 9회, 적어도 10회 또는 10회 초과로 반복된 TEE 서열-스페이스 모듈을 포함한다. 일부 실시형태에서, 5'UTR 및/또는 3'UTR은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10회 반복된 TEE 서열-스페이스 모듈을 포함한다.

[0396] 일부 실시형태에서, 두 TEE 서열을 분리시키는 스페이스는 본 발명의 폴리뉴클레오타이드의 번역을 조절할 수 있는 당업계에 공지된 다른 서열, 예를 들어, 본 명세서에 기재된 miR 서열(예를 들어, miR 결합 부위 및 miR 종자)을 포함할 수 있다. 비제한적 예로서, 두 TEE 서열을 분리시키기 위해 사용되는 각각의 스페이스는 상이한 miR 서열 또는 miR 서열의 성분(예를 들어, miR 종자 서열)을 포함할 수 있다.

[0397] 일부 실시형태에서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 miR 및/또는 TEE 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드에 miR 서열 및/또는 TEE 서열의 혼입은 줄기 루프 영역의 형상을 변화시킬 수 있는데, 이는 번역을 증가 및/또는 감소시킬 수 있다. 예를 들어, 본 명세서에 전문이 참고로 편입된 문헌[Kedde *et al.*, Nature Cell Biology 2010 12(10):1014-20] 참조.

[0398] *마이크로RNA(miRNA) 결합 부위*

[0399] 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 조절 요소, 예를 들어, 마이크로RNA (miRNA) 결합 부위, 전사 인자 결합 부위, 구조화된 mRNA 서열 및/또는 모티프, 내인성 핵산 결합 분자에 대한 유사-수용체로서 작용하도록 조작된 인공 결합 부위, 및 이들의 조합을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 이러한 조절 요소를 포함하는 폴리뉴클레오타이드는 "센서 서열"을 포함하는 것으로 지칭된다. 센서 서열의 비제한적 예는 내용이 본 명세서에 전문이 참고로 편입된 미국 특허 공개 제2014/0200261호에 기재되어 있다.

[0400] 일부 실시형태에서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, 리보핵산(RNA), 예를 들어, 전령 RNA(mRNA))는 관심 대상의 폴리펩타이드를 암호화하는 오픈 리딩 프레임(ORF)을 포함하고, 하나 이상의 miRNA 결합 부위(들)를 추가로 포함한다. miRNA 결합 부위(들)의 포함 또는 혼입은 천연 유래 miRNA의 조직-특이적 및/또는 세포 유형 특이적 발현에 기반하여 본 발명의 폴리뉴클레오타이드의, 그리고 결국 그로부터 암호화된 폴리펩타이드의 조절을 제공한다.

[0401] miRNA, 예를 들어, 천연-유래 miRNA는 폴리뉴클레오타이드에 결합하고 폴리펩타이드의 안정성을 감소시킴으로써 또는 번역을 저해함으로써 유전자 발현을 하향조절하는 19 내지 25개의 뉴클레오타이드 길이 비암호화 RNA이다. miRNA 서열은 "종자" 영역, 즉, 성숙 miRNA의 2 내지 8번 위치의 영역 내 서열을 포함한다. miRNA 종자는 성숙 miRNA의 2 내지 8 또는 2 내지 7번 위치를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, miRNA 종자는 7개의 뉴클레오타이드(예를 들어, 성숙 miRNA의 뉴클레오타이드 2 내지 8)를 포함할 수 있되, 대응하는 miRNA 결합 부위에서 종자-상보성 부위는 miRNA 1번 위치와 마주보는 아데노신(A)에 의해 측정된다. 일부 실시형태에서, miRNA 종자는 6개의 뉴클레오타이드(예를 들어, 성숙 miRNA의 뉴클레오타이드 2 내지 7)를 포함할 수 있되, 대응하는 miRNA 결합 부위에서 종자-상보성 부위는 miRNA 1번 위치에 마주보는 아데노신(A)에 의해 측정된다. 예를 들어, 문헌 [Grimson A, Farh KK, Johnston WK, Garrett-Engele P, Lim LP, Bartel DP; Mol Cell. 2007 Jul 6;27(1):91-105] 참조. 세포 또는 조직에서 miRNA의 존재 또는 부재를 결정하기 위해 표적 세포 또는 조직의 miRNA 프로파일링이 수행될 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, 리보핵산(RNA), 예를 들어, 전령 RNA(mRNA))는 하나 이상의 마이크로RNA 결합 부위, 마이크로RNA 표적 서열, 마이크로RNA 상보성 서열, 또는 마이크로RNA 종자 상보성 서열을 포함한다. 이러한 서열은, 예를 들어, 임의의 공지된 마이크로RNA, 예컨대 각각의 내용이 그들의 전문이 본 명세서에 참고로 편입된 미국 특허 공개 제2005/0261218호 및 미국 특허 공개 제2005/0059005호에 교시된 것에 대응할 수 있으며, 예를 들어, 이에 대해 상보성을 가질 수 있다.

[0402] 본 명세서에 사용되는 바와 같은, 용어 "마이크로RNA(miRNA 또는 miR) 결합 부위"는 miRNA와 상호작용하거나, 회합되거나 또는 결합되도록 miRNA의 모두 또는 영역에 충분히 상보성을 갖는 5'UTR 및/또는 3'UTR에서를 포함하는, 폴리뉴클레오타이드 내의, 예를 들어, DNA 내의 또는 RNA 전사체 내의 서열을 지칭한다. 일부 실시형태에서, 관심 대상의 폴리펩타이드를 암호화하는 ORF를 포함하는 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 하나 이상의 miRNA 결합 부위(들)를 추가로 포함한다. 예시적인 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, 리보핵산(RNA), 예를 들어, 전령 RNA(mRNA))의 5'UTR 및/또는 3'UTR은 하나 이상의 miRNA 결합 부위(들)를 포함한다.

[0403] miRNA에 대해 충분한 상보성을 갖는 miRNA 결합 부위는 폴리뉴클레오타이드의 miRNA-매개 조절, 예를 들어, 폴리뉴클레오타이드의 miRNA-매개 번역 억제 또는 분해를 용이하게 하기에 충분한 상보성 정도를 지칭한다. 본 발명의 예시적 양상에서, miRNA에 대해 충분한 상보성을 갖는 miRNA 결합 부위는 폴리뉴클레오타이드의 miRNA-매개 분해, 예를 들어, mRNA의 miRNA-가이드된 RNA-유도 침묵 복합체(RISC)-매개 절단을 용이하게 하기에 충분한

상보성 정도를 지칭한다. miRNA 결합 부위는, 예를 들어, 19 내지 25개의 뉴클레오타이드 miRNA 서열에 대해, 19 내지 23개의 뉴클레오타이드 miRNA 서열에 대해 또는 22개의 뉴클레오타이드 miRNA 서열에 대해 상보성을 가질 수 있다. miRNA 결합 부위는 miRNA의 단지 일부, 예를 들어, 천연 유래 miRNA 서열의 전장의 1, 2, 3 또는 4개 미만의 뉴클레오타이드의 일부에 대해 상보성일 수 있다. 목적하는 조절이 mRNA 분해일 때 전체 또는 완전한 상보성(예를 들어, 천연 유래 miRNA 길이의 모든 또는 상당한 부분에 대해 전체 상보성 또는 완전한 상보성)이 바람직하다.

[0404] 일부 실시형태에서, miRNA 결합 부위는 miRNA 종자 서열과 상보성(예를 들어, 부분적 또는 완전한 상보성)을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, miRNA 결합 부위는 miRNA 종자 서열과 완전한 상보성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, miRNA 결합 부위는 miRNA 서열과 상보성(예를 들어, 부분적 또는 완전한 상보성)을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, miRNA 결합 부위는 miRNA 서열과 완전한 상보성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, miRNA 결합 부위는 miRNA와 완전한 상보성을 갖지만, 1, 2 또는 3개의 뉴클레오타이드 치환, 말단의 첨가 및/또는 절단을 가진다.

[0405] 일부 실시형태에서, miRNA 결합 부위는 대응하는 miRNA와 동일한 길이이다. 다른 실시형태에서, miRNA 결합 부위는 5' 말단, 3' 말단 또는 둘 다에서 대응하는 miRNA보다 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12개의 뉴클레오타이드(들)가 더 짧다. 또 다른 실시형태에서, 마이크로RNA 결합 부위는 5' 말단, 3' 말단 또는 둘 다에서 대응하는 마이크로RNA보다 2개의 뉴클레오타이드가 더 짧다. 대응하는 miRNA보다 더 짧은 miRNA 결합 부위는 여전히 miRNA 결합 부위 중 하나 이상을 혼입하는 mRNA를 분해하거나 또는 mRNA가 번역되는 것을 방지할 수 있다.

[0406] 일부 실시형태에서, miRNA 결합 부위는 활성 RISC 함유 다이스(Dicer)의 부분인 대응하는 성숙 miRNA에 결합한다. 다른 실시형태에서, RISC에서 대응하는 miRNA에 대한 miRNA 결합 부위의 결합은 miRNA 결합 부위를 함유하는 mRNA를 분해하거나 또는 mRNA가 번역되는 것을 방지한다. 일부 실시형태에서, miRNA를 포함하는 RISC 복합체가 miRNA 결합 부위를 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 절단하도록 miRNA 결합 부위는 miRNA에 대해 충분한 상보성을 가진다. 다른 실시형태에서, miRNA를 포함하는 RISC 복합체가 miRNA 결합 부위를 포함하는 폴리뉴클레오타이드에서 불안정을 유도하도록 miRNA 결합 부위는 불완전한 상보성을 가진다. 다른 실시형태에서, miRNA를 포함하는 RISC 복합체가 miRNA 결합 부위를 포함하는 폴리뉴클레오타이드의 전사를 나타내도록 miRNA 결합 부위는 불완전한 상보성을 가진다.

[0407] 일부 실시형태에서, miRNA 결합 부위는 대응하는 miRNA로부터 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12개의 미스매치(들)를 가진다.

[0408] 일부 실시형태에서, miRNA 결합 부위는 적어도 약 10, 적어도 약 11, 적어도 약 12, 적어도 약 13, 적어도 약 14, 적어도 약 15, 적어도 약 16, 적어도 약 17, 적어도 약 18, 적어도 약 19, 적어도 약 20 또는 적어도 약 21개의 대응하는 miRNA의 인접한 뉴클레오타이드에 대해 각각 상보성인 적어도 약 10, 적어도 약 11, 적어도 약 12, 적어도 약 13, 적어도 약 14, 적어도 약 15, 적어도 약 16, 적어도 약 17, 적어도 약 18, 적어도 약 19, 적어도 약 20 또는 적어도 약 21개의 인접한 뉴클레오타이드를 가진다.

[0409] 본 발명의 폴리뉴클레오타이드에 하나 이상의 miRNA 결합 부위를 조작함으로써, 당해 miRNA가 이용 가능하다는 조건 하에 폴리뉴클레오타이드는 분해 또는 감소된 번역에 대해 표적화될 수 있다. 이는 폴리뉴클레오타이드의 전달 시 표적의 효과를 감소시킬 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드가 결국 상기 조직 또는 세포를 제외한 조직 또는 세포에 전달되도록 의도되는 경우, miRNA의 하나 또는 다중 결합 부위가 폴리뉴클레오타이드의 5'UTR 및/또는 3'UTR로 조작된다면 조직 또는 세포에서 풍부한 miRNA는 관심 대상 유전자의 발현을 저해할 수 있다.

[0410] 대조적으로, miRNA 결합 부위는 그들이 특정 조직에서 단백질 발현을 증가시키기 위해 자연적으로 생기는 폴리뉴클레오타이드 서열로부터 제조될 수 있다. 예를 들어, miRNA를 함유하는 조직 또는 세포에서 단백질 발현을 개선시키기 위해 특정 miRNA에 대한 결합 부위가 폴리뉴클레오타이드로부터 제거될 수 있다.

[0411] 일 실시형태에서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 특정 세포, 예컨대, 이하로 제한되는 것은 아니지만, 정상 및/또는 암 세포에 대한 세포독성 또는 세포보호성 mRNA 치료제를 조절하기 위해 5'UTR 및/또는 3'UTR에서 적어도 하나의 miRNA-결합 부위를 포함할 수 있다. 다른 실시형태에서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 특정 세포, 예컨대, 이하로 제한되지 않지만, 정상 및/또는 암 세포에 대한 세포독성 또는 세포보호성 mRNA 치료제를 조절하기 위해 5'-UTR 및/또는 3'-UTR에서 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 이상의 miRNA-결합 부위를 포함할 수

있다.

- [0412] 다중 조직에서 발현의 조절은 하나 이상의 miRNA 결합 부위, 예를 들어, 하나 이상의 별개의 miRNA 결합 부위의 도입 또는 제거를 통해 달성될 수 있다. miRNA 결합 부위를 제거하거나 또는 삽입하는지의 결정은 발생 및/또는 질환에서 조직 및/또는 세포에서의 miRNA 발현 패턴 및/또는 그들의 프로파일링에 기반하여 만들어질 수 있다. miRNA의 동정, miRNA 결합 부위 및 그들의 발현 패턴 및 생물학에서의 역할이 보고되었다(예를 들어, 문헌 [Bonauer *et al.*, Curr Drug Targets 2010 11:943-949; Anand and Cheresch Curr Opin Hematol 2011 18:171-176; Contreras and Rao Leukemia 2012 26:404-413 (2011 Dec 20. doi: 10.1038/leu.2011.356); Bartel Cell 2009 136:215-233; Landgraf et al, Cell, 2007 129:1401-1414; Gentner and Naldini, Tissue Antigens. 2012 80:393-403] 및 이들의 모든 참고문헌; 이들 각각은 그의 전문이 본 명세서에 참고로 편입됨).
- [0413] miRNA 및 miRNA 결합 부위는 본 명세서에 전문이 참고로 편입된 미국 특허 공개 제2014/0200261호, 제 2005/0261218호 및 제2005/0059005호에 기재된 비제한적 예를 포함하는 임의의 공지된 서열에 대응할 수 있다.
- [0414] miRNA가 mRNA를 조절하고, 이에 의해 단백질 발현을 조절하는 것으로 알려진 조직의 예는 간(miR-122), 근육(miR-133, miR-206, miR-208), 내피세포(miR-17-92, miR-126), 골수성 세포(miR-142-3p, miR-142-5p, miR-16, miR-21, miR-223, miR-24, miR-27), 지방조직(let-7, miR-30c), 심장(miR-1d, miR-149), 신장(miR-192, miR-194, miR-204) 및 폐 상피세포(let-7, miR-133, miR-126)를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.
- [0415] 구체적으로, miRNA는 면역 세포(또한 조혈 세포로 불림), 예컨대 항원 제시 세포(APC)(예를 들어, 수지상 세포 및 대식세포), 대식세포, 단핵구, B 림프구, T 림프구, 과립구, 자연 살해 세포 등에서 차별적으로 발현되는 것으로 알려져 있다. 면역 세포 특이적 miRNA는 유전자 요법 및 조직/기관 이식 후에 면역원성, 자가면역, 감염에 대한 면역 반응, 염증뿐만 아니라 원치않는 면역 반응에 연루된다. 면역 세포 특이적 miRNA는 또한 조혈 세포(면역 세포)의 발생, 증식, 분화 및 세포자멸사의 다수의 양상을 조절한다. 예를 들어, miR-142 및 miR-146은 면역 세포에서 배타적으로 발현되고, 특히 골수성 수지상 세포에서 흔하다. 폴리뉴클레오타이드에 대한 면역 반응은 폴리뉴클레오타이드의 3'-UTR에 miR-142 결합 부위를 첨가함으로써 중단되어, 조직 및 세포에서 더 안정한 유전자 전달을 가능하게 한다는 것이 입증되었다. miR-142는 항원 제시 세포에서 외인성 폴리뉴클레오타이드를 효율적으로 분해하고, 형질도입 세포의 세포독성 제거를 억제한다(예를 들어, 문헌[Annoni A *et al.*, blood, 2009, 114, 5152-5161; Brown BD, *et al.*, Nat med. 2006, 12(5), 585-591; Brown BD, *et al.*, blood, 2007, 110(13): 4144-4152], 이들 각각은 그들의 전문이 본 명세서에 참고로 편입됨).
- [0416] 항원-매개 면역 반응은 유기체에 유입될 때, 항원 제시 세포에 의해 처리되고 항원 제시 세포의 표면 상에 나타나는 외래 항원에 의해 촉발되는 면역 반응을 지칭할 수 있다. T 세포는 제시된 항원을 인식할 수 있고, 항원을 발현시키는 세포의 세포독성 제거를 유도한다.
- [0417] 본 발명의 폴리뉴클레오타이드의 5'UTR 및/또는 3'UTR에 miR-142 결합 부위를 도입하는 것은 miR-142 매개 분해를 통해 항원 제시 세포에서 유전자 발현을 선택적으로 억제하여, 항원 제시 세포(예를 들어, 수지상 세포)에서 항원 제시를 제한하고, 이에 의해 폴리뉴클레오타이드의 전달 후에 항원-매개 면역 반응을 방지할 수 있다. 이어서, 폴리뉴클레오타이드는 세포독성 제거를 촉발하는 일 없이 표적 조직 또는 세포에서 안정하게 발현된다.
- [0418] 일 실시형태에서, 면역 세포, 특히, 항원 제시 세포에서 발현되는 것으로 알려진 miRNA에 대한 결합 부위는 miRNA 매개 RNA 분해를 통해 항원 제시 세포에서 폴리뉴클레오타이드의 발현을 억제하여, 항원-매개 면역 반응을 진정시키는 본 발명의 폴리뉴클레오타이드로 조작될 수 있다. 면역 세포 특이적 miRNA가 발현되지 않는 비면역 세포에서 폴리뉴클레오타이드의 발현이 유지된다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 간 특이적 단백질에 대한 면역원성 반응을 방지하기 위해, 임의의 miR-122 결합 부위가 제거될 수 있고, miR-142(및/또는 mirR-146) 결합 부위는 본 발명의 폴리뉴클레오타이드의 5'UTR 및/또는 3'UTR로 조작될 수 있다.
- [0419] 일 실시형태에서, 간세포에서 발현되는 것으로 알려진 miRNA에 대한 결합 부위는 간에서 폴리뉴클레오타이드의 발현을 억제하기 위해 본 발명의 폴리뉴클레오타이드로 조작될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 간에서 항원의 발현을 방지하기 위해, 임의의 간 특이적 miR 결합 부위는 본 발명의 폴리뉴클레오타이드의 5'UTR 및/또는 3'UTR로 조작될 수 있다.
- [0420] APC 및 대식세포에서 선택적 분해 및 억제를 추가로 유도하기 위해, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 단독으로 또는 miR-142 및/또는 miR-146 결합 부위와 조합하여, 5'UTR 및/또는 3'UTR에서 추가적인 음성 조절 요소를 포함할 수 있다. 비제한적 예로서, 추가적인 음성 조절 요소는 구성적 붕괴 요소(Constitutive Decay Element: CDE)이다.



- [0421] 면역 세포 특이적 miRNA는 hsa-let-7a-2-3p, hsa-let-7a-3p, hsa-7a-5p, hsa-let-7c, hsa-let-7e-3p, hsa-let-7e-5p, hsa-let-7g-3p, hsa-let-7g-5p, hsa-let-7i-3p, hsa-let-7i-5p, miR-10a-3p, miR-10a-5p, miR-1184, hsa-let-7f-1-3p, hsa-let-7f-2-5p, hsa-let-7f-5p, miR-125b-1-3p, miR-125b-2-3p, miR-125b-5p, miR-1279, miR-130a-3p, miR-130a-5p, miR-132-3p, miR-132-5p, miR-142-3p, miR-142-5p, miR-143-3p, miR-143-5p, miR-146a-3p, miR-146a-5p, miR-146b-3p, miR-146b-5p, miR-147a, miR-147b, miR-148a-5p, miR-148a-3p, miR-150-3p, miR-150-5p, miR-151b, miR-155-3p, miR-155-5p, miR-15a-3p, miR-15a-5p, miR-15b-5p, miR-15b-3p, miR-16-1-3p, miR-16-2-3p, miR-16-5p, miR-17-5p, miR-181a-3p, miR-181a-5p, miR-181a-2-3p, miR-182-3p, miR-182-5p, miR-197-3p, miR-197-5p, miR-21-5p, miR-21-3p, miR-214-3p, miR-214-5p, miR-223-3p, miR-223-5p, miR-221-3p, miR-221-5p, miR-23b-3p, miR-23b-5p, miR-24-1-5p, miR-24-2-5p, miR-24-3p, miR-26a-1-3p, miR-26a-2-3p, miR-26a-5p, miR-26b-3p, miR-26b-5p, miR-27a-3p, miR-27a-5p, miR-27b-3p, miR-27b-5p, miR-28-3p, miR-28-5p, miR-2909, miR-29a-3p, miR-29a-5p, miR-29b-1-5p, miR-29b-2-5p, miR-29c-3p, miR-29c-5p, miR-30e-3p, miR-30e-5p, miR-331-5p, miR-339-3p, miR-339-5p, miR-345-3p, miR-345-5p, miR-346, miR-34a-3p, miR-34a-5p, miR-363-3p, miR-363-5p, miR-372, miR-377-3p, miR-377-5p, miR-493-3p, miR-493-5p, miR-542, miR-548b-5p, miR-548c-5p, miR-548i, miR-548j, miR-548n, miR-574-3p, miR-598, miR-718, miR-935, miR-99a-3p, miR-99a-5p, miR-99b-3p 및 miR-99b-5p를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 더 나아가, 신규한 miRNA는 마이크로-어레이 혼성화 및 마이크로칩 분석을 통해 면역 세포에서 동정될 수 있다(예를 들어, 문헌[Jima DD et al, Blood, 2010, 116:e118-e127; Vaz C *et al.*, BMC Genomics, 2010, 11,288], 이들 각각의 내용은 본 명세서에 전문이 참고로 편입됨).
- [0422] 간에서 발현된 것으로 알려진 miRNA는 miR-107, miR-122-3p, miR-122-5p, miR-1228-3p, miR-1228-5p, miR-1249, miR-129-5p, miR-1303, miR-151a-3p, miR-151a-5p, miR-152, miR-194-3p, miR-194-5p, miR-199a-3p, miR-199a-5p, miR-199b-3p, miR-199b-5p, miR-296-5p, miR-557, miR-581, miR-939-3p 및 miR-939-5p를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 임의의 간 특이적 miRNA로부터의 miRNA 결합 부위는 간에서 폴리뉴클레오타이드의 발현을 조절하기 위해 본 발명의 폴리뉴클레오타이드에 도입되거나 또는 제거될 수 있다. 간 특이적 miRNA 결합 부위는 단독으로 또는 추가로 본 발명의 폴리뉴클레오타이드에서 면역 세포(예를 들어, APC) miRNA 결합 부위와 조합하여 조작될 수 있다.
- [0423] 폐에서 발현되는 것으로 알려진 miRNA는 let-7a-2-3p, let-7a-3p, let-7a-5p, miR-126-3p, miR-126-5p, miR-127-3p, miR-127-5p, miR-130a-3p, miR-130a-5p, miR-130b-3p, miR-130b-5p, miR-133a, miR-133b, miR-134, miR-18a-3p, miR-18a-5p, miR-18b-3p, miR-18b-5p, miR-24-1-5p, miR-24-2-5p, miR-24-3p, miR-296-3p, miR-296-5p, miR-32-3p, miR-337-3p, miR-337-5p, miR-381-3p 및 miR-381-5p를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 임의의 폐 특이적 miRNA로부터의 miRNA 결합 부위는 폐에서 폴리뉴클레오타이드의 발현을 조절하기 위해 본 발명의 폴리뉴클레오타이드에 도입되거나 또는 이로부터 제거될 수 있다. 폐 특이적 miRNA 결합 부위는 단독으로 또는 본 발명의 폴리뉴클레오타이드에서 면역 세포(예를 들어, APC) miRNA 결합 부위와 추가로 조합하여 조작될 수 있다.
- [0424] 심장에서 발현되는 것으로 알려진 miRNA는 miR-1, miR-133a, miR-133b, miR-149-3p, miR-149-5p, miR-186-3p, miR-186-5p, miR-208a, miR-208b, miR-210, miR-296-3p, miR-320, miR-451a, miR-451b, miR-499a-3p, miR-499a-5p, miR-499b-3p, miR-499b-5p, miR-744-3p, miR-744-5p, miR-92b-3p 및 miR-92b-5p를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 임의의 심장 특이적 마이크로RNA로부터의 miRNA 결합 부위는 심장에서 폴리뉴클레오타이드의 발현을 조절하기 위해 본 발명의 폴리뉴클레오타이드에 도입되거나 또는 이로부터 제거될 수 있다. 심장 특이적 miRNA 결합 부위는 단독으로 또는 본 발명의 폴리뉴클레오타이드에서 면역 세포(예를 들어, APC) miRNA 결합 부위와 조합하여 조작될 수 있다.
- [0425] 신경계에서 발현되는 것으로 알려진 miRNA는 miR-124-5p, miR-125a-3p, miR-125a-5p, miR-125b-1-3p, miR-125b-2-3p, miR-125b-5p, miR-1271-3p, miR-1271-5p, miR-128, miR-132-5p, miR-135a-3p, miR-135a-5p, miR-135b-3p, miR-135b-5p, miR-137, miR-139-5p, miR-139-3p, miR-149-3p, miR-149-5p, miR-153, miR-181c-3p, miR-181c-5p, miR-183-3p, miR-183-5p, miR-190a, miR-190b, miR-212-3p, miR-212-5p, miR-219-1-3p, miR-219-2-3p, miR-23a-3p, miR-23a-5p, miR-30a-5p, miR-30b-3p, miR-30b-5p, miR-30c-1-3p, miR-30c-2-3p, miR-30c-5p, miR-30d-3p, miR-30d-5p, miR-329, miR-342-3p, miR-3665, miR-3666, miR-380-3p, miR-380-5p, miR-383, miR-410, miR-425-3p, miR-425-5p, miR-454-3p, miR-454-5p, miR-483, miR-510, miR-516a-3p, miR-548b-5p, miR-548c-5p, miR-571, miR-7-1-3p, miR-7-2-3p, miR-7-5p, miR-802, miR-922, miR-9-3p 및 miR-9-5p를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 신경계에서 풍부한 miRNA는 추가로 miR-132-3p, miR-132-5p, miR-148b-



3p, miR-148b-5p, miR-151a-3p, miR-151a-5p, miR-212-3p, miR-212-5p, miR-320b, miR-320e, miR-323a-3p, miR-323a-5p, miR-324-5p, miR-325, miR-326, miR-328, miR-922를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는, 뉴런에서 특이적으로 발현되는 것 및 miR-1250, miR-219-1-3p, miR-219-2-3p, miR-219-5p, miR-23a-3p, miR-23a-5p, miR-3065-3p, miR-3065-5p, miR-30e-3p, miR-30e-5p, miR-32-5p, miR-338-5p 및 miR-657을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 신경교세포에서 특이적으로 발현되는 것을 추가로 포함한다. 임의의 CNS 특이적 miRNA로부터의 miRNA 결합 부위는 신경계에서 폴리뉴클레오타이드의 발현을 조절하기 위해 본 발명의 폴리뉴클레오타이드에 도입되거나 또는 이로부터 제거될 수 있다. 신경계 특이적 miRNA 결합 부위는 단독으로 또는 추가로 본 발명의 폴리뉴클레오타이드에서 면역 세포(예를 들어, APC) miRNA 결합 부위와 조합하여 조작될 수 있다.

[0426] **체장에서 발현된 것으로 알려진 miRNA는** miR-105-3p, miR-105-5p, miR-184, miR-195-3p, miR-195-5p, miR-196a-3p, miR-196a-5p, miR-214-3p, miR-214-5p, miR-216a-3p, miR-216a-5p, miR-30a-3p, miR-33a-3p, miR-33a-5p, miR-375, miR-7-1-3p, miR-7-2-3p, miR-493-3p, miR-493-5p 및 miR-944를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 임의의 체장 특이적 miRNA로부터의 miRNA 결합 부위는 체장에서 폴리뉴클레오타이드의 발현을 조절하기 위해 본 발명의 폴리뉴클레오타이드에 도입되거나 또는 이로부터 제거될 수 있다. 체장 특이적 miRNA 결합 부위는 단독으로 또는 추가로 본 발명의 폴리뉴클레오타이드에서 면역 세포(예를 들어, APC) miRNA 결합 부위와 조합하여 조작될 수 있다.

[0427] **신장에서 발현되는 것으로 알려진 miRNA는** miR-122-3p, miR-145-5p, miR-17-5p, miR-192-3p, miR-192-5p, miR-194-3p, miR-194-5p, miR-20a-3p, miR-20a-5p, miR-204-3p, miR-204-5p, miR-210, miR-216a-3p, miR-216a-5p, miR-296-3p, miR-30a-3p, miR-30a-5p, miR-30b-3p, miR-30b-5p, miR-30c-1-3p, miR-30c-2-3p, miR-30c-5p, miR-324-3p, miR-335-3p, miR-335-5p, miR-363-3p, miR-363-5p 및 miR-562를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 임의의 신장 특이적 miRNA로부터의 miRNA 결합 부위는 신장에서 폴리뉴클레오타이드의 발현을 조절하기 위해 본 발명의 폴리뉴클레오타이드에 도입되거나 또는 이로부터 제거될 수 있다. 신장 특이적 miRNA 결합 부위는 단독으로 또는 추가로 본 발명의 폴리뉴클레오타이드에서 면역 세포(예를 들어, APC) miRNA 결합 부위와 조합하여 조작될 수 있다.

[0428] **근육에서 발현되는 것으로 알려진 miRNA는** let-7g-3p, let-7g-5p, miR-1, miR-1286, miR-133a, miR-133b, miR-140-3p, miR-143-3p, miR-143-5p, miR-145-3p, miR-145-5p, miR-188-3p, miR-188-5p, miR-206, miR-208a, miR-208b, miR-25-3p 및 miR-25-5p를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 임의의 근육 특이적 miRNA로부터의 miRNA 결합 부위는 근육에서 폴리뉴클레오타이드의 발현을 조절하기 위해 본 발명의 폴리뉴클레오타이드에 도입되거나 또는 이로부터 제거될 수 있다. 근육 특이적 miRNA 결합 부위는 단독으로 또는 추가로 본 발명의 폴리뉴클레오타이드에서 면역 세포(예를 들어, APC) miRNA 결합 부위와 조합하여 조작될 수 있다.

[0429] **miRNA는 또한 상이한 유형의 세포, 예컨대 이하로 제한되는 것은 아니지만, 내피세포, 상피세포 및 지방세포에서 차별적으로 발현된다.**

[0430] **내피세포에서 발현되는 것으로 알려진 miRNA는** let-7b-3p, let-7b-5p, miR-100-3p, miR-100-5p, miR-101-3p, miR-101-5p, miR-126-3p, miR-126-5p, miR-1236-3p, miR-1236-5p, miR-130a-3p, miR-130a-5p, miR-17-5p, miR-17-3p, miR-18a-3p, miR-18a-5p, miR-19a-3p, miR-19a-5p, miR-19b-1-5p, miR-19b-2-5p, miR-19b-3p, miR-20a-3p, miR-20a-5p, miR-217, miR-210, miR-21-3p, miR-21-5p, miR-221-3p, miR-221-5p, miR-222-3p, miR-222-5p, miR-23a-3p, miR-23a-5p, miR-296-5p, miR-361-3p, miR-361-5p, miR-421, miR-424-3p, miR-424-5p, miR-513a-5p, miR-92a-1-5p, miR-92a-2-5p, miR-92a-3p, miR-92b-3p, 및 miR-92b-5p를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 다수의 신규한 miRNA는 딥 서열분석으로부터의 내피세포에서 발견된다(예를 들어, 문헌 [Voellenkle C *et al.*, RNA, 2012, 18, 472-484], 본 명세서에 전문이 참고로 편입됨). 임의의 내피세포 특이적 miRNA로부터의 miRNA 결합 부위는 내피세포에서 폴리뉴클레오타이드의 발현을 조절하기 위해 본 발명의 폴리뉴클레오타이드에 도입되거나 또는 이로부터 제거될 수 있다.

[0431] **상피세포에서 발현된 것으로 알려진 miRNA는** 호흡기 섬모상피 세포에서 특이적인 let-7b-3p, let-7b-5p, miR-1246, miR-200a-3p, miR-200a-5p, miR-200b-3p, miR-200b-5p, miR-200c-3p, miR-200c-5p, miR-338-3p, miR-429, miR-451a, miR-451b, miR-494, miR-802 및 miR-34a, miR-34b-5p, miR-34c-5p, miR-449a, miR-449b-3p, miR-449b-5p, 폐 상피세포에서 특이적인 let-7 패밀리, miR-133a, miR-133b, miR-126, 신장 상피세포에서 특이적인 miR-382-3p, miR-382-5p 및 각막 상피세포에서 특이적인 miR-762를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 임의의 상피세포 특이적 miRNA로부터의 miRNA 결합 부위는 상피세포에서 폴리뉴클레오타이드의 발현을 조절하기 위해 본 발명의 폴리뉴클레오타이드에 도입되거나 또는 이로부터 제거될 수 있다.

- [0432] 추가로, miRNA의 거대 그룹은 줄기 세포 자기 재생뿐만 아니라 다양한 세포 계통, 예컨대 신경 세포, 심장, 조혈 세포, 피부 세포, 골원성 세포 및 근육 세포의 발생 및/또는 분화를 제어하는 배아 줄기 세포에서 풍부하다(예를 들어, 문헌[Kuppusamy KT *et al.*, Curr. Mol Med, 2013, 13(5), 757-764; Vidigal JA and Ventura A, Semin Cancer Biol. 2012, 22(5-6), 428-436; Goff LA *et al.*, PLoS One, 2009, 4:e7192; Morin RD *et al.*, Genome Res, 2008, 18, 610-621; Yoo JK *et al.*, Stem Cells Dev. 2012, 21(11), 2049-2057], 이들 각각은 본 명세서에 전문이 참고로 편입됨). 배아 줄기 세포에서 흔한 miRNA는 let-7a-2-3p, let-a-3p, let-7a-5p, let7d-3p, let-7d-5p, miR-103a-2-3p, miR-103a-5p, miR-106b-3p, miR-106b-5p, miR-1246, miR-1275, miR-138-1-3p, miR-138-2-3p, miR-138-5p, miR-154-3p, miR-154-5p, miR-200c-3p, miR-200c-5p, miR-290, miR-301a-3p, miR-301a-5p, miR-302a-3p, miR-302a-5p, miR-302b-3p, miR-302b-5p, miR-302c-3p, miR-302c-5p, miR-302d-3p, miR-302d-5p, miR-302e, miR-367-3p, miR-367-5p, miR-369-3p, miR-369-5p, miR-370, miR-371, miR-373, miR-380-5p, miR-423-3p, miR-423-5p, miR-486-5p, miR-520c-3p, miR-548e, miR-548f, miR-548g-3p, miR-548g-5p, miR-548i, miR-548k, miR-548l, miR-548m, miR-548n, miR-548o-3p, miR-548o-5p, miR-548p, miR-664a-3p, miR-664a-5p, miR-664b-3p, miR-664b-5p, miR-766-3p, miR-766-5p, miR-885-3p, miR-885-5p, miR-93-3p, miR-93-5p, miR-941, miR-96-3p, miR-96-5p, miR-99b-3p 및 miR-99b-5p를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 다수의 예측된 신규한 miRNA는 인간 배아 줄기 세포에서 딥 서열분석에 의해 발견된다(예를 들어, 문헌[Morin RD *et al.*, Genome Res, 2008, 18, 610-621; Goff LA *et al.*, PLoS One, 2009, 4:e7192; Bar M *et al.*, Stem cells, 2008, 26, 2496-2505], 이들 각각의 내용은 본 명세서에 전문이 참고로 편입됨).
- [0433] 다수의 miRNA 발현 연구는 다양한 암세포/조직 및 다른 질환에서 miRNA의 차별적 발현을 프로파일링하도록 수행된다. 일부 miRNA는 소정의 암 세포에서 비정상적으로 과발현되고, 다른 것은 덜 발현된다. 예를 들어, miRNA는 암 세포(WO2008/154098호, 미국 특허 제2013/0059015호, 미국 특허 제2013/0042333, WO2011/157294); 암 줄기 세포(미국 특허 제2012/0053224호); 췌장암 및 질환(미국 특허 제2009/0131348호, 미국 특허 제2011/0171646호, 미국 특허 제2010/0286232호, 미국 특허 제8389210호); 천식 및 염증(미국 특허 제8415096호); 전립선 암(미국 특허 제2013/0053264호); 간세포 암종(WO2012/151212호, 미국 특허 제2012/0329672호, WO2008/054828, 미국 특허 제8252538호); 폐암 세포(WO2011/076143, WO2013/033640, WO2009/070653호, 미국 특허 제2010/0323357호); 피부 T 세포 림프종(WO2013/011378); 결장직장암세포 (WO2011/0281756, WO2011/076142); 암 양성 림프절(WO2009/100430호, 미국 특허 제2009/0263803); 비인두암(유럽 특허 제2112235호); 만성 폐쇄성 폐질환(미국 특허 제2012/0264626호, 미국 특허 제2013/0053263호); 갑상선 암(WO2013/066678); 난소암 세포(미국 특허 제2012/0309645호, WO2011/095623); 유방암 세포 (WO2008/154098, WO2007/081740호, 미국 특허 제2012/0214699호), 백혈병 및 림프종(WO2008/073915호, 미국 특허 제2009/0092974호, 미국 특허 제2012/0316081호, 미국 특허 제2012/0283310호, WO2010/018563, 이들 각각의 내용은 본 명세서에 전문이 참고로 편입됨)에서 차별적으로 발현된다.
- [0434] 비제한적 예로서, 소정의 암 및/또는 종양 세포에서 과발현된 miRNA에 대한 miRNA 결합 부위는 본 발명의 폴리뉴클레오타이드의 3'UTR로부터 제거되어, 암세포에서 과발현된 miRNA에 의해 억제된 발현을 회복시키고, 따라서, 대응하는 생물학적 기능, 예를 들어, 전사 자극 및/또는 퇴행, 세포주기 저지, 세포자멸사 및 세포사를 개선시킬 수 있다. miRNA가 상향조절되지 않는 정상 세포 및 조직은 영향 받지 않은 채로 남을 것이다.
- [0435] miRNA는 또한 복잡하나 생물학적 과정, 예컨대 혈관신생을 조절할 수 있다(예를 들어, miR-132)(Anand and Cheresch Curr Opin Hematol 2011 18:171-176). 본 발명의 폴리뉴클레오타이드에서, 생물학적으로 적절한 세포 유형 또는 적절한 생물학적 과정에 폴리뉴클레오타이드의 발현을 맞추기 위해 이러한 과정에 연루된 miRNA 결합 부위는 제거되거나 또는 도입될 수 있다. 이와 관련하여, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 영양요구성 폴리뉴클레오타이드로서 정의된다.
- [0436] 일부 실시형태에서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 miRNA 결합 부위를 포함하되, miRNA 결합 부위는 miRNA 결합 부위 서열 중 임의의 하나 이상의 하나 이상의 복제물을 포함하는, 표 1로부터 선택된 또는 본 명세서의 다른 곳에 기재된 하나 이상의 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 표 1로부터 선택되거나 또는 본 명세서의 다른 곳에 기재된 동일 또는 상이한 miRNA 결합 부위 중 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 이상(이들의 임의의 조합을 포함)을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, miRNA 결합 부위는 miR-142에 결합하거나 또는 miR-142에 대해 상보성이다. 일부 실시형태에서, miR-142는 서열 번호 303을 포함한다. 일부 실시형태에서, miRNA 결합 부위는 miR-142-3p 또는 miR-142-5p에 결합한다. 일부 실시형태에서, miR-142-3p 결합 부위는 서열번호 305를 포함한다. 일부 실시형태에서, miR-142-5p 결합 부위는 서열번호 307을 포함한다. 일부 실시형태에서, miRNA 결합 부위는 서열번호 305 또는 307에 대해 적어도 80%, 적

어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 100% 동일한 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

# 표 1

miR-142 및 대안의 miR-142 결합 부위

서열번호	설명	서열
303	miR-142	GACAGUGCAGUCACCCAUAAAAGUAGAAAGCACUACUA ACAGCACUGGAGGGUGUAGUGUUUCCUACUUUAUGGA UGAGUGUACUGUG
304	miR-142-3p	UGUAGUGUUUCCUACUUUAUGGA
305	miR-142-3p 결합 부위	UCCAUAAAAGUAGGAAACACUACA
306	miR-142-5p	CAUAAAAGUAGAAAGCACUACU
307	miR-142-5p 결합 부위	AGUAGUGCUUUCUACUUUAUG

[0437]

[0438]

일부 실시형태에서, miRNA 결합 부위는 폴리뉴클레오타이드의 임의의 위치(예를 들어, 5'UTR 및/또는 3'UTR)에서 본 발명의 폴리뉴클레오타이드에 삽입된다. 일부 실시형태에서, 5'UTR은 miRNA 결합 부위를 포함한다. 일부 실시형태에서, 3'UTR은 miRNA 결합 부위를 포함한다. 일부 실시형태에서, 5'UTR 및 3'UTR은 miRNA 결합 부위를 포함한다. 폴리펩타이드 내 삽입 부위는 폴리뉴클레오타이드 내 miRNA 결합 부위가 대응하는 miRNA의 부재하에; 그리고 miRNA의 존재하에 기능성 폴리펩타이드의 번역을 방해하지 않는다면 폴리뉴클레오타이드의 어디에나 있을 수 있으며, 폴리뉴클레오타이드 내 miRNA 결합 부위의 삽입 및 대응하는 miRNA에 대한 miRNA 결합 부위의 결합은 폴리뉴클레오타이드를 분해시키거나 또는 폴리뉴클레오타이드의 번역을 방지할 수 있다.

[0439]

일부 실시형태에서, miRNA 결합 부위는 ORF를 포함하는 본 발명의 폴리뉴클레오타이드에서 ORF의 정지 코돈으로부터 하류의 적어도 약 30개의 뉴클레오타이드에 삽입된다. 일부 실시형태에서, miRNA 결합 부위는 본 발명의 폴리뉴클레오타이드에서 ORF의 정지 코돈으로부터 하류에 적어도 약 10개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 15개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 20개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 25개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 30개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 35개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 40개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 45개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 50개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 55개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 60개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 65개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 70개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 75개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 80개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 85개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 90개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 95 뉴클레오타이드, 또는 적어도 약 100개의 뉴클레오타이드에 삽입된다. 일부 실시형태에서, miRNA 결합 부위는 본 발명의 폴리뉴클레오타이드에서 ORF의 정지 코돈으로부터 하류에 약 10개의 뉴클레오타이드 내지 약 100개의 뉴클레오타이드, 약 20개의 뉴클레오타이드 내지 약 90개의 뉴클레오타이드, 약 30개의 뉴클레오타이드 내지 약 80개의 뉴클레오타이드, 약 40개의 뉴클레오타이드 내지 약 70개의 뉴클레오타이드, 약 50개의 뉴클레오타이드 내지 약 60개의 뉴클레오타이드, 약 45개의 뉴클레오타이드 내지 약 65개의 뉴클레오타이드에 삽입된다.

[0440]

miRNA 유전자 조절은 miRNA를 둘러싸는 서열, 예컨대 이하로 제한되는 것은 아니지만, 주위 서열의 종, 서열의 유형(예를 들어, 이종성, 상동성, 외인성, 내인성 또는 인공), 주위 서열에서의 조절 요소 및/또는 주위 서열에서의 구조적 요소에 의해 영향받을 수 있다. miRNA는 5'UTR 및/또는 3'UTR에 의해 영향받을 수 있다. 비제한적 예로서, 비-인간 3'UTR은 동일한 서열 유형의 인간 3'UTR에 비해 관심 대상의 폴리펩타이드의 발현에 대한 miRNA 서열의 조절 효과를 증가시킬 수 있다.

[0441]

일 실시형태에서, 5'UTR의 다른 조절 요소 및/또는 구조적 요소는 miRNA 매개 유전자 조절에 영향을 미칠 수 있다. 조절 요소 및/또는 구조적 요소의 한 가지 예는 단백질 번역을 개시하기 위해 번역 연장 인자의 결합에 필수적인 5'UTR에서의 구조화된 IRES(내부 리보솜 유입 부위)이다. 5'-UTR에서 이런 2차적으로 구조화된 요소에 대한 EIF4A2 결합은 miRNA 매개 유전자 발현에 필수적이다(Meijer HA *et al.*, Science, 2013, 340, 82-85, 본 명세서에 전문이 참고로 편입됨). 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 마이크로RNA 매개 유전자 조절을 향상시키기 위해 이 구조화된 5'UTR을 추가로 포함할 수 있다.

[0442]

적어도 하나의 miRNA 결합 부위는 본 발명의 폴리뉴클레오타이드의 3'UTR로 조작될 수 있다. 이와 관련하여, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10개 이상의 miRNA 결합 부위는 본 발명의 폴리뉴클레오타이드의 3'UTR로 조작될 수 있다. 예를 들어, 1 내지 10, 1 내지 9, 1 내

지 8, 1 내지 7, 1 내지 6, 1 내지 5, 1 내지 4, 1 내지 3, 2 내지 1개의 miRNA 결합 부위가 본 발명의 폴리뉴클레오타이드의 3'UTR로 조작될 수 있다. 일 실시형태에서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드에 혼입된 miRNA 결합 부위는 동일할 수 있거나 또는 상이한 miRNA 부위일 수 있다. 본 발명의 폴리뉴클레오타이드에 혼입된 상이한 miRNA 결합 부위의 조합은 임의의 상이한 miRNA 부위의 하나 초과와 복제물이 혼입된 조합을 포함할 수 있다. 다른 실시형태에서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 내로 혼입된 miRNA 결합 부위는 신체에서 동일 또는 상이한 조직을 표적화할 수 있다. 비제한적 예로서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드의 3'-UTR에서 조직-, 세포 유형- 또는 질환-특이적 miRNA 결합 부위의 도입을 통해, 특정 세포 유형(예를 들어, 간세포, 골수성 세포, 내피세포, 암 세포 등)에서 발현 정도가 감소될 수 있다.

[0443] 일 실시형태에서, miRNA 결합 부위는 본 발명의 폴리뉴클레오타이드에서 3'UTR의 5' 말단 근처, 3'UTR의 5' 말단과 3' 말단 사이의 약 절반 및/또는 3'UTR의 3' 말단 근처에서 조작될 수 있다. 비제한적 예로서, miRNA 결합 부위는 3'UTR의 5' 말단 근처 및 3'UTR의 5' 말단과 3' 말단 사이의 약 절반에서 조작될 수 있다. 다른 비제한적 예로서, miRNA 결합 부위는 3'UTR의 3' 말단 근처 및 3'UTR의 5' 말단과 3' 말단 사이의 약 절반에서 조작될 수 있다. 다른 비제한적 예로서, miRNA 결합 부위는 3'UTR의 5' 말단 근처 및 3'UTR의 3' 말단 근처에서 조작될 수 있다.

[0444] 다른 실시형태에서, 3'UTR은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 miRNA 결합 부위를 포함할 수 있다. miRNA 결합 부위는 miRNA, miRNA 종자 서열 및/또는 종자 서열에 축적하는 miRNA 서열에 상보성일 수 있다.

[0445] 일 실시형태에서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 대상체의 상이한 조직 또는 상이한 세포 유형에서 발현되는 하나 초과와 miRNA 부위를 포함하도록 조작될 수 있다. 비제한적 예로서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 대상체의 간 및 신장에서 폴리뉴클레오타이드의 발현을 조절하기 위해 miR-192 및 miR-122를 포함하도록 조작될 수 있다. 다른 실시형태에서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 동일한 조직에 대해 하나 초과와 miRNA 부위를 포함하도록 조작될 수 있다.

[0446] 일부 실시형태에서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드에 의해 암호화된 폴리펩타이드와 관련된 치료적 창 또는 차별적 발현은 miRNA 결합 부위로 변경될 수 있다. 예를 들어, 사멸 신호를 제공하는 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 해당 세포의 miRNA 신호에 의해 암 세포에서 더 고도로 발현되도록 설계될 수 있다. 암세포가 더 낮은 수준의 특정 miRNA를 발현시키는 경우, 당해 miRNA(또는 miRNA)에 대한 결합 부위를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 더 고도로 발현된다. 따라서, 사멸 신호를 제공하는 폴리펩타이드는 암 세포에서 세포사를 촉발하거나 또는 유도한다. 비암세포에 이웃하고, 동일한 miRNA의 더 높은 발현을 보유하는 것은 암호화된 세포 신호에 의해 덜 영향받는데, 폴리뉴클레오타이드가 3'UTR에서 암호화된 결합 부위 또는 "센서"에 대한 miRNA 결합 효과에 기인하여 더 낮은 수준에서 발현되기 때문이다. 대조적으로, 세포 생존 또는 세포보호 신호는 암 및 비암성 세포를 함유하는 조직에 전달될 수 있으며, 여기서, miRNA는 암 세포에서 더 높은 발현을 갖는다(결과는 암 세포에 대해 더 낮은 생존 신호 및 정상 세포에 대해 더 큰 생존 신호이다). 본 명세서에 기재된 바와 같은 miRNA 결합 부위의 사용에 기반하여 상이한 신호를 갖는 다중 폴리뉴클레오타이드가 설계되고 투여될 수 있다.

[0447] 일부 실시형태에서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드의 발현은 폴리뉴클레오타이드에서 적어도 하나의 miR 결합 부위 또는 센서 서열을 혼입함으로써 그리고 투여를 위해 폴리뉴클레오타이드를 제형화함으로써 제어될 수 있다. 비제한적 예로서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 miRNA 결합 부위를 혼입함으로써 본 명세서에 기재된 임의의 지질을 포함하는 이온화 가능한 지질(예를 들어, 양이온성 지질)을 포함하는 지질 나노입자에서 폴리뉴클레오타이드를 제형화함으로써 조직 또는 세포로 표적화될 수 있다.

[0448] 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 상이한 조직, 세포 유형 또는 생물학적 조건에서 miRNA의 발현 패턴에 기반하여 특정 조직, 세포 유형 또는 생물학적 조건에서 더 표적화된 발현을 위해 조작될 수 있다. 조직-특이적 miRNA 결합 부위의 도입을 통해, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 조직 또는 세포에서 또는 생물학적 조건과 관련하여 최적의 단백질 발현에 대해 설계될 수 있다.

[0449] 일부 실시형태에서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 공지된 miRNA 종자 서열에 대해 100% 동일성을 갖거나 또는 miRNA 종자 서열에 대해 100% 미만의 동일성을 갖는 miRNA 결합 부위를 혼입하도록 설계될 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 공지된 miRNA 종자 서열에 대해 적어도 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 miRNA 결합 부위를 혼입하도록 설계될 수 있다. miRNA 종자 서열은 miRNA 결합 친화도를 감소시키도록 부분적으로 돌연변이될 수 있고, 이렇게 해서 폴리뉴클레오타이드의 감소된 하향조절을 초래한다. 본질적으로 miRNA 결합 부위와 miRNA 종자 사이의 매치 또는 미스매치 정도



는 단백질 발현을 조절하는 miRNA의 능력을 더 미세하게 조율하기 위해 가감저항기로서 작용할 수 있다. 추가로, miRNA 결합 부위의 비종자 영역에서 돌연변이는 또한 단백질 발현을 조절하는 miRNA의 능력에 영향을 미칠 수 있다.

- [0450] 일 실시형태에서, miRNA 서열은 줄기 루프의 루프에 혼입될 수 있다.
- [0451] 다른 실시형태에서, miRNA 종자 서열은 줄기 루프의 루프에 혼입될 수 있고, miRNA 결합 부위는 줄기 루프의 5' 또는 3' 줄기에 혼입될 수 있다.
- [0452] 일 실시형태에서, 번역 인핸서 요소(TEE)는 줄기 루프의 5' 단부 상에 혼입될 수 있고, miRNA 종자는 줄기 루프의 줄기에 혼입될 수 있다. 다른 실시형태에서, TEE는 줄기 루프의 5' 단부 상에 혼입될 수 있고, miRNA 종자는 줄기 루프의 줄기에 혼입될 수 있고, miRNA 결합 부위는 줄기의 3' 단부에 또는 줄기 루프 다음의 서열에 혼입될 수 있다. miRNA 종자 및 miRNA 결합 부위는 동일 및/또는 상이한 miRNA 서열에 대한 것일 수 있다.
- [0453] 일 실시형태에서, miRNA 서열 및/또는 TEE 서열의 혼입은 번역을 증가시키고/시키거나 감소시킬 수 있는 줄기 루프 영역의 형상을 변화시킨다. (예를 들어, 본 명세서에 전문이 참고로 편입된 문헌[Kedde *et al.*, "A Pumilio-induced RNA structure switch in p27-3'UTR controls miR-221 and miR-22 accessibility." Nature Cell Biology. 2010]을 참조).
- [0454] 일 실시형태에서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드의 5'-UTR은 적어도 하나의 miRNA 서열을 포함할 수 있다. miRNA 서열은 19 또는 22개의 뉴클레오타이드 서열 및/또는 종자 없는 miRNA 서열일 수 있지만, 이들로 제한되지 않는다.
- [0455] 일 실시형태에서 5'UTR에서 miRNA 서열은 본 명세서에 기재된 본 발명의 폴리뉴클레오타이드를 안정화하기 위해 사용될 수 있다.
- [0456] 다른 실시형태에서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드의 5'UTR에서 miRNA 서열은 번역 개시 부위, 예컨대 이하로 제한되는 것은 아니지만, 개시 코돈의 접근 가능성을 감소시키는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 제1 개시 코돈(AUG)에 대한 접근 가능성을 감소시키기 위해 개시 코돈(-4 내지 +37, 여기서 AUG 코돈의 A는 +1임) 주변에서 안티센스 잠금 핵산(LNA) 올리고뉴클레오타이드 및 엑손-접합 복합체(EJC)를 사용하는 전문이 본 명세서에 참고로 편입된 문헌[Matsuda *et al.*, PLoS One. 2010 11(5):e15057]을 참조한다. 마츠다(Matsuda)는 LNA 또는 EJC에 의해 개시 코돈 주변의 서열을 변경하는 것이 폴리뉴클레오타이드의 효율, 길이 및 구조적 안정성에 영향을 미쳤다는 것을 나타내었다. 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 번역 개시 부위에 대한 접근 가능성을 감소시키기 위해 번역 개시 부위 근처에서 마츠다 등에 의해 기재된 LNA 또는 EJC 서열 대신 miRNA 서열을 포함할 수 있다. 번역 개시 부위는 miRNA 서열 앞이거나, 후이거나 또는 내일 수 있다. 비제한적 예로서, 번역 개시 부위는 miRNA 서열, 예컨대 종자 서열 또는 결합 부위 내에 위치될 수 있다. 다른 비제한적 예로서, 번역 개시 부위는 miR-122 서열, 예컨대, 종자 서열 또는 miR-122 결합 부위 내에 위치될 수 있다.
- [0457] 일부 실시형태에서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 항원 제시 세포에 의해 항원 제시를 약화시키기 위해 적어도 하나의 miRNA를 포함할 수 있다. miRNA는 완전한 miRNA 서열, miRNA 종자 서열, 종자 없이 miRNA 서열, 또는 이들의 조합일 수 있다. 비제한적 예로서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드에 혼입된 miRNA는 조절계에 특이적일 수 있다. 다른 비제한적 예로서, 항원 제시를 약화시키기 위해 본 발명의 폴리뉴클레오타이드에 혼입된 miRNA는 miR-142-3p이다.
- [0458] 일부 실시형태에서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 관심 대상의 조직 또는 세포에서 암호화된 폴리펩타이드의 발현을 약화시키기 위해 적어도 하나의 miRNA를 포함할 수 있다. 비제한적 예로서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 간에서 관심 대상의 암호화된 폴리펩타이드의 발현을 약화시키기 위해 적어도 하나의 miR-122 결합 부위를 포함할 수 있다. 다른 비제한적 예로서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 적어도 하나의 miR-142-3p 결합 부위, miR-142-3p 종자 서열, 종자 없이 miR-142-3p 결합 부위, miR-142-5p 결합 부위, miR-142-5p 종자 서열, 종자 없이 miR-142-5p 결합 부위, miR-146 결합 부위, miR-146 종자 서열 및/또는 종자 없이 miR-146 결합 부위를 포함할 수 있다.
- [0459] 일부 실시형태에서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 치료적 전달에 의해 야기되는 원치않는 면역원성 반응을 억누르도록 면역 세포에서 mRNA 치료제를 선택적으로 분해시키기 위해 3'UTR에서 적어도 하나의 miRNA 결합 부위를 포함할 수 있다. 비제한적 예로서, miRNA 결합 부위는 본 발명의 폴리뉴클레오타이드를 항원 제시 세포에서 더 불안정하게 만들 수 있다. 이들 miRNA의 비제한적 예는 miR-142-5p, miR-142-3p, miR-146a-5p 및 miR-



146-3p를 포함한다.

- [0460] 일 실시형태에서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 RNA 결합 단백질과 상호작용할 수 있는 폴리뉴클레오타이드의 영역에서 적어도 하나의 miRNA 서열을 포함한다.
- [0461] 일부 실시형태에서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, RNA, 예를 들어, mRNA)는 (i) 하나 이상의 야생형 에피토프 항원을 암호화하는 서열-최적화된 뉴클레오타이드 서열(예를 들어, ORF) 및 (ii) miRNA 결합 부위(예를 들어, miR-142에 결합하는 miRNA 결합 부위)를 포함한다.
- [0462] 일부 실시형태에서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 본 명세서에 개시된 하나 이상의 암 에피토프 폴리펩타이드 및 본 명세서에 개시된 miRNA 결합 부위, 예를 들어, miR-142에 결합하는 miRNA 결합 부위를 암호화하는 유라실-변형 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 암 에피토프 폴리펩타이드를 암호화하는 유라실-변형 서열은 적어도 하나의 화학적으로 변형된 핵염기, 예를 들어, 5-메톡시유라실을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 하나 이상의 암 에피토프 폴리펩타이드를 암호화하는 유라실-변형 서열에서 핵염기(예를 들어, 유라실) 유형의 적어도 95%는 변형된 핵염기이다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 암 에피토프 폴리펩타이드를 암호화하는 유라실-변형 서열에서 유라실의 적어도 95%는 5-메톡시유리딘이다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 하나 이상의 암 에피토프 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드는 본 명세서에 개시되어 있으며, miRNA 결합 부위는 전달체, 예를 들어, 화학식 (I), (IA), (II), (IIa), (IIb), (IIc), (IId) 또는 (IIe), 예를 들어, 화합물 1 내지 232 중 어떤 것을 갖는 지질을 포함하는, LNP로 제형화된다.
- [0463] 3'UTR 및 AU 풍부 요소
- [0464] 소정의 실시형태에서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, 본 발명의 암 항원 에피토프를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드)는 3'UTR을 추가로 포함한다. 소정의 실시형태에서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, 본 발명의 활성화 종양유전자 돌연변이 펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드)는 3'UTR을 추가로 포함한다.
- [0465] 3'-UTR은 즉시 번역 종결 코돈에 이어지고 전사후에 유전자 발현에 영향을 미치는 조절 영역을 종종 함유하는 mRNA의 부분이다. 3'-UTR 내의 조절 영역은 mRNA의 폴리아데닐화, 번역 효율, 국소화, 및 안정성에 영향을 미칠 수 있다. 일 실시형태에서, 본 발명에 유용한 3'-UTR은 조절 단백질 또는 마이크로RNA에 대한 결합 부위를 포함한다. 일부 실시형태에서, 3'-UTR은 리프레서 단백질에 결합하고 mRNA의 발현을 저해하는 사일런서 영역을 가진다. 다른 실시형태에서, 3'-UTR은 AU-풍부 요소를 포함한다. 단백질은 국소화된 방식공로 전사체의 안정성 또는 붕괴 속도에 영향을 미치거나 또는 번역 개시에 영향을 미치도록 ARE에 결합한다. 다른 실시형태에서, 3'-UTR은 mRNA 전사체의 단부에 폴리(A) 꼬리로 불리는 수백개의 아데닌 잔기의 첨가를 지시하는 서열 AAUAAA를 포함한다.
- [0466] 천연 또는 야생형 3'UTR은 그들에 함입된 아데노신 및 유리딘의 신장을 갖는 것으로 알려져 있다. 이들 AU 풍부 신호는 높은 전환율을 갖는 유전자에서 특히 우세하다. 그들의 서열 특징 및 기능적 특성에 기반하여, AU 풍부 요소(ARE)는 3가지 부류로 분리될 수 있으며(Chen et al, 1995): 클래스 I ARE는 U-풍부 영역 내에서 AUUUA 모티프의 몇몇 분산된 복제물을 함유한다. C-Myc 및 MyoD는 클래스 I ARE를 함유한다. 클래스 II ARE는 2 이상의 중복 UUAUUUA(U/A)(U/A) 나노머를 갖는다. 이 유형의 ARE를 함유하는 분자는 GM-CSF 및 TNF- $\alpha$ 를 포함한다. 클래스 III ARE는 덜 제대로 정의된다. 이들 U 풍부 영역은 AUUUA 모티프를 함유하지 않는다. c-Jun 및 마이오게닌은 이 부류의 2가지 잘 연구된 예이다. ARE에 대한 대부분의 단백질 결합은 전령을 탈안정화하는 것으로 알려져 있는 반면, ELAV 패밀리의 구성원, 가장 현저하게는 HuR은 mRNA의 안정성을 증가시키는 것으로 보고되었다. HuR은 모두 3가지 부류의 ARE에 결합한다. 핵산 분자의 3'UTR에 HuR 특이적 결합을 조작하는 것은 HuR 결합 그리고 그에 따른 생체내 전령의 안정화를 야기할 것이다.
- [0467] 3'UTR AU 풍부 요소(ARE)의 도입, 제거 또는 변형은 본 발명의 폴리뉴클레오타이드의 안정성을 조절하기 위해 사용될 수 있다. 특정 폴리뉴클레오타이드를 조작할 때, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드를 더 안정하게 만들기 위해 ARE의 하나 이상의 복제물이 도입될 수 있고, 이에 의해 번역을 축소시키며 얻어진 단백질의 생산을 감소시킨다. 마찬가지로, ARE는 세포내 안정성을 증가시키기 위해 동정되고 제거되거나 또는 돌연변이될 수 있고, 따라서, 얻어진 단백질의 번역 및 생산을 증가시킨다. 형질감염 실험은 본 발명의 폴리뉴클레오타이드를 이용하여 적절한 세포주에서 수행될 수 있고, 단백질 생산은 형질감염 후 다양한 시점에 분석될 수 있다. 예를 들어, 세포는 상이한 ARE-조작 분자로 그리고 적절한 단백질에 ELISA 키트를 이용하고 형질감염 후 6시간, 12시간, 24

시간, 48시간 및 7일에 생산된 단백질을 검정함으로써 형질감염될 수 있다.

- [0468] 5' 캡을 갖는 영역
- [0469] 본 발명은 또한 5' 캡과 본 발명의 폴리뉴클레오타이드를 둘 다 포함하는 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, 암 항원 에피토프를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드, 예컨대 활성화 종양유전자 돌연변이 캡타이드)를 포함한다.
- [0470] 천연 mRNA의 5'캡은 핵 유출에 수반되어, mRNA 안정성을 증가시키며, mRNA 캡 결합 단백질(CBP)에 결합되는데, 이는 성숙 환식 mRNA 종을 형성하기 위해 폴리(A) 결합 단백질의 CBP의 회합을 통해 세포 및 번역 적격에서 mRNA 안정성을 초래한다. 캡은 mRNA 스플라이싱 동안 5' 근위의 인트론 제거를 추가로 보조한다.
- [0471] 내인성 mRNA 분자는 mRNA 분자의 말단의 구아노신 캡 잔기와 5'-말단의 전사된 센스 뉴클레오타이드 사이에 5'-ppp-5'-트라이포스페이트 결합을 생성하는 캡핑된 5'-말단일 수 있다. 이어서, 이 5'-구아닐레이트 캡은 메틸화되어 N7-메틸-구아닐레이트 잔기를 생성할 수 있다. mRNA의 5' 단부의 말단 및/또는 종점 전의 전사된 뉴클레오타이드의 리보스 당은 선택적으로 또한 2'-O-메틸화될 수 있다. 구아닐레이트 캡 구조를 통한 5'-디캡핑(decapping) 및 이 구조의 절단은 축퇴를 위해 핵산 분자, 예컨대 mRNA 분자를 표적화할 수 있다.
- [0472] 일부 실시형태에서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, 암 항원 에피토프를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드)는 캡 모이어티를 혼입한다.
- [0473] 일부 실시형태에서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, 암 항원 에피토프를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드, 예컨대 활성화 종양유전자 돌연변이 캡타이드)는 디캡핑을 방지하는 가수분해 가능하지 않은 캡 구조를 포함하고, 따라서 mRNA 반감기를 증가시킨다. 캡 구조 가수분해는 5'-ppp-5' 포스포로다이에스터 결합의 절단을 필요로 하기 때문에, 변형된 뉴클레오타이드는 캡핑 반응을 사용할 수 있다. 예를 들어, 뉴 잉글랜드 바이오랩스(New England Biolabs)(매사추세츠주 입스위치에 소재)로부터의 백신시아 캡핑 효소(Vaccinia Capping Enzyme)는 5'-ppp-5' 캡에서 포스포로티오네이트 결합을 생성하기 위해 제조업자의 설명서에 따라 α-티오-구아노신 뉴클레오타이드와 함께 사용될 수 있다. 추가적인 변형된 구아노신 뉴클레오타이드, 예컨대 α-메틸-포스포네이트 및 셀레노-포스페이트 뉴클레오타이드가 사용될 수 있다.
- [0474] 추가적인 변형은 당 고리의 2'-하이드록실 상에서 폴리뉴클레오타이드(상기 언급한 바와 같음)의 5'-말단 및/또는 5'-종점 전의 리보스 당의 2'-O-메틸화를 포함하지만, 이것으로 제한되지 않는다. 다중 별개의 5'-캡 구조는 핵산 분자의 5'-캡, 예컨대 mRNA 분자로서 작용하는 폴리뉴클레오타이드를 생성하기 위해 사용될 수 있다. 본 명세서에서 또한 합성 캡, 유사체, 화학적 캡, 화학적 캡 유사체 또는 구조적 또는 기능적 캡 유사체로서 지칭되는 캡 유사체는 그들의 화학적 구조가 천연(즉, 내인성, 야생형 또는 생리학적) 5'-캡과 상이한 반면, 캡 기능을 보유한다. 캡 유사체는 화학적으로(즉, 비효소적으로) 또는 효소적으로 합성될 수 있고/있거나 본 발명의 폴리뉴클레오타이드에 연결될 수 있다.
- [0475] 예를 들어, 반전 방지 캡 유사체(Anti-Reverse Cap Analog: ARCA) 캡은 5'-5'-트라이포스페이트기에 의해 연결되는 2개의 구아닌을 함유하되, 하나의 구아닌은 N7 메틸기뿐만 아니라 3'-O-메틸기(즉, N7,3'-O-다이메틸-구아노신-5'-트라이포스페이트-5'-구아노신(m7G-3'mppp-G; 이는 동등하게 3' O-Me-m7G(5')ppp(5')G로 표기될 수 있음)를 함유한다. 다른 변형된, 구아닌의 3'-O 원자는 캡핑된 폴리뉴클레오타이드의 5'-말단의 뉴클레오타이드에 연결된다. N7- 및 3'-O-메틸화된 구아닌은 캡핑된 폴리뉴클레오타이드의 말단 모이어티를 제공한다.
- [0476] 다른 예시적인 캡은 mCAP인데, 이는 ARCA와 유사하지만 구아노신 상에 2'-O-메틸기를 가진다(즉, N7,2'-O-다이메틸-구아노신-5'-트라이포스페이트-5'-구아노신, m7Gm-ppp-G).
- [0477] 일부 실시형태에서, 캡은 다이뉴클레오타이드 캡 유사체이다. 비제한적 예로서, 다이뉴클레오타이드 캡 유사체는 보라노포스페이트기 또는 포스포로셀레네이트기, 예컨대 내용이 본 명세서에 전문이 참고로 편입된 미국 특허 제8,519,110호에 기재된 다이뉴클레오타이드 캡 유사체를 갖는 상이한 포스페이트 위치에서 변형될 수 있다.
- [0478] 다른 실시형태에서, 캡은 캡 유사체이며, 당업계에 공지되고/되거나 본 명세서에 기재된 캡 유사체의 N7-(4-클로로로페녹시에틸) 치환된 다이뉴클레오타이드이다. 캡 유사체의 N7-(4-클로로로페녹시에틸) 치환된 다이뉴클레오타이드 형태의 비제한적 예는 N7-(4-클로로로페녹시에틸)-G(5')ppp(5')G 및 N7-(4-클로로로페녹시에틸)-m3'-OG(5')ppp(5')G 캡 유사체를 포함한다(예를 들어, 문헌[Kore *et al.* Bioorganic & Medicinal Chemistry 2013 21:4570-4574]에 기재된 다양한 캡 유사체 및 캡 유사체를 합성하는 방법; 이의 내용은 본 명세서에 전문이 참고로 편입됨). 다른 실시형태에서, 본 발명의 캡 유사체는 4-클로로/브로모페녹시에틸 유사체이다.

- [0479] 캡 유사체가 폴리뉴클레오타이드 또는 이의 영역의 동시 캡핑을 허용하지만, 시험관내 전사 반응에서, 20%까지의 전사체는 캡핑되지 않은 채로 남을 수 있다. 이뿐만 아니라 내인성, 세포의 전사 기작에 의해 생산된 핵산의 내인성 5'-캡 구조로부터의 캡 유사체의 구조적 차이는 감소된 번역 적격 및 감소된 세포 안정성을 야기할 수 있다.
- [0480] 본 발명의 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, 암 항원 에피토프를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드)는 또한 더 정확한 5'-캡 구조를 생성하기 위해 효소를 이용하여 제조 후(IVT이든 또는 화학적 합성이든) 캡핑될 수 있다. 본 명세서에 사용되는 바와 같은, 어구 "더 정확한"은 구조적으로 또는 기능적으로 내인성 또는 야생형 특징을 밀접하게 반영하거나 또는 모방하는 특징을 지칭한다. 즉, "더 정확한" 특징은 선행 기술의 합성 특징 또는 유사체 등에 비해 내인성, 야생형, 천연 또는 생리학적 세포 기능을 더 잘 나타내며, 또는 이는 한 가지 이상의 사항에서 대응하는 내인성, 야생형, 천연 또는 생리학적 특징을 능가한다. 본 발명의 더 정확한 5' 캡 구조의 비제한적 예는 특히 당업계에 공지된 합성 5' 캡 구조에 비해(또는 야생형, 천연 또는 생리학적 5' 캡 구조에 대해) 캡 결합 단백질의 결합, 증가된 반감기, 5' 엔도뉴클레아제에 대한 감소된 감수성 및/또는 5' 디캡핑이다. 예를 들어, 재조합 백시니아 바이러스 캡핑 효소 및 재조합 2'-O-메틸트랜스퍼라제는 폴리뉴클레오타이드의 5'-말단 뉴클레오타이드와 구아닌 캡 뉴클레오타이드 사이의 정규 5'-5'-트라이포스페이트 결합을 생성할 수 있되, 캡 구아닌은 N7 메틸화를 함유하고, mRNA의 5'-말단 뉴클레오타이드는 2'-O-메틸을 함유한다. 이러한 구조는 Cap1 구조로 칭해진다. 이 캡은, 예를 들어 당업계에 공지된 다른 5' 캡 유사체 구조에 비해, 세포의 전염증 사이토카인의 더 높은 번역-적격 및 세포 안정성 및 감소된 활성화를 초래할 수 있다. 캡 구조는 7mG(5')ppp(5')N<sub>1</sub>pN<sub>2</sub>p(캡 0), 7mG(5')ppp(5')N<sub>1</sub>mpNp(캡 1) 및 7mG(5')-ppp(5')N<sub>1</sub>mpN<sub>2</sub>mp(캡 2)를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.
- [0481] 비제한적 예로서, 제조후 키메라 폴리펩타이드의 캡핑은 더 효율적일 수 있는데, 키메라 폴리뉴클레오타이드의 거의 100%가 캡핑될 수 있기 때문이다. 이는 캡 유사체가 시험관내 전사 반응 과정에서 키메라 폴리뉴클레오타이드에 연결될 때의 대략 80%와 대조적이다.
- [0482] 본 발명에 따르면, 5' 말단의 캡은 내인성 캡 또는 캡 유사체를 포함할 수 있다. 본 발명에 따르면, 5' 말단의 캡은 구아닌 유사체를 포함할 수 있다. 유용한 구아닌 유사체는 이노신, N<sub>1</sub>-메틸-구아노신, 2'-플루오로-구아노신, 7-데아자-구아노신, 8-옥소-구아노신, 2-아미노-구아노신, LNA-구아노신, 및 2-아지도-구아노신을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.
- [0483] 폴리-A 꼬리
- [0484] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, 암 항원 에피토프를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드, 예컨대 활성화 종양유전자 돌연변이 펩타이드)는 폴리-A 꼬리를 추가로 포함한다. 추가 실시형태에서, 폴리-A 꼬리 상의 말단기는 안정화를 위해 혼입될 수 있다. 다른 실시형태에서, 폴리-A 꼬리는 데스-3' 하이드록실 꼬리를 포함한다.
- [0485] RNA 가공 동안, 아데닌 뉴클레오타이드의 긴 사슬(폴리-A 꼬리)은 안정성을 증가시키기 위해 폴리뉴클레오타이드, 예컨대 mRNA 분자에 첨가될 수 있다. 전사 직후에, 전사체의 3' 단부는 3' 하이드록실을 유리시키도록 절단될 수 있다. 이어서, 폴리-A 중합효소는 RNA에 아데닌 뉴클레오타이드 사슬을 첨가한다. 폴리아데닐화로 불리는 공정은, 예를 들어, 대략 80 내지 대략 250개의 잔기 길이(대략 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240 또는 250개의 잔기 길이를 포함)일 수 있는 폴리-A 꼬리를 첨가한다.
- [0486] 폴리A 꼬리는 또한 작제물이 핵으로부터 유출된 후에 첨가될 수 있다.
- [0487] 본 발명에 따르면, 폴리 A 꼬리 상의 말단기는 안정화를 위해 혼입될 수 있다. 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 데스-3' 하이드록실 꼬리를 포함할 수 있다. 그들은 또한 주니 리(Junjie Li) 등(Current Biology, Vol. 15, 1501-1507, August 23, 2005, 이의 내용은 본 명세서에 그의 전문이 참고로 편입됨)에 의해 교시된 바와 같은 구조적 모이머티 또는 2'-O메틸 변형을 포함할 수 있다.
- [0488] 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 히스톤 mRNA를 포함하는 대안의 폴리A 꼬리 구조를 갖는 전사체를 암호화하도록 설계될 수 있다. 노르부리(Norbury)에 따르면, "말단의 유리화가 또한 인간 복제-의존적 히스톤 mRNA에서 검출되었다. 이들 mRNA의 전환은 염색체 DNA 복제의 완료 또는 저해 후 잠재적으로 독성인 히스톤 축적의 방지에 중요한 것으로 생각된다. 이들 mRNA는 3' 폴리(A) 꼬리의 그들의 결여, 안정한 줄기-루프 구조 및 그의 동족 줄기-루프 결합 단백질(SLBP)에 의해 대신에 추정되는 기능에 의해 구별되며; 후자는 폴리아데닐화된 mRNA 상의 PABP와 동일한 기능을 수행한다" (Norbury, "Cytoplasmic RNA: a case of the tail wagging the dog," Nature

Reviews Molecular Cell Biology; AOP, published online 29 August 2013; doi:10.1038/nrm3645) 이의 내용은 본 명세서에 그의 전문이 참고로 편집된다.

- [0489] 독특한 폴리-A 꼬리 길이는 본 발명의 폴리뉴클레오타이드에 대해 소정의 이점을 제공한다. 일반적으로, 폴리-A 꼬리의 길이는, 존재한다면, 길이가 30개 초과인 뉴클레오타이드이다. 다른 실시형태에서, 폴리-A 꼬리는 길이가 35개 초과인 뉴클레오타이드(예를 들어, 적어도 약 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900, 1,000, 1,100, 1,200, 1,300, 1,400, 1,500, 1,600, 1,700, 1,800, 1,900, 2,000, 2,500 및 3,000개 초과인 뉴클레오타이드)이다.
- [0490] 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드 또는 이의 영역은 약 30 내지 약 3,000개의 뉴클레오타이드(예를 들어, 30 내지 50, 30 내지 100, 30 내지 250, 30 내지 500, 30 내지 750, 30 내지 1,000, 30 내지 1,500, 30 내지 2,000, 30 내지 2,500, 50 내지 100, 50 내지 250, 50 내지 500, 50 내지 750, 50 내지 1,000, 50 내지 1,500, 50 내지 2,000, 50 내지 2,500, 50 내지 3,000, 100 내지 500, 100 내지 750, 100 내지 1,000, 100 내지 1,500, 100 내지 2,000, 100 내지 2,500, 100 내지 3,000, 500 내지 750, 500 내지 1,000, 500 내지 1,500, 500 내지 2,000, 500 내지 2,500, 500 내지 3,000, 1,000 내지 1,500, 1,000 내지 2,000, 1,000 내지 2,500, 1,000 내지 3,000, 1,500 내지 2,000, 1,500 내지 2,500, 1,500 내지 3,000, 2,000 내지 3,000, 2,000 내지 2,500, 및 2,500 내지 3,000)를 포함한다.
- [0491] 일부 실시형태에서, 폴리-A 꼬리는 전체 폴리뉴클레오타이드의 길이 또는 폴리뉴클레오타이드의 특정 영역의 길이에 대해 설계된다. 이 설계는 암호화 영역의 길이, 특정 특징 또는 영역의 길이에 기반하거나 또는 폴리뉴클레오타이드로부터 발현된 궁극의 산물의 길이에 기반할 수 있다.
- [0492] 이와 관련하여, 폴리-A 꼬리는 폴리뉴클레오타이드 또는 이의 특징보다 길이가 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 또는 100% 더 클 수 있다. 폴리-A 꼬리는 또한 그것이 속하는 폴리뉴클레오타이드의 분획으로서 설계될 수 있다. 이와 관련하여, 폴리-A 꼬리는 작제물의 총 길이, 작제물 영역 또는 작제물의 총 길이 - 폴리-A 꼬리의 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 또는 90% 이상일 수 있다. 추가로, 폴리-A 결합 단백질에 대한 폴리뉴클레오타이드의 조작된 결합 부위 및 접합은 발현을 향상시킬 수 있다.
- [0493] 추가적으로, 다중 별개의 폴리뉴클레오타이드는 폴리-A 꼬리의 3'-말단에서 변형된 뉴클레오타이드를 이용하여 3'-단부를 통해 PABP(폴리-A 결합 단백질)를 통해 함께 연결될 수 있다. 형질감염 실험은 적절한 세포주에서 수행될 수 있고, 단백질 생산은 형질감염 후 12시간, 24시간, 48시간, 72시간 및 7일에 ELISA에 의해 검정될 수 있다.
- [0494] 일부 실시형태에서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 폴리A-G 쿼텟 영역을 포함하도록 설계된다. G-쿼텟(G-quartet)은 DNA와 RNA 둘 다에서 G-풍부 서열에 의해 형성될 수 있는 4개의 구아닌 뉴클레오타이드의 환식 수소 결합된 검정이다. 이 실험에서, G-쿼텟은 폴리-A 꼬리의 단부에 혼입된다. 얻어진 폴리뉴클레오타이드는 안정성, 단백질 생산 및 다양한 시점에 반감기를 포함하는 다른 매개변수에 대해 검정된다. 폴리A-G 쿼텟은 120개의 뉴클레오타이드 단독의 폴리-A 꼬리를 이용하여 알 수 있는 적어도 75%와 동등한 mRNA로부터 단백질 생산을 초래한다는 것을 발견하였다.
- [0495] 개시 코돈 영역
- [0496] 본 발명은 또한 개시 코돈 영역과 본 명세서에 기재된 폴리뉴클레오타이드를 둘 다 포함하는 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, 암 항원 에피토프를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드, 예컨대 활성화 종양유전자 돌연변이 펩타이드)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 개시 코돈 영역과 유사한 또는 이와 같이 작용하는 영역을 가질 수 있다.
- [0497] 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드의 번역은 개시 코돈 AUG가 아닌 코돈 상에서 개시될 수 있다. 폴리뉴클레오타이드의 번역은 대안의 개시 코돈, 예컨대, 이하로 제한되지 않지만, ACG, AGG, AAG, CTG/CUG, GTG/GUG, ATA/AUA, ATT/AUU, TTG/UUG 상에서 개시될 수 있다(문헌[Touriol *et al.* Biology of the Cell 95 (2003) 169-178 및 Matsuda and Mauro PLoS ONE, 2010 5:11] 참조; 이들 각각의 내용은 본 명세서에 전문이 참고로 편집됨).
- [0498] 비제한적 예로서, 폴리뉴클레오타이드의 번역은 대안의 개시 코돈 ACG 상에서 시작한다. 다른 비제한적 예로서, 폴리뉴클레오타이드 번역은 대안의 개시 코돈 CTG 또는 CUG 상에서 시작한다. 또 다른 비제한적 예로서, 폴리뉴클레오타이드의 번역은 대안의 개시 코돈 GTG 또는 GUG 상에서 시작한다.



- [0499] 번역을 개시하는 코돈, 예컨대 이하에 제한되지는 않지만, 개시 코돈 또는 대안의 개시 코돈에 축적하는 뉴클레오타이드는 폴리펩타이드의 번역 효율, 길이 및/또는 구조에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(예를 들어, 문헌[Matsuda and Mauro PLoS ONE, 2010 5:11] 참조; 이의 내용은 본 명세서에 전문이 참고로 편입됨). 번역을 개시하는 코돈에 축적하는 임의의 뉴클레오타이드의 가리움은 폴리뉴클레오타이드의 번역 개시의 위치, 번역 효율, 길이 및/또는 구조를 변경시키는데 사용될 수 있다.
- [0500] 일부 실시형태에서, 가리움된 개시 코돈 또는 대안의 개시 코돈에서 번역 개시 확률을 감소시키기 위해 코돈을 가리거나 또는 숨기기 위하여 개시 코돈 또는 대안의 개시 코돈 근처에서 가리움제가 사용될 수 있다. 가리움제의 비제한적 예는 안티센스 잠금 핵산(LNA) 폴리뉴클레오타이드 및 엑손-접합 복합체(EJC)를 포함한다(예를 들어, 문헌[Matsuda and Mauro describing masking agents LNA polynucleotides and EJCs (PLoS ONE, 2010 5:11)] 참조; 이의 내용은 본 명세서에 전문이 참고로 편입됨).
- [0501] 다른 실시형태에서, 번역이 대안의 개시 코돈 상에서 개시될 가능성을 증가시키기 위해 폴리뉴클레오타이드의 개시 코돈을 가리기 위하여 가리움제가 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 번역이 가리움된 개시 코돈 또는 대안의 개시 코돈에 대해 하류의 개시 코돈 또는 대안의 개시 코돈 상에서 개시될 기회를 증가시키기 위해 제1 개시 코돈 또는 대안의 개시 코돈을 가리움하기 위하여 가리움제가 사용될 수 있다.
- [0502] 일부 실시형태에서, 개시 코돈 또는 대안의 개시 코돈은 miR 결합 부위에 대해 완전한 적격 내에 위치될 수 있다. miR 결합 부위의 완전한 적격은 가리움제와 유사하게 폴리펩타이드의 번역, 길이 및/또는 구조를 제어하게 할 수 있다. 비제한적 예로서, 개시 코돈 또는 대안의 개시 코돈은 miRNA 결합 부위에 대해 완전한 적격의 중간에 위치될 수 있다. 개시 코돈 또는 대안의 개시 코돈은 제1 뉴클레오타이드, 제2 뉴클레오타이드, 제3 뉴클레오타이드, 제4 뉴클레오타이드, 제5 뉴클레오타이드, 제6 뉴클레오타이드, 제7 뉴클레오타이드, 제8 뉴클레오타이드, 제9 뉴클레오타이드, 제10 뉴클레오타이드, 제11 뉴클레오타이드, 제12 뉴클레오타이드, 제13 뉴클레오타이드, 제14 뉴클레오타이드, 제15 뉴클레오타이드, 제16 뉴클레오타이드, 제17 뉴클레오타이드, 제18 뉴클레오타이드, 제19 뉴클레오타이드, 제20 뉴클레오타이드 또는 제21 뉴클레오타이드 다음에 위치될 수 있다.
- [0503] 다른 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드의 개시 코돈은 개시 코돈이 아닌 코돈에서 폴리뉴클레오타이드 번역을 시작하기 위해 폴리뉴클레오타이드 서열로부터 제거될 수 있다. 폴리뉴클레오타이드의 번역은 제거된 개시 코돈 다음의 코돈 상에서 또는 하류의 개시 코돈 또는 대안의 개시 코돈 상에서 시작할 수 있다. 비제한적 예에서, 개시 코돈 ATG 또는 AUG는 하류의 개시 코돈 또는 대안의 개시 코돈 상에서 번역을 개시하기 위해 폴리뉴클레오타이드 서열의 처음 3개의 뉴클레오타이드로서 제거된다. 개시 코돈이 제거된 폴리뉴클레오타이드 서열은 번역의 개시, 폴리뉴클레오타이드의 길이 및/또는 폴리뉴클레오타이드의 구조를 제어하기 위해 또는 개시하기 위한 시도를 위해 하류의 개시 코돈 및/또는 대안의 개시 코돈에 대해 적어도 하나의 가리움제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0504] 정지 코돈 영역
- [0505] 본 발명은 또한 정지 코돈 영역과 본 명세서에 기재된 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, 암 항원 에피토프를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드, 예컨대 활성화 종양유전자 돌연변이 펩타이드)를 둘 다 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 3' 비번역 영역(UTR) 앞에 적어도 2개의 정지 코돈을 포함할 수 있다. 정지 코돈은 DNA의 경우에 TGA, TAA 및 TAG로부터, 또는 RNA의 경우에 UGA, UAA 및 UAG로부터 선택될 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 DNA의 경우에 정지 코돈 TGA, 또는 RNA의 경우에 정지 코돈 UGA 및 하나의 추가적인 정지 코돈을 포함한다. 추가적인 실시형태에서, 추가적인 정지 코돈은 TAA 또는 UAA일 수 있다. 다른 실시형태에서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 3개의 연속적 정지 코돈, 4개의 정지 코돈 또는 그 이상을 포함한다.
- [0506] 삽입 및 치환
- [0507] 본 발명은 또한 삽입 및/또는 치환을 추가로 포함하는 본 개시내용의 폴리뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0508] 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드의 5'UTR은 적어도 하나의 영역의 삽입 및/또는 동일한 염기의 뉴클레오타이드의 가닥으로 대체될 수 있다. 뉴클레오타이드의 영역 및/또는 가닥은 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7 또는 적어도 8개의 뉴클레오타이드를 포함할 수 있지만, 이들로 제한되지 않으며, 뉴클레오타이드는 천연 및/또는 비천연일 수 있다. 비제한적 예로서, 뉴클레오타이드의 그룹은 5 내지 8개의 아데닌, 사이토신, 티민, 본 명세서에 개시된 임의의 다른 뉴클레오타이드의 가닥 및/또는 이들의 조합을 포함할 수 있다.



- [0509] 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드의 5'UTR은 적어도 2개 영역 및/또는 상이한 2가지 염기의 뉴클레오타이드, 예컨대, 이하로 제한되는 것은 아니지만, 아데닌, 사이토신, 티민, 본 명세서에 개시된 임의의 다른 뉴클레오타이드 및/또는 이들의 조합의 가닥의 삽입으로 대체될 수 있다. 예를 들어, 5'UTR은 5 내지 8개의 아데닌 염기의 삽입 다음에 5 내지 8개의 사이토신 염기의 삽입으로 대체될 수 있다. 다른 예에서, 5'UTR은 5 내지 8개의 사이토신 염기의 삽입 다음에 5 내지 8개의 아데닌 염기의 삽입으로 대체될 수 있다.
- [0510] 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 RNA 중합효소에 의해 인식될 수 있는 전사 개시 부위 하류의 적어도 하나의 치환 및/또는 삽입을 포함할 수 있다. 비제한적 예로서, 적어도 하나의 치환 및/또는 삽입은 전사 개시 부위 바로 하류의 영역(예컨대, 이하로 제한되는 것은 아니지만, +1 내지 +6)에서 적어도 하나의 핵산을 치환함으로써 전사 개시 부위 하류에서 생길 수 있다. 전사 개시 부위 바로 하류의 뉴클레오타이드의 영역에 대한 변화는 개시 속도에 영향을 미칠 수 있고, 겔보기 뉴클레오타이드 트라이포스페이트(NTP) 반응 상수 값을 증가시키며, 전사 개시 동안 전사 복합체로부터 짧은 전사체의 해리를 증가시킨다(Briebe et al, Biochemistry (2002) 41: 5144-5149; 본 명세서에 전문이 참고로 편입됨). 적어도 하나의 뉴클레오타이드의 변형, 치환 및/또는 삽입은 서열의 침묵 돌연변이를 야기할 수 있거나 또는 아미노산 서열에서 돌연변이를 야기할 수 있다.
- [0511] 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 전사 개시 부위 하류의 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 11, 적어도 12 또는 적어도 13개의 구아닌 염기의 치환을 포함할 수 있다.
- [0512] 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 전사 개시 부위 바로 하류의 영역에서 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5 또는 적어도 6개의 구아닌 염기의 치환을 포함할 수 있다. 비제한적 예로서, 영역 내 뉴클레오타이드가 GGGAGA라면, 구아닌 염기는 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3 또는 적어도 4개의 아데닌 뉴클레오타이드에 의해 치환될 수 있다. 다른 비제한적 예에서, 영역 내 뉴클레오타이드가 GGGAGA라면, 구아닌 염기는 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3 또는 적어도 4개의 사이토신 염기로 치환될 수 있다. 다른 비제한적 예에서, 영역 내 뉴클레오타이드가 GGGAGA라면, 구아닌 염기는 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3 또는 적어도 4개의 티민, 및/또는 본 명세서에 기재된 임의의 뉴클레오타이드로 치환될 수 있다.
- [0513] 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 개시 코돈 상류의 적어도 하나의 치환 및/또는 삽입을 포함할 수 있다. 명확을 기하기 위하여, 당업자는 개시 코돈이 단백질 암호화 영역의 제1 코돈인 반면, 전사 개시 부위는 전사가 시작되는 부위라는 것을 인식할 것이다. 폴리뉴클레오타이드는, 뉴클레오타이드 염기의 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7 또는 적어도 8개의 치환 및/또는 삽입을 포함할 수 있지만, 이들로 제한되지 않는다. 뉴클레오타이드 염기는 개시 코돈 상류의 1, 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4 또는 적어도 5개의 위치에서 삽입되거나 또는 치환될 수 있다. 삽입 및/또는 치환된 뉴클레오타이드는 동일한 염기(예를 들어, 모두 A 또는 모두 C 또는 모두 T 또는 모두 G), 2개의 상이한 염기(예를 들어, A 및 C, A 및 T, 또는 C 및 T), 3개의 상이한 염기(예를 들어, A, C 및 T 또는 A, C 및 T) 또는 적어도 4개의 상이한 염기일 수 있다.
- [0514] 비제한적 예로서, 폴리뉴클레오타이드에서 암호화 영역 상류의 구아닌 염기는 아데닌, 사이토신, 티민 또는 본 명세서에 기재된 임의의 뉴클레오타이드로 치환될 수 있다. 다른 비제한적 예에서, 폴리뉴클레오타이드에서 구아닌 염기의 치환은 전사 개시 부위 하류의 그리고 개시 코돈 앞의 영역에서 적어도 하나의 구아닌 염기를 남기도록 설계될 수 있다(문헌[Esvelt *et al.* Nature (2011) 472(7344):499-503] 참조; 이의 내용은 본 명세서에 전문이 참고로 편입됨). 비제한적 예로서, 적어도 5개의 뉴클레오타이드가 전사 개시 부위 하류 그러나 개시 코돈 상류의 1개 위치에서 삽입될 수 있지만, 적어도 5개의 뉴클레오타이드는 동일한 염기 유형일 수 있다.
- [0515] 본 개시내용에 따르면, 키메라 폴리뉴클레오타이드의 2개 영역 또는 부분은, 예를 들어 트라이포스페이트 화합물을 이용하여 결합되거나 또는 결합될 수 있다. 일부 실시형태에서, 100개 이하의 뉴클레오타이드의 제1 영역 또는 부분은 5'-모노포스페이트 및 말단의 3'-desOH로 화학적으로 합성되거나 또는 OH로 차단된다. 영역이 80개보다 더 긴 뉴클레오타이드라면, 이는 후속적으로 결합에 의해 화학적으로 연결되는 2개 이상의 가닥으로서 합성될 수 있다. 제1 영역 또는 부분이 IVT를 이용하여 비위치적으로 변형된 영역 또는 부분으로서 합성된다면, 3'-말단의 후속적 캡핑에 의한 5'-모노포스페이트로의 전환이 이어질 수 있다. 모노포스페이트 보호기는 당업계에 공지된 임의의 것으로부터 선택될 수 있다. 키메라 폴리뉴클레오타이드의 제2 영역 또는 부분은, 예를 들어 본 명세서에 기재된 바와 같은 화학적 합성 또는 IVT 방법을 이용하여 합성될 수 있다. IVT 방법은 변형된 캡을 갖는 프라이머를 이용할 수 있는 RNA 중합효소의 사용을 포함할 수 있다. 대안적으로, 캡은 화학적으로 합성되고, IVT 영역 또는 부분에 결합될 수 있다.

- [0516] 결찰 방법에 대해, DNA T4 리가제에 의한 결찰 다음에 DNase 처리(DNA T4 리가제 활성화에 필요한 DNA 스플린트(splint)를 제거하기 위함)는 연관(concatenation) 산물의 바람직하지 않은 형성을 용이하게 방지하여야 한다는 것이 주목된다.
- [0517] 전체 키메라 폴리뉴클레오타이드는 포스페이트-당 골격에 의해 제조될 필요가 없다. 영역 또는 부분 중 하나가 폴리펩타이드를 암호화한다면, 이러한 영역 또는 부분은 포스페이트-당 골격을 포함하는 것이 바람직하다.
- [0518] 결찰은 임의의 적절한 기법, 예컨대 효소 결찰, 클릭 화학, 오소클릭 화학, 솔루링크(solulink) 또는 당연계에 공지된 다른 생체접합 화학을 이용하여 수행될 수 있다. 일부 실시형태에서, 결찰은 상보성 올리고뉴클레오타이드 스플린트에 의해 지시된다. 일부 실시형태에서, 결찰은 상보성 올리고뉴클레오타이드 스플린트 없이 수행된다.
- [0519] 다른 양상에서, 본 발명은 IVT 방법에 의해 mRNA 암 백신을 제조하기 위한 키트에 관한 것이다. 개인화된 암 백신에서, 환자 특이적 돌연변이를 동정하고 하나 이상의 네오에피토프로 환자를 백신접종하는 것은 중요하다. 이러한 백신에서, mRNA의 ORF에 의해 암호화된 항원(들)은 환자에 특이적일 것이다. 항원(들)을 암호화하는 5'- 및 3'-단부는 더 광범위하게 적용 가능할 수 있는데, 그들이 비번역 영역 및 다수의 RNA에 대해 혼한 안정화 영역을 포함하기 때문이다. 특히, 본 개시내용은 환자-특이적 에피토프를 암호화하는 ORF와 조합될 수 있는 키메라 폴리뉴클레오타이드의 하나 이상의 부분, 예컨대 RNA의 하나 이상의 5'- 및/또는 3'-영역을 포함하는 키트를 제공한다. 예를 들어, 키트는 5'-ORF, 3'-ORF, 및 폴리(A) 꼬리 중 하나 이상을 함유하는 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 각각의 폴리뉴클레오타이드 성분은 개개 용기에 있다. 다른 실시형태에서, 하나 초과 폴리뉴클레오타이드 성분이 단일 용기에 함께 존재한다. 일부 실시형태에서, 키트는 결찰효소를 포함한다. 일부 실시형태에서, 제공된 키트는 사용을 위한 설명서를 포함한다. 일부 실시형태에서, 설명서는 키트로부터 하나 이상의 성분에 에피토프 암호화 ORF, 예를 들어, 5'-ORF, 3'-ORF, 및/또는 폴리(A) 꼬리를 결찰시키기 위한 설명서를 포함한다.
- [0520] 본 발명에 따른 개인화된 암 백신을 생성하는 방법은 조직 샘플의 본 명세서에 기재된 바와 같은 딥 핵산 또는 단백질 서열분석 방법과 같은 기법을 이용하는 돌연변이의 동정을 수반한다. 일부 실시형태에서, 환자의 전사체에서 돌연변이의 초기 동정이 수행된다. 환자의 전사체로부터의 데이터는 발견되는 환자 특이적 및 종양 특이적 돌연변이를 동정하기 위해 환자 엑솜으로부터의 서열 정보와 비교된다. 비교는 악성변이체로서 지칭되는 추정적 네오에피토프의 데이터셋을 생성한다. 악성변이체는 환자당 대략 100 내지 10,000개의 후보 돌연변이를 포함할 수 있다. 악성변이체는 신생항원 백신의 생성을 위한 최적의 돌연변이를 동정하기 위해질의 또는 알고리즘 세트를 이용하는 데이터 프로빙 분석을 실시한다. 일부 실시형태에서, mRNA 신생항원 백신이 설계되고 제작된다. 이어서, 환자는 백신으로 처리된다.
- [0521] 신생항원 백신은 다중 네오에피토프 또는 하나 이상의 단일 RNA 백신 또는 이들의 조합을 포함하는 다시트론성 백신일 수 있다.
- [0522] 일부 실시형태에서, 환자 치료의 시작을 위한 돌연변이 동정 공정의 개시로부터의 전체 방법은 2개월 미만에 달성된다. 다른 실시형태에서 전체 공정은 7주 미만, 6주 미만, 5주 미만, 4주 미만, 3주 미만, 2주 미만 또는 1주 미만에 달성된다. 일부 실시형태에서, 전체 방법은 30일 미만에 수행된다.
- [0523] 돌연변이 동정 공정은 전사체 분석과 엑솜 분석 둘 다 또는 전사체만 또는 엑솜만의 분석을 수반할 수 있다. 일부 실시형태에서, 전사체 분석이 처음에 수행되고, 엑솜 분석이 두번째로 수행된다. 분석은 생물학적 또는 조직 샘플에 대해 수행된다. 일부 실시형태에서, 생물학적 또는 조직 샘플은 혈액 또는 혈청 샘플이다. 다른 실시형태에서 샘플은 조직 은행 샘플 또는 B-세포의 EBV 형질저환이다.
- [0524] 암 연관 돌연변이의 소정의 특성을 분석함으로써, 최적의 네오에피토프는 mRNA 백신 내 포함에 대해 평가되고/되거나 선택될 수 있다는 것이 인식되고 인정되었다. 예를 들어, 주어진 시간에, 몇몇 특성 중 하나 이상은 백신 내 포함을 위한 네오에피토프 세트를 선택하기 위해 평가되고 가중치 부여될 수 있다. 네오에피토프 또는 네오에피토프 세트의 특성은, 예를 들어, 환자 RNA-seq 또는 다른 핵산 분석에서 유전자 또는 전사체-수준 발현의 평가, 이용 가능한 데이터베이스에서의 조직-특이적 발현, 공지된 종양 유전자/종양 억제자, 변이체 호출 신뢰도 스코어; RNA-seq 대립유전자-특이적 발현; 보존적 대 비보존적 아미노산 치환; 점돌연변이의 위치(증가된 TCR 맞물림에 대한 센터링 스코어); 점돌연변이의 위치(차별적 HLA 결합에 대한 앵커링 스코어); 자성: 환자 WES 데이터와 100% 미만의 코어 에피토프 상동성; 8량체 내지 11량체에 대한 HLA-A 및 -B IC50; 15량체 내지 20량체에 대한 HLA-DRB1 IC50; 난잡 스코어(즉, 결합하도록 예측된 환자 HLA의 수); 8량체-11량체에 대한 HLA-C

IC50; 15량체 내지 20량체에 대한 HLA-DRB3-5 IC50; 15량체 내지 20량체에 대한 HLA-DQB1/A1 IC50; 15량체 내지 20량체에 대한 HLA-DPB1/A1 IC50; 클래스 I 대 클래스 II 비율; 다뤄지는 환자 HLA-A, -B 및 DRB1 알로타이프의 다양성; 점 돌연변이 대 복잡한 에피토프의 비율(예를 들어, 프레임시프트) 및/또는 유사-에피토프 HLA 결합 스코어를 포함할 수 있다.

- [0525] 일부 실시형태에서, 최적의 네오에피토프를 동정하기 위해 사용되는 암 연관 돌연변이의 특성은 돌연변이의 유형, 환자 샘플 내 돌연변이의 존재비, 자기 반응성의 결여 및 펩타이드 조성물의 특성과 관련된 특성이다.
- [0526] 돌연변이의 유형은 추정적 에피토프가 백신에 포함되어야 하는지의 여부를 결정함에 있어서 인자로서 결정되고 고려되어야 한다. 돌연변이의 유형은 다를 수 있다. 일부 예에서, 단일 백신에서 다중의 상이한 유형의 돌연변이를 포함하는 것이 바람직할 수 있다. 다른 예에서, 단일 유형의 돌연변이가 더 바람직할 수 있다. 특정 돌연변이에 대한 값은 가중치 부여되고 계산될 수 있다. 일부 실시형태에서, 특정 돌연변이는 단일 뉴클레오타이드 다형(single nucleotide polymorphism: SNP)이다. 일부 실시형태에서, 특정 돌연변이는 복잡한 변이체, 예를 들어, 인트론 보유로부터 초래된 펩타이드 서열, 복잡한 스플라이싱 사건, 또는 서열의 판독 프레임을 변화시키는 삽입/결실이다.
- [0527] 환자 샘플에서 돌연변이의 존재비가 또한 스코어링되고 추정적 에피토프가 백신에 포함되어야 하는지 여부의 결정에 고려될 수 있다. 고도로 흔한 돌연변이는 더 강한 면역 반응을 촉진시킬 수 있다.
- [0528] 면역원성의 고려는 백신에 포함을 위한 최적의 네오에피토프의 선택에서 중요한 성분이다. 면역원성은, 예를 들어, 네오에피토프의 MHC 결합 능력, HLA 난잡, 돌연변이 위치, 예측된 T 세포 반응성, 실제 T 세포 반응성, 특정 입체배치를 야기하는 구조 및 얻어진 용매 노출 및 특정 아미노산의 제시를 분석함으로써 평가될 수 있다. 공지된 알고리즘, 예컨대 NetMHC 예측 알고리즘은 공통 HLA-A 및 -B 대립유전자에 결합하는 펩타이드의 능력을 예측하는 데 사용될 수 있다. MHC 결합 펩타이드의 구조적 평가는 또한 인실리코 3-차원 분석 및/또는 단백질 도킹 프로그램에 의해 수행될 수 있다. 로세타(Rosetta) 알고리즘으로부터 획득된 것과 같은 MHC 분자에 결합될 때 예측된 에피토프의 사용은 에피토프가 MHC 분자에 결합될 때 에피토프의 아미노산 잔기의 용매 노출 정도를 평가하는 데 사용될 수 있다. T 세포 반응성은 시험관내 에피토프 및 T 세포를 이용하는 실험에 의해 평가될 수 있다. 대안적으로 T 세포 반응성은 T 세포 반응/서열 데이터셋을 이용하여 평가될 수 있다.
- [0529] 백신에 포함된 네오에피토프의 중요한 성분은 자기 반응성의 결여이다. 추정적 네오에피토프는 에피토프가, 예를 들어 악성 세포 내의 유전자 변화의 결과로서 생기는 종양 조직으로 제한된다는 것을 확인하기 위해 선별될 수 있다. 이상적으로는, 에피토프는 환자의 정상 조직에 존재하지 않아야 하며, 따라서, 마이-유사 에피토프는 데이터셋 중에서 필터링된다. 개인화된 암호화 계층은 자기-반응성의 결여를 결정하기 위해 신생항원 후보의 비교를 위한 기준으로 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 개인화된 암호화 계층은 개별화된 전사체 및/또는 엑솜으로부터 생성된다.
- [0530] 펩타이드 조성물의 특성이 또한 에피토프 설계에서 고려될 수 있다. 예를 들어 스코어는 에피토프에서 발견되는 보존적 대 비보존적 아미노산의 값에 대해 각각의 추정 에피토프를 제공할 수 있다.
- [0531] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 도구에 의해 수행된 분석은 환자로부터 상이한 시간에, 즉, 치료 개입 전에 또는 후에 상이한 조직 샘플로부터 획득된 특성의 상이한 세트를 비교하는 것을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 특성의 하나의 세트로부터의 최대 값의 평균은 특성의 다른 세트로부터의 최대 값의 평균과 비교될 수 있다. 예를 들어, HLA 결합에 대한 평균 값은 분포의 두 상이한 세트 간에 비교될 수 있다. 분포의 두 세트는, 예를 들어, 며칠, 몇 개월 또는 몇 년에 의해 분리된 시간에 대해 결정될 수 있다.
- [0532] 게다가, 본 발명자들은 암 돌연변이의 특성에 대한 이러한 데이터가 수집되고, 본 명세서에 기재된 알고리즘을 이용하여 분석될 수 있다는 것을 인식하고 인정하였다. 데이터는 개인화된 암 백신의 개발을 위해 네오에피토프 및 네오에피토프의 세트를 동정하는 데 유용하다.
- [0533] 일부 실시형태에서, 종양 변이체 펩타이드의 모든 주석이 달린 전사체는 본 발명에 따라 백신에 포함된다. 일부 실시형태에서, RNAseq에서 동정된 RNA의 번역은 본 발명에 따른 백신에 포함된다.
- [0534] 2 이상의 펩타이드의 연쇄체, 예를 들어, 2 이상의 신생항원은 펩타이드 경계에서 의도치 않은 새로운 에피토프(유사에피토프)를 생성할 수 있다는 것이 인식될 것이다. 이러한 유사에피토프를 방지하거나 또는 제거하기 위해, 클래스 I 대립유전자는 연쇄체에서 펩타이드 경계를 가로지르는 히트에 대해 스캐닝될 수 있다. 일부 실시형태에서, 연쇄체 내의 펩타이드 순서는 유사에피토프 형성을 감소시키거나 또는 제거하기 위해 서플링된다. 일부 실시형태에서, 링커는 유사에피토프 형성을 감소시키거나 또는 제거하기 위해 펩타이드, 예를 들어, 단일 아

미노산 링커, 예컨대 글리신 사이에 사용된다. 일부 실시형태에서, 고정 아미노산은 유사에피토프 형성을 감소시키거나 또는 제거하는 다른 아미노산으로 대체될 수 있다. 일부 실시형태에서, 펩타이드는 유사에피토프 형성을 감소시키거나 또는 제거하기 위해 연쇄체 내의 펩타이드 경계에서 제거된다.

[0535] 일부 실시형태에서, 다중 펩타이드 에피토프 항원은 유사에피토프를 최소화하기 위해 배열되고 정돈된다. 다른 실시형태에서 다중 펩타이드 에피토프 항원은 유사에피토프가 없는 폴리펩타이드이다. 암 항원 에피토프가 머리 꼬리 형성에서 연쇄동일서열 구조로 배열될 때, 각각의 암 항원 에피토프 사이에 접합부가 형성된다. 상기는 펩타이드의 N-말단 상의 에피토프로부터 몇몇, 즉, 1 내지 10개의 아미노산 및 인접한 직접 연결된 에피토프의 C-말단 상에서 몇몇, 즉, 1 내지 10개의 아미노산을 포함한다. 접합부는 면역 반응을 생성할 수 있는 면역원성 펩타이드가 아니라는 것은 중요하다. 일부 실시형태에서, 접합부는 개인화된 암 백신에 대해 IC50이 약 50nM 초과로 설계된 대상체의 HLA 단백질에 결합하는 펩타이드 서열을 형성한다. 다른 실시형태에서 접합부 펩타이드 서열은 IC50이 약 10nM, 150nM, 200nM, 250nM, 300nM, 350nM, 400nM, 450nm, 또는 500nM 초과인 대상체의 HLA 단백질에 결합한다.

[0536] 본 명세서에 기재된 기법에 따른 네오에피토프 특성규명 시스템은 이와 관련하여 실시형태가 제한되지 않기 때문에 임의의 적합한 형태를 취할 수 있다. 일부 실시형태와 관련하여 사용될 수 있는 컴퓨터 시스템(900)의 예시적 실행을 도 5에 나타낸다. 하나 이상의 컴퓨터 시스템, 예컨대 컴퓨터 시스템(900)은 상기 기재한 임의의 기능성을 실행하기 위해 실행될 수 있다. 컴퓨터 시스템(900)은 하나 이상의 프로세서(910) 및 임의의 적합한 데이터 저장 매체로 형성될 수 있는 하나 이상의 컴퓨터 판독 가능한 저장 매체(즉, 만질 수 있는, 일시적이지 않은 컴퓨터-판독 가능한 매체), 예를 들어, 휘발성 저장소(920) 및 하나 이상의 비휘발성 저장 매체(930)를 포함할 수 있다. 프로세서(910)는 이와 관련하여 실시형태가 제한되지 않기 때문에 임의의 적합한 방식으로 휘발성 저장소(920) 및 비휘발성 저장 장치(930)에 대한 기재 데이터 및 이에 대한 판독 데이터를 제어할 수 있다. 본 명세서에 기재된 임의의 기능성을 수행하기 위해, 프로세서(910)는 프로세서(910)에 의한 실행을 위한 설명서를 저장하는 만질 수 있는, 일시적이지 않은 컴퓨터-판독 가능한 매체로서 작용할 수 있는, 하나 이상의 컴퓨터-판독 가능한 저장 매체(예를 들어, 휘발성 저장소(920) 및/또는 비휘발성 저장 장치(930))에 저장된 하나 이상의 설명서를 실행할 수 있다.

[0537] 상기 기재한 실시형태는 임의의 다수의 방법으로 실행될 수 있다. 예를 들어, 실시형태는 하드웨어, 소프트웨어 또는 이들의 조합을 이용하여 실행될 수 있다. 소프트웨어에서 실행될 때, 소프트웨어 암호는 단일의 컴퓨터로 제공되든 또는 다중 컴퓨터 중에 분포되든 임의의 적합한 프로세서 또는 프로세서의 수집에 대해 실행될 수 있다. 상기 기재한 기능을 수행하는 임의의 성분 또는 성분들의 수집은 일반적으로 상기 논의한 기능을 제어하는 하나 이상의 컨트롤러로서 고려될 수 있다는 것이 인식되어야 한다. 하나 이상의 컨트롤러는 수많은 방법으로, 예컨대 전용 하드웨어로, 또는 상기 인용한 기능을 수행하는 마이크로코드 또는 소프트웨어를 이용하여 프로그래밍된 일반적 목적의 하드웨어(예를 들어, 하나 이상의 프로세서)로 실행될 수 있다.

[0538] 이와 관련하여, 하나의 실행은 하나 이상의 프로세서 상에서 실행될 때, 상기 논의한 기능을 수행하는 컴퓨터 프로그램(즉, 복수의 설명서)으로 암호화된 적어도 하나의 컴퓨터-판독 가능한 저장 매체(즉, 적어도 하나의 만질 수 있는, 일시적이지 않은 컴퓨터-판독 가능한 매체), 예컨대, 컴퓨터 메모리(예를 들어, 하드 드라이브, 플래시 메모리, 프로세서, 작업 메모리 등), 플로피 디스크, 광학 디스크, 자기 테이프 또는 다른 만질 수 있는, 일시적이지 않은 컴퓨터-판독 가능한 매체)를 포함한다는 것이 인식되어야 한다. 이것에 저장된 프로그램이 본 명세서에 논의된 기법을 실행하기 위해 임의의 컴퓨터 자원에 부하될 수 있도록 컴퓨터-판독 가능한 저장 매체는 수송 가능될 수 있다. 추가로, 실행할 때, 상기 논의한 기능을 수행하는 컴퓨터 프로그램에 대한 언급은 호스트 컴퓨터에 대한 적용 프로그램 실행으로 제한되지 않는다는 것이 인식되어야 한다. 오히려, 용어 "컴퓨터 프로그램"은 본 명세서에서 상기 기법을 실행하기 위한 하나 이상의 프로세서를 프로그래밍하기 위해 사용될 수 있는 임의의 유형의 컴퓨터 암호(예를 들어, 소프트웨어 또는 마이크로코드)에 대한 일반적 의미로 사용된다.

