

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일

2020년 12월 10일 (10.12.2020) WIPO | PCT



(10) 국제공개번호

WO 2020/246750 A2

(51) 국제특허분류:

A61K 39/39 (2006.01)

A61K 47/24 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

A61K 39/02 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2020/006952

(22) 국제출원일:

2020년 5월 29일 (29.05.2020)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2019-0067129 2019년 6월 7일 (07.06.2019) KR

(71) 출원인: 가톨릭대학교 산학협력단 (THE CATHOLIC UNIVERSITY OF KOREA INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 06951 서울시 서초구 반포대로 222, 가톨릭대학교 성의교정 내 (반포동), Seoul (KR). 한국과학기술연구원 (KOREA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) [KR/KR]; 02792 서울시 성북구 화랑로14길 5 (하월곡동), Seoul (KR).

(72) 발명자: 남재환 (NAM, Jae Hwan); 10419 경기도 고양시 일산동구 강촌로 114, 509-703(백석동, 삼호풍림아파트), Gyeonggi-do (KR). 금교창 (KEUM, Gyo Chang); 02792 서울시 성북구 화랑로14길 5 (하월곡동), Seoul (KR). 박효정 (PARK, Hyo Jung); 08770 서울시 관악구 남부순환로 1430, 111-501(신림동, 신림푸르지오아파트), Seoul (KR). 방은경 (BANG, Eun Kyoung); 02792 서울시 성북구 화랑로14길 5 (하월곡동), Seoul (KR). 고헌리 (KO, Hae Li); 14784 경기도 부천시 양지로184번길 8-11, 302호(옥길동), Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: 네이트특허법인 (NEIT PATENT & LAW FIRM); 06251 서울시 강남구 역삼로 122, 4층(역삼동, 하나빌딩), Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA,

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION CONTAINING STABILIZED NUCLEIC ACID ADJUVANT

(54) 발명의 명칭: 안정화된 핵산 면역증강제를 함유하는 약학 조성물

(57) Abstract: Disclosed is a composition for stabilizing a nucleic acid molecule, which is an adjuvant, the composition containing a nucleic acid molecule, which is an adjuvant, a metal complex for stabilizing the nucleic acid molecule, and, selectively, a metal complex or a pharmaceutical composition containing an immunogen, which can be a peptide or a protein. The metal complex interacts with a nucleic acid molecule, which is an adjuvant, and/or an immunogen so as to stabilize the pharmaceutically active ingredients, and induces continual effectiveness of active ingredients without degradation.

(57) 요약서: 본 개시는 면역증강제(adjuvant)인 핵산 분자, 상기 핵산 분자를 안정화시키는 금속 착화합물 및 선택적으로 펩타이드 또는 단백질일 수 있는 면역원을 포함하는 약학 조성물 또는 금속 착화합물을 포함하는 면역증강제인 핵산 분자를 안정화시키는 조성물에 관한 것이다. 금속 착화합물은 면역증강제인 핵산 분자 및 또는 면역원과 상호작용하여 이들 약학적 유효성분을 안정화시키고, 이들 유효성분이 분해되지 않고 지속적으로 효능을 발휘할 수 있도록 유도한다.



WO 2020/246750 A2

명세서

발명의 명칭: 안정화된 핵산 면역증강제를 함유하는 약학 조성물 기술분야

- [1] 본 특허출원은 2019년 6월 7일에 출원한 대한민국 특허출원 제10-2019-0067129호의 우선권의 이익을 주장한다.
- [2] 본 특허출원은 대한민국정보 보건복지부(과제고유번호: H1 15C2955), 대한민국 과학기술정보통신부(과제고유번호: 2014R1A6A3A0405719) 및 대한민국 한국과학기술연구원(과제고유번호: Kist project 2E29221)의 지원을 받은 연구성과물에 관한 것이다.
- [3] 본 개시는 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 핵산 면역증강제의 안정성을 향상시킬 수 있는 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [4] 생명체 내에서 면역 체계(immune system)는 병원체와 종양 세포 등을 탐지하고, 이들을 제거함으로써, 질병으로부터 생명체를 보호하는 생물학적인 구조 및 과정을 의미한다. 면역 체계는 크게 내재 면역 체계(선천 면역 체계, 자연 면역 체계; innate immune system)과 적응 면역 체계(후천 면역 체계, 획득 면역 체계; adaptive immune system)으로 구분될 수 있다.
- [5] 내재 면역 체계는 비-특이적인 방법으로 숙주가 감염되지 않도록 방어하는 세포나 메커니즘으로서, 특정 병원체 등을 기억하지 않고 즉각적으로 반응하는 면역 체계다. 모든 종류의 동물과 식물은 내재 면역 체계를 가지고 있으며, 식물, 곰팡이, 곤충 등은 내재 면역 체계만을 가지고 있다. 반면, 적응 면역 체계는 항원이나 병원체에 특이적인 면역 체계로서, 특이적 면역 반응을 유도하기 위해서는 항원 제시 과정을 통한 비-자기 항원을 인식하여야 한다. 적응 면역 체계에서 특정 항원 또는 항원에 감염된 세포에 대한 특이적인 면역 반응이 가능하다. 또한, 적응 면역 체계를 구성하는 기억 세포 (memory cell)는 이미 수행된 면역 반응을 불러들일 수 있기 때문에, 동일한 병원체가 여러 번 체내에 침입하였을 때, 이들을 신속하게 제거할 수 있다.
- [6] 또한, 면역 체계는 체액성 면역과 세포성 면역으로 구분될 수 있다. 체액성 면역(항체성 면역; humoral immunity)에서 골수에서 유래한 B lymphocyte가 항원을 인식한 후 분화되어 면역글로불린(immunoglobulin, Ig)이라는 당-단백질로 이루어지는 항체를 분비하고, 분비된 항체에 의하여 감염된 병원균이 제거되는 면역 반응이 일어난다. 반면, 세포성 면역(cell mediated immunity, CMI)은 흉선에서 유래한 T lymphocyte가 항원을 인식하여 림포카인(lymphokine)을 분비하거나 직접 감염된 세포를 죽이는 면역 반응이다.
- [7] 병원균 등에 대한 면역 반응을 유도하기 위해 병원균의 전체 또는 일부를 접종하는 백신 항원이 다양한 질병의 예방이나 치료에 사용된다. 백신 항원에

의하여 야기될 수 있는 다양한 면역 반응이 유도되는 것이 바람직하다. 초기에 개발된 약독화 생 백신(attenuated live vaccine)이나 불활 사균 백신(inactivated killed vaccine)을 대신하여 최근에는 구조와 성분이 명확한 서브유닛 백신(subunit vaccine)이 주로 개발되고 있다. 서브유닛 백신은 기존 백신에 비하여 면역원성이 낮기 때문에 면역 반응을 증가시키기 위하여 면역증강제(adjuvant)를 사용한다.

- [8] 대부분의 병원성 세균이나 바이러스 감염에는 항체가 기본적인 방어 작용을 담당하므로 백신 항원에 의해 유도되는 항체만으로도 예방 효과가 충분한 경우가 많다. 그러나 지금까지 백신이 개발되지 못한 감염 질병은 예방이나 치료에 세포성 면역반응이 중요한 작용을 하는 경우가 많으므로 세포성 면역반응을 유도하는 면역증강제를 사용하면 개발 성공가능성을 높일 수 있다.
- [9] 현재 인간 백신에 사용되고 있는 면역증강제는 1) 수산화알루미늄/인산알루미늄/수산화인산황산 알루미늄과 같은 금속 염인 alum, 2) 스쿠알렌(squalene)을 기반으로 하는 oil in water emulsion 형태의 면역증강제인 MF59 등이 사용되고 있다. 하지만, 이들 면역증강제는 체액성 면역 반응 활성화는 우수한 반면, 세포성 면역 유도 활성화는 매우 낮다. 따라서, 이들 면역증강제는 항체만으로 감염 방어가 가능한 경우에만 활용될 수 있을 뿐이고, 세포성 면역 반응이 요구되는 백신에 사용하기는 적합하지 못하다는 한계가 있다.
- [10] 한편, 대표적인 병원체인 미생물의 세포벽에는 지질다당류(lipopolysaccharides; LPS), 베타-1,3-글루칸(β -1,3-glucan) 및 펩티도글리칸(peptidoglycans)과 같은 당-단백질로 이루어진 병원성 관련 분자 유형(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)을 가지고 있다. 이러한 병원성 관련 분자 유형(PAMPs)은 숙주의 면역 체계를 구성하는 특정 단백질, 예를 들어 유형인식수용체(PRRs, pattern recognition receptors) 또는 유형인식단백질(PRP, pattern recognition proteins)에 의해 인식된다. 각각의 PRPs는 병원체 표면에 존재하는 적절한 PAMPs를 인식하여 복합체를 형성하여, 식균작용(phagocytosis), 노듈 형성(nodule formation), 피포화(encapsulation), 단백질분해효소 캐스케이드(proteinase cascade) 활성화, 및 항균 펩타이드의 합성 등과 같은 일련의 면역 반응을 유발시킨다.
- [11] Toll-유사 수용체(Toll-like receptors, TLRs)은 대표적인 PRR로서 TLR 작용제(agonist)는 면역 세포에 대한 활성이 강하기 때문에 백신 면역증강제로 개발되고 있다. 예를 들어, 내독소(endotoxin)인 LPS는 면역 세포의 TLR4에 작용하여 강력한 면역 활성을 보이고 있다.
- [12] 인간과 같은 고등 생명체의 게놈 DNA와 달리, 세균의 DNA는 CpG 모티프(motif)의 사이토신이 메틸화(methylation)되어 있지 않다. 따라서 고등 생명체의 면역 세포는 CpG 모티프의 사이토신이 메틸화되지 않은 세균의 DNA를 비-자기 항원으로 인식할 수 있는데, 이를 인식하는 수용체가 TLR9이다. TLR9 작용제는 다양한 면역 반응을 증강시킬 수 있는데, TLR9 작용제로서 CpG

모티프를 포함하는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide)가 면역증강제로 개발되고 있다. 하지만, TLR 작용제로 사용되는 LPS와 CpG 모티프는 독성이 매우 강하고 생체 내에서 염증 반응을 야기하는 등의 부작용이 있어서 안전성이라는 측면에서 문제가 있다.

- [13] 외부에서 숙주에게 감염되는 바이러스가 가진 RNA를 숙주의 TLR 7/8이 인식하여 인터페론 알파/베타를 포함한 다양한 염증성 사이토카인을 유도하게 되며 이러한 반응이 항바이러스 신호전달 기전(mechanism)뿐만 아니라 숙주의 면역을 활성화 시켜, 백신 면역증강제로 활용 가능하다. 그러나 RNA는 인체에서 RNase에 의해 너무 빠르게 분해되기 때문에 면역증강제로 기능을 하기 위해서는 인체 내에서 일정 기간 유지되어야 할 필요가 있으며, RNA의 인체 내 분해를 막아주는 핵산 안정제가 필요하다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

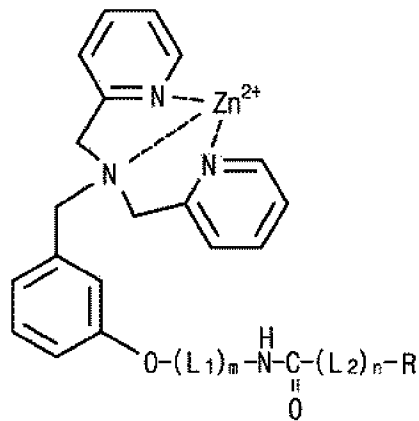
- [14] 본 개시의 목적은 약학적 유효성분을 안정화시켜 약학적 유효성분의 활성을 향상시킬 수 있는 조성물을 제공하고자 하는 것이다.

과제 해결 수단

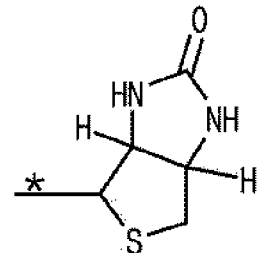
- [15] 일 측면에 따르면, 본 개시는 면역증강제인 핵산 분자; 및 상기 핵산 분자를 안정화시키며, 하기 화학식 1의 구조를 가지는 금속 착화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 약학 조성물을 제공한다.

- [16] [화학식 1]

[17]

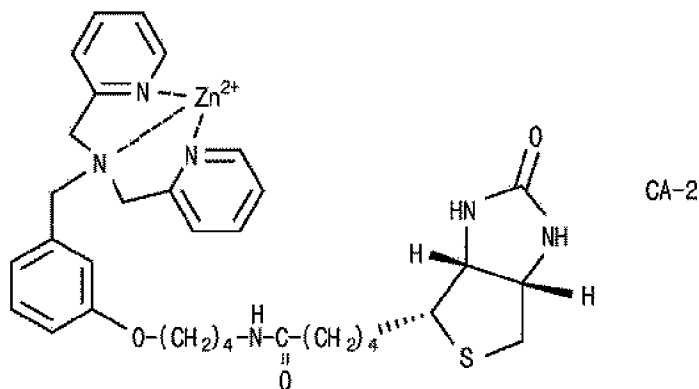
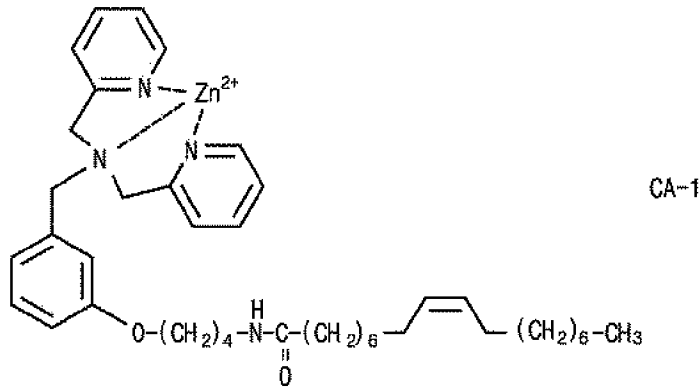


- [18] 화학식 1에서 L_1 및 L_2 는 각각 독립적으로 $C_1 \sim C_{20}$ 지방족 연결기임; m 및 n 은 각각 독립적으로 0 또는 1의 정수임; R 은 $C_1 \sim C_{20}$ 알킬기 또는



이며, 별표는 연결 부위를 나타냄.

- [19] 상기 조성물은 펩타이드 및 단백질 중에서 적어도 하나인 면역원을 더욱 포함할 수 있고, 상기 면역원은 바이러스성 항원 및 병원균 항원 중에서 적어도 하나인 항원을 포함할 수 있다.
- [20] 예를 들어, 상기 핵산 분자는 발현 조절 서열인 적어도 하나의 내부리보솜결합부위(Internal ribosome entry site; IRES) 요소를 포함할 수 있다.
- [21] 상기 내부리보솜결합부위 요소는 바이러스성 내부리보솜결합부위 요소를 포함할 수 있다.
- [22] 예를 들어, 상기 바이러스성 내부리보솜결합부위 요소는 피코나바이러스과(Picornaviridae) 바이러스, 토가바이러스과(Togaviridae) 바이러스, 디시스트로바이러스과(Dicistroviridae) 바이러스, 플라비바이러스과(Flaviridae) 바이러스, 레트로바이러스과(Retroviridae) 바이러스, 헤르페스바이러스과(Herpesviridae) 바이러스 및 이들의 조합으로 구성되는 군에서 선택되는 바이러스에서 유래한 바이러스성 내부리보솜결합부위 요소를 포함할 수 있다.
- [23] 보다 구체적으로, 상기 바이러스성 내부리보솜결합부위 요소는 콕사키바이러스, 귀뚜라미바이러스, 뇌심근염바이러스 및 이들의 조합으로 구성되는 군에서 선택되는 바이러스에서 유래하는 바이러스성 내부리보솜결합부위 요소를 포함할 수 있다.
- [24] 선택적으로, 상기 핵산 분자는 상기 적어도 하나의 내부리보솜결합부위 요소와 작동 가능하게 연결되는 코딩 영역을 더욱 포함할 수 있다.
- [25] 예를 들어, 상기 약학 조성물은 펩타이드 및 단백질 중에서 적어도 하나인 면역원을 더욱 포함하고, 상기 코딩 영역은 상기 면역원을 암호화하는 핵산 서열을 포함할 수 있다.
- [26] 다른 예시적인 측면에서, 상기 핵산 분자는 상기 적어도 하나의 내부리보솜결합부위 요소의 상류(upstream)에 삽입되는 다수의 아데노신 또는 티미딘을 포함할 수 있다.
- [27] 예를 들어, 상기 다수의 아데노신 또는 티미딘은 20개 내지 400개의 아데노신 또는 티미딘을 포함할 수 있다.
- [28] 상기 금속 착화합물은 하기 화학식 2의 구조를 가지는 어느 하나의 금속 착화합물을 포함할 수 있다.
- [29] [화학식 2]
- [30]



- [31] 다른 측면에서, 본 개시는 전술한 화학식 1의 구조를 가지는 금속 착화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 면역증강제인 핵산 분자 안정용 조성물을 제공한다.
- [32] 또 다른 측면에서, 본 개시는 전술한 화학식 1의 구조를 가지는 금속 착화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 이용하여 면역 증강제인 핵산 분자를 안정화시키는 방법 또는 전술한 화학식 1의 구조를 가지는 금속 착화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 면역 증강제인 핵산 분자를 안정화시키기 위한 용도를 제공한다.

발명의 효과

- [33] 본 개시는 면역증강제인 핵산 분자를 안정화시킬 수 있도록 소정 구조를 가지는 금속 착화합물을 도입한 약학 조성물 또는 핵산 분자 안정용 조성물을 제안한다. 금속 착화합물을 도입하여 면역증강제인 핵산 분자를 안정화시켜 면역증강제의 활성을 향상시킬 수 있다. 본 개시에 따른 조성물을 사용하여 전염병을 비롯한 다양한 질병을 예방 또는 치료하기 위한 백신이나 치료제로 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [34] 도 1은 본 개시의 예시적인 측면에 따라 면역증강제로 사용될 수 있는 핵산 분자로서, 단일 발현 카세트를 가지는 핵산 분자의 구성을 개략적으로 나타낸 모식도이다.
- [35] 도 2는 본 개시의 측면에 따라 면역증강제로 사용될 수 있는 핵산 분자로서,

- 다수 발현 카세트를 가지는 핵산 분자의 구성을 개략적으로 나타낸 모식도이다.
- [36] 도 3 및 도 4는 각각 본 개시의 예시적인 실시예에 따라 합성된 핵산 분자를 마우스에서 면역한 뒤, 마우스의 혈청에서 특정 면역글로불린의 양을 ELISA를 이용하여 분석한 결과를 보여주는 그래프이다.
- [37] 도 5는 본 개시의 예시적인 실시예에 따라 합성된 핵산 분자를 마우스에 면역한 뒤, 마우스의 비장세포에서 Th₁ 세포의 분화를 촉진하는 사이토카인인 IL-4를 생산하는 세포의 개수를 ELISPOT을 이용하여 분석한 결과를 보여주는 그래프이다.
- [38] 도 6 및 도 7은 각각 본 개시의 예시적인 실시예에 따라 합성된 핵산 분자를 마우스에 면역하고, 면역된 마우스의 비장세포에서 Th₁ 세포의 분화를 촉진하는 사이토카인인 IL-6와 IFN- γ 의 양을 ELISA를 이용하여 분석하여 결과를 보여주는 그래프이다.
- [39] 도 8 및 도 9는 각각 본 개시의 예시적인 실시예에 따라 합성된 면역증강제인 핵산 분자와 금속 착화합물을 포함하는 조성물을 마우스에 면역한 뒤, 마우스의 혈청에서 특정 면역글로불린의 양을 EILSA를 이용하여 분석한 결과를 보여주는 그래프이다.
- [40] 도 10과 도 11은 각각 본 개시의 예시적인 실시예에 따라 합성된 면역증강제인 핵산 분자와 금속 착화합물을 포함하는 조성물의 제타 전위를 측정한 결과를 보여주는 그래프와, 원자력현미경(AFM) 이미지이다.
- [41] 도 12는 발명의 예시적인 실시예에 따라 합성된 면역증강제인 핵산 분자와 금속 착화합물을 포함하는 조성물을 마우스에 면역한 뒤, 마우스의 혈청에서 특정 면역글로불린의 양을 ELISA를 이용하여 분석한 결과를 보여주는 그래프이다.
- [42] 도 13은 본 개시의 예시적인 실시예에 따라 합성된 면역증강제인 핵산 분자와 금속 착화합물을 포함하는 약학 조성물을 마우스에 면역한 뒤, 중화항체가를 측정한 결과를 보여주는 그래프이다.
- [43] 도 14는 본 개시의 예시적인 실시예에 따라 면역한 마우스에 바이러스로 challenge하여 생존율을 평가한 결과를 보여주는 그래프이다.
- [44] 도 15 및 도 16은 각각 본 개시의 예시적인 실시예에 따라 합성된 면역증강제인 핵산 분자와 금속 착화합물을 포함하는 조성물을 원숭이에 면역한 뒤, 마우스의 혈청에서 특정 면역글로불린의 양을 EILSA를 이용하여 분석한 결과를 보여주는 그래프와, 특정 면역글로불린을 분비하는 비장세포의 개수를 ELISPOT을 이용하여 분석한 결과를 보여주는 그래프이다.
- [45] 도 17은 본 개시의 예시적인 실시예에 따라 제조된 조성물을 원숭이에 면역하고, 면역 경과 일수에 따른 중화항체가를 분석한 결과를 보여주는 그래프이다.
- [46] 도 18 및 도 19는 각각 본 개시의 예시적인 실시예에 따라 합성된 면역증강제인 핵산 분자와 금속 착화합물을 포함하는 조성물을 마우스에 면역한 뒤, 특정

면역글로불린의 양을 ELISA를 이용하여 분석한 결과를 보여주는 그래프와, Th₁ 세포의 분화를 촉진하는 사이토카인을 분비하는 비장세포의 개수를 ELISPOT을 이용하여 분석한 결과를 보여주는 그래프이다.

[47] 도 20은 본 개시의 예시적인 실시예에 따라 제조된 조성물을 마우스에 면역한 뒤, FAMA(fluorescent antibody to membrane antigen) 기법을 사용하여 중화항체를 분석한 결과를 보여주는 그래프이다.

[48] 도 21 및 도 22는 각각 본 개시의 예시적인 실시예에 따라 합성된 면역증강제인 핵산 분자와 금속 착화합물을 포함하는 조성물을 마우스에 면역한 뒤, 마우스의 혈청에서 특정 면역글로불린의 양을 EILSA를 이용하여 분석한 결과를 보여주는 그래프이다.

[49] 도 23은 본 개시의 예시적인 실시예에 따라 제조된 조성물을 마우스에 면역한 뒤, 면역된 마우스의 기관지폐포세척액(BALF)에서 IgA의 양을 ELISA를 이용하여 분석한 결과를 보여주는 그래프이다.

[50] 도 24 및 도 25는 각각 본 개시의 예시적인 실시예에 따라 제조된 조성물을 마우스에 면역한 뒤, 면역 경과일수에 따른 haemagglutination inhibition (HI) 역가(titer)를 분석한 결과를 보여주는 그래프이다.

[51] 도 26은 본 개시의 예시적인 실시예에 따라 제조된 조성물을 마우스에 면역한 뒤, 마우스의 비장 세포에서 IFN- γ 및 IL-4를 분비하는 세포의 개수를 ELISPOT을 이용하여 분석한 결과를 보여주는 그래프이다.

[52] 도 27은 본 개시의 예시적인 실시예에 따라 제조된 조성물에 핵산 안정제를 넣어 마우스에 면역한 후 RNA 양을 실시간 PCR을 통해 측정하여 그 결과를 보여주는 그래프이다.

[53] 도 28은 본 개시의 예시적인 실시예에 따라 제조된 조성물에 핵산 안정제를 각각 다른 농도로 넣어 복합물을 이루는 것과 RNase에 의해 분해되는 것을 막아내는 것을 겔 전기영동을 수행하여 확인한 것이다.

발명의 실시를 위한 형태

[54] 필요한 경우에 첨부하는 도면을 참조하면서 본 개시를 상세하게 설명한다.

[55] 용어의 정의

[56] 본 명세서에서 “폴리뉴클레오티드” 또는 “핵산 분자”는 교환 가능하게 사용되며, 임의 길이의 뉴클레오티드의 중합체를 지칭하고 DNA(예컨대 cDNA) 및 RNA 분자를 포괄적으로 포함한다. 핵산 분자의 구성 단위인 “뉴클레오티드”는 데옥시리보뉴클레오티드, 리보뉴클레오티드, 변형된 뉴클레오티드 또는 염기, 및/또는 그 유사체, 또는 DNA 또는 RNA 중합 효소(polymerase)에 의해, 또는 합성 반응에 의해 중합체 내로 혼입(incorporated)될 수 있는 임의의 기질일 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 변형된 뉴클레오티드, 당 또는 염기가 변형된 유사체(analogue), 예컨대 메틸화 뉴클레오티드 및 그 유사체를 포함할 수 있다(Scheit, Nucleotide Analogs, John

- Wiley, New York(1980); Uhlman 및 Peyman, Chemical Reviews, 90:543-584(1990)).
- [57] 뉴클레오티드에서의 변이는 단백질에서 변이를 가져오지 않는 것도 있다. 이러한 핵산은 기능적으로 균등한 코돈(codon) 또는 동일한 아미노산을 암호화하는(encoding) 코돈 (예를 들어, 코돈의 축퇴성(degeneracy)에 의해, 아르기닌(arginine) 또는 세린(serine)에 대한 코돈은 여섯 개이다), 또는 생물학적으로 균등한 아미노산을 암호화하는 코돈을 포함하는 핵산 분자를 포함한다. 또한, 뉴클레오티드에서의 변이가 단백질 자체에 변화를 가져올 수도 있다. 단백질의 아미노산에 변화를 가져오는 변이인 경우에도 원래 의도하였던 단백질과 거의 동일한 활성을 나타내는 것이 얻어질 수 있다.
- [58] 본 개시의 핵산 또는 폴리뉴클레오티드가 가지는 특징, 예를 들어 RNA 백신 및/또는 면역증강제로서의 효과를 갖는 범위에서, 본 개시의 펩타이드 및 핵산 분자는 서열목록에 기재된 아미노산 서열 또는 염기 서열에 한정되지 않는다는 것은 통상의 기술자에게 명확하다. 예를 들어, 본 개시의 제조합 단백질에 포함될 수 있는 생물학적 기능 균등물은 본 개시의 제조합 단백질과 균등한 생물학적 활성을 발휘하는 아미노산 서열의 변이를 가지는 펩타이드일 수 있다.
- [59] 본 명세서에서 사용된 용어 “벡터”는 숙주세포에 전달이 가능하며 바람직하게는 하나 이상의 목적 유전자 또는 서열의 발현이 가능하도록 만들어진 구조물을 의미한다. 예를 들면 벡터에는 바이러스 벡터(viral vectors), DNA 또는 RNA 발현 벡터(expression vectors), 플라스미드(plasmid), 코스미드(cosmid) 또는 파지 벡터(phage vectors), CCA(cationic condensing agents)와 연결된 DNA 또는 RNA 발현 벡터, 리포솜(liposomes)으로 포장된 DNA 또는 RNA 발현 벡터, 프로듀서 세포(producer cells)와 같은 특정 진핵세포(eukaryotic cells) 등이 포함된다.
- [60] 본 명세서에서 “발현 조절 요소(expression control/regulation element)”는 핵산의 전사(transcription) 및/또는 전사체 형태의 핵산으로부터 번역(translation)을 조절하는 핵산 서열을 의미할 수 있다. 선택적으로 해당 용어는 전사된 핵산 분자의 번역 과정을 제어하는 핵산 서열을 가리키는데 사용될 수 있다. 이 경우, 해당 용어는 “번역 조절 요소(transcription control/regulation element)”와 상호교환적으로 사용될 수 있다. “전사 조절 요소(transcription control/regulation element)”는 핵산의 전사를 조절하는 핵산 서열을 의미한다. 전사 조절 서열은 구조 프로모터(constitutive promoter) 또는 유도 프로모터(inducible promoter)와 같은 프로모터 또는 인핸서(enhancer) 등이 있다. 또한, 전사체 형태의 핵산으로부터 단백질 또는 펩타이드로의 번역을 조절하는 핵산 서열에 대해서 “번역 조절 요소(translation control/regulation element)”라는 용어가 사용될 수 있다. 이들 발현 조절 서열/요소, 전사 조절 서열/요소 및/또는 번역 조절 서열/요소는 발현될 서열, 예를 들어 전사 또는 번역될 핵산 서열에 작동적으로 연결(operatively linked)되어 있다.
- [61] 본 명세서에서 용어 “작동 가능하게 연결된(operatively linked)”은 핵산 발현

조절서열(예: 프로모터, 시그널 서열, 리보솜 결합부위, 전사 종결서열 등)과 다른 핵산 서열 사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절 서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 해독을 조절하게 된다.

[62] 본 명세서에서 용어, "약학적 유효량" 또는 "치료적 유효량"은 활성 성분, 펩타이드 또는 이들의 단편, 및/또는 해당 펩타이드 또는 단편을 암호화하는 핵산 분자의 효율 또는 활성을 충분히 달성할 수 있는 양을 의미한다.

[63] 본 개시의 약학 조성물은 면역증강제(adjuvant)인 핵산 분자와, 상기 핵산 분자를 안정화시키는 금속 착화합물과, 선택적으로 면역원을 포함한다. 면역증강제로 사용되는 핵산 분자는 특별히 한정되지는 않는다. 일례로, 핵산 분자는 적어도 하나의 관심 유전자(Gene of Interest, GOI), 즉 표적 서열(target sequence)을 발현시킬 수 있도록, 내부리보솜결합부위(Internal Ribosomal Entry Site; IRES) 요소를 가지는 적어도 하나의 발현 조절 서열을 포함한다.

[64] 도 1은 본 개시의 예시적인 측면에 따라 1개의 발현 카세트 또는 발현 유닛을 포함하는 폴리뉴클레오티드 또는 핵산 분자의 구성을 개략적으로 나타낸 모식도이다. 도 1에 나타낸 바와 같이, 본 개시의 예시적인 측면에 따른 핵산 분자는 내부리보솜결합부위(Internal ribosome entry site; IRES), 예를 들어, 바이러스성 IRES 활성을 가지는 염기 서열을 포함하는 발현 조절 요소(expression control element; ECE)를 포함한다. 하나의 예시적인 측면에서, 발현 조절 요소(ECE)는 IRES 활성을 가지는 바이러스성 5'-비번역영역(5'Untranslated Region, 5'-UTR)을 포함할 수 있다.

