



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0008521
(43) 공개일자 2016년01월22일

- | | |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>C12N 15/63</i> (2006.01) <i>A61K 31/70</i> (2006.01)
 <i>A61K 31/7088</i> (2006.01) <i>A61K 31/713</i> (2006.01)
 <i>A61K 45/06</i> (2006.01) <i>A61K 48/00</i> (2006.01)
 <i>C07K 14/705</i> (2006.01) <i>C12N 15/113</i> (2010.01)
 <i>C12N 9/02</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>C12N 15/63</i> (2013.01)
 <i>A61K 31/70</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2015-7029905
 (22) 출원일자(국제) 2014년03월14일
 심사청구일자 없음
 (85) 번역문제출일자 2015년10월15일
 (86) 국제출원번호 PCT/US2014/027453
 (87) 국제공개번호 WO 2014/152540
 국제공개일자 2014년09월25일
 (30) 우선권주장
 61/786,737 2013년03월15일 미국(US)
 (뒷면에 계속)</p> | <p>(71) 출원인
 모더나 세라퓨틱스, 인코포레이티드
 미국 매사추세츠 02139 캠브리지 테크놀로지 스퀘어 200</p> <p>(72) 발명자
 호지 스티븐 지.
 미국 뉴욕주 10065 뉴욕 이스트 63알디 스트리트 #21디 250
 황 에릭 이-춘
 미국 매사추세츠주 02118 보스턴 웨어햄 스트리트 #302 90
 (뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
 장훈</p> |
|--|---|

전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 발명의 명칭 콜레스테롤 수준을 변경하는 조성물 및 방법

(57) 요약

본 발명은 폴리뉴클레오타이드, 1차 전사체 및 mmRNA 분자를 사용하는 조성물, 방법 및 키트에 관한 것이다. 본 발명은 또한 폴리뉴클레오타이드, 1차 전사체 및 mmRNA 분자를 사용하여 콜레스테롤 수준을 변경하기 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

A61K 31/7088 (2013.01)
A61K 31/713 (2013.01)
A61K 45/06 (2013.01)
A61K 48/0066 (2013.01)
C07K 14/705 (2013.01)
C12N 15/113 (2013.01)
C12N 9/0073 (2013.01)
C12Y 114/13017 (2013.01)
C12N 2310/00 (2013.01)

(72) 발명자

블렌 조셉 빈

미국 매사추세츠주 02111 보스턴 29비 에이버리 스트리트 1

길드 저스틴

미국 매사추세츠주 01701 프래밍햄 에드켈 로드 495

드 푸제롤레 안토닌

벨기에 1410 워털루 아브뉴 넵턴 15

엘스워드 제프 린

미국 매사추세츠주 02420 렉싱턴 메리엄 스트리트 23

(30) 우선권주장

61/828,214	2013년05월29일	미국(US)
61/839,488	2013년06월26일	미국(US)
61/903,474	2013년11월13일	미국(US)
14/135,887	2013년12월20일	미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

허용되는 희석제 또는 담체 중의

- (a) PCSK9 음성 LDLR을 암호화하는 합성 폴리뉴클레오타이드 및
 - (b) CYP7A1을 암호화하는 합성 폴리뉴클레오타이드
- 를 포함하는 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, (c) 아토르바스타틴, 세리바스타틴, 플루바스타틴, 로바스타틴, 메바스타틴, 피타바스타틴, 프라바스타틴, 심바스타틴 및 이들의 배합물로 이루어진 그룹으로부터 선택된 스타틴을 추가로 포함하는 것인, 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 합성 폴리뉴클레오타이드는

- (a) 연결된 뉴클레오사이드의 제1 영역으로서, 상기 제1 영역은 적어도 하나의 콜레스테롤 조절 폴리펩타이드를 암호화하는 것인, 연결된 뉴클레오사이드의 제1 영역;
- (b) (i) 천연 5' 비번역 영역(UTR), 서열 번호 1 및 이의 기능적 변이체로 이루어진 그룹으로부터 선택된 연결된 뉴클레오사이드의 서열을 포함하는, 상기 제1 영역의 5' 말단에 위치한 제1 플랭킹 영역(flanking region);
- (c) (i') 천연 3' UTR, 하나 이상의 microRNA 또는 microRNA 결합 부위 또는 microRNA 시드를 포함하는 상기한 것 중의 어느 것, 및 이의 기능적 변이체 또는 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 연결된 뉴클레오사이드의 서열; 및
- (ii') 연결된 뉴클레오사이드의 3' 테일링 서열을 포함하는, 상기 제1 영역의 3' 말단에 위치한 제2 플랭킹 영역을 포함하고;

상기 연결된 뉴클레오사이드의 제1 영역이 적어도 제1 변형된 뉴클레오사이드를 포함하는 것인, 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 제2 플랭킹 영역은 적어도 하나의 miR 결합 부위를 암호화하는 것인, 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 miR 결합 부위는 miR-122a 및 miR-422a로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것인, 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 합성 폴리뉴클레오타이드는 적어도 하나의 화학 변형(chemical modification)을 포함하는 것인, 조성물.

청구항 7

피험자에서 간 세포를 제1항 내지 제6항 중의 어느 한 항의 조성물과 접촉시키는 것을 포함하는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 피험자의 혈장에서 콜레스테롤 수준을 측정하는 것을 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 간 세포를 스타틴과 접촉시키는 것을 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 10

제7항에 있어서, 상기 피험자는 사람인 것인 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 사람은 CYP7A1에 다형성을 가지는 것인 방법.

청구항 12

질환 또는 장애의 치료를 필요로 하는 피험자에게 제1항 내지 제6항 중의 어느 한 항의 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 질환 또는 장애의 치료를 필요로 하는 피험자에서 질환 또는 장애를 치료하는 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 질환 또는 장애는 지방 간 질환, 간 세포 암종, NASH, 지방증, 가족성 고콜레스테롤혈증(FH), 고콜레스테롤혈증, 및 이소성(aberrant) 지단백질 프로파일로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 14

제12항에 있어서, 상기 질환 또는 장애는 가족성 고콜레스테롤혈증(FH)인 것인 방법.

청구항 15

제7항 내지 제14항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 약제학적으로 허용되는 부형제를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 16

제7항 내지 제14항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 지질을 포함하고, 상기 지질은 DLin-DMA, DLin-K-DMA, DLin-KC2-DMA, 98N12-5, C12-200, DLin-MC3-DMA, reLNP, PLGA, PEG, PEG-DMA 및 폐길화(PEGylated) 지질 및 이들의 혼합물로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 17

제12항에 있어서, 상기 합성 폴리뉴클레오타이드는 1ug 내지 150ug의 총 1일 용량으로 투여되는 것인 방법.

청구항 18

상기 피험자를 제1항 내지 제6항 중의 어느 한 항의 조성물과 접촉시키는 것을 포함하는, 피험자의 혈장에서 콜레스테롤 수준을 조절하는 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 조절은 수준 감소인 것인 방법.

발명의 설명

기술분야

관련 출원에 대한 참조

본 출원은 콜레스테롤 수준을 변경하는 조성물 및 방법이라는 발명의 명칭으로 2013년 3월 15일자에 출원된 미국 가출원 번호 61/786,737; 콜레스테롤 수준을 변경하는 조성물 및 방법이라는 발명의 명칭으로 2013년 5월 29일자에 출원된 미국 가출원 번호 61/828,214; 콜레스테롤 수준을 변경하는 조성물 및 방법이라는 발명의 명칭으로 2013년 6월 26일자에 출원된 미국 가출원 번호 61/839,488; 콜레스테롤 수준을 변경하는 조성물 및 방법이라는 발명의 명칭으로 2013년 11월 13일자에 출원된 미국 가출원 번호 61/903,474; 및 콜레스테롤 수준을 변경하는 조성물 및 방법이라는 발명의 명칭으로 2013년 12월 20일자에 출원된 미국 출원 번호 14/135,887에 대한 우

[0001]

[0002]

선권을 주장하며, 이들 각각의 전문은 본원에 참조로 삽입된다.

[0003] **서열 목록에 대한 참조**

[0004] 본 출원은 전자 형식의 서열 목록과 함께 제출된다. 서열 목록은 크기가 175,503 바이트인 2014년 3월 13자에 생성된 M044PCTSQLST.txt 라는 제목으로서 제공된다. 서열 목록의 전자 형식에서의 정보는 그 전문이 본원에 참조로 삽입된다.

[0005] [기술분야]

[0006] 본 발명은 유기체에서 콜레스테롤 수준을 조절 및/또는 변경하거나 유기체에서 콜레스테롤 수송 (trafficking) 을 변경하기 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다. 하나의 측면에서, 본 발명은 치료제에서의 RNA, 예를 들면, 변형 RNA에 관한 것이다. 본 발명의 RNA 또는 변형 RNA는 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 복수의 단백질을 암호화할 수 있다. 본 발명의 RNA 또는 변형 RNA는 또한 관심 대상의 폴리펩타이드를 생성하는데 사용될 수 있다. 본 발명의 변형 RNA 분자는 mRNA일 수 있고, 따라서 변형 mRNA로서 언급될 수 있다. 관심 대상의 폴리펩타이드는 치료제 및/또는 임상 및 연구 설정에서 사용될 수 있다.

배경 기술

[0007] 높은 콜레스테롤은 심장 마비 및 뇌졸중에 대한 다수의 위험 요인들 중 하나이다. 비록 빈약한 식사 및 운동 부족이 높은 콜레스테롤 유전학적 변화 (high cholesterolgenetic change) 의 공통 원인이지만, 예를 들면, LDLR 의 결핍에 의해 초래된 가족성 고콜레스테롤혈증 (FH) 은 높은 콜레스테롤의 원인일 수 있다. 다수의 콜레스테롤 저하 약물은 현재 판매되고 있지만, 이들은 특정 조건 또는 다른 약물과의 위험 또는 금기사항이 없는 것이 아니다. 이러한 약물은 스타틴, 피브레이트, 니아신, 담즙산 (수지), 피토스테롤, 또는 지방의 흡수를 방지하거나 콜레스테롤의 흡수를 감소시키는 기타 화합물, 또는 콜레스테롤 수송 경로에서의 표적 유전자를 포함한다.

[0008] 핵산계 콜레스테롤 저하 약물은, 예를 들면, 동형접합 가족성 고콜레스테롤혈증 (FH)의 치료를 위해 2013년 1월에 승인된, ApoB-100, 미포메르센을 표적화하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 억제제를 포함한다. 2012년 12월, FDA는 또한 동일한 병태를 위한 로미타피드를 승인했다.

[0009] 콜레스테롤 표적화 약물과 연관된 간 관련 문제, 특히 혈청 트랜스아미나아제의 상승 및 간 지방의 축적 (또는 간 지방증)이 더 문제이다. 예를 들면, 미포메르센을 둘러싼 잠재적으로 유의미한 안정성 문제 때문에, 약물은 간 독성에 대한 박스 경고가 붙을 것이고, 처방자 및 약국의 인증 뿐만 아니라 약물이 각각의 새로운 처방과 적절하게 사용되는지의 문서화를 요구할 것이다. 미포메르센이 일반적으로 LDL 콜레스테롤 저하에서 효과적인 반면 (임상 시험 환자 중 절반 이상은 LDL 수준의 20% 이상 감소를 나타냈으며, 동형접합 FH 시험에서, 이것은 LDL을 24.7% 감소시켰다), 전형적인 FH 환자는 400-1000mg/dL 사이의 평균 LDL을 가진다. 결과적으로, 저하는 이들 환자에서 충분히 가능하지 않았다. 추가로, 상기 시험들은, 비록 심혈관 이점이 물론 궁극적으로 의도된 약물 효과이지만, 심혈관 결과를 평가하기 위해 작동될 정도로 크지 않았다. 또한, 심장 장애의 심각한 부작용이 3 상 시험에서 미포메르센 군에서 발생하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명은 관심 대상의 폴리펩타이드 (예를 들면, 변형 mRNA 또는 mmRNA) 를 암호화하고 당업계에서의 문제들 중 하나 이상을 해결하는 구조적 및/또는 화학적 특징을 가지는 핵산계 화합물 또는 폴리뉴클레오타이드를 제공함으로써 LDL 콜레스테롤 수준 상승과 간 기능의 조절이상 둘 다의 문제를 다룬다.

과제의 해결 수단

[0011] 이를 위해서, 본 발명자들은 특정한 변형 mRNA 서열이 면역 반응을 바로 모면, 회피 또는 약화시키는 것을 넘어서 이득을 가지는 치료제로서의 가능성을 가지는 것을 밝혀냈다. 이러한 연구는 공개된 동시 계류 출원들, 2011년 8월 5일자로 출원된 국제 출원 PCT/US2011/046861 및 2011년 10월 3일자로 출원된 국제 출원 PCT/US2011/054636, 2011년 10월 3일자로 출원된 국제 출원 PCT/US2011/054617에 상세히 기재되어 있으며, 그 전문은 본원에 참조로 삽입된다.

[0012] **발명의 개요**

- [0013] 콜레스테롤 및/또는 콜레스테롤 수송과 관련된 질환 및 장애의 치료, 예방 또는 진단에서 RNA, 예를 들면, 변형 RNA를 사용하는 조성물, 방법 및 키트 RNA가 본원에 기재된다.
- [0014] 본 발명에 따르면, 콜레스테롤 수송과 관련된 경로는 콜레스테롤의 농도, 이의 가공 또는 운반을 변경시키는 하나 이상의 폴리펩타이드 (효소 포함) 를 제공함으로써 조절된다.
- [0015] 하나의 실시형태에서, 혈장으로부터 간 세포로의 LDL 콜레스테롤의 운반은 상기 세포에 더 많은 수용체 분자를 제공하거나 LDL 수용체의 파괴를 최소화함으로써 증가된다. 제 1 예에서, LDL 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA 가 제공된다. 제 2 예에서, LDL 수용체로부터의 돌연변이체 형태는 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA에 의해 암호화된다. 이러한 돌연변이체 LDL 수용체 (LDL-R 또는 LDLR) 는 PCSK-9의 결합에서 어떤 방식으로든 결핍된다. 따라서, PCSK9 결합 결핍성 LDLR은 콜레스테롤을 간 세포에 초래한다.
- [0016] LDLR 돌연변이체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 및/또는 mmRNA가 본원에 제공된다. 하나의 측면에서, 변형 mRNA는 서열 번호 19와 같지만 이에 한정되지 않는 LDLR의 아미노산 314-393을 포함하는 영역에서 하나 이상의 아미노산 돌연변이를 포함할 수 있는 LDLR 돌연변이체를 암호화할 수 있다. 하나의 실시형태에서, 아미노산의 영역은 서열 번호 19의 아미노산 316-339를 포함한다. 변형 mRNA는 1-메틸슈도우리딘과 같지만 이에 한정되지 않는 하나 이상의 뉴클레오사이드 변형을 포함할 수 있다. 변형 mRNA는 또한 5-메틸시토신과 같은 뉴클레오사이드 변형을 포함할 수 있다.
- [0017] 서열 번호 19와 같지만 이에 한정되지 않는 LDLR의 아미노산 314-393을 포함하는 영역에서 하나 이상의 아미노산 돌연변이를 포함할 수 있는 LDLR 돌연변이체를 암호화할 수 있는 변형 mRNA를 피험자에게 투여하는 것을 포함하는, 피험자에서 혈청 콜레스테롤을 감소시키는 방법이 또한 본원에서 제공된다. 하나의 실시형태에서, 아미노산의 영역은 서열 번호 19의 아미노산 316-339를 포함한다.
- [0018] 하나의 실시형태에서, CYP7A1을 암호화 및/또는 과발현하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA 가 간 세포에 제공된다. CYP7A1 는 담즙산 합성에 대한 속도 제한 효소이며, 도입되는 콜레스테롤의 제거를 촉진한다. 높은 혈장 저밀도 지질단백질 (LDL) 및 간 콜레스테롤 함량 뿐만 아니라 결핍성 담즙산 분비와 관련된 CYP7A1 돌연변이를 가지는 인간이 존재한다.
- [0019] 하나의 실시형태에서, 낮은 혈장 콜레스테롤 및 수반되는 콜레스테롤 처리 증가를 초래하는 2개의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA 가 전달된다.
- [0020] 하나의 실시형태에서, 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA 는 microRNA 결합 부위 또는 씨드를 함유하기 위해 3'UTR 에서 변형된다. 본 실시형태에서, 대략 30분의 통상의 반감기를 가지는 CYP7A1 폴리뉴클레오타이드는 miR-탈안정화 (특히 간 세포에서 아주 흔한 miR122a) 에 의해 전사 의존적으로 제조될 수 있다. 본 실시형태에 따르면, miR122a 결합 부위가 덜 안정한 전사체를 초래하는 mmRNA의 3'UTR 내에 도입될 수 있다. 작제물로 조작되는 결합 부위의 수에 따라, 이것은 안정성의 적정을 가능하게 하고, 따라서 암호화된 CYP7A1 효소의 발현의 조절을 가능하게 한다. CYP7A1을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA 는 또한 개념 연구 및 기초 연구의 증거에 유용한 마우스 모델을 만드는데 유용할 수 있다. 이들 연구는 복용량 의존성 유전자 요법을 생성하는 것과 유사하다.
- [0021] 하나의 실시형태에서, 치료 요법은 환자가 스타틴에 저반응성인 CYP7A1 다형성을 제공하는 희귀 질환을 위해 설계할 수 있다. 이러한 경우, 본 발명의 유효 조성물의 연구는 신속히 완료되고 식이 기반 도전에 기초할 수 있다. 이와 같이, 본 발명의 조성물은 희귀하고 광범위한 콜레스테롤 관련 질환을 포함하는 질환의 연구 및 치료에 유용하다.
- [0022] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 조성물은 다른 약물 화합물과 함께 투여될 수 있다. 이러한 다른 약물은 특히 스타틴을 포함한다. 스타틴의 예는 아토르바스타틴, 세리바스타틴, 플루바스타틴, 로바스타틴, 메바스타틴, 피타바스타틴, 프라바스타틴, 심바스타틴 및 이들의 배합물을 포함하지만, 이들에 한정되는 것은 아니다.
- [0023] 본 발명에 따르면, 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA를 포함하는 조성물은 희귀 비알콜성 지방 간 질환과 같은 질환을 치료하는데 유용하다. 이러한 장애의 치료에서, 간 콜레스테롤을 자연 소멸 (담즙을 통해 제외) 로 유도하는 임의의 치료제가 탁월한 치료 결과를 가질 것으로 생각된다. 결과적으로, 폴리뉴클레오타이드, LDLR을 암호화하는 1차 작제물 또는 mmRNA의 투여가 간 세포에서 콜레스테롤을 증가시키지만, CYP7A1을 암호화하는 제2 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA의 동시 투여가 담즙을 통해 콜레스테롤을 밖으로 제

속 유도함으로써 공지된 치료제에 의해 현재 나타난 지방간 증상을 방지할 수 있다.

- [0024] 적어도 LDLR 또는 PCSK9 LDLR 돌연변이체를 CYP7A1 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA와 함께 전달하는 것에 추가하여, 스타틴과 같은 추가의 약물을 전달하는 것이 본원에 기재된 LDLR-CYP7A1 치료에 매우 상승적일 것으로 추가로 예상된다. 결과적으로, 콜레스테롤 분비는 촉진될 것이고, 새로운 형성이 방지될 것이고, 혈장으로부터의 운반이 증가할 것이다.
- [0025] 하나의 실시형태에서, mmRNA의 믹스는 콜레스테롤 항상성 경로를 따라 적정되어 체외로 콜레스테롤의 대사를 촉진할 것이다.
- [0026] 다른 실시형태에서, 담즙산 격리제 또는 지용성 비타민이 동시 투여될 수 있다.
- [0027] 명확성을 위해 별도의 실시형태의 맥락에서 기재된 본 개시물의 일정한 특징이 또한 단일 실시형태에서 배합물로 제공될 수 있는 것은 추가로 인정된다. 간결성을 위해 단일 실시형태의 맥락에서 기재된 본 개시물의 다양한 특징이 또한 별도로 또는 임의의 적합한 하위 배합물로 제공될 수 있다.
- [0028] 본 발명의 각종 실시형태의 상세 내용은 하기 상세한 설명에서 설명한다. 본 발명의 기타 특징, 목적 및 이점은 상세한 설명 및 도면으로부터 및 특허청구범위로부터 자명할 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0029] 상기 및 기타 목적, 특징 및 이점은 참조 부호와 같이 상이한 도면을 통해 동일한 부분을 의미하는 첨부되는 도면에서 도시된 바와 같이 본 발명의 특정 실시형태의 추후 설명으로부터 자명할 것이다. 도면은 반드시 크기를 변경할 필요는 없으며, 그 대신에 발명의 각종 실시형태의 원리를 설명할 때에 강조한다.
- 도 1은 본 발명의 1차 작제물의 모식도이다.
- 도 2는 본 발명의 1차 작제물의 모식도이다.
- 도 3은 간 세포에서 콜레스테롤 수송의 경로를 도시한 것이다.
- 도 4는 저밀도 지질단백질 수용체 (LDLR) 변형 mRNA의 유동 세포계수 플롯이다.
- 도 5는 LDLR 변형 mRNA의 유동 세포계수 플롯이다.
- 도 6은 LDLR 발현의 그래프이다. 도 6a는 부가된 LDLR mRNA와 비교한 세포의 LDL 수용체 발현을 도시한 것이다. 도 6b는 형질감염 후 세포의 LDL 수용체 발현을 도시한 것이다. 도 6c는 BODIPY® 표지된 LDL의 포화를 도시한 것이다. 도 6d는 세포에 대한 BODIPY-LDL의 결합 친화도를 도시한 것이다. 도 6e는 각각의 분획의 총 콜레스테롤 함량을 도시한 것이다.
- 도 7은 LDLR 변형 mRNA 산물의 생체분석기 이미지이다. 레인 1, 뉴클레오타이드에서의 크기 마커; 레인 2, LDLR 변형 mRNA.
- 도 8은 HEK293 세포에서 형질감염된 800 ng의 LDLR 변형 mRNA의 유동 세포계수 플롯이다.
- 도 9는 HEK293 세포에서 형질감염된 LDLR 변형 mRNA의 유동 세포계수 플롯이다.
- 도 10은 혈청에서 콜레스테롤 수준을 도시한 것이다. 도 10a는 혼합 LDLR 녹아웃 마우스 (상부 패널) 및 야생형 마우스 (하부 패널)로부터의 FPLC 분획의 흡광도 프로파일을 도시한 것이다. 도 10b는 각각의 분획의 총 콜레스테롤 함량을 도시한 것이다.
- 도 11은 HEK293 세포에서 형질감염된 변이체 LDLR 변형 mRNA의 유동 세포계수 플롯이다.
- 도 12는 PCSK9의 유무 하에 HEK293 세포에서 형질감염된 변이체 LDLR 변형 mRNA의 유동 세포계수 플롯이다.
- 도 13은 형질감염된 변이체 LDLR 변형 mRNA의 유동 세포계수 플롯이다. 도 13a는 LDLR mRNA 형질감염 세포에 대한 BODIPY-LDL의 결합의 등고선 플롯을 도시한 것이다. 도 13b는 BODIPY-LDL의 최대 세포 결합의 절반을 도시한 것이다.
- 도 14는 LDLR mRNA에 의한 형질감염 후 반감기에 대한 영향을 도시한 것이다. 도 14a는 야생형 LDLR mRNA를 도시한 것이다. 도 14b는 4개의 아미노산 치환체 (N316A, E317A, D331A 및 Y336A)를 가지는 변이체 LDLR을 암호화하는 LDLR mRNA를 도시한 것이다. 도 14c는 1개의 아미노산 치환체 Y336A를 가지는 변이체 LDLR을 암호화하는 LDLR mRNA를 도시한 것이다. 도 14d는 1개의 아미노산 치환체 E317A를 가지는 변이체 LDLR을 암호화하는

LDLR mRNA를 도시한 것이다. 도 14e는 1개의 아미노산 치환체 N316A를 가지는 변이체 LDLR을 암호화하는 LDLR mRNA를 도시한 것이다. 도 14f는 1개의 아미노산 치환체 L339D를 가지는 변이체 LDLR을 암호화하는 LDLR mRNA를 도시한 것이다. 도 14g는 1개의 아미노산 치환체 D331E를 가지는 변이체 LDLR을 암호화하는 LDLR mRNA를 도시한 것이다.

도 15는 PCSK의 양이 변할 때 세포 표면 LDLR에 대한 영향을 도시한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0030] 세포 내부에서 핵산, 예를 들면, 리보 핵산 (RNA) 을 전달할 수 있는 것, 시험관내에서, 생체내에서, 동일 위치에서 또는 생체외에서, 예를 들면, 핵산의 세포내 번역 및 관심 대상의 암호화된 폴리펩타이드의 생산을 초래하는 것은 치료제, 진단제, 시약의 분야 및 생물학적 어세이를 위한 큰 관심 대상이다. 비-통합적 폴리뉴클레오타이드의 전달 및 기능은 특히 중요하다.
- [0031] 관심 대상의 하나 이상의 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 설계, 조제, 제조 및/또는 형성을 위한 조성물 (약제학적 조성물 포함) 및 방법이 본원에 기재된다. 본원에 기재된 관심 대상의 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 선택, 설계 및/또는 이용을 위한 시스템, 방법, 장치 및 키트도 또한 제공된다.
- [0032] 본 발명에 따르면, 이들 폴리뉴클레오타이드는 바람직하게는 변형되어 당업계의 다른 폴리펩타이드 암호화 분자의 결핍을 방지한다. 그러므로, 이들 폴리뉴클레오타이드는 변형 mRNA 또는 mmRNA로서 언급된다.
- [0033] 조직에서의 안정성 및/또는 청소 (clearance), 수용체 흡수 및/또는 동력학, 조성물에 의한 세포 접근, 번역 기계에 의한 관여, mRNA 반감기, 번역 효율, 번역 모면, 단백질 생산 능력, 분비 효율 (적용가능한 경우), 순환에 대한 접근성, 단백질 반감기 및/또는 세포 상태, 기능 및/또는 활성의 조절 중의 하나 이상을 향상시키도록 설계된 관심 대상의 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 및/또는 mmRNA가 부분적으로 본원에 제공된다. 구체적으로, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 및/또는 mmRNA는 유기체, 특히 인간 환자에서 콜레스테롤 수준 또는 콜레스테롤 수송을 변경하는데 유용하다.
- [0034] 본 발명에 따르면, 콜레스테롤 수송과 관련된 경로는 콜레스테롤의 농도, 이의 가공 또는 운반을 변경시키는 하나 이상의 폴리펩타이드 (효소 포함) 를 제공함으로써 조절된다.
- [0035] 하나의 실시형태에서, 혈장으로부터 간 세포로의 LDL 콜레스테롤의 운반은 상기 세포에 더 많은 수용체 분자를 제공하거나 LDL 수용체의 파괴를 최소화함으로써 증가된다. 제 1 예에서, LDL 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA 가 제공된다. 제 2 예에서, LDL 수용체로부터의 돌연변이체 형태는 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA에 의해 암호화된다. 이러한 돌연변이체 LDL 수용체 (LDL-R 또는 LDLR) 는 PCSK-9의 결합에서 어떤 방식으로든 결핍된다. PCSK-9의 결합 부위는 LDLR의 EGF-A (또는 EGF 유사 반복) 도메인에 이미 국한되어 있었다 (예를 들면, 문헌 [Kwon et al. *Molecular Basis for LDL receptor recognition by PCSK9*. PNAS. 2008 105(6), 1820-1825] 참조; 그 전문은 본원에 참조로 삽입된다). 따라서, PCSK9 결합 결핍성 LDLR은 콜레스테롤을 간 세포에 초래한다.
- [0036] 하나의 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA는 PCSK-9에 대한 결합이 결핍된 돌연변이체 LDLR을 암호화할 수 있다.
- [0037] 하나의 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA는 하나 이상의 아미노산 돌연변이를 PCSK-9 결합 부위에 포함하는 돌연변이체 LDLR을 암호화할 수 있다. 돌연변이체 LDLR은 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 8개, 9개, 10개 또는 10개 이상의 돌연변이를 포함할 수 있다.
- [0038] 하나의 실시형태에서, 돌연변이체 LDLR은 하나 이상의 아미노산 돌연변이를 LDLR의 EGF-A 도메인 (EGF 유사 반복 도메인) 에 포함할 수 있다. 비제한적인 예로서, EGF-A 도메인은 아미노산 314-393을 포함하는 LDLR의 영역에 위치된다. 다른 비제한적인 예로서, EGF-A 도메인은 아미노산 314-393을 포함하는 서열 번호 19의 영역이다.
- [0039] 하나의 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA는 하나 이상의 아미노산 돌연변이를 EGF 유사 1 도메인에 포함하는 돌연변이체 LDLR을 암호화할 수 있다. EGF 유사 1 도메인은 아미노산 314-353을 포함하는 LDLR의 영역에 위치될 수 있다. 비제한적인 예로서, EGF 유사 1 도메인은 아미노산 314-353을 포함하는 서열 번호 19의 영역이다.

- [0040] 하나의 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA는 하나 이상의 아미노산 돌연변이를 EGF 유사 2 도메인에 포함하는 돌연변이체 LDLR을 암호화할 수 있다. EGF 유사 2 도메인은 아미노산 353-393을 포함하는 LDLR의 영역에 위치될 수 있다. 비제한적인 예로서, EGF 유사 2 도메인은 아미노산 353-393을 포함하는 서열 번호 19의 영역이다.
- [0041] 하나의 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA는 PCSK-9 결합 결핍성 돌연변이체 LDLR을 암호화할 수 있다. PCSK-9 결합 결핍성 돌연변이체 LDLR은 하나 이상의 아미노산 돌연변이를 아미노산 314-393을 포함하는 서열 번호 19의 영역에 포함할 수 있다. 비제한적인 예로서, 하나 이상의 돌연변이는 아미노산 314-353 사이에 위치될 수 있다. 다른 비제한적인 예로서, 하나 이상의 돌연변이는 아미노산 315-340 사이에 위치될 수 있다. 또 다른 비제한적인 예로서, 하나 이상의 돌연변이는 아미노산 354-393 사이에 위치될 수 있다.
- [0042] 하나의 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA는 하나 이상의 돌연변이를 PCSK-9 결합 영역에 포함하는 PCSK-9 결합 결핍성 돌연변이체 LDLR을 암호화할 수 있다. 돌연변이는 아미노산 314-393을 포함하는 서열 번호 19의 영역에 위치될 수 있다. 돌연변이의 영역의 비제한적인 예로서, 돌연변이는 314-353, 315-340 및 354-393의 영역에 위치될 수 있다. 다른 비제한적인 예로서, 돌연변이는 위치 316, 317, 331, 336 또는 339에 있을 수 있다. 또 다른 비제한적인 예로서, 돌연변이체 LDLR은 위치 316, 317, 331 및 336에서 돌연변이를 포함할 수 있다.
- [0043] 하나의 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA는 316, 317, 331, 336 및/또는 339와 같지만 이들에 한정되지 않는 아미노산 위치에서 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 PCSK-9 결합 결핍성 돌연변이체 LDLR을 암호화할 수 있다. 비제한적인 예로서, PCSK-9 결합 결핍성 돌연변이체 LDLR은 돌연변이 N316A, E317A, D331A, D331E, Y336A 및/또는 L339D 중의 하나 이상을 포함할 수 있으며, 여기서, "N316A"는 아스파라긴이 위치 316에서 알라닌으로 치환된 것을 의미한다. 다른 비제한적인 예로서, PCSK-9 결합 결핍성 돌연변이체 LDLR은 돌연변이 N316A, E317A, D331A 및 Y336A를 포함할 수 있다.
- [0044] 하나의 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA는 316, 317, 331, 336 및/또는 339와 같지만 이들에 한정되지 않는 아미노산 위치에서 4개의 돌연변이를 포함하는 PCSK-9 결합 결핍성 돌연변이체 LDLR을 암호화할 수 있다. 비제한적인 예로서, PCSK-9 결합 결핍성 돌연변이체 LDLR은 N316A, E317A, D331A, D331E, Y336A 및/또는 L339D와 같은 돌연변이들 중의 임의의 4개를 포함할 수 있으며, 여기서, "N316A"는 아스파라긴이 위치 316에서 알라닌으로 치환된 것을 의미한다. 다른 비제한적인 예로서, PCSK-9 결합 결핍성 돌연변이체 LDLR은 돌연변이 N316A, E317A, D331A 및 Y336A를 포함할 수 있다.
- [0045] 하나의 실시형태에서, 간 세포에 CYP7A1을 암호화 및/또는 과발현하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물, 또는 mmRNA가 제공된다. CYP7A1은 담즙산 합성을 위한 속도 제한 효소이고, 도입되는 콜레스테롤의 제거를 촉진한다. 결핍된 담즙산 분비뿐만 아니라, 고혈장 저밀도 지질단백질(LDL) 및 간 콜레스테롤 함량과 관련된 CYP7A1 돌연변이를 갖는 사람들이 있다.
- [0046] 하나의 실시형태에서, 2개의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물, 또는 mmRNA가 전달됨으로써, 더 낮은 혈장 콜레스테롤 및 수반되는 증진된 콜레스테롤 처리를 일으킨다.
- [0047] 하나의 실시형태에서, 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물, 또는 mmRNA는 마이크로RNA 결합부위 또는 씨드(seed)를 함유하도록 3'UTR에서 변형된다. 이 실시형태에서, 정상적인 반감기가 대략 30분인 CYP7A1 폴리뉴클레오타이드는 miR-불안정화(miR-destabilization)에 의해 전사-의존성(transcription-dependent)으로 만들 수 있다 (특히, 간 세포에 편재한 miR122a). 이 실시형태에 따라, miR122a 결합부위는 mmRNA의 3'UTR로 혼입되어 전사체를 덜 안정하게 만들 수 있다. 이는 작제물로 조작된 결합부위의 수에 따라, 안정성의 적정을 허용하고, 이에 따라 암호화된 CYP7A1 효소의 발현을 조절하도록 한다. CYP7A1을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA는 또한 개념 연구 및 기본적인 리서치의 증거로 유용한 마우스 모델을 생성하는데 유용할 수 있다. 이들 연구는 용량 의존성 유전자 치료법을 생성하는 것과 유사하다.
- [0048] 하나의 실시형태에서, 치료 섭생은 환자에게 스타틴에 대해 저반응성(hyporesponsive)인 CYP7A1 다형성(polymorphism)을 주는 희귀질환에 대해 디자인될 수 있다. 이 경우에, 본 발명의 효과적인 조성물 연구는 신속히 그리고 식이-기본 챌린지(diet-based challenges)를 근거로 하여 완성할 수 있다. 그러한 본 발명의 조성물은 희귀 및 우세함 모두의, 콜레스테롤 관련 질환을 포함한 질환의 연구 및 치료에 유용하다.
- [0049] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 조성물은 다른 약제 화합물과 함께 투여될 수 있다. 상기 다른 약제는 특히 스타틴을 포함한다. 스타틴의 예는, 이로써 제한되는 것은 아니지만, 아토르바스타틴, 세리바스타틴, 플루바스

타틴, 로바스타틴, 메바스타틴, 피타바스타틴, 프라바스타틴, 심바스타틴, 및 이들의 조합을 포함한다.

[0050] 본 발명에 따르면, 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA를 포함하는 조성물은 비-알콜성 지방간 회귀 질환과 같은 질환을 치료하는데 유용하다. 이 질환의 치료시, 간의 콜레스테롤을 그의 자연적인 소멸(담즙을 통해 몸으로부터)로 유도하는 임의의 치료제가 우수한 치료 결과를 갖도록 시도되었다. 결과적으로, LDLR을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA의 투여는 간 세포에서 콜레스테롤을 증가시키지만, CYP7A1을 암호화하는 제2 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물, 또는 mmRNA의 공-투여는 담즙을 통해 콜레스테롤을 밖으로 계속해서 유도함으로써, 통상 공지된 치료제에 의해 보여진 지방간 증상을 피하도록 시도되었다.

[0051] CYP7A1 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA와 함께, 적어도 LDLR 또는 PCSK9 LDLR 돌연변이체를 전달하는 것 이외에, 스타틴과 같은 부가 약제의 전달이 본원에 기술된 LDLR-CYP7A1 치료법에 대해 매우 상승적이라고 또한 예상된다. 결과적으로, 콜레스테롤 분비는 촉진되고, 새로운 형성은 방지되며, 혈장으로부터의 운반은 증가된다.

[0052] 하나의 실시형태에서, mmRNA의 혼합물은 몸으로부터 콜레스테롤의 가동(mobilization)을 촉진하기 위하여 콜레스테롤 항상성(homeostasis) 경로를 따라 적정된다.

[0053] 다른 실시형태로, 담즙산 씨퀘스터런트(sequesterant) 또는 지용성 비타민이 공-투여될 수 있다.

[0054] 명확성을 위해, 별도의 실시형태로 기술된, 본 기재의 특정 특징이 단일 실시형태로 병용하여 또한 제공될 수 있음을 추가로 이해한다. 역으로, 간결성을 위해, 단일 실시형태로 기술된 본 기재의 다양한 특징들은 또한 별도로 또는 임의의 적절한 부조합으로 제공될 수 있다.

[0055] **I. 본 발명의 조성물 (mmRNA)**

[0056] 본 발명은 핵산 분자, 특히 관심있는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 및/또는 mmRNA를 제공한다. 용어 "핵산"은 그의 광의의 의미로, 뉴클레오타이드 중합체를 포함하는 임의의 혼합물 및/또는 물질을 포함한다. 이들 중합체는 종종 폴리뉴클레오타이드로서 지칭된다. 본 발명의 예시적인 핵산 또는 폴리뉴클레오타이드는, 이로써 제한되는 것은 아니지만, 리보핵산 (RNAs), 데옥시리보핵산 (DNAs), 트레오스 핵산 (TNAs), 글리콜 핵산 (GNAs), 펩타이드 핵산 (PNAs), 잠금 핵산(locked nucleic acids)(LNAs, β -D-리보 배위를 갖는 LNA, α -L-리보 배위를 갖는 α -LNA (LNA의 부분입체이성체), 2'-아미노 관능성을 갖는 2'-아미노-LNA 및 2'-아미노 관능성을 갖는 2'-아미노- α -LNA를 포함) 또는 이의 하이브리드를 포함한다.

[0057] 바람직한 실시형태에서, 핵산 분자는 메신저 RNA (mRNA)이다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "메신저 RNA" (mRNA)는 관심있는 폴리뉴클레오타이드를 암호화하고, 시험관내(*in vitro*), 생체내(*in vivo*), 동일 반응계내(*in situ*) 또는 생체외(*ex vivo*)에서 관심있는 암호화된 폴리뉴클레오타이드를 생성하도록 번역될 수 있는 합성 폴리뉴클레오타이드와 같은, 임의의 폴리뉴클레오타이드를 지칭한다.

[0058] 전통적으로, mRNA 분자의 기본 성분은 적어도 암호화 영역, 5'UTR, 3'UTR, 5' 캡(cap) 및 폴리-A 테일(tail)을 포함한다. 이러한 야생형 모듈 구조(modular structure)를 구성함에 있어서, 본 발명은 모듈 조직화를 유지하지만, 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드가 도입되는 세포의 선천적 면역 반응의 실질적 유도 결여를 포함한, 재프로그래밍된 폴리뉴클레오타이드에 유용한 특성을 부여하는 하나 이상의 구조적 및/또는 화학적 변형 또는 변화를 포함하는 폴리뉴클레오타이드 또는 1차 RNA 작제물을 제공함으로써 통상적인 mRNA 분자의 관능성 범위를 확장시킨다. 또한, 합성 변형된 mRNA 분자와 같은, 본 발명의 변형된 mRNA 분자는 "mmRNA"라 부른다. 본원에 사용된 바와 같이, "구조적" 특징 또는 변형은 둘 이상의 결합된 뉴클레오타이드가 뉴클레오타이드 자체에 대한 상당한 화학적 변형없이 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA로 삽입, 결실, 복제화(duplicated), 반전 또는 랜덤화되는 것이다. 화학적 결합은 구조적 변형을 수행하기 위해서는 반드시 파괴되어 재형될 것이기 때문에, 구조적 변형은 화학적 특성의 것이고, 이에 따라 화학적 변형이다. 그러나, 구조적 변형은 상이한 뉴클레오타이드 서열을 생성할 것이다. 예를 들어, 폴리뉴클레오타이드 "ATCG"는 "AT-5meC-G"로 화학적으로 변형시킬 수 있다. 동일한 폴리뉴클레오타이드는 "ATCG"에서 "ATCCCG"로 구조적으로 변형시킬 수 있다. 여기서, 디뉴클레오타이드 "CC"가 삽입되어, 폴리뉴클레오타이드에 구조적 변형을 일으켰다.

[0059] mmRNA 아키텍처(Architecture)

- [0060] 본 발명의 mmRNA는 본원에서 입증된 바와 같이, 핵산-기본 치료제를 사용한 효과적인 폴리펩타이드 생산의 현존 문제점을 극복하는데 사용되는 그들의 작용 및/또는 구조적 디자인 특징에 있어서 야생형 mRNA와 구별된다.
- [0061] 도 1은 본 발명의 대표적인 폴리뉴클레오타이드 1차 작제물 (100)을 나타낸다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "1차 작제물(primary construct)" 또는 "1차 mRNA 작제물"은 관심있는 하나 이상의 폴리펩타이드를 암호화하고, 본원에서 암호화된 관심있는 폴리펩타이드가 번역될 수 있도록 충분한 구조적 및/또는 화학적 특징을 유지하는 폴리뉴클레오타이드 전사체를 지칭한다. 1차 작제물은 본 발명의 폴리뉴클레오타이드일 수 있다. 구조적으로 또는 화학적으로 변형되는 경우, 1차 작제물은 mmRNA로서 지칭될 수 있다.
- [0062] 도 1로 되돌아가서, 여기서 1차 작제물 (100)은 제1 플랭킹 영역(flanking region) (104) 및 제2 플랭킹 영역 (106)에 의해 플랭킹된 결합된 뉴클레오타이드의 제1 영역 (102)를 함유한다. 본원에 사용된 바와 같이, "제1 영역"은 "암호화 영역(coding region)" 또는 "암호화하는 영역(region encoding)" 또는 간단히 "제1 영역"으로서 지칭될 수 있다. 이러한 제1 영역은, 이로써 제한되는 것은 아니지만, 관심있는 암호화된 폴리펩타이드를 포함할 수 있다. 관심있는 폴리펩타이드는 그의 5' 말단에 신호 서열 영역 (103)에 의해 암호화된 하나 이상의 신호 서열을 포함할 수 있다. 플랭킹 영역 (104)는 하나 이상의 완전 또는 불완전한 5'UTR 서열을 포함하는 결합된 뉴클레오타이드 영역을 포함할 수 있다. 플랭킹 영역 (104)는 또한 5' 말단 캡 (108)을 포함할 수 있다. 제2 플랭킹 영역 (106)은 하나 이상의 완전 또는 불완전한 3'UTR을 포함하는 결합된 뉴클레오타이드 영역을 포함할 수 있다. 플랭킹 영역 (106)은 또한 3' 테일링 서열 (110)을 포함할 수 있다.
- [0063] 제1 영역 (102)의 5' 말단 및 제1 플랭킹 영역 (104)를 브릿징하는 것은 제1 작동 영역(operational region) (105)이다. 전통적으로, 이러한 작동 영역은 개시 코돈(Start codon)을 포함한다. 작동 영역은 대안적으로 개시-코돈을 포함하는 임의의 번역 개시 서열 또는 신호를 포함할 수 있다.
- [0064] 제1 영역 (102)의 3' 말단 및 제2 플랭킹 영역 (106)을 브릿징하는 것은 제2 작동 영역 (107)이다. 전통적으로, 이러한 작동 영역은 정지 코돈(Stop codon)을 포함한다. 작동 영역은 대안적으로 정지-코돈을 포함하는 임의의 번역 개시 서열 또는 신호를 포함할 수 있다. 본 발명에 따르면, 다중 연속 정지 코돈이 또한 사용될 수 있다.
- [0065] 도 2는 본 발명의 대표적인 폴리뉴클레오타이드 1차 작제물 (130)을 나타낸다. 폴리뉴클레오타이드 1차 작제물은 관심있는 하나 이상의 폴리펩타이드를 암호화하고, 본원에서 암호화된 관심있는 폴리펩타이드가 번역될 수 있도록 충분한 구조적 및/또는 화학적 특징을 유지하는 폴리뉴클레오타이드 전사체를 지칭한다. 관심있는 폴리펩타이드 및 관심있는 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 비-제한적 예는 "Modified Polynucleotides for the Production of Biologics"란 제목의 2012년 4월 2일자로 출원된 미국 가특허출원 제 61/618,862호; "Modified Polynucleotides for the Production of Biologics"란 제목의 2012년 8월 10일자로 출원된 미국 가특허출원 제61/681,645; "Modified Polynucleotides for the Production of Biologics"란 제목의 2012년 12월 14일자로 출원된 미국 가특허출원 제61/737,130호; "Modified Polynucleotides for the Production of Biologics and Proteins Associated with Human Disease"란 제목의 2013년 3월 9일자로 출원된 국제출원 제PCT/US2013/030062호; "Modified Polynucleotides for the Production of Antibodies"란 제목의 2012년 4월 2일자로 출원된 미국 가특허출원 제 61/618,866호; "Modified Polynucleotides for the Production of Antibodies"란 제목의 2012년 8월 10일자로 출원된 미국 가특허출원 제61/681,647호; "Modified Polynucleotides for the Production of Antibodies"란 제목의 2012년 12월 14일자로 출원된 미국 가특허출원 제61/737,134호; "Modified Polynucleotides"란 제목의 2013년 3월 9일자로 출원된 국제출원 제 PCT/US2013/030063호; "Modified Polynucleotides for the Production of Vaccines"란 제목의 2012년 4월 2일자로 출원된 미국 가특허출원 제61/618,868호; "Modified Polynucleotides for the Production of Vaccines"란 제목의 2012년 8월 10일자로 출원된 미국 가특허출원 제61/681,648호; "Modified Polynucleotides for the Production of Vaccines"란 제목의 2012년 12월 14일자로 출원된 미국 가특허출원 제61/737,135호; "Modified Polynucleotides for the Production of Therapeutic Proteins and Peptides"란 제목의 2012년 4월 2일자로 출원된 미국 가특허출원 제61/618,870호; "Modified Polynucleotides for the Production of Therapeutic Proteins and Peptides"란 제목의 2012년 8월 10일자로 출원된 미국 가특허출원 제61/681,649호; "Modified Polynucleotides for the Production of Therapeutic Proteins and Peptides"란 제목의 2012년 12월 14일자로 출원된 미국 가특허출원 제61/737,139호; "Modified Polynucleotides for the Production of Secreted Proteins"란 제목의 2012년 4월 2일자로 출원된 미국 가특허출원 제61/618,873호; "Modified Polynucleotides for the Production of Secreted Proteins"란 제목의 2012년 8월 10일자로 출원된 미국 가특허출원 제 61/681,650호; "Modified Polynucleotides for the Production of Secreted Proteins"란 제목의 2012년 12월

14일자로 출원된 미국 가특허출원 제61/737,147호; "Modified Polynucleotides for the Production of Secreted Proteins"란 제목의 국제출원 제PCT/US2013/030064호; "Modified Polynucleotides for the Production of Plasma Membrane Proteins"란 제목의 2012년 4월 2일자로 출원된 미국 가특허출원 제 61/618,878호; "Modified Polynucleotides for the Production of Plasma Membrane Proteins"란 제목의 2012년 8월 10일자로 출원된 미국 가특허출원 제61/681,654호; "Modified Polynucleotides for the Production of Plasma Membrane Proteins"란 제목의 2012년 12월 14일자로 출원된 미국 가특허출원 제61/737,152호; "Modified Polynucleotides for the Production of Membrane Proteins"란 제목의 2013년 3월 9일자로 출원된 국제출원 제PCT/US2013/030059호; "Modified Polynucleotides for the Production of Cytoplasmic and Cytoskeletal Proteins"란 제목의 2012년 4월 2일자로 출원된 미국 가특허출원 제61/618,885호; "Modified Polynucleotides for the Production of Cytoplasmic and Cytoskeletal Proteins"란 제목의 2012년 8월 10일자로 출원된 미국 가특허출원 제61/681,658호; "Modified Polynucleotides for the Production of Cytoplasmic and Cytoskeletal Proteins"란 제목의 2012년 12월 14일자로 출원된 미국 가특허출원 제61/737,155호; "Modified Polynucleotides for the Production of Cytoplasmic and Cytoskeletal Proteins"란 제목의 2013년 3월 9일자로 출원된 국제출원 제PCT/US2013/030066호; "Modified Polynucleotides for the Production of Intracellular Membrane Bound Proteins"란 제목의 2012년 4월 2일자로 출원된 미국 가특허출원 제61/618,896호; "Modified Polynucleotides for the Production of Intracellular Membrane Bound Proteins"란 제목의 2012년 7월 5일자로 출원된 미국 가특허출원 제61/668,157호; "Modified Polynucleotides for the Production of Intracellular Membrane Bound Proteins"란 제목의 2012년 8월 10일자로 출원된 미국 가특허출원 제 61/681,661호; "Modified Polynucleotides for the Production of Intracellular Membrane Bound Proteins"란 제목의 2012년 12월 14일자로 출원된 미국 가특허출원 제61/737,160호; "Modified Polynucleotides for the Production of Nuclear Proteins"란 제목의 2012년 4월 2일자로 출원된 미국 가특허출원 제61/618,911호; "Modified Polynucleotides for the Production of Nuclear Proteins"란 제목의 2012년 8월 10일자로 출원된 미국 가특허출원 제61/681,667호; "Modified Polynucleotides for the Production of Nuclear Proteins"란 제목의 2012년 12월 14일자로 출원된 미국 가특허출원 제61/737,168호; "Modified Polynucleotides for the Production of Nuclear Proteins"란 제목의 2013년 3월 9일자로 출원된 국제출원 제PCT/US2013/030067호; "Modified Polynucleotides for the Production of Proteins"란 제목의 2012년 4월 2일자로 출원된 미국 가특허출원 제61/618,922호; "Modified Polynucleotides for the Production of Proteins"란 제목의 2012년 8월 10일자로 출원된 미국 가특허출원 제61/681,675호; "Modified Polynucleotides for the Production of Proteins"란 제목의 2012년 12월 14일자로 출원된 미국 가특허출원 제61/737,174호; "Modified Polynucleotides for the Production of Proteins"란 제목의 2013년 3월 9일자로 출원된 국제출원 제PCT/US2013/030060호; "Modified Polynucleotides for the Production of Proteins Associated with Human Disease"란 제목의 2012년 4월 2일자로 출원된 미국 가특허출원 제61/618,935호; "Modified Polynucleotides for the Production of Proteins Associated with Human Disease"란 제목의 2012년 8월 10일자로 출원된 미국 가특허출원 제 61/681,687호; "Modified Polynucleotides for the Production of Proteins Associated with Human Disease"란 제목의 2012년 12월 14일자로 출원된 미국 가특허출원 제61/737,184호; "Modified Polynucleotides for the Production of Proteins Associated with Human Disease"란 제목의 2013년 3월 9일자로 출원된 국제출원 제 PCT/US2013/030061호; "Modified Polynucleotides for the Production of Proteins Associated with Human Disease"란 제목의 2012년 4월 2일자로 출원된 미국 가특허출원 제61/618,945호; "Modified Polynucleotides for the Production of Proteins Associated with Human Disease"란 제목의 2012년 8월 10일자로 출원된 미국 가특허출원 제61/681,696호; "Modified Polynucleotides for the Production of Proteins Associated with Human Disease"란 제목의 2012년 12월 14일자로 출원된 미국 가특허출원 제61/737,191호; "Modified Polynucleotides for the Production of Proteins Associated with Human Disease"란 제목의 2012년 4월 2일자로 출원된 미국 가특허출원 제61/618,953호; "Modified Polynucleotides for the Production of Proteins Associated with Human Disease"란 제목의 2012년 8월 10일자로 출원된 미국 가특허출원 제61/681,704호; "Modified Polynucleotides for the Production of Proteins Associated with Human Disease"란 제목의 2012년 12월 14일자로 출원된 미국 가특허출원 제61/737,203호; "In Vivo Production of Proteins"란 제목의 2013년 3월 15일자로 출원된 국제출원 제PCT/US2013/031821호; "Modified Polynucleotides for the Production of Cosmetic Proteins and Peptides"란 제목의 2012년 8월 10일자로 출원된 미국 가특허출원 제61/681,720호; "Modified Polynucleotides for the Production of Cosmetic Proteins and Peptides"란 제목의 2012년 12월 14일자로 출원된 미국 가특허출원 제61/737,213호; "Modified Polynucleotides for the Production of Cosmetic Proteins and Peptides"란 제목의 2013년 3월 9일자로 출원된 국제출원 제PCT/US2013/030068호;

"Modified Polynucleotides for the Production of Oncology-Related Proteins and Peptides"란 제목의 2012년 8월 10일자로 출원된 미국 가특허출원 제61/681,742호 및 "Modified Polynucleotides for the Production of Oncology-Related Proteins and Peptides"란 제목의 2013년 3월 9일자로 출원된 국제출원 제 PCT/US2013/030070호의 표 6에 기술되어 있으며, 이들 각각의 내용은 본 명세서에 참조로 그들의 전문이 포함된다.

- [0066] 도 2로 되돌아가서, 여기서 1차 작제물 (130)은 제1 플랭킹 영역 (134) 및 제2 플랭킹 영역 (136)에 의해 플랭킹된 결합된 뉴클레오타이드의 제1 영역 (132)를 함유한다. 본원에 사용된 바와 같이, "제1 영역"은 "암호화 영역" 또는 "암호화하는 영역" 또는 간단히 "제1 영역"으로서 지칭될 수 있다. 이러한 제1 영역은, 이로써 제한되는 것은 아니지만, 관심있는 암호화된 폴리펩타이드를 포함할 수 있다. 한 측면에 있어서, 제1 영역 (132)는, 이로써 제한되는 것은 아니지만, 관심있는 적어도 1개의 폴리펩타이드를 암호화하는 오픈 리딩 프레임 (open reading frame)을 포함할 수 있다. 오픈 리딩 프레임은 전체적으로 또는 부분적으로 최적화된 코돈일 수 있다. 플랭킹 영역 (134)는 완전히 최적화된 코돈이거나 부분적으로 최적화된 코돈일 수 있는 하나 이상의 완전 또는 불완전한 5'UTR 서열을 포함하는 결합된 뉴클레오타이드 영역을 포함할 수 있다. 플랭킹 영역 (134)는 이로써 제한되는 것은 아니지만, miR 서열, TERZAK™ 서열 및 번역조절 서열을 포함하는, 적어도 1개의 핵산 서열을 포함할 수 있다. 플랭킹 영역 (134)는 또한 5' 말단 캡 (138)을 포함할 수 있다. 5' 말단 캡핑 영역 (138)은 자연적으로 생성된 캡, 합성 캡 또는 최적화된 캡을 포함할 수 있다. 최적화된 캡의 비-제한적 예는 미국 특허 제US7074596호 및 국제 특허공보 WO2008157668, WO2009149253 및 WO2013103659에서 Rhoads가 교시한 캡들을 포함한다. 제2 플랭킹 영역 (106)은 하나 이상의 완전 또는 불완전한 3'UTR을 포함하는 결합된 뉴클레오타이드 영역을 포함할 수 있다. 제2 플랭킹 영역 (136)은 완전 최적화된 코돈이거나 부분적으로 최적화된 코돈일 수 있다. 플랭킹 영역 (134)는 이로써 제한되는 것은 아니지만, miR 서열 및 번역조절 서열을 포함한 적어도 1개의 핵산 서열을 포함할 수 있다. 제2 플랭킹 영역 (136) 다음에 폴리뉴클레오타이드 1차 작제물은 3' 테일링 서열 (140)을 포함할 수 있다. 3' 테일링 서열 (140)은 합성 테일링 영역 (142) 및/또는 쇄종결 뉴클레오사이드 (144)를 포함할 수 있다. 합성 테일링 영역의 비-제한적 예는 폴리A 서열, 폴리C 서열, 폴리A-G 콰르텟(quartet)을 포함한다. 쇄종결 뉴클레오사이드의 비-제한적 예는 2'-O 메틸, F 및 잠금 핵산(LNA)을 포함한다.
- [0067] 제1 영역 (132)의 5' 말단 및 제1 플랭킹 영역 (134)를 브릿징하는 것은 제1 작동 영역 (144)이다. 전통적으로, 이러한 작동 영역은 개시 코돈을 포함한다. 작동 영역은 대안적으로 개시-코돈을 포함하는 임의의 번역 개시 서열 또는 신호를 포함할 수 있다.
- [0068] 제1 영역 (132)의 3' 말단 및 제2 플랭킹 영역 (136)을 브릿징하는 것은 제2 작동 영역 (146)이다. 전통적으로, 이러한 작동 영역은 정지 코돈을 포함한다. 작동 영역은 대안적으로 정지-코돈을 포함하는 임의의 번역 개시 서열 또는 신호를 포함할 수 있다. 본 발명에 따르면, 다중 연속 정지 코돈이 또한 사용될 수 있다.
- [0069] 일반적으로, 본 발명의 1차 작제물의 제1 영역의 최단 길이는 디펩타이드, 트리펩타이드, 테트라펩타이드, 펜타펩타이드, 헥사펩타이드, 헵타펩타이드, 옥타펩타이드, 노나펩타이드 또는 데카펩타이드를 암호화하기에 충분한 핵산 서열의 길이일 수 있다. 다른 실시형태로, 길이는 2 내지 30개 아미노산, 예를 들어, 5-30, 10-30, 2-25, 5-25, 10-25, 또는 10-20개 아미노산의 펩타이드를 암호화하기에 충분할 수 있다. 그 길이는 적어도 11, 12, 13, 14, 15, 17, 20, 25 또는 30개 아미노산의 펩타이드, 또는 40개 이하의 아미노산, 예를 들어, 35, 30, 25, 20, 17, 15, 14, 13, 12, 11 또는 10개 아미노산 이하인 펩타이드를 암호화하기에 충분할 수 있다. 폴리뉴클레오타이드 서열이 암호화할 수 있는 디펩타이드의 예는, 이로써 제한되는 것은 아니지만, 카르노신 및 안세린을 포함한다.
- [0070] 일반적으로, 본 발명의 관심있는 폴리펩타이드를 암호화하는 제1 영역의 길이는 길이가 약 30개 초과인 뉴클레오타이드이다 (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 3,000, 4,000, 5,000, 6,000, 7,000, 8,000, 9,000, 10,000, 20,000, 30,000, 40,000, 50,000, 60,000, 70,000, 80,000, 90,000 또는 100,000개 뉴클레오타이드까지 및 이를 포함하는 것, 또는 이들을 초과). 본원에 사용된 바와 같이, "제1 영역"은 "암호화 영역" 또는 "암호화하는 영역" 또는 간단히 "제1 영역"으로서 지칭될 수 있다.
- [0071] 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA는 약 30 내지 약 100,000개 뉴클레오타이드 (예: 30 내지 50, 30 내지 100, 30 내지 250, 30 내지 500, 30 내지 1,000, 30 내지 1,500, 30 내지 3,000, 30

내지 5,000, 30 내지 7,000, 30 내지 10,000, 30 내지 25,000, 30 내지 50,000, 30 내지 70,000, 100 내지 250, 100 내지 500, 100 내지 1,000, 100 내지 1,500, 100 내지 3,000, 100 내지 5,000, 100 내지 7,000, 100 내지 10,000, 100 내지 25,000, 100 내지 50,000, 100 내지 70,000, 100 내지 100,000, 500 내지 1,000, 500 내지 1,500, 500 내지 2,000, 500 내지 3,000, 500 내지 5,000, 500 내지 7,000, 500 내지 10,000, 500 내지 25,000, 500 내지 50,000, 500 내지 70,000, 500 내지 100,000, 1,000 내지 1,500, 1,000 내지 2,000, 1,000 내지 3,000, 1,000 내지 5,000, 1,000 내지 7,000, 1,000 내지 10,000, 1,000 내지 25,000, 1,000 내지 50,000, 1,000 내지 70,000, 1,000 내지 100,000, 1,500 내지 3,000, 1,500 내지 5,000, 1,500 내지 7,000, 1,500 내지 10,000, 1,500 내지 25,000, 1,500 내지 50,000, 1,500 내지 70,000, 1,500 내지 100,000, 2,000 내지 3,000, 2,000 내지 5,000, 2,000 내지 7,000, 2,000 내지 10,000, 2,000 내지 25,000, 2,000 내지 50,000, 2,000 내지 70,000, 및 2,000 내지 100,000개)를 포함한다.

[0072] 본 발명에 따라, 제1 및 제2 플랭킹 영역은 독립적으로 길이가 15 내지 1,000개 뉴클레오타이드 (예: 30, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 및 900개 초과 뉴클레오타이드 또는 적어도 30, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900, 및 1,000개 뉴클레오타이드)의 범위일 수 있다.

[0073] 본 발명에 따라, 테일링 서열은 길이가 0 내지 500개 뉴클레오타이드 (예: 적어도 60, 70, 80, 90, 120, 140, 160, 180, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 또는 500개 뉴클레오타이드)의 범위일 수 있다. 테일링 영역이 폴리A 테일인 경우, 길이는 폴리A 결합 단백질 결합의 단위로 또는 그의 함수로서 측정할 수 있다. 이 실시형태에서, 폴리A 테일은 폴리A 결합 단백질의 적어도 4개 단량체를 결합하기에 충분히 길다. 폴리A 결합 단백질 단량체는 대략 38개 뉴클레오타이드의 스트레치에 결합된다. 또한, 약 80개 뉴클레오타이드 및 160개 뉴클레오타이드의 폴리A 테일이 관능성인 것으로 관찰되었다.

[0074] 본 발명에 따라, 캡핑 영역은 단일 캡 또는 캡을 형성하는 일련의 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 이 실시형태에서, 캡핑 영역은 길이가 1 내지 10개, 예를 들어, 2-9, 3-8, 4-7, 1-5, 5-10, 또는 적어도 2, 또는 10개 또는 더 소수의 뉴클레오타이드일 수 있다. 일부 실시형태에서, 캡은 존재하지 않는다.

[0075] 본 발명에 따라, 제1 및 제2 작동 영역은 길이가 3 내지 40개, 예를 들어, 5-30, 10-20, 15개, 또는 적어도 4, 또는 30개나 더 소수의 뉴클레오타이드의 범위일 수 있고, 개시 및/또는 정지 코돈 이외에, 하나 이상의 신호 및/또는 제한 서열을 포함할 수 있다.

[0076] 사이클릭 mmRNA

[0077] 본 발명에 따라, 1차 작제물 또는 mmRNA는 폴리A 결합 단백질과 5'-말단 결합 단백질 사이에 상호작용을 돕기 위해 번역 컨피턴트 분자(translation competent molecule)를 생성하도록 고리화(cyclized)시키거나 연쇄체화(concatemerized)시킬 수 있다. 고리화 또는 연쇄체화의 메카니즘은 적어도 3개의 상이한 경로를 통해 일어날 수 있다: 1) 화학적, 2) 효소적, 및 3) 리보자임 촉매화. 새로이 형성된 5'-/3'- 결합은 분자내 또는 분자간일 수 있다.

[0078] 제1 경로로, 핵산의 5'-말단 및 3'-말단은 함께 가까워지면, 분자의 5'-말단 및 3'-말단 사이에 새로운 공유결합을 형성하는 화학적으로 반응성인 그룹을 함유한다. 5'-말단은 NHS-에스테르 반응성 그룹을 함유할 수 있고, 3'-말단은 유기 용매에서 합성 mRNA 분자의 3'-말단의 3'-아미노-말단화된 뉴클레오타이드가 5'-NHS-에스테르 잔기 상의 친핵성 공격을 일으켜 새로운 5'-/3'-아미드 결합을 형성하도록 3'-아미노-말단화도니 뉴클레오타이드를 함유할 수 있다.

[0079] 제2 경로로, T4 RNA 리가제가 5'-포스포릴화 핵산 분자를 핵산의 3'-하이드록실 그룹으로 효소적으로 결합시키는데 사용되어 새로운 포스포로디에스테르 결합을 형성할 수 있다. 예시 반응으로, 제조자의 프로토콜에 따라 1μg의 핵산 분자를 37°C에서 1시간 동안 1 내지 10 unit의 T4 RNA 리가제 (New England Biolabs, Ipswich, MA)와 함께 배양시킨다. 결합 반응은 효소적 결합 반응을 돕기 위해 병렬로 5'- 및 3'-영역 모두와 염기-페어링(base-pairing)할 수 있는 스플릿(split) 올리고뉴클레오타이드의 존재하에 일어날 수 있다.

[0080] 제3 경로로, cDNA 주형의 5'- 또는 3'-말단은 시험관내 전사 도중, 생성된 핵산 분자가 핵산 분자의 3'-말단에 핵산 분자의 5'-말단을 결합시킬 수 있는 활성 리보자임 서열을 함유할 수 있도록 리가제 리보자임 서열을 암호화한다. 리가제 리보자임은 그룹 I 인트론, 그룹 I 인트론, 델타 간염 바이러스(Hepatitis Delta Virus), 헤어핀(Hairpin) 리보자임으로부터 유도될 수 있거나, SELEX (systematic evolution of ligands by exponential

enrichment)에 의해 선택될 수 있다. 리보자임 리가제 반응은 0 내지 37°C의 온도에서 1 내지 24시간 걸릴 수 있다.

[0081]

mmRNA 다합체

[0082]

본 발명에 따라, 다중의 독특한 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA는 3'-말단에서 변형된 뉴클레오타이드를 사용하여 3'-말단을 통해 함께 결합될 수 있다. 화학적 콘주게이션은 세포로 전달의 화학양론을 조절하기 위하여 사용될 수 있다. 예를 들어, 글리옥실레이트 사이클 효소, 이소시트레이트 리아제 및 말레이트 신타제는 1:1 비로 HepG2 세포로 공급되어 세포성 지방산 대사작용을 변화시킬 수 있다. 이 비는 하나의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA 중에 대해 3'-아지도 말단화된 뉴클레오타이드 및 반대편 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA 중에 대해서는 C5-에티닐 또는 알킬닐-함유 뉴클레오타이드를 사용하여 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA를 화학적으로 결합시켜 조절할 수 있다. 변형된 뉴클레오타이드는 제자의 프로토콜에 따라 말단 트랜스퍼라제 (New England Biolabs, Ipswich, MA)를 사용하여 전사-후 부가한다. 3'-변형된 뉴클레오타이드의 부가 후, 2개의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA 중은 구리의 존재 또는 부재하에 수용액에서 합하여, 문헌에 기술된 바와 같은 클릭 화학 메카니즘을 통한 새로운 공유결합을 형성할 수 있다.

[0083]

다른 예로, 2개 초과 폴리뉴클레오타이드는 관능화된 링커 분자를 사용하여 함께 결합시킬 수 있다. 예를 들어, 관능화된 사카라이드 분자는 3'-관능화된 mRNA 분자 (즉, 3'-말레이미드 에스테르, 3'-NHS-에스테르, 알킬닐) 상에서 동족 잔기와 반응하는 다중 화학적 반응성 그룹 (SH-, NH₂-, N₃, etc...)을 함유하도록 화학적으로 변형시킬 수 있다. 변형된 사카라이드 상에 반응성 그룹의 수는 콘주게이트된 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA의 화학양론적 비를 직접 조절하기 위하여 화학양론적 방식으로 조절할 수 있다.

[0084]

mmRNA 콘주게이트 및 조합물

[0085]

단백질 생산을 추가로 개선하기 위하여, 본 발명의 1차 작제물 또는 mmRNA는 다른 폴리뉴클레오타이드, 염료, 인터칼레이팅제 (intercalating agents) (예: 아크리딘), 가교결합제 (예: 소탈렌, 미토마이신 C), 포르피린 (TPPC4, 텍사피린, 사피린), 폴리사이클릭 방향족 탄화수소 (예: 페나진, 디하이드로페나진), 인공 엔도뉴클레아제 (예: EDTA), 알킬화제, 인산염, 아미노, 머캅토, PEG (예: PEG-40K), MPEG, [MPEG]₂, 폴리아미노, 알킬, 치환된 알킬, 방사능표지된 마커, 효소, 합텐 (예: 비오틴), 운반/흡수 촉진제 (facilitator) (예: 아스피린, 비타민 E, 엽산), 합성 리보뉴클레아제, 단백질, 예를 들어, 당단백질, 또는 펩타이드, 예를 들어, 공-리간드에 대한 특이 친화성을 갖는 분자, 또는 항체, 예를 들어, 암 세포, 내피 세포, 또는 골 세포와 같은 특정 세포 형태에 결합되는 항체, 호르몬 및 호르몬 수용체, 비-펩타이드 중 (예: 지질, 렉틴, 탄수화물, 비타민, 보조인자 (cofactor)) 또는 약제에 콘주게이트되도록 디자인될 수 있다.

[0086]

콘주게이트화 (conjugation)는 증가된 안정성 및/또는 반감기를 유발할 수 있고, 세포, 조직 또는 유기체의 특정 부위로 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA를 표적화하는데 특히 유용할 수 있다.

[0087]

본 발명에 따라, mmRNA 또는 1차 작제물은 하나 이상의 RNAi 제제, siRNAs, shRNAs, miRNAs, miRNA 결합부위, 안티센스 RNAs, 리보자임, 촉매적 DNA, tRNA, 삼중 나선 형성을 유도하는 RNA, aptamer 또는 벡터 등과 함께투여되거나, 또는 이들을 추가로 암호화할 수 있다.

[0088]

이관능성 (Bifunctional) mmRNA

[0089]

본 발명의 하나의 실시형태는 이관능성 폴리뉴클레오타이드 (예: 이관능성 1차 작제물 또는 이관능성 mmRNA)이다. 명칭이 의미하는 바와 같이, 이관능성 폴리뉴클레오타이드는 적어도 2개의 관능을 갖거나 기능할 수 있는 것들이다. 이들 분자는 또한 관례상 다-관능성으로서 언급될 수 있다.

[0090]

이관능성 폴리뉴클레오타이드의 다중 관능성은 RNA에 의해 암호화되거나 (관능은 암호화된 생성물이 번역될 때까지 입증될 수 없다), 폴리뉴클레오타이드 자체의 특성일 수 있다. 그것은 구조적 또는 화학적일 수 있다. 이관능성의 변형된 폴리뉴클레오타이드는 폴리뉴클레오타이드와 공유적으로 또는 정전기적으로 관련되는 관능을 포함할 수 있다. 추가로, 두 관능은 mmRNA 및 다른 분자의 복합체로 제공될 수 있다.

- [0091] 이관능성 폴리뉴클레오타이드는 항-증식성인 펩타이드를 암호화할 수 있다. 이들 펩타이드는 선형, 사이클릭, 한정(constrained) 또는 랜덤 코일일 수 있다. 그들은 압타머, 신호전달 분자, 리간드 또는 모의체나 이들의 모방체(mimics)로서 작용할 수 있다. 항-증식성 펩타이드는 번역되면, 길이가 3 내지 50개 아미노산일 수 있다. 그들은 5-40, 10-30개 또는 대략 15개 아미노산의 길이일 수 있다. 그들은 단일쇄, 다중쇄 또는 분지형일 수 있고, 번역시 복합체(complexe), 응집체(aggregate) 또는 임의의 다중-유닛 구조물을 형성할 수 있다.
- [0092]
- [0093] *비암호화 폴리뉴클레오타이드 및 1차 작제물*
- [0094] 본원에 기술된 바와 같이, 부분적으로 또는 실질적으로 해독(번역)이 가능하지 않은 서열, 예를 들어, 비암호화 영역을 가지는 폴리뉴클레오타이드 및 1차 작제물이 제공된다. 이러한 비암호화 영역은 당해 1차 작제물의 "제 1 영역"이 될 수 있다. 다르게는, 상기 비암호화 영역은 제 1 영역 이외의 영역이 될 수 있다. 이러한 분자들은 일반적으로 해독이 되지 않는지만, 리보솜 단백질이나 운반 RNA (tRNA)와 같은 하나 이상의 해독 기구 구성 요소들에 하나 이상 결합하여 이들을 봉쇄함으로써 단백질 발현에 영향을 줄 수 있으므로, 세포 내에서 효과적으로 단백질 발현을 감소시키거나 세포 내에서 하나 이상의 경로 또는 캐스케이드를 조절하여 결과적으로는 단백질 수준을 변화시키게 된다. 당해 폴리뉴클레오타이드 또는 1차 작제물은 하나 이상의 장쇄 비암호화 RNA (lncRNA, 또는 lincRNA) 또는 이의 일부분, 소형 인(nucleolar) RNA (sno-RNA), 마이크로 RNA (miRNA), 소형 간섭 RNA (siRNA) 또는 Piwi와 상호작용하는 RNA (piRNA)를 함유하거나 암호화할 수 있다.
- [0095] 관심 대상 폴리펩타이드
- [0096] 본 발명에 따르면, 당해 1차 작제물은 하나 이상의 관심 대상 폴리펩타이드 또는 이의 단편을 암호화하도록 고안된다. 관심 대상 폴리펩타이드로서는, 이에 제한되지는 않지만, 전장 폴리펩타이드, 복수 개의 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드의 단편을 포함하며, 이들은 독립적으로 하나 이상의 핵산, 복수 개의 핵산, 핵산의 단편 또는 임의의 상기 언급한 것의 변이체에 의해 암호화될 수 있다. 본원에서, "관심 대상 폴리펩타이드" 라는 용어는 본 발명의 1차 작제물 내에 암호화되도록 선택되는 임의의 폴리펩타이드를 지칭한다. 본원에서, "폴리펩타이드" 라는 말은 대개 펩타이드 결합에 의해 함께 결합된 아미노산 잔기들의 (천연 또는 비천연) 중합체를 의미한다. 상기 용어는, 본원에서 임의의 크기, 구조 또는 기능을 갖는 단백질, 폴리펩타이드 및 펩타이드를 지칭한다. 어떤 경우에는, 암호화되는 폴리펩타이드는 약 50개의 아미노산보다 더 작는데, 이러한 폴리펩타이드는 펩타이드로 명명된다. 폴리펩타이드가 펩타이드인 경우, 이는 적어도 약 2개, 3개, 4개, 또는 적어도 5개의 아미노산 잔기의 길이가 될 것이다. 따라서, 폴리펩타이드로서는 유전자 산물, 자연 발생 폴리펩타이드, 합성 폴리펩타이드, 동족체, 오솔로그(ortholog), 파랄로그(paralog), 단편 및 상기한 것들의 다른 균등체, 변이체 및 유사체를 포함한다. 폴리펩타이드는 단일 분자일 수 있거나, 또는 이량체, 삼량체 또는 사량체와 같은 다분자 복합체일 수 있다. 이들은 단쇄 또는 다중쇄 폴리펩타이드, 예컨대 항체 또는 인슐린을 포함할 수도 있고, 연관되거나 결합될 수도 있다. 가장 일반적인 이황화 결합은 다중쇄 폴리펩타이드에서 발견된다. 폴리펩타이드 라는 용어는 하나 이상의 아미노산 잔기들이 상응하는 자연 발생 아미노산의 인위적인 화학 유사체인 아미노산 중합체에도 적용될 수 있다.
- [0097] "폴리펩타이드 변이체" 라는 용어는 천연 서열 또는 기준 서열과 아미노산 서열이 다른 분자들을 지칭한다. 아미노산 서열 변이체는 천연 또는 기준 서열에 비하여 아미노산 서열 내의 특정 위치에서 치환, 결실, 및/또는 삽입을 보유할 수 있다. 보통, 변이체는 천연 또는 기준 서열에 대하여 적어도 약 50%의 동일성 (상동성)을 보유할 것이고, 바람직하게는, 이들은 천연 또는 기준 서열에 대하여 적어도 약 80%, 보다 바람직하게는 적어도 약 90% 동일할(상동성일) 것이다.
- [0098] 일부 실시형태에서 "변이체 모방체"가 제공된다. 본원에서, "변이체 모방체" 라는 용어는 활성화 서열을 모방하는 하나 이상의 아미노산을 포함하는 것을 말한다. 예를 들어, 글루타메이트는 인-트레오닌 및/또는 인-세린에 대한 모방체로서 기능할 수 있다. 다르게는, 변이체 모방체는 당해 모방체를 함유하는 탈활성화 또는 불활성화 생성물을 유도할 수 있는데, 예를 들어, 페닐알라닌은 티로신에 대한 불활성화 치환체로서 작용할 수 있거나, 또는 알라닌은 세린에 대한 불활성화 치환체로서 작용할 수 있다.
- [0099] 아미노산 서열에 대해 사용되는 "상동성" 이라는 말은, 최대 % 상동성을 달성하기 위하여 서열을 정렬하고 필요하다면 갭(gap)을 도입한 후의, 제 2 서열의 아미노산 서열 내의 잔기와 동일한 후보 아미노산 서열 내의 잔기의 백분율(%)로서 정의된다. 서열 정렬에 대한 방법 및 컴퓨터 프로그램은 당업계에 잘 알려져 있다. 상동성은 % 동일성의 계산에 의해 좌우되지만, 당해 계산에 도입되는 갭과 페널티 때문에 수치는 다를 수 있다.

- [0100] 폴리펩타이드 서열에 대해 사용되는 "동족체" 라는 말은 제2 종(species)의 제2 서열에 실질적인 동일성을 가지는 다른 종들의 상응하는 서열을 의미한다.
- [0101] "유사체" 는 하나 이상의 아미노산 변형, 예를 들어, 모체 또는 출발 폴리펩타이드의 하나 이상의 특성들을 여전히 보유하는 아미노산 잔기의 치환, 부가 또는 결실에 따라 달라지는 폴리펩타이드 변이체를 포함한다.
- [0102] 본 발명은 변이체와 유도체를 포함하는 폴리펩타이드 기반의 여러 유형의 조성물을 고려하고 있다. 이들은 치환성, 삽입성, 결실성 및 공유결합성 변이체 및 유도체를 포함한다. "유도체" 라는 용어는 "변이체" 라는 용어와 동의어로 사용되지만, 일반적으로 기준 분자 또는 출발 분자에 대해 임의의 방식으로 변형 및/또는 변화된 분자를 지칭한다.
- [0103] 이와 같이, 기준 서열에 대하여 치환, 삽입 및/또는 부가, 결실 및 공유결합 변형을 함유하는 mRNA로 암호화된 폴리펩타이드, 특히 본원에 개시된 폴리펩타이드 서열이 본 발명의 범위 내에 포함된다. 예를 들어, 서열 태그 또는 아미노산, 예컨대 하나 이상의 리신이 본 발명의 펩타이드 서열에 (예를 들어, N-말단 또는 C-말단 끝에) 부가될 수 있다. 서열 태그는 펩타이드 정제화 또는 국소화 과정에 사용될 수 있다. 리신은 펩타이드 가용성을 증대시키기 위해 또는 비오틴화가 가능하도록 하기 위해 사용될 수 있다. 다르게는, 펩타이드 또는 단백질의 아미노산 서열의 카복시 및 아미노 말단 영역에 위치한 아미노산 잔기는 절두된 서열을 대비하여 선택적으로 결실될 수 있다. 어떤 아미노산 (예를 들어, C-말단 또는 N-말단 잔기)은 다르게는 서열의 용도, 예를 들어 가용성이거나 고체 지지체에 연결된 보다 큰 서열의 일부인 서열의 발현으로서의 용도에 따라 결실될 수 있다.
- [0104] 폴리펩타이드를 언급할 때 "치환성 변이체" 라는 것은 천연 또는 출발 서열 내에 적어도 하나의 아미노산 잔기가 제거되고 동일한 위치의 그 자리에 다른 아미노산이 삽입된 폴리펩타이드를 말한다. 당해 치환은 분자 내에 단 하나의 아미노산이 치환되는 단일 치환일 수 있거나, 또는 동일한 분자 내에 2개 이상의 아미노산이 치환되는 다중 치환일 수 있다.
- [0105] 본원에서 "보존적 아미노산 치환" 이라는 용어는 서열 내에 통상적으로 존재하는 아미노산을 비슷한 크기, 전하, 또는 극성의 다른 아미노산으로 치환하는 것을 지칭한다. 보존적 치환의 예로서는 무극성 (소수성) 잔기 예컨대 이소루신, 발린 및 루신을 다른 무극성 잔기로 치환한 것을 포함한다. 마찬가지로, 보존적 치환의 예로서는 하나의 극성 (친수성) 잔기를 다른 극성 잔기로 치환하는 것을 포함하는데, 예컨대 아르기닌과 리신, 글루타민과 아스파라긴 그리고 글리신과 세린 간의 치환을 들 수 있다. 추가로, 염기성 잔기, 예컨대 리신, 아르기닌 또는 히스티딘을 다른 염기성 잔기로 치환하는 것, 또는 하나의 산성 잔기, 예컨대 아스파르트산 또는 글루탐산을 다른 산성 잔기로 치환하는 것이 보존적 치환의 추가적 예들이다. 비보존적 치환의 예로서는 무극성 (소수성) 아미노산 잔기, 예컨대 이소루신, 발린, 루신, 알라닌, 메티오닌을 극성 (친수성) 잔기, 예컨대 시스테인, 글루타민, 글루탐산 또는 리신으로 치환하고/하거나 극성 잔기를 무극성 잔기로 치환하는 것을 포함한다.
- [0106] 폴리펩타이드를 언급할 때 "삽입성 변이체" 라는 것은 천연 또는 출발 서열의 특정 위치에서의 한 아미노산에 바로 인접하여 삽입된 하나 이상의 아미노산을 가지는 폴리펩타이드를 말한다. 어떤 아미노산에 "바로 인접한" 이라는 말은 그 아미노산의 알파-카복시 또는 알파-아미노 작용기에 연결되었다는 것을 의미한다.
- [0107] 폴리펩타이드를 언급할 때 "결실성 변이체" 라는 것은 천연 또는 출발 아미노산 서열에 제거된 하나 이상의 아미노산을 가지는 폴리펩타이드를 말한다. 보통, 결실성 변이체는 당해 분자의 특정 영역에 결실된 하나 이상의 아미노산을 보유할 것이다.
- [0108] 폴리펩타이드를 언급할 때 "공유결합성 유도체" 라는 것은 천연 또는 출발 단백질을 유기 단백질성 또는 비단백질성 유도체화제를 사용하여 변형시키는 것, 및/또는 번역(해독)후 변형을 포함한다. 공유결합성 변형은 통상 당해 단백질의 표적화된 아미노산 잔기를 선택된 측쇄 또는 말단 잔기와 반응할 수 있는 유기 유도체화제와 반응시킴으로써, 또는 선택된 재조합 숙주 세포 내에서 작용하는 번역후 변형 기작을 활용함으로써 도입된다. 이렇게 생성된 공유결합성 유도체는 생물학적 활성, 번역결정법, 또는 재조합 당단백질의 번역친화성 정제를 위한 항-단백질 항체의 제조를 위해 중요한 잔기들을 확인할 목적의 프로그램에서 유용하다. 이러한 변형들은 당업계의 통상적인 기술 범위 내에 속하며, 과도한 실험 없이 수행된다.
- [0109] 어떤 번역후 변형들은 발현된 폴리펩타이드에 대한 재조합 숙주 세포 활동의 결과이다. 글루타민일 및 아스파라긴일 잔기는 흔히 상응하는 글루타미 및 아스파르트산 잔기로 번역후 탈아미드화된다. 다르게는, 이들 잔기는 가벼운 산성 조건 하에 탈아미드화된다. 이들 잔기들은 어떠한 형태이든 본 발명에 따라 생성된 폴리펩타이드 내에 존재할 수 있다.

- [0110] 기타 번역후 변형으로는 프롤린과 리신의 수산화, 세릴 또는 트레오닐 잔기의 하이드록실 그룹의 인산화, 리신, 아르기닌 및 히스티딘 측쇄의 알파-아미노 그룹의 메틸화를 포함한다 (문헌 [T. E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)] 참조).
- [0111] 폴리펩타이드를 언급할 때 "특질"이라는 것은 한 분자에 있어서 뚜렷이 구별되는 아미노산 서열 기반의 구성 성분으로서 정의된다. 본 발명의 mmRNA에 의해 암호화되는 폴리펩타이드의 특질로서는 표면적인 현상, 국소적 입체구조 형태, 접힘, 루프, 반-루프, 도메인, 반-도메인, 부위, 말단 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다.
- [0112] 본원에서 폴리펩타이드를 언급할 때 "표면적인 현상"이라는 용어는 단백질의 가장 바깥쪽 표면에 나타나는 폴리펩타이드 기반의 구성 요소를 가리킨다.
- [0113] 본원에서 폴리펩타이드를 언급할 때 "국소적 입체구조 형태"라는 용어는 당해 단백질의 한정가능한 공간 내에 위치하고 있는 단백질의 폴리펩타이드 기반의 구조적인 현상을 가리킨다.
- [0114] 본원에서 폴리펩타이드를 언급할 때 "접힘"이라는 용어는 에너지가 최소화되는 경우에 그에 따라 생성된 아미노산 서열의 입체구조를 지칭한다. 접힘은 접힘 과정의 제2 단계 또는 제3 단계에서 일어날 수 있다. 제2 단계 접힘의 예로서는 베타 시트와 알파 헬릭스를 포함한다. 제3 단계 접힘의 예로서는 에너지 힘의 응집 또는 분리에 의해 형성된 도메인 및 영역들을 포함한다. 이러한 방식으로 형성된 영역들로서는 소수성 및 친수성 주머니 등을 포함한다.
- [0115] 본원에서 단백질 입체구조와 관련하여 "회전(turn)"이라는 용어는 펩타이드 또는 폴리펩타이드 백본의 방향을 변화시키는 굽힘을 의미하며, 1개, 2개, 3개 이상의 아미노산 잔기를 수반할 수 있다.
- [0116] 본원에서 폴리펩타이드를 언급할 때 "루프"라는 용어는 펩타이드 또는 폴리펩타이드 백본의 방향을 역전하는 작용을 할 수 있는 폴리펩타이드의 구조적 특징을 가리킨다. 루프가 한 폴리펩타이드 내에서 발견되어 백본의 방향을 변화시키기만 하는 경우, 이는 4개 이상의 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 올리비아 등(Oliva et al.)은 5개 부류 이상의 단백질 루프를 확인한 바 있다 (문헌 [J. Mol Biol 266 (4): 814-830; 1997] 참조). 루프는 개방되거나 폐쇄될 수 있다. 폐쇄형 루프 또는 "순환형" 루프는 브릿지 모이어티들 사이에 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개 이상의 아미노산을 포함할 수 있다. 이러한 브릿지 모이어티는 이황화 브릿지를 가지는 폴리펩타이드 내에서 통상적인 시스테인-시스테인 브릿지 (Cys-Cys)를 포함할 수 있고, 또는 다르게는 브릿지 모이어티는 본원에 사용된 디브로모질릴 제제와 같이 비단백질 기반일 수 있다.
- [0117] 본원에서 폴리펩타이드를 언급할 때 "반-루프"라는 용어는 당해 루프가 유래한 확인된 루프의 아미노산 잔기 수의 적어도 절반을 가지는 루프의 일부분을 지칭한다. 루프는 항상 짝수의 아미노산 잔기를 포함하는 것은 아니다. 따라서, 어떤 루프가 홀수의 아미노산을 함유하거나 포함하는 것으로 확인되는 경우에는, 홀수 루프의 반-루프는 당해 루프의 정수 부분이나 그 다음으로 가까운 정수 부분을 포함할 것이다 (루프의 아미노산 수/2+/-0.5 아미노산). 예를 들어, 7개의 아미노산을 가지는 것으로 확인된 루프는 3개의 아미노산 또는 4개의 아미노산을 갖는 반-루프를 생성할 수 있다 (7/2=3.5+/-0.5, 따라서 3 또는 4가 됨).
- [0118] 본원에서 폴리펩타이드를 언급할 때 "도메인"이라는 용어는 하나 이상의 확인가능한 구조적 또는 기능적 형질 또는 특성 (예를 들어, 결합능, 단백질-단백질 상호작용을 위한 부위로서의 기능)을 가지는 폴리펩타이드의 모티프를 지칭한다.
- [0119] 본원에서 폴리펩타이드를 언급할 때 "반-도메인"이라는 용어는 당해 도메인이 유래한 확인된 도메인의 아미노산 잔기 수의 적어도 절반을 가지는 도메인의 일부분을 의미한다. 도메인은 항상 짝수의 아미노산 잔기를 포함하는 것은 아니다. 따라서, 어떤 도메인이 홀수의 아미노산을 함유하거나 포함하는 것으로 확인되는 경우에는, 홀수 도메인의 반-도메인은 당해 도메인의 정수 부분이나 그 다음으로 가까운 정수 부분을 포함할 것이다 (도메인의 아미노산 수/2+/-0.5 아미노산). 예를 들어, 7개의 아미노산을 가지는 것으로 확인된 도메인은 3개의 아미노산 또는 4개의 아미노산을 갖는 반-도메인을 생성할 수 있다 (7/2=3.5+/-0.5, 따라서 3 또는 4가 됨). 또한, 서브 도메인은 도메인 또는 반-도메인 내에서 확인될 수 있으며, 이러한 서브 도메인들은 당해 서브 도메인이 유래한 도메인 또는 반-도메인 내에서 확인되는 모든 구조적 또는 기능적 특성들보다는 적은 특성을 보유하고 있다. 또한, 본원에서 임의의 도메인 유형을 포함하는 아미노산은 폴리펩타이드의 백본을 따라 인접하고 있을 필요는 없다 (즉, 비인접 아미노산은 구조적으로 접혀 도메인, 반-도메인 또는 서브 도메인을 생성할 수 있다).
- [0120] 본원에서 폴리펩타이드를 언급할 때 아미노산에 대한 하나의 실시형태와 관련하여 "부위"라는 용어는 "아미노산

잔기" 및 "아미노산 측쇄"와 동의어로 사용된다. 부위라는 것은 본 발명의 폴리펩타이드 기반의 분자 내에서 변형되거나, 조작되거나, 변화되거나, 유도되거나 또는 다양화될 수 있는 펩타이드 또는 폴리펩타이드 내의 위치를 말한다.

[0121] 본원에서 폴리펩타이드를 언급할 때 "말단(들)"이라는 용어는 펩타이드 또는 폴리펩타이드의 맨 끝을 지칭한다. 이러한 맨 끝 부분은 펩타이드 또는 폴리펩타이드의 처음 부위 또는 마지막 부위에만 한정되는 것은 아니고, 당해 말단 영역에서 추가의 아미노산을 포함할 수 있다. 본 발명의 폴리펩타이드 기반의 분자는 N-말단 (유리 아미노 그룹 (NH₂)을 갖는 아미노산으로 종료)과 C-말단 (유리 카복실 그룹 (COOH)을 갖는 아미노산으로 종료)을 모두 함유하는 것을 특징으로 할 수 있다. 본 발명의 단백질은 경우에 따라서는 이황화 결합 또는 비공유결합성 힘에 의해 함께 결합된 복수 개의 폴리펩타이드 사슬로 이루어져 있다 (다량체, 올리고머). 이러한 종류의 단백질은 복수 개의 N- 및 C-말단을 가질 것이다. 다르게는, 폴리펩타이드의 말단은 상황에 따라 비폴리펩타이드 기반의 모이어티, 예컨대 유기 컨주게이트로 시작되거나 종료되도록 변형될 수 있다.

[0122] 일단 어떤 임의의 특질들이 본 발명의 1차 작제물 또는 mmRNA에 의해 암호화된 폴리펩타이드의 목적하는 구성요소로서 확인되거나 규정되면, 이동, 스와핑, 역전, 결실, 무작위화 또는 복제를 통해서 이러한 특질들에 대한 임의의 여러 조작 및/또는 변형이 수행될 수 있다. 더욱이, 특질들의 조작은 본 발명의 분자에 대한 변형과 동일한 결과를 유발할 수 있다. 예를 들어, 도메인의 결실을 수반하는 조작은 전장 길이의 분자보다 적은 길이의 분자를 암호화하는 핵산의 변형이 변화시키는 것과 똑같이 분자 길이의 변화를 초래할 것이다.

[0123] 변형과 조작은 당업계에 공지된 방법들, 예컨대 이에 제한되지는 않지만, 부위 특이적 돌연변이 유발법에 의해 달성될 수 있다. 이렇게 변형된 분자들은 이후 시험관내 또는 생체내 검정, 예컨대 본원에 기술된 것들 또는 당업계에 공지된 임의의 다른 적절한 스크리닝 검정법을 사용하여 활성에 대해 시험할 수 있다.

[0124] 본 발명에 따르면, 당해 폴리펩타이드는 여러 번의 실험을 거쳐 발견된 공통 서열(consensus sequence)을 포함할 수 있다. 본원에서 "공통 서열"은 하나 이상의 부위에 다양성을 허용하는 서열의 공통의 집단을 나타내는 단일 서열이다.

[0125] 당업계의 숙련자들이 인지하고 있는 바와 같이, 단백질 단편, 기능성 단백질 도메인 및 동족 단백질도 본 발명의 관심 대상 폴리펩타이드의 범위 내에 속하는 것으로 간주된다. 예를 들어, 본원에는 10개, 20개, 30개, 40개, 50개, 60개, 70개, 80개, 90개, 100개 이상의 아미노산 길이의 기준 단백질의 임의의 단백질 단편 (기준 폴리펩타이드 서열보다 적어도 1개의 아미노산 잔기가 더 짧지만 다른 부분은 동일한 폴리펩타이드 서열을 의미함)이 제공된다. 또 다른 예로서, 본원에 기술된 임의의 서열과 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90%, 약 95% 또는 약 100% 동일한 약 20개, 약 30개, 약 40개, 약 50개 또는 약 100개의 아미노산의 연장을 포함하는 임의의 단백질이 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 특정 실시형태에서, 본 발명에 따라 사용될 폴리펩타이드는 본원에 제공되거나 참조된 임의의 서열에 나타난 바와 같이 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개 이상의 돌연변이를 포함한다.

[0126] *암호화된 폴리펩타이드*

[0127] 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA는 관심 대상 폴리펩타이드, 예컨대 펩타이드 및 단백질을 암호화하도록 고안될 수 있다.

[0128] 하나의 실시형태에서, 1차 작제물 또는 mmRNA는 기준 폴리펩타이드 서열과 특정한 동일성을 가지는 변이체 폴리펩타이드를 암호화할 수 있다. 본원에서, "기준 폴리펩타이드 서열"은 출발 폴리펩타이드 서열을 지칭한다. 기준 서열은 야생형 서열 또는 다른 서열의 고안에 언급된 임의의 서열이 될 수 있다. "기준 폴리펩타이드 서열"은 임의의 암호화 LDLR 및/또는 CYP7a1 또는 이들의 변이체일 수 있다.

[0129] 당업계에 공지된 "동일성"이라는 용어는 서열들을 비교하여 결정된, 2개 이상의 펩타이드 서열 간의 관계를 지칭한다. 당업계에서, 동일성은 2개 이상의 일련의 아미노산 잔기들 간에 정합 수에 의해 결정된 펩타이드들 간의 서열 관련성의 정도를 의미한다. 동일성은 특정 수학적 모델 또는 컴퓨터 프로그램 (즉, "알고리즘")에 의해 다루어진 갭(gap) 정렬을 갖는 (있는 경우) 보다 작은 2개 이상의 서열 간의 동일한 정합의 %(백분율)로 측정한다. 관련 펩타이드들의 동일성은 공지된 방법으로 바로 계산될 수 있다. 이러한 방법들로서는, 이에 제한되지는 않지만, 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]; [Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994]; [Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic

Press, 1987]; [Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York, 1991]; 및 [Carillo et al., SIAM J. Applied Math. 48, 1073 (1988)]에 기술된 것들을 포함한다.

[0130] 일부 실시형태에서, 당해 폴리펩타이드 변이체는 기준 폴리펩타이드와 동일하거나 유사한 활성을 가질 수 있다. 다르게는, 당해 변이체는 기준 폴리펩타이드에 대하여 변화된 (예를 들어, 증대 또는 감소된) 활성을 가질 수 있다. 일반적으로, 본 발명의 특정 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드의 변이체는, 본원에 기술되고 당업계의 숙련자들에게 공지되어 있는 서열 정렬 프로그램 및 파라미터들에 의해 측정하였을 때, 특정한 기준 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드에 대하여 적어도 약 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%의 동일성, 그러나 100% 미만인 서열 동일성을 가질 것이다. 이러한 정렬에 사용되는 수단으로서서는 블라스트 스위트(BLAST suite)의 수단들을 포함한다 (문헌 [Stephen F. Altschul, Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaefer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402] 참조). 다른 수단들은 본원에 기술되어 있는데, 구체적으로 "상동성"의 정의 부분에 설명되어 있다.

[0131] BLAST 알고리즘에서 디폴트 파라미터들로서는, 예를 들어 예상 역치값 10, 워드 글자 크기 28, 정합/부정합 스코어 1, -2, 선형 갭 비용(Gap costs Linear)을 포함한다. 임의의 필터 뿐만 아니라, 종 특이적 반복, 예를 들어 호모 사피엔스에 대한 선별도 이용될 수 있다.

[0132] 펩타이드

[0133] 본원에 개시된 1차 작제물 또는 mmRNA는 하나 이상의 승인되거나 "시험 중인" 단백질 또는 펩타이드를 암호화할 수 있다.

[0134] 본 발명에 따르면, 현재 시판중이거나 개발 중인 하나 이상의 단백질 또는 펩타이드는 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 종양 관련 mmRNA에 의해 암호화될 수 있다. 특정 이론에 얽매이거자 하는 것은 아니지만, 본 발명의 1차 작제물 또는 mmRNA로의 도입(혼입)은 적어도 부분적으로는 당해 작제물 고안의 특이성, 순도 및 선택성에 기인하기 때문에 향상된 치료 효능을 유발할 것으로 여겨진다.

[0135] 당해 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 및/또는 mmRNA는 생물학적 및/또는 생리학적 과정 및/또는 화학물을 변화시킬 수 있는데, 예컨대 이에 제한되지는 않지만, 질병 및/또는 장애의 진행을 변화시키고 (예를 들어, 진행을 늦추고), 콜레스테롤 및/또는 저밀도 리포단백질 (LDL) 콜레스테롤을 감소시키며, 크리글러-나자르 증후군 (Crigler-Najjar syndrome)을 개선시키고, 헵시딘 및/또는 제2형 혈색소침착증 기능을 복구하여 철 흡수를 조절하며, 담즙산 대사를 회복하고, 가족성 고콜레스테롤혈증으로 인한 관상 동맥성 심장 질환 위험을 감소시키며, 과각화성 플라크 및 각막 혼탁을 방지하여 손 및/또는 발에서 과각화성 플라크를 치유할 수 있다.

[0136] 하나의 실시형태에서, 당해 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 및/또는 mmRNA는 결실 또는 돌연변이된 유전자로부터 생성된 단백질을 대체할 목적으로 세포 또는 조직 내에서 폴리펩타이드를 발현시키는데 사용될 수 있다.

[0137] 또한, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA는 희귀한 간 질병 및/또는 장애와 관련된 대사성 장애를 치료하는데 사용될 수 있다.

[0138] 측부(flanking) 영역: 비번역화 영역 (UTR)

[0139] 유전자의 비번역화 영역 (UTR)은 전사는 되지만 해독(번역)되지는 않는다. 5' UTR은 전사 시작 부위에서 출발하여 출발 코돈까지 계속 이어지지만 출발 코돈을 포함하지는 않는 반면; 3' UTR은 출발 코돈 직후부터 출발하여 전사 종결 신호까지 계속된다. 핵산 분자의 안정성 및 번역의 관점에서, UTR에 의해 수행되는 조절 역할에 대해 더 확실해지고 있는 증거가 있다. UTR의 조절적 특징은 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 및/또는 mmRNA에 도입되어 당해 분자의 안정성을 향상시킬 수 있다. 전사체들이 목적하지 않은 기관 부위로 오도될 경우를 대비하여 고유한 특징들을 도입하여 이들의 제어된 하향 조절을 확실히 보장하게 할 수 있다.

[0140] 5' UTR 및 번역 개시

[0141] 천연 5' UTR은 번역(해독) 개시에 역할을 하는 특징을 보유한다. 이들은 리보솜이 여러 유전자들의 번역을 개시하는 과정에 관련된 것으로 흔히 알려진 코작(Kozak) 서열과 같은 시그너처(signature, 특성)들을 보유하고 있다. 코작 서열은 공통 서열인 CCR(A/G)CCAUGG [여기서, R은 퓨린 (아데닌 또는 구아닌)으로, 뒤에 다른 'G'를 수반하는 출발 코돈 (AUG)에서 상부 방향으로 3번째의 염기에 해당함]을 가진다. 5' UTR은 신장 인자의 결

함에 관여하는 제2차 구조를 형성하는 것으로도 알려진 바 있다.

[0142] 특정 표적 기관의 풍부하게 발현되는 유전자들에서 통상 발견되는 특징들을 조합함으로써, 누구나 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA의 안정성 및 단백질 생산을 향상시킬 수 있다. 예를 들어, 간에서 발현되는 mRNA, 예컨대 알부민, 혈청 아밀로이드 A, 아포리포단백질 A/B/E, 트랜스페린, 알파 페토단백질, 에리트로포이에틴 또는 인자 VIII의 5' UTR 도입은, 간 세포주 또는 간에서 mmRNA와 같은 핵산 분자의 발현을 향상시키는데 사용될 수 있다. 마찬가지로, 다른 조직 특이적인 mRNA의 5' UTR을 사용하여 하기의 해당 조직에서의 발현을 향상시키는 것도 가능하다 - 근육 (MyoD, 미오신, 미오글로빈, 미오게닌, 헤르쿨린), 상피 세포 (Tie-1, CD36), 골수 세포 (C/EBP, AML1, G-CSF, GM-CSF, CD11b, MSR, Fr-1, i-NOS), 백혈구 (CD45, CD18), 지방 조직 (CD36, GLUT4, ACRP30, 아디포넥틴) 및 폐의 상피 세포 (SP-A/B/C/D).

[0143] 기타 비-UTR 서열은 5' UTR (또는 3' UTR) UTR 내로 도입될 수 있다. 예를 들어, 인트론 또는 인트론 서열의 일부는 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA의 측부 영역 내로 도입될 수 있다. 인트론 서열의 도입은 단백질 생산 뿐만 아니라 mRNA 수준도 증가시킬 수 있다.

[0144] 5' UTR은 본 발명에서 사용하기 위해 선택될 수 있고, 이에 제한되지는 않지만, 번역을 제어하기 위한 5' UTR과 같은 구조화된 UTR일 수 있다. 비제한적인 예로서, 구조화된 5' UTR은 함께 계류중인, 발명의 명칭이 "RNA 작제물을 이용한 차등 표적화"인 미국 가특허 출원 제61/758,921호 (2013. 1. 31 출원); 발명의 명칭이 "RNA 작제물을 이용한 차등 표적화"인 미국 가특허 출원 제61/781,139호 (2013. 3. 14 출원); 발명의 명칭이 "말단 최적화된 RNA"인 미국 가특허 출원 제61/729,933호 (2012. 11. 26 출원); 발명의 명칭이 "말단 최적화된 RNA"인 미국 가특허 출원 제61/737,224호 (2012. 12. 14 출원) 및 발명의 명칭이 "말단 최적화된 RNA"인 미국 가특허 출원 제61/829,359호 (2013. 5. 31 출원) (이들 각 출원은 그 내용 전체가 본원에 참조로 포함됨)에 기술된 말단 변형법 중 임의의 하나를 사용하는 경우에 유익할 수 있다.

[0145] 3' UTR 및 AU가 풍부한 성분

[0146] 3' UTR은 아데노신(A)과 우리딘(U)이 포함된 연장부를 가지는 것으로 알려져 있다. 이러한 AU가 풍부한 시그너처(특성)는 높은 회전율을 갖는 유전자에서 특히 우세하다. AU가 풍부한 성분 (ARE)은 이들의 서열 특징과 기능적 특성을 기초로 3개의 클래스로 분리될 수 있다 (Chen et al, 1995): 클래스 I ARE는 U 풍부 영역 내에 수 개의 분산된 AUUUA 모티프의 복제본을 함유한다. C-Myc 및 MyoD는 클래스 I ARE를 함유한다. 클래스 II ARE는 2개 이상의 중첩 UUAUUUA(U/A)(U/A) 9량체를 보유한다. 이러한 유형의 ARE를 함유하고 있는 분자는 GM-CSF 및 TNF- α 를 포함한다. 클래스 III ARE는 잘 정의되어 있지 않다. 이러한 U 풍부 영역은 AUUUA 모티프를 함유하지 않는다. c-Jun 및 미오게닌은 이러한 클래스 중 잘 연구된 2가지 예이다. ARE에 결합하는 대부분의 단백질들은 전령을 불안정하게 하는 것으로 알려져 있는 반면, ELAV 패밀리의 구성원들은 (HuR이 가장 눈에 띈) mRNA의 안정성을 증대시키는 것으로 입증되었다. HuR은 3개 클래스 모두의 ARE에 결합한다. 핵산 분자의 3' UTR 내로 HuR 특이적 결합 부위를 조작하여 넣으면 HuR 결합을 유도할 수 있어, 생체내 메시지를 안정화시킬 수 있다.

[0147] 3' UTR AU 풍부 성분 (ARE)의 도입, 제거 또는 변형이 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA의 안정성을 조절하는데 사용될 수 있다. 특정 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA를 조작하는 경우, ARE의 하나 이상의 복제본을 도입하여 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA를 덜 안정적이도록 만들어, 이로써 번역을 축소시켜 결과물인 단백질의 생성을 감소시킬 수 있다. 마찬가지로, ARE를 동정하고 제거 또는 돌연변이 유발시켜, 세포내 안정성을 증가시켜 번역 및 결과물인 단백질의 생성을 증대시킬 수 있다. 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA를 사용하여 관련 세포주 내에서 형질 감염 실험을 수행할 수 있으며, 단백질 생성은 형질 감염 후 다양한 시점에서 분석될 수 있다. 예를 들어, 세포를 서로 다른 ARE-조작 분자들을 사용하여 형질 감염시키고, 관련 단백질에 대해 ELISA 키트를 사용하여 형질 감염 후 6시간, 12시간, 24시간, 48시간 및 7일 되는 때에 생성된 단백질을 분석할 수 있다.

[0148] 마이크로RNA 결합 부위 도입

[0149] 마이크로RNA (또는 miRNA)는 핵산 분자의 3' UTR에 결합하여 핵산 분자의 안정성을 감소시키거나 번역을 저해시킴으로써 유전자 발현을 하향 조절하는 19-25개의 뉴클레오타이드 길이의 비암호화 RNA이다. 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA는 하나 이상의 마이크로RNA 표적 서열, 마이크로RNA 서열, 마이크로RNA 결합 부위, 또는 마이크로RNA 씨드를 포함할 수 있다. 이러한 서열은 US 공개공보 US2005/0261218 및 US 공개공보 US2005/0059005에 교시된 것과 같은 공지된 임의의 마이크로RNA, 또는 함께 계류중인 출원 USSN

61/758,921 (2013. 1. 31 출원, 변호사 업무처리 일련번호 2030.1039)의 표 7에 열거된 것들과 상응할 수 있다 (상기 문헌들의 내용은 그 내용 전체가 본원에 참조로 포함됨).

[0150] 마이크로RNA 서열은 "씨드" 영역, 즉 성숙한 마이크로RNA의 2-8번 위치의 영역 내의 서열을 포함하는데, 이 서열은 miRNA 표적 서열에 대해 완벽한 왓슨-크릭 상보성을 가진다. 마이크로RNA 씨드는 성숙한 마이크로RNA의 2-8 또는 2-7번 위치를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 마이크로RNA 씨드는 7개의 뉴클레오타이드 (예를 들어, 성숙한 마이크로RNA의 2-8번 뉴클레오타이드)를 포함할 수 있는데, 여기서 상응하는 miRNA 표적 내의 씨드-상보적 부위는 마이크로RNA 1번 위치의 맞은편의 아데닌 (A)에 의해 측정된다. 일부 실시형태에서, 마이크로RNA 씨드는 6개의 뉴클레오타이드 (예를 들어, 성숙한 마이크로RNA의 2-7번 뉴클레오타이드)를 포함할 수 있는데, 여기서 상응하는 miRNA 표적 내의 씨드-상보적 부위는 마이크로RNA 1번 위치의 맞은편의 아데닌 (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]을 참조한다. 마이크로RNA 씨드의 염기들은 표적 서열과 완전한 상보성을 가진다. 당해 마이크로RNA가 이용가능하다면, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA의 3' UTR 내로 마이크로RNA 표적 서열을 조작하여 넣음으로써, 누구나 분해 또는 감소된 번역을 위한 분자들을 표적으로 삼을 수 있다. 이 과정은 핵산 분자의 전달시 엇나간 효과의 위험을 감소시켜 줄 것이다. 마이크로RNA의 동정, 마이크로RNA 표적 영역, 및 이들의 발현 패턴과 생물학에서의 역할에 대해서는 보고된 바 있다 (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] 참조).

[0151] 예를 들어, 단일 핵산 분자가 mRNA이고 간까지 전달할 의도는 없지만 거기에 도달하게 되는 경우에는, 이후 간에 풍부한 마이크로RNA인 miR-122는, 하나 또는 복수 개의 miR-122의 표적 부위가 당해 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA의 3' UTR 내로 조작되어 들어간다면 대상 유전자의 발현을 억제할 수 있다. 서로 다른 마이크로RNA를 위한 하나 또는 복수 개의 결합 부위의 도입은 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA의 긴 수명, 안정성 및 단백질 번역을 추가로 감소시키기 위해 조작될 수 있다.

[0152] 본원에서, "마이크로RNA 부위" 라는 용어는 마이크로RNA 표적 부위 또는 마이크로RNA 인식 부위, 또는 당해 마이크로RNA가 결합 또는 연관되는 임의의 뉴클레오타이드 서열을 지칭한다. "결합"은 왓슨-크릭의 하이브리드화 규칙을 따를 수 있거나, 또는 당해 마이크로RNA 부위 또는 이와 인접한 부위에서 마이크로RNA와 표적 서열과의 임의의 안정한 결합을 나타낼 수 있다.

[0153] 역으로, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA의 목적상, 마이크로RNA 결합 부위는 특정 조직 내에서 단백질 발현을 증가시키기 위해 이들이 자연적으로 발생한 서열로부터 나오도록 (즉, 제거되도록) 조작될 수 있다. 예를 들어, miR-122 결합 부위가 제거되어 간에서의 단백질 발현을 향상시킬 수 있다. 복수 개의 조직에서의 발현의 조절은 하나 또는 수개의 마이크로RNA 결합 부위의 도입 또는 제거를 통해 달성될 수 있다.

[0154] 마이크로RNA가 mRNA를 조절하고 이로써 단백질 발현도 조절하는 것으로 알려진 조직의 예로서는, 이에 제한되지는 않지만, 간 (miR-122), 근육 (miR-133, miR-206, miR-208), 상피 세포 (miR-17-92, miR-126), 골수 세포 (miR-142-3p, miR-142-5p, miR-16, miR-21, miR-223, miR-24, miR-27), 지방 조직 (let-7, miR-30c), 심장 (miR-1d, miR-149), 신장 (miR-192, miR-194, miR-204) 및 폐의 상피 세포 (let-7, miR-133, miR-126)를 포함한다. 마이크로RNA는 복잡한 생물학적 공정, 예컨대 혈관형성 공정도 조절할 수도 있다 (miR-132) (문헌 [Anand and Cheresch Curr Opin Hematol 2011 18:171-176] 참조). 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA에서, 당해 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA 발현을 생물학적으로 관련된 세포 유형 또는 관련 생물학적 공정에 맞추어 조정하기 위해, 이러한 공정들에 관계되는 마이크로RNA에 대한 결합 부위는 제거되거나 도입될 수 있다.

[0155] 마지막으로, 서로 다른 세포 유형에서의 마이크로RNA의 발현 패턴의 이해를 통해, 특정 세포 유형에서 또는 특정 생물학적 조건 하에서만 보다 표적화된 발현을 위해 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA는 조작될 수 있다. 조직 특이적인 마이크로RNA 결합 부위의 도입을 통해, 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA은 조직 내에서 또는 생물학적 조건의 맥락에서 단백질 발현에 최적이 되도록 고안될 수 있다.

[0156] 조작된 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA를 사용하여 관련 세포주 내에서 형질 감염 실험을 수행할 수 있으며, 단백질 생성은 형질 감염 후 다양한 시점에서 분석될 수 있다. 예를 들어, 세포를 서로 다른 마이크로RNA 결합 부위로 조작된 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA를 사용하여 형질 감염시키고, 관련 단백질에 대해 ELISA 키트를 사용하여 형질 감염 후 6시간, 12시간, 24시간, 48시간 및 7일 되는 때에 생성된 단

백질을 분석할 수 있다. 생체내 실험도 마이크로RNA-결합 부위로 조작된 분자를 사용하여 수행해서, 형성된 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA의 조직 특이적인 발현에서의 변화를 검사할 수 있다.

[0157] 하나의 실시형태에서, 당해 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 및/또는 mmRNA는 적어도 하나의 miR 서열 또는 이의 변이체를 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 및/또는 mmRNA에서 사용하기 위한 miR 서열을 총망라한 목록은 함께 계류중인 국제특허출원 제PCT/US13/62531호 (M037.20)의 표 9에 기술되어 있다 (상기 문헌의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함된다).

[0158] 하나의 실시형태에서, 당해 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 및/또는 mmRNA는 HMG-CoA 리덕타아제 또는 PCSK9의 비번역화 영역에 결합하여 이를 억제하는 적어도 하나의 miR 서열을 포함할 수 있다. HMG-CoA 리덕타아제 또는 PCSK9의 비번역화 영역에 결합하여 이를 억제하는 miR 서열의 비제한적인 예들은 국제특허공보 제W02013154766호에 기술되어 있다 (상기 문헌의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함된다). 비제한적인 예로서, 당해 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 및/또는 mmRNA는 miR-520d-5p, miR-224 또는 이들의 변이체를 포함하는 miR 서열을 포함할 수 있다 (예를 들어, 국제특허공보 제W02013154766호를 참조하며, 상기 문헌의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함된다). 또 다른 비제한적인 예로서, 당해 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 및/또는 mmRNA는 국제특허공보 제W02013154766호 (상기 문헌의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함됨)의 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 10 및/또는 서열번호 11을 포함하거나 암호화하는 miR 서열을 포함할 수 있다. 또 다른 비제한적인 예로서, 당해 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 및/또는 mmRNA는 miR-224 또는 이들의 변이체를 포함하는 miR 서열을 포함할 수 있다 (예를 들어, 국제특허공보 제W02013154766호를 참조하며, 상기 문헌의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함된다). 또 다른 비제한적인 예로서, 당해 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 및/또는 mmRNA는 miR-520d-5p 및 miR-224 또는 이들의 변이체를 포함하는 miR 서열을 포함할 수 있다 (예를 들어, 국제특허공보 제W02013154766호를 참조하며, 상기 문헌의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함된다).