[0539] GC-풍부 도메인

[0540] 정의

[0541] GC-풍부: 본 명세서에 사용되는 바와 같은, 용어 "GC-풍부"는 구아닌(G) 및/또는 사이토신(C) 핵염기, 또는 이들의 유도체 또는 유사체를 포함하는 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, mRNA), 또는 이의 임의의 부분(예를 들어, RNA 요소)의 핵염기 조성을 지칭하되, GC-함량은 약 50% 더 크다. 용어 "GC-풍부"는 약 50% GC-함량을 포함하는 유전자, 비-암호화 영역, 5'UTR, 3'UTR, 오픈 리딩 프레임, RNA 요소, 서열 모티프, 또는 이들의 임의의 별개의 서열, 단편 또는 세그먼트를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 폴리뉴클레오타이드의 모두 또는 일부를 지칭한



다. 개시내용의 일부 실시형태에서, GC-풍부 폴리뉴클레오타이드, 또는 이의 임의의 부분은 구아닌(G) 및/또는 사이토신(C) 핵염기를 배타적으로 포함한다.

[0542] GC-함량: 본 명세서에 사용되는 바와 같은, 용어 "GC-함량"은 구아닌(G) 및 사이토신(C) 핵염기, 이의 유도체 또는 유사체인 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, mRNA), 또는 이의 일부(예를 들어, RNA 요소)에서의 (DNA에서 그 리고 RNA에서 아데닌(A) 및 티민(T) 또는 유라실(U), 및 이들의 유도체 또는 유사체를 포함하는, 가능한 핵 염기의 총 수로부터) 핵염기의 백분율을 지칭한다. 용어 "GC-함량"은 유전자, 비-암호화 영역, 5' 또는 3'UTR, 오픈 리딩 프레임, RNA 요소, 서열 모티프, 또는 이들의 임의의 별개의 서열, 단편 또는 세그먼트를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 폴리뉴클레오타이드의 모두 또는 일부를 지칭한다.

[0543] 개시 코돈: 본 명세서에 사용되는 바와 같은, 용어 "시작 코돈"과 상호 호환적으로 사용되는 용어 "개시 코돈"은 리보솜에 의해 번역되고 연결된 아데닌-유라실-구아닌 핵염기의 삼중물을 포함하는 오픈 리딩 프레임의 첫번째 코돈을 지칭한다. 개시 코돈은 아데닌(A), 유라실(U) 및 구아닌(G)의 첫번째 글자 암호에 의해 표기되고, 종종 단순히 "AUG"로서 기재된다. 자연적 mRNA는 본 명세서에서 "대안의 개시 코돈"으로서 지칭되는 개시 코돈으로서 AUG 이외의 코돈을 사용할 수 있지만, 본 명세서에 기재된 폴리뉴클레오타이드의 개시 코돈은 AUG 코돈을 사용한다. 번역 개시 과정 동안에, 개시 코돈을 포함하는 서열은 리보솜에 의해 결합된 개시제 tRNA의 안티코돈에 대한 상보성 염기쌍(Met-tRNA<sup>Met</sup>)을 통해 인식된다. 오픈 리딩 프레임은 본 명세서에서 "교번의 개시 코돈"으로서 지칭되는 하나 이상의 AUG 개시 코돈을 함유할 수 있다.

[0544] 개시 코돈은 번역 개시에서 중요한 역할을 한다. 개시 코돈은 리보솜에 의해 번역되는 오픈 리딩 프레임의 첫번째 코돈이다. 전형적으로, 개시 코돈은 뉴클레오타이드 삼중물 AUG를 포함하지만, 그러나, 일부 예에서 번역 개시는 별개의 뉴클레오타이드를 포함하는 다른 코돈에서 일어날 수 있다. 적혈구에서 번역의 개시는 수많은 단백질, 단백질-RNA, 및 전령 RNA 분자(mRNA) 사이의 RNA-RNA 상호작용, 40S 리보솜 소단위, 번역 기작의 다른 성분(예를 들어, 진행 개시 인자; eIF)을 수반하는 다단계 생화학 공정이다. mRNA 번역 개시의 현재의 모델은 특정 번역-촉진 뉴클레오타이드 내용물(코작 서열) 내에 존재하는 첫 번째 AUG 코돈과 마주칠 때까지 뉴클레오타이드를 5'에서 3'으로 스캐닝함으로써 개시전 복합체(대안적으로 "43S 개시전 복합체"; "PIC"로서 약칭)가 mRNA의 보충 부위(전형적으로 5' 캡)로부터 개시 코돈까지 전위된다는 것을 상정한다(Kozak (1989) J Cell Biol 108:229-241). PIC에 의한 스캐닝은 Met-tRNA<sup>Met</sup> 전달 RNA의 개시제의 안티코돈을 포함하는 상보성 염기쌍과 mRNA의 개시 코돈을 포함하는 뉴클레오타이드 사이에서 종결된다. AUG 코돈과 Met-tRNA<sup>Met</sup> 안티코돈 사이의 생성적 염기쌍은 번역 연장에 적절한 활성 리보솜을 형성하기 위해 PIC에 거대 60S 리보솜 소단위의 결합에서 끝나는 일련의 구조적 및 생화학적 사건을 유발한다.

[0545] 코작 서열: 용어 "코작 서열"(또한 "코작 공통 서열"로서 지칭됨)은 유전자 또는 오픈 리딩 프레임의 발현을 향상시키기 위한 그리고 진핵생물에서 5'UTR에 위치된 개시 인핸서 요소를 지칭한다. 코작 공통 서열은 본래 프레 프로인술린 유전자의 번역에 대해 개시 코돈(AUG)을 둘러싸는 단일 돌연변이의 효과 분석 후의 서열 GCCGCC로서 정의되며, 여기서 R = 퓨린이다(Kozak (1986) Cell 44:283-292). 본 명세서에 개시된 폴리뉴클레오타이드는 코작 공통 서열 또는 이의 유도체 또는 변형을 포함한다. (번역 인핸서 조성물 및 이의 사용 방법의 예는, 본 명세서에 전문이 참고로 편입된 미국 특허 제5,807,707호(Andrews *et al.*); 본 명세서에 전문이 참고로 편입된 미국 특허 제5,723,332호; 본 명세서에 전문이 참고로 편입된 미국 특허 제5,891,665호(Wilson)을 참조)

[0546] 누설 스캐닝: "누설 스캐닝(leaky scanning)"으로서 알려진 현상은 개시 코돈을 우회하고 대신에 교번의 또는 대안의 개시 코돈이 인식될 때까지 하류의 스캐닝을 계속하는 경우에 일어날 수 있다. 발생 빈도에 따라서, PIC에 의한 개시코돈의 우회는 번역 효율의 감소를 초래할 수 있다. 더 나아가, 목적하는 치료 반응을 유발하지 못할 수도 있는 원치않는 비정상적 번역 산물의 생성을 초래하는 이 하류의 AUG 코돈으로부터의 번역이 일어날 수 있다. 일부 경우에, 비정상 번역 산물은 사실 해로운 반응을 야기할 수 있다(Kracht *et al.*, (2017) Nat Med 23(4):501-507).

[0547] 변형된: 본 명세서에서 사용되는 "변형된" 또는 "변형"은 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, mRNA)의 조성 또는 구조의 변화된 상태 또는 변화를 지칭한다. 폴리뉴클레오타이드는 화학적으로, 구조적으로 그리고/또는 기능적으로 포함하는 다양한 방법으로 변형될 수 있다. 예를 들어, 폴리뉴클레오타이드는 하나 이상의 RNA 요소의 혼입에 의해 구조적으로 변형될 수 있되, RNA 요소는 하나 이상의 기능(예를 들어, 번역 조절 활성)을 제공하는 서열 및/또는 RNA 2차 구조(들)를 포함한다. 따라서, 본 개시내용의 폴리뉴클레오타이드는 하나 이상의 변형을



포함할 수 있다(예를 들어, 하나 이상의 화학적, 구조적 또는 기능적 변형(이들의 임의의 조합을 포함함)을 포함할 수 있다).

[0548] **핵염기:** 본 명세서에 사용되는 바와 같은, 용어 "핵염기"(대안적으로 "뉴클레오타이드 염기" 또는 "질소 염기")는 핵산 또는 이의 일부 또는 세그먼트에 개선된 특성(예를 들어, 결합 친화도, 뉴클레아제 내성, 화학적 안정성)을 부여하는 천연 유래 퓨린 및 피리미딘의 임의의 유도체 또는 유사체를 포함하는, 핵산에서 발견되는 퓨린 또는 피리미딘 복소환식을 지칭한다. 아데닌, 사이토신, 구아닌, 티민 및 유라실은 천연 핵산에서 우세하게 발견되는 핵염기이다. 당업계에 공지된 바와 같은 그리고/또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 다른 천연, 비천연 및/또는 합성 핵염기는 핵산에 혼입될 수 있다.

[0549] **뉴클레오사이드/뉴클레오타이드:** 본 명세서에 사용되는 바와 같은, 용어 "뉴클레오사이드"는 당 분자(예를 들어, RNA에서 리보스 또는 DNA에서 데옥시리보스), 또는 핵염기(예를 들어, 퓨린 또는 피리미딘)에 공유적으로 연결된 이의 유도체 또는 유사체, 또는 뉴클레오사이드간 연결기(예를 들어, 포스페이트기)를 결여하는 이의 유도체 또는 유사체(또한 본 명세서에서 "핵염기"로서 지칭됨)를 함유하는 화합물을 지칭한다. 본 명세서에 사용되는 바와 같은, 용어 "뉴클레오타이드"는 핵산 또는 이의 일부 또는 세그먼트에 개선된 화학적 및/또는 기능적 특성(예를 들어, 결합 친화도, 뉴클레아제 내성, 화학적 안정성)을 부여하는 뉴클레오사이드간 연결기(예를 들어, 포스페이트기)에 공유 결합된 뉴클레오사이드 또는 이의 임의의 유도체, 유사체 또는 변형을 지칭한다.

[0550] **핵산:** 본 명세서에 사용되는 바와 같은, 용어 "핵산"은 그의 가장 넓은 의미로 사용되며, 뉴클레오타이드, 또는 이의 유도체 또는 유사체의 중합체를 포함하는 임의의 화합물 및/또는 물질을 포함한다. 이들 중합체는 종종 "폴리뉴클레오타이드"로서 지칭된다. 따라서, 본 명세서에서 사용되는 용어 "핵산" 및 "폴리뉴클레오타이드"는 동등하며, 상호 호환적으로 사용된다. 본 개시내용의 예시적인 핵산 또는 폴리뉴클레오타이드는 리보핵산(RNA), 데옥시리보핵산(DNA), DNA-RNA 혼성체, RNAi-유도체, RNAi 제제, siRNA, shRNA, mRNA, 변형된 mRNA, miRNA, 안티센스 RNA, 리보자임, 촉매적 DNA, 삼중 나선 형성을 유도하는 RNA, 트레오스 핵산(TNA), 글리콜 핵산(GNA), 펩타이드 핵산(PNA), 잠금 핵산( $\beta$ -D-리보 입체배치를 갖는 LNA,  $\alpha$ -L-리보 입체배치를 갖는  $\alpha$ -LNA(LNA의 부분 입체이성질체), 2'-아미노 작용기를 갖는 2'-아미노-LNA, 및 2'-아미노 작용기를 갖는 2'-아미노- $\alpha$ -LNA를 포함하는 LNA) 또는 이들의 혼성체를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0551] **핵산 구조:** 본 명세서에 사용되는 바와 같은, 용어 "핵산 구조"("폴리뉴클레오타이드 구조"와 상호 호환적으로 사용됨)는 핵산(예를 들어, mRNA)을 포함하는 연결된 뉴클레오타이드 또는 이의 유도체 또는 유사체의 원자, 화학적 구성성분, 요소, 모티프 및/또는 서열의 배열 또는 조직화를 지칭한다. 상기 용어는 또한 핵산의 2-차원 또는 3-차원 상태를 지칭한다. 따라서, 용어 "RNA 구조"는 RNA 분자(예를 들어, mRNA)를 포함하는, 연결된 뉴클레오타이드 또는 이의 유도체 또는 유사체의 원자, 화학적 구성성분, 요소, 모티프 및/또는 서열의 배열 또는 조직화를 지칭하고/하거나 RNA 분자의 2-차원 및/또는 3-차원 상태를 지칭한다. 핵산 구조는 본 명세서에서 증가된 조직화 복잡성에 기반하여 본 명세서에서 "분자 구조", "1차 구조", "2차 구조" 및 "3차 구조"로서 지칭되는 4개의 조직화 범주로 추가로 경계가 나누어질 수 있다.

[0552] **오픈 리딩 프레임:** 본 명세서에 사용되는 바와 같은, "ORF"로서 약칭되는 용어 "오픈 리딩 프레임"은 폴리펩타이드를 암호화하는 mRNA 분자의 세그먼트 또는 영역을 지칭한다. ORF는 개시 코돈으로 시작하고 정지 코돈으로 종결되는 비-중복, 인프레임 코돈의 연속적 신장을 포함하며, 리보솜에 의해 번역된다.

[0553] **개시전 복합체(PIC):** 본 명세서에 사용되는 바와 같은, 용어 "개시전 복합체"(대안적으로 "43S 개시전 복합체"; "PIC"로서 약칭)는 40S 리보솜 소단위, 진핵생물 개시 인자(eIF1, eIF1A, eIF3, eIF5), 및 본질적으로 mRNA 분자의 5' 캡에 부착될 수 있는 eIF2-GTP-Met-tRNA<sub>Met</sub> 삼중 복합체를 포함하고 부착 후에 5'UTR의 리보솜 스캐닝을 수행할 수 있는, 리보핵단백질 복합체를 지칭한다.

[0554] **RNA 요소:** 본 명세서에 사용되는 바와 같은, 용어 "RNA 요소"는 생물학적 기능을 제공하고/하거나 생물학적 활성(예를 들어, 번역 조절 활성)을 갖는 RNA 분자의 부분, 단편 또는 세그먼트를 지칭한다. 하나 이상의 RNA 요소, 예컨대 본 명세서에 기재된 것의 혼입에 의한 폴리뉴클레오타이드의 변형은 변형된 폴리뉴클레오타이드에 하나 이상의 바람직한 기능적 특성을 제공한다. 본 명세서에 기재된 바와 같은 RNA 요소는 천연 유래, 비-천연 유래, 합성, 조작 또는 이들의 임의의 조합일 수 있다. 예를 들어, 조절 활성을 제공하는 천연 유래 RNA 요소는 바이러스, 원핵 및 진핵 유기체(예를 들어, 인간)의 전사체 전체적으로 발견되는 요소를 포함한다. RNA 요소, 특히 진핵 mRNA 및 번역된 바이러스 RNA는 세포에서 다수의 기능을 매개하는 데 연루되는 것으로 나타났다. 예시적인 천연 RNA 요소는 번역 개시 요소(예를 들어, 내부 리보솜 유입 부위(IRES), 문헌[Kieft *et al.*, (2001)

RNA 7(2):194-206) 참조], 번역 인핸서 요소(예를 들어, APP mRNA 번역 인핸서 요소, 문헌[Rogers *et al.*, (1999) J Biol Chem 274(10):6421-6431] 참조), mRNA 안정성 요소(예를 들어, AU-풍부 요소 (AREs), 문헌[Garneau *et al.*, (2007) Nat Rev Mol Cell Biol 8(2):113-126] 참조), 번역 억제 요소(예를 들어, 문헌[Blumer *et al.*, (2002) Mech Dev 110(1-2):97-112] 참조), 단백질-결합 RNA 요소(예를 들어, 철-반응성 요소, 문헌[Selezneva *et al.*, (2013) J Mol Biol 425(18):3301-3310]), 세포질 폴리아데닐화 요소(Villalba *et al.*, (2011) Curr Opin Genet Dev 21(4):452-457), 및 촉매 RNA 요소(예를 들어, 리보자임, 문헌[Scott *et al.*, (2009) Biochim Biophys Acta 1789(9-10):634-641] 참조)를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0555] 체류 시간: 본 명세서에 사용되는 바와 같은, 용어 "체류 시간"은 개시된 복합체(PIC)의 점유 시간 또는 별개 위치에서의 리보솜 또는 mRNA 분자에 따른 위치를 지칭한다.

[0556] 번역 조절 활성: 본 명세서에 사용되는 바와 같은, 용어 "번역 조절 활성"("번역 조절 작용"과 상호 호환적으로 사용됨)은 생물학적 작용, 메커니즘, 또는 PIC 및/또는 리보솜의 활성을 포함하는 번역 장치의 활성을 조절하는 (예를 들어, 조절하거나, 영향을 미치거나, 제어하거나, 변화시키는) 공정을 지칭한다. 일부 양상에서, 목적하는 번역 조절 활성은 mRNA 번역의 번역 신뢰도를 촉진시키고/시키거나 향상시킨다. 일부 양상에서, 목적하는 번역 조절 활성은 누설 스캐닝을 감소시키고/시키거나 저해한다.

[0557] 폴리펩타이드를 암호화하는 오픈 리딩 프레임은 포함하는 폴리뉴클레오타이드의 번역은 다양한 시스-작용성 핵산 구조에 의해 제공되는 다양한 메커니즘에 의해 제어되고 조절될 수 있다. 예를 들어, 헤어핀 또는 다른 더 고차의(예를 들어, 유사매듭(pseudoknot)) 분자내 mRNA 2차 구조를 형성하는 천연 유래, 시스-작용성 RNA 요소는 폴리뉴클레오타이드에 번역 조절 활성을 제공할 수 있되, RNA 요소는 RNA 요소가 특히 5'-캡 구조에 가까운 5'UTR에 위치될 때 폴리뉴클레오타이드 번역의 개시에 영향을 미치거나 또는 조절한다(Pelletier and Sonenberg (1985) Cell 40(3):515-526; Kozak (1986) Proc Natl Acad Sci 83:2850-2854). 시스-작용성 RNA 요소는 수많은 프레임시프트 사건에 연루된 번역 연장에 영향을 미칠 수 있다(Namy *et al.*, (2004) Mol Cell 13(2):157-168). 내부 리보솜 유입 서열(IRES)은 전형적으로 5'UTR에 위치되지만, 또한 천연 유래 mRNA의 암호화 영역 내에서 발견되는 것으로 보고된 다른 유형의 시스-작용성 RNA 요소를 나타낸다(Holcik *et al.* (2000) Trends Genet 16(10):469-473). 세포의 mRNA에서, IRES는 종종 5'-캡 구조와 함께 존재하고, 캡-의존적 번역이 손상된 조건 하에 번역되는 기능성 능력을 갖는 mRNA를 제공한다(Gebauer *et al.*, (2012) Cold Spring Harb Perspect Biol 4(7):a012245). 다른 유형의 천연 유래 시스-작용성 RNA 요소는 상류의 오픈 리딩 프레임(uORF)을 포함한다. 천연 유래 uORF는 수많은 mRNA의 5'UTR 내에서 특이하게 또는 다양하게 생기며, 주요 ORF 하류의 번역에 보통 부정적으로 영향을 미친다(효소에서 GCN4 mRNA 및 포유류에서 ATF4 mRNA의 주목할 만한 제외, 여기서 uORF는 증가된 eIF2 인산화 조건 하에 하류의 주요 ORF의 번역을 촉진시키는 작용을 함(Hinnebusch (2005) Annu Rev Microbiol 59:407-450)). 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, mRNA)를 포함하는 성분, 구조, 요소, 모티프 및/또는 특정 서열에 의해 제공된 예시적인 번역 조절 활성은 mRNA 안정화 또는 탈안정화(Baker & Parker (2004) Curr Opin Cell Biol 16(3):293-299), 번역 활성화 (Villalba *et al.*, (2011) Curr Opin Genet Dev 21(4):452-457), 및 번역 억제(Blumer *et al.*, (2002) Mech Dev 110(1-2):97-112)를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 연구는 천연 유래, 시스-작용성 RNA 요소가 혼입에 의해 이중성 폴리뉴클레오타이드를 변형시키기 위해 사용될 때 그들의 각각의 기능을 부여할 수 있다는 것을 나타내었다(Goldberg-Cohen *et al.*, (2002) J Biol Chem 277(16):13635-13640).

[0558] 기능성 RNA 요소를 포함하는 변형된 폴리뉴클레오타이드

[0559] 본 개시내용은 변형을 포함하는 합성 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, RNA 요소)를 제공하되, 변형은 목적하는 번역 조절 활성을 제공한다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용은 5' 비번역 영역(UTR), 개시 코돈, 폴리펩타이드를 암호화하는 전체 오픈 리딩 프레임, 3'UTR, 및 적어도 하나의 변형을 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 제공하되, 적어도 하나의 변형은 목적하는 번역 조절 활성, 예를 들어, mRNA 번역의 번역 신뢰도를 촉진시키고/시키거나 향상시키는 변형을 제공한다. 일부 실시형태에서, 목적하는 번역 조절 활성은 시스-작용성 조절 활성이다. 일부 실시형태에서, 목적하는 번역 조절 활성은 개시 코돈에서 또는 개시 코돈에 대해 근위에서 43S 개시전 복합체(PIC) 또는 리보솜의 체류 시간 증가이다. 일부 실시형태에서, 목적하는 번역 조절 활성은 개시 코돈에서 또는 개시 코돈으로부터 폴리펩타이드 합성의 개시 증가이다. 일부 실시형태에서, 목적하는 번역 조절 활성은 전체 오픈 리딩 프레임으로부터 번역된 폴리펩타이드 양의 증가이다. 일부 실시형태에서, 목적하는 번역 조절 활성은 PIC 또는 리보솜에 의해 탈암호화된 개시 코돈의 신뢰도 증가이다. 일부 실시형태에서, 목적하는 번역 조절 활성은 PIC 또는 리보솜에 의한 누설 스캐닝의 저해 또는 감소이다. 일부 실시형태에서, 목적하는 번역 조절 활성은 PIC 또는 리보솜에 의해 개시 코돈을 탈암호화하는 속도의 감소이다. 일부 실시형태에서, 목적하는

번역 조절 활성은 개시 코돈 이외의 mRNA 내의 임의의 코돈에서 폴리펩타이드 합성 개시의 저해 또는 감소이다. 일부 실시형태에서, 목적하는 번역 조절 활성은 전체 오픈 리딩 프레임 이외의 mRNA 내에서 임의의 오픈 리딩 프레임으로부터 번역된 폴리펩타이드 양의 저해 또는 감소이다. 일부 실시형태에서, 목적하는 번역 조절 활성은 비정상 번역 산물 생산의 저해 또는 감소이다. 일부 실시형태에서, 목적하는 번역 조절 활성은 앞서 언급한 번역 조절 활성 중 하나 이상의 조합이다.

[0560] 따라서, 본 개시내용은 폴리뉴클레오타이드, 예를 들어, 서열을 포함하는 RNA 요소를 포함하는 mRNA 및/또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 목적하는 번역 조절 활성을 제공하는 RNA 2차 구조(들)를 제공한다. 일부 양상에서, mRNA는 서열을 포함하는 RNA 요소 및/또는 mRNA 번역의 번역 신뢰도를 촉진시키고/시키거나 향상시키는 RNA 2차 구조(들)를 포함한다. 일부 양상에서, mRNA는 서열을 포함하는 RNA 요소 및/또는 목적하는 번역 조절 활성, 예컨대 누설 스캐닝의 저해 및/또는 감소를 제공하는 RNA 2차 구조(들)를 포함한다. 일부 양상에서, 본 개시내용은 서열을 포함하는 RNA 요소 및/또는 누설 스캐닝을 저해하고/하거나 감소시키는 RNA 2차 구조(들)를 포함하는 mRNA를 제공하여, mRNA의 번역 신뢰도를 촉진시킨다.

[0561] 일부 실시형태에서, RNA 요소는 천연 및/또는 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, RNA 요소는 본 명세서에 기재된 바와 같은 목적하는 번역 조절 활성을 제공하는, 연결된 뉴클레오타이드 서열, 또는 이의 유도체 또는 유사체를 포함한다. 일부 실시형태에서, RNA 요소는 안정한 RNA 2차 구조를 형성하거나 또는 이로 폴딩되는 연결된 뉴클레오타이드 서열, 또는 이의 유도체 또는 유사체를 포함하되, RNA 2차 구조는 본 명세서에 기재된 바와 같은 목적하는 번역 조절 활성을 제공한다. RNA 요소는 요소의 1차 서열(예를 들어, GC-풍부 요소), 요소에 의해 형성된 RNA 2차 구조(예를 들어, 줄기-루프), RNA 분자 내의 요소의 위치(예를 들어, mRNA의 5'UTR 내에 위치), 요소의 생물학적 기능 및/또는 활성(예를 들어, "번역 인핸서 요소") 및 이들의 임의의 조합에 의해 동정되고/되거나 이들에 기반하여 특성규명될 수 있다.

[0562] 일부 양상에서, 본 개시내용은 누설 스캐닝을 저해하고/하거나 mRNA 번역의 번역 신뢰도를 촉진시키는 하나 이상의 구조적 변형을 갖는 mRNA를 제공하되, 구조적 변형 중 적어도 하나는 GC-풍부 RNA 요소이다. 일부 양상에서, 본 개시내용은 적어도 하나의 변형을 포함하는 변형된 mRNA를 제공하되, 적어도 하나의 변형은 mRNA의 5'UTR 내 코작 공통 서열에 선행하는 연결된 뉴클레오타이드의 서열을 포함하는 GC-풍부 RNA 요소, 또는 이의 유도체 또는 유사체이다. 일 실시형태에서, GC-풍부 RNA 요소는 mRNA의 5'UTR 내 코작 공통 서열 상류의 약 30, 약 25, 약 20, 약 15, 약 10, 약 5, 약 4, 약 3, 약 2, 또는 약 1개의 뉴클레오타이드(들)에 위치된다. 다른 실시형태에서, GC-풍부 RNA 요소는 코작 공통 서열 상류의 15-30, 15-20, 15-25, 10-15, 또는 5-10개의 뉴클레오타이드에 위치된다. 다른 실시형태에서, GC-풍부 RNA 요소는 mRNA의 5'UTR 내 코작 공통 서열에 바로 인접하여 위치된다.

[0563] 임의의 앞서 언급한 또는 관련된 양상에서, 본 개시내용은 임의의 순서로 연결된 3-30, 5-25, 10-20, 15-20, 약 20, 약 15, 약 12, 약 10, 약 7, 약 6 또는 약 3 뉴클레오타이드의 서열, 이의 유도체 또는 유사체를 포함하는 GC-풍부 RNA 요소를 제공하되, 서열 조성물은 70-80% 사이토신, 60-70% 사이토신, 50%-60% 사이토신, 40-50% 사이토신, 30-40% 사이토신 염기이다. 임의의 앞서 언급한 또는 관련된 양상에서, 본 개시내용은 임의의 순서로 연결된 3-30, 5-25, 10-20, 15-20, 약 20, 약 15, 약 12, 약 10, 약 7, 약 6 또는 약 3 뉴클레오타이드의 서열, 이의 유도체 또는 유사체를 포함하는 GC-풍부 RNA 요소를 제공하되, 서열 조성물은 약 80% 사이토신, 약 70% 사이토신, 약 60% 사이토신, 약 50% 사이토신, 약 40% 사이토신, 또는 약 30% 사이토신이다.

[0564] 임의의 앞서 언급한 또는 관련된 양상에서, 본 개시내용은 임의의 순서로 연결된 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 또는 3개의 뉴클레오타이드의 서열을 포함하는 GC-풍부 RNA 요소, 또는 이의 유도체 또는 유사체를 제공하되, 서열 조성물은 70-80% 사이토신, 60-70% 사이토신, 50%-60% 사이토신, 40-50% 사이토신, 또는 30-40% 사이토신이다. 임의의 앞서 언급한 또는 관련된 양상에서, 본 개시내용은 임의의 순서로 연결된 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 또는 3개의 뉴클레오타이드의 서열을 포함하는 GC-풍부 RNA 요소, 또는 이의 유도체 또는 유사체를 제공하되, 서열 조성물은 약 80% 사이토신, 약 70% 사이토신, 약 60% 사이토신, 약 50% 사이토신, 약 40% 사이토신, 또는 약 30% 사이토신이다.

[0565] 일부 실시형태에서, 본 개시내용은 적어도 하나의 변형을 포함하는 변형된 mRNA를 제공하되, 적어도 하나의 변형은 mRNA의 5'UTR에서 코작 공통 서열에 선행하는 연결된 뉴클레오타이드의 서열을 포함하는 GC-풍부 RNA 요소, 또는 이의 유도체 또는 유사체이되, GC-풍부 RNA 요소는 mRNA의 5'UTR에서 코작 공통 서열 상류의 약 30, 약 25, 약 20, 약 15, 약 10, 약 5, 약 4, 약 3, 약 2, 또는 약 1개의 뉴클레오타이드(들)에 위치되고, GC-풍부 RNA 요소는 임의의 순서로 연결된 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20



개의 뉴클레오타이드의 서열, 또는 이의 유도체 또는 유사체를 포함하되, 서열 조성물은 50% 초과와 사이토신이다. 일부 실시형태에서, 서열 조성물은 55% 초과와 사이토신, 60% 초과와 사이토신, 65% 초과와 사이토신, 70% 초과와 사이토신, 75% 사이토신, 80% 초과와 사이토신, 85% 초과와 사이토신 또는 90% 초과와 사이토신이다.

[0566] 다른 양상에서, 본 개시내용은 적어도 하나의 변형을 포함하는 변형된 mRNA를 제공하되, 적어도 하나의 변형은 mRNA의 5'UTR 내 코작 공통 서열에 선행하는 연결된 뉴클레오타이드의 서열을 포함하는 GC-풍부 RNA 요소, 또는 이의 유도체 또는 유사체이되, GC-풍부 RNA 요소는 mRNA의 5'UTR 내 코작 공통 서열 상류의 약 30, 약 25, 약 20, 약 15, 약 10, 약 5, 약 4, 약 3, 약 2, 또는 약 1개의 뉴클레오타이드(들)에 위치되고, GC-풍부 RNA 요소는 약 3-30, 5-25, 10-20, 15-20 또는 약 20, 약 15, 약 12, 약 10, 약 6 또는 약 3개의 뉴클레오타이드의 서열, 또는 이의 유도체 또는 유사체를 포함하되, 서열은 반복 GC-모티프를 포함하되, 반복 GC-모티프는  $[CCG]_n$ 이고, 여기서,  $n = 1$  내지 10,  $n = 2$  내지 8,  $n = 3$  내지 6, 또는  $n = 4$  내지 5이다. 일부 실시형태에서, 서열은 반복 GC-모티프  $[CCG]_n$ 을 포함하고, 여기서  $n = 1, 2, 3, 4$  또는 5이다. 일부 실시형태에서, 서열은 반복 GC-모티프  $[CCG]_n$ 을 포함하며, 여기서  $n = 1, 2$  또는 3이다. 일부 실시형태에서, 서열은 반복 GC-모티프  $[CCG]_n$ 을 포함하며, 여기서  $n = 1$ 이다. 일부 실시형태에서, 서열은 반복 GC-모티프  $[CCG]_n$ 을 포함하며, 여기서  $n = 2$ 이다. 일부 실시형태에서, 서열은 반복 GC-모티프  $[CCG]_n$ 을 포함하며, 여기서  $n = 3$ 이다. 일부 실시형태에서, 서열은 반복 GC-모티프  $[CCG]_n$ 을 포함하며, 여기서  $n = 4$ (서열번호 308)이다. 일부 실시형태에서, 서열은 반복 GC-모티프  $[CCG]_n$ 을 포함하며, 여기서  $n = 5$ (서열번호 309)이다.

[0567] 다른 양상에서, 본 개시내용은 적어도 하나의 변형을 포함하는 변형된 mRNA를 제공하되, 적어도 하나의 변형은 mRNA의 5'UTR 내 코작 공통 서열에 선행하는 연결된 뉴클레오타이드의 서열을 포함하는 GC-풍부 RNA 요소, 또는 이의 유도체 또는 유사체이되, GC-풍부 RNA 요소는 표 2에 제시된 서열 중 임의의 하나를 포함한다. 일 실시형태에서, GC-풍부 RNA 요소는 mRNA의 5'UTR 내 코작 공통 서열 상류의 약 30, 약 25, 약 20, 약 15, 약 10, 약 5, 약 4, 약 3, 약 2, 또는 약 1개의 뉴클레오타이드(들)에 위치된다. 다른 실시형태에서, GC-풍부 RNA 요소는 코작 공통 서열 상류의 약 15-30, 15-20, 15-25, 10-15 또는 5-10개의 뉴클레오타이드에 위치된다. 다른 실시형태에서, GC-풍부 RNA 요소는 mRNA의 5'UTR 내 코작 공통 서열에 바로 인접하여 위치된다.

[0568] 다른 양상에서, 본 개시내용은 적어도 하나의 변형을 포함하는 변형된 mRNA를 제공하되, 적어도 하나의 변형은 mRNA의 5'UTR 내 코작 공통 서열에 선행하는 표 2에 제시된 서열 V1[CCCCGGCGCC](서열번호 310)을 포함하는 GC-풍부 RNA 요소, 또는 이의 유도체 또는 유사체이다. 일부 실시형태에서, GC-풍부 요소는 mRNA의 5'UTR 내 코작 공통 서열에 바로 인접한 그리고 상류에 위치된 표 2에 제시된 바와 같은 서열 V1을 포함한다. 일부 실시형태에서, GC-풍부 요소는 mRNA의 5'UTR 내 코작 공통 서열 상류에 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 염기가 위치된 표 2에 제시한 바와 같은 서열 V1을 포함한다. 다른 실시형태에서, GC-풍부 요소는 mRNA의 5'UTR 내 코작 공통 서열 상류에 1-3, 3-5, 5-7, 7-9, 9-12 또는 12-15개의 염기가 위치된 표 2에 제시된 바와 같은 서열 V1을 포함한다.

[0569] 다른 양상에서, 본 개시내용은 적어도 하나의 변형을 포함하는 변형된 mRNA를 제공하되, 적어도 하나의 변형은 mRNA의 5'UTR 내 코작 공통 서열에 선행하는, 표 2에 제시된 바와 같은 서열 V2[CCCCGGC]를 포함하는 GC-풍부 RNA 요소, 또는 이의 유도체 또는 유사체이다. 일부 실시형태에서, GC-풍부 요소는 mRNA의 5'UTR 내 코작 공통 서열에 바로 인접한 그리고 상류에 위치된 표 2에 제시된 바와 같은 서열 V2를 포함한다. 일부 실시형태에서, GC-풍부 요소는 mRNA의 5'UTR 내 코작 공통 서열 상류에 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 염기가 위치된 표 2에 제시한 바와 같은 서열 V2를 포함한다. 다른 실시형태에서, GC-풍부 요소는 mRNA의 5'UTR 내 코작 공통 서열 상류에 1-3, 3-5, 5-7, 7-9, 9-12 또는 12-15개의 염기가 위치된 표 2에 제시된 바와 같은 서열 V2를 포함한다.

[0570] 다른 양상에서, 본 개시내용은 적어도 하나의 변형을 포함하는 변형된 mRNA를 제공하되, 적어도 하나의 변형은 mRNA의 5'UTR 내 코작 공통 서열에 선행하는 표 2에 제시된 바와 같은 서열 EK[GCCGCC]을 포함하는 GC-풍부 RNA 요소, 또는 이의 유도체 또는 유사체이다. 일부 실시형태에서, GC-풍부 요소는 mRNA의 5'UTR 내 코작 공통 서열에 바로 인접한 그리고 상류에 위치된 표 2에 제시된 바와 같은 서열 EK를 포함한다. 일부 실시형태에서, GC-풍부 요소는 mRNA의 5'UTR 내 코작 공통 서열 상류에 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 염기가 위치된 표 2에 제시한 바와 같은 서열 EK를 포함한다. 다른 실시형태에서, GC-풍부 요소는 mRNA의 5'UTR 내 코작 공통 서열 상류에 1-3, 3-5, 5-7, 7-9, 9-12 또는 12-15개의 염기가 위치된 표 2에 제시된 바와 같은 서열 EK를 포함한다.

[0571] 또 다른 양상에서, 본 개시내용은 적어도 하나의 변형을 포함하는 변형된 mRNA를 제공하되, 적어도 하나의 변형

은 mRNA의 5'UTR 내 코작 공통 서열에 선행하는 표 2에 제시한 바와 같은 서열 V1[CCCCGGCGCC](서열번호 310)을 포함하는 GC-풍부 RNA 요소 또는 이의 유도체 또는 유사체이되, 5'UTR은 표 2에 나타내는 다음의 서열을 포함한다:

[0572] GGGAAATAAGAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGA(서열번호 311).

[0573] 일부 실시형태에서, GC-풍부 요소는 표 2에 나타낸 5'UTR 서열 내 코작 공통 서열에 바로 인접한 그리고 상류에 위치한 표 2에 제시된 바와 같은 서열 V1을 포함한다. 일부 실시형태에서, GC-풍부 요소는 mRNA의 5'UTR 내 코작 공통 서열 상류에 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 염기가 위치한 표 2에 제시한 바와 같은 서열 V1을 포함하되, 5'UTR은 표 2에 나타낸 다음의 서열을 포함한다:

[0574] GGGAAATAAGAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGA(서열번호 312).

[0575] 다른 실시형태에서, GC-풍부 요소는 mRNA의 5'UTR 내 코작 공통 서열 상류에 1-3, 3-5, 5-7, 7-9, 9-12 또는 12-15개의 염기가 위치한 표 1에 제시된 바와 같은 서열 V1을 포함하되, 5'UTR은 표 2에 나타낸 다음의 서열을 포함한다:

[0576] GGGAAATAAGAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGA(서열번호 312).

[0577] 일부 실시형태에서, 5'UTR은 표 2에 제시된 다음의 서열을 포함한다:

[0578] GGGAAATAAGAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGACCCGGCGCCGCCACC(서열번호 313).

표 2

[0579]

서열번호	5'UTR	5'UTR 서열
314	표준	GGGAAATAAGAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACC
313	V1-UTR	GGGAAATAAGAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGACCCGGCGCCGCCACC
315	V2-UTR	GGGAAATAAGAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGACCCGGCGCCGCCACC
	<b>GC-풍부 RNA 요소</b>	<b>서열</b>
	KO(전통적 코작 공통)	[GCCA/GCC]
	EK	[GCCGCC]
310	V1	[CCCCGGCGCC]
	V2	[CCCCGGC]
	(CCG) <sub>n</sub> , 여기서 n=1-10	[CCG] <sub>n</sub>
	(GCC) <sub>n</sub> , 여기서 n=1-10	[GCC] <sub>n</sub>

[0580] 다른 양상에서, 본 개시내용은 적어도 하나의 변형을 포함하는 변형된 mRNA를 제공하되, 적어도 하나의 변형은 헤어핀 또는 줄기-루프를 형성하는 순서로 연결된 뉴클레오타이드의 서열을 포함하는 안정한 RNA 2차 구조 또는 이의 유도체 또는 유사체를 포함하는 GC-풍부 RNA 요소이다. 일 실시형태에서, 안정한 RNA 2차 구조는 코작 공통 서열의 상류에 있다. 다른 실시형태에서, 안정한 RNA 2차 구조는 코작 공통 서열 상류에 약 30, 약 25, 약 20, 약 15, 약 10, 또는 약 5개의 뉴클레오타이드가 위치된다. 다른 실시형태에서, 안정한 RNA 2차 구조는 코작 공통 서열 상류에 약 20, 약 15, 약 10 또는 약 5개의 뉴클레오타이드가 위치된다. 다른 실시형태에서, 안정한 RNA 2차 구조는 코작 공통 서열 상류에 약 5, 약 4, 약 3, 약 2, 약 1개의 뉴클레오타이드가 위치된다. 다른 실시형태에서, 안정한 RNA 2차 구조는 코작 공통 서열 상류에 약 15-30, 약 15-20, 약 15-25, 약 10-15, 또는 약 5-10개의 뉴클레오타이드가 위치된다. 다른 실시형태에서, 안정한 RNA 2차 구조는 코작 공통 서열 상류에 12 내지 15개의 뉴클레오타이드가 위치된다. 다른 실시형태에서, 안정한 RNA 2차 구조는 약 -30 kcal/mol, 약 -20 내지 -30 kcal/mol, 약 -20 kcal/mol, 약 -10 내지 -20 kcal/mol, 약 -10 kcal/mol, 약 -5 내지 -10 kcal/mol의 델타 G(deltaG)를 가진다.

[0581] 다른 실시형태에서, 변형은 폴리펩타이드를 암호화하는 오픈 리딩 프레임에 작동 가능하게 연결되며 변형 및 오픈 리딩 프레임은 이중성이다.

[0582] 다른 실시형태에서, GC-풍부 RNA 요소의 서열은 구아닌(G) 및 사이토신(C) 핵염기를 배타적으로 포함한다.

[0583] 본 명세서에 기재된 바와 같은 목적하는 번역 조절 활성을 제공하는 RNA 요소는 공지된 기법, 예컨대 리보솜 프



로파일링을 이용하여 동정되고 특성규명될 수 있다. 리보솜 프로파일링은 mRNA에 결합된 PIC 및/또는 리보솜의 위치 결정을 허용하는 기법이다(예를 들어, 본 명세서에 참고로 편입된 문헌[Ingolia *et al.*, (2009) Science 324(5924):218-23] 참조). 기법은 뉴클레아제 분해로부터, PIC 및/또는 리보솜에 의한 mRNA의 영역 또는 세그먼트의 보호에 기반한다. 보호는 '풋프린트'로 칭해지는 RNA의 30bp 단편 생성을 초래한다. RNA 풋프린트의 서열 및 빈도는 당업계에 공지된 방법(예를 들어, RNA-seq)에 의해 분석될 수 있다. 풋프린트는 리보솜의 A-부위 상에 거의 집중된다. PIC 또는 리보솜이 mRNA를 따라서 특정 위치 또는 자리에 있다면, 이들 위치에서 생성된 풋프린트는 상대적으로 통상적이다. 연구는 더 많은 풋프린트가 PIC 및/또는 리보솜이 감소된 지속성을 나타내는 위치에서 생성되고 더 적은 풋프린트가 PIC 및/또는 리보솜이 증가된 지속성을 나타내는 위치에서 생성된다는 것을 나타내었다(Gardin *et al.*, (2014) eLife 3:e03735). 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 RNA 요소 중 임의의 하나 이상을 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 따라서 별개의 위치 또는 자리에서 PIC 또는 리보솜의 체류 시간 또는 점유 시간은 리보솜 프로파일링에 의해 결정된다.

[0584] 치료 방법

[0585] 본 명세서에서 인간 및 다른 포유류에서 암의 예방 및/또는 치료를 위한 조성물(예를 들어, 약제학적 조성물), 방법, 키트 및 시약이 제공된다. 암 RNA 백신은 치료제 또는 예방제로서 사용될 수 있다. 그들은 암을 예방하고/하거나 치료하기 위한 의약에서 사용될 수 있다. 예시적 양상에서, 본 개시내용의 암 RNA 백신은 암으로부터 예방적 보호를 제공하기 위해 사용된다. 암으로부터의 예방적 보호는 본 개시내용의 암 RNA 백신의 투여 후에 달성될 수 있다. 백신은 1회, 2회, 3회, 4회 이상 투여될 수 있지만, 백신을 1회(선택적으로 이어서 단일 부스터) 투여하는 것으로 충분할 가능성이 있다. 치료 반응을 달성하기 위해 암을 갖는 개체에게 백신을 투여하는 것은 더 바람직하다. 그에 따라 투약은 조절될 필요가 있을 수 있다.

[0586] 일단 mRNA 백신이 합성되면, 이는 환자에게 투여된다. 일부 실시형태에서, 백신은 2개월까지, 3개월까지, 4개월까지, 5개월까지, 6개월까지, 7개월까지, 8개월까지, 9개월까지, 10개월까지, 11개월까지, 1년까지, 1과 1/2년까지, 2년까지, 3년까지 또는 4년까지 동안의 스케줄로 투여된다. 스케줄은 동일하거나 또는 변할 수 있다. 일부 실시형태에서, 스케줄은 처음 3주 동안 매주이고, 이어서, 이후는 매달이다.

[0587] 백신은 임의의 경로에 의해 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 백신은 IM 또는 IV 경로에 의해 투여된다.

[0588] 치료의 임의의 시점에, 백신 내 돌연변이가 여전히 적절한지의 여부를 결정하기 위해 환자는 시험될 수 있다. 해당 분석에 기반하여, 백신은 하나 이상의 상이한 돌연변이를 포함하도록 또는 하나 이상의 돌연변이를 제거하도록 조절되거나 또는 재구성될 수 있다.

[0589] 치료적 및 예방적 조성물

[0590] 본 명세서에서, 예를 들어, 인간 및 다른 포유류에서 암의 예방, 치료 또는 진단을 위한 조성물(예를 들어, 약제학적 조성물), 방법, 키트 및 시약이 제공되며, 암 RNA 백신은 치료제 또는 예방제로서 사용될 수 있다. 그들은 암을 예방하고/하거나 치료하기 위한 의약으로서 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 암 백신은, 예를 들어, 생체외에서 말초 혈액 단핵구 세포(PBMC)를 활성화하기 위해 면역 효과기 세포의 프라이밍에 사용하고, 이어서 대상체에게 주입(재주입)되는 데 사용하기 위해 상정될 수 있다.

[0591] 예시적인 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 RNA 폴리뉴클레오타이드를 함유하는 암 백신은 대상체(예를 들어, 포유류 대상체, 예컨대 인간 대상체)에게 투여될 수 있고, RNA 폴리뉴클레오타이드는 항원 폴리펩타이드를 생산하기 위해 생체내에서 번역된다.

[0592] 암 RNA 백신은 세포, 조직 또는 유기체에서 폴리펩타이드(예를 들어, 항원 또는 면역원)의 번역에 대해 유도될 수 있다. 예시적인 실시형태에서, 이러한 번역이 생체외에서, 배양물에서 또는 시험관내에서 일어나는 실시형태가 상정될 수 있지만, 이러한 번역은 생체내에서 일어난다. 예시적인 실시형태에서, 세포, 조직 또는 유기체는 항원 폴리펩타이드를 암호화하는 적어도 하나의 번역 가능한 영역을 갖는 폴리뉴클레오타이드를 함유하는 암 RNA 백신을 함유하는 유효량의 조성물과 접촉된다.

[0593] "유효량"의 암 RNA 백신은 표적 조직, 표적 세포 유형, 투여 수단, 폴리뉴클레오타이드의 물리적 특징(예를 들어, 변형된 뉴클레오타이드의 크기 및 정도) 및 암 RNA 백신의 다른 성분 및 다른 결정소에 적어도 부분적으로 기반하여 제공된다. 일반적으로, 유효량의 암 RNA 백신 조성물은 바람직하게는 동일한 항원 또는 펩타이드 항원을 암호화하는 대응하는 비변형 폴리뉴클레오타이드를 함유하는 조성물보다 더 효율적으로 세포 내 항원 생산 작용으로서 유도된 또는 증강된 면역 반응을 제공한다. 증가된 항원 생산은 증가된 세포 형질감염(RNA 백신으로 형질감염된 세포의 백분율), 폴리뉴클레오타이드로부터의 증가된 단백질 번역, 감소된 핵산 분해(예를 들어, 변

형된 폴리뉴클레오타이드의 증가된 지속기간에 의해 입증됨)에 의해 입증될 수 있다.

- [0594] 일부 실시형태에서, 본 개시내용에 따른 RNA 백신(그들의 암호화된 폴리펩타이드를 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 포함)은 암의 치료를 위해 사용될 수 있다.
- [0595] 암 RNA 백신은 건강한 개체에 대한 활성 면역 계획의 부분으로서 또는 암에서 초기에 또는 증상의 개시 후 활성 암 동안 예방적으로 또는 치료적으로 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 세포, 조직 또는 대상체에게 제공된 본 개시내용의 RNA 백신의 양은 면역 예방에 대해 효과적인 양일 수 있다.
- [0596] 암 RNA 백신은 다른 예방적 또는 치료적 화합물과 함께 투여될 수 있다. 비제한적 예로서, 예방적 또는 치료적 화합물은 면역 강화제, 아췌반트, 또는 부스터일 수 있다. 본 명세서에 사용되는 바와 같은 조성물, 예컨대 백신을 언급할 때, 용어 "부스터"는 예방적(백신) 조성물의 추가 투여를 지칭한다. 부스터(또는 부스터 백신)는 예방적 조성물의 초기 투여 후에 제공될 수 있다. 예방적 조성물의 초기 투여와 부스터 사이의 투여 시간은 1분, 2분, 3분, 4분, 5분, 6분, 7분, 8분, 9분, 10분, 15분, 20분, 35분, 40분, 45분, 50분, 55분, 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 7시간, 8시간, 9시간, 10시간, 11시간, 12시간, 13시간, 14시간, 15시간, 16시간, 17시간, 18시간, 19시간, 20시간, 21시간, 22시간, 23시간, 1일, 36시간, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 1주, 10일, 2주, 3주, 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 10개월, 11개월, 1년, 18개월, 2년, 3년, 4년, 5년, 6년, 7년, 8년, 9년, 10년, 11년, 12년, 13년, 14년, 15년, 16년, 17년, 18년, 19년, 20년, 25년, 30년, 35년, 40년, 45년, 50년, 55년, 60년, 65년, 70년, 75년, 80년, 85년, 90년, 95년 또는 99년 초과일 수 있지만, 이들로 제한되지 않는다. 예시적 실시형태에서, 예방적 조성물의 초기 투여와 부스터 사이의 투여 시간은 1주, 2주, 3주, 1개월, 2개월, 3개월, 6개월 또는 1년일 수 있지만, 이들로 제한되지 않는다.
- [0597] 일 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 당업계에 공지된 백신의 투여와 유사하게 근육내로 또는 진피내로 투여될 수 있다.
- [0598] mRNA 암 백신은 암의 중증도 또는 충족되지 않는 의학적 필요 정도 또는 수준에 따라서 다양한 상황에서 이용될 수 있다. 비제한적 예로서, mRNA 암 백신은 임의의 병기의 암을 치료하기 위해 이용될 수 있다. mRNA 암 백신은 그들이 훨씬 더 큰 항체 역가, T 세포 반응을 생산하고 상업적으로 이용 가능한 항암 백신보다 더 빨리 반응을 생산한다는 점에서 우수한 특성을 가진다. 이론에 의해 구속되는 일 없이, 본 발명자들은 mRNA 암 백신이 천연 세포 기작을 끌어들이기 때문에 mRNA로서 mRNA 암 백신은 번역 시 적절한 단백질 입체배치를 생산하도록 더 양호하게 설계된다는 가설을 세웠다. 생체외에서 제조하고 원치않는 세포 반응을 촉발할 수 있는 전통적인 백신과 달리, mRNA 암 백신은 더 천연의 방식으로 세포계에 제공된다.
- [0599] mRNA 백신이 치료할 수 있는 암의 비제한적 목록을 이하에 제시한다. 펩타이드 에피토프 또는 항원은 이들 암 또는 종양의 임의의 항원으로부터 유래될 수 있다. 이러한 에피토프는 암 또는 종양 항원으로서 지칭된다. 암 세포는 상이한 단계의 종양 진행 동안 세포 표면 분자를 차별적으로 발현시킬 수 있다. 예를 들어, 암 세포는 양성 상태에서 세포 표면 항원을 발현시킬 수 있고, 이제 전이 시 당해 특정 세포 표면을 하향 조절한다. 이렇게 해서, 종양 또는 암 항원은 암 진행의 임의의 병기 동안 생산된 항원을 포함할 수 있다는 것이 상정된다. 본 발명의 방법은 이들 변화를 위해 수용되도록 조절될 수 있다. 예를 들어, 몇몇 상이한 mRNA 백신은 특정 환자에 대해 생성될 수 있다. 예를 들어 제1 백신은 치료의 시작 시 사용될 수 있다. 이후의 시점에, 새로운 mRNA 백신이 생성되고 발현 중인 상이한 항원을 처리하기 위해 환자에게 투여될 수 있다.
- [0600] 일부 실시형태에서, 종양 항원은 다음의 항원 중 하나이다: CD2, CD19, CD20, CD22, CD27, CD33, CD37, CD38, CD40, CD44, CD47, CD52, CD56, CD70, CD79, CD137, 4- IBB, 5T4, AGS-5, AGS-16, 안지오포이에틴 2, B7.1, B7.2, B7DC, B7H1, B7H2, B7H3, BT-062, BTLA, CAIX, 암배아 항원, CTLA4, Cripto, ED-B, ErbB1, ErbB2, ErbB3, ErbB4, EGFL7, EpCAM, EphA2, EphA3, EphB2, FAP, 피브로넥틴, 엽산 수용체, 강글리오사이드 GM3, GD2, 글루코코르티코이드-유도 종양 괴사 인자 수용체(GITR), gp100, gpA33, GPNMB, ICOS, IGF1R, 인테그린 av, 인테그린  $\alpha v \beta$ , LAG-3, 루이스 Y, 메조텔린, c-MET, MN 탄산무수화효소 IX, MUC1, MUC16, Nectin-4, NKGD2, NOTCH, OX40, OX40L, PD-1, PDL1, PSCA, PSMA, RANKL, ROR1, ROR2, SLC44A4, 신테칸-1, TACI, TAG-72, 테나신, TIM3, TRAILR1, TRAILR2, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, 및 이들의 변이체.
- [0601] 암 또는 종양은 신생물, 악성 종양, 전이, 또는 그것이 암성으로 고려되도록 제어되지 않은 세포 성장을 특징으로 하는 임의의 질환 또는 장애를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 암은 1차 또는 전이성 암일 수 있다. 본 발명에 따라 치료될 수 있는 특정 암은 이하에 열거되는 것을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다(이러한

장애의 검토를 위해, 문헌[Fishman *et al.*, 1985, Medicine, 2d Ed., J.B. Lippincott Co., Philadelphia] 참조). 암은 담관암; 방광암; 교아세포종 및 수아세포종을 포함하는 뇌암; 유방암; 자궁경부암; 융모막암종; 결장암; 자궁내막암; 식도암; 위암; 급성 림프구성 및 골수성 백혈병을 포함하는 혈액학적 신생물; 다발성 골수종; AIDS-연관 백혈병 및 성인 T-세포 백혈병 림프종; 보웬병 및 파제트병을 포함하는 상피내 신생물; 갑암; 폐암; 호지킨병 및 림프구성 림프종을 포함하는 림프종; 신경모세포종; 편평세포암종을 포함하는 경구암; 상피세포, 기질 세포, 생식 세포 및 간충직 세포로부터 생기는 것을 포함하는 난소암; 췌장암; 전립선 암; 직장암; 평활근 육종, 횡문근육종, 지방육종, 섬유육종 및 골육종을 포함하는 육종; 흑색종, 카포시 육종, 기저세포암 및 편평 세포암을 포함하는 피부암; 생식종양, 예컨대 정상피종, 비정상피종, 기형종, 융모막암종을 포함하는 고환암; 간질 종양 및 생식 세포 종양; 갑상선 선암종 및 수질 암종을 포함하는 갑상선암; 및 선암종 및 율름 종양을 포함하는 신장암을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 통상적으로 접하는 암은 유방, 전립선, 폐, 난소, 결장 직장 및 뇌암을 포함한다.

[0602] 일부 실시형태에서, 암은 비소세포 폐암(NSCLC), 소세포 폐암, 흑색종, 방광 요로 상피 암종, HPV-음성 두경부 편평세포 암종(HNSCC) 및 고빈도 미세부수체인 고형 악성 종양 (MSI H)/미스매치 수선(MMR) 결여로 이루어진 군 으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, NSCLC는 EGFR 민감성 돌연변이 및/또는 ALK 전좌를 결여한다. 일부 실시형태에서, 고빈도 미세부수체인 고형 악성 종양(MSI H)/미스매치 수선(MMR) 결핍은 결장직장암, 위 선암종, 식도 선암종 및 자궁내막암으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 암은 췌장, 복막, 대장, 소장, 담관, 폐, 자궁내막, 난소, 생식관, 위장관, 자궁경부, 위, 요로, 결장, 직장 및 조혈 및 림프구 조직의 암 으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 암은 결장직장암이다.

[0603] 본 명세서에서 선택적으로 하나 이상의 약제학적으로 허용 가능한 부형제와 조합하여 암 RNA 백신 및 RNA 백신 조성물 및/또는 복합체를 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다.

[0604] 암 RNA 백신은 단독으로 또는 하나 이상의 다른 성분과 함께 제형화되거나 또는 투여될 수 있다. 예를 들어, 암 RNA 백신(백신 조성물)은 면역 강화제(예를 들어, 아췌반트)를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 다른 성분을 포함한다. 일부 실시형태에서, 암 RNA 백신은 면역 강화제 또는 아췌반트를 포함하지 않는다(즉, 그들은 면역 강화제 또는 아췌반트가 없다).

[0605] 다른 실시형태에서 본 명세서에 기재된 mRNA 암 백신은 환자를 치료하는 데 유용한 임의의 다른 요법과 조합될 수 있다. 예를 들어 환자는 mRNA 암 백신 및 항암제로 치료될 수 있다. 따라서, 일 실시형태에서, 본 발명의 방법은 하나 이상의 암치료제와 함께, 예를 들어, 항암제, 전통적인 암 백신, 화학요법, 방사선요법 등과 함께(예를 들어, 동시에 또는 전반적 치료 절차의 부분으로서) 사용될 수 있다. 다를 수 있는 암 치료의 매개변수는 투약량, 투여 시간 또는 지속기간 또는 요법을 포함하지만, 이들로 제한되지 않으며; 암 치료는 투약량, 시간 또는 지속기간이 다를 수 있다. 암에 대한 다른 치료는 단독으로 또는 임의의 이전의 치료 방법과 조합하여 이용될 수 있는 수술이다. 유용한 것으로 알려져 있거나, 또는 사용되었거나 또는 암의 예방 또는 치료를 위해 현재 사용 중인 임의의 제제 또는 요법(예를 들어, 전통적인 암 백신, 화학요법, 방사선 요법, 수술, 호르몬 요법, 및/또는 생물학적 요법/면역요법)은 본 명세서에 기재된 본 발명에 따라 본 발명의 조성물과 조합하여 사용될 수 있다. 의학 분야의 당업자는 대상체에 대한 적절한 치료를 결정할 수 있다.

[0606] 이러한 제제(즉, 항암제)의 예는 알킬화제(예를 들어, 질소 머스터드, 예를 들어, 클로람부실, 사이클로포스파마이드, 아이소파마이드, 메클로레타민, 멜팔란, 유라실 머스터드를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 DNA-상호작용 제제; 아지리딘, 예컨대 티오테파; 메탄설폰에이트 에스터, 예컨대 부설판; 나이트로소 유레아, 예컨대 카무스틴, 로무스틴, 스트렙토조신; 백금 착물, 예컨대 시스플라틴, 카보플라틴; 생체환원성 알킬화제, 예컨대 미토마이신, 및 프로카바진, 다카바진 및 알트레타민); DNA 가닥-파괴제, 예를 들어, 블레오마이신; 개재 토 포아이스머라제 II 저해제, 예를 들어, 개재 약물(Intercalator), 예컨대 암사크린, 닥티노마이신, 다우노루비신, 독소루비신, 이다루비신, 미톡산트론 및 비개재 약물, 예컨대 에토포사이드 및 테니포사이드; 비개재성 토 포아이스머라제 II 저해제, 예를 들어, 에토포사이드 및 테니포사이드; 및 DNA 소홈(minor groove) 결합제, 예를 들어, 플리카마이딘; 엽산 길항제, 예컨대 메토틱세이트 및 트라이메톱세이트를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 항대사물질; 피리미딘 길항제s, 예컨대 플루오로유라실, 플루오로데옥시유리딘, CB3717, 아자시티딘 및 플록수리딘; 퓨린 길항제, 예컨대 머캅토피린, 6-티오구아닌, 펜토스타틴; 당 변형 유사체, 예컨대 사이타라빈 및 플루다라빈; 및 리보뉴클레오타이드 환원효소 저해제, 예컨대 하이드록시유레아; 콜키신, 빈크리스틴 및 빈블라스틴, 알칼로이드와 파클리탁살 및 사이톡산을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 튜블린 상호작용제; 에스트로겐, 접합된 에스트로겐 및 에틸일 에스트라다이올 및 다이에틸stil베스테를, 클로르트라이아니센 및 이텐스트롤을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 호르몬제; 프로게스틴, 예컨대 하이드록시프로게스테론 카프로에

이트, 메드록세프로게스테론, 및 메게스트롤; 및 안드로겐, 예컨대 테스토스테론, 테스토스테론 프로피오네이트; 플루옥시메스테론, 메틸테스토스테론; 부신 코르티코스테로이드, 예를 들어, 프레드니손, 텍사 메타손, 메틸프레드니솔론 및 프레드니솔론; 황체형성호르몬 방출 호르몬 제제 또는 성선자극호르몬-방출 호르몬 길항제, 예를 들어, 류프로라이드 아세테이트 및 고세렐린 아세테이트; 항발정 호르몬제, 예컨대 타목시펜, 항안드로겐 제제, 예컨대 플루타마이드를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 항호르몬 항원; 및 항부신제, 예컨대 미토탄 및 아미노글루테티마이드; IL-1.알파., IL-1  $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-18, TGF- $\beta$ , GM-CSF, M-CSF, G-CSF, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , LAF, TCGF, BCGF, TRF, BAF, BDG, MP, LIF, OSM, TMF, PDGF, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , 및 유테로글로빈을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 사이토카인(미국 특허 제5,696,092호); VEGF(예를 들어, 다른 중성화 항체)를 저해하는 제제, 가용성 수용체 작제물, 타이로신 키나제 저해제, 안티센스 전략, RNA 앵타머 및 VEGF 또는 VEGF 수용체에 대한 리보자임, 면역독소 및 코아글리난트, 종양 백신 및 항체를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 항혈관신생제를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0607]

본 발명에 따라 사용될 수 있는 항암제의 구체적 예는 아시비신; 아칼루비신; 아코다졸 하이드로클로라이드; 아크로닌; 아도젤레신; 알테스류킨; 알트레타민; 암보마이신; 아메탄트론 아세테이트; 아미노글루테티마이드; 암사크린; 아나스트로졸; 안트라마이신; 아스파라기나제; 아스피린; 아자시타딘; 아제테파; 아조토마이신; 바티마스맷; 벤조데파; 비갈루타마이드; 비산트렌 하이드로클로라이드; 비스나파이드 다이메실레이트; 비젤레신; 블레오마이신 설페이트; 브레퀴나르 나트륨; 브로피리민; 부셀판; 캅티노마이신; 칼루스테론; 카라세마이드; 카르베티머; 카보플라틴; 카무스틴; 카루비신 하이드로클로라이드; 카르젤레신; 세테핀골; 클로람부실; 시롤레마이신; 시스플라틴; 클라드리빈; 크리스나톨 메실레이트; 사이클로포스파마이드; 사이타라빈; 다카르바진; 닥티노마이신; 다우노루비신 하이드로클로라이드; 데시타빈; 텍소르마플라틴; 데자구아닌; 데자구아닌 메실레이트; 다이아지쿠온; 도세탁셀; 독소루비신; 독소루비신 하이드로클로라이드; 드롤록시펜; 드롤록시펜 시트레이트; 드로모스타놀론 프로피오네이트; 두아조마이신; 에다트렉세이트; 에플로미틴 하이드로클로라이드; 엘사미트루신; 엔로플라틴; 엔프로메이트; 에피프로피딘; 에피루비신 하이드로클로라이드; 에르볼로졸; 에소루비신 하이드로클로라이드; 에스트라무스틴; 에스트라무스틴 포스페이트 나트륨; 에타니다졸; 에토포사이드; 에토포사이드 포스페이트; 에토프린; 파드로졸 하이드로클로라이드; 파자라빈; 펜레티나이드; 플록수리딘; 플루다라빈 포스페이트; 플루오로유라실; 플루로시타빈; 포스퀴돈; 포스트라이에신 나트륨; 겐시타빈; 겐시타빈 하이드로클로라이드; 하이드록시유레아; 이다루비신 하이드로클로라이드; 이포스파마이드; 일모포신; 인터류킨 II(재조합 인터류킨 II, 또는 rIL2를 포함), 인터페론 알파-2a; 인터페론 알파-2b; 인터페론 알파-n1; 인터페론 알파-n3; 인터페론 베타-I a; 인터페론 감마-I b; 이프로플라틴; 이리노테칸 하이드로클로라이드; 란레오타이드 아세테이트; 레트로졸; 류프로라이드 아세테이트; 리아로졸 하이드로클로라이드; 로메트렉솔 나트륨; 로무스틴; 로속산트론 하이드로클로라이드; 마소프로콜; 메이탄신; 메클로르에타민 하이드로클로라이드; 메게스트론 아세테이트; 멜레게스트롤 아세테이트; 멜팔란; 메노가릴; 머캅토피린; 메토티렉세이트; 메토티렉세이트 나트륨; 메토프린; 메투레데파; 미틴도마이드; 미토카르신; 미토크로민; 미토길린; 미토말신; 미토마이신; 미토스파; 미토탄; 미톡산트론 하이드로클로라이드; 마이코페놀산; 노코다졸; 노갈라마이신; 오르마플라틴; 옥시수란; 파클리탁셀; 페가스파르가제; 펠리오마이신; 펜타무스틴; 페플로마이신 설페이트; 페르포스파마이드; 피포브로만; 피포셀판; 피록산트론 하이드로클로라이드; 플리카마이신; 플로메스탄; 포르피머 나트륨; 포르피로마이신; 프레드니무스틴; 프로카바진 하이드로클로라이드; 퓨로마이신; 퓨로마이신 하이드로클로라이드; 피라조푸린; 리보프린; 로글레티마이드; 사핀골; 사핀골 하이드로클로라이드; 세무스틴; 심트라젠; 스파르포세이트 나트륨; 스파르소마이신; 스피로게르마늄 하이드로클로라이드; 스피로무스틴; 스피로플라틴; 스트렙토니그린; 스트렙토조신; 설로페누; 탈아이소마이신; 테코갈란 나트륨; 테가푸르; 텔록산트론 하이드로클로라이드; 테모포르핀; 테니포사이드; 테록시론; 테스톨락톤; 티아미프린; 티오구아닌; 티오데파; 티아조푸린; 티라파자민; 토레미펜 시트레이트; 트레스톨론 아세테이트; 트라이시리빈 포스페이트; 트라이메트렉세이트; 트라이메트렉세이트 글루쿠로네이트; 트립토텔린; 투볼로졸 하이드로클로라이드; 유라실 머스터드; 유레데파; 바프레오타이드; 베르테포르핀; 빈블라스틴 설페이트; 빈크리스틴 설페이트; 빈데신; 빈데신 설페이트; 비네피딘 설페이트; 빈글리시네이트 설페이트; 빈류로신 설페이트; 비노렐빈 타르트레이트; 빈로시딘 설페이트; 빈줄리딘 설페이트; 보로졸; 제니플라틴; 지노스타틴; 및 조루비신 하이드로클로라이드를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0608]

다른 항암 약물은 20-에피-1,25 다이하이드록시비타민 D3; 5-에틴일유라실; 혈관신생 저해제; 항-등축화 결정형태발생 단백질-1; 아라-CDP-DL-PTBA; BCR/ABL 길항제; CaRest M3; CARN 700; 카제인 키나제 저해제(ICOS); 클로트리마졸; 콜리스마이신 A; 콜리스마이신 B; 콤프레타스타틴 A4; 크람베시딘816; 크립토피신 8; 큐라신 A; 데하이드로다이텐닌 B; 다이텐닌 B; 다이하이드로-5-아자사이티딘; 다이하이드로탁솔, 듀오카르마이신 SA; 카할



라라이드 F; 라멜라린-N 트라이아세테이트; 류프롤라이드+에스트로겐+프로게스테론; 리소클린아마이드 7; 모노포스포릴 지질 A+마이오박테리움 세포벽 sk; N-아세틸디날린; N-치환된 벤즈아마이드; 06-벤질구아닌; 플라세틴 A; 플라세틴 B; 백금 착물; 백금 화합물; 백금-트라이아민 착물; 레늄 Re 186 에티드로네이트; RII 레틴아마이드; 루비기는 B 1; SarCNU; 사르코피톨 A; 사르그라모스탐; 노화 유래 저해제 1; 스피카마이신 D; 탈리무스틴; 5-플루오로유라실; 트롬보포이에틴; 티모트리난; 갑상선 자극 호르몬; 바리올린 B; 탈리도마이드; 베라세울; 베라민; 베르딘; 베르테포르핀; 비노렐빈; 빈살틴; 비탁신; 자노테론; 제니플라틴; 및 질라스코브를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0609] 본 발명은 또한 x-선, 감마선 및 암세포를 파괴하기 위한 방사선의 다른 공급원의 사용을 포함하는 방사선 요법과 병용하여, mRNA 암 백신을 포함하는 조성물의 투여를 포함한다. 바람직한 실시형태에서, 방사선 치료는 외부 빔 방사선 또는 원격치료법으로서 투여되며, 방사선은 원거리 공급원으로부터 보내진다. 다른 바람직한 실시형태에서, 방사선 치료는 내부 요법 또는 근접 방사선치료로서 투여되며, 방사성 선원은 암세포 또는 종양 덩어리에 근접하여 신체 내에 위치된다.

[0610] 구체적 실시형태에서, 적절한 항암 요법은 암 유형에 따라 선택된다. 예를 들어, 난소암을 갖는 환자는 복강내 방사선 요법, 예컨대 P32 요법, 전체 복부 및 골반 방사선 요법, 시스플라틴, 파클리탁셀(탁셀) 또는 도세탁셀(탁소텔)의 조합 및 시스플라틴 또는 카보플라틴, 사이클로포스파마이드와 시스플라틴의 조합물, 사이클로포스파마이드와 카보플라틴의 조합물, 5-FU와 류코보린의 조합물, 에토포사이드, 리포솜 독소루비신, 겐시타빈 또는 토포테칸을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는, 난소암 요법에 유용한 1종 이상의 다른 제제의 예방적 또는 치료적 유효량과 조합하여 mRNA 암 백신을 포함하는 조성물의 예방적 또는 치료적 유효량이 투여될 수 있다. 암 요법 및 그들의 투약량, 투여 경로 및 권장되는 용법은 당업계에 공지되어 있으며, 문헌[Physician's Desk Reference (56th ed., 2002)]으로서 기재되어 있다.

[0611] 본 발명의 일부 바람직한 실시형태에서, mRNA 암 백신은 T 세포 활성화제와 함께 투여되고, 예컨대 면역관문 조절자이다. 면역관문 조절제는 자극관문 분자와 저해관문 분자, 즉, 항-CTLA4 및 항-PD1 항체를 둘 다 포함한다.

[0612] 자극 관문 저해제는 관문 공정을 촉진시킴으로써 작용한다. 몇몇 자극 관문 분자는 종양 괴사 인자(TNF) 수용체 슈퍼패밀리의 구성원(CD27, CD40, OX40, GITR 및 CD137)인 반면, 다른 것은 B7-CD28 슈퍼패밀리(CD28 및 ICOS)에 속한다. OX40(CD134)은 효과기 및 기억 T 세포의 확장에 연루된다. 항-OX40 단클론성 항체는 진행된 암을 치료하는 데 효과적인 것으로 나타났다. MEDI0562는 인간화된 OX40 작용제이다. GITR, 글루코코티코이드-유도 TNFR 패밀리의 관련 유전자는 T 세포 확장에 연루되며, GITR에 대한 몇몇 항체는 항-종양 반응을 촉진시키는 것으로 나타났다. ICOS, 유도성 T-세포 공동자극제는 T 세포 효과기 기능에서 중요하다. CD27는 천연 T 세포의 항원-특이적 확장을 뒷받침하며, T 및 B 세포 기억의 생성에 연루된다. 몇몇 작용성 항-CD27 항체는 발생 중이다. CD122는 인터류킨-2 수용체 베타 소단위이다. NKTR-214는 CD122-편향 면역-자극 사이토카인이다.

[0613] 저해관문 분자는 PD-1, TIM-3, VISTA, A2AR, B7-H3, B7-H4, BTLA, CTLA-4, IDO, KIR 및 LAG3을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. CTLA-4, PD-1 및 그의 리간드는 T-세포 기능 및 다른 세포 기능의 모든 단계 전체적으로 중요한 역할을 하는 공동 신호전달 분자의 CD28-B7 패밀리의 구성원이다. CTLA-4, 세포독성 T-림프구-연관 단백질 4(CD152)는 T 세포 증식을 제어하는 데 연루된다.

[0614] PD-1 수용체는 활성화된 T 세포(및 B 세포)의 표면 상에서 발현되며, 정상 환경 하에서, 항원-제시 세포, 예컨대 수지상 세포 또는 대식세포의 표면 상에서 발현되는 그의 리간드(PD-L1 및 PD-L2)에 결합한다. 이런 상호작용은 T 세포에 신호를 보내며, 그를 저해한다. 암 세포는 그의 표면 상에서 고수준의 PD-L1의 발현을 유도함으로써 이 시스템의 이점을 취한다. 이는 그들이 PD-1 경로의 제어를 획득하도록 허용하며, 종양 미세환경에 유입될 수 있는 PD-1을 발현시키는 T 세포를 끄고, 따라서 항암 면역 반응을 억제한다. 펩트폴리주맙(앞에서 MK-3475 및 램브폴리주맙, 상표명 키트루다(Keytruda))는 암 면역요법에서 사용되는 인간 항체이다. 이는 PD-1 수용체를 표적화한다.

[0615] IDO, 즉, 인돌아민 2,3-다이옥시세나제는 T 및 NK 세포를 억제하는 트립토판 이화작용 효소이며, Treg 및 골수성-유래 억제 세포를 생성하고 활성화시키고, 종양 혈관신생을 촉진시킨다. TIM-3, 즉, T-세포 면역글로불린 도메인 및 뮤신 도메인 3은 그의 리간드인 갈락틴-9와의 상호작용 시 세포사를 촉발시킴으로써 Th1/Tc1 기능의 음성 조절자로서 작용한다. VISTA, 즉, T 세포 활성화의 V-도메인 Ig 억제제.

[0616] 관문 저해제는 단클론성 항체, 인간화된 항체, 완전한 인간 항체, 융합 단백질 또는 이들의 조합 또는 소분자와 같은 분자이다. 예를 들어, 관문 저해제는 CTLA-4, PDL1, PDL2, PD1, B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, TIM3, GAL9,

LAG3, VISTA, KIR, 2B4, CD160, CGEN-15049, CHK 1, CHK2, A2aR, B-7 패밀리 리간드 또는 이들의 조합일 수 있는 관문 단백질을 저해한다. 관문 단백질의 리간드는 CTLA-4, PDL1, PDL2, PD1, B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, TIM3, GAL9, LAG3, VISTA, KIR, 2B4, CD160, CGEN-15049, CHK 1, CHK2, A2aR 및 B-7 패밀리를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 일부 실시형태에서, 항-PD-1 항체는 BMS-936558(니볼루맵)이다. 다른 실시형태에서 항-CTLA-4 항체는 이필리무맵이다(상표명 여보이(Yervoy), 이전에 MDX-010 및 MDX-101로서 알려짐).

- [0617] 일부 바람직한 실시형태에서, 관문 조절제를 포함하는 암 치료제는 암 치료제, 예를 들어, 항-PD1, 사이토카인, 케모카인 또는 자극 수용체/리간드(예를 들어, OX40)를 암호화하는 mRNA의 형태로 전달된다.
- [0618] 일부 실시형태에서, 암 치료제는 표적화된 요법이다. 표적화된 요법은 BRAF 저해제, 예컨대 베무라페닙 (PLX4032) 또는 다프라페닙일 수 있다. BRAF 저해제는 PLX 4032, PLX 4720, PLX 4734, GDC-0879, PLX 4032, PLX-4720, PLX 4734 및 소라페닙 토실레이트일 수 있다. BRAF는 또한 원암유전자 B-Raf 및 v-Raf 뮤린 육종 바이러스 종양유전자 상동체 B1으로서도 지칭되는 B-Raf로 불리는 단백질을 생성하는 인간 유전자이다. B-Raf 단백질은 세포 성장을 지시하는 데 연루되는 세포 내부의 신호를 보내는 데 연루된다. BRAF 저해제인 베무라페닙은 후기 흑색종의 치료를 위해 FDA에 의해 승인되었다.
- [0619] 다른 실시형태에서, T-세포 치료제는 OX40L이다. OX40은 종양 괴사 인자/신경 성장 인자 수용체(TNFR/NGFR) 패밀리의 구성원이다. OX40은 T-세포 활성화뿐만 아니라 정상 및 악성 림프구 세포의 분화, 증식 또는 세포자멸사의 조절에서 어떤 역할을 할 수 있다.
- [0620] 일 양상에서, 본 발명의 방법은 대상체에게 PD-1 길항제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 양상에서, PD-1 길항제는 PD-1에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 부분이다. 특정 양상에서, PD-1 길항제는 단클론성 항체이다. 일부 양상에서, PD-1 길항제는 니볼루맵, 펌브롤리주맵 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0621] 다른 양상에서, 본 발명의 방법은 대상체에게 PDL-1 길항제를 투여하는 단계를 더 포함한다. 일부 양상에서, PD-L1 길항제는 PD-L1에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 부분이다. 특정 양상에서, PD-L1 길항제는 단클론성 항체이다. 일부 양상에서, PD-L1 길항제는 두르발루맵, 아벨루맵, MEDI473, BMS-936559, 아테졸리주맵 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0622] 다른 양상에서, 본 발명의 방법은 대상체에게 CTLA-4 길항제를 투여하는 단계를 더 포함한다. 일부 양상에서, CTLA-4 길항제는 CTLA-4에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 부분이다. 특정 양상에서, CTLA-4 길항제는 단클론성 항체이다. 일부 양상에서, CTLA-4 길항제는 이필리무맵, 트레멜리무맵 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0623] 본 발명의 소정의 실시형태는 대상체에게 1종 이상의 항암제와 함께 폴리뉴클레오타이드, 특히, KRAS 백신 펩타이드를 암호화하는 mRNA를 투여하는 단계를 포함하는, 암 치료가 필요한 대상체에서 암을 치료하는 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 1종 이상의 항암제는 관문 저해제 항체 또는 항체들이다. 일부 실시형태에서, 1종 이상의 항암제는 관문 저해제 항체 또는 항체들을 암호화하는 mRNA이다.
- [0624] 일 양상에서, 대상체는 본 개시내용의 폴리뉴클레오타이드 전에 PD-1 길항제로 이전에 치료되었다. 다른 양상에서, 대상체는 본 개시내용의 폴리뉴클레오타이드 전에 PD-1에 결합하는 단클론성 항체로 치료되었다. 다른 양상에서, 대상체는 본 방법의 폴리뉴클레오타이드 전에 항-PD-1 단클론성 항체 요법으로 치료되었다. 다른 양상에서, 항-PD-1 단클론성 항체 요법은 니볼루맵, 펌브롤리주맵, 피딜리주맵 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다.
- [0625] 다른 양상에서, 대상체는 본 개시내용의 폴리뉴클레오타이드 전에 PDL-1에 결합하는 단클론성 항체로 치료되었다. 다른 양상에서, 대상체는 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 전에 항-PDL-1 단클론성 항체 요법으로 치료되었다. 다른 양상에서, 항-PDL-1 단클론성 항체 요법은 두르발루맵, 아벨루맵, MEDI473, BMS-936559, 아테졸리주맵 또는 이들의 임의의 조합물을 포함한다.
- [0626] 일부 양상에서, 대상체는 본 개시내용의 폴리뉴클레오타이드 전에 CTLA-4 길항제로 치료되었다. 다른 양상에서, 대상체는 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 전에 CTLA-4에 결합하는 단클론성 항체 요법으로 앞서 치료되었다. 다른 양상에서, 대상체는 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 전에 항-CTLA-4 단클론성 항체로 치료되었다. 다른 양상에서, 항-CTLA-4 항체 요법은 이필리무맵 또는 트레멜리무맵을 포함한다.
- [0627] 일 실시형태에서, 본 개시내용에 유용한 항-PD-1 항체(또는 이의 항원-결합 부분)은 펌브롤리주맵이다. 펌브롤리주맵(또한 "키트루다(KEYTRUDA)(등록상표)", 람브롤리주맵 및 MK-3475로서 알려짐)은 인간 세포 표면 수용체

PD-1(예정사-1 또는 세포예정사-1)에 관련된 인간화된 단클론성 IgG4 항체이다. 캄브롤리주맵은, 예를 들어, 미국 특허 제8,900,587호에 기재되어 있으며; 또한 <http://www.cancer.gov/drugdictionary?cdrid=695789>(마지막 접속: 2014년 12월 14일)를 참조한다. 캄브롤리주맵은 재발성 또는 난치성 흑색종 및 진행된 NSCLC의 치료용으로 FDA에 의해 승인되었다.

[0628] 다른 실시형태에서, 본 개시내용에 유용한 항-PD-1 항체는 니볼루맵이다. 니볼루맵(또한 "옵디보(OPDIVO)(등록 상표)"로서 알려짐; 이전에 5C4, BMS-936558, MDX-1106, 또는 ONO-4538로 표기됨)은 PD-1 리간드(PD-L1 및 PD-L2)와의 상호작용을 선택적으로 방지하는 완전한 인간 IgG4(S228P) PD-1 면역관문 저해제 항체이며, 이에 의해 항종양 T-세포 기능의 하향 조절을 차단한다(미국 특허 제8,008,449; Wang *et al.*, 2014 Cancer Immunol Res. 2(9):846-56). 니볼루맵은 신세포 암종(신장 선암종 또는 부신종), 흑색종, 및 비소세포 폐암(NSCLC)을 포함하는 다양한 진행된 고형 종양에서 활성을 나타내었다(Topalian *et al.*, 2012a; Topalian *et al.*, 2014; Drake *et al.*, 2013; WO 2013/173223).

[0629] 다른 실시형태에서, 항-PD-1 항체는 PD-1 수용체에 대해 단클론성 항체인 MEDI0680(앞서 AMP-514)이다. MEDI0680은, 예를 들어, 미국 특허 제8,609,089B2에 또는 <http://www.cancer.gov/drugdictionary?cdrid=756047>(마지막 접속 2014년 12월 14일)에 기재되어 있다.

[0630] 소정의 실시형태에서, 항-PD-1 항체는 인간화된 단클론성 항체인 BGB-A317이다. BGB-A317은 미국 특허 공개 제 2015/0079109에 기재되어 있다.

[0631] 소정의 실시형태에서, PD-1 길항제는 B7-DC Fc 융합 단백질인 AMP-224이다. AMP-224는 미국 특허 공개 제 2013/0017199호에 또는 <http://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-drug?cdrid=700595> (마지막 접속 2015년 7월 8일)에서 논의된다.

[0632] 소정의 실시형태에서, 본 개시내용에 유용한 항-PD-L1 항체는 MSB0010718C(또한 아벨루맵으로 불림; 미국 특허 제2014/0341917호 참조) 또는 BMS-936559(앞서 12A4 또는 MDX-1105)(예를 들어, 미국 특허 제7,943,743호; WO 2013/173223)이다. 다른 실시형태에서, 항-PD-L1 항체는 MPDL3280A(또한 RG7446으로서 알려짐)(예를 들어, 문헌[Herbst *et al.* (2013) J Clin Oncol 31(suppl):3000. Abstract]; 미국 특허 제8,217,149호), MEDI4736(또한 두르발루맵으로 불림; Khleif (2013) In: Proceedings from the European Cancer Congress 2013; September 27-October 1, 2013; Amsterdam, The Netherlands)이다.

[0633] 예시적인 임상 항-CTLA-4 항체는 미국 특허 제6,984,720호에 개시된 바와 같은 인간 mAb 10D1(현재 이필리무맵으로서 알려져 있고, 여보이(등록상표)로서 시판됨)이다. 본 발명에 유용한 다른 항-CTLA-4 항체는 트레멜리무맵(또한 CP-675,206로서 알려져 있다)이다. 트레멜리무맵은 인간 IgG2 단클론성 항-CTLA-4 항체이다. 트레멜리무맵은 WO/2012/122444, 미국 특허 공개 제2012/263677, 또는 WO 공개 2007/113648 A2에 기재되어 있다.

[0634] 다음의 표(표 10)는 사용 및 검사에서 특정 종양 유형 및 요법의 유형에서의 KRAS 돌연변이의 예를 제공한다. 본 발명의 조성물은 임의의 이들 요법과 병용하여 유용하다.

표 10

[0635]

	결장직장	췌장	폐	자궁내막양 암종
#US KRAS* 환자(mKRAS 발생률)	57,712	49,257	26,695	10,281
KRAS 돌연변이% (대 총계)	45.0%	97.0%	31.0%	21.4%
시험한 PD-L1 저해제	아테졸리주맵 (P3-NR) 두르발루맵 (P2-NR)	두르발루맵 (P2-R)	아벨루맵 (P3-R) 아테졸리주맵 (P3-R) 두르발루맵 (P2-R)	없음
시험한 PD-1 저해제	니볼루맵 (P2-R) 캄브롤리주맵 (P2-R)	니볼루맵 (P2-R) 캄브롤리주맵 (P2-R)	니볼루맵 (P2-R) 캄브롤리주맵 (P2-R)	니볼루맵 (P2-R) 캄브롤리주맵 (P2-R)
시험한 암 백신	없음	없음	GI-4000 (P2-C)DPV-001 (P2-R)	없음
시험한 KRAS 백신	없음	없음	GI-4000 (P2-C)DPV-001 (P2-R)	없음

KRAS 백신에 대한 불(Bull) 사례	45% w/ 돌연변이체 KRAS 가장 큰 pt 풀 36% G12D 대립유전자 21% G12V 대립유전자	97% w/ 돌연변이체 KRAS는 이 종양 39% G12D 대립유전자 30% G12V 대립유전자를 정합	31% w/ 돌연변이체 KRAS 39% G12C 대립유전자 21% G12V 대립유전자	21% w/ 돌연변이체 KRAS
KRAS 백신에 대한 우선권 (H/M/L)	H	H	H	M

- [0636] 다른 실시형태에서, 암 치료제는 사이토카인이다. 또 다른 실시형태에서, 암 치료제는 집단 기반 종양 특이적 항원을 포함하는 백신이다.
- [0637] 다른 실시형태에서, 암 치료제는 암-생식계열 유전자에 의해 발현되는 하나 이상의 전통적인 항원(또한 "공유된 암 항원"으로서 지칭되는, 다수의 환자에서 발현되는 종양에 공통된 항원)을 함유하는 백신이다. 일부 실시형태에서, 전통적인 항원은 일반적으로 암 또는 종양에서 또는 암 또는 종양의 특정 유형에서 발견되는 것으로 알려진 것이다. 일부 실시형태에서, 전통적인 암 항원은 비돌연변이 종양 항원이다. 일부 실시형태에서, 전통적인 암 항원은 돌연변이된 종양 항원이다.
- [0638] p53 유전자(공식적 기호 TP53)는 인간암에서의 임의의 다른 유전자보다 더 빈번하게 돌연변이된다. 거대 코호트 연구는 대부분의 p53 돌연변이에 대해, 게놈 위치가 한 명 또는 단지 소수의 환자에 대해 독특하며, 돌연변이가 특정 환자 집단에 대해 설계된 치료적 백신에 대해 재발성 신생항원으로서 사용될 수 없다는 점을 나타내었다. 그러나, p53 좌위의 소집단은 유전자 내 몇몇 위치가 상대적으로 고빈도로 돌연변이되는 "핫스팟" 패턴을 나타낸다. 현재하게는, 이들 재발성으로 돌연변이된 영역의 대부분은 mRNA 스플라이싱 기작에 의해 인식되는 정규 뉴클레오타이드 서열모티프를 붕괴시키는 엑손-인트론 경계 근처에서 생긴다.
- [0639] 국소 아미노산 서열에 대한 변화 없음이 예측된다면(즉, 동의 또는 인트론 돌연변이에 대해), 스플라이싱 모티프의 돌연변이는 최종 mRNA 서열을 변경시킬 수 있다. 따라서, 이들 돌연변이는, 그들이 예측 가능하지 않은 방법으로 mRNA 스플라이싱을 변경시키고 번역 단백질에 대해 심각한 기능적 영향을 발휘한다고 해도, 통상적인 주석 도구에 의해 "비암호화"로서 종종 주석이 달리며, 추가 분석에 대해 무시된다. 대안적으로 스플라이싱된 아 이소폼이 인프레임 서열 변화를 생성한다면(즉, 사전결정 코돈(PTC)이 생성되지 않음), 넌센스-매개 mRNA 붕괴(NMD)에 의한 고갈을 벗어날 수 있으며, HLA 시스템에 의해 세포 표면 상에서 용이하게 발현되고, 가공되며 제시될 수 있다. 추가로, 돌연변이-유래 대안의 스플라이싱은 보통 "모호"하며, 즉, 정상 조직에서 발현되지 않으며, 따라서 비자기 신생항원으로서 T-세포에 의해 인식될 수 있다.
- [0640] 일부 예에서, 암 치료제는 재발성 다형("핫 스팟 돌연변이")인 하나 이상의 신생항원을 포함하는 백신이다. 예를 들어, 특히, 본 발명은 p53에서 소정의 재발성 체세포 암 돌연변이로부터 초래된 신생항원 펩타이드 서열을 제공한다. 예시적인 돌연변이 및 mRNA 스플라이싱 사건 얻어진 신생항원 펩타이드 및 HLA-제한된 에피토프는:
- [0641] (1) 에피토프 AVSPCISFVW(서열번호 233)(HLA-B\*57:01, HLA-B\*58:01), HPLASCQCFF(서열번호 234)(HLA-B\*35:01, HLA-B\*53:01), FVWNFGIPL(서열번호 235)(HLA-A\*02:01, HLA-A\*02:06, HLA-B\*35:01)를 함유하는 펩타이드 서열 TAKSVTCTVSCPEGLASMRLQLCLAVSPCISFVWNFGIPLHPLASCQCFFIVYPLNV(서열번호 232)를 갖는 보유된 인트론을 유도하는, 코돈 p.T125에 이웃하는 정규 5' 스플라이스 부위에서의 돌연변이;
- [0642] (2) 에피토프 LQVLSLGTSY(서열번호 237)(HLA-B\*15:01), FQSNTQNAV(서열번호 238)(HLA-B\*15:01)를 함유하는 펩타이드 서열 EYFTLQVLSLGTSYQVESFQSNTQNAVFFLTPLPAIGAFAIRGQ(서열번호 236)를 갖는 보유된 인트론을 유도하는, 코돈 p.331에 이웃하는 정규 5' 스플라이스 부위에서의 돌연변이;
- [0643] (3) 에피토프 CTMFCQLAK(서열번호 240)(HLA-A\*11:01), KSVTCTMF(서열번호 241)(HLA-B\*58:01)를 함유하는 신규한 스페닝 펩타이드 서열 AKSVTCTMFCQLAK(서열번호 239)를 생성하는 모호한 대안의 엑손 3' 스플라이스 부위를 유도하는, 코돈 p.126에 이웃하는 정규 3' 스플라이스 부위에서의 돌연변이; 및/또는
- [0644] (4) 에피토프 VPYEPPEVW(서열번호 243)(HLA-B\*53:01, HLA-B\*51:01), LTVPPSTAW(서열번호 244)(HLA-B\*58:01, HLA-B\*57:01)를 함유하는 신규한 스페닝 펩타이드 서열 VPYEPPEVWLALTVPSTAWAA(서열번호 242)를 생성하는 모호한 대안의 인트론 5' 스플라이스 부위를 유도하는 코돈 p.224에 이웃하는 정규 5' 스플라이스 부위에서의 돌연변이를 포함하지만, 이들로 제한되지 않되,



- [0645] 전사체 코돈 위치는 양상블 v83 인간 게놈 주석으로부터의 정규 전장 p53 전사체 ENST00000269305(서열번호 245)를 지칭한다.
- [0646] 일 실시형태에서, 본 발명은 신생항원 펩타이드 (1) 내지 (4) 중 하나 이상에 대해 암호화하는 오픈 리딩 프레임(ORF)을 암호화하는 mRNA를 포함하는 암 치료 백신을 제공한다. 일 실시형태에서, 본 발명은 임의의 상기 돌연변이를 함유하는 환자의 종양에 기반하여 펩타이드 (1) 내지 (4) 중 하나 이상을 함유하거나 또는 암호화하는 백신의 선택적 투여를 제공한다. 일 실시형태에서, 본 발명은 임의의 상기 돌연변이를 함유하는 대상체의 종양 및 얻어진 신생항원에 결합하도록 예측된 대응하는 HLA 대립유전자를 함유하는 대상체의 정상 HLA 유형의 이중 기준에 기반하여 백신의 선택적 투여를 제공한다.
- [0647] 일부 실시형태에서, 암 치료 백신은 하나 이상의 재발성 다형을 암호화하는 하나 이상의 mRNA를 포함한다. 일부 실시형태에서, 암 치료 백신은 하나 이상의 환자 특이적 신생항원을 암호화하는 하나 이상의 mRNA를 포함한다. 일부 실시형태에서, 암 치료 백신은 면역관문 조절자를 암호화하는 하나 이상의 mRNA를 포함한다. 하나 이상의 재발성 다형, 하나 이상의 환자 특이적 신생항원 및/또는 하나 이상의 면역관문 조절자는 임의의 방식으로 조합될 수 있다. 예를 들어, 하나 이상의 재발성 다형, 하나 이상의 환자 특이적 신생항원 및/또는 하나 이상의 면역관문 조절자를 암호화하는 하나 이상의 연쇄체 작제물에 대해 바람직할 수 있다. 다른 예에서, 하나 이상의 재발성 다형, 하나 이상의 환자 특이적 신생항원 및/또는 하나 이상의 면역관문 조절자는 별개의 mRNA 작제물에 의해 암호화되는 것이 바람직할 수 있다. 하나 이상의 재발성 다형, 하나 이상의 환자 특이적 신생항원 및/또는 하나 이상의 면역관문 조절자는 동시에 투여될 수 있거나 또는 순차적으로 투여될 수 있다는 것이 인식될 것이다.
- [0648] mRNA 암 백신 및 항암 치료는 심지어 면역 치료 반응을 추가로 향상시키기 위해 조합될 수 있다. mRNA 암 백신 및 다른 치료제는 동시에 또는 순차적으로 투여될 수 있다. 다른 치료제가 동시에 투여될 때, 그들은 동일한 또는 별개의 제형으로 투여될 수 있지만, 동시에 투여된다. 다른 치료제 및 mRNA 암 백신의 투여가 일시적으로 분리될 때, 다른 치료제는 서로 순차적으로 그리고 mRNA 암 백신과 함께 투여된다. 이들 화합물의 투여 사이의 시간의 분리는 겨우 몇 분일 수 있거나 또는 몇 시간, 며칠, 몇 주, 몇 개월처럼 더 길 수도 있다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 이들 화합물의 투여 사이의 시간의 분리는 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 8시간, 12시간, 24시간 이상이다. 일부 실시형태에서, 이들 화합물의 투여 사이의 시간의 분리는 2일, 3일, 4일, 5일, 6일 또는 7일 이상이다. 일부 실시형태에서, mRNA 암 백신은 항암 치료 전에 투여된다. 일부 실시형태에서, mRNA 암 백신은 항암 치료 후에 투여된다.
- [0649] 다른 치료제는 항암 치료제, 아지반트, 사이토카인, 항체, 항원 등을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.
- [0650] 일부 양상에서, 제공된 방법은 면역관문 조절자와 병용하여 mRNA 암 백신을 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 면역관문 조절자, 예를 들어, 관문 저해제, 예컨대 항-PD-1 항체는 대상체에게 100 내지 300mg을 전달하기에 충분한 투약량 수준으로 투여된다. 일부 실시형태에서, 면역관문 조절자, 예를 들어, 관문 저해제, 예컨대 항-PD-1 항체는 대상체에게 200mg을 전달하기에 충분한 투약량 수준으로 투여된다. 일부 실시형태에서, 면역관문 조절자, 예를 들어, 관문 저해제, 예컨대 항-PD-1 항체는 정맥내 주입에 의해 투여된다. 일부 실시형태에서, 3종의 면역관문 조절자는 대상체에게 2회, 3회, 4회 이상 투여된다. 일부 실시형태에서, 면역관문 조절자는 대상체에게 mRNA 백신 투여와 동일한 날에 투여된다.
- [0651] RNA 백신은 하나 이상의 약제학적으로 허용 가능한 부형제와 조합하여 제형화되거나 또는 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 백신 조성물은 적어도 하나의 추가적인 활성 물질, 예를 들어, 치료적으로 활성인 물질, 예방적으로 활성인 물질, 또는 이 둘의 조합물을 포함한다. 백신 조성물은 멸균, 무발열원 또는 멸균과 무 발열원 둘 다일 수 있다. 약제, 예컨대 백신 조성물의 제형 및/또는 제조에서 일반적 고려사항은, 예를 들어, 문헌 [Remington: The Science and Practice of Pharmacy 21st ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2005 (본 명세서에 전문이 참고로 편입됨)]에서 발견되었다.
- [0652] 일부 실시형태에서, 암 RNA 백신은 인간, 인간 환자 또는 대상체에게 투여된다. 본 개시내용의 목적을 위해, 어구 "활성 성분"은 일반적으로 RNA 백신 또는 그에 함유된 폴리뉴클레오타이드, 예를 들어, 항원 폴리펩타이드를 암호화하는 RNA 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, mRNA 폴리뉴클레오타이드)를 지칭한다.
- [0653] 본 명세서에 기재된 백신 조성물의 제형은 약학 분야에서 공지되거나 또는 이후에 개발된 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. 일반적으로, 이러한 제조 방법은 활성 성분(예를 들어, mRNA 폴리뉴클레오타이드)를 부형제 및/또는 하나 이상의 다른 부속 성분에 합치고, 이어서, 필요하다면 그리고/또는 바람직하다면, 생성물을 목적하

는 단일- 또는 다회 용량 단위로 나누고/나누거나 성형하고/성형하거나 패키징하는 단계를 포함한다.

[0654] 암 RNA 백신은 (1) 안정성 증가; (2) 세포 형질감염의 증가; (3) (예를 들어, 데포 제형으로부터) 지속 또는 지연 방출의 허용; (4) 생체 분포의 변경(예를 들어, 특정 조직 또는 세포 유형에 대한 표적); (5) 생체내 암호화된 단백질 번역의 증가; 및/또는 (6) 생체내에서 암호화된 단백질(항원)의 방출 프로파일 변경을 위해 하나 이상의 부형제를 이용하여 제형화될 수 있다. 전통적인 부형제, 예컨대 임의의 그리고 모든 용매, 분산 매질, 희석제 또는 다른 액체 비히클, 분산물 또는 현탁 보조제, 표면 활성제, 등장제, 증점제 또는 유화제, 보존제에 추가로, 부형제는 리피도이드, 리포솜, 지질 나노입자, 중합체, 리포플렉스, 코어-껍질 나노입자, 펩타이드, 단백질, 암 RNA 백신으로 형질감염된 세포(예를 들어, 대상체에서 이식을 위해), 하이알루로니다제, 나노입자 모방체 및 이들의 조합물을 포함할 수 있지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0655] 가속화된 혈액 청소율

[0656] 본 발명은 반복적으로 투여된 활성제, 예컨대 생물학적으로 활성제에 대한 ABC의 효과를 감소시키기 위한 화합물, 조성물 및 이의 사용 방법을 제공한다. 용이하게 명확한 바와 같이, 투여된 활성제에 대한 ABC의 효과를 함께 감소시키거나 또는 제거하는 것은 그의 반감기 그에 따른 효능을 효과적으로 증가시킨다.

[0657] 일부 실시형태에서, 용어 ABC를 감소시키는은 양성 기준 대조군 ABC에 비해 LNP, 예컨대 MC3 LNP를 유도하는 ABC의 임의의 감소를 지칭한다. ABC 유도성 LNP는 주어진 시간 틀 내에서 제2 또는 후속적 투여 시 활성제의 순환 수준의 감소를 야기한다. 따라서, ABC의 감소는 표준 LNP에 비해 제2 또는 후속적 투약 시 순환제의 더 적은 청소율을 지칭한다. 감소는, 예를 들어, 적어도 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 100%일 수 있다. 일부 실시형태에서, 감소는 10-100%, 10-50%, 20-100%, 20-50%, 30-100%, 30-50%, 40-100%, 40-80%, 50-90% 또는 50-100%이다. 대안적으로 ABC의 감소는 제2 또는 후속적 투여 후 순환제의 적어도 검출 가능한 수준 또는 표준 LNP의 투여 후 순환제에 비해 순환제의 적어도 2배, 3배, 4배, 5배 증가를 특징으로 할 수 있다. 일부 실시형태에서, 감소는 2-100배, 2-50배, 3-100배, 3-50배, 3-20배, 4-100배, 4-50배, 4-40배, 4-30배, 4-25배, 4-20배, 4-15배, 4-10배, 4-5배, 5-100배, 5-50배, 5-40배, 5-30배, 5-25배, 5-20배, 5-15배, 5-10배, 6-100배, 6-50배, 6-40배, 6-30배, 6-25배, 6-20배, 6-15배, 6-10배, 8-100배, 8-50배, 8-40배, 8-30배, 8-25배, 8-20배, 8-15배, 8-10배, 10-100배, 10-50배, 10-40배, 10-30배, 10-25배, 10-20배, 10-15배, 20-100배, 20-50배, 20-40배, 20-30배 또는 20-25배이다.

[0658] 본 개시내용은 청소율에 덜 민감하고 따라서 더 긴 생체내 반감기를 갖는 지질-포함 화합물 및 조성물을 제공한다. 이는 특히 조성물이 만성 투여를 포함하여 반복될 것이 의도되는 경우, 훨씬 더 구체적으로는 이러한 반복된 투여가 며칠 또는 몇주에 일어나는 경우이다.

[0659] 상당하게는, 이들 조성물은 가속화된 혈액 청소율(ABC)의 관찰된 현상에 덜 민감하거나 또는 완전히 회피한다. ABC는 소정의 외인성으로 투여된 제제가 제2 및 후속적 투여 시 혈액으로부터 빠르게 제거되는 현상이다. 이 현상은, 지질화제, 리포솜 또는 다른 지질계 전달 비히클 및 지질-캡슐화제를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 다양한 지질-함유 조성물에 대해 부분적으로 관찰되었다. 지금까지는, ABC의 기반은 불명하게 이해되고, 일부 경우에 체액성 면역 반응에 기인하며, 그에 따라 특히 임상 상황에서 생체내 그의 영향을 제한하기 위한 전략은 달성하기 힘들게 남아있었다.

[0660] 본 개시내용은 ABC에 대해 민감하다고 하더라도 덜 민감한 화합물 및 조성물을 제공한다. 일부 중요한 양상에서, 이러한 화합물 및 조성물은 지질-포함 화합물 또는 조성물이다. 본 개시내용의 지질-함유 화합물 또는 조성물은 놀랍게도 생체내에서 제2 및 후속적 투여 시 ABC를 경험하지 않는다. ABC에 대한 이런 내성은 며칠 또는 1 내지 2주를 포함하는 시간간의 시간 내에 반복된 사용을 포함하는 생체내에서의 반복된 사용에 특히 적합한 이들 화합물 및 조성물을 제공한다. 이 향상된 안정성 및/또는 반감기는 B1a 및/또는 B1b 세포 및/또는 통상적인 B 세포, pDC 및/또는 혈소판을 활성화시키는 이들 조성물의 불능에 부분적으로 기인한다.

[0661] 따라서 본 개시내용은 가속화된 혈액 청소율(ABC)을 겪는 메커니즘의 설명을 제공한다. 본 개시내용에 따라 그리고 본 명세서에 제공된 발명에서 ABC 현상은 그것이 지질 및 지질 나노입자에 관한 것이기 때문에 B1a 및/또는 B1b 세포, pDC 및/또는 혈소판을 수반하는 선천성 면역 반응을 적어도 부분적으로 매개한다는 것이 발견되었다. B1a 세포는 정상적으로는 순환 IgM의 형태에서 천연 항체의 분비를 초래한다. 이 IgM은 다반응성인데, 이는 각각에 대해 상대적으로 낮은 친화도에도 불구하고 다양한 항원에 결합할 수 있다는 것을 의미한다.

[0662] 본 발명에 따르면 일부 지질화된 제제 또는 지질-포함 제형, 예컨대 생체내에서 투여된 지질 나노입자는 ABC를

촉발하고 이에 대해 실시된다는 것을 발견하였다. 이제 본 발명에 따르면 LNP의 제1 용량의 투여 시, 선천성 면역 반응(본 명세서에서 센서로서 지칭됨)을 생성하는 데 연루된 하나 이상의 세포는 이러한 제제에 결합하며, 활성화되고, 이어서, ABC 및 독성을 촉진시키는 면역 인자(본 명세서에서 효과기로서 지칭됨)의 캐스케이드를 개시한다는 것이 발견되었다. 예를 들어, B1a 및 B1b 세포는 LNP에 결합하고, 활성화되며(단독으로 또는 다른 센서, 예컨대 pDC 및/또는 효과기 예컨대 IL6의 존재 하에), LNP에 결합하는 천연 IgM을 분비할 수 있다. 대상체에서 이미 존재하는 천연 IgM은 또한 LNP를 인식하고 이에 결합함으로써, 상보체 고정을 촉발할 수 있다. 제1 용량의 투여 후에, 천연 IgM의 생산은 LNP 투여의 1 내지 2시간 내에 시작된다. 전형적으로 약 2 내지 3주까지, 천연 IgM은 IgM의 천연 반감기에 기인하여 시스템으로부터 제거된다. 천연 IgG는 LNP의 투여 후 대략 96시간에 생산이 시작된다. 미경험 상황에서 투여될 때 제제는 B1a 세포 또는 B1b 세포 또는 천연 IgG의 활성화 후에 생산된 천연 IgM에 의해 상대적으로 방해가 되지 않는 그의 생물학적 효과를 발휘할 수 있다. 천연 IgM 및 천연 IgG는 비특이적이며, 따라서, 항-PEG IgM 및 항-PEG IgG와 별개이다.

[0663] 본 출원인은 메커니즘에 의해 구속되지 않지만, LNP는 다음의 메커니즘을 통해 ABC 및/또는 독성을 촉발하는 것으로 제안된다. LNP가 대상체에게 투여될 때, LNP는 혈액을 통해 비장으로 빠르게 수송되는 것으로 여겨진다. LNP는 혈액 및/또는 비장에서 면역 세포와 만날 수 있다. 빠른 선천성 면역 반응은 혈액 및/또는 비장 내의 LNP의 존재에 반응하여 촉발된다. 본 명세서에서 출원인은 LNP의 투여 시간 내에 몇몇 반응 센서는 LNP의 존재에 반응된다는 것을 나타내었다. 이들 센서는 면역 반응을 생성하는 데 연루된 면역 세포, 예컨대 B 세포, pDC, 및 혈소판을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 센서는 비장에, 예컨대 비장의 변연대에 그리고/또는 혈액에 존재할 수 있다. LNP는 다른 센서와 상호작용할 수 있는 하나 이상의 센서와 물리적으로 상호작용할 수 있다. 이러한 경우에, LNP는 센서와 직접적으로 또는 간접적으로 상호작용한다. 센서는 LNP의 인식에 반응하여 서로 직접적으로 상호작용할 수 있다. 예를 들어 다수의 센서가 비장에 위치되고, 서로 용이하게 상호작용할 수 있다. 대안적으로 센서 중 하나 이상은 혈액에서 LNP와 상호작용할 수 있고, 활성화된다. 이어서, 활성화된 센서는 (예를 들어, 사이토카인과 같은 전령, 예를 들어, IL6의 자극 또는 생성을 통해) 다른 센서와 직접적으로 또는 간접적으로 상호작용될 수 있다.

[0664] 일부 실시형태에서, LNP는 각각의 다음의 센서와 직접적으로 상호작용하고 활성화시킬 수 있다: pDC, B1a 세포, B1b 세포 및 혈소판. 이어서, 이들 세포는 궁극적으로 ABC 및/또는 LNP의 반복된 투약과 연관된 독성을 야기하는 효과기의 생산을 개시하기 위해 서로 직접적으로 또는 간접적으로 상호작용할 수 있다. 예를 들어, 출원인은 LNP 투여가 pDC 활성화, 혈소판 응집 및 활성화 및 B 세포 활성화의 투여를 야기한다는 것을 나타내었다. LNP에 반응하여 혈소판은 또한 응집되고, 활성화되며, B 세포와 함께 응집된다. pDC 세포는 활성화된다. LNP는 혈소판 및 B 세포의 표면과 상대적으로 빠르게 상호작용하는 것으로 발견되었다. LNP에 반응한 이들 센서 중 임의의 하나 또는 이들 센서의 조합의 활성화 차단은 보통 일어나는 면역 반응을 약화시키는 데 유용하다. 면역 반응의 이런 약화는 ABC 및/또는 독성의 회피를 야기한다.

[0665] 센서가 일단 활성화되면, 효과기를 생산한다. 본 명세서에 사용되는 바와 같은 효과기는 면역 세포, 예컨대 B 세포에 의해 생산되는 면역 분자이다. 효과기는 면역글로불린, 예컨대 천연 IgM 및 천연 IgG 및 사이토카인 예컨대 IL6을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. B1a 및 B1b 세포는 LNP의 투여 후 2 내지 6시간 내에 천연 IgM의 생산을 자극한다. 천연 IgG는 96시간 내에 검출될 수 있다. IL6 수준은 몇 시간 내에 증가된다. 천연 IgM 및 IgG는 며칠 내지 몇 주 동안 신체에서 순환된다. 이 시간 동안, 순환 효과기는 새로 투여된 LNP와 상호작용하여 신체에 의한 청소율에 대해 해당 LNP를 촉발시킨다. 예를 들어, 효과기는 LNP를 인식하고 LNP에 결합할 수 있다. 효과기의 Fc 영역은 대식세포에 의해 인식될 수 있고, 대식세포에 의해 장식된 LNP의 흡수를 촉발할 수 있다. 이어서, 대식세포는 비장에 수송된다. 면역 센서에 의한 효과기의 생산은 ABC에 대해 관찰된 시간과 상관관계가 있는 일시적 반응이다.

[0666] 투여된 용량이 제2 또는 후속적 투여 반응이라면, 그리고 이러한 제2 또는 후속적 용량이 앞서 유도된 천연 IgM 및/또는 IgG가 시스템으로부터 제거되기 전에(예를 들어, 2 내지 3개의 창 시간 기간) 투여된다면, 이러한 제2 또는 후속적 투약은 순환 천연 IgM 및/또는 천연 IgG 또는 Fc에 의해 표적화되는 데, 이는 대안의 상보체 경로 활성화를 촉발시키고, 그 자체는 빠르게 제거된다. 효과기가 신체로부터 제거되거나 또는 수가 감소된 후에 LNP가 투여될 때, ABC는 관찰되지 않는다.

[0667] 따라서, LNP와 하나 이상의 센서 사이의 상호작용을 저해하기 위해, LNP에 의한 하나 이상의 센서의 활성화를 저해하기 위해(직접적 또는 간접적), 하나 이상의 효과기의 생산을 저해하기 위해 그리고/또는 하나 이상의 효과기의 활성을 저해하기 위해 본 발명의 양상에 따라 유용하다. 일부 실시형태에서, LNP는 센서와 LNP의 상호작용을 제어하거나 또는 차단하도록 설계된다. 예를 들어, LNP는 센서와의 상호작용을 방지하기 위해 변경된 PC

및/또는 PEG를 가질 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로 LNP에 의해 유도된 면역 반응을 저해하는 제제는 이들 효과기 중 임의의 하나 이상을 달성하기 위해 사용될 수 있다.