[65] 핵산 분자는 또한 펩타이드 또는 단백질을 암호화하는 관심유전자(GOI)의 열린해독틀(open reading frame; ORF), 또는 표적 서열(TS)를 포함하는 코딩 영역(coding region, CR)을 포함할 수 있다. 코딩 영역(CR)은 발현 조절 요소(ECE), 예를 들어 IRES 활성을 가지는 5'-UTR의 하류, 즉, 3'쪽에 위치할 수 있다. 일례로, 코딩 영역(CR)은 펩타이드 또는 단백질을 암호화하는 표적 서열(target sequence, TS)을 포함한다. 상기 표적 서열은 면역원, 리포터, 약품 등과 관련한 펩타이드 또는 단백질을 암호화하는 염기 서열을 포함할 수 있다.

[66] 핵산 분자는 DNA 또는 RNA일 수 있다. 하나의 예시적인 측면에서, 본 개시에 따른 핵산 분자는 RNA 플랫폼 형태를 가질 수 있다. 핵산 분자가 RNA 형태인 경우, 코딩 영역(CR)은 관심유전자의 전사체 서열로 이루어질 수도 있다.

[67] 발현 조절 요소(ECE)는 관심유전자의 열린해독틀 형태로 삽입될 수 있는 코딩 영역(CR)과 작동 가능하게 연결되는 IRES 염기 서열을 포함한다. 전술한 바와 같이, 발현 조절 요소(ECS)는 IRES 활성을 가지는 염기 서열을 포함하는 5'UTR(5' Untranslated Region)의 구조를 가질 수 있다. 5'UTR은 코딩 영역(CR)으로부터 발현되는 펩타이드 및/또는 단백질의 번역 과정에서 번역개시복합체(translational initiation complex)가 결합하는 영역이며, IRES는 2차 및 3차 구조를 복잡하게 형성하여 코딩 영역(CR)의 번역을 유도하는 cis-acting 염기 서열이다. 예시적인 실시형태에서, 발현 조절 요소(ECE)은

바이러스성 IRES 요소를 포함할 수 있다.

- [68] 일례로, 발현 조절 요소(ECE)는 바이러스성 IRES 요소를 가지는 5' UTR을 가질 수 있다. 바이러스성 IRES 요소는 피코나바이러스과(Picornaviridae), 토가바이러스과(Togaviridae), 디시스트로바이러스과(Dicistroviridae), 플라비바이러스과(Flaviridae), 레트로바이러스과(Retroviridae) 및/또는 헤르페스바이러스과(Herpesviridae)의 바이러스에서 유래할 수 있다.
- [69] IRES 요소는 독특한 2차 또는 3차 구조를 가지며, RNA의 접힘 구조와, 진핵성 개시 인자(eukaryotic initiation factors; eIFs) 또는 특정 자극 IRES trans-acting 인자의 관여와 같은 번역 작동 방식에 근거하여 4개의 class로 구분될 수 있다. Class I IRES는 eIF4를 제외한 대부분의 전사 개시 인자들을 필요로 하며, 원래의(canonical) 스캐닝 모델에서와 같이 40S 리보솜 복합체(complex)에 편입(recruit)하며, CVB3와 같은 피코나바이러스과 바이러스에서 발견된다. Class II IRES는 RNA 서열의 5' 말단에서 어떠한 스캐닝도 없이 개시 코돈에서 직접 번역을 개시하며, Class I IRES에서와 같이 대부분의 eIF를 필요로 하고, EMCV와 같은 일부 피코나바이러스과 바이러스에서 발견된다. Class III IRES는 스캐닝 없이 pseudoknot과 같은 RNA 접힘(fold) 구조를 인식하여 개시 코돈에서 직접 번역을 개시하지만, Class I이나 II IRES와 비교해서 적은 eIF를 필요로 하고, JEV와 같은 플라비바이러스과 바이러스에서 발견된다. Class IV IRES는 어떠한 eIF도 필요로 하지 않는 간단한 개시 모드를 가지고 있다. 번역 중간체(translation intermediate)를 안정화시키기 위하여 단지 eIF2만 관련되며, 일부 복잡한 RNA 접힘 구조를 가지고 있다. RNA 서열 중 5' UTR에 보통 위치하는 다른 IRES와 달리, Class IV IRES는 CrPV와 같은 디시스트로바이러스과의 intergenic region (IGR)에서 발견된다.
- [70] 예를 들어, 피코나바이러스과에 속하는 바이러스성 IRES 요소는 엔테로바이러스속(Enterovirus) 바이러스, 카디오바이러스속(Cardiovirus) 바이러스, 아프토바이러스속(Aphthovirus)에 바이러스, 헤파토바이러스속(Hepatovirus) 바이러스 및/또는 테스코바이러스속(Teschovirus) 바이러스에 유래할 수 있다. 일례로, 엔테로바이러스속 바이러스성 IRES 요소는 엔테로바이러스 A 내지 엔테로바이러스 J 유형과, 리노바이러스(Rhinovirus) A 내지 리노바이러스 C형으로 분류되는 바이러스에서 유래할 수 있다.
- [71] 다른 예시적인 측면에서, 피코나바이러스과에 속하는 바이러스성 IRES 요소는 1) 폴리오바이러스(Poliiovirus, PV), 리노바이러스(Rhinovirus, RV), 콕사키바이러스(Coxsachievirus), 예를 들면, 콕사키바이러스B3(Coxsachie virus B3, CVB3) 및/또는 엔테로바이러스71(Enterovirus71, EV71)와 같은 엔테로바이러스속 바이러스, 2) 뇌심근염바이러스(Encephalomyocarditis virus, EMCV) 및/또는 마우스뇌척수염바이러스(Theiler murine encephalomyelitis virus, TMEV)와 같은 카디오바이러스속(Cardiovirus) 바이러스, 3) 구제역 질병

바이러스(Foot-and-mouth disease virus, FMDV)와 같은 아프토바이러스속 바이러스, 4) A형 간염바이러스(Hepatitis A Virus, HAV)와 같은 헤파토바이러스속 바이러스 및/또는 5) 돼지테스코바이러스(Porcine teschovirus, PTV, 예를 들어 PTV-1)와 같은 테스코바이러스속 바이러스에서 유래한 IRES 활성을 가지는 염기 서열을 가질 수 있지만, 이에 한정되지 않는다.

- [72] 다른 선택적인 측면에서, 토가바이러스과에 속하는 바이러스성 IRES 요소는 알파바이러스속(Alphavirus) 바이러스, 예를 들어, 신드비스 바이러스(Sindbis virus, SV)에서 유래할 수 있다. 또한, 디시스트로바이러스과에 속하는 바이러스성 IRES 요소는, 예를 들어, 크리파바이러스속(Cripavirus) 바이러스, 예를 들어, 갈색날개노린재장내바이러스(Plautia stali intestine virus, PSIV), 귀뚜라미 마비바이러스(Cricket paralysis virus, CrPV), 트리아토마바이러스(Triatoma virus), 및/또는 기장테두리진딧물바이러스(Rhopalosiphum padi virus, RXPV)에서 유래할 수 있다.
- [73] 다른 예시적인 측면에서, 플라비바이러스과에 속하는 바이러스성 IRES 요소는 1) 헤파시바이러스속(Hepacivirus) 바이러스, 예를 들어, C형 간염바이러스(Hepatitis C virus, HCV), 2) 플라비바이러스속(Flavivirus) 바이러스, 예를 들어, 일본뇌염바이러스(Japanese Encephalitis Virus, JEV), 3) 페스티바이러스속(Pestivirus) 바이러스, 예를 들어, 돼지열병바이러스(Classical swine fever virus, CSFV) 및/또는 소바이러스성설사병바이러스(Bovine viral diarrhea virus, BVDV)에서 유래한 IRES 활성을 가지는 염기 서열을 포함할 수 있다.
- [74] 다른 예시적인 측면에서, 레트로바이러스과에 속하는 바이러스성 IRES 요소는 1) 감마레트로바이러스속(Gammaretrovirus)에 바이러스, 예를 들어, 프렌드 마우스레트로바이러스(Friend murine leukemia virus, FMLV), 몰로니마우스레트로
- [75] 바이러스(Moloney murine leukemia virus, MMLV) 및/또는 2) 알파레트로바이러스속
- [76] (Alpharetrovirus) 바이러스, 예를 들어, 라우스육종바이러스(Rous sarcoma virus, RSV)에서 유래한 IRES 활성을 가지는 염기 서열을 포함할 수 있다. 또한, 헤르페스바이러스과에 속하는 바이러스성 IRES 염기 서열은 마디바이러스속(Mardivirus)에 속하는 마렉병바이러스(Marek's disease virus, MDV)에서 유래할 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [77] 일레로, 발현 조절 요소(ECE)를 구성하는 바이러스성 IRES 염기 서열은 피코나바이러스과(Picornaviridae) 및/또는 디시스트로바이러스과(Dicistroviridae)에 속하는 바이러스에서 유래한 것일 수 있다. 이때, 피코나바이러스과 바이러스에서 유래한 IRES 요소는 엔테로바이러스속 바이러스, 카디오바이러스속 바이러스 및/또는

아프토타이러속속 바이러스에서 유래한 IRES 활성을 가지는 염기 서열일 수 있다. 특히 바람직하게는 엔테로바이러스속 바이러스에서 유래한 IRES 활성을 가지는 염기 서열일 수 있다.

- [78] 한편, 엔테로바이러스속 바이러스에서 유래한 IRES 요소는 CVB3와 같은 콕사키바이러스 등의 엔테로바이러스속 바이러스 및/또는 EMCV와 같은 카디오바이러스속 바이러스에서 유래한 IRES 활성을 가지는 염기 서열일 수 있다. 또한, 디시스트로바이러스과 바이러스에서 유래한 IRES 염기 서열은 크리파바이러스속 바이러스인 PSIV 및/또는 CrPV, 바람직하게는 CrPV에서 유래한 IRES 활성을 가지는 염기 서열일 수 있다.
- [79] 하나의 예시적인 측면에서, 발현 조절 요소(ECE)는 CVB3, EMCV, CrPV 및 이들의 조합으로 구성되는 군에서 선택되는 바이러스 유래의 IRES 염기 서열을 가질 수 있지만, 이에 한정되지 않는다.
- [80] 한편, 본 개시에 따른 핵산 분자는 열린해독틀(ORF) 형태로 연결될 수 있는 코딩 영역(CR)의 발현 효율을 증가시킬 수 있는 핵산 서열이 더욱 삽입될 수 있다. 일례로, 발현 조절 요소(ECE)에 인접하여, 바람직하게는 상류에, 다수의 아데노신 "MA"이나 티미딘 "MT"이 삽입될 수 있다. 하나의 예시적인 측면에서, IRES 염기 서열을 가지는 발현 조절 요소(ECE)에 인접하여 20 내지 400개, 바람직하게는 30 내지 300개, 더욱 바람직하게는 30 내지 200개, 가장 바람직하게는 30 내지 100개의 연속적인 아데노신 또는 티미딘이 삽입될 수 있다.
- [81] 하나의 예시적인 측면에서, 발현 조절 요소(ECE)로서 바이러스성 IRES를 포함하는 핵산 분자가 번역증강제로 기능할 수 있다. 이 경우, 발현 조절 요소(ECE)의 상류 및/또는 하류 중 적어도 어느 한 곳에 MCS(multi-cloning site)를 포함할 수 있다.
- [82] 선택적인 측면에서, 핵산 분자가 코딩 영역(CR)은 단백질 또는 펩타이드로 발현될 수 있는 관심유전자(GOI)의 열린해독틀(ORF) 형태의 염기 서열로 이루어질 수 있다. 코딩 영역(CR)은 발현 조절 요소(ECE)와 작동 가능하게 연결될 수 있다. 예를 들어, 코딩 영역(CR)은 발현 조절 요소(ECE)의 3'쪽에 위치할 수 있지만, 코딩 영역(CR)의 위치가 이에 한정되는 것은 아니다.
- [83] 하나의 예시적인 측면에서, 코딩 영역(CR)은 항원, 항체, 치료제, 이들의 단편, 이들의 변이체 및/또는 이들의 유도체를 암호화하는 열린해독틀(ORF)로 이루어질 수 있다. 예를 들어, 코딩 영역(CR)이 면역원성 펩타이드 또는 단백질을 암호화하는 경우, 코딩 영역(CR)은 항원 또는 이들의 에피토프(epitope)와 같은 단편을 암호화하는 열린해독틀(ORF)인 염기 서열을 가질 수 있다. 예를 들어, 코딩 영역(CR)은 본 개시에 따른 조성물에 포함될 수 있는 면역원을 암호화하는 염기 서열로 이루어질 수도 있다.
- [84] 하나의 예시적인 측면에서, 코딩 영역(CR)은 항원, 이의 단편, 변이체 또는 유도체를 암호화하는 열린해독틀로 이루어질 수 있다. 예를 들어, 코딩

영역(CR)으로부터 발현될 수 있는 항원은 종양(tumor) 항원, 동물 항원, 초목 항원, 바이러스 항원, 박테리아 항원, 곰팡이 항원 및 원생동물 항원, 자가면역 항원 또는 알레르기 항원을 고려할 수 있다. 종양(tumor) 세포의 표면 항원 및 표면 항원, 특히, 바이러스 병원균, 박테리아 병원균, 곰팡이 병원균 또는 원생동물 병원균의, 분비된 형태가 바람직하다.

- [85] 코딩 영역(CR)으로부터 발현될 수 있는 병원성 항원은 개체, 예를 들어 포유류 개체, 특히 인간에 의해 면역 반응을 유도하는 병원성 유기체로부터 유래될 수 있다. 일례로, 병원성 항원은 박테리아성, 바이러스성 또는 원생동물학적(다세포성) 병원성 유기체들로부터 유래될 수 있다. 하나의 예시적인 측면에서, 병원성 항원은 바이러스, 박테리아 또는 원생동물과 같은 유기체의 표면에 위치한 표면 항원(surface antigens), 예를 들어 단백질(또는 단백질의 단편, 예를 들어 표면 하위의 외부 일부분)일 수 있다.
- [86] 하나의 예시적인 측면에서, 코딩 영역(CR)에 의해 암호화될 수 있는 병원성 항원들은 감염성 질병(infectious disease)와 관련된 병원균으로부터 유래되는 단백질 또는 펩타이드 항원이다.
- [87] 예를 들어, 병원균에서 유래한 항원과 관련해서, 본 개시의 핵산 분자의 코딩 영역(CR)으로부터 발현되는 항원은 인플루엔자 바이러스, 호흡기 세포 융합 바이러스(RSV), 헤르페스 심플렉스바이러스(HSV), 인유두종 바이러스(HPV), 인간 면역결핍 바이러스(HIV), 플라즈모디움, 스타필로코쿠스 아우레우스, 땀기열 바이러스, 클라미디아 트라코마티스, 거대세포바이러스(CMV), B형 간염 바이러스(HBV), 미코박테리움 튜버큘로시스, 광견병 바이러스, 황열병 바이러스, 중동호흡기증후군 코로나바이러스(MERS-CoV) 및/또는 지카바이러스(Zika virus)로부터 선택된 병원균으로부터 유래한 항원들이다.
- [88] 즉, 하나의 예시적인 측면에서, 코딩 영역(CR)에서 발현될 수 있는 펩타이드 또는 단백질은, 항원 및 항체를 포함하는 면역원과 같이 생체 내에서 면역 반응을 유도할 수 있는 펩타이드 또는 단백질이다. 다시 말하면, 코딩 영역(CR)은 항원이나 항체 등과 같이 면역원성 펩타이드 또는 단백질을 암호화하는 열린해독틀(ORF)로 이루어질 수 있다. 이에 따라, 본 개시에 따른 핵산 분자는 유전자 백신 등으로 기능할 수 있다. 한편, 코딩 영역(CR)에 삽입될 수 있는 염기 서열은 본 개시의 핵산 분자를 발현하기 위해 사용되는 벡터 및/또는 숙주세포의 종류 등에 따라 최적화된(optimized) 염기 서열을 가지도록 설계, 변경될 수 있다.
- [89] 하나의 예시적인 측면에 따르면, 본 개시에 따른 핵산 분자는 RNA 형태를 가질 수 있다. 이때, 코딩 영역(CR)이 전술한 병원성 항원과 같이 생체 내에서 면역 반응을 유발할 수 있는 단백질 및/또는 펩타이드를 암호화하는 열린해독틀(ORF)로 이루어지는 경우, 본 개시에 따른 핵산 분자는 RNA 백신 또는 RNA 면역증강제로 활용되어 생체 내에 직접 주입될 수 있다.
- [90] 다른 예시적인 측면에서, 코딩 영역(CR)은 질병 치료와 관련된 펩타이드

및/또는 단백질을 암호화하는 열린해독틀(ORF)을 포함할 수 있다. 이 경우, 본 개시에 따른 핵산 분자는 유전자 치료제 및/또는 질병 치료와 관련된 면역 반응을 강화시킬 수 있는 면역증강제로 활용될 수 있다. 예시적인 측면에서, 질병 치료와 관련된 단백질 또는 펩타이드는 대사 또는 내분비 질환 치료에 사용되는 치료 단백질/펩타이드; 혈액 질환, 순환계 질환, 호흡계 질환, 암 또는 종양 질환, 감염성 질환 또는 면역 결핍증 치료에 사용되는 치료 단백질/펩타이드; 호르몬 대체 요법에 사용되는 치료 단백질/펩타이드; 체세포를 만능 줄기 세포 또는 전능 줄기 세포로 역분화 또는 유도하는데 사용되는 치료 단백질/펩타이드; 보조제 또는 면역 자극 단백질로부터 선택되는 치료 단백질/펩타이드 및/또는 항체를 포함할 수 있다.

- [91] 하나의 예시적인 측면에서, 코딩 영역 (CR)은 후술하는 조성물 중에서 약학적으로 활성인 물질에 대응되는, 즉 약학적으로 활성인 물질 또는 그 일부를 암호화하는 핵산의 열린해독틀을 포함할 수 있다. 예를 들어, 약학적으로 활성인 물질이 항원 또는 항체와 같은 펩타이드 또는 단백질로 이루어지는 경우, 코딩 영역 (CR)은 이들 항원 또는 항체, 또는 이들의 단편을 암호화하는 열린해독틀로 이루어질 수 있다.
- [92] 코딩 영역(CR)을 구성하는 열린해독틀의 길이는 제한이 없으며, 열린해독틀(ORF)의 길이에 따른 발현 효율은 본 개시에 따른 핵산 분자, 이를 이용한 재조합 발현 벡터 및 치료 또는 예방을 위한 핵산 백신 등의 개발에서 큰 고려 대상이 아니다. Codon usage는 보통 다양한 종에서 단백질/펩타이드 발현에 영향을 미칠 수 있으나, 인간의 codon usage bias는 보통 단백질/펩타이드 발현에 큰 영향을 미치지 않는다고 알려져 있으므로, 인간을 대상으로 하는 핵산 백신이나 유전자 치료제를 개발할 때 고려 대상이 아니다.
- [93] 다만, 시작 코돈은 Kozak 서열을 가지고 있어야 하며, 종결 코돈 근처의 염기서열도 최적화할 필요가 있다. 필요한 경우, 발현하고자 하는 관심유전자(GOI) 또는 이의 전사체인 mRNA의 코돈 서열 중 세 번째 부분을 GC로 바꾸어 아미노산의 변화 없이 표적 서열의 GC%를 증가시켜 mRNA의 안정성을 높일 수도 있다.
- [94] 핵산 분자에 코딩 영역 (CR)을 삽입하기 위하여 핵산 분자는 하나 이상의 클로닝 사이트, 바람직하게는 다중 클로닝 부위(Multiple Cloning Site; MCS)를 포함할 수 있다. 하나 이상의 클로닝 부위는 하나 이상의 제한효소 (restriction endonuclease) 인식 서열 (recognition site) 및/또는 제한효소에 의해 절단되는 서열을 포함할 수 있다. 제한효소는 박테리아나 고세균 등에서 발견되는 자연적인 제한효소는 물론이고, 인위적으로 제조된 제한효소 (예를 들어, Zinc finger nuclease이나 TAL effector의 DNA 결합 부위에 근거한 제한효소 또는 PNA-기반의 PNAzymes 등)를 포함할 수 있다.
- [95] 예를 들어, 자연적으로 일어나는 제한효소는 1) Type I 제한효소 (인식 부위와 떨어지는 부위를 절단하고, ATP, S-adenosyl-L-methionine 및 마그네슘 이온을

필요로 함), 2) Type II 제한효소 (인식부위 내부 또는 인식부위에서 약간 떨어진 특정 부위를 절단하며, 대부분 마그네슘 이온을 필요로 함), 3) Type III 제한효소 (인식 부위에서 약간 떨어진 부위를 절단하며, ATP는 필요하지만, ATP의 가수분해는 필요 없음), 4) Type IV 제한효소 (메틸화, 하이드록시메틸화 또는 글루코실-하이드록시메틸화 등 변형된 부위를 표적으로 함), 5) Type V 제한효소 (CRISPRs의 cas9-gRNA complex) 등으로 구분될 수 있다.

- [96] 예를 들어, 다음과 같은 제한효소 인식 부위 및/또는 제한효소 절단 부위 (제한효소)를 사용할 수 있다. 5'-ATCGAT-3'(AclI), 5'-AGGCCT-3'(AatI), 5'-TGATCA-3'(AbaI), 5'-GGATCC-3'(BamHI), 5'-GCAGC(N)₈-3'(BbvI), 5'-(N)₁₀CGA(N)₆TGC(N)₁₂-3'(BcgI), 5'-(N)₈GAG(N)₅CTC(N)₁₃-3'(BpII), 5'-GTCTC(N)-3'(BsmAI; Alw26I), 5'-ACTGGN-3'(BsrI), 5'-ATCGAT-3'(ClaI), 5'-CTCTTCN-3'(EarI), 5'-CTGAAG(N)₁₆-3'(Eco57I), 5'-GAATTC-3'(EcoRI), 5'-CCWGG-3'(EcoRII; W는 A 또는 T), 5'-GATATC-3'(EcoRV), 5'-GGATG(N)₉-3'(FokI), 5'-GGCC-3'(HaeIII), 5'-AAGCTT-3'(HindIII), 5'-CCGG-3'(HpaIII), 5'-GGTGA(N)₈-3'(HphI), 5'-GGTACC-3'(KpnI), 5'-GATC-3'(MboI), 5'-ACGCGT-3'(MluI), 5'-GCCGGC-3'(NaeI), 5'-GATATG-3'(NdeII), 5'-GCCGGC-3'(NgoMIV), 5'-CATG-3'(NlaIII), 5'-GCGGCCGC-3'(NotI), 5'-TTAATTAA-3'(PacI), 5'-CTGCAG-3'(PstI), 5'-GAGCTC-3'(SacI), 5'-CCGCGG-3'(SacII), 5'-GTCGAC-3'(SalI), 5'-GCATC(N)5-3'(SfaNI), 5'-CCCGGG-3'(SmaI), 5'-TCGA-3'(TaqI), 5'-TCTAGA-3'(XbaI), 5'-CTCGAG-3'(XhoI) 및 이들의 조합.
- [97] 한편, 발현 조절 요소(ECE)로서 IRES 염기 서열을 포함하는 5'UTR을 가지는 경우, 본 개시의 핵산 분자는 선택적으로 코딩 영역(CR)을 구성하는 열린해독틀(ORF)의 발현 효율을 향상시키기 위하여 3'UTR을 더욱 포함할 수 있다. 이때, 코딩 영역(CR)은 5'UTR과 3'UTR 사이에 위치할 수 있다. 3'UTR은 5'-UTR과 함께 관심유전자(GOI) 또는 이의 전사체의 번역 효율을 향상시키고, 전사체인 mRNA가 세포 내에서 파괴되지 않고 안정적으로 유지되는데 중요한 역할을 한다.
- [98] 하나의 예시적인 측면에서, 3'UTR로서 전술한 IRES 염기 서열을 가지는 바이러스성 5'UTR에 대응될 수 있는 바이러스성 3'UTR을 사용할 수 있다. 이때, 3'UTR은 전술한 IRES를 가지는 5'UTR과 동일하거나 상이한 소스로부터 유래한 것일 수 있다. 하나의 예시적인 측면에서, 바이러스성 3'UTR은 피코나바이러스과(Picornaviridae) 바이러스, 토가바이러스과(Togaviridae) 바이러스, 디시스트로바이러스과(Dicistroviridae) 바이러스, 플라비바이러스과(Flaviridae) 바이러스, 레트로바이러스과(Retroviridae) 바이러스 및/또는 헤르페스바이러스과(Herpesviridae) 바이러스에서 유래한 것일 수 있다.
- [99] 일례로 피코나바이러스과 바이러스 유래의 3'UTR은 1) 엔테로바이러스속

바이러스(예: PV, RV, CVB3와 같은 콕사키바이러스(Coxsachievirus) 및/또는 EV71, 2) 카디오바이러스속(Cardiovirus) 바이러스(예: EMCV 및/또는 TMEV), 3) 아프토바이러스속 바이러스(예: FMDV), 4) 헤파토바이러스속 바이러스(예: HAV), 및/또는 5) 테스코바이러스속 바이러스(예: PTV-1과 같은 PTV) 유래의 3'UTR을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [100] 토가바이러스과 바이러스 유래의 3'UTR은 알파바이러스속 바이러스(예: SV) 유래의 3'UTR을 포함하고, 디시스트로바이러스과 바이러스 유래의 3'UTR은 크리파바이러스속(Cripavirus) 바이러스(예: PSIV, CrPV, 트리아토마바이러스(Triatoma virus) 및/또는 RXPД) 유래의 3'UTR을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 선택적인 측면에서, 플라비바이러스과 바이러스 유래의 3'UTR은 헤파시바이러스속(Hepacivirus) 바이러스(예: HCV) 및/또는 플라비바이러스속(Flavivirus) 바이러스(예: JEV) 및/또는 페스티바이러스속(Pestivirus) 바이러스(예: CSFV 및/또는 BVDV) 유래의 3'URT을 포함할 수 있다. 다른 예시적인 측면에서, 레트로바이러스과 바이러스 유래의 3'UTR은 감마레트로바이러스속(Gammaretrovirus) 바이러스(예: FMLV 및/또는 MMLV) 및/또는 알파레트로바이러스속(Alpharetrovirus) 바이러스(예: RSV) 유래의 3'UTR을 포함할 수 있다. 또한, 헤르페스바이러스과 바이러스 유래의 3'UTR은 마디바이러스속(Mardivirus) 바이러스(예: MDV) 유래의 3'URT을 포함할 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [101] 또한, 핵산 분자는 발현 조절 서열에 인접하여 핵산 분자의 전사를 촉진하는 전사 조절 요소(Transcription control element, TCE)를 가질 수 있다. 일례로, 전사 조절 요소(TCE)는 발현 조절 요소(ECE)의 5'쪽에 위치할 수 있다. 이러한 전사 조절 요소(TCE)는 특별히 제한되는 것은 아니다. 전사 조절 요소는 인핸서 또는 프로모터를 포함할 수 있다. 인핸서 서열은 프로모터에서 다양한 부위에 위치하여 인핸서 서열이 없을 때의 프로모터에 의한 전사 활성화와 비교하여, 전사 활성을 증가시키는 염기 서열이다. 전사 조절 요소(TCE)의 하나인 프로모터는 코딩 영역(CR)에 작동 가능하게 연결된다.

- [102] 천연 프로모터 서열 및 다수의 이중 프로모터를 둘 다 사용하여 열린해독틀(ORF)로 이루어지는 표적 서열의 증폭 및/또는 발현을 지시할 수 있다. 예를 들어, 본 개시의 핵산 분자가 면역증강제로 사용되는 경우라면, 전사 조절 요소(TCE)는 포유동물 세포의 게놈으로부터 유래된 프로모터 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터 또는 박테리오파지에서 유래한 프로모터가 이용될 수 있다.

- [103] 예를 들어, 전사 조절 요소(TCE)는 CMV(cytomegalo virus) 프로모터, 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, HSV의 tk 프로모터, T7 프로모터, T3 프로모터, SM6 프로모터, RSV 프로모터, EF1 알파프로모터, 메탈로티오닌 프로모터, 베타-액틴 프로모터, 인간 IL-2 유전자의 프로모터, 인간 IFN 유전자의 프로모터, 인간 IL-4 유전자의

프로모터, 인간 림포톡신 유전자의 프로모터, 인간 GM-CSF 유전자의 프로모터, 암세포 특이적 프로모터 (예컨대, TERT 프로모터, PSA 프로모터, PSMA 프로모터, CEA 프로모터, E2F 프로모터 및 AFP 프로모터) 및 조직 특이적 프로모터 (예컨대, 알부민 프로모터)를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [104] 선형화된 DNA로부터 RNA로의 전사를 위해서 예를 들어 박테리오파지 등에서 유래한 프로모터 서열과 같은 전사 조절 요소(TCE)가 발현 조절 요소(ECE)의 5'쪽에 위치할 수 있다. 이러한 전사 조절 서열(TCE)로서 T7 박테리오파지 유래의 프로모터 이외에도 T3 박테리오파지 유래의 프로모터, SP6 박테리오파지 유래의 프로모터 등 선형화된 DNA 주형으로부터 mRNA를 전사할 수 있는 임의의 전사 조절 요소(TCE)가 발현 조절 요소(ECE) 인근에 위치할 수 있다.
- [105] 핵산 분자는 전술한 발현 조절 요소(ECE), 코딩 영역(CR), 3'-UTR 및 전사 조절 요소(TCE) 이외에도 코딩 영역(CR)을 구성하는 열린해독틀(ORF) 형태의 표적 서열(TS)의 발현을 유도할 수 있는 염기 서열이 삽입될 수 있다. 하나의 예시적인 측면에서, IRES 염기 서열을 가지는 발현 조절 요소(ECS, 예: IRES 염기 서열을 가지는 5'UTR)과 코딩 영역(CR)의 개시 코돈 사이에 Kozak 서열이 삽입될 수 있다. 다른 선택적인 측면에서, 발현 조절 요소(ECE)의 3'쪽에 개시 코돈으로 작용할 수 있는 염기 서열(예: CCTGCT)이 삽입되고/삽입되거나, 발현 조절 요소(ECE)의 3'쪽에 관심유전자(GOI)의 발현 효율을 향상시킬 수 있는 인식 서열(예: ATGGCAGCTCAA) 등이 삽입될 수 있다.
- [106] 아울러, 코딩 영역(CR)의 3'쪽, 만약 3'UTR이 사용되는 경우라면 3'UTR의 3'쪽에 전사된 핵산 분자를 안정화시키면서, 코딩 영역(CR)에 존재하는 열린해독틀(ORF)의 번역 효율을 더욱 향상시킬 수 있는 폴리아데닐레이션 신호 서열 및/또는 폴리아데노신 서열(PA)이 더욱 삽입될 수 있다. 일례로, 본 개시의 핵산 분자가 RNA 형태의 전사체 서열로 이루어지는 경우, 폴리아데노신 서열(PA)은 대략 25개 내지 대략 400개, 바람직하게는 30개 내지 400개, 더욱 바람직하게는 50 내지 250개, 가장 바람직하게는 60 내지 250개의 아데노신으로 이루어진 핵산 서열일 수 있다.
- [107] 다른 예시적인 측면에서, 본 개시의 핵산 분자가 DNA 형태의 폴리뉴클레오티드로 이루어지는 경우, 폴리아데닐레이션 신호 서열이 코딩 영역 (CR)의 3'쪽에 위치할 수 있다. 폴리아데닐레이션 신호 서열은 5'-NNUANA-3' 모티프의 공통 서열 (N은 아데닌, 사이토신, 티미딘, 구아닌, 우라실 및 이들의 변이체에서 선택될 수 있는 임의의 염기 또는 뉴클레오티드) 가질 수 있다. 예를 들어, 폴리아데닐레이션 신호 서열은 5'-AAUAAA-3' 또는 5'-AUUAAA-3'와 같은 공통 서열을 가질 수 있다. 일례로, 폴리아데닐레이션 신호 서열은 SV40, 인간 성장호르몬 (human growth factor, hGH), 소 성장 호르몬 (Bovine Growth hormone, BGH) 또는 토끼 베타-글로빈 (rabbit beta-globine, rbGlob) 등에서 유래한 것을 사용할 수 있지만, 이에 한정되지 않는다.

