(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0004731
(43) 공개일자 2025년01월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/51 (2006.01) *A61K 45/06* (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) *A61K 9/00* (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01) *C12N 15/88* (2017.01)
(52) CPC특허분류
A61K 9/5123 (2013.01)
A61K 45/06 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-7037208
(22) 출원일자(국제) 2023년04월26일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년11월07일
(86) 국제출원번호 PCT/US2023/066266
(87) 국제공개번호 WO 2023/212618
국제공개일자 2023년11월02일
(30) 우선권주장
63/335,092 2022년04월26일 미국(US)

(71) 출원인
스트랜드 세러퓨틱스 인코포레이티드
미국 02215 매사추세츠 보스턴 오버랜드 스트리트 20 스위트 에이
(72) 발명자
소웰 라이언
미국 02215 매사추세츠주 보스턴 오버랜드 스트리트 20 스위트 에이 스트랜드 세러퓨틱스 인코포레이티드 씨/오
부텔로 리오
미국 02215 매사추세츠주 보스턴 오버랜드 스트리트 20 스위트 에이 스트랜드 세러퓨틱스 인코포레이티드 씨/오
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인코리아나

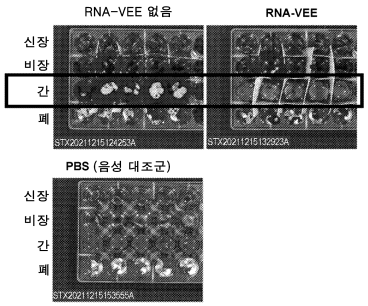
전체 청구항 수 : 총 59 항

(54) 발명의 명칭 **베네수엘라 말 뇌염 (VEE) 레플리콘을 포함하는 지질 나노입자 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 개시내용은 VEE 레플리콘을 포함하는 지질 나노입자 (LNP)에 관한 것이며, 여기서 LNP는 간 내에서 페이로드의 발현을 선택적으로 감소시키고/시키거나 회피하는 데 유용하다. 본 개시내용은 또한 다양한 질환 및 장애를 치료하기 위한 이러한 LNP의 용도에 관한 것이다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61K 48/0041 (2013.01)
A61K 9/0019 (2013.01)
C12N 15/86 (2013.01)
C12N 15/88 (2013.01)
C12N 2770/36143 (2013.01)
(72) 발명자
아브라함 우벳
미국 02215 매사추세츠주 보스턴 오버랜드 스트리트 20 스위트 에이 스트랜드 세러퓨틱스 인코포레이티드 씨/오
자오 웨이위
미국 02215 매사추세츠주 보스턴 오버랜드 스트리트 20 스위트 에이 스트랜드 세러퓨틱스 인코포레이티드 씨/오
메논 난디타
미국 02215 매사추세츠주 보스턴 오버랜드 스트리트 20 스위트 에이 스트랜드 세러퓨틱스 인코포레이티드 씨/오
샤 알록
미국 02215 매사추세츠주 보스턴 오버랜드 스트리트 20 스위트 에이 스트랜드 세러퓨틱스 인코포레이티드 씨/오
남비아르 프라샨트
미국 02215 매사추세츠주 보스턴 오버랜드 스트리트 20 스위트 에이 스트랜드 세러퓨틱스 인코포레이티드 씨/오
기타다 다스쿠
미국 02215 매사추세츠주 보스턴 오버랜드 스트리트 20 스위트 에이 스트랜드 세러퓨틱스 인코포레이티드 씨/오

명 세 서

청구범위

청구항 1

이종 단백질 발현의 감소 또는 회피를 필요로 하는 대상체의 간에서 이종 단백질의 발현을 감소 또는 회피하는 방법으로서, (i) 하나 이상 유형의 지질, 및 (ii) 베네수엘라 말 뇌염 (VEE) 바이러스로부터 유래된 레플리콘("VEE 레플리콘")을 포함하는 지질 나노입자를 대상체에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 VEE 레플리콘은 이종 단백질을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는, 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 발현을 감소시키는 것은, 참조 대상체 (*예를 들면*, 상응하는 지질 나노입자를 받았지만 레플리콘이 VEE 레플리콘이 아닌 대상체)의 것과 비교하여, (i) 간에서 발현되는 이종 단백질의 양을 감소시키는 것, (ii) 간에서 이종 단백질의 발현의 지속기간을 감소시키는 것, 또는 (iii) (i) 및 (ii) 둘 모두를 포함하는, 방법.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 투여 후, 간에서 발현되는 이종 단백질의 양이 참조 대상체의 것과 비교하여 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 또는 약 100%만큼 감소되는, 방법.

청구항 4

제 3 항에 있어서, 투여 후, 간이 이종 단백질을 발현시키지 않는, 방법.

청구항 5

제 2 항 또는 제 3 항에 있어서, 투여 후, 간에서 이종 단백질의 발현의 지속기간이 참조 대상체의 것과 비교하여 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 또는 약 100%만큼 감소되는, 방법.

청구항 6

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서, 투여 후, 이종 단백질이 대상체의 비-간 조직에서 발현되고, 상기 비-간 조직이 비장, 폐, 종양, 또는 이들의 조합으로부터 선택되는, 방법.

청구항 7

제 6 항에 있어서, 투여 후, 비-간 조직에서 발현되는 이종 단백질의 양이 참조 대상체의 비-간 조직에서 관찰된 것과 비교하여 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 적어도 약 100% 또는 그 초과인, 방법.

청구항 8

제 6 항 또는 제 7 항에 있어서, 투여 후, 비-간 조직에서 이종 단백질의 발현의 지속기간이 참조 대상체의 비-간 조직에서 관찰된 것과 비교하여 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 적어도 약 100%인, 방법.

청구항 9

이종 단백질의 선택적 발현을 필요로 하는 대상체의 비-간 조직에서 이종 단백질을 선택적으로 발현시키는 방법으로서, (i) 하나 이상 유형의 지질, 및 (ii) 베네수엘라 말 뇌염 (VEE) 바이러스로부터 유래된 레플리콘 ("VEE

레플리콘")을 포함하는 지질 나노입자를 대상체에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 VEE 레플리콘은 이종 단백질을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는, 방법.

청구항 10

제 9 항에 있어서, 투여 후, 비-간 조직에서 발현되는 이종 단백질의 양이 대상체의 간에서 관찰된 상응하는 양보다 적어도 약 2-배, 적어도 약 3-배, 적어도 약 4-배, 적어도 약 5-배, 적어도 약 6-배, 적어도 약 7-배, 적어도 약 8-배, 적어도 약 9-배, 적어도 약 10-배, 적어도 약 15-배, 적어도 약 20-배, 적어도 약 25-배, 적어도 약 30-배, 적어도 약 35-배, 적어도 약 40-배, 적어도 약 45-배, 또는 적어도 약 50-배 더 큰, 방법.

청구항 11

제 9 항 또는 제 10 항에 있어서, 투여 후, 비-간 조직에서 이종 단백질의 발현의 지속기간이 대상체의 간에서 관찰된 상응하는 지속기간보다 적어도 약 2-배, 적어도 약 3-배, 적어도 약 4-배, 적어도 약 5-배, 적어도 약 6-배, 적어도 약 7-배, 적어도 약 8-배, 적어도 약 9-배, 적어도 약 10-배, 적어도 약 15-배, 적어도 약 20-배, 적어도 약 25-배, 적어도 약 30-배, 적어도 약 35-배, 적어도 약 40-배, 적어도 약 45-배, 또는 적어도 약 50-배 또는 더 큰, 방법.

청구항 12

제 9 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 비-간 조직이 비장, 폐, 또는 둘 모두를 포함하는, 방법.

청구항 13

치료를 필요로 하는 대상체에서 질환 또는 장애를 치료하는 방법으로서, (i) 하나 이상 유형의 지질, 및 (ii) 베네수엘라 말 뇌염 (VEE) 바이러스로부터 유래된 레플리콘 ("VEE 레플리콘")을 포함하는 지질 나노입자를 대상체에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 VEE 레플리콘은 이종 단백질을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하고, 투여 후, 이종 단백질은 대상체의 비-간 조직에서 우선적으로 발현되는, 방법.

청구항 14

제 13 항에 있어서, 투여 후, 비-간 조직에서 발현되는 이종 단백질의 양이 대상체의 간에서 관찰된 상응하는 양보다 적어도 약 2-배, 적어도 약 3-배, 적어도 약 4-배, 적어도 약 5-배, 적어도 약 6-배, 적어도 약 7-배, 적어도 약 8-배, 적어도 약 9-배, 적어도 약 10-배, 적어도 약 15-배, 적어도 약 20-배, 적어도 약 25-배, 적어도 약 30-배, 적어도 약 35-배, 적어도 약 40-배, 적어도 약 45-배, 또는 적어도 약 50-배 또는 더 큰, 방법.

청구항 15

제 13 항 또는 제 14 항에 있어서, 투여 후, 비-간 조직에서 이종 단백질의 발현의 지속기간이 대상체의 간에서 관찰된 상응하는 지속기간보다 적어도 약 2-배, 적어도 약 3-배, 적어도 약 4-배, 적어도 약 5-배, 적어도 약 6-배, 적어도 약 7-배, 적어도 약 8-배, 적어도 약 9-배, 적어도 약 10-배, 적어도 약 15-배, 적어도 약 20-배, 적어도 약 25-배, 적어도 약 30-배, 적어도 약 35-배, 적어도 약 40-배, 적어도 약 45-배, 또는 적어도 약 50-배 또는 더 큰, 방법.

청구항 16

제 13 항 내지 제 15 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 비-간 조직이 비장, 폐, 또는 둘 모두를 포함하는, 방법.

청구항 17

제 13 항 내지 제 16 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 질환 또는 장애가 암, 염증성 장애, 단일유전자성 장애, 신경학적 장애, 정신과적 장애, 또는 이들의 조합을 포함하는, 방법.

청구항 18

제 17 항에 있어서, 상기 암이 흑색종, 편평 세포 암, 소세포 폐 암, 비-소세포 폐 암, 폐의 선암종, 폐의 편평 암종, 복막의 암, 간세포성 암, 위장 암, 췌장 암, 교모세포종, 자궁경부 암, 난소 암, 간 암, 방광 암, 간종양, 유방 암, 결장 암, 결장직장 암, 자궁내막 또는 자궁 암, 타액선 암종, 신장 암, 전립선 암, 외음부

암, 갑상선 암, 간 암종, 위 암, 두경부 암, 또는 이들의 조합을 포함하는, 방법.

청구항 19

내약성 증가를 필요로 하는 대상체에서 지질 나노입자-기반 요법의 내약성을 증가시키는 방법으로서, (i) 하나 이상 유형의 지질, 및 (ii) 베네수엘라 말 뇌염 (VEE) 바이러스로부터 유래된 레플리콘 ("VEE 레플리콘")을 포함하는 지질 나노입자를 대상체에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 VEE 레플리콘은 이종 단백질을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는, 방법.

청구항 20

제 19 항에 있어서, 지질 나노입자-기반 요법의 내약성이 참조 대상체 (*예를 들면*, 상응하는 지질 나노입자를 제공받았지만 레플리콘이 VEE 레플리콘이 아닌 대상체)에서 관찰된 상응하는 내약성보다 적어도 약 2-배, 적어도 약 3-배, 적어도 약 4-배, 적어도 약 5-배, 적어도 약 6-배, 적어도 약 7-배, 적어도 약 8-배, 적어도 약 9-배, 적어도 약 10-배, 적어도 약 15-배, 적어도 약 20-배, 적어도 약 25-배, 적어도 약 30-배, 적어도 약 35-배, 적어도 약 40-배, 적어도 약 45-배, 또는 적어도 약 50-배 또는 그 초과만큼 대상체에서 증가되는, 방법.

청구항 21

제 20 항에 있어서, 지질 나노입자-기반 요법의 증가된 내약성이 감소된 간 독성과 연관되는, 방법.

청구항 22

제 21 항에 있어서, 투여 후, 상기 대상체는 참조 대상체에서 관찰된 상응하는 간 독성과 비교하여 감소된 간 독성을 나타내는, 방법.

청구항 23

제 22 항에 있어서, 대상체에서 상기 간 독성은 참조 대상체의 것과 비교하여 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 또는 약 100%만큼 감소되는, 방법.

청구항 24

제 19 항 내지 제 23 항 중 어느 한 항에 있어서, 투여 후, 상기 대상체가 참조 대상체의 간에서 관찰된 상응하는 발현과 비교하여 간에서 이종 단백질의 감소된 발현을 나타내는, 방법.

청구항 25

제 24 항에 있어서, 투여 후, 대상체의 간에서 발현되는 이종 단백질의 양이 참조 대상체의 간에서 관찰된 것과 비교하여 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 또는 약 100%만큼 감소되는, 방법.

청구항 26

제 24 항 또는 제 25 항에 있어서, 투여 후, 대상체의 간에서 이종 단백질의 발현의 지속기간이 참조 대상체의 간에서 관찰된 것과 비교하여 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 또는 약 100%만큼 감소되는, 방법.

청구항 27

제 19 항 내지 제 26 항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체의 비-간 조직에서 발현되는 이종 단백질의 양이 참조 대상체의 비-간 조직에서 관찰된 것과 비교하여 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 적어도 약 100% 또는 그 초과인, 방법.

청구항 28

제 19 항 내지 제 27 항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체의 비-간 조직에서 이종 단백질의 발현의 지속기간이 참조 대상체의 것과 비교하여 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 적어도 약 100%인, 방법.

청구항 29

감소된 간 독성과 연관되는 지질 나노입자-기반 요법을 생산하는 방법으로서, (i) 하나 이상 유형의 지질을 포함하는 지질 나노입자, 및 (ii) 베네수엘라 말 뇌염 (VEE) 바이러스로부터 유래된 레플리콘 ("VEE 레플리콘")을 조합하는 것을 포함하며, 여기서 VEE 레플리콘은 이종 단백질을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는, 방법.

청구항 30

제 1 항 내지 제 29 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 VEE 레플리콘은 서열번호: 187에 제시된 뉴클레오티드 서열을 갖는, 방법.

청구항 31

제 1 항 내지 제 30 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이종 단백질은 사이토카인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 키메라 항원 수용체, 또는 이들의 조합을 포함하는, 방법.

청구항 32

제 31 항에 있어서, 상기 사이토카인은 인터류킨 (IL)-12 단백질을 포함하는, 방법.

청구항 33

제 32 항에 있어서, 상기 VEE 레플리콘의 핵산 서열은 다음을 포함하는, 방법: (i) IL-12 베타 서브유닛을 인코딩하고 서열번호: 51, 서열번호: 52, 서열번호: 53, 서열번호: 54, 서열번호: 55, 서열번호: 56, 서열번호: 57, 서열번호: 58, 서열번호: 59, 서열번호: 60, 서열번호: 61, 서열번호: 62, 서열번호: 63, 서열번호: 64, 서열번호: 65, 서열번호: 66, 서열번호: 67, 서열번호: 68, 서열번호: 69, 서열번호: 70, 서열번호: 71, 서열번호: 72, 서열번호: 73, 서열번호: 74, 또는 서열번호: 75에 제시된 서열과 적어도 약 75%, 적어도 약 76%, 적어도 약 77%, 적어도 약 78%, 적어도 약 79%, 적어도 약 80%, 적어도 약 81%, 적어도 약 82%, 적어도 약 83%, 적어도 약 84%, 적어도 약 85%, 적어도 약 86%, 적어도 약 87%, 적어도 약 88%, 적어도 약 89%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 약 100% 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열; (ii) IL-12 알파 서브유닛을 인코딩하고 서열번호: 101, 서열번호: 102, 서열번호: 103, 서열번호: 104, 서열번호: 105, 서열번호: 106, 서열번호: 107, 서열번호: 108, 서열번호: 109, 서열번호: 110, 서열번호: 111, 서열번호: 112, 서열번호: 113, 서열번호: 114, 서열번호: 115, 서열번호: 116, 서열번호: 117, 서열번호: 118, 서열번호: 119, 서열번호: 120, 서열번호: 121, 서열번호: 122, 서열번호: 123, 서열번호: 124, 또는 서열번호: 125에 제시된 서열과 적어도 약 77%, 적어도 약 78%, 적어도 약 79%, 적어도 약 80%, 적어도 약 81%, 적어도 약 82%, 적어도 약 83%, 적어도 약 84%, 적어도 약 85%, 적어도 약 86%, 적어도 약 87%, 적어도 약 88%, 적어도 약 89%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 약 100% 동일한 뉴클레오티드 서열; 또는 (iii) (i) 및 (ii) 둘 모두.

청구항 34

제 33 항에 있어서, 상기 사이토카인은 IL-12 단백질을 포함하지 않는, 방법.

청구항 35

제 1 항 내지 제 34 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상 유형의 지질은 이온화가능한 지질, 양이온성 지질, 리피도이드, 인지질, 스테롤, 또는 이들의 조합을 포함하는, 방법.

청구항 36

제 35 항에 있어서, 상기 하나 이상 유형의 지질이 TT3, 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민

(DOPE), 콜레스테롤, C14-PEG2000, 또는 이들의 조합을 포함하는, 방법.

청구항 37

제 36 항에 있어서, 상기 하나 이상 유형의 지질이 TT3인, 방법.

청구항 38

제 36 항 또는 제 37 항에 있어서, 상기 C14-PEG2000이 1,2-디미리스토일-rac-글리세로-3-메톡시폴리에틸렌 글리콜-2000 (DMG-PEG2000), 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[메톡시(폴리에틸렌 글리콜)-2000] (DMPE-PEG2000), 또는 둘 모두를 포함하는, 방법.

청구항 39

제 36 항 내지 제 38 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 C14-PEG2000은 지질 나노입자에서 포매되는, 방법.

청구항 40

제 36 항 내지 제 38 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 C14-PEG2000은 단리된 폴리뉴클레오티드가 지질 나노입자에서 캡슐화된 후에 첨가된, 방법.

청구항 41

제 1 항 내지 제 40 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 지질 나노입자는 약 30-500 nm의 직경을 갖는, 방법.

청구항 42

제 1 항 내지 제 41 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 지질 나노입자는 약 50-400 nm의 직경을 갖는, 방법.

청구항 43

제 1 항 내지 제 42 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 지질 나노입자는 약 70-300 nm의 직경을 갖는, 방법.

청구항 44

제 1 항 내지 제 43 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 지질 나노입자는 약 100-200 nm의 직경을 갖는, 방법.

청구항 45

제 1 항 내지 제 44 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 지질 나노입자는 약 100-175 nm의 직경을 갖는, 방법.

청구항 46

제 1 항 내지 제 45 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 지질 나노입자는 약 100-160 nm의 직경을 갖는, 방법.

청구항 47

제 1 항 내지 제 46 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상 유형의 지질 및 상기 VEE 레플리콘은 약 1:2 내지 약 15:1의 질량비를 갖는, 방법.

청구항 48

제 47 항에 있어서, 상기 하나 이상 유형의 지질 및 상기 VEE 레플리콘은 1:2, 1:1.5, 1:1.2, 1:1.1, 1:1, 1.1:1, 1.2:1, 1.5:1, 2:1, 2.5:1, 3:1, 3.5:1, 4:1, 4.5:1, 5:1, 5.5:1, 6:1, 6.5:1, 7:1, 7.5:1, 8:1, 8.5:1, 9:1, 9.5:1, 10:1, 10.5:1, 11:1, 11.5:1, 12:1, 12.5:1, 13:1, 13.5:1, 14:1, 14.5:1, 또는 15:1의 질량비를 갖는, 방법.

청구항 49

제 1 항 내지 제 48 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 VEE 레플리콘은 5'-캡을 포함하는, 방법.

청구항 50

제 1 항 내지 제 49 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 VEE 레플리콘은 조절성 요소를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 51

제 50 항에 있어서, 상기 조절성 요소는 적어도 하나의 번역 인핸서 요소 (TEE), 번역 개시 서열, 적어도 하나의 마이크로RNA 결합 부위 또는 이의 씨드, 연결된 뉴클레오시드의 3' 테일링 영역, AU 풍부 요소 (ARE), 전사후 제어 조절인자, 5' UTR, 3' UTR, 및 이들의 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 52

제 51 항에 있어서, 연결된 뉴클레오시드의 상기 3' 테일링 영역은 폴리-A 꼬리, 폴리A-G 콰르텟, 또는 스템 루프 서열을 포함하는, 방법.

청구항 53

제 1 항 내지 제 52 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 VEE 레플리콘은 적어도 하나의 변형된 뉴클레오시드를 포함하는, 방법.

청구항 54

제 53 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 변형된 뉴클레오시드는 6-아자-시티딘, 2-티오-시티딘, α-티오-시티딘, 슈도-이소-시티딘, 5-아미노알릴-우리딘, 5-요오도-우리딘, N1-메틸-슈도우리딘, 5,6-디히드로우리딘, α-티오-우리딘, 4-티오-우리딘, 6-아자-우리딘, 5-히드록시-우리딘, 데옥시-티미딘, 슈도-우리딘, 이노신, α-티오-구아노신, 8-옥소-구아노신, O6-메틸-구아노신, 7-데아자-구아노신, N1-메틸 아데노신, 2-아미노-6-클로로-퓨린, N6-메틸-2-아미노-퓨린, 6-클로로-퓨린, N6-메틸-아데노신, α-티오-아데노신, 8-아지도-아데노신, 7-데아자-아데노신, 피롤로-시티딘, 5-메틸-시티딘, N4-아세틸-시티딘, 5-메틸-우리딘, 5-요오도-시티딘, 및 이들의 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 55

제 1 항 내지 제 54 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상 유형의 지질 및 상기 VEE 레플리콘은 약 10:1의 질량비를 갖는, 방법.

청구항 56

제 1 항 내지 제 55 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 지질 나노입자는 종양내, 척추내, 근육내, 정맥내, 피하, 흡입, 피내, 림프내, 안내, 복강내, 흉막내, 척수내, 혈관내, 비강, 경피성, 설하, 점막하, 경피, 또는 경점막 투여를 통해 대상체에게 투여되는, 방법.

청구항 57

제 1 항 내지 제 56 항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 추가의 치료적 제제를 대상체에게 투여하는 것을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 58

제 57 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 추가의 치료적 제제는 화학치료적 약물, 표적화된 항-암 요법, 종양용해성 약물, 세포독성 제제, 면역-기반 요법, 사이토카인, 외과적 절차, 방사선 절차, 공자극성 분자의 활성화제, 면역 관문 억제제, 백신, 세포성 면역요법, 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는, 방법.

청구항 59

제 58 항에 있어서, 상기 면역 관문 억제제가 항-PD-1 항체, 항-PD-L1 항체, 항-LAG-3 항체, 항-CTLA-4 항체, 항-GITR 항체, 항-TIM3 항체, 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는, 방법.

발명의 설명

배 경 기 술

[0001] 관련된 출원에 대한 교차-참조

[0002] 본 PCT 출원은 그 전체가 본원에 참조로 포함되는, 2022년 4월 26일 출원된, 미국 가출원 번호 63/335,092의 우선권 이익을 주장한다.

[0003] EFS-WEB을 통해 전자적으로 제출된 서열 목록에 대한 참조

[0004] 서열 목록의 내용은 전자적으로 제출되고 (명칭: 4597_016PC01_SequenceListing_ST26.XML; 크기: 410,263 바이트; 및 생성일자: 2023년 4월 24일), 출원은 그 전체가 본원에 참조로 포함되는 출원과 함께 제출된다.

[0005] 개시내용의 배경

[0006] 핵산-기반 치료 (*예를 들면*, mRNA 백신)는 다양한 질환의 치료에 점점 중요한 접근법이 되고 있다. 투여시, 인코딩된 단백질은 면역 반응 (*예를 들면*, 항-종양 면역 반응을 유도하기 위한 종양 항원)을 유도하기 위해 또는 건강한 상태를 유지하도록 중요한 기능을 제공하기 위해 생산될 수 있다. 하지만, 핵산 분자를 전달하기 위한 현행 전달 플랫폼은 효과없거나 바람직하지 않은 부작용과 연관되어, 핵산-기반 요법의 전체 잠재력을 제한시킨다. 예를 들어, mRNA가 관여되는 경우, 지질 나노입자 (LNP)는 mRNA를 캡슐화하는데 흔히 사용된다. 그리고, LNP 전달을 개선하기 위해, 많은 노력이, 예를 들면, 다양한 유형의 포유류 조직, 기관 및/또는 세포 (예를 들면, 포유류 간 세포)에서 mRNA의 세포내 전달 및/또는 발현에 영향을 미칠 수 있는 신규한 지질 또는 특정한 지질 조성물을 식별하는데 집중하였다. 하지만, 이들 기존 접근법은 값비싸고 시간 소모형이고 예측할 수 없다. 추가적으로, LNP는 *생체내* 투여되는 경우 간 독성과 또한 연관되었다. 따라서, 대상체에게 핵산을 전달하는 것의 더욱 안전하고 더욱 효과적인 수단을 제공할 수 있는 개선된 LNP가 당업계에서 필요하다.

발명의 내용

[0007] 개시내용의 간단한 개요

[0008] 단백질 발현의 감소 또는 회피를 필요로 하는 대상체의 간에서 이종 단백질의 발현을 감소 또는 회피하는 방법이 본원에 제공되며, 이는 (i) 하나 이상 유형의 지질, 및 (ii) 베네수엘라 말 뇌염 (VEE) 바이러스로부터 유래된 레플리콘 ("VEE 레플리콘") -여기서 VEE 레플리콘은 이종 단백질을 인코딩하는 핵산 서열을 포함함-을 포함하는 지질 나노입자를 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 일부 양태에서, 발현을 감소시키는 것은 참조 대상체 (*예를 들면*, 상응하는 지질 나노입자를 받았지만 레플리콘이 VEE 레플리콘이 아닌 대상체)의 것과 비교될 때 (i) 간에서 발현되는 이종 단백질의 양을 감소시키는 것, (ii) 간에서 이종 단백질의 발현의 지속기간을 감소시키는 것, 또는 (iii) (i) 및 (ii)를 모두 포함한다.

[0009] 일부 양태에서, 투여 후, 간에서 발현되는 이종 단백질의 양은 참조 대상체의 것과 비교하여 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 또는 약 100%만큼 감소된다. 일부 양태에서, 투여 후, 간은 이종 단백질을 발현시키지 않는다.

[0010] 일부 양태에서, 투여 후, 간에서 이종 단백질의 발현의 지속기간은 참조 대상체의 것과 비교하여 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 또는 약 100%만큼 감소된다.

[0011] 일부 양태에서, 투여 후, 이종 단백질은 대상체의 비-간 조직에서 발현되고, 여기서 비-간 조직은 비장, 폐, 종양, 또는 이들의 조합으로부터 선택된다. 일부 양태에서, 투여 후, 비-간 조직에서 발현되는 이종 단백질의 양은 참조 대상체의 비-간 조직에서 관찰된 것과 비교하여 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 적어도 약 100% 또는 그 초과이다. 일부 양태에서, 비-간 조직에서 이종 단백질의 발현의 지속기간은 참조 대상체의 비-간 조직에서 관찰된 것과 비교하여 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 적어도 약 100%이다.

[0012] 이종 단백질의 선택적 발현을 필요로 하는 대상체의 비-간 조직에서 이종 단백질을 선택적으로 발현시키는 방법이 또한 본원에 제공되며, 이는 (i) 하나 이상 유형의 지질, 및 (ii) 베네수엘라 말 뇌염 (VEE) 바이러스로부터 유래된 레플리콘 ("VEE 레플리콘") -여기서 VEE 레플리콘은 이종 단백질을 인코딩하는 핵산 서열을 포함함-을 포함하는 지질 나노입자를 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.

[0013] 일부 양태에서, 투여 후, 비-간 조직에서 발현되는 이종 단백질의 양은 대상체의 간에서 관찰된 상응하는 양보다 적어도 약 2-배, 적어도 약 3-배, 적어도 약 4-배, 적어도 약 5-배, 적어도 약 6-배, 적어도 약 7-배, 적어도 약 8-배, 적어도 약 9-배, 적어도 약 10-배, 적어도 약 15-배, 적어도 약 20-배, 적어도 약 25-배, 적어도 약 30-배, 적어도 약 35-배, 적어도 약 40-배, 적어도 약 45-배, 또는 적어도 약 50-배 더 크다. 일부 양태에서, 투여 후, 비-간 조직에서 이종 단백질의 발현의 지속기간은 대상체의 간에서 관찰된 상응하는 지속기간보다 적어도 약 2-배, 적어도 약 3-배, 적어도 약 4-배, 적어도 약 5-배, 적어도 약 6-배, 적어도 약 7-배, 적어도 약 8-배, 적어도 약 9-배, 적어도 약 10-배, 적어도 약 15-배, 적어도 약 20-배, 적어도 약 25-배, 적어도 약 30-배, 적어도 약 35-배, 적어도 약 40-배, 적어도 약 45-배, 또는 적어도 약 50-배 또는 더 크다. 일부 양태에서, 비-간 조직은 비장, 폐, 또는 둘 모두를 포함한다.

[0014] 치료를 필요로 하는 대상체에서 질환 또는 장애를 치료하는 방법이 본원에 개시되며, 이는 (i) 하나 이상 유형의 지질, 및 (ii) 베네수엘라 말 뇌염 (VEE) 바이러스로부터 유래된 레플리콘 ("VEE 레플리콘") -여기서 VEE 레플리콘은 이종 단백질을 인코딩하는 핵산 서열을 포함함-을 포함하는 지질 나노입자를 대상체에게 투여하는 것을 포함하고, 투여 후, 이종 단백질은 대상체의 비-간 조직에서 우선적으로 발현된다.

[0015] 일부 양태에서, 투여 후, 비-간 조직에서 발현되는 이종 단백질의 양은 대상체의 간에서 관찰된 상응하는 양보다 적어도 약 2-배, 적어도 약 3-배, 적어도 약 4-배, 적어도 약 5-배, 적어도 약 6-배, 적어도 약 7-배, 적어도 약 8-배, 적어도 약 9-배, 적어도 약 10-배, 적어도 약 15-배, 적어도 약 20-배, 적어도 약 25-배, 적어도 약 30-배, 적어도 약 35-배, 적어도 약 40-배, 적어도 약 45-배, 또는 적어도 약 50-배 또는 더 크다. 일부 양태에서, 투여 후, 비-간 조직에서 이종 단백질의 발현의 지속기간은 대상체의 간에서 관찰된 상응하는 지속기간보다 적어도 약 2-배, 적어도 약 3-배, 적어도 약 4-배, 적어도 약 5-배, 적어도 약 6-배, 적어도 약 7-배, 적어도 약 8-배, 적어도 약 9-배, 적어도 약 10-배, 적어도 약 15-배, 적어도 약 20-배, 적어도 약 25-배, 적어도 약 30-배, 적어도 약 35-배, 적어도 약 40-배, 적어도 약 45-배, 또는 적어도 약 50-배 또는 크다. 일부 양태에서, 비-간 조직은비장, 폐, 또는 둘 모두를 포함한다.

[0016] 일부 양태에서, 본 개시내용으로 치료될 수 있는 질환 또는 장애는 암, 염증성 장애, 단일유전자성 장애, 신경학적 장애, 정신과적 장애, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 양태에서, 암은 흑색종, 편평 세포 암, 소세포 폐 암, 비-소세포 폐 암, 폐의 선암종, 폐의 편평 암종, 복막의 암, 간세포성 암, 위장 암, 췌장 암, 교모세포종, 자궁경부 암, 난소 암, 간 암, 방광 암, 간종양, 유방 암, 결장 암, 결장직장 암, 자궁내막 또는 자궁 암, 타액선 암종, 신장 암, 전립선 암, 외음부 암, 갑상선 암, 간 암종, 위 암, 두경부 암, 또는 이들의 조합을 포함한다.

[0017] 본 개시내용은 내약성 증가를 필요로 하는 대상체에서 지질 나노입자-기반 요법의 내약성을 증가시키는 방법을 추가로 제공하며, 이는 (i) 하나 이상 유형의 지질, 및 (ii) 베네수엘라 말 뇌염 (VEE) 바이러스로부터 유래된 레플리콘 ("VEE 레플리콘") -여기서 VEE 레플리콘은 이종 단백질을 인코딩하는 핵산 서열을 포함함-을 포함하는 지질 나노입자를 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.

[0018] 일부 양태에서, 지질 나노입자-기반 요법의 내약성은 참조 대상체에서 (*예를 들면*, 상응하는 지질 나노입자를 받았지만 레플리콘이 VEE 레플리콘이 아닌 대상체)에서 관찰된 상응하는 내약성보다 적어도 약 2-배, 적어도 약 3-배, 적어도 약 4-배, 적어도 약 5-배, 적어도 약 6-배, 적어도 약 7-배, 적어도 약 8-배, 적어도 약 9-배, 적어도 약 10-배, 적어도 약 15-배, 적어도 약 20-배, 적어도 약 25-배, 적어도 약 30-배, 적어도 약 35-배, 적어도 약 40-배, 적어도 약 45-배, 또는 적어도 약 50-배 또는 그 초과만큼 대상체에서 증가된다.

[0019] 일부 양태에서, 지질 나노입자-기반 요법의 증가된 내약성은 감소된 간 독성과 연관된다. 일부 양태에서, 투여 후, 대상체는 참조 대상체에서 관찰된 상응하는 간 독성과 비교하여 감소된 간 독성을 나타낸다. 일부 양태에서, 대상체에서 간 독성은 참조 대상체의 것과 비교하여 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 또는 약 100%만큼 감소된다.

[0020] 일부 양태에서, 투여 후, 대상체는 참조 대상체의 간에서 관찰된 상응하는 발현과 비교하여 간에서 이종 단백질의 감소된 발현을 나타낸다.

[0021] 일부 양태에서, 투여 후, 대상체의 간에서 발현되는 이종 단백질의 양은 참조 대상체의 간에서 관찰된 것과 비교하여 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 또는 약 100%만큼 감소된다. 일부 양태에서, 투여 후,

대상체의 간에서 이종 단백질의 발현의 지속기간은 참조 대상체의 간에서 관찰된 것과 비교하여 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 또는 약 100%만큼 감소된다. 일부 양태에서, 대상체의 비-간 조직에서 발현되는 이종 단백질의 양은 참조 대상체의 비-간 조직에서 관찰된 것과 비교하여 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 적어도 약 100% 또는 그 초과이다. 일부 양태에서, 대상체의 비-간 조직에서 이종 단백질의 발현의 지속기간은 참조 대상체의 것과 비교하여 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 적어도 약 100%이다.

[0022] 감소된 간 독성과 연관되는 지질 나노입자-기반 요법을 생산하는 방법이 본원에 제공되며, 이는 (i) 하나 이상 유형의 지질을 포함하는 지질 나노입자, 및 (ii) 베네수엘라 말 뇌염 (VEE) 바이러스로부터 유래된 레플리콘 ("VEE 레플리콘") -여기서 VEE 레플리콘은 이종 단백질을 인코딩하는 핵산 서열을 포함함-을 조합하는 것을 포함한다.

[0023] 본원에 제공된 방법들 중 임의의 것에서, 일부 양태에서, VEE 레플리콘은 서열번호: 187에 제시된 뉴클레오티드 서열을 갖는다. 일부 양태에서, 이종 단백질은 사이토카인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 키메라 항원 수용체, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 양태에서, 사이토카인은 인터류킨 (IL)-12 단백질을 포함한다.

[0024] 일부 양태에서, VEE 레플리콘의 핵산 서열은 다음을 포함한다: (i) IL-12 베타 서브유닛을 인코딩하고 서열번호: 51, 서열번호: 52, 서열번호: 53, 서열번호: 54, 서열번호: 55, 서열번호: 56, 서열번호: 57, 서열번호: 58, 서열번호: 59, 서열번호: 60, 서열번호: 61, 서열번호: 62, 서열번호: 63, 서열번호: 64, 서열번호: 65, 서열번호: 66, 서열번호: 67, 서열번호: 68, 서열번호: 69, 서열번호: 70, 서열번호: 71, 서열번호: 72, 서열번호: 73, 서열번호: 74, 또는 서열번호: 75에 제시된 서열과 적어도 약 75%, 적어도 약 76%, 적어도 약 77%, 적어도 약 78%, 적어도 약 79%, 적어도 약 80%, 적어도 약 81%, 적어도 약 82%, 적어도 약 83%, 적어도 약 84%, 적어도 약 85%, 적어도 약 86%, 적어도 약 87%, 적어도 약 88%, 적어도 약 89%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 약 100% 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열; (ii) IL-12 알파 서브유닛을 인코딩하고 서열번호: 101, 서열번호: 102, 서열번호: 103, 서열번호: 104, 서열번호: 105, 서열번호: 106, 서열번호: 107, 서열번호: 108, 서열번호: 109, 서열번호: 110, 서열번호: 111, 서열번호: 112, 서열번호: 113, 서열번호: 114, 서열번호: 115, 서열번호: 116, 서열번호: 117, 서열번호: 118, 서열번호: 119, 서열번호: 120, 서열번호: 121, 서열번호: 122, 서열번호: 123, 서열번호: 124, 또는 서열번호: 125에 제시된 서열과 적어도 약 77%, 적어도 약 78%, 적어도 약 79%, 적어도 약 80%, 적어도 약 81%, 적어도 약 82%, 적어도 약 83%, 적어도 약 84%, 적어도 약 85%, 적어도 약 86%, 적어도 약 87%, 적어도 약 88%, 적어도 약 89%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 약 100% 동일한 뉴클레오티드 서열; 또는 (iii) (i) 및 (ii) 둘 모두.

[0025] 일부 양태에서, 사이토카인은 IL-12 단백질을 포함하지 않는다.

[0026] 일부 양태에서, 하나 이상 유형의 지질은 이온화가능한 지질, 양이온성 지질, 리피도이드, 인지질, 스테롤, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 양태에서, 하나 이상 유형의 지질은 TT3, 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 (DOPE), 콜레스테롤, C14-PEG2000, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 양태에서, 하나 이상 유형의 지질은 TT3이다. 일부 양태에서, C14-PEG2000은 1,2-디미리스토일-rac-글리세로-3-메톡시폴리에틸렌 글리콜-2000 (DMG-PEG2000), 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[메톡시(폴리에틸렌 글리콜)-2000] (DMPE-PEG2000), 또는 둘 모두를 포함한다. 일부 양태에서, C14-PEG2000은 지질 나노입자에서 포매된다. 일부 양태에서, C14-PEG2000은 단리된 폴리뉴클레오티드가 지질 나노입자에서 캡슐화된후 첨가되었다.

[0027] 일부 양태에서, 지질 나노입자는 약 30-500 nm의 직경을 갖는다. 일부 양태에서, 지질 나노입자는 약 50-400 nm의 직경을 갖는다. 일부 양태에서, 지질 나노입자는 약 70-300 nm의 직경을 갖는다. 일부 양태에서, 지질 나노입자는 약 100-200 nm의 직경을 갖는다. 일부 양태에서, 지질 나노입자는 약 100-175 nm의 직경을 갖는다. 일부 양태에서, 지질 나노입자는 약 100-160 nm의 직경을 갖는다.

[0028] 일부 양태에서, 하나 이상 유형의 지질 및 VEE 레플리콘은 약 1:2 내지 약 15:1의 질량비를 갖는다. 일부 양태에서, 하나 이상 유형의 지질 및 VEE 레플리콘은 1:2, 1:1.5, 1:1.2, 1:1.1, 1:1, 1.1:1, 1.2:1, 1.5:1, 2:1,

2.5:1, 3:1, 3.5:1, 4:1, 4.5:1, 5:1, 5.5:1, 6:1, 6.5:1, 7:1, 7.5:1, 8:1, 8.5:1, 9:1, 9.5:1, 10:1, 10.5:1, 11:1, 11.5:1, 12:1, 12.5:1, 13:1, 13.5:1, 14:1, 14.5:1, 또는 15:1의 질량비를 갖는다.

[0029] 일부 양태에서, VEE 레플리콘은 5'-캡을 포함한다.

[0030] 일부 양태에서, VEE 레플리콘은 조절성 요소를 추가로 포함한다. 일부 양태에서, 조절성 요소는 적어도 하나의 번역 인핸서 요소 (TEE), 번역 개시 서열, 적어도 하나의 마이크로RNA 결합 부위 또는 이의 씨드, 연결된 뉴클레오시드의 3' 테일링 영역, AU 풍부 요소 (ARE), 전사후 제어 조절인자, 5' UTR, 3' UTR, 및 이들의 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 일부 양태에서, 연결된 뉴클레오시드의 3' 테일링 영역은 폴리-A 꼬리, 폴리 A-G 콰르텟, 또는 스템 루프 서열을 포함한다.

[0031] 일부 양태에서, VEE 레플리콘은 적어도 하나의 변형된 뉴클레오시드를 포함한다. 일부 양태에서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오시드는 6-아자-시티딘, 2-티오-시티딘, α-티오-시티딘, 슈도-이소-시티딘, 5-아미노알릴-우리딘, 5-요오도-우리딘, N1-메틸-슈도우리딘, 5,6-디히드로우리딘, α-티오-우리딘, 4-티오-우리딘, 6-아자-우리딘, 5-히드록시-우리딘, 데옥시-티미딘, 슈도-우리딘, 이노신, α-티오-구아노신, 8-옥소-구아노신, O6-메틸-구아노신, 7-데아자-구아노신, N1-메틸 아데노신, 2-아미노-6-클로로-퓨린, N6-메틸-2-아미노-퓨린, 6-클로로-퓨린, N6-메틸-아데노신, α-티오-아데노신, 8-아지도-아데노신, 7-데아자-아데노신, 피롤로-시티딘, 5-메틸-시티딘, N4-아세틸-시티딘, 5-메틸-우리딘, 5-요오도-시티딘, 및 이들의 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

[0032] 일부 양태에서, 하나 이상 유형의 지질 및 VEE 레플리콘은 약 10:1의 질량비를 갖는다.

[0033] 일부 양태에서, 지질 나노입자는 종양내, 척추내, 근육내, 정맥내, 피하, 흡입, 피내, 림프내, 안내, 복강내, 흉막내, 척수내, 혈관내, 비강, 경피성, 설하, 점막하, 경피, 또는 경점막 투여를 통해 대상체에게 투여된다.

[0034] 본원에 제공된 방법들 중 임의의 것에서, 일부 양태에서, 본 방법은 적어도 하나의 추가의 치료적 제제를 대상체에게 투여하는 것을 추가로 포함한다. 일부 양태에서, 적어도 하나의 추가의 치료적 제제는 화학치료적 약물, 표적화된 항-암 요법, 종양용해성 약물, 세포독성 제제, 면역-기반 요법, 사이토카인, 외과적 절차, 방사선 절차, 공자극성 분자의 활성화제, 면역 관문 억제제, 백신, 세포성 면역요법, 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다. 일부 양태에서, 면역 관문 억제제는 항-PD-1 항체, 항-PD-L1 항체, 항-LAG-3 항체, 항-CTLA-4 항체, 항-GITR 항체, 항-TIM3 항체, 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0035] 도면의 간단한 설명

도 1은 하기 중 하나의 정맥내 투여 후 마우스의 간에서 발광 발현의 비교를 제공한다: (1) 임의의 VEE 레플리콘이 없는 RNA (RNA-VEE 없음), (2) VEE 레플리콘이 있는 RNA (RNA-VEE), 및 (3) PBS. 비교를 위하여, 신장, 비장, 및 폐에서의 발광 발현이 또한 제공된다.

도 2a 및 **2b**는 LNP1 또는 LNP2의 단일 정맥내 투여 후 마우스의 간에서 td-Tomato 단백질 형광 발현의 비교를 제공한다. LNP1 및 LNP2 둘 모두는 핵 국소화 신호에 융합된 인코딩 Cre 리콤비나제 (Cre-NLS)와 VEE 레플리콘이 있는 mRNA로 로딩되었다. 대조군 동물은 PBS의 투여를 받았다. **도 2a**에서, 형광 발현은 (대조군으로 정규화된) % 복사 효율로서 도시된다. **도 2b**에서, 형광 발현은 평균 복사 효율로서 도시된다. 두 도면 모두에서, 각 기호는 하나의 측정된 기관 및 평균의 표준 오차를 나타내는 오차 막대를 나타낸다. LNP 대 대조군 그룹 사이 형광성 강도에서의 차이는 양측 독립 스튜던트 t-테스트 (N=3)를 사용하여 통계적으로 분석되었다.

도 3a 및 **3b**는 LNP3, LNP4, LNP5, 또는 LNP6의 단일 정맥내 투여 후 마우스의 간에서 td-Tomato 단백질 형광 발현의 비교를 제공한다. LNP3-LNP6의 각각은 임의의 VEE 레플리콘이 없는 mRNA (RNA-VEE 없음) 및 핵 국소화 신호에 융합된 인코딩 Cre 리콤비나제 (Cre-NLS)로 로딩되었다. 대조군 동물은 PBS의 투여를 받았다. **도 3a**에서, 형광 발현은 (대조군으로 정규화된) % 평균 복사 효율로서 도시된다. **도 3b**에서, 형광 발현은 평균 복사 효율로서 도시된다.

도 4a 및 **4b**는 LNP7 또는 LNP3의 단일 정맥내 투여 후 마우스의 간에서 td-Tomato 단백질 형광 발현의 비교를 제공한다. LNP3 및 LNP7 둘 모두는 임의의 VEE 레플리콘이 없는 mRNA (RNA-VEE 없음) 및 핵 국소화 신호에 융합된 인코딩 Cre 리콤비나제 (Cre-NLS)로 로딩되었다. 대조군 동물은 PBS의 투여를 받았다. **도 4a**에서, 형광 발현은 (대조군으로 정규화된) % 평균 복사 효율로서 도시된다. **도 4b**에서, 형광 발현은 평균 복사 효율로서 도시된다.

도 5a 및 **5b**는 VEE 레플리콘이 있는 mRNA 및 인코딩 반딧불 루시퍼라제로 모두 로딩된 LNP8, LNP9, 또는 LNP2의 단일 투여 후 마우스의 간에서 반딧불 루시퍼라제 발현의 비교를 제공한다. LNP8은 어느 한쪽 정맥내로 (IV) 또는 종양내로 (IT) 동물에게 투여되었다. LNP9 및 LNP2는 정맥내로 동물에게 투여되었다. 대조군 동물은 PBS의 투여를 받았다. **도 5a**에서, 루시퍼라제 발현은 (대조군으로 정규화된) % 광도로서 도시된다. **도 5b**에서, 루시퍼라제 발현은 평균 광도로서 도시된다. 두 도면 모두에서, 각 기호는 하나의 측정된 기관을 나타내고 오차 막대는 평균의 표준 오차를 나타낸다.

도 6a 및 **6b**는 (임의의 VEE 레플리콘이 없는 mRNA (RNA-VEE 없음) 및 인코딩 반딧불 루시퍼라제로 모두 로딩된) LNP8, LNP9, 또는 LNP2의 단일 정맥내 투여 후 마우스의 간에서 반딧불 루시퍼라제 발현의 비교를 제공한다. 대조군 동물은 PBS의 투여를 받았다. **도 6a**에서, 루시퍼라제 발현은 (대조군으로 정규화된) % 광도로서 도시된다. **도 6b**에서, 루시퍼라제 발현은 평균 광도로서 도시된다. 두 도면 모두에서, 각 기호는 하나의 측정된 기관을 나타내고 오차 막대는 평균의 표준 오차를 나타낸다. LNP 대 대조군 그룹 사이 생물발광 강도에서의 차이는 양측 독립 스튜던트 t-테스트 (N=5)를 사용하여 통계적으로 분석되었다.

