



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년12월10일
(11) 등록번호 10-2741572
(24) 등록일자 2024년12월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/63 (2006.01) A61K 31/7105 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01) A61K 45/06 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) C12N 15/88 (2017.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/63 (2013.01)
A61K 31/7105 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-7009937
(22) 출원일자(국제) 2018년09월06일
심사청구일자 2021년09월01일
(85) 번역문제출일자 2020년04월06일
(65) 공개번호 10-2020-0104282
(43) 공개일자 2020년09월03일
(86) 국제출원번호 PCT/US2018/049772
(87) 국제공개번호 WO 2019/051100
국제공개일자 2019년03월14일
(30) 우선권주장
1714430.4 2017년09월07일 영국(GB)
62/632,056 2018년02월19일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
Curr Opin Virol. 2015 Aug,13:40-8.*
Nat Biotechnol. 2015 Aug,33(8):839-41.*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
콤바인드 테라퓨틱스, 인코포레이션
미국, 델라웨어 19808, 윌밍턴, 리틀 폴스 드라이브 251
(72) 발명자
미콜, 로메인
영국 런던 에스더블유1더블유 9알비, 엘리자베스 스트리트 12
안토스즈치크, 슬라보미르
미국 델라웨어 19808, 윌밍턴, 스위트 400, 센터 빌 로드 2711, 콤바인드 테라퓨틱스, 인코포레이션 내
(74) 대리인
나승택

전체 청구항 수 : 총 18 항

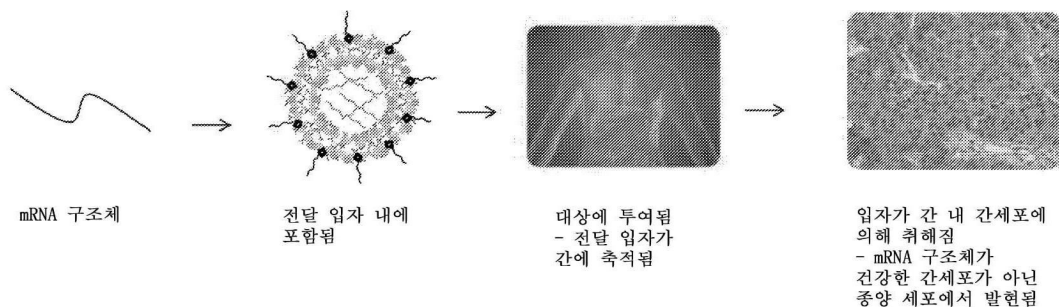
심사관 : 이현지

(54) 발명의 명칭 조직에서 코딩 리보핵산의 표적화된 전달, 발현 및 조절을 위한 조성물 및 방법

(57) 요약

전달 입자, 및 전달 입자와 복합체화되거나, 전달 입자에 의해 캡슐화되거나, 또는 다르게는 전달 입자와 회합되는 적어도 제1 mRNA 서열을 포함하는, 표적 기관 내에서 폴리펩티드를 발현시키기 위한 조성물. mRNA 서열은 폴리펩티드를 코딩하는 코딩 서열, 적어도 제1 비번역 영역(UTR) 서열, 및 적어도 하나의 마이크로-RNA(miRNA) 결합 부위 서열을 포함하고, 여기서 miRNA 결합 부위서열은 제1 UTR 서열 내 5' 바로 옆 또는 3' 바로 옆에 위치한다. miRNA 결합 부위 서열은 표적 기관 내 포함된 제1 세포 유형과 제2 세포 유형 사이의 코딩 서열의 차등 발현을 제공하도록 선택된다. 상기 조성물은 화학요법, 중앙 세포 붕괴성 바이러스 요법 및 세포 요법을 포함하는 다른 치료적 접근법과 조합으로, 또는 이러한 치료적 접근법들을 보완하기 위해 사용될 수 있다. 특히 간암, 뇌암, 폐암, 유방암 및 췌장암과 같은 질환의 치료에서의, 상기 조성물의 제조 및 사용 방법이 제공된다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 31/713 (2013.01)

A61K 45/06 (2013.01)

A61K 48/00 (2024.01)

C12N 15/88 (2013.01)

C12N 2800/107 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

암의 치료에 사용하기 위한 조성물로서, 상기 조성물은:

전달 입자; 및

표적 기관 내에서의 폴리펩티드 발현을 위한 적어도 하나의 mRNA 서열을 포함하고, 상기 mRNA 서열은:

상기 폴리펩티드를 코딩하는 적어도 하나의 코딩 서열;

적어도 제1 비번역 영역(UTR) 서열;

서로 다른 적어도 세개의 마이크로-RNA(miRNA) 결합 부위 서열들을 포함하고;

상기 적어도 세개의 miRNA 결합 부위 서열들은 제1 UTR 서열 내 5' 바로 옆 또는 3' 바로 옆에 위치하며;

