



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(11) 공개번호 10-2022-0023340  
(43) 공개일자 2022년03월02일

- |  |  |
|--|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)<br/><i>A61K 39/00</i> (2006.01) <i>A61P 35/00</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류<br/><i>A61K 39/0011</i> (2021.08)<br/><i>A61P 35/00</i> (2018.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2021-7038364</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2020년04월24일<br/>심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2021년11월24일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/EP2020/061477</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2020/216911<br/>국제공개일자 2020년10월29일</p> <p>(30) 우선권주장<br/>19171323.9 2019년04월26일<br/>유럽특허청(EPO)(EP)</p> | <p>(71) 출원인<br/>이더알엔에이 이뮤노테라피스 엔브이<br/>벨기에, 2845 니엘, 갈리레이란 19</p> <p>(72) 발명자<br/>디 코커, 스테파안<br/>벨기에, 2845 니엘, 갈리레이란 19<br/>비버스, 상느<br/>벨기에, 2845 니엘, 갈리레이란 19<br/>토미, 피터<br/>벨기에, 2845 니엘, 갈리레이란 19</p> <p>(74) 대리인<br/>김순웅</p> |
|--|--|

전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 mRNA 제형

**(57) 요약**

본 발명은 mRNA 제형 분야에 관한 것으로, 특히 기능적 면역자극 단백질 CD40L, CD70 및 caTLR4를 코딩하는 하나 이상의 mRNA 분자의 조합물; 및 항원을 코딩하는 하나 이상의 mRNA 분자를 제공한다. 본 발명의 조합물은 특히 mRNA 분자가 5' CAP-1 구조를 포함하고 슈도우리딘과 같은 하나 이상의 변형된 뉴클레오시드를 추가로 함유할 수 있다는 것을 특징으로 한다. 본 발명은 또한 특히 백신접종, 및 세포 증식성 장애의 치료에 있어서의 상기 조합물 및 용도를 포함하는 조성물을 제공한다.

(52) CPC특허분류

*A61K 2039/53* (2013.01)

*A61K 2039/55516* (2013.01)

*A61K 2039/55555* (2013.01)

*A61K 2039/585* (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

조합물로서,

- 기능적 면역자극 단백질 CD40L, CD70 및 caTLR4를 코딩하는 하나 이상의 mRNA 분자; 및
  - 하나 이상의 항원 또는 에피토프를 코딩하는 하나 이상의 mRNA 분자를 포함하고;
- 상기 mRNA 분자 중 적어도 하나가 5' CAP-1 구조를 갖는 것을 특징으로 하는, 조합물.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 mRNA 분자 모두는 5' CAP-1 구조를 갖는, 조합물.

#### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 mRNA 분자는 적어도 하나의 변형된 뉴클레오시드를 추가로 포함하는, 조합물.

#### 청구항 4

제3항에 있어서, 상기 적어도 하나의 변형된 뉴클레오시드는 슈도우리딘, 5-메톡시-우리딘, 5-메틸-시티딘, 2-티오-우리딘, 및 N6-메틸아데노신을 포함하는 목록으로부터 선택되는, 조합물.

#### 청구항 5

제3항 또는 제4항에 있어서, 상기 적어도 하나의 변형된 뉴클레오시드는 4-티오-슈도우리딘, 2-티오-슈도우리딘, 1-카복시메틸-슈도우리딘, 1-프로피닐-슈도우리딘, 1-타우리노메틸-슈도우리딘, N1-메틸-슈도우리딘, 4-티오-1-메틸-슈도우리딘, 2-티오-1-메틸-슈도우리딘, 1-메틸-1-데아자-슈도우리딘, 2-티오-1-메틸-1-데아자-슈도우리딘, 디히드로슈도우리딘, 2-티오-디히드로슈도우리딘, 4-메톡시-슈도우리딘, 및 4-메톡시-2-티오-슈도우리딘을 포함하는 목록으로부터 선택되는 슈도우리딘; 특히 N1-메틸-슈도우리딘인, 조합물.

#### 청구항 6

제5항에 있어서, 상기 mRNA 분자의 우리딘의 약 100%는 N1-메틸-슈도우리딘로 대체되는, 조합물.

#### 청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 조합물 및 적어도 하나의 약학적으로 허용되는 제제를 포함하는, 약학 조성물.

#### 청구항 8

제7항에 있어서, 상기 조합물은 나노입자, 예컨대 지질 나노입자 또는 중합체 나노입자로 제형화되는, 약학 조성물.

#### 청구항 9

제7항 또는 제8항에 있어서, 상기 조성물은 정맥내, 결절내, 종양내, 피하, 피내 또는 근육내 제형용으로 제형화되는, 약학 조성물.

#### 청구항 10

제7항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 백신 형태인, 약학 조성물.

#### 청구항 11

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서; 또는 제7항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 또는 수의학에 사용하기 위한, 조합물 또는 약학 조성물.

**청구항 12**

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서; 또는 제7항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 백신접종에 사용하기 위한, 조합물 또는 약학 조성물.

**청구항 13**

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서; 또는 제7항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항원은 암 항원인, 조합물 또는 약학 조성물.

**청구항 14**

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서; 또는 제7항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 증식성 장애 치료에 사용하기 위한, 조합물 또는 약학 조성물.

**청구항 15**

세포 증식성 장애 치료 방법으로서, 상기 방법은 이를 필요로 하는 대상체에 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 조합물; 또는 제7항 내지 제10항 중 어느 한 항의 약학 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 mRNA 제형 분야에 관한 것으로, 특히 기능적 면역자극 단백질 CD40L, CD70 및 caTLR4를 코딩하는 하나 이상의 mRNA 분자의 조합물; 및 항원을 코딩하는 하나 이상의 mRNA 분자를 제공한다. 본 발명의 조합물은 특히 mRNA 분자가 5' CAP-1 구조를 포함하고 슈도우리딘과 같은 하나 이상의 변형된 뉴클레오시드를 추가로 함유할 수 있다는 것을 특징으로 한다. 본 발명은 또한 특히 백신접종, 및 세포 증식성 장애의 치료에 있어서의 상기 조합물 및 용도를 포함하는 조성물을 제공한다.

**배경 기술**

[0002] mRNA 백신에 의해 유도되는 T 세포 반응의 크기 및 기능적 특성은 투여 경로, 전달 비히클, 및 mRNA의 고유 특성 사이의 복잡한 상호작용에 의해 좌우된다. 투여 경로는 기관 및 세포 수준에서 mRNA의 생체분포를 결정할 것이다. 이와 관련하여, 나노캐리어에 복합체화된 mRNA를 사용한 정맥내 면역화는 큰 크기(magnitude)/고품질 T 세포 반응을 유도하기 위한 특히 강력한 접근법으로 등장하였지만, 면역원성은 결정적으로 전달 비히클의 물리화학적 특성에 의존한다. 마지막으로, mRNA 포맷 그 자체가 면역원성에 큰 영향을 미칠 가능성이 있다. 5'Cap 구조와 ssRNA 및 dsRNA 서열 모티프의 존재 여부에 따라, 시험관 내 전사된(IVT: in vitro transcribed) RNA는 실제로 다양한 RNA 센서에 의해 인식될 수 있다. 이러한 RNA 센서의 트리거링(triggering)은 T 세포 분화를 지원할 필수 사이토카인 반응을 유도하는 반면, 이는 또한 mRNA를 분해하고 번역 정지를 차단하기 위한 항바이러스 시그니처를 유도한다. 따라서, mRNA 백신의 경우, mRNA로 코딩된 항원의 적절한 발현을 가능하게 하기 위해 선천적인 활성화가 밀접하게 균형을 이룰 필요가 있다.

