



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0040345
(43) 공개일자 2023년03월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/12 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/215 (2006.01) A61K 47/59 (2017.01)
A61K 47/69 (2017.01) A61P 31/14 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 39/12 (2013.01)
A61K 39/215 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-7004590
(22) 출원일자(국제) 2021년07월13일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2023년02월08일
(86) 국제출원번호 PCT/US2021/041487
(87) 국제공개번호 WO 2022/015766
국제공개일자 2022년01월20일
(30) 우선권주장
63/051,351 2020년07월13일 미국(US)

(71) 출원인
오레곤 헬스 앤드 사이언스 유니버시티
미국 97239 오레곤 포틀랜드 에스더블유 샘 잭슨
파크 로드 3181 메일 코드: 엘106티티
피디엑스 파마슈티컬즈, 인크.
미국 97239 오리건주 포틀랜드 에스 본드 애비뉴
3303 씨에이치13비 씨턴쓰 플로어
(72) 발명자
안타시, 와짜나
미국 97239 오레곤 포틀랜드 에스. 반크로프트 스트리트
690 엘106티티
레다, 셰리프
미국 97239 오레곤 포틀랜드 에스. 본드 애비뉴
3303 13스 플로어
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 김영

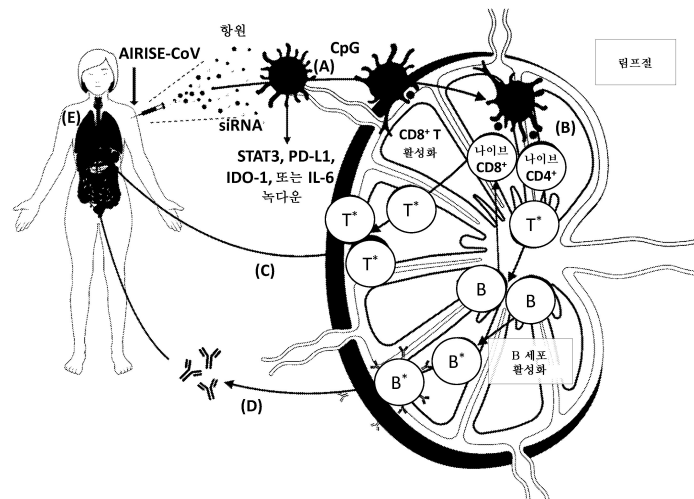
전체 청구항 수 : 총 65 항

(54) 발명의 명칭 면역 반응을 유도하기 위한 면역원성 구축물, 조성물 및 방법

(57) 요약

나노입자; 나노입자의 외부 표면과 정전기적으로 결합된 양이온성 중합체 및 양이온성 중합체 또는 나노입자의 외부 표면과 결합된 안정화제; 및 항원 또는 항원 생산 작용제를 포함하는 면역원성 구축물이 개시된다. 임의로, 구축물은 아주반트 및/또는 하나 이상의 기능적 올리고뉴클레오타이드(들) (예를 들어, siRNA 또는 pDNA)를 포함할 수 있다. 또한, 아주반트, 항원, 및 임의로 siRNA를 세포에 공동-전달하고, 대상체에서 면역 반응을 유도하며, 대상체에서 감염성 질환을 치료 또는 예방하기 위해 상기 제공된 면역원성 구축물을 사용하는 방법이 개시된다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 47/59 (2017.08)

A61K 47/6923 (2017.08)

A61K 47/6929 (2017.08)

A61P 31/14 (2018.01)

A61K 2039/5154 (2013.01)

A61K 2039/5555 (2013.01)

A61K 2039/55561 (2013.01)

A61K 2039/575 (2013.01)

C12N 2770/10034 (2013.01)

(72) 발명자

레다, 모아타즈

미국 97239 오레곤 포틀랜드 에스. 반크로프트 스트리트 690 엘106티티

응암체르트라쿨, 위라폴

미국 97239 오레곤 포틀랜드 에스. 본드 애비뉴 3303 13스 플로어

왕, 루이지에

미국 97239 오레곤 포틀랜드 에스. 본드 애비뉴 3303 13스 플로어

명세서

청구범위

청구항 1

하기를 포함하는 면역원성 구축물로서:

나노입자;

나노입자의 외부 표면과 정전기적으로 결합된 폴리에틸렌이민 (PEI)을 포함하는 소정량의 가교된 양이온성 중합체, 여기서 PEI 함량은 나노입자 플랫폼 (NP)의 적어도 10 중량%임; 및

가교된 PEI와 공유 결합된 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 포함하는 소정량의 안정화제

를 포함하는 나노입자 플랫폼 (NP); 및

감염체의 항원 또는 항원 생산 작용제,

여기서 구축물의 유체역학적 크기는 1 마이크로미터 이하인

면역원성 구축물.

청구항 2

제1항에 있어서, 나노입자가 메소다공성 실리카 나노입자 (MSNP)인 면역원성 구축물.

청구항 3

하기를 포함하는 면역원성 구축물:

나노입자;

나노입자의 외부 표면과 결합된 가교된 양이온성 중합체; 및

가교된 양이온성 중합체 또는 나노입자의 외부 표면과 결합된 안정화제

를 포함하는 나노입자 플랫폼 (NP); 및

감염체의 항원 또는 항원 생산 작용제.

청구항 4

제1항 또는 제3항에 있어서, 아주반트를 추가로 포함하는 면역원성 구축물.

청구항 5

제4항에 있어서, 아주반트가 CpG 올리고뉴클레오타이드, CpG 서열을 함유하는 DNA TLR 효능제, 비-CpG DNA TLR 효능제, RNA TLR 효능제, 알루미늄 염, 항-CD40 항체, 융합 단백질, 시토카인, 소분자 TLR 효능제, 오일- 또는 계면활성제-기반 아주반트, 리포폴리사카라이드, 식물 추출물 또는 그의 유도체 중 하나 이상을 포함하는 것인 면역원성 구축물.

청구항 6

제5항에 있어서, 아주반트가 CpG 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 것인 면역원성 구축물.

청구항 7

제4항에 있어서, 아주반트가 폴리 I:C를 포함하는 것인 면역원성 구축물.

청구항 8

제4항에 있어서, 아주반트가 NP의 1-20 wt.%로 존재하는 것인 면역원성 구축물.

청구항 9

제1항 또는 제3항에 있어서, 나노입자가 실리카 나노입자, 실리콘 나노입자, 산화철 나노입자, 금 나노입자, 은 나노입자, 탄소칼슘 나노입자, 인산칼슘 나노입자, 탄소 나노튜브, 또는 아주반트 나노입자인 면역원성 구축물.

청구항 10

제9항에 있어서, 나노입자가 메소다공성 실리카 나노입자 (MSNP)인 면역원성 구축물.

청구항 11

제10항에 있어서, MSNP가 2-6 nm, 7 nm, 또는 7 nm 미만의 평균 세공 크기를 갖는 것인 면역원성 구축물.

청구항 12

제9항에 있어서, 나노입자가 산화철 나노입자인 면역원성 구축물.

청구항 13

제1항 또는 제3항에 있어서, 양이온성 중합체가 PEI, 키토산, 폴리프로필렌이민, 폴리로신, 폴리아미도아민, 폴리(알릴아민), 폴리(디알릴디메틸암모늄 클로라이드), 폴리(N-이소프로필 아크릴아미드-코-아크릴아미드), 폴리(N-이소프로필 아크릴아미드-코-아크릴산), 디에틸아미노에틸-텍스트란, 폴리-(N-에틸-비닐피리디늄 브로마이드), 폴리(디메틸아미노)에틸 메타크릴레이트, 폴리(에틸렌 글리콜)-코-폴리(트리메틸아미노에틸메타크릴레이트 클로라이드), 또는 그의 둘 이상의 혼합물을 포함하는 것인 면역원성 구축물.

청구항 14

제1항 또는 제3항에 있어서, 양이온성 중합체가 PEI이거나 또는 그를 포함하는 것인 면역원성 구축물.

청구항 15

제1항 또는 제3항에 있어서, 양이온성 중합체가 약 0.8 kDa 내지 약 25 kDa의 분자량을 갖는 것인 면역원성 구축물.

청구항 16

제1항 또는 제3항에 있어서, 양이온성 중합체가 NP의 1-50 wt.%로 존재하는 것인 면역원성 구축물.

청구항 17

제1항 또는 제3항에 있어서, 안정화제가 PEG, 텍스트란, 폴리시알산, 히알루론산, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리비닐 알콜, 폴리아크릴아미드, 또는 그의 둘 이상의 혼합물을 포함하는 것인 면역원성 구축물.

청구항 18

제17항에 있어서, 안정화제가 PEG인 면역원성 구축물.

청구항 19

제1항 또는 제3항에 있어서, 안정화제가 약 1 kDa 내지 약 20 kDa, 또는 약 5 kDa의 분자량을 갖는 것인 면역원성 구축물.

청구항 20

제1항 또는 제3항에 있어서, 안정화제가 NP의 1-50 wt.%, 약 10-30 wt.%, 약 5 내지 20 wt.%, 약 15 wt.%, 또는 약 20 wt.%로 존재하는 것인 면역원성 구축물.

청구항 21

제1항 또는 제3항에 있어서, 항원이 단백질을 포함하고, 단백질 항원이 안정화제와 접합되는 것인 면역원성 구축물.

청구항 22

제1항 또는 제3항에 있어서, 항원이 펩티드이고, 펩티드 항원이 가교된 양이온성 중합체와 정전기적으로 결합되는 것인 면역원성 구축물.

청구항 23

제1항 또는 제3항에 있어서, 항원 생산 작용제가 mRNA 또는 pDNA이고, 항원 생산 작용제가 가교된 양이온성 중합체와 정전기적으로 결합되는 것인 면역원성 구축물.

청구항 24

제1항 또는 제3항에 있어서, 감염체가 바이러스인 면역원성 구축물.

청구항 25

제24항에 있어서, 감염체가 베타-코로나바이러스인 면역원성 구축물.

청구항 26

제25항에 있어서, 감염체가 SARS-CoV-2, SARS-CoV-1, 또는 MERS-CoV인 면역원성 구축물.

청구항 27

제26항에 있어서, 감염체가 SARS-CoV-2인 면역원성 구축물.

청구항 28

제27항에 있어서, 항원이 재조합 전장 SARS-CoV-2 단백질이거나, 또는 항원 생산 작용제가 재조합 전장 SARS-CoV-2 단백질을 코딩하는 것인 면역원성 구축물.

청구항 29

제21항에 있어서, 전장 SARS-CoV-2 단백질이 SARS-CoV-2 스파이크 당단백질, SARS-CoV-2 뉴클레오펙시드 단백질, 또는 SARS-CoV-2 막 단백질인 면역원성 구축물.

청구항 30

제27항에 있어서, 항원이 단백질 서브유닛이거나, 또는 항원 생산 작용제가 단백질 서브유닛을 코딩하는 것인 면역원성 구축물.

청구항 31

제30항에 있어서, 단백질 서브유닛이 SARS-CoV-2 스파이크 당단백질 S1 영역, S2 영역, 또는 수용체 결합 도메인 (RBD) 영역에 상응하는 것인 면역원성 구축물.

청구항 32

제27항에 있어서, 항원이 SARS-CoV-2 스파이크 당단백질의 면역원성 서열에 상응하는 펩티드이거나, 또는 항원 생산 작용제가 SARS-CoV-2 스파이크 당단백질의 면역원성 서열에 상응하는 펩티드를 코딩하는 것인 면역원성 구축물.

청구항 33

제32항에 있어서, 펩티드가 서열식별번호: 1-8 중 어느 하나의 서열을 포함하는 것인 면역원성 구축물.

청구항 34

제27항에 있어서, 항원 생산 작용제가 mRNA 또는 pDNA인 면역원성 구축물.

청구항 35

제1항 또는 제3항에 있어서, 감염체가 박테리아, 기생충, 원생동물, 또는 진균인 면역원성 구축물.

청구항 36

제1항 또는 제3항에 있어서, 항원 또는 항원 생산 작용제가 NP의 0.5-20 wt.%로 존재하는 것인 면역원성 구축물.

청구항 37

제1항 또는 제3항에 있어서, 면역원성 구축물이 적어도 하나의 올리고뉴클레오타이드를 추가로 포함하는 것인 면역원성 구축물.

청구항 38

제37항에 있어서, 적어도 하나의 올리고뉴클레오타이드가 양이온성 중합체와 정전기적으로 결합되는 것인 면역원성 구축물.

청구항 39

제38항에 있어서, 적어도 하나의 올리고뉴클레오타이드가 siRNA, miRNA, miRNA 모방체, 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 것인 면역원성 구축물.

청구항 40

제38항에 있어서, 적어도 하나의 올리고뉴클레오타이드가 siRNA를 포함하는 것인 면역원성 구축물.

청구항 41

제40항에 있어서, siRNA가, 그의 발현 또는 상향조절이 세포의 면역억제와 연관되는 유전자를 억제하거나 하향조절하는 것인 면역원성 구축물.

청구항 42

제41항에 있어서, 세포가 항원-제시 세포인 면역원성 구축물.

청구항 43

제42항에 있어서, 항원-제시 세포가 수지상 세포 또는 대식세포인 면역원성 구축물.

청구항 44

제43항에 있어서, 유전자가 STAT3, IDO-1, IL-6, 또는 PD-L1인 면역원성 구축물.

청구항 45

제37항에 있어서, 올리고뉴클레오타이드가 NP의 1-10 wt.%로 존재하는 것인 면역원성 구축물.

청구항 46

제1항 또는 제3항에 있어서, 면역원성 구축물이 세포에 대한 표적화제를 추가로 포함하는 것인 면역원성 구축물.

청구항 47

제46항에 있어서, 세포가 항원-제시 세포인 면역원성 구축물.

청구항 48

제47항에 있어서, 항원-제시 세포가 수지상 세포 또는 대식세포인 면역원성 구축물.

청구항 49

제48항에 있어서, 표적화제가 만노스; 항원-제시 세포 상에 표시된 에피토프를 인식하고 그와 결합하는 모노클

로날 또는 폴리클로날 항체 또는 그의 단편; 또는 항원-제시 세포 상의 표면 수용체와 결합하는 리간드 중 적어도 하나를 포함하는 것인 면역원성 구축물.

청구항 50

제3항에 있어서, 약 10 nm 내지 약 10 마이크로미터의 유체역학적 직경을 갖는 면역원성 구축물.

청구항 51

제1항 또는 제3항에 있어서, 약 30 nm 내지 약 200 nm의 유체역학적 직경을 갖는 면역원성 구축물.

청구항 52

제1항 또는 제3항에 있어서, 약 80 nm 내지 약 999 nm의 유체역학적 직경을 갖는 면역원성 구축물.

청구항 53

복수개의 제1항 또는 제3항의 면역원성 구축물을 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 54

제1항 또는 제3항의 면역원성 구축물, 및 적어도 하나의 생물학상 또는 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 조성물.

청구항 55

제1항 또는 제3항의 면역원성 구축물, 및 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 백신.

청구항 56

세포를 제1항 또는 제3항의 면역원성 구축물과 접촉시키는 것을 포함하는, 항원 및 아주반트를 세포에 공동-전달하는 방법.

청구항 57

제56항에 있어서, 세포가 항원-제시 세포인 방법.

청구항 58

제57항에 있어서, 세포가 수지상 세포 또는 대식세포인 방법.

청구항 59

제56항에 있어서, 세포가 근육 세포인 방법.

청구항 60

제1항 또는 제3항의 면역원성 구축물의 면역-자극 양을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법.

청구항 61

제60항에 있어서, 대상체에서 감염체에 대항한 면역 반응을 유도하는 것을 초래하는 방법.

청구항 62

제60항에 있어서, 대상체에서 감염성 질환을 치료 또는 예방하는 것을 초래하는 방법.

청구항 63

제62항에 있어서, 대상체가 인간인 방법.

청구항 64

제62항에 있어서, 대상체가 면역저하된 것인 방법.

청구항 65

제62항에 있어서, 면역원성 구축물이 경피로, 근육내로, 흡입에 의해, 또는 비강내로 투여되는 것인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 2020년 7월 13일에 출원된 미국 가출원 번호 63/051,351을 우선권 주장하며, 이 가출원은 그 전체 내용이 본원에 참조로 포함된다.

[0003] 연방 지원 연구에 관한 진술

[0004] 본 발명은 국립 보건원에서 수여한 보조금 R44 CA217534 하에 정부 지원으로 이루어졌다. 정부는 본 발명에 대한 특정 권리를 가지고 있다.

배경 기술

[0005] 2020년의 첫 몇 주 동안, 세계는 고도로 병원성인 베타-코로나바이러스로부터 대유행을 일으키기에 충분한 인수 공통 전염병 확산을 달성한 새로운 인간 병원체의 출현을 입증하였다. COVID-19로서 공지된 고도로 감염성인 질환의 원인인 2019년 신종 코로나바이러스 (SARS-CoV-2)는 2002-2003년 중국에서 전염병을 일으킨 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 (SARS-CoV-1) 및 2012-2013년 사우디아라비아와 그 주변국에 영향을 미친 중동 호흡기 증후군 코로나바이러스 (MERS-CoV)를 포함하는 베타-코로나바이러스의 새로운 구성원이다.

[0006] 중국에서 처음 출현한 후, COVID-19의 급속한 확산으로 인해 1,300만 건 초과와 확진 사례와 50만 명 넘는 사망자가 발생하였다 (2020년 7월 기준). 이러한 새로운 바이러스에 대항한 안전하고 효과적인 치료제 및 예방제가 긴급히 요구된다.

[0007] 따라서, 이러한 바이러스와 신종 감염성 질환에 적용할 수 있는 새로운 면역원성 전략이 필요하다.

발명의 내용

[0008] 본 개시내용은 감염체에 대항한 면역 반응을 유도하기 위한 면역원성 구축물, 조성물 및 방법을 제공한다. 예를 들어, 본 개시내용의 조성물은 베타-코로나바이러스성 감염, 예를 들어, SARS-CoV-2, SARS-CoV-1, MERS-CoV 및 관련 바이러스에 의한 감염에 대항한 면역 반응을 유도하는데 사용될 수 있다. 본 개시된 기술은 동물 (예컨대 애완동물 및 가축)에서의 감염성 질환과 함께, 현재의 다른 감염성 질환, 예컨대 Dengue, 말라리아에도 적용가능하다.

[0009] 한 측면에서, 본 개시내용은 나노입자, 나노입자의 외부 표면과 결합된 가교된 양이온성 중합체, 가교된 양이온성 중합체 또는 나노입자의 외부 표면과 결합된 안정화제, 및 감염체에 대한 항원 (예를 들어, 전장 단백질, 단백질 서브유닛, 폴리펩티드, 펩티드 또는 그의 혼합물) 또는 항원 생산 작용제 (예컨대 항원 생산 핵산, 예를 들어, mRNA 또는 pDNA)를 함유하는 면역원성 구축물을 특징으로 한다.

[0010] 일부 실시양태에서, 면역원성 구축물은 아주반트를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 아주반트는 CpG 올리고뉴클레오타이드, CpG 서열을 함유하는 DNA TLR 효능제, 비-CpG DNA TLR 효능제, RNA TLR 효능제, 알루미늄 염, 항-CD40 항체, 융합 단백질, 시토카인, 소분자 TLR 효능제, 오일- 또는 계면활성제-기반 아주반트, 리포폴리사카라이드, 식물 추출물 또는 그의 유도제 중 하나 이상을 포함한다. 일부 실시양태에서, 아주반트는 CpG 올리고뉴클레오타이드 (예를 들어, CpG ODN 1826 또는 CpG ODN 7909/2006)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 아주반트는 폴리 I:C를 포함한다. 일부 실시양태에서, 아주반트는 나노입자 플랫폼 (NP 또는 중합체/안정화제 코팅된 나노입자)의 1-20 wt.% (예를 들어, 1-10 wt.%, 2-7 wt.%, 2-4 wt.%, 2-10 wt.%, 5-10 wt.%, 10-20 wt.%; 또는 약 4 wt.%, 약 5 wt.%, 약 6 wt.%, 약 7 wt.%, 약 10 wt.%, 또는 약 20 wt.%)로 존재한다. 일부 실시양태에서, 아주반트는 NP의 2-10 wt.%로 존재한다.

[0011] 일부 실시양태에서, 나노입자는 실리카 나노입자 (예를 들어, 메소다공성 실리카 나노입자), 실리콘 나노입자, 산화철 나노입자, 금 나노입자, 은 나노입자, 탄소 나노입자, 또는 탄소 나노튜브이다. 다양한 실시양태에서 메소다공성 나노입자의 세공 크기는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 2-5, 2-7, 6-10, 11-15, 16-20, 21-30, 또는

31-50 nm이다.

- [0012] 실시양태에서, 나노입자는 아주반트 나노입자 또는 면역자극 나노입자 (예를 들어, 리포솜, 리포플렉스 입자, 지질-기반 입자, 폴리플렉스 입자, 중합체-기반 입자, 무기 입자 (예를 들어, 인산칼슘 또는 탄산칼슘 나노입자, 알루미늄 염 입자, 실리카 입자), 바이로솜 또는 바이러스-유사 입자; 또는 1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄 프로판 (DOTAP), 콜레스테롤, 3 β -[N-(N',N'-디메틸아미노에탄)-카르바모일] 콜레스테롤, 포스포티딜 콜린/콜레스테롤, 키토산, 폴리- γ -글루탐산 (γ -PGA), 히알루론산, 폴리에틸렌이민 (PEI), 폴리(프로필아크릴산), 폴리프로필렌 술피드, 폴리(락트산-코-글리콜산) (PLGA), 아밀로펙틴, 말토덱스트린, 폴리스티렌, 금, 산화코발트, 명반, 트리팔미토일-S-글리세릴 시스테인 (PAM₃Cys), 스쿠알렌, 몬타니드 ISA 50V, 몬타니드 ISA 51, 몬타니드 ISA 201, 몬타니드 ISA 206 및 몬타니드 ISA 720 중 하나 이상을 포함하는 나노입자)이다.
- [0013] 일부 실시양태에서, 양이온성 중합체는 폴리에틸렌이민 (PEI), 키토산, 폴리프로필렌이민, 폴리리신, 폴리아미도아민, 폴리(알릴아민), 폴리(디알릴디메틸암모늄 클로라이드), 폴리(N-이소프로필 아크릴아미드-코-아크릴아미드), 폴리(N-이소프로필 아크릴아미드-코-아크릴산), 디에틸아미노에틸-텍스트란, 폴리-(N-에틸-비닐피리디늄 브로마이드), 폴리(디메틸아미노)에틸 메타크릴레이트, 및 폴리(에틸렌 글리콜)-코-폴리(트리메틸아미노에틸 메타크릴레이트 클로라이드)로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 양이온성 중합체는 PEI이다. 일부 실시양태에서, 양이온성 중합체는 약 0.8 kDa 내지 약 25 kDa (예를 들어, 약 0.8 kDa 내지 약 10 kDa, 약 0.8 kDa 내지 약 5 kDa, 약 0.8 kDa 내지 약 2.5 kDa, 약 2.5 kDa 내지 약 10 kDa, 또는 약 5 kDa 내지 약 10 kDa)의 분자량을 갖는다. 일부 실시양태에서, 양이온성 중합체는 NP의 약 1 내지 50 wt.% (예를 들어, 5 내지 40 wt.%, 10 내지 30 wt.%, 20 내지 30 wt.%, 5 내지 10 wt.%, 5 내지 15 wt.%, 5 내지 20 wt.%, 5 내지 25 wt.%, 5 내지 30 wt.%, 10 내지 20 wt.%, 10 내지 25 wt.%, 또는 25 내지 40 wt.%; 또는 약 5, 10, 15, 20, 25, 30, 또는 35 wt.%)로 존재한다. 일부 실시양태에서, 양이온성 중합체는 NP의 10 내지 20 wt.%로 존재한다.
- [0014] 일부 실시양태에서, 안정화제는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 텍스트란, 폴리시알산, 히알루론산, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리비닐 알콜 및 폴리아크릴아미드로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 안정화제는 PEG이다. 일부 실시양태에서, 안정화제는 약 1 kDa 내지 약 20 kDa (예를 들어, 약 0.8 kDa 내지 약 10 kDa, 약 0.8 kDa 내지 약 5 kDa, 약 2 kDa 내지 약 10 kDa, 약 0.8 kDa 내지 약 2.5 kDa, 약 2.5 kDa 내지 약 10 kDa, 또는 약 5 kDa 내지 약 10 kDa)의 분자량을 갖는다. 일부 실시양태에서, 안정화제는 NP의 1 내지 50 wt.% (예를 들어, 5 내지 30 wt.%, 10 내지 20 wt.%, 10 내지 25 wt.%, 5 내지 15 wt.%, 5 내지 20 wt.%, 5 내지 25 wt.%, 또는 1 내지 10 wt.%, 또는 약 5, 10, 15, 20, 25, 35, 40 또는 45 wt.%)로 존재한다. 안정화제는 카고 로딩 전 또는 후, 또는 둘 다에 도입될 수 있다.
- [0015] 일부 실시양태에서, 감염체는 바이러스, 예컨대 베타-코로나바이러스 (예를 들어, SARS-CoV-2, SARS-CoV-1, 또는 MERS-CoV)이다. 일부 실시양태에서, 항원은 재조합 전장 단백질, 예를 들어, 전장 SARS-CoV-2 스파이크 당단백질, SARS-CoV-2 뉴클레오캡시드 단백질 또는 SARS-CoV-2 막 단백질이다. 일부 실시양태에서, 항원은 단백질 서브유닛, 예를 들어, SARS-CoV-2 스파이크 당단백질의 S1, S2 또는 수용체 결합 도메인 (RBD) 영역에 상응하는 단백질 서브유닛이다. 일부 실시양태에서, 항원은 감염체의 면역원성 서열에 상응하는 펩티드 또는 펩티드의 혼합물이다. 예를 들어, 감염체는 SARS-CoV-2이고 항원은 서열식별번호(SEQ ID NO): 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 및/또는 8의 펩티드(들) 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 항원 생산 작용제는 mRNA 또는 pDNA, 예를 들어, 시험관내 (예를 들어, DC) 또는 생체내 (예를 들어, DC, 근육 세포)에서 항원으로 발현되거나 번역되는 mRNA 또는 pDNA이다. 일부 실시양태에서, 항원 또는 항원 생산 작용제는 NP의 0.5-20 wt.% (예를 들어, 0.5-10 wt.%, 1-6 wt.%, 1-15 wt.%, 1.5-10 wt.% 또는 2-5 wt.%)로 존재한다. 일부 실시양태에서, 항원은 단백질 서브유닛과 펩티드의 혼합물을 포함할 수 있다.
- [0016] 일부 실시양태에서, 면역원성 구축물은 siRNA, miRNA, miRNA 모방체, 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드로부터 선택된 적어도 하나의 유형의 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 유형의 올리고뉴클레오타이드는 양이온성 중합체와 정전기적으로 결합된다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 유형의 올리고뉴클레오타이드는 siRNA, 예를 들어, 세포, 예컨대 항원-제시 세포 (예를 들어, 수지상 세포 또는 대식세포)의 면역억제와 연관된 유전자를 억제하거나 하향조절하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 유전자는 STAT3, IDO-1, IL-6 또는 PD-L1이다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 유형의 올리고뉴클레오타이드는 NP의 약 1-50 wt.% (예를 들어, 2 wt.%, 3 wt.%, 4 wt.%, 5 wt.%, 2-5 wt.%, 2-8 wt.%, 2 내지 10 wt.%, 2 내지 25 wt.%, 또는 2 내지 50 wt.%)로 존재한다.
- [0017] 일부 실시양태에서, 면역원성 구축물은 세포, 예컨대 항원-제시 세포 (예를 들어, 수지상 세포 또는 대식세포)

에 대한 표적화제를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 표적화제는 만노스; 항원-제시 세포의 표면 상에 표시된 에피토프를 인식하고 그와 결합하는 모노클로날 또는 폴리클로날 항체 또는 그의 단편; 압타머; 및 항원-제시 세포 상의 표면 수용체와 결합하는 리간드이다. 일부 실시양태에서, 표적화제는 NP의 0.1-20 wt.% (예를 들어, 0.1 내지 1 wt.%, 0.2 내지 2 wt.%, 1 내지 5 wt.%, 또는 1 내지 10 wt.%; 또는 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 또는 9 wt.%)로 존재한다.

[0018] 일부 실시양태에서, 면역원성 구축물은 표지제를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 표지제는 형광 염료 및/또는 금속 프로브 (예를 들어, 란타나이드 프로브, 양자점, 금 나노입자 또는 가돌리늄 킬레이트)이다.

[0019] 일부 실시양태에서, 면역원성 구축물은 동적 광 산란 기술 또는 제타사이저 (Zetasizer) [맬번 파날리티컬 (Malvern Panalytical)] 또는 이와 유사한 장치에 의해 수용액 (예컨대 PBS, 트리스 완충액 또는 물)에서 측정된 약 10 nm 내지 약 999 nm (예를 들어, 약 80 nm 내지 약 200 nm, 또는 약 90 nm 내지 약 130 nm)의 유체역학적 직경을 갖는다. 일부 실시양태에서, 면역원성 구축물은 수용액 (예컨대 PBS, 트리스 완충액 또는 물)에서 측정된 약 1 마이크로미터 내지 약 10 마이크로미터 (예를 들어, 약 1 마이크로미터 내지 약 2 마이크로미터)의 유체역학적 직경을 갖는다. 일부 실시양태에서, 나노입자는, 예를 들어, 투과 전자 현미경 검사에 의해 측정된 바와 같이 약 5 nm 내지 999 nm (예를 들어, 약 20 nm 내지 약 200 nm, 약 30 nm 내지 약 60 nm, 약 10 nm, 약 20 nm, 약 30 nm, 약 50 nm, 약 60 nm, 약 200 내지 약 750 nm 또는 약 500 내지 999 nm)의 직경을 갖는다.

[0020] 본 개시내용은 나노입자, 지질 층, 및 감염체에 대한 항원 (예를 들어, 전장 단백질, 단백질 서브유닛, 폴리펩티드 또는 펩티드) 또는 항원 생산 작용제 (예컨대 항원 생산 핵산, 예를 들어, mRNA 또는 pDNA)를 함유하는 면역원성 구축물을 추가로 특징으로 한다.

[0021] 일부 실시양태에서, 면역원성 구축물은 아주반트를 추가로 함유한다. 일부 실시양태에서, 아주반트는 CpG 올리고뉴클레오타이드, CpG 서열을 함유하는 DNA TLR 효능제, 비-CpG DNA TLR 효능제, RNA TLR 효능제, 알루미늄 염, 항-CD40 항체, 융합 단백질, 시토카인, 소분자 TLR 효능제, 오일- 또는 계면활성제-기반 아주반트, 리포폴리사카라이드, 식물 추출물 또는 그의 유도체 중 하나 이상을 포함한다. 일부 실시양태에서, 아주반트는 CpG 올리고뉴클레오타이드 (예를 들어, CpG ODN 1826 또는 CpG ODN 7909/2006)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 아주반트는 NP에 로딩된다. 일부 실시양태에서, 아주반트는 지질 층 상에 또는 지질 층 내에 로딩된다. 일부 실시양태에서, 아주반트는 NP의 1-20 wt.% (예를 들어, 1-10 wt.%, 2-7 wt.%, 2-4 wt.%, 2-10 wt.%, 5-10 wt.%, 10-20 wt.%; 또는 약 4 wt.%, 약 5 wt.%, 약 6 wt.%, 약 7 wt.%, 약 10 wt.%, 또는 약 20 wt.%)로 존재한다. 일부 실시양태에서, 아주반트는 NP의 2-10 wt.%로 존재한다.

[0022] 일부 실시양태에서, 나노입자는 실리카 나노입자 (예를 들어, 메소다공성 실리카 나노입자), 실리콘 나노입자, 산화철 나노입자, 금 나노입자, 은 나노입자, 또는 탄소 나노튜브이다.

[0023] 일부 실시양태에서, 나노입자는 아주반트 나노입자 또는 면역자극 나노입자 (예를 들어, 리포솜, 리포플렉스 입자, 지질-기반 입자, 폴리플렉스 입자, 중합체-기반 입자, 무기 입자 (예를 들어, 인산칼슘 나노입자, 알루미늄 염 입자, 실리카 입자), 바이러스-유사 입자; 또는 1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄 프로판 (DOTAP), 콜레스테롤, 3β-[N-(N',N'-디메틸아미노에탄)-카르바모일] 콜레스테롤, 포스파티딜콜린/콜레스테롤, 키토산, 폴리-γ-글루탐산 (γ-PGA), 히알루론산, 폴리에틸렌이민 (PEI), 폴리(프로필아크릴산), 폴리프로필렌 술폰 (PPS), 폴리(락트산-코-글리콜산) (PLGA), 아밀로펙틴, 말토덱스트린, 폴리스티렌, 금, 산화코발트, 명반, 트리팔미토일-S-글리세릴 시스테인 (PAM₃Cys), 스쿠알렌, 몬타니드 ISA 50V, 몬타니드 ISA 51, 몬타니드 ISA 201, 몬타니드 ISA 206 및 몬타니드 ISA 720 중 하나 이상을 포함하는 나노입자)이다.

[0024] 일부 실시양태에서, 지질 층은 중성 지질 (예를 들어, 프로스타글란딘, 에이코사노이드 또는 글리세리드), 지방산 변형 지질 (예를 들어, 2-디피타노일-sn-글리세로-3-포스포콜린 또는 1-(12-비오틴(아미노도데카노일))-2-올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민), 인지질 (예를 들어, 포스파티딜콜린, 포스파티딜에탄올아민, 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린, 또는 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민), 지방산 (예를 들어, 스테아르산 또는 라우르산), 중합가능한 지질 (예를 들어, 콜레스테롤-PEG 또는 디스테아로일-rac-글리세롤-PEG2K), 양이온성 지질 (예를 들어, 1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄-프로판 또는 디메틸디옥타데실암모늄 브로마이드), 스핑고지질 (예를 들어, 스핑고미엘린 또는 세라미드) 및 스테롤 (예를 들어, 콜레스테롤 또는 스티르마스테롤)로부터 선택된 지질 중 하나 이상을 포함하는 단층 또는 다층 막이다. 일부 실시양태에서, 지질 층은 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민, 디메틸디옥타데실암모늄 브로마이드, 콜레스테롤, 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린, 및 디스테아로일-rac-글리세롤-PEG2K를 포함한다. 실시양태에서, 지

질 층은 NP의 0.1-99.9 wt.%로 존재한다.

- [0025] 일부 실시양태에서, 감염체는 바이러스, 예컨대 베타-코로나바이러스 (예를 들어, SARS-CoV-2, SARS-CoV-1, 또는 MERS-CoV)이다. 일부 실시양태에서, 항원은 재조합 전장 단백질, 예를 들어, 전장 SARS-CoV-2 스파이크 당 단백질, SARS-CoV-2 뉴클레오캡시드 단백질 또는 SARS-CoV-2 막 단백질이다. 일부 실시양태에서 항원의 조합 (예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 초과와 상이한 항원)이 제형에 사용된다. 일부 실시양태에서, 항원은 단백질 서브유닛, 예를 들어, SARS-CoV-2 스파이크 당단백질의 S1, S2 또는 RBD 영역에 상응하는 단백질 서브유닛이다. 일부 실시양태에서, 항원은 감염체의 면역원성 서열에 상응하는 펩티드 또는 펩티드의 혼합물이다. 예를 들어, 감염체는 SARS-CoV-2이며, 항원은 서열식별번호: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 및/또는 8의 펩티드(들) 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 항원 생산 작용제는 mRNA 또는 pDNA, 예를 들어, 시험관내 (예를 들어, DC) 또는 생체내 (예를 들어, DC, 근육 세포)에서 항원으로 발현되거나 번역되는 mRNA 또는 pDNA이다. 일부 실시양태에서, 항원 또는 항원 생산 작용제는 NP의 0.5-20 wt.% (예를 들어, 1-15 wt.%, 1.5-10 wt.%, 또는 2-5 wt.%)로 존재한다. 일부 실시양태에서, 항원은 단백질 서브유닛과 펩티드의 혼합물로 구성될 수 있다.
- [0026] 일부 실시양태에서, 감염체는 박테리아이다. 일부 실시양태에서, 항원은 독소이드, 예를 들어, 특정 박테리아 독소에 대하여 면역화하도록 의도된 불활성화 독소이다. 일부 실시양태에서, 항원은 박테리아의 당 코팅에 대항한 면역성을 생성하도록 의도된 박테리아의 폴리사카라이드이다. 일부 실시양태에서, 항원은 박테리아로부터의 하나 이상의 재조합 단백질(들)로 이루어진다.
- [0027] 일부 실시양태에서, 면역원성 구축물은 siRNA, miRNA, miRNA 모방체, 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드로부터 선택된 적어도 하나의 유형의 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 유형의 올리고뉴클레오티드는 siRNA, 예를 들어, 세포, 예컨대 항원-제시 세포 (예를 들어, 수지상 세포 또는 대식세포)의 면역억제와 연관된 유전자를 억제하거나 하향조절하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 유전자는 STAT3, IDO-1, IL-6 또는 PD-L1이다. 일부 실시양태에서 적어도 하나의 유형의 올리고뉴클레오티드가 NP에 로딩된다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 유형의 올리고뉴클레오티드는 지질 층 상에 또는 지질 층 내에 로딩된다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 유형의 올리고뉴클레오티드는 NP의 0.01 내지 10 wt.%로 존재한다.
- [0028] 일부 실시양태에서, 면역원성 구축물은 세포, 예컨대 항원-제시 세포 (예를 들어, 수지상 세포 또는 대식세포)에 대한 표적화제를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 표적화제는 만노스; 항원-제시 세포의 표면 상에 표시된 에피토프를 인식하고 그와 결합하는 모노클로날 또는 폴리클로날 항체 또는 그의 단편; 압타머; 또는 항원-제시 세포 상의 표면 수용체와 결합하는 리간드이다.
- [0029] 일부 실시양태에서, 면역원성 구축물은 표지제를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 표지제는 형광 염료 및/또는 금속 프로브 (예를 들어, 란타나이드 프로브, 양자점, 금 나노입자 또는 가돌리늄 킬레이트)이다.
- [0030] 일부 실시양태에서, 면역원성 구축물은 10 nm 내지 10 마이크로미터의 유체역학적 직경을 갖는다. 일부 실시양태에서, 면역원성 구축물은 수용액 (예컨대 PBS, 트리스 완충액 또는 물)에서 측정된 약 10 nm 내지 약 999 nm (예를 들어, 약 80 nm 내지 약 200 nm, 또는 약 90 nm 내지 약 150 nm)의 유체역학적 직경을 갖는다. 일부 실시양태에서, 면역원성 구축물은 수용액 (예컨대 PBS, 트리스 완충액 또는 물)에서 측정된 약 1 마이크로미터 내지 약 10 마이크로미터 (예를 들어, 약 1 마이크로미터 내지 약 2 마이크로미터)의 유체역학적 직경을 갖는다. 일부 실시양태에서, 나노입자는, 예를 들어, 투과 전자 현미경 검사에 의해 측정된 바와 같이 약 5 nm 내지 999 nm (예를 들어, 약 20 nm 내지 약 200 nm, 약 30 nm 내지 약 60 nm, 약 200 내지 약 750 nm 또는 약 500 내지 999 nm)의 직경을 갖는다.
- [0031] 일부 실시양태에서, 나노입자는 항산화제 나노입자이다.
- [0032] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 본 개시내용의 면역원성 구축물 및 제약상 허용되는 부형제를 포함한 제약 조성물을 특징으로 한다. 일부 실시양태에서, 제약 조성물은 기재된 바와 같은 미결합된 아주반트를 추가로 포함한다.
- [0033] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 본 개시내용의 면역원성 구축물 및 제약상 허용되는 부형제를 포함한 백신을 특징으로 한다.
- [0034] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 올리고뉴클레오티드 (예를 들어, siRNA), 항원 또는 항원 생산 작용제 (예를 들어, mRNA 또는 pDNA), 및/또는 아주반트를 세포 (예를 들어, 근육 세포 또는 항원-제시 세포, 예컨대 수지상 세포 또는 대식세포)에 공동-전달하는 방법을 특징으로 한다. 이러한 방법은 세포를 본 개시내용의 면역원성

구축물과 접촉시키는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 면역원성 구축물은 적어도 하나의 항원 생산 작용제 (예를 들어, mRNA 또는 pDNA)를 포함하고 대상체에게 근육내 투여되고 근육 세포에 의해 흡수되며, 여기서 면역원성 구축물은 후속 면역 세포 활성화를 위해 적어도 하나의 항원을 생산하도록 근육 세포를 유도시킨다.

[0035] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 대상체에서 감염체에 대한 면역 반응을 유도하는 방법을 특징으로 한다. 이러한 방법은 면역원성 양의 본 개시내용의 면역원성 구축물을 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 대상체는 인간이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 면역저하된 것이다 (예를 들어, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 또는 80세 이상의 고령자 또는 노인 대상체, 또는 면역저하되고 감염되기 쉬운 것으로 공지된 기저 의학적 병태(들), 예컨대 당뇨병 및 암이 있는 대상체). 일부 실시양태에서, 면역원성 구축물은 근육내 주사에 의해 투여된다.

[0036] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 대상체에서 감염체에 대한 면역 반응을 증가시키는 방법을 특징으로 한다. 이러한 방법은 유효량의 본 개시내용의 면역원성 구축물을 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 대상체는 인간이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 면역저하된 것이다 (예를 들어, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 또는 80세 이상의 고령자 또는 노인 대상체, 또는 면역저하되고 감염되기 쉬운 것으로 공지된 기저 의학적 병태(들)가 있는 대상체). 일부 실시양태에서, 면역원성 구축물은 근육내 주사에 의해 투여된다. 일부 실시양태에서, 면역원성 구축물은 흡입에 의해 투여된다.

[0037] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 감염체에 대하여 대상체에게 백신접종하는 방법을 특징으로 한다. 이러한 방법은 유효량의 본 개시내용의 면역원성 구축물을 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 대상체는 인간이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 면역저하된 것이다 (예를 들어, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 또는 80세 이상의 고령자 또는 노인 대상체, 또는 면역저하되고 감염되기 쉬운 것으로 공지된 기저 의학적 병태(들)가 있는 대상체). 일부 실시양태에서, 면역원성 구축물은 근육내 주사에 의해 투여된다. 일부 실시양태에서, 면역원성 구축물은 흡입에 의해 투여된다.