상기 적어도 세개의 miRNA 결합 부위 서열들은 상기 표적 기관 내의 상이한 세포 유형들에서 상기 코딩 서열의 차등 발현을 가능하게 하고,

상기 표적 기관은 간, 뇌, 폐, 유방 및 췌장으로부터 선택되고,

상기 폴리펩티드는 종양세포 붕괴성 바이러스 병독성 인자를 포함하고,

상기 적어도 하나의 mRNA 서열은 상기 전달 입자와 복합체화되거나, 상기 전달 입자에 의해 캡슐화되거나, 또는 상기 전달 입자와 회합되는, 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 전달 입자가 아미노알코올 리피도이드를 포함하는, 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 mRNA 서열이 상기 전달 입자에 의해 캡슐화된 것인, 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 전달 입자가 상기 표적 기관에 대해 표적화된 것인, 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 전달 입자가 단백질, 펩티드, 탄수화물, 당단백질, 지질, 소분자 및 핵산으로부터 선택되는 표적화제를 포함하고; 상기 표적화제는 상기 표적 기관의 세포와 우선적으로 회합하는, 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 mRNA 서열이 3개 초과인 결합 부위 서열들을 포함하는, 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 상이한 세포 유형들이 비신생물성 세포, 형질전환된 세포 표현형, 전암성 표현형 및 신생물성 표현형을 포함하는 군으로부터 선택된 상이한 세포 유형들인, 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 mRNA가 복수의 코딩 서열을 포함하는, 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 마이크로-RNA(miRNA) 결합 부위 서열들이 하나 이상의 miRNA-122 결합 부위 서열들, 이의

변이체들 및 상동체들을 포함하는, 조성물.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 서로 다른 적어도 세개의 miRNA 결합 부위 서열들은 miRNA-122; miRNA-124a; miRNA-125; Let-7; 및 miRNA-375로 이루어지는 군으로부터 선택되는 miRNA와 혼성화할 수 있는, 조성물.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 조성물은 종양세포 붕괴성 바이러스를 더 포함하는, 조성물.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 압은 간암인, 조성물.

청구항 13

제1항에 있어서, 상기 mRNA 서열이 종양세포 붕괴성 바이러스의 효능을 증가시키는 치료제를 코딩하는, 조성물.

청구항 14

제11항에 있어서, 상기 종양세포 붕괴성 바이러스가 하나 이상의 병독성 유전자의 돌연변이에 의해 약독화된 것인, 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 mRNA 서열이 하나 이상의 병독성 유전자, 또는 이의 등가물 또는 상동체를 코딩하는, 조성물.

청구항 16

제11항에 있어서, 상기 종양세포 붕괴성 바이러스가 볼티모어 바이러스 분류의 1 내지 7군 중 어느 하나로부터 선택되는, 조성물.

청구항 17

제11항에 있어서, 상기 종양세포 붕괴성 바이러스가 수포성 구내염 바이러스, 마라바 바이러스, 폴리오 바이러스, 레오바이러스, 홍역 바이러스, 뉴캐슬병 바이러스, 콕사키바이러스 A21, 파코바이러스, 제1형 단순포진 바이러스 및 아데노바이러스 중 하나 이상을 포함하는 군으로부터 선택되는, 조성물.

청구항 18

제11항에 있어서, 상기 종양세포 붕괴성 바이러스가 단순포진 바이러스인, 조성물.

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원

[0002] 본 출원은 2017년 9월 7일자 출원된 영국 특허 출원 번호 제1714430.4호 및 2018년 2월 19일자 출원된 미국 가출원 번호 제62/632,056호를 우선권 주장하며, 상기 문헌들은 그 전문이 본원에 참조로서 인용된다.

[0003] 기술분야

[0004] 본 발명은 메신저(messenger) 리보핵산(mRNA) 전달 기술, 전형적으로 나노입자 기반 전달, 및 다양한 치료적, 진단적 및 예방적 조치에서 이러한 mRNA 전달 기술을 제조 및 사용하는 방법에 관한 것이다. 이러한 전달 시스템은 독립형 중재로서, 또는 다른 치료 성분과 조합으로 사용될 수 있다.

배경 기술

[0005] 유전자 요법은 질환을 치료하기 위해 코딩 폴리뉴클레오티드를 환자의 세포에 도입하는 방법이다. 예를 들어, 표적 세포에서 돌연변이된 및/또는 기능을 상실한 유전자를 온전한 카피로 대체할 수 있다. 유전자 요법은 종종 바이러스 벡터에 의존하여 코딩 폴리뉴클레오티드를 표적 세포에 도입하지만, 바이러스의 사용 없이 폴리뉴클레오티드를 세포에 전달하는 다른 기술이 존재한다. 바이러스의 이점에는, 가능한 비교적 높은 트랜스펙션율(transfection rate)뿐 아니라, 바이러스를 표적 세포에 들어가게 하는 결합 단백질의 제어의 의해 바이러스를 특정 세포 유형으로 표적화하는 능력이 포함된다. 대조적으로, 코딩 폴리뉴클레오티드를 세포에 도입하는 비(非)바이러스 방법은, 낮은 트랜스펙션율뿐 아니라, 특정 기관 및 세포 유형으로 발현을 표적화하기 위한 선

택에 제한이 있다는 문제가 있을 수 있다. 하지만, 바이러스 중재의 본질은 독성 및 염증의 위험을 수반하는 것 뿐 아니라, 도입된 인자의 발현 지속기간 및 정도에 대한 제어가 제한적이다.

[0006] 생물학적 접근법을 기반으로 한 종양 치료요법은, 암을 보다 정확하게 표적화하고 파괴하기 위해, 예를 들어 다른 것들 중에서 특히 직접 세포 용해, 세포독성 면역 효과기 메커니즘 및 혈관 붕괴를 통한, 매우 다양한 메커니즘을 이용할 수 있기 때문에, 전통적인 화학요법에 비해 이점이 있다. 그 결과, 이러한 접근법의 가능성에 대한 임상 연구의 수가 유의하게 증가해 왔다. 하지만, 다양한 치료 활성 범위로 인해, 다수의 파라미터가 이의 치료적 잠재성에 영향을 미칠 수 있으며, 따라서 치료 활성을 증강시킬 수 있는 치료 실패 또는 방법론에 대한 이유를 정의하는 것이 어려울 수 있기 때문에, 전임상 및 임상 연구는 복잡하다. 표적 활성, 종양 특이성을 유지하고, 부작용을 감소시키는 것 또한 이러한 실험적이고 강력한 요법의 주요 과제이다.