[0003] 본원에서, 우리는 백신 유도된 T 세포 반응의 크기 및 기능적 특성에 대한 다양한 mRNA 포맷의 영향을 다루었다. 3가지 상이한 mRNA 포맷을 본 연구에서 다루었으며, 이들은 선천적인 면역계에 의해 의한 인식 정도가 상이하다: 1) ARCA-Capped, 비-변형 mRNA 2) CleanCapped, 비-변형 mRNA 3) CleanCapped, 변형된 mRNA. ARCA-Capped mRNA는 소위 5'Cap-0 구조를 가지며, 이는 mRNA를 안정화시키고 번역 개시를 유도하지만, RNA 분해 및 번역 정지를 유도하는 몇몇 RNA 센서에 의해 인식된다. Clean-Capped mRNA는 그 대신 Cap-1 구조를 가지며, 이는 mRNA가 여러 RNA 센서(MDA-5, RIG-I 및 IFIT-1)에 대해 보이지 않게 한다. 진핵세포 mRNA는 전형적으로 톨-유사 수용체(TLR: Toll-like Receptor) 3, 7 및 8과의 상호작용을 낮추는 다양한 뉴클레오시드 변형체(예컨대 슈도-우리딘, 5 메틸시티딘, N1 메틸슈도-우리딘)이 내장되어 있다. 3종의 mRNA 포맷 모두에 대해, 우리는 TriMix(기능적 면역자극 단백질 CD40L, CD70 및 caTLR4를 코딩하는 mRNA 분자)가 유발된 T 세포 반응의 크기 뿐만 아니라 유발된 초기 사이토카인 반응의 크기에 미치는 영향을 평가하였다.

[0004] 우리의 연구는 T 세포 반응과 초기 염증 반응의 관점에서 상이한 mRNA 포맷 사이의 중요한 차이점을 밝혀냈다. ARCA-capped, 비변형된 mRNA는 정맥내 주입 시 가장 두드러진 염증 반응을 유도하였다. 혈청 사이토카인 역가는 Clean-Capped mRNA로 전환함으로써 상당히 감소되었고 N1 메틸슈도-우리딘에 의한 우리딘의 동시 치환에 의해

추가로 약화되었다. 시험된 mRNA 포맷 중 어느 것도 TriMix를 첨가하면 전신 사이토카인 반응이 약화되지 않았다.

[0005] T 세포 반응의 크기와 관련하여, TriMix 부재 시(항원만) 세 가지 상이한 mRNA 포맷 사이에 유의미한 차이가 관찰되지 않았다. 그럼에도 불구하고, TriMix 첨가 시, mRNA 포맷 사이에 T 세포 반응의 큰 차이가 나타났다. TriMix는 ARCA-Capped, 비변형된 mRNA의 경우 T 세포 반응의 크기를 개선하지 않은 반면, TriMix는 CleanCapped, 비변형된 및 CleanCapped 변형된 mRNA의 경우 T 세포 반응의 크기를 강력하게 향상시켰다. 전체적으로, T 세포 반응은 5 : 5의 비율의 E7 : TriMix 및 CleanCapped 비-변형 및 CleanCapped 변형된 mRNA 포맷으로 면역화한 경우 T 세포 반응이 가장 높았으며, 모든 순환 CD8 T 세포의 최대 80%가 E7에 특이적이었다.

### 발명의 내용

- [0006] 제1 양태에서, 본 발명은 다음을 포함하는 조합물을 제공한다:
- [0007] - 기능적 면역자극 단백질 CD40L, CD70 및 caTLR4를 코딩하는 하나 이상의 mRNA 분자; 및
- [0008] - 항원을 코딩하는 하나 이상의 mRNA 분자;
- [0009] 여기서 상기 mRNA 분자 중 적어도 하나는 5' CAP-1 구조를 갖는 것을 특징으로 한다.
- [0010] 본 발명의 특정 실시형태에서, 상기 mRNA 분자의 적어도 2, 적어도 3, 또는 모두는 5' CAP-1 구조를 갖는다.
- [0011] 또 다른 특정 실시형태에서, 상기 mRNA 분자는 슈도우리딘, 5-메톡시-우리딘, 5-메틸-시티딘, 2-티오-우리딘, 및 N6-메틸아데노신을 포함하는 목록으로부터 선택되는 것과 같은, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오시드를 추가로 포함한다.
- [0012] 추가의 특정 실시형태에서, 상기 변형된 뉴클레오시드는 4-티오-슈도우리딘, 2-티오-슈도우리딘, 1-카복시메틸-슈도우리딘, 1-프로피닐-슈도우리딘, 1-타우리노메틸-슈도우리딘, N1-메틸-슈도우리딘, 4-티오-1-메틸-슈도우리딘, 2-티오-1-메틸-슈도우리딘, 1-메틸-1-데아자-슈도우리딘, 2-티오-1-메틸-1-데아자-슈도우리딘, 디히드로슈도우리딘, 2-티오-디히드로슈도우리딘, 4-메톡시-슈도우리딘, 및 4-메톡시-2-티오-슈도우리딘을 포함하는 목록으로부터 선택되는 슈도우리딘일 수 있다. 매우 특정한 실시형태에서, 상기 적어도 하나의 변형된 뉴클레오시드는 N1-메틸-슈도우리딘이다.
- [0013] 또 다른 특정 실시형태에서, 상기 mRNA 분자 중 약 100%의 우리딘은 N1-메틸-슈도우리딘으로 대체된다.
- [0014] 본 발명은 본원에 정의된 바와 같은 조합물 및 적어도 하나의 약학적으로 허용되는 제제를 포함하는 약학 조성물을 추가로 제공한다.
- [0015] 또 다른 특정 실시형태에서, 본원에 정의된 바와 같은 조합물은 나노입자, 예컨대 지질 나노입자 또는 중합체 나노입자로 제형화된다.
- [0016] 추가 실시형태에서, 본원에 정의된 바와 같은 조성물은 정맥내, 결절내, 종양내, 피하, 피내 또는 근육내 제형용으로 제형화된다.
- [0017] 또 다른 추가 특정 실시형태에서, 본 발명에 따른 조성물은 백신 형태일 수 있다.
- [0018] 본 발명의 특정 실시형태에서, 상기 항원은 암 항원이다.
- [0019] 본 발명은 인간 또는 수의학에서 사용하기 위한; 보다 특히 백신접종에 사용하기 위한 및/또는 세포 증식성 장애 치료에서 사용하기 위한 본원에 정의된 바와 같은 조합물, 또는 조성물을 추가로 제공한다.
- [0020] 본 발명은 또한 세포 증식성 장애 치료 방법을 제공하며, 상기 방법은 이를 필요로 하는 대상체에 본원에 정의된 바와 같은 조합물 또는 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.

### 도면의 간단한 설명

[0021] 이제 도면을 구체적으로 참조하면, 도시된 세부사항은 예시에 불과하며 본 발명의 상이한 실시형태의 예시적인 논의의 위를 위한 것임을 강조한다. 이들은 본 발명의 원리 및 개념적 측면에 대한 가장 유용하고 쉽게 설명되는 것으로 여겨지는 것을 제공하기 위해 제시된다. 이와 관련하여 본 발명의 기본적인 이해를 위해 필요한 것보다 더 자세하게 본 발명의 구조적 세부사항을 나타내려는 시도는 이루어지지 않았다. 설명은 본 발명의 여러 형태가 실제로 구현될 수 있는 방법을 당업자에게 명백하게 하는 도면과 함께 취해진다.

**도 1:** 전신 염증 반응에 대한 mRNA 포맷 및 TriMix의 영향. 표시된 mRNA LNP로 마우스의 정맥내 주입 후 6시간에 혈청 사이토카인 역가를 측정하였다. E7/TriMix mRNA를 10 : 0, 7,5 : 2,5, 5 : 5의 비율로 LNP로 캡슐화하였다(50/10/39,5/0,5). mRNA는 뉴클레오시드 변형이 없는 ARCA capped(ARCA/non-mod), 뉴클레오시드 변형이 없는 CleanCap(CleanCap/non-mod) 또는 N1메틸슈도-우리딘을 함유하는 CleanCap(CleanCap/mod)이었다. n = 6; 2원 ANOVA 분석. ns = 유의하지 않음; \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001 \*\*\*\* p < 0,0001.

**도 2:** CleanCap/변형된 mRNA LNP에 대한 염증 반응 역동학. E7 및 TriMix mRNA를 표시된 비율로 LNP로 캡슐화하고 10 µg의 총 mRNA 용량으로 정맥내로 투여하였다. 모든 mRNA는 CleanCap 및 N1메틸슈도-우리딘으로 치환된 100% 우리딘을 함유하였다. 혈청 사이토카인을 주입 후 6시간 및 24시간에 측정하였다.