[0159] 5' 캡핑

[0160] mRNA의 5' 캡 구조는 핵의 수송에 연관되어 있어 mRNA의 안정성을 증대시키고, mRNA 캡 결합 단백질 (CBP)에 결합하는데, 당해 CBP와 폴리(A) 결합 단백질과의 결합을 통해 성숙한 순환 mRNA 종을 형성함으로써 세포 내에서 mRNA의 안정성 및 번역 기능을 담당한다. 캡은 추가로 mRNA 스플라이싱 도중에 5' 근위의 인트론 제거를 보조한다.

[0161] 내인성 mRNA 분자는 5'-말단이 캡핑되어 말단 구아노신 캡 잔기와 mRNA 분자의 5'-말단 전사된 센스 뉴클레오타이드 사이에 5'-ppp-5'-트리포스페이트 결합을 생성할 수 있다. 이후, 이러한 5'-구아닐레이트 캡은 메틸화되어 N7-메틸-구아닐레이트 잔기를 생성할 수 있다. mRNA의 5' 말단의 말단 및/또는 전말단(anteterminal)이 전사된 뉴클레오타이드의 리보스 당도 선택적으로 2'-O-메틸화될 수 있다. 구아닐레이트 캡 구조의 가수분해 및 절단을 통한 5'-캡 제거는 분해를 위해 mRNA 분자와 같은 핵산 분자를 표적으로 삼을 수 있다.

[0162] 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 및 mmRNA에 대한 변형은 캡 제거를 방지하는 비가수분해형 캡 구조를 생성하여 이에 따라 mRNA의 반감기를 증가시킬 수 있다. 캡 구조의 가수분해에는 5'-ppp-5' 포스포디에스테르 결합의 절단이 요구되기 때문에, 캡핑 반응 동안에는 변형된 뉴클레오타이드가 사용될 수 있다. 예를 들어, 뉴 잉글랜드 바이오랩스 (New England Biolabs, 미국 메사추세츠주 Ipswich 소재)의 백신시아(Vaccinia) 캡핑 효소를 제조업자의 설명에 따라 α-티오-구아노신 뉴클레오타이드와 함께 사용하여 5'-ppp-5' 캡 내에서 포스포로티오에이트 결합을 생성할 수 있다. α-메틸-포스포네이트 및 셀레노-포스페이트 뉴클레오타이드와 같은 추가의 변형된 구아노신 뉴클레오타이드도 사용될 수 있다.

[0163] 추가의 변형으로서, 이에 제한되지는 않지만, 당 고리의 2'-하이드록실 그룹 상에서 mRNA의 5' 말단 및/또는 전말단 뉴클레오타이드 리보스 당의 2'-O-메틸화 (상기 언급된 바와 같음)를 포함한다. 복수 개의 다른 5'-캡 구조들을 사용하여 mRNA 분자와 같은 핵산 분자의 5'-캡을 생성할 수 있다.

[0164] 본원에서 합성 캡 유사체, 화학적 캡, 화학적 캡 유사체 또는 구조적 또는 기능적 캡 유사체로도 지칭되는 캡 유사체는 이들의 화학적 구조면에서 천연(즉, 내인성, 야생형 또는 생리학적) 5'-캡과 상이하지만, 캡 기능은 유지한다. 캡 유사체는 화학적으로(즉, 비효소적으로) 또는 효소적으로 합성되고/되거나 핵산 분자에 연결될 수 있다.

[0165] 예를 들면, 항-역 캡 유사체(ARCA)는 5'-5'-트리포스페이트 그룹에 의해 연결된 2개의 구아닌을 함유하고, 여기서 하나의 구아닌은 N7 메틸 그룹 뿐만 아니라 3'-O-메틸 그룹(즉, N7,3'-O-디메틸-구아노신-5' ' -트리포스페이트-5'-구아노신 (m⁷G-3'mppp-G; 이는 3' O-Me-m⁷G(5')ppp(5')G로 동등하게 지정될 수 있다)을 함유한다. 나머

지 변형되지 않은 구아닌의 3'-O 원자는 캡핑된 핵산 분자(예: mRNA 또는 mmRNA)의 5' 말단 뉴클레오타이드에 연결된다. N7- 및 3'-O-메틸화된 구아닌은 캡핑된 핵산 분자(예: mRNA 또는 mmRNA)의 말단 모이어티를 제공한다.

[0166] 다른 예시적 캡은 ARCA와 유사하지만 구아노신 상에 2'-O-메틸 그룹을 갖는 mCAP(즉, N7,2'-O-디메틸-구아노신-5'-트리포스페이트-5'-구아노신, m⁷Gm-ppp-G)이다.

[0167] 캡 유사체는 시험관내 전사 반응에서 핵산 분자의 동시적 캡핑을 가능하게 하지만, 최대 20%의 전사체가 캡핑되지 않고 남게된다. 내인성 세포성 전사 기구(transcription machinery)에 의해 생성된 핵산의 내인성 5'-캡 구조와 캡 유사체와의 이러한 차이 및 구조적 차이는 감소된 해독 능력 및 감소된 세포 안정성을 초래할 수 있다.

[0168] 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 및 mmRNA는 또한, 보다 진성인(authentic) 5'-캡 구조를 생성하기 위해 전사 후에 효소를 사용하여 캡핑할 수도 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "보다 진성인"이란 어구는 내인성 또는 야생형 특징을 구조적으로 또는 기능적으로 면밀하게 반영하거나 모사하는 특징을 지칭한다. 즉, "보다 진성인" 특징은 선행 기술의 합성 특징 또는 유사체 등과 비교해 내인성, 야생형, 천연 또는 생리학적 세포 기능 및/또는 구조를 보다 잘 나타내거나, 이는 하나 이상의 측면에서 상응하는 내인성, 야생형, 천연 또는 생리학적 특징을 능가한다. 본 발명의 보다 진성인 5' 캡 구조의 비제한적 예는, 특히 당업계에서 공지된 합성 5' 캡 구조(또는 야생형, 천연 또는 생리학적 5'캡 구조)와 비교해 증진된 캡 결합 단백질의 결합, 증가된 반감기, 5' 엔도뉴클레아제에 대한 감소된 감수성 및/또는 감소된 5'탈캡핑을 갖는 것들이다. 예를 들면, 재조합 백시니아 바이러스 캡핑 효소 및 재조합 2'-O-메틸트랜스퍼라제 효소는 mRNA의 5'-말단 뉴클레오타이드와 구아닌 캡 뉴클레오타이드 사이에 정준 5'-5'-트리포스페이트 연결을 생성시킬 수 있고, 이때 캡 구아닌은 N7 메틸화를 함유하고 mRNA의 5'-말단 뉴클레오타이드는 2'-O-메틸을 함유한다. 이러한 구조는 캡1 구조로 명명된다. 이러한 캡은, 예를 들면 당업계에 공지된 다른 5'캡 유사체 구조와 비교해, 보다 높은 해독 능력과 세포 안정성 및 감소된 세포성 염증촉진 사이토킨의 활성화를 야기한다. 캡 구조는 7mG(5')ppp(5')N,pN2p(cap 0), 7mG(5')ppp(5')N1mpNp(cap 1) 및 7mG(5')-ppp(5')N1mpN2mp(cap 2)를 포함한다.

[0169] 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA는 전사 후에 캡핑될 수 있고, 이러한 과정이 보다 효율적이기 때문에, 거의 100%의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA가 캡핑될 수 있다. 이것은 캡 유사체가 시험관내 전사 반응의 과정 중에 mRNA에 연결되는 경우에 약 80%인 것과 대조적이다.

[0170] 본 발명에 따라서, 5' 말단 캡은 내인성 캡 또는 캡 유사체를 포함할 수 있다. 본 발명에 따라서, 5' 말단 캡은 구아닌 유사체를 포함할 수 있다. 유용한 구아닌 유사체는 이노신, N1-메틸-구아노신, 2'플루오로-구아노신, 7-데아자-구아노신, 8-옥소-구아노신, 2-아미노-구아노신, LNA-구아노신 및 2-아지도-구아노신을 포함한다.

[0171] *바이러스 서열*

[0172] 보리 황화 위축 바이러스(BYDV-PAV)의 해독 인핸서 서열과 같지만 이에 제한되지 않는 추가의 바이러스 서열을 조작하고 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA의 3' UTR에 삽입할 수 있고 시험관내 및 생체 내에서 작제물의 해독을 자극할 수 있다. 형질감염 실험을 관련 세포주에서 수행할 수 있고, 단백질 생산을 형질감염 후 12시간째, 24시간째, 48시간째, 72시간째 및 7일째에 ELISA로 검정할 수 있다.

[0173] *IRES 서열*

[0174] 추가로, 내부 리보솜 진입 부위(IRES)를 함유할 수 있는 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA가 제공된다. 피코르나 바이러스에서 처음 동정된 특징으로서, IRES는 5' 캡 구조의 부재하에 단백질 합성을 개시하는데 있어 중요한 역할을 한다. IRES는 단독의 리보솜 결합 부위로서 작용할 수 있거나 mRNA의 다수의 리보솜 결합 부위 중 하나로서 기능할 수 있다. 하나 이상의 기능적 리보솜 결합 부위를 함유하는 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA는 리보솜에 의해 독립적으로 해독되는 수개의 펩타이드 또는 폴리펩타이드를 암호화할 수 있다("다중시스트론성(multicistronic) 핵산 분자"). 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA에 IRES가 제공되는 경우, 임의로 제2 해독가능한 영역이 추가 제공된다. 본 발명에 따라 사용될 수 있는 IRES 서열의 예는, 제한 없이, 피코르나 바이러스(예: FMDV), 페스트 바이러스(CFFV), 폴리오 바이러스(PV), 뇌심근염 바이러스(ECMV), 구제역 바이러스(FMDV), C형 간염 바이러스(HCV), 고전적 돼지 열병 바이러스(CSFV), 쥐 백혈병 바이러스(MLV), 유인원 면역결핍 바이러스(SIV) 또는 귀뚜라미 마비 바이러스(CrPV)로부터의 IRES 서열을 포함한다.

[0175] *폴리-A 테일*

- [0176] RNA 프로세싱 동안, 아데닌 뉴클레오타이드의 장쇄(폴리-A 테일)이 안정성을 증가시키기 위해 mRNA 분자와 같은 폴리뉴클레오타이드에 첨가될 수 있다. 전사 직후, 전사체의 3' 말단은 유리 3' 하이드록실로부터 절단될 수 있다. 이어서, 폴리-A 폴리머라제는 아데닌 뉴클레오타이드의 쇠를 RNA에 첨가한다. 폴리아데닐화라 지칭되는 과정은 길이가 100 내지 250개 잔기일 수 있는 폴리-A 테일을 첨가한다.
- [0177] 독특한 폴리-A 테일 길이는 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA에 특징한 이점을 제공한다는 것이 밝혀졌다.
- [0178] 일반적으로, 본 발명의 폴리-A 테일의 길이는 30개 초과 뉴클레오타이드 길이이다. 다른 실시형태에서, 폴리-A 테일은 길이가 35개 초과 뉴클레오타이드(예: 적어도 또는 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, 2,500개 및 3,000개 초과 뉴클레오타이드)이다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA는 약 30 내지 약 3,000개의 뉴클레오타이드(예: 30 내지 50개, 30 내지 100개, 30 내지 250개, 30 내지 500개, 30 내지 750개, 30 내지 1,000개, 30 내지 1,500개, 30 내지 2,000개, 30 내지 2,500개, 50 내지 100개, 50 내지 250개, 50 내지 500개, 50 내지 750개, 50 내지 1,000개, 50 내지 1,500개, 50 내지 2,000개, 50 내지 2,500개, 50 내지 3,000개, 100 내지 500개, 100 내지 750개, 100 내지 1,000개, 100 내지 1,500개, 100 내지 2,000개, 100 내지 2,500개, 100 내지 3,000개, 500 내지 750개, 500 내지 1,000개, 500 내지 1,500개, 500 내지 2,000개, 500 내지 2,500개, 500 내지 3,000개, 1,000 내지 1,500개, 1,000 내지 2,000개, 1,000 내지 2,500개, 1,000 내지 3,000개, 1,500 내지 2,000개, 1,500 내지 2,500개, 1,500 내지 3,000개, 2,000 내지 3,000개, 2,000 내지 2,500개 및 2,500 내지 3,000개)를 포함한다.
- [0179] 하나의 실시형태에서, 폴리-A 테일은 전체 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA의 길이와 관련하여 디자인된다. 이러한 디자인은 암호화 영역의 길이, 특정한 특징 또는 영역(예를 들면, 제1 영역 또는 플랭킹 영역(flanking region))의 길이에 기초할 수 있거나 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA로부터 발현된 최종 생성물의 길이에 기초할 수 있다.
- [0180] 이러한 상황에서, 폴리-A 테일은 길이가 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA 또는 이들의 특징보다 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 또는 100% 클 수 있다. 폴리-A 테일은 또한 이것이 속하는 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA의 부분으로서 디자인될 수 있다. 이러한 상황에서, 폴리-A 테일은 작제물의 총 길이 또는 작제물에서 폴리-A 테일을 제외한 총 길이의 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 또는 90% 이상일 수 있다. 게다가, 폴리-A 결합 단백질에 대한 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA의 조작된 결합 부위 및 접합은 발현을 증진시킬 수 있다.
- [0181] 추가로, 다수의 별개의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA를 폴리-A 테일의 3'-말단에서 변형된 뉴클레오타이드를 사용하여 3'-말단을 통해 함께 PABP(폴리-A 결합 단백질)에 연결시킬 수 있다. 형질감염 실험을 관련 세포주에서 수행할 수 있고, 단백질 생산을 형질감염 후 12시간째, 24시간째, 48시간째, 72시간째 및 7일째에 ELISA로 검정할 수 있다.
- [0182] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 1차 작제물은 폴리A-G 사중체(Quartet)를 포함하도록 디자인한다. G-사중체는 DNA 및 RNA 둘 다에서 G-풍부 서열에 의해 형성될 수 있는 구아닌 뉴클레오타이드의 사이클릭 수소 결합된 정렬이다. 이러한 하나의 실시형태에서, G-사중체는 폴리-A 테일의 말단에 혼입된다. 생성된 mmRNA 작제물은 안정성, 단백질 생산 및 다양한 시점에서의 반감기를 포함하는 기타 파라미터에 대해 검정한다. 폴리A-G 사중체는 120개 뉴클레오타이드의 폴리-A 테일만을 단독으로 사용하였을 때 관찰된 단백질 생산의 적어도 75%에 상당하는 단백질 생산을 야기하는 것으로 발견되었다.
- [0183] **정량**
- [0184] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA는 하나 이상의 체액으로부터 유래된 엑소솜에서 정량될 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "체액"은 말초혈, 혈청, 혈장, 복수, 뇨, 뇌척수액(CSF), 담, 타액, 골수, 관절낭액, 수양액, 양수, 귀지, 모유, 기관지폐포 세척액, 정액, 전립선액, 쿠퍼액 또는 사정전 요도액, 땀, 대변, 모발, 누액, 낭액, 흉수 및 복수, 심낭액, 림프, 미즙, 유미, 담즙, 간질액, 월경, 농, 피지, 구토물, 질 분비물, 점막 분비물, 물변, 땀, 동/강으로부터의 세척액, 기관지폐 흡입액, 포배강액 및 체대혈을 포함한다. 대안으로, 엑소솜은 폐, 심장, 췌장, 위, 창자, 방광, 신장, 난소, 고환, 피부, 결장, 유방, 전립선, 뇌, 식도, 간 및 태반으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 기관으로부터 회수될 수 있다.

[0185] 정량 방법에서, 2mL 이하의 샘플이 피험자로부터 수득되고, 엑소솜은 크기 배제 크로마토그래피, 밀도 구배 원심분리, 분별 원심분리, 나노막 한외여과, 면역흡착 포획, 친화성 정제, 미세유체 분리 또는 이들의 조합에 의해 분리된다. 분리에서, 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA의 수준 또는 농도는 투여되는 작제물의 발현 수준, 존재, 부재, 절두 또는 변경일 수 있다. 수준이 하나 이상의 임상 표현형 또는 사람 질환 바이오마커와 상관관계가 있는 것이 유리하다. 검정은 특정한 프로브, 세포측정법, qRT-PCR, 실시간 PCR, PCR, 유세포 측정법, 전기영동, 질량분광분석 또는 이들의 조합을 사용하여 수행할 수 있는 한편, 엑소솜은 효소연계 면역흡착 검정(ELISA) 방법과 같은 면역조직화학 방법을 사용하여 분리시킬 수 있다. 엑소솜은 또한 크기 배제 크로마토그래피, 밀도 구배 원심분리, 분별 원심분리, 나노막 한외여과, 면역흡착 포획, 친화성 정제, 미세유체 분리 또는 이들의 조합에 의해 분리시킬 수도 있다.

[0186] 상기 방법들은 잔류하거나 전달되는 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA의 수준을 실시간으로 모니터링할 수 있는 능력을 조사자에게 제공한다. 이는 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA가 구조적 또는 화학적 변형으로 인해 내인성 형태와 상이하기 때문에 가능하다.

[0187] **II. mmRNA의 디자인 및 합성**

[0188] 본 발명에 따라 사용하기 위한 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA는 화학적 합성, 일반적으로 시험관 내 전사(IVT)로 명명되는 효소적 합성 또는 보다 긴 전구체의 효소적 또는 화학적 절단 등을 포함하나 이에 제한되지 않은 임의의 입수가 가능한 기술에 따라서 제조할 수 있다. RNA의 합성 방법은 당업계에 공지되어 있다 [참조: 예를 들면, Gait, M.J. (ed.) *Oligonucleotide synthesis: a practical approach*, Oxford [Oxfordshire], Washington, DC: IRL Press, 1984; 및 Herdewijn, P. (ed.) *Oligonucleotide synthesis: methods and applications*, Methods in Molecular Biology, v. 288 (Clifton, N.J.) Totowa, N.J.: Humana Press, 2005; 이들 둘 다는 본원에서 참조로 인용된다].

[0189] 본 발명의 1차 작제물의 디자인 및 합성 방법은 일반적으로 유전자 작제 단계, mRNA 생산 단계(변형되거나 변형되지 않음) 및 정제 단계를 포함한다. 효소적 합성 방법에서, 관심 폴리펩타이드를 암호화하는 표적 폴리뉴클레오타이드 서열을 cDNA 주형을 생성하도록 증폭될 벡터 내로 혼입하기 위해 먼저 선택한다. 임의로, 표적 폴리뉴클레오타이드 서열 및/또는 임의의 플랭킹 서열을 코돈 최적화시킬 수 있다. 이어서, cDNA 주형을 사용하여 시험관내 전사(IVT)를 통해mRNA를 생산한다. 생산 후, mRNA는 정제 및 정화 과정을 겪을 수 있다. 이러한 단계들은 하기에서 보다 상세히 제공된다.

[0190] **유전자 작제**

[0191] 유전자 작제 단계는 유전자 합성, 벡터 증폭, 플라스미드 정제, 플라스미드 선형화와 정화 및 cDNA 합성과 정화를 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0192] **유전자 합성**

[0193] 일단 관심 또는 표적 대상의 폴리펩타이드가 생산을 위해 선택되면, 1차 작제물을 디자인한다. 1차 작제물 내에서, 관심 대상의 폴리펩타이드를 암호화하는 연결된 뉴클레오타이드의 제1 영역을 선택된 핵산(DNA 또는 RNA)의 오픈 리딩 프레임(open reading frame; ORF)을 사용하여 작제할 수 있다. ORF는 야생형 ORF, 이의 동종형, 변이체 또는 단편을 포함할 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "오픈 리딩 프레임" 또는 "ORF"는 관심 대상의 폴리펩타이드를 암호화할 수 있는 핵산(DNA 또는 RNA)을 지칭하고자 한다. ORF는 흔히 개시 코돈 ATG로 시작하고 넌센스(nonsense) 또는 종결 코돈 또는 신호로 종결된다.

[0194] 추가로, 제1 영역의 뉴클레오타이드 서열은 코돈 최적화될 수 있다. 코돈 최적화 방법은 당업계에 공지되어 있고 몇몇 목표 중 하나 이상을 달성하려는 노력에 유용할 수 있다. 상기 목표는 적절한 폴딩을 보장하기 위해 표적 및 숙주 유기체에서 코돈 빈도를 매치시키고, mRNA 안정성을 증가시키거나 2차 구조를 감소시키기 위해 GC 함량을 편중시키고, 해독 속도를 조정하여 단백질의 다양한 도메인이 적절하게 폴딩되도록 하거나 mRNA 내의 2차 구조 문제를 감소시키거나 제거하기 위해, 유전자 작제 또는 발현을 손상시킬 수 있는 탠덤 반복 코돈(tandem repeat condon) 또는 염기 런(base runs)을 최소화하고, 전사 및 해독 제어 영역을 맞춤 제조하고, 단백질 이동(trafficking) 서열을 삽입하거나 제거하고, 암호화된 단백질에 해독후 변형 부위(예: 글리코실화 부위)를 제거/첨가하고, 단백질 도메인을 첨가, 제거 또는 셔플링(shuffle)하고, 제한 부위를 삽입하거나 결실시키고, 리보솜 결합 부위 및 mRNA 분해 부위를 변형시키는 것을 포함한다. 코돈 최적화 도구, 알고리즘 및 서비스는 당업계에 공지되어 있고, 비제한적 예는 GeneArt(Life Technologies) 및/또는 DNA2.0(Menlo Park CA)로부터의 서비스를 포함한다. 하나의 실시형태에서, ORF 서열은 최적화 알고리즘을 사용하여 최적화시킨다. 각각

의 아미노산에 대한 코돈 옵션은 표 1에 제시된다.

표 1

코돈 옵션

아미노산	단일 문자 코드	코돈 옵션
이소류신	I	ATT, ATC, ATA
류신	L	CTT, CTC, CTA, CTG, TTA, TTG
발린	V	GTT, GTC, GTA, GTG
페닐알라닌	F	TTT, TTC
메티오닌	M	ATG
시스테인	C	TGT, TGC
알라닌	A	GCT, GCC, GCA, GCG
글리신	G	GGT, GGC, GGA, GGG
프롤린	P	CCT, CCC, CCA, CCG
트레오닌	T	ACT, ACC, ACA, ACG
세린	S	TCT, TCC, TCA, TCG, AGT, AGC
티로신	Y	TAT, TAC
트립토판	W	TGG
글루타민	Q	CAA, CAG
아스파라긴	N	AAT, AAC
히스티딘	H	CAT, CAC
글루탐산	E	GAA, GAG
아스파르트산	D	GAT, GAC
라이신	K	AAA, AAG
아르기닌	R	CGT, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG
셀레노시스테인	Sec	셀레노시스테인 삽입 요소(SECIS)의 존재하에 mRNA 중의 UGA
종결 코돈	종결	TAA, TAG, TGA

[0195]

[0196]

하나의 실시형태에서, 변형된 mRNA 뉴클레오타이드 서열은 당업계에 공지되어 있고/있거나 본원에 기술된 방법으로 코돈 최적화할 수 있다. 서열이 코돈 최적화된 후, 이를 제한 부위를 함유하는 영역에 대해 추가로 평가할 수 있다. 제한 부위를 상기 서열로부터 제거하기 위해, 상기 제한 부위 내의 적어도 하나의 뉴클레오타이드를 다른 뉴클레오타이드로 대체시킬 수 있지만, 뉴클레오타이드의 대체는 코돈 최적화된 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화되는 아미노산 서열을 변경한다.

[0197]

본 발명의 일부 실시형태에서 유익한 것으로 고려될 수 있는 특징은 1차 작제물에 의해 암호화될 수 있고 제1 또는 제2 플랭킹 영역으로서 ORF를 플랭킹할 수 있다. 플랭킹 영역은 ORF의 최적화 전 및/또는 후에 1차 작제물 내로 혼입될 수 있다. 1차 작제물이 5' 및 3' 플랭킹 영역 둘 다를 함유하는 것이 요구되지는 않는다. 이러한 특징의 예는 비해독 영역(UTR), 코작(Kozak) 서열, 올리고(dT) 서열 및 검출가능한 태그를 포함하나 이에 제한되지 않으며, XbaI 인식을 가질 수 있는 다중 클로닝 부위를 포함할 수 있다.

[0198]

일부 실시형태에서, 5' UTR 및/또는 3' UTR이 플랭킹 영역으로서 제공될 수 있다. 다수의 5' 또는 3' UTR이 상기 플랭킹 영역에 포함될 수 있고 동일하거나 상이한 서열의 플랭킹 영역에 포함될 수 있다. 아무 것도 포함하지 않는 플랭킹 영역의 임의의 부분은 코돈 최적화될 수 있고, 어떠한 것이라도 코돈 최적화 전 및/또는 후에 하나 이상의 상이한 구조적 또는 화학적 변형을 독립적으로 함유할 수 있다. 특징들의 조합이 제1 및 제2 플랭킹 영역에 포함될 수 있고 다른 특징들 내에 함유될 수 있다. 예를 들면, ORF는 강력한 코작 해독 개시 신호를 포함할 수 있는 5' UTR 및/또는 폴리-A 테일의 주형화된 첨가를 위한 올리고(dT) 서열을 포함할 수 있는 3' UTR에 의해 플랭킹될 수 있다.

[0199]

2012년 12월 14일자로 출원된 동시계류중인 미국 가특허 출원 제61/737,130호의 표 2 및 3은 플랭킹 영역으로서 본 발명의 1차 작제물에서 이용될 수 있는 예시적 UTR의 목록을 제공한다. A, T, C 또는 G를 포함하는 하나 이상의 뉴클레오타이드가 말단에 첨가되거나 이로부터 제거된 5' 또는 3'UTR의 변이체를 이용할 수 있다.

- [0200] 열거된 UTR은 예시이며 어떠한 유전자로부터의 어떠한 UTR이라도 1차 작제물의 각각의 제1 또는 제2 영역 내로 혼입시킬 수 있음이 이해되어야 한다. 게다가, 임의의 공지된 유전자의 다수의 야생형 UTR이 이용될 수 있다. 또한, 본 발명의 범주 내에서 야생형 유전자의 변이체가 아닌 인공 UTR이 제공된다. 이러한 UTR 및 이의 부분은 이들이 선택되었거나 배향 또는 위치가 변경될 수 있는 전사체에서와 동일한 배향으로 위치될 수 있다. 따라서, 5' 또는 3' UTR은 하나 이상의 다른 5' UTR 또는 3' UTR과 함께 역전, 단축, 연장될 수 있거나 키메라가 될 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "변경된"이란 용어는 UTR 서열과 관련되는 경우 UTR이 기준 서열과 비교하여 어떠한 면에서 변화된 것을 의미한다. 예를 들면, 3' 또는 5' UTR은 상기 교시한 바와 같이 야생형 또는 본래의 UTR과 비교해 배향 또는 위치의 변화에 의해 변경될 수 있거나 추가적 뉴클레오타이드의 포함, 뉴클레오타이드의 결실, 뉴클레오타이드의 교환 또는 전위에 의해 변경될 수 있다. "변경된" UTR(3'인지 5'인지에 상관없이)을 생성하는 이러한 변화 중 어느 것이든 변이체 UTR을 포함한다.
- [0201] 하나의 실시형태에서, 5' 또는 3' UTR과 같은 이중, 삼중 또는 사중 UTR이 사용될 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "이중" UTR은 동일한 UTR의 2개 카피가 연속하여 또는 실질적으로 연속하여 암호화되어 있는 것이다. 예를 들면, 이중 베타-글로빈 3' UTR은 미국 특허 공보 제20100129877호(이의 내용은 전부 본원에서 참조로 인용된다)에 기술된 바와 같이 사용될 수 있다.
- [0202] 또한, 본 발명의 범주 내에서 패턴화된(patterned) UTR이 제공된다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "패턴화된 UTR"은 1회, 2회 또는 3회 이상 반복된 ABABAB 또는 AABBAABBAABB 또는 ABCABCABC 또는 이의 변이체와 같은 반복 또는 교호 패턴을 반영하는 UTR이다. 이러한 패턴들에 있어, 각각의 문자 A, B 또는 C는 뉴클레오타이드 수준에서 상이한 UTR을 나타낸다.
- [0203] 하나의 실시형태에서, 플랭킹 영역은 단백질이 공통의 기능, 구조, 특성을 공유하는 전사체의 계열(family)로부터 선택된다. 예를 들면, 관심 대상의 폴리펩타이드는 특정한 세포 또는 조직에서 발현되거나 발달 동안 어느 시점에서 발현되는 단백질 계열에 속할 수 있다. 이들 유전자 중 어느 하나로부터의 UTR은 동일하거나 상이한 단백질 계열의 임의의 다른 UTR과 교환되어 새로운 키메라 1차 전사체를 생성시킬 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "단백질 계열"은 광의적 의미에서 적어도 하나의 기능, 구조, 특징, 국소화, 기원 또는 발현 패턴을 공유하는 2종 이상의 관심 대상의 폴리펩타이드의 그룹을 지칭한다.
- [0204] 최적화(경우에 따라) 후, 1차 작제물 성분을 재구성하고, 플라스미드, 바이러스, 코스미드 및 인공 염색체과 같으나 이에 제한되지 않는 벡터로 형질전환시킨다. 예를 들면, 최적화된 작제물을 재구성하고 화학적 적격 이. 콜라이, 효모, 뉴로스포라, 옥수수, 초파리 등으로 형질전환시키는데, 여기서 높은 카피 플라스미드-유사 또는 염색체 구조가 본원에 기술된 방법에 의해 발생한다.
- [0205] **종결 코돈**
- [0206] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 1차 작제물은 3' 비해독 영역(UTR) 전에 적어도 2개의 종결 코돈을 포함할 수 있다. 종결 코돈은 TGA, TAA 및 TAG로부터 선택될 수 있다. 하나의 실시형태에서, 본 발명의 1차 작제물은 종결 코돈 TGA 및 하나의 추가 종결 코돈을 포함한다. 추가의 실시형태에서, 추가의 종결 코돈은 TAA일 수 있다.
- [0207] 다른 실시형태에서, 본 발명의 1차 작제물은 3' 비해독 영역(UTR) 전에 3개의 종결 코돈을 포함할 수 있다.
- [0208] **벡터 증폭**
- [0209] 이어서, 1차 작제물을 함유하는 벡터를 증폭시키고, 플라스미드를 인비트로젠(Invitrogen) PURELINK™ HiPure Maxiprep 키트(캘리포니아주 칼스바드)를 사용하는 맥시 제조(maxi prep)와 같은 이에 제한되지 않는 당업계에 공지된 방법을 사용하여 단리시키고 정제한다.
- [0210] **플라스미드 선형화**
- [0211] 이어서, 플라스미드를 제한 효소 및 완충액의 사용과 같으나 이에 제한되지 않는 당업계에 공지된 방법을 사용하여 선형화할 수 있다. 선형화 반응은 예를 들면 인비트로젠 PURELINK™ PCR 마이크로 키트(캘리포니아주 칼스바드), 및 강음이온 교환 HPLC, 약음이온 교환 HPLC, 역상 HPLC(RP-HPLC) 및 소수성 상호작용 HPLC(HIC-HPLC) 및 인비트로젠의 표준 PURELINK™ PCR 키트(캘리포니아주 칼스바드)와 같으나 이에 제한되지 않는 HPLC 기반 정제 방법을 포함하는 방법을 사용하여 정제할 수 있다. 정제 방법은 실시된 선형화 반응의 크기에 따라 변형될 수 있다. 이어서, 선형화된 플라스미드를 사용하여 시험관내 전사(IVT) 반응을 위한 cDNA를 생성시킨다.

- [0212] *cDNA* 주형 합성
- [0213] *cDNA* 주형은 선형화된 플라스미드를 폴리머라제 연쇄 반응(PCR)시켜 합성할 수 있다. 2012년 12월 14일자로 출원된 미국 가특허 출원 제61/737,130호의 표 4는 본 발명의 PCR 반응에서 유용할 수 있는 프라이머 및 프로브의 목록을 제공한다. 상기 목록은 완전한 것이 아니며 임의의 증폭을 위한 프라이머-프로브 디자인은 당업계의 기술 내에 있음이 이해되어야 한다. 프로브는 또한 표적 분자에 대한 염기쌍형성 정확성 및 염기쌍형성 강도를 증가시키기 위해 화학적으로 변형된 염기를 함유할 수 있다.
- [0214] 하나의 실시형태에서, *cDNA*는 전사되기 전에 서열결정 분석될 수 있다.
- [0215] *mRNA* 생산
- [0216] *mRNA* 또는 *mmRNA* 생산 과정은 시험관내 전사, *cDNA* 주형 제거 및 RNA 정화 및 *mRNA* 캡핑 및/또는 테일링 반응(tailing reaction)을 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0217] 시험관내 전사
- [0218] 이전 단계에서 생성된 *cDNA*를 시험관내 전사(IVT) 시스템을 사용하여 전사할 수 있다. 상기 시스템은 전형적으로 전사 완충액, 뉴클레오타이드 트리포스페이트(NTP), RNase 저해제 및 폴리머라제를 포함한다. NTP는 사내에서 제조될 수 있거나 공급처로부터 선택될 수 있거나 본원에 기술된 바와 같이 합성될 수 있다. NTP는 천연 및 비천연(변형된) NTP를 포함하는 본원에 기술된 것들로부터 선택될 수 있지만 이에 제한되지 않는다. 폴리머라제는 T7 RNA 폴리머라제, T3 RNA 폴리머라제, 및 변형된 핵산을 혼입시킬 수 있는 폴리머라제와 같으나 이에 제한되지 않는 돌연변이 폴리머라제로부터 선택될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0219] RNA 폴리머라제
- [0220] 어떠한 수의 RNA 폴리머라제 또는 변이체라도 본 발명의 1차 작제물의 디자인에서 사용될 수 있다.
- [0221] RNA 폴리머라제는 이러한 RNA 폴리머라제 서열의 아미노산을 삽입하거나 결실시켜 변형시킬 수 있다. 비제한적 예로서, RNA 폴리머라제는 변형되지 않은 RNA 폴리머라제와 비교해서 증가된 2'-변형된 뉴클레오타이드 트리포스페이트 혼입 능력을 나타내도록 변형시킬 수 있다[참조: 국제 공보 제W02008078180호 및 미국 특허 제 8,101,385호; 이들의 전문은 본원에서 참조로 인용된다].
- [0222] 변이체는 RNA 폴리머라제를 진화시키고(evolver), RNA 폴리머라제 아미노산 및/또는 핵산 서열을 최적화하고/하거나 당업계에 공지된 다른 방법을 사용함으로써 획득할 수 있다. 비제한적 예로서, T7 RNA 폴리머라제 변이체는 에스벨트(Esvelt) 등[참조: Nature (2011) 472(7344):499-503; 이의 전문은 본원에서 참조로 인용된다]에 의해 제시된 연속적 방향성 진화 시스템(continuous directed evolution system)을 사용하여 진화시킬 수 있고, 이때 T7 RNA 폴리머라제의 클론은 93번 위치에서 라이신에서 트레오닌의로의 치환(K93T), I4M, A7T, E63V, V64D, A65E, D66Y, T76N, C125R, S128R, A136T, N165S, G175R, H176L, Y178H, F182L, L196F, G198V, D208Y, E222K, S228A, Q239R, T243N, G259D, M267I, G280C, H300R, D351A, A354S, E356D, L360P, A383V, Y385C, D388Y, S397R, M401T, N410S, K450R, P451T, G452V, E484A, H523L, H524N, G542V, E565K, K577E, K577M, N601S, S684Y, L699I, K713E, N748D, Q754R, E775K, A827V, D851N 또는 L864F와 같으나 이에 제한되지 않는 적어도 하나의 돌연변이를 암호화할 수 있다. 다른 비제한적 예로서, T7 RNA 폴리머라제 변이체는 적어도 미국 공보 제20100120024호 및 제20070117112호(이들의 전문은 본원에서 참조로 인용된다)에 기술된 바와 같은 돌연변이를 암호화할 수 있다. RNA 폴리머라제의 변이체는 또한 치환 변이체, 보존적 아미노산 치환, 삽입 변이체, 결실 변이체 및/또는 공유 유도체를 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0223] 하나의 실시형태에서, 1차 작제물은 야생형 또는 변이체 RNA 폴리머라제에 의해 인식되도록 디자인할 수 있다. 이렇게 하면서, 1차 작제물을 야생형 또는 모체 1차 작제물로부터 서열 변화된 부위 또는 영역을 함유하도록 변형시킬 수 있다.
- [0224] 하나의 실시형태에서, 1차 작제물은 RNA 폴리머라제 결합 또는 인식 부위의 상류, RNA 폴리머라제 결합 또는 인식 부위의 하류, TATA 박스 서열의 상류, 1차 작제물의 TATA 박스 서열의 하류이나 1차 작제물의 암호화 영역의 상류, 5'UTR의 내, 5'UTR 전 및/또는 5'UTR 후에 적어도 하나의 치환 및/또는 삽입을 포함하도록 디자인할 수 있다.
- [0225] 하나의 실시형태에서, 1차 작제물의 5'UTR은 동일한 염기의 뉴클레오타이드의 적어도 하나의 영역 및/또는 스트링의 삽입에 의해 재체될 수 있다. 뉴클레오타이드의 영역 및/또는 스트링은 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도

5개, 적어도 6개, 적어도 7개 또는 적어도 8개의 뉴클레오타이드를 포함할 수 있고, 뉴클레오타이드는 천연 및/또는 비천연일 수 있다. 비제한적 예로서, 뉴클레오타이드의 그룹은 5 내지 8개의 아데닌, 사이토신, 티민, 본원에 기술된 다른 임의의 뉴클레오타이드의 스트링 및/또는 이들의 조합을 포함할 수 있다.

[0226] 하나의 실시형태에서, 1차 작제물의 5'UTR은 아데닌, 사이토신, 티민, 본원에 기술된 다른 임의의 뉴클레오타이드 및/또는 이들의 조합과 같으나 이에 제한되지 않는 2개의 상이한 염기의 뉴클레오타이드의 적어도 2개의 영역 및/또는 스트링의 삽입에 의해 대체될 수 있다. 예를 들면, 5'UTR은 5 내지 8개의 아데닌 염기의 삽입에 이어서 5 내지 8개의 사이토신 염기의 삽입에 의해 대체될 수 있다. 다른 예에서, 5'UTR은 5 내지 8개의 사이토신 염기의 삽입에 이어서 5 내지 8개의 아데닌 염기의 삽입에 의해 대체될 수 있다.

[0227] 하나의 실시형태에서, 1차 작제물은 RNA 폴리머라제에 의해 인식될 수 있는 전사 개시 부위의 하류에 적어도 하나의 치환 및/또는 삽입을 포함할 수 있다. 비제한적 예로서, 적어도 하나의 치환 및/또는 삽입은 전사 개시 부위의 바로 하류의 영역(+1 내지 +6과 같으나 이에 제한되지 않는)에서 적어도 하나의 핵산을 치환시킴으로써 전사 개시 부위의 하류에서 일어날 수 있다. 전사 개시 부위의 바로 하류에서의 뉴클레오타이드 영역의 변화는 개시 속도에 영향을 줄 수 있고 명백한 뉴클레오타이드 트리포스페이트(NTP) 반응 상수값을 증가시킬 수 있고 초기 전사 동안 전사 복합체로부터의 짧은 전사체의 해리를 증가시킬 수 있다[참조: Briebe et al, Biochemistry (2002) 41: 5144-5149; 이의 전문은 본원에서 참조로 인용된다]. 적어도 하나의 핵산의 변형 및/또는 삽입은 핵산 서열의 잠재성 돌연변이(silent mutation)를 유발할 수 있거나 아미노산 서열의 돌연변이를 유발할 수 있다.

[0228] 하나의 실시형태에서, 1차 작제물은 전사 개시 부위의 하류에서 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개, 적어도 10개, 적어도 11개, 적어도 12개 또는 적어도 13개의 구아닌 염기의 치환을 포함할 수 있다.

[0229] 하나의 실시형태에서, 1차 작제물은 전사 개시 부위의 바로 하류에 있는 영역에 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개 또는 적어도 6개 구아닌 염기의 치환을 포함할 수 있다. 비제한적 예로서, 상기 영역 내의 뉴클레오타이드가 GGGAGA인 경우, 구아닌 염기는 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개 또는 적어도 4개의 아데닌 뉴클레오타이드로 치환될 수 있다. 다른 비제한적 예로서, 상기 영역 내의 뉴클레오타이드가 GGGAGA인 경우, 구아닌 염기는 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개 또는 적어도 4개의 사이토신 염기로 치환될 수 있다. 또 다른 비제한적 예로서, 상기 영역 내의 뉴클레오타이드가 GGGAGA인 경우, 구아닌 염기는 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개 또는 적어도 4개의 티민 및/또는 본원에 기술된 임의의 뉴클레오타이드로 치환될 수 있다.

[0230] 하나의 실시형태에서, 1차 작제물은 개시 코돈의 상류에 적어도 하나의 치환 및/또는 삽입을 포함할 수 있다. 명료성의 목적상, 당업자는 개시 코돈이 단백질 암호화 영역의 첫번째 코돈인 반면에 전사 개시 부위는 전사가 시작하는 부위임을 이해할 것이다. 1차 작제물은 뉴클레오타이드 염기의 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개 또는 적어도 8개의 치환 및/또는 삽입을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 뉴클레오타이드 염기는 개시 코돈의 상류에 있는 1개, 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개 또는 적어도 5개의 위치에서 삽입되거나 치환될 수 있다. 삽입되고/되거나 치환되는 뉴클레오타이드는 동일한 염기(예를 들면, 모든 A 또는 모든 C 또는 모든 T 또는 모든 G), 2가지의 상이한 염기(예를 들면, A 및 C, A 및 T, 또는 C 및 T), 3가지의 상이한 염기(e.g., A, C 및 T 또는 A, C 및 T) 또는 적어도 4가지의 상이한 염기일 수 있다. 비제한적 예로서, 1차 작제물의 암호화 영역의 상류에서 구아닌 염기는 아데닌, 사이토신, 티민 또는 본원에 기술된 임의의 뉴클레오타이드로 치환될 수 있다. 다른 비제한적 예로서, 1차 작제물에서의 구아닌 염기의 치환은 전사 개시 부위의 하류 및 개시 코돈의 전에 있는 영역에 하나의 구아닌 염기가 남도록 디자인할 수 있다[참조: Esvelt et al. Nature (2011) 472(7344):499-503; 이의 전문은 본원에서 참조로 인용된다]. 비제한적 예로서, 적어도 5개의 뉴클레오타이드가 전사 개시 부위의 하류이나 개시 코돈의 상류에 있는 1개의 위치에 삽입될 수 있고, 적어도 5개의 뉴클레오타이드는 동일한 염기 유형일 수 있다.

[0231] cDNA 주형 제거 및 정화

[0232] cDNA 주형은 데옥시리보뉴클레아제 I(DNase I) 처리와 같으나 이에 제한되지 않는 당업계에 공지된 방법을 사용하여 제거할 수 있다. RNA 정화는 또한 Beckman Coulter(메사추세츠 덴버스)로부터의 AGENCOURT® CLEANSEQ® 시스템과 같으나 이에 제한되지 않는 정제 방법, 강음이온 교환 HPLC, 약음이온 교환 HPLC, 역상 HPLC(RP-HPLC) 및 소수성 상호작용 HPLC(HIC-HPLC)와 같으나 이에 제한되지 않는 HPLC 기반 정제 방법을 포함할 수 있다. .

- [0233] *캡핑 및/또는 테일링 반응*
- [0234] 상기 기본 구조물 또는 mmRNA는 또한 캡핑 및/또는 테일링 반응을 겪을 수 있다. 캡핑 반응이 당 분야에 공지된 방법에 의해 수행되어 상기 기본 구조물의 5' 말단에 5' 캡을 부가할 수 있다. 캡핑 방법은 백신 캡핑 요소(New England Biolabs, 미국 마이애미주 입스위치 소재)의 사용을 포함하지만, 이로 제한되지는 않는다.
- [0235] 폴리-A 테일링 반응은 2' O-메틸트랜스퍼라제를 포함하지만 이로 제한되지 않는 당 분야에 공지된 방법 및 본원에 기술된 방법에 의해 수행될 수 있다. cDNA로부터 생성된 기본 구조물이 폴리-T를 포함하지 않는 경우, 상기 기본 구조물을 세척하기 전에 상기 폴리-A-테일링 반응을 수행하는 것이 유리할 수 있다.
- [0236] *mRNA 정제*
- [0237] 기본 구조물 또는 mmRNA 정제는 mRNA 또는 mmRNA 세척, 품질 보증 및 품질 관리를 포함하지만 이로 제한되지는 않는다. mRNA 또는 mmRNA 세척은 AGENCOURT® 비드(Beckman Coulter Genomics, 미국 마이애미주 덴버 소재), 폴리-T 비드, LNA™ 올리고-T 캡처 탐침(EXIQON® Inc, 덴마크 베드바엑 소재), 또는 HPLC 기반 정제방법(이는 강한 음이온 교환 HPLC, 약한 음이온 교환 HPLC, 역상 HPLC(RP-HPLC) 및 소수성 상호작용 HPLC(HIC-HPLC)를 포함하지만 이로 제한되지는 않는다)을 포함하지만 이로 제한되지 않는 당 분야에 공지된 방법에 의해 수행될 수 있다. "정제된 mRNA 또는 mmRNA"와 같이 폴리뉴클레오타이드와 연관되어 사용되는 용어 "정제된"은 하나 이상의 오염물로부터 분리되는 것을 지칭한다. 본원에서 사용되는 "오염물"은 또 다른 물질을 부적합하거나 불순하거나 불량하게 만드는 임의의 물질이다. 따라서, 정제된 폴리뉴클레오타이드(예: DNA 및 RNA)는 자연에서 발견되는 것과는 상이한 형태 또는 세팅으로 존재하거나 처리 또는 정제방법을 거치기 전에 존재하는 것과는 상이한 형태 또는 세팅으로 존재한다.
- [0238] 품질 보증 및/또는 품질 관리는 겔 전기영동, UV 흡수, 또는 분석용 HPLC를 포함하지만 이로 제한되지 않는 방법들을 사용하여 수행될 수 있다.
- [0239] 또 다른 실시형태에서, 상기 mRNA 또는 mmRNA는 역전사효소-PCR을 포함하지만 이로 제한되지 않는 방법들에 의해 서열화될 수 있다.
- [0240] 하나의 실시형태에서, 상기 mRNA 또는 mmRNA는 자외선 가시광선 분광계(UV/Vis)를 포함하지만 이로 제한되지 않는 방법들을 사용하여 정량화될 수 있다. UV/Vis 분광계의 비제한적 예는 NANODROP® 분광계(ThermoFisher, 미국 마이애미주 월담 소재)이다. 상기 정량화된 mRNA 또는 mmRNA는 상기 mRNA 또는 mmRNA가 적절한 크기인지를 측정하고 상기 mRNA 또는 mmRNA의 분해가 전혀 일어나지 않는지를 점검하기 위해 분석될 수 있다. 상기 mRNA 및/또는 mmRNA의 분해는 아가로스 겔 전기영동, HPLC 기반 정제 방법들(이들은 강한 음이온 교환 HPLC, 약한 음이온 교환 HPLC, 역상 HPLC(RP-HPLC) 및 소수성 상호작용 HPLC(HIC-HPLC)를 포함하지만 이로 제한되지는 않는다), 액체 크로마토그래피-질량 분광법(LCMS), 모세관 전기영동(CE) 및 모세관 겔 전기영동(CGE)을 포함하지만 이로 제한되지 않는 방법들에 의해 점검될 수 있다.
- [0241] *신호 서열*
- [0242] 상기 기본 구조물 또는 mmRNA는 또한 상기 폴리펩타이드의 치료 관련 위치로의 수송(trafficking)을 용이하게 하는 추가의 특징을 암호화할 수 있다. 단백질 수송을 돕는 이러한 특징 중 하나가 신호 서열이다. 본원에서 사용되는 "신호 서열" 또는 "신호 펩타이드"는 각각 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드이며, 이는 각각 상기 코딩 영역 또는 암호화된 폴리펩타이드의 5' (또는 N-말단)에 혼입되는 길이 약 9 내지 200개의 뉴클레오타이드(3 내지 60개의 아미노산)이다. 이들 서열의 첨가로 인해, 상기 암호화된 폴리펩타이드가 하나 이상의 분비 경로를 통해 상기 세포체로 수송된다. 일부 신호 펩타이드는 상기 단백질들이 운송된 후 신호 펩타이드에 의해 상기 단백질로부터 분리된다.
- [0243] 신호 서열은, 본원에 참조로 인용되는, 2012년 12월 14일자로 출원되어 계류 중인 미국 가특허원 제61/737,130 호에 열거된 것들 중의 임의의 것으로부터 선택될 수 있다. 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 기본 구조물 또는 mmRNA에 의한 암호화를 위해 혼입될 수 있는 단백질 신호 서열은 α-1-항트립신, G-CSF, 인자 IX, 프로락틴, 알부민, HMMSP38, 오르니틴 카바모일트랜스퍼라제, 시토크롬 C 옥시다제 서브유닛 8A, 타입 III, 박테리아성, 바

이러스성, 분비 신호, Vrg-6, PhoA, OmpA, STI, STII, 아밀라제, 알파 인자, 엔도글루카나제 V, 분비 신호, 진균성 및 피브로넥틴으로부터의 신호 서열을 포함한다.

[0244] 상기 표에서, SS는 분비 신호이고, MLS는 미토콘드리아 리더 신호이다. 본 발명의 기본 구조물 또는 mmRNA는 상기 신호 서열 또는 분획 또는 이들의 변형체 중의 임의의 것을 암호화하도록 설계될 수 있다. 이들 서열은 상기 폴리펩타이드 코딩 영역의 초입, 중간 또는 말단에, 또는 대안으로 인접 영역 내에 포함될 수 있다.

[0245] 본 발명에서 사용될 수 있는 추가의 신호 서열은, 예를 들면, <http://www.signalpeptide.de/> or <http://proline.bic.nus.edu.sg/spdb/>에서 발견되는 것들과 같은 데이터베이스에 교시된 것들을 포함한다. 미국 특허 제8,124,379호, 제7,413,875호 및 제7,385,034호에 기술된 것들 또한 본 발명의 범위 내에 속하고, 상기 특허 각각의 내용은 전문이 본원에 참조로 인용된다.

[0246] 표적 선택

[0247] 본 발명에 따르면, 상기 기본 구조물은 적어도, 하나 이상의 관심 폴리펩타이드를 암호화하는 연결된 뉴클레오사이드의 제1 영역을 포함한다. 본 발명의 관심 폴리펩타이드 또는 "표적"은 하기 표 2에 열거하였다. 표 2에는, 관심 폴리펩타이드를 암호화하는 유전자의 명칭 및 설명 이외에도, ENSEMBL 전사 ID(ENST), ENSEMBL 단백질 ID(ENSP) 및, 입수 가능한 경우, 최적화된 서열 ID(OPT SEQ ID)가 제시되어 있다. 임의의 특정한 유전자의 경우, 하나 이상의 변형 또는 동형 단백질이 존재할 수 있다. 이들이 존재하는 경우, 이들 역시 상기 표에 제시하였다. 당 분야의 숙련가들은 표에 기재된 것이 잠재적 인접 영역임을 이해할 것이다. 이들은 상기 ORF 또는 코딩 영역의 5' (업스트림) 또는 3' (다운스트림)에 각각의 ENST 전사로 암호화된다. 상기 코딩 영역은 상기 ENSP 서열을 교시함으로써 명확하고 특정하게 기술된다. 결과적으로, 상기 단백질을 암호화하는 인접부를 교시하는 서열이 인접 영역으로 간주된다. 또한, 하나 이상의 이용 가능한 데이터베이스 또는 알고리즘을 사용함으로써 상기 5' 및 3' 인접 영역들을 추가로 특성화할 수 있다. 데이터베이스는 상기 ENST 전사의 인접 영역에 포함된 특징들에 대해 주석을 달고 있으며, 이들은 당 분야에서 입수 가능하다.

표 2

표적

표적	유전자	설명	ENST	전사 서열 번호	ENSP	단백 질 서열 번호
1	LDLR	저밀도 지단백질 수용체	455727	1	397829	17
2	LDLR	저밀도 지단백질 수용체	561343	2	454147	18
3	LDLR	저밀도 지단백질 수용체	558518	3	454071	19
4	LDLR	저밀도 지단백질 수용체	558013	4	453346	20
5	LDLR	저밀도 지단백질 수용체	535915	5	440520	21
6	LDLR	저밀도 지단백질 수용체	545707	6	437639	22
7	LDLR1_D331E PCSK9 돌연변이	저밀도 지단백질 수용체/PCSK9 돌연변이	없음	7	없음	--
8	LDLR1_L339D PCSK9 돌연변이	저밀도 지단백질 수용체/PCSK9 돌연변이	없음	8	없음	--
9	LDLR1_N316A PCSK9 돌연변이	저밀도 지단백질 수용체/PCSK9 돌연변이	없음	9	없음	--
10	LDLR1_E317A PCSK9 돌연변이	저밀도 지단백질 수용체/PCSK9 돌연변이	없음	10	없음	--
11	LDLR1_Y336A PCSK9 돌연변이	저밀도 지단백질 수용체/PCSK9 돌연변이	없음	11	없음	--
12	LDLR1_4A PCSK9 돌연변이	저밀도 지단백질 수용체/PCSK9 돌연변이	없음	12	없음	--
13	CYP7A1	콜레스테롤 7 알파 수산화효소	없음	13 (서열 번호 39, 40 및 41을 포함한다)	없음	23
14	PCSK9	전구단백질 전환효소 서브틸리신/객신 타입 9	543384	14	441859	24
15	PCSK9	전구단백질 전환효소 서브틸리신/객신 타입 9	452118	15	401598	25

[0248]

16	PCSK9	전구단백질 전환효소 서브틸리신/객신 타입 9	302118	16	303208	26
----	-------	--------------------------	--------	----	--------	----

[0249]

[0250]

하나의 실시형태에서, 본 발명의 표적은 2012년 4월 2일자로 출원되고 발명의 명칭이 생명공학 의약품을 제조하기 위한 변형된 폴리뉴클레오타이드(Modified Polynucleotides for the Production of Biologics)인 미국 특허허원 제61/618,862호; 2012년 4월 10일자로 출원되고 발명의 명칭이 생명공학 의약품 제조를 위한 변형된 폴리뉴클레오타이드인 미국 특허허원 제61/681,645호; 2012년 12월 14일자로 출원되고 발명의 명칭이 생명공학 의약품 제조를 위한 변형된 폴리뉴클레오타이드인 미국 특허허원 제61/737,130호; 2012년 4월 2일자로 출원되고 발명의 명칭이 항체를 제조하기 위한 변형된 폴리뉴클레오타이드(Modified Polynucleotides for the Production of Antibodies)인 미국 특허허원 제61/618,866호; 2012년 8월 10일자로 출원되고 발명의 명칭이 항체를 제조하기 위한 변형된 폴리뉴클레오타이드인 미국 특허허원 제61/681,647호; 2012년 12월 14일자로 출원되고 발명의 명칭이 항체를 제조하기 위한 변형된 폴리뉴클레오타이드인 미국 특허허원 제61/737,134호; 2012년 4월 2일자로 출원되고 발명의 명칭이 백신을 제조하기 위한 변형된 폴리뉴클레오타이드(Modified Polynucleotides for the Production of Vaccines)인 미국 특허허원 제61/618,868호; 2012년 8월 10일자로 출

원되고 발명의 명칭이 백신을 제조하기 위한 변형된 폴리뉴클레오타이드인 미국 가특허원 제61/681,648호; 2012년 12월 14일자로 출원되고 발명의 명칭이 백신을 제조하기 위한 변형된 폴리뉴클레오타이드인 미국 가특허원 제61/737,135호; 2012년 4월 2자로 출원되고 발명의 명칭이 치료용 단백질 및 펩타이드를 제조하기 위한 변형된 폴리뉴클레오타이드(Modified Polynucleotides for the Production of Therapeutic Proteins and Peptides)인 미국 가특허원 제61/618,870호; 2012년 8월 10자로 출원되고 발명의 명칭이 치료용 단백질 및 펩타이드를 제조하기 위한 변형된 폴리뉴클레오타이드인 미국 가특허원 제61/681,649호; 2012년 12월 14자로 출원되고 발명의 명칭이 치료용 단백질 및 펩타이드를 제조하기 위한 변형된 폴리뉴클레오타이드인 미국 가특허원 제61/737,139호; 2012년 4월 2자로 출원되고 발명의 명칭이 분비단백질을 제조하기 위한 변형된 폴리뉴클레오타이드(Modified Polynucleotides for the Production of Secreted Proteins)인 미국 가특허원 제61/618,873호; 2012년 8월 10자로 출원되고 발명의 명칭이 분비단백질을 제조하기 위한 변형된 폴리뉴클레오타이드인 미국 가특허원 제61/681,650호; 2012년 12월 14자로 출원되고 발명의 명칭이 분비단백질을 제조하기 위한 변형된 폴리뉴클레오타이드인 미국 가특허원 제61/737,147호; 2012년 4월 2자로 출원되고 발명의 명칭이 세포막 단백질을 제조하기 위한 변형된 폴리뉴클레오타이드인 미국 가특허원 제61/618,878호; 2012년 8월 10자로 출원되고 발명의 명칭이 세포막 단백질을 제조하기 위한 변형된 폴리뉴클레오타이드인 미국 가특허원 제61/681,654호; 2012년 12월 14자로 출원되고 발명의 명칭이 세포막 단백질을 제조하기 위한 변형된 폴리뉴클레오타이드인 미국 가특허원 제61/737,152호; 2012년 4월 2자로 출원되고 발명의 명칭이 세포질 및 세포골격 단백질을 제조하기 위한 변형된 폴리뉴클레오타이드(Modified Polynucleotides for the Production of Cytoplasmic and Cytoskeletal Proteins)인 미국 가특허원 제61/618,885호; 2012년 8월 10자로 출원되고 발명의 명칭이 세포질 및 세포골격 단백질을 제조하기 위한 변형된 폴리뉴클레오타이드인 미국 가특허원 제61/681,658호; 2012년 12월 14자로 출원되고 발명의 명칭이 세포질 및 세포골격 단백질을 제조하기 위한 변형된 폴리뉴클레오타이드인 미국 가특허원 제61/737,155호; 2012년 4월 2자로 출원되고 발명의 명칭이 세포내막 결합 단백질을 제조하기 위한 변형된 폴리뉴클레오타이드(Modified Polynucleotides for the Production of Intracellular Membrane Bound Proteins)인 미국 가특허원 제61/618,896호; 2012년 7월 5자로 출원되고 발명의 명칭이 세포내막 결합 단백질을 제조하기 위한 변형된 폴리뉴클레오타이드인 미국 가특허원 제61/668,157호; 2012년 8월 10자로 출원되고 발명의 명칭이 세포내막 결합 단백질을 제조하기 위한 변형된 폴리뉴클레오타이드인 미국 가특허원 제61/681,661호; 2012년 12월 14자로 출원되고 발명의 명칭이 세포내막 결합 단백질을 제조하기 위한 변형된 폴리뉴클레오타이드인 미국 가특허원 제61/737,160호; 2012년 4월 2자로 출원되고 발명의 명칭이 핵 단백질을 제조하기 위한 변형된 폴리뉴클레오타이드(Modified Polynucleotides for the Production of Nuclear Proteins)인 미국 가특허원 제61/618,911호; 2012년 8월 10자로 출원되고 발명의 명칭이 핵 단백질을 제조하기 위한 변형된 폴리뉴클레오타이드인 미국 가특허원 제61/681,667호; 2012년 12월 14자로 출원되고 발명의 명칭이 핵 단백질을 제조하기 위한 변형된 폴리뉴클레오타이드인 미국 가특허원 제61/737,168호; 2012년 4월 2자로 출원되고 발명의 명칭이 단백질을 제조하기 위한 변형된 폴리뉴클레오타이드(Modified Polynucleotides for the Production of Proteins)인 미국 가특허원 제61/618,922호; 2012년 8월 10자로 출원되고 발명의 명칭이 단백질을 제조하기 위한 변형된 폴리뉴클레오타이드인 미국 가특허원 제61/681,675호; 2012년 12월 14자로 출원되고 발명의 명칭이 단백질을 제조하기 위한 변형된 폴리뉴클레오타이드인 미국 가특허원 제61/737,174호; 2012년 4월 2자로 출원되고 발명의 명칭이 사람 질병과 관련된 단백질을 제조하기 위한 변형된 폴리뉴클레오타이드(Modified Polynucleotides for the Production of Proteins Associated with Human Disease)인 미국 가특허원 제61/618,935호; 2012년 8월 10자로 출원되고 발명의 명칭이 사람 질병과 관련된 단백질을 제조하기 위한 변형된 폴리뉴클레오타이드인 미국 가특허원 제61/681,687호; 2012년 12월 14자로 출원되고 발명의 명칭이 사람 질병과 관련된 단백질을 제조하기 위한 변형된 폴리뉴클레오타이드인 미국 가특허원 제61/737,184호; 2012년 4월 2자로 출원되고 발명의 명칭이 사람 질병과 관련된 단백질을 제조하기 위한 변형된 폴리뉴클레오타이드인 미국 가특허원 제61/618,945호; 2012년 8월 10자로 출원되고 발명의 명칭이 사람 질병과 관련된 단백질을 제조하기 위한 변형된 폴리뉴클레오타이드인 미국 가특허원 제61/681,696호; 2012년 12월 14자로 출원되고 발명의 명칭이 사람 질병과 관련된 단백질을 제조하기 위한 변형된 폴리뉴클레오타이드인 미국 가특허원 제61/737,191호; 2012년 4월 2자로 출원되고 발명의 명칭이 사람 질병과 관련된 단백질을 제조하기 위한 변형된 폴리뉴클레오타이드인 미국 가특허원 제61/618,953호; 2012년 8월 10자로 출원되고 발명의 명칭이 사람 질병과 관련된 단백질을 제조하기 위한 변형된 폴리뉴클레오타이드인 미국 가특허원 제61/681,704호; 2012년 12월 14자로 출원되고 발명의 명칭이 사람 질병과 관련된 단백질을 제조하기 위한 변형된 폴리뉴클레오타이드인 미국 가특허원 제61/737,203호; 2013년 3월 9자로 출원되고 발명의 명칭이 생명공학 의약품 및 사람 질병과 관련된 단백질을 제조하기 위한 변형된 폴리뉴클레오타이드인 국제 출원 제PCT/US2013/030062호; 2013년 3월 9자로 출원되고 발명의 명칭이 변형된 폴리뉴클레오타이드인 국제 출원 제

PCT/US2013/030063호; 발명의 명칭이 분비 단백질을 제조하기 위한 변형된 폴리뉴클레오타이드인 국제 출원 제 PCT/US2013/030064호; 2013년 3월 9자로 출원되고 발명의 명칭이 막 단백질을 제조하기 위한 변형된 폴리뉴클레오타이드인 국제 출원 제PCT/US2013/030059호; 2013년 3월 9자로 출원되고 발명의 명칭이 세포골격 단백질을 제조하기 위한 변형된 폴리뉴클레오타이드인 국제 출원 제PCT/US2013/030066호; 2013년 3월 9자로 출원되고 발명의 명칭이 핵 단백질을 제조하기 위한 변형된 폴리뉴클레오타이드인 국제 출원 제PCT/US2013/030067호; 2013년 3월 9자로 출원되고 발명의 명칭이 단백질을 제조하기 위한 변형된 폴리뉴클레오타이드인 국제 출원 제PCT/US2013/030060호; 2013년 3월 9자로 출원되고 발명의 명칭이 사람 질병과 관련된 단백질을 제조하기 위한 변형된 폴리뉴클레오타이드인 국제 출원 제PCT/US2013/030061호; 2013년 3월 9자로 출원되고 발명의 명칭이 화장품 단백질 및 펩타이드를 제조하기 위한 변형된 폴리뉴클레오타이드(Modified Polynucleotides for the Production of Cosmetic Proteins and Peptides)인 국제 출원 제PCT/US2013/030068호; 2013년 3월 9자로 출원되고 발명의 명칭이 종양학-관련 단백질 및 펩타이드를 제조하기 위한 변형된 폴리뉴클레오타이드(Modified Polynucleotides for the Production of Oncology-Related Proteins and Peptides)인 국제 출원 제 PCT/US2013/030070호; 2013년 3월 15자로 출원되고 발명의 명칭이 단백질의 체내 제조(In Vivo Production of Proteins)인 국제 출원 제PCT/US2013/031821호에 기술된 표적들 중의 임의의 것일 수 있으며, 상기 특허원 각각의 내용은 전문이 본원에 참조로 인용된다.

[0251]

단백질 분리 신호 및 위치

[0252]

하나의 실시형태에서, 본 발명의 폴리펩타이드는 하나 이상의 단백질 분리 위치를 함유하는 하나 이상의 단백질 분리 신호를 포함할 수 있다. 상기 단백질 분리 위치는 N-말단, C-말단, 상기 N-말단과 상기 C-말단 사이의 임의의 공간(이는 상기 N-말단과 상기 C-말단 사이의 중간, 상기 N-말단과 상기 중간 지점 사이, 상기 중간 지점과 상기 C-말단 사이를 포함하지만 이로 제한되지는 않는다), 및 이들 위치의 조합에 배치될 수 있다.

[0253]

본 발명의 폴리펩타이드는 전구단백질 전환효소(또는 전구호르몬 전환효소), 트롬빈 또는 인자 Xa 단백질 분리 신호를 포함할 수 있지만, 이로 제한되지는 않는다. 전구단백질 전환효소는 9개의 프로테이나제의 계열이며, 효모 핵신과 관련된 7개의 기본 아미노산-특이적 서브틸리신-유사 세린 프로테이나제(이는 전구호르몬 전환효소 1/3(PC1/3)로서 공지되어 있다), PC2, 퓨린, PC4, PC5/6, 쌍을 이룬 기본 아미노산 분리 효소 4(PACE4) 및 PC7, 비-기본 잔기에서 분리하는 2개의 기타 서브틸라제(일명, 서브틸리신 핵신 효소 1(SKI-1) 및 전구단백질전환효소 서브틸리신 핵신 9(PCSK9))을 포함한다.

[0254]

하나의 실시형태에서, 본 발명의 기본 구조물 및 mmRNA는 상기 기본 구조물 또는 mmRNA가 하나 이상의 암호화된 단백질 분리 신호를 함유하도록 엔지니어링될 수 있다. 상기 암호화된 단백질 분리 신호는 상기 개시 코돈 전, 상기 개시 코돈 후, 상기 코딩 영역 전, 상기 코딩 영역 내부(이는 상기 코딩 영역 내의 중간, 상기 개시 코돈과 상기 중간 지점 사이, 상기 중간 지점과 상기 종결 코돈 사이를 포함하지만 이로 제한되지 않는다), 상기 코딩 영역 후, 상기 종결 코돈 전, 2개의 종결 코돈 사이, 상기 종결 코돈 후, 및 이들의 조합에 배치될 수 있다.

[0255]

하나의 실시형태에서, 본 발명의 기본 구조물 및 mmRNA는 하나 이상의 단백질 분리 위치를 함유하는 하나 이상의 암호화된 단백질 분리 신호를 포함할 수 있다. 상기 암호화된 단백질 분리 신호는 전구단백질 전환효소(또는 전구호르몬 전환효소), 트롬빈 및/또는 인자 Xa 단백질 분리 신호를 포함할 수 있지만, 이로 제한되지 않는다. 당 분야의 숙련자는 본 발명의 기본 구조물 또는 mmRNA 내에 포함될 적합한 암호화된 단백질 분리 신호를 측정하기 위해 상기 표 1 또는 기타 공지된 방법들을 사용할 수 있다. 예를 들면, 신호 서열로 출발하여 표 1의 코돈을 고려하면, 생성된 폴리펩타이드에 단백질 신호를 생성할 수 있는 상기 기본 구조물에 맞는 신호를 설계할 수 있다.

[0256]

하나의 실시형태에서, 본 발명의 폴리펩타이드는 하나 이상의 단백질 분리 신호 및/또는 위치를 포함한다.

[0257]

비제한적인 예로서, 본원에 전문이 참조로 인용되는 미국 특허 제7,374,930호 및 미국 공보 제20090227660호는 상기 세포의 골지체로부터의 발현 생성물 내에서 GLP-1의 N-말단 메티오닌을 분리하기 위해 퓨린 분리 위치를 사용한다. 하나의 실시형태에서, 본 발명의 폴리펩타이드는 하나 이상의 단백질 분리 신호 및/또는 위치를 포함하되, 상기 폴리펩타이드는 GLP-1이 아니다.

[0258]

하나의 실시형태에서, 본 발명의 기본 구조물 또는 mmRNA는 하나 이상의 암호화된 단백질 분리 신호 및/또는 위치를 포함한다.

[0259]

하나의 실시형태에서, 본 발명의 기본 구조물 또는 mmRNA는 하나 이상의 암호화된 단백질 분리 신호 및/또는 위

치를 포함하되, 상기 기본 구조물 또는 mmRNA는 GLP-1을 암호화하지 않는다.

[0260] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 기본 구조물 또는 mmRNA는 하나 이상의 코딩 영역을 포함할 수 있다. 다수의 코딩 영역이 본 발명의 기본 구조물 또는 mmRNA에 존재하는 경우, 상기 다수의 코딩 영역은 암호화된 단백질 분리 위치에 의해 분리될 수 있다. 비제한적 예로서, 상기 기본 구조물 또는 mmRNA는 정돈된 패턴으로 표시될 수 있다. 이러한 패턴 위에 AXBY 형태가 따르는데, 여기서 A 및 B는 동일하거나 상이한 코딩 영역일 수 있는 코딩 영역이고/이거나 동일하거나 상이한 폴리펩타이드를 암호화할 수 있고, X 및 Y는 동일하거나 상이한 단백질 분리 신호를 암호화할 수 있는 암호화된 단백질 분리 신호이다. 제2의 이러한 패턴은 형태 AXYBZ를 따르는데, 여기서 A 및 B는 동일하거나 상이한 코딩 영역일 수 있는 코딩 영역이고/이거나 동일하거나 상이한 폴리펩타이드를 암호화할 수 있고, X, Y 및 Z는 동일하거나 상이한 단백질 분리 신호를 암호화할 수 있는 암호화된 단백질 분리 신호이다. 제3의 패턴은 형태 ABXCY를 따르는데, 여기서 A, B 및 C는 동일하거나 상이한 코딩 영역일 수 있는 코딩 영역이고/이거나 동일하거나 상이한 폴리펩타이드를 암호화할 수 있고, X 및 Y는 동일하거나 상이한 단백질 분리 신호를 암호화할 수 있는 암호화된 단백질 분리 신호이다.

[0261] 하나의 실시형태에서, 상기 폴리펩타이드, 기본 구조물 및 mmRNA는 또한 단백질 분리 위치를 암호화하는 서열을 함유하여 상기 폴리펩타이드, 기본 구조물 및 mmRNA가 상기 단백질 분리 위치에 대한 특정한 프로테아제 처리에 의해 캐리어 영역 또는 용합 쪽으로부터 방출될 수 있도록 할 수 있다.

[0262] **III. 변형**

[0263] 본원에서, 폴리뉴클레오타이드(예: 기본 구조물 또는 mRNA 분자)에서 용어 "변형" 또는 필요에 따라 "변형된"은 A, G, U 또는 C 리보뉴클레오타이드에 대한 변형을 지칭한다. 일반적으로, 본원에서, 이들 용어는 천연 5' -말단 mRNA 캡 잔기에서 리보뉴클레오타이드 변형을 지칭하려는 의도는 없다. 폴리펩타이드에서, 상기 용어 "변형"은 20개의 아미노산, 잔기의 정규 세트와 비교한 변형을 지칭한다.

[0264] 상기 변형은 다양한 뚜렷한 변형일 수 있다. 일부 실시형태들에서, 상기 코딩 영역, 상기 인접 영역 및/또는 말단 영역은 1개, 2개 또는 그 이상의(임의로 상이한) 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드 변형을 함유할 수 있다. 일부 실시형태들에서, 세포에 유도된 변형된 폴리뉴클레오타이드, 기본 구조물 또는 mmRNA는 변형되지 않은 폴리뉴클레오타이드, 기본 구조물 또는 mmRNA에 비해 상기 세포에서 분해 감소를 나타낼 수 있다.

[0265] 상기 폴리뉴클레오타이드, 기본 구조물 및 mmRNA는 당, 핵염기, 또는 뉴클레오타이드간 결합(예: 결합 포스페이트/포스포디에스테르 결합/포스포디에스테르 주쇄)에 대한 변형과 같은 임의의 유용한 변형을 포함할 수 있다. 피리미딘 핵염기의 하나 이상의 원자는 임의로 치환된 아미노, 임의로 치환된 티올, 임의로 치환된 알킬(예: 메틸 또는 에틸) 또는 할로(예: 클로로 또는 플루오로)로 대체 또는 치환될 수 있다. 특정 실시형태들에서, 변형(예: 하나 이상의 변형)은 상기 당과 상기 뉴클레오타이드간 결합 각각에 존재한다. 본 발명에 따르는 변형은 데옥시리보핵산(DNA), 트레오스 핵산(TNA), 글리콜 핵산(GNA), 펩타이드 핵산(PNA), 차단된 핵산(LNA) 또는 이의 혼성물에 대한 리보핵산(RNA)의 변형일 수 있다. 추가의 변형들이 본원에 기술되어 있다.

[0266] 본원에 기술된 바와 같이, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 기본 구조물 및 mmRNA는 상기 mRNA가 도입되는 세포의 선천적인 면역 반응을 실질적으로 유도하지 않는다. 유도된 선천적인 면역 반응의 특징은 1) 염증성 시토킨의 발현 증가, 2) 세포내 PRR(RIG-I, MDA5 등)의 활성화, 및/또는 3) 단백질 번역의 종결 또는 감소를 포함한다.

[0267] 특정 실시형태들에서, 상기 세포 내로 유도되는 변형된 핵산 분자가 세포내에서 분해되는 것이 바람직할 수 있다. 예를 들면, 변형된 핵산 분자의 분해는 단백질 생성의 정확한 타이밍이 요망되는 경우 바람직할 수 있다. 따라서, 일부 실시형태들에서, 본 발명은 분해 도메인을 함유하는 변형된 핵산 분자를 제공하며, 상기 도메인은 세포 내에서 지시되는 방식으로 작용될 수 있다.

[0268] 상기 폴리뉴클레오타이드, 기본 구조물 및 mmRNA는 임의로 기타 제제(예: RNAi-유도제, RNAi 제제, siRNA, shRNA, miRNA, 항감작 RNA, 리보자임, 삼중 나선 형성을 유도하는 촉매적 DNA, tRNA 및 RNA, 압타머, 벡터 등)를 포함할 수 있다. 일부 실시형태들에서, 상기 폴리뉴클레오타이드, 기본 구조물 또는 mmRNA는 하나 이상의 메신저 RNA(mRNA) 및 하나 이상의 변형된 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드(예: mmRNA 분자)를 포함할 수 있다. 이들 폴리뉴클레오타이드, 기본 구조물 및 mmRNA에 대한 세부사항은 다음과 같다.

- [0269] 폴리뉴클레오타이드 및 기본 구조물
- [0270] 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 기본 구조물 및 mmRNA는 관심 폴리펩타이드를 암호화하는 연결된 뉴클레오타이드의 제1 영역, 상기 제1 영역의 5' 말단에 위치하는 제1 인접 영역, 및 상기 제1 영역의 3' 말단에 위치하는 제2 인접 영역을 포함한다.
- [0271] 일부 실시형태들에서, 상기 폴리뉴클레오타이드, 기본 구조물 또는 mmRNA(예: 제1 영역, 제1 인접 영역 또는 제2 인접 영역)은 임의의 염기, 당, 주쇄, 빌딩 블록 또는 기타 구조식 또는 화학식을 갖는 n개의 연결된 뉴클레오타이드를 포함하며, 이들은 전문이 본원에 참조로 인용되는 2012년 10월 3일자로 출원된 국제 출원 PCT/US12/58519(대리인 도켓 번호: M009.20)에 기술된 바와 같은 화학식 I 내지 IX 또는 이의 임의의 하위구조를 포함하지만 이로 제한되지는 않는다. 이러한 구조는 상기 당, 핵염기, 뉴클레오타이드간 결합 또는 이들의 조합에 대한 변형을 포함한다.
- [0272] 화학적 변형의 조합은 전문이 본원에 참조로 인용되는 2012년 10월 3일자로 출원된 국제 출원 PCT/US12/58519(대리인 도켓 번호: M009.20)에 기술된 것들을 포함하지만 이로 제한되지 않는 문헌에 교시된 것들을 포함한다.
- [0273] 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 기본 구조물 또는 mmRNA의 합성은 전문이 본원에 참조로 인용되는 2012년 10월 3일자로 출원된 국제 출원 PCT/US12/58519(대리인 도켓 번호: M009.20)에 기술된 방법들에 따를 수 있다.
- [0274] 일부 실시형태들에서, 상기 핵염기는 시토신, 구아닌, 아데닌 및 우라실로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0275] 일부 실시형태들에서, 상기 변형된 핵염기는 변형된 우라실이다. 예시되는 핵염기 및 변형된 우라실을 갖는 뉴클레오타이드는 슈도우리딘(ψ), 피리딘-4-온리보뉴클레오타이드, 5-아자-우리딘, 6-아자-우리딘, 2-티오-5-아자-우리딘, 2-티오-우리딘(s^2U), 4-티오-우리딘(s^4U), 4-티오-슈도우리딘, 2-티오-슈도우리딘, 5-하이드록시-우리딘(ho^5U), 5-아미노알릴-우리딘, 5-할로-우리딘(예: 5-요오도-우리딘 또는 5-브로모-우리딘), 3-메틸-우리딘(m^3U), 5-메톡시-우리딘(mo^5U), 우리딘 5-옥시아세트산(cmo^5U), 우리딘 5-옥시아세트산 메틸 에스테르($mcmo^5U$), 5-카복시메틸-우리딘(cm^5U), 1-카복시메틸-슈도우리딘, 5-카복시하이드록시메틸-우리딘(chm^5U), 5-카복시하이드록시메틸-우리딘 메틸 에스테르($mchm^5U$), 5-메톡시카보닐메틸-우리딘(mcm^5U), 5-메톡시카보닐메틸-2-티오-우리딘(mcm^5s^2U), 5-아미노메틸-2-티오-우리딘(nm^5s^2U), 5-메틸아미노메틸-우리딘(mnm^5U), 5-메틸아미노메틸-2-티오-우리딘(mnm^5s^2U), 5-메틸아미노메틸-2-셀레노-우리딘(mnm^5se^2U), 5-카바모일메틸-우리딘(ncm^5U), 5-카복시메틸아미노메틸-우리딘($cmnm^5U$), 5-카복시메틸아미노메틸-2-티오-우리딘($cmnm^5s^2U$), 5-프로피닐-우리딘, 1-프로피닐-슈도우리딘, 5-타우리노메틸-우리딘(τm^5U), 1-타우리노메틸-슈도우리딘, 5-타우리노메틸-2-티오-우리딘(τm^5s^2U), 1-타우리노메틸-4-티오-슈도우리딘, 5-메틸-우리딘(m^5U , 즉, 상기 핵염기 테옥시티민을 가짐), 1-메틸-슈도우리딘($m^1\psi$), 5-메틸-2-티오-우리딘(m^5s^2U), 1-메틸-4-티오-슈도우리딘($m^1s^4\psi$), 4-티오-1-메틸-슈도우리딘, 3-메틸-슈도우리딘($m^3\psi$), 2-티오-1-메틸-슈도우리딘, 1-메틸-1-데아자-슈도우리딘, 2-티오-1-메틸-1-데아자-슈도우리딘, 디하이드로우리딘(D), 디하이드로슈도우리딘, 5,6-디하이드로우리딘, 5-메틸-디하이드로우리딘($m5D$), 2-티오-디하이드로우리딘, 2-티오-디하이드로슈도우리딘, 2-메톡시-우리딘, 2-메톡시-4-티오-우리딘, 4-메톡시-슈도우리딘, 4-메톡시-2-티오-슈도우리딘, N1-메틸-슈도우리딘, 3-(3-아미노-3-카복시프로필)우리딘(acp^3U), 1-메틸-3-(3-아미노-3-카복시프로필)슈도우리딘($acp^3\psi$), 5-(이소펜테닐아미노메틸)우리딘(inn^5U), 5-(이소펜테닐아미노메틸)-2-티오-우리딘(inn^5s^2U), α -티오-우리딘, 2'-O-메틸-우리딘(Um), 5,2'-O-디메틸-우리딘(m^5Um), 2'-O-메틸-슈도우리딘(ψm), 2-티오-2'-O-메틸-우리딘(s^2Um), 5-메톡시카보닐메틸-2'-O-메틸-우리딘(mcm^5Um), 5-카바모일메틸-2'-O-메틸-우리딘(ncm^5Um), 5-카복시메틸아미노메틸-2'-O-메틸-우리딘($cmnm^5Um$), 3,2'-O-디메틸-우리딘(m^3Um), 5-(이소펜테닐아미노메틸)-2'-O-메틸-우리딘(inn^5Um), 1-티오-우리딘, 테옥시티미딘, 2'-F-아라-우리딘, 2'-F-우리딘, 2'-OH-아라-우리딘, 5-(2-카보메톡시비닐) 우리딘, 및 5-[3-(1-E-프로페닐아미노)우리딘을 포함한다.
- [0276] 일부 실시형태들에서, 상기 변형된 핵염기는 변형된 시토신이다. 예시되는 핵염기 및 변형된 시토신을 갖는 뉴클레오타이드는 5-아자-시티딘, 6-아자-시티딘, 슈도이소시티딘, 3-메틸-시티딘(m^3C), N4-아세틸-시티딘(ac^4C),

5-포밀-시티딘(f^5C), N4-메틸-시티딘(m^4C), 5-메틸-시티딘(m^5C), 5-할로-시티딘(예: 5-요오도-시티딘), 5-하이드록시메틸-시티딘(hm^5C), 1-메틸-슈도이소시티딘, 피롤로-시티딘, 피롤로-슈도이소시티딘, 2-티오-시티딘(s^2C), 2-티오-5-메틸-시티딘, 4-티오-슈도이소시티딘, 4-티오-1-메틸-슈도이소시티딘, 4-티오-1-메틸-1-테아자-슈도이소시티딘, 1-메틸-1-테아자-슈도이소시티딘, 제블라린, 5-아자-제블라린, 5-메틸-제블라린, 5-아자-2-티오-제블라린, 2-티오-제블라린, 2-메톡시-시티딘, 2-메톡시-5-메틸-시티딘, 4-메톡시-슈도이소시티딘, 4-메톡시-1-메틸-슈도이소시티딘, 라이시딘(k^2C), α -티오-시티딘, 2'-O-메틸-시티딘(Cm), 5,2'-O-디메틸-시티딘(m^5Cm), N4-아세틸-2'-O-메틸-시티딘(ac^4Cm), N4,2'-O-디메틸-시티딘(m^4Cm), 5-포밀-2'-O-메틸-시티딘(f^5Cm), N4,N4,2'-O-트리메틸-시티딘(m^4_2Cm), 1-티오-시티딘, 2'-F-아라-시티딘, 2'-F-시티딘, 및 2'-OH-아라-시티딘을 포함한다.

[0277]

일부 실시형태들에서, 상기 변형된 핵염기는 변형된 아데닌이다. 예시되는 핵염기 및 변형된 아데닌을 갖는 뉴클레오사이드는 2-아미노-퓨린, 2, 6-디아미노퓨린, 2-아미노-6-할로-퓨린(예: 2-아미노-6-클로로-퓨린), 6-할로-퓨린(예: 6-클로로-퓨린), 2-아미노-6-메틸-퓨린, 8-아지도-아데노신, 7-테아자-아데닌, 7-테아자-8-아자-아데닌, 7-테아자-2-아미노-퓨린, 7-테아자-8-아자-2-아미노-퓨린, 7-테아자-2,6-디아미노퓨린, 7-테아자-8-아자-2,6-디아미노퓨린, 1-메틸-아데노신(m^1A), 2-메틸-아데닌(m^2A), N6-메틸-아데노신(m^6A), 2-메틸티오-N6-메틸-아데노신(ms^2m^6A), N6-이소펜테닐-아데노신(i^6A), 2-메틸티오-N6-이소펜테닐-아데노신(ms^2i^6A), N6-(시스-하이드록시이소펜테닐)아데노신(io^6A), 2-메틸티오-N6-(시스-하이드록시이소펜테닐)아데노신(ms^2io^6A), N6-글리시닐카바모일-아데노신(g^6A), N6-트레오닐카바모일-아데노신(t^6A), N6-메틸-N6-트레오닐카바모일-아데노신(m^6t^6A), 2-메틸티오-N6-트레오닐카바모일-아데노신(ms^2g^6A), N6,N6-디메틸-아데노신(m^6_2A), N6-하이드록시노발릴카바모일-아데노신(hn^6A), 2-메틸티오-N6-하이드록시노발릴카바모일-아데노신(ms^2hn^6A), N6-아세틸-아데노신(ac^6A), 7-메틸-아데닌, 2-메틸티오-아데닌, 2-메톡시-아데닌, α -티오-아데노신, 2'-O-메틸-아데노신(Am), N6,2'-O-디메틸-아데노신(m^6Am), N6,N6,2'-O-트리메틸-아데노신(m^6_2Am), 1,2'-O-디메틸-아데노신(m^1Am), 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.

[0278]

일부 실시형태들에서, 상기 변형된 핵염기는 변형된 구아닌이다. 예시되는 핵염기 및 변형된 구아닌을 갖는 뉴클레오사이드는 이노신(I), 1-메틸-이노신(m^1I), 오신(imG), 메틸오신(mimG), 4-테메틸-오신(imG-14), 이소오신(imG2), 이부토신(yW), 피옥시이부토신(o_2yW), 하이드록시이부토신(OHyW), 저변형된 하이드록시이부토신(OHyW*), 7-테아자-구아노신, 케오신(Q), 에폭시케오신(oQ), 갈락토실-케오신(galQ), 만노실-케오신(manQ), 7-시아노-7-테아자-구아노신($preQ_0$), 7-아미노메틸-7-테아자-구아노신($preQ_1$), 아케오신(G^+), 7-테아자-8-아자-구아노신, 6-티오-구아노신, 6-티오-7-테아자-구아노신, 6-티오-7-테아자-8-아자-구아노신, 7-메틸-구아노신(m^7G), 6-티오-7-메틸-구아노신, 7-메틸-이노신, 6-메톡시-구아노신, 1-메틸-구아노신(m^1G), N2-메틸-구아노신(m^2G), N2,N2-디메틸-구아노신(m^2_2G), N2,7-디메틸-구아노신($m^{2,7}G$), N2, N2,7-디메틸-구아노신($m^{2,2,7}G$), 8-옥소-구아노신, 7-메틸-8-옥소-구아노신, 1-메틸-6-티오-구아노신, N2-메틸-6-티오-구아노신, N2,N2-디메틸-6-티오-구아노신, α -티오-구아노신, 2'-O-메틸-구아노신(Gm), N2-메틸-2'-O-메틸-구아노신(m^2Gm), N2,N2-디메틸-2'-O-메틸-구아노신($m^{22}Gm$), 1-메틸-2'-O-메틸-구아노신(m^1Gm), N2,7-디메틸-2'-O-메틸-구아노신($m^{2,7}Gm$), 2'-O-메틸-이노신(Im), 1,2'-O-디메틸-이노신(m^1Im), 및 2'-O-리보실구아노신(포스페이트)(Gr(p))를 포함한다.

[0279]

상기 뉴클레오타이드의 핵염기는 독립적으로 퓨린, 피리미딘, 퓨린 또는 피리미딘 동족체로부터 선택될 수 있다. 예를 들면, 상기 핵염기는 각각 독립적으로 아데닌, 시토신, 구아닌, 우라실 또는 히포크산틴으로부터 선택될 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 상기 핵염기는 또한, 예를 들면, 염기의 천연 및 합성 유도체를 포함할 수 있으며, 피라졸로[3,4-d]피리미딘, 5-메틸시토신(5-me-C), 5-하이드록시메틸 시토신, 크산틴, 히포크산틴, 2-아미노아데닌, 아데닌 및 구아닌의 6-메틸 및 기타 알킬 유도체, 아데닌 및 구아닌의 2-프로필 및 기타 알킬 유도체, 2-티오우라실, 2-티오티민 및 2-티오시토신, 5-프로피닐 우라실 및 시토신, 6-아조 우라

실, 시토신 및 티민, 5-우라실(슈도우라실), 4-티오우라실, 8-할로(예: 8-브로모), 8-아미노, 8-티올, 8-티오알킬, 8-하이드록실 및 기타 8-치환된 아데닌 및 구아닌, 5-할로, 특히 5-브로모, 5-트리플루오로메틸 및 기타 5-치환된 우라실 및 시토신, 7-메틸구아닌 및 7-메틸아데닌, 8-아자구아닌 및 8-아자아데닌, 데아자구아닌, 7-테아자구아닌, 3-테아자구아닌, 데아자아데닌, 7-테아자아데닌, 3-테아자아데닌, 피라졸로[3,4-d]피리미딘, 이미다조[1,5-a]1,3,5 트리아진은, 9-데아자퓨린, 이미다조[4,5-d]피라진, 티아졸로[4,5-d]피리미딘, 피라진-2-온, 1,2,4-트리아진, 피리다진; 및 1,3,5 트리아진을 포함한다. 상기 뉴클레오타이드가 약칭 A, G, C, T 또는 U를 사용하여 기술되는 경우, 각각의 문자는 대표 염기 및/또는 이의 유도체를 지칭하는데, 예를 들면, A는 아데닌 또는 아데닌 동족체(예: 7-테아자 아데닌)를 포함한다.

[0280] 변형된 뉴클레오사이드 및 뉴클레오타이드(예: 빌딩 블록 분자)는 각각 전문이 본원에 참조로 인용되는 문헌에 기술된 합성 방법들에 따라 제조될 수 있다[참조: Ogata et al., J. Org. Chem. 74:2585-2588(2009); Purmal et al., Nucl. Acids Res. 22(1): 72-78,(1994); Fukuhara et al., Biochemistry, 1(4): 563-568(1962); and Xu et al., Tetrahedron, 48(9): 1729-1740(1992)]

[0281] 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 기본 구조물 및 mmRNA는 상기 분자의 전체 길이를 따라 균일하게 변형될 수도 있고 그렇지 않을 수도 있다. 예를 들면, 뉴클레오타이드의 하나 이상 또는 모든 형태(예: 퓨린 또는 피리미딘, 또는 A, G, U, C 중의 임의의 하나 이상 또는 전부)는 본 발명의 폴리뉴클레오타이드에서 또는 이의 소정의 미리 결정된 서열 영역(예를 들면, 도 1에 나타난 서열 영역 중의 하나 이상)에서 균일하게 변형되거나 그렇지 않을 수 있다. 일부 실시형태들에서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드에서(또는 이의 소정의 서열 영역에서) 모든 뉴클레오타이드 X가 변형되며, 여기서 X는 뉴클레오타이드 A, G, U, C 중의 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 or A+G+C 중의 임의의 하나일 수 있다.

[0282] 상이한 당 변형, 뉴클레오타이드 변형 및/또는 뉴클레오사이드간 결합(예: 주쇄 구조물)이 상기 폴리뉴클레오타이드, 기본 구조물 또는 mmRNA 내의 다양한 위치에 존재할 수 있다. 당 분야의 숙련자 중의 한 명이라면 상기 뉴클레오타이드 동족체 또는 기타 변형(들)이 폴리뉴클레오타이드, 기본 구조물 또는 mmRNA의 임의의 위치(들)에 배치되어 상기 폴리뉴클레오타이드, 기본 구조물 또는 mmRNA의 기능이 실질적으로 감소하지 않도록 할 수 있음을 이해할 것이다. 변형은 또한 5' 또는 3' 말단 변형일 수 있다. 상기 폴리뉴클레오타이드, 기본 구조물 또는 mmRNA는 약 1% 내지 약 100% 변형된 뉴클레오타이드(전체 뉴클레오타이드 함량에 대해, 또는 하나 이상의 형태의 뉴클레오타이드, 즉 A, G, U 또는 C 중의 하나 이상에 대해)를 함유하거나 임의의 중간 %(예: 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%, 및 95% 내지 100%)를 함유할 수 있다.

[0283] 일부 실시형태들에서, 상기 폴리뉴클레오타이드, 기본 구조물 또는 mmRNA는 변형된 피리미딘(예: 변형된 우라실/우리딘/U 또는 변형된 시토신/시티딘/C)을 포함한다. 일부 실시형태들에서, 상기 폴리뉴클레오타이드, 기본 구조물 또는 mmRNA 분자 중의 상기 우라실 또는 우리딘(일반적으로: U)은 약 1% 내지 약 100%의 변형된 우라실 또는 변형된 우리딘(예: 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%의 변형된 우라실 또는 변형된 우리딘)으로 대체될 수 있다. 상기 변형된 우라실 또는 우리딘은 독특한 단일 구조를 갖는 화합물에 의해 대체되거나 상이한 구조들(예를 들면, 본원에 기술된 바와 같은 2개, 3개, 4개 또는 그 이상의 독특한 구조들)을 갖는 다수의 화합물들에 의해 대체될 수 있다.

[0284] 일부 실시형태들에서, 상기 폴리뉴클레오타이드, 기본 구조물 또는 mmRNA 분자 중의 상기 시토신 또는 시티딘(일반적으로: C)은 약 1% 내지 약 100%의 변형된 시토신 또는 변형된 시티딘(예: 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%의 변형된 시토신 또는 변형된 시티딘)으로 대체될 수 있다. 상기 변형된 시토신 또는 시티딘은 독특한 단일 구조를 갖는 화합물에 의해 대체되거나 상이한 구조들(예를 들면, 본원에 기술된 바와 같은 2개, 3개, 4개 또는 그 이상의 독특한 구조들)을 갖는 다수의 화합물들에 의해 대체될 수 있다.

- [0285] 일부 실시형태들에서, 상기 폴리뉴클레오타이드, 기본 구조물 또는 mmRNA는 번역 가능하다.
- [0286] 폴리뉴클레오타이드, 기본 구조물 및 mmRNA의 기타 성분들은 임의적이며, 일부 실시형태에서 유익하다. 예를 들면, 5' 비번역 영역(UTR) 및/또는 3' UTR이 제공되며, 이들 중 하나 또는 둘 다는 독립적으로 하나 이상의 상이한 뉴클레오타이드 변형을 함유할 수 있다. 이러한 하나의 실시형태들에서, 뉴클레오타이드 변형들 또한 상기 번역 가능한 영역에 존재할 수 있다. 또한 코작(Kozak) 서열을 함유하는 폴리뉴클레오타이드, 기본 구조물 및 mmRNA도 제공된다.
- [0287] 일부 실시형태들에서, 상기 시토신의 25% 이상은 화학식 (b10)-(b14)의 화합물에 의해 대체된다(예를 들면, 약 30% 이상, 약 35% 이상, 약 40% 이상, 약 45% 이상, 약 50% 이상, 약 55% 이상, 약 60% 이상, 약 65% 이상, 약 70% 이상, 약 75% 이상, 약 80% 이상, 약 85% 이상, 약 90% 이상, 약 95% 이상, 또는 약 100%).
- [0288] 일부 실시형태들에서, 상기 우라실의 25% 이상은 화학식 (b1)-(b9)의 화합물에 의해 대체된다(예를 들면, 약 30% 이상, 약 35% 이상, 약 40% 이상, 약 45% 이상, 약 50% 이상, 약 55% 이상, 약 60% 이상, 약 65% 이상, 약 70% 이상, 약 75% 이상, 약 80% 이상, 약 85% 이상, 약 90% 이상, 약 95% 이상, 또는 약 100%).
- [0289] 일부 실시형태들에서, 상기 시토신의 25% 이상은 화학식 (b10)-(b14)의 화합물에 의해 대체되고, 상기 우라실의 25% 이상은 화학식 (b1)-(b9)의 화합물에 의해 대체된다(예를 들면, 약 30% 이상, 약 35% 이상, 약 40% 이상, 약 45% 이상, 약 50% 이상, 약 55% 이상, 약 60% 이상, 약 65% 이상, 약 70% 이상, 약 75% 이상, 약 80% 이상, 약 85% 이상, 약 90% 이상, 약 95% 이상, 또는 약 100%).

[0290] **IV. 약제학적 조성물**

[0291] 제형물, 투여, 전달 및 투여량

[0292] 본 발명은 폴리뉴클레오타이드, 기본 구조물 및 mmRNA 조성물, 및 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 부형제와 배합된 복합체를 제공한다. 약제학적 조성물은 임의로 하나 이상의 추가의 활성 물질, 예를 들면, 치료용 및/또는 예방용 활성 물질을 포함할 수 있다. 약제학적 제제의 제형 및/또는 제조에서 일반적인 고려사항은, 예를 들면, (전문이 본원에 참조로 인용되는) 문헌[참조: Remington: The Science and Practice of Pharmacy 21st ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2005]에서 찾아볼 수 있다..

[0293] 일부 실시형태들에서, 조성물들은 사람, 사람 환자 또는 대상에게 투여된다. 본 명세서의 목적상, "활성 성분"이라는 구절은 일반적으로 본원에 기술된 바와 같이 전달되는 폴리뉴클레오타이드, 기본 구조물 및 mmRNA를 지칭한다.

[0294] 본원에 제공된 약제학적 조성물들의 설명이 원칙적으로 사람에게 투여하기에 적합한 약제학적 조성물에 관한 것이기는 하지만, 당 분야의 숙련자들은 이러한 조성물이 일반적으로 임의의 기타 동물, 예를 들면, 사람이 아닌 동물, 예를 들면, 사람이 아닌 포유동물에게 투여하기에 적합하다는 것을 이해할 것이다. 사람에게 투여하기에 적합한 약제학적 조성물이 다양한 동물에 대한 투여에 적합하도록 하기 위한 상기 조성물의 변형은 널리 이해되고, 통상의 기술을 가진 수의학 약리학자는 실험을 한다 하더라도 통상적인 실험만으로 이러한 변형을 설계 및/또는 수행할 수 있다. 상기 약제학적 조성물의 투여가 고려되는 대상은 사람 및/또는 기타 영장류; 소, 돼지, 말, 양, 고양이, 개, 쥐 및/또는 래트와 같은 상업적 이득과 관련된 포유동물을 포함하는 포유동물들; 및/또는 가금류, 닭, 오리, 거위 및/또는 칠면조와 같은 상업적 이득과 관련된 조류를 포함하는 조류를 포함하지만, 이로 제한되지는 않는다.

[0295] 본원에 기술된 약제학적 조성물의 제형물은 약리학 분야에서 공지되거나 이후 개발될 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. 일반적으로, 이러한 준비 방법들은 상기 활성 성분을 부형제 및/또는 하나 이상의 기타 추가 성분들과 혼합시킨 다음, 필요한 경우 및/또는 바람직한 경우, 상기 생성물은 바람직한 단일- 또는 다회-투여 단위

로 분할, 성형 및/또는 포장하는 단계를 포함한다.

[0296] 본 발명에 따르는 약제학적 조성물은 벌크 형태로, 단일 단위 투여량으로서 및/또는 다수의 단일 단위 투여량으로 제조, 포장 및/또는 판매될 수 있다. 본원에서 사용되는 "단위 투여량"은 소정량의 활성 성분을 포함하는 약제학적 조성물의 개별 함량이다. 상기 활성 성분의 양은 일반적으로 대상에게 투여되는 활성 성분의 투여량과 동일하고/하거나 이러한 투여량의 편의에 따른 분획(예: 이러한 투여량의 1/2 또는 1/3)이다.

[0297] 본 발명에 따르는 약제학적 조성물에서 상기 활성 성분, 상기 약제학적으로 허용되는 부형제 및/또는 임의의 추가 성분들의 상대적인 양은 치료 대상의 정체, 크기 및/또는 상태에 따라 변할 것이며, 상기 조성물이 투여되는 경로에 따라 추가로 변할 것이다. 예를 들면, 상기 조성물은 0.1% 내지 100%, 예를 들면 0.5 내지 50%, 1 내지 30%, 5 내지 80%, 또는 80%(w/w) 이상의 활성 성분을 포함할 수 있다.

[0298] 본원에 기술된 임의의 폴리뉴클레오타이드, 기본 구조물 및 mmRNA는 2012년 12월 14일자로 출원되고 발명의 명칭이 변형된 뉴클레오사이드, 뉴클레오타이드 및 핵산 조성물(Modified Nucleoside, Nucleotide, and Nucleic Acid Compositions)인 국제 출원 제PCT/US2012/069610호에 기술된 바와 같이 제형화될 수 있으며, 상기 출원은 전문이 본원에 참조로 인용된다.

[0299] 제형물

[0300] 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 기본 구조물 및 mmRNA는 하기 목적을 위한 하나 이상의 부형제를 사용하여 제형화될 수 있다: (1) 안정성 증가; (2) 세포 형질주입 증가; (3) (예를 들면, 상기 폴리뉴클레오타이드, 기본 구조물 또는 mmRNA의 데포 제형물로부터의) 서방성 또는 지연 방출 허용; (4) 생물학적 분포 변경(예를 들면, 상기 폴리뉴클레오타이드, 기본 구조물 또는 mmRNA를 특정 조직 또는 세포 형태로 표적화); (5) 체내에서 암호화된 단백질의 번역 증가; 및/또는 (6) 체내에서 암호화된 단백질의 방출 프로파일 변경. 임의의 및 모든 용매, 분산 매체, 희석제 또는 기타 액체 비히클, 분산 또는 현탁 조제, 표면활성제, 등장제, 증점제 또는 유화제, 방부제와 같은 기존의 부형제 이외에도, 본 발명의 부형제들은 리피도이드, 리포솜, 지질 나노입자, 중합체, 리포플렉스, 코어-셸 나노입자, 펩타이드, 단백질, (예를 들면, 대상 내로 이식하기 위해) 폴리뉴클레오타이드, 구조물 또는 mmRNA로 형질주입된 세포, 하이알루로니다제, 나노입자 유사체 및 이들의 조합을 포함할 수 있으나, 이로 제한되지 않는다. 따라서, 본 발명의 제형물은 하나 이상의 부형제를 포함할 수 있으며, 이들 각각은 함께 상기 폴리뉴클레오타이드, 기본 구조물 또는 mmRNA의 안정성을 증가시키고/시키거나, 상기 폴리뉴클레오타이드, 기본 구조물 또는 mmRNA에 의해 세포 형질주입을 증가시키고/시키거나, 폴리뉴클레오타이드, 기본 구조물 또는 mmRNA 암호화된 단백질의 발현을 증가시키고/시키거나, 폴리뉴클레오타이드, 기본 구조물 또는 mmRNA 암호화된 단백질의 방출 프로파일을 변경시키는 양으로 포함한다. 추가로, 본 발명의 기본 구조물 및 mmRNA는 자가-조립된 핵산 나노입자를 사용하여 제형화될 수 있다.

[0301] 본원에 기술된 약제학적 조성물의 제형물은 약리학 분야에서 공지되거나 이후 개발될 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. 일반적으로, 이러한 준비 방법들은 상기 활성 성분을 부형제 및/또는 하나 이상의 기타 추가 성분들과 회합시키는 단계를 포함한다.

[0302] 본 발명에 따르는 약제학적 조성물은 벌크 형태로, 단일 단위 투여량으로서 및/또는 다수의 단일 단위 투여량으로 제조, 포장 및/또는 판매될 수 있다. 본원에서 사용되는 "단위 투여량"은 소정량의 활성 성분을 포함하는 약제학적 조성물의 개별 함량을 지칭한다. 상기 활성 성분의 양은 일반적으로 대상에게 투여되는 활성 성분의 투여량과 동일하고/하거나 이러한 투여량의 편의에 따른 분획(이는 이러한 투여량의 1/2 또는 1/3을 포함하지만 이로 제한되지 않는다)일 수 있다.

[0303] 본 명세서에 따르는 약제학적 조성물에서 상기 활성 성분, 상기 약제학적으로 허용되는 부형제 및/또는 임의의 추가 성분들의 상대적인 양은 치료 대상의 정체, 크기 및/또는 상태에 따라 변할 것이며, 상기 조성물이 투여되는 경로에 따라 추가로 변할 것이다. 예를 들면, 상기 조성물은 0.1% 내지 99%(w/w)의 활성 성분을 포함할 수 있다.

[0304] 일부 실시형태들에서, 본원에 기술된 제형물들은 하나 이상의 mmRNA를 함유할 수 있다. 비제한적 예로서, 상기 제형물은 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개의 mmRNA를 함유할 수 있다. 하나의 실시형태에서, 상기 제형물은 사람 단백질, 수의학 단백질, 박테리아성 단백질, 생물학적 단백질, 항체, 면역성 단백질, 치료용 펩타이드 및 단백질, 분비단백질, 세포막, 세포질 및 세포골격 단백질, 세포내막 결합 단백질, 핵 단백질, 사람 질병과 관련된 단백질 및/또는 사람 질병이 아닌 질병과 관련된 단백질을 포함하지만 이로 제한되지 않는 카테고리로부터 선택

된 변형된 mRNA 암호화 단백질을 함유할 수 있다. 하나의 실시형태에서, 상기 제형물은 3개 이상의 변형된 mRNA 암호화 단백질을 함유한다. 하나의 실시형태에서, 상기 제형물은 5개 이상의 변형된 mRNA 암호화 단백질을 함유한다.

[0305] 약제학적 제형물은 약제학적으로 허용되는 부형제를 추가로 포함할 수 있으며, 이들 부형제는, 본원에서 사용되는 바와 같이, 바람직한 특정한 투여 제형에 적합한 임의의 및 모든 용매, 분산 매체, 희석제 또는 기타 액체 비히클, 분산 또는 현탁 조제, 표면활성제, 등장제, 증점제 또는 유화제, 방부제 등을 포함하지만 이로 제한되지는 않는다. 약제학적 조성물을 제형화하기 위한 다양한 부형제들과 상기 조성물을 제조하기 위한 기술들은 당 분야에 공지되어 있다[참조: Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, A. R. Gennaro, Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006; 본원에 참조로 인용됨]. 임의의 통상적인 부형제 매체가 바람직하지 않은 생물학적 효과를 생성하거나 아니면 상기 약제학적 조성물의 임의의 기타 성분(들)과 유해한 방식으로 상호작용하는 등에 의해 물질 또는 이의 유도체와 비혼화성이 될 수 있는 경우를 제외하고는, 통상적인 부형제 매체의 사용은 본 명세서의 범위 내에서 고려될 수 있다.

[0306] 일부 실시형태들에서, 상기 지질 나노입자의 입자 크기는 증가하고/하거나 감소될 수 있다. 입자 크기의 변화는 염증을 포함하지만 이로 제한되지 않는 생물학적 반응에 대항하는데 도움이 될 수 있거나 포유동물에게 전달되는 상기 변형된 mRNA의 생물학적 효과를 증가시킬 수 있다.

[0307] 약제학적 조성물의 제조에서 사용되는 약제학적으로 허용되는 부형제는 불활성 희석제, 표면활성제 및/또는 유화제, 방부제, 완충제, 윤활제 및/또는 오일을 포함하지만, 이로 제한되지는 않는다. 이러한 부형제들은 본 발명의 약제학적 제형물 내에 임의로 포함될 수 있다.

[0308] 하나의 실시형태에서, 상기 폴리뉴클레오타이드, 기본 구조물 및/또는 mRNA는 콜레스테롤과 같은 분자들을 봉쇄할 수 있는 나노구조물로 투여, 제형화 또는 전달될 수 있다. 이들 나노입자 및 이들 나노입자들의 제조방법들의 비제한적 예는 전문이 본원에 참조로 인용되는 미국 특허 공보 제US20130195759호에 기술되어 있다. 이들 나노입자들의 예시 구조는 전문이 본원에 참조로 인용되는 미국 특허 공보 제US20130195759호의 도 1에 도시되며, 코어 및 상기 코어를 둘러싼 셸을 포함할 수 있다.

[0309] *리피도이드*

[0310] 리피도이드의 합성은 광범위하게 기술되어 있으며, 이들 화합물을 함유하는 제형물은 폴리뉴클레오타이드, 기본 구조물 또는 mmRNA의 전달에 특히 적합하다(참조: Mahon et al., Bioconjug Chem. 2010 21:1448-1454; Schroeder et al., J Intern Med. 2010 267:9-21; Akinc et al., Nat Biotechnol. 2008 26:561-569; Love et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 107:1864-1869; Siegwart et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 108:12996-3001; 이들 문헌은 모두 전문이 본원에 참조로 인용된다).

[0311] 이들 리피도이드가 설치류 및 사람이 아닌 영장류에서 이종가닥 소형 간섭 RNA 분자를 효과적으로 전달하는데 사용되어 왔지만(참조: Akinc et al., Nat Biotechnol. 2008 26:561-569; Frank-Kamenetsky et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 105:11915-11920; Akinc et al., Mol Ther. 2009 17:872-879; Love et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 107:1864-1869; Leuschner et al., Nat Biotechnol. 2011 29:1005-1010; 이들 문헌은 모두 전문이 본원에 참조로 인용된다), 본 명세서는 이들의 제형물, 및 단일가닥 폴리뉴클레오타이드, 기본 구조물 또는 mmRNA를 전달하는데 있어서의 용도를 기술한다. 이들 리피도이드를 함유하는 복합체, 미셀, 리포솜 또는 입자들이 제조될 수 있으므로, 암호화된 단백질의 제조에 의해 판단되는 바와 같이 상기 폴리뉴클레오타이드, 기본 구조물 또는 mmRNA가 효과적으로 전달될 수 있으며, 이후 국부 및/또는 전신 투여 경로를 통해 리피도이드 제형물이 주입될 수 있다. 폴리뉴클레오타이드, 기본 구조물 또는 mmRNA의 리피도이드 복합체는 정맥내, 근육내 또는 피하 경로를 포함하지만 이로 제한되지 않는 다양한 수단에 의해 투여될 수 있다.

[0312] 핵산의 체내 전달은 상기 제형물 조성, 입자 페길레이션(PEGylation)의 성질, 하중도, 올리고뉴클레오타이드 대 지질 비, 및 입자 크기와 같은 생물물리학적 파라미터를 포함하지만 이로 제한되지 않는 많은 파라미터에 의해 영향을 받을 수 있다(Akinc et al., Mol Ther. 2009 17:872-879; 이는 전문이 본원에 참조로 인용된다). 일례로서, 폴리(에틸렌 글리콜)(PEG)의 앵커 쇠 길이의 작은 변화는 체내 효율에 현저한 효과를 일으킬 수 있다. 펜타[3-(1-라우릴아미노프로피오닐)]-트리에틸렌테트라민 하이드로클로라이드(TETA-5LAP; aka 98N12-5, 참조: Murugaiah et al., Analytical Biochemistry, 401:61(2010)), C12-200(유도체 및 변형체 포함) 및 MD1를 포함하지만 이로 제한되지 않는 상이한 리피도이드를 갖는 제형물이 체내 활성을 위해 시험될 수 있다.