[0668] 또한 통상적인 B 세포는 또한 ABC에 연루된다는 것이 결정되었다. 구체적으로, 제제의 제1 투여 시, 본 명세서에서 CD19(+)로 지칭되는 통상적인 B 세포는 제제에 결합하고, 이에 반응할 수 있다. B1a 및 B1b 세포와 다르긴 하지만, 통상적인 B 세포는 제1 IgM 반응(LNP의 투여 후 대략 96시간에 시작) 다음에 기억 반응과 동시에 IgG 반응(LNP의 투여 후 대략 14일에 시작)을 시작할 수 있다. 따라서, 통상적인 B 세포는 투여제에 반응하고, ABC를 매개하는 IgM(종종적으로 IgG)에 기여한다. IgM 및 IgG는 전형적으로 항-PEG IgM 및 항-PEG IgG이다.

[0669] 일부 예에서, 대다수의 ABC 반응은 B1a 세포 및 B1a-매개된 면역 반응을 통해 매개된다는 것이 상정된다. 추가로 일부 예에서, ABC 반응은 IgM과 IgG 둘 다에 의해 매개되며, 통상적인 B 세포와 B1a 세포는 둘 다 이러한 효과를 매개한다는 것이 상정된다. 또 다른 예에서, ABC 반응은 천연 IgM 분자에 의해 매개되며, 이 중 일부는 활성화된 B1a 세포에 의해 생산될 수 있는 천연 IgM에 결합할 수 있다. 천연 IgM은 LNP의 하나 이상의 성분에 결합할 수 있으며, 예를 들어, LNP의 인지질 성분에 결합(예컨대 인지질의 PC 모이어티에 결합)하고/하거나 LNP의 PEG-지질 성분에 결합(예컨대 PEG-DMG에 결합, 특히, PEG-DMG의 PEG 모이어티에 결합)한다. B1a는 포스포타디콜린에 대한 리간드인 CD36을 발현시키기 때문에, CD36 수용체는 B1a 세포의 활성화 및 그에 따른 천연 IgM의 생산을 매개할 수 있다는 것이 상정된다. 또 다른 예에서, ABC 반응은 통상적인 B 세포에 의해 주로 매개된다.

[0670] 본 발명에 따르면, ABC 현상은 B1a 세포를 활성화시키지 않는 화합물 및 조성물(예컨대, 제제, 전달 비히클 및 제형)의 사용을 통해 적어도 부분적으로 감소되거나 또는 없어질 수 있다는 것을 발견하였다. B1a 세포를 활성화시키지 않는 화합물 및 조성물은 본 명세서에서 B1a 비활성 화합물 및 조성물로서 지칭될 수 있다. 추가로 본 발명에 따르면 ABC 현상은 통상적인 B 세포를 활성화시키지 않는 화합물 및 조성물의 사용을 통해 적어도 부분적으로 감소되거나 또는 없어질 수 있다는 것이 추가로 발견되었다. 통상적인 B 세포를 활성화시키지 않는 화합물 및 조성물은 일부 실시형태에서 본 명세서에서 CD19-비활성 화합물 및 조성물로서 지칭될 수 있다. 따라서, 본 명세서에 제공된 일부 실시형태에서, 화합물 및 조성물은 B1a 세포를 활성화시키지 않으며, 그들은 통상적인 B 세포를 활성화시키지 않는다. B1a 세포 및 통상적인 B 세포를 활성화시키지 않는 화합물 및 조성물은 본 명세서에서 일부 실시형태에서 B1a/CD19-비활성 화합물 및 조성물로서 지칭될 수 있다.

[0671] 이들 근본적인 메커니즘은 본 명세서에서 이해되지 않으며, 이 현상에서 B1a 및 B1b 세포 및 그들의 통상적인 B 세포와 그들의 상호작용의 역할은 또한 인식되지 않았다.

[0672] 따라서, 본 개시내용은 ABC를 촉진시키지 않는 화합물 및 조성물을 제공한다. 이들은 추가로 B1a 및/또는 B1b 세포, 혈소판 및/또는 pDC, 및 선택적으로 통상적인 B 세포를 또한 활성화시킬 수 없는 것을 특징으로 할 수 있다. 이들 화합물(예를 들어, 생물학적으로 활성인 제제, 예컨대 예방제, 치료제 및 진단제, 전달 비히클(리포솜, 지질 나노입자 및 다른 지질계 캡슐화 구조를 포함) 등을 포함하는 제제) 및 조성물(예를 들어, 제형 등)은 반복된 투여 및 단기간의 시간 내에(예를 들어, 1 내지 2주 내에) 일어나는 반복된 투여를 필요로 하는 적용에 특히 바람직하다. 이는, 예를 들어, 제제가 정기적으로, 가까운 간격으로 대상체에게 제공되는 백신 치료제인 경우이다. 본 명세서에 제공된 발견은 유사하게 투여되고/되거나 ABC가 실시된 이들 및 다른 제제에 적용될 수 있다.

[0673] 특히 지질-포함 화합물, 지질-포함 입자, 및 지질-포함 조성물에 관심이 있는데, 이들은 ABC에 민감한 것으로 알려져 있기 때문이다. 이러한 지질-포함 화합물 입자, 및 조성물은 생물학적으로 활성인 제제로서 또는 이러한 제제에 대한 전달 비히클로서 광범위하게 사용되었다. 따라서, ABC의 효과가 제제 그 자체에 대해 감소되든 또는 그의 전달 비히클 상에서 감소되든 이러한 제제의 효능을 개선시키는 능력은 매우 다양한 활성제에 유리하다.

[0674] 또한 본 명세서에서 하나 이상의 생물학적 활성제의 반복 용량 투여와 연관된 급성기 반응(acute phase response: ARP)를 자극하거나 또는 촉진시키지 않는 조성물이 제공된다.

[0675] 조성물은, 일부 예에서, 천연 IgM을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 IgM에 결합하지 않을 수도 있다.

[0676] 조성물은, 일부 예에서, 급성기 단백질, 예컨대 이하로 제한되는 것은 아니지만, C-반응 단백질에 결합하지 않을 수도 있다.

[0677] 조성물은, 일부 예에서, CD5(+) 매개 면역 반응을 촉발하지 않을 수도 있다. 본 명세서에 사용되는 바와 같은, CD5(+) 매개 면역 반응은 B1a 및/또는 B1b 세포에 의해 매개되는 면역 반응이다. 이러한 반응은 ABC 반응, 급성



기 반응, 천연 IgM 및/또는 IgG의 유도 등을 포함할 수 있다.

- [0678] 조성물은, 일부 예에서, CD19(+) 매개 면역 반응을 촉발시키지 않을 수도 있다. 본 명세서에 사용되는 바와 같은, CD19(+) 매개 면역 반응은 통상적인 CD19(+), CD5(-) B 세포에 의해 매개되는 면역 반응이다. 이러한 반응은 IgM의 유도, IgG의 유도, 기억 B 세포의 유도, ABC 반응, 단백질이 LNP 내에서 캡슐화될 수 있는 항-단백질 반응을 포함하는 항-약물 항체(ADA) 반응 등을 포함할 수 있다.
- [0679] B1a 세포는 선천성 면역에 연루된 B 세포의 소집단이다. 이들 세포는 천연 항체 또는 천연 혈청 항체로서 지칭되는 순환 IgM의 공급원이다. 천연 IgM 항체는 다수의 항원에 대해 약한 친화도를 갖는 것을 특징으로 하며, 따라서 그들은 "다-특이적" 또는 "다-반응성"으로서 지칭되는데, 이는 하나 초과의 항원에 결합하는 그들의 능력을 나타낸다. B1a 세포는 IgG를 생산할 수 없다. 추가적으로, 그들은 기억 세포로 발생되지 않으며, 따라서 적응 면역 반응에 기여하지 않는다. 그러나, 그들은 활성화 시 IgM을 분비할 수 있다. 분비된 IgM은 면역계가 앞서 투여된 항원에 대해 상대적으로 미경험으로 제공되는 시점인 약 2 내지 3주 내에 전형적으로 제거된다. 이 시간 기간 후(예를 들어 초기 노출 후 약 3주에) 동일한 항원이 제시된다면, 항원은 빠르게 제거되지 않는다. 그러나, 상당하게는, 항원은 해당 시간 기간 내에(예를 들어, 2주 내에(1주 내 또는 며칠 내를 포함)) 제시된다면, 항원은 빠르게 제거된다. 연속적 용량 사이의 이런 지연은 사용에 적합하지 않은 소정의 지질-함유 치료제 또는 진단제를 제공하였다.
- [0680] 인간에서, B1a 세포는 CD19(+), CD20(+), CD27(+), CD43(+), CD70(-) 및 CD5(+)이다. 마우스에서, B1a 세포는 CD19(+), CD5(+), 및 CD45 B 세포 아이소폼 B220(+)이다. 전형적으로 B1a 세포를 다른 통상적인 B 세포와 구별하는 CD5의 발현이 있다. B1a 세포는 고수준의 CD5를 발현시킬 수 있으며, 이에 기반하여 저수준 또는 검출 가능하지 않은 수준의 CD5를 발현시키는 다른 B-1 세포, 예컨대 B-1b 세포와 구별될 수 있다. CD5는 pan-T 세포 표면 당단백질이다. B1a 세포는 또한 지방산 전위효소로서 알려진 CD36을 발현시킨다. CD36은 클래스 B 스캐빈저 수용체 패밀리의 구성원이다. CD36은 산화된 저밀도 지방단백질, 천연 지방단백질, 산화된 인지질 및 장쇄 지방산을 포함하는 다수의 리간드에 결합할 수 있다.
- [0681] B1b 세포는 선천성 면역에 연루된 B 세포의 다른 소집단이다. 이들 세포는 순환 천연 IgM의 다른 공급원이다. PS를 포함하는 몇몇 항원은 B1b 활성화를 통해 T 세포 독립적 면역을 유도할 수 있다. CD27은 전형적으로 항원 활성화에 반응하여 B1b 세포 상에서 상향조절된다. B1a 세포와 유사하게, B1b 세포는 전형적으로 특정 신체 위치, 예컨대 비장 및 복막강에 위치되고, 혈액에서 존재비가 매우 낮다. B1b 분비된 천연 IgM은 전형적으로 면역계가 앞서 투여된 항원에 대해 상대적으로 미경험으로 제공되는 시점인 약 2 내지 3주 내에 제거된다. 동일한 항원이 이 시간 기간 후에(예를 들어, 초기 노출 후 약 3주에) 제시된다면, 항원은 빠르게 제거되지 않는다. 그러나, 상당하게, 항원이 해당 시간 기간 내에(예를 들어, 1주 내에 또는 며칠 내를 포함하여, 2주 내에) 제시된다면, 항원은 빠르게 제거된다. 연속적 투약 사이의 이런 지연은 사용에 적합하지 않은 소정의 지질-함유 치료제 또는 진단제를 제공하였다.
- [0682] 일부 실시형태에서, B1a 및/또는 B1b 세포 활성화를 차단하는 것이 바람직하다. B1a 및/또는 B1b 세포 활성화를 차단하기 위한 한 가지 전략은 지질 나노입자의 성분이 B 세포 활성화 및 해당 성분의 중성화를 촉진시키는지를 결정하는 것을 수반한다. 본 명세서에서 적어도 PEG 및 포스파티딜콜린(PC)이 다른 세포와의 B1a 및 B1b 세포 상호작용 및/또는 활성화에 기여한다는 것을 발견하였다. PEG는 활성화를 야기할 수 있는 B1 세포와 혈소판 사이의 응집을 촉진하는 데 어떤 역할을 할 수 있다. PC(LNP에서의 헬퍼 지질)는 또한 가능하게는 B 세포 표면 상에서 CD36 수용체와의 상호작용을 통해 B1 세포를 활성화시키는 데 연루된다. 수많은 입자는 PEG-지질 대안의, 무 PEG를 갖고/갖거나 PC 대체 지질(예를 들어, 올레산 또는 이의 유사체)을 설계하고 시험하였다. 출원인은 반복 투여 시 ABC를 달리 촉진시키는 LNP 내의 이들 성분 중 하나 이상의 대체가 천연 IgM 및/또는 B 세포 활성화의 생산을 감소시킴으로써 ABC를 방지하는 데 유용하다는 것을 확립하였다. 따라서, 본 발명은 B 세포 촉발자의 포함을 제거한 설계의 결과로서 ABC가 감소된 LNP를 포함한다.
- [0683] B1a 및/또는 B1b 세포 활성화를 차단시키기 위한 다른 전략은 LNP에 의해 유도되는 면역 반응을 저해하는 제제를 이용하는 것을 수반한다. 이들 유형의 제제는 이하에 상세하게 논의한다. 일부 실시형태에서, 이들 제제는 B1a/B1b 세포와 LNP 또는 혈소판 또는 pDC 사이의 상호작용을 차단한다. 예를 들어, 제제는 상호작용을 물리적으로 차단하는 항체 또는 다른 결합제일 수 있다. 이의 예는 CD36 또는 CD6에 결합하는 항체이다. 제제는 또한 일단 활성화되면 또는 활성화 전에 B1a/B1b 세포가 신호전달되는 것을 방지하거나 또는 불가능하게 하는 화합물일 수 있다. 예를 들어, LNP 또는 다른 면역 세포와의 B 세포 상호작용으로부터 초래된 B1a/B1b 신호전달 캐스케이드에서 하나 이상의 성분을 차단할 수 있다. 다른 실시형태에서, 제제는 활성화 후 B1a/B1b 세포에 의해 생

산된 하나 이상의 효과기로 작용할 수 있다. 이들 효과기는, 예를 들어, 천연 IgM 및 사이토카인을 포함한다.

[0684] 본 발명의 양상에 따르면 pDC 세포의 활성화가 차단될 때, LNP에 반응한 B 세포 활성화가 감소된다는 것이 입증된다. 따라서, ABC 및/또는 독성을 회피하기 위해, pDC 활성화를 방지하는 것이 바람직할 수 있다. 상기 논의한 전략과 유사하게, pDC 세포 활성화는 pDC와 LNP 및/또는 B 세포/혈소판 사이의 상호작용과 상호작용하는 제제에 의해 차단될 수 있다. 대안적으로 활성화되는 능력을 차단하는 pDC 상에서 또는 그의 효과기 상에서 작용하는 제제는 ABC를 회피하기 위해 LNP와 함께 사용될 수 있다.

[0685] 혈소판은 또한 ABC 및 독성에서 중요한 역할을 할 수 있다. 제1 용량의 LNP가 대상체에게 투여된 후에 매우 빠르게, 혈소판은 LNP와 회합하고, 응집하며, 활성화된다. 일부 실시형태에서, 혈소판 응집 및/또는 활성화를 차단하는 것은 바람직하다. 혈소판 응집 및/또는 활성화를 차단하기 위한 한 가지 전략은 지질 나노입자의 성분이 혈소판 응집 및/또는 활성화 및 해당 성분의 중성화를 촉진시키는지를 결정하는 것을 수반한다. 본 명세서에서 적어도 PEG가 혈소판 응집, 활성화 및/또는 다른 세포와의 상호작용에 기여한다는 것을 발견하였다. 수많은 입자는 PEG-지질을 가지며, 대안의 그리고 무 PEG가 설계되고 시험되었다. 다르게는 반복 투여 시 ABC를 촉진시키는 LNP 내의 이들 성분 중 하나 이상의 대체는 천연 IgM 및/또는 혈소판 응집의 생산을 감소시킴으로써 ABC를 예방하는 데 유용하다는 것을 확립하였다. 따라서, 본 발명은 혈소판 촉발지의 포함을 제거하는 설계의 결과로서 ABC가 감소된 LNP를 포함한다. 대안적으로 활성을 차단하기 위해 혈소판 상에서 작용하는 제제는, 일단 그것이 활성화되거나 또는 그의 효과기 상에 있다면, ABC를 회피하기 위해 LNP와 함께 사용될 수 있다.

[0686] ABC 활성 및 관련된 활성의 측정

[0687] LNP를 포함하는, 본 명세서에 제공된 다양한 화합물 및 조성물은 생체내 투여 시 ABC 활성을 촉진시키지 않는다. 이들 LNP는 이하에 기재되는 것과 같지만, 이들로 제한되지 않는 다수의 검정을 통해 특성규명되고/되거나 동정될 수 있다.

[0688] 일부 실시형태에서, 상기 방법은 ABC를 촉진시키는 면역 반응을 생산하는 일 없이 LNP를 투여하는 단계를 수반한다. ABC를 촉진시키는 면역 반응은 하나 이상의 센서, 예컨대 B1 세포, pDC 또는 혈소판, 및 하나 이상의 효과기, 예컨대 천연 IgM, 천연 IgG 또는 사이토카인 예컨대 IL6의 활성화를 수반한다. 따라서 ABC를 촉진시키는 면역 반응을 생산하는 일 없이 LNP의 투여는 하나 이상의 센서의 상당한 활성화 및 하나 이상의 효과기의 상당한 생산 없이 LNP의 투여를 최소로 수반한다. 이와 관련하여 사용되는 유의한은 ABC 촉발 LNP의 제2 용량에 대해 예상되는 혈액 청소율 수준에 대해 제2 용량의 모두 또는 부분의 가속화된 혈액 청소율의 생리적 결과를 야기하는 양을 지칭한다. 예를 들어, 제2 용량 후 관찰된 ABC가 ABC 촉발 LNP에 대해 예상된 것보다 더 낮도록 면역 반응은 약화되어야 한다.

[0689] B1a 또는 B1b 활성화 검정

[0690] 본 개시내용에서 제공된 소정의 조성물은 B 세포, 예컨대 B1a 또는 B1b 세포(CD19+ CD5+) 및/또는 통상적인 B 세포(CD19+ CD5-)를 활성화시키지 않는다. B1a 세포, B1b 세포 또는 통상적인 B 세포의 활성화는 다수의 방법으로 결정될 수 있는데, 이 중 일부는 이하에 제공된다. B 세포 집단은 분획화된 B 세포 집단 또는 비장세포 또는 말초 혈액 단핵구 세포(PBMC)의 비분획화 집단으로서 제공될 수 있다. 이후에, 세포 집단이 시간 기간 동안 선택된 LNP와 인큐베이션시킬 수 있다면, 추가적인 분석을 위해 채취된다. 대안적으로, 상청액은 채취되고 분석될 수 있다.

[0691] 활성화 마커 세포 표면 발현의 상향 발현

[0692] B1a 세포, B1b 세포 또는 통상적인 B 세포의 활성화는 후기 활성화 마커, 예컨대 CD86을 포함하는 B 세포 활성화 마커의 증가된 발현으로서 입증될 수 있다. 예시적인 비제한적 검정에서, 비분획화된 B 세포는 비장세포 집단으로서 또는 PBMC 집단으로서 제공되고, 특정 시간 기간 동안 선택된 LNP와 함께 인큐베이션되고, 이어서, 표준 B 세포 마커, 예컨대 CD19에 대해 그리고 활성화 마커, 예컨대 CD86에 대해 염색되고, 예를 들어 유세포분석을 이용하여 분석된다. 적합한 음성 대조군은 배지와 함께 동일한 집단을 인큐베이션시키고, 이어서, 동일한 염색 및 시각화 단계를 수행하는 것을 수반한다. 음성 대조군에 비해 시험 집단의 CD86 발현 증가는 B 세포 활성화를 나타낸다.

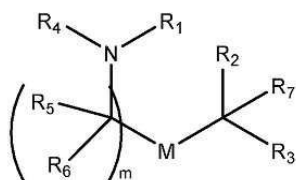
[0693] 전염증 사이토카인 방출

[0694] B 세포 활성화는 또한 사이토카인 방출 검정에 의해 평가될 수 있다. 예를 들어, 활성화는 관심 대상의 LNP의 노출 시 사이토카인 예컨대 IL-6 및/또는 TNF-알파의 생산 및/또는 분비를 통해 평가될 수 있다.

- [0695] 이러한 검정은 당업계에 잘 공지된 일상적인 사이토카인 분비 검정을 이용하여 수행될 수 있다. 사이토카인 분비의 증가는 B 세포 활성화를 나타낸다.
- [0696] B 세포에 대한 LNP 결합/회합 및/또는 이에 의한 흡수
- [0697] B 세포에 대한 LNP 회합 또는 결합은 또한 관심 대상의 LNP를 평가하기 위해 그리고 이러한 LNP를 추가로 특정 규명하기 위해 사용될 수 있다. 회합/결합 및/또는 흡수/내재화는 검출 가능하게 표시된, 예컨대 형광 표시된 LNP를 이용하여 그리고 다양한 인큐베이션 기간 후 B 세포에서 또는 상에서 이러한 LNP의 위치를 추적하여 평가될 수 있다.
- [0698] 본 발명은 본 명세서에 제공된 조성물이 인식 또는 검출을 회피할 수 있고, 선택적으로 ABC의 하류의 매개체, 예컨대 순환 IgM 및/또는 급성기 반응 매개체, 예컨대 급성기 단백질(예를 들어, C-반응성 단백질(C-reactive protein: CRP))에 의해 결합할 수 있다.
- [0699] ABC를 감소시키기 위한 사용 방법
- [0700] 또한 본 명세서에서 ABC를 촉진시키는 일 없이 대상체에게 제제, 예컨대 치료제를 캡슐화할 수 있는 LNP를 전달하기 위한 방법이 제공된다.
- [0701] 일부 실시형태에서, 본 방법은 ABC를 촉진시키지 않는, 예를 들어, LNP에 대한 천연 IgM 결합의 생산을 유도하지 않는, B1a 및/또는 B1b 세포를 활성화시키지 않는 본 명세서에 기재된 임의의 LNP를 투여하는 단계를 포함한다. 본 명세서에 사용되는 바와 같은, "ABC를 촉진시키지 않는" LNP는 실질적인 ABC를 야기하는 면역 반응을 유도하지 않거나 또는 실질적인 ABC를 야기하기에 충분하지 않은 실질적으로 저수준의 면역 반응을 유도하는 LNP를 지칭한다. LNP에 대한 천연 IgM 결합의 생산을 유도하지 않는 LNP는 LNP에 대한 천연 IgM 결합을 유도하지 않거나 또는 실질적인 ABC를 야기하기에 충분하지 않은 천연 IgM 분자의 실질적으로 저수준을 유도하는 LNP를 지칭한다. B1a 및/또는 B1b 세포를 활성화시키지 않는 LNP는 LNP에 대한 천연 IgM 결합을 생산하는 B1a 및/또는 B1b 세포의 반응을 유도하지 않거나 또는 실질적인 ABC를 야기하기에 충분하지 않은 B1a 및/또는 B1b 반응의 실질적으로 낮은 수준을 유도하는 LNP를 지칭한다.
- [0702] 일부 실시형태에서, 상기 용어는 생산을 활성화시키지 않고 유도하지 않으며, 기준 값 또는 조건에 대한 상대적 감소이다. 일부 실시형태에서, 기준값 또는 조건은 표준 LNP, 예컨대 MC3 LNP에 의한 IgM과 같은 분자 생산의 활성화 또는 유도의 양이다. 일부 실시형태에서, 상대적 감소는 적어도 30%, 예를 들어 적어도 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 감소이다. 다른 실시형태에서 상기 용어는 B 세포와 같은 세포를 활성화시키지 않으며, 단백질, 예컨대 IgM의 생산을 유도하지 않고, 검출 가능하지 않은 양의 활성 세포 또는 특정 단백질을 지칭할 수 있다.
- [0703] 혈소판 효과 및 독성
- [0704] 본 발명은 추가로 LNP 투여와 관련된 용량-제한적 독성의 기초를 이루는 메커니즘의 설명을 부분적으로 전체로 한다. 이러한 독성은 응고 장애, 과중성 혈관 내 응고(DIC, 또한 소모성 응고 장애로서 지칭됨), 급성인지 또는 만성인지의 여부, 및/또는 혈관 혈전증을 수반할 수 있다. 일부 예에서, LNP와 관련된 용량-제한적 독성은 급성기 반응(APR) 또는 상보체 활성화-관련 유사알레르기(CARPA)이다.
- [0705] 본 명세서에 사용되는 바와 같은, 응고 장애는 생체내에서 증가된 응고(혈병)를 지칭한다. 본 개시내용에 보고된 발견은 이러한 증가된 응고와 일치되며, 근본적인 메커니즘에 대한 통찰을 상당히 제공한다. 응고는 다수의 상이한 인자 및 세포 유형을 수반하는 과정이며, 이전에는 LNP와 혈소판 사이의 관계 및 상호작용은 이와 관련하여 이해되지 않았다. 본 개시내용은 이러한 상호작용의 증거를 제공하며, 또한 감소된 혈소판 회합, 감소된 혈소판 응집 및/또는 감소된 혈소판 응집을 포함하는 감소된 혈소판 효과를 갖도록 변형된 화합물 및 조성물을 제공한다. 이러한 혈소판 효과를 조절하는(바람직하게는 하향조절하는 것을 포함) 능력은 LNP 투여 후 응고 장애의 발생률 및/또는 중증도를 감소시킬 수 있다. 이는 결국 이러한 LNP에 관한 독성을 감소시킴으로써 LNP 및 중요하게는 그들의 화물(cargo)이 이것이 필요한 환자에게 더 고용량으로 투여되도록 허용할 것이다.
- [0706] CARPA는 과민 반응(hypersensitivity reaction: HSR)에서 나타나는 급성 면역 독성의 부류이며, 이는 나노의학 및 생물학에 의해 촉발될 수 있다. 알레르기 반응과 달리, CARPA는 전형적으로 IgE를 수반하지 않지만, 병원균을 제거하는 신체의 능력을 향상시키는 선천성 면역계의 부분인 보체계의 활성화 결과로서 생긴다. 다음의 경로, 즉, 고전적 보체 경로(CP), 대안의 경로(AP) 및 렉틴 경로(LP) 중 하나 이상은 CARPA에 연루될 수 있다. 문헌[Szebeni, Molecular Immunology, 61:163-173 (2014)].

- [0707] 고전적 경로는 C1q, C1r, C1s, 또는 C1qr2s2를 함유하는 C1-복합체의 활성화에 의해 촉발된다. C1q가 항원과 복합체화되는 IgM 또는 IgG에 결합할 때, 또는 C1q가 병원균의 표면에 직접적으로 결합할 때 C1-복합체의 활성화가 일어난다. 이러한 결합은 C1q 분자에서의 입체배와 변화를 야기하는데, 이는 C1r의 활성화를 야기하고, 결국, C1s를 절단한다. C1r2s2 성분은 이제 C4 및 이어서, C2를 분할하여, C4a, C4b, C2a 및 C2b를 생성한다. C4b 및 C2b는 결합되어 고전적 경로 C3-전환효소(C4b2b 복합체)를 형성하고, 이는 C3의 C3a 및 C3b로의 절단을 촉진한다. 이어서, C3b는 C3 전환효소에 결합하여 C5 전환효소(C4b2b3b 복합체)를 형성한다. 대안의 경로는 자발적 C3 가수분해의 결과로서 지속적으로 활성화된다. 인자 P(프로퍼딘)는 대안의 경로의 양성 조절자이다. 프로퍼딘의 올리고머화는 C3 전환효소를 안정화시키는데, 이는, 이어서, 훨씬 더 많은 C3을 절단할 수 있다. C3 분자는 표면에 결합되고, 더 많은 B, D, 및 P 활성을 보충하여, 보체 활성화의 증폭을 야기한다.
- [0708] 급성기 반응(APR)은 감염을 방지하고 잠재적 병원균을 제거하기 위한 복잡한 전신 선천성 면역 반응이다. 수많은 단백질이 APR에 연루되며, C-반응성 단백질은 잘 특성규명된 것이다.
- [0709] 본 발명에 따르면, 소정의 LNP가 생체내 투여의 거의 직후에 혈소판과 물리적으로 회합할 수 있는 한편, 다른 LNP가 배정 수준에서 모두 또는 단독으로 혈소판과 회합하지 않는다는 것을 발견하였다. 상당하게는, 혈소판과 회합하는 해당 LNP는 또한 이후에 형성되는 혈소판 응집물을 분명하게 안정화시킨다. 소정의 LNP와 혈소판의 물리적 접촉은 투여 후 장기간 동안 지속적으로 응집된 채로 남아있거나 응집물을 형성하는 이러한 혈소판의 능력과 상관관계가 있다. 이러한 응집물은 활성화된 혈소판 및 또한 선천성 면역 세포 예컨대 대식세포 및 B 세포를 포함한다.
- [0710] 지질 나노입자(LNP)
- [0711] 한 세트의 실시형태에서, 지질 나노입자(LNP)가 제공된다. 일 실시형태에서, 지질 나노입자는 이온화 가능한 지질, 구조적 지질, 인지질 및 mRNA를 포함하는 지질을 포함한다. 본 명세서에 기재된 LNP의 각각은 본 명세서에 기재된 mRNA에 대한 제형으로서 사용될 수 있다. 일 실시형태에서, 지질 나노입자는 이온화 가능한 지질, 구조적 지질, 인지질 및 mRNA를 포함한다. 일부 실시형태에서, LNP는 이온화 가능한 지질, PEG-변형 지질, 인지질 및 구조적 지질을 포함한다. 일부 실시형태에서, LNP는 약 20 내지 60%의 이온화 가능한 지질: 약 5 내지 25%의 인지질: 약 25 내지 55%의 구조적 지질; 및 약 0.5 내지 15%의 PEG-변형 지질의 물비를 가진다. 일부 실시형태에서, LNP는 약 50% 이온화 가능한 지질, 약 1.5% PEG-변형 지질, 약 38.5% 구조적 지질 및 약 10% 인지질의 물비를 포함한다. 일부 실시형태에서, LNP는 약 55% 이온화 가능한 지질, 약 2.5% PEG 지질, 약 32.5% 구조적 지질 및 약 10% 인지질의 물비를 포함한다. 일부 실시형태에서, 이온화 가능한 지질은 이온화 가능한 아미노 또는 양이온성 지질이고, 인지질은 중성 지질이며, 그리고 구조적 지질은 콜레스테롤이다. 일부 실시형태에서, LNP는 이온화 가능한 지질: 콜레스테롤: DSPC: PEG2000-DMG의 50:38.5:10:1.5의 물비를 가진다.
- [0712] 이온화 가능한 아미노 지질
- [0713] 본 개시내용은 유리한 특성을 갖는 약제학적 조성물을 제공한다. 예를 들어, 본 명세서에 기재된 지질(예를 들어, 화학식 (I), (IA), (II), (IIa), (IIb), (IIc), (IId), (IIe), (III), (IV), (V) 또는 (VI) 중 어떤 것을 갖는 것)은 포유류 세포 또는 기관에 대한 치료적 및/또는 예방적 제제의 전달을 위해 지질 나노입자 조성물에서 유리하게 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 명세서에 기재된 지질은 면역원성이 거의 없거나 또는 전혀 없다. 예를 들어, 본 명세서에 개시된 지질 화합물은 기준 지질(예를 들어, MC3, KC2, 또는 DLinDMA)에 비해 더 낮은 면역원성을 가진다. 예를 들어, 본 명세서에 개시된 지질 및 치료제 또는 예방제를 포함하는 제형은 기준 지질(예를 들어, MC3, KC2 또는 DLinDMA) 및 동일한 치료제 또는 예방제를 포함하는 대응하는 제형에 비해 증가된 치료 지수를 가진다. 특히, 본 출원은 하기를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다:
- [0714] (a) 하나 이상의 암 에피토프 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드; 및
- [0715] (b) 전달제.
- [0716] 일부 실시형태에서, 전달제는 하기 화학식 (I)을 갖는 지질 화합물 또는 이의 염 또는 입체이성질체를 포함한다:





(I)

식 중:

R<sub>1</sub>은 C<sub>5-30</sub> 알킬, C<sub>5-20</sub> 알켄일, -R\*YR", -YR" 및 -R"M'R'로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R<sub>2</sub> 및 R<sub>3</sub>은 H, C<sub>1-14</sub> 알킬, C<sub>2-14</sub> 알켄일, -R\*YR", -YR" 및 -R\*OR"로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되거나, 또는 R<sub>2</sub> 및 R<sub>3</sub>은 그들이 부착된 원자와 함께 헤테로사이클 또는 카보사이클을 형성하며;

R<sub>4</sub>는 C<sub>3-6</sub> 카보사이클, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>Q, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CHQR, -CHQR, -CQ(R)<sub>2</sub>, 및 비치환된 C<sub>1-6</sub> 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기서 Q는 카보사이클, 헤테로사이클, -OR, -O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>N(R)<sub>2</sub>, -C(O)OR, -OC(O)R, -CX<sub>3</sub>, -CX<sub>2</sub>H, -CXH<sub>2</sub>, -CN, -N(R)<sub>2</sub>, -C(O)N(R)<sub>2</sub>, -N(R)C(O)R, -N(R)S(O)<sub>2</sub>R, -N(R)C(O)N(R)<sub>2</sub>, -N(R)C(S)N(R)<sub>2</sub>, -N(R)R<sub>8</sub>, -O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OR, -N(R)C(=NR<sub>9</sub>)N(R)<sub>2</sub>, -N(R)C(=CHR<sub>9</sub>)N(R)<sub>2</sub>, -OC(O)N(R)<sub>2</sub>, -N(R)C(O)OR, -N(OR)C(O)R, -N(OR)S(O)<sub>2</sub>R, -N(OR)C(O)OR, -N(OR)C(O)N(R)<sub>2</sub>, -N(OR)C(S)N(R)<sub>2</sub>, -N(OR)C(=NR<sub>9</sub>)N(R)<sub>2</sub>, -N(OR)C(=CHR<sub>9</sub>)N(R)<sub>2</sub>, -C(=NR<sub>9</sub>)N(R)<sub>2</sub>, -C(=NR<sub>9</sub>)R, -C(O)N(R)OR 및 -C(R)N(R)<sub>2</sub>C(O)OR로부터 선택되고, 각각의 n은 1, 2, 3, 4 및 5로부터 독립적으로 선택되며;

각각의 R<sub>5</sub>는 C<sub>1-3</sub> 알킬, C<sub>2-3</sub> 알켄일 및 H로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;

각각의 R<sub>6</sub>은 C<sub>1-3</sub> 알킬, C<sub>2-3</sub> 알켄일 및 H로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며;

M 및 M'는 -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)N(R')-, -N(R')C(O)-, -C(O)-, -C(S)-, -C(S)S-, -SC(S)-, -CH(OH)-, -P(O)(OR')O-, -S(O)<sub>2</sub>-, -S-S-, 아릴기 및 헤테로아릴기로부터 독립적으로 선택되고;

R<sub>7</sub>은 C<sub>1-3</sub> 알킬, C<sub>2-3</sub> 알켄일 및 H로 이루어진 군으로부터 선택되며;

R<sub>8</sub>은 C<sub>3-6</sub> 카보사이클 및 헤테로사이클로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R<sub>9</sub>는 H, CN, NO<sub>2</sub>, C<sub>1-6</sub> 알킬, -OR, -S(O)<sub>2</sub>R, -S(O)<sub>2</sub>N(R)<sub>2</sub>, C<sub>2-6</sub> 알켄일, C<sub>3-6</sub> 카보사이클 및 헤테로사이클로 이루어진 군으로부터 선택되며;

각각의 R은 C<sub>1-3</sub> 알킬, C<sub>2-3</sub> 알켄일 및 H로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;

각각의 R'는 C<sub>1-18</sub> 알킬, C<sub>2-18</sub> 알켄일, -R\*YR", -YR" 및 H로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며;

각각의 R"는 C<sub>3-14</sub> 알킬 및 C<sub>3-14</sub> 알켄일로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;

각각의 R\*은 C<sub>1-12</sub> 알킬 및 C<sub>2-12</sub> 알켄일로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며;

각각의 Y는 독립적으로 C<sub>3-6</sub> 카보사이클이고;

각각의 X는 F, Cl, Br 및 I로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며; 그리고

m은 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 및 13으로부터 선택된다.

일부 실시형태에서, 화학식 (I)의 화합물의 소집단은 하기의 화합물 또는 이의 염 또는 입체이성질체를 포함하되, 이때

R<sub>1</sub>은 C<sub>5-20</sub> 알킬, C<sub>5-20</sub> 알켄일, -R\*YR", -YR" 및 -R"M'R'로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R<sub>2</sub> 및 R<sub>3</sub>은 H, C<sub>1-14</sub> 알킬, C<sub>2-14</sub> 알켄일, -R\*YR", -YR" 및 -R\*OR"로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되거나

또는 R<sub>2</sub> 및 R<sub>3</sub>은 그들이 부착된 원자와 함께 헤테로사이클 또는 카보사이클을 형성하고;

- [0738] R<sub>4</sub>는 C<sub>3-6</sub> 카보사이클, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>Q, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CHQR, -CHQR, \*CQ(R)<sub>2</sub>, 및 비치환된 C<sub>1-6</sub> 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 Q는 카보사이클, 헤테로사이클, -OR, -O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>N(R)<sub>2</sub>, -C(O)OR, -OC(O)R, -CX<sub>3</sub>, -CX<sub>2</sub>H, -CXH<sub>2</sub>, -CN, -N(R)<sub>2</sub>, -C(O)N(R)<sub>2</sub>, -N(R)C(O)R, -N(R)S(O)<sub>2</sub>R, -N(R)C(O)N(R)<sub>2</sub>, -N(R)C(S)N(R)<sub>2</sub>, 및 -C(R)N(R)<sub>2</sub>C(O)OR로부터 선택되고, 그리고 각각의 n은 1, 2, 3, 4 및 5로부터 독립적으로 선택되며;
- [0739] 각각의 R<sub>5</sub>는 C<sub>1-3</sub> 알킬, C<sub>2-3</sub> 알켄일 및 H로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;
- [0740] 각각의 R<sub>6</sub>은 C<sub>1-3</sub> 알킬, C<sub>2-3</sub> 알켄일 및 H로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며;
- [0741] M 및 M'는 -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)N(R')-, -N(R')C(O)-, -C(O)-, -C(S)-, -C(S)S-, -SC(S)-, -CH(OH)-, -P(O)(OR')O-, -S(O)<sub>2</sub>-, 아릴기 및 헤테로아릴기로부터 독립적으로 선택되고;
- [0742] R<sub>7</sub>은 C<sub>1-3</sub> 알킬, C<sub>2-3</sub> 알켄일 및 H로 이루어진 군으로부터 선택되며;
- [0743] 각각의 R은 C<sub>1-3</sub> 알킬, C<sub>2-3</sub> 알켄일 및 H로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;
- [0744] 각각의 R'는 C<sub>1-18</sub> 알킬, C<sub>2-18</sub> 알켄일, -R\*YR", -YR" 및 H로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며;
- [0745] 각각의 R"는 C<sub>3-14</sub> 알킬 및 C<sub>3-14</sub> 알켄일로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;
- [0746] 각각의 R\*은 C<sub>1-12</sub> 알킬 및 C<sub>2-12</sub> 알켄일로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며;
- [0747] 각각의 Y는 독립적으로 C<sub>3-6</sub> 카보사이클이고;
- [0748] 각각의 X는 F, Cl, Br 및 I로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며; 그리고 m은 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 및 13으로부터 선택되며,
- [0749] 알킬 및 알켄일기는 선형 또는 분지형일 수 있다.
- [0750] 일부 실시형태에서, 화학식 (I)의 화합물의 소집단은 R<sub>4</sub>가 -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>Q, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CHQR, -CHQR 또는 -CQ(R)<sub>2</sub>일 때의 화합물을 포함하며, (i) n이 1, 2, 3, 4 또는 5일 때, Q는 -N(R)<sub>2</sub>가 아니거나, 또는 (ii) n이 1 또는 2일 때 Q는 5, 6 또는 7-원 헤테로사이클로알킬이 아니다.
- [0751] 일부 실시형태에서, 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 염 또는 이성질체, 입체이성질체의 다른 소집단은 하기를 포함한다:
- [0752] R<sub>1</sub>은 C<sub>5-30</sub> 알킬, C<sub>5-20</sub> 알켄일, -R\*YR", -YR" 및 -R"M'R'로 이루어진 군으로부터 선택되고
- [0753] R<sub>2</sub> 및 R<sub>3</sub>은 H, C<sub>1-14</sub> 알킬, C<sub>2-14</sub> 알켄일, -R\*YR", -YR" 및 -R\*OR"로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되거나, 또는 R<sub>2</sub> 및 R<sub>3</sub>은 그들이 부착된 원자와 함께 헤테로사이클 또는 카보사이클을 형성하고;
- [0754] R<sub>4</sub>는 C<sub>3-6</sub> 카보사이클, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>Q, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CHQR, -CHQR, -CQ(R)<sub>2</sub>, 및 비치환된 C<sub>1-6</sub> 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기서 Q는 옥소(=O), OH, 아미노, 모노- 또는 다이-알킬아미노 및 C<sub>1-3</sub> 알킬로부터 선택된 하나 이상의 치환체로 치환되는, C<sub>3-6</sub> 카보사이클, N, O 및 S로부터 선택되는 하나 이상의 헤테로원자를 갖는 5- 내지 14-원 헤테로아릴, -OR, -O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>N(R)<sub>2</sub>, -C(O)OR, -OC(O)R, -CX<sub>3</sub>, -CX<sub>2</sub>H, -CXH<sub>2</sub>, -CN, -C(O)N(R)<sub>2</sub>, -N(R)C(O)R, -N(R)S(O)<sub>2</sub>R, -N(R)C(O)N(R)<sub>2</sub>, -N(R)C(S)N(R)<sub>2</sub>, -CRN(R)<sub>2</sub>C(O)OR, -N(R)R<sub>8</sub>, -O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OR, -N(R)C(=NR<sub>9</sub>)N(R)<sub>2</sub>, -N(R)C(=CHR<sub>9</sub>)N(R)<sub>2</sub>, -OC(O)N(R)<sub>2</sub>, -N(R)C(O)OR, -N(OR)C(O)R, -N(OR)S(O)<sub>2</sub>R, -N(OR)C(O)OR, -N(OR)C(O)N(R)<sub>2</sub>, -N(OR)C(S)N(R)<sub>2</sub>, -N(OR)C(=NR<sub>9</sub>)N(R)<sub>2</sub>, -N(OR)C(=CHR<sub>9</sub>)N(R)<sub>2</sub>, -C(=NR<sub>9</sub>)N(R)<sub>2</sub>, -C(=NR<sub>9</sub>)R, -C(O)N(R)OR 및 N, O 및 S로부터 선택되는 하나 이상의 헤테로원자를 갖는 5- 내지 14-원 헤테로사이클로알킬로부터 선택되고, 각각의 n은 1, 2, 3, 4 및 5로부터 독립적으로 선택되며;
- [0755] 각각의 R<sub>5</sub>는 C<sub>1-3</sub> 알킬, C<sub>2-3</sub> 알켄일 및 H로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;

- [0756] 각각의  $R_6$ 은  $C_{1-3}$  알킬,  $C_{2-3}$  알켄일 및 H로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며;
- [0757] M 및 M'는  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ ,  $-C(O)N(R')-$ ,  $-N(R')C(O)-$ ,  $-C(O)-$ ,  $-C(S)-$ ,  $-C(S)S-$ ,  $-SC(S)-$ ,  $-CH(OH)-$ ,  $-P(O)(OR')O-$ ,  $-S(O)_2-$ ,  $-S-S-$ , 아릴기 및 헤테로아릴기로부터 독립적으로 선택되고;
- [0758]  $R_7$ 은  $C_{1-3}$  알킬,  $C_{2-3}$  알켄일 및 H로 이루어진 군으로부터 선택되며;
- [0759]  $R_8$ 은  $C_{3-6}$  카보사이클 및 헤테로사이클로 이루어진 군으로부터 선택되고;
- [0760]  $R_9$ 는 H, CN,  $NO_2$ ,  $C_{1-6}$  알킬,  $-OR$ ,  $-S(O)_2R$ ,  $-S(O)_2N(R)_2$ ,  $C_{2-6}$  알켄일,  $C_{3-6}$  카보사이클 및 헤테로사이클로 이루어진 군으로부터 선택되며;
- [0761] 각각의 R은  $C_{1-3}$  알킬,  $C_{2-3}$  알켄일 및 H로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;
- [0762] 각각의 R'는  $C_{1-18}$  알킬,  $C_{2-18}$  알켄일,  $-R*YR''$ ,  $-YR''$  및 H로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며;
- [0763] 각각의 R''는  $C_{3-14}$  알킬 및  $C_{3-14}$  알켄일로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;
- [0764] 각각의 R\*은  $C_{1-12}$  알킬 및  $C_{2-12}$  알켄일로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며;
- [0765] 각각의 Y는 독립적으로  $C_{3-6}$  카보사이클이고;
- [0766] 각각의 X는 F, Cl, Br 및 I로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며; 그리고
- [0767] m은 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 및 13으로부터 선택된다.
- [0768] 일부 실시형태에서, 화학식 (I)의 화합물의 다른 소집단은 하기 화합물 또는 이의 염 또는 이성질체를 포함하되, 이때
- [0769]  $R_1$ 은  $C_{5-30}$  알킬,  $C_{5-20}$  알켄일,  $-R*YR''$ ,  $-YR''$  및  $-R''M'R'$ 로 이루어진 군으로부터 선택되고;
- [0770]  $R_2$  및  $R_3$ 은 H,  $C_{1-14}$  알킬,  $C_{2-14}$  알켄일,  $-R*YR''$ ,  $-YR''$  및  $-R*OR''$ 로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며, 또는  $R_2$  및  $R_3$ 은 그들이 부착된 원자와 함께 헤테로사이클 또는 카보사이클을 형성하고;
- [0771]  $R_4$ 는  $C_{3-6}$  카보사이클,  $-(CH_2)_nQ$ ,  $-(CH_2)_nCHQR$ ,  $-CHQR$ ,  $-CQ(R)_2$ , 및 비치환된  $C_{1-6}$  알킬로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기서 Q는  $C_{3-6}$  카보사이클, N, O 및 S로부터 선택되는 하나 이상의 헤테로원자를 갖는 5- 내지 14-원 헤테로사이클,  $-OR$ ,  $-O(CH_2)_nN(R)_2$ ,  $-C(O)OR$ ,  $-OC(O)R$ ,  $-CX_3$ ,  $-CX_2H$ ,  $-CXH_2$ ,  $-CN$ ,  $-C(O)N(R)_2$ ,  $-N(R)C(O)R$ ,  $-N(R)S(O)_2R$ ,  $-N(R)C(O)N(R)_2$ ,  $-N(R)C(S)N(R)_2$ ,  $-CRN(R)_2C(O)OR$ ,  $-N(R)R_8$ ,  $-O(CH_2)_nOR$ ,  $-N(R)C(=NR_9)N(R)_2$ ,  $-N(R)C(=CHR_9)N(R)_2$ ,  $-OC(O)N(R)_2$ ,  $-N(R)C(O)OR$ ,  $-N(OR)C(O)R$ ,  $-N(OR)S(O)_2R$ ,  $-N(OR)C(O)OR$ ,  $-N(OR)C(O)N(R)_2$ ,  $-N(OR)C(S)N(R)_2$ ,  $-N(OR)C(=NR_9)N(R)_2$ ,  $-N(OR)C(=CHR_9)N(R)_2$ ,  $-C(=NR_9)R$ ,  $-C(O)N(R)OR$  및  $-C(=NR_9)N(R)_2$ 로부터 선택되고, 각각의 n은 1, 2, 3, 4 및 5로부터 독립적으로 선택되며; Q가 5- 내지 14-원 헤테로사이클이고 그리고 (i)  $R_4$ 가  $-(CH_2)_nQ$ 이거나(n은 1 또는 2임) 또는 (ii)  $R_4$ 가  $-(CH_2)_nCHQR$ 이거나(n은 1임), 또는 (iii)  $R_4$ 가  $-CHQR$ , 및  $-CQ(R)_2$ 일 때, Q는 5- 내지 14-원 헤테로아릴 또는 8- 내지 14-원 헤테로사이클로알킬 중 하나이고;
- [0772] 각각의  $R_5$ 는  $C_{1-3}$  알킬,  $C_{2-3}$  알켄일 및 H로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며;
- [0773] 각각의  $R_6$ 은  $C_{1-3}$  알킬,  $C_{2-3}$  알켄일 및 H로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;
- [0774] M 및 M'는  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ ,  $-C(O)N(R')-$ ,  $-N(R')C(O)-$ ,  $-C(O)-$ ,  $-C(S)-$ ,  $-C(S)S-$ ,  $-SC(S)-$ ,  $-CH(OH)-$ ,  $-P(O)(OR')O-$ ,  $-S(O)_2-$ ,  $-S-S-$ , 아릴기 및 헤테로아릴기로부터 독립적으로 선택되며;
- [0775]  $R_7$ 은  $C_{1-3}$  알킬,  $C_{2-3}$  알켄일 및 H로 이루어진 군으로부터 선택되고;
- [0776]  $R_8$ 은  $C_{3-6}$  카보사이클 및 헤테로사이클로 이루어진 군으로부터 선택되며;

- [0777]  $R_9$ 는 H, CN,  $NO_2$ ,  $C_{1-6}$  알킬, -OR,  $-S(O)_2R$ ,  $-S(O)_2N(R)_2$ ,  $C_{2-6}$  알켄일,  $C_{3-6}$  카보사이클 및 헤테로사이클로 이루어진 군으로부터 선택되고;
- [0778] 각각의 R은  $C_{1-3}$  알킬,  $C_{2-3}$  알켄일 및 H로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며;
- [0779] 각각의 R'는  $C_{1-18}$  알킬,  $C_{2-18}$  알켄일,  $-R^*YR''$ ,  $-YR''$  및 H로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;
- [0780] 각각의 R''는  $C_{3-14}$  알킬 및  $C_{3-14}$  알켄일로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며;
- [0781] 각각의 R\*은  $C_{1-12}$  알킬 및  $C_{2-12}$  알켄일로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;
- [0782] 각각의 Y는 독립적으로  $C_{3-6}$  카보사이클이며;
- [0783] 각각의 X는 F, Cl, Br 및 I로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며; 그리고
- [0784] m은 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 및 13으로부터 선택된다.
- [0785] 일부 실시형태에서, 화학식 (I)의 화합물의 다른 소집단은 하기 화합물 또는 이의 염 또는 이성질체를 포함한다:
- [0786]  $R_1$ 은  $C_{5-30}$  알킬,  $C_{5-20}$  알켄일,  $-R^*YR''$ ,  $-YR''$  및  $-R''M'R'$ 로 이루어진 군으로부터 선택되고;
- [0787]  $R_2$  및  $R_3$ 은 H,  $C_{1-14}$  알킬,  $C_{2-14}$  알켄일,  $-R^*YR''$ ,  $-YR''$  및  $-R^*OR''$ 로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되거나, 또는  $R_2$  및  $R_3$ 은 그들이 부착된 원자와 함께 헤테로사이클 또는 카보사이클을 형성하고;
- [0788]  $R_4$ 는  $C_{3-6}$  카보사이클,  $-(CH_2)_nQ$ ,  $-(CH_2)_nCHQR$ ,  $-CHQR$ ,  $-CQ(R)_2$ , 및 비치환된  $C_{1-6}$  알킬로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기서 Q는 옥소(=O), OH, 아미노 및  $C_{1-3}$  알킬로부터 선택된 하나 이상의 치환체로 치환된,  $C_{3-6}$  카보사이클, N, O 및 S로부터 선택되는 하나 이상의 헤테로원자를 갖는 5- 내지 14-원 헤테로아릴, -OR,  $-O(CH_2)_nN(R)_2$ ,  $-C(O)OR$ ,  $-OC(O)R$ ,  $-CX_3$ ,  $-CX_2H$ ,  $-CXH_2$ ,  $-CN$ ,  $-C(O)N(R)_2$ ,  $-N(R)C(O)R$ ,  $-N(R)S(O)_2R$ ,  $-N(R)C(O)N(R)_2$ ,  $-N(R)C(S)N(R)_2$ ,  $-CRN(R)_2C(O)OR$ ,  $-N(R)R_8$ ,  $-O(CH_2)_nOR$ ,  $-N(R)C(=NR_9)N(R)_2$ ,  $-N(R)C(=CHR_9)N(R)_2$ ,  $-OC(O)N(R)_2$ ,  $-N(R)C(O)OR$ ,  $-N(OR)C(O)R$ ,  $-N(OR)S(O)_2R$ ,  $-N(OR)C(O)OR$ ,  $-N(OR)C(O)N(R)_2$ ,  $-N(OR)C(S)N(R)_2$ ,  $-N(OR)C(=NR_9)N(R)_2$ ,  $-N(OR)C(=CHR_9)N(R)_2$ ,  $-C(=NR_9)R$ ,  $-C(O)N(R)OR$  및  $-C(=NR_9)N(R)_2$ , 및 N, O 및 S로부터 선택되는 하나 이상의 헤테로원자를 갖는 5- 내지 14-원 헤테로사이클로알킬로부터 선택되고, 각각의 n은 1, 2, 3, 4 및 5로부터 독립적으로 선택되며;
- [0789] 각각의  $R_5$ 는  $C_{1-3}$  알킬,  $C_{2-3}$  알켄일 및 H로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;
- [0790] 각각의  $R_6$ 은  $C_{1-3}$  알킬,  $C_{2-3}$  알켄일 및 H로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며;
- [0791] M 및 M'는  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ ,  $-C(O)N(R')-$ ,  $-N(R')C(O)-$ ,  $-C(O)-$ ,  $-C(S)-$ ,  $-C(S)S-$ ,  $-SC(S)-$ ,  $-CH(OH)-$ ,  $-P(O)(OR')O-$ ,  $-S(O)_2-$ ,  $-S-S-$ , 아릴기 및 헤테로아릴기로부터 독립적으로 선택되고;
- [0792]  $R_7$ 은  $C_{1-3}$  알킬,  $C_{2-3}$  알켄일 및 H로 이루어진 군으로부터 선택되며;
- [0793]  $R_8$ 은  $C_{3-6}$  카보사이클 및 헤테로사이클로 이루어진 군으로부터 선택되고;
- [0794]  $R_9$ 는 H, CN,  $NO_2$ ,  $C_{1-6}$  알킬, -OR,  $-S(O)_2R$ ,  $-S(O)_2N(R)_2$ ,  $C_{2-6}$  알켄일,  $C_{3-6}$  카보사이클 및 헤테로사이클로 이루어진 군으로부터 선택되며;
- [0795] 각각의 R는  $C_{1-3}$  알킬,  $C_{2-3}$  알켄일 및 H로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;
- [0796] 각각의 R'는  $C_{1-18}$  알킬,  $C_{2-18}$  알켄일,  $-R^*YR''$ ,  $-YR$ ,  $-YR''$  및 H로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며;
- [0797] 각각의 R''는  $C_{3-14}$  알킬 및  $C_{3-14}$  알켄일로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;
- [0798] 각각의 R\*은  $C_{1-12}$  알킬 및  $C_{2-12}$  알켄일로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며;



- [0799] 각각의 Y는 독립적으로 C<sub>3-6</sub> 카보사이클이며;
- [0800] 각각의 X는 F, Cl, Br 및 I로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며; 그리고
- [0801] m은 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 및 13으로부터 선택된다.
- [0802] 일부 실시형태에서, 화학식 (I)의 화합물의 다른 소집단은 하기의 화합물 또는 이의 염 또는 이성질체를 포함한다:
- [0803] R<sub>1</sub>은 C<sub>5-20</sub> 알킬, C<sub>5-20</sub> 알켄일, -R\*YR", -YR" 및 -R"M'R'로 이루어진 군으로부터 선택되고;
- [0804] R<sub>2</sub> 및 R<sub>3</sub>은 H, C<sub>1-14</sub> 알킬, C<sub>2-14</sub> 알켄일, -R\*YR", -YR", 및 -R\*OR"로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되거나 또는 R<sub>2</sub> 및 R<sub>3</sub>은 그들이 부착된 원자와 함께 헤테로사이클 또는 카보사이클을 형성하고;
- [0805] R<sub>4</sub>는 C<sub>3-6</sub> 카보사이클, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>Q, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CHQR, -CHQR, -CQ(R)<sub>2</sub>, 및 비치환된 C<sub>1-6</sub> 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기서 Q는 C<sub>3-6</sub> 카보사이클, N, O 및 S로부터 선택된 하나 이상의 헤테로원자를 갖는 5- 내지 14-원 헤테로사이클, -OR, -O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>N(R)<sub>2</sub>, -C(O)OR, -OC(O)R, -CX<sub>3</sub>, -CX<sub>2</sub>H, -CXH<sub>2</sub>, -CN, -C(O)N(R)<sub>2</sub>, -N(R)C(O)R, -N(R)S(O)<sub>2</sub>R, -N(R)C(O)N(R)<sub>2</sub>, -N(R)C(S)N(R)<sub>2</sub>, -CRN(R)<sub>2</sub>C(O)OR, -N(R)R<sub>8</sub>, -O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OR, -N(R)C(=NR<sub>9</sub>)N(R)<sub>2</sub>, -N(R)C(=CHR<sub>9</sub>)N(R)<sub>2</sub>, -OC(O)N(R)<sub>2</sub>, -N(R)C(O)OR, -N(OR)C(O)R, -N(OR)S(O)<sub>2</sub>R, -N(OR)C(O)OR, -N(OR)C(O)N(R)<sub>2</sub>, -N(OR)C(S)N(R)<sub>2</sub>, -N(OR)C(=NR<sub>9</sub>)N(R)<sub>2</sub>, -N(OR)C(=CHR<sub>9</sub>)N(R)<sub>2</sub>, -C(=NR<sub>9</sub>)R, -C(O)N(R)OR, -N(R)<sub>2</sub> 및 -C(=NR<sub>9</sub>)N(R)<sub>2</sub>로부터 선택되고, 각각의 n은 1, 2, 3, 4 및 5로부터 독립적으로 선택되며; 그리고 Q가 5- 내지 14-원 헤테로사이클이고, 그리고 (i) R<sub>4</sub>이 -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>Q(이때 n은 1 또는 2임)이거나 또는 (ii) R<sub>4</sub>가 -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CHQR이거나(이때 n은 1임), 또는 (iii) R<sub>4</sub>가 -CHQR, 및 -CQ(R)<sub>2</sub>일 때, Q는 5 내지 14-원 헤테로아릴 또는 8- 내지 14-원 헤테로사이클로알킬이고;
- [0806] 각각의 R<sub>5</sub>는 C<sub>1-3</sub> 알킬, C<sub>2-3</sub> 알켄일 및 H로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;
- [0807] 각각의 R<sub>6</sub>은 C<sub>1-3</sub> 알킬, C<sub>2-3</sub> 알켄일 및 H로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며;
- [0808] M 및 M'는 -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)N(R')-, -N(R')C(O)-, -C(O)-, -C(S)-, -C(S)S-, -SC(S)-, -CH(OH)-, -P(O)(OR')O-, -S(O)<sub>2</sub>-, -S-S-, 아릴기 및 헤테로아릴기로부터 독립적으로 선택되고;
- [0809] R<sub>7</sub>은 C<sub>1-3</sub> 알킬, C<sub>2-3</sub> 알켄일 및 H로 이루어진 군으로부터 선택되며;
- [0810] R<sub>8</sub>은 C<sub>3-6</sub> 카보사이클 및 헤테로사이클로 이루어진 군으로부터 선택되고;
- [0811] R<sub>9</sub>는 H, CN, NO<sub>2</sub>, C<sub>1-6</sub> 알킬, -OR, -S(O)<sub>2</sub>R, -S(O)<sub>2</sub>N(R)<sub>2</sub>, C<sub>2-6</sub> 알켄일, C<sub>3-6</sub> 카보사이클 및 헤테로사이클로 이루어진 군으로부터 선택되며;
- [0812] 각각의 R은 C<sub>1-3</sub> 알킬, C<sub>2-3</sub> 알켄일 및 H로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;
- [0813] 각각의 R'는 C<sub>1-18</sub> 알킬, C<sub>2-18</sub> 알켄일, -R\*YR", -YR, -YR" 및 H로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며;
- [0814] 각각의 R"는 C<sub>3-14</sub> 알킬 및 C<sub>3-14</sub> 알켄일로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;
- [0815] 각각의 R\*은 C<sub>1-12</sub> 알킬, C<sub>1-12</sub> 알켄일 및 C<sub>2-12</sub> 알켄일로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며;
- [0816] 각각의 Y는 독립적으로 C<sub>3-6</sub> 카보사이클이고;
- [0817] 각각의 X는 F, Cl, Br 및 I로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며; 그리고
- [0818] m은 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 및 13으로부터 선택된다,
- [0819] 또한 일부 실시형태에서, 화학식 (I)의 화합물의 다른 소집단은 하기의 화합물 또는 이의 염 또는 입체이성질체를 포함하되, 이때

- [0820]  $R_1$ 은  $C_{5-20}$  알킬,  $C_{5-20}$  알켄일,  $-R^*YR''$ ,  $-YR''$  및  $-R''M'R'$ 로 이루어진 군으로부터 선택되고;
- [0821]  $R_2$  및  $R_3$ 은 H,  $C_{1-14}$  알킬,  $C_{2-14}$  알켄일,  $-R^*YR''$ ,  $-YR''$  및  $-R^*OR''$ 로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되거나, 또는  $R_2$  및  $R_3$ 은 그들이 부착된 원자와 함께 헤테로사이클 또는 카보사이클을 형성하고;
- [0822]  $R_4$ 는  $C_{3-6}$  카보사이클,  $-(CH_2)_nQ$ ,  $-(CH_2)_nCHQR$ ,  $-CHQR$ ,  $-CQ(R)_2$ , 및 비치환된  $C_{1-6}$  알킬로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기서 Q는  $-N(R)_2$ ,  $C_{3-6}$  카보사이클, N, O 및 S로부터 선택되는 하나 이상의 헤테로원자를 갖는 5- 내지 14-원 헤테로사이클,  $-OR$ ,  $-O(CH_2)_nN(R)_2$ ,  $-C(O)OR$ ,  $-OC(O)R$ ,  $-CX_3$ ,  $-CX_2H$ ,  $-CXH_2$ ,  $-CN$ ,  $-C(O)N(R)_2$ ,  $-N(R)C(O)R$ ,  $-N(R)S(O)_2R$ ,  $-N(R)C(O)N(R)_2$ ,  $-N(R)C(S)N(R)_2$ ,  $-CRN(R)_2C(O)OR$ 로부터 선택되고, 그리고 각각의 n은 1, 2, 3, 4 및 5로부터 독립적으로 선택되며; 그리고 Q가 5- 내지 14-원 헤테로사이클일 때 그리고 (i)  $R_4$ 가  $-(CH_2)_nQ$ 일 때(n은 1 또는 2임) 또는 (ii)  $R_4$ 가  $-(CH_2)_nCHQR$ 일 때(이때 n은 1임), 또는 (iii)  $R_4$ 가  $-CHQR$  및  $-CQ(R)_2$ 일 때, Q는 5- 내지 14-원 헤테로아릴 또는 8- 내지 14-원 헤테로사이클로알킬 중 하나이고;
- [0823] 각각의  $R_5$ 는  $C_{1-3}$  알킬,  $C_{2-3}$  알켄일 및 H로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며;
- [0824] 각각의  $R_6$ 은  $C_{1-3}$  알킬,  $C_{2-3}$  알켄일 및 H로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;
- [0825] M 및 M'는  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ ,  $-C(O)N(R')-$ ,  $-N(R')C(O)-$ ,  $-C(O)-$ ,  $-C(S)-$ ,  $-C(S)S-$ ,  $-SC(S)-$ ,  $-CH(OH)-$ ,  $-P(O)(OR')O-$ ,  $-S(O)_2-$ , 아릴기 및 헤테로아릴기로부터 독립적으로 선택되며;
- [0826]  $R_7$ 은  $C_{1-3}$  알킬,  $C_{2-3}$  알켄일 및 H로 이루어진 군으로부터 선택되고;
- [0827] 각각의 R은  $C_{1-3}$  알킬,  $C_{2-3}$  알켄일 및 H로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며;
- [0828] 각각의 R'는  $C_{1-18}$  알킬,  $C_{2-18}$  알켄일,  $-R^*YR''$ ,  $-YR''$  및 H로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;
- [0829] 각각의 R''는  $C_{3-14}$  알킬 및  $C_{3-14}$  알켄일로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며;
- [0830] 각각의 R\*은  $C_{1-12}$  알킬 및  $C_{2-12}$  알켄일로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;
- [0831] 각각의 Y는 독립적으로  $C_{3-6}$  카보사이클이며;
- [0832] 각각의 X는 F, Cl, Br 및 I로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며; 그리고
- [0833] m은 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 및 13으로부터 선택된다.
- [0834] 또한 일부 실시형태에서, 화학식 (I)의 화합물의 다른 소집단은 하기의 화합물 또는 이의 염 또는 입체이성질체를 포함한다:
- [0835]  $R_1$ 은  $C_{5-30}$  알킬,  $C_{5-20}$  알켄일,  $-R^*YR''$ ,  $-YR''$  및  $-R''M'R'$ 로 이루어진 군으로부터 선택되고;
- [0836]  $R_2$  및  $R_3$ 은 H,  $C_{1-14}$  알킬,  $C_{2-14}$  알켄일,  $-R^*YR''$ ,  $-YR''$  및  $-R^*OR''$ 로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되거나 또는  $R_2$  및  $R_3$ 은 그들이 부착된 원자와 함께 헤테로사이클 또는 카보사이클을 형성하고;
- [0837]  $R_4$ 는  $C_{3-6}$  카보사이클,  $-(CH_2)_nQ$ ,  $-(CH_2)_nCHQR$ ,  $-CHQR$ ,  $-CQ(R)_2$ , 및 비치환된  $C_{1-6}$  알킬로 이루어진 군으로부터 선택되며, Q는  $C_{3-6}$  카보사이클, N, O 및 S로부터 선택되는 하나 이상의 헤테로원자를 갖는 5- 내지 14-원 헤테로아릴,  $-OR$ ,  $-O(CH_2)_nN(R)_2$ ,  $-C(O)OR$ ,  $-OC(O)R$ ,  $-CX_3$ ,  $-CX_2H$ ,  $-CXH_2$ ,  $-CN$ ,  $-C(O)N(R)_2$ ,  $-N(R)C(O)R$ ,  $-N(R)S(O)_2R$ ,  $-N(R)C(O)N(R)_2$ ,  $-N(R)C(S)N(R)_2$ ,  $-CRN(R)_2C(O)OR$ ,  $-N(R)R_8$ ,  $-O(CH_2)_nOR$ ,  $-N(R)C(=NR_9)N(R)_2$ ,  $-N(R)C(=CHR_9)N(R)_2$ ,  $-OC(O)N(R)_2$ ,  $-N(R)C(O)OR$ ,  $-N(OR)C(O)R$ ,  $-N(OR)S(O)_2R$ ,  $-N(OR)C(O)OR$ ,  $-N(OR)C(O)N(R)_2$ ,  $-N(OR)C(S)N(R)_2$ ,  $-N(OR)C(=NR_9)N(R)_2$ ,  $-N(OR)C(=CHR_9)N(R)_2$ ,  $-C(=NR_9)R$ ,  $-C(O)N(R)OR$  및  $-C(=NR_9)N(R)_2$ 로부터 선택되고, 각각의 n은 1, 2, 3, 4 및 5로부터 독립적으로 선택되며;
- [0838] 각각의  $R_5$ 는  $C_{1-3}$  알킬,  $C_{2-3}$  알켄일 및 H로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;

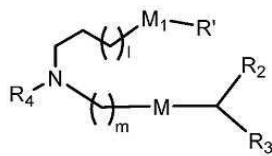
- [0839] 각각의  $R_6$ 은  $C_{1-3}$  알킬,  $C_{2-3}$  알켄일 및 H로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며;
- [0840] M 및 M'는  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ ,  $-C(O)N(R')-$ ,  $-N(R')C(O)-$ ,  $-C(O)-$ ,  $-C(S)-$ ,  $-C(S)S-$ ,  $-SC(S)-$ ,  $-CH(OH)-$ ,  $-P(O)(OR')O-$ ,  $-S(O)_2-$ ,  $-S-S-$ , 아릴기 및 헤테로아릴기로부터 독립적으로 선택되고;
- [0841]  $R_7$ 은  $C_{1-3}$  알킬,  $C_{2-3}$  알켄일 및 H로 이루어진 군으로부터 선택되며;
- [0842]  $R_8$ 은  $C_{3-6}$  카보사이클 및 헤테로사이클로 이루어진 군으로부터 선택되고;
- [0843]  $R_9$ 는 H, CN,  $NO_2$ ,  $C_{1-6}$  알킬,  $-OR$ ,  $-S(O)_2R$ ,  $-S(O)_2N(R)_2$ ,  $C_{2-6}$  알켄일,  $C_{3-6}$  카보사이클 및 헤테로사이클로 이루어진 군으로부터 선택되며;
- [0844] 각각의 R은  $C_{1-3}$  알킬,  $C_{2-3}$  알켄일 및 H로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;
- [0845] 각각의 R'는  $C_{1-18}$  알킬,  $C_{2-18}$  알켄일,  $-R^*YR''$ ,  $-YR''$  및 H로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며;
- [0846] 각각의 R''는  $C_{3-14}$  알킬 및  $C_{3-14}$  알켄일로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;
- [0847] 각각의 R\*은  $C_{1-12}$  알킬 및  $C_{2-12}$  알켄일로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며;
- [0848] 각각의 Y는 독립적으로  $C_{3-6}$  카보사이클이고;
- [0849] 각각의 X는 F, Cl, Br 및 I로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며; 그리고
- [0850] m은 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 및 13으로부터 선택된다.
- [0851] 일부 실시형태에서, 화학식 (I)의 화합물의 다른 소집단은 하기의 화합물 또는 이의 염 또는 입체이성질체를 포함하되, 이때
- [0852]  $R_1$ 은  $C_{5-20}$  알킬,  $C_{5-20}$  알켄일,  $-R^*YR''$ ,  $-YR''$  및  $-R''M'R'$ 로 이루어진 군으로부터 선택되며;
- [0853]  $R_2$  및  $R_3$ 은 H,  $C_{1-14}$  알킬,  $C_{2-14}$  알켄일,  $-R^*YR''$ ,  $-YR''$  및  $-R^*OR''$ 로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되거나 또는  $R_2$  및  $R_3$ 은 그들이 부착된 원자와 함께 헤테로사이클 또는 카보사이클을 형성하고;
- [0854]  $R_4$ 는  $C_{3-6}$  카보사이클,  $-(CH_2)_nQ$ ,  $-(CH_2)_nCHQR$ ,  $-CHQR$ ,  $-CQ(R)_2$ , 및 비치환된  $C_{1-6}$  알킬로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기서 Q는  $C_{3-6}$  카보사이클, N, O 및 S로부터 선택되는 하나 이상의 헤테로원자를 갖는 5- 내지 14-원 헤테로아릴,  $-OR$ ,  $-O(CH_2)_nN(R)_2$ ,  $-C(O)OR$ ,  $-OC(O)R$ ,  $-CX_3$ ,  $-CX_2H$ ,  $-CXH_2$ ,  $-CN$ ,  $-C(O)N(R)_2$ ,  $-N(R)C(O)R$ ,  $-N(R)S(O)_2R$ ,  $-N(R)C(O)N(R)_2$ ,  $-N(R)C(S)N(R)_2$ ,  $-CRN(R)_2C(O)OR$ 로부터 선택되고, 그리고 각각의 n은 1, 2, 3, 4 및 5로부터 독립적으로 선택되며;
- [0855] 각각의  $R_5$ 는  $C_{1-3}$  알킬,  $C_{2-3}$  알켄일 및 H로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;
- [0856] 각각의  $R_6$ 은  $C_{1-3}$  알킬,  $C_{2-3}$  알켄일 및 H로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며;
- [0857] M 및 M'는  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ ,  $-C(O)N(R')-$ ,  $-N(R')C(O)-$ ,  $-C(O)-$ ,  $-C(S)-$ ,  $-C(S)S-$ ,  $-SC(S)-$ ,  $-CH(OH)-$ ,  $-P(O)(OR')O-$ ,  $-S(O)_2-$ , 아릴기 및 헤테로아릴기로부터 독립적으로 선택되며;
- [0858]  $R_7$ 은  $C_{1-3}$  알킬,  $C_{2-3}$  알켄일 및 H로 이루어진 군으로부터 선택되며;
- [0859] 각각의 R은  $C_{1-3}$  알킬,  $C_{2-3}$  알켄일 및 H로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며;
- [0860] 각각의 R'는  $C_{1-18}$  알킬,  $C_{2-18}$  알켄일,  $-R^*YR''$ ,  $-YR''$  및 H로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;
- [0861] 각각의 R''는  $C_{3-14}$  알킬 및  $C_{3-14}$  알켄일로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며;
- [0862] 각각의 R\*은  $C_{1-12}$  알킬 및  $C_{2-12}$  알켄일로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;

- [0863] 각각의 Y는 독립적으로 C<sub>3-6</sub> 카보사이클이며;
- [0864] 각각의 X는 F, Cl, Br 및 I로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며; 그리고
- [0865] m은 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 및 13으로부터 선택된다.
- [0866] 또한 일부 실시형태에서, 화학식 (I)의 화합물의 다른 소집단은 하기의 화합물 또는 이의 염 또는 입체이성질체를 포함하되, 이때
- [0867] R<sub>1</sub>은 C<sub>5-30</sub>알킬, C<sub>5-20</sub> 알켄일, -R\*YR", -YR" 및 -R"M'R'로 이루어진 군으로부터 선택되고;
- [0868] R<sub>2</sub> 및 R<sub>3</sub>은 H, C<sub>2-14</sub> 알킬, C<sub>2-14</sub> 알켄일, -R\*YR", -YR" 및 -R\*OR"로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되거나 또는 R<sub>2</sub> 및 R<sub>3</sub>은 그들이 부착된 원자와 함께 헤테로사이클 또는 카보사이클을 형성하며;
- [0869] R<sub>4</sub>는 -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>Q 또는 -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CHQR이며, 여기서 Q는 -N(R)<sub>2</sub>이고, 그리고 n은 3, 4 및 5로부터 선택되며;
- [0870] 각각의 R<sub>5</sub>는 C<sub>1-3</sub> 알킬, C<sub>2-3</sub> 알켄일 및 H로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며;
- [0871] 각각의 R<sub>6</sub>은 C<sub>1-3</sub> 알킬, C<sub>2-3</sub> 알켄일 및 H로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;
- [0872] M 및 M'는 -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)N(R')-, -N(R')C(O)-, -C(O)-, -C(S)-, -C(S)S-, -SC(S)-, -CH(OH)-, -P(O)(OR')O-, -S(O)<sub>2</sub>-, -S-S-, 아릴기 및 헤테로아릴기로부터 독립적으로 선택되며;
- [0873] R<sub>7</sub>은 C<sub>1-3</sub> 알킬, C<sub>2-3</sub> 알켄일 및 H로 이루어진 군으로부터 선택되고;
- [0874] 각각의 R은 C<sub>1-3</sub> 알킬, C<sub>2-3</sub> 알켄일 및 H로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며;
- [0875] 각각의 R'는 C<sub>1-18</sub> 알킬, C<sub>2-18</sub> 알켄일, -R\*YR", -YR" 및 H로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;
- [0876] 각각의 R"은 C<sub>3-14</sub> 알킬 및 C<sub>3-14</sub> 알켄일로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;
- [0877] 각각의 R\*은 C<sub>1-12</sub> 알킬 및 C<sub>1-12</sub> 알켄일로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;
- [0878] 각각의 Y는 독립적으로 C<sub>3-6</sub> 카보사이클이며;
- [0879] 각각의 X는 F, Cl, Br 및 I로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며; 그리고
- [0880] m은 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 및 13으로부터 선택된다.
- [0881] 또한 일부 실시형태에서, 화학식 (I)의 화합물의 다른 소집단은 하기의 화합물 또는 이의 염 또는 입체이성질체를 포함하되, 이때,
- [0882] R<sub>1</sub>은 C<sub>5-20</sub> 알킬, C<sub>5-20</sub> 알켄일, -R\*YR", -YR" 및 -R"M'R'로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;
- [0883] R<sub>2</sub> 및 R<sub>3</sub>은 H, C<sub>2-14</sub> 알킬, C<sub>2-14</sub> 알켄일, -R\*YR", -YR" 및 -R\*OR"이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되거나 또는 R<sub>2</sub> 및 R<sub>3</sub>은 그들이 부착된 원자와 함께 헤테로사이클 또는 카보사이클을 형성하고;
- [0884] R<sub>4</sub>는 -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>Q 또는 -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CHQR이며, 여기서, Q는 -N(R)<sub>2</sub>이고, 그리고 n은 3, 4 및 5로부터 선택되며;
- [0885] 각각의 R<sub>5</sub>는 C<sub>1-3</sub> 알킬, C<sub>2-3</sub> 알켄일 및 H로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;
- [0886] 각각의 R<sub>6</sub>은 C<sub>1-3</sub> 알킬, C<sub>2-3</sub> 알켄일 및 H로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며;
- [0887] M 및 M'는 -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)N(R')-, -N(R')C(O)-, -C(O)-, -C(S)-, -C(S)S-, -SC(S)-, -CH(OH)-, -P(O)(OR')O-, -S(O)<sub>2</sub>-, 아릴기 및 헤테로아릴기로부터 독립적으로 선택되고;
- [0888] R<sub>7</sub>은 C<sub>1-3</sub> 알킬, C<sub>2-3</sub> 알켄일 및 H로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며;
- [0889] 각각의 R은 C<sub>1-3</sub> 알킬, C<sub>2-3</sub> 알켄일 및 H로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;



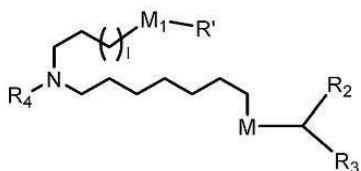
- [0890] 각각의 R'는 C<sub>1-18</sub> 알킬, C<sub>2-18</sub> 알켄일, -R\*YR", -YR" 및 H로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며;
- [0891] 각각의 R"는 C<sub>3-14</sub> 알킬 및 C<sub>3-14</sub> 알켄일로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;
- [0892] 각각의 R\*은 C<sub>1-12</sub> 알킬 및 C<sub>1-12</sub> 알켄일로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며;
- [0893] 각각의 Y는 독립적으로 C<sub>3-6</sub> 카보사이클이고;
- [0894] 각각의 X는 F, Cl, Br 및 I로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며; 그리고
- [0895] m은 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 및 13으로부터 선택된다.
- [0896] 또 다른 실시형태에서, 화학식 (I)의 화합물의 다른 소집단은 하기의 화합물 또는 이의 염 또는 입체이성질체를 포함한다:
- [0897] R<sub>1</sub>은 C<sub>5-30</sub> 알킬, C<sub>5-20</sub> 알켄일, -R\*YR", -YR" 및 -R"M'R'로 이루어진 군으로부터 선택되고;
- [0898] R<sub>2</sub> 및 R<sub>3</sub>은 C<sub>1-14</sub> 알킬, C<sub>2-14</sub> 알켄일, -R\*YR", -YR" 및 -R\*OR"로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되거나 또는 R<sub>2</sub> 및 R<sub>3</sub>은 그들이 부착된 원자와 함께 헤테로사이클 또는 카보사이클을 형성하고;
- [0899] R<sub>4</sub>는 -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>Q, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CHQR, -CHQR, 및 -CQ(R)<sub>2</sub>로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기서 Q는 -N(R)<sub>2</sub>이고, n은 1, 2, 3, 4 및 5로부터 선택되며;
- [0900] 각각의 R<sub>5</sub>는 C<sub>1-3</sub> 알킬, C<sub>2-3</sub> 알켄일 및 H로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;
- [0901] 각각의 R<sub>6</sub>은 C<sub>1-3</sub> 알킬, C<sub>2-3</sub> 알켄일 및 H로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며;
- [0902] M 및 M'는 -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)N(R')-, -N(R')C(O)-, -C(O)-, -C(S)-, -C(S)S-, -SC(S)-, -CH(OH)-, -P(O)(OR')O-, -S(O)<sub>2</sub>-, -S-S-, 아릴기 및 헤테로아릴기로부터 독립적으로 선택되고;
- [0903] R<sub>7</sub>은 C<sub>1-3</sub> 알킬, C<sub>2-3</sub> 알켄일 및 H로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며;
- [0904] 각각의 R은 C<sub>1-3</sub> 알킬, C<sub>2-3</sub> 알켄일 및 H로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며;
- [0905] 각각의 R'는 C<sub>1-18</sub> 알킬, C<sub>2-18</sub> 알켄일, -R\*YR", -YR" 및 H로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;
- [0906] 각각의 R"는 C<sub>3-14</sub> 알킬 및 C<sub>3-14</sub> 알켄일로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며;
- [0907] 각각의 R\*은 C<sub>1-12</sub> 알킬 및 C<sub>1-12</sub> 알켄일로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;
- [0908] 각각의 Y는 독립적으로 C<sub>3-6</sub> 카보사이클이며;
- [0909] 각각의 X는 F, Cl, Br 및 I로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며; 그리고
- [0910] m은 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 및 13으로부터 선택된다.
- [0911] 또 다른 실시형태에서, 화학식 (I)의 화합물의 다른 소집단은 하기의 화합물 또는 이의 염 또는 입체이성질체를 포함하되, 이때
- [0912] R<sub>1</sub>은 C<sub>5-20</sub> 알킬, C<sub>5-20</sub> 알켄일, -R\*YR", -YR" 및 -R"M'R'로 이루어진 군으로부터 선택되고;
- [0913] R<sub>2</sub> 및 R<sub>3</sub>은 C<sub>1-14</sub> 알킬, C<sub>2-14</sub> 알켄일, -R\*YR", -YR" 및 -R\*OR"로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되거나 또는 R<sub>2</sub> 및 R<sub>3</sub>은 그들이 부착된 원자와 함께 헤테로사이클 또는 카보사이클을 형성하고;
- [0914] R<sub>4</sub>는 -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>Q, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CHQR, -CHQR, 및 -CQ(R)<sub>2</sub>로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며, 여기서 Q는 -N(R)<sub>2</sub>이고, n은 1, 2, 3, 4 및 5로부터 선택되며;
- [0915] 각각의 R<sub>5</sub>는 C<sub>1-3</sub> 알킬, C<sub>2-3</sub> 알켄일 및 H로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;

- [0916] 각각의  $R_6$ 은  $C_{1-3}$  알킬,  $C_{2-3}$  알켄일 및 H로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며;
- [0917] M 및 M'는  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ ,  $-C(O)N(R')-$ ,  $-N(R')C(O)-$ ,  $-C(O)-$ ,  $-C(S)-$ ,  $-C(S)S-$ ,  $-SC(S)-$ ,  $-CH(OH)-$ ,  $-P(O)(OR')O-$ ,  $-S(O)_2-$ , 아릴기 및 헤테로아릴기로부터 독립적으로 선택되고;
- [0918]  $R_7$ 은  $C_{1-3}$  알킬,  $C_{2-3}$  알켄일 및 H로 이루어진 군으로부터 선택되며;
- [0919] 각각의 R은  $C_{1-3}$  알킬,  $C_{2-3}$  알켄일 및 H로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;
- [0920] 각각의 R'는  $C_{1-18}$  알킬,  $C_{2-18}$  알켄일,  $-R^*YR''$ ,  $-YR''$  및 H로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며;
- [0921] 각각의 R''는  $C_{3-14}$  알킬 및  $C_{3-14}$  알켄일로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;
- [0922] 각각의 R\*은  $C_{1-12}$  알킬 및  $C_{1-12}$  알켄일로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며;
- [0923] 각각의 Y는 독립적으로  $C_{3-6}$  카보사이클이고;
- [0924] 각각의 X는 F, Cl, Br 및 I로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며; 그리고
- [0925] m은 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 및 13으로부터 선택된다.
- [0926] 소정의 실시형태에서, 화학식 (I)의 화합물의 소집단은 하기 화학식 (IA)의 화합물 또는 이의 염 또는 입체이성 질체를 포함한다:



(IA)

- [0927]
- [0928] 식 중, l은 1, 2, 3, 4 및 5로부터 선택되며; m은 5, 6, 7, 8 및 9로부터 선택되고;  $M_1$ 은 결합 또는 M'이며;  $R_4$ 는 비치환된  $C_{1-3}$  알킬, 또는  $-(CH_2)_nQ$ 이고, 이때 Q는 OH,  $-NHC(S)N(R)_2$ ,  $-NHC(O)N(R)_2$ ,  $-N(R)C(O)R$ ,  $-N(R)S(O)_2R$ ,  $-N(R)R_8$ ,  $-NHC(=NR_9)N(R)_2$ ,  $-NHC(=CHR_9)N(R)_2$ ,  $-OC(O)N(R)_2$ ,  $-N(R)C(O)OR$ , 헤테로아릴, 또는 헤테로사이클로알킬이며; M 및 M'는  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ ,  $-C(O)N(R')-$ ,  $-P(O)(OR')O-$ ,  $-S-S-$ , 아릴기 및 헤테로아릴기로부터 독립적으로 선택되고; 그리고
- [0929]  $R_2$  및  $R_3$ 은 H,  $C_{1-14}$  알킬, 및  $C_{2-14}$  알켄일로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된다.
- [0930] 일부 실시형태에서, 화학식 (I)의 화합물의 소집단은 화학식 (IA), 화학식 (II)의 화합물 또는 이의 염 또는 입체이성 질체를 포함한다:
- [0931] 식 중,
- [0932] l은 1, 2, 3, 4 및 5로부터 선택되며; m은 5, 6, 7, 8 및 9로부터 선택되고;
- [0933]  $M_1$ 은 결합 또는 M'이며;
- [0934]  $R_4$ 는 비치환된  $C_{1-3}$ 알킬, 또는  $-(CH_2)_nQ$ 이고, 여기서 Q는 OH,  $-NHC(S)N(R)_2$  또는  $-NHC(O)N(R)_2$ 이고;
- [0935] M 및 M'는  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ ,  $-C(O)N(R')-$ ,  $-P(O)(OR')O-$ , 아릴기 및 헤테로아릴기로부터 독립적으로 선택되며; 그리고
- [0936]  $R_2$  및  $R_3$ 은 H,  $C_{1-14}$  알킬 및  $C_{2-14}$  알켄일로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된다.
- [0937] 소정의 실시형태에서, 화학식 (I)의 화합물의 소집단은 하기 화학식 (II)의 화합물 또는 이의 염 또는 입체이성 질체를 포함한다:



(II)

[0938]

[0939]

식 중, 1은 1, 2, 3, 4 및 5로부터 선택되며;  $M_1$ 은 결합 또는  $M'$ 이고;  $R_4$ 는 비치환된  $C_{1-3}$  알킬, 또는  $-(CH_2)_nQ$ 이며, 이때  $n$ 은 2, 3 또는 4이고, 그리고  $Q$ 는  $OH$ ,  $-NHC(S)N(R)_2$ ,  $-NHC(O)N(R)_2$ ,  $-N(R)C(O)R$ ,  $-N(R)S(O)_2R$ ,  $-N(R)R_8$ ,  $-NHC(=NR_9)N(R)_2$ ,  $-NHC(=CHR_9)N(R)_2$ ,  $-OC(O)N(R)_2$ ,  $-N(R)C(O)OR$ , 헤테로아릴, 또는 헤테로사이클로알킬이고;  $M$  및  $M'$ 는  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ ,  $-C(O)N(R')-$ ,  $-P(O)(OR')O-$ ,  $-S-S-$ , 아릴기 및 헤테로아릴기로부터 독립적으로 선택되며; 그리고

[0940]

$R_2$  및  $R_3$ 은  $H$ ,  $C_{1-14}$  알킬 및  $C_{2-14}$  알켄일로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된다.

[0941]

일부 실시형태에서, 화학식 (I)의 화합물의 소집단은 화학식 (II)의 화합물 또는 이의 염 또는 입체이성질체를 포함하되,

[0942]

1은 1, 2, 3, 4 및 5로부터 선택되고;

[0943]

$M_1$ 은 결합 또는  $M'$ 이며;

[0944]

$R_4$ 는 비치환된  $C_{1-3}$  알킬 또는  $-(CH_2)_nQ$ 이고, 이때  $n$ 은 2, 3 또는 4이며, 그리고  $Q$ 는  $OH$ ,  $-NHC(S)N(R)_2$ , 또는  $-NHC(O)N(R)_2$ 이고;

[0945]

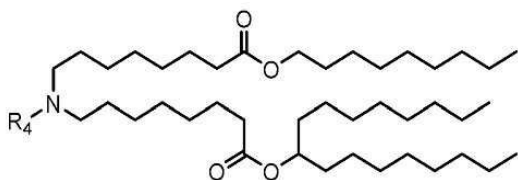
$M$  및  $M'$ 는  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ ,  $-C(O)N(R')-$ ,  $-P(O)(OR')O-$ , 아릴기 및 헤테로아릴기로부터 독립적으로 선택되며; 그리고

[0946]

$R_2$  및  $R_3$ 은  $H$ ,  $C_{1-14}$  알킬 및  $C_{2-14}$  알켄일로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된다.

[0947]

일부 실시형태에서, 화학식 (I)의 화합물은 하기 화학식 (IIa) 또는 이의 염을 갖는다:



(IIa)

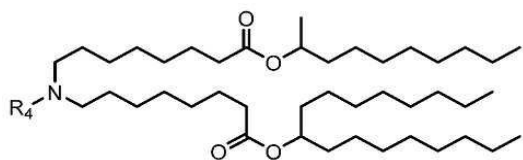
[0948]

[0949]

식 중,  $R_4$ 는 상기 기재한 바와 같다.

[0950]

일부 실시형태에서, 화학식 (I)의 화합물은 하기 화학식 (IIb) 또는 이의 염을 갖는다:



(IIb)

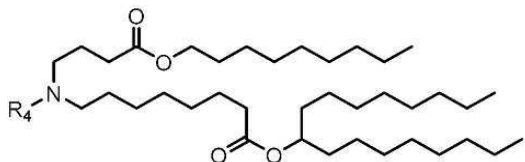
[0951]

[0952]

식 중,  $R_4$ 는 상기 기재한 바와 같다.

[0953]

일부 실시형태에서, 화학식 (I)의 화합물은 하기 화학식 (IIc) 또는 이의 염을 갖는다:

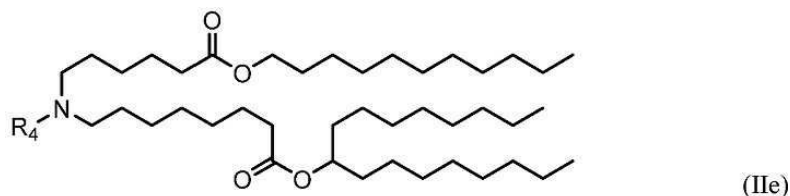


(IIc)

[0954]

[0955] 식 중,  $R_4$ 는 상기 기재한 바와 같다.

[0956] 일부 실시형태에서, 화학식 (I)의 화합물은 하기 화학식 (IIe) 또는 이의 염을 갖는다:



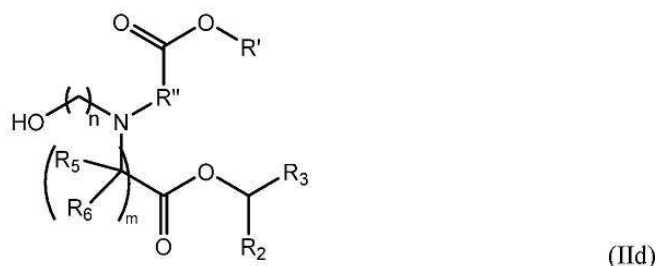
[0957]

[0958] 식 중,  $R_4$ 는 상기 기재한 바와 같다.

[0959] 일부 실시형태에서, 화학식 (IIa), (IIb), (IIc) 또는 (IIe)의 화합물은  $R_4$ 를 포함하며, 이는  $-(CH_2)_nQ$  및  $-(CH_2)_nCHQR$ 로부터 선택되되, Q, R 및 n은 상기 정의한 바와 같다.

[0960] 일부 실시형태에서, Q는  $-OR$ ,  $-OH$ ,  $-O(CH_2)_nN(R)_2$ ,  $-OC(O)R$ ,  $-CX_3$ ,  $-CN$ ,  $-N(R)C(O)R$ ,  $-N(H)C(O)R$ ,  $-N(R)S(O)_2R$ ,  $-N(H)S(O)_2R$ ,  $-N(R)C(O)N(R)_2$ ,  $-N(H)C(O)N(R)_2$ ,  $-N(H)C(O)N(H)(R)$ ,  $-N(R)C(S)N(R)_2$ ,  $-N(H)C(S)N(R)_2$ ,  $-N(H)C(S)N(H)(R)$  및 헤테로사이클로 이루어진 군으로부터 선택되되, R은 상기 정의한 바와 같다. 일부 양상에서, n은 1 또는 2이다. 일부 실시형태에서, Q는  $OH$ ,  $-NHC(S)N(R)_2$ , 또는  $-NHC(O)N(R)_2$ 이다.

[0961] 일부 실시형태에서, 화학식 (I)의 화합물은 하기 화학식 (IIId) 또는 이의 염 또는 이성질체를 갖는다:



[0962]

[0963] 식 중, n은 2, 3 또는 4이고; 그리고 m,  $R'$ ,  $R''$  및  $R_2$  내지  $R_6$ 은 본 명세서에 기재된 바와 같다. 예를 들어,  $R_2$  및  $R_3$ 의 각각은  $C_{5-14}$  알킬 및  $C_{5-14}$  알켄일로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택될 수 있고, n은 2, 3 및 4로부터 선택되며, 그리고  $R'$ ,  $R''$ ,  $R_5$ ,  $R_6$  및 m은 상기 정의한 바와 같다.

[0964] 화학식 (IIId)의 화합물의 일부 양상에서,  $R_2$ 는  $C_8$  알킬이다. 화학식 (IIId)의 화합물의 일부 양상에서,  $R_3$ 은  $C_5-C_9$  알킬이다. 화학식 (IIId)의 화합물의 일부 양상에서, m은 5, 7 또는 9이다. 화학식 (IIId)의 화합물의 일부 양상에서, 각각의  $R_5$ 은 H이다. 화학식 (IIId)의 화합물의 일부 양상에서, 각각의  $R_6$ 은 H이다.

[0965] 다른 양상에서, 본 출원은 (1) 화학식 (I)을 갖는 화합물; (2) 선택적으로 헬퍼 지질(예를 들어, 인지질); (3) 선택적으로 구조적 지질(예를 들어, 스테롤); 및 (4) 선택적으로 지질 접합체(예를 들어, PEG-지질)를 포함하는, 지질 조성물(예를 들어, 지질 나노입자(LNP))를 제공한다. 예시적인 실시형태에서, 지질 조성물(예를 들어, LNP)은 하나 이상의 암 에피토프 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 예를 들어, 거기에 캡슐화된 폴리뉴클레오타이드를 추가로 포함한다.

[0966] 본 명세서에 사용되는 바와 같은, 용어 "알킬" 또는 "알킬기"는 하나 이상의 탄소 원자(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20개 이상의 탄소 원자)를 포함하는 선형 또는 분지형, 포화 탄화수소를 의미한다.

[0967] " $C_{1-14}$  알킬"이라는 표기는 1 내지 14개의 탄소 원자를 포함하는 선형 또는 분지형, 포화된 탄화수소를 의미한다. 알킬기는 선택적으로 치환될 수 있다.

[0968] 본 명세서에 사용되는 바와 같은, 용어 "알켄일" 또는 "알켄일기"는 2개 이상의 탄소 원자(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20개 이상의 탄소 원자) 및 적어도 하나의 이중결합



을 포함하는, 선형 또는 분지형 탄화수소를 의미한다.

- [0969] " $C_{2-14}$  알켄일"이라는 표기는 2 내지 14개의 탄소 원자 및 적어도 하나의 이중 결합을 포함하는 선형 또는 분지형 탄화수소를 의미한다. 알켄일기는 1, 2, 3, 4개 이상의 이중 결합을 포함할 수 있다. 예를 들어,  $C_{18}$  알켄일은 하나 이상의 이중 결합을 포함할 수 있다. 2개의 이중 결합을 포함하는  $C_{18}$  알켄일기는 리놀레일기일 수 있다. 알켄일기는 선택적으로 치환될 수 있다.
- [0970] 본 명세서에 사용되는 바와 같은, 용어 "카보사이클" 또는 "탄소환식기"는 탄소 원자의 1개 이상의 고리를 포함하는 단환식 또는 다환식계를 의미한다. 고리는 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15원 고리일 수 있다.
- [0971] " $C_{3-6}$  카보사이클"이라는 표기는 3 내지 6개의 탄소 원자를 갖는 단일 고리를 포함하는 카보사이클을 의미한다. 카보사이클은 하나 이상의 이중 결합을 포함할 수 있고, 방향족(예를 들어, 아릴기)일 수 있다. 카보사이클의 예는 사이클로프로필, 사이클로펜틸, 사이클로헥실, 페닐, 나프틸 및 1,2-다이하이드로나프틸기를 포함한다. 카보사이클은 선택적으로 치환될 수 있다.
- [0972] 본 명세서에 사용되는 바와 같은, 용어 "헤테로사이클" 또는 "복소환식기"는 하나 이상의 고리를 포함하는 단환식 또는 다환식계를 의미하며, 여기서 적어도 하나의 고리는 적어도 하나의 헤테로원자를 포함한다. 헤테로원자는, 예를 들어, 질소, 산소 또는 황 원자일 수 있다. 고리는 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12원 고리일 수 있다. 헤테로사이클은 하나 이상의 이중 결합을 포함할 수 있고, 방향족(예를 들어, 헤테로아릴기)일 수 있다. 헤테로사이클의 예는 이미다졸릴, 이미다졸리딘일, 옥사졸릴, 옥사졸리딘일, 티아졸릴, 티아졸리딘일, 피라졸리딘일, 피라졸릴, 아이속사졸리딘일, 아이속사졸릴, 아이소티아졸리딘일, 아이소티아졸릴, 몰폴린일, 피롤릴, 피롤리딘일, 퓨릴, 테트라하이드로퓨릴, 티오펜일, 피리딘일, 피페리딘일, 퀴놀릴 및 아이소퀴놀릴기를 포함한다. 헤테로사이클은 선택적으로 치환될 수 있다.
- [0973] 본 명세서에 사용되는 바와 같은, "생체 분해성 기"는 대상체에서 지질의 더 빠른 대사를 용이하게 할 수 있는 기이다. 생체 분해성 기는  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ ,  $-C(O)N(R')-$ ,  $-N(R')C(O)-$ ,  $-C(O)-$ ,  $-C(S)-$ ,  $-C(S)S-$ ,  $-SC(S)-$ ,  $-CH(OH)-$ ,  $-P(O)(OR')O-$ ,  $-S(O)_2-$ , 아릴기 및 헤테로아릴기일 수 있지만, 이들로 제한되지 않는다.
- [0974] 본 명세서에 사용되는 바와 같은, "아릴기"는 하나 이상의 방향족 고리를 포함하는 탄소환식기이다. 아릴기의 예는 페닐 및 나프틸기를 포함한다.
- [0975] 본 명세서에 사용되는 바와 같은, "헤테로아릴기"는 하나 이상의 방향족 고리를 포함하는 복소환식기이다. 헤테로아릴기의 예는 피롤릴, 퓨릴, 티오펜일, 이미다졸릴, 옥사졸릴 및 티아졸릴을 포함한다. 아릴과 헤테로아릴기는 둘 다 선택적으로 치환될 수 있다. 예를 들어, M 및 M'는 선택적으로 치환된 페닐, 옥사졸 및 티아졸로 이루어진 비제한적 군으로부터 선택될 수 있다. 본 명세서의 화학식에서, M 및 M'는 상기 생체 분해성 기의 목록으로부터 독립적으로 선택될 수 있다.
- [0976] 알킬, 알켄일 및 사이클릴(예를 들어, 카보사이클릴 및 헤테로사이클릴)기는 달리 구체화되지 않는 한, 선택적으로 치환될 수 있다. 선택적인 치환체는 할로젠 원자(예를 들어, 염화물, 브롬화물, 플루오린화물 또는 아이오딘화물기), 카복실산(예를 들어,  $-C(O)OH$ ), 알코올(예를 들어, 하이드록실,  $-OH$ ), 에스터(예를 들어,  $-C(O)OR$  또는  $-OC(O)R$ ), 알데하이드(예를 들어,  $-C(O)H$ ), 카보닐(예를 들어,  $-C(O)R$ , 대안적으로  $C=O$ 로 나타냄), 아실 할로젠화물(예를 들어,  $-C(O)X$ , 이때 X는 브롬화물, 플루오린화물, 염화물 및 아이오딘화물로부터 선택된 할로젠화물임), 탄산염(예를 들어,  $-OC(O)OR$ ), 알콕시(예를 들어,  $-OR$ ), 아세탈(예를 들어,  $-C(OR)_2R$ "), 이때 각각의 OR은 동일 또는 상이할 수 있는 알콕시기이고, R""는 알킬 또는 알켄일기임), 인산염(예를 들어,  $P(O)_4^{3-}$ ), 티올 (예를 들어,  $-SH$ ), 설포사이드(예를 들어,  $-S(O)R$ ), 설피산(예를 들어,  $-S(O)OH$ ), 설피온산(예를 들어,  $-S(O)_2OH$ ), 티알(예를 들어,  $-C(S)H$ ), 설피에이트(예를 들어,  $S(O)_4^{2-}$ ), 설피온일(예를 들어,  $-S(O)_2-$ ), 아마이드(예를 들어,  $-C(O)NR_2$ , 또는  $-N(R)C(O)R$ ), 아지도(예를 들어,  $-N_3$ ), 나이트로(예를 들어,  $-NO_2$ ), 사이아노(예를 들어,  $-CN$ ), 아이소사이아노(예를 들어,  $-NC$ ), 아실옥시(예를 들어,  $-OC(O)R$ ), 아미노(예를 들어,  $-NR_2$ ,  $-NRH$  또는  $-NH_2$ ), 카바모일(예를 들어,  $-OC(O)NR_2$ ,  $-OC(O)NRH$  또는  $-OC(O)NH_2$ ), 설피온아마이드(예를 들어,  $-S(O)_2NR_2$ ,  $-S(O)_2NRH$ ,  $-S(O)_2NH_2$ ,  $-N(R)S(O)_2R$ ,  $-N(H)S(O)_2R$ ,  $-N(R)S(O)_2H$  또는  $-N(H)S(O)_2H$ ), 알킬기, 알켄일기, 및 사이

클릴 (예를 들어, 카보사이클릴 또는 헤테로사이클릴)기로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있지만, 이들로 제한되지 않는다.

- [0977] 임의의 앞서 언급한 것에서, R은 본 명세서에 정의한 바와 같은 알킬 또는 알켄일기이다. 일부 실시형태에서, 치환체가 그 자체는, 예를 들어, 본 명세서에 정의된 바와 같이 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 치환체로 추가로 치환될 수 있다. 예를 들어, C<sub>1-6</sub> 알킬기는 본 명세서에 정의된 바와 같이 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 치환체로 추가로 치환될 수 있다.
- [0978] 화학식 (I), (IA), (II), (IIa), (IIb), (IIc), (IId) 및 (IIe) 중 임의의 하나의 화합물은 적용 가능할 때 다음의 특징 하나 이상을 포함한다.
- [0979] 일부 실시형태에서, R<sub>4</sub>는 C<sub>3-6</sub> 카보사이클, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>Q, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CHQR, -CHQR 및 -CQ(R)<sub>2</sub>로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기서 Q는 C<sub>3-6</sub> 카보사이클, N, O, S 및 P로부터 선택되는 하나 이상의 헤테로원자를 갖는 5- 내지 14-원 방향족 또는 비방향족 헤테로사이클, -OR, -O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>N(R)<sub>2</sub>, -C(O)OR, -OC(O)R, -CX<sub>3</sub>, -CX<sub>2</sub>H, -CXH<sub>2</sub>, -CN, -N(R)<sub>2</sub>, -C(O)N(R)<sub>2</sub>, -N(R)C(O)R, -N(R)S(O)<sub>2</sub>R, -N(R)C(O)N(R)<sub>2</sub>, -N(R)C(S)N(R)<sub>2</sub>, 및 -C(R)N(R)<sub>2</sub>C(O)OR로부터 선택되고, 각각의 n은 1, 2, 3, 4 및 5로부터 독립적으로 선택된다.
- [0980] 다른 실시형태에서, R<sub>4</sub>는 C<sub>3-6</sub> 카보사이클, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>Q, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CHQR, -CHQR, 및 -CQ(R)<sub>2</sub>로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기서 Q는 옥소(=O), OH, 아미노 및 C<sub>1-3</sub> 알킬로부터 선택된 하나 이상의 치환체로 치환되는, C<sub>3-6</sub> 카보사이클, N, O 및 S로부터 선택되는 하나 이상의 헤테로원자를 갖는 5- 내지 14-원 헤테로아릴, -OR, -O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>N(R)<sub>2</sub>, -C(O)OR, -OC(O)R, -CX<sub>3</sub>, -CX<sub>2</sub>H, -CXH<sub>2</sub>, -CN, -C(O)N(R)<sub>2</sub>, -N(R)C(O)R, -N(R)S(O)<sub>2</sub>R, -N(R)C(O)N(R)<sub>2</sub>, -N(R)C(S)N(R)<sub>2</sub>, -C(R)N(R)<sub>2</sub>C(O)OR, 및 N, O 및 S로부터 선택되는 하나 이상의 헤테로원자를 갖는 5- 내지 14-원 헤테로사이클로알킬로부터 선택되고, 그리고 각각의 n은 1, 2, 3, 4 및 5로부터 독립적으로 선택된다.
- [0981] 다른 실시형태에서, R<sub>4</sub>는 C<sub>3-6</sub> 카보사이클, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>Q, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CHQR, -CHQR, 및 -CQ(R)<sub>2</sub>로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 Q는 C<sub>3-6</sub> 카보사이클, N, O 및 S로부터 선택되는 하나 이상의 헤테로원자를 갖는 5- 내지 14-원 헤테로사이클, -OR, -O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>N(R)<sub>2</sub>, -C(O)OR, -OC(O)R, -CX<sub>3</sub>, -CX<sub>2</sub>H, -CXH<sub>2</sub>, -CN, -C(O)N(R)<sub>2</sub>, -N(R)C(O)R, -N(R)S(O)<sub>2</sub>R, -N(R)C(O)N(R)<sub>2</sub>, -N(R)C(S)N(R)<sub>2</sub>, -C(R)N(R)<sub>2</sub>C(O)OR로부터 선택되며, 그리고 각각의 n은 1, 2, 3, 4 및 5로부터 독립적으로 선택되며; 그리고 Q가 5- 내지 14-원 헤테로사이클이고 (i) R<sub>4</sub>는 -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>Q이며(n은 1 또는 2임), 또는 (ii) R<sub>4</sub>는 -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CHQR이며(n은 1임), 또는 (iii) R<sub>4</sub>는 -CHQR, 및 -CQ(R)<sub>2</sub>일 때, Q는 5- 내지 14-원 헤테로아릴 또는 8- 내지 14-원 헤테로사이클로알킬 중 하나이다.
- [0982] 다른 실시형태에서, R<sub>4</sub>는 C<sub>3-6</sub> 카보사이클, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>Q, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CHQR, -CHQR 및 -CQ(R)<sub>2</sub>로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기서, Q는 C<sub>3-6</sub> 카보사이클, N, O 및 S로부터 선택되는 하나 이상의 헤테로원자를 갖는 5- 내지 14-원 헤테로아릴, -OR, -O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>N(R)<sub>2</sub>, -C(O)OR, -OC(O)R, -CX<sub>3</sub>, -CX<sub>2</sub>H, -CXH<sub>2</sub>, -CN, -C(O)N(R)<sub>2</sub>, -N(R)C(O)R, -N(R)S(O)<sub>2</sub>R, -N(R)C(O)N(R)<sub>2</sub>, -N(R)C(S)N(R)<sub>2</sub>, -C(R)N(R)<sub>2</sub>C(O)OR로부터 선택되고, 그리고 각각의 n은 1, 2, 3, 4 및 5로부터 독립적으로 선택된다.
- [0983] 다른 실시형태에서, R<sub>4</sub>는 비치환된 C<sub>1-4</sub> 알킬, 예를 들어, 비치환된 메틸이다.
- [0984] 소정의 실시형태에서, 본 개시내용은 화학식 (I)을 갖는 화합물을 제공하되, R<sub>4</sub>는 -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>Q 또는 -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CHQR이며, 여기서 Q는 -N(R)<sub>2</sub>이고, 그리고 n은 3, 4 및 5로부터 선택된다.
- [0985] 소정의 실시형태에서, 본 개시내용은 화학식 (I)을 갖는 화합물을 제공하되, R<sub>4</sub>는 -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>Q, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CHQR, -CHQR, 및 -CQ(R)<sub>2</sub>로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기서 Q는 -N(R)<sub>2</sub>이고, n은 1, 2, 3, 4 및 5로부터 선택된다.
- [0986] 소정의 실시형태에서, 본 개시내용은 화학식 (I)을 갖는 화합물을 제공하되, R<sub>2</sub> 및 R<sub>3</sub>은 C<sub>2-14</sub> 알킬, C<sub>2-14</sub> 알켄일, -R\*YR", -YR" 및 -R\*OR"로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되거나 또는 R<sub>2</sub> 및 R<sub>3</sub>은 그들이 부착된 원자와

함께 헤테로사이클 또는 카보사이클을 형성하며, 그리고  $R_4$ 는  $-(CH_2)_nQ$  또는  $-(CH_2)_nCHQR$ 이며, 여기서  $Q$ 는  $-N(R)_2$  이고, 그리고  $n$ 은 3, 4 및 5로부터 선택된다.

[0987] 소정의 실시형태에서,  $R_2$  및  $R_3$ 은  $C_{2-14}$  알킬,  $C_{2-14}$  알켄일,  $-R^*YR''$ ,  $-YR''$  및  $-R^*OR''$ 로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되거나 또는  $R_2$  및  $R_3$ 은 그들이 부착된 원자와 함께 헤테로사이클 또는 카보사이클을 형성한다.

[0988] 일부 실시형태에서,  $R_1$ 은  $C_{5-20}$  알킬 및  $C_{5-20}$  알켄일로 이루어진 군으로부터 선택된다.

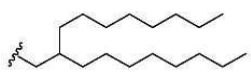
[0989] 다른 실시형태에서,  $R_1$ 은  $-R^*YR''$ ,  $-YR''$  및  $-R''M'R'$ 로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0990] 소정의 실시형태에서,  $R_1$ 은  $-R^*YR''$  및  $-YR''$ 로부터 선택된다. 일부 실시형태에서,  $Y$ 는 사이클로프로필기이다. 일부 실시형태에서,  $R^*$ 은  $C_8$  알킬 또는  $C_8$  알켄일이다. 소정의 실시형태에서,  $R''$ 은  $C_{3-12}$  알킬이다. 예를 들어,  $R''$ 은  $C_3$  알킬일 수 있다. 예를 들어,  $R''$ 은  $C_{4-8}$  알킬(예를 들어,  $C_4$ ,  $C_5$ ,  $C_6$ ,  $C_7$  또는  $C_8$  알킬)일 수 있다.

[0991] 일부 실시형태에서,  $R_1$ 은  $C_{5-20}$  알킬이다. 일부 실시형태에서,  $R_1$ 은  $C_6$  알킬이다. 일부 실시형태에서,  $R_1$ 은  $C_8$  알킬이다. 다른 실시형태에서,  $R_1$ 은  $C_9$  알킬이다. 소정의 실시형태에서,  $R_1$ 은  $C_{14}$  알킬이다. 다른 실시형태에서,  $R_1$ 은  $C_{18}$  알킬이다.

[0992] 일부 실시형태에서,  $R_1$ 은  $C_{5-20}$  알켄일이다. 소정의 실시형태에서,  $R_1$ 은  $C_{18}$  알켄일이다. 일부 실시형태에서,  $R_1$ 은 리놀레일이다.

[0993] 소정의 실시형태에서,  $R_1$ 은 분지형이다(예를 들어, 데칸-2-일, 운데칸-3-일, 도데칸-4-일, 트라이데칸-5-일, 테트라데칸-6-일, 2-메틸운데칸-3-일, 2-메틸데칸-2-일, 3-메틸운데칸-3-일, 4-메틸도데칸-4-일 또는 헵타데카-9-

일). 소정의 실시형태에서,  $R_1$ 은  이다.