- [108] 한편, 도 1에서는 하나의 발현 조절 서열과, 하나의 코딩 영역을 포함하는 핵산 분자를 도시하였다. 다른 측면에서, 본 개시의 핵산 분자는 IRES 염기 서열을 가지는 다수의 발현 조절 서열과, 어느 하나의 발현 조절 서열에 의하여 발현될 수 있는 단백질 및/또는 펩타이드를 암호화하는 다수의 코딩 영역을 포함할 수 있다. 도 2는 다수의 발현 조절 서열 및 다수의 코딩 영역을 포함하는 핵산 분자를 개략적으로 나타낸다.
- [109] 도 2에 나타낸 바와 같이, 본 개시의 다른 측면에 따른 핵산 분자는 2개의 발현 카세트 (expression cassette, EC1, EC2) 또는 발현 유닛을 포함하고 있다. 제 1 발현 카세트(EC1)는 IRES 활성을 가지는 제 1 발현 조절 요소(ECE1; 예: 5'UTR 1)를 포함한다. 선택적으로, 제 1 발현 카세트(EC1)는 제 1 발현 조절 요소(ECE1)과 작동 가능하게 연결되며, 제 1 표적 서열(TS1)로서 제 1 열린해독틀(ORF1)로 이루어지는 제 1 코딩 영역(CR1)을 포함한다. 제 2 발현 카세트(EC2)는 IRES 활성을 가지는 제 2 발현 조절 요소(ECE2; 예: 5'UTR 2)를 포함하고, 선택적으로 제 2 발현 조절 요소(ECE2)와 작동 가능하게 연결되며 제 2 표적 서열(TS2)로서 제 2 열린해독틀(ORF2)로 이루어지는 제 2 코딩 영역(CR2)을 포함한다. 하나의 예시적인 측면에서, 제 2 발현 조절 요소(ECE2)는 제 1 발현 조절 요소(ECE1)의 3'쪽에 위치할 수 있고, 제 1 코딩 영역(CR1)은 제 1 발현 조절 요소(ECE1)과 제 2 발현 조절 요소(ECE2) 사이에 위치하고, 제 2 코딩 영역 (CR2)은 제 2 발현 조절 요소(ECE2)의 3'쪽에 위치할 수 있다.
- [110] 하나의 예시적인 측면에서, 상기 제 1 발현 조절 요소(ECE1) 및 제 2 발현 조절 요소(ECE2)은 각각 전술한 바이러스성 IRES, 예를 들어 IRES 활성을 가지는 바이러스성 5'UTR일 수 있다. 이때, 제 1 발현 조절 요소(ECE1)와 제 2 발현 조절 요소(ECE2)는 동일한 소스로부터 유래할 수도 있고, 상이한 소스로부터 유래할 수도 있다.
- [111] 선택적인 측면에서, 핵산 분자는 다수의 발현 조절 요소(ECE1, ECE2) 중에서 적어도 어느 하나의 발현 조절 요소에 인접하여, 예를 들어, 다수의 발현 조절 요소(ECE1, ECE2) 중에서 적어도 어느 하나의 발현 조절 요소의 5'쪽에 다수의 아데노신(MA1, MA2) 또는 다수의 티미딘(MT1, MT2)이 삽입될 수 있다.
- [112] 일례로, 도 2에서는 전사 조절 요소(TCE)에 근접하게 위치하는 제 1 발현 조절 요소(ECE1)의 5'쪽과, 제 2 발현 조절 요소(ECE2)의 5'쪽에 다수의 아데노신(MA1, MA2)가 각각 삽입된 것을 도시하고 있다. 하지만, 코딩 영역(CR1, CR2)을 구성하는 각각의 열린해독틀 (ORF1, ORF2)의 발현 효율을 향상시킬 수 있는 다수의 아데노신(MA1, MA2) 또는 티미딘(MT1, MT2)은 제 1 발현 조절 요소(ECE1) 및 제 2 발현 조절 요소(ECE2) 중에서 어느 하나에 인접하여 (즉, 이들 발현 조절 요소 중에서 어느 하나의 발현 조절 요소의 5'쪽에), 삽입될 수도 있다.
- [113] 하나의 예시적인 측면에서, 제 1 발현 조절 요소(ECE1) 및 제 2 발현 조절 요소(ECE2) 중에서 적어도 하나는 바이러스에서 유래한 IRES 염기 서열을

- 포함할 수 있다. 구체적으로, 제 1 발현 조절 요소(ECE1) 및/또는 제 2 발현 조절 요소(ECE2)는 각각 독립적으로 피코나바이러스과(Picornaviridae) 바이러스, 토가바이러스과(Togaviridae) 바이러스, 디시스트로바이러스과(Dicistroviridae) 바이러스, 플라비바이러스과(Flaviridae) 바이러스, 레트로바이러스과(Retroviridae) 바이러스 및/또는 헤르페스바이러스과(Herpesviridae) 바이러스에서 유래한 바이러스성 IRES 염기 서열을 포함할 수 있다.
- [115] 예를 들어, 바이러스성 IRES 염기 서열을 가지는 제 1 발현 조절 요소(ECE1) 및/또는 제 2 발현 조절 요소(ECE2)는 각각 독립적으로 피코나바이러스과(Picornaviridae) 바이러스 및/또는 디시스트로바이러스과(Dicistroviridae) 바이러스에서 유래한 IRES 활성을 가지는 염기 서열을 포함할 수 있다. 일례로, 피코나바이러스과 바이러스 유래의 IRES 염기 서열을 가지는 제 1/제 2 발현 조절 요소(ECE1/ECE2) 중에서 적어도 하나는 엔테로바이러스속 바이러스, 카디오바이러스속 바이러스 또는 아프토바이러스속 바이러스 유래의 IRES 활성을 가지는 염기 서열을 포함할 수 있고, 특히 바람직하게는 엔테로바이러스속 바이러스 유래의 IRES 활성을 가지는 염기 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 엔테로바이러스속 바이러스성 IRES 염기 서열을 가지는 제 1/제 2 발현 조절 요소(ECE1/ECE2) 중에서 적어도 하나는 CVB3와 같은 콕사키바이러스 등의 엔테로바이러스속 바이러스에서 유래한 IRES 활성을 가지는 염기 서열을 가지거나, EMCV와 같은 카디오바이러스속 바이러스에서 유래한 IRES 활성을 가지는 염기 서열을 가질 수 있다.
- [116] 또한, 디시스트로바이러스과 바이러스 유래의 IRES 염기 서열을 가지는 제 1/제 2 발현 조절 요소(ECE1, ECE2) 중에서 적어도 하나는 크리파바이러스속 바이러스에 속하는 PSIV 또는 CrPV에서 유래한 IRES 활성을 가지는 염기 서열일 수 있다.
- [117] 한편, 예시적인 측면에서, 코딩 영역은 상기 제 1 발현 조절 요소(ECE1)과 상기 제 2 발현 조절 요소(ECE2) 사이에 위치하는 제 1 코딩 영역(CR1)과, 제 2 발현 조절 요소(ECE2)의 3'쪽에 위치하는 제 2 코딩 영역(CR2)을 포함할 수 있다. 제 1 코딩 영역(CR1)과 제 2 코딩 영역(CR2)은 각각 펩타이드 또는 단백질을 암호화하는 유전자 또는 이의 전사체인 열린해독틀로 이루어질 수 있다. 일례로, 제 1 코딩 영역(CR1) 및 제 2 코딩 영역(CR2)은 각각 전술한 항원/항체와 같은 면역원 및/또는 질병 치료와 관련된 단백질/펩타이드 등을 각각 암호화하는 열린해독틀(ORF1, ORF2)로 이루어질 수 있다. 하나의 예시적인 측면에 따르면, 제 1 코딩 영역(CR1)은 제 1 발현 조절 요소(ECE1; 예: 5'-UTR 1)와 작동 가능하게 연결되고, 제 2 코딩 영역(CR2)은 제 2 발현 조절 요소(ECE 2; 예: 5'-UTR 2)와 작동 가능하게 연결될 수 있다.
- [118] 제 1 코딩 영역(CR1)을 구성하는 제 1 열린해독틀(ORF1)인 제 1 표적 서열(TS1)과 제 2 코딩 영역(CR2)을 구성하는 열린해독틀(ORF)인 제 2 표적

서열(TS2)은 각각 상이한 단백질 또는 펩타이드를 암호화하는 열린해독틀로 이루어질 수 있다. 이 경우, 하나의 핵산 분자에서 상이한 단백질 또는 펩타이드를 발현할 수 있다. 하나의 예시적인 측면에서, 제 1 코딩 영역(CR1)과 제 2 코딩 영역(CR2)이 각각 상이한 항원 또는 이의 단편 등을 암호화하는 열린해독틀로 이루어질 수 있다. 이때, 본 개시에 따른 핵산 분자 또는 재조합 발현 벡터를 사용하여 상이한 항원을 발현할 수 있고, 다수의 질병을 예방하는 유전자 백신으로 활용될 수도 있다. 다른 예시적인 측면에서, 제 1 코딩 영역(CR1)과 제 2 코딩 영역(CR2)이 각각 상이한 치료용 단백질 또는 펩타이드를 암호화하는 열린해독틀로 이루어진 경우, 본 개시에 따른 핵산 분자 또는 재조합 발현 벡터를 사용하여 상이한 질병을 치료하는데 활용될 수 있다.

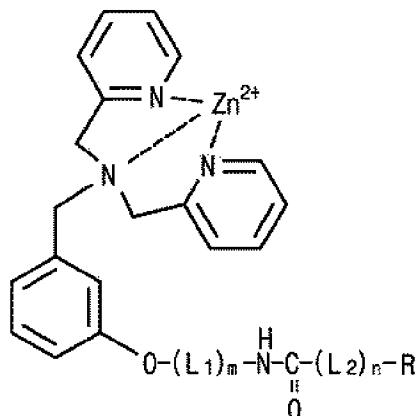
- [119] 도 1에서 설명한 것과 유사하게, 도 2에 도시된 다수의 발현 조절 요소(ECE1, ECE2)과 다수의 코딩 영역(CR1, CR2)을 포함하는 핵산 분자는 열린해독틀(ORF1, ORF2)의 발현을 향상시킬 수 있는 핵산 서열을 더욱 포함할 수 있다. 일례로, 제 1 발현 조절 요소(ECE1) 및/또는 제 2 발현 조절 요소(ECE2)이 각각 IRES 염기 서열을 가지는 바이러스성 5'UTR인 경우, 핵산 분자는 3'UTR을 더욱 포함할 수 있다. 이때, 3'UTR은 바람직하게는 제 2 코딩 영역(CR2)의 3'쪽에 위치할 수 있다. 3'UTR은 특별히 한정되지는 않지만, 도 1을 참조하면서 설명한 바 있는 바이러스성 3'UTR을 사용할 수 있다.
- [120] 예를 들어, 3'UTR은 제 1 발현 조절 요소(ECE1)을 구성하는 5'UTR 1 또는 제 2 발현 조절 요소(ECE2)를 구성하는 5'-UTR 2에서 유래한 것을 사용할 수 있다. 하나의 예시적인 측면에서, 3'UTR은 5'-UTR 1과 동일한 소스에서 유래한 것을 사용할 수 있지만, 본 개시가 이에 한정되지 않는다.
- [121] 그 외에도, 도 2에 도시된 핵산 분자는 발현 조절 요소(ECE1, ECE2), 예를 들어 제 1 발현 조절 요소(ECE1)에 인접하게 위치하는 전사 조절 요소(TCE), 각각의 발현 조절 요소(ECE1, ECE2)에 각각 작동 가능하게 연결된 코딩 영역 사이(CR1, CR2)의 Kozak 서열을 포함할 수 있다. 아울러, 필요한 경우 각각의 발현 조절 요소(ECE1, ECE2)의 3'쪽에 각각 개시 코돈으로 작용할 수 있는 서열 및/또는 발현 효율을 향상시킬 수 있는 인식 서열 등이 삽입될 수 있다. 또한, 하나의 예시적인 측면에서, 제 2 코딩 영역(CR2)의 3'쪽, 일례로 3'UTR이 삽입된다면 3'UTR의 3'쪽에 폴리아데닐레이션 신호 서열 또는 폴리아데노신 서열(PA)이 더욱 삽입될 수 있다.
- [122] 도 2에서 발현 조절 요소(ECE1, ECE2)와 코딩 영역(CR1, CR2)이 각각 2개로 구분된 것으로 도시하고 있으나, IRES 염기 조절 서열을 가지는 발현 조절 서열의 개수 및/또는 이들 발현 조절 서열과 작동 가능하게 연결되는 코딩 영역의 개수는 2개를 초과할 수 있다.
- [123] 도 1 및 도 2에 도시된 핵산 분자는 벡터 내에 삽입될 수 있다. 예를 들면 벡터에는 바이러스 벡터(viral vectors), DNA 또는 RNA 발현 벡터(expression vectors), 플라스미드(plasmid), 코스미드(cosmid) 또는 파지벡터(phage vectors),

CCA(cationic condensing agents)와 연결된 DNA 또는 RNA 발현 벡터, 리포솜(liposomes)으로 포장된 DNA 또는 RNA 발현 벡터, 프로듀서 세포(producer cells)와 같은 특정 진핵세포(eukaryotic cells) 등이 포함된다. 하나의 예시적인 측면에 따르면, 전술한 핵산 분자를 적절한 벡터에 삽입한 뒤에 시험관내 전사(*in vitro* transcription, IVT)를 통하여 RNA 형태의 핵산 분자로 변형될 수 있다. 벡터 성분은 일반적으로 복제 기점 (특히 벡터가 원핵세포에 삽입되는 경우), 선별 marker 유전자, 신호 서열, 및 전사 종결 서열을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

- [124] 면역증강제로서 사용될 수 있는 본 개시의 핵산 분자는 비-항원 특이적인 면역 반응을 유발할 수 있다. 면역 반응과 관련하여 T-lymphocyte는 T-헬퍼 1 (Th₁) 세포 및 T-헬퍼 2 (Th₂) 세포로 분화되며, 면역 체계는 세포내 (Th1) 및 세포외 (Th2) 병원균 (예를 들면 항원)을 파괴할 수 있다. Th₁ 세포는 대식세포 및 세포독성 T-세포의 활성화에 의해 세포 매개성(cell-mediated) 면역 반응을 돕는다. 한편, Th₂ 세포는, 원형질 세포로의 전환을 위한 B-세포의 증강 및 항체 (예를 들면 항원에 대항하는)의 형성에 의해 체액성(humoral) 면역 반응을 촉진한다. Th₁/Th₂ 비율은 면역 반응에서 매우 중요한데, 본 개시의 핵산 분자는 Th₁ 면역 반응, 즉 세포 매개성 면역 반응을 강화, 유도한다. 따라서 본 개시에 따른 핵산 분자가 약학적으로 활성인 물질, 예를 들어 면역 증강 성분과 함께 생체에 투여되면, 본 개시의 핵산 분자는 약학적으로 활성인 물질에 의해 유발된 특정한 면역 반응을 강화하는 면역증강제 (adjuvant)로서의 역할을 수행할 수 있다.
- [125] 조성물은 면역증강제로 사용되는 핵산 분자를 안정화시키는 금속 착화합물 또는 이들의 약학적으로 허용되는 염을 포함한다. 금속 착화합물은 2개의 피콜릴기(picoyl group)이 치환된 아미노기인 다이피콜릴아민(dipicolylamine)을 구성하는 질소 원자와 배위 결합을 형성하는 아연 이온을 포함할 수 있다. 피콜릴기와 연결된 아미노기의 질소 원자는 아릴옥시기를 통하여 아미드 결합을 형성하고, 아미드 결합의 양측에 지방족 링커(연결기)가 연결될 수 있다. 일례로, 본 개시에 따라 면역증강제인 핵산 분자를 안정화시키는 금속 착화합물은 하기 화학식1의 구조를 가질 수 있다.

[126] [화학식 1]

[127]



The chemical structure shows a zinc ion (Zn^{2+}) coordinated by two pyridine rings and two nitrogen atoms of a 1,2-bis(2-((3-((4-((6-oxo-6-((2-((2-phenyl-2-oxoethyl)oxy)butyl)amino)hexyl)vinyl)octyl)oxy)phenyl)ethyl)pyridine)methyl)pyridine ligand. The ligand consists of a central pyridine ring substituted at the 2 and 6 positions with methyl groups, which are further substituted with 2-((3-((4-((6-oxo-6-((2-((2-phenyl-2-oxoethyl)oxy)butyl)amino)hexyl)vinyl)octyl)oxy)phenyl)ethyl)pyridine)methyl groups. The terminal group is a long alkyl chain with a terminal vinyl group.

[133] 화학식 1 또는 화학식 2의 구조를 가지는 금속 착화물의 약학적으로 허용되는 염은 약학적으로 허용되는 유리산(free acid)에 의해 형성되는 산 부가염을

포함할 수 있다. 유리산으로는 유기산과 무기산을 사용할 수 있으며, 유리산으로는 유기산과 무기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 인산, 황산, 질산, 주석산 등을 사용할 수 있고 유기산으로는 메탄술폰산, p-톨루엔술폰산, 아세트산, 트리플루오로아세트산, 말레인산(maleic acid), 숙신산, 옥살산, 벤조산, 타르타르산, 푸마르산(fumaric acid), 만데르산, 프로피온산(propionic acid), 구연산(citric acid), 젖산(lactic acid), 글리콜산(glycollic acid), 글루콘산(gluconic acid), 갈락투론산, 글루탐산, 글루타르산(glutaric acid), 글루쿠론산(glucuronic acid), 아스파르트산, 아스코르브산, 카본산, 바닐릭산, 히드로아이오딕산 등을 사용할 수 있으며, 이들에 제한되지 않는다.

- [134] 화학식 1 또는 화학식 2의 구조를 가지는 금속 착화합물은 양이온성 금속 성분을 포함한다. 따라서, 음이온을 띠는 면역증강제로서의 핵산 분자와 상호작용하여 복합체(complex)를 형성하여 핵산 분자를 안정화시킨다. 특히, 면역증강제로서 RNA 플랫폼 형태를 가지는 핵산 분자는 생체 내에서 분해 효소 등에 의해 분해되어 그 활성이 유지되지 못한다. 화학식 1 또는 화학식 2의 구조를 금속 착화합물이 핵산 분자와 complex를 형성하면, 분해 효소 등에 의해 핵산 분자가 분해되는 것이 방지되거나 최소화될 수 있다. 또한, 화학식 1 또는 화학식 2의 구조를 가지는 금속 착화합물은 단백질 또는 펩타이드일 수 있는, 약학적 유효성분인 면역원과도 상호작용하여 면역원을 안정화시킬 수 있다.
- [135] 한편, 예시적인 측면에서, 조성물은 전술한 면역증강제로서의 핵산 분자와 안정화제로서의 금속 착화합물 이외에도, 약학적으로 활성인 물질을 더욱 포함할 수 있다. 약학적으로 활성인 물질은 면역원과 같은 면역 증강 성분이다. 다른 항원 성분, 예를 들면, 비활성화되거나 약독화된 병원균이 또한 사용될 수 있다.
- [136] 일례로, 약학적으로 활성인 물질은 암, 전염병, 자가면역 질환 또는 알레르기에 대한 치료 및/또는 예방 효과를 가지는 화합물일 수 있다. 예를 들어, 약학적으로 활성인 물질은 펩타이드, 단백질, 핵산, 치료적으로 활성 있는 저분자량의 유기 또는 무기 화합물, 당, 항원 또는 항체, 본 개시가 속하는 기술분야에서 공지된 치료제, 항원 세포, 항원 세포의 절편, 세포 조각, 화학적 또는 광선 조사에 의하여 변형된 (예를 들어 약독화되거나 비활성화된) 병원균 (바이러스 또는 박테리아 등)을 포함한다.
- [137] 일례로, 약학적으로 활성인 물질의 하나인 면역원으로서의 항원은 펩타이드, 폴리펩타이드, 단백질, 세포, 세포 추출물, 다당류, 복합 다당류, 지질, 당지질(glycolipid) 및 탄수화물일 수 있다. 보다 구체적으로, 약학적으로 활성인 물질의 하나인 항원은 코딩 영역(CR/CR1/CR2)에 의하여 발현되는 종양 항원, 동물 항원, 초목 항원, 바이러스 항원, 박테리아 항원, 곰팡이 항원, 원생동물 항원, 자가면역 항원 또는 알레르기 항원을 포함할 수 있다.
- [138] 예를 들어, 종양 세포의 표면 항원 및 표면 항원, 특히, 바이러스 병원균,

박테리아 병원균, 곰팡이 병원균 또는 원생 동물 병원균의, 분비된 형태가 바람직하다. 물론 항원은, 예를 들어 본 개시에 따른 핵산 분자 내부에 존재할 수 있고, 또한, 적당한 담체 (carrier)에 결합된 헵텐(haptene) 형태로 존재할 수 있다. 다른 항원 성분, 비활성화되거나 약독화된 병원균이 또한 사용될 수 있다.

- [139] 다른 선택적인 실시형태에서, 약학적으로 활성인 물질은 항체, 바람직하게는 치료적으로 유효한 항체가 사용될 수 있다. 본 개시에 따르면 암 (cancer) 또는 전염병, 예를 들어 세포 표면 단백질, 종양 억제 유전자 또는 이의 저해제(inhibitor) 성장 인자 및 신장인자 (elongation factor), 세포자멸(apoptosis)-관련 단백질, 종양 항원, 또는 앞에서 설명한 항원 등에서 중요한 역할을 하는 항원, 단백질 또는 핵산에 대한 항체가 특히 바람직하다.
- [140] 예를 들어, 약학적으로 활성인 물질이 항원인 경우, 조성물은 백신으로 적용될 수 있으며, 약학적으로 활성인 물질이 치료용 항체인 경우, 약학 조성물은 질병 치료제로 적용될 수 있다. 하나의 예시적인 측면에서, 면역증강제로 사용되는 핵산 분자의 코딩 영역(CR, CR1, CR2)이 항원, 항체 또는 이들의 단편을 암호화하는 경우, 약학적으로 활성인 물질은 이들 항원, 항체 또는 이들의 단편일 수 있다.
- [141] 본 개시에 따른 조성물은 면역증강제로서의 핵산 분자 이외에 추가적인 면역증강제를 포함할 수 있다. 추가적인 면역증강제는 약학적으로 활성인 물질 및/또는 면역증강제로서 사용된 핵산 분자의 면역학적 활성을 강화시킨다. 약학 조성물에 첨가될 수 있는 추가적인 면역증강제는 프로타민(protamine), 뉴클레오린(nucleolin), 스페르민(spermine), 스페르미딘(spermidine) 및 양이온성 다당류와, 안정화 양이온성 펩타이드 또는 폴리펩타이드, alum 용액, 수산화알루미늄, 인산알루미늄 겔, 조류 (algae)의 글루칸, 스쿠알렌 또는 그 에멀션, Toll-유사 수용체: TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TLR11, TLR12 또는 TLR13에 대한 (리간드로서의) 결합 친화성에 기인되어 면역 증강하는 것으로 알려진 성분, CpG 모티프를 가지는 핵산이며, 특히 CpG-RNA 또는 CpG-DNA이다.
- [142] 본 개시에 따른 핵산 분자와, 추가적인 면역증강제를 혼합하는 경우에 이들의 배합 비율은 특별히 한정되지 않는다. 일례로, 본 개시에 따른 핵산 분자와 추가적인 면역증강제는 100:1 내지 1:100, 바람직하게는 10:1 내지 1:10, 더욱 바람직하게는 5:1 내지 1:5, 가장 바람직하게는 3:1 내지 1:3의 중량 비율로 배합될 수 있다.
- [143] 본 개시에 따라 면역증강제로 사용되는 핵산 분자의 함량이나 농도는 특별히 제한되지 않는다. 특히, RNA 플랫폼 형태의 핵산 분자를 사용하는 경우, 생체 내에서 신속하게 분해되기 때문에 안전성 및 안정성을 확보할 수 있다. 하나의 예시적인 측면에서 본 개시에 따른 핵산 분자는 백신과 같은 약학적 조성물 중에 1 내지 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 바람직하게는 10 내지 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 사용될 수 있다.
- [144] 하나의 예시적인 측면에서, 조성물이 액체 형태인 경우, 약학적으로 허용되는

담체는 예를 들어, 발열원이 없는 물 (pyrogen-free water); 예를 들어 인산염(phosphate), 시트르산 염(citrate) 등등, 완충 용액과 같은 등장액 (isotonic saline) 또는 완충 (수)용액, 예를 들어, 땅콩유, 면실유, 참기름, 올리브유, 옥수수유 및 카카오 열매의 오일과 같은 식물성 기름; 예를 들어, 폴리프로필렌글리콜, 글리세롤, 소르비톨, 만니톨, 폴리에틸렌글리콜 및 알긴산(alginic acid) 등과 같은 폴리올을 포함할 수 있다. 액체의 조성물을 생체에 주입하기 위하여 나트륨염, 칼슘염 및 선택적으로 칼륨염을 포함하는 수성 버퍼가 사용될 수 있다. 나트륨염, 칼슘염 및 칼륨염은 염소, 요오드 또는 브롬과 같은 할로겐의 형태, 또는 수산화물, 탄산염, 탄산수소염, 또는 황산염 등의 형태로 존재할 수 있다.

- [145] 또한, 조성물이 고체 형태인 경우, 약학적으로 허용되는 담체는 고체 필러, 액체 필러 또는 희석제와 같은 고체 담체를 포함할 수 있으며, 생체에 투여하기 적당한 캡슐화 (encapsulating) 화합물이 또한 사용될 수 있다. 예를 들어, 약학적으로 허용되는 고체 담체는, 젓당(lactose), 포도당(glucose), 설탕(sucrose)와 같은 당; 예를 들어, 옥수수 전분 또는 감자 전분과 같은 전분; 예를 들어, 소듐 카르복시메틸셀룰로오스, 에틸셀룰로오스, 셀룰로오스 아세테이트와 같은 셀룰로오스 및 이의 유도체; 분말화된 트래거캔스(tragacanth); 엿기름 (malt); 젤라틴; 수지 (tallow); 예를 들어, 스테아르산, 마그네슘 스테아레이트와 같은 고체 활택제; 황산 칼슘 등이다. 주사용으로 적당한 담체는 하이드로젤(hydrogel), 조절된 방출용 장치, 지연된 방출용(delayed release) 장치, 폴리젓산 (polylactic acid) 및 콜라겐 매트릭스를 포함한다. 국소 용도로 적당한 약학적으로 허용되는 담체는 로션, 크림, 젤 및 이와 유사한 것에 사용되는데 적당한 것을 포함한다. 만약 조성물이 경구 투여된다면, 태블릿, 캡슐 및 이와 유사한 것은 바람직한 단위 투여 형태이다. 구강 투여를 위하여 사용될 수 있는, 단위 투여 형태의 제조를 위한 약학적으로 허용되는 담체는 본 기술분야에 잘 알려져 있다.

- [146] 약학적으로 허용되는 담체는 본 개시에 따른 조성물이 투여되는 방식에 따라 선택될 수 있다. 본 개시에 따른 조성물은, 예를 들어, 전신으로 (systemically) 투여될 수 있다. 투여 경로는, 예를 들어, 경구 (oral), 피하내, 정맥내, 근육내, 관절내 (intra-articular), 활액내 (intrasynovial), 흉골내, 경막내 (intrathecal), 간내 (intrahepatic), 병변내 (intralesional), 두개내 (intracranial), 경피 (transdermal), 진피내 (intradermal), 폐내 (intrapulmonal), 복강내 (intraperitoneal), 심장내 (intracardial), 동맥내 (intraarterial), 및 설하 국소 (sublingual topical) 및/또는 비강내 (intranasal) 경로를 포함한다.

- [147] 본 개시에 따른 조성물은 임의의 편리한 투여 형태, 예를 들어 정제, 분말, 캡슐, 용액, 분산액, 현탁액, 시럽, 분무제, 좌제, 겔, 에멀전, 패치 등으로 투여될 수 있다. 조성물은 제약 제제에 통상적인 성분, 예를 들어, 하나 이상의 완충제, 안정화제, 계면활성제, 습윤제, 윤활제, 유화제, 현탁화제, 보존제, 항산화제, 불투명화제, 활택제, 가공 보조제, 착색제, 감미제, 향료, 향미제, 희석제, 및

약물(즉, 본 개시의 유효 성분인 핵산 분자, 유전자 전달체 또는 이의 약학 조성물)의 멋진 외양을 제공하거나 제약 제품 (즉, 의약)의 제조에 도움이 되는 다른 공지된 첨가제를 포함할 수 있다.

[148] 대안적으로 또는 추가로, 조성물은 그의 기능을 증진시키는 작용제, 예컨대 예를 들어 세포독성제, 시토키인, 화학요법제, 또는 성장-억제제, 또는 성장-증진제를 포함할 수 있다. 이러한 분자는 의도된 목적에 유효한 양으로 조합되어 적합하게 존재한다.

[149] 사용되어야 하는 조성물의 적당한 양은 동물 모델을 이용한 통상의 실험에 의해 결정될 수 있다. 그러한 모델은, 어떠한 제한을 내포함이 없이, 토끼, 양, 마우스, 쥐, 개 및 인간이 아닌 영장류 모델을 포함한다. 바람직한 주사용 단위 투여 형태는 멸균 수용액, 생리 식염수, 또는 이의 혼합물을 포함한다. 그러한 용액의 pH는 약 7.4로 조정되어야 한다.