[0007] 비(非)임상 맥락에서도, 특정 표적 조직 또는 기관에서 폴리펩티드와 같은 특정 유전자 생성물의 발현을 유도하는 능력이 빈번하게 요구된다. 다수의 경우, 표적 조직 또는 기관은 하나 초과 유형의 세포를 포함할 것이며, 이러한 경우, 유전자 생성물을 상이한 세포 유형에서 상이한 정도로 발현시키는 것, 즉, 상이한 세포 유형에서 차등 발현을 제공하는 것이 또한 빈번하게 요구된다. 시험관내 및 생체내에서 폴리뉴클레오티드를 도입하는 방법이 존재하지만, 이는 상기 논의된 바와 동일한 한계를 갖는다.

[0008] 따라서, mRNA와 같은 폴리뉴클레오티드 서열을 특정 기관 및/또는 조직에 전달하기 위한 방법 및 조성물, 및 특정 세포에서 전달된 폴리뉴클레오티드 서열의 발현을 조절하는 방법을 추가로 개발할 필요가 있다.

발명의 내용

[0009] 따라서, 본 발명은 발현 가능한 메신저 RNA(mRNA)를 표적 기관의 세포에 전달할 수 있고, 표적 기관 내 상이한 세포, 세포 유형 및/또는 조직에서 차등 발현을 유도하기 위해 마이크로RNA-매개 발현 조절의 세포 시스템을 사용하는 조성물 및 방법을 제공한다. 표적 기관의 세포 내에서 전달을 가능하게 하기 위해 mRNA를 포함하는 나노 규모 전달 시스템이 사용된다. mRNA를 공급함으로써, 본 발명은 상이한 세포 유형, 예를 들어 암성, 비(非)암성, 병든 또는 건강한 세포 내에서, 공급된 mRNA로부터 폴리펩티드 유전자 생성물의 제어 가능하며 제한된 외인성 발현을 가능하게 한다.

[0010] 본 발명은 다양한 부가된, 병용 투여된 또는 동시 투여된 요법의 기능을 증강 또는 조절하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명은 종양 세포 붕괴성 바이러스 요법, 화학요법, 항체 요법 또는 방사선요법과 함께 사용될 수 있다. 일례에서, 환자에게 투여된 종양 세포 붕괴성 바이러스(oncolytic virus)의 효능을 증가시키는 인자를 코딩하는 mRNA는, 암성 세포에서 선택적으로 발현될 수 있기 때문에, 비암성 및/또는 건강한 세포를 보존하면서 암 세포의 바이러스 용해를 증가시킬 수 있다. 이러한 접근법은 약독화된 종양 세포 붕괴성 바이러스가 이웃하는 비암성 또는 건강한 세포가 아닌, 암성 세포에서 완전한 효능으로 회복되도록 하는 데 사용될 수 있다. 이러한 접근법의 핵심 이점은, 표적외(off target) 효과를 감소시키고 치료 효과의 효능을 증가시켜, 투여량 및 관련 부작용의 감소를 유도하는 것이다.

[0011] 본 발명의 제1 양태에 따라, 전달 입자, 및 전달 입자와 복합체화되거나, 전달 입자에 의해 캡슐화되거나, 또는 다르게는 전달 입자와 회합되는 적어도 제1 mRNA 서열을 포함하는 조성물인, 표적 기관 내에서 폴리펩티드를 발현시키기 위한 조성물이 제공된다. mRNA 서열은 폴리펩티드를 코딩하는 코딩 서열, 적어도 제1 비(非)번역 영역(UTR) 서열, 및 적어도 하나의 마이크로-RNA(miRNA) 결합 부위 서열을 포함하고, 여기서 miRNA 결합 부위 서열은 제1 UTR 서열 내 5' 바로 옆 또는 3' 바로 옆에 위치한다. miRNA 결합 부위 서열은 표적 기관 내 포함된 제1 세포 유형과 제2 세포 유형 사이의 코딩 서열의 차등 발현을 제공하도록 선택된다.

[0012] 본 발명의 일 구현예에서, mRNA 서열은 전달 입자에 의해 캡슐화될 수 있다. 전달 입자는 아미노알코올 리피도이드를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 전달 입자는 표적 기관에 대하여 표적화된 것이고, 단백질, 펩티드, 탄수화물, 당단백질, 지질, 소분자 및 핵산으로부터 선택되는 하나 이상의 표적화제를 추가로 포함할 수 있으며, 여기서 이러한 표적화제는 표적 기관의 세포와 우선적으로 회합한다.

[0013] 본 발명의 일 구현예에서, miRNA 결합 부위 서열은 복수의 miRNA 결합 부위 서열을 포함한다. 복수의 miRNA 결합 부위 서열은 2개 초과, 적합하게는 3개 초과, 전형적으로 4개 초과 결합 부위 서열을 포함할 수 있다. 복수의 miRNA 결합 부위 서열은 각각 실질적으로 동일한 서열일 수 있거나, 또는 하나 이상의 실질적으로 상이한 서열일 수 있다. 복수의 miRNA 결합 부위 서열은 동일한 miRNA 중, 또는 동일한 miRNA 종의 상이한 변이체에 대한 표적인 서열의 상이한 변형일 수 있다. 본 발명의 일 구현예에서, miRNA 결합 부위 서열은 하나 이상의

miRNA-122 결합 부위 서열(이의 변이체 및 상동체 포함)을 포함할 수 있다.