[0994] 소정의 실시형태에서,  $R_1$ 은 비치환된  $C_{5-20}$  알킬 또는  $C_{5-20}$  알켄일이다. 소정의 실시형태에서,  $R'$ 는 치환된  $C_{5-20}$  알킬 또는  $C_{5-20}$  알켄일(예를 들어,  $C_{3-6}$  카보사이클 예컨대 1-사이클로프로필노닐로 치환됨)이다.

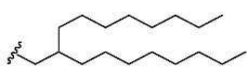
[0995] 다른 실시형태에서,  $R_1$ 은  $-R''M'R'$ 이다.

[0996] 일부 실시형태에서,  $R'$ 은  $-R^*YR''$  및  $-YR''$ 로부터 선택된다. 일부 실시형태에서,  $Y$ 는  $C_{3-8}$  사이클로알킬이다. 일부 실시형태에서,  $Y$ 는  $C_{6-10}$  아릴이다. 일부 실시형태에서,  $Y$ 는 사이클로프로필기이다. 일부 실시형태에서,  $Y$ 는 사이클로헥실기이다. 소정의 실시형태에서,  $R^*$ 은  $C_1$  알킬이다.

[0997] 일부 실시형태에서,  $R''$ 은  $C_{3-12}$  알킬 및  $C_{3-12}$  알켄일로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서,  $Y$ 에 인접한  $R''$ 은  $C_1$  알킬이다. 일부 실시형태에서,  $Y$ 에 인접한  $R''$ 은  $C_{4-9}$  알킬(예를 들어,  $C_4$ ,  $C_5$ ,  $C_6$ ,  $C_7$  또는  $C_8$  또는  $C_9$  알킬)이다.

[0998] 일부 실시형태에서,  $R'$ 은  $C_4$  알킬 및  $C_4$  알켄일로부터 선택된다. 소정의 실시형태에서,  $R'$ 은  $C_5$  알킬 및  $C_5$  알켄일로부터 선택된다. 일부 실시형태에서,  $R'$ 은  $C_6$  알킬 및  $C_6$  알켄일로부터 선택된다. 일부 실시형태에서,  $R'$ 은  $C_7$  알킬 및  $C_7$  알켄일로부터 선택된다. 일부 실시형태에서,  $R'$ 은  $C_9$  알킬 및  $C_9$  알켄일로부터 선택된다.

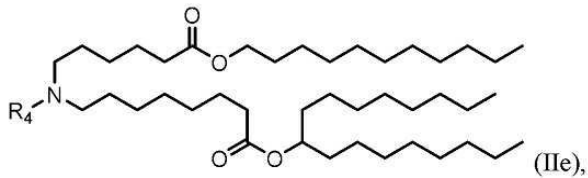
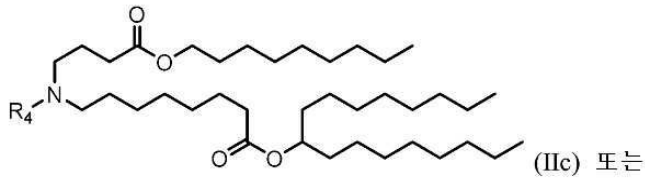
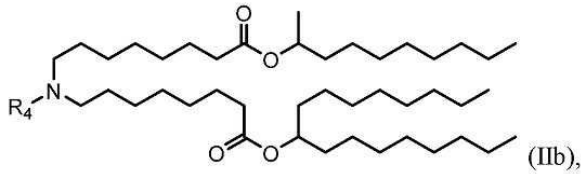
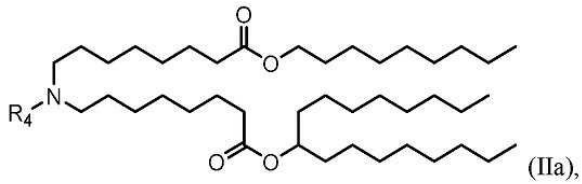
[0999] 다른 실시형태에서,  $R'$ 은  $C_{11}$  알킬 및  $C_{11}$  알켄일로부터 선택된다. 다른 실시형태에서,  $R'$ 은  $C_{12}$  알킬,  $C_{12}$  알켄일,  $C_{13}$  알킬,  $C_{13}$  알켄일,  $C_{14}$  알킬,  $C_{14}$  알켄일,  $C_{15}$  알킬,  $C_{15}$  알켄일,  $C_{16}$  알킬,  $C_{16}$  알켄일,  $C_{17}$  알킬,  $C_{17}$  알켄일,  $C_{18}$  알킬 및  $C_{18}$  알켄일로부터 선택된다. 소정의 실시형태에서,  $R'$ 은 분지형(예를 들어, 데칸-2-일, 운데칸-3-일, 도데칸-4-일, 트라이데칸-5-일, 테트라데칸-6-일, 2-메틸운데칸-3-일, 2-메틸데칸-2-일, 3-메틸운데

칸-3-일, 4-메틸도데칸-4-일 또는 헵타데카-9-일)이다. 소정의 실시형태에서,  $R'$ 은  이다.

- [1000] 소정의 실시형태에서, R'는 비치환된 C<sub>1-18</sub> 알킬이다. 소정의 실시형태에서, R'는 치환된 C<sub>1-18</sub> 알킬(예를 들어, C<sub>3-6</sub> 카보사이클로 치환된 C<sub>1-15</sub> 알킬 예컨대 1-사이클로프로필노닐)이다.
- [1001] 일부 실시형태에서, R"는 C<sub>3-14</sub> 알킬 및 C<sub>3-14</sub> 알켄일로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, R"는 C<sub>3</sub> 알킬, C<sub>4</sub> 알킬, C<sub>5</sub> 알킬, C<sub>6</sub> 알킬, C<sub>7</sub> 알킬 또는 C<sub>8</sub> 알킬이다. 일부 실시형태에서, R"는 C<sub>9</sub> 알킬, C<sub>10</sub> 알킬, C<sub>11</sub> 알킬, C<sub>12</sub> 알킬, C<sub>13</sub> 알킬 또는 C<sub>14</sub> 알킬이다.
- [1002] 일부 실시형태에서, M'는 -C(O)O-이다. 일부 실시형태에서, M'는 -OC(O)-이다.
- [1003] 다른 실시형태에서, M'는 아릴기 또는 헤테로아릴기이다. 예를 들어, M'는 페닐, 옥사졸 및 티아졸로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.
- [1004] 일부 실시형태에서, M은 -C(O)O-이고, 일부 실시형태에서, M은 -OC(O)-이다. 일부 실시형태에서, M은 -C(O)N(R')-이다. 일부 실시형태에서, M은 -P(O)(OR')O-이다.
- [1005] 다른 실시형태에서, M은 아릴기 또는 헤테로아릴기이다. 예를 들어, M은 페닐, 옥사졸 및 티아졸로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.
- [1006] 일부 실시형태에서, M은 M'와 동일하다. 다른 실시형태에서, M은 M'와 상이하다.
- [1007] 일부 실시형태에서, 각각의 R<sub>5</sub>는 H이다. 소정의 이러한 실시형태에서, 각각의 R<sub>6</sub>은 또한 H이다.
- [1008] 일부 실시형태에서, R<sub>7</sub>은 H이다. 다른 실시형태에서, R<sub>7</sub>은 C<sub>1-3</sub> 알킬(예를 들어, 메틸, 에틸, 프로필 또는 i-프로필)이다.
- [1009] 일부 실시형태에서, R<sub>2</sub> 및 R<sub>3</sub>은 독립적으로 C<sub>5-14</sub> 알킬 또는 C<sub>5-14</sub> 알켄일이다.
- [1010] 일부 실시형태에서, R<sub>2</sub>와 R<sub>3</sub>은 동일하다. 일부 실시형태에서, R<sub>2</sub> 및 R<sub>3</sub>은 C<sub>8</sub> 알킬이다. 소정의 실시형태에서, R<sub>2</sub> 및 R<sub>3</sub>은 C<sub>2</sub> 알킬이다. 다른 실시형태에서, R<sub>2</sub> 및 R<sub>3</sub>은 C<sub>3</sub> 알킬이다. 일부 실시형태에서, R<sub>2</sub> 및 R<sub>3</sub>은 C<sub>4</sub> 알킬이다. 소정의 실시형태에서, R<sub>2</sub> 및 R<sub>3</sub>은 C<sub>5</sub> 알킬이다. 다른 실시형태에서, R<sub>2</sub> 및 R<sub>3</sub>은 C<sub>6</sub> 알킬이다. 일부 실시형태에서, R<sub>2</sub> 및 R<sub>3</sub>은 C<sub>7</sub> 알킬이다.
- [1011] 다른 실시형태에서, R<sub>2</sub>와 R<sub>3</sub>은 상이하다. 소정의 실시형태에서, R<sub>2</sub>는 C<sub>8</sub> 알킬이다. 일부 실시형태에서, R<sub>3</sub>는 C<sub>1-7</sub>(예를 들어, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub> 또는 C<sub>7</sub> 알킬) 또는 C<sub>9</sub> 알킬이다.
- [1012] 일부 실시형태에서, R<sub>7</sub> 및 R<sub>3</sub>은 H이다.
- [1013] 소정의 실시형태에서, R<sub>2</sub>는 H이다.
- [1014] 일부 실시형태에서, m은 5, 7 또는 9이다.
- [1015] 일부 실시형태에서, R<sub>4</sub>는 -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>Q 및 -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CHQR로부터 선택된다.
- [1016] 일부 실시형태에서, Q는 -OR, -OH, -O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>N(R)<sub>2</sub>, -OC(O)R, -CX<sub>3</sub>, -CN, -N(R)C(O)R, -N(H)C(O)R, -N(R)S(O)<sub>2</sub>R, -N(H)S(O)<sub>2</sub>R, -N(R)C(O)N(R)<sub>2</sub>, -N(H)C(O)N(R)<sub>2</sub>, -N(H)C(O)N(H)(R), -N(R)C(S)N(R)<sub>2</sub>, -N(H)C(S)N(R)<sub>2</sub>, -N(H)C(S)N(H)(R), -C(R)N(R)<sub>2</sub>C(O)OR, 카보사이클 및 헤테로사이클로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [1017] 소정의 실시형태에서, Q는 -OH이다.
- [1018] 소정의 실시형태에서, Q는 치환된 또는 비치환된 5- 내지 10-원 헤테로아릴이고, 예를 들어, Q는 이미다졸, 피리미딘, 퓨린, 2-아미노-1,9-다이하이드로-6H-퓨린-6-온-9-일(또는 구아닌-9-일), 아데닌-9-일, 사이토신-1-일, 또는 유라실-1-일이다. 소정의 실시형태에서, Q는 치환된 5- 내지 14-원 헤테로사이클로알킬이고, 예를 들어, 옥소(=O), OH, 아미노 및 C<sub>1-3</sub> 알킬로부터 선택된 하나 이상의 치환체로 치환된다. 예를 들어, Q는 4-메틸피페라진일, 4-(4-메톡시벤질)피페라진일 또는 아이소인돌린-2-일-1,3-다이온이다.

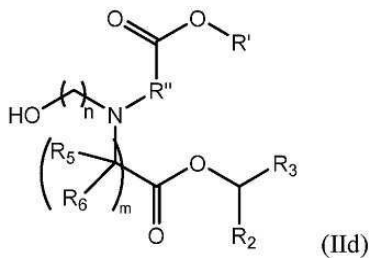


- [1019] 소정의 실시형태에서, Q는 비치환된 또는 치환된 C<sub>6-10</sub> 아릴(예컨대 페닐) 또는 C<sub>3-6</sub> 사이클로알킬이다.
- [1020] 일부 실시형태에서, n은 1이다. 다른 실시형태에서, n은 2이다. 추가 실시형태에서, n은 3이다. 소정의 다른 실시형태에서, n은 4이다. 예를 들어, R<sub>1</sub>는 -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OH일 수 있다. 예를 들어, R<sub>4</sub>는 -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>OH일 수 있다. 예를 들어, R<sub>4</sub>는 -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>OH일 수 있다. 예를 들어, R<sub>4</sub>는 벤질일 수 있다. 예를 들어, R<sub>4</sub>는 4-메톡시벤질일 수 있다.
- [1021] 일부 실시형태에서, R<sub>1</sub>는 C<sub>3-6</sub> 카보사이클이다. 일부 실시형태에서, R<sub>4</sub>는 C<sub>3-6</sub> 사이클로알킬이다. 예를 들어, R<sub>4</sub>는, 예를 들어, OH, 할로, C<sub>1-6</sub> 알킬 등으로 선택적으로 치환된 사이클로헥실이다. 예를 들어, R<sub>4</sub>는 2-하이드록시사이클로헥실일 수 있다.
- [1022] 일부 실시형태에서, R은 H이다.
- [1023] 일부 실시형태에서, R은 비치환된 C<sub>1-3</sub> 알킬 또는 비치환된 C<sub>2-3</sub> 알켄일이다. 예를 들어, R<sub>4</sub>는 -CH<sub>2</sub>CH(OH)CH<sub>3</sub> 또는 -CH<sub>2</sub>CH(OH)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>일 수 있다.
- [1024] 일부 실시형태에서, R은 치환된 C<sub>1-3</sub> 알킬, 예를 들어, CH<sub>2</sub>OH이다. 예를 들어, R<sub>4</sub>는 -CH<sub>2</sub>CH(OH)CH<sub>2</sub>OH일 수 있다.
- [1025] 일부 실시형태에서, R<sub>2</sub> 및 R<sub>3</sub>은 그들이 부착된 원자와 함께 헤테로사이클 또는 카보사이클을 형성한다. 일부 실시형태에서, R<sub>2</sub> 및 R<sub>3</sub>은 그들이 부착된 원자와 함께 N, O, S 및 P로부터 선택된 하나 이상의 헤테로원자를 갖는 5- 내지 14-원 방향족 또는 비방향족 헤테로사이클을 형성한다. 일부 실시형태에서, R<sub>2</sub> 및 R<sub>3</sub>은 그들이 부착된 원자와 함께 선택적으로 치환된 C<sub>3-20</sub> 카보사이클(예를 들어, C<sub>3-18</sub> 카보사이클, C<sub>3-15</sub> 카보사이클, C<sub>3-12</sub> 카보사이클, 또는 C<sub>3-10</sub> 카보사이클)을 방향족 또는 비방향족 중 하나로 형성한다. 일부 실시형태에서, R<sub>2</sub> 및 R<sub>3</sub>은 그들이 부착된 원자와 함께 C<sub>3-6</sub> 카보사이클을 형성한다. 다른 실시형태에서, R<sub>2</sub> 및 R<sub>3</sub>은 그들이 부착된 원자와 함께 C<sub>6</sub> 카보사이클, 예컨대 사이클로헥실 또는 페닐기를 형성한다. 소정의 실시형태에서, 헤테로사이클 또는 C<sub>3-6</sub> 카보사이클은 (예를 들어, 동일한 고리 원자에서 또는 인접한 또는 비인접 고리 원자에서) 하나 이상의 알킬기로 치환된다. 예를 들어, R<sub>2</sub> 및 R<sub>3</sub>은 그들이 부착된 원자와 함께 하나 이상의 C<sub>5</sub> 알킬 치환을 보유하는 사이클로헥실 또는 페닐기를 형성할 수 있다. 소정의 실시형태에서, R<sub>2</sub> 및 R<sub>3</sub>에 의해 형성된 헤테로사이클 또는 C<sub>3-6</sub> 카보사이클은 카보사이클기로 치환된다. 예를 들어, R<sub>2</sub> 및 R<sub>3</sub>은 그들이 부착된 원자와 함께 사이클로헥실로 치환되는 사이클로헥실 또는 페닐기를 형성할 수 있다. 일부 실시형태에서, R<sub>2</sub> 및 R<sub>3</sub>은 그들이 부착된 원자와 함께 C<sub>7-15</sub> 카보사이클, 예컨대 사이클로헵틸, 사이클로펜타데칸일 또는 나프틸기를 형성한다.
- [1026] 일부 실시형태에서, R<sub>4</sub>는 -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>Q 및 -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CHQR로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, Q는 -OR, -OH, -O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>N(R)<sub>2</sub>, -OC(O)R, -CX<sub>3</sub>, -CN, -N(R)C(O)R, -N(H)C(O)R, -N(R)S(O)<sub>2</sub>R, -N(H)S(O)<sub>2</sub>R, -N(R)C(O)N(R)<sub>2</sub>, -N(H)C(O)N(R)<sub>2</sub>, -N(H)C(O)N(H)(R), -N(R)C(S)N(R)<sub>2</sub>, -N(H)C(S)N(R)<sub>2</sub>, -N(H)C(S)N(H)(R) 및 헤테로사이클로 이루어진 군으로부터 선택된다. 다른 실시형태에서, Q는 이미다졸, 피리미딘 및 퓨린으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [1027] 일부 실시형태에서, R<sub>2</sub> 및 R<sub>3</sub>은 그들이 부착된 원자와 함께 헤테로사이클 또는 카보사이클을 형성한다. 일부 실시형태에서, R<sub>2</sub> 및 R<sub>3</sub>은 그들이 부착된 원자와 함께 C<sub>3-6</sub> 카보사이클, 예컨대 페닐기를 형성한다. 소정의 실시형태에서, 헤테로사이클 또는 C<sub>3-6</sub> 카보사이클은 하나 이상의 알킬기로(예를 들어, 동일한 고리 원자에서 또는 인접한 또는 비인접 고리 원자에서) 치환된다. 예를 들어, R<sub>2</sub> 및 R<sub>3</sub>은 그들이 부착된 원자와 함께 하나 이상의 C<sub>5</sub> 알킬 치환을 보유하는 페닐기를 형성할 수 있다.
- [1028] 일부 실시형태에서, 화학식 (I)의 화합물의 소집단은 하기 화학식 (IIa), (IIb), (IIc) 또는 (IIe)의 화합물 또는 이의 염 또는 이성질체를 포함한다:



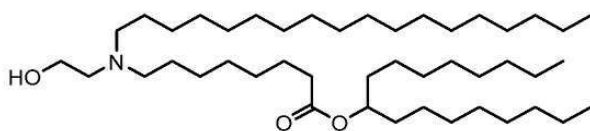
식 중, R<sub>4</sub>는 본 명세서에 기재된 바와 같다.

일부 실시형태에서, 화학식 (I)의 화합물의 소집단은 하기 화학식 (IIId)의 화합물 또는 이의 염 또는 이성질체를 포함한다:

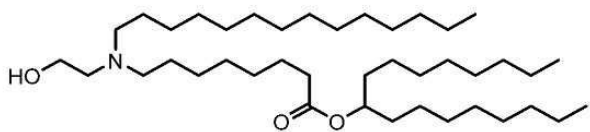


n은 2, 3 또는 4이고; 그리고 m, R', R'' 및 R<sub>2</sub> 내지 R<sub>6</sub>은 본 명세서에 기재된 바와 같다. 예를 들어, R<sub>2</sub> 및 R<sub>3</sub>의 각각은 C<sub>5-14</sub> 알킬 및 C<sub>5-14</sub> 알켄일로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택될 수 있다.

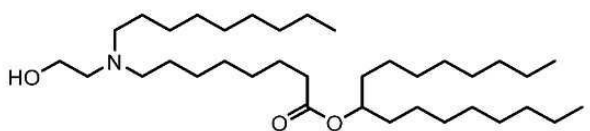
일부 실시형태에서, 본 개시내용의 약제학적 조성물, 화학식 (I)의 화합물은 하기로 이루어진 군 및 이들의 염 또는 입체이성질체로부터 선택된다:



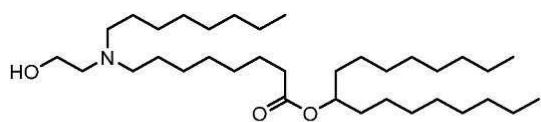
(화합물 1),



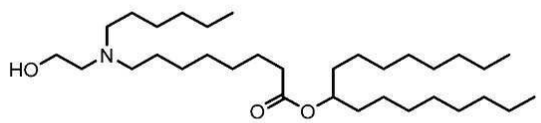
(화합물 2),



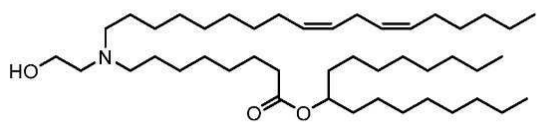
(화합물 3),



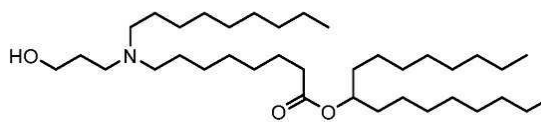
(화합물 4),



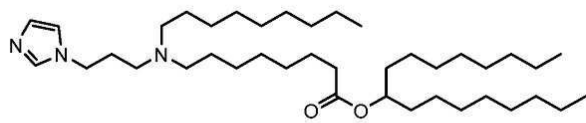
(화합물 5),



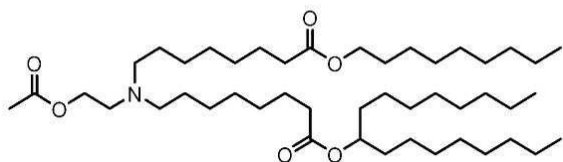
(화합물 6),



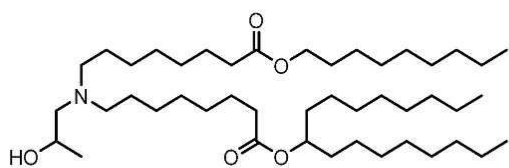
(화합물 7),



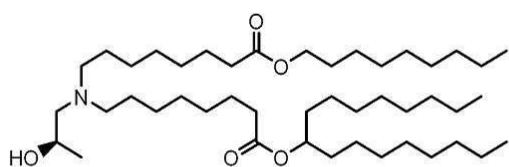
(화합물 8),



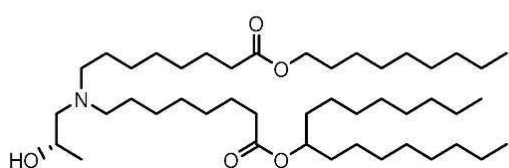
(화합물 9),



(화합물 10),

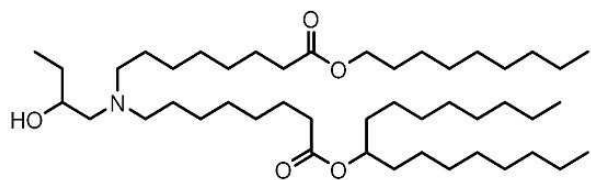


(화합물 11),

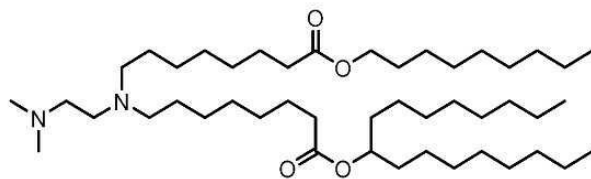


(화합물 12),

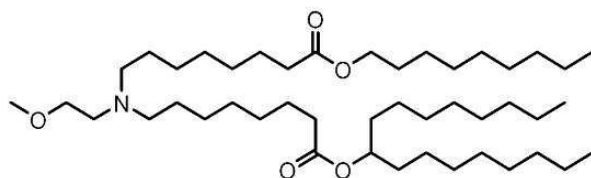
[1037]



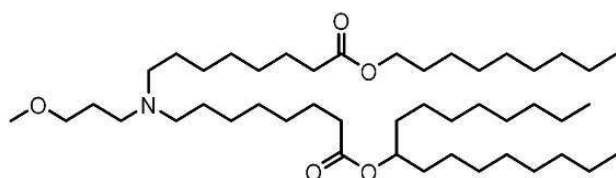
(화합물 13),



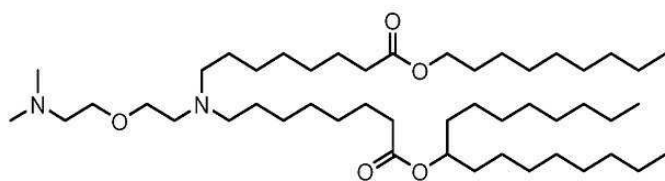
(화합물 14),



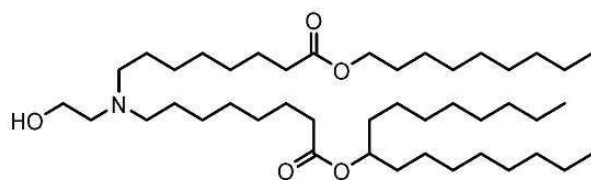
(화합물 15),



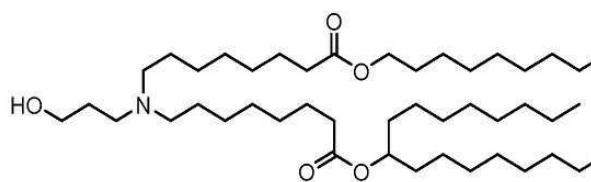
(화합물 16),



(화합물 17),

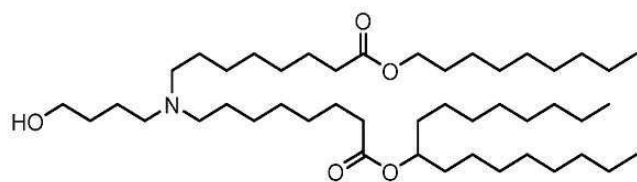


(화합물 18),

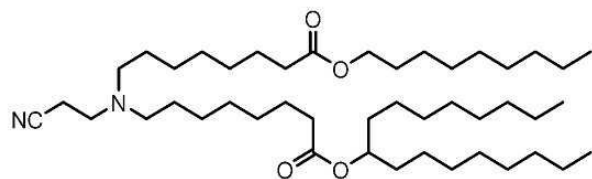


(화합물 19),

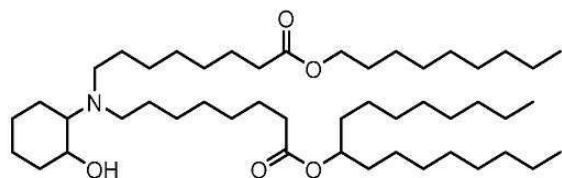
[1038]



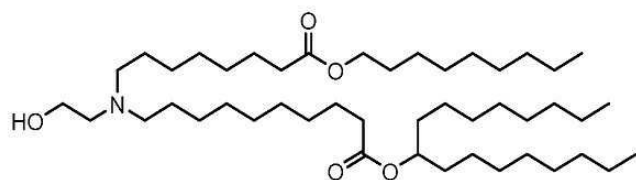
(화합물 20),



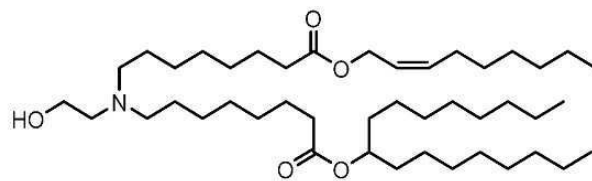
(화합물 21),



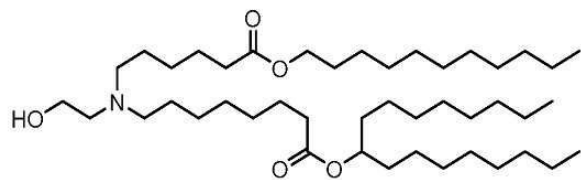
(화합물 22),



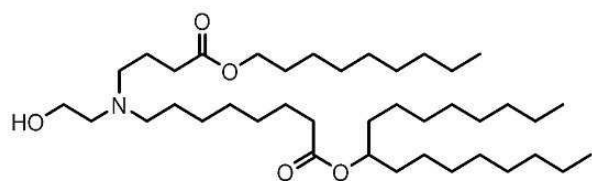
(화합물 23),



(화합물 24),



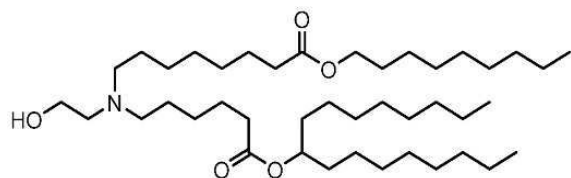
(화합물 25),



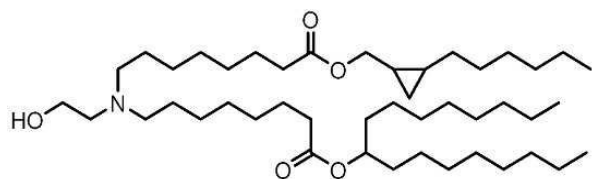
(화합물 26),

[1039]

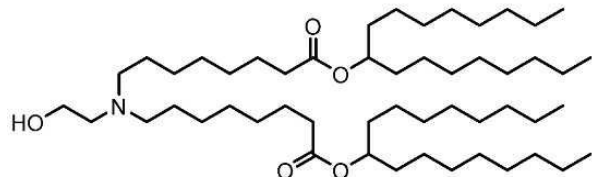




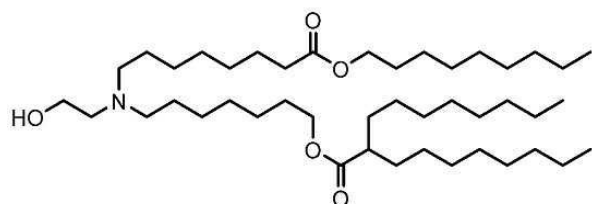
(화합물 27),



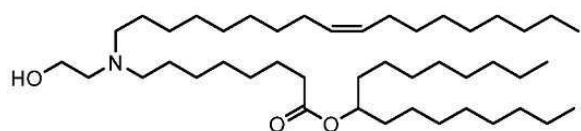
(화합물 28),



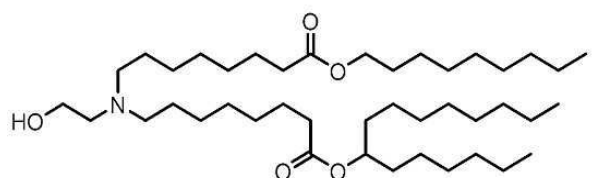
(화합물 29),



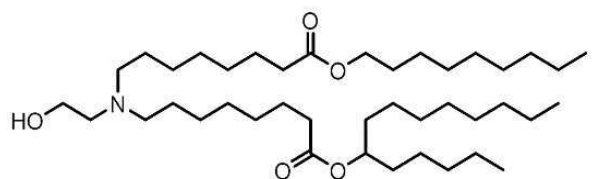
(화합물 30),



(화합물 31),

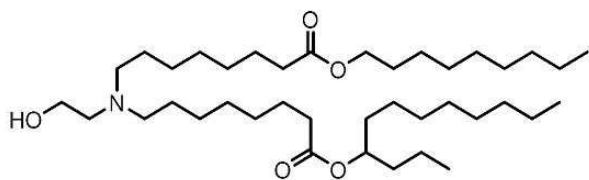


(화합물 32),

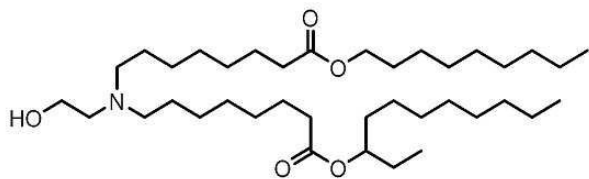


(화합물 33),

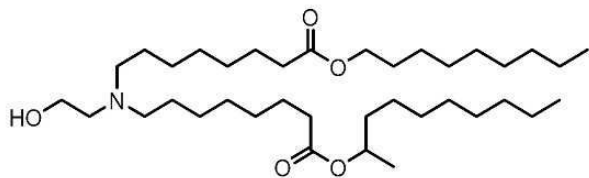
[1040]



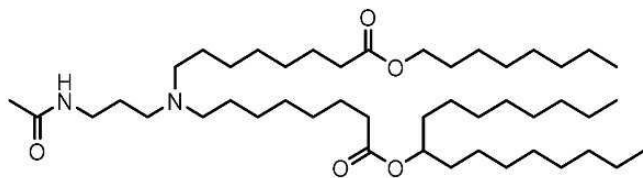
(화합물 34),



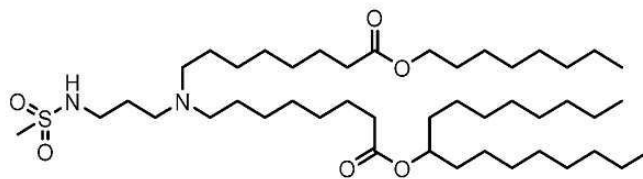
(화합물 35),



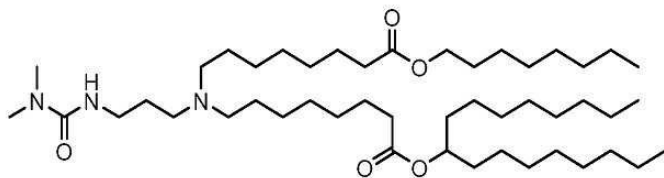
(화합물 36),



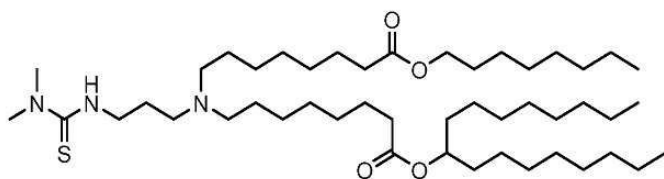
(화합물 37),



(화합물 38),

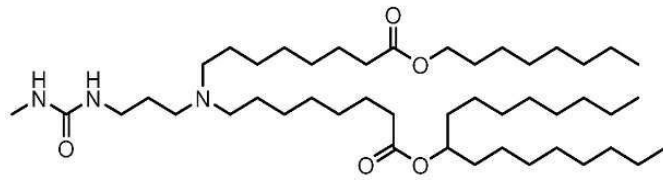


(화합물 39),

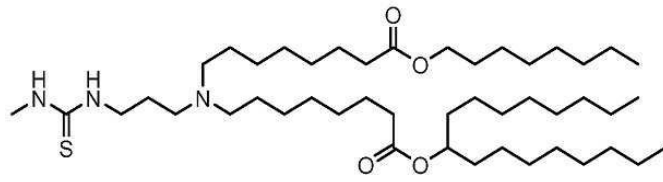


(화합물 40),

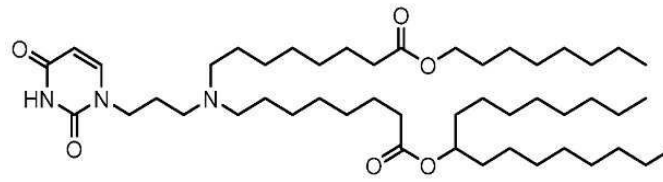
[1041]



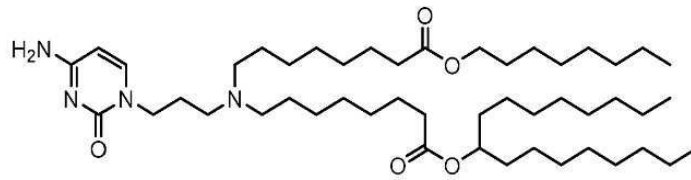
(화합물 41),



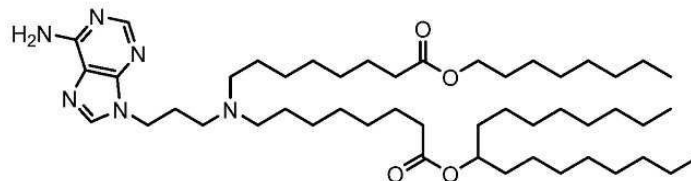
(화합물 42),



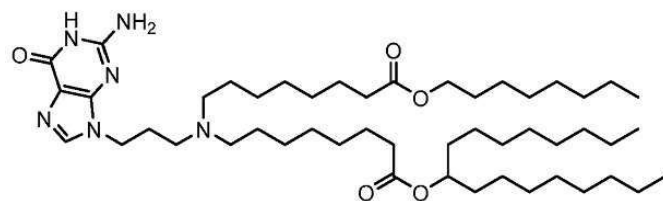
(화합물 43),



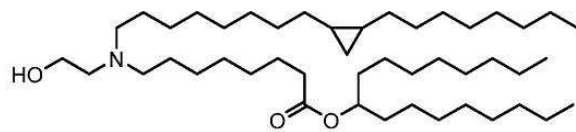
(화합물 44),



(화합물 45),

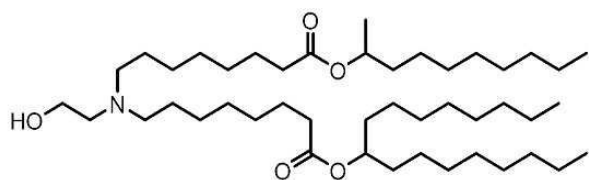


(화합물 46),

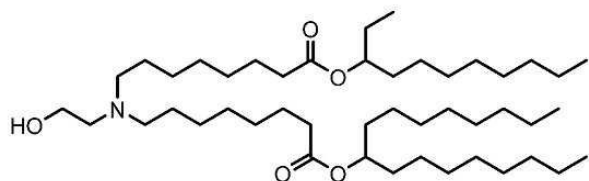


(화합물 47),

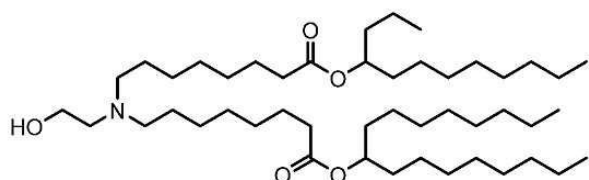
[1042]



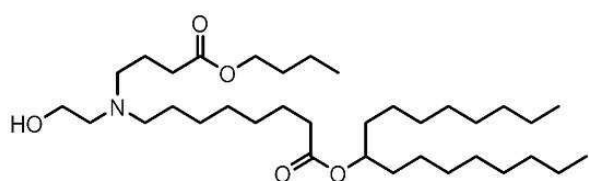
(화합물 48),



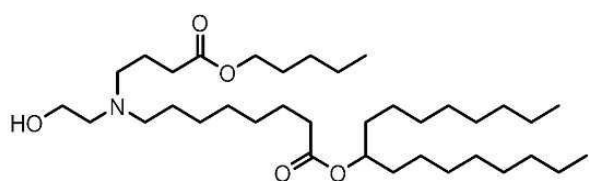
(화합물 49),



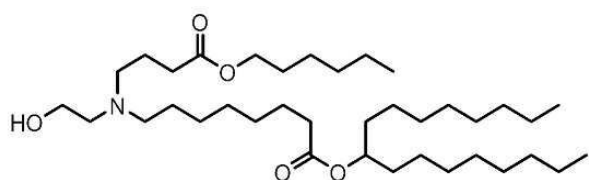
(화합물 50),



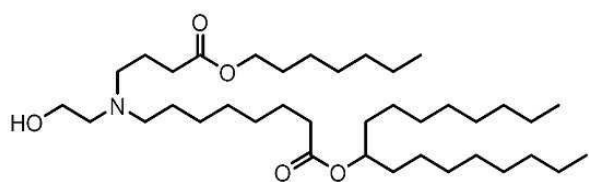
(화합물 51),



(화합물 52),

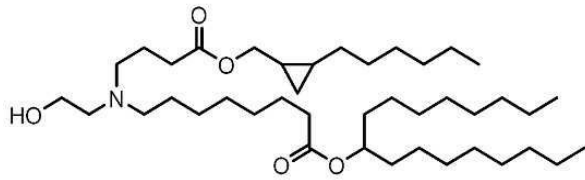


(화합물 53),

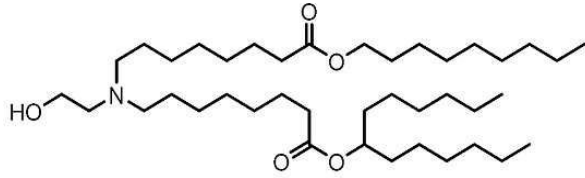


(화합물 54),

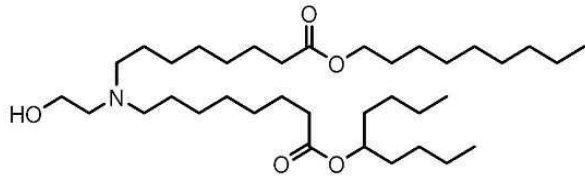
[1043]



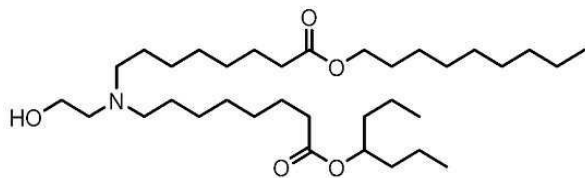
(화합물 55),



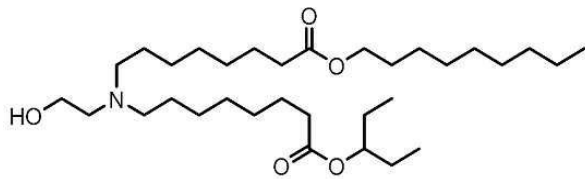
(화합물 56),



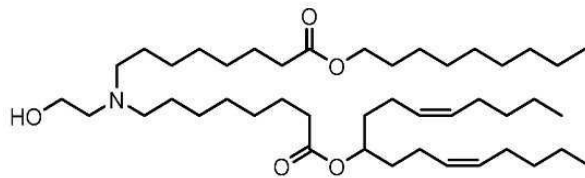
(화합물 57),



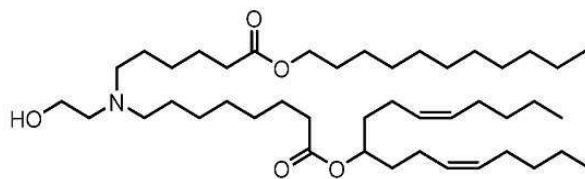
(화합물 58),



(화합물 59),



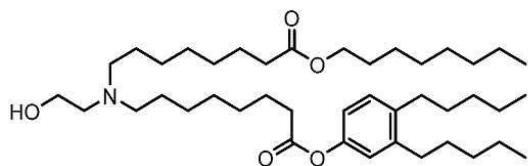
(화합물 60),



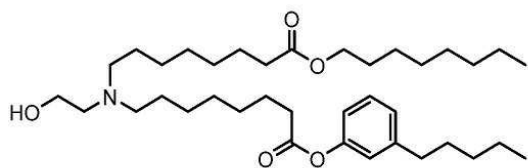
(화합물 61),

[1044]

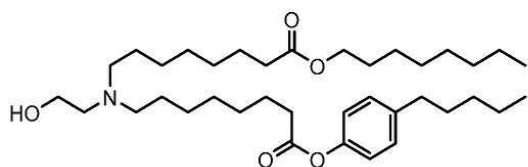




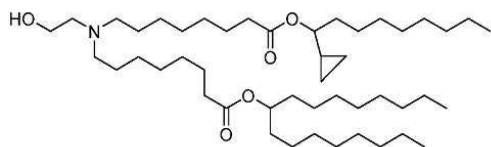
(화합물 62),



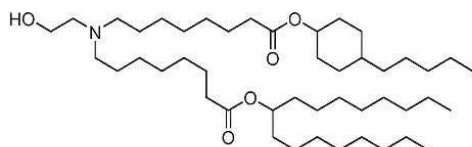
(화합물 63),



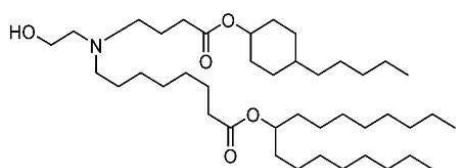
(화합물 64),



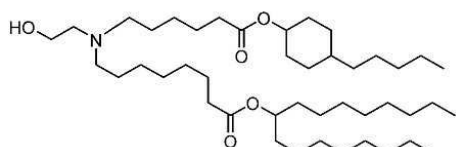
(화합물 65),



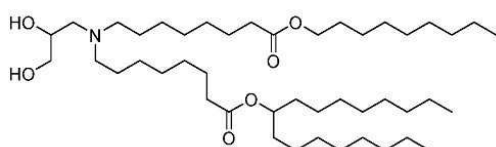
(화합물 66),



(화합물 67),

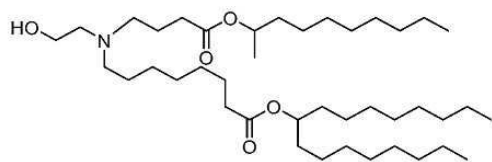


(화합물 68),

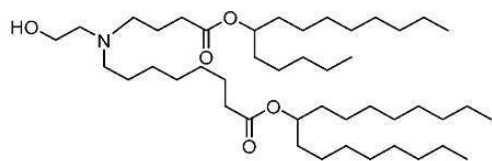


(화합물 69),

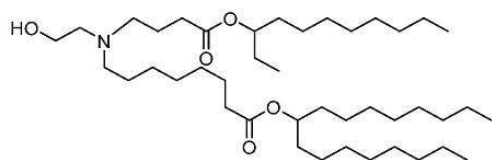
[1045]



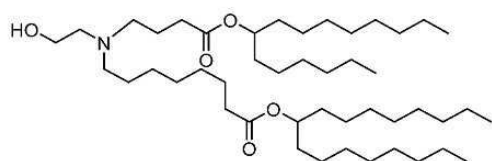
(화합물 70),



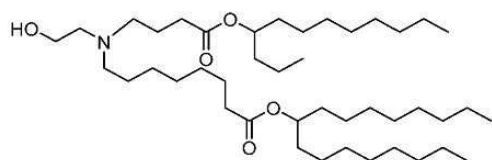
(화합물 71),



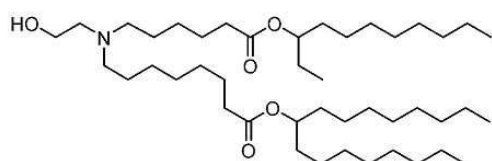
(화합물 72),



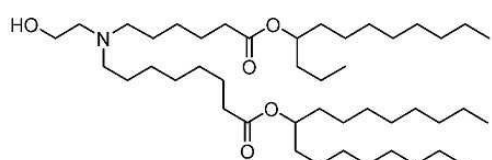
(화합물 73),



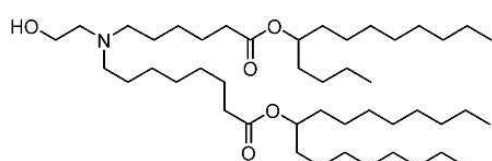
(화합물 74),



(화합물 75),

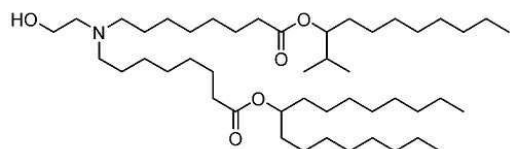


(화합물 76),

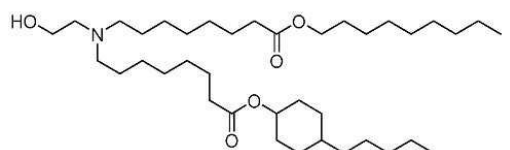


(화합물 77),

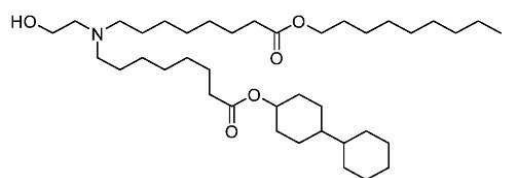
[1046]



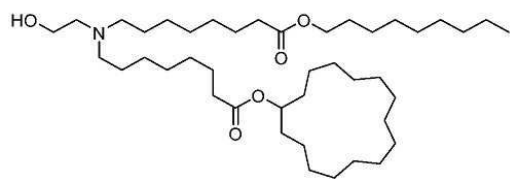
(화합물 78),



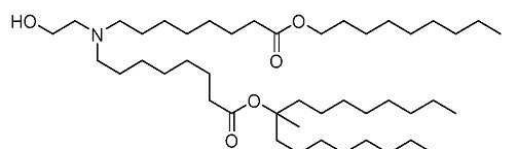
(화합물 79),



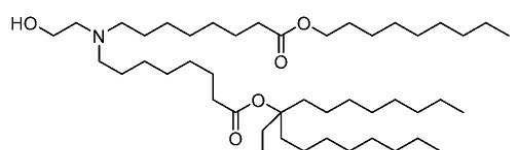
(화합물 80),



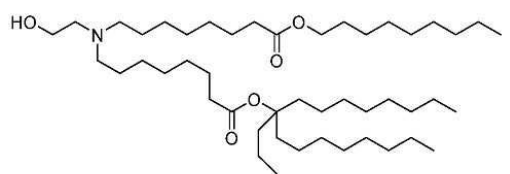
(화합물 81),



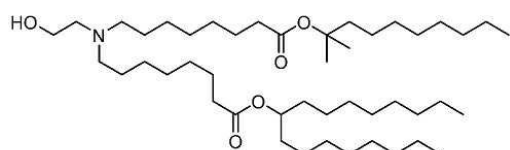
(화합물 82),



(화합물 83),

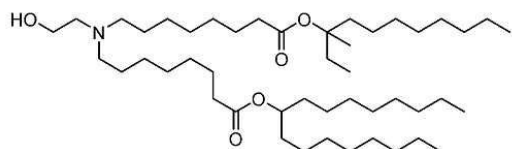


(화합물 84),

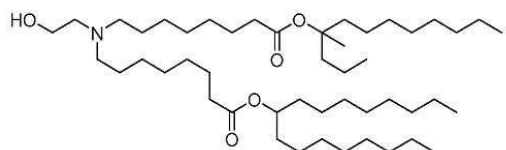


(화합물 85),

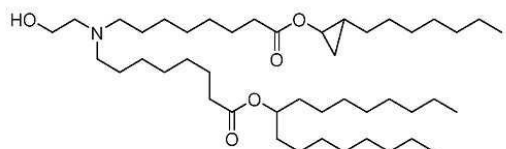
[1047]



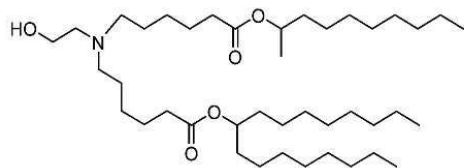
(화합물 86),



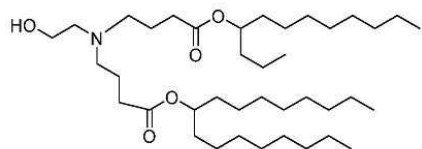
(화합물 87),



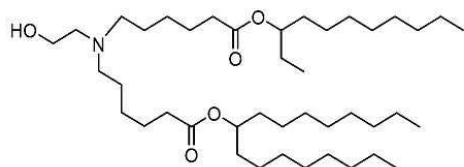
(화합물 88),



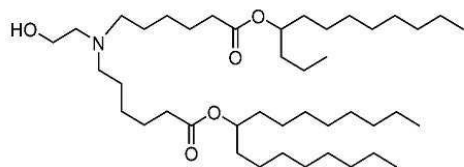
(화합물 89),



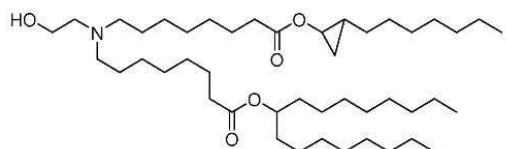
(화합물 90),



(화합물 91),

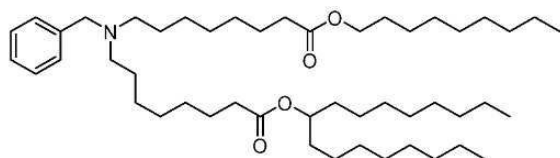


(화합물 92),

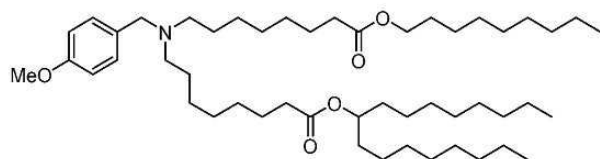


(화합물 93),

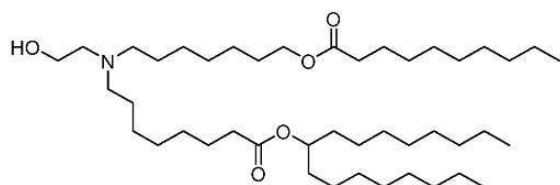
[1048]



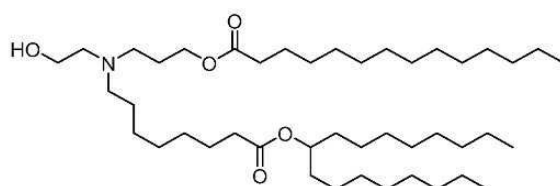
(화합물 94),



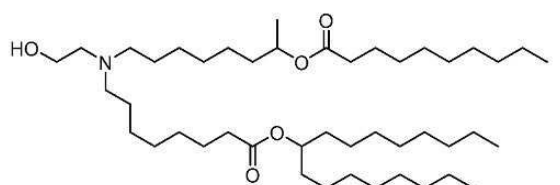
(화합물 95),



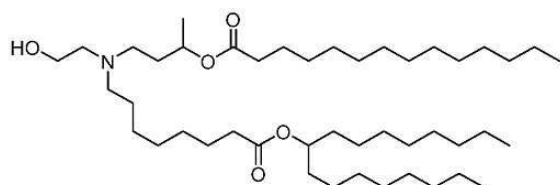
(화합물 96),



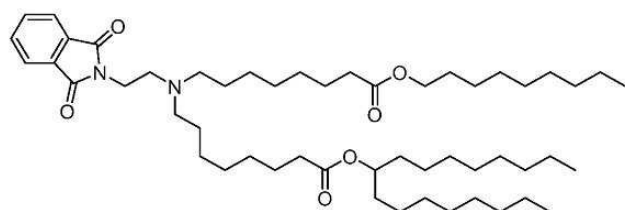
(화합물 97),



(화합물 98),



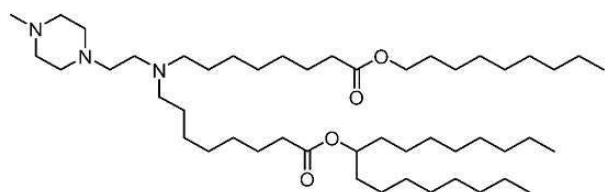
(화합물 99),



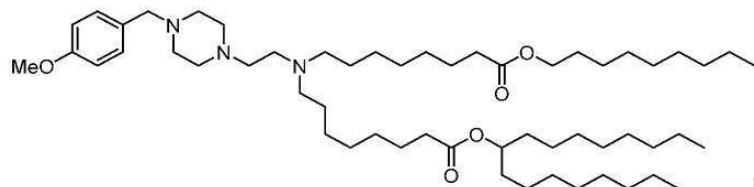
(화합물 100),

[1049]

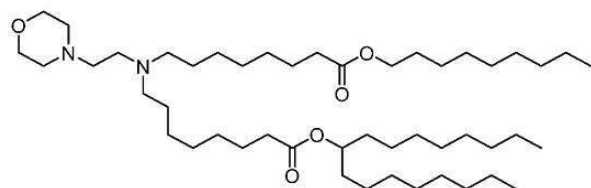




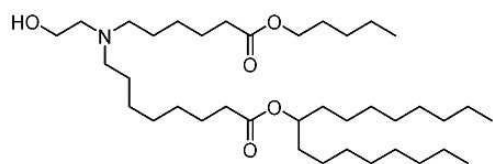
(화합물 101),



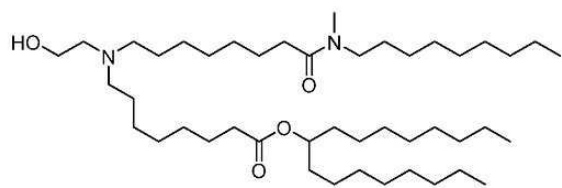
(화합물 102),



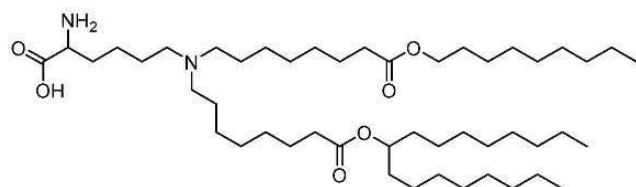
(화합물 103),



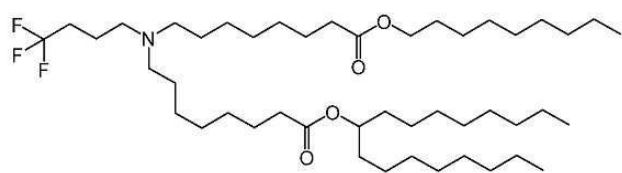
(화합물 104),



(화합물 105),

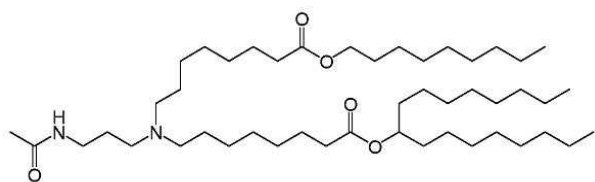


(화합물 106),

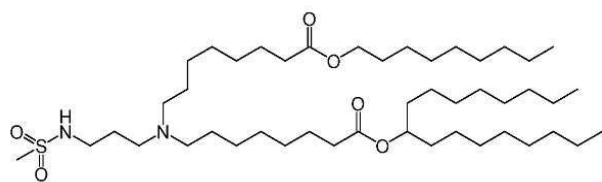


(화합물 107),

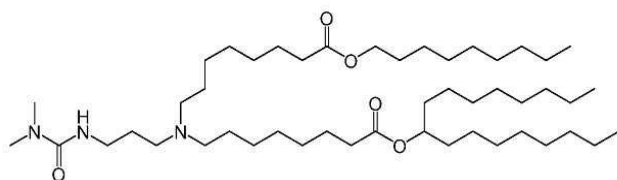
[1050]



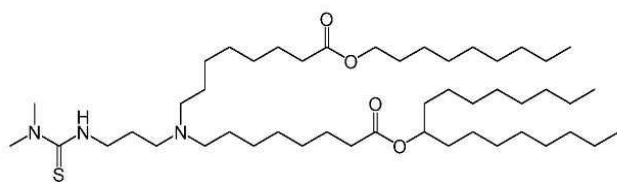
(화합물 108),



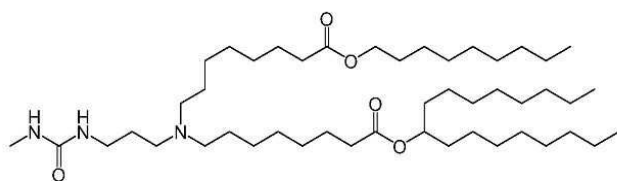
(화합물 109),



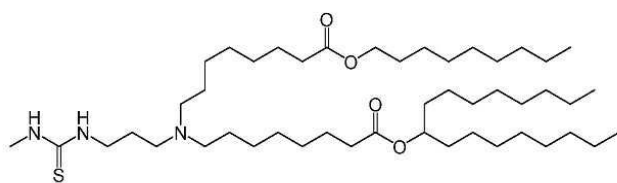
(화합물 110),



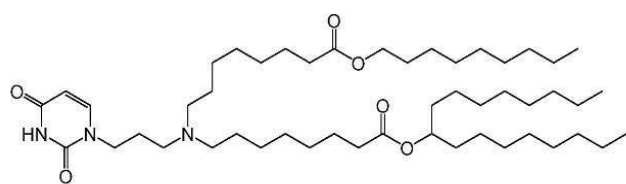
(화합물 111),



(화합물 112),

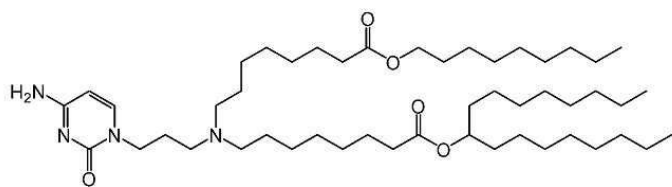


(화합물 113),

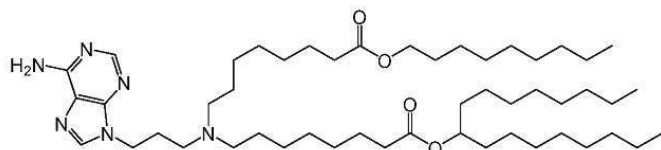


(화합물 114),

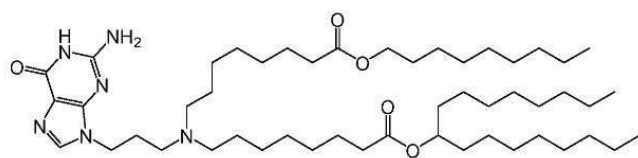
[1051]



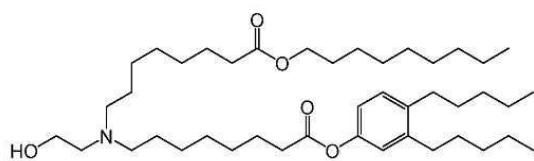
(화합물 115),



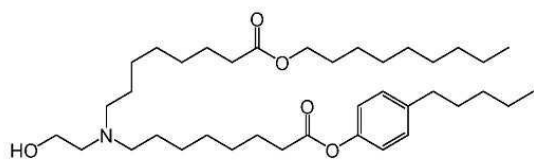
(화합물 116),



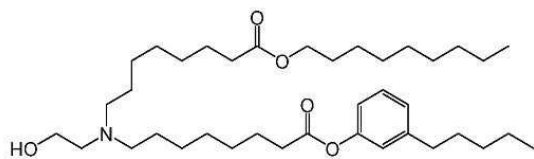
(화합물 117),



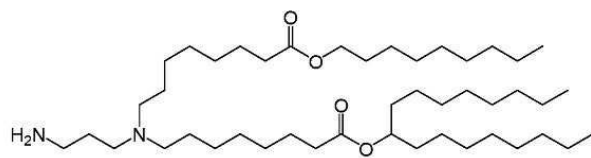
(화합물 118),



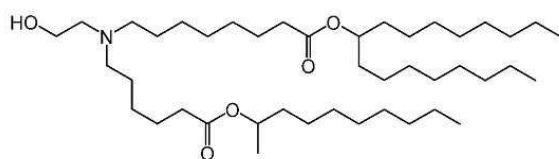
(화합물 119),



(화합물 120),

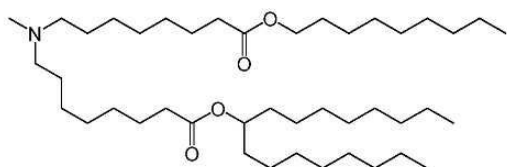


(화합물 121),

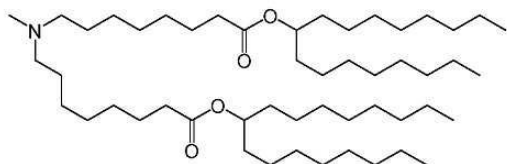


(화합물 122),

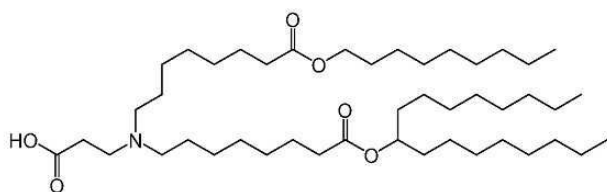
[1052]



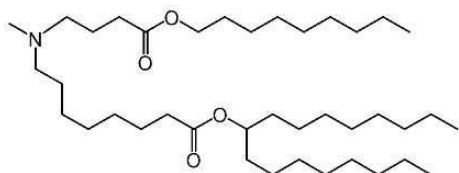
(화합물 123),



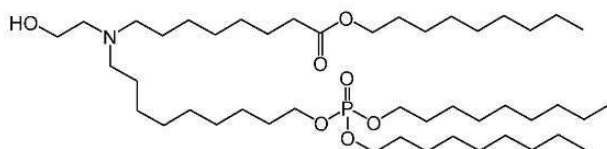
(화합물 124),



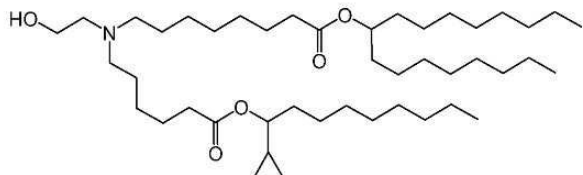
(화합물 125),



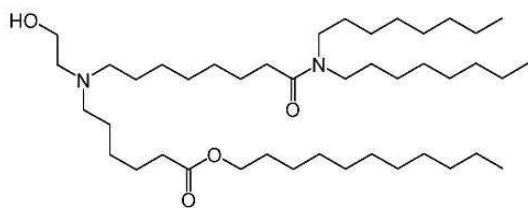
(화합물 126),



(화합물 127),

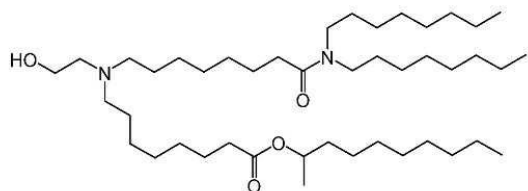


(화합물 128),

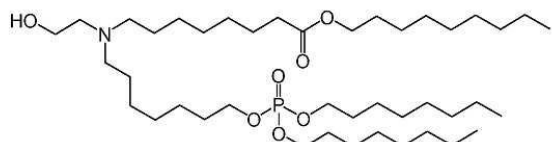


(화합물 129),

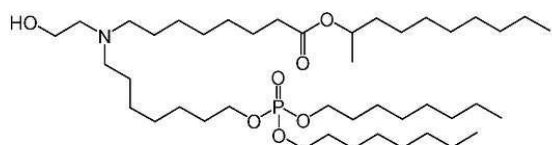
[1053]



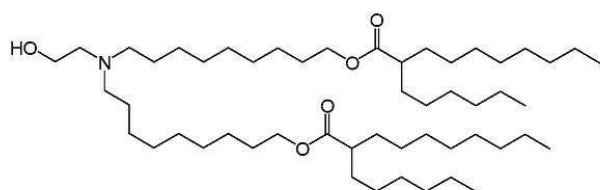
(화합물 130),



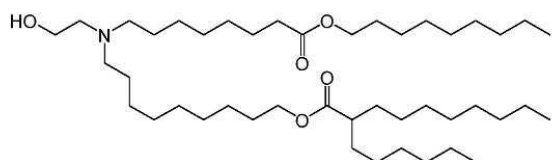
(화합물 131),



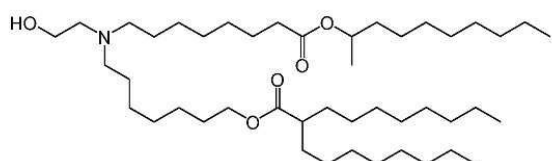
(화합물 132),



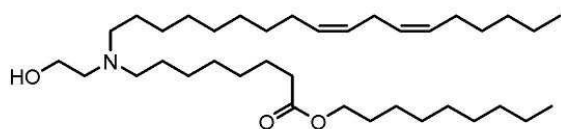
(화합물 133),



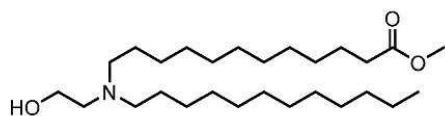
(화합물 134),



(화합물 135),



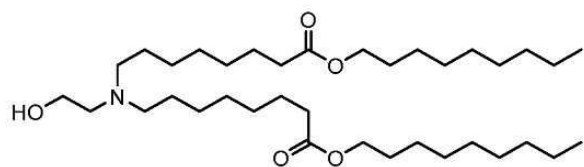
(화합물 136),



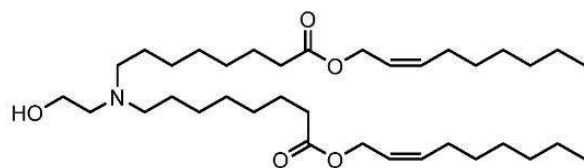
(화합물 137),

[1054]

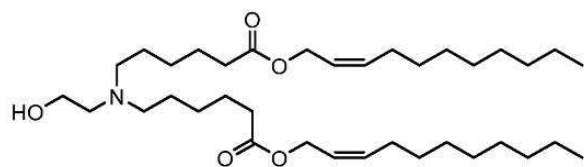




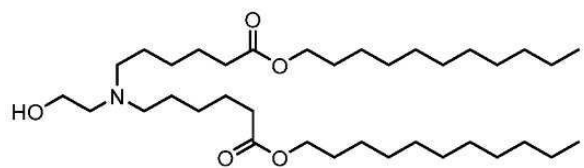
(화합물 138),



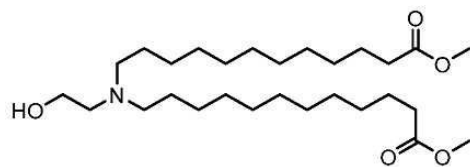
(화합물 139),



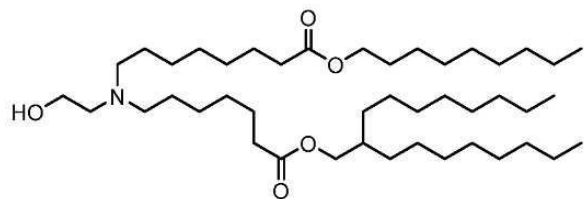
(화합물 140),



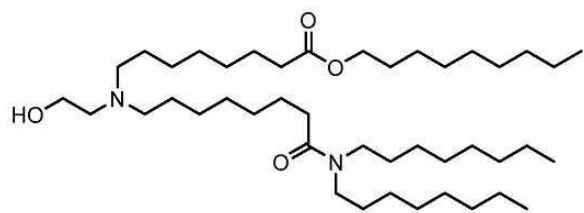
(화합물 141),



(화합물 142),

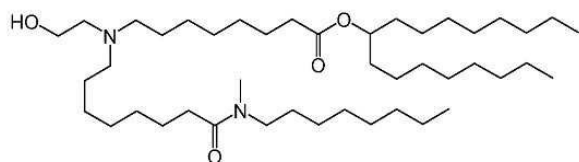


(화합물 143),

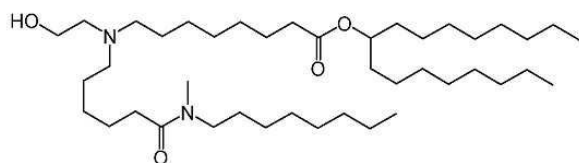


(화합물 144),

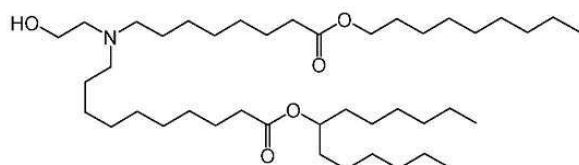
[1055]



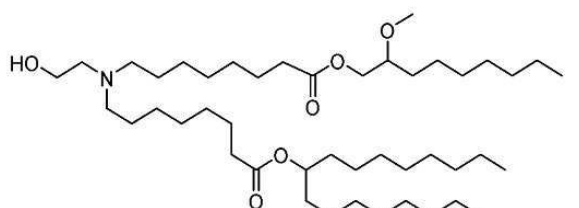
(화합물 145),



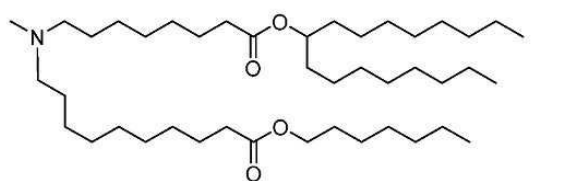
(화합물 146),



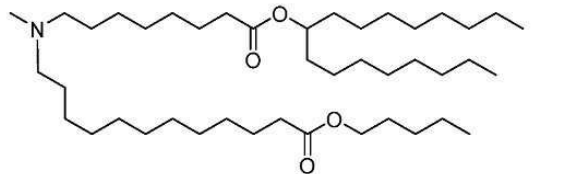
(화합물 147),



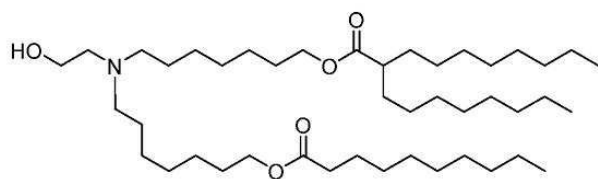
(화합물 148),



(화합물 149),

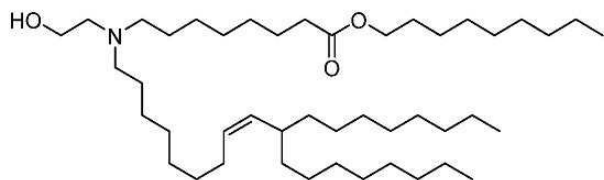


(화합물 150),

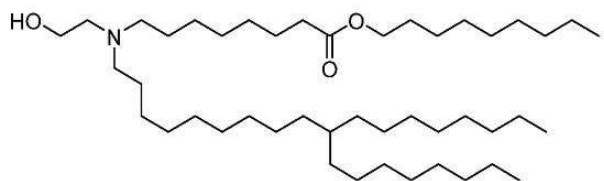


(화합물 151),

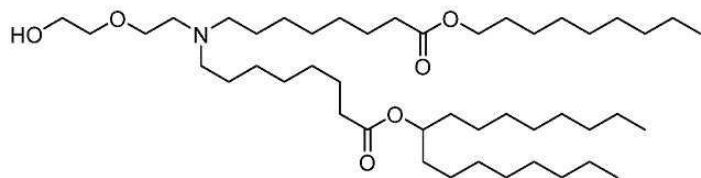
[1056]



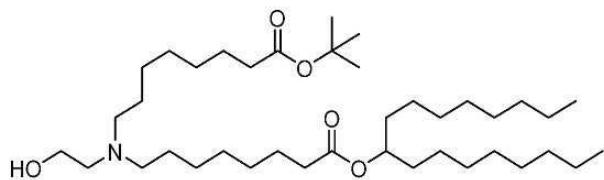
(화합물 152),



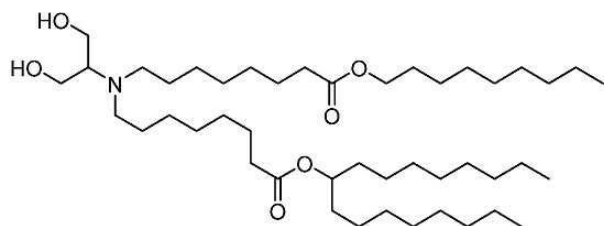
(화합물 153),



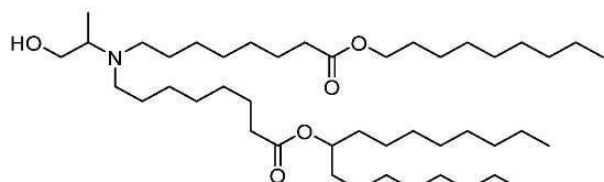
(화합물 154),



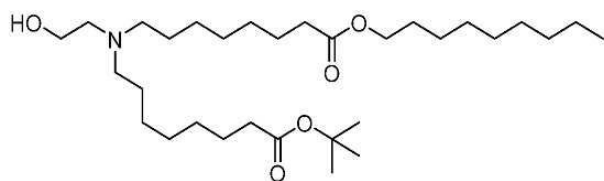
(화합물 155),



(화합물 156),

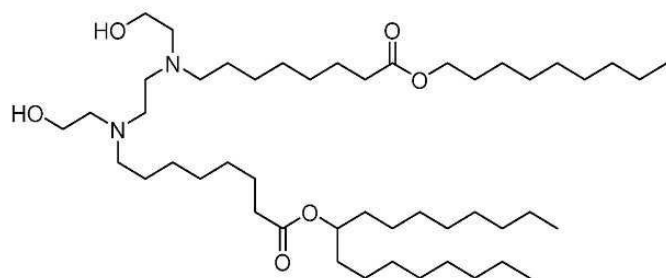


(화합물 157),

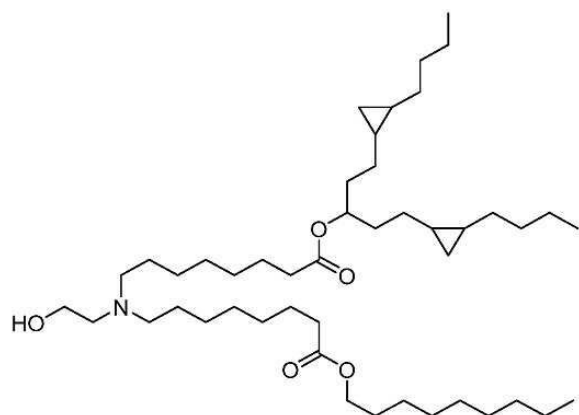


(화합물 158),

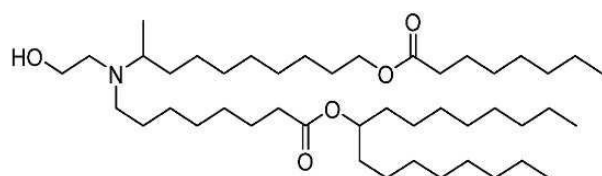
[1057]



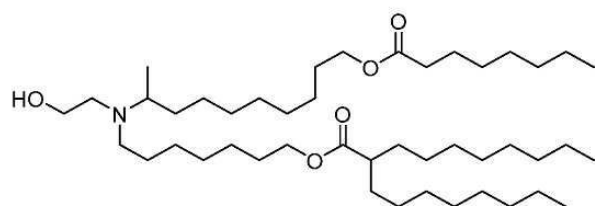
(화합물 159),



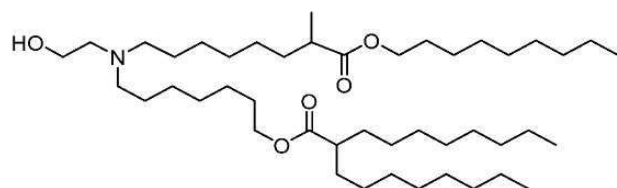
(화합물 160),



(화합물 161),

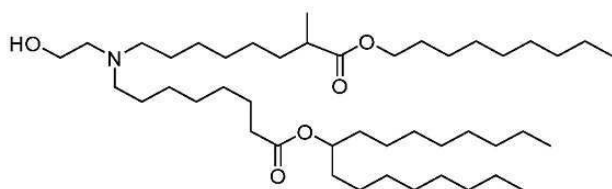


(화합물 162),

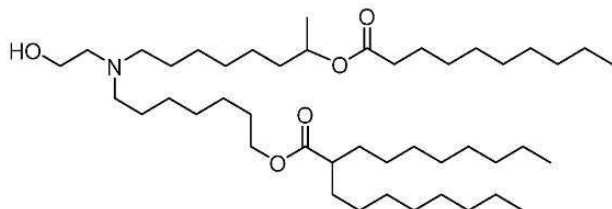


(화합물 163),

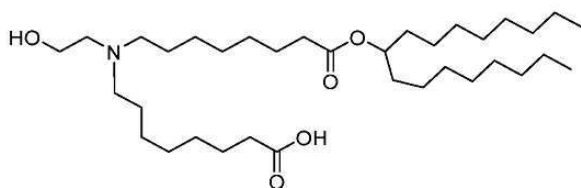
[1058]



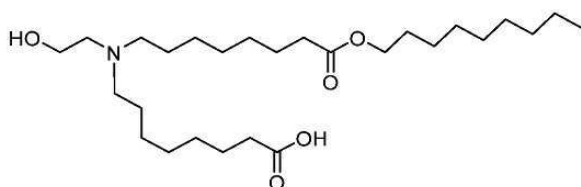
(화합물 164),



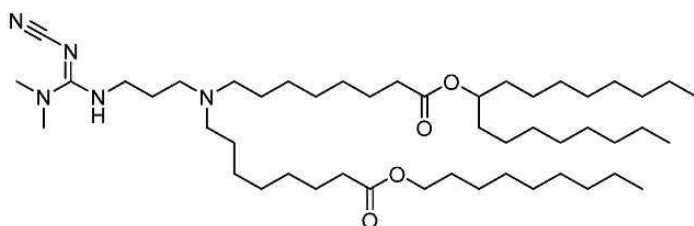
(화합물 165),



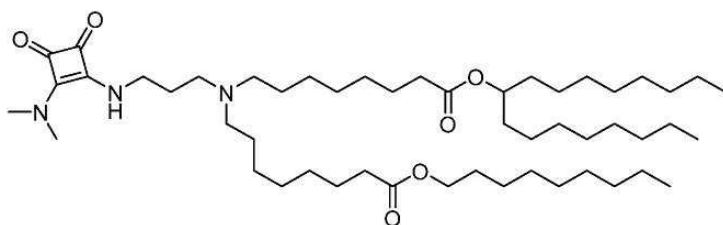
(화합물 166),



(화합물 167),



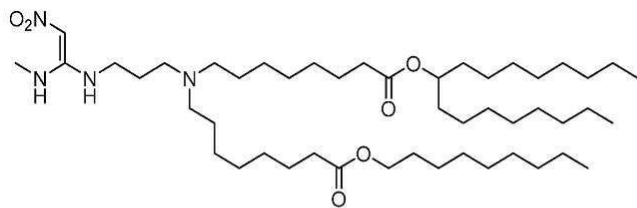
(화합물 168),



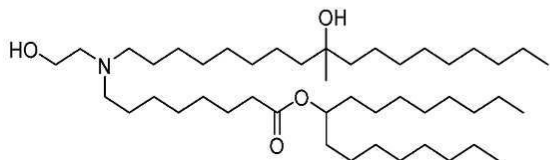
(화합물 169),

[1059]

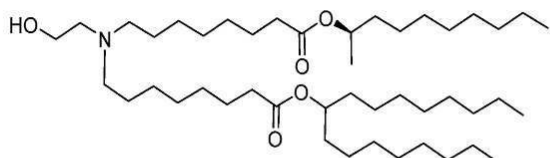




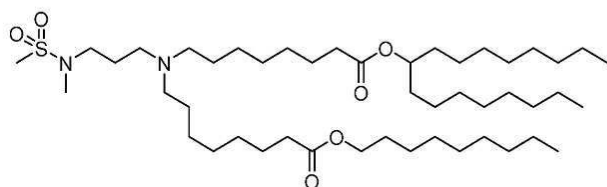
(화합물 170),



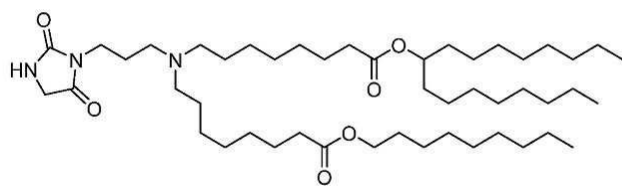
(화합물 171),



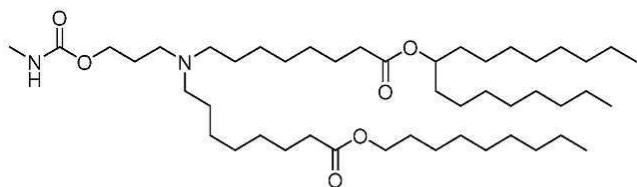
(화합물 172),



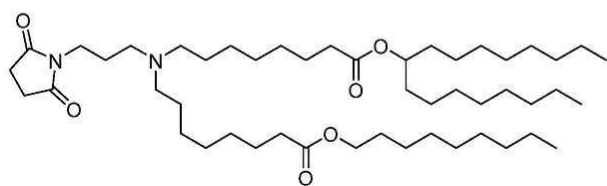
(화합물 173),



(화합물 174),

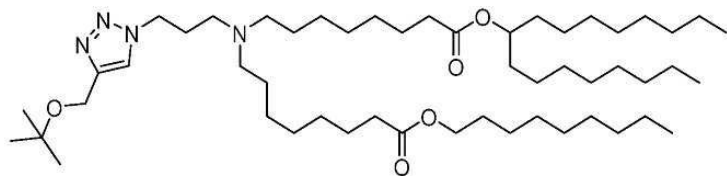


(화합물 175),

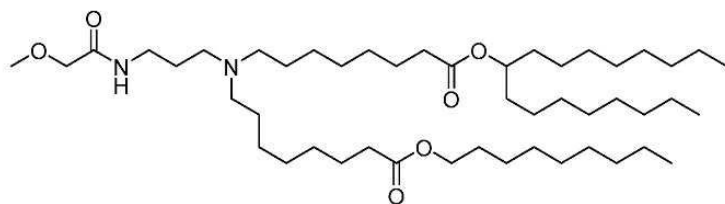


(화합물 176),

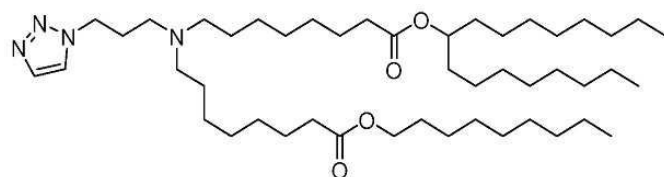
[1060]



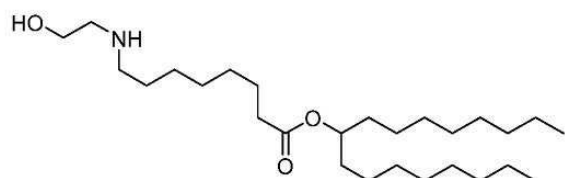
(화합물 177),



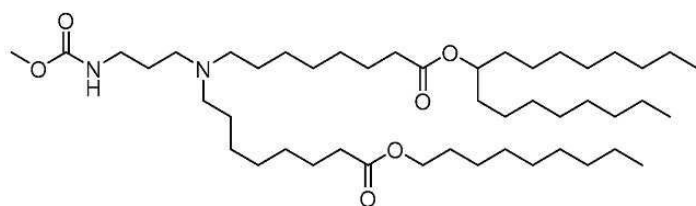
(화합물 178),



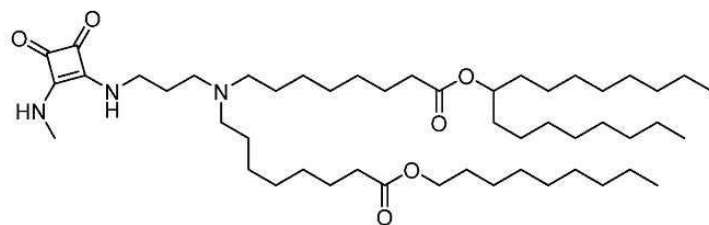
(화합물 179),



(화합물 180),

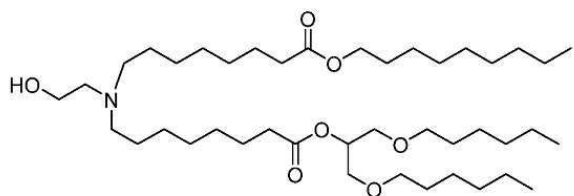


(화합물 181),

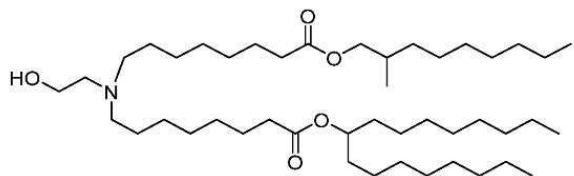


(화합물 182),

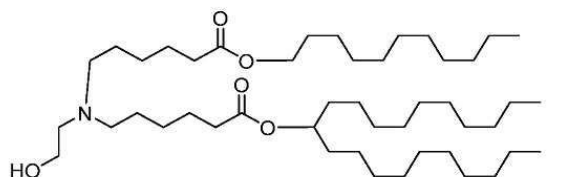
[1061]



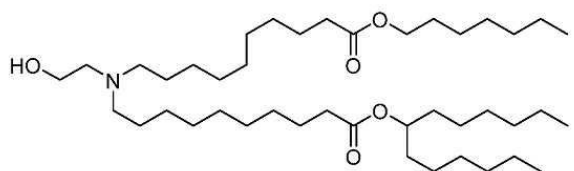
(화합물 183),



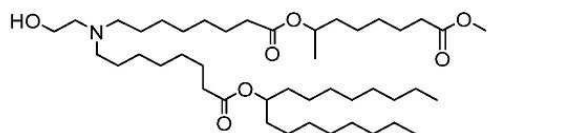
(화합물 184),



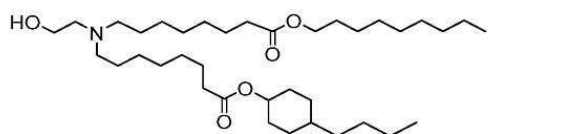
(화합물 185),



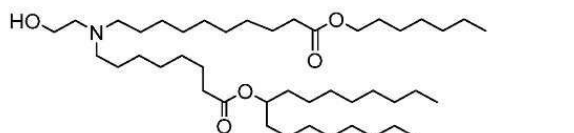
(화합물 186),



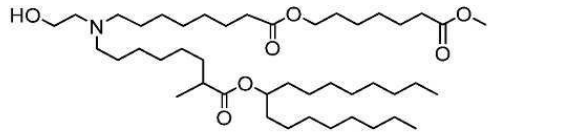
(화합물 187),



(화합물 188),

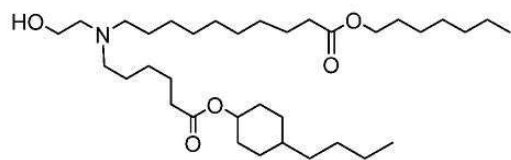


(화합물 189),

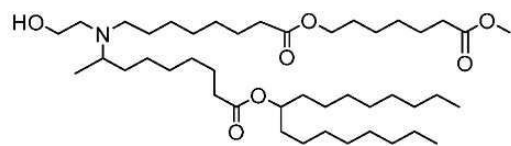


(화합물 190),

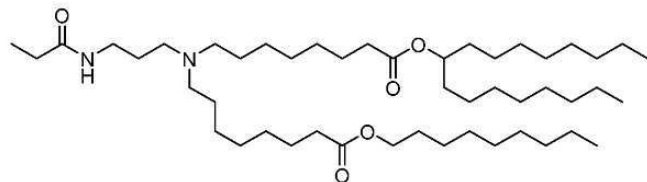
[1062]



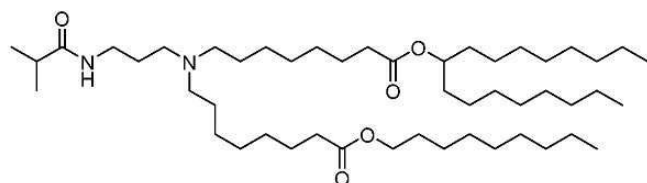
(화합물 191),



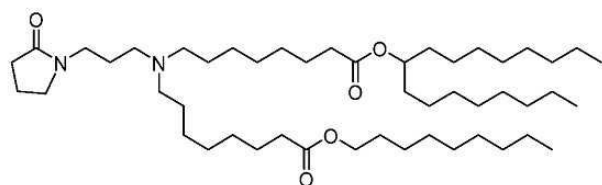
(화합물 192),



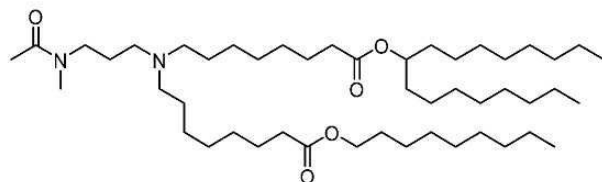
(화합물 193),



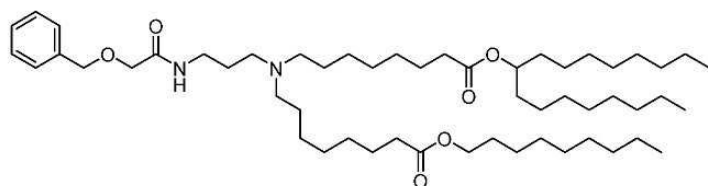
(화합물 194),



(화합물 195),

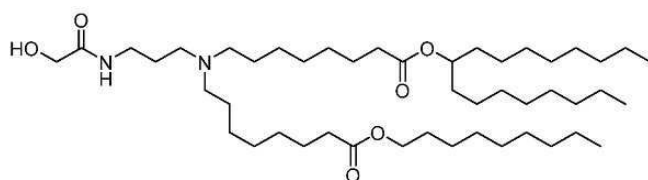


(화합물 196),

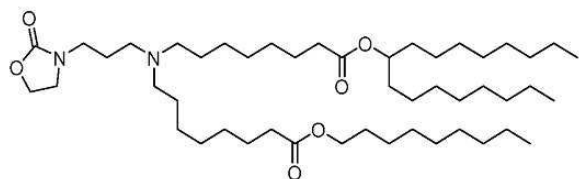


(화합물 197),

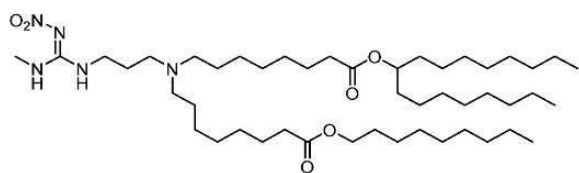
[1063]



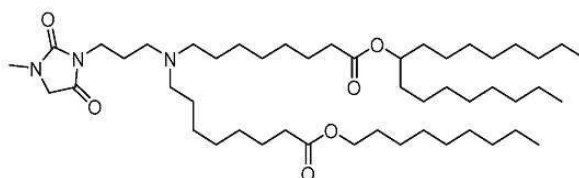
(화합물 198),



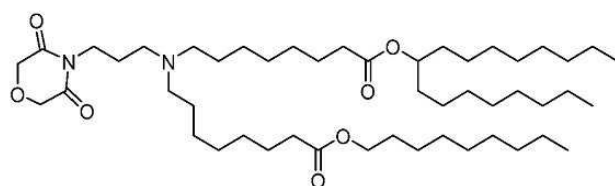
(화합물 199),



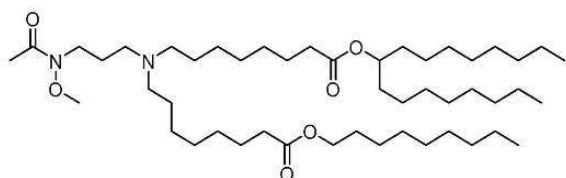
(화합물 200),



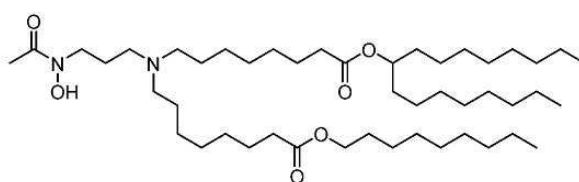
(화합물 201),



(화합물 202),



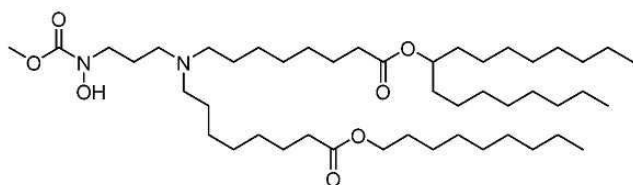
(화합물 203),



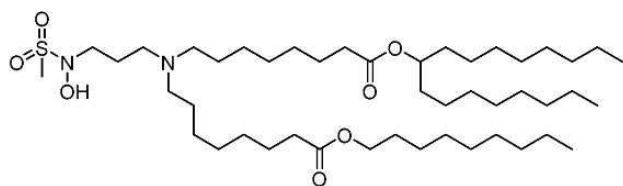
(화합물 204),

[1064]

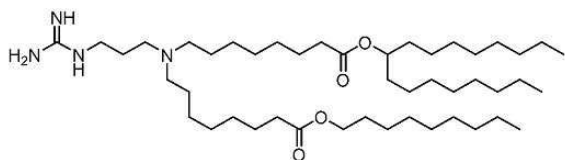




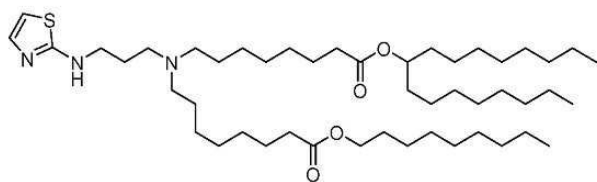
(화합물 205),



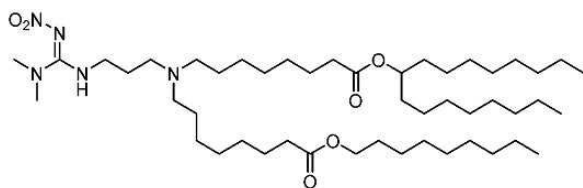
(화합물 206),



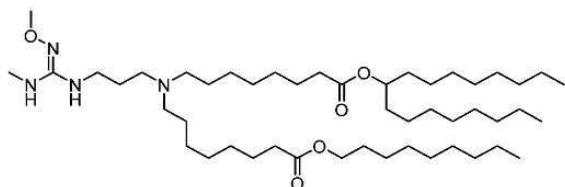
(화합물 207),



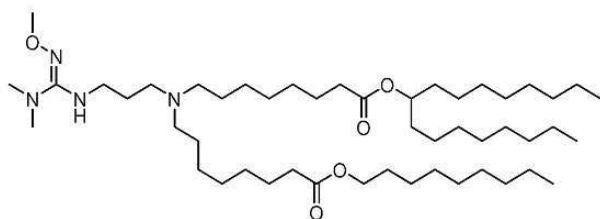
(화합물 208),



(화합물 209),

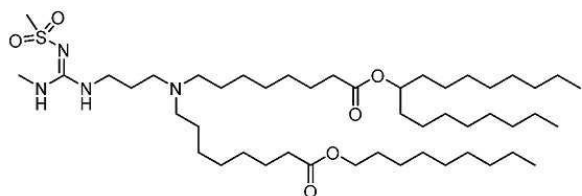


(화합물 210),

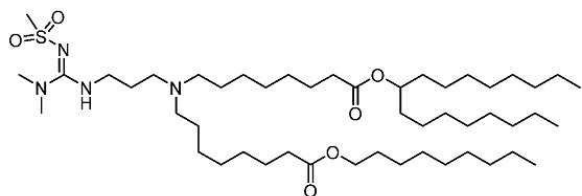


(화합물 211),

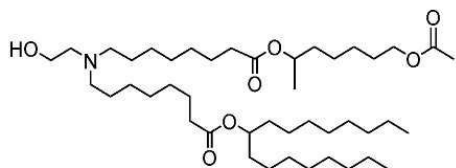
[1065]



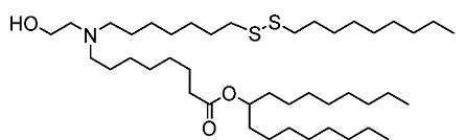
(화합물 212),



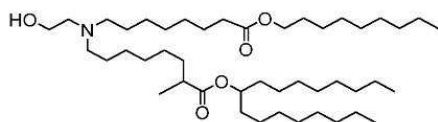
(화합물 213),



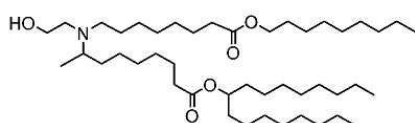
(화합물 214),



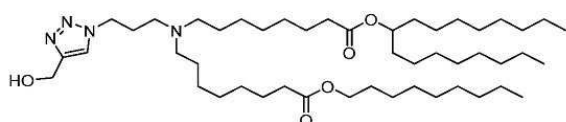
(화합물 215),



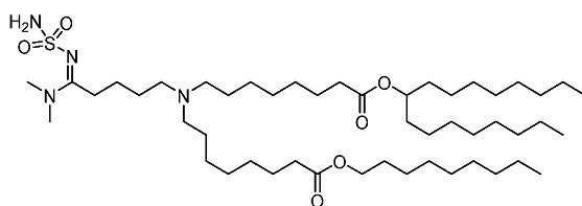
(화합물 216),



(화합물 217),

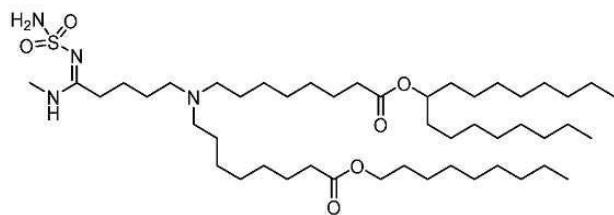


(화합물 218),

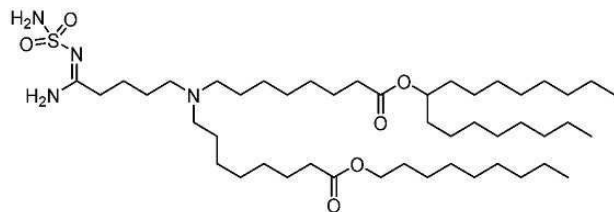


(화합물 219),

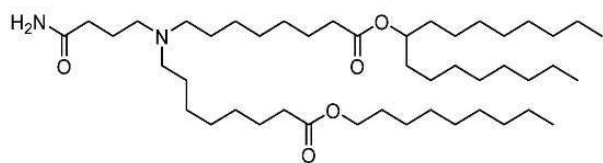
[1066]



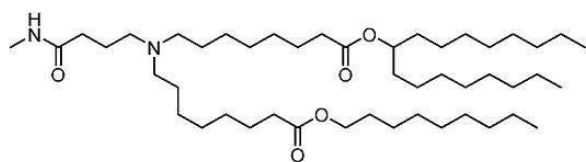
(화합물 220),



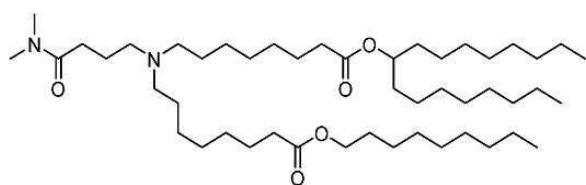
(화합물 221),



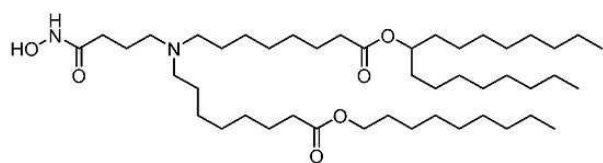
(화합물 222),



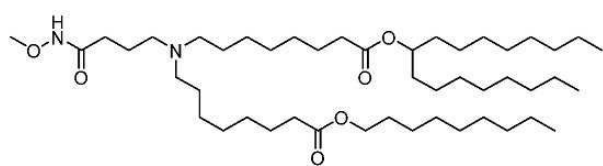
(화합물 223),



(화합물 224),

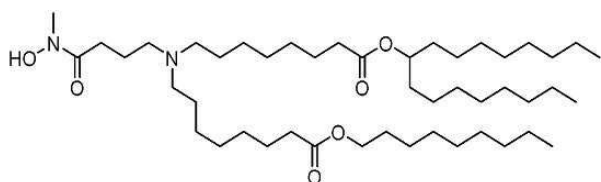


(화합물 225),

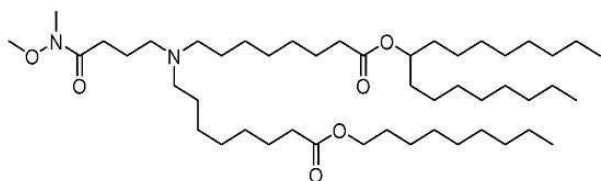


(화합물 226),

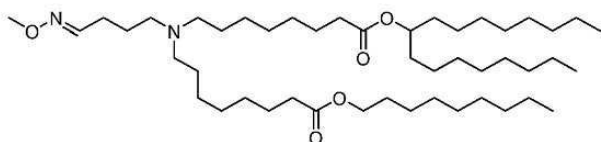
[1067]



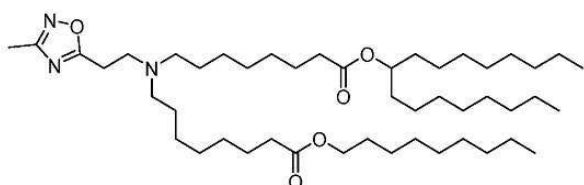
(화합물 227),



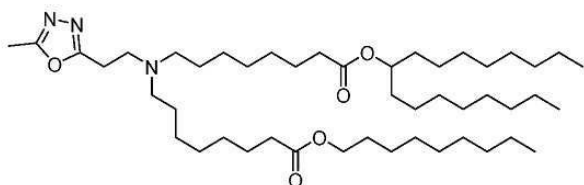
(화합물 228),



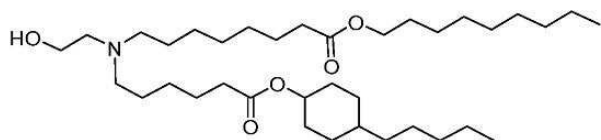
(화합물 229),



(화합물 230),



(화합물 231),

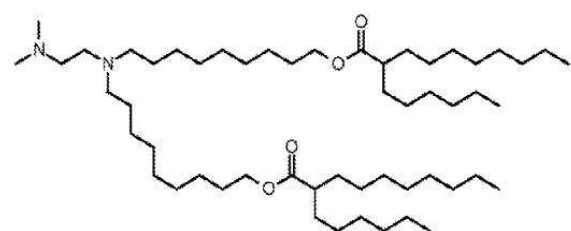


(화합물 232)

[1068]

[1069]

일부 실시형태에서, 나노입자는 다음의 화합물 또는 이의 염 또는 입체이성질체를 포함한다:



(화합물 343)

[1070]

[1071]

다른 실시형태에서, 화학식 (I)의 화합물은 화합물 1 내지 화합물 147, 또는 이의 염 또는 입체이성질체로 이루어진 군으로부터 선택된다.

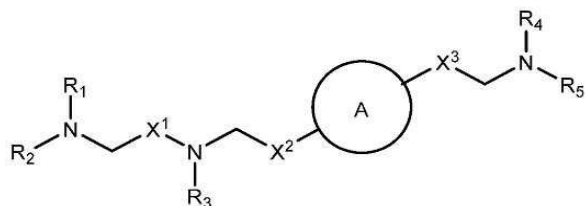
[1072]

일부 실시형태에서, 중심 피페라진 모이어티를 포함하는 이온화 가능한 지질이 제공된다. 본 명세서에 기재된 지질은 포유류 세포 또는 기관에 치료 및/또는 예방제의 전달을 위해 지질 나노입자 조성물에서 유리하게 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 명세서에 기재된 지질은 면역원성이 거의 없거나 또는 전혀 없다. 예를 들어, 본 명세서에 개시된 지질 화합물은 기준 지질(예를 들어, MC3, KC2 또는 DLinDMA)에 비해 더 낮은 면역원성을 가진다. 예를 들어, 본 명세서에 개시된 지질 및 치료제 또는 예방제를 포함하는 제형은 기준 지질(예를 들어, MC3, KC2 또는 DLinDMA) 및 동일한 치료제 또는 예방제를 포함하는 대응하는 제형에 비해 증가된 치료 지수를 가진다.

[1073]

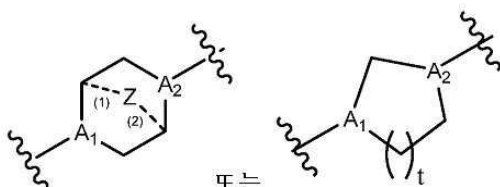
일부 실시형태에서, 전달제는 하기 화학식 (III)을 갖는 지질 화합물 또는 이의 염 또는 입체이성질체를 포함한

다;



(III)

식 중,



고리 A는 또는 이고;

t는 1 또는 2이며;

A<sub>1</sub> 및 A<sub>2</sub>는 CH 또는 N으로부터 각각 독립적으로 선택되고;

Z는 CH<sub>2</sub>이거나 또는 부재이되, Z가 CH<sub>2</sub>일 때, 파선 (1) 및 (2)는 각각 단일 결합을 나타내고; 그리고 Z가 없을 때, 파선 (1)과 (2)는 둘 다 부재이며;

R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> 및 R<sub>5</sub>는 C<sub>5-20</sub> 알킬, C<sub>5-20</sub> 알켄일, -R"MR', -R\*YR", -YR" 및 -R\*OR"로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;

각각의 M은 -C(O)O-, -OC(O)-, -OC(O)O-, -C(O)N(R')-, -N(R')C(O)-, -C(O)-, -C(S)-, -C(S)S-, -SC(S)-, -CH(OH)-, -P(O)(OR')O-, -S(O)<sub>2</sub>-, 아릴기 및 헤테로아릴기로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며;

X<sup>1</sup>, X<sup>2</sup> 및 X<sup>3</sup>은 결합, -CH<sub>2</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-, -CHR-, -CHY-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-C(O)-, -C(O)O-CH<sub>2</sub>-, -OC(O)-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-C(O)O-, -CH<sub>2</sub>-OC(O)-, -CH(OH)-, -C(S)- 및 -CH(SH)-로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;

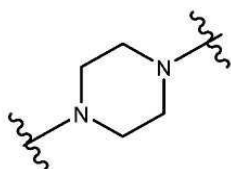
각각의 Y는 독립적으로 C<sub>3-6</sub> 카보사이클이며;

각각의 R\*은 C<sub>1-12</sub> 알킬 및 C<sub>2-12</sub> 알켄일로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;

각각의 R은 C<sub>1-3</sub> 알킬 및 C<sub>3-6</sub> 카보사이클로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며;

각각의 R'는 C<sub>1-12</sub> 알킬, C<sub>2-12</sub> 알켄일 및 H로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고; 그리고

각각의 R"는 C<sub>3-12</sub> 알킬 및 C<sub>3-12</sub> 알켄일로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며;



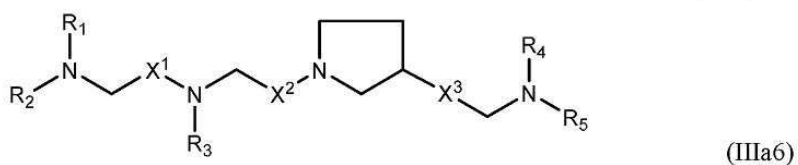
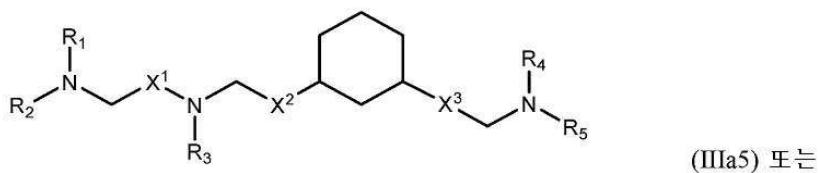
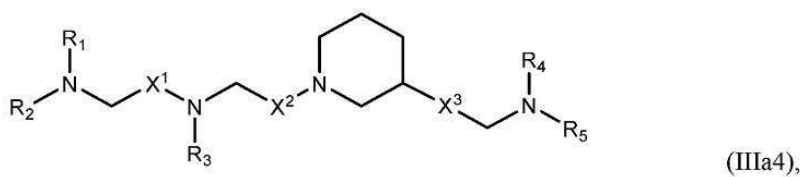
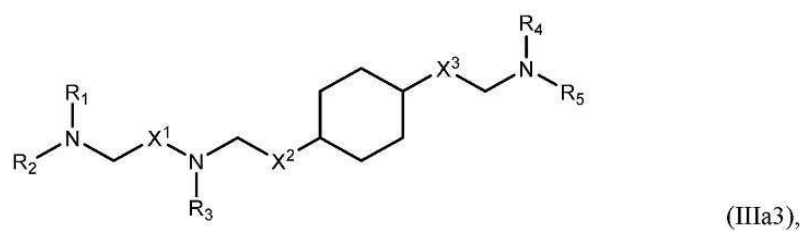
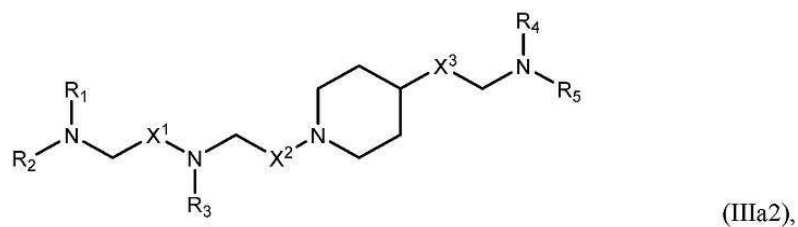
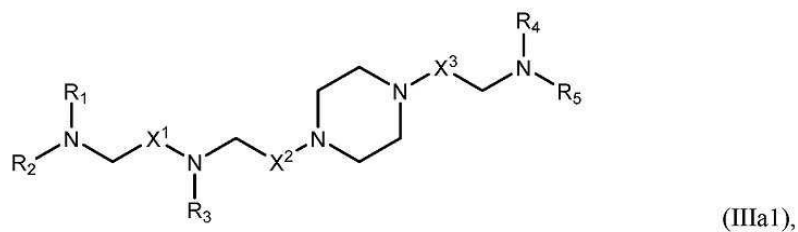
고리 A가 일 때,

i) X<sup>1</sup>, X<sup>2</sup> 및 X<sup>3</sup> 중 적어도 하나는 -CH<sub>2</sub>-가 아니고; 그리고/또는

ii) R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> 및 R<sub>5</sub> 중 적어도 하나는 -R"MR'이며.