도면의 간단한 설명

[0038] 도 1은 감염 (CoV로서 공지되기도 한 SARS-CoV-2에 의한 바이러스성 감염으로 예시됨)에 대한 면역 반응을 유도하기 위한, 본 개시내용의 실시양태에 따른 면역원성 구축물의 사용을 입증하는 도식이다. 근육내 또는 피하 주사 시, 면역원성 구축물 (AIRISE-CoV)은 항원-제시 세포 (APC, 예를 들어, 수지상 세포 및 대식세포)에 의해 흡수된다. APC에서 CpG에 의한 면역 활성화 및 siRNA에 의한 면역억제 유전자의 억제는 제시를 위해 전달된 항원을 프로세싱하는 활성을 증진시킨다 (A). 활성화된 항원이 로딩된 APC는 주사 부위에서 림프절로 이동한 후 (B), 항원-특이적 CD8+ T 세포를 활성화시킨 다음 (C), 바이러스에 대한 이펙터 및 기억 T 세포로 증식한다. 활성화된 APC는 또한 B 세포와 CD4+ T 세포를 활성화하며, 후자는 CD8+ T 세포와 B 세포를 추가로 활성화할 수 있으며, 이는 차례로 신체의 모든 곳에서, 예컨대 폐에서 (E) 바이러스성 감염 (현재 및 미래)에 대한 체액성 면역 반응 (항체, D)을 초래한다. 구축물이 항원 생산 작용제 (예컨대 mRNA 및 pDNA)를 전달하는 경우, 근육 세포는 주사된 구축물을 흡수하여 APC에 의해 프로세싱될 항원을 생산한 다음, 동일한 프로세스 A-E를 따른다.

도 2는 SIINFEKL 펩티드 [서열식별번호: 90; SF, 아나스펙(Anaspec)] 및 CpG 1826 [인비트로젠(Invivogen)]이 로딩된 PEI 및 PEG로 코팅된 메소다공성 실리카 나노입자 (나노입자 플랫폼; NP)의 유체역학적 크기 (직경 또는 Z-평균 직경)를 제시하는 그래프이다.

도 3은 PBS에서 측정된, NP의 약 2 wt.% 및 9 wt.%로 폴리 I:C가 로딩된 NP (MSNP-PEI-PEG)의 유체역학적 크기를 제시한다.

도 4a-4d는 (도 4a) STAT3에 대한 siRNA (siSTAT3)가 로딩된 NP 및 (도 4b) siSTAT3 및 CpG가 로딩된 NP를 사용하여 다중 종의 다중 세포에서 48시간에 STAT3 녹다운을 제시한다. STAT3 및 HPRT mRNA에 대한 D-17 (개 골육종), BMDC (마우스로부터의 골수 유래 수지상 세포), J774 (마우스 대식세포), B16F10 (마우스 흑색종) 및 HCC1954 (인간 유방암) qRT-PCR 분석을 상응하는 종의 프라이머로 수행하였다. 전체에 걸쳐 단일 siSTAT3 서열이 사용되었다. siSCR = 스크램블된 siRNA 대조군. ***p<0.001; ****p<0.0001. siSTAT3의 용량은 50 nM이었고, CpG의 용량은 220 nM이었다. 도 4c는 NP 또는 다르마펙트(Dharmafect)에 의한 비-표적화 스크램블된 siRNA (siSCR) 및 CpG를 C3H/HEJ 마우스로부터 채취한 수지상 세포로 공동-전달하는 것을 제시하는 그래프이다. 각각의 siRNA의 용량은 50 nM이고 NP의 2.0 wt.%이며, CpG의 용량은 NP의 4 wt.%였다. siRNA-다르마펙트 제형은 제조업체의 프로토콜에 따라 제조되었다. 처리 후 48시간에 qRT-PCR로 mRNA를 분석하였다. 도 4d는 siSTAT3 외에, NP가 또한 PD-L1에 대한 siRNA (siPDL1)를 전달하여, LLC-JSP 세포에서 PD-L1 단백질 발현

(유동 세포계수법에 의해 측정된 바와 같음)을 효과적으로 녹다운시킬 수 있음을 제시하는 그래프이다. 세포를 PD-L1에 대항한 30 nM siRNA (siPDL1) 또는 2 wt.% siRNA에서 30 nM 스크램블된 siRNA (siSCR)를 함유하는 NP로 처리하였다. 처리 후 72시간에, 세포를 채취하고 유동 세포계수법에 의해 PD-L1 단백질 발현에 대해 평가하였다. RFU = 상대 형광 단위. "NP"는 문헌 [Ngamcherdtrakul et al., Advanced Functional Materials, 25(18):2646-2659, 2015] 및 미국 특허 출원 공개 번호 2017/0173169에 기재된 바와 같이 가교된 PEI 및 PEG로 코팅된 메소다공성 실리카 나노입자를 나타낸다.

도 5a-5c는 siSTAT3 또는 CpG 단독을 전달하는 NP보다 더 큰 면역원성 효과를 유도하는 siSTAT3-CpG-NP를 제시한다. 양측성 B16F10 흑색종 종양을 갖는 마우스를 3일 간격으로 총 3회 용량으로 한 종양에만 종양내 주사하였다. (도 5a) 국소 처리된 종양 및 (도 5b) 원위 미처리된 종양의 종양 성장 곡선을 평균 $\pm$ SEM으로 플롯팅하였다. (도 5c) 마우스의 생존 곡선. 용량 (각각의 주사당): 20 μ g CpG; 4 μ g siSTAT3; 0.22 mg NP. CpG-NP vs. siSTAT3-CpG-NP에 대한 * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$.

도 6a-6c는 siSTAT3-CpG-NP가 siSTAT3 또는 CpG 단독을 전달하는 NP보다 더 우수하게 종양 및 배액 림프절(DLN)에서 CD8⁺ T 세포의 증식을 증진시킨다는 것을 제시한다. 모델, 처리 용량 및 일정은 **도 5a-5c**에서와 같았다. 첫 번째 처리 후 7일에, 국소 (처리됨) 및 원위 (미처리됨) 종양 둘 다의 종양 및 DLN으로부터 채취한 세포는 림프절에서 이펙터 (CD44⁺) CD8⁺ T 세포의 증식 상태 (Ki-67) (도 6c)와 함께, 종양 (도 6a) 및 DLN (도 6b)의 살아있는 CD45⁺CD3⁺ T 세포 집단에서 CD4⁺FoxP3⁺ 조절 T 세포에 대한 CD8⁺ T 세포의 비를 결정하기 위해 분석되었다. 대괄호가 달리 지정하지 않는 한, siSTAT3-CpG-NP vs. 식염수에 대한 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ (n=3/군).

도 7은 SF (서열식별번호: 90)의 존재 하에 인큐베이션한 후 IFN γ 활성화된 CD8⁺ T 세포의 백분율을 제시하는 그래프이다. 세포는 미처리된 마우스, SF 및 CpG가 로딩된 NP (CpG-SF-NP)로 처리된 마우스, SF가 로딩된 NP (SF-NP)로 처리된 마우스, CpG가 로딩된 NP (CpG-NP)로 처리된 마우스, 및 불완전 프로인트 아주반트로 제형화된 SF (IFA/SF)로 처리된 마우스로부터 획득되었다. * $p < 0.05$. 사용된 용량: 16 μ g CpG 및 40 μ g SF.

도 8a 및 8b는 (도 8a) 1) PEI 및 PEG로 코팅되고 약 3 wt.% SARS-CoV-2 스파이크 단백질, 2 wt.% siRNA 및 4 wt.% CpG가 로딩된 메소다공성 실리카 나노입자 (NP)의 유체역학적 크기; 및 (도 8b) 2 wt.%의 siRNA에서 스파이크 단백질-접합된 NP (스파이크-NP)에 의해 전달된 30 또는 60 nM siLUC (루시페라제에 대항한 siRNA)로 처리된 LM2-41uc+/H2N에서 루시페라제의 성공적인 침투를 제시한다. siSCR = 스크램블된 siRNA 대조군.

도 9a 및 9b는 (도 9a) 표 5에서와 같이 CaP-L과 함께 H2N (유방) 세포주에 전달된 루시페라제 siRNA로 루시페라제 유전자 녹다운을 제시한다. 도 9b는 미처리된 세포와 비교하여 처리된 세포의 비변화된 총 단백질 수준에 의해 표시된 바와 같이 처리가 세포에 독성이 아님을 제시한다. siRNA 용량은 50 nM였으며; 단백질 분석은 처리 후 2일이었다.

도 10은 CpG, siSTAT3-NP, CpG-NP, siSTAT3-CpG-NP (AIRISE-02) 또는 AIRISE-CoV (스파이크 단백질, siSTAT3 및 CpG를 함유하는 면역원성 구조물)로 처리한 후 활성화된 수지상 세포 (MHCII+ CD80+ CD11c+ 세포)의 집단을 제시한다. 발바닥 주사에 의해 마우스에게 상이한 처리물이 투여되었다. 용량은 0.5 mg NP (2 wt.% siSTAT3, 4 wt.% CpG, 및/또는 3 wt.% SARS-CoV-2 스파이크 단백질 항원)였다. 처리 후 2일에, 배액 림프절 (DLN) 및 비-배액 림프절 (NDLN)을 수집하고 유동 세포계수법 분석을 위해 단일 세포로 프로세싱하였다. * $p < 0.05$ vs 식염수 (군당 n = 3).

도 11은 AIRISE-CoV로 백신접종된 BALB/c 마우스에서 SARS-CoV-2 스파이크 (S) 항원에 대한 체액성 반응을 제시한다. 8주령 BALB/c 마우스에게 80 μ l AIRISE-CoV (0.5 mg NP, 2 wt.% siSTAT3, 4 wt.% CpG, 3 wt.% SARS-CoV-2 스파이크 단백질 항원)를 발바닥 주사함으로써 백신접종하였다 (용량 1: 제0일; 용량 2: 제17일). 혈청을 연속적으로 희석한 후 ELISA에 의해 SARS-CoV-2 S IgG 항체 수준을 평가하기 위해 제16일 (용량 1 효과) 및 제38일 (용량 2 효과)에 혈청을 수집하였다. 데이터는 n = 2 (미처리됨) 및 n = 3 (AIRISE-CoV)에 대한 평균 OD_{450 nm} 값 (평균 $\pm$ SD)을 나타낸다.

도 12a 및 12b는 12주 후 AIRISE-CoV로 백신접종된 BALB/c 마우스에서 SARS-CoV-2 스파이크 (S) 항원에 대한 체액성 반응을 제시한다. 8주령 BALB/c 마우스 (M1-M3은 마우스 1, 2 및 3을 나타냄)에게 (도 12a) 80 μ l AIRISE-CoV (0.5 mg NP, 2 wt.% siSTAT3, 4 wt.% CpG, 3 wt.% SARS-CoV-2 스파이크 단백질 항원) 또는 (도 12b) 2개의 SARS-CoV-2 스파이크 펩티드를 항원으로 사용하여 활용하는 80 μ l의 AIRISE-CoV (0.5 mg NP, 2 wt.%

siSTAT3, 4 wt.% CpG, 3 wt.% SARS-CoV-2 스파이크 펩티드 항원)를 발바닥 주사함으로써 백신접종하였다 (용량 1: 제0일; 용량 2: 제17일). ELISA에 의해 SARS-CoV-2 S IgG 항체 수준을 평가하기 위해 제80일에 혈청을 수집하였다. 데이터는 각각의 면역화된 마우스 또는 나이브 마우스에 대한 2개의 실험 복제물의 평균 OD_{450 nm} 값 (평균 ± SD)을 나타낸다.

도 13은 AIRISE-CoV의 2회 용량으로 백신접종된 BALB/c 마우스에서 SARS-CoV-2 스파이크 (S) 항원에 대한 체액성 반응을 제시한다. 8주령 BALB/c 마우스에게 AIRISE-CoV (0.5 mg NP, 2 wt.% siSTAT3, 4 wt.% CpG, 3 wt.% SARS-CoV-2 스파이크 단백질 항원)를 발바닥 (f.p.) 주사함으로써 백신접종하였다 (용량 1: 제0일; 용량 2: 제17일). ELISA에 의해 SARS-CoV-2 S IgG 항체의 수준을 평가하기 위해 백신접종 후 상이한 주 (제3-54주)에 혈청을 수집하였다. 데이터는 5마리의 면역화된 마우스 및 1마리의 나이브 마우스의 평균 OD_{450 nm} 값 (평균 ± SD)을 나타낸다.

도 14a-c는 단일 용량의 AIRISE-CoV, siSTAT3-스�파이크-NP 또는 CpG-스�파이크-NP 각각으로 백신접종된 BALB/c 마우스에서 SARS-CoV-2 스파이크 (S) 항원에 대한 체액성 반응을 제시한다. 8주령 BALB/c 마우스에게 단일 용량의 (a) AIRISE-CoV (0.4 mg NP, 2 wt.% siSTAT3, 4 wt.% CpG, 3 wt.% SARS-CoV-2 스파이크 단백질 항원; n=4), (b) siSTAT3-스�파이크-NP (0.4 mg NP, 2 wt.% siSTAT3, 3 wt.% 스파이크 단백질 항원; n=3), 또는 (c) CpG-스�파이크-NP (0.4 mg NP, 4 wt.% CpG, 3 wt.% 스파이크 단백질 항원; n=3)를 근육내 (i.m.) 주사함으로써 백신접종하였다. ELISA에 의해 SARS-CoV-2 S IgG 항체 수준을 평가하기 위해 백신접종 후 상이한 주 (제6-36주)에 혈청을 수집하였다. 데이터는 3-4마리의 면역화된 마우스 및 1마리의 나이브 마우스의 평균 OD_{450 nm} 값 (평균 ± SD)을 나타낸다.

도 15는 (도 11로부터의) 면역화된 혈청에 의한 HEK293-hACE2 세포의 SARS-CoV-2 슈도바이러스 감염의 억제력을 제시한다. 그래프는 나이브 마우스 대비 AIRISE-CoV로 면역화된 마우스로부터의 상이한 혈청 희석액 하에 %GFP+ 세포를 제시한다. 계산된 중화 역가 (바이러스의 50%를 중화시키는데 필요한 희석; NT₅₀) 값이 표 6에 제시되어 있다.

도 16a 및 16b는 siSTAT3-NP 또는 siSTAT3-CpG-NP로 처리한 후 BMDc (도 16a) 및 J774 (도 16b)의 세포 생육력을 예시하는 그래프이다. NP 용량은 처리 후 2일에 35 µg/ml (2 wt.% siRNA; 7 wt.% CpG)이다.

서열 목록에 대한 언급

본원에 기재된 핵산 및/또는 아미노산 서열은 37 C.F.R. § 1.822에 정의된 바와 같은, 표준 문자 약어를 사용하여 제시된다. 각각의 핵산 서열의 한 가닥만이 제시되어 있지만, 상보적 가닥은 적절할 경우 실시양태에 포함되는 것으로 이해된다. 2021년 7월 12일경에 생성되고 파일 크기가 16 KB인 "2IS9696.txt (Sequence Listing.txt)"라는 제목의 컴퓨터 판독가능 텍스트 파일이 본 출원에 대한 서열 목록을 함유하며, 그 전체 내용이 본원에 참조로 포함된다.

서열식별번호: 1-8은 스파이크 단백질 (서열식별번호: 1-5), 뉴클레오펙시드 단백질 (서열식별번호: 6), 막 단백질 (서열식별번호: 7) 및 외피 단백질 (서열식별번호: 8)로부터의 대표적인 SARS-CoV-2 T-세포 및/또는 B-세포 에피토프의 아미노산 서열이다.

서열식별번호: 8-89 및 91은 표 2 (하기)에 기재된 바와 같은 예시적인 siRNA에 상응하는 핵산 서열이다. 서열 목록의 각각의 서열에 포함되지는 않았으나, 각각의 siRNA는 임의로, 3' 단부에 테옥시미딘 디뉴클레오티드 (dTdT) 또는 다른 테옥시-디뉴클레오티드 (예를 들어, dTdT) 오버행을 포함할 수 있다.

서열식별번호: 90은 T 세포를 자극하기 위해 사용되는 오프알부민 펩티드이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0039]

예를 들어, 감염체, 예를 들어, 바이러스, 예컨대 베타-코로나바이러스 감염, 예컨대 SARS-CoV-2 감염, SARS-CoV-1 감염, MERS-CoV 감염 또는 기타 바이러스 및 병원체에 대한 치료 또는 예방을 위한, 면역 반응을 유도하기 위한 면역원성 구축물이 본원에 기재된다. 감염성 질환에 대한 이들 신규 면역원성 구축물은 면역억제 유전자를 조정하여 면역을 자극하기 위해 항원, 아두반트, 및 일부 실시양태에서 siRNA를 전달하기 위해 단일 전달 운반체를 활용한다.

[0040]

면역원성 구축물은 나노입자 (예를 들어, 메소다공성 실리카 나노입자 (MSNP)), 양이온성 중합체 (예를 들어,

PEI), 안정화제 (예를 들어, PEG), 및 항원, 및 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 아주반트 (예를 들어, CpG) 및/또는 올리고뉴클레오타이드 (예를 들어, siRNA)를 함유한다. 다양한 부가의 작용제의 조합이 또한 고려된다. 본 개시내용의 면역원성 구축물은 또한 하나 초과 유형의 양이온성 중합체, 안정화제, 항원, 아주반트 및/또는 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 예를 들어, 면역원성 구축물은 동일하거나 상이한 표적 감염체(들)에 작용하는 다수의 상이한 올리고뉴클레오타이드 및/또는 항원을 포함할 수 있다. 이러한 부가의 작용제의 사용은 부가적 또는 상승적 효과를 제공할 수 있다.

[0041] 본 개시내용의 면역원성 구축물은 새로운 감염성 질환에 대한 강력하고 오래 지속되는 면역성을 유도하기 위해, 아주반트 (예를 들어, CpG 올리고뉴클레오타이드), 바이러스 항원 (예를 들어, 단백질 또는 펩티드) 또는 항원 생산 작용제 (예를 들어, mRNA 또는 pDNA), 및 임의로 siRNA를 공동-전달하는데 사용될 수 있다 (도 1). 면역원성 구축물은 신체의 항원-제시 세포 (예를 들어, 수지상 세포, B 세포 및 대식세포)를 프라이밍하여 이펙터 및 기억 T 림프구와 감염체 단백질을 인식하는 체액성 면역 반응을 활성화시키기 위해 항원을 활용한다. 이러한 면역원성 구축물은 미래의 감염을 예방하거나 질환의 중증도를 감소시킬 수 있다.

[0042] 본 개시내용의 측면은 하기와 같은 부가의 세부사항 및 옵션과 함께 하기에 기재된다: (I) 정의; (II) 나노입자; (III) 양이온성 중합체; (IV) 안정화제; (V) 아주반트; (VI) 항원 및 항원 생산 작용제; (VII) 올리고뉴클레오타이드; (VIII) 표적화제; (IX) 표지제; (X) 면역원성 구축물 합성; (XI) 지질-코팅된 나노입자를 포함한 면역원성 구축물; (XII) 면역원성 구축물 제형 및 사용 방법; (XIII) 예시적인 실시양태; (XIV) 실험 실시예 (실시예 1-8 포함); 및 (XV) 종결 단락. 이러한 제목은 본 개시내용의 해석을 제한하지 않으며 조직 목적으로만 제공된다.

[0043] I. 정의

[0044] 본 개시내용의 이해를 용이하게 하기 위해, 다수의 용어가 하기에 정의된다. 본원에 정의된 용어는 본 개시내용과 관련된 분야에서 통상의 기술자가 통상적으로 이해하는 바와 같은 의미를 갖는다. 본원에서의 전문 용어는 본 개시내용의 구체적 실시양태를 설명하기 위해 사용되지만, 그들의 사용은 청구범위에 요약된 것을 제외하고는 본 개시내용을 제한하지 않는다.

[0045] 용어 "CpG 모티프"는 포스포디에스테르 뉴클레오타이드간 연결 또는 포스포디에스테르 유도체 뉴클레오타이드간 연결을 통해 3' G 뉴클레오타이드에 연결된 5' C 뉴클레오타이드를 지칭한다. 일부 실시양태에서, CpG 모티프는 포스포디에스테르 뉴클레오타이드간 연결을 포함한다. 일부 실시양태에서, CpG 모티프는 포스포디에스테르 유도체 뉴클레오타이드간 연결을 포함한다.

[0046] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "클래스 A CpG ODN" ("A-클래스 CpG ODN", "D-유형 CpG ODN" 또는 "클래스 A CpG DNA 서열"로서 지칭되기도 함)은 생물학적 및 화학적 과학에서의 통상적인 의미에 따라 사용되며 5', 3' 또는 양 단부에 폴리-G 서열 중 하나 이상; CpG 모티프를 포함한 내부 팔린드롬 서열; 또는 데옥시뉴클레오타이드를 연결하는 하나 이상의 포스포디에스테르 유도체를 포함한 올리고데옥시뉴클레오타이드를 포함한 CpG 모티프를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 클래스 A CpG ODN은 5', 3' 또는 양 단부에 폴리-G 서열; CpG 모티프를 포함한 내부 팔린드롬 서열; 및 데옥시뉴클레오타이드를 연결하는 하나 이상의 포스포디에스테르 유도체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 포스포디에스테르 유도체는 포스포로티오에이트이다. 클래스 A CpG ODN의 예는 ODN D19, ODN 1585, ODN 2216, 및 ODN 2336을 포함한다.

[0047] 용어 "클래스 B CpG ODN" 또는 "B-클래스 CpG ODN" 또는 "K-유형 CpG ODN" 또는 "클래스 B CpG DNA 서열"은 생물학적 및 화학적 과학에서의 통상적인 의미에 따라 사용되며, CpG 모티프를 포함한 6량체 모티프 중 하나 이상; 모든 데옥시뉴클레오타이드를 연결하는 포스포디에스테르 유도체를 포함한 올리고데옥시뉴클레오타이드를 포함한 CpG 모티프를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 클래스 B CpG ODN은 CpG 모티프를 포함한 6량체 모티프의 하나 이상의 카피 및 모든 데옥시뉴클레오타이드를 연결하는 포스포디에스테르 유도체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 포스포디에스테르 유도체는 포스포로티오에이트이다. 일부 실시양태에서, 클래스 B CpG ODN은 CpG 모티프를 포함한 하나의 6량체 모티프를 포함한다. 일부 실시양태에서, 클래스 B CpG ODN은 CpG 모티프를 포함한 6량체 모티프의 2개의 카피를 포함한다. 일부 실시양태에서, 클래스 B CpG ODN은 CpG 모티프를 포함한 6량체 모티프의 3개의 카피를 포함한다. 일부 실시양태에서, 클래스 B CpG ODN은 CpG 모티프를 포함한 6량체 모티프의 4개의 카피를 포함한다. 클래스 B CpG ODN의 예는 ODN 1668, ODN 1826, ODN 2006 및 ODN 2007을 포함한다.

[0048] 용어 "클래스 C CpG ODN" 또는 "C-클래스 CpG ODN" 또는 "C-유형 CpG DNA 서열"은 생물학적 및 화학적 과학에서의 통상적인 의미에 따라 사용되며, CpG 모티프를 포함한 팔린드롬 서열 및 모든 데옥시뉴클레오타이드를 연결

하는 포스포디에스테르 유도체 (포스포로티오에이트)를 포함한 올리고데옥시뉴클레오타이드를 지칭한다. 클래스 C CpG ODN의 예는 ODN 2395 및 ODN M362를 포함한다.

[0049] 본원에 사용된 바와 같은, "면역원성"은 예를 들어 시험관내 검정 (예를 들어, 혼합 림프구 반응; 세포독성 T 세포 사멸, 항원으로 면역 세포 자극 시 시토킨 상향조절 등), 생체의 검정 (예를 들어, 미세중화 검정을 통한 항체 중화 역가; ELISA 검정을 통한 항원-특이적 항체 및 항체-분비 B 세포) 및 세포성 및 체액성 면역의 성공적인 유도를 확인하는 생체내 검정 (예를 들어, 바이러스 공격으로부터 살아 있는 표본을 보호할 수 있는 면역화의 능력)에 의해 측정된 바와 같이, 면역 반응을 촉발시킬 수 있는 작용제 (예를 들어, 면역원성 구축물, 그의 성분, 또는 면역원성 구축물을 함유하는 조성물)의 능력을 지칭한다.

[0050] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "면역원성 양"은 대상체에서 면역 반응을 유도하는 면역원성 구축물 또는 조성물의 양 (예를 들어, 통상적인 기술, 예컨대 ELISA에 의해 결정된 바와 같이 대상체에서 항체 역가의 증가에 의해 반영됨)을 지칭한다.

[0051] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "감염체"는 감염 및/또는 질환을 유발하는 작용제를 지칭한다. 감염체는 바이러스, 박테리아, 진균 및 기생충, 또는 그의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 감염체는 바이러스이다. 부가의 감염체가 본원에서 논의되고/거나 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지될 것이다. 예를 들어, 감염체는 본원에 기재된 바와 같은 면역원성 구축물의 "표적"으로서 지칭될 수 있다. 예를 들어, 바이러스 표적은 코로나바이러스, 코리네박테리움, 에볼라바이러스, 오르소믹소바이러스, 헤파토바이러스, 헤모필루스 박테리움, HIV, HPV, 모르빌라바이러스, 미코박테리움, 메닝고코쿠스 박테리움, 오르소루블라바이러스, 노로바이러스, 스트렙토코쿠스, 엔테로바이러스, 오르소뉴모바이러스, 로타바이러스, 루비바이러스, 헤르페스바이러스, 클로스트리디움 박테리움, 보르데텔라 박테리움 또는 플라비바이러스일 수 있다. 병원체가 감염체로서 지칭되기도 한다.

[0052] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "감염성 질환"은 감염체, 예컨대 박테리아, 바이러스, 기생충 또는 진균에 의해 유발된 질환을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 감염성 질환은 바이러스성 감염이다. 감염성 질환의 예는 코로나바이러스 기반 감염 (예컨대 중동 호흡기 증후군 (MERS), 중증 급성 호흡기 증후군 (SARS) 및 코로나바이러스 질환 (예를 들어, COVID-19)); 코리네박테리움(*Corynebacterium*) 기반 감염 (예컨대 디프테리아); 에볼라바이러스 기반 감염 (예컨대 에볼라); 오르소믹소바이러스와 바이러스 기반 감염 (예컨대 인플루엔자 A, B 또는 C); 헤파토바이러스 A, B, C, D 또는 E 기반 감염 (예컨대 간염); 헤모필루스(*Haemophilus*) 기반 감염 (예컨대 고관절 질환); 인간 면역결핍 바이러스 (HIV) 기반 감염 (예컨대 후천성 면역결핍 증후군 (AIDS)); 인간 유두종 바이러스 (HPV) 기반 감염; 모르빌라바이러스(*Morbillivirus*) 기반 감염 (예컨대 홍역); 미코박테리움(*Mycobacterium*) 기반 감염 (예컨대 결핵); 네이세리아(*Neisseria*) 기반 감염 (예컨대 수막염); 오르소루블라바이러스(*Orthorubulavirus*) 기반 감염 (예컨대 유행성 이하선염); 노로바이러스 기반 감염; 스트렙토코쿠스(*Streptococcus*) 기반 감염; 엔테로바이러스 기반 감염 (예컨대 소아마비); 오르소뉴모바이러스(*Orthopneumovirus*) 기반 감염; 로타바이러스 기반 감염; 루비바이러스(*Rubivirus*) 기반 감염 (예컨대 풍진); 헤르페스바이러스 기반 감염 (예컨대 헤르페스, 수두 및 대상포진); 클로스트리디움(*Clostridium*) 기반 감염 (예컨대 파상풍 및 보툴리누스 중독); 보르데텔라(*Bordetella*) 기반 감염 (예컨대 백일해); 플라비바이러스(*Flavivirus*) 기반 감염 (예컨대 지카); 등을 포함한다. 부가의 감염성 질환이 본원에서 논의되고/거나 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지될 것이다 (예를 들어, 문헌 [Pati et al., *Front Immunol.* 9:2224, 2018 (16 pages)] 및 그 내부에 인용된 참고문헌).

[0053] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "생물학적 허용되는 부형제" 및 "제약학적 허용되는 부형제"는 대상체에서 무독성 및 비-염증 특성을 갖는 임의의 불활성 성분 (예를 들어, 면역원성 구축물을 현탁할 수 있는 비히클)을 지칭한다. 전형적인 부형제는, 예를 들어, 안정성, 전달, 흡수, 반감기, 효능, 약동학 및/또는 약력학을 증진시키거나, 유해 부작용을 감소시키거나, 또는 생물학적 및/또는 제약 및/또는 식이 보충제 사용에 대한 기타 이점을 제공할 수 있는, 담체, 결합제, 충전제, 윤활제, 유화제, 현탁제, 감미제, 향료, 보존제, 완충제, 습윤제, 붕해제, 발포제 및 기타 통상적인 부형제 및 부가제 및/또는 기타 부가제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 허용되는 부형제는 면역원성 구축물과 결합되지 않은 아주반트를 포함한다.

[0054] 본원에 사용된 바와 같은 "pDNA"는 플라스미드 DNA, 예를 들어, 감염체의 적어도 하나의 항원을 코딩하는 플라스미드를 지칭한다.

[0055] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "예방하는"은 감염성 질환, 예를 들어, 바이러스성 감염 (예컨대 베타 코로나바이러스, 예컨대 SARS-CoV-2, SARS-CoV-1, MERS-CoV 또는 관련 바이러스에 의한 감염), 박테리아성 감염, 진균

성 감염, 또는 기생충 감염에 걸릴 위험을 감소시키는 것 (예를 들어, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 99%, 또는 약 100%만큼)을 의미한다. 예방이 효과적인지의 여부를 결정하기 위해, 본 개시내용의 조성물을 투여받은 대상체와 조성물을 투여받지 못한 유사한 상황의 대상체 (예를 들어, 바이러스성 감염, 예컨대 SARS-CoV-2, SARS-CoV-1, 또는 MERS-CoV 감염, 또는 관련 바이러스에 의한 감염의 위험이 있는 대상체) 간의 비교가 이루어질 수 있다. 또한, 조성물을 투여받은 대상체와 대조군, 기준선 또는 공지된 측정 수준 간에 비교가 이루어질 수 있다.

[0056] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "대상체"는 인간, 비-인간 영장류, 또는 비-영장류 포유류, 예컨대 개, 고양이, 말, 소, 돼지, 염소, 원숭이, 래트, 마우스 및/또는 양일 수 있다. 일부 실시양태에서, 대상체는 인간이다.

[0057] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "TLR-결합 DNA 치환기"는 적어도 하나의 데옥시리보핵산을 포함한 틀-유사 수용체 ("TLR")와 결합할 수 있는 치환기 또는 모이어티를 지칭한다. 일부 실시양태에서, TLR-결합 DNA 치환기는 핵산이다. 일부 실시양태에서, TLR-결합 DNA 치환기는 적어도 하나의 핵산 유사체를 포함한다. 일부 실시양태에서, TLR-결합 DNA 치환기는 대체 백본을 갖는 적어도 하나의 핵산 유사체 (예를 들어, 포스포디에스테르 유도체 (예를 들어, 포스포르아미데이트, 포스포로디아미데이트, 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포노카르복실산, 포스포노카르복실레이트, 포스포노아세트산, 포스포노포름산, 메틸 포스포네이트, 붕소 포스포네이트, 또는 O-메틸포스포로아미다이트), 펩티드 핵산 백본(들), LNA 또는 연결)를 포함한다. 일부 실시양태에서, TLR-결합 DNA 치환기는 DNA를 포함한다. 일부 실시양태에서, TLR-결합 DNA 치환기 내의 모든 뉴클레오티드는 데옥시리보뉴클레오티드이다. 일부 실시양태에서, TLR-결합 DNA 치환기는 포스포디에스테르 및 포스포디에스테르 유도체 (예를 들어, 포스포르아미데이트, 포스포로디아미데이트, 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포노카르복실산, 포스포노카르복실레이트, 포스포노아세트산, 포스포노포름산, 메틸 포스포네이트, 붕소 포스포네이트, O-메틸포스포로아미다이트, 또는 그의 조합)로부터 선택된 뉴클레오티드간 연결을 갖는 DNA를 포함하거나 이러한 DNA이다. 일부 실시양태에서, TLR-결합 DNA 치환기는 포스포디에스테르 및 포스포로티오에이트로부터 선택된 뉴클레오티드간 연결을 갖는 DNA를 포함한다. 일부 실시양태에서, TLR-결합 DNA 치환기는 포스포디에스테르, 포스포로티오에이트 및 포스포로디티오에이트로부터 선택된 백본 연결을 갖는 DNA를 포함하거나 이러한 DNA이다. 일부 실시양태에서, TLR-결합 DNA 치환기는 포스포디에스테르 백본 연결을 포함한 DNA를 포함하거나 이러한 DNA이다. 일부 실시양태에서, TLR-결합 DNA 치환기는 다른 TLR보다 TLR9와 우선적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, TLR-결합 DNA 치환기는 TLR9와 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, TLR-결합 DNA 치환기는 TLR3과 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, TLR-결합 DNA 치환기는 TLR7과 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, TLR-결합 DNA 치환기는 TLR8과 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, TLR-결합 DNA 치환기는 세포 하위구획 (예를 들어, 엔도솜) 연관된 TLR (예를 들어, TLR3, TLR7, TLR8 또는 TLR9)과 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, TLR-결합 DNA 치환기는 G-풍부 올리고뉴클레오티드를 포함하거나 G-풍부 올리고뉴클레오티드이다. 일부 실시양태에서, TLR-결합 DNA 치환기는 CpG 모티프를 포함한다 (즉, CpG 올리고데옥시뉴클레오티드 (ODN)임). 일부 실시양태에서, CpG 모티프는 비메틸화된다. 일부 실시양태에서, TLR-결합 DNA 치환기는 클래스 A CpG 올리고데옥시뉴클레오티드 (ODN)이다. 일부 실시양태에서, TLR-결합 DNA 치환기는 클래스 B CpG 올리고데옥시뉴클레오티드 (ODN)이다. 일부 실시양태에서, TLR-결합 DNA 치환기는 클래스 C CpG 올리고데옥시뉴클레오티드 (ODN)이다. 일부 실시양태에서, TLR-결합 DNA 치환기 (예를 들어, TLR9-결합 DNA 치환기)는 A, G, C 또는 T 염기가 있는 데옥시리보핵산 및 포스포디에스테르 연결 및/또는 포스포디에스테르 유도체 연결 (예를 들어, 포스포로티오에이트 연결(들))을 포함한다.

[0058] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "치료" 또는 "치료하는"은 감염성 질환, 예를 들어, 바이러스성 감염, 예를 들어, 베타-코로나바이러스 (예를 들어, SARS-CoV-2, SARS-CoV-1, 또는 MERS-CoV 감염 또는 관련 바이러스) 감염을 저하, 감소시키거나, 그의 진행을 감소시키거나, 또는 그의 부작용을 감소시키는 것 (예를 들어, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 99%, 또는 약 100%만큼)을 지칭한다. 치료가 효과적인지의 여부를 결정하기 위해, 치료받은 대상체와 치료를 받지 않은 유사한 상황의 대상체 (예를 들어, 바이러스성 감염, 예컨대 SARS-CoV-2, SARS-CoV-1, 또는 MERS-CoV 감염, 또는 관련 바이러스에 의한 감염이 있거나 이러한 감염의 위험이 있는 대상체) 간의 비교가 이루어질 수 있다. 또한, 치료받은 대상체와 대조군, 기준선 또는 공지된 측정 수준 간에 비교가 이루어질 수 있다. 바이러스성 감염 (예를 들어, 베타-코로나바이러스 감염, 예컨대 SARS-CoV-2, SARS-CoV-1, 또는 MERS-CoV 감염, 또는 관련 바이러스에 의한 감염)을 치료하는 것은 바이러스 로딩을 감소시키는 것 (예를 들어, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 99%, 또는 약 100%만큼 감소), 대상체의 입

원 일수를 감소시키는 것 (예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50일, 또는 그 초과 일수만큼 감소), 대상체가 항바이러스 요법을 필요로 하는 일수를 감소시키는 것 (예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50일, 또는 그 초과 일수만큼 감소), 및/또는 대상체가 필요로 하는 항바이러스 요법의 용량을 감소시키는 것 중 하나 이상을 포함한다.

[0059] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "백신"은 대상체에서 감염체에 대한 면역 반응을 유도할 수 있고/거나 감염체와 연관된 감염 및/또는 질환을 치료 및/또는 예방할 수 있는 작용제 (예를 들어, 면역원성 구축물, 그의 성분, 또는 면역원성 구축물을 함유하는 조성물)를 지칭한다.

[0060] II. 나노입자

[0061] 본 개시내용의 조성물 및 방법에 유용한 나노입자는 메소다공성 실리카 나노입자 (예를 들어, MSNP), 산화철 나노입자, 은 나노입자, 금 나노입자, 인산칼슘, 무기 나노입자, 탄소 나노튜브, 리포좀, 지질 나노입자 또는 양이온성 중합체 입자를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 나노입자는 다공성일 수도 있고 아닐 수도 있다. 나노입자 코어에 대한 예시적인 크기는 약 5 nm 내지 약 999 nm, 약 5 nm 내지 약 90 nm, 약 5 nm 내지 약 20 nm, 약 20 nm 내지 약 400 nm, 약 20 nm 내지 약 500 nm, 약 20 nm 내지 약 100 nm, 약 20 nm 내지 200 nm, 약 30 nm 내지 약 100 nm, 약 30 nm 내지 약 80 nm, 약 30 nm 내지 약 60 nm, 약 40 nm 내지 약 80 nm, 약 50 nm 내지 400 nm, 약 50 내지 500 nm, 약 70 nm 내지 약 90 nm, 약 100 nm 내지 약 200 nm, 약 200 nm 내지 약 500 nm, 약 500 nm 내지 약 999 nm, 또는 약 5 nm, 약 10 nm, 약 20 nm, 약 30 nm, 약 40 nm, 약 50 nm, 약 60 nm, 약 70 nm, 약 80 nm, 약 90 nm, 또는 약 100 nm이다. 일반적으로, 나노입자 코어는 구형이지만, 다른 모양, 예컨대 막대형 및 디스크형이 사용될 수도 있다. 일부 실시양태에서, 나노입자는 메소다공성 실리카 나노입자 (MSNP)이다.

[0062] 일부 실시양태에서, 나노입자는 아주반트 또는 면역자극 특성을 갖는다. 아주반트 또는 면역자극 특성을 갖는 예시적인 나노입자는 리포좀, 리포플렉스, 지질-기반 입자, 폴리플렉스, 중합체 입자, 무기 입자 (예를 들어, 알루미늄 염 입자 및 인산칼슘 나노입자), 바이러스-유사 입자; 또는 1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄 프로판 (DOTAP), 콜레스테롤, 3β-[N-(N',N'-디메틸아미노에탄)-카르바모일] 콜레스테롤, 포스포티딜콜린/콜레스테롤, 키토산, 폴리-γ-글루탐산 (γ-PGA), 히알루론산, 폴리에틸렌이민 (PEI), 폴리(프로필아크릴산), 폴리프로필렌 술폰 (PPS), 폴리(락트산-코-글리콜산) (PLGA), 아밀로펙틴, 말토덱스트린, 폴리스티렌, 금, 산화코발트, 명반, 트리팔미토일-S-글리세릴 시스테인 (PAM₃Cys), 스쿠알렌, 몬타니드 ISA 50V, 몬타니드 ISA 51, 몬타니드 ISA 201, 몬타니드 ISA 206 및 몬타니드 ISA 720 중 하나 이상으로부터 형성된 나노입자를 포함한다.

[0063] 나노입자 플랫폼 (NP)을 만들기 위해, 공유적 또는 비공유적의 다양한 메커니즘에 의해 부가의 성분이 나노입자에 부착된다. 예를 들어, 양이온성 중합체는, 예를 들어, 실리카 또는 산화철 나노입자에 대해 전하에 의해 나노입자에 부착될 수 있다. 대안적으로, 나노입자의 표면은 양이온성 중합체 및/또는 다른 성분과 접합하기 위한 반응성 모이어티를 포함하도록 변경될 수 있거나, 또는 양이온성 중합체 또는 다른 성분은 나노입자와 결합하는 모이어티를 포함할 수 있다. 예를 들어, 나노입자 코어, 예컨대 실리카, 실리콘, 금, 산화철 및 은 나노입자뿐만 아니라 탄소 나노튜브는 양이온성 중합체 및 다른 성분과의 부착 이전에 반응성 모이어티, 예컨대 티올, 포스포네이트, 카르복실레이트, 및 아민으로 변형될 수 있다. 양이온성 중합체 및 다른 성분은 나노입자 코어와 결합하기 전에, 말레이미드, N-히드록시 숙신이미드 (NHS) 에스테르 또는 아지드를 포함한 이들 또는 다른 모이어티를 포함하도록 변형될 수 있다. 성분은 표면 상에 또는 세공 (존재하는 경우에) 내에서 나노입자에 직접 부착될 수 있다. 대형 분자 카고, 예컨대 단백질, mRNA 또는 플라스미드 DNA (pDNA)는 나노입자의 외부 표면 (또는 임의로, 나노입자 코어에 적용된 코팅, 즉 NP 상에 로딩됨)에 부착되는 반면, 더 작은 분자, 예컨대 염료는 나노입자 또는 NP의 세공 내부뿐만 아니라 외부 표면 상에 부착될 수 있다. 본 개시내용의 면역원성 구축물은 부가의 성분이 로딩된 후에 그들의 서브-마이크론 크기를 유리하게 유지한다.

[0064] III. 양이온성 중합체

[0065] 일부 실시양태에서, 나노입자, 예컨대 MSNP는 양이온성 중합체 또는 다른 화합물로 코팅된다. 양이온성 중합체는 임의의 적절한 수단을 사용하여 나노입자의 표면과 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 양이온성 중합체는 정전기적 상호작용을 통해 나노입자와 결합한다. 양이온성 중합체는 양전하를 갖는 임의의 중합체, 예컨대 PEI, 폴리아미도아민, 폴리(알릴아민), 폴리(디알릴디메틸암모늄 클로라이드), 키토산, 폴리(N-이소프로필 아크릴아미드-코-아크릴아미드), 폴리(N-이소프로필 아크릴아미드-코-아크릴산), 폴리(L-리신), 디에틸아미노에틸-덱스트란, 폴리(N-에틸-비닐피리디늄 브로마이드), 폴리(디메틸아미노)에틸 메타크릴레이트, 또는 폴리(에틸렌 글리콜)-코-폴리(트리메틸아민-에틸메타크릴레이트 클로라이드)일 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 다른 양이

온성 중합체는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백할 것이며, 예를 들어, 문헌 [Polymer Handbook, 4th Edition, Edited by: Brandrup, E.H. Immergut, and E.A. Grukle; John Wiley & Sons, 2003]에서 찾을 수 있다.