- [0014] 표적 기관에서 상이한 세포 유형은 비(非)신생물성 세포, 신생물성(전암성 또는 암성) 세포 및 이들의 조합을 포함할 수 있다. 특히, 제1 및 제2 세포 유형은 비신생물성 세포, 형질전환된 세포 표현형, 전암성 표현형 및 신생물성 표현형을 포함하는 군으로부터의 상이한 선택일 수 있다. 비신생물성 세포는 건강한 세포로서 간주될 수 있거나, 또는 대안적으로 건강하지 않지만(예를 들어 경화성, 염증이 생긴 또는 감염된) 비암성인 세포를 포함할 수 있다.
- [0015] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 표적 기관은 적어도 제1 세포 표현형 및 적어도 제2 세포 표현형을 포함하고; 선택적으로 표적 기관은 적어도 제3, 제4, 제5, 제6, 제7 및 제8의 세포 표현형을 포함하며; 적합하게는 표적 기관은 복수의 세포 표현형을 포함한다. 본 발명이 복수의 세포 표현형을 포함하는 구현예에 관한 것인 경우, 차등 발현은 복수의 세포 표현형 중 적어도 하나에서 검출 가능한 수준으로 일어나지만, 다른 세포 표현형에서는 더 낮은 정도로 또는 검출 가능하지 않은 정도로 일어난다.
- [0016] 본 발명의 구현예에서, 표적 기관은 상이한 miRNA 발현 패턴을 나타내는 제1 및 제2 세포 유형을 포함한다. 표적 기관은 간, 뇌, 폐, 유방 또는 채장으로부터 선택될 수 있다. 표적 기관은 단일 수 있으며, 이러한 구현예에서, 입자 및 mRNA는 모두 대상 환자 또는 동물의 간 내에 포함된 세포 유형 또는 조직 내 코딩 서열의 차등 발현을 용이하게 하도록 구성된다.
- [0017] 제1 UTR 서열은 코딩 서열의 3'에 위치할 수 있다. 다른 구현예에서, 제1 UTR 서열은 코딩 서열의 5'에 위치할 수 있다. 본 발명의 일 구현예에서, mRNA 서열은 표적 기관 내 상이한 세포 유형 중 적어도 하나에서 발견되는 UTR 서열과 적어도 90% 유사성을 갖는 제2 UTR 서열을 추가로 포함한다. 선택적으로, 제2 UTR 서열은 표적 기관 내 적어도 하나의 병들지 않은 세포 유형에서 UTR 서열과 적어도 90% 유사성을 갖는다. 선택적으로, 제2 UTR 서열은 표적 기관 내 적어도 하나의 병든 세포 유형에서 UTR 서열과 적어도 90% 유사성을 갖는다.
- [0018] 일부 구현예에서, 폴리펩티드는 치료 증강 인자를 포함한다. 치료 증강 인자는 종양 억제 단백질, 프로그램화된 세포 사멸 단백질, 프로그램화된 세포 사멸 경로의 저해제, 단일클론 항체, 또는 이의 단편 또는 유도체, 서열-특이적 뉴클레아제, 종양 세포 붕괴성 바이러스 병독성 인자, 사이토카인, 케모카인, 형광 마커 단백질, 및 이들의 조합으로부터 선택될 수 있다. 일 구현예에서, 치료 증강 인자는 하기로 이루어지는 군으로부터 선택되는 면역조절 분자이다:
- [0019] (i) TNF α , TNF β , IFN α , IFN β , IFN감마, IL1, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL8, IL9, IL10, IL11, IL12, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5 CXCL9 및 CXCL10 중 하나 이상으로부터 선택되는, 면역 반응 및 염증에 관여하는 사이토카인;
- [0020] (ii) GM-CSF, TLR7 및 TLR9중 하나 이상으로부터 선택되는, 수지상 세포 활성화제;
- [0021] (iii) CD40, CD40L, CD160, 2B4, Tim-3, GP-2, B7H3 및 B7H4 중 하나 이상으로부터 선택되는, 세포 수용체 및 이의 리간드를 표적으로 하는 분자;
- [0022] (iv) TGF β 저해제;
- [0023] (v) T-세포 막 단백질 3 저해제;
- [0024] (vi) 프로그램화된 사멸 1(PD1), 프로그램화된 사멸-리간드 1(PDL1), 프로그램화된 사멸-리간드 2(PDL2), 세포 독성 T-림프구 항원 4(CTLA4) 및 림프구-활성화 유전자 3(LAG3)의 저해제; 및
- [0025] (vii) NF- κ B 저해제.
- [0026] 일 구현예에서, 본 발명에 따른 조성물은 종양 세포 붕괴성 바이러스를 추가로 포함할 수 있다. 적합하게는, 상기 바이러스는 볼티모어(Baltimore) 바이러스 분류의 1 내지 7군 중 어느 하나로부터 선택된다. 선택적으로, 종양 세포 붕괴성 바이러스는 수포성 구내염 바이러스, 마라바(Maraba) 바이러스, 폴리오(Polio) 바이러스, 레오 바이러스(Reovirus), 홍역 바이러스, 뉴캐슬병(Newcastle disease) 바이러스, 콕사키바이러스(Coxsackievirus) A21, 파보바이러스(Parvovirus), 제1형 단순포진 바이러스 및 아데노바이러스(Adenovirus) 중 하나 이상을 포함하는 군으로부터 선택된다.
- [0027] 본 발명의 또 다른 양태에서, 표적 기관 내에서 폴리펩티드를 발현시키기 위한 단리된 mRNA 서열이 제공된다. 상기 서열은 폴리펩티드를 코딩하는 적어도 하나의 코딩 서열, 적어도 제1 비번역 영역(UTR) 서열, 및 적어도 하나의 마이크로-RNA(miRNA) 결합 부위 서열을 포함하고, 여기서 miRNA 결합 부위 서열은 제1 UTR 서열 내 5'