[1091] 일부 실시형태에서, 화합물은 하기 화학식 (IIIa1) 내지 (IIIa6) 중 어떤 것을 갖는다:

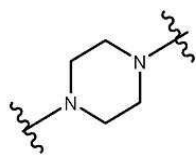


[1093]

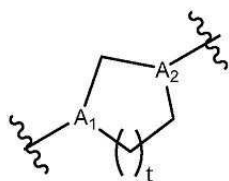
[1094] 화학식 (III)의 화합물 또는 (IIIa1) 내지 (IIIa6) 중 어떤 것은 적용 가능할 때 다음의 특징 중 하나 이상을 포함한다.

[1095] 일부 실시형태에서, 고리 A는 이다.

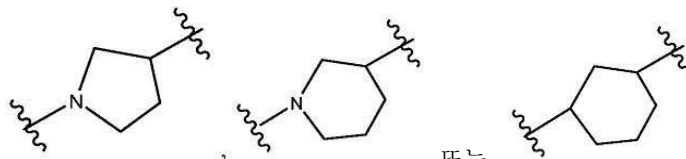
[1096] 일부 실시형태에서, 고리 A는 또는 이다.



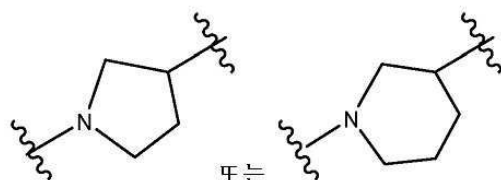
[1097] 일부 실시형태에서, 고리 A는 이다.



[1098] 일부 실시형태에서, 고리 A는 이다.



[1099] 일부 실시형태에서, 고리 A는 , 또는 이다.



[1100] 일부 실시형태에서, 고리 A는 또는 이되, 고리는 N 원자가  $X^2$ 에 연결된 다.

[1101] 일부 실시형태에서, Z는  $CH_2$ 이다.

[1102] 일부 실시형태에서, Z는 부재이다.

[1103] 일부 실시형태에서,  $A_1$  및  $A_2$  중 적어도 하나는 N이다.

[1104] 일부 실시형태에서,  $A_1$  및  $A_2$  각각은 N이다.

[1105] 일부 실시형태에서,  $A_1$  및  $A_2$  각각은 CH이다.

[1106] 일부 실시형태에서,  $A_1$ 은 N이고,  $A_2$ 는 CH이다.

[1107] 일부 실시형태에서,  $A_1$ 은 CH이고,  $A_2$ 는 N이다.

[1108] 일부 실시형태에서,  $X^1$ ,  $X^2$  및  $X^3$  중 적어도 하나는  $-CH_2-$ 가 아니다. 예를 들어, 소정의 실시형태에서,  $X^1$ 은  $-CH_2-$ 가 아니다. 일부 실시형태에서,  $X^1$ ,  $X^2$  및  $X^3$  중 적어도 하나는  $-C(O)-$ 이다.

[1109] 일부 실시형태에서,  $X^2$ 는  $-C(O)-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ ,  $-C(O)-CH_2-$ ,  $-CH_2-C(O)-$ ,  $-C(O)O-CH_2-$ ,  $-OC(O)-CH_2-$ ,  $-CH_2-C(O)O-$  또는  $-CH_2-OC(O)-$ 이다.

[1110] 일부 실시형태에서,  $X^3$ 은  $-C(O)-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ ,  $-C(O)-CH_2-$ ,  $-CH_2-C(O)-$ ,  $-C(O)O-CH_2-$ ,  $-OC(O)-CH_2-$ ,  $-CH_2-C(O)O-$  또는  $-CH_2-OC(O)-$ 이다. 다른 실시형태에서,  $X^3$ 은  $-CH_2-$ 이다.

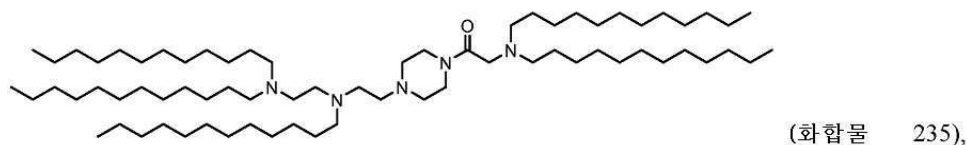
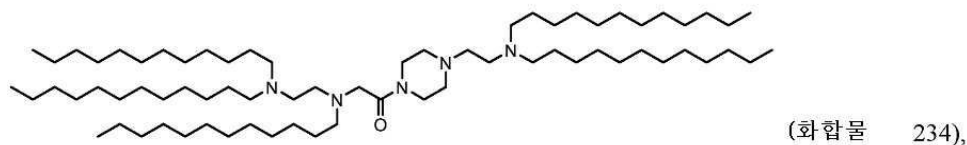
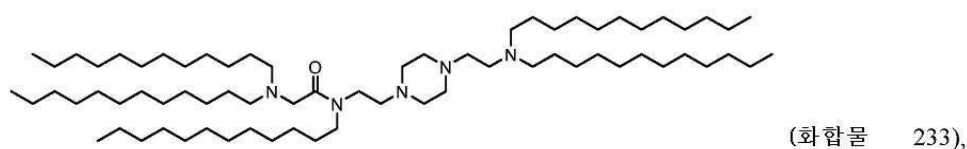
[1111] 일부 실시형태에서,  $X^3$ 은 결합 또는  $-(CH_2)_2-$ 이다.

[1112] 일부 실시형태에서,  $R_1$ 과  $R_2$ 는 동일하다. 소정의 실시형태에서,  $R_1$ ,  $R_2$  및  $R_3$ 은 동일하다. 일부 실시형태에서,  $R_4$ 와  $R_5$ 는 동일하다. 소정의 실시형태에서,  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$ 와  $R_5$ 는 동일하다.

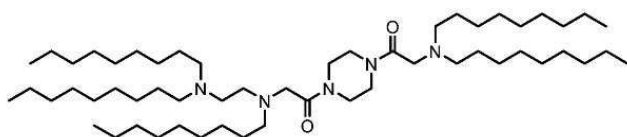
[1113] 일부 실시형태에서,  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$  및  $R_5$  중 적어도 하나는  $-R''MR'$ 이다. 일부 실시형태에서,  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$  및  $R_5$  중 최대 하나는  $-R''MR'$ 이다. 예를 들어,  $R_1$ ,  $R_2$  및  $R_3$  중 적어도 하나는  $-R''MR'$ 일 수 있고/있거나,  $R_4$  및  $R_5$  중 적어도 하나는  $-R''MR'$ 이다. 소정의 실시형태에서, 적어도 하나의 M은  $-C(O)O-$ 이다. 일부 실시형태에서, 각각의 M은  $-C(O)O-$ 이다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 M은  $-OC(O)-$ 이다. 일부 실시형태에서, 각각의 M은  $-OC(O)-$ 이다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 M은  $-OC(O)O-$ 이다. 일부 실시형태에서, 각각의 M은  $-OC(O)O-$ 이다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의  $R''$ 는  $C_3$  알킬이다. 소정의 실시형태에서, 각각의  $R''$ 는  $C_3$  알킬이다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의  $R''$ 는  $C_5$  알킬이다. 소정의 실시형태에서, 각각의  $R''$ 는  $C_5$  알킬이다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의  $R''$ 는  $C_6$  알킬이다. 소정의 실시형태에서, 각각의  $R''$ 는  $C_6$  알킬이다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의  $R''$ 는  $C_7$  알킬이다. 소정의 실시형태에서, 각각의  $R''$ 는  $C_7$  알킬이다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의  $R'$ 는  $C_5$  알킬이다. 소정의 실시형태에서, 각각의  $R'$ 는  $C_5$  알킬이다. 다른 실시형태에서, 적어도 하나의  $R'$ 는  $C_1$  알킬이다. 소정의 실시형태에서, 각각의  $R'$ 는  $C_1$  알킬이다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의  $R'$ 는  $C_2$  알킬이다. 소정의 실시형태에서, 각각의  $R'$ 는  $C_2$  알킬이다.

[1114] 일부 실시형태에서,  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$  및  $R_5$  중 적어도 하나는  $C_{12}$  알킬이다. 소정의 실시형태에서,  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$  및  $R_5$ 의 각각은  $C_{12}$  알킬이다.

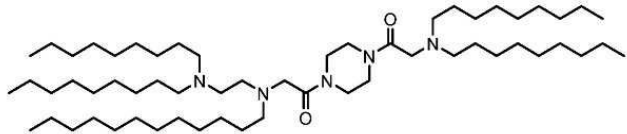
[1115] 소정의 실시형태에서, 상기 화합물은 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다:



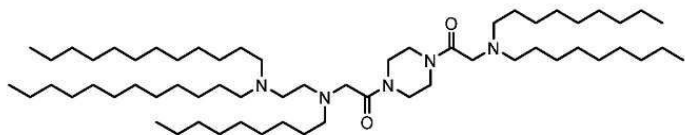
[1116]



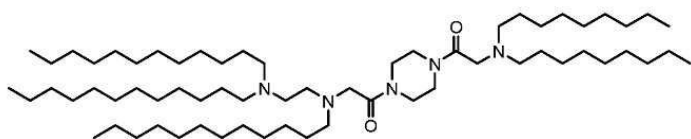
(화합물 236),



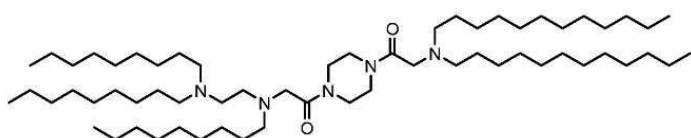
(화합물 237),



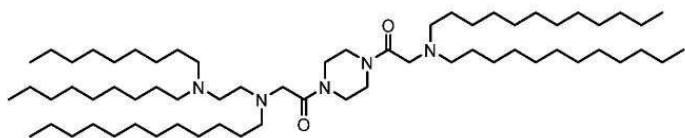
(화합물 238),



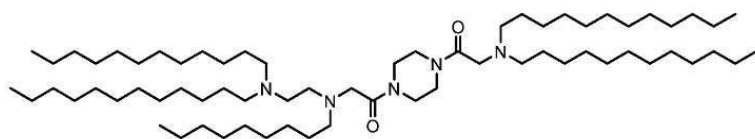
(화합물 239),



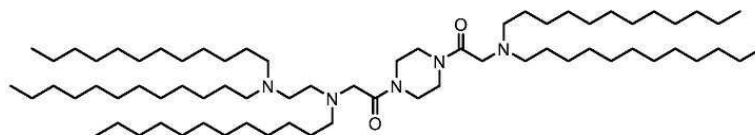
(화합물 240),



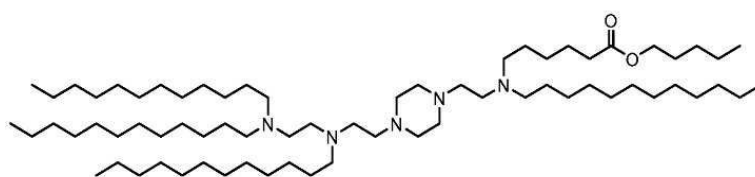
(화합물 241),



(화합물 242),

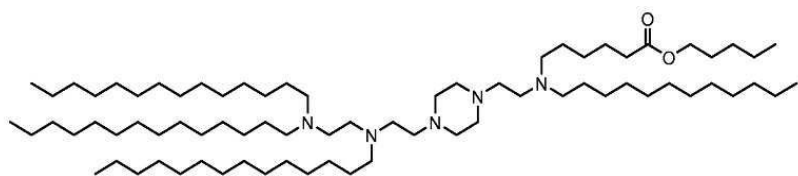


(화합물 243),

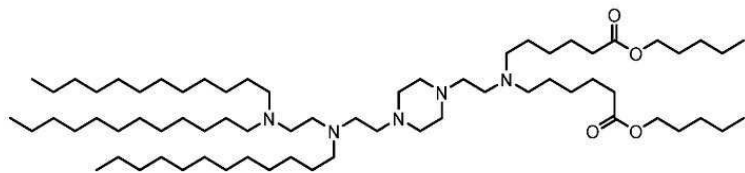


(화합물 244),

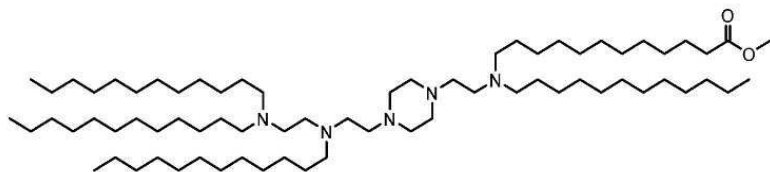
[1117]



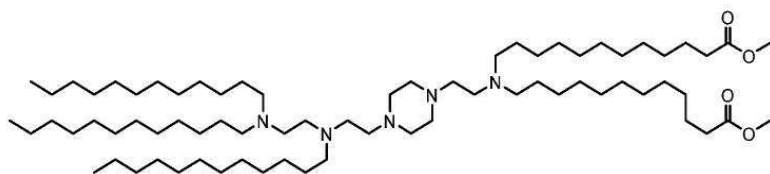
(화합물 245),



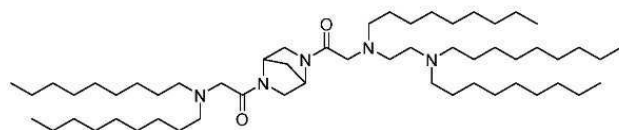
(화합물 246),



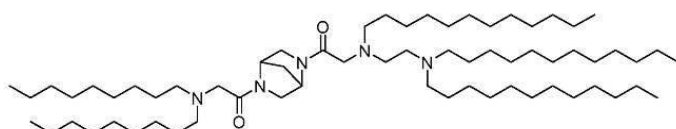
(화합물 247),



(화합물 248),



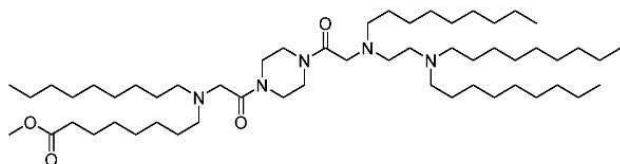
(화합물 274),



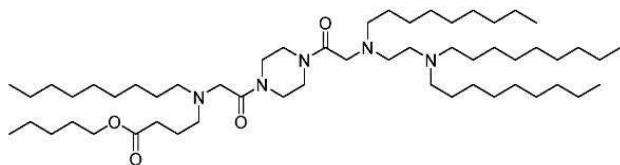
(화합물 275),

[1118]

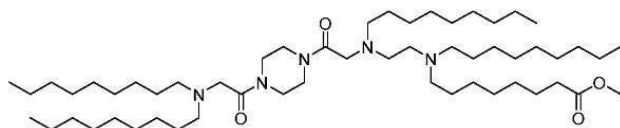




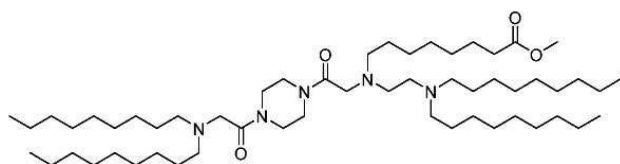
(화합물 276),



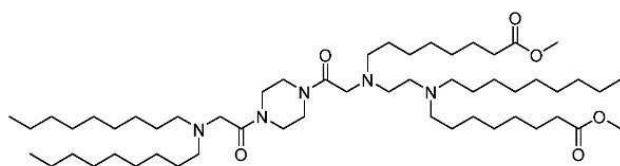
(화합물 277),



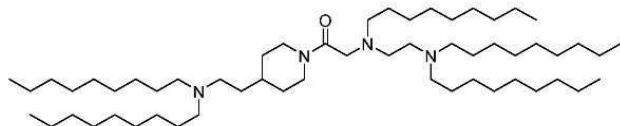
(화합물 278),



(화합물 279),

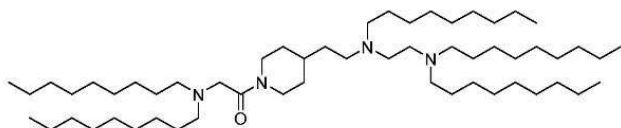


(화합물 280),

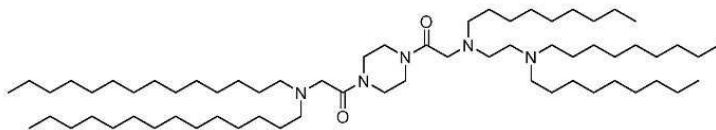


(화합물 281),

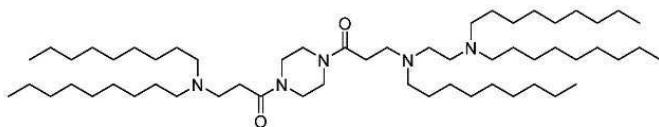
[1119]



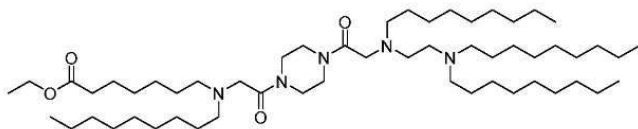
(화합물 282),



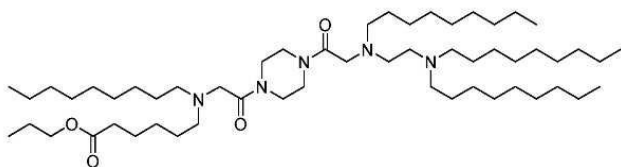
(화합물 283),



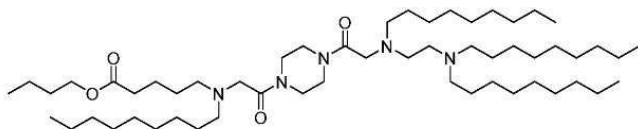
(화합물 284),



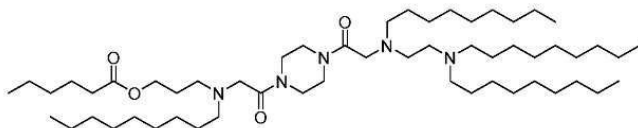
(화합물 285),



(화합물 286),

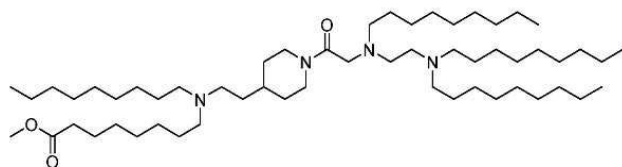


(화합물 287),

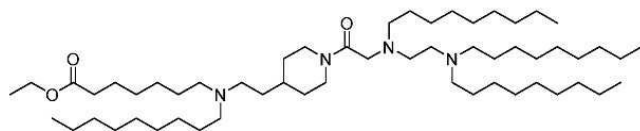


(화합물 288),

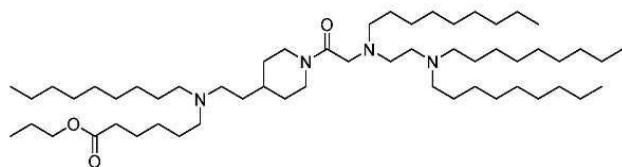
[1120]



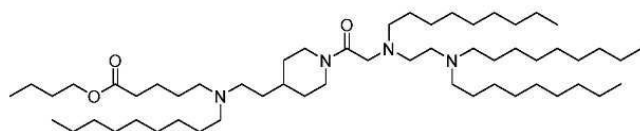
(화합물 289),



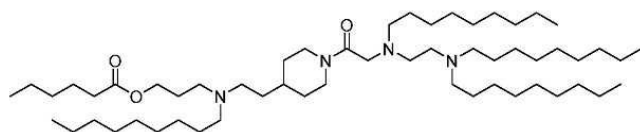
(화합물 290),



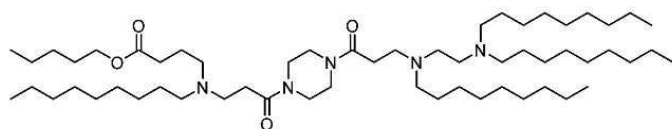
(화합물 291),



(화합물 292),

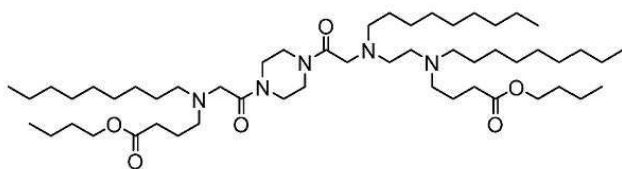


(화합물 293),

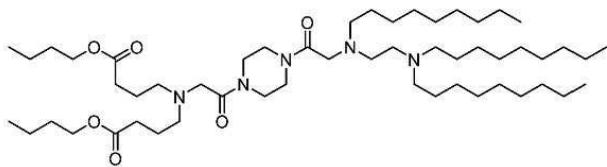


(화합물 294),

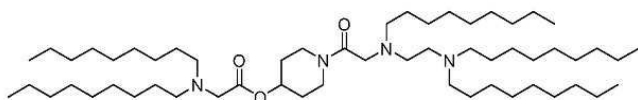
[1121]



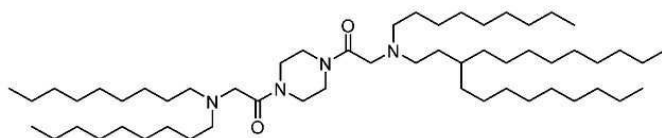
(화합물 295),



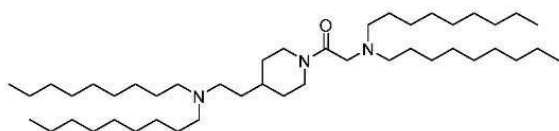
(화합물 296),



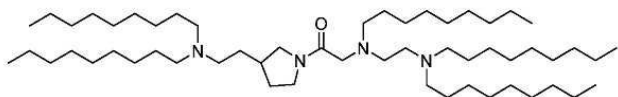
(화합물 297),



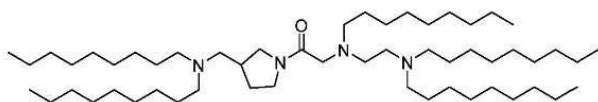
(화합물 298),



(화합물 300),

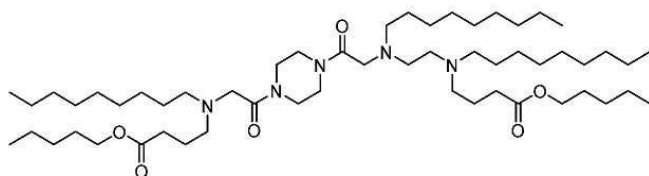


(화합물 301),

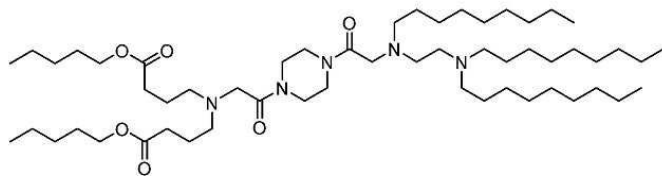


(화합물 302),

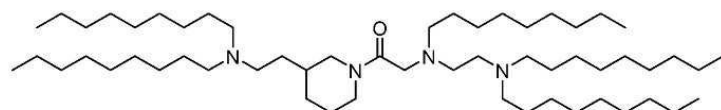
[1122]



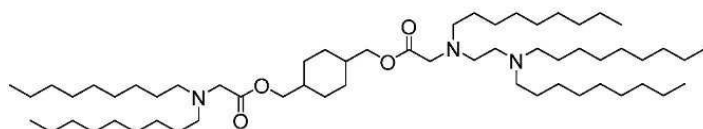
(화합물 303),



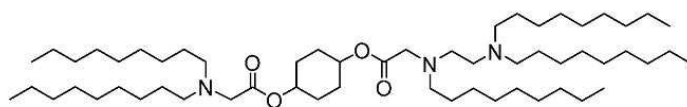
(화합물 304),



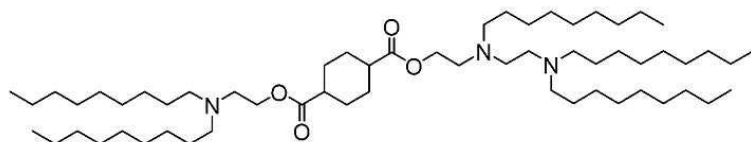
(화합물 305),



(화합물 306),



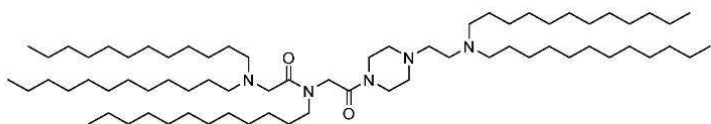
(화합물 307),



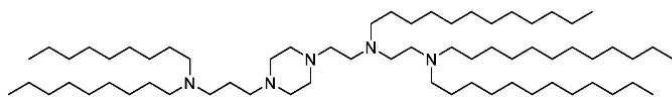
(화합물 308),

[1123]

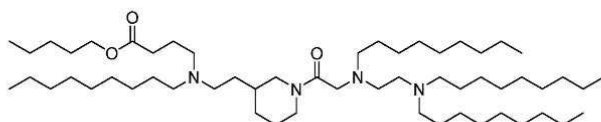




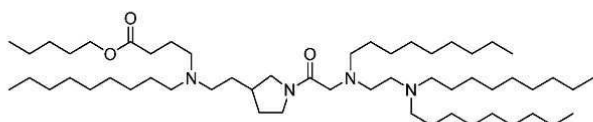
(화합물 310),



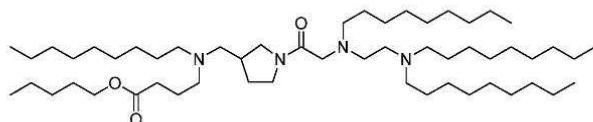
(화합물 311),



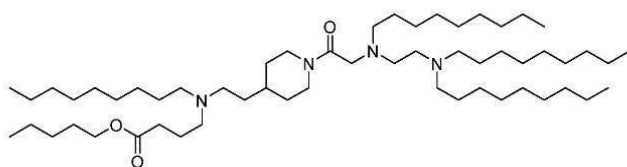
(화합물 312),



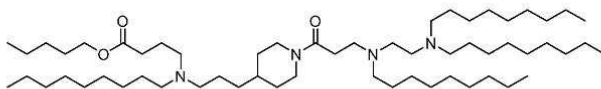
(화합물 313),



(화합물 314),

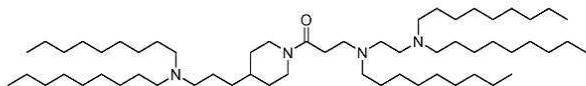


(화합물 315),

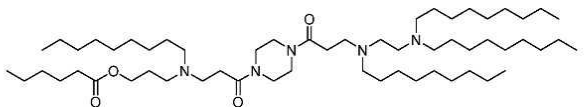


(화합물 316),

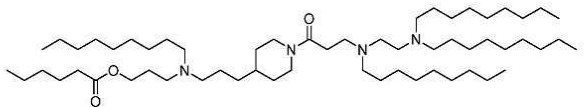
[1124]



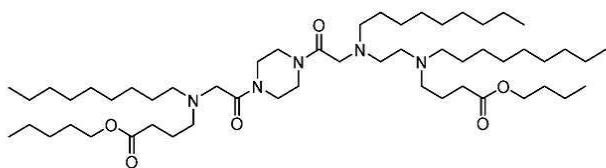
(화합물 317),



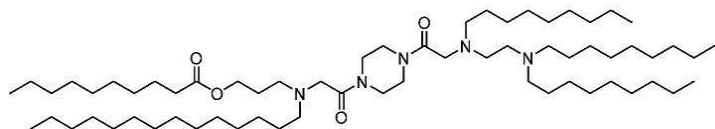
(화합물 318),



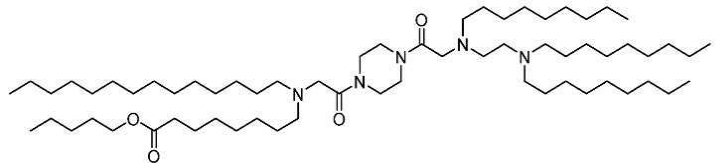
(화합물 319),



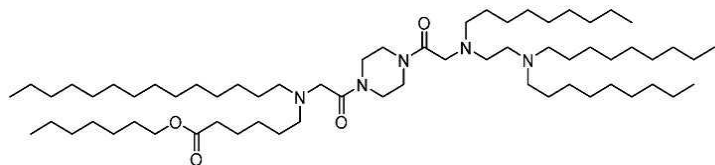
(화합물 320),



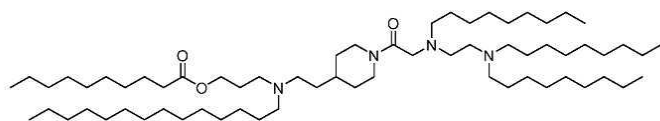
(화합물 321),



(화합물 322),

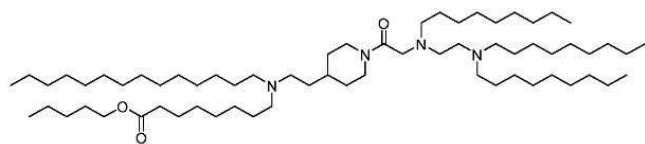


(화합물 323),

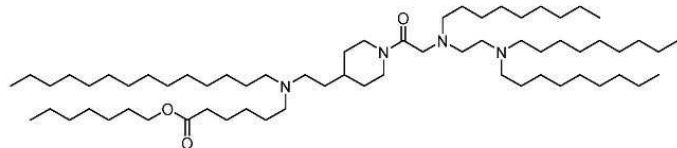


(화합물 324),

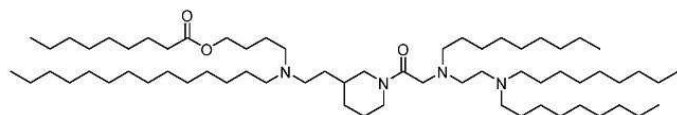
[1125]



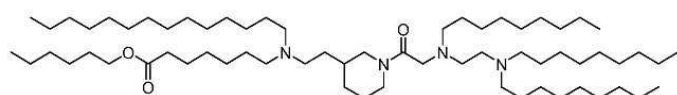
(화합물 325),



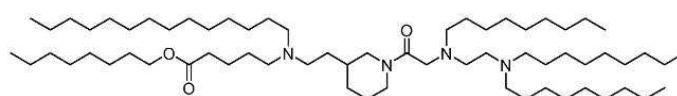
(화합물 326),



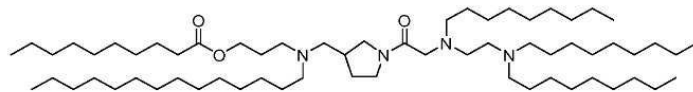
(화합물 327),



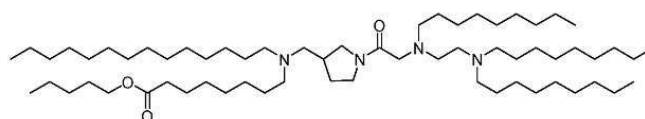
(화합물 328),



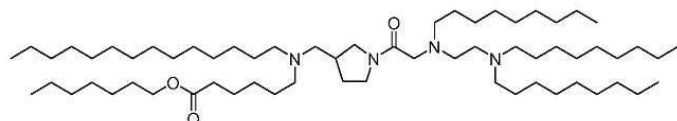
(화합물 329),



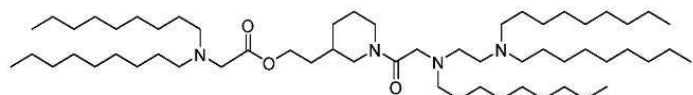
(화합물 330),



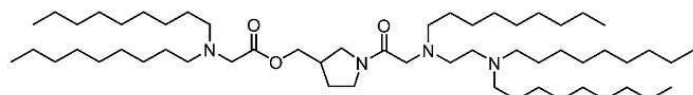
(화합물 331),



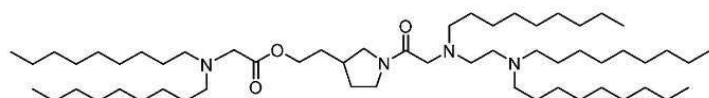
(화합물 332),



(화합물 333),

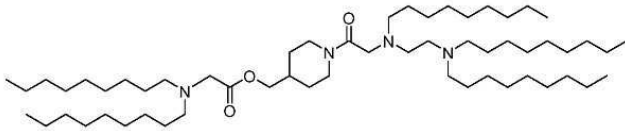


(화합물 334),

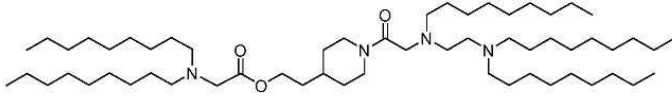


(화합물 335),

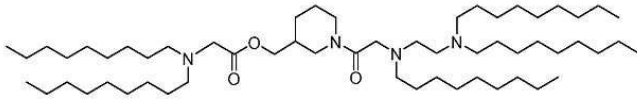
[1126]



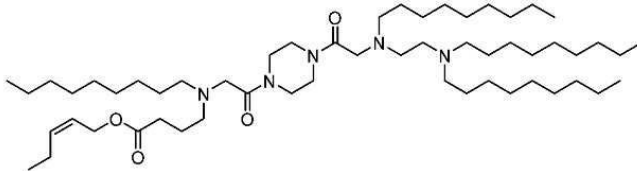
(화합물 336),



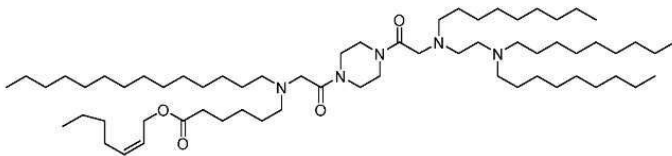
(화합물 337),



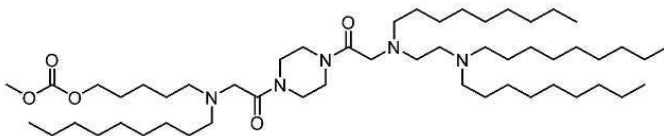
(화합물 338),



(화합물 339),



(화합물 340) 및



(화합물 341).

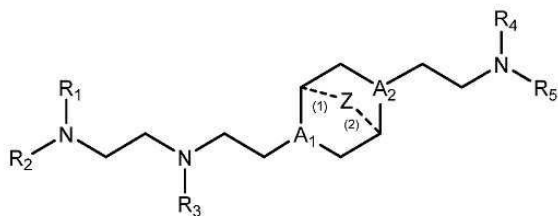
[1127]

[1128]

일부 실시형태에서, 전달제는 화합물 236을 포함한다.

[1129]

일부 실시형태에서, 전달제는 화학식 (IV)을 갖는 화합물 또는 이의 염 또는 입체이성질체를 포함한다:



(IV)

[1130]

[1131]

식 중,

[1132]

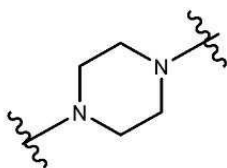
$A_1$  및  $A_2$ 는 CH 또는 N으로부터 각각 독립적으로 선택되고,  $A_1$  및  $A_2$  중 적어도 하나는 N이며;

[1133]

Z는  $CH_2$  또는 부재이되, Z가  $CH_2$ 일 때, 파선 (1) 및 (2)는 각각 단일 결합을 나타내고; 그리고 Z가 없을 때, 파선 (1)과 (2)는 둘 다 부재이고;

[1134]

$R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$  및  $R_5$ 는  $C_{6-20}$  알킬 및  $C_{6-20}$  알켄일로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며;



[1135]

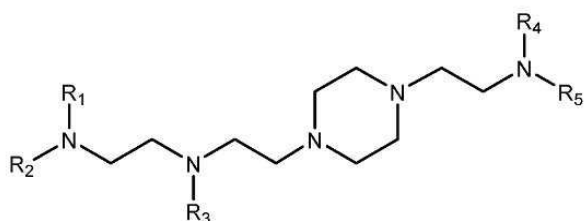
고리 A가 일 때,

[1136]

i)  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$ 와  $R_5$ 는 동일하되,  $R_1$ 은  $C_{12}$  알킬,  $C_{18}$  알킬 또는  $C_{18}$  알켄일이 아니고;

- [1137] ii)  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$  및  $R_5$  중 하나만이  $C_{6-20}$  알켄일로부터 선택되며;
- [1138] iii)  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$  및  $R_5$  중 적어도 하나는  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$  및  $R_5$  중 적어도 하나의 다른 것과 상이한 수의 탄소 원자를 갖고;
- [1139] iv)  $R_1$ ,  $R_2$  및  $R_3$ 은  $C_{6-20}$  알켄일로부터 선택되고, 그리고  $R_4$  및  $R_5$ 는  $C_{6-20}$  알킬로부터 선택되거나; 또는
- [1140] v)  $R_1$ ,  $R_2$  및  $R_3$ 은  $C_{6-20}$  알킬로부터 선택되고, 그리고  $R_4$  및  $R_5$ 는  $C_{6-20}$  알켄일로부터 선택된다.

[1141] 일부 실시형태에서, 화합물은 하기 화학식 (IVa)를 갖는다:



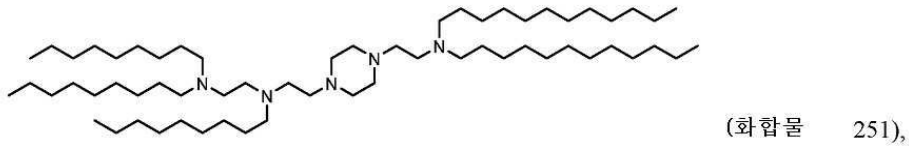
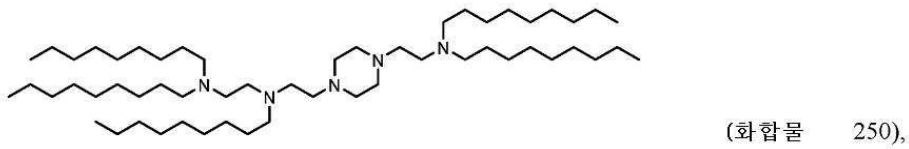
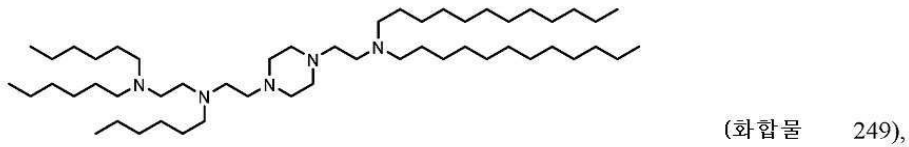
(IVa)

- [1142]
- [1143] 화학식 (IV) 또는 (IVa)의 화합물은 적용 가능할 때 다음의 특징 중 하나 이상을 포함한다.
- [1144] 일부 실시형태에서, Z는  $CH_2$ 이다.
- [1145] 일부 실시형태에서, Z는 부재이다.
- [1146] 일부 실시형태에서,  $A_1$  및  $A_2$  중 적어도 하나는 N이다.
- [1147] 일부 실시형태에서,  $A_1$  및  $A_2$ 의 각각은 N이다.
- [1148] 일부 실시형태에서,  $A_1$  및  $A_2$ 의 각각은 CH이다.
- [1149] 일부 실시형태에서,  $A_1$ 은 N이고,  $A_2$ 는 CH이다.
- [1150] 일부 실시형태에서,  $A_1$ 은 CH이고,  $A_2$ 는 N이다.
- [1151] 일부 실시형태에서,  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$ 와  $R_5$ 는 동일하고,  $C_{12}$  알킬,  $C_{18}$  알킬, 또는  $C_{18}$  알켄일이 아니다. 일부 실시형태에서,  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$ 와  $R_5$ 는 동일하고,  $C_9$  알킬 또는  $C_{14}$  알킬이다.
- [1152] 일부 실시형태에서,  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$  및  $R_5$  중 하나만이  $C_{6-20}$  알켄일로부터 선택된다. 소정의 이러한 실시형태에서,  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$  및  $R_5$ 는 동일한 수의 탄소 원자를 가진다. 일부 실시형태에서,  $R_4$ 는  $C_{5-20}$  알켄일로부터 선택된다. 예를 들어,  $R_4$ 는  $C_{12}$  알켄일 또는  $C_{18}$  알켄일일 수 있다.
- [1153] 일부 실시형태에서,  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$  및  $R_5$  중 적어도 하나는  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$  및  $R_5$  중 적어도 하나의 다른 것과 상이한 수의 탄소 원자를 가진다.
- [1154] 소정의 실시형태에서,  $R_1$ ,  $R_2$  및  $R_3$ 은  $C_{6-20}$  알켄일로부터 선택되고, 그리고  $R_4$  및  $R_5$ 는  $C_{6-20}$  알킬로부터 선택된다. 다른 실시형태에서,  $R_1$ ,  $R_2$  및  $R_3$ 은  $C_{6-20}$  알킬로부터 선택되고, 그리고  $R_4$  및  $R_5$ 는  $C_{6-20}$  알켄일로부터 선택된다. 일부 실시형태에서,  $R_1$ ,  $R_2$  및  $R_3$ 은 동일한 수의 탄소 원자를 갖고/갖거나  $R_4$  및  $R_5$ 는 동일한 수의 탄소 원자를 가진다. 예를 들어,  $R_1$ ,  $R_2$  및  $R_3$ , 또는  $R_4$  및  $R_5$ 는 6, 8, 9, 12, 14 또는 18개의 탄소 원자를 가질 수 있다. 일부 실시형태에서,  $R_1$ ,  $R_2$  및  $R_3$ , 또는  $R_4$  및  $R_5$ 는  $C_{18}$  알켄일(예를 들어, 리놀레일)이다. 일부 실시형태에서,  $R_1$ ,  $R_2$  및  $R_3$ , 또는  $R_4$  및  $R_5$ 는 6, 8, 9, 12 또는 14개의 탄소 원자를 포함하는 알킬기이다.
- [1155] 일부 실시형태에서,  $R_1$ 은  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$  및  $R_5$ 와 상이한 수의 탄소 원자를 가진다. 다른 실시형태에서,  $R_3$ 은  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_4$  및  $R_5$ 와 상이한 수의 탄소 원자를 가진다. 추가 실시형태에서,  $R_4$ 는  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  및  $R_5$ 와 상이한 수의 탄소 원

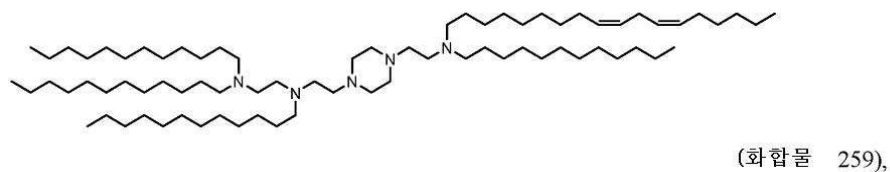
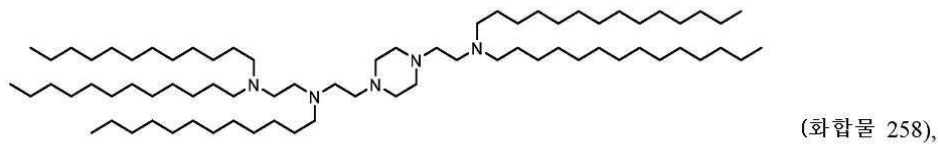
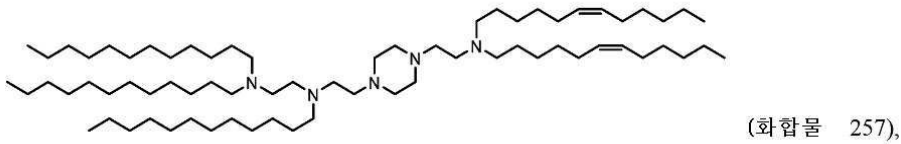
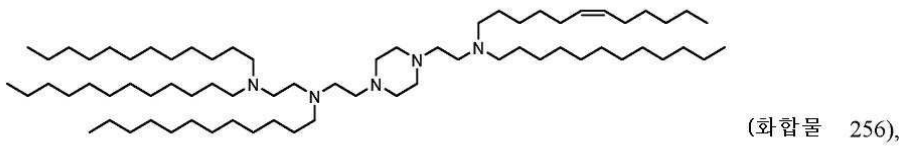
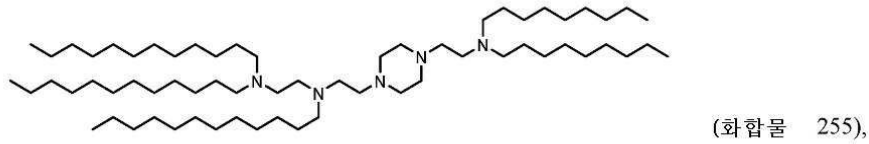
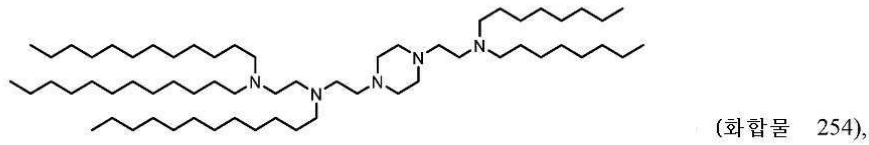
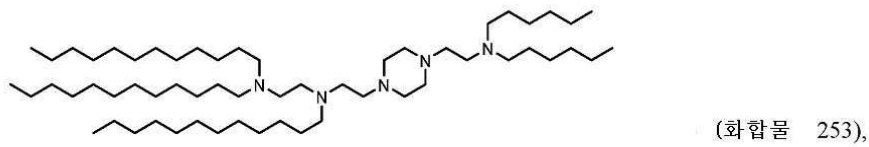
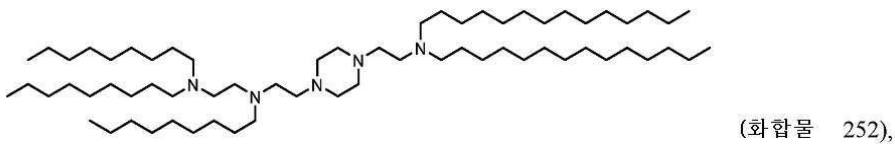


자를 가진다.

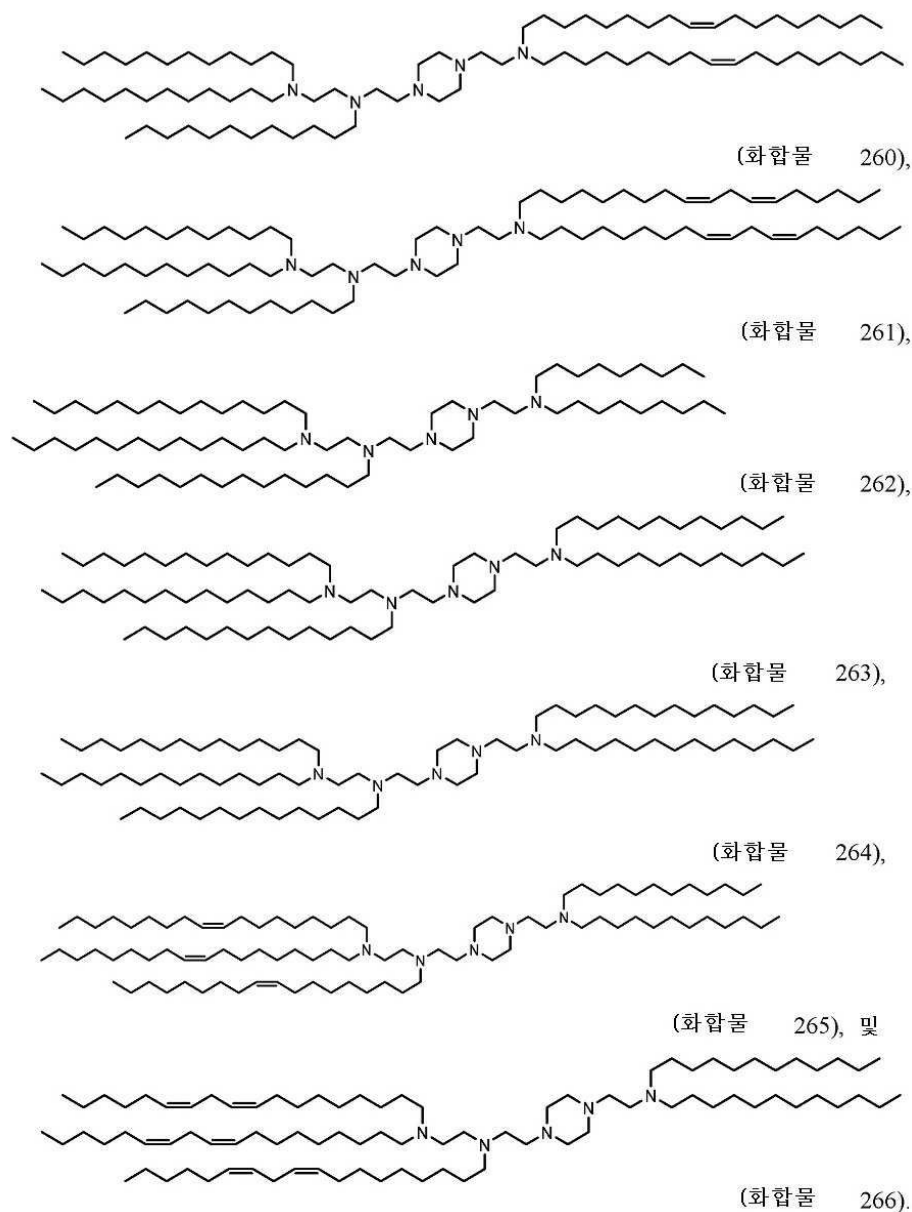
[1156] 일부 실시형태에서, 화합물은 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다:



[1157]

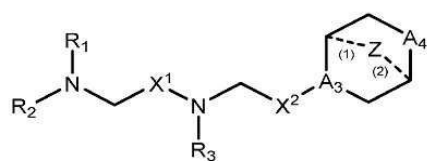


[1158]



[1159]

[1160] 다른 실시형태에서, 전달제는 하기 화학식 (V)를 갖는 화합물 또는 이의 염 또는 입체이성질체를 포함한다:



(V)

[1161]

[1162] 식 중,

[1163] A<sub>3</sub>은 CH 또는 N이고;

[1164] A<sub>4</sub>는 CH<sub>2</sub> 또는 NH이며; 그리고 A<sub>3</sub> 및 A<sub>4</sub> 중 적어도 하나는 N 또는 NH이고;

[1165] Z는 CH<sub>2</sub> 또는 부재이되, Z가 CH<sub>2</sub>일 때, 파선 (1) 및 (2)는 각각 단일 결합을 나타내고; 그리고 Z가 없을 때, 파선 (1)과 (2)는 둘 다 부재이고;

[1166] R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> 및 R<sub>3</sub>은 C<sub>5-20</sub> 알킬, C<sub>5-20</sub> 알켄일, -R"MR', -R\*YR", -YR" 및 -R\*OR"로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며;

[1167] 각각의 M은  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ ,  $-C(O)N(R')-$ ,  $-N(R')C(O)-$ ,  $-C(O)-$ ,  $-C(S)-$ ,  $-C(S)S-$ ,  $-SC(S)-$ ,  $-CH(OH)-$ ,  $-P(O)(OR')O-$ ,  $-S(O)_2-$ , 아릴기 및 헤테로아릴기로부터 독립적으로 선택되고;

[1168]  $X^1$  및  $X^2$ 는  $-CH_2-$ ,  $-(CH_2)_2-$ ,  $-CHR-$ ,  $-CHY-$ ,  $-C(O)-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ ,  $-C(O)-CH_2-$ ,  $-CH_2-C(O)-$ ,  $-C(O)O-CH_2-$ ,  $-OC(O)-CH_2-$ ,  $-CH_2-C(O)O-$ ,  $-CH_2-OC(O)-$ ,  $-CH(OH)-$ ,  $-C(S)-$  및  $-CH(SH)-$ 로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며;

[1169] 각각의 Y는 독립적으로  $C_{3-6}$  카보사이클이고;

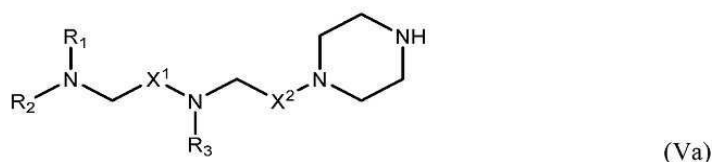
[1170] 각각의 R\*은  $C_{1-12}$  알킬 및  $C_{2-12}$  알켄일로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며;

[1171] 각각의 R은  $C_{1-3}$  알킬 및  $C_{3-6}$  카보사이클로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;

[1172] 각각의 R'는  $C_{1-12}$  알킬,  $C_{2-12}$  알켄일 및 H로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며; 그리고

[1173] 각각의 R"는  $C_{3-12}$  알킬 및  $C_{3-12}$  알켄일로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된다.

[1174] 일부 실시형태에서, 화합물은 하기 화학식 (Va)를 갖는다:



[1175]

[1176] 화학식 (V) 또는 (Va)의 화합물은 적용 가능할 때 다음의 특징 중 하나 이상을 포함한다.

[1177] 일부 실시형태에서, Z는  $CH_2$ 이다.

[1178] 일부 실시형태에서, Z는 부재이다.

[1179] 일부 실시형태에서,  $A_3$  및  $A_4$  중 적어도 하나는 N 또는 NH이다.

[1180] 일부 실시형태에서,  $A_3$ 은 N이고,  $A_4$ 는 NH이다.

[1181] 일부 실시형태에서,  $A_3$ 은 N이고,  $A_4$ 는  $CH_2$ 이다.

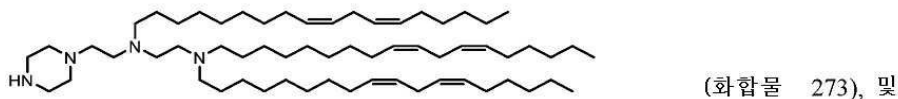
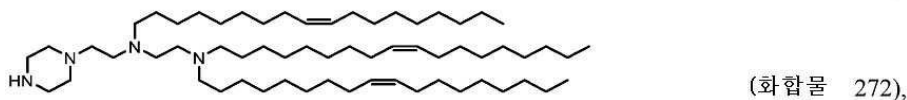
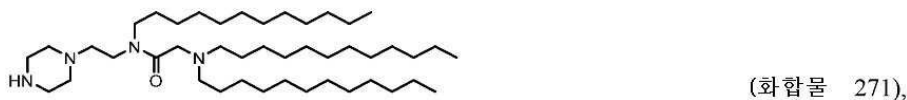
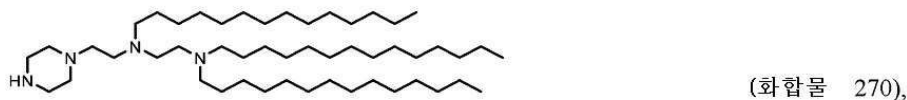
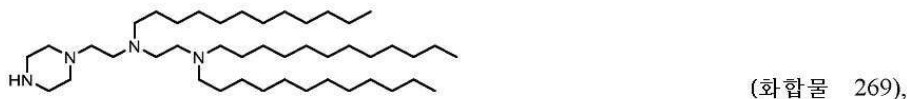
[1182] 일부 실시형태에서,  $A_3$ 은 CH이고,  $A_4$ 는 NH이다.

[1183] 일부 실시형태에서,  $X^1$  및  $X^2$  중 적어도 하나는  $-CH_2-$ 이 아니다. 예를 들어, 소정의 실시형태에서,  $X^1$ 은  $-CH_2-$ 이 아니다. 일부 실시형태에서,  $X^1$  및  $X^2$  중 적어도 하나는  $-C(O)-$ 이다.

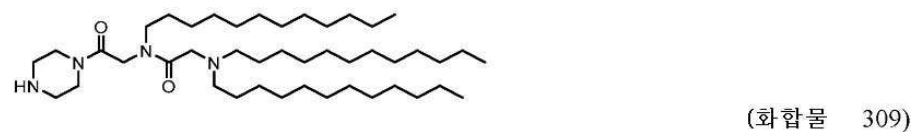
[1184] 일부 실시형태에서,  $X^2$ 는  $-C(O)-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ ,  $-C(O)-CH_2-$ ,  $-CH_2-C(O)-$ ,  $-C(O)O-CH_2-$ ,  $-OC(O)-CH_2-$ ,  $-CH_2-C(O)O-$  또는  $-CH_2-OC(O)-$ 이다.

[1185] 일부 실시형태에서,  $R_1$ ,  $R_2$  및  $R_3$ 은  $C_{5-20}$  알킬 및  $C_{5-20}$  알켄일로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된다. 일부 실시형태에서,  $R_1$ ,  $R_2$ 와  $R_3$ 은 동일하다. 소정의 실시형태에서,  $R_1$ ,  $R_2$  및  $R_3$ 은  $C_6$ ,  $C_9$ ,  $C_{12}$  또는  $C_{14}$  알킬이다. 다른 실시형태에서,  $R_1$ ,  $R_2$  및  $R_3$ 은  $C_{18}$  알켄일이다. 예를 들어,  $R_1$ ,  $R_2$  및  $R_3$ 은 리놀레일일 수 있다.

[1186] 일부 실시형태에서, 화합물은 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다:

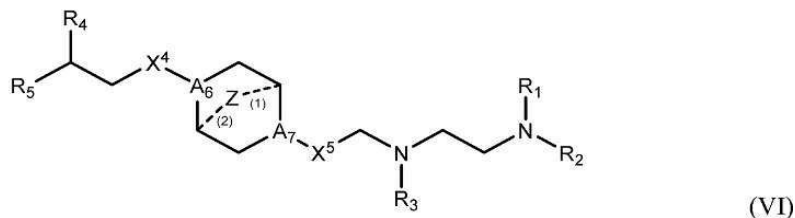


[1187]



[1188]

[1189] 다른 실시형태에서, 전달제는 화학식 (VI)를 갖는 화합물 또는 이의 염 또는 입체이성질체를 포함한다:



[1190]

[1191] 식 중,

[1192] A<sub>6</sub> 및 A<sub>7</sub>은 CH 또는 N으로부터 각각 독립적으로 선택되며, A<sub>6</sub> 및 A<sub>7</sub> 중 적어도 하나는 N이고;

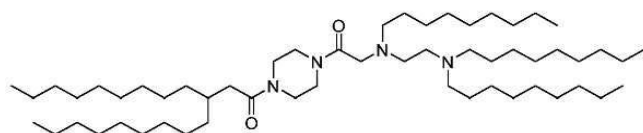
[1193] Z는 CH<sub>2</sub> 또는 부재이며, Z가 CH<sub>2</sub>일 때, 파선 (1) 및 (2)는 각각 단일 결합을 나타내고; 그리고 Z가 없을 때, 파선 (1)과 (2)는 둘 다 부재이고;

[1194] X<sup>4</sup> 및 X<sup>5</sup>는 -CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-, -CHR-, -CHY-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-C(O)-, -C(O)O-CH<sub>2</sub>-, -OC(O)-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-C(O)O-, -CH<sub>2</sub>-OC(O)-, -CH(OH)-, -C(S)- 및 -CH(SH)-로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며;

[1195] R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> 및 R<sub>5</sub>는 각각 C<sub>5-20</sub> 알킬, C<sub>5-20</sub> 알켄일, -R"MR', -R\*YR", -YR" 및 -R\*OR"로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;

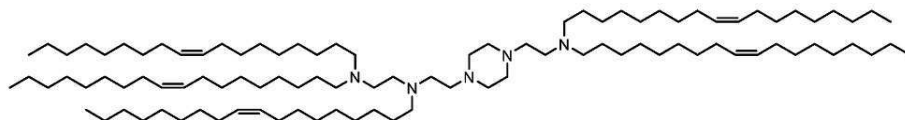
[1196] 각각의 M은 -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)N(R')-, -N(R')C(O)-, -C(O)-, -C(S)-, -C(S)S-, -SC(S)-, -CH(OH)-, -P(O)(OR')O-, -S(O)<sub>2</sub>-, 아릴 및 헤테로아릴기로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며;

- [1197] 각각의 Y는 독립적으로 C<sub>3-6</sub> 카보사이클이며;
- [1198] 각각의 R\*은 C<sub>1-12</sub> 알킬 및 C<sub>2-12</sub> 알켄일로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;
- [1199] 각각의 R은 C<sub>1-3</sub> 알킬 및 a C<sub>3-6</sub> 카보사이클로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;
- [1200] 각각의 R'는 C<sub>1-12</sub> 알킬, C<sub>2-12</sub> 알켄일 및 H로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고; 그리고
- [1201] 각각의 R"는 C<sub>3-12</sub> 알킬 및 C<sub>3-12</sub> 알켄일로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된다.
- [1202] 일부 실시형태에서, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> 및 R<sub>5</sub>는 각각 C<sub>6-20</sub> 알킬 및 C<sub>6-20</sub> 알켄일로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된다.
- [1203] 일부 실시형태에서, R<sub>1</sub>과 R<sub>2</sub>는 동일하다. 소정의 실시형태에서, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>와 R<sub>3</sub>은 동일하다. 일부 실시형태에서, R<sub>4</sub>와 R<sub>5</sub>는 동일하다. 소정의 실시형태에서, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>와 R<sub>5</sub>는 동일하다.
- [1204] 일부 실시형태에서, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> 및 R<sub>5</sub> 중 적어도 하나는 C<sub>9-12</sub> 알킬이다. 소정의 실시형태에서, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> 및 R<sub>5</sub>의 각각은 독립적으로 C<sub>9</sub>, C<sub>12</sub> 또는 C<sub>14</sub> 알킬이다. 소정의 실시형태에서, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> 및 R<sub>5</sub>의 각각은 C<sub>9</sub> 알킬이다.
- [1205] 일부 실시형태에서, A<sub>6</sub>은 N이고, A<sub>7</sub>은 N이다. 일부 실시형태에서, A<sub>6</sub>은 CH이고, A<sub>7</sub>은 N이다.
- [1206] 일부 실시형태에서, X<sup>4</sup>는 -CH<sub>2</sub>-이고, X<sup>5</sup>은 -C(O)-이다. 일부 실시형태에서, X<sup>4</sup> 및 X<sup>5</sup>은 -C(O)-이다.
- [1207] 일부 실시형태에서, A<sub>6</sub>이 N이고 A<sub>7</sub>은 N일 때, X<sup>4</sup> 및 X<sup>5</sup> 중 적어도 하나는 -CH<sub>2</sub>-가 아니고, 예를 들어, X<sup>4</sup> 및 X<sup>5</sup> 중 적어도 하나는 -C(O)-이다. 일부 실시형태에서, A<sub>6</sub>이 N이고, A<sub>7</sub>이 N일 때, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> 및 R<sub>5</sub> 중 적어도 하나는 -R"MR'이다.
- [1208] 일부 실시형태에서, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> 및 R<sub>5</sub> 중 적어도 하나는 -R"MR'이 아니다.
- [1209] 일부 실시형태에서, 화합물은 하기와 같다:



(화합물 299)

- [1210] 다른 실시형태에서, 전달제는 하기 화학식을 갖는 화합물을 포함한다:



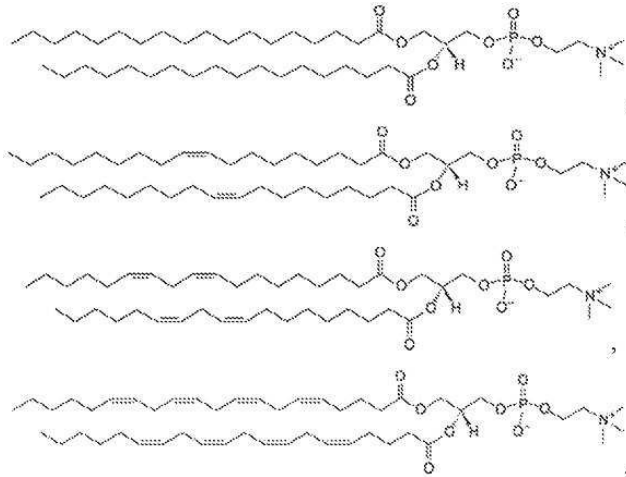
(화합물 342)

- [1212] 본 명세서에 개시된 지질 화합물의 아민 모이어티는 소정의 조건 하에 양성자화될 수 있다. 예를 들어, 화학식 (I)에 따른 지질의 중심 아민 모이어티는 전형적으로 아미노 모이어티의 pKa 미만의 pH에서 양성자화(즉, 양으로 하전)되고, 실질적으로 pKa 초과 pH에서 하전되지 않는다. 이러한 지질은 이온화 가능한 아미노 지질로 지칭될 수 있다.
- [1214] 하나의 구체적 실시형태에서, 이온화 가능한 아미노 지질은 화합물 18이다. 다른 실시형태에서, 이온화 가능한 아미노 지질은 화합물 236이다.
- [1215] 일부 실시형태에서, 이온화 가능한 아미노 지질, 예를 들어, 화학식 (I)의 화합물의 양은 지질 조성물 중에서 약 1mol% 내지 99mol%의 범위이다.

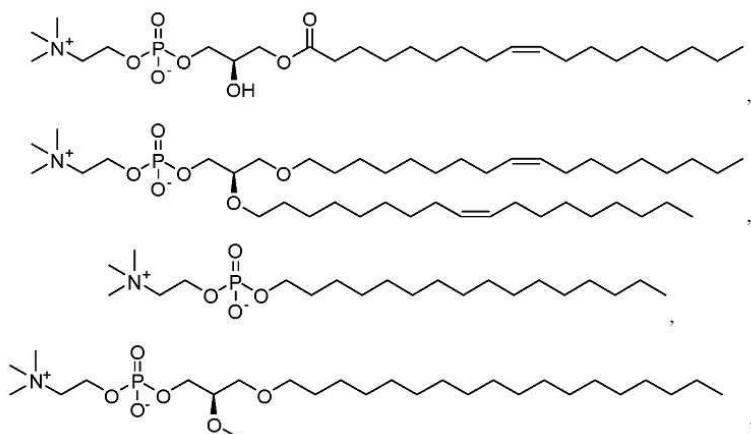
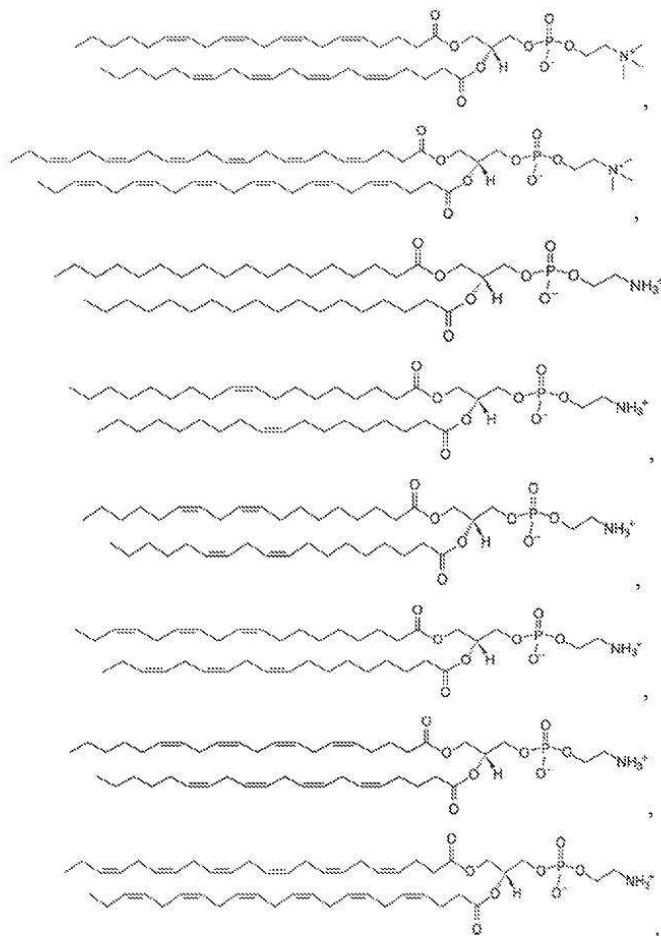


- [1216] 일 실시형태에서, 이온화 가능한 아미노 지질, 예를 들어, 화학식 (I)의 화합물의 양은 지질 조성물 중에서 적어도 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 또는 99mol%이다.
- [1217] 일 실시형태에서, 이온화 가능한 아미노 지질, 예를 들어, 화학식 (I)의 화합물의 양은 지질 조성물 중에서 약 30mol% 내지 약 70mol%, 약 35mol% 내지 약 65mol%, 약 40mol% 내지 약 60mol%, 및 약 45mol% 내지 약 55mol%의 범위이다.
- [1218] 하나의 구체적 실시형태에서, 이온화 가능한 아미노 지질, 예를 들어, 화학식 (I)의 화합물의 양은 지질 조성물 중에서 약 50mol%이다.
- [1219] 본 명세서에 개시된 이온화 가능한 아미노 지질, 예를 들어, 화학식 (I)의 화합물에 추가로, 본 명세서에 개시된 약제학적 조성물의 지질 조성물은 추가적인 성분, 예컨대 인지질, 구조적 지질, PEG-지질 및 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다.
- [1220] 인지질
- [1221] 본 명세서에 개시된 약제학적 조성물의 지질 조성물은 하나 이상의 인지질, 예를 들어, 하나 이상의 포화 또는 (다)불포화 인지질 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 일반적으로, 인지질은 인지질 모이어티 및 하나 이상의 지방산 모이어티를 포함한다.
- [1222] 인지질 모이어티는, 예를 들어, 포스파티딜 콜린, 포스파티딜 에탄올아민, 포스파티딜 글리세롤, 포스파티딜 세린, 포스파티드산, 2-라이소포스파티딜 콜린 및 스핑고마이엘린으로 이루어진 비제한적 기로부터 선택될 수 있다.
- [1223] 지방산 모이어티는, 예를 들어, 라우르산, 미리스트산, 미리스트올레산, 팔미트산, 팔미트올레산, 스테아르산, 올레산, 리놀레산, 알파-리놀렌산, 에루신산, 피탄산, 아라키딘산, 아라키돈산, 에이코사펜탄산, 베헨산, 도코사펜탄산 및 도코사헥산산으로 이루어진 비제한적 군으로부터 선택될 수 있다.
- [1224] 특정 인지질은 막에 대한 용해를 용이하게 할 수 있다. 예를 들어, 양이온성 인지질은 막(예를 들어, 세포의 또는 세포내 막)의 하나 이상의 음으로 하전된 인지질과 상호작용할 수 있다. 막에 대한 인지질의 용해는 지질-함유 조성물(예를 들어, LNP)의 하나 이상의 요소(예를 들어, 치료제)가 막을 통과하도록 허용하여, 예를 들어, 표적 조직에 대한 하나 이상의 요소 전달을 허용할 수 있다.
- [1225] 분지화, 산화, 고리화 및 알카인을 포함하는 변형 및 치환을 갖는 천연 종을 포함하는 비천연 인지질 종이 또한 상정된다. 예를 들어, 인지질은 하나 이상의 알카인(예를 들어, 하나 이상의 이중 결합이 삼중 결합으로 대체되는 알켄일기)으로 작용기화되거나 또는 이에 가교결합될 수 있다. 적절한 반응 조건 하에서, 알카인기는 아자이드에 대한 노출 시 구리-촉매된 첨가환화를 겪을 수 있다. 이러한 반응은 막 침투 또는 세포 인식을 용이하게 하기 위해 나노입자 조성물의 지질 이중층을 작용기와 하는 데 또는 유용한 성분에 나노입자 조성물을 접합하는 데, 예컨대 모이어티(예를 들어, 염료)를 표적화하거나 또는 영상화하는 데 유용할 수 있다.
- [1226] 인지질은 글리세로인지질, 예컨대 포스파티딜콜린, 포스파티딜에탄올아민, 포스파티딜세린, 포스파티딜이노시톨, 포스파티딜 글리세롤 및 포스파티드산을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 인지질은 또한 포스포스핑고지질, 예컨대 스핑고마이엘린을 포함한다.

[1227] 인지질의 예는 다음을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다:

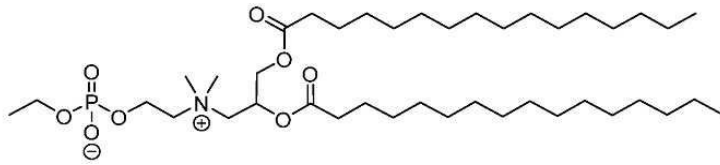


[1228]



[1229]

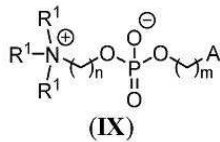
, 및



[1230]

[1231]

소정의 실시형태에서, 본 발명에서 유용한 또는 잠재적으로 유용한 인지질은 DSPC의 유사체 또는 변이체이다. 소정의 실시형태에서, 본 발명에서 유용한 또는 잠재적으로 유용한 인지질은 화학식 (IX)의 화합물 또는 이의 염이다:



[1232]

[1233]

식 중:

[1234]

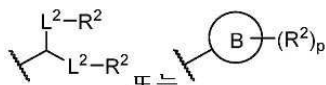
각각의  $R^1$ 은 독립적으로 선택적으로 치환된 알킬이거나; 또는 선택적으로 2개의  $R^1$ 이 개재 원자와 함께 결합되어 선택적으로 치환된 단환식 카보사이클릴 또는 선택적으로 치환된 단환식 헤테로사이클릴을 형성하거나; 또는 선택적으로 3개의  $R^1$ 은 개재 원자와 함께 결합되어 선택적으로 치환된 이환식 카보사이클릴 또는 선택적으로 치환된 이환식 헤테로사이클릴을 형성하며;

[1235]

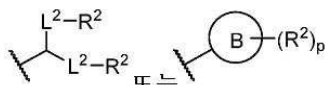
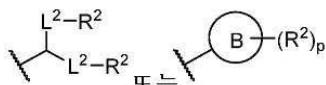
$n$ 은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10이고;

[1236]

$m$ 은 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10이며;



[1237]

A는 화학식  또는  를 갖고;

[1238]

$L^2$ 의 각각의 예는 독립적으로 결합 또는 선택적으로 치환된  $C_{1-6}$  알킬렌이되, 선택적으로 치환된  $C_{1-6}$  알킬렌의 하나의 메틸렌 단위는 선택적으로  $-O-$ ,  $-N(R^N)-$ ,  $-S-$ ,  $-C(O)-$ ,  $-C(O)N(R^N)-$ ,  $-NR^NC(O)-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ ,  $-OC(O)O-$ ,  $-OC(O)N(R^N)-$ ,  $-NR^NC(O)O-$  또는  $-NR^NC(O)N(R^N)-$ 로 대체되고;

[1239]

$R^2$ 의 각각의 예는 독립적으로 선택적으로 치환된  $C_{1-30}$  알킬, 선택적으로 치환된  $C_{1-30}$  알켄일, 또는 선택적으로 치환된  $C_{1-30}$  알킨일이되; 선택적으로  $R^2$ 의 하나 이상의 메틸렌 단위는 선택적으로 치환된 카보사이클릴렌, 선택적으로 치환된 헤테로사이클릴렌, 선택적으로 치환된 아릴렌, 선택적으로 치환된 헤테로아릴렌,  $-N(R^N)-$ ,  $-O-$ ,  $-S-$ ,  $-C(O)-$ ,  $-C(O)N(R^N)-$ ,  $-NR^NC(O)-$ ,  $-NR^NC(O)N(R^N)-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ ,  $-OC(O)O-$ ,  $-OC(O)N(R^N)-$ ,  $-NR^NC(O)O-$ ,  $-C(O)S-$ ,  $-SC(O)-$ ,  $-C(=NR^N)-$ ,  $-C(=NR^N)N(R^N)-$ ,  $-NR^NC(=NR^N)-$ ,  $-NR^NC(=NR^N)N(R^N)-$ ,  $-C(S)-$ ,  $-C(S)N(R^N)-$ ,  $-NR^NC(S)-$ ,  $-NR^NC(S)N(R^N)-$ ,  $-S(O)-$ ,  $-OS(O)-$ ,  $-S(O)O-$ ,  $-OS(O)O-$ ,  $-OS(O)_2-$ ,  $-S(O)_2O-$ ,  $-OS(O)_2O-$ ,  $-N(R^N)S(O)-$ ,  $-S(O)N(R^N)-$ ,  $-N(R^N)S(O)N(R^N)-$ ,  $-OS(O)N(R^N)-$ ,  $-N(R^N)S(O)O-$ ,  $-S(O)_2-$ ,  $-N(R^N)S(O)_2-$ ,  $-S(O)_2N(R^N)-$ ,  $-N(R^N)S(O)_2N(R^N)-$ ,  $-OS(O)_2N(R^N)-$  또는  $-N(R^N)S(O)_2O-$ 로 독립적으로 대체되며;

[1240]

$R^N$ 의 각각의 예는 독립적으로 수소, 선택적으로 치환된 알킬 또는 질소 보호기이고;

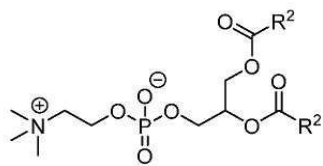
[1241]

고리 B는 선택적으로 치환된 카보사이클릴, 선택적으로 치환된 헤테로사이클릴, 선택적으로 치환된 아릴, 또는 선택적으로 치환된 헤테로아릴이며; 그리고

[1242]

$p$ 는 1 또는 2이고;

[1243] 단, 화합물은 하기 화학식을 갖지 않으며:

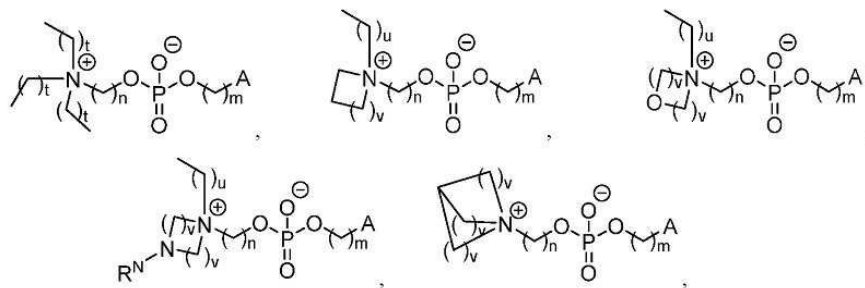


[1244]

[1245]  $R^2$ 의 각각의 예는 독립적으로 비치환된 알킬, 비치환된 알켄일 또는 비치환된 알킨일이다.

[1246] i) 인지질 열 변형

[1247] 소정의 실시형태에서, 본 발명에서 유용하거나 또는 잠재적으로 유용한 인지질은 변형된 인지질 헤드(예를 들어, 변형된 콜린기)를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 변형된 헤드를 갖는 인지질은 변형된 4차 아민으로 변형된 DSPC 또는 이의 유사체이다. 예를 들어, 화학식 (IX)의 실시형태에서,  $R^1$  중 적어도 하나는 메틸이 아니다. 소정의 실시형태에서,  $R^1$  중 적어도 하나는 수소 또는 메틸이 아니다. 소정의 실시형태에서, 화학식 (IX)의 화합물 또는 이의 염은 다음의 화학식 중 하나를 갖는다:



[1248]

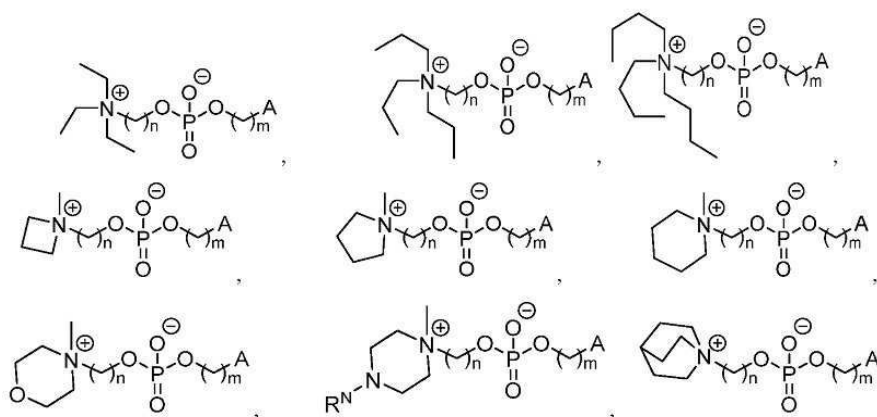
[1249] 식 중:

[1250] 각각의 t는 독립적으로 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10이고;

[1251] 각각의 u는 독립적으로 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10이며; 그리고

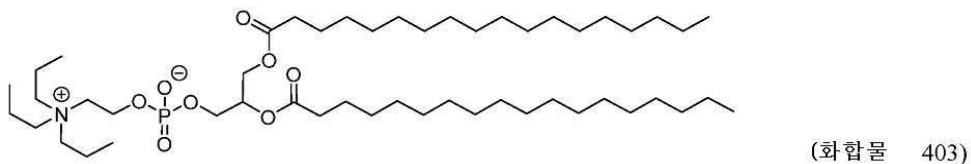
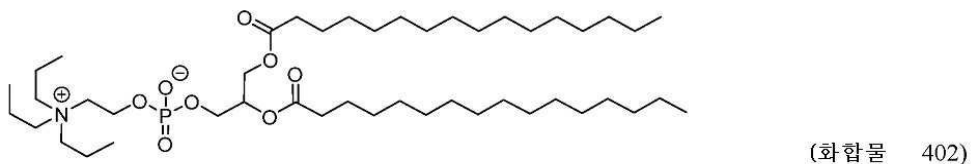
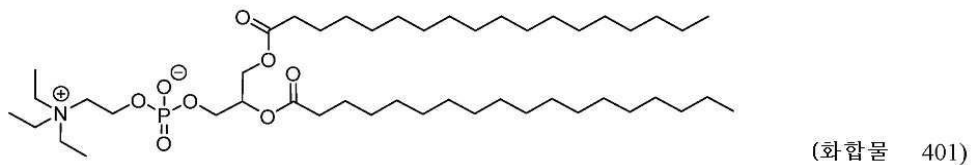
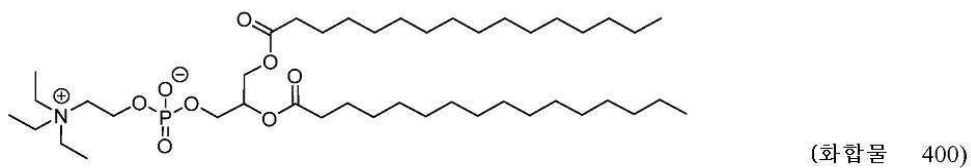
[1252] 각각의 v는 독립적으로 1, 2 또는 3이다.

[1253] 소정의 실시형태에서, 화학식 (IX)의 화합물은 다음의 화학식 중 하나 또는 이의 염을 갖는다:

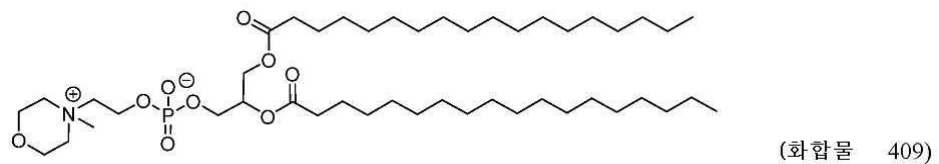
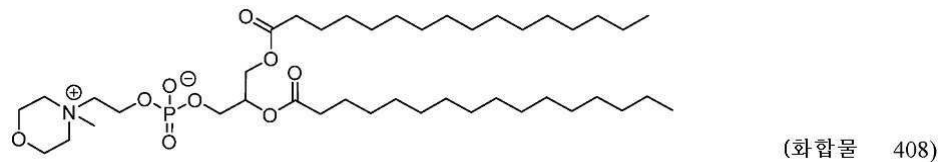
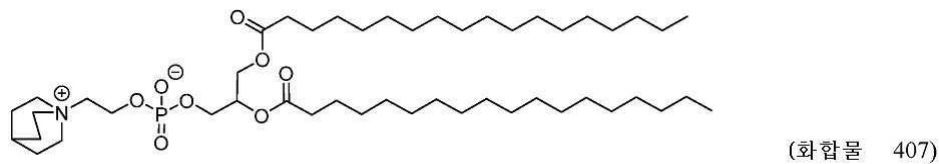
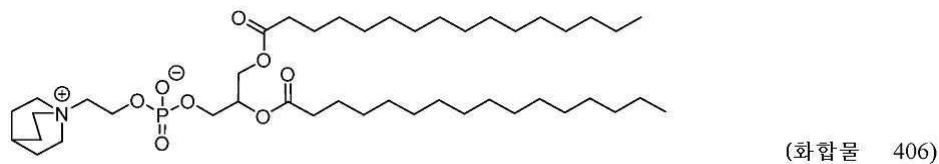
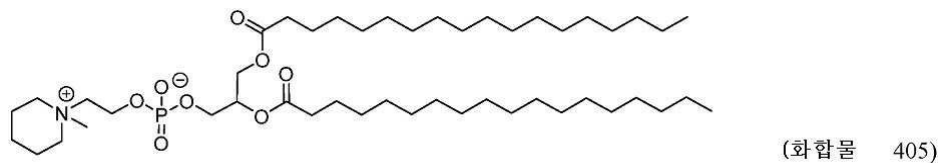
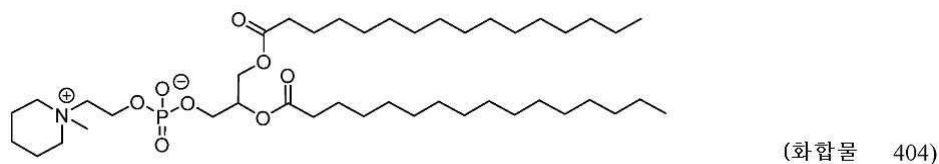


[1254]

[1255] 소정의 실시형태에서, 화학식 (IX)의 화합물은 다음의 화학식 중 하나 또는 이의 염을 갖는다:



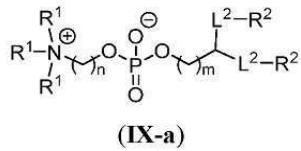
[1256]



[1257]

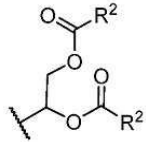
[1258] 소정의 실시형태에서, 화학식 (IX)의 화합물은 하기 화학식(IX-a) 또는 이의 염을 갖는다:





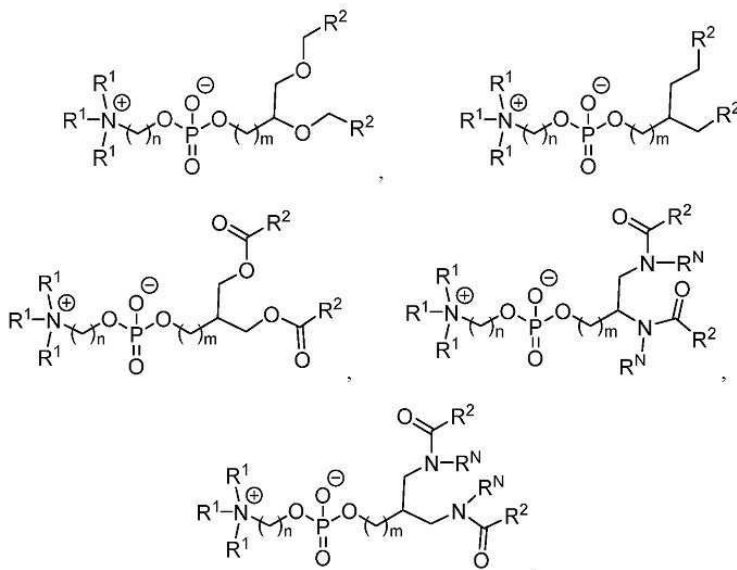
[1259]

[1260] 소정의 실시형태에서, 본 발명에서 유용하거나 또는 잠재적으로 유용한 인지질은 변형된 코어를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 변형된 코어를 갖는 인지질은 변형된 코어 구조를 갖는 DSPC, 또는 이의 유사체이다. 예를 들어, 화학식 (IX-a)의 소정의 실시형태에서, 기 A는 다음의 화학식을 갖지 않는다:



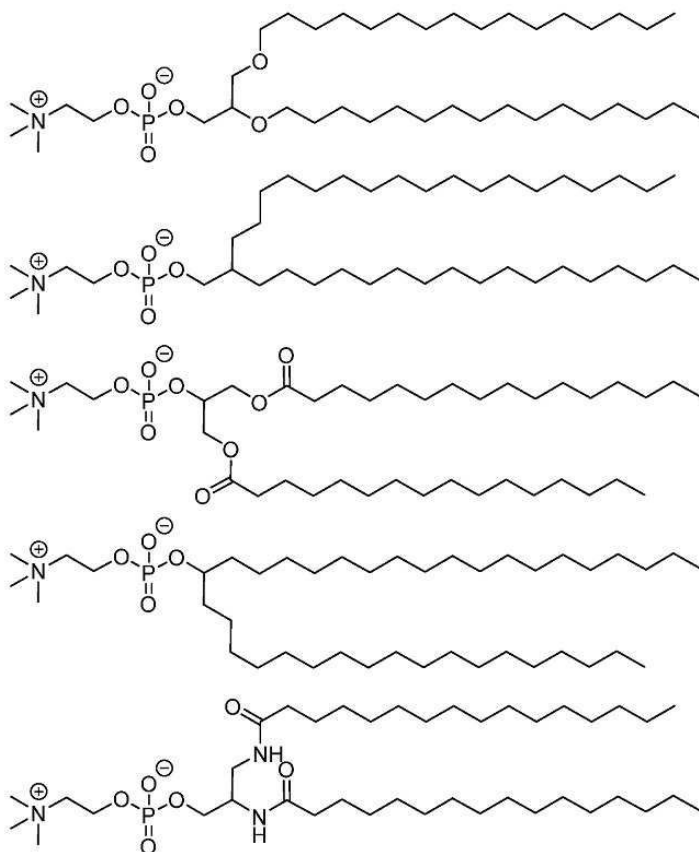
[1261]

[1262] 소정의 실시형태에서, 화학식 (IX-a)의 화합물은 다음의 화학식 중 하나 또는 이의 염을 갖는다:



[1263]

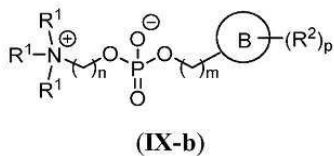
[1264] 소정의 실시형태에서, 화학식 (IX)의 화합물은 다음의 화학식 중 하나 또는 이의 염을 갖는다:



[1265]

[1266]

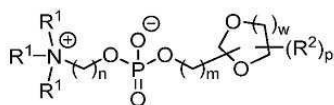
소정의 실시형태에서, 본 발명에서 유용하거나 또는 잠재적으로 유용한 인지질은 글리세라이드 모이어티 대신에 환식 모이어티를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 본 발명에서 유용한 인지질은 글리세라이드 모이어티 대신에 환식 모이어티를 갖는 DSPC, 또는 이의 유사체이다. 소정의 실시형태에서, 화학식 (IX)의 화합물은 하기 화학식 (IX-b) 또는 이의 염을 갖는다:



[1267]

[1268]

소정의 실시형태에서, 화학식 (IX-b)의 화합물은 하기 화학식(IX-b-1) 또는 이의 염을 갖는다:



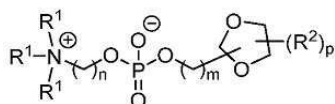
[1269]

[1270]

w는 0, 1, 2 또는 3이다.

[1271]

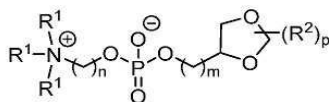
소정의 실시형태에서, 화학식 (IX-b)의 화합물은 하기 화학식(IX-b-2) 또는 이의 염을 갖는다:



[1272]

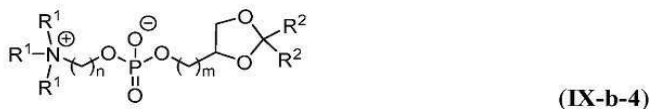
[1273]

소정의 실시형태에서, 화학식 (IX-b)의 화합물은 하기 화학식(IX-b-3) 또는 이의 염을 갖는다:



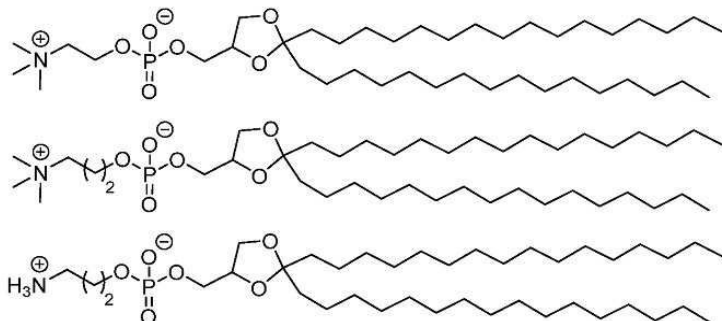
[1274]

[1275] 소정의 실시형태에서, 화학식 (IX-b)의 화합물은 하기 화학식(IX-b-4) 또는 이의 염을 갖는다:



[1276]

[1277] 소정의 실시형태에서, 화학식 (IX-b)의 화합물은 다음 중 하나 또는 이의 염이다:

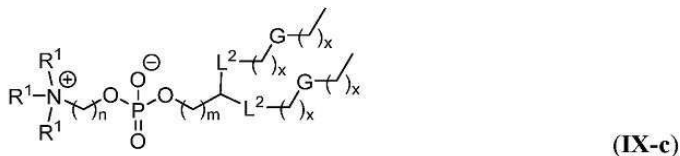


[1278]

[1279] (ii) 인지질 꼬리 변형

[1280] 소정의 실시형태에서, 본 발명에서 유용하거나 또는 잠재적으로 유용한 인지질은 변형된 꼬리를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 본 발명에서 유용하거나 또는 잠재적으로 유용한 인지질은 변형된 꼬리를 갖는 DSPC, 또는 이의 유사체이다. 본 명세서에 기재된 바와 같이, "변형된 꼬리"는 더 짧은 또는 더 긴 지방족쇄, 분지가 도입된 지방족쇄, 치환체가 도입된 지방족쇄, 하나 이상의 메틸렌이 환식 또는 헤테로원자기로 대체된 지방족쇄, 또는 이들의 임의의 조합을 갖는 꼬리일 수 있다. 예를 들어, 소정의 실시형태에서, (IX)의 화합물은 화학식(IX-a) 또는 이의 염을 갖되, R<sup>2</sup>의 적어도 하나의 예는 R<sup>2</sup>가 선택적으로 치환된 C<sub>1-30</sub> 알킬인 각각의 예이되, R<sup>2</sup>의 하나 이상의 메틸렌 단위는 선택적으로 치환된 카보사이클릴렌, 선택적으로 치환된 헤테로사이클릴렌, 선택적으로 치환된 아릴렌, 선택적으로 치환된 헤테로아릴렌, -N(R<sup>N</sup>)-, -O-, -S-, -C(O)-, -C(O)N(R<sup>N</sup>)-, -NR<sup>N</sup>C(O)-, -NR<sup>N</sup>C(O)N(R<sup>N</sup>)-, -C(O)O-, -OC(O)-, -OC(O)O-, -OC(O)N(R<sup>N</sup>)-, -NR<sup>N</sup>C(O)O-, -C(O)S-, -SC(O)-, -C(=NR<sup>N</sup>)-, -C(=NR<sup>N</sup>)N(R<sup>N</sup>)-, -NR<sup>N</sup>C(=NR<sup>N</sup>)-, -NR<sup>N</sup>C(=NR<sup>N</sup>)N(R<sup>N</sup>)-, -C(S)-, -C(S)N(R<sup>N</sup>)-, -NR<sup>N</sup>C(S)-, -NR<sup>N</sup>C(S)N(R<sup>N</sup>)-, -S(O)-, -OS(O)-, -S(O)O-, -OS(O)O-, -OS(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>O-, -OS(O)<sub>2</sub>O-, -N(R<sup>N</sup>)S(O)-, -S(O)N(R<sup>N</sup>)-, -N(R<sup>N</sup>)S(O)N(R<sup>N</sup>)-, -OS(O)N(R<sup>N</sup>)-, -N(R<sup>N</sup>)S(O)O-, -S(O)<sub>2</sub>-, -N(R<sup>N</sup>)S(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>N(R<sup>N</sup>)-, -N(R<sup>N</sup>)S(O)<sub>2</sub>N(R<sup>N</sup>)-, -OS(O)<sub>2</sub>N(R<sup>N</sup>)- 또는 -N(R<sup>N</sup>)S(O)<sub>2</sub>O-로 독립적으로 대체된다.

[1281] 소정의 실시형태에서, 화학식 (IX)의 화합물은 하기 화학식(IX-c) 또는 이의 염을 갖는다:



[1282]

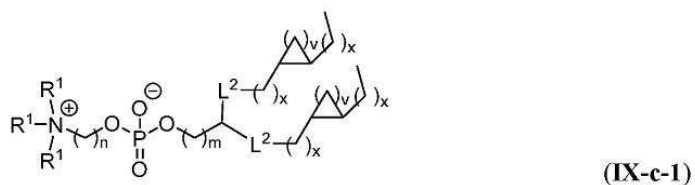
[1283] 식 중:

[1284] 각각의 x는 독립적으로 0 내지 30 사이의 정수이고; 그리고

[1285] 각각의 예에서, G는 선택적으로 치환된 카보사이클릴렌, 선택적으로 치환된 헤테로사이클릴렌, 선택적으로 치환된 아릴렌, 선택적으로 치환된 헤테로아릴렌, -N(R<sup>N</sup>)-, -O-, -S-, -C(O)-, -C(O)N(R<sup>N</sup>)-, -NR<sup>N</sup>C(O)-, -NR<sup>N</sup>C(O)N(R<sup>N</sup>)-, -C(O)O-, -OC(O)-, -OC(O)O-, -OC(O)N(R<sup>N</sup>)-, -NR<sup>N</sup>C(O)O-, -C(O)S-, -SC(O)-, -C(=NR<sup>N</sup>)-, -C(=NR<sup>N</sup>)N(R<sup>N</sup>)-, -NR<sup>N</sup>C(=NR<sup>N</sup>)-, -NR<sup>N</sup>C(=NR<sup>N</sup>)N(R<sup>N</sup>)-, -C(S)-, -C(S)N(R<sup>N</sup>)-, -NR<sup>N</sup>C(S)-, -NR<sup>N</sup>C(S)N(R<sup>N</sup>)-, -S(O)-,

-OS(O)-, -S(O)O-, -OS(O)O-, -OS(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>O-, -OS(O)<sub>2</sub>O-, -N(R<sup>N</sup>)S(O)-, -S(O)N(R<sup>N</sup>)-, -N(R<sup>N</sup>)S(O)N(R<sup>N</sup>)-, -OS(O)N(R<sup>N</sup>)-, -N(R<sup>N</sup>)S(O)O-, -S(O)<sub>2</sub>-, -N(R<sup>N</sup>)S(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>N(R<sup>N</sup>)-, -N(R<sup>N</sup>)S(O)<sub>2</sub>N(R<sup>N</sup>)-, -OS(O)<sub>2</sub>N(R<sup>N</sup>)-, 또는 -N(R<sup>N</sup>)S(O)<sub>2</sub>O-로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된다. 각각의 가능성은 본 발명의 별개의 실시형태를 나타낸다.

[1286] 소정의 실시형태에서, 화학식 (IX-c)의 화합물은 하기 화학식(IX-c-1) 또는 이의 염을 갖는다:

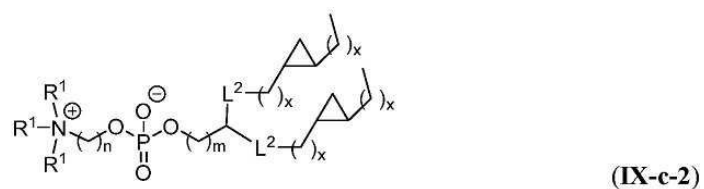


[1287]

[1288] 식 중,

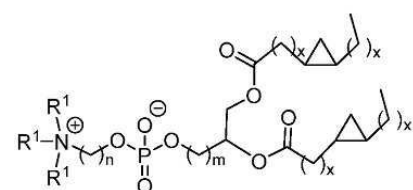
[1289] v의 각각의 예는 독립적으로 1, 2 또는 3이다.

[1290] 소정의 실시형태에서, 화학식 (IX-c)의 화합물은 하기 화학식(IX-c-2) 또는 이의 염을 갖는다:



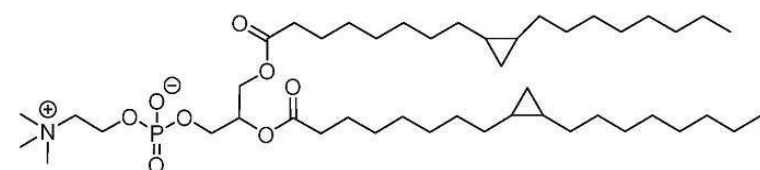
[1291]

[1292] 소정의 실시형태에서, 화학식 (IX-c)의 화합물은 다음의 화학식 또는 이의 염을 갖는다:



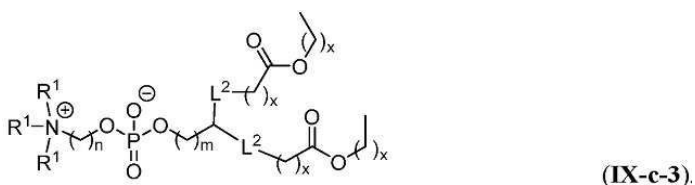
[1293]

[1294] 소정의 실시형태에서, 화학식 (IX-c)의 화합물은 다음의 화학식 또는 이의 염을 갖는다:



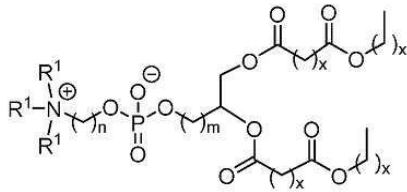
[1295]

[1296] 소정의 실시형태에서, 화학식 (IX-c)의 화합물은 하기 화학식(IX-c-3) 또는 이의 염을 갖는다:



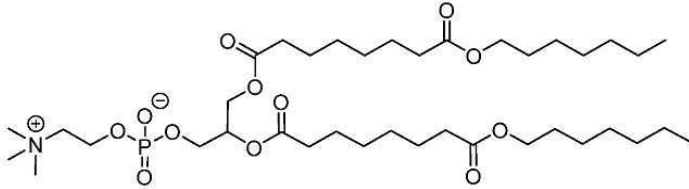
[1297]

[1298] 소정의 실시형태에서, 화학식 (IX-c)의 화합물은 다음의 화학식 또는 이의 염을 갖는다:



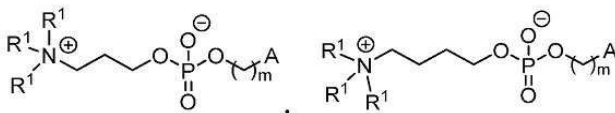
[1299]

[1300] 소정의 실시형태에서, 화학식 (IX-c)의 화합물은 다음의 화학식 또는 이의 염을 갖는다:



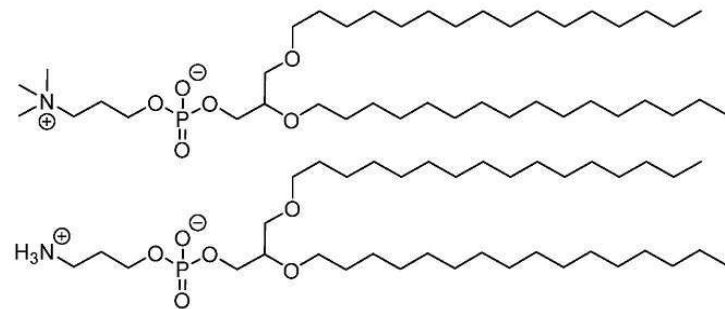
[1301]

[1302] 소정의 실시형태에서, 본 발명에서 유용하거나 또는 잠재적으로 유용한 인지질은 변형된 포스포콜린 모이어티를 포함하되, 포스포릴기에 4차 아민을 연결하는 알킬쇄는 에틸렌(예를 들어, n은 2가 아님)이 아니다. 따라서, 소정의 실시형태에서, 본 발명에서 유용하거나 또는 잠재적으로 유용한 인지질은 화학식 (IX)의 화합물이되, n은 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10이다. 예를 들어, 소정의 실시형태에서, 화학식 (IX)의 화합물은 다음의 화학식 중 하나 또는 이의 염을 갖는다:



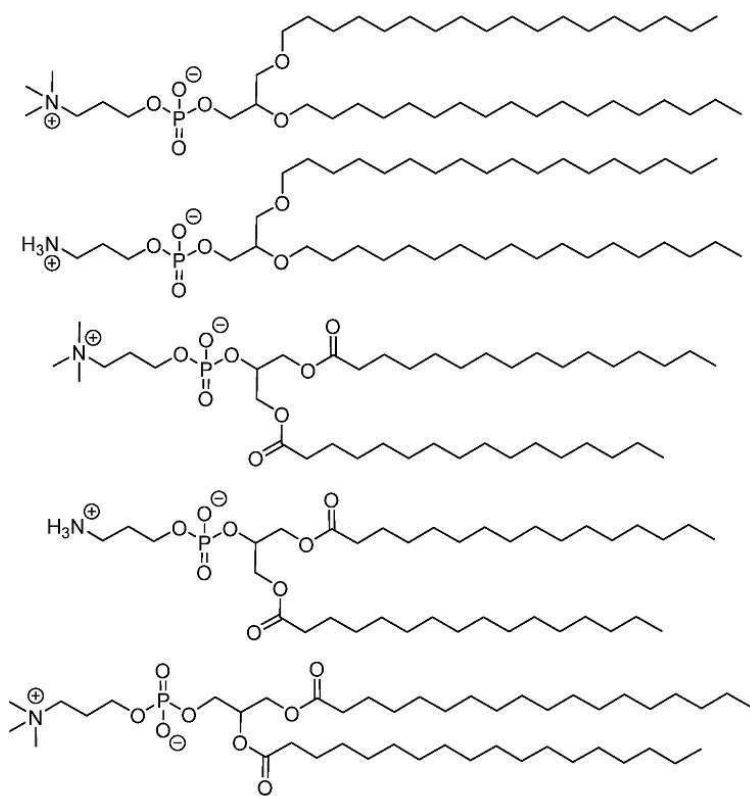
[1303]

[1304] 소정의 실시형태에서, 화학식 (IX)의 화합물은 다음 중 하나 또는 이의 염이다:

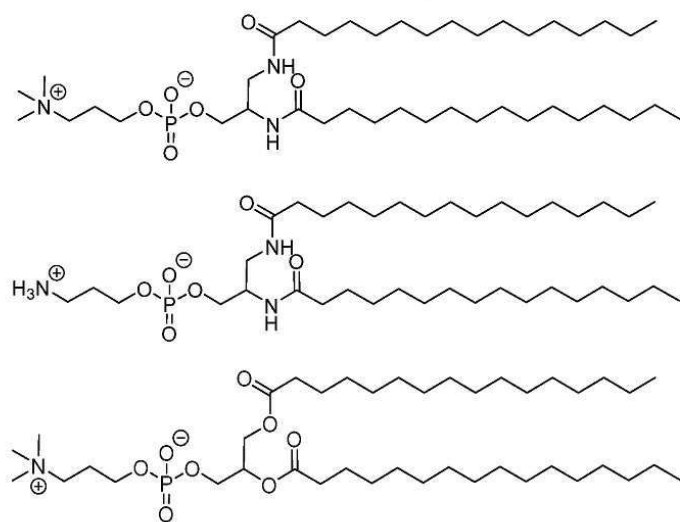


[1305]



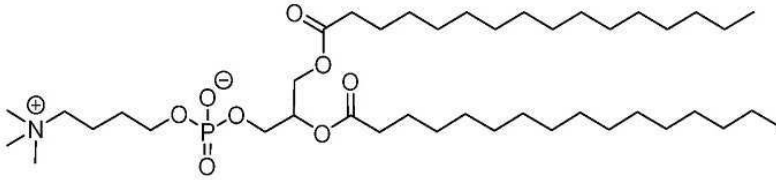


(화합물 411)

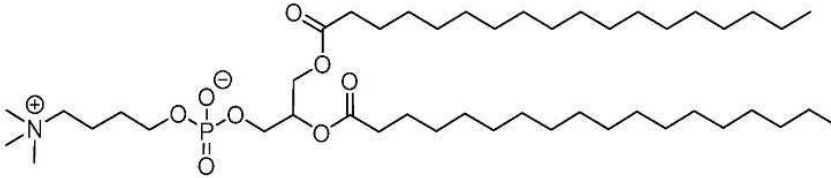


(화합물 412)

[1306]



(화합물 413)

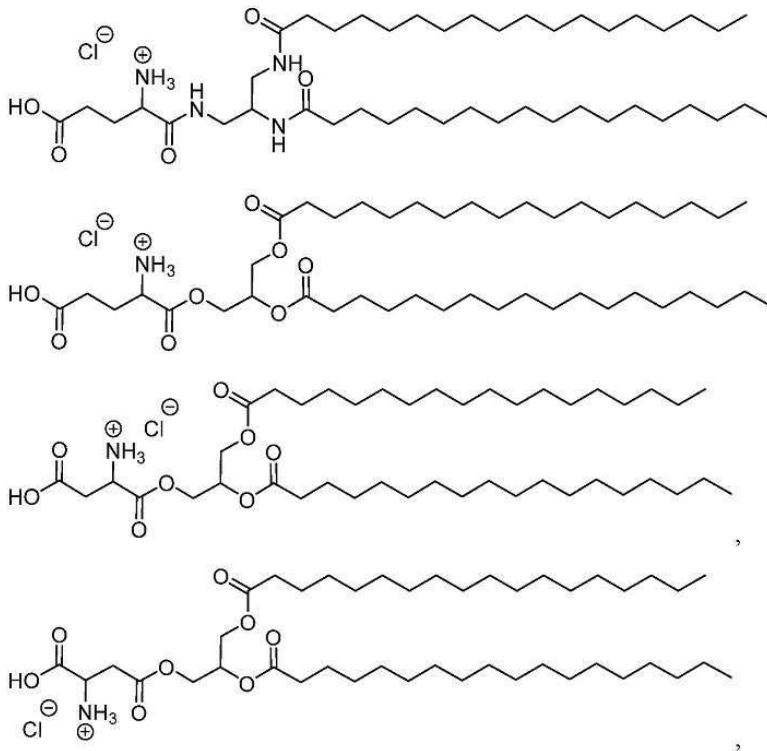


(화합물 414)

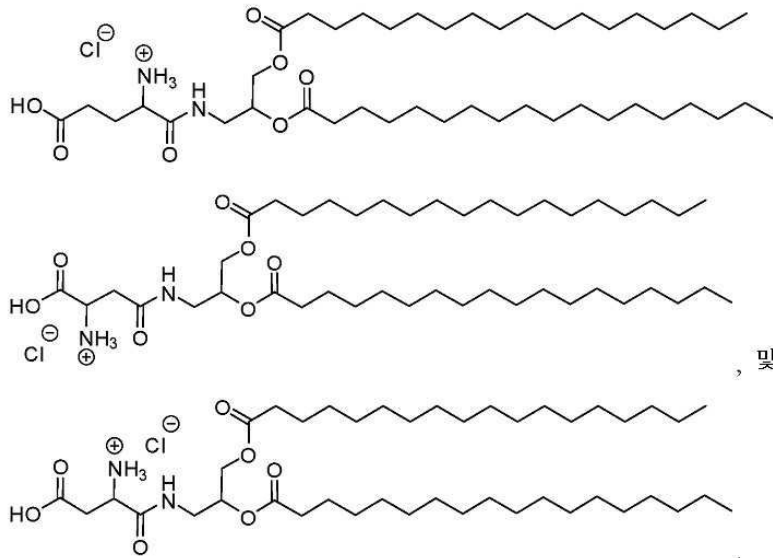
[1307]

[1308] 대안의 지질

[1309] 소정의 실시형태에서, 대안의 지질은 본 발명의 인지질 대신 사용된다. 이러한 대안의 지질의 비제한적 예는 다음을 포함한다:



[1310]



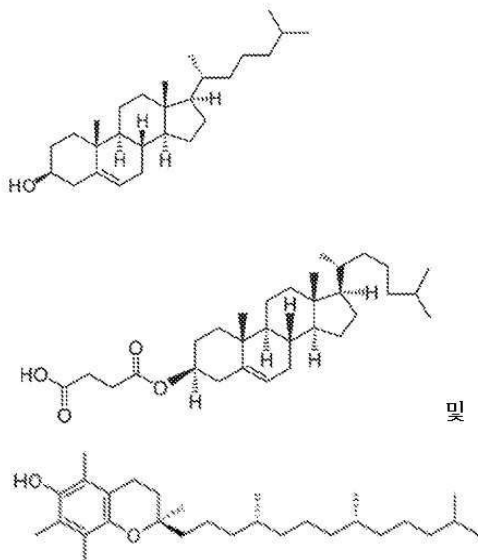
[1311]

[1312] 구조적 지질

[1313] 본 명세서에 개시된 약제학적 조성물의 지질 조성물은 하나 이상의 구조적 지질을 포함할 수 있다. 본 명세서에 사용되는 바와 같은, 용어 "구조적 지질"은 스테롤 및 또한 스테롤 모이어티를 함유하는 지질을 지칭한다.