- [0313] 본원에서 "98N12-5"로서 지칭되는 리피도이드가 문헌[Akinc et al., Mol Ther. 2009 17:872-879]에 기재되어 있으며, 상기 문헌은 전문이 본원에 참조로 인용된다.
- [0314] 본원에서 "C12-200"로서 지칭되는 리피도이드가 문헌[Love et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 107:1864-1869; 및 Liu and Huang, Molecular Therapy. 2010 669-670; 상기 문헌은 둘 다 전문이 본원에 참조로 인용된다]에 기재되어 있다. 상기 리피도이드 제형물은 폴리뉴클레오타이드, 기본 구조물 또는 mmRNA 이외에도 3개 또는 4개나 그 이상의 성분들을 포함하는 입자들을 포함할 수 있다. 일례로서, 특정한 리피도이드를 갖는 제형물은 98N12-5를 포함하지만 이로 제한되지 않으며, 42% 리피도이드, 48% 콜레스테롤 및 10% PEG(C14 알킬 쇠 길이)를 함유할 수 있다. 또 다른 예로서, 특정한 리피도이드를 갖는 제형물은 C12-200을 포함하지만 이로 제한되지 않으며, 50% 리피도이드, 10% 디스테로일포스파티딜 콜린, 38.5% 콜레스테롤 및 1.5% PEG-DMG를 함유할 수 있다.
- [0315] 하나의 실시형태에서, 전신계 정맥내 투여를 위해 리피도이드로 제형화된 폴리뉴클레오타이드, 기본 구조물 또는 mmRNA는 간을 표적으로 할 수 있다. 예를 들면, 폴리뉴클레오타이드, 기본 구조물 또는 mmRNA를 사용하고 42% 98N12-5, 48% 콜레스테롤, 및 10% PEG-지질의 지질 물 조성을 포함하며 총 지질 대 폴리뉴클레오타이드, 기본 구조물 또는 mmRNA의 최종 중량 비가 약 7.5 대 1이고 상기 PEG 지질에 대해 C14 알킬 쇠 길이를 갖고 평균 입자 크기가 대략 50 내지 60nm인 최종 최적화된 정맥내 제형물은 상기 제형물의 분포가 상기 간에 대해 90%를 초과하도록 할 수 있다(참조: Akinc et al., Mol Ther. 2009 17:872-879; 이는 전문이 본원에 인용된다). 또 다른 예에서, C12-200(참조: 미국 가특허원 제61/175,770호 및 공개된 국제 출원 WO2010129709, 이들은 각각 전문이 본원에 참조로 인용된다) 리피도이드를 사용하는 정맥내 제형물은 C12-200/디스테로일포스파티딜 콜린/콜레스테롤/PEG-DMG의 물 비가 50/10/38.5/1.5이고 총 지질 대 폴리뉴클레오타이드, 기본 구조물 또는 mmRNA의 중량 비가 7 대 1일 수 있고, 80nm의 평균 입자 크기가 폴리뉴클레오타이드, 기본 구조물 또는 mmRNA를 간 세포에 전달하기에 효과적인 수 있다(참조: Love et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 107:1864-1869; 이는 본원에 참조로 인용된다). 또 다른 실시형태에서, MD1 리피도이드-함유 제형물은 체내에서 폴리뉴클레오타이드, 기본 구조물 또는 mmRNA를 간 세포에 효과적으로 전달하는데 사용될 수 있다. 근육내 또는 피하 경로에 맞게 최적화된 리피도이드 제형물의 특징은 상기 표적 세포 형태, 및 제형물이 세포의 매트릭스를 통해 상기 혈류 내로 확산하는 능력에 따라 현저하게 변할 수 있다. 내피 소공의 크기로 인해 효과적인 간 세포 전달을 위해 150nm 미만의 입자 크기가 바람직할 수 있지만(참조: Akinc et al., Mol Ther. 2009 17:872-879; 이는 본원에 참조로 인용된다), 내피 세포, 골수 세포 및 근육 세포를 포함하지만 이로 제한되지 않는 기타 세포 형태에 상기 제형물을 전달하기 위해 리피도이드-제형화된 폴리뉴클레오타이드, 기본 구조물 또는 mmRNA를 사용하는 것은 유사하게 크기가 제한되지 않을 수 있다. 체내에서 간 세포 이외의 기타 세포(예: 골수 세포 및 내피)에 siRNA를 전달하기 위해 리피도이드 제형물을 사용하는 것은 보고되어 있다[참조: Akinc et al., Nat Biotechnol. 2008 26:561-569; Leuschner et al., Nat Biotechnol. 2011 29:1005-1010; Cho et al. Adv. Funct. Mater. 2009 19:3112-3118; 8th International Judah Folkman Conference, Cambridge, MA October 8-9, 2010, 이는 전문이 본원에 참조로 인용된다). 단구와 같은 골수 세포로 효과적으로 전달하려면, 리피도이드 제형물은 유사한 성분 물 비를 가질 수 있다. 리피도이드와 기타 성분들(이는 디스테로일포스파티딜 콜린, 콜레스테롤 및 PEG-DMG를 포함하지만 이로 제한되지 않는다)의 상이한 비는 간 세포, 골수 세포, 근육 세포 등을 포함하지만 이로 제한되지 않는 상이한 세포 형태로 전달하기 위해 상기 폴리뉴클레오타이드, 기본 구조물 또는 mmRNA의 제형물을 최적화하는데 사용될 수 있다. 예를 들면, 상기 성분 물 비는 50% C12-200, 10% 디스테로일포스파티딜 콜린, 38.5% 콜레스테롤, 및 1.5% PEG-DMG를 포함할 수 있지만 이로 제한되지 않는다(참조: Leuschner et al., Nat Biotechnol 2011 29:1005-1010; 이는 전문이 참조로 인용된다). 핵산을 피하내 또는 근육내 전달을 통해 세포들(이는 지방 세포 및 근육 세포를 포함하지만 이로 제한되지 않는다)에 국부 전달하기 위해 리피도이드 제형물을 사용하는 것은 전신계 전달에 바람직한 제형물 성분들 전부를 필요로 하지 않을 수 있고, 그 자체로 리피도이드 및 상기 폴리뉴클레오타이드, 기본 구조물 또는 mmRNA만을 포함할 수 있다.
- [0316] 상이한 리피도이드들의 조합은 상기 리피도이드가 폴리뉴클레오타이드, 기본 구조물 또는 mmRNA에 의한 세포 형질주입을 증가시킬 수 있으므로 상기 폴리뉴클레오타이드, 기본 구조물 또는 mmRNA 유도된 단백질 생산의 효율을 개선시키고/시키거나 암호화된 단백질의 번역을 증가시키는 데 사용될 수 있다(참조: Whitehead et al., Mol. Ther. 2011, 19:1688-1694; 이는 전문이 본원에 참조로 인용된다).
- [0317] 리포솜, 리포플렉스 및 지질 나노입자

- [0318] 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 및 mmRNA는 하나 이상의 리포솜, 리포플렉스 또는 지질 나노입자를 사용하여 제형화될 수 있다. 하나의 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA의 약제학적 조성물은 리포솜을 포함한다. 리포솜은, 주로 지질 이중층으로 구성될 수 있고 영양소 및 약제학적 제형의 투여를 위한 전달 비히클로서 사용될 수 있는 인위적으로 제조되는 소포이다. 리포솜은 상이한 크기의 것들, 예를 들면, 직경이 수백 나노미터일 수 있고 협폭의 수성 격벽에 의해 분리된 일련의 동심 이중층을 함유할 수 있는 다중라멜라 소포(MLV), 직경이 50nm 미만일 수 있는 작은 단일셀 소포(SUV), 및 직경이 50 내지 500nm일 수 있는 거대 단일라멜라 소포(LUV)일 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 리포솜 디자인은, 리포솜의 건강하지 못한 조직에의 부착을 개선하거나 또는 이에 제한되는 것은 아니지만 세포내 섭취와 같은 사건을 활성화하기 위해 흡수인 또는 리간드를 비제한적으로 포함할 수 있다. 리포솜은 약제학적 제형의 전달을 개선하기 위해 낮거나 높은 pH를 함유할 수 있다.
- [0319] 리포솜의 형성은 물리화학적 특성, 예를 들면, 포집되는 약제학적 제형 및 리포솜 성분, 지질 소포가 분산되는 매질의 성질, 포집되는 물질의 유효 농도 및 이의 잠재적 독성, 및 소포의 적용 및/또는 전달 동안에 수반되는 임의의 추가 공정, 의도된 분야를 위한 소포의 최적화 크기, 다분산도 및 반감기, 및 안전하고 효율적인 리포솜 제품의 대규모 생산 가능성 및 배치간(batch-to-batch) 재현력에 좌우될 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0320] 하나의 실시형태에서, 본원에 기재된 약제학적 조성물은, 리포솜, 예를 들어, 1,2-디올레일옥시-N,N-디메틸아미노프로판(DODMA) 리포솜, 마리나 바이오테크(Marina Biotech, 미국 워싱턴주 보셀 소재)로부터의 DiLa2 리포솜, 1,2-디리놀레일옥시-3-디메틸아미노프로판(DLin-DMA), 2,2-디리놀레일-4-(2-디메틸아미노에틸)-[1,3]-디옥솔란(DLin-KC2-DMA) 및 MC3(US 제20100324120호; 이의 전체 내용이 인용에 의해 본원에 포함됨)으로부터 형성되는 리포솜, 및 소분자 약물, 예를 들면, 이에 제한되는 것은 아니지만, 얀센 바이오테크, 인코포레이션(Janssen Biotech, Inc., 미국 펜실베이니아주 호르섬 소재)으로부터의 DOXIL®을 전달할 수 있는 리포솜을 제한 없이 포함할 수 있다.
- [0321] 하나의 실시형태에서, 본원에 기재된 약제학적 조성물은, 리포솜, 예를 들면, 선행 기술에 기재되고 시험관내 및 생체내 올리고뉴클레오타이드 전달에 적합한 것으로 입증된, 안정된 플라스미드-지질 입자(SPLP) 또는 안정된 핵산 지질 입자(SNALP)의 합성으로부터 형성되는 리포솜을 제한 없이 포함할 수 있다(참조: Wheeler et al. Gene Therapy. 1999 6:271-281; Zhang et al. Gene Therapy. 1999 6:1438-1447; Jeffs et al. Pharm Res. 2005 22:362-372; Morrissey et al., Nat Biotechnol. 2005 2:1002-1007; Zimmermann et al., Nature. 2006 441:111-114; Heyes et al. J Contr Rel. 2005 107:276-287; Semple et al. Nature Biotech. 2010 28:172-176; Judge et al. J Clin Invest. 2009 119:661-673; deFougerolles Hum Gene Ther. 2008 19:125-132; 상기 모든 문헌은 그 전체 내용이 본원에 포함된다). 휠러(Wheeler) 등에 의한 최초의 제조 방법은 세제 투석 방법이었으며, 상기 세제 투석 방법은 나중에 제프스(Jeffs) 등에 의해 개선되었고, 자발적 소포 형성 방법이라 불린다. 리포솜 제형은 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA에 더하여 3 내지 4개의 지질 구성요소로 구성된다. 일례로, 리포솜은, 제프스 등에 의해 기재된 바와 같이, 55% 콜레스테롤, 20% 디스테로일포스파티딜콜린(DSPC), 10% PEG-S-DSG 및 15% 1,2-디올레일옥시-N,N-디메틸아미노프로판(DODMA)을 비제한적으로 함유할 수 있다. 또다른 예로서, 특정 리포솜 제형은, 헤이스(Heyes) 등에 의해 기재된 바와 같이, 48% 콜레스테롤, 20% DSPC, 2% PEG-c-DMA 및 30% 양이온성 지질을 비제한적으로 함유할 수 있고, 여기서 상기 양이온성 지질은 1,2-디스테아릴옥시-N,N-디메틸아미노프로판(DSDMA), DODMA, DLin-DMA, 또는 1,2-디리놀레일옥시-3-디메틸아미노프로판(DLenDMA)일 수 있다.
- [0322] 하나의 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 및/또는 mmRNA는 관능화된 지질 이중층 사이에 가교결합을 가질 수 있는 지질 소포 내에 제형화될 수 있다.
- [0323] 하나의 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 및/또는 mmRNA는 지질-다가 양이온 복합체 내에 제형화될 수 있다. 지질-다가 양이온 복합체의 형성은 당해 기술분야에 공지된 방법에 의해 및/또는 미국 특허 공보 제20120178702호에 기재된 바와 같이 달성될 수 있으며, 상기 문헌은 그 전체 내용이 인용에 의해 본원에 포함된다. 비제한적인 예로서, 다가 양이온은 양이온성 펩타이드 또는 폴리펩타이드, 예를 들면, 폴리리신, 폴리오르니틴 및/또는 폴리아르기닌을 비제한적으로 포함할 수 있다. 또다른 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 및/또는 mmRNA는 중성 지질, 예를 들면, 이에 제한되는 것은 아니지만, 콜레스테롤 또는 디올레오일 포스파티딜에탄올아민(DOPE)을 추가로 포함할 수 있는 지질-다가 양이온 복합체 내에 제형화될 수 있다.
- [0324] 리포솜 제형은 양이온성 지질 구성요소, 양이온성 지질 포화도, 폐길화의 성질, 모든 구성요소들의 비, 및 크기

와 같은 생물물리학 파라미터의 선택에 의해 영향을 받을 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다. Semple 등에 의한 하나의 예시에서(참조: Semple et al. Nature Biotech. 2010 28:172-176), 리포솜 제형은 57.1% 양이온성 지질, 7.1% 디팔미토일포스파티딜콜린, 34.3% 콜레스테롤 및 1.4% PEG-c-DMA로 구성되었다. 또 다른 예로서, 양이온성 지질의 조성 변화는 siRNA를 각종 항원 제시 세포에 더욱 효과적으로 전달할 수 있었다(참조: Basha et al. Mol Ther. 2011 19:2186-2200; 이의 전체 내용이 인용에 의해 본원에 포함된다).

[0325]

일부 실시형태에서, LNP 제형의 약동학 특성 및/또는 생물분포를 변경하기 위해, LNP 제형 중 PEG의 비를 증가 또는 감소시킬 수 있고/있거나 PEG 지질의 탄소쇄 길이를 C14로부터 C18로 변형시킬 수 있다. 비제한적인 예로서, LNP 제형은 양이온성 지질, DSPC 및 콜레스테롤에 비교하여 1 내지 5%의 지질 몰 비의 PEG-c-DOMG를 함유할 수 있다. 또 다른 실시형태에서, PEG-c-DOMG는 PEG 지질, 예를 들면, PEG-DSG(1,2-디스테아로일-sn-글리세롤, 메톡시폴리에틸렌 글리콜) 또는 PEG-DPG(1,2-디팔미토일-sn-글리세롤, 메톡시폴리에틸렌 글리콜)로 대체될 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 양이온성 지질은 당해 기술분야에 공지된 임의의 지질, 예를 들면, DLin-MC3-DMA, DLin-DMA, C12-200 및 DLin-KC2-DMA로부터 선택될 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0326]

하나의 실시형태에서, 양이온성 지질은 국제 공보 제WO2012040184호, 제WO2011153120호, 제WO2011149733호, 제WO2011090965호, 제WO2011043913호, 제WO2011022460호, 제WO2012061259호, 제WO2012054365호, 제WO2012044638호, 제WO2010080724호, 제WO201021865호 및 제WO2008103276호, 미국 특허 제7,893,302호 및 제7,404,969호 및 미국 특허 공보 제US20100036115호에 기재된 양이온성 지질로부터 비제한적으로 선택될 수 있고; 상기 문헌들 각각은 그 전체 내용이 인용에 의해 본원에 포함된다. 또 다른 실시형태에서, 양이온성 지질은 국제 공보 제WO2012040184호, 제WO2011153120호, 제WO2011149733호, 제WO2011090965호, 제WO2011043913호, 제WO2011022460호, 제WO2012061259호, 제WO2012054365호 및 제WO2012044638호에 기재된 화학식 A로부터 비제한적으로 선택될 수 있고; 상기 문헌들 각각은 그 전체 내용이 인용에 의해 본원에 포함된다. 추가의 또 다른 실시형태에서, 양이온성 지질은 국제 공보 제WO2008103276호의 화학식 CLI 내지 CLXXIX, 미국 특허 제7,893,302호의 화학식 CLI 내지 CLXXIX, 미국 특허 제7,404,969호의 화학식 CLI 내지 CLXXXII 및 미국 특허 공보 제US20100036115호의 화학식 I 내지 VI로부터 비제한적으로 선택될 수 있고; 상기 문헌들 각각은 그 전체 내용이 인용에 의해 본원에 포함된다. 비제한적인 예로서, 양이온성 지질은 (20Z,23Z)-N,N-디메틸노나코사-20,23-디엔-10-아민, (17Z,20Z)-N,N-디메틸헥사코사-17,20-디엔-9-아민, (1Z, 19Z)-N5N-디메틸헨타코사-16,19-디엔-8-아민, (13Z,16Z)-N,N-디메틸도코사-13,16-디엔-5-아민, (12Z,15Z)-NJN-디메틸헨타코사-12,15-디엔-4-아민, (14Z,17Z)-N,N-디메틸트리코사-14,17-디엔-6-아민, (15Z,18Z)-N,N-디메틸테트라코사-15,18-디엔-7-아민, (18Z,21Z)-N,N-디메틸헵타코사-18,21-디엔-10-아민, (15Z,18Z)-N,N-디메틸테트라코사-15,18-디엔-5-아민, (14Z,17Z)-N,N-디메틸트리코사-14,17-디엔-4-아민, (19Z,22Z)-N,N-디메틸옥타코사-19,22-디엔-9-아민, (18Z,21Z)-N,N-디메틸헵타코사-18,21-디엔-8-아민, (17Z,20Z)-N,N-디메틸헥사코사-17,20-디엔-7-아민, (16Z;19Z)-N,N-디메틸헨타코사-16,19-디엔-6-아민, (22Z,25Z)-N,N-디메틸헨트리아콘타-22,25-디엔-10-아민, (21Z,24Z)-N,N-디메틸트리아콘타-21,24-디엔-9-아민, (18Z)-N,N-디메틸헵타코스-18-엔-10-아민, (17Z)-N,N-디메틸헥사코스-17-엔-9-아민, (19Z,22Z)-NJN-디메틸옥타코사-19,22-디엔-7-아민, N,N-디메틸헵타코산-10-아민, (20Z,23Z)-N-에틸-N-메틸노나코사-20,23-디엔-10-아민, 1-[(11Z,14Z)-1-노닐리코사-11,14-디엔-1-일]피롤리딘, (20Z)-N,N-디메틸헵타코스-20-엔-10-아민, (15Z)-N,N-디메틸헵타코스-15-엔-10-아민, (14Z)-N,N-디메틸노나코스-14-엔-10-아민, (17Z)-N,N-디메틸노나코스-17-엔-10-아민, (24Z)-N,N-디메틸트리트리아콘트-24-엔-10-아민, (20Z)-N,N-디메틸노나코스-20-엔-10-아민, (22Z)-N,N-디메틸헨트리아콘트-22-엔-10-아민, (16Z)-N,N-디메틸헨타코스-16-엔-8-아민, (12Z,15Z)-N,N-디메틸-2-노닐헨타코사-12,15-디엔-1-아민, (13Z,16Z)-N,N-디메틸-3-노닐도코사-13,16-디엔-1-아민, N,N-디메틸-1-[(1S,2R)-2-옥틸사이클로프로필]헵타데칸-8-아민, 1-[(1S,2R)-2-헥실사이클로프로필]-N,N-디메틸노나데칸-10-아민, N,N-디메틸-1-[(1S,2R)-2-옥틸사이클로프로필]노나데칸-10-아민, N,N-디메틸-21-[(1S,2R)-2-옥틸사이클로프로필]헨타코산-10-아민, N,N-디메틸-1-[(1S,2S)-2-[(1R,2R)-2-펜틸사이클로프로필]메틸]사이클로프로필]노나데칸-10-아민, N,N-디메틸-1-[(1S,2R)-2-옥틸사이클로프로필]헥사데칸-8-아민, N,N-디메틸-[(1R,2S)-2-운데실사이클로프로필]테트라데칸-5-아민, N,N-디메틸-3-{7-[(1S,2R)-2-옥틸사이클로프로필]헵탈}도데칸-1-아민, 1-[(1R,2S)-2-헵탈]사이클로프로필]-N,N-디메틸옥타데칸-9-아민, 1-[(1S,2R)-2-데실사이클로프로필]-N,N-디메틸헨타데칸-6-아민, N,N-디메틸-1-[(1S,2R)-2-옥틸사이클로프로필]펜타데칸-8-아민, R-N,N-디메틸-1-[(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디엔-1-일옥시]-3-(옥틸옥시)프로판-2-아민, S-N,N-디메틸-1-[(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디엔-1-일옥시]-3-(옥틸옥시)프로판-2-아민, 1-{2-[(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디엔-1-일옥시]-1-[(옥틸옥시)메틸]에틸}피롤리딘, (2S)-N,N-디메틸-1-[(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디엔-1-일옥시]-3-[(5Z)-옥트-5-엔-1-일옥시]프로판-2-아민, 1-{2-[(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디엔-1-일옥시]-1-[(옥

틸옥시)메틸}에틸}아제티딘, (2S)-1-(헥실옥시)-N,N-디메틸-3-[(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디엔-1-일옥시]프로판-2-아민, (2S)-1-(헵틸옥시)-N,N-디메틸-3-[(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디엔-1-일옥시]프로판-2-아민, N,N-디메틸-1-(노닐옥시)-3-[(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디엔-1-일옥시]프로판-2-아민, N,N-디메틸-1-[(9Z)-옥타데카-9-엔-1-일옥시]-3-(옥틸옥시)프로판-2-아민(화합물 9); (2S)-N,N-디메틸-1-[(6Z,9Z,12Z)-옥타데카-6,9,12-트리엔-1-일옥시]-3-(옥틸옥시)프로판-2-아민,

(2S)-1-[(11Z,14Z)-아이코사-11,14-디엔-1-일옥시]-N,N-디메틸-3-(펜틸옥시)프로판-2-아민, (2S)-1-(헥실옥시)-3-[(11Z,14Z)-아이코사-11,14-디엔-1-일옥시]-N,N-디메틸프로판-2-아민, 1-[(11Z,14Z)-아이코사-11,14-디엔-1-일옥시]-N,N-디메틸-3-(옥틸옥시)프로판-2-아민, 1-[(13Z,16Z)-도코사-13,16-디엔-1-일옥시]-N,N-디메틸-3-(옥틸옥시)프로판-2-아민, (2S)-1-[(13Z,16Z)-도코사-13,16-디엔-1-일옥시]-3-(헥실옥시)-N,N-디메틸프로판-2-아민, (2S)-1-[(13Z)-도코스-13-엔-1-일옥시]-3-(헥실옥시)-N,N-디메틸프로판-2-아민, 1-[(13Z)-도코스-13-엔-1-일옥시]-N,N-디메틸-3-(옥틸옥시)프로판-2-아민, 1-[(9Z)-헥사데카-9-엔-1-일옥시]-N,N-디메틸-3-(옥틸옥시)프로판-2-아민, (2R)-N,N-디메틸-H(1-메토일옥틸)옥시]-3-[(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디엔-1-일옥시]프로판-2-아민, (2R)-1-[(3,7-디메틸옥틸)옥시]-N,N-디메틸-3-[(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디엔-1-일옥시]프로판-2-아민, N,N-디메틸-1-(옥틸옥시)-3-({8-[(1S,2S)-2-[(1R,2R)-2-펜틸사이클로프로필]메틸}사이클로프로필)옥틸)옥시)프로판-2-아민, N,N-디메틸-1-({8-(2-옥틸사이클로프로필)옥틸)옥시}-3-(옥틸옥시)프로판-2-아민 및 (11E,20Z,23Z)-N,N-디메틸노나코사-11,20,2-트리엔-10-아민 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 입체이성체로부터 선택될 수 있다.

[0327] 하나의 실시형태에서, 양이온성 지질은 당해 기술분야에 공지된 방법에 의해 및/또는 국제 공보 제W02012040184호, 제W02011153120호, 제W02011149733호, 제W02011090965호, 제W02011043913호, 제W02011022460호, 제W02012061259호, 제W02012054365호, 제W02012044638호, 제W02010080724호 및 제W0201021865호에 기재된 바와 같이 합성될 수 있고; 상기 문헌들 각각은 그 전체 내용이 인용에 의해 본원에 포함된다.

[0328] 하나의 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 및/또는 mmRNA의 LNP 제형은 PEG-c-DOMG를 3% 지질 몰 비로 함유할 수 있다. 또다른 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 및/또는 mmRNA의 LNP 제형은 PEG-c-DOMG를 1.5% 지질 몰 비로 함유할 수 있다.

[0329] 하나의 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 및/또는 mmRNA의 약제학적 조성물은 국제 공보 제 2012099755호에 기재된 폐길화된 지질들 중 적어도 하나를 포함할 수 있고, 상기 문헌은 인용에 의해 본원에 포함된다.

[0330] 하나의 실시형태에서, LNP 제형은 PEG-DMG 2000(1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[메톡시(폴리에틸렌 글리콜)-2000]을 함유할 수 있다. 하나의 실시형태에서, LNP 제형은 PEG-DMG 2000, 당해 기술분야에 공지된 양이온성 지질 및 적어도 하나의 다른 구성요소를 함유할 수 있다. 또다른 실시형태에서, LNP 제형은 PEG-DMG 2000, 당해 기술분야에 공지된 양이온성 지질, DSPC 및 콜레스테롤을 함유할 수 있다. 비제한적인 예로서, LNP 제형은 PEG-DMG 2000, DLin-DMA, DSPC 및 콜레스테롤을 함유할 수 있다. 또다른 비제한적인 예로서, LNP 제형은 PEG-DMG 2000, DLin-DMA, DSPC 및 콜레스테롤을 2:40:10:48의 몰 비로 함유할 수 있다(참조: Geall et al., Nonviral delivery of self-amplifying RNA vaccines, PNAS 2012; PMID: 22908294).

[0331] 하나의 실시형태에서, LNP 제형은 국제 공보 제W02011127255호 또는 제W02008103276호에 기재된 방법에 의해 제형화될 수 있고, 상기 문헌들 각각은 그 전체 내용이 인용에 의해 본원에 포함된다. 비제한적인 예로서, 본원에 기재된 변형 RNA는 제W02011127255호 및/또는 제W02008103276호에 기재된 바와 같이 LNP 제형 내에 캡슐화될 수 있고; 상기 문헌들 각각은 그 전체 내용이 인용에 의해 본원에 포함된다.

[0332] 하나의 실시형태에서, 본원에 기재된 LNP 제형은 다가 양이온성 조성물을 포함할 수 있다. 비제한적인 예로서, 다가 양이온성 조성물은 미국 특허 공보 제US20050222064호의 화학식 1 내지 60으로부터 선택될 수 있고; 상기 문헌은 그 전체 내용이 인용에 의해 본원에 포함된다. 또다른 실시형태에서, 다가 양이온성 조성물을 포함하는 LNP 제형은 본원에 기재된 변형 RNA의 생체내 및/또는 시험관내 전달에 사용될 수 있다.

[0333] 하나의 실시형태에서, 본원에 기재된 LNP 제형은 투과성 증진제 분자를 추가로 포함할 수 있다. 비제한적인 투과성 증진제 분자는 미국 특허 공보 제US20050222064호에 기재되어 있고; 상기 문헌은 그 전체 내용이 인용에 의해 본원에 포함된다.

[0334] 하나의 실시형태에서, 약제학적 조성물은, 리포솜, 예를 들면, DiLa2 리포솜(미국 워싱턴주 보셀 소재의 마리나 바이오테크), SMARTICLES®(미국 워싱턴주 보셀 소재의 마리나 바이오테크), 중성 DOPC(1,2-디올레오일-sn-글리

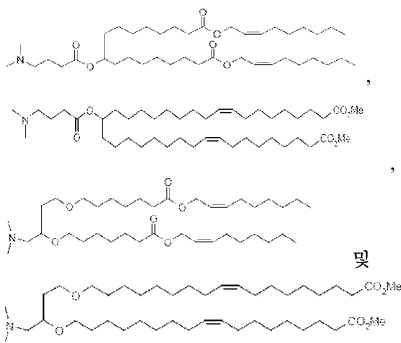
세로-3-포스포콜린) 기반 리포솜(예를 들면, 난소암을 위한 siRNA 전달(참조: Landen et al. Cancer Biology & Therapy 2006 5(12)1708-1713)) 및 히알우로난-코팅된 리포솜(이스라엘 소재의 콰이어트 테라퓨틱스(Quiet Therapeutics)) 내에 제형화될 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0335]

지질 나노입자 제형은 양이온성 지질을, 신속하게 제거되는 지질 나노입자(reLNP)로서 공지된 생물분해성의 양이온성 지질로 대체함으로써 개선될 수 있다. 이온화가능한 양이온성 지질, 예를 들면, 이에 제한되는 것은 아니지만, DLinDMA, DLin-KC2-DMA 및 DLin-MC3-DMA는 경시적으로 혈장 및 조직 내에 축적되는 것으로 밝혀졌으며 독성의 잠재적인 원인일 수 있다. 신속하게 제거되는 지질의 신속한 메커니즘은 래트에서 지질 나노입자의 내약성 및 치료 지수를 1mg/kg 용량으로부터 10mg/kg 용량의 크기로 개선시킬 수 있다. 효소적으로 분해되는 에스테르 연결기를 포함시키는 것은 reLNP 제형의 활성을 여전히 유지하면서 양이온성 구성요소의 분해 및 대사 프로파일을 개선시킬 수 있다. 에스테르 연결기는 지질 쇄 내에 내부적으로 위치할 수 있거나, 이는 지질 쇄 단부의 말단에 위치할 수 있다. 내부의 에스테르 연결기는 지질 쇄 내의 임의의 탄소를 대체할 수 있다.

[0336]

하나의 실시형태에서, 내부의 에스테르 연결기는 포화된 탄소의 양 측면 상에 위치할 수 있다. reLNP의 비제한적인 예는 다음을 포함한다.



[0337]

[0338]

하나의 실시형태에서는, 나노종(nanospecies)들, 중합체 및 면역원을 포함할 수 있는 지질 나노입자를 전달함으로써 면역 반응을 도출할 수 있다(미국 공보 제20120189700호 및 국제 공보 제W02012099805호; 상기 문헌들 각각은 그 전체 내용이 인용에 의해 본원에 포함된다). 중합체는 나노종들을 캡슐화할 수 있거나 나노종들을 부분적으로 캡슐화할 수 있다.

[0339]

지질 나노입자를 가공하여 입자의 표면 특성을 변경시켜, 지질 나노입자가 점막 장벽을 투과할 수 있도록 할 수 있다. 점액은 점막 조직, 예를 들면, 구강(예를 들면, 혀막 및 식도막 및 편도선 조직), 안구, 위장(예를 들면, 위, 소장, 대장, 결장, 직장), 코, 호흡기(예를 들면, 코, 인두, 기관 및 기관지 막), 생식기(예를 들면, 질, 자궁 및 요도 막) 상에 위치하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 더 높은 약물 캡슐화 효율 및 다양한 약물의 지속적인 전달을 제공하는 능력으로 인해 선호되는 10 내지 200nm 초과의 나노입자는 너무 커서 점막 장벽을 통해 신속하게 확산될 수 없는 것으로 사료된다. 점액은 계속해서 분비되고, 흘러지고, 폐기되거나 소화되고 재순환되므로, 포획된 입자의 대부분이 몇 초 내에 또는 몇 시간 내에 점막 조직으로부터 제거될 수 있다. 저분자량 폴리에틸렌 글리콜(PEG)로 조밀하게 코팅된 거대 중합체 나노입자(직경 200nm 내지 500nm)는 물 중에서 확산되는 동일 입자보다 단지 4 내지 6배 더 낮게 점액을 통해 확산되었다(참조: Lai et al. PNAS 2007 104(5):1482-487; Lai et al. Adv Drug Deliv Rev. 2009 61(2): 158-171; 상기 문헌들 각각은 그 전체 내용이 인용에 의해 본원에 포함된다). 나노 입자의 이동은 광표백 후 형광 회복(FRAP: fluorescence recovery after photobleaching) 및 고해상도 다중 입자 트래킹(MPT: multiple particle tracking)을 비제한적으로 포함하는 형광 현미경 기술 및/또는 침투 속도를 이용하여 측정될 수 있다.

[0340]

점액을 투과하도록 가공된 지질 나노입자는 중합체 물질(즉, 중합체 코어) 및/또는 중합체-비타민 접합체 및/또는 3블록 공중합체를 포함할 수 있다. 중합체 물질에는 폴리아민, 폴리에테르, 폴리아미드, 폴리에스테르, 폴리카바메이트, 폴리우레아, 폴리카보네이트, 폴리(스티렌), 폴리아미드, 폴리설폰, 폴리우레탄, 폴리아세틸렌, 폴리에틸렌, 폴리에틸렌이민, 폴리이소시아네이트, 폴리아크릴레이트, 폴리메타크릴레이트, 폴리아크릴로니트릴 및 폴리아릴레이트가 포함될 수 있다. 중합체 물질은 생물분해성 및/또는 생물적합성일 수 있다. 특정 중합체의 비제한적인 예에는 폴리(카프롤락톤)(PCL), 에틸렌 비닐 아세테이트 중합체(EVA), 폴리(락트산)(PLA), 폴리(L-락트산)(PLLA), 폴리(글리콜산)(PGA), 폴리(락트산-코-글리콜산)(PLGA), 폴리(L-락트산-코-글리콜산)(PLLGA), 폴리(D,L-락티드)(PDLA), 폴리(L-락티드)(PLLA), 폴리(D,L-락티드-코-카프롤락톤), 폴리(D,L-락티드)

드-코-카프롤락톤-코-글리콜리드), 폴리(D,L-락티드-코-PEO-코-D,L-락티드), 폴리(D,L-락티드-코-PP0-코-D,L-락티드), 폴리알킬 시아노아크릴레이트, 폴리우레탄, 폴리-L-리신(PLL), 하이드록시프로필 메타크릴레이트(HPMA), 폴리에틸렌글리콜, 폴리-L-글루탐산, 폴리(하이드록시산), 폴리안하이드라이드, 폴리오르토에스테르, 폴리(에스테르 아미드), 폴리아미드, 폴리(에스테르 에테르), 폴리카보네이트, 폴리알킬렌, 예를 들면, 폴리에틸렌 및 폴리프로필렌, 폴리알킬렌 글리콜, 예를 들면, 폴리(에틸렌 글리콜)(PEG), 폴리알킬렌 옥사이드(PEO), 폴리알킬렌 테레프탈레이트, 예를 들면, 폴리(에틸렌 테레프탈레이트), 폴리비닐 알코올(PVA), 폴리비닐 에테르, 폴리비닐 에스테르, 예를 들면, 폴리(비닐 아세테이트), 폴리비닐 할라이드, 예를 들면, 폴리(비닐 클로라이드)(PVC), 폴리비닐피롤리돈, 폴리실록산, 폴리스티렌(PS), 폴리우레탄, 유도체화된 셀룰로스, 예를 들면, 알킬 셀룰로스, 하이드록시알킬 셀룰로스, 셀룰로스 에테르, 셀룰로스 에스테르, 니트로 셀룰로스, 하이드록시프로필셀룰로스, 카복시메틸셀룰로스, 아크릴산 중합체, 예를 들면, 폴리(메틸(메트)아크릴레이트)(PMMA), 폴리(에틸(메트)아크릴레이트), 폴리(부틸(메트)아크릴레이트), 폴리(이소부틸(메트)아크릴레이트), 폴리(헥실(메트)아크릴레이트), 폴리(이소데실(메트)아크릴레이트), 폴리(라우릴(메트)아크릴레이트), 폴리(페닐(메트)아크릴레이트), 폴리(메틸 아크릴레이트), 폴리(이소프로필 아크릴레이트), 폴리(이소부틸 아크릴레이트), 폴리(옥타데실 아크릴레이트) 및 이들의 공중합체 및 혼합물, 폴리디옥사논 및 이의 공중합체, 폴리하이드록시알카노에이트, 폴리프로필렌 푸마레이트, 폴리옥시메틸렌, 폴록사머, 폴리(오르토)에스테르, 폴리(부틸산), 폴리(발레르산), 폴리(락티드-코-카프롤락톤), 및 트리메틸렌 카보네이트, 폴리비닐피롤리돈이 포함된다. 지질 나노입자는 공중합체, 예를 들면, 블록 공중합체 및 (폴리(에틸렌 글리콜))-(폴리(프로필렌 옥사이드))-(폴리(에틸렌 글리콜)) 3블록 공중합체로 코팅될 수 있거나 그와 관련될 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다(미국 공보 제 20120121718호 및 미국 공보 제2010003337호 참조; 상기 문헌들 각각은 그 전체 내용이 인용에 의해 본원에 포함된다). 공중합체는 일반적으로 안전하다고 여겨지는(GRAS) 중합체일 수 있으며, 지질 나노입자의 형성은 새로운 화학적 개체가 생성되지 않도록 하는 방식으로 이루어질 수 있다. 예를 들면, 지질 나노입자는 새로운 화학적 개체를 형성하지 않으면서 PLGA 나노입자를 코팅하는 폴록사머를 포함할 수 있고, 이는 여전히 사람 점액을 신속하게 투과한다(참조: Yang et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2011 50:2597-2600; 상기 문헌은 그 전체 내용이 인용에 의해 본원에 포함된다).

[0341] 중합체-비타민 접합체의 비타민은 비타민 E일 수 있다. 접합체의 비타민 부분은 다른 적합한 구성요소, 예를 들면, 비타민 A, 비타민 E, 다른 비타민, 콜레스테롤, 소수성 모이어티, 또는 다른 계면활성제의 소수성 구성요소(예를 들면, 스테롤 쇠, 지방산, 탄화수소 쇠 및 알킬렌 옥사이드 쇠)로 치환될 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0342] 점액을 투과하도록 가공된 지질 나노입자는 표면 변형제, 예를 들면, mmRNA, 음이온성 단백질(예를 들면, 소 혈청 알부민), 계면활성제(예를 들면, 양이온성 계면활성제, 예를 들면, 디메틸디옥타데실-암모늄 브로마이드), 당류 또는 당 유도체(예를 들면, 사이클로덱스트린), 핵산, 중합체(예를 들면, 헤파린, 폴리에틸렌 글리콜 및 폴록사머), 점액 용해제(예를 들면, N-아세틸시스테인, 머그워트(mugwort), 브로멜라인, 파파인, 클레로덴드럼(clerodendrum), 아세틸시스테인, 브롬헥신, 카보시스테인, 에프라지논, 메스나, 암브록솔, 소브레롤, 도미오돌, 레토스테인, 스테프로닌, 티오프로닌, 겔술린, 티모신 β4 도르나제 알파, 벨테넥신, 에르도스테인) 및, rhDNase를 포함하는 각종 DNase를 포함할 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 표면 변형제는 지질 나노입자의 표면 내에 매립 또는 메쉬화(enmeshed)될 수 있거나 (예를 들면, 코팅, 흡착, 공유 결합 또는 다른 공정에 의해) 지질 나노입자의 표면 상에 배치될 수 있다(미국 공보 제20100215580호 및 미국 공보 제20080166414호 참조; 상기 문헌들 각각은 그 전체 내용이 인용에 의해 본원에 포함된다).

[0343] 점액을 투과하는 지질 나노입자는 본원에 기재된 적어도 하나의 mmRNA를 포함할 수 있다. mmRNA는 지질 나노입자 내에 캡슐화될 수 있고/있거나 상기 입자 표면 상에 배치될 수 있다. mmRNA는 지질 나노입자에 공유 결합될 수 있다. 점액을 투과하는 지질 나노입자의 제형은 복수의 나노입자를 포함할 수 있다. 또한, 제형은 점액과 상호작용하고 주변 점액의 구조 및/또는 점착 특성을 변경시켜 점액부착을 감소시킬 수 있는 입자를 함유할 수 있으며, 이는 점액 투과성 지질 나노입자의 점막 조직으로의 전달을 증가시킬 수 있다.

[0344] 하나의 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA는 리포플렉스, 예를 들면, 제한 없이, ATUPLEX™ 시스템, DACC 시스템, DBTC 시스템 및 사일런스 테라퓨틱스(Silence Therapeutics, 영국 런던 소재)로부터의 다른 siRNA-리포플렉스 기술, STEMAGENT®(미국 매사추세츠주 캠브리지 소재)로부터의 STEMFACT™, 및 폴리에틸렌이민(PEI) 또는 프로타민계의 표적화된 및 비-표적화된 핵산 전달제로서 제형화된다(참조: Aleku et al. *Cancer Res.* 2008 68:9788-9798; Strumberg et al. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2012 50:76-78; Santel et al., *Gene Ther* 2006 13:1222-1234; Santel et al., *Gene Ther* 2006 13:1360-1370; Gutbier et al., *Pulm*

Pharmacol. Ther. 2010 23:334-344; Kaufmann et al. Microvasc Res 2010 80:286-293 Weide et al. J Immunother. 2009 32:498-507; Weide et al. J Immunother. 2008 31:180-188; Pascolo Expert Opin. Biol. Ther. 4:1285-1294; Fotin-Mleczek et al., 2011 J. Immunother. 34:1-15; Song et al., Nature Biotechnol. 2005, 23:709-717; Peer et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 6;104:4095-4100; deFougerolles Hum Gene Ther. 2008 19:125-132; 상기 모든 문헌들은 그 전체 내용이 인용에 의해 본원에 포함된다).

[0345]

하나의 실시형태에서, 이러한 제형은 또한 이들이 생체내에서 간 세포, 면역 세포, 종양 세포, 내피 세포, 항원 제시 세포 및 백혈구를 비제한적으로 포함하는 상이한 세포 유형들로 수동적으로 또는 능동적으로 유도되도록 구성되거나 조성 변경될 수 있다(참조: Akinc et al. Mol Ther. 2010 18:1357-1364; Song et al., Nat Biotechnol. 2005 23:709-717; Judge et al., J Clin Invest. 2009 119:661-673; Kaufmann et al., Microvasc Res 2010 80:286-293; Santel et al., Gene Ther 2006 13:1222-1234; Santel et al., Gene Ther 2006 13:1360-1370; Gutbier et al., Pulm Pharmacol. Ther. 2010 23:334-344; Basha et al., Mol. Ther. 2011 19:2186-2200; Fenske and Cullis, Expert Opin Drug Deliv. 2008 5:25-44; Peer et al., Science. 2008 319:627-630; Peer and Lieberman, Gene Ther. 2011 18:1127-1133; 상기 모든 문헌들은 그 전체 내용이 인용에 의해 본원에 포함된다). 제형의 간 세포로의 수동적 표적화의 일례는 DLin-DMA, DLin-KC2-DMA 및 MC3-기반 지질 나노입자 제형을 포함하며, 이들은 생체내에서 아포지질단백질 E에 결합하고 간 세포 내에서 이들 제형의 결합 및 흡수를 촉진시키는 것으로 밝혀졌다(참조: Akinc et al. Mol Ther. 2010 18:1357-1364; 상기 문헌은 그 전체 내용이 인용에 의해 본원에 포함된다). 제형은 또한 이들 표면 상에서 상이한 리간드의 발현을 통해 선택적으로 표적화될 수 있으며, 이는 플레이트, 트랜스페린, N-아세틸갈락토사민(GalNAc) 및 항체 표적화 접근법에 의해 비제한적으로 예시되는 바와 같다(참조: Kolhatkar et al., Curr Drug Discov Technol. 2011 8:197-206; Musacchio and Torchilin, Front Biosci. 2011 16:1388-1412; Yu et al., Mol Membr Biol. 2010 27:286-298; Patil et al., Crit Rev Ther Drug Carrier Syst. 2008 25:1-61; Benoit et al., Biomacromolecules. 2011 12:2708-2714 Zhao et al., Expert Opin Drug Deliv. 2008 5:309-319; Akinc et al., Mol Ther. 2010 18:1357-1364; Srinivasan et al., Methods Mol Biol. 2012 820:105-116; Ben-Arie et al., Methods Mol Biol. 2012 757:497-507; Peer 2010 J Control Release. 20:63-68; Peer et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 104:4095-4100; Kim et al., Methods Mol Biol. 2011 721:339-353; Subramanya et al., Mol Ther. 2010 18:2028-2037; Song et al., Nat Biotechnol. 2005 23:709-717; Peer et al., Science. 2008 319:627-630; Peer and Lieberman, Gene Ther. 2011 18:1127-1133; 상기 모든 문헌들은 그 전체 내용이 인용에 의해 본원에 포함된다).

[0346]

하나의 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA는 고체 지질 나노입자로서 제형화된다. 고체 지질 나노입자(SLN)는 10 내지 1000nm의 평균 직경을 갖는 구형체일 수 있다. SLN은, 친유성 분자를 가용화시킬 수 있고 계면활성제 및/또는 유화제로 안정화될 수 있는 고체 지질 코어 매트릭스를 보유한다. 추가의 실시형태에서, 지질 나노입자는 자가-조립 지질-중합체 나노입자일 수 있다(참조: Zhang et al., ACS Nano, 2008, 2 (8), pp 1696-1702; 상기 문헌은 그 전체 내용이 인용에 의해 본원에 포함된다).

[0347]

리포솜, 리포플렉스 또는 지질 나노입자는 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA 유도성 단백질 생산의 효능을 개선시키는 데 사용될 수 있는데, 그 이유는 이들 제형은 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA에 의한 세포 형질감염을 증가시킬 수 있고/있거나; 암호화된 단백질의 번역을 증가시킬 수 있기 때문이다. 하나의 이러한 예시는 폴리플렉스 플라스미드 DNA의 효과적인 전신 전달을 가능하게 하기 위한 지질 캡슐화의 사용을 포함한다(참조: Heyes et al., Mol Ther. 2007 15:713-720; 상기 문헌은 그 전체 내용이 인용에 의해 본원에 포함된다). 리포솜, 리포플렉스 또는 지질 나노입자는 또한 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA의 안정성을 증가시키는 데 사용될 수 있다.

[0348]

하나의 실시형태에서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 및/또는 mmRNA는 조절된 방출 및/또는 표적화된 전달을 위해 제형화될 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, "조절된 방출"이란 치료적 결과를 달성하기 위해 특정 방출 패턴에 따르는 약제학적 조성물 또는 화합물 방출 프로파일을 나타낸다. 하나의 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA는 조절된 방출 및/또는 표적화된 전달을 위해 본원에 기재되고/되거나 당해 기술분야에 공지된 전달제 내에 캡슐화될 수 있다. 본원에서 사용된 용어 "캡슐화하다"란, 봉지하거나, 둘러싸거나 매입하는 것을 의미한다. 이것이 본 발명의 화합물의 제형화와 관련될 때, 캡슐화는 실질적이거나, 완전하거나 부분적일 수 있다. 용어 "실질적으로 캡슐화"이란 적어도 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, 99.9, 99.9% 초과 또는 99.999% 초과인 본 발명의 약제학적 조성물 또는 화합물이 전달제 내에 봉지되거나, 둘러싸이거나 매입될 수 있다는 것을 의미한다. "부분적 캡슐화"는 본 발명의 약제학적 조성물

또는 화합물의 10% 미만, 10, 20, 30, 40, 50% 또는 그 미만이 전달체 내에 봉지되거나, 둘러싸이거나 매입될 수 있다는 것을 의미한다. 유리하게는, 캡슐화는 형광 및/또는 전자 현미경 사진을 사용하여 본 발명의 약제학적 조성물 또는 화합물의 배출 또는 활성을 측정함으로써 결정될 수 있다. 예를 들면, 적어도 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, 99.9, 99.99% 또는 99.99% 초과와 본 발명의 약제학적 조성물 또는 화합물이 전달체 내에 캡슐화된다.

[0349] 또다른 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA는 지질 나노입자 또는 신속하게 제거되는 지질 나노입자 내에 캡슐화될 수 있고, 이어서 상기 지질 나노입자 또는 신속하게 제거되는 지질 나노입자는 본원에 기재되고/되거나 당해 기술분야에 공지된 중합체, 하이드로겔 및/또는 수술용 쥘런트 내에 캡슐화될 수 있다. 비제한적인 예로서, 중합체, 하이드로겔 또는 수술용 쥘런트는 PLGA, 에틸렌 비닐 아세테이트(EVAc), 폴록사머, GELSITE®(미국 플로리다주 알라추아 소재의 나노테라퓨틱스, 인코포레이션(Nanotherapeutics, Inc.)), HYLENEX®(미국 캘리포니아주 샌디에이고 소재의 할로자임 테라퓨틱스(Halozyme Therapeutics), 수술용 쥘런트, 예를 들면, 피브리노겐 중합체(미국 조지아주 코넬리아 소재의 에티콘 인코포레이션(Ethicon Inc.)), TISSELL®(미국 일리노이주 디어필드 소재의 박스터 인터내셔널, 인코포레이션(Baxter International, Inc)), PEG계 쥘런트 및 COSEAL®(미국 일리노이주 디어필드 소재의 박스터 인터내셔널, 인코포레이션)일 수 있다.

[0350] 하나의 실시형태에서, 지질 나노입자는 피험자 내에 주사될 때 겔을 형성할 수 있는, 당해 기술분야에 공지된 임의의 중합체 또는 하이드로겔 내에 캡슐화될 수 있다. 또다른 비제한적인 예로서, 지질 나노입자는 생물분해 가능한 중합체 매트릭스 내에 캡슐화될 수 있다.

[0351] 하나의 실시형태에서, 조절된 방출 및/또는 표적화된 전달을 위한 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA 제형은 또한 적어도 하나의 조절된 방출 코팅을 포함할 수 있다. 조절된 방출 코팅은 OPADRY®, 폴리비닐피롤리돈/비닐 아세테이트 공중합체, 폴리비닐피롤리돈, 하이드록시프로필 메틸셀룰로스, 하이드록시프로필 셀룰로스, 하이드록시에틸 셀룰로스, EUDRAGIT RL®, EUDRAGIT RS® 및 셀룰로스 유도체, 예를 들면, 에틸셀룰로스 수분산액(AQUACOAT® 및 SURELEASE®)을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0352] 하나의 실시형태에서, 조절된 방출 및/또는 표적화된 전달 제형은 다가 양이온 측쇄를 함유할 수 있는 적어도 하나의 분해성 폴리에스테르를 포함할 수 있다. 분해성 폴리에스테르는 폴리(세린 에스테르), 폴리(L-락티드-코-L-리신), 폴리(4-하이드록시-L-프롤린 에스테르) 및 이들의 조합물을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 또다른 실시형태에서, 분해성 폴리에스테르는 PEG 접합물을 포함하여, 폐기화된 중합체를 형성할 수 있다.

[0353] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 및/또는 mmRNA는 치료적 나노입자 내에 캡슐화될 수 있다. 치료적 나노입자는 본원에 기재되고 당해 기술분야, 예를 들면, 국제 공보 제WO2010005740호, 제WO2010030763호, 제WO2010005721호, 제WO2010005723호, 제WO2012054923호, 미국 공보 제US20110262491호, 제US20100104645호, 제US20100087337호, 제US20100068285호, 제US20110274759호, 제US20100068286호 및 미국 특허 제8,206,747호에 공지된 방법에 의해 제형화될 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니고; 상기 문헌들 각각은 그 전체 내용이 인용에 의해 본원에 포함된다. 또다른 실시형태에서, 치료적 중합체 나노입자는 미국 공보 제US20120140790호에 기재된 방법에 의해 확인될 수 있으며, 상기 문헌은 그 전체 내용이 인용에 의해 본원에 포함된다.

[0354] 하나의 실시형태에서, 치료적 나노입자는 지속 방출을 위해 제형화될 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, "지속 방출"이란 특정 기간에 걸쳐 소정의 방출 속도에 따르는 약제학적 조성물 또는 화합물을 나타낸다. 상기 기간은 수시간, 수일, 수주일, 수개월 및 수년을 포함할 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 비제한적인 예로서, 지속 방출성 나노입자는 중합체 및 치료제, 예를 들면, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 및 mmRNA를 포함할 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다(국제 공보 제2010075072호 및 미국 공보 제US20100216804호 및 제US20110217377호 참조, 상기 문헌들 각각은 그 전체 내용이 인용에 의해 본원에 포함된다).

[0355] 하나의 실시형태에서, 치료적 나노입자는 표적 특이적으로 제형화될 수 있다. 비제한적인 예로서, 치료적 나노입자는 코르티코스테로이드를 포함할 수 있다(국제 공보 제WO2011084518호 참조). 하나의 실시형태에서, 치료적 나노입자는 암 특이적으로 제형화될 수 있다. 비제한적인 예로서, 치료적 나노입자는 국제 공보 제WO2008121949호, 제WO2010005726호, 제WO2010005725호, 제WO2011084521호 및 미국 공보 제US20100069426호, 제US20120004293호 및 제US20100104655호에 기재된 나노입자 내에 제형화될 수 있고, 상기 문헌들 각각은 그 전체 내용이 인용에 의해 본원에 포함된다.

- [0356] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 나노입자는 중합체 매트릭스를 포함할 수 있다. 비제한적인 예로서, 나노입자는 2개 이상의 중합체, 예를 들면, 폴리에틸렌, 폴리카보네이트, 폴리안하이드라이드, 폴리하이드록시산, 폴리프로필푸마레이트, 폴리카프롤락톤, 폴리아미드, 폴리아세탈, 폴리에테르, 폴리에스테르, 폴리(오르토에스테르), 폴리스시아노아크릴레이트, 폴리비닐 알코올, 폴리우레탄, 폴리포스포젠, 폴리아크릴레이트, 폴리메타크릴레이트, 폴리스시아노아크릴레이트, 폴리우레아, 폴리스티렌, 폴리아민, 폴리리신, 폴리(에틸렌 이민), 폴리(세린 에스테르), 폴리(L-락티드-코-L-리신), 폴리(4-하이드록시-L-프롤린 에스테르) 또는 이들의 조합물을 포함할 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0357] 하나의 실시형태에서, 2블럭 공중합체는 PEG를 중합체, 예를 들면, 폴리에틸렌, 폴리카보네이트, 폴리안하이드라이드, 폴리하이드록시산, 폴리프로필푸마레이트, 폴리카프롤락톤, 폴리아미드, 폴리아세탈, 폴리에테르, 폴리에스테르, 폴리(오르토에스테르), 폴리스시아노아크릴레이트, 폴리비닐 알코올, 폴리우레탄, 폴리포스포젠, 폴리아크릴레이트, 폴리메타크릴레이트, 폴리스시아노아크릴레이트, 폴리우레아, 폴리스티렌, 폴리아민, 폴리리신, 폴리(에틸렌 이민), 폴리(세린 에스테르), 폴리(L-락티드-코-L-리신), 폴리(4-하이드록시-L-프롤린 에스테르) 또는 이들의 조합물과 조합하여 포함할 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0358] 하나의 실시형태에서, 치료적 나노입자는 2블럭 공중합체를 포함한다. 비제한적인 예로서, 치료적 나노입자는 PLGA-PEG 블럭 공중합체를 포함한다(미국 공보 제US20120004293호 및 미국 특허 제8,236,330호 참조, 상기 문헌들은 그 전체 내용이 인용에 의해 본원에 포함된다). 또다른 비제한적인 예에서, 치료적 나노입자는 PEG 및 PLA 또는 PEG 및 PLGA의 2블럭 공중합체를 포함하는 잠행(stealth) 나노입자이다(미국 특허 제No 8,246,968호 참조, 상기 문헌 각각은 그 전체 내용이 인용에 의해 본원에 포함된다).
- [0359] 하나의 실시형태에서, 치료적 나노입자는 적어도 하나의 아크릴 중합체를 포함할 수 있다. 아크릴 중합체는 아크릴산, 메타크릴산, 아크릴산 및 메타크릴산 공중합체, 메틸 메타크릴레이트 공중합체, 에톡시에틸 메타크릴레이트, 시아노에틸 메타크릴레이트, 아미노알킬 메타크릴레이트 공중합체, 폴리(아크릴산), 폴리(메타크릴산), 폴리스시아노아크릴레이트 및 이들의 조합물을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0360] 하나의 실시형태에서, 치료적 나노입자는 본원에 기재되고/되거나 당해 기술분야에 공지된 적어도 하나의 양이온성 중합체를 포함할 수 있다.
- [0361] 하나의 실시형태에서, 치료적 나노입자는 적어도 하나의 아민-함유 중합체, 예를 들면, 폴리리신, 폴리에틸렌아민, 폴리(아미도아민) 덴드리머 및 이들의 조합물을 포함할 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0362] 하나의 실시형태에서, 치료적 나노입자는 다량 양이온성 측쇄를 함유할 수 있는 적어도 하나의 분해성 폴리에스테르를 포함할 수 있다. 분해성 폴리에스테르에는 폴리(세린 에스테르), 폴리(L-락티드-코-L-리신), 폴리(4-하이드록시-L-프롤린 에스테르) 및 이들의 조합물이 포함되지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 또다른 실시형태에서, 분해성 폴리에스테르는 PEG 접합물을 포함하여, 폐기화된 중합체를 형성할 수 있다.
- [0363] 또다른 실시형태에서, 치료적 나노입자는 적어도 하나의 표적 리간드의 접합물을 포함할 수 있다.
- [0364] 하나의 실시형태에서, 치료적 나노입자는 암을 표적화하는 데 사용될 수 있는 수용액 내에 제형화될 수 있다(국제 공보 제WO2011084513호 및 미국 공보 제US20110294717호 참조, 상기 문헌들 각각은 그 전체 내용이 인용에 의해 본원에 포함된다).
- [0365] 하나의 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA는 합성 나노담체 내에 캡슐화되고/되거나, 합성 나노담체에 결합되고/되거나 합성 나노담체와 연합될 수 있다. 합성 나노담체는 당해 기술분야에 공지되고/되거나 본원에 기재된 방법을 사용하여 제형화될 수 있다. 비제한적인 예로서, 합성 나노담체는 국제 공보 제WO2010005740호, 제WO2010030763호 및 미국 공보 제US20110262491호, 제US20100104645호 및 제US20100087337호에 기재된 방법에 의해 제형화될 수 있고, 상기 문헌들 각각은 그 전체 내용이 인용에 의해 본원에 포함된다. 또다른 실시형태에서, 합성 나노담체 제형은 국제 공보 제WO2011072218호 및 미국 특허 제8,211,473호에 기재된 방법에 의해 동결건조될 수 있고; 상기 문헌들 각각은 그 전체 내용이 인용에 의해 본원에 포함된다.
- [0366] 하나의 실시형태에서, 합성 나노담체는 본원에 기재된 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 및/또는 mmRNA를 방출하기 위한 반응성 그룹을 함유할 수 있다(국제 공보 제WO20120952552호 및 미국 공보 제US20120171229호 참조, 상기 문헌들 각각은 그 전체 내용이 인용에 의해 본원에 포함된다).
- [0367] 하나의 실시형태에서, 합성 나노담체는 합성 나노담체의 전달로부터 면역 반응을 향상시키기 위한 면역자극제를 함유할 수 있다. 비제한적인 예로서, 합성 나노담체는 면역계의 Th1-기반 반응을 향상시킬 수 있는 Th1 면역자

극제를 포함할 수 있다(국제 공보 제WO2010123569호 및 미국 공보 제US20110223201호 참조, 상기 문헌들 각각은 그 전체 내용이 인용에 의해 본원에 포함된다).

[0368] 하나의 실시형태에서, 합성 나노담체는 표적화된 방출을 위해 제형화될 수 있다. 하나의 실시형태에서, 합성 나노담체는 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 및/또는 mmRNA를 특정한 pH에서 그리고/또는 원하는 기간 간격 후에 방출하도록 제형화된다. 비제한적인 예로서, 합성 나노입자는 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 및/또는 mmRNA를 24시간 후에 그리고/또는 4.5의 pH에서 방출하도록 제형화될 수 있다(국제 공보 제WO2010138193호 및 제WO2010138194호 및 미국 공보 제US20110020388호 및 제US20110027217호 참조, 상기 문헌들 각각은 그 전체 내용이 인용에 의해 본원에 포함된다).

[0369] 하나의 실시형태에서, 합성 나노담체는 본원에 기재된 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 및/또는 mmRNA의 조절되고/되거나 지속적인 방출을 위해 제형화될 수 있다. 비제한적인 예로서, 지속 방출을 위한 합성 나노담체는 당해 기술분야에 공지되고/되거나, 본원에 기재되고/되거나 국제 공보 제WO2010138192 및 미국 공보 제20100303850호에 기재된 바와 같은 방법에 의해 제형화될 수 있고, 상기 문헌들 각각은 그 전체 내용이 인용에 의해 본원에 포함된다.

[0370] 중합체, 생물분해성 나노입자 및 코어-셸 나노입자

[0371] 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 및 mmRNA는 천연 및/또는 합성 중합체를 사용하여 제형화될 수 있다. 전달에 사용될 수 있는 중합체의 비제한적인 예에는 미러스 바이오(MIRUS® Bio)(미국 위스콘신주 매디슨 소재) 및 로체 매디슨(Roche Madison)(미국 위스콘신주 매디슨 소재)으로부터의 Dynamic POLYCONJUGATE™ 제형, PHASERX™ 중합체 제형, 예를 들면, 제한 없이, SMARTT POLYMER TECHNOLOGY™(미국 워싱턴주 시애틀 소재), DMRI/DOPE, 폴록사머, 바이칼(Vical)(미국 캘리포니아주 샌디에이고 소재)로부터의 VAXFECTIN® 애쥬번트, 키토산, 칼란도 파마슈티칼스(Calando Pharmaceuticals)(미국 캘리포니아주 패서디나 소재)로부터의 사이클로렉스트린, 덴드리머 및 폴리(락트-코-글리콜산)(PLGA) 중합체, RONDEL™(RNAi/올리고뉴클레오타이드 나노입자 전달) 중합체(미국 캘리포니아주 패서디나 소재의 애로우헤드 리서치 코퍼레이션(Arrowhead Research Corporation)) 및 pH 반응성 공-블럭 중합체, 예를 들면, 이에 제한되는 것은 아니지만, PHASERX™(미국 워싱턴주 시애틀 소재)가 포함되지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0372] PLGA 제형의 비제한적인 예에는 PLGA 주사형 데포가 포함되지만, 이에 제한되는 것은 아니다(예를 들면, PLGA를 66% N-메틸-2-피롤리돈(NMP)에 용해시켜 형성되고 잔량은 수성 용매 및 류프롤리드인 ELIGARD®로서, 일단 주사되면, PLGA 및 류프롤리드 펩타이드가 피하 공간 내에 침적된다).

[0373] 많은 이들 중합체 접근법은 생체내 올리고뉴클레오타이드를 세포의 세포질 내로 전달하는 데 있어 효능이 입증되었다(문헌[deFougerolles Hum Gene Ther. 2008 19:125-132]에서 검토되었으며; 상기 문헌은 그 전체 내용이 인용에 의해 본원에 포함된다). 핵산의 강건한 생체내 전달을 제공하는 2가지 중합체 접근법은, 이 경우 짧은 간섭 RNA(siRNA)를 이용하는, 동적 다중 접합물 및 사이클로렉스트린계 나노입자이다. 이들 전달 접근법 중 첫 번째 것은 동적 다중 접합물을 사용하며, 이는 마우스 생체내에서 간 세포내 침투 내인성 표적 mRNA 및 siRNA를 효과적으로 전달하는 것으로 밝혀졌다(참조: Rozema et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 104:12982-12887). 이러한 특정한 접근법은 다중 구성요소 중합체 시스템이며, 이의 중요한 특징은 핵산, 이 경우 siRNA에 다이설파이드 결합을 통해 공유 결합되고, (전하 차폐를 위한) PEG 그룹과 (간 세포 표적화를 위한) N-아세틸갈락토사민 그룹 둘 모두가 pH-민감성 결합을 통해 결합되는 멤브레인-활성 중합체를 포함한다는 것이다(참조: Rozema et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 104:12982-12887). 간 세포에 결합되고 엔도솜 내로 진입할 때, 중합체 복합체는 낮은 pH 환경에서 해체되고, 이때 중합체가 이의 양전하를 노출시켜, 엔도솜 탈출 및 중합체로부터의 siRNA의 세포질 방출을 야기한다. N-아세틸갈락토사민 그룹을 만노스 그룹으로 대체함으로써, 표적화를 아시알로당단백질 수용체-발현 간 세포로부터 동양(sinusoidal) 내피 및 쿠퍼(Kupffer) 세포로 변경할 수 있는 것으로 밝혀졌다. 또다른 중합체 접근법은 트랜스페린-표적화된 사이클로렉스트린-함유 다가 양이온 나노입자의 사용을 수반한다. 이들 나노입자는 트랜스페린 수용체-발현 유잉 육종 종양 세포 내 EWS-FLI1 유전자 산물의 표적화된 침투화가 입증되었으며(참조: Hu-Lieskovan et al., Cancer Res.2005 65: 8984-8982), 이들 나노입자 내에 제형화된 siRNA는 사람이 아닌 영장류에서 내약성이 우수하였다(참조: Heidel et al., Proc Natl Acad Sci USA 2007 104:5715-21). 이들 전달 전략들 둘 모두는 표적화된 전달과 엔도솜 탈출 메커니즘 둘 모두를 사용하는 합리적인 접근법을 포함한다.

[0374] 중합체 제형은 (예를 들면, 근육내 또는 피하 주사 후) 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA의 지속적인 또는 지연된 방출을 허용할 수 있다. 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA에 대한 변경된 방출 프로파

일은, 예를 들면, 암호화된 단백질의 장기간에 걸친 번역을 야기할 수 있다. 중합체 제형은 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA의 안정성을 증가시키는 데에도 사용될 수 있다. 생물분해성 중합체는 종래 기술에서 mmRNA가 아닌 핵산을 분해로부터 보호하는 데 사용되었으며, 생체내 부하물의 지속적 방출을 야기하는 것으로 밝혀졌다(참조: Rozema et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 104:12982-12887; Sullivan et al., Expert Opin Drug Deliv. 2010 7:1433-1446; Convertine et al., Biomacromolecules. 2010 Oct 1; Chu et al., Acc Chem Res. 2012 Jan 13; Manganiello et al., Biomaterials. 2012 33:2301-2309; Benoit et al., Biomacromolecules. 2011 12:2708-2714; Singha et al., Nucleic Acid Ther. 2011 2:133-147; deFougerolles Hum Gene Ther. 2008 19:125-132; Schaffert and Wagner, Gene Ther. 2008 16:1131-1138; Chaturvedi et al., Expert Opin Drug Deliv. 2011 8:1455-1468; Davis, Mol Pharm. 2009 6:659-668; Davis, Nature 2010 464:1067-1070; 상기 문헌들 각각은 그 전체 내용이 인용에 의해 본원에 포함된다).

[0375] 하나의 실시형태에서, 약제학적 조성물은 지속 방출성 제형일 수 있다. 추가의 실시형태에서, 지속 방출성 제형은 피하 전달을 위한 것일 수 있다. 지속 방출성 제형은 PLGA 미세구, 에틸렌 비닐 아세테이트(EVAc), 폴록사머, GELSITE®(미국 플로리다주 알라추아 소재의 나노테라퓨틱스, 인코포레이션), HYLENEX®(미국 캘리포니아주 샌디에이고 소재의 할로자임 테라퓨틱스), 수술용 셸런트, 예를 들면, 피브리노겐 중합체(미국 조지아주 코넬리아 소재의 에티콘 인코포레이션), TISSELL®(미국 일리노이주 디어필드 소재의 박스터 인터내셔널, 인코포레이션), PEG계 셸런트 및 COSEAL®(미국 일리노이주 디어필드 소재의 박스터 인터내셔널, 인코포레이션)을 포함할 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0376] 비제한적인 예로서, 변형된 mRNA는, PLGA 미세구를 조정가능한 방출 속도(예를 들면, 수일 및 수주)로 제조하고 상기 변형된 mRNA를 상기 PLGA 미세구 내에 캡슐화함으로써, 캡슐화 공정 동안 상기 변형된 mRNA의 완전성을 유지하면서 PLGA 미세구 내에 제형화될 수 있다. EVAc는 임상전 지속 방출 이식 분야(예를 들면, 녹내장을 위한 필로카르핀 안과용 삽입물인 연장 방출성 제품 아큐서트(Ocusert) 또는 지속 방출성 프로게스테론 자궁내 장치인 프로게스타서트(progestasert); 경피 전달 시스템 테스트덤(Testoderm), 듀라게식(Duragesic) 및 셀레길린(Selegiline); 카테터)에서 광범위하게 사용되는 비-생물분해성, 생물적합성 중합체이다. 폴록사머 F-407 NF는, 5°C 미만의 온도에서 낮은 점도를 갖고 15°C 초과의 온도에서 고체 겔을 형성하는 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌-폴리옥시에틸렌의 친수성 비이온성 계면활성제 3블럭 공중합체이다. PEG계 수술용 셸런트는, 1분 내에 제조될 수 있고 3분 내에 밀봉되고 30일 이내에 재흡수되는 전달 장치 내에 혼합된 2개의 합성 PEG 구성요소를 포함한다. GELSITE® 및 천연 중합체는 투여 부위에서 제자리(in-situ) 겔화될 수 있다. 이들은 이온 상호작용을 통해 단백질 및 펩타이드 치료 후부 물질과 상호작용하여 안정화 효과를 제공하는 것으로 밝혀졌다.

[0377] 중합체 제형은 또한, 플레이트, 트랜스페린 및 N-아세틸갈락토사민(GaINAc)에 의해 비제한적으로 예시되는 바와 같은 상이한 리간드의 발현을 통해 선택적으로 표적화될 수 있다(참조: Benoit et al., Biomacromolecules. 2011 12:2708-2714; Rozema et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 104:12982-12887; Davis, Mol Pharm. 2009 6:659-668; Davis, Nature 2010 464:1067-1070; 상기 문헌들 각각은 그 전체 내용이 인용에 의해 본원에 포함된다).

[0378] 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 및/또는 mmRNA는 중합체 화합물과 함께 또는 중합체 화합물 내에 제형화될 수 있다. 중합체에는 폴리에텐, 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 폴리(1-리신)(PLL), PLL에 그래프트된 PEG, 양이온성 지질중합체, 생물분해성 양이온성 지질중합체, 폴리에틸렌이민(PEI), 가교결합된 분지형 폴리(알킬렌이민), 폴리아민 유도체, 변형된 폴록사머, 생물분해성 중합체, 생물분해성 블럭 공중합체, 생물분해성 랜덤 공중합체, 생물분해성 폴리에스테르 공중합체, 생물분해성 폴리에스테르 블럭 공중합체, 생물분해성 폴리에스테르 블럭 랜덤 공중합체, 직쇄 생물분해성 공중합체, 폴리[α -(4-아미노부틸)-L-글리콜산](PAGA), 생물분해성 가교결합된 양이온성 다중-블럭 공중합체, 폴리카보네이트, 폴리안하이드라이드, 폴리하이드록시산, 폴리프로필푸마레이트, 폴리카프롤락톤, 폴리아미드, 폴리아세탈, 폴리에테르, 폴리에스테르, 폴리(오르토에스테르), 폴리시아노아크릴레이트, 폴리비닐 알코올, 폴리우레탄, 폴리포스파젠, 폴리아크릴레이트, 폴리메타크릴레이트, 폴리시아노아크릴레이트, 폴리우레아, 폴리스티렌, 폴리아민, 폴리리신, 폴리(에틸렌 이민), 폴리(세린 에스테르), 폴리(L-락티드-코-L-리신), 폴리(4-하이드록시-L-프롤린 에스테르), 아크릴 중합체, 아민-함유 중합체 또는 이들의 조합물과 같은 적어도 하나의 중합체가 포함될 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0379] 비제한적인 예로서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 및/또는 mmRNA는 PLL과 그래프트된 PEG의 중합체 화합물을 사용해 제형화될 수 있으며, 이는 미국 특허 제6,177,274호에 기재된 바와 같고, 상기 문헌은 그 전체 내용이 인용에 의해 본원에 포함된다. 제형은 시험관내 세포 형질감염 또는 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 및/또는 mmRNA의 생체내 전달을 위해 사용될 수 있다. 또다른 예에서, 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물

및/또는 mmRNA는 양이온성 중합체를 갖는 용액 또는 매질 중에, 건조 약제학적 조성물 중에 또는 건조될 수 있는 용액 중에 현탁될 수 있고, 이는 미국 공보 제20090042829호 및 제20090042825호에 기재된 바와 같으며, 상기 문헌들 각각은 그 전체 내용이 인용에 의해 본원에 포함된다.

[0380] 또다른 비제한적인 예로서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA는 PLGA-PEG 블럭 공중합체를 사용해 제형화될 수 있다(미국 공보 제US20120004293호 및 미국 특허 제8,236,330호 참조, 상기 문헌들 각각은 그 전체 내용이 인용에 의해 본원에 포함된다). 비제한적인 예로서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA는 PEG 및 PLA 또는 PEG 및 PLGA의 2블럭 공중합체를 사용해 제형화될 수 있다(미국 특허 제 8,246,968호 참조, 상기 문헌은 그 전체 내용이 인용에 의해 본원에 포함된다).

[0381] 폴리아민 유도체는 핵산을 전달하거나 질환을 치료 및/또는 예방하거나 이식형 또는 주사형 장치 내에 포함시키기 위해 사용될 수 있다(미국 공보 제20100260817호 참조, 상기 문헌은 그 전체 내용이 인용에 의해 본원에 포함된다). 비제한적인 예로서, 약제학적 조성물은 변형된 핵산 및 mmRNA 및 미국 공보 제20100260817호(상기 문헌의 내용은 그 전체가 인용에 의해 본원에 포함된다)에 기재된 폴리아민 유도체를 포함할 수 있다.

[0382] 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA는 적어도 하나의 아크릴 중합체를 사용해 제형화될 수 있다. 아크릴 중합체에는 아크릴산, 메타크릴산, 아크릴산 및 메타크릴산 공중합체, 메틸 메타크릴레이트 공중합체, 에톡시에틸 메타크릴레이트, 시아노에틸 메타크릴레이트, 아미노 알킬 메타크릴레이트 공중합체, 폴리(아크릴산), 폴리(메타크릴산), 폴리시아노아크릴레이트 및 이들의 조합물이 포함되지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0383] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA는 국제 공보 제WO2011115862호, 제WO2012082574호 및 제WO2012068187호에 기재된 적어도 하나의 중합체를 사용해 제형화될 수 있고, 상기 문헌들 각각은 그 전체 내용이 인용에 의해 본원에 포함된다. 또다른 실시형태에서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA는 제WO2011115862호에 기재된 바와 같은 화학식 Z의 중합체를 사용해 제형화될 수 있고, 상기 문헌은 그 전체 내용이 인용에 의해 본원에 포함된다. 추가의 또다른 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA는 제WO2012082574호 또는 제WO2012068187호에 기재된 바와 같은 화학식 Z, Z' 또는 Z"의 중합체를 사용해 제형화될 수 있고, 상기 문헌들 각각은 그 전체 내용이 인용에 의해 본원에 포함된다. 본 발명의 변형 RNA와 함께 제형화되는 중합체는 제WO2012082574호 또는 제WO2012068187호에 기재된 방법에 의해 합성될 수 있고, 상기 문헌들 각각은 그 전체 내용이 인용에 의해 본원에 포함된다.

[0384] 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA의 제형은 폴리리신, 폴리에틸렌이민, 폴리(아미도아민) 덴드리머 또는 이들의 조합물과 같은 적어도 하나의 아민-함유 중합체를 포함할 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0385] 예를 들면, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 및/또는 mmRNA는 폴리(알킬렌 이민), 생물분해성의 양이온성 지질중합체, 생물분해성 블럭 공중합체, 생물분해성 중합체 또는 생물분해성 랜덤 공중합체, 생물분해성 폴리에스테르 블럭 공중합체, 생물분해성 폴리에스테르 중합체, 생물분해성 폴리에스테르 랜덤 공중합체, 직쇄 생물분해성 공중합체, PAGA, 생물분해성의 가교결합된 양이온성 다중-블럭 공중합체 또는 이들의 조합물을 포함하는 약제학적 화합물 내에 제형화될 수 있다. 생물분해성의 양이온성 지질중합체는 당해 기술분야에 공지되고/되거나 미국 특허 제6,696,038호, 미국 출원 제20030073619호 및 제20040142474호에 기재된 방법에 의해 제조될 수 있고, 상기 문헌들 각각은 그 전체 내용이 인용에 의해 본원에 포함된다. 폴리(알킬렌 이민)은 당해 기술분야에 공지되고/되거나 미국 공보 제20100004315호에 기재된 바와 같은 방법을 사용하여 제조될 수 있고, 상기 문헌은 그 전체 내용이 인용에 의해 본원에 포함된다. 생물분해성 중합체, 생물분해성 블럭 공중합체, 생물분해성 랜덤 공중합체, 생물분해성 폴리에스테르 블럭 공중합체, 생물분해성 폴리에스테르 중합체 또는 생물분해성 폴리에스테르 랜덤 공중합체는 당해 기술분야에 공지되고/되거나 미국 특허 제6,517,869호 및 제6,267,987호에 기재된 바와 같은 방법을 사용하여 제조될 수 있고, 상기 문헌들 각각의 내용은 그 전체가 인용에 의해 본원에 포함된다. 직쇄 생물분해성 공중합체는 당해 기술분야에 공지되고/되거나 미국 특허 제6,652,886호에 기재된 바와 같은 방법을 사용하여 제조될 수 있다. PAGA 중합체는 당해 기술분야에 공지되고/되거나 미국 특허 제6,217,912호에 기재된 바와 같은 방법을 사용하여 제조될 수 있고, 상기 문헌은 그 전체 내용이 인용에 의해 본원에 포함된다. PAGA 중합체를 중합체, 예를 들면, 폴리-L-리신, 폴리아르기닌, 폴리오르니틴, 히스톤, 아비딘, 프로타민, 폴리락티드 및 폴리(락티드-코-글리콜리드)와 공중합하여 공중합체 또는 블럭 공중합체를 형성할 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 생물분해성의 가교결합된 양이온성 다중-블럭 공중합체는 당해 기술분

야에 공지되고/되거나 미국 특허 제8,057,821호 또는 미국 공보 제2012009145호에 기재된 바와 같은 방법에 의해 제조될 수 있고, 상기 문헌들 각각은 그 전체 내용이 인용에 의해 본원에 포함된다. 예를 들면, 다중-블럭 공중합체는 분지된 폴리에틸렌이민에 비교해 구별되는 패턴을 갖는 직쇄 폴리에틸렌이민(LPEI) 블럭을 사용하여 합성될 수 있다. 또한, 조성물 또는 약제학적 조성물은 당해 기술분야에 공지되거나, 본원에 기재되거나, 미국 공보 제2010004315호 또는 미국 특허 제6,267,987호 및 제6,217,912호에 기재된 바와 같은 방법에 의해 제조될 수 있고, 상기 문헌들 각각은 그 전체 내용이 인용에 의해 본원에 포함된다.

[0386] 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 및 mmRNA는 다가 양이온성 측쇄를 함유할 수 있는 적어도 하나의 분해성 폴리에스테르를 사용해 제형화될 수 있다. 분해성 폴리에스테르는 폴리(세린 에스테르), 폴리(L-락티드-코-L-리신), 폴리(4-하이드록시-L-프롤린 에스테르) 및 이들의 조합물을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 또다른 실시형태에서, 분해성 폴리에스테르는 PEG 접합물을 포함하여, 폐경화된 중합체를 형성할 수 있다.

[0387] 하나의 실시형태에서, 본원에 기재된 중합체는 지질-말단 PEG에 접합될 수 있다. 비제한적인 예로서, PLGA는 지질-말단 PEG에 접합되어 PLGA-DSPE-PEG를 형성할 수 있다. 또다른 비제한적인 예로서, 본 발명과 함께 사용하기 위한 PEG 접합체는 국제 공보 제W02008103276호에 기재되어 있으며, 상기 문헌은 그 전체 내용이 인용에 의해 본원에 포함된다.

[0388] 하나의 실시형태에서, 본원에 기재된 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 및/또는 mmRNA는 또다른 화합물과 접합될 수 있다. 접합체의 비제한적인 예시는 미국 특허 제7,964,578호 및 제7,833,992호에 기재되어 있고, 상기 문헌들 각각은 그 전체 내용이 인용에 의해 본원에 포함된다. 또다른 실시형태에서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 및/또는 mmRNA는 미국 특허 제7,964,578호 및 제7,833,992호에 기재된 바와 같은 화학식 1 내지 122의 접합체와 접합될 수 있으며, 상기 문헌들 각각은 그 전체 내용이 인용에 의해 본원에 포함된다.

[0389] 전체 내용이 인용에 의해 본원에 포함되는 미국 공보 제2010004313호에 기재된 바와 같이, 유전자 전달 조성물은 뉴클레오타이드 서열 및 폴록사머를 포함할 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 및/또는 mmRNA는 미국 공보 제2010004313호에 기재된 폴록사머와 함께 유전자 전달 조성물에 사용될 수 있다.

[0390] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 중합체 제형은, 양이온성 담체를 포함할 수 있는 상기 중합체 제형을, 콜레스테롤 및 폴리에틸렌 글리콜 그룹에 공유 결합될 수 있는 양이온성 지질중합체와 접촉시킴으로써 안정화될 수 있다. 중합체 제형은 미국 공보 제20090042829호에 기재된 방법을 사용하여 양이온성 지질중합체와 접촉될 수 있고, 상기 문헌은 그 전체 내용이 인용에 의해 본원에 포함된다. 양이온성 담체에는 폴리에틸렌이민, 폴리(트리메틸렌이민), 폴리(테트라메틸렌이민), 폴리프로필렌이민, 아미노글리코사이드-폴리아민, 디데옥시-디아미노-b-사이클로덱스트린, 스페르민, 스페르미딘, 폴리(2-디메틸아미노)에틸 메타크릴레이트, 폴리(리신), 폴리(히스티딘), 폴리(아르기닌), 양이온화된 젤라틴, 덴드리머, 키토산, 1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄-프로판(DOTAP), N-[1-(2,3-디올레오일옥시)프로필]-N,N,N-트리메틸암모늄 클로라이드(DOTMA), 1-[2-(올레오일옥시)에틸]-2-올레일-3-(2-하이드록시에틸)이미다졸리늄 클로라이드(DOTIM), 2,3-디올레일옥시-N-[2(스페르민카복사미도)에틸]-N,N-디메틸-1-프로판아미늄 트리플루오로아세테이트(DOSPA), 3B-[N-(N',N'-디메틸아미노에탄)-카바모일]콜레스테롤 하이드로클로라이드(DC-콜레스테롤 HC1) 디헵타데실아미도글리실 스페르미딘(DOGS), N,N-디스테아릴-N,N-디메틸암모늄 브로마이드(DDAB), N-(1,2-디머리스틸옥시프로프-3-일)-N,N-디메틸-N-하이드록시에틸 암모늄 브로마이드(DMRIE), N,N-디올레일-N,N-디메틸암모늄 클로라이드(DODAC) 및 이들의 조합물이 포함될 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0391] 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 및 mmRNA는 또한 중합체, 지질 및/또는 다른 생물분해성 제제, 예를 들면, 인산칼슘의 조합물을 사용하여 나노입자로서 제형화될 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 구성요소들을 코어-셸, 하이브리드 및/또는 적층 구성 방식으로 합쳐서 나노입자의 미세-조정을 가능하게 하여 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 및 mmRNA의 전달이 향상되도록 할 수 있다(참조: Wang et al., Nat Mater. 2006 5:791-796; Fuller et al., Biomaterials. 2008 29:1526-1532; DeKoker et al., Adv Drug Deliv Rev. 2011 63:748-761; Endres et al., Biomaterials. 2011 32:7721-7731; Su et al., Mol Pharm. 2011 Jun 6;8(3):774-87; 상기 문헌은 그 전체 내용이 인용에 의해 본원에 포함된다).

[0392] 지질 및/또는 중합체와 조합되는 생물분해성 인산칼슘 나노입자는 생체내에서 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 및 mmRNA를 전달하는 것으로 밝혀졌다. 하나의 실시형태에서는, 아니사미드(anisamide)와 같은 표적화 리간드를 추가로 함유할 수 있는 지질 코팅된 인산칼슘 나노입자를 사용하여 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작

제물 및 mmRNA를 전달할 수 있다. 예를 들면, 마우스 전이성 폐 모델에서 siRNA를 효과적으로 전달하기 위해, 지질 코팅된 인산칼슘 나노입자를 사용하였다(참조: Li et al., J Contr Rel. 2010 142: 416-421; Li et al., J Contr Rel. 2012 158:108-114; Yang et al., Mol Ther. 2012 20:609-615). 이러한 전달 시스템은 siRNA의 전달을 개선시키기 위해, 표적화된 나노입자와 엔도솜 탈출을 향상시키기 위한 구성요소를 둘 다 검비한다.

[0393] 하나의 실시형태에서는, 인산칼슘을 PEG-다가 음이온 블럭 공중합체와 함께 사용하여 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 및 mmRNA를 전달할 수 있다(참조: Kazikawa et al., J Contr Rel. 2004 97:345-356; Kazikawa et al., J Contr Rel. 2006 111:368-370).

[0394] 하나의 실시형태에서는, PEG-전하-전환성 중합체(참조: Pitella et al., Biomaterials. 2011 32:3106-3114)를 사용하여, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 및 mmRNA를 전달하기 위한 나노입자를 형성할 수 있다. PEG-전하-전환성 중합체는 산성 pH에서 다가 양이온으로 개질됨으로써 PEG-다가 음이온 블럭 공중합체 상에서 개선되어, 엔도솜 탈출을 향상시킬 수 있다.

[0395] 코어-셸 나노입자의 사용은 양이온성의 가교결합된 나노젤 코어 및 각종 셸을 합성하기 위한 고속-대량(high-throughput) 접근법에 추가로 중점을 두었다(참조: Siegwart et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 108:12996-13001). 중합체 나노입자의 복합체화, 전달 및 내재화는 나노입자의 코어 및 셸 구성요소들 둘 모두에서의 화학 조성을 변경함으로써 정밀하게 조절될 수 있다. 예를 들면, 코어-셸 나노입자는, 이들이 콜레스테롤을 나노입자에 공유 결합시킨 후, siRNA를 마우스 간 세포에 효율적으로 전달할 수 있다.

[0396] 하나의 실시형태에서는, 중간의 PLGA 층 및 PEG를 함유하는 외부적인 중성 지질 층을 포함하는 중공 지질 코어를 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 및 mmRNA의 전달에 사용할 수 있다. 비제한적인 예로서, 루시페라제-발현 종양을 갖는 마우스에서, 지질-중합체-지질 혼성 나노입자는 통상적인 리포플렉스와 비교하여 루시페라제 발현을 현저하게 억제하는 것으로 밝혀졌다(참조: Shi et al, Angew Chem Int Ed. 2011 50:7027-7031).

[0397] 펩타이드 및 단백질

[0398] 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 및 mmRNA를 펩타이드 및/또는 단백질을 사용해 제형화하여 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA에 의한 세포의 형질감염을 증가시킬 수 있다. 하나의 실시형태에서, 펩타이드, 예를 들면, 이에 제한되는 것은 아니지만, 세포 투과성 펩타이드 및 단백질 및 세포내 전달을 가능하게 하는 펩타이드를 사용하여 약제학적 제형을 전달할 수 있다. 본 발명의 약제학적 제형과 함께 사용될 수 있는 세포 투과성 펩타이드의 비제한적인 예에는 세포내 공간으로의 전달을 촉진시키는 다가 양이온에 부착된 세포-투과성 펩타이드 서열, 예를 들면, HIV-유도된 TAT 펩타이드, 페네트라틴(penetratin), 트랜스포탄(transportan) 또는 hCT 유도된 세포-투과성 펩타이드가 포함된다(예를 들면, 문헌[Caron et al., Mol. Ther. 3(3):310-8 (2001); Langel, Cell-Penetrating Peptides: Processes and Applications (CRC Press, Boca Raton FL, 2002); El-Andaloussi et al., Curr. Pharm. Des. 11(28):3597-611 (2003); 및 Deshayes et al., Cell. Mol. Life Sci. 62(16):1839-49 (2005)] 참조, 상기 모든 문헌들은 인용에 의해 본원에 포함된다). 조성물은 또한 조성물의 세포내 공간으로의 전달을 향상시키는 세포 투과성 제제, 예를 들면, 리포솜을 포함하도록 제형화될 수 있다. 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 및 mmRNA는 세포내 전달을 가능하게 하기 위해, 펩타이드 및/또는 단백질, 예를 들면, 에일레론 테라퓨틱스(Aileron Therapeutics, 미국 매사추세츠주 캠브리지 소재) 및 퍼메온 바이올로지스(Permeon Biologics, 미국 매사추세츠주 캠브리지 소재)로부터의 펩타이드 및/또는 단백질에 착화될 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다(참조: Cronican et al., ACS Chem. Biol. 2010 5:747-752; McNaughton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2009 106:6111-6116; Sawyer, Chem Biol Drug Des. 2009 73:3-6; Verdine and Hilinski, Methods Enzymol. 2012:503:3-33; 상기 모든 문헌들은 그 전체 내용이 인용에 의해 본원에 포함된다).

[0399] 하나의 실시형태에서, 세포-투과성 폴리펩타이드는 제1 도메인 및 제2 도메인을 포함할 수 있다. 제1 도메인은 과충전된 폴리펩타이드를 포함할 수 있다. 제2 도메인은 단백질-결합 파트너를 포함할 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, "단백질-결합 파트너"는 항체 및 이의 관능성 단편, 스캐폴드 단백질 또는 펩타이드를 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 세포-투과성 폴리펩타이드는 단백질-결합 파트너를 위한 세포내 결합 파트너를 추가로 포함할 수 있다. 세포-투과성 폴리펩타이드는 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA가 도입될 수 있는 세포로부터 분비될 수 있다.

[0400] 펩타이드 또는 단백질을 포함하는 제형을 사용하여, 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA에 의한 세포 형질감염을 증가시킬 수 있고/있거나, 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA의 생물분포를 (예를 들면,

특이적인 조직 또는 세포 유형을 표적화함으로써) 변경할 수 있고/있거나, 암호화된 단백질의 번역을 증가시킬 수 있다.

- [0401] 세포
- [0402] 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 및 mmRNA는 세포 내로 생체의 형질감염될 수 있고, 후속적으로 피험자 내로 이식된다. 비제한적인 예로서, 약제학적 조성물은 변형 RNA를 간 및 골수 세포로 전달하기 위해 적혈구 세포를 포함할 수 있고, 변형 RNA를 바이러스-유사 입자(VLP) 내로 전달하기 위해 바이로솜을 포함할 수 있으며, 변형 RNA를 전달하기 위해, 전기천공된 세포, 예를 들면, 이에 제한되는 것은 아니지만, MAXCYTE®(미국 매릴랜드주 게이더스버그 소재) 및 ERYTECH®(프랑스 리옹 소재)로부터의 전기천공된 세포를 포함할 수 있다. mmRNA가 아닌 부하물을 전달하기 위한 적혈구 세포, 바이러스 입자 및 전기천공된 세포의 사용 예가 문서에 기록되어 있다(참조: Godfrin et al., Expert Opin Biol Ther. 2012 12:127-133; Fang et al., Expert Opin Biol Ther. 2012 12:385-389; Hu et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 108:10980-10985; Lund et al., Pharm Res. 2010 27:400-420; Huckriede et al., J Liposome Res. 2007;17:39-47; Cusi, Hum Vaccin. 2006 2:1-7; de Jonge et al., Gene Ther. 2006 13:400-411; 상기 모든 문헌들은 그 전체 내용이 인용에 의해 본원에 포함된다).
- [0403] 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 및 mmRNA는 국제 공보 제WO2011085231호 및 미국 공보 제20110171248호에 기재된 방법에 의해 합성되는 합성 VLP 내에서 전달될 수 있고, 상기 문헌들 각각은 그 전체 내용이 인용에 의해 본원에 포함된다.
- [0404] 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 및 mmRNA의 세포-기반 제형을 사용하여 (예를 들면, 세포 담체 내에서) 세포 형질감염을 보장할 수 있고/있거나, 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA의 생물분포를 (예를 들면, 특이적인 조직 또는 세포 유형을 표적화함으로써) 변경할 수 있고/있거나, 암호화된 단백질의 번역을 증가시킬 수 있다.
- [0405] 바이러스 및 비-바이러스 매개 기술을 포함하여, 다양한 방법이 당해 기술분야에 공지되어 있으며 이들은 핵산의 세포 내로의 도입에 적합하다. 전형적인 비-바이러스 매개 기술의 예에는 전기천공, 인산칼슘 매개 이동, 뉴클레오펙션(nucleofection), 소노포레이션(sonoporation), 열 충격, 마그네토펙션(magnetofection), 리포솜 매개 이동, 미세주입, 미세투사물 매개 이동(나노입자), 양이온성 중합체 매개 이동(DEAE-덱스트란, 폴리에틸렌이민, 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 등) 또는 세포 융합이 포함되지만, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0406] 소노포레이션, 또는 세포 초음파처리 기술은 세포 혈장막의 침투성을 변형시키기 위해 음파(예를 들면, 초음파 주파수)를 사용하는 것이다. 소노포레이션 방법은 당해 기술분야의 업자들에게 공지되어 있으며 생체내에서 핵산을 전달하는 데 사용된다(참조: Yoon and Park, Expert Opin Drug Deliv. 2010 7:321-330; Postema and Gilja, Curr Pharm Biotechnol. 2007 8:355-361; Newman and Bettinger, Gene Ther. 2007 14:465-475; 상기 모든 문헌들은 그 전체 내용이 인용에 의해 본원에 포함된다). 소노포레이션 방법은 당해 기술분야에 공지되어 있으며, 또한, 예를 들면, 이는 미국 특허 공보 제20100196983호에서 세균과 관련이 있고, 예를 들면, 미국 특허 공보 제20100009424호에서 다른 세포 유형들과 관련되어 있는 것으로 사료되며, 상기 문헌들은 각각 그 전체 내용이 인용에 의해 본원에 포함된다.
- [0407] 전기천공 기술도 또한 당해 기술분야에 익히 공지되어 있고, 생체내에서 그리고 임상적으로 핵산을 전달하는 데 사용된다(참조: Andre et al., Curr Gene Ther. 2010 10:267-280; Chiarella et al., Curr Gene Ther. 2010 10:281-286; Hojman, Curr Gene Ther. 2010 10:128-138; 상기 모든 문헌들은 그 전체가 인용에 의해 본원에 포함된다). 하나의 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA는 실시예 26에 기재된 바와 같이 전기천공에 의해 전달될 수 있다.
- [0408] 히알우로니다제
- [0409] 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA의 근육내 또는 피하 국소 주사는 히알우로난의 가수분해를 촉매하는 히알우로니다제를 포함할 수 있다. 간질 장벽의 구성요소인 히알우로니다제는 히알우로난의 가수분해를 촉매함으로써 히알우로난의 점도를 감소시켜 조직 침투성을 증가시킨다(참조: Frost, Expert Opin. Drug Deliv. (2007) 4:427-440; 상기 문헌은 그 전체 내용이 인용에 의해 본원에 포함된다). 이는 이들의 분산, 및 형질감염된 세포에 의해 생성된 암호화된 단백질의 전신 분포를 가속화하는 데 유용하다. 대안적으로, 히알우로니다제는 근육내 또는 피하 투여된 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA에 노출되는 세포 수를 증가시키는 데 사용될 수 있다.

- [0410] 나노입자 모사물
- [0411] 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA는 나노입자 모사물 내에 캡슐화될 수 있고/있거나 나노입자 모사물에 흡수될 수 있다. 나노입자 모사물은 전달 기능 유기체 또는 입자, 예를 들면, 병원체, 바이러스, 세균, 진균, 기생충, 프리온 및 세포를 모사할 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 비제한적인 예로서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA는 바이러스의 전달 기능을 모사할 수 있는 비-비리온 입자 내에 캡슐화될 수 있다(국제 공보 제W02012006376호 참조, 상기 문헌은 그 전체 내용이 인용에 의해 본원에 포함된다).
- [0412] 나노튜브
- [0413] 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA는 적어도 하나의 나노튜브, 예를 들면, 이에 제한되는 것은 아니지만, 로제트(rosette) 나노튜브, 탄소 나노튜브 및/또는 단일-벽 탄소 나노튜브에 부착될 수 있거나 또는 그렇지 않으면 결합될 수 있고, 상기 로제트 나노튜브는 링커(linker)를 갖는 트윈 베이스(twin base)를 갖는다. 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA는, 결합력, 예를 들면, 이에 제한되는 것은 아니지만, 입체 결합력, 이온 결합력, 공유 결합력 및/또는 다른 결합력을 통해 나노튜브에 결합될 수 있다.
- [0414] 하나의 실시형태에서, 나노튜브는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA를 세포 내로 방출할 수 있다. 신체 내에서 나노튜브의 상호작용을 제어하고/하거나, 본원에 기재된 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA에 부착 또는 결합시키기 위해, 적어도 하나의 나노튜브의 크기 및/또는 표면 구조를 변경할 수 있다. 하나의 실시형태에서, 적어도 하나의 나노튜브의 빌딩 블럭 및/또는 상기 빌딩 블럭에 부착된 관능 그룹을 변경하여 나노튜브의 치수 및/또는 특성을 조절할 수 있다. 비제한적인 예로서, 나노튜브가 정상 혈관벽 내의 홀을 통과하는 것을 방해하면서도 여전히 중앙 조직 혈관 내의 더 큰 홀을 통과하기에 충분히 작게 나노튜브의 길이를 변경할 수 있다.
- [0415] 하나의 실시형태에서, 적어도 하나의 나노튜브는 또한 폴리에틸렌 글리콜과 같은 중합체를 비제한적으로 포함하는 전달 증진 화합물로 코팅될 수 있다. 또다른 실시형태에서, 적어도 하나의 나노튜브 및/또는 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA를 약제학적으로 허용되는 부형제 및/또는 전달 비히클과 혼합할 수 있다.
- [0416] 하나의 실시형태에서는, 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA를 적어도 하나의 로제트 나노튜브에 부착시키고/시키거나 그렇지 않으면 결합시킨다. 로제트 나노튜브는 당해 기술분야에 공지된 공정에 의해 및/또는 국제 공보 제W02012094304호에 기재된 공정에 의해 형성될 수 있고, 상기 문헌은 그 전체 내용이 인용에 의해 본원에 포함된다. 적어도 하나의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 및/또는 mmRNA를 국제 공보 제W02012094304호에 기재된 바와 같은 공정에 의해 적어도 하나의 로제트 나노튜브에 부착시키고/시키거나 그렇지 않으면 결합시킬 수 있고, 상기 문헌은 그 전체 내용이 인용에 의해 본원에 포함되며, 여기서 적어도 하나의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA가 로제트 나노튜브에 부착되거나 그렇지 않으면 결합되도록 할 수 있는 조건하에 로제트 나노튜브 또는 로제트 나노튜브 형성 모듈을 수성 매질 중에서 적어도 하나의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 및/또는 mmRNA와 혼합한다.
- [0417] 접합체
- [0418] 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 및 mmRNA는, 담체 또는 표적화 그룹에 공유 결합된, 또는 융합 단백질과 함께 생성하는 2개의 암호화 영역을 포함하는(예를 들면, 표적화 그룹 및 치료 단백질을 포함하는), 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA와 같은 접합체를 포함한다.
- [0419] 본 발명의 접합체는 천연 물질, 예를 들면, 단백질(예를 들면, 사람 혈청 알부민(HSA), 저밀도 지질단백질(LDL), 고밀도 지질단백질(HDL) 또는 글로불린); 탄수화물(예를 들면, 텍스트란, 폴루란, 키틴, 키토산, 이눌린, 사이클로덱스트린 또는 히알루론산); 또는 지질을 포함한다. 리간드는 또한 재조합 또는 합성 분자, 예를 들면, 합성 중합체, 예컨대, 합성 폴리아미노산, 올리고뉴클레오타이드(예를 들면, 압타머)일 수 있다. 폴리아미노산의 예에는 폴리리신(PLL), 폴리 L-아스파르트산, 폴리 L-글루탐산, 스티렌-말레산 무수물 공중합체, 폴리(L-락티드-코-글리콜리드) 공중합체, 디비닐 에테르-말레산 무수물 공중합체, N-(2-하이드록시프로필)메타크릴아미드 공중합체(HMPA), 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 폴리비닐 알코올(PVA), 폴리우레탄, 폴리(2-에틸아크릴산), N-이소프로필아크릴아미드 중합체 또는 폴리포스파진이 포함된다. 폴리아미드의 예에는 폴리에틸렌아민, 폴리리신(PLL), 스펙트린, 스펙트리딘, 폴리아민, 슈도펩타이드-폴리아민, 펩티도미메틱 폴리아민, 텐드림어 폴리아민, 아르기닌, 아미딘, 프로타민, 양이온성 지질, 양이온성 포르피린, 폴리아민의 4급 염 또는 알파 나선형 펩타이드가 포함된다.

- [0420] 폴리뉴클레오타이드 접합체, 특히 RNA에의 폴리뉴클레오타이드 접합체의 제조를 교시하는 대표적인 미국 특허에는 미국 특허 제4,828,979호; 제4,948,882호; 제5,218,105호; 제5,525,465호; 제5,541,313호; 제5,545,730호; 제5,552,538호; 제5,578,717호, 제5,580,731호; 제5,591,584호; 제5,109,124호; 제5,118,802호; 제5,138,045호; 제5,414,077호; 제5,486,603호; 제5,512,439호; 제5,578,718호; 제5,608,046호; 제4,587,044호; 제4,605,735호; 제4,667,025호; 제4,762,779호; 제4,789,737호; 제4,824,941호; 제4,835,263호; 제4,876,335호; 제4,904,582호; 제4,958,013호; 제5,082,830호; 제5,112,963호; 제5,214,136호; 제5,082,830호; 제5,112,963호; 제5,214,136호; 제5,245,022호; 제5,254,469호; 제5,258,506호; 제5,262,536호; 제5,272,250호; 제5,292,873호; 제5,317,098호; 제5,371,241호, 제5,391,723호; 제5,416,203호, 제5,451,463호; 제5,510,475호; 제5,512,667호; 제5,514,785호; 제5,565,552호; 제5,567,810호; 제5,574,142호; 제5,585,481호; 제5,587,371호; 제5,595,726호; 제5,597,696호; 제5,599,923호; 제5,599,928호 및 제5,688,941호; 제6,294,664호; 제6,320,017호; 제6,576,752호; 제6,783,931호; 제6,900,297호; 제7,037,646호가 포함되지만, 이에 제한되는 것은 아니고; 상기 문헌들 각각은 그 전체 내용이 인용에 의해 본원에 포함된다.
- [0421] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 접합체는 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 및/또는 mmRNA를 위한 담체로서 기능할 수 있다. 접합체는 양이온성 중합체, 예를 들면, 폴리아민, 폴리리신, 폴리알킬렌아민, 및 폴리(에틸렌 글리콜)에 그래프트될 수 있는 폴리에틸렌아민을 포함할 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 비제한적인 예로서, 접합체는 중합체 접합체와 유사할 수 있으며, 중합체 접합체의 합성 방법은 미국 특허 제 6,586,524호에 기재되어 있고, 상기 문헌은 그 전체 내용이 인용에 의해 본원에 포함된다.
- [0422] 접합체는 또한, 표적화 그룹, 예를 들면, 세포 또는 조직 표적화 제제, 예를 들면, 렉틴, 당단백질, 지질 또는 단백질, 예를 들면, 신장 세포와 같은 특정한 세포 유형에 결합하는 항체를 포함할 수 있다. 표적화 그룹은 티로트로핀, 펠라노트로핀, 렉틴, 당단백질, 계면활성제 단백질 A, 뮤신 탄수화물, 다가 락토스, 다가 갈락토스, N-아세틸-갈락토사민, N-아세틸-글루코사민 다가 만노스, 다가 푸코스, 글리코실화된 폴리아미노산, 다가 갈락토스, 트랜스페린, 비스포스페이트, 폴리글루타메이트, 폴리아스파르테이트, 지질, 콜레스테롤, 스테로이드, 담즙산, 폴레이트, 비타민 B12, 비오틴, RGD 펩타이드, RGD 펩타이드 모사물 또는 압타머일 수 있다.
- [0423] 표적화 그룹은 단백질, 예를 들면, 당단백질, 또는 펩타이드, 예를 들면, 공동-리간드에 특이적인 친화성을 갖는 분자, 또는 항체, 예를 들면, 암 세포, 내피 세포 또는 골 세포와 같은 특정한 세포 유형에 결합하는 항체일 수 있다. 표적화 그룹은 또한 호르몬 및 호르몬 수용체를 포함할 수 있다. 이들은 또한 비-펩타이드 종들, 예를 들면, 지질, 렉틴, 탄수화물, 비타민, 공동 인자, 다가 락토스, 다가 갈락토스, N-아세틸-갈락토사민, N-아세틸-글루코사민 다가 만노스, 다가 푸코스 또는 압타머를 포함할 수 있다. 리간드는, 예를 들면, 리포폴리사카라이드, 또는 p38 MAP 키나제의 활성체일 수 있다.
- [0424] 표적화 그룹은 특정한 수용체를 표적화할 수 있는 임의의 리간드일 수 있다. 이의 예에는 폴레이트, GalNAc, 갈락토스, 만노스, 만노스-6P, 압타머, 인테그린 수용체 리간드, 케모킨 수용체 리간드, 트랜스페린, 비오틴, 세로토닌 수용체 리간드, PSMA, 엔도텔린, GCPII, 소마토스타틴, LDL 및 HDL 리간드가 제한 없이 포함된다. 특정 실시형태에서, 표적화 그룹은 압타머이다. 압타머는 변형되지 않을 수 있거나, 본원에 개시된 변형의 임의의 조합을 가질 수 있다.
- [0425] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 억제학적 조성물은 화학적 변형, 예를 들면, 잠긴 핵산과 유사한 변형을 포함할 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0426] 잠긴 핵산(LNA), 예를 들면, 산타리스(Santaris)로부터의 잠긴 핵산의 제조를 교시하는 대표적인 미국 특허에는 다음의 것들이 포함되지만, 이에 제한되는 것은 아니다: 미국 특허 제6,268,490호; 제6,670,461호; 제6,794,499호; 제6,998,484호; 제7,053,207호; 제7,084,125호; 및 제7,399,845호, 상기 문헌들 각각은 그 전체 내용이 인용에 의해 본원에 포함된다.
- [0427] PNA 화합물의 제조를 교시하는 대표적인 미국 특허에는 미국 특허 제5,539,082호; 제5,714,331호; 및 제 5,719,262호가 비제한적으로 포함되고, 상기 문헌들 각각은 인용에 의해 본원에 포함된다. PNA 화합물의 추가의 교시는, 예를 들면, 문헌[Nielsen et al., Science, 1991, 254, 1497-1500]에서 찾을 수 있다.
- [0428] 본 발명에서 특징적인 일부 실시형태는 포스포로티오에이트 골격 및 다른 변형된 골격을 갖는 올리고뉴클레오타이드, 및 특히 상기 언급된 미국 특허 제5,489,677호의 $--CH_2--NH--CH_2--$, $--CH_2--N(CH_3)--O--CH_2--$ [메틸렌(메틸 이미노) 또는 MMI 골격으로서 공지됨], $--CH_2--O--N(CH_3)--CH_2--$, $--CH_2--N(CH_3)--N(CH_3)--CH_2--$ 및 $--N(CH_3)--$

CH₂--CH₂--[여기서, 본래의 포스포디에스테르 골격은 --O-P(O)₂--O--CH₂--로서 나타냄], 및 상기 언급된 미국 특허 제5,602,240호의 아미드 골격을 갖는 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA를 포함한다. 일부 실시형태에서, 본원에서 특징적인 폴리뉴클레오타이드는 상기 언급된 미국 특허 제5,034,506호의 모르폴리노 골격 구조를 갖는다.

[0429]

2' 위치에서의 변형이 또한 전달에 도움이 될 수 있다. 바람직하게는, 2' 위치에서의 변형은 폴리펩타이드-코딩 서열 내에 위치하지 않고, 즉, 번역가능한 영역 내에 위치하지 않는다. 2' 위치에서의 변형은 5'UTR, 3'UTR 및/또는 꼬리 영역 내에 위치할 수 있다. 2' 위치에서의 변형은 2' 위치에서 다음 중 하나를 포함할 수 있다: H(즉, 2'-데옥시); F; O-, S-, 또는 N-알킬; O-, S-, 또는 N-알케닐; O-, S- 또는 N-알킬닐; 또는 O-알킬-O-알킬, 여기서, 상기 알킬, 알케닐 및 알킬닐은 치환되거나 치환되지 않은 C₁ 내지 C₁₀ 알킬 또는 C₂ 내지 C₁₀ 알케닐 및 알킬닐일 수 있다. 예시적인 적합한 변형은 O[(CH₂)_nO]_mCH₃, O(CH₂)_nOCH₃, O(CH₂)_nNH₂, O(CH₂)_nCH₃, O(CH₂)_nONH₂ 및 O(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂을 포함하고, 여기서 n 및 m은 1 내지 약 10이다. 다른 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA는 2' 위치에서 다음 중 하나를 포함한다: 저급 알킬, 알크아릴, 아르알킬, O-알크아릴 또는 O-아르알킬로 치환된 C₁ 내지 C₁₀ 저급 알킬, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, 헤테로사이클로알킬, 헤테로사이클로알크아릴, 아미노알킬아미노, 폴리알킬아미노, 치환된 실릴, RNA 개열 그룹, 리포터 그룹, 삽입체(intercalator), 약동학 특성을 개선시키기 위한 그룹, 또는 약력학 특성을 개선시키기 위한 그룹, 및 유사한 특성을 갖는 다른 치환체. 일부 실시형태에서, 변형은 2'-메톡시에톡시(2'-O--CH₂CH₂OCH₃, 2'-O-(2-메톡시에틸) 또는 2'-MOE로도 공지됨)(참조: Martin et al., *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78:486-504), 즉, 알콕시-알콕시 그룹을 포함한다. 또다른 예시적 변형은 본원에서 하기 실시예에 기재된 바와 같은, 2'-DMAOE로도 공지된 2'-디메틸아미노옥시에톡시, 즉, O(CH₂)₂ON(CH₃)₂ 그룹, 및 또한 본원에서 하기 실시예에 기재된 바와 같은, 2'-디메틸아미노에톡시에톡시(당해 기술분야에서 2'-O-디메틸아미노에톡시에틸 또는 2'-DMAEOE로도 공지됨), 즉, 2'-O--CH₂--O--CH₂--N(CH₂)₂이다. 다른 변형은 2'-메톡시(2'-OCH₃), 2'-아미노프로폭시(2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂) 및 2'-플루오로(2'-F)를 포함한다. 유사한 변형이 또한 다른 위치, 특히 3' 말단 뉴클레오타이드 상의 당의 3' 위치 또는 2'-5' 결합된 dsRNA 내 및 5' 말단 뉴클레오타이드의 5' 위치에서 만들어질 수 있다. 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 또한 펜토푸라노실 당 대신에 사이클로부틸 모이어티와 같은 당 무사물을 가질 수 있다. 이러한 변형된 당 구조물의 제조를 교시하는 대표적인 미국 특허에는 미국 특허 제4,981,957호; 제5,118,800호; 제5,319,080호; 제5,359,044호; 제5,393,878호; 제5,446,137호; 제5,466,786호; 제5,514,785호; 제5,519,134호; 제5,567,811호; 제5,576,427호; 제5,591,722호; 제5,597,909호; 제5,610,300호; 제5,627,053호; 제5,639,873호; 제5,646,265호; 제5,658,873호; 제5,670,633호; 및 제5,700,920호가 비제한적으로 포함되고, 상기 문헌들 각각은 인용에 의해 본원에 포함된다.

[0430]

추가 다른 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA는 세포 투과성 폴리펩타이드에 공유적으로 접합된다. 세포-투과성 펩타이드는 또한 신호 서열을 포함할 수 있다. 본 발명의 접합체는 증가된 안정성; 증가된 세포 형질감염; 및/또는 변경된 생물분포를 갖도록(예를 들면, 특이적 조직 또는 세포 유형에 표적화되도록) 설계될 수 있다.

[0431]

자가-조립된 핵산 나노입자

[0432]

핵산 가닥은 용이하게 재프로그램(reprogrammable)될 수 있기 때문에, 자가-조립된 나노입자는 정밀하게 조절될 수 있는 잘 정의된 크기를 갖는다. 예를 들면, 암-표적화 나노전달 담체를 위한 최적의 입자 크기는 20 내지 100nm인데, 그 이유는, 20nm를 초과하는 직경은 신장 청소를 피하고, 증진된 침투성 및 체류 효과를 통해 특정 종양에의 전달을 증진시키기 때문이다. 자가-조립된 핵산 나노입자를 사용하면, 크기 및 형상에 있어 단일한 균일 집단은 증진된 전달을 위한 암-표적화 리간드의 정밀하게 조절된 공간 배향 및 밀도를 갖는다. 비제한적인 예로서, 올리고뉴클레오타이드 나노입자는 짧은 DNA 단편 및 치료적 siRNA의 프로그램가능한 자가 조립을 이용하여 제조된다. 이들 나노입자는 조절가능한 입자 크기 및 표적 리간드 위치 및 밀도에서 분자적으로 동일하다. DNA 단편 및 siRNA는 1-단계 반응으로 자가-조립되어, 표적화된 생체내 전달을 위한 DNA/siRNA 사면체 나노입자를 생성한다(참조: Lee et al., *Nature Nanotechnology* 2012 7:389-393).

[0433]

부형제

[0434]

약제학적 제형은 약제학적으로 허용되는 부형제를 추가로 포함할 수 있고, 상기 부형제는, 본원에서 사용되는 바와 같이, 원하는 특정 용량형에 적합한, 임의의 그리고 모든 용매, 분산 매질, 희석제 또는 다른 액체

비히클, 분산 또는 현탁 보조제, 표면 활성제, 등장제, 증점제 또는 유화제, 보존제, 고체 결합제, 운환제 등을 포함한다. 문헌[Remington's The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, A. R. Gennaro (Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006; 인용에 의해 본원에 포함됨)]에는 약제학적 조성물의 제형화에 사용되는 각종 부형제 및 이의 제조를 위한 공지된 기술이 개시되어 있다. 임의의 통상적인 부형제 매질이, 예를 들면, 임의의 바람직하지 못한 생물학적 효과를 나타내거나 그렇지 않으면 약제학적 조성물의 임의의 다른 성분(들)과 유해한 방식으로 상호작용함으로써 물질 또는 이의 유도체와 상용될 수 없는 경우를 제외하고는, 이의 사용은 본 발명의 범위 내에 있는 것으로 고려된다.

[0435] 일부 실시형태에서, 약제학적으로 허용되는 부형제는 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 순수하다. 일부 실시형태에서, 부형제는 사람 및 수의학적 용도에서의 사용을 위해 승인된다. 일부 실시형태에서, 부형제는 미국 식품 의약청에 의해 승인된다. 일부 실시형태에서, 부형제는 의약 등급이다. 일부 실시형태에서, 부형제는 미국 약전(USP), 유럽 약전(EP), 영국 약전, 및/또는 국제 약전의 기준을 만족시킨다.

[0436] 약제학적 조성물의 제조에 사용되는 약제학적으로 허용되는 부형제에는 불활성 희석제, 분산제 및/또는 과립화제, 표면 활성제 및/또는 유화제, 붕해제, 결합제, 보존제, 완충제, 운환제 및/또는 오일이 포함되지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 이러한 부형제는 임의로 약제학적 조성물에 포함될 수 있다.