바로 옆 또는 3' 바로 옆에 위치한다. miRNA 결합 부위 서열은 표적 기관 내 상이한 세포 유형에서 코딩 서열의 차등 발현을 가능하게 한다. 또한, 본 발명의 일 구현예에서, 이러한 mRNA 서열을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 발현 구조체가 고려된다. 이러한 양태는, 본 발명의 다른 구현예의 mRNA 서열에 관하여 상기 논의된 특징 중 임의의 것을 추가로 포함할 수 있다고 의도된다. 또 다른 구현예에서, 폴리펩티드는 서열번호 3에 개시된 바와 같은 형광 마커 단백질을, 예컨대 mCherry를 코딩할 수 있다.

[0028] 본 발명의 추가의 양태에서, 암의 치료, 예방, 발병 또는 진행의 지연, 또는 암과 관련된 증상 완화 방법이 제공되며, 상기 방법은 상기 양태 및 구현예에 따라 논의된 바와 같은 조성물을 이를 필요로 하는 대상에게 투여하는 단계를 포함한다. 특정 구현예에서, 폴리펩티드는 치료 증강 인자, 예컨대 면역조절 분자 또는 상기 기재된 바와 같은 다른 인자를 코딩할 수 있다.

[0029] 본 발명의 추가의 구현예에서, mRNA는 동일하거나 상이한 폴리펩티드를 인코딩할 수 있는, 복수의 코딩 서열을 포함한다.

[0030] 본 발명의 일 양태에서, 상기 기재된 mRNA 서열을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 발현 벡터 구조체가 제공된다. 적합하게는, 폴리뉴클레오티드 발현 벡터는 DNA 플라스미드를 포함한다.

[0031] 본 발명의 구현예에서, 대상은 인간 또는 비(非)인간 동물일 수 있다. 암은 간암, 뇌암, 폐암, 유방암 또는 췌장암으로부터 선택될 수 있다. 암은 간암일 수 있으며, 적합하게는 간암종 또는 전이성 간암일 수 있다. 간암은 간암종 또는 간모세포종과 같은 원발성 암, 또는 간에서의 속발성/전이성 암일 수 있다. 전이성 암은 알려진 또는 알려지지 않은 원발성 고형 종양에서 유래할 수 있다. 상기 방법은 대상에게 화학요법, 종양 세포 붕괴성 바이러스, 방사선요법, 생물체제, 종양 세포 붕괴성 바이러스, 소분자 약물, 입양 세포 요법(예컨대 CAR-T 세포 요법, CAR-NK 요법), 및 이들의 조합과 같은 치료요법 또는 치료제를 투여하는 것을 추가로 포함할 수 있다.

[0032] 본 발명의 일 양태에서, 상기 양태 및 구현예에 따라 논의된 바와 같은 조성물 및 화합물은 의약, 적합하게는 암의 치료를 위한 의약에 사용된다. 암은 간암일 수 있으며, 적합하게는 간암종, 간모세포종, 담관암종, 혈관육종과 같은 원발성 암, 또는 간에서의 속발성/전이성 암일 수 있다.

[0033] 본 발명의 추가의 양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 복수의 전달 입자를 포함하는 조성물을 제조하는 방법으로서,

[0034] (i) 캡슐화 조성물을 제공하는 단계;

[0035] (ii) mRNA 서열을 포함하는 용액을 제공하는 단계로서, 여기서 mRNA 서열은 표적 기관 내에서 폴리펩티드를 발현시키기 위한 것으로, mRNA 서열은

[0036] 폴리펩티드를 코딩하는 적어도 하나의 코딩 서열;

[0037] 적어도 제1 비번역 영역(UTR) 서열;

[0038] 적어도 하나의 마이크로-RNA(miRNA) 결합 부위 서열을 포함하고,

[0039] 여기서 miRNA 결합 부위 서열은 제1 UTR 서열 내 5' 바로 옆 또는 3' 바로 옆에 위치하며,

[0040] miRNA 결합 부위 서열은 표적 기관 내 상이한 세포 유형에서 코딩 서열의 차등 발현을 가능하게 하는, 단계;

[0041] (iii) 캡슐화 조성물을 mRNA 서열을 포함하는 용액과 조합하여, 캡슐화 조성물과 mRNA 서열 사이의 복합체를 형성하는 단계; 및

[0042] (iv) (iii)의 복합체를 분산시켜, 복수의 전달 입자를 생성하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다.

[0043] 적합하게는, 캡슐화 조성물은 아미노알코올 리피도이드, 선택적으로 C12-200 아미노알코올 리피도이드를 포함하는 에탄올성 용액으로 구성된다. 전형적으로, 복수의 전달 입자는 평균 직경이 적어도 약 1 나노미터(nm), 적합하게는 적어도 약 30 nm, 선택적으로 적어도 약 50 nm 내지 최대 약 150 nm인 전달 입자를 포함한다.