[1314] 지질 나노입자에서 구조적 지질의 혼입은 입자 내 다른 지질의 응집을 완화시킬 수 있다. 구조적 지질은 콜레스테롤, 페코스테롤, 시토스테롤, 에르고스테롤, 캄페스테롤, 스티그마스테롤, 브라시카스테롤, 토마티딘, 토마틴, 우르솔산, 알파-토코페롤, 호파노이드, 피토스테롤, 스테로이드 및 이들의 혼합물을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 군으로부터 선택될 수 있다. 일부 실시형태에서, 구조적 지질은 스테롤이다. 본 명세서에 정의되는 바와 같은 "스테롤"은 스테로이드 알코올로 이루어진 스테로이드의 하위그룹이다. 소정의 실시형태에서, 구조적 지질은 스테로이드이다. 소정의 실시형태에서, 구조적 지질은 콜레스테롤이다. 소정의 실시형태에서, 구조적 지질은 콜레스테롤의 유사체이다. 소정의 실시형태에서, 구조적 지질은 알파-토코페롤이다. 구조적 지질의 예는 다음을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다:

[1315]



[1316]

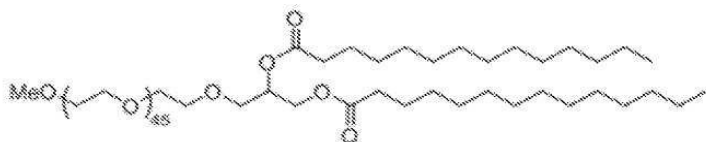
[1317] 일 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 약제학적 조성물의 지질 조성물 중의 구조적 지질(예를 들어, 스테롤 예컨대 콜레스테롤)의 양은 약 20mol% 내지 약 60mol%, 약 25mol% 내지 약 55mol%, 약 30mol% 내지 약 50mol%, 또는 약 35mol% 내지 약 45mol%의 범위이다.

[1318] 일 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 약제학적 조성물의 지질 조성물 중의 구조적 지질(예를 들어, 스테롤 예컨대 콜레스테롤)의 양은 약 25mol% 내지 약 30mol%, 약 30mol% 내지 약 35mol%, 또는 약 35mol% 내지 약 40mol%의 범

위이다.

- [1319] 일 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 약제학적 조성물의 지질 조성물 중의 구조적 지질(예를 들어, 스테롤 예컨대 콜레스테롤)의 양은 약 24mol%, 약 29mol%, 약 34mol%, 또는 약 39mol%이다.
- [1320] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 약제학적 조성물의 지질 조성물 중의 구조적 지질(예를 들어, 스테롤 예컨대 콜레스테롤)의 양은 적어도 약 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 또는 60mol%이다.
- [1321] 폴리에틸렌 글리콜(PEG)-지질
- [1322] 본 명세서에 개시된 약제학적 조성물의 지질 조성물은 1종 이상의 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 지질을 포함할 수 있다.
- [1323] 본 명세서에 사용되는 바와 같은, 용어 "PEG-지질"은 폴리에틸렌 글리콜(PEG)-변형 지질을 지칭한다. PEG-지질의 비제한적 예는 PEG-변형된 포스파티딜에탄올아민 및 포스파티드산, PEG-세라마이드 접합체(예를 들어, PEG-CerC14 또는 PEG-CerC20), PEG-변형된 다이알킬아민 및 PEG-변형된 1,2-다이아실옥시프로판-3-아민을 포함한다. 이러한 지질은 또한 폐길화된(PEGylated) 지질로서 지칭된다. 예를 들어, PEG 지질은 PEG-c-DOMG, PEG-DMG, PEG-DLPE, PEG-DMPE, PEG-DPPC 또는 PEG-DSPE 지질일 수 있다.
- [1324] 일부 실시형태에서, PEG-지질은 1,2-다이미리스토일-sn-글리세롤 메톡시폴리에틸렌 글리콜(PEG-DMG), 1,2-다이스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[아미노(폴리에틸렌 글리콜)] (PEG-DSPE), PEG-다이스테틸 글리세롤(PEG-DSG), PEG-다이팔메톨레일, PEG-다이올레일, PEG-다이스테아릴, PEG-다이아실글리카마이드(PEG-DAG), PEG-다이팔미토일 포스파티딜에탄올아민(PEG-DPPE) 또는 PEG-1,2-다이미리스틸옥시프로판-3-아민(PEG-c-DMA)을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.
- [1325] 일 실시형태에서, PEG-지질은 PEG-변형된 포스파티딜에탄올아민, PEG-변형된 포스파티드산, PEG-변형된 세라마이드, PEG-변형된 다이알킬아민, PEG-변형된 다이아실글리세롤, PEG-변형된 다이알킬글리세롤 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [1326] 일부 실시형태에서, PEG-지질의 지질 모이어티는 약 C<sub>14</sub> 내지 약 C<sub>22</sub>, 바람직하게는 약 C<sub>14</sub> 내지 약 C<sub>16</sub>의 길이를 갖는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, PEG 모이어티, 예를 들어, mPEG-NH<sub>2</sub>는 크기가 약 1000, 2000, 5000, 10,000, 15,000 또는 20,000 달톤이다. 일 실시형태에서, PEG-지질은 PEG<sub>2k</sub>-DMG이다.
- [1327] 일 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 지질 나노입자는 비-확산성 PEG인 PEG 지질을 포함할 수 있다. 비-확산성 PEG의 비제한적 예는 PEG-DSG 및 PEG-DSPE를 포함한다.
- [1328] PEG-지질, 예컨대 본 명세서에 전문이 참고로 편입된 미국 특허 제8158601호 및 국제 특허 출원 공개 WO 2015/130584 A2에 기재되어 있는 것이 공지되어 있다.
- [1329] 일반적으로, 본 명세서에 기재된 다양한 화학식의 다른 지질 성분(예를 들어, PEG 지질)의 일부는 본 명세서에 전문이 참고로 편입된 2016년 12월 10일자로 출원된 국제 특허 출원 PCT/US2016/000129(발명의 명칭: Compositions and Methods for Delivery of Therapeutic Agents)로서 합성될 수 있다.
- [1330] 지질 나노입자 조성물의 지질 성분은 폴리에틸렌 글리콜, 예컨대 PEG 또는 PEG-변형 지질을 포함하는 하나 이상의 분자를 포함할 수 있다. 이러한 중은 대안적으로 폐길화된 지질로서 지칭될 수 있다. PEG 지질은 폴리에틸렌 글리콜로 변형된 지질이다. PEG 지질은 PEG-변형된 포스파티딜에탄올아민, PEG-변형된 포스파티드산, PEG-변형된 세라마이드, PEG-변형된 다이알킬아민, PEG-변형된 다이아실글리세롤, PEG-변형된 다이알킬글리세롤 및 이들의 혼합물을 포함하는, 비제한적 군으로부터 선택될 수 있다. 예를 들어, PEG 지질은 PEG-c-DOMG, PEG-DMG, PEG-DLPE, PEG-DMPE, PEG-DPPC 또는 PEG-DSPE 지질일 수 있다.

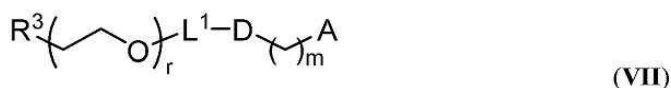
[1331] 일부 실시형태에서, PEG-변형 지질은 PEG DMG의 변형된 형태이다. PEG-DMG는 다음의 구조를 갖는다:



[1332]

[1333] 일 실시형태에서, 본 발명에서 유용한 PEG 지질은 국제 특허 출원 공개 W02012099755에 기재된 폐길화된 지질일 수 있으며, 이의 내용은 본 명세서에 전문이 참고로 편입된다. 이들 예시적인 PEG 본 명세서에 기재된 지질 중 어떤 것은 PEG쇄 상에 하이드록실기를 포함하도록 변형될 수 있다. 소정의 실시형태에서, PEG 지질은 PEG-OH 지질이다. 본 명세서에 일반적으로 정의되는 바와 같이, "PEG-OH 지질"(또한 본 명세서에서 "하이드록시-폐길화된 지질"로 지칭됨)은 지질 상에 하나 이상의 하이드록실(-OH) 기를 갖는 폐길화된 지질이다. 소정의 실시형태에서, PEG-OH 지질은 PEG쇄 상에 하나 이상의 하이드록실기를 포함한다. 소정의 실시형태에서, PEG-OH 또는 하이드록시-폐길화된 지질은 PEG쇄의 말단에서 -OH 기를 포함한다. 각각의 가능성은 본 발명의 별개의 실시형태를 나타낸다.

[1334] 소정의 실시형태에서, 본 발명에서 유용한 PEG 지질은 화학식 (VII)의 화합물이다. 본 명세서에서 하기 화학식 (VII)의 화합물 또는 이의 염이 제공된다



[1335]

[1336] 식 중:

[1337]  $R^3$ 은  $-\text{OR}^0$ 이고;

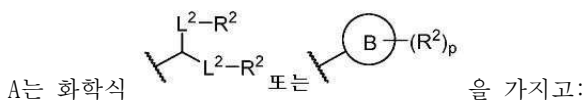
[1338]  $R^0$ 는 수소, 선택적으로 치환된 알킬 또는 산소 보호기이며;

[1339]  $r$ 은 1 내지 100의 정수(1과 100을 포함)이고;

[1340]  $L^1$ 은 선택적으로 치환된  $\text{C}_{1-10}$  알킬렌이되, 선택적으로 치환된  $\text{C}_{1-10}$  알킬렌의 적어도 하나의 메틸렌은 선택적으로 치환된 카보사이클릴렌, 선택적으로 치환된 헤테로사이클릴렌, 선택적으로 치환된 아릴렌, 선택적으로 치환된 헤테로아릴렌,  $\text{O}$ ,  $\text{N}(\text{R}^N)$ ,  $\text{S}$ ,  $\text{C}(\text{O})$ ,  $\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^N)$ ,  $\text{NR}^N\text{C}(\text{O})$ ,  $\text{C}(\text{O})\text{O}$ ,  $-\text{OC}(\text{O})-$ ,  $\text{OC}(\text{O})\text{O}$ ,  $\text{OC}(\text{O})\text{N}(\text{R}^N)$ ,  $\text{NR}^N\text{C}(\text{O})\text{O}$  또는  $\text{NR}^N\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^N)$ 로 독립적으로 대체되며;

[1341]  $D$ 는 생리적 조건 하에 절단 가능한 클릭 화학 또는 모이어티에 의해 얻어지는 모이어티이고;

[1342]  $m$ 은 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10이며;



[1344]  $L^2$ 의 각각의 예는 독립적으로 결합 또는 선택적으로 치환된  $\text{C}_{1-6}$  알킬렌이되, 선택적으로 치환된  $\text{C}_{1-6}$  알킬렌의 하나의 메틸렌 단위는 선택적으로  $\text{O}$ ,  $\text{N}(\text{R}^N)$ ,  $\text{S}$ ,  $\text{C}(\text{O})$ ,  $\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^N)$ ,  $\text{NR}^N\text{C}(\text{O})$ ,  $\text{C}(\text{O})\text{O}$ ,  $\text{OC}(\text{O})$ ,  $\text{OC}(\text{O})\text{O}$ ,  $\text{OC}(\text{O})\text{N}(\text{R}^N)$ ,  $-\text{NR}^N\text{C}(\text{O})\text{O}$  또는  $\text{NR}^N\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^N)$ 로 대체되고;

[1345]  $R^2$ 의 각각의 예는 독립적으로 선택적으로 치환된  $\text{C}_{1-30}$  알킬, 선택적으로 치환된  $\text{C}_{1-30}$  알켄일, 또는 선택적으로 치환된  $\text{C}_{1-30}$  알킨일; 선택적으로  $R^2$ 의 하나 이상의 메틸렌 단위는 선택적으로 치환된 카보사이클릴렌, 선택적으로 치환된 헤테로사이클릴렌, 선택적으로 치환된 아릴렌, 선택적으로 치환된 헤테로아릴렌,  $\text{N}(\text{R}^N)$ ,  $\text{O}$ ,  $\text{S}$ ,  $\text{C}(\text{O})$ ,  $\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^N)$ ,  $\text{NR}^N\text{C}(\text{O})$ ,  $-\text{NR}^N\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^N)$ ,  $\text{C}(\text{O})\text{O}$ ,  $\text{OC}(\text{O})$ ,  $\text{OC}(\text{O})\text{O}$ ,  $\text{OC}(\text{O})\text{N}(\text{R}^N)$ ,  $\text{NR}^N\text{C}(\text{O})\text{O}$ ,  $\text{C}(\text{O})\text{S}$ ,  $\text{SC}(\text{O})$ ,



$-C(=NR^N)$ ,  $C(=NR^N)N(R^N)$ ,  $NR^N C(=NR^N)$ ,  $NR^N C(=NR^N)N(R^N)$ ,  $C(S)$ ,  $C(S)N(R^N)$ ,  $NR^N C(S)$ ,  $NR^N C(S)N(R^N)$ ,  $S(O)$ ,  $OS(O)$ ,  $S(O)O$ ,  $OS(O)O$ ,  $OS(O)_2$ ,  $S(O)_2O$ ,  $OS(O)_2O$ ,  $N(R^N)S(O)$ ,  $-S(O)N(R^N)$ ,  $N(R^N)S(O)N(R^N)$ ,  $OS(O)N(R^N)$ ,  $N(R^N)S(O)O$ ,  $S(O)_2$ ,  $N(R^N)S(O)_2$ ,  $S(O)_2N(R^N)$ ,  $N(R^N)S(O)_2N(R^N)$ ,  $OS(O)_2N(R^N)$  또는  $N(R^N)S(O)_2O$ 로 독립적으로 대체되며;

[1346]  $R^N$ 의 각각의 예는 독립적으로 수소, 선택적으로 치환된 알킬 또는 질소 보호기이고;

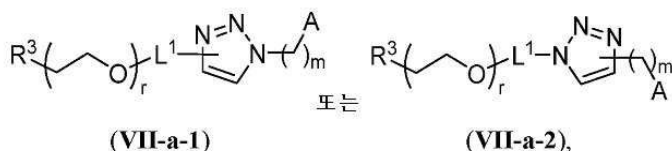
[1347] 고리 B는 선택적으로 치환된 카보사이클릴, 선택적으로 치환된 헤테로사이클릴, 선택적으로 치환된 아릴, 또는 선택적으로 치환된 헤테로아릴이며; 그리고

[1348] p는 1 또는 2이다.

[1349] 소정의 실시형태에서, 화학식 (VII)의 화합물은 PEG-OH 지질이다(즉,  $R^3$ 은  $-OR^0$ 이고, 그리고  $R^0$ 는 수소임). 소정의 실시형태에서, 화학식 (VII)의 화합물은 하기 화학식(VII-OH) 또는 이의 염을 갖는다:

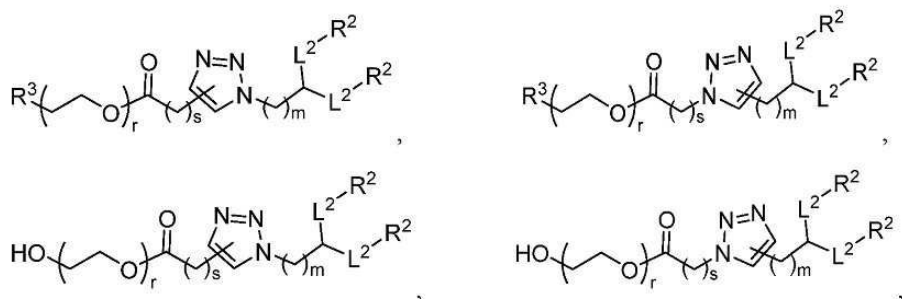


[1351] 소정의 실시형태에서, D는 클릭 화학(예를 들어, 트라이아졸)에 의해 얻어진 모이어티이다. 소정의 실시형태에서, 화학식 (VII)의 화합물은 하기 화학식(VII-a-1) 또는 (VII-a-2) 또는 이의 염을 갖는다:



[1352]

[1353] 소정의 실시형태에서, 화학식 (VII)의 화합물은 다음의 화학식 중 하나를 갖는다:

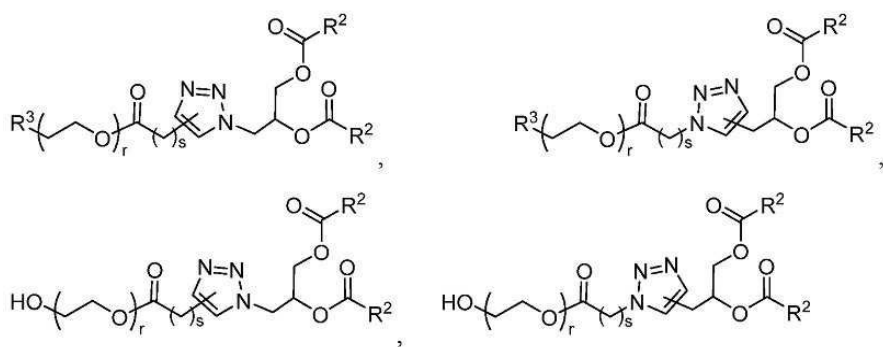


[1354]

[1355] 식 중,

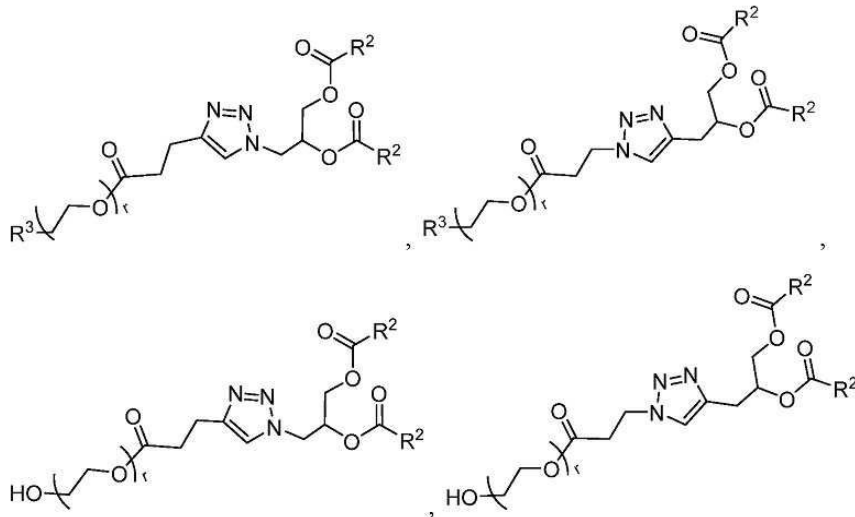
[1356] s는 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10이다.

[1357] 소정의 실시형태에서, 화학식 (VII)의 화합물은 다음의 화학식 중 하나 또는 이의 염을 갖는다:



[1358]

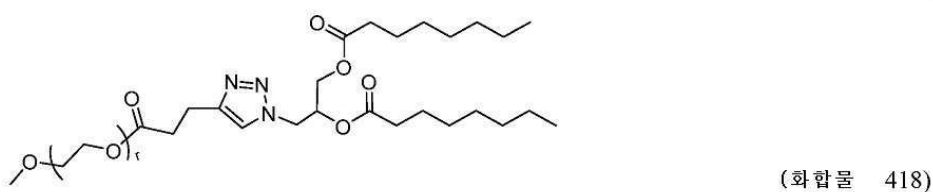
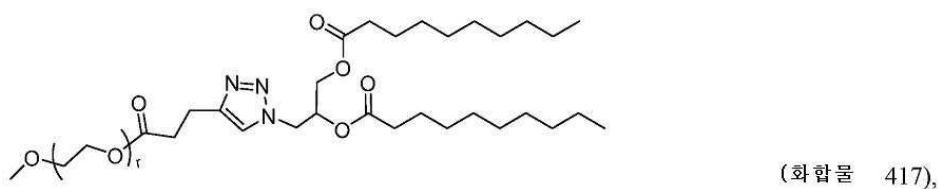
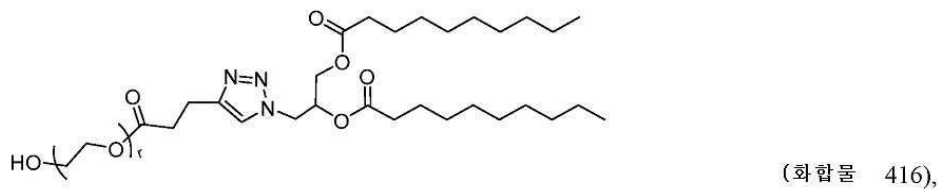
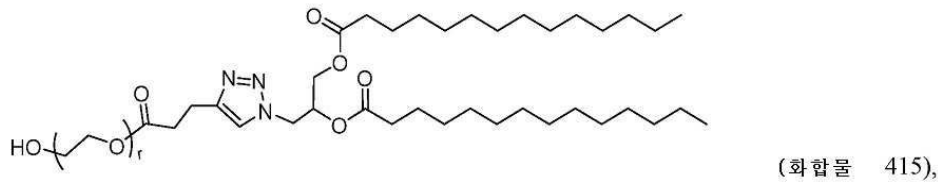
[1359] 소정의 실시형태에서, 화학식 (VII)의 화합물은 다음의 화학식 중 하나 또는 이의 염을 갖는다:



[1360]

[1361]

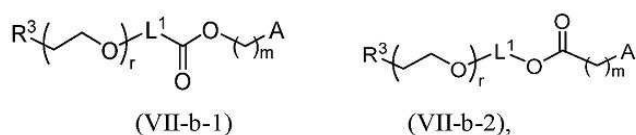
소정의 실시형태에서, 화학식 (VII)의 화합물은 다음의 화학식 중 하나 또는 이의 염을 갖는다:



[1362]

[1363]

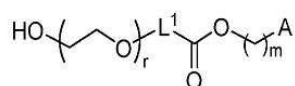
소정의 실시형태에서, D는 생리적 조건(예를 들어, 에스터, 아마이드, 카보네이트, 카바메이트, 유레아) 하에서 절단 가능한 모이어티이다. 소정의 실시형태에서, 화학식 (VII)의 화합물은 하기 화학식(VII-b-1) 또는 (VII-b-2) 또는 이의 염을 갖는다:



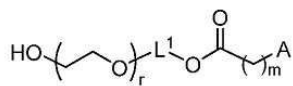
[1364]

[1365]

소정의 실시형태에서, 화학식 (VII)의 화합물은 하기 화학식(VII-b-1-OH) 또는 (VII-b-2-OH) 또는 이의 염을 갖는다:



(VII-b-1-OH)

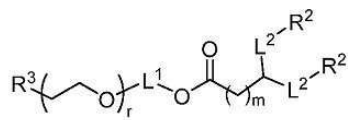
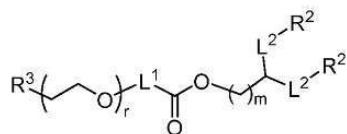


(VII-b-2-OH)

[1366]

[1367]

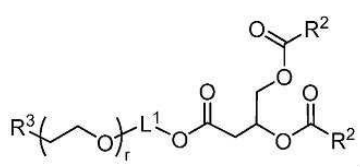
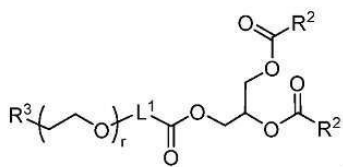
소정의 실시형태에서, 화학식 (VII)의 화합물은 다음의 화학식 중 하나 또는 이의 염이다:



[1368]

[1369]

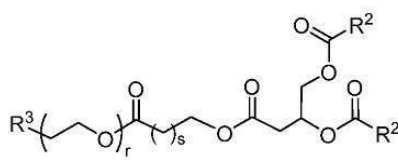
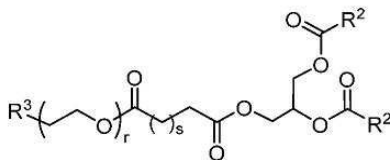
소정의 실시형태에서, 화학식 (VII)의 화합물은 다음의 화학식 중 하나 또는 이의 염이다:



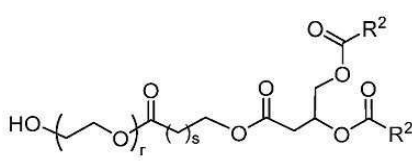
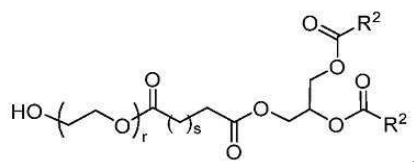
[1370]

[1371]

소정의 실시형태에서, 화학식 (VII)의 화합물은 다음의 화학식 중 하나 또는 이의 염이다:



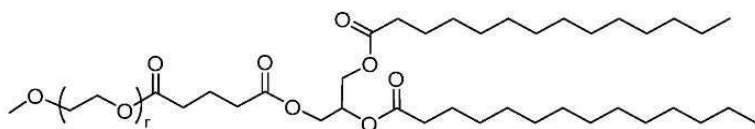
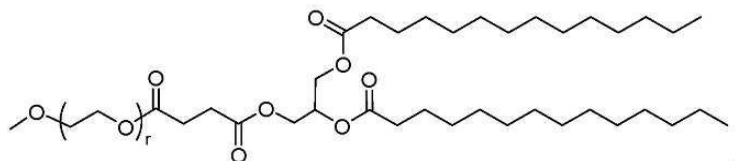
[1372]



[1373]

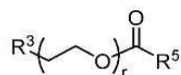
[1374]

소정의 실시형태에서, 화학식 (VII)의 화합물은 다음의 화학식 중 하나 또는 이의 염이다:



[1375]

[1376] 소정의 실시형태에서, 본 발명에서 유용한 PEG 지질은 폐길화된 지방산이다. 소정의 실시형태에서, 본 발명에서 유용한 PEG 지질은 화학식 (VIII)의 화합물이다. 본 명세서에서 화학식 (VIII)의 화합물 또는 이의 염이 제공된다:



(VIII)

[1377] 식 중,

[1379]  $\text{R}^3$ 은  $-\text{OR}^0$ 이고;

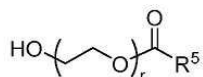
[1380]  $\text{R}^0$ 는 수소, 선택적으로 치환된 알킬 또는 산소 보호기이며;

[1381]  $r$ 은 1 내지 100의 정수(1과 100을 포함)이고;

[1382]  $\text{R}^5$ 는 선택적으로 치환된  $\text{C}_{10-40}$  알킬, 선택적으로 치환된  $\text{C}_{10-40}$  알켄일, 또는 선택적으로 치환된  $\text{C}_{10-40}$  알킨일이며; 그리고 선택적으로  $\text{R}^5$  중 하나 이상의 메틸렌기는 선택적으로 치환된 카보사이클릴렌, 선택적으로 치환된 헤테로사이클릴렌, 선택적으로 치환된 아릴렌, 선택적으로 치환된 헤테로아릴렌,  $\text{N}(\text{R}^N)$ , O, S,  $\text{C}(\text{O})$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^N)$ ,  $\text{NR}^N\text{C}(\text{O})$ ,  $\text{NR}^N\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^N)-$ ,  $\text{C}(\text{O})\text{O}$ ,  $\text{OC}(\text{O})$ ,  $\text{OC}(\text{O})\text{O}$ ,  $\text{OC}(\text{O})\text{N}(\text{R}^N)$ ,  $-\text{NR}^N\text{C}(\text{O})\text{O}$ ,  $\text{C}(\text{O})\text{S}$ ,  $\text{SC}(\text{O})$ ,  $\text{C}(=\text{NR}^N)$ ,  $\text{C}(=\text{NR}^N)\text{N}(\text{R}^N)$ ,  $\text{NR}^N\text{C}(=\text{NR}^N)$ ,  $\text{NR}^N\text{C}(=\text{NR}^N)\text{N}(\text{R}^N)$ ,  $-\text{C}(\text{S})$ ,  $\text{C}(\text{S})\text{N}(\text{R}^N)$ ,  $\text{NR}^N\text{C}(\text{S})$ ,  $\text{NR}^N\text{C}(\text{S})\text{N}(\text{R}^N)$ ,  $\text{S}(\text{O})$ ,  $\text{OS}(\text{O})$ ,  $\text{S}(\text{O})\text{O}$ ,  $\text{OS}(\text{O})\text{O}$ ,  $\text{OS}(\text{O})_2$ ,  $-\text{S}(\text{O})_2\text{O}$ ,  $\text{OS}(\text{O})_2\text{O}$ ,  $\text{N}(\text{R}^N)\text{S}(\text{O})$ ,  $\text{S}(\text{O})\text{N}(\text{R}^N)$ ,  $\text{N}(\text{R}^N)\text{S}(\text{O})\text{N}(\text{R}^N)$ ,  $\text{OS}(\text{O})\text{N}(\text{R}^N)$ ,  $\text{N}(\text{R}^N)\text{S}(\text{O})\text{O}$ ,  $-\text{S}(\text{O})_2$ ,  $\text{N}(\text{R}^N)\text{S}(\text{O})_2$ ,  $\text{S}(\text{O})_2\text{N}(\text{R}^N)$ ,  $\text{N}(\text{R}^N)\text{S}(\text{O})_2\text{N}(\text{R}^N)$ ,  $\text{OS}(\text{O})_2\text{N}(\text{R}^N)$  또는  $\text{N}(\text{R}^N)\text{S}(\text{O})_2\text{O}$ 로 대체되고; 그리고

[1383]  $\text{R}^N$ 의 각각의 예는 독립적으로 수소, 선택적으로 치환된 알킬, 또는 질소 보호기이다.

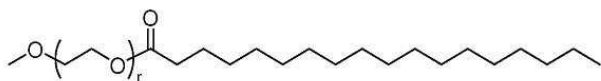
[1384] 소정의 실시형태에서, 화학식 (VIII)의 화합물은 하기 화학식(VIII-OH) 또는 이의 염을 갖는다:



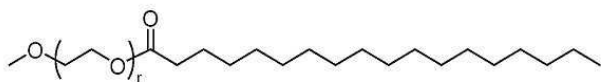
(VIII-OH)

[1386] 일부 실시형태에서,  $r$ 은 45이다. 다른 실시형태에서  $r$ 은 1이다.

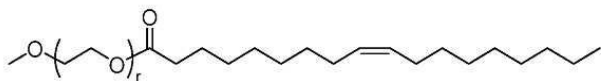
[1387] 소정의 실시형태에서, 화학식 (VIII)의 화합물은 다음의 화학식 중 하나 또는 이의 염을 갖는다:



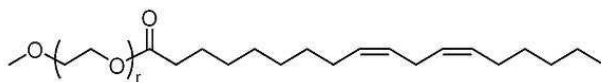
(화합물 419),



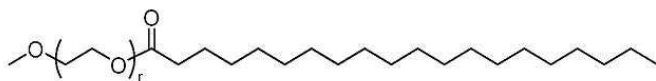
(화합물 420),



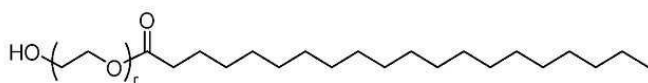
(화합물 421),



(화합물 422),



(화합물 423),



(화합물 424),



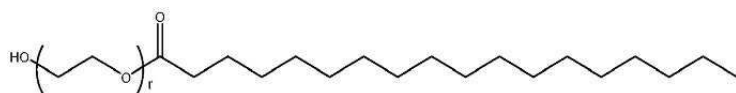
(화합물 425),



(화합물 426)

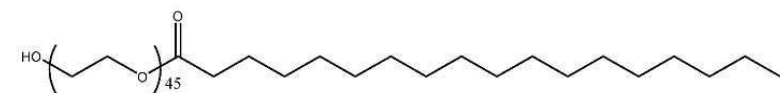
. 일부 실시형태에서, r은 45이다.

또 다른 실시형태에서, 화학식 (VIII)의 화합물은 하기 화학식 또는 이의 염이다:



(화합물 427)

일 실시형태에서, 화학식 (VIII)의 화합물은



(화합물 428)이다.

일 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 약제학적 조성물의 지질 조성물 중의 PEG-지질의 양은 약 0.1mol% 내지 약 5mol%, 약 0.5mol% 내지 약 5mol%, 약 1mol% 내지 약 5mol%, 약 1.5mol% 내지 약 5mol%, 약 2mol% 내지 약 5mol%, 약 0.1mol% 내지 약 4mol%, 약 0.5mol% 내지 약 4mol%, 약 1mol% 내지 약 4mol%, 약 1.5mol% 내지 약 4mol%, 약 2mol% 내지 약 4mol%, 약 0.1mol% 내지 약 3mol%, 약 0.5mol% 내지 약 3mol%, 약 1mol% 내지 약 3mol%, 약 1.5mol% 내지 약 3mol%, 약 2mol% 내지 약 3mol%, 약 0.1mol% 내지 약 2mol%, 약 0.5mol% 내지 약 2mol%, 약 1mol% 내지 약 2mol%, 약 1.5mol% 내지 약 2mol%, 약 0.1mol% 내지 약 1.5mol%, 약 0.5mol% 내지 약 1.5mol%, 또는 약 1mol% 내지 약 1.5mol%의 범위이다.

일 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 지질 조성물 중의 PEG-지질의 양은 약 2mol%이다. 일 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 지질 조성물 중의 PEG-지질의 양은 약 1.5mol%이다.

일 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 지질 조성물 중의 PEG-지질의 양은 적어도 약 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 4, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9 또는 5mol%이다.

일부 양상에서, 본 명세서에 개시된 약제학적 조성물의 지질 조성물은 PEG-지질을 포함하지 않는다.

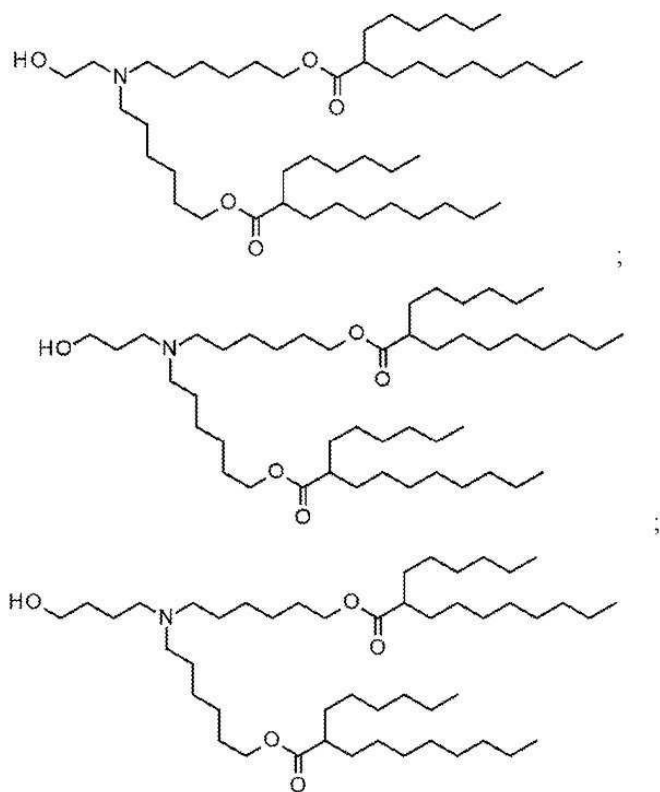
다른 이온화 가능한 아미노 지질



[1398] 본 명세서에 개시된 약제학적 조성물의 지질 조성물은 화학식 (I), (II), (III), (IV), (V) 또는 (VI)에 따라 지질에 추가로 또는 대신에 하나 이상의 이온화 가능한 아미노 지질을 포함할 수 있다.

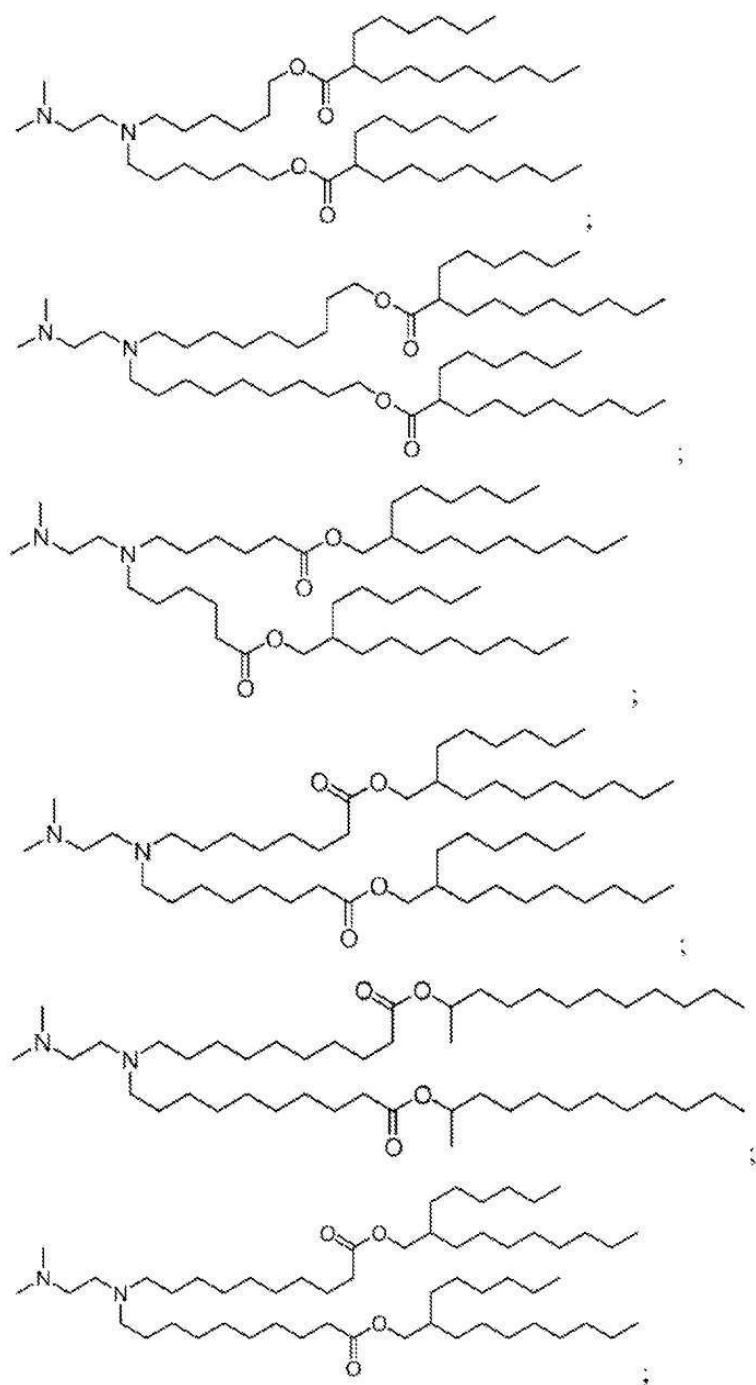
[1399] 이온화 가능한 지질은 3-(다이도데실아미노)-N1,N1,4-트라이도데실-1-피페라진에탄아민(KL10), N1-[2-(다이도데실아미노)에틸]-N1,N4,N4-트라이도데실-1,4-피페라진다이에탄아민(KL22), 14,25-다이트라이도데실-15,18,21,24-테트라아자-옥타트라이아콘탄(KL25), 1,2-다이리놀레일옥시-N,N-다이메틸아미노프로판(DLin-DMA), 2,2-다이리놀레일-4-다이메틸아미노메틸-[1,3]-다이옥솔란(DLin-K-DMA), 헵타트라이아콘타-6,9,28,31-테트라엔-19-일 4-(다이메틸아미노)부타노에이트(DLin-MC3-DMA), 2,2-다이리놀레일-4-(2-다이메틸아미노에틸)-[1,3]-다이옥솔란(DLin-KC2-DMA), 1,2-다이올레일옥시-N,N-다이메틸아미노프로판(DODMA), (13Z,165Z)-N,N-다이메틸-3-노니도코사-13-16-다이엔-1-아민(L608), 2-({8-[(3β)-콜레스트-5-엔-3-일옥시]옥틸}옥시)-N,N-다이메틸-3-[(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-다이엔-1-일옥시]프로판-1-아민(옥틸-CLinDMA), (2R)-2-({8-[(3β)-콜레스트-5-엔-3-일옥시]옥틸}옥시)-N,N-다이메틸-3-[(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-다이엔-1-일옥시]프로판-1-아민(옥틸-CLinDMA (2R)) 및 (2S)-2-({8-[(3β)-콜레스트-5-엔-3-일옥시]옥틸}옥시)-N,N-다이메틸-3-[(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-다이엔-1-일옥시]프로판-1-아민(옥틸-CLinDMA (2S))으로 이루어진 비제한적 군으로부터 선택될 수 있다. 이들에 추가로, 이온화 가능한 아미노 지질은 또한 환식 아민기를 포함하는 지질일 수 있다.

[1400] 이온화 가능한 지질은 또한 본 명세서에서 전문이 참고로 편입된 국제 특허 출원 공개 WO 2017/075531 A1에 개시된 화합물일 수 있다. 예를 들어, 이온화 가능한 아미노 지질은 하기 화합물 및 이들의 임의의 조합을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다:

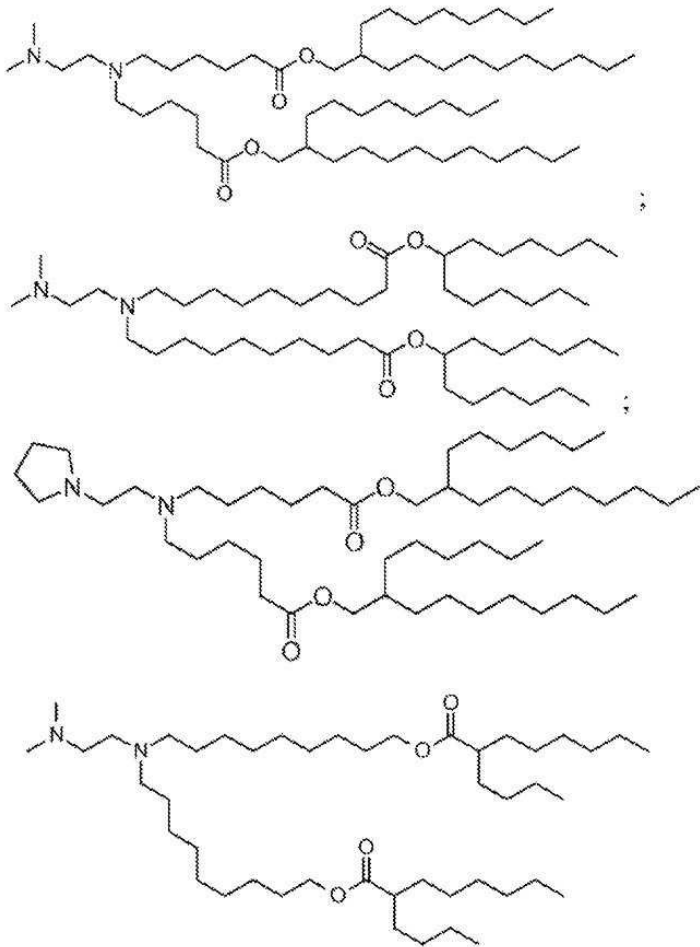


[1401]

[1402] 이온화 가능한 지질은 또한 본 명세서에 전문이 참고로 편입된 국제 특허 출원 공개 WO 2015/199952 A1에 개시된 화합물일 수 있다. 예를 들어, 이온화 가능한 아미노 지질은 하기 화합물 및 이들의 임의의 조합을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다:



[1403]



[1404]

[1405] 나노입자 조성물

[1406] 본 명세서에 개시된 약제학적 조성물의 지질 조성물은 상기 기재한 것에 추가로 하나 이상의 성분을 포함할 수 있다. 예를 들어, 지질 조성물은 하나 이상의 침투성 향상제 분자, 탄수화물, 중합체, 표면 개질제(예를 들어, 계면활성제) 또는 다른 성분을 포함할 수 있다. 예를 들어, 침투성 향상제 분자는 미국 특허 출원 공개 제 2005/0222064호에 의해 기재된 분자일 수 있다. 탄수화물은 단순당(예를 들어, 글루코스) 및 다당류(예를 들어, 글리코겐 및 이의 유도체 및 유사체)를 포함할 수 있다.

[1407] 중합체는 본 명세서에 개시된 약제학적 조성물(예를 들어, 지질 나노입자 형태의 약제학적 조성물)을 캡슐화하거나 또는 부분적으로 캡슐화하기 위해 포함되고/되거나 사용될 수 있다. 중합체는 생분해성 및/또는 생체적합성일 수 있다. 중합체는 중합체, 폴리에터, 폴리아마이드, 폴리에스터, 폴리카바메이트, 폴리우레아, 폴리카보네이트, 폴리스타이렌, 폴리이미드, 폴리설폰, 폴리우레탄, 폴리아세틸렌, 폴리에틸렌, 폴리에틸렌이민, 폴리이소사이아네이트, 폴리아크릴레이트, 폴리메타크릴레이트, 폴리아크릴로나이트릴 및 폴리아크릴레이트로부터 선택되지만, 이들로 제한되지 않는다.

[1408] 지질 조성물과 폴리뉴클레오타이드 사이의 비는 약 10:1 내지 약 60:1 (wt/wt)일 수 있다.

[1409] 일부 실시형태에서, 지질 조성물과 폴리뉴클레오타이드 사이의 비는 약 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, 15:1, 16:1, 17:1, 18:1, 19:1, 20:1, 21:1, 22:1, 23:1, 24:1, 25:1, 26:1, 27:1, 28:1, 29:1, 30:1, 31:1, 32:1, 33:1, 34:1, 35:1, 36:1, 37:1, 38:1, 39:1, 40:1, 41:1, 42:1, 43:1, 44:1, 45:1, 46:1, 47:1, 48:1, 49:1, 50:1, 51:1, 52:1, 53:1, 54:1, 55:1, 56:1, 57:1, 58:1, 59:1 또는 60:1 (wt/wt)일 수 있다. 일부 실시형태에서, 지질 조성물 대 치료제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 wt/wt 비는 약 20:1 또는 약 15:1이다.

[1410] 일 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 지질 나노입자는 5:1, 10:1, 15:1, 20:1, 25:1, 30:1, 35:1, 40:1, 45:1, 50:1, 55:1, 60:1 또는 70:1의 지질:폴리뉴클레오타이드 중량비 또는 5:1 내지 약 10:1, 약 5:1 내지 약 15:1, 약 5:1 내지 약 20:1, 약 5:1 내지 약 25:1, 약 5:1 내지 약 30:1, 약 5:1 내지 약 35:1, 약 5:1 내지 약 40:1, 약 5:1 내지 약 45:1, 약 5:1 내지 약 50:1, 약 5:1 내지 약 55:1, 약 5:1 내지 약 60:1, 약 5:1 내지

지 약 70:1, 약 10:1 내지 약 15:1, 약 10:1 내지 약 20:1, 약 10:1 내지 약 25:1, 약 10:1 내지 약 30:1, 약 10:1 내지 약 35:1, 약 10:1 내지 약 40:1, 약 10:1 내지 약 45:1, 약 10:1 내지 약 50:1, 약 10:1 내지 약 55:1, 약 10:1 내지 약 60:1, 약 10:1 내지 약 70:1, 약 15:1 내지 약 20:1, 약 15:1 내지 약 25:1, 약 15:1 내지 약 30:1, 약 15:1 내지 약 35:1, 약 15:1 내지 약 40:1, 약 15:1 내지 약 45:1, 약 15:1 내지 약 50:1, 약 15:1 내지 약 55:1, 약 15:1 내지 약 60:1 또는 약 15:1 내지 약 70:1와 같지만, 이들로 제한되지 않는 이들의 임의의 비로 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, mRNA)를 포함할 수 있다.

- [1411] 일 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 지질 나노입자는 대략 0.1mg/ml 내지 2mg/ml, 예컨대 이하로 제한되는 것은 아니지만, 0.1mg/ml, 0.2mg/ml, 0.3mg/ml, 0.4mg/ml, 0.5mg/ml, 0.6mg/ml, 0.7mg/ml, 0.8mg/ml, 0.9mg/ml, 1.0mg/ml, 1.1mg/ml, 1.2mg/ml, 1.3mg/ml, 1.4mg/ml, 1.5mg/ml, 1.6mg/ml, 1.7mg/ml, 1.8mg/ml, 1.9mg/ml, 2.0mg/ml 또는 2.0mg/ml 초과 농도로 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.
- [1412] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 약제학적 조성물은 지질 나노입자(LNP)로서 제형화된다. 따라서, 본 개시내용은 또한 (i) 전달제, 예컨대 본 명세서에 기재된 바와 같은 화학식 (I) 또는 (III)의 화합물을 포함하는 지질 조성물, 및 (ii) 하나 이상의 암 에피토프 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 나노입자 조성물을 제공한다. 이러한 나노입자 조성물에서, 본 명세서에 개시된 지질 조성물은 하나 이상의 암 에피토프 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 캡슐화할 수 있다.
- [1413] 나노입자 조성물은 전형적으로 마이크로미터 또는 더 적은 규모로 크기가 정해지고, 지질 이중층을 포함할 수 있다. 나노입자 조성물은 지질 나노입자(LNP), 리포솜(예를 들어, 지질 소수포) 및 리포플렉스를 포함한다. 예를 들어, 나노입자 조성물은 직경이 500nm 이하인 지질 이중층을 갖는 리포솜일 수 있다.
- [1414] 나노입자 조성물은, 예를 들어, 지질 나노입자(LNP), 리포솜 및 리포플렉스를 포함한다. 일부 실시형태에서, 나노입자 조성물은 하나 이상의 지질 이중층을 포함하는 소수포이다. 소정의 실시형태에서, 나노입자 조성물은 수성 구획에 의해 분리된 2개 이상의 구심성 이중층을 포함한다. 지질 이중층은 작용기화되고/되거나 서로 가교결합될 수 있다. 지질 이중층은 하나 이상의 리간드, 단백질 또는 통로를 포함할 수 있다.
- [1415] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 나노입자 조성물은 화학식 (I), (III), (IV), (V) 또는 (VI)에 따라 적어도 하나의 화합물을 포함한다. 예를 들어, 나노입자 조성물은 화합물 1 내지 147 중 하나 이상, 또는 화합물 1 내지 342 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 나노입자 조성물은 또한 다양한 다른 성분을 포함할 수 있다. 예를 들어, 나노입자 조성물은 화학식 (I), (II), (III), (IV), (V) 또는 (VI)에 따른 지질, 예컨대 (i) 적어도 하나의 인지질, (ii) 적어도 하나의 구조적 지질, (iii) 적어도 하나의 PEG-지질, 또는 (iv) 이들의 임의의 조합에 추가로 하나 이상의 지질을 포함할 수 있다. 구조적 지질의 포함은, 예를 들어, 화학식 III에 따른 지질이 본 발명의 지질 나노입자 조성물에서 사용될 때, 선택적일 수 있다.
- [1416] 일부 실시형태에서, 나노입자 조성물은 화학식 (I)의 화합물(예를 들어, 화합물 18, 25, 26 또는 48)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 나노입자 조성물은 화학식 (I)의 화합물(예를 들어, 화합물 18, 25, 26 또는 48) 및 인지질(예를 들어, DSPC)을 포함한다.
- [1417] 일부 실시형태에서, 나노입자 조성물은 화학식 (III)의 화합물(예를 들어, 화합물 236)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 나노입자 조성물은 화학식 (III)의 화합물(예를 들어, 화합물 236) 및 인지질(예를 들어, DOPE 또는 DSPC)을 포함한다.
- [1418] 일부 실시형태에서, 나노입자 조성물은 화학식 (I)의 화합물(예를 들어, 화합물 18, 25, 26 또는 48)로 이루어지거나 또는 본질적으로 이루어진 지질 조성물을 포함한다. 일부 실시형태에서, 나노입자 조성물은 화학식 (I)의 화합물(예를 들어, 화합물 18, 25, 26 또는 48) 및 인지질(예를 들어, DSPC)로 이루어지거나 또는 본질적으로 이루어진 지질 조성물을 포함한다.
- [1419] 일부 실시형태에서, 나노입자 조성물은 화학식 (III)의 화합물(예를 들어, 화합물 236)로 이루어지거나 또는 본질적으로 이루어진 지질 조성물을 포함한다. 일부 실시형태에서, 나노입자 조성물은 화학식 (III)의 화합물(예를 들어, 화합물 236) 및 인지질(예를 들어, DOPE 또는 DSPC)로 이루어지거나 또는 본질적으로 이루어진 지질 조성물을 포함한다.
- [1420] 일 실시형태에서, 지질 나노입자는 이온화 가능한 지질, 구조적 지질, 인지질 및 mRNA를 포함한다. 일부 실시형태에서, LNP는 이온화 가능한 지질, PEG-변형 지질, 인지질 및 구조적 지질을 포함한다. 일부 실시형태에서, LNP는 약 20 내지 60% 이온화 가능한 지질: 약 5 내지 25% 인지질: 약 25 내지 55% 구조적 지질; 및 약 0.5 내지 15% PEG-변형 지질의 물비를 가진다. 일부 실시형태에서, LNP는 약 50% 이온화 가능한 지질, 약 1.5% PEG-변

형 지질, 약 38.5% 구조적 지질 및 약 10% 인지질의 물비를 포함한다. 일부 실시형태에서, LNP는 약 55% 이온화 가능한 지질, 약 2.5% PEG 지질, 약 32.5% 구조적 지질 및 약 10% 인지질의 물비를 포함한다. 일부 실시형태에서, 이온화 가능한 지질은 이온화 가능한 아미노 지질이고, 인지질은 중성 지질이며, 구조적 지질은 콜레스테롤이다. 일부 실시형태에서, LNP는 이온화 가능한 지질:콜레스테롤:DSPC:PEG 지질의 물비가 50:38.5:10:1.5이다. 일부 실시형태에서, 이온화 가능한 지질은 화합물 18 또는 화합물 236이고, PEG 지질은 화합물 428이다.

[1421] 일부 실시형태에서, LNP는 화합물 18:콜레스테롤:인지질:화합물 428의 물비가 50:38.5:10:1.5이다. 일부 실시형태에서, LNP는 화합물 18:콜레스테롤:DSPC:화합물 428의 물비가 50:38.5:10:1.5이다.

[1422] 일부 실시형태에서, LNP는 화합물 236:콜레스테롤:인지질:화합물 428의 물비가 50:38.5:10:1.5이다. 일부 실시형태에서, LNP는 화합물 236:콜레스테롤:DSPC:화합물 428의 물비가 50:38.5:10:1.5이다.

[1423] 일부 실시형태에서, LNP는 다분산도 값이 0.4 미만이다. 일부 실시형태에서, LNP는 중성 pH에서 순 중성 전하를 가진다. 일부 실시형태에서, LNP는 평균 직경이 50 내지 150nm이다. 일부 실시형태에서, LNP는 평균 직경이 80 내지 100nm이다.

[1424] 본 명세서에 일반적으로 정의되는 바와 같이, 용어 "지질"은 소수성 또는 양친매성 특성을 갖는 작은 분자를 지칭한다. 지질은 천연 유래 또는 합성일 수 있다. 지질 부류의 예는 지방, 왁스, 스테롤-함유 대사물질, 비타민, 지방산, 글리세롤지질, 글리세로인지질, 스펅고지질, 당지질 및 폴리케타이드 및 프레놀 지질을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 일부 예에서, 일부 지질의 양친매성 특성은 그들이 수성 매질에서 리포솜, 소수포 또는 막을 형성하도록 야기한다.

[1425] 일부 실시형태에서, 지질 나노입자(LNP)는 이온화 가능한 지질을 포함할 수 있다. 본 명세서에 사용되는 바와 같은, 용어 "이온화 가능한 지질"은 당업계에서 그의 보통의 의미를 가지며, 하나 이상의 하전된 모이어티를 포함하는 지질을 지칭할 수 있다. 일부 실시형태에서, 이온화 가능한 지질은 양으로 하전되거나 또는 음으로 하전될 수 있다. 이온화 가능한 지질은 양으로 하전될 수 있으며, 이 경우에 "양이온성 지질"로서 지칭될 수 있다. 소정의 실시형태에서, 이온화 가능한 지질 분자는 아민기를 포함할 수 있고, 이온화 가능한 아미노 지질로서 지칭될 수 있다. 본 명세서에 사용되는 바와 같은, "하전된 모이어티"는 형식 전하, 예를 들어, 1가(+1 또는 -1), 2가(+2 또는 -2), 3가(+3 또는 -3) 등을 운반하는 화학적 모이어티이다. 하전된 모이어티는 양이온성(즉, 음으로 하전) 또는 양이온성(즉, 양으로 하전)일 수 있다. 양으로 하전된 모이어티의 예는 아민기(예를 들어, 1차, 2차 및/또는 3차 아민), 암모늄기, 피리디늄기, 구아니딘기 및 이미디졸륨기를 포함한다. 특정 실시형태에서, 하전된 모이어티는 아민기를 포함한다. 음으로 하전된 기 또는 이의 전구체의 예는 카복실레이트기, 설포네이트기, 설페이트기, 포스포네이트기, 포스페이트기, 하이드록실기 등을 포함한다. 하전된 모이어티의 전하는, 일부 경우에, 환경적 조건에 따라 다를 수 있고, 예를 들어, pH의 변화는 모이어티의 전하를 변경시킬 수 있고/있거나 모이어티가 하전 또는 비하전되도록 야기할 수 있다. 일반적으로, 분자의 전하 밀도는 원하는 대로 선택될 수 있다.

[1426] 용어 "하전된" 또는 "하전된 모이어티"는 분자 상에서 "부분적인 음전하" 또는 "부분적인 양전하"를 지칭하지 않는다는 것이 이해되어야 한다. 용어 "부분적 음전하" 및 "부분적 양전하"는 당업계의 보통의 의미로 주어진다. "부분적 음전하"는 전자 밀도가 결합의 하나의 원자쪽으로 당겨지도록 작용기가 극성화되어, 원자 상에서 부분적 음전하를 생성하는 결합을 포함할 때 야기된다. 당업자는 일반적으로 이런 방법으로 극성화될 수 있는 결합을 인식할 것이다.

[1427] 일부 실시형태에서, 이온화 가능한 지질은 때때로 "이온화 가능한 양이온성 지질"로서 당업계에서 지칭되는 이온화 가능한 아미노 지질이다. 일 실시형태에서, 이온화 가능한 아미노 지질은 링커 구조를 통해 연결되는 양으로 하전된 친수성 헤드 및 소수성 꼬리를 가질 수 있다.

[1428] 이들에 추가로, 이온화 가능한 지질은 또한 환식 아민기를 포함하는 지질일 수 있다.

[1429] 일 실시형태에서, 이온화 가능한 지질은 국제 특허 출원 W02013086354 및 W02013116126에 기재된 이온화 가능한 지질로부터 선택될 수 있지만, 이것으로 제한되지 않으며, 이들 각각의 내용은 그들의 전문이 본 명세서에 참고로 편입된다.

[1430] 또 다른 실시형태에서, 이온화 가능한 지질은 미국 특허 제7,404,969호의 화학식 CLI-CLXXXII로부터 선택될 수 있지만, 이것으로 제한되지 않으며; 이들 각각은 본 명세서에 그들의 전문이 참고로 편입된다.

[1431] 일 실시형태에서, 지질은 절단 가능한 지질, 예컨대 본 명세서에 전문이 참고로 편입된 국제 특허 출원 공개



W02012/170889에 기재된 것일 수 있다. 일 실시형태에서, 지질은 당업계에 공지되고/되거나 국제 특허 출원 공개 W02013/086354에 기재된 바와 같은 방법에 의해 합성될 수 있으며, 이들 각각의 내용은 그들의 전문이 본 명세서에 참고로 편입된다.

- [1432] 나노입자 조성물은 다양한 방법에 의해 특성규명될 수 있다. 예를 들어, 현미경 관찰법(예를 들어, 투과 전자 현미경 또는 주사 전자 현미경)은 나노입자 조성물의 형태 및 크기 분포를 시험하기 위해 사용될 수 있다. 동적 광 산란 또는 전위차법(예를 들어, 전위차 적정)은 제타 전위를 측정하기 위해 사용될 수 있다. 동적 광 산란은 또한 입자 크기를 결정하기 위해 이용될 수 있다. 기기, 예컨대 제타시저 나노 ZS(Zetasizer Nano ZS)(영국 우스터셔 앨번에 소재한 앨번 인스트루먼츠 엘티디(Malvern Instruments Ltd))는 또한 나노입자 조성물, 예컨대 입자 크기, 다분산 지수 및 제타 전위의 다중 특징을 측정하기 위해 사용될 수 있다.
- [1433] 일부 실시형태에서, 나노입자 조성물은 화학식 (I)의 화합물(예를 들어, 화합물 18, 25, 26 또는 48)로 이루어지거나 또는 본질적으로 이루어진 지질 조성물을 포함한다. 일부 실시형태에서, 나노입자 조성물은 화학식 (I)의 화합물(예를 들어, 화합물 18, 25, 26 또는 48) 및 인지질(예를 들어, DSPC 또는 MSPC)로 이루어지거나 또는 본질적으로 이루어진 지질 조성물을 포함한다.
- [1434] 나노입자 조성물은 다양한 방법에 의해 특성규명될 수 있다. 예를 들어, 현미경 관찰법(예를 들어, 투과 전자 현미경 또는 주사 전자 현미경)은 나노입자 조성물의 형태 및 크기 분포를 시험하기 위해 사용될 수 있다. 동적 광 산란 또는 전위차법(예를 들어, 전위차 적정)은 제타 전위를 측정하기 위해 사용될 수 있다. 동적 광 산란은 또한 입자 크기를 결정하기 위해 이용될 수 있다. 기기, 예컨대 제타시저 나노 ZS(Zetasizer Nano ZS)(영국 우스터셔 앨번에 소재한 앨번 인스트루먼츠 엘티디(Malvern Instruments Ltd))는 또한 나노입자 조성물, 예컨대 입자 크기, 다분산 지수 및 제타 전위의 다중 특징을 측정하기 위해 사용될 수 있다.
- [1435] 나노입자의 크기는 생물학적 반응, 예컨대, 이하로 제한되는 것은 아니지만, 염증에 대응하도록 할 수 있거나, 또는 폴리뉴클레오타이드의 생물학적 효과를 증가시킬 수 있다.
- [1436] 본 명세서에 사용되는 바와 같은, 나노입자 조성물과 관련하여 "크기" 또는 "평균 크기"는 나노입자 조성물의 평균 직경을 지칭한다.
- [1437] 일 실시형태에서, 하나 이상의 암 에피토프 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 직경이, 약 10 내지 약 100nm, 예컨대 이하로 제한되는 것은 아니지만, 약 10 내지 약 20nm, 약 10 내지 약 30nm, 약 10 내지 약 40nm, 약 10 내지 약 50nm, 약 10 내지 약 60nm, 약 10 내지 약 70nm, 약 10 내지 약 80nm, 약 10 내지 약 90nm, 약 20 내지 약 30nm, 약 20 내지 약 40nm, 약 20 내지 약 50nm, 약 20 내지 약 60nm, 약 20 내지 약 70nm, 약 20 내지 약 80nm, 약 20 내지 약 90nm, 약 20 내지 약 100nm, 약 30 내지 약 40nm, 약 30 내지 약 50nm, 약 30 내지 약 60nm, 약 30 내지 약 70nm, 약 30 내지 약 80nm, 약 30 내지 약 90nm, 약 30 내지 약 100nm, 약 40 내지 약 50nm, 약 40 내지 약 60nm, 약 40 내지 약 70nm, 약 40 내지 약 80nm, 약 40 내지 약 90nm, 약 40 내지 약 100nm, 약 50 내지 약 60nm, 약 50 내지 약 70nm, 약 50 내지 약 80nm, 약 50 내지 약 90nm, 약 50 내지 약 100nm, 약 60 내지 약 70nm, 약 60 내지 약 80nm, 약 60 내지 약 90nm, 약 60 내지 약 100nm, 약 70 내지 약 80nm, 약 70 내지 약 90nm, 약 70 내지 약 100nm, 약 80 내지 약 90nm, 약 80 내지 약 100nm 및/또는 약 90 내지 약 100nm인 지질 나노입자에서 제형화된다.
- [1438] 일 실시형태에서, 나노입자는 직경이 약 10 내지 500nm이다. 일 실시형태에서, 나노입자는 직경이 100nm 초과, 150nm 초과, 200nm 초과, 250nm 초과, 300nm 초과, 350nm 초과, 400nm 초과, 450nm 초과, 500nm 초과, 550nm 초과, 600nm 초과, 650nm 초과, 700nm 초과, 750nm 초과, 800nm 초과, 850nm 초과, 900nm 초과, 950nm 초과 또는 1000nm 초과이다.
- [1439] 일부 실시형태에서, 나노입자 조성물의 가장 큰 치수는 1  $\mu\text{m}$ 이거나 또는 더 짧다(예를 들어, 1 $\mu\text{m}$ , 900nm, 800nm, 700nm, 600nm, 500nm, 400nm, 300nm, 200nm, 175nm, 150nm, 125nm, 100nm, 75nm, 50nm 또는 더 짧다).
- [1440] 나노입자 조성물은 상대적으로 균질할 수 있다. 다분산 지수는 나노입자 조성물의 균질도, 예를 들어, 나노입자 조성물의 입자 크기 분포를 나타내기 위해 사용될 수 있다. 작은(예를 들어, 0.3 미만) 다분산 지수는 일반적으로 좁은 입자 크기 분포를 나타낸다. 나노입자 조성물은 다분산 지수가 약 0 내지 약 0.25, 예컨대 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.10, 0.11, 0.12, 0.13, 0.14, 0.15, 0.16, 0.17, 0.18, 0.19, 0.20, 0.21, 0.22, 0.23, 0.24 또는 0.25일 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 나노입자 조성물의 다분산 지수는 약 0.10 내지 약 0.20일 수 있다.
- [1441] 나노입자 조성물의 제타 전위는 조성물의 동전기적 퍼텐셜을 나타내기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 제타

전위는 나노입자 조성물의 표면 전하를 기재할 수 있다. 양성 또는 음성의 상대적으로 낮은 전하를 갖는 나노입자 조성물이 일반적으로 바람직한데, 더 고도로 하전된 중은 신체에서 세포, 조직 및 다른 요소와 바람직하지 않게 상호작용할 수 있기 때문이다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 나노입자 조성물의 제타 전위는 약 -10mV 내지 약 +20mV, 약 -10mV 내지 약 +15mV, 약 10mV 내지 약 +10mV, 약 -10mV 내지 약 +5mV, 약 -10mV 내지 약 0mV, 약 -10mV 내지 약 -5mV, 약 -5mV 내지 약 +20mV, 약 -5mV 내지 약 +15mV, 약 -5mV 내지 약 +10mV, 약 -5mV 내지 약 +5mV, 약 -5mV 내지 약 0mV, 약 0mV 내지 약 +20mV, 약 0mV 내지 약 +15mV, 약 0mV 내지 약 +10mV, 약 0mV 내지 약 +5mV, 약 +5mV 내지 약 +20mV, 약 +5mV 내지 약 +15mV, 또는 약 +5mV 내지 약 +10mV일 수 있다.

[1442] 일부 실시형태에서, 지질 나노입자의 제타 전위는 약 0mV 내지 약 100mV, 약 0mV 내지 약 90mV, 약 0mV 내지 약 80mV, 약 0mV 내지 약 70mV, 약 0mV 내지 약 60mV, 약 0mV 내지 약 50mV, 약 0mV 내지 약 40mV, 약 0mV 내지 약 30mV, 약 0mV 내지 약 20mV, 약 0mV 내지 약 10mV, 약 10mV 내지 약 100mV, 약 10mV 내지 약 90mV, 약 10mV 내지 약 80mV, 약 10mV 내지 약 70mV, 약 10mV 내지 약 60mV, 약 10mV 내지 약 50mV, 약 10mV 내지 약 40mV, 약 10mV 내지 약 30mV, 약 10mV 내지 약 20mV, 약 20mV 내지 약 100mV, 약 20mV 내지 약 90mV, 약 20mV 내지 약 80mV, 약 20mV 내지 약 70mV, 약 20mV 내지 약 60mV, 약 20mV 내지 약 50mV, 약 20mV 내지 약 40mV, 약 20mV 내지 약 30mV, 약 30mV 내지 약 100mV, 약 30mV 내지 약 90mV, 약 30mV 내지 약 80mV, 약 30mV 내지 약 70mV, 약 30mV 내지 약 60mV, 약 30mV 내지 약 50mV, 약 30mV 내지 약 40mV, 약 40mV 내지 약 100mV, 약 40mV 내지 약 90mV, 약 40mV 내지 약 80mV, 약 40mV 내지 약 70mV, 약 40mV 내지 약 60mV, 및 약 40mV 내지 약 50 mV일 수 있다. 일부 실시형태에서, 지질 나노입자의 제타 전위는 약 10mV 내지 약 50mV, 약 15mV 내지 약 45mV, 약 20mV 내지 약 40mV 및 약 25mV 내지 약 35 mV일 수 있다. 일부 실시형태에서, 지질 나노입자의 제타 전위는 약 10mV, 약 20mV, 약 30mV, 약 40mV, 약 50mV, 약 60mV, 약 70mV, 약 80mV, 약 90mV, 및 약 100mV일 수 있다.

[1443] 용어 폴리뉴클레오타이드의 "캡슐화 효율"은 제공된 초기량에 비해 제조 후 나노입자 조성물에 의해 캡슐화되거나 또는 달리 관련된 폴리뉴클레오타이드의 양을 기재한다. 본 명세서에 사용되는 바와 같은, "캡슐화"는 완전한, 실질적인 또는 부분적 동봉, 가둠, 둘러쌈 또는 감쌈을 지칭할 수 있다.

[1444] 캡슐화 효율은 바람직하게는 높다(예를 들어, 약 100%). 캡슐화 효율은, 예를 들어, 나노입자 조성물을 분해하기 전에 그리고 후에 나노입자 조성물을 함유하는 용액에서 폴리뉴클레오타이드의 양을 1종 이상의 유기 용매 또는 세정제와 비교함으로써, 측정될 수 있다.

[1445] 형광은 용액 중의 유리 폴리뉴클레오타이드의 양을 측정하기 위해 사용될 수 있다. 본 명세서에 기재된 나노입자 조성물에 대해, 폴리뉴클레오타이드의 캡슐화 효율은 적어도 50%, 예를 들어 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%일 수 있다. 일부 실시형태에서, 캡슐화 효율은 적어도 80%일 수 있다. 소정의 실시형태에서, 캡슐화 효율은 적어도 90%일 수 있다.

[1446] 본 명세서에 개시된 약제학적 조성물 중에 존재하는 폴리뉴클레오타이드의 양은 다중 인자, 예컨대 폴리뉴클레오타이드의 크기, 목적하는 표적 및/또는 적용, 또는 나노입자 조성물의 다른 특성에 의존할 뿐만 아니라 폴리뉴클레오타이드의 특성에 의존할 수 있다.

[1447] 예를 들어, 나노입자 조성물에서 유용한 mRNA의 양은 mRNA의 크기(길이 또는 분자량으로서 표현), 서열 및 다른 특징에 의존할 수 있다. 나노입자 조성물 중의 폴리뉴클레오타이드의 상대적 양은 또한 다를 수 있다.

[1448] 본 개시내용의 지질 나노입자 조성물 중에 존재하는 지질 조성물 및 폴리뉴클레오타이드의 상대적 양은 효능 및 내약성에 따라 최적화될 수 있다. 폴리뉴클레오타이드로서 mRNA를 포함하는 조성물에 대해, N:P 비는 유용한 측정법으로서 작용할 수 있다.

[1449] 나노입자 조성물의 N:P 비가 발현과 내약성을 둘 다 제어하기 때문에, 낮은 N:P 비 및 강한 발현을 갖는 나노입자 조성물이 바람직하다. N:P 비는 나노입자 조성물에서 지질 대 RNA의 비에 따라 다르다.

[1450] 일반적으로, 더 낮은 N:P 비가 바람직하다. 하나 이상의 RNA, 지질 및 이의 양은 약 2:1 내지 약 30:1, 예컨대 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 12:1, 14:1, 16:1, 18:1, 20:1, 22:1, 24:1, 26:1, 28:1 또는 30:1의 N:P 비를 제공하도록 선택될 수 있다. 소정의 실시형태에서, N:P 비는 약 2:1 내지 약 8:1일 수 있다. 다른 실시형태에서, N:P 비는 약 5:1 내지 약 8:1이다. 소정의 실시형태에서, N:P 비는 5:1 내지 6:1이다. 하나의 구체적 양상에서, N:P 비는 약 5.67:1이다.

[1451] 나노입자 조성물을 제공하는 것에 추가로, 본 개시내용은 또한 폴리뉴클레오타이드를 캡슐화하는 단계를 포함하는 지질 나노입자의 생산 방법을 제공한다. 이러한 방법은 본 명세서에 개시된 임의의 약제학적 조성물을 이용

하는 것 및 당업계에 공지된 지질 나노입자의 생산 방법에 따라 지질 나노입자를 생산하는 것을 포함한다. 예를 들어, 문헌[Wang *et al.* (2015) "Delivery of oligonucleotides with lipid nanoparticles" Adv. Drug Deliv. Rev. 87:68-80; Silva *et al.* (2015) "Delivery Systems for Biopharmaceuticals. Part I: Nanoparticles and Microparticles" Curr. Pharm. Technol. 16: 940-954; Naseri *et al.* (2015) "Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers: Structure, Preparation and Application" Adv. Pharm. Bull. 5:305-13; Silva *et al.* (2015) "Lipid nanoparticles for the delivery of biopharmaceuticals" Curr. Pharm. Biotechnol. 16:291-302] 및 이들에 인용된 참고문헌 참조.

[1452] **키트 제형**

[1453] 이들 방법을 수행하기 위한 키트는 또한 본 발명의 다른 양상에서 제공된다. 키트는 지질 나노입자 제형을 수용하는 용기, 백신 제형을 수용하는 용기, 및 개인화된 mRNA 암 백신 제형을 생산하기 위해 백신 제형에 개인화된 mRNA 암 백신을 첨가하고, 대상체에게 투여 24 시간 내에 개인화된 mRNA 암 백신 제형을 지질 나노입자 제형과 혼합하기 위한 설명서를 포함한다. 일부 실시형태에서, 키트는 2 내지 100개의 암 항원을 암호화하는 오픈 리딩 프레임에 갖는 mRNA를 포함한다.

[1454] 물품은 하나 이상의 용기에서 본 발명의 약제학적 또는 진단적 등급 화합물을 포함한다. 물품은 본 발명의 화합물의 용도를 촉진하거나 또는 기재하는 설명서 또는 표지를 포함할 수 있다.

[1455] 본 명세서에 사용되는 바와 같은, "촉진된"은 암의 치료와 관련된 본 발명의 조성물과 관련된, 교육 방법, 병원 및 다른 의료기관 지침, 약제 판매를 포함하는 약제학적 산업 활동 및 임의의 광고 또는 임의의 형태의 글로 적힌, 경구 및 전자적 통신을 포함하는 다른 촉진 활동을 비롯한 모든 사업 방법을 포함한다.

[1456] "설명서"는 촉진의 구성성분을 정의하며, 전형적으로 본 발명의 조성물에 대한 또는 조성물의 포장과 관련된 기재된 설명서를 수반할 수 있다. 설명서는 또한 임의의 방식으로 제공된 임의의 경구 또는 전자적 설명서를 포함할 수 있다.

[1457] 따라서 본 명세서에 기재된 제제는, 일부 실시형태에서, 치료적, 진단적 또는 연구 적용분야에서 그들의 사용을 용이하게 하기 위해 약제학적 또는 진단적 또는 연구 키트에 조립될 수 있다. 키트는 본 발명의 성분 및 사용을 위한 설명서를 수용하는 하나 이상의 용기를 포함할 수 있다. 구체적으로, 이러한 키트는 의도된 적용분야 및 이들 제제의 적절한 투여를 기재하는 1종 이상의 제제를 포함할 수 있다. 소정의 실시형태에서, 키트의 제제는 특정 적용분야에 그리고 제제의 투여 방법에 적합한 약제학적 제형 및 투약량으로 있을 수 있다.

[1458] 키트는 의사에 의한 본 명세서에 기재된 방법의 사용을 용이하게 하도록 설계될 수 있고, 다수의 형태를 취할 수 있다. 적용 가능하다면, 키트의 조성물 각각은 액체 형태로(예를 들어, 용액으로) 또는 고체 형태(예를 들어, 건조 분말)로 제공될 수 있다. 소정의 경우에, 조성물의 일부는, 예를 들어, 키트와 함께 제공될 수도 있고 또는 제공되지 않을 수도 있는 적합한 용매 또는 다른 중(예를 들어, 물 또는 세포 배양물 배지)의 첨가에 의해 구성할 수 있거나 또는 다르게(예를 들어, 활성 형태로) 처리될 수 있다. 본 명세서에 사용되는 바와 같은, "설명서"는 설명서의 구성성분 및/또는 홍보를 정할 수 있으며, 전형적으로 본 발명의 포장에 또는 포장과 관련된 기재된 설명서를 수반한다. 설명서는 또한 사용자가 설명서가 키트, 예를 들어, 시정각(예를 들어, 비디오테이프, DVD 등), 인터넷 및/또는 웹 기반 통신 등과 관련된다는 것을 명확하게 인식하는 임의의 방식으로 임의의 경구 또는 전자적 설명서를 포함할 수 있다. 기재된 설명서는 제조, 약제학적 또는 생물학적 제품의 사용 또는 판매를 규제하는 정부 기관에 의해 처방되는 형태일 수 있으며, 이 설명서는 또한 인간 투여를 위한 제조 기관에 의한 승인, 사용 또는 판매를 반영할 수 있다.

[1459] 키트는 하나 이상의 용기에서 본 명세서에 기재된 성분 중 임의의 하나 이상을 함유할 수 있다. 예로서, 일 실시형태에서, 키트는 키트의 하나 이상의 구성요소를 혼합하는 것 및/또는 샘플을 분리 및 혼합하는 것 및 대상체에게 적용하는 것을 위한 설명서를 포함할 수 있다. 키트는 본 명세서에 기재된 제제를 수용하기 위한 용기를 포함할 수 있다. 제제는 멸균으로 제조되고, 주사기에 패키징되고 냉장 보관될 수 있다. 대안적으로 이는 바이알 또는 저장을 위한 다른 용기에 수용될 수 있다. 제2 용기는 멸균으로 제조된 다른 제제를 가질 수 있다. 대안적으로 키트는 사전 혼합되고, 주사기, 바이알, 관 또는 다른 용기에 담긴 활성제를 포함할 수 있다.

[1460] 키트는 파우치 내에서 혈렁하게 패키징된 부속물, 하나 이상의 관, 용기 박스 또는 백(bag)과 함께 다양한 형태, 예컨대 블리스터 파우치, 수축 포장 파우치, 진공 밀봉 파우치, 밀봉 가능한 열성형 트레이, 또는 유사한 파우치 또는 트레이 형태를 가질 수 있다. 키트는 부속물이 첨가된 후에 멸균될 수 있고, 이에 의해 용기 내 개개 부속물이 다르게 벗겨지게 한다. 임의의 적절한 멸균 기법, 예컨대 방사선 멸균, 열 멸균 또는 당업계에 공지된

다른 멸균 방법을 이용하여 멸균될 수 있다. 키트는 또한 특정 적용분야, 예를 들어, 용기, 세포 배지, 염, 완충제, 시약, 주사기, 바늘, 직물, 예컨대 게이지에 따라서 다른 성분, 예컨대 소독 작용제를 도포하거나 또는 제거하기 위한 거즈, 일회용 글로브, 투여 전에 제제에 대한 지지체 등을 포함할 수 있다.

[1461] 키트의 조성물은 임의의 적합한 형태로서, 예를 들어, 액체 용액으로서 또는 건주 분말로서 제공될 수 있다. 제공된 조성물이 건조 분말일 때, 분말은 또한 제공될 수 있는 적합한 용매의 첨가에 의해 재구성될 수 있다. 조성물의 액체 형태가 청해되는 실시형태에서, 액체 형태는 농축되거나 또는 바로 사용 가능할 수 있다. 용매는 화합물 및 사용 방식 또는 투여에 의존할 것이다. 약물 조성물에 대한 적합한 용매는 잘 공지되어 있으며, 문헌에서 이용 가능하다. 용매는 화합물 및 사용 또는 투여 방식에 의존할 것이다.

[1462] 실시형태의 하나의 세트에서 키트는 하나 이상의 용기 수단, 예컨대 바이알, 관 등에 가두어서 수용하도록 구획화된 운반체 수단을 포함할 수 있으며, 용기 수단의 각각은 본 방법에서 사용하기 위한 별개의 요소 중 하나를 포함한다. 예를 들어, 용기 중 하나는 검정을 위한 양성 대조군을 포함할 수 있다. 추가적으로, 키트는 다른 성분에 대한 용기, 예를 들어, 검정에서 유용한 완충제를 포함할 수 있다.

[1463] 본 발명은 또한 마감된 포장 및 표시된 약제학적 제품을 포함한다. 이 제조 물품은 적절한 베셀 또는 용기, 예컨대 유리 바이알 또는 기밀 봉합된 다른 용기를 포함한다. 비경구 투여에 적합한 투약 형태의 경우에, 활성 성분은 무 미립자 용액으로서 투여하기에 적합하며 멸균이다. 다시 말해서, 본 발명은 비경구 용액과 동결건조 분말을 둘 다 포함하며, 각각은 멸균이고, 후자는 주사 전에 재구성하기에 적합하다. 대안적으로, 단위 투약 형태는 경구, 경피, 국소 또는 점막 전달에 적합한 고체일 수 있다.

[1464] 바람직한 실시형태에서, 단위 투약 형태는 정맥내, 근육내 또는 피하 전달에 적합하다. 따라서, 본 발명은 각각의 전달 경로에 적합한 용액, 바람직하게는 멸균을 포함한다.

[1465] 다른 바람직한 실시형태에서, 본 발명의 조성물은 레시틴, 타우로콜산 및 콜레스테롤을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 생분해성 세정제와 함께; 또는 감마 글로불린 및 혈청 알부민을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 다른 단백질과 함께 용기에 저장된다. 더 바람직하게는, 본 발명의 조성물은 인간 용도를 위해 인간 혈청 알부민과 함께 저장되고, 수의학적 용도를 위해 소 혈청 알부민과 함께 저장된다.

[1466] 임의의 약제학적 제품에 따르면, 패키징 물질 및 용기는 저장 및 보관 동안에 제품의 안정성을 보호하도록 설계된다. 추가로, 본 발명의 제품은 당해 질환 또는 장애를 적절하게 예방하거나 또는 치료하는 방법에 대해 의사, 기술자 또는 환자에게 조언하는 사용을 위한 설명서 또는 다른 정보 물질을 포함한다. 다시 말해서, 제조 물품은 실제 용량, 모니터링 절차(예컨대 평균 절대 림프구 계수, 중앙 세포 계수 및 중앙 크기를 모니터링하는 방법) 및 다른 모니터링 정보를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 투약 요법을 나타내거나 또는 시사하는 설명서 수단을 포함한다.

[1467] 더 구체적으로는, 본 발명은 패키징 물질, 예컨대 박스, 병, 관, 바이알, 용기, 스프레이, 취입기, 정맥내(i.v.) 백, 봉투 등; 및 상기 포장 물질 내에 수용된 약제학적 제제의 적어도 하나의 단위 투약 형태를 포함하는 제조 물품을 제공한다. 본 발명은 또한 패키징 물질, 예컨대 박스, 보틀, 관, 바이알, 용기, 스프레이, 취입기, 정맥내(i.v.) 백, 봉투 등; 및 상기 패키징 물질 내에 수용된 각각의 약제의 적어도 하나의 단위 투약 형태를 포함하는 제조 물품을 제공한다. 본 발명은 패키징 물질, 예컨대 박스, 보틀, 관, 바이알, 용기, 스프레이, 취입기, 정맥내(i.v.) 백, 봉투 등; 및 상기 패키징 물질 내에 수용된 각각의 약제의 적어도 하나의 단위 투약 형태를 포함하는 제조 물품을 추가로 제공한다. 본 발명은 제형의 주사를 위해 바람직하게는 멸균 형태로 패키징된 바늘 또는 주사기 및/또는 패키징된 알코올 패드를 포함하는 제조 물품을 추가로 제공한다.

[1468] 백신 조성물 중의 활성 성분의 상대적 양, 약제학적으로 허용 가능한 부형제 및/또는 임의의 추가적인 성분은 치료 중인 대상체의 신원, 크기 및/또는 병태에 따라서, 그리고 추가로 조성물이 투여될 경로에 따라서 다를 수 있다. 예를 들어, 조성물은 0.1% 내지 99%(w/w)의 활성 성분을 포함할 수 있다. 예로서, 조성물은 0.1% 내지 100%, 예를 들어, .5 내지 50%, 1 내지 30%, 5 내지 80%, 적어도 80%(w/w)의 활성 성분을 포함할 수 있다.

[1469] 일부 실시형태에서, 약제학적 제품을 함유하는 패키지는 0.1mg 내지 1mg의 mRNA를 함유한다. 일부 실시형태에서, 약제학적 제품을 함유하는 패키지는 0.35mg의 mRNA를 함유한다. 일부 실시형태에서, mRNA의 농도는 1mg/mL이다.

[1470] 일부 실시형태에서, 약제학적 제품을 함유하는 패키지는 5 내지 15mg의 총 지질을 함유한다. 일부 실시형태에서, 약제학적 제품을 함유하는 패키지는 7mg의 총 지질을 함유한다. 일부 실시형태에서, 총 지질의



농도는 20mg/ml이다.

- [1471] 일부 실시형태에서, RNA(예를 들어, mRNA) 백신 조성물은 목적하는 치료적, 진단적, 예방적 또는 영상화 효과를 얻기 위해 0.0001mg/kg 내지 100mg/kg, 0.001mg/kg 내지 0.05mg/kg, 0.005mg/kg 내지 0.05mg/kg, 0.001mg/kg 내지 0.005mg/kg, 0.05mg/kg 내지 0.5mg/kg, 0.01mg/kg 내지 50mg/kg, 0.1mg/kg 내지 40mg/kg, 0.5mg/kg 내지 30mg/kg, 0.01mg/kg 내지 10mg/kg, 0.1mg/kg 내지 10mg/kg, 또는 1mg/kg 내지 25mg/kg의 대상체 체중/일을 1일, 1주마다, 1개월마다 1회 이상 등으로 전달하기에 충분한 투약량 수준으로 투여될 수 있다(예를 들어, 국제 특허 출원 공개 WO2013/078199에 기재된 단위 용량 범위, 본 명세서에 전문이 참고로 편입됨). 일부 실시형태에서, RNA(예를 들어, mRNA) 백신은 0.0100mg, 0.025mg, 0.050mg, 0.075mg, 0.100mg, 0.125mg, 0.150mg, 0.175mg, 0.200mg, 0.225mg, 0.250mg, 0.275mg, 0.300mg, 0.325mg, 0.350mg, 0.375mg, 0.400mg, 0.425mg, 0.450mg, 0.475mg, 0.500mg, 0.525mg, 0.550mg, 0.575mg, 0.600mg, 0.625mg, 0.650mg, 0.675mg, 0.700mg, 0.725mg, 0.750mg, 0.775mg, 0.800mg, 0.825mg, 0.850mg, 0.875mg, 0.900mg, 0.925mg, 0.950mg, 0.975mg, 또는 1.0mg을 전달하기에 충분한 투약량 수준으로 투여된다. 일부 실시형태에서, RNA(예를 들어, mRNA) 백신은 대상체에게 10 $\mu$ g 내지 400 $\mu$ g의 mRNA 백신을 전달하기에 충분한 투약량 수준으로 투여된다. 일부 실시형태에서, RNA(예를 들어, mRNA) 백신은 대상체에게 0.033mg, 0.1mg, 0.2mg, 또는 0.4mg을 전달하기에 충분한 투약량 수준으로 투여된다.
- [1472] 목적하는 투약량은 1일 3회, 1일 2회, 1일 1회, 격일, 3일마다, 매주마다, 2주마다, 3주마다, 4주마다, 2개월마다, 3개월마다, 6개월마다 등으로 전달될 수 있다. 소정의 실시형태에서, 목적하는 투약량은 다중 투여(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14회 이상의 투여)를 이용하여 전달될 수 있다. 다중 투여가 사용될 때, 분할 투약 요법, 예컨대 본 명세서에 기재된 것이 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, RNA 백신 조성물은 0.0005mg/kg 내지 0.01mg/kg, 예를 들어, 약 0.0005mg/kg 내지 약 0.0075mg/kg, 예를 들어, 약 0.0005mg/kg, 약 0.001mg/kg, 약 0.002mg/kg, 약 0.003mg/kg, 약 0.004mg/kg 또는 약 0.005mg/kg을 전달하기에 충분한 투약량 수준으로 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, RNA 백신 조성물은 0.025mg/kg 내지 0.250mg/kg, 0.025mg/kg 내지 0.500mg/kg, 0.025mg/kg 내지 0.750mg/kg, 또는 0.025mg/kg 내지 1.0mg/kg을 전달하기에 충분한 투약량 수준으로 1회 또는 2회(이상) 투여된다.
- [1473] 일부 실시형태에서, RNA 백신 조성물은 0.0100mg, 0.025mg, 0.050mg, 0.075mg, 0.100mg, 0.125mg, 0.150mg, 0.175mg, 0.200mg, 0.225mg, 0.250mg, 0.275mg, 0.300mg, 0.325mg, 0.350mg, 0.375mg, 0.400mg, 0.425mg, 0.450mg, 0.475mg, 0.500mg, 0.525mg, 0.550mg, 0.575mg, 0.600mg, 0.625mg, 0.650mg, 0.675mg, 0.700mg, 0.725mg, 0.750mg, 0.775mg, 0.800mg, 0.825mg, 0.850mg, 0.875mg, 0.900mg, 0.925mg, 0.950mg, 0.975mg 또는 1.0mg의 총 용량으로 또는 총 용량을 전달하기에 충분한 투약량 수준으로 2회(예를 들어, 제0일 및 제7일, 제0일 및 제14일, 제0일 및 제21일, 제0일 및 제28일, 제0일 및 제60일, 제0일 및 제90일, 제0일 및 제120일, 제0일 및 제150일, 제0일 및 제180일, 제0일 및 3개월 이후, 제0일 및 6개월 이후, 제0일 및 9개월 이후, 제0일 및 12개월 이후, 제0일 및 18개월 이후, 제0일 및 2년 이후, 제0일 및 5년 이후 또는 제0일 및 10년 이후) 투여될 수 있다. 더 높은 그리고 더 낮은 투약량 및 투여 빈도가 본 개시내용에 의해 포함된다. 예를 들어, RNA 백신 조성물은 3 또는 4회 이상으로 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, mRNA 백신 조성물은 3주마다 1일 1회로 투여된다.
- [1474] 일부 실시형태에서, RNA 백신 조성물은 0.010mg, 0.025mg, 0.100mg 또는 0.400mg의 총 용량 또는 총 용량을 전달하기에 충분한 투약량 수준으로 2회(예를 들어, 제0일 및 제7일, 제0일 및 제14일, 제0일 및 제21일, 제0일 및 제28일, 제0일 및 제60일, 제0일 및 제90일, 제0일 및 제120일, 제0일 및 제150일, 제0일 및 제180일, 제0일 및 3개월 이후, 제0일 및 6개월 이후, 제0일 및 9개월 이후, 제0일 및 12개월 이후, 제0일 및 18개월 이후, 제0일 및 2년 이후, 제0일 및 5년 이후, 또는 제0일 및 10년 이후) 투여될 수 있다.
- [1475] 일부 실시형태에서, 대상체를 백신접종하는 방법에서 사용하기 위한 RNA 백신은 대상체를 백신접종하기 위한 유효량으로 10 $\mu$ g/kg 내지 400 $\mu$ g/kg의 핵산 백신의 단일 투약량이 대상체에게 투여된다. 일부 실시형태에서, 대상체를 백신접종하는 방법에서 사용하기 위한 RNA 백신은 대상체를 백신접종하기 위한 유효량으로 10 $\mu$ g 내지 400 $\mu$ g의 핵산 백신의 단일 투약량이 대상체에게 투여된다.
- [1476] 일부 실시형태에서, RNA 백신 조성물은 MC3, 콜레스테롤, DSPC 및 PEG2000-DMG를 포함하는 지질 나노입자, 완충제 시트르산삼나트륨, 수크로스 및 주사용수 중에서 제형화된 본 명세서에 기재된 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 비제한적 예로서, 상기 조성물은 2.0mg/ml의 약물 물질(예를 들어, 암 항원을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드), 21.8mg/ml의 MC3, 10.1mg/ml의 콜레스테롤, 5.4mg/ml의 DSPC, 2.7mg/ml의 PEG2000-DMG, 5.16mg/ml



의 시트르산삼나트륨, 71mg/ml의 수크로스 및 1.0ml의 주사용수를 포함한다.

- [1477] 일부 실시형태에서, 나노입자(예를 들어, 지질 나노입자)는 평균 직경이 10 내지 500nm, 20 내지 400nm, 30 내지 300nm, 40 내지 200nm이다. 일부 실시형태에서, 나노입자(예를 들어, 지질 나노입자)는 평균 직경이 50 내지 150nm, 50 내지 200nm, 80 내지 100nm 또는 80 내지 200nm이다.
- [1478] 일부 실시형태에서, RNA 백신은 5 내지 15mg의 총 지질, 예를 들어, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15mg의 총 지질을 포함한다. 일부 실시형태에서, RNA 백신은 7mg의 총 지질을 포함한다. 일부 실시형태에서, 백신 제형 중의 총 지질의 농도는 10 내지 30mg/ml, 예를 들어, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30mg/ml이다.
- [1479] 플라젤린은 박테리아 운동과 관련된 편모를 형성하기 위해 중합하는 대략 500개의 아미노산 단량체 단백질이다. 플라젤린은 다양한 플라젤린화된 박테리아(예를 들어, 살모넬라 티피뮤리움(*Salmonella typhimurium*))뿐만 아니라 비-플라젤린화된 박테리아(예컨대 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*))에 의해 발현된다. 선천성 면역계의 세포(수지상 세포, 대식세포 등)에 의한 플라젤린의 감지는 Toll-유사 수용체 5(TLR5)에 의해서 뿐만 아니라 Nod-유사 수용체(NLR) Ipaf 및 Naip5에 의해 매개된다. TLR 및 NLR는 선천성 면역 반응 및 적응성 면역 반응의 활성화에서 어떤 역할을 하는 것으로 동정되었다. 이렇게 해서, 플라젤린은 백신에서 아췌반트 효과를 제공한다.
- [1480] 공지된 플라젤린 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열은 NCBI 젠뱅크 데이터베이스에서 공공연하게 입수 가능하다. 특히 살모넬라 티피뮤리움, 헬리코박터 파일로리(*H. Pylori*), 비브리오 콜레라(*V. Cholera*), 세라티아 마르세센스(*S. marcesens*), 쉬겔라 플렉스네리(*S. flexneri*), 트레포네마 팔리둠(*T. pallidum*), 레지오넬라 뉴모필라(*L. pneumophila*), 보렐리아 부르그도르페리(*B. burgdorferi*), 클로스트리듐 디피실(*C. difficile*), 리조비움 멜리로티(*R. meliloti*), 아그로박테리움 투메파시엔스(*A. tumefaciens*), 리조비움 루피니(*R. lupini*), 바르토넬라 클라리드게이애(*B. clarridgeiae*), 프로테우스 미라빌리스(*P. Mirabilis*), 바실러스 서브틸리스(*B. subtilus*), 리스테리아 모노사이토게네스(*L. monocytogenes*), 슈도모나스 아에루기노사(*P. aeruginosa*) 및 이콜라이(*E. coli*)로부터의 플라젤린 서열이 공지되어 있다.
- [1481] 본 명세서에서 사용되는 플라젤린 폴리펩타이드는 전장 플라젤린 단백질, 이의 면역원성 단편 및 플라젤린 단백질 또는 이의 면역원성 단편에 대해 적어도 50% 서열 동일성을 갖는 펩타이드를 지칭한다. 예시적인 플라젤린 단백질은 살모넬라 티피(*Salmonella typhi*)(유니프로(UniPro) 입력 번호: Q56086), 살모넬라 티피뮤리움(A0A0C9DG09), 살모넬라 엔테리티디스(*Salmonella enteritidis*)(A0A0C9BAB7) 및 살모넬라 콜레라에수이스(*Salmonella choleraesuis*)(Q6V2X8)로부터의 플라젤린을 포함한다. 일부 실시형태에서, 플라젤린 폴리펩타이드는 플라젤린 단백질 또는 이의 면역원성 단편에 대해 적어도 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 가진다.
- [1482] 일부 실시형태에서, 플라젤린 폴리펩타이드는 면역원성 단편이다. 면역원성 단편은 면역 반응을 유발하는 플라젤린 단백질의 일부이다. 일부 실시형태에서, 면역 반응은 TLR5 면역 반응이다. 면역원성 단편의 예는 힌지 영역의 모두 또는 일부가 결실되거나 또는 다른 아미노산으로 대체되는 플라젤린 단백질이다. 예를 들어, 항원 폴리펩타이드는 힌지 영역에서 삽입될 수 있다. 힌지 영역은 플라젤린의 추가변 영역이다. 플라젤린의 힌지 영역은 또한 "D3 도메인 또는 영역", "프로펠러 도메인 또는 영역", "추가변 도메인 또는 영역" 및 "가변 도메인 또는 영역"으로서 지칭된다. 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "힌지 영역의 적어도 일부"는 플라젤린의 힌지 영역의 임의의 부분, 또는 힌지 영역의 전체를 지칭한다. 다른 실시형태에서 플라젤린의 면역원성 단편은 20, 25, 30, 35 또는 40개의 아미노산인 플라젤린의 C-말단 단편이다.
- [1483] 플라젤린 단량체는 도메인 D0 내지 D3에 의해 형성된다. 줄기 세포를 형성하는 D0 및 D1은 직렬의 긴 알파 나선으로 구성되고, 상이한 박테리아 중에서 고도로 보존된다. D1 도메인은 TLR5 활성화에 유용한 아미노산의 몇몇 신장을 포함한다. 전체 D1 도메인 또는 도메인 내의 활성 영역 중 하나 이상은 플라젤린의 면역원성 단편이다. D1 도메인 내의 면역원성 영역의 예는 살모넬라 티피뮤리움 FliC 플라젤린에서 잔기 88 내지 114 및 잔기 411 내지 431을 포함한다. 88 내지 100개의 영역에서 13개의 아미노산 내에서, 살모넬라 플라젤린과 TLR5 활성화를 여전히 보존하는 다른 플라젤린 사이에 적어도 6개의 치환이 허용된다. 따라서, 플라젤린의 면역원성 단편은 TLR5를 활성화하고 FliC의 88 내지 100에서 살모넬라 서열(LQVRRELAVQSAN; 서열번호 356)에 대해 53% 이상 동일한 13개의 아미노산 모티프를 함유하는 플라젤린 유사 서열을 포함한다.
- [1484] 일부 실시형태에서, RNA(예를 들어, mRNA) 백신은 플라젤린의 융합 단백질을 암호화하는 RNA 및 하나 이상의 항

원 폴리펩타이드를 포함한다. 본 명세서에서 사용되는 "융합 단백질"은 작제물의 두 성분의 연결을 지칭한다. 일부 실시형태에서, 항원 폴리펩타이드의 카복시-말단은 플라젤린 폴리펩타이드의 아미노 말단에 융합되거나 또는 연결된다. 다른 실시형태에서, 항원 폴리펩타이드의 아미노 말단은 플라젤린 폴리펩타이드의 카복시 말단에 융합되거나 또는 연결된다. 융합 단백질은, 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6개 이상의 항원 폴리펩타이드에 연결된 1, 2, 3, 4, 5, 6개 이상의 플라젤린 폴리펩타이드를 포함할 수 있다. 2 이상의 플라젤린 폴리펩타이드 및/또는 2 이상의 항원 폴리펩타이드가 연결될 때, 이러한 작제물은 "다량체"로서 지칭될 수 있다.

[1485] 융합 단백질의 성분 각각은 서로 직접적으로 연결될 수 있거나 또는 링커를 통해 연결될 수 있다. 예를 들어, 링커는 아미노산 링커일 수 있다. 융합 단백질의 성분을 연결하기 위해 RNA(예를 들어, mRNA) 백신에 의해 암호화된 아미노산 링커는, 예를 들어, 라이신 잔기, 글루탐산 잔기, 세린 잔기 및 알라닌 잔기로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 구성원을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 링커는 길이가 1 내지 30, 1 내지 25, 1 내지 25, 5 내지 10, 5, 15 또는 5 내지 20개의 아미노산이다.

[1486] 백신 투여 방식

[1487] 암 RNA 백신은 치료적으로 유효한 결과를 초래하는 임의의 경로에 의해 투여될 수 있다. 이들은 진피내, 근육내 및/또는 피하 투여를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 본 개시내용은 RNA 백신이 필요한 대상체에게 이를 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 정확한 필요량은 대상체의 종, 연령 및 일반적 상태, 질환의 중증도, 특정 조성물, 그의 투여 방식, 그의 활성 방식 등에 의존하여 대상체에 따라 다를 것이다. 암 RNA 백신 조성물은 전형적으로 투여의 용이함 및 투약량의 균일화를 위해 투약 단위 형태로 제형화된다. 그러나, 암 RNA 백신 조성물의 총 1일 용법은 타당한 의학적 판단의 범주 내에서 담당 의사에 의해 결정될 수 있다는 것이 이해될 것이다. 임의의 특정 환자에 대해 구체적인 치료적으로 유효한, 예방적으로 유효한 또는 적절한 영상화 용량 수준은 치료 중인 장애 및 장애의 중증도; 사용되는 구체적인 화합물의 활성; 사용되는 구체적 조성물; 환자의 연령, 체중, 일반적 건강상태, 성별 및 식이요법; 사용되는 구체적 화합물의 투여 시간, 투여 경로, 및 배설물; 치료의 지속기간; 사용되는 구체적 화합물과 병용하여 또는 동시에 사용되는 약물; 및 의학 분야에 잘 공지된 유사한 인자를 포함하는 다양한 인자에 의존할 것이다.

[1488] 일부 실시형태에서, 암 RNA 백신 조성물은 목적하는 치료적, 진단적, 예방적 또는 영상화 효과를 얻기 위해 1일 마다, 1일 1회 이상, 1주마다, 1개월마다 등으로 0.0001mg/kg 내지 100mg/kg, 0.001mg/kg 내지 0.05mg/kg, 0.005mg/kg 내지 0.05mg/kg, 0.001mg/kg 내지 0.005mg/kg, 0.05mg/kg 내지 0.5mg/kg, 0.01mg/kg 내지 50mg/kg, 0.1mg/kg 내지 40mg/kg, 0.5mg/kg 내지 30mg/kg, 0.01mg/kg 내지 10mg/kg, 0.1mg/kg 내지 10mg/kg, 또는 1mg/kg 내지 25mg/kg의 대상체 체중을 전달하기에 충분한 투약량 수준으로 투여될 수 있다(예를 들어, 본 명세서에 전문이 참고로 편입된 국제 특허 출원 공개 WO2013/078199에 기재된 단위 용량 범위를 참조). 목적하는 투약량은 1일 3회, 1일 2회, 1일 1회, 격일로, 3일마다, 매주, 2주마다, 3주마다, 4주마다, 2개월마다, 3개월마다, 6개월마다 등일 수 있다. 소정의 실시형태에서, 목적하는 투약량은 다중 투여(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14회 이상의 투여)를 이용하여 전달될 수 있다. 다중 투여가 사용될 때, 분할 투약 요법, 예컨대 본 명세서에 기재된 것이 사용될 수 있다. 예시적인 실시형태에서, 암 RNA 백신 조성물은 0.0005mg/kg 내지 0.01mg/kg, 예를 들어, 약 0.0005mg/kg 내지 약 0.0075mg/kg, 예를 들어, 약 0.0005mg/kg, 약 0.001mg/kg, 약 0.002mg/kg, 약 0.003mg/kg, 약 0.004mg/kg 또는 약 0.005mg/kg을 전달하기에 충분한 투약량 수준으로 투여될 수 있다.

[1489] 본 명세서에 기재된 RNA 백신 약제학적 조성물은 본 명세서에 기재된 투약 형태, 예컨대 비강내, 기관내 또는 주사용(예를 들어, 정맥내, 안구내, 유리체내, 근육내, 진피내, 심장내, 복강내 및 피하)로 제형화될 수 있다.

[1490] 본 발명은 다음의 설명에 제시되거나 또는 도면에 도시된 성분의 구성 및 배열의 상세한 설명에 대한 그의 적용으로 제한되지 않는다. 본 발명은 다양한 방법으로 실행되거나 또는 수행되는 다른 실시형태가 가능하다. 또한, 본 명세서에 사용된 어구 및 용어는 설명의 목적을 위한 것이며, 제한하는 것으로 간주되어서는 안 된다. 본 명세서에서 "포함하는(including)", "포함하는(comprising)" 또는 "갖는", "함유하는", "수반하는" 및 이의 변형의 사용은 본 명세서에서 이후에 열거되는 항목 및 이의 동등물뿐만 아니라 추가적인 항목을 포함하는 것으로 의도된다.

[1491] 실시예

[1492] **실시예 1. 폴리뉴클레오타이드의 제조**

[1493] 본 개시내용에 따르면, 폴리뉴클레오타이드 및 이의 부분 또는 영역의 제조는 본 명세서에 전문이 참고로 편입

된 국제 특허 출원 W02014/152027(발명의 명칭: "Manufacturing Methods for Production of RNA Transcripts")에 교시된 방법을 이용하여 달성될 수 있다.

- [1494] 정제 방법은 국제 특허 출원 W02014/152030 및 W02014/152031에 교시된 것을 포함할 수 있고, 이들 각각은 본 명세서에 전문이 참고로 편입된다.
- [1495] 폴리뉴클레오타이드의 검출 및 특성규명 방법은 본 명세서에 전문이 참고로 편입된 W02014/144039에 교시된 바와 같이 수행될 수 있다.
- [1496] 본 개시내용의 폴리뉴클레오타이드의 특성규명은 폴리뉴클레오타이드 맵핑, 역전사효소 서열분석, 전하 분포 분석 및 RNA 불순물의 검출로 이루어진 군으로부터 선택되는 절차를 이용하여 수행될 수 있되, 특성규명은 RNA 전사체 서열의 결정, RNA 전사체 순도의 결정, 또는 RNA 전사체의 전하 이질성 결정을 포함한다. 이러한 방법은, 예를 들어, W02014/144711 및 W02014/144767에 교시되어 있으며, 이들 각각의 내용은 본 명세서에 전문이 참고로 편입된다.
- [1497] **실시예 2 키메라 폴리뉴클레오타이드 합성**
- [1498] 도입
- [1499] 본 개시내용에 따르면, 키메라 폴리뉴클레오타이드의 두 영역 또는 부분은 트라이포스페이트 화학을 이용하여 결합되거나 또는 결합될 수 있다.
- [1500] 이 방법에 따르면, 제1 영역 또는 100개 이하의 뉴클레오타이드 부분은 5' 모노포스페이트 및 말단의 3'desOH로 화학적으로 합성하거나 또는 OH로 차단한다. 영역이 80개의 뉴클레오타이드보다 더 길다면, 이는 결합을 위해 2개의 가닥으로서 합성할 수 있다.
- [1501] 시험관내 전사(IVT)를 이용하여 위치적으로 변형되지 않은 영역 또는 부분으로서 제1 영역 또는 부분을 합성한다면, 3' 말단의 후속적 캡핑에 의한 5'모노포스페이트의 전환을 따를 수 있다.
- [1502] 모노포스페이트 보호기는 당업계에 공지된 임의의 것으로부터 선택할 수 있다.
- [1503] 키메라 폴리뉴클레오타이드의 제2 영역 또는 부분은 화학적 합성 또는 IVT 방법을 이용하여 합성할 수 있다. IVT 방법은 변형된 캡을 갖는 프라이머를 이용할 수 있는 RNA 중합효소를 포함할 수 있다. 대안적으로, 130개까지의 뉴클레오타이드의 캡핑은 화학적으로 합성하고 IVT 영역 또는 부분에 결합할 수 있다.
- [1504] 전체 키메라 폴리뉴클레오타이드는 포스페이트-당 골격으로 제조할 필요가 없다. 영역 중 하나 또는 부분이 폴리펩타이드를 암호화한다면, 이러한 영역 또는 부분은 포스페이트-당 골격을 포함하는 것이 바람직하다.
- [1505] 이어서, 결합은 임의의 공지된 클릭 화학, 오쏘클릭 화학, 솔루링크 또는 당업계에 공지된 다른 생체접합 화학을 이용하여 수행한다.
- [1506] **합성 경로**
- [1507] 키메라 폴리뉴클레오타이드는 일련의 개시 세그먼트를 이용하여 생성한다. 이러한 세그먼트는 하기를 포함한다:
- [1508] (a) 정상 3'OH를 포함하는 캡핑된 그리고 보호된 5' 세그먼트(SEG. 1)
- [1509] (b) 폴리펩타이드의 암호화영역을 포함하고 정상 3'OH를 포함할 수 있는 5' 트라이포스페이트 세그먼트(SEG. 2)
- [1510] (c) 코디세핀을 포함하거나 또는 3'OH가 없는 키메라 폴리뉴클레오타이드의 3' 단부(예를 들어, 꼬리)에 대한 5' 모노포스페이트 세그먼트(SEG. 3)
- [1511] 합성(화학적 또는 IVT) 후에, 세그먼트 3(SEG. 3)은 코디세핀으로 처리하고, 이어서, 5'모노포스페이트를 생성하기 위해 파이로포스파타제로 처리한다.
- [1512] 이어서, RNA 리가제를 이용하여 세그먼트 2(SEG. 2)를 SEG. 3에 결합시킨다. 이어서, 결합된 폴리뉴클레오타이드를 정제하고 나서, 파이로포스파타제로 처리하여 다이포스페이트를 절단한다. 이어서, 처리한 SEG.2 내지 SEG. 3 작제물을 정제하고 나서, SEG. 1을 5' 말단에 결합시킨다. 키메라 폴리뉴클레오타이드의 추가적인 정제 단계를 수행할 수 있다.
- [1513] 각각의 단계의 수율은 90 내지 95%만큼 많을 수 있다.
- [1514] **실시예 3: cDNA 생산을 위한 PCR**

- [1515] cDNA의 제조를 위한 PCR 절차를 카파 바이오시스템즈(Kapa Biosystems)(매사추세츠주 워번에 소재)에 의한 2x KAPA HIFI(상표명) 핫스타트 레디믹스(HotStart ReadyMix)를 이용하여 수행한다. 이 시스템은 2x KAPA ReadyMix 12.5 $\mu$ l; 정방향 프라이머(10 $\mu$ M) 0.75 $\mu$ l; 역방향 프라이머(10 $\mu$ M) 0.75 $\mu$ l; 주형 cDNA -100 ng; 및 25.0 $\mu$ l로 희석시킨 dH<sub>2</sub>O를 포함한다. 반응 조건은 5분 동안 95 $^{\circ}$ C에서 그리고 20초 동안 98 $^{\circ}$ C, 이어서, 15초 동안 58 $^{\circ}$ C, 이어서, 45초 동안 72 $^{\circ}$ C, 이어서, 5분 동안 72 $^{\circ}$ C, 이어서 종결까지 4 $^{\circ}$ C의 25주기이다.
- [1516] 제조업자의 설명서에 따라 인비트로젠사(Invitrogen)의 퓨어링크(PURELINK)(상표명) PCR 마이크로 키트(PCR Micro Kit)(캘리포니아주 칼스베드에 소재)를 이용하여 반응물을 세정한다(5 $\mu$ g까지). 더 큰 반응물은 더 큰 용량을 갖는 생성물을 이용하는 세정을 필요로 할 것이다. 세정 후에, 나노드롭(NANODROP)(상표명)을 이용하여 cDNA를 정량화하고 나서, 아가로스 겔 전기영동에 의해 분석하여 cDNA가 예상된 크기인지를 확인한다. 이어서, 시험관내 전사 반응으로 진행 전에 서열분석을 위해 cDNA를 제출한다.
- [1517] **실시예 4. 시험관내 전사(IVT)**
- [1518] 시험관내 전사 반응은 균일하게 변형된 폴리뉴클레오타이드를 함유하는 폴리뉴클레오타이드를 생성한다. 이러한 균일하게 변형된 폴리뉴클레오타이드는 본 개시내용의 폴리뉴클레오타이드의 영역 또는 부분을 포함할 수 있다. 천연 및 비천연 NTP를 이용하여 입력 뉴클레오타이드 트라이포스페이트(nucleotide triphosphate: NTP) 혼합물을 생성한다.
- [1519] 전형적인 시험관내 전사 반응은 하기를 포함한다:
- [1520] 1 주형 cDNA 1.0 $\mu$ g
- [1521] 2 10x 전사 완충제(400mM 트리스-HCl pH 8.0, 190mM MgCl<sub>2</sub>, 50mM DTT, 10 mM 스퍼미딘) 2.0 $\mu$ l
- [1522] 3 관습적 NTP(각각 25mM) 7.2 $\mu$ l
- [1523] 4 RNase 저해제 20 U
- [1524] 5 T7 RNA 중합효소 3000 U
- [1525] 6 dH<sub>2</sub>O 20.0 $\mu$ l까지 및
- [1526] 7 3시간 내지 5시간 동안 37 $^{\circ}$ C에서 인큐베이션.
- [1527] 조질의 IVT 혼합물을 다음날 세정을 위해 4 $^{\circ}$ C에서 밤새 저장할 수 있다. 이어서, 1U의 무 RNase(RNase-free) DNase를 사용하여 본래의 주형을 분해한다. 37 $^{\circ}$ C에서 15분의 인큐베이션 후에, 제조업자의 설명서에 따라 앰비온(Ambion)의 메가클리어(MEGACLEAR)(상표명) 키트(텍사스주 오스틴에 소재)를 이용하여 mRNA를 정제한다. 이 키트는 500 $\mu$ g까지의 RNA를 정제할 수 있다. 세정 후에, 나노드롭(NanoDrop)을 이용하여 RNA를 정량화하고, 아가로스 겔 전기영동에 의해 분석하여 RNA가 적절한 크기를 갖는다는 것과 RNA의 분해가 일어나지 않았다는 것을 확인한다.
- [1528] **실시예 5. STING 연구**
- [1529] 본 실시예에서, 면역 강화제, 예컨대 구성적으로 활성인 STING이 연쇄체 백신에 대해 T-세포 반응을 촉진시킬 수 있는지 여부를 연구하였다. 클래스 I 및 클래스 II 에피토프를 암호화하는 RNA 31 연쇄동일서열을 암호화하는 mRNA 작제물을 백신으로서 사용하였고, 클래스 I 및 클래스 II 에피토프에 대한 T-세포 반응에 대한 STING의 효과를 연구하였다. RNA 31 및 STING mRNA를 공동제형화하였고, 동시에 전달하거나, 또는 STING mRNA의 지연된 전달과 함께 공동제형화하지 않았다. 동물에 제1일에 프라이밍 용량 및 제15일에 부스트를 제공하였다. 제22일에 비장세포를 채취하였다.
- [1530] 연쇄동일서열 백신에 대해 다양한 비로 STING을 첨가할 때 면역원성을 결정하기 위해, STING을 상위 랭크된 상업적으로 입수 가능한 아주반트와 비교하기 위해, 면역원성이 STING 투약 시기에 의존하는지의 여부를 결정하기 위해, 그리고 STING과 함께 투약될 때 비제형 mRNA의 면역원성을 시험하기 위해 상이한 물질을 시험하였다. 다음의 물질/조건을 시험하였다: RNA 31(3 $\mu$ g), 폴리 I:C(10 $\mu$ g)와 함께 RNA 31(3 $\mu$ g), MPLA(5 $\mu$ g)와 함께 RNA 31(3 $\mu$ g), STING(1 $\mu$ g)/RNA 31(3 $\mu$ g), STING(0.6 $\mu$ g)/RNA 31(3 $\mu$ g), STING(0.6 $\mu$ g)/RNA 54(3 $\mu$ g), STING(0.6 $\mu$ g)/RNA 31(3 $\mu$ g)(24시간 후), STING(0.6 $\mu$ g)/RNA 31(3 $\mu$ g)(48시간 후), STING(0.6 $\mu$ g)/RNA 31(3 $\mu$ g)(비제형화), 및 STING(6 $\mu$ g)/RNA 31(30 $\mu$ g)(비제형화). CA-54는 5 클래스 II 에피토프의 연쇄동일서열이다(이들 모두는 RNA 31 내에 함유



됨).