[150] 필요한 경우, 약학적으로 활성인 물질 및/또는 면역증강제로서의 핵산 분자에 의하여 유도되는 면역원성을 더욱 증가시키기 위하여, 본 개시에 따른 조성물은 하나 이상의 보조 물질을 추가적으로 포함할 수 있다. 이러한 보조 물질의 비제한적인 예는 수지상 세포 (DC)의 성숙을 허용하는 화합물, 예를 들어 리포다당질, TNF-알파 또는 CD40 리간드, GM-CSF 및/또는 사이토카인이다. 구체적으로, 다양한 인터루킨류, 인터페론류, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, LT-베타, TNF-알파, hGH와 같은 성장 인자와 같은, 면역 반응을 촉진하는, 모노킨, 림포킨, 인터루킨 또는 케오카인과 같은 사이토카인이다.

[151] 본 개시에 따른 조성물에 추가적으로 하나 이상의 완충제, 안정화제, 계면활성제, 습윤제, 윤활제, 유화제, 현탁화제, 보존제, 항산화제, 불투명화제, 활택제, 가공 보조제, 착색제, 감미제, 향료, 향미제, 희석제, 및 약물 (즉, 본 개시의 유효 성분인 핵산 분자, 유전자 전달체 또는 이의 조성물)의 멋진 외양을 제공하거나 제약 제품 (즉, 의약)의 제조에 도움이 되는 다른 공지된 첨가제를 포함할 수 있다. 일례로, Tween과 같은 유화제; 예를 들어, 소듐 라우릴 설페이트와 같은 습윤제; 착색제; 맛을 부여하는 제제 (taste-imparting agent), 태블릿을 형성하는 제제; 안정화제; 항산화제; 보존제이다.

[152] 본 개시에 따른 핵산 분자는 특히 Th₁ 면역 반응을 강화한다. 일례로, 본 개시에 따른 조성물은 종양-특이성 (tumor-specific) 또는 병원균-특이성 면역 반응을 유발하기 위하여 사용된다. 본 개시에 따른 그러한 조성물 또는 백신은 항원을 제시하는 세포 (APC)의 면역 반응을 증가시키는데 특히 바람직하게 사용될 수 있다. 이와 같이 특히 바람직하게, 본 개시에 따른 조성물 또는 백신은 암 (cancer) 또는 종양 (tumor)의 치료를 위하여 사용될 수 있다.

[153] 또한, 본 개시에 따른 핵산 분자를 포함하는 조성물은 전염병을 치료 및/또는 예방하는데 사용될 수 있다. 상기 전염병은 인플루엔자, 말라리아, SARS, 황열 (yellow fever), AIDS, 라임보렐리오시스, 리슈만편모충증, 수막염, MERS, ZIKA, 첨형 콘딜로마 (Condyloma acuminata), 우묵한 사마귀 (hollow wart), 탕기열, 3일

열 (three-day fever), 에볼라바이러스, 감기, 초여름 뇌염 (FSME), 독감 (flu), 대상포진 (shingles), 간염, 단순포진 타입 I, 단순포진 타입 II, 대상 포진 (herpes zoster), 일본 뇌염, 라사열 (Lassa fever), 마르부르크 바이러스, 홍역, 수족구병, 단핵구증, 볼거리 (mumps), 노르윙크 바이러스 감염, 파이프 선열 (Pfeiffer's glandular fever), 천연두, 회색질척수염 (아동기 절름발이), 가막성 후두염 (pseudo-croup), 제 5 전염성 홍반병, 광견병, 사마귀, 웨스트 나일 열 (West Nile fever), 수두, 거세포성 (cytomegalic) 바이러스 (CMV)로부터 선택되거나, 유산 (전립선 염증), 탄저병, 충수염, 보렐리아증, 보툴리눔독소증, 캄필로박터 감염증 (Campylobacter), 클라미디아 트라코마티스 (Chlamydia trachomatis)(요도의 염증, 결막염), 콜레라, 디프테리아, 도너반증, 후두개염, 발진티푸스, 가스 괴저 (gas gangrene), 임질, 야생토끼병, 헬리코박터 파일로리, 백일해, 풍토 가래툼 (climatic bubo), 골수염, 리지오넬라 병, 나병, 리스테리아증, 폐렴, 수막염, 박테리아성 수막염, 탄저병, 중이염, 마이코플라스마 호미니스 (Mycoplasma hominis), 신생아 패혈증 (용모양막염), 괴저구내염, 파라티푸스, 플라그, 라이터 증후군, 록키산 홍반열, 살모넬라 파라티푸스, 살모넬라 티푸스, 성홍열, 매독, 과상풍, 트리퍼 (tripper), 찌꺼가무시 병, 결핵, 티푸스, 질염, 연성 궤양과 같은 박테리아성 전염병으로부터 선택되거나; 및 아메바증 (amoebiasis), 주혈흡충증 (bilharziosis), 샤가스 병 (Chagas disease), 무좀, 효모 곰팡이 반점 (yeast fungus spot), 옴 (scabies), 말라리아, 회선사상충증 (onchocercosis)(사상충증 (river blindness)), 또는 곰팡이성 질병, 독소포자충증, 트리코모나스증, 파동편모충증 (trypanosomiasis)(수면병), 내장 리슈마니아증, 기저귀 피부염, 주혈흡충증(schistosomiasis), 어독 (시가테라 독), 칸디다증, 피부 리슈마니아증, 람블편모충증 (giardiasis), 또는 수면병과 같은 기생충, 원충 또는 곰팡이에 의해 생긴 전염병으로부터 선택되거나; 또는 포낭충, 어조충 (fish tapeworm), 여우의 촌충 (fox tapeworm), 개의 촌충 (canine tapeworm), 이 (lice), 소의 촌충 (bovine tapeworm), 돼지의 촌충 (porcine tapeworm), 아주 작은 촌충 (miniature tapeworm)에 의해 생긴 전염병으로부터 선택될 수 있다.

[154] 또한, 본 개시에 따른 핵산 분자를 포함하는 조성물은 알레르기성 장애 또는 질병을 치료 및/또는 예방하는데 사용될 수 있다. 알레르기는 어떠한 외부의 항원 또는 알레르기 항원에 대한 비정상적인, 후천적인 면역학적 과민성을 전형적으로 포함하는 상태이다. 알레르기는 이러한 항원 또는 알레르기 항원에 대한 국부적 또는 전신성 염증 반응을 정상적으로 유발하며, 이러한 알레르기 항원에 대해 체내에서 면역을 유도한다. 이와 관련된 알레르기 항원은 예를 들어, 잔디, 꽃가루, 곰팡이, 약물, 또는 수많은 환경적 유발 등을 포함한다.

[155] 알레르기의 타입으로 잘 알려진 것은, 이들에 제한되지 않는, 알레르기성 천식 (비강 점막의 부기를 유발함), 알레르기성 결막염 (결막의 발적 및 가려움을 유발함), 알레르기성 비염 ("진초열"), 아나필락시스, 혈관 부종, 아토피성 피부염 (습진), 두드러기, 호산구증가증, 호흡, 곤충 자상 (insect stings)에 대한 알레르기,

피부 알레르기 (습진, 두드러기 및 (접촉) 피부염과 같은, 다양한 발진을 유발하며, 이들을 포함함), 음식 알레르기, 약에 대한 알레르기 등을 포함한다.

[156] 예를 들어, 본 개시에 따른 조성물은 단백질인 알레르기 항원 (예를 들면 고양이 알레르기 항원, 먼지 알레르기 항원, 쯤진드기 (mite) 항원, 식물 항원 (예를 들면 자작나무 항원) 등)로부터 유래하는 알레르기성 장애 또는 질환을 치료 및/또는 예방할 수 있다. 본 개시의 조성물은 과도한 면역 반응을 더 강한 Th₁ 반응으로 바꿀 수 있으며, 그에 따라 원하지 않는 IgE 반응을 억제하거나 약화시킬 수 있다.

[157] 또한, 본 개시에 따른 핵산 분자 및 금속 착화합물을 포함하는 조성물은 자가면역성 질병의 치료 및/또는 예방을 위해 사용될 수 있다. 자가면역성 질병은 전신적 또는 기관-특이적 자가면역 질병 또는 국부적 자가면역성 질병으로 나뉘어질 수 있다. 본 개시의 조성물에 의하여 치료 및/또는 예방될 수 있는 자가면역성 질병은 쇼그렌 증후군, 공피증, 류마티스 관절염 및 다발근육염을 포함하는 전신 증후군, 또는 내분비계 (DM 타입 1, 하시모토 갑상선염, 에디슨 병 등), 피부과 (심상성 천포창), 혈액학의 (자가면역성 용혈성 빈혈), 신경의 (다발경화증)이 될 수 있는 국소 적응 증후군의 카테고리 나뉘어질 수 있거나, 또는 체조직의 외접 물질 (circumscribed mass)을 포함할 수 있다. 치료되어야 하는 자가면역성 질병은 타입 I 자가면역성 질병, 타입 II 자가면역성 질병, 타입 III 자가면역성 질병 또는 타입 IV 자가면역성 질병으로 구성된 그룹으로부터 선택될 수 있다. 예를 들어, 다발경화증 (MS), 류마티스 관절염, 당뇨병, 타입 I 당뇨병 (diabetes mellitus), 전신 홍반성 루프스 (SLE), 만성 다발성관절염, 바세도우 병, 만성 간염의 자가면역 형태, 궤양성 대장염, 타입 I 알레르기 질병, 타입 II 알레르기 질병, 타입 III 알레르기 질병, 타입 IV 알레르기 질병, 섬유근육통, 탈모, 베크테레프 병, 크론 병, 중증 근육 무력증, 신경성 피부염, 류마티스 다발성 근통, 진행성 전신성 경화증 (PSS), 건선, 라이터 증후군, 류마티스성 관절염, 건선, 혈관염 등 또는 타입 II 당뇨병을 들 수 있다.

[158] 이하, 예시적인 실시형태를 통하여 본 개시를 설명하지만, 본 개시가 하기 실시예에 기재된 기술사상으로 한정되지 않는다.

[159] 제조예 1: RNA 핵산 분자 제조

[160] 콕사키바이러스 B3(CVB3)에서 유래한 IRES 요소를 가지는 RNA 플랫폼 인공 핵산 분자를 제작하였다. 주형 DNA 서열은 다음과 같이 설계하였다.

[161] 5' - BamHI인식 서열 - T7 promoter (서열식별번호: 6) - 다수 아데노신 (MA-50) - CVB3 5' UTR (서열식별번호: 1) - 발현향상서열(ATGGCAGCTCAA) - MCS로서 EcoRI-ClaI-SacI 인식 서열 - CVB3 3' UTR (서열식별번호: 4) - poly A 50 - NotI 인식 서열 - 3'.

[162] 각각의 코딩 영역의 표적 서열은, 각각의 RNA 플랫폼 내부로 MCS 삽입을 위한 제한효소 부위로 변환된 정방향 및 역방향 프라이머를 사용하여 증폭되었다. 각각의 코딩 영역의 표적 서열은 제한효소(New England Biolabs, USA)를

사용하여 RNA 플랫폼의 MCS 내부로 삽입되었다. *E. coli* DH5 α -competent 세포가 플라스미드 제조를 위해 사용되었고, 모든 플라스미드 클론은 제한효소 맵핑 및 직접 DNA 서열 분석(Cosmo Genetech, Korea)을 통하여 점검되었다. Transfection-등급 플라스미드는 LaboPass Plasmid Mini Purification Kit를 사용하여, 제조업자 매뉴얼(Cosmo Genetech)에 따라 수득되었다. 주형 DNA는 pGH 벡터 내부로 cloning되었고, 제한효소를 사용하여 선형화되었다. 시험관 전사(IVT)는 Ribomax Large-scale RNA Production System T7 (Promega, USA)를 사용하여 수행되었다.

- [163] 시험관 전사를 위하여, 모든 RNA 플랫폼은 NotI로 선형화되었다. 3 μ g의 NotI-절단 플라스미드, T7 전사 버퍼(5x), 25 mM rNTP, nuclease-free water, T7 효소 혼합물을 함유하는 전사 반응은 37°C에서 4시간 동안 incubation되었다. 전사체는 플라스미드 DNA 1 μ g RNase-free DNase I (Promega) 1 μ l를 사용하여 37°C에서 15분 동안 incubation하고, 10분 동안 65°C에서 다시 incubation하여 반응을 종료시켰다. 제조자의 지시에 따라, high yield RNA ultra-purification kit (RBC, 대만)을 사용하여 RNA를 정제하는 동안, 임의의 DNA 오염을 제거하기 위하여 DNase I 처리(Promega)를 수행하였다. DNA 및 RNA의 순도 및 농도는 NanoDrop-2000 spectrophotometer (Thermo Fisher-Scientific, USA)를 사용하여 평가하였다. 본 제조예에 따라 제조된 RNA 핵산 분자를 "pMA-CVB3-MCS"로 지칭한다.
- [164] 제조예 2: RNA 핵산 분자 제조
- [165] 다음과 같이 뇌심근염바이러스(EMCV)에서 유래한 IRES 요소를 가지는 주형 DNA를 사용한 것을 제외하고 제조예 1과 동일한 절차를 반복하여 RNA 플랫폼의 인공 핵산 분자를 제조하였다. 본 제조예에 따라 제조된 핵산 분자를 "pMA-EMCV-MCS"로 지칭한다.
- [166] 5' - EcoRI인식 서열 - T7 promoter (서열식별번호: 6) - 다수 아데노신 (MA-50) - EMCV 5' UTR (서열식별번호: 2) - MCS로서 ClaI-PacI-SacI 인식 서열 - EMCV 3' UTR (서열식별번호: 5) - poly A 50 - NotI 인식 서열 - 3'.
- [167] 제조예 3: RNA 핵산 분자 제조
- [168] 다음과 같이 귀뚜라미마비바이러스(CrPV)에서 유래한 IRES 요소를 가지는 주형 DNA를 사용한 것을 제외하고 제조예 1과 동일한 절차를 반복하여 RNA 플랫폼의 인공 핵산 분자를 제조하였다. 본 제조예에 따라 제조된 핵산 분자를 "pMA-CrPV-MCS"로 지칭한다.
- [169] 5' - BamHI인식 서열 - T7 promoter (서열식별번호: 6) - 다수 아데노신 (MA-50) - CrPV IGR IRES (서열식별번호: 3) - MCS로서 BamHI-EcoRI-PacI-SacI 인식 서열 - SV40 후기 폴리아데닐레이션 신호 서열 (서열식별번호: 7) - NotI 인식 서열 - 3'.
- [170] 제조예 4: RNA 핵산 분자 제조
- [171] T7 promoter와 CVB3 5' UTR 사이에 50개의 아데노신(MA-50)을 대신하여 50개의 티미딘(MT-50)을 삽입한 주형 DNA를 사용한 것을 제외하고 제조예 1의

절차를 반복하여 RNA 플랫폼의 인공 핵산 분자를 제조하였다. 본 제조예에 따라 제조된 핵산 분자를 "pMT-CVB3-MCS"로 지칭한다.

[172] 제조예 5: RNA 핵산 분자 제조

[173] T7 promoter와 EMCV 5' UTR 사이에 50개의 아데노신(MA-50)을 대신하여 50개의 티미딘(MT-50)을 삽입한 주형 DNA를 사용한 것을 제외하고 제조예 2의 절차를 반복하여 RNA 플랫폼의 인공 핵산 분자를 제조하였다. 본 제조예에 따라 제조된 핵산 분자를 "pMT-EMCV-MCS"로 지칭한다.

[174] 제조예 6: RNA 핵산 분자 제조

[175] T7 promoter와 CrPV IGR IRES 사이에 50개의 아데노신(MA-50)을 대신하여 50개의 티미딘(MT-50)을 삽입한 주형 DNA를 사용한 것을 제외하고 제조예 1의 절차를 반복하여 RNA 플랫폼의 인공 핵산 분자를 제조하였다. 본 제조예에 따라 제조된 핵산 분자를 "pMT-CrPV-MCS"로 지칭한다.

[176] 제조예 7: RNA 핵산 분자 제조

[177] T7 promoter와 CVB3 5' UTR 사이에 50개의 아데노신(MA-50)을 삽입하지 않은 DNA를 사용한 것을 제외하고 제조예 1의 절차를 반복하여 RNA 플랫폼의 인공 핵산 분자를 제조하였다. 본 제조예에 따라 제조된 핵산 분자를 "pCVB3-MCS"로 지칭한다.

[178] 제조예 8: RNA 핵산 분자 제조

[179] T7 promoter와 EMCV 5' UTR 사이에 50개의 아데노신(MA-50)을 삽입하지 않은 주형 DNA를 사용한 것을 제외하고 제조예 2의 절차를 반복하여 RNA 플랫폼의 인공 핵산 분자를 제조하였다. 본 제조예에 따라 제조된 핵산 분자를 "pEMCV-MCS"로 지칭한다.

[180] 제조예 9: RNA 핵산 분자 제조

[181] T7 promoter와 CrPV IGR IRES 사이에 50개의 아데노신(MA-50)을 삽입하지 않은 주형 DNA를 사용한 것을 제외하고 제조예 1의 절차를 반복하여 RNA 플랫폼의 인공 핵산 분자를 제조하였다. 본 제조예에 따라 제조된 핵산 분자를 "pCrPV-MCS"로 지칭한다.

[182] 실시예 1: 면역학적 분석

[183] 제조예 1 내지 제조예 9에서 각각 제조된 RNA 플랫폼 핵산 분자를 1주일의 간격을 두고 총 2회에 걸쳐 6주령 C57BL/6 마우스에 주입하여, 면역하였다. 항원으로 MERS-CoV soluble spike 단백질(서열식별번호: 15, MERS S protein)을 가지는 백신(SK Bioscience)을 5 μ g 주입하였고, 제조예 1-9에서 제조된 핵산 분자 20 μ g과 alum 120 μ g을 근육주사를 통해 주입하였다. 면역 그룹은 하기 표 1과 같이 총 12개의 그룹(G1~G12)으로 구분하였다.

[184]

[표1]

핵산 분자 및 인플루엔자 단백질

그룹	면역 물질
G1	PBS (60 $\mu\ell$)
G2	MERS S protein
G2	MERS S protein + Alum
G4	MERS S protein + Alum + pMA-pCVB3-MCS
G5	MERS S protein + Alum + pMA-EMCV-MCS
G6	MERS S protein + Alum + pMA-CrPV-MCS
G7	MERS S protein + Alum + pMT-CVB3-MCS
G8	MERS S protein + Alum + pMT-EMCV-MCS
G9	MERS S protein + Alum + pMT-CrPV-MCS
G10	MERS S protein + Alum + pCVB3-MCS
G11	MERS S protein + Alum + pEMCV-MCS
G12	MERS S protein + Alum + pCrPV-MCS

- [185] 2차 면역 2주 후에 마우스 혈청에서 항원으로 주입된 MERS-CoV spike 단백질에 특이적인 IgG1과 IgG2c 면역글로불린의 양을 ELISA 기법을 이용하여 분석하였다. 96-well plate (Corning®)을 JEV envelope 단백질로 코팅하고, 4°C에서 밤새 incubation하였다. 단백질이 코팅된 well을 200 $\mu\ell$ blocking buffer (PBS - 1% BSA)를 사용하여 1시간 동안 상온에서 차단하고, 희석된 혈청 샘플을 plate에 첨가하고 상온에서 1시간 동안 incubation하였다. Well을 200 $\mu\ell$ PBS-T (PBS-0.05% tween 20)을 사용하여 3회 세척한 뒤, 항-마우스 IgG1-HRP 또는 IgG2c-HRP가 접합된(conjugated) 항체와, PBS에서 1:1,000~1:10,000으로 희석시킨 IgG1-바이오틴 항체와 항-IgG2c-HRP을 플레이트에 첨가하고 상온에서 1시간 동안 incubation하였다. PBS-T로 3회 세척한 뒤, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) 기질을 첨가하고 15분 동안 incubation한 뒤, 반응을 종료하기 위하여 2N H₂SO₄를 사용하였다. O.D값은 GloMax explorer microplate reader (Promega)를 사용하여 450 nm에서 측정하였다. 본 실시예에 따른 분석 결과를 도 3 및 도 4에 나타낸다. 도 3에 나타낸 바와 같이, MERS-CoV 항원만을 주입한 그룹(G2)에 비하여, alum을 제재화 한 그룹(G3)와 핵산 분자를 제재화한 그룹(G4-G12)에서 Th₂ 면역 반응과 관련이 있는 IgG1 수준은 높았다. 이는 코딩 영역 없이 바이러스 유래 IRES만을 포함한 핵산 분자가 Th₂ 면역 반응, 즉 체액성 면역을 유도하는 면역 자극 인자로 기능하는 것을 의미한다. 또한, 도 4에 나타낸 바와 같이, Th₁ 면역 반응을 주로 나타내는 면역글로불린인

IgG2c의 수준은 alum으로 제제화한 그룹(G3)에 비하여, RNA 핵산 분자를 주입한 그룹(G6, G7, G8, G10, G12)에서 높았다. 바이러스성 IRES만을 포함하는 핵산 분자가 Th₁ 면역 반응과 Th₂ 면역 반응을 통하여 T세포 활성화를 유도하는 면역 자극인자로 기능할 수 있다는 것을 알 수 있다.

[186] 제조예 10: RNA 핵산 분자 제조

[187] 귀뚜라미마비 바이러스(CrPV)와 뇌심근염바이러스(EMCV)에서 각각 유래한 IRES 요소를 가지는 다중 발현카세트의 RNA 플랫폼 인공 핵산 분자를 제작하였다. 주형 DNA 서열은 다음과 같이 설계하였고, 그 외에는 제조예 1과 동일한 절차를 반복하였다. 본 제조예에 따라 제조된 핵산 분자를 "pCrPV-HA-EMCV-HA"로 지칭한다.

[188] 5' - BamHI 인식 서열 - T7 promoter (서열식별번호: 6) - CrPV IGR IRES (서열식별번호: 3) - EcoRI 인식 서열 - 제 1 코딩 영역으로 인플루엔자 바이러스의 haemagglutinin (HA) 암호화 서열 (서열식별번호: 9; 5' 말단에 ATG 및 3' 말단에 TGA 추가) - MCS로서 ClaI-MluI-SacI 인식 서열 - EMCV 5' UTR (서열식별번호: 2) - MCS로서 EcoRV-SalI-PacI 인식 서열 - Kozak 서열 (GACC) - 제 2 코딩 영역으로 인플루엔자 바이러스의 HA 암호화 서열 (서열식별번호: 10; 3' 말단에 TGA 추가) - MCS로서 PacI-SacII 인식 서열 - SV40 폴리아데닐레이션 신호 서열 (서열식별번호: 7) - NotI 인식 서열 - 3'.

[189] 제조예 11: RNA 핵산 분자 제조

[190] 다음과 같이 콕사키바이러스 B3 (CVB3)와 뇌심근염바이러스(EMCV)에서 각각 유래한 IRES 요소를 가지는 다중 발현카세트의 주형 DNA를 사용한 것을 제외하고 제조예 1과 동일한 절차를 반복하여 RNA 플랫폼의 인공 핵산 분자를 제조하였다. 본 제조예에 따라 제조된 핵산 분자를 "pMA-CVB3-HA-EMCV-HA"로 지칭한다.

[191] 5' - BamHI 인식 서열 - T7 promoter (서열식별번호: 6) - HpaI 인식 서열 - 50개의 아데노신 (MA) - HpaI 인식 서열 - CVB3 5' UTR (서열식별번호: 1) - EcoRI 인식 서열 - Kozak 서열 - 제 1 코딩 영역으로 인플루엔자 바이러스의 haemagglutinin (HA) 암호화 서열 (서열식별번호: 10; 3' 말단에 TGA 추가) - MCS로서 ClaI-MluI-SacI 인식 서열 - EMCV 5' UTR (서열식별번호: 2) - MCS로서 EcoRV-SalI-PacI 인식 서열 - Kozak 서열 (GACC) - 제 2 코딩 영역으로 인플루엔자 바이러스의 HA 암호화 서열 (서열식별번호: 10; 3' 말단에 TGA 추가) - MCS로서 PacI-SacII 인식 서열 - CVB3 3' UTR (서열식별번호: 4) - 50개의 아데노신 (poly A tail) - NotI 인식 서열 - 3'.

[192] 실시예 2: 면역학적 분석

[193] 제조예 10 및 제조예 11에서 각각 제조된 RNA 플랫폼 핵산 분자를 2주일의 간격을 두고 총 3회에 걸쳐 6주령 C57BL/6 마우스에 주입하여, 면역하였다. 비교를 위하여 PBS, inactivated PR8 influenza virus (iPR8; 서열식별번호: 16), Alum (aluminum hydroxide), protamine, LNP (lipid nano particle, 지질나노입자)도

동일한 면역 스케줄에 따라 마우스에 주입하였다.

- [194] 면역 그룹은 하기 표 2와 같이 총 11개의 그룹으로 구분하였다. 항원으로 사용된 iPR8 virus는 2.5×10^5 pfu/50 μ l/mice로 처리하였고, alum은 5 μ g 당 120 μ g/mice를 넣어 formulation(제제화)하여 마우스에 면역하였다. 면역에 사용된 RNA 플랫폼 형태의 핵산 분자는 각각 50 μ g/mice로 면역하였으며, 일부 핵산 분자는 25 μ g의 protamine으로 formulation하여 (RNA: Protamine ratio = 2: 1) 마우스에 면역에 이용하였다. 또한, 근육 주사에서 면역 물질의 부피 (volume)는 LP를 주입할 때 120 μ l/mice인 것을 제외하면 모두 100 μ l/mice이었고, 비장 주사에서 부피는 45 μ l/mice로 수행되었다.

- [195] [표2]

핵산 분자의 제제화 및 인플루엔자 단백질

그룹	I.M					EP				I.M.	
	PBS	HA 1	HA2	HA3	HA4	HA5	HA6	HA7	HA8	HA9	HA10
iPR8	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Alum	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
NA1	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-
NA2	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+
Protamine	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
LNP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

I.M: Intramuscular Injection; EP: Electroporation; NA1: pCrPV-HA-EMCV-HA; NA2: pMA-CVB3-HA-EMCV-HA

- [196] 3차 면역 8일 후 (약 2주) challenge를 수행하였고, challenge 4일 후 (확연한 체중감소가 일어났을 때) sacrifice한 마우스의 비장에서 얻은 비장세포(1×10^6 /100 μ l/well; 96 well plate)에 MHC I 펩타이드와 recombinant iPR8 단백질을 2 μ g (well당)을 처리하여 stimulation하고, 2일 후 얻은 HA specific Th₁ cell (IFN- γ secretion; IL-4)을 ELISPOT(Mabtech)을 이용하여 분석하였고, stimulation하고, 3일 후 얻은 culture supernatant의 cytokine을 ELISA kit (eBioscience)를 이용하여 분석하였다. ELISPOT 분석 결과를 도 5에, ELISA 분석 결과를 도 6 및 도 7에 각각 나타낸다.

- [197] 도 5에 나타낸 바와 같이, MHC I peptide로 stimulation 한 경우, 항원인 iPR8에 alum을 formulation한 HA2 그룹과 비교해서, iPR8 바이러스에 핵산 분자를 함께 처리한 HA3, HA4 그룹에서 더 높은 수치의 IL-4를 분비하는 T cell population이 증가하였다. 도 6 및 도 7에 나타낸 바와 같이, peptide stimulation 하였을 때는 positive control인 iPR8 virus를 alum과 함께 formulation한 그룹 (HA2)의 경우에는

IL-6 및 IFN- γ 의 발현 수준이 높지 않으나, iPR8 virus에 핵산 분자를 함께 처리한 그룹(HA3, HA4)에서 IL-6 및 IFN- γ 의 발현 수준이 크게 증가하였다.

[198] 제조예 12: RNA 핵산 분자 제조

[199] 다음과 같이 귀뚜라미바이러스(CrPV)에서 유래한 IRES 요소를 가지는 단일 발현카세트의 주형 DNA를 사용한 것을 제외하고 제조예 10과 동일한 절차를 반복하여 RNA 플랫폼의 인공 핵산 분자를 제조하였다. 본 실시예에 따라 제조된 핵산 분자를 "pCrPV-JEV"로 지칭한다.

[200] 5' - KpnI 인식 서열 - T7 promoter (서열식별번호: 5) - CrPV IGR IRES (서열식별번호: 1) - BamHI 인식 서열 - 코딩 영역으로 JEV envelope 단백질 암호화 서열 (서열식별번호: 11) - MCS로서 PacI-SacI 인식 서열 - SV40 폴리아데닐레이션 신호 서열 (서열식별번호: 7) - NotI 인식 서열 - 3'.

[201] 실시예 3: 면역학적 분석

[202] 제조예 12에서 제조된 핵산 분자에 안정화제로서 화학식 2의 CA-1과 CA-2를 제제화한 약학 조성물을 2주일의 간격을 두고 2회 BALB/c 마우스(대한바이오링크)에 근육주사로 주입하여 면역하였다. 항원으로서 JEV envelope 단백질(Nakayama strain; GenBank: AF272392.1)이 포함된 subunit 백신(International Vaccine Institute)을 5 μ g 주입하였고, 그룹에 따라 pCrPV-JEV 핵산 분자를 20 μ g, 안정화제인 CA-1를 22.3 μ g, CA-2를 23.1 μ g, 인간 alum 120 μ g를 주입하였고, 비교를 위하여 protamine(Sigma Aldrich) 16 μ g, LP (지방 사슬을 가지는 양이온성 펩타이드) 9.6 μ g를 마우스에 각각 주입하였다. 면역 그룹은 표 3과 같이 총 9개의 그룹의 구분하였다.

[203] [표3]

핵산 분자의 제제화 및 JEV 단백질

그룹	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9
JEV Envelope	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Alum	-	-	+	-	+	+	+	+	+
pCrPV-JEV	-	-	-	+	+	+	+	+	+
안정화제	-	-	-	-	-	P	LP	CA-1	CA-2
P: protamine									

[204] 면역시킨 마우스의 혈청을 이용하여, 실시예 1과 동일한 절차에 따라 면역글로불린의 수준을 ELISA 기법을 이용하여 분석하였다. 1차 면역 후에 안정화제를 사용하지 않은 그룹 (G5)와 비교해서 금속 착화합물 형태의 안정화제인 CA-1과 CA-2를 첨가한 그룹(G8, G9)에서 IgG1의 생산이 증가하였고(도 8), 2차 면역 2주 후에 안정화제인 CA-1을 첨가한 그룹(G8)에서 Th₁ 면역 반응과 관련 있는 IgG2a의 생산이 크게 증가하였다(도 9).