[0044] 본 발명의 추가의 양태에서, 암의 치료, 예방, 발병 또는 진행의 지연, 또는 암과 관련된 증상 완화 방법으로서, 상기 양태 및 구현예에 따라 논의된 바와 같은 조성물을 제공하는 단계, 및 상기 조성물을 종양 세포 붕괴성 바이러스와 조합으로 또는 동시에 이를 필요로 하는 대상에게 투여하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다.

[0045] 일 구현예에서, mRNA 서열은 종양 세포 붕괴성 바이러스의 효능을 증가시키는 치료제를 코딩한다. 종양 세포 붕

괴성 바이러스는 하나 이상의 병독성 유전자의 결실에 의해 약독화된 것일 수 있고, mRNA 서열은 하나 이상의 병독성 유전자 또는 이의 등가물을 코딩할 수 있다.

[0046] 일부 구현예에서, 종양 세포 붕괴성 바이러스는 볼티모어 바이러스 분류의 1 내지 7군 중 어느 하나로부터 선택된다. 종양 세포 붕괴성 바이러스는 수포성 구내염 바이러스, 마라바 바이러스, 폴리오 바이러스, 레오바이러스, 홍역 바이러스, 뉴캐슬병 바이러스, 콕사키바이러스 A21, 파코바이러스, 제1형 단순포진 바이러스 및 아데노바이러스 중 하나 이상을 포함하는 군으로부터 선택될 수 있다. 일 구현예에서, 종양 세포 붕괴성 바이러스는 단순포진 바이러스이고, mRNA 서열은 US3을 코딩하며 서열번호 4를 포함할 수 있다. 또 다른 구현예에서, 종양 세포 붕괴성 바이러스는 단순포진 바이러스이고, mRNA 서열은 ICP6을 코딩하며 서열번호 5를 포함할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0047] 본 발명은 첨부되는 도면을 참조로 추가로 설명된다:

도 1은, 본 발명의 하나의 구현예에 따른, 리피도이드 캡슐화된 mRNA 조성물의 투여 방법의 개략도를 보여준다.

도 2는, 본 발명의 구현예에 따른, mRNA 구조체를 제조하는 데 사용되었던 벡터인, DNA 합성 벡터를 제조하기 위한 클로닝 방법의 예를 보여준다.

도 3은, 본 발명의 구현예에서 사용되고 도 4에 도시된 mRNA 구조체의 3가지 변형, 및 코딩 서열의 3'에 위치하는 UTR 서열 내 또는 이에 인접한 한 쌍의 miRNA 결합 서열(본원에서 miR-122에 결합하는 서열)의 삽입 지점에 대한 가능한 선택을 보여준다.

도 4는, DNA 플라스미드, 주형 플라스미드뿐 아니라, 도 3에 도시된 mRNA 구조체를 제조하기 위한 합성 벡터의 예를 보여준다.

도 5, 6 및 7은, 도 3에 도시된 바와 같은 mRNA 구조체 변형을 제조하기 위한 합성 벡터를 제조하는 데 사용될 수 있는 방법의 예를 보여준다.

도 8은, 본 발명의 일 구현예에 따른, 전달 입자의 제조에 사용될 수 있는 구성 화합물의 예의 화학식을 보여준다.

도 9a는, 본 발명의 일 구현예에 따른, mRNA를 포함하는 전달 입자의 나노제형의 제조 방법을 보여준다.

도 9b는, 본 발명의 일 구현예에 따른 mRNA를 포함하고, 도 8에 도시된 캡슐화 구성 화합물을 추가로 포함하는 전달 입자의 단면 구조를 보여준다.

도 10a는, 건강한 인간 간세포 배양물(인간 플레이팅 가능한 간세포(Human Plateable Hepatocyte), HMCPP5), 인간 간암종(Hep3B) 및 인간 간모세포종(HepG2) 세포로부터의 세포를 *시험관내*에서 본 발명의 구현예에 따른 조성물로 트랜스펙션시켰던 실험 결과를 나타내는 형광 현미경 이미지이다. 2가지 전달 입자를 투여하였다: 하나는 형광 단백질 mCherry를 인코딩하는 mRNA를 함유하는 전달 입자(mRNA-mCh-DMP^{CTX})이고, 다른 하나는 형광 단백질 mCherry를 인코딩하는 mRNA를 함유하지만, 표적 세포에서 miRNA-122 함량에 의해 차등 발현이 제어되는 전달 입자(mRNA-mCh-122-DMP^{CTX})입.

도 10b는, 도 10a의 실험에 따라 트랜스펙션된 세포의 48시간 후 형광 강도의 정량화를 보여준다. 결과는 평균 \pm SD(표준편차)로 제시된다. 통계적 유의성은 *t* 검정을 사용하여 결정되었다. 별표는 트랜스펙션된 세포에서 mRNA-mCherry와 mRNA-mCherry-122 발현 사이의 통계적으로 유의한 차이를 나타낸다(****p < 0.0001, ***p < 0.001).

도 11은, 인간 간세포(HMCPP5)를 도 10a에 사용된 전달 입자로 여러번 (MPT) 또는 한번 (ST) 트랜스펙션시켰던 실험 결과의 그래프를 보여준다. mCherry의 발현은 트랜스펙션 24, 28, 72, 96 및 144시간 후에 측정된 형광 강도 수준에 의해 결정된다. 결과는 평균 \pm SD로 제시된다. 통계적 유의성은 *t* 검정을 사용하여 결정되었다. 별표는 트랜스펙션된 세포에서 mRNA-mCherry와 mRNA-mCherry-122 발현 사이의 통계적으로 유의한 차이를 나타낸다(*p < 0.01, **p < 0.05).