[1531] 결과를 도 12 내지 도 13에 나타낸다. 항원-특이적 IFN $\gamma$  반응을 클래스 II 에피토프로 시험하였을 때, STING은 mRNA에 의해 암호화된 MHC 클래스 II 에피토프에 대한 면역 반응을 촉진시키는 것으로 발견되었다. STING은 상업적으로 입수 가능한 아췌반트와 비슷하게 거동하였다(용량의 5 내지 10배 차이). 시험한 비로 둘 다 작업하였지만, 1:5 STING:항원비는 1:3 조합보다 더 양호하게 수행하였다(도 12). 상기 기재한 바와 같이 그리고 도 13에 나타난 바와 같이 클래스 I 에피토프를 이용하여 유사한 결과를 얻었다. 마찬가지로, 1:5 STING:항원비는 클래스 I 에피토프에 대한 1:3 조합보다 더 양호하게 수행된다는 것을 발견하였다.

[1532] 추가로, 이후의 시점(24시간)에 STING의 투약은 공동전달에 대해 유사한 면역원성을 가진다는 것을 발견하였다(도 14).

[1533] 추가적인 실험에서, 상이한 STING-대-항원비의 효과는 52 뮤린 에피토프를 이용하여(에피토프\_4a\_DX\_RX\_perm를 첨가) 시험하였다. 마우스는 제1일에 프라이밍 용량, 제8일에 부스트 용량을 받았고, 제15일에 비장세포를 채취하였다. ELISpot 및 FACS를 이용하여 제자극에 대한 T 세포 반응을 평가하였다. 연쇄체를 암호화하는 에피토프에 대응하는 펩타이드 서열로 제자극을 수행하였다. 2개의 클래스 II 에피토프(RNA 2, RNA 3) 및 4개의 클래스 I 에피토프(RNA 7, RNA 10, RNA 13, RNA 22)에 대한 T 세포 반응을 시험하였다.

[1534] 상당히 놀랍게도, 시험한 대다수의 비에 걸쳐 STING의 첨가는 항원 단독에 비해 T 세포 반응을 개선시키고, 결코 항원 단독보다 더 나쁘게 수행되지 않았다는 것을 발견하였다. 반응성의 폭은 예상되지 않았다. 시험한 6가지 항원(에피토프) 중 4가지에 대해, 10 내지 30 $\mu$ g의 총 용량으로 항원에 대한 STING의 첨가는 50 $\mu$ g 용량의 항원 단독보다 더 높은 T 세포 반응을 지속적으로 생산하였다. 따라서, 개선된 면역원성을 위해 STING:항원의 비로 넓은 종 모양 곡선이 생겼다.

[1535] 연구 그룹은 다음의 표에 나타난 바와 같다:

STING:Ag 비	0:1		20:1		5:1		1:1		1:5		1:20	
총 mRNA $\mu$ g	STING ( $\mu$ g)	Ag ( $\mu$ g)	STING ( $\mu$ g)	Ag ( $\mu$ g)	STING ( $\mu$ g)	Ag ( $\mu$ g)	STING ( $\mu$ g)	Ag ( $\mu$ g)	STING ( $\mu$ g)	Ag ( $\mu$ g)	STING ( $\mu$ g)	Ag ( $\mu$ g)
0.15	2.85	0.15										
0.5	9.5	0.5										
1.5	28.6	1.5										
3	27	3	2.85	0.15	2.4	0.6	1.5	1.5	0.6	2.4	0.15	2.85
10	20	10	9.5	0.5	8.3	1.4	5.0	5.0	1.4	8.3	0.5	9.5
30	0	30	28.6	1.4	25.0	4.2	15.0	15.0	4.2	25.0	1.4	28.6
50	0	50										

[1536]

[1537] 클래스 II 에피토프 중에서, RNA 2(도 6에 나타난 결과) 및 RNA 3(도 7에 나타난 결과)는 STING의 첨가가 50 $\mu$ g까지의 항원 단독 용량을 포함하는, 항원 단독 그룹에 비해 1:1 미만의 비(STING:항원)에서 T 세포 반응을 증가시켰다는 것을 나타내었다. 도 7의 좌측 패널은 STING의 첨가가 항원 단독 그룹에 비해 모든 비에서 T 세포 반응을 증가시켰다는 것을 나타낸다.

[1538] 클래스 I 에피토프에 의해 유사한 결과를 알 수 있었다. RNA 7(도 8에 나타난 결과), RNA 13(도 9에 나타난 결과), RNA 22(도 10에 나타난 결과) 및 RNA 10(도 11에 나타난 결과)은 모두 STING:항원의 비가 총 mRNA 용량에 비교할 때 항원 단독 그룹에 비해 더 높은 T 세포 반응을 생산한다는 것을 나타내었다.

# [1539] 실시예 6. 연쇄체 연구

[1540] 더 긴 작제물의 전체 번역초과가 가능한지의 여부를 시험하기 위해 그리고 20 내지 52개의 에피토프 작제물에 함유된 에피토프에 대한 면역원성을 비교하기 위해 연구를 수행하였다. 실험에 대해, 화합물 257을 함유하는 LNP에서 상이한 제형의 5개 그룹을 시험하였다:

그룹	시험/대조군 물질	최종 농도	클래스 II (작제물의 수- 아미노산의 수)	클래스 I (작제물의 수- 아미노산의 수)
1	RNA 31	3	5-31 aa	15-31aa
2	20 에피토프 21 측점	3	5-21 aa	15-21aa
3	20 에피토프 21 측점 클래스 II_15 측점 클래스 I	3	5-21 aa	15-15aa
4	52 에피토프 21 측점	7.5	13-21 aa	39-21aa
5	52 에피토프 21 측점 클래스 II_15 측점 클래스 I	7.5	13-21 aa	39-15aa

[1541]



[1542] 투약은 동일한 피코몰이었는데, 이는 작제물의 길이에도 불구하고 모든 그룹이 각각의 개개 에피토프의 동일 농도를 받았다는 것을 의미한다. 동물에 제0일에 1 용량을 제공하고(프라이밍 용량), 제6일에 제2 용량(부스트)을 제공하였고, 이어서, 제12일에 비장세포를 채취하고 나서, IFN $\gamma$  ELISpot을 샘플 상에서 수행하였다.

[1543] 52 에피토프-함유 백신의 면역원성을 시험하였다. 시험한 4가지 작제물 각각에 대해 RNA 1/SIINFEKL(서열번호 231)은 최종 에피토프였다. 52 에피토프 작제물에서 SIINFEKL(서열번호 231) T-세포 반응은 연쇄체의 전체 번역 초과를 확인하였는데, RNA 1/SIINFEKL(서열번호 231)의 자극을 수행하였을 때 모든 시험군으로부터 INF $\gamma$  반응을 관찰하였다(도 1). 예상한 바와 같이, 연쇄체는 RNA 1/SIINFEKL(서열번호 231) 에피토프를 갖지 않기 때문에, RNA 31 연쇄체에서 발견된 RNA 1이 없다는 것을 주목한다.

[1544] 52량체와 20량체 작제물 사이의 면역원성은 유사하였다. 예를 들어, 둘 다 클래스 I 에피토프로 재자극하였을 때 유사하게 거동하며(도 2) 클래스 II 에피토프 길이의 트리밍(Trimming)은 면역원성을 개선시키는 한편, 21 내지 15개 아미노산의 클래스 I 에피토프 트리밍은 면역원성에 영향을 미치지 않았다. 추가로, 추가적인 에피토프에 대한 면역원성은 52 에피토프 작제물에서 검출되었다(도 3). 52량체와 20량체 작제물은 둘 다 클래스 II 에피토프로 재자극할 때와 비슷하게 거동하였다(도 4).

### 표 3

#### 선택된 서열

서열 번호	서열
1	MPHSSLHPSIPCRGHGAQKAALVLLSACLVTWGLGEPPEHTLRYLVHLASLQLGLLNGVCSLAEELRHIHS RYRGSYWRTVRACLGCPRLRRGALLLSIYFYSLPNAVGPFTWMLALLGLSQALNILLGLKGLAPAEISAVCEKGNFN MAHGLAWSYYIGYLRILPELQARIRTYNQHYNNLLRGAVSQRLYILLPLDCGVPDNLMSADPNIRFLDKLPQQTGD HAGIKDRVYSNSIYELLENGQRAGTCVLEYATPLQTLFAMSQYSQAGFSREDRLEQAKLFCRTLEDILADAPESQNNC RLIAYQEPADDSFSLSQEVLRLRQEEKEEVTGSLKTSAVPSTSTMSQEPellisGMEKPLPLRTDFS (Hu STING(V155M); 에피토프 태그 없음)
2	MPHSSLHPSIPCRGHGAQKAALVLLSACLVTWGLGEPPEHTLRYLVHLASLQLGLLNGVCSLAEELRHIHS RYRGSYWRTVRACLGCPRLRRGALLLSIYFYSLPNAVGPFTWMLALLGLSQALNILLGLKGLAPAEISAVCEKGNFN VAHGLAWSYYIGYLRILPELQARIRTYNQHYNNLLRGAVSQRLYILLPLDCGVPDNLMSADPNIRFLDKLPQQTGDH AGIKDRVYSNSIYELLENGQRAGTCVLEYATPLQTLFAMSQYSQAGFSREDtLEQAKLFCRTLEDILADAPESQNNCRL IAYQEPADDSFSLSQEVLRLRQEEKEEVTGSLKTSAVPSTSTMSQEPellisGMEKPLPLRTDFS (Hu STING(R284T); 에피토프 태그 없음)
3	MPHSSLHPSIPCRGHGAQKAALVLLSACLVTWGLGEPPEHTLRYLVHLASLQLGLLNGVCSLAEELRHIHS RYRGSYWRTVRACLGCPRLRRGALLLSIYFYSLPNAVGPFTWMLALLGLSQALNILLGLKGLAPAEISAVCEKGNFN VAHGLAWSYYIGYLRILPELQARIRTYNQHYNNLLRGAVSQRLYILLPLDCGVPDNLMSADPNIRFLDKLPQQTGDH AGIKDRVYSNSIYELLENGQRAGTCVLEYATPLQTLFAMSQYSQAGFSREDmLEQAKLFCRTLEDILADAPESQNNCR LIAYQEPADDSFSLSQEVLRLRQEEKEEVTGSLKTSAVPSTSTMSQEPellisGMEKPLPLRTDFS (Hu STING (R284M); 에피토프 태그 없음)
4	MPHSSLHPSIPCRGHGAQKAALVLLSACLVTWGLGEPPEHTLRYLVHLASLQLGLLNGVCSLAEELRHIHS RYRGSYWRTVRACLGCPRLRRGALLLSIYFYSLPNAVGPFTWMLALLGLSQALNILLGLKGLAPAEISAVCEKGNFN VAHGLAWSYYIGYLRILPELQARIRTYNQHYNNLLRGAVSQRLYILLPLDCGVPDNLMSADPNIRFLDKLPQQTGDH AGIKDRVYSNSIYELLENGQRAGTCVLEYATPLQTLFAMSQYSQAGFSREDKLEQAKLFCRTLEDILADAPESQNNCR LIAYQEPADDSFSLSQEVLRLRQEEKEEVTGSLKTSAVPSTSTMSQEPellisGMEKPLPLRTDFS (Hu STING (R284K); 에피토프 태그 없음)

[1545]

서열 번호	서열
5	MPHSSLHPSIPCPRGHGAQKAALVLLSACLVTWGLGEPPEHTLRYLVHLASLQLGLLNGVCSLAEELRHHIS RYRGSYWRTVRACLCGPLRRGALLLSIYFYSLPNAVGPFTWMLALLGLSQALNILLGLKGLAPAEISAVCEKGNF VAHGLAWSYIYIGYLRLLPELQARITYNQHYNNLLRGAVSQRLYILLPLDCGVPDNLMSADPNIRFLDKLPQQTGDH AGIKDRVYSNSIYELLENGQRAGTCVLEYATPLQTLFAMSQYSQAGFSREDRLEQAKLFCRTLEDILADAPESQNNCR LIAYQEPADDSSFSLSQEVLRHLRQEEKEEVTGSLKTSAVPSTSTMSQEPellisgMEKPLPLRTDFS (Hu STING(N154S); 에피토프 태그 없음)
6	MPHSSLHPSIPCPRGHGAQKAALVLLSACLVTWGLGEPPEHTLRYLVHLASLQLGLLNGVCSLAEELRHHIS RYRGSYWRTVRACLCGPLRRGALLLSIYFYSLPNAVGPFTWMLALLGLSQALNILLGLKGLAPAEISAIKEKGNFN VAHGLAWSYIYIGYLRLLPELQARITYNQHYNNLLRGAVSQRLYILLPLDCGVPDNLMSADPNIRFLDKLPQQTGDH AGIKDRVYSNSIYELLENGQRAGTCVLEYATPLQTLFAMSQYSQAGFSREDRLEQAKLFCRTLEDILADAPESQNNCR LIAYQEPADDSSFSLSQEVLRHLRQEEKEEVTGSLKTSAVPSTSTMSQEPellisgMEKPLPLRTDFS (Hu STING(V147L); 에피토프 태그 없음)
7	MPHSSLHPSIPCPRGHGAQKAALVLLSACLVTWGLGEPPEHTLRYLVHLASLQLGLLNGVCSLAEELRHHIS RYRGSYWRTVRACLCGPLRRGALLLSIYFYSLPNAVGPFTWMLALLGLSQALNILLGLKGLAPAEISAVCEKGNFN VAHGLAWSYIYIGYLRLLPELQARITYNQHYNNLLRGAVSQRLYILLPLDCGVPDNLMSADPNIRFLDKLPQQTGDH AGIKDRVYSNSIYELLENGQRAGTCVLEYATPLQTLFAMSQYSQAGFSREDRLEQAKLFCRTLEDILADAPESQNNCR LIAYQEPADDSSFSLSQEVLRHLRQEEKEEVTGSLKTSAVPSTSTMSQEPellisgMEKPLPLRTDFS (Hu STING (E315Q); 에피토프 태그 없음)
8	MPHSSLHPSIPCPRGHGAQKAALVLLSACLVTWGLGEPPEHTLRYLVHLASLQLGLLNGVCSLAEELRHHIS RYRGSYWRTVRACLCGPLRRGALLLSIYFYSLPNAVGPFTWMLALLGLSQALNILLGLKGLAPAEISAVCEKGNFN VAHGLAWSYIYIGYLRLLPELQARITYNQHYNNLLRGAVSQRLYILLPLDCGVPDNLMSADPNIRFLDKLPQQTGDH AGIKDRVYSNSIYELLENGQRAGTCVLEYATPLQTLFAMSQYSQAGFSREDRLEQAKLFCRTLEDILADAPESQNNCR LIAYQEPADDSSFSLSQEVLRHLRQEEKEEVTGSLKTSAVPSTSTMSQEPellisgMEKPLPLaTDFS (Hu STING (R375A); 에피토프 태그 없음)
9	MPHSSLHPSIPCPRGHGAQKAALVLLSACLVTWGLGEPPEHTLRYLVHLASLQLGLLNGVCSLAEELRHHIS RYRGSYWRTVRACLCGPLRRGALLLSIYFYSLPNAVGPFTWMLALLGLSQALNILLGLKGLAPAEISALCEKGNFS MAHGLAWSYIYIGYLRLLPELQARITYNQHYNNLLRGAVSQRLYILLPLDCGVPDNLMSADPNIRFLDKLPQQTGD HAGIKDRVYSNSIYELLENGQRAGTCVLEYATPLQTLFAMSQYSQAGFSREDRLEQAKLFCRTLEDILADAPESQNNC RLIAYQEPADDSSFSLSQEVLRHLRQEEKEEVTGSLKTSAVPSTSTMSQEPellisgMEKPLPLRTDFS (Hu STING(V147L/N154S/V155M); 에피토프 태그 없음)
10	MPHSSLHPSIPCPRGHGAQKAALVLLSACLVTWGLGEPPEHTLRYLVHLASLQLGLLNGVCSLAEELRHHIS RYRGSYWRTVRACLCGPLRRGALLLSIYFYSLPNAVGPFTWMLALLGLSQALNILLGLKGLAPAEISALCEKGNFS MAHGLAWSYIYIGYLRLLPELQARITYNQHYNNLLRGAVSQRLYILLPLDCGVPDNLMSADPNIRFLDKLPQQTGD HAGIKDRVYSNSIYELLENGQRAGTCVLEYATPLQTLFAMSQYSQAGFSREDMLEQAKLFCRTLEDILADAPESQNN CRLIAYQEPADDSSFSLSQEVLRHLRQEEKEEVTGSLKTSAVPSTSTMSQEPellisgMEKPLPLRTDFS (Hu STING(R284M/V147L/N154S/V155M); 에피토프 태그 없음)
199	ATGCCCCACAGTAGCCTCCACCCAGCATCCCCTGCCCCAGAGGCCACGGCGCACAGAAGGCCGCCCTGG TGCTGCTGAGCGCCTGTCTGGTGACCCTGTGGGGTCTGGGCGAGCCCCGAGCACACCCTGCGGTACCTCGT GCTGCATCTGGCCAGCCTGCAGCTGGGCTGCTGCTGAACGGCGTGTGCAGCCTGGCCGAAGAGCTGAGACA CATCCACAGCAGATACAGAGGCTCCTACTGGAGAACCCTCAGAGCCTGCTCGGCTGTCCCCTGAGAAGAGGC GCCCTGCTGCTCCTGAGCATCTACTTACTACAGCCTGCCAACGCCGTGGGCCCCCCCTTCACTGGATGCTG GCCCTGCTGGGCTGAGCCAGGCCCTGAACATCTGCTGGGCTGAAGGCTTGGCCCCCGGAGATCTCCG CCGTGTGCGAGAAGGGCACTCAACATGGCCATGGCCTTGCCTGGTCTACTACATCGGCTACCTGAGACTG ATCCTGCCCGAGCTGCAGGCCAGAATCAGAACCTACAACCAGCACTACAACAACCTGCTGAGAGGCCGCGTGA GCCAAGACTGTACATCCTGCTGCCCTGGACTGCGGCGTGCCCGACAACCTTAGCATGGCCGACCCCAACATC AGATTCCTGGACAAGCTGCCCCAGCAGACCGGCGACACCGCGCATCAAGGACAGAGTGTACAGCAACAGC ATCTACGAGCTGCTGGAGAACGGCCAGAGAGCCGGCACCTGCTGCTGGAGTACGCCACCCCCCTGCAGACCC TGTTCCGCTGAGCCAGTACAGCCAGGCGGCTTCAGCAGAGAGGACAGACTGGAGCAAGCCAAGCTGTTCTG CAGAACCTGGAGGACATCTGCGGAGCGCCCCGAGAGCCAAACAACCTGCAGACTGATCGCTACCGGA GCCCCGCCAGCAGCAGCTTACGCTGAGCCAGGAAGTGTGAGACACCTGAGACAGGAAGAGAAGGAGG AGGTGACCGTGGGAAGCTGAAGACCGCGCGTCCCAGCACCAGCACCATGAGCCAGAGCCCCGAGCTGC TGATCAGCGCATGGAGAAGCCCCCTGCCCTGAGAACCAGCTCAGC (huSTING(V155M); 에피토프 태그 없음; 뉴클레오타이드 서열)

[1546]



서열 번호	서열
200	<p>ATGCCTCACAGCAGCTGCACCCTAGCATCCCTTGCCCTAGAGGCCACGGCGCCAGAAAGGCCGCCCTGG TGCTGCTGAGCGCCTGCTGGTGACCTGTGGGGCCTGGGGGAGCCTCTGAGCACACCTGAGATACCTGGT GCTGCACCTGGCCAGCCTGCTGAGCTGGGCTGCTGCTGAACGGCGTGTGAGCCTGGCCGAGGAGCTGAGACA CATCCACAGCAGATACAGAGGCAGCTACTGGAGAACCCTGAGAGCCTGCTGGGCTGCCCTCTGAGAAGAGG CGCCTGCTGCTGCTGAGCATCTACTTCTACTACAGCCTGCCTAACGCCGTGGGCCCTCCTTTACCTGGATGCT GGCCTGCTGGGCTGAGCCAGGCCCTGAACATCCTGCTGGGCTGAAGGGCTGGCCCTGCCGAGATCAGC GCCGTGTGCGAGAAGGGCACTTCAACGTGGCCACGGCCTGGCCTGGAGCTACTACATCGGCTACCTGAGAC TGATCCTGCTGAGCTGACGGCCAGAACTCAGAACCTACAACCAGCACTACAACAACCTGCTGAGAGGGCCGCT GAGCCAGAGACTGTACATCCTGCTGCTTGGACTGCGGCTGCTGACAACCTGAGCATGGCCGACCCCTAAC ATCAGATTCTGGACAAGCTGCTCAGCAGACCGGCCGACACGCGCGCATCAAGGACAGAGTGTACAGCAACA GCATCTACGAGCTGCTGGAGAAGGCCAGAGAGCCGGCACCTGCGTGTGGAGTACGCCACCCCTCTGAGAC CCTGTTGCGCATGAGCCAGTACAGCCAGGCCGGCTTACAGCAGAGAGGACACCTGGAGCAGGCCAAGCTGTTT TGCAGAACCTGGAGGACATCTGGCCGACGCCCTGAGAGCCAGAACAACTGCAGACTGATCGCTACCAGG AGCCTGCCGACGACAGCAGCTTCAAGCTGAGCCAGGAGGTGCTGAGACACCTGAGACAGGAGGAGAAGGAG GAGGTGACCGTGGGCGAGCCTGAAGACCAGCGCGTGCCTAGCACCAGCACCATGAGCCAGGAGCCTGAGCTG CTGATCAGCGGCATGGAGAAGCCTCTGCCTCTGAGAACCAGCTTCAGC (Hu STING(R284T); 에피토프 태그 없음; 뉴클레오타이드 서열)</p>
201	<p>ATGCCCCACAGCAGCTGCACCCTCCATCCCTGTCCAGAGGCCACGGCGCCAGAAAGGCCGCCCTGG TGCTGCTGAGCGCCTGCTGGTGACCTTATGGGGCCTGGGGGAGCCCCCGAGCACACCTGAGATACCTGGT CCTGCACCTGGCCAGCCTCCAGCTGGGCTGCTGCTCAACGGCGTGTGAGCCTGGCCGAGGAGCTGAGACAC ATCCACAGCAGATACAGAGGCAGCTACTGGAGAACCCTGAGAGCCTGCTGGGTTGCCACTGAGAAGAGGA GCTCTGCTGCTGCTGAGCATCTACTTCTACTACTCGCTGCCAACGCTGTGGGCCCCCTTACCTGGATGCTG GCCCTGCTGGGTCTGAGCCAGGCCCTGAACATCCTCTGGGCTGAAGGGCTGGCCCCCGCCGAGATAAGCG CCGTTTGCGAGAAGGGCACTTCAACGTGGCCCATGGCCTGGCCTGGAGCTACTACATCGGCTACTTACGCTG ATCTGCCCCGAGCTGCAGGCCAGAACTCAGAACCTACAACCAGCATTACAACAACCTGCTGAGAGGGCCGCTGA GCCAGAGACTGTATATCTGCTGCCCTGGACTGCGGCTGCCGACAACTGAGCATGGCCGACCCCAACATC AGATTCTGGACAAGCTCCCCAGCAGACCGGGCACCACGCGGAATCAAAGACAGAGTGTATAGCAACAGCA TCTACGAGCTGCTGAGAACGGCCAGAGAGCCGGCACCTGCGTACTGGAGTACGCCACCCCTTGCAGACCT GTTTGCCATGAGCCAGTACAGCCAGGCCGGCTTCAAGCAGAGAGGACATGCTGGAGCAGGCCAAGCTGTTCTGC AGAACCCTGGAGGACATCCTGGCCGACGCCCCGAGAGCCAGAACAACTGCAGACTGATCGCTACCAAGAGC CCGCCGACGACAGCAGCTTCAAGCAGGAGGTGCTGAGACATCTGAGACAGGAGGAGAAGGAGGAG GTGACCGTGGGCGACCTCAAGACCAGCGCTGTGCCCTCTACCAGCACCATGAGCCAGGAGCCCGAGCTGCTGA TCAGCGGCATGGAGAAGCCCTGCCCTGAGAACAGACTTCAGC (hu STING (R284M); 에피토프 태그 없음; 뉴클레오타이드 서열)</p>
202	<p>ATGCCCCATAGCAGCCTGCACCCAGCATCCCTGCCCCAGAGGCCACGGCGCCAGAAAGGCCGCCCTGG TCCTGCTGAGCGCATGCTGGTCAACCTGTGGGGCCTGGGGGAGCCCCCGAGCACACCTGAGATACCTGGT GCTGCACCTGCCAGCCTGCTGAGCTGGGCTGCTGCTGAACGGCGTGTGAGCCTGGCCGAGGAGCTGAGACA CATCCACAGCAGATATAGAGGCAGCTACTGGAGAACCCTGAGAGCTTGCCTGGCTGCCCTCTGAGAAGAGGC GCCCTGCTGCTGCTGAGCATCTACTTTTACTACAGCCTGCCAACGCTGTGGGCCCTTTCACGTGATGCTC GCCCTGCTGGGACTGAGCCAGGCCCTGAACATCCTGCTGGGCTTAAGGGCTAGCCCCCGCCGAGATCAGCG CCGTGTGCGAGAAGGGCAACTCAATGTGGCCACGGCCTGGCCTGGAGCTACTACATCGGCTACCTGAGACT GATCTGCCCCGAGCTGCAGGCCAGAACTCAGAACCTACAATCAGCACTACAACAACCTGCTGAGAGGCGCGTG AGCCAGAGACTGTACATCCTGCTGCCCTGGACTGCGGCTGCCGACAACCTCAGCATGGCCGACCCCAACAT CAGATTCTGGACAAGCTGCCCCAGCAGACCGGCGACCAACCGGCATCAAGGATCGCGTGTACAGCAACAGC ATCTACGAGCTGCTGGAACAGGCCAGAGAGCCGGAACCTGCGTGTGGAGTACGCCACACCCCTGCAGACCC TGTTGCGCATGAGCCAGTACAGCCAGGCCGGCTTCAAGCAGAGAGGACAAGCTGGAGCAGGCCAAGCTGTTCT GCAGAACCTGGAGGATATCTCGCCGACGCCCCGAGAGCCAGAACAACTGCAGGCTGATCGGTACCCAGG AGCCCGCTGACGACAGCAGCTTTAGCCTGAGCCAGGAGGTGCTGAGACATCTGCGTCAAGAGGAAAAGGAGG AGGTGACCGTGGGCTCCCTGAAGACCAGCGCGTGCCAGCACCAGCACCATGAGCCAGGAGCCCGAGCTGC TGATCAGCGGCATGGAGAAGCCACTGCCCTCAGAACCGACTTCAGC (Hu STING (R284K); 에피토프 태그 없음; 뉴클레오타이드 서열)</p>

[1547]

서열 번호	서열
203	<p>ATGCCTCACAGCAGCCTGCACCCTAGCATCCCTTGCCCTAGAGGCCACGGCGCCAGAAAGGCCGCCCTGG TGCTGCTGAGCGCCTGCCTGGTGACCTGTGGGGCCTGGGGGAGCCTCCTGAGCACACCTGAGATACCTGGT GCTGCACCTGGCCAGCCTGCAGCTGGGCCTGCTGCTGAACGGCGTGTGCAGCCTGGCCGAGGAGCTGAGACA CATCCACAGCAGATACAGAGGCAGCTACTGGAGAACCCTGAGAGCCTGCCTGGGCTGCCCTCTGAGAAGAGG CGCCCTGCTGCTGCTGAGCATCTACTTACTACAGCCTGCCTAACGCCGTGGGCCCTCCTTTCACCTGGATGCT GGCCCTGCTGGGCCTGAGCCAGGCCCTGAACATCCTGCTGGGCCTGAAGGGCCTGGCCCTGCCGAGATCAGC GCCGTGTGCGAGAAGGGCAACTTCAGCGTGGCCACGGCCTGGCCTGGAGCTACTACATCGGCTACCTGAGAC TGATCCTGCCTGAGCTGCAGGCCAGAATCAGAACCTACAACCAGCACTACAACAACCTGCTGAGAGGGCCCGT GAGCCAGAGACTGTACATCCTGCTGCTTGGACTGCGGCGTGCCTGACAACCTGAGCATGGCCGACCCCTAAC ATCAGATTCTGGACAAGCTGCCTCAGCAGACCGGCCGACACGCCGGCATCAAGGACAGAGTGTACAGCAACA GCATCTACGAGCTGCTGGAGAACGGCCAGAGAGCCGGCACCTGCGTGTGGAGTACGCCACCCCTCTGCAGAC CCTGTTGCGCATGAGCCAGTACAGCCAGGCCGGCTTCAGCAGAGAGGACAGACTGGAGCAGGCCAAGCTGTTT TGCAGAACCTGGAGGACATCCTGGCCGACGCCCTGAGAGCCAGAACAACTGCAGACTGATCGCCTACCAGG AGCCTGCCGACGACAGCAGCTTCAGCCTGAGCCAGGAGGTGCTGAGACACCTGAGACAGGAGGAGAAGGAG GAGGTGACCGTGGGCAGCCTGAAGACCAGCGCCGTGCCTAGCACCAGCACCATGAGCCAGGAGCCTGAGCTG CTGATCAGCGGCATGGAGAAGCCTCTGCCTCTGAGAACCAGCTTCAGC</p> <p>(Hu STING(N154S); 에피토프 태그 없음; 뉴클레오타이드 서열)</p>
204	<p>ATGCCTCACAGCAGCCTGCACCCTAGCATCCCTTGCCCTAGAGGCCACGGCGCCAGAAAGGCCGCCCTGG TGCTGCTGAGCGCCTGCCTGGTGACCTGTGGGGCCTGGGGGAGCCTCCTGAGCACACCTGAGATACCTGGT GCTGCACCTGGCCAGCCTGCAGCTGGGCCTGCTGCTGAACGGCGTGTGCAGCCTGGCCGAGGAGCTGAGACA CATCCACAGCAGATACAGAGGCAGCTACTGGAGAACCCTGAGAGCCTGCCTGGGCTGCCCTCTGAGAAGAGG CGCCCTGCTGCTGCTGAGCATCTACTTACTACAGCCTGCCTAACGCCGTGGGCCCTCCTTTCACCTGGATGCT GGCCCTGCTGGGCCTGAGCCAGGCCCTGAACATCCTGCTGGGCCTGAAGGGCCTGGCCCTGCCGAGATCAGC GCCCTGTGCGAGAAGGGCAACTTCAACGTGGCCACGGCCTGGCCTGGAGCTACTACATCGGCTACCTGAGAC TGATCCTGCCTGAGCTGCAGGCCAGAATCAGAACCTACAACCAGCACTACAACAACCTGCTGAGAGGGCCCGT GAGCCAGAGACTGTACATCCTGCTGCTTGGACTGCGGCGTGCCTGACAACCTGAGCATGGCCGACCCCTAAC ATCAGATTCTGGACAAGCTGCCTCAGCAGACCGGCCGACACGCCGGCATCAAGGACAGAGTGTACAGCAACA GCATCTACGAGCTGCTGGAGAACGGCCAGAGAGCCGGCACCTGCGTGTGGAGTACGCCACCCCTCTGCAGAC CCTGTTGCGCATGAGCCAGTACAGCCAGGCCGGCTTCAGCAGAGAGGACAGACTGGAGCAGGCCAAGCTGTTT TGCAAGAACCTGGAGGACATCCTGGCCGACGCCCTGAGAGCCAGAACAACTGCAGACTGATCGCCTACCAGG AGCCTGCCGACGACAGCAGCTTCAGCCTGAGCCAGGAGGTGCTGAGACACCTGAGACAGGAGGAGAAGGAG GAGGTGACCGTGGGCAGCCTGAAGACCAGCGCCGTGCCTAGCACCAGCACCATGAGCCAGGAGCCTGAGCTG CTGATCAGCGGCATGGAGAAGCCTCTGCCTCTGAGAACCAGCTTCAGC</p> <p>(Hu STING(V147L); 에피토프 태그 없음; 뉴클레오타이드 서열)</p>
205	<p>ATGCCTCACAGCAGCCTGCACCCTAGCATCCCTTGCCCTAGAGGCCACGGCGCCAGAAAGGCCGCCCTGG TGCTGCTGAGCGCCTGCCTGGTGACCTGTGGGGCCTGGGGGAGCCTCCTGAGCACACCTGAGATACCTGGT GCTGCACCTGGCCAGCCTGCAGCTGGGCCTGCTGCTGAACGGCGTGTGCAGCCTGGCCGAGGAGCTGAGACA CATCCACAGCAGATACAGAGGCAGCTACTGGAGAACCCTGAGAGCCTGCCTGGGCTGCCCTCTGAGAAGAGG CGCCCTGCTGCTGCTGAGCATCTACTTACTACAGCCTGCCTAACGCCGTGGGCCCTCCTTTCACCTGGATGCT GGCCCTGCTGGGCCTGAGCCAGGCCCTGAACATCCTGCTGGGCCTGAAGGGCCTGGCCCTGCCGAGATCAGC GCCGTGTGCGAGAAGGGCAACTTCAACGTGGCCACGGCCTGGCCTGGAGCTACTACATCGGCTACCTGAGAC TGATCCTGCCTGAGCTGCAGGCCAGAATCAGAACCTACAACCAGCACTACAACAACCTGCTGAGAGGGCCCGT GAGCCAGAGACTGTACATCCTGCTGCTTGGACTGCGGCGTGCCTGACAACCTGAGCATGGCCGACCCCTAAC ATCAGATTCTGGACAAGCTGCCTCAGCAGACCGGCCGACACGCCGGCATCAAGGACAGAGTGTACAGCAACA GCATCTACGAGCTGCTGGAGAACGGCCAGAGAGCCGGCACCTGCGTGTGGAGTACGCCACCCCTCTGCAGAC CCTGTTGCGCATGAGCCAGTACAGCCAGGCCGGCTTCAGCAGAGAGGACAGACTGGAGCAGGCCAAGCTGTTT TGCAGAACCTGGAGGACATCCTGGCCGACGCCCTGAGAGCCAGAACAACTGCAGACTGATCGCCTACCAGC AGCCTGCCGACGACAGCAGCTTCAGCCTGAGCCAGGAGGTGCTGAGACACCTGAGACAGGAGGAGAAGGAG GAGGTGACCGTGGGCAGCCTGAAGACCAGCGCCGTGCCTAGCACCAGCACCATGAGCCAGGAGCCTGAGCTG CTGATCAGCGGCATGGAGAAGCCTCTGCCTCTGAGAACCAGCTTCAGC</p> <p>(Hu STING (E315Q); 에피토프 태그 없음; 뉴클레오타이드 서열)</p>

[1548]



서열 번호	서열
206	<p>ATGCCTCACAGCAGCCTGCACCCTAGCATCCCTTGCCCTAGAGGCCACGGCGCCAGAAAGGCCGCCCTGG TGCTGCTGAGCGCCTGCTGTTGACCTGTGGGGCCTGGGCGAGCCTCTGAGCACACCTGAGATACCTGGT GCTGCACCTGGCCAGCCTGCAGCTGGGCTGCTGCTGAACGGCGTGTGCAGCCTGGCCGAGGAGCTGAGACA CATCCACAGCAGATACAGAGGCAGCTACTGGAGAACCCTGAGAGCCTGCCTGGGCTGCCCTCTGAGAAGAGG CGCCCTGCTGCTGCTGAGCATCTACTTCTACTACAGCCTGCCTAACGCCGTGGGCCCTCCTTTCACCTGGATGCT GGCCCTGCTGGGCTGAGCCAGGCCCTGAACATCCTGCTGGGCTGAAGGGCTGGCCCTGCCGAGATCAGC GCCGTGTGCGAGAAGGGCAACTTCAACGTGGCCACGGCCTGGCCTGGAGCTACTACATCGGCTACCTGAGAC TGATCCTGCTGAGCTGCAGGCCAGAAATCAGAACTACAACCAGCACTACAACAACCTGCTGAGAGGGCCGCT GAGCCAGAGACTGTACATCCTGCTGCTCTGGACTGCGGCTGCCTGACAACCTGAGCATGGCCGACCCCTAAC ATCAGATTCTGGACAAGCTGCTCAGCAGACCGGCGACACGCGCGCATCAAGGACAGAGTGTACAGCAACA GCATCTACGAGCTGCTGGAGAACGGCCAGAGAGCCGGCACCTGCGTGTGAGTACGCCACCCCTCTGCAGAC CCTGTTGCGCATGAGCCAGTACAGCCAGGCCGGCTTACAGCAGAGAGGACAGACTGGAGCAGGCCAAGCTGTTT TGCAGAACCTGGAGGACATCTGGCCGACGCCCTGAGAGCCAGAACAACTGCAGACTGATCGCTACCAGG AGCCTGCCGACGACAGCAGCTTCAAGCTGAGCCAGGAGGTGCTGAGACACCTGAGACAGGAGGAGAAGGAG GAGGTGACCGTGGGCGAGCCTGAAGACCAGCGCGTGCCTAGCACCAGCACCATGAGCCAGGAGCCTGAGCTG CTGATCAGCGGCATGAGAAGCCTCTGCCTCTGGCCACCGACTTCAGC (Hu STING (R375A); no epitope tag; nucleotide sequence)</p>
207	<p>ATGCCTCACAGCAGCCTGCACCCTAGCATCCCTTGCCCTAGAGGCCACGGCGCCAGAAAGGCCGCCCTGG TGCTGCTGAGCGCCTGCTGTTGACCTGTGGGGCCTGGGCGAGCCTCTGAGCACACCTGAGATACCTGGT GCTGCACCTGGCCAGCCTGCAGCTGGGCTGCTGCTGAACGGCGTGTGCAGCCTGGCCGAGGAGCTGAGACA CATCCACAGCAGATACAGAGGCAGCTACTGGAGAACCCTGAGAGCCTGCCTGGGCTGCCCTCTGAGAAGAGG CGCCCTGCTGCTGCTGAGCATCTACTTCTACTACAGCCTGCCTAACGCCGTGGGCCCTCCTTTCACCTGGATGCT GGCCCTGCTGGCCTGAGCCAGGCCCTGAACATCCTGCTGGGCTGAAGGGCTGGCCCTGCCGAGATCAGC GCCCTGTGCGAGAAGGGCAACTTCAAGCATGGCCACGGCCTGGCCTGGAGCTACTACATCGGCTACCTGAGAC TGATCCTGCTGAGCTGCAGGCCAGAAATCAGAACTACAACCAGCACTACAACAACCTGCTGAGAGGGCCGCT GAGCCAGAGACTGTACATCCTGCTGCTCTGGACTGCGGCTGCCTGACAACCTGAGCATGGCCGACCCCTAAC ATCAGATTCTGGACAAGCTGCTCAGCAGACCGGCGACACGCGCGCATCAAGGACAGAGTGTACAGCAACA GCATCTACGAGCTGCTGGAGAACGGCCAGAGAGCCGGCACCTGCGTGTGAGTACGCCACCCCTCTGCAGAC CCTGTTGCGCATGAGCCAGTACAGCCAGGCCGGCTTACAGCAGAGAGGACAGACTGGAGCAGGCCAAGCTGTTT TGAGAACCCTGGAGGACATCTGGCCGACGCCCTGAGAGCCAGAACAACTGCAGACTGATCGCTACCAGG AGCCTGCCGACGACAGCAGCTTCAAGCTGAGCCAGGAGGTGCTGAGACACCTGAGACAGGAGGAGAAGGAG GAGGTGACCGTGGGCGAGCCTGAAGACCAGCGCGTGCCTAGCACCAGCACCATGAGCCAGGAGCCTGAGCTG CTGATCAGCGGCATGAGAAGCCTCTGCCTCTGAGAACCAGACTTCAGC (Hu STING(V147L/N154S/V155M); 에피토프 태그 없음; 뉴클레오타이드 서열)</p>
208	<p>ATGCCTCACAGCAGCCTGCACCCTAGCATCCCTTGCCCTAGAGGCCACGGCGCCAGAAAGGCCGCCCTGG TGCTGCTGAGCGCCTGCTGTTGACCTGTGGGGCCTGGGCGAGCCTCTGAGCACACCTGAGATACCTGGT GCTGCACCTGGCCAGCCTGCAGCTGGGCTGCTGCTGAACGGCGTGTGCAGCCTGGCCGAGGAGCTGAGACA CATCCACAGCAGATACAGAGGCAGCTACTGGAGAACCCTGAGAGCCTGCCTGGGCTGCCCTCTGAGAAGAGG CGCCCTGCTGCTGCTGAGCATCTACTTCTACTACAGCCTGCCTAACGCCGTGGGCCCTCCTTTCACCTGGATGCT GGCCCTGCTGGGCTGAGCCAGGCCCTGAACATCCTGCTGGGCTGAAGGGCTGGCCCTGCCGAGATCAGC GCCCTGTGCGAGAAGGGCAACTTCAAGCATGGCCACGGCCTGGCCTGGAGCTACTACATCGGCTACCTGAGAC TGATCCTGCTGAGCTGCAGGCCAGAAATCAGAACTACAACCAGCACTACAACAACCTGCTGAGAGGGCCGCT GAGCCAGAGACTGTACATCCTGCTGCTCTGGACTGCGGCTGCCTGACAACCTGAGCATGGCCGACCCCTAAC ATCAGATTCTGGACAAGCTGCTCAGCAGACCGGCGACACGCGCGCATCAAGGACAGAGTGTACAGCAACA GCATCTACGAGCTGCTGGAGAACGGCCAGAGAGCCGGCACCTGCGTGTGAGTACGCCACCCCTCTGCAGAC CCTGTTGCGCATGAGCCAGTACAGCCAGGCCGGCTTACAGCAGAGAGGACATGCTGGAGCAGGCCAAGCTGTTT TGCAGAACCTGGAGGACATCTGGCCGACGCCCTGAGAGCCAGAACAACTGCAGACTGATCGCTACCAGG AGCCTGCCGACGACAGCAGCTTCAAGCTGAGCCAGGAGGTGCTGAGACACCTGAGACAGGAGGAGAAGGAG GAGGTGACCGTGGGCGAGCCTGAAGACCAGCGCGTGCCTAGCACCAGCACCATGAGCCAGGAGCCTGAGCTG CTGATCAGCGGCATGAGAAGCCTCTGCCTCTGAGAACCAGACTTCAGC (Hu STING(R284M/V147L/N154S/V155M); 에피토프 태그 없음; 뉴클레오타이드 서열)</p>
209	<p>TGATAATAGGCTGGAGCCTCGGTGGCCTAGCTTCTTGCCCTTGGGCTCCCCCAGCCCCCTCTCCCTTC CTGCACCCGTACCCCCAAACACCATTTGTCACTCCAGTGGTCTTTGAATAAAGTCTGAGTGGGCGGC (miR122 결합 부위를 함유하는 STING V155M 작제물에서 사용되는 3'UTR)</p>

[1549]





표 5

	결장	%	직장	%	총	%
12D	635	35.04	178	33.46	813	34.68
12V	364	20.09	124	23.31	488	20.82
13D	338	18.65	88	16.54	426	18.17
						73.68

[1556]

[1557]

도 16, 도 17 및 도 18은 각각 HRAS, KRAS 및 NRAS에 대한 아이소폼-특이적 점 돌연변이를 도시한다. 각각의 점 돌연변이를 갖는 종양의 총 수를 나타내는 데이터는 COSMIC v52 방출로부터 수집되었다. 각각의 아미노산 치환을 생성하는 단일 염기 돌연변이를 나타낸다. 각각의 암 유형에 대한 각각의 아이소폼에 대해 가장 빈번한 돌연변이를 회색 음영으로 강조한다. H/L: 조혈/림프구 조직. (Prior *et al.* Cancer Res. 2012 May 15; 72(10): 2457-2467).

[1558]

추가로, 2차 KRAS 돌연변이는 EGFR 차단 내성 환자에서 동정하였다. RAS는 EGFR의 하류이며, EGFR 차단 요법에 대한 내성 메커니즘을 구성하는 것을 발견하였다. EGFR 차단 내성 KRAS 돌연변이체 종양은 본 명세서에 개시한 조성물 및 방법을 이용하여 표적화할 수 있다. 소수의 경우에, 하나 초과와 KRAS 돌연변이를 동일한 환자에서 동정하였다(4개까지의 상이한 돌연변이가 공동으로 생김). 이 돌연변이의 범위는 결장직장암에서 1차 종양 미스센스 돌연변이체와 적어도 다소 상이한 것으로 나타난다. (Diaz *et al.* The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers, Nature 486:537 (2012); Misale *et al.* Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer, Nature 486:532 (2012)). 도 19는 EGFR 차단 내성의 획득 후 2차 KRAS 돌연변이를 도시한다. (Diaz *et al.* The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers, Nature 486:537 (2012)). 도 20은 EGFR 차단 후 2차 KRAS 돌연변이를 도시한다. (Misale *et al.* Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer, Nature 486:532 (2012)).

[1559]

도 21에 나타난 바와 같이, NRAS는 또한 결장직장암에서 돌연변이되지만, KRAS보다 더 낮은 빈도이다.

[1560]

이 실시예에서, 동물에 적어도 하나의 활성화 종양유전자 돌연변이 펩타이드, 예를 들어, 적어도 하나의 활성화 KRAS 돌연변이를 암호화하는 mRNA를 포함하는 RNA 암 백신을 투여한다. HLA-A\*11:01 Tg 마우스(타코닉(Taconic), 군주 9660F, n=4) 또는 HLA-A\*2:01 Tg 마우스(타코닉, 군주 9659F, n=4)에 다음과 같이 돌연변이된 KRAS를 암호화하는 mRNA를 투여하였다: 제1일에 돌연변이된 KRAS를 암호화하는 mRNA를 투여하고, 제8일에 채혈하고 나서, 제15일에 돌연변이된 KRAS를 암호화하는 mRNA를 투여하고, 제22일에 동물을 희생시켰다. 시험군을 다음과 같이 표 6에 나타낸다:

표 6

시험군	그룹	시험/대조군 물질	유전자 아류반트	비허글	경로	투약 요법
KRAS-MUT	1	KRAS G12D	없음 (NTFIX)	화합물 25	IM	제1일, 제15일
	2	KRAS G12V	없음 (NTFIX)	화합물 25	IM	제1일, 제15일
	3	KRAS G13D	없음 (NTFIX)	화합물 25	IM	제1일, 제15일
Ag 없음	4	NTFIX	NTFIX	화합물 25	IM	제1일, 제15일

[1561]

[1562]

0.5mg/kg의 용량(20g 동물 당 10μg)으로 동물에 mRNA를 투여한다. 골지플러그(GolgiPlug)(브레펠딘 A)의 존재 하에 37도씨에서 4시간 동안 생체의 재 자극(펩타이드 당 1μg/ml)을 시험한다. KRAS G12D, KRAS G12V, KRAS G13D, KRAS G12WT, KRAS G13WT, 및 펩타이드 없음에 대해 세포내 사이토카인 염색(ICS)을 시험한다.

[1563]

KRAS 돌연변이를 암호화하는 mRNA를 T 세포를 생성하는 능력에 대해 시험한다. KRAS 돌연변이를 암호화하는

mRNA의 효능을, 예를 들어, 펩타이드 백신접종과 비교한다.

[1564] 예시적인 KRAS 돌연변이체 펩타이드 서열 및 mRNA 작제물을 표 7 내지 9에 나타낸다.

표 7

KRAS 돌연변이체 펩타이드 서열

	9 AA 서열	15량체	25량체
G12D	VVGADGVGK (서열번호 316)	KLVVVGADGVGKSAL (서열번호 317)	MTEYKLVVVGADGVGKSALTIQLIQ (서열번호 318)
G12V	VVGAVGVGK (서열번호 319)	KLVVVGAVGVGKSAL (서열번호 320)	MTEYKLVVVGAVGVGKSALTIQLIQ (서열번호 321)
G13D	VGAGDVGKS (서열번호 322)	LVVVGAGDVGKSALT (서열번호 323)	MTEYKLVVVGAGDVGKSALTIQLIQ (서열번호 324)
G12C	VVGACGVGK (서열번호 325)	KLVVVGACGVGKSA (서열번호 326)	MTEYKLVVVGACGVGKSALTIQLIQ (서열번호 327)
WT			MTEYKLVVVGAGGVGKSALTIQLIQ (서열번호 328)

[1565]

표 8

KRAS 돌연변이체 아미노산 서열

KRAS 돌연변이체	아미노산 서열
KRAS(G12D) 15량체	MKLVVVGADGVGKSAL (서열번호 329)
KRAS(G12V) 15량체	MKLVVVGAVGVGKSAL (서열번호 330)
KRAS(G13D) 15량체	MLVVVGAGDVGKSALT (서열번호 331)
KRAS(G12D) 25량체	MTEYKLVVVGADGVGKSALTIQLIQ (서열번호 332)
KRAS(G12V) 25량체	MTEYKLVVVGAVGVGKSALTIQLIQ (서열번호 333)
KRAS(G13D) 25량체	MTEYKLVVVGAGDVGKSALTIQLIQ (서열번호 334)
KRAS(G12D) 15량체 <sup>^3</sup>	MKLVVVGADGVGKSALKLVVVVGADGVGKSALKLVVVVGADGVGKSAL (서열번호 335)
KRAS(G12V) 15량체 <sup>^3</sup>	MKLVVVGAVGVGKSALKLVVVVGAVGVGKSALKLVVVVGAVGVGKSAL (서열번호 336)
KRAS(G13D) 15량체 <sup>^3</sup>	MLVVVGAGDVGKSALTLVVVGAGDVGKSALTLVVVGAGDVGKSALT (서열번호 337)
KRAS(G12D) 25량체 <sup>^3</sup>	MTEYKLVVVGADGVGKSALTIQLIQMTEYKLVVVGADGVGKSALTIQL IQMTEYKLVVVGADGVGKSALTIQLIQ (서열번호 338)
KRAS(G12V) 25량체 <sup>^3</sup>	MTEYKLVVVGAVGVGKSALTIQLIQMTEYKLVVVGAVGVGKSALTIQL IQMTEYKLVVVGAVGVGKSALTIQLIQ (서열번호 339)
KRAS(G13D) 25량체 <sup>^3</sup>	MTEYKLVVVGAGDVGKSALTIQLIQMTEYKLVVVGAGDVGKSALTIQL IQMTEYKLVVVGAGDVGKSALTIQLIQ (서열번호 340)
KRAS(G12C) 25량체	MTEYKLVVVGACGVGKSALTIQLIQ (서열번호 341)
KRAS(G12C) 25량체 <sup>^3</sup>	MTEYKLVVVGACGVGKSALTIQLIQMTEYKLVVVGACGVGKSALTIQL IQMTEYKLVVVGACGVGKSALTIQLIQ (서열번호 342)
KRAS(WT) 25량체	MTEYKLVVVGAGGVGKSALTIQLIQ (서열번호 343)

[1566]



표 9

KRAS 돌연변이체 항원 mRNA 서열

mRNA 명칭	Orf 서열 (아미노산)	Orf 서열 (뉴클레오타이드)
KRAS (G12D) 25량체	MTEYKLVVVGADGV GKSALTIQLIQ (SEQ (서열번호 357))	ATGACCGAGTACAAGCTGGTGGTGGTGGGCGCCGAC GGCGTGGGCAAGAGCGCCCTGACCATCCAGCTGATC CAG (서열번호 344)
KRAS (G12V) 25량체	MTEYKLVVVGAVGV GKSALTIQLIQ (서열번호 358)	ATGACCGAGTACAAGCTGGTGGTGGTGGGCGCCGTG GGCGTGGGCAAGAGCGCCCTGACCATCCAGCTGATC CAG (서열번호 345)
KRAS (G13D) 25량체	MTEYKLVVVGADGV GKSALTIQLIQ (서열번호 359)	ATGACCGAGTACAAGCTGGTGGTGGTGGGCGCCGGC GACGTGGGCAAGAGCGCCCTGACCATCCAGCTGATC CAG (서열번호 346)
KRAS (G12D) 25량체 <sup>3</sup>	MTEYKLVVVGADGV GKSALTIQLIQMTEY KLVVVGADGVGKSA LTIQLIQMTEYKLVV VGADGVGKSALTIQL IQ (서열번호 360)	ATGACCGAGTACAAGCTTAGTGGTTGTGGGCGCCGAC GGCGTGGGCAAGAGCGCCCTCACCATCCAGCTTATC CAGATGACGGAATATAAGTTAGTAGTAGTGGGAGCC GACGGTGTGCGCAAGTCCGCTTTGACCATTTCAACTT ATTCAGATGACAGAGTATAAGCTGGTTCGTTGTAGGC GCAGACGGCGTTGAAAAGTCCGCACTGACGATCCAG TTGATCCAG (서열번호 347)
KRAS (G12V) 25량체 <sup>3</sup>	MTEYKLVVVGAVGV GKSALTIQLIQMTEY KLVVVGAVGVGKSA LTIQLIQMTEYKLVV VGAVGVGKSALTIQL IQ (서열번호 361)	ATGACCGAGTACAAGCTCGTCGTGGTGGGCGCCGTG GGCGTGGGCAAGAGCGCCCTAACCATCCAGTTGATC CAGATGACCGAATATAAGCTCGTGGTAGTCGGAGCG GTGGGCGTTGGCAAGTCAGCGCTAACAAATACTA ATCCAAATGACCGAATACAAGCTAGTTGTAGTCGGT GCCGTGCGCGTTGAAAAGTCAGCCCTTACAATTACG CTCATTCAG (서열번호 348)
KRAS (G13D) 25량체 <sup>3</sup>	MTEYKLVVVGADGV GKSALTIQLIQMTEY KLVVVGADGVGKSA LTIQLIQMTEYKLVV VGADGVGKSALTIQL IQ (서열번호 362)	ATGACCGAGTACAAGCTCGTAGTGGTTGGCGCCGGC GACGTGGGCAAGAGCGCCCTAACCATCCAGCTCATC CAGATGACAGAATATAAGCTTGTGGTTGTGGGAGCA GGAGACGTGGGAAAAGAGTGCCTTGACGATTCAACTC ATACAGATGACCGAATACAAGTTGGTGGTGGTTCGGC GCAGGTGACGTTGGTAAGTCTGCACTAACTATACAA CTGATCCAG (서열번호 349)
KRAS (G12C) 25량체	MTEYKLVVVGACGV GKSALTIQLIQ (서열번호 363)	ATGACCGAGTACAAGCTGGTGGTGGTGGGCGCCTGC GGCGTGGGCAAGAGCGCCCTGACCATCCAGCTGATC CAG (서열번호 350)
KRAS (G12C) 25량체 <sup>3</sup>	MTEYKLVVVGACGV GKSALTIQLIQMTEY KLVVVGACGVGKSA LTIQLIQMTEYKLVV VGACGVGKSALTIQL IQ (서열번호 364)	ATGACCGAGTACAAGCTCGTGGTTGTTGGCGCCCTGC GGCGTGGGCAAGAGCGCCCTCACCATCCAGCTCATC CAGATGACAGAGTATAAGTTAGTCGTTGTTCGGAGCT TGCGGAGTTGAAAAGTCGGCGCTCACCATTCAACTC ATACAAATGACAGAATATAAGTTAGTGGTGGTGGGT GCGTGTGGCGTTGGCAAGAGTGCCTTACTATCCAG CTCATTCAG (서열번호 351)
KRAS (WT) 25량체	MTEYKLVVVGAGGV GKSALTIQLIQ (서열번호 365)	ATGACCGAGTACAAGCTGGTGGTGGTGGGCGCCGGC GGCGTGGGCAAGAGCGCCCTGACCATCCAGCTGATC CAG (서열번호 352)

화학: 유리단 변형된 N1-메틸 슈도유리딘 (m1P)

캡: C1

꼬리: T100

5' UTR 서열(표준 5' 측접 (생성 FP+T7 부위+ 5'UTR을 포함함) ):  
TCAAGCTTTTGGACCCTCGTACAGAAGCTAATACGACTCACTATAGGGAAATAAG  
AGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACC (SEQ ID NO:353)

5' UTR 서열(프로모터 없음) : GGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAA  
GAAATATAAGAGCCACC (서열번호 354)

3' UTR 서열(인간 3'UTR XbaI 없음) : TGATAATAGGCTGGAGCCTCGGTGGCCA  
TGCTTCTTGCCCCCTTGGGCCTCCCCCAGCCCCCTCCTCCCCCTTCTGACCCGTAC  
CCCCGTGGTCTTTGAATAAAGTCTGAGTGGGCGGC (서열번호 355)

실시예 8. p53에서의 재발 스플라이스 부위 및 침묵 돌연변이 "핫스팟"

p53 유전자(공식 기호 TP53)를 인간암에서의 임의의 다른 유전자보다 더 빈번하게 돌연변이시킨다. 거대 코호트 연구는 대부분의 p53 돌연변이에 대해, 게놈 위치가 1명 또는 단지 소수의 환자에 대해 독특하며, 돌연변이가

환자의 특정 집단에 대해 설계된 치료 백신에 대한 재발성 신생항원으로서 사용될 수 없다는 것을 나타내었다. 그러나, p53 좌위의 소집단은 "핫스팟" 패턴을 나타내는데, 이때 유전자에서 몇몇 위치는 상대적으로 높은 빈도로 돌연변이된다. 현저하게는, 이들 재발성으로 돌연변이된 영역의 대부분은 엑손-인트론 경계에서 생기며, mRNA 스플라이싱 기작에 의해 인식되는 정규 뉴클레오타이드 서열 모티프를 붕괴시킨다. 국소 아미노산 서열에 대한 변화가 예측된다고 하더라도(즉, 동의 또는 인트론 돌연변이에 대해) 스플라이싱 모티프의 돌연변이는 최종 mRNA 서열을 변경시킬 수 있다. 따라서, 그들이 예측 가능하지 않은 방법에서 mRNA 스플라이싱을 변경시키고, 번역 단백질에 대한 심한 기능성 영향을 발휘하지만, 이들 돌연변이는 종종 공통 주석 도구에 의해 "비암호화"로서 주석이 달리고, 추가 분석에 대해 무시된다. 대안적으로 스플라이싱된 아이소폼이 인프레임 서열 변화를 생성한다면(즉, PTC가 생성되지 않음), NMD에 의한 고갈을 벗어나며 HLA 시스템에 의해 세포 표면 상에서 용이하게 발현되고, 처리되며 제시될 수 있다. 추가로, 돌연변이-유래된 대안의 스플라이싱은 보통 "모호"(즉, 정상 조직에서 발현되지 않음)하며, 따라서 비-자기 신생항원으로서 T-세포에 의해 인식될 수 있다.

[1571] 몇몇 돌연변이 부위는 RNA-seq에 의해 보유된 인트론 또는 모호한 스플라이싱을 생성하는 것을 확인하였다. 2개의 대표적인 돌연변이-유래 펩타이드는 암호화 게놈에서 어디에서나 매칭이 없는 다중 HLA-A2 결합 에피토프를 가진다.

[1572] 동정한 p53에서 재발 돌연변이는 하기:

[1573] (1) 에피토프 AVSPCISFVW(서열번호 233)(HLA-B\*57:01, HLA-B\*58:01), HPLASCQCFF(서열번호 234)(HLA-B\*35:01, HLA-B\*53:01), FVWNFGIPL(서열번호 235)(HLA-A\*02:01, HLA-A\*02:06, HLA-B\*35:01)를 함유하는 펩타이드 서열 TAKSVTCTVSCPEGLASMLQLCLAVSPCISFVWNFGIPLHPLASCQCFFIVYPLNV(서열번호 232)를 갖는 보유된 인트론을 유도하는, 코돈 p.T125에 이웃하는 정규 5' 스플라이스 부위에서의 돌연변이;

[1574] (2) 에피토프 LQVLSLGTSY(서열번호 237)(HLA-B\*15:01), FQSNTQNAV(서열번호 238)(HLA-B\*15:01)를 함유하는 펩타이드 서열 EYFTLQVLSLGTSYQVESFQSNTQNAVFFLTPLPAIGAFAIRGQ(서열번호 236)를 갖는 보유된 인트론을 유도하는, 코돈 p.331에 이웃하는 정규 5' 스플라이스 부위에서의 돌연변이;

[1575] (3) 에피토프 CTMFCQLAK(서열번호 240)(HLA-A\*11:01), KSVTCTMF(서열번호 241)(HLA-B\*58:01)를 함유하는 신규한 스페닝 펩타이드 서열 AKSVTCTMFCQLAK(서열번호 239)를 생성하는 모호한 대안의 엑손 3' 스플라이스 부위를 유도하는, 코돈 p.126에 이웃하는 정규 3' 스플라이스 부위에서의 돌연변이; 및 (4) 에피토프 VPYEPPEVW(서열번호 243)(HLA-B\*53:01, HLA-B\*51:01), LTVPPSTAW(서열번호 244)(HLA-B\*58:01, HLA-B\*57:01)를 함유하는 신규한 스페닝 펩타이드 서열 VPYEPPEVWLALTVPSTAWAA(서열번호 242)를 생성하는 모호한 대안의 인트론 5' 스플라이스 부위를 유도하는 코돈 p.224에 이웃하는 정규 5' 스플라이스 부위에서의 돌연변이를 포함하되, 전사체 코돈 위치는 앙상블 v83 인간 게놈 주석으로부터의 정규 전장 p53 전사체 ENST00000269305(서열번호 245)를 지칭한다.

[1576] 균등론

[1577] 당업자는 단지 일상적인 실험을 이용하여 본 명세서에 기재된 개시내용의 구체적 실시형태에 대한 다수의 동등물을 인식하거나 또는 확인할 수 있을 것이다. 이러한 동등물은 다음의 청구범위에 의해 포함되는 것으로 의도된다.

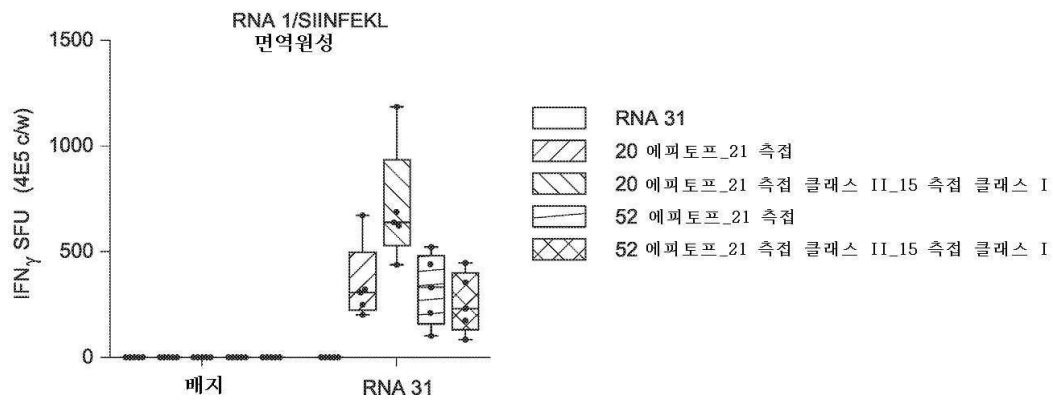
[1578] 관심 대상의 하나 이상의 값이 적용되는 용어 "대략" 또는 "약"은 언급된 기준 값과 유사한 값을 지칭한다. 소정의 실시형태에서, 용어 "대략" 또는 "약"은 달리 언급되지 않는 한 또는 내용으로부터 달리 분명하지 않다면, 언급된 기준 값의 방향(초과 또는 미만)에서 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 이하에 속하는 값의 범위를 지칭한다(이러한 숫자가 가능한 값의 100%를 초과하는 경우를 제외함).

[1579] 본 명세서에 개시된 특허 문헌을 포함하는 모든 참고문헌은 그들의 전문이 참고로 편입된다.

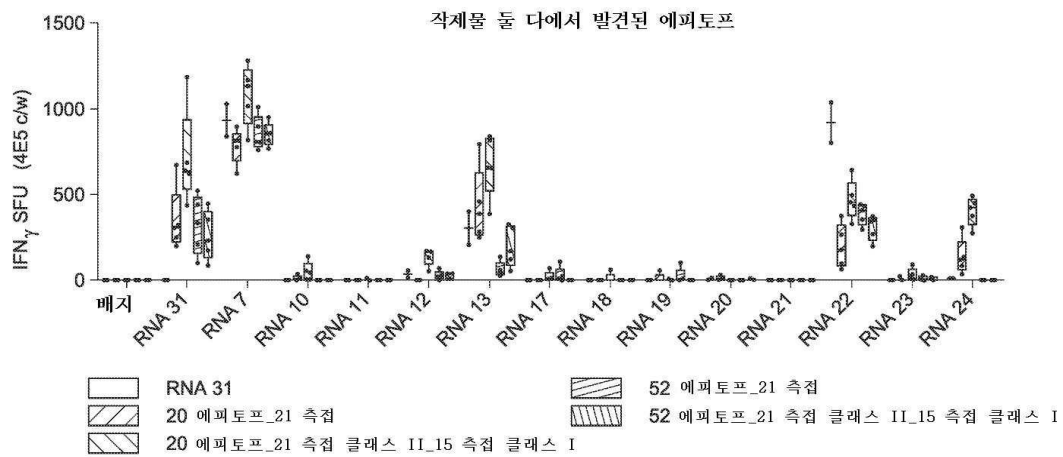


## 도면

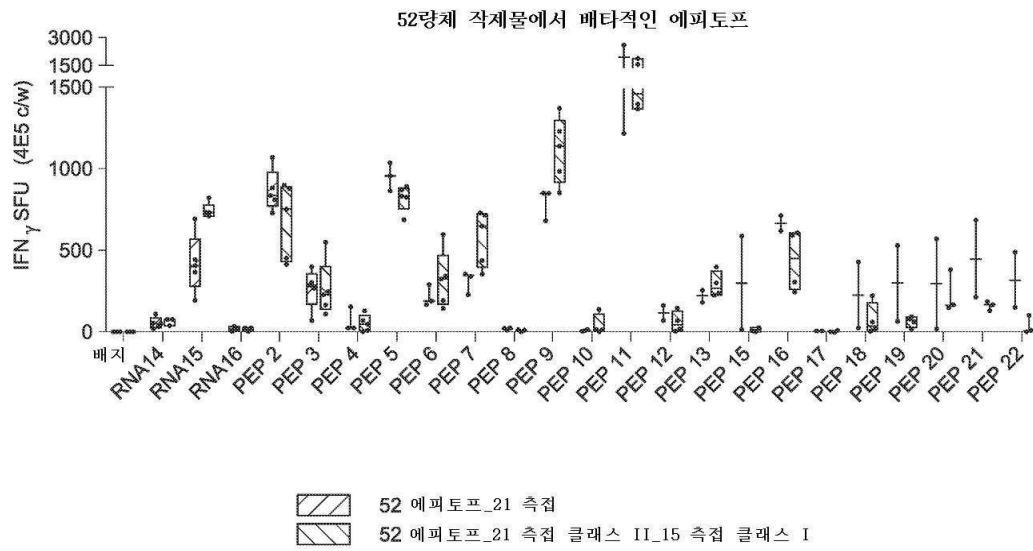
### 도면1



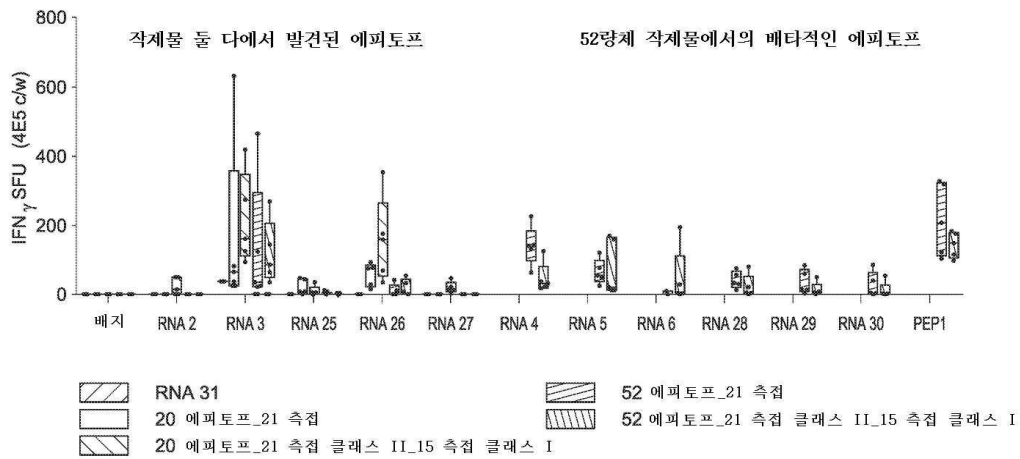
### 도면2



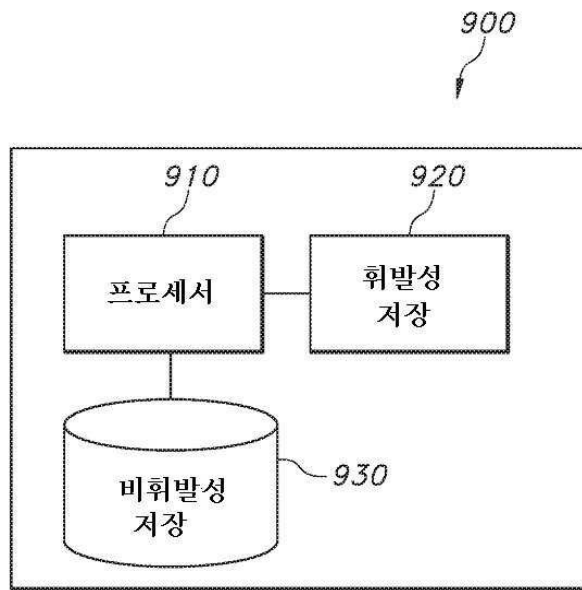
도면3



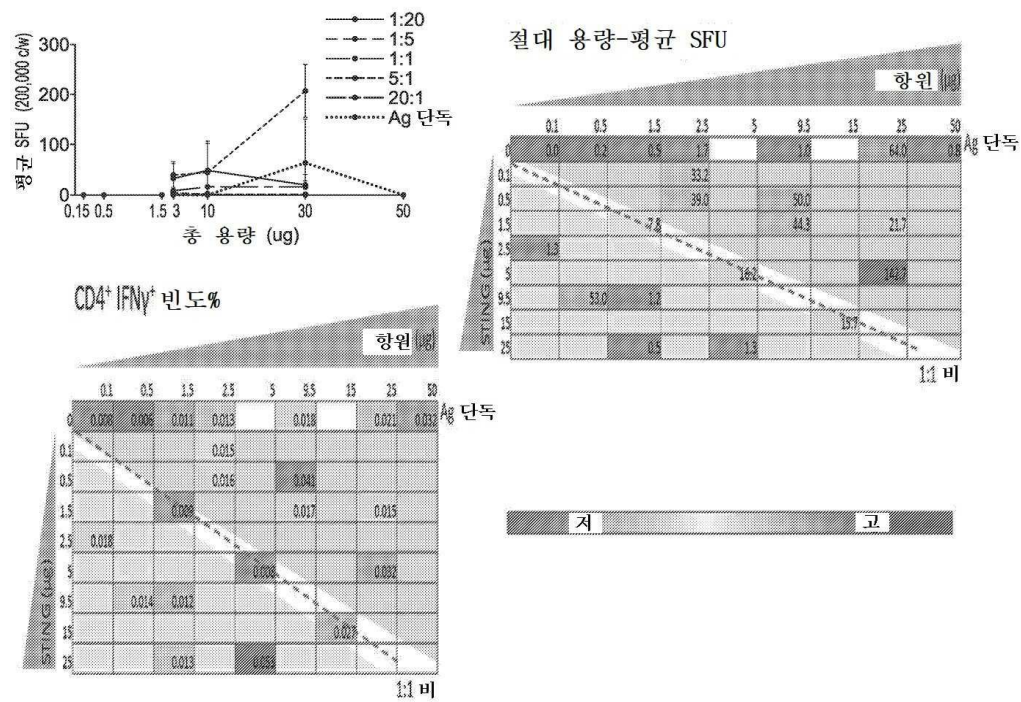
도면4



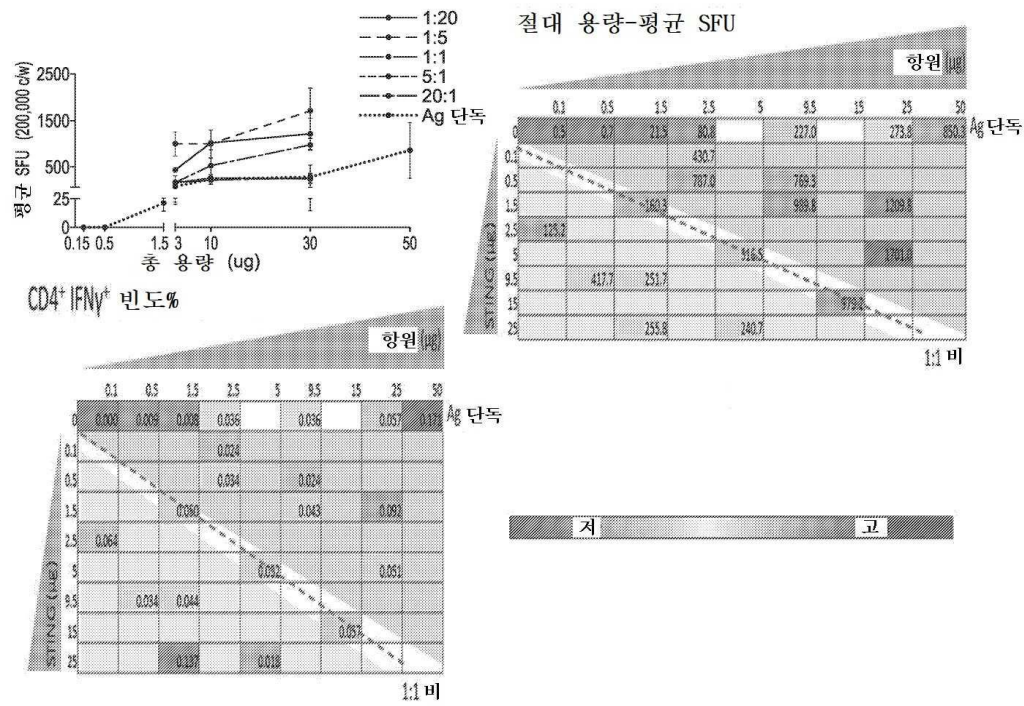
도면5



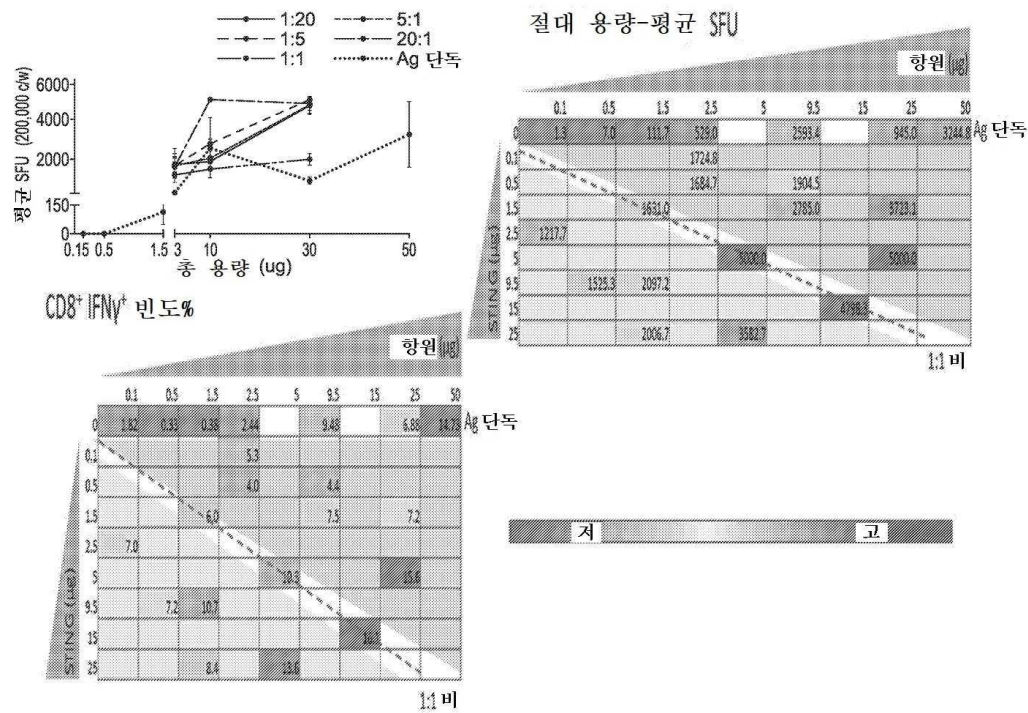
도면6



도면7

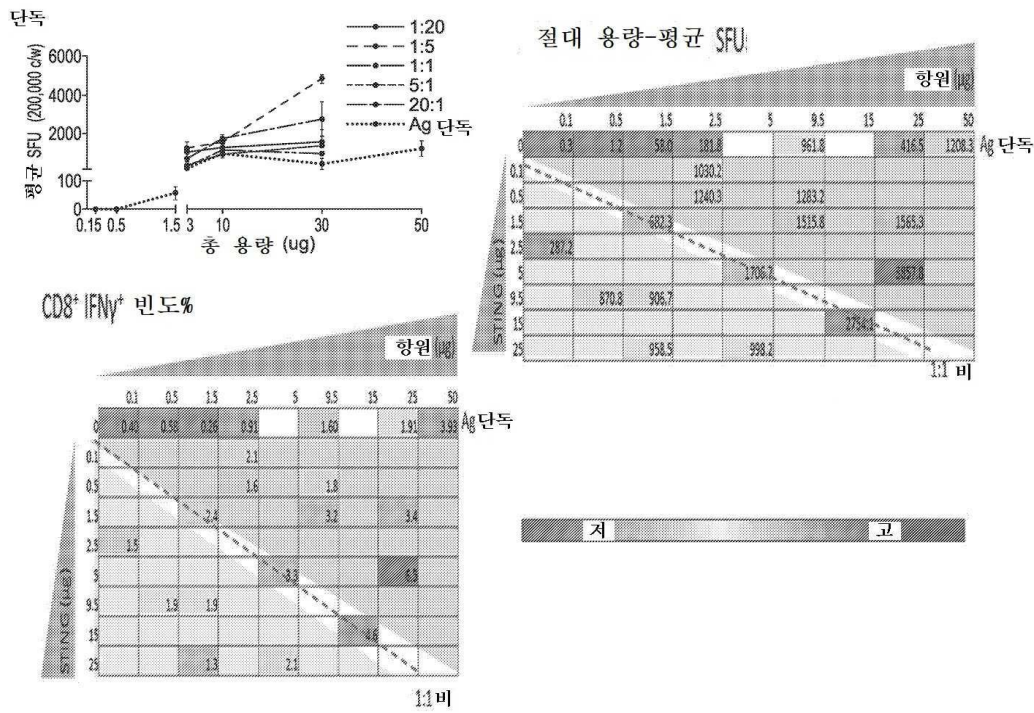


도면8

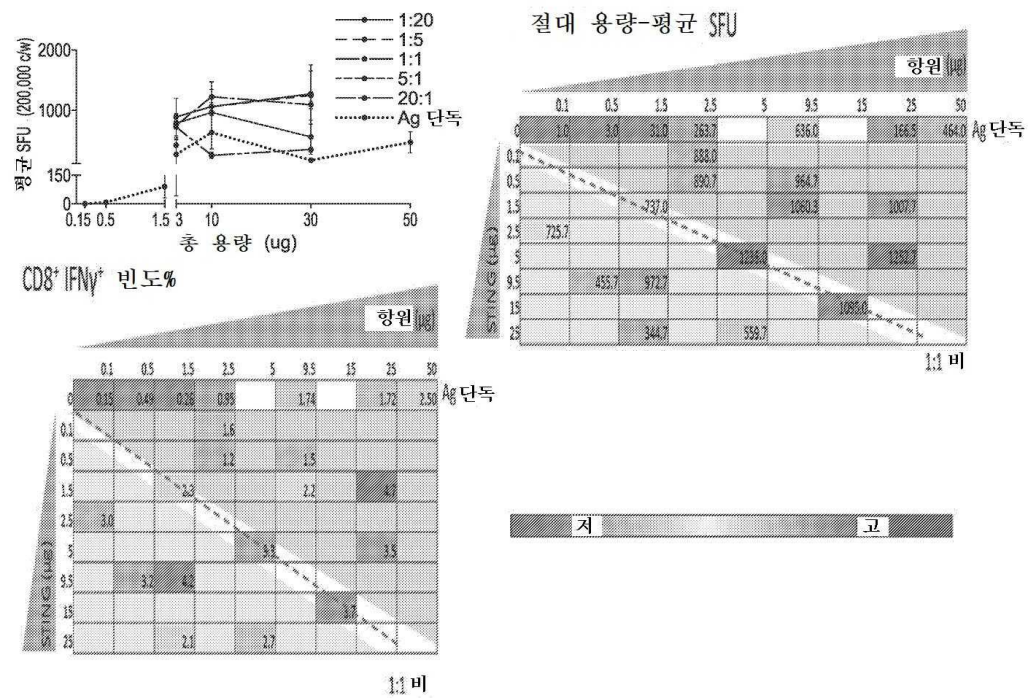




도면9

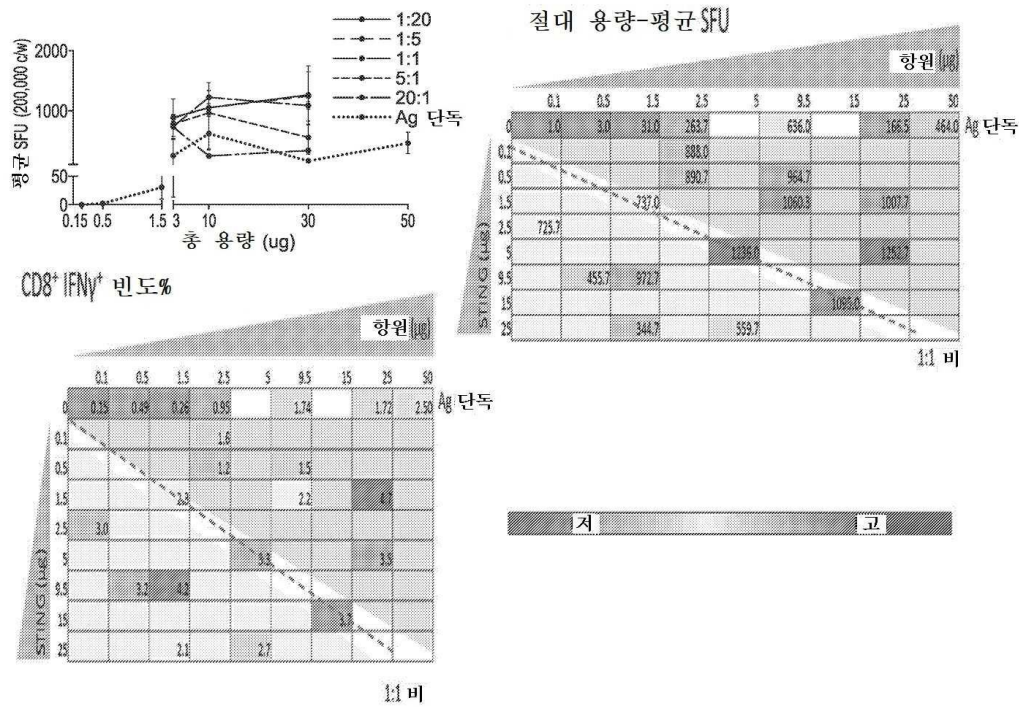


도면10

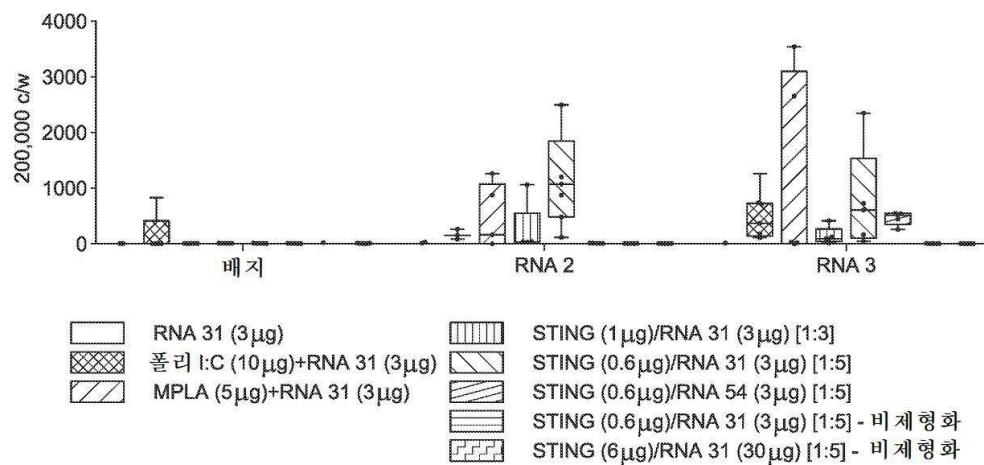




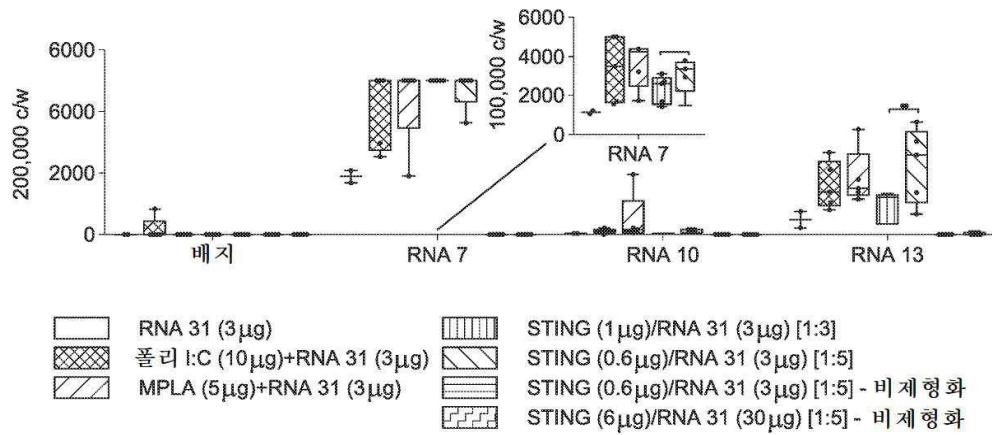
도면11



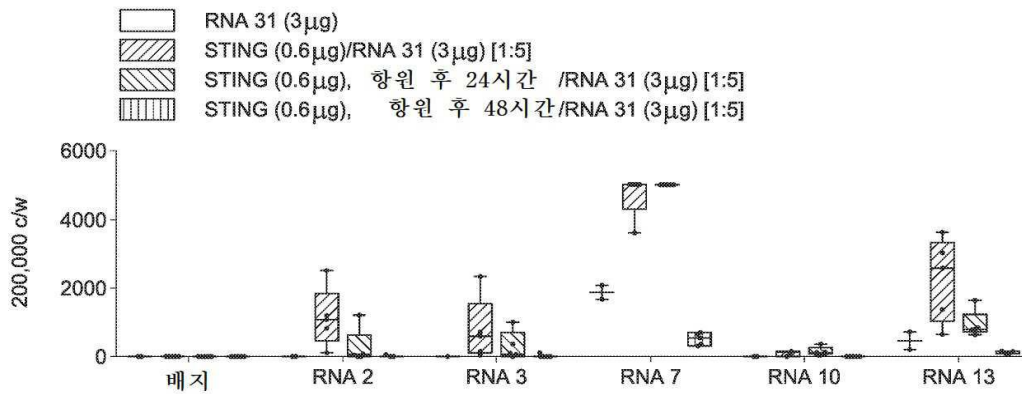
도면12



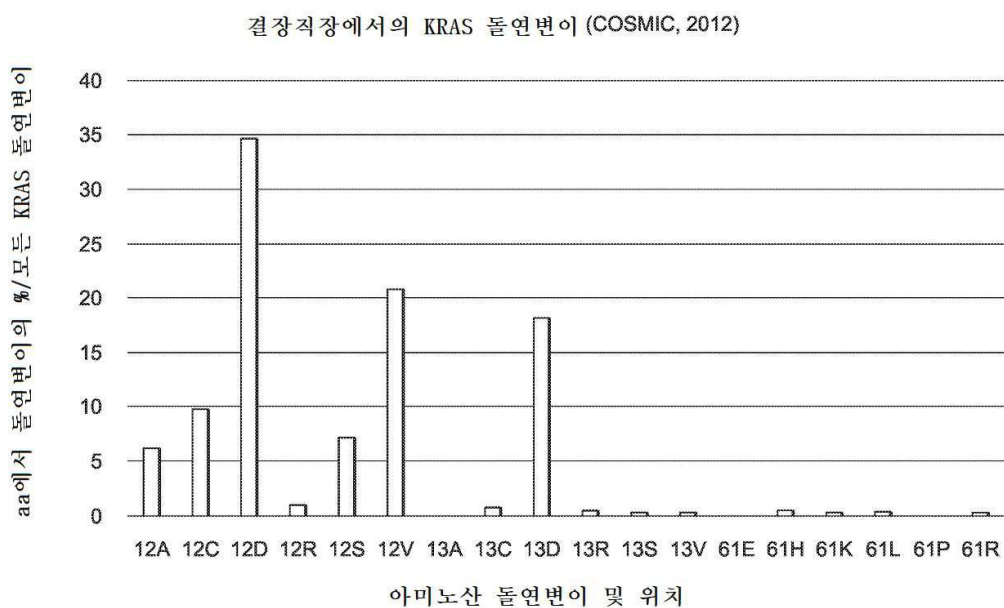
도면13



도면14



도면15



도면16

HRAS		코돈 12: GGC						코돈 13: GGT						코돈 61: CAG						총계
원발성 조직	암	-C-	T-	-A-	C-	A-	-T-	-C-	T-	-A-	C-	A-	-T-	G-	-C/T	A-	-T-	-C-	-G-	
		12A	12C	12D	12R	12S	12V	13A	13C	13D	13R	13S	13V	61E	61H	61K	61L	61P	61R	
전립선	선암종	0	0	0	0	1	1	0	0	0	3	0	0	0	3	0	18	0	3	29
침샘	선암종	0	0	1	4	1	8	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	6	23
피부	양성 멜라닌세포 모반	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	20	0	11	35
	암종	0	2	2	0	0	24	0	0	1	0	0	0	0	3	0	3	0	0	35
	악성 흑색종	0	0	0	0	0	2	0	0	1	0	0	0	0	1	2	3	0	2	11
위	선암종	0	0	0	0	0	14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14
갑상선	선종-결절-갑상선종	0	0	0	0	0	19	0	0	0	0	0	0	0	1	4	0	1	16	41
	암종	2	2	2	1	2	19	0	2	3	6	0	0	0	2	10	1	1	23	76
요관	방광 암종	0	4	9	0	6	90	0	3	0	2	0	3	0	0	6	6	0	9	138
상부 호흡기	입	0	5	3	2	24	14	0	1	3	4	1	4	0	3	0	3	0	9	76
총계		2	13	17	8	34	191	0	6	8	19	1	7	0	14	23	54	2	79	478

도면17a

KRAS		코돈 12: GGT						코돈 13: GGC						코돈 61: CAA						총계
원발성 조직	암	-C-	T-	-A-	C-	A-	-T-	-C-	T-	-A-	C-	A-	-T-	G-	-C/T	A-	-T-	-C-	-G-	
		12A	12C	12D	12R	12S	12V	13A	13C	13D	13R	13S	13V	61E	61H	61K	61L	61P	61R	
담관	담관 암종	14	29	107	6	30	49	0	5	12	0	1	0	0	2	0	0	0	0	255
담낭	암종	0	5	60	9	12	10	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	98
결장직장 결장	선암종	107	184	635	18	133	364	0	10	338	6	3	3	0	5	1	4	0	1	1812
	직장 선암종	37	45	178	4	33	124	0	6	88	4	0	3	0	5	0	3	0	2	532
자궁내막	암종	39	26	121	3	12	68	2	4	26	0	1	1	0	3	0	0	0	0	306
HIL	조혈 신생물	8	4	38	2	10	12	0	0	25	0	0	0	0	4	1	2	0	0	106
	림프구 신생물	19	7	43	4	10	10	0	0	48	0	1	0	0	3	0	0	3	0	148
폐	선암종	106	545	222	27	59	279	1	43	31	1	1	1	0	11	1	5	0	2	1335
기관지 폐포	선암종	6	42	38	3	4	33	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	128
	비소세포 암종	34	283	113	14	30	112	0	23	20	1	1	1	1	6	4	1	1	5	650
	편평세포 암종	3	25	26	5	6	10	0	0	1	0	1	0	3	0	1	0	1	2	84
난소	암종	25	20	171	12	3	150	4	4	17	0	0	3	0	1	0	0	0	0	410
췌장	도관 암종	57	79	1312	312	67	812	0	1	13	0	2	0	0	6	0	0	0	0	2661
	PanIN	0	3	10	1	0	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	26
	관 변질 형성	0	0	6	0	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13
	선종	6	3	44	13	1	16	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	85
	자가면역 췌장염	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10
	경계성 종양	0	2	11	2	0	6	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	22
	만성 췌장염	0	6	42	8	5	21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	82
이형성 원위치 신생물		1	0	24	16	4	17	0	0	1	0	0	0	0	3	0	0	0	0	66

도면17b

	과형성	0	7	32	18	4	16	0	1	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	81
전립선	선암종	0	9	13	1	2	35	0	0	15	0	6	0	0	0	2	0	0	1	84
피부	암종	0	2	1	0	1	5	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	11
	악성 흑색종	0	0	3	2	1	8	0	0	1	0	0	0	0	1	0	3	0	1	20
소장	선암종	4	8	25	0	4	10	0	0	2	0	0	1	0	1	0	0	0	0	55
위	선암종	20	8	63	1	8	22	0	3	20	0	11	1	0	0	1	1	0	2	161
갑상선	암종	5	18	35	4	15	8	1	1	22	2	10	0	0	0	1	0	3	4	129
요관	방광 암종	4	4	4	2	4	3	0	0	3	1	0	0	1	1	0	0	0	0	27
상부호흡기	입	1	3	3	1	6	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	16
총계		496	1367	3390	488	464	2219	8	103	686	16	39	15	5	56	12	20	8	21	9413



도면18

NRAS		코돈 12: GGT										코돈 13: GGT										코돈 61: CAA									
		-C-	T-	A-	C-	A-	T-	-C-	T-	A-	C-	A-	T-	G-	-C/T	A-	T-	-C-	-G-												
원발성 조직		12A	12C	12D	12R	12S	12V	13A	13C	13D	13R	13S	13V	61E	61H	61K	61L	61P	61R	총계											
HLL	조혈 신생물	22	32	185	8	56	31	12	14	93	29	3	29	2	28	24	20	6	29	623											
	림프종 신생물	7	11	60	0	17	11	1	4	54	7	1	6	1	21	37	20	11	27	296											
피부	양성 멜라닌세포 모반	0	2	4	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	55	1	0	35	99											
	암종	0	0	5	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	3	0	0	0	0	10											
갑상선	악성 흑색종	2	2	28	5	8	2	1	0	14	12	0	16	1	24	273	64	2	301	755											
	선종-결절-갑상선종	0	1	0	0	0	2	0	1	0	0	0	0	1	1	12	1	0	44	63											
상부 호흡기	암종	0	7	2	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	5	32	9	0	182	240											
	후두	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20											
총계		31	55	284	13	101	46	15	20	163	49	5	52	5	82	433	115	19	618	2106											

도면19a

보충표 2. KRAS 평가

환자 #	기준 KRAS 상태		순환 돌연변이체 KRAS (단편 /mL)*										후속 (26주 내지 52주)		2차 KRAS 돌연변이체 검출하기 위한 시간 (주)		2차 KRAS 돌연변이체 검출로부터 진행 시간(주)	
	종양 유전자형	기준에서 검출된 돌연변이체 KRAS 대립유전자	검출된 2차 순환 돌연변이체 KRAS 대립유전자		1주		5주		9주		13주		17주		25주			
			G12V	G12C	G12A	G12R	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD		
1	WT	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	17	16
2	WT	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD		
3	G12D	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD		
4	WT	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD		
5	WT	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD		
6	WT	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD		
7	WT	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD		
8	G13D	G13D	NMD	23	NMD	100	119								386			
9	WT	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD		
10	WT	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD		
11	WT	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD		
12	WT	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD		
13	WT	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD		
14	WT	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD		
15	WT	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD		
16	WT	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD		
17	WT	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD		
18	WT	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD		
19	WT	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD		
20	G13D	G13D	NMD	411	148	1216									2484			

도면19b

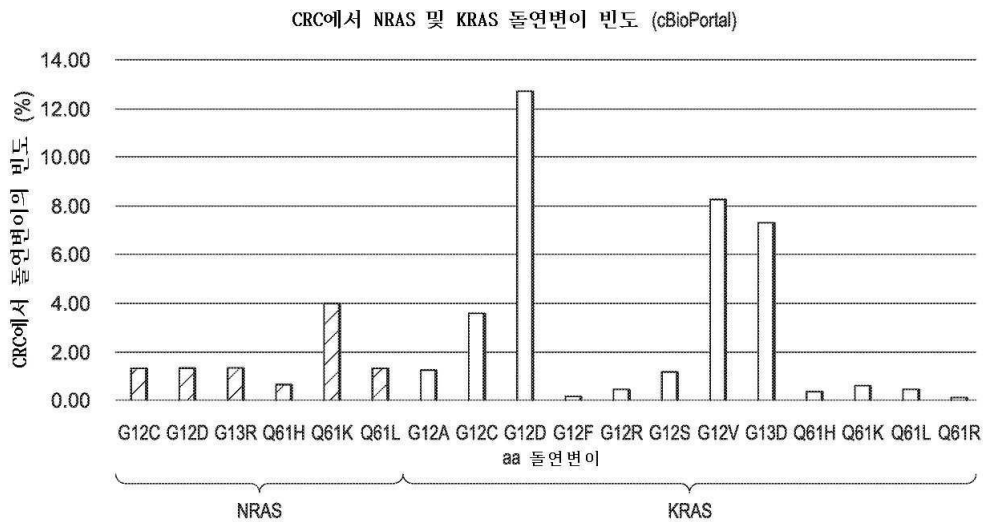
21	WT	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD			16	18	동시
22	WT	NMD	G12B	NMD	NMD	NMD	NMD	24			17	동시
			G12C	NMD	NMD	NMD	NMD	3				
			G12A	NMD	NMD	NMD	NMD	8				
			G12D	NMD	NMD	NMD	NMD	4				
23	WT	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD		NMD			
24	WT	NMD	G12A	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD		3	26	29
25	WT	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD				
26	WT	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	
27	WT	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	NMD	
28	G12D	G12D	NMD	810	618	808					984	NMD

\*NMD = 평가 샘플에서 검출된 돌연변이 없음; 괄호 값은 표시한 시점에 이용 가능하지 않은 샘플을 나타냄

도면20

항 -EGFR- 내성 종양 KRAS 돌연변이 상태			
환자 ID	돌연변이	백분율	판독 */ 사건 †
1	WT*	0%	0/12,123
2	G13D*	10%	859/8,556
4	G13D*	5.9%	461/7,764
5	G13D*	14.3%	1,037/7,247
6	G13D*	8.6%	651/7,577
7	WT*	0%	0/17,142
8	Q61H†	17.3%	5,960/190,200
9	G12D†	0.04%	17/40,200
	G13D†	0.44%	117/26,400
10	WT†	0%	0/50,300
11	WT† (증폭된 KRAS)	0%	0/30,400

도면21



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> MODERNATX, INC.