[205] 제조예 13 RNA 핵산 분자 제조

[206] 코딩 영역의 표적 서열로서 JEV envelope 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 대신하여, MERS-CoV의 soluble spike 단백질을 암호화하는 핵산 서열(서열식별번호: 8; 5' 말단에 ATG 추가)을 사용한 것을 제외하고 제조예 12와 동일한 절차를 반복하여 RNA 플랫폼의 인공 핵산 분자를 제조하였다. 본 실시예에 따라 제조된 핵산 분자를 "pCrPV-MERS"로 지칭한다.

[207] 실시예 4: 약학 조성물의 물리적 특성 평가

[208] (1) N/P 비율(N/P ratio)에 따른 제타 전위(Zeta potential) 측정

[209] 제조예 13에서 제조된 핵산 분자(pCrPV-MERS)와 안정화제로서 화학식 2의 CA-1과 CA-2가 제제화된 착물로서의 약학 조성물을 초-순수에서 다른 N/P 비율을 가지도록 제조하였다. Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments)를 사용하여 제타 전위를 측정하였다. 측정 결과는 도 10에 표시되어 있다. N/P 비율의 절대값이 큰 1.8, 2.0인 약학 조성물을 배양된 Human peripheral blood mononuclear cells (hPBMC; Zen Bio)에 처리하여 사이토카인의 유도를 점검하였다. N/P 비율의 -ve 전하와 +ve 전하는 사이토카인의 유도에 영향을 미치지 않고, 안정화제 자체는 사이토카인을 유도하지 않았다(데이터 미도시). 이에 따라, 마우스를 면역하기 위하여 RNA 핵산 분자와 안정화제 사이의 NP 비율이 1.8(-ve 전하) 및 2.0(+ve 전하)인 것을 다음 실시예에서 사용하였다.

[210] 이어서, RNA 핵산 분자와 안정화제 사이에 착화가 성공적으로 이루어졌는지를 확인하기 위하여 원자력현미경(AFM)을 사용하여 평가하였다. RNA-안정화제를 RNase-free water에서 희석시키고 절단된 미카 기판(Pelco Mica Sheets, Ted Pella Corp.) 상에 증착시킨 뒤에 밤새 incubation하였다. 미카 표면을 RNase-free water로 씻어낸 뒤 질소 가스를 사용하여 즉시 건조시켰다. 생성된 샘플을 AC-240TS tip이 구비된 Park NX-10 ADM (Park Systems Corp.) 상에서 non-contact mode에서 스캐닝 하였다. 분석 결과를 도 11에 나타낸다. 안정화제인 CA-1로 제제화 된 RNA 면역증강제는 대략 100 nm 직경을 가지는 큰 구형 구조를 보여주었고, LP로 제제화 된 RNA 면역증강제는 대략 50 nm 크기의 구형 구조를, 안정화제가 없는 RNA 면역증강제는 대략 25 nm 크기의 구형 구조를 보여주었다. 이는 안정화제로 사용된 금속 착물인 CA-1이 RNA 면역증강제와 전하 상호작용을 통하여 성공적으로 complex를 형성하였으며, 전문 항원 제시 세포(profession antigen presenting cell)가 해당 complex를 쉽게 받아들일 수 있다는 것을 의미한다.

[211] 실시예 5: 면역학적 분석

[212] 제조예 13에서 제조된 핵산 분자에 안정화제로서 화학식 2의 CA-1을 제제화한 약학 조성물을 1회 6주령의 C57BL/6 마우스(대한바이오링크)에 근육주사로 주입하여 면역하였다. 항원으로서 MERS-CoV Soluble spike 단백질(서열식별번호: 15; MERS S 단백질; MERS-CoV EMC/2012 strain; GenBank: AF88936.1)이 포함된 백신(International Vaccine Institute)을 1 μ g

주입하였고, 그룹에 따라 pCrPV-MERs 핵산 분자를 20 μ g, 안정화제인 CA-1를 46 μ g, aluminum alum(Thermo scientific) 500 μ g을 주입하였고, 비교를 위하여 LP (지방 사슬을 가지는 양이온성 펩타이드) 19 μ g을 마우스에 각각 주입하였다. 면역 그룹은 표 4와 같이 총 8개의 그룹의 구분하였다.

[213] [표4]

핵산 분자의 제제화 및 MERS Soluble spike 단백질

그룹	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8
MESR S 단백질	-	+	+	+	+	+	+	+
Alum	-	-	+	-	-	-	-	-
pCrPV-MERS	-	-	-	+	+	+	+	+
안정화제	-	-	-	-	LP	LP	CA-1	CA-1
N/P 비율					1.8	2.0	1.8	2.0

[214] 실시예 3과 동일한 절차를 반복하여 면역 2주 후 마우스의 혈청에서 항원으로 주입된 MERS soluble spike 단백질에 특이적인 IgG1과 IgG2c 면역글로불린의 양을 ELISA 기법을 이용하여 분석하였다. 분석 결과를 도 12에 나타낸다. Th₂ 면역 반응과 관련된 면역글로불린인 IgG1의 수준은 G3~G8 그룹에서 큰 차이가 없었다. 하지만, Th₁ 면역 반응과 관련된 면역글로불린인 IgG2c 수준은 LP 및 CA-1로 안정화시킨 RNA 면역증강제를 주입한 그룹(G5~G8)에서 현저하게 증가하였다. 또한, N/P 비율은 IgG1 및 IgG2c의 발현을 유도하는데 아무런 영향을 미치지 못하였다. RNA 면역증강제와 안정화제를 제제화할 때 -ve N/P 비율이 1.8인 것을 사용하여 후속 면역학적 분석을 수행하였다.

[215] 실시예 6: 면역학적 분석

[216] 제조예 13에서 제조된 핵산 분자에 안정화제로서 화학식 2의 CA-1을 제제화한 약학 조성물을 1회 6주령 hDPP4-transgenic 마우스(박성균 박사, 한국생명공학연구원)에 근육주사로 주입하여 면역하였다. 항원으로서 MERS-CoV Soluble spike 단백질(서열식별번호: 15; MERS S 단백질)이 포함된 백신을 1 μ g 주입하였고, 그룹에 따라 pCrPV-MERs 핵산 분자를 20 μ g, 안정화제인 CA-1를 46 μ g, alum(Brentanne) 24 μ g을 주입하였고, 비교를 위하여 LP (지방 사슬을 가지는 양이온성 펩타이드) 19 μ g을 마우스에 각각 주입하였다. 면역 그룹은 표 5와 같이 총 7개의 그룹으로 구분하였다.

[217]

[표5]

핵산 분자의 제제화 및 MERS Soluble spike 단백질

그룹	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7
MESR S 단백질	-	+	+	+	+	+	+
Alum	-	-	+	-	+	+	+
pCrPV-MERS	-	-	-	+	+	+	+
안정화제	-	-	-	-	-	LP	CA-1
N/P 비율						1.8	1.8

[218] (1) Plaque reduction neutralization test

[219] MERS-CoV spike 단백질로 감염된 hDDP4 Tg 마우스의 혈청을 무혈청 배지를 사용하여 1:10에서 1:5120까지 연속하여 희석시켰다. 100 PFU MERS-CoV를 희석시킨 샘플과 혼합하여 바이러스-혈청 혼합물을 제조하고 1시간 동안 37°C에서 incubation하였다. 바이러스-혈청 혼합물을 Vero 세포에 접종시켰다. 플레이트를 5% CO₂에서 1시간 동안 37°C에서 incubation하였다. 바이러스가 흡착된 뒤, agar overlay 배지를 첨가하고, 플레이트를 5% CO₂에서 3일 동안 37°C에서 incubation하였다. 세포를 0.1% crystal violet 용액(Sigma)으로 염색하고, 플라크를 눈으로 계수하였다. 중화 백분율은 감소 값을 나타내는데, 이는 100 X 100 PFU 바이러스 감염된 well내의 플라크 개수/ 바이러스-혈청 혼합물 감염된 well에서 플라크 개수로 연산되었다. 분석 결과를 도 13에 나타낸다. CA-1로 제제화 된 약학 조성물을 사용한 그룹(G7)에서 Th₂ 면역 반응과 관련된 중화항체가 수준이 가장 높았다.

[220] (2) 마우스 생존율 평가

[221] 면역 3주 후, 면역 마우스를 MERS 바이러스 (5,000 PFU/mouse)로 challenge 한 뒤, 마우스의 생존율을 평가하였다. 평가 결과를 도 14에 나타낸다. CA-1로 제제화 한 약학 조성물로 면역한 그룹(G7)은 100%의 생존율을 보여주었다. Alum을 함께 사용하여 면역한 그룹(G5)과 LP로 제제화 한 약학 조성물로 면역한 그룹(G6)은 90%의 생존율을 보였고, alum 또는 핵산 분자 중에서 하나만을 사용한 그룹(G3, G4)은 약 70%의 생존율을 보여주었다.

[222] 실시예 7: 면역학적 분석

[223] 제조예 13에서 제조된 핵산 분자(pCrPV-MERS)와 화학식 2의 CA-1 등이 제제화 된 착물로서의 약학 조성물을 5~6세의 필리핀원숭이(Cynomolgus macaques)에 면역시켰다. 9마리의 원숭이를 3개의 그룹으로 구분하여, MERS-CoV spike 단백질 백신 100 µg만으로 면역시킨 그룹(G1), MERS-CoV spike 단백질 백신 100 µg에 2.4 mg의 alum을 함께 면역시킨 그룹(G2), MERS-CoV spike 단백질 백신 100 µg에 안정화제로서 화학식 2의 CA-1로 제제화 한 RNA 핵산(pCrPV-MERS) 200 µg과 2.4 mg alum을 동시에 면역시킨 그룹(G3)의 3개

그룹으로 구분하고, 1회 근육주사로 주입하여 면역시켰다. 면역 2주 후에, 혈액 샘플을 얻었다. 혈액 샘플링과 면역 과정에서의 근육주사를 할 때 ketamine (10 mg/kg)이 주입되었다.

[224] (1) ELISA 분석

[225] 면역 2주일이 지난 뒤, 원숭이의 혈장에서 항원 특이적 총 IgG과 IgM의 수준을 ELISA를 이용하여 분석하였다. 96-well plate membrane (Thermo Scientific)을 MERS-CoV spike 단백질 50 ng/well로 코팅하고 밤새 4°C에서 incubation하였다. Well을 200 μ l blocking buffer (PBS-0.05% Tween20-10% FBS)를 사용하여 상온에서 1시간 동안 차단하였다. 희석시킨 혈장을 플레이트에 첨가하고, 상온에서 2시간 incubation하였다. Well을 200 μ l PBS-T를 사용하여 6회 세척하였다. Blocking buffer에서 1:10,000으로 희석된 항-원숭이 IgG/IgM-HRP 접합된 항체를 첨가하고, 플레이트를 상온에서 1시간 incubation하였다. PBS-T로 6회 세척하고, TMB 기질을 첨가하고, 15분 동안 incubation한 뒤, 반응을 종료시키기 위하여 2N H₂SO₄를 첨가하였다. ELISA plate reader (Epoch, Bio-Tek Instruments, Inc.)를 사용하여 450 nm에서 O.D 값을 측정하였다. 면역증강제로서 핵산 분자를 CA-1로 안정화시킨 약학 조성물로 면역시킨 그룹(G3)에서 면역글로불린 수준이 크게 증가하였다(도 15).

[226] (2) Double color enzymatic ELISPOT

[227] PBMC는 다음과 같은 방법으로 분리하였다. 면역 후 0주와 2주 지난 시점에서 혈액을 채집하기 위해 EDTA 튜브를 사용하였다. PBMC는 Ficoll-Hypaque (Lymphoprep; Axis-Shield, 1114545)를 사용하여 20분 동안 서서히 가속시키면서 4000 rpm에서 원심분리하여 분리하였다. PBMC 내에 존재하는 적혈구 세포(RBC)는 상온에서 5분 동안 ACK lysis 버퍼(Gibco)를 사용하여 lysis시킨 뒤에, FACS 버퍼(2% FBS를 가지는 1X PBS)로 1회 세척하였다. 10% FBS와 penicillin/streptomycin (1X)로 보강된 RPMI에서 다시 세포를 현탁시켰다.

[228] 96-well plate (Millipore) 내의 high protein 결합 PVDF 필터 membrane을 10 μ g/ml 항-원숭이 IgG, IgA, IgM (H&L) goat antibody (Rockland)와 MERS spike 단백질로 코팅하고 밤새 4°C에서 incubation한 뒤, well을 PBS로 1회 세척하였다. 현탁시킨 PBMC를 200 μ l CTL-TEST™ B Medium에 plate한 뒤, 5% CO₂에서 4시간 37°C에서 incubation하였다. Well을 200 μ l PBS로 2회 세척하고, 다시 200 μ l PBS-0.05% Tween 20 (PBS-T)로 2회 세척하였다. PBS-0.05% Tween 20-1% FBS (PBS-T-F)에서 1:1,000으로 희석시킨, 항-원숭이 IgG-FITC 접합 항체와 IgM-바이오틴 접합 항체(Rockland)를 각각의 well에 첨가하고, 상온에서 2시간 incubation하였다. 200 μ l PBS-T로 well을 2회 세척하고, PBS-T-F에서 1:1,000으로 희석시킨 FITC-HRP 항체와 Strep-AP(CTL)을 첨가하였다. 상온에서 1시간 incubation한 뒤, 200 μ l PBS-T로 well을 2회 세척하고 다시 증류수로 2회 세척하였다. Incubation한 뒤, developer 용액(CTL)을 각각의 well에 첨가하고 상온에서 15분 incubation하였다. 반응을 종료하기 위하여 well을 수돗물로

세척하였다. Membrane이 완전히 건조되면, spot을 스캐닝하고, immunospot CTL reader (S6 Universal analyzer)를 사용하여 계수하였다. 단백질 특이적인 항체 분비 세포(antibody secreting cells, ASCs)를 나타내는 특정 면역글로불린을 분비하는 세포의 개수를 ELISPOT을 사용하여 검출한 결과를 보여주는 도 16에 나타낸 것과 같이, G3 그룹은 IgG을 분비하는 ASC의 개수가 $68 \pm 47.9/\text{million}$ 이었고, G2 그룹은 IgG을 분비하는 ASC의 개수가 $27 \pm 24.2/\text{million}$ 이었다. 또한, 모든 그룹에서 상대적으로 약한 단백질-특이적 IgM 분비 세포 반응이 관찰되었다(G1: 검출되지 않음; G2: 2.7 ± 2.9 ; G3: 0.7 ± 0.6).

[229] (3) 중화항체가 분석

[230] 실시예 5와 동일한 방법에 따라 plaque reduction neutralizing test(PRNT)를 사용하여 중화항체가 분석을 진행하였다. 분석 결과를 도 17에 나타낸다. G3 그룹에서 중화항체가 약간 높게 측정되었다.

[231] 제조예 14: RNA 핵산 분자 제조

[232] 다음과 같이 단일 발현카세트의 주형 DNA를 사용하고, 제조예 3과 동일한 절차를 반복하여 RNA 플랫폼의 인공 핵산 분자를 제조하였다. 본 실시예에 따라 제조된 핵산 분자를 "pCrPV-VZV"로 지칭한다.

[233] 5' - KpnI 인식 서열 - T7 promoter (서열식별번호: 6) - CrPV IGR IRES (서열식별번호: 2) - MCS로서 BamHI-EcoRI-PacI 인식 서열 - 코딩 영역으로 VZV(Varicella-Zoster virus) gE 암호화 서열 (서열식별번호: 12; 5' 말단에 ttaattaa 삽입, 3' 말단에 gagctctaa 삽입) - SacI 인식 서열 - SV40 폴리아데닐레이션 신호 서열 (서열식별번호: 7) - NotI 인식 서열 - 3'.

[234] 실시예 8: 면역학적 분석

[235] 제조예 14에서 제조된 RNA 핵산 분자에 안정화제로서 화학식 2의 CA-1을 제제화 한 약학 조성물을 C57BL/6 마우스에 근육주사로 주입하여 면역하였다. 먼저, VZV seropositive 개체의 면역 시스템을 모방하기 위하여, 항원으로 사용될 제조합 VZV gE 단백질(Oka/SK strain 중 262-927 뉴클레오타이드에서 발현; GenBank: AF272392.1; CHO 세포에서 발현 벡터를 사용하여 발현됨; SK Bioscience)을 포함하는 생-약독화 VZV 백신(Oka/SK strain; SKyZoster, SK Bioscience) 2000 PFU를 사용하여 6주령 C57BL/6 마우스를 1차 항원투여(priming)하였다. 1차 항원투여 처리된 마우스를 "LAV priming"로 지칭한다. 1차 항원투여 후 35일 후에, 4주일의 간격을 두고, 그룹에 따라 항원인 VZV gE 단백질이 포함된 백신 10 μg , RNA 핵산 분자(pCrPV-VZV) 20 μg , CA-1 46 μg 을 마우스에 근육주사를 통하여 2회 면역시켰다. 면역 그룹은 표 6과 같이 5개의 그룹으로 구분하였다.

[236]

[표6]

핵산 분자의 제제화 및 VZV gE 단백질

그룹	G1	G2	G3	G4	G5
LAV priming	-	+	+	+	+
VZV gE 단백질	-	-	+	+	+
pCrPV-VZV	-	-	-	+	+
안정화제	-				CA-1

[237] (1) ELISA 분석

[238] 2차 면역 4주 후, 면역시킨 마우스의 혈청을 이용하여 ELISA 분석을 수행하였다. 항원만으로 면역시킨 그룹(G3)과 비교해서, 핵산 분자를 함께 면역시킨 그룹(G4, G5)에서 IgG1 및 IgG2a의 수준이 크게 증가한 것을 확인하였다(도 18).

[239] (2) ELISPOT 분석

[240] 2차 면역 4주 후에 면역시킨 비장세포에서, VZV gE 단백질에 특이적인 사이토카인으로서, Th₁ 면역 반응과 관련된 사이토카인인 IFN- γ 와 IL-2 사이토카인을 분비하는 세포의 개수를 분석하였다. 항원만으로 면역시킨 그룹(G3)과 비교해서, 핵산 분자를 함께 면역시킨 그룹(G4, G5)에서 IFN- γ 및 IL-2를 분비하는 세포의 빈도가 2 ~ 3배 증가하였다(도 19). 특히, IL-2를 분비하는 면역세포의 증가는 T세포 활성화 발생의 증가와, CD8 T세포의 유지 및 CD8 T세포가 terminal effector 세포 및 메모리 세포로의 분화를 나타낸다. 이러한 VZV-특이적인 T세포 활성화 유도는 노인들에서 성공적인 VZV 면역에 필수적이다. 이러한 결과는 RNA 면역증강제가 VZV 서브유닛 백신의 효능과 관련해서 이상적인 면역증강제일 수 있다는 것을 암시한다.

[241] (3) FMMA 평가

[242] 6주령 기니피그 (Dunkin-Hartley strain, KOSA Bio)에 대략 5,000 PFU/mouse를 포함하는 VZV 생-약독화 백신(SK Bioscience)을 사용하여 1차 항원투여 하였다. 1차 항원투여하고 35일 후에, 2주일의 간격을 두고, 그룹에 따라 VZV gE 단백질이 포함된 백신 0.5 ml RNA 핵산 분자(pCrPV-VZV) 50 μ g, CA-1 115 μ g을 기니피그에 피하주사를 통하여 접종, 면역시켰다.

[243] Fluorescent Antibody to Membrane Antigen (FAMA)는 다음과 같이 진행하였다. 항-VZV IgG를 측정하기 위하여, 30 μ l DPBS를 U-자형 바닥 96-well plate에 첨가하였다. 기니피그로부터 채취한 혈청을 1:2에서 1:1024까지 연속 희석시켰다. 감염 세포로부터 얻은 세포-연계 바이러스 30 μ l를 well에 첨가하고, 37°C에서 30분 동안 incubation하였다. 2,000 rpm에서 5분 원심분리하고, 상청액(supernatant)을 제거한 뒤, 세포를 1% 젤라틴-DPBS (2:1) 버퍼로 세척하고, 1:200으로 희석시킨 항-인간 IgG-FITC conjugate 30 μ l를 모든 well에 첨가하고,

플레이트를 37°C에서 30분 동안 incubation하였다. 1% 젤라틴-DPBS 버퍼로 세척하고, 각각의 well에 글리세롤-DBPS (2:1) 4 μ l 첨가하고, 공초점 망원경을 사용하여 시각화하였다. 백신만으로 면역시킨 그룹과 비교해서, 면역증강제인 핵산 분자와 안정화제인 CA-1을 함께 면역시킨 그룹에서 VZV-특이적인 중화항체가 대략 2배 증가하였다(도 20). 따라서, 면역증강제인 핵산 분자가 생-약독화 백신에서 체액성 면역을 보다 활성화시킬 수 있다는 것을 확인하였다.

[244] 제조예 15: RNA 핵산 분자 제조

[245] 다음과 같이 단일 발현카세트의 주형 DNA를 사용하고, 제조예 3과 동일한 절차를 반복하여 RNA 플랫폼의 인공 핵산 분자를 제조하였다. 본 실시예에 따라 제조된 핵산 분자를 “pCrPV-Flu-HA2 A”로 지칭한다.

[246] 5' - KpnI 인식 서열 - T7 promoter (서열식별번호: 6) - CrPV IGR IRES (서열식별번호: 3) - BamHI 인식 서열 - 코딩 영역으로 influenza HA2 A type을 암호화하는 핵산 서열 (서열식별번호: 13) - MCS로서 PacI-SacI 인식 서열 - SV40 폴리아데닐레이션 신호 서열 (서열식별번호: 7) - NotI 인식 서열 - 3'.

[247] 제조예 16: RNA 핵산 분자 제조

[248] 코딩 영역으로 influenza HA2 A type을 암호화하는 핵산 서열을 대신하여 influenza HA2 B type을 암호화하는 핵산 서열(서열식별번호: 14)을 사용한 것을 제외하고 제조예 6의 절차를 반복하여 RNA 플랫폼의 인공 핵산 분자를 제조하였다. 본 실시예에 따라 제조된 핵산 분자를 “pCrPV-Flu-HA2 B”로 지칭한다.

[249] 실시예 9: 면역학적 분석

[250] 제조예 15 및 제조예 16에서 제조된 핵산 분자에 안정화제로서 화학식 2의 CA-1을 제제화 한 약학 조성물을 6주령 BALB/c 마우스에 근육주사로 주입하여 면역하였다. 2주일의 간격을 두고, 그룹에 따라 항원인 약독화 인플루엔자 바이러스 백신(HA 항원 0.6 g/mouse)과, RNA 핵산(pCrPV-Flu-HA2 A와 pCrPV-Flu HA2 B가 각각 50% 비율로 혼합; 이하 pCrPV-Flu라 함) 20 μ g과, 안정화제로서 CA-1 46 μ g을 주입하였다. 비교를 위하여 LP 19 μ g, protamine (프로토시) 19.4 μ g을 사용하여 또한 pCrPV-Flu를 제제화 하였다. 약독화 인플루엔자 바이러스 백신(SKYCellful; SK Bioscience)은 2018~2019년도의 seasonal 백신으로서, A/H1N1과 관련한 A/Michigan/45/2015(NYMC X-275), A/H3N2와 관련한 A/Singapore/INEIMH-16-0010/2016 (IVR-186), B/Yamagata와 관련한 B/Phuket/3073/2013 및 B/Victoria와 관련한 B/Maryland/15/2016을 혼합하여, 세포기반에서 제조한 4가 백신으로, PBS를 이용하여 100배 희석시켰다. 면역 그룹을 표 7과 같이 6개의 그룹으로 구분하였다.

[251]

[표7]

핵산 분자의 제제화 및 인플루엔자 단백질

그룹	G1	G2	G3	G4	G5	G6
약독화 백신	-	+	+	+	+	+
pCrPV-Flu	-	-	+	+	+	+
안정화제				CA-1	LP	P
P: Protamine						

[252] (1) 면역글로불린 ELISA 분석

[253] 위에서 면역시킨 마우스의 혈청을 1차 면역 2주 후, 2차 면역 2주 후에 각각 채취하여 실시예 1에서 개시된 것과 동일한 절차를 반복하여 IgG1과 IgG2a의 수준을 분석하였다. 1차 면역 2주 후에, 핵산 분자로 면역하지 않은 그룹(G2)에 비하여 핵산 분자를 함께 면역한 그룹(G3~G6)에서 항원-특이적 IgG1과 IgG2a 수준이 높았다(도 21). 반면, 2차 면역 2주 후에, 핵산 분자로 면역하지 않은 그룹(G2)에서도 핵산 분자를 함께 면역한 그룹(G3~G6)만큼 IgG1의 생산은 유도되었으나, IgG2a 수준은 낮았다. 반면, 핵산 분자로 면역한 모든 그룹(G3~G6)은 IgG1 및 IgG2a 수준이 강한 boosting 효과를 보여주었다(도 22).

[254] (2) 점액 면역 반응 평가

[255] 인플루엔자 바이러스 감염으로부터의 생체 보호와 관련해서 중요한 점막 면역 반응을 평가하기 위하여, 기관지폐포세척액(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)에서 항원-특이적 IgA 수준을 ELISA를 이용하여 측정하였다. 22G 카테터를 마우스 기관에 삽입하여, 1% FBS가 포함된 0.8 ml PBS (PBS/FBS)를 기도로 흘려서 안락사한 마우스에 대하여 기관지폐포세척(BAL)을 수행하였다. 기관지폐포세척액을 4°C에서 10분 동안 800 x g에서 원심분리 하고, 얻어진 BALF를 대상으로 ELISA를 수행하였다. 핵산 분자가 함께 면역한 모든 그룹(G3~G6)에서 IgA 생산이 유도된 반면, 항원만으로 면역한 그룹(G2)에서 IgA이 유도되지 못하였다(도 23). 핵산 분자가 근육주사를 통해 주입되었음에도, 점막 면역 반응을 야기할 수 있다는 것을 확인하였다.

[256] (3) 혈구응집 억제(Haemagglutination Inhibition; HI) titer 평가

[257] HI 분석은 "Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza"에 따라 수행하였다. 면역시킨 마우스 혈청을 37°C에서 18시간 동안 receptor-destroying enzyme (RDE)로 처리하고, 56°C에서 30분 동안 열로 불활성화하고, 비특이적 반응을 제거하기 위하여 chicken 적혈구를 사용하여 흡착시켰다. 이어서, 모든 혈청을 V-자 바닥 96-well microtiter 플레이트에서 25 μ l PBS로 연속적으로 희석시키고, 표준 바이러스 항원(4 HA units/25 μ l)을 사용하여 상온에서 1시간 동안 incubation하였다. 이후 0.5 chicken 적혈구 50 μ l를 첨가하고, 플레이트를 상온에서 45분 동안 incubation하였다. 항체 titer (기하평균

mean titers)는 2회 실험에서 응집이 완전히 억제되는 최고 역가 혈청 농도로 표현되었다. 처음 희석 농도가 1/10이었으므로, 검출될 수 있는 항체 titer의 최저 한계는 10이었다. 10 미만의 titer는 5로 할당하였다.

[258] 1차 면역 후에 백신만으로 면역시킨 그룹(G2)은 인플루엔자 strain에 대하여 seronegative (HI 기하평균 titer < 10)이었으나, 핵산 분자를 함께 면역시킨 그룹(G3~G6)에서 A/H1N1 및 A/H3N2 lineage에 대한 HI titer는 1:10 ~ 1:80이었다. 한편, B-type lineage와 관련해서, 핵산 분자를 함께 면역시킨 그룹(G3~G6)인 경우에도 B/Yamagata lineage에 대한 HI titer는 대략 1:10, B/Victoria lineage에 대한 HI titer는 1:5로 낮은 수준이었다(도 24).

[259] 2차 면역 후에 백신만으로 면역시킨 그룹(G2)과 비교해서, 핵산 분자를 함께 면역시킨 그룹(G3 ~ G6)은 A/H1N1 strain에 대해서는 9~14배, A/H3N2 strain에 대해서는 3~11배, B/Yamagata lineage에 대해서는 3배, B/Victoria lineage에 대해서는 4~9배 높았다(도 25).

[260] (3) ELISPOT 분석

[261] 면역시킨 마우스의 비장세포를 채취하여, Th₁ 면역 반응과 관련 있는 사이토카인인 IFN- γ 와 Th₂ 면역 반응과 관련 있는 사이토카인인 IL-4를 분비하는 세포의 개수를 ELISPOT을 이용하여 분석하였다. 백신만을 면역시킨 그룹(G2)과 비교해서 핵산 분자를 함께 면역시킨 그룹(G3~G6)에서 IFN- γ 를 분비하는 세포의 빈도는 2 ~ 4배 증가한 반면, 면역시킨 모든 그룹(G2~G6)에서 IL-4를 분비하는 세포의 빈도는 거의 유사하였다(도 26).

[262] 모든 결과를 종합하면, 핵산 분자를 사용하여 면역시킨 모든 그룹은 호흡기 바이러스에 대한 생체 보호 효과를 부여하는데 중요한 점막 면역 반응을 발휘할 수 있고, 세포성 면역 반응인 Th₁ 면역 반응과 체액성 면역 반응인 Th₂ 면역 반응을 모두 유도한다는 것을 나타낸다.

[263] 실시예 10: RNA 분해 방어 분석

[264] 제조예 1 내지 제조예 9에서 각각 제조된 RNA 플랫폼 핵산 분자와, 화학식 2의 CA-1을 함께 넣어 제재화 한 약학 조성물을 마우스 근육에 주사한 후 적시된 시간에 근육을 적출하여 제조예 1 내지 제조예 9에서 만들어진 RNA adjuvant에 길이에 해당되는 프라이머를 이용하여 real-time PCR를 수행하였다. 안정제인 CA-1을 함께 접종한 마우스의 근육에서 CA-1이 없는 RNA adjuvant를 접종한 마우스의 근육에서 보다 6시간까지 더 잘 RNA를 보존하고 있는 것을 볼 수 있다 (도 27).

[265] 또한 제조예 1 내지 제조예 9에서 각각 제조된 RNA 플랫폼 핵산 분자와 화학식 2의 CA-1을 함께 넣어 제재화 한 약학 조성물을 다양한 N/P ratio로 제조한 후 겔 전기영동을 수행하였다. 겔 상에서 이동도가 감소하는 것으로부터 N/P ratio 1.4 이상에서 핵산 분자와 CA-1의 복합체가 잘 형성되어 이동도가 낮은 겔 전기영동 위쪽에 복합체가 나타나는 것을 확인하였다. 또한, 동일하게 형성한 CA-1과 RNA 핵산 분자의 복합체를 RNase에 노출시켜 반응한 뒤, 잔여 RNA를 겔

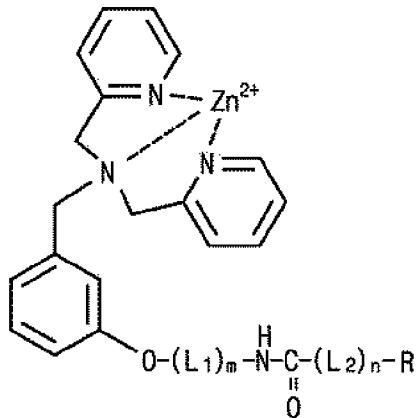
전기영동을 통해 확인하였다. CA-1을 함께 넣어 제제화 한 것에서 모두 RNase에 의한 RNA의 분해를 억제한 것을 확인하였다(도 28).