도 12a는, 건강한 마우스 간세포(AML12 세포주)를, 트랜스펙션 24시간 후 나타난 mCherry의 상대적 발현 수준을 갖는 도 10a에 사용된 전달 입자로 *시험관내*에서 트랜스펙션시켰던 실험 결과를 나타내는 형광 현미경 이미지를

보여준다.

도 12b는, 도 12a의 결과뿐 아니라, 추가로 트랜스펙션 72시간 후의 시간 지점에 대한 결과에 대하여 계수된 픽셀%로서의 형광 강도의 정량화를 제공하는 그래프를 보여준다.

도 13은, 인간 간세포(HMCPP5), 인간 간모세포종(HepG2) 및 인간 간암종(Hep3B) 세포를, miRNA 차등 발현 제어 하에서, 25 kDa 분자 질량의 예시적인 인간 폴리펩티드를 인코딩하는 mRNA를 포함하는 본 발명의 일 구현예에 따른 조성물로 트랜스펙션시켰던 2가지 실험(실험 1 및 실험 2로 표시됨)에서의 웨스턴 블롯(Western blot) 결과를 보여준다.

도 14는, 간암종(Hep3B) 및 간모세포종(HepG2) 모델로부터의 인간 세포의 생존력에 대한 단순포진 바이러스 변이체 R7041의 효과를 보여준다. 상대적 세포 생존력에 대한 바이러스 적용의 효과가 제시되어 있다.

도 15는, 간암종 모델로부터의 인간 세포를 본 발명의 일 구현예에 따른 조성물 및 방법으로 처리한 후, MTS 비색 검정을 통해 시험한 시험관내 실험에 대한 시간표를 보여준다.

도 16a 및 16b는, 도 15의 시간표 후, 간모세포종(도 16a) 및 간암종(도 16b) 모델로부터의 인간 세포를 바이러스 단독 또는 본 발명의 일 구현예에 따른 조성물과의 조합으로 처리했던 시험관내 실험 결과를 보여준다. 상기 조성물은 US3을 코딩하는 mRNA를 포함하는 전달 입자(US3 mRNA DMP^{CTx})이다. 세포 생존력에 대한 상기 처리 효과가 제시되어 있다.

도 17a 및 17b는, 인간 간암종의 마우스 모델을 사용한 생체내 실험 결과를 보여준다. 도 17a는, 종양 성장을 보여준다(Hep3B 세포는 루시페라아제로 표지됨). 도 17b는, mCherry를 코딩하는 mRNA를 사용한 건강한 마우스 간의 형광 현미경 이미지를 보여준다(mCherry-DMP^{CTx}-miRNA122 조성물을 사용한 경우에는 형광이 검출되지 않았음).

도 18은, 도 17a에 제시된 바와 동일한 마우스 모델을 사용한 생체내 실험의 면역조직화학 현미경 사진 결과를 보여준다. US3을 코딩하는 mRNA를 포함하는 전달 입자(US3 mRNA DMP^{CTx} miRNA-122)는 꼬리 정맥을 통해 투여되고, 종양 조직에서 US3 단백질의 더 짙은 염색에 의해 입증되는 바와 같이 병들지 않은 간세포와 종양 간 조직 사이에서 차등 발현을 제공한다. 종양 조직과 병들지 않은 조직 사이의 경계는 점선으로 표시되어 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0048] 달리 지시되지 않는 한, 본 발명의 실시는 당업자의 능력 내에 있는, 화학, 분자 생물학, 미생물학, 재조합 DNA 기술 및 화학적 방법의 통상의 기술을 이용한다. 이러한 기술은 또한, 예를 들어 하기 문헌에 설명되어 있다: [M.R. Green, J. Sambrook, 2012, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Fourth Edition, Books 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY]; [Ausubel, F. M. et al. (1995 and periodic supplements; Current Protocols in Molecular Biology, ch. 9, 13, and 16, John Wiley & Sons, New York, N. Y.)]; [B. Roe, J. Crabtree, and A. Kahn, 1996, DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques, John Wiley & Sons]; [J. M. Polak and James O'D. McGee, 1990, In Situ Hybridisation: Principles and Practice, Oxford University Press]; [M. J. Gait (Editor), 1984, Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press]; 및 [D. M. J. Lilley and J. E. Dahlberg, 1992, Methods of Enzymology: DNA Structure Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA Methods in Enzymology, Academic Press]. 이러한 일반적인 문서들은 각각 본원에 참조로서 인용된다.

[0049] 본 발명을 설명하기 전에, 본 발명의 이해를 돕는 다수의 정의가 제공된다. 본원에 인용된 모든 참고문헌은 그 전문이 본원에 참조로서 인용된다. 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자에게 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다.

[0050] 본원에 사용된 바, 용어 '포함하는'은, 임의의 언급된 요소가 필수적으로 포함되고, 다른 요소도 선택적으로 포함될 수 있다는 것을 의미한다. '~로 본질적으로 이루어진'은, 임의의 언급된 요소가 필수적으로 포함되고, 열거된 요소의 기본적 및 신규한 특징에 실질적으로 영향을 미칠 수 있는 요소는 배제되며, 다른 요소가 선택적으로 포함될 수 있다는 것을 의미한다. '~로 이루어진'은, 열거된 것들 이외의 모든 요소가 배제된다는 것을 의미한다. 이러한 용어 각각에 의해 정의된 구현예는 본 발명의 범위 내에 속한다.