<120> RNA CANCER VACCINES



<130> M1378.70062W000  
 <140> PCT/US2017/058595  
 <141> 2017-10-26  
 <150> US 62/453,465  
 <151> 2017-02-01  
 <150> US 62/453,444  
 <151> 2017-02-01  
 <150> US 62/558,238  
 <151> 2017-09-13  
 <160> 365  
 <170> PatentIn version 3.5  
 <210> 1  
 <211> 379  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polypeptide  
 <400> 1

Met Pro His Ser Ser Leu His Pro Ser Ile Pro Cys Pro Arg Gly His

1	5	10	15
Gly	Ala	Gln	Lys
Ala	Ala	Leu	Val
Leu	Leu	Ser	Ala
Cys	Leu	Val	Thr
20	25	30	
Leu	Trp	Gly	Leu
Gly	Glu	Pro	Pro
Glu	His	Thr	Leu
Arg	Tyr	Leu	Val
35	40	45	
Leu	His	Leu	Ala
Ser	Leu	Gln	Leu
Gly	Leu	Leu	Asn
Gly	Val	Cys	
50	55	60	
Ser	Leu	Ala	Glu
Glu	Leu	Arg	His
Ile	His	Ser	Arg
Tyr	Arg	Gly	Ser
65	70	75	80
Tyr	Trp	Arg	Thr
Val	Arg	Ala	Cys
Leu	Gly	Cys	Pro
Leu	Arg	Arg	Gly
85	90	95	
Ala	Leu	Leu	Leu
Leu	Ser	Ile	Tyr
Phe	Tyr	Tyr	Ser
Leu	Pro	Asn	Ala
100	105	110	
Val	Gly	Pro	Pro
Phe	Thr	Trp	Met
Leu	Ala	Leu	Leu
Gly	Leu	Ser	Gln
115	120	125	

Ala Leu Asn Ile Leu Leu Gly Leu Lys Gly Leu Ala Pro Ala Glu Ile

130 135 140

Ser Ala Val Cys Glu Lys Gly Asn Phe Asn Met Ala His Gly Leu Ala

145 150 155 160

Trp Ser Tyr Tyr Ile Gly Tyr Leu Arg Leu Ile Leu Pro Glu Leu Gln

165 170 175

Ala Arg Ile Arg Thr Tyr Asn Gln His Tyr Asn Asn Leu Leu Arg Gly

180 185 190

Ala Val Ser Gln Arg Leu Tyr Ile Leu Leu Pro Leu Asp Cys Gly Val

195 200 205

Pro Asp Asn Leu Ser Met Ala Asp Pro Asn Ile Arg Phe Leu Asp Lys

210 215 220

Leu Pro Gln Gln Thr Gly Asp His Ala Gly Ile Lys Asp Arg Val Tyr

225 230 235 240

Ser Asn Ser Ile Tyr Glu Leu Leu Glu Asn Gly Gln Arg Ala Gly Thr

245 250 255

Cys Val Leu Glu Tyr Ala Thr Pro Leu Gln Thr Leu Phe Ala Met Ser

260 265 270

Gln Tyr Ser Gln Ala Gly Phe Ser Arg Glu Asp Arg Leu Glu Gln Ala

275 280 285

Lys Leu Phe Cys Arg Thr Leu Glu Asp Ile Leu Ala Asp Ala Pro Glu

290 295 300

Ser Gln Asn Asn Cys Arg Leu Ile Ala Tyr Gln Glu Pro Ala Asp Asp

305 310 315 320

Ser Ser Phe Ser Leu Ser Gln Glu Val Leu Arg His Leu Arg Gln Glu

325 330 335

Glu Lys Glu Glu Val Thr Val Gly Ser Leu Lys Thr Ser Ala Val Pro

340 345 350

Ser Thr Ser Thr Met Ser Gln Glu Pro Glu Leu Leu Ile Ser Gly Met

355 360 365

Glu Lys Pro Leu Pro Leu Arg Thr Asp Phe Ser

370 375

<210> 2

<211> 379

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 2

Met Pro His Ser Ser Leu His Pro Ser Ile Pro Cys Pro Arg Gly His

1 5 10 15

Gly Ala Gln Lys Ala Ala Leu Val Leu Leu Ser Ala Cys Leu Val Thr

20 25 30

Leu Trp Gly Leu Gly Glu Pro Pro Glu His Thr Leu Arg Tyr Leu Val

35 40 45

Leu His Leu Ala Ser Leu Gln Leu Gly Leu Leu Leu Asn Gly Val Cys

50 55 60

Ser Leu Ala Glu Glu Leu Arg His Ile His Ser Arg Tyr Arg Gly Ser

65 70 75 80

Tyr Trp Arg Thr Val Arg Ala Cys Leu Gly Cys Pro Leu Arg Arg Gly

85 90 95

Ala Leu Leu Leu Leu Ser Ile Tyr Phe Tyr Tyr Ser Leu Pro Asn Ala

100 105 110

Val Gly Pro Pro Phe Thr Trp Met Leu Ala Leu Leu Gly Leu Ser Gln

115 120 125

Ala Leu Asn Ile Leu Leu Gly Leu Lys Gly Leu Ala Pro Ala Glu Ile

130 135 140

Ser Ala Val Cys Glu Lys Gly Asn Phe Asn Val Ala His Gly Leu Ala

145 150 155 160

Trp Ser Tyr Tyr Ile Gly Tyr Leu Arg Leu Ile Leu Pro Glu Leu Gln

165 170 175

Ala Arg Ile Arg Thr Tyr Asn Gln His Tyr Asn Asn Leu Leu Arg Gly

180 185 190

Ala Val Ser Gln Arg Leu Tyr Ile Leu Leu Pro Leu Asp Cys Gly Val

195 200 205

Pro Asp Asn Leu Ser Met Ala Asp Pro Asn Ile Arg Phe Leu Asp Lys

210 215 220

Leu Pro Gln Gln Thr Gly Asp His Ala Gly Ile Lys Asp Arg Val Tyr

225 230 235 240

Ser Asn Ser Ile Tyr Glu Leu Leu Glu Asn Gly Gln Arg Ala Gly Thr

245 250 255

Cys Val Leu Glu Tyr Ala Thr Pro Leu Gln Thr Leu Phe Ala Met Ser

260 265 270

Gln Tyr Ser Gln Ala Gly Phe Ser Arg Glu Asp Thr Leu Glu Gln Ala

275 280 285

Lys Leu Phe Cys Arg Thr Leu Glu Asp Ile Leu Ala Asp Ala Pro Glu

290 295 300

Ser Gln Asn Asn Cys Arg Leu Ile Ala Tyr Gln Glu Pro Ala Asp Asp

305 310 315 320

Ser Ser Phe Ser Leu Ser Gln Glu Val Leu Arg His Leu Arg Gln Glu

325 330 335

Glu Lys Glu Glu Val Thr Val Gly Ser Leu Lys Thr Ser Ala Val Pro

340 345 350

Ser Thr Ser Thr Met Ser Gln Glu Pro Glu Leu Leu Ile Ser Gly Met

355 360 365

Glu Lys Pro Leu Pro Leu Arg Thr Asp Phe Ser

370 375

<210> 3

<211> 379

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 3

Met Pro His Ser Ser Leu His Pro Ser Ile Pro Cys Pro Arg Gly His

1 5 10 15

Gly Ala Gln Lys Ala Ala Leu Val Leu Leu Ser Ala Cys Leu Val Thr  
 20 25 30  
 Leu Trp Gly Leu Gly Glu Pro Pro Glu His Thr Leu Arg Tyr Leu Val  
 35 40 45  
 Leu His Leu Ala Ser Leu Gln Leu Gly Leu Leu Leu Asn Gly Val Cys  
 50 55 60  
 Ser Leu Ala Glu Glu Leu Arg His Ile His Ser Arg Tyr Arg Gly Ser  
 65 70 75 80  
 Tyr Trp Arg Thr Val Arg Ala Cys Leu Gly Cys Pro Leu Arg Arg Gly  
 85 90 95  
 Ala Leu Leu Leu Leu Ser Ile Tyr Phe Tyr Tyr Ser Leu Pro Asn Ala  
 100 105 110  
 Val Gly Pro Pro Phe Thr Trp Met Leu Ala Leu Leu Gly Leu Ser Gln  
 115 120 125  
 Ala Leu Asn Ile Leu Leu Gly Leu Lys Gly Leu Ala Pro Ala Glu Ile  
 130 135 140  
 Ser Ala Val Cys Glu Lys Gly Asn Phe Asn Val Ala His Gly Leu Ala  
 145 150 155 160  
 Trp Ser Tyr Tyr Ile Gly Tyr Leu Arg Leu Ile Leu Pro Glu Leu Gln  
 165 170 175  
 Ala Arg Ile Arg Thr Tyr Asn Gln His Tyr Asn Asn Leu Leu Arg Gly  
 180 185 190  
 Ala Val Ser Gln Arg Leu Tyr Ile Leu Leu Pro Leu Asp Cys Gly Val  
 195 200 205  
 Pro Asp Asn Leu Ser Met Ala Asp Pro Asn Ile Arg Phe Leu Asp Lys  
 210 215 220  
 Leu Pro Gln Gln Thr Gly Asp His Ala Gly Ile Lys Asp Arg Val Tyr  
 225 230 235 240  
 Ser Asn Ser Ile Tyr Glu Leu Leu Glu Asn Gly Gln Arg Ala Gly Thr  
 245 250 255  
 Cys Val Leu Glu Tyr Ala Thr Pro Leu Gln Thr Leu Phe Ala Met Ser



260                      265                      270  
 Gln Tyr Ser Gln Ala Gly Phe Ser Arg Glu Asp Met Leu Glu Gln Ala  
 275                      280                      285  
 Lys Leu Phe Cys Arg Thr Leu Glu Asp Ile Leu Ala Asp Ala Pro Glu  
 290                      295                      300  
 Ser Gln Asn Asn Cys Arg Leu Ile Ala Tyr Gln Glu Pro Ala Asp Asp  
  
 305                      310                      315                      320  
 Ser Ser Phe Ser Leu Ser Gln Glu Val Leu Arg His Leu Arg Gln Glu  
 325                      330                      335  
 Glu Lys Glu Glu Val Thr Val Gly Ser Leu Lys Thr Ser Ala Val Pro  
 340                      345                      350  
 Ser Thr Ser Thr Met Ser Gln Glu Pro Glu Leu Leu Ile Ser Gly Met  
 355                      360                      365  
 Glu Lys Pro Leu Pro Leu Arg Thr Asp Phe Ser  
 370                      375

<210> 4

<211> 379

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 4

Met Pro His Ser Ser Leu His Pro Ser Ile Pro Cys Pro Arg Gly His  
 1                      5                      10                      15  
 Gly Ala Gln Lys Ala Ala Leu Val Leu Leu Ser Ala Cys Leu Val Thr  
 20                      25                      30  
 Leu Trp Gly Leu Gly Glu Pro Pro Glu His Thr Leu Arg Tyr Leu Val  
 35                      40                      45  
 Leu His Leu Ala Ser Leu Gln Leu Gly Leu Leu Leu Asn Gly Val Cys  
  
 50                      55                      60  
 Ser Leu Ala Glu Glu Leu Arg His Ile His Ser Arg Tyr Arg Gly Ser  
 65                      70                      75                      80  
 Tyr Trp Arg Thr Val Arg Ala Cys Leu Gly Cys Pro Leu Arg Arg Gly

85 90 95  
 Ala Leu Leu Leu Leu Ser Ile Tyr Phe Tyr Tyr Ser Leu Pro Asn Ala  
 100 105 110  
 Val Gly Pro Pro Phe Thr Trp Met Leu Ala Leu Leu Gly Leu Ser Gln  
  
 115 120 125  
 Ala Leu Asn Ile Leu Leu Gly Leu Lys Gly Leu Ala Pro Ala Glu Ile  
 130 135 140  
 Ser Ala Val Cys Glu Lys Gly Asn Phe Asn Val Ala His Gly Leu Ala  
 145 150 155 160  
 Trp Ser Tyr Tyr Ile Gly Tyr Leu Arg Leu Ile Leu Pro Glu Leu Gln  
 165 170 175  
 Ala Arg Ile Arg Thr Tyr Asn Gln His Tyr Asn Asn Leu Leu Arg Gly  
  
 180 185 190  
 Ala Val Ser Gln Arg Leu Tyr Ile Leu Leu Pro Leu Asp Cys Gly Val  
 195 200 205  
 Pro Asp Asn Leu Ser Met Ala Asp Pro Asn Ile Arg Phe Leu Asp Lys  
 210 215 220  
 Leu Pro Gln Gln Thr Gly Asp His Ala Gly Ile Lys Asp Arg Val Tyr  
 225 230 235 240  
 Ser Asn Ser Ile Tyr Glu Leu Leu Glu Asn Gly Gln Arg Ala Gly Thr  
  
 245 250 255  
 Cys Val Leu Glu Tyr Ala Thr Pro Leu Gln Thr Leu Phe Ala Met Ser  
 260 265 270  
 Gln Tyr Ser Gln Ala Gly Phe Ser Arg Glu Asp Lys Leu Glu Gln Ala  
 275 280 285  
 Lys Leu Phe Cys Arg Thr Leu Glu Asp Ile Leu Ala Asp Ala Pro Glu  
 290 295 300  
 Ser Gln Asn Asn Cys Arg Leu Ile Ala Tyr Gln Glu Pro Ala Asp Asp  
  
 305 310 315 320  
 Ser Ser Phe Ser Leu Ser Gln Glu Val Leu Arg His Leu Arg Gln Glu  
 325 330 335

Glu Lys Glu Glu Val Thr Val Gly Ser Leu Lys Thr Ser Ala Val Pro  
340 345 350  
Ser Thr Ser Thr Met Ser Gln Glu Pro Glu Leu Leu Ile Ser Gly Met  
355 360 365  
Glu Lys Pro Leu Pro Leu Arg Thr Asp Phe Ser  
370 375

<210> 5

<211> 379

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 5

Met Pro His Ser Ser Leu His Pro Ser Ile Pro Cys Pro Arg Gly His  
1 5 10 15

Gly Ala Gln Lys Ala Ala Leu Val Leu Leu Ser Ala Cys Leu Val Thr  
20 25 30

Leu Trp Gly Leu Gly Glu Pro Pro Glu His Thr Leu Arg Tyr Leu Val  
35 40 45

Leu His Leu Ala Ser Leu Gln Leu Gly Leu Leu Leu Asn Gly Val Cys

50 55 60

Ser Leu Ala Glu Glu Leu Arg His Ile His Ser Arg Tyr Arg Gly Ser  
65 70 75 80

Tyr Trp Arg Thr Val Arg Ala Cys Leu Gly Cys Pro Leu Arg Arg Gly  
85 90 95

Ala Leu Leu Leu Leu Ser Ile Tyr Phe Tyr Tyr Ser Leu Pro Asn Ala  
100 105 110

Val Gly Pro Pro Phe Thr Trp Met Leu Ala Leu Leu Gly Leu Ser Gln

115 120 125

Ala Leu Asn Ile Leu Leu Gly Leu Lys Gly Leu Ala Pro Ala Glu Ile  
130 135 140

Ser Ala Val Cys Glu Lys Gly Asn Phe Ser Val Ala His Gly Leu Ala  
145 150 155 160

Trp Ser Tyr Tyr Ile Gly Tyr Leu Arg Leu Ile Leu Pro Glu Leu Gln  
165 170 175  
Ala Arg Ile Arg Thr Tyr Asn Gln His Tyr Asn Asn Leu Leu Arg Gly  
180 185 190  
Ala Val Ser Gln Arg Leu Tyr Ile Leu Leu Pro Leu Asp Cys Gly Val  
195 200 205  
Pro Asp Asn Leu Ser Met Ala Asp Pro Asn Ile Arg Phe Leu Asp Lys  
210 215 220  
Leu Pro Gln Gln Thr Gly Asp His Ala Gly Ile Lys Asp Arg Val Tyr  
225 230 235 240  
Ser Asn Ser Ile Tyr Glu Leu Leu Glu Asn Gly Gln Arg Ala Gly Thr  
245 250 255  
Cys Val Leu Glu Tyr Ala Thr Pro Leu Gln Thr Leu Phe Ala Met Ser  
260 265 270  
Gln Tyr Ser Gln Ala Gly Phe Ser Arg Glu Asp Arg Leu Glu Gln Ala  
275 280 285  
Lys Leu Phe Cys Arg Thr Leu Glu Asp Ile Leu Ala Asp Ala Pro Glu  
290 295 300  
Ser Gln Asn Asn Cys Arg Leu Ile Ala Tyr Gln Glu Pro Ala Asp Asp  
305 310 315 320  
Ser Ser Phe Ser Leu Ser Gln Glu Val Leu Arg His Leu Arg Gln Glu  
325 330 335  
Glu Lys Glu Glu Val Thr Val Gly Ser Leu Lys Thr Ser Ala Val Pro  
340 345 350  
Ser Thr Ser Thr Met Ser Gln Glu Pro Glu Leu Leu Ile Ser Gly Met  
355 360 365  
Glu Lys Pro Leu Pro Leu Arg Thr Asp Phe Ser  
370 375

<210> 6

<211> 379

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 6

Met Pro His Ser Ser Leu His Pro Ser Ile Pro Cys Pro Arg Gly His

1 5 10 15

Gly Ala Gln Lys Ala Ala Leu Val Leu Leu Ser Ala Cys Leu Val Thr

20 25 30

Leu Trp Gly Leu Gly Glu Pro Pro Glu His Thr Leu Arg Tyr Leu Val

35 40 45

Leu His Leu Ala Ser Leu Gln Leu Gly Leu Leu Leu Asn Gly Val Cys

50 55 60

Ser Leu Ala Glu Glu Leu Arg His Ile His Ser Arg Tyr Arg Gly Ser

65 70 75 80

Tyr Trp Arg Thr Val Arg Ala Cys Leu Gly Cys Pro Leu Arg Arg Gly

85 90 95

Ala Leu Leu Leu Leu Ser Ile Tyr Phe Tyr Tyr Ser Leu Pro Asn Ala

100 105 110

Val Gly Pro Pro Phe Thr Trp Met Leu Ala Leu Leu Gly Leu Ser Gln

115 120 125

Ala Leu Asn Ile Leu Leu Gly Leu Lys Gly Leu Ala Pro Ala Glu Ile

130 135 140

Ser Ala Leu Cys Glu Lys Gly Asn Phe Asn Val Ala His Gly Leu Ala

145 150 155 160

Trp Ser Tyr Tyr Ile Gly Tyr Leu Arg Leu Ile Leu Pro Glu Leu Gln

165 170 175

Ala Arg Ile Arg Thr Tyr Asn Gln His Tyr Asn Asn Leu Leu Arg Gly

180 185 190

Ala Val Ser Gln Arg Leu Tyr Ile Leu Leu Pro Leu Asp Cys Gly Val

195 200 205

Pro Asp Asn Leu Ser Met Ala Asp Pro Asn Ile Arg Phe Leu Asp Lys

210 215 220

Leu Pro Gln Gln Thr Gly Asp His Ala Gly Ile Lys Asp Arg Val Tyr



225                      230                      235                      240  
Ser Asn Ser Ile Tyr Glu Leu Leu Glu Asn Gly Gln Arg Ala Gly Thr

245                      250                      255  
Cys Val Leu Glu Tyr Ala Thr Pro Leu Gln Thr Leu Phe Ala Met Ser

260                      265                      270  
Gln Tyr Ser Gln Ala Gly Phe Ser Arg Glu Asp Arg Leu Glu Gln Ala

275                      280                      285  
Lys Leu Phe Cys Arg Thr Leu Glu Asp Ile Leu Ala Asp Ala Pro Glu

290                      295                      300  
Ser Gln Asn Asn Cys Arg Leu Ile Ala Tyr Gln Glu Pro Ala Asp Asp

305                      310                      315                      320  
Ser Ser Phe Ser Leu Ser Gln Glu Val Leu Arg His Leu Arg Gln Glu

325                      330                      335  
Glu Lys Glu Glu Val Thr Val Gly Ser Leu Lys Thr Ser Ala Val Pro

340                      345                      350  
Ser Thr Ser Thr Met Ser Gln Glu Pro Glu Leu Leu Ile Ser Gly Met

355                      360                      365  
Glu Lys Pro Leu Pro Leu Arg Thr Asp Phe Ser

370                      375

<210> 7

<211> 379

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 7

Met Pro His Ser Ser Leu His Pro Ser Ile Pro Cys Pro Arg Gly His

1                      5                      10                      15

Gly Ala Gln Lys Ala Ala Leu Val Leu Leu Ser Ala Cys Leu Val Thr

20                      25                      30

Leu Trp Gly Leu Gly Glu Pro Pro Glu His Thr Leu Arg Tyr Leu Val

35                      40                      45

Leu His Leu Ala Ser Leu Gln Leu Gly Leu Leu Leu Asn Gly Val Cys

50 55 60

Ser Leu Ala Glu Glu Leu Arg His Ile His Ser Arg Tyr Arg Gly Ser

65 70 75 80

Tyr Trp Arg Thr Val Arg Ala Cys Leu Gly Cys Pro Leu Arg Arg Gly

85 90 95

Ala Leu Leu Leu Leu Ser Ile Tyr Phe Tyr Tyr Ser Leu Pro Asn Ala

100 105 110

Val Gly Pro Pro Phe Thr Trp Met Leu Ala Leu Leu Gly Leu Ser Gln

115 120 125

Ala Leu Asn Ile Leu Leu Gly Leu Lys Gly Leu Ala Pro Ala Glu Ile

130 135 140

Ser Ala Val Cys Glu Lys Gly Asn Phe Asn Val Ala His Gly Leu Ala

145 150 155 160

Trp Ser Tyr Tyr Ile Gly Tyr Leu Arg Leu Ile Leu Pro Glu Leu Gln

165 170 175

Ala Arg Ile Arg Thr Tyr Asn Gln His Tyr Asn Asn Leu Leu Arg Gly

180 185 190

Ala Val Ser Gln Arg Leu Tyr Ile Leu Leu Pro Leu Asp Cys Gly Val

195 200 205

Pro Asp Asn Leu Ser Met Ala Asp Pro Asn Ile Arg Phe Leu Asp Lys

210 215 220

Leu Pro Gln Gln Thr Gly Asp His Ala Gly Ile Lys Asp Arg Val Tyr

225 230 235 240

Ser Asn Ser Ile Tyr Glu Leu Leu Glu Asn Gly Gln Arg Ala Gly Thr

245 250 255

Cys Val Leu Glu Tyr Ala Thr Pro Leu Gln Thr Leu Phe Ala Met Ser

260 265 270

Gln Tyr Ser Gln Ala Gly Phe Ser Arg Glu Asp Arg Leu Glu Gln Ala

275 280 285

Lys Leu Phe Cys Arg Thr Leu Glu Asp Ile Leu Ala Asp Ala Pro Glu

290 295 300  
Ser Gln Asn Asn Cys Arg Leu Ile Ala Tyr Gln Gln Pro Ala Asp Asp

305 310 315 320  
Ser Ser Phe Ser Leu Ser Gln Glu Val Leu Arg His Leu Arg Gln Glu

325 330 335  
Glu Lys Glu Glu Val Thr Val Gly Ser Leu Lys Thr Ser Ala Val Pro

340 345 350  
Ser Thr Ser Thr Met Ser Gln Glu Pro Glu Leu Leu Ile Ser Gly Met

355 360 365  
Glu Lys Pro Leu Pro Leu Arg Thr Asp Phe Ser

370 375

<210> 8

<211> 379

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 8

Met Pro His Ser Ser Leu His Pro Ser Ile Pro Cys Pro Arg Gly His

1 5 10 15

Gly Ala Gln Lys Ala Ala Leu Val Leu Leu Ser Ala Cys Leu Val Thr

20 25 30

Leu Trp Gly Leu Gly Glu Pro Pro Glu His Thr Leu Arg Tyr Leu Val

35 40 45

Leu His Leu Ala Ser Leu Gln Leu Gly Leu Leu Leu Asn Gly Val Cys

50 55 60

Ser Leu Ala Glu Glu Leu Arg His Ile His Ser Arg Tyr Arg Gly Ser

65 70 75 80

Tyr Trp Arg Thr Val Arg Ala Cys Leu Gly Cys Pro Leu Arg Arg Gly

85 90 95

Ala Leu Leu Leu Leu Ser Ile Tyr Phe Tyr Tyr Ser Leu Pro Asn Ala

100 105 110

Val Gly Pro Pro Phe Thr Trp Met Leu Ala Leu Leu Gly Leu Ser Gln

115 120 125

Ala Leu Asn Ile Leu Leu Gly Leu Lys Gly Leu Ala Pro Ala Glu Ile

130 135 140

Ser Ala Val Cys Glu Lys Gly Asn Phe Asn Val Ala His Gly Leu Ala

145 150 155 160

Trp Ser Tyr Tyr Ile Gly Tyr Leu Arg Leu Ile Leu Pro Glu Leu Gln

165 170 175

Ala Arg Ile Arg Thr Tyr Asn Gln His Tyr Asn Asn Leu Leu Arg Gly

180 185 190

Ala Val Ser Gln Arg Leu Tyr Ile Leu Leu Pro Leu Asp Cys Gly Val

195 200 205

Pro Asp Asn Leu Ser Met Ala Asp Pro Asn Ile Arg Phe Leu Asp Lys

210 215 220

Leu Pro Gln Gln Thr Gly Asp His Ala Gly Ile Lys Asp Arg Val Tyr

225 230 235 240

Ser Asn Ser Ile Tyr Glu Leu Leu Glu Asn Gly Gln Arg Ala Gly Thr

245 250 255

Cys Val Leu Glu Tyr Ala Thr Pro Leu Gln Thr Leu Phe Ala Met Ser

260 265 270

Gln Tyr Ser Gln Ala Gly Phe Ser Arg Glu Asp Arg Leu Glu Gln Ala

275 280 285

Lys Leu Phe Cys Arg Thr Leu Glu Asp Ile Leu Ala Asp Ala Pro Glu

290 295 300

Ser Gln Asn Asn Cys Arg Leu Ile Ala Tyr Gln Glu Pro Ala Asp Asp

305 310 315 320

Ser Ser Phe Ser Leu Ser Gln Glu Val Leu Arg His Leu Arg Gln Glu

325 330 335

Glu Lys Glu Glu Val Thr Val Gly Ser Leu Lys Thr Ser Ala Val Pro

340 345 350

Ser Thr Ser Thr Met Ser Gln Glu Pro Glu Leu Leu Ile Ser Gly Met

355                                      360                                      365  
 Glu Lys Pro Leu Pro Leu Ala Thr Asp Phe Ser  
 370                                      375  
  
 <210> 9  
 <211> 379  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polypeptide  
 <400> 9  
 Met Pro His Ser Ser Leu His Pro Ser Ile Pro Cys Pro Arg Gly His  
 1                                      5                                      10                                      15  
 Gly Ala Gln Lys Ala Ala Leu Val Leu Leu Ser Ala Cys Leu Val Thr  
 20                                      25                                      30  
 Leu Trp Gly Leu Gly Glu Pro Pro Glu His Thr Leu Arg Tyr Leu Val  
 35                                      40                                      45  
 Leu His Leu Ala Ser Leu Gln Leu Gly Leu Leu Leu Asn Gly Val Cys  
  
 50                                      55                                      60  
 Ser Leu Ala Glu Glu Leu Arg His Ile His Ser Arg Tyr Arg Gly Ser  
 65                                      70                                      75                                      80  
 Tyr Trp Arg Thr Val Arg Ala Cys Leu Gly Cys Pro Leu Arg Arg Gly  
 85                                      90                                      95  
 Ala Leu Leu Leu Leu Ser Ile Tyr Phe Tyr Tyr Ser Leu Pro Asn Ala  
 100                                      105                                      110  
 Val Gly Pro Pro Phe Thr Trp Met Leu Ala Leu Leu Gly Leu Ser Gln  
  
 115                                      120                                      125  
 Ala Leu Asn Ile Leu Leu Gly Leu Lys Gly Leu Ala Pro Ala Glu Ile  
 130                                      135                                      140  
 Ser Ala Leu Cys Glu Lys Gly Asn Phe Ser Met Ala His Gly Leu Ala  
 145                                      150                                      155                                      160  
 Trp Ser Tyr Tyr Ile Gly Tyr Leu Arg Leu Ile Leu Pro Glu Leu Gln  
 165                                      170                                      175



Ala Arg Ile Arg Thr Tyr Asn Gln His Tyr Asn Asn Leu Leu Arg Gly

180 185 190  
Ala Val Ser Gln Arg Leu Tyr Ile Leu Leu Pro Leu Asp Cys Gly Val  
195 200 205  
Pro Asp Asn Leu Ser Met Ala Asp Pro Asn Ile Arg Phe Leu Asp Lys  
210 215 220  
Leu Pro Gln Gln Thr Gly Asp His Ala Gly Ile Lys Asp Arg Val Tyr  
225 230 235 240  
Ser Asn Ser Ile Tyr Glu Leu Leu Glu Asn Gly Gln Arg Ala Gly Thr

245 250 255  
Cys Val Leu Glu Tyr Ala Thr Pro Leu Gln Thr Leu Phe Ala Met Ser  
260 265 270  
Gln Tyr Ser Gln Ala Gly Phe Ser Arg Glu Asp Arg Leu Glu Gln Ala  
275 280 285  
Lys Leu Phe Cys Arg Thr Leu Glu Asp Ile Leu Ala Asp Ala Pro Glu  
290 295 300  
Ser Gln Asn Asn Cys Arg Leu Ile Ala Tyr Gln Glu Pro Ala Asp Asp

305 310 315 320  
Ser Ser Phe Ser Leu Ser Gln Glu Val Leu Arg His Leu Arg Gln Glu  
325 330 335  
Glu Lys Glu Glu Val Thr Val Gly Ser Leu Lys Thr Ser Ala Val Pro  
340 345 350  
Ser Thr Ser Thr Met Ser Gln Glu Pro Glu Leu Leu Ile Ser Gly Met  
355 360 365  
Glu Lys Pro Leu Pro Leu Arg Thr Asp Phe Ser  
370 375

<210> 10

<211> 379

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 10

Met Pro His Ser Ser Leu His Pro Ser Ile Pro Cys Pro Arg Gly His

1 5 10 15

Gly Ala Gln Lys Ala Ala Leu Val Leu Leu Ser Ala Cys Leu Val Thr

20 25 30

Leu Trp Gly Leu Gly Glu Pro Pro Glu His Thr Leu Arg Tyr Leu Val

35 40 45

Leu His Leu Ala Ser Leu Gln Leu Gly Leu Leu Leu Asn Gly Val Cys

50 55 60

Ser Leu Ala Glu Glu Leu Arg His Ile His Ser Arg Tyr Arg Gly Ser

65 70 75 80

Tyr Trp Arg Thr Val Arg Ala Cys Leu Gly Cys Pro Leu Arg Arg Gly

85 90 95

Ala Leu Leu Leu Leu Ser Ile Tyr Phe Tyr Tyr Ser Leu Pro Asn Ala

100 105 110

Val Gly Pro Pro Phe Thr Trp Met Leu Ala Leu Leu Gly Leu Ser Gln

115 120 125

Ala Leu Asn Ile Leu Leu Gly Leu Lys Gly Leu Ala Pro Ala Glu Ile

130 135 140

Ser Ala Leu Cys Glu Lys Gly Asn Phe Ser Met Ala His Gly Leu Ala

145 150 155 160

Trp Ser Tyr Tyr Ile Gly Tyr Leu Arg Leu Ile Leu Pro Glu Leu Gln

165 170 175

Ala Arg Ile Arg Thr Tyr Asn Gln His Tyr Asn Asn Leu Leu Arg Gly

180 185 190

Ala Val Ser Gln Arg Leu Tyr Ile Leu Leu Pro Leu Asp Cys Gly Val

195 200 205

Pro Asp Asn Leu Ser Met Ala Asp Pro Asn Ile Arg Phe Leu Asp Lys

210 215 220

Leu Pro Gln Gln Thr Gly Asp His Ala Gly Ile Lys Asp Arg Val Tyr

225 230 235 240

Ser Asn Ser Ile Tyr Glu Leu Leu Glu Asn Gly Gln Arg Ala Gly Thr  
245 250 255  
Cys Val Leu Glu Tyr Ala Thr Pro Leu Gln Thr Leu Phe Ala Met Ser  
260 265 270  
Gln Tyr Ser Gln Ala Gly Phe Ser Arg Glu Asp Met Leu Glu Gln Ala  
275 280 285  
Lys Leu Phe Cys Arg Thr Leu Glu Asp Ile Leu Ala Asp Ala Pro Glu  
290 295 300

Ser Gln Asn Asn Cys Arg Leu Ile Ala Tyr Gln Glu Pro Ala Asp Asp  
305 310 315 320  
Ser Ser Phe Ser Leu Ser Gln Glu Val Leu Arg His Leu Arg Gln Glu  
325 330 335  
Glu Lys Glu Glu Val Thr Val Gly Ser Leu Lys Thr Ser Ala Val Pro  
340 345 350  
Ser Thr Ser Thr Met Ser Gln Glu Pro Glu Leu Leu Ile Ser Gly Met  
355 360 365

Glu Lys Pro Leu Pro Leu Arg Thr Asp Phe Ser  
370 375

<210> 11

<400> 11

000

<210> 12

<400> 12

000

<210> 13

<400> 13

000

<210> 14

<400> 14

000

<210> 15

<400> 15

000

<210> 16  
 <400> 16  
 000  
 <210> 17  
 <400> 17  
 000  
 <210> 18  
 <400> 18  
 000  
 <210> 19  
 <400> 19  
 000  
 <210> 20  
 <400> 20  
 000  
 <210> 21  
 <400> 21  
 000  
 <210> 22  
 <400> 22  
 000  
 <210> 23  
 <400> 23  
 000  
 <210> 24  
 <400> 24  
 000  
  
 <210> 25  
 <400> 25  
 000  
 <210> 26  
 <400> 26  
 000  
 <210> 27

<400> 27  
 000  
 <210> 28  
 <400> 28  
 000  
 <210> 29  
 <400> 29  
 000  
 <210> 30  
 <400> 30  
 000  
 <210> 31  
 <400> 31  
 000  
 <210> 32  
 <400> 32  
 000  
 <210> 33  
 <400> 33  
 000  
 <210> 34  
 <400> 34  
 000  
 <210> 35  
 <400> 35  
 000  
 <210> 36  
 <400> 36  
 000  
 <210> 37  
 <400> 37  
 000  
 <210> 38  
 <400> 38  
 000  
 <210> 39



<400> 39  
 000  
 <210> 40  
 <400> 40  
 000  
 <210> 41  
 <400> 41  
 000  
 <210  
 > 42  
 <400> 42  
 000  
 <210> 43  
 <400> 43  
 000  
 <210> 44  
 <400> 44  
 000  
 <210> 45  
 <400> 45  
 000  
 <210> 46  
 <400> 46  
 000  
 <210> 47  
 <400> 47  
 000  
 <210> 48  
 <400> 48  
 000  
 <210> 49  
 <400> 49  
 000  
 <210> 50  
 <400> 50

000

<210> 51

<400> 51

000

<210> 52

<400> 52

000

<210> 53

<400> 53

000

<210> 54

<400> 54

000

<210> 55

<400> 55

000

<210> 56

<400> 56

000

<210> 57

<400> 57

000

<210> 58

<400> 58

000

<210> 59

<400> 59

000

<210> 60

<400> 60

000

<210> 61

<400> 61

000

<210> 62  
 <400> 62  
 000  
 <210> 63  
 <400> 63  
 000  
 <210> 64  
 <400> 64  
 000  
 <210> 65  
 <400> 65  
 000  
 <210> 66  
 <400> 66  
 000  
 <210> 67  
 <400> 67  
 000  
 <210> 68  
 <400> 68  
 000  
 <210> 69  
 <400> 69  
 000  
 <210> 70  
 <400> 70  
 000  
 <210> 71  
 <400> 71  
 000  
 <210> 72  
 <400> 72  
 000  
 <210> 73  
 <400> 73  
 000

<210> 74  
 <400> 74  
 000  
 <210> 75  
 <400> 75  
 000  
 <210> 76  
 <400>  
 > 76  
 000  
 <210> 77  
 <400> 77  
 000  
 <210> 78  
 <400> 78  
 000  
 <210> 79  
 <400> 79  
 000  
 <210> 80  
 <400> 80  
 000  
 <210> 81  
 <400> 81  
 000  
 <210> 82  
 <400> 82  
 000  
 <210> 83  
 <400> 83  
 000  
 <210> 84  
 <400> 84  
 000  
 <210> 85

<400> 85  
000  
<210> 86  
<400> 86  
000  
<210> 87  
<400> 87  
000  
<210> 88  
<400> 88  
000  
<210> 89  
<400> 89  
000  
<210> 90  
<400> 90  
000  
<210> 91  
<400> 91  
000  
<210> 92  
<400> 92  
000  
<210> 93  
<400> 93  
  
000  
<210> 94  
<400> 94  
000  
<210> 95  
<400> 95  
000  
<210> 96  
<400> 96



000

<210> 97

<400> 97

000

<210> 98

<400> 98

000

<210> 99

<400> 99

000

<210> 100

<400> 100

000

<210> 101

<400> 101

000

<210> 102

<400> 102

000

<210> 103

<400> 103

000

<210> 104

<400> 104

000

<210> 105

<400> 105

000

<210> 106

<400> 106

000

<210> 107

<400> 107

000

<210> 108

<400> 108

000

<210> 109

<400> 109

000

<210> 110

<211> 15

<400> 110

000

<210> 111

<400> 111

000

<210> 112

<400> 112

000

<210> 113

<400> 113

000

<210> 114

<400> 114

000

<210> 115

<400> 115

000

<210> 116

<400> 116

000

<210> 117

<400> 117

000

<210> 118

<400> 118

000

<210> 119

<400> 119

000

<210> 120

<400> 120

000

<210> 121

<400> 121

000

<210> 122

<400> 122

000

<210> 123

<400> 123

000

<210> 124

<400> 124

000

<210> 125

<400> 125

000

<210

> 126

<400> 126

000

<210> 127

<400> 127

000

<210> 128

<400> 128

000

<210> 129

<400> 129

000

<210> 130

<400> 130

000

<210> 131  
 <400> 131  
 000  
 <210> 132  
 <400> 132  
 000  
 <210> 133  
 <400> 133  
 000  
 <210> 134  
 <400> 134  
 000  
 <210> 135  
 <400> 135  
 000  
 <210> 136  
 <400> 136  
 000  
 <210> 137  
 <400> 137  
 000  
 <210> 138  
 <400> 138  
 000  
 <210> 139  
 <400> 139  
 000  
 <210> 140  
 <400> 140  
 000  
 <210> 141  
 <400> 141  
 000  
 <210>  
 142

<400> 142  
 000  
 <210> 143  
 <400> 143  
 000  
 <210> 144  
 <400> 144  
 000  
 <210> 145  
 <400> 145  
 000  
 <210> 146  
 <400> 146  
 000  
 <210> 147  
 <400> 147  
 000  
 <210> 148  
 <400> 148  
 000  
 <210> 149  
 <400> 149  
 000  
 <210> 150  
 <400> 150  
 000  
 <210> 151  
 <400> 151  
 000  
 <210> 152  
 <400> 152  
 000  
 <210> 153  
 <400> 153  
 000  
 <210> 154



<400> 154  
 000  
 <210> 155  
 <400> 155  
 000  
 <210> 156  
 <400> 156  
 000  
 <210> 157  
 <400> 157  
 000  
 <210> 158  
  
 <400> 158  
 000  
 <210> 159  
 <400> 159  
 000  
 <210> 160  
 <400> 160  
 000  
 <210> 161  
 <400> 161  
 000  
 <210> 162  
 <400> 162  
 000  
 <210> 163  
 <400> 163  
 000  
 <210> 164  
 <400> 164  
 000  
 <210> 165  
 <400> 165

000

<210> 166

<400> 166

000

<210> 167

<400> 167

000

<210> 168

<400> 168

000

<210> 169

<400> 169

000

<210> 170

<211> 1137

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 170

atgccccaca gtagcctcca cccagcatc ccctgcccc gaggccacgg cgcacagaag 60

gccgccctgg tgctgctgag cgctgtctg gtgacctgt ggggtctggg cgagccccc 120

gagcacacc tgcggtacct cgtgtgcat ctggccagcc tgcagctggg cctgctgctg 180

aacggcgtgt gcagcctggc cgaagagctg agacacatcc acagcagata cagaggctcc 240

tactggagaa ccgtcagagc ctgcctcggc tgtcccctga gaagaggcgc cctgctgctc 300

ctgagcatct acttctacta cagcctgccc aacgccgtgg gccccccctt cacctggatg 360

ctggccctgc tgggcctgag ccaggccctg aacatcctgc tgggcctgaa gggcttggcc 420

cccgccgaga tctccgccgt gtgcgagaag ggcaacttca acatggccca tggccttgcc 480

tggtcctact acatcggeta cctgagactg atcctgccc agctgcaggc cagaatcaga 540

acctacaacc agcactacaa caacctgctg agaggcgccg tgagccaaag actgtacatc 600

ctgctgcccc tggactgcgg cgtgcccagc aaccttagca tggccgaccc caacatcaga 660

ttcctggaca agctgcccc gacagccggc gaccacgccg gcatcaagga cagagtgtac 720

agcaacagca tctacagct gctggagaac ggccagagag ccggcacctg cgtgctggag 780

tacgccacc cctgcagac cctgttcgcc atgagccagt acagccaggc cggttcagc 840

agagaggaca gactggagca agccaagctg ttctgcagaa ccctggagga catcctggcg 900

gacgcccccg agagccaaaa caactgcaga ctgatcgctt accaggagcc cgccgacgac 960

agcagettca gcctgagcca ggaagtgtg agacacctga gacaggaaga gaaggaggag 1020

gtgaccgtgg gaagcctgaa gaccagcgcc gtgcccagca ccagcaccat gagccaggag 1080

cccgagctgc tgatcagcgg catggagaag cccctgcccc tgagaaccga cttcagc 1137

<210> 171

<400> 171

000

<210> 172

<400> 172

000

<210> 173

<400> 173

000

<210> 174

<400> 174

000

<210> 175

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>

Synthetic Polynucleotide

<400> 175

uauuuagugu gauaauggcg uu 22

<210> 176

<211> 57

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 176

gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag accccggcgc cgccacc 57

<210> 177

<400> 177

000

<210> 178

<400> 178

000

<210> 179

<400> 179

000

<210> 180

<400> 180

000

<210> 181

<400> 181

000

<210> 182

<400> 182

000

<210> 183

<400> 183

000

<210> 184

<400> 184

000

<210> 185

<400> 185

000

<210> 186

<400> 186

000

<210> 187

<400> 187

000

<210> 188

<400> 188

000

<210> 189

<400> 189

000

<210> 190

<400> 190

000

<210> 191

<400> 191

000

<210> 192

<400> 192

000

<210> 193

<400> 193

000

<210> 194

<400> 194

000

<210> 195

<400> 195

000

<210> 196

<400> 196

000

<210> 197

<400> 197

000

<210> 198

<400> 198

000

<210> 199

<

211> 1137

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 199

atgccccaca gtagcctcca cccagcatc ccctgcccc gaggccacgg cgcacagaag	60
gccgcccctgg tgctgctgag cgcctgtctg gtgacctgt ggggtctggg cgagccccc	120
gagcacacc tgcggtacct cgtgctgcat ctggccagcc tgcagctggg cctgctgctg	180
aacggcgtgt gcagcctggc cgaagagctg agacacatcc acagcagata cagaggctcc	240
tactggagaa ccgtcagagc ctgcctggc tgtccctga gaagaggcgc cctgctgctc	300
ctgagcatct acttctacta cagcctgccc aacgccgtgg gccccccctt cacctggatg	360
ctggccctgc tgggcctgag ccaggccctg aacatcctgc tgggcctgaa gggcttgcc	420
cccgccgaga tctccgccgt gtgcgagaag ggcaacttca acatggcca tggccttgcc	480
tggctctact acatcggtca cctgagactg atcctgccc agctgcaggc cagaatcaga	540
acctacaacc agcactaca caacctgtg agaggcgccg tgagccaaag actgtacatc	600
ctgctgcccc tggactgcgg cgtgcccagc aaccttagca tggccgacct caacatcaga	660
ttcttgga agctgcccc gcagaccggc gaccacgccc gcatcaagga cagagtgtac	720
agcaacagca tctacagct gctggagaac ggccagagag ccggcacctg cgtgctggag	780
tacgccacc ccctgcagac cctgttcgcc atgagccagt acagccagc cggttcagc	840
agagaggaca gactggagca agccaagctg ttctgcagaa ccctggagga catcctggcg	900
gacgcccc agagccaaa caactgcaga ctgatgcct accaggagcc cgccgacgac	960
agcagcttca gcctgagcca ggaagtgtg agacacctga gacaggaaga gaaggaggag	1020
gtgacctgg gaagcctgaa gaccagcgcc gtgcccagca ccagcacat gagccaggag	1080
cccgaagtgc tgatcagcg catggagaag ccctgcccc tgagaaccga cttcagc	1137

<210> 200

<211> 1137

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 200

atgectcaca gcagcctgca ccctagcatc ccttgcccta gaggccacgg cgcccagaag	60
gccgcccctgg tgctgctgag cgcctgcctg gtgacctgt ggggcctggg cgagcctcct	120
gagcacacc tgagatacct ggtgtgtcac ctggccagcc tgcagctggg cctgctgctg	180
aacggcgtgt gcagcctggc cgaggagctg agacacatcc acagcagata cagaggcagc	240
tactggagaa ccgtgagagc ctgcctgggc tgcctctga gaagaggcgc cctgctgctg	300



ctgagcatct acttctacta cagcctgcct aacgccgtgg gccctccttt cacctggatg 360

ctggccctgc tgggcctgag ccaggccctg aacatcctgc tgggcctgaa gggcctggcc 420

cctgcccaga tcagcccggt gtgcgagaag ggcaacttca acgtggccca cggcctggcc 480

tggagctact acatcggtta cctgagactg atcctgcctg agctgcaggc cagaatcaga 540

acctacaacc agcactacaa caacctgctg agaggcgccg tgagccagag actgtacatc 600

ctgctgcctc tggactgcgg cgtgcctgac aacctgagca tggccgaccc taacatcaga 660

ttcctggaca agctgcctca gcagaccggc gaccacgccg gcatcaagga cagagtgtac 720

agcaacagca tctacgagct gctggagaac ggccagagag ccggcacctg cgtgctggag 780

tacgccaccc ctctgcagac cctgttcgcc atgagccagt acagccaggc cggcttcagc 840

agagaggaca ccctggagca ggccaagctg ttctgcagaa ccctggagga catcctggcc 900

gagcccccgt agagccagaa caactgcaga ctgatgcct accaggagcc tgccgacgac 960

agcagcttca gcctgagcca ggaggtgctg agacacctga gacaggagga gaaggaggag 1020

gtgaccgtgg gcagcctgaa gaccagcgcc gtgcctagca ccagcaccat gagccaggag 1080

cctgagctgc tgatcagcgg catggagaag cctctgcctc tgagaaccga cttcagc 1137

<210> 201

<211> 1137

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 201

atgccccaca gcagcctgca cccctccatc cctgttccca gaggccacgg cgeccagaag 60

gccgccttgg tgctgtgag cgctgcctg gtgacctat ggggcctggg cgagccccc 120

gagcacacc tgagatact ggtcctgcac ctggccagcc tccagctggg cctgtgctc 180

aacggcgtgt gtagcctggc cgaggagctg agacacatcc acagcagata cagaggcagc 240

tactggagaa ccgtgagagc ctgcctgggt tgccactga gaaggaggc tetgtgtctg 300

ctgagcatct acttctacta ctgcgtgcc aacgtgttg gccccccctt cacctggatg 360

ctggccctgc tgggtctgag ccaggccctg aacatcctcc tgggcctgaa gggcctggcc 420

cccgcagaga taagcccggt ttgcgagaag ggcaacttca acgtggccca tggcctggcc 480

tggagctact acatcggtta cttacgctg atcctgccc agctgcaggc cagaatcaga 540

acctacaacc agcattacaa caacctgctg agaggcgccg tgagccagag actgtatata 600

ctgctgcccc tggactgcgg cgtgcccagc aacctgagca tggccgaccc caacatcaga 660

ttcctggaca agctcccca gcagaccggc gaccacgccg gaatcaaaga cagagtgtat	720
agcaacagca tctacgagct gctggagaac ggccagagag ccggcacctg cgtactggag	780
tagccaccc ccttgacagc cctgtttgcc atgagccagt acagccaggc cggcttcagc	840
agagaggaca tgctggagca ggccaagctg ttctgcagaa ccctggagga catcctggcc	900
gacgccccg agagccagaa caactgcaga ctgatcgct accaagagcc cgccgacgac	960
agcagcttca gcttaagcca ggaggtgctg agacatctga gacaggagga gaaggaggag	1020
gtgaccgtgg gcagcctcaa gaccagcgct gtgccctcta ccagcaccat gagccaggag	1080
cccagctgc tgatcagcg catggagaag cccctgcccc tgagaacaga cttcagc	1137
<210> 202	
<211> 1137	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 202	
atgccccata gcagcctgca cccagcatc cctgcccc gagggcacgg cggccagaag	60
gccgccctgg tctgtctgag cgcattgctg gtacacctgt ggggcctggg cgagccccc	120
gagcacacc tgagatact ggtgtgtgac ctgccagcc tgcagctggg cctgtgtctg	180
aacggcgtgt gcagcctggc cgaggagctg agacacatcc acagcagata tagaggcagc	240
tactggagaa ccgtgagagc ttgcctcggc tgccccctga gaagaggcgc cctgtgtctg	300
ctgagcatct acitttacta cagcctgccc aacgtgtgg gcccccttt cacgtggatg	360
ctgcacctgc tgggactgag ccagccctg aacatcctgc tgggccttaa gggcctagcc	420
cccgcgaga tcagcgccgt gtgcgagaag ggcaacttca atgtggcca cggcctggcc	480
tggagctact acatcggtta cctgagactg atcctgccc agctgcaggc cagaatcaga	540
acctacaatc agactacaa caacctgctg agaggcgccg tgagccagag actgtacatc	600
ctgtgcccc tggactgagg cgtgcccgc aacctcagca tggccgacct caacatcaga	660
ttcctggaca agctgcccc gcagaccggc gaccacgccg gcatcaagga tcgctgtac	720
agcaacagca tctacgagct gctggaaaac ggccagagag ccggaacctg cgtgctggag	780
tagccacac ccctgcagac cctgttcgcc atgagccagt acagccaggc cggcttcagc	840
agagaggaca agctggagca ggccaagctg ttctgcagaa ccctggagga tatcctgcc	900
gacgccccg agagccagaa caactgcagg ctgatcgct accaggagcc cgctgacgac	960
agcagcttta gcctgagcca ggaggtgctg agacatctgc gtcaagagga aaaggaggag	1020

gtgaccgtgg gctccctgaa gaccagcgcc gtgcccagca ccagcaccat gagccaggag 1080  
 cccgagctgc tgatcagcgg catggagaag cactgcccc tcagaaccga cttcagc 1137  
 <210> 203  
 <211> 1137  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 203  
 atgcctcaca gcagcctgca ccctagcatc ccttgcccta gaggccacgg cgcccagaag 60  
 gccgcccctgg tgctgctgag cgcctgcctg gtgaccctgt ggggcctggg cgagcctcct 120  
 gagcacaccc tgagatacct ggtgctgcac ctggccagcc tgcagctggg cctgctgctg 180  
 aacggcgtgt gcagcctggc cgaggagctg agacacatcc acagcagata cagaggcagc 240  
 tactggagaa ccgtgagagc ctgcctgggc tgccctctga gaagaggcgc cctgctgctg 300  
 ctgagcatct acttctacta cagcctgcct aacgccgtgg gccctccttt cacctggatg 360  
 ctggccctgc tgggcctgag ccaggccctg aacatcctgc tgggcctgaa gggcctggcc 420  
 cctgccgaga tcagcgcctg gtgcgagaag ggcaacttca gcgtggccca cggcctggcc 480  
 tggagctact acatcggtta cctgagactg atcctgcctg agctgcaggc cagaatcaga 540  
 acctacaacc agcactaca caacctgctg agaggcgccg tgagccagag actgtacatc 600  
 ctgctgcctc tggactgcgg cgtgcctgac aacctgagca tggccgaccc taacatcaga 660  
 ttcttgaca agctgcctca gcagaccggc gaccacgccg gcatcaagga cagagtgtac 720  
 agcaacagca tctacagct gctggagaac ggccagagag ccggcacctg cgtgctggag 780  
 tacgccaccc ctctgcagac cctgttcgcc atgagccagt acagccaggc cggcttcagc 840  
 agagaggaca gactggagca ggccaagctg ttctgcagaa ccctggagga catcctggcc 900  
 gagccccctg agagccagaa caactgcaga ctgatgcct accaggagcc tgccgacgac 960  
 agcagcttca gcctgagcca ggaggtgctg agacacctga gacaggagga gaaggaggag 1020  
 gtgaccgtgg gcagcctgaa gaccagcgcc gtgcctagca ccagcaccat gagccaggag 1080  
 cctgagctgc tgatcagcgg catggagaag cctctgcctc tgagaaccga cttcagc 1137  
 <210> 204  
 <211> 1137  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 204

atgcctcaca gcagcctgca ccctagcatc ccttgcccta gaggccacgg cgcccagaag	60
gccgcccctgg tgctgctgag cgcctgcctg gtgaccctgt ggggcctggg cgagcctcct	120
gagcacaccc tgagatacct ggtgctgcac ctggccagcc tgcagctggg cctgctgctg	180
aacggcgtgt gcagcctggc cgaggagctg agacacatcc acagcagata cagaggcagc	240
tactggagaa ccgtgagagc ctgcctgggc tgcctctga gaagaggcgc cctgctgctg	300
ctgagcatct acttctacta cagcctgcct aacgccgtgg gccctccttt cacctggatg	360
ctggccctgc tgggcctgag ccaggccctg aacatcctgc tgggcctgaa gggcctggcc	420
cctgccgaga tcagcgcctt gtgcgagaag ggcaacttca acgtggcca cggcctggcc	480
tggagctact acatcggtta cctgagactg atcctgcctg agctgcaggc cagaatcaga	540
acctacaacc agcactacaa caacctgctg agaggcgccg tgagccagag actgtacatc	600
ctgctgcctc tggactgcgg cgtgcctgac aacctgagca tggccgaccc taacatcaga	660
ttcctggaca agctgcctca gcagaccggc gaccacgccg gcatcaagga cagagtgtac	720
agcaacagca tctacgagct gctggagaac ggccagagag ccggcacctg cgtgctggag	780
tacgccaccc ctctgcagac cctgttcgcc atgagccagt acagccaggc cggttcagc	840
agagaggaca gactggagca ggccaagctg ttctgcagaa ccctggagga catcctggcc	900
gacgcccctg agagccagaa caactgcaga ctgatgcct accaggagcc tgccgacgac	960
agcagcttca gcctgagcca ggaggtgctg agacacctga gacaggagga gaaggaggag	1020
gtgaccgtgg gcagcctgaa gaccagcgcc gtgcctagca ccagcaccat gagccaggag	1080
cctgagctgc tgatcagcgg catggagaag cctctgcctc tgagaaccga cttcagc	1137

<210> 205

<211> 1137

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 205

atgcctcaca gcagcctgca ccctagcatc ccttgcccta gaggccacgg cgcccagaag	60
gccgcccctgg tgctgctgag cgcctgcctg gtgaccctgt ggggcctggg cgagcctcct	120
gagcacaccc tgagatacct ggtgctgcac ctggccagcc tgcagctggg cctgctgctg	180
aacggcgtgt gcagcctggc cgaggagctg agacacatcc acagcagata cagaggcagc	240
tactggagaa ccgtgagagc ctgcctgggc tgcctctga gaagaggcgc cctgctgctg	300

ctgagcatct acttctacta cagcctgcct aacgccgtgg gccctccttt cacctggatg 360

ctggccctgc tgggcctgag ccaggccctg aacatcctgc tgggcctgaa gggcctggcc 420

cctgcccaga tcagcgccgt gtgcgagaag ggcaacttca acgtggccca cggcctggcc 480

tggagctact acatcggtta cctgagactg atcctgcctg agctgcaggc cagaatcaga 540

acctacaacc agcactacaa caacctgctg agaggcgccg tgagccagag actgtacatc 600

ctgctgcctc tggactgcgg cgtgcctgac aacctgagca tggccgaccc taacatcaga 660

ttcctggaca agctgcctca gcagaccggc gaccacgccg gcatcaagga cagagtgtac 720

agcaacagca tctacgagct gctggagaac ggccagagag ccggcacctg cgtgctggag 780

tacgccaccc ctctgcagac cctgttcgcc atgagccagt acagccaggc cggcttcagc 840

agagaggaca gactggagca ggccaagctg ttctgcagaa ccctggagga catcctggcc 900

gacgcccctg agagccagaa caactgcaga ctgatgcct accagcagcc tgccgacgac 960

agcagcttca gcctgagcca ggaggtgctg agacacctga gacaggagga gaaggaggag 1020

gtgaccgtgg gcagcctgaa gaccagcgcc gtgcctagca ccagcaccat gagccaggag 1080

cctgagctgc tgatcagcgg catggagaag cctctgcctc tgagaaccga cttcagc 1137

<210> 206

<211> 1137

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 206

atgcctcaca gcagcctgca ccctagcatc ccttgcctta gaggccacgg cgcccagaag 60

gccgccttgg tgctgctgag cgctgcctg gtgacctgt ggggcctggg cgagcctcct 120

gagcacacc tgagatacct ggtgtgtcac ctggccagcc tgcagctggg cctgctgctg 180

aacggcgtgt gcagcctggc cgaggagctg agacacatcc acagcagata cagaggcagc 240

tactggagaa ccgtgagagc ctgcctgggc tgccctctga gaagaggcgc cctgctgctg 300

ctgagcatct acttctacta cagcctgcct aacgccgtgg gccctccttt cacctggatg 360

ctggccctgc tgggcctgag ccaggccctg aacatcctgc tgggcctgaa gggcctggcc 420

cctgcccaga tcagcgccgt gtgcgagaag ggcaacttca acgtggccca cggcctggcc 480

tggagctact acatcggtta cctgagactg atcctgcctg agctgcaggc cagaatcaga 540

acctacaacc agcactacaa caacctgctg agaggcgccg tgagccagag actgtacatc 600

ctgctgcctc tggactgcgg cgtgcctgac aacctgagca tggccgaccc taacatcaga 660

ttcctggaca agctgcctca gcagaccggc gaccacgccg gcatcaagga cagagtgtac 720  
 agcaacagca tctacgagct gctggagaac ggccagagag ccggcacctg cgtgctggag 780

tacgccaccc ctctgcagac cctgttcgcc atgagccagt acagccaggc cggcttcagc 840  
 agagaggaca gactggagca ggccaagctg ttctgcagaa ccctggagga catcctggcc 900  
 gacgcccctg agagccagaa caactgcaga ctgatcgct accaggagcc tgccgacgac 960  
 agcagcttca gcctgagcca ggaggtgctg agacacctga gacaggagga gaaggaggag 1020  
 gtgaccgtgg gcagcctgaa gaccagcgcc gtgcctagca ccagcaccat gagccaggag 1080  
 cctgagctgc tgatcagcgg catggagaag cctctgcctc tggccaccga cttcagc 1137

<210> 207  
 <211> 1137  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 207

atgcctcaca gcagcctgca ccctagcatc ccttgccta gagggcacgg cggccagaag 60  
 gccgccctgg tgctgctgag cgctgcctg gtgacctgt ggggcctggg cgagcctcct 120  
 gagcacaccc tgagatacct ggtgtctgac ctggccagcc tgcagctggg cctgctgctg 180  
 aacggcgtgt gcagcctggc cgaggagctg agacacatcc acagcagata cagaggcagc 240  
 tactggagaa ccgtgagagc ctgcctgggc tgccctctga gaagaggcgc cctgctgctg 300  
 ctgagcatct acttctacta cagcctgcct aacgccgtgg gccctccttt cacctggatg 360

ctggccctgc tgggcctgag ccaggccctg aacatcctgc tgggcctgaa gggcctggcc 420  
 cctgcccaga tcagcgccct gtgcgagaag ggcaacttca gcatggccca cggcctggcc 480  
 tggagctact acatcggtca cctgagactg atcctgcctg agctgcaggc cagaatcaga 540  
 acctacaacc agcactaca caacctgctg agaggcgccg tgagccagag actgtacatc 600  
 ctgctgcctc tggactgcgg cgtgcctgac aacctgagca tggccgaccc taacatcaga 660  
 ttcctggaca agctgcctca gcagaccggc gaccacgccg gcatcaagga cagagtgtac 720  
 agcaacagca tctacgagct gctggagaac ggccagagag ccggcacctg cgtgctggag 780

tacgccaccc ctctgcagac cctgttcgcc atgagccagt acagccaggc cggcttcagc 840  
 agagaggaca gactggagca ggccaagctg ttctgcagaa ccctggagga catcctggcc 900  
 gacgcccctg agagccagaa caactgcaga ctgatcgct accaggagcc tgccgacgac 960  
 agcagcttca gcctgagcca ggaggtgctg agacacctga gacaggagga gaaggaggag 1020



gtgaccgtgg gcagcctgaa gaccagcgcc gtgcctagca ccagcaccat gagccaggag 1080  
 cctgagctgc tgatcagcgg catggagaag cctctgcctc tgagaaccga cttcagc 1137  
 <210> 208  
 <211> 1137  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 208  
 atgcctcaca gcagcctgca ccctagcatc ccttgcccta gaggccacgg cgcccagaag 60  
 gccgcccttg tgctgctgag cgcctgcctg gtgaccctgt ggggcctggg cgagcctcct 120  
 gagcacaccc tgagatacct ggtgctgcac ctggccagcc tgcagctggg cctgctgctg 180  
 aacggcgtgt gcagcctggc cgaggagctg agacacatcc acagcagata cagaggcagc 240  
 tactggagaa ccgtgagagc ctgcctgggc tgccctctga gaagaggcgc cctgctgctg 300  
 ctgagcatct acttctacta cagcctgcct aacgccgtgg gccctccttt cacctggatg 360

ctggccctgc tgggcctgag ccaggccctg aacatcctgc tgggcctgaa gggcctggcc 420  
 cctgccgaga tcagcgcct gtgcgagaag ggcaacttca gcatggcca cggcctggcc 480  
 tggagctact acatcgcta cctgagactg atcctgcctg agctgcaggc cagaatcaga 540  
 acctacaacc agcactaca caacctgctg agaggcgccg tgagccagag actgtacatc 600  
 ctgctgcctc tggactgcgg cgtgcctgac aacctgagca tggccgaccc taacatcaga 660  
 ttcttgaca agctgcctca gcagaccggc gaccacgccg gcatcaagga cagagtgtac 720  
 agcaacagca tctacgagct gctggagaac ggccagagag ccggcacctg cgtgctggag 780

tacgccaccc ctctgcagac cctgttcgcc atgagccagt acagccaggc cggcttcagc 840  
 agagaggaca tgctggagca ggccaagctg ttctgcagaa ccctggagga catcctggcc 900  
 gacgccctg agagccagaa caactgcaga ctgatgcct accaggagcc tgccgacgac 960  
 agcagcttca gcctgagcca ggaggtgctg agacacctga gacaggagga gaaggaggag 1020  
 gtgaccgtgg gcagcctgaa gaccagcgcc gtgcctagca ccagcaccat gagccaggag 1080  
 cctgagctgc tgatcagcgg catggagaag cctctgcctc tgagaaccga cttcagc 1137  
 <210> 209  
 <211> 141  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 209

tgataatagg ctggagcctc ggtggcctag cttcttgccc cttgggcctc cccccagccc 60

ctcctccctc tctgcaccc gtacccccca aacaccattg tcacactcca gtggtctttg 120

aataaagtct gaggggcgg c 141

<210> 210

<400> 210

000

<210> 211

<400> 211

000

<210> 212

<400> 212

000

<210> 213

<400> 213

000

<210> 214

<400> 214

000

<210> 215

<400> 215

000

<210> 216

<400> 216

000

<210> 217

<400> 217

000

<210> 218

<400> 218

000

<210> 219

<400> 219

000

<210> 220

<400> 220

000

<210> 221

<400> 221

000

<210> 222

<400> 222

000

<210> 223

<400> 223

000

<210> 224

<211> 380

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 224

Met Pro His Ser Ser Leu His Pro Ser Ile Pro Cys Pro Arg Gly His

1 5 10 15

Gly Ala Gln Lys Ala Ala Leu Val Leu Leu Ser Ala Cys Leu Val Thr

20 25 30

Leu Trp Gly Leu Gly Glu Pro Pro Glu His Thr Leu Arg Tyr Leu Val

35 40 45

Leu His Leu Ala Ser Leu Gln Leu Gly Leu Leu Leu Asn Gly Val Cys

50 55 60

Ser Leu Ala Glu Glu Leu Arg His Ile His Ser Arg Tyr Arg Gly Ser

65 70 75 80

Tyr Trp Arg Thr Val Arg Ala Cys Leu Gly Cys Pro Leu Arg Arg Gly

85 90 95

Ala Leu Leu Leu Leu Ser Ile Tyr Phe Tyr Tyr Ser Leu Pro Asn Ala

100 105 110

Val Gly Pro Pro Phe Thr Trp Met Leu Ala Leu Leu Gly Leu Ser Gln  
115 120 125  
Ala Leu Asn Ile Leu Leu Gly Leu Lys Gly Leu Ala Pro Ala Glu Ile  
130 135 140  
Ser Ala Val Cys Glu Lys Gly Asn Phe Asn Val Ala His Gly Leu Ala  
145 150 155 160  
Trp Ser Tyr Tyr Ile Gly Tyr Leu Arg Leu Ile Leu Pro Glu Leu Gln  
165 170 175  
Ala Arg Ile Arg Thr Tyr Asn Gln His Tyr Asn Asn Leu Leu Arg Gly  
180 185 190  
Ala Val Ser Gln Arg Leu Tyr Ile Leu Leu Pro Leu Asp Cys Gly Val  
195 200 205  
Pro Asp Asn Leu Ser Met Ala Asp Pro Asn Ile Arg Phe Leu Asp Lys  
210 215 220  
Leu Pro Gln Gln Thr Gly Asp His Ala Gly Ile Lys Asp Arg Val Tyr  
225 230 235 240  
Ser Asn Ser Ile Tyr Glu Leu Leu Glu Asn Gly Gln Arg Ala Gly Thr  
245 250 255  
Cys Val Leu Glu Tyr Ala Thr Pro Leu Gln Thr Leu Phe Ala Met Ser  
260 265 270  
Gln Tyr Ser Gln Ala Gly Phe Ser Arg Glu Asp Lys Leu Glu Gln Ala  
275 280 285  
Lys Leu Phe Cys Arg Thr Leu Glu Asp Ile Leu Ala Asp Ala Pro Glu  
290 295 300  
Ser Gln Asn Asn Cys Arg Leu Ile Ala Tyr Gln Glu Pro Ala Asp Asp  
305 310 315 320  
Ser Ser Phe Ser Leu Ser Gln Glu Val Leu Arg His Leu Arg Gln Glu  
325 330 335  
Glu Lys Glu Glu Val Thr Val Gly Ser Leu Lys Thr Ser Ala Val Pro  
340 345 350  
Ser Thr Ser Thr Met Ser Gln Glu Pro Glu Leu Leu Ile Ser Gly Met

355	360	365	
Glu Lys Pro Leu Pro Leu Arg Thr Asp Phe Ser Thr			
370	375	380	
<210> 225			
<211> 1140			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> Synthetic Polynucleotide			
<400> 225			
atgccccata gcagcctgca cccagcatc cctgccccca gaggccacgg cgcccagaag		60	
gccgccctgg tctgtctgag cgcatgcctg gtcaccctgt ggggcctggg cgagccccc		120	
gagcacaccc tgagatacct ggtgctgcac ctgccagcc tgcagctggg cctgctgctg		180	
aacggcgtgt gcagcctggc cgaggagctg agacacatcc acagcagata tagaggcagc		240	
tactggagaa ccgtgagagc ttgcctcggc tgccccctga gaagaggcgc cctgctgctg		300	
ctgagcatct acttttacta cagcctgccc aacgtgtgtg gcccccttt cacgtggatg		360	
ctgcacctgc tgggactgag ccaggccctg aacatcctgc tgggccttaa gggcctagcc		420	
cccgccgaga tcagcgccgt gtgcgagaag ggcaacttca atgtggccca cggcctggcc		480	
tggagctact acatcggtta cctgagactg atcctgcccg agctgcaggc cagaatcaga		540	
acctacaatc agcactacaa caacctgctg agaggcgccg tgagccagag actgtacatc		600	
ctgtgcccc tggactgcgg cgtgccccgac aacctcagca tggccgaccc caacatcaga		660	
ttcctggaca agctgcccc gcagaccggc gaccacgccg gcatcaagga tcgcgtgtac		720	
agcaacagca tctacgagct gctggaaaac ggccagagag ccggaacctg cgtgctggag		780	
tacgccacac ccctgcagac cctgttcgcc atgagccagt acagccaggc cggcttcagc		840	
agagaggaca agctggagca ggccaagctg ttctgcagaa ccctggagga tatcctgcc		900	
gacgcccccg agagccagaa caactgcagg ctgatcgcgt accaggagcc cgctgacgac		960	
agcagcttta gcctgagcca ggaggtgctg agacatctgc gtcaagagga aaaggaggag		1020	
gtgacctggg gtcacctgaa gaccagcgcc gtcccagca ccagcaccat gagccaggag		1080	
cccagactgc tgatcagcgg catggagaag ccaactgccc tcagaaccga cttcagcacc		1140	
<210> 226			
<211> 15			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 226

Ile Leu Met Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile

1 5 10 15

<210> 227

<211> 21

<212> PRT

<213>

> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 227

Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser

1 5 10 15

Ala Ser His Leu Glu

20

<210> 228

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 228

Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu

1 5 10

<210> 229

<211> 15

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 229

Gln Ser Ile Ala Leu Ser Ser Leu Met Val Ala Gln Ala Ile Pro

1 5 10 15

<210> 230

<211> 13

<212> PRT



<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 230

Ala Lys Phe Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala

1 5 10

<210> 231

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

Synthetic Polypeptide

<400> 231

Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu

1 5

<210> 232

<211> 56

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 232

Thr Ala Lys Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Cys Pro Glu Gly Leu Ala

1 5 10 15

Ser Met Arg Leu Gln Cys Leu Ala Val Ser Pro Cys Ile Ser Phe Val

20 25 30

Trp Asn Phe Gly Ile Pro Leu His Pro Leu Ala Ser Cys Gln Cys Phe

35 40 45

Phe Ile Val Tyr Pro Leu Asn Val

50 55

<210> 233

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 233

Ala Val Ser Pro Cys Ile Ser Phe Val Trp

1 5 10

<210> 234

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 234

His Pro Leu Ala Ser Cys Gln Cys Phe Phe

1 5 10

<210> 235

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 235

Phe Val Trp Asn Phe Gly Ile Pro Leu

1 5

<210> 236

<211> 44

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 236

Glu Tyr Phe Thr Leu Gln Val Leu Ser Leu Gly Thr Ser Tyr Gln Val

1 5 10 15

Glu Ser Phe Gln Ser Asn Thr Gln Asn Ala Val Phe Phe Leu Thr Val

20 25 30

Leu Pro Ala Ile Gly Ala Phe Ala Ile Arg Gly Gln

35 40

<210> 237

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 237

Leu Gln Val Leu Ser Leu Gly Thr Ser Tyr

1 5 10

<210> 238

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 238

Phe Gln Ser Asn Thr Gln Asn Ala Val Phe

1 5 10

<210> 239

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 239

Ala Lys Ser Val Thr Cys Thr Met Phe Cys Gln Leu Ala Lys

1 5 10

<210> 240

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 240

Cys Thr Met Phe Cys Gln Leu Ala Lys

1 5

<210> 241

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 241

Lys Ser Val Thr Cys Thr Met Phe

1 5

<210> 242

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 242

Val Pro Tyr Glu Pro Pro Glu Val Trp Leu Ala Leu Thr Val Pro Pro

1 5 10 15

Ser Thr Ala Trp Ala Ala

20

<210> 243

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 243

Val Pro Tyr Glu Pro Pro Glu Val Trp

1 5

<210> 244

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 244

Leu Thr Val Pro Pro Ser Thr Ala Trp

1 5

<210> 245

<211> 1182

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 245

atggaggagc cgcagtcaga tcttagcgtc gagccccctc tgagtcagga aacattttca 60  
gacctatgga aactacttcc tgaaaacaac gttctgtccc ctttgccgtc ccaagcaatg 120  
gatgatttga tgctgtcccc ggacgatatt gaacaatggt tcactgaaga cccaggtcca 180

gatgaagctc ccagaatgcc agaggctgct cccccctgg ccctgcacc agcagctcct 240  
acaccggcgg ccctgcacc agccccctcc tggccctgt catcttctgt cccttcccag 300  
aaaacctacc agggcagcta cggtttccgt ctgggcttct tgcattctgg gacagccaag 360  
tctgtgactt gcacgtactc ccctgccctc aacaagatgt tttgccaact ggccaagacc 420  
tgccctgtgc agctgtgggt tgattccaca ccccccccg gcaccgcgt ccgcgccatg 480  
gccatctaca agcagtcaca gcacatgacg gaggttgtga ggcgctgccc ccacatgag 540  
cgctgctcag atagcgatgg tctggcccct cctcagcatc ttatccgagt ggaaggaaat 600

ttgcgtgtgg agtatttga tgacagaaac acttttcgac atagtgtggt ggtgccctat 660  
gagccgcctg aggttggtc tgactgtacc accatccact acaactacat gtgtaacagt 720  
tcctgcatgg gcggcatgaa ccggaggccc atcctcacca tcacacact ggaagactcc 780  
agtggtaatc tactgggacg gaacagcttt gaggtgctg tttgtgctg tcctgggaga 840  
gaccggcgca cagaggaaga gaatctccgc aagaaagggg agcctcacca cgagctgccc 900  
ccaggagca ctaagcgagc actgccaac aacaccagct cctctcccca gccaaagaag 960  
aaaccactgg atggagaata ttaccctt cagatccgtg ggctgagcg cttcgagatg 1020

ttccgagagc tgaatgagc cttggaactic aaggatgccc aggctgggaa ggagccaggg 1080  
gggagcaggg ctactccag ccacctgaag tcaaaaagg gtcagtctac ctcccgccat 1140  
aaaaaactca tgttcaagac agaaggcct gactcagact ga 1182

<210> 246

<211> 9

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 246

ccrccaugg 9

<210> 247

<211> 47

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 247

gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccacc 47

<210> 248

<211> 47

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 248

gggagaucag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccacc 47

<210> 249

<211> 145

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 249

ggaauaaaag ucuaacaca acauauacaa aacaaacgaa ucuaagcaa ucaagcauuc 60

uacuucuaau gcagcaauuu aaaucauuuc uuuuaaagca aaagcaauuu ucugaaaauu 120

uucaccauuu acgaacgaua gcaac 145

<210> 250

<211> 42

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 250

gggagacaag cuuggcauuc cgguacuguu gguaaagcca cc 42

<210> 251

<211> 47

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 251



gggagaucag agagaaaaga agaguaagaa gaaauuaag agccacc 47

<210> 252

<211> 145

<212> RNA

<213>

Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 252

ggaauaaaag ucuaacaca acauauacaa aacaaacgaa ucuaagcaa ucaagcauuc 60

uacuucuaau gcagcauuu aaaucauuu uuuuaagca aaagcauuu ucugaaaauu 120

uucaccauuu acgaacgaua gcaac 145

<210> 253

<211> 42

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 253

gggagacaag cuuggcauuc cgguacuguu gguaagcca cc 42

<210> 254

<211> 47

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 254

gggaauuaac agagaaaaga agaguaagaa gaaauuaag agccacc 47

<210> 255

<211> 47

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 255

gggaaauuag acagaaaaga agaguaagaa gaaauuaag agccacc 47

<210> 256

<211> 47

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 256

gggaaauaag agaguaaaga acaguaagaa gaaauauaag agccacc 47

<210> 257

<211> 47

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 257

gggaaaaaag agagaaaaga agacuaagaa gaaauauaag agccacc 47

<210> 258

<211> 47

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 258

gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gauauauaag agccacc 47

<210> 259

<211> 47

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 259

gggaaauaag agacaaaaca agaguaagaa gaaauauaag agccacc 47

<210> 260

<211> 47

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 260

gggaaauuag agaguaaaga acaguaagua gaauuaaaag agccacc 47

<210> 261  
 <211> 47  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 261  
 gggaaauaag agagaaauaga agaguaagaa gaaauuaag agccacc 47  
 <210> 262  
 <211> 47  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 262  
 gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaaauuaag agccacc 47  
 <210> 263  
 <211> 47  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 263  
 gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaaauuaag agccacc 47  
 <210> 264  
 <211> 92  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 264  
 ucaagcuuuu ggaccucgu acagaagcua auacgacua cuauaggga auaagagaga 60  
 aaagaagagu aagaagaaau auaagagcca cc 92  
 <210> 265  
 <211> 142  
 <212> RNA  
 <213>  
 Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 265

ugauaaauagu ccauaaagua ggaaacacua cagcuggagc cucgguggcc augcuucuug 60

cccuugggc cccccccag cccuccucc ccuuccugca cccguacccc cguggucuuu 120

gaauaaaguc ugagugggcg gc 142

<210> 266

<211> 142

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 266

ugauaaauagg cuggagccuc gguggcucca uaaaguagga aacacuacac augcuucuug 60

cccuugggc cccccccag cccuccucc ccuuccugca cccguacccc cguggucuuu 120

gaauaaaguc ugagugggcg gc 142

<210> 267

<211> 142

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 267

ugauaaauagg cuggagccuc gguggccaug cuucuugccc cuuccauaaa guaggaaaca 60

cuacaugggc cccccccag cccuccucc ccuuccugca cccguacccc cguggucuuu 120

gaauaaaguc ugagugggcg gc 142

<210> 268

<211> 142

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 268

ugauaaauagg cuggagccuc gguggccaug cuucuugccc cuugggccuc cccccagucc 60

auaaaguagg aaacacuaca cccuccucc ccuuccugca cccguacccc cguggucuuu 120

gaauaaaguc ugagugggcg gc 142

<210> 269

<211> 142

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 269

ugauaaauagg cuggagccuc gguggccaug cuucuugccc cuugggccuc cccccagccc 60

cuccucuccu ucuccauaaa guaggaaaca cuacacugca cccguacccc cguggucuuu 120

gaauaaaguc ugagugggcg gc 142

<210> 270

<211> 142

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 270

ugauaaauagg cuggagccuc gguggccaug cuucuugccc cuugggccuc cccccagccc 60

cuccucuccu uccugcacc guacccccuc cauaaaguag gaaacacuac aguggucuuu 120

gaauaaaguc ugagugggcg gc 142

<210> 271

<211> 142

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 271

ugauaaauagg cuggagccuc gguggccaug cuucuugccc cuugggccuc cccccagccc 60

cuccucuccu uccugcacc guacccccgu ggucuuugaa uaaaguucca uaaaguagga 120

aacacuacac ugagugggcg gc 142

<210> 272

<211> 371

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 272

gcgccugccc accugccacc gacugcugga acccagccag ugaggaggcc ugccccacca 60

gaguccugcu ccucacucc ucgccccgcc ccuguccca gaguccacc ugsggggcucu	120
cuccacccuu cucagaguuc caguuucaac cagaguucca accaauaggc uccauccucu	180
ggauucuggc caaugaaaau ucucccuggc aggguccucu uuuuuucca gagcuccacc	240
ccaaccagga gcucuaguua auggagagcu ccagcacac ucggagcuug ugcuuugucu	300
ccacgcaaag cgauaaaaua aagcauuggu ggccuuuggu cuuugaauaa agccugagua	360
ggaagucuag a	371
<210> 273	
<211> 568	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 273	
gccccugccg cuccaccccc caccacucg gggcccggu ucaagagaga gcggggucug	60
aucucgugua gccauauaga guuugcuuc gagugucugc uuuguuuagu agaggugggc	120
aggaggagcu gaggggcugg ggcuggggug uugaaguugg cuuugcaugc ccagcgaugc	180
gccucccugu gggaugucac caccucggga accgggagug gcccuuggcu cacuguguuc	240
ugcaugguuu ggaucugaau uaauuguccu uuucuuuaa uccaaccga acuuuuucca	300
accuccaaac uggcuguaac cccaaaucca agccauuaac uacaccugac aguagcauu	360
gucugauuaa ucacuggccc cuugaagaca gcagaaugc ccuuugcaau gaggaggaga	420
ucugggcugg gcgggccagc uggggaagca uuugacuauc uggaacuugu gugugccucc	480
ucagguaugg cagugacuca ccuguuuuu auaaaacaac cugcaacauc ucauggucuu	540
ugaauaaagc cugaguagga agucuaga	568
<210> 274	
<211> 289	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 274	
acacacucca ccuccagcac gcgacuucuc aggacgacga aucuucuaa ugsgggggcg	60
gcugagcucc agccaccccg cagucacuuu cuuuguaaca acuuccguug cugccaucgu	120
aaacugacac aguuuuuaa acguguacau acauuacu uauaccucau uuuguuuuu	180



uucgaaacaa agcccgugg aagaaaaugg aaaacuugaa gaagcauuaa agucauucug	240
uuaagcugcg uaaauggucu uugaauaaag ccugaguagg aagucuaga	289
<210> 275	
<211> 379	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 275	
caucacauuu aaaagcaucu cagccuacca ugagaauaag agaaagaaaa ugaagaucaa	60
aagcuauuuc aucuguuuuu cuuuuucguu gguguaaagc caacaccug ucuaaaaaac	120
auaaaauuu uaaaucauuu ugccucuuuu cucugugcuu caauuaauaa aaaauggaaa	180
gaaucuaaua gagugguaca gcacuguuau uuuucaaaga uguguugcua uccugaaaau	240
ucuguagguu cuguggaagu uccaguguuc ucucuauuuc cacuucggua gaggauuucu	300
aguuucuugu gggcuauuaa aaauaaucuu uaaucucuu cuaauggucu ugaauaaag	360
ccugaguagg aagucuaga	379
<210> 276	
<211> 118	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 276	
gcugccuucu gcggggcuug ccuucuggcc augcccuucu ucucuccuu gcaccuguac	60
cucuuggucu uugaauaaag ccugaguagg aaggcgccg cucgagcaug caucuaga	118
<210> 277	
<211> 908	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 277	
gccagcccu ccccauccca uguauuuau ucuaauuaa auuuauugucu auuuagccu	60
cauauuuuaa gacaggaag agcagaacgg agccccaggc cucugugucc uuccugcau	120
uucugaguuu cauucuccug ccuguagcag ugagaaaaag cuccuguccu cccaucuccu	180

ggacuggggag guagauaggu aaauaccaag uauuuuuuac uaugacugcu cccagcccu	240
ggcucugcaa ugggcacugg gaugagccgc ugugagcccc ugguccugag ggucgccacc	300
ugggacccuu gagaguaa ggucccccac gugggagaca agaaauccu guuuauuuu	360
uaaacagcag uguuccccau cuggguccuu gcaccccuca cucuggccuc agccgacugc	420
acagcggccc cugcaucucc uuggcuguga ggccccugga caagcagagg uggccagagc	480
ugggagggau ggcccugggg ucccacgaau uugcugggga aucucguuuu ucuucuaag	540
acuuuuggga caugguuuga cucccgaaca ucaccgacgc gucuccuguu uuucugggug	600
gccucgggac accugccug ccccccagag ggucaggacu gugacuuuu uuagggccag	660
gcaggugccu ggacauuugc cuugcuggac ggggacuggg gaugugggag ggagcagaca	720
ggaggaauc uucagggcu gugugugaaa ggaagcucca cugucacccu ccaccucuuc	780
acccccacu caccaguguc ccuccacug ucacauugua acugaacuuc aggauauaa	840
aguguuugc uccauggucu uugaauaaag ccugaguagg aaggcggccg cucgagcaug	900
caucuaga	908
<210> 278	
<211> 835	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 278	
acuaaauca aauuaaaaaa gaaagaaau ugaaaaaacu uucucuugc cauuucuuc	60
ucuucuuuuu uaacugaaag cugaauccu ccauuucuuc ugcacauca cuugcuuaa	120
uugugggcaa aagagaaaaa gaaggauuga ucagagcau gugcauaca guuucuuua	180
cuccuuccc cgccccca aaaaauugaa uuuuuuuuuc aacacucua caccuguuau	240
ggaaaaugc aaccuuugua agaaaacaa aauaaaaau gaaaaauaa aaccuuaac	300
auuugacca cuuguggcu uugaauauc uccacagagg gaaguuaaa acccaacu	360
caaagguuu aaacuaccuc aaaacacuu ccaugagug ugauccacu uguuaggugc	420
ugaccuagac agaugaagac uagguccu guuuuuuuu guucauaaa caaaggugc	480
auuuauagu auuucagaa cuugaaga guugauggug cuagaaga uugagaagaa	540
auacuccug auugaguug aucguguggu guuuuuuuu aaaaauuu uuuagcauc	600
auuuuuucca ucuuuuucc aauuuuagu augcagauu uuugcccaa ucuucucag	660
auucagcau uguucuugc cagucacau uucaucuuc uccaugguuc cacagaagcu	720

uuguuuuug ggcaagcaga aaaauuuuuu uguaccuauu uuguauaugu gagauguuuu	780
aaauuuuug gaaaaaaug aaauaaagca uguuugguuu uccaaaagaa cauau	835
<210> 279	
<211> 297	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 279	
cgccgccgcc cgggccccgc agucgagggu cgugagccca ccccguccau ggugcuaagc	60
gggcccgggu ccacacggc cagcaccgcu gcucacucgg acgacgccc ggccugcac	120
cucuccagcu ccuccacgg ggucgccgua gccccggccc ccgccagcc ccaggucucc	180
ccaggcccuc cgaggcugc ccggccuccc uccccugca gccauccaa ggcuccugac	240
cuaccuggcc ccugagcucu ggagcaagcc cugacccaau aaaggcuuug aaccgau	297
<210> 280	
<211> 602	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 280	
ggggcuagag cccucuccgc acagcgugga gacggggcaa ggaggggggu uauuaggauu	60
ggugguuuug uuuugcuuug uuuaaagccg ugaggaaaug gcacaacuuu accucugugg	120
gagaugcaac acugagagcc aagggguggg aguugggaua auuuuuuauu aaaagaaguu	180
uuuccacuuu gaauugcuua aaguggcauu uuuccuauu gcagucacuc cucucauuuc	240
uaaaauaggg acguggccag gcacgguggc ucaugccugu aaucccagca cuuugggagg	300
ccgaggcagg cggcucacga ggucaggaga ucgagacuau ccuggcuaac acgguaaaac	360
ccugucucua cuaaaaguac aaaaauuuag cugggcgugg ugguaggcac cuguaguccc	420
agcuacucgg gaggcugagg caggagaaag gcaugaaucc aagaggcaga gcuugcagug	480
agcugagauc acgccauugc acuccagccu gggcaacagu guuaagacuc ugucuaaa	540
auaaauaaa aaauaaaaua auaaauaaa auuaaaaaa aaagcgagau guugcccuca	600
aa	602
<210> 281	
<211> 785	

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 281

ggcccgccc cgucggacug cccccagaaa gccuccugcc ccugccagu gaaguccuuc	60
agugagcccc uccccagcca gcccucccu ggccccgccg gauguauaaa uguaaaaaug	120
aaggaauuac auuuuauaug ugagcgagca agccggcaag cgagcacagu auuuuuucuc	180
caucccucc cugccugcuc cuuggcaccc ccaugcugcc uucagggaga caggcaggga	240
gggcuugggg cugcaccucc uaccuccca ccagaacga cccacuggg agagcuggug	300
gugcagccuu cccucccug uauaagacac uuugccaagg cucucccuc ucgcccac	360
ccugcuugcc cgucccaca gcuuccugag ggcuauuuc gggaaggag aguucuuugc	420
ugccccuguc uggaagacgu ggcucugggu gagguaggcg ggaaaggag gaguguuua	480
guucuuuggg gaggccacc caaacccag cccaacucc aggggcaccu augagauagg	540
caugcuac cccuccca gacaggccu ccugucucc agggcccca ccgagguucc	600
cagggcugga gacuuccu gguaaacau ccuccagccu cccucccu ggggacgcca	660
aggagguggg ccacaccag gaagggaag cgggcagccc cguuuuggg acgugaacgu	720
uuuaauuuu uuugcugaau uccuuuaca cuaaaaua cagauuuugu uauaaaaaa	780
auugu	785

<210> 282

<211> 3001

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 282

auauuaagga ucaagcugu agcuauuuu gccaccucug caguuuuggg aacaggcaaa	60
uaaaguauca guauacaugg ugauguacau cuguagcaaa gcucuuggag aaaaugaaga	120
cugaagaaag caaagcaaaa acuguauaga gagauuuuuc aaaagcagua aucccucaau	180
uuuaaaaaag gauugaaaau ucuaaauguc uuucugugca uauuuuuugu guuaggaauc	240
aaaaguauuu uauaaaagga gaaagaacag ccucauuua gauguagucc uguuggauuu	300
uuuauccuc cucaguaacc agaaauguu uaaaaaacua aguguuuagg auuucagac	360
aacauuauac auggcucuga aauaucugac acaauguaa cauugcaggc accugcauuu	420
uauuuuuuu uuuaacaa augugacuaa uuugaacuu uuaugaacuu cugagcuguc	480

cccuugcaau ucaaccgcag uuugaauuaa ucauaucaaa ucaguuuuaa uuuuuuaau 540  
 uguacuucag agucuauauu ucaagggcac auuuucucac uacuauuuua auacauuaaa 600  
 ggacuaaaau aucuuucaga gaugcuggaa acaaaucuu ugcuuuauau guuucuuuag 660  
 aauaccaaag aaacauacaa cuugaaaaau aguaauagua uuuuugaaga ucccauuucu 720  
  
 aaugggagau cucuuuaauu ucgaucaacu uauaaugugu aguacuauau uaagugcacu 780  
 ugaguggaau ucaacauuug acuaauaaaa ugaguucauc auguuggcaa gugauguggc 840  
 aauuauucucu ggugacaaaa gaguaaaauc aaauuuucu gccuguuaca aaaucaagg 900  
 aagaccugcu acuaugaaa agaugacauu aaucugucuu cacuguuuau aaucggaug 960  
 gauuuuuuuu caaauucagug uguguuuuga ggucuuuauu aaugaugac auuugagaga 1020  
 aaugguggc uuuuuuagcu accucuuugu ucauuuaagc accaguaaag aucaugucu 1080  
 uuuauagaag uguagauuuu cuuugugacu uugcuaucgu gccuaaagcu cuaaaauuag 1140  
  
 gugaauugugu gaugaauacu cagauuuuuu gucucucua auaauuagu uggucuaag 1200  
 uuucuaaaa auuuuuuac acaugaaaga caaucucua accagaaaa gaaguaguac 1260  
 aauuuuuuu acuguaaagc ugcguuuuag ugaguuuuaa acacacagua ucuuuugguu 1320  
 uuauaaucag uuucuuuuu gcugugccug agauuaagau cuguguauu gugugugugu 1380  
 gugugugcgu uuuguguuu aagcagaaaa gacuuuuuu aaaguuuua gugauaaug 1440  
 cauuuuguu auugaucua gaucacuagu aaacucaggg cugaauuaa ccauguauu 1500  
 ucuauuagaa gaaagaaaac accaucuuu uuccugccu uuuucucuc ucaaaguagu 1560  
  
 uguaguuaa ucuagaaaga agcauuuug auuucuuuag aagguaguuc cugcacucag 1620  
 uuuaaacua aaauaauc auuuggaau uuuuuuuu ugucuaagua aaaaauuua 1680  
 uuuaauuaa uuuuuuuu guuuuauuu auucuuugcu auuugccau ccuuugucu 1740  
 cauuuguuu aaugaauug aaaaauucag ccuguuuau uuuuuuuac uuuuugguu 1800  
 aggaauuuu aaggauuuu guauauuaa uuucuuuuu uauuuuucca aaagguuagu 1860  
 ggacuuaugu uauuuuuu ggcaaaaauc uaaaaacaac aaaaauuuu uuuuacuuu 1920  
 cuuuuacuu auuccucuu uuccaauaag ucauacuuu gguagauug acuuuuuuu 1980  
  
 uuuuuguuu auucacuua ucuuuuugau auuuuaguau aaauuuua aaaaauuu 2040  
 uguaccuuu agucugucac caaaaaaaa aaauuucug uagguaguga aaucuaag 2100  
 uugauuugc uuuagggc uuuuacuau ccuuuuuu cucuuugc uuuuuuagg 2160  
 aguuuguuu uaaaauuc aucuaagca aaaauguau uaaauccau uacugguuau 2220  
 auacccaag gauuauuuu caugcucua uaaagacaca ugcacacua uuuuuuugc 2280  
 agcacuuu acaauagca agacuugga ccaacccaa uguccauca ugauagacu 2340

gauuaagaaa augugcaca auacaccaug gaauacuauug cagccauaaa aaaggaugag	2400
uucauguccu uuguaggac auggauaaag cuggaaacca ucauucugag caaacuauug	2460
caaggacaga aaaccaaaca cugcauguuc ucacucauag gugggaauug aacaugaga	2520
acacuuggac acaagguagg gaacaccaca caccagggcc ugucaugggg uggggggagu	2580
ggggagggau agcauuagga gauauaccua auguaaauga ugaguuaaug ggugcagcac	2640
accaacaugg cacauguaua cauauaguac aaaccugcac guugugcaca uguaccuag	2700
aacuuuaagu auauuaaaa aaaaaagaa aacagaagcu auuuuaaag aaguauuug	2760
cugaaauaaa ugugaucuuu ccuauuaaaa aaauaaagaa auuuuggggu aaaaaaac	2820
aaauauuugu auucugaaa aaucuaaga gaguggaugu gaaguguucu caccacaaa	2880
gugauaacua auugagguaa ugcacauuu auuagaaag auuuugucau uccacaauug	2940
auauauacu aaaaauauu uauacacaau aaauacauac auuaaaaaa aaguuaaau	3000
a	3001
<210> 283	
<211> 1037	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 283	
cccaccugc acgccggcac caaaccugc cccccacc cccccacuc aucacuaaac	60
agaguaaaau gugaugcgaa uuucccgac caaccugauu cgcuagauuu uuuuaagga	120
aaagcuugga aagccaggac acaacgcugc ugccugcuuu gugcagggu cuccggggcu	180
cagccugag uuggcaucac cugcgaggc ccucugggg cucagccug agcuaguguc	240
accugcacag ggcccucuga ggcucagccc ugagcuggcg ucaccuguc agggcccucu	300
ggggcucagc ccugagcugg ccucaccugg guuccccacc cggggcucuc cugcccugc	360
cuccugcccg ccucuccucc ugccugcgca gcuccuucc uaggcaccuc ugugcugcau	420
cccaccagc ugagcaagac gccucucgg gccugugcc gcacuagccu ccucuccuc	480
ugucccaua gcuguuuuu ccaccaauc cucaccuac aguuacuuu caauuaacu	540
caaagcaagc ucuuccuc agcuuggggc agccauuggc cucugucug uuuugggaaa	600
ccaaggucag gaggccguug cagacauaaa ucucggcgac ucggccccgu cuccugagg	660
uccugcuggu gaccggccug gaccuuggc cuacagccu ggaggccgu gcugaccagc	720
acugacccc accucagaga guacucgag gggcguggc ugcacuaag accucgaga	780



uuaacggugc uaaccccguc ugcuccuccc ucccgcagag acuggggccu ggacuggaca	840
ugagagcccc uuggugccac agagggcugu gucuuacuag aaacaacgca aaccucuccu	900
uccucagaau agugaugugu ucgacguuuu aucaaaggcc cccuuucua guucauguua	960
guuuugcucc uucuguguuu uuucugaac cauaucgaug uugcugacuu uuccaaauaa	1020
agguuuucac uccucuc	1037
<210> 284	
<211> 577	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 284	
agaggccugc cuccagggcg ggacugaggc cugagcgcuc cugccgcaga gcuggccgcg	60
ccaaauaauug ucucugugag acucgagaac uuucuuuuu uuccaggcug guucggauuu	120
gggguggauu uggguuuugu ucccuccuc cacucucucc caccuccucc ccgccccuuu	180
uuuuuuuuuu uuuaaacug guauuuuauc uuugauucuc cuucagcccu caccuccggu	240
ucucaucuuu cuugaucaac aucuuuuuu gccucugucc ccuucucua ucucuuagcu	300
ccccuccaac cuggggggga guggugugga gaagccacag gccugagauu ucaucugcuc	360
uccuuccugg agcccagagg agggcagcag aagggggugg ugucuccaac ccccagcac	420
ugaggaagaa cggggcucuu cucauuucac ccuuccuuu cuccuccgccc cccaggacug	480
ggccacuucu ggguggggga gugggucucca gauuggcuca cacugagaau guaagaacua	540
caaacaaaau uucuaauaaa uuauuuuug ugucucc	577
<210> 285	
<211> 2212	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 285	
cuccuccau cccaaccugg cuccuccca cccaaccaac uuuccccca acccgaaac	60
agacaagcaa ccaaacuga accccucaaa aagccaaaa augggagaca auuucacaug	120
gacuuuggaa aaauuuuuu uccuuugcau ucaucucua aacuuaguuu uuaucuuuga	180
ccaaccgaac augacaaaa accaaaagug cauucaaccu uaccaaaaa aaaaaaaaaa	240
aaagaauaaa uaaaauacuu uuuaaaaaag gaagcuuggu ccacuugcuu gaagaccuau	300

gcggggguuaa gucccuuucu gcccguuggg cuuauaagaaac cccaauugcug ccuuuucugc	360
uccuuuucucc acaccccccu ugagggccucc ccuccacucc uucccaaauc ugucucucca	420
gaagacacag gaaacaauu auugucugcc cagcaaucaa aggcuaugcu caaacaccca	480
aguggccccc acccucagcc cgcuccugcc cggccagcac cccagggccc ugaggggaccu	540
ggggguucua gacugccaaa gaagccuugc caucuggcgc uccauggcuc cuugcaacau	600
cuccccuucg uuuuugaggg ggucaugccg ggggagccac cagccccua cuggguucgg	660
aggagaguca ggaaggcca cgacaaagca gaaacaucgg auuuggggaa cgcgugucaa	720
ucccuugugc cgcagggcug ggcgggagag acuguucugu uccuugugua acuguguugc	780
ugaaagacua ccucguucuu gucuugaugu gucaccgggg caacugccug ggggcgggga	840
ugggggcagg guggaagcgg cucccauuu uauaccaag gugcuacauc uaugugaugg	900
gugggguggg gagggaucau cuggugcuau agaaaugag augcccccc aggccagcaa	960
auguuccuuu uuguucaaag ucuauuuua uuccuugua uuuuuuuuu uuuuuuuuu	1020
uuuuugugga ugaggacuug ugaauuuuuc uaaaggugcu auuuuacau gaggagagagc	1080
gugugcggcu ccagcccagc ccgcugcuca cuuuccacc ucucuccacc ugccucuggc	1140
uucucaggcc ucugcucucc gaccucucuc cucugaaacc cuccuccaca gcugcagccc	1200
auccucccgg cuccuccua gucuugcug cguccucugu ccccgguuu cagagacaac	1260
uucccaaagc acaaagcagu uuuuccccc agggguggga ggaagcaaaa gacucuguac	1320
cuauuuuua uguguauau aaauugagau guuuuuuuu auuuugauug cuggaauaaa	1380
gcauguggaa augacccaaa cauaauccgc aguggccucc uauuuuccu cuuuggaguu	1440
gggggagggg uagacauagg gaaggggcuu ugagggugaug ggcuugccu ccauuccugc	1500
ccuuuccuc cccacuauu ucuucuagau ccuccauaa cccacuccc cuuucucuca	1560
cccuucuuu accgcaaacc uuucuacuuc cuuuuauu uucuauucuu gcauuuuccu	1620
ugcaccuuuu ccaauuccuc uucucccug caauaccau caggcaaucc acugcacaa	1680
cacacacaca cacucuac aucuggguu guccaaaccu cauaccacu ccccucaag	1740
cccauccacu cuccacccc uggaugccu gcacuuggug gcggugggau gcuauggau	1800
acugggaggg ugaggggagu ggaacccgug aggaggaccu gggggccuc cuugaacug	1860
acaugaaggg ucaucuggcc ucugcuccu ucucacccac gcugaccucc ugccgaagga	1920
gcaacgcaac aggagagggg ucugcugagc cuggcgaggg ucugggaggg accaggagga	1980
aggcgugcuc ccugcucgu guccuggccc ugagggagug agggagacag acaccuggga	2040

gagcuguggg gaaggcacuc gcaccgugcu cuugggaagg aaggagaccu ggcccugcuc 2100

accacggacu gggugccucg accuccugaa uccccagaac acaaccccc ugggcugggg 2160

uggucugggg aaccaucgug ccccgccuc cgcuccuacuc cuuuuaagc uu 2212

<210> 286

<211> 729

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 286

uuggccaggc cugaccucu uggaccuuc uucuuugccg acaaccacug cccagcagcc 60

ucugggaccu cgggguccca gggaaccag uccagccucc uggcuguuga cuucccauug 120

cucuuggagc caccaaucua agagauucua agagauuccu gcaggccaga ggcggaacac 180

accuuuauug cuggggcucu ccgugguguu cuggaccag cccuggaga caccuucac 240

uuuuacugcu uuguagugac ucgugcucuc caaccugcu uccugaaaaa ccaaggcccc 300

cuuccccac cucuuccaug gggugagacu ugagcagaac aggggcuucc ccaaguugcc 360

cagaaagacu gucuggguga gaagccaugg ccagagcuuc ucccaggcac agguuguuca 420

ccagggacuu cugcuucaag uuuuggggua aagacaccug gaucagacuc caagggcugc 480

ccugagucug ggacuucugc cuccauggcu ggucaugaga gcaaacgua guccccugga 540

gacagcgacu ccagagaacc ucuugggaga cagaagaggc aucugugcac agcucgaucu 600

ucuacuugcc uguggggagg ggagugacag guccacacac cacacugggu caccugucc 660

uggaugccuc ugaagagagg gacagaccgu cagaaacugg agaguucua uuaaagguca 720

uuuaaacca 729

<210> 287

<211> 847

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 287

uccuccggga cccagcccu caggauuccu gaugcuccaa ggcgacugau gggcgugga 60

ugaaguggca cagucagcuu ccugggggc uggugucaug uugggcuccu gggcggggg 120

cacggccugg cauuuacgc auugcugcca cccaggucc accugucucc acuuucacag 180

ccuccaaguc uguggcucuu ccuucuguc cuccgagggg cuugccuuc cuugugucca 240

gugaggugcu cagugaucgg cuuaacuuag agaagcccg cccuccccu ucuccgucug 300

ucccaagagg gucugcucug agccugcguu ccuagguggc ucggccucag cugccugggu 360

uguggccgcc cuagcauccu guaugccac agcuacugga aucccgccug cugcuccggg 420

ccaagcuucu gguugauuaa ugagggcaug gggugguccc ucaagaccuu cccuaccuu 480

uuguggaacc agugaugccu caaagacagu gucccccucca cagcugggug ccaggggcag 540

gggauccuca guauagccgg ugaaccuga uaccaggagc cugggccucc cugaacccu 600

ggcuuccagc caucucaug ccagccuccu ccuggaccuc uggccccc gccccuucc 660

cacacagccc cagaagggu ccagagcuga cccacucca ggaccuagc ccagcccuc 720

agccucauc ggagccccug aagaccagc ccaccaccu uucuggccuc aucugacac 780

gcuccgcauc cugcugugug uccuguucca uguuccggu ccauccaaau acacuucug 840

gaacaaa 847

<210> 288

<211> 110

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 288

gcuggagccu cgguggccau gcuucuugc ccuugggccu cccccagcc ccuccuccc 60

uuccugcacc cguacccccg uggucuuuga auaaagucug agugggcggc 110

<210> 289

<211> 119

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 289

ugauaaauagg cuggagccuc gguggccaug cuucuugccc cuugggccuc cccccagccc 60

cuccucccu uccugcacc guacccccgu ggucuuugaa uaaagucuga gugggcggc 119

<210> 290

<211> 133

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 290

gcuggagccu cgguggccau gcuucuugcc ccuugggccu cccccagcc ccuccucucc	60
uuccugcacc cguacccccc ccauaaagua ggaaacacua caguggucuu ugaauaaagu	120
cugagugggc ggc	133
<210> 291	
<211> 141	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 291	
ugauaaauagg cuggagccuc gguggccaug cuucuugccc cuugggccuc cccccagccc	60
cuccucuccu uccugcacc guaccccccg cauuaauacu cacgguacga guggucuuug	120
aaauaaagucu gagugggcgg c	141
<210> 292	
<211> 164	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 292	
ugauaaauagu ccauaaagua ggaaacacua cagcuggagc cucgguggcc augcuucuug	60
cccuugggc cuccccccag cccuccucc ccuuccugca cccguacccc ccgcauuuu	120
acucacggua cgaguggucu uugaauaaag ucugaguggg cggc	164
<210> 293	
<211> 188	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 293	
ugauaaauagu ccauaaagua ggaaacacua cagcuggagc cucgguggcc augcuucuug	60
cccuugggc cuccaauaag uaggaaacac uacauccccc cagccccucc ucccuuccu	120
gcacccguac cccuccaua aaguaggaaa cacuacagug gucuuugaau aaagucugag	180
ugggcggc	188
<210> 294	

<211> 140	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 294	
ugauaaauagg cuggagccuc gguggccaug cuucuugccc cuugggccuc cccccagccc	60
cuccucuccu uccugcacc guacccccag uagugcuuuc uacuuuaugg uggucuuuga	120
auaaagucug agugggcggc	140
<210> 295	
<211> 181	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 295	
ugauaaauaga guagugcuuu cuacuuuaug gcuggagccu cgguggccau gcuucuugcc	60
ccuugggccu guagugcuuu cuacuuuaug uccccccagc cccucuccc uuccugcacc	120
cguacccccu guagugcuuu cuacuuuaug guggucuuug aauaaagucu gagugggcgg	180
c	181
<210> 296	
<211> 184	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 296	
ugauaaauaga guagugcuuu cuacuuuaug gcuggagccu cgguggccau gcuucuugcc	60
ccuugggccu ccauaaagua ggaaacacua cacccccca gcccuccuc cccuuccugc	120
accguaccc ccaguaguc uuucuaauuu augguggucu uugaauaaag ucugaguggg	180
cggc	184
<210> 297	
<211> 142	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	



<400> 297  
 ugauaaugu ccauaaagua ggaaacacua cagcuggagc cucgguggcc augcuucuug 60  
  
 ccccuugggc cccccccag cccuccucc ccuuccugca cccguacccc cguggucuuu 120  
 gaauaaaguc ugagugggcg gc 142  
 <210> 298  
 <211> 142  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 298  
 ugauaaugg cuggagccuc gguggucca uaaaguagga aacacuacac augcuucuug 60  
 ccccuugggc cccccccag cccuccucc ccuuccugca cccguacccc cguggucuuu 120  
 gaauaaaguc ugagugggcg gc 142  
 <210> 299  
  
 <211> 142  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 299  
 ugauaaugg cuggagccuc gguggccaug cuucuugccc cuugggccuc cauaaaguag 60  
 gaaacacuac accccccag cccuccucc ccuuccugca cccguacccc cguggucuuu 120  
 gaauaaaguc ugagugggcg gc 142  
 <210> 300  
 <211> 142  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 300  
 ugauaaugg cuggagccuc gguggccaug cuucuugccc cuugggccuc cccccagccc 60  
  
 cuccucccu uccugacccc guacccccac ccuauacaa auuagcaua aguggucuuu 120  
 gaauaaaguc ugagugggcg gc 142  
 <210> 301

<211> 188

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 301

ugauaauga ccccaucac aauuagcau aagcuggagc cucgguggcc augcuucuug	60
cccuugggc caccucauc acauuagca uuaaucccc cagccccucc ucccuuccu	120
gcaccguac cccaccccu aucacaaua gcauuagug gucuugaau aaagucugag	180
ugggcggc	188

<210> 302

<211> 188

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 302

ugauaauga ccccaucac aauuagcau aagcuggagc cucgguggcc augcuucuug	60
cccuugggc cucauuaag uaggaacac uacaucccc cagccccucc ucccuuccu	120
gcaccguac cccaccccu aucacaaua gcauuagug gucuugaau aaagucugag	180
ugggcggc	188

<210> 303

<211> 87

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 303

gacagucag ucacccaua aguagaaagc acuacuaa gcacuggagg guguaguguu	60
uccuacuuu uggaugagug uacugug	87

<210> 304

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 304

uguaguguuu ccuacuuuau gga	23
<210> 305	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 305	
uccauaaagu aggaacacu aca	23
<210> 306	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 306	
cauaaaguag aaagcacuac u	21
<210> 307	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 307	
aguagugcuu ucuacuuuau g	21
<210> 308	
<211> 12	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 308	
ccgccgccgc cg	12
<210> 309	
<211> 15	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 309  
 ccgccgccgc cgccg 15  
 <210> 310  
 <211> 10  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 310  
 ccccgccgcc 10  
 <210> 311  
 <211> 41  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 311  
 gggaataag agagaaaaga agagtaagaa gaaatataag a 41  
 <210> 312  
 <211> 41  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 312  
 gggaataag agagaaaaga agagtaagaa gaaatataag a 41  
 <210> 313  
 <211> 57  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 313  
 gggaataag agagaaaaga agagtaagaa gaaatataag accccggcgc cgccacc 57  
 <210> 314  
 <211> 47  
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 314

gggaaataag agagaaaaga agagtaagaa gaaatataag agccacc

47

<210> 315

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 315

gggaaataag agagaaaaga agagtaagaa gaaatataag accccggcgc cacc

54

<210> 316

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 316

Val Val Gly Ala Asp Gly Val Gly Lys

1 5

<210> 317

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 317

Lys Leu Val Val Val Gly Ala Asp Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu

1 5 10 15

<210> 318

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 318

Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Asp Gly Val Gly Lys

1 5 10 15

Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln

20 25

<210> 319

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 319

Val Val Gly Ala Val Gly Val Gly Lys

1 5

<210> 320

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 320

Lys Leu Val Val Val Gly Ala Val Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu

1 5 10 15

<210> 321

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 321

Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Val Gly Val Gly Lys

1 5 10 15

Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln

20 25

<210> 322

<211> 9

<212> PRT



<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 322

Val Gly Ala Gly Asp Val Gly Lys Ser

1 5

<210> 323

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 323

Leu Val Val Val Gly Ala Gly Asp Val Gly Lys Ser Ala Leu Thr

1 5 10 15

<210>

> 324

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 324

Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Asp Val Gly Lys

1 5 10 15

Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln

20 25

<210> 325

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 325

Val Val Gly Ala Cys Gly Val Gly Lys

1 5

<210> 326

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 326

Lys Leu Val Val Val Gly Ala Cys Gly Val Gly Lys Ser Ala

1 5 10

<210> 327

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 327

Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Cys Gly Val Gly Lys

1 5 10 15

Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln

20 25

<210> 328

<211> 25

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 328

Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Gly Val Gly Lys

1 5 10 15

Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln

20 25

<210> 329

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 329

Met Lys Leu Val Val Val Gly Ala Asp Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu

1 5 10 15

<210> 330

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 330

Met Lys Leu Val Val Val Gly Ala Val Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu

1 5 10 15

<210> 331

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 331

Met Leu Val Val Val Gly Ala Gly Asp Val Gly Lys Ser Ala Leu Thr

1 5 10 15

<210> 332

<211>

> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 332

Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Asp Gly Val Gly Lys

1 5 10 15

Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln

20 25

<210> 333

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 333

Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Val Gly Val Gly Lys

1                      5                      10                      15

Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln

20                      25

<210> 334

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 334

Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Asp Val Gly Lys

1                      5                      10                      15

Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln

20                      25

<210> 335

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 335

Met Lys Leu Val Val Val Gly Ala Asp Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu

1                      5                      10                      15

Lys Leu Val Val Val Gly Ala Asp Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu Lys

20                      25                      30

Leu Val Val Val Gly Ala Asp Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu

35                      40                      45

<210> 336

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 336

Met Lys Leu Val Val Val Gly Ala Val Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu

1                    5                    10                    15  
Lys Leu Val Val Val Gly Ala Val Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu Lys

20                    25                    30  
Leu Val Val Val Gly Ala Val Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu

35                    40                    45

<210> 337

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 337

Met Leu Val Val Val Gly Ala Gly Asp Val Gly Lys Ser Ala Leu Thr

1                    5                    10                    15

Leu Val Val Val Gly Ala Gly Asp Val Gly Lys Ser Ala Leu Thr Leu

20                    25                    30

Val Val Val Gly Ala Gly Asp Val Gly Lys Ser Ala Leu Thr

35                    40                    45

<210> 338

<211> 75

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 338

Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Asp Gly Val Gly Lys

1                    5                    10                    15

Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val

20                    25                    30

Val Val Gly Ala Asp Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu

35                    40                    45

Ile Gln Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Asp Gly Val

50                    55                    60

Gly Lys Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln

65                    70                    75

<210> 339

<211> 75

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 339

Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Val Gly Val Gly Lys

1 5 10 15

Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val

20 25 30

Val Val Gly Ala Val Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu

35 40 45

Ile Gln Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Val Gly Val

50 55 60

Gly Lys Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln

65 70 75

<210> 340

<211> 75

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 340

Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Asp Val Gly Lys

1 5 10 15

Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val

20 25 30

Val Val Gly Ala Gly Asp Val Gly Lys Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu

35 40 45

Ile Gln Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Asp Val

50 55 60

Gly Lys Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln

65 70 75



<210> 341

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 341

Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Cys Gly Val Gly Lys  
1 5 10 15

Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln  
20 25

<210> 342

<211> 75

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 342

Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Cys Gly Val Gly Lys  
1 5 10 15

Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val  
20 25 30

Val Val Gly Ala Cys Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu  
35 40 45

Ile Gln Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Cys Gly Val  
50 55 60

Gly Lys Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln  
65 70 75

<210> 343

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 343

Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Gly Val Gly Lys

1	5	10	15
---	---	----	----

Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln

	20	25	
--	----	----	--

<210> 344

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 344

atgaccgagt acaagctggt ggtggtgggc gccgacggcg tgggcaagag cgccctgacc	60
atccagctga tccag	75

<210> 345

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 345

atgaccgagt acaagctggt ggtggtgggc gccgtggcg tgggcaagag cgccctgacc	60
atccagctga tccag	75

<210> 346

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 346

atgaccgagt acaagctggt ggtggtgggc gccgacggcg tgggcaagag cgccctgacc	60
atccagctga tccag	75

<210> 347

<211> 225

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 347

atgaccgagt acaagttagt ggttgtgggc gccgacggcg tgggcaagag cgccctcacc	60
atccagctta tccagatgac ggaatataag ttagtagtag tgggagccga cgtgtcggc	120
aagtcgcgtt tgaccattca acttattcag atgacagagt ataagctggt cgtttaggc	180
gcagacggcg ttggaaagtc ggcactgacg atccagttga tccag	225
<210> 348	
<211> 225	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 348	
atgaccgagt acaagctcgt cgtggtgggc gccgtggcg tgggcaagag cgccctaacc	60
atccagttga tccagatgac cgaatataag ctctgtgtag tcggagcggg gggcgttggc	120
aagtcagcgc taacaatata actaatccaa atgaccgaat acaagctagt ttagtcggt	180
gccgtcggcg ttggaaagtc agcccttaca attcagctca ttcag	225
<210> 349	
<211> 225	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 349	
atgaccgagt acaagctcgt agtggttggc gccggcgacg tgggcaagag cgccctaacc	60
atccagctca tccagatgac agaataataag ctgtgtgttg tgggagcagg agacgtggga	120
aagagtgcgt tgacgattca actcatacag atgaccgaat acaagttggt ggtggtcggc	180
gcaggtgacg ttgtaagtc tgcactaact atacaactga tccag	225
<210> 350	
<211> 75	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 350	
atgaccgagt acaagctggt ggtggtgggc gcctgcggcg tgggcaagag cgccctgacc	60
atccagctga tccag	75

<210> 351  
 <211> 225  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 351  
 atgaccgagt acaagctcgt ggttgttggc gcctgcggcg tgggcaagag cgccctcacc 60  
 atccagctca tccagatgac agagtataag ttagtcgttg tcggagcttg cggagttgga 120  
  
 aagtcggcgc tcaccattca actcatacaa atgacagaat ataagttagt ggtgggtgggt 180  
 gcgtgtggcg ttggcaagag tgcgcttact atccagctca ttcag 225  
 <210> 352  
 <211> 75  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 352  
 atgaccgagt acaagctggt ggtggtgggc gccggcggcg tgggcaagag cgccctgacc 60  
 atccagctga tccag 75  
 <210> 353  
 <211> 92  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
  
 <400> 353  
 tcaagctttt ggaccctcgt acagaagcta atacgactca ctatagggaa ataagagaga 60  
 aaagaagagt aagaagaaat ataagagcca cc 92  
 <210> 354  
 <211> 47  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 354  
 gggaaataag agagaaaaga agagtaagaa gaaatataag agccacc 47

<210> 355

<211> 119

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 355

tgataatagg ctggagcctc ggtggccatg cttcttgccc cttgggcctc cccccagccc 60

ctctccctt tctgcaccc gtacccccgt ggtctttgaa taaagtctga gtgggcggc 119

<210> 356

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 356

Leu Gln Arg Val Arg Glu Leu Ala Val Gln Ser Ala Asn

1 5 10

<210> 357

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 357

Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Asp Gly Val Gly Lys

1 5 10 15

Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln

20 25

<210> 358

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 358

Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Val Gly Val Gly Lys

1 5 10 15

Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln

20 25

<210> 359

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 359

Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Asp Val Gly Lys

1 5 10 15

Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln

20 25

<210> 360

<211> 75

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 360

Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Asp Gly Val Gly Lys

1 5 10 15

Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val

20 25 30

Val Val Gly Ala Asp Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu

35 40 45

Ile Gln Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Asp Gly Val

50 55 60

Gly Lys Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln

65 70 75

<210> 361

<211> 75

<212> PRT

<213> Artificial Sequence



<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 361

Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Val Gly Val Gly Lys  
 1 5 10 15  
 Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val  
 20 25 30  
 Val Val Gly Ala Val Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu  
 35 40 45  
 Ile Gln Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Val Gly Val  
 50 55 60

Gly Lys Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln  
 65 70 75

<210> 362

<211> 75

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 362

Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Asp Val Gly Lys  
 1 5 10 15  
 Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val  
 20 25 30  
 Val Val Gly Ala Gly Asp Val Gly Lys Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu  
 35 40 45  
 Ile Gln Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Asp Val  
 50 55 60

Gly Lys Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln  
 65 70 75

<210> 363

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 363

Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Cys Gly Val Gly Lys

1 5 10 15

Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln

20 25

<210> 364

<211> 75

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 364

Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Cys Gly Val Gly Lys

1 5 10 15

Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val

20 25 30

Val Val Gly Ala Cys Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu

35 40 45

Ile Gln Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Cys Gly Val

50 55 60

Gly Lys Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln

65 70 75

<210> 365

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 365

Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Gly Val Gly Lys

1 5 10 15

Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln

20 25