**도 3: a)** 10 : 0(TriMix 없음) 및 5 : 5의 E7/TriMix 비율로 E7/TriMix mRNA LNP를 사용하여 면역화 시 E7-특이적 T 세포 반응의 크기에 대해 mRNA 포맷이 미치는 영향. **b)** 표시된 E7 대 TriMix 비율에서 ARCA/non-mod mRNA 및 CleanCap mod mRNA를 사용하여 면역화한 경우 E7-특이적 T 세포 반응의 크기에 대해 TriMix가 미치는 영향. 2원 ANOVA 분석 후 Tukey's 다중 비교 시험. ns = 유의하지 않음; \* p < 0,05 \*\* p < 0,01 \*\*\* p < 0,001.

**도 4:** 10 : 0(TriMix 없음) 및 5 : 5의 E7/TriMix 비율에서 E7 E7/TriMix mRNA LNP를 사용하여 3차 면역화 후 ELISPOT로 평가한 IFN-γ T 세포 반응의 크기. mRNA는 뉴클레오시드 변형이 없는 ARCA capped(ARCA/non-mod), 뉴클레오시드 변형이 없는 CleanCap(CleanCap/non-mod) 또는 N1메틸슈도-우리딘을 함유하는 CleanCap(CleanCap/mod)였다. n = 6; 2원 ANOVA 분석. ns = 유의하지 않음; \* p < 0,05; \*\* p < 0,01.

**도 5: a)** 표시된 mRNA 포맷을 가진 E7 mRNA LNP를 사용하여 마우스에 주입 시 초기 체중의 %로 표현한 마우스 체중. LNP를 0, 7 및 14일차에 정맥내로 주입하였다. **b)** 각각 ARCA, non-mod mRNA, CleanCap, non-mod mRNA 및 CleanCap, mod mRNA에 대해 표시된 E7/TriMix mRNA LNP에서 LNP를 사용하여 마우스에 주입 시 초기 체중의 %로 표현한 마우스 체중.

**도 6:** PBS 또는 표시된 mRNA LNP를 사용하여 3차 주입 후 마우스 혈청의 ALT/AST 수준. 2원 ANOVA 분석 후 Tukey's 다중 비교 시험. ns = 유의하지 않음; \* p < 0,05 \*\* p < 0,01 \*\*\* p < 0,001.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0022] 본원에 이미 상술된 바와 같이, 본 발명은 다음을 포함하는 조합물을 제공한다:
- [0023] - 기능적 면역자극 단백질 CD40L, CD70 및 caTLR4를 코딩하는 하나 이상의 mRNA 분자; 및
- [0024] - 항원을 코딩하는 하나 이상의 mRNA 분자;
- [0025] 여기서 상기 mRNA 분자 중 적어도 하나가 5' CAP-1 구조를 갖는 것을 특징으로 한다.
- [0026] 본 발명 전체에 걸쳐, 용어 "TriMix"는 CD40L, CD70 및 caTLR4 면역자극 단백질을 코딩하는 mRNA 분자 혼합물을 나타낸다. CD40L 및 caTLR4 조합물의 사용은 가용성 CD40L 및 LPS의 첨가를 통한 CD40과 TLR4 라이게이션에 대해 나타난 바와 같이 성숙한, 사이토카인/케모카인 분비 DC를 생성한다. CD70을 DC에 도입하면 활성화된 T-세포 아포토시스를 억제하고 T-세포 증식을 지원함으로써 CD27<sup>+</sup> 나이브 T-세포에 대한 동시-자극 신호를 제공한다. caTLR4의 대안으로서, 다른 틀-유사 수용체(TLR)가 사용될 수 있다. 각각의 TLR에 대해, 구성적 활성 형태가 공지되어 있고, 숙주 면역 반응을 유도하기 위해 DC 내로 도입될 가능성이 있다. 그러나, 우리의 견해로는 caTLR4가 가장 강력한 활성화 분자이므로 바람직하다.
- [0027] 본원에서 사용되거나 언급된 mRNA 또는 DNA는 네이키드 mRNA 또는 DNA일 수 있거나, 보호된 mRNA 또는 DNA일 수 있다. mRNA 또는 DNA의 보호는 이의 안정성을 증가시키면서도 백신접종 목적에 대한 mRNA 또는 DNA 사용 능력을 보존한다. mRNA 및 DNA 둘 모두의 보호의 비-제한적인 예는 다음일 수 있다: 리포솜-캡슐화, 프로타민-보호, (양이온성) 지질 리포플렉스화(Lipoplexation), 지질성, 양이온성 또는 다가양이온성 조성물, 만노실화된 리포플렉스화, 버블 리포소타민(Bubble Liposomation), 폴리에틸렌이민(PEI) 보호, 리포솜-로딩된 미세버블 보호 등.
- [0028] 본 발명은 특히 종양-특이적 항원과 관련하여 사용하기에 적합하지만, 이는 또한 다른 유형의 표적-특이적 항원과 관련하여 적합하게 사용될 수 있다.
- [0029] 본 명세서 전반에 걸쳐 사용된 용어 "표적"은 본원에서 기술될 수 있는 특정 예에 한정되지 않는다. 임의의 감

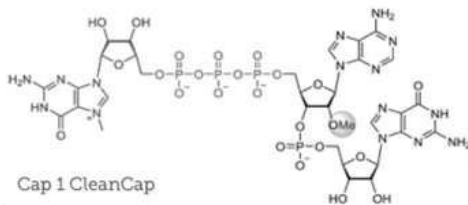
염원 예컨대 바이러스, 박테리아 또는 진균이 표적화될 수 있다. 또한 임의의 종양 또는 암세포가 표적화될 수 있다. 본 명세서 전반에 걸쳐 사용된 용어 "표적-특이적 항원"은 본원에서 기술될 수 있는 특정 예에 한정되지 않는다. 본 발명이 제시되는 표적-특이적 항원과 관계 없이 APC에서 면역자극의 유도과 관련이 있다는 것이 당업자에게 명백할 것이다. 제시될 항원은 대상체에서 면역 반응을 유도하고자 하는 표적의 유형에 따라 달라질 것이다. 표적-특이적 항원의 전형적인 예는 종양, 박테리아 및 진균 세포에 특이적이거나 바이러스 단백질 또는 바이러스 구조에 특이적인 발현된 또는 분비된 마커이다. 본 발명의 보호 범위를 제한하고자 하는 것은 아니지만, 마커의 가능한 몇 가지 예가 아래 나열되어 있다.

[0030] 본 명세서 전반에 걸쳐 사용된 용어 "신생물", "암" 및/또는 "종양"은 예시될 수 있는 암 또는 종양의 유형으로 제한되는 것으로 의도되지 않는다. 따라서 상기 용어는 모든 증식성 장애 예컨대 신생물, 이형성증, 전암성 (pre-malignant) 또는 전암성 (pre-cancerous) 병변, 비정상적인 세포 성장, 양성 종양, 악성 종양, 암 또는 전이를 포괄하며, 상기 암은 다음의 군으로부터 선택될 수 있다: 백혈병, 비소세포 폐암, 소세포 폐암, CNS 암, 흑색종, 난소암, 신장암, 전립선암, 유방암, 신경교종, 결장암, 방광암, 육종, 췌장암, 결장직장암, 두경부암, 간암, 골암, 골수암, 위암, 십이지장암, 식도암, 갑상선암, 혈액암, 및 림프종. 암에 대한 특이적인 항원은 예컨대 MelanA/MART1, 암 생식선 항원, gp100, 티로시나제, CEA, PSA, Her-2/neu, 서마이빈, 텔로머라제일 수 있다.

[0031] 본 발명의 백신의 바람직한 실시형태에서, mRNA 또는 DNA 분자는 CD40L 및 CD70 면역자극 단백질을 코딩한다. 본 발명의 백신의 특히 바람직한 실시형태에서, mRNA 또는 DNA 분자는 CD40L, CD70, 및 caTLR4 면역자극 단백질을 코딩한다.

[0032] 면역자극 단백질을 코딩하는 상기 mRNA 또는 DNA 분자는 단일 mRNA 또는 DNA 분자의 일부일 수 있다. 바람직하게는, 상기 단일 mRNA 또는 DNA 분자는 2개 이상의 단백질을 동시에 발현할 수 있다. 일 실시형태에서, 면역자극 단백질을 코딩하는 mRNA 또는 DNA 분자는 내부 리보솜 진입 부위(IRES: internal ribosomal entry site) 또는 자가-절단 2a 펩티드 코딩 서열에 의해 단일 mRNA 또는 DNA 분자에서 분리된다.