[266] 복합체가 형성되어 겔 전기영동 위쪽에 복합체가 나타나는 것을 확인하였으며, CA-1을 함께 넣어 제제화 한 것에서 모두 RNase에 의한 RNA의 분해를 억제한 것을 확인하였다.

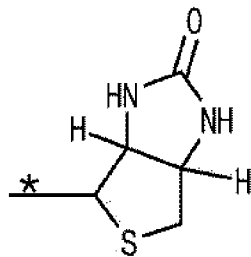
[267] 상기에서는 본 개시의 예시적인 실시형태 및 실시예에 기초하여 본 개시를 설명하였으나, 본 개시가 상기 실시형태 및 실시예에 기재된 기술사상으로 한정되는 것은 아니다. 오히려 본 개시가 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 전술한 실시형태 및 실시예를 토대로 다양한 변형과 변경을 용이하게 추고할 수 있다. 하지만, 이러한 변형과 변경은 모두 본 개시의 권리범위에 속한다는 점은, 첨부하는 청구범위에서 분명하다.

청구범위

- [청구항 1] 면역증강제인 핵산 분자; 및
상기 핵산 분자를 안정화시키며, 하기 화학식 1의 구조를 가지는 금속 착화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 약학 조성물.
[화학식 1]



화학식 1에서 L_1 및 L_2 는 각각 독립적으로 $C_1 \sim C_{20}$ 지방족 연결기임; m 및 n 은 각각 독립적으로 0 또는 1의 정수임; R 은 $C_1 \sim C_{20}$ 알킬기 또는 이며, 별표는 연결 부위를 나타냄.



- [청구항 2] 제 1항에 있어서, 펩타이드 및 단백질 중에서 적어도 하나인 면역원을 더욱 포함하는 약학 조성물.
- [청구항 3] 제 2항에 있어서, 상기 면역원은 바이러스성 항원 및 병원균 항원 중에서 적어도 하나인 항원을 포함하는 약학 조성물.
- [청구항 4] 제 1항에 있어서, 상기 핵산 분자는 발현 조절 서열인 적어도 하나의 내부리보솜결합부위(Internal ribosome entry site; IRES) 요소를 포함하는 약학 조성물.
- [청구항 5] 제 4항에 있어서, 상기 내부리보솜결합부위 요소는 바이러스성 내부리보솜결합부위 요소를 포함하는 약학 조성물.
- [청구항 6] 제 5항에 있어서, 상기 바이러스성 내부리보솜결합부위 요소는 피코나바이러스과(Picornaviridae) 바이러스, 토가바이러스과(Togaviridae) 바이러스, 디시스트로바이러스과(Dicistroviridae) 바이러스, 플라비바이러스과(Flaviridae) 바이러스, 레트로바이러스과(Retroviridae) 바이러스, 헤르페스바이러스과(Herpesviridae) 바이러스 및 이들의 조합으로 구성되는 군에서 선택되는 바이러스에서 유래한 바이러스성

[청구항 7] 제 5항에 있어서, 상기 바이러스성 내부리보솜결합부위 요소는 콕사키바이러스, 귀뚜라미바이러스, 뇌심근염바이러스 및 이들의 조합으로 구성되는 군에서 선택되는 바이러스에서 유래하는 바이러스성 내부리보솜결합부위 요소를 포함하는 약학 조성물.

[청구항 8] 제 4항에 있어서, 상기 핵산 분자는 상기 적어도 하나의 내부리보솜결합부위 요소와 작동 가능하게 연결되는 코딩 영역을 더욱 포함하는 약학 조성물.

[청구항 9] 제 8항에 있어서, 펩타이드 및 단백질 중에서 적어도 하나인 면역원을 더욱 포함하고, 상기 코딩 영역은 상기 면역원을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 약학 조성물.

[청구항 10] 제 4항에 있어서, 상기 핵산 분자는 상기 적어도 하나의 내부리보솜결합부위 요소의 상류(upstream)에 삽입되는 다수의 아데노신 또는 티미딘을 포함하는 약학 조성물.

[청구항 11] 제 10항에 있어서, 상기 다수의 아데노신 또는 티미딘은 20개 내지 400개의 아데노신 또는 티미딘을 포함하는 약학 조성물.

[청구항 12] 제 1항에 있어서, 상기 금속 착화합물은 하기 화학식 2의 구조를 가지는 어느 하나의 금속 착화합물을 포함하는 약학 조성물.

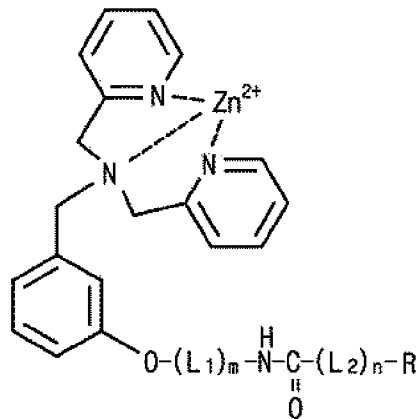
CA-1

CA-2

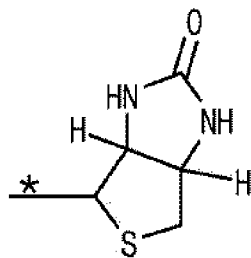
[청구항 13] 하기 화학식 1의 구조를 가지는 금속 착화합물 또는 이의 약학적으로

허용되는 염을 포함하는 면역증강제인 핵산 분자 안정용 조성물.

[화학식 1]

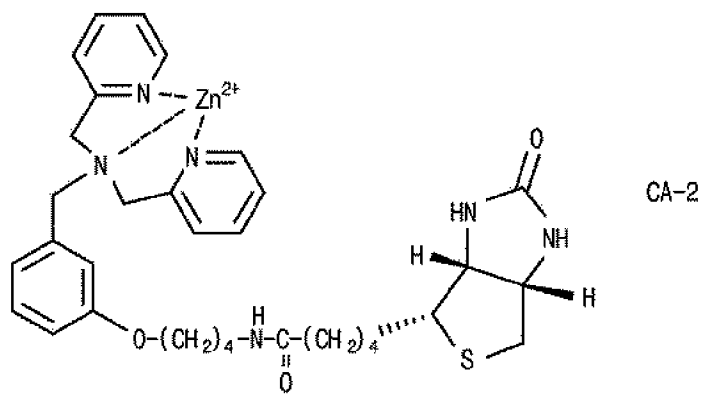
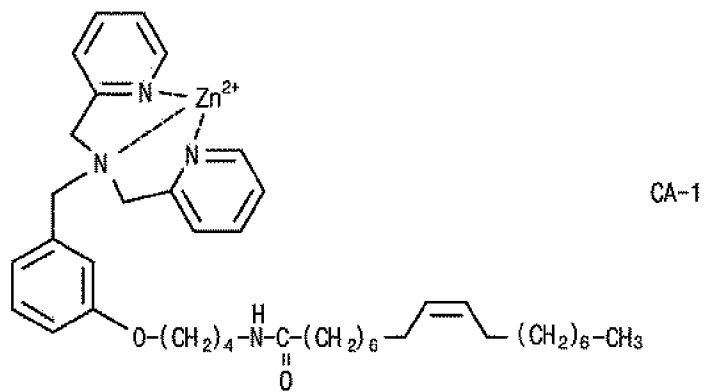


화학식 1에서 L_1 및 L_2 는 각각 독립적으로 $C_1 \sim C_{20}$ 지방족 연결기임; m 및 n 은 각각 독립적으로 0 또는 1의 정수임; R 은 $C_1 \sim C_{20}$ 알킬기 또는 이며, 별표는 연결 부위를 나타냄.

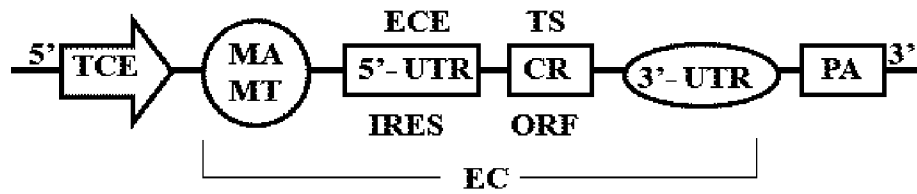


- [청구항 14] 제 13항에 있어서, 펩타이드 및 단백질 중에서 적어도 하나인 면역원을 더욱 포함하는 핵산분자 안정용 조성물.
- [청구항 15] 제 13항에 있어서, 상기 핵산 분자는 발현 조절 서열인 적어도 하나의 내부리보솜결합부위(Internal ribosome entry site; IRES) 요소를 포함하는 핵산분자 안정용 조성물.
- [청구항 16] 제 15항에 있어서, 상기 핵산 분자는 상기 적어도 하나의 내부리보솜결합부위 요소는 바이러스성 내부리보솜결합부위 요소를 포함하는 핵산분자 안정용 조성물.
- [청구항 17] 제 15항에 있어서, 상기 핵산 분자는 상기 적어도 하나의 내부리보솜결합부위 요소와 작동 가능하게 연결되는 코딩 영역을 더욱 포함하는 핵산분자 안정용 조성물.
- [청구항 18] 제 17항에 있어서, 펩타이드 및 단백질 중에서 적어도 하나인 면역원을 더욱 포함하고, 상기 코딩 영역은 상기 면역원을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 핵산분자 안정용 조성물.
- [청구항 19] 제 15항에 있어서, 상기 핵산 분자는 상기 적어도 하나의 내부리보솜결합부위 요소의 상류(upstream)에 삽입되는 다수의 아데노신 또는 티미딘을 포함하는 핵산분자 안정용 조성물.
- [청구항 20] 제 13항에 있어서, 상기 금속 착화합물은 하기 화학식 2의 구조를 가지는

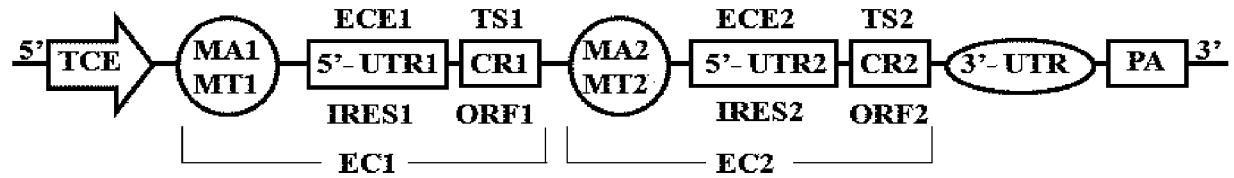
어느 하나의 금속 착화합물을 포함하는 핵산분자 안정용 조성물.
[화학식 2]



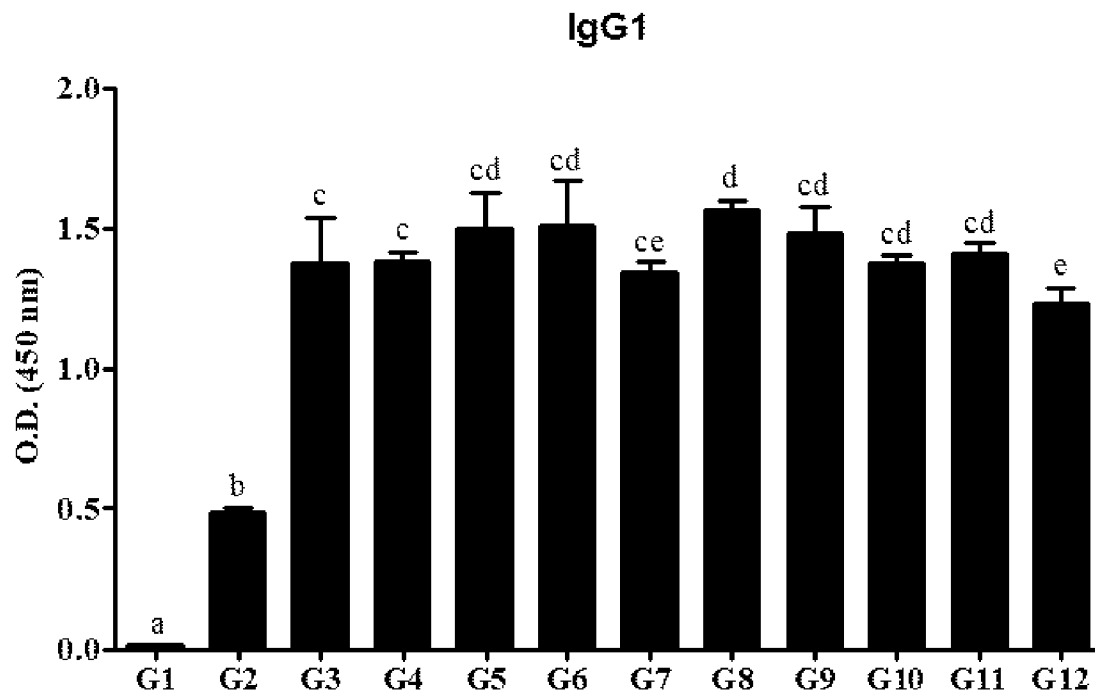
[도1]



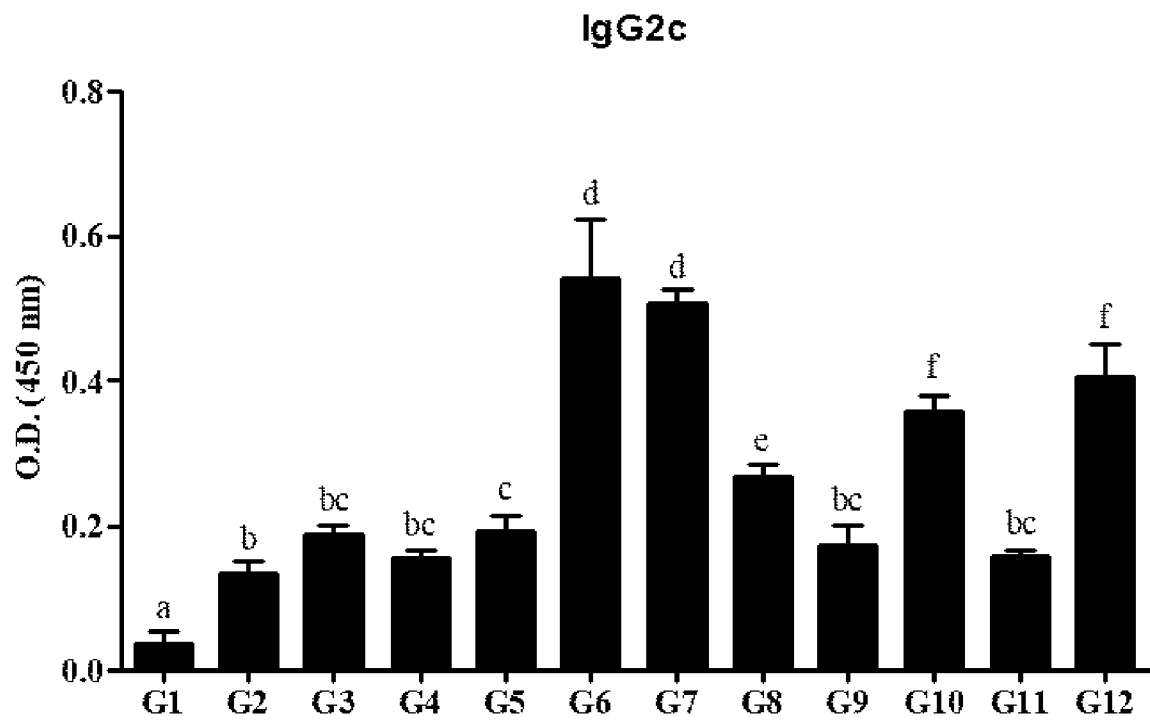
[도2]



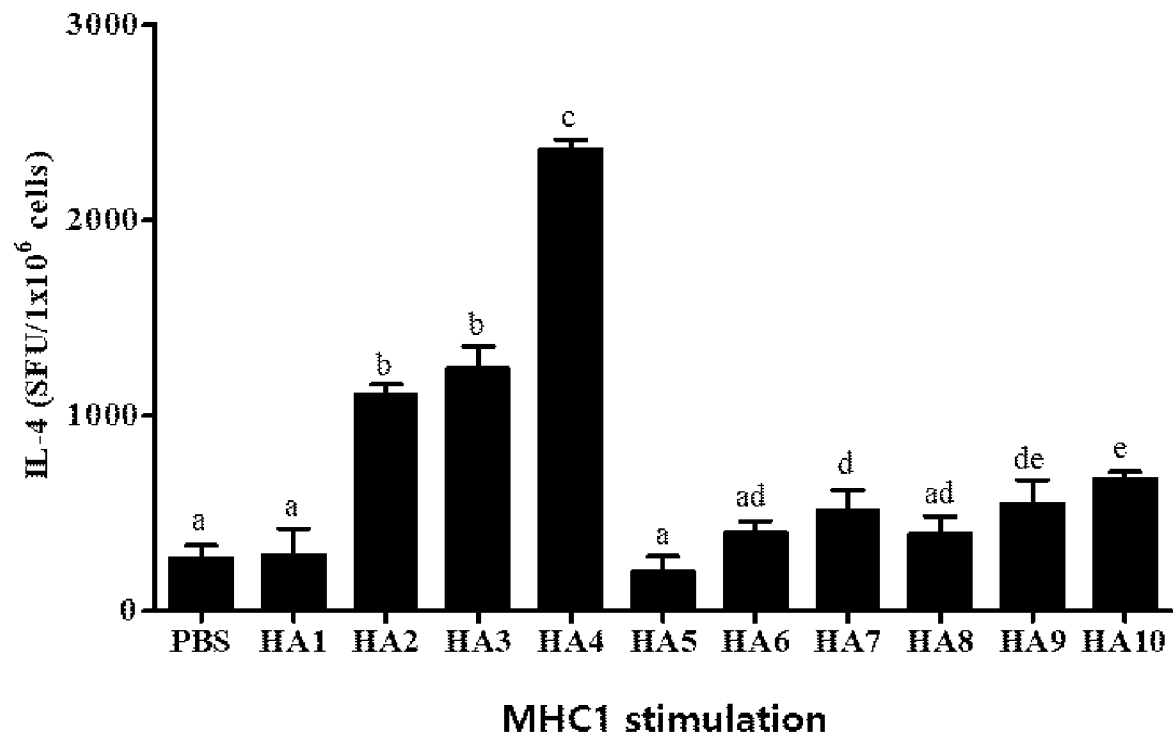
[도3]



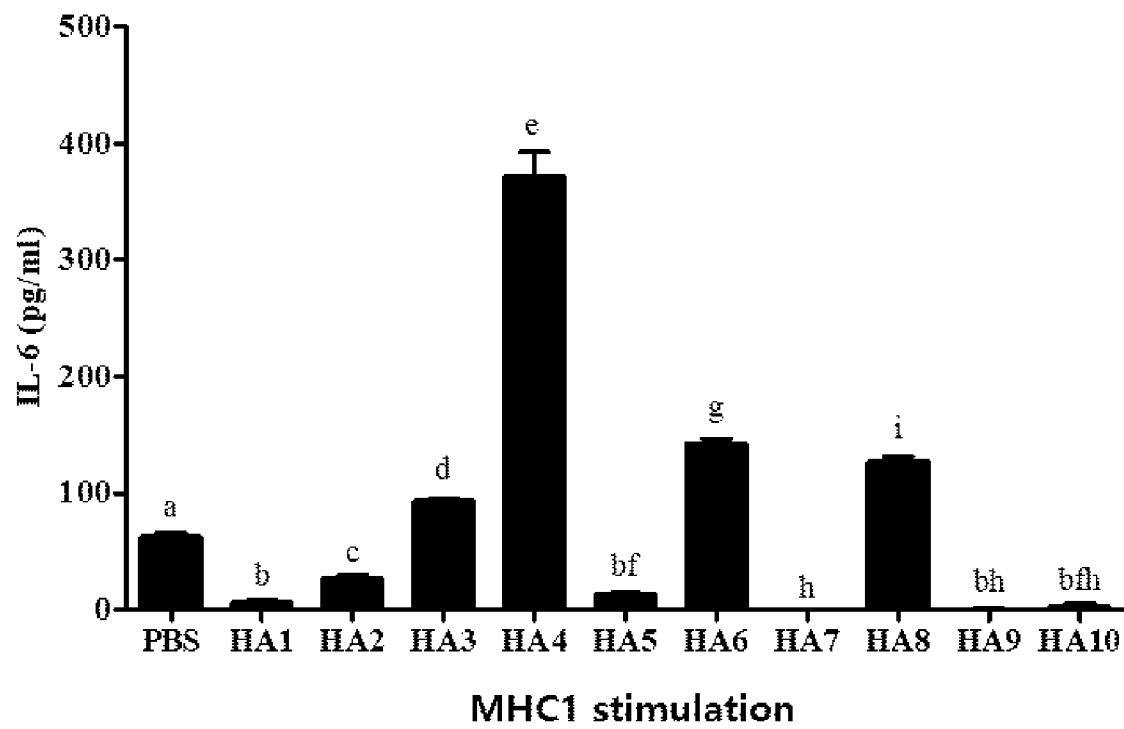
[도4]



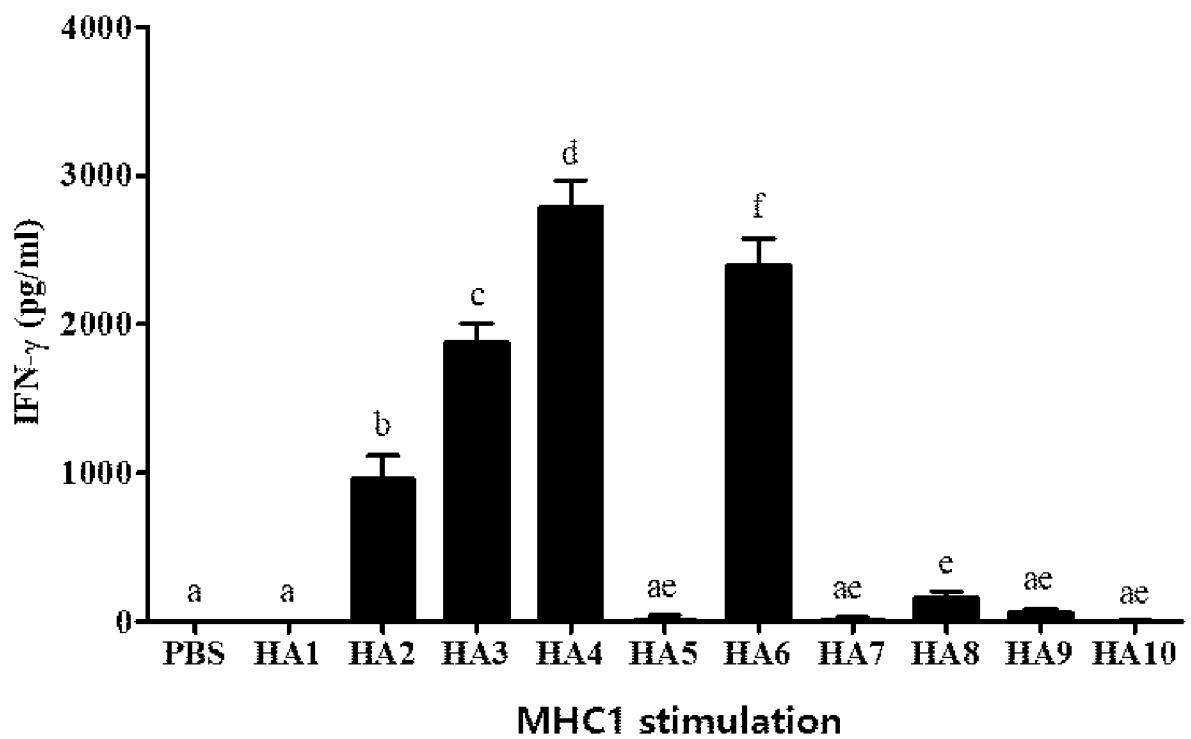
[도5]



[도6]

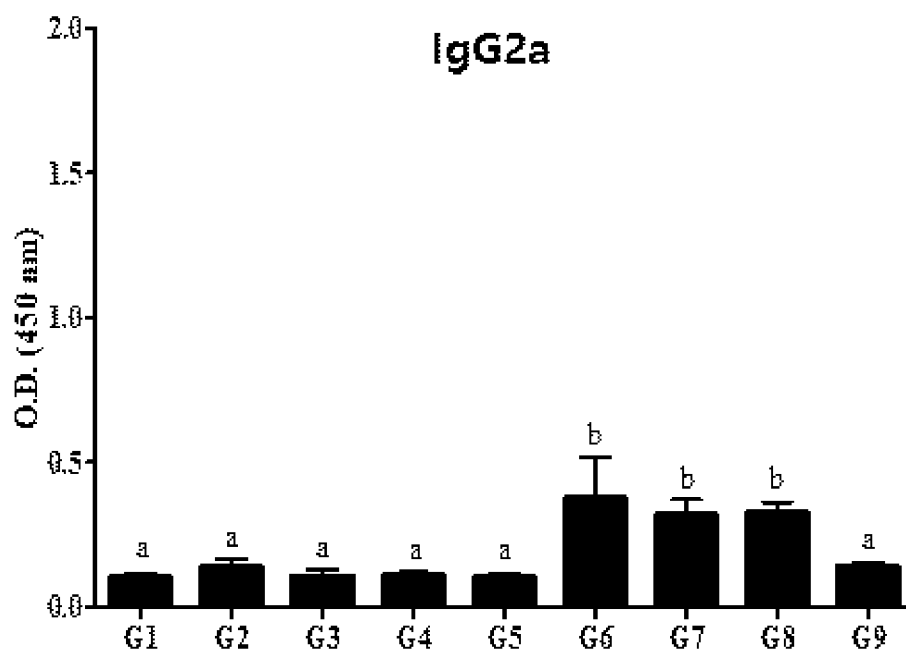
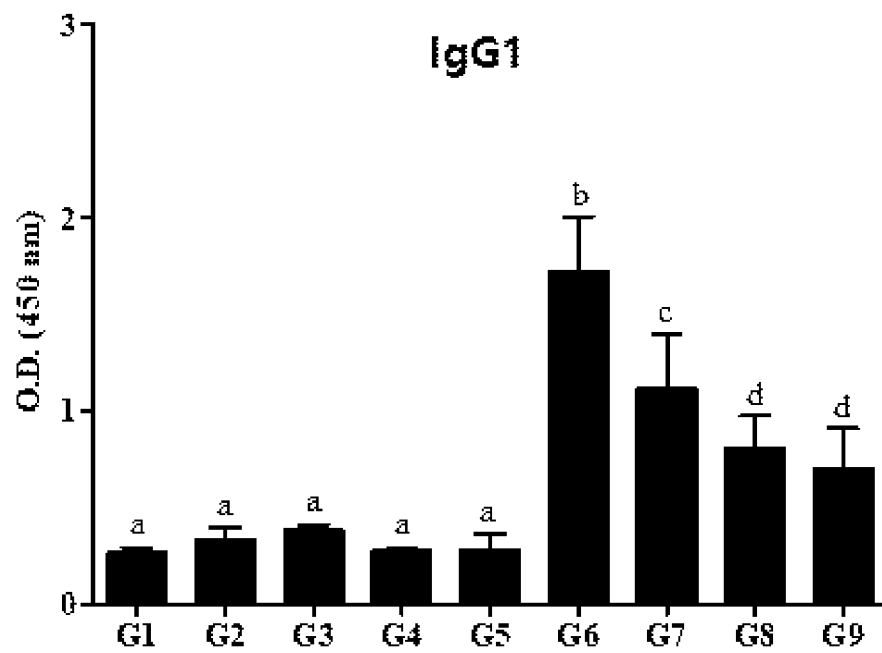


[도7]



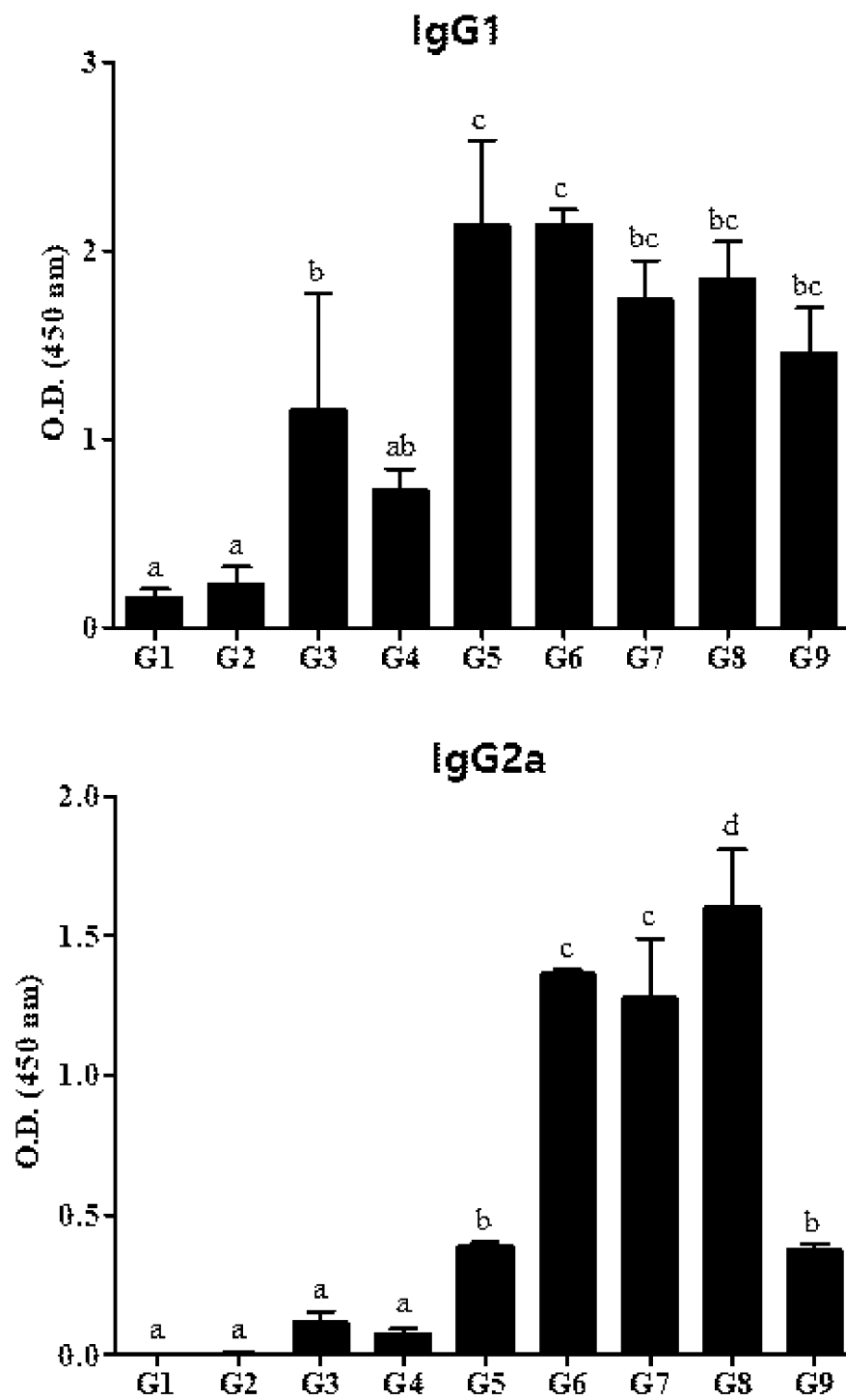
[도8]