[0066] 양이온성 중합체는 선형 또는 분지형일 수 있다. 일부 실시양태에서, 양이온성 중합체는 크기가 약 500 Da 내지 25 kDa 범위일 수 있고 분지형 또는 선형일 수 있다. 예를 들어, 평균 크기가 1.8 kDa 내지 10 kDa인 분지형 PEI가 나노입자 상에 로딩될 수 있다 (나노입자 플랫폼: NP 산출). 나노입자에 대한 양이온성 중합체의 비는 원하는 결과에 따라 달라질 수 있다. 양이온성 중합체는 NP의 1 내지 50 wt.%, 예를 들어, 5 내지 40 wt.%, 10 내지 30 wt.%, 20 내지 30 wt.%, 5 내지 15 wt.%, 5 내지 20 wt.%, 5 내지 25 wt.%, 5 내지 30 wt.%, 10 내지 20 wt.%, 10 내지 25 wt.%, 또는 25 내지 40 wt.%, 예를 들어, 약 5, 10, 15, 20, 25, 30, 또는 35 wt.%로 존재할 수 있다. 일부 실시양태에서, 양이온성 중합체는 NP의 10 내지 20 wt.%로 존재한다.

[0067] 일부 실시양태에서, 양이온성 중합체는, 예를 들어, 절단가능한 디설피드 결합, 나노입자 상의 사전- 또는 사후-코팅으로 가교된다. 일부 실시양태에서, 부착된 양이온성 중합체는, 예를 들어, DSP (디티오비스[숙신이미딜 프로피오네이트]), DTSSP (3,3'-디티오비스(술포숙신이미딜 프로피오네이트) 및 DTBP (디메틸 3,3'-디티오비스 프로피오네이트)를 사용하여 나노입자, 예를 들어, MSNP와 결합한 후에 가교된다. 가교는 용액 중 유리 양이온성 중합체의 부재 또는 존재에서 일어날 수 있다. 다른 실시양태에서, 양이온성 중합체는 가교되지 않는다.

[0068] IV. 안정화제

[0069] 안정화제는, 예를 들어, 임의의 적절한 수단에 의해 나노입자 및/또는 양이온성 중합체와 접합될 수 있다. 일부 실시양태에서, 안정화제는 나노입자 (예를 들어, MSNP) 상에 코팅된 가교된 양이온성 중합체의 아민 또는 다른 반응성기와 접합된다. 예시적인 안정화제는 PEG, 텍스트란, 폴리시알산, 히알루론산, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리비닐 알콜 및 폴리아크릴아미드, 또는 그의 조합을 포함한다.

[0070] 안정화제는, 예를 들어, 나노입자, 양이온성 중합체 및/또는 다른 성분과의 부착을 위해, 다수의 화학적으로 반응성인기를 가질 수 있다. 예를 들어, 반응성 안정화제, 예를 들어, PEG 유도체는 2개의 기능적 모이어티, 예컨대 각각의 단부 상에 말레이미드와 활성화된 에스테르 둘 다를 함유하는 말레이미드-PEG-N-히드록시숙신이미딜 에스테르 (Mal-PEG-NHS)를 가질 수 있다. 본 개시내용의 조성물 및 방법과 연계해서 사용된 안정화제, 예를 들어, PEG는 일반적으로 500 Da - 40 kDa, 예를 들어, 2 - 10 kDa 범위의 분자량을 갖는다. 안정화제는 NP의 1 내지 50 wt.%, 예를 들어, 5 내지 30 wt.%, 10 내지 20 wt.%, 10 내지 25 wt.%, 5 내지 15 wt.%, 5 내지 20 wt.%, 5 내지 25 wt.%, 또는 1 내지 10 wt.%, 예를 들어, 약 5, 10, 15, 20, 25, 35, 40 또는 45 wt.%로 존재할 수 있다.

[0071] 일부 실시양태에서, 안정화제 (예를 들어, PEG)는 NP 안정성을 증진 (예를 들어, 응집 및 침전을 감소)시키고/거나 카고 분자(들), 예컨대 siRNA, miRNA, mRNA 및 pDNA를, 예를 들어, 효소적 분해로부터 보호하기 위해 도입된다.

[0072] 본 개시내용의 조성물 및 방법과 연계해서 사용된 안정화제 (예를 들어, PEG)는 일반적으로 500 Da-40 kDa, 예를 들어, 5 kDa, 2-5 kDa, 2-10 kDa, 5-10 kDa 범위의 분자량을 갖는다. 다양한 실시양태에서 안정화제는 나노입자 플랫폼 (NP)의 1 내지 50 wt. %, 예를 들어, 5 내지 30 wt. %, 10 내지 20 wt. %, 10 내지 25 wt. %, 5 내지 15 wt. %, 5 내지 20 wt. %, 5 내지 25 wt. %, 또는 1 내지 10 wt. %, 예를 들어, 약 5, 10, 15, 20, 25, 35, 40 또는 45 wt. %로 존재한다. 안정화제의 크기와 밀도는 대형 카고, 예컨대 단백질 및 mRNA를 수용하도록 최적화될 수 있다.

[0073] 일부 실시양태에서, 안정화제는 카고 로딩 전에 도입된다. 일부 실시양태에서, 안정화제는 카고 로딩 후에 도입된다. 일부 실시양태에서, 안정화제는 카고 로딩 전과 후 둘 다에 도입되고/거나 적어도 하나의 카고 분자의 로딩과 공동으로 도입된다.

[0074] 일부 나노입자 (예컨대 PEI 및 PEG로 코팅된 메소다공성 실리카 및 산화철 나노입자)는 매우 낮은 온도 (예를 들어, -80℃)에서 물질을 저장할 필요가 없도록 장기 저장 및 운송 동안 항원 및 항원 생산 작용제를 보호할 수 있다.

[0075] V. 아주반트

[0076] 본원에 제공된 구축물은 적어도 하나의 아주반트를 포함할 수 있다. 아주반트는 나노입자 내에 함유되거나 또

는 그렇지 않으면 수소 결합, 반 데르 발스 상호작용, 정전기적 상호작용, 소수성 상호작용 및 나노입자 상의 모이어티와의 화학적 접합을 포함한, 비공유 또는 공유 상호작용을 통해 나노입자, 양이온성 중합체 또는 안정 화제와 연합될 수 있다. 화학적 접합은 티올-말레이미드, NHS 에스테르-아민, 아지드-알킨 및 기타 클릭 화학 을 포함한다. 일부 실시양태에서, 아주반트는 티올화되고 티올-말레이미드 반응을 통해 말레이미드 기를 함유 하는 안정화제와 접합된다 (국제 출원 번호 PCT/US2016/022655 참조; 이는 그 전체 내용이 본원에 참조로 포함 됨). 일부 실시양태에서, 아주반트는 나노입자 상에 코팅된 양이온성 중합체 상에 정전기적으로 로딩된다. 아 주반트는 NP의 1-20 wt.%, 예를 들어, 1-10 wt.%, 2-7 wt.%, 2-4 wt.%, 2-10 wt.%, 5-10 wt.%, 10-20 wt.%, 예를 들어, 약 4 wt.%, 5 wt.%, 6 wt.%, 7 wt.%, 10 wt.%, 또는 20 wt.%로 존재할 수 있다.

[0077] 아주반트는 또한 치료제의 일부이거나 치료제와 접합될 수 있으며, 예를 들어, 표적 유전자를 녹다운시키는 올리고뉴클레오타이드, 예컨대 siRNA는 면역-자극 서열을 함유하도록 설계될 수 있다.

[0078] 일반적으로, 아주반트는 백신 조성물로의 혼합물이 항원에 대한 면역 반응을 증가시키거나 달리 변형시키는 임 의의 물질이다. 항원에 대한 면역 반응을 증가시킬 수 있는 아주반트의 능력은 전형적으로 면역-매개 반응에서 의 상당한 증가 또는 질환 증상에서의 감소에 의해 나타난다. 예를 들어, 체액성 면역의 증가는 전형적으로 항 원에 대해 유발된 항체의 역가에서의 상당한 증가에 의해 나타나고, T-세포 활성의 증가는 전형적으로 증가된 항원-특이적 T 세포 증식, 표적 세포의 사멸, 또는 시토카인 분비에서 나타난다. 아주반트는 또한, 예를 들어, 주로 체액성 또는 Th2 반응을 주로 세포성 또는 Th1 반응으로 변화시킴으로써 면역 반응을 변경할 수 있다.

[0079] 적합한 아주반트는 TLR-결합 DNA 치환기, 예컨대 CpG 올리고뉴클레오타이드 (예를 들어, ISS 1018; 앰플리박스 (Amplivax); CpG ODN 7909, CpG ODN 1826, CpG ODN D19, CpG ODN 1585, CpG ODN 2216, CpG ODN 2336, ODN 1668, ODN 1826, ODN 2006, ODN 2007, ODN 2395, ODN M362, 및 SD-101), CpG 서열을 함유하는 DNA TLR 효능제 (예를 들어, dSLIM), 비-CpG DNA TLR 효능제 (예를 들어, EnanDIM), 및 양이온성 펩티드-접합된 CpG 올리고뉴 클레오타이드 (예를 들어, IC30, IC31); RNA TLR 효능제 (예를 들어, 폴리 I:C 및 폴리-ICLC); 알루미늄 염 (예 를 들어, 수산화알루미늄, 인산알루미늄, 염화알루미늄, 및 황산칼륨 알루미늄); 항-CD40 항체 (예를 들어, CP- 870,893); 시토카인, 예컨대 과립구-대식세포 콜로니-자극 인자 (GM-CSF); 소분자 TLR 효능제 (예를 들어, 이미 퀴모드, 레시퀴모드, 가르디퀴모드 및 3M-052); 융합 단백질 (예를 들어, ImuFact IMP321, CyaA 및 ONTAK); 오 일- 또는 계면활성제-기반 아주반트, 예컨대 MF59, 몬타니드 IMS 1312, 몬타니드 ISA 206, 몬타니드 ISA 50V 및 몬타니드 ISA-51; 식물 추출물, 예컨대 사포닌으로부터 유래된 QS21 자극제 [아퀼라 바이오텍 (Aquila Biotech; 미국 매사추세츠주 우스터)]; 미코박테리아 추출물 및 합성 박테리아 세포벽 모방체, 예컨대 리포폴리사카라이 드 (예를 들어, 모노포스포릴 지질 A, OM-174, OM-197-MP-EC 및 Pam3Cys); 크산테논 유도체 (예를 들어, 바디 메잔); 그의 혼합물 (예를 들어, AS-15); 및 기타 독점 아주반트, 예컨대 리비의 데톡스, 쉘, 또는 슈퍼포스를 포함한다. 여러 면역학적 아주반트 (예를 들어, 수지상 세포에 특이적인 MF59) 및 그의 제조가 이전에 기재된 바 있다 (Dupuis et al., *Cell Immunol.* 186(1): 18-27, 1998; Allison, *Dev Biol Stand.*; 92:3-11, 1998). 또한 시토카인을 사용할 수 있다. 여러 시토카인은 림프계 조직으로의 수지상 세포 이동에 영향을 미쳐 (예를 들어, TNF-알파), 수지상 세포가 T-림프구에 대한 효율적인 항원-제시 세포로의 성숙을 가속화하며 (예를 들어, GM-CSF, IL-1 및 IL-4) (미국 특허 번호 5,849,589), 면역아주반트로서 작용하는 것 (예를 들어, IL-12)과 직 접적으로 연계되어 있다 (Gabrilovich et al., *J Immunother Emphasis Tumor Immunol.* (6):414-418, 1996). 톨-유사 수용체 (TLR) 또는 TLR을 활성화시키는 작용제가 또한 아주반트로서 사용될 수 있으며, 이는 "병원체- 연관된 분자 패턴" (PAMPs)이라고 하는 많은 미생물이 공유하는 보존된 모티프를 인식하는 패턴 인식 수용체 (PRR) 패밀리의 중요한 구성원이다.

[0080] 일부 실시양태에서, 아주반트는 CpG 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. CpG 면역-자극 올리고뉴클레오타이드는 또 한 백신 환경에서 아주반트의 효과를 증진시키는 것으로 보고되었다. 임의의 특정한 기계론적 이론에 얽매이는 것은 아니지만, CpG 올리고뉴클레오타이드는 주로 TLR9인 톨-유사 수용체 (TLR)를 통해 선천적 (비-적응) 면역 체 계를 활성화시킴으로써 적어도 부분적으로 작용한다. CpG 촉발된 TLR9 활성화는 예방 및 치료 백신 둘 다에서 펩티드 또는 단백질 항원, 생 또는 사멸 바이러스, 수지상 세포 백신, 자가 세포성 백신 및 폴리사카라이드 접 합체를 비롯한 광범위한 항원에 대한 항원-특이적 체액성 및 세포성 반응을 증진시킨다. 더 중요한 것은 수지 상 세포의 성숙과 분화를 증진시켜, CD4 헬퍼 T-세포의 부재 하에서도 TH1 세포의 활성화 증진과 강력한 세포독 성 T-림프구 (CTL) 생성을 초래한다는 것이다. TLR9 자극에 의해 유도된 TH1 바이어스는 정상적으로 TH2 바이 어스를 촉진하는 명반 또는 불완전 프로인트 아주반트 (IFA)와 같은 백신 아주반트의 존재 하에서도 유지된다. CpG 올리고뉴클레오타이드는 항원이 상대적으로 약할 때 강한 반응을 유도하는데 특히 필요한 제형, 예컨대 마이 크로입자, 나노입자, 지질 에멀전 또는 유사한 제형 내에서 또는 다른 아주반트와 함께 제형화되거나 공동-투여

될 때 훨씬 더 큰 아주반트 활성을 나타낸다. 그들은 또한 면역 반응을 가속화하고, 일부 실험에서 CpG가 없는 전체 용량 백신에 필적할만한 항체 반응으로 항원 용량을 두 자릿수만큼 감소시킬 수 있었다 (Krieg, Nature Reviews, Drug Discovery, 5:471-484, 2006). 미국 특허 번호 6,406,705에는 항원-특이적 면역 반응을 유도하기 위해 CpG 올리고뉴클레오타이드, 비-핵산 아주반트 및 항원을 조합하여 사용하는 것이 기재되어 있다. 상업적으로 입수가능한 CpG TLR9 길항제는 몰로겐 (Mologen; 독일 베를린)의 dSLIM (이중 줄기 루프 면역조정제)이다. 다른 TLR 결합 분자, 예컨대 RNA 결합 TLR 7, TLR 8 및/또는 TLR 9가 또한 사용될 수 있다.

[0081] 크산테는 유도체, 예컨대 예를 들어, 바디메잔 또는 AsA404 (5,6-디메틸아크산테논-4-아세트산 (DMXAA)로서 공지되기도 함)가 또한 본 개시내용의 실시양태에 따른 아주반트로서 사용될 수 있다. 대안적으로, 이러한 유도체는 또한, 예를 들어, 전신 또는 종양내 전달을 통해 본 개시내용의 백신과 병행하여 투여되어 종양 부위에서 면역을 자극할 수 있다. 이론에 얽매어는 것은 아니지만, 그러한 크산테는 유도체는 인터페론 (IFN) 유전자 ISTING 수용체의 자극제를 통해 IFN 생산을 자극함으로써 작용하는 것으로 여겨진다 (예를 들어, 문헌 [Conlon et al., J Immunology, 190:5216-5225, 2013; 및 Kim et al., ACS Chem Biol, 8:1396-1401, 2013] 참조). 유용한 아주반트의 다른 예는 치료적으로 작용하고/거나 아주반트로서 작용할 수 있는, 화학적으로 변형된 CpG (예를 들어, CpR, Idera), 폴리 I:C (예를 들어, 폴리i:CI2U), 비-CpG 박테리아 DNA 또는 RNA 뿐만 아니라 면역활성 소분자 및 항체, 예컨대 시클로포스파미드, 수니티닙, 베바시주맙, 셀레브렉스(Celebrex)TM, NCX-4016, 실테나필, 타달라필, 바르데나필, 소라피닙, XL-999, CP-547632, 파조파닙, ZD2171, AZD2171, 이필리무맙, 트레멜리무맙, 및 SC58175를 포함한다. 본 개시내용의 문맥에서 유용한 아주반트 및 부가제의 양 및 농도는 과도한 실험 없이 숙련된 기술자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 부가의 아주반트는 콜로니-자극 인자, 예컨대 과립구 대식세포 콜로니 자극 인자 [GM-CSF, 사르그라마스탐(sargramostim)]를 포함한다.

[0082] 일부 실시양태에서, 아주반트는 폴리-ICLC를 포함한다. 폴리-ICLC는 폴리-리신과 카르복시메틸셀룰로스를 부가하여 혈청 뉴클레아제에 의한 열변성 및 가수분해에 대해 안정화된, 평균 길이 5000개 뉴클레오타이드의 폴리I 및 폴리C 가닥을 포함하여 합성적으로 제조된 이중 가닥 RNA이다. 이러한 화합물은 PAMP 패밀리의 두 구성원인 TLR3 및 MDA5의 RNA 헬리카제-도메인을 활성화시켜, DC 및 자연 살해 (NK) 세포 활성화 및 유형 I 인터페론, 시토카인 및 케모카인의 "자연 혼합물"의 생산을 초래한다. 더욱이, 폴리-ICLC는 2개의 IFN 유도성 핵 효소 시스템인 2' 5'-OAS 및 PKR (4-6)로서 공지되기도 한 PI/eIF2a 키나제 뿐만 아니라 RIG-I 헬리카제 및 MDA5에 의해 매개되는 보다 직접적이고 광범위한 숙주-표적화된 항감염 효과 및 가능하게는 항종양 효과를 발휘한다.

[0083] 면역원성 구축물과 연합될 수 있는 면역학적 아주반트의 예는 TLR 리간드, C-유형 렉틴 수용체 리간드, NOD-유사 수용체 리간드, RLR 리간드, 및 RAGE 리간드를 포함한다. TLR 리간드는 리포폴리사카라이드 (LPS) 및 그의 유도체 뿐만 아니라 지질 A 및 모노포스포릴 지질 A (MPL), 글리코피라노실 지질 A, PET-지질 A, 및 3-O-테사실-4'-모노포스포릴 지질 A를 포함한 그의 유도체를 포함할 수 있다. 구체적인 실시양태에서, 면역학적 아주반트는 MPL이다. 또 다른 실시양태에서, 면역학적 아주반트는 LPS이다. TLR 리간드는 또한 TLR3 리간드 (예를 들어, 폴리이노신산-폴리시티딜산 (폴리 I:C)), TLR7 리간드 (예를 들어, 이미퀴모드 및 레시퀴모드), 및 TLR9 리간드를 포함할 수 있다.

[0084] VI. 항원 및 항원 생산 작용제

[0085] 본원에 제공된 면역원성 구축물은 적어도 하나의 항원 또는 항원 생산 작용제를 포함하며; 예시적인 구축물은 적어도 하나의 항원 및 적어도 하나의 항원 생산 작용제 둘 다를 포함한다. 면역원성 구축물이 하나 초과인 항원 및/또는 항원 생산 작용제를 함유하는 실시양태에서, 이들 항원은 상이한 감염체에 상응할 수 있고/이로부터 유래될 수 있거나 동일한 감염체에 상응할 수 있고/이로부터 유래될 수 있다. 항원 또는 항원 생산 작용제는 항원이 상응하는 감염체에 대한 면역 반응을 유도할 수 있는 경우 - 예를 들어, 항원 (또는 항원 생산 작용제) 이 실험실에서 합성, 조작, 재조합 및/또는 생산되는 경우, 또는 감염체 자체로부터 분리 또는 추출되는 경우, 감염체"의" 것으로 또는 감염체"로부터"로 간주될 수 있다.

[0086] 항원 또는 항원 생산 작용제는 나노입자 내에 부분적으로 또는 완전히 함유되거나 또는 그렇지 않으면 수소 결합, 반 데르 발스 상호작용, 정전기적 상호작용, 소수성 상호작용 및 나노입자 상의 모이어티와의 화학적 접합을 포함한, 비공유 또는 공유 상호작용을 통해 나노입자, 양이온성 중합체 및/또는 안정화제와 연합될 수 있다. 화학적 접합은 티올-말레이미드, NHS 에스테르-아민, 아지드-알킨 및 기타 클릭 화학을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항원 또는 항원 생산 작용제는 티올화되고 티올-말레이미드 반응을 통해 말레이미드 기를 함유하는 안정화제와 접합된다 (국제 출원 번호 PCT/US2016/022655 참조). 일부 실시양태에서, 항원 또는 항원 생산 작용제는 나노입자와의 소수성 상호작용을 통해 양이온성 중합체 상에 로딩된다. 일부 실시양태에서, 항원 또는 항

원 생산 작용제는 양이온성 중합체 상에 정전기적으로 로딩된다. 항원 또는 항원 생산 작용제는 NP의 2 wt.%, 3 wt.%, 4 wt.%, 5 wt.%, 0.5-20 wt.%, 예를 들어, 1-15 wt.%, 1.5-10 wt.%, 1-6 wt.%, 또는 2-5 wt.%로 존재할 수 있다.

[0087] 항원은 신체에 의해 "이물질"로서 인식되어 결과적으로 신체의 면역 세포에 의해 항원-특이적 면역 반응을 유도하는 임의의 물질이다. 항원은 종종 신체의 항원-제시 세포 (예를 들어, 수지상 세포)에 의해 삼켜지고 항원-특이적 면역을 유도하기 위한 T 세포 및/또는 B 세포에 대한 주요 조직 적합성 복합체를 통해 제시되는 에피토프로 프로세싱된다. 면역 반응은 세포성 및/또는 체액성일 수 있다. 세포성 면역의 증가는 전형적으로 항원-특이적 T-세포 활성화의 증가, 증식, 및 항원을 인식하고 제거할 수 있는 T 세포의 증진된 능력으로 나타난다. 체액성 면역의 증가는 전형적으로 관심 항원을 인식하고 중화시킬 수 있는 항체를 생산하는 항원-특이적 B 세포 활성화 및 증식의 증가로 나타난다.

[0088] 항원의 한 범주는 관심 감염체 (표적)와 관련된 (또는 그로부터 유래된) 특이적 단백질에 상응하는 재조합 전장 단백질 또는 단백질 서브유닛이다. 예를 들어, 항원은 면역원성으로서 확인된 전장 SARS-CoV-2 스파이크 당단백질일 수 있다 (Grifoni et al. *Cell Host Microbe*. 2020; 27(4): 671-80; Ou et al. *Nat Commun*. 2020, 11(1): 1620; Walls et al. *Cell*. 2020; 181(2): 281-92). 또한, 항원은 SARS-CoV-2 뉴클레오키프 단백질, 막 단백질 등에 상응할 수 있다. 항원은 또한 단백질의 특이적 기능적 영역 (즉, 단백질 서브유닛 또는 단백질 도메인)에 상응할 수 있다. 예를 들어, 항원은 SARS-CoV-2 스파이크 당단백질의 S1, S2 또는 RBD 영역에 상응할 수 있다.

[0089] 항원(들)은 또한 관심 감염체 (표적 감염체) 내의 면역원성 서열에 상응하는 (그로부터 유래되는) 펩티드 (또는 여러 펩티드)일 수 있다. 펩티드는 다양한 면역 반응을 유도할 수 있는 에피토프 역할을 한다. 항원은 생물정보학적 접근 방식, 및/또는 면역 세포 자극에 연관된 실험 데이터에 의해 분석된 바와 같이, 예측된 면역원성을 기반으로 선택된 에피토프일 수 있다. 예를 들어, 펩티드는 세포성 및 체액성 면역원성 둘 다에서 예측되는 SARS-CoV-2 스파이크 당단백질의 위치 494-508 또는 1056-1070을 나타낼 수 있다 (Fast et al. *bioRxiv*. 2020: 2020.02.19.955484).

[0090] 여러 펩티드로 구성된 항원과 관련하여, 항원(들)은 전체 (또는 거의 전체) 단백질을 포괄하는 중복되는 (또는 비-중복되는) 펩티드의 카테일일 수 있거나, 또는 단일 단백질 또는 2개 이상의 상이한 단백질 (하나 또는 상이한 표적 감염성 유기체를 표적화할 수 있음)의 면역원성 영역(들)에 상응하는 펩티드의 혼합물일 수 있다. 예를 들어, 항원(들)은 SARS-CoV-2 스파이크 단백질, 뉴클레오키프 단백질 및 막 단백질을 포함하는 펩티드의 혼합일 수 있다. 표 1에는 면역원성 기반 생물정보학적 예측 접근 방식, 예컨대 면역 에피토프 데이터베이스 및 분석 리소스 (IEDB) 및 디스코토프(Discotope) 2.0 예측 알고리즘, 뿐만 아니라 에피토프 반응의 관점에서 가장 명확히 규명된 코로나바이러스인 SARS-CoV-1과 높은 서열 유사성 (예를 들어, >90%, >80%, >70%, >60%, 또는 >50%)인 것으로 예측되는 SARS-CoV-2 T-세포 및/또는 B-세포 에피토프의 예가 제시되어 있다 (Grifoni et al. *Cell Host Microbe*. 2020; 27(4): 671-80; Fast et al. *bioRxiv*. 2020: 2020.02.19.955484).

[0091] 표 1:

유전자	서열	위치	SEQ ID NO
스파이크 (S)	KLPDFTGCV	424-433	1
	SQSIHAYTMSLGAEN	689-703	2
	IPNTFTISVTTEILP	714-728	3
	FGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIG	888-909	4
	APHGVVFLHVTYVPA	1056-1070	5
뉴클레오키프 (N)	ATKAYNVTQAFGRRG	267-281	6
막 (M)	IASFRLFARTRSMWS	97-111	7
외피 (E)	VKPSFYVYSRVKNLN	52-66	8

[0092]

[0093] 예측된 면역원성 에피토프에 대한 다른 예는 문헌 (Prachar et al. *bioRxiv*. 2020: 2020.03.20.000794; Chour et al. *medRxiv*. 2020; 2020.05.04.20085779) 및 SARS-CoV-2 항원 공급업체의 웹사이트 [예를 들어, 시노 바이오로지컬(Sino Biological), 크리에이티브 다이아그노스틱스(Creative Diagnostics), 센게닉스(Sengenics), AB 클로날 테크놀로지(ABclonal Technology)]에서 찾을 수 있다. MHC 결합 능력을 기반으로 면역원성 영역을 확인하기 위한 예측 도구가 또한 널리 이용가능하다.

[0094] 다양한 실시양태에서, 항원 생산 작용제는 표적 감염체에 상응하거나 이에 특이적인 특이적 단백질 또는 펩티드를 코딩하는 핵산, 예컨대 mRNA 또는 pDNA이다. 일단 대상체에게 투여되면, mRNA 또는 pDNA는 궁극적으로 세포

성 및 체액성 면역 반응을 활성화시킬 수 있는 원하는 단백질로 발현 (mRNA의 경우 번역 또는 pDNA의 경우 전사/번역)되는 세포의 세포질로 유입된다. 항원 코딩 서열은 특이적 단백질 또는 단백질 서브유닛을 코딩하는 임의의 서열일 수 있으며; 예를 들어, SARS-CoV-2 스파이크 단백질, 스파이크 RBD 도메인, 스파이크 S1 도메인 등을 코딩하는 mRNA 또는 pDNA이다. 효능, 안정성 및 단백질 수율을 증가시키기 위해, mRNA 또는 pDNA는 코돈 최적화, 변형된 뉴클레오타이드의 사용, 폴리아데닐화 등의 대상이 될 수 있다. 예를 들어, 5' UTR 및 3' UTR의 설계는 mRNA 안정성, 번역, 단백질 생산 및 구조에 중요하며; 관심 mRNA를 기반으로 5' UTR 및 3' UTR의 설계를 최적화하는 여러 온라인 도구가 있다. 효과적인 항원 발현을 위해, mRNA는 하기를 포함하도록 합성될 것이다: 5' 캡 - 5' 비번역 영역 (UTR) - 항원 코딩 서열 - 3' 비번역 영역 (UTR) - 폴리 A 꼬리. mRNA는 또한 비-변형될 수 있거나, 뉴클레오타이드 변형될 수 있거나, 또는 자기 증폭될 수 있다. 예를 들어, 변형된 우리딘 또는 변형된 시티딘의 혼입은 선천적 면역 분자에 의한 조기 인식을 피하고 번역 효율을 개선시키기 위해 수행될 수 있다.

[0095] 적합한 부가의 표적 항원은 관련 기술분야에 공지되어 있으며 (예를 들어, 문헌 [Pati et al., *Front Immunol.* 9:2224, 2018 (16 pages)] 및 그 내부에 인용된 참고문헌), 상업적으로 정부 및 과학 출처로부터 입수가 가능하다. 부가의 예시적 항원이 하기에 제공된다.

[0096] **예시적인 바이러스 항원:** 바이러스 항원은 하기 바이러스 과 중 임의의 것으로부터의 바이러스를 포함하나 그에 제한되지는 않는 임의의 바이러스로부터 단리될 수 있다: 아데노바이러스, 아레나바이러스과, 아르테리아바이러스, 아스트로바이러스과, 배큘로바이러스과, 배드나바이러스, 바르나바이러스과, 비르나바이러스과, 브로모바이러스과, 분야바이러스과, 칼리시바이러스과, 카필로바이러스, 칼라바이러스, 콜리모바이러스, 썬코바이러스과, 클로스테로바이러스, 코모바이러스과, 코로나바이러스과 (예를 들어, 코로나바이러스, 예컨대 COVID-19를 포함한, 중증 급성 호흡기 증후군 (SARS) 바이러스), 코르티코바이러스과, 시스토바이러스과, 델타 바이러스, 디안토바이러스, 에나모바이러스, 필로바이러스과 (예를 들어, 마르부르그 바이러스 및 에볼라 바이러스 (예를 들어, 자이르, 레스틴, 코트디부아르, 또는 수단 변종)), 플라비바이러스과 (예를 들어, C형 간염 바이러스, 뎅기열 바이러스 1, 뎅기열 바이러스 2, 뎅기열 바이러스 3, 및 뎅기열 바이러스 4), 한타바이러스과 (예를 들어, 한타바이러스), 헤파드나바이러스과, 헤르페스바이러스과 (예를 들어, 인간 헤르페스바이러스 1, 3, 4, 5, 및 6, 및 시토메갈로바이러스), 히포바이러스과, 이리도바이러스과, 레비바이러스과, 리포트릭스바이러스과, 마이크로바이러스과, 오르소믹소바이러스과 (예를 들어, 인플루엔자 바이러스 A 및 B 및 C), 유두종 바이러스과 (인간 유두종 바이러스 (HPV) 및 동물 유두종 바이러스 둘 다 포함), 파포바이러스과, 파라믹소바이러스과 (예를 들어, 홍역, 유행성 이하선염 및 인간 호흡기 세포융합 바이러스), 파르보바이러스과, 피코르나바이러스과 (예를 들어, 폴리오바이러스, 리노바이러스, 헤파토바이러스 및 아프토바이러스), 폭스바이러스과 (예를 들어, 백시니아 및 천연두 바이러스), 레오바이러스과 (예를 들어, 로타바이러스), 레트로바이러스과 (예를 들어, 렌티바이러스, 예컨대 인간 면역결핍 바이러스 (HIV) 1 및 HIV 2), 랩도바이러스과 (예를 들어, 광견병 바이러스, 홍역 바이러스, 호흡기 세포융합 바이러스 등), 로타바이러스과 (예를 들어, 로타바이러스 A-J), 토가바이러스과 (예를 들어, 풍진 바이러스, 뎅기열 바이러스 등), 헤면형 바이러스, 및 토티바이러스과. 적합한 바이러스 항원은 또한 뎅기열 단백질 M 또는 단백질 E, 뎅기열 DINS1, 뎅기열 DINS2 및 뎅기열 DINS3의 전체 또는 일부를 포함한다.

[0097] 바이러스 항원은 특정한 균주, 예컨대 유두종 바이러스, 헤르페스 바이러스, 예를 들어, 단순 헤르페스 1 및 2; 간염 바이러스, 예를 들어, A형 간염 바이러스 (HAV), B형 간염 바이러스 (HBV), C형 간염 바이러스 (HCV), 델타 D형 간염 바이러스 (HDV), E형 간염 바이러스 (HEV) 및 G형 간염 바이러스 (HGV), 진드기 매개 뇌염 바이러스; 파라인플루엔자, 수두-대상포진, 시토메갈로바이러스, 엡스타인-바르, 로타바이러스, 리노바이러스, 아데노 바이러스, 콕사키바이러스, 말 뇌염, 일본 뇌염, 황열, 리프트 밸리열, 및 림프구성 맥락수막염으로부터 유래될 수 있다. 부가의 실시양태에서, 바이러스 항원 마커는 CMV, 감기 바이러스, 엡스타인-바르, 독감 바이러스, A형, B형 및 C형 간염 바이러스, 단순 헤르페스, HIV, 인플루엔자, 일본 뇌염, 홍역, 소아마비, 광견병, 호흡기 세포융합, 풍진, 천연두, 수두 대상 포진 또는 웨스트 나일 바이러스에 의해 발현된 펩티드를 포함한다.

[0098] 추가의 특정한 예로서, 시토메갈로바이러스 항원은 외피 당단백질 B 및 CMV pp65를 포함하고; 엡스타인-바르 항원은 EBV EBNA1, EBV P18 및 EBV P23을 포함하며; 간염 항원은 HBV의 S, M 및 L 단백질, HBV의 프리-S 항원, HBCAG DELTA, HBV HBE, C형 간염 바이러스 RNA, HCV NS3 및 HCV NS4를 포함하고; 단순 헤르페스 바이러스 항원은 즉시 초기 단백질 및 당단백질 D를 포함하며; HIV 항원은 gag, pol, 및 env 유전자의 유전자 산물, 예컨대 HIV gp32, HIV gp41, HIV gp120, HIV gp160, HIV P17/24, HIV P24, HIV P55 GAG, HIV P66 POL, HIV TAT, HIV GP36, Nef 단백질 및 역전사효소를 포함하고; 인플루엔자 항원은 헤마글루티닌 및 뉴라미니다제를 포함하며; 일

본 뇌염 바이러스 항원은 단백질 E, M-E, M-E-NS1, NS1, NS1-NS2A 및 80% E를 포함하고; 홍역 항원은 홍역 바이러스 융합 단백질을 포함하며; 광견병 항원은 광견병 당단백질 및 광견병 핵단백질을 포함하고; 호흡기 세포 융합 바이러스 항원은 RSV 융합 단백질 및 M2 단백질을 포함하며; 로타바이러스 항원은 VP7sc를 포함하고; 풍진 항원은 단백질 E1 및 E2를 포함하며; 수두 대상포진 바이러스 항원은 gpI 및 gpII를 포함한다. 부가의 특정한 예시적인 바이러스 항원 서열은 Nef (66-97); Nef (116-145); Gag p17 (17-35); Gag p17-p24 (253-284); 및 Pol 325-355 (RT 158-188)을 포함한다. 바이러스 항원의 부가의 예에 대해서는 문헌 [Fundamental Virology, Second Edition, eds. Fields, B. N. and Knipe, D. M. (Raven Press, New York, 1991)]을 참조한다.

[0099] **예시적인 박테리아 항원:** 박테리아 항원은 악티노미세스, 아나바에나, 바실루스, 박테로이데스, 브렐로비브리오, 보르데텔라, 보렐리아, 캄필로박터, 카울로박터, 클라미디아, 클로로비움, 크로마티움, 클로스트리디움, 코리네박테리움, 시토파가, 데이노코쿠스, 에스케리키아, 프란시셀라, 할로박테리움, 헬리오박터, 헤모필루스, 헤모필루스 인플루엔자 유형 B (HIB), 히포마이코로비움, 레지오넬라, 랩토스피라증, 리스테리아, 메닝고코쿠스 A, B 및 C, 메타노박테리움, 마이크로코쿠스, 미코박테리움, 미코플라스마, 믹소코쿠스, 네이세리아, 니트로박터, 오실라토리아, 프로클로론, 프로테우스, 슈도모나스, 로도스피릴럼, 리케치아, 살모넬라, 시겔라, 스피릴럼, 스피로카에타, 스태필로코쿠스, 스트렙토코쿠스, 스트렙토미세스, 술폴로부스, 써모플라즈마, 티오바실루스, 및 트레포네마, 비브리오, 및 예르시니아를 포함한 임의의 박테리움으로부터 유래될 수 있다. 박테리아를 표적화하는 항원은, 예를 들어, 탄저병, 그람-음성 바실루스, 클라미디아, 디프테리아, 헬리코박터 필로리(*Helicobacter pylori*), 미코박테리움 투베르쿨로시스(*Mycobacterium tuberculosis*), 백일해 독소, 뉴모코쿠스, 리케치아, 스태필로코쿠스, 스트렙토코쿠스 및 파상풍으로부터 유래될 수 있다.

[0100] 그에 대항하여 본 발명의 대상인 면역원성 구조물 및 방법이 사용될 수 있는 박테리아성 감염은 그람-음성 및 그람-양성 박테리아 둘 다를 포함한다. 그람-양성 박테리아의 예는 파스테우렐라(*Pasteurella*) 종, 스태필로코쿠스(*Staphylococcus*) 종, 및 스트렙토코쿠스(*Streptococcus*) 종을 포함한다. 그람-음성 박테리아의 예는 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*), 슈도모나스(*Pseudomonas*) 종, 및 살모넬라(*Salmonella*) 종을 포함한다.

[0101] 감염성 박테리아의 구체적 예는 악티노미세스 이스라엘리이(*Actinomyces israelii*), 바실루스 안트라시스(*Bacillus anthracis*), 박테로이데스(*Bacteroides*) 종, 보렐리아 부르그도르페리(*Borrelia burgdorferi*), 병원성 캄필로박터(*Campylobacter*) 종, 클로스트리디움 페르프린젠스(*Clostridium perfringens*), 클로스트리디움 테타니(*Clostridium tetani*), 코리네박테리움 디프테리아에(*Corynebacterium diphtheriae*), 코리네박테리움 종, 엔테로코쿠스(*Enterococcus*) 종, 엔테로박터 아에로게네스(*Enterobacter aerogenes*), 에리시펠로트릭스 루시오파티에(*Erysipelothrix rhusiopathie*), 에스케리키아 콜라이, 푸소박테리움 뉴클레아툼(*Fusobacterium nucleatum*), 헤모필루스 인플루엔자에(*Haemophilus influenzae*), 헬리코박터 필로리, 클렙시엘라 뉴모니아에(*Klebsiella pneumoniae*), 레지오넬라 뉴모필리아(*Legionella pneumophila*), 랩토스피라(*Leptospira*), 리스테리아 모노시토게네스(*Listeria monocytogenes*), 미코박테리아(*Mycobacteria*) 종 [예를 들어 엠. 투베르쿨로시스(*M. tuberculosis*), 엠. 아비움(*M. avium*), 엠. 인트라셀룰라레(*M. intracellulare*), 엠. 칸사이이(*M. kansasii*), 엠. 고르도나에(*M. gordonae*)], 네이세리아 고노르호아에(*Neisseria gonorrhoeae*), 네이세리아 메닝기티디스(*Neisseria meningitidis*), 파스테우렐라 물토시다(*Pasteurella multocida*), 리케치아(*Rickettsia*), 시겔라 플렉스네리이(*Shigella flexnerii*), 시겔라 디센테리아에(*Shigella dysenteriae*), 스태필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 스트렙토코쿠스 피오케네스(*Streptococcus pyogenes*) (군 A 스트렙토코쿠스), 스트렙토코쿠스 아갈락티아에(*Streptococcus agalactiae*) (군 B 스트렙토코쿠스), 스트렙토코쿠스 (비리단스 군), 스트렙토코쿠스 파에칼리스(*Streptococcus faecalis*), 스트렙토코쿠스 보비스(*Streptococcus bovis*), 스트렙토코쿠스 (혐기성 종), 스트렙토코쿠스 뉴모니아에(*Streptococcus pneumoniae*), 스트렙토바실루스 모닐리포르미스(*Streptobacillus moniliformis*), 트레포네마 팔리둠(*Treponema pallidum*), 및 트레포네마 페르테누에(*Treponema pertenuae*), 비브리오 콜레라에(*Vibrio cholerae*)를 포함한다.

[0102] 박테리아 항원의 특정한 예로서, 탄저병 항원은 탄저병 보호 항원을 포함하며; 그람-음성 바실루스 항원은 리포폴리사카라이드를 포함하며; 디프테리아 항원은 디프테리아 독소를 포함하며; 미코박테리움 투베르쿨로시스 항원은 미콜산, 열 충격 단백질 65 (HSP65), 30 kDa 주요 분비 단백질 및 항원 85A을 포함하며; 백일해 독소 항원은 헤마글루티닌, 퍼타틴, FIM2, FIM3 및 아데닐레이트 시클라제를 포함하며; 폐렴구균 항원은 뉴몰리신 및 폐렴구균 피막 폴리사카라이드를 포함하며; 리케치아 항원은 rompA를 포함하며; 스트렙토코쿠스 항원은 M 단백질을 포함하며; 파상풍 항원은 파상풍 독소를 포함한다.