도 7a 및 **7b**는 어느 한쪽 (a) 임의의 VEE 레플리콘이 없는 mRNA (RNA-VEE 없음) 및 인코딩 반딧불 루시퍼라제로 로딩된 LNP8 또는 (b) VEE 레플리콘이 있는 mRNA 및 인코딩 반딧불 루시퍼라제로 로딩된 LNP8로 단일 투여 후 마우스의 간에서 반딧불 루시퍼라제 발현의 비교를 제공한다. **도 7a**에서, 루시퍼라제 발현은 (대조군으로 정규화된 % 광도로서 도시된다. **도 7b**에서, 루시퍼라제 발현은 평균 광도로서 도시된다. 두 도면 모두에서, 각 기호는 하나의 측정된 기관을 나타내고 오차 막대는 평균의 표준 오차를 나타낸다. LNP 대 대조군 그룹 사이 생물발광 강도에서의 차이는 양측 독립 스튜던트 t-테스트를 사용하여 통계적으로 분석되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0036] 본 개시내용의 상세한 설명

[0037] 본 개시내용은 지질 나노입자 (LNP) 및 대상체에서 페이로드 (*예를 들면*, 이종 단백질)를 선택적으로 전달하기 위한 이러한 LNP의 용도에 관한 것이다. 더욱 구체적으로, 본 개시내용의 LNP는 (i) 하나 이상 유형의 지질, 및 (ii) 베네수엘라 말 뇌염 (VEE) 바이러스로부터 유래된 레플리콘 ("VEE 레플리콘")을 포함하며, 여기서 VEE 레플리콘은 페이로드를 인코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 본원에 입증된 대로, 일부 양태에서, 대상체에게 투여되는 경우, 본원에 기재된 LNP는 대상체의 간 내에서 인코딩된 페이로드의 발현을 선택적으로 회피 및/또는 예방할 수 있다. 따라서, 일부 양태에서, 본 개시내용의 LNP는 당업계에서 이용가능한 다른 전달 플랫폼과 비교하여 감소된 간 독성과 연관된다. 본 개시내용의 추가의 양태는 본 출원 전체에 걸쳐 제공된다.

[0038] 본 개시내용이 더욱 상세히 기재되기 전에, 이러한 것이 물론 다양할 수 있음에 따라, 본 개시내용이 기재된 특정한 조성 또는 공정 단계로 제한되지 않음이 이해되어야 한다. 본 개시내용 판독시 당업자에게 명백할 바와 같이, 본원에 기재되고 실례된 개별 양태들의 각각은 본 개시내용의 범위 또는 정신에서 이탈 없이 다른 몇몇 양태들 중 임의의 것의 속성에서 용이하게 분리될 수 있거나 이와 조합될 수 있는 별개 구성요소 및 속성을 갖는다. 임의의 언급된 방법은 언급된 이벤트의 순서대로 또는 논리적으로 가능한 임의의 다른 순서대로 실시될 수 있다.

[0039] 본원에 제공된 제목은 전체로서 본 명세서를 참조하여 정의될 수 있는 본 개시내용의 다양한 양태의 제한이 아니다. 본 개시내용의 범위가 첨부된 청구항에 의해서만 제한되기 때문에, 본원에 사용된 용어가 특정한 양태만을 설명하기 위한 것이고, 제한되도록 의도되지 않음이 또한 이해되어야 한다.

[0040] **I. 정의**

[0041] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 본 개시내용이 속하는 당업계에서 숙련가에 의해 흔히 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 충돌의 경우, 정의를 포함하여, 본 출원이 지배할 것이다. 문맥에 의해 달리 요구되지 않는 한, 단수형 용어는 복수형을 포함할 수 있고 복수형 용어는 단수형을 포함할 수 있다.

[0042] 본 개시내용 전체에 걸쳐, 용어 "**한**" 또는 "**하나**" 독립체는 그 독립체의 하나 이상을 지칭하고; 예를 들어, "한 폴리뉴클레오티드"는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 나타내는 것으로 이해된다. 이와 같이, 용어 "한" (또는 "하나"), "하나 이상", 및 "적어도 하나"는 본원에 교환가능하게 사용될 수 있다.

[0043] 또한, 본원에 사용된 바와 같이 "**및/또는**"은 다른 것이 있든 없든 2개 특정된 속성 또는 구성요소의 각각의 특정 개시내용으로서 간주되어야 한다. 따라서, 본원에 문구 예컨대 "A 및/또는 B"에서 사용된 경우에 용어 "및/

또는"은 "A 및 B", "A 또는 B", "A" (단독), 및 "B" (단독)를 포함하도록 의도된다. 마찬가지로, 문구 예컨대 "A, B, 및/또는 C"에서 사용된 경우에 용어 "및/또는"은 하기 양태들의 각각을 포괄하도록 의도된다: A, B, 및 C; A, B, 또는 C; A 또는 C; A 또는 B; B 또는 C; A 및 C; A 및 B; B 및 C; A (단독); B (단독); 및 C (단독).

[0044] 어떤 양태가 언어 "**포함하는**"으로 본원에 기재되어도, "**으로 이루어지는**" 및/또는 "**으로 본질적으로 이루어지는**"의 측면에서 기재된 달리 유사한 양태가 또한 제공됨이 이해된다.

[0045] 용어 "**약**"은 본원에 대략, 대충, 대강, 또는 그의 영역을 의미하는 데 사용된다. 용어가 숫자적 범위와 공동으로 사용되는 때, 숫자적 값 위 및 아래 경계를 확장시킴으로써 그 범위를 수정한다. 일반적으로, 용어 "약"은 본원에, 달리 지시되지 않는 한, 명시된 값 위 및 아래 숫자적 값을 위 또는 아래 (더 높거나 더 낮은) 10 퍼센트의 분산에 의해 수정하는데 사용된다.

[0046] 숫자 또는 일련의 숫자에 앞서 용어 "**적어도**"는, 문맥으로부터 명백한 대로, 용어 "적어도"에 인접한 숫자, 및 논리적으로 포함될 수 있는 모든 후속 숫자 또는 정수를 포함하도록 이해된다. 예를 들어, 핵산 분자에서 뉴클레오티드의 수는 정수이어야 한다. 예를 들어, "21-뉴클레오티드 핵산 분자의 적어도 18개 뉴클레오티드"는 18, 19, 20, 또는 21개 뉴클레오티드가 지시된 특성을 가짐을 의미한다. 적어도 일련의 숫자 또는 범위 앞에 존재하는 때, "적어도"가 일련으로 또는 범위로 각 숫자를 수정할 수 있음이 이해된다. "적어도"는 정수로 또한 제한되지 않는다 (*예를 들면,* "적어도 5%"는 유효 자릿수의 고려 없이 5.0%, 5.1%, 5.18%를 포함한다.

[0047] 용어 "**에서 유래된**"은, 본원에 사용된 바와 같이, 특정된 분자 또는 유기체에서 단리되거나 이를 사용하여 만들어지는 구성요소, 또는 특정된 분자 또는 유기체로부터 정보 (*예를 들면,* 아미노산 또는 핵산 서열)를 지칭한다. 예를 들어, 제2 핵산 서열에서 유래되는 핵산 서열은 제2 핵산 서열의 뉴클레오티드 서열과 동일하거나 실질적으로 비슷한 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 뉴클레오티드 또는 폴리펩티드의 경우에, 유래된 종은, 예를 들어, 자연 발생 돌연변이유발, 인공 유도 돌연변이유발 또는 인공 랜덤 돌연변이유발에 의해 수득될 수 있다. 뉴클레오티드 또는 폴리펩티드를 유래하는데 사용된 돌연변이유발은 의도적으로 유도될 수 있거나 의도적으로 랜덤일 수 있거나, 각각의 혼합일 수 있다. 첫번째 것에서 유래된 상이한 뉴클레오티드 또는 폴리펩티드를 창출하기 위한 뉴클레오티드 또는 폴리펩티드의 돌연변이유발은 (*예를 들면,* 폴리머라제 불신에 의해 야기된) 랜덤 이벤트일 수 있고 유래된 뉴클레오티드 또는 폴리펩티드의 식별은, *예를 들면,* 본원에 논의된 대로 적절한 스크리닝 방법에 의해 이루어질 수 있다. 일부 양태에서, 제2 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열에서 유래되는 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열은 각각 제2 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열과 적어도 약 50%, 적어도 약 51%, 적어도 약 52%, 적어도 약 53%, 적어도 약 54%, 적어도 약 55%, 적어도 약 56%, 적어도 약 57%, 적어도 약 58%, 적어도 약 59%, 적어도 약 60%, 적어도 약 61%, 적어도 약 62%, 적어도 약 63%, 적어도 약 64%, 적어도 약 65%, 적어도 약 66%, 적어도 약 67%, 적어도 약 68%, 적어도 약 69%, 적어도 약 70%, 적어도 약 71%, 적어도 약 72%, 적어도 약 73%, 적어도 약 74%, 적어도 약 75%, 적어도 약 76%, 적어도 약 77%, 적어도 약 78%, 적어도 약 79%, 적어도 약 80%, 적어도 약 81%, 적어도 약 82%, 적어도 약 83%, 적어도 약 84%, 적어도 약 85%, 적어도 약 86%, 적어도 약 87%, 적어도 약 88%, 적어도 약 89%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 약 100%의 서열 동일성을 갖고, 여기서 제1 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열은 제2 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열의 생물학적 활성을 보유한다.

[0048] "**핵산**", "**핵산 분자**", "**뉴클레오티드 서열**", "**핵산 서열**", "**폴리뉴클레오티드**", 및 이의 문법적 이형은 교환가능하게 사용되고 어느 한쪽 단일 가닥 형태, 또는 이중-가닥 나선으로 리보뉴클레오시드 (아데노신, 구아노신, 우리딘 또는 시티딘; "RNA 분자") 또는 데옥시리보뉴클레오시드 (데옥시아데노신, 데옥시구아노신, 데옥시티미딘, 또는 데옥시시티딘; "DNA 분자")의 포스페이트 에스테르 중합체성 형태, 또는 이의 임의의 포스포에스테르 유사체, 예컨대 포스포로티오에이트 및 티오에스테르를 지칭한다. 단일 가닥 핵산 서열은 단일-가닥 DNA (ssDNA) 또는 단일-가닥 RNA (ssRNA)를 지칭한다. 이중 가닥 DNA-DNA, DNA-RNA 및 RNA-RNA 나선은 가능하다. 용어 핵산 분자, 및 특히 DNA 또는 RNA 분자는 분자의 1차 및 2차 구조만을 지칭하고, 임의의 특정한 3차 형태로 이것을 제한하지 않는다. 따라서, 이 용어는, *특히,* 선형 또는 원형 DNA 분자 (*예를 들면,* 제한 단편), 플라스미드, 초나선 DNA 및 염색체에서 발견된 이중-가닥 DNA를 포함한다. 특정한 이중-가닥 DNA 분자의 구조 논의에서, 서열은 DNA의 비-전사된 가닥 (*즉,* mRNA와 상동인 서열을 갖는 가닥)을 따라 5'에서 3' 방향으로 서열만을 제공하는 일반 관례에 따라 본원에 기재될 수 있다. "재조합 DNA 분자"는 분자 생물학적 조작을 거친 DNA 분자이다. DNA는, 비제한적으로,cDNA, 게놈성 DNA, 플라스미드 DNA, 합성 DNA, 및 절반-합성 DNA를 포함한다. 본 개시내용의 "핵산 조성물"은 본원에 기재된 경우에 하나 이상의 핵산을 포함한다. 본원에 기재된 경우에, 본 개시내용의 폴리뉴클레오티드는 DNA, RNA, 또는 둘 모두를 포함한다. 일부 양태에서, 용어 "폴리뉴클레오티드"는

폴리데옥시리보뉴클레오티드 (2-데옥시-D-리보스 함유), 스플라이싱되든 스플라이싱되지 않든, tRNA, rRNA, shRNA, siRNA, miRNA 및 mRNA를 포함하는, 폴리리보뉴클레오티드 (D-리보스 함유), 퓨린 또는 피리미딘 염기의 N- 또는 C-글리코시드인 폴리뉴클레오티드의 임의의 다른 유형, 및 노르무클레오티딕 백본을 함유하는 다른 중합체, 예를 들어, 폴리아미드 (*예를 들면*, 펩티드 핵산 "PNA") 및 폴리모르폴리노 중합체, 및 다른 합성 서열-특이적 핵산 중합체를 포함하고 다만 중합체는 염기 짝짓기 및 염기 스택킹을 허용하는, 예컨대 DNA 및 RNA에서 발견되는 구성에서 핵염기를 함유한다.

[0049] 용어 "**레플리콘**"은, 본원에 사용된 바와 같이, 관심의 세포에서 폴리뉴클레오티드의 복제를 허용하는 복제의 기원을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 지칭한다. 본원에 추가로 기재된 경우에, 일부 양태에서, 레플리콘은 자가-복제 mRNA이다 (*즉*, 표적 세포 내에서 이의 자체 증폭 또는 복제를 유도할 수 있다) (또한 본원에 "**repRNA**" 또는 "**RNA-VEE**"로서 지칭됨). 이의 자체 증폭을 유도하기 위해, RNA 분자는 RNA 증폭을 촉매화시키는데 필요한 효소(들) (예를 들면, 알파바이러스 비구조적 단백질 nsP1, nsP2, nsP3, nsP4)를 인코딩해야 하고 또한 인코딩된 효소(들)에 의해 인식되고 활용되는 복제에 필요한 시스 RNA 서열을 함유해야 한다. 알파바이러스 RNA 벡터 레플리콘은 하기 순서화된 요소를 함유해야 한다: 비구조적 단백질-매개된 증폭에 필요한 5' 바이러스성 또는 세포성 서열 (5'CSE, 또는 5' 시스 복제 서열, 또는 복제를 위하여 시스로 필요한 5' 바이러스성 서열, 또는 알파바이러스의 전사를 개시할 수 있는 5' 서열로서 또한 지칭될 수 있음), 발현되는 경우, 생물학적으로 활성 알파바이러스 비구조적 단백질 (예를 들면, nsP1, nsP2, nsP3, nsP4)에 대하여 코딩하는 서열, 및 비구조적 단백질-매개 증폭에 필요한 3' 바이러스성 또는 세포성 서열 (3'CSE, 또는 복제를 위하여 시스로 필요한 3' 바이러스성 서열, 또는 알파바이러스 RNA 폴리머라제 인식 서열로서 또한 지칭될 수 있음). 알파바이러스 RNA 벡터 레플리콘은 하나 이상의 이종 서열(들), 예컨대 예를 들어, 특정 양태에서, 서브게놈성 단편의 바이러스성 전사를 증가 또는 감소시키기 위해, 또는 결함적 헬퍼 또는 구조적 단백질 발현 카셋트와 상동성을 감소시키기 위해 변형될 수 있는 IRES 또는 바이러스성 (예를 들면, 알파바이러스성) 서브게놈성 프로모터 (예를 들면, 연접 영역 프로모터)를 발현시키기 위한 수단, 및 발현될 하나 이상의 이종 서열(들)을 함유할 수 있다. 레플리콘은 추가의 서열, 예를 들어, 하나 이상의 폴리펩티드 (예를 들면, 단백질-인코딩 유전자 또는 3' 근위 유전자) 및/또는 폴리아데닐레이트 관을 인코딩하는 하나 이상의 이종 서열(들)을 또한 함유할 수 있다. 레플리콘은 알파바이러스 구조적 단백질 (캡시드, E1, E2)의 모두를 인코딩하는 서열을 함유하지 않아야 한다. 레플리콘 벡터에 의해 발현될 수 있는 이종 서열의 비-제한적 예는, 예를 들어 본원에 그 전체가 참조로 포함된 미국 특허 번호 6,015,686에 기재되고, 예를 들어, 항원, 림포카인, 사이토카인, 등을 포함한다. 본 개시내용으로부터 명백한 대로, 본원에 제공된 VEE 레플리콘은 repRNA이다. 따라서, "VEE 레플리콘", "RNA-VEE", 및 "repRNA"는 본 출원에서 교환가능하게 사용된다. 추가적으로, 용어 "임의의 VEE 레플리콘이 없는 mRNA", "임의의 VEE 레플리콘이 없는 RNA", 및 "RNA- VEE 없음"은 용어 "modRNA"와 교환가능하게 본원에 사용된다.

[0050] 용어 "**약학적으로 허용가능한 담체**", "약학적으로 허용가능한 부형제", 및 이의 문법적 이형은 인간을 포함하는 동물에서 사용을 위하여 미국 연방 정부의 규제 기관에 의해 승인되거나 미국 약전에서 나열된 임의의 제제, 뿐만 아니라 대상체에게 조성물의 투여를 금지하는 정도로 바람직하지 않은 생리학적 효과의 생산을 야기하지 않고 투여된 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 폐지하지 않는 임의의 담체 또는 희석제를 포괄한다. 약학적 조성물 제조하기에서 유용하고 일반적으로 안전하고, 비-독성이고, 바람직한 부형제 및 담체가 포함된다.

[0051] 본원에 사용된 용어 "**약학적 조성물**"은 하나 이상의 다른 화학적 구성요소, 예컨대 약학적으로 허용가능한 담체 및 부형제와 혼합 또는 섞이거나, 이에 현탁된 본원에 기재된 화합물, 예컨대, *예를 들면*, 본 개시내용의 폴리뉴클레오티드 중 하나 이상을 지칭한다.

[0052] 용어 "**폴리펩티드**", "**펩티드**", 및 "**단백질**"은, *예를 들면*, 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드에 의해 인코딩되는 임의의 길이의 아미노산의 중합체를 지칭하기 위해 본원에 교환가능하게 사용된다. 중합체는 변형된 아미노산을 포함할 수 있다. 본 용어는 자연적으로 또는 개입; 예를 들어, 디술피드 결합 형성, 글리코실화, 지질화, 아세틸화, 인산화, 또는 임의의 다른 조작 또는 변형, 예컨대 라벨링 구성요소와 접합에 의해 변형된 아미노산 중합체를 또한 포괄한다. 예를 들어, 아미노산의 하나 이상의 유사체 (예를 들어, 비자연 아미노산 예컨대 호모시스테인, 오르니틴, p-아세틸페닐알라닌, D-아미노산, 및 크레아틴 포함), 뿐만 아니라 당업계에서 알려진 다른 변형을 함유하는 폴리펩티드가 정의 내에서 또한 포함된다. 용어 "폴리펩티드"는 본원에 사용된 바와 같이 임의의 크기, 구조, 또는 기능의 단백질, 폴리펩티드, 및 펩티드를 지칭한다.

[0053] 폴리펩티드는 유전자 산물, 자연 발생 폴리펩티드, 합성 폴리펩티드, 동족체, 오솔로그, 파라로그, 단편 및 다른 등가물, 변이체, 및 상기의 유사체를 포함한다.

[0054] 폴리펩티드는 단일 폴리펩티드일 수 있거나 다중-분자성 복합체 예컨대 이량체, 삼량체 또는 사량체일 수 있다. 이들은 단일 쇄 또는 다중-쇄 폴리펩티드를 또한 포함할 수 있다. 가장 흔히 디술피드 결합은 다중-쇄 폴리펩티드에서 발견된다. 용어 폴리펩티드는 하나 이상의 아미노산 잔기가 상응하는 자연 발생 아미노산의 인공 화학적 유사체인 아미노산 중합체에 또한 적용할 수 있다. 일부 양태에서, "펩티드"는 약 50개 이하 아미노산 길이, *예를 들면*, 약 5, 약 10, 약 15, 약 20, 약 25, 약 30, 약 35, 약 40, 약 45, 또는 약 50개 아미노산 길이일 수 있다.

[0055] 용어 "**코딩 서열**" 또는 서열 "**인코딩**"은 본원에 특정한 단백질, *예를 들면*, 예컨대 IL-12를 "인코딩하는" DNA 또는 RNA 영역 (전사된 영역)을 의미하는데 사용된다. 코딩 서열은, 적절한 조절성 영역, 예컨대 프로모터의 제어 하에 배치되는 경우, *시험관내* 또는 *생체내*, 폴리펩티드로 전사되고 (DNA) 번역된다 (RNA). 코딩 서열의 경계는 5' (아미노) 말단에서 시작 코돈 및 3' (카르복시) 말단에서 번역 정지 코돈에 의해 결정된다. 코딩 서열은, 비제한적으로, 원핵생물 또는 진핵생물로부터 cDNA, 원핵생물 또는 진핵생물로부터 게놈성 DNA, 및 합성 DNA 서열을 포함할 수 있다. 전사 종결 서열은 코딩 서열에 대해 3' 위치될 수 있다.

[0056] 코작 공통 서열, 코작 공통 또는 코작 서열은 진핵성 mRNA에서 발생하는 서열로서 알려지고 공통 (gcc)gccRccAUGG (서열번호: 174)를 갖고, 여기에서 R은 또 다른 "G"가 뒤따르는 시작 코돈 (AUG)의 상류에 퓨린 (아데닌 또는 구아닌) 3개 염기이다. 일부 양태에서, 폴리뉴클레오티드는 코작 공통 서열과 적어도 약 95% 이상, *예를 들면*, 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함한다. 일부 양태에서, 폴리뉴클레오티드는 코작 공통 서열을 포함한다.

[0057] 용어 "**RNA**"는 본원에 적어도 하나의 리보뉴클레오티드 잔기를 포함하는 분자를 의미하는데 사용된다. "**리보뉴클레오티드**"는 β-D-리보푸라노실 기의 2'-위치에서 히드록실 기가 있는 뉴클레오티드에 관한 것이다. 본 용어는 이중-가닥 RNA, 단일-가닥 RNA, 단리된 RNA 예컨대 부분적으로 또는 완전히 정제된 RNA, 본질적으로 순수한 RNA, 합성 RNA, 재조합으로 생성된 RNA를 포함하고 하나 이상의 뉴클레오티드의 부가, 결실, 치환 및/또는 변경에 의해 자연 발생 RNA와 상이하다. 용어 "**mRNA**"는 "**메신저-RNA**"를 의미하고 DNA 템플레이트를 사용함으로써 생성되고 펩티드 또는 단백질을 인코딩하는 "**전사물**"에 관한 것이다. 전형적으로, mRNA는 5'-UTR, 단백질 코딩 영역 및 3'-UTR을 포함한다. mRNA는 세포내 및 시험관내 제한된 반감기를 단지 소유한다. 본 개시내용의 맥락에서, mRNA는 DNA 템플레이트로부터 시험관내 전사에 의해 생성될 수 있다. 시험관내 전사 방법론은 당업자에게 알려진다. 예를 들어, 상업적으로 이용가능한 다양한 시험관내 전사 키트가 있다. 본 개시내용의 일부 양태에서, RNA, 바람직하게는 mRNA는 5'-캡 구조로 변형된다.

[0058] 본원에 사용된 용어 "**동일성**" (*예를 들면*, 서열 동일성)은 중합체성 분자들 사이, *예를 들면*, 폴리뉴클레오티드 분자들 사이 전반적 단량체 보존을 지칭한다. 임의의 추가의 한정사 없이 용어 "동일한", *예를 들면*, 폴리뉴클레오티드 A가 폴리뉴클레오티드 B와 동일한 것은 폴리뉴클레오티드 서열이 100% 동일함 (100% 서열 동일성)을 암시한다. 2개 서열을, *예를 들면*, "70% 동일한" 것으로 기재하는 것은 이들을, *예를 들면*, "70% 서열 동일성"을 갖는 것으로서 기재하는 것과 동등하다.

[0059] 2개 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드 서열의 퍼센트 동일성의 계산은, 예를 들어, 최적 비교 목적을 위하여 2개 서열을 정렬함으로써 수행될 수 있다 (*예를 들면*, 갭은 최적의 정렬을 위하여 제1 및 제2 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드 서열 중 하나 또는 둘 모두에 도입될 수 있고 비-동일한 서열은 비교 목적을 위하여 무시될 수 있다). 일부 양태에서, 비교 목적을 위하여 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. 상응하는 아미노산 위치에서 아미노산, 또는 폴리뉴클레오티드의 경우에 염기는 그 다음 비교된다.

[0060] 제1 서열에서 한 위치가 제2 서열에서 상응하는 위치와 동일한 아미노산 또는 뉴클레오티드에 의해 점유되는 때, 분자는 그 위치에서 동일하다. 2개 서열 사이 퍼센트 동일성은, 2개 서열의 최적 정렬을 위하여 도입될 필요가 있는, 갭의 수, 및 각 갭의 길이를 고려하여, 서열에 의해 공유된 동일한 위치의 수의 함수이다. 서열의 비교 및 2개 서열 사이 퍼센트 동일성은 수학적 알고리즘을 사용하여 성취될 수 있다.

[0061] 상이한 서열 (*예를 들면*, 폴리뉴클레오티드 서열)을 정렬하는데 사용될 수 있는 적합한 소프트웨어 프로그램은 다양한 출처에서 이용가능하다. 퍼센트 서열 동일성을 결정하기 위한 하나의 적합한 프로그램은 미국 정부의 국립 생명공학 정보 센터 BLAST 웹사이트 (blast.ncbi.nlm.nih.gov)에서 이용가능한 BLAST 프로그램 모음의 일부인 bl2seq이다. bl2seq는 어느 한쪽 BLASTN 또는 BLASTP 알고리즘을 사용하여 2개 서열 사이 비교를 수행한다. BLASTN은 핵산 서열을 비교하는데 사용되고, 한편 BLASTP는 아미노산 서열을 비교하는데 사용된다. 다른 적합한 프로그램은, *예를 들면*, EMBOSS 생물정보학 프로그램 모음의 일부이고 worldwideweb.ebi.ac.uk/Tools/psa에서

유럽 생물정보학 연구소 (EBI)에서 또한 이용가능한, Needle, Stretcher, Water, 또는 Matcher가 있다.

[0062] 서열 정렬은 당업계에서 알려진 방법 예컨대 MAFFT, Clustal (ClustalW, Clustal X 또는 Clustal Omega), MUSCLE, 등을 사용하여 실행될 수 있다.

[0063] 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 참조 서열과 정렬하는 단일 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 표적 서열 내에서 상이한 영역은 그들의 자체 퍼센트 서열 동일성을 각각 가질 수 있다. 퍼센트 서열 동일성 값은 가장 가까운 10분의 1로 반올림됨이 유의된다. 예를 들어, 80.11, 80.12, 80.13, 및 80.14는 80.1로 반올림되고, 한편 80.15, 80.16, 80.17, 80.18, 및 80.19는 80.2로 반올림된다. 길이 값이 항상 정수일 수 있음이 또한 유의된다.

[0064] 일부 양태에서, 제2 아미노산 서열 (또는 핵산 서열)에 대한 제1 아미노산 서열 (또는 핵산 서열)의 백분율 동일성 (%ID)은 %ID = 100 x (Y/Z)로서 계산되고, 식중 Y는 (시각적 검사 또는 특정한 서열 정렬 프로그램에 의해 정렬된 경우에) 제1 및 제2 서열의 정렬에서 동일한 매치로서 채점된 아미노산 잔기 (또는 핵염기)의 수이고 Z는 제2 서열에서 잔기의 총수이다. 제1 서열의 길이가 제2 서열보다 더 길면, 제2 서열에 대한 제1 서열의 퍼센트 동일성은 제1 서열에 대한 제2 서열의 퍼센트 동일성보다 더 높을 것이다.

[0065] 당업자는 퍼센트 서열 동일성의 계산을 위한 서열 정렬의 생성이 1차 서열 데이터에 의해 배타적으로 구동된 2진 서열-서열 비교로 제한되지 않음을 이해할 것이다. 서열 정렬이 서열 데이터를 이질적 소스로부터 데이터 예컨대 구조적 데이터 (*예를 들면,* 결정학적 단백질 구조), 기능적 데이터 (*예를 들면,* 돌연변이의 자리), 또는 계통학적 데이터와 통합시킴으로써 생성될 수 있음이 또한 이해될 것이다. 다중 서열 정렬을 생성하기 위해 이질적 데이터를 통합하는 적합한 프로그램은 www.tcoffee.org에서 이용가능하고, 대안적으로, *예를 들면,* EBI로부터 이용가능한 T-Coffee이다. 퍼센트 서열 동일성을 계산하는데 사용된 최종 정렬이 어느 한쪽 자동으로 또는 수동으로 큐레이션될 수 있음이 또한 이해될 것이다.

[0066] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "**단리된**", "**정제된**", "**추출된**", 및 이의 문법적 이형은 교환가능하게 사용되고 하나 이상의 정제 과정을 거친 본 개시내용의 원하는 조성물, 예를 들면, 본 개시내용의 폴리뉴클레오티드의 한 제조물의 상태를 지칭한다. 일부 양태에서, 본원에 사용된 바와 같은 단리 또는 정제는 오염물을 함유하는 샘플로부터 본 개시내용의 조성물을 제거, 부분적으로 제거하는 것 (*예를 들면,* 한 분획)의 공정이다.

[0067] 본원에 사용된 용어 "**발현**"은 폴리뉴클레오티드가 유전자 산물, *예를 들면,* RNA 또는 폴리펩티드 (*예를 들면,* 치료적 단백질, *예를 들면,* 코로나바이러스 단백질)를 생산하는 공정을 지칭한다. 이는 제한 없이 폴리뉴클레오티드의 마이크로 RNA 결합 부위, 작은 헤어핀 RNA (shRNA), 작은 간섭 RNA (siRNA), 또는 임의의 다른 RNA 산물로의 전사를 포함한다. 이는, 제한 없이, 폴리뉴클레오티드의 메신저 RNA (mRNA)로의 전사, 및 mRNA의 폴리펩티드로의 번역을 포함한다. 발현은 "유전자 산물"을 생산한다. 본원에 사용된 바와 같이, 유전자 산물은, *예를 들면,* 핵산, 예컨대 유전자의 전사에 의해 생산된 RNA일 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 유전자 산물은 어느 한쪽 유전자의 전사에 의해 생산된 핵산, RNA 또는 miRNA, 또는 전사물로부터 번역되는 폴리펩티드일 수 있다. 본원에 기재된 유전자 산물은 전사후 변형, *예를 들면,* 폴리아데닐화 또는 스플라이싱이 있는 핵산, 또는 번역후 변형, *예를 들면,* 인산화, 메틸화, 글리코실화, 지질의 첨가, 다른 단백질 서브유닛과의 결합, 또는 단백질분해성 절단이 있는 폴리펩티드를 추가로 포함한다.

[0068] 더 큰 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드, 각각의 부분인 폴리펩티드 모이어티 또는 폴리뉴클레오티드 모이어티에 관하여 "**이종**"은 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드 분자의 나머지 부분과 상이한 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드에서 기원하는 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드를 기재한다. 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드의 추가의 이종 구성요소는 본원에 기재된 남은 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드, 각각과 동일한 유기체에서 기원할 수 있거나, 추가의 구성요소는 상이한 유기체에서 나올 수 있다. 예를 들어, 이종 폴리펩티드는 합성일 수 있거나, 상이한 종, 개체의 상이한 세포 유형, 또는 별개 개체의 세포의 동일하거나 상이한 유형에서 유래될 수 있다. 본원에 기재된 경우에, 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드의 ORF에 의해 인코딩된 단백질 (또는 폴리펩티드)은 폴리뉴클레오티드와 이종이다.

[0069] 용어 "**반감기**"는 분자의 활성, 양 또는 수의 절반을 제거하는데 필요한 기간에 관한 것이다. 본 개시내용의 맥락에서, RNA의 반감기는 상기 RNA의 안정성을 나타낸다. 질환의 "**발달**" 또는 "**진행**"은 질환의 초기 증상 및/또는 그에 따른 진행을 의미한다. 질환의 발달은 당업계에서 잘 알려진 대로 표준 임상 기법을 사용하여 검출 및 평가될 수 있다. 하지만, 발달은 예측할 수 없는 진행을 또한 지칭한다. 본원에 사용된 바와 같이, 발달 또는 진행은 증상의 생물학적 과정을 지칭한다. 발달은 발생, 재발, 및 발병을 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이,

표적 질환 또는 장애의 발병 또는 발생은 초기 발병 및/또는 재발을 포함한다.

[0070] **II. 본 개시내용의 방법**

[0071] ***II.A. 선택적 발현의 방법***

[0072] 본 개시내용은 일반적으로 지질 나노입자 (LNP)를 사용하여 세포에 페이로드 (또한 본원에 "생물학적으로 활성 분자"로서 지칭됨)의 전달에 관한 것이다. 본 개시내용에 유용한 LNP는 LNP가 조직-특이적 향성을 나타내도록 변형되거나 조작되었다. 본원에 사용된 바와 같이, "**조직-특이적 향성**"은 다른 조직을 표적화하지 않으면서 특이적 조직을 표적화하는 LNP의 능력을 지칭한다. 예를 들어, 본원에 입증된 대로, 본원에 기재된 LNP는 간에서 아닌 비-간 조직 (*예를 들면*, 비장 및 폐)에서 페이로드의 발현을 유도할 수 있다. 임의의 하나의 이론에 의해 구속되지 않고, 출원인은 베네수엘라 말 뇌염 (VEE) 바이러스로부터 유래된 레플리콘 ("**VEE 레플리콘**")을 포함하도록 LNP를 변형 또는 조작하는 것이 페이로드의 발현을 간에서 회피되거나 감소시키도록 페이로드의 선택적 전달을 허용함을 확인하였다.

[0073] 따라서, 일부 양태에서, 발현의 감소 또는 회피를 필요로 하는 대상체의 간에서 페이로드 (*예를 들면*, 이종 단백질)의 발현을 감소 또는 회피하는 방법이 본원에 제공되며, 이는 (i) 하나 이상 유형의 지질, 및 (ii) 베네수엘라 말 뇌염 (VEE) 바이러스로부터 유래된 레플리콘 ("VEE 레플리콘") -여기서 VEE 레플리콘은 페이로드를 인코딩하는 핵산 서열을 포함함-을 포함하는 지질 나노입자를 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.

[0074] 일부 양태에서, 페이로드의 발현은 전적으로 회피된다 (*즉*, 페이로드는 투여 후 간에서 발현되지 않는다). 일부 양태에서, 간에서 페이로드의 발현은 대상체 내에서 비-간 조직 (*예를 들면*, 비장 및 폐)과 비교하여 감소된다. 예를 들어, 일부 양태에서, 투여 후, 간에서 페이로드의 발현은 비-간 조직에서 상응하는 발현과 비교하여 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 또는 약 100%만큼 감소된다. 일부 양태에서, 간에서 페이로드의 발현은 참조 대상체 (*예를 들면*, VEE 레플리콘을 포함하지 않는 상응하는 지질 나노입자를 받았던 대상체)의 간에서 페이로드의 발현과 비교하여 감소된다. 일부 양태에서, 투여 후, 간에서 페이로드의 발현은 참조 대상체의 간에서 상응하는 발현과 비교하여 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 또는 약 100%만큼 감소된다.

[0075] 본원에 사용된 바와 같이, "**발현 감소하기**"는 (i) 조직 (*예를 들면*, 간)에서 발현되는 페이로드의 총량에서의 감소; (ii) 페이로드가 조직 (*예를 들면*, 간)에서 얼마나 오래 발현되는지 (*즉*, 지속기간)의 감소; 또는 (iii) (i) 및 (ii) 둘 모두를 지칭한다.

[0076] 따라서, 일부 양태에서, 본원에 기재된 (*예를 들면*, 페이로드를 인코딩하는 VEE 레플리콘을 포함하는) LNP의 투여 후, 간에서 발현되는 페이로드의 총량은 비-간 조직 (*예를 들면*, 비장 및 폐)과 비교하여 감소된다. 일부 양태에서, 간에서 발현되는 페이로드의 총량은 비-간 조직에서 상응하는 양과 비교하여 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 또는 약 100%만큼 감소된다. 일부 양태에서, 간에서 발현되는 페이로드의 총량은 참조 대상체 (*예를 들면*, VEE 레플리콘을 포함하지 않는 상응하는 지질 나노입자를 받았던 대상체)의 간에서 발현되는 페이로드의 총량과 비교하여 감소된다. 일부 양태에서, 본원에 기재된 (*예를 들면*, 페이로드를 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 VEE 레플리콘을 포함하는) LNP의 투여 후, 간에서 발현되는 페이로드의 총량은 참조 대상체의 간에서 상응하는 양과 비교하여 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 또는 약 100%만큼 감소된다.

[0077] 본원에 기재된 경우에, 일부 양태에서, 본원에 기재된 (*예를 들면*, 페이로드를 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 VEE 레플리콘을 포함하는) LNP의 투여 후, 페이로드는, *예를 들면*, 비-간 조직에서 상응하는 발현 및/또는 참조 대상체 (*예를 들면*, VEE 레플리콘을 포함하지 않는 상응하는 지질 나노입자를 받았던 대상체)의 간에서 상응하는 발현과 비교하여 간에서 단지 일시적으로 발현된다. 따라서, 일부 양태에서, 본 개시내용의 LNP를 투여하는 것은 비-간 조직 (*예를 들면*, 비장 및 폐)과 비교하여 간에서 페이로드 발현의 감소된 지속기간을 초래한다. 일부 양태에서, 간에서 페이로드 발현의 지속기간은 비-간 조직에서 상응하는 지속기간과 비교하여 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 또는 약 100%만큼 감소된다. 일부 양태에서, 치료를 필요로 하는 대상

체에게 본원에 기재된 (*예를 들면*, 페이로드를 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 VEE 레플리콘을 포함하는) LNP의 투여 후, 대상체의 간에서 페이로드 발현의 지속기간은 참조 대상체 (*예를 들면*, VEE 레플리콘을 포함하지 않는 상응하는 지질 나노입자를 받았던 대상체)의 간에서 페이로드 발현의 지속기간과 비교하여 감소된다. 일부 양태에서, 대상체의 간에서 페이로드 발현의 지속기간은 참조 대상체의 간에서 상응하는 지속기간과 비교하여 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 또는 약 100%만큼 감소된다.

[0078] 일부 양태에서, 본원에 기재된 LNP (*예를 들면*, 페이로드를 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 VEE 레플리콘을 포함함)의 투여 후, (i) 발현되는 페이로드의 총량 및 (ii) 페이로드 발현의 지속기간 둘 모두는 비-간 조직 (*예를 들면*, 비장 및 폐)과 비교하여 간에서 감소된다. 일부 양태에서, (i) 발현되는 페이로드의 총량 및 (ii) 페이로드 발현의 지속기간 둘 모두는 비-간 조직에서 상응하는 값과 비교하여 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 또는 약 100%만큼 감소된다. 일부 양태에서, 본원에 기재된 LNP (*예를 들면*, 페이로드를 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 VEE 레플리콘을 포함함)의 투여 후, (i) 발현되는 페이로드의 총량 및 (ii) 페이로드 발현의 지속기간 둘 모두는 참조 대상체 (*예를 들면*, VEE 레플리콘을 포함하지 않는 상응하는 지질 나노입자를 받았던 대상체)의 간에서 상응하는 값과 비교하여 간에서 감소된다. 일부 양태에서, (i) 발현되는 페이로드의 총량 및 (ii) 페이로드 발현의 지속기간 둘 모두는 참조 대상체의 간에서 상응하는 값과 비교하여 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 또는 약 100%만큼 감소된다.

[0079] 본 개시내용으로부터 명백한 대로, 일부 양태에서, 본원에 기재된 LNP는 참조 대상체 (*예를 들면*, VEE 레플리콘을 포함하지 않는 상응하는 지질 나노입자를 받았던 대상체)에서 상응하는 발현과 비교하여 비-림프양 조직에서 페이로드의 발현에 최소 효과를 갖는다. 따라서, 일부 양태에서, 투여 후, 대상체의 비-간 조직에서 발현되는 페이로드의 총량은 참조 대상체의 비-간 조직에서 관찰된 것과 비교하여 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 적어도 약 100% 또는 그 초과이다. 일부 양태에서, 본원에 기재된 LNP (*예를 들면*, VEE 레플리콘을 포함하지 않는 상응하는 지질 나노입자를 받았던 대상체) 투여하기후, 비-간 조직에서 페이로드 발현의 지속기간은 참조 대상체의 비-간 조직에서 관찰된 것과 비교하여 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 적어도 약 100%이다.

[0080] 적어도 상기 개시내용으로부터 명백한 대로, 본 개시내용의 일부 양태는 치료를 필요로 하는 대상체의 비-간 조직에서 페이로드 (*예를 들면*, 이종 단백질)를 선택적으로 발현시키는 방법에 관한 것이다. 일부 양태에서, 이러한 방법은 (i) 하나 이상 유형의 지질, 및 (ii) 베네수엘라 말 뇌염 (VEE) 바이러스로부터 유래된 레플리콘 ("VEE 레플리콘") -여기서 VEE 레플리콘은 페이로드를 인코딩하는 핵산 서열을 포함함-을 포함하는 지질 나노입자를 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하고, 투여 후, 간에서 페이로드 발현이 비-간 조직에서 상응하는 발현과 비교하여 감소된다. 본원에 추가로 기재된 경우에, 비-간 조직은 간 이외의 대상체 내에서 임의의 적합한 조직을 포함할 수 있다. 이러한 비-간 조직의 비-제한적 예는 비장, 폐, 또는 둘 모두를 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이, "**선택적 발현**" 또는 "**우선적 발현**", 또는 이의 문법적 이형은 제2 조직 (*예를 들면*, 간)과 비교하여 제1 조직 (*예를 들면*, 비-간 조직)에서 (*예를 들면*, 페이로드의) 증가된 발현을 지칭한다. 일부 양태에서, 페이로드는 비-간 조직에서 선택적으로 또는 우선적으로 발현되고, 여기에서 비-간 조직에서 발현 (*예를 들면*, 페이로드의 총량 및/또는 페이로드 발현의 지속기간)은 간에서 상응하는 발현과 비교하여 증가된다. 일부 양태에서, 비-간 조직에서 페이로드의 발현은 대상체의 다른 비-간 조직에서 상응하는 발현과 동일하다. 일부 양태에서, 비-간 조직에서 페이로드의 발현은 대상체의 다른 비-간 조직에서 상응하는 발현과 비교하여 증가된다. 일부 양태에서, 비-간 조직에서 페이로드의 발현은 대상체에서 다른 비-간 조직과 비교하여 감소되지만 간에서 상응하는 발현과 비교하여 증가된다.

[0081] 본원에 입증된 대로, 일부 양태에서, 본 개시내용의 LNP는 간과 비교하여 비장에서 페이로드의 선택적 (또는 우선적) 발현 유도하기에 유용하다. 따라서, 일부 양태에서, 비장에서 발현된 페이로드의 총량은 간에서 관찰된 상응하는 양과 비교하여 적어도 약 1-배, 적어도 약 2-배, 적어도 약 3-배, 적어도 약 4-배, 적어도 약 5-배, 적어도 약 6-배, 적어도 약 7-배, 적어도 약 8-배, 적어도 약 9-배, 적어도 약 10-배, 적어도 약 15-배, 적어도 약 20-배, 적어도 약 25-배, 적어도 약 30-배, 적어도 약 35-배, 적어도 약 40-배, 적어도 약 45-배, 적어도 약 50-배 초과, 적어도 약 75-배 초과, 또는 적어도 약 100-배 초과 또는 그 이상만큼 증가된다. 일부 양태에서,

비장에서 페이로드 발현의 지속기간은 간에서 관찰된 상응하는 지속기간과 비교하여 적어도 약 1-배, 적어도 약 2-배, 적어도 약 3-배, 적어도 약 4-배, 적어도 약 5-배, 적어도 약 6-배, 적어도 약 7-배, 적어도 약 8-배, 적어도 약 9-배, 적어도 약 10-배, 적어도 약 15-배, 적어도 약 20-배, 적어도 약 25-배, 적어도 약 30-배, 적어도 약 35-배, 적어도 약 40-배, 적어도 약 45-배, 적어도 약 50-배 초과, 적어도 약 75-배 초과, 또는 적어도 약 100-배 초과 또는 그 이상만큼 증가된다.

[0082] 본원에 또한 입증된 경우에, 일부 양태에서, 본 개시내용의 LNP는 간과 비교하여 폐에서 페이로드의 선택적 발현 유도하기에 유용하다. 따라서, 일부 양태에서, 폐에서 발현된 페이로드의 총량은 간에서 관찰된 상응하는 양과 비교하여 적어도 약 1-배, 적어도 약 2-배, 적어도 약 3-배, 적어도 약 4-배, 적어도 약 5-배, 적어도 약 6-배, 적어도 약 7-배, 적어도 약 8-배, 적어도 약 9-배, 적어도 약 10-배, 적어도 약 15-배, 적어도 약 20-배, 적어도 약 25-배, 적어도 약 30-배, 적어도 약 35-배, 적어도 약 40-배, 적어도 약 45-배, 적어도 약 50-배 초과, 적어도 약 75-배 초과, 또는 적어도 약 100-배 초과 또는 그 이상만큼 증가된다. 일부 양태에서, 폐에서 페이로드 발현의 지속기간은 간에서 관찰된 상응하는 지속기간과 비교하여 적어도 약 1-배, 적어도 약 2-배, 적어도 약 3-배, 적어도 약 4-배, 적어도 약 5-배, 적어도 약 6-배, 적어도 약 7-배, 적어도 약 8-배, 적어도 약 9-배, 적어도 약 10-배, 적어도 약 15-배, 적어도 약 20-배, 적어도 약 25-배, 적어도 약 30-배, 적어도 약 35-배, 적어도 약 40-배, 적어도 약 45-배, 적어도 약 50-배 초과, 적어도 약 75-배 초과, 또는 적어도 약 100-배 초과 또는 그 이상만큼 증가된다.

[0083] ***II.B. 치료 방법***

[0084] 본 개시내용으로부터 명백한 대로, 본원에 기재된 (예를 들면, 페이로드를 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 VEE 레플리콘을 포함하는) LNP는 광범위한 질환 또는 장애 치료하기에 유용할 수 있다. 따라서, 일부 양태에서, 치료를 필요로 하는 대상체에서 질환 또는 장애를 치료하는 방법이 본원에 제공되며, 이는 (i) 하나 이상 유형의 지질, 및 (ii) 베네수엘라 말 뇌염 (VEE) 바이러스로부터 유래된 레플리콘 ("VEE 레플리콘") -여기서 VEE 레플리콘은 페이로드를 인코딩하는 핵산 서열을 포함함-을 포함하는 지질 나노입자를 대상체에게 투여하는 것을 포함하고, 투여 후, 페이로드는 대상체의 비-간 조직에서 우선적으로 발현된다. 일부 양태에서, LNP의 투여 후, 비- 간 조직에서 발현되는 페이로드의 양은 대상체의 간에서 관찰된 상응하는 양보다 적어도 약 1-배, 적어도 약 2-배, 적어도 약 3-배, 적어도 약 4-배, 적어도 약 5-배, 적어도 약 6-배, 적어도 약 7-배, 적어도 약 8-배, 적어도 약 9-배, 적어도 약 10-배, 적어도 약 15-배, 적어도 약 20-배, 적어도 약 25-배, 적어도 약 30-배, 적어도 약 35-배, 적어도 약 40-배, 적어도 약 45-배, 적어도 약 50-배, 적어도 약 75-배, 또는 적어도 약 100-배 또는 더 크다. 일부 양태에서, LNP의 투여 후, 비-간 조직에서 페이로드 발현의 지속기간은 대상체의 간에서 관찰된 상응하는 지속기간보다 적어도 약 1-배, 적어도 약 2-배, 적어도 약 3-배, 적어도 약 4-배, 적어도 약 5-배, 적어도 약 6-배, 적어도 약 7-배, 적어도 약 8-배, 적어도 약 9-배, 적어도 약 10-배, 적어도 약 15-배, 적어도 약 20-배, 적어도 약 25-배, 적어도 약 30-배, 적어도 약 35-배, 적어도 약 40-배, 적어도 약 45-배, 적어도 약 50-배, 적어도 약 75-배, 또는 적어도 약 100-배 또는 더 크다.