[0033] 일부 바람직한 실시형태에서, 본 발명의 방법에서 사용된 mRNA는 소위 CAP-1 구조(CleanCap)가 있는 5' cap 구조를 가지며, 이는 cap 뉴클레오타이드와 관련하여 끝에서 두 번째의 뉴클레오타이드에 리보스의 2' 히드록실기 하기에 예시된 바와 같이 메틸화되었음을 의미한다:



[0034] 또 다른 특정 실시형태에서, 본 발명의 사용된 mRNA 분자의 2, 3, 4 등 또는 모두는 소위 CAP-1 구조가 있는 5' cap 구조를 갖는다.

[0035] 추가 실시형태에서, 본 발명의 하나 이상의 mRNA 분자는 적어도 하나의 변형된 뉴클레오시드를 추가로 포함할 수 있다. 또 다른 특정 실시형태에서, 본 발명의 사용된 mRNA 분자의 2, 3, 4 등 또는 모두는 적어도 하나의 변형된 뉴클레오시드를 갖는다.

[0036] 본 발명의 또 다른 특정 실시형태에서, 상기 mRNA 분자는 예컨대 슈도우리딘, 5-메톡시-우리딘, 5-메틸-시티딘, 2-티오-우리딘, 및 N6-메틸아데노신을 포함하는 목록으로부터 선택되는 것과 같은 적어도 하나의 변형된 뉴클레오시드를 추가로 포함한다.

[0037] 본 발명의 특정 실시형태에서, 상기 적어도 하나의 변형된 뉴클레오시드는 목록 4-티오-슈도우리딘, 2-티오-슈도우리딘, 1-카복시메틸-슈도우리딘, 1-프로피닐-슈도우리딘, 1-타우리노메틸-슈도우리딘, N1-메틸-슈도우리딘, 4-티오-1-메틸-슈도우리딘, 2-티오-1-메틸-슈도우리딘, 1-메틸-1-데아자-슈도우리딘, 2-티오-1-메틸-1-데아자-슈도우리딘, 디히드로슈도우리딘, 2-티오-디히드로슈도우리딘, 4-메톡시-슈도우리딘, 및 4-메톡시-2-티오-슈도우리딘으로부터 선택되는 것과 같은, 슈도우리딘일 수 있다. 매우 특정한 실시형태에서, 상기 적어도 하나의 변형된 뉴클레오시드는 N1-메틸-슈도우리딘이다.

[0038] 본 발명의 맥락 내에서 사용하기에 적합한 대안적인 뉴클레오시드 변형은 다음을 포함한다: 피리딘-4-온 리보뉴

클레오시드, 5-아자-우리딘, 2-티오-5-아자-우리딘, 4-티오-슈도우리딘, 2-티오-슈도우리딘, 5-히드록시우리딘, 3-메틸우리딘, 5-카복시메틸-우리딘, 1-카복시메틸-슈도우리딘, 5-프로피닐-우리딘, 1-프로피닐-슈도우리딘, 5-타우리노메틸우리딘, 1-타우리노메틸-슈도우리딘, 5-타우리노메틸-2-티오-우리딘, 1-타우리노메틸-4-티오-우리딘, 5-메틸-우리딘, 1-메틸-슈도우리딘, 4-티오-1-메틸-슈도우리딘, 2-티오-1-메틸-슈도우리딘, 1-메틸-1-테아자-슈도우리딘, 2-티오-1-메틸-1-테아자-슈도우리딘, 디히드로우리딘, 디히드로슈도우리딘, 2-티오-디히드로우리딘, 2-티오-디히드로슈도우리딘, 2-메톡시우리딘, 2-메톡시-4-티오-우리딘, 4-메톡시-슈도우리딘, 및 4-메톡시-2-티오-슈도우리딘. 일부 실시형태에서, mRNA는 5-아자-시티딘, 슈도이소시티딘, 3-메틸-시티딘, N4-아세틸시티딘, 5-포밀시티딘, N4-메틸시티딘, 5-히드록시메틸시티딘, 1-메틸-슈도이소시티딘, 피롤로-시티딘, 피롤로-슈도이소시티딘, 2-티오-시티딘, 2-티오-5-메틸-시티딘, 4-티오-슈도이소시티딘, 4-티오-1-메틸-슈도이소시티딘, 4-티오-1-메틸-1-테아자-슈도이소시티딘, 1-메틸-1-테아자-슈도이소시티딘, 제블라린, 5-아자-제블라린, 5-메틸-제블라린, 5-아자-2-티오-제블라린, 2-티오-제블라린, 2-메톡시-시티딘, 2-메톡시-5-메틸-시티딘, 4-메톡시-슈도이소시티딘, 및 4-메톡시-1-메틸-슈도이소시티딘으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 뉴클레오시드를 포함한다. 일부 실시형태에서, mRNA는 2-아미노퓨린, 2,6-디아미노퓨린, 7-테아자-아데닌, 7-테아자-8-아자-아데닌, 7-테아자-2-아미노퓨린, 7-테아자-8-아자-2-아미노퓨린, 7-테아자-2,6-디아미노퓨린, 7-테아자-8-아자-2,6-디아미노퓨린, 1-메틸아데노신, N6-이소펜타닐아데노신, N6-(시스-히드록시이소펜타닐)아데노신, 2-메틸티오-N6-(시스-히드록시이소펜타닐)아데노신, N6-글리시닐카바모일아데노신, N6-트레오닐카바모일아데노신, 2-메틸티오-N6-트레오닐 카바모일아데노신, N6,N6-디메틸아데노신, 7-메틸아데닌, 2-메틸티오-아데닌, 및 2-메톡시-아데닌으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 뉴클레오시드를 포함한다. 일부 실시형태에서, mRNA는 이노신, 1-메틸-이노신, 와이오신, 와이부토신, 7-테아자-구아노신, 7-테아자-8-아자-구아노신, 6-티오-구아노신, 6-티오-7-테아자-구아노신, 6-티오-7-테아자-8-아자-구아노신, 7-메틸-구아노신, 6-티오-7-메틸-구아노신, 7-메틸이노신, 6-메톡시-구아노신, 1-메틸구아노신, N2-메틸구아노신, N2,N2-디메틸구아노신, 8-옥소-구아노신, 7-메틸-8-옥소-구아노신, 1-메틸-6-티오-구아노구아노신, 및 N2,N2-디메틸-6-티오-구아노신으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 뉴클레오시드를 포함한다.

- [0040] 본 발명에서 사용되는 mRNA 분자는 하나 이상의 변형된 뉴클레오티드를 함유할 수 있으며, 특정 실시형태에서 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100%의 특정 유형의 뉴클레오티드가 변형된 것으로 대체될 수 있다. 동일한 mRNA 분자 내에 상이한 뉴클레오티드 변형이 포함되는 것도 또한 배제되지 않는다. 본 발명의 매우 특정한 실시형태에서, 상기 mRNA 분자의 우리딘의 약 100%가 N1-메틸-슈도우리딘으로 대체된다.
- [0041] 본 발명은 본원에 정의된 바와 같은 조합물 및 적어도 하나의 약학적으로 허용되는 제제를 포함하는 약학 조성물을 추가로 제공한다.
- [0042] 특정한 실시형태에서, 본 발명의 하나 이상의 상기 mRNA 분자는 추가로 번역 인핸서 및/또는 핵 보유 요소를 함유할 수 있다. 적합한 번역 인핸서 및 핵 보유 요소는 국제공개 WO2015071295호에 기술된 것들이다.
- [0043] 본 발명의 추가의 실시형태에서, 상기 하나 이상의 mRNA 분자는 비경구 투여용으로 제형화되며; 보다 특히 정맥내, 결절내, 종양내, 피하, 피내 또는 근육내 제형으로 제형화된다.
- [0044] 추가의 특정한 실시형태에서, 상기 mRNA 분자는 결절내 또는 종양내 투여용으로 제형화되며, 링거 락테이트 완충액과 같은 적합한 주입 완충액 중의 네이키드 mRNA 분자 형태로 존재한다.
- [0045] 본 발명은 또한 본원에 정의된 바와 같은 조합물 또는 조성물을 제공하며; 상기 mRNA 분자의 하나 이상은 나노입자에 포함된다.
- [0046] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "나노입자"는 특히 핵산의 전신, 특히 정맥내 투여에 적합한 입자를 만드는 직경을 갖는 입자의 입자를 지칭하며, 전형적으로 1000 나노미터(nm) 미만의 직경을 갖는다.
- [0047] 본 발명의 특정한 실시형태에서, 나노입자는 지질 나노입자 및 중합체 나노입자를 포함하는 목록으로부터 선택된다.
- [0048] 지질 나노입자(LNP: lipid nanoparticle)는 일반적으로 상이한 지질의 조합물로 구성된 나노크기 입자로 알려져 있다. 다수의 상이한 유형의 지질이 이러한 LNP에 포함될 수 있지만, 본 발명의 LNP는 예를 들어 이온화가능한 지질, 인지질, 스테롤 및 PEG 지질의 조합으로 구성될 수 있다.
- [0049] 중합체 나노입자는 전형적으로 나노구체(nanosphere) 또는 나노캡슐일 수 있다. 2가지 주요 전략, 즉, "하향식(top-down)" 접근법 및 "상향식(bottom-up)" 접근법이 중합체 나노입자의 제조에 사용된다. 하향식 접근법에서, 사전형성된 중합체의 분산이 중합체 나노입자를 생성하는 반면, 하향식 접근법에서, 단량체의 중합화가 중합체