[0103] **예시적인 기생충 항원:** 기생충 항원은 임의의 기생충, 예컨대 바베시아 마이크로티(*Babesia microti*), 바베시아 디베르간스(*Babesia divergens*), 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*), 칸디다 트로피칼리스(*Candida*

tropicalis), 클라미디아 프시타시(*Chlamydia psittaci*), 클라미디아 트라코마티스(*Chlamydia trachomatis*), 크립토크쿠스 네오포르만스(*Cryptococcus neoformans*), 엔타모에바 히스토리티카(*Entamoeba histolytica*), 지아르디아 람블리아(*Giardia lamblia*), 히스토플라스마 캡슐라툼(*Histoplasma capsulatum*), 레이슈마니아 트로피카(*Leishmania tropica*), 레이슈마니아(*Leishmania*) 종, 레이슈마니아 브라질리엔시스(*Leishmania braziliensis*), 레이슈마니아 도노반니(*Leishmania donovani*), 미코플라스마 뉴모니아에(*Mycoplasma pneumoniae*), 노카르디아 아스테로이데스(*Nocardia asteroides*), 플라스모디움 팔시파룸(*Plasmodium falciparum*), 플라스모디움 말라리아에(*Plasmodium malariae*), 플라스모디움 오발레(*Plasmodium ovale*), 플라스모디움 비박스(*Plasmodium vivax*), 리케치아 리케치이(*Rickettsia rickettsii*), 리케치아 티피(*Rickettsia typhi*), 스킴스토소마 만소니(*Schistosoma mansoni*), 톡소플라스마 곤디이(*Toxoplasma gondii*), 트리코모나스 바지날리스(*Trichomonas vaginalis*), 트리파노소마 브루세이(*Trypanosoma brucei*), 트리파노소마 크루지(*Trypanosoma cruzi*), 트리파노소마 감비엔세(*Trypanosoma gambiense*), 트리파노소마 로데시엔세(*Trypanosoma rhodesiense*) (아프리카 수면병), 트리파노소마 크루지 (차구스병), 백선 (버짐), 편형동물 및 회충으로부터의 항원으로부터 수득될 수 있다. 기생충은 연충 유기체이거나, 또는 구충증/구충, 고래회충유충증, 회충-기생충성 폐렴, 회충-아프리카너구리회충증, 촌충-촌충 감염, 간흡충증, 디옥토피페 레날리스(*Dioctophyme renalis*) 감염, 열두조충증-촌충, 기니아 벌레-드라쿤쿨리아증, 포충증-촌충, 요충-요충증, 간흡충-간질증, 비대흡충증-장 흡충, 턱구충증, 왜소조충증, 로아 사상충증, 칼라바르 부기, 만소넬라증, 사상충증, 요코가와흡충증-장 흡충, 회선사상충증, 중국 간 흡충, 폐흡충증, 폐 흡충, 주혈흡충증-빌하르츠 주혈 흡충증, 주혈흡충증 또는 달팽이 열 (모든 유형), 장 주혈흡충증, 요로 주혈흡충증, 일본 주혈흡충에 의한 주혈흡충증, 아시아 장 주혈흡충증, 스파르가눔증, 분선충증-기생충성 폐렴, 소 촌충, 돼지 촌충, 개회충증, 선모충증, 주혈흡충성 피부염, 편충 및 상피병 림프 사상충증을 포함하나 이에 제한되지 않는 질환을 유발하는 벌레 또는 유기체일 수 있다. 기생충은 기생충 벌레, 할조운 증후군, 구더기증, 모래벼룩, 인간 쇠파리 및 흡혈매기를 포함하는 질환을 유발하는 유기체 또는 유기체들일 수 있다. 기생충은 빈대, 머릿니-술증, 몸이-술증, 사면발이-술증, 모낭충-모낭충증, 옴, 나선구더기 및 코클리옴리아를 포함하는 질환을 유발하는 체외 기생충 또는 유기체일 수 있다.

[0104] 항원은 스포로조안(*Sporozoan*) 항원, 플라스모디움(*Plasmodium*) 항원, 예컨대 포자소체 단백질, 스포로조이트(*Sporozoite*) 표면 단백질, 간 단계 항원, 정단 막 연관된 단백질, 또는 메로조이트(*Merozoite*) 표면 단백질의 전체 또는 일부를 포함한다. 히스토플라스마 항원은 열 충격 단백질 60 (HSP60)을 포함하고; 레이슈마니아 항원은 gp63 및 리포포스포글리칸을 포함하며; 플라스모디움 팔시파룸(*plasmodium falciparum*) 항원은 메로조이트 표면 항원, 스포로조이트 표면 항원, 포자소체 항원, 생식모세포/생식세포 표면 항원, 혈액 단계 항원 pf 155/RESA를 포함한 원충 및 기타 기생충 항원을 포함하고; 주혈흡충 항원은 글루타티온-S-트랜스퍼라제 및 파라미오신을 포함하며; 톡소플라스마 항원은 SAG-1 및 p30을 포함하고; 트리파노소마 크루지 항원은 75-77 kDa 항원 및 56 kDa 항원을 포함하며; 백선증 항원은 트리코피틴을 포함한다.

[0105] **예시적인 진균 항원:** 진균 병원체의 예는 아스페르길루스(*Aspergillus*) 종, 블라스토미세스 데르마티티디스(*Blastomyces dermatitidis*), 콕시디오이데스 이미티스(*Coccidioides immitis*), 크립토크쿠스 네오포르만스, 칸디다 알비칸스 및 기타 칸디다(*Candida*) 종, 클라미디아 트라코마티스, 히스토플라스마 캡슐라툼, 클라미디아 트라코마티스, 노카르디아(*Nocardia*) 종 및 뉴모시티스 카리니이(*Pneumocystis carinii*)를 포함한다. 진균을 표적화하는 항원은, 예를 들어, 칸디다, 콕시디오이데스, 크립토크쿠스 및 히스토플라스마로부터 유래될 수 있다. 진균 항원의 특정한 예로서, 콕시디오이데스 항원은 소구 항원을 포함하며; 크립토크쿠스 항원은 피막 폴리사카라이드를 포함한다.

[0106] 상기 언급된 바와 같이, 박테리아, 바이러스, 진균 및 기생충으로부터의 항원은 본 개시내용의 백신으로 제형화될 수 있고 본 개시내용의 방법에 따라 투여될 수 있다. 항원의 비-제한적 예는 동물, 예컨대 하기 동물을 감염시키는 감염체를 형성하는 항원을 포함한다:

[0107] **돼지:** 에리시켈로트릭스 루시오파티에, 악티노바실루스 플레우로뉴모니아에(*Actinobacillus pleuropneumoniae*), 미코플라스마 히오뉴모니아에(*Mycoplasma hyopneumoniae*), 이. 콜라이(*E. coli*) K88, K99, F41 및 987P, 클로스트리디움 페르프린젠스 유형 c, 살모넬라 콜레라에슬스(*Salmonella choleraesuls*), 파스테우렐라 물토시다, 보르테텔라 브론키셉티카(*Bordetella bronchiseptica*), 렘토스피라 브라티슬라바(*Leptospira bratislava*), 렘토스피라 카니콜라(*Leptospira canicola*), 렘토스피라 그립포티포사(*Leptospira grippotyphosa*), 렘토스피라 하르드조(*Leptospira hardjo*), 렘토스피라 프로모나(*Leptospira promona*), 렘토스피라 익테로(*Leptospira ictero*), 돼지 인플루엔자 바이러스, 썬코바이러스, 돼지 생식기 및 호흡기 증후군 바이러스 (PRRSV), 돼지 두

창, 로타바이러스, 돼지 호흡기 코로나바이러스, 파보 바이러스, 가성광견병, 전염성 위장염 인자.

[0108] **말:** 스트렙토코쿠스 에퀴(*Streptococcus equi*), 클로스트리디움 테타니, 말 인플루엔자 바이러스 A1 및 A2 균주, 말 비페렘 유형 1, 1b 및 4, 동부 말 뇌척수염, 서부 말 뇌척수염, 베네수엘라 말 뇌척수염, 말 로타바이러스, 말 헤르페스바이러스, 말 감염성 빈혈 바이러스, 서부 나일 바이러스, 칸디다 알비칸스, 아스페르길루스, 콕시디오이데스 이미티스, 크립토코쿠스 네오포르만스, 히스토플라즈마 파르시미노숨(*Histoplasma farciminosum*).

[0109] **소:** 이. 콜라이 0157:H7, 파스테우렐라 물토시다, 파스테우렐라 헤몰리티카, 랩토스피라 카니콜라, 랩토스피라 그립포티포사, 랩토스피라 하르드조, 랩토스피라 프로모나, 랩토스피라 익테로, 클로스트리디움 페르프린젠스 유형 C, 클로스트리디움 페르프린젠스 유형 D, 클로스트리디움 차우보에이(*Clostridium chauvoei*), 클로스트리디움 노비(*Clostridium novyi*), 클로스트리디움 셉티쿰(*Clostridium septicum*), 클로스트리디움 테타누스, 클로스트리디움 헤몰리티쿰(*Clostridium haemolyticum*), 클로스트리디움 소르델리이(*Clostridium sordellii*), 살모넬라 더블린(*Salmonella dublin*) 및 티피뮤리움(*typhimurium*), 소 로타바이러스, 소 코로나바이러스, 소 비기관지염, 소 설사 바이러스, 파라인플루엔자-3, 호흡기 세포융합 바이러스, 트리코피톤 베루코숨(*Trichophyton verrucosum*).

[0110] **가금류:** 살모넬라 티피뮤리움, 세르풀리나 필로시콜리(*Serpulina pilosicoli*), 마렉병 바이러스, 감염성 윤활낭 병, 감염성 기관지염, 뉴캐슬병 바이러스, 레오 바이러스, 칠면조 비기관지염, 콕시디아증.

[0111] **개:** 랩토스피라 카니콜라, 랩토스피라 그립포티포사, 랩토스피라 하르드조, 랩토스피라 프로모나, 랩토스피라 익테로, 개 보렐리아 부르그도르페리, 개 에를리히아 카니스(*Ehrlichia canis*), 개 보르데텔라 브론키셉티카, 개 지아르디아 람블리아, 개 디스토퍼, 개 아데노바이러스, 개 코로나바이러스, 개 파라인플루엔자, 개 파보바이러스, 개 광견병, 벼룩, 편모충, 폐선충, 안실로스토마 카니눔(*Ancylostoma caninum*), 운시나리아 스테노세팔라(*Uncinaria stenocephala*), 마이크로스포룸 카니스(*Microsporium canis*).

[0112] **고양이:** 고양이 감염성 복막염 바이러스, 고양이 비기관지염, 고양이 범백혈구감소증, 고양이 칼리시바이러스, 고양이 코로나바이러스, 고양이 알파헤르페스바이러스 1, 고양이 면역결핍 바이러스, 고양이 백혈병 바이러스, 광견병 리사바이러스, 보르데텔라, 바실루스, 바르토넬라, 부르코홀데리아, 클라미디아, 클로스트리디움, 코리네박테리움, 살모넬라, 프로테우스, 에스케리키아, 프로테우스, 모락셀라, 노카르디아, 헤모필루스, 파스테우렐라, 슈도모나스, 스타필로코쿠스, 스트렙토코쿠스, 마이크로스포룸 카니스, 난니지아 집스(*Nannizzia gyps*), 난니지아 풀바(*Nannizzia fulva*), 난니지아 나나(*Nannizzia nana*), 트리코피톤 멘타그로피테스(*Trichophyton mentagrophytes*), 트리코피톤 베루코숨, 안실로스토마 카니눔, 크립토스포리디움, 디로필라리아 이미티스(*Dirofilaria immitis*), 벼룩, 편모충, 이소스포라(*Isospora*) 종, 폐선충, 올라눌루스 트리쿠스피(*Ollanulus tricuspi*), 피살로프테라 히스피다(*Physaloptera hispida*), 사르코프테스 스카비에이(*Sarcoptes scabiei*), 촌충, 톡사스카리스 레오니나(*Toxascaris leonina*), 톡소카라 카티(*Toxocara cati*), 톡소플라스마 곤디이(*Toxoplasma gondii*), 운시나리아 스테노세팔라 및 편충.

[0113] VII. 올리고뉴클레오티드

[0114] 일부 실시양태에서, 면역원성 구축물은 하나 이상의 올리고뉴클레오티드, 예를 들어, siRNA, miRNA, miRNA 모방체 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 올리고뉴클레오티드는 임의의 수단에 의해 부착될 수 있다. 일부 실시양태에서, 음으로 하전된 siRNA는 정전기적 상호작용을 사용하여 나노입자, 예를 들어, MSNP 상의 양으로 하전된 양이온성 중합체에 부착된다. 올리고뉴클레오티드는 세포 내에서 발현된 하나 이상의 유전자, 예를 들어, 항원-제시 세포 (예를 들어, 수지상 세포)의 면역억제와 연관된 유전자를 억제하거나 하향조절하는 것, 예컨대 STAT3, PD-L1, IDO-1 및 IL-6을 표적화할 수 있다. 일부 실시양태에서, 단일 올리고뉴클레오티드는 복수개의 다양한 효능을 갖는 유전자를 표적화할 수 있다. 다른 실시양태에서, 복수개의 올리고뉴클레오티드는 단일 유전자를 표적화할 수 있다. 추가 실시양태에서, 복수개의 올리고뉴클레오티드는 복수개의 유전자를 표적화할 수 있다.

[0115] 올리고뉴클레오티드는 NP의 약 1 중량% 내지 10 중량%, 예를 들어, 약 2 중량% 내지 약 6 중량%로 존재할 수 있다. 일부 실시양태에서, 예를 들어, siRNA당 NP (NP/siRNA)는 결합 프로세스 동안 약 10:1 내지 약 100:1 범위의 중량비로 사용되어, 완전한 결합을 달성한다. 완전한 결합은 NP당 최대 40 wt.% siRNA를 달성할 수 있다.

[0116] 전형적으로, 올리고뉴클레오티드는 그의 상향조절이 항원-제시 세포 (예를 들어, 수지상 세포)의 면역억제의 일부 측면과 연관되는 유전자를 억제하거나 하향조절한다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 공개 서열 데이터베

이스에서 쉽게 입수가 가능한, 이들 표적에 대한 대표적인 서열에 접근하는 방법을 이해할 것이다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타드는 siRNA, 예컨대 STAT3, PD-L1, IDO-1, IL-6 등이다. 예시적인 siRNA가 표 2에 제시되어 있다.

표 2

명칭	대표적인 진뱅크 수탁 번호	siRNA 서열 SEQ ID NOs:
신호 전달자 및 전사 활성화제 3 (STAT3)	NM_003150.3; NM_139276.2; NM_213662.1; XM_005257616.3; XM_005257617.3; XM_011525145.2; XM_011525146.2; XM_017024972.1; XM_017024973.1; XM_017024974.1; XM_017024975.1; XM_017024976.1	9 및 10
프로그래밍된 사멸- 리간드 1 (PD-L1)	NM_001267706.1; NM_001314029.2; NM_014143.4; NR_052005.2	11-14
프로그래밍된 사멸- 리간드 2 (PD-L2)	NM_025239.4; XM_005251600.3; XP_005251657.1	15-18
인돌아민 2,3- 디옥시게나제 1 (IDO-1)	NM_002164.6; NG_028155.1	19-22
시토카인 신호전달의 억제제 1 (SOCS-1)	NM_003745.1; DQ086801.1; U88326.1; NP_003736.1	23-29
형질전환 성장 인자 배타 1 (TGF-β)	NM_000660.7; XM_011527242.2;	30 및 31
TGF 베타 수용체 1 (TGFR1)	NM_004612.4; NM_001130916.3; NM_001306210.2; XM_011518948.2; XP_011517250.1; XM_011518949.2; XP_011517251.1	32-36
TGF 베타 수용체 2 (TGFR2)	NM_003242.6; NM_001024847.2; XM_011534043.2; XP_011532345.1; XM_011534045.3; XP_011532347.1; XM_017007106.1; XP_016862595.1	37-40
인터류킨-10 (IL-10)	NG_012088.1; NM_000572.3; NM_001382624.1; NR_168466.1; NR_168467.1	41-45
인터류킨 10 수용체 서브유닛 알파 (IL- 10RA)	NM_001558.4; NR_026691.2; XM_024448493.1; XP_024304261.1	46 및 47
아르기나제-1 (ARG-1)	NG_007086.2; NM_000045.4; NM_001244438.2; NM_001369020.1; NR_160934.1	48-51
갈락틴-1 (LGALS1)	NM_002305.4; NP_002296.1	52-54
갈락틴-3 (LGALS3)	NG_017089.1; NM_001357678.2; NP_001344607.1; NM_002306.4; NP_002297.2; NR_003225.2	55-51
인터류킨-6 (IL-6)	NG_011640.1; NM_000600.5; NM_001318095.2; NP_001305024.1; NM_001371096.1; NP_001358025.1	62-66
T 세포 활성화 억제제를 함유하는 V-set 도메인 (VTCN-1)	NM_024626.4; NP_078902.2; NM_001253849.1; NP_001240778.1; NM_001253850.1; NP_001240779.1	67 및 68
유도성 산화질소 신타제 (iNOS, 또는 NOS2)	NG_011470.1; NM_000625.4; NP_000616.3	69-75
세마포린-4A (SEMA4A)	NM_022367.4; NM_001193300.2; NM_001193301.1; NM_001193302.1; NP_001180231.1; NM_001370567.1	
Bcl-2 상동 길항제 킬러 (BAK1)	NM_001188.4; NP_001179.1; XM_011514779.3; XP_011513081.1; XM_011514780.1; XP_011513082.1	76-78
Bcl-2-연관된 X 단백질 (BAX)	NM_138761.4; NP_620116.1; NM_004324.4; NP_004315.1; NM_138763.4; NP_620118.1; NM_138764.5; NP_620119.2; NM_001291428.2; NP_001278357.1	79-81

명칭	대표적인 진뱅크 수탁 번호	siRNA 서열 SEQ ID NOs:
Bcl-2-유사 단백질 11 (BIM, 또는 BCL2L11)	NM_138621.5; NP_619527.1; NM_006538.5; NP_006529.1; NM_138622.3; NP_619528.1; NM_138623.3; NP_619529.1; NM_138624.3; NP_619530.1	82-85, 91
(포스파타제 및 텐신 상동제) PTEN	NM_000314.8; NP_000305.3; NM_001304717.5; NP_001291646.4; NM_001304718.2; NP_001291647.1	86-89

VIII. 표적화제

일부 실시양태에서, 면역원성 구축물은, 예를 들어, 면역원성 구축물의 표적 부위로의 특이적 전달을 위한 표적 화제를 추가로 포함할 수 있다. 표적화제는 부위를 표적화하고 임의로 세포로의 내재화를 돕거나 유도하기 위해 사용될 수 있다.

- [0122] 예시적인 표적화제는 모노클로날 항체, 단일쇄 가변 단편(scFv) 항체, 항체의 다른 항원 결합 단편, 압타머, 작은 표적화 분자(예를 들어, 세포 표면 수용체, 예컨대 N-아세틸갈락토사민, 만노스, 트랜스페린 및 염산과 결합하는 리간드), 탄수화물, 및 세포 또는 조직, 예를 들어, 면역 세포, 예컨대 항원-제시 세포(예를 들어, 수지상 세포 또는 대식세포)에 대한 결합 친화성을 갖는 펩티드를 포함한다.
- [0123] 일부 실시양태에서, 표적화제는 면역 세포, 예컨대 항원-제시 세포(예를 들어, 수지상 세포 또는 대식세포)를 표적화한다. 표적화제는 면역 세포의 표면 상에 표시된 에피토프를 인식하고 그와 결합하는 모노클로날 또는 폴리클로날 항체 또는 그의 단편, 및 면역 세포 상의 세포 표면 수용체와 결합하는 리간드를 포함한다. 그러한 수용체 중 하나인 렉틴 DEC-205는 체액성(항체 기반) 및 세포성(CD8 T 세포) 반응을 2 내지 4배 증가시키기 위해 시험관내 및 마우스에서 사용되었다(Hawiger et al., *J. Exp. Med.*, 194(6):769-79, 2001; Bonifaz et al., *J. Exp. Med.*, 196(12):1627-38 2002; Bonifaz et al., *J. Exp. Med.*, 199(6):815-24, 2004). 이들 보고서에서, 항원은 항-DEC205 중쇄와 융합되었고 재조합 항체 분자가 면역화에 사용되었다.
- [0124] 만노스-특이적 렉틴(만노스 수용체) 및 IgG Fc 수용체를 비롯한 다양한 다른 세포내이입 수용체가 또한, 항원 제시 효율의 유사한 증진과 함께 이러한 방식으로 표적화되었다. 표적화될 수 있는 다른 적합한 수용체 및 표면 단백질은 DC-SIGN, 33D1, SIGLEC-H, DCIR, CD11c, CD40, DEC-205, 열 충격 단백질 수용체 및 스캐빈저 수용체를 포함한다. 이들 수용체에 대한 표적화 모이어티는 이들 수용체를 발현하는 면역 세포로의 우선적인 흡수를 위해 면역원성 구축물에 부착될 수 있다. 그 예는 높은 수준의 만노스 수용체를 갖는 대식세포 및 DC에 대한 표적화된 전달을 위해 면역원성 구축물 상에 부착된 만노스이다.
- [0125] 표적화될 수 있는 다른 수용체는 톨-유사 수용체(TLR)를 포함한다. TLR은 병원체-연관된 분자 패턴(PAMP)을 인식하고 그와 결합한다. PAMP는 수지상 세포의 표면 상의 TLR을 표적화하고 내부적으로 신호를 보냄으로써, 잠재적으로 DC 항원 흡수, 성숙 및 T 세포 자극 능력을 증가시킨다. 입자 표면과 접합되거나 또는 공동-캡슐화된 PAMP는 비메틸화된 CpG DNA(박테리아), 이중 가닥 RNA(바이러스), 리포폴리사카라이드(박테리아), 펩티도글리칸(박테리아), 리포아라비노만닌(박테리아), 자이모산(효모), 미코플라즈마 지단백질 예컨대 MALP-2(박테리아), 플라젤린(박테리아) 폴리(이노신산-시티딜산)(박테리아), 리포테이코산(박테리아) 또는 이미다조퀴놀린(합성)을 포함한다.
- [0126] 표적화제는 임의의 수단에 의해 면역원성 구축물에 부착될 수 있고, 적합한 접합 화학은 관련 기술분야에 공지되어 있으며 본원에 기재되어 있다. 일부 실시양태에서, 표적화제는 티올화되고 후속적으로 티올-말레이미드 반응을 통해 Mal-PEG-PEI-MSNP와 접합된다. 일부 실시양태에서, 표적화제는 NHS 에스테르와 아민의 반응에 의해 NP와 접합되기 전에 PEG 안정화제에 부착된다. 표적화제는 NP의 0.1 내지 10 wt.%, 예를 들어, 0.1 내지 1 wt.% 또는 1 내지 5 wt.%, 예를 들어, 항체의 경우 1 내지 10 wt.% 또는 scFV의 경우 0.1 내지 2 wt.%, 예를 들어, 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 또는 9 wt.%로 존재할 수 있다.
- [0127] **IX. 표지제**
- [0128] 일부 실시양태에서, 면역원성 구축물은, 예를 들어, 란타나이드, 형광 염료, 양자점, 방사성 추적자 또는 금 나노입자로 표지될 수 있다. 표지는 기계, 검출기, 센서, 장치, 칼럼, 또는 증진되거나 비증진된 인간의 눈이 표지된 조성물과 비표지된 조성물을 구별하는 것을 도와줄 수 있는 임의의 물질일 수 있다. 표지의 예는 방사성 동위원소(예를 들어, PET 추적자), 염료, 염색, 양자점, 금 나노입자, 효소, 비방사성 금속(예를 들어, MRI 조영제), 자석, 바이오틴, 단백질 태그, 임의의 항체 에피토프 또는 그의 임의의 조합을 포함한다. 예시적인 형광 염료는 FITC, RITC, CyTM 염료, 아민-반응성 딜라이트(Dylight®) 염료 및 아민-반응성 알렉사 플루오르(Alexa Fluor®) 염료를 포함한다. 일부 실시양태에서, 란타나이드는 공유 결합 또는 흡착에 의해 나노입자, 예를 들어, MSNP의 히드록실, 티올, 아민 또는 포스포네이트 기 상에 로딩될 수 있다. 란타나이드는, 예를 들어, 질량 분석법에 의해 높은 감도와 분해능으로 샘플 검출을 용이하게 할 수 있는 반면, 형광 염료는 형광 영상화 기술에 의해 샘플 정량화를 허용한다. 란타나이드 예컨대 가돌리늄을 함유하는 면역원성 구축물은 또한 질량 분석을 영상화하기 위한 MRI 조영제로서 작용할 수 있다.
- [0129] 일부 실시양태에서, 표지, 예컨대 형광 염료는, 예를 들어, 하나 이상의 나노입자 결합 아민과 형광 염료에 부착된 활성화된 에스테르 모이어티(예컨대 NHS 에스테르) 간의 친핵성 아실 치환을 통해 나노입자, 예를 들어, 아민-MSNP의 세공 내부에 로딩된다. 이러한 표지는 형광 영상화 기술을 사용하여 추적할 수 있는 면역원성 구축물을 생산한다. 이러한 표지는 양이온성 중합체 및/또는 안정화제의 로딩 전 또는 후에 추가될 수 있다(즉, 표지는 나노입자 또는 NP에 적용될 수 있음). 추가 실시양태에서, 표지는 임의의 적절한 수단에 의해 나노입자에 대한 부착 전 또는 후에 NP의 양이온성 중합체, 안정화제 또는 기타 성분(예를 들어, 올리고뉴클레오타이드)

에 부착될 수 있다.

[0130] **X. 면역원성 구축물 합성**

[0131] 성분들은 공유 및 정전기적 결합을 포함한 임의의 수단에 의해 나노입자 또는 NP 또는 면역원성 구축물의 다른 성분과 결합될 수 있다. 다양한 접합 화학이 관련 기술분야에 공지되어 있으며 본원에 기재되어 있다. 일부 실시양태에서, 성분 중 하나 이상은 나노입자 또는 NP의 표면과 결합된다. 다른 실시양태에서, 성분 중 하나 이상은 나노입자 (예를 들어, MSNP)의 세공 내에서 결합된다. 추가 실시양태에서, 성분 중 하나 이상은 서로 결합된다. 일부 실시양태에서, 아주반트 및/또는 항원 또는 항원 생산 작용제는 안정화제와 공유 결합된다. 안정화제는 (예를 들어, 아민을 통해) 양이온성 중합체와 공유 결합될 수 있고, 이어서 나노입자의 외부와 정전기적으로 결합될 수 있다. 일부 실시양태에서, 아주반트 및/또는 항원 또는 항원 생산 작용제는 화학적 접합, 정전기적 상호작용, 소수성 상호작용, 수소 결합 또는 반 데르 발스 상호작용을 통해 양이온성 중합체와 결합된다. 예를 들어, 항원 또는 항원 생산 작용제는 안정화제와 공유 결합될 수 있는 반면, 아주반트는 양이온성 중합체와 정전기적으로 또는 소수성으로 결합된다.

[0132] 나노입자가 세공을 갖는 일부 실시양태에서, 세공은 나노입자 (예를 들어, MSNP)의 외부 표면 상의 제1 위치에 제1 구멍을 가지며, 나노입자의 외부 표면 상의 제2 위치에 상이한 제2 구멍을 갖는다. 세공의 크기와 성분의 크기가 결합에 영향을 줄 것이지만, 성분은 세공 내부의 길이를 따라 어디든지 결합될 수 있다.

[0133] 나노입자, 예컨대 MSNP는 상업적으로 획득되거나 임의의 방법에 의해 생성될 수 있으나, 일부 실시양태에서 MSNP는 제1 계면활성제를 제2의 상이한 계면활성제와 조합하여 제1 혼합물을 형성하고, 제1 혼합물을 가열하며 실리카 전구체를 제1 혼합물에 부가하여 제2 혼합물을 형성하고, 일정 시간 동안 온도를 유지하여 MSNP를 생성하고, 원심분리에 의해 MSNP를 회수함으로써 형성된다. 계면활성제는 환류 조건에서 산성 용매 중에 MSNP를 혼합함으로써 제거될 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 혼합물은 실리카 전구체를 부가하기 전에 가열될 수 있다. 다른 실시양태에서, 제1 혼합물은 실온에 있을 수 있고 제2 혼합물은 가열될 수 있다. 그 결과로 생성된 MSNP는 다공성이 높은 균일하거나 또는 비-균일한 입자 크기를 가질 수 있다.

[0134] 예를 들어, 균일한 MSNP를 형성하기 위해, 세틸트리메틸암모늄 클로라이드 (CTAC)를 수 중에서 트리에탄올아민 (TEA)과 조합하고, 95℃로 가열하면서, 테트라에틸 오르소실리케이트를 부가할 수 있다. CTAC 양을 일정하게 유지하는 상태에서의 TEA 양의 변화는, 그 결과로 생성된 MSNP의 크기를 변경시키는데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, TEA의 양은 약 100 내지 약 600 μL , 약 200 내지 약 450 μL , 또는 약 200 내지 약 350 μL 이다. 일부 실시양태에서, TEA의 양은 0.1-1% v/v, 예를 들어, 0.35% v/v이다. 비-균일한 MSNP는 강한 염기, 예컨대 NaOH를 사용하여 생성될 수 있다. 예를 들어, 세틸트리메틸 암모늄 브로마이드 (CTAB)를 계면활성제로서 사용할 수 있고, NaOH를 염기 촉매로서 사용할 수 있다.

[0135] 산화철 나노입자는 구입하거나 [예를 들어, 페라헴(Feraheme)] 또는 합성할 수 있다. 금 및 은 나노입자는 공개된 다양한 프로토콜에 따라 합성하거나 또는 공급업체, 예컨대 시그마 알드리치(Sigma Aldrich), 나노크스(Nanocs), 나노컴포식스(nanoComposix)로부터 구입할 수 있다. 탄소 나노튜브는 공개된 다양한 프로토콜에 따라 합성하거나 또는 공급업체, 예컨대 시그마 알드리치, US 리서치 나노소재(US Research nanomaterial) 및 아메리칸 엘리먼트스(American Elements)로부터 구입할 수 있다.

[0136] 일부 실시양태에서, 예컨대 티올, 아민, 카르복실레이트, 또는 포스포네이트이나 이에 제한되지는 않는 작용기는 하나 이상의 시약, 예를 들어, 유기실란, 예컨대 (3-아미노프로필)트리에톡시실란 및 (3-아미노프로필)트리에톡시실란의 사용을 통해 합성하는 동안, 나노입자, 예를 들어, MSNP의 외부 표면에 부가될 수 있다. 유기실란은 계면활성제가 MSNP로부터 제거되기 전 또는 후에 부가될 수 있다. 유사 시약 및 기타 유기 시약, 예컨대 글루타르온, 메르캅토프로피온산, DMSA, PEG-티올, 올레산 및 텍스트란을 이용하여 산화철 나노입자, 은 나노입자, 금 나노입자 및 탄소 나노튜브를 변형시킬 수 있다. 기능화된 나노입자는 또한 직접 구입할 수 있으며, 예를 들어, 카르복실산, 아미드, 폴리아미노벤젠 술폰산, 옥타데실아민 및 PEG로 표면이 변형된 탄소 나노튜브는 시그마 알드리치로부터 구입할 수 있다.

[0137] 그 결과로 생성된 NP (예를 들어, 표면 변형 후의 MSNP)는 임의의 적절한 크기, 예를 들어, 약 20 nm 내지 약 200 nm, 약 20 nm 내지 약 400 nm, 약 20 nm 내지 약 500 nm, 약 20 nm 내지 약 100 nm, 약 30 nm 내지 약 100 nm, 약 40 nm 내지 약 200 nm, 약 50 nm 내지 약 200 nm, 약 50 nm 내지 400 nm, 약 50 내지 500 nm, 약 30 nm 내지 약 80 nm, 40 nm 내지 약 80 nm, 약 30 nm, 약 40 nm, 약 30 nm 내지 약 60 nm, 약 50 nm, 약 60 nm, 약 80 nm, 약 100 nm, 약 120 nm, 또는 약 150 nm일 수 있다.

[0138] 그 결과로 생성된 면역원성 구축물, 예를 들어, 항원(들) 또는 항원 생산 작용제(들)가 로딩된 NP는 적절한 크기, 예를 들어, 약 20 nm 내지 약 200 nm, 약 30 nm 내지 약 100 nm, 약 40 nm 내지 약 200 nm, 약 50 nm 내지 약 200 nm, 약 30 nm 내지 약 80 nm, 40 nm 내지 약 80 nm, 약 30 nm, 약 40 nm, 약 30 nm 내지 약 60 nm, 약 100 nm 내지 200 nm, 약 100 nm 내지 약 500 nm, 약 100 nm 내지 약 999 nm, 약 100 nm 내지 약 400 nm, 약 50 nm, 약 60 nm, 약 80 nm, 약 100 nm, 약 120 nm, 약 150 nm, 약 200 nm, 약 300 nm, 약 400 nm, 약 500 nm, 약 600 nm, 약 700 nm, 약 800 nm, 약 900 nm, 약 999 nm일 수 있다.

[0139] **XI. 지질-코팅된 나노입자를 포함한 면역원성 구축물**

[0140] 또한 지질 코팅된 나노입자 코어 (예를 들어, 본원에 개시된 나노입자 중 임의의 것)를 포함한 면역원성 구축물이 본원에 개시된다. 일부 실시양태에서, 지질-코팅된 인산칼슘 (CaP-L)을 포함하는 면역원성 구축물은 인산칼슘 코어로 구성되며 (CaP-L), 여기서 코어는, 예를 들어, CaCl_2 및 Na_2HPO_4 와 주변 지질 층 간의 반응에 의해 형성된다. Ca/P 몰비는 10 내지 200의 범위일 수 있다. CaP 코어 나노입자의 크기는 5 내지 999 nm (예를 들어, 약 20 nm 내지 약 200 nm, 약 30 nm 내지 약 100 nm, 약 40 nm 내지 약 200 nm, 약 50 nm 내지 약 200 nm, 약 30 nm 내지 약 80 nm, 40 nm 내지 약 80 nm, 약 30 nm, 약 40 nm, 약 30 nm 내지 약 60 nm, 약 50 nm, 또는 약 60 nm)의 범위일 수 있다. 지질 층 두께는 1 내지 999 nm (예를 들어, 약 20 nm 내지 약 200 nm, 약 30 nm 내지 약 100 nm, 약 40 nm 내지 약 200 nm, 약 50 nm 내지 약 200 nm, 약 30 nm 내지 약 80 nm, 40 nm 내지 약 80 nm, 약 200 내지 약 750 nm, 약 500 내지 999 nm, 약 30 nm, 약 40 nm, 약 30 nm 내지 약 60 nm, 약 50 nm, 또는 약 60 nm)의 범위일 수 있다. 지질 층은 양이온성 지질 (예를 들어, DOTAP, 디메틸디옥타데실암모늄 브로마이드, D-Lin-MC3-DMA), PEG화 지질 (예를 들어, DMG-PEG 2000, DSG-PEG 2000), 작용기 (예를 들어, -SH, -NH₂, -COOH)를 갖는 기능화된 PEG화 지질, 표적화제 (예를 들어, 만노스 또는 본원에 개시된 것 중 임의의 것)와 접합된 PEG화 지질, 인지질 (예를 들어, 1,2-디스테아로일-sn-3-포스파콜린 (DSPC), 디올레오일포스파티드산 (DOPA) 또는 디올레오일포스파티딜에탄올아민 (DOPE)) 및 콜레스테롤 중 하나 이상을 포함한다. 상기 지질 각각은 지질 층의 0-100% (w/w) (예를 들어, 0-10%, 0-20%, 0-30%, 0-40%, 0-50%, 0-60%, 0-70%, 0-80%, 0-90%, 5-15%, 5-25%, 10-50%, 25-75%, 50-90%, 또는 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90%, 또는 100%)를 차지할 수 있다. PEG화 지질/기능화된 PEG화 지질/표적화된 PEG화 지질은 안정성을 증진시키고 혈액 중 면역원성 구축물의 순환을 연장시키는 반면, 인지질 조성물 및 콜레스테롤은 지질 코팅 구조를 형성하고 안정화시킨다. 기능화된 PEG화 지질은 핵산 및/또는 항원과의 추가 접합을 위한 것이다. 표적화된 PEG화 지질은 표적화된 세포로의 흡수 효능을 증진시키기 위한 것이다. 인산칼슘 코어는 CaP-L의 0.1-99.9% (w/w) (예를 들어, 0-10%, 0-20%, 0-30%, 0-40%, 0-50%, 0-60%, 0-70%, 0-80%, 0-90%, 5-15%, 5-25%, 10-50%, 25-75%, 50-90%, 또는 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90%, 또는 99.9%)를 차지할 수 있다. 지질 층은 CaP-L의 0.1-99.9% (w/w) (예를 들어, 0-10%, 0-20%, 0-30%, 0-40%, 0-50%, 0-60%, 0-70%, 0-80%, 0-90%, 5-15%, 5-25%, 10-50%, 25-75%, 50-90%, 또는 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90%, 또는 99.9%)를 차지할 수 있다. 하나 이상의 유형의 계면활성제 (예를 들어, 트윈 80, 트윈 20, 스펠 80, 스펠 20, PVP, SDS, SLS, PEG)가 CaP-L의 형성을 돕기 위해 포함될 수 있다. 계면활성제:CaP-L 중량비는 0-50%의 범위일 수 있다. 로딩된 카고가 있거나 없는 CaP-L의 유체역학적 크기는 10 nm 내지 10 마이크로미터 (예를 들어, 약 80 nm 내지 약 200 nm, 또는 약 90 nm 내지 약 150 nm, 약 1 마이크로미터 내지 약 2 마이크로미터)의 범위일 수 있다.

[0141] 일부 실시양태에서, 하나 이상의 유형의 올리고뉴클레오타이드 (예를 들어, siRNA, mRNA, shRNA, miRNA, DNA 및 CpG 올리고뉴클레오타이드 중 하나 이상)는 나노입자의 코어 (예를 들어, 올리고뉴클레오타이드의 핵산 백본의 포스페이트 기와 Ca^{2+} 양이온 간의 이온성 상호작용을 통한 인산칼슘 코어)에 로딩된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 유형의 올리고뉴클레오타이드 (예를 들어, siRNA, mRNA, shRNA, miRNA, DNA 및 CpG 올리고뉴클레오타이드 중 하나 이상)는 핵산 백본의 포스페이트 기와 양이온성 지질 간의 이온성 상호작용에 의해 지질 층에 로딩된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 유형의 올리고뉴클레오타이드 (예를 들어, siRNA, mRNA, shRNA, miRNA, DNA 및 CpG 올리고뉴클레오타이드 중 하나 이상)는 지질 층의 기능화된 PEG화 지질과 접합된다. 예를 들어, CaP-L로의 하나 이상의 유형의 올리고뉴클레오타이드의 로딩은 나노입자의 0.01 내지 10 wt.%의 범위일 수 있다.

[0142] 일부 실시양태에서, 하나 이상의 유형의 항원 또는 항원 생산 작용제 (예를 들어, 펩티드, 단백질 및 폴리사카라이드 중 하나 이상)는 나노입자의 코어 (예를 들어, 인산칼슘 코어)에 로딩된다. 일부 실시양태에서, 적절한 친수성-친유성 균형을 갖는 하나 이상의 유형의 항원 또는 항원 생산 작용제 (예를 들어, 펩티드, 단백질 및 폴리사카라이드 중 하나 이상)는 지질 층에 삽입된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 유형의 항원 또는 항원

생산 작용제 (예를 들어, 펩티드, 단백질 및 폴리사카라이드 중 하나 이상)는 나노입자 (예를 들어, 반 데르 발스 상호작용 및/또는 인산칼슘 코어의 Ca^{2+} 이온과의 이온성 상호작용을 통한 인산칼슘 나노입자)의 표면 상에 흡착된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 유형의 항원 또는 항원 생산 작용제 (예를 들어, 펩티드, 단백질 및 폴리사카라이드 중 하나 이상)는 공유 결합을 통해 지질 층의 기능화된 PEG화 지질과 접합될 수 있다. 하나 이상의 유형의 항원 또는 항원 생산 작용제를 나노입자 (예를 들어, 인산칼슘 나노입자)에 로딩하는 것은 나노입자의 0.01 내지 10 wt.%의 범위일 수 있다.

[0143] **XII. 면역원성 구축물 제형 및 사용 방법**

[0144] 면역원성 구축물은 관련 기술분야에 공지된 바와 같이 치료, 진단 또는 연구 용도로 제형화될 수 있다. 면역원성 구축물은 생체내 또는 생체의 사용을 위해 이용될 수 있다. 면역원성 구축물에 함유된 작용제의 효과는 세포내 또는 세포외에서 발생할 수 있다.

[0145] 면역원성 구축물은 제형화 즉시 사용되거나 저장될 수 있다. 일부 실시양태에서, 면역원성 구축물은 동결보호제, 예컨대 트레할로스와 같은 당을 사용하여 건조 상태로 동결건조될 수 있다. 최적의 트레할로스 및 동결건조 조건은 새로 만든 물질과 비교하여 입자 크기 및 전하 및 효능의 관점에서, 예를 들어, 특정 siRNA를 함유하는 면역원성 구축물에 대한 유전자 녹다운 효능의 관점에서, 면역원성 구축물을 보존할 수 있다. 본 개시내용의 면역원성 구축물은 동결건조될 때 적어도 6개월 동안 안정적이다.

[0146] 면역원성 구축물은 제약 조성물 중의 제약상 유효한 부형제와 함께 제형화될 수 있다. 제약 조성물은 활성제, 예를 들어, 면역원성 구축물과 결합되지 않은 아주반트, 동결보호제, 안정화제, 보존제 및/또는 가용화제를 포함할 수 있다. 치료적 투여를 위한 면역원성 구축물의 유효량은, 예를 들어, 임상적 및 환자-특이적 요인에 따라 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 쉽게 결정될 것이다.

[0147] 이들 및 다른 유효 단위 투여량은 단일 용량으로, 또는 예를 들어 3주 주기 동안 1주당 2회 투여 요법으로 매일, 매주 또는 매월 수 회 투여되는 형태로 투여될 수 있다. 부가의 실시양태에서, 투여량은 임상적 및 환자-특이적 요인에 따라 임의의 적절한 투여 요법으로 다른 치료 요법과 함께 투여될 수 있다. 면역원성 구축물의 면역원성 양을 포함하는 본 개시내용의 조성물의 전달 양, 전달 시기 및 전달 방식은 개체의 체중, 연령, 성별 및 상태, 질환 및/또는 관련 증상의 심각성, 투여가 예방적인지 아니면 치료적인지의 여부에 따라 개체 기준으로, 그리고 약물 전달, 흡수, 반감기를 포함한 약동학, 및 효능에 영향을 미치는 것으로 공지된 기타 요인에 기초하여 일상적으로 조정될 것이다.

[0148] 본 개시내용의 제형은 통상적으로, 인간을 비롯한 포유류 대상체에서 암, 섬유증 및 염증을 포함한 질환의 증상을 실질적으로 예방하거나 완화시키는데 필요하고 충분한 최소 투여 요법에 근접하도록 선택될 것이다. 치료 투여량 및 투여 프로토콜은 종종 수일 또는 심지어 1주 이상 또는 수년에 걸친 반복 투여를 포함할 것이다. 효과적인 치료 요법은 또한 수일, 수주, 수개월 또는 심지어 수년에 걸쳐 지속되는 1일 또는 1일 수회 용량에 따라 투여되는 예방적 투여량을 포함할 수 있다.

[0149] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 면역원성 구축물은 본 개시내용의 많은 다른 고려된 조성물과 같이 임의로 항산화제, 완충제, 정균제 및/또는 제형이 포유류 대상체의 혈액과 등장성이 되게 하는 용질을 함유할 수 있는, 수성 및 비수성 멸균 주사가능 용액; 및 현탁액 및/또는 증점제를 포함할 수 있는 수성 및 비수성 멸균 현탁액을 포함하여, 비경구 투여, 예를 들어, 정맥내, 근육내, 종양내, 비강내, 피하, 진피내, 또는 복강내 투여용으로 제형화된다. 제형은 단위 용량 또는 다중 용량 용기에 존재할 수 있다. 본 개시내용의 부가의 조성물 및 제형은 비경구 투여 후 연장 방출을 위한 중합체를 포함할 수 있다. 비경구 제제는 이러한 투여에 적합한 용액, 분산액 또는 에멀전일 수 있다. 대상 작용제는 또한 비경구 투여 후 연장 방출을 위해 중합체로 제형화될 수 있다. 제약상 허용되는 제형 및 성분은 전형적으로 멸균되거나 쉽게 멸균가능하고, 생물학적으로 불활성이며, 쉽게 투여될 것이다. 이러한 물질은 제약 배합 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지되어 있다. 비경구 제제는 전형적으로 완충제 및 보존제, 및 제약상 및 생리학상 허용되는 주사가능 유체, 예컨대 물, 생리식염수, 균형 염 용액, 수성 텍스트로스, 글리세롤 등을 함유한다. 즉석 주사 용액, 에멀전 및 현탁액은 이전에 기재된 종류의 멸균 분말, 과립 및 정제로부터 제조될 수 있다. 바람직한 단위 투여 제형은 상기 본원에 기재된 바와 같은, 활성 성분(들)의 1일 용량 또는 단위, 1일 하위 용량, 또는 그의 적절한 분획을 함유하는 것이다.