[0085] 본원에 기재된 (*예를 들면*, 페이로드를 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는, VEE 레플리콘을 포함하는) LNP는 당업계에서 알려진 임의의 적합한 질환 또는 장애를 치료하는데 사용될 수 있다. 치료될 수 있는 질환 및 장애의 비-제한적 예는 암, 염증성 장애, 단일유전자성 장애, 신경학적 장애, 정신과적 장애, 또는 이들의 조합을 포함한다. 본 개시내용으로부터 명백한 대로, 일부 양태에서, 본원에 기재된 LNP는 면역 반응을 조절 (*예를 들면*, 증가 또는 감소)하는데 사용될 수 있다. 일부 양태에서, 본원에 기재된 LNP는 백신으로서 사용될 수 있다. 일부 양태에서, 질환 또는 장애는 암을 포함한다. 암의 비-제한적 예는 다음을 포함한다: 흑색종, 편평 세포 암, 소세포 폐 암, 비-소세포 폐 암, 폐의 선암종, 폐의 편평 암종, 복막의 암, 간세포성 암, 위장 암, 췌장 암, 교모세포종, 자궁경부 암, 난소 암, 간 암, 방광 암, 간종양, 유방 암, 결장 암, 결장직장 암, 자궁내막 또는 자궁 암, 타액선 암종, 신장 암, 전립선 암, 외음부 암, 갑상선 암, 간 암종, 위 암, 두경부 암, 또는 이들의 조합.

[0086] 본 개시내용에서 다른 곳에 추가로 기재된 경우에, 일부 양태에서, 당업계에서 이용가능한 다른 전달 플랫폼과 비교하여, 본원에 기재된 LNP는 감소된 바람직하지 않은 부작용과 증가된 안전성을 허용한다. 예를 들어, 많은 과거 LNP-기반 종양내 치료 접근법으로, 간 독성은 (*예를 들면*, 간 내에서 LNP의 축적으로 인해) 상당한 문제이었다. *예를 들면*, 그 전체가 본원에 참조로 포함되는, Jain *et al.*, *Nucleic Acid Ther* 28(5): 285-296 (Oct. 2018), *참조*. 임의의 하나의 이론에 의해 구속되지 않고, 일부 양태에서, 간 내에서 페이로드의 발현을 회피 또는 감소시킴으로써, 본원에 기재된 (*예를 들면*, 페이로드를 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는, VEE 레플리콘을 포함하는) LNP는 감소된 간 독성과 연관된다. 예를 들어, 일부 양태에서, 본원에 제공된 LNP의 투여 후, 참조 대상체 (*예를 들면*, 상응하는 LNP를 제공하였지만 VEE 레플리콘이 없는 대상체)와 비교하여 대상체에서 감소된

간 독성이 있다. 일부 양태에서, 대상체에서 간 독성은 참조 대상체의 것과 비교하여 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 또는 약 100%만큼 감소된다. 간 독성은 당업계에서 이용가능한 임의의 적합한 방법을 사용하여 측정될 수 있다. 일부 양태에서, 간 독성은 대상체의 일반 독성 평가 (*예를 들면*, 임상 관용 및 일반 건강 상태)를 실행함으로써 평가될 수 있다. 이러한 평가를 하는데 사용될 수 있는 비-제한 기준은 다음을 포함한다: 대상체의 활동, 음식 소비, 신체 점수 지수, 수화 상태, 및 이들의 조합. 일부 양태에서, 생물학적 샘플은 대상체 (*예를 들면*, 혈액 또는 혈청)로부터 수득될 수 있고 혈액학 및/또는 임상 화학은 실행될 수 있다. 예를 들어, 일부 양태에서, 간 트란스아미나제 (ALT/AST)의 수준, 총 빌리루빈, 혈청 알부민, 또는 이들의 조합은 측정될 수 있다. 이러한 측정은 간 독성을 평가하기 위해 참조 (*예를 들면*, 건강한 대상체에서 상응하는 양)과 비교될 수 있다. 일부 양태에서, 더욱 침습적 방법 (*예를 들면*, 간의 미시적 평가)는 또한 사용될 수 있다.

[0087] 당업자에게 명백할 대로, 일부 양태에서, 감소된 간 독성은 투여된 LNP의 더 큰 내약성을 허용할 수 있다. 따라서, 일부 양태에서, 내약성 증가를 필요로 하는 대상체에서 LNP-기반 요법의 내약성을 증가시키는 방법이 본원에 제공되며, 이는 (i) 하나 이상 유형의 지질, 및 (ii) 베네수엘라 말 뇌염 (VEE) 바이러스로부터 유래된 레플리콘 ("VEE 레플리콘") -여기서 VEE 레플리콘은 페이로드 (*예를 들면*, 이종 단백질)를 인코딩하는 핵산 서열을 포함함-을 포함하는 지질 나노입자를 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 일부 양태에서, 지질 나노입자-기반 요법의 내약성은 참조 대상체 (*예를 들면*, 상응하는 지질 나노입자를 받았지만 레플리콘이 VEE 레플리콘이 아닌 대상체)에서 관찰된 상응하는 내약성보다 적어도 약 2-배, 적어도 약 3-배, 적어도 약 4-배, 적어도 약 5-배, 적어도 약 6-배, 적어도 약 7-배, 적어도 약 8-배, 적어도 약 9-배, 적어도 약 10-배, 적어도 약 15-배, 적어도 약 20-배, 적어도 약 25-배, 적어도 약 30-배, 적어도 약 35-배, 적어도 약 40-배, 적어도 약 45-배, 또는 적어도 약 50-배 또는 초과만큼 대상체에서 증가된다.

[0088] 본 개시내용의 일부 양태에서, 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드, 벡터, 지질 나노입자, 및/또는 약학적 조성물 (또한 본원에 "조성물"로서 지칭됨)은 질환 또는 장애를 치료하는데 사용된다. 일부 양태에서, 질환 또는 장애는 암을 포함한다. 치료될 수 있는 암의 비-제한적 예는 본 개시내용에서 다른 곳에 제공된다.

[0089] 일부 양태에서, 본원에 기재된 LNP 또는 이러한 LNP를 포함하는 조성물 (또한 집합적으로 본원에 "**조성물**"로서 지칭됨) 중 임의의 것의 유효량은 적합한 루트, 예컨대 종양내 투여, 정맥내 투여 (*예를 들면*, 볼루스로서 또는 일정 기간 동안 연속 주입에 의해), 근육내, 복강내, 뇌척수막내, 피하, 관절내, 활막내, 척추내, 경구, 흡입, 또는 국부 루트를 통해 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여된다. 제트 분무기 및 초음파 분무기를 포함하는 액체 제형을 위한 상업적으로 이용가능한 분무기는 투여에 유용하다. 액체 제형은 분무될 수 있고 동결건조된 분말은 재구성후 분무될 수 있다. 일부 양태에서, 본원에 기재된 약학적 조성물은 플루오로카본 제형 및 정량 흡입기를 사용하여 에어로졸화되거나, 동결건조되고 밀링된 분말로서 흡입된다. 일부 양태에서, 본원에 기재된 약학적 조성물은 종양내 주사를 위하여 제형화된다. 일부 양태에서, 본원에 기재된 약학적 조성물은, 예를 들어, 국소 부위 예컨대 종양 부위 또는 감염성 부위에 주사된 국소 루트를 통해 대상체에게 투여된다. 일부 양태에서, 대상체는 인간이다.

[0090] 본 개시내용으로부터 명백할 대로, 일부 양태에서, 본원에 기재된 조성물은 어느 한쪽 단독으로 또는 하나 이상의 다른 활성 제제와 조합으로 치료적 효과를 부여하기 위해 유효량으로 대상체에게 투여된다. 일부 양태에서, 조성물은 암으로 고통받는 대상체에게 투여되고, 치료적 효과는 감소된 종양 부담, 암 세포의 감소, 증가된 면역 활성, 또는 이들의 조합을 포함한다. 투여된 조성물 (*예를 들면*, 지질 나노입자)이 치료적 효과를 달성하였는지는 당업계에서 알려진 임의의 적합한 방법 (*예를 들면*, 종양 부피 및/또는 T 세포 활성 측정하기)을 사용하여 결정될 수 있다. 유효량은, 당업자에 의해 인식된 대로, 치료되고 있는 특정한 병태, 병태의 중증도, 연령, 신체 조건, 크기, 성별 및 중량을 포함하는 개별 환자 파라미터, 치료의 지속기간, 병용 요법의 성격 (있다면), 특이적 투여 루트 및 건강 종사자의 전문 지식 내에서 유사 인자에 의존하여 다양하다.

[0091] 경험적 고려사항, 예컨대 반감기는 일반적으로 투약량의 결정에 기여할 것이다. 투여 빈도는 요법의 과정에 걸쳐 결정 및 조정될 수 있고, 일반적으로, 그러나 반드시는 아니고, 표적 질환/장애의 치료 및/또는 억압 및/또는 호전 및/또는 지연에 기반된다. 대안적으로, 본원에 기재된 조성물 (*예를 들면*, 지질 나노입자)의 지속된 연속 방출 제형은 적절할 수 있다. 지속된 방출을 달성하기 위한 다양한 제형 및 장치는 당업계에서 알려진다.

[0092] 본 개시내용의 일부 양태에서, 치료는 본원에 개시된 조성물의 단일 주사이다. 일부 양태에서, 단일 주사는 치료를 필요로 하는 대상체에게 종양내로 투여된다.

[0093] 본 개시내용의 일부 양태에서, 본원에 기재된 조성물에 대한 투약량은 조성물 (*예를 들면*, 본원에 기재된 지질

나노입자)의 하나 이상의 투여(들)가 주어진 개체에서 경험적으로 결정될 수 있다. 일부 양태에서, 개체는 본원에 기재된 조성물의 증분적 투약량이 주어진다. 본원에 조성물의 효능을 평가하기 위해, 질환/장애의 지표가 뒤따르게 될 수 있다. 병태에 의존하여, 수 일 또는 더 오랜 동안에 반복된 투여의 경우, 일부 양태에서, 치료는 증상의 원하는 억압이 발생하는 때까지 또는 충분한 치료적 수준이 표적 질환 또는 장애, 또는 이들의 증상을 경감하기 위해 달성되는 때까지 지속된다.

[0094] 본 개시내용의 일부 양태에서, 용량화 빈도는 매주 약 1회, 매 2 주 약 1회, 매 3 주 약 1회, 매 4 주 약 1회, 매 5 주 약 1회, 매 6 주 약 1회, 매 7 주 약 1회, 매 8 주 약 1회, 매 9 주 약 1회, 또는 매 10 주 약 1회; 또는 1 개월, 약 매 2 개월, 또는 약 매 3 개월, 또는 더 오랜 동안 약 1회이다. 사용된 본원에 기재된 조성물(*예를 들면*, 지질 나노입자)의 용량화 용법 (*예를 들면*, 투약량 및/또는 용량화 빈도)은 시간이 지남에 따라 다양할 수 있다.

[0095] 본 개시내용의 일부 양태에서, 본 방법은 본원에 기재된 조성물의 하나 또는 여러 용량을 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.

[0096] 조성물 (*예를 들면*, 본원에 기재된 지질 나노입자)의 적절한 투약량은 특정 조성물 (*예를 들면*, 지질 나노입자), 질환/장애 (*예를 들면*, 암)의 유형 및 중증도, 조성물 (*예를 들면*, 지질 나노입자)이 예방적 또는 치료적 목적으로 투여되는지 여부, 이전 요법, 조성물 (*예를 들면*, 지질 나노입자)에 대한 대상체의 임상 이력 및 반응, 그리고 주치의의 재량에 의존할 것이다. 일부 양태에서, 임상의는 원하는 결과를 달성하는 투약량이 도달되는 때까지 본원에 개시된 조성물을 투여할 수 있다. 일부 양태에서, 원하는 결과는 종양 부담에서의 감소, 암 세포에서의 감소, 또는 증가된 면역 활성이다. 본원에 기재된 하나 이상의 조성물의 투여는, 예를 들어, 수령자의 생리학적 조건, 투여의 목적이 치료적 또는 예방성인지 여부, 및 숙련된 의사에게 알려진 다른 인자에 따라 연속적 또는 간헐적일 수 있다. 본원에 기재된 조성물의 투여는 본질적으로 미리선택된 기간 동안 연속적일 수 있거나, *예를 들면*, 어느 한쪽 표적 질환 또는 장애의 발달하기 전에, 동안에, 또는 후에 일련의 간격을 둔 용량일 수 있다.

[0097] 본원에 사용된 바와 같이, 표적 질환/장애를 경감하는 것은 질환의 발달 또는 진행을 지연시키거나, 또는 질환의 중증도를 감소시키는 것을 포함한다. 질환을 경감시키는 것은 반드시 치유적 결과를 필요로 하는 것은 아니다. 본원에 사용된 바와 같이, 표적 질환 또는 장애의 발달을 "지연시키는 것"은 질환의 진행을 지체, 방해, 둔화, 지연, 안정화, 및/또는 연기하는 것을 의미한다. 이 지연은 치료되고 있는 질환 및/또는 대상체의 이력에 의존하여 다양한 기간 동안일 수 있다. 질환의 발달을 지연 또는 경감하거나, 질환의 발병을 지연시키는 방법은, 본 방법을 사용하지 않는 것과 비교될 때, 주어진 시간 틀에서 질환의 하나 이상의 증상의 발달하기의 확률을 감소시키고/시키거나 주어진 시간 틀에서 증상의 정도를 감소시키는 방법이다. 이러한 비교는, 통계적으로 유의미한 결과를 제공하기에 충분한 다수의 대상체를 사용하여, 임상 연구에 전형적으로 기반된다.

[0098] 일부 양태에서, 본원에 기재된 조성물은 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 또는 그 초과만큼 생체내 암 세포 성장 또는 종양 부담을 감소시키기에 충분한 양으로 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여된다. 일부 양태에서, 본원에 기재된 조성물은 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 또는 그 초과만큼 면역 활성 증가시키기에 효과적인 양으로 투여된다.

[0099] 일부 양태에서, 대상체에게 조성물을 투여하는 것은 대상체에서 면역 활성, 예컨대 T 세포 활성을 향상시킨다. 일부 양태에서, 면역 활성은 참조 대상체 (*예를 들면*, 조성물의 투여에 앞서 대상체 또는 조성물의 투여에 반응하지 않았던 상응하는 대상체)의 면역 활성과 비교하여 적어도 약 0.5-배, 적어도 약 1-배, 적어도 약 2-배, 적어도 약 3-배, 적어도 약 4-배, 적어도 약 5-배, 적어도 약 6-배, 적어도 약 7-배, 적어도 약 8-배, 적어도 약 9-배, 적어도 약 10-배, 적어도 약 15-배, 적어도 약 20-배, 적어도 약 25-배, 적어도 약 50-배 또는 그 초과만큼 향상되거나 증가된다.

[0100] 일부 양태에서, 대상체는 암을 갖거나, 갖는 것으로 의심되거나, 위험에 처한 인간이다. 일부 양태에서 암은 흑색종, 편평 세포 암, 소세포 폐 암, 비-소세포 폐 암, 폐의 선암종, 폐의 편평 암종, 복막의 암, 간세포성 암, 위장 암, 췌장 암, 교모세포종, 자궁경부 암, 난소 암, 간 암, 방광 암, 간종양, 유방 암, 결장 암, 결장직장 암, 자궁내막 또는 자궁 암, 타액선 암종, 신장 암, 전립선 암, 외음부 암, 갑상선 암, 간 암종, 위 암, 및 편평 세포 두경부 암을 포함하는 다양한 유형의 두경부 암으로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 일부 양태에서, 암은 흑색종, 폐 암, 결장직장 암, 신-세포 암, 요로상피 암종, 또는 호지킨 림프종일 수 있다.

[0101] 표적 질환 또는 장애를 갖는 대상체는 일상적 건강 검진, *예를 들면*, 실험실 테스트, 기관 기능적 테스트, CT 스캔, 또는 초음파에 의해 확인될 수 있다. 표적 질환 또는 장애를 갖는 것으로 의심된 대상체는 질환 또는 장애의 하나 이상의 증상을 보여줄 수 있다. 질환 또는 장애에 대하여 위험에 처한 대상체는 그 질환 또는 장애과 연관된 위험 인자들 중 하나 이상을 갖는 대상체일 수 있다. 질환 또는 장애에 대하여 위험에 처한 대상체는 일상적 의료 행위에 의해 또한 확인될 수 있다.

[0102] 일부 양태에서, 본원에 기재된 조성물은 적어도 하나의 추가의 적합한 치료적 제제와 공-투여된다. 일부 양태에서, 적어도 하나의 추가의 적합한 치료적 제제는 항-암 제제, 항-바이러스성 제제, 항-박테리아성 제제, 또는 본원에 기재된 조성물 (*예를 들면*, 지질 나노입자)의 면역조절성 효과를 향상 및/또는 보완하는데 사용하는 다른 제제를 포함한다. 본원에 기재된 조성물과 조합으로 사용될 수 있는 추가의 치료적 제제의 추가 예는 다음을 포함한다: 화학치료적 약물, 표적화된 항-암 요법, 종양용해성 약물, 세포독성 제제, 면역-기반 요법, 사이토카인, 외과적 절차, 방사선 절차, 공자극성 분자의 활성화제, 면역 관문 억제제, 백신, 세포성 면역요법, 또는 이들의 임의의 조합. 일부 양태에서, 본원에 기재된 조성물 및 적어도 하나의 추가의 치료적 제제는 대상체에게 순차적 방식으로 투여된다, 즉, 각 치료적 제제는 상이한 시간에 투여된다. 일부 양태에서, 본원에 기재된 조성물 및 적어도 하나의 추가의 치료적 제제는 대상체에게 실질적으로 동시 방식으로 투여된다.

[0103] 본원에 기재된 조성물 및 또 다른 항-암 제제 (*예를 들면*, 화학치료적 제제)의 임의의 조합이 암을 치료하기 위하여 임의의 순서로 사용될 수 있음이 당업자에 의해 이해될 것이다. 본원에 기재된 조합은 다수의 인자에 기초하여 선택될 수 있으며, 이는 종양 형성 또는 종양 성장의 감소, 암 세포의 감소, 면역 활성의 증가, 및/또는 암과 연관된 적어도 하나의 증상의 경감 효과, 또는 조합의 또 다른 제제의 부작용 완화 효과를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, 본원에 기재된 조합된 요법은 조합의 개별 구성원과 연관된 부작용들 중 임의의 것, 예를 들어, 항-암 제제와 연관된 부작용을 감소시킬 수 있다.

[0104] 일부 양태에서, 다른 항-암 치료적 제제는 화학요법, 방사선 요법, 외과적 요법, 면역요법, 또는 이들의 조합이다. 일부 양태에서, 화학치료적 제제는 카르보플라틴, 시스플라틴, 도세탁셀, 젬시타빈, 나브-파클리탁셀, 페메트렉세드, 비노렐빈, 또는 이들의 조합이다. 일부 양태에서, 방사선 요법은 이온화 방사선, 감마-방사선, 중성자 빔 방사선요법, 전자 빔 방사선요법, 양성자 요법, 근접 치료, 전신 방사성 동위원소, 방사선민감제, 또는 이들의 조합이다. 일부 양태에서, 외과적 요법은 근치 수술 (*예를 들면*, 종양 제거 수술), 예방적 수술, 복강경 수술, 레이저 수술, 또는 이들의 조합이다. 일부 양태에서, 면역요법은 적응적 세포 전이, 치료적 암 백신, 또는 이들의 조합이다.

[0105] 일부 양태에서, 화학치료적 제제는 백금화 제제, 예컨대 카르보플라틴, 옥살리플라틴, 시스플라틴, 네다플라틴, 사트라플라틴, 로바플라틴, 트리플라틴, 테트라니트레이트, 피코플라틴, 프롤린닥, 아로플라틴 및 기타 유도체; 토포이소머라제 I 억제제, 예컨대 캄프토테신, 토포테칸, 이리노테칸/SN38, 루비테칸, 벨로테칸, 및 기타 유도체; 토포이소머라제 II 억제제, 예컨대 에토포시드 (VP-16), 다우노루비신, 독소루비신 제제 (*예를 들면*, 독소루비신, 독소루비신 HCl, 독소루비신 유사체, 또는 독소루비신 및 리포솜내 이의 염 또는 유사체), 미톡산트론, 아클라루비신, 에피루비신, 이다루비신, 암루비신, 암사크린, 피라루비신, 발루비신, 조루비신, 테니포시드 및 기타 유도체; 항대사제, 예컨대 엽산 계열 (메토트렉세이트, 페메트렉세드, 랄티트렉세드, 아미노프테린, 및 동류); 퓨린 길항제 (티오구아닌, 플루다라빈, 클라드리빈, 6-메르캅토퓨린, 펜토스타틴, 클로파라빈 및 동류) 및 피리미딘 길항제 (시타라빈, 플록수리딘, 아자시티딘, 테가푸르, 카르모푸르, 카파시타빈, 젬시타빈, 히드록시우레아, 5-플루오로우라실 (5FU), 및 동류); 알킬화 제제, 예컨대 질소 머스타드 (*예를 들면*, 시클로포스파미드, 멜팔란, 클로람부실, 메클로레타민, 이포스파미드, 트로포스파미드, 프레드니무스틴, 벤다무스틴, 우라무스틴, 에스트라무스틴, 및 동류); 니트로소우레아 (*예를 들면*, 카르무스틴, 로무스틴, 세무스틴, 포테무스틴, 니무스틴, 라니무스틴, 스트렙토조신, 및 동류); 트리아젠 (*예를 들면*, 다카르바진, 알트레타민, 테모졸로미드, 및 동류); 알킬 술포네이트 (*예를 들면*, 부술판, 만노술판, 트레오술판, 및 동류); 프로카르바진; 미토브로니톨, 및 아지리딘 (*예를 들면*, 카르보쿠온, 트리아지쿠온, 티오TEPA, 트리에틸렌말라민, 및 동류); 항생제, 예컨대 히드록시우레아, 안트라사이클린 (*예를 들면*, 독소루비신 제제, 다우노루비신, 에피루비신 및 기타 유도체); 안트라세네디온 (*예를 들면*, 미톡산트론 및 동류); 스트렙토마이세스과 (*예를 들면*, 블레오마이신, 미토마이신 C, 악티노마이신, 플리카마이신); 자외선; 및 이들의 조합이다.

[0106] 일부 양태에서, 다른 항-암 치료적 제제는 항체이다. 항체 (바람직하게는 단클론성 항체)는 다양한 기전을 통해서 암 세포에 대해 그들의 치료적 효과를 달성한다. 이들은 세포사멸 또는 프로그램된 세포사 생산하기에 직접 효과를 가질 수 있다. 이들은 신호 전달 경로의 구성요소 예컨대 *예를 들면*, 성장 인자 수용체를 차단시켜, 종양 세포의 증식을 효과적으로 정지시킬 수 있다. 단클론성 항체를 발현시키는 세포에서, 이들은 항-인자형 항체

형성을 가져올 수 있다. 간접 효과는 세포독성을 갖는 세포, 예컨대 단핵구 및 대식세포 모집하기를 포함한다. 이 유형의 항체-매개 세포 죽이기는 항체-의존적 세포 매개된 세포독성 (ADCC)으로 불린다. 항체는, 보체 의존적 세포독성 (CDC)으로서 알려진, 직접 세포 독성을 초래하는, 보체를 또한 결합시킨다. 면역치료적 약물 또는 방법과 외과적 방법을 조합하는 것은, *예를 들면,* Gadri et al. 2009: 뮤린 림프종의 요법에서 수지상 세포 백신화 및 항-CD20 항체 치료의 상승작용적 효과. J Immunother. 32(4): 333-40에서 입증된 대로, 성공적 접근법이다. 하기 목록은 본 개시내용과 조합으로 사용될 수 있는 항-암 항체 및 잠재적 항체 표적 (괄호내)의 일부 비-제한적 예를 제공한다: 아바고보맙 (CA-125), 압식시맙 (CD41), 아데카투무맙 (EpCAM), 아푸투주맙 (CD20), 알라시주맙 페골 (VEGFR2), 알투모맙 펜테테이트 (CEA), 아마툭시맙 (MORAb-009), 아나투모맙 마페나톡스 (TAG-72), 아폴리주맙 (HLA-DR), 아르시투모맙 (CEA), 바비툭시맙 (포스파티딜세린), 벡투모맙 (CD22), 벨리무맙 (BAFF), 베바시주맙 (VEGF-A), 비바투주맙 메르탄신 (CD44 v6), 블리나투모맙 (CD19), 브렌툭시맙 베도틴 (CD30 TNFRSF8), 칸투주맙 메르탄신 (뮤신 CanAg), 칸투주맙 라브탄신 (MUC1), 카프로맙 펜데티드 (전립선 암종 세포), 칼루맙 (CNT0888), 카투막소맙 (EpCAM, CD3), 세툭시맙 (EGFR), 시타투주맙 보가톡스 (EpCAM), 식수투무맙 (IGF-1 수용체), 클라우딕시맙 (클라우딘), 클리바투주맙 테트라세탄 (MUC1), 코나투무맙 (TRAIL-R2), 다세투주맙 (CD40), 달로투주맙 (인슐린-유사 성장 인자 I 수용체), 데노수맙 (RANKL), 데투모맙 (B-림프종 세포), 드로지투맙 (DR5), 에크로멕시맙 (GD3 강글리오시드), 에드레콜로맙 (EpCAM), 엘로투주맙 (SLAMF7), 에나바투주맙 (PDL192), 엔시툭시맙 (NPC-1C), 에프라투주맙 (CD22), 에르투막소맙 (HER2/neu, CD3), 에타라시주맙 (인테그린 αvβ3), 파레투주맙 (엽산 수용체 1), FBTA05 (CD20), 피클라투주맙 (SCH 900105), 피기투무맙 (IGF-1 수용체), 플란보투맙 (당단백질 75), 프레솔리무맙 (TGF-β), 갈럭시맙 (CD80), 가니투맙 (IGF-I), 젬투주맙 오조가미신 (CD33), 게보키주맙 (IL-1β), 기렌툭시맙 (탄산 탈수효소 9 (CA-IX)), 글렘바투무맙 베도틴 (GPNMB), 이브리투모맙 티욱세탄 (CD20), 이크루쿠맙 (VEGFR-1), 이고보마 (CA-125), 인다툭시맙 라브탄신 (SDC1), 인테투무맙 (CD51), 이노투주맙 오조가미신 (CD22), 이필리무맙 (CD152), 이라투무맙 (CD30), 라베투주맙 (CEA), 렉사투무맙 (TRAIL-R2), 리비비루맙 (B형 간염 표면 항원), 린투주맙 (CD33), 로르보투주맙 메르탄신 (CD56), 루카투무맙 (CD40), 루밀릭시맙 (CD23), 마파투무맙 (TRAIL-R1), 마투주맙 (EGFR), 메폴리주맙 (IL-5), 밀라투주맙 (CD74), 미투모맙 (GD3 강글리오시드), 모가물리주맙 (CCR4), 목세투모맙 파수도톡스 (CD22), 나콜로맙 타페나톡스 (C242 항원), 나프투모맙 에스타페나톡스 (5T4), 나르나투맙 (RON), 네시투무맙 (EGFR), 니모투주맙 (EGFR), 니볼루맙 (IgG4), 오파투무맙 (CD20), 올라라투맙 (PDGF-R α), 오나르투주맙 (인간 분산 인자 수용체 키나제), 오포르투주맙 모나톡스 (EpCAM), 오레고보맙 (CA-125), 옥셀루맙 (OX-40), 파니투무맙 (EGFR), 파트리투맙 (HER3), 펨투모마 (MUC1), 페르투주마 (HER2/neu), 핀투모맙 (선암종 항원), 프리투무맙 (비멘틴), 라코투모맙 (N-글리콜릴뉴라민산), 라드레투맙 (피브로넥틴 엑스트라 도메인-B), 라피비루맙 (광견병 바이러스 당단백질), 라무시루맙 (VEGFR2), 릴로투무맙 (HGF), 리툭시맙 (CD20), 로바투무맙 (IGF-1 수용체), 사말리주맙 (CD200), 시브로투주맙 (FAP), 실툭시맙 (IL-6), 타발루맙 (BAFF), 타카투주맙 테트락세탄 (알파-태아단백질), 타플리투모맙 팝톡스 (CD19), 테나투모맙 (테나신 C), 테프로투무맙 (CD221), 티실리무맙 (CTLA-4), 티가투주맙 (TRAIL-R2), TNX-650 (IL-13), 토시투모맙 (CD20), 트라스투주맙 (HER2/neu), TRBS07 (GD2), 트레멜리무맙 (CTLA-4), 투코투주맙 셀몰류킨 (EpCAM), 우블리툭시맙 (MS4A1), 우렐루맙 (4-1BB), 볼로식시맙 (인테그린 α5β1), 보투무맙 (종양 항원 CTAA16.88), 잘루투무맙 (EGFR), 자놀리무맙 (CD4).

[0107] 일부 양태에서, 다른 항-암 치료적 제제는 사이토카인, 케모카인, 공자극성 분자, 융합 단백질, 또는 이들의 조합이다. 케모카인의 예는, 비제한적으로, CCR7 및 이의 리간드 CCL19 및 CCL21, 게다가 CCL2, CCL3, CCL5, 및 CCL16을 포함한다. 다른 예는 CXCR4, CXCR7 및 CXCL12이다. 게다가, 공자극성 또는 조절성 분자 예컨대 *예를 들면,* B7 리간드 (B7.1 및 B7.2)가 유용하다. 또한 유용한 것은 다른 사이토카인 예컨대 *예를 들면,* 인터류킨 특히 (*예를 들면,* IL-1 내지 IL17), 인터페론 (*예를 들면,* IFN알파1 내지 IFN알파8, IFN알파10, IFN알파13, IFN알파14, IFN알파16, IFN알파17, IFN알파21, IFN베타1, IFNW, IFNE1 및 IFNK), 조혈 인자, TGF (*예를 들면,* TGF-α, TGF-β, 및 TGF 계열의 다른 구성원), 마지막으로 비제한적으로 41BB, 41BB-L, CD137, CD137L, CTLA-4GITR, GITRL, Fas, Fas-L, TNFR1, TRAIL-R1, TRAIL-R2, p75NGF-R, DR6, LT.베타.R, RANK, EDAR1, XEDAR, Fn114, Troy/Trade, TAJ, TNFRII, HVEM, CD27, CD30, CD40, 4-1BB, OX40, GITR, GITRL, TACI, BAFF-R, BCMA, RELT, 및 CD95 (Fas/APO-1), 글루코코르티코이드-유도 TNFR-관련 단백질, TNF 수용체-관련 세포사멸-매개 단백질 (TRAMP) 및 사멸 수용체-6 (DR6)을 포함하는, 수용체 및 그들의 리간드뿐만 아니라 다른 자극성 분자의 종양 괴사 인자 계열의 구성원이다. 특히 CD40/CD40L 및 OX40/OX40L은 T 세포 생존 및 증식에 관한 그들의 직접 영향 때문에 조합된 면역요법에 대하여 중요한 표적이다. 검토를 위하여 Lechner et al. 2011: 고형 종양의 면역요법을 위한 케모카인, 공자극성 분자 및 융합 단백질. Immunotherapy 3 (11), 1317-1340 참조.

[0108] 일부 양태에서, 다른 항-암 치료제는 박테리아성 치료이다. 연구자는 산소-부족 종양의 내부를 소모시키기 위해

혐기성 박테리아, 예컨대 *클로스트리듐 노비이* (*Clostridium novyi*)를 사용하였다. 이들은 그 다음 이들이 종양의 산소화된 측면과 접촉하는 때 사멸해야 하여서, 이들이 신체의 나머지에 무해할 것임을 의미한다. 또 다른 전략은 비-독성 전구약물을 독성 약물로 전환시킬 수 있는 효소로 형질전환된 혐기성 박테리아를 사용하는 것이다. 종양의 괴사성 및 저산소성 구역에서 박테리아의 증식으로, 효소는 오로지 종양에서 발현된다. 따라서, 전신으로 적용된 전구약물은 종양에서만 독성 약물로 대사된다. 이것은 비병원성 혐기성생물 *클로스트리듐 스포로게네스* (*sporogenes*)를 이용해 효과적인 것으로 입증되었다.

[0109] 일부 양태에서, 다른 항-암 치료적 제제는 키나제 억제제이다. 암 세포의 성장 및 생존은 키나제 활성의 조절해제와 밀접하게 연동된다. 정상 키나제 활성을 회복하고 그에 대하여 종양 성장을 감소시키기 위해 광범위한 억제제가 사용된다. 표적화된 키나제의 그룹은 수용체 티로신 키나제 *예를 들면,* BCR-ABL, B-Raf, EGFR, HER-2/ErbB2, IGF-IR, PDGFR-α, PDGFR-β, c-키트, Flt-4, Flt3, FGFR1, FGFR3, FGFR4, CSF1R, c-Met, RON, c-Ret, ALK, 세포질 티로신 키나제 *예를 들면,* c-SRC, c-YES, Abl, JAK-2, 세린/트레오닌 키나제 *예를 들면,* ATM, Aurora A & B, CDKs, mTOR, PKCi, PLKs, b-Raf, S6K, STK11/LKB1 및 지질 키나제 *예를 들면,* PI3K, SK1을 포함한다. 작은 분자 키나제 억제제는 *예를 들면* PHA- 739358, 닐로티닙, 다사티닙, 및 PD166326, NSC 743411, 라파티닙 (GW-572016), 카네르티닙 (CI-1033), 세막시닙 (SU5416), 바탈라닙 (PTK787/ZK222584), 수텐트 (SU11248), 소라페닙 (BAY 43-9006) 및 레플루노미드 (SU101)를 포함한다. 더 많은 정보에 대하여 *예를 들면,* Zhang et al. 2009: 작은 분자 키나제 억제제를 이용한 암 표적화하기. Nature Reviews Cancer 9, 28-39 참조.

[0110] 일부 양태에서, 다른 항-암 치료적 제제는 톨-유사 수용체이다. 톨-유사 수용체 (TLR) 계열의 구성원은 선천적 면역성과 적응적 면역성 사이 중요한 연쇄이고 많은 보조제의 효과는 TLR의 활성화에 의지한다. 암에 대해 다수의 확립된 백신은 백신 반응을 부스팅하기 위해 TLR에 리간드를 편입시킨다. TLR2, TLR3, TLR4 이외에 특히 TLR7 및 TLR8은 수동 면역요법 접근법에서 암 요법에 대하여 검사되었다. 밀접하게 관련된 TLR7 및 TLR8은 면역세포, 종양 세포, 및 종양 미세환경에 영향을 미침으로써 항종양 반응에 기여하고 뉴클레오시드 유사체 구조에 의해 활성화될 수 있다. 모든 TLR은 독립형 면역요법제 또는 암 백신 보조제로서 사용되었고 본 개시내용의 제형 및 방법과 상승작용적으로 조합될 수 있다. 더 많은 정보에 대하여 van Duin et al. 2005: 백신화에서 TLR 신호전달 촉발하기. Trends in Immunology, 27(1):49-55 참조.

[0111] 일부 양태에서, 다른 항-암 치료적 제제는 혈관신생 억제제이다. 혈관신생 억제제는 종양이 생존하는데 필요한 혈관의 확장적 성장 (혈관신생)을 예방한다. 그들의 증가하는 영양소 및 산소 수요를 충족하기 위해 종양 세포에 의해 촉진된 혈관신생은 예를 들어 상이한 분자를 표적화함으로써 차단될 수 있다. 본 개시내용과 조합될 수 있는 혈관신생-매개 분자 또는 혈관신생 억제제의 비-제한적 예는 가용성 VEGF (VEGF 아이소폼 VEGF121 및 VEGF165, 수용체 VEGFR1, VEGFR2 및 공-수용체 뉴로필린-1 및 뉴로필린-2) 1 및 NRP-1, 안지오포이에틴 2, TSP-1 및 TSP-2, 안지오스타틴 및 관련된 분자, 엔도스타틴, 바소스타틴, 칼레티쿨린, 혈소판 인자-4, TIMP 및 CDAI, Meth-1 및 Meth-2, IFN-α, -β 및 -γ, CXCL10, IL-4, -12 및 -18, 프로트롬빈 (크링글 도메인-2), 항트롬빈 III 단편, 프로락틴, VEGI, SPARC, 오스테오폰틴, 마스핀, 칸스타틴, 프로리페린-관련 단백질, 레스틴 및 다음과 같은 약물 *예를 들면,* 베바시주맙, 이트라코나졸, 카르복시아미도트리아졸, TNP-470, CM101, IFN-α, 혈소판 인자-4, 수라민, SU5416, 트롬보스폰딘, VEGFR 길항제, 혈관신생억제성 스테로이드+헤파린, 연골-유래 혈관신생 억제성 인자, 매트릭스 메탈로프로테이나제 억제제, 2-메톡시에스트라디올, 테코갈란, 테트라티오몰리브데이트, 탈리도미드, 트롬보스폰딘, 프로락티나 Vβ3 억제제, 리노미드, 타스퀴니모드이다, 검토를 위하여 Schoenfeld and Dranoff 2011: 항-혈관신생 면역요법. Hum Vaccin. (9):976-81 참조.

[0112] 일부 양태에서, 다른 항-암 치료적 제제는 바이러스-기반 백신이다. 본 개시내용의 제형과 함께 조합된 치료적 접근법에서 사용될 수 있는 이용가능하거나 발달 중인 다수의 바이러스-기반 암 백신이 있다. 이러한 바이러스성 벡터의 사용의 하나의 이점은, 면역 활성화에 필요한 위험 신호를 창출하는 바이러스성 감염의 결과로서 발생하는 염증성 반응으로, 면역 반응을 개시하는 그들의 고유한 능력이다. 이상적 바이러스성 벡터는 안전해야 하고 항-종양 특이적 반응 부스팅을 허용하기 위해 항-벡터 면역 반응을 도입하지 않아야 한다. 재조합 바이러스 예컨대 백시니아 바이러스, 단순 포진 바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스, 레트로바이러스 및 아비폭스바이러스는 동물 종양 모델에서 사용되었고 그들의 고무적 결과에 기반하여, 인간 임상 시험은 개시되었다. 특히 중요한 바이러스-기반 백신은 바이러스의 외피로부터 특정 단백질을 함유하는 작은 입자인, 바이러스-유사 입자 (VLP)이다. 바이러스-유사 입자는 바이러스로부터 임의의 유전적 물질을 함유하지 않고 감염을 유발시킬 수 없지만 이들은 그들의 외피에 종양 항원을 제시하도록 작제될 수 있다. VLP는 다양한 바이러스 예컨대 *예를 들면,* B형 간염 바이러스 또는 파르보비리다애 (Parvoviridae) (*예를 들면,* 아데노-연관된 바이러스), 레트로비리다애 (Retroviridae) (*예를 들면,* HIV), 및 플라비비리다애 (Flaviviridae) (*예를 들면,* C형 간염

바이러스)를 포함하는 다른 바이러스 계열에서 유래될 수 있다. 일반 검토를 위하여 Sorensen and Thompsen 2007: "암의 바이러스-기반 면역요법: 우리는 무엇을 알고 우리는 어디로 가고 있는가?" APMIS 115(11):1177-93을 참조하고; 암에 대한 바이러스-유사 입자는 Buonaguro et al. 2011: 감염성 질환 및 암에 대한 바이러스-유사 입자-기반 백신에서의 개발. Expert Rev Vaccines 10(11):1569-83에서; 그리고 Guillen et al. 2010: 백신 항원 및 보조제로서 바이러스-유사 입자: 만성 질환, 암 면역요법 및 감염성 질환 예방적 전략에 대한 적용. 백신학 논문집 2 (2), 128-133에서 검토된다.

[0113] 일부 양태에서, 다른 항-암 치료적 제제는 펩티드-기반 표적 요법이다. 펩티드는 세포 표면 수용체 또는 종양을 둘러싸는 병든 세포외 매트릭스에 결합할 수 있다. 이들 펩티드 (*예를 들면,* RGD)에 부착되는 방사성 핵종은 핵종이 세포의 근처에서 감쇠하면 결국 암 세포를 사멸시킨다. 특히 이들 결합 모티프의 올리고머 또는 다량체가 특히 관심인 것은, 이것이 향상된 종양 특이성 및 친화성을 초래할 수 있기 때문이다. 비-제한적 예로 Yamada 2011: 전립선 암, 방광 암, 및 악성 신경교종에 대한 펩티드-기반 암 백신 요법. Nihon Rinsho 69(9): 1657-61 참조.

[0114] **III. 지질 나노입자**

[0115] 본원에 기재된 경우에, 본 개시내용의 LNP는, LNP가 세포 (*예를 들면,* 비-간 조직 내에서 세포)에 페이로드 (*예를 들면,* 이종 단백질)의 선택적 전달을 허용할 수 있도록, 조직-특이적 향성을 나타낸다. 일부 양태에서, 전달은 *생체내* (*예를 들면,* 대상체에게 본원에 기재된 LNP를 투여함으로써) 또는 *생체외* (*예를 들면, 시험관내* 세포로 본원에 기재된 LNP를 배양시킴으로써) 발생할 수 있다. "**지질 나노입자**" (LNP)는, 본원에 사용된 바와 같이, 인접한 지질 이중층을 갖는 소포, 예컨대 구형 소포를 지칭한다. 지질 나노입자는 약학적 요법이 표적화된 자리에 전달되는 방법에서 사용될 수 있다. LNP의 비-제한적 예는 리포솜, 볼라암피힐스, 고형 지질 나노입자 (SLN), 나노구조화된 지질 담체 (NLC), 단층 막 구조 (*예를 들면,* 고고균 및 미셀), 지질-유사 나노입자 (LLN), 중합체성 나노입자 (PNP), 지질 중합체 하이브리드 나노입자 (LPN), 또는 이들의 조합을 포함한다.

[0116] 일부 양태에서, 지질 나노입자는 하나 이상 유형의 지질을 포함한다. "**지질**"은, 본원에 사용된 바와 같이, 비제한적으로, 지방 산의 에스테르를 포함하고, 일부 양태에서, 물에서 불용성이지만, 많은 유기 용매에서 가용성임을 특징으로 하는 유기 화합물의 한 그룹을 지칭한다. 따라서, 달리 지시되지 않는 한, 지질은 천연 지질 및 지질-유사 물질 (*예를 들면,* 리피도이드)을 포함한다. 이들은 적어도 3개 부류로 보통 분할된다: (1) 지방 및 오일뿐만 아니라 왁스를 포함하는 "단순 지질"; (2) 인지질 및 당지질을 포함하는 "복합 지질"; 및 (3) "유래된 지질" 예컨대 스테로이드. 지질의 비-제한적 예는 트리글리세리드 (*예를 들면,* 트리스테아린), 디글리세리드 (*예를 들면,* 글리세롤 바헤네이트), 모노글리세리드 (*예를 들면,* 글리세롤 모노스테아레이트), 지방 산 (*예를 들면,* 스테아르산), 스테로이드 (*예를 들면,* 콜레스테롤), 및 왁스 (*예를 들면,* 세틸 팔미테이트)를 포함한다. 일부 양태에서, 본 개시내용에 유용한 지질은 이온화가능한 지질, 양이온성 지질, 리피도이드, 인지질, 스테롤, 또는 이들의 조합을 포함한다.

[0117] 일부 양태에서, LNP에서 하나 이상 유형의 지질은 이온화가능한 지질을 포함한다. 따라서, 일부 양태에서, 본 개시내용에 유용한 LNP는 (i) 이온화가능한 지질 및 (ii) 페이로드를 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 VEE 레플리콘을 포함한다.

[0118] 이온화가능한 지질의 비-제한적 예는 다음을 포함한다: ((4-히드록시부틸)아잔디일)비스(헥산-6,1-디일)비스(2-헥실데카노에이트)(ALC-0315), 헵타데칸-9-일 8-((2-히드록시에틸)(6-옥소-6-(운데실옥시)헥실)아미노) 옥타노에이트 (SM-102), 헵타데칸-9-일 8-((2-히드록시에틸)(8-(노닐옥시)-8-옥소옥틸)아미노)옥타노에이트 (지질 5), 디((Z)-논-2-엔-1-일) 9-((4-(디메틸아미노)부타노일)옥시)헵타데칸디오에이트 (L319), 3-(디도데실아미노)-N1,N1,4 트리도데실-1-피페라진에탄아민 (KL10), N1-[2 (디도데실아미노)에틸]-N1,N4,N4-트리도데실 1,4-피페라진디에탄아민 (KL22), 14,25-디트리데실-15,18,21,24-테트라아자-옥타트리아콘탄 (KL25), 1,2-딜리놀레일옥시-N,N-디메틸아미노프로판 (DLin-DMA), 2,2-딜리놀레일-4-디메틸아미노메틸-[1,3]-디옥솔란 (DLin-K-DMA), 헵타트리아콘타-6,9,28,31-테트라엔-19-일-4-(디메틸아미노)부타노에이트 (DLin-MC3-DMA), 2,2-딜리놀레일-4-(2 디메틸아미노에틸)-[1,3]-디옥솔란 (DLin-KC2-DMA), 1,2-디올레일옥시-N,N-디메틸아미노프로판 (DODMA), 2-({8-[(3β)-콜레스트-5-엔-3-일옥시]옥틸}옥시)-N,N-디메틸-3-[(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디엔-1-일옥시]프로판-1-아민 (옥틸-CLinDMA), (2R)-2-({8-[(3β)-콜레스트-5-엔-3-일옥시]옥틸}옥시)-N,N-디메틸-3-[(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디엔-1-일옥시]프로판-1-아민 (옥틸-CLinDMA (2R)), 및 (2S)-2-({8-[(3β)-콜레스트-5-엔-3-일옥시]옥틸}옥시)-N,N-디메틸-3-[(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디엔-1-일옥시]프로판-1-아민 (옥틸-CLinDMA(2S)), 또는 이들의 임의의 조합.

[0119] 일부 양태에서, LNP에서 하나 이상 유형의 지질은 양이온성 지질을 포함한다. 일부 양태에서, 본 개시내용에 유용한 LNP는 (i) 양이온성 지질 및 (ii) 페이로드를 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 VEE 레플리콘을 포함한다. 일부 양태에서, (즉, 양이온성 지질 및 VEE 레플리콘을 포함하는) LNP는 이온화가능한 지질을 추가로 포함한다.

[0120] "**양이온성 지질**"은, 본원에 사용된 바와 같이, 선택된 pH, 예컨대 생리학적 pH에서 순 양전하를 띠는 다수의 지질 종들 중 임의의 것을 지칭한다. 양이온성 지질의 비-제한적 예는 다음을 포함한다: 1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄-프로판 (DOTAP), 리포펙타민, N-[1-(2,3-디올레오일옥시)프로필]-N,N,N-트리메틸암모늄 클로리드 (DOTMA), 1-[2-(올레오일옥시)에틸]-2-올레일-3-(2-히드록시에틸)이미다졸리늄 클로리드 (DOTEVI), 2,3-디올레일옥시-N-[2(스페르민카르복스아미도)에틸]-N,N-디메틸-1-프로판아미늄 트리플루오로아세테이트 (DOSPA), N,N-디스테아릴-N,N-디메틸암모늄 브로미드 (DDAB), N-(1,2-디미리스틸옥시프로프-3-일)-N,N-디메틸-N-히드록시 에틸 암모늄 브로미드 (DMRIE), N-(1,2-디올레오일옥시프로프-3-일)-N,N-디메틸-N-히드록시에틸 암모늄 브로미드 (DORIE), N,N-디올레일-N,N-디메틸암모늄 클로리드 (DODAC), 1,2-디라우로일-sn-글리세로-3-에틸포스포콜린 (DLePC), 1,2-디스테아로일-3-트리메틸암모늄-프로판 (DSTAP), 1,2-디팔미토일-3-트리메틸암모늄-프로판 (DPTAP), 1,2-디리놀레오일-3-트리메틸암모늄-프로판 (DLTAP), 1,2-디미리스토일-3-트리메틸암모늄-프로판 (DMTAP), 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-에틸포스포콜린 (DSePC), 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-에틸포스포콜린 (DPePC), 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-에틸포스포콜린 (DMePC), 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-에틸포스포콜린 (DOePC), 1,2-디-(9Z-테트라데세노일)-sn-글리세로-3-에틸포스포콜린 (14:1 EPC), 1-팔미토일-2-올레오일-sn-글리세로-3-에틸포스포콜린 (16:0-18:1 EPC), 또는 이들의 임의의 조합. 추가의 예는 본 개시내용 전체에 걸쳐 제공된다.