나노입자의 형성을 유도한다. 하향식 및 상향식 방법 둘 모두 합성 중합체/단량체 예컨대 폴리(d,l-락타이드-co-글리콜라이드), 폴리(에틸 시아노아크릴레이트), 폴리(부틸 시아노아크릴레이트), 폴리(이소부틸 시아노아크릴레이트), 및 폴리(이소헥실 시아노아크릴레이트); 안정화제 예컨대 폴리(비닐 알코올) 및 디데실디메틸암모늄 브로마이드; 및 유기 용매 예컨대 디클로로메탄 및 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 사이클로헥산, 아세토니트릴, 아세톤 등을 사용한다. 최근에 과학계에서는 천연 중합체를 사용하여 합성 중합체를 대체할 수 있는 방법과 독성이 덜한 합성 방법을 모색하고 있다.

[0050] 본 발명은 또한 인간 및 수의학에서 사용하기 위한, 특히 세포 증식성 장애의 치료에서 사용하기 위한, 보다 특히 대상체에서 종양에 대한 면역 반응 유도에서 사용하기 위한, 본원에 정의된 바와 같은 조합물 및 백신을 제공한다.

[0051] 마지막으로, 본 발명은 본 발명의 조합물 또는 백신을 이를 필요로 하는 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 세포 증식성 장애의 치료 방법을 제공한다.

[0052] 조성물은 또한 동물의 질환의 예방 및/또는 치료를 포함하는 본원의 목적을 위한 수의학 분야에서 가치가 있을 수 있으며, 또한 - 소, 돼지, 양, 닭, 어류, 등과 같은 경제적으로 중요한 동물의 경우 - 동물의 성장 및/또는 체중 및/또는 고기 또는 동물로부터 수득되는 다른 생성물의 양 및/또는 품질을 향상시키는데 가치가 있을 수 있다.

[0053] 본 발명은 이제 다음의 합성 및 생물학적 실시예에 의해 설명될 것이며, 이는 어떤 식으로든 본 발명의 범위를 제한하지 않는다.

[0054] 실시예

[0055] **재료 및 방법**

[0056] **마우스**

[0057] 암컷 C57BL/6 마우스를 Charles River Laboratories(France)로부터 구입하고 표준 배당 재료 및 케이지 강화가 있는 개별 통풍 케이지에 수용하였다. 동물 실험을 위한 기관(Vrije Universiteit Brussel) 및 유럽 연합 지침에 따라 동물을 유지하고 처리하였다. 마우스가 음식과 물에 자유롭게 접근할 수 있게 하였다. 실험은 마우스가 8주령이 되었을 때 시작하였다. 마우스(n = 6/군)에 0, 7 및 14일차에 LNP 중의 10 ug mRNA(200 µL의 부피로)를 미정맥을 통해 3회 정맥내 주입하였다. 대조군 마우스에는 동일한 시간 간격으로 200 µL의 PBS를 주입하였다. 마우스 무게를 2일마다 모니터링하였다.

[0058] **mRNA 합성 및 정제**

[0059] eTherNA 플라스미드 pEthern-v2로부터 시험관 내 전사(IVT)에 의해 eTherNA에 의해 E7 mRNA를 제조하였다. HPV16-E7 단백질 코딩하는 서열을 신호 서열과 인간 DC-LAMP의 막횡단 및 세포질 영역 사이의 프레임 내로 클로닝하였다. 이러한 키메라 유전자를 5' 말단에 번역 인핸서 및 3' 말단에 RNA 안정화 서열이 풍부한 pEthern-v2 플라스미드(국제공개 WO2015071295호)에 클로닝하였다. CD40L, caTLR4 및 CD70 mRNA(TriMix 성분)를 pEthern-v2 플라스미드 내로 클로닝하였다. IVT 후, dsRNA를 셀룰로스 정제로 제거하였다. 셀룰로스 분말을 Sigma에서 구입하여 16% 에탄올을 포함하는 1xSTE(소듐 클로라이드-Tris-EDTA) 완충액 중에서 세척하였다. IVT mRNA(16% 에탄올을 포함하는 1xSTE 중의)를 세척된 셀룰로스 펠릿에 첨가하고 실온에서 20분 동안 진탕하였다. 이어서 이를 진공 필터(Corning)로 가져왔다. 용출액은 ssRNA 분획을 포함하며 모든 실험에서 사용하였다. mRNA 품질을 모세관 겔 전기영동(Agilent, Belgium)으로 모니터링하였다.

[0060] **mRNA 지질-기반 나노입자 생성**

[0061] NanoAssemblr Benchtop(Precision Nanosystems)을 사용하여 9 mL/분의 속도로 말산 완충액(20 mM 말산(Sigma), 30 mM NaCl(Sigma), pH3)중의 mRNA 용액과 지질 용액을 2 : 1 부피 비율로 미세유체 혼합하여 지질 기반 나노입자를 생성하였다. 지질 용액은 Coatsome-EC(NOF corporation), DOPE(Avanti), 콜레스테롤(Sigma) 및 DMG-PEG2000(Sunbright GM-020, NOF corporation)의 혼합물을 각각 50/10/39.5/0.5의 몰 비율로 함유하였다. LNP를 slide-a-lyzer 투석 카세트(20K MWCO, 3 mL, ThermoFisher)를 사용하여 PBS(LNP 부피보다 100배 더 많은 PBS 부피)에 대해 투석하였다. 크기 및 다분산도를 Zetasizer Nano(Malvern)를 사용하여 동적 광 산란으로 측정하였다.

[0062] **사이토카인 적정 평가**

[0063] 첫 번째 mRNA LNP 투여 6 및 24시간 후, 처리군 및 대조군 마우스의 50  $\mu$ L의 혈액을 응고 활성화제(ref 41.1500.005, Sarstedt)가 들어있는 튜브에 수집하였다. 수집 튜브를 원심분리하고(5분, 10000 g) 혈청을 Eppendorf 튜브에 옮기고 사용할 때까지  $-20^{\circ}\text{C}$ 에 저장하였다. 사이토카인 IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , MCP-1, IL-6, IL-12, RANTES, G-CSF 및 IP-10의 적정을 평가하기 위해, 혈청을 얼음 상에서 해동시키고 ProcartaPlex Immunoassay(ThermoFisher Scientific)에서 사용하였다. 프로토콜에 따라 분석을 수행하였다. 혈청 샘플을 범용 분석 완충액(ProcartaPlex 키트에 포함되어 있음) 중에서 3회 희석하고 형광으로 표지된 비드와 함께 120분 동안 인큐베이션 하였다. Procartaplex 분석의 판독을 MagPix 기기(Luminex) 상에서 수행하였다.