[0437] 예시적인 희석제에는 탄산칼슘, 탄산나트륨, 인산칼슘, 인산이칼슘, 황산칼슘, 인산수소칼슘, 인산나트륨 락토스, 수크로스, 셀룰로스, 미세결정성 셀룰로스, 카올린, 만니톨, 소르비톨, 이노시톨, 염화나트륨, 건조 전분, 옥수수 전분, 분말 당 등 및/또는 이들의 조합물이 포함되지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0438] 예시적인 과립화제 및/또는 분산제에는 감자 전분, 옥수수 전분, 타피오카 전분, 나트륨 전분 글리콜레이트, 점토, 알긴산, 구아 검, 시트러스 펄프, 한천, 벤토나이트, 셀룰로스 및 목재 생성물, 천연 해면, 양이온-교환 수지, 탄산칼슘, 규산염, 탄산나트륨, 가교결합된 폴리(비닐-피롤리돈)(크로스포비돈), 나트륨 카복시메틸 전분(나트륨 전분 글리콜레이트), 카복시메틸 셀룰로스, 가교결합된 나트륨 카복시메틸 셀룰로스(크로스카멜로스), 메틸셀룰로스, 프리젤라틴화된 전분(전분 1500), 미세결정성 전분, 수불용성 전분, 칼슘 카복시메틸 셀룰로스, 규산마그네슘알루미늄(VEEGUM®), 라우릴 황산나트륨, 4급 암모늄 화합물 등 및/또는 이들의 조합물이 포함되지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0439] 예시적인 표면 활성제 및/또는 유화제에는 천연 유화제(예를 들면, 아카시아, 한천, 알긴산, 알긴산나트륨, 트라가칸트, 콘드릭스(chondrux), 콜레스테롤, 크산탄, 펙틴, 젤라틴, 난황, 카제인, 양모지, 콜레스테롤, 왁스 및 레시틴), 콜로이드성 점토(예를 들면, 벤토나이트[규산알루미늄] 및 VEEGUM®[규산마그네슘알루미늄]), 장쇄 아미노산 유도체, 고분자량 알코올(예를 들면, 스테아릴 알코올, 세틸 알코올, 올레일 알코올, 트리아세틴 모노스테아레이트, 에틸렌 글리콜 디스테아레이트, 글리세릴 모노스테아레이트 및 프로필렌 글리콜 모노스테아레이트, 폴리비닐 알코올), 카보머(예를 들면, 카복시 폴리메틸렌, 폴리아크릴산, 아크릴산 중합체, 및 카복시비닐 중합체), 카라기난, 셀룰로스 유도체(예를 들면, 카복시메틸셀룰로스 나트륨, 분말화된 셀룰로스, 하이드록시메틸 셀룰로스, 하이드록시프로필 셀룰로스, 하이드록시프로필 메틸셀룰로스, 메틸셀룰로스), 소르비탄 지방산 에스테르(예를 들면, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노라우레이트[TWEEN®20], 폴리옥시에틸렌 소르비탄[TWEENn®60], 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노올레이트[TWEEN®80], 소르비탄 모노팔미테이트[SPAN®40], 소르비탄 모노스테아레이트[Span®60], 소르비탄 트리스테아레이트[Span®65], 글리세릴 모노올레이트, 소르비탄 모노올레이트[SPAN®80]), 폴리옥시에틸렌 에스테르(예를 들면, 폴리옥시에틸렌 모노스테아레이트[MYRJ®45], 폴리옥시에틸렌 수소화 파미자유, 폴리에톡실화 피마자유, 폴리옥시메틸렌 스테아레이트 및 SOLUTOL®), 수크로스 지방산 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 지방산 에스테르(예를 들면, CREMOPHOR®), 폴리옥시에틸렌 에테르(예를 들면, 폴리옥시에틸렌 라우릴 에테르[BRIJ®30]), 폴리(비닐-피롤리돈), 디에틸렌 글리콜 모노라우레이트, 트리에탄올아민 올레이트, 나트륨 올레이트, 칼륨 올레이트, 에틸 올레이트, 올레산, 에틸 라우레이트, 라우릴 황산나트륨, PLUORINC®F 68, POLOXAMER® 188, 세트리모늄 브로마이드, 세틸피리디늄 클로라이드, 벤즈알코늄 클로라이드, 도큐세이트 나트륨 등 및/또는 이들의 조합물이 포함되지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0440] 예시적인 결합제에는 전분(예를 들면, 옥수수 전분 및 전분 페이스트); 젤라틴; 당류(예를 들면, 수크로스, 글루코스, 텍스트로스, 텍스트린, 당밀, 락토스, 락티톨, 만니톨); 천연 및 합성 검(예를 들면, 아카시아, 알긴산나트륨, 아이리쉬 모스(Irish moss) 추출물, 판와르(panwar) 검, 가티 검, 이사폴(isapol) 껍질의 점질물, 카복시메틸셀룰로스, 메틸셀룰로스, 에틸셀룰로스, 하이드록시메틸셀룰로스, 하이드록시프로필 셀룰로스, 하이드록시프로필 메틸셀룰로스, 미세결정성 셀룰로스, 셀룰로스 아세테이트, 폴리(비닐-피롤리돈), 규산마그네슘알루미늄

늄(Veegum®) 및 라치(larch) 아라보갈락탄); 알긴산염; 폴리에틸렌 옥사이드; 폴리에틸렌 글리콜; 무기 칼슘염; 규산; 폴리메타크릴레이트; 왁스; 물; 알코올 등 및 이들의 조합물이 포함되지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0441]

예시적인 보존제에는 산화방지제, 킬레이트제, 향미생물성 보존제, 항진균성 보존제, 알코올 보존제, 산성 보존제 및/또는 다른 보존제가 포함될 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 예시적인 산화방지제에는 알파 토코페롤, 아스코르브산, 아스코르빌 팔미테이트, 부틸화 하이드록시아니솔, 부틸화 하이드록시톨루엔, 모노티오글리세롤, 칼륨 메타바이설파이트, 프로피온산, 프로필 갈레이트, 나트륨 아스코르베이트, 나트륨 바이설파이트, 나트륨 메타바이설파이트 및/또는 나트륨 설파이트가 포함되지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 예시적인 킬레이트제에는 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA), 시트르산 일수화물, 디나트륨 에데테이트, 디칼륨 에데테이트, 에데트산, 푸마르산, 말산, 인산, 나트륨 에데테이트, 타르타르산 및/또는 트리나트륨 에데테이트가 포함된다. 예시적인 향미생물성 보존제에는 벤즈알코늄 클로라이드, 벤즈에토늄 클로라이드, 벤질 알코올, 브로노폴, 세트리미드, 세틸피리디늄 클로라이드, 클로르헥시딘, 클로로부탄올, 클로로크레솔, 클로르옥시레놀, 크레솔, 에틸알코올, 글리세린, 헥세티딘, 이미드우레아, 페놀, 페녹시에탄올, 페닐에틸 알코올, 페닐수은 니트레이트, 프로필렌 글리콜 및/또는 티메로살이 포함되지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 예시적인 항진균성 보존제에는 부틸 파라벤, 메틸 파라벤, 에틸 파라벤, 프로필 파라벤, 벤조산, 하이드록시벤조산, 칼륨 벤조에이트, 칼륨 소르베이트, 나트륨 벤조에이트, 나트륨 프로피오네이트 및/또는 소르브산이 포함되지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 예시적인 알코올 보존제에는 에탄올, 폴리에틸렌 글리콜, 페놀, 페놀계 화합물, 비스페놀, 클로로부탄올, 하이드록시벤조에이트 및/또는 페닐에틸 알코올이 포함되지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 예시적인 산성 보존제에는 비타민 A, 비타민 C, 비타민 E, 베타-카로텐, 시트르산, 아세트산, 데하이드로아세트산, 아스코르브산, 소르브산 및/또는 피트산이 포함되지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 다른 보존제에는 토코페롤, 토코페롤 아세테이트, 데테록심 메실레이트, 세트리미드, 부틸화 하이드록시아니솔(BHA), 부틸화 하이드록시톨루엔(BHT), 에틸렌디아민, 라우릴 황산나트륨(SLS), 라우릴 에테르 황산나트륨(SLES), 나트륨 바이설파이트, 나트륨 메타바이설파이트, 칼륨 설파이트, 칼륨 메타바이설파이트, GLYDANT PLUS®, PHENONIP®, 메틸파라벤, GERMALL®115, GERMABEN® II, NEOLONE™, KATHON™ 및/또는 EUXYL®이 포함되지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0442]

예시적인 완충제에는 시트레이트 완충 용액, 아세테이트 완충 용액, 포스페이트 완충 용액, 염화암모늄, 탄산칼슘, 염화칼슘, 칼슘 시트레이트, 칼슘 글루비오네이트, 칼슘 글루세이트, 칼슘 글루코네이트, d-글루콘산, 칼슘 글리세로포스페이트, 칼슘 락테이트, 프로판산, 칼슘 레불리네이트, 펜탄산, 2염기성 인산칼슘, 인산, 3염기성 인산칼슘, 인산 수산화칼슘, 아세트산칼슘, 염화칼슘, 칼슘 글루코네이트, 칼슘 혼합물, 2염기성 인산칼슘, 1염기성 인산칼슘, 인산칼슘 혼합물, 아세트산나트륨, 중탄산나트륨, 염화나트륨, 시트르산나트륨, 락트산나트륨, 2염기성 인산나트륨, 1염기성 인산나트륨, 인산나트륨 혼합물, 트로메타민, 수산화마그네슘, 수산화알루미늄, 알긴산, 발열 물질 제거수, 등장 염수, 링거액, 에틸 알코올 등 및/또는 이들의 조합물이 포함되지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0443]

예시적인 윤활제에는 스테아르산마그네슘, 스테아르산칼슘, 스테아르산, 실리카, 활석, 맥아, 글리세릴 베헤네이트, 수소화된 식물유, 폴리에틸렌 글리콜, 벤조산나트륨, 아세트산나트륨, 염화나트륨, 류신, 라우릴 황산마그네슘, 라우릴 황산나트륨 등 및 이들의 조합물이 포함되지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0444]

예시적인 오일에는 아몬드, 아프리카트 커넬, 아보카도, 바바수, 버가모트, 블랙 커런트 씨드, 보리지, 케이드(cade), 카모마일, 카놀라, 캐러웨이, 카나우바, 피마자, 신나몬, 코코아 버터, 코코넛, 대구 간, 커피, 옥수수, 면실, 예뮬, 유칼립투스, 이브닝 프림로즈(evening primrose), 어류, 아마씨, 게라니올, 박(gourd), 포도씨, 헤이즐 너트, 히습, 이소프로필 미리스테이트, 호호바, 쿠쿠이 너트(kukui nut), 라반딘, 라벤더, 레몬, 리트 씨 쿠베바(litsea cubeba), 마카데미아 너트, 맬로우(mallow), 망고씨, 메도우폼씨, 밍크(mink), 너트맥, 올리브, 오렌지, 오렌지 러피, 팜, 팜 커넬, 피치 커넬, 땅콩, 피피씨, 호박씨, 평지씨, 쌀겨, 로즈마리, 잇꽃, 샌들우드(sandalwood), 사스쿠아나(sasquana), 사보우리(savoury), 산자나무(sea buckthorn), 참깨, 시어버터, 실리콘, 대두, 해바라기, 차나무, 엉겅퀴(thistle), 츠바키(tsubaki), 베티버(vetiver), 호두 및 맥아 오일이 포함되지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 예시적인 오일에는 부틸 스테아레이트, 카프릴산 트리글리세라이드, 카프르산 트리글리세라이드, 사이클로메티콘, 디에틸 세바케이트, 디메티콘 360, 이소프로필 미리스테이트, 광유, 옥틸도데카놀, 올레일 알코올, 실리콘 오일 및/또는 이들의 조합물이 포함되지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0445]

코코아 버터 및 좌제 왁스, 착색제, 코팅제, 감미제, 풍미제 및/또는 향미제와 같은 부형제가 제형업자의 판단에 따라 조성물 중에 존재할 수 있다.

- [0446] 전달
- [0447] 본 발명은, 가능하게는 약물 전달 과학에 있어서의 진보를 고려하여, 임의의 적합한 경로에 의한 치료, 제약, 진단 또는 이미징 중 어느 것을 위한 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA의 전달을 포함한다. 전달은 네이키드(naked)의 또는 제형화된 전달일 수 있다.
- [0448] 네이키드 전달
- [0449] 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA는 네이키드로 세포에 전달될 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, "네이키드"란 형질감염을 증진시키는 제제를 갖지 않는 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA를 전달하는 것을 나타낸다. 예를 들면, 세포에 전달되는 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA는 변형을 함유하지 않을 수 있다. 네이키드 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA는 당해 기술분야에 공지되고 본원에 기재된 투여 경로를 사용하여 세포에 전달될 수 있다.
- [0450] 제형화된 전달
- [0451] 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA는 본원에 기재된 방법을 사용하여 제형화될 수 있다. 제형은 변형된 및/또는 변형되지 않은 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA를 함유할 수 있다. 제형은 세포 투과 제제, 약제학적으로 허용되는 담체, 전달 제제, 생물침식성 또는 생물적합성 중합체, 용매 및 지속-방출성 전달 대포를 추가로 포함할 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 제형화된 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA는 당해 기술분야에 공지되고 본원에 기재된 투여 경로를 사용하여 세포에 전달될 수 있다.
- [0452] 조성물은 또한, 직접적인 담금 또는 배쌍(bathing), 카테터를 통해, 젤, 산제, 연고, 크림, 젤, 로션 및/또는 점적제에 의해, 조성물로 코팅되거나 함침된 직물 또는 생물분해성 물질과 같은 기재를 사용함으로써 그리고 기타 방식을 비제한적으로 포함하여, 당해 기술분야의 몇 가지 방식 중 어느 것으로, 장기 또는 조직으로의 직접적인 전달을 위해 제형화될 수 있다.
- [0453] 투여
- [0454] 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA는 치료적으로 유효한 결과를 제공하는 임의의 경로에 의해 투여될 수 있다. 이는 장관, 위장관, 경막외, 경구, 경피, 경막외(경막 주위), 뇌내(대뇌 속), 뇌실내(뇌실 속), 피부(피부 위의 도포), 피내(피부 자체 속), 피하(피부 밑), 비내 투여(코를 통한), 정맥내(정맥 속), 동맥내(동맥 속), 근육내(근육 속), 심장내(심장 속), 골내 주입(골수 속), 척수강내(척추관 속), 복강내(복막 속)으로의 주입 또는 주사), 방광내 주입, 유리체내(안구를 통한), 해면체내 주사(음경의 기저부 속), 질내 투여, 자궁내, 양막외 투여, 경피(전신 분포를 위한 온전한 피부를 통한 확산), 경점막(점막을 통한 확산), 흡입(코로 빨아들임), 설하, 구순하, 관장, 점안(결막 위) 또는 점이가 포함되지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 특정 실시형태에서, 조성물은 이들이 혈액-뇌 장벽, 혈관 장벽 또는 다른 상피 장벽을 통과할 수 있도록 하는 방식으로 투여될 수 있다. 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA를 위한 비제한적인 투여 경로를 아래에서 설명한다.
- [0455] 비경구 및 주사 투여
- [0456] 경구 및 비경구 투여를 위한 액체 용량형에는 약제학적으로 허용되는 유액제, 미세유액제, 용액제, 현탁액제, 시럽 및/또는 엘릭시르가 포함되지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 활성 성분에 더하여, 액체 용량형은 당해 기술분야에서 흔히 사용되는 불활성 희석제, 예를 들면, 물 또는 다른 용매, 가용화제 및 유효제, 예를 들면, 에틸 알코올, 이소프로필 알코올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸렌 글리콜, 디메틸포름아미드, 오일(특히, 면실유, 땅콩유, 옥수수유, 배아유, 올리브유, 피마자유 및 참깨유), 글리세롤, 테트라하이드로푸르푸릴 알코올, 폴리에틸렌 글리콜, 및 소르비탄 지방산 에스테르 및 이들의 혼합물을 포함할 수 있다. 불활성 희석제 외에도, 경구 조성물은 습윤제, 유효제 및 현탁제, 감미제, 풍미제 및/또는 향미제와 같은 보조제를 포함할 수 있다. 비경구 투여를 위한 특정 실시형태에서, 조성물은 CREMOPHOR®, 알코올, 오일, 변성 오일, 글리콜, 폴리소르베이트, 사이클로덱스트린, 중합체 및/또는 이들의 조합물과 같은 가용화제와 혼합된다.
- [0457] 주사가능한 제제, 예를 들면, 멸균성의 주사가능한 수성 또는 유성 현탁액제는 적합한 분산제, 습윤제 및/또는 현탁제를 사용하여 공지된 기술에 따라 제형화될 수 있다. 멸균성의 주사가능한 제제는 무독성의 비경구적으로 허용되는 희석제 및/또는 용매 중의, 예를 들면, 1,3-부탄디올 중 용액으로서의 멸균성 주사가능 용액제, 현탁액제 및/또는 유액제일 수 있다. 사용될 수 있는 허용가능한 비히클 및 용매 중에는 물, 링거액, U.S.P. 및 등

장성 염화나트륨 용액이 있다. 멸균성 고정유가 용매 또는 현탁 매질로서 통상적으로 사용된다. 이러한 목적을 위해, 합성 모노글리세라이드 또는 디글리세라이드를 포함하는 임의의 무자극성 고정유가 사용될 수 있다. 올레산과 같은 지방산이 주사제의 제조에 사용될 수 있다.

[0458] 주사가 가능한 제형은, 예를 들면, 세균-보유 필터를 통한 여과에 의해, 그리고/또는 사용 전에 멸균수 또는 다른 멸균 주사가 가능 매질 내에 용해되거나 분산될 수 있는 멸균 고체 조성물 형태 내에 멸균제를 혼입시킴으로써 멸균될 수 있다.

[0459] 활성 성분의 효과를 연장시키기 위해, 피하 또는 근육내 주사로부터 활성 성분의 흡수를 서행시키는 것이 종종 바람직하다. 이는 수용해도가 불량한 결정질 또는 무정형 물질의 액체 현탁액의 사용에 의해 달성될 수 있다. 그러면 약물의 흡수 속도는 이의 용해 속도에 좌우되고, 용해 속도는 다시 결정 크기 및 결정형에 좌우될 수 있다. 대안적으로, 비경구 투여되는 약물 형태의 지연된 흡수는 약물을 오일 비히클 내에 용해시키거나 현탁시킴으로써 달성된다. 주사가 가능 데포 형태는 폴리락티드-폴리글리콜리드와 같은 생물분해성 중합체 중에서 약물의 미세캡슐 매트릭스를 형성함으로써 제조된다. 약물 대 중합체 비 및 사용되는 특정 중합체의 성질에 따라, 약물 방출 속도가 조절될 수 있다. 다른 생물분해성 중합체의 예에는 폴리(오르토에스테르) 및 폴리(안하이드라이드)가 포함된다. 데포 주사가 가능 제형은 약물을 신체 조직과 상용성인 리포솜 또는 미세유화액 중에 포집함으로써 제조된다.

[0460] 직장 및 질내 투여

[0461] 직장 또는 질내 투여를 위한 조성물은 전형적으로는 조성물을 적합한 비자극성 부형제, 예를 들면, 주위 온도에서는 고체이지만 체온에서는 액체에서 직장 또는 질내 내에서 용융되어 활성 성분을 방출하는 코코아 버터, 폴리에틸렌 글리콜 또는 좌제 왁스와 혼합함으로써 제조될 수 있는 좌제이다.

[0462] 경구 투여

[0463] 경구 투여용 고체 용량형은 캡슐제, 정제, 환제, 산제 및 과립제를 포함한다. 이러한 고체 용량형에서, 활성 성분은 적어도 하나의 불활성의 약제학적으로 허용되는 부형제, 예를 들면, 시트르산나트륨 또는 인산이칼슘 및/또는 충전제 또는 증량제(예를 들면, 전분, 락토스, 수크로스, 글루코스, 만니톨 및 규산), 결합제(예를 들면, 카복시메틸셀룰로오스, 알긴산염, 젤라틴, 폴리비닐피롤리디논, 수크로스 및 아카시아), 보습제(예를 들면, 글리세롤), 붕해제(예를 들면, 한천, 탄산칼슘, 감자 또는 타피오카 전분, 알긴산, 특정 규산염 및 탄산나트륨), 용해 지연제(예를 들면, 파라핀), 흡수 촉진제(예를 들면, 4급 암모늄 화합물), 습윤제(예를 들면, 세틸 알코올 및 글리세롤 모노스테아레이트), 흡수제(예를 들면, 카올린 및 벤토나이트 점토) 및 윤활제(예를 들면, 활석, 스테아르산칼슘, 스테아르산마그네슘, 고체 폴리에틸렌 글리콜, 라우릴 황산나트륨) 및 이들의 혼합물과 혼합된다. 캡슐제, 정제 및 환제의 경우, 용량형은 완충제를 포함할 수 있다.

[0464] 국소 또는 경피 투여

[0465] 본원에 기재된 바와 같이, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA를 함유하는 조성물은 국소 투여용으로 제형화될 수 있다. 피부는 쉽게 접근가능하기 때문에 전달을 위한 이상적인 표적 부위가 될 수 있다. 유전자 발현을 피부에 국한시켜 잠재적으로 비특이적 독성을 피할 뿐만 아니라, 피부 내의 특정 층 및 세포 유형에도 국한시킬 수 있다.

[0466] 전달되는 조성물의 피부 발현 부위는 핵산 전달의 경로에 좌우될 것이다. 흔히 3개의 경로가 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA를 피부에 전달하는 것으로 여겨진다: (i) 국소 도포(예를 들면, 국부/영역 치료 및/또는 화장품 도포용); (ii) 피내 주사(예를 들면, 국부/영역 치료 및/또는 화장품 도포용); 및 (iii) 전신 전달(예를 들면, 피부와 피부의 영역을 둘 다 침범하는 피부과 질환 치료용). 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA는 당해 기술분야에 공지된 몇 가지 상이한 접근법에 의해 피부에 전달될 수 있다. 대부분의 국소 전달 접근법, 예를 들면, 이에 제한되는 것은 아니지만, 비양이온성 리포솜-DNA 복합체, 양이온성 리포솜-DNA 복합체, 입자-매개성(유전자 총), 천공-매개성 유전자 형질감염, 및 바이러스 전달 접근법은 DNA의 전달에 작용하는 것으로 나타났다. 핵산 전달 후, 기초 각질세포, 피지선 세포, 피부 섬유아세포 및 피부 대식세포를 비제한적으로 포함하는 많은 상이한 피부 세포 유형 내에서 유전자 산물이 검출되었다.

[0467] 하나의 실시형태에서, 본 발명은 본 발명의 방법을 편리하게 그리고/또는 효과적으로 수행하기 위한 다양한 드레싱(예를 들면, 상처 드레싱) 또는 밴드(예를 들면, 접착 밴드)를 제공한다. 전형적으로 드레싱 또는 밴드는, 사용자가 피험자(들)의 다중 치료를 수행하게 하기에 충분한 양의 본원에 기재된 약제학적 조성물 및/또는 폴리

뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA를 포함할 수 있다.

- [0468] 하나의 실시형태에서, 본 발명은 하나 이상의 주사제 내에서 전달되는 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA 조성물을 제공한다.
- [0469] 하나의 실시형태에서, 국소 및/또는 경피 투여 전에, 피부와 같은 조직의 적어도 하나의 영역을 침투성을 증가시킬 수 있는 장치 및/또는 용액에 적용시킬 수 있다. 하나의 실시형태에서는, 조직을 연마 장치에 적용시켜 피부의 침투성을 증가시킬 수 있다(미국 특허 공보 제20080275468호 참조, 이의 전체 내용이 인용에 의해 본원에 포함된다). 또다른 실시형태에서는, 조직을 초음파 증강 장치에 적용시킬 수 있다. 초음파 증강 장치는 미국 공보 제20040236268호 및 미국 특허 제6,491,657호 및 제6,234,990호에 기재된 장치를 비제한적으로 포함할 수 있고; 상기 문헌들 각각은 그 전체 내용이 인용에 의해 본원에 포함된다. 조직의 침투성을 향상시키는 방법이 미국 공보 제20040171980호 및 제20040236268호 및 미국 특허 제6,190,315호에 기재되어 있고; 상기 문헌들 각각은 그 전체 내용이 인용에 의해 본원에 포함된다.
- [0470] 하나의 실시형태에서는, 본원에 기재된 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 및 mmRNA의 제형을 전달하기 전에 장치를 사용하여 조직의 침투성을 증진시킬 수 있다. 피부의 침투성은 당해 기술분야에 공지되고/되거나 미국 특허 제6,190,315호에 기재된 방법에 의해 측정될 수 있고, 상기 문헌은 그 전체 내용이 인용에 의해 본원에 포함된다. 비제한적인 예로서, 변형된 mRNA 제형은 미국 특허 제6,190,315호에 기재된 약물 전달 방법에 의해 전달될 수 있고, 상기 문헌은 그 전체 내용이 인용에 의해 본원에 포함된다.
- [0471] 또다른 비제한적인 예에서는, 침투성을 증가시킬 수 있는 장치에 조직을 적용시키기 전, 적용시키는 동안 및/또는 적용시킨 후, 조직을 국소 마취제 공용 혼합물(EMLA) 크림으로 처리할 수 있다. 카츠(Katz) 등(참조: Anesth Analg (2004); 98:371-76; 이의 전체 내용이 인용에 의해 본원에 포함됨)은 EMLA 크림을 저에너지와 조합하여 사용한 경우, 표재성 피부 무통각의 발생이 저에너지 초음파 전처리 후 5분 후와 같이 신속하게 나타났음을 입증하였다.
- [0472] 하나의 실시형태에서는, 침투성을 증가시키도록 조직을 처리하기 전, 처리하는 동안 및/또는 처리한 후, 향상제를 조직에 도포할 수 있다. 향상제에는 이동 향상제, 물리적 향상제 및 캐비테이션(cavitation) 향상제가 포함되지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 향상제의 비제한적인 예는 미국 특허 제6,190,315호에 기재되어 있고, 상기 문헌은 그 전체 내용이 인용에 의해 본원에 포함된다.
- [0473] 하나의 실시형태에서는, 본원에 기재된 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 및/또는 mmRNA의 제형을 전달하기 전에 장치를 사용하여 조직의 침투성을 증진시킬 수 있으며, 상기 제형은 면역 반응을 야기시키는 물질을 추가로 함유할 수 있다. 또다른 비제한적인 예에서, 면역 반응을 야기시키는 물질을 함유하는 제형은 미국 공보 제20040171980호 및 제20040236268호에 기재된 방법에 의해 전달될 수 있고; 상기 문헌들 각각은 그 전체 내용이 인용에 의해 본원에 포함된다.
- [0474] 조성물의 국소 및/또는 경피 투여를 위한 용량형에는 연고, 페이스트, 크림, 로션, 젤, 산제, 용액제, 분무제, 흡입제 및/또는 패치가 포함될 수 있다. 일반적으로, 활성 성분은, 필요할 수 있는 경우, 약제학적으로 허용되는 부형제 및/또는 임의의 필요한 보존제 및/또는 완충제와 멸균 조건하에 혼합된다.
- [0475] 추가로, 본 발명은 경피 패치의 사용을 고려하며, 이는 종종 화합물의 신체로의 조절된 전달을 제공하는 추가의 이점을 갖는다. 이러한 용량형은, 예를 들면, 화합물을 적합한 매질 내에 용해시키고/시키거나 분산시킴으로써 제조될 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 속도 조절 멤브레인을 제공하고/하거나 화합물을 중합체 매트릭스 및/또는 젤 내에 분산시킴으로써 속도를 조절할 수 있다.
- [0476] 국소 투여에 적합한 제형에는 액체 및/또는 반액체 제제, 예를 들면, 리니먼트제, 로션, 수중유 및/또는 유중수 유액제, 예를 들면, 크림, 연고 및/또는 페이스트, 및/또는 현탁액제가 포함되지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 국소 투여될 수 있는 제형은, 예를 들면, 약 0.1% 내지 약 10%(w/w)의 활성 성분을 포함할 수 있지만, 활성 성분의 농도는 용매 중 활성 성분의 용해도 한계와 같이 높을 수 있다. 국소 투여용 제형은 본원에 기재된 추가 성분들 중 하나 이상을 추가로 포함할 수 있다.
- [0477] 데포 투여
- [0478] 본원에 기재된 바와 같이, 일부 실시형태에서, 조성물은 연장 방출을 위해 데포 내에 제형화된다. 일반적으로는, 특정 장기 또는 조직("표적 조직")이 투여에 표적화된다.
- [0479] 본 발명의 일부 양상에서, 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA는 표적 조직 내에 또는 표적 조직 근위

부에 공간적으로 보유된다. 포유동물 피험자의 표적 조직에 조성물을 제공하는 방법이 제공되고, 상기 방법은 (하나 이상의 표적 세포를 함유하는) 상기 표적 조직을, 상기 조성물, 특히 상기 조성물의 핵산 성분(들)이 표적 조직 내에 실질적으로 보유되도록 하는 조건하에 상기 조성물과 접촉시킴에 의한 것이며, 이는 적어도 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, 99.9, 99.99% 또는 99.99% 초과 조성물이 표적 조직 내에 보유된다는 것을 의미한다. 유리하게는, 체류는 하나 이상의 표적 세포에 유입된 조성물에 존재하는 핵산의 양을 측정함으로써 결정된다. 예를 들면, 피험자에 투여된 핵산의 적어도 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, 99.9, 99.99% 또는 99.99% 초과 양이 투여 후 소정 시간에 세포 내에 존재한다. 예를 들면, 포유동물 피험자에 대한 근육내 주사는 리보핵산 및 형질감염 시약을 함유하는 수성 조성물을 사용하여 수행하고, 근육 세포 내에 존재하는 리보핵산의 양을 측정함으로써 조성물의 체류를 결정한다.

[0480] 본 발명의 양상은 포유동물 피험자의 표적 조직에 조성물을 제공하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 (하나 이상의 표적 세포를 함유하는) 상기 표적 조직을, 상기 조성물이 표적 조직 내에 실질적으로 보유되도록 하는 조건하에 상기 조성물과 접촉시킴에 의한 것이다. 조성물은 관심 폴리펩타이드가 적어도 하나의 표적 세포 내에서 생성되도록 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA의 유효량을 함유한다. 조성물은 일반적으로 세포 투과 제제 및 약제학적으로 허용되는 담체를 함유하지만, "네이키드" 핵산(예를 들면, 세포 투과 제제 또는 다른 제제를 갖지 않는 핵산)이 또한 고려된다.

[0481] 일부 상황에서는, 조직 내에서 세포에 의해 생산되는 단백질의 양이 바람직하게 증가된다. 바람직하게는, 이러한 단백질 생산의 증가는 표적 조직 내의 세포에 공간적으로 국한된다. 따라서, 포유동물 피험자의 조직 내에서 관심 단백질의 생산을 증가시키는 방법이 제공된다. 소정 용적의 표적 조직 내에 함유된 실질적 비율의 세포 내에서 관심 폴리펩타이드를 생산하기 위한 단위량의 조성물을 결정하는 것이 특징인, 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA를 함유하는 조성물이 제공된다.

[0482] 일부 실시형태에서, 조성물은 다수의 상이한 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA를 포함하며, 여기서 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA중 하나 초과는 목적하는 폴리펩타이드를 암호화한다. 임의로, 조성물은 또한 세포 투과제를 함유하여 조성물의 세포내 전달을 돕는다. 표적 조직의 소정 용적 내로 함유된 세포의 실질 백분율로 관심 폴리펩타이드를 생성하는 데 필요한 조성물의 용량이 결정된다(일반적으로, 소정 용적에 인접한 조직에 관심 폴리펩타이드의 현저한 생성을 유도하지 않고, 또는 표적 조직에 대해 원위로). 이러한 결정 후, 결정 용량은 포유동물 피검체의 조직으로 직접 도입된다.

[0483] 하나의 실시형태에서, 본 발명은 하나 이상의 주사에 또는 분할 용량의 주사에 의하여 전달되는 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA를 제공한다.

[0484] 하나의 실시형태에서, 본 발명은 소형 1회용 약제 저장소 또는 패치 펌프를 사용하여 표적 조직 부근에 보유될 수 있다. 패치 펌프의 비제한적인 예는 BD®(Franklin Lakes, NJ), 인설렛 코포레이션(Insulet Corporation)(Bedford, MA), 스테디메드 테라퓨틱스(SteadyMed Therapeutics)(San Francisco, CA), 메드트로닉(Medtronic)(Minneapolis, MN), 유니라이프(UniLife)(York, PA), 밸러리티스(Valeritas)(Bridgewater, NJ) 및 스프링리프 테라퓨틱스(SpringLeaf Therapeutics)(Boston, MA)에 의해 제조되고/되거나 판매되는 제품을 포함한다.

[0485] *패 투여*

[0486] 약제학적 조성물은 구강을 거친 패 투여에 적합한 제형으로 제조되고/되거나 포장되고/되거나 판매될 수 있다. 이러한 제형은 활성 성분을 포함하고 직경이 약 0.5 내지 7mm 또는 1 내지 약 6mm 범위인 건조 입자를 포함할 수 있다. 이러한 조성물은 적합하게는 추진제 스트림이 분말이 향하는 건조 분말 저장소를 포함하여 분말을 분산시키는 장치를 사용하고/하거나, 밀봉된 용기에 저비점 추진제에 용해되고/되거나 현탁된 활성 성분을 포함하는 장치와 같은 자체 추진 용매/분말 분배 용기를 사용하여, 투여하기 위한 건조 분말 형태이다. 이러한 분말은 입자의 중량 기준 98%의 직경이 0.5nm를 초과하고 입자의 수 기준 95% 이상의 직경이 7nm 미만인 입자를 포함한다. 대안적으로, 입자의 중량 기준 95% 이상의 직경은 1nm를 초과하고 입자의 수 기준 90% 이상의 직경은 6nm 미만이다. 건조 분말 조성물은 당과 같은 고형 미분 희석제를 포함하고, 단위 용량 형태로 편리하게 제공된다.

[0487] 저비점 추진제는 일반적으로 대기압하에 비점이 65°F인 액상 추진제를 포함한다. 일반적으로, 추진제는 조성물의 50 내지 99.9%(w/w)를 구성할 수 있고, 활성 성분은 조성물의 0.1 내지 20%(w/w)를 구성할 수 있다. 추진제

는 액상 비이온성 및/또는 고형 음이온성 계면활성제 및/또는 고형 희석제 등의 추가 성분(이는 활성 성분을 포함하는 입자와 동위의 입자 크기를 가질 수 있음)을 추가로 포함할 수 있다.

[0488] 폐 전달용으로 제형화된 약제학적 조성물은 용제 및/또는 현탁제의 액적 형태로 활성 성분을 제공할 수 있다. 이러한 제형은 활성 성분을 포함하는, 임의로 무균성의, 수성 및/또는 희석 알콜 용제 및/또는 현탁제로서 제조되고/되거나 포장되고/되거나 판매될 수 있고, 편리하게는 어떠한 연무(nebulization) 및/또는 분무(atomization) 장치라도 사용하여 투여될 수 있다. 이러한 제형은 이들로 제한되지 않지만, 향미제, 예를 들면, 사카린 나트륨, 휘발성 오일, 완충제, 표면 활성제 및/또는 보존제, 예를 들면, 메틸하이드록시벤조에이트를 포함하는, 하나 이상의 추가 성분을 추가로 포함할 수 있다. 이러한 투여 경로에 의하여 제공되는 액적은 평균 직경이 약 0.1 내지 약 200nm의 범위일 수 있다.

[0489] *비내, 비강 및 구강 투여*

[0490] 폐 전달에 유용한 것으로 본원에 기재된 제형은 약제학적 조성물의 비내 전달에 유용하다. 비내 투여에 적합한 또 다른 제형은 활성 성분을 포함하고 평균 입자 크기가 약 0.2 내지 500 μ m인 조악한 분말이다. 이러한 제형은 비성 호흡(snuff)을 하는 방식으로, 즉, 코에 가깝게 잡은 분말 용기로부터 비강을 통하여 신속하게 흡입하여 투여된다.

[0491] 비강 투여(nasal administration)에 적합한 제형은 활성 성분을 예를 들면, 약 0.1%(w/w)로 적게 내지는 100%(w/w)로 많게 포함할 수 있고, 본원에 기재된 추가 성분중 하나 이상을 포함할 수 있다. 약제학적 조성물은 구강 투여에 적합한 제형으로 제조되고/되거나 포장되고/되거나 판매될 수 있다. 이러한 제형은 예를 들면, 통상적인 방법을 사용하여 제조된 정제 및/또는 로젠지 형태일 수 있고, 예를 들면, 0.1 내지 20%(w/w) 활성 성분일 수 있고 잔량은 경구 용해 가능하고/하거나 분해 가능한 조성물 및 임의로, 본원에 기재된 하나 이상의 추가 성분을 포함한다. 대안적으로, 구강 투여에 적합한 제형은 활성 성분을 포함하는 분말 및/또는 에어로졸화 및/또는 분무화 용제 및/또는 현탁제를 포함할 수 있다. 이러한 분말화, 에어로졸화 및/또는 에어로졸화 제형은, 분산시, 평균 입자 및/또는 액적 크기가 약 0.1 내지 약 200nm의 범위일 수 있고, 본원에 기재된 어떠한 추가의 성분중 하나 이상을 추가로 포함할 수 있다.

[0492] *안구 투여*

[0493] 약제학적 조성물은 안구 투여에 적합한 제형으로 제조되고/되거나 포장되고/되거나 판매될 수 있다. 이러한 제형은 예를 들면, 수성 또는 유상 액체 부형제 중의 활성 성분의 0.1/1.0%(w/w) 용제 및/또는 현탁제를 포함하는 점안제의 형태일 수 있다. 이러한 점안제는 완충제, 염 및/또는 본원에 기재된 하나 이상의 어떠한 추가의 성분을 추가로 포함할 수 있다. 유용한 기타 안구 투여 가능한 제형은 미세결정성 형태 및/또는 리포솜 제제에 활성 성분을 포함하는 것을 포함한다. 점이제 및/또는 점안제는 본 발명의 범위 내에 있는 것으로 고려한다.

[0494] 페이로드 투여: 검출 가능한 제제 및 치료제

[0495] 본원에 기재된 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA는 생물학적 표적에 물질은 생물 표적에 물질의 전달("페이로드"), 예를 들면, 표적의 검출을 위한 검출 가능한 물질의 전달, 또는 치료제의 전달이 필요하다수의 상이한 시나리오에 사용될 수 있다. 검출 방법은 표지/염색/영상이 필요한 어떠한 상황에서라도, 이들로 제한되지는 않지만, 시험관내 및 생체내 영상화 방법, 예를 들면, 면역조직 화학, 생물 발광 영상(BLI), 자기 공명 영상(MRI), 양전자 방출 단층 촬영(PET), 전자 현미경, X-선 컴퓨터 단층 촬영, 라만 영상, 광간섭 단층 촬영, 흡수 영상, 열상, 형광 반사 영상, 형광 현미경, 형광 분자 단층 촬영 영상, 핵 자기 공명 영상, X-선 영상, 초음파 영상, 광음향 영상, 실험실 분석을 포함할 수 있다.

[0496] 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA는 어떠한 유용한 방향으로라도 링커 및 페이로드를 둘 다 포함하도록 계획될 수 있다. 예를 들면, 두 말단을 갖는 링커는 한 말단을 페이로드에, 다른 말단을 핵염기에, 예를 들면, deaza-아데노신 또는 deaza-구아노신의 C-7 또는 C-8 위치의 말단에, 또는 시토신 또는 우라실의 N-3 또는 C-5 위치에 부착하는 데 사용된다. 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 하나 초과 페이로드(예: 라벨 및 전사 억제제), 뿐만 아니라 분할 가능한 링커를 포함할 수 있다. 하나의 실시형태에서, 변형 뉴클레오타이드는 변형 7-deaza-아데노신 트리포스페이트이며, 여기서 분할 가능한 링커는 7-deaza-아데닌의 C7 위치에 부착되고, 링커의 다른 말단은 억제제(예: 시티딘상 핵염기의 C5 위치)에 부착되고, 라벨(예: Cy5)은 링커의 중심에 부착된다(예를 들면, 본원에서 참조로 인용된, 미국 특허 제7,994,304호의 도 5 및 컬럼 9 및 10의 A*pCp C5 Parg Capless의 화합물 1을 참조). 변형 7-deaza-아데노신 트리포스페이트를 암호화 영역에 혼입시, 수득한 폴리뉴클레오타이드는 라벨 및 억제제(예: 폴리머라제 억제제)에 부착된 분할 가능한 링커를 갖는다. 링커의 분할시

(예를 들면, 분할 가능한 디설피이드 잔기를 갖는 링커를 환원시키는 환원 조건으로), 라벨 및 억제제가 방출된다. 추가의 링커 및 페이로드(예: 치료제, 검출 가능한 라벨 및 세포 투과 페이로드)는 본원에 기재되어 있다.

[0497] 예를 들면, 본원에 기재된 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA는 유도된 다능성 줄기 세포(iPS 세포)에 사용될 수 있고, 이는 클러스터내 전체 세포에 비교하여 트랜스팩팅된 세포를 직접 추적할 수 있다. 또 다른 예에서, 링커를 통하여 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA에 부착될 수 있고 형광 표지될 수 있는 약제는 생체내, 예를 들면, 세포내 약제를 추적하는 데 사용될 수 있다. 기타 예는 이들로 제한되지는 않지만, 세포로의 가역적 약제 전달에서의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA의 사용을 포함한다.

[0498] 본원에 기재된 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA는 특정 소기관에 대한, 페이로드, 예를 들면, 검출 가능한 제제 또는 치료제의 세포내 표적화에 사용될 수 있다. 예시적인 세포내 표적은, 이들로 제한되지는 않지만, 진행 mRNA 프로세싱을 위한 핵 국소화, 또는 억제제를 함유하는 mRNA에 연결된 핵 국소화 서열(NLS)을 포함할 수 있다.

[0499] 또한, 본원에 기재된 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA는 예를 들면, 살아있는 동물의 세포 또는 조직에 치료제를 전달하는 데 사용될 수 있다. 예를 들면, 링커를 통하여 치료제에 부착된 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA는 치료제가 세포로 이동하여 세포내 표적에 이르도록 하는 막 투과를 촉진시킬 수 있다.

[0500] 일부 실시형태에서, 페이로드는 치료제, 예를 들면, 세포독소, 방사성 이온, 화학치료제 또는 기타 치료제일 수 있다. 세포독소 또는 세포독성제는 세포에 유해할 수 있는 어떠한 제제라도 포함한다. 예로는, 이들로 제한되지 않지만, 탁솔, 사이토칼라신 B, 그라미시딘 D, 에티디움 브로마이드, 에메틴, 미토마이신, 에토포시드, 테니포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 콜키신, 독소루비신, 다우노루비신, 디하이드록시아나트라신디온, 미톡사트론, 미트라마이신, 안티노마이신 D, 1-테하이드로테스토스테론, 글루코코르티코이드, 프로카인, 테트라카인, 리도카인, 프로판올롤, 푸로마이신, 마이탄시노이드, 예를 들면, 마이타노시놀(본원에서 전체적으로 참조로 인용된 미국 특허 제5,208,020호), 라켈마이신(CC-1065, 모두 본원에서 참조로 인용된, 미국 특허 제5,475,092호, 제5,585,499호 및 제5,846,545호 참조), 이의 유사체 또는 동족체가 포함된다. 방사성 이온은, 이들로 제한되지는 않지만, 요오드(예: 요오드 125 또는 요오드 131), 스트론튬 89, 인, 파라듐, 세슘, 이리듐, 포스페이트, 코발트, 이트륨 90, 사마륨 153 및 프라세오디뮴을 포함한다. 기타 치료제는, 이들로 제한되지는 않지만, 대사길 항물질(예: 메토크세이트, 6-머캅토프린, 6-티오구아닌, 시타라빈, 5-플루오로우라실 데카바진), 알킬화제(예: 메클로레타민, 티오테파 클로람부실, 라켈마이신(CC-1065), 멜팔란, 카무스틴(BSNU), 로무스틴(CCNU), 사이클로포스파미드, 부설판, 디브로모만니톨, 스트렘토조도신, 미토마이신 C 및 시스-디클로로디아민 백금 (II)(DDP) 시스플라틴), 안트라사이클린(예: 다우노루비신(이전 명칭 다우노마이신) 및 독소루비신), 항생제(예: 닥티노마이신(이전 명칭 안티노마이신), 블레오마이신, 미트라마이신 및 안트라마이신(AMC)) 및 항유사분열제(예: 빈크리스틴, 빈블라스틴, 탁솔 및 마이탄시노이드)를 포함한다.

[0501] 일부 실시형태에서, 페이로드는 검출 가능한 제제, 예를 들면, 다양한 유기 소분자, 무기 화합물, 나노입자, 효소 또는 효소 물질, 형광 물질, 발광 물질(예: 루미놀), 생물발광 물질(예: 루시페라제, 루시페린 및 에퀴린), 화학 발광 물질, 방사성 물질(예: ⁸F, ⁶⁷Ga, ^{81m}Kr, ⁸²Rb, ¹¹¹In, ¹²³I, ¹³³Xe, ²⁰¹Tl, ¹²⁵I, ³⁵S, ¹⁴C, ³H 또는 ^{90m}Tc(예: 퍼테크네이트(테크네이트(VII), TcO₄⁻로서), 및 조영제(예: 금(예: 금 나노입자), 가돌리늄(예: 킬레이트화 Gd), 산화철(예: 초상자성 산화철(SPIO), 단결정성 산화철 나노입자(MION) 및 초소형 초상자성 산화철(USPIO)), 망산 킬레이트(예: Mn-DPDP), 황산바륨, 요오드화 조영제(이오핵술), 마이크로버블 또는 퍼플루오로카본)일 수 있다. 이러한 광학 검출 가능한 라벨은 예를 들면, 제한 없이, 4-아세트아미도-4'-이소티오시아네이트스틸벤-2,2'-디설피온산; 아크리딘 및 유도체(예: 아크리딘 및 아크리딘 이소티오시아네이트); 5-(2'-아미노에틸)아미노나프탈렌-1-설피온산(EDANS); 4-아미노-N-[3-비닐설포닐]페닐]나프탈아미드-3,5-디설피네이트; N-(4-아닐리노-1-나프틸)말레이미드; 안트라닐아미드; BODIPY; 브릴리언트 옐로우(Brilliant Yellow); 쿠마린 및 유도체(예: 쿠마린, 7-아미노-4-메틸쿠마린(AMC, 쿠마린 120) 및 7-아미노-4-트리플루오로메틸쿠마린(쿠마린 151)); 시아닌 염료; 시아노신; 4,6'-디아미니디노-2-페닐인돌(DAPI); 5',5"-디브로모피로갈올-설포나프탈레인(브로모피로갈올 레드); 7-디에틸아미노-3-(4'-이소티오시아네이트페닐)-4-메틸쿠마린; 디에틸렌트리아민 펜타아세테이트; 4,4'-디이소티오시아네이트디하이드로스틸벤-2,2'-디설피온산; 4,4'-디이소티오시아네이트스틸벤-2,2'-디설피온산; 5-[디메틸아미노]-나프탈렌-1-설피닐 클로라이드(DNS, 단설피클로라이드); 4-디메틸아미노페닐아조페닐-4'-이소티오시아네이트(DABITC); 예오신 및 유도체(예: 예오신 및 예오신 이소티오시아네이트); 에리트로신 및 유도체(예: 에리트로신 B 및 에리트로신 이소티오시아네이트); 에티디움; 플루오레세인 및 유도체(예: 5-카복시플루오레세인(FAM), 5-(4,6-디클로로트리아진-2-일)아미노플루오레세인(DTAF), 2',7'-디메톡시-4'5'-디

클로로-6-카복시프루오레세인, 플루오레세인, 프루오레세인 이소티오시아네이트, X-로다민-5-(및 6)-이소티오시아네이트(QFITC 또는 XRITC) 및 플루오레스카민; 2-[2-[3-[[1,3-디하이드로-1,1-디메틸-3-(3-설포프로필)-2H-벤즈[e]인돌-2-일리덴]에틸리덴]-2-[4-(에톡시카보닐)-1-피페라지닐]-1-사이클로펜텐-1-일]에테닐]-1,1-디메틸-3-(3-설포프로필)-1H-벤즈[e]인돌리움 하이드록사이드, 내염, n,n-디에틸에탄아민과의 화합물 (1:1)(IR144); 5-클로로-2-[2-[3-[(5-클로로-3-에틸-2(3H)-벤조티아졸-일리덴]에틸리덴]-2-(디페닐아미노)-1-사이클로펜텐-1-일]에테닐]-3-에틸벤조티아졸륨 퍼클로레이트(IR140); 말라카이트 그린(Malachite Green) 이소티오시아네이트; 4-메틸엠펠리페론 오르토크레졸프탈레인; 니트로티로신; 파라로스아닐린; 페놀 레드; B-피코에리트린; o-프탈디알데히드; 피렌 및 유도체(예: 피렌, 피렌 부티레이트 및 석신이미딜 1-피렌); 부티레이트 퀸텀 도트; 리액티브 레드(Reactive Red) 4(CIBACRON™ 브릴리언트 레드 3B-A); 로다민 및 유도체(예: 6-카복시-X-로다민(ROX), 6-카복시로다민(R6G), fltmdkals 로다민 B 설포닐 클로라이드 로다린(Rhod), 로다민 B, 로다민 123, 로다민 X 이소티오시아네이트, 설포로다민 B, 설포로다민 101, 설포로다민 101의 설포닐 클로라이드 유도체(텍사스 레드), N,N,N',N'-테트라메틸-6-카복시로다민(TAMRA) 테트라메틸 로다민 및 테트라메틸 로다민 이소티오시아네이트(TRITC)); 리보플라빈; 로솔산; 테르븀 킬레이트 유도체; 시아닌-3(Cy3); 시아닌-5(Cy5); 시아닌-5.5(Cy5.5), 시아닌-7(Cy7); IRD 700; IRD 800; 알렉사(Alexa) 647; 라 줄타 블루(La Jolta Blue); 프탈로시아닌; 및 나프탈로시아닌을 포함한다.

[0502]

일부 실시형태에서, 검출 가능한 제제는 활성화시 검출 가능하게 되는 비-검출 가능 전구체(예: 형광원 테트라진-형광단 작제물(예: 테트라진-BODIPY FL, 테트라진-오레곤 그린(Oregon Green) 488, 또는 테트라진-BODIPY TMR-X) 또는 효소 활성화 가능 형광 발생제(예: PROSENSE®(VisEn Medical)))일 수 있다. 효소 표지된 조성물이 사용될 수 있는 시험관내 검정은, 이들로 제한되지는 않지만, 효소 연결 면역흡착 분석(ELISA), 면역침전 분석, 면역형광, 효소 면역분석(EIA), 방사면역부분분석(RIA), 및 웨스턴 블롯 분석(Western blot analysis)을 포함한다.

[0503]

병용

[0504]

폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA는 하나 이상의 기타 치료제, 진단제 또는 영상화제와 병용(used in combination with)될 수 있다. "...와 함께(in combination with)"란, 제제가 동시에 투여되고/되거나 함께 전달하기 위하여 제형화되어야 함을 암시하려는 것이 아니지만, 이러한 전달 방법은 본 발명이 영역 내에 있다. 조성물은 하나 이상의 기타 목적하는 치료 또는 의료 시술과 함께, 또는 그 이전에 또는 그 이후에 투여될 수 있다. 일반적으로, 각각의 제제는 그 제제에 대하여 정해진 용량 및/또는 시간표로 투여한다. 일부 실시형태에서, 본 발명은 이의 생체이용률을 개선시키고/시키거나, 이의 대사를 감소시키고/시키거나 변경하고/하거나, 이의 배설을 억제하고/하거나, 이의 체내 분포를 변경할 수 있는 제제와 함께 약제학적, 예방적, 진단적 또는 영상화 조성물을 전달하는 것을 포함한다. 비제한적 예로서, 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 및/또는 mmRNA는 암 치료용의 또는 과증식성 세포를 조절하는 약제학적 제제와 병용될 수 있다. 본원에서 전체적으로 참조로 인용된 미국 특허 제7,964,571호에는, 인터류킨-12에 대해 코딩하는 DNA 플라스미드를 리포중합체와 포함하는 약제학적 조성물을 사용하고, 또한 하나 이상의 항암제 또는 화학요법제를 투여하는, 고품 원발 또는 전이 종양의 치료용 병용 요법이 기재되어 있다. 추가로, 항-증식성 분자를 암호화하는 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 및/또는 mmRNA는 약제학적 조성물과 리포중합체에 존재할 수 있다(예를 들면, 하나 이상의 화학요법제 또는 항암제와 투여될 수 있는 항증식성 분자 및 리포중합체를 암호화하는 DNA 플라스미드를 포함하는 약제학적 조성물을 청구하는, 본원에서 전체적으로 참조로 인용된 미국 특허공개공보 제20110218231호 참조).

[0505]

투약

[0506]

본 발명은 본 발명에 따르는 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 및/또는 mmRNA 및 이들의 암호화된 단백질 또는 착체를 이를 필요로 하는 피검체에 투여함을 포함하는 방법을 제공한다. 핵산, 단백질 또는 착체, 또는 이의 약제학적, 영상화, 진단 또는 예방 조성물이 질환, 장애 및/또는 상태(예: 작업 기억 손상과 관련된 질환, 장애 및/또는 상태)를 예방, 치료, 진단 또는 영상화하기에 유효한 어떠한 투여량 및 투여 경로라도 사용하여 피검체에 투여될 수 있다. 정확한 필요량은 피검체의 중, 연령, 일반적 상태, 질환의 중증도, 특정 조성, 이의 투여 방식, 이의 활성 방식 등에 따라, 피검체마다 달라진다. 본 발명에 따르는 조성물은 통상적으로 투여 용이성 및 투여량 균일성에 대한 투여 단위 형태로 제형화된다. 그러나, 본 발명의 조성물의 일일 사용은 안전한 의학적 판단 영역 내에서 주치의에 의하여 결정될 수 있음을 이해할 것이다. 어떠한 특정 환자에 대하여 특정한 치료학적으로 유효하거나, 예방적으로 유효하거나, 적합한 영상화 용량 수준은 치료되는 장애 및 장애의 중증도; 사용되는 특정 화합물의 활성; 사용되는 특정 조성물; 환자의 연령, 체중, 일반 건강, 성별 및 식이; 사용된 특정 화합물의 투여 시간, 투여 경로 및 배설률; 치료 기간; 사용된 특정 화합물과 병용되거나 동시에 사

용되는 약제; 및 의술 분야에 익히 공지된 유사 인자를 포함한 다양한 인자에 좌우된다.

[0507] 특정 실시형태에서, 본 발명에 따르는 조성물은 1일, 1일 1회 이상 피검체 체중의 약 0.0001 내지 약 100mg/kg, 약 0.001 내지 약 0.05mg/kg, 약 0.005 내지 약 0.05mg/kg, 약 0.001 내지 약 0.005mg/kg, 약 0.05 내지 약 0.5mg/kg, 약 0.01 내지 약 50mg/kg, 약 0.1 내지 약 40mg/kg, 약 0.5 내지 약 30mg/kg, 약 0.01 내지 약 10mg/kg, 약 0.1 내지 약 10mg/kg 또는 약 1 내지 약 25mg/kg을 전달하기에 충분한 투여 수준으로 투여되어 목적하는 치료, 진단, 예방 또는 영상화 효과를 수득할 수 있다. 목적하는 투여량은 1일 3회, 1일 2회, 1일 1회, 2일마다, 3일마다, 매주, 2주마다, 3주마다, 또는 4주마다 전달될 수 있다. 특정 실시형태에서, 목적하는 투여량은 다중 투여(예를 들면, 2회, 3회, 4회, 5회, 6회, 7회, 8회, 9회, 10회, 11회, 12회, 13회, 14회, 또는 그 이상의 투여)를 사용하여 전달될 수 있다.

[0508] 본 발명에 따라, 분할 용량 요법의 투여로 포유동물 피검체에 보다 높은 단백질 수준이 생성됨이 밝혀졌다. 본원에서 사용된 바와 같이, "분할 용량"은 단일 단위 용량 또는 총 일일 용량의 분할, 예를 들면, 단일 단위 용량의 2회 이상의 투여이다. 본원에서 사용된 바와 같이, "단일 단위 용량"은 1용량/ 1회/ 단일 경로/ 단일 접촉점, 즉 단일 투여 사례로 투여되는 어떠한 치료제의 용량이다. 본원에서 "총 일일 용량"은 24시간의 기간에 주어지거나 처방된 양이다. 이는 단일 단위 용량으로서 투여될 수 있다. 하나의 실시형태에서, 본 발명의 mmRNA는 분할 용량으로 피검체에게 투여된다. mmRNA는 완충제 중에서만, 또는 본원에 기재된 제형 중에서 제형화될 수 있다.

[0509] 투여 형태

[0510] 본원에 기재된 약제학적 조성물은 본원에 기재된 투여 형태, 예를 들면, 국소, 비내, 기관내 또는 주사용으로 (예: 정맥내, 안내, 유리체내, 근육내, 심장내, 복강내, 피하) 제형화될 수 있다.

[0511] 액상 투여 형태

[0512] 비경구 투여용 액상 투여 형태는, 이들로 제한되지는 않지만, 약제학적으로 허용되는 에멀전, 마이크로에멀전, 용제, 현탁제, 시럽 및/또는 엘릭서를 포함한다. 활성 성분 이외에, 액상 투여 형태는 이들로 제한되지는 않지만, 물 또는 기타 용매, 가용화제 및 유화제, 예를 들면, 에틸 알콜, 이소프로필 알콜, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알콜, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸렌 글리콜, 디메틸포름아미드, 오일(특히, 면실유, 땅콩유, 옥수수유, 배아유, 올리브유, 피마자유 및 참기름), 글리세롤, 테트라하이드로프루피릴 알콜, 폴리에틸렌 글리콜 및 소르비탄의 지방산 에스테르, 및 이들의 혼합물을 포함하는 당해 기술 분야에서 일반적으로 사용되는 불활성 희석제를 포함할 수 있다. 비경구 투여에 대한 특정 실시형태에서, 조성물은 가용화제, 예를 들면, CREMOPHOR®, 알콜, 오일, 변성유, 글리콜, 폴리소르베이트, 사이클로덱스트린, 중합체 및/또는 이들의 배합물과 혼합할 수 있다.

[0513] 주사제

[0514] 주사 가능 제제, 예를 들면, 무균 주사 가능 수성 또는 유성 현탁제가 공지된 기술에 따라 제형화될 수 있고, 적합한 분산제, 습윤화제 및/또는 현탁제를 포함할 수 있다. 무균 주사 가능 제제는 비독성의 비경구로 허용되는 희석제 및/또는 용매 중의 무균 주사 가능 용제, 현탁제 및/또는 에멀전, 예를 들면, 1,3-부탄디올 중의 용제일 수 있다. 사용될 수 있는 허용되는 비히클 및 용매 중에는, 이들로 제한되지는 않지만, 물, 링거액(Ringer's solution), U.S.P. 및 등장성 염화나트륨 용액이 있다. 멸균, 고정유가 용매 또는 현탁 배지로서 편리하게 사용된다. 이를 위하여, 합성 모노- 또는 디글리세라이드를 포함하는 어떠한 블랜드 고정유라도 사용될 수 있다. 지방산, 예를 들면, 올레산이 주사용 제제에 사용될 수 있다.

[0515] 주사 가능 제형은 예를 들면, 박테리아 보유 필터를 통하여 여과하고/하거나, 사용 전 무균수 또는 기타 무균 주사 가능 배지에 용해되거나 분산될 수 있는무균 고형 조성물 형태의 무균화제를 혼입시켜 무균화될 수 있다.

[0516] 활성 성분의 효과를 연장시키기 위하여, 피하 또는 근육내 주사로부터의 활성 성분의 흡착을 느리게 하는 것이 바람직할 수 있다. 이는 수 용해도가 불량한 결정성 또는 무정형 물질의 액상 현탁제의 사용으로 달성될 수 있다. 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA의 흡수율은 이어서 이의 용해율에 좌우되고, 이는 차례로 결정 크기 및 결정 형태에 좌우될 수 있다. 대안적으로, 오일 비히클 중의 비경구 투여된 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA의 지연된 흡수는 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA를 오일 비히클에 용해시키거나 현탁시켜 달성될 수 있다. 주사 가능한 디포우 형태는 폴리락티드-폴리글리콜라이드 등의 생분해성 중합체 중의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA의 마이크로인캡슐 기질(matrix)을 형성하여 제조된다. 중합체에 대한 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA의 비 및 사용된 특정 중합체의 특성에 따라, 폴리뉴클

레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA 방출물이 조절될 수 있다. 기타 생분해성 중합체의 예는, 이들로 제한되지는 않지만, 폴리(오르토에스테르) 및 폴리(무수물)을 포함한다. 디포우 주사 가능 제형은 신체 조직과 혼화성인 리포솜 또는 마이크로에멀전에 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA를 포획하여 제조될 수 있다.

[0517]

폐

[0518]

본원에서 폐 전달에 유용하다고 기재된 제형은 또한 약제학적 조성물의 비내 전달에 사용될 수도 있다. 비내 투여에 적합한 또 다른 제형은 활성 성분을 포함하고 평균 입자 크기가 약 0.2 내지 500 μ m인 조악한 산제일 수 있다. 이러한 제형은 비성 호흡을 하는 방식으로, 즉, 코에 가깝게 잡은 분말 용기로부터 비강을 통하여 신속하게 흡입하여 투여될 수 있다.

[0519]

비강 투여에 적합한 제형은 활성 성분을 예를 들면, 약 0.1%(w/w)로 적게 내지는 100%(w/w)로 많이 포함할 수 있고, 본원에 기재된 추가 성분중 하나 이상을 포함할 수 있다. 약제학적 조성물은 구강 투여에 적합한 제형으로 제조되고/되거나 포장되고/되거나 판매될 수 있다. 이러한 제형은 예를 들면, 통상적인 방법을 사용하여 제조된 정제 및/또는 로젠지 형태일 수 있고, 예를 들면, 0.1 내지 20%(w/w) 활성 성분일 수 있고, 여기서 잔량은 경구 용해 가능하고/하거나 분해 가능한 조성물 및 임의로, 본원에 기재된 하나 이상의 추가 성분을 포함한다. 대안적으로, 구강 투여에 적합한 제형은 활성 성분을 포함하는 분말 및/또는 에어로졸화 및/또는 분무화 용제 및/또는 현탁제를 포함할 수 있다. 이러한 분말화, 에어로졸화 및/또는 에어로졸화 제형은, 분산시, 평균 입자 및/또는 액적 크기가 약 0.1 내지 약 200nm의 범위일 수 있고, 본원에 기재된 어떠한 추가 성분중 하나 이상을 추가로 포함할 수 있다.

[0520]

약제학적 제제의 제형 및/또는 제조에서의 일반적인 고려 사항은 예를 들면, 문헌[참조: Remington: The Science and Practice of Pharmacy 21st ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2005(본원에서 참조로 인용됨)]에서 찾을 수 있다.

[0521]

코팅 또는 쉘

[0522]

정제, 당제, 캡슐, 환제 및 산제의 고체 투여 형태는 약제 제형화 기술 분야에 익히 공지된 장용피 및 기타 코팅과 같은 코팅 및 쉘로 제조할 수 있다. 이는 불투명화제를 임의로 포함할 수 있고 활성 성분(들)을 유일하게 또는 우선적으로, 장관의 특정 부분으로, 임의로, 지연된 방식으로 방출하는 조성을 가질 수 있다. 사용될 수 있는 매립 조성물의 예는 중합체성 물질 및 왁스를 포함한다. 유사한 유형의 고형 조성물이 락토스 또는 유당 뿐만 아니라 고분자량 폴리에틸렌 글리콜 등과 같은 부형제를 사용하여 연질 및 경질 충전 젤라틴 캡슐에 충전제로서 사용될 수 있다.

[0523]

약제학적 조성물의 특성

[0524]

본원에 기재된 약제학적 조성물은 생체이용률, 치료 범위(therapeutic window) 및/또는 분포 용적 중 하나 이상을 특징으로 할 수 있다.

[0525]

생체이용률

[0526]

폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA는, 본원에 기재된 바와 같은 운반제와의 조성물로 제형화될 때, 본원에 기재된 전달제가 부족한 조성물과 qIryl하여 생체이용률 증가를 나타낼 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "생체이용률"은 포유동물에 투여된 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA의 주어진 양의 전신 이용률을 말한다. 생체이용률은 화합물을 포유동물에 투여한 이후 화합물의 비변화 형태의 최대 혈청 또는 혈장 농도(C_{max}) 또는 곡선하 면적(AUC)을 측정하여 평가될 수 있다. AUC는 횡 좌표를 따르는 시간(X-축)에 대한 종좌표를 따르는 화합물(Y-축)의 혈청 또는 혈장 농도를 프로팅하는 곡선하 면적의 측정이다. 일반적으로, 특정 화합물에 대한 AUC는 당업자에게 공지된 방법을 사용하여, 그리고 본원에서 참조로 인용된 문헌(참조: G. S. Banker, Modern Pharmaceutics, Drugs and the Pharmaceutical Sciences, v. 72, Marcel Dekker, New York, Inc., 1996)에 기재된 바와 같이 계산될 수 있다.

[0527]

C_{max} 값은 화합물을 포유동물에 투여한 이후 포유동물의 혈청 또는 혈장에서 달성되는 화합물의 최대 농도이다. 특정 화합물의 C_{max} 값은 당업자에게 공지된 방법을 사용하여 측정될 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "생체이용률 증가" 또는 "약동학 개선"은 포유동물의 AUC, C_{max} 또는 C_{min} 으로 측정된, 제1 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA의 전신 이용률이, 본원에 기재된 전달제와 동시 투여시 이러한 동시 투여를 하지 않을 때보다 더 크음을 의미한다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA의 생체이용률은 약

2% 이상, 약 5% 이상, 약 10% 이상, 약 15% 이상, 약 20% 이상, 약 25% 이상, 약 30% 이상, 약 35% 이상, 약 40% 이상, 약 45% 이상, 약 50% 이상, 약 55% 이상, 약 60% 이상, 약 65% 이상, 약 70% 이상, 약 75% 이상, 약 80% 이상, 약 85% 이상, 약 90% 이상, 약 95% 이상 또는 약 100% 증가할 수 있다.

[0528] 치료 범위

[0529] 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA는, 본원에 기재된 전달제와의 조성물로 제형화시, 본원에 기재된 전달제가 부족한 투여된 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA 조성물의 치료 범위와 비교하여 투여된 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA 조성물의 치료 범위 증가를 나타낼 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같은, "치료 범위"는 치료 효과를 유도하는 높은 반응성을 갖는, 혈장 농도 범위, 또는 활성 부위에서의 치료학적 활성 물질 수준의 범위를 말한다. 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 전달제와 동시 투여시 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA의 치료 범위는 약 2% 이상, 약 5% 이상, 약 10% 이상, 약 15% 이상, 약 20% 이상, 약 25% 이상, 약 30% 이상, 약 35% 이상, 약 40% 이상, 약 45% 이상, 약 50% 이상, 약 55% 이상, 약 60% 이상, 약 65% 이상, 약 70% 이상, 약 75% 이상, 약 80% 이상, 약 85% 이상, 약 90% 이상, 약 95% 이상 또는 약 100% 증가할 수 있다.

[0530] 분포 용적

[0531] 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA는, 본원에 기재된 전달제와의 조성물로 제형화시, 본원에 기재된 전달제가 부족한 조성물에 비하여, 개선된, 예를 들면, 감소되거나 표적화된 분포 용적(V_{dist})을 나타낼 수 있다. 분포 용적(V_{dist})은 체내 약제의 양을 혈액 또는 혈장내 약제의 농도에 관련시킨다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "분포 용적"은 혈액 또는 혈장에서와 동일한 농도에서 체내 약제의 총량을 함유하는 데 필요한 유체 용적을 말한다: V_{dist} 는 체내 약제의 양/ 혈액 또는 혈장내 약제의 농도와 동일하다. 예를 들면, 10mg 용량 및 10mg/L의 혈장 농도에 대하여, 분포의 용적은 1리터일 것이다. 분포 용적은 약제가 혈관의 조직에 존재하는 범위를 반영한다. 큰 분포 용적은 혈장 단백질 결합과 비교한 조직 성분에 결합하는 화합물의 경향성을 반영한다. 임상 셋팅에서, V_{dist} 는 정상 상태 농도를 달성하는 가중 용량을 측정하는 데 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA의 분포 용적은 본원에 기재된 전달제와 동시 투여시 약 2% 이상, 약 5% 이상, 약 10% 이상, 약 15% 이상, 약 20% 이상, 약 25% 이상, 약 30% 이상, 약 35% 이상, 약 40% 이상, 약 45% 이상, 약 50% 이상, 약 55% 이상, 약 60% 이상, 약 65% 이상, 약 70% 이상 증가할 수 있다.

[0532] 생물학적 효과

[0533] 하나의 실시형태에서, 동물에게 전달된 변형 mRNA의 생물학적 효과는 동물의 단백질 발현을 분석함으로써 분류될 수 있다. 게프로그래밍된 단백질 발현은 본 발명의 포유동물 투여된 변형 mRNA로부터 회수된 생물학적 샘플을 분석하여 측정될 수 있다. 하나의 실시형태에서, 50pg/ml 이상의 포유동물에게 투여된 변형 mRNA에 의하여 암호화된 발현 단백질이 바람직할 수 있다. 예를 들면, 포유동물에게 전달된 변형 mRNA에 의하여 암호화된 단백질에 대해 50-200pg/ml의 단백질 발현이 포유동물의 단백질의 치료학적 유효량인 것으로 나타날 수 있다.

[0534] 질량 분광법에 의한 변형 핵산의 검출

[0535] 질량 분광법(MS)은 이온으로의 이의 전환 후 분자에 대한 구조 및 분자 질량/농도 정보를 제공할 수 있는 분석 기술이다. 분자는 먼저 이온화되어 양전하 또는 음전하를 획득한 다음, 질량 분석기를 통하여 이동하여 이의 질량/전하(m/z) 비에 따라 검출기의 상이한 영역에 도달한다.

[0536] 질량 분광법은 개별 샘플을 이온화하고 추가의 분석을 위해 하전된 분자를 생성하기 위한 이온원을 포함하는 질량 분광계를 사용하여 수행한다. 예를 들면, 샘플의 이온화는 전기분무 이온화(ESI), 대기압 화학 이온화(APCI), 광이온화, 전자 이온화, 고속 원자 충격(FAB)/ 액체 2차 이온화(LSIMS), 기질 보조 레이저 탈착/ 이온화(MALDI), 전계 이온화, 전계 탈착, 열분무/플라즈마분무 이온화 및 입자 빔 이온화에 의하여 수행될 수 있다. 당업자는 이온화 방법의 선택이 측정되는 분석물, 샘플 유형, 검출기 유형, 양성 대 음성 모드 선택 등을 기준으로 결정될 수 있음을 이해할 것이다.

[0537] 샘플을 이온화한 후, 이렇게 생성된 양으로 하전되거나 음으로 하전된 이온은 분석하여 질량 대 전하 비(즉, m/z)를 측정할 수 있다. 질량 대 전하 비를 결정하기에 적합한 분석기는 4중 분석기, 이온 트랩 분석기 및 비행 시간법 분석기를 포함한다. 이온은 몇 가지 검출 방식을 사용하여 검출될 수 있다. 예를 들면, 선택된 이온은 검출될 수 있거나(즉, 선택적 이온 모니터링 모드를 사용하여), 대안적으로, 이온은 주사 방식, 예를

다면, 다중 반응 모니터링(MRM) 또는 선택된 반응 모니터링(SRM)을 사용하여 검출될 수 있다.

- [0538] 펩타이드 표준물의 안정성 동위 원소 표지된 희석과 결합된 액체 크로마토그래피-다중 반응 모니터링(LC-MS/MRM)은 단백질 검증에 유효한 방법인 것으로 나타났다(예를 들면, 다음 참조: Keshishian et al., Mol Cell Proteomics 2009 8: 2339-2349; Kuhn et al., Clin Chem 2009 55:1108-1117; Lopez et al., Clin Chem 2010 56:281-290). 바이오마커 발견 연구에 종종 사용되는 비표적화 질량 분광법과 달리, 표적화 MS 방법은 착체 혼합물 중의 선택된 수십 내지 수백 개의 선택된 펩타이드에 대한 기구의 전체 분석 용량에 초점을 맞춘 MS의 펩타이드 서열 기반 방식이다. 관심 단백질로부터 유도된 펩타이드로만 검출 및 분절을 제한함으로써, 감도 및 재현성이 발견-모드 MS 방법과 비교하여 극적으로 개선된다. 이러한 단백질의 질량 분광법 기반 다중 반응 모니터링(MRM) 정량화의 방법은 임상 샘플의 신속하고, 표적화되고, 다중화된 단백질 발견 프로파일링을 통한 바이오마커의 발견 및 정량화에 극적으로 영향을 미칠 수 있다.
- [0539] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 하나 이상의 변형 mRNA에 의하여 암호화된 하나 이상의 단백질을 함유할 수 있는 생물학적 샘플은 MRM-MS의 방법에 의하여 분석될 수 있다. 생물학적 샘플의 정량화는 이들로 제한되지는 않지만, 내부 표준물로서 동위원소로 표지된 펩타이드 또는 단백질을 추가로 포함할 수 있다.
- [0540] 본 발명에 따라, 생물학적 샘플은, 일단 피검체로부터 획득되면, 효소 소화시킬 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "소화"는 더 짧은 펩타이드로 파괴하는 것을 의미한다. 본원에서 사용된 바와 같이, "샘플을 처리하여 단백질을 소화시킨다"는 구절은 샘플 내에서 단백질을 파괴하는 방법으로 샘플을 조작함을 의미한다. 이러한 효소는, 이들로 제한되지는 않지만, 트립신, 엔도프로테이나제 Glu-C 및 키모트립신을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 본 발명의 하나 이상의 변형 mRNA에 의하여 암호화된 하나 이상의 단백질을 함유할 수 있는 생물학적 샘플은 효소를 사용하여 소화될 수 있다.
- [0541] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 변형 mRNA에 의하여 암호화된 단백질을 함유할 수 있는 생물학적 샘플은 전기분무 이온화를 사용하여 단백질에 대하여 분석될 수 있다. 전기분무 이온화(ESI) 질량 분광법(ESIMS)은 전기 에너지를 사용하여 질량 분광법에 의하여 분석되기 전에 용액으로부터 기체 상으로 이온을 이동시키는 것을 지원한다. 샘플은 당해 기술분야에 공지된 방법을 사용하여 분석될 수 있다(예를 들면, 다음 참조: Ho et al., Clin Biochem Rev. 2003 24(1):3-12). 용액에 함유된 이온성 화학종은 전하 액적의 미세 분무를 분산시키고, 용매를 증발시키고, 하전된 액적으로부터 이온을 분출시켜 고도로 하전된 액적 미스트를 발생하여, 기체 상으로 이동될 수 있다. 고도로 하전된 액적의 미스트는 이들로 제한되지는 않지만, 4중 질량 분석기 등의, 1개 이상, 2개 이상, 3개 이상 또는 4개 이상의 질량 분석기를 사용하여 분석될 수 있다. 추가로, 질량 분광 방법은 정제 단계를 포함할 수 있다. 비제한적 예로서, 제1 사극자는 단일 m/z 비를 선택하도록 설정되어 상이한 m/z 비를 갖는 기타 분자 이온을 여과할 수 있고 이는 MS 분석 전에 복잡하고 시간 소모적인 샘플 정제 절차를 배제시킬 수 있다.
- [0542] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 변형 mRNA에 의하여 암호화된 단백질을 함유할 수 있는 생물학적 샘플은 일렬(tandem) ESIMS 시스템(예: MS/MS)에서 단백질에 대하여 분석될 수 있다. 비제한적 예로서, 액적은 제품 주사(또는 딸 주사), 전구체 주사(모 주사), 중성 손실 또는 다중 반응 모니터링을 사용하여 분석될 수 있다.
- [0543] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 변형 mRNA에 의하여 암호화된 단백질을 함유할 수 있는 생물학적 샘플은 기질 보조 레이저 탈착/이온화(MALDI) 질량 분광법(MALDIMS)을 사용하여 분석될 수 있다. MALDI는 대형 및 소형 분자, 예를 들면, 단백질의 비파괴 증발 및 이온화를 제공한다. MALDI 분석에서, 분석물은 먼저 매우 몰 과량의 기질 물질로 동시 결정화되고, 이는 또한, 이들로 제한되지는 않지만, 자외선 흡수 약 유기산을 포함할 수 있다. MALDI에 사용되는 기질의 비제한적 예는 α -시아노-4-하이드록시신남산, 3,5-디메톡시-4-하이드록시신남산 및 2,5-디하이드록시벤조산이다. 분석물-기질 혼합물의 레이저 방사로 기질과 분석물의 증발이 발생할 수 있다. 레이저 유도된 탈착으로 온전한 분석물의 고 이온 수율을 제공하고 높은 정확도로 화합물을 측정하는 것이 가능하다. 샘플은 당해 기술분야에 공지된 방법(예를 들면, 다음 참조: Lewis, Wei and Siuzdak, Encyclopedia of Analytical Chemistry 2000:5880-5894)을 사용하여 분석될 수 있다. 비제한적인 예로서, MALDI 분석에 사용되는 질량 분석기는 선형 비행 시간(TOF), TOF 반사 또는 푸리에(Fourier) 변형 질량 분석기를 포함할 수 있다.
- [0544] 하나의 실시형태에서, 분석물-기질 혼합물은 건조-액적 방법을 사용하여 형성될 수 있다. 생물학적 샘플은 기질과 혼합되어 기질 대 샘플 비가 약 5000:1인 포화 기질 용액을 생성한다. 그 다음, 포화 기질 용액의 분액(약 0.5-2.0 μ l)을 건조시켜 분석물-기질 혼합물을 형성한다.

- [0545] 하나의 실시형태에서, 분석물-기질 혼합물은 박층 방법을 사용하여 형성될 수 있다. 기질 균질 필름을 우선 형성한 다음, 샘플을 적용하고, 기질에 의하여 흡수시켜 분석물-기질 혼합물을 형성할 수 있다.
- [0546] 하나의 실시형태에서, 분석물-기질 혼합물은 후층 방법을 사용하여 형성될 수 있다. 기질 균질 필름을 니트로-셀룰로스 기질 첨가제로 형성한다. 일단 균일한 니트로-셀룰로스 기질 층이 수득되면, 샘플을 적용하고 기질로 흡수시켜 분석물-기질 혼합물을 형성한다.
- [0547] 하나의 실시형태에서, 분석물-기질 혼합물은 샌드위치 방법을 사용하여 형성될 수 있다. 기질 결정의 박층은 박층 방법에서와 같이 수행하고 이후 수성 트리플루오로아세트산, 샘플 및 기질의 액적을 가하여 제조한다. 그 다음, 샘플은 기질로 흡수되어 분석물-기질 혼합물을 형성한다.
- [0548] **V. 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 및 mmRNA의 용도**
- [0549] 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 및 mmRNA는 세포의 표현형을 변경하는 데 사용될 수 있다. 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 및 mmRNA는 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 다중 단백질을 암호화하여 관심 폴리펩타이드를 생성할 수 있다. 관심 폴리펩타이드는 치료 및/또는 임상 및 연구 설정에 사용될 수 있다. 비제한적인 예로서, 관심 폴리펩타이드는 재프로그래밍 인자, 분화 인자 및 탈-분화 인자를 포함할 수 있다.
- [0550] 치료법
- [0551] 치료제
- [0552] 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 및 mmRNA, 예를 들면, 본원에 기재된 변형 핵산 및 변형 RNA, 및 이들로부터 해독된 단백질은 치료제 또는 예방제로서 사용될 수 있다. 이는 의약, 요법 및 예방 치료에 있어서의 용도에 제공된다. 예를 들면, 본원에 기재된 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA는 피검체에 투여될 수 있으며, 여기서 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA는 생체내에서 해독되어 피검체에 치료 또는 예방 폴리펩타이드를 생성한다. 사람 및 기타 포유동물의 질환 또는 상태의 진단, 치료 또는 예방용 조성물, 방법, 키트 및 시약이 제공된다. 본 발명의 활성 치료제는 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA, 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA를 함유하는 세포, 또는 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA로부터 해독된 폴리펩타이드를 포함한다.
- [0553] 특정 실시형태에서, 단백질 또는 단백질들에 대해 암호화하는 해독 가능한 영역을 함유하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA를 함유하는 병용 치료법이 본원에서 제공된다.
- [0554] 본원에 기재된 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA를 사용하는 세포 개체군에서 재조합 폴리펩타이드의 해독을 유도하는 방법이 본원에서 제공된다. 이러한 해독은 생체내, 생체외, 배양물내 또는 시험관내에서 수행될 수 있다. 세포 개체군은 하나 이상의 뉴클레오타이드 변형 및 재조합 폴리펩타이드를 암호화하는 해독 가능한 영역을 갖는 핵산을 함유하는 유효량의 조성물과 접촉한다. 개체군은 핵산이 세포 개체군의 하나 이상의 세포로 국소화되도록 하는 조건하에 접촉시키고, 재조합 폴리펩타이드는 핵산으로부터의 세포 내에서 해독된다.
- [0555] 조성물의 "유효량"은 적어도 부분적으로는, 표적 조직, 표적 세포 유형, 투여 수단, 핵산의 물리적 특성(예: 변형 뉴클레오타이드의 크기 및 범위) 및 기타 결정 인자를 기반으로 제공된다. 일반적으로, 유효량의 조성물은 세포내 효율적인, 바람직하게는 상응하는 비변형 핵산을 함유하는 조성물보다 효율적인 단백질 생성을 제공한다. 증가된 효율성은 증가된 세포 트랜스펙션(즉, 핵산으로 트랜스펙팅된 세포의 백분율), 핵산으로부터의 증가된 단백질 해독, 감소된 핵산 분해(예를 들면, 변형 핵산으로부터의 단백질 해독의 증가된 기간에 의하여 입증된 바와 같음), 또는 숙주 세포의 감소된 선천 면역 반응에 의하여 입증될 수 있다.
- [0556] 본 발명의 측면은 이를 필요로 하는 포유동물 피검체내 재조합 폴리펩타이드의 생체내 해독을 유도하는 방법에 관한 것이다. 여기서, 하나 이상의 구조 또는 화학 변형 및 재조합 폴리펩타이드를 암호화하는 해독 가능한 영역을 갖는 핵산을 함유하는 유효량의 조성물은 본원에 기재된 전달 방법을 사용하여 피검체에 투여된다. 핵산은 일정량으로 핵산이 피검체의 세포로 국소화되고 재조합 폴리펩타이드가 핵산으로부터 세포 내에 해독되도록 하는 기타의 조건하에 제공된다. 핵산이 국소화되는 세포, 또는 세포가 존재하는 조직은 1라운드 이상의 핵산 투여로 표적화될 수 있다.
- [0557] 특정 실시형태에서, 투여된 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA는 재조합 폴리펩타이드가 해독되는 세포, 조직 또는 유기체에 실질적으로 부재한 기능성 활성을 제공하는 하나 이상의 재조합 폴리펩타이드의 생성을 지시한다. 예를 들면, 결손 기능성 활성은 자연상 효소, 구조 또는 유전자 조절될 수 있다. 관련 실시형태에서, 투여된 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA는 존재하지만 재조합 폴리펩타이드가 해독되는 세포에

실질적으로 결핍된 기능성 활성을 증가시키는(예를 들면, 상승적으로) 하나 이상의 재조합 폴리펩타이드의 생성을 지시한다.

[0558] 기타 실시형태에서, 투여된 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA는 재조합 폴리펩타이드가 해독되는 세포에 실질적으로 부재한 폴리펩타이드(또는 다중 폴리펩타이드)를 대체하는 하나 이상의 재조합 폴리펩타이드의 생성을 지시한다. 이러한 부재는 암호화 유전자 또는 이의 조절 경로의 유전 돌연변이로 인한 것일 수 있다. 일부 실시형태에서, 재조합 폴리펩타이드는 세포내 내인성 단백질 수준을 증가시키고; 이러한 증가는 내인성 단백질의 수준을 정상이하 수준으로부터 정상 수준까지, 또는 정상 수준으로부터 초-정상 수준까지 끌어올릴 수 있다.

[0559] 대안적으로, 재조합 폴리펩타이드는 세포내 존재하거나 세포 표면에 존재하거나 세포로부터 분비된 내인성 단백질의 활성을 길항하는 작용을 한다. 통상적으로, 내인성 단백질의 활성은 예를 들면, 변경된 활성 또는 국소화를 발생시키는 내인성 단백질의 돌연변이로 인하여, 피검체에 유해하다. 추가로, 재조합 폴리펩타이드는 세포내 존재하거나 세포의 표면에 존재하거나 세포로부터 분비된 생물학적 잔기의 활성을 직접 또는 간접적으로 길항한다. 길항된 생물학적 잔기의 예는 지질(예: 콜레스테롤), 지단백질(예: 저밀도 지단백질), 핵산, 탄수화물, 단백질 독소, 예를 들면, 시가 및 과산화물 독소, 또는 소분자 독소, 예를 들면, 보툴리눔, 콜레라 및 디프테리아 독소를 포함한다. 추가로, 길항된 생물학적 분자는 바람직하지 않은 활성, 예를 들면, 세포독성 또는 세포증식 억제 활성을 나타내는 내인성 단백질일 수 있다.

[0560] 본원에 기재된 재조합 단백질은 핵 등의 특정 구획 내에 잠재적으로, 세포내 국소화를 위하여 엔지니어링할 수 있거나, 세포로부터의 분비 또는 세포의 원형질 막으로 전위를 위하여 엔지니어링된다.

[0561] 본 발명의 기타 측면은 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA를 함유하는 세포를 포유동물 피검체에 이식하는 것에 관한 것이다. 세포를 포유동물 피검체에 투여하는 것은 당업자에게 공지되어 있고, 이들로 제한되지는 않지만, 국소 이식(예: 국소 또는 피하 투여), 기관 전달 또는 전신 주사(예: 정맥내 주사 또는 흡입) 및 약제학적으로 허용되는 담체내 세포의 제형을 포함한다. 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA를 함유하는 이러한 조성물은 근육내, 경동맥, 복강내, 정맥내, 비내, 피하, 내시경, 경피 또는 막내로의 투여용으로 제형화될 수 있다. 일부 실시형태에서, 조성물은 확장 방출용으로 제형화될 수 있다.

[0562] 치료제를 투여할 수 있는 피검체는 질환, 장애 또는 유해한 상태로 고통받거나 이를 전개할 위험이 있을 수 있다. 임상 진단, 마이오마커 수준, 게놈-광범위 결합 연구(GWAS) 및 당해 기술 분야에 공지된 기타 방법을 포함할 수 있는, 이들 기준으로 피검체를 확인, 진단 및 분류하는 방법이 제공된다.

[0563] 질환 또는 장애

[0564] 가족성 고콜레스테롤혈증

[0565] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA는 가족성 고콜레스테롤혈증(FH)을 치료하는 데 사용될 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "가족성 고콜레스테롤혈증" 또는 "FH"는 혈장 중 저밀도 지단백질(LDL)-결합 콜레스테롤의 상승된 수준을 특징으로 하는 상염색체 우성 유전 장애를 말한다. 정상 환자의 LDL 콜레스테롤 수준(예를 들면, 130mg/dL)과 비교하여, 이형접합 및 동형접합 FH 환자의 수준은 각각 350-550mg/dL 내지 600mg/dL 미만으로 상승한다. FH 환자 또는 피검체의 이러한 수준의 LDL 콜레스테롤 상승은 조직내 콜레스테롤 침착을 유도하고, 젊은 나이에 심혈관 질환의 위험이 증가될 수 있다. 일부 실시형태에서, 이들 개체의 혈중 LDL의 높은 수준은 LDL 수용체를 암호화하는 유전자내 돌연변이의 결과일 수 있다. LDL은 트리글리세라이드 풍부한 매우 저밀도의 지단백질 또는 VLDL의 지질분해성 이화작용에 의한 순환 내에서 생성된다. 지질 이동 및 에스테르화 반응 후, 결코 제한하는 것은 아니지만, LDL 수용체가 순환시 LDL을 결합하고, 수용체가 발현되는 간 세포 표면으로의 LDL의 세포내이입을 촉진시킨다고 여겨진다. 이러한 수용체가 기능장애인 경우, LDL 수준은 혈류내 이의 연장된 보유까지 순환에서 상승되어 잔존하고, 죽상경화증의 전개를 촉진한다. LDLR 유전자내 불활성화 돌연변이는 일반적으로 각각 정상인의 ~50% 및 ~10-15%인 이형접합 및 동형접합 환자에 있어서 LDLR 발현을 갖는 대다수의 FH 사례의 원인이다. FH를 갖는 개체는 FH 관련 유전자 돌연변이에 대해 이형접합 또는 동형접합일 수 있다. 이형접합 FH는 일반적인 개체수에서 유병률이 ~1/500인 가장 일반적인 유전 장애중 하나인 한편; 질환의 동형접합 형태는 유병률이 ~1/1,000,000로 보다 희귀하다. 동형접합 개체의 증상은 보다 심각할 수 있다. 이들로 제한되지는 않지만, 황색종(지방 피부 성장)을 밝혀내는 신체 검사를 포함한, 당해 기술분야에 공지된 방법에 의하여 아동기 또는 청소년기 동안 진단이 가능하다. 가족력 및 유전학의 분석을 통하여 FH를 조기 진단할 수 있다(참조: Sjouke, B. et al., *Familial hypercholesterolemia*:

present and future management. *Curr Cardiol Rep*. 2011 Dec;13(6):527-36; Avis, H.J. et al., *A systematic review and meta-analysis of statin therapy in children with familial hypercholesterolemia*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007 Aug;27(8):1803-10; 이들 각각은 본원에서 전체적으로 참조로 인용된다).

- [0566] 스타틴, 니아신 및 수지와 같은, 현재의 치료제는 간내 LDLR 발현의 유도를 통하여, 혈청 콜레스테롤 수준을 직접적으로 또는 간접적으로 감소시킬 수 있다. 이러한 접근은 다수의 이형접합 FH 환자에 대해서는 효과적인 반면, 문제시될 수 있다. 이 약제를 복용한 환자의 25-30% 이상은 이들의 목적하는 LDL 콜레스테롤 목표를 달성하지 못한다. 이러한 제제는 주로 이들 환자의 간내 기능적 LDLR의 낮은 잔여 수준으로 인하여 동형접합 FH 치료에 있어서는 훨씬 덜 효과적이다. 이들 환자의 대부분은 스타틴에 비반응성이고, 심각한 질환 형태에 있어서는, 치료가 LDL 성분체집 및 간 이식으로 한정된다. 현재의 치료는 LDL-콜레스테롤 수준을 목표치로 저하시키는 데 언제나 성공적이지 않으므로, 신규한 치료가 긴급하게 필요하다.
- [0567] 하나의 실시형태에서, FH 환자는 본 발명의 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA를 포함하는 조성물을 투여받을 수 있다. 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA는 펩타이드, 단백질 또는 이의 단편, 예를 들면, 이들로 제한되지는 않지만, 저밀도 지단백질 수용체 (LDLR), 아포지단백질 B(APOB) 및 단백질 컨버타제 서브틸리신/켁신 9gud(PCSK9)을 암호화할 수 있다.
- [0568] 하나의 실시형태에서, FH는 LDLR의 펩타이드, 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA를 포함하는 본 발명의 조성물을 투여하여 치료할 수 있다. 또 다른 실시형태에서, FH는 펩타이드, 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA를 포함하는 본 발명의 조성물을 투여하여 치료할 수 있다.
- [0569] 하나의 실시형태에서, FH는 APOB의 펩타이드, 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA를 포함하는 본 발명의 조성물을 투여하여 치료될 수 있다. 또 다른 실시형태에서, FH는 펩타이드, 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA를 포함하는 본 발명의 조성물을 투여하여 치료할 수 있다. 하나의 실시형태에서, FH는 PCSK9의 펩타이드, 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA를 포함하는 본 발명의 조성물을 투여하여 치료할 수 있다. 또 다른 실시형태에서, FH는 펩타이드, 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA를 포함하는 본 발명의 조성물을 투여하여 치료할 수 있다.
- [0570] 또 다른 실시형태에서, 세포주내 또는 잠재적 관심 세포주의 수집물내 특정 폴리펩타이드, 특히 공지된 활성을 갖는 참조 단백질의 단백질 변종과 같은 관심 폴리펩타이드의 발현을 최적화하는 것이 유용할 수 있다. 하나의 실시형태에서, 복수의 표적 세포 유형을 제공하고, 폴리펩타이드를 암호화하는 변형 mRNA를 복수의 표적 세포 유형 각각과 접촉시켜, 표적 세포내 관심 폴리펩타이드의 발현을 최적화시키는 방법이 제공된다. 추가로, 배양 조건은 단백질 생성 효율을 증가시키도록 변경될 수 있다. 후속적으로, 복수의 표적 세포 유형의 관심 폴리펩타이드의 존재 및/또는 수준은 검출되거나/되거나 정량화되어, 이와 관련된 효율적인 표적 세포 및 세포 배양 조건의 선택에 의하여 관심 발현의 폴리펩타이드의 최적화가 가능하다. 이러한 방법은 관심 폴리펩타이드가 하나 이상의 획득후 변형을 함유하거나, 실질적인 3차 구조를 가져서, 종종 효율적인 단백질 생성을 복잡하게 하는 경우, 유용할 수 있다.
- [0571] 본원에 기재된 방법 및 조성물은 내인성 효능제 생물학적 반응을 감소시키거나 차단하고/하거나, 수용체를 길항시키거나 포유동물 피검체내 분자를 시그널링할 수 있는 단백질을 생성하는 데 사용될 수 있다. 예를 들면, IL-12 및 IL-23 수용체 시그널링은 류머티스 관절염, 건선, 홍반성 루푸스, 강직성 척추염 및 크론 병과 같은 다발성 경화증 및 염증성 질환과 같은 만성 자가면역 장애에서 강화될 수 있다(참조: Kikly K, Liu L, Na S, Sedgwich JD (2006) *Cur. Opin. Immunol.* 18(6): 670-5). 또 다른 실시형태에서, 핵산은 케모카인 수용체에 대한 길항제를 암호화한다. 케모카인 수용체 CXCR-4 및 CCR-5는 HIV가 숙주 세포로 진입하는 데 필요하다(참조: Arenzana-Seisdedos F et al, (1996) *Nature*. Oct 3; 383 (6599):400).
- [0572] 세포 표면에 대한 리간드 또는 수용체의 발현
- [0573] 본원에 기재된 측면의 일부 측면 및 실시형태에서, 본원에 기재된 폴리뉴클레오타이드, 1차 작제물 또는 mmRNA는 세포의 표면상 리간드 또는 리간드 수용체(예: 귀소성 장기(homing moiety))를 발현하는 데 사용될 수 있다. 세포 표면에 부착된 리간드 또는 리간드 수용체 장기는 세포가 생체내 조직 또는 제제와 목적하는 생물학적 상

호 작용을 하도록 할 수 있다. 리간드는 항체, 항체 단편, 압타머, 펩타이드, 비타민, 탄수화물, 단백질 또는 폴리펩타이드, 수용체, 예를 들면, 세포-표면 수용체, 부착 분자, 글리코단백질, 당 잔사, 치료제, 약제, 글리코사미노글리칸 또는 이들의 어떠한 배합물일 수 있다. 예를 들면, 리간드는 암세포 특이 항원을 인식하여, 세포가 종양 세포와 우선적으로 상호 작용할 수 있게 하여, 변형 세포의 종양 특이적 국소화를 허용하는 항체일 수 있다. 바람직한 리간드는 치료되는 조직의 외부 면상 표적 세포와 상호작용할 수 있으므로, 리간드는 세포 조성물이 치료되는 조직에 축적되는 능력을 부여할 수 있다. 다른 조직에 대한 제한된 교차 반응성을 갖는 리간드가 일반적으로 바람직하다.

[0574] 일부 경우, 리간드는 세포가 특정 조직을 표적으로 하도록 하거나 특정 리간드와 상호작용하도록 하는 귀소성 잔기로서 작용할 수 있다. 이러한 귀소성 잔기는 이들로 제한되지는 않지만, 제한 없이 Fv 단편, 단쇄 Fv (scFv) 단편, Fab' 단편, F(ab')₂ 단편, 단일 도메인 항체, 케말화 항체 및 항체 단편, 인간화 항체 및 항체 단편, 및 상기의 다가 버전을 포함하는, 특정한 결합 쌍, 항체, 모노클로날 항체 또는 이들의 유도체 또는 유사체; 제한 없이 단일특이성 또는 이중특이성 항체, 예를 들면, 디설파이드 안정화 Fv 단편, ScFv 일련 ((SCFV)₂ 단편), 이항체, 삼항체 또는 사항체(이는 통상적으로 공유 결합되거나 안정화된(즉, 류신 지퍼 또는 나선 안정화) scFv 단편임)를 포함하는 다가 결합 시약의 어떠한 구성원이라도 포함할 수 있고; 기타 귀소성 잔기는 예를 들면, 압타머, 수용체 및 융합 단백질을 포함한다.

[0575] 일부 실시형태에서, 귀소성 잔기는 표면 결합 상체일 수 있으며, 이는 세포 표적 특이성을 조정할 수 있다. 이는 매우 특이성인 항체가 목적하는 표적 부위에 대한 관심 에피토프에 대하여 상승될 수 있으므로, 특히 유용하다. 하나의 실시형태에서, 다중 항체는 세포의 표면에 발현되고, 각각의 항체는 목적하는 표적에 대해 상이한 특이성을 가질 수 있다. 이러한 접근은 귀소성 상호 작용의 결합성 및 특이성을 증가시킬 수 있다.

[0576] 당업자는 세포의 목적하는 국소화 또는 기능을 기준으로 어떠한 귀소성 잔기라도 선택할 수 있으며, 예를 들면, 에스트로겐 수용체 리간드, 예를 들면, 타목시펜은 세포 표면상 에스트로겐 수용체 수가 증가하는 에스트로겐 의존성 유방암 세포에 대한 표적 세포일 수 있다. 리간드/수용체 상호 작용의 기타 비제한적 예는 CCR1(예: 다발성 경화증 및/또는 류머티스 관절염에서 염증이 생긴 관절 조직 또는 뇌의 치료용), CCR7, CCR8(예: 림프절 조직에 대한 표적화), CCR6, CCR9, CCR10(예: 장 조직에 대한 표적화), CCR4, CCR10(예: 피부에 대한 표적화), CXCR4(예: 일반 강화 이행용), HCELL(예: 염증 및 염증성 장애의 치료용, 골수), α4β7(예: 장 점막 표적화), VLA-4/VCAM-1(예: 내피에 대한 표적화)을 포함한다. 일반적으로, 표적화에 수반된 어떠한 수용체라도(예: 암 전이)본원에 기재된 방법 및 조성물에 사용하기 위하여 이용될 수 있다.

[0577] VI. 키트 및 장치

[0578] 본 발명은 본 발명의 방법을 편리하게 및/또는 효율적으로 수행하기 위한 다양한 키트를 제공한다. 전형적으로 키트는 사용자가 피험자(들)의 다중 치료를 수행하고/하거나 다수의 실험을 수행하고, 세포 및/또는 세포의 집단과 적어도 한번 접촉할 수 있도록 충분한 양 및/또는 개수의 성분을 포함할 것이다.

[0579] 하나의 실시형태에서, 본 발명은 본 발명의 분자(폴리뉴클레오타이드, 주요 작제물 또는 mmRNA)를 포함하는 키트를 제공한다. 하나의 실시형태에서, 키트는 하나 이상의 기능성 항체 또는 이의 기능성 단편을 포함한다.

[0580] 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 주요 작제물 또는 mmRNA와 함께 유용한 키트 및 장치는 2012년 12월 14일자로 출원되어 동시-계류중인 미국 가특허원 제61/737,130호에 기재된 것들을 포함하며, 이의 내용은 전문이 본원에 참고로 인용된다.

[0581] VII. 정의

[0582] 본 명세서에서의 다양한 위치에서, 본 발명의 개시내용의 화합물의 치환체가 그룹들 또는 범위들로 기재되어 있다. 본 발명의 개시내용은 이러한 그룹 및 범위의 구성원들의 각각 및 모든 개별적 조합을 포함하는 것으로 구체적으로 의도된다. 예를 들면, 용어 "C₁₋₆ 알킬"은 메틸, 에틸, C₃ 알킬, C₄ 알킬, C₅ 알킬, 및 C₆ 알킬을 개별적으로 나타내는 것으로 구체적으로 의도된다.

[0583] 약: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "약"은 언급된 값의 +/- 10%를 의미한다.

[0584] 병용하여 투여된: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "병용하여 투여된" 또는 "병용 투여"는, 2개 이상의 제제

들이 피험자에게 동시에 또는 환자에서 각각의 제제의 효과가 중첩될 수 있도록 하는 간격내에서 투여됨을 의미한다. 몇몇 실시형태에서, 이들은 서로 약 60, 30, 15, 10, 5, 또는 1분내에 투여된다. 몇몇 실시형태에서, 제제들의 투여는, 병용(예컨대, 상승작용) 효과가 달성되도록 함께 충분히 근접하게 간격을 둔다.

[0585] 동물: 본원에서 사용되는 바와 같이, "동물"이란 용어는, 동물계의 어떠한 구성원을 나타낸다. 몇몇 실시형태에서, "동물"이란 어떠한 발달 단계에 있는 사람을 나타낸다. 몇몇 실시형태에서, "동물"이란 어떠한 발달 단계에 있는 비-사람 동물을 나타낸다. 특정 실시형태에서, 비-사람 동물은 포유류(예컨대, 설치류, 마우스, 랫트, 토끼, 원숭이, 개, 고양이, 양, 소, 영장류 또는 돼지)이다. 몇몇 실시형태에서, 동물은 포유류, 조류, 파충류, 양서류, 어류 및 벌레를 포함하지만, 이들로 제한되는 것은 아니다. 몇몇 실시형태에서, 동물은 형질전환 동물, 유전자-조작된 동물 또는 클론이다.

[0586] 대략: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "대략" 또는 "약"은, 관심 대상의 하나 이상의 값에 적용되는 바와 같이, 명시된 참조 값과 유사한 값을 나타낸다. 특정 실시형태에서, 용어 "대략" 또는 "약"은, 달리 명시되지 않거나 내용으로부터 달리 자명하지 않는 한, 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 또는 그 미만 내에 속하는 값의 범위(이러한 수가 가능한 값의 100%를 초과하는 경우는 제외함)를 나타낸다.

[0587] 와 연관된(Associated with): 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "과 관련된", "접합된", "연결된", "부착된" 및 "테더링된"은, 2개 이상의 잔기와 관련하여 사용되는 경우, 당해 잔기들이 직접적으로 또는 연결체로서 작용하는 하나 이상의 추가의 잔기들을 통해 물리적으로 연합되거나 서로 연결되어, 당해 잔기들이 당해 구조가 사용되는 조건, 예를 들면, 생리학적 조건하에서 물리적으로 연합되도록 하기에 충분히 안정한 구조를 형성함을 의미한다. "연합"은 엄격히 직접적인 공유 화학 결합을 통해 이루어질 필요는 없다. 이것은 또한, 이온 결합 또는 수소 결합 또는 하이브리드화 기반 연결성이 "연합된" 실체가 생리학적으로 연합되도록 하기에 충분히 안정함을 시사할 수 있다.

[0588] 이작용성: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "이작용성"은 적어도 2개의 기능을 유지할 수 있거나 유지하는 임의의 물질, 분자 또는 잔기를 나타낸다. 이 기능은 동일한 성과 또는 상이한 성과를 발휘할 수 있다. 기능을 발생하는 구조는 동일하거나 상이할 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 이작용성 변형 RNA는 세포독성 펩타이드를 암호화(제1 기능)할 수 있는 반면 암호화 RNA를 포함하는 뉴클레오사이드는 본래 또는 그 자체로 세포독성이다(제2 기능). 이러한 예에서, 이작용성 변형 RNA의 암세포로의 전달은 암을 개선하거나 치료하는 펩타이드 또는 단백질 분자를 생산할 뿐만 아니라 변형 RNA의 번역 대신에 분해를 일으켜야만 하는 세포로 뉴클레오사이드의 세포독성 적재량을 전달한다.

[0589] 생체적합성: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "생체적합성"은 면역계에 의해 손상, 독성 또는 거부의 위험을 거의 내지 전혀 야기하지 않으면서 살아있는 세포, 조직, 장기 또는 시스템과 상용성임을 의미한다.

[0590] 생분해성: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "생분해성"은 살아있는 것들의 작용에 의해 무해한 생성물로 분해될 수 있음을 의미한다.

[0591] 생물학적으로 활성인: 본원에서 사용되는 바와 같이, 어구 "생물학적으로 활성인"은 생물학적 시스템 및/또는 유기체에서 활성을 갖는 임의의 물질의 특징을 나타낸다. 예를 들면, 유기체에 투여되는 경우, 해당 유기체에 대해 생물학적 효과를 갖는 물질이 생물학적으로 활성인 것으로 간주된다. 특정 실시형태에서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 주요 작제물 또는 mmRNA는, 폴리뉴클레오타이드, 주요 작제물 또는 mmRNA의 일부라도 생물학적으로 활성이거나 생물학적으로 관련된 것으로 고려되는 활성을 모방하는 경우, 생물학적으로 활성인 것으로 간주될 수 있다.

[0592] 암 줄기세포: 본원에서 사용되는 바와 같이, "암 줄기세포"는 자기-재생 및/또는 비정상적인 증식 및 분화를 겪어 종양을 형성할 수 있는 세포이다.

[0593] 화학 용어: 본원에 달리 정의되지 않는 화학 용어들은 2012년 12월 14일자로 출원되어 동시-계류중인 미국 가특허원 제61/737,130호에 기재된 화학 용어 정의에 따를 것이며, 상기 출원의 내용은 전문이 본원에 참고로 인용된다.

[0594] 용어 "부분입체이성체"는, 본원에서 사용되는 바와 같이, 서로의 거울상은 아니지만 서로에 대해 비대칭인 입체이성체를 의미한다.

[0595] 용어 제제의 "유효량"은, 본원에서 사용되는 바와 같이, 유익하거나 목적하는 결과, 예를 들면, 임상 결과를 받

휘하기에 충분한 양이며, 이와 같이, "유효량"은 이것이 적용되는 맥락에 따라 좌우된다. 예를 들면, 암을 치료하는 제제를 투여한다는 맥락에서, 제제의 유효량은, 예를 들면, 제제를 투여하지 않고서 수득된 반응과 비교하여 암의, 본원에 정의된 바와 같은, 치료를 달성하기에 충분한 양이다.

[0596] 용어 "에난티오머"는, 본원에서 사용되는 바와 같이, 적어도 80%(즉, 적어도 90%의 하나의 에난티오머 및 최대 10%의 다른 하나의 에난티오머), 바람직하게는 적어도 90%, 보다 바람직하게는 적어도 98%의 광학 순도 또는 에난티오머 과잉율(당업계의 표준 방법으로 측정되는 바와 같음)을 갖는, 본 발명의 화합물의 각각의 개별적인 광학 활성 형태를 의미한다.

[0597] 용어 "이성체"는, 본원에서 사용되는 바와 같이, 본 발명의 화합물의 임의의 토토머, 입체이성체, 에난티오머, 또는 부분입체이성체를 의미한다. 본 발명의 화합물은 하나 이상의 키랄 중심 및/또는 이중 결합을 가질 수 있으며, 따라서, 이중-결합 이성체(즉, 기하 E/Z 이성체) 또는 부분입체이성체(예를 들면, 에난티오머(즉, (+) 또는 (-)) 또는 시스/트랜스 이성체)와 같은 입체이성체로서 존재하는 것으로 인지된다. 본 발명에 따르면, 본원에 도시된 화학 구조, 및 이에 따라 본 발명의 화합물은 상응하는 입체이성체의 전부, 즉, 입체이성체적으로 순수한 형태(예를 들면, 기하이성체적으로 순수한, 에난티오머적으로 순수한, 또는 부분입체이성체적으로 순수한) 및 에난티오머성 및 입체이성체성 혼합물, 예를 들면, 라세미체 둘 다를 포함한다. 본 발명의 화합물의 에난티오머성 및 입체이성체성 혼합물은 전형적으로 널리 공지된 방법, 예를 들면, 키랄상 가스 크로마토그래피, 키랄상 고성능 액체 크로마토그래피, 키랄 염 복합체로서의 화합물의 결정화, 또는 키랄 용매에서의 화합물의 결정화에 의해 이들 성분 에난티오머 또는 입체이성체로 분해될 수 있다. 에난티오머 및 입체이성체는 또한 널리 공지된 비대칭 합성방법에 의해 입체이성체적으로 또는 에난티오머적으로 순수한 중간체, 시약, 및 촉매로부터 수득될 수 있다.

[0598] 용어 "입체이성체"는, 본원에서 사용되는 바와 같이, 화합물(예를 들면, 본원에 기재된 화학식의 화합물)이 가질 수 있는 모든 가능한 이상한 이성체 형태 뿐만 아니라 배좌 형태, 특히 모든 가능한 입체화학 및 배좌 이성체 형태, 기본 분자 구조의 모든 부분입체이성체, 에난티오머 및/또는 배좌이성체를 나타낸다. 본 발명의 몇몇 화합물은 상이한 토토머 형태로 존재할 수 있으며, 후자의 모두는 본 발명의 범위내에 포함된다.

[0599] 화합물: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "화합물"은 도시된 구조의 모든 입체이성체, 기하이성체, 토토머, 및 동위원소를 포함하는 것으로 한다.

[0600] 본원에 기재된 화합물은 비대칭(예를 들면, 하나 이상의 입체중심을 갖는)일 수 있다. 에난티오머 및 부분입체이성체와 같은 모든 입체이성체가, 달리 나타내지 않는 한, 의도된다. 비대칭적으로 치환된 탄소원자를 함유하는 본 개시내용의 화합물은 광학 활성 형태 또는 라세미 형태로 분리될 수 있다. 광학 활성 출발 물질로부터 광학 활성 형태를 제조하는 방법은, 라세미 혼합물의 분해에 의해 또는 입체선택적 합성에 의해서와 같이 당업계에 공지되어 있다. 올레핀의 다수의 기하이성체, C=N 이중 결합 등이 또한 본원에 기재된 화합물에 존재할 수 있으며, 이러한 모든 안정한 이성체가 본 개시내용에서 고려된다. 본 개시내용의 화합물의 시스 및 트랜스 기하이성체는 기재되어 있으며, 이성체들의 혼합물로서 또는 분리된 이성체 형태로서 분리될 수 있다.

[0601] 본 개시내용의 화합물은 또한 토토머 형태를 포함한다. 토토머 형태는 단일 결합과 인접 이중 결합의 스와핑(swapping) 및 단백질의 동시 이동으로부터 야기된다. 토토머 형태는 동일한 실험식과 총 전하를 갖는 이성체성 양성자화 상태인 양성자이전 토토머(prototropic tautomer)를 포함한다. 양성자이전 토토머의 예는 케톤-에놀 쌍, 아미드-이미드산 쌍, 락탐-락탐 쌍, 아미드-이미드산 쌍, 엔아민-이민 쌍, 및 양성자가 헤테로사이클릭 시스템의 둘 이상의 위치를 차지할 수 있는 고리 모양 형태, 예를 들면, 1H- 및 3H-이미다졸, 1H-, 2H- 및 4H-1,2,4-트리아졸, 1H- 및 2H-이소인돌, 및 1H- 및 2H-피라졸을 포함한다. 토토머 형태는 평형 상태일 수 있거나 적절한 치환에 의해 하나의 형태로 입체적으로 록킹된다.

[0602] 본 개시내용의 화합물은 또한 중간체 또는 최종 화합물에서 발생하는 원자들의 모든 동위원소들을 포함한다. "동위원소"는 동일한 원자수를 갖지만 핵의 상이한 갯수의 중성자로부터 초래되는 상이한 질량수를 갖는 원자를 나타낸다. 예를 들면, 수소의 동위원소는 삼중수소 및 중수소를 포함한다.

[0603] 본 개시내용의 화합물 및 염은 용매 또는 물 분자와 함께 제조되어 통상의 방법에 의해 용매화물 및 수화물을 형성할 수 있다.

[0604] 위임된(committed): 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "위임된"은, 세포를 언급하는 경우, 세포가 정상적인 상황하에서 분화 경로에 충분히 멀리 있을 때, 상이한 세포 유형으로 대신에 특정 세포 유형 또는 세포 유형의 서브세트로 분화를 계속하거나 덜 분화된 세포 유형으로 복귀할 것임을 의미한다.

- [0605] 보존된: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "보존된"은 비교되는 둘 이상의 서열들의 동일한 위치에서 변경되지 않는 것인 폴리뉴클레오타이드 서열 또는 폴리펩타이드 서열의 뉴클레오타이드 또는 아미노산 잔기를 각각 나타낸다. 비교적 보존된 뉴클레오타이드 또는 아미노산은 서열내 다른 곳에 나타는 뉴클레오타이드 또는 아미노산보다 더 관련된 서열 중에서 보존된 것들이다.
- [0606] 몇몇 실시형태에서, 둘 이상의 서열은, 이들이 서로 100% 동일하다면, "완전히 보존"되었다고 한다. 몇몇 실시형태에서, 둘 이상의 서열은, 이들이 서로 적어도 70% 동일하거나, 적어도 80% 동일하거나, 적어도 90% 동일하거나, 적어도 95% 동일하다면, "고도로 보존"되었다고 한다. 몇몇 실시형태에서, 둘 이상의 서열은, 이들이 서로 약 70% 동일하거나, 약 80% 동일하거나, 약 90% 동일하거나, 약 95%, 약 98%, 또는 약 99% 동일하다면, "고도로 보존"되었다고 한다. 몇몇 실시형태에서, 둘 이상의 서열이, 이들이 서로 적어도 30% 동일하거나, 적어도 40% 동일하거나, 적어도 50% 동일하거나, 적어도 60% 동일하거나, 적어도 70% 동일하거나, 적어도 80% 동일하거나, 적어도 90% 동일하거나, 적어도 95% 동일하다면, "보존"되었다고 한다. 몇몇 실시형태에서, 둘 이상이 서열은, 이들이 약 30% 동일하거나, 약 40% 동일하거나, 약 50% 동일하거나, 약 60% 동일하거나, 약 70% 동일하거나, 약 80% 동일하거나, 약 90% 동일하거나, 약 95% 동일하거나, 약 98% 동일하거나, 약 99% 동일하다면, "보존"되었다고 한다. 서열의 보존은 올리고뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드의 전체 길이에 적용될 수 있거나 이의 일부, 영역 또는 특성에 적용될 수 있다.
- [0607] 제어 방출: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "제어 방출"은 치료적 성과를 얻기 위한 특정 방출 패턴에 따르는 약제학적 조성물 또는 화합물 방출 프로파일을 나타낸다.
- [0608] 사이클릭 또는 폐환된: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "사이클릭"은 연속 루프의 존재를 나타낸다. 사이클릭 분자는 원형일 필요는 없으며, 단지 결합하여 소단위들의 깨지지 않은 쇄를 형성하면 된다. 본 발명의 조각된 RNA 또는 mRNA와 같은 사이클릭 분자는 단일 단위 또는 다량체일 수 있거나 복합체 또는 보다 높은 차수의 구조의 하나 이상의 성분을 포함한다.
- [0609] 세포정지성: 본원에서 사용되는 바와 같이, "세포정지성"은 세포(예를 들면, 포유류 세포(예를 들면, 사람 세포)), 세균, 바이러스, 진균, 원생동물, 기생충, 프리온(prion), 또는 이들의 조합의 성장, 분할 또는 증식을 억제하거나, 감소시키거나, 저해함을 나타낸다.
- [0610] 세포독성: 본원에서 사용되는 바와 같이, "세포독성"은 세포(예를 들면, 포유류 세포(예를 들면, 사람 세포)), 세균, 바이러스, 진균, 원생동물, 기생충, 프리온(prion), 또는 이들의 조합에 대해 사멸, 또는 손상, 독성 또는 치명적인 작용을 유발함을 나타낸다.
- [0611] 전달: 본원에서 사용되는 바와 같이, "전달"은 화합물, 물질, 실체, 잔기, 적재물 또는 적재량을 전달하는 작용 또는 방식을 나타낸다.
- [0612] 전달제: 본원에서 사용되는 바와 같이, "전달제"는 표적화된 세포로의 폴리뉴클레오타이드, 주요 작제물 또는 mmRNA의 생체내 전달을 적어도 부분적으로 촉진하는 임의의 물질을 나타낸다.
- [0613] 탈안정화: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "탈안정화", "탈안정화하다" 또는 "탈안정화 영역"은 동일할 영역 또는 분자의 출발, 야생형 또는 천연 형태보다 덜 안정한 영역 또는 분자를 의미한다.
- [0614] 검출 가능한 표지: 본원에서 사용되는 바와 같이, "검출 가능한 표지"는 방사선촬영, 형광성, 화학발광성, 효소 활성, 흡광도 등을 포함한 당업계에 공지된 방법들에 의해 용이하게 검출되는 다른 실체와 함께 부착되거나, 혼입되거나 연합되는 하나 이상의 마커, 신호 또는 잔기를 나타낸다. 검출 가능한 표지는 방사선동위원소, 형광단, 발색단, 효소, 염료, 금속 이온, 리간드, 예를 들면, 바이오틴, 아비딘, 스트렙타비딘 및 합텐, 양자점 등을 포함한다. 검출 가능한 표지는 본원에 개시된 펩타이드 또는 단백질 내의 임의의 위치에 위치될 수 있다. 이들은 아미노산, 펩타이드 또는 단백질내에 존재할 수 있거나, N- 또는 C-말단에 위치할 수 있다.
- [0615] 발달 가능성(Developmental Potential): 본원에서 사용되는 바와 같이, "발달 가능성" 또는 "발달 효능"은 분화 시 세포에 의해 달성될 수 있는 모든 발달 세포 수명 또는 세포 유형의 전부를 나타낸다.
- [0616] 발달 가능성 변화 인자: 본원에서 사용되는 바와 같이, "발달 가능성 변화 인자"는 세포의 발달 가능성을 변화시킬 수 있는 단백질 또는 RNA를 나타낸다.
- [0617] 소화하다: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "소화하다"는 보다 작은 조각들 또는 성분들로 파괴되는 것을 의미한다. 폴리펩타이드 또는 단백질을 언급하는 경우, 소화는 펩타이드의 생산을 초래한다.