[0121] 일부 양태에서, LNP에서 하나 이상 유형의 지질은 리피도이드를 포함한다. 따라서, 일부 양태에서, 본원에 기재된 LNP는 다음을 포함한다: (i) 리피도이드 및 (ii) 페이로드를 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 VEE 레플리콘. 일부 양태에서, (즉, 리피도이드 및 VEE 레플리콘을 포함하는) LNP는 이온화가능한 지질, 양이온성 지질, 또는 둘 모두를 추가로 포함한다.

[0122] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "**리피도이드**"는 지질, *예를 들면*, 합성 양이온성 지질의 하나 이상의 특징을 갖는 분자를 지칭한다. 일부 양태에서, 리피도이드는 LNP의 순 양전하를 증가시키는 일련의 2차 및 3차 아민을 가질 수 있다. 지질-유사 물질 및/또는 리피도이드의 비-제한적 예는 다음을 포함한다: 1,1'-((2-(4-(2-((2-(비스(2-히드록시도데실)아미노)에틸)(2-히드록시도데실)아미노)에틸)피페라진-1-일)에틸)아잔디일)비스(도데칸-2-올) (C12-200), 3,6-비스(4-(비스(2-히드록시도데실)아미노)부틸)피페라진2,5-디온 (cKK-E12), 테트라키스(8-메틸노닐) 3,3',3'',3'''-(((메틸아잔디일)비스(프로판-3,1 디일))비스(아잔트리일))테트라프로피오네이트 (306Oi_{10}), G0-C14, 5A2-SC8, 3,6-비스(4-(비스((9Z,12Z)-2-히드록시옥타데카9,12-디엔-1-일)아미노)부틸)피페라진-2,5-디온 (OF-02), (((3,6-디옥소피페라진-2,5-디일)비스(부탄-4,1-디일))비스(아잔트릴))테트라키스(에탄2,1-디일)(9Z,9'Z,9''Z,9'''Z,12Z,12'Z,12''Z,12'''Z)-테트라키스(옥타데카-9,12-디에노에이트) (OF-Deg-Lin), (((3,6-디옥소피페라진-2,5-디일)비스(부탄-4,1-디일))비스(아잔트리일))테트라키스(부탄-4,1-디일)(9Z,9'Z,9''Z,9'''Z,12Z,12'Z,12''Z,12'''Z)-테트라키스(옥타데카-9,12-디에노에이트) (OF-C4-Deg-Lin), N1,N3,N5-트리스(3-(디도데실아미노)프로필)벤젠1,3,5-트리카복스아미드 (TT3), 헥사(옥탄-3-일) 9,9',9'',9''',9'''',9'''''-((((벤젠-1,3,5-트리카르보닐)리스(아잔디일)) 트리스 (프로판-3,1-디일))트리스(아잔트리일))헥사노나노에이트 (FTT5), PL-1 [Nature Communications, 12-7264(2021)에 개시됨, 이에 참조로 포함됨], 98N12-5 [Molecular Therapy vol. 17 no. 5 May 2009에 개시됨, 이에 참조로 포함됨], 에틸 5,5-디((Z)-헵타데크-8-엔-1-일)-1-(3-(피롤리딘-1-일)프로필)-2,5-디히드로-1H-이미다졸-2-카르복실레이트 (A2-Iso5-2DC18(A2)) 및 A12-Iso5-2DC18 (A12), 또는 이들의 임의의 조합.

[0123] 일부 양태에서, 지질은 스테롤을 포함한다. 일부 양태에서, 본 개시내용에 유용한 LNP는 (i) 스테롤 및 (ii) 페이로드를 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 VEE 레플리콘을 포함한다. 일부 양태에서, (즉, 스테롤 및 VEE 레플리콘을 포함하는) LNP는 이온화가능한 지질, 양이온성 지질, 리피도이드, 또는 이들의 임의의 조합을 추가로 포함한다.

[0124] 본원에 사용된 바와 같이, "**스테롤**"은 지질 막 패킹 결함을 채우고 구조적 무결성을 제공하는데 사용될 수 있는 콜레스테롤 또는 콜레스테롤 유사체를 지칭한다. 스테롤의 비-제한적 예는 다음을 포함한다: 콜레스테롤, 페코스테롤, 시토스테롤, 에르고스테롤, 캄페스테롤, 스티그마스테롤, 브라시카스테롤, 토마티딘, 토마틴, 우르솔산, 알파-토코페롤, 및 이들의 조합을 포함한다. 일부 양태에서, 스테롤은 콜레스테롤이다.

[0125] 일부 양태에서, 지질은 인지질을 포함한다. 일부 양태에서, 본 개시내용에 유용한 LNP는 (i) 인지질 및 (ii) 페

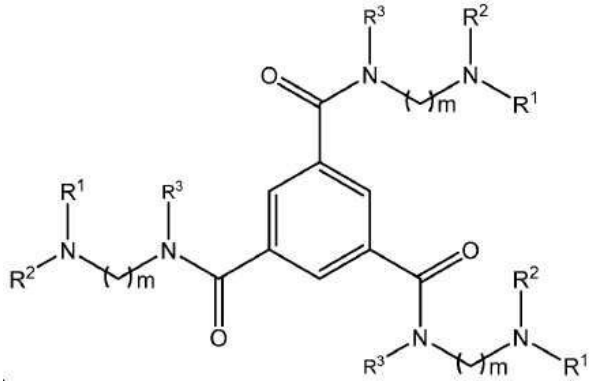
이로드를 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 VEE 레플리콘을 포함한다. 일부 양태에서, (즉, 인지질 및 VEE 레플리콘을 포함하는) LNP는 이온화가능한 지질, 양이온성 지질, 리피도이드, 스테롤, 또는 이들의 임의의 조합을 추가로 포함한다.

[0126] 인지질의 비-제한적 예는 다음을 포함한다: 1,2-디리놀레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (DLPC), 1,2-디미리스토일-sn-글리세롤-포스포콜린 (DMPC), 1,2-디올레오일-sn-글리세롤-3-포스포콜린 (DOPC), 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (DPPC), 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (DSPC), 1,2-디운데카노일-sn-글리세로-포스포콜린 (DUPC), 1-팔미토일-2-올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (POPC), 1,2-디-O-옥타데세닐-sn-글리세로-3-포스포콜린 (18:0 디에테르 PC), 1-올레오일-2-콜레스테릴헤미숙시노일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (OChemsPC), 1-헥사데실-sn-글리세로-3-포스포콜린 (C16 리소 PC), 1,2-디리놀레노일-sn-글리세로-3-포스포콜린, 1,2-디아라키도노일-sn-글리세로-3-포스포콜린, 1,2-디도코사헥사노일-sn-글리세로-3-포스포콜린, 1,2-디오레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 (DOPE), 1,2-디피타노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 (ME 16.0 PE), 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민, 1,2-디리놀레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민, 1,2-디리놀레노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민, 1,2-디아라키도노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민, 1,2-디도코사헥사에노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민, 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포-rac-(1-글리세롤) 나트륨염 (DOPG), 스핑고미엘린 및 이들의 임의의 조합. 일부 양태에서, 인지질은 1-미리스토일-2-팔미토일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (14:0-16:0 PC, MPPC), 1-미리스토일-2 스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (14:0-18:0 PC, MSPC), 1-팔미토일 2-아세틸-sn-글리세로-3-포스포콜린 (16:0-02:0 PC), 1-팔미토일-2-미리스토일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (16:0-14:0 PC, PMPC), 1-팔미토일-2-스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (16:0-18:0 PC, PSPC), 1-팔미토일-2-올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (16:0-18:1 PC, POPC), 1-팔미토일-2-리놀레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (16:0-18:2 PC, PLPC), 1-팔미토일-2-아라키도노일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (16:0-20:4 PC), 1-팔미토일-2-도코사헥사에노일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (14:0-22:6 PC), 1-스테아로일-2-미리스토일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (18:0-14:0 PC, SMPC), 1-스테아로일-2-팔미토일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (18:0-16:0 PC, SPPC), 1-스테아로일-2-올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (18:0-18:1 PC, SOPC), 1-스테아로일-2-리놀레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (18:0-18:2 PC), 1-스테아로일-2-아라키도노일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (18:0-20:4 PC), 1-스테아로일-2-도코사헥사에노일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (18:0-22:6 PC), 1-올레오일-2-미리스토일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (18:1-14:0 PC, OMPC), 1-올레오일-2-팔미토일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (18:1-16:0 PC, OPPC), 1-올레오일-2-스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (18: 1-18:0 PC, OSPC), 1-팔미토일-2-올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 (16:0-18:1 PE, POPE), 1-팔미토일-2-리놀레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 (16:0-18:2 PE), 1-팔미토일-2-아라키도노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 (16:0-20:4 PE), 1-팔미토일-2-도코사헥사에노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 (16:0-22:6 PE), 1-스테아로일-2-올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 (18:0-18:1 PE), 1-스테아로일-2-리놀레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 (18:0-18:2 PE), 1-스테아로일-2-아라키도노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 (18:0-20:4 PE), 1-스테아로일-2-도코사헥사에노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 (18:0-22:6 PE), 1-올레오일-2-콜레스테릴헤미숙시노일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (OChemsPC), 및 이들의 임의의 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

[0127] 따라서, 일부 양태에서, 본 개시내용에 유용한 LNP는 (i) 하나 이상의 천연 지질 (*예를 들면*, 천연 양이온성 지질) 및 (ii) 페이로드를 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 VEE 레플리콘을 포함한다. 일부 양태에서, 본 개시내용에 유용한 LNP는 (i) 하나 이상의 합성 지질 (*예를 들면*, 리피도이드) 및 (ii) 페이로드를 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 VEE 레플리콘을 포함한다. 일부 양태에서, 본 개시내용에 유용한 LNP는 (i) 천연 지질 (*예를 들면*, 양이온성 지질) 및 합성 지질 (*예를 들면*, 리피도이드) 둘 모두, 및 (ii) 페이로드를 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 VEE 레플리콘을 포함한다.

[0128] 본 개시내용의 LNP와 사용될 수 있는 지질의 예는, 비제한적으로, N1,N3,N5-트리스(3-(디도데실아미노)프로필) 벤젠-1,3,5-트리카르복사미드 (TT3), N-(2,3-디올레오일옥시)프로필)-N,N,N-트리메틸암모늄 클로리드 (DOTAP); 리포펙타민; 1,2-디리놀레일옥시-N,N-디메틸아미노프로판 (DLinDMA), 1,2-디리놀레닐옥시-N,N-디메틸아미노프로판 (DLenDMA); 디옥타데실디메틸암모늄 (DODMA), 디스테아릴디메틸암모늄 (DSDMA), N,N-디올레일-N,N,-디메틸암모늄 클로리드 (DODAC); N-(2,3-디올레일옥시)프로필)-N,N,N-트리메틸암모늄 클로리드 (DOTMA); N-N-디스테아릴-N,N-디메틸암모늄 브로미드 (DDAB); 3-(N-(N',N'-디메틸아미노에탄)-카르바모일)콜레스테롤 (DC-Chol) 및 N-(1,2-디미리스틸옥스프로프-3-일)-N,N-디메틸-N-히드록시에틸 암모늄 브로미드 (DMRIE)를 포함한다.

[0129] 일부 양태에서, 지질은 화학식 I:

[0130]  (화학식 I)

[0131] 및 이의 염으로 나타나고; 식중 각 R^1은 독립적으로 미치환된 알킬이고; 각 R^2는 독립적으로 미치환된 알킬이고; 각 R^3은 독립적으로 수소 또는 치환된 또는 미치환된 알킬이고; 각 m은 독립적으로 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8이다. 일부 양태에서, 각 R^1은 독립적으로 미치환된 알킬이고; 각 R^2는 독립적으로 미치환된 알킬이고; R^3은 수소이고; 각 m은 3이다. 일부 양태에서, 적어도 하나의 R^1은 미치환된 C_{1-24} 알킬이다. 일부 양태에서, 적어도 하나의 R^1은 미치환된 C_{1-18} 알킬이다. 일부 양태에서, 적어도 하나의 R^1은 미치환된 C_{1-12} 알킬이다. 일부 양태에서, 적어도 하나의 R^1은 미치환된 C_{6-18} 알킬이다. 일부 양태에서, 적어도 하나의 R^1은 미치환된 C_{6-12} 알킬이다. 일부 양태에서, 적어도 하나의 R^1은 미치환된 C_{8-12} 알킬이다. 일부 양태에서, 적어도 하나의 R^1은 미치환된 C_{10-12} 알킬이다. 일부 양태에서, 적어도 하나의 R^1은 미치환된 C_{11} 알킬이다.

[0132] 일부 양태에서, 적어도 하나의 R^2는 미치환된 C_{1-24} 알킬이다. 일부 양태에서, 적어도 하나의 R^2는 미치환된 C_{1-18} 알킬이다. 일부 양태에서, 적어도 하나의 R^2는 미치환된 C_{1-12} 알킬이다. 일부 양태에서, 적어도 하나의 R^2는 미치환된 C_{6-18} 알킬이다. 일부 양태에서, 적어도 하나의 R^2는 미치환된 C_{6-12} 알킬이다. 일부 양태에서, 적어도 하나의 R^2는 미치환된 C_{8-12} 알킬이다. 일부 양태에서, 적어도 하나의 R^2는 미치환된 C_{10-12} 알킬이다. 일부 양태에서, 적어도 하나의 R^2는 미치환된 C_{11} 알킬이다.

[0133] 일부 양태에서, 적어도 2개 R^1은 미치환된 C_{1-24} 알킬이다. 일부 양태에서, 적어도 2개 R^1은 미치환된 C_{1-18} 알킬이다. 일부 양태에서, 적어도 2개 R^1은 미치환된 C_{1-12} 알킬이다. 일부 양태에서, 적어도 2개 R^1은 미치환된 C_{6-18} 알킬이다. 일부 양태에서, 적어도 2개 R^1은 미치환된 C_{6-12} 알킬이다. 일부 양태에서, 적어도 2개 R^1은 미치환된 C_{8-12} 알킬이다. 일부 양태에서, 적어도 2개 R^1은 미치환된 C_{10-12} 알킬이다. 일부 양태에서, 적어도 2개 R^1은 미치환된 C_{11} 알킬이다.

[0134] 일부 양태에서, 적어도 2개 R^2는 미치환된 C_{1-24} 알킬이다. 일부 양태에서, 적어도 2개 R^2는 미치환된 C_{1-18} 알킬이다. 일부 양태에서, 적어도 2개 R^2는 미치환된 C_{1-12} 알킬이다. 일부 양태에서, 적어도 2개 R^2는 미치환된 C_{6-18} 알킬이다. 일부 양태에서, 적어도 2개 R^2는 미치환된 C_{6-12} 알킬이다. 일부 양태에서, 적어도 2개 R^2는 미치환된 C_{8-12} 알킬이다. 일부 양태에서, 적어도 2개 R^2는 미치환된 C_{10-12} 알킬이다. 일부 양태에서, 적어도 2개 R^2는 미치환된 C_{11} 알킬이다.

[0135] 일부 양태에서, R^1의 모든 경우는 미치환된 C_{1-24} 알킬이다. 일부 양태에서, R^1의 모든 경우는 미치환된 C_{1-18} 알킬

이다. 일부 양태에서, R^1의 모든 경우는 미치환된 C_{1-12} 알킬이다. 일부 양태에서, R^1의 모든 경우는 미치환된 C_{6-18} 알킬이다. 일부 양태에서, R^1의 모든 경우는 미치환된 C_{6-12} 알킬이다. 일부 양태에서, R^1의 모든 경우는 미치환된 C_{8-12} 알킬이다. 일부 양태에서, R^1의 모든 경우는 미치환된 C_{10-12} 알킬이다. 일부 양태에서, R^1의 모든 경우는 미치환된 C_{11} 알킬이다.

[0136] 일부 양태에서, R^2의 모든 경우는 미치환된 C_{1-24} 알킬이다. 일부 양태에서, R^2의 모든 경우는 미치환된 C_{1-18} 알킬이다. 일부 양태에서, R^2의 모든 경우는 미치환된 C_{1-12} 알킬이다. 일부 양태에서, R^2의 모든 경우는 미치환된 C_{6-18} 알킬이다. 일부 양태에서, R^2의 모든 경우는 미치환된 C_{6-12} 알킬이다. 일부 양태에서, R^2의 모든 경우는 미치환된 C_{8-12} 알킬이다. 일부 양태에서, R^2의 모든 경우는 미치환된 C_{10-12} 알킬이다. 일부 양태에서, R^2의 모든 경우는 미치환된 C_{11} 알킬이다.

[0137] 일부 양태에서, 적어도 하나의 R^3은 수소이다. 일부 양태에서, 적어도 하나의 R^3은 치환된 또는 미치환된 알킬이다. 일부 양태에서, 적어도 하나의 R^3은 치환된 또는 미치환된 C_{1-18} 알킬이다. 일부 양태에서, 적어도 하나의 R^3은 치환된 또는 미치환된 C_{1-12} 알킬이다. 일부 양태에서, 적어도 하나의 R^3은 치환된 또는 미치환된 C_{1-6} 알킬이다. 일부 양태에서, 적어도 하나의 R^3은 치환된 또는 미치환된 C_{1-4} 알킬이다. 일부 양태에서, 적어도 하나의 R^3은 치환된 또는 미치환된 C_{2-4} 알킬이다. 일부 양태에서, 적어도 하나의 R^3은 치환된 또는 미치환된 메틸이다.

[0138] 일부 양태에서, 적어도 하나의 R^3은 치환된 알킬이고, 여기서 치환된 알킬은 할로겐으로 치환된다. 일부 양태에서, 적어도 하나의 R^3은 치환된 알킬이고, 여기서 치환된 알킬은 플루오르로 치환된다. 일부 양태에서, 적어도 하나의 R^3은 치환된 알킬이고, 여기서 치환된 알킬은 할로겐화된 알킬로 치환된다.

[0139] 일부 양태에서, 적어도 2개 R^3은 수소이다. 일부 양태에서, 적어도 2개 R^3은 치환된 또는 미치환된 알킬이다. 일부 양태에서, 적어도 2개 R^3은 치환된 또는 미치환된 C_{1-18} 알킬이다. 일부 양태에서, 적어도 2개 R^3은 치환된 또는 미치환된 C_{1-12} 알킬이다. 일부 양태에서, 적어도 2개 R^3은 치환된 또는 미치환된 C_{1-6} 알킬이다. 일부 양태에서, 적어도 2개 R^3은 치환된 또는 미치환된 C_{1-4} 알킬이다. 일부 양태에서, 적어도 2개 R^3은 치환된 또는 미치환된 C_{2-4} 알킬이다. 일부 양태에서, 적어도 2개 R^3은 치환된 또는 미치환된 메틸이다.

[0140] 일부 양태에서, 적어도 2개 R3은 치환된 알킬이고, 여기서 치환된 알킬은 할로겐으로 치환된다. 일부 양태에서, 적어도 2개 R3은 치환된 알킬이고, 여기서 치환된 알킬은 플루오르로 치환된다. 일부 양태에서, 적어도 2개 R3은 치환된 알킬이고, 여기서 치환된 알킬은 할로겐화된 알킬로 치환된다.

[0141] 일부 양태에서, R^3의 모든 경우는 수소이다. 일부 양태에서, R^3의 모든 경우는 치환된 또는 미치환된 알킬이다. 일부 양태에서, R^3의 모든 경우는 치환된 또는 미치환된 C_{1-18} 알킬이다. 일부 양태에서, R^3의 모든 경우는 치환된 또는 미치환된 C_{1-12} 알킬이다. 일부 양태에서, R^3의 모든 경우는 치환된 또는 미치환된 C_{1-6} 알킬이다. 일부 양태에서, R^3의 모든 경우는 치환된 또는 미치환된 C_{1-4} 알킬이다. 일부 양태에서, R^3의 모든 경우는 치환된 또는 미치환된 C_{2-4} 알킬이다. 일부 양태에서, R^3의 모든 경우는 치환된 또는 미치환된 메틸이다.

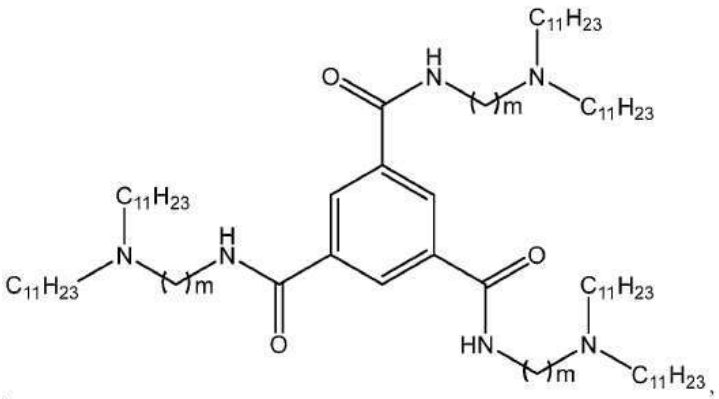
[0142] 일부 양태에서, R^3의 모든 경우는 치환된 알킬이고, 여기서 치환된 알킬은 할로겐으로 치환된다. 일부 양태에서, R^3의 모든 경우는 치환된 알킬이고, 여기서 치환된 알킬은 플루오르로 치환된다. 일부 양태에서, R^3의 모든 경우

는 치환된 알킬이고, 여기서 치환된 알킬은 할로겐화된 알킬로 치환된다.

[0143] 일부 양태에서, 적어도 하나의 m은 3이다. 일부 양태에서, 적어도 하나의 m은 4이다. 일부 양태에서, 적어도 하나의 m은 5이다. 일부 양태에서, 적어도 하나의 m은 6이다. 일부 양태에서, 적어도 하나의 m은 7이다. 일부 양태에서, 적어도 하나의 m은 8이다. 일부 양태에서, 적어도 2개 m은 3이다. 일부 양태에서, 적어도 2개 m은 4이다. 일부 양태에서, 적어도 2개 m은 5이다. 일부 양태에서, 적어도 2개 m은 6이다. 일부 양태에서, 적어도 2개 m은 7이다. 일부 양태에서, 적어도 2개 m은 8이다.

[0144] 일부 양태에서, m의 모든 경우는 3이다. 일부 양태에서, m의 모든 경우는 4이다. 일부 양태에서, m의 모든 경우는 5이다. 일부 양태에서, m의 모든 경우는 6이다. 일부 양태에서, m의 모든 경우는 7이다. 일부 양태에서, m의 모든 경우는 8이다.

[0145] 본 개시내용의 일부 양태에서, 지질은 하기로 표시되는 TT3이다:



[0146] .

[0147] 식중 m의 모든 경우=3. 화학식 I 및 TT3의 조성, 합성, 및 용도는 그 전체가 본원에 참조로 포함되는 WO2016187531A1에 기재된다.

[0148] 따라서, 일부 양태에서, 본원에 기재된 LNP는 (i) TT3 및 (ii) 페이로드를 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 VEE 레플리콘을 포함한다. "**TT3**"은, 본원에 사용된 바와 같이, 세포에 다양한 생물학적 활성 제제 (*예를 들면*, 본원에 기재된 페이로드)의 전달을 위하여 지질 나노입자를 형성할 수 있다. 이외에도, 본 개시내용은 또한 로딩되지 않은 TT3-LNP가 *생체내* 및 *시험관내* 암 세포에서 면역원성 세포사 (ICD)를 유도할 수 있음을 입증한다. 면역원성 세포사는, 본원에 기재된 경우에, 수지상 세포 (DC)의 활성화 및 특이적 T 세포 반응의 후속 활성화를 통해서 효과적 면역 반응을 유도할 수 있는 세포사의 형태를 지칭한다. 일부 양태에서, 면역원성 세포사를 거치는 세포는 종양 세포이다.

[0149] 일부 양태에서, 지질은 DOTAP이다. 따라서, 일부 양태에서, 본 개시내용의 LNP는 (i) DOTAP 및 (ii) 페이로드를 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 VEE 레플리콘을 포함한다. "**DOTAP**"는, 본원에 사용된 바와 같이, 지질 나노입자를 또한 형성할 수 있다. DOTAP는 일시적이거나 안정한 유전자 발현을 위하여 진핵성 세포에 효모 인공 염색체 (YAC)를 포함하는 DNA의 고도로 효율적 형질감염에 사용될 수 있고, 포유류 세포의 연구 샘플에 다른 음으로 하전된 분자, 예컨대 RNA, 올리고뉴클레오티드, 뉴클레오티드, 리보핵단백질 (RNP) 복합체, 및 단백질의 효율적 전달에 또한 적합하다.

[0150] 본 개시내용의 일부 양태에서, 지질은 리포펙타민이다. 일부 양태에서, 본원에 기재된 LNP는 (i) 리포펙타민 및 (ii) 페이로드를 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 VEE 레플리콘을 포함한다. "**리포펙타민**"은, 본원에 사용된 바와 같이, 분자 및 세포 생물학에서 사용된, Invitrogen에 의해 생산되고 판매된, 일반적 형질감염 시약이다. 리포펙션에 의해 *시험관내* 세포 배양물에 RNA (mRNA 및 siRNA 포함) 또는 플라스미드 DNA의 형질감염 효율을 증가시키는데 사용된다. 리포펙타민은, 형질감염 페이로드를 포집하는, 수성 환경에서 리포솜 또는 지질 나노입자를 형성할 수 있는 지질 서브유닛을 함유한다. RNA-함유 리포솜 (그들의 표면에서 양으로 하전됨)은, 세포 막과 리포솜의 중성 공-지질 매개 융합으로 인해, 살아있는 세포의 음으로 하전된 원형질 막과 융합하여, 핵산 카고 분자가 복제 또는 발현을 위하여 세포질로 가로지르게 할 수 있다.

[0151] 일부 양태에서, 본원에 기재된 LNP는 단일 유형의 지질 (*예를 들면*, 모든 리피도이드, *예를 들면*, 모든 TT3)을 포함한다. 일부 양태에서, 본 개시내용의 LNP는 여러 유형의 지질을 포함한다. 예를 들어, 일부 양태에서, LNP는 다른 지질 성분과 함께 리피도이드 (*예를 들면*, TT3)를 포함한다. 이들은 전형적으로 비제한적으로 포파티딜

콜린 (PC) (예를 들면, 1,s-디스테아로일-sn-글리세로-3-포포콜린 (DSPC), 및 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포포에탄올아민 (DOPE), 스테롤 (예를 들면, 콜레스테롤), 및 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)-지질 접합체 (예를 들면, 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[폴레이트(폴리에틸렌 글리콜)-2000 (DSPE-PEG2000) 및 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[메톡시(폴리에틸렌 글리콜)-2000 (C14-PEG2000))에 속하는 다른 지질 분자를 포함한다. 표 1은 예시적 LNP, TT3-LNP 및 DOTAP-LNP의 제형을 보여준다.

표 1.

DOTAP-LNP 몰비	DOTAP 40	DSPC 10	콜레스테롤 48	DSPE-PEG2000 2
TT3-LNP 몰비	TT3 20	DOPE 30	콜레스테롤 40	C14-PEG2000 0.75

[0152]

[0153] 일부 양태에서, LNP는 C14-PEG2000을 포함한다. 따라서, 일부 양태에서, 본 개시내용에 유용한 LNP는 (i) C14-PEG2000 및 (ii) 페이로드를 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 VEE 레플리콘을 포함한다. 일부 양태에서, C14-PEG2000은 1,2-디미리스토일-rac-글리세로-3-메톡시폴리에틸렌 글리콜-2000 (DMG-PEG2000), 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[메톡시(폴리에틸렌 글리콜)-2000] (DMPE-PEG2000), 또는 둘 모두를 포함한다. 일부 양태에서, C14-PEG2000 (또는 본원에 개시된 다른 지질 성분)은 VEE 레플리콘의 캡슐화에 앞서 LNP에서 포매될 수 있다. 일부 양태에서, C14-PEG2000 (또는 본원에 개시된 다른 지질 성분)은 VEE 레플리콘의 캡슐화후 LNP에 첨가될 수 있다. 예를 들어, 일부 양태에서, VEE 레플리콘은 LNP에서 캡슐화되고, 그 다음 C14-PEG2000 (본원에 개시된 다른 지질 성분)은, *예를 들면*, 미셀을 사용하여 LNP에 부착된다.

[0154] 일부 양태에서, 본 개시내용에 유용한 LNP는 중합체성 물질을 포함한다. 따라서, 일부 양태에서, 본원에 제공된 LNP는 (i) 중합체성 물질 및 (ii) 페이로드를 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 VEE 레플리콘을 포함한다. 일부 양태에서, LNP는 (i) 하나 이상 유형의 지질, (ii) 중합체성 물질, 및 (iii) 페이로드를 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 VEE 레플리콘을 포함한다. 일부 양태에서, 하나 이상 유형의 지질은 이온화가능한 지질, 양이온성 지질, 리피도이드, 인지질, 스테롤, 또는 이들의 조합을 포함한다.

[0155] 일부 양태에서, 중합체성 물질은 양이온성 중합체 또는 비-양이온성 중합체, 예컨대 본원에 기재된 것들을 포함한다. 중합체성 물질의 비-제한적 예는, 참조로 이에 편입되는, Jiang et al. 재료 과학 및 재료 공학에서의 참조 모듈. (2021) 및 Byun *et al. BioChip J* (2022)에 개시된다. 중합체성 물질의 비-제한적 예는 다음을 포함한다: 폴리에틸렌이민 (PEI), 폴리(아미도아민)(PAMAM), 폴리(β-아미노 에스테르) (PBAE), 폴리(2-N,N-디메틸아미노에틸 메타크릴레이트) (PDMAEMA), 폴리(아미노산) (PAA), 키토산 덱스트란 (Raemdonck *et al.*, 2009), 사이클로덱스트린 (Singh *et al.*, 2019), 셀룰로스 (Kim *et al.*, 2020), 히알루론산, 폴리락트산 (PLA), 폴리(락틱-코-글리콜산) (PLGA), 및 폴리카프로락톤 (PCL).

[0156] 적어도 상기 개시내용으로부터 명백한 대로, 일부 양태에서, 본 개시내용에 유용한 LNP는 페이로드를 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 VEE 레플리콘, 및 하기 구성요소들 중 하나 이상을 포함한다: (i) 이온화가능한 지질, (ii) 양이온성 지질, (iii) 지질-유사 물질 (*예를 들면*, 리피도이드), (iv) 인지질, (v) 스테롤, (vi) 페길화된 지질, 및 (vii) 중합체성 물질. 일부 양태에서, 본원에 기재된 LNP는 페이로드를 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 VEE 레플리콘, 및 하기 중 하나 이상을 포함한다: (i) 이온화가능한 지질, (ii) 양이온성 지질, (iii) 인지질, (iv) 스테롤, 및 (v) 페길화된 지질. 일부 양태에서, 본원에 기재된 LNP는 페이로드를 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 VEE 레플리콘, 및 하기 중 하나 이상을 포함한다: (i) 지질-유사 물질 (*예를 들면*, 리피도이드), (ii) 인지질, (iii) 스테롤, 및 (iv) 페길화된 지질. 일부 양태에서, 본원에 기재된 LNP는 페이로드를 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 VEE 레플리콘, 및 하기 중 하나 이상을 포함한다: (i) 중합체성 물질, (ii) 인지질, (iii) 스테롤, 및 (iv) 페길화된 지질. 일부 양태에서, 본원에 기재된 LNP는 페이로드를 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 VEE 레플리콘, 및 하기 중 하나 이상을 포함한다: (i) 중합체성 물질, (ii) 지질, (iii) 인지질, (iv) 스테롤, 및 (v) 페길화된 지질.

[0157] 지질 나노입자의 입자 크기는 약물 방출 속도, 생체-분포, 점막접착, 물의 세포성 흡수 및 나노입자의 내부로의 완충액 교환, 및 단백질 확산에 영향을 미칠 수 있다. 본 개시내용의 일부 양태에서, LNP의 직경은 약 30 내지 약 500 nm 범위이다. 본 개시내용의 일부 양태에서, LNP의 직경은 약 30 내지 약 500 nm, 약 50 내지 약 400 nm, 약 70 내지 약 300 nm, 약 100 내지 약 200 nm, 약 100 내지 약 175 nm, 또는 약 100 내지 약 160 nm 범위이다. 본 개시내용의 일부 양태에서, LNP의 직경은 100-160 nm 범위이다. 본 개시내용의 일부 양태에서, LNP의

직경은 약 30 nm, 약 40 nm, 약 50 nm, 약 60 nm, 약 70 nm, 약 80 nm, 약 90 nm, 약 100 nm, 약 101 nm, 약 102 nm, 약 103 nm, 약 104 nm, 약 105 nm, 약 106 nm, 약 107 nm, 약 108 nm, 약 109 nm, 약 110 nm, 약 111 nm, 약 112 nm, 약 113 nm, 약 114 nm, 약 115 nm, 약 116 nm, 약 117 nm, 약 118 nm, 약 119 nm, 약 120 nm, 약 130 nm, 약 140 nm, 약 150 nm, 또는 약 160 nm일 수 있다. 일부 양태에서, 지질 나노입자는 약 140 nm의 직경을 갖는다.

[0158] 제타 전위는 지질 나노입자 표면에서 유효 전하의 측정치이다. 제타 전위의 크기는 입자 안정성에 대한 정보를 제공한다. 일부 양태에서, 본원에 기재된 나노입자의 제타 전위는 약 -20 내지 약 20 mv 범위이다. 본 개시내용의 일부 양태에서, LNP의 제타 전위는 약 3 내지 약 6 mv 범위이다. 본 개시내용의 일부 양태에서, LNP의 제타 전위는 약 3 mv, 약 3.1 mv, 약 3.2 mv, 약 3.3 mv, 약 3.4 mv, 약 3.5 mv, 약 3.6 mv, 약 3.7 mv, 약 3.8 mv, 약 3.9 mv, 약 4 mv, 약 4.1 mv, 약 4.2 mv, 약 4.3 mv, 약 4.4 mv, 약 4.5 mv, 약 4.6 mv, 약 4.7 mv, 약 4.8 mv, 약 4.9 mv, 약 5 mv, 약 5.1 mv, 약 5.2 mv, 약 5.3 mv, 약 5.4 mv, 약 5.5 mv, 약 5.6 mv, 약 5.7 mv, 약 5.8 mv, 약 5.9 mv, 또는 약 6 mv일 수 있다. 일부 양태에서, 본원에 기재된 나노입자의 제타 전위는 약 -6.0 mv, 약 -5.9 mv, 약 -5.8 mv, 약 -5.7 mv, 약 -5.6 mv, 약 -5.5 mv, 약 -5.4 mv, 약 -5.3 mv, 약 -5.2 mv, 약 -5.1 mv, 약 -5.0 mv, 약 -4.9 mv, 약 -4.8 mv, 약 -4.7 mv, 약 -4.6 mv, 약 -4.5 mv, 약 -4.4 mv, 약 -4.3 mv, 약 -4.2 mv, 약 -4.1 mv, 약 -4.0 mv, 약 -3.9 mv, 약 -3.8 mv, 약 -3.7 mv, 약 -3.6 mv, 약 -3.5 mv, 약 -3.4 mv, 약 -3.3 mv, 약 -3.2 mv, 약 -3.1 mv, 약 -3.0 mv, 약 -2.9 mv, 약 -2.8 mv, 약 -2.7 mv, 약 -2.6 mv, 약 -2.5 mv, 약 -2.4 mv, 약 -2.3 mv, 약 -2.2 mv, 약 -2.1 mv, 약 -2.0 mv, 약 -1.9 mv, 약 -1.8 mv, 약 -1.7 mv, 약 -1.6 mv, 약 -1.5 mv, 약 -1.4 mv, 약 -1.3 mv, 약 -1.2 mv, 약 -1.1 mv, 약 -1.0 mv, 약 -0.9 mv, 약 -0.8 mv, 약 -0.7 mv, 약 -0.6 mv, 약 -0.5 mv, 약 -0.4 mv, 약 -0.3 mv, 약 -0.2 mv, 약 -0.1 mv, 약 0.0 mv, 0.1 약 mv, 약 0.2 mv, 약 0.3 mv, 약 0.4 mv, 약 0.5 mv, 약 0.6 mv, 약 0.7 mv, 약 0.8 mv, 약 0.9 mv, 약 1.0 mv, 약 1.1 mv, 약 1.2 mv, 약 1.3 mv, 약 1.4 mv, 약 1.5 mv, 약 1.6 mv, 약 1.7 mv, 약 1.8 mv, 약 1.9 mv, 약 2.0 mv, 약 2.1 mv, 약 2.2 mv, 약 2.3 mv, 약 2.4 mv, 약 2.5 mv, 약 2.6 mv, 약 2.7 mv, 약 2.8 mv, 약 2.9 mv, 약 3.0 mv, 약 3.1 mv, 약 3.2 mv, 약 3.3 mv, 약 3.4 mv, 약 3.5 mv, 약 3.6 mv, 약 3.7 mv, 약 3.8 mv, 약 3.9 mv, 약 4.0 mv, 약 4.1 mv, 약 4.2 mv, 약 4.3 mv, 약 4.4 mv, 약 4.5 mv, 약 4.6 mv, 약 4.7 mv, 약 4.8 mv, 약 4.9 mv, 약 5.0 mv, 약 5.1 mv, 약 5.2 mv, 약 5.3 mv, 약 5.4 mv, 약 5.5 mv, 약 5.6 mv, 약 5.7 mv, 약 5.8 mv, 약 5.9 mv, 또는 약 6.0 mv일 수 있다

[0159] 일부 양태에서, 본 개시내용은 지질 나노입자 (LNP)가 있는 캡슐화된 폴리뉴클레오티드 (*예를 들면*, VEE 레플리콘 mRNA)에 관련된다. 본 개시내용의 일부 양태에서, LNP의 지질과 폴리뉴클레오티드 (*예를 들면*, VEE 레플리콘 mRNA) 사이 질량비는 약 1:2 내지 약 15:1 범위이다. 일부 양태에서, 지질과 폴리뉴클레오티드 (*예를 들면*, VEE 레플리콘 mRNA) 사이 질량비는 약 1:2, 약 1:1.9, 약 1:1.8, 약 1:1.7, 약 1:1.6, 약 1:1.5, 약 1:1.4, 약 1:1.3, 약 1:1.2, 약 1:1.1, 약 1:1, 약 1.1:1, 약 1.2:1, 약 1.3:1, 약 1.4:1, 약 1.5:1, 약 1.6:1, 약 1.7:1, 약 1.8:1, 약 1.9:1, 약 2:1, 약 2.5:1, 약 3:1, 약 3.5:1, 약 4:1, 약 4.5:1, 약 5:1, 약 5.5:1, 약 6:1, 약 6.5:1, 약 7:1, 약 7.5:1, 약 8:1, 약 8.5:1, 약 9:1, 약 9.5:1, 약 10:1, 약 10.5:1, 약 11:1, 약 11.5:1, 약 12:1, 약 12.5:1, 약 13:1, 약 13.5:1, 약 14:1, 약 14.5:1, 또는 약 15:1일 수 있다. 본 개시내용의 일부 양태에서, 지질과 폴리뉴클레오티드 (*예를 들면*, VEE 레플리콘 mRNA) 사이 질량비는 약 10:1이다.

[0160] **IV. VEE 레플리콘**

[0161] 하나 이상 유형의 지질 (*예를 들면*, 상기 기재된 것들) 이외에도, 본 개시내용의 LNP는 페이로드를 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 VEE 레플리콘을 포함한다. 본 개시내용에서 다른 곳에 추가로 기재된 대로, 출원인은 VEE 레플리콘과 하나 이상의 지질 (*예를 들면*, 리피도이드, *예를 들면*, TT3) 사이 상호작용이, 비-간 조직 (*예를 들면*, 비장 및 폐)과 비교하여, LNP가 간을 회피하고/거나 간 내에서 페이로드의 발현을 감소시키게 하는, 특정 개선된 특성, 예컨대 조직-특이적 향성이 있는 본원에 기재된 LNP를 제공함을 확인하였다.

[0162] VEE 바이러스는 주로 말 종에서 VEE 또는 뇌척수염을 유발시키는 모기에 의해 전형적으로 전파된 바이러스성 병원체이다. 인간은, 하지만, VEE를 또한 접촉할 수 있고, 면역계가 약화된 사람들은 VEE로 감염되면 심각한 합병증을 가질 위험에 특히 처한다. VEE의 비리온은 구형이고 외부 표면 주위 퍼진 당단백질 표면 단백질이 있는 지질 막을 소유한다. VEE는, 5'-말단 캡 및 3'-말단 폴리(A) 트랙을 배제하는, 대략 11.45 kb의 게놈을 갖고, 4개 비구조적 단백질 (nsP) 및 5개 구조적 단백질을 포함한다. 비-구조적 단백질은 nsP1, nsP2, nsP3, 및 nsP4를 포함하고, 한편 구조적 영역은 단백질 C, E3, E2, 6K, 및 E1을 인코딩한다. 일부 양태에서, 자가-증폭 레플리콘 RNA는 VEE에서 유래된 WT 레플리콘 RNA이다. 야생형 VEE 바이러스 레플리콘 RNA의 서열은 서열번호: 186에 제시

된다 (표 4 *참조*).

[0163] 일부 양태에서, 본 개시내용에 유용한 VEE 레플리콘은 서열번호: 186 또는 이의 단편에 제시된 서열과 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 약 100% 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 양태에서, 본 개시내용에 유용한 VEE 레플리콘은 서열번호: 187에 제시된 서열과 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 약 100% 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 양태에서, VEE 레플리콘은 서열번호: 187에 제시된 핵산 서열을 포함한다. 일부 양태에서, VEE 레플리콘은 서열번호: 187에 제시된 핵산 서열로 이루어진다. 일부 양태에서, VEE 레플리콘은 서열번호: 187에 제시된 핵산 서열로 본질적으로 이루어진다.

[0164] 일부 양태에서, 본 개시내용에 유용한 VEE 레플리콘은 당업계에서 알려진 임의의 VEE 레플리콘을 포함한다. 일부 양태에서, VEE 레플리콘은 하나 이상의 돌연변이를 포함한다. 예를 들어, 일부 양태에서, VEE 레플리콘은 비-구조적 단백질 nsP2 및 nsP3이 있는 돌연변이를 포함하고, 여기서 돌연변이는 인간 세포에서 서브게놈성 발현을 촉진시킨다. 일부 양태에서, VEE 레플리콘은 야생형 VEE 레플리콘 (서열번호: 186)과 비교하여 인코딩된 페이로드의 더 큰 발현을 허용하는 돌연변이를 포함한다. 일부 양태에서, 자가-증폭 레플리콘 RNA는 서열번호: 186의 WT 레플리콘의 핵산 위치 3936 및/또는 4758에서 적어도 하나의 점 돌연변이를 포함한다. 일부 양태에서, 자가-증폭 레플리콘 RNA는 하기 점 돌연변이들 중 적어도 하나를 포함한다: 서열번호: 186의 WT 레플리콘 서열의 위치 3936 (G3936C)에 구아닌에서 시토신으로 및 위치 4758 (A4758G)에 아데닌에서 구아닌으로. G3936C 돌연변이는 아미노산 잔기 1309 (G1309R)에 글리신에서 아르기닌으로 변화를 초래할 것이다. A4758G 돌연변이는 아미노산 잔기 1583 (51583G)에 세린에서 글리신으로 변화를 초래할 것이다. 이러한 VEE 레플리콘에 관한 추가의 개시내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함되는 *예를 들면* US20200281994A1에 제공된다.

[0165] 임의의 하나의 이론에 의해 구속되지 않고, 일부 양태에서, VEE 레플리콘과 하나 이상의 지질 (*예를 들면*, 리피도이드, *예를 들면*, TT3) 사이 상호작용은 간을 표적화하지 않는 LNP를 초래한다. 그리고, LNP가 간을 표적화하지 않기 때문에, 일부 양태에서, 페이로드는 간에서 발현되지 않는다. 일부 양태에서, (*예를 들면*, 페이로드를 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 VEE 레플리콘을 포함하는) 본원에 기재된 LNP는 간을 표적화할 수 있지만, 페이로드의 발현은 비-간 조직에서 상응하는 발현과 비교하여 감소된다.

[0166] 일부 양태에서, VEE 레플리콘은 톨 유사 수용체 (TLR)의 활성화를 유도할 수 있다. TLRs, TLR3, TLR7/8, 및 TLR9의 서브세트는 항바이러스성 사이토카인 예컨대 유형 I 인터페론 (IFN)의 생산을 촉발시킴으로써 항바이러스성 반응에 연루된다. TLR3은 많은 바이러스에 대하여 복제 매개자인, 이중 가닥 RNA에 반응한다. TLR7/8은 바이러스성 단일-가닥 RNA를 인식하고, 반면에 TLR9는 바이러스성 DNA 내에서 메틸화되지 않은 CpG 모티프를 인식한다. 바이러스 인식에 연루된 TLR은 엔도솜성 막에서 발현되고 어댑터 단백질 MyD88에 대한 그들의 요건에 따라 분리될 수 있다: TLR3 활성은 MyD88-독립적인 한편 TLRs7/8/9는 MyD88에 의존한다. TLR3의 활성화는 유형 I 인터페론 (IFN)의 생산으로 이어진다. ISGF3 (STAT1/STAT2/IRF9) 복합체를 통해서 유형-I 인터페론 신호전달은 지속된 Rip3 활성화 및 괴사에 필요하다. 임의의 하나의 이론에 구속되지 않고, 일부 양태에서, 유형 I 인터페론의 유도는 간 내에서 페이로드의 발현을 감소 및/또는 억압할 수 있다.

[0167] ***IV.A. 페이로드***

[0168] 본원에 기재된 경우에, 본 개시내용에 유용한 VEE 레플리콘은 페이로드를 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "**페이로드**"는 본원에 기재된 LNP와 접촉되는 표적 (*예를 들면*, 표적 세포)에 작용할 수 있는 임의의 제제를 지칭한다. 일부 양태에서, 달리 지시되지 않는 한, 용어 페이로드는 용어 "**생물학적으로 활성 분자**"와 교환가능하게 사용될 수 있다. 본 개시내용에 유용한 페이로드의 비-제한적 예는 다음을 포함한다: 뉴클레오티드 (*예를 들면*, 검출가능한 모이어티 또는 독소를 포함하거나 전사를 방해하는 뉴클레오티드), 핵산 (*예를 들면*, 폴리펩티드 예컨대 효소를 인코딩하는 DNA 또는 mRNA 분자, 또는 조절성 기능을 갖는 RNA 분자 예컨대 miRNA, dsDNA, lncRNA, siRNA, 안티센스 올리고뉴클레오티드, 포스포로디아미데이트 모르폴리노 올리고머 (PMO), 펩티드-접합 포스포로디아미데이트 모르폴리노 올리고머 (PPMO), 또는 이들의 조합), 아미노산 (*예를 들면*, 검출가능한 모이어티 또는 독소를 포함하거나 번역을 방해하는 아미노산), 폴리펩티드 (*예를 들면*, 효소), 지질, 탄수화물, 및 작은 분자 (*예를 들면*, 작은 분자 약물 및 독소).