[0064] **ALT/AST ELISA**

[0065] 3차 mRNA LNP 투여 24시간 후, 처리군 및 대조군 마우스의 50  $\mu$ L의 혈액을 응고 활성화제(ref 41.1500.005, Sarstedt)가 들어있는 튜브에 수집하였다. 수집 튜브를 원심분리하고(5분, 10000 g) 혈청을 Eppendorf 튜브에 옮기고 사용할 때까지  $-20^{\circ}\text{C}$ 에 저장하였다. 알라닌 트랜스아미나제 1(ALT) 및 아스파테이트 트랜스아미나제(AST)의 혈청 역가를 평가하기 위해, 혈청을 얼음 상에서 해동시키고 ALT1 ELISA(Abbexa ref. abx570182) 및 AST ELISA(Abbexa ref. abx255199)에서 사용하였다. 오직 하나의 편차로 키트 프로토콜에 따라 분석을 수행하였다; 이러한 유형의 샘플은 제한적이기 때문에 규정된 부피의 혈청의 절반만 플레이트에 첨가하였다. 혈청 샘플을 키트에 포함된 샘플 희석 완충액에 5배 희석하였다. SpectraMax M3 플레이트 판독기(Molecular Devices) 상에서 ELISA를 판독하였다.

[0066] **유세포 분석**

[0067] **E7-특이적 T 세포 수**

[0068] 6, 13 및 19일차에 처리군 및 대조군 마우스로부터 혈액을 수집하였다. 적혈구를 세포용해하고 나머지 백혈구를 제조사의 지침(MBL International)에 따라 APC 표지된 E7(RAHYNIYTF)-테트라머(SEQ ID N<sup>o</sup> 1)로 염색하였다. 과량의 테트라머를 세척해내고 표면 분자(표 1에 열거됨)의 항체 혼합물을 세포에 첨가하고  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 30분 동안 인큐베이션 하였다. LSR Fortessa 세포측정기 상에서 데이터를 수집하고 Flow Jo Software로 분석하였다.

**표 1**

[0069]

항체	형광물질	클론	회사
생존 염료	Zombie Aqua	n.a.	BioLegend
CD3	PerCPeF710	17A2	eBioscience(Thermo Fisher)
CD8	V450	53-6.7	BD Horizon

[0070] **E7-특이적 T 세포의 수의 유세포 분석에 사용된 항체 목록**

[0071] **IFN- $\gamma$  ELISpot 평가**

[0072] 무린 IFN- $\gamma$  ELISpot 키트(Diaclone, USA)를 사용하였다. 마이크로적정 플레이트(96-웰, Diaclone, USA)를 제조사의 지침에 따라 항-IFN- $\gamma$  포획 항체로 밤새 코팅하고 비특이적 결합을 RPMI 세포주 배양 배지를 함유하는 10% FBS로 2시간 동안  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 차단하였다. 20일차에, 마우스를 마취시키고 이의 비장을 수확하였다. 비장세포의 단일 세포 현탁액을 제조하고 마이크로적정 플레이트에 펩티드 자극을 포함하거나 포함하지 않고 10000 세포/웰로 씨딩하였다. 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 E7 펩티드를 전용 웰에서 자극에 사용하였다. 양성 대조군으로서, T 세포를 항-CD3/항-CD28 비드로 자극하였다. 세포를 24시간 동안 인큐베이션 하였다. 이후, 세포를 세척하고 반점을 제조사의 지침(Diaclone)에 따라 발생시켰다. 반점을 AID ELISpot 판독기(Autoimmun Diagnostika GmbH, Strassberg, Germany)를 사용하여 계수하였다.

[0073] **결과 및 논의**

[0074] **LNP 제형 및 물리화학적 특성**

[0075] 모든 mRNA LNP를 NanoAssemblr(PNI) 상에서 미세유체 혼합하여 생성하였다. 간략하게, SS-EC, DOPE, 콜레스테롤 및 DMG-PEG2000로 구성된 에탄올성 지질 혼합물을 재료 및 방법 섹션에 상세히 설명된 바와 같이 관심 mRNA의 산성 용액과 혼합하였다. 구성 지질에 대한 몰% 비율은 50% CoatsomeSS-EC, 10% DOPE, 39,5% 콜레스테롤 및 0,5% DMG-PEG2000이었다. 이어서 mRNA LNP를 PBS에 대해 투석하고 모든 mRNA LNP의 크기 및 다분산도(PDI)를 동적 광 산란(DLS)으로 측정하였다. 표 2에 나타낸 바와 같이, 모든 mRNA LNP는 mRNA 포맷 및 E7: TriMix 비율

과 관계 없이 크기 및 PDI가 유사하였다.

표 2

[0076]

	면역화 1		면역화 2		면역화 3		평균	
	크기 (nm)	PDI	크기 (nm)	PDI	크기 (nm)	PDI	크기 (nm)	PDI
10 ug E7, ARCA, non-mod	130	0.112	115	0.087	109	0.089	118	0.096
10 ug E7, CleanCap, non-mod	129	0.121	117	0.088	103	0.082	116	0.097
10 ug E7, CleanCap, mod	119	0.097	115	0.085	110	0.085	115	0.089
7.5/2.5 ug E7/TriMix, ARCA, non-mod	125	0.090	109	0.102	104	0.094	113	0.095
7.5/2.5 ug E7/TriMix, CleanCap, non-mod	116	0.114	111	0.111	108	0.093	111	0.106
7.5/2.5 ug E7/TriMix, CleanCap, mod	118	0.104	114	0.088	116	0.096	116	0.096
5/5 ug E7/TriMix, ARCA, non-mod	117	0.118	119	0.125	115	0.137	117	0.127
5/5 ug E7/TriMix, CleanCap, non-mod	115	0.076	117	0.113	113	0.088	115	0.092
5/5 ug E7/TriMix, CleanCap, mod	114	0.104	116	0.117	108	0.058	112	0.093
평균	120	0.104	115	0.102	110	0.091	115	0.099

[0077]

정맥내 면역화에 사용된 지질-기반 나노입자의 크기 및 PDI(다분산도)

[0078]

mRNA 포맷은 E7/TriMix mRNA LNP에 대한 염증 반응을 결정한다

[0079]

mRNA를 ARCA-Cap 또는 CleanCap으로 동시-전사적으로 캡핑하였다. ARCA Cap mRNA에는 뉴클레오시드 변형이 포함되어 있지 않았다(ARCA, non-mod mRNA). CleanCap mRNA는 변형된 뉴클레오시드를 함유하지 않았거나(CleanCap, non-mod mRNA) N1메틸슈도-우리딘에 의한 100% 우리딘 치환(CleanCap, mod mRNA)을 나타냈다. 염증 반응에 대한 mRNA 포맷 및 TriMix의 영향을 해결하기 위해, E7 mRNA를 표시된 비율로 TriMix와 혼합하고 LNP 내로 캡슐화하였다. C57BL/6 마우스에 10 µg mRNA의 총 용량을 미정맥으로 투여하였다. 주입 후 6시간 및 24시간에 혈청 샘플을 수집하고 IFN-α, IFN-γ, IL-6, MCP-1, G-CSF 및 RANTES에 대해 분석하였다.

[0080]

도 1에서 알 수 있는 바와 같이, N1 메틸슈도-우리딘의 혼입 없이 ARCA를 CleanCap으로 대체하면 몇 가지(IFN-α, IFN-γ, RANTES 및 MCP-1)가 크게 감소하지만 모든 사이토카인이 해결되지는 않았다(IL-6, G-CSF). N1 메틸슈도-우리딘에 의한 우리딘의 동시 대체(CleanCap, mod)는 염증 반응을 더욱 약화시켰으며, 현재 모든 사이토카인은 ARCA, non-mod mRNA에 비해 상당히 감소하였다. 이러한 데이터는 세포질 RNA 센서에 의한 ARCA 대 CleanCapped mRNA의 차등 감지 및 엔도솜 TLR에 의한 N1 메틸슈도-우리딘 mRNA의 감소된 인식과 일치한다. 놀랍게도, TriMix mRNA에 의한 E7 mRNA의 부분적인 대체는 염증성 사이토카인의 혈청 역가를 상승시키지 않았다.

[0081]

우리는 다음으로 CleanCapped, N1 메틸슈도-우리딘 변형된 mRNA를 함유하는 정맥내로 주입된 mRNA LNP의 염증 반응의 동역학을 다루었다(도 2). 모든 사이토카인은 주입 후 6시간에 상당한 상승을 보인 반면, 사이토카인 역가는 주입 후 24시간에 거의 기준선으로 돌아갔으며, 이는 CleanCap/mod mRNA LNP에 대한 사이토카인 반응이 일시적이고 연료(fuel) 사이토카인 방출 증후군이 아님을 분명하게 나타낸다.