- [0618] 분화된 세포: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "분화된 세포"는, 이의 천연 형태에서는, 전분화성(pluripotent)이 아닌 임의의 체세포를 나타낸다. 분화된 세포는 또한 부분적으로 분화된 세포를 포함한다.
- [0619] 분화: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "분화 인자"는 세포가 목적하는 세포-유형으로 분화되도록 유도할 수 있는 단백질, RNA 또는 소분자와 같은 발달 가능성 변화 인자를 나타낸다.
- [0620] 분화하다: 본원에서 사용되는 바와 같이, "분화하다"는 위임되지 않거나 덜 위임된 세포가 위임 세포의 특징을 획득하는 공정을 나타낸다.
- [0621] 원위: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "원위"는 중심으로부터 멀리 위치하거나 관심 지점 또는 영역으로부터 멀리 위치함을 의미한다.
- [0622] 용량 분할 인자(Dose splitting factor(DSF))-비는 총 1일 용량 또는 단일 단위 용량의 PUD로 나뉜 용량 분할 치료의 PUD이다. 이 값은 투약 섭생군의 비교로부터 유도된다.
- [0623] 배아 줄기 세포: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "배아 줄기 세포"는 배아 배반포의 내세포 집단의 자연 발생 전분화성 줄기 세포를 나타낸다.
- [0624] 캡슐화하다: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "캡슐화하다"는 동봉하다(enclose), 둘러싸다(surround) 또는 감싸다(encas)를 의미한다.
- [0625] 암호화된 단백질 절단 신호: 본원에서 사용되는 바와 같이, "암호화된 단백질 절단 신호"는 단백질 절단 신호를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 나타낸다.
- [0626] 조작된: 본원에서 사용되는 바와 같이, 본 발명의 실시형태는 출발점, 야생형 또는 천연 분자와는 다른, 구조적이든 또는 화학적이든, 특징 또는 특성을 갖도록 설계되는 경우 "조작"된다.
- [0627] 엑소좀: 본원에서 사용되는 바와 같이, "엑소좀"은 포유류의 세포들에 의해 분비된 소포 또는 RNA 분해에 관련된 복합체이다.
- [0628] 발현: 본원에서 사용되는 바와 같이, 핵산 서열의 "발현"은 다음의 현상들 중의 하나 이상을 나타낸다: (1) DNA 서열로부터의 RNA 주형의 생산(예를 들면, 전사에 의해); (2) RNA 전사체의 프로세싱(예를 들면, 스플라이싱(splicing), 편집(editing), 5' 캡 형성 및/또는 3' 말단 프로세싱에 의해); (3) RNA에서 폴리펩타이드 또는 단백질로의 번역; 및 (4) 폴리펩타이드 또는 단백질의 번역후 변형.
- [0629] 특성: 본원에서 사용되는 바와 같이, "특성"은 특징, 특성(property) 또는 독특한 요소를 나타낸다.
- [0630] 제형: 본원에서 사용되는 바와 같이, "제형"은 폴리뉴클레오타이드, 주요 작제물 또는 mmRNA 및 전달체를 포함한다.
- [0631] 단편: "단편"은, 본원에서 사용되는 바와 같이, 일부를 나타낸다. 예를 들면, 단백질의 단편은 배양된 세포들로부터 단리된 전장 단백질을 소화시킴으로써 수득되는 폴리펩타이드를 포함할 수 있다.
- [0632] 기능적: 본원에서 사용되는 바와 같이, "기능적" 생물학적 분자는 특징화된 특성 및/또는 활성을 나타내는 형태의 생물학적 분자이다.
- [0633] 상동성: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "상동성"은 중합체성 분자들, 예를 들면, 핵산 분자들(예를 들면, DNA 분자들 및/또는 RNA 분자들) 간의 및/또는 폴리펩타이드 분자들 간의 전체적인 관련성을 나타낸다. 몇몇 실시형태에서, 중합체성 분자는, 서열이 적어도 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99% 동일하거나 유사하다면 서로 "상동성"인 것으로 간주된다. 용어 "상동성"은 반드시 적어도 두 개의 서열(폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드 서열) 간의 비교를 나타낸다. 발명에 따르면, 두 개의 폴리뉴클레오타이드 서열은, 이들이 암호화하는 폴리펩타이드가 적어도 약 20개의 아미노산의 적어도 하나의 가지에 대해 적어도 약 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 심지어 99%인 경우 상동성인 것으로 간주된다. 몇몇 실시형태에서, 상동성 폴리뉴클레오타이드 서열은 4-5개의 독특하게 특정된 아미노산의 가치를 암호화하는 능력에 의해 특징지워진다. 길이가 60개 미만의 뉴클레오타이드인 폴리뉴클레오타이드 서열의 경우, 상동성은 적어도 4 내지 5개의 독특하게 특정된 아미노산의 가치를 암호화하는 능력에 의해 결정된다. 본 발명에 따르면, 두 개의 단백질 서열은, 단백질이 적어도 약 20개의 아미노산의 적어도 하나의 가지에 대해 적어도 약 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90% 동일한 경우 상동성인 것으로 간주된다.
- [0634] 동일성: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "동일성"은 중합체 분자들 간, 예를 들면, 올리고뉴클레오타이드

분자들(예를 들면, DNA 분자들 및/또는 RNA 분자들) 간 및/또는 폴리펩타이드 분자들 간의 전체 관련성을 나타낸다. 두 개의 폴리뉴클레오타이드 서열의 동일성 퍼센트의 계산은, 예를 들면, 최적의 비교 목적을 위해 두 개의 서열을 정렬함으로써 수행될 수 있다(예를 들면, 갭(gap)이 최적의 정렬을 위해 제1 및 제2 핵산 서열 중의 하나 또는 둘 다로 도입될 수 있고, 동일하지 않은 서열은 비교 목적을 위해 무시될 수 있다). 특정 실시형태에서, 비교 목적을 위해 정렬된 서열의 길이는 참조 서열의 길이의 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 100%이다. 대응하는 뉴클레오타이드 위치에서의 뉴클레오타이드들을 그후 비교한다. 제1 서열내 위치가 제2 서열내 대응하는 위치와 동일한 뉴클레오타이드에 의해 점유되는 경우, 분자는 그 위치에서 동일하다. 두 개의 서열 사이의 동일성 퍼센트는 두 개의 서열의 최적의 정렬을 위해 도입될 필요가 있는 갭의 길이, 및 각각의 갭의 수를 고려하여, 서열에 의해 공유된 동일한 위치의 개수의 함수이다. 서열의 비교 및 두 개의 서열 사이의 동일성 퍼센트의 결정은 수학적 알고리즘을 사용하여 달성될 수 있다. 예를 들면, 두 개의 뉴클레오타이드 서열 사이의 동일성 퍼센트는 문헌[참조: 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; and Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; 이들 각각은 본원에 참고로 인용된다]에 기재된 바와 같은 방법을 사용하여 결정될 수 있다. 예를 들면, 2개의 뉴클레오타이드 서열 간의 동일성 퍼센트는, PAM120 중량 잔기 표, 12의 갭 길이 패널티 및 4의 갭 패널티를 사용하여 ALIGN 프로그램(버전 2.0) 내로 편입된, 메이어스(Meyers) 및 밀러(Miller)의 알고리즘(CABIOS, 1989, 4:11-17)을 사용하여 결정될 수 있다. 두 개의 뉴클레오타이드 서열 간의 동일성 퍼센트는, 대안적으로, NWSgapdna.CMP 매트릭스를 사용하는 GCG 소프트웨어 패키지 내의 GAP 프로그램을 사용하여 결정될 수 있다. 서열들 간의 동일성 퍼센트를 결정하는데 통상적으로 사용되는 방법은 문헌[참조: Carillo, H., and Lipman, D., SIAM J Applied Math., 48:1073 (1988); 본원에 참고로 인용됨]에 개시된 것들을 포함하지만, 이들로 제한되는 것은 아니다. 동일성을 결정하기 위한 기술은 공개적으로 이용가능한 컴퓨터 프로그램으로 성문화되어 있다. 두 개의 서열 간의 상동성을 결정하기 위한 예시적인 컴퓨터 소프트웨어는 GCG 프로그램 패키지, Devereux, J., et al., *Nucleic Acids Research*, 12(1), 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, 및 FASTA Altschul, S. F. et al., *J. Molec. Biol.*, 215, 403 (1990))를 포함하지만, 이들로 제한되는 것은 아니다.

- [0635] 유전자의 발현을 억제하다: 본원에서 사용되는 바와 같이, 어구 "유전자의 발현을 억제하다"는 유전자의 발현 생성물의 양의 감소를 야기함을 의미한다. 발현 생성물은 유전자로부터 전사된 RNA(예를 들면, mRNA) 또는 유전자로부터 전사된 mRNA로부터 번역된 폴리펩타이드일 수 있다. 전형적으로 mRNA 수준의 감소는 이로부터 번역된 폴리펩타이드 수준의 감소를 초래한다. 발현 수준은 mRNA 또는 단백질을 측정하기 위한 표준 기술을 사용하여 결정할 수 있다.
- [0636] 시험관내: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "시험관내"는 유기체(예를 들면, 동물, 식물 또는 미생물) 내라기 보다는 인공 환경, 예를 들면, 시험관 또는 반응 용기에서, 세포 배양액에서, 페트리 접시(petri dish) 등에서 발생하는 사건을 나타낸다.
- [0637] 생체내: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "생체내"는 유기체(예를 들면, 동물, 식물 또는 미생물 또는 이의 세포 또는 조직) 내에서 발생하는 사건을 나타낸다.
- [0638] 단리된: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "단리된"은 이것이 연관되었던(천연이든 혹은 실험적 세팅이든지) 적어도 일부의 성분으로부터 분리된 물질 또는 실체를 나타낸다. 단리된 물질들은 이들이 연관된 물질을 기준으로 다양한 수준의 순도를 지닐 수 있다. 단리된 물질 및/또는 실체는 이들이 초기에 연관된 다른 성분의 적어도 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90%, 또는 그 이상으로부터 분리될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 단리된 제제는 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99%, 또는 약 99% 이상 순수하다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 물질은, 다른 성분들을 실질적으로 함유하지 않는다면, "순수"하다.
- [0639] 실질적으로 단리된: "실질적으로 단리된"이란 화합물은 이것이 형성되었거나 검출된 환경으로부터 실질적으로 분리됨을 의미한다. 부분 분리는, 예를 들면, 본 개시내용의 화합물 속에 풍부한 조성물을 포함할 수 있다. 실질적인 분리는 본 개시내용의 화합물 또는 이의 염을 적어도 약 50중량%, 적어도 약 60중량%, 적어도 약 70중량%, 적어도 약 80중량%, 적어도 약 90중량%, 적어도 약 95중량%, 적어도 약 97중량% 또는 적어도 약 99중량%

함유하는 조성물을 포함할 수 있다. 화합물 및 이의 염을 단리시키는 방법은 당업계에서 통상적이다.

- [0640] 링커: 본원에서 사용되는 바와 같이, 링커는 원자들의 그룹, 예를 들면, 10-1,000개의 원자를 나타내며, 탄소, 아미노, 알킬아미노, 산소, 황, 설펍사이드, 설포닐, 카보닐 및 이민 등과 같은 원자 또는 그룹으로 구성될 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 링커는 제1 말단에서 핵염기 혹은 당 잔기 상의 변형된 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드에, 그리고 제2 말단에서 페이로드, 예를 들면, 검출 가능한 제제 또는 치료제에 부착될 수 있다. 링커는 핵산 서열 내로의 혼입을 방해하지 않기에 충분한 길이일 수 있다. 링커는 본원에 기재된 바와 같이 mmRNA 다량체(예를 들면, 둘 이상의 폴리뉴클레오타이드, 주요 작제물, 또는 mmRNA 분자의 결합을 통해) 또는 mmRNA 접합체를 형성하기 위해서 뿐만 아니라 페이로드를 투여하기 위해서와 같이 유용한 목적을 위해 사용될 수 있다. 링커 내에 혼입될 수 있는 화학 그룹의 예는 알킬, 알케닐, 알키닐, 아미도, 아미노, 에테르, 티오에테르, 에스테르, 알킬렌, 헤테로알킬렌, 아릴 또는 헤테로사이클릴을 포함하지만, 이들로 제한되는 것은 아니며, 이들 각각은 본원에 기재된 바와 같이 임의로 치환될 수 있다. 링커의 예는 불포화 알칸, 폴리에틸렌 글리콜(예를 들면, 에틸렌 또는 프로필렌 글리콜 단량체성 단위, 예를 들면, 디에틸렌 글리콜, 디프로필렌 글리콜, 트리에틸렌 글리콜, 트리프로필렌 글리콜, 테트라에틸렌 글리콜 또는 테트라에틸렌 글리콜), 및 텍스트란 중합체를 포함하지만, 이들로 제한되는 것은 아니다. 또 다른 예는 환원제 또는 열분해를 사용하여 절단될 수 있는, 링커 내의 절단 가능한 잔기, 예를 들면, 디설파이드 결합(-S-S-) 또는 아조 결합(-N=N-)을 포함하지만, 이들로 제한되는 것은 아니다. 선택적으로 절단 가능한 결합의 비제한적인 예는, 예를 들면, 트리스(2-카복시에틸)포스핀(TCEP) 또는 기타의 환원제 및/또는 열분해의 사용에 의해 절단될 수 있는 아미도 결합 뿐만 아니라, 예를 들면, 산성 또는 염기성 가수분해에 의해 절단될 수 있는 에스테르 결합을 포함한다.
- [0641] MicroRNA(miRNA) 결합 부위: 본원에서 사용되는 바와 같이, microRNA(miRNA) 결합 부위는 miRNA의 적어도 "시드" 영역이 결합하는 핵산 전사체의 뉴클레오타이드 위치 또는 영역을 나타낸다.
- [0642] 변형된: 본원에서 사용되는 바와 같이 "변형된"은 본 발명의 분자의 변화된 상태 또는 구조를 나타낸다. 분자는 화학적으로, 구조적으로, 및 기능적으로를 포함하는 다수의 방식으로 변형될 수 있다. 하나의 실시형태에서, 본 발명의 mRNA 분자는, 예를 들면, 이것이 천연 리보뉴클레오타이드 A, U, G, 및 C와 관련되기 때문에, 비-천연의 뉴클레오사이드 및/또는 뉴클레오타이드의 도입에 의해 변형된다. 캡 구조와 같은 비전형적인 뉴클레오타이드는 "성문화"되지 않은 것으로 간주되지만, 이들은 A, C, G, U 리보뉴클레오타이드의 화학 구조와는 상이하다.
- [0643] 점액: 본원에서 사용되는 바와 같이, "점액"은 점성이고 점액 당단백질을 포함하는 천연 물질을 나타낸다.
- [0644] 다분화성(multipotent): 본원에서 사용되는 바와 같이, "다분화성" 또는 "부분 분화된 세포"는, 세포를 언급하는 경우, 하나 이상의 배엽의 세포로 분화될 수 있지만 모든 세 개의 배엽으로 분화될 수는 없는 발달 가능성을 갖는 세포를 나타낸다.
- [0645] 자연 발생적: 본원에서 사용되는 바와 같이, "자연 발생적"은 인공적인 도움 없이 자연에 존재함을 의미한다.
- [0646] 비-사람 척추동물: 본원에서 사용되는 바와 같이, "비-사람 척추동물"은 야생 종 및 사육 종을 포함하는, 호모 사피엔스(Homo sapiens)를 제외한 모든 척추동물을 포함한다. 비-사람 척추동물의 예는 알파카(alpaca), 반탱(banteng), 비손(bison), 낙타, 고양이, 소, 사슴, 개, 당나귀, 가얄(gayal), 염소, 기니 피그, 말, 라마(llama), 노새, 돼지, 토끼, 순록, 양, 물소(sheep water buffalo) 및 야크(yak)와 같은 포유류를 포함하지만, 이들로 제한되는 것은 아니다.
- [0647] 오프 표적(off-target): 본원에서 사용되는 바와 같이, "오프 표적"은 임의의 하나 이상의 표적, 유전자 또는 세포 전사체에 대한 임의의 의도되지 않은 효과를 나타낸다.
- [0648] 소능성(oligopotent): 본원에서 사용되는 바와 같이, "소능성"은, 세포를 언급하는 경우, 다분화성 줄기 세포보다 세포 계통의 더 제한된 서브세트를 야기함을 의미한다.
- [0649] 개방 판독 프레임: 본원에서 사용되는 바와 같이, "개방 판독 프레임" 또는 "ORF"는 주어진 판독 프레임 내에 정지 코돈을 함유하지 않는 서열을 나타낸다.
- [0650] 작동 가능하게 연결된: 본원에서 사용되는 바와 같이, 어구 "작동 가능하게 연결된"은 둘 이상의 분자, 작제물, 전사체, 실체, 잔기 등 사이의 기능적 연결을 나타낸다.
- [0651] 임의로 치환된: 본원에서 "임의로 치환된 X"(예를 들면, 임의로 치환된 알킬)라는 형태의 어구는 "X, 여기서, X는 임의로 치환된다"(예를 들면, "알킬, 여기서, 상기 알킬은 임의로 치환된다")와 동일한 것으로 의도된다.

특정 "X"(예를 들면 알킬) 자체가 임의적임을 의미하려는 것은 아니다.

[0652] 펩타이드: 본원에서 사용되는 바와 같이, "펩타이드"는 50개 이하의 아미노산 길이, 예를 들면, 약 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 또는 50개의 아미노산의 길이이다.

[0653] 파라토프(paratope): 본원에서 사용되는 바와 같이, "파라토프"는 항체의 항원-결합 부위를 나타낸다.

[0654] 환자: 본원에서 사용되는 바와 같이, "환자"는 치료를 추구하거나 치료가 요구되거나, 치료를 필요로 하거나, 치료를 받는 중이거나, 치료를 받을 예정인 피험자, 또는 특수한 질환 또는 병태에 대해 숙련된 전문가에 의한 관리하에 있는 피험자를 나타낸다.

[0655] 약제학적으로 허용되는: 어구 "약제학적으로 허용되는"은 본원에서, 건전한 의학적 판단 범위내에서, 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응 또는 다른 문제점 또는 합병증 없이 사람 및 동물의 조직과 접촉하여 사용하기에 적합하고, 합당한 이익/위험비를 제공하는 화합물, 물질, 조성물 및/또는 투여형을 나타내는데 사용된다.

[0656] 약제학적으로 허용되는 부형제: 어구 "약제학적으로 허용되는 부형제"는, 본원에서 사용되는 바와 같이, 환자에서 실질적으로 무독성이고 비-염증성인 특성을 갖는, 본원에 기재된 화합물 이외의 임의의 성분(예를 들면, 활성 화합물을 현탁시키거나 용해시킬 수 있는 비히클)을 나타낸다. 부형제는, 예를 들면, 다음을 포함할 수 있다: 점착방지제, 향산화제, 결합제, 코팅, 압축 조제, 봉쇄제, 염료(착색제), 유연제, 유화제, 충전제(회석제), 필름 형성제 또는 코팅, 풍미제, 향수, 활주제(유동 증진제), 윤활제, 방부제, 인쇄 잉크, 흡수제, 현탁제 또는 분산제, 감미제 및 수화용 수(waters of hydration). 예시적인 부형제는 다음을 포함하지만, 이들로 제한되는 것은 아니다: 부틸화 하이드록시톨루엔(BHT), 탄산칼슘, 인산칼슘(이염기성), 칼슘 스테아레이트, 크로스카멜로스, 가교결합 폴리비닐 피롤리돈, 시트르산, 크로스포비돈, 시스테인, 에틸셀룰로스, 젤라틴, 하이드록시프로필 셀룰로스, 하이드록시프로필 메틸셀룰로스, 락토스, 마그네슘 스테아레이트, 말티톨, 만니톨, 메티오닌, 메틸셀룰로스, 메틸 파라벤, 미세결정성 셀룰로스, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리비닐 피롤리돈, 포비돈, 예비젤라틴화 전분, 프로필 파라벤, 레티닐 팔미테이트, 셀락, 이산화규소, 나트륨 카복시메틸 셀룰로스, 시트르산나트륨, 나트륨 전분 글리콜레이트, 소르비톨, 전분(옥수수), 스테아르산, 수크로스, 탈크, 이산화티타늄, 비타민 A, 비타민 E, 비타민 C 및 자일리톨.

[0657] 약제학적으로 허용되는 염: 본 개시내용은 또한 본원에 기재된 화합물의 약제학적으로 허용되는 염을 포함한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "약제학적으로 허용되는 염"은 존재하는 산 또는 염기 잔기를 이의 염 형태로 전환시킴으로써(예를 들면, 유리 염기 그룹을 적절한 유기 산과 반응시킴으로써) 모 화합물(parent compound)이 변형되는 개시된 화합물의 유도체를 나타낸다. 약제학적으로 허용되는 염의 예는, 아민과 같은 염기성 잔기의 광산 또는 유기산 염; 카복실산과 같은 산성 잔기의 알칼리 또는 유기 염 등을 포함하지만, 이들로 제한되는 것은 아니다. 대표적인 산 부가 염은 아세테이트, 아디페이트, 알기네이트, 아스코르베이트, 아스파르테이트, 벤젠설포네이트, 벤조에이트, 비셀페이트, 보레이트, 부티레이트, 캄포레이트, 캄포르설포네이트, 시트레이트, 사이클로펜탄프로피오네이트, 디글루코네이트, 도데실설포네이트, 에탄설포네이트, 푸마레이트, 글루코헵토네이트, 글리세로포스페이트, 헤미설포네이트, 헥사노에이트, 하이드로브로마이드, 하이드로클로라이드, 하이드로요오다이드, 2-하이드록시-에탄설포네이트, 락토비오네이트, 락테이트, 라우레이트, 라우릴 설포네이트, 말레이트, 말레에이트, 말로네이트, 메탄설포네이트, 2-나프탈렌설포네이트, 니코티네이트, 니트레이트, 올레이트, 옥살레이트, 팔미테이트, 파모에이트, 펙티네이트, 퍼셀페이트, 3-페닐프로피오네이트, 포스페이트, 피크레이트, 피발레이트, 프로피오네이트, 스테아레이트, 석시네이트, 설포네이트, 타르트레이트, 티오시아네이트, 툴루엔설포네이트, 운데카노에이트, 발레레이트 염 등을 포함한다. 대표적인 알칼리 또는 알칼리 토금속 염은 나트륨, 리튬, 칼륨, 칼슘, 마그네슘 등 뿐만 아니라 무독성 암모늄, 4급 암모늄, 및 암모늄, 테트라메틸암모늄, 테트라에틸암모늄, 메틸아민, 디메틸아민, 트리메틸아민, 트리에틸아민, 에틸아민 등을 포함하지만 이들로 제한되지 않는 아민 양이온을 포함한다. 본 개시내용의 약제학적으로 허용되는 염은 형성된 모 화합물로부터, 예를 들면, 무독성 무기 또는 유기 산으로부터의 통상적인 무독성 염을 포함한다. 본 개시내용의 약제학적으로 허용되는 염은 통상의 화학적 방법에 의해 염기성 또는 산성 잔기를 함유하는 모 화합물로부터 합성될 수 있다. 일반적으로, 이러한 염은 이들 화합물의 유리 산 또는 염기 형태를 화학량론적 양의 적절한 염기 또는 산과 물 또는 유기 용매 중에서, 또는 2개의 혼합물 중에서 반응시킴으로써 제조될 수 있으며; 일반적으로 에테르, 에틸 아세테이트, 에탄올, 이소프로판올 또는 아세토니트릴과 같은 비수성 매질이 바람직하다. 적절한 염의 목록은 문헌[참조: *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, p. 1418, *Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use*, P.H. Stahl and C.G. Wermuth (eds.), Wiley-VCH, 2008, and Berge et al., *Journal of Pharmaceutical Science*, 66, 1-19 (197

7])에서 찾을 수 있으며, 이들 문헌의 각각은 전문이 본원에 참고로 인용된다.

- [0658] 약동학: 본원에서 사용되는 바와 같이, "약동학"은, 살아있는 유기체에 투여된 물질의 수명의 결정과 관련된 기간 때문에, 분자 또는 화합물의 임의의 하나 이상의 특성을 나타낸다. 약동학은 흡수, 분포, 대사 및 분비의 정도 및 속도를 포함한 수개의 영역으로 나누어진다. 이것을 통상 ADME라고 하며, 여기서 (A) 흡수는 물질이 혈류로 도입되는 공정이고; (D) 분포는 신체의 체액 및 조직 전반에 걸친 물질의 분산 또는 보급이며; (M) 대사(또는 생물변환)는 모 화합물에서 자손 대사산물의 비가역적인 변환이고; (E) 배출(또는 제거)은 신체로부터의 물질의 제거를 나타낸다. 드문 경우에, 몇몇 약물은 신체 조직 내에 비가역적으로 축적된다.
- [0659] 약제학적으로 허용되는 용매화물: 용어 "약제학적으로 허용되는 용매화물"은, 본원에서 사용되는 바와 같이, 적절한 용매의 분자가 결정 격자에 혼입되어 있는 본 발명의 화합물을 의미한다. 적절한 용매는 투여된 용량에서 생리학적으로 허용 가능하다. 예를 들면, 용매화물은 유기 용매, 물 또는 이들의 혼합물을 포함하는 용액으로부터의 결정화, 재결정화 또는 침전에 의해 제조될 수 있다. 적절한 용매의 예는 에탄올, 물(예를 들면, 1-, 2- 및 3-수화물), N-메틸피롤리돈(NMP), 디메틸 설펝사이드(DMSO), N,N'-다이메틸포름아미드(DMF), N,N'-디메틸아세트아미드(DMAC), 1,3-디메틸-2-이미다졸리디논(DMEU), 1,3-디메틸-3,4,5,6-테트라하이드로-2-(1H)-피리미디논(DMPU), 아세트나이트릴(ACN), 프로필렌 글리콜, 에틸 아세테이트, 벤질 알콜, 2-피롤리돈, 벤질 벤조에이트 등이다. 물이 용매인 경우, 용매화물을 "수화물"이라고 한다.
- [0660] 물리화학적: 본원에서 사용되는 바와 같이, "물리화학적"은 물리적 및/또는 화학적 특성을 의미하거나 이와 관련됨을 의미한다.
- [0661] 전분화성: 본원에서 사용되는 바와 같이, "전분화성"은, 상이한 조건하에서, 세가지 모든 배엽 특유의 세포 유형으로 분화할 수 있는 발달 가능성을 갖는 세포를 나타낸다.
- [0662] 전분화능(pluripotency): 본원에서 사용되는 바와 같이, "전분화능" 또는 "전분화성 상태"는 세가지 모든 배아 배엽(내배엽, 중배엽 및 외배엽)으로 분화할 수 있는 능력을 갖는 세포의 발달 가능성을 나타낸다.
- [0663] 예방하는: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "예방하는"은 감염, 질환, 장애 및/또는 병태의 개시를 부분적으로 또는 완전히 지연시키고/시키거나; 특정 감염, 질환, 장애 및/또는 병태의 하나 이상의 증상, 특징 또는 임상 징후의 개시를 부분적으로 또는 완전히 지연시키고/시키거나; 특정 감염, 질환, 장애 및/또는 병태의 하나 이상의 증상, 특징 또는 징후의 개시를 부분적으로 또는 완전히 지연시키고/시키거나; 감염, 특정 질환, 장애 및/또는 병태로부터의 진행을 부분적으로 또는 완전히 지연시키고/시키거나; 감염, 질환, 장애 및/또는 병태와 관련된 병리의 발병 위험을 감소시킴을 나타낸다.
- [0664] 전구약물: 본 개시내용은 또한 본원에 기재된 화합물의 프로드럭을 포함한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "전구약물"은 화학적 또는 물리적 변화시 치료제로서 작용하는 물질, 분자 또는 실체에 대해 예견된 형태의 임의의 물질, 분자 또는 실체를 나타낸다. 전구약물은 일부 방식으로 공유 결합되거나 봉쇄될 수 있으며, 이것은 포유류 피험자에게 투여되기 전, 투여 시 또는 투여 후에 활성 약물 잔기로 방출되거나 전환된다. 전구약물은, 변형이 통상의 조작으로 또는 생체내에서 모 화합물로 절단되도록 하는 방식으로 화합물에 존재하는 관능 그룹을 변형시킴으로써 제조될 수 있다. 전구약물은, 하이드록실, 아미노, 설펝사이드, 또는 카복실 그룹이, 포유류 피험자에게 투여되는 경우, 절단되어 각각 유리 하이드록실, 아미노, 설펝사이드 또는 카복실 그룹을 형성하는 임의의 그룹에 결합되는 화합물을 포함한다. 전구약물의 제조 및 용도는 문헌[참조; T. Higuchi and V. Stella, "Pro-drugs as Novel Delivery Systems," Vol. 14 of the A.C.S. Symposium Series, and in *Bioreversible Carriers in Drug Design*, ed. Edward B. Roche, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987, 이들 둘 다는 전문이 본원에 참고로 인용됨]에 논의되어 있다.
- [0665] 증식하다: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "증식하다"는 성장하거나, 확장하거나 또는 증가하거나, 또는 신속하게 성장하도록, 확장하도록 또는 증가하도록 함을 의미한다. "증식성"은 증식하는 능력을 지니는 것을 의미한다. "항증식성"은 증식 특성과 대항 또는 반대인 특성을 지니는 것을 의미한다.
- [0666] 전구 세포(progenitor cell): 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "전구 세포"는 분화에 의해 야기될 수 있는 세포에 비해 보다 큰 발달 가능성을 갖는 세포를 나타낸다.
- [0667] 단백질 절단 부위: 본원에서 사용되는 바와 같이, "단백질 절단 부위"는 아미노산 쇄의 조절된 절단이 화학적, 효소적 또는 광화학적 수단에 의해 달성될 수 있는 부위를 나타낸다.
- [0668] 단백질 절단 신호: 본원에서 사용되는 바와 같이 "단백질 절단 신호"는 절단에 대해 폴리펩타이드를 플래그하거

나 표시하는 적어도 하나의 아미노산을 나타낸다.

- [0669] 관심 대상 단백질: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "관심 대상 단백질" 또는 "목적하는 단백질"은 본원에 제공된 것들 및 이들의 단편, 돌연변이체, 변이체 및 변형을 포함한다.
- [0670] 근위: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "근위"는 중심 또는 관심 대상 지점 또는 영역에 보다 가까이 위치함을 의미한다
- [0671] 정제된: 본원에서 사용되는 바와 같이, "정제하다", "정제된", "정제"는 원치 않는 성분, 물질 오염, 혼합물 또는 결함으로부터 실질적으로 순수하게 하거나 청소함을 의미한다.
- [0672] 반복 형질전환(repeated transfection): 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "반복 형질전환"은 동일 세포 배양물이 폴리뉴클레오타이드, 주요 작제물 또는 mmRNA로 다수회 형질감염됨을 나타낸다. 세포 배양물은 적어도 2회, 적어도 3회, 적어도 4회, 적어도 5회, 적어도 6회, 적어도 7회, 적어도 8회, 적어도 9회, 적어도 10회, 적어도 11회, 적어도 12회, 적어도 13회, 적어도 14회, 적어도 15회, 적어도 16회, 적어도 17회, 적어도 18회, 적어도 19회, 적어도 20회, 적어도 25회, 적어도 30회, 적어도 35회, 적어도 40회, 적어도 45회, 적어도 50회 또는 그 이상 형질감염될 수 있다.
- [0673] 재프로그래밍(reprogramming): 본원에서 사용되는 바와 같이, "재프로그래밍"은 세포 또는 세포 집단의 발달 가능성을 복귀시키는 공정을 나타낸다.
- [0674] 재프로그래밍 인자: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "재프로그래밍 인자"는 이의 발현이 덜 분화되거나 분화되지 않은 상태로의 세포의 재프로그래밍에 기여하는, 단백질, RNA 또는 소분자와 같은 발달 가능성 변화 인자를 나타낸다.
- [0675] 샘플: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "샘플" 또는 "생물학적 샘플"은 이의 조직, 세포 또는 성분 부분(예를 들면, 혈액, 점액, 림프액, 관절 낭액, 뇌 척수액, 타액, 양수, 양막계대혈, 뇨, 질액 및 정액을 포함하지만 이들로 제한되지 않는 체액)의 하위세트를 나타낸다. 샘플은 또한 전체 유기체 또는 이의 조직, 세포 또는 성분 부분의 하위세트, 또는 예를 들면, 혈장, 혈청, 척수액, 림프액, 피부, 호흡기, 창자 및 비뇨생식기관의 외부 단면들을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 이의 분획 또는 부분으로부터 제조된 균질물, 용해물 또는 추출물, 눈물, 타액, 유액, 혈액 세포, 중앙, 장기를 포함할 수 있다. 샘플은 또한 영양 브로쓰(nutrient broth) 또는 겔과 같은 배지를 나타내며, 이것은 단백질 또는 핵산 분자와 같은 세포 성분을 함유할 수 있다.
- [0676] 신호 서열: 본원에서 사용되는 바와 같이, 어구 "신호 서열"은 단백질의 전달 또는 국지화를 지시할 수 있는 서열을 나타낸다.
- [0677] 단일 단위 용량: 본원에서 사용되는 바와 같이, "단일 단위 용량"은 1회 용량/1회로/단일 경로/단일 접촉점, 즉, 단일 투여 사건으로 투여되는 임의의 치료제의 용량이다.
- [0678] 유사성: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "유사성"은 중합체성 분자들 사이, 예를 들면, 폴리뉴클레오타이드 분자들(예를 들면, DNA 분자들 및/또는 RNA 분자들) 사이 및/또는 폴리펩타이드 분자들 사이의 전체적인 관련성을 나타낸다. 서로에 대한 중합체 분자들의 유사성 퍼센트의 계산은, 유사성 퍼센트의 계산이 당업계에서 이해되는 바와 같이 보존적 치환을 고려한다는 것을 제외하고는, 동일성 퍼센트의 계산과 동일한 방식으로 수행될 수 있다.
- [0679] 체세포: 본원에서 사용되는 바와 같이, "체세포"는 생식 세포, 착상전 배아에 존재하거나 이로부터 획득되는 세포, 또는 시험관내에서 이러한 세포의 증식으로부터 야기되는 세포를 제외한 임의의 세포를 나타낸다.
- [0680] 체세포 줄기 세포: 본원에서 사용되는 바와 같이, "체세포 줄기 세포"는 태아, 소아 및 성인 조직을 포함한 비-배아 조직으로부터 유도된 임의의 전분화성 또는 다분화성 줄기 세포를 나타낸다.
- [0681] 체세포 전분화성 세포: 본원에서 사용되는 바와 같이, "체세포 전분화성 세포"는 전분화성 상태로 변경된 발달 가능성을 갖는 체세포를 나타낸다.
- [0682] 분할 용량: 본원에서 사용되는 바와 같이, "분할 용량"은 단일 단위 용량 또는 총 1일 용량을 2회 이상의 용량으로 분할한 것이다.
- [0683] 안정한: 본원에서 사용되는 바와 같이, "안정한"은 반응 혼합물로부터 유용한 정도의 순도로의 분리에 견디기에 충분히 강하고, 바람직하게는 유효한 치료제로 제형화될 수 있는 화합물을 나타낸다.

- [0684] 안정화된: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "안정화하다", "안정화된", "안정화된 영역"은 안정하게 만들거나 안정하게 됨을 의미한다.
- [0685] 줄기 세포: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "줄기 세포"는 특정 발달 가능성 없이 자기-재생 특성 및 다중 세포 유형으로 분화될 수 있는 발달 가능성을 갖는 분화되지 않거나 부분 분화된 상태의 세포를 나타낸다. 줄기 세포는 이의 발달 가능성을 유지하면서 분화 및 더 많은 이러한 줄기 세포를 야기할 수 있다.
- [0686] 피험자: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "피험자" 또는 "환자"는, 본 발명에 따르는 조성물이, 예를 들면, 실험적, 진단적, 예방적 및/또는 치료적 목적을 위해 투여될 수 있는 임의의 유기체를 나타낸다. 전형적인 피험자는 동물(예를 들면, 포유류, 예를 들어, 마우스, 래트, 토끼, 비-사람 영장류 및 사람) 및/또는 식물을 포함한다.
- [0687] 실질적으로: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "실질적으로"는 관심 대상 특징 또는 특성의 전체 또는 전체에 근접한 한도 또는 정도를 나타내는 정성적인 상태를 나타낸다. 생물학적 분야의 통상의 숙련가는, 생물학적 및 화학적 현상은 설사 완료된다 하더라도 극히 드물고/드물거나 완료되도록 진행되거나 절대적인 결과를 달성하거나 피하는 것으로 이해할 것이다. 따라서, 용어 "실질적으로"는 다수의 생물학적 및 화학적 현상에서 고유한 완성도의 잠재적인 결여를 포착하기 위해 본원에서 사용된다.
- [0688] 실질적으로 동일함: 본원에서 사용되는 바와 같이 이것은 용량들 사이의 시간차와 관련되므로, 당해 용어는 +/- 2%를 의미한다.
- [0689] 실질적으로 동시에: 본원에서 사용되는 바와 같이 그리고 이것은 다수의 용량과 관련되므로, 당해 용어는 2초 이내를 의미한다.
- [0690] 를 앓고 있는(suffering from): 질환, 장애 및/또는 병태"를 앓고 있는" 개체는 질환, 장애 및/또는 병태의 하나 이상의 증상으로 진단되거나 증상을 나타낸다.
- [0691] 에 대해 민감한(susceptible to): 질환, 장애 및/또는 병태"에 대해 민감한" 개체는 질환, 장애 및/또는 병태를 지닌 것으로 진단되지 않고/않거나 이들의 증상들을 나타내지 않을 수 있지만, 질환 또는 이의 증상을 발병할 성향을 갖고 있다. 몇몇 실시형태에서, 질환, 장애 및/또는 병태(예를 들어, 암)에 대해 민감한 개체는 다음 중의 하나 이상을 특징으로 할 수 있다: (1) 질환, 장애 및/또는 병태의 발달과 관련된 유전적 돌연변이; (2) 질환, 장애 및/또는 병태의 발병과 관련된 유전적 다형성; (3) 질환, 장애 및/또는 병태와 관련된 단백질 및/또는 핵산의 증가된 및/또는 감소된 발현 및/또는 활성; (4) 질환, 장애 및/또는 병태의 발병과 관련된 습관 및/또는 생활방식들; (5) 질환, 장애 및/또는 병태의 가족력; 및 (6) 질환, 장애 및/또는 병태의 발병과 관련된 미생물에 대한 노출 및/또는 감염. 몇몇 실시형태에서, 질환, 장애 및/또는 병태에 대해 민감한 개체는 그 질환, 장애 및/또는 병태를 발병할 것이다. 몇몇 실시형태에서, 질환, 장애 및/또는 병태에 대해 민감한 개체는 그 질환, 장애 및/또는 병태를 발병하지 않을 것이다.
- [0692] 서방출: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "서방출"은 특정 시간 주기에 걸쳐서 방출 속도에 따르는 약제학적 조성물 또는 화합물 방출 프로파일을 나타낸다.
- [0693] 합성: 용어 "합성"은 사람의 손으로 생산, 제조 및/또는 제작됨을 의미한다. 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드 또는 기타 분자의 합성은 화학적 또는 효소적일 수 있다.
- [0694] 표적 세포: 본원에서 사용되는 바와 같이, "표적 세포"는 임의의 하나 이상의 관심 대상 세포를 나타낸다. 세포는 시험관내, 생체내, 동일 반응계내 또는 유기체의 조직 또는 장기 내에서 발견될 수 있다. 유기체는 동물, 바람직하게는 포유류, 보다 바람직하게는 사람, 가장 바람직하게는 환자일 수 있다.
- [0695] 치료제: 용어 "치료제"는, 피험자에게 투여되는 경우, 치료적, 진단적 및/또는 예방적 효과를 갖고/갖거나 목적하는 생물학적 및/또는 약리학적 효과를 발휘하는 임의의 제제를 나타낸다.
- [0696] 치료학적 유효량: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "치료학적 유효량"은 감염, 질환, 장애 및/또는 병태를 앓고 있거나 이에 대해 민감한 피험자에게 투여되는 경우 감염, 질환, 장애 및/또는 병태를 치료하고/하거나 이의 증상들을 개선시키고/시키거나, 진단하고/하거나, 예방하고/하거나 이의 개시를 지연시키기에 충분한 전달하고자 하는 제제(예를 들면, 핵산, 약물, 치료제, 진단제, 예방제 등)의 양을 의미한다.
- [0697] 치료학적으로 유효한 성과: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "치료학적으로 유효한 성과"는 감염, 질환, 장애 및/또는 병태를 앓고 있거나 이에 대해 민감한 피험자에서, 감염, 질환, 장애 및/또는 병태를 치료하고/하거나

나 이의 증상들을 개선시키고/시키거나, 진단하고/하거나, 예방하고/하거나 이의 개시를 지연시키기에 충분한 성과를 의미한다.

- [0698] 총 1일 용량: 본원에서 사용되는 바와 같이, "총 1일 용량"은 24시간 내에 제공되거나 처방되는 양이다. 이것은 단일 단위 용량으로서 투여될 수 있다.
- [0699] 전형성능(totipotency): 본원에서 사용되는 바와 같이, "전형성능"은 성인 신체 뿐만 아니라 태반을 포함한 배의 조직에서 발견되는 모든 세포를 만들 수 있는 발달 가능성을 갖는 세포를 나타낸다.
- [0700] 전사 인자: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "전사 인자"는, 예를 들면, 전사의 활성화 또는 억제에 의해, DNA의 RNA로의 전사를 조절하는 DNA-결합 단백질을 나타낸다. 일부 전사 인자는 전사만을 조절하는 반면, 다른 것은 다른 단백질과 관련하여 작용한다. 일부 전사 인자는 소정의 조건하에서 전사를 활성화하고 억제하는 것 둘 다를 할 수 있다. 일반적으로, 전사 인자는 표적 유전자의 조절 영역 내의 특정 컨센서스 서열(consensus sequence)과 매우 유사한 특정 표적 서열 또는 서열들에 결합한다. 전사 인자는 표적 유전자만의 전사를 조절하거나 다른 분자와의 복합체로 조절할 수 있다.
- [0701] 전사: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "전사"는 외인성 핵산을 세포에 도입하는 방법을 나타낸다. 형질감염의 방법은 화학적 방법, 물리적 처리 및 양이온성 지질 또는 혼합물을 포함하지만, 이들로 억제되는 것은 아니다.
- [0702] 전환분화: 본원에서 사용되는 바와 같이, "전환분화"는 한가지 유형의 분화된 세포가 식별 특징(identifying characteristics)을 상실하고 이들의 표현형을 다른 완전 분화된 세포의 표현형으로 변화시키는 능력을 나타낸다.
- [0703] 치료하는: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "치료하는"은 특정 감염, 질환, 장애 및/또는 병태의 하나 이상의 증상 또는 특징의 개시를 일부 또는 전부 완화시키고/시키거나, 개선시키고/시키거나, 향상시키고/시키거나, 경감시키고/시키거나, 지연시키고/시키거나, 이의 진행을 억제하고/하거나, 이의 중증도를 감소시키고/시키거나, 이의 발생을 감소시킴을 나타낸다. 예를 들면, 암을 "치료하는"은 종양의 생존, 성장 및/또는 확산을 억제함을 나타낼 수 있다. 치료는 질환, 장애 및/또는 병태의 증상을 나타내지 않는 피험자에게 및/또는 질환, 장애 및/또는 병태와 관련된 병리학을 발병할 위험을 감소시킬 목적으로 질환, 장애 및/또는 병태의 조기 증상만을 나타내는 피험자에게 투여될 수 있다.
- [0704] 비변형된: 본원에서 사용되는 바와 같이, "비변형된"은 어떠한 방식으로 변화되기 전의 임의의 물질, 화합물 또는 분자를 나타낸다. 비변형된, 반드시 그런 것은 아니지만, 생분자의 야생형 또는 천연형을 나타낸다. 분자는 일련의 변형을 겪을 수 있고, 이에 따라, 각각의 변형된 분자가 후속적인 변형을 위한 "비변형된" 출발 분자로서 작용할 수 있다.
- [0705] 등가물 및 범위
- [0706] 당업계 숙련가들은 단지 통상적인 실험을 사용하여 본원에 기재된 발명에 따르는 구체적인 실시형태들에 대한 다수의 등가물을 인지하거나 확인할 수 있을 것이다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명으로 제한되는 것으로 의도된 것이 아니라, 오히려 첨부된 특허청구범위에 기술된 바와 같다.
- [0707] 특허청구범위에서, "a", "an" 및 "the"와 같은 관사는, 달리 나타내거나 달리 내용으로부터 명백하지 않는 한, 하나 또는 이상을 의미할 수 있다. 그룹의 하나 이상의 구성원들 사이에 "또는(or)"을 포함하는 특허청구범위 또는 설명은, 그룹 구성원들 중의 하나, 하나 이상, 또는 모두가, 달리 나타내거나 내용으로부터 명백하지 않는 한, 주어진 생성물 또는 공정에 존재하거나, 사용되거나, 달리 이와 관련되는 경우 만족되는 것으로 간주된다. 본 발명은, 그룹의 정확히 하나의 구성원이 주어진 생성물 또는 공정에 존재하거나, 사용되거나, 또는 달리 이와 관련되는 실시형태들을 포함한다. 본 발명은, 그룹 구성원들의 하나 이상, 또는 모두가 주어진 생성물 또는 공정에 존재하거나, 사용되거나, 또는 달리 이와 관련되는 실시형태들을 포함한다.
- [0708] 용어 "포함하는"은 추가의 요소들 또는 단계들의 포괄을 개방하고 허용하지만 필요로 하지는 않음을 의도하는 것으로 주지된다. 용어 "포함하는"이 본원에서 사용되는 경우, 이에 따라 용어 "로 이루어진"이 또한 포함되고 기재된다.
- [0709] 범위가 제공되는 경우, 종점이 포함된다. 또한, 달리 나타내거나 달리 당업계의 통상의 숙련가의 이해 및 정황으로부터 명백하지 않는 한, 범위로 나타낸 값들은, 내용이 달리 명확하게 나타내지 않는 한, 본 발명의 상이하나의 실시형태에서 명시된 범위 내의 특정한 값 또는 소범위를 그 범위의 하한치의 단위의 10분의 1로 추정할

수 있음을 이해해야 한다.

- [0710] 또한, 선행 기술에 속하는 본 발명의 특정 실시형태가 특허청구범위의 하나 이상으로부터 명확하게 배제될 수 있음을 이해해야 한다. 이러한 하나의 실시형태는 당업계의 통상의 숙련가게 공지된 것으로 간주되기 때문에, 이들은, 배제가 본원에 명확하게 기술되지 않은 경우에도, 배제될 수 있다. 본 발명의 조성물의 특정 실시형태 (예를 들면, 이에 의해 암호화된 핵산 또는 단백질; 생산 방법; 사용 방법 등)은 하나 이상의 특허청구범위로부터 어떠한 이유로, 선행 기술의 존재와의 관련 여부와 상관없이 배제될 수 있다.
- [0711] 모든 인용된 자료들, 예를 들면, 본원에 인용된 참고문헌, 공보, 데이터베이스, 데이터베이스 실체, 및 기술은, 인용에서 명확하게 기술되지 않더라도, 참고로 본 출원에 포함된다. 인용된 자료와 본 출원의 기술내용이 상충하는 경우에, 본 출원의 기술내용이 지배할 것이다.
- [0712] 섹션 및 표 제목은 제한으로 의도되지 않는다.
- [0713] 실시예
- [0714] 실시예 1. 변형된 mRNA 제조
- [0715] 본 발명에 따르는 변형된 mRNA(mRNA)는 표준 실험실 방법 및 재료를 사용하여 제조될 수 있다. 관심 대상 유전자의 개방 관독 프레임(ORF)은 코작 번역 개시 신호를 함유할 수 있는 5' 비번역 영역(UTR) 및/또는 폴리-A 테일의 주형화된 부가를 위한 올리고(dT) 서열을 포함할 수 있는 알파-글로빈 3' UTR이 이의 각 측면에 있을 수 있다. 변형된 mRNA는 세포의 선천적 면역 반응을 감소시키도록 변형될 수 있다. 세포 반응을 감소시키기 위한 변형은 유사유리딘(ψ) 및 5-메틸-시티딘(5mC 또는 m5C)을 포함할 수 있다[문헌 참조: Kariko K et al. Immunity 23:165-75 (2005), Kariko K et al. Mol Ther 16:1833-40 (2008), Anderson BR et al. NAR (2010); 이들 각각은 전문이 본원에 참고로 인용됨].
- [0716] ORF는 또한 다양한 업스트림(upstream) 또는 다운스트림(downstream) 부가물(예를 들면, β -글로빈, 태그 등과 같지만, 이에 제한되지 않음)을 포함할 수 있으며, DNA2.0(캘리포니아주 멘로 파크시에 소재)과 같지만 이에 제한되지 않는 최적화 서비스로부터 주문될 수 있고, XbaI 인식을 가질 수 있는 다중 클로닝 부위를 함유할 수 있다. 작제물의 수용시, 이것은 재구성되어 화학적으로 컴피턴트한 이. 콜라이(E. coli)로 형질전환될 수 있다.
- [0717] 본 발명의 경우, NEB DH5-알파 컴피턴트 이. 콜라이가 사용된다. 형질전환은 100ng의 플라스미드를 사용하는 NEB 지시에 따라 수행된다. 프로토콜은 다음과 같다:
- [0718] 1. NEB 5-알파 컴피턴트 이. 콜라이 세포의 튜브를 얼음 위에서 10분 동안 해동시킨다.
- [0719] 2. 1pg 내지 100ng의 플라스미드 DNA를 함유하는 1 내지 5 μ l를 세포 혼합물에 첨가한다. 튜브를 4 내지 5회 주의해서 휘둘러서 세포와 DNA를 혼합한다. 와동(vortex)시키지 않는다.
- [0720] 3. 혼합물을 얼음 상에서 30분 동안 둔다. 혼합하지 않는다.
- [0721] 4. 42°C에서 정확히 30분 동안 열 쇼크(heat shock)시킨다. 혼합하지 않는다.
- [0722] 5. 얼음 상에 5분 동안 둔다. 혼합하지 않는다.
- [0723] 6. 실온의 950 μ l의 SOC를 혼합물 내로 피펫팅한다.
- [0724] 7. 37°C에서 60분 동안 둔다. 격렬하게(250rpm) 진탕시키거나 회전시킨다.
- [0725] 8. 선택 플레이트를 37°C로 가운시킨다.
- [0726] 9. 튜브를 휘두르고 뒤집어서 세포를 완전히 혼합한다.
- [0727] 또는, 30°C에서 24-36시간 또는 25°C에서 48시간 동안 항온처리한다.
- [0728] 그후, 단일 콜로니를 사용하여 적절한 항생제를 사용하는 5ml의 LB 성장 배지에 접종한 후 5시간 동안 성장 (250RPM, 37°C)되도록 한다. 그후, 이것을 사용하여 200ml의 배양 배지에 접종하고 동일한 조건하에 밤새 성장 되도록 한다.
- [0729] 플라스미드(850 μ g까지)를 단리시키기 위해, 제조사의 지침에 따라 Invitrogen PURELINK™ HiPure Maxiprep 키트(캘리포니아주의 칼스배드시에 소재)를 사용하여 맥시 프렙(maxi prep)을 수행한다.

[0730]

시험관내 전사(IVT)를 위한 cDNA를 생성하기 위해, 플라스미드를 먼저 XbaI와 같은 제한 효소를 사용하여 선형화시킨다. XbaI를 사용한 전형적인 제한 소화는 다음을 포함할 것이다: 플라스미드 1.0 μ g; 10x 완충액 1.0 μ l; XbaI 1.5 μ l; dH₂O 10 μ l까지; 37°C에서 1시간 동안 항온처리함. 실험실 규모(< 5 μ g)에서 수행할 경우, 반응물을 Invitrogen의 PURELINK™ PCR Micro 키트(캘리포니아주의 칼스배드시에 소재)를 사용하여 제조사의 지침에 따라 세정한다. 보다 큰 규모의 정제는 Invitrogen의 표준 PURELINK™ PCR 키트(캘리포니아주의 칼스배드시에 소재)와 같은 큰 부하 용량을 갖는 제품을 사용하여 수행하는 것이 필요할 수 있다. 세정 후, 선형화된 벡터를 NanoDrop을 사용하여 정량하고 분석하여 아가로스 겔 전기영동을 사용한 선형화를 확인한다.

[0731]

비제한적인 예로서, G-CSF는 관심 대상 폴리펩타이드를 나타낼 수 있다. 실시예 1 내지 5에 개략적으로 요약된 단계들에서 사용되는 서열이 표 3에 나타내어져 있다. 개시 코돈(ATG)은 표 3의 각 서열에서 밑줄그어져 있는 것임에 주의해야 한다.

표 3

G-CSF 서열

서열 번호	설명
27	cDNA 서열: <u>ATGGCTGGACCTGCCACCCAGAGCCCCATGAAGCTGATGGCCC</u> TGCAGCTGCTGCTGTGGCACAGTGCACCTGGACAGTGCAGGA AGCCACCCCTGGGCCCTGCCAGCTCCCTGCCCCAGAGCTTC CTGCTCAAGTGCTTAGAGCAAGTGAGGAAGATCCAGGGCGAT GGCGCAGCGCTCCAGGAGAAGCTGTGTGCCACCTACAAGCTGT GCCACCCCGAGGAGCTGGTGCTGCTCGGACACTCTTGGGCAT CCCCTGGGCTCCCCTGAGCAGCTGCCCCAGCCAGGCCCTGCAG CTGGCAGGCTGCTTGAGCCAACCTCATAGCGGCCCTTTCTCTTA CCAGGGGCTCCTGCAGGCCCTGGAAGGGATCTCCCCGAGTTG GGTCCACCTTGGACACACTGCAGCTGGACGTCGCCGACTTTG CCACCACCTTGGCAGCAGATGGAAGAACTGGGAATGGCCC CTGCCCTGCAGCCACCCAGGGTGCCATGCCGGCCTTCGCCTC TGCTTCCAGCGCCGGGCAGGAGGGTCTGGTTGCCTCCCAT TGCAGAGCTTCTGGAGGTGCTGACCGGTTCTACGCCACC TTGCCAGCCCTGA

[0732]

28	<p>T7 폴리머라제 부위, AfeI 및 Xba 제한 부위를 갖는 cDNA: TAATACGACTCACTATA GGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGA GCCACC ATGGCTGGACCTGCCACCCAGAGCCCCATGAAGCTGATGGCCC TGCAGCTGCTGCTGTGGCACAGTGCCTCTGGACAGTGCAGGA AGCCACCCCTGGGCCCTGCCAGCTCCCTGCCAGAGCTTC CTGCTCAAGTGCTTAGAGCAAGTGAGGAAGATCCAGGGCGAT GGCGCAGCGCTCCAGGAGAAGCTGTGTGCCACTACAAGCTGT GCCACCCCGAGGAGCTGGTGTGCTCGGACACTCTCTGGGCAT CCCTGGGCTCCCTGAGCAGCTGCCCCAGCCAGGCCCTGCAG CTGGCAGGCTGCTTGAGCCAACCTCATAGCGGCCTTTCTCTA CCAGGGGCTCCTGCAGGCCCTGGAAGGGATCCCCGAGTTG GGTCCACCTTGGACACACTGCAGCTGGACGTGCGCGACTTTG CCACCACATCTGGCAGCAGATGGAAGAACTGGGAATGGCCC CTGCCCTGCAGCCACCCAGGGTGCCATGCCGGCCTTCGCCTC TGCTTTCCAGCGCCGGCAGGAGGGTCTGGTTGCCTCCCAT CTGCAGAGCTTCTGGAGGTGTCGTACCGCGTTCTACGCCACC TTGCCAGCCCTGA AGCGCTGCCTTCTGCGGGGCTTGCCTTCTGGCCATGCCCTTCT CTCTCCCTTGACCTGTACTCTTGGTCTTTGAATAAAGCCTGA GTAGGAAGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGA</p>
29	<p>최적화 서열: T7 폴리머라제 부위, AfeI 및 Xba 제한 부위를 함유함 TAATACGACTCACTATA GGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGA GCCACC ATGGCCGGTCCCGGACCCAAAGCCCCATGAACTTATGGCCC TGCAGTTGCTGCTTTGGCACTCGGCCCTCTGGACAGTCCAAGA AGCGACTCCTCTCGGACCTGCCTCATCGTTGCCGAGTCATTCC TTTTGAAGTGTCTGGAGCAGGTGCGAAAGATTCAGGGCGATGG AGCCGCACTCCAAGAGAAGCTCTGCGCGACATACAACTTTG CATCCGAGGAGCTCGTACTGCTCGGGCACAGCTTGGGGATTG CCTGGGCTCCTCTCTCGTCTGTCCGTGCGAGGCTTTGCAAGTTG GCAGGGTGCCTTCCAGCTCCACTCCGGTTTGTCTTGTATCA GGGACTGCTGCAAGCCCTTGAGGGAATCTCGCCAGAATTGGGC CCGACGCTGGACACGTTGCAGCTCGACGTGGCGGATTTGCGAA CAACCATCTGGCAGCAGATGGAGGAACTGGGGATGGCACCCG CGCTGCAGCCACGCAGGGGGCAATGCCGGCCTTTGCGTCCGC GTTTCAGCGCAGGGCGGGTGGAGTCTCGTAGCGAGCCACCTT CAATCATTTTTGGAAGTCTCGTACCGGGTGTGAGACATCTTG CGCAGCCGTGA</p>

[0733]

	<p>AGCGCTGCCTTCTGCGGGGCTTGCCTTCTGGCCATGCCCTTCTT CTCTCCCTTGACCTGTACTCTTGGTCTTTGAATAAAGCCTGA GTAGGAAGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGA</p>
30	<p>mRNA 서열 (전사본) GGGAAAU AAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAUAU AAGA GCCACC AUGGCCGGUCCCGGACCCAAAGCCCCAUGAAACUUAUGGCC CUGCAGUUGCUGCUUUGGCACUCGGCCUCUGGACAGUCCAA GAAGCGACUCCUCUGGACCUCAUCGUUGCCGAGUCA UUCUUAUGAAGUGUCUGGAGCAGGUGCGAAAGAUUCAGGG CGAUGGAGCCGCACUCCAAGAGAAGCUCUGCGGACAUACAA ACUUGCCAUCCGAGGAGCUCGUACUGCUCGGGCACAGCUU GGGGAUCCUUGGGUCCUCUCUGUCCUGUCCGUCGAGGC UUGCAGUUGGCAGGGUGCCUUUCCAGCUCCACUCCGGUUU GUUCUUGUAUCAGGGACUCUGCAAGCCUUGAGGGAAUCU CGCAGAAUUGGCCCGACGCUUGACACGUUGCAGCUCGACG UGGCGAUUUCGCAACAACCAUCUGGCAGCAGAUGGAGGAA CUGGGGAUUGGCACCCGCGCUGCAGCCACGAGGGGGCAUG CCGGCCUUUGCUGCCGCUUUCAGCGCAGGGCGGGUGGAGUC CUCGUAGCGAGCCACCUUAUCAUUAUUUGGAAGUCUCGUA CCGGGUCUGAGACAUCUUGCGCAGCCGUGA AGCGCUGCCUUCUGCGGGGCUUGCCUUCUGGCCAUGCCUUC UUCUCUCCUUGCACCUGUACCUCUUGGUCUUUGAAUAAAGC CUGAGUAGGAAG</p>

[0734]

- [0735] 실시예 2: cDNA 제조를 위한 PCR
- [0736] cDNA의 제조를 위한 PCR 절차는 Kapa Biosystems(매사추세츠주의 워번시에 소재)에 의한 2x KAPA HIFI™ HotStart ReadyMix를 사용하여 수행한다. 이 시스템은 2x KAPA ReadyMix 12.5 μ l; 순방향 프라이머(10 μ M) 0.75 μ l; 역방향 프라이머(10 μ M) 0.75 μ l; 주형 cDNA 100ng; 및 25.0 μ l로 희석된 dH₂O를 포함한다. 반응 조건은 95 $^{\circ}$ C에서 5분 동안, 그리고 98 $^{\circ}$ C에서 20초 동안, 이어서 58 $^{\circ}$ C에서 15초 동안, 이어서 72 $^{\circ}$ C에서 45초, 이어서 72 $^{\circ}$ C에서 5분 동안, 이어서 4 $^{\circ}$ C에서 종결되도록 하는 25 사이클이다.
- [0737] 본 발명의 역방향 프라이머는 mRNA에 폴리-A₁₂₀을 위해 폴리-T₁₂₀을 혼입시킨다. 보다 길거나 보다 짧은 폴리(T) 트랙트(tract)를 갖는 다른 역방향 프라이머를 사용하여 mRNA에서 폴리(A) 테일의 길이를 조절할 수 있다.
- [0738] 반응물을 Invitrogen의 PURELINK™ PCR Micro 키트(캘리포니아주의 칼스배드시에 소재)를 사용하여 제조사의 지침에 따라 세정한다(5 μ g까지). 보다 큰 반응은 용량이 보다 큰 제품을 사용한 세정을 필요로 할 것이다. 세정 후에, cDNA를 NanoDrop을 사용하여 정량하고, 아가로스 겔 전기영동에 의해 분석하여 cDNA가 예측된 크기임을 확인한다. 그 후, cDNA를 서열 분석을 위해 시험관내 전사 반응을 진행하기 전에 제공한다.
- [0739] 실시예 3. 시험관내 전사(IVT)
- [0740] 시험관내 전사 반응은 변형된 뉴클레오타이드 또는 변형 RNA를 함유하는 mRNA를 생성한다. 도입 뉴클레오타이드 트리포스페이트(NTP) 믹스는 천연 및 비-천연 NTP를 이용해서 사내에서 제조된다.
- [0741] 전형적인 시험관내 전사 반응은 다음을 포함한다:
- [0742] 주형 cDNA 1.0 μ g
- [0743] 10x 전사 완충액(400mM 트리스-HCl pH 8.0, 190mM MgCl₂, 50mM DTT, 10mM 스퍼미딘) 2.0 μ l
- [0744] 통상의 NTP(각각 25mM) 7.2 μ l
- [0745] RNase 억제제 20 U
- [0746] T7 RNA 폴리머라제 3000 U
- [0747] dH₂O 20.0 μ l까지
- [0748] 37 $^{\circ}$ C에서 3시간 내지 5시간 항온처리.
- [0749] 조약한 IVT 혼합물은 다음날 세정을 위해 4 $^{\circ}$ C에서 밤새 저장할 있다. 그 후, 1 U의 RNase-미함유 DNase를 사용하여 원래의 주형을 소화시킨다. 37 $^{\circ}$ C에서 15분간 항온처리한 후, mRNA를 Ambion의 MEGACLEAR™ 키트(텍사스주의 오스틴시에 소재)를 사용하여 제조사의 지침에 따라 정제한다. 이 키트는 500 μ g까지의 RNA를 정제할 수 있다. 세정 후, RNA를 NanoDrop을 사용하여 정량하고, 아가로스 겔 전기영동에 의해 분석하여, RNA가 적절한 크기이고 RNA의 분해가 일어나지 않았음을 확인한다.
- [0750] 실시예 4. mRNA의 효소적 캡핑
- [0751] mRNA의 캡핑은 다음과 같이 수행하며, 여기서, 혼합물은 다음을 포함한다: IVT RNA 60 μ g 내지 180 μ g 및 dH₂O 72 μ l 이하. 이 혼합물을 65 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 항온처리하여 RNA를 변성시킨 다음 즉시 얼음으로 이동시킨다.
- [0752] 그 후, 프로토콜은 10x 캡핑 완충액(0.5M Tri-HCl(pH 8.0), 60mM KCl, 12.5mM MgCl₂)(10.0 μ l); 20mM GTP(5.0 μ l); 20mM S-아데노실 메티오닌(2.5 μ l); RNase 억제제(100 U); 2'-O-메틸트랜스퍼라제(400U); 백시니아 캡핑 효소(구아닐릴 트랜스퍼라제)(40 U); dH₂O(28 μ l 이하)의 혼합; 및 60 μ g RNA에 대해서 37 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 또한 180 μ g RNA에 대해서 2시간까지의 항온처리를 포함한다
- [0753] 그 후, mRNA를 Ambion의 MEGACLEAR™ 키트(텍사스주의 오스틴시에 소재)를 사용하여 제조사의 지침에 따라 정제한다. 세정 후, RNA를 NANODROP™(ThermoFisher, 매사추세츠주의 왈탐시에 소재)을 사용하여 정량하고, 아가로

스 겔 전기영동에 의해 분석하여, RNA가 적절한 크기이고 RNA의 분해가 일어나지 않았음을 확인한다. 또한, RNA 산물은 역-전사-PCR을 가동시켜 서열분석함으로써 서열분석용 cDNA를 생성할 수 있다.

[0754] 실시예 5. 폴리A 테일링 반응

[0755] cDNA에서 폴리-T 없이, 폴리-A 테일링 반응은 최종 산물의 세정 전에 수행해야 한다. 이것은 캡핑된 IVT RNA(100 μ l); RNase 억제제(20 U); 10x 테일링 완충액(0.5M Tris-HCl(pH 8.0), 2.5M NaCl, 100mM MgCl₂)(12.0 μ l); 20mM ATP(6.0 μ l); 폴리-A 폴리머라제(20 U); dH₂O 123.5 μ l 이하의 혼합 및 37°C에서 30분 동안의 항온처리에 의해 수행된다. 폴리-A 테일이 이미 전사체 내에 있다면, 테일링 반응은 생략하고 Ambion의 MEGACLEAR™ 키트(텍사스주의 오스틴시에 소재)를 사용하여 세정을 진행한다(500 μ g까지). 폴리-A 폴리머라제는 바람직하게는 효모에서 발현되는 재조합 효소이다.

[0756] 본원에서 수행되고 기재된 연구를 위해, 폴리-A 테일을 IVT 주형에 암호화시켜 160개 뉴클레오타이드 길이를 포함한다. 그러나, 폴리A 테일링 반응의 진행도(processivity) 또는 통합성이 항상 정확하게 160개의 뉴클레오타이드를 야기할 수는 없음을 이해해야 한다. 따라서, 대략 160개, 예를 들면, 약 150 내지 165, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164 또는 165개의 뉴클레오타이드의 폴리A 테일이 본 발명의 범위 내에 있다.

[0757] 실시예 6. 천연 5' 캡 및 5' 캡 유사체

[0758] 변형 RNA의 5' 캡핑을 이하의 화학적 RNA 캡 유사체를 사용하는 시험관내-전사 반응 동안 부수적으로 완료시켜 제조사의 프로토콜에 따라 5'-구아노신 캡 구조를 생성할 수 있다: 3'-O-Me-m7G(5')ppp(5')G[ARCA 캡]; G(5')ppp(5')A; G(5')ppp(5')G; m7G(5')ppp(5')A; m7G(5')ppp(5')G(New England BioLabs, 매사추세츠주의 입스위치시에 소재). 변형 RNA의 5' 캡핑은, 백시니아 바이러스 캡핑 효소를 사용하여 전사후에 완료시켜 "캡 0" 구조: m7G(5')ppp(5')G(New England BioLabs, 매사추세츠주의 입스위치시에 소재)를 생성할 수 있다. 캡 1 구조를 백시니아 바이러스 캡핑 효소 및 2'-O 메틸-트랜스퍼라제 둘 다를 사용하여 생성시켜, m7G(5')ppp(5')G-2'-O-메틸을 생성할 수 있다. 캡 2 구조를 캡 1 구조에 이어 2'-O 메틸트랜스퍼라제를 사용하여 5'-뒤에서 세 번째(antepenultimate) 뉴클레오타이드의 2'-O-메틸화로부터 생성할 수 있다. 캡 3 구조는 캡 2 구조에 이어 2'-O 메틸-트랜스퍼라제를 사용하여 5'-뒤에서 네 번째(preantepenultimate) 뉴클레오타이드의 2'-O-메틸화로부터 생성할 수 있다. 효소는 바람직하게는 재조합체 공급원으로부터 유도된다.

[0759] 포유류의 세포내로 형질감염되는 경우, 변형된 mRNA는 12 내지 18시간 또는 18시간 이상, 예를 들면, 24, 36, 48, 60, 72 또는 72시간 이상의 안정성을 갖는다.

[0760] 실시예 7. 캡핑

[0761] A. 단백질 발현 검정

[0762] ARCA(3' O-Me-m7G(5')ppp(5')G) 캡 유사체 또는 캡1 구조를 함유하는 사람 G-CSF를 암호화하는 합성 mRNA(서열에 나타내지 않은 대략 160개 뉴클레오타이드 길이의 폴리A 테일을 갖는 서열번호 30으로 표시된 mRNA)는 동등한 농도에서 사람 원시 각질세포로 형질감염될 수 있다. 6, 12, 24 및 36시간 형질감염 후, 배양 배지로 분비된 G-CSF의 양을 ELISA로 분석할 수 있다. 배지로 더 높은 수준의 G-CSF를 분비하는 합성 mRNA는 보다 높은 번역-컴퍼트 캡 구조를 갖는 합성 mRNA에 상응할 것이다.

[0763] B. 순도 분석 합성

[0764] ARCA 캡 유사체 또는 캡1 구조 조 합성 산물을 함유하는 사람 G-CSF를 암호화하는 합성 mRNA(서열로 나타내지 않은 대략 160개 뉴클레오타이드 길이의 폴리A 테일을 갖는 서열번호 30으로 표시된 mRNA)는 변성 아가로스-우레아 겔 전기영동 또는 HPLC 분석을 사용하여 순도에 대해 비교할 수 있다. 전기영동에 의해 단일의 통합된 밴드를 지니는 합성 mRNA는 다중 밴드 또는 스트리킹 밴드(streaking band)를 지니는 합성 mRNA에 비해 보다 높은 순도의 산물에 상응한다. 단일의 HPLC 피크를 지니는 합성 mRNA는 또한 보다 높은 순도의 산물에 상응할 것이다. 보다 높은 효율을 갖는 캡핑 반응은 보다 순수한 mRNA 집단을 제공할 것이다.

[0765] C. 사이토킨 분석

- [0766] ARCA 캡 유사체 또는 캡1 구조를 함유하는 사람 G-CSF를 암호화하는 합성 mRNA(서열로 나타내지 않은 대략 160 개 뉴클레오타이드 길이의 폴리A 테일을 갖는 서열번호 30으로 표시된 mRNA)는 다수의 농도에서 사람 원시 각질 세포로 형질감염시킬 수 있다. 형질감염 후 6, 12, 24 및 36시간째에, 배양 배지로 분비된 TNF-알파 및 IFN-베타와 같은 전염증성 사이토킨의 양을 ELISA로 분석할 수 있다. 배지로 보다 높은 수준의 전염증성 사이토킨을 분비하는 합성 mRNA는 면역-활성화 캡 구조를 함유하는 합성 mRNA에 상응할 것이다.
- [0767] D. 캡핑 반응 효율
- [0768] ARCA 캡 유사체 또는 캡1 구조를 함유하는 사람 G-CSF를 암호화하는 합성 mRNA(서열로 나타내지 않은 대략 160 개 뉴클레오타이드 길이의 폴리A 테일을 갖는 서열번호 30으로 표시된 mRNA)는 캡핑된 mRNA 뉴클레아제 처리 후에 LC-MS에 의해 캡핑 반응 효율에 대해 분석할 수 있다. 캡핑된 mRNA의 뉴클레아제 처리는 유리 뉴클레오타이드와 LC-MS에 의해 검출 가능한 캡핑된 5'-5-트리포스페이트 캡 구조의 혼합물을 산출할 것이다. LC-MS 스펙트럼 상에서의 캡핑된 산물의 양은 반응으로부터의 총 mRNA의 퍼센트로서 표현될 수 있고, 캡핑 반응 효율에 상응할 것이다. 보다 높은 캡핑 반응 효율을 가진 캡 구조는 LC-MS에 의해 보다 높은 양의 캡핑된 산물을 지닐 것이다.
- [0769] 실시예 8. 변형 RNA 또는 RT PCR 산물의 아가로스 겔 전기영동
- [0770] 개별 변형 RNA(20 μ l 용적 중 200 내지 400ng) 또는 역전사된 PCR 산물(200 내지 400ng)을 웰 내에 비변성 1.2% 아가로스 E-겔(Invitrogen, 캘리포니아주의 칼스버드시에 소재) 상에 장입하고 제조사의 프로토콜에 따라 12 내지 15분 동안 가동시킨다.
- [0771] 실시예 9. Nanodrop 변형 RNA 정량 및 UV 스펙트럼 데이터
- [0772] TE 완충액(1 μ l) 중의 변형 RNA를 Nanodrop UV 흡광도 관독을 위해 사용하여 시험관내 전사 반응으로부터의 각각의 변형 RNA의 수율을 정량한다.
- [0773] 실시예 10. 단백질 발현에 대한 스크리닝 방법
- [0774] A. 전기분무 이온화
- [0775] 피험자에게 투여된 변형 RNA에 의해 암호화된 단백질을 함유할 수 있는 생물학적 샘플을 1, 2, 3 또는 4개의 질량 분석기를 사용하여 전기분무 이온화(ESI)를 위한 제조사의 프로토콜에 따라 제조하고 분석한다. 생물학적 샘플을 또한 탠덤(tandem) ESI 질량 분광법 시스템을 사용하여 분석할 수 있다.
- [0776] 단백질 단편, 또는 전체 단백질의 패턴을 주어진 단백질에 대해 공지된 대조물과 비교하고, 비교에 의해 정체를 결정한다.
- [0777] B. 기질-보조 레이저 탈착/이온화
- [0778] 피험자에게 투여된 변형 RNA에 의해 암호화된 단백질을 함유할 수 있는 생물학적 샘플을 기질-보조 레이저 탈착/이온화(MALDI)를 위한 제조사의 프로토콜에 따라 제조하고 분석한다.
- [0779] 단백질 단편, 또는 전체 단백질의 패턴을 주어진 단백질에 대해 공지된 대조물과 비교하고, 비교에 의해 정체를 결정한다.
- [0780] C. 액체 크로마토그래피-질량 분석법-질량 분석법
- [0781] 변형 RNA에 의해 암호화된 단백질을 함유할 수 있는 생물학적 샘플을 트립신 효소로 처리하여 그 안에 함유된 단백질을 소화시킬 수 있다. 생성된 펩타이드를 액체 크로마토그래피-질량 분석법-질량 분석법(LC/MS/MS)에 의해 분석한다. 펩타이드를 질량 분석기에서 단편화하여, 컴퓨터 알고리즘을 통한 단백질 서열에 매치될 수 있는 진단 패턴을 수득한다. 소화된 샘플을 주어진 단백질에 대해 1ng 이하의 출발 물질을 달성하도록 희석시킬 수 있다. 단순 완충액 백그라운드(예를 들면, 물 또는 휘발성 염)를 함유하는 생물학적 샘플은 용해 소화(in-solution digest)를 지시하도록 잘 받아들일 수 있다; 보다 복잡한 백그라운드(예를 들면, 세제, 비-휘발성 염, 글리세롤)는 샘플 분석을 촉진하기 위해 추가의 세정 단계를 필요로 한다.
- [0782] 단백질 단편, 또는 전체 단백질의 패턴을 주어진 단백질에 대해 공지된 대조물과 비교하고, 비교에 의해 정체를

결정한다.

[0783] 실시예 11. LDL-R1 돌연변이 mRNA 서열

[0784] PCSK9 결합이 결손된 하나 이상의 LDL-R 단백질을 암호화하는 서열이 표 4에 제공되어 있다. RNA의 개시 부위는 밑줄그어진 "AUG"이고, 5' UTR 및 3' UTR은 볼드체이다.

표 4

LDL-R 서열

설명	서열	서열 번호
LDLR1_D331E mRNA	GGGAAAUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAUAUAAGAGCCACCAU <u>GGGUCCGUGGGGCU</u> GGAAAGCUUAGAUGACAGUCGCGCUCCUUCGAGCAGCAGGAA CUGCGGUCGGAGAU <u>CGAUGCGAGCGCAACGAGU</u> UCCA AUGCCAAGAUGGGAAGU <u>UAUUUCGUACAAGUGGGUC</u> UGCGAUGGAUCAGCGGAAUGUCAGGACGGAAGCGAUG AGAGCCAAGAAACAUGCCUCUCAGUGACAUGCAAGUC GGGAGACUUCUCGUGCGGAGGACGCGUAAACAGAU <u>GU</u> AU <u>UCCACAGUUUUGGCGUCGGAUGGUCAGGUGGACU</u> GCGACAACGGUUCAGAU <u>GAACAGGGAUGUCCCGAA</u> AACGUGCUCACAAGACGAGUUUCGUCGCAUGAUGGA AAGUGCAUUUCGCGGAGUUCGU <u>AUGUGAUUCGGAUC</u> GGGACUUCUGGACGCGUCGACGAAAGCGUCAUGCCC GGUACUUACUUGCGGGCCAGCCUCAU <u>UCCAUGCAAC</u>	7

[0785]

<p>AGCUC AACGUGCAUCCCCAGCUGUGGGCCUGUGACA AUGAUCCUGAUUGUGAGGACGGUAGCGACGAGUGGCC GCAGAGAUGUAGGGGUUUGUACGUUUCCAAGGAGAC UCAAGCCCUGUUCGGCCUUUGAGUUUCACUGCCUGU CGGGUGAAUGCAUCCACUCCAGCUGGCGAUGUGAUGG UUGGGCCCGACUGCAAAGAUAAAGAGCGACGAGGAGAAU UGCGCGGUCGCGACGUGCAGACCCGAGUAGAUUCCAGU GCUCCG AUGGAAACUGCAUCCACGGGAGCCGGCAGUG UGAUCGCGAGUACGAUUUAAGACAUGUCAGACGAG GUCGGAUGCGUGAACGUCACGUUGUGCGAGGGUCCGA ACAAAGUUUAAAGUGCCAUUCGGGCGAAUGUAUACGCU CGAUAAAGUCUGCAACAUGGGCGGAGAUUUGAGGGAU UGGUCAGACGAACCAUCAAGGAGUGCGGCACUAACG AGUGUUUGGACAAUAACGGCGGGUUGUCGACGUCUG CAAUGAACUCAAAUAUGGGUUAUGAGUUCUCUGUCCU GACGGAUUCCAGCUGGUUCGCGCAGCGCAGAUUGCGAGG ACAUCGACGAGUGCCAGGACCCCGACACAUUGUCGA GUUGUGUGUCAACCUUGAAGGAGGGUAACAAGUCCAG UGCGAGGAGGGAUUUCAGCUUGACCCGCACAGAAAG CAUGUAAAGCGGUGGGGUCCAUUGCGUAUUUGUUUUU CACAAACAGACAUGAAGUGCGGAAGAUAGCCCUUGAU CGCAGCGAAUAUACGUCACUGAUCCUAAUCUUAGGA AUGUCGUGGGCCUUGACACGGAGGUAGCAUCAAUAG AAUCUACUGGUCCGACCUUCACAGAGAAUGAUCUGU UCAACACAGUUGGAUCGGGCGCACGGGUUGUCGUCGU ACGAUACGGUAAUUAGCCGCGACAUCAGCGCCAGA CGGACUCGCGGUCGACUGGAUCCAUGCAACAUCUAC UGGACAGACUCCGUGUUGGAAACCGUAUCCGUAGCUG ACACAAGGGGAGUGAAGCGGAAACUCUUUUUAGAGA GAACGCAGCAAACCGAGAGCAAUCGUGGUCGAUCCG GUGCAUUGGAUUCAUGUAUUGGACCGAUUGGGGAACGC CAGCCAAAUAAGAAAGGCGGUUUGAAUGGGGUCGA CAUCUACUCGUGGUGACUGAGAAUAUUCAGUGGCCA AACGGGAUCACCUUGGACUUGUUGCGGGGAGGUUGU AUUGGGUGGACUAAAGCUCCACUCGUAUCAGCUCGAU CGACGUGAACGGCGGAAUAAGGAAACUAUUCUCGAA GAUGAGAAAAGACUGGCCACCCUUCUCGUCGCGG UGUUCGAGGACAAAGUAUUUUGGACAGACAUAUCA CGAAGCGAUUUUCAGCCAACCGCUGACAGGGUUCG GAUGUCAUUCUUGGCCGAAAACCUUCUGAGCCCGG AAGAUUUGGUUUUGUUACAUAUUUGACCCAACCCAG AGGUGUGAAUUGGUGCAACGGACGCAUUGUCGAAC GGAGGUUGCCAGUAUCUCUGUCUCCUGCACCCGAGA UUAAUCCCAUUCACCAAGUUCACGUGUGCGUGCCC AGACGGAAUGCUUCUUGCGAGGGACAUGGAGUCCUGU CUCACCGAAAGCGGAAGCGGCAUGGGCCACACAAGAGA CUUCGACUGUCCGCCUAAAGUGUCCUCGACGGCGGU CCGAACUCAGCAUACGACCACAGACCCGUGCCGAU ACCUUCGCGGUUGCCCGGAGCAACACCGGGGUUGACGA CAGUAGAAAUCGUAACCAUGAGCCACCGGACCUUGG AGAUGUCGACGGCAGAGGCAUUGAGAAGAAACCCAGC UCGGUCAGAGCCUCAGCAUCGUGUCGUUUUUGUGC UGCUUGUGUUUCUGUUUGGGUGUGUUUCUUGUUGU GGAAGAACUGGGCCUUAAAGAAUAACAUCGUAUAA CUUCGAUAAUCCGGUAUACCAGAAAACCCAGAGGAU</p>

[0786]

	<p>GAAGUGCAUAAUUGUCACAACCAAGAUGGCUAAUUCGU ACCCGUCCAGGCAAUUGGUUAUCACUUGAGGACGACGU GGCCUGAUAAUAGGCUGCCUUCUGCGGGGCUUGCCU UCUGGCCAUGCCUUCUUCUCUCCUUGCACCUGUA CCUCUUGGUCUUUGAAUAAAGCCUGAGUAGGAAG</p>	
<p>LDLR1_L339D mRNA</p>	<p>GGGAAAUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAU AUAAGAGCCACCAUUGGUCCGUGGGGCUUGAAGCUU AGAUGGACAGUCGCGCUCCUUCUUCGAGCAGCAGGAA CUGCGGUCGGAGAUUGAUGCGAGCGCAACGAGUCCA AUGCCAAGAUUGGAAAGUUAUUUCGUACAAGUGGGUC UGCGAUUGGAUCAGCGGAAUGUCAGGACGGAAGCGAUG AGAGCCAAGAAACAUUGCCUCUCAGUGACAUUGCAAGUC GGGAGACUUCUGUGCGGAGGACGCGUAAACAGAUUGU AUUCCACAGUUUUGGCGCUGCGAUGGUCAGGUGGACU GCGACAACGCUUCAGAUAAACAGGGAUGUCCUCCGAA AACGUGCUCACAAGACGAGUUUCGUGCCAUGAUGGA AAGUGCAUUUCGCGGCAGUUCGUUUGAUGAUUCGGAUC GGGACUGUCUGGACGGCUCGGACGAAGCGUACUUGCCC GGUACUUACUUGCGGGCCAGCCUCAUCCAAUGCAAC AGCUC AACGUGCAUUCUCCAGCUGUGGGCCUUGGACA AUGAUCCUGAUUGUGAGGACGGUAGCGACGAGUGGCC GCAGAGAUUGAGGGUUUGUACGUUUAUCCAAGGAGAC UCAAGCCCCUGUCCGCCUUUGAGUUACUGCCUGU CGGGUGAAUGCAUCCACUCCAGCUGGCGAUGUGAUGG UGGGCCCCGACUGCAAAGUAAGAGCGACGAGGAGAAU UGCGCGGUCGCGACGUGCAGACCCGAGUAGUUCAGU GCUCCGAUGGAAACUGCAUCCACGGGAGCCGGCAGUG UGAUCGCGAGUACGAUUGUAAAGACAUGUCAGACGAG GUCGGAUUGCGUGAACGUCACGUUGUGCGAGGGUCCGA ACAAGUUUAAAGUGCCAUUCGGGCGAAUGUAUUACGCU CGAUAAAGUCUGCAACAUGGGCGGAGAUUGUAGGGAU UGGUCAGACGAACCAUCAAGGAGUGCGGCACUAACG AGUGUUUGGACAAUAAACGGCGGGUGUUCGCACGUCUG CAAUGAUCUCAAUUUGGGUUAUGAGUGUGAUUGUCCU GACGGAUUCACGUGGUCGCGCAGCGCAGAUUGCGAGG ACAUCGACGAGUGCCAGGACCCGACACAUGUUCGCA GUUGUGUGUCAACCUUGAAGGAGGGUACAAGUGCCAG UGCGAGGAGGGAUUUCAGCUUGACCCGCACACGAAAAG CAUGUAAAGCGGUGGGGUCCAUUGCGUAUUUGUUUUU CACAAACAGACAUUGAAGUGCGGAAGAUAGCCCUUGAU CGCAGCGAAUUAACGUCACUGAUCCCUAAUCUUAAGGA AUGUCGUGGCCUUGACACGGAGGUAGCAUCAAUAG AAUCUACUGGUCCGACCUUCACAGAGAAUGAUCUGU UCAACACAGUUGGAUCGGGCGCACGGGGUGUCUCGU ACGAUACGUAUUAGCGCGGACAUCCAGGCGCCAGA CGGACUCGCGGUCGACUGGAUCCAUAGCAACAUCUAC UGGACAGACUCCGUGUUGGAAACCGUAUCCGUAGCUG ACACAAAGGGAGUGAAGCGGAAAACUUCUUUUAGAGA GAACGGCAGCAAACCGAGAGCAAUCGUGGUCGAUCCG GUGCAUGGAUUCAGUUAUUGGACCGAUUGGGGAACGC CAGCCAAAUAAGAAAGGGCGGUUGAAUGGGGUUGA CAUCUACUCGUGGACUGAGAAUUAUCAGUGGCCA AACGGGAUACCUUGGACUUGUUGCGGGGAGGUUGU AUUGGGUGGACUCAAGCUCACUCGAUCAGCUCGAU CGACGUGAACGGCGGAAUAGGAAAACUUAUUCUGAA</p>	<p>8</p>

[0787]

	<p>GAUGAGAAAAGACUGGCCACCCUUCUCGUCGCGG UGUUCGAGGACAAAGUAUUUUGGACAGACAUCA CGAAGCGAUCUUUCAGCCAACCGCCUGACAGGUCG GAUGUCAUUCUCUUGGCCGAAAACCUUCUGAGCCCG AAGAUUUGUCUUUGUUCACAAUUUGACCAACCCAG AGGUGUGAAUUGGUGCGAACGGACGACAUUGCGAAC GGAGGUUGCCAGUAUCUCUGUCUCCUGCACCCAG UUAUCCCAUUCACCCAAGUUCACGUGUGCGUGCCC AGACGGAUUGCUUCUUGCGAGGGACAUAGAUCCUGU CUCACCGAAGCGGAAGCGGCAGUGGCCACACAAGAG CUUCGACUGUCCGCCUUAAGUGUCCUGACGCGGU CCGAACUCAGCAUACGACCACACGACCCGUGCCGAU ACCUCGCGGUUGCCCGAGCAACACCGGGGUUGACGA CAGUAGAAAUCGUAACCAUGACCCACAGGCACUUGG AGAUGUCGACGGCAGAGGCAUUGAGAAGAAACCCAGC UCGGUCAGAGCCUCAGCAUCGUGCUGCCUUAUUGUC UGCUUGUGUUUCUCUGUUUGGGUGUGUCUUGUUGU GGAAGAACUGGCCCUAAGAAUUAACAUCUGAUUA CUUCGAUAAUCCGGUUAACAGAAAACACAGAGGAU GAAGUGCAUUAUUGUCAACCAAGUAGGCUUAUCGU ACCCGUCCAGGCAAAUGGUUAUCACUUGAGGACGACG GGCCUGAAUAGGCGUCCUUCUGCGGGGCUUGCCU UCUGGCCAUGCCUUCUUCUCUCCUUGCACCCUGUA CCUCUUGGUCUUUGAAUAAAGCCUGAGUAGGAAG</p>	
<p>LDLR1_N316A mRNA</p>	<p>GGGAAAUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAA AUAAGAGCCACCAUGGGUCCGUGGGGCUGGAAGCUU AGAUGGACAGUCGCGCUCCUCCUUGCAGCAGCAGGAA CUGCGGUCGAGAUUCGAUGCGAGCGCAACGAGUUC AUGCCAAGAUUGGGAAGUGUAUUUCGUACAAGUGGGUC UGCGAUGGAUCAGCGGAAUGUCAGGACGGAAGCGAUG AGAGCCAAGAAACAUGCCUCUCAGUGACAUGCAAGUC GGGAGACUUCUGGCGGAGGACGCGUAAACAGAUUGU AUUCCACAGUUUUGGCGCUGCGAUGGUCAGGUGGACU GCGACAACGGUUCAGAUGAACAGGGAUGUCCUCCGAA AACGUGCUCACAAGACGAGUUCGUCGCAUGAUGGA AAGUGCAUUUCGCGGCAUUCGUAUGUGAUUCGGAUC GGGACUGUCUGGACGGCUCGGACGAAGCGUCAUGCCC GGUACUUAUCUGCGGGCCAGCCUCAUCCAAUGCAAC AGCUCAACGUGCAUUCGCCAGCUUGGGCCUGUGACA AUGAUCCUGAUUGUGAGGACGGAUGCGACGAGUGGCC GCAGAGAUUJAGGGUUUGUACGUUAUCCAAGGAGAC UCAAGCCCCUGUCCGCCUUUGAGUUACUGCCUGU CGGGUGAAUGCAUCCACUCCAGCUGGGCAUGUGAUGG UGGGCCCGACUGCAAAGAUAAAGAGCGACGAGGAAU UGCGCGGUCGCGACGUGCAGACCCGAGUAGUUCAGU GCUCCGUAUGGAAACUGCAUCCACGGGAGCCGGCAGUG UGAUCGCGAGUACGAUUGUAAGACAUGUCAGACGAG GUCGGAUGCGUGAACGUCACGUUGUGCGAGGGUCCGA ACAAGUUUAAGUGCCAUUCGGGCGAAUGUAUACGCU CGAUAAAGUCUGCAACAUGGGCGGAGAUUGAUGGGAU UGGUCAGACGAACCAUCAAGGAGUGCGCACUGCAG AGUGUUUGGACAAAACGGCGGGUGUUCGCACGUCUG CAUAGUUCUCAAUUUGGGUUAUGAGUUGUCUUGUCCU GACGGAUUCCAGCUGGUCGCGCAGCGCAGAUGCGAGG ACAUCGACGAGUGCCAGGACCCGACACAUGUUCGCA</p>	<p>9</p>

[0788]

	<p>GUUGUGUGUCAACCUUGAAGGAGGGUACAAGUGCCAG UGCGAGGAGGGAUUUCAGCUUGACCCGCACACGAAAG CAUGUAAAAGCGGUGGGUCCAUUGCGUAUUGUUUUU CACAAACAGACAUGAAGUGCGGAAGAUACCCUUGAU CGCAGCGAAUAUACGUACUGAUCCCUAAUCUUAGGA AUGUCGUGGCCUUGACACGAGGUAGCAUAAAUAAG AAUCUACUGGUCGACCUCACACAGAGAAUGAUCUGU UCAACACAGUUGGAUCGGGCGCACGGGUGUCUGU ACGAUACGGUAAUAGCCGCGACAUCCAGGCGCCAGA CGGACUCGCGGUCGACUGGAUCCAUGCAACAUCUAC UGGACAGACUCCGUGUUGGGAACCGUAUCCGUAGCUG ACACAAGGGAGUGAAGCGGAAAACUUCUUUUAGAGA GAACGGCAGCAAACCGAGAGCAUUCGUGGUGAUCCG GUGCAUGGAUUCAGUAUUGGACCGAUUGGGGAACGC CAGCCAAAUAAGAAAGGCGGUUUGAAUUGGGGUCGA CAUCUACUCGUGGUGACUGAGAAUUAUCAGUGGCCA AACGGGAUCACCUUGGACUUGUUGUCGGGGAGGUUGU AUUGGGUGGACUCAAAGCUCACUCGAUCAGCUCGAU CGACGUGAAACGGCGGAAUAGGAAAACUUAUCUGGAA GAUGAGAAAAGACUGGCCACCCUUCUCGUCGCGCG UGUUCGAGGACAAAGUAUUUUGGACAGACAUCUCAA CGAAGCGAUCUUUCAGCCAACCGCCUGACAGGGUCG GAUGUCAUCUCUUGGCCGAAAACCUUCUGAGCCCG AAGAUAUGGUCUUGUUUCACAAUUGACCCAACCCAG AGGUGUGAAUUGGUGCGAACGGACGACAUUUGCGAAC GGAGGUUGCCAGUAUCUCUGUCUCCUGCACCCAGA UUAUCCCAUUCACCAAGUUCACGUUGCGUGGCC AGACGGAAUGCUUCUUGCGAGGGACAUGGAUCCUGU CUCACCGAAGCGGAAGCGGAGUGGCCACACAAGAGA CUUCGACUGCCGCUUAAAAGUGUCCUGACGGCGGU CCGAACUCAGCAUACGACACACGACCCGUGCCGAU ACCUCGCGGUUGCCCGGAGCAACACCGGGUUGACGA CAGUAGAAAUCGUAACCAUGGCCACCAGGCACUUGG AGAUGUCGACGGCAGAGGCAAUGAGAAGAAACCCAGC UCGGUCAGAGCCUCAGCAUCGUGCUGCCUUAUUGUC UGCUUGUGUUUCUCUGUUUGGGUGUUCUUGUUGU GGAAGAACUGGCGCCUUAAGAAUAUCAACUCGAUUA CUUCGAUAAUCCGGUAUACCAAGAAAACCAAGAGGAU GAAGUGCAUAAUUGUCACAACCAAGAUGGCUAUUCGU ACCGUCCAGGCAAUUGGUUACAUUGAGGACGACGU GGCCUGAUAUAGGCGUCUUCUGCGGGGCUUGCCU UCUGGCCAUGCCCUUCUCUCCUUGCACCGUGUA CCUCUUGGUCUUUGAAUAAAGCCUGAGUAGGAAG</p>	
<p>LDLR1_E317A mRNA</p>	<p>GGGAAAUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAU AUAAGAGCCACCAUUGGGUCCGUGGGGUGGAAGCUU AGAUGGACAGUCGCGCUCUCCUUGCAGCAGCAGGAA CUGCGGUUGGAGAUUGAUGCGAGCGCAACGAGUCCA AUGCCAAGAUUGGGAAGUGUAUUUCGUACAAGUGGGUC UGCGAUGGAUCAGCGGAAUGUCAGGACGGAAGCGAUG AGAGCCAAGAAACAUGCCUCUCAGUGACAUGCAAGUC GGGAGACUUCUCGUGCGGAGGACGCGUAAACAGAUGU AUUCCACAGUUUUGGCGUCGGAUGGUCAGGUGGACU GCGACAAACGGUUCAGAUGAACAGGGAUGUCCUCCGAA AACGUGUCACACAAGACGAGUUUCGUGCCAUGAUGGA</p>	<p>10</p>

[0789]

<p>AAGUGCAUUUCGCGGCAGUUCGUAUGUGAUUCGGAUC GGGACUGUCUGGACGGCUCGGACGAAGCGUCAUGCCC GGUACUUAUUCGCGGCAGCCUCAUUCCAAUGCAAC AGCUC AACGUGCAUUCGCCAGCUGUGGGCCUGUGACA AUGAUCCUGAUUGUGAGGACGGUAGCGACGAGUGGCC GCAGAGAUAGGGUUUGUACGUAUCCAAGGAGAC UCAAGCCCUGUUCGGCCUUGAGUUUCACUGCCUGU CGGGUGAAUGCAUCCACUCCAGCUGGCGAUGUGAUGG UGGGCCCGACUGCAAAGUAAGAGCGACGAGGAGAAU UGCGCGGUCGCGACGUGCAGACCCG AUGAGUUC CAGU GCUCCG AUGGAAACUGCAUCCACGGGAGCCGGCAGUG UGAUCGCGAGUACGAUUGUAAGACAUUGUCAGACGAG GUCCG AUGCGUGAACGUCACGUUGUGCGAGGGUCCGA ACAAAGUUAAAGUGCCAUCGCGGAAUGUAUUCGCU CGAUAAAGUCUGCAACAUGGCGCGAGAUUGAGGGAU UGGUCAGACGAACCAUCAAGGAGUGCGGCACUAACG CAUGUUUGGACAAUACCGCGGGUGUUCGCACGUCUG CAAUGAUCUCAAUUGGGUAUGAGUGUCUCUGUCCU GACGGAUUCAGCUGGUCGCGCAGCGCAGAUUGCGAGG ACAUCGACGAGUGCCAGGACCCCGACACAUUUCGCA GUUGUGUGUCAACCUUGAAGGAGGGUAACAUGGCCAG UGCGAGGAGGGAUUUCAGCUUACCCGACACGAAAG CAUGUAAAGCGGUGGGGUCCAUGCGUAUUUGUUUU CACAACAGACAUAGAUGCGGAAGAUAGCCCUUGAU CGCAGCGAAUACGUCACUGAUCCUAAUCUUGGA AUGUCGUGGCCUUGACACGGAGGUAGCAUCAAUAG AAUCUACUGGUCCGACCUUCACAGAGAAUGAUCUGU UCAACACAGUUGGAUCGCGCGCACGGGUGUCGUCGU ACGAUACGUAUUAGCCGCGACAUCCAGCGCCAGA CGGACUCGCGGUCGACUGGAUCCAUGCAACAUUCAC UGGACAGACUCCGUGUUGGGAACCGUAUCCGUAGCUG ACACAAGGGAGUGAAGCGGAAACUCUUUUAGAGA GAACGGCAGCAAACCGAGAGCAAUCGUGGUCGAUCCG GUGCAUGGAUUCAUGUAUUGGACCGAUUGGGAAACGC CAGCCAAAUCAAGAAAGCGGUGUUUGAAUGGGGUCGA CAUCUACUCGUCUGGAGACUGAGAAUUCAGUGGCCA AACGGGAUCACCUUGGACUUGUUGCGGGGAGGUUGU AUUGGGUGGACUCAAGCUCACUCGUAUCAGCUCGAU CGACGUGAACGGCGGAAUAGGAAAACUUAUCUGAA GAUGAGAAAAGACUGGCCACCCUUCUCGUCGCGG UGUUCGAGGACAAAGUAUUUGGACAGACAUCAUCAA CGAAGCGAUUUUCAGCCAACCGCCUGACAGGGUCG GAUGCAAUCUCUUGGCCGAAACCUUCUGAGCCCGG AAGAU AUGGUCUUGUUACAAUUGACCCAACCCAG AGGUGUGAAUUGGUGCAACGGACGACAUUGUCGAAC GGAGGUUGCCAGUAUCUCUGUCUCCUGCACCCGAGA UUAUCCCCAUACCCAAGUUCACGUGUGCGUGCCC AGACGGAAUGCUUCUUGCGAGGGACAUGAGAUCCUGU CUCACCGAAGCGGAAGCGGACUGGCCACACAAGAGA CUUCGACUGUCCGCCUAAAGUGUCCUCGACGGCGGU CCGAAUCUCAGCAUACGACCACGACCCGUGCCGAU ACCUCGCGGUUGCCCGAGCAACACCGGGUUGACGA CAGUAGAAUCGUAACCAUGAGCCACGACACUUGG AGAUGUCGACGGCAGAGGCAAUGAGAAGAAACCCAGC UCGGUCAGAGCCUCAGCAUCGUGUGCCUUAUUGUC</p>
--

[0790]

	<p>UGCUUGUUGUUUCUCUGUUUGGGUGUGUUCUUGUUUGU GGAAGAACUGGCGCCUUAGAAUAUCAACUCGAUUA CUUCGAUAAUCCGGUAUACCAGAAAACACAGAGGAU GAAGUGCAUAAUUGUCACAACCAAGAUUGGCUAUUCGU ACCCGUCCAGGCAAAUUGGUUACACUUGAGGACGACGU GGCCUGAUAUAAGGCGUCCUUCUGCGGGGCUUGCCU UCUGGCCAUGCCUUCUUCUCCUUGCACCCUGUA CCUCUUGGUCUUUGAAUAAAGCCUGAGUAGGAAG</p>	
<p>LDLRI_Y336A mRNA</p>	<p>GGGAAUAAGAGAGAAAAGAGUAAGAAGAAAU AUAAGAGCCACCAUGGGUCCGUGGGGCUUGAAGCUU AGAUGGACAGUCGCGUCCUUCUUGCAGCAGCAGGAA CUGCGGUCGGAGAUCCGAGGCGCAACGAGUUCU AUGCCAAGAUUGGGAAGUUAUUCGUACAAGUGGGUC UGCGAUGGUAUCAGCGAAUGUCAGGACGGAAGCGAUG AGAGCCAAGAAACAUGCCUCUCAGUGACAUGCAAGUC GGGAGACUUCUCUGGCGGAGGACGCGUAAACAGAU AUUCACAGUUUUGGCGCUGCGAUGGUCAGGUGGACU GCGACAACGGUUCAGAUGAACAGGGAUGUCCCGAA AACGUGCUCACAAGACGAGUUUCGUCGCAUGAUGGA AAGUGCAUUUCGCGGCAGUUCGUUUGAUGAUCGGAUC GGGACUGUCUGGACGGCUCGGACGAAGCGUCAUGCCC GGUACUUAUCUGCGGGCCAGCCUUAUCCAAUGCAAC AGCUCAACGUGCAUUCGCCAGCUGGGGCCUGGACA AUGAUCCUGAUUGUGAGGACGGUAGCGCAGUUGGCC GCAGAGAUUGAGGGUUUGUACGUUUAUCCAAAGGAGAC UCAAGCCCUGUUCGCGCUUUGAGUUUCACUGCCUGU CGGGUGAUGCAUCCACUCCAGCUGGGCGAUGUGAUGG UGGGCCCGACUGCAAAGAUAAAGAGCGACGAGGAAU UGCGCGGUCGCGACGUGCAGACCCGAGUAGUUCAGU GCUCCGAUGGAAACUGCAUCCACGGGAGCCGGCAGUG UGAUCGCGAGUACGAUUGUAAGACAUGUCAGACGAG GUCGGAUGCGGUAACGUCACGUGUGCGAGGGUCCGA ACAAGUUUAAGUGCCAUUCGGGCGAAUGAUUACGCU CGAUAAAGUCUGCAACAUGGCGCGAGAUUGAGGGAU UGGUCAGACGAACCAUCAAGGAGUGCGGCACUAACG AGUGUUUGGACAAUACGGCGGGUGUUCGCACGUCUG CAUAGUUCUCAAUUUGGGGCGAGUGUCUCUGUCCU GACGGAUUCCAGCUGGUCGCGCAGCGCAGAUUGCGAGG ACAUCGACGAGUGCCAGGACCCGACACAUGUUCGCA GUUGUGUGUCAACCUUGAAGGAGGGUACAAGUGCCAG UGCGAGGAGGGAUUUCAGCUUGACCCGCACACGAAAG CAUGUAAAGCGGUGGGGUCCAUUGCGUAUUUGUUUU CACAAACAGACAUGAAGUGCGGAAGAUGACCCUUGAU CGCAGCGAAUACGUCACUGAUCCUAAUCUUAAGGA AUGUCGUGGCCUUGACACGGAGGUAGCAUCAAUAG AAUCUACUGGUCGACCCUCACAGAGAUGAUCUGU UCAACACAGUUGGAUCGGGCGCACGGGUGUCGUCGU ACGAUACGGUAAUAGCCGCGACAUCAGGCGCCAGA CGGACUCGCGGUCGACUGGAUCCAUAGCAACAUCUAC UGGACAGACUCCGUGUUGGGAACCGUAUCCGUAGCUG ACACAAAGGGAGUGAAGCGGAAAACUUCUUUUAGAGA GAACGGCAGCAAACCGAGAGCAAUCGUGGUCGUAUCCG GUGCAUGGAUUCAGUAUUGGACCGAUUGGGGAACGC CAGCCAAAUCAAGAAAGCGGCUUUGAAUGGGGUCGA</p>	<p>11</p>

[0791]

	<p>CAUCUACUCGCGUGGACUGAGAAUUAUCAGUGCCA AACGGGAUCACCUUGGACUUGUUGUCGGGGAGGUUGU AUUGGGUGGACUCAAGCUCCACUCGAUCAGUCGAU CGACUGAACGGCGGAAAUAGGAAAACUUAUUCUGAA GAUGAGAAAAGACUGGCCACCCUUCUCGUCGCGG UGUUCGAGGACAAAAGUAUUUUGGACAGACAUCAUCAA CGAAGCGAUCUUUCAGCCAACCGCCUGACAGGGUCG GAUGUCAAUCUCUUGGCCGAAAACCUUCUGAGCCCG AAGAUUUGGUCUUUUAUUCACAAUUUGACCAACCCAG AGGUGUGAAUUGGUGCGAACGGACGACAUUGUCGAAC GGAGGUUGCCAGUAUCUCUGUCUCCUGCACCCAGA UUAAUCCCCAUUCACCAAGUUCACGUGUGCGUGGCC AGACGGAUUCUUCUGCGAGGACAUGAGAUCCUGU CUCACCGAAGCGAAGCGGCAGUGGCCACACAAGAGA CUUCGACUUGCCCUUAAAGUGUCCUCGACGGCGGU CCGAACUCAGCAUACGACCACAGACCCGUGCCGAU ACCUUCGCGUUGCCCGAGCAACACCGGGGUUGACGA CAGUAGAAAUCGUAAACCAUGAGCCACCAGGACUUGG AGAUGUCGACGGCAGAGGCAAUGAGAAGAAACCCAGC UCGGUCAGAGCCUCAGCAUCGUGUGCCUUAUUGUGC UGCUUGUGUUUCUCUGUUUGGGUGUGUUCUUGUUGU GGAAGAACUGGCGCCUUAAGAAUUAACAUCGAUUA CUUCGAAAUCCGGUUAACCGAAAACACAGAGGAU GAAGUGCAUUAUUGUCACAACCAAGAUGGCUAUUCGU ACCCGUCCAGGCAAAUUGGUUAUCUUGAGGACGACGU GGCCUGAAUUAAGGCUCCUUCUGCGGGGCUUGCCU UCUGGCCAUGCCUUCUUCUCCUUGCACCUUGUA CCUUCUGGUCUUUGAAUAAAGCCUGAGUAGGAAG</p>	
<p>LDLR1_4A mRNA</p>	<p>GGGAAUUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAA AUAAGAGCCACCAUGGGUCCGUGGGGCUGGAAAGCUU AGAUGGACAGUCGCGCUCCUCCUUGCAGCAGCAGGAA CUGCGGUCGGAGAUUGAUGCGAGCGCAACGAGUCCA AUGCCAAGAUGGGAAGUGUAUUUCGUACAAGUGGGUC UGCGAUGGAUCAGCGGAAUGUCAGGACGGAAGCGAUG AGAGCCAAGAAACAUGCCUCUCAGUGACAUGCAAGUC GGGAGACUUCUCGUGCGGAGGACGCUAAACAGAUGU AUUCCACAGUUUUGGCGUGCGAUGGUCAGGUGGACU GCGACAACGGUUCAGAUGAACAGGGAUGUCCUCCGAA AACGUGCUCACAAGACGAGUUUCGUCGCAUGAUGGA AAGUGCAUUUCGCGGCGAGUUCGUAUGGUAUUCGGAUC GGGACUUCUGGACGGCUCGGACGAAGCGUUAUGCC GGUACUUAUUGCGGGCCAGCCUUAUCCAUGCAAC AGCUC AACGUGCAUCCCCAGCUGUGGGCCUGGACA AUGAUCCUGAUUGGAGGACGGUAGCGCAGGUGGCC GCAGAGAUUAGGGUUUGUACGUAUUAUCCAAGGAGAC UCAAGCCCUUGUUCGGCUUUGAGUUUCACUGCCUGU CGGGUGAAUGCAUCCACUCCAGCUGGCGAUGUGAUGG UGGGCCCGACUGCAAAGAUAAAGAGCGACGAGGAGAAU UGCGCGGUCGCGACGUCGAGACCCGUAUGAGUUCAGU GCUCCG AUGGAAACUGCAUCCACGGGAGCCGGCAGUG UGAUCGCGAGUACGAUUGUAAGACAUUGCAGACGAG GUCGGAUGCGUGAACGUCACGUUGUGCGAGGGUCCGA ACAAAGUUUAAGUGCCAUCGGGCGAAUGUAUACGCU CGAUAAAGUCUGCAACAUGGCGCGAGAUUGAAGGGAU</p>	<p>12</p>

[0792]

	UGGUCAGACGAACCCAUCAAGGAGUGCGGCACUGCAG CAUGUUUGGACAAUAACGGCGGGUGUUCGCACGUCUG CAUUGCACUCAAAAUUGGGGAGAGUGUCUCUGCCU GACGGAUUCCAGCUGGUCGCGCAGCGCAGAUUCGAGG ACAUCGACGAGUGCCAGGACCCCGACACAUUUCGCA GUUGUGUGUCAACCUUGAAGGAGGGUACAAGUGCCAG UGCGAGGAGGGAUUUCAGCUUGACCCGCACACGAAAG CAUGUAAAAGCGGUGGGGUCCAUGCGUAUUUGUUUU CACAAACAGACAUGAAGUGCGGAAGAUACCCUUGAU CGCAGCGAAUAUACGUCACUGAUCCUAAUCUUAGGA AUGUCGUGGCCUUGACACGGAGGUAGCAUCAAAUAG AAUCUACUGGUCGACCCUCACAGAGAAUGAUCUGU UCAACACAGUUGGAUCGGGCGCACGGGUGUCGUCGU ACGAUACGGUAAUAGCCGCGACAUCAGGCCCGCAGA CGGACUCGCGGUCGACUGGAUCCAUAGCAACAUCUAC UGGACAGACUCCGUGUUGGGAACCGUAUCCGUAGCUG ACACAAAGGGAGUGAAGCGGAAAACUCUUUUAGAGA GAACGGCAGCAAACCGAGAGCAUCGUGGUCGAUCCG GUGCAUGGAUUCAGUAUUGGACCGAUUGGGAAACGC CAGCCAAAUAAGAAGGGCGUUUGAAUGGGGUCGA CAUCUACUCGUGGUGACUGAGAAUUAUCAGUGGCCA AACGGGAUCACCUUGACUUGUUGUCGGGGAGGUUGU AUUGGGUGACUCAAGCUCACUCGAUCAGCUCGAU CGACGUGAACGGCGAAUAGGAAAACUAUUCUGAA GAUGAGAAAAGACUGGCCACCCUUCUCGUCGCGG UGUUCGAGGACAAAGUAUUUGGACAGACAUCAUCAA CGAAGCGAUUCUUUACGCCAACCGCCUGACAGGGUCG GAUGUCAUUCUUGGCCGAAAACCUUCUGAGCCCGG AAGAUAUGGUCUUGUUUCACAAUUGACCCACCCAG AGGUGUGAAUUGGUGCGAACGGACGACAUUGUCGAAC GGAGGUUGCCAGUAUCUCUGUCUCCUCCGACCCAGGA UUAUCCCAUUCACCCAAGUUCACGUGGCGUGCCC AGACGGAUUGCUUCUUGCGAGGGACAUGAGAUCUGU CUCACCGAAGCGGAAGCGGAGUGGCCACACAAGAGA CUUCGACUGUCGCCUUAAGUGUCCUGACGGCGGU CCGAACUCAGCAUACGACACACGACCGUGGCCGAU ACCUCGCGGUUGCCCGGAGCAACCCGGGUUGACGA CAGUAGAAUCGUAACCAUGAGCCACGACUUGG AGAUGUCGAGGAGGCAUUGAGAAAGAAACCCAGC UCGGUCAGAGCCUACGACUCGUGCCUUAUUGUGC UGCUUGUGUUUCUCUGUUUGGGUGUGUUCUUGUUGU GGAAGAUCUGGCCUUAAGAAUAUCAUCGAUUA CUUCGAUAAUCCGUUAUACAGAAAACACAGAGGAU GAAGUGCAUAAUUGUCACAACCAAGAUUGCUAUUCGU ACCGUCCAGGCAAAUUGGUUACACUUGAGGACGACGU GGCCUGAAUAAUAGGCGUCCUUCGCGGGGCUUGCCU UCUGGCCAUGCCUUCUUCUCCUUGCACCGUA CCUCUUGGUCUUUGAAUAAAGCCUGAGUAGGAAG	
일반 LDLR1 5'UTR	GGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATAT AAGAGCCACC	31
일반 LDLR1 3'UTR (마우스 기원)	TGATAATAGGCTGCCTTCTGCGGGGCTTGCTTCTGGCC ATGCCCTTCTTCTCCTTGACCTGTACTCTTGTGTCT TTGAATAAAGCCTGAGTAGGAAG	32

[0793]

[0794]

실시예 12. LDLR1 단백질 서열

[0795]

하나 이상의 돌연변이 LDL-R1 단백질의 서열이 표 5에 제공되어 있다.