[0169] 일부 양태에서, 페이로드는 단백질 (*예를 들면*, 이종 단백질)을 인코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 당업자에게 명백할 대로, 임의의 적합한 단백질은 페이로드에서 인코딩될 수 있다. 일부 양태에서, 단백질은 검출가능한 단

백질 (*예를 들면*, 형광성 단백질)을 포함한다. 이러한 검출가능한 단백질의 비-제한적 예는 다음을 포함한다: 루시퍼라제, wt-GFP, 녹색 형광성 단백질 (예를 들면, EGFP, Emerald, Superfolder GFP, Azami Green, mWasabi, TagGFP, TurboGFP, AcGFP, ZsGreen, T-Sapphire, 등), 청색 형광성 단백질, (예를 들면, EBFP, EBFP2, Azurite, mTagBFP, 등), 시안 형광성 단백질 (예를 들면, ECFP, mECFP, Cerulean, mTurquoise, CyPet, AmCyan1, Midori-Ishi Cyan, TagCFP, mTFP1 (청녹색), 등), 황색 형광성 단백질 (예를 들면, EYFP, Topaz, Venus, mCitrine, YPet, TagYFP, PhiYFP, ZsYellow1, mBanana, 등), 주황색 형광성 단백질 (예를 들면, Kusabira Orange, Kusabira Orange2, mOrange, mOrange2, dTomato, dTomato-Tandem, TagRFP, TagRFP-T, DsRed, DsRed2, DsRed-Express (T1), DsRed-Monomer, mTangerine, 등), 또는 적색 형광성 단백질 (예를 들면, mRuby, mApple, mStrawberry, AsRed2, mRFP1, JRed, mCherry, HcRed1, mRaspberry, dKeima-Tandem, HcRed-Tandem, mPlum, AQ143, 등).

[0170] 일부 양태에서, 페이로드는 치료적 단백질을 인코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 이러한 치료적 단백질의 비-제한적 예는 사이토카인을 포함한다. 일부 양태에서, 사이토카인은 인터류킨 (IL)-12 분자를 포함한다. 일부 양태에서, IL-12 분자는 IL-12, IL-12 서브유닛 (*예를 들면*, IL-12 베타 서브유닛 또는 IL-12 알파 서브유닛), 또는 면역조절성 기능을 보유하는 돌연변이체 IL-12 분자를 포함한다. 일부 양태에서, 사이토카인은 IL-12가 아니다. 일부 양태에서, 사이토카인은 (i) 사이토카인의 공통 감마쇄 패밀리; (ii) 사이토카인의 IL-1 패밀리; (iii) 조혈 사이토카인; (iv) 인터페론 (*예를 들면*, 유형 I, 유형 II, 또는 유형 III); (v) 사이토카인의 TNF 패밀리; (vi) 사이토카인의 IL-17 패밀리; (vii) 손상-연관 분자성 패턴 (DAMP); (viii) 관용원성 사이토카인; 또는 (ix) 이들의 조합으로부터 선택된다. 일부 양태에서, 사이토카인은 IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-15, IL-21, IFN-γ, IL-1α, IL-1β, IL-1ra, IL-18, IL-33, IL-36α, IL-36β, IL-36γ, IL-36ra, IL-37, IL-38, IL-3, IL-5, IL-6, IL-11, IL-13, IL-23, 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자 (GM-CSF), 과립구-콜로니 자극 인자 (G-CSF), 백혈병 억제 인자 (LIF), 줄기 세포 인자 (SCF), 트롬보포이에틴 (TPO), 대식세포-콜로니 자극 인자 (M-CSF), 에리트로포이에틴 (EPO), Flt-3, IFN-α, IFN-β, IFN-γ, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, TNF-α, TNF-β, BAFF, APRIL, 림프독소 베타 (TNF-γ), IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E, IL-17F, IL-25, TSLP, IL-35, IL-27, TGF-β, 또는 이들의 조합을 포함한다. 인코딩될 수 있는 다른 단백질의 추가의 예는 아래에 추가로 제공된다.

[0171] 페이로드가 IL-12 단백질을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 경우, 일부 양태에서, (*예를 들면*, 본원에 기재된 핵산 분자에 의해 인코딩된) IL-12 단백질은 서열번호: 182와 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94% 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 약 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0172] 일부 양태에서, IL-12 분자는 IL-12α 및/또는 IL-12β 서브유닛을 포함한다. 일부 양태에서, IL-12α 서브유닛은 서열번호: 183과 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 약 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0173] 일부 양태에서, IL-12β 서브유닛은 서열번호: 184와 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94% 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 약 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0174] 일부 양태에서, 본원에 기재된 VEE 레플리콘은 코돈 최적화된 핵산 서열을 포함한다. 따라서, 일부 양태에서, 본원에 개시된 IL-12 단백질 (*예를 들면*, IL-12 p35 서브유닛, IL-12 p40 서브유닛, 또는 헤테로이량체성 IL-12 p70)을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 야생형 뉴클레오티드 서열 (*예를 들면*, 서열번호: 185)의 것과 상이하다.

[0175] 일부 양태에서, VEE 레플리콘은 IL-12β 서브유닛을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하고, 여기서 핵산 서열은 서열번호: 51, 서열번호: 52, 서열번호: 53, 서열번호: 54, 서열번호: 55, 서열번호: 56, 서열번호: 57, 서열번호: 58, 서열번호: 59, 서열번호: 60, 서열번호: 61, 서열번호: 62, 서열번호: 63, 서열번호: 64, 서열번호: 65, 서열번호: 66, 서열번호: 67, 서열번호: 68, 서열번호: 69, 서열번호: 70, 서열번호: 71, 서열번호: 72, 서열번호: 73, 서열번호: 74, 또는 서열번호: 75 중 임의의 하나에 제시된 서열과 적어도 약 75%, 적어도 약 76%, 적어도 약 77%, 적어도 약 78%, 적어도 약 79%, 적어도 약 80%, 적어도 약 81%, 적어도 약 82%, 적어도 약 83%, 적어도 약 84%, 적어도 약 85%, 적어도 약 86%, 적어도 약 87%, 적어도 약 88%, 적어도 약 89%, 적

어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 약 100% 서열 동일성을 갖는다.

[0176] 일부 양태에서, 본 개시내용에 유용한 VEE 레플리콘은 IL-12β 서브유닛을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하고, 여기서 핵산 서열은 (i) 서열번호: 51에 제시된 서열과 적어도 76%, 적어도 77%, 적어도 78%, 적어도 79%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 서열 동일성; (ii) 서열번호: 52에 제시된 서열과 적어도 78%, 적어도 79%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 서열 동일성; (iii) 서열번호: 53에 제시된 서열과 적어도 77%, 적어도 78%, 적어도 79%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 서열 동일성; (iv) 서열번호: 54에 제시된 서열과 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 서열 동일성; (v) 서열번호: 55에 제시된 서열과 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 서열 동일성; (vi) 서열번호: 56에 제시된 서열과 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 서열 동일성; (vii) 서열번호: 57에 제시된 서열과 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 서열 동일성; (viii) 서열번호: 58에 제시된 서열과 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 서열 동일성; (ix) 서열번호: 59에 제시된 서열과 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 서열 동일성; (x) 서열번호: 65, 69, 또는 74에 제시된 서열과 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 서열 동일성; (xi) 서열번호: 66, 70, 또는 75에 제시된 서열과 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 서열 동일성; (xii) 서열번호: 62에 제시된 서열과 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 서열 동일성; (xiii) 서열번호: 63에 제시된 서열과 적어도 99% 또는 100% 서열 동일성; 또는 (xiv) 서열번호: 64에 제시된 서열과 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 서열 동일성을 갖는다.

[0177] 일부 양태에서, IL-12β 서브유닛을 인코딩하는 핵산 분자는 서열번호: 51에 제시된 서열을 포함한다. 일부 양태에서, IL-12β 서브유닛을 인코딩하는 핵산 분자는 서열번호: 52에 제시된 서열을 포함한다. 일부 양태에서, IL-12β 서브유닛을 인코딩하는 핵산 분자는 서열번호: 53에 제시된 서열을 포함한다. 일부 양태에서, IL-12β 서브유닛을 인코딩하는 핵산 분자는 서열번호: 54에 제시된 서열을 포함한다. 일부 양태에서, IL-12β 서브유닛을 인코딩하는 핵산 분자는 서열번호: 55에 제시된 서열을 포함한다. 일부 양태에서, IL-12β 서브유닛을 인코딩하는 핵산 분자는 서열번호: 56에 제시된 서열을 포함한다 일부 양태에서, IL-12β 서브유닛을 인코딩하는 핵산 분자는 서열번호: 57에 제시된 서열을 포함한다. 일부 양태에서, IL-12β 서브유닛을 인코딩하는 핵산 분자는 서열번호: 58에 제시된 서열을 포함한다. 일부 양태에서, IL-12β 서브유닛을 인코딩하는 핵산 분자는 서열번호: 59에 제시된 서열을 포함한다. 일부 양태에서, IL-12β 서브유닛을 인코딩하는 핵산 분자는 서열번호: 65에 제시된 서열을 포함한다. 일부 양태에서, IL-12β 서브유닛을 인코딩하는 핵산 분자는 서열번호: 66에 제시된 서열을 포함한다. 일부 양태에서, IL-12β 서브유닛을 인코딩하는 핵산 분자는 서열번호: 67에 제시된 서열을 포함한다. 일부 양태에서, IL-12β 서브유닛을 인코딩하는 핵산 분자는 서열번호: 68에 제시된 서열을 포함한다. 일부 양태에서, IL-12β 서브유닛을 인코딩하는 핵산 분자는 서열번호: 69에 제시된 서열을 포함한다. 일부 양태에서, IL-12β 서브유닛을 인코딩하는 핵산 분자는 서열번호: 70에 제시된 서열을 포함한다. 일부 양태에서, IL-12β 서브유닛을 인코딩하는 핵산 분자는 서열번호: 71에 제시된 서열을 포함한다. 일부 양태에서, IL-12β 서브유닛을 인코딩하는 핵산 분자는 서열번호: 72에 제시된 서열을 포함한다. 일부 양태에서, IL-12β 서브유닛을 인코딩하는 핵산 분자는 서열번호: 73에 제시된 서열을 포함한다. 일부 양태에서, IL-12β 서브유닛을 인코딩하는 핵산 분자는 서열번호: 74에 제시된 서열을 포함한다. 일부 양태에서, IL-12β 서브유닛을 인코딩하는 핵산 분자는 서열번호: 75에 제시된 서열을 포함한다. 일부 양태에서, IL-12β 서브유닛을 인코딩하는 핵산 분자는 서열번호: 62에 제시된 서열을 포함한다. 일부 양태에서, IL-12β 서브유닛을 인코딩하는 핵산 분

자는 서열번호: 63에 제시된 서열을 포함한다. 일부 양태에서, IL-12β 서브유닛을 인코딩하는 핵산 분자는 서열번호: 64에 제시된 서열을 포함한다. 일부 양태에서, IL-12β 서브유닛을 인코딩하는 핵산 분자는 서열번호: 60에 제시된 서열을 포함한다. 일부 양태에서, IL-12β 서브유닛을 인코딩하는 핵산 분자는 서열번호: 61에 제시된 서열을 포함한다.

[0178] 일부 양태에서, VEE 레플리콘은 IL-12 p35 서브유닛 (또한 본원에 IL-12α 서브유닛으로서 지칭됨)을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하고, 여기서 핵산 서열은 서열번호: 101, 서열번호: 102, 서열번호: 103, 서열번호: 104, 서열번호: 105, 서열번호: 106, 서열번호: 107, 서열번호: 108, 서열번호: 109, 서열번호: 110, 서열번호: 111, 서열번호: 112, 서열번호: 113, 서열번호: 114, 서열번호: 115, 서열번호: 116, 서열번호: 117, 서열번호: 118, 서열번호: 119, 서열번호: 120, 서열번호: 121, 서열번호: 122, 서열번호: 123, 서열번호: 124, 또는 서열번호: 125 중 임의의 하나에 제시된 서열과 적어도 약 77%, 적어도 약 78%, 적어도 약 79%, 적어도 약 80%, 적어도 약 81%, 적어도 약 82%, 적어도 약 83%, 적어도 약 84%, 적어도 약 85%, 적어도 약 86%, 적어도 약 87%, 적어도 약 88%, 적어도 약 89%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 약 100% 서열 동일성을 갖는다.

[0179] 일부 양태에서, 본 개시내용에 유용한 VEE 레플리콘은 IL-12 p35 서브유닛을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하고, 여기서 핵산 서열은 (i) 서열번호: 101에 제시된 서열과 적어도 79%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 서열 동일성; (ii) 서열번호: 102에 제시된 서열과 적어도 78%, 적어도 79%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 서열 동일성; (iii) 서열번호: 103에 제시된 서열과 적어도 77%, 적어도 78%, 적어도 79%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 서열 동일성; (iv) 서열번호: 104에 제시된 서열과 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 서열 동일성; (v) 서열번호: 105에 제시된 서열과 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 서열 동일성; (vi) 서열번호: 106에 제시된 서열과 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 서열 동일성; (vii) 서열번호: 107에 제시된 서열과 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 서열 동일성; (viii) 서열번호: 108에 제시된 서열과 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 서열 동일성; (ix) 서열번호: 109에 제시된 서열과 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 서열 동일성; (x) 서열번호: 115, 119, 또는 124에 제시된 서열과 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 서열 동일성; (xi) 서열번호: 116, 120, 또는 125에 제시된 서열과 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 서열 동일성; (xii) 서열번호: 112에 제시된 서열과 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 서열 동일성; (xiii) 서열번호: 113에 제시된 서열과 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 서열 동일성; 또는 (xiv) 서열번호: 114에 제시된 서열과 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 서열 동일성을 갖는다.

[0180] 일부 양태에서, IL-12α 서브유닛을 인코딩하는 핵산 분자는 서열번호: 101에 제시된 서열을 포함한다. 일부 양태에서, IL-12α 서브유닛을 인코딩하는 핵산 분자는 서열번호: 102에 제시된 서열을 포함한다. 일부 양태에서, IL-12α 서브유닛을 인코딩하는 핵산 분자는 서열번호: 103에 제시된 서열을 포함한다. 일부 양태에서, IL-12α 서브유닛을 인코딩하는 핵산 분자는 서열번호: 104에 제시된 서열을 포함한다. 일부 양태에서, IL-12α 서브유닛을 인코딩하는 핵산 분자는 서열번호: 105에 제시된 서열을 포함한다. 일부 양태에서, IL-12α 서브유닛을 인코딩하는 핵산 분자는 서열번호: 106에 제시된 서열을 포함한다. 일부 양태에서, IL-12α 서브유닛을 인코딩하는 핵산 분자는 서열번호: 107에 제시된 서열을 포함한다. 일부 양태에서, IL-12α 서브유닛을 인코딩하는 핵산 분자는 서열번호: 108에 제시된 서열을 포함한다. 일부 양태에서, IL-12α 서브유닛을 인코딩하는 핵산 분자는

서열번호: 109에 제시된 서열을 포함한다. 일부 양태에서, IL-12α 서브유닛을 인코딩하는 핵산 분자는 서열번호: 115에 제시된 서열을 포함한다. 일부 양태에서, IL-12α 서브유닛을 인코딩하는 핵산 분자는 서열번호: 116에 제시된 서열을 포함한다. 일부 양태에서, IL-12β 서브유닛을 인코딩하는 핵산 분자는 서열번호: 117에 제시된 서열을 포함한다. 일부 양태에서, IL-12β 서브유닛을 인코딩하는 핵산 분자는 서열번호: 118에 제시된 서열을 포함한다. 일부 양태에서, IL-12β 서브유닛을 인코딩하는 핵산 분자는 서열번호: 119]에 제시된 서열을 포함한다. 일부 양태에서, IL-12β 서브유닛을 인코딩하는 핵산 분자는 서열번호: 120에 제시된 서열을 포함한다. 일부 양태에서, IL-12β 서브유닛을 인코딩하는 핵산 분자는 서열번호: 121에 제시된 서열을 포함한다. 일부 양태에서, IL-12β 서브유닛을 인코딩하는 핵산 분자는 서열번호: 122에 제시된 서열을 포함한다. 일부 양태에서, IL-12β 서브유닛을 인코딩하는 핵산 분자는 서열번호: 123에 제시된 서열을 포함한다. 일부 양태에서, IL-12β 서브유닛을 인코딩하는 핵산 분자는 서열번호: 124에 제시된 서열을 포함한다. 일부 양태에서, IL-12β 서브유닛을 인코딩하는 핵산 분자는 서열번호: 125에 제시된 서열을 포함한다. 일부 양태에서, IL-12α 서브유닛을 인코딩하는 핵산 분자는 서열번호: 112에 제시된 서열을 포함한다. 일부 양태에서, IL-12α 서브유닛을 인코딩하는 핵산 분자는 서열번호: 113에 제시된 서열을 포함한다. 일부 양태에서, IL-12α 서브유닛을 인코딩하는 핵산 분자는 서열번호: 114에 제시된 서열을 포함한다. 일부 양태에서, IL-12β 서브유닛을 인코딩하는 핵산 분자는 서열번호: 110에 제시된 서열을 포함한다. 일부 양태에서, IL-12β 서브유닛을 인코딩하는 핵산 분자는 서열번호: 111에 제시된 서열을 포함한다.

[0181] 일부 양태에서, IL-12 p40 서브유닛을 인코딩하는 핵산 분자 및 IL-12 p35 서브유닛을 인코딩하는 핵산 분자는 서로 접합될 수 있다. 예를 들어, 일부 양태에서, 본 개시내용은 제1 핵산 및 제2 핵산을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오티드를 제공하고, 여기서 제1 핵산은 IL-12 p40 서브유닛을 인코딩하고 제2 핵산은 IL-12 p35 서브유닛을 인코딩한다. 일부 양태에서, IL-12α 서브유닛 및 IL-12β 서브유닛은 링커에 의해 연결된다. 일부 양태에서, 링커는 적어도 약 2, 적어도 약 5, 적어도 약 6, 적어도 약 7, 적어도 약 8, 적어도 약 9, 적어도 약 10, 적어도 약 11, 적어도 약 12, 적어도 약 13, 적어도 약 14, 적어도 약 15, 적어도 약 16, 적어도 약 17, 적어도 약 18, 적어도 약 19, 또는 적어도 약 20개 아미노산의 아미노산 링커를 포함한다. 일부 양태에서, 링커는 (GS) 링커를 포함한다. 일부 양태에서, GS 링커는 (Gly3Ser)n 또는 S(Gly3Ser)n의 화학식을 갖고, 여기서 n은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 또는 100으로 이루어지는 군으로부터 선택된 양의 정수이다. 일부 양태에서, (Gly3Ser)n 링커는 (Gly3Ser)3 또는 (Gly3Ser)4이다.

[0182] 일부 양태에서, VEE 레플리콘은 케모카인을 인코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 케모카인의 비-제한적 예는 CCL14, CCL19, CCL20, CCL21, CCL25, CCL27, CXCL12, CXCL13, CXCL-8, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL11, 및 CXCL10을 포함한다. 일부 양태에서, VEE 레플리콘은 성장 인자를 인코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "**성장 인자**"는 세포들 사이 신호전달할 수 있고 세포성 성장을 자극할 수 있는 자연 발생 서브스턴스를 지칭한다. 사이토카인이 성장 인자일 수 있어도, 특정 유형의 사이토카인은 세포 성장에서 억제성 효과를 또한 가질 수 있고, 이에 따라 2개 용어를 구별할 수 있다. 성장 인자의 비-제한적 예는 아드레노메둘린 (AM), 안지오포이에틴 (Ang), 자가분비 운동 인자, 골 형태형성 단백질 (BMP), 섬모 신경영양성 인자 (CNTF), 백혈병 억제성 인자 (LIF), 인터루킨-6 (IL-6), 대식세포 콜로니-자극 인자 (m-CSF), 과립구 콜로니-자극 인자 (G-CSF), 과립구 대식세포 콜로니-자극 인자 (GM-CSF), 상피 성장 인자 (EGF), 에프린 A1, 에프린 A2, 에프린 A3, 에프린 A4, 에프린 A5, 에프린 B1, 에프린 B2, 에프린 B3, 에리트로포이에틴 (EPO), 섬유아세포 성장 인자 1(FGF1), 섬유아세포 성장 인자 2(FGF2), 섬유아세포 성장 인자 3(FGF3), 섬유아세포 성장 인자 4(FGF4), 섬유아세포 성장 인자 5(FGF5), 섬유아세포 성장 인자 6(FGF6), 섬유아세포 성장 인자 7(FGF7), 섬유아세포 성장 인자 8(FGF8), 섬유아세포 성장 인자 9(FGF9), 섬유아세포 성장 인자 10(FGF10), 섬유아세포 성장 인자 11(FGF11), 섬유아세포 성장 인자 12(FGF12), 섬유아세포 성장 인자 13(FGF13), 섬유아세포 성장 인자 14(FGF14), 섬유아세포 성장 인자 15(FGF15), 섬유아세포 성장 인자 16(FGF16), 섬유아세포 성장 인자 17(FGF17), 섬유아세포 성장 인자 18(FGF18), 섬유아세포 성장 인자 19(FGF19), 섬유아세포 성장 인자 20(FGF20), 섬유아세포 성장 인자 21(FGF21), 섬유아세포 성장 인자 22(FGF22), 섬유아세포 성장 인자 23(FGF23), 태아 소 소마토트로핀 (FBS), 신경교 세포주-유래 신경영양성 인자 (GDNF), 뉴르투린, 페르세핀, 아르테민, 성장 분화 인자-9 (GDF9), 간세포 성장 인자 (HGF), 간종양-유래 성장 인자 (HDGF), 인슐린, 인슐린-유사 성장 인자-1 (IGF-1), 인슐린-유사 성장 인자-2 (IGF-2), 인터류킨-1 (IL-1), IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, 각질세포 성장 인자 (KGF), 이동-자극 인자 (MSF), 대식세포-자극 단백질 (MSP), 미오스타틴 (GDF-8), 뉴레굴린 1 (NRG1), 뉴레굴린 2 (NRG2), 뉴레굴린 3 (NRG3), 뉴레굴린 4 (NRG4), 뇌-유래 신경영양성 인자 (BDNF), 신경 성장 인자 (NGF), 뉴로트로핀-3 (NT-3), 뉴로트로핀-4 (NT-4), 태반 성장 인자 (PGF), 혈소판-유

래 성장 인자 (PDGF), 레날라제 (RNLS), T-세포 성장 인자 (TCGF), 트롬보포이에틴 (TPO), 형질전환 성장 인자 알파 (TGF-α), 형질전환 성장 인자 베타 (TGF-β), 종양 괴사 인자-알파 (TNF-α), 및 혈관 내피 성장 인자 (VEGF)를 포함한다.

[0183] 일부 양태에서, 본 개시내용에 유용한 VEE 레플리콘은 리간드 결합 단백질을 인코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 리간드 결합 단백질의 비-제한적 예는 키메라 항원 수용체 (CAR), T 세포 수용체 (TCR), 키메라 항체-T 세포 수용체 (caTCR), 키메라 신호전달 수용체 (CSR), T 세포 수용체 모방체 (TCR 모방체), 및 이들의 조합을 포함한다.

[0184] 일부 양태에서, VEE 레플리콘은 CAR을 인코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 일부 양태에서, CAR은 표준 CAR로서 설계된다. "**표준 CAR**"에서, 상이한 구성요소 (*예를 들면*, 세포외 표적화 도메인, 막관통 도메인, 및 세포내 신호전달/활성화 도메인)는 단일 융합 단백질로서 선형적으로 작제된다. 일부 양태에서, CAR은 제1 세대 CAR로서 설계된다. "**제1 세대**" CAR은 세포외 결합 도메인, 힌지 영역, 막관통 도메인, 및 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인으로 구성된다. 모든 제1 세대 CAR은 CD3ζ 쇄 도메인을 세포내 신호전달 도메인으로서 함유한다. 일부 양태에서, CAR은 제2 세대 CAR로서 설계된다. "**제2 세대**" CAR은 공자극성 도메인 (*예를 들면*, CD28 또는 4-1BB)을 추가적으로 함유한다. 일부 양태에서, CAR은 제3 세대 CAR로서 설계된다. "**제3 세대**" CAR은 이들이 여러 공자극성 도메인 (*예를 들면*, CD28-4-1BB 또는 CD28-OX40)을 함유하는 것을 제외하고 제2 세대 CAR과 유사하다. 일부 양태에서, CAR은 제4 세대 CAR로서 설계된다. "**제4 세대**" CAR (또한 TRUCK 또는 장갑 CAR로서 알려짐)은 기능을 추가로 개선할 수 있는 추가의 인자를 추가적으로 함유한다. 예를 들어, 일부 양태에서, 제4 세대 CAR은 표적화된 종양 조직에서 CAR 신호전달시 방출될 수 있는 사이토카인을 추가적으로 함유한다. 일부 양태에서, 제4 세대 CAR은, CAR의 활성을 도와 추가로 조절할 수 있는, 하나 이상의 추가의 요소 예컨대 귀소 및 자살 유전자를 포함한다. 일부 양태에서, CAR은 스플릿 CAR로서 설계된다. "**스플릿 CAR**" 시스템에서, CAR의 하나 이상의 구성 요소 (*예를 들면*, 세포외 표적화 도메인, 막관통 도메인, 및 세포내 신호전달/활성화 도메인)는 온전한 기능적 수용체의 조립을 촉진시키는 여러 입력에 의존하도록 2개 이상의 부분들로 갈라진다. 일부 양태에서, CAR은 스위칭가능한 CAR로서 설계된다. "**스위칭가능한 CAR**"로, CAR은 자극물의 존재 하에 (*예를 들면*, 일시적으로) 온 (온-스위치 CAR) 또는 오프 (오프-스위치 CAR)로 스위칭될 수 있다. 본 개시내용과 사용될 수 있는 CAR의 추가의 예는, *예를 들면*, US 2020/0172879 A1 및 US 2019/0183932 A1에 기재되고, 이들의 각각은 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

[0185] 일부 양태에서, 본원에 기재된 VEE 레플리콘은 항체 또는 이의 항원-결합 단편 (집합적으로 본원에 "**항체**"로서 지칭됨)을 인코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 항체는 천연 공급원에서 유래될 수 있거나, 부분적으로 또는 전체적으로 합성적으로 생산될 수 있다. 일부 양태에서, 항체는 단클론성 항체이다. 일부 양태에서, 단클론성 항체는 IgG 항체이다. 일부 양태에서, 단클론성 항체는 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4이다. 일부 양태에서, 항체는 다클론성 항체이다. 일부 양태에서, 항원-결합 단편은 Fab, Fab', 및 $F(ab')_2$, $F(ab1)_2$, Fv, dAb, 및 Fd 단편으로부터 선택된다. 일부 양태에서, 항원-결합 단편은 scFv 또는 $(scFv)_2$ 단편이다. 일부 양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 NANOBODY® (단일-도메인 항체)이다. 일부 양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 이중특이적 또는 다중-특이적 항체이다.

[0186] ***IV.B. 추가의 구성요소***

[0187] 일부 양태에서, 본 개시내용에 유용한 VEE 레플리콘은 하기 추가의 구성요소들 중 하나 이상이 있는 핵산 서열을 포함한다.

[0188] *말단 아키텍처 변형: UTR*

[0189] 유전자의 미번역된 영역 (UTR)은 전사되지만 번역되지 않는다. 5'UTR은 전사 시작 부위에서 시작하고 시작 코돈까지 계속하지만 시작 코돈을 포함하지 않고; 반면에, 3'UTR은 정지 코돈 직후 시작하고 전사적 종결 신호까지 계속한다. 핵산 분자의 안정성 및 번역의 측면에서 UTR에 의해 하게 된 조절성 역할에 대하여 실제 증거가 증가하고 있다. UTR의 조절성 속성은 분자의 안정성을 향상시키기 위해 본 개시내용의 RNA에 편입될 수 있다. 특이적 속성은 이들이 바람직하지 않은 기관 부위로 잘못 지시되는 경우에 전사물의 제어된 하향-조절을 보장하도록 또한 편입될 수 있다.

[0190] *5' UTR 및 번역 개시*

[0191] 천연 5'UTR은 번역 개시에 대하여 역할을 하는 속성을 보유한다. 이들은 리보솜이 많은 유전자의 번역을 개시하

는 공정에서 연루되는 것으로 일반적으로 알려지는 코작 서열 같은 시그니처를 갖는다. 코작 서열은 공통 CCR(A/G)CCAUGG를 갖고, 여기에서 R은, 또 다른 'G'에 의해 뒤따르는, 시작 코돈 (AUG)의 상류에 퓨린 (아데닌 또는 구아닌) 3개 염기이다. 5'UTR은 또한 신장 인자 결합에 연루되는 2차 구조를 형성하는 것으로 알려졌다.

[0192] 신장 인자 결합에 연루된 5'UTR 2차 구조는 5'UTR 또는 3'UTR에서 다른 RNA 결합 분자와 상호작용하여 유전자 발현을 조절할 수 있다. 예를 들어, 5'UTR에서 2차적으로 구조화된 요소에 결합하는 신장 인자 EIF4A2는 마이크로RNA 매개된 억제에 필요하다 (Meijer H A et al., Science, 2013, 340, 82-85, 그 전체가 본원에 참조로 포함됨). 5'UTR에서 상이한 2차 구조는 측접 영역에 편입되어 특이적 조직 또는 세포에서 mRNA를 어느 한쪽 안정화 또는 선택적으로 불안정화시킬 수 있다.

[0193] 특이적 표적 기관의 풍부하게 발현된 유전자에서 전형적으로 발견된 속성을 조작함으로써, 본 개시내용의 핵산 또는 mRNA의 안정성 및 단백질 생산을 향상시킬 수 있다. 예를 들어, 간-발현된 mRNA, 예컨대 알부민, 혈청 아밀로이드 A, 아포리포단백질 A/B/E, 트란스페린, 알파 태아단백질, 에리트로포이에틴, 또는 인자 VIII의 5' UTR의 도입은 간 세포주 또는 간에서 핵산 분자, 예컨대 mmRNA의 발현을 향상시키는데 사용될 수 있다. 마찬가지로, 그 조직에서 발현을 개선하기 위해 다른 조직-특이적 mRNA로부터 5' UTR의 사용은 근육 (MyoD, 미오신, 미오글로빈, 미오제닌, 헤르쿨린), 내피 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 폐 상피 세포 (SP-A/B/C/D)에 대하여 가능하다.

[0194] 다른 비-UTR 서열은 5' (또는 3' UTR) UTR에 편입될 수 있다. 예를 들어, 인트론 또는 인트론 서열의 부문은 본 개시내용의 핵산 또는 mRNA의 측접 영역에 편입될 수 있다. 인트론성 서열의 편입은 단백질 생산뿐만 아니라 mRNA 수준을 증가시킬 수 있다.

[0195] 본 개시내용의 일부 양태에서, GTX 유전자로부터 IRES 서열의 적어도 하나의 단편은 5'UTR에서 포함될 수 있다. 비-제한적 예로서, 단편은 GTX 유전자의 IRES로부터 18개 뉴클레오티드 서열일 수 있다. 또 다른 비-제한적 예로서, GTX 유전자의 IRES 서열로부터 18개 뉴클레오티드 서열 단편은 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드의 5'UTR에서 탠덤으로 반복될 수 있다. 18개 뉴클레오티드 서열은 5'UTR에서 적어도 1회, 적어도 2회, 적어도 3 회, 적어도 4 회, 적어도 5 회, 적어도 6 회, 적어도 7 회, 적어도 8 회, 적어도 9 회 또는 10 회 초과 반복될 수 있다.

[0196] 뉴클레오티드는 5' (또는 3') UTR로부터 돌연변외, 대체 및/또는 제거될 수 있다. 예를 들어, 시작 코돈의 상류에 하나 이상의 뉴클레오티드는 또 다른 뉴클레오티드로 대체될 수 있다. 대체될 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드들은 시작 코돈의 상류에 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 또는 60개 초과 뉴클레오티드일 수 있다. 또 다른 예로서, 시작 코돈의 상류에 하나 이상의 뉴클레오티드는 UTR로부터 제거될 수 있다.

[0197] *5'UTR, 3'UTR 및 번역 인핸서 요소 (TEE)*

[0198] 일부 양태에서, IL-12를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열의 5'UTR은 적어도 하나의 번역적 인핸서 폴리뉴클레오티드, 번역 인핸서 요소, 번역적 인핸서 요소 (집합적으로 "TEE"로서 지칭됨)를 포함한다. 일부 양태에서, TEE는 전사 프로모터와 시작 코돈 사이 자리잡는다. 일부 양태에서, 5'UTR에서 적어도 하나의 TEE가 있는 RNA는 5'UTR에 캡을 포함한다. 일부 양태에서, 적어도 하나의 TEE는 캡-의존적 또는 캡-독립적 번역을 거치고 있는 IL-12를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열의 5'UTR에서 자리잡을 수 있다.

[0199] 용어 "번역적 인핸서 요소" 또는 "번역 인핸서 요소" (본원에 집합적으로 "TEE"로서 지칭됨)는 mRNA로부터 생산된 폴리펩티드 또는 단백질의 양을 증가시키는 서열을 지칭한다.

[0200] 일 양태에서, TEE는 핵산의 번역적 활동 예컨대, 비제한적으로, 캡-의존적 또는 캡-독립적 번역을 촉진시킬 수 있는 UTR에서 보존된 요소이다. 이들 서열의 보존은 인간을 포함하는 14 종에 걸쳐서 Panek et al (Nucleic Acids Research, 2013, 1-10; 그 전체가 본원에 참조로 포함됨)에 의해 이전에 나타났다.

[0201] 일부 양태에서, IL-12를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은, 그 전체가 본원에 참조로 포함되는, 미국 출원 번호 2014/0147454에 개시된 것과 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95% 또는 적어도 약 99% 동일성을 갖는 적어도 하나의 TEE를 갖는다. 일부 양태에서, RNA는, 이들의 각각이 그 전체가 본원에 참조로 포함되는, 미국 특허 공개 번호 US20090226470, US20070048776, US20130177581 및 US20110124100, 국제 특허 공개 번호 WO1999024595, WO2012009644, WO2009075886 및 WO2007025008, 유럽 특허 공개 번호 EP2610341A1 및

EP2610340A1, 미국 특허 번호 6,310,197, 미국 특허 번호 6,849,405, 미국 특허 번호 7,456,273, 미국 특허 번호 7,183,395에 기재된 TEE와 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95% 또는 적어도 약 99% 동일성을 갖는 적어도 하나의 TEE를 포함한다.

[0202] 일부 양태에서, IL-12를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열의 5'UTR은 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 11, 적어도 12, 적어도 13, 적어도 14, 적어도 15, 적어도 16, 적어도 17, 적어도 18 적어도 19, 적어도 20, 적어도 21, 적어도 22, 적어도 23, 적어도 24, 적어도 25, 적어도 30, 적어도 35, 적어도 40, 적어도 45, 적어도 50, 적어도 55 또는 60개 초과 TEE 서열을 포함할 수 있다. 일부 양태에서, RNA의 5'UTR에서 TEE 서열은 동일하거나 상이한 TEE 서열이다. 일부 양태에서, TEE 서열은 1회, 2회, 또는 3 회 초과 반복된 한 패턴 예컨대 ABABAB 또는 AABBAABBAABB 또는 ABCABCABC 또는 이들의 변이체로 있다. 이들 패턴에서, 각 문자, A, B, 또는 C는 뉴클레오티드 수준에서 상이한 TEE 서열을 나타낸다.

[0203] 일부 양태에서, 2개 TEE 서열을 분리시키는 스페이서는 RNA의 번역을 조절하는 당업계에서 알려진 다른 서열 예컨대, 비제한적으로, 본원에 기재된 miR 서열 (*예를 들면,* miR 결합 부위 및 miR 씨드)을 포함한다. 일부 양태에서, 2개 TEE 서열을 분리시키는데 사용된 각 스페이서는 상이한 miR 서열 또는 miR 서열 (*예를 들면,* miR 씨드 서열)의 구성요소를 포함한다.

[0204] 일부 양태에서, 본 개시내용의 IL-12를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열의 5'UTR에서 사용된 TEE는 IRES 서열 예컨대, 비제한적으로, 이들의 각각이 그 전체가 본원에 참조로 포함되는, 미국 특허 번호 7,468,275 및 국제 특허 공개 번호 WO2001055369에 기재된 것들이다.

[0205] 일부 양태에서, 본원에 기재된 TEE는 IL-12를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열의 5'UTR 및/또는 3'UTR에서 자리잡는다. 일부 양태에서, 3'UTR에서 자리잡은 TEE는 5'UTR에서 편입을 위하여 기재되고/거나 이에 자리잡은 TEE과 동일하고/거나 상이하다.

[0206] 일부 양태에서, IL-12를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열의 3'UTR은 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 11, 적어도 12, 적어도 13, 적어도 14, 적어도 15, 적어도 16, 적어도 17, 적어도 18 적어도 19, 적어도 20, 적어도 21, 적어도 22, 적어도 23, 적어도 24, 적어도 25, 적어도 30, 적어도 35, 적어도 40, 적어도 45, 적어도 50, 적어도 55 또는 60개 초과 TEE 서열을 포함한다. 일부 양태에서, 본 개시내용의 IL-12를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열의 3'UTR에서 TEE 서열은 동일하거나 상이한 TEE 서열이다. TEE 서열은 1회, 2회, 또는 3 회 초과 반복된 한 패턴 예컨대 ABABAB 또는 AABBAABBAABB 또는 ABCABCABC 또는 이의 변이체로 있다. 이들 패턴에서, 각 문자, A, B, 또는 C는 뉴클레오티드 수준에서 상이한 TEE 서열을 나타낸다.

[0207] 일부 양태에서, 3'UTR은 2개 TEE 서열을 분리시키기 위한 스페이서를 포함한다. 일부 양태에서, 스페이서는 15개 뉴클레오티드 스페이서 및/또는 당업계에서 알려진 다른 스페이서이다. 일부 양태에서, 3'UTR은 3'UTR에서 적어도 1회, 적어도 2회, 적어도 3 회, 적어도 4 회, 적어도 5 회, 적어도 6 회, 적어도 7 회, 적어도 8 회 및 적어도 9 회 또는 9 회 초과 반복된 TEE 서열-스페이서 모듈을 포함할 수 있다.

[0208] 일부 양태에서, 2개 TEE 서열을 분리시키는 스페이서는 IL-12를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열의 번역을 조절하는 당업계에서 알려진 다른 서열, 예컨대, 비제한적으로, 본원에 기재된 miR 서열 (*예를 들면,* miR 결합 부위 및 miR 씨드)을 포함한다. 일부 양태에서, 2개 TEE 서열을 분리시키는데 사용된 각 스페이서는 상이한 miR 서열 또는 miR 서열 (*예를 들면,* miR 씨드 서열)의 구성요소를 포함한다.

[0209] *마이크로RNA 결합 부위 편입하기*

[0210] 일부 양태에서, IL-12를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 센서 서열을 추가로 포함한다. 센서 서열은, 예를 들어, 마이크로RNA 결합 부위, 전사 인자 결합 부위, 구조화된 mRNA 서열 및/또는 모티프, 내인성 핵산 결합 분자에 대한 슈도-수용체로서 작용하도록 조작된 인공 결합 부위를 포함한다. 적어도 하나의 센서 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드의 비-제한적 예는 그 전체가 참조로 포함되는 미국 출원 번호 2014/0147454에 기재된다.

[0211] 일부 양태에서, 표적 세포 또는 조직의 마이크로RNA (miRNA) 프로파일링은 세포 또는 조직에서 miRNA의 존재 또는 부재를 결정하기 위해 실행된다.

[0212] 마이크로RNA (또는 miRNA)는 어느 한쪽 핵산 분자 안정성을 감소시킴으로써 또는 번역을 억제시킴으로써 핵산

분자의 3'UTR에 결합하고 유전자 발현을 하향-조절하는 19-25개 뉴클레오티드 길이 비코딩 RNA이다. 일부 양태에서, RNA는 하나 이상의 마이크로RNA 표적 서열, 마이크로RNA 서열, 또는 마이크로RNA 씨드를 포함한다. 이러한 서열은 임의의 알려진 마이크로RNA 예컨대, 이들의 내용이 그들 전체가 본원에 참조로 포함되는, 미국 공개 US2005/0261218 및 미국 공개 US2005/0059005에 교시된 것들에 상응할 수 있다. 비-제한적 예로서, 인간 게놈에서 알려진 마이크로RNA, 그들의 서열 및 씨드 서열은 그 전체가 본원에 참조로 포함되는 미국 출원 번호 2014/0147454에 기재된다.

[0213] 마이크로RNA 서열은 "씨드" 영역, 즉, 서열이 miRNA 표적 서열에 대해 완벽한 왓슨-크릭 상보성을 갖는, 성숙한 마이크로RNA의 위치 2-8의 영역에서 서열을 포함한다. 마이크로RNA 씨드는 성숙한 마이크로RNA의 위치 2-8 또는 2-7을 포함한다. 일부 양태에서, 마이크로RNA 씨드는 7개 뉴클레오티드 (*예를 들면,* 성숙한 마이크로RNA의 뉴클레오티드 2-8)를 포함하고, 여기서 상응하는 miRNA 표적에서 씨드-상보적 부위는 마이크로RNA 위치 1에 반대된 아데닌 (A)에 의해 측접된다. 일부 양태에서, 마이크로RNA 씨드는 6개 뉴클레오티드 (*예를 들면,* 성숙한 마이크로RNA의 뉴클레오티드 2-7)를 포함하고, 여기서 상응하는 miRNA 표적에서 씨드-상보적 부위는 마이크로RNA 위치 1에 반대된 아데닌 (A)에 의해 측접된다. 예를 들어, Grimson A, Farh K, Johnston W K, Garrett-Engele P, Lim L P, Bartel D P; Mol Cell. 2007 Jul. 6; 27(1):91-105 참조. 마이크로RNA 씨드의 염기는 표적 서열과 완전한 상보성을 갖는다. 본 개시내용의 핵산 또는 mRNA의 3'UTR에 마이크로RNA 표적 서열을 조작함으로써 분해 또는 감소된 번역을 위하여 분자를 표적화할 수 있고, 다만 당해 마이크로RNA는 이용가능하다. 이 공정은 핵산 분자 전달시 오조준 효과의 위험을 감소시킬 것이다. 마이크로RNA, 마이크로RNA 표적 영역, 및 그들의 발현 패턴의 식별 그리고 생물학에서의 역할은 보고되었다 (Bonauer et al., Curr Drug Targets 2010 11:943-949; Anand and Cheresh Curr Opin Hematol 2011 18:171-176; Contreras and Rao Leukemia 2012 26:404-413 (2011 Dec. 20. doi: 10.1038/leu.2011.356); Bartel Cell 2009 136:215-233; Landgraf et al, Cell, 2007 129:1401-1414; Gentner and Naldini, 조직 항원. 2012 80:393-403 및 그안에 모든 참조문헌, 이들의 각각은 그 전체가 본원에 참조로 포함됨).

[0214] 예를 들어, mRNA가 간으로 전달되도록 의도되지 않고 거기에서 끝나면, 간에서 풍부한 마이크로RNA인, miR-122는 miR-122의 하나 또는 여러 표적 부위가 변형된 핵산, 향상된 변형된 RNA 또는 리보핵산의 3'UTR에 조작되는 경우 관심의 유전자의 발현을 억제시킬 수 있다. 상이한 마이크로RNA에 대하여 하나 또는 여러 결합 부위의 도입은 변형된 핵산, 향상된 변형된 RNA 또는 리보핵산의 수명, 안정성, 및 단백질 번역을 추가로 감소시키도록 조작될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "마이크로RNA 부위"는 마이크로RNA 표적 부위 또는 마이크로RNA 인식 부위, 또는 마이크로RNA가 결합하거나 회합하는 임의의 뉴클레오티드 서열을 지칭한다. "결합"이 전통적 왓슨-크릭 혼성화 규칙을 따를 수 있거나 마이크로RNA 부위에 또는 이에 인접한 표적 서열과 마이크로RNA의 임의의 안정한 회합을 반영할 수 있음이 이해되어야 한다.

[0215] 반대로, 본 개시내용의 IL-12를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열의 목적을 위하여, 마이크로RNA 결합 부위는 특이적 조직에서 단백질 발현을 증가시키기 위해 이들이 자연적으로 발생하는 서열 밖으로 조작 (이로부터 제거)될 수 있다. 예를 들어, miR-122 결합 부위는 간에서 단백질 발현을 개선하기 위해 제거될 수 있다.

[0216] 일부 양태에서, IL-12를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 특이적 세포 예컨대, 비제한적으로, 정상 및/또는 암성 세포 (*예를 들면,* HEP3B 또는 SNU449)에 세포독성 또는 세포보호적 mRNA를 유도하기 위해 3'UTR에서 적어도 하나의 miRNA-결합 부위를 포함한다.

[0217] 마이크로RNA가 mRNA, 이에 의해 단백질 발현을 조절하는 것으로 알려지는 조직의 예는, 비제한적으로, 간 (miR-122), 근육 (miR-133, miR-206, miR-208), 내피 세포 (miR-17-92, miR-126), 골수양 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 폐 상피 세포 (let-7, miR-133, miR-126)를 포함한다.

[0218] 구체적으로, 마이크로RNA는 면역 세포 (또한 조혈 세포로 불림), 예컨대 항원 제시 세포 (APC) (*예를 들면,* 수지상 세포 및 대식세포), 대식세포, 단핵구, B 림프구, T 림프구, 과립구, 자연 살해 세포, 등에서 차등적으로 발현되는 것으로 알려진다. 면역 세포 특이적 마이크로RNA는 면역원성, 자가면역성, 감염에 대한 면역-반응, 염증, 뿐만 아니라 유전자 요법 및 조직/기관 이식후 원치 않는 면역 반응에 연루된다. 면역 세포 특이적 마이크로RNA는 조혈 세포 (면역 세포)의 발달, 증식, 분화 및 세포사멸의 많은 양태를 또한 조절한다. 예를 들어, miR-142 및 miR-146은 면역 세포에서 배타적으로 발현되고, 골수양 수지상 세포에서 특히 풍부하다. 외인성 핵산 분자에 대한 면역 반응이 전달된 유전자 작제물의 3'UTR에 miR-142 결합 부위를 첨가함으로써 중단되어, 조직 및 세포에서 더욱 안정한 유전자 전달을 가능하게 함이 당업계에서 입증되었다. miR-142는 항원 제시 세포에

서 외인성 mRNA를 효율적으로 분해시키고 형질도입된 세포의 세포독성 제거를 억제시킨다 (Annoni A et al., blood, 2009, 114, 5152- 5161; Brown B D, et al., Nat med. 2006, 12(5), 585-591; Brown B D, et al., blood, 2007, 110(13): 4144-4152, 이들의 각각은 그 전체가 본원에 참조로 포함됨).