[0082]

mRNA 포맷은 항원-특이적 T 세포 반응의 크기와 기능성에 영향을 미친다

[0083]

T 세포 반응의 크기 및 기능적 특성에 대한 mRNA 포맷의 영향을 평가하기 위해, E7 mRNA를 상이한 mRNA 포맷에 대해 표시된 비율로 TriMix mRNA와 혼합하였다. 마우스를 0, 7 및 14일차에 각각의 mRNA LNP로 10 µg의 총 mRNA 용량으로 면역화시켰다. 6, 13 및 19일차에, PBMC를 수집하고 유세포 분석기로 염색하여 E7-특이적 CD8 T 세포의 퍼센트를 평가하였다.

[0084]

도 3으로부터 알 수 있는 바와 같이, mRNA LNP를 사용한 정맥내 면역화는 강력한 E7-특이적 T 세포 반응을 유도

하였으며, E7 : TriMix 비율 5 : 5의 CleanCap/non-mod mRNA LNP 및 CleanCap/mod mRNA LNP 처리군에서 가장 높은 E7-특이적 T 세포 퍼센트가 유도되었다.

[0085] TriMix mRNA의 부재 시(E7: TriMix 10 : 0), 3가지 mRNA 포맷 사이에 유도된 T 세포 반응의 크기에서 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 그럼에도 불구하고, E7 mRNA 절반은 TriMix(5 : 5 비율)로 치환하였을 때, CleanCap/non-mod mRNA 및 CleanCap/mod mRNA로 면역화된 마우스는 ARCA/non-mod mRNA로 면역화된 마우스와 비교하여 유의하게 더 높은 수준의 E7-특이적 T 세포를 나타냈다(도 3a). 따라서 TriMix의 영향은 mRNA 포맷에 명백하게 의존하며, TriMix는 ARCA/non-mod mRNA의 경우 이점을 나타내지 않았지만 CleanCap/mod mRNA의 경우 매우 중요한 이점을 나타냈다.

[0086] CleanCap/mod mRNA의 경우, 5 : 5 비율의 E7/TriMix는 7,5 : 2,5 비율과 비교하여 더 강력한 T 세포 반응을 일으키는 것으로 나타났으며, 이는 항원 mRNA 대 TriMix mRNA 비율을 추가로 최적화하기 위한 추가 연구를 보증한다.

[0087] E7-특이적 T 세포 반응의 크기 및 기능성을 3차 면역화 후 획득된 비장세포 상에서 IFN- $\gamma$  ELISPOT로 추가로 분석하였다. 혈액에서 순환하는 E7-특이적 CD8 T 세포의 관점에서 관찰한 것과 마찬가지로, TriMix는 ARCA, non-mod mRNA의 경우 IFN- $\gamma$  생성 비장세포의 수를 증가시키지 않았지만, CleanCap/non-mod mRNA and CleanCap/mod mRNA의 경우 TriMix는 반응을 증가시켰다(도 4).

[0088] **TriMix는 체중 감소나 간 손상에 영향을 미치지 않는다**

[0089] 체중 감소 및 ALT/AST 수준을 독성 및 간손상에 대한 대리 지표로 측정하였다. 도 5에서 알 수 있는 바와 같이, 모든 LNP는 마우스의 일시적인 체중 감소를 유도한 후 -주사 후 24시간에 가장 두드러짐 - 빠르게 회복되었다. ARCA-캡핑 mRNA가 PBS 주입 마우스에 비해 가장 높은 체중 감소를 유발하는 경향이 있었지만 mRNA 포맷 자체는 체중 감소 정도에 거의 영향일 미치지 않는 것으로 나타났다. 언급된 mRNA 포맷 중 어느 것도 TriMix가 체중 감소를 악화시키지 않았다.

[0090] 마지막으로, 우리는 간 손상에 대한 대리 지표로서 사용되는, 간 효소 AST/ALT의 혈청 역가에 대한 정맥내 mRNA LNP 백신접종의 영향을 평가하였다. AST/ALT 수준을 3차 면역화 후 1주일에 ELISA로 평가하였다. 처리군 중 어느 것도 ALT/AST 수준이 강력하게 상승되지 않았다. E7/TriMix mRNA LNP 처리 마우스의 경우, mRNA 포맷과 관계 없이 PBS 마우스에 비해 ALT 및 AST 수준의 통계학적으로 유의한 증가가 측정되지 않았다. 놀랍게도, E7-단독 mRNA LNP로 처리한 마우스는 PBS에 대한 AST 수준에서 낮지만 유의한 상향조절을 나타냈다(도 6).

[0091] **결론**

[0092] 본 연구에서, 우리는 이전에 최적화된 LNP 제형을 사용하여 항원/TriMix mRNA 백신접종의 면역원성 및 염증 안전성에 대한 mRNA 포맷의 영향을 다루었다.

[0093] CleanCap으로 ARCA를 대체하면 전신 염증 반응의 유의하게 감소하였다. ARCA를 사용한 동시-전사 캡핑의 효율은 약 70%이며, 생성된 mRNA의 30%는 RIG-I에서 감지되는 5' 삼인산 말단이 있었다. 또한, 천연 메틸화된 Cap1 구조 대신, ARCA는 비-메틸화된 "Cap-0" 구조를 도입하여, 염증을 유발하는 다양한 RNA 센서를 다시 유발한다. CleanCap(Cap-1)은 더 높은 효율(> 90%)로 통합되고 천연 Cap1 구조를 도입하여, 선천적인 인식 및 염증을 낮춘다. N1 메틸우리딘에 의한 우리딘의 치환은 IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  및 IL-6의 혈청 역가를 추가로 낮추며, 이는 N1 메틸 슈도-우리딘 치환이 TLR7 및 RIG-I 활성화를 낮춘다는 것을 입증하는 이전의 보고와 일치한다. 중요한 것은, 다루었던 E7/TriMix mRNA 비율 및 mRNA 포맷 중 어느 것도, TriMix가 전신 염증 반응을 악화시키지 않았다는 것이다.

[0094] T 세포 반응 크기 및 동역학 관점에서, TriMix의 부재 시 mRNA 포맷 사이에 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 그러나, TriMix 첨가 시, mRNA 포맷 사이에 강력한 차이가 발생하였다. 높은 염증성 ARCA, non-mod mRNA 포맷의 경우, TriMix는 T 세포 반응의 크기를 더 증가시키는데 실패하였다. 그럼에도 불구하고, 낮은 염증성 mRNA 포맷 CleanCap, non-mod 및 CleanCap, mod의 경우, TriMix는 면역-자극 기능을 발휘하여 E7-특이적 CD8 T 세포 반응의 크기를 강력하게 증가시켰다. 유사하게, TriMix mRNA는 또한 CleanCap, non-mod and CleanCap, mod mRNA로 면역화한 경우 IFN- $\gamma$  분비 T 세포의 수를 향상시켰지만 ARCA, non-mod mRNA LNP로 면역화한 경우는 그렇지 않았다.

[0095] TriMix mRNA에 의해 항원 mRNA가 부분적으로 치환된 CleanCap/mod mRNA LNP가 가장 높은 수준의 T 세포 반응을 유발하지만 가장 낮은 염증 반응을 일으키기 때문에, 우리는 이러한 mRNA LNP 포맷이 가장 우수한 치료 지수를

나타내는 것으로 보인다.