[0150] 일부 실시양태에서, 면역원성 구축물은 경구 투여용으로 제형화되고 캡슐, 정제, 에멀전 및 수성 현탁액, 분산액 및 용액을 포함한 임의의 경구적으로 허용되는 투여 형태일 수 있다. 일부 실시양태에서, 투여 형태는 경구

투여 형태, 예컨대 압착 정제, 경질 또는 연질 겔 캡슐, 장용 코팅 정제, 삼투 방출 캡슐, 또는 부형제의 독특한 조합이다. 정제의 경우, 통상적으로 사용되는 부형제는 락토스, 만니톨, 및 옥수수 전분을 포함한다. 예컨대 스테아린산 마그네슘이지만 이에 제한되지는 않는 윤활제가 또한 전형적으로 부가된다. 캡슐 형태의 경구 투여의 경우에 유용한 희석제는 락토스, 만니톨, 글루코스, 수크로스, 옥수수 전분, 감자 전분 또는 셀룰로스를 포함한다. 부가의 실시양태에서, 투여 형태는 캡슐을 포함하며, 여기서 캡슐은 원하는 지속 방출 제형을 제공하기 위한 물질의 혼합물을 함유한다. 수성 현탁액 또는 에멀전을 경구 투여할 때, 활성 성분은 유화제 또는 현탁제와 조합된 오일 상에 현탁되거나 용해될 수 있다. 원하는 경우, 특정 감미제, 향미제 또는 착색제를 부가할 수 있다.

[0151] 일부 실시양태에서, 면역원성 구축물은 비강내 투여 또는 흡입용으로 제형화된다. 비강 투여 또는 흡입용 조성물은 에어로졸, 점적제, 겔 및 분말로서 편리하게 제형화될 수 있다. 에어로졸 제형은 전형적으로 생리학상 허용되는 수성 또는 비수성 용매 중의 활성 물질의 용액 또는 미세 현탁액을 포함하며, 통상적으로 분무 장치와 함께 사용하기 위해 카트리지 또는 리필 형태를 취할 수 있는 밀봉된 용기에 멸균 형태로 단일 또는 다중 투여 용량으로 제시된다. 대안적으로, 밀봉된 용기는 단일 분사 장치, 예컨대 단일 용량 비강 흡입기 또는 사용 후 폐기하도록 의도된 계량 밸브가 장착된 에어로졸 디스펜서일 수 있다. 투여 형태가 에어로졸 디스펜서를 포함하는 경우, 압축 가스, 예컨대 압축 공기 또는 유기 추진제, 예컨대 플루오로-클로로-탄화수소일 수 있는 추진제를 함유할 것이다. 에어로졸 투여 형태는 또한 펌프-분무기의 형태를 취할 수 있다.

[0152] 국소 운반체가 면역원성 구축물을 전달하기 위해 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 국소 운반체는 에멀전, 겔 또는 연고이다. 다른 실시양태에서, 면역원성 구축물은 스프레이 제형으로 제형화될 수 있다. 에멀전, 예컨대 크림 및 로션은 적어도 2개의 비혼화성 상을 포함하는 분산 시스템이며, 하나의 상은 직경이 0.1 μm 내지 100 μm 범위인 비말로서 다른 상에 분산되어 있다. 전형적으로 안정성을 개선시키기 위해 유화제가 포함된다. 물이 분산 상이고 오일이 분산 매질인 경우, 에멀전은 유중수 에멀전이라고 한다. 오일이 수성 상 전체에 비말로서 분산되는 경우, 에멀전은 수중유 에멀전이라고 한다. 국소 운반체로서 사용될 수 있는 에멀전, 예컨대 크림 및 로션, 및 그의 제조는 문헌 [Remington: The Science and Practice of Pharmacy (Lloyd V. Allen 22nd ed. 2012)]에 개시되어 있으며, 이는 본원에 참조로 포함되어 있다.

[0153] 연고는 균질하고 점성이 있는 반고체 제제일 수 있으며, 가장 통상적으로 점도가 높고 오일기가 많은 걸쭉한 오일 (오일 80% - 물 20%)이다. 연고는 어느 정도 폐색이 필요한 경우, 보호, 치료 또는 예방 목적으로 피부에 활성 성분을 적용하거나 연화제로서 사용할 수 있다.

[0154] 크림은 오일과 물이 거의 같은 비율로 혼합된 에멀전이다. 이는 피부의 각질층 외층까지 상당히 잘 침투한다. 크림은 일반적으로 연고보다 묽으며, 용기에서 꺼낼 때 모양이 유지된다.

[0155] 연고/크림의 비히클은 연고 베이스로서 공지되어 있다. 베이스의 선택은 연고의 임상 적응증에 따라 다르다. 상이한 유형의 연고 베이스는 탄화수소 베이스, 예를 들어, 경질 파라핀, 연질 파라핀, 미세결정질 왁스 및 세레신; 흡수 베이스, 예를 들어, 양모 지방, 밀랍; 수용성 베이스, 예를 들어, 매크로콜 200, 300 및 400; 및 유화 베이스, 예를 들어, 유화 왁스, 식물성 오일 (예컨대 올리브 오일, 코코넛 오일, 참깨 오일, 아몬드 오일 및 땅콩 오일)을 포함한다. 면역원성 구축물은 베이스에 분산되어 있으며 나중에 약물이 상처에 침투한 후 분산된다. 연고/크림은 피부 분비물과 비혼화성, 혼화성이거나 또는 유화가능한 제제를 제공하기 위해 소수성, 친수성 또는 수-유화 베이스를 포함하여 제형화될 수 있다. 이들은 또한 지방이 많은 탄화수소, 흡수성, 물로 제거 가능한, 또는 수용성 베이스로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, 크림/연고 베이스는 특히, 활성제, 백색 페트롤라툼, 물, 알란토인, EDTA, 스테아릴 알콜, Brij 721, Brij 72, 메틸셀룰로스, 이소프로필 미리스테이트, 소르비탄 모노올레이트, 폴리옥실 40 스테아레이트, 부틸화 히드록시톨루엔, 프로필렌 글리콜, 메틸파라벤, 프로필파라벤, 100%로 되기까지의 탈이온수, 및 중성 pH로 되기까지의 완충제를 함유될 수 있다.

[0156] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용의 면역원성 구축물을 전달하기 위해 사용되는 국소 운반체는 겔, 예를 들어, 2-상 겔 또는 단일 상 겔이다. 겔은 작은 무기 입자 또는 큰 유기 분자가 액체에 의해 상호 침투된 현탁액으로 이루어진 반고체 시스템이다. 겔 덩어리가 작은 이산 무기 입자들의 네트워크를 포함하는 경우, 2-상 겔로서 분류된다. 일부 실시양태에서, 액체는 물 또는 또 다른 수성 매질일 수 있고 겔 덩어리는 히드로겔로서 정의된다. 히드로겔은 알지네이트, 폴리아크릴레이트, 폴리아릴렌 옥사이드 및/또는 폴리 N-비닐 피롤리돈을 포함할 수 있다. 히드로겔은 또한 무정형, 즉 보습제, 예컨대 프로필렌 글리콜 또는 글리세린을 함유하는 카르복시메틸셀룰로스의 제형과 같은 고형물과 반대되는 점성 겔일 수 있다. 예시적인 무정형 히드로겔은 말토덱스트라- β -글루칸, 아세만난, 카르복시메틸셀룰로스, 펙틴, 크산탄 검, 콜라겐, 케라틴 및 꿀을 포함한다.

- [0157] 면역원성 구축물은 경구 투여를 위해 생분해성 캡슐로 패키징될 수 있다. 대안적으로, 면역원성 구축물 현탁액이 방광 내부에 도입될 수 있다. 이것은 방광에 투여된 약물이 방광 내벽의 암 세포와 직접 접촉하게 되는 방광내 화학요법과 유사한다.
- [0158] 하기 예시적인 실시양태 및 실시예(들)는 본 개시내용의 특정한 실시양태를 입증하기 위해 포함된다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 본 개시내용에 비추어 본원에 개시된 구체적인 실시양태에 많은 변화가 이루어질 수 있고 본 개시내용의 요지 및 범위를 벗어나지 않고서도 여전히 같거나 유사한 결과를 수득할 수 있음을 인식해야 한다. 하기 실시예에서, 그리고 설명의 목적을 위해, 본 개시내용의 다양한 측면의 완전한 이해를 제공하기 위해 다수의 구체적인 세부사항이 제시된다. 그러나, 관련 기술분야의 통상의 기술자라면 본 개시내용이 이러한 구체적인 세부사항 없이도 실시될 수 있음을 이해할 것이다. 다른 경우에, 공지된 구조 및 장치는 본 발명을 모호하게 하는 것을 피하기 위해 보다 일반적으로 제시되거나 논의된다. 개시된 발명이 적용될 수 있는 많은 상이하고 대안적인 구성, 장치 및 기술이 있음을 주목해야 한다. 하기 실시예는 개시된 방법의 예시이다. 이러한 개시내용에 비추어, 관련 기술분야의 통상의 기술자는 개시된 방법의 이들 실시예 및 다른 실시예의 변동이 과도한 실험 없이 가능할 것임을 인식할 것이다.
- [0159] **XIII. 예시적인 실시양태**
- [0160] *예시적인 실시양태 세트 1:*
- [0161] 1. 나노입자; 나노입자의 외부 표면과 결합된 가교된 양이온성 중합체; 가교된 양이온성 중합체 또는 나노입자의 외부 표면과 결합된 안정화제; 및 감염체에 대한 항원 또는 항원 생산 작용제를 포함하는 면역원성 구축물.
- [0162] 2. 실시양태 1에 있어서, 아주반트를 추가로 포함하는 면역원성 구축물.
- [0163] 3. 실시양태 2에 있어서, 아주반트가 CpG 올리고뉴클레오타이드, CpG 서열을 함유하는 DNA TLR 효능제, 비-CpG DNA TLR 효능제, RNA TLR 효능제, 알루미늄 염, 항-CD40 항체, 융합 단백질, 시토키인, 소분자 TLR 효능제, 오일- 또는 계면활성제-기반 아주반트, 리포폴리사카라이드, 식물 추출물 또는 그의 유도체 중 하나 이상을 포함하는 것인 면역원성 구축물.
- [0164] 4. 실시양태 2 또는 3에 있어서, 아주반트가 CpG 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 것인 면역원성 구축물.
- [0165] 5. 실시양태 2 내지 4 중 어느 한 실시양태에 있어서, 아주반트가 폴리 I:C를 포함하는 것인 면역원성 구축물.
- [0166] 6. 실시양태 2 내지 5 중 어느 한 실시양태에 있어서, 아주반트가 나노입자의 1-20 wt.%로 존재하는 것인 면역원성 구축물.
- [0167] 7. 실시양태 1 내지 6 중 어느 한 실시양태에 있어서, 나노입자가 실리카 나노입자, 실리콘 나노입자, 산화철 나노입자, 금 나노입자, 은 나노입자, 탄소 나노튜브, 또는 아주반트 나노입자인 면역원성 구축물.
- [0168] 8. 실시양태 1 내지 7 중 어느 한 실시양태에 있어서, 나노입자가 메소다공성 실리카 나노입자인 면역원성 구축물.
- [0169] 9. 실시양태 1 내지 8 중 어느 한 실시양태에 있어서, 양이온성 중합체가 PEI, 키토산, 폴리프로필렌이민, 폴리리신, 폴리아미도아민, 폴리(알릴아민), 폴리(디알릴디메틸암모늄 클로라이드), 폴리(N-이소프로필 아크릴아미드-코-아크릴아미드), 폴리(N-이소프로필 아크릴아미드-코-아크릴산), 디에틸아미노에틸-텍스트란, 폴리-(N-에틸-비닐피리디늄 브로마이드), 폴리(디메틸아미노)에틸 메타크릴레이트, 및 폴리(에틸렌 글리콜)-코-폴리(트리메틸아미노에틸메타크릴레이트 클로라이드)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 면역원성 구축물.
- [0170] 10. 실시양태 1 내지 9 중 어느 한 실시양태에 있어서, 양이온성 중합체가 PEI인 면역원성 구축물.
- [0171] 11. 실시양태 1 내지 10 중 어느 한 실시양태에 있어서, 양이온성 중합체가 약 0.8 kDa 내지 약 25 kDa의 분자량을 갖는 것인 면역원성 구축물.
- [0172] 12. 실시양태 1 내지 11 중 어느 한 실시양태에 있어서, 양이온성 중합체가 나노입자의 1-50 wt.%로 존재하는 것인 면역원성 구축물.
- [0173] 13. 실시양태 1 내지 12 중 어느 한 실시양태에 있어서, 안정화제가 PEG, 텍스트란, 폴리시알산, 히알루론산, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리비닐 알콜 및 폴리아크릴아미드로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 면역원성 구축물.

- [0174] 14. 실시양태 1 내지 13 중 어느 한 실시양태에 있어서, 안정화제가 PEG인 면역원성 구축물.
- [0175] 15. 실시양태 1 내지 14 중 어느 한 실시양태에 있어서, 안정화제가 약 1 kDa 내지 약 20 kDa의 분자량을 갖는 것인 면역원성 구축물.
- [0176] 16. 실시양태 1 내지 15 중 어느 한 실시양태에 있어서, 안정화제가 나노입자의 1-50 wt.%로 존재하는 것인 면역원성 구축물.
- [0177] 17. 실시양태 1 내지 16 중 어느 한 실시양태에 있어서, 감염체가 바이러스인 면역원성 구축물.
- [0178] 18. 실시양태 1 내지 17 중 어느 한 실시양태에 있어서, 감염체가 베타-코로나바이러스인 면역원성 구축물.
- [0179] 19. 실시양태 1 내지 18 중 어느 한 실시양태에 있어서, 감염체가 SARS-CoV-2, SARS-CoV-1, 또는 MERS-CoV인 면역원성 구축물.
- [0180] 20. 실시양태 1 내지 19 중 어느 한 실시양태에 있어서, 감염체가 SARS-CoV-2인 면역원성 구축물.
- [0181] 21. 실시양태 20에 있어서, 항원 또는 항원 생산 작용제가 재조합 전장 단백질인 면역원성 구축물.
- [0182] 22. 실시양태 21에 있어서, 항원 또는 항원 생산 작용제가 전장 SARS-CoV-2 스파이크 당단백질, SARS-CoV-2 뉴클레오캡시드 단백질, 또는 SARS-CoV-2 막 단백질인 면역원성 구축물.
- [0183] 23. 실시양태 20에 있어서, 항원 또는 항원 생산 작용제가 단백질 서브유닛인 면역원성 구축물.
- [0184] 24. 실시양태 23에 있어서, 항원 또는 항원 생산 작용제가 SARS-CoV-2 스파이크 당단백질의 S1, S2, 또는 RBD 영역에 상응하는 단백질 서브유닛인 면역원성 구축물.
- [0185] 25. 실시양태 20에 있어서, 항원 또는 항원 생산 작용제가 SARS-CoV-2 스파이크 당단백질의 면역원성 서열에 상응하는 펩티드인 면역원성 구축물.
- [0186] 26. 실시양태 25에 있어서, 항원 또는 항원 생산 작용제가 서열식별번호: 1-8 중 어느 하나의 펩티드 서열을 갖는 것인 면역원성 구축물.
- [0187] 27. 실시양태 20에 있어서, 항원 또는 항원 생산 작용제가 mRNA 또는 pDNA인 면역원성 구축물.
- [0188] 28. 실시양태 1 내지 27 중 어느 한 실시양태에 있어서, 항원 또는 항원 생산 작용제가 나노입자의 0.5-20 wt.%로 존재하는 것인 면역원성 구축물.
- [0189] 29. 실시양태 1 내지 28 중 어느 한 실시양태에 있어서, 면역원성 구축물이 적어도 하나의 유형의 올리고뉴클레오타이드를 추가로 포함하는 것인 면역원성 구축물.
- [0190] 30. 실시양태 29에 있어서, 적어도 하나의 유형의 올리고뉴클레오타이드가 양이온성 중합체와 정전기적으로 결합되는 것인 면역원성 구축물.
- [0191] 31. 실시양태 30에 있어서, 적어도 하나의 유형의 올리고뉴클레오타이드가 siRNA, miRNA, miRNA 모방체, 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 것인 면역원성 구축물.
- [0192] 32. 실시양태 31에 있어서, 적어도 하나의 유형의 뉴클레오타이드가 siRNA를 포함하는 것인 면역원성 구축물.
- [0193] 33. 실시양태 32에 있어서, siRNA가, 그의 상향조절이 세포의 면역억제와 연관되는 유전자를 억제하거나 하향조절하는 것인 면역원성 구축물.
- [0194] 34. 실시양태 33에 있어서, 세포가 항원-제시 세포인 면역원성 구축물.
- [0195] 35. 실시양태 34에 있어서, 항원-제시 세포가 수지상 세포 또는 대식세포인 면역원성 구축물.
- [0196] 36. 실시양태 35에 있어서, 유전자가 STAT3, IDO-1, IL-6, 또는 PD-L1인 면역원성 구축물.
- [0197] 37. 실시양태 29 내지 35 중 어느 한 실시양태에 있어서, 적어도 하나의 유형의 올리고뉴클레오타이드가 나노입자의 1-10 wt.%로 존재하는 것인 면역원성 구축물.
- [0198] 38. 실시양태 1 내지 37 중 어느 한 실시양태에 있어서, 면역원성 구축물이 세포에 대한 표적화제를 추가로 포함하는 것인 면역원성 구축물.
- [0199] 39. 실시양태 38에 있어서, 세포가 항원-제시 세포인 면역원성 구축물.

- [0200] 40. 실시양태 39에 있어서, 항원-제시 세포가 수지상 세포 또는 대식세포인 면역원성 구축물.
- [0201] 41. 실시양태 39 또는 40에 있어서, 표적화제가 만노스; 항원-제시 세포 상에 표시된 에피토프를 인식하고 그와 결합하는 모노클로날 또는 폴리클로날 항체 또는 그의 단편; 또는 항원-제시 세포 상의 표면 수용체와 결합하는 리간드인 면역원성 구축물.
- [0202] 42. 실시양태 38 내지 41 중 어느 한 실시양태에 있어서, 표적화제가 나노입자의 0.1 내지 10 wt.%로 존재하는 것인 면역원성 구축물.
- [0203] 43. 실시양태 1 내지 42 중 어느 한 실시양태에 있어서, 면역원성 구축물이 표지제를 추가로 포함하는 것인 면역원성 구축물.
- [0204] 44. 실시양태 43에 있어서, 표지제가 형광 염료 및/또는 금속 프로브인 면역원성 구축물.
- [0205] 45. 실시양태 1 내지 44 중 어느 한 실시양태에 있어서, 약 10 nm 내지 약 10 마이크로미터의 유체역학적 직경을 갖는 면역원성 구축물.
- [0206] 46. 실시양태 45에 있어서, 약 90 nm 내지 약 150 nm의 유체역학적 직경을 갖는 면역원성 구축물.
- [0207] 47. 실시양태 1 내지 46 중 어느 한 실시양태에 있어서, 나노입자가 약 5 내지 약 999 nm의 직경을 갖는 것인 면역원성 구축물.
- [0208] 48. 나노입자; 나노입자의 외부 표면을 코팅하는 지질 층; 및 감염체에 대한 항원 또는 항원 생산 작용제를 포함하는 면역원성 구축물.
- [0209] 49. 실시양태 40에 있어서, 아주반트를 추가로 포함하는 면역원성 구축물.
- [0210] 50. 실시양태 49에 있어서, 아주반트가 CpG 올리고뉴클레오타이드, CpG 서열을 함유하는 DNA TLR 효능제, 비-CpG DNA TLR 효능제, RNA TLR 효능제, 알루미늄 염, 항-CD40 항체, 융합 단백질, 시토카인, 소분자 TLR 효능제, 오일- 또는 계면활성제-기반 아주반트, 리포폴리사카라이드, 식물 추출물 또는 그의 유도체 중 하나 이상을 포함하는 것인 면역원성 구축물.
- [0211] 51. 실시양태 49 또는 50에 있어서, 아주반트가 CpG 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 것인 면역원성 구축물.
- [0212] 52. 실시양태 49 내지 51 중 어느 한 실시양태에 있어서, 아주반트가 나노입자에 로딩되는 것인 면역원성 구축물.
- [0213] 53. 실시양태 49 내지 52 중 어느 한 실시양태에 있어서, 아주반트가 지질 층 상에 또는 지질 층 내에 로딩되는 것인 면역원성 구축물.
- [0214] 54. 실시양태 49 내지 53 중 어느 한 실시양태에 있어서, 아주반트가 나노입자의 1-20 wt.%로 존재하는 것인 면역원성 구축물.
- [0215] 55. 실시양태 48 내지 54 중 어느 한 실시양태에 있어서, 나노입자가 실리카 나노입자, 실리콘 나노입자, 산화철 나노입자, 금 나노입자, 은 나노입자, 탄소 나노튜브, 또는 아주반트 나노입자인 면역원성 구축물.
- [0216] 56. 실시양태 55에 있어서, 나노입자가 인산칼슘 나노입자인 면역원성 구축물.
- [0217] 57. 실시양태 48 내지 56 중 어느 한 실시양태에 있어서, 지질 층이 중성 지질, 지방산 변형 지질, 인지질, 지방산, 중합가능한 지질, 양이온성 지질, 스펅고지질 및 스테롤로부터 선택된 지질 중 하나 이상을 포함하는 단층 또는 다층 막인 면역원성 구축물.
- [0218] 58. 실시양태 57에 있어서, 중성 지질이 프로스타글란딘, 에이코사노이드 또는 글리세리드이고; 지방산 변형 지질이 1,2-디피타노일-sn-글리세로-3-포스포콜린 또는 1-(12-비오틴(아미노도데카노일))-2-올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민이며; 인지질이 포스파티딜콜린, 포스파티딜에탄올아민, 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린, 또는 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민이고; 지방산이 스테아르산 또는 라우르산이며; 중합가능한 지질이 콜레스테롤-PEG 또는 디스테아로일-rac-글리세롤-PEG2K이고; 양이온성 지질이 1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄-프로판 또는 디메틸디옥타데실암모늄 브로마이드이며; 스펅고지질이 스펅고미엘린 또는 세라미드이고; 스테롤이 콜레스테롤 또는 스티그마스테롤인 면역원성 구축물.
- [0219] 59. 실시양태 58에 있어서, 지질 층이 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민, 디메틸디옥타데실암모늄 브로마이드, 콜레스테롤, 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린, 및 디스테아로일-rac-글리세롤-PEG2K

를 포함하는 것인 면역원성 구축물.

- [0220] 60. 실시양태 48 내지 59 중 어느 한 실시양태에 있어서, 지질 층이 나노입자의 0.1-99.9 wt.%로 존재하는 것인 면역원성 구축물.
- [0221] 61. 실시양태 48 내지 60 중 어느 한 실시양태에 있어서, 감염체가 바이러스인 면역원성 구축물.
- [0222] 62. 실시양태 48 내지 61 중 어느 한 실시양태에 있어서, 감염체가 베타-코로나바이러스인 면역원성 구축물.
- [0223] 63. 실시양태 48 내지 62 중 어느 한 실시양태에 있어서, 감염체가 SARS-CoV-2, SARS-CoV-1, 또는 MERS-CoV인 면역원성 구축물.
- [0224] 64. 실시양태 48 내지 63 중 어느 한 실시양태에 있어서, 감염체가 SARS-CoV-2인 면역원성 구축물.
- [0225] 65. 실시양태 64에 있어서, 항원 또는 항원 생산 작용제가 재조합 전장 단백질인 면역원성 구축물.
- [0226] 66. 실시양태 65에 있어서, 항원 또는 항원 생산 작용제가 전장 SARS-CoV-2 스파이크 당단백질, SARS-CoV-2 뉴클레오캡시드 단백질, 또는 SARS-CoV-2 막 단백질인 면역원성 구축물.
- [0227] 67. 실시양태 64에 있어서, 항원 또는 항원 생산 작용제가 단백질 서브유닛인 면역원성 구축물.
- [0228] 68. 실시양태 67에 있어서, 항원 또는 항원 생산 작용제가 SARS-CoV-2 스파이크 당단백질의 S1, S2, 또는 RBD 영역에 상응하는 단백질 서브유닛인 면역원성 구축물.
- [0229] 69. 실시양태 64에 있어서, 항원 또는 항원 생산 작용제가 SARS-CoV-2 스파이크 당단백질의 면역원성 서열에 상응하는 펩티드인 면역원성 구축물.
- [0230] 70. 실시양태 69에 있어서, 항원 또는 항원 생산 작용제가 서열식별번호: 1-8 중 어느 하나의 펩티드 서열을 갖는 것인 면역원성 구축물.
- [0231] 71. 실시양태 64에 있어서, 항원 또는 항원 생산 작용제가 mRNA 또는 pDNA인 면역원성 구축물.
- [0232] 72. 실시양태 48 내지 71 중 어느 한 실시양태에 있어서, 항원 또는 항원 생산 작용제가 나노입자에 로딩되는 것인 면역원성 구축물.
- [0233] 73. 실시양태 48 내지 72 중 어느 한 실시양태에 있어서, 항원 또는 항원 생산 작용제가 지질 층 상에 또는 지질 층 내에 로딩되는 것인 면역원성 구축물.
- [0234] 74. 실시양태 48 내지 73 중 어느 한 실시양태에 있어서, 항원 또는 항원 생산 작용제가 나노입자의 0.01 내지 10 wt.%로 존재하는 것인 면역원성 구축물.
- [0235] 75. 실시양태 48 내지 74 중 어느 한 실시양태에 있어서, 면역원성 구축물이 적어도 하나의 유형의 올리고뉴클레오타이드를 추가로 포함하는 것인 면역원성 구축물.
- [0236] 76. 실시양태 75에 있어서, 적어도 하나의 유형의 올리고뉴클레오타이드가 siRNA를 포함하는 것인 면역원성 구축물.
- [0237] 77. 실시양태 76에 있어서, siRNA가, 그의 상향조절이 세포의 면역억제와 연관되는 유전자를 억제하거나 하향 조절하는 것인 면역원성 구축물.
- [0238] 78. 실시양태 77에 있어서, 세포가 항원-제시 세포인 면역원성 구축물.
- [0239] 79. 실시양태 78에 있어서, 항원-제시 세포가 수지상 세포 또는 대식세포인 면역원성 구축물.
- [0240] 80. 실시양태 79에 있어서, 유전자가 STAT3, IDO-1, IL-6, 또는 PD-L1인 면역원성 구축물.
- [0241] 81. 실시양태 74 내지 80 중 어느 한 실시양태에 있어서, 적어도 하나의 유형의 올리고뉴클레오타이드가 나노입자의 0.01 내지 10 wt.%로 존재하는 것인 면역원성 구축물.
- [0242] 82. 실시양태 48 내지 81 중 어느 한 실시양태에 있어서, 면역원성 구축물이 세포에 대한 표적화제를 추가로 포함하는 것인 면역원성 구축물.
- [0243] 83. 실시양태 82에 있어서, 세포가 항원-제시 세포인 면역원성 구축물.
- [0244] 84. 실시양태 83에 있어서, 항원-제시 세포가 수지상 세포 또는 대식세포인 면역원성 구축물.

- [0245] 85. 실시양태 84에 있어서, 표적화제가 만노스; 항원-제시 세포 상에 표시된 에피토프를 인식하고 그와 결합하는 모노클로날 또는 폴리클로날 항체 또는 그의 단편; 또는 항원-제시 세포 상의 표면 수용체와 결합하는 리간드인 면역원성 구축물.
- [0246] 86. 실시양태 48 내지 85 중 어느 한 실시양태에 있어서, 면역원성 구축물이 표지제를 추가로 포함하는 것인 면역원성 구축물.
- [0247] 87. 실시양태 86에 있어서, 표지제가 형광 염료 및/또는 금속 프로브인 면역원성 구축물.
- [0248] 88. 실시양태 48 내지 87 중 어느 한 실시양태에 있어서, 약 10 nm 내지 약 10 마이크로미터의 유체역학적 직경을 갖는 면역원성 구축물.
- [0249] 89. 실시양태 88에 있어서, 약 90 nm 내지 약 150 nm의 유체역학적 직경을 갖는 면역원성 구축물.
- [0250] 90. 실시양태 1 내지 89 중 어느 한 실시양태에 있어서, 나노입자가 약 5 내지 999 nm의 크기를 갖는 것인 면역원성 구축물.
- [0251] 91. 실시양태 1 내지 90 중 어느 한 실시양태의 면역원성 구축물 및 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 제약 조성물.
- [0252] 92. 실시양태 1 내지 90 중 어느 한 실시양태의 면역원성 구축물 및 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 백신.
- [0253] 93. 세포를 실시양태 1 내지 90 중 어느 한 실시양태의 면역원성 구축물과 접촉시키는 것을 포함하는, 항원 및 아주반트를 세포에 공동-전달하는 방법.
- [0254] 94. 실시양태 93에 있어서, 세포가 항원-제시 세포인 방법.
- [0255] 95. 실시양태 94에 있어서, 세포가 수지상 세포 또는 대식세포인 방법.
- [0256] 96. 실시양태 93에 있어서, 세포가 근육 세포인 방법.
- [0257] 97. 실시양태 1 내지 90 중 어느 한 실시양태의 면역원성 구축물의 면역원성 양을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 이러한 대상체에서 감염체에 대한 면역 반응을 유도하는 방법.
- [0258] 98. 실시양태 97에 있어서, 대상체가 인간인 방법.
- [0259] 99. 실시양태 97 또는 98에 있어서, 대상체가 면역저하된 것인 방법.
- [0260] 100. 실시양태 97 내지 99 중 어느 한 실시양태에 있어서, 면역원성 구축물이 근육내 주사에 의해 투여되는 것인 방법.
- [0261] 101. 실시양태 1 내지 90 중 어느 한 실시양태의 면역원성 구축물의 면역원성 양을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 이러한 대상체에서 감염성 질환을 치료 또는 예방하는 방법.
- [0262] 102. 실시양태 101에 있어서, 대상체가 인간인 방법.
- [0263] 103. 실시양태 101 또는 102에 있어서, 대상체가 면역저하된 것인 방법.
- [0264] 104. 실시양태 101 내지 103 중 어느 한 실시양태에 있어서, 면역원성 구축물이 근육내로, 흡입에 의해, 또는 비강내로 투여되는 것인 방법.
- [0265] *예시적인 실시양태 세트 2:*
- [0266] 1. 나노입자; 나노입자의 외부 표면과 정전기적으로 결합된 폴리에틸렌이민 (PEI)을 포함하는 소정량의 가교된 양이온성 중합체, 여기서 PEI 함량은 나노입자 플랫폼 (NP)의 적어도 10 중량%임; 및 가교된 PEI와 공유 결합된 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 포함하는 소정량의 안정화제를 포함하는 나노입자 플랫폼 (NP); 및 감염체의 항원 또는 항원 생산 작용제를 포함하는 면역원성 구축물로서, 여기서 구축물의 유체역학적 크기는 1 마이크로미터 이하인 면역원성 구축물.
- [0267] 2. 실시양태 1에 있어서, 나노입자가 메소다공성 실리카 나노입자 (MSNP)인 면역원성 구축물.
- [0268] 3. 나노입자; 나노입자의 외부 표면과 결합된 가교된 양이온성 중합체; 및 가교된 양이온성 중합체 또는 나노입자의 외부 표면과 결합된 안정화제를 포함하는 나노입자 플랫폼 (NP); 및 감염체의 항원 또는 항원 생산 작용제를 포함하는 면역원성 구축물.

- [0269] 4. 실시양태 1 또는 실시양태 3에 있어서, 아주반트를 추가로 포함하는 면역원성 구축물.
- [0270] 5. 실시양태 4에 있어서, 아주반트가 CpG 올리고뉴클레오타이드, CpG 서열을 함유하는 DNA TLR 효능제, 비-CpG DNA TLR 효능제, RNA TLR 효능제, 알루미늄 염, 항-CD40 항체, 융합 단백질, 시토카인, 소분자 TLR 효능제, 오일- 또는 계면활성제-기반 아주반트, 리포폴리사카라이드, 식물 추출물 또는 그의 유도체 중 하나 이상을 포함하는 것인 면역원성 구축물.
- [0271] 6. 실시양태 5에 있어서, 아주반트가 CpG 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 것인 면역원성 구축물.
- [0272] 7. 실시양태 4에 있어서, 아주반트가 폴리 I:C를 포함하는 것인 면역원성 구축물.
- [0273] 8. 실시양태 4 내지 7 중 어느 한 실시양태에 있어서, 아주반트가 NP의 1-20 wt.%로 존재하는 것인 면역원성 구축물.
- [0274] 9. 실시양태 1 또는 실시양태 3, 또는 본 세트에서의 임의의 다른 실시양태에 있어서, 나노입자가 실리카 나노입자, 실리콘 나노입자, 산화철 나노입자, 금 나노입자, 은 나노입자, 탄산칼슘 나노입자, 인산칼슘 나노입자, 탄소 나노튜브, 또는 아주반트 나노입자인 면역원성 구축물.
- [0275] 10. 실시양태 9에 있어서, 나노입자가 메소다공성 실리카 나노입자 (MSNP)인 면역원성 구축물.
- [0276] 11. 실시양태 10에 있어서, MSNP가 2-6 nm, 7 nm, 또는 7 nm 미만의 평균 세공 크기를 갖는 것인 면역원성 구축물.
- [0277] 12. 실시양태 9에 있어서, 나노입자가 산화철 나노입자인 면역원성 구축물.
- [0278] 13. 실시양태 1 또는 실시양태 3, 또는 본 세트에서의 임의의 다른 실시양태에 있어서, 양이온성 중합체가 PEI, 키토산, 폴리프로필렌아민, 폴리리신, 폴리아미도아민, 폴리(알릴아민), 폴리(디알릴디메틸암모늄 클로라이드), 폴리(N-이소프로필 아크릴아미드-코-아크릴아미드), 폴리(N-이소프로필 아크릴아미드-코-아크릴산), 디에틸아미노에틸-텍스트란, 폴리-(N-에틸-비닐피리디늄 브로마이드), 폴리(디메틸아미노)에틸 메타크릴레이트, 폴리(에틸렌 글리콜)-코-폴리(트리메틸아미노에틸메타크릴레이트 클로라이드), 또는 그의 둘 이상의 혼합물을 포함하는 것인 면역원성 구축물.
- [0279] 14. 실시양태 1 또는 실시양태 3에 있어서, 양이온성 중합체가 PEI이거나 또는 그를 포함하는 것인 면역원성 구축물.
- [0280] 15. 실시양태 1 또는 실시양태 3, 또는 본 세트에서의 임의의 다른 실시양태에 있어서, 양이온성 중합체가 약 0.8 kDa 내지 약 25 kDa의 분자량을 갖는 것인 면역원성 구축물.
- [0281] 16. 실시양태 1 또는 실시양태 3, 또는 본 세트에서의 임의의 다른 실시양태에 있어서, 양이온성 중합체가 NP의 1-50 wt.%로 존재하는 것인 면역원성 구축물.
- [0282] 17. 실시양태 1 또는 실시양태 3, 또는 본 세트에서의 임의의 다른 실시양태에 있어서, 안정화제가 PEG, 텍스트란, 폴리시알산, 히알루론산, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리비닐 알콜, 폴리아크릴아미드, 또는 그의 둘 이상의 혼합물을 포함하는 것인 면역원성 구축물.
- [0283] 18. 실시양태 17에 있어서, 안정화제가 PEG인 면역원성 구축물.
- [0284] 19. 실시양태 1 또는 실시양태 3, 또는 본 세트에서의 임의의 다른 실시양태에 있어서, 안정화제가 약 1 kDa 내지 약 20 kDa, 또는 약 5 kDa의 분자량을 갖는 것인 면역원성 구축물.
- [0285] 20. 실시양태 1 또는 실시양태 3, 또는 본 세트에서의 임의의 다른 실시양태에 있어서, 안정화제가 NP의 1-50 wt.%, 약 10-30 wt.%, 약 5 내지 20 wt.%, 약 15 wt.%, 또는 약 20 wt.%로 존재하는 것인 면역원성 구축물.
- [0286] 21. 실시양태 1 또는 실시양태 3, 또는 본 세트에서의 임의의 다른 실시양태에 있어서, 항원이 단백질을 포함하고, 단백질 항원이 안정화제와 접합되는 것인 면역원성 구축물.
- [0287] 22. 실시양태 1 또는 실시양태 3에 있어서, 항원이 펩티드이고, 펩티드 항원이 가교된 양이온성 중합체와 정전기적으로 결합되는 것인 면역원성 구축물.
- [0288] 23. 실시양태 1 또는 실시양태 3, 또는 본 세트에서의 임의의 다른 실시양태에 있어서, 항원 생산 작용제가 mRNA 또는 pDNA이고, 항원 생산 작용제가 가교된 양이온성 중합체와 정전기적으로 결합되는 것인 면역원성 구축물.

물.

- [0289] 24. 실시양태 1 또는 실시양태 3, 또는 본 세트에서의 임의의 다른 실시양태에 있어서, 감염체가 바이러스인 면역원성 구축물.
- [0290] 25. 실시양태 24에 있어서, 감염체가 베타-코로나바이러스인 면역원성 구축물.
- [0291] 26. 실시양태 25에 있어서, 감염체가 SARS-CoV-2, SARS-CoV-1, 또는 MERS-CoV인 면역원성 구축물.
- [0292] 27. 실시양태 26에 있어서, 감염체가 SARS-CoV-2인 면역원성 구축물.
- [0293] 28. 실시양태 27에 있어서, 항원이 재조합 전장 SARS-CoV-2 단백질이거나, 또는 항원 생산 작용제가 재조합 전장 SARS-CoV-2 단백질을 코딩하는 것인 면역원성 구축물.
- [0294] 29. 실시양태 21, 또는 본 세트에서의 임의의 다른 실시양태에 있어서, 전장 SARS-CoV-2 단백질이 SARS-CoV-2 스파이크 당단백질, SARS-CoV-2 뉴클레오캡시드 단백질, 또는 SARS-CoV-2 막 단백질인 면역원성 구축물.
- [0295] 30. 실시양태 27에 있어서, 항원이 단백질 서브유닛이거나, 또는 항원 생산 작용제가 단백질 서브유닛을 코딩하는 것인 면역원성 구축물.
- [0296] 31. 실시양태 30에 있어서, 단백질 서브유닛이 SARS-CoV-2 스파이크 당단백질 S1 영역, S2 영역, 또는 수용체 결합 도메인 (RBD) 영역에 상응하는 것인 면역원성 구축물.
- [0297] 32. 실시양태 27, 또는 본 세트에서의 임의의 다른 실시양태에 있어서, 항원이 SARS-CoV-2 스파이크 당단백질의 면역원성 서열에 상응하는 펩티드이거나, 또는 항원 생산 작용제가 SARS-CoV-2 스파이크 당단백질의 면역원성 서열에 상응하는 펩티드를 코딩하는 것인 면역원성 구축물.
- [0298] 33. 실시양태 32에 있어서, 펩티드가 서열식별번호: 1-8 중 어느 하나의 서열을 포함하는 것인 면역원성 구축물.
- [0299] 34. 실시양태 27에 있어서, 항원 생산 작용제가 mRNA 또는 pDNA인 면역원성 구축물.
- [0300] 35. 실시양태 1 또는 실시양태 3, 또는 본 세트에서의 임의의 다른 실시양태에 있어서, 감염체가 박테리아, 기생충, 원생동물, 또는 진균인 면역원성 구축물.
- [0301] 36. 실시양태 1 또는 실시양태 3, 또는 본 세트에서의 임의의 다른 실시양태에 있어서, 항원 또는 항원 생산 작용제가 NP의 0.5-20 wt.%로 존재하는 것인 면역원성 구축물.
- [0302] 37. 실시양태 1 또는 실시양태 3에 있어서, 면역원성 구축물이 적어도 하나의 올리고뉴클레오타이드를 추가로 포함하는 것인 면역원성 구축물.
- [0303] 38. 실시양태 37에 있어서, 적어도 하나의 올리고뉴클레오타이드가 양이온성 중합체와 정전기적으로 결합되는 것인 면역원성 구축물.
- [0304] 39. 실시양태 38에 있어서, 적어도 하나의 올리고뉴클레오타이드가 siRNA, miRNA, miRNA 모방체, 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 것인 면역원성 구축물.
- [0305] 40. 실시양태 38에 있어서, 적어도 하나의 올리고뉴클레오타이드가 siRNA를 포함하는 것인 면역원성 구축물.
- [0306] 41. 실시양태 40에 있어서, siRNA가, 그의 발현 또는 상향조절이 세포의 면역억제와 연관되는 유전자를 억제하거나 하향조절하는 것인 면역원성 구축물.
- [0307] 42. 실시양태 41에 있어서, 세포가 항원-제시 세포인 면역원성 구축물.
- [0308] 43. 실시양태 42에 있어서, 항원-제시 세포가 수지상 세포 또는 대식세포인 면역원성 구축물.
- [0309] 44. 실시양태 43에 있어서, 유전자가 STAT3, IDO-1, IL-6, 또는 PD-L1인 면역원성 구축물.
- [0310] 45. 실시양태 37에 있어서, 올리고뉴클레오타이드가 NP의 1-10 wt.%로 존재하는 것인 면역원성 구축물.
- [0311] 46. 실시양태 1 또는 실시양태 3, 또는 본 세트에서의 임의의 다른 실시양태에 있어서, 면역원성 구축물이 세포에 대한 표적화제를 추가로 포함하는 것인 면역원성 구축물.
- [0312] 47. 실시양태 46에 있어서, 세포가 항원-제시 세포인 면역원성 구축물.