[0219] 많은 마이크로RNA 발현 연구는 다양한 암 세포/조직 및 다른 질환에서 마이크로RNA의 차등적 발현을 프로파일링하기 위해 당업계에서 작제된다. 일부 마이크로RNA는 특정 암 세포에서 비정상적으로 과-발현되고 다른 것은 저-발현된다. 예를 들어, 마이크로RNA는 암 세포 (WO2008/154098, US2013/0059015, US2013/0042333, WO2011/157294); 암 스템 세포 (US2012/0053224); 췌장 암 및 질환 (US2009/0131348, US2011/0171646, US2010/0286232, 미국 특허 번호 8,389,210); 천식 및 염증 (미국 특허 번호 8,415,096); 전립선 암 (US2013/0053264); 간세포성 암종 (WO2012/151212, US2012/0329672, WO2008/054828, 미국 특허 번호 8,252,538); 폐 암 세포 (WO2011/076143, WO2013/033640, WO2009/070653, US2010/0323357); 피부 T 세포 림프종 (WO2013/011378); 결장직장 암 세포 (WO2011/0281756, WO2011/076142); 암 양성 림프절 (WO2009/100430, US2009/0263803); 비인두 암종 (EP2112235); 만성 폐쇄성 폐 질환 (US2012/0264626, US2013/0053263); 갑상선 암 (WO2013/066678); 난소 암 세포 (US2012/0309645, WO2011/095623); 유방 암 세포 (WO2008/154098, WO2007/081740, US2012/0214699), 백혈병 및 림프종 (WO2008/073915, US2009/0092974, US2012/0316081, US2012/0283310, WO2010/018563, 이들의 각각의 내용은 그들 전체가 본원에 참조로 포함됨)에서 차등적으로 발현된다

[0220] 적어도 하나의 마이크로RNA 부위는 IL-12를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열의 3' UTR에 조작될 수 있다. 일부 양태에서, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10개 또는 그 초과의 마이크로RNA 부위는 IL-12를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열의 3' UTR에 조작될 수 있다. 일부 양태에서, IL-12를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 편입된 마이크로RNA 부위는 동일하거나 상이한 마이크로RNA 부위이다. 일부 양태에서, IL-12를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 편입된 마이크로RNA 부위는 신체에서 동일하거나 상이한 조직을 표적화한다. 비-제한적 예로서, mRNA의 3' UTR에서 조직-, 세포-유형-, 또는 질환-특이적 마이크로RNA 결합 부위의 도입을 통해서, 특이적 세포 유형 (*예를 들면*, 간세포, 골수양 세포, 내피 세포, 암 세포, 등)에서 발현의 정도는 감소될 수 있다.

[0221] 일부 양태에서, 마이크로RNA 부위는 3'UTR의 5' 말단 근처에서, 3'UTR의 5' 말단과 3' 말단 사이 약 절반 및/또는 3'UTR의 3' 말단 근처에서 조작된다. 일부 양태에서, 마이크로RNA 부위는 3'UTR의 5' 말단 및 3'UTR의 5' 말단과 3' 말단 사이 약 절반 근처에서 조작된다. 일부 양태에서, 마이크로RNA 부위는 3'UTR의 3' 말단 및 3'UTR의 5' 말단과 3' 말단 사이 약 절반 근처에서 조작된다. 일부 양태에서, 마이크로RNA 부위는 3'UTR의 5' 말단 근처에서 그리고 3'UTR의 3' 말단 근처에서 조작된다.

[0222] 일부 양태에서, mRNA는 어느 한쪽 알려진 씨드 서열에 100% 동일성을 갖거나 씨드 서열에 100% 미만 동일성을 갖는 마이크로RNA 결합 영역 부위를 포함한다. 씨드 서열은 마이크로RNA 결합 친화도를 감소시키기 위해 부분적으로 돌연변이될 수 있고 이로써 그 mRNA 전사물의 감소된 하향 조절을 초래할 수 있다. 본질적으로, 표적 mRNA와 마이크로RNA 씨드 사이 매치 또는 미스-매치의 정도는 단백질 발현을 조절하는 마이크로RNA의 능력을 더욱 미세하게 튜닝하기 위한 가변 저항기 역할을 할 수 있다. 이외에도, 마이크로RNA 결합 부위의 비-씨드 영역에서 돌연변이는 단백질 발현을 조절하는 마이크로RNA의 능력에 또한 영향을 미칠 수 있다.

[0223] *RNA 결합 단백질 (RBP)에 대한 RNA 모티프*

[0224] RNA 결합 단백질 (RBP)은 공전사 및 전사후 유전자 발현의 수많은 양태 예컨대, 비제한적으로, RNA 스플라이싱, 국소화, 번역, 전환, 폴리아데닐화, 캡핑, 변형, 유출 및 국소화를 조절할 수 있다. RNA-결합 도메인 (RBD), 예컨대, 비제한적으로, RNA 인식 모티프 (RR) 및 hnRNP K-상동성 (KH) 도메인은 RBP와 그들의 RNA 표적 사이 서열 회합을 전형적으로 조절한다 (Ray et al. Nature 2013. 499:172-177; 그 전체가 본원에 참조로 포함됨). 일부 양태에서, 정준 RBD는 짧은 RNA 서열을 결합시킨다. 일부 양태에서, 정준 RBD는 RNA 구조를 인식한다.

[0225] RNA 결합 단백질 및 관련된 핵산 및 단백질 서열의 비제한적 예는, 그 전체가 본원에 참조로 포함된 미국 출원 번호 2014/0147454에 기재된다.

[0226] 일부 양태에서, 관심의 mRNA의 안정성을 증가시키기 위해, HuR을 인코딩하는 mRNA는 세포에 또는 조직에 관심의 mRNA와 함께 공-형질감염되거나 공-주사된다. 이들 단백질은 시험관내 관심의 mRNA에 또한 테더링될 수 있고 그 다음 세포에 함께 투여될 수 있다. 폴리 A 꼬리 결합 단백질, PABP는 번역적 개시를 자극하기 위해 진핵성 번역 개시 인자 eIF4G와 상호작용한다. mRNA 약물과 함께 이들 RBP를 인코딩하는 mRNA의 공-투여 및/또는 시험관내

mRNA 약물로 이들 단백질 테더링 및 세포에 단백질-결합 mRNA를 투여하는 것은 mRNA의 번역적 효율을 증가시킬 수 있다. 동일한 개념은 다양한 번역 인자 및 촉진인자를 인코딩하는 mRNA, 뿐만 아니라 단백질 자체와 함께 mRNA의 공-투여까지 확장되어 RNA 안정성 및/또는 번역적 효율에 영향을 줄 수 있다.

[0227] 일부 양태에서, IL-12를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 적어도 하나의 RNA-결합 모티프 예컨대, 비제한적으로 RNA-결합 도메인 (RBD)을 포함한다.

[0228] 일부 양태에서, 연결된 뉴클레오시드의 제1 영역 및/또는 적어도 하나의 측접 영역은 적어도 하나의 RBD를 포함한다. 일부 양태에서, 연결된 뉴클레오시드의 제1 영역은 스플라이싱 인자에 관련된 RBD를 포함하고 적어도 하나의 측접 영역은 안정성 및/또는 번역 인자를 위한 RBD를 포함한다.

[0229] *3'UTR에서 다른 조절성 요소*

[0230] 마이크로RNA 결합 부위 이외에도, 상이한 조직 및 세포에서 mRNA 안정성 및 번역을 조절하는, 천연 mRNA의 3'-UTR에서 다른 조절성 서열은 제거될 수 있거나 RNA에 도입될 수 있다. 이러한 시스-조절성 요소는, 비제한적으로, 시스-RNP (리보핵단백질)/RBP (RNA 결합 단백질) 조절성 요소, AU-풍부 요소 (AUE), 구조화된 스템-루프, 구성적 붕괴 요소 (CDE), GC-풍부함 및 다른 구조화된 mRNA 모티프를 포함할 수 있다 (Parker B J et al., Genome Research, 2011, 21, 1929-1943, 그 전체가 본원에 참조로 포함됨). 예를 들어, CDE는 로퀸 (Roquin) 단백질과 그들의 상호작용을 통해서 mRNA 분해를 매개하는 조절성 모티프의 한 부류이다. 특히, CDE는 대식세포에서 사이토카인 생산을 제한하기 위해 발달 및 염증의 조절인자를 인코딩하는 많은 mRNA에서 발견된다 (Leppek K et al., 2013, Cell, 153, 869-881, 그 전체가 본원에 참조로 포함됨).

[0231] 일부 양태에서, RNA는 영양요구성이다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "영양요구성"은 단백질 발현이 실질적으로 방지되거나 감소되도록 공간적 또는 시간적 신호에 반응하여 mRNA의 분해 또는 불활성화를 촉발, 촉진 또는 유도하는 적어도 하나의 속성을 포함하는 mRNA를 지칭한다. 이러한 공간적 또는 시간적 신호는 번역될 mRNA의 자리 예컨대 특정한 조직 또는 기관 또는 세포성 환경을 포함한다. 온도, pH, 이온성 강도, 수분 함량 및 기타 등등을 포함하는 신호가 또한 고려된다.

[0232] *3' UTR 및 AU 풍부 요소*

[0233] 3'UTR은 이들에 포매된 아데노신 및 우리딘의 스트레치를 갖는 것으로 알려진다. 이들 AU 풍부 시그니처는 높은 전환 속도로 유전자에서 특히 만연한다. 그들의 서열 속성 및 기능적 특성에 기반하여, AU 풍부 요소 (ARE)는 3개 부류로 분리될 수 있다 (Chen et al, 1995): 부류 I ARE는 U-풍부 영역 내에서 AUUUA 모티프의 몇몇 분산된 카피를 함유한다. C-Myc 및 MyoD는 부류 I ARE를 함유한다. 부류 II ARE는 2개 이상의 중첩 UUAUUUA(U/A)(U/A) 구량체를 소유한다. 이 유형의 ARE를 함유하는 분자는 GM-CSF 및 TNF-a를 포함한다. 부류 III ARES는 덜 잘 정의된다. 이들 U 풍부 영역은 AUUUA 모티프를 함유하지 않는다. c-Jun 및 미오게닌은 이 부류의 2개 잘-연구된 예이다. ARE에 결합하는 대부분의 단백질은 메신저를 불안정화하는 것으로 알려지고, 반면 ELAV 계열의 구성원들, 가장 특히 HuR은 mRNA의 안정성을 증가시키는 것으로 문서화되었다. HuR은 모두 3개 부류의 ARE에 결합한다. 핵산 분자의 3' UTR에 HuR 특이적 결합 부위를 조작하는 것은 HuR 결합 및 이에 따라, 생체내 메세지의 안정화를 초래할 것이다.

[0234] 3' UTR AU 풍부 요소 (ARE)의 도입, 제거 또는 변형은 본 개시내용의 핵산 또는 mRNA의 안정성을 조절하는데 사용될 수 있다. 특이적 핵산 또는 mRNA를 조작하는 때, ARE의 하나 이상의 카피는 본 개시내용의 핵산 또는 mRNA를 덜 안정하게 만들고 이에 의해 번역을 단축시키고 생성된 단백질의 생산을 감소시키기 위해 도입될 수 있다. 마찬가지로, ARE는 세포내 안정성을 증가시키고 이에 따라 생성된 단백질의 번역 및 생산을 증가시키기 위해 식별 및 제거될 수 있거나 돌연변이될 수 있다. 형질감염 실험은 본 개시내용의 핵산 또는 mRNA를 사용하여 관련한 세포주에서 실행될 수 있고 단백질 생산은 형질감염후 다양한 시점에 검정될 수 있다. 예를 들어, 세포는 상이한 ARE-조작 분자로 그리고 관련한 단백질에 ELISA 키트를 사용하고 형질감염후 약 6 시간, 약 12 시간, 약 24 시간, 약 48 시간, 및/또는 약 7 일에 생산된 단백질을 검정함으로써 형질감염될 수 있다.

[0235] *3' UTR 및 삼중 나선*

[0236] 일부 양태에서, IL-12를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 핵산, IL-12를 인코딩하는 향상된 뉴클레오티드 서열 또는 리보핵산의 3' 단부에서 삼중 나선을 포함한다. 일부 양태에서, IL-12를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열의 3' 단부는 삼중 나선을 단독으로 또는 폴리-A 꼬리와 조합으로 포함한다.

[0237] 일부 양태에서, IL-12를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 적어도 제1 및 제2 U-풍부 영역, 제1 영역과 제2 영역

사이 보존된 스템 루프 영역 및 A-풍부 영역을 포함한다. 일부 양태에서, 제1 및 제2 U-풍부 영역 그리고 A-풍부 영역은 핵산의 3' 단부에서 삼중 나선을 형성하도록 회합한다. 이 삼중 나선은 핵산을 안정화, 핵산의 번역적 효율을 향상 및/또는 분해로부터 3' 단부를 보호할 수 있다. 예시적 삼중 나선은, 비제한적으로, 전이-연관된 폐 선암종 전사물 1 (MALAT1), MEN-β 및 폴리아데닐화된 핵 (PAN) RNA의 삼중 나선 서열을 포함한다 (Wilusz et al., Genes & Development 2012 26:2392-2407; 그 전체가 본원에 참조로 포함됨).

[0238] *스템 루프*

[0239] 일부 양태에서, IL-12를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 스템 루프 예컨대, 비제한적으로, 히스톤 스템 루프를 포함한다. 일부 양태에서, 스템 루프는 그 전체가 본원에 참조로 포함된 국제 특허 공개 번호 WO2013103659에 기재된 대로 길이가 약 25 또는 약 26개 뉴클레오티드인 뉴클레오티드 서열 예컨대, 비제한적으로, 서열번호: 7-17이다. 히스톤 스템 루프는 코딩 영역에 대해 3' (*예를 들면*, 코딩 영역의 3' 말단에서) 자리잡을 수 있다. 비-제한적 예로서, 스템 루프는 본원에 기재된 핵산의 3' 단부에서 자리잡을 수 있다.

[0240] 일부 양태에서, 히스톤 스템 루프를 포함하는, IL-12를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 적어도 하나의 쇄 종결 뉴클레오시드의 부가에 의해 안정화될 수 있다. 이론에 의해 구속됨의 바램 없이, 적어도 하나의 쇄 종결 뉴클레오시드의 부가는 핵산의 분해를 둔화시킬 수 있고 이에 따라 핵산의 반감기를 증가시킬 수 있다.

[0241] 일부 양태에서, 쇄 종결 뉴클레오시드는 그 전체가 본원에 참조로 포함된 국제 특허 공개 번호 WO2013103659에 기재된 것이다. 일부 양태에서, 쇄 종결 뉴클레오시드는 3'-데옥시아데노신 (코디세핀), 3'-데옥시우리딘, 3'-데옥시시토신, 3'-데옥시구아노신, 3'-데옥시티민, 2',3'-디데옥시뉴클레오시드, 예컨대 2',3'-디데옥시아데노신, 2',3'-디데옥시우리딘, 2',3'-디데옥시시토신, 2',3'-디데옥시구아노신, 2',3'-디데옥시티민, 2'-데옥시뉴클레오시드, 또는 -O-메틸뉴클레오시드이다.

[0242] 일부 양태에서, IL-12를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 히스톤 스템 루프, 폴리A 꼬리 서열 및/또는 5' 캡 구조를 포함한다. 일부 양태에서, 히스톤 스템 루프는 폴리A 꼬리 서열 전에 및/또는 후에 있다. 히스톤 스템 루프 및 폴리A 꼬리 서열을 포함하는 핵산은 본원에 기재된 쇄 종결 뉴클레오시드를 포함할 수 있다.

[0243] 일부 양태에서, IL-12를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 히스톤 스템 루프 및 5' 캡 구조를 포함한다. 5' 캡 구조는, 비제한적으로, 본원에 기재된 및/또는 당업계에서 알려진 것들을 포함한다.

[0244] *5' 캡핑*

[0245] mRNA의 5' 캡 구조는 mRNA 안정성을 증가시키는, 핵 유출에 연루되고 mRNA 캡 결합 단백질 (CBP)을 결합시키고, 이는 성숙한 환식 mRNA 종을 형성하기 위해 폴리(A) 결합 단백질과 CBP의 회합을 통해서 번역 역량 및 세포에서의 mRNA 안정성을 담당한다. 캡은 추가로 mRNA 스플라이싱 동안 5' 근위 인트론 제거의 제거를 돕는다.

[0246] 내인성 mRNA 분자는 5'-단부 캡핑되어 말단 구아노신 캡 잔기와 mRNA의 5'-말단 전사된 센스 뉴클레오티드 사이 5'-ppp-5'-트리포스페이트 연결을 생성할 수 있다. 이 5'-구아닐레이트 캡은 그 다음 메틸화되어 N7-메틸-구아닐레이트 잔기를 생성할 수 있다. mRNA의 5' 단부의 말단 및/또는 말단전 전사된 뉴클레오티드의 리보스 당은 임의로 또한 2'-O-메틸화될 수 있다. 구아닐레이트 캡 구조의 가수분해 및 절단을 통해서 5'-디캡핑은 분해를 위하여 핵산 분자, 예컨대 mRNA 분자를 표적화할 수 있다.

[0247] 본 개시내용의 RNA에 대한 변형은 디캡핑을 방지하고 이에 따라 mRNA 반감기를 증가시키는 비-가수분해가능한 캡 구조를 생성할 수 있다. 캡 구조 가수분해가 5'-ppp-5' 포스포로디에스테르 연결의 절단이 필요하기 때문에, 변형된 뉴클레오티드는 캡핑 반응 동안 사용될 수 있다. 예를 들어, New England Biolabs (Ipswich, Mass.)로부터 백시니아 캡핑(Vaccinia Capping) 효소는 5'-ppp-5' 캡에서 포스포로티오에이트 연결을 창출하기 위해 제조업체의 지침에 따라 α-티오-구아노신 뉴클레오티드와 사용될 수 있다. 추가의 변형된 구아노신 뉴클레오티드 예컨대 α-메틸-포스포네이트 및 셀레노-포스페이트 뉴클레오티드가 사용될 수 있다.

[0248] 추가의 변형은, 비제한적으로, 당 고리의 2'-히드록실 기에서 (상기 언급된 대로) mRNA의 5'-말단 및/또는 5'-말단전 뉴클레오티드의 리보스 당의 2'-O-메틸화를 포함한다. 여러 별개 5'-캡 구조는 핵산 분자, 예컨대 mRNA 분자의 5'-캡을 생성하는데 사용될 수 있다.

[0249] 본원에 합성 캡 유사체, 화학적 캡, 화학적 캡 유사체, 또는 구조적 또는 기능적 캡 유사체로서 또한 지칭되는 캡 유사체는, 캡 기능을 보유하면서, 그들의 화학적 구조에서 천연 (즉 내인성, 야생형 또는 생리학적) 5'-캡과 상이하다. 캡 유사체는 핵산 분자에 화학적으로 (즉 비-효소적으로) 또는 효소적으로 합성 및/연결될 수 있다.

[0250] 예를 들어, 항-역전 캡 유사체 (ARCA) 캡은 5'-5'-트리포스페이트 기에 의해 연결된 2개 구아닌을 함유하고, 여기서 1개 구아닌은 N7 메틸 기뿐만 아니라 3'-O-메틸 기 (즉, N7,3'-O-디메틸-구아노신-5'-트리포스페이트-5'-구아노신 (m7G-3' mppp-G; 이는 동등하게 3' O-Me-m7G(5')ppp(5')G로 지정될 수 있음)를 함유한다. 다른, 미변형된, 구아닌의 3'-O 원자는 캡핑된 핵산 분자 (*예를 들면*, mRNA 또는 mmRNA)의 5'-말단 뉴클레오티드에 연결된다. N7- 및 3'-O-메틸화된 구아닌은 캡핑된 핵산 분자 (*예를 들면*, mRNA 또는 mmRNA)의 말단 모이어티를 제공한다.

[0251] 또 다른 예시적 캡은, ARCA와 유사하지만 구아노신에서 2'-β-메틸 기 (즉, N7,2'-O-디메틸-구아노신-5'-트리포스페이트-5'-구아노신, m7Gm-ppp-G)를 갖는 mCAP이다.

[0252] 일부 양태에서, 캡은 디뉴클레오티드 캡 유사체이다. 일부 양태에서, 디뉴클레오티드 캡 유사체는 보라노포스페이트 기 또는 포스포로셀레노에이트 기 예컨대, 그 전체가 본원에 참조로 포함된, 미국 특허 번호 8,519,110에 기재된 디뉴클레오티드 캡 유사체로 상이한 포스페이트 위치에서 변형된다.

[0253] 일부 양태에서, 캡은 당업계에서 알려진 및/또는 본원에 기재된 캡 유사체의 N7-(4-클로로페녹시에틸) 치환된 디쿠클레오티드 형태인 캡 유사체이다. 캡 유사체의 N7-(4-클로로페녹시에틸) 치환된 디뉴클레오티드 형태의 비-제한적 예는 N7-(4- 클로로페녹시에틸)-G(5')ppp(5')G 및 N7-(4-클로로페녹시에틸)-m3'-OG(5')ppp(5')G 캡 유사체를 포함한다 (*예를 들면*, Kore et al. Bioorganic & Medicinal Chemistry 2013 21:4570-4574에 기재된 다양한 캡 유사체 및 캡 유사체를 합성하는 방법 참조; 이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함됨). 일부 양태에서, 본 개시내용의 캡 유사체는 4-클로로/브로모페녹시에틸 유사체이다.

[0254] 캡 유사체가 *시험관내* 전사 반응에서 핵산 분자의 동반 캡핑을 허용하는 한편, 전사물의 최대 약 20%는 캡핑되지 않은 상태로 남아 있다. 이뿐만 아니라 내인성, 세포성 전사 기계류에 의해 생산된 핵산의 내인성 5'-캡 구조로부터 캡 유사체의 구조적 차이는 감소된 번역적 역량 및 감소된 세포성 안정성을 초래할 수 있다. 따라서, 일부 양태에서, 본원에 제공된 방법 (*예를 들면*, 실시예 1-3, *참조*)은 본원에 기재된 뉴클레오티드를 발현시키는 생산된 IL-12의 캡핑 효율을 증가시킬 수 있다. 일부 양태에서, 본원에 제공된 방법으로, 폴리뉴클레오티드의 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 약 100%는 캡핑된다. 일부 양태에서, 본원에 제공된 방법으로, 폴리뉴클레오티드의 적어도 약 50%는 캡핑된다. 일부 양태에서, 폴리뉴클레오티드의 적어도 약 60%는 캡핑된다. 일부 양태에서, 폴리뉴클레오티드의 적어도 약 70%는 캡핑된다. 일부 양태에서, 폴리뉴클레오티드의 적어도 약 80%는 캡핑된다. 일부 양태에서, 폴리뉴클레오티드의 적어도 약 85%는 캡핑된다. 일부 양태에서, 폴리뉴클레오티드의 적어도 약 90%는 캡핑된다. 일부 양태에서, 폴리뉴클레오티드의 적어도 약 95%는 캡핑된다. 일부 양태에서, 폴리뉴클레오티드의 적어도 약 100%는 캡핑된다. 일부 양태에서, 폴리뉴클레오티드의 적어도 약 80% 내지 약 100%는 캡핑된다.

[0255] 일부 양태에서, 5'-캡 또는 5'-캡 유사체가 있는 RNA를 제공하는 것은 상기 5'-캡 또는 5'-캡 유사체의 존재 하에 DNA 템플레이트의 시험관내 전사에 의해 달성되고, 여기서 상기 5'-캡은 생성된 RNA 가닥에 공-전사적으로 편입된다.

[0256] 일부 양태에서, RNA는, 예를 들어, 시험관내 전사에 의해 생성될 수 있고, 5'-캡은 캡핑 효소, 예를 들어, 백시니아 바이러스의 캡핑 효소를 사용하여 후-전사적으로 RNA에 부착될 수 있다. 일부 양태에서, IL-12를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은, 더욱 진정한 5'-캡 구조를 생성하기 위해, 효소를 사용하여, 후-전사적으로 캡핑된다. 본원에 사용된 바와 같이, 문구 "더욱 진정한"은 어느 한쪽 구조적으로 또는 기능적으로 내인성 또는 야생형 속성을 밀접하게 반영하거나 모방하는 속성을 지칭한다. 즉, "더욱 진정한" 속성은 선행 기술의 합성 속성 또는 유사체, 등과 비교하여 내인성, 야생형, 자연적 또는 생리학적 세포성 기능 및/또는 구조를 더욱 잘 나타내거나, 하나 이상의 측면에서 상응하는 내인성, 야생형, 자연적 또는 생리학적 속성을 능가한다. 본 개시내용의 더욱 진정한 5' 캡 구조의 비-제한적 예는, 다른 것들 중에, 당업계에서 알려진 합성 5' 캡 구조와 (또는 야생형, 자연적 또는 생리학적 5' 캡 구조와) 비교하여, 캡 결합 단백질의 향상된 결합, 증가된 반감기, 5' 엔도뉴클레아제에 대한 감소된 감수성 및/또는 감소된 5' 디캡핑을 갖는 것들이다. 예를 들어, 재조합 백시니아 바이러스 캡핑 효소 및 재조합 2'-O-메틸트란스퍼라제 효소는 캡 구아닌이 N7 메틸화를 함유하고 mRNA의 5'-말단 뉴클레오티드가 2'-O-메틸을 함유하는 mRNA의 5'-말단 뉴클레오티드와 구아닌 캡 뉴클레오티드 사이 정준 5'-5'-트리포스페이트 연결을 창출할 수 있다. 이 캡은, *예를 들면*, 당업계에서 알려진 다른 5' 캡 유사체 구조와 비교하여, 더 높은 번역적-역량 및 세포성 안정성 그리고 세포성 전-염증성 사이토카인의 감소된 활성화를

초래한다. 캡 구조는 7mG(5')ppp(5')N,pN2p, 7mG(5')ppp(5')N1mpNp, 7mG(5')-ppp(5')N1mpN2 mp 및 m(7)Gpppm(3)(6,6,2')Apm(2')Apm(2')Cpm(2)(3,2')Up를 포함한다.

[0257] 일부 양태에서, 5' 말단 캡은 내인성 캡 또는 캡 유사체를 포함한다. 일부 양태에서, 5' 말단 캡은 구아닌 유사체를 포함한다. 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.

[0258] 일부 양태에서, 5' 캡은 5'에서 5' 트리포스페이트 연결을 포함한다. 일부 양태에서, 5' 캡은 티오포스페이트 변형을 포함하는 5'에서 5' 트리포스페이트 연결을 포함한다. 일부 양태에서, 5' 캡은 2'-O 또는 3'-O-리보스-메틸화된 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 양태에서, 5' 캡은 변형된 구아노신 뉴클레오티드 또는 변형된 아데노신 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 양태에서, 5' 캡은 7-메틸구아닐레이트를 포함한다. 예시적 캡 구조는 m7G(5')ppp(5')G, m7,2`O-mG(5')ppSp(5')G, m7G(5')ppp(5')2`O-mG, 및 m7,3`O- mG(5')ppp(5')2`O-mA를 포함한다.

[0259] 일부 양태에서, IL-12를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 변형된 5' 캡을 포함한다. 5' 캡에서 변형은 mRNA의 안정성을 증가시킬 수 있고, mRNA의 반감기를 증가시킬 수 있고, mRNA 번역적 효율을 증가시킬 수 있다. 일부 양태에서, 변형된 5' 캡은 하기 변형들 중 하나 이상을 포함한다: 캡핑된 구아노신 트리포스페이트 (GTP)의 2' 및/또는 3' 위치에서 변형, (탄소환식 고리를 생산한) 당 고리 산소의 메틸렌 모이어티 (CH2)로의 대체, 캡 구조의 트리포스페이트 브릿지 모이어티에서 변형, 또는 핵염기 (G) 모이어티에서 변형.

[0260] 변형될 수 있는 5' 캡 구조는, 비제한적으로, 그 전체가 본원에 참조로 포함되는 미국 출원 번호 2014/0147454 및 WO2018/160540에 기재된 캡을 포함한다.

[0261] *IRES 서열*

[0262] 일부 양태에서, IL-12를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 내부 리보솜 진입 부위 (IRES)를 포함한다. 속성 피코르나 바이러스로서 처음 확인된, IRES는 5' 캡 구조의 부재 하에 단백질 합성 개시하기에서 중요한 역할을 한다. IRES는 유일한 리보솜 결합 부위로서 작용할 수 있거나, mRNA의 여러 리보솜 결합 부위들 중 하나의 역할을 할 수 있다. 1개 초과 기능적 리보솜 결합 부위를 함유하는 핵산 또는 mRNA는 리보솜 ("멀티시스트론 핵산 분자")에 의해 독립적으로 번역되는 몇몇 펩티드 또는 폴리펩티드를 인코딩할 수 있다. 핵산 또는 mRNA가 IRES와 제공되는 때, 제2 번역가능한 영역이 추가로 임의로 제공된다. 본 개시내용에 따라 사용될 수 있는 IRES 서열의 예는 제한 없이 피코르나바이러스 (*예를 들면,* FMDV), 해충 바이러스 (CFFV), 소아마비 바이러스 (PV), 뇌심근염 바이러스 (ECMV), 구제역 바이러스 (FMDV), C형 간염 바이러스 (HCV), 돼지열병 바이러스 (CSFV), 뮤린 백혈병 바이러스 (MLV), 원숭이 면역 결핍 바이러스 (SIV) 또는 귀뚜라미 마비 바이러스 (CrPV)로부터의 것들을 포함한다.

[0263] *말단 아키텍처 변형: 폴리-A 꼬리*

[0264] RNA 가공 동안, 아데닌 뉴클레오티드의 장쇄 (폴리-A 꼬리)는 분자의 안정성을 증가시기 위해 메신저 RNA (mRNA) 분자에 정상적으로 부가된다. 전사 직후, 전사물의 3' 단부는 절단되어 3' 히드록실을 유리시킨다. 그 다음 폴리-A 폴리머라제는 아데닌 뉴클레오티드의 쇄를 RNA에 부가한다. 폴리아데닐화로 불린, 공정은 100 내지 250개 잔기 길이인 폴리-A 꼬리를 부가한다.

[0265] 일부 양태에서, 3' 꼬리의 길이는 길이가 약 30개 초과 뉴클레오티드이다. 일부 양태에서, 폴리-A 꼬리는 길이가 약 35개 초과 뉴클레오티드이다. 일부 양태에서, 길이는 적어도 약 40개 뉴클레오티드이다. 일부 양태에서, 길이는 적어도 약 45개 뉴클레오티드이다. 일부 양태에서, 길이는 적어도 약 55개 뉴클레오티드이다. 일부 양태에서, 길이는 적어도 약 60개 뉴클레오티드이다. 일부 양태에서, 길이는 적어도 70개 뉴클레오티드이다. 일부 양태에서, 길이는 적어도 약 80개 뉴클레오티드이다. 일부 양태에서, 길이는 적어도 약 90개 뉴클레오티드이다. 일부 양태에서, 길이는 적어도 약 100개 뉴클레오티드이다. 일부 양태에서, 길이는 적어도 약 120개 뉴클레오티드이다. 일부 양태에서, 길이는 적어도 약 140개 뉴클레오티드이다. 일부 양태에서, 길이는 적어도 약 160개 뉴클레오티드이다. 일부 양태에서, 길이는 적어도 약 180개 뉴클레오티드이다. 일부 양태에서, 길이는 적어도 약 200개 뉴클레오티드이다. 일부 양태에서, 길이는 적어도 약 250개 뉴클레오티드이다. 일부 양태에서, 길이는 적어도 약 300개 뉴클레오티드이다. 일부 양태에서, 길이는 적어도 약 350개 뉴클레오티드이다. 일부 양태에서, 길이는 적어도 약 400개 뉴클레오티드이다. 일부 양태에서, 길이는 적어도 약 450개 뉴클레오티드이다. 일부 양태에서, 길이는 적어도 약 500개 뉴클레오티드이다. 일부 양태에서, 길이는 적어도 약 600개 뉴클레오티드이다. 일부 양태에서, 길이는 적어도 약 700개 뉴클레오티드이다. 일부 양태에서, 길이는 적어도 약 800개 뉴클레오티

드이다. 일부 양태에서, 길이는 적어도 약 900개 뉴클레오티드이다. 일부 양태에서, 길이는 적어도 약 1000개 뉴클레오티드이다. 일부 양태에서, 길이는 적어도 약 1100개 뉴클레오티드이다. 일부 양태에서, 길이는 적어도 약 1200개 뉴클레오티드이다. 일부 양태에서, 길이는 적어도 약 1300개 뉴클레오티드이다. 일부 양태에서, 길이는 적어도 약 1400개 뉴클레오티드이다. 일부 양태에서, 길이는 적어도 약 1500개 뉴클레오티드이다. 일부 양태에서, 길이는 적어도 약 1600개 뉴클레오티드이다. 일부 양태에서, 길이는 적어도 약 1700개 뉴클레오티드이다. 일부 양태에서, 길이는 적어도 약 1800개 뉴클레오티드이다. 일부 양태에서, 길이는 적어도 약 1900개 뉴클레오티드이다. 일부 양태에서, 길이는 적어도 약 2000개 뉴클레오티드이다. 일부 양태에서, 길이는 적어도 약 2500개 뉴클레오티드이다. 일부 양태에서, 길이는 적어도 약 3000개 뉴클레오티드이다.

[0266] 일부 양태에서, IL-12를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 폴리A-G 콰르텟을 포함하도록 설계된다. G-콰르텟은 DNA 및 RNA 둘 모두에서 G-풍부 서열에 의해 형성될 수 있는 4개 구아닌 뉴클레오티드의 환식 수소 결합된 어레이이다. 이 양태에서, G-콰르텟은 폴리-A 꼬리의 단부에 편입된다. 생성된 핵산 또는 mRNA는 안정성, 단백질 생산 및 다양한 시점에 반감기를 포함하는 다른 파라미터에 대하여 검정될 수 있다. 폴리A-G 콰르텟이 120개 뉴클레오티드 단독의 폴리-A 꼬리를 사용하여 보여진 것의 적어도 75%에 상당한 단백질 생산을 초래함이 발견되었다.

[0267] 일부 양태에서, IL-12를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 폴리A 꼬리를 포함하고 쇄 종결 뉴클레오시드의 부가에 의해 안정화된다. 일부 양태에서, 폴리A 꼬리로 IL-12를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 5' 캡 구조를 추가로 포함한다.

[0268] 일부 양태에서, IL-12를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 폴리A-G 콰르텟을 포함한다. 일부 양태에서, 폴리A-G 콰르텟으로 IL-12를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 5' 캡 구조를 추가로 포함한다.

[0269] 일부 양태에서, 폴리A 꼬리 또는 폴리A-G 콰르텟을 포함하는, IL-12를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 3'-데옥시뉴클레오시드, 2',3'-디데옥시뉴클레오시드 3'-O-메틸뉴클레오시드, 3'-O-에틸뉴클레오시드, 3'-아라비노시드, 및 당업계에서 알려지고/거나 본원에 기재된 다른 변형된 뉴클레오시드의 부가에 의해 안정화된다.

[0270] *변형된 뉴클레오시드*

[0271] 일부 양태에서, IL-12를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 하나 이상의 변형된 뉴클레오시드를 포함한다. 일부 양태에서, 하나 이상의 변형된 뉴클레오시드는 6-아자-시티딘, 2-티오-시티딘, α-티오-시티딘, 슈도-이소-시티딘, 5-아미노알릴-우리딘, 5-요오도-우리딘, N1-메틸-슈도우리딘, 5,6-디히드로우리딘, α-티오-우리딘, 4-티오-우리딘, 6-아자-우리딘, 5-히드록시-우리딘, 데옥시-티미딘, 슈도-우리딘, 이노신, α-티오-구아노신, 8-옥소-구아노신, O6-메틸-구아노신, 7-데아자-구아노신, N1-메틸 아데노신, 2-아미노-6-클로로-퓨린, N6-메틸-2-아미노-퓨린, 6-클로로-퓨린, N6-메틸-아데노신, α-티오-아데노신, 8-아지도-아데노신, 7-데아자-아데노신, 피롤로-시티딘, 5-메틸-시티딘, N4-아세틸-시티딘, 5- 메틸-우리딘, 5-요오도-시티딘, 및 이들의 조합을 포함한다.

[0272] 일부 양태에서, IL-12를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에서 하나 이상의 우리딘은 변형된 뉴클레오시드에 의해 대체된다. 일부 양태에서, 우리딘을 대체하는 변형된 뉴클레오시드는 슈도우리딘 (ψ), N1-메틸-슈도우리딘 (m1ψ) 또는 5-메틸-우리딘 (m5U)이다.

[0273] 일부 양태에서, IL-12를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 그들 전체가 본원에 참조로 포함되는 미국 출원 번호 2014/0147454, 국제 출원 WO2018160540, 국제 출원 WO2015/196118, 또는 국제 출원 WO2015/089511에 기재된 대로 IL-12를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0274] *세포독성 뉴클레오시드*

[0275] 일부 양태에서, IL-12를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 하나 이상의 세포독성 뉴클레오시드를 포함한다. 예를 들어, 세포독성 뉴클레오시드는 폴리뉴클레오티드 예컨대 IL-12 또는 mRNA를 인코딩하는 2작용성 뉴클레오티드 서열에 편입될 수 있다. 세포독성 뉴클레오시드 항-암 제제는, 비제한적으로, 아데노신 아라비노시드, 시타라빈, 시토신 아라비노시드, 5-플루오로우라실, 플루다라빈, 플록수리딘, FTORAFUR® (테가푸르와 우라실의 조합), 테가푸르 ((RS)-5-플루오로-1-(테트라히드로푸란-2-일)피리미딘-2,4(1H,3H)-디온), 및 6-메르캅토퓨린을 포함한다.

[0276] 다수의 세포독성 뉴클레오시드 유사체는 임상적으로 사용되거나, 항암 제제로서 임상 시험의 대상체이었다. 이러한 유사체의 예는, 비제한적으로, 시타라빈, 젬시타빈, 트록사시타빈, 데시타빈, 테자시타빈, 2'-데옥시-

2'-메틸리데시티딘 (DMDC), 클라드리빈, 클로파라빈, 5-아자시티딘, 4'-티오-아라시티딘, 시클로펜테닐시토신 및 1-(2-C-시아노-2-데옥시-베타-D-아라비노-펜토푸라노실)-시토신을 포함한다. 이러한 화합물의 또 다른 예는 플루다라빈 포스페이트이다. 이들 화합물은 전신으로 투여될 수 있고 세포독성 제제의 전형적인 부작용 예컨대, 비제한적으로, 증식하는 정상 세포에 비해 종양 세포에 대하여 거의 또는 전혀 없는 특이성을 가질 수 있다.

[0277] 세포독성 뉴클레오시드 유사체의 다수의 전구약물은 당업계에서 또한 보고된다. 예는, 비제한적으로, N4-베헤노일-1-베타-D-아라비노푸라노실시토신, N4-옥타데실-1-베타-D-아라비노푸라노실시토신, N4-팔미토일-1-(2-C-시아노-2-데옥시-베타-D-아라비노-펜토푸라노실) 시토신, 및 P-4055 (시타라빈 5'-엘라이드산 에스테르)를 포함한다. 일반적으로, 이들 전구약물은 주로 간 및 전신 순환에서 활성 약물로 전환될 수 있고 종양 조직에서 활성 약물의 선택적 방출을 거의 또는 전혀 표시하지 않는다. 예를 들어, 5'-데옥시-5-플루오로시티딘 (및 결국 5-플루오로우라실)의 전구약물인 카페시타빈은 간 및 종양 조직 둘 모두에서 대사된다. "생리학적 조건 하에 쉽게 가수분해가능한 라디칼"을 함유하는 일련의 카페시타빈 유사체는 Fujiu et al. (미국 특허 번호 4,966,891)에 의해 청구되었고 본원에 참조로 포함된다. Fujiu에 의해 기재된 시리즈는 5'-데옥시-5-플루오로시티딘의 N4 알킬 및 아르알킬 카르바메이트 그리고 이들 화합물이 정상 생리학적 조건 하에 가수분해에 의해 활성화되어 5'-데옥시-5-플루오로시티딘을 제공한다는 의미를 포함한다.

[0278] 일련의 시타라빈 N4-카르바메이트는 화합물이 간 및 혈장에서 시타라빈으로 전환하도록 설계된 Fadl et al (Pharmazie. 1995, 50, 382-7, 그 전체가 본원에 참조로 포함됨)에 의해 보고되었다. 그 전체가 본원에 참조로 포함된 WO 2004/041203은, 전구약물의 일부가 N4-카르바메이트인, 젬시타빈의 전구약물을 개시한다. 이들 화합물은 젬시타빈의 위장 독성을 극복하도록 설계되었고 위장관으로부터 온전한 전구약물의 흡수후 간 및 혈장에서 가수분해성 방출에 의해 젬시타빈을 제공하도록 의도되었다. Nomura et al (Bioorg Med. Chem. 2003, 11, 2453-61, 그 전체가 본원에 참조로 포함됨)는, 생체환원시, 세포독성 뉴클레오시드 화합물를 생산하기 위해 산성 조건 하에 추가 가수분해가 필요한 중간체를 생산한 1-(3-C-에티닐-β-D-리보-펜토파라노실) 시토신의 아세탈 유도체를 기재하였다.

[0279] 화학요법제일 수 있는 세포독성 뉴클레오티드는, 비제한적으로, 피라졸로 [3,4-D]-피리미딘, 알로푸리놀, 아자티오프린, 카페시타빈, 시토신 아라비노시드, 플루오로우라실, 메르캅토퓨린, 6-티오구아닌, 아시클로비르, 아라-아데노신, 리바비린, 7-데아자-아데노신, 7-데아자-구아노신, 6-아자-우라실, 6-아자-시티딘, 티미딘 리보뉴클레오티드, 5-브로모데옥시우리딘, 2-클로로-퓨린, 및 이노신, 또는 이들의 조합을 또한 포함한다.

[0280] **V. 약학적 조성물**

[0281] 일부 양태에서, 본 개시내용은 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드, 벡터, 및/또는 지질 나노입자를 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 개시내용의 일부 양태에서, 약학적 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체 (부형제)를 추가로 포함한다. "허용가능한"은, 본원에 사용된 바와 같이, 담체가 조성물의 활성 성분과 호환성이어야 하고 치료될 대상체에게 해롭지 않아야 함을 의미한다. 일부 양태에서, 담체는 활성 성분을 안정화시킬 수 있다. 약학적으로 허용가능한 부형제 (담체)는 완충액을 포함하고, 이는 당업계에서 잘 알려진다. *예를 들면*, Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. (2000) Lippincott Williams and Wilkoins, Ed. K. E. Hoover, *참조*.

[0282] 생체내 투여에 사용될 약학적 조성물은 멸균이어야 한다. 이것은, 예를 들어, 멸균 여과막을 통해서 여과에 의해 용이하게 성취된다. 지질 나노입자는 멸균 접근 포트를 갖는 컨테이너, 예를 들어, 피하 주사 바늘로 뚫을 수 있는 마개를 갖는 정맥내 용액 백 또는 바이알에 배치될 수 있다.

[0283] 본 개시내용의 일부 양태에서, 약학적 조성물은 종양내, 척추내, 근육내, 정맥내, 피하, 흡입, 피내, 림프내, 안내, 복강내, 흉막내, 척수내, 혈관내, 비강, 경피성, 설하, 점막하, 경피, 또는 경점막 투여를 위하여 제형화될 수 있다. 본 개시내용의 일부 양태에서, 약학적 조성물은 종양내 주사를 위하여 제형화될 수 있다. 종양내 주사는, 본원에 사용된 바와 같이, 종양에 직접 주사를 지칭한다. 고 농도의 조성물은, 소량의 약물을 사용하면서, 현장에서 달성될 수 있다. 면역요법의 국소 전달은, 상당한 전신 노출 및 오조준 독성을 방지하면서, 여러 조합 요법을 허용한다.

[0284] 본 개시내용의 일부 양태에서, 약학적 조성물은 근육내 주사, 정맥내 주사, 또는 피하 주사를 위하여 제형화될 수 있다.

[0285] 본 개시내용의 일부 양태에서, 약학적 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체, 완충액 제제, 부형제, 염, 또는 안정화제를 동결건조된 제형 또는 수용액의 형태로 포함한다. *예를 들면*, Remington: The Science and

Practice of Pharmacy 20th Ed. (2000) Lippincott Williams and Wilkins, Ed. K. E. Hoover, *참조*. 허용가능한 담체 및 부형제, 또는 안정화제는 사용된 투약량 및 농도에서 수령자에게 비독성이고, 완충액 예컨대 포스페이트, 시트레이트, 및 다른 유기 산; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함하는 항산화제; 방부제 (예컨대 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로리드; 헥사메토늄 클로리드; 벤즈알코늄 클로리드, 벤제토늄 클로리드; 페놀, 부틸, 또는 벤질 알코올; 알킬 파라벤 예컨대 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레조르시놀; 시클로헥사놀; 3-펜탄올; 및 m-크레졸); 저분자량 (약 10개 미만 잔기) 폴리펩티드; 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴, 또는 면역글로불린; 친수성 중합체 예컨대 폴리비닐피롤리돈; 아미노산 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라진, 히스티딘, 아르기닌, 또는 리신; 글루코스, 만노스, 또는 덱스트란을 포함하는 단당류, 이당류, 및 기타 탄수화물; 킬레이트화 제제 예컨대 EDTA; 당 예컨대 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨; 염 형성 반대 이온 예컨대 나트륨; 금속 착물 (*예를 들면,* Zn-단백질 착물); 및/또는 비-이온성 계면활성제 예컨대 TWEEN™, PLURONICS™ 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 포함한다.

[0286] 일부 양태에서, 본원에 기재된 약학적 조성물은 당업계에서 알려진, 예컨대 Epstein, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688 (1985); Hwang, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030 (1980); 및 그들 전체가 참조로 이에 편입되는 미국 특허 번호 4,485,045 및 4,544,545에 기재된 방법에 의해 제조될 수 있는 지질 나노입자를 포함한다. 향상된 순환 시간이 있는 리포솜은 그 전체가 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 번호 5,013,556에 개시된다. 일부 양태에서, 리포솜은 포스파티딜콜린, 콜레스테롤, 및 PEG-유도체화 포스파티딜에탄올아민 (PEG-PE)을 포함하는 지질 조성물로 역상 증발 방법에 의해 생성될 수 있다. 리포솜은 정의된 기공 크기의 필터를 통해서 압출되어 원하는 직경이 있는 리포솜을 산출한다.

[0287] 본 개시내용의 일부 양태에서, 약학적 조성물은 지속된-방출 형식으로 제형화된다. 지속된-방출 제조물의 적합한 예는 매트릭스가 성형품, *예를 들면,* 필름 또는 마이크로캡슐의 형태인 지질 나노입자를 함유하는 고체 소수성 중합체의 반투과성 매트릭스를 포함한다. 지속된-방출 매트릭스의 예는, 비제한적으로, 폴리에스테르, 하이드로겔 (예를 들어, 폴리(2-히드록시에틸-메타크릴레이트), 또는 폴리(비닐알코올)), 폴리락티드 (미국 특허 번호 3,773,919), L-글루탐산과 7 에틸-L-글루타메이트의 공중합체, 분해불가능한 에틸렌-비닐 아세테이트, 분해가능한 락트산-글리콜산 공중합체 예컨대 LUPROM DEPOT™ (락트산-글리콜산 공중합체 및 류프롤리드 아세테이트로 구성된 주사형 미세구), 수크로스 아세테이트 이소부티레이트, 및 폴리-D-(-)-3-히드록시부티르산을 포함한다.

[0288] 일부 양태에서, 적합한 표면-활성 제제는, 비제한적으로, 비-이온성 제제, 예컨대 폴리옥시에틸렌소르비탄 (*예를 들면,* TWEEN™ 20, 40, 60, 80 또는 85) 및 다른 소르비탄 (*예를 들면,* SPAN™ 20, 30, 60, 80, 또는 85)을 포함한다. 일부 양태에서, 표면-활성 제제가 있는 조성물은 0.05 내지 5% 표면-활성 제제를 포함한다. 일부 양태에서 조성물은 0.1 내지 2.5%를 포함한다. 다른 성분, 예를 들어 만니톨 또는 다른 약학적으로 허용가능한 비히클이, 필요한 경우 첨가될 수 있음이 이해될 것이다.