표 5

단백질 서열

설명	서열	서열 번호
LDLR1_D331E 단백질	MGPWGWKLRWTVALLAAAGTAVGDR CERNEFCQD GK CISYKWVCDGSAECQDGSDESQETCLSVTCKSGDFSCGGRV NRCIPQFWRCDGQVDCDNGSDEQGCPKTCSDQDFRCHDG KCISRQFVCDSDRDCLDGSDEASCPVLTGPA SFQNSSTCI PQLWACDNDPDCEDGSDEWPQRCRGLYVFQGDSSPCSAFE FHCLSGECIHSSWRCDGGPDKDKSDEENCAVATCRPDEFQ CSDGNCIHGSRQCDREYDCKDMSDEVGCNVNLTCEGPNKF KCHSGECITLTKVNCNMARDCRDWSEPIKECGTNECLDNN GGC SHVCNELKIGYECLCPDGFQLVAQRRCEDIDECQD PDT CSQLCVNLEGGYKQCCEGFQLDPHTKACKAVGSIAYLFFT NRHEVRKMTLDRSEYTS LIPNLRNVV ALDTEV ASNRIY WSD LSQRMICSTQLDRAHGVS SYDTVISRDIQAPDGLAVDWIHS NIYWTDSVLGTYSVADTKGVKRKTLFRENGSKPRAIVVDPV HGFMYWTDWGTAKIKKGG LNVVDIYSLVTENIQWPNGIT LDLLSGRLYWVDSKLHSSIDVNGGNRKTILEDEKRLAHPF SLAVFEDKVFWDIINEAIFSANRLTGS DVNLLAENLLSPED MVLFHNLTPRGVNW CERTT LSNGGCQYLCLPAPQINPHSP KFTCACPDGMLLARDMRSCLTEAEAAVATQETSTVRLKVS STAVRTQHTTTRPV P DTSRLPGATPGLTTVEIVTMSHQALG DVAGRNEKKPSSVRALSIVLPIVLLVFLCLGVFLLWKNWR LKNINSINFDNPVYQKTTEDEVHICHNQDGYSPSRQMVSL EDDVA	33
LDLR1_L339D 단백질	MGPWGWKLRWTVALLAAAGTAVGDR CERNEFCQD GK CISYKWVCDGSAECQDGSDESQETCLSVTCKSGDFSCGGRV NRCIPQFWRCDGQVDCDNGSDEQGCPKTCSDQDFRCHDG KCISRQFVCDSDRDCLDGSDEASCPVLTGPA SFQNSSTCI PQLWACDNDPDCEDGSDEWPQRCRGLYVFQGDSSPCSAFE FHCLSGECIHSSWRCDGGPDKDKSDEENCAVATCRPDEFQ CSDGNCIHGSRQCDREYDCKDMSDEVGCNVNLTCEGPNKF KCHSGECITLTKVNCNMARDCRDWSEPIKECGTNECLDNN GGC SHVCN DLKIGYECDCPDGFQLVAQRRCEDIDECQD PDT CSQLCVNLEGGYKQCCEGFQLDPHTKACKAVGSIAYLFFT NRHEVRKMTLDRSEYTS LIPNLRNVV ALDTEV ASNRIY WSD LSQRMICSTQLDRAHGVS SYDTVISRDIQAPDGLAVDWIHS NIYWTDSVLGTYSVADTKGVKRKTLFRENGSKPRAIVVDPV HGFMYWTDWGTAKIKKGG LNVVDIYSLVTENIQWPNGIT LDLLSGRLYWVDSKLHSSIDVNGGNRKTILEDEKRLAHPF SLAVFEDKVFWDIINEAIFSANRLTGS DVNLLAENLLSPED MVLFHNLTPRGVNW CERTT LSNGGCQYLCLPAPQINPHSP KFTCACPDGMLLARDMRSCLTEAEAAVATQETSTVRLKVS STAVRTQHTTTRPV P DTSRLPGATPGLTTVEIVTMSHQALG DVAGRNEKKPSSVRALSIVLPIVLLVFLCLGVFLLWKNWR	34

[0796]

	LKNINSINFDPVYQKTTDEVHICHNQDGYSPSRQMVSL EDDVA	
LDLR1_N316A 단백질	MGPWGWKLRWTVALLAAAGTAVGDR CERNEFQCQDGK CISYKWWCDGSAECQDGSDESQETCLSVTCKSGDFSCGGRV NRCIPQFWRCDGQVDCDNGSDEQGCPPKTC SQDEF RCHDG KCISRQFVCDSDRDCLDGSDEASCPVLTCPASFOCNSSTCI PQLWACDNDPDCEDGSD EWPQRCRGLYVFGDSSPCSAFE FHCLSGECIHSSWRCDGGPDKDKSDEENCAVATCRPDEFQ CSDGNCIHGRQCDREYDCKDMSDEVGCNNVTLCEGPNKF KCHSGECITLTKVCMARDCRDWSDEPIKECGTAECLDNN GGCSHVCNDLKIGYECLCPDGFQLVAQRCEIDECQDPDT CSQLCVNLEGGYKQCCEEGFQDPHTKACKAVGSIAYLFFT NRHEVRKMTLDRSEYTSIPNLRNVVALDTEVASNRIY WSD LSQRMICSTQLDRAHGVSSYDTVISRDIQAPDGLAVD WIHS NIYWTDSVLGT VSVADTKGVKRKTLFRENGSKPRAIVVDPV HGFMWTDWGTPAKIKKGG LNVDIYSLVTENIQWPNGIT LDLLSGRLYWVDSKLSISSIDVNGGNRKTILEDEKRLAHPF SLAVFEDKVFWDIINEAIFSANRLTGS DVNLLAENLLSPED MVLFHNLTPRGVNW CERTTLSNGGCQYLCLPAPQINPHSP KFTCACPDGMLLARDMRSCLTEAEEAVATQETSTVRLKVS STAVRTOHTTTRPV PDSRLPGATPGLTTVEIVTMSHQALG DVAGRGNEKKPSSVRALSIVLPIVLLVFLCLGVFLLWKNWR LKNINSINFDPVYQKTTDEVHICHNQDGYSPSRQMVSL EDDVA	35
LDLR1_E317A 단백질	MGPWGWKLRWTVALLAAAGTAVGDR CERNEFQCQDGK CISYKWWCDGSAECQDGSDESQETCLSVTCKSGDFSCGGRV NRCIPQFWRCDGQVDCDNGSDEQGCPPKTC SQDEF RCHDG KCISRQFVCDSDRDCLDGSDEASCPVLTCPASFOCNSSTCI PQLWACDNDPDCEDGSD EWPQRCRGLYVFGDSSPCSAFE FHCLSGECIHSSWRCDGGPDKDKSDEENCAVATCRPDEFQ CSDGNCIHGRQCDREYDCKDMSDEVGCNNVTLCEGPNKF KCHSGECITLTKVCMARDCRDWSDEPIKECGTAECLDNN GGCSHVCNDLKIGYECLCPDGFQLVAQRCEIDECQDPDT CSQLCVNLEGGYKQCCEEGFQDPHTKACKAVGSIAYLFFT NRHEVRKMTLDRSEYTSIPNLRNVVALDTEVASNRIY WSD LSQRMICSTQLDRAHGVSSYDTVISRDIQAPDGLAVD WIHS NIYWTDSVLGT VSVADTKGVKRKTLFRENGSKPRAIVVDPV HGFMWTDWGTPAKIKKGG LNVDIYSLVTENIQWPNGIT LDLLSGRLYWVDSKLSISSIDVNGGNRKTILEDEKRLAHPF SLAVFEDKVFWDIINEAIFSANRLTGS DVNLLAENLLSPED MVLFHNLTPRGVNW CERTTLSNGGCQYLCLPAPQINPHSP KFTCACPDGMLLARDMRSCLTEAEEAVATQETSTVRLKVS STAVRTOHTTTRPV PDSRLPGATPGLTTVEIVTMSHQALG DVAGRGNEKKPSSVRALSIVLPIVLLVFLCLGVFLLWKNWR LKNINSINFDPVYQKTTDEVHICHNQDGYSPSRQMVSL EDDVA	36
LDLR1_Y336A 단백질	MGPWGWKLRWTVALLAAAGTAVGDR CERNEFQCQDGK CISYKWWCDGSAECQDGSDESQETCLSVTCKSGDFSCGGRV NRCIPQFWRCDGQVDCDNGSDEQGCPPKTC SQDEF RCHDG KCISRQFVCDSDRDCLDGSDEASCPVLTCPASFOCNSSTCI PQLWACDNDPDCEDGSD EWPQRCRGLYVFGDSSPCSAFE	37

[0797]

	FHCLSGECIHSSWRCDGGPDCKDKSDEENCAVATCRPDEFQ CSDGNCHGSRQCDREYDCKDMSDEVGCNVNLTCEGPNKF KCHSGECITLTK VCNMARDCRDWSDEPIKECGTNECLDNN GGCASHVCNDLKIGAECLCPDGFQVLAQRRCEDIDECQDPDT CSQLCVNLEGGYKCQCEGFQDPHTKACKAVGSIAYLFFT NRHEVRKMTLDRSEYTSIPNLRNVV ALDTEVASNRIY WSD LSQRMICSTQLDRAHGVSSYDTVISRDIQAPDGLAVDWIHS NIYWTDVSLGTVSVADTKGVKRRKTLFRENGSKPRAIVVDPV HGFMYWTDWGTPAKIKKGGGLNGVDIYSLV TENIQWPNGIT LDLLSGRLY WVDSKLSHSIDVNGGNRKTILEDEKRLAHPF SLAVFEDKVFWDIINEAIFSANRLTGSVDNLLAENLLSPED MVLFHNLTPRQVNVWCERTTLSNGGCQYLCLPAPQINPHSP KFTCACPDGMMLARDMRSCLTEAAAVATQETSTVRLKVS STAVRTQHTTTRPVPTSRPGLATPGLTTVEIVTMSHQALG DVAGRGNEKKPSSVRALSIVLPIVLLVFLCLGVFLLWKNWR LKNINSINFDPVYQKTTEDEVHICHNQDGYSPSRQMVSL EDDVA	
LDLR1_4A 단백질	MGPWGWKLRWTVALLAAAGTAVGDR CERNEFQCQDGK CISYKVVCDGSAECQDGSDESQETCLSVTCKSGDFSCGGRV NRCIPQFWRCDGQVDCDNGSDEQGCPKTCQDEFRCHDG KCISRQFVCDSDRDCLDGSDEASCPVLTGCPASFQCSNSTCI PQLWACDNDPDCEDGSDEWPQRGRGLYVFGDSSPCSAFE FHCLSGECIHSSWRCDGGPDCKDKSDEENCAVATCRPDEFQ CSDGNCHGSRQCDREYDCKDMSDEVGCNVNLTCEGPNKF KCHSGECITLTK VCNMARDCRDWSDEPIKECGTAACLDNN GGCASHVCNALKIGAECLCPDGFQVLAQRRCEDIDECQDPDT CSQLCVNLEGGYKCQCEGFQDPHTKACKAVGSIAYLFFT NRHEVRKMTLDRSEYTSIPNLRNVV ALDTEVASNRIY WSD LSQRMICSTQLDRAHGVSSYDTVISRDIQAPDGLAVDWIHS NIYWTDVSLGTVSVADTKGVKRRKTLFRENGSKPRAIVVDPV HGFMYWTDWGTPAKIKKGGGLNGVDIYSLV TENIQWPNGIT LDLLSGRLY WVDSKLSHSIDVNGGNRKTILEDEKRLAHPF SLAVFEDKVFWDIINEAIFSANRLTGSVDNLLAENLLSPED MVLFHNLTPRQVNVWCERTTLSNGGCQYLCLPAPQINPHSP KFTCACPDGMMLARDMRSCLTEAAAVATQETSTVRLKVS STAVRTQHTTTRPVPTSRPGLATPGLTTVEIVTMSHQALG DVAGRGNEKKPSSVRALSIVLPIVLLVFLCLGVFLLWKNWR LKNINSINFDPVYQKTTEDEVHICHNQDGYSPSRQMVSL EDDVA	38

[0798]

[0799]

실시예 13. Cyp7a1 서열

[0800]

CYP7A1 단백질 개방 관독 프레임을 암호화하는 서열, 및 5'UTR 및 3'UTR이 표 6에 제공되어 있다. 암호화된 단백질의 서열이 또한 나타내어져 있다.

표 6

CYP7a1 서열

설명	서열	서열번호
CYP7a1 암호화 영역	ATGATGACCACATCTTTGATTTGGGGGATTGCTATAGCAGCA TGCTGTTGTCTATGGCTTATTCTTGAATTAGGAGAAGGCAA ACGGGTGAACCACCTCTTGAGAATTGATTAATCCATACCTG GGCTGTGCTCTGCAATTTGGTGCCAATCCTCTTGAGTTCCTC AGAGCAAATCAAAGGAAACATGGTCATGTTTTACCTGCAA	39

[0801]

	ACTAATGGGAAAATATGTCCATTTCATCACAATCCCTTGTC ATACCATAAGGTGTTGTGCCCGGAAAATATTTGATTGGAA AAAATTTCACTTTGCTACTTCTGCGAAGGCATTTGGGCACAG AAGCATTGACCCGATGGATGGAAATACCACTGAAAACATAA ACGACACTTTTCATCAAAACCCTGCAGGGCCATGCCTTGAATT CCCTCACGGAAAAGCATGATGGAAAACCTCCAACGTATCATG AGACCTCAGTCTCCTCTAACTCAAAGACCGCTGCCTGGGTG ACAGAAGGGATGTATTCTTTCTGCTACCGAGTGATGTTTGAA GCTGGGTATTTAACTATCTTTGGCAGAGATCTTACAAGGCGG GACACACAGAAAAGCACATATTCTAAACAATCTTGACAACTT CAAGCAATTCGACAAAAGTCTTTCCAGCCCTGGTAGCAGGCCT CCCCATTCACATGTTTCAAGACTGCGCACAATGCCCGGAGA AACTGGCAGAGAGCTTGAGGCACGAGAACCTCCAAAAGAG GGAAAGCATCTCAGAAGTATCAGCCTGCGCATGTTTCTCAA TGACACTTTGTCACCTTTGATGATCTGGAGAAGGCCAAGAC ACACCTCGTGGTCTCTGGGCATCGCAAGCAAACACCATTC AGCGACTTTCTGGAGTTTATTTCAAATGATTAGGAACCCAGA AGCAATGAAAGCAGCTACTGAAAGAAGTAAAAGAACATTA GAGAATGCTGGTCAAAAAGTCAAGCTGGAAAGGCAATCCTAT TTGTTTGAGTCAAGCAGAACTGAATGACCTGCCAGTATTAGA TAGTATAATCAAGGAATCGCTGAGGCTTTCCAGTGCCTCCCT CAACATCCGGACAGCTAAGGAGGATTTCACTTTGCACCTTGA GGACGGTTCCTACAACATCCGAAAAGATGACATCATAGCTC TTTACCACAGTTAATGCACCTTAGATCCAGAAATCTACCCAG ACCTTTGACTTTTAAATATGATAGGTATCTTGATGAAAACG GGAAGACAAAGACTACCTTCTATTGTAATGGACTCAAGTTA AAGTATTACTACATGCCCTTTGGATCGGGAGCTACAATATGT CCTGGAAGATTGTTTCGCTATCCACGAAATCAAGCAATTTTGT ATTCTGATGCTTTCTTATTTGAAATGGAGCTTATAGAGGGC CAAGCTAAATGTCCACCTTTGGACCAAGTCCCGGGCAGGCTTG GGCATTTCGCCCCATTGAATGATATTGAATTTAAATATAAA TTCAAGCATTTG	
CYP7a1 5'UTR	GGGAAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAG AGCCACC	40
CYP7a1 3'UTR	TGATAATAGGCTGGAGCCCTCGGTGGCCATGCTTCTTGCCCT TGGGCTCCCCCAGCCCTCCTCCCTTCTGACCCGTAC CCCCGTGGTCTTTGAATAAAGTCTGAGTGGGCGGC	41
CYP7A1 단백질	MMTSLIWGIAIAACCCLWLILGIRRRQTGEPPELNLIPYLGCA LQFGANPLEFLRANQRKHGHVFTCKLMGKYVHFITNPLSYHKV LCHGKYFDWKKPHFATSACAFGHRSDPMDGN'TTENINDTFIK TLQGHALNSLTESMMENLQRIMRPPVSSNSKTAAWVTEGMYS FCYRVMFEAGYLTIFFGRDLTRRDITQKAHILNNDNFQFDKVF PALVAGLPIHMFRTAHNAREKLAESLRHENLQKRESISELISLR MFLNDTLSTFDDLEKAKTHLVVWASQANTIPATFWSLQFQIR NPEAMKAATEEVKRTLENAGQKVSLEGNPICLSQAEIENDLPVL DSIIKESLRLSSASLNIRTKEDFTLHLEDGYSNIRKDDIILYPO LMHLDPEIYDPDLTFKYDRYLDENGTKTTFYCNGLKLYYY MPFGSGATICPGRLFATHEIKQFLILMLSYFELELIEGQAKCPPLD QSRAGLGLPPLNDIEFKYKFKHL	23

[0802]

[0803]

실시예 14. NASH HCC 동물 모델

[0804]

본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 주요 작제물 및 mmRNA를 포함하는 화합물을 비-알콜성 지방간염(NASH)에 대한 동물 모델에서 시험할 수 있다. 하나의 모델은 STAM(TM) 마우스(Stelic Institute and Co, 일본 도쿄 소재)의 사용을 포함한다.

[0805]

실시예 15-20을 위한 재료

[0806]

LDLR 단백질 개방 관독 프레임, mCherry 단백질 개방 관독 프레임, 및 루시퍼라제 단백질 개방 관독 프레임을 암호화하는 서열 및 5'UTR 및 3'UTR이 표 7에 제공되어 있다. RNA의 개시 부위는 밑줄그어진 "AUG"이고, 5' UTR 및 3' UTR은 볼드체이다.

표 7

LDLR, mCherry 및 루시퍼라제 서열

명칭	서열	서열 번호
LDLR mRNA 서열	GGGAAAU AAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAU AUAAGAGCCACCAUGGGUCCGUGGGCUGGAAGCUU AGAUGGACAGUCGCGCUCCUUGCAGCAGCAGGAA CUGCGGUCGGAGAUCGAUCGAGCGCAACGAGUCCA AUGCCAAGAUGGGAAGUGUAUUUCGUACAAGUGGGU CUGCGAUGGAUCAGCGGAAUGUCAGGACGGAAGCGAU GAGAGCCAAGAAACAUGCCUCUCAGUGACAUGCAAGU CGGAGACUUCUCGUGCGGAGGACCGUAACACAGAU UAUUCCACAGUUUUGGCGCUGCGAUGUCAGGUGGAC UGCGACAACGGUUCAGAUACAAGGGAUGUCCCGGA AAACGUGCUCACAAGACGAGUUUCGUGCCAUGAUGG AAAGUGCAUUUCGCGCAGUUCGUAUGUGAUUCGGAU CGGGACUGUCUGGACGGCUCGGACGAAAGCGUCAUGCC CGGUACUUACUUGCGGGCCAGCCUCAUCCAUGCAA CAGCUCAACGUGCAUUCGCCAGCUGUGGGCCUGUGAC AAUGAUCCUGAUUGUGAGGACGGUAGCGACGAGU GGC CGCAGAGAUGUAGGGUUUUGUACGUUCCAAGGAG ACUCAAGCCCCUGUUCGCGCUUUGAGUUUCACUGCCU GUCGGGUGAAUGCAUCCACUCGAGCUGGCGAUGUGAU GUGGGCCCGACUGCAAGAUAAGAGCGACGAGGAGA AUUGCGGGUCGCGACGUCAGACCCGUAUGAUUCCA GUGUCUCCGUAUGGAAACUGCAUCCACGGAGCCGGCAG UGUGAUCGCGAGUACGAUUGUAAAGACAUGUCAGACG AGGUCGGAUGCGUGAACGUCACGUUGUGCGAGGGUCC GAACAAGUUUAAAGUGCCAUCGCGGCGAAUGUAUACG CUCGAUAAAGUCUGCAACAUGGCGCGAGAUUGUAGGG AUUGGUCAGACGAACCAUCAAGGAGUGCGGCACUAA CGAGUGUUUGGACAUAACCGCGGGUGUUCGCACGUC UGCAAUGAUCUAAAAUUGGUUAUGAGUGUCUCUGUC CUGACGGAUUCAGCUGGUCGCGCAGCGCAGAUGCGA GGACAUCGACGAGUCCAGGACCCCGACACAUGUUCG CAGUUGUGUGUCAACCUUGAAGGAGGGUACAAGUGCC AGUGCGAGGAGGGAUUUCAGCUUGACCCGCACACGAA AGCAUGUAAAAGCGGUGGGGUCCAUUGCGUAUUUGUU UUUCACAAACAGACAUGAAGUGCGGAAGAUAGACCUU GAUCGCAGCGAAUUAUCGUCACUGAUCCUAAUCUUA GGAAUGUCGUGGGCCUUGACACGGAGGUAGCAUAAA UAGAAUCUACUGGUCCGACCUUCACAGAGAAUGAUC UGUUCAACACAGUUGGAUCGGGCGCACGGGUGUCGU CGUACGAUACGGUAAUAGCCGCGACAUCCAGGCGCC AGACGGACUCGCGGUCGACUGGAUCCAUAGCAACAUC UACUGGACAGACUCCGUGUUGGGAACCGUAUCCGUAG CUGACACAAAGGGAGUGAAGCGGAAAACUCUUUUUAG AGAGAACGGCAGCAAACCGAGAGCAAUCGUGGUCGAU CCGUGCAUGGAUUCAGUAUUGGACCGAUUGGGGAA	42

[0807]

	<p>CGCCAGCCAAAUCAAGAAAGGCGGUUUGAAUGGGGU CGACAUCUACUCGCGUGGACUGAGAAUUCAGUGG CCAAACGGGAUCACCUUGGACUUGUUGUCGGGGAGGU UGUAUUGGGUGGACUCAAGCUCACUCGAUCAGCUC GAUCGACGUGAACGGCGGAAAUAGGAAAACUUAUCUC GAAGAUGAGAAAAGACUGGCCACCCUUCUCGCUCG CGGUGUUCGAGGACAAAGUAUUUUGGACAGACAUCAU CAACGAAGCGAUCUUUCAGCCAACCGCCUGACAGGG UCGGAUGUCAAUUCUCUGGCCGAAAACCUUCUGAGCC CGGAAGAU AUGGUCUUGUUUCAAAUUGACCCAACC CAGAGGUGUGAAUUGGUGCGAACGGACGACAUUGUCG AACGGAGGUUGCCAGUAUCUCUGUCUCCUGCACCCC AGAUUAAUCCCAUUCACCCAAGUUCACGUGUGCGUG CCCAGACGGAAUGCUUCUUGCGAGGGACAUGAGAUC UGUCUCACCGAAGCGGAAGCGGCAGUGGCCACACAAG AGACUUCGACUGUCCGCCUUAAGUGUCCUCGACGGC GGUCCGAACUCAGCAUACGACCACAGACCCGUGCCC GAUACCUCCGCGGUUGCCCGAGCAACACCGGGUUGA CGACAGUAGAAAUCGUAACCAUGAGCCACCAAGGCACU UGGAGAUGUCGCAGGCAGAGGCAAUGAGAAGAAACCC AGCUCGGUCAGAGCCUCAGCAUCGUGCUGCCUAAUUG UGCUGCUUGUGUUUCUGUUUGGGUGUGUUCUUGU UGUGGAAGAACUGGCCCUUAAGAAUAUCAACUCGAU UAACUUCGAUAAUCCGGUAUACCAGAAAACACAGAG GAUGAAGUGCAUUAUUGUCAACAACCAAGAUGGCUAAU CGUACCCGUCAGGCAAUUGGUAUCACUUGAGGACGA CGUGGCCUGAUAAGCUGCCUUCUGCGGGGCUUGCCU UCUGGCCAUGCCCUUCUCUCUCCCUUGCACCGUA CCUCUUGGUCUUUGAAUAAAGCCUGAGUAGGAAG</p>	
<p>mCherry mRNA 서열</p>	<p>GGGAAAUAAGAGAGAAAAGAGUAAGAAGAAAU AUAAGAGCCACCAUGGUAUCCAAGGGGAGGAGGAC AACAUGGCGAUCAUCAAGGAGUUAUGCGAUUCAAGG UGCACAUGGAAGGUUCGGUCAACGGACACGAAUUGA AAUCGAAGGAGAGGGUGAAGGAAGGCCCUAUGAAGG GACACAGACCCGGAACUCAAGGUCACGAAAGGGGGA CCACUUCUUCGCGCGGGACAUCUUCGCCCCAGU UUAUGUACGGGUCCAAGCAUAUGUGAAGCAUCCCGC CGAUUUCUGACUAUCUGAAACUCAGCUUCCCGAG GGAUUCAAGUGGGAGCGGGUCAUGAACUUGAGGAC GGGGGUGUAGUCACCGUAACCCAAGACUCAAGCCUCC AAGACGGCGAGUUAUCUACAAGGUCAAACUGCGGGG GACUAACTUUCGUCGGAUGGGCCGGUGAUGCAGAAG AAAACGAUGGGAUGGGAAGCGUCAUCGAGAGGAUG UACCCAGAAGAUUGGUGCAUUGAAGGGGAGAUCAAGC AGAGACUGAAGUUGAAAGAUUGGGGACAUUAUGAUG CCGAGGUGAAAACGACAUACAAGCGAAAAAGCCGGU GCAGCUUCCCGGAGCGUAUAUUGUAAAUAUCAAGUUG GAUAUUAUCUACACAAUAGAGGACUACACAAUUGUCG AACAGUACGAACGCGCUGAGGGUAGACACUCGACGGG AGGCAUGGACGAGUUGUACAAAUGAUAAGCUGCCU</p>	<p>43</p>

[0808]

	CUGCGGGGCUUGCCUUCUGGCCAUGCCUUCUUCU CUCCUUGCACCUGUACCUCUUGGUCUUUGAAUAAA GCCUGAGUAGGAAG	
루시퍼 라제 mRNA 서열	GGGAAAUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAA AUAAGAGCCACCAUGGAAGAUGCGAAGAACAUCAAG AAGGGACCUGCCCGUUUUACCCUUUGGAGGACGGUA CAGCAGGAGAACAGCUCCACAAGCGAUGAAACGCUA CGCCUUGUCCCCGGAACGAUUGCGUUUACCGAUGCA CAUAUUGAGGUAGACAUCACAUACGCAGAAUACUUCG AAAUGUCGGUGAGGCGUGGCCGGAAGCGAUGAAGAGAU AUGGUCUUAAACUAUAUCACCGCAUCGUGUGUGUUC GGAGAACUCAUUGCAGUUUUUCAUGCCGGUCCUUGGA GCACUUUUCAUCGGGGUCGAGUCGCGCCAGCGAACG ACAUCUACAAUGAGCGGGAACUCUUGAAUAGCAUGGG AAUCUCCCAGCCGACGGUCGUGUUUGUCUCCAAAAAG GGGUCGAGAAAUAUCCUCAACGUGCAGAAGAAGCUCC CCAUAUUAUCAAAGAUCAUAUUAUGGAUAGCAAGAC AGAUUACCAAGGGUUCAGUCGAUGUAUACCUUUGUG ACAUCGCAUUUGCCGCGCCAGGGUUUAACGAGUAUGACU UCGUCCCCGAGUCAUUUGACAGAGAUAAAACCAUCGC GCUGAUUAUGAAUUCUCCGGGUAGCACCGUUUGCCA AAGGGGUGGCGUUUGCCCAACCGCACUGCUUGUGUC GGUUCUCGCACGCUAGGGAUCCUUAUCUUUGGUAUACA GAUCAUUCGGACACAGCAAUCCUGCCGUGGUACCU UUUCAUCACGGUUUUUGGCAUGUUCACGACUCUCGGCU AUUUGAUUUUGCGGUUCAGGGUCGUACUUAUGUAUC GGUUCGAGGAAGAACUGUUUUUGAGAUCCUUGCAAG AUUACAAGAUCAGUCGGCCUCCUUGUGCCAACGCU UUUCUCAUUCUUUGCGAAAUCGACACUUAUUGUAAG UAUGACCUUUCCAAUCUGCAUGAGAUUGCCUCAGGGG GAGCGCCGUUAGCAAGGAAGUCGGGGAGGACAGUGGC CAAGCGCUUCCACCUUCCCGGAUUCGGCAGGGAUAC GGGUCACGGAGACAACAUCCGGAUCCUUAUCACGC CCGAGGGUGACGAUAAGCCGGGAGCCGUCGAAAAGU GGUCCCUUCUUUGAAGCCAAGGUCGUAGACCUCGAC ACGGGAAAACCCUCGGAGUGAACCAGAGGGGGCGAGC UCUGCGUGAGAGGGCCGAUGAUCAUUGCAGGUUACGU GAAUAACCCUGAAGCGACGAAUUGCGUGAUCGACAAG GAUGGGUGGUUGCAUUCGGGAGACAUUGCCUUAUUGG GAUGAGGAUGAGCACUUCUUUAUCGUAGAUCGACUUA AGAGCUUGAUCAAUAACAAAGGCUAUCAGGUAGCGCC UGCCGAGCUCGAGUCAAUCCUGCUCCAGCACCCCAAC AUUUUCGACGCGGAGUGGCCGGGUUGCCCGAUGACG ACGCGGGUGAGCUGCCAGCGGCCGUGGUAGUCCUCGA ACAUGGGAACAAUAGACCGAAAAGGAGAUCCGUGGAC UACGUAGCAUCACAAGUGACGACUCGGAAGAAACUGA GGGGAGGGUAGUCUUUGUGGACGAGGUCCCCAAAG GCUUGACUGGGAAGCUUGACGCUCGAAAAUCCGGGA AAUCCUGAUUAAGGCAAAGAAAGGCGGGAUUAUCGCU GUCUGAUAAAGCUGCCUUCUGCGGGGCUUGCCUUCU GGCCAUGCCUUCUUCUCCUUGCACCUGUACCU CUUGGUCUUUGAAUAAAGCCUGAGUAGGAAG	44

[0809]

[0810]

실시예 15. 포유류에서의 LDLR 생체내 연구

[0811]

저밀도 지단백질(LDL) 수용체(LDLR) mRNA(서열 번호 42에 나타난 mRNA 서열; 로 완전 변형된 5-메틸사이토신 및 유사우리딘; 5' 캡, Cap1; 서열로 나타내지 않은 160개 뉴클레오타이드의 폴리A 테일)는, 8.0µg mRNA를 둘베코 변형 이글 배지(DMEM)와 0.2mL의 최종 용적으로 되도록 혼합함으로써 리포펙타민(Lipofectamine) 2000과 착물화시켰다.

[0812]

리포펙타민 2000을 DMEM으로 12.5배 희석시키고, 등가 용적의 희석된 LDL 수용체 mRNA 용액과 혼합하였다. 샘플을 실온에서 5분 항온처리하고, 0.1mL 용적의 착물화된 mRNA 혼합물을 세마리 C57BL/6 마우스 각각의 꼬리 정맥에 주사하였다. 각각의 동물은 2.0µg의 총 용량의 LDL 수용체 mRNA를 제공받았다. 6시간 후, 동물을 희생시키고, 비장을 제거하였다. 비장세포를 표준 과정(적혈구 세포의 사전 용리 없이)에 따라 단리하고, 등가량의 사람 LDL 수용체에 특이적인 IgG 또는 대조물로서의 비-면역 IgG로 염색하였다.

[0813]

LDL 수용체의 발현을 CD11b+ 비장세포 집단에서의 게이팅과 유세포 분석법(flow cytometry)으로 평가하였다. 도 4에 도시된 바와 같이, 생체내에서 CD11b+ 비장세포 집단에서의 LDL 수용체의 발현은 비-면역 IgG로 염색된 세포(비-면역 IgG)와 비교하여 LDL 수용체 IgG로 염색된 우측으로 이동된 피크(LDLR IgG)의 존재에 의해 세가지 별개의 마우스의 각각에서 자명하였다.

[0814]

리포펙타민 단독으로 처리된 마우스의 경우, LDL 수용체 특이적인 피크가 관찰되지 않았으며, 염색은 비-면역

IgG에서 관찰된 바와 유사하였다.

[0815]

실시예 16. 마우스에서 LDLR의 생체내 발현

[0816]

LDLR -/- 마우스를 LDLR mmRNA의 생체내 발현을 시험하는데 사용한다. LDLR mmRNA를 주사에 의해 LDLR -/- 마우스에 투여한다. 마우스로부터의 조직을 LDLR 발현에 대해 실험한다. 마우스 조직의 웨스턴 블롯 분석(Western blot analysis)은 수행하여 LDLR mmRNA 투여의 결과로서의 LDLR 단백질 발현을 찾는다. 실시간 RT-PCR을 마우스 조직 상에서 수행하여 LDLR 유전자 발현을 찾는다.

[0817]

실시예 17. 펩타이드 정체의 확인

[0818]

펩타이드의 정체를 확인하기 위해 단백질을 액체 크로마토그래피-탠덤식 질량 분석법과 질량 분석법(LC-MS/MS)과 정량적 LC-다중 반응 모니터링(MRM)을 사용하여 평가할 수 있다.

[0819]

본원에 기재된 단백질 표적의 정체는 액체 크로마토그래피-탠덤식 질량 분석법과 질량 분석법(LC-MS/MS)과 정량적 LC-다중 반응 모니터링(MRM) 검정(Biognosys AG, Schlieren Switzerland)을 사용하여 평가할 수 있다. 변형된 mRNA로부터 발현된 단백질을 함유하는 HeLa 세포 용리물을 세포 용리물 중의 펩타이드의 정체를 확인하기 위해 LC-MS/MS와 정량적 LC-MRM 검정(Biognosys, Schlieren Switzerland)을 사용하여 평가한다. 동정된 펩타이드 단편을 당업계에 공지되고/되거나 기재된 방법들을 사용하여 이소형을 포함한 공지된 단백질에 대해 비교한다.

[0820]

A. 샘플 제조

[0821]

용리 완충액 중의 각각 샘플의 단백질을 1시간 동안 37°C에서 5mM 트리스(2-카복시에틸)포스핀(TCEP)과 향온처리함으로써 환원시킨다. 알킬화는 암흑 속에 실온에서 30분 동안 10mM 요오도아세트아미드를 사용하여 수행한다. 단백질을 프로테아제:단백질 비를 1:50으로 하여 트립신(서열 등급, Promega Corporation, Madison, WI)을 사용하여 펩타이드로 소화시킨다. 소화는 37°C에서 밤새 수행한다(총 소화 시간은 12시간이다). 펩타이드를 제조사의 지침에 따라 C18 스피ن 컬럼(The Nest Group, Southborough, MA)을 사용하여 질량 분광법 분석을 위해 설정한다. 펩타이드를 완전한 건조도로 되도록 건조시키고, LC 용매 A(1% 아세트오닐트릴, 0.1% 포름산(FA))에 재현탁시킨다. 모든 용매는 SIGMA-ALDRICH®(St. Louis, MO)로부터의 HPLC-등급이고, 여기서 달리 명시되지 않는 한, SIGMA-ALDRICH®(St. Louis, MO)로부터 입수된다.

[0822]

B. LC-MS/MS 및 LC-MRM

[0823]

펩타이드를 모든 질량 분광법 분석에 대해 Proxeon Easy nLC 나노-액체 크로마토그래피 시스템 상에서 패키징된 C18 컬럼(Magic AQ, 3um 입자 크기, 200µm기공 크기, Michrom Bioresources, Inc (Auburn, CA); 11cm 컬럼 길이, 75um 내경, New Objective (Woburn, MA))에 주입한다. LC 용매는 A: 0.1% FA를 갖는 물 중의 1% 아세트오닐트릴; B: 0.1% FA를 갖는 아세트오닐트릴 중의 3% 물이다. 슛건 분석을 위한 LC 구배는 120분 내 5-35% 용매 B에 이어 2분 내 35-100% 용매 B 및 8분 동안 100% 용매(총 구배 길이는 130분이다)이다. 펩타이드 발견을 위한 LC-MS/MS 슛건 시험은 표준 나노-전기분무 소스가 장착된 Thermo Scientific(Thermo Fisher Scientific)(Billerica, MA) Q Exactive 질량 분석기 상에서 수행한다. LC-MRM을 위한 LC 구배는 30분 내 5-35% 용매 B에 이어 2분 내 35-100% 용매 B 및 8분 동안 100% 용매 B(총 구배 길이는 40분이다)이다. Thermo Scientific(Thermo Fisher Scientific)(Billerica, MA) TSQ Vantage triple quadrupole 질량 분석기에는 표준 나노-전기분무 소스가 장착되어 있다. 재검량을 위한 비계획 MRM 모드에서는, 이것을 트랜지션(transition) 당 20ms의 체류 시간으로 작동시킨다. 샘플에 걸친 펩타이드의 상대적 정량을 위해, TSQ Vantage를 획득 창 길이를 4분으로 하여 계획된 MRM 모드로 작동시킨다. LC 용출물을 1.9 kV에서 전기분무하고, MRM 분석을 0.7Da의 Q1 피크 폭을 사용하여 수행한다. 충돌 에너지는 판매자의 시방서에 따라 선형 회귀에 의해 TSQ Vantage에 대해 계산된다.

[0824]

C. 검정 설계, 데이터 프로세싱 및 분석

[0825]

LC-MRM 검정의 생성을 위해, LC-MS/MS 분석으로부터의 12개의 가장 강력한 단편 이온을 계획된 LC-MRM 모드로 측정하고, 데이터를 MQUEST®(Clueteq, Karlsruhe, Germany), mProphet의 스코어링 파트를 사용하여 프로세싱

하였다(문헌 참조; Reiter et al, mProphet: Automated data processing and statistical validation for large-scale SRM experiments, Nature Methods, 2011 (8), 430-435; 이의 내용은 본원에 참고로 인용됨). 검정을 수동으로 검증하고, 정확한 단편 강도를 구하고, iRT(색인 체류 시간)를 Biognosys의 iRT-펩타이드와 비교하여 배정한다(문헌 참조; Escher et al. Using iRT, a normalized retention time for more targeted measurement of Peptides, Proteomics, 2012 (12), 1111-1121; 이의 내용은 본원에 참고로 인용됨).

[0826] 샘플 시리즈에 걸친 펩타이드 상대적 정량을 위해, 각 검정의 8개의 가장 강력한 트랜지션을 샘플 시리즈에 걸쳐 측정한다. 데이터 분석은 SpectroDive™(Biognosys, Schlieren Switzerland)을 사용하여 수행한다. 총 피크 면적을 선택된 펩타이드에 대해 비교하고, 0.05의 오류 발견률을 적용한다. 0.05 미만의 Q값을 갖는 펩타이드는 비제하며, 각각의 샘플에서 검출되지 않는 것으로 간주된다.

[0827] 실시예 18. 화학 변형을 함유하는 변형된 mRNA로부터의 펩타이드 정체의 확인

[0828] 저밀도 지단백질 수용체(LDLR) 변형된 mRNA(서열 번호 42에 나타낸 mRNA 서열; 서열로 나타내지 않은 대략 140개 뉴클레오타이드의 폴리A 테일; 5' 캡, Cap1; 5-메틸사이토신 및 유사우리딘으로 완전 변형됨)로부터 생성된 단백질을 함유하는 세포 용리물을 실시예 17에 기재된 바와 같은 정량적 LC-MRM과 LC-MS/MS를 사용하여 평가하였다. 평가된 단백질에 대해 동정된 펩타이드 단편이 표 8에 나타나 있다. 모든 펩타이드는 모 단백질에 대해 특이적이고, LDLR 및 HFE2는 모 단백질 및 이의 이소형에 대해 특이적이었다. 표 8에서, "Uniprot ID"는 펩타이드 단편 서열이 데이터베이스에서 모든 검토 단백질에 대해 블롯팅되는 경우 UniProt 데이터베이스로부터의 단백질 식별자를 나타낸다. 세포 용리물 중의 단백질을 평가하는데 사용되는 항존 단백질이 표 9에 나타나 있다.

표 8

단백질 및 펩타이드 단편 서열

단백질	펩타이드 단편 서열	펩타이드 단편 서열번호	Uniprot ID
LDLR	MICSTQLDR	45	P01130, P01130-4, P01130-3, P01130-2
LDLR	LAHPFSLAVFEDK	46	P01130, P01130-4, P01130-3, P01130-2
LDLR	NVVALDTEVASNR	47	P01130, P01130-4, P01130-3, P01130-2
LDLR	TCSQDEFR	48	P01130, P01130-4

[0829]

표 9

항존 단백질

단백질	펩타이드 단편 서열	펩타이드 단편 서열 번호	Uniprot ID
베타-액틴 (ACTB)	VAPEEHPVLLTEAPLNPK	49	P60709
글리세르알데히드-3-포스페이트 데하이드로게나제 (G3P)	VVDLMAHMASK	50	P04406
열 충격 단백질 HSP 90-베타 (HS90B)	HLEINPDHPIVETLR	51	P08238
열 충격 단백질 HSP 90-베타 (HS90B)	YIDQEELNK	52	P08238
L-락테이트 데하이드로게나제 A 쇠 (LDHA)	DQLIYNLLK	53	P00338
L-락테이트 데하이드로게나제 A 쇠 (LDHA)	GEMMDLQHGSFLR	54	P00338
포스포글리세레이트 키나제 1 (PGK1)	ALESPERPFILGGA	55	P00558
포스포글리세레이트 키나제 1 (PGK1)	LGDVYVNDAFGTAHR	56	P00558
60S 산성 리보솜성 단백질 P0 (RLA0)	IIQLDDYPK	57	P05388

[0830]

[0831]

실시예 19. 세포 배양물 중의 저밀도 지단백질 수용체 발현의 검출

[0832]

A. HeLa 세포 형질감염

[0833]

HeLa 세포를 표준 세포 배양 조건하에서 밤새 배양한 10% 태아 송아지 혈청(FCS, Life Technologies, Grand Island, NY) 및 1X glutamax 시약(Life Technologies, Grand Island, NY)이 보충된 이글 최소 필수 배지(EMEM, Life Technologies, Grand Island, NY) 중에서 24-웰 접시(Corning Life Sciences, Tewksbury, MA)(7.5 x 10⁴ 개 세포/웰)에 플레이팅하였다. 250ng의 저밀도 지단백질 수용체(LDLR) 변형된 mRNA(서열 번호 42에 나타낸 mRNA 서열; 서열로 나타내지 않은 대략 140개 뉴클레오타이드의 폴리A 테일; 5'캡, Cap1; 5-메틸사이토신 및 유사우리딘으로 완전 변형됨), mCherry 변형된 mRNA(서열 번호 43에 나타낸 mRNA 서열; 서열로 나타내지 않은 대략 160개 뉴클레오타이드의 폴리A 테일; 5'캡, Cap1; 5-메틸사이토신 및 유사우리딘으로 완전 변형됨) 또는 루시페라제 변형된 mRNA(서열 번호 44에 나타낸 mRNA 서열; 서열로 나타내지 않은 대략 160개 뉴클레오타이드의 폴리A 테일; 5'캡, Cap1; 5-메틸사이토신 및 유사우리딘으로 완전 변형됨)와 50μl Opti-MEM 시약(Life Technologies, Grand Island, NY)을 제1 튜브 중에서 혼합하고 1μl의 L2000 형질감염 시약(Life Technologies, Grand Island, NY)을 50μl의 Opti-MEM 중에서 제2 튜브에서 배합함으로써 처리하고자 하는 각 웰에 대해 형질감염 용액을 제조하였다. 제조 후, 제1 및 제2 튜브를 각각의 내용물을 배합하기 전에 실온에서 5분 동안 항온처리하였다. 배합된 형질감염 용액을 실온에서 15분 동안 항온처리하였다. 그후, 100μl의 형질감염 용액을 각 웰에 가하였다. 세포를 연속 분석 전에 추가로 16시간 동안 배양하였다.

[0834]

B. 유세포 분석법에 의한 LDLR 검출

[0835]

형질감염 후, 배지를 세포로부터 제거하고, 60μl의 0.25% 트립신(Life Technologies, Grand Island, NY)을 각 웰에 가하였다. 세포를 240μl/웰의 트립신 억제제(Life Technologies, Grand Island, NY)의 첨가 전에 2분 동안 트립신화하였다. 생성된 세포 용액을 96 웰 플레이트(Corning Life Sciences, Tewksbury, MA)로 옮기고,

세포를 원심분리(5분 동안 800 x 중력)에 의해 펠렛화하고, 상청액은 버렸다. 세포 펠렛을 PBS로 세척하고, Foxp3 고정/침투 용액(eBioscience, San Diego, CA) 중에서 45분 동안 재현탁시켰다. 세포를 원심분리(5분 동안 800 x 중력)에 의해 다시 펠렛화하고, 침투 완충액(eBiosciences, San Diego, CA) 중에서 10분 동안 재현탁시켰다. 세포를 원심분리(5분 동안 800 x 중력)에 의해 다시 펠렛화하고, 침투 완충액에서 세척하였다. 그 후, 세포를 LDLR에 대해 지시된 1차 항원으로 처리한 다음, 피코에리트린-표지된 이차 항체로 처리하였다. 그 후, 표지된 세포를 FACS 완충액(1% 소 혈청 알부민 및 0.1% 나트륨 아지드를 갖는 PBS)과 배합하고, 클러스터 튜브로 옮겼다. 그 후, 도 5에 나타낸 바와 같이, 표지된 세포를 BD Accuri(BD Biosciences, San Jose, CA)를 사용하여 유세포 분석법으로 분석하였다.

[0836] C. 면역형광법에 의한 LDLR 검출

[0837] 형질감염된 세포를 PBS로 세척하고, 고정 용액(4% 포름알데히드를 갖는 PBS)로 실온에서 20분 동안 처리하였다. 그 후, 세포를 PBS로 세척하고, 침투/차단 용액(5% 소 혈청 알부민과 0.1% Tween-20을 갖는 Tris 완충 염수)로 처리하였다. 세포를 0.05% Tween-20을 함유하는 PBS로 3회 세척하기 전에 부드럽게 교반하면서 실온에서 2시간 동안 항온처리하였다. 그 후, 세포를 1차 항체(염소 항-LDLR, R&D Systems, Minneapolis, MN) 또는 정상 IgG 대조물로 또는 이들 없이 실온에서 2시간 동안 처리하고, 0.05% Tween-20을 함유하는 PBS로 3회 세척하고, 형광 표지(R&D Systems, Minneapolis, MN)를 갖는 당나귀 항-염소 IgG의 1:200 희석액을 함유하는 이차 항체 용액으로 처리하였다. 세포를 0.05% Tween-20을 함유하는 PBS로 다시 세척하고, 형광 현미경 영상법으로 검사하였다. 루시퍼라제 또는 mCherry를 일시적으로 발현하는 세포를 형광 면역염색 없이 형광 현미경법으로 검사하였다.

[0838] 실시에 20. 저밀도 지단백질 수용체(LDLR) 발현

[0839] A. 시험관내 LDLR 발현

[0840] 사람 배아 신장 상피(HEK293) 세포(LGC standards GmbH, Wesel, Germany)를 6-웰 플레이트(BD Biosciences, San Jose, USA) 상에 시딩하였다. HEK293을 3mL 세포 배양 배지 중에서 웰 당 약 500,000개 세포의 밀도로 시딩하였다. 리포펙타민 단독 또는 LDLR mRNA(서열 번호 42에 나타낸 mRNA; 5-메틸사이토신 및 1-메틸유사우리딘으로 완전 변형됨; 5'캡, cap 1, (서열로 나타내지 않은) 대략 160개 뉴클레오타이드의 폴리A 테일)를 함유하는 리포펙타민 또는 G-CSF mRNA(서열 번호 30에 나타낸 mRNA; 5-메틸사이토신 및 유사우리딘으로 완전 변형됨; 5'캡, cap1; 서열로 나타내지 않은 대략 160개 뉴클레오타이드의 폴리A 테일)의 대조물을 함유하는 리포펙타민을 웰 당 4000, 800, 400, 40, 및 4ng의 LDLR 변형된 mRNA의 양으로 세포에 시딩한 직후 가하고, 항온처리하였다. 37°C에서 18시간의 항온처리 후, 세포를 세척하고, 고정하고, 염색하였다. G-CSF mRNA 형질감염 세포를 항-LDLR 항체로 처리하고, LDLR 형질감염 세포의 하나의 세트를 대조군으로서 정상 염소 IgG로 처리하였다. 결합된 1차 항체를 피코에리트린(PE)-표지된 이차 항체로 처리한 후 FACS 분석으로 검출하였다.

[0841] 도 6a에 나타낸 바와 같이, FACS 분석의 결과는 모든 게이팅된 살아있는 세포의 74.8%가 800ng 용량의 LDLR mRNA에서 LDLR을 발현하는 것으로 검출되었음을 보여준다. 40ng 용량의 LDLR mRNA에서, 모든 게이팅된 살아있는 세포의 11.6%가 LDLR을 발현하는 것으로 검출되었다. 대조군 비면역 IgG로 염색된 LDLR mRNA 처리된 세포에서는 염색이 관찰되지 않았다. G-CSF mRNA로 형질감염된 세포에서는 LDLR 양성 세포가 검출되지 않았다.

[0842] B. 단백질 추적

[0843] 사람 배아 심장 상피(HEK293) 세포(LGC standards GmbH, Wesel, Germany)를 6-웰 플레이트(BD Biosciences, San Jose, USA) 상에 시딩하였다. HEK293을 3mL 세포 배양 배지 중에서 웰 당 약 500,000개 세포의 밀도로 시딩하였다. 리포펙타민 단독 또는 LDLR mRNA(서열 번호 42에 나타낸 mRNA; 5-메틸사이토신 및 1-메틸유사우리딘으로 완전 변형됨; 5'캡, cap 1, (서열로 나타내지 않은) 대략 160개 뉴클레오타이드의 폴리A 테일)를 함유하는 리포펙타민 또는 G-CSF mRNA(서열 번호 30에 나타낸 mRNA; 5-메틸사이토신 및 유사우리딘으로 완전 변형됨; 5'캡, cap1; 서열로 나타내지 않은 대략 160개 뉴클레오타이드의 폴리A 테일)의 대조물을 함유하는 리포펙타민을 웰 당 세포를 시딩한 직후 가하고, 항온처리하였다. 15시간 후 형질감염 배지를 완전 배지로 교체하였다. 형질감염된 세포를 배지를 교체한지 0, 2, 4, 8, 24, 48, 및 72시간 후에 수확하였다. 형질감염된 세포를 피코에리트린(PE)에 접합된 항-LDLR 항체로 처리하고, LDLR 형질감염된 세포의 하나의 세트를 대조물로서 PE에 접합된 정상 염소 IgG로 처리하였다. 결합된 1차 항체를 상기한 바와 같이 FACS 분석으로 검출하였다.

[0844] 도 6b에 나타낸 바와 같이, FACS 분석은 모든 게이팅된 살아있는 세포의 ~65%가 형질감염 배지로 세척한 후 0.0-h 시점(형질감염한지 15.0-h 후)에서 LDLR을 발현하는 것으로 검출됨을 보여준다. 양성 세포 퍼센트는 시간에 따라 37°C에서 감소하여, 형질감염 배지를 제거한지 24h 후까지, LDLR은 검출되지 않았다.

[0845] C. BODIPY®-표지된 LDLR

[0846] 발현된 LDLR이 기능적인지를 평가하기 위해, BODIPY® 표지된 LDL(Life Technologies, Woburn, MA)을 사용하였다. HEK293 세포를 LDLR 변형된 mRNA(서열 번호 42에 나타낸 mRNA; 5-메틸사이토신 및 1-메틸유사우리딘으로 완전 변형됨; 5'캡, cap 1, (서열로 나타내지 않은) 대략 16개 뉴클레오타이드의 폴리A 테일) 또는 G-CSF 변형된 mRNA(서열 번호 30에 나타낸 mRNA; 5-메틸사이토신 및 유사우리딘으로 완전 변형됨; 5'캡, cap1; 서열로 나타내지 않은 대략 160개 뉴클레오타이드의 폴리A 테일)로 밤새 형질감염시키고, 세포를 세척하고, 증가량의 BODIPY-LDL와 항온처리하였다. 37°C에서 1.0-h 동안의 항온처리 후, 세포를 세척하고, BODIPY-LDL의 결합을 FACS로 평가하였다. LDLR mRNA 형질감염된 세포에 대한 BODIPY-LDL의 결합은 고 친화도(Kd ~60ng/mL)이고, 도 6c에 도시된 바와 같이 가포화성이었다. 대조적으로, G-CSF 변형된 mRNA으로 형질감염된 세포에 대해서는 결합이 관찰되지 않았다.

[0847] LDL 결합 특이성을 평가하기 위해, LDL-BODIPY 결합 신호가 비표지된 LDL과의 경쟁에 의해 감소될 수 있는지에 대해 조사하였다. HEK293 세포를 LDLR 및 대조군으로서의 G-CSF mRNA로 밤새 형질감염시켰다. 0.5ug/mL의 LDL-BODIPY를 0.01, 0.1, 0.5, 1.0, 10, 100 또는 500ug/mL의 비표지된 BODIPY를 갖는 형질감염된 세포에 동시에 가하였다. 표지된 LDL에 대해 유세포 분석법을 통해 양성으로 검출된 살아있는 게이팅된 형질감염된 세포의 퍼센트가 표 10에 나타내어져 있다. LDL-BODIPY 신호는 더 많은 비표지된 LDL가 첨가될수록 점진적으로 감소되었다.

표 10

퍼센트 표지된 LDL 염색 퍼센트

비표지된 LDL 농도 (ug/mL)	검출된 표지된 세포 (%)
0	100
0.01	97.7
0.1	59.0
0.5	64.1
1	76.0
10	48.4
100	3.2
500	0.9

[0848]

[0849] 경쟁 연구에서, BODIPY-LDL의 결합은 비표지된 LDL에 의해 용량-의존적 방식으로 감소될 수 있었다(도 6d). 이러한 데이터는 LDLR mRNA를 발현하는 세포에 대한 BODIPY-LDL의 결합이 가포화성이고, 특이적이며, 높은 친화도를 가짐을 보여준다.

[0850] 생체내 LDLR mRNA의 발현이 혈장 콜레스테롤의 수준을 감소시킬 수 있는지를 평가하기 위해, LDLR 녹아웃 마우스(Jackson Laboratories, Bar harbor, Maine)를 리포펙타민 2000 중의 2.0mg의 LDLR mRNA의 단일 0.1mL 정맥내 주사에 의해 처리하거나, 리포펙타민 2000 단독(도 6e에서 "음성"으로 나타냄)을 주사하였다. 24.0-h 후, 혈청을 각 마우스로부터 분리하고, 크기 배제 크로마토그래피에 의한 급속 단백질 액체 크로마토그래피(FPLC)에 분별하였다. 양성 대조군으로서, 활성 단백질 사람 성장 호르몬(Abcam Cat# ab116162)을 또한 사용하였다(도 6e에서 "성장 호르몬"으로 나타냄). 각 분획의 총 콜레스테롤 함량이 도 6e에 나타내어져 있다. SDS-PAGE 분석은, apo B 함유 지단백질(VLDL, IDL 및 LDL)이 분획 3-5로 제한되었음을 보여주었다. 분획 3 내지 6의 평균 총 콜레스테롤은 음성 대조군의 경우 416.1ug, 양성 대조군(성장 호르몬)의 경우 409.0ug, mRNA 암호화 LDLR이 투여된 마우스의 경우 321.3ug이었다. 비히클의 주사에 비해, LDLR mRNA의 단일 주사에 의한 LDLR 녹아웃 마우스의 처리는 VLDL+IDL+LDL 분획 중의 콜레스테롤 함량을 대략 20%까지 감소시켰다. 이러한 데이터는 LDLR 녹아웃 마우스에서의 LDLR mRNA의 발현이 콜레스테롤-풍부 지단백질의 혈청 수준을 감소시킬 수 있음을 보여준다.

[0851] 실시예 21. 화학 변형을 함유하는 변형된 mRNA로부터의 펩타이드 정체의 확인

[0852] 5-메틸사이토신 및 유사우리딘으로 완전 변형되거나(5mC 및 pU), 5-메틸사이토신 및 1-메틸유사우리딘으로 완전

변형되거나(5mC 및 1mpU), 유사우리딘(pU)으로 완전 변형되거나, 1-메틸유사우리딘(1mpU)으로 완전 변형되거나, 우리딘 잔기의 25%는 2-티오우리딘으로 변형되고 사이토신 잔기의 25%는 5-메틸사이토신으로 변형된(s2U 및 5mC) 저밀도 지단백질 수용체(LDLR) 변형된 mRNA(서열 번호 42에 나타난 mRNA 서열; 서열로 나타내지 않은 대략 140개 뉴클레오타이드의 폴리A 테일; 5'캡, Cap1) 및 LDLR-PCSK9-4A 변형된 mRNA(서열 번호 12에 나타난 mRNA 서열; 서열로 나타내지 않은 대략 140개 뉴클레오타이드의 폴리A 테일; 5'캡, Cap1)로부터 제조된 단백질을 함유하는 세포 용리물을 실시예 17에 기재된 바와 같이 정량적 LC-MRM과 LC-MS/MS을 사용하여 평가하였다. 평가된 단백질에 대해 동정된 펩타이드 단편이 표 11에 나타내어져 있다.

표 11

단백질 및 펩타이드 단편 서열

	펩타이드 단편 서열번호	5mC 및 pU	5mC 및 1mpU	s2U 및 5mC	pU	1mpU
LDLR						
AVGSIAYLFFTN R	58	YES	YES	-	YES	YES
SEYTSILIPPLR	59	-	YES	-	-	YES
LDLR-PCSK9-4A						
AVGSIAYLFFTN R	58	YES	YES	-	YES	YES
IGAELCLPDGFQ LVAQR	60	YES	YES	-	-	YES
TCSQDEFR	48	YES	YES	-	-	YES

[0853]

[0854]

실시예 22. 야생형 LDLR 및 PCSK9 결합 결손 LDLR 변형된 mRNA의 설계 및 합성

[0855]

A. LDLR 변형된 mRNA

[0856]

암호화 LDLR을 암호화하는 변형된 mRNA(서열 번호 42에 나타난 mRNA 서열; 서열로 나타내지 않은 대략 160개 뉴클레오타이드의 폴리A 테일; 5'캡, Cap1; 1-메틸유사우리딘 및 5-메틸유사우리딘으로 완전 변형됨)를 이전에 기재된 바와 같이 합성하였다. 변형된 mRNA 산물을 Agilent 2100 바이분석기를 사용하여 분석하였으며, 도 7에 나타난 바와 같이, ~2.8Kb의 예상된 크기의 단일 밴드가 관찰되었다.

[0857]

B. PCSK9 결합 결손 LDLR 변형된 mRNA

[0858]

사람 PCSK9 결합 결손 LDLR을 암호화하는 변형된 mRNA를 상기한 바와 같이 합성한다. 변형된 mRNA는 Y336A(서열번호 37), E317A(서열번호 36), N316A(서열번호 35), L339D(서열번호 34), 또는 D331E(서열번호 33)와 같은 단일 아미노산 치환을 갖는 PCSK9 결합 결손 돌연변이 LDLR 또는 아미노산 치환: N316A, E317A, Y336A 및 D331A(서열번호 38)(여기서, 예를 들면, "N316A"는 316 위치의 아미노산 아스파라긴이 아미노산 알라닌으로 치환됨을 의미한다)을 갖는 사중 돌연변이 변이체를 암호화한다. 돌연변이된 LDLR mRNA는 본원에 기재된 화학 변형을 추가로 포함한다. 변형된 mRNA 산물의 확인은 바이오분석기 및 펩타이드 소화와 같은 당업계에 공지된 방법으로 수행한다.

[0859]

실시예 23. LDLR 변형된 mRNA의 시험관내 발현

[0860]

사람 배아 신장 293(HEK293) 세포를 리포펙타민 단독, LDLR을 암호화하는 변형된 mRNA를 함유하는 리포펙타민(서열 번호 42에 나타난 mRNA 서열; 서열로 나타내지 않은 대략 160개 뉴클레오타이드의 폴리A 테일; 5'캡, Cap1; 1-메틸유사우리딘 및 5-메틸사이토신으로 완전 변형됨) 또는 G-CSF를 암호화하는 변형 RNA를 함유하는 리포펙타민의 대조군(서열 번호 30에 나타난 mRNA 서열; 서열로 나타내지 않은 대략 160개 뉴클레오타이드의 폴리A 테일; 5'캡, Cap1; 1-메틸유사우리딘 및 5-메틸사이토신으로 완전 변형됨)으로 형질감염시켰다. 37°C에서 18 시간 항온처리 후, 세포를 세척하고, 고정하고, 피코에리트린(PE)-표지된 항-사람 LDLR 항체(R&D Systems, Minneapolis, MN; 사람 LDL R 친화도 정제된 다중클론성 AbAF2148) 또는 PE-표지된 염소 비-면역 IgG(R&D Systems, Minneapolis, MN; R&D Systems 정제된 염소 IgG R&D Systems 카탈로그 번호 AC-108-C)로 염색하였다. PE에 대한 접합을 Innova biosciences lightning-link 접합 키트(Lightning-Link R-PE 항체 표지화 키트 Novus Biologicals 카탈로그 번호: 703-0010)로 완료하였다.

[0861] 사람 LDLR의 발현을 유세포 분석법으로 모니터링하였다. 증가량(4-4000ng)의 LDLR 변형된 mRNA로의 형질감염은 PE-표지된 항-LDLR IgG로 염색된 세포의 퍼센트를 증가시켰지만, G-CSF 변형된 mRNA의 대조군으로 형질감염된 세포에서는 그렇지 않았다. LDLR을 암호화하는 800ng의 변형된 mRNA의 형질감염이 도 8에 나타내어져 있다. LDLR 변형된 mRNA로 형질감염된 세포에서 PE-표지된 비-면역 IgG로 검출된 양성 염색은 없었다.

[0862] LDLR 발현은 형질감염시킨지 8 내지 24시간에 피크에 도달하였다가 그후 감소하였다.

[0863] 실시예 24. LDLR의 검출

[0864] 사람 배아 신장 293(HEK293) 세포를 were transfected with LDLR을 암호화하는 변형된 mRNA를 함유하는 리포펙타민(서열 번호 42에 나타낸 mRNA 서열, 서열로 나타내지 않은 대략 160개 뉴클레오타이드의 폴리A; 5'캡, Cap1; 1-메틸유사우리딘 및 5-메틸사이토신으로 완전 변형됨) 또는 G-CSF를 암호화하는 변형된 mRNA를 함유하는 리포펙타민의 대조군(서열 번호 30에 나타낸 mRNA 서열; 서열로 나타내지 않은 대략 160개 뉴클레오타이드의 폴리A 테일; 5'캡, Cap1; 1-메틸유사우리딘 및 5-메틸사이토신으로 완전 변형됨). 37°C에서 16시간의 항온처리 후, 세포를 세척하고, 완전 성장 배지로 교체하였다. 세포를 수확하고, 형질감염한지 0, 2, 4 및 8시간 후에 LDLR에 대해 염색하였다. 도 9에 나타낸 바와 같이, LDLR은 형질감염 후 살아있는 세포의 68.1%에서 검출되었으며, 형질감염 배지의 부재하에서 8시간째에 27.6%로 감소하였다. 도 9에서, 컬럼 1 및 2는 LDLR을 암호화하는 mRNA로 형질감염되었고, 컬럼 3은 G-CSF를 암호화하는 대조군 mRNA로 형질감염되었다. 컬럼 1 및 3은 피코에리트린(PE)-표지된 항-사람 LDLR 항체(R&D Systems, Minneapolis, MN; 사람 LDL R 친화도 정제된 다중클론성 AbAF2148)로 염색되었고, 컬럼 2는 대조군으로서 PE에 접합된 염소 IgG(R&D Systems, Minneapolis, MN; R&D Systems 정제된 염소 IgG R&D Systems 카탈로그 번호 AC-108-C)로서 염색되었다. PE에 대한 접합을 Innova biosciences lightning-link 접합 키트(Lightning-Link R-PE 항체 표지화 키트 Novus Biologicals 카탈로그 번호: 703-0010)로 완료하였다.

[0865] 실시예 25. PCSK9 결합 결손 LDLR 변형된 mRNA의 시험관내 발현

[0866] 사람 및 마우스 야생형 LDLR 및 사람 PCSK9 결합 결손 LDLR을 암호화하는 변형된 mRNA를 본원에 기재된 바와 같이 합성한다. 변형된 mRNA를 당업계에 공지된 방법으로 HEK293 세포로 형질감염시켰다. 야생형 LDLR 및 PCSK9 결합 결손 LDLR 돌연변이체의 발현을 형질감염 후 스크리닝하여 최고 발현하는 변형된 mRNA를 측정하였다.

[0867] 실시예 26. Hep-G2 세포에서의 LDLR의 PCSK9 하향-조절

[0868] 사람 간 세포 암종(Hep-G2) 세포를 완전 배지(10% 지단백질 결손 혈청을 갖는 DMEM 배지(Intracel Resources, Frederick, MD))에서 배양하여 내인성 LDLR을 하향 조절한다. PCSK9에 의한 LDLR 발현의 하향-조절은 공지된 방법(예를 들면, 문헌 참조: Lipari et al., Furin-cleaved Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 (PCSK9) Is Active and Modulates Low Density Lipoprotein Receptor and Serum Cholesterol Levels. J Biol Chem. 2012, 287(52): 43482-43491; McNutt et al. Antagonism of Secreted PCSK9 Increases Low Density Lipoprotein Receptor Expression in HepG2 Cells. J Biol Chem. 2009. 284(16): 10561-10570; 이들 각각은 전문가 본원에 참고로 인용됨)으로 평가될 것이다.

[0869] LDLR 발현의 하향-조절을 평가하는 한 가지 방법은 Hep-G2 세포를 본원에 기재된 바와 같이 야생형 LDLR 변형된 mRNA 또는 PCSK9 결합 결손 LDLR 변형된 mRNA로 형질감염시키는 것이다. Hep-G2 세포를 완전 배지에서 배양하여, LDLR 변형된 mRNA로 형질감염 전에 내인성 LDLR을 하향-조절한다. 37°C에서 24시간 항온처리 후, 야생형 LDLR 또는 PCSK9 결합 결손 LDLR을 암호화하는 변형된 mRNA로의 형질감염으로부터의 LDLR의 대사회전율(turnover)을 외인성 PCSK9(R & D Systems, Minneapolis, MN)의 존재 및 부재하에서 세포 용리물의 웨스턴 블롯 분석(PROTEIN SIMPLE™, Santa Clara, CA)에 의해 및 유세포 분석법(예를 들면, FACS sorting)에 의해 평가한다. 가장 PCSK9-무감각 LDLR을 암호화하는 변형된 mRNA를 구한다.

[0870] 실시예 27. 간 세포 형질도입 제형

[0871] 지질 나노입자(LNP)를 당업계에 공지되고, 본원에 기재되고/되거나 전문이 본원에 참고로 인용된 "변형된 뉴클레오타이드, 뉴클레오타이드, 및 핵산 조성물"이라는 발명의 명칭의 제PCT/US2012/069610호에 기재된 방법을 사용하여 제형화한다. 본원에 사용된 LNP는 이온화 가능한 지질 DLin-KC2-DMA 또는 양이온성 지질 C12-200을 포함할 수 있다.

[0872] 루시페라제를 암호화하는 변형된 mRNA(예를 들면, 서열 번호 44; 서열로 나타내지 않은 적어도 140개 뉴클레오타이드의 폴리A 테일; 5' 캡, Cap1; 본원에 기재된 적어도 하나의 화학 변형으로 변형됨)는 DLin-KC2-DMA 또는 C12-200을 포함하는 LNP에서 제형화한다. 제형화된 루시페라제를 야생형 마우스 및 LDLR 결손 마우스에게 투여한다. 야생형 및 LDLR 결손 마우스의 간 세포에서의 루시페라제의 발현은 당업계에 공지되거나 본원에 기재된 방법을 사용하여, 변형된 mRNA의 투여 후 소정의 간격으로 측정한다. 영상화하기 20분 전에, 마우스에게 D-루시페린 용액을 150mg/kg으로 하여 복강내 주사한다. 동물을 마취하고, IVIS lumina II 영상화 시스템(Perkin Elmer, Waltham, MA)으로 영상을 획득한다. 생물발광을 총 플럭스(광자/초)로서 측정한다.

[0873] 실시예 28. 마우스에서의 LDLR의 생체내 발현

[0874] LDLR -/- 마우스를 사용하여 야생형 사람 또는 뮤린 LDLR을 암호화하거나 PCSK9 결함 결손 사람 또는 뮤린 LDLR을 암호화하는 변형된 mRNA(총괄하여, "LDLR 변형된 mRNA")의 생체내 발현을 시험한다. 지질 나노입자 중서 제형화된 LDLR 변형된 mRNA를 0.005-0.5mg/kg(예를 들면 0.005mg/kg, 0.010mg/kg, 0.015mg/kg, 0.020mg/kg, 0.030mg/kg, 0.040mg/kg, 0.050mg/kg, 0.1mg/kg, 0.2mg/kg, 0.3mg/kg, 0.4mg/kg 및 0.5mg/kg)의 증가량의 LDLR 변형된 mRNA를 함유하는 0.1mL 정맥내 주사를 통해 LDLR -/- 마우스에 투여한다. 마우스를 주사한지 2시간 내지 96시간(예를 들면, 2hr, 2.5hr, 3hr, 3.5hr, 4hr, 5hr, 6hr, 7hr, 8hr, 9hr, 10hr, 12hr, 24hr, 48hr, 72hr 및 96hr) 후와 같은 다양한 시간에 희생시킨다. 간을 절개하고, 세포 용리물 및 간을 분석용으로 제조한다. mRNA 전사체에서의 LDLR 단백질 발현 및 약물 수준 변화는 항-LDLR 항체를 사용한 웨스턴 블롯 분석으로 측정하고, 마우스 조직에서의 변형된 LDLR mRNA의 발현은 실시간 RT-PCR로 분석한다. 혈청을 변형된 mRNA의 주사 후 다양한 시점에서 수집하고, 마우스 LUMINEX® 패널을 사용하여 사이토킨 패널에 대해 분석한다. 나머지 혈청은 VLDL+IDL+LDL 콜레스테롤의 검증을 위해 FPLC에 의해 분별할 것이다(문헌[참조; Garber et al. A sensitive and convenient method for lipoprotein profile analysis of individual mouse plasma samples. Journal of Lipid Research. 2000. 14: 1020-1026; 전문이 본원에 참고로 인용됨]에 기재된 방법 참조).

[0875] 추가의 연구에서, LDLR -/- 마우스에게 야생형 사람 또는 뮤린 LDLR을 암호화하거나 PCSK9 결함 결손 사람 또는 뮤린 LDLR을 암호화하는 변형된 mRNA를 1회 이상 투여한다. 혈청을 변형된 mRNA의 주사 후 다양한 시점에서 수집하고, 마우스 LUMINEX®패널을 사용하여 사이토킨 패널에 대해 분석하고, VLDL+IDL+LDL 콜레스테롤에 대해 검정한다. 마우스를 또한 희생시키고, 간을 절개하고, 세포 용리물을 분석용으로 제조한다.

[0876] 실시예 29. 와타나베(WHHL) 토끼에서의 LDLR의 생체내 발현

[0877] 와타나베(WHHL) 토끼를 사용하여, 야생형 사람 LDLR을 암호화하거나 PCSK9 결함 결손 사람 LDLR을 암호화하는 변형된 mRNA("LDLR 변형된 mRNA")의 생체내 발현을 시험한다. 지질 나노입자 중에서 제형화된 LDLR 변형된 mRNA를 0.005-0.5mg/kg(예를 들면, 0.005mg/kg, 0.010mg/kg, 0.015mg/kg, 0.020mg/kg, 0.030mg/kg, 0.040mg/kg, 0.050mg/kg, 0.1mg/kg, 0.2mg/kg, 0.3mg/kg, 0.4mg/kg 및 0.5mg/kg)의 LDLR 변형된 mRNA를 함유하는 주사를 통해 토끼에게 투여한다. WHHL 토끼를 주사한지 2시간 내지 96시간 후(예를 들면, 2hr, 2.5hr, 3hr, 3.5hr, 4hr, 5hr, 6hr, 7hr, 8hr, 9hr, 10hr, 12hr, 24hr, 48hr, 72hr 및 96hr) 희생시키고, 간을 절개하고, 세포 용리물을 분석용으로 제조한다. mRNA 전사체에서의 LDLR 단백질 발현 및 변화를 항-LDLR 항체를 사용하여 웨스턴 블롯 분석에 의해 세포 용리물에서 측정하고, 토끼 조직에서의 LDLR의 발현을 실시간 RT-PCR로 분석한다. 혈청을 변형된 mRNA의 주사 후 다양한 시점에서 수집하고, 사이토킨 패널에 대해 분석하고 VLDL+IDL+LDL 콜레스테롤에 대해 검정한다.

[0878] 실시예 30. LDLR 결손 돼지에서의 LDLR의 생체내 발현

[0879] LDLR 결손 돼지(Exemplar Genetics, Sioux Center, IA)를 사용하여, 야생형 사람 LDLR을 암호화하거나 PCSK9 결함 결손 사람 LDLR을 암호화하는 변형된 mRNA("LDLR 변형된 mRNA")의 생체내 발현을 시험한다. 지질 나노입

자 중에서 제형화된 LDLR 변형된 mRNA를 0.005-0.5mg/kg(예를 들면, 0.005mg/kg, 0.010mg/kg, 0.015mg/kg, 0.020mg/kg, 0.030mg/kg, 0.040mg/kg, 0.050mg/kg, 0.1mg/kg, 0.2mg/kg, 0.3mg/kg, 0.4mg/kg 및 0.5mg/kg)의 LDLR 변형된 mRNA를 함유하는 주사를 통해 LDLR 결손 돼지에게 투여한다. 돼지를 주사한지 2시간 내지 96시간 후(예를 들면, 2hr, 2.5hr, 3hr, 3.5hr, 4hr, 5hr, 6hr, 7hr, 8hr, 9hr, 10hr, 12hr, 24hr, 48hr, 72hr 및 96hr) 희생시키고, 간을 절개하고, 세포 용리물을 분석용으로 제조한다. mRNA 전사체에서의 LDLR 단백질 발현 및 변화를 항-LDLR 항체를 사용하여 웨스턴 블롯 분석에 의해 세포 용리물에서 측정하고, 돼지 조직에서의 LDLR의 발현을 실시간 RT-PCR로 분석한다. 혈청을 변형된 mRNA의 주사 후 다양한 시점에서 수집하고, 사이토킨 패널에 대해 분석하고 VLDL+IDL+LDL 콜레스테롤에 대해 검정한다.

[0880] 실시예 31. LDLR 결손 붉은털 원숭이(Rhesus Monkey)에서의 LDLR의 생체내 발현

[0881] LDLR 결손 붉은털 원숭이(Southwest National Primate Research Center, San Antonio, TX)를 사용하여, 야생형 사람 LDLR을 암호화하거나 PCSK9 결함 결손 사람 LDLR을 암호화하는 변형된 mRNA("LDLR 변형된 mRNA")의 생체내 발현을 시험한다. 지질 나노입자 중에서 제형화된 LDLR 변형된 mRNA를 0.005-0.5mg/kg(예를 들면, 0.005mg/kg, 0.010mg/kg, 0.015mg/kg, 0.020mg/kg, 0.030mg/kg, 0.040mg/kg, 0.050mg/kg, 0.1mg/kg, 0.2mg/kg, 0.3mg/kg, 0.4mg/kg 및 0.5mg/kg)의 LDLR 변형된 mRNA를 함유하는 주사를 통해 LDLR 결손 원숭이에게 투여한다. 원숭이를 주사한지 2시간 내지 96시간 후(예를 들면, 2hr, 2.5hr, 3hr, 3.5hr, 4hr, 5hr, 6hr, 7hr, 8hr, 9hr, 10hr, 12hr, 24hr, 48hr, 72hr 및 96hr) 희생시키고, 간을 절개하고, 세포 용리물을 분석용으로 제조한다. mRNA 전사체에서의 LDLR 단백질 발현 및 변화를 항-LDLR 항체를 사용하여 웨스턴 블롯 분석에 의해 세포 용리물에서 측정하고, 원숭이 조직에서의 LDLR의 발현을 실시간 RT-PCR로 분석한다. 혈청을 변형된 mRNA의 주사 후 다양한 시점에서 수집하고, 사이토킨 패널에 대해 분석하고 VLDL+IDL+LDL 콜레스테롤에 대해 검정한다.

[0882] 실시예 32. 다중-용량 연구

[0883] 다중 용량을 사용한 연구를 LDLR-/- 마우스를 사용하여 설계하고 수행한다. 마우스에게 지질 나노입자 중에서 제형화된, 사람 또는 마우스 야생형 LDLR을 암호화하거나 PCSK9 결함 결손 사람 LDLR을 암호화하는 변형된 LDLR mRNA 0.5mg/kg, 0.05mg/kg, 0.005mg/kg 또는 0.0005mg/kg을 28일에 걸쳐 8회(1주 2회) 정맥내 주사한다. mRNA 전사체에서의 LDLR 단백질 발현 및 변화를 항-LDLR 항체를 사용하여 웨스턴 블롯 분석에 의해 세포 용리물에서 측정하고, 조직에서의 LDLR의 발현을 실시간 RT-PCR로 분석한다. 혈청을 예비-결정된 시간 간격 동안 수집하고, 본원에 기재된 바와 같이 사이토킨에 대해 분석하고, VLDL+IDL+LDL 콜레스테롤에 대해 검정한다.

[0884] 실시예 33. 야생형 및 LDLR 녹아웃 마우스에서의 총 콜레스테롤

[0885] 3마리 야생형 마우스(C57BL/6J) 및 3마리 LDLR 녹아웃 마우스(B6. 129S7-1dlrtm1Her/J, Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine)로부터의 혈청을 수집하고, FPLC로 분별하였다. 야생형 및 LDLR 녹아웃 마우스로부터의 용출된 혈청 분획의 흡광도를 260 및 280nm에서 측정하였다. 각 분획을 Wako 콜레스테롤 E 효소적 비색법(Wako, Richmond, VA)으로 총 콜레스테롤에 대해 분석하였다. 도 10a에 나타난 바와 같이, 흡광도 프로파일은 마우스 종 둘 다에서 세 개의 뚜렷한 단백질 피크를 나타내었다(도 10a). 도 10b에서 분획 3 내지 6에 걸친 첫번째 피크는 LDLR 녹아웃 마우스에서 콜레스테롤에 대해 최고인 것으로 시험되었다. 도 10b에서 분획 7 내지 12에 걸친 두번째 피크는 야생형 마우스에서 총 콜레스테롤에 대해 최고인 것으로 시험되었다. 도 10b에서 분획 14 내지 18에 걸친 세번째 피크는 마우스 종 둘 다에서 콜레스테롤에 대해 낮거나 음성인 것으로 시험되었다.

[0886] 실시예 34. 야생형 LDLR 또는 PCSK9 결함-결손 변이체의 발현

[0887] 사람 배아 신장 상피(HEK293) 세포(LGC standards GmbH, Wesel, Germany)를 48-웰 플레이트(BD Biosciences, San Jose, USA) 상에 시딩한다. HEK293을 0.2mL 세포 배양 배지 중에서 웰 당 약 60,000개 세포의 밀도로 시딩한다. 1uL 리포펙타민 및 150ng의 야생형(WT) LDLR mRNA(서열 번호 42에 나타난 mRNA 서열; 서열로 나타내지 않은 대략 160개 뉴클레오타이드의 폴리A 테일; 5'캡, Cap1; 5-메틸사이토신 및 1-메틸유사우리딘으로 완전 변

형됨) 또는 150ng의 LDLR 서열 변이체 mRNA 또는 G-CSF mRNA의 대조군(서열 번호 30에 나타낸 mRNA; 5-메틸사이토신 및 유사우리딘으로 완전 변형됨; 5'캡, cap1; 서열로 나타내지 않은 대략 160개 뉴클레오타이드의 폴리A 테일)을 함유하는 제형을 세포를 웰 당 60,000개의 양으로 시딩한 직후 가하고, 항온처리한다.

[0888]

제조하고 시험된 LDLR mRNA 서열 변이체는 다음을 포함한다: 4개의 아미노산 치환 변이체(4A: N316A, E317A, D331A, 및 Y336A)(서열 번호 12에 나타낸 mRNA 서열; 서열로 나타내지 않은 대략 160개 뉴클레오타이드의 폴리A 테일; 5'캡, Cap1; 5-메틸사이토신 및 1-메틸유사우리딘으로 완전 변형됨), 또는 다음의 단일 아미노산 치환 변이체 Y336A(서열 번호 11에 나타낸 mRNA 서열; 서열로 나타내지 않은 대략 160개 뉴클레오타이드의 폴리A 테일; 5'캡, Cap1; 5-메틸사이토신 및 1-메틸유사우리딘으로 완전 변형됨), E317A(서열 번호 10에 나타낸 mRNA 서열; 서열로 나타내지 않은 대략 160개 뉴클레오타이드의 폴리A 테일; 5'캡, Cap1; 5-메틸사이토신 및 1-메틸유사우리딘으로 완전 변형됨), N316A(서열 번호 9에 나타낸 mRNA 서열; 서열로 나타내지 않은 대략 160개 뉴클레오타이드의 폴리A 테일; 5'캡, Cap1; 5-메틸사이토신 및 1-메틸유사우리딘으로 완전 변형됨), L339D(서열 번호 8에 나타낸 mRNA 서열; 서열로 나타내지 않은 대략 160개 뉴클레오타이드의 폴리A 테일; 5'캡, Cap1; 5-메틸사이토신 및 1-메틸유사우리딘으로 완전 변형됨), D331E(서열 번호 7에 나타낸 mRNA 서열; 서열로 나타내지 않은 대략 160개 뉴클레오타이드의 폴리A 테일; 5'캡, Cap1; 5-메틸사이토신 및 1-메틸유사우리딘으로 완전 변형됨).

[0889]

대조군으로서, G-CSF mRNA 형질감염된 세포를 항-LDLR 항체(R&D Systems, Minneapolis, MN; 사람 LDL R 친화도 정제된 다중클론성 AbAF2148)로 처리하고, LDLR 형질감염된 세포의 하나의 세트를 정상 염소 IgG(R&D Systems, Minneapolis, MN; 정제된 염소 IgG R&D Systems 카탈로그 번호 AC-108-C)로 처리하였다. 결합된 1차 항체를 피코에리트린(PE)-표지된 항체(R&D Systems, Minneapolis, MN)로의 처리 후 FACS 분석에 의해 검출하였다. PE에 대한 접합을 Innova biosciences lightning-link 접합 키트(Lightning-Link R-PE 항체 표지화 키트 Novus Biologicals 카탈로그 번호: 703-0010)로 완료하였다.

[0890]

도 11에 나타낸 바와 같이, FACS 분석은 shows 모든 게이팅된 살아있는 세포의 32%가 150ng 용량의 야생형 LDLR mRNA에서 LDLR을 발현하는 것으로 검출됨을 보여준다(도 11에서 WT). 유사하게, LDLR mRNA 변이체로 형질감염된 세포의 경우, 모든 게이팅된 살아있는 세포의 12-33% 사이가 150ng 용량에서 LDLR을 발현하는 것으로 검출되었다. 대조군 비-면역 IgG로 염색된 LDLR mRNA 처리 세포에서는 염색이 관찰되지 않았고(LDLR WT 형질감염 이소형 염색), LDLR 양성 세포는 G-CSF mRNA로 형질감염된 세포에서 검출되지 않았다(GCSF 형질감염 LDLR 염색).

[0891]

실시예 35. 외인성 PCSK9에 의한 LDLR의 하향-조절

[0892]

사람 배아 신장 상피(HEK293) 세포(LGC standards GmbH, Wesel, Germany)를 48-웰 플레이트(BD Biosciences, San Jose, USA) 상에 시딩한다. HEK293을 0.2mL 세포 배양 배지 중에서 웰 당 약 60,000개 세포의 밀도로 시딩한다. 1uL의 리포펙타민 2000 및 150ng의 야생형(WT) LDLR mRNA(서열 번호 42에 나타낸 mRNA 서열; 서열로 나타내지 않은 대략 160개 뉴클레오타이드의 폴리A 테일; 5'캡, Cap1; 5-메틸사이토신 및 1-메틸유사우리딘으로 완전 변형됨) 또는 150ng의 LDLR 서열 변이체 mRNA 또는 150ng의 G-CSF mRNA의 대조군(서열 번호 30에 나타낸 mRNA; 5-메틸사이토신 및 유사우리딘으로 완전 변형됨; 5'캡, cap1; 서열로 나타내지 않은 대략 160개 뉴클레오타이드의 폴리A 테일)을 함유하는 제형을 세포를 웰 당 800ng의 양으로 시딩한 직후 가하고, 60 μg/mL의 외인성 사람 PCSK9의 존재 및 부재하에서 항온처리하였다

[0893]

제조되고 시험된 LDLR mRNA 서열 변이체는 다음을 포함한다: 4개 아미노산 치환 변이체(4A: N316A, E317A, D331A, 및 Y336A)(서열 번호 12에 나타낸 mRNA 서열; 서열로 나타내지 않은 대략 160개 뉴클레오타이드의 폴리A 테일; 5'캡, Cap1; 5-메틸사이토신 및 1-메틸유사우리딘으로 완전 변형됨), 또는 다음의 단일 아미노산 치환 변이체 Y336A(서열 번호 11에 나타낸 mRNA 서열; 서열로 나타내지 않은 대략 160개 뉴클레오타이드의 폴리A 테일; 5'캡, Cap1; 5-메틸사이토신 및 1-메틸유사우리딘으로 완전 변형됨), E317A(서열 번호 10에 나타낸 mRNA 서열; 서열로 나타내지 않은 대략 160개 뉴클레오타이드의 폴리A 테일; 5'캡, Cap1; 5-메틸사이토신 및 1-메틸유사우리딘으로 완전 변형됨), N316A(서열 번호 9에 나타낸 mRNA 서열; 서열로 나타내지 않은 대략 160개 뉴클레오타이드의 폴리A 테일; 5'캡, Cap1; 5-메틸사이토신 및 1-메틸유사우리딘으로 완전 변형됨), L339D(서열 번호 8에 나타낸 mRNA 서열; 서열로 나타내지 않은 대략 160개 뉴클레오타이드의 폴리A 테일; 5'캡, Cap1; 5-메틸사이토신 및 1-메틸유사우리딘으로 완전 변형됨), D331E(서열 번호 7에 나타낸 mRNA 서열; 서열로 나타내지 않은 대략 160개 뉴클레오타이드의 폴리A 테일; 5'캡, Cap1; 5-메틸사이토신 및 1-메틸유사우리딘으로 완전 변형됨).

[0894]

37°C에서 15시간 후, 형질감염 배지를 제거하고, 세포를 세척하고, 상기한 바와 같이 피코에리트린(PE)에 접합

된 항-LDLR 항체(R&D Systems, Minneapolis, MN; 사람 LDL R 친화도 정제된 다중클론성 AbAF2148)로 처리하였다. LDLR 형질감염된 세포의 하나의 세트를 PE에 접합된 정상 염소 IgG(R&D Systems, Minneapolis, MN; 정제된 염소 IgG R&D Systems 카탈로그 번호 AC-108-C)로 처리하고, 비형질감염된 세포의 다른 세트는 대조군으로서 사용하였다. G-CSF 변형된 mRNA로 형질감염된 세포를 추가의 음성 대조군으로서 사용하였다. PE에 대한 접합을 Innova biosciences lightning-link 접합 키트(Lightning-Link R-PE 항체 표지화 키트 Novus Biologicals 카탈로그 번호: 703-0010)로 완료하였다. 결합된 1차 항체를 상기한 바와 같은 유세포 분석법으로 검출하였다.

도 12에 나타낸 바와 같이, FACS 분석은 야생형 LDLR mRNA로 형질감염된 세포에서 세포 표면 LDLR 발현이 게이팅된 살아있는 세포의 51.6%이었음을 나타내었다. 이 값은 외인성 PCSK9가 형질감염 동안 배지에 첨가되는 경우 게이팅된 살아있는 세포의 21.5%로 감소되었다. 이와 달리, PCSK9 결합 도메인에 치환을 갖는 LDLR mRNA 변이체의 각각은 외인성 PCSK9에 의한 하향-조절에 대해 덜한 민감도를 나타냈으며(표 12), 감소 퍼센트 값은 (야생형 LDLR에서 관찰된 58% 감소와 비교하여) -8.1% 내지 29%에 이르렀다.

표 12

외인성 PCSK9에 의한 세포 표면 LDLR 발현의 하향-조절

LDLR mRNA	세포 LDLR 양성의 %		LDLR 발현의 감소 퍼센트 (%)
	PCSK9 부재	PCSK9 존재	
WT	51.6	21.5	58.3
N316A, E317A, D331A, Y336A	65.1	63.3	2.8
Y336A	73.1	52.1	28.7
E317A	71.8	51.9	27.7
N316A	60.8	65.7	-8.1
L339D	69.4	60.9	12.2
D331E	69.4	60.9	0.8
G-CSF 음성 대조군	1.06	0.76	NA

실시예 36. 변이체 LDLR mRNA에 의해 발현된 기능성

발현된 LDLR이 기능성인지를 평가하기 위해, BODIPY-표지된 LDL을 사용하였다. 웰 당 60,000개 HEK293 세포를 1uL 리포펙타민 2000 및 150ng 암호화 야생형(WT) LDLR mRNA(서열 번호 42에 나타낸 mRNA 서열; 서열로 나타내지 않은 대략 160개 뉴클레오타이드의 폴리A 테일; 5'캡, Cap1; 5-메틸사이토신 및 1-메틸유사우리딘으로 완전 변형됨) 또는 150ng의 LDLR 변이체 mRNA 또는 150ng의 G-CSF mRNA의 대조군(서열 번호 30에 나타낸 mRNA; 5-메틸사이토신 및 유사우리딘으로 완전 변형됨; 5'캡, cap1; 서열로 나타내지 않은 대략 160개 뉴클레오타이드의 폴리A 테일)을 함유하는 제형으로 밤새 형질감염시켰다.

제조되고 시험된 LDLR 변이체 mRNA 서열은 다음을 포함한다: 4개 아미노산 치환 변이체(4A: N316A, E317A, D331A, 및 Y336A)(서열 번호 12에 나타낸 mRNA 서열; 서열로 나타내지 않은 대략 160개 뉴클레오타이드의 폴리A 테일; 5'캡, Cap1; 5-메틸사이토신 및 1-메틸유사우리딘으로 완전 변형됨), 또는 다음의 단일 아미노산 치환 변이체 Y336A(서열 번호 11에 나타낸 mRNA 서열; 서열로 나타내지 않은 대략 160개 뉴클레오타이드의 폴리A 테일; 5'캡, Cap1; 5-메틸사이토신 및 1-메틸유사우리딘으로 완전 변형됨), E317A(서열 번호 10에 나타낸 mRNA 서열; 서열로 나타내지 않은 대략 160개 뉴클레오타이드의 폴리A 테일; 5'캡, Cap1; 5-메틸사이토신 및 1-메틸유사우리딘으로 완전 변형됨), N316A(서열 번호 9에 나타낸 mRNA 서열; 서열로 나타내지 않은 대략 160개 뉴클레오타이드의 폴리A 테일; 5'캡, Cap1; 5-메틸사이토신 및 1-메틸유사우리딘으로 완전 변형됨), L339D(서열 번호 8에 나타낸 mRNA 서열; 서열로 나타내지 않은 대략 160개 뉴클레오타이드의 폴리A 테일; 5'캡, Cap1; 5-메틸사이토신 및 1-메틸유사우리딘으로 완전 변형됨), D331E(서열 번호 7에 나타낸 mRNA 서열; 서열로 나타내지 않은 대략 160개 뉴클레오타이드의 폴리A 테일; 5'캡, Cap1; 5-메틸사이토신 및 1-메틸유사우리딘으로 완전 변형됨).

세포를 세척하고, 증가량(0ug/ml, 0.1ug/ml, 1.0ug/ml, 10ug/ml 또는 50ug/ml)의 BODIPY-LDL과 항온처리하였다. 37°C에서 1시간 동안 항온처리 후, 세포를 세척하고, 세포 결합 BODIPY-LDL을 유세포 분석법으로 평가하였다. 등고선 플롯이 도 13a에 도시되어 있다. 야생형(WT) 및 LDLR PCSK9 결합 변이체에 대해, LDLR mRNA 형질감염된 세포에 대한 BODIPY-LDL의 결합은 BODIPY-LDL 농도에 따라 증가하는 게이팅된 세포 집단

에서 우측 이동으로서 자명하였다. 게이팅된 세포 집단에서의 유사한 우측 이동은 LDLR mRNA 작제물 각각으로 형질감염된 세포에 대해서도 보여진다. 도 13b에 나타낸 바와 같이, 반-최대(half-maximal) 세포 결합성은 야생형 또는 PCSK9 결합-결손 LDLR mRNA로 형질감염된 세포에 대한 BODIPY-LDL 결합에서도 동일하였다. 각각의 작제물에 대해, BODIPY-LDL 결합은 높은 친화도(0.6-0.7ng/mL 사이의 반-최대 결합)를 가지며, 가포화성이었다. BODIPY-LDL 결합은 G-CSF mRNA로 형질감염된 세포에서는 관찰되지 않았다.

[0901] 실시예 37. 세포 표면 LDLR에 대한 반감기의 평가

[0902] LDLR mRNA로 형질감염된 세포에서 세포 표면 LDL 수용체의 겉보기 반감기를 조절할 수 있는지를 평가하기 위해, HEK293 세포를 24 웰 플레이트 상에 웰 당 130,000개 세포로 플레이팅하고, LDLR mRNA로 형질감염시키고, 상기한 바와 같이 14시간 동안 항온처리하였다. 세포 단층을 세척하고, PCSK9(60 µg/mL)를 갖거나 PCSK9를 갖지 않는 신선한 배지를 가하였다. 37°C에서 다양한 항온처리 시간 후, 세포 표면 LDLR 발현을 상기한 바와 같이 항-LDLR 항체를 사용하여 유세포 분석법으로 모니터링하였다. 도 14a에 나타낸 바와 같이, 300ng의 야생형 LDLR mRNA(서열 번호 42에 나타낸 mRNA 서열; 서열로 나타내지 않은 대략 160개 뉴클레오타이드의 폴리A 테일; 5'캡, Cap1; 5-메틸사이토신 및 1-메틸유사우리딘으로 완전 변형됨)로 형질감염된 세포에서의 세포 표면 LDLR은 대략 13시간의 겉보기 반감기를 가지면서 시간-의존적 방식으로 감소하였다. 야생형 LDLR mRNA로 형질감염된 세포의 배지로의 PCSK9의 첨가는 세포 표면 LDLR의 겉보기 반감기를 약 4시간로 감소시켰다. 도 14a에서, "*"는 통계 검정에 의한 유의적인 차이를 나타낸다.

[0903] 이와 달리, 300ng의 PCSK9 결합-결손 LDLR mRNA로 형질감염된 세포의 배지로의 PCSK9의 첨가는 세포 표면 LDLR의 겉보기 반감기에 있어서 변화를 거의 또는 전혀 야기하지 않았다(도 13b-13g). 제조되고 시험된 PCSK9 결합-결손 LDLR mRNA 서열은 다음을 포함한다: 4개 아미노산 치환 변이체(4A: N316A, E317A, D331A, 및 Y336A)(서열 번호 12에 나타낸 mRNA 서열; 서열로 나타내지 않은 대략 160개 뉴클레오타이드의 폴리A 테일; 5'캡, Cap1; 5-메틸사이토신 및 1-메틸유사우리딘으로 완전 변형됨), 또는 다음의 단일 아미노산 치환 변이체 Y336A(서열 번호 11에 나타낸 mRNA 서열; 서열로 나타내지 않은 대략 160개 뉴클레오타이드의 폴리A 테일; 5'캡, Cap1; 5-메틸사이토신 및 1-메틸유사우리딘으로 완전 변형됨), E317A(서열 번호 10에 나타낸 mRNA 서열; 서열로 나타내지 않은 대략 160개 뉴클레오타이드의 폴리A 테일; 5'캡, Cap1; 5-메틸사이토신 및 1-메틸유사우리딘으로 완전 변형됨), N316A(서열 번호 9에 나타낸 mRNA 서열; 서열로 나타내지 않은 대략 160개 뉴클레오타이드의 폴리A 테일; 5'캡, Cap1; 5-메틸사이토신 및 1-메틸유사우리딘으로 완전 변형됨), L339D(서열 번호 8에 나타낸 mRNA 서열; 서열로 나타내지 않은 대략 160개 뉴클레오타이드의 폴리A 테일; 5'캡, Cap1; 5-메틸사이토신 및 1-메틸유사우리딘으로 완전 변형됨), D331E(서열 번호 7에 나타낸 mRNA 서열; 서열로 나타내지 않은 대략 160개 뉴클레오타이드의 폴리A 테일; 5'캡, Cap1; 5-메틸사이토신 및 1-메틸유사우리딘으로 완전 변형됨).

[0904] 도 14b-14g의 이러한 데이터는 PCSK9 결합 부위에 돌연변이를 갖는 LDLR을 암호화하는 LDLR mRNA로 형질감염된 세포가 외인성 PCSK9에 반응하지 못함을 보여주며, 이것은 이러한 결합 변이체가 생체내에서 야생형 LDLR보다 더 긴 반감기를 가질 수 있으며, 고콜레스테롤혈증을 갖는 환자를 치료하는데 유용할 수 있음을 시사한다.

[0905] 실시예 38. 세포 표면 LDLR에 대한 증가하는 PCSK9 양의 효과

[0906] 완전 세포 배지, 10% 태아 소 혈청으로 보충된 MEM(GlutaMAX, Life Science Catalog#41090-036)에 첨가된 증가량의 PCSK9에 의한 세포 표면 LDLR 발현의 하향-조절을 평가하기 위해, HEK293 세포를 웰 당 300,000개 세포로 플레이팅하고, 6시간 동안 항온처리하고, 300ng의 야생형 LDLR mRNA(서열 번호 42에 나타낸 mRNA 서열; 서열로 나타내지 않은 대략 160개 뉴클레오타이드의 폴리A 테일; 5'캡, Cap1; 5-메틸사이토신 및 1-메틸유사우리딘으로 완전 변형됨) 또는 PCSK9 결합 변이체를 암호화하는 LDLR mRNA로 15시간 동안 형질감염시켰다. 제조되고 시험된 PCSK9 결합 변이체 mRNA 서열은 N316A(서열 번호 9에 나타낸 mRNA 서열; 서열로 나타내지 않은 대략 160개 뉴클레오타이드의 폴리A 테일; 5'캡, Cap1; 5-메틸사이토신 및 1-메틸유사우리딘으로 완전 변형됨), 및 D331E(서열 번호 7에 나타낸 mRNA 서열; 서열로 나타내지 않은 대략 160개 뉴클레오타이드의 폴리A 테일; 5'캡, Cap1; 5-메틸사이토신 및 1-메틸유사우리딘으로 완전 변형됨)의 단일 아미노산 치환 변이체를 포함한다. UGT1A1을 암호화하는 mRNA의 대조군(서열 번호 61에 나타낸 mRNA 서열; 서열로 나타내지 않은 대략 160개 뉴클레오타이드의 폴리A 테일; 5'캡, Cap1; 5-메틸사이토신 및 1-메틸유사우리딘으로 완전 변형됨)을 또한 사용하였다.

[0907] 15시간의 항온처리 후, 세포 단층을 세척하고, 완충액 단독 또는 증가량의 PCSK9를 함유하는 완충액을 가하였다. 세포를 5시간 동안 항온처리하고, 세포 표면 LDLR 발현을 상기한 바와 같이 유세포 분석법으로 측정하였다. 도 15에 나타난 바와 같이, 야생형 LDLR mRNA로 형질감염된 세포에서의 세포 표면 LDL 수용체는 PCSK9에 의해 용량-의존적 방식으로 감소하였다. LDLR의 최대 감소는 20mg/mL의 외인성 PCSK9에서 달성되었다. 이와 달리, PCSK9는 PCSK9 결합-결손 변이체 N316A 또는 D331E를 암호화하는 LDLR mRNA로 형질감염된 세포에서 세포 표면 LDLR에 대해서는 효과가 없었다. 세포 표면 LDLR은 UGT1A1을 암호화하는 mRNA로 형질감염된 HEK293 세포에서는 검출되지 않았다. 이러한 데이터는 PCSK9에 대한 결합 부위에서 돌연변이를 암호화하는 LDLR mRNA로부터 발현된 LDLR은 외인성 PCSK9에 민감하지 않다.

[0908] 실시예 39. LDLR의 간 세포 형질도입 제형

[0909] 지질 나노입자(LNP)를 당업계에 공지되고, 본원에 기재되고/되거나 전문이 본원에 참고로 인용된 "변형된 뉴클레오사이드, 뉴클레오타이드, 및 핵산 조성물"이라는 발명의 명칭의 제PCT/US2012/069610호에 기재된 방법을 사용하여 제형화한다. 본원에 사용된 LNP는 이온화 가능한 지질 DLin-KC2-DMA 또는 양이온성 지질 C12-200을 포함할 수 있다.

[0910] LDLR 또는 LDLR 돌연변이체를 암호화하는 변형된 mRNA(예를 들면, 서열번호 7-12; 서열로 나타내지 않은 적어도 140개 뉴클레오타이드의 폴리A 테일; 5'캡, Cap1; 본원에 기재된 적어도 하나의 화학 변형으로 변형됨)를 DLin-KC2-DMA 또는 C12-200을 포함하는 LNP에서 제형화한다. 제형화된 LDLR 또는 LDLR 돌연변이체를 야생형 마우스 및 LDLR 결손 마우스에 투여한다. 야생형 및 LDLR 결손 마우스의 간 세포에서의 LDLR의 발현을 당업계에 공지되거나 본원에 기재된 방법을 사용하여, 변형된 mRNA의 투여 후 소정의 간격으로 측정한다.

[0911] 실시예 40. LNP 제형화된 변형된 mRNA의 전달

[0912] 루시페라제 mRNA(서열 번호 44에 나타난 mRNA 서열; 서열로 나타내지 않은 적어도 140개 뉴클레오타이드의 폴리A 테일; 5'캡, Cap1)를 5-메틸사이토신 및 유사우리딘으로 완전 변형시키거나, 5-메틸사이토신 및 1-메틸유사우리딘으로 완전 변형시키거나, 유사우리딘으로 완전 변형시키거나, 1-메틸유사우리딘으로 완전 변형시키거나, 우리딘 잔기의 25%는 2-티오우리딘으로 변형시키고 사이토신 잔기의 25%는 5-메틸사이토신으로 변형시킨다. 그후, 루시페라제 mRNA를 양온성 지질 DLin-KC2-DMA(KC2) 또는 C12-200을 포함하는 지질 나노입자 중에서 제형화한다. PBS 중의 제형화된 LNP 또는 PBS 단독의 대조물을 표 13에 요약된 바와 같이 LDLR -/- 또는 정상 마우스에게 정맥내 투여한다. 마우스를 주사한지 2시간, 8시간, 24시간 및 48시간째에 영상화한다. 영상화하기 10분 전에, 마우스에게 150mg/kg의 D-루시페린 용액을 복강내 주사한다. 그후, 동물을 마취시키고, 영상을 IVIS Lumina II 영상화 시스템(Perkin Elmer)으로 획득한다.

표 13

투여 섭생

그룹	마우스 종	양이온성 지질	용량 (mg/kg)	mRNA 용량/마우스 (mg)	주사 용적 (mL)
1	LDLR-/-	KC2	0.5	0.01	0.1
2	LDLR-/-	KC2	0.05	0.001	0.1
3	정상	KC2	0.5	0.01	0.1
4	정상	KC2	0.05	0.001	0.1
5	LDLR-/-	C12-200	0.5	0.01	0.1
6	LDLR-/-	C12-200	0.05	0.001	0.1
7	정상	C12-200	0.5	0.01	0.1
8	정상	C12-200	0.05	0.001	0.1

[0913]

[0914] 실시예 41. UGT1A1 변형된 mRNA를 투여한 포유류의 연구

[0915] A. 설치류

- [0916] 다중 용량을 사용한 연구를 랫트 및/또는 마우스(예를 들면 LDLR^{-/-} 마우스)를 사용하여 설계하고 수행한다. 설치류에게 본원에 기재된 사람, 마우스 또는 랫트 LDLR 또는 이의 이소형 또는 변이체를 암호화하는 변형된 LDLR mRNA 0.5mg/kg, 0.05mg/kg, 0.005mg/kg 또는 0.0005mg/kg을 7일간에 걸쳐 1회 이상 근육내 또는 정맥내 주사한다. LDLR mRNA를 5% 수크로스, 염수 또는 지질 나노입자 중에서 제형화한다. mRNA 전사체에서의 LDLR 단백질 발현 및 변화를 항-LDLR 항체를 사용하여 웨스턴 블롯 분석에 의해 세포 용리물에서 측정하고, 조직에서의 약물 수준 및 LDLR의 전사를 실시간 RT-PCR로 분석한다. 랫트로부터의 혈청을 예비-결정된 시간 간격 동안 수집하고, 상기한 바와 같이 사이토킨 패널에 대해 분석하고 콜레스테롤 수준에 대해 검정한다.
- [0917] B. 비-사람 영장류(NHP)
- [0918] 5% 수크로스, 염수 또는 지질 나노입자 중에서 제형화된 LDLR 변형된 mRNA를 비-사람 영장류에 근육내 또는 정맥내 투여한다. 주사는 용량의 0.005-0.5mg/kg(예를 들면, 0.005mg/kg, 0.010mg/kg, 0.015mg/kg, 0.020mg/kg, 0.030mg/kg, 0.040mg/kg, 0.050mg/kg, 0.1mg/kg, 0.2mg/kg, 0.3mg/kg, 0.4mg/kg 및 0.5mg/kg) 용량의 LDLR mRNA를 함유한다. mRNA 전사체에서의 LDLR 단백질 발현 및 약물 수준 변화를 항-LDLR 항체를 사용하여 웨스턴 블롯 분석으로 측정하고, 근육 조직에서의 변형된 LDLR mRNA의 수준을 실시간 RT-PCR로 분석한다. 비-사람 영장류로부터의 혈청을 주사 후 소정의 간격으로 수집하고, 본원에 기재된 바와 같이 사이토킨 패널에 대해 분석하고 콜레스테롤 수준에 대해 검정한다.
- [0919] 실시예 42. 포유류에서의 UGT1A1 변형된 mRNA의 반복 용량 투여 연구
- [0920] A. 설치류
- [0921] 다중 용량을 사용한 연구를 랫트 및/또는 마우스(예를 들면 LDLR^{-/-} 마우스)를 사용하여 설계하고 수행한다. 설치류를 사람 또는 랫트 LDLR을 암호화하는 변형된 LDLR mRNA 0.5mg/kg, 0.05mg/kg, 0.005mg/kg 또는 0.0005mg/kg으로 4주의 기간에 걸쳐 1회 이상(예를 들면, 매일, 1주 2회, 5일 마다, 매주, 10일 마다, 격주) 근육내 또는 정맥내 주사한다. LDLR mRNA를 5% 수크로스, 염수 또는 지질 나노입자 중에서 제형화한다.
- [0922] mRNA 전사체에서의 LDLR 단백질 발현 및 변화를 항-LDLR 항체를 사용하여 웨스턴 블롯 분석에 의해 세포 용리물에서 측정하고, 조직에서의 약물 수준 및 LDLR의 전사를 실시간 RT-PCR로 분석한다. 랫트로부터의 혈청을 소정의 시간 간격 동안 수집하고, 본원에 기재된 바와 같이 사이토킨 패널에 대해 분석하고 콜레스테롤 수준에 대해 검정한다.
- [0923] B. 비-사람 영장류 (NHP)
- [0924] 5% 수크로스, 염수 또는 지질 나노입자 중에서 제형화된 LDLR 변형된 mRNA를 4주의 기간에 걸쳐 1회 이상(예를 들면, 매일, 1주 2회, 5일 마다, 매주, 10일 마다, 격주) 비-사람 영장류에 근육내 또는 정맥내 투여한다. 주사는 0.005-0.5mg/kg(예를 들면 0.005mg/kg, 0.010mg/kg, 0.015mg/kg, 0.020mg/kg, 0.030mg/kg, 0.040mg/kg, 0.050mg/kg, 0.1mg/kg, 0.2mg/kg, 0.3mg/kg, 0.4mg/kg 및 0.5mg/kg) 용량의 LDLR mRNA를 함유한다.
- [0925] 비-사람 영장류를 연구 개시일 전에 칭량하고, 연구 8일째, 15일째 및 말기에 칭량한다. mRNA 전사체에서의 LDLR 단백질 발현 및 약물 수준 변화를 항-LDLR 항체를 사용하여 웨스턴 블롯 분석으로 측정하고, 근육 조직 중의 변형된 LDLR mRNA의 수준을 실시간 RT-PCR로 분석한다. 비-사람 영장류로부터의 혈청을 주사 후 소정의 간격으로 수집하고, 본원에 기재된 바와 같이 사이토킨 패널에 대해 분석하고 콜레스테롤 수준에 대해 검정한다.
- [0926] 실시예 43. 미세생리학적 시스템
- [0927] LDLR 및 본원에 기재된 이의 변이체를 암호화하는 변형된 mRNA를 완충액, 지질 나노입자 및 PLGA에서와 같이 본원에 기재된 방법 중의 하나를 사용하여 제형화한다. 그후, 이러한 제형을 국제 공개공보 제W02013086502호, 제W02013086486호 및 제W02013086505호에 기재된 바와 같이 유기 칩으로부터 생성된 미세생리학적 시스템에 투여하거나 이와 접촉시키며, 상기 문헌 각각의 내용은 전문가 본원에 참고로 인용된다.
- [0928] 실시예 44. LDLR 돌연변이
- [0929] 하나의 실시형태에서, 본원에 기재된 폴리뉴클레오타이드는 PCSK9에 대한 결합이 결손된 적어도 하나의 LDLR 단

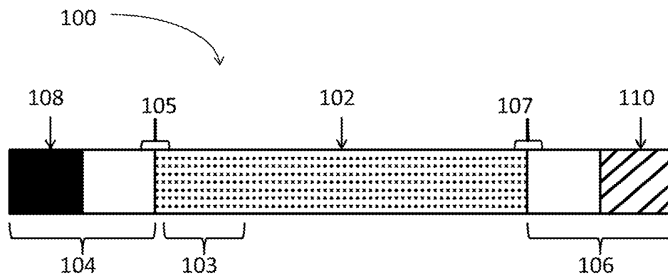
백질을 암호화한다. 비제한적인 예로서, LDLR 단백질은 본원에 기재된 바와 같이 PCSK9 결합 결손에 대해 적어도 하나의 돌연변이를 포함할 수 있다.