- [0313] 48. 실시양태 47에 있어서, 항원-제시 세포가 수지상 세포 또는 대식세포인 면역원성 구축물.
- [0314] 49. 실시양태 48에 있어서, 표적화제가 만노스; 항원-제시 세포 상에 표시된 에피토프를 인식하고 그와 결합하는 모노클로날 또는 폴리클로날 항체 또는 그의 단편; 또는 항원-제시 세포 상의 표면 수용체와 결합하는 리간드 중 적어도 하나를 포함하는 것인 면역원성 구축물.
- [0315] 50. 실시양태 3에 있어서, 약 10 nm 내지 약 10 마이크로미터의 유체역학적 직경을 갖는 면역원성 구축물.
- [0316] 51. 실시양태 1 또는 실시양태 3, 또는 본 세트에서의 임의의 다른 실시양태에 있어서, 약 30 nm 내지 약 200 nm의 유체역학적 직경을 갖는 면역원성 구축물.
- [0317] 52. 실시양태 1 또는 실시양태 3, 또는 본 세트에서의 임의의 다른 실시양태에 있어서, 약 80 nm 내지 약 999 nm의 유체역학적 직경을 갖는 면역원성 구축물.
- [0318] 53. 복수개의 실시양태 1 또는 실시양태 3, 또는 본 세트에서의 임의의 다른 실시양태의 면역원성 구축물을 포함하는 면역원성 조성물.
- [0319] 54. 실시양태 1 또는 실시양태 3, 또는 본 세트에서의 임의의 다른 실시양태의 면역원성 구축물, 및 적어도 하나의 생물학상 또는 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 조성물.
- [0320] 55. 실시양태 1 또는 실시양태 3, 또는 본 세트에서의 임의의 다른 실시양태의 면역원성 구축물, 및 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 백신.
- [0321] 56. 세포를 실시양태 1 또는 실시양태 3, 또는 본 세트에서의 임의의 다른 실시양태의 면역원성 구축물과 접촉시키는 것을 포함하는, 항원 및 아주반트를 세포에 공동-전달하는 방법.
- [0322] 57. 실시양태 56에 있어서, 세포가 항원-제시 세포인 방법.
- [0323] 58. 실시양태 57에 있어서, 세포가 수지상 세포 또는 대식세포인 방법.
- [0324] 59. 실시양태 56에 있어서, 세포가 근육 세포인 방법.
- [0325] 60. 실시양태 1 또는 실시양태 3, 또는 본 세트에서의 임의의 다른 실시양태의 면역원성 구축물의 면역- 자극 양을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법.
- [0326] 61. 실시양태 60에 있어서, 대상체에서 감염체에 대항한 면역 반응을 유도하는 것을 초래하는 방법.
- [0327] 62. 실시양태 60에 있어서, 대상체에서 감염성 질환을 치료 또는 예방하는 것을 초래하는 방법.
- [0328] 63. 실시양태 62에 있어서, 대상체가 인간인 방법.
- [0329] 64. 실시양태 62에 있어서, 대상체가 면역저하된 것인 방법.
- [0330] 65. 실시양태 62에 있어서, 면역원성 구축물이 경피로, 근육내로, 흡입에 의해, 또는 비강내로 투여되는 것인 방법.
- [0331] **XIV. 실험 실시예**
- [0332] **실시예 1. 면역원성 구축물의 제조**
- [0333] PEI 및 PEG로 코팅된 메소다공성 실리카 기반 나노입자는 이전에 기재된 바와 같이 합성되었다 (예를 들어, 국제 출원 번호 PCT/US2016/022655 참조; 이는 그 전체 내용이 본원에 참조로 포함됨). 간단히 언급하면, 메소다공성 실리카 나노입자 (MSNP)는 졸-겔 합성에 의해 합성되었다. MSNP 코어는 폴리에틸렌이민 (PEI) 및 폴리에틸렌글리콜 (PEG)로 층별로 코팅되었다. MSNP 상의 PEI는 또한 증진된 올리고뉴클레오타이드 전달 효능 및 안전성을 위해 가교 (주로 그 자체로)되었다 (문헌 [Ngamcherdtrakul et al., *Advanced Functional Materials*, 25(18):2646-2659, 2015] 참조). 이러한 가교는 카고의 완충 능력과 엔도솜 탈출을 증가시키고, 또한 나노입자 플랫폼 (NP)의 표면 전하를 감소시킨다. NP 또는 면역원성 구축물의 표면 전하를 감소시키면, 백신접종에 중요한 항원 제시 세포의 안전성이 초래된다 (도 16 참조). 본 실시예에서 사용된 MSNP의 세공 크기는 TEM에 의해 2-3 nm인 것으로 측정되었고, 배럿-조이너-할렌다(Barrett-Joyner-Halenda) (BJH) 세공 크기 분석 (예를 들어, 질소 흡착 및 탈착을 포함)에 의해 6.6 nm인 것으로 측정되었다. 가교된 PEI 및 PEG로 코팅된 MSNP는 이후 나노입자 플랫폼 또는 "NP"로서 지칭된다.
- [0334] CpG 1826 (마우스 서열; 인비보젠)은 10분 혼합에 의해 NP에 정전기적으로 로딩되었지만, 더 짧은 시간 (2-5

분)이 또한 효과적이었다. 로딩은 원심분리에 의해 카고-로딩된 NP를 분리할 때 상청액 중의 유리 카고 분자의 부재에 의해 확인된 바와 같이 완전한 결합 방식으로 수행되었다. siRNA는 Dy677 염료 [다르마콘(Dharmacon)]와 접합되므로, 형광 신호로써 정량화되었다. 상청액 중의 미결합된 CpG 및 siRNA 카고 함량은 나노드롭 분광광도계, 마이크로플레이트 분광광도계 또는 겔 전기영동에 의해 측정되었다. SIINFEKL (SF; 서열식별번호: 90) 펩티드는 NP와 2시간 혼합함으로써 NP (PEI 층 위)와의 비공유 상호작용을 통해 로딩되었지만, 더 짧은 시간도 효과적이었다. 큰 단백질 (항체, 전장 단백질)은 전형적으로 공유 결합에 의해 로딩되지만 (실시예 4), 비공유 결합도 가능하다. 큰 단백질 카고, 예컨대 스파이크 단백질은 메소다공성 실리카의 작은 세공 (예를 들어, 2-6 nm) 내부에 캡슐화되지 않고, 그 대신 물질의 표면에 부착된다 (예를 들어, PEG-PEI 층에 접합 또는 정전기적으로 결합되거나, 또는 외부 실리카 표면 상에 흡착됨).

[0335] 상청액 (원심분리기 상) 중의 미결합된 펩티드 또는 단백질의 양은 펩티드/단백질 상에 접합된 형광 염료의 형광 신호 또는 BCA 검정에 의해 명확히 규명되었다. 다른 단백질 검정이 또한 사용될 수 있다. 다수 유형의 카고 로딩 시, 그 결과로 생성되는 면역원성 구축물의 유체역학적 크기 (직경)는 세포성 흡수에 적합한 5 마이크로미터 미만 (예를 들어, 1 마이크로미터 미만)으로 유지된다. 도 2에 제시된 바와 같이, NP에 5 wt.% SF (비공유 결합을 포함) 및 2 wt.% CpG가 로딩되었을 때, 이는 약 100 nm의 유체역학적 크기를 유지하였다. 표 3에 제시된 바와 같이, 나노입자 플랫폼 (열중량 분석 (TGA)에 의해 명확히 규명된 MSNP-PEI-PEG [15 wt.% 가교된 PEI 및 10 wt.% PEG가 로딩된 MSNP])에 약 3 wt.% 스파이크 단백질 (예를 들어, 공유 결합을 포함), 2 wt.% siRNA 및 4 wt.% CpG를 로딩하였고, 이는 150 nm 미만의 유체역학적 크기를 유지하였다. siRNA 및 CpG는 면역원성 구축물에 마지막으로 로딩된다. 약 2-4 wt.%의 siRNA 로딩으로, CpG는 150 nm 미만의 크기를 유지하면서 약 4-9 wt.%로 로딩될 수 있다 (표 4). CpG, siRNA 및 펩티드는 상응하는 최종 wt.%에서 완전한 결합 방식 (원심분리 시 상청액 중의 미결합된 카고의 부재에 의해 확인됨)으로 이전에 기재된 바와 같이 NP 용액과 혼합함으로써 로딩되었다. CpG 1826 (마우스 서열)이 실시예 1-4 전반에 걸쳐 사용되었지만, CpG 7909/2006 (인간 서열)이 또한 평가되었으며 유사한 특징을 나타냈다. 모든 퍼센트 로딩은 NP의 중량을 기준으로 한다.

[0336] 표 3은 1) 15 wt.% 가교된 PEI 및 10 wt.% PEG로 코팅된 메소다공성 실리카 나노입자 (NP), 2) 약 2 wt.% siRNA 및 약 6 wt.% CpG가 로딩된 NP, 3) 스파이크 단백질 (3 wt.%) 접합된 NP (스파이크-NP), 및 4) 약 2 wt.% siRNA 및 약 4 wt.% CpG가 로딩된 스파이크-NP의 유체역학적 크기를 제시한다. 평균 크기 (Z-평균) 및 다분산도 지수 (PDI)는 맬번 제타사이저를 사용한 3가지 측정값으로부터 제시된다. 모든 로딩은 나노입자 플랫폼 (NP 또는 PEG-PEI-MSNP)의 중량을 기준으로 한다.

[0337] 표 3:

물질	유체역학적 크기	PDI
NP	90.1 ± 0.8	0.17 ± 0.03
(2%) siRNA-(6%) CpG-NP	106.6 ± 0.4	0.15 ± 0.01
스파이크-NP	84.4 ± 0.5	0.12 ± 0.01
스파이크-(2%) siRNA-(4%) CpG-NP	146.1 ± 6.1	0.18 ± 0.01

[0338]

[0339] 표 4는 PEI 및 PEG로 코팅되고 NP의 중량 기준으로 약 2-4 wt.% siRNA 및 약 4-9 wt.% CpG가 로딩된 메소다공성 실리카 나노입자 (NP)의 유체역학적 크기를 제시한다.

[0340] 표 4:

물질	유체역학적 크기	PDI
(2%) siRNA-(4%) CpG-NP	95.5 ± 1.3	0.14 ± 0.01
(2%) siRNA-(6%) CpG-NP	106.6 ± 0.4	0.15 ± 0.01
(2%) siRNA-(9%) CpG-NP	146.7 ± 1.5	0.22 ± 0.03
(4%) siRNA-(6%) CpG-NP	120.4 ± 1.7	0.17 ± 0.02

[0341]

[0342] CpG 외에도, 다른 아주반트, 예컨대 폴리 I:C [아디포젠(Adipogen)]가 면역원성 구축물 상에 비공유적으로 로딩될 수 있다. 폴리 I:C는 폴리 I:C 용액과 NP 용액의 10분 혼합에 의해 정전기적으로 및 완전한 결합 방식으로

NP에 로딩되었다. 유체역학적 크기는 약 2 wt.% 로딩에서 작게 유지되었지만 (88 nm) 약 9 wt.% 로딩에서는 상당히 증가하였다 (4.8 마이크로미터) (도 3).

[0343] **실시예 2. 면역억제 유전자 (예를 들어, STAT3, PD-L1)를 녹다운시키기 위한 CpG 및 올리고뉴클레오타이드 (예를 들어, siRNA)의 NP 공동-전달**

[0344] STAT3는 강력한 면역억제 유전자로 간주된다. STAT3에 대항하여 siRNA가 로딩된 (siSTAT3) NP의 녹다운 효능을 결정하기 위해, 면역 세포 (즉, 수지상 세포, 대식세포) 및 다양한 암 세포 (B16-F10, HCC1954, D17)를 RNA 간섭 및 qRT-PCR 전에 48시간 동안 siSTAT3-NP (실시예 1로부터의, PEI 및 PEG로 코팅된 메소다공성 실리카)로 처리하여 세포주에서 STAT3의 녹다운 효능을 결정하였다. 도 4a에 제시된 바와 같이, 면역원성 구축물 (siSTAT3-NP)은 면역 및 암 세포주 둘 다에서 >70% 표적 유전자 녹다운을 초래한다. 동일한 siSTAT3 서열은 인간, 개 및 마우스 세포에서 STAT3 유전자를 녹다운시킬 수 있다 (도 4a). siRNA와 CpG 둘 다가 로딩된 동일한 면역원성 구축물은 여전히 면역 세포와 암 세포 둘 다에서 STAT3를 녹다운시키는데 효과적이었다 (도 4b). 흥미롭게도, siSCR-NP는 또한 DC에서 STAT3 수준을 감소시키는 것으로 밝혀졌다 (도 4c 참조). 이는 세포 생존력이 미처리된 대조군에 비해 변하지 않았기 때문에 NP 독성에 의해 유발된 것이 아니며, STAT3 mRNA는 하우스키핑 mRNA로 정규화되었다. 임의의 설명에 얽매는 것은 아니지만, 이는 항산화제가 이전에 STAT3 활성화를 포함한, 면역 억제 경로에 길항작용을 하는 것으로 보고되었기 때문에 메소다공성 실리카 나노입자의 항산화 특성 때문일 수 있다고 제안된다 (Yoon et al., *Autophagy*, 6(8):1125-1138, 2010). 다른 한편으로는, 다르마펙트 (호리존 디스커버리(Horizon Discovery)에 의한 양이온성 지질 (비-항산화제)에 기반한 상업적 형질감염 인자)는 DC에서 STAT3 발현을 증가시키며 (도 4c), 이는 바람직하지 않은 면역억제 TME로 이어질 수 있는 것으로 밝혀졌다. 도 4d는 폐 세포에서 PD-L1 단백질 발현을 녹다운시키기 위해 PD-L1 siRNA를 전달하기 위해 나노입자가 또한 사용될 수 있음을 제시한다. 이는 문헌 [Ngamcherdtrakul et al., *Advanced Functional Materials*, 25(18):2646-2659, 2015 and Morry et al., *Biomaterials*, 66:41-52, 2015]에 기재된 항산화제 메소다공성 실리카 나노입자 플랫폼의 사용이 STAT3-매개 경로를 제어하는데 지질 나노입자보다 유리할 수 있음을 시사한다.

[0345] 150 nm 미만의 면역원성 구축물의 유체역학적 크기를 유지하면서 NP (PEG-PEI-MSN)에 NP의 2-4 wt.% siRNA 및 4-9 wt.%가 로딩될 수 있다 (표 4). CpG 및 siSTAT3의 생체내 NP 공동 전달은 도 5 및 6에 제시된 바와 같이 CpG 또는 siSTAT3 단독의 NP 전달보다 더 나은 적응 면역을 촉발시킨다. C57BL/6 마우스의 양쪽 어깨에 250K 및 100K B16F10 흑색종 세포를 체내 이식하여 국소 (원발성) 및 원위 (전이성) 종양을 각각 모델링하였다. 종양 체내 이식 후 8일에, 처리물을 각각 3일 간격으로 총 3회 용량으로 국소 종양에 종양 내로 주사하였고, 원위 종양은 미처리된 채로 방치하였다. 종양 크기 및 생존율을 도 5a-c에 제시된 바와 같이 매주 적어도 2회 모니터링하였다. 도 5는 siSTAT3 및 CpG의 NP 공동-전달 (siSTAT3-CpG-NP)이 (siSTAT3에 의한) 면역억제 환경을 조정하여, 더 큰 전신 항종양 면역 반응을 야기한다는 것을 제시하며, 이는 CpG 단독을 전달하는 NP (CpG-NP) 또는 siTAT3 단독을 전달하는 NP (siSTAT3-NP)와 비교하여 국소 처리된 종양 (도 5a)과 원위 종양 (도 5b) 둘 다에서의 더 큰 종양 감소 및 더 큰 생존율 (도 5c)에 의해 입증된다. 도 6은 siSTAT3-CpG-NP 처리가 국소 (처리된) 및 원위 (미처리된) 종양 (도 6a) 및 연관 배액 림프절 (DLN) 둘 다에서 유의미하게 더 높은 CD8/Treg 비를 초래하였음을 제시하며 ($p < 0.05$ vs. 식염수) (도 6b), 이는 성공적인 계내 종양 백신접종을 확인시켜 준다. 조절 T 세포 (Treg)는 전형적으로 환자의 종양에서 상승되며 CD8+ T 세포 활성을 포함한 항종양 면역 반응을 억제한다. 활성화된 T 세포는 또한 종양 배액 림프절에서 더 많이 증식하였다 (도 6c). 이러한 결과는 면역 세포 및 다른 세포 (예를 들어, 암 또는 근육 세포)에서 표적 유전자를 녹다운시킬 수 있는 면역원성 구축물의 능력을 입증하며, siRNA 및 아주반트 (예를 들어, CpG)의 공동-전달을 위해 본 개시내용의 면역원성 구축물을 사용하는 이론적 근거를 제공한다. 도 5 및 6에서 계내 암 백신접종에 대해, 종양은 항원에 대한 저장소로서 의존하였음을 주목해야 한다 (따라서 외부 항원은 구축물에 추가되지 않았음).

[0346] **실시예 3. 적응 (항원-특이적) 면역 반응을 유도하기 위한 CpG 및 항원의 NP 공동-전달**

[0347] 전신 항원-특이 면역을 유도할 수 있는 CpG-SF-NP (CpG 및 SF가 로딩된 NP)의 능력을 결정하기 위한 연구가 시행되었다. 간단히 언급하면, C57BL/6 마우스 ($n=3$ /군)에게 CpG-SF-NP, SF 단독이 로딩된 NP (SF-NP) 또는 CpG 단독이 로딩된 NP (CpG-NP), 및 불완전 프로틴트 아주반트 (IFA)로 제형화된 SF (IFA/SF)의 면역원성 구축물을 발바닥을 통해 주사하였다. 미처리된 마우스가 대조군으로서 포함되었다. 처리 후 1주일에, 마우스의 비장으로부터 세포를 채취하여, 골지블록(Golgi block)으로 처리하고 SF의 존재 또는 부재 하에서 6시간 동안 인큐베이션하였다. 그의 생산이 CD8+ T-세포 반응에 상응하는 세포내 IFN γ 가 유동 세포계수법에 의해 분석되었다. 도 7에 제시된 바와 같이, CpG-SF-NP는 생체의 펩티드 재자극 후 탁월한 CD8+ T-세포 반응을 유도하였다. 실시예 1-3으로부터의 결과는 아주반트, 항원 및/또는 올리고뉴클레오타이드의 공동-전달을 위해 본 개시내용의 면역원성

구축물을 사용하는 것에 대한 강력한 이론적 근거를 제공한다.

[0348] 실시예 4. 스파이크 단백질-접합된 NP (면역원성 구축물)의 합성

[0349] 예를 들어, 전장 SARS-CoV-2 스파이크 당단백질 (시노 바이오테크놀로지)이 NP (PEI-PEG-MSNP)에 공유 부착되었다. 간단히 언급하면, 스파이크 단백질은 NP와 혼합하고 4°C에서 밤새 진탕하기 전에 1시간 동안 티올화되었다. 진탕 후, 최종 면역원성 구축물을 세척하고, 최종 스파이크 단백질 함량은 상청액의 BCA 검정에 의해 결정된 바와 같이 미결합된 단백질의 양을 기준으로 NP의 3 wt.%인 것으로 결정되었다. siRNA (루시페라제 또는 비-표적 스크램블된 siRNA에 대한) 및 CpG는 정전기적 상호작용 (실온에서 5-10분 동안 진탕)을 통해 면역원성 구축물에 마지막으로 로딩되었다. 스파이크-접합된 NP의 유체역학적 크기는 100 nm 미만이었으며, 스파이크 당단백질의 로딩 후 150 nm 미만으로 유지되었다 (표 3 및 도 8a). 스파이크-NP는 siRNA를 효과적으로 전달하여 인간 세포에서 모델 유전자 (루시페라제)를 녹다운시킬 수 있었다 (도 8b). 간단히 언급하면, 세포를 웰당 3500개 세포로 플레이팅하고 37°C에서 밤새 인큐베이션하였다. 그 다음날, 세포를 30 또는 60 nM의 siRNA 용량으로 스파이크-NP로 처리하였다. 처리 후 48시간에, 세포를 용해시키고 제조 프로토콜 [썬모피셔 사이언티픽(ThermoFisher Scientific)]에 따라 루시페라제 발광 검정 키트 (썬모피셔 사이언티픽)에 의해 루시페라제 활성을 분석하고 BCA 단백질 검정 키트에 의해 단백질 농도를 분석하였다. 용해물의 루시페라제 활성은 동일한 웰 중 상응하는 단백질 농도로 정규화되었고 미처리된 대조군의 백분율로서 보고되었다. 모든 처리는 4중으로 수행되었다.

[0350] 실시예 5. 지질-코팅된 인산칼슘 나노입자 플랫폼 (CaP-L)의 합성

[0351] 인산칼슘 나노입자 (CaPNP)는 유중수 마이크로 에멀전에서 합성되었다. 간단히 언급하면, 60 μ L의 2.5 M CaCl_2 (피셔 사이언티픽; USA)를 4 mL의 시클로헥산 [시그마 (Sigma; USA)]/이게팔(Igepal) CO-520 (시그마, USA) (71:29, v/v)에 분산시켜 칼슘 상을 형성하였다. 60 μ L의 12.5 mM Na_2HPO_4 (피셔 사이언티픽, USA)를 또 다른 4 mL의 시클로헥산/이게팔 CO-520 (71:29, v/v)에 분산시켜 인산염 상을 형성하였다. CHCl_3 (피셔 사이언티픽, USA) 중 40 μ L의 20 mM 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 [아반티 폴라 리피즈 (Avanti Polar Lipids; USA)]을 인산염 상에 추가하였다. 이어서 인산염 상을 칼슘 상에 적가하였다. 혼합물을 실온에서 0, 10, 15 또는 20분 동안 교반하였다. 등용적의 에탄올 [데콘 랩스 (Decon Labs; USA)]을 추가하여 마이크로 에멀전을 깨뜨렸다. CaPNP를 21,000 g에서 15분 동안 원심분리하여 수집한 다음, 무수 에탄올로 3회 세척하여 잔류 오일 상을 제거하였다. 펠렛을 100 μ L의 CHCl_3 에 현탁시켰다. CaP-L은 CHCl_3 중 10 μ L의 CaPNP를 CHCl_3 중 1.4 μ L의 20 mM 디메틸디옥타데실암모늄 브로마이드 (시그마, USA), 1.4 μ L의 20 mM 콜레스테롤 (시그마, USA), 2.8 μ L의 20 mM 디스테아로일-rac-글리세롤-PEG2K (아반티 폴라 리피즈, USA), 및 0.7 μ L의 20 mM 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (시그마, USA)과 혼합한 다음, 약간의 수조 초음파처리를 통해 형성되었다. 그 이후 CHCl_3 를 감압 하에서 제거하고, 100 μ L의 PBS 1X (pH=7.2)로 재수화하여 CaP-L을 형성하였다. CaP-L의 유체역학적 크기는 제타사이저 (ZS-90/맬번; 영국 맬번)로 측정하였다 (표 5).

[0352] 표 5는 지질-코팅된 인산칼슘 NP (CaP-L) 및 0.3 중량%의 CaP-L로 siRNA가 로딩된 CaP-L의 유체역학적 크기를 제시한다.

[0353] 표 5:

물질	유체역학적 크기	PDI
CaP-L	98.1 $\pm$ 0.6	0.25 $\pm$ 0.02
siRNA/CaP-L	90.6 $\pm$ 2.8	0.26 $\pm$ 0.03

[0354] siRNA 로딩된 지질-코팅된 CaP-L (siRNA-CaP-L)의 합성

[0355] siRNA 로딩된 인산칼슘 나노입자는 유중수 마이크로에멀전에서 합성되었다. 간단히 언급하면, 5 μ g의 siRNA를 60 μ L의 2.5 M CaCl_2 (피셔 사이언티픽, USA)에 추가하고, 그 결과로 생성된 용액을 이어서 4 mL의 시클로헥산/이게팔 CO-520 (시그마, USA) (71:29, v/v)에 분산시켜 칼슘 상을 형성하였다. 60 μ L의 12.5 mM Na_2HPO_4 (피셔 사이언티픽, USA)를 또 다른 4 mL의 시클로헥산/이게팔 CO-520 (71:29, v/v)에 분산시켜 인산염 상을 형성하였다. CHCl_3 (피셔 사이언티픽, USA) 중 40 μ L의 20 mM 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 (아반티 폴라 리피즈, USA)을 인산염 상에 추가한 다음, 인산염 상을 칼슘 상에 적가하였다. 혼합물을 실온에서

10분 동안 교반한 후, 등용적의 에탄올 (테콘 랩스, USA)을 부가하여 마이크로에멀전을 깨뜨렸다. 그 결과로 생성된 siRNA-CaPNP를 21,000 g에서 15분 동안 원심분리하여 수집한 다음, 무수 에탄올로 3회 세척하여 잔류 오일 상을 제거하였다. 이렇게 하여 수득된 펠릿을 100 μ L의 CHCl_3 에 현탁시켰다. siRNA-CaP-L은 CHCl_3 중 10 μ L의 siRNA-CaPNP를 CHCl_3 중 1.4 μ L의 20 mM 디메틸디옥타데실암모늄 브로마이드 (시그마, USA), 1.4 μ L의 20 mM 콜레스테롤 (시그마, USA), 2.8 μ L의 20 mM 디스테아로일-rac-글리세롤-PEG2K (아반티 폴라 리피즈, USA), 및 0.7 μ L의 20 mM 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (시그마, USA)과 혼합한 다음, 약간의 수조 초음파처리를 통해 형성되었다. 그 이후 CHCl_3 를 감압 하에서 제거하고, 100 μ L의 PBS 1X (pH=7.2)로 재수화하여 CaP-L을 형성하였다. siRNA-CaP-L 유체역학적 크기는 제타사이저 (ZS-90/멜번; 영국 멜번)로 측정하였다 (표 5). 물질은 인간 세포에서 (모델 단백질로서) 루시페라제를 녹다운시킬 수 있었고 (도 9a), 세포에 안전한 것으로 밝혀졌다 (도 9b).

[0357] siRNA/CpG 로딩된 지질-코팅된 CaP-L (siRNA/CpG-CaP-L)의 합성

[0358] siRNA 로딩된 인산칼슘 나노입자 (siRNA-CaPNP)는 유중수 마이크로에멀전에서 합성되었다. 간단히 언급하면, 5 μ g의 siRNA (스크램블 siRNA)를 60 μ L의 2.5 M CaCl_2 (피셔 사이언티픽, USA)에 부가하였다. 이어서 상기 용액을 4 mL의 시클로헥산 (시그마, USA)/이게팔 CO-520 (시그마, USA) (71:29, v/v)에 분산시켜 칼슘 상을 형성하였다. 60 μ L의 12.5 mM Na_2HPO_4 (피셔 사이언티픽, USA)를 또 다른 4 mL의 시클로헥산/이게팔 CO-520 (71:29, v/v)에 분산시켜 인산염 상을 형성하였다. CHCl_3 (피셔 사이언티픽, USA) 중 40 μ L의 20 mM 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 (아반티 폴라 리피즈, USA)을 인산염 상에 부가하였다. 이어서 인산염 상을 칼슘 상에 적가하고, 혼합물을 실온에서 10분 동안 교반하였다. 등용적의 에탄올 (테콘 랩스, USA)을 부가하여 마이크로에멀전을 깨뜨리고, 이렇게 하여 수득된 siRNA-CaPNP를 21,000 g에서 15분 동안 원심분리하여 수집한 후, 무수 에탄올로 3회 세척하여 잔류 오일 상을 제거하였다. 그 결과로 생성된 펠릿을 100 μ L의 CHCl_3 에 현탁시켰다. siRNA/CaP-L은 CHCl_3 중 10 μ L의 siRNA-CaPNP를 CHCl_3 중 1.4 μ L의 20 mM 디메틸디옥타데실암모늄 브로마이드 (시그마, USA), 1.4 μ L의 20 mM 콜레스테롤 (시그마, USA), 2.8 μ L의 20 mM 디스테아로일-rac-글리세롤-PEG2K (아반티 폴라 리피즈, USA), 및 0.7 μ L의 20 mM 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (시그마, USA)과 혼합한 다음, 약간의 수조 초음파처리를 통해 형성되었다. 그 이후 CHCl_3 를 감압 하에서 제거하고, siRNA/CpG-CaP-L을 2 μ g의 CpG (CpG 7909/2006)를 함유한 100 μ L의 PBS 1X (pH=7.2)로 재수화하여 형성하였다.

[0359] mRNA/siRNA/CpG 로딩된 지질-코팅된 CaPNP (mRNA/siRNA/CpG-CaP-L)의 합성

[0360] mRNA/siRNA 로딩된 인산칼슘 코어 (mRNA/siRNA-CaPNP)는 유중수 마이크로에멀전에서 합성되었다. 2.5 μ g의 siRNA (스크램블 siRNA) 및 2.5 μ g의 mRNA (반딧불이 루시페라제 mRNA)를 60 μ L의 2.5 M CaCl_2 (피셔 사이언티픽, USA)에 부가하였다. 이어서 상기 용액을 4 mL의 시클로헥산/이게팔 CO-520 (시그마, USA) (71:29, v/v)에 분산시켜 칼슘 상을 형성하였다. 60 μ L의 12.5 mM Na_2HPO_4 (피셔 사이언티픽, USA)를 또 다른 4 mL의 시클로헥산/이게팔 CO-520 (71:29, v/v)에 분산시켜 인산염 상을 형성하였다. CHCl_3 (피셔 사이언티픽, USA) 중 40 μ L의 20 mM 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 (아반티 폴라 리피즈, USA)을 인산염 상에 부가하였다. 이어서 인산염 상을 칼슘 상에 적가하였다. 혼합물을 실온에서 10분 동안 교반하였다. 등용적의 에탄올 (테콘 랩스, USA)을 부가하여 마이크로에멀전을 깨뜨렸다. mRNA/siRNA-CaPNP를 21,000 g에서 15분 동안 원심분리하여 수집한 다음, 무수 에탄올로 3회 세척하여 잔류 오일 상을 제거하였다. 펠릿을 100 μ L의 CHCl_3 에 현탁시켰다. mRNA/siRNA/CaP-L은 CHCl_3 중 10 μ L의 mRNA/siRNA-CaPNP를 CHCl_3 중 1.4 μ L의 20 mM 디메틸디옥타데실암모늄 브로마이드 (시그마, USA), 1.4 μ L의 20 mM 콜레스테롤 (시그마, USA), 2.8 μ L의 20 mM 디스테아로일-rac-글리세롤-PEG2K (아반티 폴라 리피즈, USA), 및 0.7 μ L의 20 mM 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (시그마, USA)과 혼합한 다음, 약간의 수조 초음파처리를 통해 형성되었다. 그 이후 CHCl_3 를 감압 하에서 제거하고, 1 μ g의 CpG (CpG 7909/2006)를 함유한 100 μ L의 PBS 1X (pH=7.2)로 재수화하여 mRNA/siRNA/CpG-CaP-L을 형성하였다.

[0361] 실시예 6. COVID-19 백신 (AIRISE-CoV)을 위한 면역원성 구축물

[0362] AIRISE-CoV 합성 및 특징규명. AIRISE-CoV는 가교된 폴리에틸렌이민 (PEI) 및 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 중합체

층으로 코팅된 메소다공성 실리카 나노입자 (MSNP, 50 nm) 코어로 이루어진다. SARS-CoV-2 스파이크 당단백질 항원 (S)은 본 발명자들의 이전 작업 (문헌 [Ngamcherdtrakul et al., *Advanced Functional Materials*, 25(18):2646-2659, 2015] 및 미국 특허 출원 공개 번호 2017/0173169)에서 항체 로딩과 유사한 외부에서 PEG와의 접합에 의해 로딩된 후, PEI와의 정전기적 상호작용을 통해 CpG 올리고뉴클레오타이드 및 siRNA를 로딩하고 PEG 층에 의한 효소적 분해로부터 보호된다. 생체 환원성 가교를 통해 저분자량 PEI (10 kDa)를 사용하여 독성 없이 siRNA 또는 단백질의 세포질로의 엔도솜 탈출에 필요한 고분자량 PEI (25 kDa)의 효능을 달성할 수 있다. 나노입자 플랫폼은 작은 입자 크기 (~200 nm)를 유지하면서 여러 유형의 카고 (siRNA, CpG)를 로딩하고 보호하기 위한 다양성으로 인해 암 백신 전달에 사용되었다. 암 백신 적용에서, 본 발명자들은 구축물에 항원을 로딩하지 않고, 백신 효과를 생성하기 위해 종양 내부의 항원에 의존한다 (종양내 주사를 통한). AIRISE-CoV의 최종 조성은 15% PEI, 10% PEG (TGA 기준), 3% 스파이크 단백질 (비신코닌산 검정 (BCA) 기준) (모두 NP 중량 기준)이다. CpG 및 siRNA는 NP의 중량을 기준으로, 각각 4% 및 2%로 로딩된다 (완전한 로딩은 나노드롭에 의해 확인됨).

[0363] **나노입자 상의 siSTAT3 및 CpG는 DC 활성화를 효과적으로 촉진한다.** 본 발명자들은 도 10에서, 발바닥 주사 시, siSTAT3 및 CpG 둘 다 로딩된 NP가 단일 성분을 전달하는 NP보다 더 효과적으로 배액 림프절 (DLN)에서 DC를 활성화할 수 있음을 제시한다. AIRISE-처리된 마우스만이 식염수와 비교할 때 배액 림프절에서 활성화된 DC의 비율이 유의미하게 더 높았다 ($p < 0.05$). 비-배액 림프절 (NDLN)에는 활성이 없는 것으로 보이며, 이는 DC 프라이밍의 국소적 효과를 시사한다. 면역 세포 집단을 정량화하기 위한 항체 염색 방법은 공개된 보고서 (문헌 [Ngamcherdtrakul et al., *Advanced Material*, 2021; doi: 10.1002/adma.202100628])를 따른다.

[0364] **AIRISE-CoV로 백신접종된 마우스에서 SARS-CoV-2 IgG 항체의 존재.** 도 11에 제시된 바와 같이, AIRISE-CoV로 백신접종된 BALB/c 마우스는 ELISA에서 종말점 역가에 의해 평가된 바와 같이, 혈청에서 높은 수준의 SARS-CoV-2 결합 IgG 항체를 생성하였다. 종말점 역가는 SARS-CoV-2 결합 항체가 검출가능한 혈청 희석 배수를 나타내며 체액성 면역원성 (항체 생산)의 유도를 평가하는데 널리 사용된다. AIRISE-CoV는 1회 및 2회 용량 후 각각 10^5 및 10^6 의 종말점 역가를 도출했으며 (도 11), 이는 다른 주요 COVID-19 백신 후보와 비슷하거나 더 우수한다 (표 6).

[0365] 도 12a에서, 본 발명자들은 첫 번째 용량 후 최대 12주 동안 모든 면역화된 마우스에서 높은 수준의 IgG 항체가 유지되었음을 제시한다. 또한, 본 발명자들은 전장 스파이크 단백질 항원을 2개의 면역원성 스파이크 펩티드 [JPT 펩티드 테크놀로지스(JPT Peptide Technologies)로부터의 424-433 및 891-906]로 대체하는 것이 상당한 항체 역가를 도출하지 않았음을 제시하며 (도 12b), 이는 전장 스파이크 단백질 항원의 사용에 대한 강력한 이론적 근거를 제공한다. 두 펩티드 모두 정전기적 상호작용을 통해 나노구축물에 로딩되었다. 임의의 설명에 얽매는 것은 아니지만, 두 펩티드는 강한 반응을 이끌어내지 못하였다. 그러나, 동일한 NP가 항원 특이적 면역 반응을 촉발하는 효과적인 펩티드 전달을 이전에 제시하였다 (예를 들어, SF 전달, 도 7).

[0366] 본 발명자들은 발바닥 (도 13, 총 2회 용량) 또는 근육내 (도 14a, 1회 용량만)를 통해 AIRISE-CoV를 주사한 마우스가 지금까지 높은 수준의 항체를 유지했음을 발견하였다 (즉, 발바닥 투여 경로를 통해 최대 54주, 및 근육내 경로를 통해 36주). 이는 항체 생성 및 체액성 면역 유도가 오래 지속된다는 것을 시사한다.

[0367] **표 6. 주요 COVID-19 백신 또는 백신 후보의 항체 (Ab) 반응**

명칭 (회사)	백신 유형	인간에서의 Ab 역가 (vs. 회복기)	마우스에서의 Ab 역가 (종말점 역가)
mRNA-1273 (모더나)	스파이크 (S) 단백질을 코딩하는 mRNA	5.5배	$\sim 10^5$
ChAdOx1 nCoV-19 (아스트라제네카/ 옥스포드)	S 단백질을 발현하는 아데노바이러스 벡터	유사함	$\sim 10^2$ - 10^3
BNT162b1 (화이자/바이오엔테크)	삼량체화 S-RBD를 코딩하는 mRNA	~ 2 내지 5배	N/A
NVX-CoV2373 (노바백스)	삼량체 S 단백질을 갖는 제조함 NP	6배	$\sim 10^5$
INO-4800 (이노비오)	S 단백질을 코딩하는 DNA 백신	N/A	$\sim 10^3$

[0368]

[0369] 스파이크 단백질, siSTAT3 및 CpG를 포함하는 AIRISE-CoV는 면역억제 또는 면역저하 대상체 (예를 들어, 고령

대상체 또는 면역 체계를 저하시키는 질환 및 병태가 있는 대상체)에서 유효한 백신접종을 위해 개발되었다. 그러나, 시험된 정상적인 면역 마우스에서, 본 발명자들은 스파이크 단백질 단독, 스파이크 단백질 및 siSTAT3 (도 14b), 또는 스파이크 단백질 및 CpG (도 14c)가 로딩된 PEI 및 PEG로 코팅된 메소다공성 실리카 나노입자 (NP)가 또한 이들 마우스에서 높고 지속적인 항체 수준을 생성할 수 있었음을 발견하였고, 이는 NP가 유리 항원 (np 없음)보다 더 나은 백신을 생성하기 위해 항원 전달에 효과적으로 사용될 수 있음을 시사한다. 도 14b-14c에 제시된 바와 같이, 1회 용량의 siSTAT3 로딩된 스파이크-NP (도 14b) 또는 1회 용량의 CpG 로딩된 스파이크-NP (도 14c)를 사용한 백신접종이 또한 적어도 36주 동안 지속되는 높은 수준의 SARS-CoV-2 IgG 항체를 도출할 수 있었다. 이는 항체 생성 및 체액성 면역 유도가 오래 지속된다는 것을 추가로 입증한다. 이는 NP가 카고물 보호 및 유지하고 이를 항원 제시 세포에 효과적으로 전달할 수 있는 능력 때문일 수 있다.

[0370] **면역화된 혈청에 의한 SARS-CoV-2 유사 바이러스의 중화.** SARS-CoV-2 특이적 IgG 항체가 SARS-CoV-2를 중화시키는데 효과적인지 결정하기 위해, 본 발명자들은 인간 ACE2 (스파이크 단백질 결합 수용체)를 발현하는 HEK293-유래 세포주를 형질감염시키는 SARS-CoV-2 유사 바이러스를 억제할 수 있는 면역화된 혈청의 능력을 평가하는데 널리 사용되고 있는 방법인 유사 바이러스 (CoV2-S-PsV) 중화 검정을 구축하였다. 이러한 검정은 SARS-CoV-2 스파이크 (S) 단백질로 위형화된 복제-결합, GFP-코딩 리포터 렌티바이러스를 활용한다. 따라서, 중화 능력은 %GFP+ 세포에 의해 결정된다 (즉, 낮은 %GFP+는 중화 항체의 존재로 인해 유사 바이러스가 HEK293-hACE2 세포를 형질감염시킬 수 없음을 나타냄). 도 15는 AIRISE-CoV로 백신접종된 마우스로부터 수득된 혈청에서의 항체 역가가 어떻게 CoV2-S-PsV 감염을 효과적으로 중화시킬 (즉, ACE2 수용체에 대한 결합을 억제할) 수 있었지만, 나이브 마우스로부터의 혈청은 효과가 없었다는 것을 제시한다. 더욱이, 본 발명자들은 표 7에 제시된 바와 같이 2회 용량 후 중화 역가 (바이러스의 50%를 중화시키는데 필요한 희석; NT₅₀)가 회복기 환자 혈청에서 발견된 역가보다 더 높거나 비슷하였다는 것을 발견하였다.

[0371] **표 7**은 도 15에서의 샘플로부터의 중화 역가 (바이러스의 50%를 중화시키는데 필요한 희석; NT₅₀)를 제시한다.

[0372] **표 7:**

혈청 샘플	NT ₅₀
회복기 샘플 1	3.3 x 10 ²
회복기 샘플 2	2.2 x 10 ³
AIRISE-CoV M1 (1회 용량)	5.74 x 10 ¹
AIRISE-CoV M2 (1회 용량)	7.57 x 10 ¹
AIRISE-CoV M3 (1회 용량)	3.02 x 10 ²
AIRISE-CoV M1 (2회 용량)	1.11 x 10 ³
AIRISE-CoV M2 (2회 용량)	6.09 x 10 ³
AIRISE-CoV M3 (2회 용량)	6.34 x 10 ³

[0373]

[0374] **실시예 7. 가교된 PEI 및 PEG를 갖는 나노입자 (NP)는 항원-제시 세포에 안전하다.**

[0375] 도 16에 제시된 바와 같이, siSTAT3 또는 siSTAT3+CpG가 로딩된 본원에 기재된 NP는 골수 유래 수지상 세포 (BMDC, 도 16a) 및 대식세포 (J774, 도 16b) 둘 다에 안전하였다. NP 용량은 35 µg/ml (2 wt.% siRNA; 7 wt.% CpG)였다. 제조업체의 프로토콜에 따라 처리 후 2일에 셀타이터-글로(CellTiter-Glo) 검정에 의해 생존력을 평가하였다.

[0376] **실시예 8. mRNA 로딩된 MSNP 구축물의 합성**

[0377] 메소다공성 실리카 코팅된 가교된 PEI (MSNP-PEI) 또는 가교된 PEI 및 PEG (MSNP-PEI-PEG)는 백신을 생성하기 위한 mRNA 전달에 사용될 수 있다. MSNP-PEI 또는 MSNP-PEI-PEG를 실온에서 15-60분 동안 350 rpm에서 오비탈 진탕기 상에서 PBS 중의 반딧불이 루시페라제 mRNA (나노입자의 1 wt.%)와 혼합하였다. mRNA는 입자의 외부 표면과 정전기적으로 결합되었다. mRNA와 혼합하기 전 및 후의 입자 크기는 제타사이저를 사용하여 측정되었다 (표 8). 미결합된 mRNA를 함유하는 상층액은 혼합물을 원심분리한 후에 수득되었다. 상층액 중의 mRNA 농도는 나노드롭 (ND-1000, 써모 사이언티픽)을 사용하여 분석되었다. mRNA의 97% 초과가 MSNP-PEI 또는 MSNP-PEI-PEG와 결합되었다.