[0096]

**서열 목록**

<210> 1  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

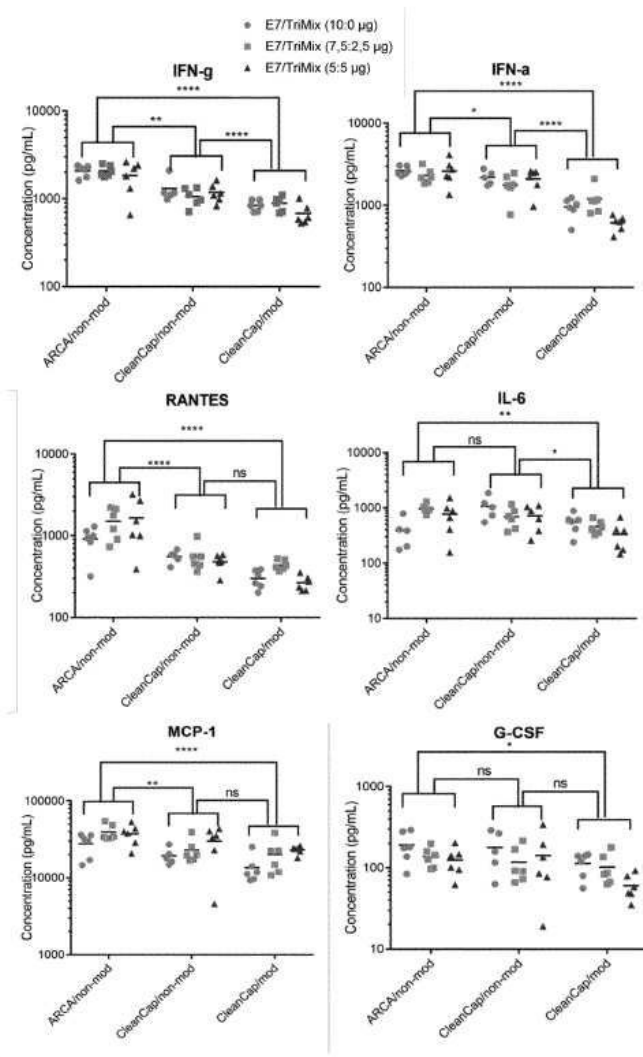
<220>  
 <223> E7 - Tetramer

<400> 1  
 Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe  
 1 5

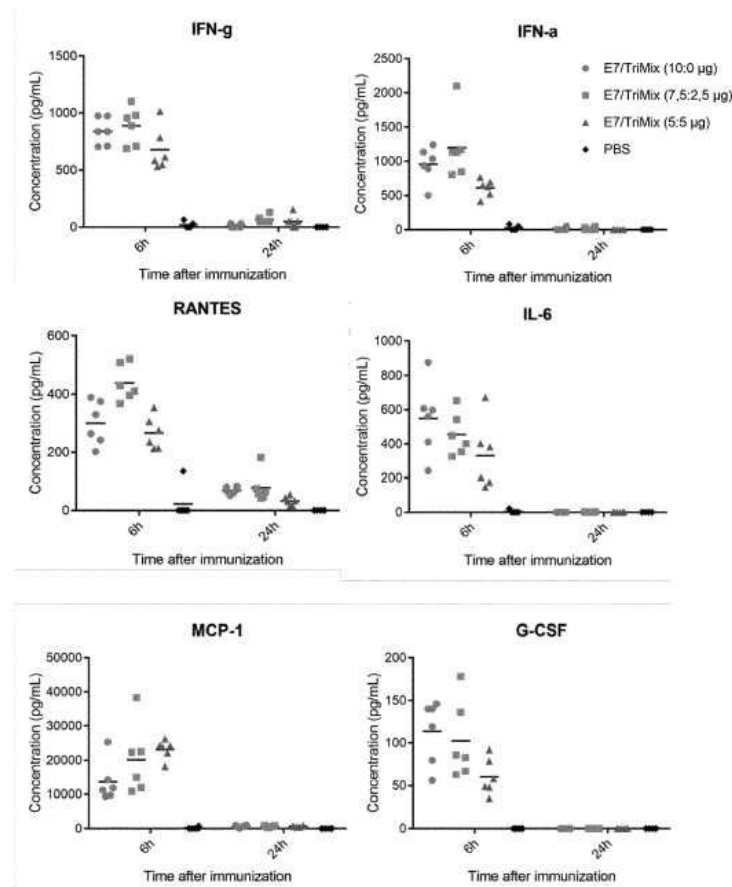
[0097]

**도면**

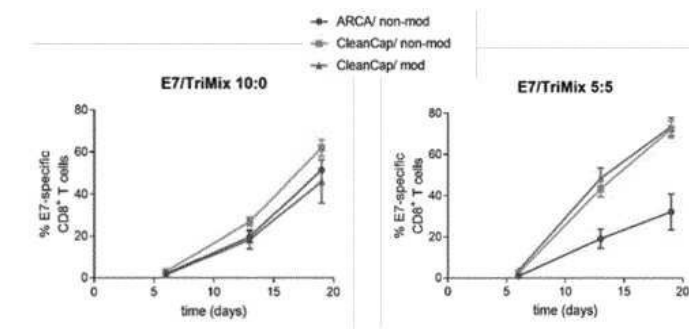
**도면1**



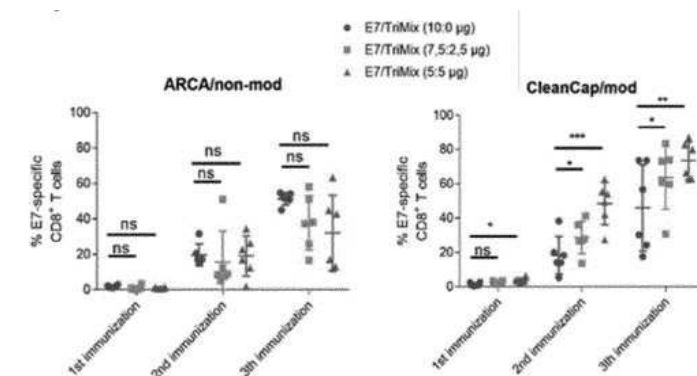
도면2



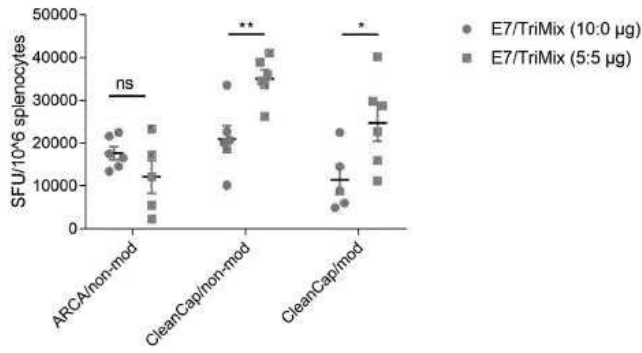
도면3a



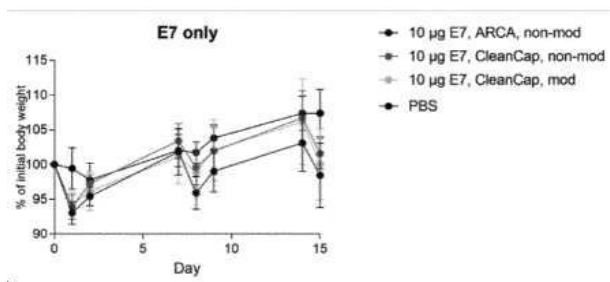
도면3b



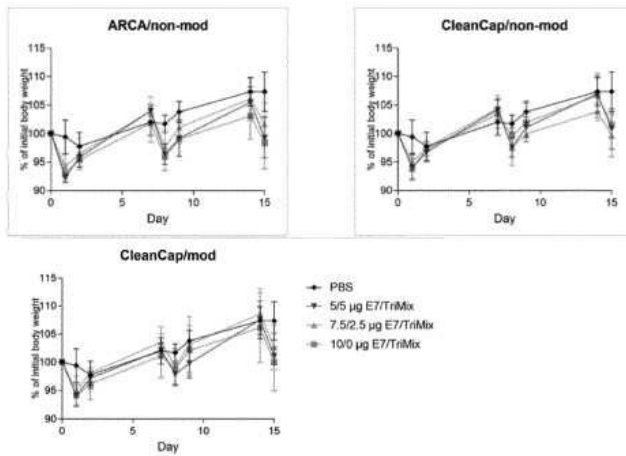
도면4



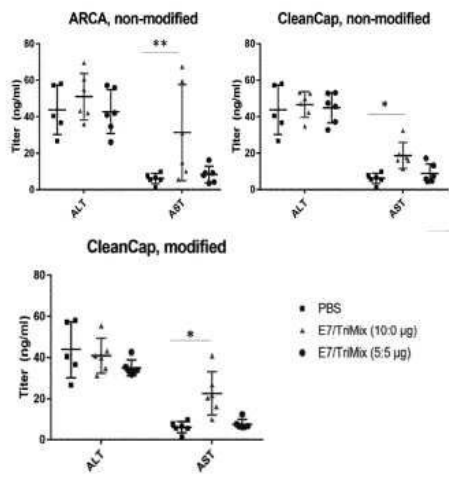
도면5a



도면5b



도면6



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> eTheRNA Immunotherapies NV

<120> mRNA Formulation

<130> ETR-050

<150> EP19171323.9

<151> 2019-04-26

<160> 1

<170> BiSSAP 1.3

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> E7 - Tetramer

<400> 1

Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe

1

5