[0289] 일부 양태에서, 약학적 조성물은 경구, 비경구, 또는 직장 투여, 혹은 흡입 또는 통기에 의한 투여를 위한 단위 투약량 형태 예컨대 정제, 알약, 캡슐, 분말, 과립, 용액 또는 현탁액, 또는 좌약이다.

[0290] 고체 조성물 예컨대 정제를 제조하기 위해, 주활성 성분은 약학적 담체, *예를 들면,* 종래 정제화 성분 예컨대 옥수수 전분, 락토스, 수크롯, 소르비톨, 활석, 스테아르산, 스테아르산마그네슘, 인산이칼슘 또는 검, 및 다른 약학적 희석제, 예를 들면, 물과 혼합되어 본 개시내용의 화합물, 또는 이의 비-독성 약학적으로 허용가능한 염의 균질한 혼합물을 함유하는 고체 전제형 조성물을 형성할 수 있다. 이들 전제형 조성물을 균질한 것으로 지칭하는 때, 조성물이 똑같이 효과적 단위 투약 형태 예컨대 정제, 알약, 및 캡슐로 쉽게 세분화될 수 있도록 활성 성분이 조성물 전체에 걸쳐 균일하게 분산됨이 의미된다. 이 고체 전제형 조성물은 그 다음 본 개시내용의 활성 성분 약 0.1 내지 약 500 mg을 함유하는 상기 기재된 유형의 단위 투약 형태로 세분화된다. 신규 조성물의 정제 또는 알약은 코팅되거나 달리 배합되어 장시간 작용의 이점을 제공하는 투약 형태를 제공할 수 있다. 예를 들어, 정제 또는 알약은 내부 투약량 및 외부 투약량 구성요소를 포함할 수 있고, 후자는 전자보다 외피의 형태로 있다. 2개 구성요소는 위에서 붕괴에 저항하는 역할을 하고 내부 구성요소가 십이지장으로 온전하게 통과하거나 방출이 지연되도록 하는 장용층에 의해 분리될 수 있다. 다양한 물질은 이러한 장용층 또는 코팅물에 사용될 수 있고, 이러한 물질은 다수의 중합체성 산 그리고 셸락, 세틸 알코올, 및 셀룰로스 아세테이트와 같은 물질과 중합체성 산의 혼합물을 포함한다.

[0291] 적합한 에멀젼은 상업적으로 이용가능한 지방 에멀젼, 예컨대 INTRALIPID™, LIPOSYN™, INFONUTROL™,

LIPOFUNDIN™, 및 LIPIPHYSAN™을 사용하여 제조될 수 있다. 활성 성분은 어느 한쪽 사전-혼합된 에멀젼 조성물일 수 있거나 대안적으로 오일 (*예를 들면*, 대두유, 홍화유, 면실유, 참기름, 옥수수유, 또는 아몬드유) 그리고 인지질 (*예를 들면*, 계란 인지질, 대두 인지질, 또는 대두 레시틴) 및 물과 혼합시 형성된 에멀젼에 용해될 수 있다. 다른 성분, 예를 들어 글리세롤 또는 글루코스가 에멀젼의 강장성을 조정하기 위해 첨가될 수 있음이 이해될 것이다. 적합한 에멀젼은 최대 약 20% 오일, 예를 들어, 약 5 내지 약 20%를 전형적으로 함유할 것이다. 지방 에멀젼은 적합한 크기를 갖는 지방 방울을 포함할 수 있고 약 5.5 내지 약 8.0의 범위에서 pH를 가질 수 있다.

[0292] 흡입 또는 통기를 위한 약학적 조성물은 약학적으로 허용가능한, 수성 또는 유기 용매, 또는 이의 혼합물에서 용액 및 현탁액, 그리고 분말을 포함한다. 액체 또는 고체 조성물은 상기 제시된 대로 적합한 약학적으로 허용가능한 부형제를 함유할 수 있다. 일부 양태에서, 조성물은 국소 또는 전신 효과를 위하여 경구 또는 비강 호흡기 루트에 의해 투여된다.

[0293] 약학적으로 허용가능한 용매에서 조성물은 기체를 사용하여 분무될 수 있다. 분무된 용액은 분무 장치에서 직접적으로 호흡될 수 있거나 분무 장치는 페이스 마스크, 텐트 또는 간헐적 양압 호흡기에 부착될 수 있다. 용액, 현탁액, 또는 분말 조성물은 적절한 방식으로 제형을 전달하는 장치로부터 투여될 수 있다.

[0294] **VI. 요법에서 사용을 위한 키트**

[0295] 본 개시내용은 질환 또는 장애, 예컨대 암 (*예를 들면*, 흑색종, 폐 암, 결장직장 암, 또는 신-세포 암)에 대해 면역요법, 및/또는 질환 또는 장애 (*예를 들면*, 암)에 대한 위험을 치료 또는 감소시키는 데 사용하기 위한 키트를 또한 제공한다. 일부 양태에서, 키트는 본원에 기재된 조성물을 포함하는 하나 이상의 컨테이너를 포함한다.

[0296] 일부 양태에서, 키트는 본원에 기재된 방법들 중 임의의 것에 따라 사용을 위한 지침을 포함한다. 예를 들어, 포함된 지침은 표적 질환을 치료, 발병을 지연, 또는 경감하기 위해 본원에 기재된 약학적 조성물의 투여의 설명을 포함할 수 있다. 일부 양태에서, 지침은 표적 질환/장애 (*예를 들면*, 암)의 위험에 처한 대상체에게 본원에 기재된 조성물 투여하기의 설명을 포함한다.

[0297] 일부 양태에서, 지침은 투약량 정보, 용량화 일정, 및 투여 루트를 포함한다. 일부 양태에서, 컨테이너는 단위 용량, 벌크 패키지 (*예를 들면*, 다중-용량 패키지) 또는 아-단위 용량이다. 일부 양태에서, 지침은 라벨 또는 패키지 삽입물 (*예를 들면*, 키트에서 포함된 종이 시트)에서 작성된 지침이다. 일부 양태에서, 지침은 기계-판독가능한 지침 (*예를 들면*, 자기 또는 광학 저장 디스크에 담긴 지침)이다.

[0298] 일부 양태에서, 라벨 또는 패키지 삽입물은 본원에 개시된 조성물이 본원에 기재된 것과 같은 암과 연관된 질환 또는 장애를 치료, 발병 지연, 및/또는 경감시키기 위해 사용됨을 나타낸다. 본원에 기재된 방법들 중 임의의 것을 실시하기 위한 지침들이 제공될 수 있다.

[0299] 일부 양태에서, 본원에 기재된 키트는 적합한 패키징으로 있다. 일부 양태에서, 적합한 패킹은 바이알, 병, 단지, 유연한 패키징 (*예를 들면*, 시일 마일라 또는 플라스틱 백), 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 양태에서, 패키징은 특이적 장치 예컨대 흡입기, 비강 투여 장치 (*예를 들면*, 아토마이저), 또는 주입 장치 예컨대 미니펌프와 조합으로 사용을 위한 패키지를 포함한다. 일부 양태에서, 키트는 멸균 접근 포트를 포함한다 (예를 들어 컨테이너는 피하 주사 바늘로 뚫을 수 있는 마개를 갖는 정맥내 용액 백 또는 바이알일 수 있다). 일부 양태에서, 컨테이너는 멸균 접근 포트를 또한 가질 수 있다 (예를 들어 컨테이너는 피하 주사 바늘로 뚫을 수 있는 마개를 갖는 정맥내 용액 백 또는 바이알일 수 있다). 일부 양태에서, 적어도 하나의 활성 제제는 본원에 기재된 대로 조성물이다.

[0300] 일부 양태에서, 키트는 추가의 구성요소 예컨대 완충액 및 해석적 정보를 추가로 포함한다. 일부 양태에서, 키트는 컨테이너 및 컨테이너 상의 또는 이와 연관된 라벨 또는 패키지 삽입물(들)을 포함한다. 일부 양태에서, 본 개시내용은 본원에 기재된 키트의 내용물을 포함하는 제조 물품을 제공한다.

[0301] ***일반 기법***

[0302] 본 개시내용의 실시는, 달리 지시되지 않는 한, 업계의 기술범위 내에 있는, 분자 생물학 (재조합 기법 포함), 미생물학, 세포 생물학, 생화학 및 면역학의 종래 기법을 이용할 것이다. 분자 클로닝: 실험실 매뉴얼, 제2판 (Sambrook et al., 1989) Cold Spring Harbor Press; 올리고뉴클레오티드 합성 (M.J. Gait 편집, 1984); 분자 생물학에서의 방법, Humana Press; 세포 생물학: 실험실 노트북 (J. E. Cellis 편집, 1998) Academic Press;

동물 세포 배양 (R. I. Freshney 편집, 1987); 세포 및 조직 배양 개론 (J.P. Mather and P.E. Roberts, 1998) Plenum Press; 세포 및 조직 배양: 실험실 절차 (A. Doyle, J.B. Giffiths and D.G. Newell 편집, 1993-8) J. Wiley and Sons; 효소학 방법 (Academic Press, Inc.); 실험 면역학 핸드북 (D.M. Weir and C.C. Blackwell 편집); 포유류 세포를 위한 유전자 전이 벡터 (J.M. Miller and M.P. Calos 편집, 1987); 분자 생물학에서의 현재 프로토콜 (F.M. Ausubel et al., 편집, 1987): PCR: 중합효소 연쇄 반응 (Mullis et al., 편집, 1994); 면역학에서의 현재 프로토콜 (J.E. Coligan et al., 편집, 1991); 분자 생물학에서의 짧은 프로토콜 (Wiley and Sons, 1999); 면역생물학 (C.A. Janeway and P. Travers, 1997); 항체 (P. Finch, 1997); 항체: 실용적인 접근법 (D. Catty, 편집, IRL Press, 1988-1989); 모노클로날 항체: 실용적 접근법 (P. Shepherd and C. Dean, 편집, Oxford University Press, 2000); 항체 사용하기: 실험실 매뉴얼 (E. Harlow and D. Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); 항체 (M. Zanette and J.D. Capra, 편집, Harwood Academic Publishers, 1995). 추가 상세화 없이, 당업자가 상기 설명에 기반하여 본 개시내용을 최대한 활용할 수 있다고 믿어진다. 본원에 인용된 모든 출판물 (상기 및 본 개시내용의 다른 곳에 나열된 것들 포함)은 그들 전체가 참조로 포함된다.

[0303] 실시예

[0304] 실시예 1: VEE 레플리콘을 포함하는 LNP의 작제

[0305] 본원에 기재된 LNP를 작제하기 위해, 하기 물질 및 방법을 사용하였다:

[0306] *템플레이트 제조*

[0307] 템플레이트 DNA를 BspQI 제한 효소를 사용하여 선형화하였다. 선형화 이후, DNA를 6개 디아볼륨에 대하여 필터에서 완충액 교환하였다. 이 DNA를 그 다음 T7 RNA 폴리머라제 및 NTP를 사용하여 IVT하였다. IVT 이후, 남은 DNA를 DNaseI를 사용하여 소화시켰다. mRNA를 그 다음 액체 크로마토그래피에 앞서 완충액 교환하였다. 이 이후, mRNA를 재차 완충액 교환하였고 그 다음 품질 관리 목적으로 검정하였다.

[0308] *T-연접을 이용한 종래 BL-1 LNP 제형의 제조*

[0309] 지질 물질을 각각 칭량하였고 에탄올에 용해시켰다. 에탄올 상을 아래 형태로 조성 비율에 따라 모든 지질 물질을 혼합함으로써 제조하였다. 수성 상을 RNA 분자 (*예를 들면*, VEE 레플리콘이 있는 mRNA 또는 임의의 VEE가 없는 대조군 mRNA)를 20mM 시트레이트 완충액 (pH 4.0), 300mM NaCl 및 물로 희석함으로써 제조하였다. 3:1 (수성 상: 에탄올 상)의 유속 비율로 T-연접 혼합을 통해서 LNP의 에탄올 상 및 수성 상을 혼합하고 이어서 1:1 (LNP 상 : PEG 상)의 유속 비율로 T-연접 혼합을 통해 TBS 완충액 (pH 4.0)으로 즉시 인-라인 희석에 의해 LNP를 제공하였다. 아래 표 2는 LNP 조성물에서 포함된 구성요소들의 각각의 상대적 양을 제공한다.

[0310] **표 2. BL-1 LNP 조성물**

구성요소	예시적 양	중량비
mRNA	1.0 mg	1.0
BL-1	12.7 mg	12.7
DSPC	2.8 mg	2.8
콜레스테롤	2.8 mg	2.8
베타-시토스테롤	2.8 mg	2.8
DMG-PEG-2k	1.5 mg	1.5

[0311] *T-연접을 이용한 PEG후 미셀 TT3 LNP 제형의 제조*

[0312] 지질 물질을 각각 칭량하였고 에탄올에 용해시켰다. 에탄올 상을 아래 형태로 조성 비율에 따라, DMG-PEG-2K를 제외한 모든 지질 물질을 혼합함으로써 제조하였다. 수성 상을 RNA 분자 (*예를 들면*, VEE 레플리콘이 있는 mRNA 또는 임의의 VEE 레플리콘이 없는 대조군 mRNA)를 20mM 시트레이트 완충액 (pH 4.0), 300mM NaCl 및 물로 희석함으로써 제조하였다. PEG 미셀 상을 DMG-PEG-2K의 상응하는 양을 TBS 완충액에 첨가하고 와동을 통해 철저히 혼합함으로써 제조하였다. 마지막으로, 3:1 (수성 상: 에탄올 상)의 유속 비율로 T-연접 혼합을 통해서 LNP의 에탄올 상 및 수성 상을 먼저 혼합하고, 이어서 1:1 (LNP 상 : PEG 상)의 유속 비율로 T-연접 혼합을 통해 PEG 미셀 상으로 즉시 인-라인 희석에 의해 PEG후 미셀 TT3 LNP를 제공하였다. 아래 표 3은 LNP 조성물에 포함된 구성요소 각각의 상대적 양(예시적 양 및 중량비로서 모두)을 제공한다.

표 3. TT3 LNP 조성물

[0313]

구성요소	예시적 양	중량비
mRNA	1.0 mg	1.0
TT3	10 mg	10.0
DOPE	8.0 mg	8.0
콜레스테롤	5.6 mg	5.6
DMG-PEG-2k	4.1 mg	4.1

[0314]

표 3A.

TT3 LNP 조성물 구성요소	중량비
mRNA	1.0
TT3	10.0
DOPE	8.0
콜레스테롤	5.6
PEG-DMG-2k 미셀	중량비
DMG-PEG-2k	4.1 (미셀의 부분이 아닌, 상기 mRNA에 대해)

[0315] *완충액 교환 및 BL-1/TT3 LNP의 냉동/해동*

[0316] 제공된 BL-1/TT3 LNP를 완충액 교환하였고 접선 유동 여과를 통해 농축시켰다. 후속적으로, TBS 스톡 용액내 40% 수크로스 (W/V)를 모든 제조된 BL-1/TT3 LNP에 첨가하여 10% 수크로스 중 LNP의 최종 용액을 만들었다. LNP의 최종 RNA 농도를 2% TE+Triton으로 LNP를 해리시킴으로써 측정하였고 Quant-it RiboGreen 검정으로 추가로 검출하였다. LNP를 50 μg/튜브 분취량으로 분취하였고 냉동을 위하여 -80 ℃에 두었다. LNP로 용량화 전에, LNP를 실온에서 해동시켰다.

[0317] 실시예 2: 간 발현의 분석

[0318] 간을 표적화하는 실시예 1에서 작제된 LNP의 능력을 평가하기 위해, 생체분포 분석을 마우스에서 실행하였다. 간략히, 동물은 하기의 투여를 받았고 단백질 발현을 생물발광 검정을 사용하여 평가하였다: (1) PBS (음성 대조군), (2) 임의의 VEE 레플리콘이 없는 대조군 mRNA (RNA-VEE 없음)으로 로딩된 LNP, 또는 (3) VEE 레플리콘이 있는 mRNA (RNA-VEE)로 로딩된 LNP.

[0319] 도 1에 도시된 대로, RNA-VEE 없음을 받았던 동물에서, 간 내에서 상당한 단백질 발현이 있었다. 대조적으로, RNA-VEE를 받았던 동물에서, 간에서 관찰된 단백질의 검출가능한 발현은 거의 없었다. 다른 조직 (*예를 들면*, 비장 및 폐)에서 단백질 발현은 RNA-VEE 없음 및 RNA-VEE 그룹으로부터 동물들 중에서 비교가능하여, 간에서 관찰된 효과의 특이성을 입증하였다.

[0320] 상기 결과는 본원에 기재된 LNP가 간에서 발현을 선택적으로 회피 및/또는 감소할 수 있음을 입증하여, LNP가 더 큰 내약성 (*예를 들면*, 감소된 간 독성)을 허용할 수 있음을 시사한다.

[0321] 실시예 3: 간 독성의 평가

[0322] *생체내* 효과를 추가로 평가하기 위해, 본 개시내용의 LNP를 실시예 2에 기재된 대로 동물 (*예를 들면*, 마우스)에게 투여할 것이다. 그 다음, 간 독성을 다양한 방법을 통해 동물에서 평가할 것이다. 예를 들어, 일부 양태에서, 간 효소 (ALT/AST)의 수준을, *예를 들면*, 동물의 혈액에서 측정할 것이다. 일부 양태에서, 동물의 일반 독성 (*예를 들면*, 활동, 음식 소비, 신체 점수 지수, 수화 상태, 또는 이들의 조합)을 평가할 것이다. 일부 양태에서, 간의 미시적 평가를 실행하여 간에 관한 임의의 LNP-관련된 영향을 검출할 것이다.

[0323] 실시예 4: 추가의 지질 나노입자의 작제

[0324] 본원에 기재된 VEE 레플리콘을 추가로 평가하기 위해, 추가의 LNP를 실시예 1에 기재된 대로 본원에 기재된 상이한 지질 (*예를 들면*, 이온화가능한 지질, 양이온성 지질, 또는 지질-유사 물질, *예를 들면*, 리피도이드)을 포

함하도록 작제하였다. 전체로, 9개 상이한 LNP를 작제하였고 (본원에 LNP1-LNP9로서 지칭됨) VEE 레플리콘 (본원에 기재됨)이 있는 mRNA 또는 임의의 VEE 레플리콘이 없는 대조군 mRNA로 캡슐화하는데 사용하였다. 페이로드 발현을 유도하는 이들 LNP의 능력을 후속 실시예에서 기재된 대로 평가하였다.

[0325] 실시예 5: VEE 레플리콘이 있는 RNA로 로딩된 지질 나노입자를 이용한 간 발현의 분석

[0326] 간에서 발현을 선택적으로 회피 및/또는 감소시키는 본원에 기재된 VEE 레플리콘의 능력을 추가로 평가하기 위해, B6.Cg Gt (ROSA) 26Sortm14 (CAG-tdTomato) Hze/J (Ai 리포터) 마우스는 LNP1 또는 LNP2의 단일 정맥내 투여를 받았다. LNP1 및 LNP2 둘 모두를 핵 국소화 신호 (NLS)-Cre를 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 20 μg의 VEE 레플리콘으로 로딩하였다. 대조군 동물은 포스페이트 완충된 식염수 용액 (PBS)의 투여를 받았다. Cre 유전자는 DNA 분자에서 특이적 부위들 사이 DNA의 재조합을 촉매화시킬 수 있는 부위-특이적 DNA 리콤비나제인 Cre 단백질을 인코딩한다. 이들 부위는 loxP 서열로서 알려지고 재조합이 발생할 수 있는 경우 방향성 코어 서열을 둘러싸는 Cre에 대하여 특이적 결합 부위를 함유한다. Cre는 간 조직에서 Cre-매개된 재조합을 나타내는 tdTomato 형광을 유도한다. LNP 투여 약 72 시간 (hrs)후, 마우스의 간 내에서 tdTomato 형광 발현을 형광성 IVIS 이미징을 사용하여 측정하였다.

[0327] 도 2a 및 2b에 도시된 대로, 어느 한쪽 LNP1 및 LNP2를 받았던 마우스의 간에서 관찰된 형광성 신호는 대조군 동물에서 관찰된 것과 크게 다르지 않았다. 추가적으로, LNP1 및 LNP2를 받았던 동물들 사이 경우에, 간에서 형광 발현의 분명한 차이는 또한 없었다. 이들 결과는 간에서 발현을 선택적으로 회피 및/또는 감소시키는 본원에 기재된 VEE 레플리콘의 능력을 강조한다. 결과는 VEE 레플리콘의 간-회피 특성이 LNP1과 LNP2 사이 적어도 임의의 차이와 무관함을 추가로 시사한다.

[0328] 실시예 6: VEE 레플리콘이 없는 RNA로 로딩된 지질 나노입자를 이용한 간 발현의 분석

[0329] 본원에 기재된 LNP가 간을 실제 표적화할 수 있는지를 확인하기 위해, B6.Cg Gt (ROSA) 26Sortm14 (CAG-tdTomato) Hze/J (Ai 리포터) 마우스는 LNP3, LNP4, LNP5, 또는 LNP6의 단일 정맥내 투여를 받았다. LNP들의 각각을 임의의 VEE 레플리콘 및 인코딩 핵 국소화 신호 (NLS)-Cre (RNA-VEE 없음) 없이 20 μg의 mRNA로 로딩하였다. 대조군 동물은 PBS의 투여를 받았다. LNP 투여 약 72 시간후, 마우스의 간 내에서 tdTomato 형광 발현을 형광성 IVIS 이미징을 사용하여 재차 측정하였다. 실시예 4에 기재된 대로, 간 내에서 td-Tomato 형광 발현이 조직에서 Cre-매개된 재조합을 나타낼 것임을 예상하였다.

[0330] 도 3a 및 3b에 도시된 대로, 대조군 동물에서, 대조군 그룹으로부터 마우스의 간에서 관찰된 검출가능한 형광 신호는 없었다. 대조적으로, 강한 형광 신호를 (RNA-VEE 없음으로 각각 로딩된) 테스트된 LNP들 중 하나의 투여를 받았던 마우스의 간에서 관찰하였다.

[0331] 추가로 분석하기 위해, LNP7 (임의의 VEE 레플리콘 없이 mRNA로 또한 로딩됨, 여기서 mRNA는 NLS-Cre를 인코딩함; RNA-VEE)을 tdTomato 리포터 마우스에 정맥내로 투여하였다. 비교를 위하여, 동물들의 일부는 상기 사용된 (즉, 임의의 VEE 레플리콘 및 인코딩 NLS-Cre 없이 mRNA로 로딩된) LNP3을 받았다. 대조군 동물을 PBS 단독으로 치료하였다. 재차, LNP 투여 약 72 시간후, td-Tomato 형광을 형광성 IVIS 이미징을 사용하여 정량화하였다.

[0332] 도 4a 및 4b에 도시된 대로, 대조군 동물과 비교하여, 상당한 형광성 신호를 LNP7을 받았던 동물의 간에서 관찰하였다. 형광 신호는 LNP3으로 치료된 마우스에서 관찰된 것과 비교가능하였다.

[0333] 본 실시예에서 제공된 결과는 본원에 기재된 LNP가 간을 실제 표적화할 수 있음을 집합적으로 입증하여, 이전 실시예에서 관찰된 간 회피 및/또는 감소된 간 발현이 VEE 레플리콘 자체에 특이적임을 시사한다.

[0334] 실시예 7: VEE 레플리콘이 있는 RNA 또는 임의의 VEE 레플리콘이 없는 RNA로 로딩된 지질 나노입자의 투여 후 간에서 반딧불 루시퍼라제 발현의 분석

[0335] 상이한 형광 모델에서 상기-기재된 결과를 확인하기 위해, C57BL/6J 마우스는 하기 LNP들 중 하나의 단일 투여를 받았다: LNP8, LNP9, 및 LNP2. LNP9 및 LNP2를 정맥내로 동물에게 투여하였다. LNP8을 정맥내로 또는 종양내로 동물에게 투여하였다. LNP들 (즉, LNP8, LNP9, 및 LNP2)의 각각을, 가시광선 (530nm-640nm)을 생산하는 반응인, d-루시페린의 옥시루시페린으로의 산소화를 촉매화하는 효소를 인코딩하는 반딧불 루시퍼라제 유전자인, VEE 레플리콘 및 인코딩 FLuc를 포함하는 40 μg의 mRNA로 로딩하였다. 대조군 동물은 PBS의 투여를 받았다. 투여 약 24 시간후, 간에서 루시퍼라제 발현을 생물발광 IVIS 이미징을 사용하여 측정하였다.

[0336] td-Tomato 리포터 마우스로 이전에 관찰된 바와 같이, 대조군 동물과 비교하여, LNP2의 투여를 받았던 C57BL/6J 마우스의 간에서 루시퍼라제 발현에서 상당한 차이는 없었다. 유사한 결과를 어느 한쪽 LNP8 또는 LNP9를 받았

던 C57BL/6J 마우스에서 관찰하였다. 추가적으로, 투여 루트는 (적어도 정맥내 투여와 종양내 투여 사이로서), 정맥내로 또는 종양내로 LNP8을 받았던 동물에서 루시퍼라제 발현에서 상당한 차이가 관찰되지 않았기 때문에, 임의의 효과를 갖는 것으로 나타나지 않았다.

[0337] 재차, 지질 나노입자 그들 자체가 간을 실제 표적화할 수 있는지를 확인하기 위해, LNP2, LNP8, 및 LNP9를 임의의 VEE 레플리콘이 없는 10 μg의 mRNA 및 인코딩 반딧불 루시퍼라제로 이번에는 로딩하였다. 그 다음, LNP의 단일 용량을 C57BL/6J 마우스에게 정맥내로 투여하였고, 약 24 시간 후에, 간에서 루시퍼라제 발현을 생물발광 IVIS 이미징을 사용하여 측정하였다.

[0338] 도 6a 및 6b에서 도시된 대로, LNP8, LNP9, 및 LNP2를 포함하는 LNP 그룹에 대하여 간에서 생물발광 신호는 대조군에서의 것보다 상당히 더 높아서, 테스트된 각 LNP에 대하여 간에서 FLuc-mod RNA의 특이적 발현을 나타냈다.

[0339] 상기 결과는 본원에 기재된 LNP가 간을 표적화할 수 있음을 확인한다. 상기 결과는 본원에 기재된 VEE 레플리콘의 간-회피 특성 확인을 또한 돕는다.

[0340] 실시예 8: 어느 한쪽 VEE 레플리콘이 있는 RNA 또는 임의의 VEE 레플리콘이 없는 RNA로 로딩된 지질 나노입자의 간 특이적 전달의 비교

[0341] 간 특이성에 관한 임의의 VEE 레플리콘이 없는 mRNA (RNA-VEE 없음)와 VEE 레플리콘이 있는 mRNA (RNA-VEE) 사이 직접 비교를 제공하기 위해, C57BL/6J 마우스는 2 mg/kg의 어느 한쪽 (1) RNA-VEE 없음 인코딩 반딧불 루시퍼라제 또는 (2) RNA-VEE 인코딩 반딧불 루시퍼라제로 로딩된 LNP8의 단일 정맥내 투여를 받았다. 그 다음, 투여 약 48 시간후, 생물발광 IVIS 이미징을 사용하여 동물의 간에서 루시퍼라제 발현을 측정하였다.

[0342] 도 7a 및 7b에서 도시된 대로, RNA-VEE 없음 그룹에 대하여 간에서 생물발광 신호는 RNA-VEE 레플리콘 그룹에서의 것보다 상당히 더 높았다. 이 결과는 RNA-VEE 없음이 간에서 발현을 허용하는 한편 RNA-VEE가 간에서 발현을 방지함을 추가로 확인한다. 추가적으로, 본 결과는 본원에 기재된 VEE 레플리콘의 간 회피 특성이 사용된 지질 나노입자와 무관함이 또한 추가로 입증한다.

[0343] 실시예 9: VEE 레플리콘이 있는 RNA 및 이온화가능한 지질을 포함하는 지질 나노입자

[0344] 본원에 기재된 VEE 레플리콘의 간 회피 특성을 평가하기 위해, 이온화가능한 지질을 포함하는 지질 나노입자를 작제하여 지질 나노입자를 만들 것이고, 그 다음 VEE 레플리콘이 있는 mRNA를 캡슐화하고 페이로드 (RNA-VEE)를 인코딩하는데 사용할 것이다. 이온화가능한 지질을 하기로부터 선택할 것이다: ((4-히드록시부틸)아잔디일)비스(헥산-6,1-디일)비스(2-헥실데카노에이트) (ALC-0315), 헵타데칸-9-일 8-((2-히드록시에틸)(6-옥소-6-(운데실옥시)헥실)아미노)옥타노에이트 (SM-102), 헵타데칸-9-일 8-((2-히드록시에틸)(8-(노닐옥시)-8-옥소옥틸)아미노)옥타노에이트 (지질 5), 디((Z)-논-2-엔-1-일) 9-((4-(디메틸아미노)부타노일)옥시)헵타데칸디오에이트 (L319), 3-(디도데실아미노)-N1,N1,4 트리도데실-1-피페라진에탄아민 (KL10), N1-[2 (디도데실아미노)에틸]-N1,N4,N4-트리도데실 1,4-피페라진디에탄아민 (KL22), 14,25-디트리데실-15,18,21,24-테트라아자-옥타트리아콘탄 (KL25), 1,2-디리놀레일옥시-N,N-디메틸아미노프로판 (DLin-DMA), 2,2-디리놀레일-4-디메틸아미노메틸-[1,3]-디옥솔란 (DLin-K-DMA), 헵타트리아콘타-6,9,28,31-테트라엔-19-일-4-(디메틸아미노)부타노에이트 (DLin-MC3-DMA), 2,2-디리놀레일-4-(2 디메틸아미노에틸)-[1,3]-디옥솔란 (DLin-KC2-DMA), 1,2-디올레일옥시-N,N-디메틸아미노프로판 (DODMA), 2-({8-[(3β)-콜레스트-5-엔-3-일옥시]옥틸}옥시)-N,N-디메틸-3-[(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디엔-1-일옥시]프로판-1-아민 (옥틸-CLinDMA), (2R)-2-({8-[(3β)-콜레스트-5-엔-3-일옥시]옥틸}옥시)-N,N-디메틸-3-[(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디엔-1-일옥시]프로판-1-아민 (옥틸-CLinDMA (2R)), 및 (2S)-2-({8-[(3β)-콜레스트-5-엔-3-일옥시]옥틸}옥시)-N,N-디메틸-3-[(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디엔-1-일옥시]프로판-1-아민 (옥틸-CLinDMA(2S)), 또는 이들의 임의의 조합.

[0345] 상기 LNP (*즉*, 이온화가능한 지질 및 RNA-VEE를 포함)를 *생체내* 투여할 것이고 그 다음 인코딩된 페이로드의 발현을 (*예를 들면*, 실시예 4-7에 기재된 대로) 간에서 평가할 것이다. 일부 양태에서, 간 독성을 (*예를 들면*, 실시예 3에 기재된 대로) 동물에서 또한 평가할 것이다.

[0346] 실시예 10: VEE 레플리콘이 있는 RNA 및 양이온성 지질을 포함하는 지질 나노입자

[0347] 본원에 기재된 VEE 레플리콘의 간 회피 특성을 평가하기 위해, 양이온성 지질을 포함하는 지질 나노입자를 작제하여 지질 나노입자를 만들 것이고, 그 다음 VEE 레플리콘이 있는 mRNA를 캡슐화하고 페이로드 (RNA-VEE)를 인코딩하는데 사용할 것이다. 양이온성 지질을 하기로부터 선택할 것이다: 1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄-프로

판 (DOTAP), 리포펙타민, N-[1-(2,3-디올레오일옥시)프로필]-N,N,N-트리메틸암모늄 클로리드 (DOTMA), 1-[2-(올레오일옥시)에틸]-2-올레일-3-(2-히드록시에틸)이미다졸리늄 클로리드 (DOTEVI), 2,3-디올레일옥시-N-[2(스페르민카르복스아미도)에틸]-N,N-디메틸-1-프로판아미늄 트리플루오로아세테이트 (DOSPA), N,N-디스테아릴-N,N-디메틸암모늄 브로미드 (DDAB), N-(1,2-디미리스틸옥시프로프-3-일)-N,N-디메틸-N-히드록시 에틸 암모늄 브로미드 (DMRIE), N-(1,2-디올레오일옥시프로프-3-일)-N,N-디메틸-N-히드록시 에틸 암모늄 브로미드 (DORIE), N,N-디올레일-N,N-디메틸암모늄 클로리드 (DODAC), 1,2-디라우로일-sn-글리세로-3-에틸포스포콜린 (DLePC), 1,2-디스테아로일-3-트리메틸암모늄-프로판 (DSTAP), 1,2-디팔미토일-3-트리메틸암모늄-프로판 (DPTAP), 1,2-디리놀레오일-3-트리메틸암모늄-프로판 (DLTAP), 1,2-디미리스토일-3-트리메틸암모늄-프로판 (DMTAP), 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-에틸포스포콜린 (DSePC), 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-에틸포스포콜린 (DPePC), 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-에틸포스포콜린 (DMePC), 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-에틸포스포콜린 (DOePC), 1,2-디-(9Z-테트라데세노일)-sn-글리세로-3-에틸포스포콜린 (14:1 EPC), 1-팔미토일-2-올레오일-sn-글리세로-3-에틸포스포콜린 (16:0-18:1 EPC), 또는 이들의 임의의 조합.

[0348] 상기 LNP (*즉*, 양이온성 지질 및 RNA-VEE를 포함)를 *생체내* 투여할 것이고 그 다음 인코딩된 페이로드의 발현을 (*예를 들면*, 실시예 4-7에 기재된 대로) 간에서 평가할 것이다. 일부 양태에서, 간 독성을 (*예를 들면*, 실시예 3에 기재된 대로) 동물에서 또한 평가할 것이다.

[0349] 실시예 10: VEE 레플리콘이 있는 RNA 및 지질-유사 물질을 포함하는 지질 나노입자

[0350] 본원에 기재된 VEE 레플리콘의 간 회피 특성을 평가하기 위해, 지질-유사 물질을 포함하는 지질 나노입자를 작제하여 지질-유사 나노입자 (LLN)를 만들 것이고, 그 다음 VEE 레플리콘이 있는 mRNA를 캡슐화하고 페이로드 (RNA-VEE)를 인코딩하는데 사용할 것이다. 지질-유사 물질을 하기로부터 선택할 것이다: 1,1'-((2-(4-(2-((2-(비스(2-히드록시도데실)아미노)에틸)(2-히드록시도데실)아미노)에틸)피페라진-1-일)에틸)아잔디일)비스(도데칸-2-올) (C12-200), 3,6-비스(4-(비스(2-히드록시도데실)아미노)부틸)피페라진2,5-디온 (cKK-E12), 테트라키스(8-메틸노닐) 3,3',3'',3'''-(((메틸아잔디일) 비스(프로판-3,1 디일))비스 (아잔트리일))테트라프로피오네이트 (306Oi10), G0-C14, 5A2-SC8, 3,6-비스(4-(비스((9Z,12Z)-2-히드록시옥타데카9,12-디엔-1-일)아미노)부틸)피페라진-2,5-디온 (OF-02), (((3,6-디옥소피페라진-2,5-디일)비스 (부탄-4,1-디일))비스(아잔트리일))테트라키스(에탄2,1-디일) (9Z,9'Z,9''Z,9'''Z,12Z,12'Z,12''Z,12'''Z)-테트라키스(옥타데카-9,12-디에노에이트) (OF-Deg-Lin), (((3,6-디옥소피페라진-2,5-디일)비스(부탄-4,1-디일)) 비스(아잔트리일))테트라키스(부탄-4,1-디일) (9Z,9'Z,9''Z,9'''Z,12Z,12'Z,12''Z,12'''Z)-테트라키스(옥타데카-9,12-디에노에이트) (OF-C4-Deg-Lin), N1,N3,N5-트리스(3-(디도데실아미노)프로필)벤젠1,3,5-트리카르복스아미드 (TT3), 헥사(옥탄-3-일) 9,9',9'',9''',9'''',9'''''-((((벤젠-1,3,5-트리카르보닐)리스(아잔디일)) 트리스 (프로판-3,1-디일)) 트리스(아잔트리일))헥사노나노에이트 (FTT5), PL-1 [Nature Communications, 12-7264(2021)에 개시됨, 본원에 참조로 이에 편입됨], 98N12-5 [Molecular Therapy vol. 17 no. 5 May 2009에 개시됨, 본원에 참조로 이에 편입됨], 에틸 5,5-디((Z)-헵타덱-8-엔-1-일)-1-(3-(피롤리딘-1-일)프로필)-2,5-디히드로-1H-이미다졸-2-카르복실레이트 (A2-Iso5-2DC18(A2)) 및 A12-Iso5-2DC18(A12), 또는 이들의 임의의 조합.

[0351] 상기 LLP (*즉*, 지질-유사 물질 및 RNA-VEE를 포함)를 *생체내* 투여할 것이고 그 다음 인코딩된 페이로드의 발현을 (*예를 들면*, 실시예 4-7에 기재된 대로) 간에서 평가할 것이다. 일부 양태에서, 간 독성을 (*예를 들면*, 실시예 3에 기재된 대로) 동물에서 또한 평가할 것이다.

[0352] 실시예 12: VEE 레플리콘이 있는 RNA 및 중합체성 물질을 포함하는 지질 나노입자

[0353] 본원에 기재된 VEE 레플리콘의 간 회피 특성을 평가하기 위해, 중합체성 물질을 포함하는 지질 나노입자를 작제하여 중합체성 나노입자 (PNP)를 만들 것이고, 그 다음 VEE 레플리콘이 있는 mRNA를 캡슐화하고 페이로드 (RNA-VEE)를 인코딩하는데 사용할 것이다. 중합체성 물질을 하기로부터 선택할 것이다: 폴리에틸렌이민 (PEI), 폴리(아미도아민) (PAMAM), 폴리 (β-아미노 에스테르) (PBAE), 폴리 (2-N,N-디메틸아미노에틸 메타크릴레이트) (PDMAEMA), 폴리 (아미노산) (PAA), 키토산 덱스트란, 사이클로덱스트린, 셀룰로스, 히알루론산, 폴리락트산 (PLA), 폴리 (락틱-코-글리콜산) (PLGA), 폴리카프로락톤 (PCL).

[0354] 상기 PNP (*즉*, 중합체성 물질 및 RNA VEE를 포함)를 *생체내* 투여할 것이고 그 다음 인코딩된 페이로드의 발현을 (*예를 들면*, 실시예 4-7에 기재된 대로) 간에서 평가할 것이다. 일부 양태에서, 간 독성을 (*예를 들면*, 실시예 3에 기재된 대로) 동물에서 또한 평가할 것이다.

표 4. 예시적 VEE 레플리콘 서열

야생형 VEE 레플리콘 서열 (서열번호: 186)	ATGGGCGGCGCATGAGAGAAGCCCAGACCAATTACCTACCCAAAATGGA GAAAGTTCACGTTGACATCGAGGAAGACAGCCCATTCCTCAGAGCTTTG CAGCGGAGCTTCCCGCAGTTTGAGGTAGAAGCCAAGCAGGTCACTGATA ATGACCATGCTAATGCCAGAGCGTTTTCGCATCTGGCTTCAAAACTGAT CGAAACGGAGGTGGACCCATCCGACACGATCCTTGACATTGGAAGTGCG CCCGCCCGCAGAATGTATTCTAAGCACAAGTATCATTGTATCTGTCCGA TGAGATGTGCGGAAGATCCGGACAGATTGTATAAGTATGCAACTAAGCT GAAGAAAAACTGTAAGGAAATAACTGATAAGGAATTGGACAAGAAAATG AAGGAGCTGGCCGCCGTCATGAGCGACCCTGACCTGGAAACTGAGACTA TGTGCCTCCACGACGACGAGTCGTGTCGCTACGAAGGGCAAGTCGCTGT TTACCAGGATGTATACGCGGTTGACGGACCGACAAGTCTCTATCACCAA GCCAATAAGGGAGTTAGAGTCGCCTACTGGATAGGCTTTGACACCACCC CTTTTATGTTTAAGAACTTGGCTGGAGCATATCCATCATACTCTACCAA CTGGGCCGACGAAACCGTGTTAACGGCTCGTAACATAGGCCTATGCAGC TCTGACGTTATGGAGCGGTCACGTAGAGGGATGTCCATTCTTAGAAAGA AGTATTTGAAACCATCCAACAATGTTCTATTCTCTGTTGGCTCGACCAT CTACCACGAGAAGAGGGACTTACTGAGGAGCTGGCACCTGCCGTCTGTA TTTCACTTACGTGGCAAGCAAAATTACACATGTCGGTGTGAGACTATAG TTAGTTGCGACGGGTACGTCGTTAAAAGAATAGCTATCAGTCCAGGCCT GTATGGGAAGCCTTCAGGCTATGCTGCTACGATGCACCGCGAGGGATTC TTGTGCTGCAAAGTGACAGACACATTGAACGGGGAGAGGGTCTCTTTTC CCGTGTGCACGTATGTGCCAGCTACATTGTGTGACCAAATGACTGGCAT ACTGGCAACAGATGTCAGTGCGGACGACGCGCAAAAACTGCTGGTTGGG CTCAACCAGCGTATAGTCGTCAACGGTCGCACCCAGAGAAACACCAATA CCATGAAAAATTACCTTTTGCCCGTAGTGGCCCAGGCATTTGCTAGGTG GGCAAAGGAATATAAGGAAGATCAAGAAGATGAAAGGCCACTAGGACTA CGAGATAGACAGTTAGTCATGGGGTGTTGTTGGGCTTTTAGAAGGCACA AGATAACATCTATTTATAAGCGCCCGGATACCCAAACCATCATCAAAGT GAACAGCGATTTCCACTCATTCGTGCTGCCCAGGATAGGCAGTAACACA

[0355]

	TTGGAGATCGGGCTGAGAACAAGAATCAGGAAAATGTTAGAGGAGCACA
	AGGAGCCGTCACCTCTCATTACCGCCGAGGACGTACAAGAAGCTAAGTG
	CGCAGCCGATGAGGCTAAGGAGGTGCGTGAAGCCGAGGAGTTGCGCGCA
	GCTCTACCACCTTTGGCAGCTGATGTTGAGGAGCCCACTCTGGAGGCAG
	ACGTCGACTTGATGTTACAAGAGGCTGGGGCCGGCTCAGTGGAGACACC
	TCGTGGCTTGATAAAGGTTACCAGCTACGATGGCGAGGACAAGATCGGC
	TCTTACGCTGTGCTTTCTCCGCAGGCTGTACTCAAGAGTGAAAAATTAT
	CTTGCATCCACCCTCTCGCTGAACAAGTCATAGTGATAACACACTCTGG
	CCGAAAAGGGCGTTATGCCGTGGAACCATACCATGGTAAAGTAGTGGTG
	CCAGAGGGACATGCAATACCCGTCCAGGACTTTCAAGCTCTGAGTGAAA
	GTGCCACCATTGTGTACAACGAACGTGAGTTCGTAAACAGGTACCTGCA
	CCATATTGCCACACATGGAGGAGCGCTGAACACTGATGAAGAATATTAC
	AAAACTGTCAAGCCCAGCGAGCACGACGGCGAATACCTGTACGACATCG
	ACAGGAAACAGTGCGTCAAGAAAGAACTAGTCACTGGGCTAGGGCTCAC
	AGGCGAGCTGGTGGATCCTCCCTTCCATGAATTCGCCTACGAGAGTCTG
	AGAACACGACCAGCCGCTCCTTACCAAGTACCAACCATAGGGGTGTATG
	GCGTGCCAGGATCAGGCAAGTCTGGCATCATTAAAAGCGCAGTCACCAA
	AAAAGATCTAGTGGTGAGCGCCAAGAAAGAAAACTGTGCAGAAATTATA
	AGGGACGTCAAGAAAATGAAAGGGCTGGACGTCAATGCCAGAACTGTGG
	ACTCAGTGCTCTTGAATGGATGCAAACACCCCGTAGAGACCCTGTATAT
	TGACGAAGCTTTTGCTTGTCATGCAGGTACTCTCAGAGCGCTCATAGCC
	ATTATAAGACCTAAAAAGGCAGTGCTCTGCGGGGATCCCAAACAGTGCG
	GTTTTTTTAACATGATGTGCCTGAAAGTGCATTTTAACCACGAGATTTG
	CACACAAGTCTTCCACAAAAGCATCTCTCGCCGTTGCACTAAATCTGTG
	ACTTCGGTCGTCTCAACCTTGTTTTACGACAAAAAAATGAGAACGACGA
	ATCCGAAAGAGACTAAGATTGTGATTGACACTACCGGCAGTACCAAACC
	TAAGCAGGACGATCTCATTCTCACTTGTTTCAGAGGGTGGGTGAAGCAG
	TTGCAAATAGATTACAAAGGCAACGAAATAATGACGGCAGCTGCCTCTC
	AAGGGCTGACCCGTAAAGGTGTGTATGCCGTTCGGTACAAGGTGAATGA
	AAATCCTCTGTACGCACCCACCTCAGAACATGTGAACGTCCTACTGACC
	CGCACGGAGGACCGCATCGTGTGGAAAACACTAGCCGGCGACCCATGGA
	TAAAAACACTGACTGCCAAGTACCCTGGGAATTTCACTGCCACGATAGA
	GGAGTGGCAAGCAGAGCATGATGCCATCATGAGGCACATCTTGGAGAGA

[0356]

	CCGGACCCTACCGACGTCTTCCAGAATAAGGCAAACGTGTGTTGGGCCA AGGCTTTAGTGCCGGTGCTGAAGACCGCTGGCATAGACATGACCACTGA ACAATGGAACACTGTGGATTATTTTGAAACGGACAAAGCTCACTCAGCA GAGATAGTATTGAACCAACTATGCGTGAGGTTCTTTGGACTCGATCTGG ACTCCGGTCTATTTTCTGCACCCACTGTTCCGTTATCCATTAGGAATAA TCACTGGGATAACTCCCCGTCGCCTAACATGTACGGGCTGAATAAAGAA GTGGTCCGTCAGCTCTCTCGCAGGTACCCACAACTGCCTCGGGCAGTTG CCACTGGAAGAGTCTATGACATGAACACTGGTACACTGCGCAATTATGA TCCGCGCATAAACCTAGTACCTGTAAACAGAAGACTGCCTCATGCTTTA GTCCTCCACCATAATGAACACCCACAGAGTGACTTTTCTTCATTCGTCA GCAAATTGAAGGGCAGAACTGTCCTGGTGGTCGGGGAAAAGTTGTCCGT CCCAGGCAAAATGGTTGACTGGTTGTCAGACCGGCCTGAGGCTACCTTC AGAGCTCGGCTGGATTTAGGCATCCCAGGTGATGTGCCCAAATATGACA TAATATTTGTTAATGTGAGGACCCCATATAAATACCATCACTATCAGCA GTGTGAAGACCATGCCATTAAGCTTAGCATGTTGACCAAGAAAGCTTGT CTGCATCTGAATCCCGGCGGAACCTGTGTCAGCATAGGTTATGGTTACG CTGACAGGGCCAGCGAAAGCATCATTGGTGCTATAGCGCGGCAGTTCAA GTTTTCCCGGGTATGCAAACCGAAATCCTCACTTGAAGAGACGGAAGTT CTGTTTGTATTCATTGGGTACGATCGCAAGGCCCGTACGCACAATTCTT ACAAGCTTTCATCAACCTTGACCAACATTTATACAGGTTCCAGACTCCA CGAAGCCGGATGTGCACCCTCATATCATGTGGTGCGAGGGGATATTGCC ACGGCCACCGAAGGAGTGATTATAAATGCTGCTAACAGCAAAGGACAAC CTGGCGGAGGGGTGTGCGGAGCGCTGTATAAGAAATTCCCGGAAAGCTT CGATTTACAGCCGATCGAAGTAGGAAAAGCGCGACTGGTCAAAGGTGCA GCTAAACATATCATTCATGCCGTAGGACCAAACTTCAACAAAGTTTCGG AGGTTGAAGGTGACAAACAGTTGGCAGAGGCTTATGAGTCCATCGCTAA GATTGTCAACGATAACAATTACAAGTCAGTAGCGATTCCACTGTTGTCC ACCGGCATCTTTTCCGGGAACAAAGATCGACTAACCCAATCATTGAACC ATTTGCTGACAGCTTTAGACACCACTGATGCAGATGTAGCCATATACTG CAGGGACAAGAAATGGGAAATGACTCTCAAGGAAGCAGTGGCTAGGAGA GAAGCAGTGGAGGAGATATGCATATCCGACGACTCTTCAGTGACAGAAC CTGATGCAGAGCTGGTGAGGGTGCATCCGAAGAGTTCTTTGGCTGGAAG GAAGGGCTACAGCACAAGCGATGGCAAAACTTTCTCATATTTGGAAGGG