[0378] 표 8은 mRNA가 로딩된 나노입자의 유체역학적 크기를 제시한다.

[0379] 표 8:

물질	Z-평균 (nm)	PDI
MSNP-PEI	100.7 ± 0.5	0.18 ± 0.01
MSNP-PEI-PEG	102.9 ± 1.8	0.16 ± 0.02
MSNP-PEI + 1 wt.% mRNA	222.9 ± 5.4	0.30 ± 0.04
MSNP-PEI-PEG + 1 wt.% mRNA	157.9 ± 2.2	0.35 ± 0.02

[0380]

[0381] XV. 종결 단락

[0382] 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 이해되는 바와 같이, 본원에 개시된 각각의 실시양태는 그의 특정한 언급된 요소, 단계, 성분 또는 구성요소를 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나 또는 이로 이루어질 수 있다. 따라서, 용어 "포함하다" 또는 "포함하는 것"은 "포함하거나, 이로 이루어지거나, 또는 이로 본질적으로 이루어지는" 것을 인용하는 것으로 해석되어야 한다. 이행 용어 "포함하다"는 지정되지 않은 요소, 단계, 성분 또는 구성요소를 심지어 다량으로 포함하지만 이에 제한되지는 않고, 그러한 포함을 허용하는 것을 의미한다. 이행 문구 "로 이루어지는 것"은 지정되지 않은 임의의 요소, 단계, 성분 또는 구성요소를 제외한다. 이행 문구 "로 본질적으로 이루어지는 것"은 실시양태의 범위를 명시된 요소, 단계, 성분 또는 구성요소 및 실시양태에 실질적으로 영향을 미치지 않는 것들로 제한한다. 물질적 효과는 기재된 바와 같은 나노입자 구축물/플랫폼의 활성 (예를 들어, 면역원성)에 있어서의 통계적으로 유의미한 변화를 유발할 수 있을 것이다.

[0383] 달리 표시되지 않는 한, 본 명세서 및 청구범위에 사용된 성분의 양, 특성 예컨대 분자량, 반응 조건 등을 나타내는 모든 숫자는 모든 경우에 "약"이라는 용어에 의해 수식되는 것으로 이해되어야 한다. 따라서, 달리 표시되지 않는 한, 본 명세서 및 첨부된 청구범위에 제시된 수치 파라미터는 본 발명에 의해 수득하고자 하는 원하는 특성에 따라 변할 수 있는 근사치이다. 최소한 청구 범위에 대한 등가 원칙의 적용을 제한하려는 시도가 아니라, 각각의 수치 파라미터는 적어도 보고된 유효 자릿수의 관점에서 그리고 통상적인 반올림 기술을 적용함으로써 해석되어야 한다. 추가의 명확성이 요구되는 경우, 용어 "약"은 명시된 수치 또는 범위와 연계해서 사용될 때 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 합리적으로 부여된 의미를 가지며, 즉 명시된 값의 ±20%; 명시된 값의 ±19%; 명시된 값의 ±18%; 명시된 값의 ±17%; 명시된 값의 ±16%; 명시된 값의 ±15%; 명시된 값의 ±14%; 명시된 값의 ±13%; 명시된 값의 ±12%; 명시된 값의 ±11%; 명시된 값의 ±10%; 명시된 값의 ±9%; 명시된 값의 ±8%; 명시된 값의 ±7%; 명시된 값의 ±6%; 명시된 값의 ±5%; 명시된 값의 ±4%; 명시된 값의 ±3%; 명시된 값의 ±2%; 또는 명시된 값의 ±1%의 범위 이내로, 명시된 값 또는 범위보다 다소 많거나 다소 적은 것을 의미한다.

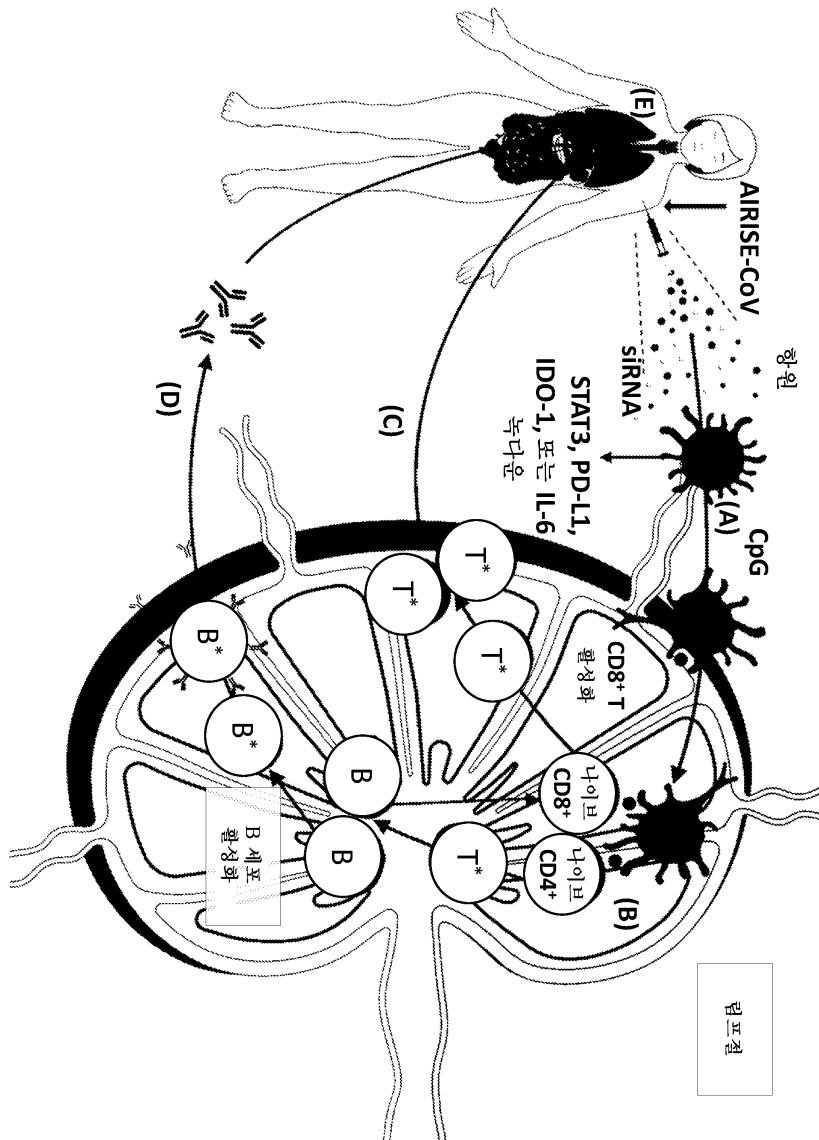
[0384] 본 발명의 넓은 범위를 제시하는 수치 범위 및 파라미터가 근사치임에도 불구하고, 구체적 실시예에 제시된 수치 값은 가능한 한 정확하게 보고된다. 그러나 임의의 수치는 본질적으로 각각의 시험 측정에서 발견된 표준 편차로부터 필연적으로 발생하는 특정 오류를 함유한다.

[0385] 본 발명을 기재하는 문맥에서 (특히 하기 청구범위의 문맥에서) 단수 용어 및 유사한 지시어의 사용은, 본원에서 달리 지시되지 않는 한 또는 문맥에 의해 명백하게 모순되지 않는 한, 단수형 및 복수형 둘 다를 포괄하는 것으로 해석되어야 한다. 본원에서 값의 범위를 언급하는 것은 그 범위 내에 속하는 각각의 별도의 값을 개별적으로 지칭하는 약칭 방법으로서 역할을 할 뿐이다. 본원에 달리 표시되지 않는 한, 각각의 개별 값은 그것이 본원에 개별적으로 인용된 것처럼 본 명세서에 포함된다. 본원에 기재된 모든 방법은 본원에 달리 표시되지 않거나 문맥상 명백하게 모순되지 않는 한 임의의 적합한 순서로 수행될 수 있다. 본원에 제공된 임의의 및 모든 예 또는 예시적인 언어 (예를 들어, "예컨대")의 사용은 단지 본 발명을 더 잘 밝히기 위한 것이며 달리 청구된 본 발명의 범위를 제한하지 않는다. 본 명세서의 어떤 언어도 본 발명의 실행에 필수적인 임의의 비-청구된 요소를 나타내는 것으로 해석되서는 안 된다.

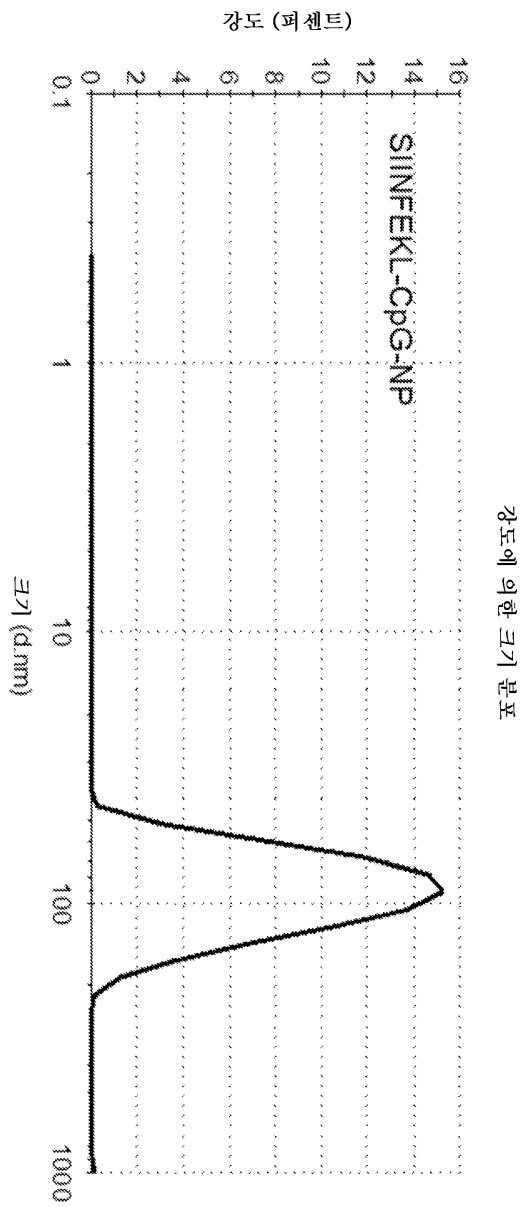
[0386] 본원에 개시된 발명의 대안적인 요소 또는 실시양태의 군화는 제한으로 해석되서는 안 된다. 각각의 군 구성원은 개별적으로 또는 군의 다른 구성원 또는 본원에 있는 다른 요소와 임의로 조합하여 참조 및 청구될 수 있다. 군의 하나 이상의 구성원이 편의 및/또는 특허성을 이유로 군에 포함되거나 또는 군으로부터 결실될 수 있는 것으로 예상된다. 그러한 임의의 포함 또는 결실이 발생하면, 본 명세서는 변형된 바와 같은 군을 함유하는 것으로 간주되므로, 첨부된 청구범위에 사용된 모든 마쿠쉬(Markush) 군의 서면 설명을 충족한다.

- [0387] 본 발명을 수행하기 위해 본 발명자들에게 공지된 최상의 모드를 포함한 본 발명의 특정 실시양태가 본원에 기재되어 있다. 물론, 이들 기재된 실시양태에 대한 변동은 전술한 설명을 관독할 때 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백해질 것이다. 본 발명자는 숙련된 기술자가 그러한 변동을 적절하게 이용하기를 기대하며, 본 발명자들은 본원에 구체적으로 기재된 것과는 다르게 본 발명이 실시되기를 의도한다. 따라서, 본 발명은 적용가능한 법률이 허용하는 바에 따라 본원에 첨부된 청구범위에 인용된 대상의 모든 변형 및 등가물을 포함한다. 더욱이, 본원에서 달리 표시되지 않거나 또는 문맥상 명백하게 모순되지 않는 한, 모든 가능한 변동에서 전술한 요소의 임의의 조합이 본 발명에 의해 포괄된다.
- [0388] 더욱이, 본 명세서 전반에 걸쳐 특허, 인쇄된 출판물, 저널 기사, 기타 서면 텍스트 및 웹 사이트 내용물에 대한 수많은 참조가 만들어졌다 (본원에 참조된 자료). 참조된 자료 각각은 구체적 참조가 포함된 우선권 체인의 첫 번째 출원의 출원 일자로서, 참조된 교시를 위해 그 전체 내용이 개별적으로 본원에 참조로 포함된다. 예를 들어, 공개 데이터베이스에서 이용가능한 본원에 언급된 화학적 화합물 및 핵산 또는 아미노산 서열과 관련하여, 인용된 데이터베이스 항목 내의 정보는 데이터베이스 식별자가 우선권 체인에 있는 출원 텍스트에 처음 포함된 일자로서 본원에 참조로 포함된다.
- [0389] 본원에 개시된 발명의 실시양태는 본 발명의 원리를 예시하는 것임을 이해해야 한다. 이용될 수 있는 다른 변형은 본 발명의 범위 내에 있다. 따라서, 제한이 아닌 예로서, 본 발명의 대안적인 구성이 본원의 교시에 따라서 활용될 수 있다. 따라서, 본 발명은 정확히 제시되고 기재된 것으로 제한되지 않는다.
- [0390] 본원에 제시된 세부사항은, 예로서 그리고 본 발명의 바람직한 실시양태에 대한 예시적인 논의를 위한 목적으로만 제공되며, 본 발명의 다양한 실시양태의 원리 및 개념적 측면에 대한 가장 유용하고 쉽게 이해할 수 있는 설명인 것으로 여겨지는 것을 제공하는 원인에 제시된다. 이와 관련하여, 본 발명의 기본적인 이해를 위해 필요한 것보다는 본 발명의 구조적 세부사항을 더 상세하게 제시하려는 시도는 이루어지지 않으며, 도면 및/또는 실시예와 함께 취해진 설명은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 본 발명의 여러 형태가 어떻게 실제로 구현될 수 있는지를 명백하게 한다.
- [0391] 본 개시내용에 사용된 정의 및 설명은 본 실시예(들)에서 명확하고 모호하지 않게 변형되거나 또는 의미의 적용이 임의의 구축을 의미가 없거나 본질적으로 의미가 없게 만드는 경우를 제외하고 임의의 미래 구축을 제어하도록 의미 및 의도된다. 용어의 구축으로 인해 의미가 없어지거나 본질적으로 의미가 없어지는 경우, 웹스터 사전 (제11판) 또는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 사전, 예컨대 옥스포드 생화학 및 분자 생물학 사전 (제2판) (Ed. Anthony Smith, Oxford University Press, Oxford, 2006), 및/또는 화학 사전 (제8판) (Ed. J. Law & R. Rennie, Oxford University Press, 2020)으로부터의 정의를 취해야 한다.