- [0930] 하나의 실시형태에서, 본원에 기재된 폴리뉴클레오타이드는 불능 유사체 2, 미토겐-반응성 인단백질(DAB2)에 대한 결합이 결손될 수 있다. 이론에 결부시키고자 하는 것은 아니지만, DAB2 결합-결손 LDLR은 DAB2 경로를 통한 LDLR의 내재화를 제한하고, 이에 따라, LDLR 흡수를 감소시킬 수 있다.
- [0931] 하나의 실시형태에서, LDLR의 NPXY 모티프는 LDLR의 코팅된 피크를 통한 신속한 내포 작용(endocytosis)에 대한 신호를 변화시키기 위해 변형될 수 있다. NPXY 모티프는 적어도 하나의 돌연변이, 적어도 두 개의 돌연변이, 적어도 세 개의 돌연변이, 적어도 네 개의 돌연변이 또는 네 개 이상의 돌연변이를 포함할 수 있다. 비-제한적인 예로서, NPXY 모티프는 LDLR 서열의 아미노산 822 내지 아미노산 829를 포함할 수 있다. 또 다른 비제한적인 예로서, NPXY 모티프는 서열 NFDNPVYQ(서열 번호 62)를 포함할 수 있다.
- [0932] 하나의 실시형태에서, LDLR 서열은 NPXY 모티프에 돌연변이를 포함하지 않는다. 또 다른 실시형태에서, LDLR 서열은 돌연변이를 포함할 수 있지만 돌연변이는 LDLR의 아미노산 822 내지 아미노산 829가 (서열 번호 62)에 나타나 있는 경우 LDLR의 822, 826, 827 또는 828 위치에 있지 않을 수 있다..
- [0933] 또 다른 실시형태에서, LDLR의 NPXY 모티프는 변형되어 LDLR의 NPXY 모티프에 대한 Sorting Nexin 17(SNX17)의 결합을 감소시킬 수 있다. LDLR의 NPXY 모티프에 대한 SNX17의 결합의 감소를 사용하여 수용체의 엔도솜 재생을 조절할 수 있다.
- [0934] 하나의 실시형태에서, SNX17의 PX 도메인(PI3P 결합)은 적어도 하나의 돌연변이를 포함할 수 있다. 적어도 하나의 돌연변이는 SNX17이 LDLR의 NPXY 모티프에 결합하여 수용체의 엔도솜 재생을 조절할 수 있는 능력을 변화시킬 수 있다.
- [0935] 하나의 실시형태에서, SNX17의 FERM-유사 도메인은 적어도 하나의 돌연변이를 포함할 수 있다. 적어도 하나의 돌연변이는 SNX17이 LDLR의 NPXY 모티프에 결합하여 수용체의 엔도솜 재생을 조절할 수 있는 능력을 변화시킬 수 있다.
- [0936] 하나의 실시형태에서, SNX17의 Ras-결합 도메인은 적어도 하나의 돌연변이를 포함할 수 있다. 적어도 하나의 돌연변이는 SNX17이 LDLR의 NPXY 모티프에 결합하여 수용체의 엔도솜 재생을 조절할 수 있는 능력을 변화시킬 수 있다.
- [0937] 하나의 실시형태에서, 본원에 기재된 LDLR 서열은 인산화된 적어도 하나의 아미노산을 포함할 수 있다. 비제한적인 예로서, 서열 NQDGYSPSR(서열 번호 63)에서의 적어도 하나의 아미노산은 인산화될 수 있다. 비제한적인 예로서, LDLR의 서열 번호 63에서 두 개의 티로신(Ys)은 인산화될 수 있다. 또 다른 비제한적인 예로서, 본원에 기재된 LDLR 서열에서 적어도 하나의 티로신(Y)은 인산화될 수 있다. 또 다른 비제한적인 예에서, 본원에 기재된 LDLR의 845 위치의 티로신과 847 위치의 티로신은 인산화된다.
- [0938] 하나의 실시형태에서, 본원에 기재된 LDLR 서열은 인산화된 적어도 하나의 아미노산을 포함할 수 있지만, 828 위치의 티로신은 인산화되지 않는다.
- [0939] 또 다른 실시형태에서, 본원에 기재된 LDLR 서열은 인산화된 적어도 하나의 아미노산을 포함할 수 있으며, 여기서, 아미노산의 적어도 하나는 828 위치에 티로신이다.
- [0940] 하나의 실시형태에서, 본원에 기재된 LDLR 서열은 C-말단 서열 LEDDVA(서열 번호 64)에 적어도 하나의 아미노산 돌연변이를 포함할 수 있다. 비제한적 예로서, 서열 번호 64는 LDLR 서열의 아미노산 855 내지 아미노산 860일 수 있다.
- [0941] 하나의 실시형태에서, LDLR 서열은 LDLR 서열의 N-결합된 글리코실화 부위에 적어도 하나의 돌연변이를 포함할 수 있다. 비제한적 예로서, 적어도 하나의 돌연변이가 아미노산 97, 156, 272, 515 및/또는 657에 위치할 수 있다.
- [0942] 또 다른 실시형태에서, LDLR 서열은 LDLR 서열의 O-결합된 글리코실화 부위에 적어도 하나의 돌연변이를 포함할 수 있다. 비제한적 예로서, 적어도 하나의 돌연변이가 아미노산 721-768에 위치할 수 있다.
- [0943] 또 다른 실시형태에서, LDLR 서열은 N-결합된 글리코실화 부위에 적어도 하나의 돌연변이를 그리고 O-결합된 글리코실화 부위에 적어도 하나의 돌연변이를 포함할 수 있다.

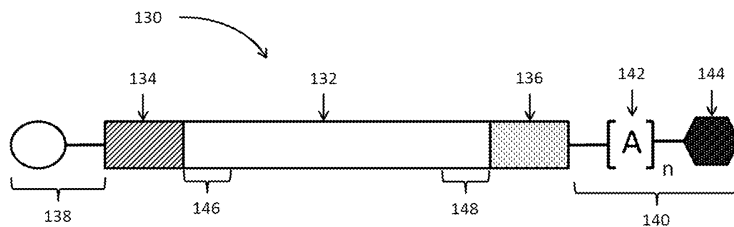
- [0944] 하나의 실시형태에서, 본원에 기재된 폴리뉴클레오타이드는 저밀도 지단백질 수용체 어댑터 단백질 1(LDLRAP1)에 대한 결합이 결손될 수 있다. 이론에 결부시키고자 하는 것은 아니지만, LDLRAP1 결합-결손 LDLR은 LDLR의 결합 및 내재화를 제한하여 LDLR 흡수를 감소시킬 수 있다.
- [0945] 하나의 실시형태에서, 본원에 기재된 LDLR 서열 및 작제물의 엑토-도메인은 세포질 도메인과 융합될 수 있다. 비제한적 예로서, LDLR 엑토-도메인은 엽산 수용체 TM-세포질 도메인과 융합될 수 있다. 또 다른 비제한적인 예로서, LDLR 엑토-도메인은 GPI-결합된 수용체 TM-세포질 도메인과 융합될 수 있다.
- [0946] 기타의 실시형태들
- [0947] 이용되는 단어들은 제한보다는 설명을 위한 단어들이며, 본 발명의 진정한 범위 및 취지를 벗어나지 않으면서 첨부된 특허청구범위의 조항 내에서 이의 보다 넓은 양상으로 변화가 이루어질 수 있음을 이해해야 한다.
- [0948] 본 발명은 수개의 기술된 실시형태에 관하여 어느 정도의 길이로 그리고 어느 정도의 특수하게 기술되어 있지만, 이것이 임의의 이러한 상세 또는 실시형태 또는 임의의 특수하나의 실시형태로 제한되어야 하는 것으로 의도되지 않으며, 이것은 선행 기술에 비추어 첨부된 특허청구범위의 가능한 가장 넓은 해석을 제공하고 따라서 본 발명의 의도된 범위를 효과적으로 망라하도록 이러한 특허청구범위를 참조하여 해석되어야 한다.
- [0949] 본원에 언급된 모든 간행물, 특허 출원, 특허 및 기타 참고문헌은 이들의 전문이 참고로 인용된다. 상충될 경우, 정의를 포함한 본 명세서가 지배할 것이다. 또한, 부문의 제목, 재료, 방법 및 실시예는 단지 예시적일 뿐 제한하는 것으로 의도되지 않는다.

도면

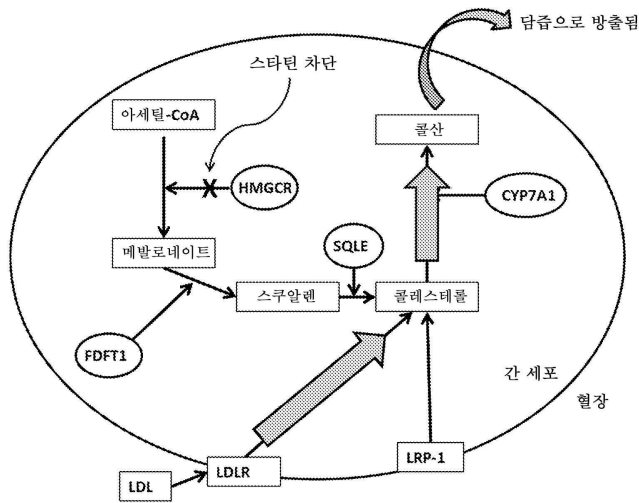
도면1



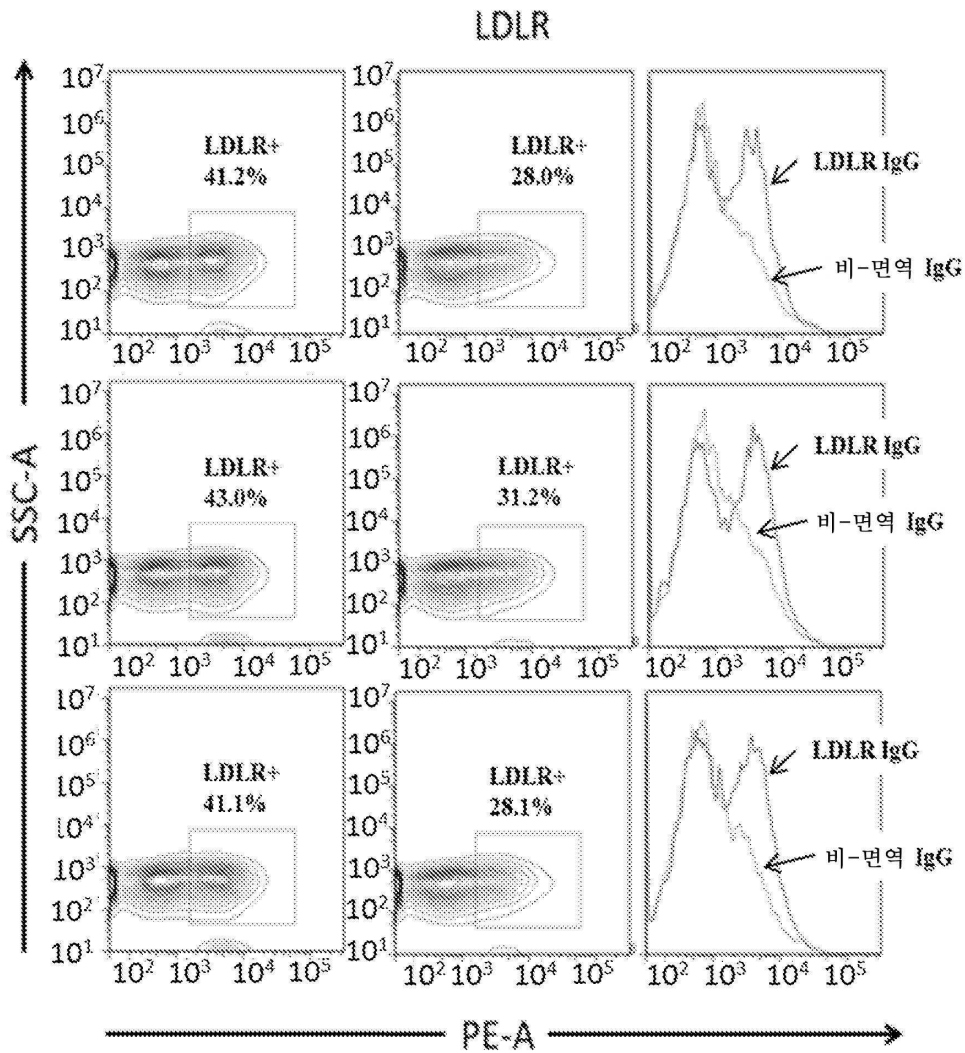
도면2



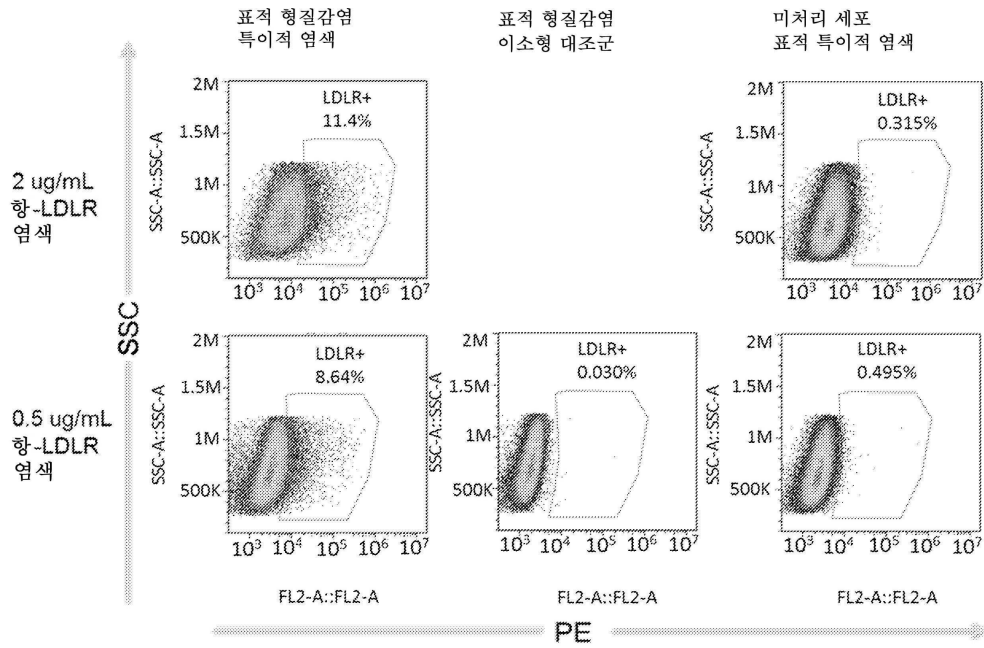
도면3



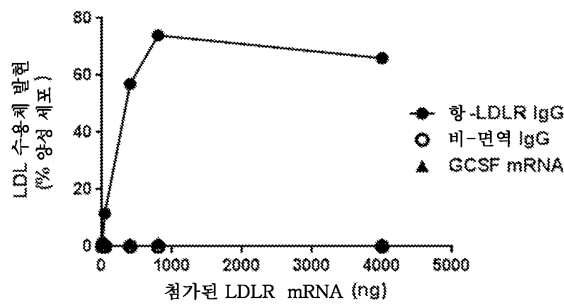
도면4



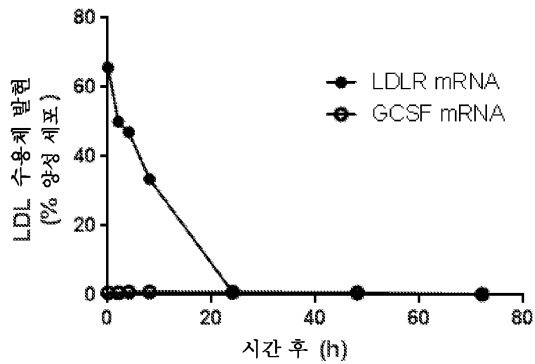
도면5



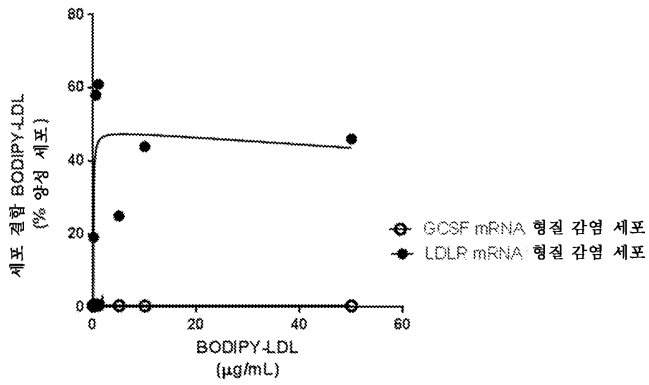
도면6a



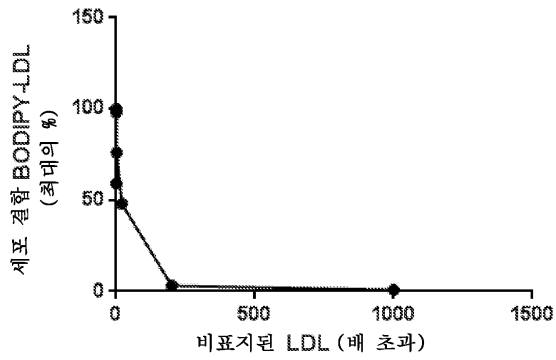
도면6b



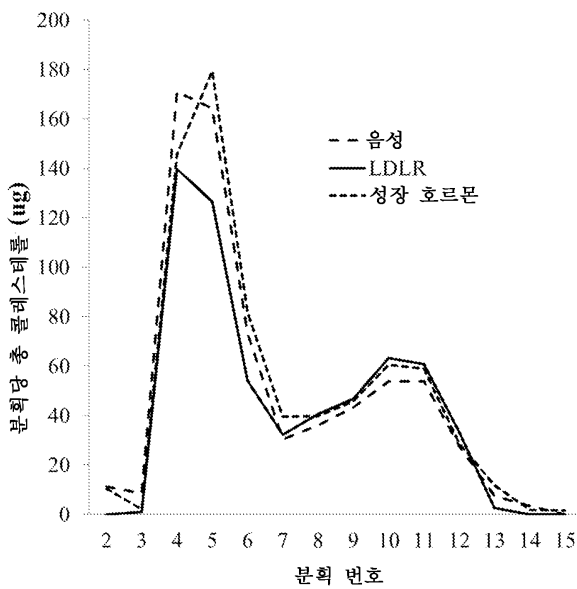
도면6c



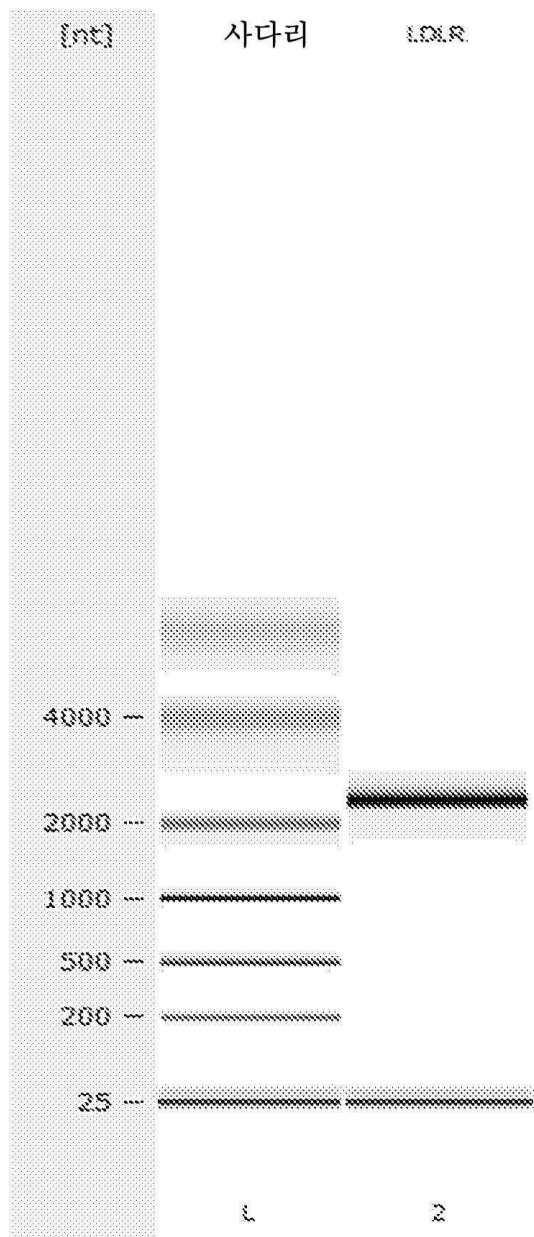
도면6d



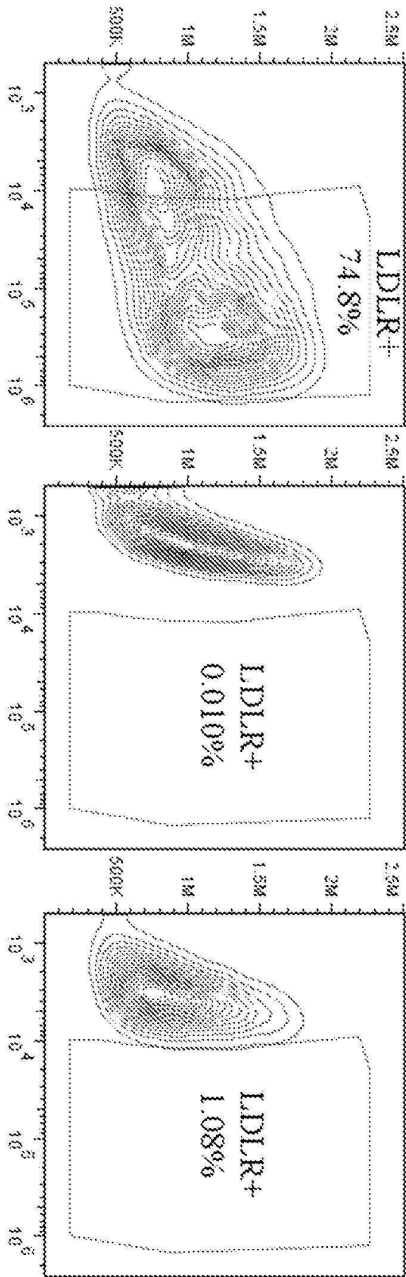
도면6e



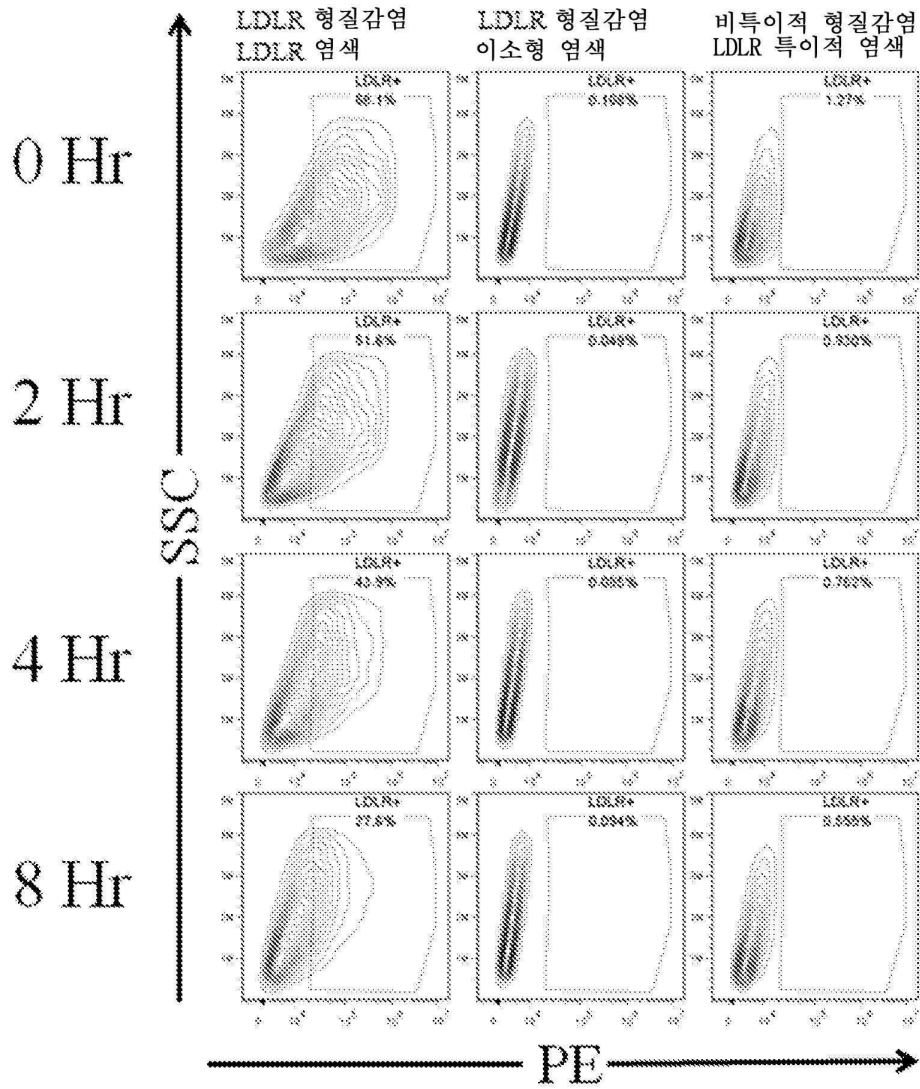
도면7



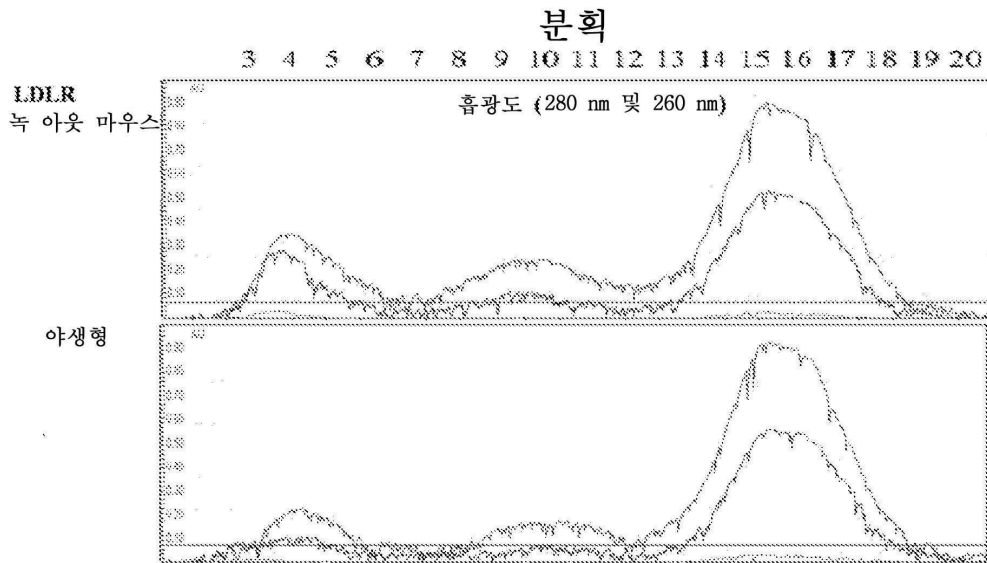
도면8



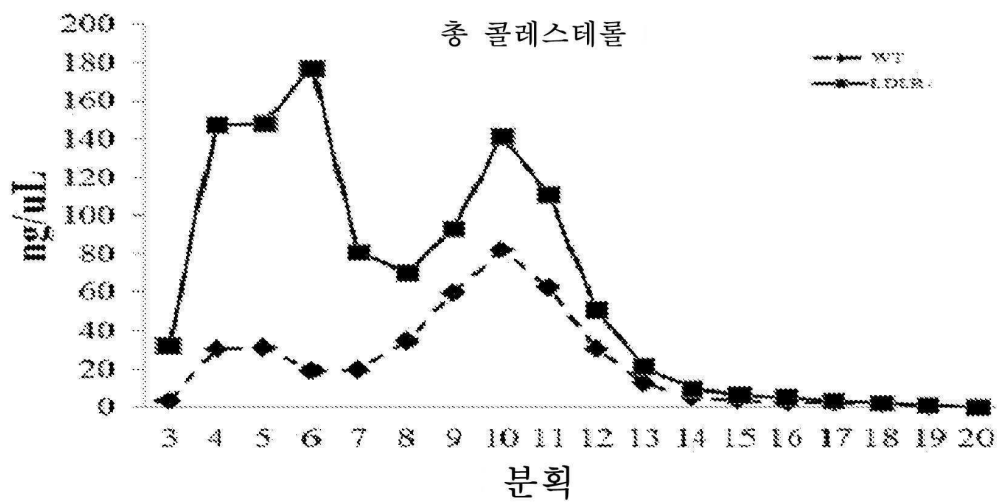
도면9



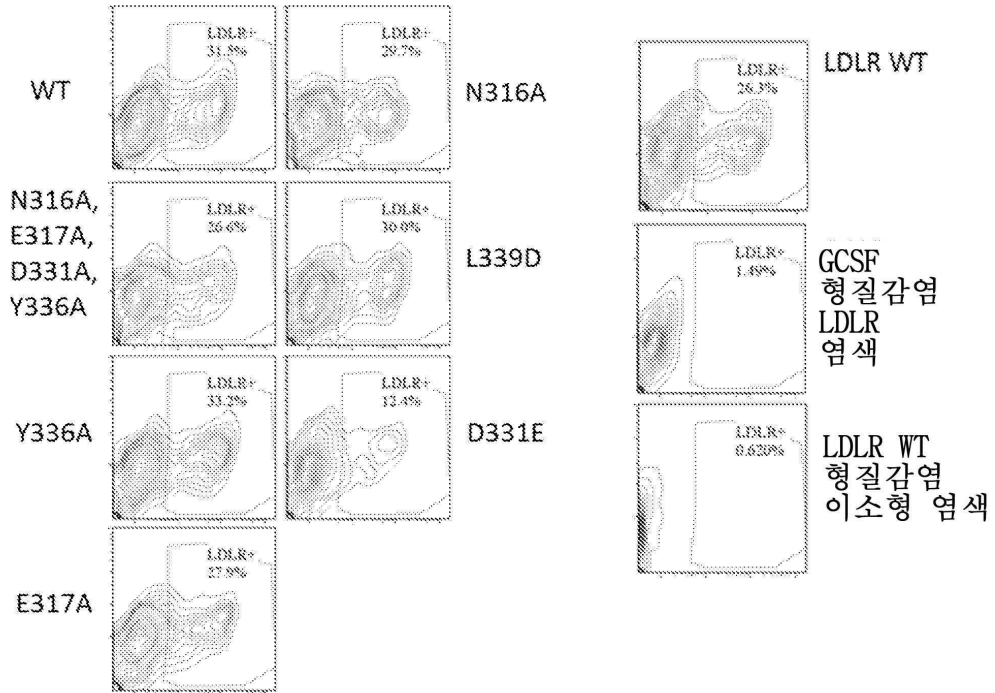
도면10a



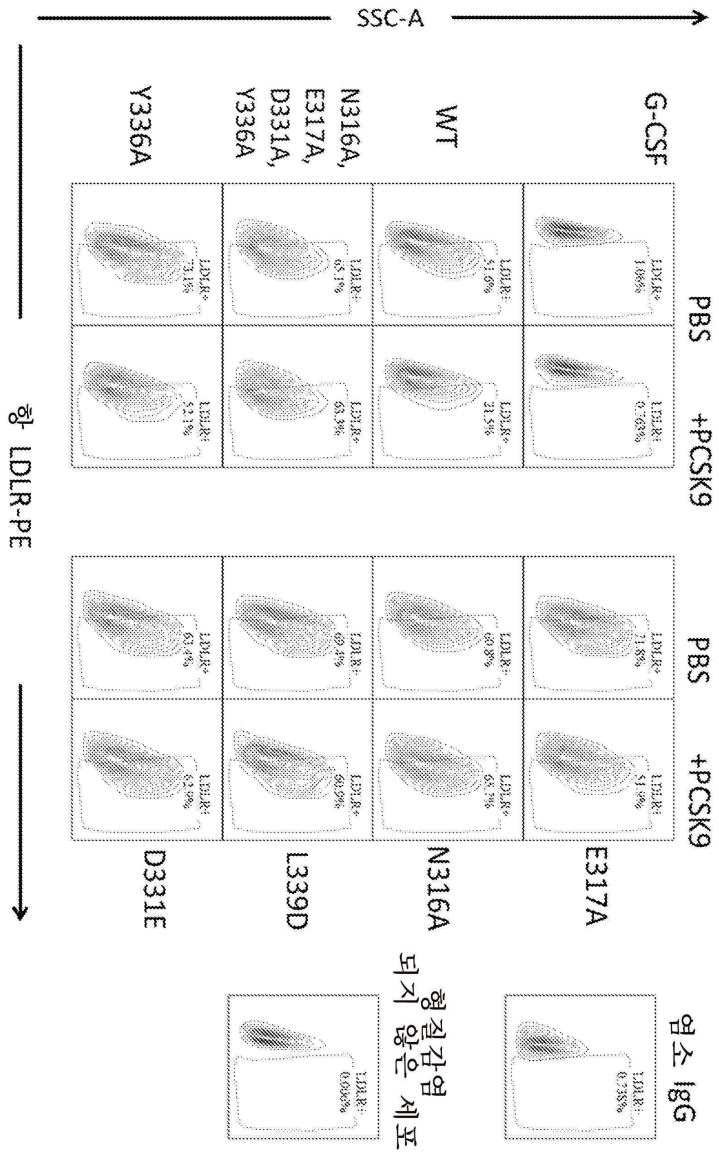
도면10b



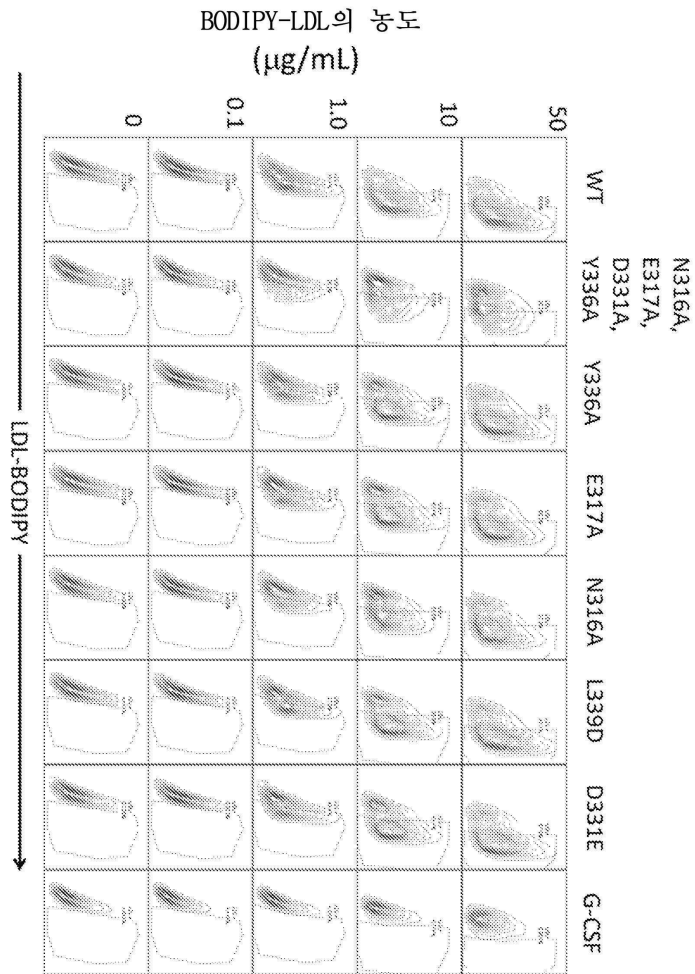
도면11



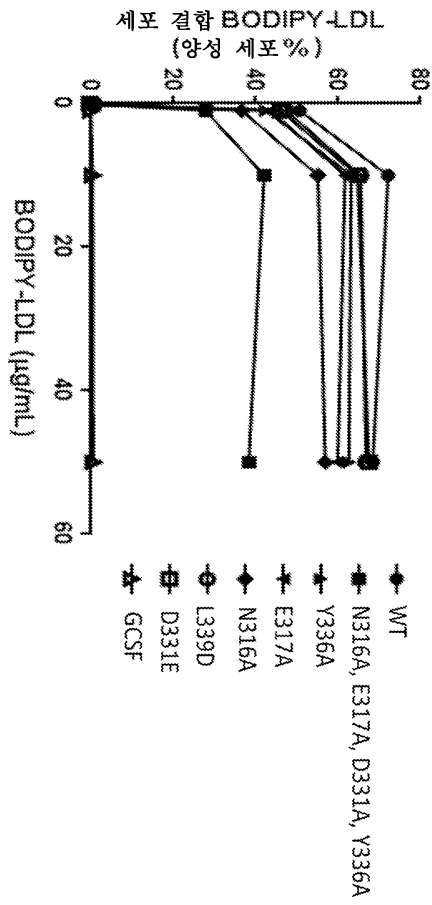
도면12



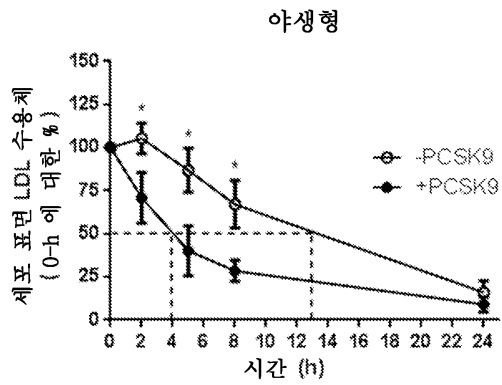
도면13a



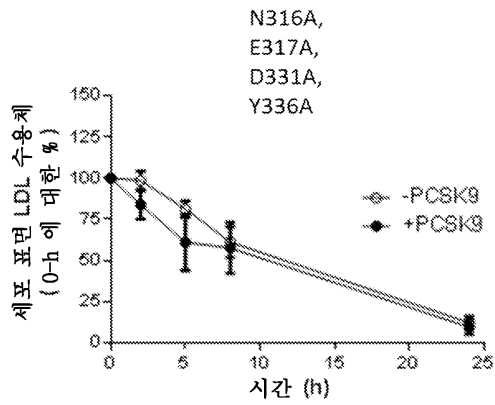
도면13b



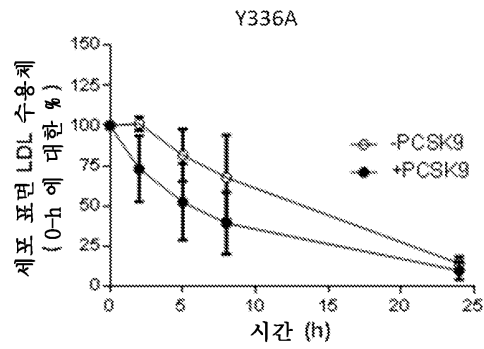
도면14a



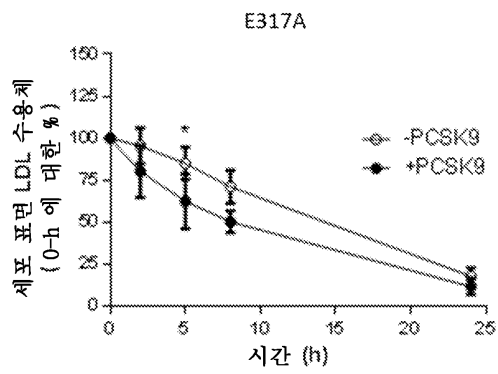
도면14b



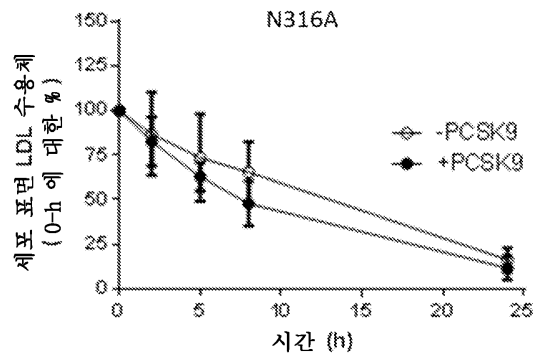
도면14c



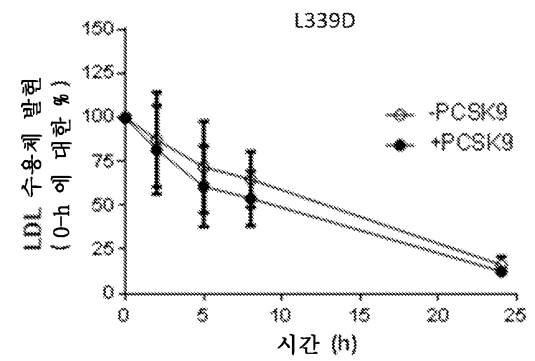
도면14d



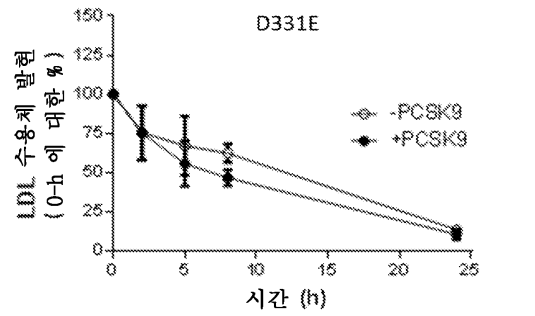
도면14e



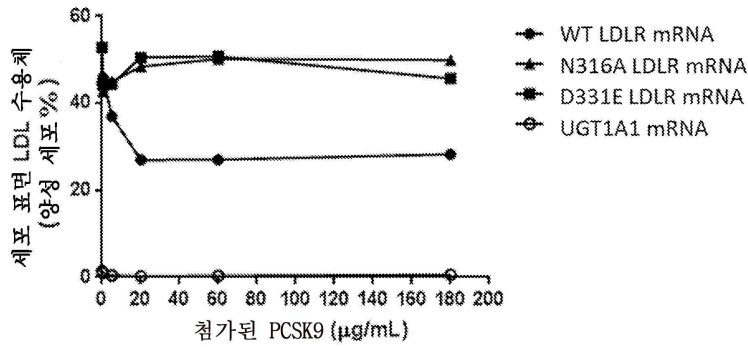
도면14f



도면14g



도면15



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> MODERNA THERAPEUTICS, INC.

<120> COMPOSITIONS AND METHODS OF ALTERING CHOLESTEROL LEVELS

<130> M044.20/2030.1044PCT

<150> US 61/786,737

<151> 2013-03-15

<150> US 61/828,214

<151> 2013-05-29

<150> US 61/839,488

<151> 2013-06-26

<150> US 61/903,474

<151> 2013-11-13

<150> US 14/135,887

<151> 2013-12-20

<160> 64

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 2333

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

gtgcaatcgc gggaagccag ggtttccagc taggacacag caggtcgtga tccgggtcgg 60

gacactgcct ggcagaggct gcgagcatgg ggccttgggg ctggaaattg cgctggaccg 120

tcgccttgct cctcggccgc gcggggactg cagtgggcga cagatgcgaa agaaacgagt 180
 tccagtgcc aagcgggaaa tgcattctct acaagtgggt ctgcatggc agcctgagt 240
 gccaggatgg ctctgatgag tcccaggaga cgtgcttgtc tgtcacctgc aatccgggg 300
 acttcagctg tgggggacct gtcaaccgct gatttcctca gttctggagg tgcgatggcc 360
 aagtggactg cgacaacggc tcagacgagc aaggctgtct gacctctgc gagggacca 420
 acaagttcaa gtgtcacagc ggcgaatgca tcacctgga caaagtctgc aacatggcta 480

 gagactgcc ggactggtca gatgaacca tcaaagagt cgggaccaac gaatgcttgg 540
 acaacaacgg cgctgttcc cacgtctgca atgacctaa gatcgctac gagtgcctgt 600
 gccccgacgg cttccagctg gtggcccagc gaagatgcga agatatgat gagtgtcagg 660
 atcccagcac ctgacccag ctctgctgta acctggaggg tggctacaag tgccagtgtg 720
 aggaaggctt ccagctggac ccccacacga aggcctgcaa ggctgtgggc tccatcgct 780
 acctttctt caccaaccgg cacgaggtca ggaagatgac gctggaccgg agcgagtaca 840
 ccagcctcat cccaacctg aggaacctg tcgctctgga cacggaggtg gccagcaata 900

 gaatctactg gtctgacctg tcccagagaa tgatctgcag caccagctt gacagagccc 960
 acggcgtctc ttctatgac accgtcatca gcagagacat ccaggcccc gacgggctgg 1020
 ctgtggactg gatccacagc aacatctact ggaccgactc tgtctgggc actgtctctg 1080
 ttgcgatc caagggcgtg aagaggaaaa cgttattcag ggagaacggc tccaagcaa 1140
 gggccatcgt ggtggatcct gttcatgct tcatgtactg gactgactgg ggaactccg 1200
 ccaagatcaa gaaagggggc ctgaatggtg tggacatcta ctcgctggtg actgaaaaca 1260
 ttcagtggcc caatggcacc acctagatc tctcagtgg ccgctctac tgggttgact 1320

 ccaaacttca ctccatctca agcatgatg tcaacggggg caaccggaag accatcttgg 1380
 aggatgaaaa gagctggcc cacccttct ccttggccgt ctttgaggac aaagtatttt 1440
 ggacagatat catcaacgaa gccattttca gtgccaaccg cctcacagg tccgatgtca 1500
 acttgttggc tgaaaccta ctgtcccag aggatatggt tctctccac aacctcacc 1560
 agccaagagg agtgaactgg tgtgagagga ccacctgag caatggcggc tgccagtatc 1620
 tgtgctccc tgccccgag atcaaccccc actcgcccaa gtttacctgc gcctgcccgg 1680
 acggcatgct gctggccagg gacatgagga gctgcctcac agaggctgag gctgcagtgg 1740

 ccacccagga gacatccacc gtcaggctaa aggtcagctc cacagccgta aggacacagc 1800
 acacaaccac ccgacctgt cccgacacct cccggctgcc tggggccacc cctgggctca 1860
 ccagggtgga gatagtaca atgtctcacc aagctctggg cgacttgct ggcagaggaa 1920
 atgagaagaa gccagtagc gtgagggctc tgtccattgt cctccccatc gtgctctctg 1980

tcttcctttg cctgggggtc ttccttctat ggaagaactg gcggttaag aacatcaaca 2040
 gcatcaactt tgacaacccc gtctatcaga agaccacaga ggatgaggtc cacatttgcc 2100
 acaaccagga cggtacagc taccctcga gacagatggt cagtctggag gatgacgtgg 2160

 cgogaacatc tgcctggagt cccgtccctg cccagaacc ttectgagac ctgcccggcc 2220
 ttgttttatt caaagacaga gaagacaaa gcattgcctg ccagagcttt gttttatata 2280
 tttattcatc tgggaggcag aacaggcttc ggacagtcc catgcaatgg ctt 2333

 <210> 2
 <211> 2220
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 2

 atggggccct ggggctgaa attgcgctgg accgtcgct tgctcctgc cgcggcgggg 60
 actgcagtgg gcgacagatg cgaaagaac gacttccagt gcaacagctc cacctgcatc 120
 ccccagctgt gggcctgca caacgacccc gactgcaag atggctcga tgagtggccg 180

 cagcgtgta ggggtcttta cgtgttccaa ggggacagta gcccctgctc ggcttccgag 240
 ttccactgcc taagtggcga gtgcatccac tccagctggc gctgtgatgg tggeccccgac 300
 tgcaaggaca aatctgacga ggaactgc gctgtggcca cctgtcggc tgacgaattc 360
 cagtgtctg atgaaactg catccatggc agccggcagt gtgaccggga atatgactgc 420
 aaggacatga gcatgaagt tggctgcgtt aatgtgacac tctcggagg acccaacaag 480
 tccaagtgc acagggcga atgcatcacc ctggacaaag tctgcaacat ggctagagac 540
 tgccgggact ggtcagatga accatcaaa gagtgcggga ccaacgaatg cttggacaac 600

 aacggcggct gttcccactg ctgcaatgac cttaatgctg gctacgagtg cctgtgcccc 660
 gacggcttcc agctgggtggc ccagcgaaga tgcaagata tcatgagtgc tcaggatccc 720
 gacacctgca gccagctctg cgtgaacctg gaggtggct acaagtcca gtgtgaggaa 780
 ggcttccagc tggaccccc cacgaaggcc tgcaaggctg tgggtccat cgcctacctc 840
 ttcttccca accggcacga ggtcaggaag atgacgctgg accggagcga gtacaccagc 900
 ctcatcccc acctgaggaa cgtggctgct ctggacacgg aggtggccag caatagaatc 960
 tactggctg accgttcca gagaatgatc tgcagacccc agcttgacag agcccacggc 1020

 gtctcttct atgacaccgt catcagcaga gacatccagg cccccgacgg gctggctgtg 1080
 gactggatcc acagcaacat ctactggacc gactctgtcc tgggcaactg ctctgttgcg 1140
 gataccaagg gcgtgaagag gaaaacttta ttcagggaga acggctcca gccaagggcc 1200

atcgtgggtg atcctgttca tggcttcatg tactggactg actggggaac tcccgcaag 1260
 atcaagaaag ggggcctgaa tgggtgggac atctactcgc tgggtactga aaacattcag 1320
 tggcccaatg gcatcacctc agatctctc agtggccgcc tctactgggt tgactccaaa 1380
 cttcactcca tctcaagcat cgatgtcaac gggggcaacc ggaagacat cttggaggat 1440

 gaaaagaggc tggcccacc cttctccttg gccgtctttg aggacaaagt attttgaca 1500
 gatatcatca acgaagccat tttcagtcc aaccgcctca caggttccga tgtcaacttg 1560
 ttggctgaaa acctactgtc cccagaggat atggttctct tccacaacct caccagcca 1620
 agaggagtga actggtgtga gaggaccacc ctgagcaatg gcggtgcca gtatctgtgc 1680
 ctcctgccc cgcagatcaa cccccactcg cccaagtta cctgcgctg cccggacggc 1740
 atgctgctgg ccaggacat gaggagtgc ctcacagagg ctgaggctgc agtggccacc 1800
 caggagacat ccaccgtcag gctaaaggtc agctccacag ccgtaaggac acagcacaca 1860

 accaccgac ctgttcccga cacctcccgg ctgcctgggg ccaccctgg gctcaccag 1920
 gtggagatag tgacaatgtc tcaccaagct ctgggcgacg ttgctggcag aggaatgag 1980
 aagaagccca gtagcgtgag ggctctgtcc attgtcctcc ccatcgtgct cctcgtcttc 2040
 ctttgcctgg gggcttctct tctatggaag aactggcggc ttaagaacat caacagcatc 2100
 aactttgaca acccctgcta tcagaagacc acagaggatg aggtccacat ttgccacaac 2160
 caggacggct acagctacc ctcgagacag atggtcagtc tggaggatga cgtggcgtga 2220

 <210> 3
 <211> 3617
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 3

 ctcttgacgt gagtgaaga cattgaaaa tcacccact gcaactcct cccctgcta 60
 gaaacctcac attgaaatgc tgtaaatgac gtgggccccg agtcaatcg cggaagcca 120
 gggtttcag ctaggacaca gcaggtcgtg atccgggtcg ggacactgcc tggcagaggc 180
 tgcgagcatg gggccctggg gctggaaatt gcgctggacc gtcgccttgc tcctcgccgc 240
 ggcggggact gcagtggcgc acagatgcga aagaaacgag ttccagtgcc aagacgggaa 300
 atgcatctcc tacaagtggg tctcagatgg cagcgtgag tgccaggatg gctctgatga 360
 gtcccaggag acgtgcttgt ctgtcacctg caaatccggg gacttcagct gtgggggccg 420

 tgtcaaccgc tgcattctc agttctggag gtgcgatggc caagtgact gcgacaacgg 480
 ctgagacgag caaggctgtc ccccaagac gtgctcccag gacgagtttc gctgccacga 540

tgggaagtgc atctctcggc agttcgtctg tgactcagac cgggactgct tggacggctc 600
 agacgaggcc tctgccccgg tgctcacctg tggccccccc agcttccagt gcaacagctc 660
 cacctgcatc ccccagctgt gggcctgcga caacgacccc gactgcgaag atggctcgga 720
 tgagtggccg cagcgtgta ggggtcttta cgtgttccaa ggggacagta gccctgctc 780
 ggccttcgag ttccactgcc taagtggcga gtgcatccac tccagctggc gctgtgatgg 840

 tggccccgac tgcaaggaca aatctgacga ggaaaactgc gctgtggcca cctgtcggcc 900
 tgacgaattc cagtgtctg atggaaactg catccatggc agccggcagt gtgaccggga 960
 atatgactgc aaggacatga gcgatgaagt tggtgcgctt aatgtgacac tctcggaggg 1020
 acccaacaag ttcaagtgtc acagcggcga atgcatcacc ctggacaaag tctgcaacat 1080
 ggctagagac tgccgggact ggtcagatga acccatcaaa gactgcggga ccaacgaatg 1140
 cttggacaac aacggcggt gttcccactg ctgcaatgac cttaatatcg gctacgagtg 1200
 cctgtgcccc gacggcttcc agctggtggc ccagcgaaga tgcgaagata tcgatgagtg 1260

 tcaggatccc gacacctgca gccagctctg cgtgaacctg gagggtggt acaagtcca 1320
 gtgtgaggaa ggcttccagc tggacccccca cacgaaggcc tgcaaggctg tgggtccat 1380
 cgctacctc ttcttaccac accggcacga ggtcaggaag atgacgctgg accggagcga 1440
 gtacaccagc ctcatcccc acctgaggaa cgtggtcgtc ctggacacgg aggtggccag 1500
 caatagaatc tactggtctg acctgtccca gagaatgatc tgcagcacc agcttgacag 1560
 agccccggc gtctcttct atgacaccgt catcagcaga gacatccagg cccccgacgg 1620
 gctggctgtg gactggatcc acagcaacat ctactggacc gactctgtcc tgggcactgt 1680

 ctctgttcg gataccaagg gcgtgaagag gaaaacttta ttcagggaga acggctccaa 1740
 gccaaaggcc atcgtggtgg atcctgttca tggttcatg tactggactg actggggaac 1800
 tcccgccaag atcaagaaag gggcctgaa tgggtggac atctactcgc tggtgactga 1860
 aaacattcag tggccaatg gcatcacct agatctctc agtggccgcc tctactgggt 1920
 tgactccaaa cttactcca tctcaagcat cgatgtcaac gggggcaacc ggaagacat 1980
 cttggaggat gaaaagaggc tggccccacc cttctccttg gccgtcttg aggacaaagt 2040
 attttgaca gatatcatca acgaagccat tttcagtgcc aaccgctca caggttccga 2100

 tgtcaacttg ttggctgaaa acctactgtc cccagaggat atggttctct tccacaacct 2160
 caccagcca agaggagtga actggtgtga gaggaccacc ctgagcaatg gcggtgcca 2220
 gtatctgtgc ctccctgccc cgcagatcaa cccccactcg cccaagtta cctgcgctg 2280
 cccggacggc atgctgtg ccaggacat gaggagctgc ctacagagg ctgaggctgc 2340
 agtggccacc caggagacat ccaccgtcag gctaaagtc agctccacag ccgtaaggac 2400

acagcacaca accacccgac ctgttcccga cacctcccgg ctgcctgggg ccaccctgg	2460
gctcaccacg gtggagatag tgacaatgtc tcaccaagct ctgggcgacg ttgctggcag	2520
aggaaatgag aagaagccca gtagcgtgag ggctctgtcc attgtectcc ccatcgtgct	2580
cctcgtcttc ctttgcctgg gggcttctct tctatggaag aactggcggc ttaagaacat	2640
caacagcadc aactttgaca accccgtcta tcagaagacc acagaggatg aggtccacat	2700
ttgccacaac caggacggct acagctaccc ctcgagacag atggtcagtc tggaggatga	2760
cgtggcgtga acatctgctt ggagtcctct ccctgccag aaccttctct gagacctgc	2820
cggccttgtt ttattcaaag acagagaaga ccaaagcatt gcctgccaga gctttgtttt	2880
atatatttat tcatctggga ggcagaacag gcttcggaca gtgccatgc aatggcttgg	2940
gttgggattt tggtttcttc ctttcctcgt gaaggataag agaaacaggc ccggggggac	3000
caggatgaca cctccatttc tctccaggaa gttttgagtt tctctccacc gtgacacaat	3060
cctcaaacat ggaagatgaa aggggagggg atgtcaggcc cagagaagca agtggcttcc	3120
aacacacaac agcagatggc accaacggga cccctggcc ctgcctcadc caccaatctc	3180
taagccaaac ccctaaactc aggagtcaac gtgtttacct cttctatgca agccttgcta	3240
gacagccagg ttagcctttg ccctgtcacc cccgaatcat gaccaccca gtgtctttcg	3300
aggtaggttt gtaccttctc taagccagga aaggattca tggcgtcggg aatgatctgg	3360
ctgaatccgt ggtggcaccg agaccaaact cattaccaa atgatccac ttcccagagg	3420
cagagcctga gtcactggtc acccttaata ttattaagt gcctgagaca cccggttacc	3480
ttggccgtga ggacacgtgg cctgcacca ggtgtggctg tcaggacacc agcctggtgc	3540
ccatctctcc gaccctacc cacttcatt cccgtggtct ccttgactt tctcagttca	3600
gagttgtaca ctgtgta	3617
<210> 4	
<211> 3144	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 4	
gccagggttt ccagctagga cacagcaggt cgtgatccgg gtcgggacac tgcctggcag	60
aggctgcgag catggggccc tggggctgga aattgcgctg gaccgtgcc ttgctctctg	120
ccgcggcggg gactgcagtg ggcgacagat gcgaaagaaa cgagttccag tgccaagacg	180
ggaaatgcat ctctacaag tgggtctgcg atggcagcgc tgagtccag gatggctctg	240
atgagtccca ggagacgtgc ttgtctgtca cctgcaaac cggggacttc agctgtgggg	300

gccgtgtcaa ccgctgcatt cctcagttct ggaggtgcga tggccaagtg gactgcgaca 360
acggctcaga cgagcaaggc tgtccccca agacgtgctc ccaggacgag tttcgctgcc 420
acgatgggaa gtgcatctct cggcagttcg tctgtgactc agaccgggac tgcttggacg 480

gctcagacga ggcctcctgc ccggtgctca cctgtggtcc cgccagcttc cagtgcaaca 540
gctccacctg catccccag ctgtgggctt gcgacaacga ccccgactgc gaagatggct 600
cggatgagtg gcccgagcgc tgtaggggtc tttacgtgtt ccaaggggac agtagccct 660
gctcggcctt cgagttccac tgcctaagtg gcgagtgcac cactccagc tggcgtgtg 720
atggtggccc cgactgcaag gacaaatctg acgaggaaaa ctgctgtgtg gccacctgc 780
gcctgacga attccagtgc tctgatggaa actgcatcca tggcagccgg cagtgtgacc 840
gggaatatga ctgcaaggac atgagcgtg aagtggctg cgtaaatgtg aactctgctg 900

agggacccaa caagttaag tgtcacagcg gcgaatgcat caccctggac aaagtctgca 960
acatggctag agactgccgg gactggtcag atgaacccat caaagagtgc gggaccaacg 1020
aatgcttggg caacaacggc ggctgttccc acgtctgcaa tgaccttaag atcggtacg 1080
agtgcctgtg ccccgacggc ttccagctgg tggcccagcg aagatgcgaa gatatcgatg 1140
agtgtcagga tcccagacc tgcagccagc tctgcgtgaa cctggagggt ggctacaagt 1200
gccagtgtga ggaaggcttc cagctggacc cccacacgaa ggcctgcaag gctgtgggct 1260
ccatcgctca cctcttctt accaaccggc acgaggtcag gaagatgacg ctggaccgga 1320

gcgagtacac cagcctcacc cccaacctga ggaacgtggt cgctctggac acggaggtgg 1380
ccagcaatag aatctactgg tctgacctgt cccagagaat gatctgcagc acccagcttg 1440
acagagccca cggcgtctct tcctatgaca ccgtcatcag cagagacacc caggccccg 1500
acgggctggc tgtggactgg atccacagca acatctactg gaccgactct gtctctggca 1560
ctgtctctgt tgcggatacc aaggcgtga agaggaaaac gttattcagg gagaacggct 1620
ccaagccaag ggccatcgtg gtggatcctg ttcattggctt catgtactgg actgactggg 1680
gaactcccgc caagatcaag aaagggggcc tgaatggtgt ggacatctac tcgctggtga 1740

ctgaaaacat tcagtggccc aatggcatca ccctagatct cctcagtggc cgctctact 1800
gggttgactc caaacttac tccatctcaa gcatcgatgt caacgggggc aaccggaaga 1860
ccatcttggg ggatgaaaag aggetggccc acccttctc cttggccgtc tttgaggaca 1920
aagtattttg gacagatacc atcaacgaag ccattttcag tgccaaccgc ctacacagtt 1980
ccgatgtcaa cttgttgctt gaaaacctac tgtccccaga ggatatggtt ctctccaca 2040
acctcaccca gccaaagga gtgaactggt gtgagaggac caccctgagc aatggcggct 2100

gccagtatct gtgcctcctt gccccgcaga tcaacccccca ctcgccaag tttacctgcg 2160

cctgccccga cggcatgctg ctggccaggg acatgaggag ctgcctcaca gaggctgagg 2220

ctgcagtggc caccaggag acatccaccg tcaggctaaa ggtcagctcc acagccgtaa 2280

ggacacagca cacaaccacc cgacctgttc ccgacacctc ccggctgcct ggggccaccc 2340

ctgggctcac cacggtggag atagtgacaa tgtctacca agctctgggc gacgttgctg 2400

gcagaggaaa tgagaagaag ccagtagcg tgagggtctt gtccattgtc ctccccatcg 2460

tgtcctcctg cttcctttgc ctgggggtct tccttctatg gaagaactgg cggcttaaga 2520

acatcaacag catcaacttt gacaaccccg tctatcagaa gaccacagag gatgaggtcc 2580

acatttgcca caaccaggac ggctacagct acccctcgat ggtcagtctg gaggatgacg 2640

tggcgtgaac atctgcctgg agtcccgtcc ctgccagaa cccttcctga gacctgcccg 2700

gccttgtttt attcaaagac agagaagacc aaagcattgc ctgccagagc tttgttttat 2760

atatttattc atctgggagg cagaacaggc ttcggacagt gccatgcaa tggcttgggt 2820

tgggattttg gtttcttctt ttctctgtga aggataagag aaacaggccc ggggggacca 2880

ggatgacacc tccatttctc tccaggaagt tttgagtttc tctccaccgt gacacaatcc 2940

tcaaacatgg aagatgaaag gggaggggat gtcaggccca gagaagcaag tggctttcaa 3000

cacacaacag cagatggcac caacgggacc ccctggcctt gcctcatcca ccaatctcta 3060

agccaaacc ctaaactcag gagtcaactg gtttacctt tctatgcaag ccttgctaga 3120

cagccagggtt agcctttgcc ctgt 3144

<210> 5

<211> 2768

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

gtgcaatcgc ggaagccag ggtttccagc taggacacag caggtcgtga tccgggtcgg 60

gacactgcct ggcagaggct gcgagcatgg ggccctgggg ctgaaaattg cgctggaccg 120

tgccttgct cctcgcccg gcggggactg cagtgggcga cagatgcgaa agaaacgagt 180

tccagtgcc agacgggaaa tgeatctctt acaagtgggt ctgcgatggc agcgtgagt 240

gccaggatgg ctctgatgag tcccaggaga cgtgctcccc caagacgtgc tcccaggacg 300

agtttcgctg ccacgatggg aagtgcattc ctcggcagtt cgtctgtgac tcagaccggg 360

actgcttga cggctcagac gaggcctcct gcccggtgct cacctgtggt cccgccagct 420

tccagtgcaa cagctccacc tgeatcccc agctgtgggc ctgcgacaac gaccccgact 480

gcgaagatgg ctcggatgag tggccgcagc gctgtagggg tctttacgtg ttccaagggg 540
 acagtagccc ctgctcggcc ttcgagttcc actgcctaag tggcaggtgc atccactcca 600

gctggcgtg tgatggtggc cccgactgca aggacaaatc tgacgaggaa aactgcgctg 660
 tggccactg tgcacctgac gaattccagt gctctgatgg aaactgcatc catggcagcc 720
 ggcagtgtga ccgggaatat gactgcaagg acatgagcga tgaagttggc tgcgttaatg 780
 tgacactctg cgagggaccc aacaagttca agtgtcacag cggcgaatgc atcacctgg 840
 acaaagtctg caacatggct agagactgcc gggactggtc agatgaacc atcaaagagt 900
 gcgggaccaa cgaatgcttg gacaacaacg gcgctgttc ccactctgc aatgacctta 960
 agatcggtcga cgagtgcctg tgccccgacg gcttccagct ggtggcccag cgaagatgcg 1020

aagatatcga tgagtgtcag gatccccaca cctgcagcca gctctgctg aacctggagg 1080
 gtggctacaa gtgccagtgt gaggaaggct tccagctgga cccccacacg aaggcctgca 1140
 aggctgtggg ctccatgcc tacctcttct tcaccaaccg gcacgaggtc aggaagatga 1200
 cgctggaccg gagcgagtac accagcctca tccccaacct gaggaacgtg gtcgctctgg 1260
 acacggagggt ggccagcaat agaatctact ggtctgacct gtcccagaga atgatctgca 1320
 gcaccagct tgacagagcc cacggcgtct ctctctatga caccgtcatc agcagagaca 1380
 tccaggcccc cgacgggctg gctgtggact ggatccacag caacatctac tggaccgact 1440

ctgtcctggg cactgtctct gttgcggata ccaagggcgt gaagaggaaa acgttattca 1500
 gggagaacgg ctccaagcca agggccatcg tggaggatcc tgttcatggc ttcattact 1560
 ggactgactg gggaaactccc gccaagatca agaaaggggg cctgaatggt gtggacatct 1620
 actcgtggt gactgaaaac attcagtggc ccaatggcat caccctagat ctctcagtg 1680
 gccgccteta ctgggttgac tccaaacttc actccatctc aagcatgat gteaacgggg 1740
 gcaaccggaa gaccatcttg gaggatgaaa agaggctggc ccaacccttc tccttggccg 1800
 tctttgagga caaagtatct tggacagata tcatcaacga agccattttc agtgccaacc 1860

gcctcacagg ttccgatgac aactgtttgg ctgaaaacct actgtcccca gaggatatgg 1920
 ttctcttcca caacctcacc cagccaagag gactgaaactg gtgtgagagg accacctga 1980
 gcaatggcgg ctgccagtat ctgtgcctcc ctgccccgca gatcaacccc cactcgccca 2040
 agtttacctg cgctgcccc gacggcatgc tgctggccag ggacatgagg agctgcctca 2100
 cagaggctga ggctgcagtg gccacccagg agacatccac cgtcaggcta aaggtcagct 2160
 ccacagccgt aaggacacag cacacaacca cccgacctgt tcccacacc tcccggctgc 2220

ctggggccac ccctgggctc accacggtgg agatagtac aatgtctcac caagctctgg 2280

gcgacgttgc tggcagagga aatgagaaga agcccagtag cgtgaggct ctgtccattg 2340

tcctcccat cgtgctctc gtcttcttt gcctgggggt cttccttcta tggagaact 2400

ggcggcttaa gaacatcaac agcatcaact ttgacaacc cgtctatcag aagaccacag 2460

aggatgaggt ccacatttgc cacaaccagg acggctacag ctaccctcg agacagatgg 2520

tcagtctgga ggatgacgtg gctgaacat ctgcctggag tccctcct gccagaacc 2580

cttctgaga cctcgccgc cttgtttat tcaaagacag agaagacaa agcattgcct 2640

gccagagctt tgtttatat atttattcat ctgggaggca gaacaggctt cggacagtgc 2700

ccatgcaatg gcttgggtg ggattttgt ttcttcttt cctcgtgaag gataagagaa 2760

acaggccc 2768

<210> 6

<211> 2429

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

gtcaatcgc ggaagccag ggtttccagc taggacacag caggtcgtga tccgggtcgg 60

gacactgcct ggcagaggct gcgagcatgg ggccctgggg ctggaaattg cgctggaccg 120

tcgccttct cctcgccgc gcggggactg cagtgggca cagatgcgaa agaacagat 180

tccagtcca agacgggaaa tgcattctct acaagtgggt ctgcgatggc agcgtgagt 240

gccaggatgg ctctgatgag tcccaggaga cgtccttgc tgtcacctgc aatccgggg 300

acttcagctg tgggggccgt gteaaccgt gatttctca gttctggagg tgcgatggcc 360

aagtggactg cgacaacggc tcagacgagc aaggctgtcc tgtggccacc tgtcgccctg 420

acgaattcca gtgctctgat ggaactgca tccatggcag ccggcagtgt gaccgggaat 480

atgactgcaa ggacatgagc gatgaagtgt gctgcgttaa tgtgacactc tgcgaggac 540

ccaacaagt caagtgtcac agcggcgaat gcatcacct ggacaaaagtc tgcaacatgg 600

ctagagactg ccgggactgg tcagatgaac ccatcaaaga gtgcgggacc aacgaatgct 660

tggacaacaa cggcgctgt tcccactct gcaatgacct taagatcggc tacgagtgcc 720

tgtccccga cggttccag ctggtggccc agcgaagatg cgaagatc gatgagtgc 780

aggatcccga cacctgcagc cagctctcgc tgaacctgga ggggtggctac aagtgccagt 840

gtgaggaagg cttccagctg gacccccaca cgaaggcctg caaggctgtg ggctccatcg 900

cctacctctt cttaccaac cggcacgagg tcaggaagat gacgctggac cggagcgagt 960

acaccagcct catcccaac ctgaggaacg tggctcgtct ggacacggag gtggccagca 1020
 atagaatcta ctggtctgac ctgtcccaga gaatgatctg cagcaccag cttgacagag 1080

cccacggcgt ctcttctat gacaccgtca tcagcagaga catccaggcc cccgacgggc 1140
 tggctgtgga ctggatccac agcaacatct actggaccga ctctgtctg ggcaactgtct 1200
 ctgttgcgga taccaagggc gtgaagagga aaacgttatt cagggagaac ggctccaagc 1260
 caaggccat cgtggtgat cctgttcacg gcttcacgta ctggactgac tggggaactc 1320
 ccgccaagat caagaaaggg ggcctgaatg gtgtggacat ctactcgtg gtgactgaaa 1380
 acattcagtg gccaatggc atcaccctag atctcctcag tggccgcctc tactgggttg 1440
 actccaaact tcactccatc tcaagcatcg atgtcaacgg gggcaaccgg aagaccatct 1500

tggaggatga aaagaggctg gcccaccct tctccttggc cgtctttgag gacaaagtat 1560
 tttggacaga tatcatcaac gaagccatct tcagtgccaa ccgctcaca ggttccgatg 1620
 tcaacttgtt ggctgaaaac ctactgtccc cagaggatat ggttctctc cacaacctca 1680
 cccagccaag agaggctgag gctgcagtgg ccaccagga gacatccacc gtcaggctaa 1740
 aggtcagctc cacagccgta aggacacagc acacaaccac ccgacctgtt cccgacacct 1800
 cccggctgcc tggggccacc cctgggctca ccacggtgga gatagtgaca atgtctcacc 1860
 aagctctggg cgacgttctt ggcagaggaa atgagaagaa gcccagtagc gtgagggtc 1920

tgtccattgt cctccccatc gtgtcctcgt tcttctttg cctgggggtc ttccttctat 1980
 ggaagaactg gcgcttaag aacatcaaca gcatcaactt tgacaacccc gtctatcaga 2040
 agaccacaga ggatgaggtc cacatttgc acaaccagga cggctacagc taccctcga 2100
 gacagatggt cagtctggag gatgacgtgg cgtgaacatc tgcttgaggt cccgtccctg 2160
 cccagaacc ttcctgagac ctgcccggc ttgttttatt caaagacaga gaagacaaa 2220
 gcattgcctg ccagagcttt gtttatata tttattcacc tgggaggcag aacaggcttc 2280
 ggacagtccc catgcaatgg cttgggttgg gattttggtt tcttcttct ctcgtgaagg 2340

ataagagaaa caggcccggg gggaccagga tgacacctc atttctctc aggaagtttt 2400
 gagtttctc ccaccgtgac acaatctc 2429

<210> 7
 <211> 2729
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Transcript Sequence
 <400> 7

gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauuaag agccaccaug gguccguggg	60
gcuggaagcu uagauggaca gucgcgcucc uccuugcagc agcaggaacu gcggucggag	120
aucgaugcga gcgcaacgag uuccaaugcc aagaugggaa guguaauucg uacaaguggg	180
ucucggaugg aucagcggaa ugucaggacg gaagcgauga gagccaagaa acaugccucu	240
cagugacaug caagucggga gacuucucgu gcggaggacg cguaaacaga uguauuccac	300
aguuuuggcg cugcgauggu cagguggacu gcgacaacgg uucagaugaa cagggauguc	360
cuccgaaaac gugcucacaa gacgaguuc gcugccauga uggaaaguc auuucgaggc	420
aguucguaug ugauucggau cgggacuguc uggacggcuc ggacgaagcg ucaugcccgg	480
uacuuacuug cgggccagcc ucauuccaau gcaacagcuc aacgugcauu ccccagcugu	540
gggccuguga caaugauccu gauugugagg acgguagcga cgaguggccg cagagaugua	600
gggguuugua cguauuccaa ggagacucaa gccccuguuc cgccuuugag uuucacugcc	660
ugucggguga augcauccac uccagcuggc gaugugaugg ugggcccgac ugcaaagaa	720
agagcgacga ggagaauucg gcggucgcga cgucgagacc cgaugaguuc cagucuccg	780
auggaaacug cauccacggg agccggcagu gugaucgcga guacgauugu aaagacaugu	840
cagacgaggu cggaugcgug aacgucacgu ugucgagggg uccgaacaag uuuuagugcc	900
auucgggcga auguauuacg cucgauaaag ucugcaacau ggcgcgagau uguagggau	960
ggucagacga acccaucaag gagugcggca cuaacgagug uuuggacaau aacggcgggu	1020
guucgcacgu cugcaaugaa cucaaaauug gguaugagug ucucuguccu gacggauucc	1080
agcuggucgc gcagcgcaga ugcgaggaca ucgacgagug ccaggacccc gacacauguu	1140
cgcaguugug ugucaaccuu gaaggagggg acaagugcca gugcgaggag ggauuucagc	1200
uugacccgca cacgaaagca uguaaagcgg ugggguccau ugcguauuug uuuuacaa	1260
acagacauga agucgggaag augacccuug aucgcagcga auauacguca cugauccua	1320
aucuuaggaa ugucugggcc cuugacacgg agguagcauc aaauagauc uacugguccg	1380
accucucaca gagaaugauc uguucaacac aguuggaucg ggcgacggg gugucgucgu	1440
acgauacggu aauuagccgc gacauccagg cgccagacgg acucgcguc gacuggauc	1500
auagcaacau cuacuggaca gacuccgugu ugggaaccgu auccguagcu gacacaaagg	1560
gagugaagcg gaaaacucuu uuuagagaga acggcagcaa accgagagca aucguggucg	1620
auccggugca uggauucaug uauuggaccg auuggggaac gccagccaaa aucaagaaag	1680
gcgguuuuua uggggucgac aucuacucgc uggugacuga gaauuucag uggccaaacg	1740
ggauccacu uggacuuguug ucggggaggu uguauugggu ggacucacaaag cuccacucga	1800

ucagcucgau cgacgugaac ggcggaaaaua ggaaaacuau ucucgaagau gagaaaagac	1860
uggccccacc cuucucguc gcgguuuucg aggacaaaagu auuuuggaca gacaucauca	1920
acgaagcgau cuuuucagcc aaccgccuga caggguccgga ugucaaucuc uuggccgaaa	1980
accuucugag cccggaagau auggucuugu uucacaauuu gaccaaccc agagguguga	2040
auuggugcga acggacgaca uugucgaacg gagguugcca guaucucugu cucccugcac	2100
cccagauuaa uccccauuca cccaaguuca cgugugcgug cccagacgga augcuucuug	2160
cgagggacau gagauccugu cucaccgaag cggaagcggc aguggccaca caagagacuu	2220
cgacugucgg ccuuaaagug uccucgacgg cgguccgaac ucagcauacg accacacgac	2280
ccgugcccga uaccucgagg uugcccggag caacaccggg guugacgaca guagaaaucg	2340
uaaccaugag ccaccaggca cuuggagaug ucgcaggcag aggcaaugag aagaaacca	2400
gcucggucag agcccucagc aucgugcugc cuauugugcu gcuuguguuu cucuguuugg	2460
guguguucuu guuguggaag aacuggcgcc uuaagaauau caacucgauu aacuucgaua	2520
auccgguaau ccagaaaacc acagaggau aagugcauau uugucacaac caagauggcu	2580
auucguacc guccaggcaa augguaacac uugaggacga cguggccuga uaaauaggcug	2640
ccuucugcgg ggcuugccuu cuggccaugc ccuucucuc ucccuugcac cuguaccucu	2700
uggucuuuga auaaagccug aguaggaag	2729
<210> 8	
<211> 2729	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Transcript Sequence	
<400> 8	
gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccaccaug gguccguggg	60
gcuggaagcu uagauggaca gucgcgucc uccuugcagc agcaggaacu gcgucggag	120
aucgaucgca gcgcaacgag uuccaaugcc aagaugggaa guguaauucg uacaaguggg	180
ucugcgaugg aucagcggaa ugucaggacg gaagcgauga gagccaagaa acaugccucu	240
cagugacaug caagucggga gacuucugc gcgaggacg cguaaacaga uguauuccac	300
aguuuuggcg cugcgauggu cagguggacu gcgacaacgg uucagaugaa cagggauguc	360
cuccgaaaac gugcucacaa gacgaguuc gcugccauga uggaaaguc auuucgaggc	420
aguucguaug ugaauccgau cgggacuguc uggacggcuc ggacgaagcg ucaugcccgg	480
uacuuacuug cgggccagcc ucauuccaau gcaacagcuc aacugcauu ccccagcugu	540

gggccuguga caaugauccu gauugugagg acgguagcga cgaguggccg cagagaugua	600
gggguuugua cguauuccaa ggagacucaa gccccuguuc cgccuuugag uuucacugcc	660
ugucggguga augcauccac uccagcuggc gaugugaugg ugggcccgcac ugcaaagaua	720
agagcgacga ggagaauugc gcggucgcga cgucgagacc cgaugaguuc cagugcuccg	780
auggaaacug cauccacggg agccggcagu gugaucgcga guacgauugu aaagacaugu	840
cagacgaggu cggaugcgug aacgucacgu ugucgagggg uccgaacaag uuuagugcc	900
auucgggcga auguaauacg cucgaaaaag ucugcaacau ggccgcgagau uguagggauu	960
ggucagacga acccaucaag gagugcgca cuaacgagug uuuggacaau aacggcgggu	1020
guucgcacgu cugcaaugau cucaaaaauug gguaugagug ugauuguccu gacggauucc	1080
agcuggucgc gcagcgcaga ugcgaggaca ucgacgagug ccaggacccc gacacauguu	1140
cgcaguugug ugucaaccuu gaaggagggg acaagugcca gugcgaggag ggauuucagc	1200
uugacccgca cacgaaagca uguaaagcgg ugggguccau ugcguuuuug uuuuucacaa	1260
acagacauga agucggaag augaccuug aucgcagcga auauacguca cugauccua	1320
aucuuaggaa ugucguggcc cuugacacgg agguagcauc aaauagaauc uacugguccg	1380
accucucaca gagaauaugc uguucaacac aguuggaucg ggccgcaggg gugucgucgu	1440
acgauacggu aauuagccgc gacaucagg cgccagacgg acucgcgguc gacuggaucc	1500
auagcaacau cuacuggaca gacuccgugu uggaaccgu auccguagcu gacacaaagg	1560
gagugaagcg gaaaacucuu uuuagagaga acggcagcaa accgagagca aucguggucg	1620
auccggugca uggauucaug uauuggaccg auuggggaac gccagccaaa aucaagaag	1680
gcgguuuuga uggggucgac aucuacucgc uggugacuga gaauuuucag uggccaaacg	1740
ggauccacu ggacuuguug ucggggaggu uguauugggu ggacucaaaag cuccacucga	1800
ucagcucgau cgacgugaac ggcggaaua ggaaaacuau ucucgaagau gagaaaagac	1860
uggccacccc cuucucgcuc gcgguguucg aggacaaagu auuuuggaca gacaucauca	1920
acgaagcgau cuuuucagcc aaccgccuga cagggucgga ugucaaucuc uggccgaaa	1980
accuucugag cccggaagau auggucuugu uucacaaauu gaccacaacc agagguguga	2040
auuggugcga acggacgaca uugucgaacg gagguugcca guaucucugu cuccucgac	2100
cccagauuaa ucccacauca cccaaguuca cgugugcgug cccagacgga augcuucug	2160
cgagggacau gagaucugc cucaccgaag cggaagcggc aguggccaca caagagacuu	2220
cgacuguccg ccuuuaagug uccucgacgg cgguccgaac ucagcauacg accacacgac	2280

ccgugcccga uaccucgcgg uugcccggag caacaccggg guugacgaca guagaaaucg 2340

uaaccaugag ccaccaggca cuuggagaug ugcgaggcag aggcaaugag aagaaaccca 2400

gcucggucag agcccucagc aucgugcugc cuauugugcu gcuuguguuu cucuguuugg 2460

guguguucuu guuguggaag aacuggcgcc uuaagaaau caacucgauu aacuucgaua 2520

auccgguaua ccagaaaacc acagagggaug aagugcauau uugucacaac caagauggcu 2580

auucguaccc guccaggcaa augguaucac uugaggacga cguggccuga uauagggcug 2640

ccuucugcgg ggcuugccuu cuggccaugc ccuucucuc ucccuugcac cuguaccucu 2700

uggucuuuga auaagccug aguaggaag 2729

<210> 9

<211> 2729

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Transcript Sequence

<400> 9

gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauuaaag agccaccaug gguccguggg 60

gcuggaagcu uagauggaca gucgcgcucc uccuugcagc agcaggaacu gcgguccggag 120

aucgaugcga gcgcaacgag uuccaaugcc aagaugggaa guguaauucg uacaaguggg 180

ucugcgaugg aucagcgga ugcaggacg gaagcgauga gagccaagaa acaugccucu 240

cagugacaug caaugcggga gacuucucgu gcggaggacg cguaaacaga uguauuccac 300

aguuuuggcg cugcgauggu cagguggacu gcgacaacgg uucagaugaa cagggauauc 360

cuccgaaaac gugcucacaa gacgaguuc gcugccauga uggaagugc auuucgcggc 420

aguucguaug ugauucggau cgggacuguc uggacggcuc ggacgaagcg ucaugcccgg 480

uacuuacuug cgggccagcc ucauuccaau gcaacagcuc aacgugcauu ccccagcugu 540

gggccuguga caaugauccu gauugugagg acgguagcga cgaguggccg cagagaugua 600

gggguuuua cguauuccaa ggagacucaa gcccuguuc cgccuuugag uuucacugcc 660

ugucggguga augcauccac uccagcuggc gaugugaugg ugggcccac ugcaaagaua 720

agagcgacga ggagaaauugc gcgguccgca cgucagacc cgaugaguuc cagucuccg 780

auggaaacug cauccacggg agccggcagu gugaucgca guacgauugu aaagacaugu 840

cagacgaggu cggaugcgug aacgucacgu ugucgaggg uccgaacaag uuuuagugcc 900

auucggcgca auguauucg cucgaaaag ucugcaacau ggcgcgagau uguagggauu 960

ggucagacga acccaucaag gagugcgca cugcagagug uuuggacaau aacggcgggu 1020

guucgcacgu cugcaaugau cucaaaaauug gguaugagug ucucuguccu gacggauucc 1080
 agcuggucgc gcagcgcaga ugcgaggaca ucgacgagug ccaggacccc gacacauguu 1140

cgcaguugug ugucaaccuu gaaggagggu acaaugcca gugcgaggag ggauuucagc 1200
 uugaccccga cacgaaagca uguaaagcgg uggggucgau ugcguuuug uuuuucaca 1260
 acagacauga agugcgaag augacccuug aucgcagcga auauacguca cugauccua 1320
 aucuuaggaa ugucgugcc cuugacacgg agguagcauc aaauagauc uacugguccg 1380
 accucucaca gagaaugauc uguucaacac aguuggaucg ggcgacggg gugucgucgu 1440
 acgauacggu aauuagccgc gacauccagg cgccagacgg acucgcguc gacuggauc 1500
 auagcaacu cuacuggaca gacuccgugu uggaaccgu auccguagcu gacacaaagg 1560

gagugaagcg gaaaaacuuu uuuaagagaga acggcagcaa accgagagca aucguggucg 1620
 auccggugca uggauucaug uauuggaccg auuggggaac gccagccaaa acaagaaag 1680
 gcgguuugaa uggggucgac aucuacucgc uggugacuga gaauuucagc uggccaaacg 1740
 ggaucccuu ggacuuguug ucggggaggu uguauugggu ggacuaaag cuccacucga 1800
 ucagcucgau cgacgugaac ggcggaaua ggaaaacua ucucgaagau gagaaaagac 1860
 uggcccccc cuucucguc gcggguucg aggacaaagu auuuuggaca gacaucauca 1920
 acgaagcgau cuuuucagcc aaccgccuga caggucgga ugucaaucuc uggccgaaa 1980

accuucugag cccggaagau auggucuugu uucacaauu gacccaacc agagguguga 2040
 auuggucgca acggacgaca uugucgaac gagguugcca guaucucugu cuccucgac 2100
 cccagauua uccccauca cccaaguca cgugucgug cccagacgga augcuucug 2160
 cgagggacau gagauccgu cucaccgaag cggaaagcggc aguggccaca caagagacu 2220
 cgacuguccg ccuuaaagug uccucgacgg cgguccgaac ucagcauacg accacacgac 2280
 ccgugcccga uaccucgagg uugcccggag caacaccggg guugacgaca guagaaucg 2340
 uaaccaugag ccaccaggca cuuggagau ucgcaggcag aggcaaugag aagaaacca 2400

gcucggucag agcccucagc aucgucguc cuauugucg gcuuguuuu cucuguuugg 2460
 guguguucuu guugugaag aacuggcgc uuaagaauu caacucgau aacuucgaa 2520
 auccguuaa ccagaaaacc acagaggau aagugcauu uugucacaac caagauggcu 2580
 auucguacc guccaggca augguaucac uugaggacga cguggccuga uauuaggcug 2640
 ccuucgagg ggcuugccu cuggccaugc ccuucucuc uccuugcac cuguaccuc 2700
 uggucuuuga auaagccug aguaggaag 2729

<210> 10

<211> 2729

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Transcript Sequence

<400> 10

gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauuaaag agccaccaug gguccguggg	60
gcuggaagcu uagauggaca gucgcgcucc uccuugcagc agcaggaacu gcgucggag	120
aucgaucgca gcgcaacgag uuccaaugcc aagaugggaa guguaauucg uacaaguggg	180
ucucggaugg aucagcggaa ugucaggacg gaagcgauga gagccaagaa acaugccucu	240
cagugacaug caagucggga gacuucugc gcgaggacg cguaaacaga uguauuccac	300
aguuuuggcg cugcgauggu cagguggacu gcgacaacgg uucagaugaa cagggauguc	360
cuccgaaaac gugcucacaa gacgaguuc gcugccauga uggaaaguc auuucgaggc	420
aguucguaug ugauucggau cgggacuguc uggacggcuc ggacgaagcg ucaugcccgg	480
uacuuacuug cgggccagcc ucauuccaau gcaacagcuc aacgugcauu ccccagcugu	540
gggccuguga caaugauccu gauugugagg acgguagcga cgaguggccg cagagaugua	600
gggguuuua cguauuccaa ggagacucaa gccccuguuc cgccuuugag uuucacugcc	660
ugucggguga augcauccac uccagcuggc gaugugaugg ugggcccac ugcaaagaa	720
agagcgacga ggagaauugc gcgguccgca cgucagacc cgaugaguuc cagucuccg	780
auggaaacug cauccacggg agccggcagu gugaucgca guacgauugu aaagacaugu	840
cagacgaggu cggaugcgug aacgucacgu ugucgagggg uccgaacaag uuuuagugcc	900
auucgggcca auguaauacg cucgauaaag ucugcaacau ggcgcgagau uguagggauu	960
ggucagacga acccaucaag gagugcggca cuaacgcaug uuuggacaau aacggcgggu	1020
guucgcacgu cugcaaugau cucaaaaauug gguaugagug ucucuguccu gacggauucc	1080
agcuggucgc gcagcgcaga ugcgaggaca ucgacgagug ccaggacccc gacacauguu	1140
cgcaguugug ugucaaccuu gaaggagggu acaagugcca gugcgaggag ggauuucagc	1200
uugacccgca cacgaaagca uguaaagcgg ugggguccau ugcguuuug uuuuacaaa	1260
acagacauga agucgggaag augaccuug aucgcagcga auauacguca cugauccua	1320
aucuuaggaa ugucguggcc cuugacacgg agguagcauc aaauagaauc uacugguccg	1380
accucucaca gagaauauc uguucaacac aguuggaucg ggcgcacggg gugucgucgu	1440
acgauacggg aauuagccgc gacaucagg cgccagacgg acucgagguc gacuggaucc	1500
auagcaacau cuacuggaca gacuccugu uggaaccgu auccguagcu gacacaaagg	1560

gagugaagcg gaaaacucuu uuuagagaga acggcagcaa accgagagca aucgugucg	1620
aucggugca uggauucaug uauuggaccg auuggggaac gccagccaaa aucaagaaag	1680
gcgguuuuagaa uggggucgac aucuacucgc uggugacuga gaauuuucag uggccaaacg	1740
ggaucaccuu ggacuuguug ucggggaggu uguauugggu ggacucuaag cuccacucga	1800
ucagcucgau cgacgugaac ggcggaaaaua ggaaaacuau ucucgaagau gagaaaagac	1860
uggccccacc cuucucguc gcggguucg aggacaaagu auuuuggaca gacaucauca	1920
acgaagcgau cuuuucagcc aaccgccuga cagggucgga ugucaaucuc uggccgaaa	1980
accuucugag cccggaagau auggucuugu uucacaaauu gacccaacc agagguguga	2040
auuggugcga acggacgaca uugucgaac gagguugcca guaucucugu cuccucgac	2100
cccagauuaa ucccacauca cccaaguca cgugugcgug cccagacgga augcuucug	2160
cgagggacau gagauccugu cucaccgaag cggaagcggc aguggccaca caagagacuu	2220
cgacugucg ccuuuaagug uccucgacgg cgguccgaac ucagcauacg accacacgac	2280
ccgugcccga uaccucgagg uugcccggag caacaccggg guugacgaca guagaaaucg	2340
uaaccaugag ccaccaggca cuuggagaug ucgcaggcag aggcaaugag aagaaacca	2400
gcucggucag agcccucagc aucgucguc cuauugucg gcuuguguuu cucuguuugg	2460
guguguucuu guuguggaag aacuggcgcc uuaagaaau caacucgau aacuucgaa	2520
auccgguaua ccagaaaacc acagaggau aagugcauu uugucacaac caagauggcu	2580
auucguacc guccaggcaa augguaucac uagaggacga cguggccuga uauagggcug	2640
ccuucugcgg ggcuugccuu cuggccaug ccuucucuc ucccuugcag cuguaccucu	2700
uggucuuuga auaaagccug aguaggaag	2729
<210> 11	
<211> 2729	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Transcript Sequence	
<400> 11	
gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaaauaag agccaccaug gguccguggg	60
gcuggaagcu uagauggaca gucgcgucucc uccuugcagc agcaggaacu gcggucggag	120
aucgaugcga gcgcaacgag uuccaaucc aagaugggaa guguaauucg uacaaguggg	180
ucugcgaugg aucagcggaa ugucaggacg gaagcgauga gagccaagaa acaugccucu	240
cagugacaug caaugcggga gacuucucgu gcggaggacg cguaaacaga uguauuccac	300

aguuuuggcg cugcgauggu cagguggacu gcgacaacgg uucagaugaa cagggauguc	360
cuccgaaaac gugcucacaa gacgaguuc gcugccauga uggaaaguc auuucgcggc	420
aguucguaug ugauucggau cgggacuguc uggacggcuc ggacgaagcg ucaugcccgg	480
uacuuacuug cgggccagcc ucauuccaau gcaacagcuc aacgugcauu ccccagcugu	540
gggccuguga caaugauccu gauugugagg acgguagcga cgaguggccg cagagaugua	600
gggguuuua cguauuccaa ggagacucua gccccuguuc cgccuuugag uuucacugcc	660
ugucggguga augcauccac uccagcuggc gaugugaugg uggccccgac ugcaaagaua	720
agagcgacga ggagaauugc gcggucgca cgugcagacc cgaugaguuc cagucuccg	780
auggaaacug cauccacggg agccggcagu gugaucgca guacgauugu aaagacaugu	840
cagacgaggu cggaugcgug aacgucacgu ugugcgaggg uccgaacaag uuuuagugcc	900
auucggcgca auguauuacg cucgauaaag ucugcaacau ggcgcgagau uguagggauu	960
ggucagacga acccaucaag gagugcggca cuaacgagug uuuggacaau aacggcgggu	1020
guucgacgu cugcaaugau cucaaaaauug gggcagagug ucucuguccu gacggauucc	1080
agcuggucgc gcagcgcaga ugcgaggaca ucgacgagug ccaggacccc gacacauguu	1140
cgcaguugug ugucaaccuu gaaggagggu acaagugcca gugcgaggag ggauuucagc	1200
uugacccgca cacgaaagca uguaaagcgg uggggucgau ugcuuuuug uuuuucacaa	1260
acagacauga agucggaag augacccuug aucgcagcga auauacguca cugaucucca	1320
aucuuagaa ugucgugcc cuugacacgg agguagcauc aaauagauc uacuggucg	1380
accucucaca gagaauaugc uguucaacac aguuggaucg ggcgcacggg gugucgucgu	1440
acgauacggu aauuacccg gacauccagg cgcacagcgg acucgcguc gacuggaucc	1500
auagcaacau cuacuggaca gacuccgugu ugggaaccgu auccguagcu gacacaaagg	1560
gagugaagcg gaaaacucuu uuuagagaga acggcagcaa accgagagca aucguggucg	1620
auccggugca uggauucaug uauuggaccg auuggggaac gccagccaaa aucaagaaag	1680
gcgguuuuua uggggucgac aucuacucgc uggugacuga gaauuuucag uggccaaacg	1740
ggauccacu ggacuuguug ucggggaggu uguauugggu ggacucuaag cuccacucga	1800
ucagcucgau cgacgugaac ggcggaaaua ggaaaacua ucucgaagau gagaaaagac	1860
uggccccacc cuucucguc gcgguguucg aggacaaagu auuuuggaca gacaucauca	1920
acgaagcga cuuuucagcc aaccgccuga caggucgga ugucaaucuc uggccgaaa	1980
accuucugag cccggaagau auggucuugu uucacaauu gacccaacc agagguguga	2040

auuggugcga acggacgaca uugucgaacg gagguugcca guaucucugu cuccucgac	2100
cccagauuaa uccccauuca cccaaguuca cgugugcgug cccagacgga augcuucuug	2160
cgagggacau gagauccugu cucaccgaag cggaagcggc aguggccaca caagagacuu	2220
cgacugucgg ccuuaaagug uccucgacgg cgguccgaac ucagcauacg accacacgac	2280
ccgugcccga uaccucgicgg uugcccggag caacaccggg guugacgaca guagaaaucg	2340
uaaccaugag ccaccaggca cuuggagaug ucgcaggcag aggcaaugag aagaaccca	2400
gcucggucag agcccucagc aucgugcugc cuauugugcu gcuuguguuu cucuguuugg	2460
guguguucuu guuguggaag aacuggcgcc uuaagaaau caacucgauu aacuucgaua	2520
auccgguuaa ccagaaaacc acagaggau g aagugcauu uugucacaac caagaugcu	2580
auucguacc guccaggcaa augguaucac uugaggacga cguggccuga uauuaggcug	2640
ccuucugcgg ggcuugccuu cuggccaugc ccuucucuc ucccuugcac cuguaccucu	2700
uggucuuuga auaagccug aguaggaag	2729
<210> 12	
<211> 2729	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Transcript Sequence	
<400> 12	
gggaaauaag agagaaaaga agaguaaaga gaaauuaag agccaccaug gguccguggg	60
gcuggaagcu uagauggaca gucgcgcucc uccuugcagc agcaggaacu gcggucggag	120
aucgaugcga gcgcaacgag uuccaaugcc aagaugggaa guguaauucg uacaaguggg	180
ucugcgaugg aucagcggaa ugucaggacg gaagcgauga gagccaagaa acaugccucu	240
cagugacaug caagucggga gacuucugc gcggaggacg cguaaacaga uguauuccac	300
aguuuuggcg cugcgauggu cagguggacu gcgacaacgg uucagaugaa cagggauuc	360
cuccgaaaac gugcucacaa gacgaguuc gcugccauga uggaaaguc auuucgcggc	420
aguucguaug ugauucggau cgggacuguc uggacggcuc ggacgaagcg ucaugcccgg	480
uacuuacuug cgggccagcc ucauuccaau gcaacagcuc aacgugcauu ccccagcugu	540
gggccuguga caaugauccu gauugugagg acgguagcga cgaguggccg cagagaugua	600
gggguuugua cguauuccaa ggagacucaa gccccuguuc cgccuuugag uuucacugcc	660
ugucggguga augcauccac uccagcuggc gaugugaugg ugggcccgcac ugcaaagaua	720
agagcgacga ggagaauugc gcggucgca cgucagacc cgaugaguuc cagugcuccg	780

auggaaacug cauccacggg agccggcagu gugaucgcga guacgauugu aaagacaugu	840
cagacgaggu cggaugcgug aacgucacgu ugugcgaggg uccgaacaag uuuuagugcc	900
auucgggcga auguauuacg cucgauaaag ucugcaacau ggcgcgagau uguagggauu	960
ggucagacga acccaucaag gagugcggca cugcagcaug uuuggacaau aacggcgggu	1020
guucgcacgu cugcaaugca cucaaaaauug gggcagagug ucucuguccu gacggauucc	1080
agcuggucgc gcagcgcaga ugcgaggaca ucgacgagug ccaggacccc gacacauguu	1140
cgcaguugug ugucaaccuu gaaggagggu acaaugcca gugcgaggag ggauuucagc	1200
uugaccccga cacgaaagca uguaaagcgg ugggguccau ugcguuuug uuuuucacaa	1260
acagacauga agugcggaag augacccuug aucgcagcga auauacguca cugauccua	1320
aucuuaggaa ugucguggcc cuugacacgg agguagcauc aaauagauc uacugguccg	1380
accucucaca gagaauauc uguucaacac aguuggaucg ggcgcacggg gugucgucgu	1440
acgauacggg aauuagccgc gacaucagg cgccagacgg acucgcgguc gacuggaucc	1500
auagcaacau cuacuggaca gacuccgugu uggaaccgu auccguagcu gacacaaagg	1560
gagugaagcg gaaaacuuu uuuagagaga acggcagcaa accgagagca aucguggucg	1620
auccggugca uggauucaug uauuggaccg auuggggaac gccagccaaa aucaagaaag	1680
gcgguuugaa uggggucgac aucuacucgc uggugacuga gaauauucag ugcccaaacg	1740
ggauccacu ggacuuguug ucggggaggu uguauugggu ggacucuaag cuccacucga	1800
ucagcucgau cgacgugaac ggcggaaaua ggaaaacuau ucucgaagau gagaaaagac	1860
uggcccaccc cuucucguc gcgguuucg aggacaaagu auuuuggaca gacaucauca	1920
acgaagcgau cuuuucagcc aaccgccuga caggguccga ugucaaucuc uuggccgaaa	1980
accuucugag cccggaagau auggucuugu uucacaauu gacccaacc agagguguga	2040
auuggucgca acggacgaca uugucgaacg gagguugcca guaucucugu cuccucgac	2100
cccagauuaa ucccacauca cccaaguca cgugugcgug cccagacgga augcuucuug	2160
cgagggacau gagauccugu cucaccgaag cggaagcggc aguggccaca caagagacuu	2220
cgacugucg ccuuuaagug uccucgacgg cgguccgaac ucagcauacg accacacgac	2280
ccgugcccga uaccucgagg uugcccggag caacaccggg guugacgaca guagaaaucg	2340
uaaccaugag ccaccaggca cuuggagaug ucgcaggcag aggcaaugag aagaaacca	2400
gcucggucag agcccucagc aucgugcuc cuauugucg gcuuguguuu cucuguuugg	2460
guguguucuu guuguggaag aacugggcc uuaagaauu caacucgauu aacuucgaa	2520

auccgguaua ccagaaaacc acagaggaug aagugcauau uugucacaac caagauggcu 2580

 auucguaccc guccaggcaa augguauacac uugaggacga cguggccuga uauuaggcug 2640
 ccuucugcgg ggcuugccuu cuggccaugc ccuucuucuc ucceuugcac cuguaccucu 2700
 uggucuuuga auaaagccug aguaggaag 2729

 <210> 13
 <211> 1678
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Transcript Sequence
 <400> 13

 gggaataag agagaaaaga agagtaagaa gaaatataag agccaccatg atgaccacat 60
 ctttgatttg ggggattgct atagcagcat gctgttgtct atggcttatt cttggaatta 120

 ggagaaggca aacgggtgaa ccacctcttg agaatggatt aattccatac ctgggctgtg 180
 ctctgcaatt tgggtccaat cctcttgagt tcctcagagc aatcaaagg aaacatggtc 240
 atgtttttac ctgcaaaact atgggaaaat atgtccattt catcacaat cccttgtcat 300
 accataagg tttgtgccac ggaaaatatt ttgattggaa aaaatttcac tttgctactt 360
 ctgcgaaggc atttgggcac agaagcattg acccgatgga tggaaatacc actgaaaaca 420
 taaacgacac tttcatcaaa accctgcagg gccatgcctt gaattccctc acgaaaagca 480
 tgatgaaaa cctccaactg atcatgagac ctccagtctc ctctaactca aagaccgctg 540

 cctgggtgac agaagggatg tattctttct gctaccgagt gatgtttgaa gctgggtatt 600
 taactatctt tggcagagat cttacaaggc gggacacaca gaaagcacat attctaaaca 660
 atcttgacaa cttcaagcaa ttcgacaag tctttccagc cctggtagca ggcctcccca 720
 ttcacatggt caggactgcg cacaatgccc gggagaaact ggcagagagc ttgaggcacg 780
 agaacctcca aaagaggaa agcatctcag aactgatcag cctgcgcatg tttctcaatg 840
 acactttgtc cacctttgat gatctggaga aggccaagac acacctcgtg gtcctctggg 900
 catcgcaagc aaacaccatt ccagcgactt tctggagttt atttcaaagc attaggaacc 960

 cagaagcaat gaaagcagct actgaagaag tgaaaagaac attagagaat gctggtcaaa 1020
 aagtcagctt ggaaggcaat cctatgtttg tgagtcaagc agaactgaat gacctgccag 1080
 tattagatag tataatcaag gaatcgctga ggctttccag tgcctccctc aacatccgga 1140
 cagctaagga ggatttact ttgcacctg aggacggttc ctacaacatc cgaagaatg 1200
 acatcatagc tctttacca cagttaatgc acttagatcc agaaatctac ccagaccctt 1260

tgacttttaa atatgatagg tatcttgatg aaaacgggaa gacaaagact accttctatt 1320
 gtaatggact caagttaaag tattactaca tgccctttgg atcgggagct acaatatgtc 1380

 ctggaagatt gttcgtatc cacgaaatca agcaattttt gattctgatg ctttcttatt 1440
 ttgaattgga gcttataagag ggccaagcta aatgtccacc tttggaccag tcccgggcag 1500
 gcttgggcat tttgcccca ttgaatgata ttgaatttaa atataaattc aagcatttgt 1560
 gataataggc tggagcctcg gtggccatgc ttcttgcccc ttgggcctcc cccagcccc 1620
 tcctcccctt cctgcacccg tacccccgtg gtctttgaat aaagtctgag tgggcggc 1678
 <210> 14
 <211> 1541
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 14
 agtggggagc acggtggaga gcggggacgg ccgctctttt ggggacttgc tggggcgtgc 60

 ggctgcgcta ttcagtggga aggttcgctgg ggttgggaga cccggaggcc gaggaagggc 120
 gagcagagca ctgccaggat atcctgcccc gatttcccag tttctgcctc gcccgggcac 180
 agacggaggc agcctggtgg aggtgtatct cctagacacc agcatacaga gtgaccaccg 240
 ggaaatcgag ggcaggggtca tggtcaccga cttcgagaat gtgcccagg aggacgggac 300
 ccgcttccac agacaggcca gcaagtgtga cagtcatggc acccacctgg caggggtggt 360
 cagcggccgg gatgccggcg tggccaaggg tgccagcatg cgcagcctgc gcgtgctcaa 420
 ctgccaaggg aagggcacgg ttagcggcac cctcataggc ctggagtta ttcggaaaag 480

 ccagctggtc cagcctgtgg ggccactggt ggtgctgctg ccctggcgg gtgggtacag 540
 ccgcgtctc aaccccct gccagcct ggcgaggct ggggtcgtgc tggtcaccgc 600
 tgccggcaac ttccgggacg atgcctgct ctactcccc gcctcagctc ccgaggtcat 660
 cacagtggg gccaccaatg cccaagacca gccggtgacc ctggggactt tggggaccaa 720
 ctttggccgc tgtgtggacc tctttgcccc aggggaggac atcattggtg cctccagcga 780
 ctgcagcacc tgctttgtgt cacagagtgg gacatcacag gctgctgccc acgtggctgg 840
 cattgcagcc atgatgctgt ctgccgagcc ggagctcacc ctggccgagt tgaggcagag 900

 actgatccac ttctctgcca aagatgtcat caatgaggcc tggttccctg aggaccagcg 960
 ggttggcagc tgttttgtag gactgtatgg tcagcacact cggggcctac acggatggcc 1020
 acagccgtcg cccctgctgc cccagatgag gagctgctga gctgctccag tttctccagg 1080
 agtgggaagc ggcggggcga gcgcatggag gcccaagggg gcaagctggt ctgccgggcc 1140

cacaacgctt ttgggggtga ggggtgtctac gccattgcc a ggtgctgctt gctaccccag 1200

gccaactgca gcgtccacac agctccacca gctgaggcca gcatggggac ccgtgtccac 1260

tgccaccaac agggccacgt cctcacaggc tgcagctccc actgggaggt ggaggacctt 1320

ggcaccaca agccgcctgt gctgaggcca cgaggtcagc ccaaccagtg cgtgggccac 1380

agggaggcca gcatccacgc ttctgtctgc catgccccag gtctggaatg caaagtcaag 1440

gagcatggaa tccccgcccc tcaggagcag gtgaccgtgg cctgcgagga gggctggacc 1500

ctgactggct gcagtgcctt ccctgggacc tcccacgtcc t 1541

<210> 15

<211> 1101

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 15

aggctcaagg cgccgccgcg gtggaccgcg cacggcctct aggtctcttc gccaggacag 60

caacctctcc cctggccctc atgggcaccg tcagctccag gcggtcctgg tggccgctgc 120

cactgctgct gctgctgctg ctgctcctgg gtcccgccgg cgcccgctgcg caggaggacg 180

aggacggcga ctacaggag ctggtgctag ccttgcgttc cgaggaggac ggcctggccg 240

aagcaccga gcacggaacc acagccacct tccaccgctg cgccaaggat ccgtggaggt 300

tgcctggcac ctactggtg gtgctgaagg aggagacca cctctcgag tcagagcga 360

ctgcccgcg cctgcaggcc caggctgccc gccgggata cctaccaag atcctgcatg 420

tcttccatgg cctttctct ggcttctgg tgaagatgag tggcgacctg ctggagctgg 480

ccttgaagtt gcccctgct gactacatcg aggaggactc ctctgtcttt gcccagagca 540

tcccgtggaa cctggagcgg attacccctc cacggtaccg ggccgatgaa taccagcccc 600

ccgcatattt ggaggatcac tgcgggggcc acagaggtgc tgttcagatg gcacttcaga 660

agactcagga gaccctgggg caggagcagt ttgactgaca gccagaggg ctgcctctg 720

attccactg aggcctgct tttcctggct gcaggggttc cagggccagg ccatttccgc 780

tggcgagga ctctgctagc agcaacctgc ctgaagtctt cctttggcct ggctgagagt 840

ttctgagacc tgcgctggag cggagacgga ggcagcctgg tggaggtgta tctctagac 900

accagcatac agagtgacca ccgggaaatc gagggcaggg tcatggtcac cgacttcgag 960

aatgtgcccg aggaggacgg gaccgccttc cacagacagg ccagcaagtg tgacagtcat 1020

ggcaccacc tggcaggggt ggtcagcggc cgggatgccg gcgtggccaa gggtgccagc 1080

atgctcagcc tgcgctgct c 1101

<210> 16

<211> 3637

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 16

```

agcgacgtcg aggcgctcat ggttgaggc gggcgccgcc gttcagttca gggctgagc      60
ctggaggagt gagccaggca gtgagactgg ctggggcggg ccgggacgcg tcgttgacgc      120
agcggctccc agctcccagc caggattccg cgcgccctt cacgcgcctt gctcctgaac      180

tfcagctect gcacagtect ccccaccgca aggetcaagg cgccgccggc gtggaccgcg      240
cacggcctct aggtctctc gccaggacag caacctctcc cctggccctc atgggacccg      300
tcagctccag gcggtcctgg tggccgctgc cactgctgct gctgctgctg ctgctcctgg      360
gtcccgcggg cgcccgctgc caggaggacg aggacggcga ctacaggag ctggtgctag      420
ccttgcttc cgaggaggac ggcctggcgg aagcaccgga gcacggaacc acagccact      480
tccaccgctg cgccaaggat ccgtggaggt tgcctggcac ctacgtggtg gtgctgaagg      540
aggagacca cctctcgag tcagagcgca ctgcccgccg cctgcaggcc caggctgccc      600

gccggggata cctaccaag atcctgcatg tcttccatgg ctttcttctt ggcttctctgg      660
tgaagatgag tggcgacctg ctggagctgg ctttgaagtt gcccctatgct gactacatcg      720
aggaggactc ctctgtcttt gccagagca tcccgtgaa cctggagcgg attaccctc      780
cacggtaccg ggcggatgaa taccagcccc ccgacggagg cagcctggtg gaggtgtatc      840
tctagacac cagcatacag agtgaccacc gggaaatcga gggcagggtc atggtcaccg      900
acttcgagaa tgtccccgag gaggacggga cccgcttcca cagacaggcc agcaagtgtg      960
acagtcatgg cacccacctg gcaggggtgg tcagcggccg ggatgccggc ttggccaagg      1020

gtgccagcat gcgcagcctg cgcgtgctca actgccaagg gaagggcacg gttagcggca      1080
ccctcatagg cctggagttt attcggaaaa gccagctggt ccagcctgtg gggccactgg      1140
tgggtgctgct gccctggcg ggtgggtaca gccgcgtcct caacgccgc tgcagcgc      1200
tggcgagggc tggggtcgtg ctggtcaccg ctgccggcaa cttccgggac gatgcctgcc      1260
tctactcccc agectcagct cccgaggta tcacagtgg ggeccaat gcccaagacc      1320
agccggtgac cctggggact ttggggacca actttggcgg ctggtggac ctctttgccc      1380
caggggagga catcattggt gcctccagcg actgcagcac ctgctttgtg tcacagagtg      1440

ggacatcaca ggctgctgcc cacgtggctg gcattgcagc catgatgctg tctgccgagc      1500
cggagctcac cctggccgag ttgaggcaga gactgatcca cttctctgcc aaagatgtca      1560

```

tcaatgaggc ctgtttccct gaggaccagc gggactgac ccccaacctg gtgcccgcc 1620
 tgccccccag cacccatggg gcaggttggc agctgttttg caggactgta tggtcagcac 1680
 actcggggcc tacacggatg gccacagccg tcgcccctg cgccccagat gaggagctgc 1740
 tgagctgctc cagtttctcc aggagtggga agcggcgggg cgagcgcagtg gaggcccaag 1800
 ggggcaagct ggtctgccgg gccacaacg cttttggggg tgagggtgtc tacgccattg 1860

ccaggtgtctg cctgctacc caggccaact gcagcgtcca cacagctcca ccagctgagg 1920
 ccagcatggg gaccctgtgc cactgccacc aacagggcca cgtcctcaca ggctgcagct 1980
 cccactggga ggtggaggac cttggcacc acaagccgcc tgtctgagg ccacgagctc 2040
 agcccaacca gtgcgtgggc cacagggagg ccagcatcca cgcttcctgc tgccatgcc 2100
 caggtctgga atgcaaagtc aaggagcatg gaatcccggc ccctcaggag caggtgaccg 2160
 tggcctgcga ggagggtgg accctgactg gctgcagctc cctccctggg acctcccag 2220
 tcctgggggc ctacccgta gacaacacgt gtgtagttag gagccgggac gtcagcacta 2280

caggcagcac cagcgaagg gccgtgacag ccgttgccat ctgctgccgg agccggcacc 2340
 tggcgcaggc ctcccaggag ctccagttag agccccatcc caggatgggt gtctggggag 2400
 ggtcaagggc tggggctgag ctttaaaatg gttccgactt gtcctctct cagccctcca 2460
 tggcctggca cgaggggatg gggatgcttc cgctttccg gggtctgtgg cctggccctt 2520
 gagtggggca gcctccttgc ctggaactca ctactctgg gtgctctct cccaggtgga 2580
 ggtgccagga agctccctcc ctactgtgg ggcatttcac cattcaaaca ggtcgagctg 2640
 tgctcgggtg ctgccagctg ctcccaatgt gccgatgtcc gtgggcagaa tgacttttat 2700

tgagctcttg ttccgtgcca ggcattcaat cctcaggtct ccaccaagga ggcaggattc 2760
 ttcccatgga taggggaggg ggcggtaggg gctgcaggga caaacatcgt tggggggtga 2820
 gtgtgaaagg tgctgatggc cctcatctcc agctaactgt ggagaagccc ctgggggctc 2880
 cctgattaat ggaggcttag ctttctggat ggcacttagc cagaggctgg agacaggtgc 2940
 gccctgtgtg gtcacagct gtgccttggg ttctgagcc acctttactc tgctctatgc 3000
 caggctgtgc tagcaacacc caaaggtggc ctgcccgggag ccatcaccta ggactgactc 3060
 ggcagtgtgc agtgggtgcat gcactgtctc agccaaccg ctccactacc cggcagggta 3120

cacattcgca ccctacttc acagaggaag aaacctggaa ccagaggggg cgtgcctgcc 3180
 aagctcacac agcaggaact gagccagaaa cgagattgg gctggctctg aagccaagcc 3240
 tcttcttact tcacccggct gggctcctca tttttacggg taacagttag gctgggaagg 3300
 ggaacacaga ccaggaagct cggtagtga tggcagaac atgcctgcag gcatggaact 3360
 ttttccgtta tcaccaggc ctgattcact ggcctggcgg agatgcttct aaggcatggt 3420

cgggggagag ggccaacaac tgtcctcct tgagcaccag cccacccaa gcaagcagac 3480
 atttatcttt tgggtctgtc ctctctgttg cctttttaca gccaactttt ctagacctgt 3540

tttgcttttg taacttgaag atattttatc tgggttttgt agcattttta ttaatatggt 3600
 gactttttaa aataaaaaca aacaaacggt gtcctaa 3637

<210> 17

<211> 692

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Met Gly Pro Trp Gly Trp Lys Leu Arg Trp Thr Val Ala Leu Leu Leu