1차 면역 후 2주

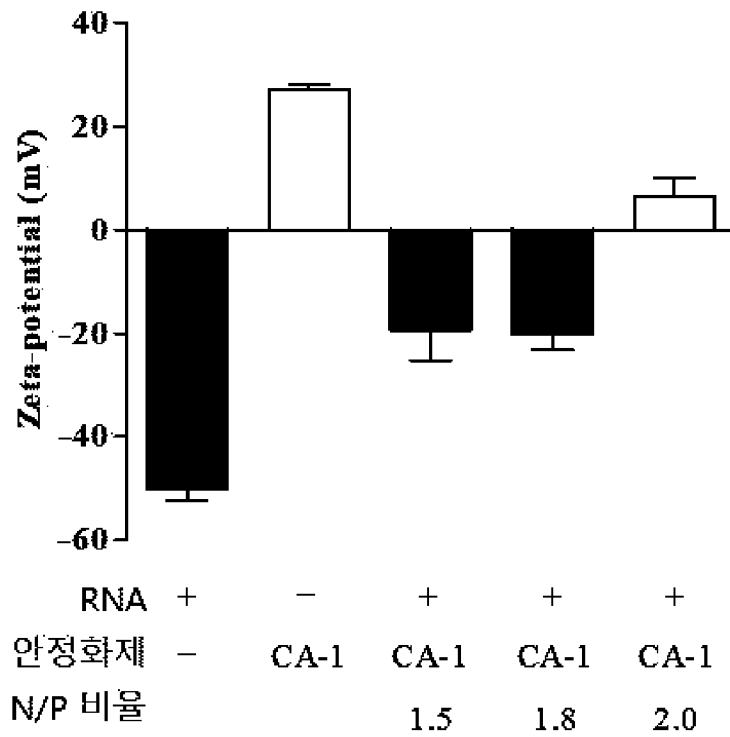
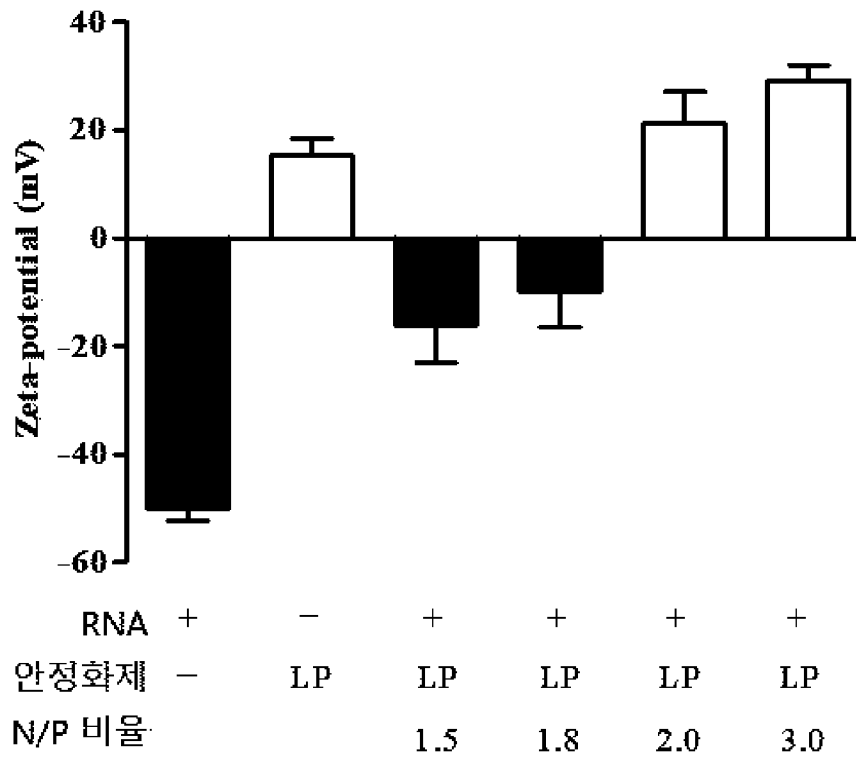


[도9]

2차 면역 후 2주

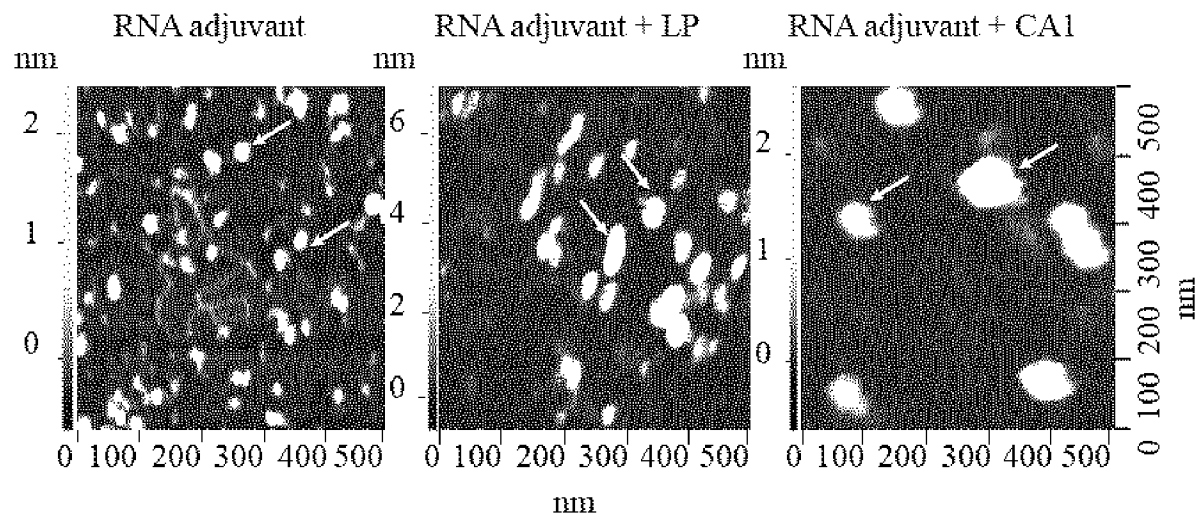


[도10]

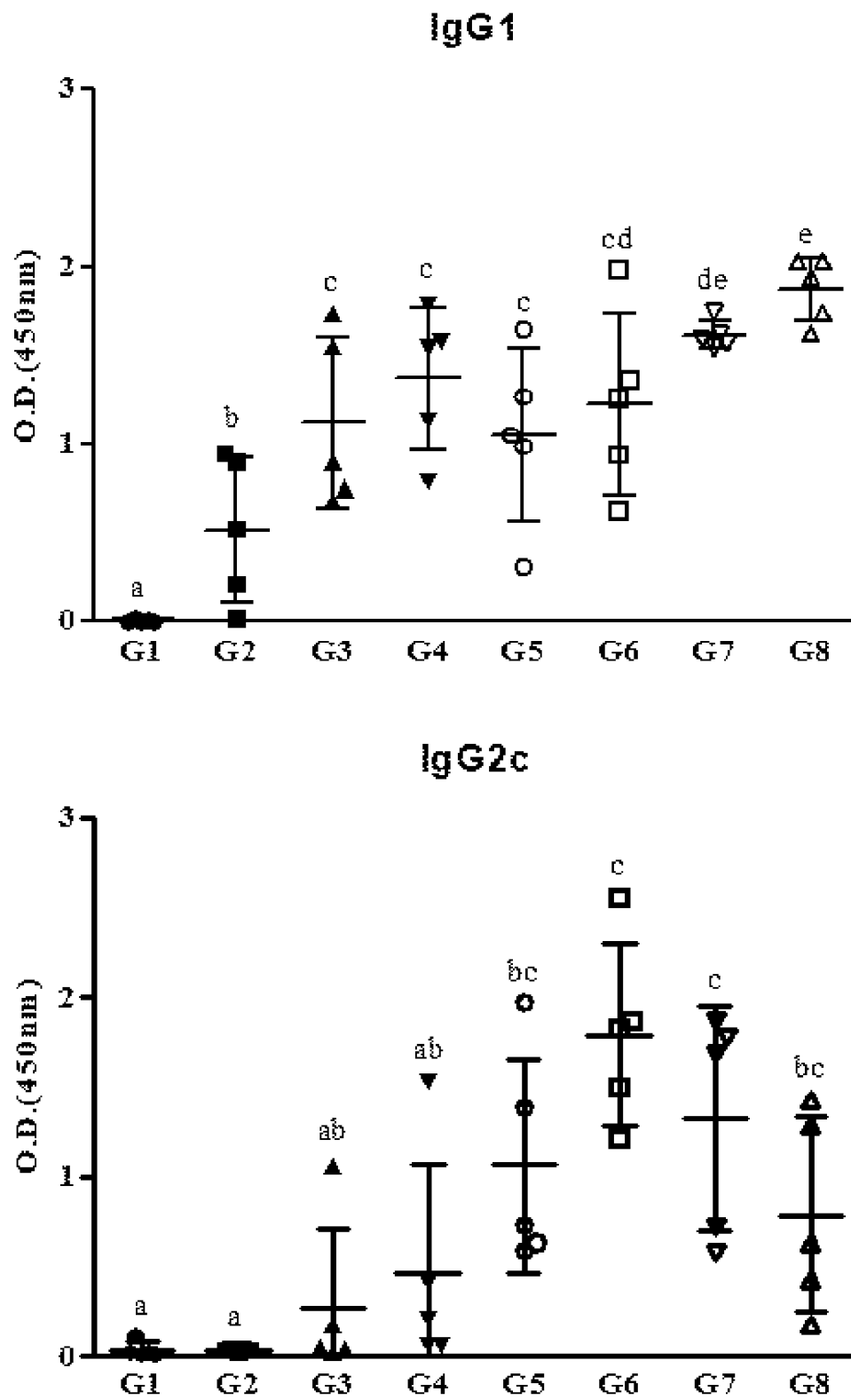


■ - charge : □ + charge

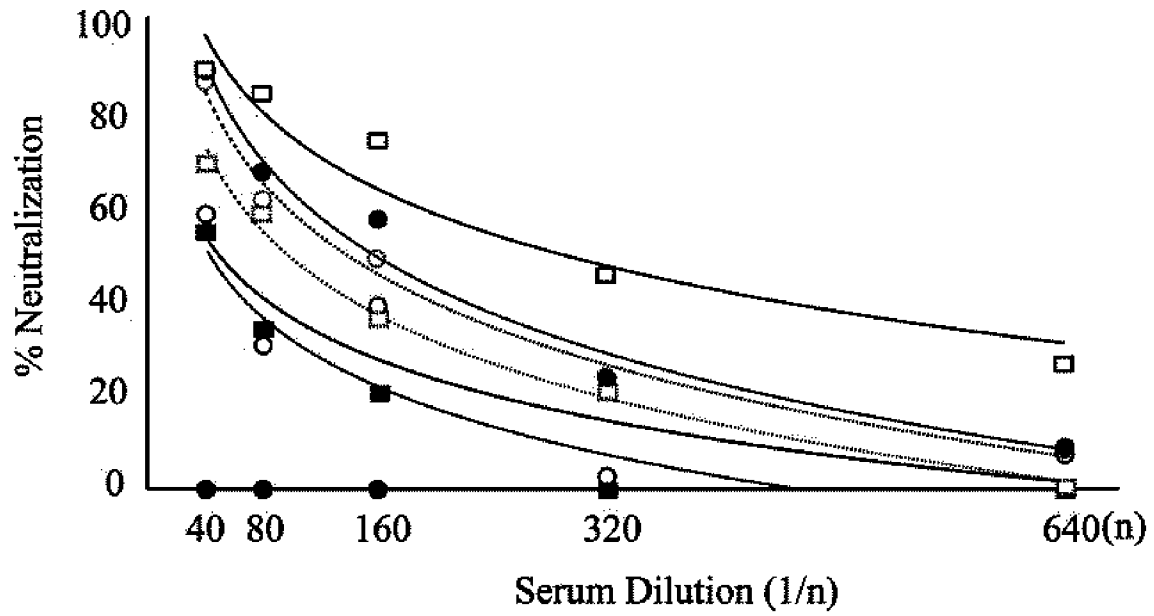
[도 11]



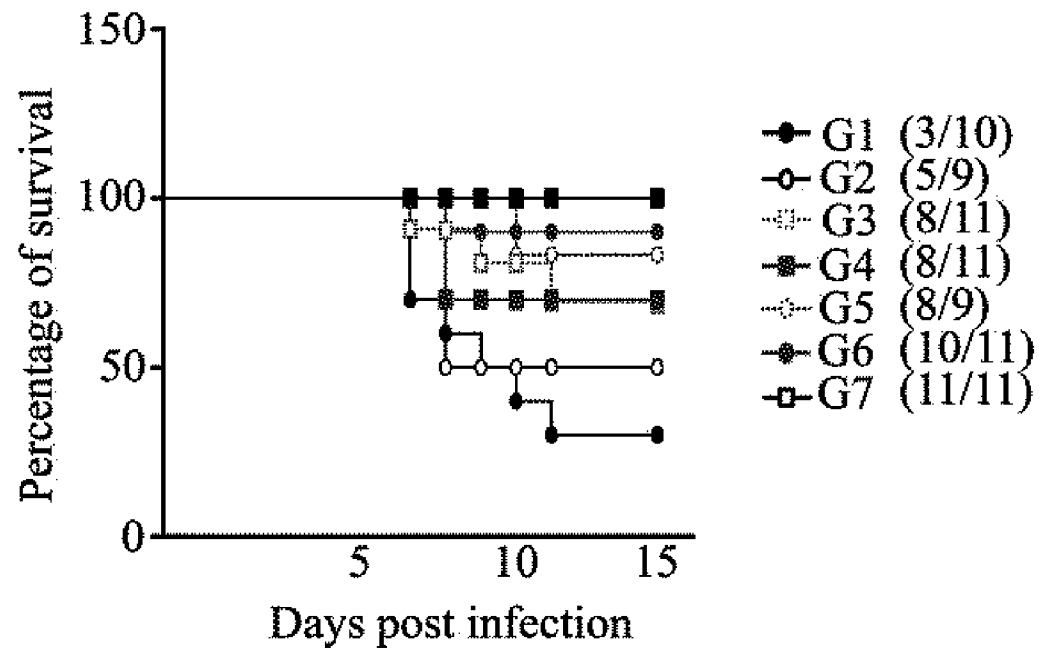
[도12]



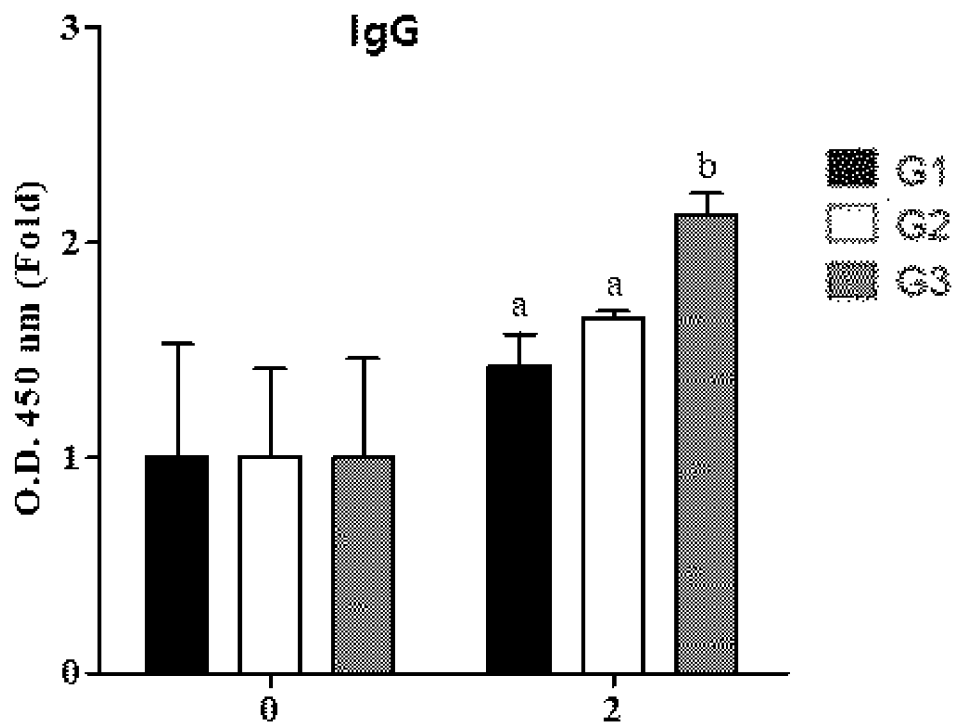
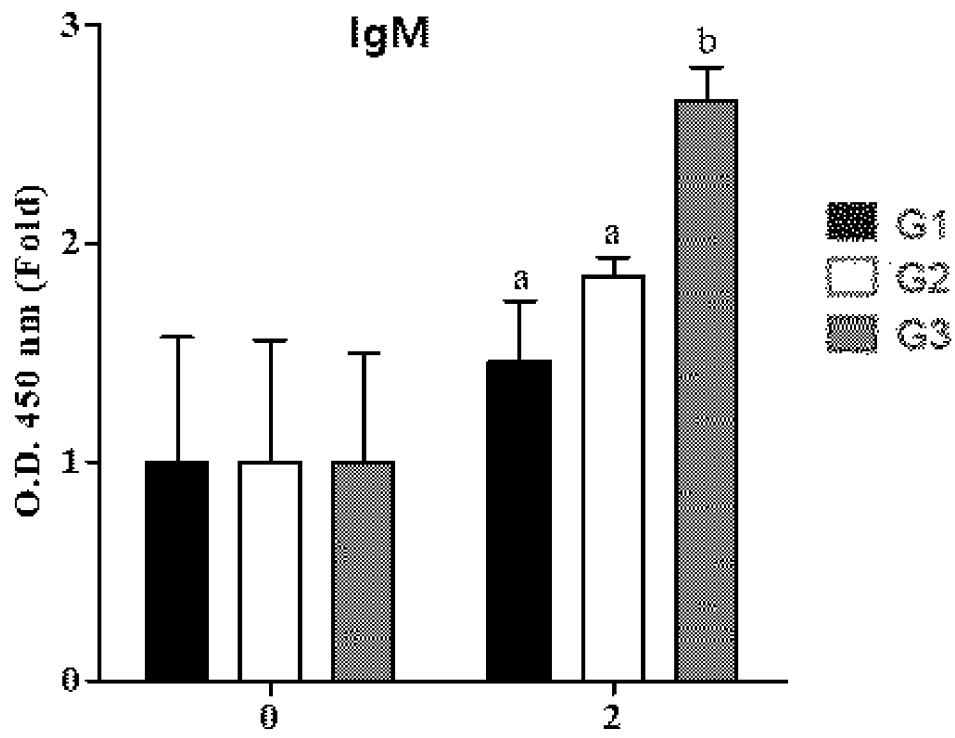
[도13]



[도14]

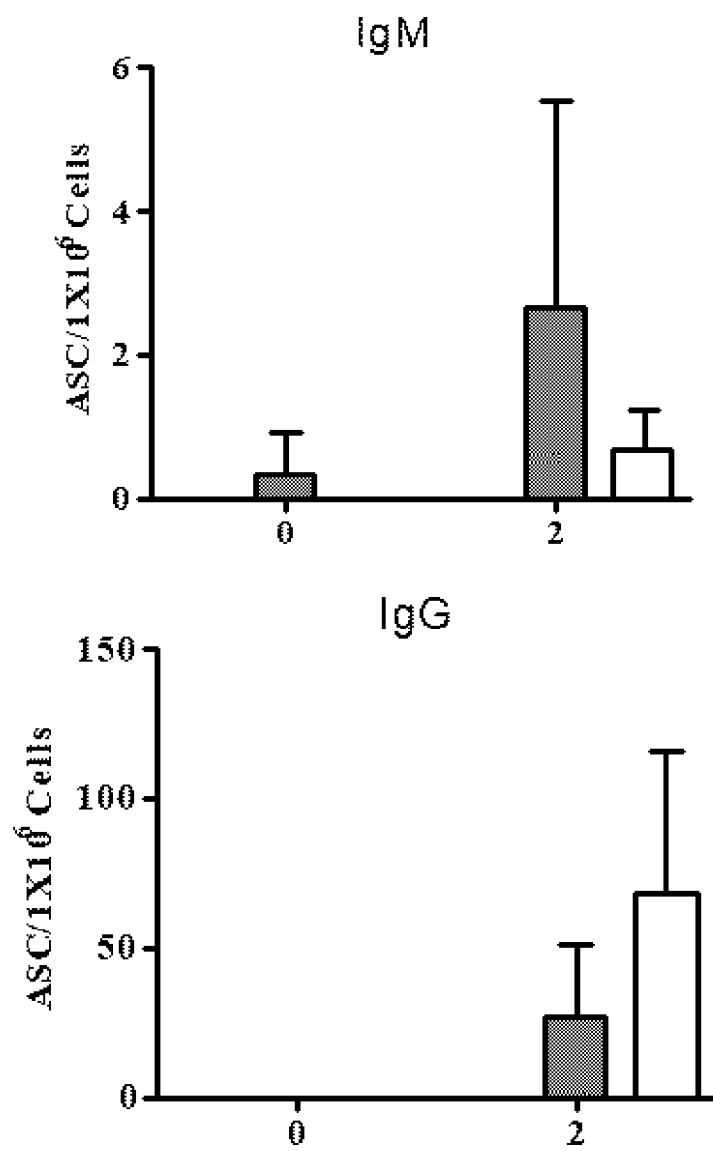


[도15]

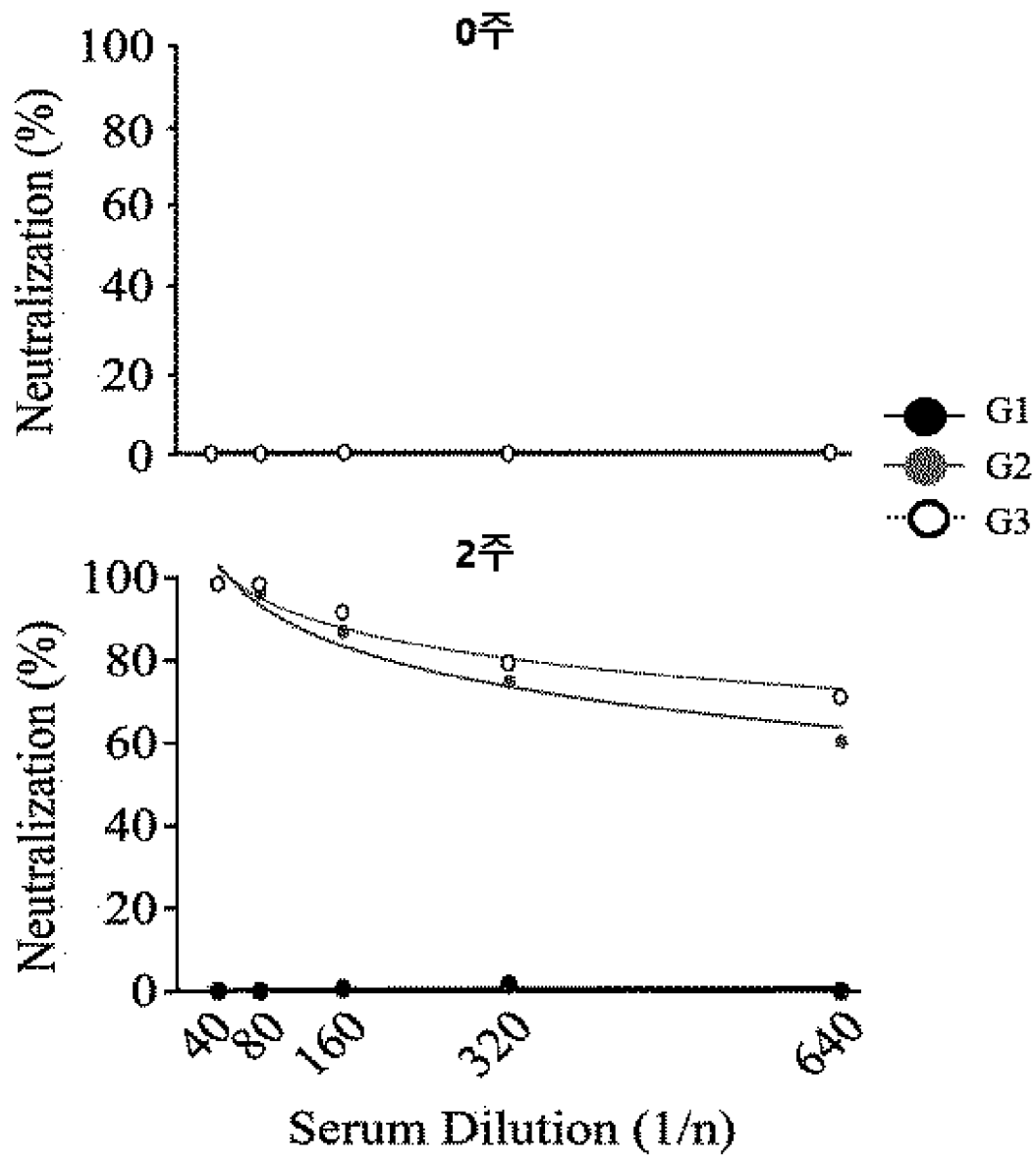


면역 후 경과 주

[도16]



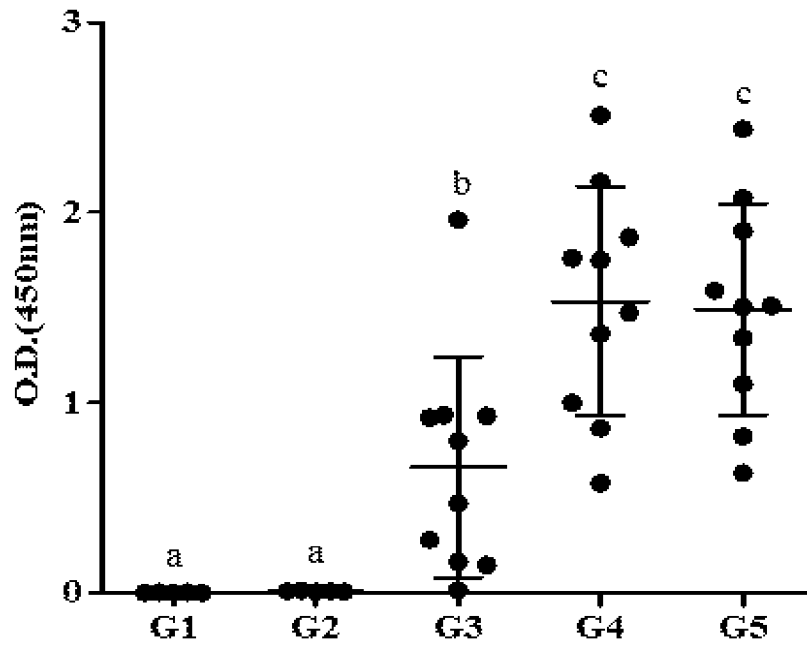
[도17]



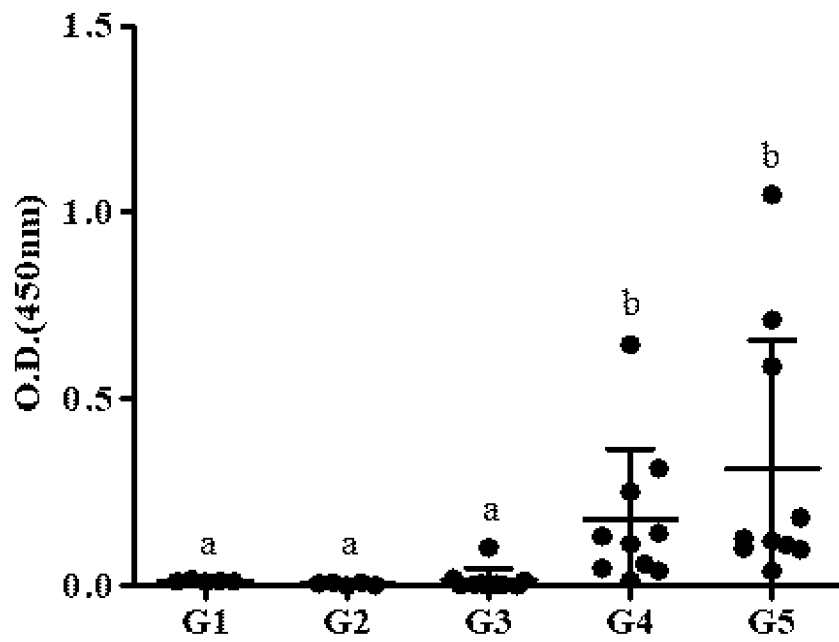
[도18]