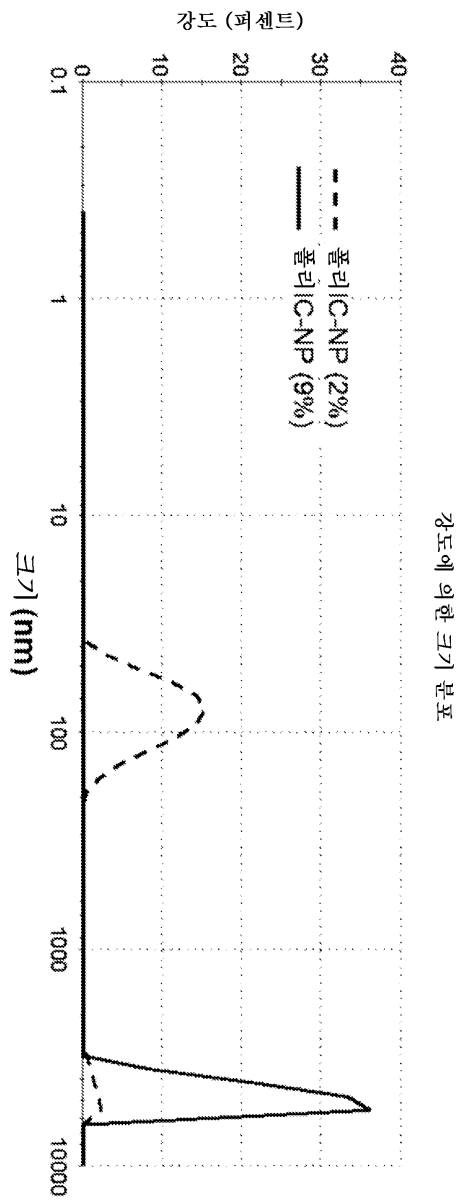
도면
도면1



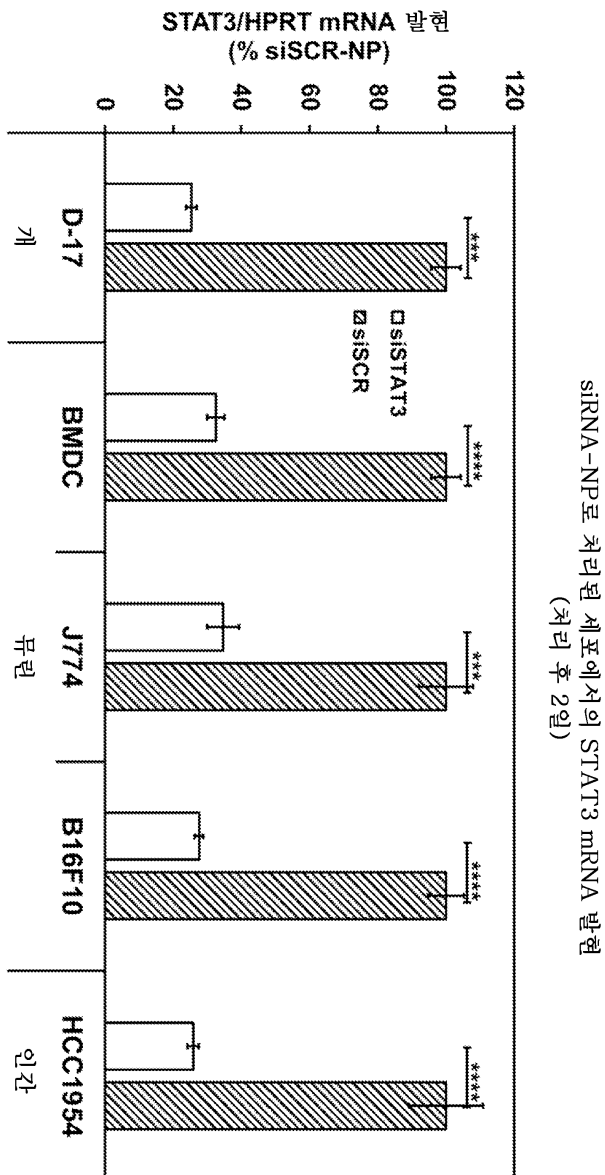
도면2



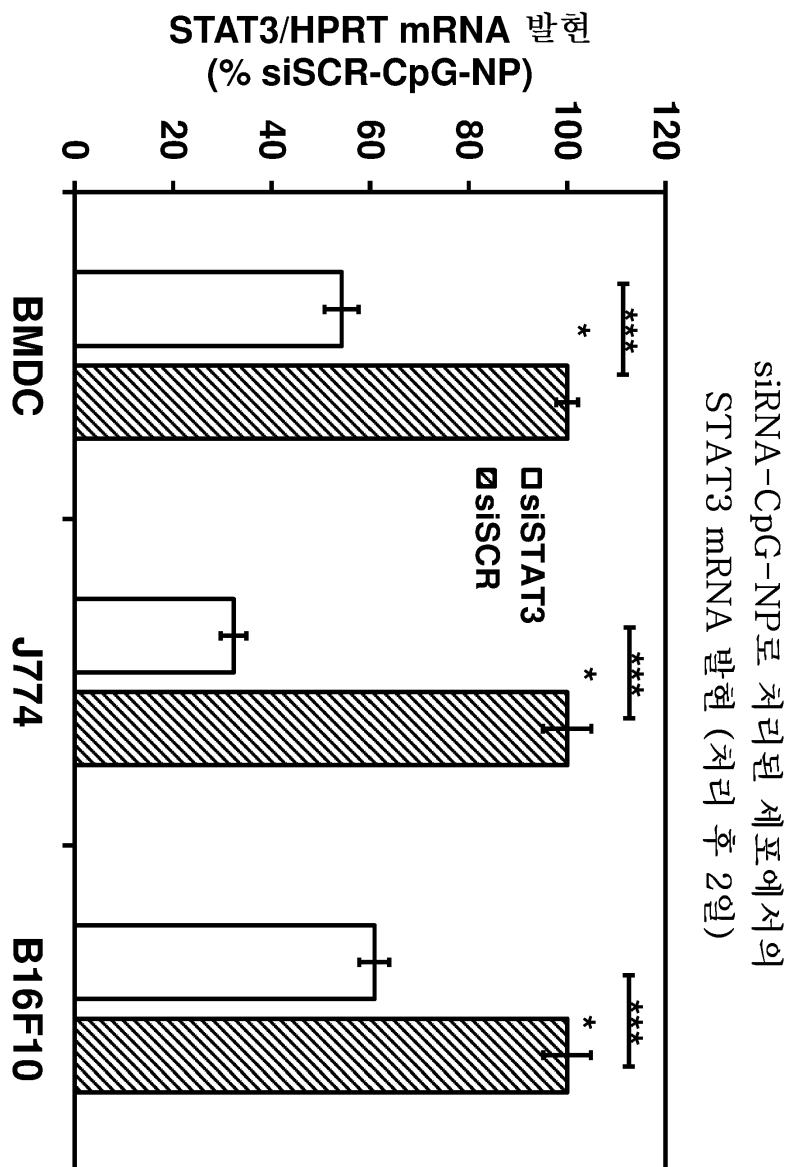
도면3



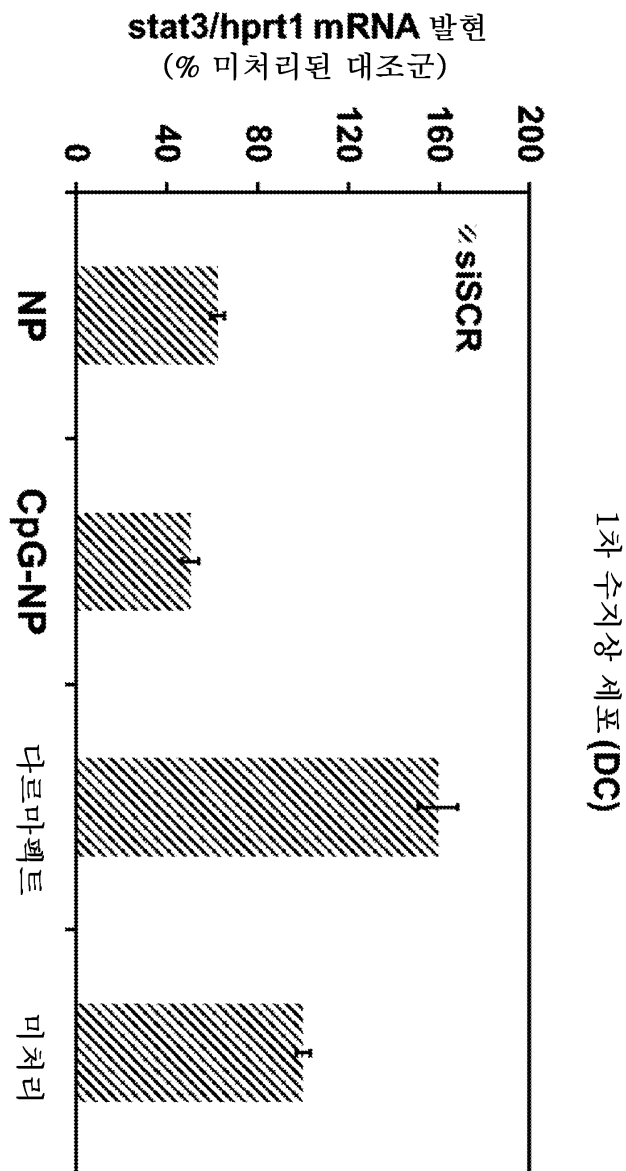
도면4a



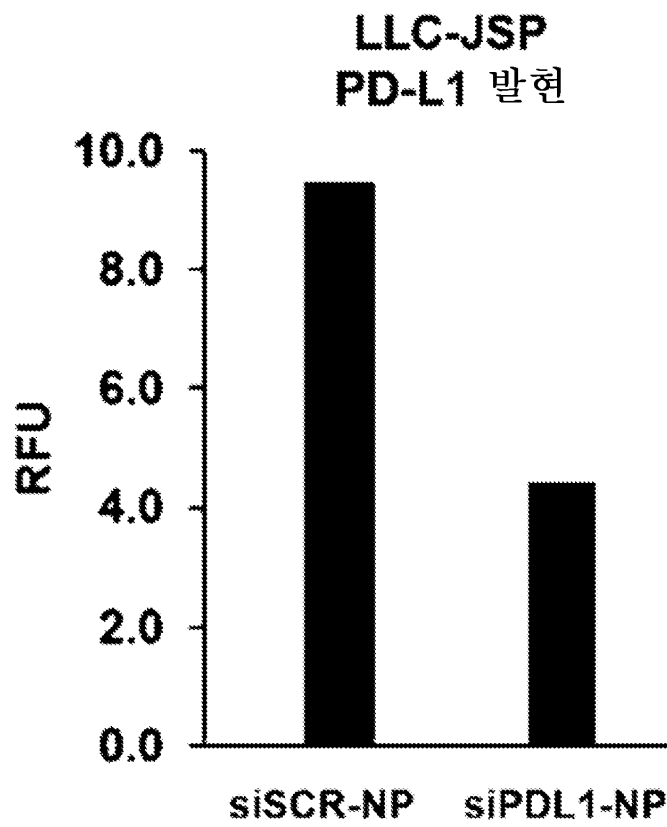
도면4b



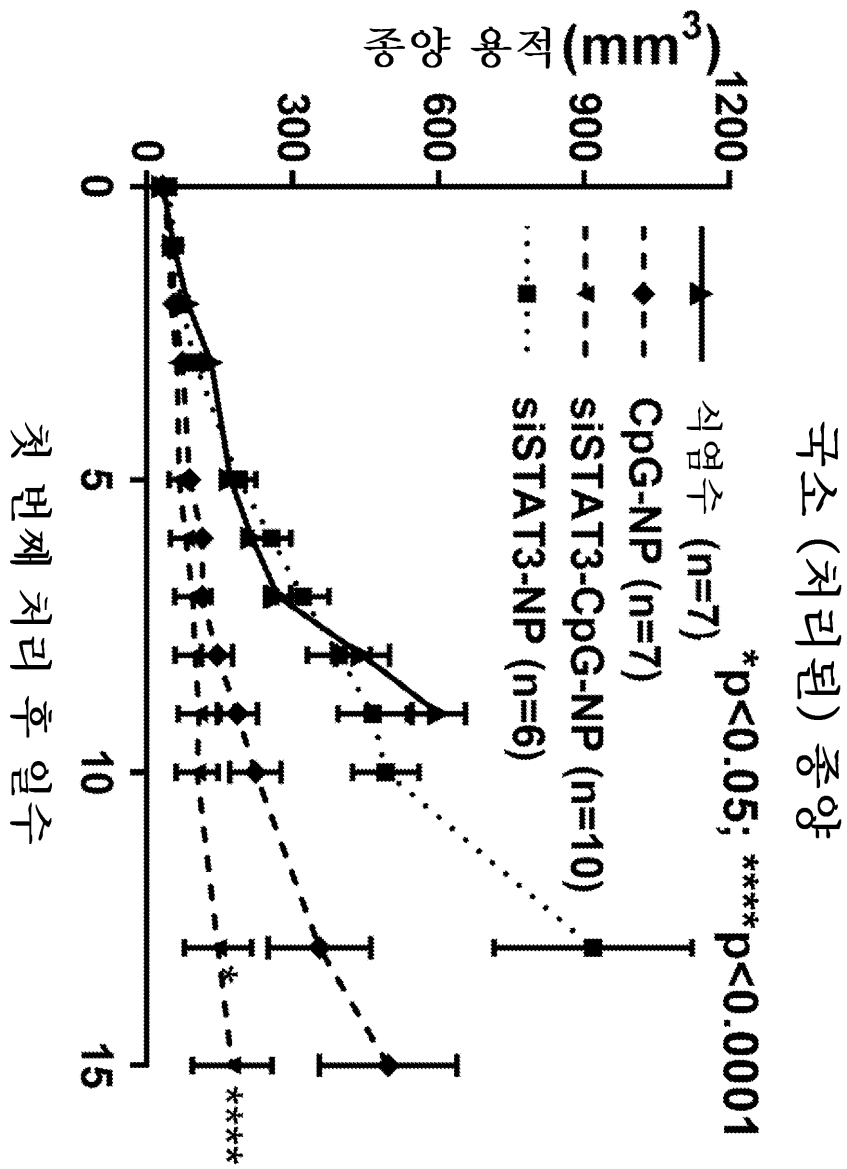
도면4c



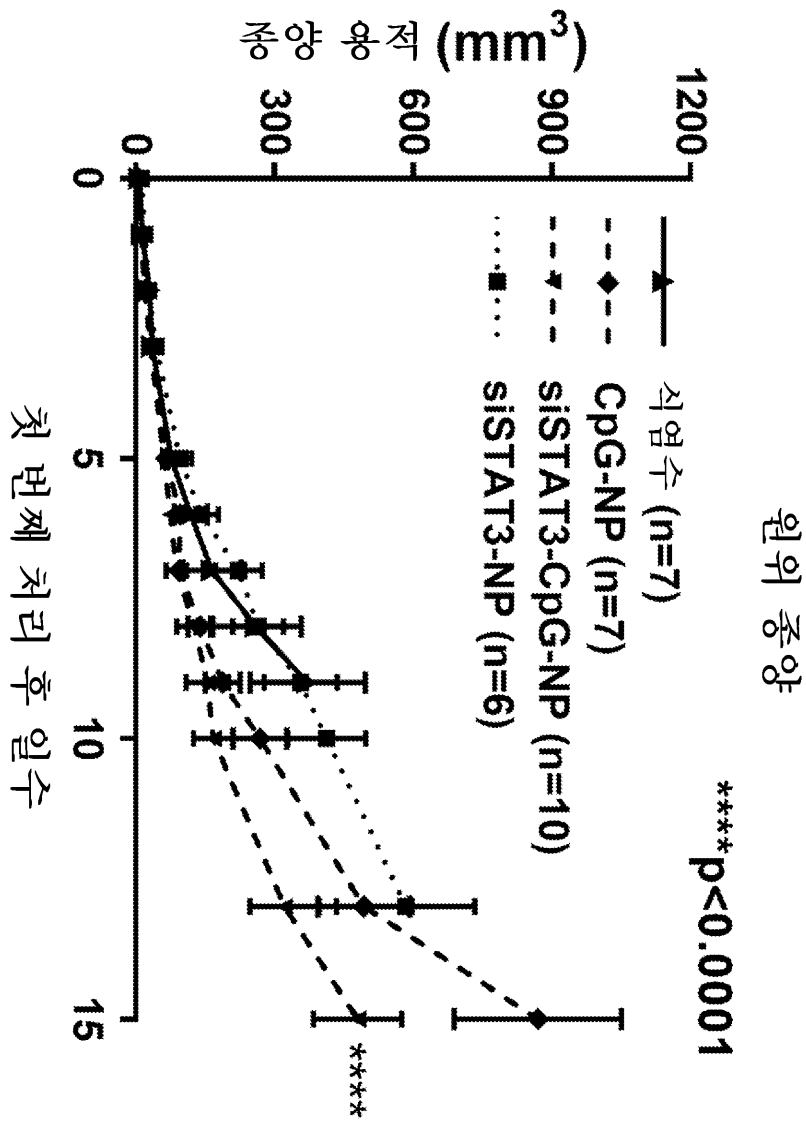
도면4d



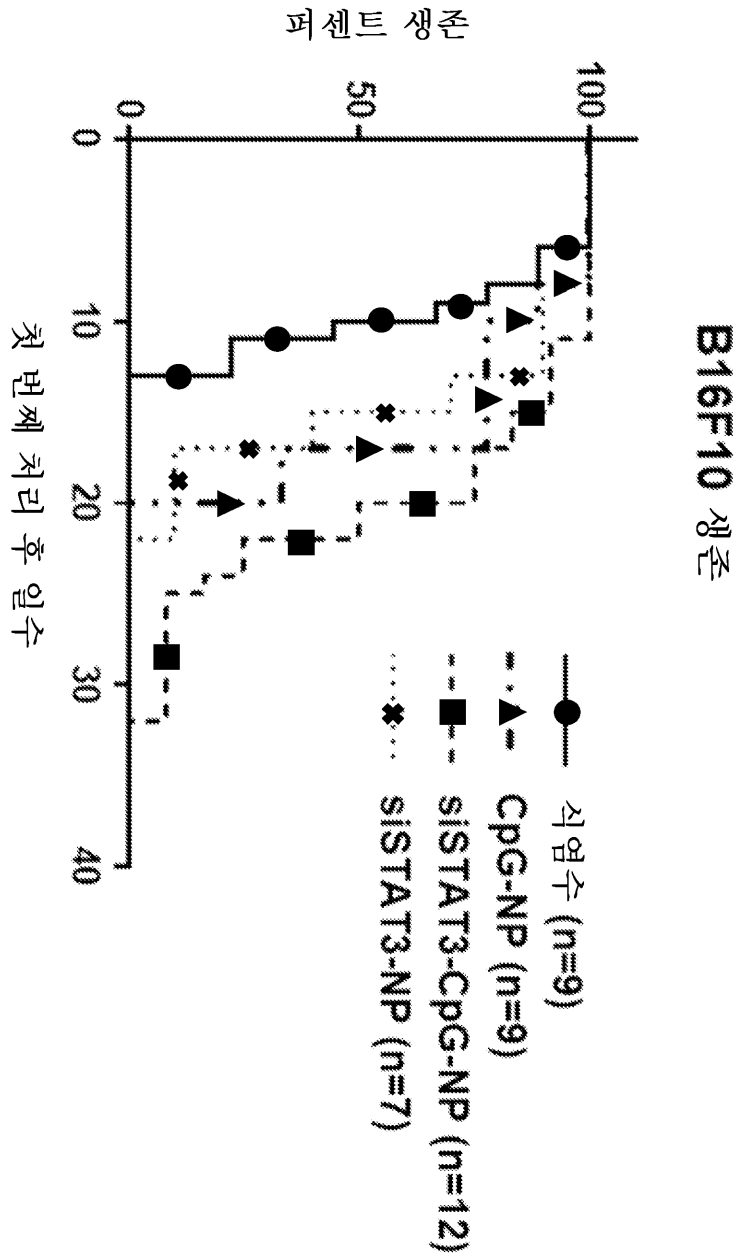
도면5a



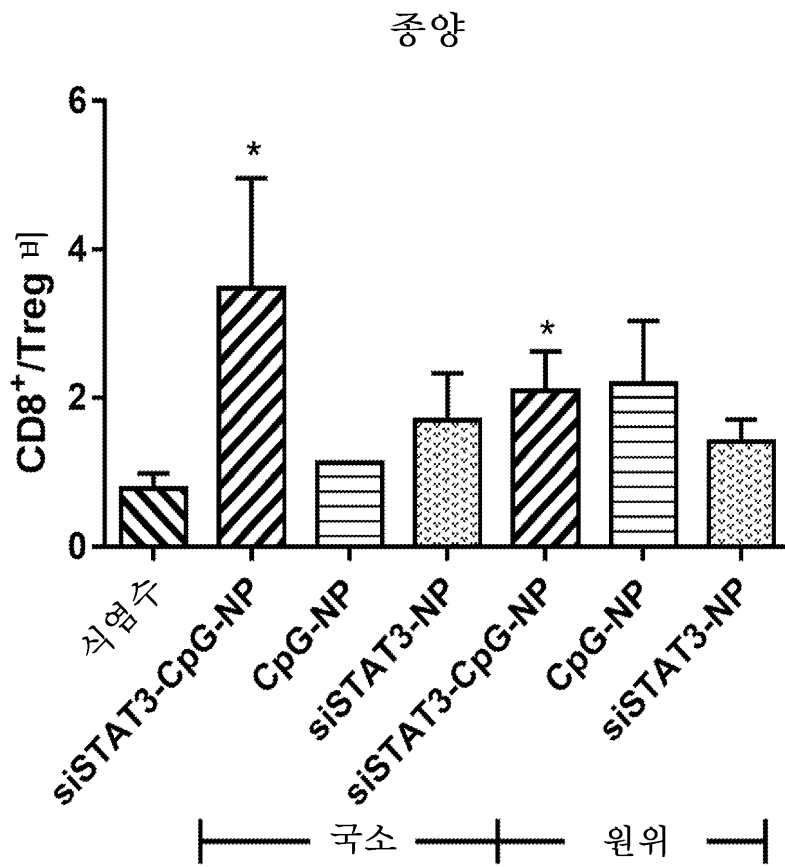
도면5b



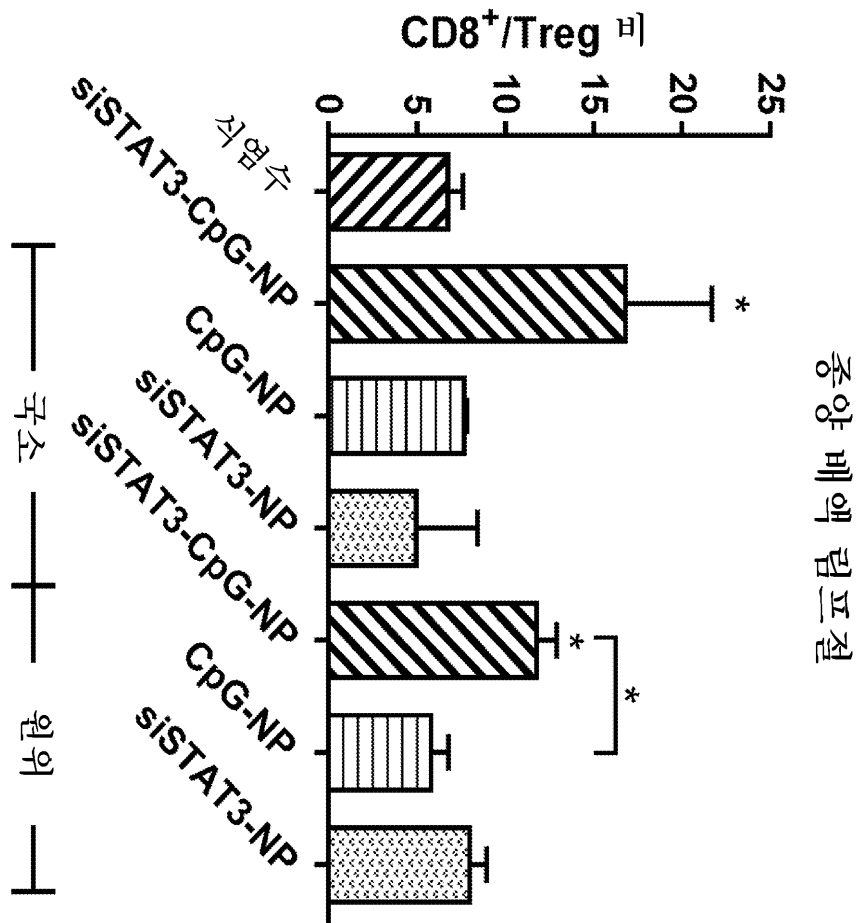
도면5c



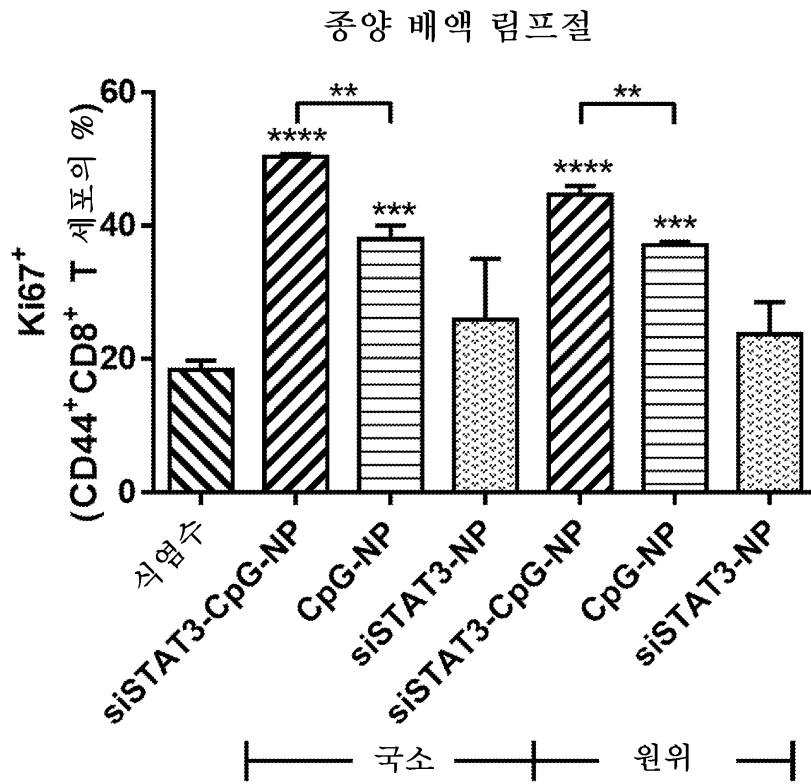
도면6a



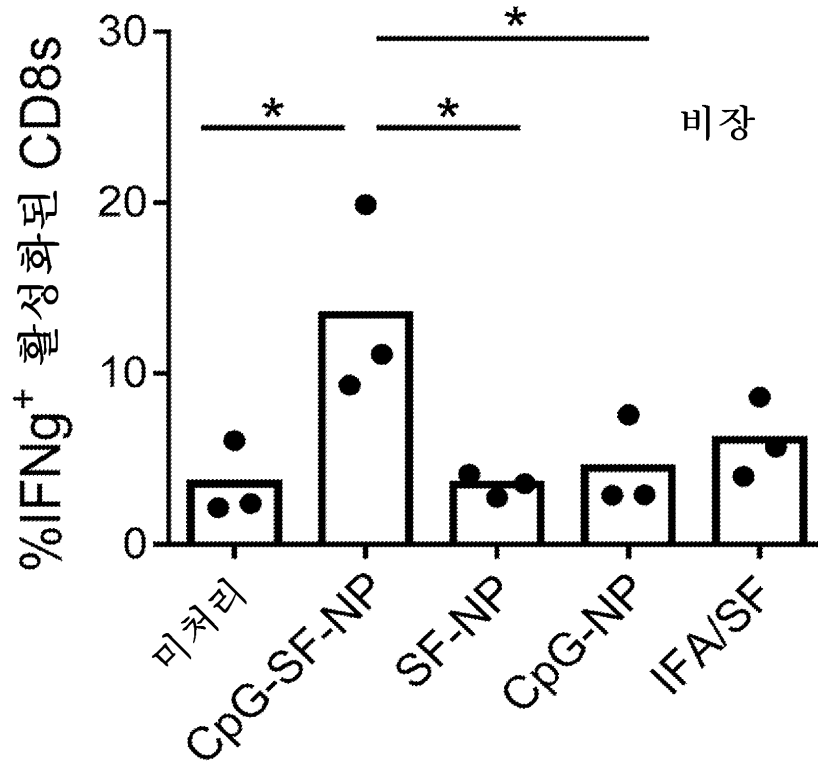
도면6b



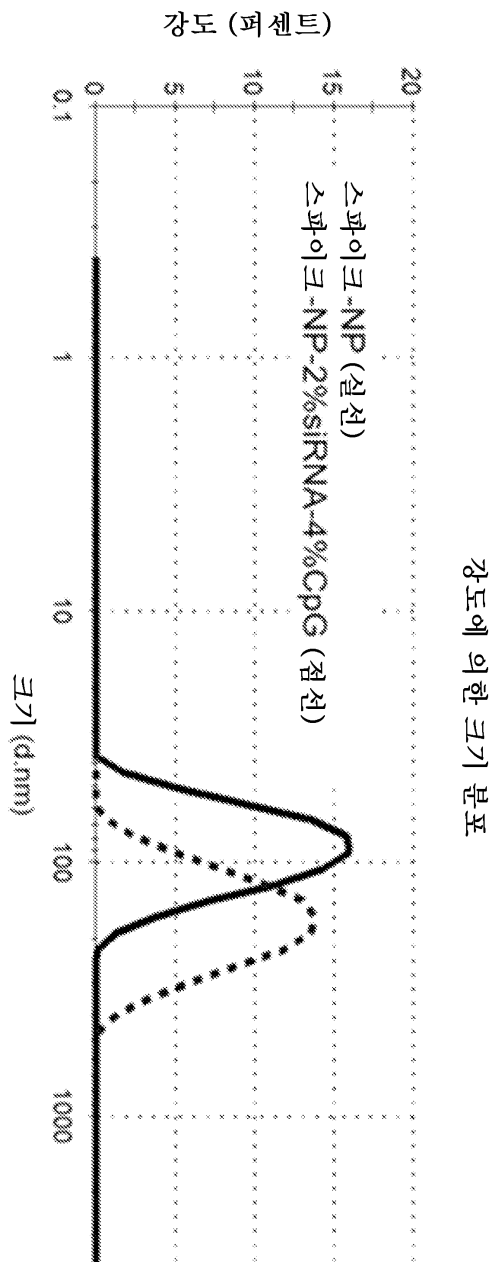
도면6c



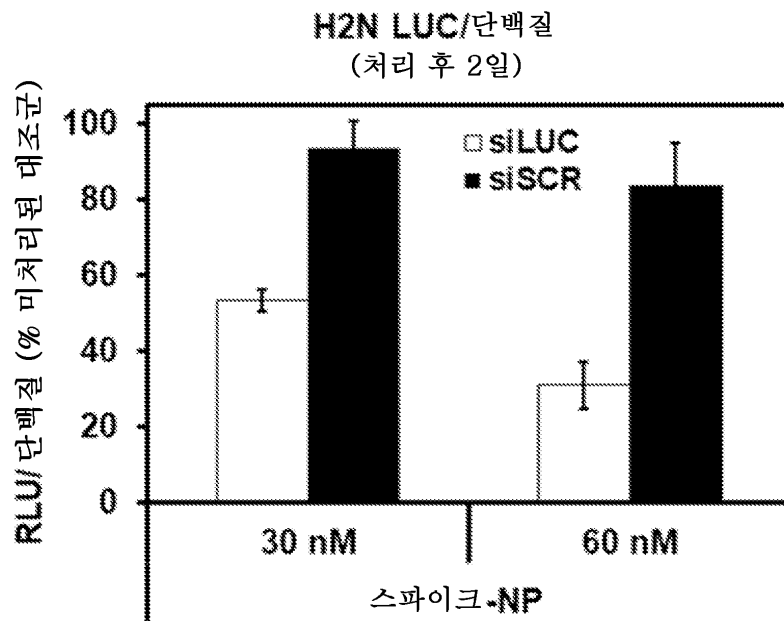
도면7



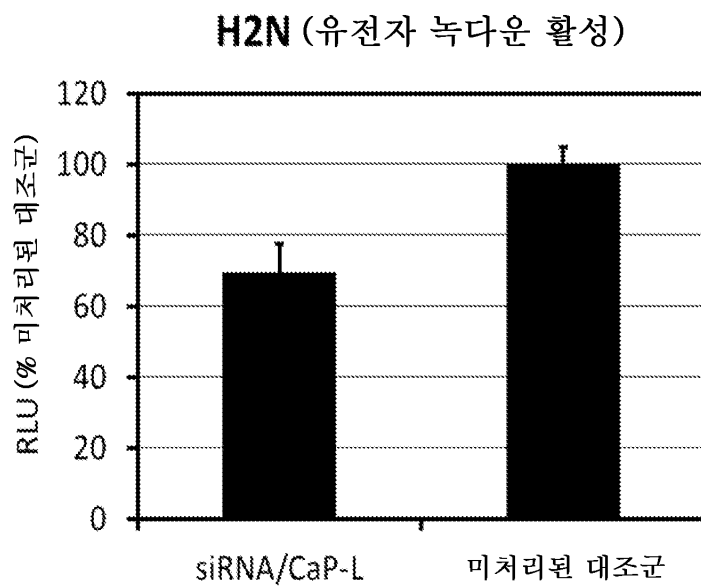
도면 8a



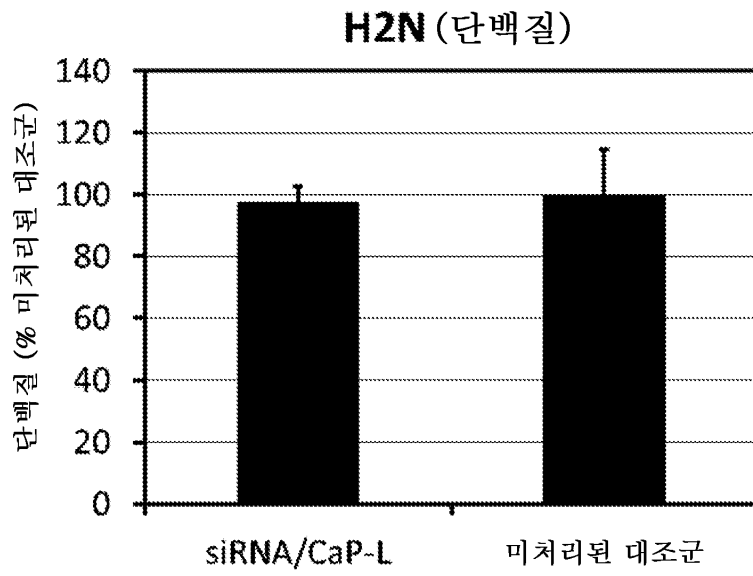
도면8b



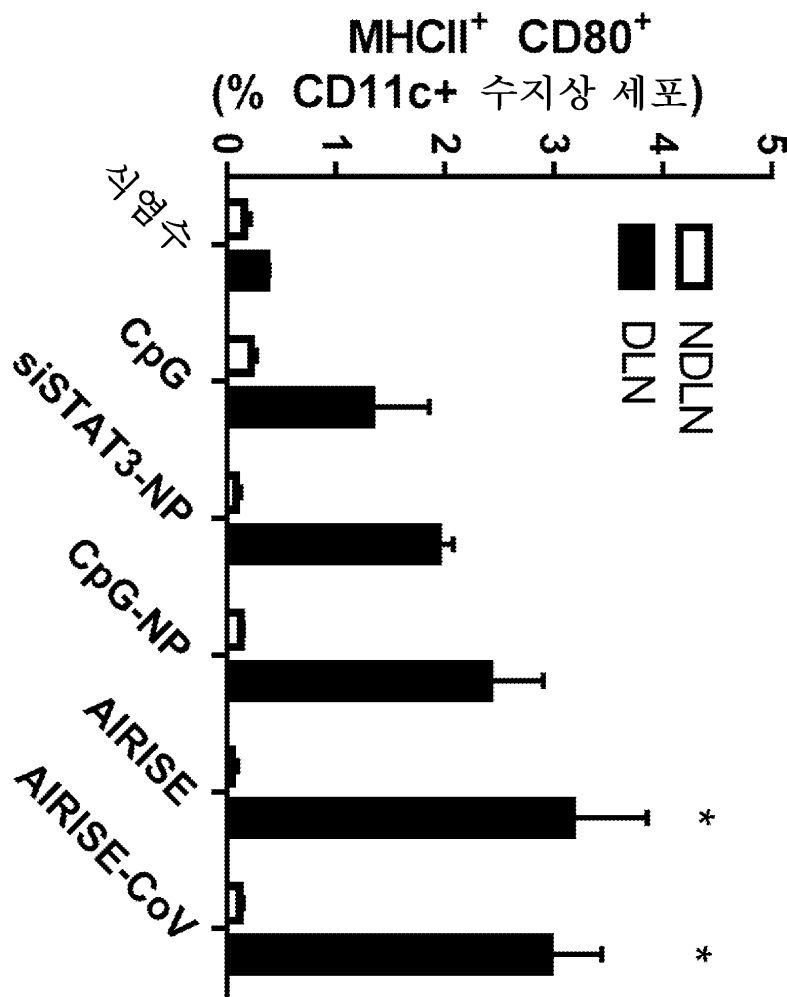
도면9a



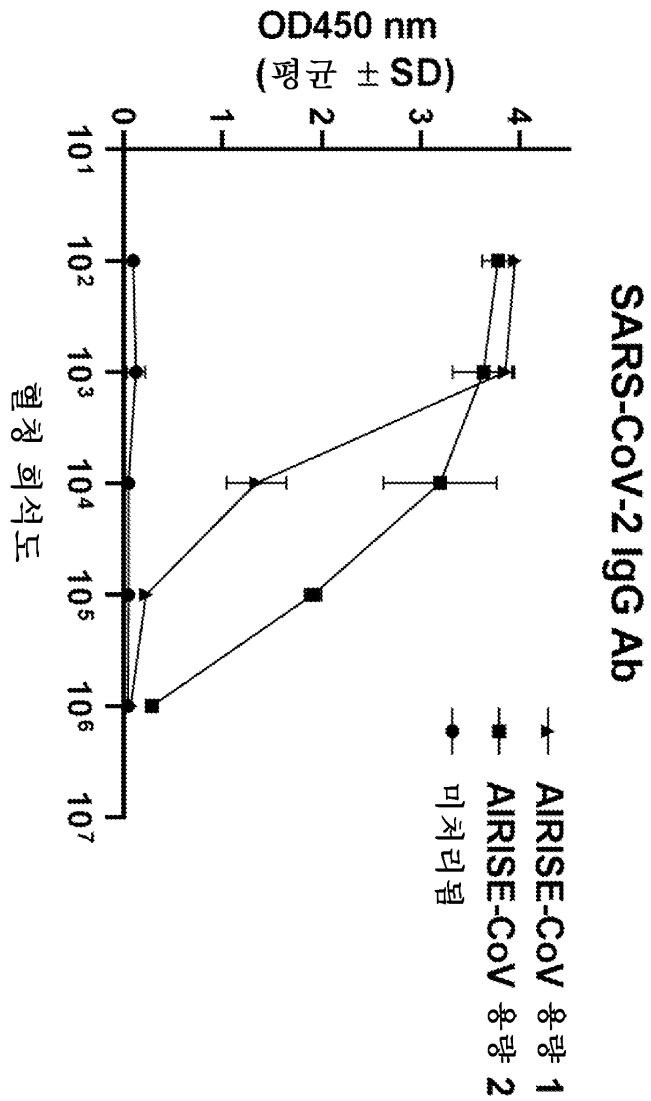
도면9b



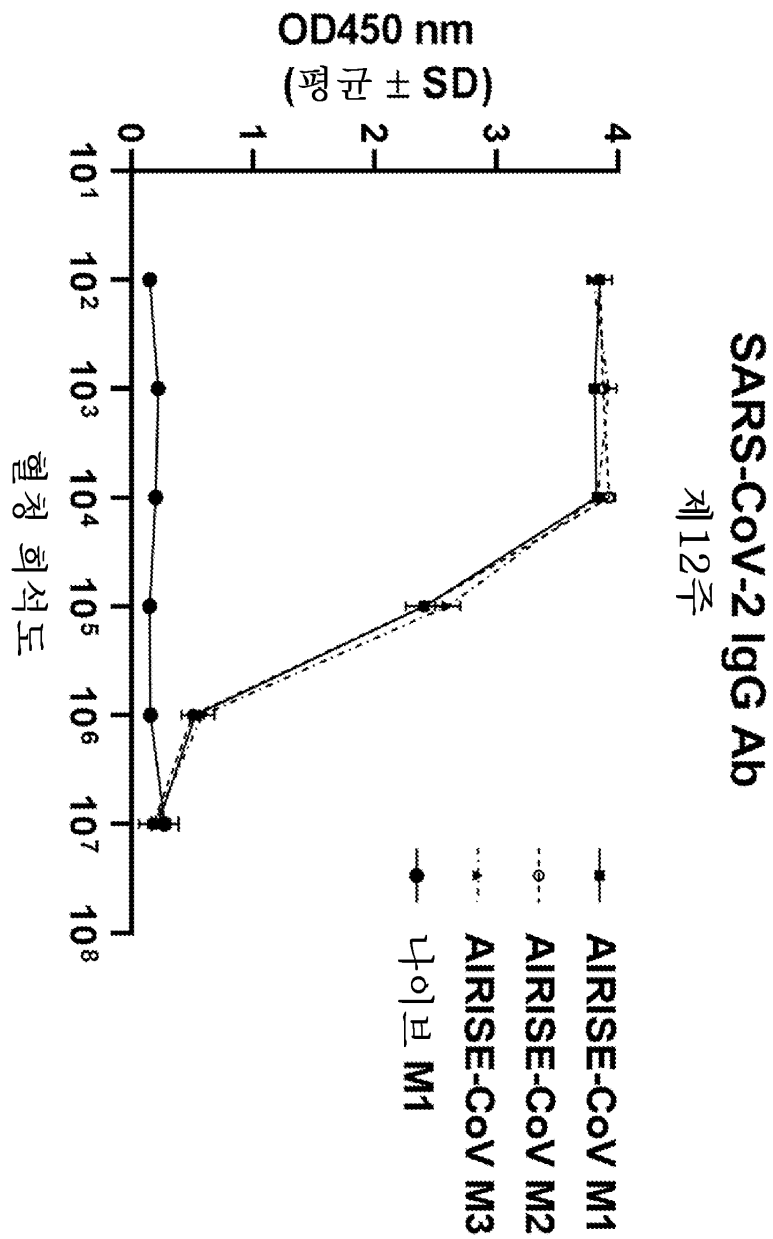
도면10



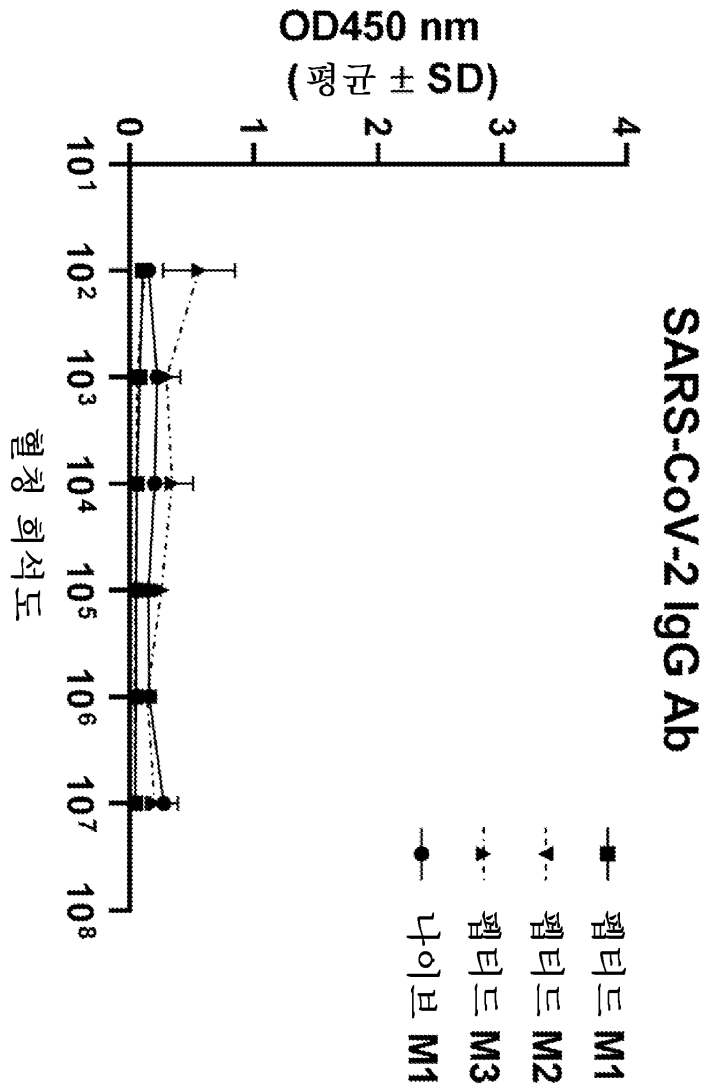
도면11



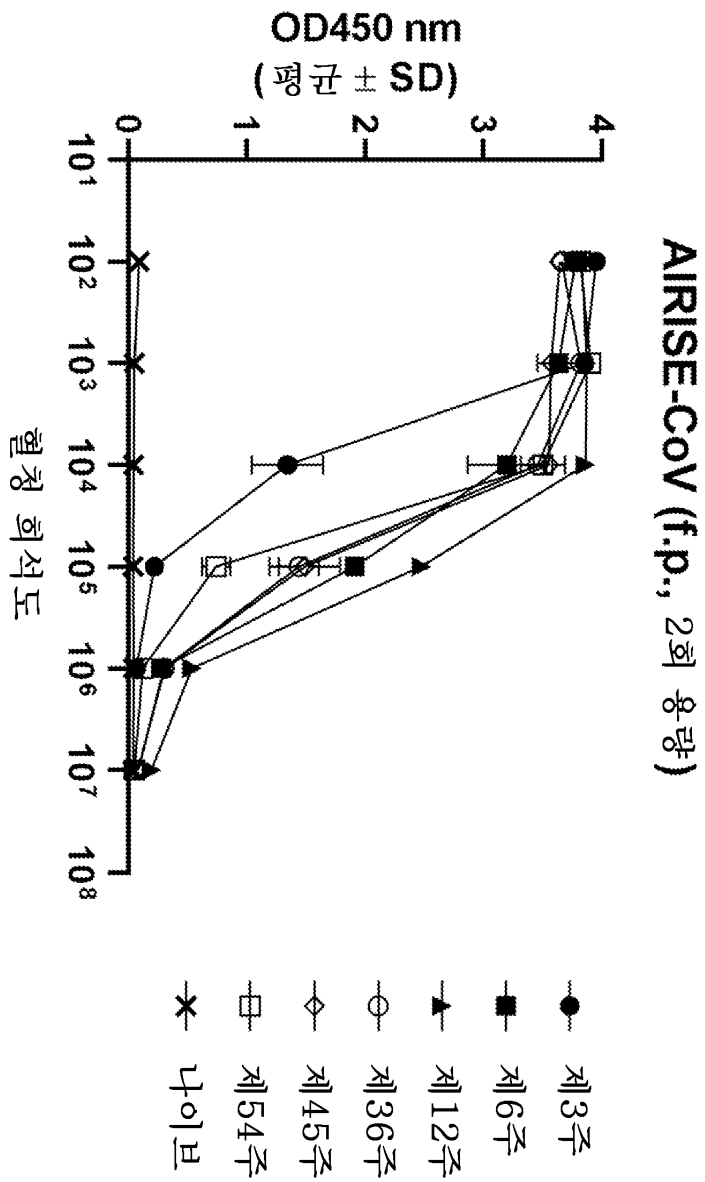
도면12a



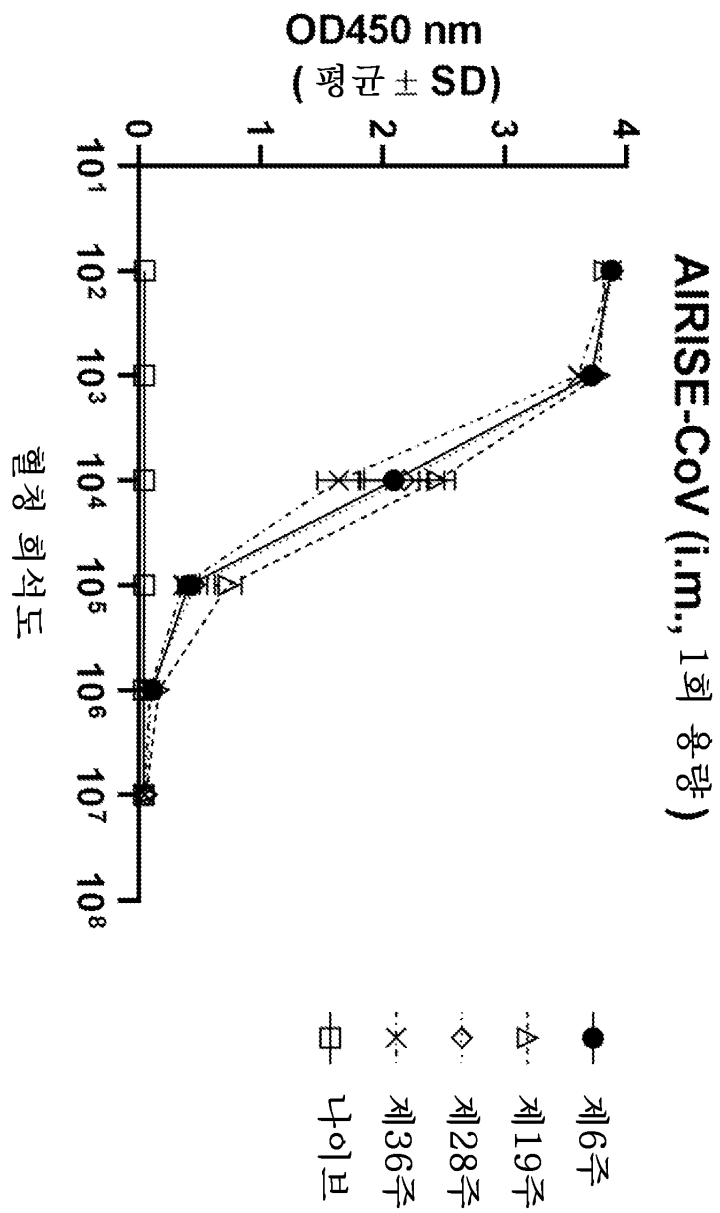
도면12b



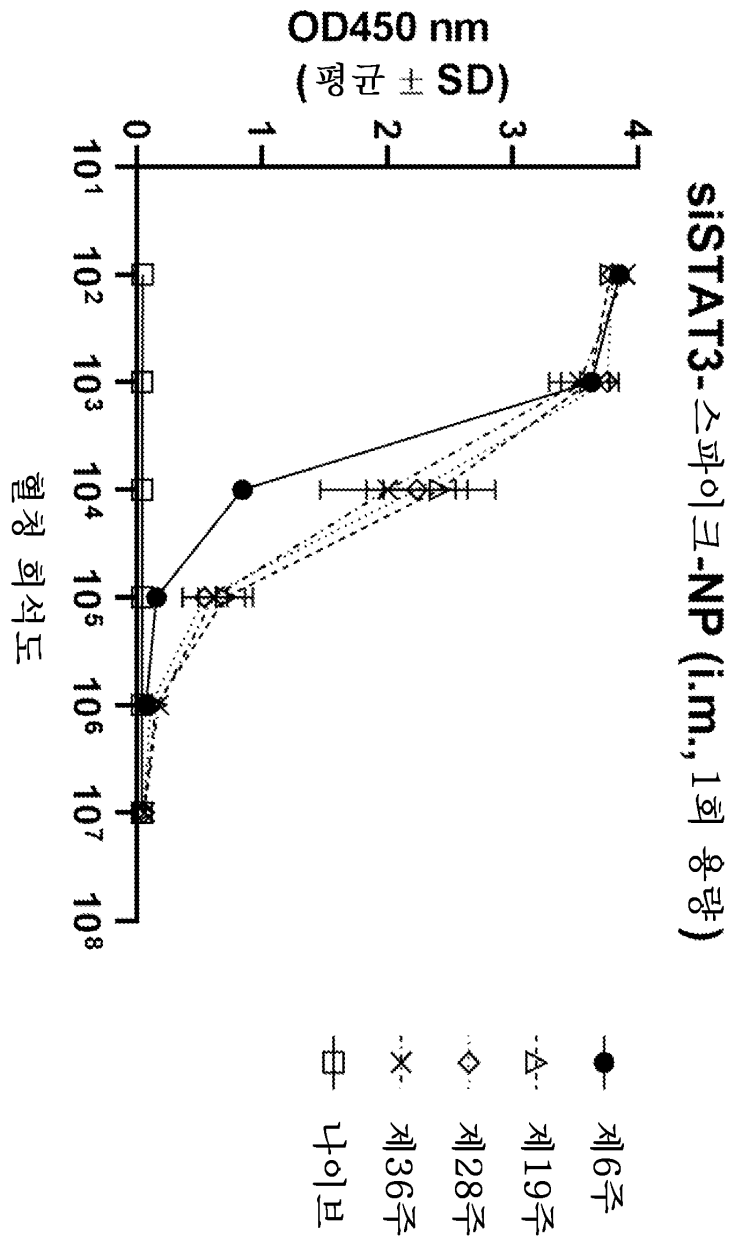
도면13



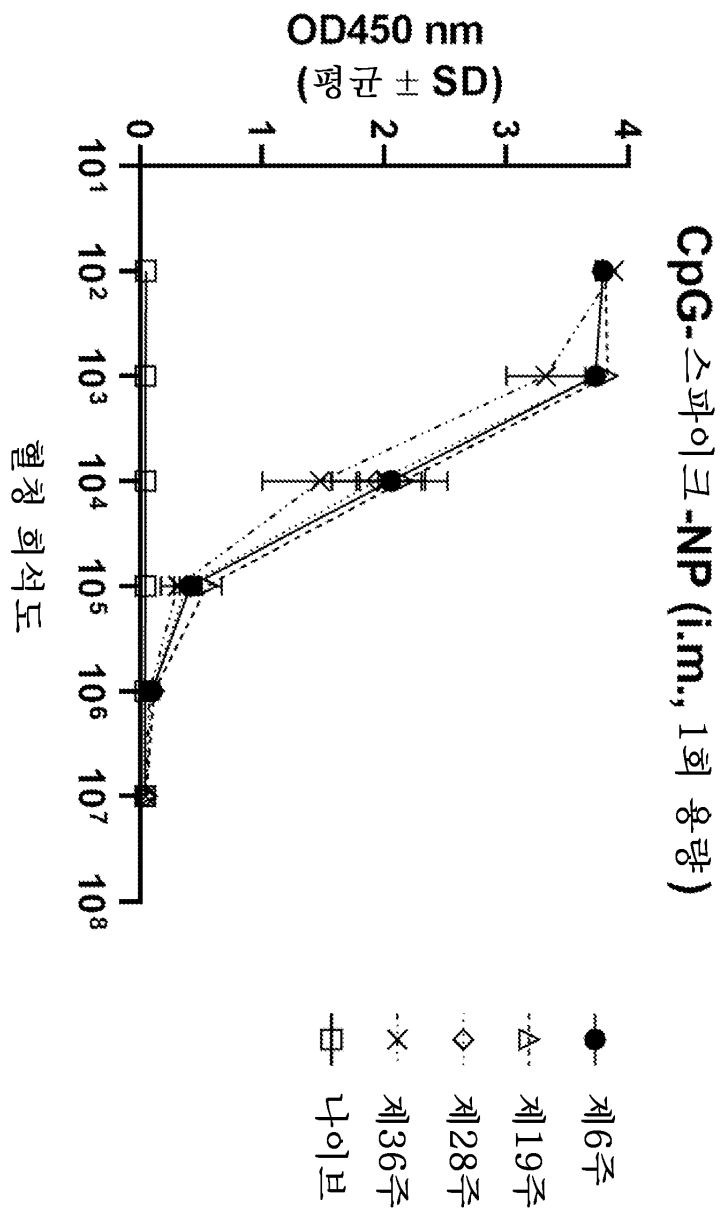
도면14a



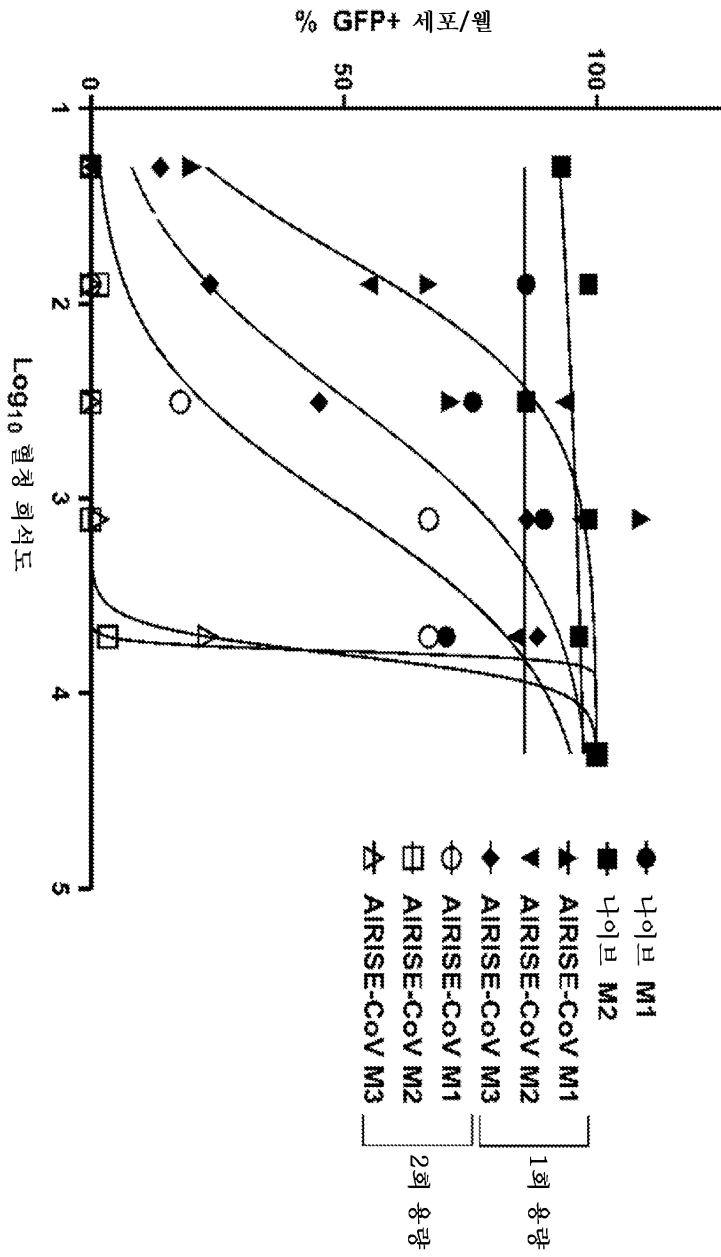
도면14b



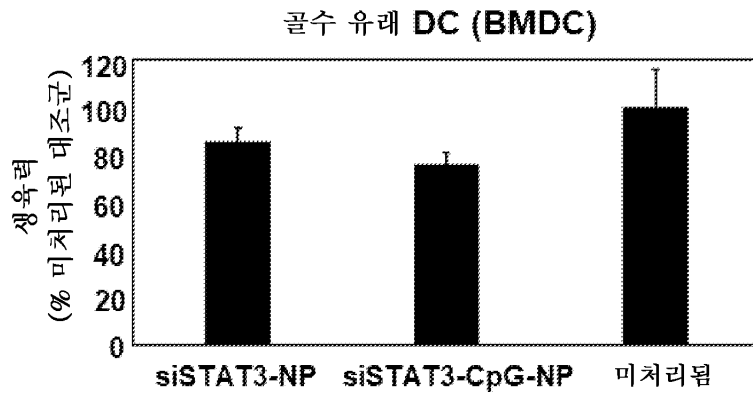
도면14c



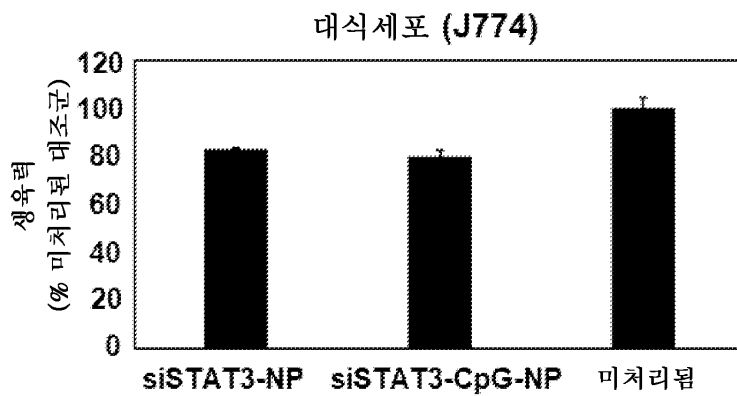
도면15



도면16a



도면16b



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Oregon Health & Science University
PDX Pharmaceuticals, Inc.

<120> IMMUNOGENIC CONSTRUCTS, COMPOSITIONS, AND METHODS FOR INDUCING
IMMUNE RESPONSE

<130> 0046-0041PCT

<150> US 63/051,351

<151> 2020-07-13

<160> 91

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> SARS-CoV-2

<400> 1

Lys Leu Pro Asp Asp Phe Thr Gly Cys Val

1 5 10

<210> 2

<211> 15

<212> PRT

<213> SARS-CoV-2

<400> 2

Ser Gln Ser Ile Ile Ala Tyr Thr Met Ser Leu Gly Ala Glu Asn

1 5 10 15

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> SARS-CoV-2

<400> 3

Ile Pro Thr Asn Phe Thr Ile Ser Val Thr Thr Glu Ile Leu Pro

1 5 10 15

<210> 4

<211> 23

<212> PRT

<213> SARS-CoV-2

<400> 4

Phe Gly Ala Gly Ala Ala Leu Gln Ile Pro Phe Ala Met Gln Met Ala

1 5 10 15

Tyr Arg Phe Asn Gly Ile Gly

20

<210> 5

<211> 15

<212> PRT

<213> SARS-CoV-2

<400> 5

Ala Pro His Gly Val Val Phe Leu His Val Thr Tyr Val Pro Ala

1 5 10 15

<210> 6

<211> 15

<212> PRT

<213> SARS-CoV-2

<400> 6

Ala Thr Lys Ala Tyr Asn Val Thr Gln Ala Phe Gly Arg Arg Gly

1 5 10 15

<210> 7

<211> 15

<212> PRT

<213> SARS-CoV-2

<400> 7

Ile Ala Ser Phe Arg Leu Phe Ala Arg Thr Arg Ser Met Trp Ser

1 5 10 15

<210> 8

<211> 15

<212> PRT

<213> SARS-CoV-2

<400> 8

Val Lys Pro Ser Phe Tyr Val Tyr Ser Arg Val Lys Asn Leu Asn

1 5 10 15

<210> 9

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

ggaucuagaa cagaaaaug

<210> 10

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 10

19

cauuuucugu ucuagaucc	19
<210> 11	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Mus musculus	
<400> 11	
cccacauaaa aaacaguug	19
<210> 12	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Mus musculus	
<400> 12	
caacuguuuu uuauguggg	19
<210> 13	
<211> 25	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 13	
ccuacuggca uuugcugaac gcauu	25
<210> 14	
<211> 25	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 14	
aaugcguuca gcaaauGCCA guagg	25
<210> 15	
<211> 25	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 15	
cccuccugca ucauugcuuu cauuu	25
<210> 16	
<211> 25	

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 16

aaaugaaagc aaugaugcag gaggg 25

<210> 17

<211> 19

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 17

ccucugaagu ucuaauuaa 19

<210> 18

<211> 21

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 18

ucggagacuu caagauuaau u 21

<210> 19

<211> 19

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 19

gggcuucuuc cucgucucu 19

<210> 20

<211> 19

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 20

agagacgagg aagaagccc 19

<210> 21

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 21

ccgugaguuu guccuuuca	19
<210> 22	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 22	
ugaaaggaca aacucacgg	19
<210> 23	
<211> 17	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 23	
cacuuccgca cauuccg	17
<210> 24	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 24	
cugggaugcc guguuuuu	19
<210> 25	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 25	
acuaccugag cuccuucccc u	21
<210> 26	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 26	
gcauccgcu gcacuuucau u	21
<210> 27	
<211> 21	
<212> RNA	

<213> Homo sapiens
 <400> 27
 aaugaaagug cacgcggaug c 21
 <210> 28
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Mus musculus
 <400> 28

 gagccuccu cguccuguc uuc 23
 <210> 29
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Mus musculus
 <400> 29
 gaagacgagg acgaggagg cuc 23
 <210> 30
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Mus musculus
 <400> 30
 aaucaagugu ggagcaacau u 21
 <210> 31
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Mus musculus
 <400> 31
 uguugcucca cacuugauu u 21

 <210> 32
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 32
 gacaucuaug caaugggcuu aguau 25

<210>	33	
<211>	25	
<212>	RNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	33	
	gcaucucacu cauguugaug gucuu	25
<210>	34	
<211>	25	
<212>	RNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	34	
	aguaagacau gauucagcca cagau	25
<210>	35	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Mus musculus	
<400>	35	
	agaauaucuu ggugaagaa	19
<210>	36	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Mus musculus	
<400>	36	
	uucuucacca agauauucu	19
<210>	37	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	37	
	gaccucaaga gcuccaaua	19
<210>	38	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Homo sapiens	

<400> 38	
uauuggagcu cuugagguc	19
<210> 39	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 39	
cgacaugaua gucacugac	19
<210> 40	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 40	
gucagugacu aucaugucg	19
<210> 41	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Mus musculus	
<400> 41	
aaauagcucc aagagaaagg c	21
<210> 42	
<211> 18	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 42	
uuauuaagcu ccagagaa	18
<210> 43	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 43	
uggaggacuu uaagguua	19
<210> 44	

<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	44	
cauagaagcc uacaugaca		19
<210>	45	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	45	
ucacggcgcu gucaucgau		19
<210>	46	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Mus musculus	
<400>	46	
ccugagcauc uuagucaua		19
<210>	47	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Mus musculus	
<400>	47	
uauagacuaag augcucagg		19
<210>	48	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	48	
ggacuggacc caucuuuca		19
<210>	49	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Homo sapiens	

<400> 49

gggcggagac cacaguuug

19

<210> 50

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 50

gggcuacucu caggauuag

19

<210> 51

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 51

gaaguaacuc gaacaguga

19

<210> 52

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 52

cgccaacacc aucgugugca a

21

<210> 53

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 53

cgccagcaac cugaaucua a

21

<210> 54

<211> 19

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 54

accugugccu acacuucaa

19

<210> 55

<211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 55
 ccucgcaugc ugaucacaa 19
 <210> 56
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Mus musculus
 <400> 56

 gauguugccu uccacuuua 19
 <210> 57
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Mus musculus
 <400> 57
 uaaaguggaa ggcaacauc 19
 <210> 58
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Mus musculus
 <400> 58
 gcagacagcu uuucguua 19
 <210> 59
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Mus musculus
 <400> 59
 uaagcgaaaa gcugucugc 19

 <210> 60
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Mus musculus

<400> 60	
ggucaacgau gcucaccua	19
<210> 61	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Mus musculus	
<400> 61	
uaggugagca ucguugacc	19
<210> 62	
<211> 66	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 62	
gaucccgau gagcguuagg acacuuugau auccgagugu ccuaacgcuc aaauuuuuu	60
uccaaa	66
<210> 63	
<211> 65	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 63	
ggcauacucg caauccugug aaacuauagg cucacaggau ugcgaguaug aaaaaagguu	60
uucga	65
<210> 64	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Mus musculus	
<400> 64	
agucggaggc uuaauuaca	19
<210> 65	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Mus musculus	
<400> 65	

caggaaaauu gccuauuga	19
<210> 66	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Mus musculus	
<400> 66	
uaaggaccaa gaccaucca	19
<210> 67	
<211> 25	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 67	
gggagacacu ccaucacagu cacua	25
<210> 68	
<211> 25	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 68	
uagugacugu gauggagugu cuccc	25
<210> 69	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 69	
cggcauguga ggaucaaaa	19
<210> 70	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 70	
uuuugauccu cacaugccg	19
<210> 71	
<211> 19	

<212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 71
 gcgggaugac uuuccaaga 19
 <210> 72
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 72
 ucuuggaaag ucauccgc 19

 <210> 73
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 73
 gcuaucgaau uugucaacc 19
 <210> 74
 <211> 18
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 74
 gguugacaaa uucgauag 18
 <210> 75
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Mus musculus
 <400> 75
 uuucaagac cucugaucu ugacc 25
 <210> 76
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Mus musculus
 <400> 76

ugccuacgaa cucuucacc	19
<210> 77	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Mus musculus	
<400> 77	
ggugaagagu ucguaggca	19
<210> 78	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 78	
gcuucguggu cgacuucau	19
<210> 79	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Mus musculus	
<400> 79	
uauggagcug cagaggau	19
<210> 80	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Mus musculus	
<400> 80	
cauccucugc agcucaua	19
<210> 81	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 81	
ccaucagggg cuggacauu	19
<210> 82	
<211> 19	
<212> RNA	

<213> Homo sapiens
 <400> 82
 gcaaccuucu gauguaagu 19
 <210> 83
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 83

 cuaccucccu acagacaga 19
 <210> 84
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Mus musculus
 <400> 84
 ggguguuugc aaaugauuau u 21
 <210> 85
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Mus musculus
 <400> 85
 uaaucuuug caaacacccu u 21
 <210> 86
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 86
 ccaauggcua agugaagaug acaau 25

 <210> 87
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 87
 ccacacgacg ggaagacaag uucau 25

<210> 88
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Mus musculus
 <400> 88
 gguguauaca ggaacaaua 19
 <210> 89
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Mus musculus
 <400> 89
 uauuguuccu guauacacc 19
 <210> 90
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Gallus gallus
 <400> 90

 Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu
 1 5
 <210> 91
 <211> 18
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 91
 guauuggaga cgauuuuaa 18