1 5 10 15

Ala Ala Ala Gly Thr Ala Val Gly Asp Arg Cys Glu Arg Asn Glu Phe

 20 25 30

Gln Cys Gln Asp Gly Lys Cys Ile Ser Tyr Lys Trp Val Cys Asp Gly

 35 40 45

Ser Ala Glu Cys Gln Asp Gly Ser Asp Glu Ser Gln Glu Thr Cys Leu

50 55 60

Ser Val Thr Cys Lys Ser Gly Asp Phe Ser Cys Gly Gly Arg Val Asn

65 70 75 80

Arg Cys Ile Pro Gln Phe Trp Arg Cys Asp Gly Gln Val Asp Cys Asp

 85 90 95

Asn Gly Ser Asp Glu Gln Gly Cys Leu Thr Leu Cys Glu Gly Pro Asn

 100 105 110

Lys Phe Lys Cys His Ser Gly Glu Cys Ile Thr Leu Asp Lys Val Cys

115 120 125

Asn Met Ala Arg Asp Cys Arg Asp Trp Ser Asp Glu Pro Ile Lys Glu

130 135 140

Cys Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp Asn Asn Gly Gly Cys Ser His Val

145 150 155 160

Cys Asn Asp Leu Lys Ile Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe

 165 170 175

Gln Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Glu Asp Ile Asp Glu Cys Gln Asp
 180 185 190

Pro Asp Thr Cys Ser Gln Leu Cys Val Asn Leu Glu Gly Gly Tyr Lys
 195 200 205

Cys Gln Cys Glu Glu Gly Phe Gln Leu Asp Pro His Thr Lys Ala Cys
 210 215 220

Lys Ala Val Gly Ser Ile Ala Tyr Leu Phe Phe Thr Asn Arg His Glu
 225 230 235 240

Val Arg Lys Met Thr Leu Asp Arg Ser Glu Tyr Thr Ser Leu Ile Pro
 245 250 255

Asn Leu Arg Asn Val Val Ala Leu Asp Thr Glu Val Ala Ser Asn Arg
 260 265 270

Ile Tyr Trp Ser Asp Leu Ser Gln Arg Met Ile Cys Ser Thr Gln Leu
 275 280 285

Asp Arg Ala His Gly Val Ser Ser Tyr Asp Thr Val Ile Ser Arg Asp
 290 295 300

Ile Gln Ala Pro Asp Gly Leu Ala Val Asp Trp Ile His Ser Asn Ile
 305 310 315 320

Tyr Trp Thr Asp Ser Val Leu Gly Thr Val Ser Val Ala Asp Thr Lys
 325 330 335

Gly Val Lys Arg Lys Thr Leu Phe Arg Glu Asn Gly Ser Lys Pro Arg
 340 345 350

Ala Ile Val Val Asp Pro Val His Gly Phe Met Tyr Trp Thr Asp Trp
 355 360 365

Gly Thr Pro Ala Lys Ile Lys Lys Gly Gly Leu Asn Gly Val Asp Ile
 370 375 380

Tyr Ser Leu Val Thr Glu Asn Ile Gln Trp Pro Asn Gly Ile Thr Leu
 385 390 395 400

Asp Leu Leu Ser Gly Arg Leu Tyr Trp Val Asp Ser Lys Leu His Ser
 405 410 415

Ile Ser Ser Ile Asp Val Asn Gly Gly Asn Arg Lys Thr Ile Leu Glu

420 425 430
 Asp Glu Lys Arg Leu Ala His Pro Phe Ser Leu Ala Val Phe Glu Asp
 435 440 445
 Lys Val Phe Trp Thr Asp Ile Ile Asn Glu Ala Ile Phe Ser Ala Asn
 450 455 460
 Arg Leu Thr Gly Ser Asp Val Asn Leu Leu Ala Glu Asn Leu Leu Ser
 465 470 475 480
 Pro Glu Asp Met Val Leu Phe His Asn Leu Thr Gln Pro Arg Gly Val

 485 490 495
 Asn Trp Cys Glu Arg Thr Thr Leu Ser Asn Gly Gly Cys Gln Tyr Leu
 500 505 510
 Cys Leu Pro Ala Pro Gln Ile Asn Pro His Ser Pro Lys Phe Thr Cys
 515 520 525
 Ala Cys Pro Asp Gly Met Leu Leu Ala Arg Asp Met Arg Ser Cys Leu
 530 535 540
 Thr Glu Ala Glu Ala Ala Val Ala Thr Gln Glu Thr Ser Thr Val Arg

 545 550 555 560
 Leu Lys Val Ser Ser Thr Ala Val Arg Thr Gln His Thr Thr Thr Arg
 565 570 575
 Pro Val Pro Asp Thr Ser Arg Leu Pro Gly Ala Thr Pro Gly Leu Thr
 580 585 590
 Thr Val Glu Ile Val Thr Met Ser His Gln Ala Leu Gly Asp Val Ala
 595 600 605
 Gly Arg Gly Asn Glu Lys Lys Pro Ser Ser Val Arg Ala Leu Ser Ile

 610 615 620
 Val Leu Pro Ile Val Leu Leu Val Phe Leu Cys Leu Gly Val Phe Leu
 625 630 635 640
 Leu Trp Lys Asn Trp Arg Leu Lys Asn Ile Asn Ser Ile Asn Phe Asp
 645 650 655
 Asn Pro Val Tyr Gln Lys Thr Thr Glu Asp Glu Val His Ile Cys His
 660 665 670

Asn Gln Asp Gly Tyr Ser Tyr Pro Ser Arg Gln Met Val Ser Leu Glu

675 680 685

Asp Asp Val Ala

690

<210> 18

<211> 739

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Met Gly Pro Trp Gly Trp Lys Leu Arg Trp Thr Val Ala Leu Leu Leu

1 5 10 15

Ala Ala Ala Gly Thr Ala Val Gly Asp Arg Cys Glu Arg Asn Asp Phe

20 25 30

Gln Cys Asn Ser Ser Thr Cys Ile Pro Gln Leu Trp Ala Cys Asp Asn

35 40 45

Asp Pro Asp Cys Glu Asp Gly Ser Asp Glu Trp Pro Gln Arg Cys Arg

50 55 60

Gly Leu Tyr Val Phe Gln Gly Asp Ser Ser Pro Cys Ser Ala Phe Glu

65 70 75 80

Phe His Cys Leu Ser Gly Glu Cys Ile His Ser Ser Trp Arg Cys Asp

85 90 95

Gly Gly Pro Asp Cys Lys Asp Lys Ser Asp Glu Glu Asn Cys Ala Val

100 105 110

Ala Thr Cys Arg Pro Asp Glu Phe Gln Cys Ser Asp Gly Asn Cys Ile

115 120 125

His Gly Ser Arg Gln Cys Asp Arg Glu Tyr Asp Cys Lys Asp Met Ser

130 135 140

Asp Glu Val Gly Cys Val Asn Val Thr Leu Cys Glu Gly Pro Asn Lys

145 150 155 160

Phe Lys Cys His Ser Gly Glu Cys Ile Thr Leu Asp Lys Val Cys Asn

165 170 175

Met Ala Arg Asp Cys Arg Asp Trp Ser Asp Glu Pro Ile Lys Glu Cys
 180 185 190

Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp Asn Asn Gly Gly Cys Ser His Val Cys
 195 200 205

Asn Asp Leu Lys Ile Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln
 210 215 220

Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Glu Asp Ile Asp Glu Cys Gln Asp Pro
 225 230 235 240

Asp Thr Cys Ser Gln Leu Cys Val Asn Leu Glu Gly Gly Tyr Lys Cys
 245 250 255

Gln Cys Glu Glu Gly Phe Gln Leu Asp Pro His Thr Lys Ala Cys Lys
 260 265 270

Ala Val Gly Ser Ile Ala Tyr Leu Phe Phe Thr Asn Arg His Glu Val
 275 280 285

Arg Lys Met Thr Leu Asp Arg Ser Glu Tyr Thr Ser Leu Ile Pro Asn
 290 295 300

Leu Arg Asn Val Val Ala Leu Asp Thr Glu Val Ala Ser Asn Arg Ile
 305 310 315 320

Tyr Trp Ser Asp Leu Ser Gln Arg Met Ile Cys Ser Thr Gln Leu Asp
 325 330 335

Arg Ala His Gly Val Ser Ser Tyr Asp Thr Val Ile Ser Arg Asp Ile
 340 345 350

Gln Ala Pro Asp Gly Leu Ala Val Asp Trp Ile His Ser Asn Ile Tyr
 355 360 365

Trp Thr Asp Ser Val Leu Gly Thr Val Ser Val Ala Asp Thr Lys Gly
 370 375 380

Val Lys Arg Lys Thr Leu Phe Arg Glu Asn Gly Ser Lys Pro Arg Ala
 385 390 395 400

Ile Val Val Asp Pro Val His Gly Phe Met Tyr Trp Thr Asp Trp Gly
 405 410 415

Thr Pro Ala Lys Ile Lys Lys Gly Gly Leu Asn Gly Val Asp Ile Tyr

420	425	430	
Ser Leu Val Thr Glu Asn Ile Gln Trp Pro Asn Gly Ile Thr Leu Asp			
435	440	445	
Leu Leu Ser Gly Arg Leu Tyr Trp Val Asp Ser Lys Leu His Ser Ile			
450	455	460	
Ser Ser Ile Asp Val Asn Gly Gly Asn Arg Lys Thr Ile Leu Glu Asp			
465	470	475	480
Glu Lys Arg Leu Ala His Pro Phe Ser Leu Ala Val Phe Glu Asp Lys			
485	490	495	
Val Phe Trp Thr Asp Ile Ile Asn Glu Ala Ile Phe Ser Ala Asn Arg			
500	505	510	
Leu Thr Gly Ser Asp Val Asn Leu Leu Ala Glu Asn Leu Leu Ser Pro			
515	520	525	
Glu Asp Met Val Leu Phe His Asn Leu Thr Gln Pro Arg Gly Val Asn			
530	535	540	
Trp Cys Glu Arg Thr Thr Leu Ser Asn Gly Gly Cys Gln Tyr Leu Cys			
545	550	555	560
Leu Pro Ala Pro Gln Ile Asn Pro His Ser Pro Lys Phe Thr Cys Ala			
565	570	575	
Cys Pro Asp Gly Met Leu Leu Ala Arg Asp Met Arg Ser Cys Leu Thr			
580	585	590	
Glu Ala Glu Ala Ala Val Ala Thr Gln Glu Thr Ser Thr Val Arg Leu			
595	600	605	
Lys Val Ser Ser Thr Ala Val Arg Thr Gln His Thr Thr Thr Arg Pro			
610	615	620	
Val Pro Asp Thr Ser Arg Leu Pro Gly Ala Thr Pro Gly Leu Thr Thr			
625	630	635	640
Val Glu Ile Val Thr Met Ser His Gln Ala Leu Gly Asp Val Ala Gly			
645	650	655	
Arg Gly Asn Glu Lys Lys Pro Ser Ser Val Arg Ala Leu Ser Ile Val			
660	665	670	

Leu Pro Ile Val Leu Leu Val Phe Leu Cys Leu Gly Val Phe Leu Leu
 675 680 685

Trp Lys Asn Trp Arg Leu Lys Asn Ile Asn Ser Ile Asn Phe Asp Asn
 690 695 700

Pro Val Tyr Gln Lys Thr Thr Glu Asp Glu Val His Ile Cys His Asn
 705 710 715 720

Gln Asp Gly Tyr Ser Tyr Pro Ser Arg Gln Met Val Ser Leu Glu Asp
 725 730 735

Asp Val Ala

<210> 19

<211> 860

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Met Gly Pro Trp Gly Trp Lys Leu Arg Trp Thr Val Ala Leu Leu Leu

1 5 10 15

Ala Ala Ala Gly Thr Ala Val Gly Asp Arg Cys Glu Arg Asn Glu Phe
 20 25 30

Gln Cys Gln Asp Gly Lys Cys Ile Ser Tyr Lys Trp Val Cys Asp Gly
 35 40 45

Ser Ala Glu Cys Gln Asp Gly Ser Asp Glu Ser Gln Glu Thr Cys Leu
 50 55 60

Ser Val Thr Cys Lys Ser Gly Asp Phe Ser Cys Gly Gly Arg Val Asn

65 70 75 80

Arg Cys Ile Pro Gln Phe Trp Arg Cys Asp Gly Gln Val Asp Cys Asp
 85 90 95

Asn Gly Ser Asp Glu Gln Gly Cys Pro Pro Lys Thr Cys Ser Gln Asp
 100 105 110

Glu Phe Arg Cys His Asp Gly Lys Cys Ile Ser Arg Gln Phe Val Cys
 115 120 125

Asp Ser Asp Arg Asp Cys Leu Asp Gly Ser Asp Glu Ala Ser Cys Pro

130 135 140

Val Leu Thr Cys Gly Pro Ala Ser Phe Gln Cys Asn Ser Ser Thr Cys

145 150 155 160

Ile Pro Gln Leu Trp Ala Cys Asp Asn Asp Pro Asp Cys Glu Asp Gly

165 170 175

Ser Asp Glu Trp Pro Gln Arg Cys Arg Gly Leu Tyr Val Phe Gln Gly

180 185 190

Asp Ser Ser Pro Cys Ser Ala Phe Glu Phe His Cys Leu Ser Gly Glu

195 200 205

Cys Ile His Ser Ser Trp Arg Cys Asp Gly Gly Pro Asp Cys Lys Asp

210 215 220

Lys Ser Asp Glu Glu Asn Cys Ala Val Ala Thr Cys Arg Pro Asp Glu

225 230 235 240

Phe Gln Cys Ser Asp Gly Asn Cys Ile His Gly Ser Arg Gln Cys Asp

245 250 255

Arg Glu Tyr Asp Cys Lys Asp Met Ser Asp Glu Val Gly Cys Val Asn

260 265 270

Val Thr Leu Cys Glu Gly Pro Asn Lys Phe Lys Cys His Ser Gly Glu

275 280 285

Cys Ile Thr Leu Asp Lys Val Cys Asn Met Ala Arg Asp Cys Arg Asp

290 295 300

Trp Ser Asp Glu Pro Ile Lys Glu Cys Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp

305 310 315 320

Asn Asn Gly Gly Cys Ser His Val Cys Asn Asp Leu Lys Ile Gly Tyr

325 330 335

Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys

340 345 350

Glu Asp Ile Asp Glu Cys Gln Asp Pro Asp Thr Cys Ser Gln Leu Cys

355 360 365

Val Asn Leu Glu Gly Gly Tyr Lys Cys Gln Cys Glu Glu Gly Phe Gln

370 375 380
 Leu Asp Pro His Thr Lys Ala Cys Lys Ala Val Gly Ser Ile Ala Tyr

 385 390 395 400
 Leu Phe Phe Thr Asn Arg His Glu Val Arg Lys Met Thr Leu Asp Arg
 405 410 415
 Ser Glu Tyr Thr Ser Leu Ile Pro Asn Leu Arg Asn Val Val Ala Leu
 420 425 430
 Asp Thr Glu Val Ala Ser Asn Arg Ile Tyr Trp Ser Asp Leu Ser Gln
 435 440 445
 Arg Met Ile Cys Ser Thr Gln Leu Asp Arg Ala His Gly Val Ser Ser

 450 455 460
 Tyr Asp Thr Val Ile Ser Arg Asp Ile Gln Ala Pro Asp Gly Leu Ala
 465 470 475 480
 Val Asp Trp Ile His Ser Asn Ile Tyr Trp Thr Asp Ser Val Leu Gly
 485 490 495
 Thr Val Ser Val Ala Asp Thr Lys Gly Val Lys Arg Lys Thr Leu Phe
 500 505 510
 Arg Glu Asn Gly Ser Lys Pro Arg Ala Ile Val Val Asp Pro Val His

 515 520 525
 Gly Phe Met Tyr Trp Thr Asp Trp Gly Thr Pro Ala Lys Ile Lys Lys
 530 535 540
 Gly Gly Leu Asn Gly Val Asp Ile Tyr Ser Leu Val Thr Glu Asn Ile
 545 550 555 560
 Gln Trp Pro Asn Gly Ile Thr Leu Asp Leu Leu Ser Gly Arg Leu Tyr
 565 570 575
 Trp Val Asp Ser Lys Leu His Ser Ile Ser Ser Ile Asp Val Asn Gly

 580 585 590
 Gly Asn Arg Lys Thr Ile Leu Glu Asp Glu Lys Arg Leu Ala His Pro
 595 600 605
 Phe Ser Leu Ala Val Phe Glu Asp Lys Val Phe Trp Thr Asp Ile Ile
 610 615 620

Asn Glu Ala Ile Phe Ser Ala Asn Arg Leu Thr Gly Ser Asp Val Asn
 625 630 635 640
 Leu Leu Ala Glu Asn Leu Leu Ser Pro Glu Asp Met Val Leu Phe His

 645 650 655
 Asn Leu Thr Gln Pro Arg Gly Val Asn Trp Cys Glu Arg Thr Thr Leu
 660 665 670
 Ser Asn Gly Gly Cys Gln Tyr Leu Cys Leu Pro Ala Pro Gln Ile Asn
 675 680 685
 Pro His Ser Pro Lys Phe Thr Cys Ala Cys Pro Asp Gly Met Leu Leu
 690 695 700
 Ala Arg Asp Met Arg Ser Cys Leu Thr Glu Ala Glu Ala Ala Val Ala

 705 710 715 720
 Thr Gln Glu Thr Ser Thr Val Arg Leu Lys Val Ser Ser Thr Ala Val
 725 730 735
 Arg Thr Gln His Thr Thr Thr Arg Pro Val Pro Asp Thr Ser Arg Leu
 740 745 750
 Pro Gly Ala Thr Pro Gly Leu Thr Thr Val Glu Ile Val Thr Met Ser
 755 760 765
 His Gln Ala Leu Gly Asp Val Ala Gly Arg Gly Asn Glu Lys Lys Pro

 770 775 780
 Ser Ser Val Arg Ala Leu Ser Ile Val Leu Pro Ile Val Leu Leu Val
 785 790 795 800
 Phe Leu Cys Leu Gly Val Phe Leu Leu Trp Lys Asn Trp Arg Leu Lys
 805 810 815
 Asn Ile Asn Ser Ile Asn Phe Asp Asn Pro Val Tyr Gln Lys Thr Thr
 820 825 830
 Glu Asp Glu Val His Ile Cys His Asn Gln Asp Gly Tyr Ser Tyr Pro

 835 840 845
 Ser Arg Gln Met Val Ser Leu Glu Asp Asp Val Ala
 850 855 860
 <210> 20

<211> 858

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Met Gly Pro Trp Gly Trp Lys Leu Arg Trp Thr Val Ala Leu Leu Leu

1 5 10 15

Ala Ala Ala Gly Thr Ala Val Gly Asp Arg Cys Glu Arg Asn Glu Phe

 20 25 30

Gln Cys Gln Asp Gly Lys Cys Ile Ser Tyr Lys Trp Val Cys Asp Gly

 35 40 45

Ser Ala Glu Cys Gln Asp Gly Ser Asp Glu Ser Gln Glu Thr Cys Leu

50 55 60

Ser Val Thr Cys Lys Ser Gly Asp Phe Ser Cys Gly Gly Arg Val Asn

65 70 75 80

Arg Cys Ile Pro Gln Phe Trp Arg Cys Asp Gly Gln Val Asp Cys Asp

 85 90 95

Asn Gly Ser Asp Glu Gln Gly Cys Pro Pro Lys Thr Cys Ser Gln Asp

 100 105 110

Glu Phe Arg Cys His Asp Gly Lys Cys Ile Ser Arg Gln Phe Val Cys

115 120 125

Asp Ser Asp Arg Asp Cys Leu Asp Gly Ser Asp Glu Ala Ser Cys Pro

130 135 140

Val Leu Thr Cys Gly Pro Ala Ser Phe Gln Cys Asn Ser Ser Thr Cys

145 150 155 160

Ile Pro Gln Leu Trp Ala Cys Asp Asn Asp Pro Asp Cys Glu Asp Gly

 165 170 175

Ser Asp Glu Trp Pro Gln Arg Cys Arg Gly Leu Tyr Val Phe Gln Gly

180 185 190

Asp Ser Ser Pro Cys Ser Ala Phe Glu Phe His Cys Leu Ser Gly Glu

195 200 205

Cys Ile His Ser Ser Trp Arg Cys Asp Gly Gly Pro Asp Cys Lys Asp

210 215 220

Lys Ser Asp Glu Glu Asn Cys Ala Val Ala Thr Cys Arg Pro Asp Glu

225 230 235 240

Phe Gln Cys Ser Asp Gly Asn Cys Ile His Gly Ser Arg Gln Cys Asp

245 250 255

Arg Glu Tyr Asp Cys Lys Asp Met Ser Asp Glu Val Gly Cys Val Asn

260 265 270

Val Thr Leu Cys Glu Gly Pro Asn Lys Phe Lys Cys His Ser Gly Glu

275 280 285

Cys Ile Thr Leu Asp Lys Val Cys Asn Met Ala Arg Asp Cys Arg Asp

290 295 300

Trp Ser Asp Glu Pro Ile Lys Glu Cys Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp

305 310 315 320

Asn Asn Gly Gly Cys Ser His Val Cys Asn Asp Leu Lys Ile Gly Tyr

325 330 335

Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys

340 345 350

Glu Asp Ile Asp Glu Cys Gln Asp Pro Asp Thr Cys Ser Gln Leu Cys

355 360 365

Val Asn Leu Glu Gly Gly Tyr Lys Cys Gln Cys Glu Glu Gly Phe Gln

370 375 380

Leu Asp Pro His Thr Lys Ala Cys Lys Ala Val Gly Ser Ile Ala Tyr

385 390 395 400

Leu Phe Phe Thr Asn Arg His Glu Val Arg Lys Met Thr Leu Asp Arg

405 410 415

Ser Glu Tyr Thr Ser Leu Ile Pro Asn Leu Arg Asn Val Val Ala Leu

420 425 430

Asp Thr Glu Val Ala Ser Asn Arg Ile Tyr Trp Ser Asp Leu Ser Gln

435 440 445

Arg Met Ile Cys Ser Thr Gln Leu Asp Arg Ala His Gly Val Ser Ser

450 455 460

Tyr Asp Thr Val Ile Ser Arg Asp Ile Gln Ala Pro Asp Gly Leu Ala

465 470 475 480
 Val Asp Trp Ile His Ser Asn Ile Tyr Trp Thr Asp Ser Val Leu Gly

 485 490 495
 Thr Val Ser Val Ala Asp Thr Lys Gly Val Lys Arg Lys Thr Leu Phe
 500 505 510
 Arg Glu Asn Gly Ser Lys Pro Arg Ala Ile Val Val Asp Pro Val His
 515 520 525
 Gly Phe Met Tyr Trp Thr Asp Trp Gly Thr Pro Ala Lys Ile Lys Lys
 530 535 540
 Gly Gly Leu Asn Gly Val Asp Ile Tyr Ser Leu Val Thr Glu Asn Ile

 545 550 555 560
 Gln Trp Pro Asn Gly Ile Thr Leu Asp Leu Leu Ser Gly Arg Leu Tyr
 565 570 575
 Trp Val Asp Ser Lys Leu His Ser Ile Ser Ser Ile Asp Val Asn Gly
 580 585 590
 Gly Asn Arg Lys Thr Ile Leu Glu Asp Glu Lys Arg Leu Ala His Pro
 595 600 605
 Phe Ser Leu Ala Val Phe Glu Asp Lys Val Phe Trp Thr Asp Ile Ile

 610 615 620
 Asn Glu Ala Ile Phe Ser Ala Asn Arg Leu Thr Gly Ser Asp Val Asn
 625 630 635 640
 Leu Leu Ala Glu Asn Leu Leu Ser Pro Glu Asp Met Val Leu Phe His
 645 650 655
 Asn Leu Thr Gln Pro Arg Gly Val Asn Trp Cys Glu Arg Thr Thr Leu
 660 665 670
 Ser Asn Gly Gly Cys Gln Tyr Leu Cys Leu Pro Ala Pro Gln Ile Asn

 675 680 685
 Pro His Ser Pro Lys Phe Thr Cys Ala Cys Pro Asp Gly Met Leu Leu
 690 695 700
 Ala Arg Asp Met Arg Ser Cys Leu Thr Glu Ala Glu Ala Ala Val Ala
 705 710 715 720

Thr Gln Glu Thr Ser Thr Val Arg Leu Lys Val Ser Ser Thr Ala Val
 725 730 735
 Arg Thr Gln His Thr Thr Thr Arg Pro Val Pro Asp Thr Ser Arg Leu
 740 745 750
 Pro Gly Ala Thr Pro Gly Leu Thr Thr Val Glu Ile Val Thr Met Ser
 755 760 765
 His Gln Ala Leu Gly Asp Val Ala Gly Arg Gly Asn Glu Lys Lys Pro
 770 775 780
 Ser Ser Val Arg Ala Leu Ser Ile Val Leu Pro Ile Val Leu Leu Val
 785 790 795 800
 Phe Leu Cys Leu Gly Val Phe Leu Leu Trp Lys Asn Trp Arg Leu Lys
 805 810 815
 Asn Ile Asn Ser Ile Asn Phe Asp Asn Pro Val Tyr Gln Lys Thr Thr
 820 825 830
 Glu Asp Glu Val His Ile Cys His Asn Gln Asp Gly Tyr Ser Tyr Pro
 835 840 845
 Ser Met Val Ser Leu Glu Asp Asp Val Ala
 850 855
 <210> 21
 <211> 819
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 21
 Met Gly Pro Trp Gly Trp Lys Leu Arg Trp Thr Val Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 Ala Ala Ala Gly Thr Ala Val Gly Asp Arg Cys Glu Arg Asn Glu Phe
 20 25 30
 Gln Cys Gln Asp Gly Lys Cys Ile Ser Tyr Lys Trp Val Cys Asp Gly
 35 40 45
 Ser Ala Glu Cys Gln Asp Gly Ser Asp Glu Ser Gln Glu Thr Cys Ser
 50 55 60

305 310 315 320
 Asp Thr Cys Ser Gln Leu Cys Val Asn Leu Glu Gly Gly Tyr Lys Cys

 325 330 335
 Gln Cys Glu Glu Gly Phe Gln Leu Asp Pro His Thr Lys Ala Cys Lys
 340 345 350
 Ala Val Gly Ser Ile Ala Tyr Leu Phe Phe Thr Asn Arg His Glu Val
 355 360 365
 Arg Lys Met Thr Leu Asp Arg Ser Glu Tyr Thr Ser Leu Ile Pro Asn
 370 375 380
 Leu Arg Asn Val Val Ala Leu Asp Thr Glu Val Ala Ser Asn Arg Ile

 385 390 395 400
 Tyr Trp Ser Asp Leu Ser Gln Arg Met Ile Cys Ser Thr Gln Leu Asp
 405 410 415
 Arg Ala His Gly Val Ser Ser Tyr Asp Thr Val Ile Ser Arg Asp Ile
 420 425 430
 Gln Ala Pro Asp Gly Leu Ala Val Asp Trp Ile His Ser Asn Ile Tyr
 435 440 445
 Trp Thr Asp Ser Val Leu Gly Thr Val Ser Val Ala Asp Thr Lys Gly

 450 455 460
 Val Lys Arg Lys Thr Leu Phe Arg Glu Asn Gly Ser Lys Pro Arg Ala
 465 470 475 480
 Ile Val Val Asp Pro Val His Gly Phe Met Tyr Trp Thr Asp Trp Gly
 485 490 495
 Thr Pro Ala Lys Ile Lys Lys Gly Gly Leu Asn Gly Val Asp Ile Tyr
 500 505 510
 Ser Leu Val Thr Glu Asn Ile Gln Trp Pro Asn Gly Ile Thr Leu Asp

 515 520 525
 Leu Leu Ser Gly Arg Leu Tyr Trp Val Asp Ser Lys Leu His Ser Ile
 530 535 540
 Ser Ser Ile Asp Val Asn Gly Gly Asn Arg Lys Thr Ile Leu Glu Asp
 545 550 555 560

Glu Lys Arg Leu Ala His Pro Phe Ser Leu Ala Val Phe Glu Asp Lys
 565 570 575
 Val Phe Trp Thr Asp Ile Ile Asn Glu Ala Ile Phe Ser Ala Asn Arg
 580 585 590
 Leu Thr Gly Ser Asp Val Asn Leu Leu Ala Glu Asn Leu Leu Ser Pro
 595 600 605
 Glu Asp Met Val Leu Phe His Asn Leu Thr Gln Pro Arg Gly Val Asn
 610 615 620
 Trp Cys Glu Arg Thr Thr Leu Ser Asn Gly Gly Cys Gln Tyr Leu Cys
 625 630 635 640
 Leu Pro Ala Pro Gln Ile Asn Pro His Ser Pro Lys Phe Thr Cys Ala
 645 650 655
 Cys Pro Asp Gly Met Leu Leu Ala Arg Asp Met Arg Ser Cys Leu Thr
 660 665 670
 Glu Ala Glu Ala Ala Val Ala Thr Gln Glu Thr Ser Thr Val Arg Leu
 675 680 685
 Lys Val Ser Ser Thr Ala Val Arg Thr Gln His Thr Thr Thr Arg Pro
 690 695 700
 Val Pro Asp Thr Ser Arg Leu Pro Gly Ala Thr Pro Gly Leu Thr Thr
 705 710 715 720
 Val Glu Ile Val Thr Met Ser His Gln Ala Leu Gly Asp Val Ala Gly
 725 730 735
 Arg Gly Asn Glu Lys Lys Pro Ser Ser Val Arg Ala Leu Ser Ile Val
 740 745 750
 Leu Pro Ile Val Leu Leu Val Phe Leu Cys Leu Gly Val Phe Leu Leu
 755 760 765
 Trp Lys Asn Trp Arg Leu Lys Asn Ile Asn Ser Ile Asn Phe Asp Asn
 770 775 780
 Pro Val Tyr Gln Lys Thr Thr Glu Asp Glu Val His Ile Cys His Asn
 785 790 795 800
 Gln Asp Gly Tyr Ser Tyr Pro Ser Arg Gln Met Val Ser Leu Glu Asp

Asp Asn Asn Gly Gly Cys Ser His Val Cys Asn Asp Leu Lys Ile Gly
 195 200 205

 Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln Leu Val Ala Gln Arg Arg
 210 215 220
 Cys Glu Asp Ile Asp Glu Cys Gln Asp Pro Asp Thr Cys Ser Gln Leu
 225 230 235 240
 Cys Val Asn Leu Glu Gly Gly Tyr Lys Cys Gln Cys Glu Glu Gly Phe
 245 250 255
 Gln Leu Asp Pro His Thr Lys Ala Cys Lys Ala Val Gly Ser Ile Ala
 260 265 270

 Tyr Leu Phe Phe Thr Asn Arg His Glu Val Arg Lys Met Thr Leu Asp
 275 280 285
 Arg Ser Glu Tyr Thr Ser Leu Ile Pro Asn Leu Arg Asn Val Val Ala
 290 295 300
 Leu Asp Thr Glu Val Ala Ser Asn Arg Ile Tyr Trp Ser Asp Leu Ser
 305 310 315 320
 Gln Arg Met Ile Cys Ser Thr Gln Leu Asp Arg Ala His Gly Val Ser
 325 330 335

 Ser Tyr Asp Thr Val Ile Ser Arg Asp Ile Gln Ala Pro Asp Gly Leu
 340 345 350
 Ala Val Asp Trp Ile His Ser Asn Ile Tyr Trp Thr Asp Ser Val Leu
 355 360 365
 Gly Thr Val Ser Val Ala Asp Thr Lys Gly Val Lys Arg Lys Thr Leu
 370 375 380
 Phe Arg Glu Asn Gly Ser Lys Pro Arg Ala Ile Val Val Asp Pro Val
 385 390 395 400

 His Gly Phe Met Tyr Trp Thr Asp Trp Gly Thr Pro Ala Lys Ile Lys
 405 410 415
 Lys Gly Gly Leu Asn Gly Val Asp Ile Tyr Ser Leu Val Thr Glu Asn
 420 425 430
 Ile Gln Trp Pro Asn Gly Ile Thr Leu Asp Leu Leu Ser Gly Arg Leu

435 Tyr Trp Val Asp Ser Lys Leu His Ser Ile Ser Ser Ile Asp Val Asn 450	440 Leu His Ser Ile Ser Ser Ile Asp Val Asn 455	445 Ile Ser Ser Ile Asp Val Asn 460
465 Gly Gly Asn Arg Lys Thr Ile Leu Glu Asp Glu Lys Arg Leu Ala His 480	470 Leu Glu Asp Glu Lys Arg Leu Ala His 485	475 Ile Ser Ser Ile Asp Val Asn 490
495 Pro Phe Ser Leu Ala Val Phe Glu Asp Lys Val Phe Trp Thr Asp Ile 510	490 Leu Thr Gly Ser Asp Val 500	495 Ile Ser Ser Ile Asp Val Asn 505
515 Asn Leu Leu Ala Glu Asn Leu Leu Ser Pro Glu Asp Met Val Leu Phe 525	510 Ile Ser Ser Ile Asp Val Asn 515	520 Leu Thr Gly Ser Asp Val 525
530 His Asn Leu Thr Gln Pro Arg Glu Ala Glu Ala Ala Val Ala Thr Gln 545	535 Leu Lys Val Ser Ser Thr Ala Val Arg Thr 550	540 Ile Ser Ser Ile Asp Val Asn 545
555 Gln His Thr Thr Thr Arg Pro Val Pro Asp Thr Ser Arg Leu Pro Gly 570	565 Thr Thr Thr Arg Pro Val Pro Asp Thr Ser Arg Leu Pro Gly 575	560 Ile Ser Ser Ile Asp Val Asn 570
580 Ala Thr Pro Gly Leu Thr Thr Val Glu Ile Val Thr Met Ser His Gln 590	585 Leu Thr Thr Thr Arg Pro Val Pro Asp Thr Ser Arg Leu Pro Gly 590	590 Ile Ser Ser Ile Asp Val Asn 585
595 Ala Leu Gly Asp Val Ala Gly Arg Gly Asn Glu Lys Lys Pro Ser Ser 610	600 Leu Leu Val Phe Leu 615	605 Ile Ser Ser Ile Asp Val Asn 610
625 Val Arg Ala Leu Ser Ile Val Leu Pro Ile Val Leu Leu Val Phe Leu 640	630 Leu Val Phe Leu 635	640 Ile Ser Ser Ile Asp Val Asn 635
645 Cys Leu Gly Val Phe Leu Leu Trp Lys Asn Trp Arg Leu Lys Asn Ile 655	650 Leu Lys Asn Ile 655	655 Ile Ser Ser Ile Asp Val Asn 650
660 Asn Ser Ile Asn Phe Asp Asn Pro Val Tyr Gln Lys Thr Thr Glu Asp 670	665 Thr Thr Glu Asp 670	670 Ile Ser Ser Ile Asp Val Asn 665
675 Glu Val His Ile Cys His Asn Gln Asp Gly Tyr Ser Tyr Pro Ser Arg 680	680 Gln Met Val Ser Leu Glu Asp Asp Val Ala 680	680 Ile Ser Ser Ile Asp Val Asn 675

<210> 23

<211> 504

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Met Met Thr Thr Ser Leu Ile Trp Gly Ile Ala Ile Ala Ala Cys Cys

1 5 10 15

Cys Leu Trp Leu Ile Leu Gly Ile Arg Arg Arg Gln Thr Gly Glu Pro

 20 25 30

Pro Leu Glu Asn Gly Leu Ile Pro Tyr Leu Gly Cys Ala Leu Gln Phe

 35 40 45

Gly Ala Asn Pro Leu Glu Phe Leu Arg Ala Asn Gln Arg Lys His Gly

 50 55 60

His Val Phe Thr Cys Lys Leu Met Gly Lys Tyr Val His Phe Ile Thr

65 70 75 80

Asn Pro Leu Ser Tyr His Lys Val Leu Cys His Gly Lys Tyr Phe Asp

 85 90 95

Trp Lys Lys Phe His Phe Ala Thr Ser Ala Lys Ala Phe Gly His Arg

 100 105 110

Ser Ile Asp Pro Met Asp Gly Asn Thr Thr Glu Asn Ile Asn Asp Thr

 115 120 125

Phe Ile Lys Thr Leu Gln Gly His Ala Leu Asn Ser Leu Thr Glu Ser

 130 135 140

Met Met Glu Asn Leu Gln Arg Ile Met Arg Pro Pro Val Ser Ser Asn

145 150 155 160

Ser Lys Thr Ala Ala Trp Val Thr Glu Gly Met Tyr Ser Phe Cys Tyr

 165 170 175

Arg Val Met Phe Glu Ala Gly Tyr Leu Thr Ile Phe Gly Arg Asp Leu

 180 185 190

Thr Arg Arg Asp Thr Gln Lys Ala His Ile Leu Asn Asn Leu Asp Asn

 195 200 205

Phe Lys Gln Phe Asp Lys Val Phe Pro Ala Leu Val Ala Gly Leu Pro

210	215	220	
Ile His Met Phe Arg Thr Ala His Asn Ala Arg Glu Lys Leu Ala Glu			
225	230	235	240
Ser Leu Arg His Glu Asn Leu Gln Lys Arg Glu Ser Ile Ser Glu Leu			
	245	250	255
Ile Ser Leu Arg Met Phe Leu Asn Asp Thr Leu Ser Thr Phe Asp Asp			
	260	265	270
Leu Glu Lys Ala Lys Thr His Leu Val Val Leu Trp Ala Ser Gln Ala			
275	280	285	
Asn Thr Ile Pro Ala Thr Phe Trp Ser Leu Phe Gln Met Ile Arg Asn			
290	295	300	
Pro Glu Ala Met Lys Ala Ala Thr Glu Glu Val Lys Arg Thr Leu Glu			
305	310	315	320
Asn Ala Gly Gln Lys Val Ser Leu Glu Gly Asn Pro Ile Cys Leu Ser			
	325	330	335
Gln Ala Glu Leu Asn Asp Leu Pro Val Leu Asp Ser Ile Ile Lys Glu			
340	345	350	
Ser Leu Arg Leu Ser Ser Ala Ser Leu Asn Ile Arg Thr Ala Lys Glu			
355	360	365	
Asp Phe Thr Leu His Leu Glu Asp Gly Ser Tyr Asn Ile Arg Lys Asp			
370	375	380	
Asp Ile Ile Ala Leu Tyr Pro Gln Leu Met His Leu Asp Pro Glu Ile			
385	390	395	400
Tyr Pro Asp Pro Leu Thr Phe Lys Tyr Asp Arg Tyr Leu Asp Glu Asn			
	405	410	415
Gly Lys Thr Lys Thr Thr Phe Tyr Cys Asn Gly Leu Lys Leu Lys Tyr			
420	425	430	
Tyr Tyr Met Pro Phe Gly Ser Gly Ala Thr Ile Cys Pro Gly Arg Leu			
435	440	445	
Phe Ala Ile His Glu Ile Lys Gln Phe Leu Ile Leu Met Leu Ser Tyr			
450	455	460	

Phe Glu Leu Glu Leu Ile Glu Gly Gln Ala Lys Cys Pro Pro Leu Asp
 465 470 475 480

Gln Ser Arg Ala Gly Leu Gly Ile Leu Pro Pro Leu Asn Asp Ile Glu
 485 490 495

Phe Lys Tyr Lys Phe Lys His Leu
 500

<210> 24

<211> 266

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Met Val Thr Asp Phe Glu Asn Val Pro Glu Glu Asp Gly Thr Arg Phe
 1 5 10 15

His Arg Gln Ala Ser Lys Cys Asp Ser His Gly Thr His Leu Ala Gly
 20 25 30

Val Val Ser Gly Arg Asp Ala Gly Val Ala Lys Gly Ala Ser Met Arg
 35 40 45

Ser Leu Arg Val Leu Asn Cys Gln Gly Lys Gly Thr Val Ser Gly Thr
 50 55 60

Leu Ile Gly Leu Glu Phe Ile Arg Lys Ser Gln Leu Val Gln Pro Val
 65 70 75 80

Gly Pro Leu Val Val Leu Leu Pro Leu Ala Gly Gly Tyr Ser Arg Val
 85 90 95

Leu Asn Ala Ala Cys Gln Arg Leu Ala Arg Ala Gly Val Val Leu Val
 100 105 110

Thr Ala Ala Gly Asn Phe Arg Asp Asp Ala Cys Leu Tyr Ser Pro Ala
 115 120 125

Ser Ala Pro Glu Val Ile Thr Val Gly Ala Thr Asn Ala Gln Asp Gln
 130 135 140

Pro Val Thr Leu Gly Thr Leu Gly Thr Asn Phe Gly Arg Cys Val Asp
 145 150 155 160

Leu Phe Ala Pro Gly Glu Asp Ile Ile Gly Ala Ser Ser Asp Cys Ser
 165 170 175
 Thr Cys Phe Val Ser Gln Ser Gly Thr Ser Gln Ala Ala Ala His Val
 180 185 190
 Ala Gly Ile Ala Ala Met Met Leu Ser Ala Glu Pro Glu Leu Thr Leu
 195 200 205
 Ala Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ile His Phe Ser Ala Lys Asp Val Ile
 210 215 220

Asn Glu Ala Trp Phe Pro Glu Asp Gln Arg Val Gly Ser Cys Phe Ala
 225 230 235 240
 Gly Leu Tyr Gly Gln His Thr Arg Gly Leu His Gly Trp Pro Gln Pro
 245 250 255
 Ser Pro Ala Ala Pro Gln Met Arg Ser Cys
 260 265

<210> 25

<211> 205

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Met Gly Thr Val Ser Ser Arg Arg Ser Trp Trp Pro Leu Pro Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Pro Ala Gly Ala Arg Ala Gln Glu
 20 25 30
 Asp Glu Asp Gly Asp Tyr Glu Glu Leu Val Leu Ala Leu Arg Ser Glu
 35 40 45
 Glu Asp Gly Leu Ala Glu Ala Pro Glu His Gly Thr Thr Ala Thr Phe
 50 55 60
 His Arg Cys Ala Lys Asp Pro Trp Arg Leu Pro Gly Thr Tyr Val Val
 65 70 75 80

Val Leu Lys Glu Glu Thr His Leu Ser Gln Ser Glu Arg Thr Ala Arg
 85 90 95
 Arg Leu Gln Ala Gln Ala Ala Arg Arg Gly Tyr Leu Thr Lys Ile Leu

100 105 110
 His Val Phe His Gly Leu Leu Pro Gly Phe Leu Val Lys Met Ser Gly
 115 120 125
 Asp Leu Leu Glu Leu Ala Leu Lys Leu Pro His Val Asp Tyr Ile Glu
 130 135 140

 Glu Asp Ser Ser Val Phe Ala Gln Ser Ile Pro Trp Asn Leu Glu Arg
 145 150 155 160
 Ile Thr Pro Pro Arg Tyr Arg Ala Asp Glu Tyr Gln Pro Pro Ala Tyr
 165 170 175
 Leu Glu Asp His Cys Gly Gly His Arg Gly Ala Val Gln Met Ala Leu
 180 185 190
 Gln Lys Thr Gln Glu Thr Leu Gly Gln Glu Gln Phe Asp
 195 200 205
 <210> 26

<211> 692

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Met Gly Thr Val Ser Ser Arg Arg Ser Trp Trp Pro Leu Pro Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Pro Ala Gly Ala Arg Ala Gln Glu
 20 25 30
 Asp Glu Asp Gly Asp Tyr Glu Glu Leu Val Leu Ala Leu Arg Ser Glu
 35 40 45
 Glu Asp Gly Leu Ala Glu Ala Pro Glu His Gly Thr Thr Ala Thr Phe

 50 55 60
 His Arg Cys Ala Lys Asp Pro Trp Arg Leu Pro Gly Thr Tyr Val Val
 65 70 75 80
 Val Leu Lys Glu Glu Thr His Leu Ser Gln Ser Glu Arg Thr Ala Arg
 85 90 95
 Arg Leu Gln Ala Gln Ala Ala Arg Arg Gly Tyr Leu Thr Lys Ile Leu
 100 105 110

His Val Phe His Gly Leu Leu Pro Gly Phe Leu Val Lys Met Ser Gly

115 120 125

Asp Leu Leu Glu Leu Ala Leu Lys Leu Pro His Val Asp Tyr Ile Glu

130 135 140

Glu Asp Ser Ser Val Phe Ala Gln Ser Ile Pro Trp Asn Leu Glu Arg

145 150 155 160

Ile Thr Pro Pro Arg Tyr Arg Ala Asp Glu Tyr Gln Pro Pro Asp Gly

165 170 175

Gly Ser Leu Val Glu Val Tyr Leu Leu Asp Thr Ser Ile Gln Ser Asp

180 185 190

His Arg Glu Ile Glu Gly Arg Val Met Val Thr Asp Phe Glu Asn Val

195 200 205

Pro Glu Glu Asp Gly Thr Arg Phe His Arg Gln Ala Ser Lys Cys Asp

210 215 220

Ser His Gly Thr His Leu Ala Gly Val Val Ser Gly Arg Asp Ala Gly

225 230 235 240

Val Ala Lys Gly Ala Ser Met Arg Ser Leu Arg Val Leu Asn Cys Gln

245 250 255

Gly Lys Gly Thr Val Ser Gly Thr Leu Ile Gly Leu Glu Phe Ile Arg

260 265 270

Lys Ser Gln Leu Val Gln Pro Val Gly Pro Leu Val Val Leu Leu Pro

275 280 285

Leu Ala Gly Gly Tyr Ser Arg Val Leu Asn Ala Ala Cys Gln Arg Leu

290 295 300

Ala Arg Ala Gly Val Val Leu Val Thr Ala Ala Gly Asn Phe Arg Asp

305 310 315 320

Asp Ala Cys Leu Tyr Ser Pro Ala Ser Ala Pro Glu Val Ile Thr Val

325 330 335

Gly Ala Thr Asn Ala Gln Asp Gln Pro Val Thr Leu Gly Thr Leu Gly

340 345 350

Thr Asn Phe Gly Arg Cys Val Asp Leu Phe Ala Pro Gly Glu Asp Ile

355 360 365
 Ile Gly Ala Ser Ser Asp Cys Ser Thr Cys Phe Val Ser Gln Ser Gly

 370 375 380
 Thr Ser Gln Ala Ala Ala His Val Ala Gly Ile Ala Ala Met Met Leu
 385 390 395 400
 Ser Ala Glu Pro Glu Leu Thr Leu Ala Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ile

 405 410 415
 His Phe Ser Ala Lys Asp Val Ile Asn Glu Ala Trp Phe Pro Glu Asp
 420 425 430
 Gln Arg Val Leu Thr Pro Asn Leu Val Ala Ala Leu Pro Pro Ser Thr

 435 440 445
 His Gly Ala Gly Trp Gln Leu Phe Cys Arg Thr Val Trp Ser Ala His
 450 455 460
 Ser Gly Pro Thr Arg Met Ala Thr Ala Val Ala Arg Cys Ala Pro Asp
 465 470 475 480
 Glu Glu Leu Leu Ser Cys Ser Ser Phe Ser Arg Ser Gly Lys Arg Arg
 485 490 495
 Gly Glu Arg Met Glu Ala Gln Gly Gly Lys Leu Val Cys Arg Ala His

 500 505 510
 Asn Ala Phe Gly Gly Glu Gly Val Tyr Ala Ile Ala Arg Cys Cys Leu
 515 520 525
 Leu Pro Gln Ala Asn Cys Ser Val His Thr Ala Pro Pro Ala Glu Ala
 530 535 540
 Ser Met Gly Thr Arg Val His Cys His Gln Gln Gly His Val Leu Thr
 545 550 555 560
 Gly Cys Ser Ser His Trp Glu Val Glu Asp Leu Gly Thr His Lys Pro

 565 570 575
 Pro Val Leu Arg Pro Arg Gly Gln Pro Asn Gln Cys Val Gly His Arg
 580 585 590
 Glu Ala Ser Ile His Ala Ser Cys Cys His Ala Pro Gly Leu Glu Cys
 595 600 605

Lys Val Lys Glu His Gly Ile Pro Ala Pro Gln Glu Gln Val Thr Val
610 615 620

Ala Cys Glu Glu Gly Trp Thr Leu Thr Gly Cys Ser Ala Leu Pro Gly

625 630 635 640

Thr Ser His Val Leu Gly Ala Tyr Ala Val Asp Asn Thr Cys Val Val

645 650 655

Arg Ser Arg Asp Val Ser Thr Thr Gly Ser Thr Ser Glu Gly Ala Val

660 665 670

Thr Ala Val Ala Ile Cys Cys Arg Ser Arg His Leu Ala Gln Ala Ser

675 680 685

Gln Glu Leu Gln

690

<210> 27

<211> 615

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 27

atggctggac ctgccacca gagcccatg aagctgatgg ccctgcagct gctgctgtgg 60
cacagtgcac tctggacagt gcaggaagcc acccccctgg gccctgccag ctcctgccc 120
cagagcttcc tgctcaagtg cttagagcaa gtgaggaaga tccagggcga tggcgcagcg 180
ctccaggaga agctgtgtgc cacctacaag ctgtgccacc ccgaggagct ggtgctgctc 240
ggacactctc tgggcatccc ctgggctccc ctgagcagct gccccagcca ggcctgcag 300
ctggcaggct gcttgagcca actccatagc ggccttttcc tctaccaggg gctcctgcag 360

gccctggaag ggatctcccc cgagttgggt cccaccttgg acacactgca gctggacgtc 420
gccgactttg ccaccacat ctggcagcag atggaagaac tgggaatggc ccctgccctg 480
cagccccacc aggtgtccat gccggccttc gcctctgctt tccagcgcgg ggcaggaggg 540
gtcctggttg cctccatct gcagagcttc ctggagggtg cgtaccgcgt tctacgccac 600
cttgcccagc cctga 615

<210> 28

<211> 800

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 28

taatacgact cactataggg aaataagaga gaaaagaaga gtaagaagaa atataagagc	60
caccatggct ggacctgcca cccagagccc catgaagctg atggccctgc agctgctgct	120
gtggcacagt gcactctgga cagtgcagga agccaccccc ctgggcccctg ccagctcctt	180
gccccagagc ttcctgctca agtgcttaga gcaagtgagg aagatccagg gcgatggcgc	240
agcgtccag gagaagctgt gtgccaccta caagctgtgc caccgagg agctggtgct	300
gctcggacac tctctgggca tcccctgggc tcccctgagc agctgcccc gccaggcctt	360
gcagctggca ggtgcttga gccaactcca tagcggcctt ttcctctacc aggggctcct	420
gcaggcccctg gaagggatct cccccgatt ggggtcccacc ttggacacac tgcagctgga	480
cgtcgccgac tttccacca ccacttgga gcagatggaa gaactgggaa tggcccctgc	540
cctgcagccc acccaggggtg ccatgccggc cttgcctct gctttccagc gccgggcagg	600
aggggtcctg gttgcctccc atctgcagag cttcctggag gtgtcgtacc gcgttctacg	660
ccaccttgcc cagcctgaa gcgctgcctt ctgccccgct tgccttctgg ccatgccctt	720
cttctctccc ttgcacctgt acctcttggc ctttgaataa agcctgagta ggaaggcggc	780
cgctcgagca tgcacttaga	800

<210> 29

<211> 800

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Transcript Sequence

<400> 29

taatacgact cactataggg aaataagaga gaaaagaaga gtaagaagaa atataagagc	60
caccatggcc ggtcccgcga cccaaagccc catgaaactt atggccctgc agttgctgct	120
ttggcactcg gccctctgga cagtccaaga agcgactcct ctgggacctg cctcatcggt	180
gccgcagtca ttccttttga agtgtctgga gcaggtgcga aagattcagg gcgatggagc	240
cgcactccaa gagaagctct gcgcgacata caaactttgc catcccagg agctcgtact	300
gctcgggcac agcttgggga ttcctgggc tctctctcg tctgtcctg cgcaggcttt	360
gcagttggca ggggtccttt cccagctcca ctccggtttg ttcttgatc agggactgct	420
gcaagccctt gagggaatct cgccagaatt gggcccgcag ctggacacgt tgcagctcga	480
cgtggcggat ttcgaacaa ccacttgga gcagatggag gaactgggga tggcaccgc	540
gctgcagccc acgcaggggg caatgccggc ctttgcgtcc gcgtttcagc gcagggcggg	600

tggagtctc gtagcgagcc accttcaatc atttttggaa gtctcgtacc ggggtgctgag 660
 acatcttgcg cagccgtgaa gcgctgcctt ctgcggggct tgccttctgg ccatgccctt 720
 cttctctccc ttgcacctgt acctcttggc ctttgaataa agcctgagta ggaaggcggc 780

 cgctcgagca tgcactaga 800
 <210> 30
 <211> 758
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Transcript Sequence
 <400> 30
 gggaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauuaag agccaccaug gccggucccg 60
 cgacccaaag cccaugaaa cuuauaggcc ugcaguugcu gcuuuggcac ucggcccucu 120
 ggacagucca agaagcgacu ccucucggac cugccucauc guugccgag ucauuccuuu 180
 ugaagugucu ggagcaggug cgaagauuc agggcgaugg agccgcacuc caagagaagc 240

 ucucgcgac auacaacuu ugccaucccg aggagcucgu acugcucggg cacagcuugg 300
 ggauucccug ggcuccucuc ucguccuguc cgucgcaggc uuugcaguug gcagggugcc 360
 uuucccagcu ccacuccggu uuguucuugu aucagggacu gcugcaagcc cuagagggaa 420
 ucucgccaga auugggccg acgcuggaca cguugcagcu cgacguggcg gauuucgcaa 480
 caaccaucug gcagcagaug gaggaacugg ggauggcacc cgcgucgag cccacgcagg 540
 gggcaaugcc ggccuuugcg uccgcguuuc agcgcagggc ggguggaguc cucguagcga 600
 gccaccuua aucauuuug gaagucucgu accgggugcu gagacaucuu gcgcagccgu 660

 gaagcgcugc cuucugcggg gcuugccuuc ugccaugcc cuucucucu cccuugcacc 720
 uguaccucu ggucuuugaa uaaagccuga guaggaag 758
 <210> 31
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 31
 gggaataag agagaaaaga agagtaagaa gaaatataag agccacc 47
 <210> 32
 <211> 102
 <212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 32

tgataatagg ctgccttctg cggggcttgc cttctggcca tgccttctt ctctcccttg 60
 cacctgtacc tcttggcttt tgaataaagc ctgagtagga ag 102

<210> 33

<211> 860

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

Met Gly Pro Trp Gly Trp Lys Leu Arg Trp Thr Val Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 Ala Ala Ala Gly Thr Ala Val Gly Asp Arg Cys Glu Arg Asn Glu Phe
 20 25 30
 Gln Cys Gln Asp Gly Lys Cys Ile Ser Tyr Lys Trp Val Cys Asp Gly
 35 40 45
 Ser Ala Glu Cys Gln Asp Gly Ser Asp Glu Ser Gln Glu Thr Cys Leu
 50 55 60
 Ser Val Thr Cys Lys Ser Gly Asp Phe Ser Cys Gly Gly Arg Val Asn
 65 70 75 80
 Arg Cys Ile Pro Gln Phe Trp Arg Cys Asp Gly Gln Val Asp Cys Asp
 85 90 95
 Asn Gly Ser Asp Glu Gln Gly Cys Pro Pro Lys Thr Cys Ser Gln Asp
 100 105 110
 Glu Phe Arg Cys His Asp Gly Lys Cys Ile Ser Arg Gln Phe Val Cys
 115 120 125
 Asp Ser Asp Arg Asp Cys Leu Asp Gly Ser Asp Glu Ala Ser Cys Pro
 130 135 140
 Val Leu Thr Cys Gly Pro Ala Ser Phe Gln Cys Asn Ser Ser Thr Cys
 145 150 155 160
 Ile Pro Gln Leu Trp Ala Cys Asp Asn Asp Pro Asp Cys Glu Asp Gly
 165 170 175

Ser Asp Glu Trp Pro Gln Arg Cys Arg Gly Leu Tyr Val Phe Gln Gly
 180 185 190
 Asp Ser Ser Pro Cys Ser Ala Phe Glu Phe His Cys Leu Ser Gly Glu
 195 200 205
 Cys Ile His Ser Ser Trp Arg Cys Asp Gly Gly Pro Asp Cys Lys Asp
 210 215 220
 Lys Ser Asp Glu Glu Asn Cys Ala Val Ala Thr Cys Arg Pro Asp Glu
 225 230 235 240
 Phe Gln Cys Ser Asp Gly Asn Cys Ile His Gly Ser Arg Gln Cys Asp
 245 250 255
 Arg Glu Tyr Asp Cys Lys Asp Met Ser Asp Glu Val Gly Cys Val Asn
 260 265 270
 Val Thr Leu Cys Glu Gly Pro Asn Lys Phe Lys Cys His Ser Gly Glu
 275 280 285
 Cys Ile Thr Leu Asp Lys Val Cys Asn Met Ala Arg Asp Cys Arg Asp
 290 295 300
 Trp Ser Asp Glu Pro Ile Lys Glu Cys Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp
 305 310 315 320
 Asn Asn Gly Gly Cys Ser His Val Cys Asn Glu Leu Lys Ile Gly Tyr
 325 330 335
 Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys
 340 345 350
 Glu Asp Ile Asp Glu Cys Gln Asp Pro Asp Thr Cys Ser Gln Leu Cys
 355 360 365
 Val Asn Leu Glu Gly Gly Tyr Lys Cys Gln Cys Glu Glu Gly Phe Gln
 370 375 380
 Leu Asp Pro His Thr Lys Ala Cys Lys Ala Val Gly Ser Ile Ala Tyr
 385 390 395 400
 Leu Phe Phe Thr Asn Arg His Glu Val Arg Lys Met Thr Leu Asp Arg
 405 410 415
 Ser Glu Tyr Thr Ser Leu Ile Pro Asn Leu Arg Asn Val Val Ala Leu

420 425 430
 Asp Thr Glu Val Ala Ser Asn Arg Ile Tyr Trp Ser Asp Leu Ser Gln

 435 440 445
 Arg Met Ile Cys Ser Thr Gln Leu Asp Arg Ala His Gly Val Ser Ser
 450 455 460
 Tyr Asp Thr Val Ile Ser Arg Asp Ile Gln Ala Pro Asp Gly Leu Ala
 465 470 475 480
 Val Asp Trp Ile His Ser Asn Ile Tyr Trp Thr Asp Ser Val Leu Gly
 485 490 495
 Thr Val Ser Val Ala Asp Thr Lys Gly Val Lys Arg Lys Thr Leu Phe

 500 505 510
 Arg Glu Asn Gly Ser Lys Pro Arg Ala Ile Val Val Asp Pro Val His
 515 520 525
 Gly Phe Met Tyr Trp Thr Asp Trp Gly Thr Pro Ala Lys Ile Lys Lys
 530 535 540
 Gly Gly Leu Asn Gly Val Asp Ile Tyr Ser Leu Val Thr Glu Asn Ile
 545 550 555 560
 Gln Trp Pro Asn Gly Ile Thr Leu Asp Leu Leu Ser Gly Arg Leu Tyr

 565 570 575
 Trp Val Asp Ser Lys Leu His Ser Ile Ser Ser Ile Asp Val Asn Gly
 580 585 590
 Gly Asn Arg Lys Thr Ile Leu Glu Asp Glu Lys Arg Leu Ala His Pro
 595 600 605
 Phe Ser Leu Ala Val Phe Glu Asp Lys Val Phe Trp Thr Asp Ile Ile
 610 615 620
 Asn Glu Ala Ile Phe Ser Ala Asn Arg Leu Thr Gly Ser Asp Val Asn

 625 630 635 640
 Leu Leu Ala Glu Asn Leu Leu Ser Pro Glu Asp Met Val Leu Phe His
 645 650 655
 Asn Leu Thr Gln Pro Arg Gly Val Asn Trp Cys Glu Arg Thr Thr Leu
 660 665 670

Ser Asn Gly Gly Cys Gln Tyr Leu Cys Leu Pro Ala Pro Gln Ile Asn
 675 680 685
 Pro His Ser Pro Lys Phe Thr Cys Ala Cys Pro Asp Gly Met Leu Leu
 690 695 700
 Ala Arg Asp Met Arg Ser Cys Leu Thr Glu Ala Glu Ala Ala Val Ala
 705 710 715 720
 Thr Gln Glu Thr Ser Thr Val Arg Leu Lys Val Ser Ser Thr Ala Val
 725 730 735
 Arg Thr Gln His Thr Thr Thr Arg Pro Val Pro Asp Thr Ser Arg Leu
 740 745 750
 Pro Gly Ala Thr Pro Gly Leu Thr Thr Val Glu Ile Val Thr Met Ser
 755 760 765
 His Gln Ala Leu Gly Asp Val Ala Gly Arg Gly Asn Glu Lys Lys Pro
 770 775 780
 Ser Ser Val Arg Ala Leu Ser Ile Val Leu Pro Ile Val Leu Leu Val
 785 790 795 800
 Phe Leu Cys Leu Gly Val Phe Leu Leu Trp Lys Asn Trp Arg Leu Lys
 805 810 815
 Asn Ile Asn Ser Ile Asn Phe Asp Asn Pro Val Tyr Gln Lys Thr Thr
 820 825 830
 Glu Asp Glu Val His Ile Cys His Asn Gln Asp Gly Tyr Ser Tyr Pro
 835 840 845
 Ser Arg Gln Met Val Ser Leu Glu Asp Asp Val Ala
 850 855 860
 <210> 34
 <211> 860
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 34
 Met Gly Pro Trp Gly Trp Lys Leu Arg Trp Thr Val Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15

Ala Ala Ala Gly Thr Ala Val Gly Asp Arg Cys Glu Arg Asn Glu Phe
 20 25 30
 Gln Cys Gln Asp Gly Lys Cys Ile Ser Tyr Lys Trp Val Cys Asp Gly
 35 40 45
 Ser Ala Glu Cys Gln Asp Gly Ser Asp Glu Ser Gln Glu Thr Cys Leu
 50 55 60
 Ser Val Thr Cys Lys Ser Gly Asp Phe Ser Cys Gly Gly Arg Val Asn
 65 70 75 80
 Arg Cys Ile Pro Gln Phe Trp Arg Cys Asp Gly Gln Val Asp Cys Asp
 85 90 95
 Asn Gly Ser Asp Glu Gln Gly Cys Pro Pro Lys Thr Cys Ser Gln Asp
 100 105 110
 Glu Phe Arg Cys His Asp Gly Lys Cys Ile Ser Arg Gln Phe Val Cys
 115 120 125
 Asp Ser Asp Arg Asp Cys Leu Asp Gly Ser Asp Glu Ala Ser Cys Pro
 130 135 140
 Val Leu Thr Cys Gly Pro Ala Ser Phe Gln Cys Asn Ser Ser Thr Cys
 145 150 155 160
 Ile Pro Gln Leu Trp Ala Cys Asp Asn Asp Pro Asp Cys Glu Asp Gly
 165 170 175
 Ser Asp Glu Trp Pro Gln Arg Cys Arg Gly Leu Tyr Val Phe Gln Gly
 180 185 190
 Asp Ser Ser Pro Cys Ser Ala Phe Glu Phe His Cys Leu Ser Gly Glu
 195 200 205
 Cys Ile His Ser Ser Trp Arg Cys Asp Gly Gly Pro Asp Cys Lys Asp
 210 215 220
 Lys Ser Asp Glu Glu Asn Cys Ala Val Ala Thr Cys Arg Pro Asp Glu
 225 230 235 240
 Phe Gln Cys Ser Asp Gly Asn Cys Ile His Gly Ser Arg Gln Cys Asp
 245 250 255
 Arg Glu Tyr Asp Cys Lys Asp Met Ser Asp Glu Val Gly Cys Val Asn

260	265	270	
Val Thr Leu Cys Glu Gly Pro Asn Lys Phe Lys Cys His Ser Gly Glu			
275	280	285	
Cys Ile Thr Leu Asp Lys Val Cys Asn Met Ala Arg Asp Cys Arg Asp			
290	295	300	
Trp Ser Asp Glu Pro Ile Lys Glu Cys Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp			
305	310	315	320
Asn Asn Gly Gly Cys Ser His Val Cys Asn Asp Leu Lys Ile Gly Tyr			
	325	330	335
Glu Cys Asp Cys Pro Asp Gly Phe Gln Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys			
340	345	350	
Glu Asp Ile Asp Glu Cys Gln Asp Pro Asp Thr Cys Ser Gln Leu Cys			
355	360	365	
Val Asn Leu Glu Gly Gly Tyr Lys Cys Gln Cys Glu Glu Gly Phe Gln			
370	375	380	
Leu Asp Pro His Thr Lys Ala Cys Lys Ala Val Gly Ser Ile Ala Tyr			
385	390	395	400
Leu Phe Phe Thr Asn Arg His Glu Val Arg Lys Met Thr Leu Asp Arg			
405	410	415	
Ser Glu Tyr Thr Ser Leu Ile Pro Asn Leu Arg Asn Val Val Ala Leu			
420	425	430	
Asp Thr Glu Val Ala Ser Asn Arg Ile Tyr Trp Ser Asp Leu Ser Gln			
435	440	445	
Arg Met Ile Cys Ser Thr Gln Leu Asp Arg Ala His Gly Val Ser Ser			
450	455	460	
Tyr Asp Thr Val Ile Ser Arg Asp Ile Gln Ala Pro Asp Gly Leu Ala			
465	470	475	480
Val Asp Trp Ile His Ser Asn Ile Tyr Trp Thr Asp Ser Val Leu Gly			
	485	490	495
Thr Val Ser Val Ala Asp Thr Lys Gly Val Lys Arg Lys Thr Leu Phe			
500	505	510	

Arg Glu Asn Gly Ser Lys Pro Arg Ala Ile Val Val Asp Pro Val His
 515 520 525
 Gly Phe Met Tyr Trp Thr Asp Trp Gly Thr Pro Ala Lys Ile Lys Lys
 530 535 540
 Gly Gly Leu Asn Gly Val Asp Ile Tyr Ser Leu Val Thr Glu Asn Ile
 545 550 555 560
 Gln Trp Pro Asn Gly Ile Thr Leu Asp Leu Leu Ser Gly Arg Leu Tyr
 565 570 575
 Trp Val Asp Ser Lys Leu His Ser Ile Ser Ser Ile Asp Val Asn Gly
 580 585 590
 Gly Asn Arg Lys Thr Ile Leu Glu Asp Glu Lys Arg Leu Ala His Pro
 595 600 605
 Phe Ser Leu Ala Val Phe Glu Asp Lys Val Phe Trp Thr Asp Ile Ile
 610 615 620
 Asn Glu Ala Ile Phe Ser Ala Asn Arg Leu Thr Gly Ser Asp Val Asn
 625 630 635 640
 Leu Leu Ala Glu Asn Leu Leu Ser Pro Glu Asp Met Val Leu Phe His
 645 650 655
 Asn Leu Thr Gln Pro Arg Gly Val Asn Trp Cys Glu Arg Thr Thr Leu
 660 665 670
 Ser Asn Gly Gly Cys Gln Tyr Leu Cys Leu Pro Ala Pro Gln Ile Asn
 675 680 685
 Pro His Ser Pro Lys Phe Thr Cys Ala Cys Pro Asp Gly Met Leu Leu
 690 695 700
 Ala Arg Asp Met Arg Ser Cys Leu Thr Glu Ala Glu Ala Ala Val Ala
 705 710 715 720
 Thr Gln Glu Thr Ser Thr Val Arg Leu Lys Val Ser Ser Thr Ala Val
 725 730 735
 Arg Thr Gln His Thr Thr Thr Arg Pro Val Pro Asp Thr Ser Arg Leu
 740 745 750
 Pro Gly Ala Thr Pro Gly Leu Thr Thr Val Glu Ile Val Thr Met Ser

```

              755              760              765
His Gln Ala Leu Gly Asp Val Ala Gly Arg Gly Asn Glu Lys Lys Pro
              770              775              780
Ser Ser Val Arg Ala Leu Ser Ile Val Leu Pro Ile Val Leu Leu Val

785              790              795              800
Phe Leu Cys Leu Gly Val Phe Leu Leu Trp Lys Asn Trp Arg Leu Lys
              805              810              815
Asn Ile Asn Ser Ile Asn Phe Asp Asn Pro Val Tyr Gln Lys Thr Thr
              820              825              830
Glu Asp Glu Val His Ile Cys His Asn Gln Asp Gly Tyr Ser Tyr Pro
              835              840              845
Ser Arg Gln Met Val Ser Leu Glu Asp Asp Val Ala

              850              855              860
<210> 35
<211> 860
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 35
Met Gly Pro Trp Gly Trp Lys Leu Arg Trp Thr Val Ala Leu Leu Leu
1              5              10              15
Ala Ala Ala Gly Thr Ala Val Gly Asp Arg Cys Glu Arg Asn Glu Phe
              20              25              30
Gln Cys Gln Asp Gly Lys Cys Ile Ser Tyr Lys Trp Val Cys Asp Gly
              35              40              45

Ser Ala Glu Cys Gln Asp Gly Ser Asp Glu Ser Gln Glu Thr Cys Leu
              50              55              60
Ser Val Thr Cys Lys Ser Gly Asp Phe Ser Cys Gly Gly Arg Val Asn
65              70              75              80
Arg Cys Ile Pro Gln Phe Trp Arg Cys Asp Gly Gln Val Asp Cys Asp
              85              90              95
Asn Gly Ser Asp Glu Gln Gly Cys Pro Pro Lys Thr Cys Ser Gln Asp

```

100	105	110	
Glu Phe Arg Cys His Asp Gly Lys Cys Ile Ser Arg Gln Phe Val Cys			
115	120	125	
Asp Ser Asp Arg Asp Cys Leu Asp Gly Ser Asp Glu Ala Ser Cys Pro			
130	135	140	
Val Leu Thr Cys Gly Pro Ala Ser Phe Gln Cys Asn Ser Ser Thr Cys			
145	150	155	160
Ile Pro Gln Leu Trp Ala Cys Asp Asn Asp Pro Asp Cys Glu Asp Gly			
165	170	175	
Ser Asp Glu Trp Pro Gln Arg Cys Arg Gly Leu Tyr Val Phe Gln Gly			
180	185	190	
Asp Ser Ser Pro Cys Ser Ala Phe Glu Phe His Cys Leu Ser Gly Glu			
195	200	205	
Cys Ile His Ser Ser Trp Arg Cys Asp Gly Gly Pro Asp Cys Lys Asp			
210	215	220	
Lys Ser Asp Glu Glu Asn Cys Ala Val Ala Thr Cys Arg Pro Asp Glu			
225	230	235	240
Phe Gln Cys Ser Asp Gly Asn Cys Ile His Gly Ser Arg Gln Cys Asp			
245	250	255	
Arg Glu Tyr Asp Cys Lys Asp Met Ser Asp Glu Val Gly Cys Val Asn			
260	265	270	
Val Thr Leu Cys Glu Gly Pro Asn Lys Phe Lys Cys His Ser Gly Glu			
275	280	285	
Cys Ile Thr Leu Asp Lys Val Cys Asn Met Ala Arg Asp Cys Arg Asp			
290	295	300	
Trp Ser Asp Glu Pro Ile Lys Glu Cys Gly Thr Ala Glu Cys Leu Asp			
305	310	315	320
Asn Asn Gly Gly Cys Ser His Val Cys Asn Asp Leu Lys Ile Gly Tyr			
325	330	335	
Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys			
340	345	350	

Glu Asp Ile Asp Glu Cys Gln Asp Pro Asp Thr Cys Ser Gln Leu Cys
 355 360 365

 Val Asn Leu Glu Gly Gly Tyr Lys Cys Gln Cys Glu Glu Gly Phe Gln
 370 375 380
 Leu Asp Pro His Thr Lys Ala Cys Lys Ala Val Gly Ser Ile Ala Tyr
 385 390 395 400
 Leu Phe Phe Thr Asn Arg His Glu Val Arg Lys Met Thr Leu Asp Arg
 405 410 415
 Ser Glu Tyr Thr Ser Leu Ile Pro Asn Leu Arg Asn Val Val Ala Leu
 420 425 430

 Asp Thr Glu Val Ala Ser Asn Arg Ile Tyr Trp Ser Asp Leu Ser Gln
 435 440 445
 Arg Met Ile Cys Ser Thr Gln Leu Asp Arg Ala His Gly Val Ser Ser
 450 455 460
 Tyr Asp Thr Val Ile Ser Arg Asp Ile Gln Ala Pro Asp Gly Leu Ala
 465 470 475 480
 Val Asp Trp Ile His Ser Asn Ile Tyr Trp Thr Asp Ser Val Leu Gly
 485 490 495

 Thr Val Ser Val Ala Asp Thr Lys Gly Val Lys Arg Lys Thr Leu Phe
 500 505 510
 Arg Glu Asn Gly Ser Lys Pro Arg Ala Ile Val Val Asp Pro Val His
 515 520 525
 Gly Phe Met Tyr Trp Thr Asp Trp Gly Thr Pro Ala Lys Ile Lys Lys
 530 535 540
 Gly Gly Leu Asn Gly Val Asp Ile Tyr Ser Leu Val Thr Glu Asn Ile
 545 550 555 560

 Gln Trp Pro Asn Gly Ile Thr Leu Asp Leu Leu Ser Gly Arg Leu Tyr
 565 570 575
 Trp Val Asp Ser Lys Leu His Ser Ile Ser Ser Ile Asp Val Asn Gly
 580 585 590
 Gly Asn Arg Lys Thr Ile Leu Glu Asp Glu Lys Arg Leu Ala His Pro

595 600 605
 Phe Ser Leu Ala Val Phe Glu Asp Lys Val Phe Trp Thr Asp Ile Ile
 610 615 620

 Asn Glu Ala Ile Phe Ser Ala Asn Arg Leu Thr Gly Ser Asp Val Asn
 625 630 635 640
 Leu Leu Ala Glu Asn Leu Leu Ser Pro Glu Asp Met Val Leu Phe His
 645 650 655
 Asn Leu Thr Gln Pro Arg Gly Val Asn Trp Cys Glu Arg Thr Thr Leu
 660 665 670
 Ser Asn Gly Gly Cys Gln Tyr Leu Cys Leu Pro Ala Pro Gln Ile Asn
 675 680 685

 Pro His Ser Pro Lys Phe Thr Cys Ala Cys Pro Asp Gly Met Leu Leu
 690 695 700
 Ala Arg Asp Met Arg Ser Cys Leu Thr Glu Ala Glu Ala Ala Val Ala
 705 710 715 720
 Thr Gln Glu Thr Ser Thr Val Arg Leu Lys Val Ser Ser Thr Ala Val
 725 730 735
 Arg Thr Gln His Thr Thr Thr Arg Pro Val Pro Asp Thr Ser Arg Leu
 740 745 750

 Pro Gly Ala Thr Pro Gly Leu Thr Thr Val Glu Ile Val Thr Met Ser
 755 760 765
 His Gln Ala Leu Gly Asp Val Ala Gly Arg Gly Asn Glu Lys Lys Pro
 770 775 780
 Ser Ser Val Arg Ala Leu Ser Ile Val Leu Pro Ile Val Leu Leu Val
 785 790 795 800
 Phe Leu Cys Leu Gly Val Phe Leu Leu Trp Lys Asn Trp Arg Leu Lys
 805 810 815

 Asn Ile Asn Ser Ile Asn Phe Asp Asn Pro Val Tyr Gln Lys Thr Thr
 820 825 830
 Glu Asp Glu Val His Ile Cys His Asn Gln Asp Gly Tyr Ser Tyr Pro
 835 840 845

Ser Arg Gln Met Val Ser Leu Glu Asp Asp Val Ala
 850 855 860
 <210> 36
 <211> 860
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 36
 Met Gly Pro Trp Gly Trp Lys Leu Arg Trp Thr Val Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15

 Ala Ala Ala Gly Thr Ala Val Gly Asp Arg Cys Glu Arg Asn Glu Phe
 20 25 30
 Gln Cys Gln Asp Gly Lys Cys Ile Ser Tyr Lys Trp Val Cys Asp Gly
 35 40 45
 Ser Ala Glu Cys Gln Asp Gly Ser Asp Glu Ser Gln Glu Thr Cys Leu
 50 55 60
 Ser Val Thr Cys Lys Ser Gly Asp Phe Ser Cys Gly Gly Arg Val Asn
 65 70 75 80

 Arg Cys Ile Pro Gln Phe Trp Arg Cys Asp Gly Gln Val Asp Cys Asp
 85 90 95
 Asn Gly Ser Asp Glu Gln Gly Cys Pro Pro Lys Thr Cys Ser Gln Asp
 100 105 110
 Glu Phe Arg Cys His Asp Gly Lys Cys Ile Ser Arg Gln Phe Val Cys
 115 120 125
 Asp Ser Asp Arg Asp Cys Leu Asp Gly Ser Asp Glu Ala Ser Cys Pro
 130 135 140

 Val Leu Thr Cys Gly Pro Ala Ser Phe Gln Cys Asn Ser Ser Thr Cys
 145 150 155 160
 Ile Pro Gln Leu Trp Ala Cys Asp Asn Asp Pro Asp Cys Glu Asp Gly
 165 170 175
 Ser Asp Glu Trp Pro Gln Arg Cys Arg Gly Leu Tyr Val Phe Gln Gly
 180 185 190
 Asp Ser Ser Pro Cys Ser Ala Phe Glu Phe His Cys Leu Ser Gly Glu

195	200	205	
Cys Ile His Ser Ser Trp Arg Cys Asp Gly Gly Pro Asp Cys Lys Asp			
210	215	220	
Lys Ser Asp Glu Glu Asn Cys Ala Val Ala Thr Cys Arg Pro Asp Glu			
225	230	235	240
Phe Gln Cys Ser Asp Gly Asn Cys Ile His Gly Ser Arg Gln Cys Asp			
	245	250	255
Arg Glu Tyr Asp Cys Lys Asp Met Ser Asp Glu Val Gly Cys Val Asn			
260	265	270	
Val Thr Leu Cys Glu Gly Pro Asn Lys Phe Lys Cys His Ser Gly Glu			
275	280	285	
Cys Ile Thr Leu Asp Lys Val Cys Asn Met Ala Arg Asp Cys Arg Asp			
290	295	300	
Trp Ser Asp Glu Pro Ile Lys Glu Cys Gly Thr Asn Ala Cys Leu Asp			
305	310	315	320
Asn Asn Gly Gly Cys Ser His Val Cys Asn Asp Leu Lys Ile Gly Tyr			
	325	330	335
Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys			
340	345	350	
Glu Asp Ile Asp Glu Cys Gln Asp Pro Asp Thr Cys Ser Gln Leu Cys			
355	360	365	
Val Asn Leu Glu Gly Gly Tyr Lys Cys Gln Cys Glu Glu Gly Phe Gln			
370	375	380	
Leu Asp Pro His Thr Lys Ala Cys Lys Ala Val Gly Ser Ile Ala Tyr			
385	390	395	400
Leu Phe Phe Thr Asn Arg His Glu Val Arg Lys Met Thr Leu Asp Arg			
405	410	415	
Ser Glu Tyr Thr Ser Leu Ile Pro Asn Leu Arg Asn Val Val Ala Leu			
420	425	430	
Asp Thr Glu Val Ala Ser Asn Arg Ile Tyr Trp Ser Asp Leu Ser Gln			
435	440	445	

Arg Met Ile Cys Ser Thr Gln Leu Asp Arg Ala His Gly Val Ser Ser
 450 455 460

Tyr Asp Thr Val Ile Ser Arg Asp Ile Gln Ala Pro Asp Gly Leu Ala
 465 470 475 480

Val Asp Trp Ile His Ser Asn Ile Tyr Trp Thr Asp Ser Val Leu Gly
 485 490 495

Thr Val Ser Val Ala Asp Thr Lys Gly Val Lys Arg Lys Thr Leu Phe
 500 505 510

Arg Glu Asn Gly Ser Lys Pro Arg Ala Ile Val Val Asp Pro Val His
 515 520 525

Gly Phe Met Tyr Trp Thr Asp Trp Gly Thr Pro Ala Lys Ile Lys Lys
 530 535 540

Gly Gly Leu Asn Gly Val Asp Ile Tyr Ser Leu Val Thr Glu Asn Ile
 545 550 555 560

Gln Trp Pro Asn Gly Ile Thr Leu Asp Leu Leu Ser Gly Arg Leu Tyr
 565 570 575

Trp Val Asp Ser Lys Leu His Ser Ile Ser Ser Ile Asp Val Asn Gly
 580 585 590

Gly Asn Arg Lys Thr Ile Leu Glu Asp Glu Lys Arg Leu Ala His Pro
 595 600 605

Phe Ser Leu Ala Val Phe Glu Asp Lys Val Phe Trp Thr Asp Ile Ile
 610 615 620

Asn Glu Ala Ile Phe Ser Ala Asn Arg Leu Thr Gly Ser Asp Val Asn
 625 630 635 640

Leu Leu Ala Glu Asn Leu Leu Ser Pro Glu Asp Met Val Leu Phe His
 645 650 655

Asn Leu Thr Gln Pro Arg Gly Val Asn Trp Cys Glu Arg Thr Thr Leu
 660 665 670

Ser Asn Gly Gly Cys Gln Tyr Leu Cys Leu Pro Ala Pro Gln Ile Asn
 675 680 685

Pro His Ser Pro Lys Phe Thr Cys Ala Cys Pro Asp Gly Met Leu Leu

690 695 700
 Ala Arg Asp Met Arg Ser Cys Leu Thr Glu Ala Glu Ala Ala Val Ala
 705 710 715 720

Thr Gln Glu Thr Ser Thr Val Arg Leu Lys Val Ser Ser Thr Ala Val
 725 730 735

Arg Thr Gln His Thr Thr Thr Arg Pro Val Pro Asp Thr Ser Arg Leu
 740 745 750

Pro Gly Ala Thr Pro Gly Leu Thr Thr Val Glu Ile Val Thr Met Ser
 755 760 765

His Gln Ala Leu Gly Asp Val Ala Gly Arg Gly Asn Glu Lys Lys Pro
 770 775 780

Ser Ser Val Arg Ala Leu Ser Ile Val Leu Pro Ile Val Leu Leu Val
 785 790 795 800

Phe Leu Cys Leu Gly Val Phe Leu Leu Trp Lys Asn Trp Arg Leu Lys
 805 810 815

Asn Ile Asn Ser Ile Asn Phe Asp Asn Pro Val Tyr Gln Lys Thr Thr
 820 825 830

Glu Asp Glu Val His Ile Cys His Asn Gln Asp Gly Tyr Ser Tyr Pro
 835 840 845

Ser Arg Gln Met Val Ser Leu Glu Asp Asp Val Ala
 850 855 860

<210> 37
 <211> 860
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 37

Met Gly Pro Trp Gly Trp Lys Leu Arg Trp Thr Val Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15

Ala Ala Ala Gly Thr Ala Val Gly Asp Arg Cys Glu Arg Asn Glu Phe
 20 25 30

Gln Cys Gln Asp Gly Lys Cys Ile Ser Tyr Lys Trp Val Cys Asp Gly

	35	40	45	
Ser Ala Glu Cys Gln Asp Gly Ser Asp Glu Ser Gln Glu Thr Cys Leu				
50		55		60
Ser Val Thr Cys Lys Ser Gly Asp Phe Ser Cys Gly Gly Arg Val Asn				
65		70		75
Arg Cys Ile Pro Gln Phe Trp Arg Cys Asp Gly Gln Val Asp Cys Asp				
		85		90
Asn Gly Ser Asp Glu Gln Gly Cys Pro Pro Lys Thr Cys Ser Gln Asp				
	100		105	110
Glu Phe Arg Cys His Asp Gly Lys Cys Ile Ser Arg Gln Phe Val Cys				
	115		120	125
Asp Ser Asp Arg Asp Cys Leu Asp Gly Ser Asp Glu Ala Ser Cys Pro				
	130		135	140
Val Leu Thr Cys Gly Pro Ala Ser Phe Gln Cys Asn Ser Ser Thr Cys				
145		150		155
Ile Pro Gln Leu Trp Ala Cys Asp Asn Asp Pro Asp Cys Glu Asp Gly				
		165		170
				175
Ser Asp Glu Trp Pro Gln Arg Cys Arg Gly Leu Tyr Val Phe Gln Gly				
	180		185	190
Asp Ser Ser Pro Cys Ser Ala Phe Glu Phe His Cys Leu Ser Gly Glu				
	195		200	205
Cys Ile His Ser Ser Trp Arg Cys Asp Gly Gly Pro Asp Cys Lys Asp				
	210		215	220
Lys Ser Asp Glu Glu Asn Cys Ala Val Ala Thr Cys Arg Pro Asp Glu				
225		230		235
				240
Phe Gln Cys Ser Asp Gly Asn Cys Ile His Gly Ser Arg Gln Cys Asp				
	245		250	255
Arg Glu Tyr Asp Cys Lys Asp Met Ser Asp Glu Val Gly Cys Val Asn				
	260		265	270
Val Thr Leu Cys Glu Gly Pro Asn Lys Phe Lys Cys His Ser Gly Glu				
	275		280	285

Cys Ile Thr Leu Asp Lys Val Cys Asn Met Ala Arg Asp Cys Arg Asp
 290 295 300

Trp Ser Asp Glu Pro Ile Lys Glu Cys Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp
 305 310 315 320
 Asn Asn Gly Gly Cys Ser His Val Cys Asn Asp Leu Lys Ile Gly Ala
 325 330 335

Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys
 340 345 350
 Glu Asp Ile Asp Glu Cys Gln Asp Pro Asp Thr Cys Ser Gln Leu Cys
 355 360 365

Val Asn Leu Glu Gly Gly Tyr Lys Cys Gln Cys Glu Glu Gly Phe Gln
 370 375 380

Leu Asp Pro His Thr Lys Ala Cys Lys Ala Val Gly Ser Ile Ala Tyr
 385 390 395 400
 Leu Phe Phe Thr Asn Arg His Glu Val Arg Lys Met Thr Leu Asp Arg
 405 410 415

Ser Glu Tyr Thr Ser Leu Ile Pro Asn Leu Arg Asn Val Val Ala Leu
 420 425 430

Asp Thr Glu Val Ala Ser Asn Arg Ile Tyr Trp Ser Asp Leu Ser Gln
 435 440 445

Arg Met Ile Cys Ser Thr Gln Leu Asp Arg Ala His Gly Val Ser Ser
 450 455 460

Tyr Asp Thr Val Ile Ser Arg Asp Ile Gln Ala Pro Asp Gly Leu Ala
 465 470 475 480

Val Asp Trp Ile His Ser Asn Ile Tyr Trp Thr Asp Ser Val Leu Gly
 485 490 495

Thr Val Ser Val Ala Asp Thr Lys Gly Val Lys Arg Lys Thr Leu Phe
 500 505 510

Arg Glu Asn Gly Ser Lys Pro Arg Ala Ile Val Val Asp Pro Val His
 515 520 525

Gly Phe Met Tyr Trp Thr Asp Trp Gly Thr Pro Ala Lys Ile Lys Lys

530 535 540
 Gly Gly Leu Asn Gly Val Asp Ile Tyr Ser Leu Val Thr Glu Asn Ile
 545 550 555 560

 Gln Trp Pro Asn Gly Ile Thr Leu Asp Leu Leu Ser Gly Arg Leu Tyr
 565 570 575
 Trp Val Asp Ser Lys Leu His Ser Ile Ser Ser Ile Asp Val Asn Gly
 580 585 590
 Gly Asn Arg Lys Thr Ile Leu Glu Asp Glu Lys Arg Leu Ala His Pro
 595 600 605
 Phe Ser Leu Ala Val Phe Glu Asp Lys Val Phe Trp Thr Asp Ile Ile
 610 615 620

 Asn Glu Ala Ile Phe Ser Ala Asn Arg Leu Thr Gly Ser Asp Val Asn
 625 630 635 640
 Leu Leu Ala Glu Asn Leu Leu Ser Pro Glu Asp Met Val Leu Phe His
 645 650 655
 Asn Leu Thr Gln Pro Arg Gly Val Asn Trp Cys Glu Arg Thr Thr Leu
 660 665 670
 Ser Asn Gly Gly Cys Gln Tyr Leu Cys Leu Pro Ala Pro Gln Ile Asn
 675 680 685

 Pro His Ser Pro Lys Phe Thr Cys Ala Cys Pro Asp Gly Met Leu Leu
 690 695 700
 Ala Arg Asp Met Arg Ser Cys Leu Thr Glu Ala Glu Ala Ala Val Ala
 705 710 715 720
 Thr Gln Glu Thr Ser Thr Val Arg Leu Lys Val Ser Ser Thr Ala Val
 725 730 735
 Arg Thr Gln His Thr Thr Thr Arg Pro Val Pro Asp Thr Ser Arg Leu
 740 745 750

 Pro Gly Ala Thr Pro Gly Leu Thr Thr Val Glu Ile Val Thr Met Ser
 755 760 765
 His Gln Ala Leu Gly Asp Val Ala Gly Arg Gly Asn Glu Lys Lys Pro
 770 775 780

Ser Ser Val Arg Ala Leu Ser Ile Val Leu Pro Ile Val Leu Leu Val
785 790 795 800

Phe Leu Cys Leu Gly Val Phe Leu Leu Trp Lys Asn Trp Arg Leu Lys
805 810 815

Asn Ile Asn Ser Ile Asn Phe Asp Asn Pro Val Tyr Gln Lys Thr Thr
820 825 830

Glu Asp Glu Val His Ile Cys His Asn Gln Asp Gly Tyr Ser Tyr Pro
835 840 845

Ser Arg Gln Met Val Ser Leu Glu Asp Asp Val Ala
850 855 860

<210> 38

<211> 860

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

Met Gly Pro Trp Gly Trp Lys Leu Arg Trp Thr Val Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

Ala Ala Ala Gly Thr Ala Val Gly Asp Arg Cys Glu Arg Asn Glu Phe
20 25 30

Gln Cys Gln Asp Gly Lys Cys Ile Ser Tyr Lys Trp Val Cys Asp Gly
35 40 45

Ser Ala Glu Cys Gln Asp Gly Ser Asp Glu Ser Gln Glu Thr Cys Leu
50 55 60

Ser Val Thr Cys Lys Ser Gly Asp Phe Ser Cys Gly Gly Arg Val Asn
65 70 75 80

Arg Cys Ile Pro Gln Phe Trp Arg Cys Asp Gly Gln Val Asp Cys Asp
85 90 95

Asn Gly Ser Asp Glu Gln Gly Cys Pro Pro Lys Thr Cys Ser Gln Asp
100 105 110

Glu Phe Arg Cys His Asp Gly Lys Cys Ile Ser Arg Gln Phe Val Cys
115 120 125

Asp Ser Asp Arg Asp Cys Leu Asp Gly Ser Asp Glu Ala Ser Cys Pro

130	135	140	
Val Leu Thr Cys Gly Pro Ala Ser Phe Gln Cys Asn Ser Ser Thr Cys			
145	150	155	160
Ile Pro Gln Leu Trp Ala Cys Asp Asn Asp Pro Asp Cys Glu Asp Gly			
	165	170	175
Ser Asp Glu Trp Pro Gln Arg Cys Arg Gly Leu Tyr Val Phe Gln Gly			
	180	185	190
Asp Ser Ser Pro Cys Ser Ala Phe Glu Phe His Cys Leu Ser Gly Glu			
	195	200	205
Cys Ile His Ser Ser Trp Arg Cys Asp Gly Gly Pro Asp Cys Lys Asp			
	210	215	220
Lys Ser Asp Glu Glu Asn Cys Ala Val Ala Thr Cys Arg Pro Asp Glu			
225	230	235	240
Phe Gln Cys Ser Asp Gly Asn Cys Ile His Gly Ser Arg Gln Cys Asp			
	245	250	255
Arg Glu Tyr Asp Cys Lys Asp Met Ser Asp Glu Val Gly Cys Val Asn			
	260	265	270
Val Thr Leu Cys Glu Gly Pro Asn Lys Phe Lys Cys His Ser Gly Glu			
	275	280	285
Cys Ile Thr Leu Asp Lys Val Cys Asn Met Ala Arg Asp Cys Arg Asp			
	290	295	300
Trp Ser Asp Glu Pro Ile Lys Glu Cys Gly Thr Ala Ala Cys Leu Asp			
305	310	315	320
Asn Asn Gly Gly Cys Ser His Val Cys Asn Ala Leu Lys Ile Gly Ala			
	325	330	335
Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys			
	340	345	350
Glu Asp Ile Asp Glu Cys Gln Asp Pro Asp Thr Cys Ser Gln Leu Cys			
	355	360	365
Val Asn Leu Glu Gly Gly Tyr Lys Cys Gln Cys Glu Glu Gly Phe Gln			
	370	375	380

Leu Asp Pro His Thr Lys Ala Cys Lys Ala Val Gly Ser Ile Ala Tyr
 385 390 395 400

Leu Phe Phe Thr Asn Arg His Glu Val Arg Lys Met Thr Leu Asp Arg
 405 410 415

Ser Glu Tyr Thr Ser Leu Ile Pro Asn Leu Arg Asn Val Val Ala Leu
 420 425 430

Asp Thr Glu Val Ala Ser Asn Arg Ile Tyr Trp Ser Asp Leu Ser Gln
 435 440 445

Arg Met Ile Cys Ser Thr Gln Leu Asp Arg Ala His Gly Val Ser Ser
 450 455 460

Tyr Asp Thr Val Ile Ser Arg Asp Ile Gln Ala Pro Asp Gly Leu Ala
 465 470 475 480

Val Asp Trp Ile His Ser Asn Ile Tyr Trp Thr Asp Ser Val Leu Gly
 485 490 495

Thr Val Ser Val Ala Asp Thr Lys Gly Val Lys Arg Lys Thr Leu Phe
 500 505 510

Arg Glu Asn Gly Ser Lys Pro Arg Ala Ile Val Val Asp Pro Val His
 515 520 525

Gly Phe Met Tyr Trp Thr Asp Trp Gly Thr Pro Ala Lys Ile Lys Lys
 530 535 540

Gly Gly Leu Asn Gly Val Asp Ile Tyr Ser Leu Val Thr Glu Asn Ile
 545 550 555 560

Gln Trp Pro Asn Gly Ile Thr Leu Asp Leu Leu Ser Gly Arg Leu Tyr
 565 570 575

Trp Val Asp Ser Lys Leu His Ser Ile Ser Ser Ile Asp Val Asn Gly
 580 585 590

Gly Asn Arg Lys Thr Ile Leu Glu Asp Glu Lys Arg Leu Ala His Pro
 595 600 605

Phe Ser Leu Ala Val Phe Glu Asp Lys Val Phe Trp Thr Asp Ile Ile
 610 615 620

Asn Glu Ala Ile Phe Ser Ala Asn Arg Leu Thr Gly Ser Asp Val Asn

625	630	635	640
Leu Leu Ala Glu Asn Leu Leu Ser Pro Glu Asp Met Val Leu Phe His			
	645	650	655
Asn Leu Thr Gln Pro Arg Gly Val Asn Trp Cys Glu Arg Thr Thr Leu			
	660	665	670
Ser Asn Gly Gly Cys Gln Tyr Leu Cys Leu Pro Ala Pro Gln Ile Asn			
	675	680	685
Pro His Ser Pro Lys Phe Thr Cys Ala Cys Pro Asp Gly Met Leu Leu			
	690	695	700
Ala Arg Asp Met Arg Ser Cys Leu Thr Glu Ala Glu Ala Ala Val Ala			
705	710	715	720
Thr Gln Glu Thr Ser Thr Val Arg Leu Lys Val Ser Ser Thr Ala Val			
	725	730	735
Arg Thr Gln His Thr Thr Thr Arg Pro Val Pro Asp Thr Ser Arg Leu			
	740	745	750
Pro Gly Ala Thr Pro Gly Leu Thr Thr Val Glu Ile Val Thr Met Ser			
	755	760	765
His Gln Ala Leu Gly Asp Val Ala Gly Arg Gly Asn Glu Lys Lys Pro			
	770	775	780
Ser Ser Val Arg Ala Leu Ser Ile Val Leu Pro Ile Val Leu Leu Val			
785	790	795	800
Phe Leu Cys Leu Gly Val Phe Leu Leu Trp Lys Asn Trp Arg Leu Lys			
	805	810	815
Asn Ile Asn Ser Ile Asn Phe Asp Asn Pro Val Tyr Gln Lys Thr Thr			
	820	825	830
Glu Asp Glu Val His Ile Cys His Asn Gln Asp Gly Tyr Ser Tyr Pro			
	835	840	845
Ser Arg Gln Met Val Ser Leu Glu Asp Asp Val Ala			
	850	855	860

<210> 39

<211> 1512

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 39

```

atgatgacca catctttgat ttgggggatt gctatagcag catgctgttg tctatggctt      60
attcttggaa ttaggagaag gcaaacgggt gaaccacctc ttgagaatgg attaattcca      120
tacctgggct gtgctctgca atttgggtcc aatcctcttg agttcctcag agcaaatcaa      180
aggaaacatg gtcatgtttt tacctgcaaa ctaatgggaa aatatgtcca tttcatcaca      240
aatcccttgt cataccataa ggtgtttgtc cacggaaaat attttgattg gaaaaaattt      300

cactttgcta cttctgcgaa ggcatTTGGG cacagaagca ttgacccgat ggatggaaat      360
accactgaaa acataaacga cactttcatc aaaaccctgc agggccatgc cttgaattcc      420
ctcacggaaa gcatgatgga aaacctcaa cgtatcatga gacctccagt ctccttaac      480
tcaaagaccg ctgcctgggt gacagaaggg atgtattctt tctgctaccg agtgatgttt      540
gaagctgggt atttaactat ctttggcaga gatcttaca ggcgggacac acagaaaagca      600
catattctaa acaatcttga caacttcaag caattcgaca aagtctttcc agccctggta      660
gcaggcctcc ccattcacat gttcaggact gcgcacaatg cccgggagaa actggcagag      720

agcttgaggc acgagaacct ccaaaagagg gaaagcatct cagaactgat cagcctgcgc      780
atgttttca atgacacttt gtccaccttt gatgatctgg agaaggcaa gacacacctc      840
gtggtcctct gggcatcga agcaaacacc attccagcga ctttctggag tttatttcaa      900
atgattagga acccagaagc aatgaaagca gctactgaag aagtgaaaag aacattagag      960
aatgctggtc aaaaagttag cttggaaggc aatcctatTT gtttgagtca agcagaactg      1020
aatgacctgc cagtattaga tagtataatc aaggaatcgc tgaggcttTc cagtgcctcc      1080
ctcaacatcc ggacagctaa ggaggattTc actttgcacc ttgaggacgg ttcctacaac      1140

atccgaaaag atgacatcat agctctttac ccacagttaa tgcacttaga tccagaaatc      1200
taccagacc ctttgacttt taaatatgat aggtatcttg atgaaaacgg gaagacaaag      1260
actaccttct attgtaatgg actcaagtta aagtattact acatgccctt tggatcggga      1320
gctacaatat gtctggaag attgttcgct atccacgaaa tcaagcaatt tttgattctg      1380
atgctttctt attttgaatt ggagcttata gagggccaag ctaaattgcc acctttggac      1440
cagTcccggg caggcttggg cattttgccg ccattgaatg atattgaatt taaatataa      1500
ttcaagcatt tg                                          1512

```

<210> 40

<211> 47

<212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 40
 gggaataag agagaaaaga agagtaagaa gaaatataag agccacc 47
 <210> 41
 <211> 119
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 41
 tgataatagg ctggagcctc ggtggccatg cttcttgccc cttgggcctc cccccagccc 60
 ctctccct tctgcaccc gtaccccct ggtctttgaa taaagtctga gtggcggc 119
 <210> 42
 <211> 2726
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Transcript Sequence
 <400> 42
 gggaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauuaag agccaccaug gguccgugg 60
 gcuggaagcu uagauggaca gucgcgucc uccuugcagc agcaggaacu gcggucggag 120
 aucgaugcga gcgcaacgag uucaaugcc aagaugggaa guguauuucg uacaaguggg 180
 ucugcgauagg aucagcggaa ugucaggacg gaagcgauga gagccaagaa acaugccucu 240
 cagugacaug caagucggga gacuucucgu gcggaggacg cguaacaga uguauuccac 300
 aguuuuggcg cugcgauggu cagguggacu gcgacaacgg uucagaugaa cagggauguc 360
 cuccgaaaac gugcucacaa gacgaguuc gcugccauga uggaaaguc auuucgcggc 420
 aguuuguaug ugauucggau cgggacuguc uggacggcuc ggacgaagcg ucaugcccgg 480
 uacuuacuug cgggccagcc ucauuccaau gcaacagcuc aacgugcauu ccccagcugu 540
 gggccuguga caaugauccu gauugugagg acgguagcga cgaguggccg cagagaugua 600
 gggguuugua cgauuuccaa ggagacuaa gccccuguuc cgccuuugag uuucacugcc 660
 ugucggguga augcauccac uccagcuggc gaugugaugg ugggcccgcac ugcaaagaua 720
 agagcgacga ggagaauugc gcggucgca cgugcagacc cgaugaguuc cagugcuccg 780
 auggaaacug cauccacggg agccggcagu gugaucgca guacgauugu aaagacaugu 840
 cagacgaggu cggaugcgug aacgucacgu ugucgaggg uccgaacaag uuuuagugcc 900

auucgggcga auguauuacg cucgauaaag ucugcaacau ggcgcgagau uguagggauu	960
ggucagacga acccaucaag gagugcggca cuaacgagug uuuggacaau aacggcgggu	1020
guucgcacgu cugcaaugau cucaaaaauug gguaugagug ucucuguccu gacggauucc	1080
agcuggucgc gcagcgcaga ugcgaggaca ucgacgagug ccaggacccc gacacauguu	1140
cgcaguugug ugucaaccuu gaaggagggu acaagugcca gugcgaggag ggauuucagc	1200
uugacccgca cacgaaagca uguaaagcgg ugggguccau ugcguuuug uuuuucacaa	1260
acagacauga agucgcgaag augacccuug aucgcagcga auauacguca cugauccua	1320
aucuuaggaa ugucugggcc cuugacacgg agguagcauc aaauagaauc uacuggucg	1380
accucucaca gagaauauc uguucaacac aguuggaucg ggcgacggg gugucgucgu	1440
acgauacggg aauuagccgc gacauccagg cgccagacgg acucgcgguc gacuggauc	1500
auagcaacau cuacuggaca gacuccugu ugggaaccgu auccguagcu gacacaaagg	1560
gagugaagcg gaaaacuuu uuugagaga acggcagcaa accgagagca aucgugucg	1620
auccggugca uggauucaug uauuggaccg auuggggaac gccagccaaa aucaagaaag	1680
gcgguuuuua uggggucgac aucuacucgc uggugacuga gaauauucag uggccaaacg	1740
ggauaccuu ggacuuguug ucggggaggu uguauugggu ggacucaaaag cuccacucga	1800
ucagcucgau cgacgugaac ggcggaaua ggaaaacuau ucucgaagau gagaaaagac	1860
uggccacccc cuucucguc gcgguguucg aggacaaagu auuuuggaca gacaucauca	1920
acgaagcga cuuuucagcc aaccgccuga caggucgga ugucaaucuc uugccgaaa	1980
accuucugag cccggaagau auggucuugu uucacaaauu gaccacacc agagguguga	2040
auuggugcga acggacgaca uugucgaac gagguugcca guaucucugu cuccugcac	2100
cccagauuaa ucccacauca cccaaguca cgugugcgug cccagacgga augcuucuug	2160
cgagggacau gagauccugu cucaccgaag cggaagcggc aguggccaca caagagacuu	2220
cgacugucg ccuuaagug uccucgacgg cgguccgaac ucagcauacg accacacgac	2280
ccgugcccga uaccucgagg uugcccggag caacaccggg guugacgaca guagaaucg	2340
uaaccaugag ccaccagca cuuggagaug ucgcaggcag aggcaaugag aagaaacca	2400
gcucggucag agcccucagc aucgucguc cuauugucg gcuuguguuu cucuguuugg	2460
guguguucuu guuguggaag aacuggcgcc uuaagaaau caacucgauu aacucgaua	2520
auccgguuaa ccagaaaacc acagaggau aagugcauu uugucacaac caagauggcu	2580
auucguacc guccaggca augguaucac uaggagcga cguggccuga uaagcugccu	2640
ucucggggc uugccuucg gccaugccu ucuucucucc cuugcaccug uaccuucgg	2700
ucuuugaaua aagccugagu aggaag	2726

<210> 43
 <211> 854
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Transcript Sequence
 <400> 43
 gggaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauuaag agccaccaug guauccaagg 60

 gggaggagga caacaugcg aucaucaagg aguucaugcg auucaaggug cacauggaag 120
 guucgguca cggacacgaa uuugaaucg aaggagaggg ugaaggaagg ccuauugaag 180
 ggacacagac cgcgaaacuc aaggucacga aagggggacc acuuccuuuc gccugggaca 240
 uucuuugccc ccaguuuug uacgggucca aagcauugu gaagcaucc gccgauuuc 300
 cugacuauu gaaacucagc uuucccgagg gauucaagug ggagcggguc augaacuuug 360
 aggacggggg uguagucacc gaaaccaag acucaagccu ccaagacggc gaguucaucu 420
 acaaggucaa acugcggggg acuaacuuc cgucggaugg gccggugaug cagaagaaaa 480

 cgaugggaug ggaagcgua ucggagagga uguacccaga agauggugca uugaaggggg 540
 agaucaagca gagacugaag uugaaagug ggggacauua ugaugccgag gugaaaacga 600
 cauacaaagc gaaaaagccg gugcagcuuc ccggagcgua uaugugaau aucaaguugg 660
 auuuuacuuc acacaugag gacuacaaa uugucgaaca guacgaacgc gcugagggua 720
 gacacucgac gggaggcaug gacgaguugu aaaaugaua agcugccuuc ugcggggcuu 780
 gccuucuggc caugcccuuc uucucucuu ugcaccugua ccucugguc uuugaauaaa 840
 gccugaguag gaag 854

<210> 44
 <211> 1796
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Transcript Sequence
 <400> 44
 gggaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauuaag agccaccaug gaagaucga 60
 agaaucaaa gaaggaccu gcccguuuu acccuugga ggacguaca gcaggagaac 120
 agcuccaaa ggcgaugaaa cgcucgccc uggucggcg aacgauugcg uuuaccgaug 180
 cacauuuuga gguagacauc acaucgcag aauacuucga aaugcggug aggcugcgcg 240

aagcgaugaa gagauauggu cuuaacacua aucaccgcau cguggugugu ucggagaacu	300
cauugcaguu uuucaugccg guccuuggag cacuuuucan cggggucgca gucgcgccag	360
cgaacgacau cuacaugag cgggaacucu ugaauagcau gggaauucc cagccgacgg	420
ucguguuugu cuccaaaaag gggcugcaga aaauccuca cgugcagaag aagcucccca	480
uuaucaaaa gaucaucau auggauagca agacagauua ccaagguuc cagucgaugu	540
auaccuuugu gacaucgcau uugccgccag gguuuacga guaugacuuc guccccgagu	600
cauuugacag agauaaaacc aucgcgcuga uuauagaauc cucggguagc accgguuugc	660
caaagggggu ggcguugccc caccgcacug cuugugugcg guucucgcac gcuagggauc	720
cuauuuugg uauacagauc auucccgaca cagcaauccu guccguggua cccuuucauc	780
acgguuuugg cauguucagc acucucggcu auuugauuug cgguuucagg gucguacuua	840
uguaucgguu cgaggaagaa cuguuuuuga gauccuugca agauuacaag auccagucgg	900
cccuccuugu gccaacgcuu uucucauuu uugcgaauc gacacuuau gauaaguaug	960
accuuuccaa ucugcaugag auugccucag ggggagcgc gcuuagcaag gaagucgggg	1020
aggcaguggc caagcgcuc caccuucccg gaaucggca gggauacggg cucacggaga	1080
caacauccgc gauccuuau acgcccagg gugacgauaa gccgggagcc gucggaaaag	1140
ugguccccuu cuuugaagcc aaggucguag accucgacac gggaaaaacc cucggaguga	1200
accagagggg cgagcucugc gugagaggc cgaugaucau gucagguuac gugaauaacc	1260
cugaagcgac gaaugcgugc aucgacaagg augggugguu gcauucggga gacauugccu	1320
auugggauga ggaugagcac uucuuuucg uagaucgacu uaagagcuug aucaauaca	1380
aaggcuauca gguagcgcu gccgagcugc agucaauccu gcuccagcac cccaacuuu	1440
ucgacgccgg aguggccggg uugcccgaug acgacgaggg ugagcugcca gcgccgugg	1500
uagucccga acaugggaaa acaaugaccg aaaaggagau cguggacuac guagcaucac	1560
aagugacgac ugcaagaaa cugaggggag gguagucuu ugggacgag gucccgaag	1620
gcuugacugg gaagcuugac gcucgaaaa uccgggaaau ccugauuaag gcaaagaag	1680
gcgggaaaa cgcugucuga uaagcugccu ucugcggggc uugccuucug gccaugccu	1740
ucuucucucc cuugcaccug uaccuuugg ucuuugaaua aagccugagu aggaag	1796
<210> 45	
<211> 9	
<212> PRT	
<213> Homo sapiens	
<400> 45	

Met Ile Cys Ser Thr Gln Leu Asp Arg

1 5

<210> 46

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 46

Leu Ala His Pro Phe Ser Leu Ala Val Phe Glu Asp Lys

1 5 10

<210> 47

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

Asn Val Val Ala Leu Asp Thr Glu Val Ala Ser Asn Arg

1 5 10

<210> 48

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

Thr Cys Ser Gln Asp Glu Phe Arg

1 5

<210> 49

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

Val Ala Pro Glu Glu His Pro Val Leu Leu Thr Glu Ala Pro Leu Asn

1 5 10 15

Pro Lys

<210> 50

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

Val Val Asp Leu Met Ala His Met Ala Ser Lys

1 5 10

<210> 51

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 51

His Leu Glu Ile Asn Pro Asp His Pro Ile Val Glu Thr Leu Arg

1 5 10 15

<210> 52

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

Tyr Ile Asp Gln Glu Glu Leu Asn Lys

1 5

<210> 53

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 53

Asp Gln Leu Ile Tyr Asn Leu Leu Lys

1 5

<210> 54

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 54

Gly Glu Met Met Asp Leu Gln His Gly Ser Leu Phe Leu Arg

1 5 10

<210> 55

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 55

Ala Leu Glu Ser Pro Glu Arg Pro Phe Leu Ala Ile Leu Gly Gly Ala

1 5 10 15

Lys

<210> 56

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 56

Leu Gly Asp Val Tyr Val Asn Asp Ala Phe Gly Thr Ala His Arg

1 5 10 15

<210> 57

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 57

Ile Ile Gln Leu Leu Asp Asp Tyr Pro Lys

1 5 10

<210> 58

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 58

Ala Val Gly Ser Ile Ala Tyr Leu Phe Phe Thr Asn Arg

1 5 10

<210> 59

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 59

Ser Glu Tyr Thr Ser Leu Ile Pro Pro Leu Arg

1 5 10

<210> 60

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 60

Ile Gly Ala Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln Leu Val Ala Gln

1 5 10 15

Arg

<210> 61

<211> 1805

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223

> Description of Artificial Sequence: Synthetic Transcript Sequence

<400> 61

```

gggaaaauag agagaaaaga agaguaagaa gaaaauaag agccaccaug gcggucgagu      60
cgcaaggugg acggccucu gugcuugguu ugcucuuug uguacucggc ccugucgugu      120
cacacgccgg gaaguuuug uugaucuccg uggacggauc acauuggcuu ucgaugcucg      180
gagcaucca gcaguucag caaagggggc augagauugu gguccuggcu cgggacgcu      240
cgcucuacau ucgcgauggu gcauucuaua cucuuagac auauccagug cccuuccagc      300
gcgaagaugu caaagaguca uuugucucac ugggacacaa cgauaucgag aacgacuccu      360

ucuugcagag agucaucaag acguacaaga aaaucaaaaa ggauagcgc augcuguugu      420
caggugcuc gcacuugcuu cacaacaagg agcugauggc gucacuggcg gagucgagcu      480
uugaugucau guugacggac ccguuuuugc cguguagccc gaucguggcg cauacuugu      540
ccuucccac cgauuuuc cuccacgcgc uucccuguag ccuggaguuu gaggcgaccc      600
aguguccaa uccuuuuca uacgucuc gaccguuguc aucacauuc gaccacauga      660
cguuccuca gcgggugaag aaauaucuca ucgcuuuuc ccaaaacuuc cucugcgag      720
ucgucuacuc cccuucgcc acgcuggcau ccgaguuucu gcagcgagag gugacuguc      780
    
```

aagaccuucu cucgucggca ucaguauggu uguuccgauc agauuucgua aaggacuacc 840
 caagaccgau caugcccaac augguguucg uagggggaau caauugccuc caccagaau 900
 cgcugagcca ggaguuuucaa gcguauauca acgcgucggg ggaacacgga auugucgugu 960
 uuagccuggg gucgauggua ucggagauuc ccgaaaagaa ggcgauaggca aucgcagacg 1020
 cacucggaaa gaucccccag acaguccuuu ggcgguauac agggacgagg ccgagcauu 1080
 uggcaacaa uacgaucuu gugaaauggu ugccgcagaa ugaucuuuc ggucaccca 1140
 ugacaagagc cuucaucagc cacgccgguu cgcauggggu auaugaauucg auuugcaaug 1200

gcgugccuau ggugaugaug ccgcucuuug gugaccagau ggacaauucg aaaaggaugg 1260
 aaaccaaggg agcaggaguc acccugaauug ugcuggaaau gacaucgag gaucucgaaa 1320
 acgcgcuuua agcggucauu aacgacaaa cguauaagga aaacauaug agguugagcu 1380
 cccuucacaa agauagaccu gucgagccau uggaccuggc cguguuuugg gucgaguucg 1440
 ugaugcggca caaggagcg ccacacuuga ggccagcugc gcaugaucug acgugguauc 1500
 aguaccacuc ccucgaugug auuggcuucc ugcuggcagu cguguugacu guggcguuuu 1560
 ucacauucaa auguugcguu uacggcuacc ggaagugcuu gggaaagaaa ggacgcguga 1620

aaaaggccca uaagucgaaa acacauugau aagcugccuu cugcggggcu ugccuucugg 1680
 ccaugcccuu cuucucucc uugcaccugu accucuaaa caccauuguc acaaacacca 1740
 uugucacaaa caccauuguc acaaacacca uugucauggu cuuugaauaa agccugagua 1800
 ggaag 1805

<210> 62

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 62

Asn Phe Asp Asn Pro Val Tyr Gln

1 5

<210> 63

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 63

Asn Gln Asp Gly Tyr Ser Tyr Pro Ser Arg

1 5 10

<210> 64

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 64

Leu Glu Asp Asp Val Ala

1

5