2차 면역 후 4주

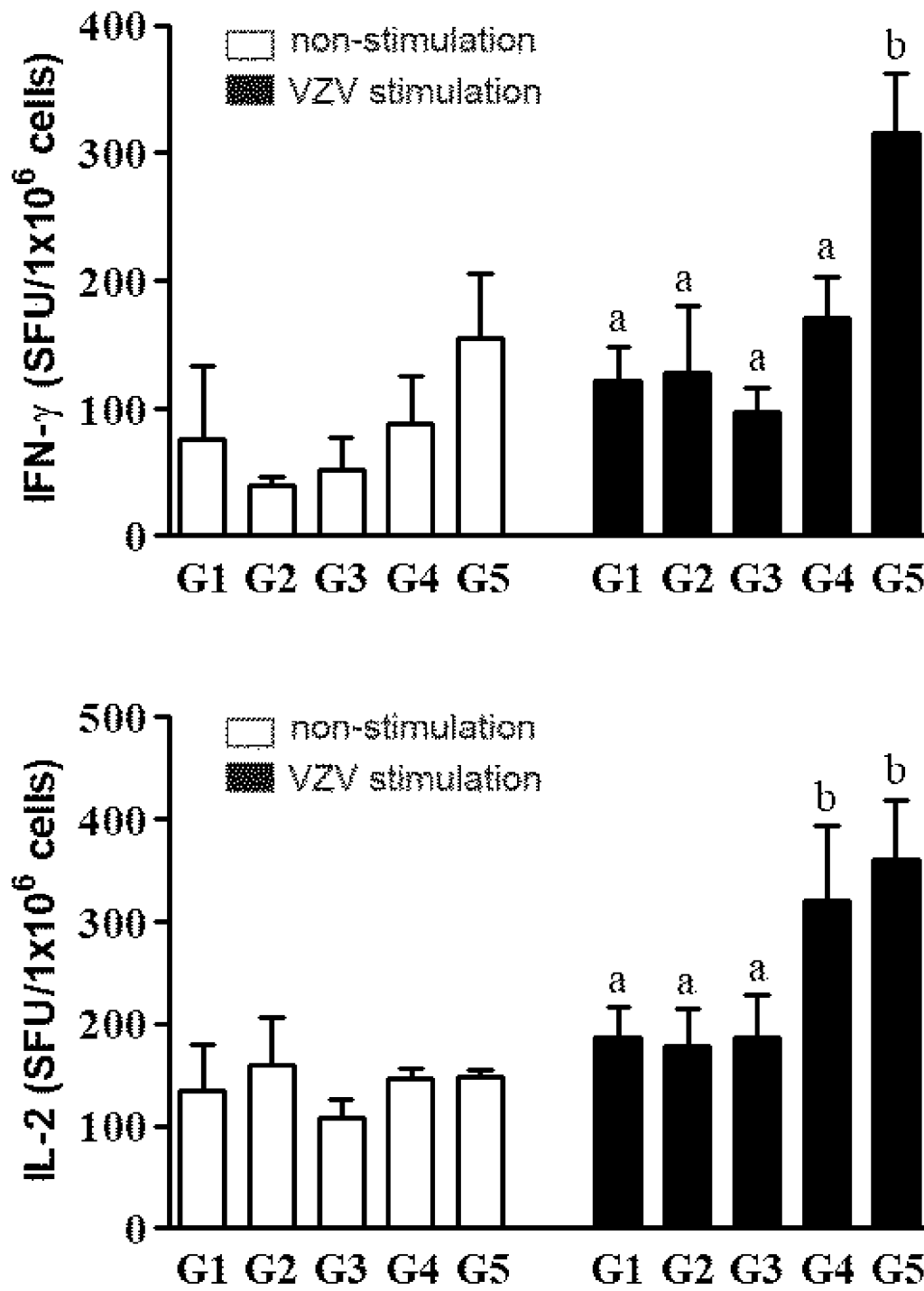
IgG1



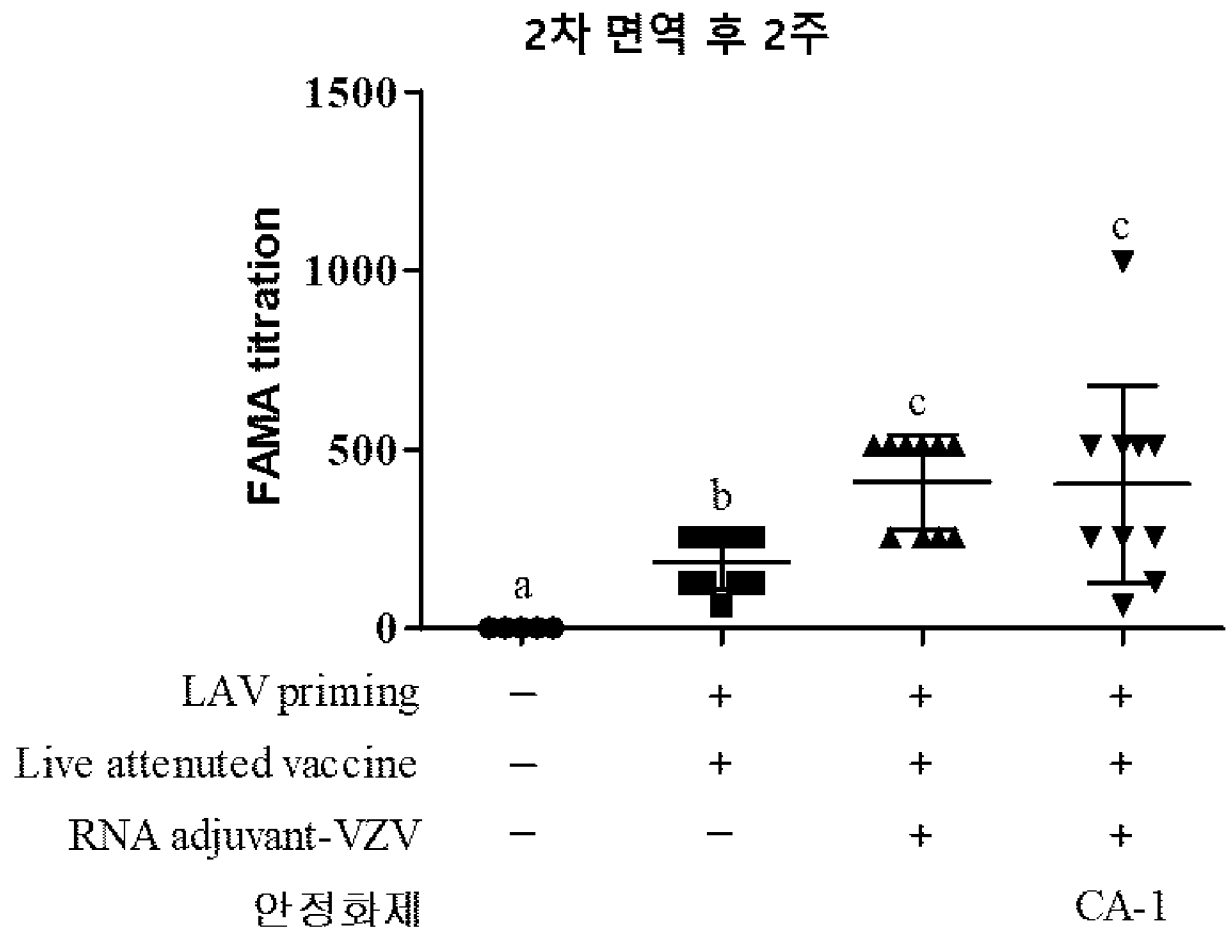
IgG2a



[도19]



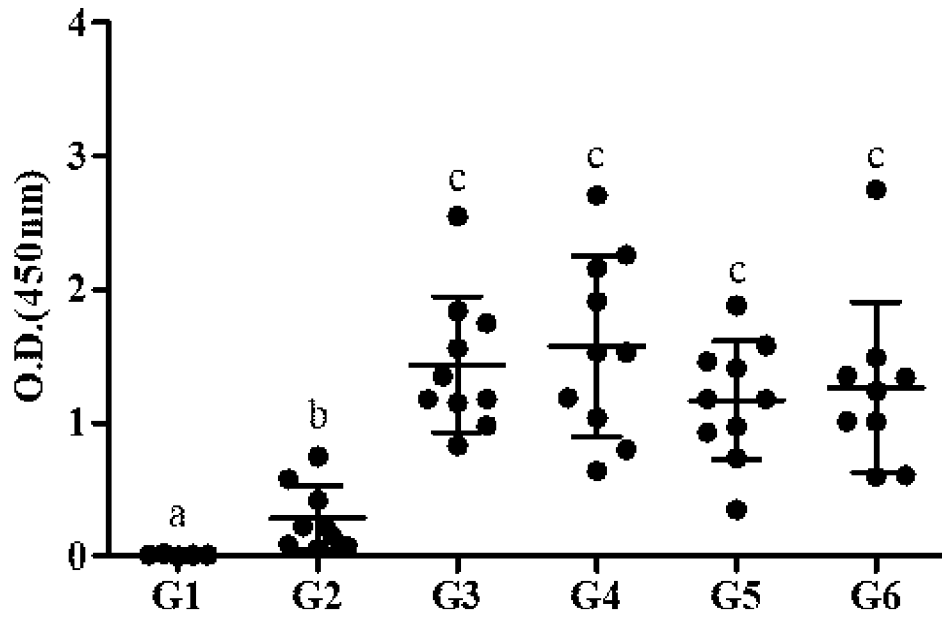
[도20]



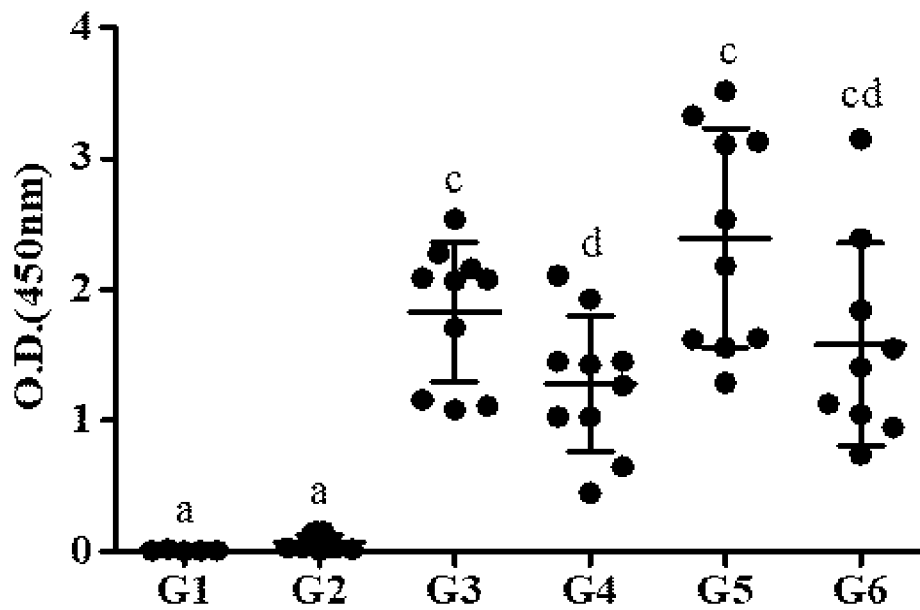
[도21]

1차 면역 후 2주

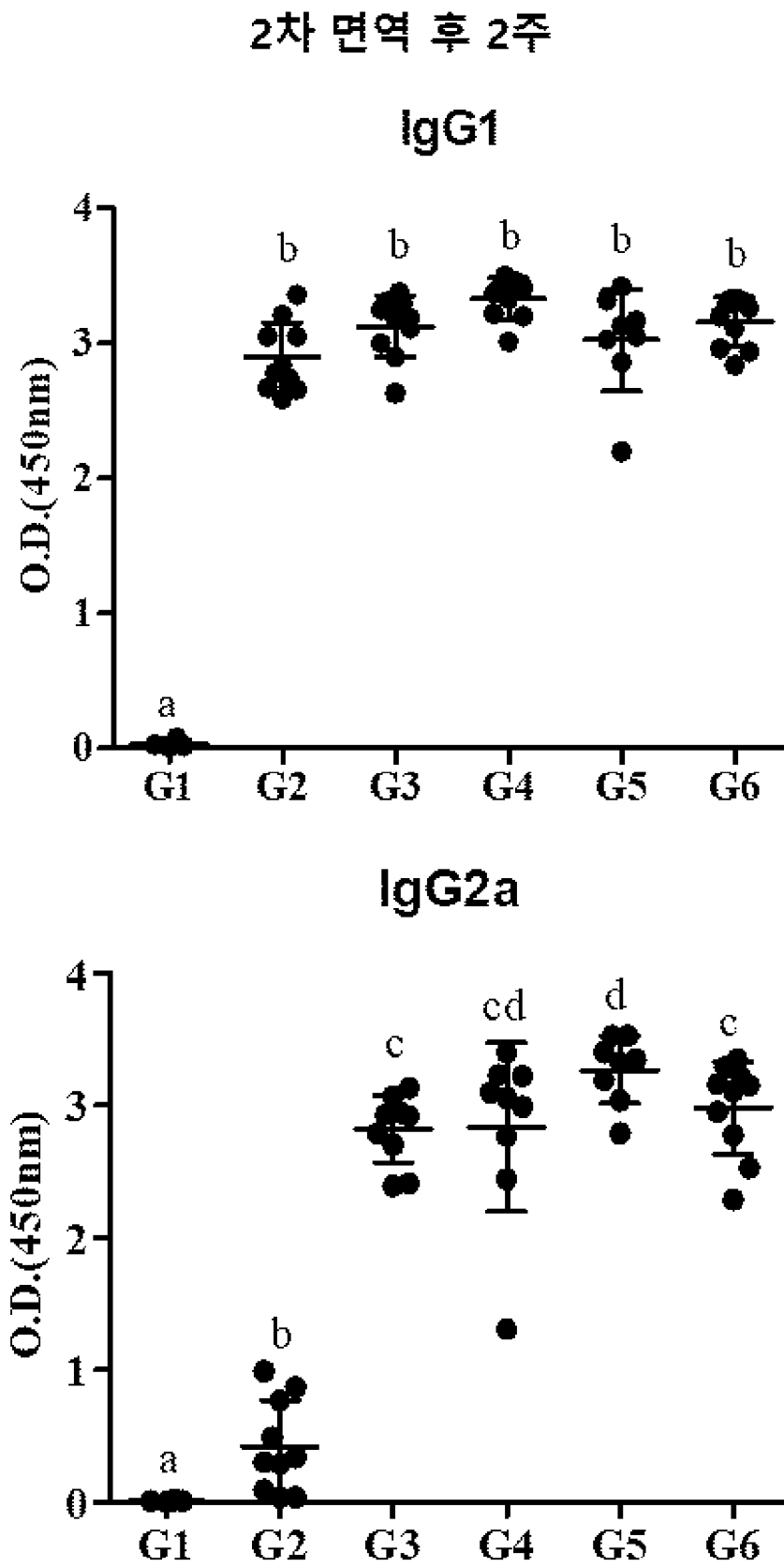
IgG1



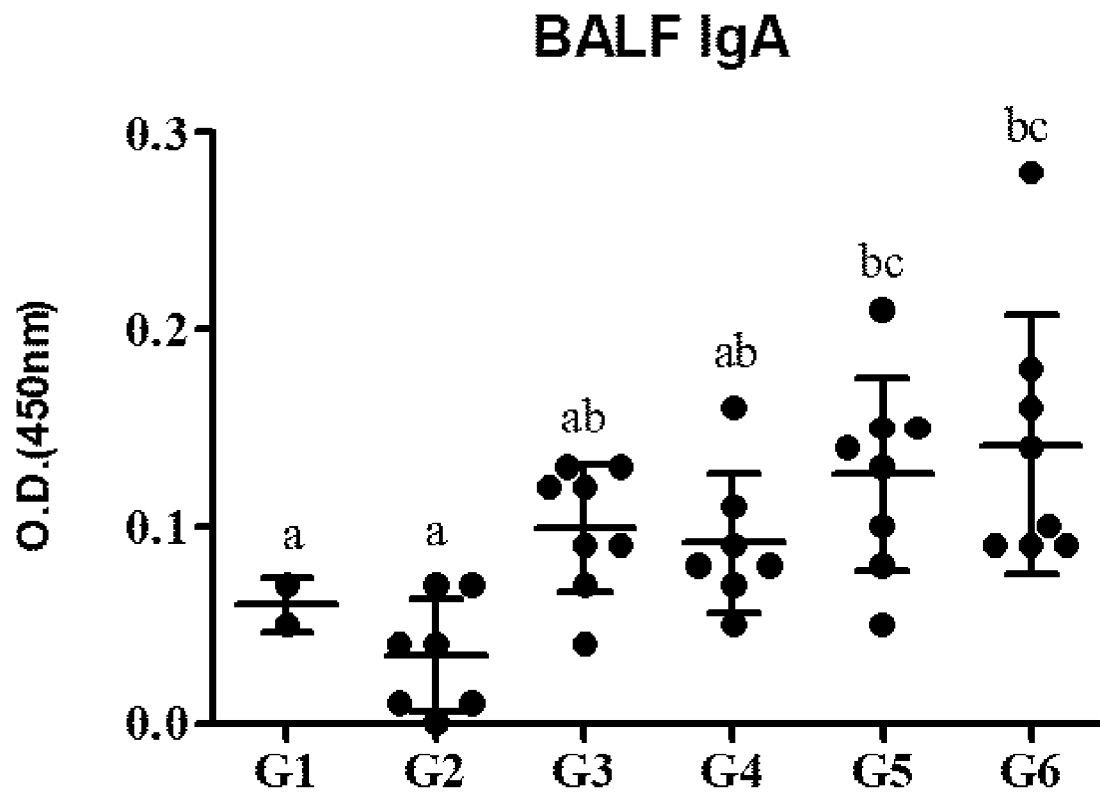
IgG2a



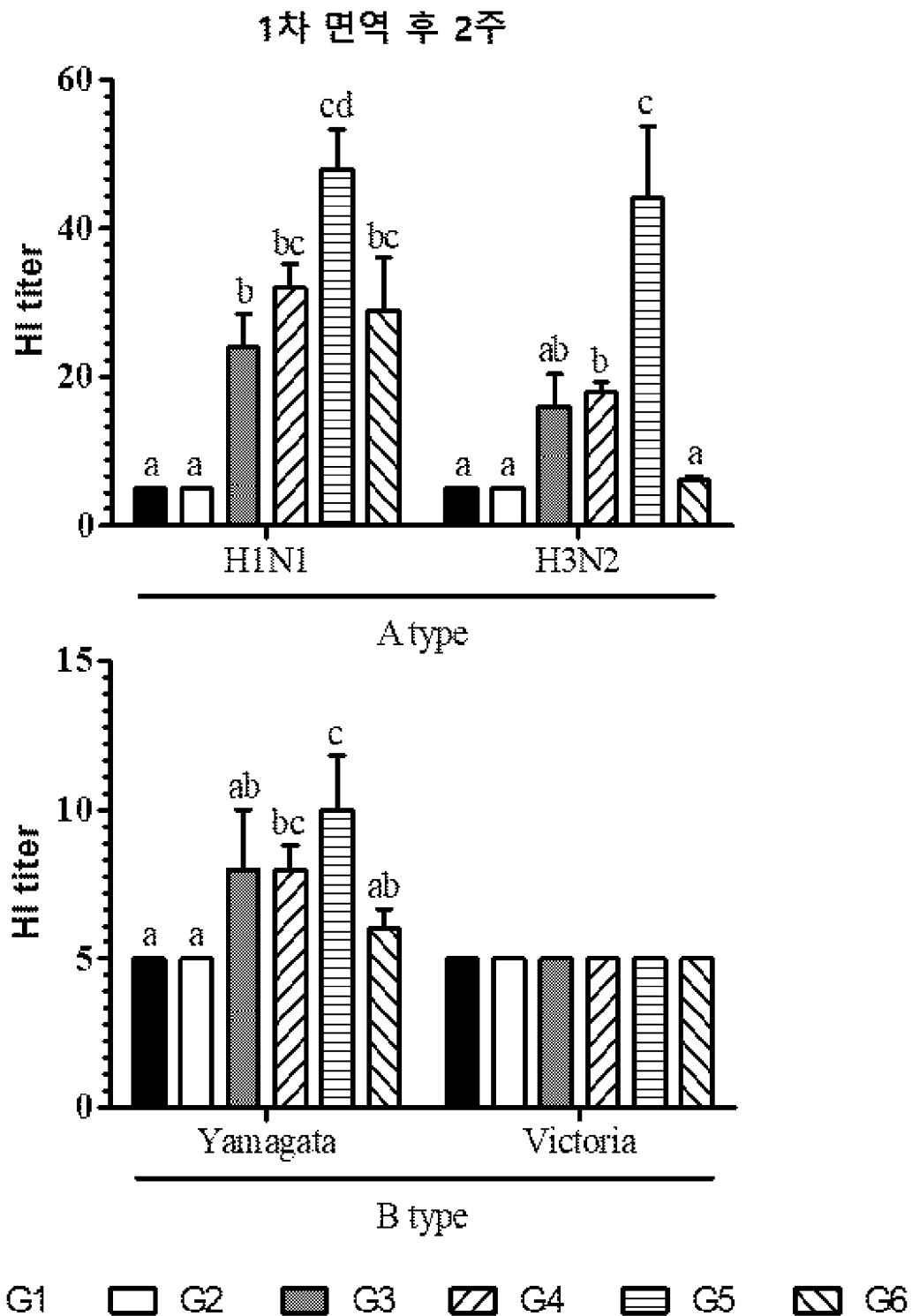
[도22]



[도23]

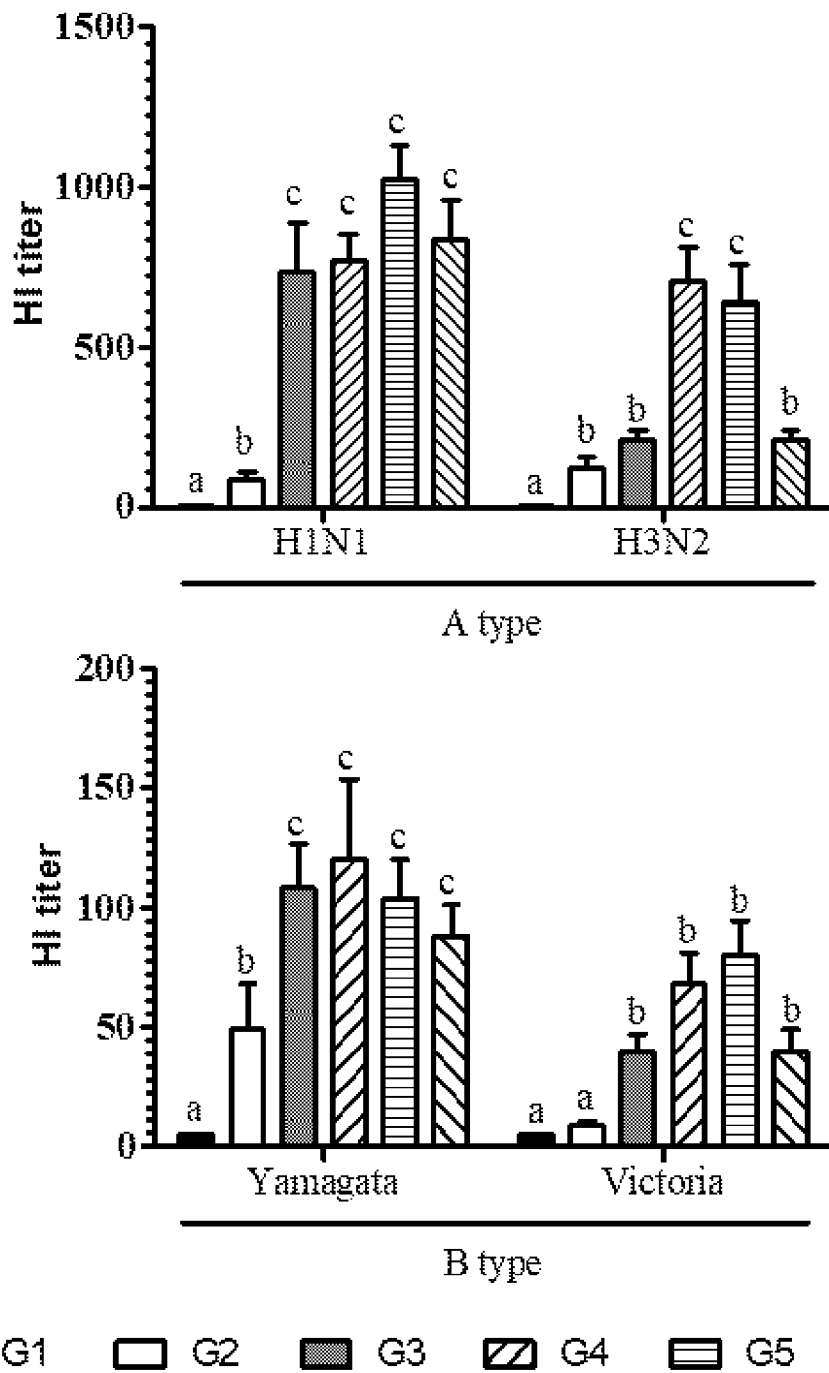


[도24]

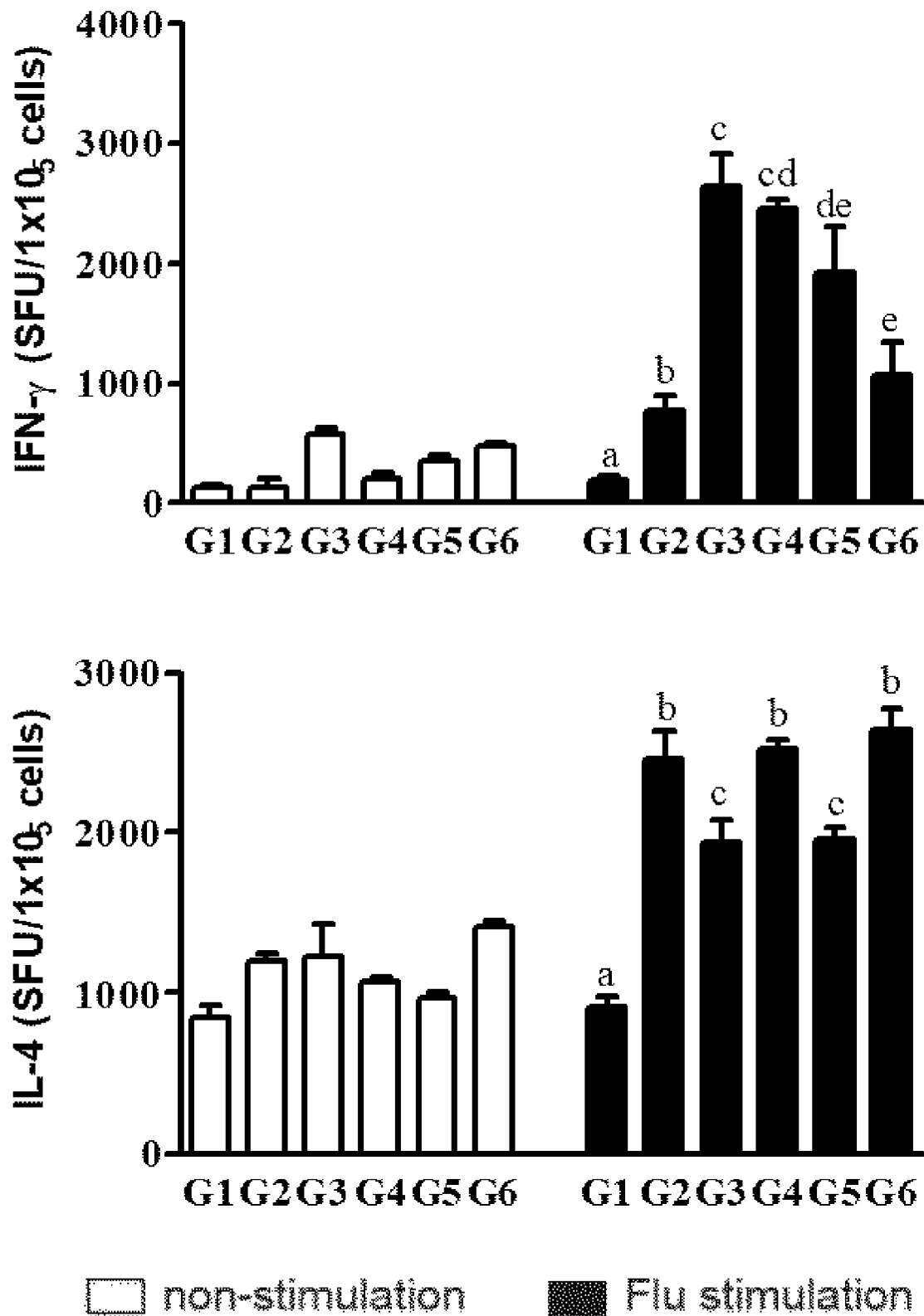


[도25]

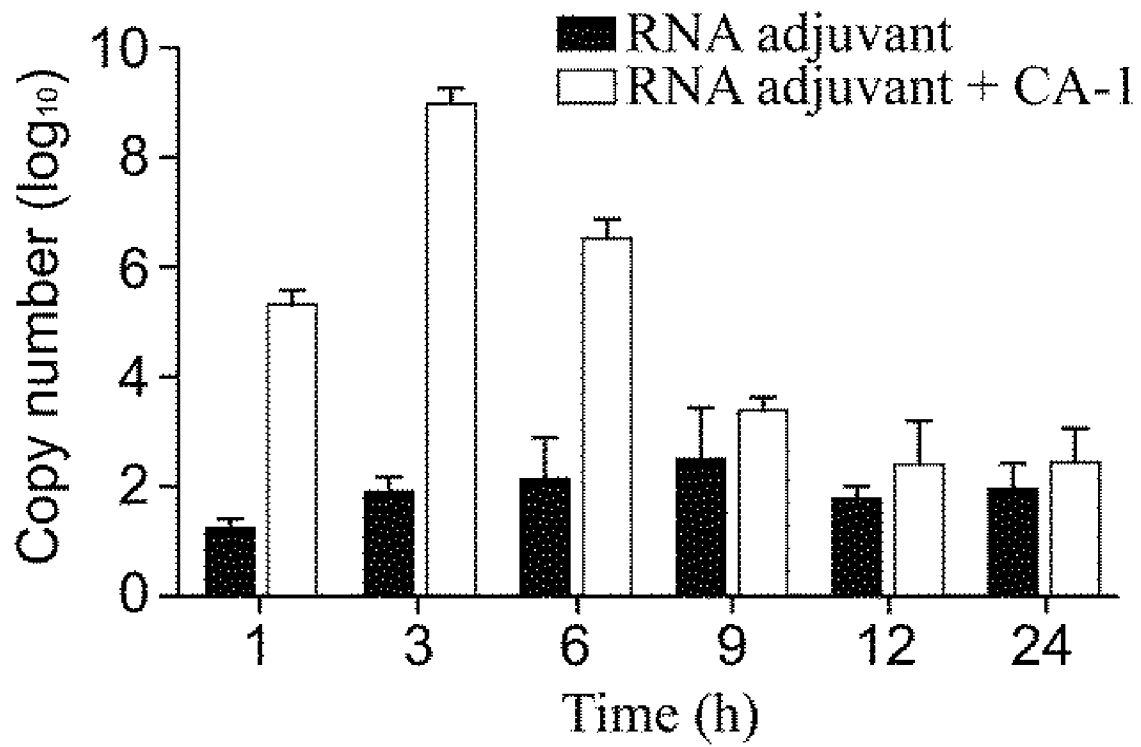
2차 면역 후 2주



[도26]



[도27]



[도28]