[0357]

	ACCAAGTTTCACCAGGCGGCCAAGGATATAGCAGAAATTAATGCCATGT
	GGCCCGTTGCAACGGAGGCCAATGAGCAGGTATGCATGTATATCCTCGG
	AGAAAGCATGAGCAGTATTAGGTCGAAATGCCCCGTCGAAGAGTCGGAA
	GCCTCCACACCACCTAGCACGCTGCCTTGCTTGTGCATCCATGCCATGA
	CTCCAGAAAGAGTACAGCGCCTAAAAGCCTCACGTCCAGAACAAATTAC
	TGTGTGCTCATCCTTTCCATTGCCGAAGTATAGAATCACTGGTGTGCAG
	AAGATCCAATGCTCCCAGCCTATATTGTTCTCACCGAAAGTGCCTGCGT
	ATATTCATCCAAGGAAGTATCTCGTGGAAACACCACCGGTAGACGAGAC
	TCCGGAGCCATCGGCAGAGAACCAATCCACAGAGGGGACACCTGAACAA
	CCACCACTTATAACCGAGGATGAGACCAGGACTAGAACGCCTGAGCCGA
	TCATCATCGAAGAGGAAGAAGAGGATAGCATAAGTTTGCTGTCAGATGG
	CCCGACCCACCAGGTGCTGCAAGTCGAGGCAGACATTCACGGGCCGCCC
	TCTGTATCTAGCTCATCCTGGTCCATTCCTCATGCATCCGACTTTGATG
	TGGACAGTTTATCCATACTTGACACCCTGGAGGGAGCTAGCGTGACCAG
	CGGGGCAACGTCAGCCGAGACTAACTCTTACTTCGCAAAGAGTATGGAG
	TTTCTGGCGCGACCGGTGCCTGCGCCTCGAACAGTATTCAGGAACCCTC
	CACATCCCGCTCCGCGCACAAGAACACCGTCACTTGCACCCAGCAGGGC
	CTGCTCGAGAACCAGCCTAGTTTCCACCCCGCCAGGCGTGAATAGGGTG
	ATCACTAGAGAGGAGCTCGAGGCGCTTACCCCGTCACGCACTCCTAGCA
	GGTCGGTCTCGAGAACCAGCCTGGTCTCCAACCCGCCAGGCGTAAATAG
	GGTGATTACAAGAGAGGAGTTTGAGGCGTTCGTAGCACAACAACAATGA
	CGGTTTGATGCGGGTGCATACATCTTTTCCTCCGACACCGGTCAAGGGC
	ATTTACAACAAAAATCAGTAAGGCAAACGGTGCTATCCGAAGTGGTGTT
	GGAGAGGACCGAATTGGAGATTTCGTATGCCCCGCGCCTCGACCAAGAA
	AAAGAAGAATTACTACGCAAGAAATTACAGTTAAATCCCACACCTGCTA
	ACAGAAGCAGATACCAGTCCAGGAAGGTGGAGAACATGAAAGCCATAAC
	AGCTAGACGTATTCTGCAAGGCCTAGGGCATTATTTGAAGGCAGAAGGA
	AAAGTGGAGTGCTACCGAACCCTGCATCCTGTTCCTTTGTATTCATCTA
	GTGTGAACCGTGCCTTTTCAAGCCCCAAGGTCGCAGTGGAAGCCTGTAA
	CGCCATGTTGAAAGAGAACTTTCCGACTGTGGCTTCTTACTGTATTATT
	CCAGAGTACGATGCCTATTTGGACATGGTTGACGGAGCTTCATGCTGCT
	TAGACACTGCCAGTTTTTGCCCTGCAAAGCTGCGCAGCTTTCCAAAGAA
	ACACTCCTATTTGGAACCCACAATACGATCGGCAGTGCCTTCAGCGATC

[0358]

[0359]

	CAGAACACGCTCCAGAACGTCCTGGCAGCTGCCACAAAAAGAAATTGCA
	ATGTCACGCAAATGAGAGAATTGCCCGTATTGGATTCGGCGGCCTTTAA
	TGTGGAATGCTTCAAGAAATATGCGTGTAATAATGAATATTGGGAAACG
	TTTAAAGAAAACCCCATCAGGCTTACTGAAGAAAACGTGGTAAATTACA
	TTACCAAATTAAAAGGACCAAAAGCTGCTGCTCTTTTTGCGAAGACACA
	TAATTTGAATATGTTGCAGGACATACCAATGGACAGGTTTGTAATGGAC
	TTAAAGAGAGACGTGAAAGTGACTCCAGGAACAAAACATACTGAAGAAC
	GGCCCAAGGTACAGGTGATCCAGGCTGCCGATCCGCTAGCAACAGCGTA
	TCTGTGCGGAATCCACCGAGAGCTGGTTAGGAGATTAAATGCGGTCCTG
	CTTCCGAACATTCATACACTGTTTGATATGTCGGCTGAAGACTTTGACG
	CTATTATAGCCGAGCACTTCCAGCCTGGGGATTGTGTTCTGGAAACTGA
	CATCGCGTCGTTTGATAAAAGTGAGGACGACGCCATGGCTCTGACCGCG
	TTAATGATTCTGGAAGACTTAGGTGTGGACGCAGAGCTGTTGACGCTGA
	TTGAGGCGGCTTTCGGCGAAATTTCATCAATACATTTGCCCACTAAAAC
	TAAATTTAAATTCGGAGCCATGATGAAATCTGGAATGTTCCTCACACTG
	TTTGTGAACACAGTCATTAACATTGTAATCGCAAGCAGAGTGTTGAGAG
	AACGGCTAACCGGATCACCATGTGCAGCATTCATTGGAGATGACAATAT
	CGTGAAAGGAGTCAAATCGGACAAATTAATGGCAGACAGGTGCGCCACC
	TGGTTGAATATGGAAGTCAAGATTATAGATGCTGTGGTGGGCGAGAAAG
	CGCCTTATTTCTGTGGAGGGTTTATTTTGTGTGACTCCGTGACCGGCAC
	AGCGTGCCGTGTGGCAGACCCCCTAAAAAGGCTGTTTAAGCTTGGCAAA
	CCTCTGGCAGCAGACGATGAACATGATGATGACAGGAGAAGGGCATTGC
	ATGAAGAGTCAACACGCTGGAACCGAGTGGGTATTCTTTCAGAGCTGTG
	CAAGGCAGTAGAATCAAGGTATGAAACCGTAGGAACTTCCATCATAGTT
	ATGGCCATGACTACTCTAGCTAGCAGTGTTAAATCATTCAGCTACCTGA
	GAGGGGCCCCTATAACTCTCTACGGCTAACCTGAATGGACTACGACATA
	GTCTAGTCCGCCAAGTCTAGCATATGGGCGCGCCCTCAGCATCGATTGA
	ATTGGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAACATGGCCATCATC
	AAGGAGTTCATGCGCTTCAAGGTGCACATGGAGGGCTCCGTGAACGGCC
	ACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCCCCTACGAGGGCAC
	CCAGACCGCCAAGCTGAAGGTGACCAAGGGTGGCCCCCTGCCCTTCGCC
	TGGGACATCCTGTCCCCTCAGTTCATGTACGGCTCCAAGGCCTACGTGA
	AGCACCCCGCCGACATCCCCGACTACTTGAAGCTGTCCTTCCCCGAGGG

[0360]

	CTTCAAGTGGGAGCGCGTGATGAACTTCGAGGACGGCGGCGTGGTGACC
	GTGACCCAGGACTCCTCCCTGCAGGACGGCGAGTTCATCTACAAGGTGA
	AGCTGCGCGGCACCAACTTCCCCTCCGACGGCCCCGTAATGCAGAAGAA
	GACCATGGGCTGGGAGGCCTCCTCCGAGCGGATGTACCCCGAGGACGGC
	GCCCTGAAGGGCGAGATCAAGCAGAGGCTGAAGCTGAAGGACGGCGGCC
	ACTACGACGCTGAGGTCAAGACCACCTACAAGGCCAAGAAGCCCGTGCA
	GCTGCCCGGCGCCTACAACGTCAACATCAAGTTGGACATCACCTCCCAC
	AACGAGGACTACACCATCGTGGAACAGTACGAACGCGCCGAGGGCCGCC
	ACTCCACCGGCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAGGAATTGGCAAGCTG
	CTTACATAGAACTCGCGGCGATTGGCATGCCGCCTTAAAATTTTTATTT
	TATTTTTCTTTTCTTTTCCGAATCGGATTTTGTTTTTAATATTTCAAAA
	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACGCGTCGAGGGGAATTAATTCTTGAAG
	ACGAAAGGGCCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTA
	TTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACA
	ATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGT
	ATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCC
	TTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGA
	AGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGC
	GGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGA
	GCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTGTTGACGC
	CGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTG
	GTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAG
	TAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGC
	CAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTT
	TTGCACAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGG
	AGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGT
	AGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAACTGGCGAACTACTTACT
	CTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTG
	CAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGA
	TAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTG
	GGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGA
	GTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGC
	CTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATA

	CTTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGA AGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTC GTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGA GATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCAC CGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTT TCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTT CTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGC CTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGG CGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGAT AAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCT TGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCATTG AGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTA AGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAA ACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGA GCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAAC GCCAGCAACGCGAGCTCTAATACGACTCACTATAG
VEE 레플리콘 서열 (서열번호 : 187)	gctcttctaagTAATACGACTCACTATAATGGGCGGCGCATGAGAGAAG CCCAGACCAATTACCTACCCAAAATGGAGAAAGTTCACGTTGACATCGA GGAAGACAGCCCATTCCTCAGAGCTTTGCAGCGGAGCTTCCCGCAGTTT GAGGTAGAAGCCAAGCAGGTCACTGATAATGACCATGCTAATGCCAGAG CGTTTTCGCATCTGGCTTCAAAACTGATCGAAACGGAGGTGGACCCATC CGACACGATCCTTGACATTGGAAGTGCGCCCGCCCGCAGAATGTATTCT AAGCACAAGTATCATTGTATCTGTCCGATGAGATGTGCGGAAGATCCGG ACAGATTGTATAAGTATGCAACTAAGCTGAAGAAAAACTGTAAGGAAAT AACTGATAAGGAATTGGACAAGAAAATGAAGGAGCTCGCCGCCGTCATG AGCGACCCTGACCTGGAAACTGAGACTATGTGCCTCCACGACGACGAGT CGTGTCGCTACGAAGGGCAAGTCGCTGTTTACCAGGATGTATACGCGGT TGACGGACCGACAAGTCTCTATCACCAAGCCAATAAGGGAGTTAGAGTC GCCTACTGGATAGGCTTTGACACCACCCCTTTTATGTTTAAGAACTTGG CTGGAGCATATCCATCATACTCTACCAACTGGGCCGACGAAACCGTGTT AACGGCTCGTAACATAGGCCTATGCAGCTCTGACGTTATGGAGCGGTCA CGTAGAGGGATGTCCATTCTTAGAAAGAAGTATTTGAAACCATCCAACA ATGTTCTATTCTCTGTTGGCTCGACCATCTACCACGAGAAGAGGGACTT

[0361]

	ACTGAGGAGCTGGCACCTGCCGTCTGTATTTCACTTACGTGGCAAGCAA
	AATTACACATGTCGGTGTGAGACTATAGTTAGTTGCGACGGGTACGTCG
	TTAAAAGAATAGCTATCAGTCCAGGCCTGTATGGGAAGCCTTCAGGCTA
	TGCTGCTACGATGCACCGCGAGGGATTCTTGTGCTGCAAAGTGACAGAC
	ACATTGAACGGGGAGAGGGTCTCTTTTCCCGTGTGCACGTATGTGCCAG
	CTACATTGTGTGACCAAATGACTGGCATACTGGCAACAGATGTCAGTGC
	GGACGACGCGCAAAAACTGCTGGTTGGGCTCAACCAGCGTATAGTCGTC
	AACGGTCGCACCCAGAGAAACACCAATACCATGAAAAATTACCTTTTGC
	CCGTAGTGGCCCAGGCATTTGCTAGGTGGGCAAAGGAATATAAGGAAGA
	TCAAGAAGATGAAAGGCCACTAGGACTACGAGATAGACAGTTAGTCATG
	GGGTGTTGTTGGGCTTTTAGAAGGCACAAGATAACATCTATTTATAAGC
	GCCCGGATACCCAAACCATCATCAAAGTGAACAGCGATTTCCACTCATT
	CGTGCTGCCCAGGATAGGCAGTAACACATTGGAGATCGGGCTGAGAACA
	AGAATCAGGAAAATGTTAGAGGAGCACAAGGAGCCGTCACCTCTCATTA
	CCGCCGAGGACGTACAAGAAGCTAAGTGCGCAGCCGATGAGGCTAAGGA
	GGTGCGTGAAGCCGAGGAGTTGCGCGCAGCTCTACCACCTTTGGCAGCT
	GATGTTGAGGAGCCCACTCTGGAAGCCGATGTCGACTTGATGTTACAAG
	AGGCTGGGGCCGGCTCAGTGGAGACACCTCGTGGCTTGATAAAGGTTAC
	CAGCTACGATGGCGAGGACAAGATCGGCTCTTACGCTGTGCTTTCTCCG
	CAGGCTGTACTCAAGAGTGAAAAATTATCTTGCATCCACCCTCTCGCTG
	AACAAGTCATAGTGATAACACACTCTGGCCGAAAAGGGCGTTATGCCGT
	GGAACCATACCATGGTAAAGTAGTGGTGCCAGAGGGACATGCAATACCC
	GTCCAGGACTTTCAAGCTCTGAGTGAAAGTGCCACCATTGTGTACAACG
	AACGTGAGTTCGTAAACAGGTACCTGCACCATATTGCCACACATGGAGG
	AGCGCTGAACACTGATGAAGAATATTACAAAACTGTCAAGCCCAGCGAG
	CACGACGGCGAATACCTGTACGACATCGACAGGAAACAGTGCGTCAAGA
	AAGAACTAGTCACTGGGCTAGGGCTCACAGGCGAGCTGGTGGATCCTCC
	CTTCCATGAATTCGCCTACGAGAGTCTGAGAACACGACCAGCCGCTCCT
	TACCAAGTACCAACCATAGGGGTGTATGGCGTGCCAGGATCAGGCAAGT
	CTGGCATCATTAAAAGCGCAGTCACCAAAAAAGATCTAGTGGTGAGCGC
	CAAGAAAGAAAACTGTGCAGAAATTATAAGGGACGTCAAGAAAATGAAA
	GGGCTGGACGTCAATGCCAGAACTGTGGACTCAGTGCTCTTGAATGGAT
	GCAAACACCCCGTAGAGACCCTGTATATTGACGAAGCTTTTGCTTGTCA

[0362]

	TGCAGGTACTCTCAGAGCGCTCATAGCCATTATAAGACCTAAAAAGGCA
	GTGCTCTGCGGGGATCCCAAACAGTGCGGTTTTTTTAACATGATGTGCC
	TGAAAGTGCATTTTAACCACGAGATTTGCACACAAGTCTTCCACAAAAG
	CATCTCTCGCCGTTGCACTAAATCTGTGACTTCGGTCGTCTCAACCTTG
	TTTTACGACAAAAAAATGAGAACGACGAATCCGAAAGAGACTAAGATTG
	TGATTGACACTACCGGCAGTACCAAACCTAAGCAGGACGATCTCATTCT
	CACTTGTTTCAGAGGGTGGGTGAAGCAGTTGCAAATAGATTACAAAGGC
	AACGAAATAATGACGGCAGCTGCCTCTCAAGGGCTGACCCGTAAAGGTG
	TGTATGCCGTTCGGTACAAGGTGAATGAAAATCCTCTGTACGCACCCAC
	CTCAGAACATGTGAACGTCCTACTGACCCGCACGGAGGACCGCATCGTG
	TGGAAAACACTAGCCGGCGACCCATGGATAAAAACACTGACTGCCAAGT
	ACCCTGGGAATTTCACTGCCACGATAGAGGAGTGGCAAGCAGAGCATGA
	TGCCATCATGAGGCACATCTTGGAGAGACCGGACCCTACCGACGTCTTC
	CAGAATAAGGCAAACGTGTGTTGGGCCAAGGCTTTAGTGCCGGTGCTGA
	AGACCGCTGGCATAGACATGACCACTGAACAATGGAACACTGTGGATTA
	TTTTGAAACGGACAAAGCTCACTCAGCAGAGATAGTATTGAACCAACTA
	TGCGTGAGGTTCTTTGGACTCGATCTGGACTCCGGTCTATTTTCTGCAC
	CCACTGTTCCGTTATCCATTAGGAATAATCACTGGGATAACTCCCCGTC
	GCCTAACATGTACGGGCTGAATAAAGAAGTGGTCCGTCAGCTCTCTCGC
	AGGTACCCACAACTGCCTCGGGCAGTTGCCACTGGAAGAGTCTATGACA
	TGAACACTGGTACACTGCGCAATTATGATCCGCGCATAAACCTAGTACC
	TGTAAACAGAAGACTGCCTCATGCTTTAGTCCTCCACCATAATGAACAC
	CCACAGAGTGACTTTTCTTCATTCGTCAGCAAATTGAAGGGCAGAACTG
	TCCTGGTGGTCGGGGAAAAGTTGTCCGTCCCAGGCAAAATGGTTGACTG
	GTTGTCAGACCGGCCTGAGGCTACCTTCAGAGCTCGGCTGGATTTAGGC
	ATCCCAGGTGATGTGCCCAAATATGACATAATATTTGTTAATGTGAGGA
	CCCCATATAAATACCATCACTATCAGCAGTGTGAAGACCATGCCATTAA
	GCTTAGCATGTTGACCAAGAAAGCTTGTCTGCATCTGAATCCCGGCGGA
	ACCTGTGTCAGCATAGGTTATGGTTACGCTGACAGGGCCAGCGAAAGCA
	TCATTGGTGCTATAGCGCGGCAGTTCAAGTTTTCCCGGGTATGCAAACC
	GAAATCCTCACTTGAAGAGACGGAAGTTCTGTTTGTATTCATTGGGTAC
	GATCGCAAGGCCCGTACGCACAATCCTTACAAGCTTTCATCAACCTTGA
	CCAACATTTATACAGGTTCCAGACTCCACGAAGCCGGATGTGCACCCTC

[0363]

[0364]

	ATATCATGTGGTGCGAGGGGATATTGCCACGGCCACCGAAGGAGTGATT
	ATAAATGCTGCTAACAGCAAAGGACAACCTGGCGGAGGGGTGTGCGGAG
	CGCTGTATAAGAAATTCCCGGAAAGCTTCGATTTACAGCCGATCGAAGT
	AGGAAAAGCGCGACTGGTCAAAGGTGCAGCTAAACATATCATTCATGCC
	GTAGGACCAAACTTCAACAAAGTTTCGGAGGTTGAAGGTGACAAACAGT
	TGGCAGAGGCTTATGAGTCCATCGCTAAGATTGTCAACGATAACAATTA
	CAAGTCAGTAGCGATTCCACTGTTGTCCACCGGCATCTTTTCCGGGAAC
	AAAGATCGACTAACCCAATCATTGAACCATTTGCTGACAGCTTTAGACA
	CCACTGATGCAGATGTAGCCATATACTGCAGGGACAAGAAATGGGAAAT
	GACTCTCAAGGAAGCAGTGGCTAGGAGAGAAGCAGTGGAGGAGATATGC
	ATATCCGACGACTCTTCAGTGACAGAACCTGATGCAGAGCTGGTGAGGG
	TGCATCCGAAGAGTTCTTTGGCTGGAAGGAAGGGCTACAGCACAAGCGA
	TGGCAAAACTTTCTCATATTTGGAAGGGACCAAGTTTCACCAGGCGGCC
	AAGGATATAGCAGAAATTAATGCCATGTGGCCCGTTGCAACGGAGGCCA
	ATGAGCAGGTATGCATGTATATCCTCGGAGAAAGCATGAGCAGTATTAG
	GTCGAAATGCCCCGTCGAAGAGTCGGAAGCCTCCACACCACCTAGCACG
	CTGCCTTGCTTGTGCATCCATGCCATGACTCCAGAAAGAGTACAGCGCC
	TAAAAGCCTCACGTCCAGAACAAATTACTGTGTGCTCATCCTTTCCATT
	GCCGAAGTATAGAATCACTGGTGTGCAGAAGATCCAATGCTCCCAGCCT
	ATATTGTTCTCACCGAAAGTGCCTGCGTATATTCATCCAAGGAAGTATC
	TCGTGGAAACACCACCGGTAGACGAGACTCCGGAGCCATCGGCAGAGAA
	CCAATCCACAGAGGGGACACCTGAACAACCACCACTTATAACCGAGGAT
	GAGACCAGGACTAGAACGCCTGAGCCGATCATCATCGAAGAGGAAGAAG
	AGGATAGCATAAGTTTGCTGTCAGATGGCCCGACCCACCAGGTGCTGCA
	AGTCGAGGCAGACATTCACGGGCCGCCCTCTGTATCTAGCTCATCCTGG
	TCCATTCCTCATGCATCCGACTTTGATGTGGACAGTTTATCCATACTTG
	ACACCCTGGAGGGAGCTAGCGTGACCAGCGGGGCAACGTCAGCCGAGAC
	TAACTCTTACTTCGCAAAGAGTATGGAGTTTCTGGCGCGACCGGTGCCT
	GCGCCTCGAACAGTATTCAGGAACCCTCCACATCCCGCTCCGCGCACAA
	GAACACCGTCACTTGCACCCAGCAGGGCCTGCTCGAGAACCAGCCTAGT
	TTCCACCCCGCCAGGCGTGAATAGGGTGATCACTAGAGAGGAGCTCGAG
	GCGCTTACCCCGTCACGCACTCCTAGCAGGTCGGTCTCGAGAACCAGCC
	TGGTCTCCAACCCGCCAGGCGTAAATAGGGTGATTACAAGAGAGGAGTT

	TGAGGCGTTCGTAGCACAACAACAATGACGGTTTGATGCGGGTGCATAC ATCTTTTCCTCCGACACCGGTCAAGGGCATTTACAACAAAAATCAGTAA GGCAAACGGTGCTATCCGAAGTGGTGTTGGAGAGGACCGAATTGGAGAT TTCGTATGCCCCGCGCCTCGACCAAGAAAAAGAAGAATTACTACGCAAG AAATTACAGTTAAATCCCACACCTGCTAACAGAAGCAGATACCAGTCCA GGAAGGTGGAGAACATGAAAGCCATAACAGCTAGACGTATTCTGCAAGG CCTAGGGCATTATTTGAAGGCAGAAGGAAAAGTGGAGTGCTACCGAACC CTGCATCCTGTTCCTTTGTATTCATCTAGTGTGAACCGTGCCTTTTCAA GCCCCAAGGTCGCAGTGGAAGCCTGTAACGCCATGTTGAAAGAGAACTT TCCGACTGTGGCTTCTTACTGTATTATTCCAGAGTACGATGCCTATTTG GACATGGTTGACGGAGCTTCATGCTGCTTAGACACTGCCAGTTTTTGCC CTGCAAAGCTGCGCAGCTTTCCAAAGAAACACTCCTATTTGGAACCCAC AATACGATCGGCAGTGCCTTCAGCGATCCAGAACACGCTCCAGAACGTC CTGGCAGCTGCCACAAAAAGAAATTGCAATGTCACGCAAATGAGAGAAT TGCCCGTATTGGATTCGGCGGCCTTTAATGTGGAATGCTTCAAGAAATA TGCGTGTAATAATGAATATTGGGAAACGTTTAAAGAAAACCCCATCAGG CTTACTGAAGAAAACGTGGTAAATTACATTACCAAATTAAAAGGACCAA AAGCTGCTGCTCTTTTTGCGAAGACACATAATTTGAATATGTTGCAGGA CATACCAATGGACAGGTTTGTAATGGACTTAAAGAGAGACGTGAAAGTG ACTCCAGGAACAAAACATACTGAAGAACGGCCCAAGGTACAGGTGATCC AGGCTGCCGATCCGCTAGCAACAGCGTATCTGTGCGGAATCCACCGAGA GCTGGTTAGGAGATTAAATGCGGTCCTGCTTCCGAACATTCATACACTG TTTGATATGTCGGCTGAAGACTTTGACGCTATTATAGCCGAGCACTTCC AGCCTGGGGATTGTGTTCTGGAAACTGACATCGCGTCGTTTGATAAAAG TGAGGACGACGCCATGGCTCTGACCGCGTTAATGATTCTGGAAGACTTA GGTGTGGACGCAGAGCTGTTGACGCTGATTGAGGCGGCTTTCGGCGAAA TTTCATCAATACATTTGCCCACTAAAACTAAATTTAAATTCGGAGCCAT GATGAAATCTGGAATGTTCCTCACACTGTTTGTGAACACAGTCATTAAC ATTGTAATCGCAAGCAGAGTGTTGAGAGAACGGCTAACCGGATCACCAT GTGCAGCATTCATTGGAGATGACAATATCGTGAAAGGAGTCAAATCGGA CAAATTAATGGCAGACAGGTGCGCCACCTGGTTGAATATGGAAGTCAAG ATTATAGATGCTGTGGTGGGCGAGAAAGCGCCTTATTTCTGTGGAGGGT TTATTTTGTGTGACTCCGTGACCGGCACAGCGTGCCGTGTGGCAGACCC

[0365]

[0366]

	CCTAAAAAGGCTGTTTAAGCTTGGCAAACCTCTGGCAGCAGACGATGAA
	CATGATGATGACAGGAGAAGGGCATTGCATGAAGAGTCAACACGCTGGA
	ACCGAGTGGGTATTCTTTCAGAGCTGTGCAAGGCAGTAGAATCAAGGTA
	TGAAACCGTAGGAACTTCCATCATAGTTATGGCCATGACTACTCTAGCT
	AGCAGTGTTAAATCATTCAGCTACCTGAGAGGGGCCCCTATAACTCTCT
	ACGGCTAACCTGAATGGACTACGACATAGTCTAGTCCGCCAAGGCCACC
	GATATCTATGTTACGTGCAAAGGTGATTGTCACCCCCCGAAAGACCATA
	TTGTGACACACCCTCAGTATCACGCCCAAACATTTACAGCCGCGGTGTC
	AAAAACCGCGTGGACGTGGTTAACATCCCTGCTGGGAGGATCAGCCGTA
	ATTATTATAATTGGCTTGGTGCTGGCTACTATTGTGGCCATGTACGTGC
	TGACCAACCAGAAACATAATTGAATACAGCAGCAATTGGCAAGCTGCTT
	ACATAGAACTCGCGGCGATTGGCATGCCGCCTTAAAATTTTTATTTTAT
	TTTTCTTTTCTTTTCCGAATCGGATTTTGTTTTTAATATTTCAAAAAAA
	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAaaagaagagcGCAGC
	TCTGGCCCGTGTCTCAAAATCTCTGATGTTACATTGCACAAGATAAAAA
	TATATCATCATGAACAATAAAACTGTCTGCTTACATAAACAGTAATACA
	AGGGGTGTTATGAGCCATATTCAACGGGAAACGTCGAGGCCGCGATTAA
	ATTCCAACATGGATGCTGATTTATATGGGTATAAATGGGCTCGCGATAA
	TGTCGGGCAATCAGGTGCGACAATCTATCGCTTGTATGGGAAGCCCGAT
	GCGCCAGAGTTGTTTCTGAAACATGGCAAAGGTAGCGTTGCCAATGATG
	TTACAGATGAGATGGTCAGACTAAACTGGCTGACGGAATTTATGCCTCT
	TCCGACCATCAAGCATTTTATCCGTACTCCTGATGATGCATGGTTACTC
	ACCACTGCGATCCCCGGAAAAACAGCATTCCAGGTATTAGAAGAATATC
	CTGATTCAGGTGAAAATATTGTTGATGCGCTGGCAGTGTTCCTGCGCCG
	GTTGCATTCGATTCCTGTTTGTAATTGTCCTTTTAACAGCGATCGCGTA
	TTTCGTCTCGCTCAGGCGCAATCACGAATGAATAACGGTTTGGTTGATG
	CGAGTGATTTTGATGACGAGCGTAATGGCTGGCCTGTTGAACAAGTCTG
	GAAAGAAATGCATAAACTTTTGCCATTCTCACCGGATTCAGTCGTCACT
	CATGGTGATTTCTCACTTGATAACCTTATTTTTGACGAGGGGAAATTAA
	TAGGTTGTATTGATGTTGGACGAGTCGGAATCGCAGACCGATACCAGGA
	TCTTGCCATCCTATGGAACTGCCTCGGTGAGTTTTCTCCTTCATTACAG
	AAACGGCTTTTTCAAAAATATGGTATTGATAATCCTGATATGAATAAAT
	TGCAGTTTCATTTGATGCTCGATGAGTTTTTCTAATCAGAATTGGTTAA

	TTGGTTGTAACACTGGCAGAGCATTACGCTGACTTGACGGGACGGCGCA AGCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTACGCGTCGTTCCACTGAG CGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTT TCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCG GTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAA CTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCC GTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTC GCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGT GTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCG GTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACG ACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCA CGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGT CGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTAT CTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTT TGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGC GGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACAT

[0367]

[0368] 요약 및 초록 섹션이 아닌, 상세한 설명 섹션이 청구항을 해석하는데 사용되도록 의도된 것임을 이해되어야 한다. 요약 및 초록 섹션은 본 발명자(들)에 의해 고려된 본 개시내용의 모두가 아닌 하나 이상의 예시적 양태를 제시할 수 있고, 따라서, 본 개시내용 및 첨부된 청구항을 어떤 식으로든 제한하도록 의도되지 않는다.

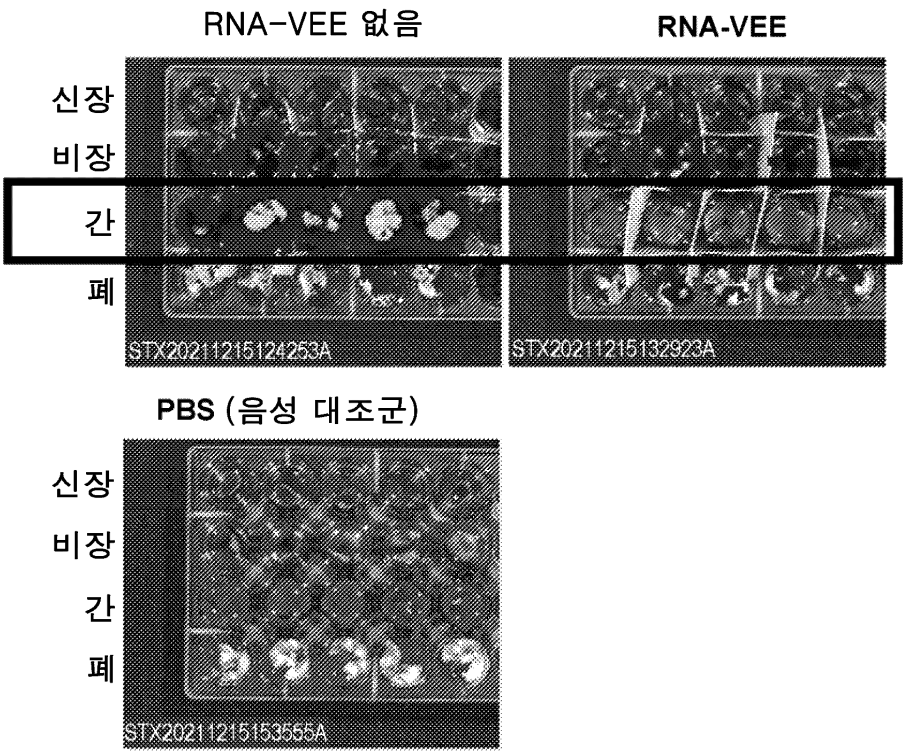
[0369] 본 개시내용은 특정된 기능 및 이의 관계의 구현을 실례하는 기능적 빌딩 블록의 도움으로 상기 기재되었다. 이들 기능적 빌딩 블록의 경계는 설명의 편의를 위하여 본원에 임의로 정의되었다. 대안적 경계는 특정된 기능 및 이의 관계가 적절하게 수행되는 한 정의될 수 있다.

[0370] 특정 양태의 상기 설명은 다른 이들이, 과도한 실험작업 없이, 본 개시내용의 일반 개념에서 이탈 없이, 다양한 응용 이러한 특이적 양태를, 해당 기술 분야의 지식을 적용함으로써, 용이하게 수정하고/거나 적응시킬 수 있다는 본 개시내용의 일반 성격을 매우 충분히 드러낼 것이다. 그러므로, 이러한 적응 및 수정은, 본원에 제시된 교시 및 안내에 기반하여, 개시된 양태의 등가물의 의미 및 범위 내에 있도록 의도된다. 본원에 문구 또는 용어가 제한이 아닌 설명을 위한 것이고, 따라서 본 명세서의 용어 또는 문구가 교시 및 안내에 비추어 숙련된 기술자에 의해 해석되어야 함이 이해되어야 한다.

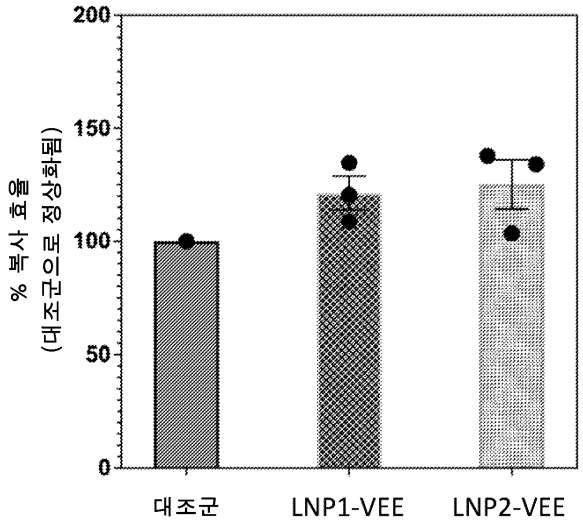
[0371] 본 개시내용의 폭 및 범위는 임의의 상기-기재된 예시적 양태에 의해 제한되지 않아야 하고, 하기 청구항 및 그들의 등가물에 따라서만 정의되어야 한다.

도면

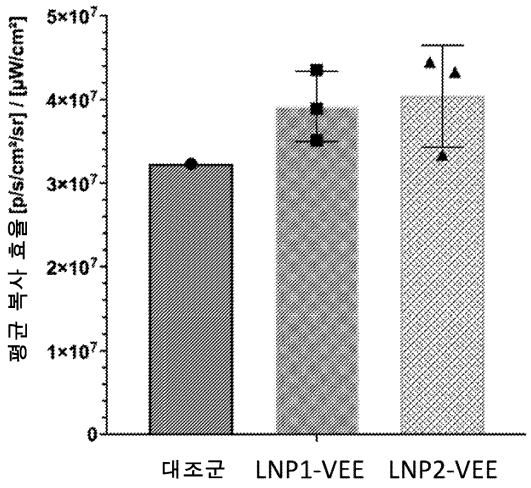
도면1


RNA-VEE 없음
RNA-VEE
신장
비장
간
폐
STX20211215124253A
STX20211215132923A
PBS (음성 대조군)
신장
비장
간
폐
STX20211215153555A

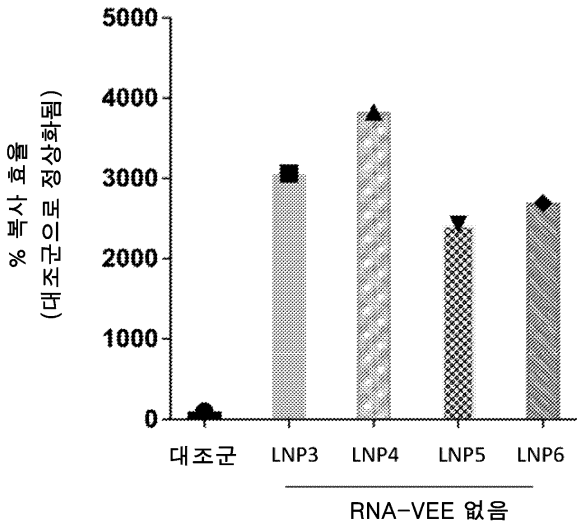
도면2a


200
150
100
50
0
% 복사 효율
(대조군으로 정상화됨)
대조군
LNP1-VEE
LNP2-VEE

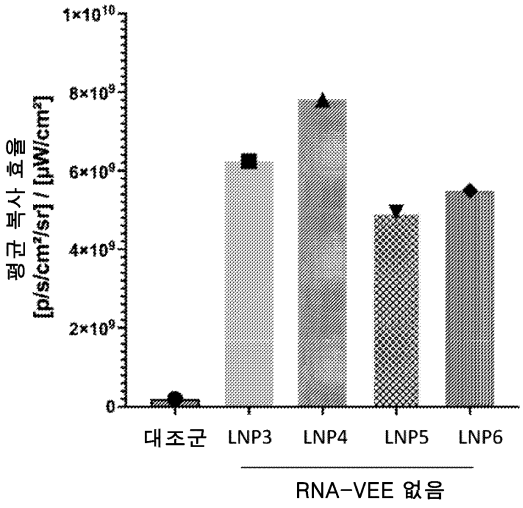
도면2b


평균 복사 효율 [p/s/cm²/sr] / [μW/cm²]
5×10⁷
4×10⁷
3×10⁷
2×10⁷
1×10⁷
0
대조군
LNP1-VEE
LNP2-VEE

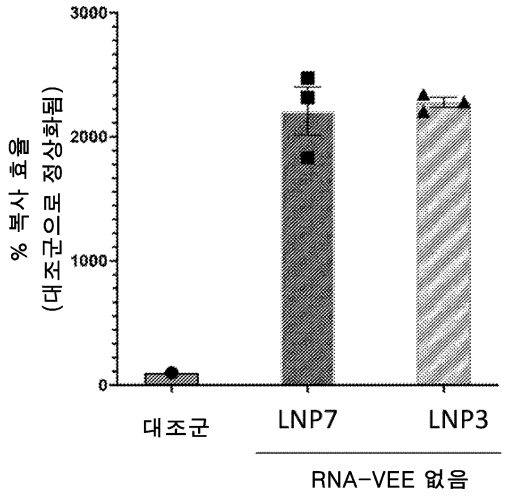
도면3a


% 복사 효율
(대조군으로 정상화됨)
5000
4000
3000
2000
1000
0
대조군
LNP3
LNP4
LNP5
LNP6
RNA-VEE 없음

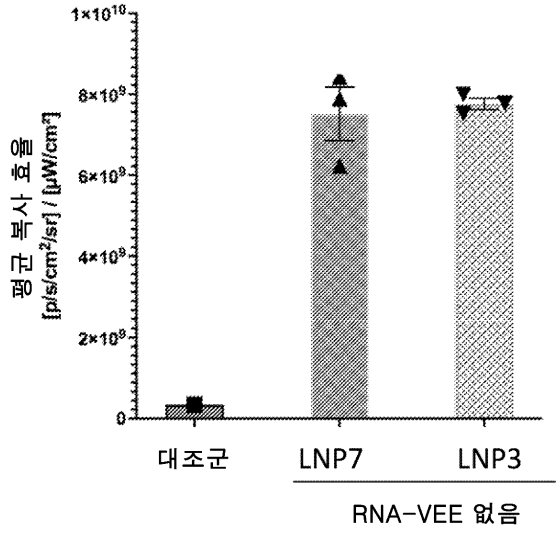
도면3b


1×10¹⁰
8×10⁹
6×10⁹
4×10⁹
2×10⁹
0
평균 복사 효율
[p/s/cm²/sr] / [μW/cm²]
대조군
LNP3
LNP4
LNP5
LNP6
RNA-VEE 없음

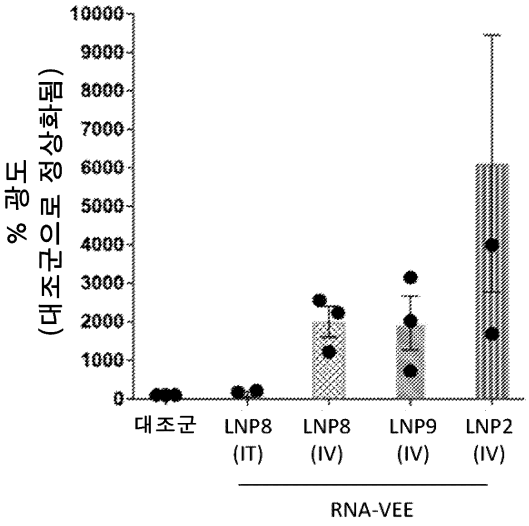
도면4a


3000
2000
1000
0
% 복사 효율
(대조군으로 정상화됨)
대조군
LNP7
LNP3
RNA-VEE 없음

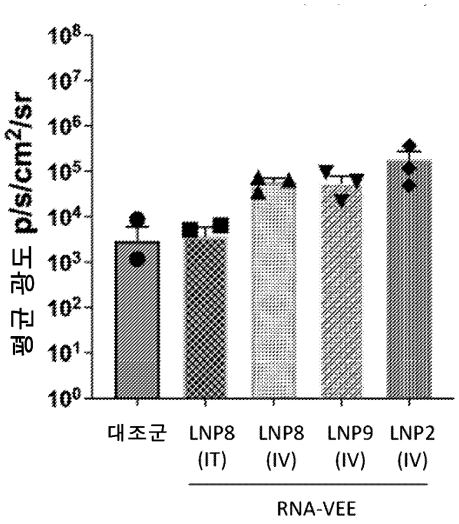
도면4b


1×10¹⁰
8×10⁹
6×10⁹
4×10⁹
2×10⁹
0
평균 복사 효율
[p/s/cm²/sr] / [μW/cm²]
대조군
LNP7
LNP3
RNA-VEE 없음

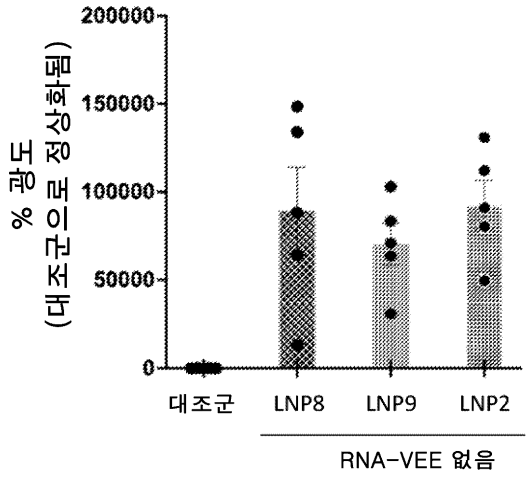
도면5a


10000
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
% 광도
(대조군으로 정상화됨)
대조군
LNP8
(IT)
LNP8
(IV)
LNP9
(IV)
LNP2
(IV)
RNA-VEE

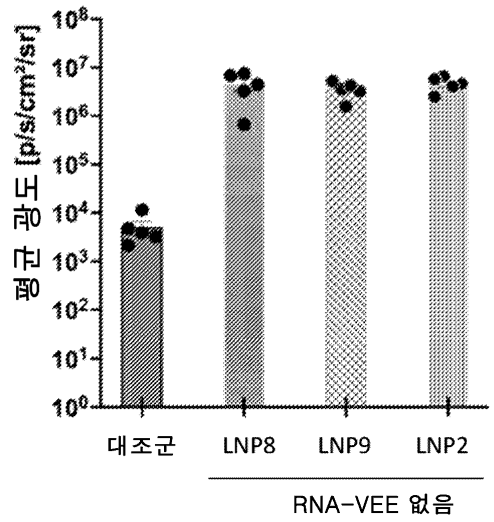
도면5b


평균 광도 p/s/cm²/sr
10⁸
10⁷
10⁶
10⁵
10⁴
10³
10²
10¹
10⁰
대조군
LNP8 (IT)
LNP8 (IV)
LNP9 (IV)
LNP2 (IV)
RNA-VEE

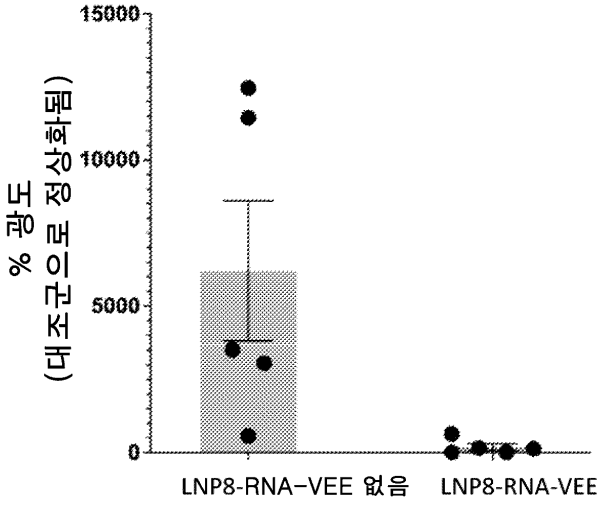
도면6a


% 광도 (대조군으로 정상화됨)
200000
150000
100000
50000
0
대조군
LNP8
LNP9
LNP2
RNA-VEE 없음

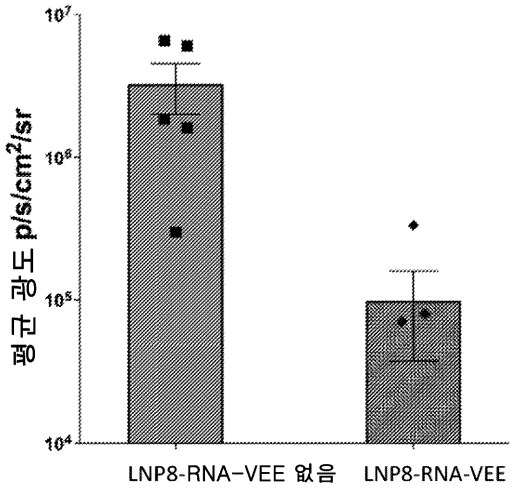
도면6b


평균 광도 [p/s/cm²/sr]
10⁸
10⁷
10⁶
10⁵
10⁴
10³
10²
10¹
10⁰
대조군
LNP8
LNP9
LNP2
RNA-VEE 없음

도면7a


% 광도
(대조군으로 정상화됨)
15000
10000
5000
0
LNP8-RNA-VEE 없음
LNP8-RNA-VEE

도면7b



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

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