[0051] 폴리뉴클레오타이드 서열에 적용될 때, 용어 '단리된'은, 서열이 천연 기원 유기체로부터 제거되어, 관련 없는 또

는 원치않는 코딩 또는 조절 서열이 없다는 것을 나타낸다. 단리된 서열은 재조합 DNA 과정 및 유전자 조작된 단백질 합성 시스템 내에서 사용하기에 적합하다. 이러한 단리된 서열에는, cDNA, mRNA 및 게놈 클론이 포함된다. 단리된 서열은 단백질 인코딩 서열로만 제한될 수 있거나, 또는 프로모터 및 전사 종결자와 같은 5' 및 3' 조절 서열을 또한 포함할 수 있다. 본 발명을 추가로 설명하기 전에, 본 발명의 이해를 돕는 다수의 정의가 제공된다.

[0052] '폴리뉴클레오티드'는, 각각의 뉴클레오티드 상의 3' 및 5' 말단이 포스포디에스테르 결합에 의해 연결된, 뉴클레오티드의 단일 또는 이중 가닥 공유결합된 서열이다. 폴리뉴클레오티드는 데옥시리보뉴클레오티드 염기 또는 리보뉴클레오티드 염기로 구성될 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 DNA 및 RNA를 포함하고, 시험관내에서 합성적으로 제조되거나, 또는 천연 공급원으로부터 단리될 수 있다. 폴리뉴클레오티드의 크기는 전형적으로 이중 가닥 폴리뉴클레오티드의 경우 염기 쌍(bp)의 수로, 또는 단일 가닥 폴리뉴클레오티드의 경우 뉴클레오티드(nt)의 수로 표현된다. 1,000 bp 또는 nt는 킬로베이스(kb)와 같다. 약 40개 미만 뉴클레오티드 길이의 폴리뉴클레오티드는 전형적으로 '올리고뉴클레오티드'로 불린다. 본원에 사용된 바, 용어 '핵산 서열'은, 각각의 뉴클레오티드 상의 3' 및 5' 말단이 포스포디에스테르 결합에 의해 연결된, 뉴클레오티드의 단일 또는 이중 가닥 공유결합된 서열이다. 폴리뉴클레오티드는 데옥시리보뉴클레오티드 염기 또는 리보뉴클레오티드 염기로 구성될 수 있다. 핵산 서열은 DNA 및 RNA를 포함할 수 있으며, 시험관내에서 합성적으로 제조되거나, 또는 천연 공급원으로부터 단리될 수 있다. 본원에서 '폴리뉴클레오티드'로도 지칭되는 핵산 서열의 크기는, 전형적으로 이중 가닥 폴리뉴클레오티드의 경우 염기 쌍(bp)의 수로, 또는 단일 가닥 폴리뉴클레오티드의 경우 뉴클레오티드(nt)의 수로 표현된다. 1,000 bp 또는 nt는 킬로베이스(kb)와 같다. 약 40개 미만 뉴클레오티드 길이의 폴리뉴클레오티드는 전형적으로 '올리고뉴클레오티드'로 불리며, 폴리머라아제 연쇄 반응(PCR)을 통하는 것과 같은 DNA의 조작에 사용하기 위한 프라이머를 포함할 수 있다.

[0053] 본원에 사용된 바, 용어 '핵산'은, 각각의 뉴클레오티드 상의 3' 및 5' 말단이 포스포디에스테르 결합에 의해 연결된, 뉴클레오티드의 단일 또는 이중 가닥 공유결합된 서열이다. 폴리뉴클레오티드는 데옥시리보뉴클레오티드 염기 또는 리보뉴클레오티드 염기로 구성될 수 있다. 핵산은 DNA 및 RNA를 포함할 수 있으며, 시험관내에서 합성적으로 제조되거나, 또는 천연 공급원으로부터 단리될 수 있다. 핵산은 변형된 DNA 또는 RNA, 예를 들어 메틸화된 DNA 또는 RNA, 또는 번역후 변형, 예를 들어 7-메틸구아노신으로의 5'-캡핑, 절단 및 폴리아데닐화와 같은 3'-처리, 및 스플라이싱에 적용된 RNA를 추가로 포함할 수 있다. 핵산은 또한 합성 핵산(XNA), 예컨대 핵시톨 핵산(HNA), 시클로핵센 핵산(CeNA), 트레오스 핵산(TNA), 글리세롤 핵산(GNA), 잠금 핵산(LNA) 및 펩티드 핵산(PNA)을 포함할 수 있다. 본원에서 '폴리뉴클레오티드'로도 지칭되는 핵산의 크기는, 전형적으로 이중 가닥 폴리뉴클레오티드의 경우 염기 쌍(bp)의 수로, 또는 단일 가닥 폴리뉴클레오티드의 경우 뉴클레오티드(nt)의 수로 표현된다. 1,000 bp 또는 nt는 킬로베이스(kb)와 같다. 약 100개 미만 뉴클레오티드 길이의 폴리뉴클레오티드는 전형적으로 '올리고뉴클레오티드'로 불리며, 폴리머라아제 연쇄 반응(PCR)을 통하는 것과 같은 DNA의 조작에 사용하기 위한 프라이머를 포함할 수 있다. 본 발명의 특정 구현예에서, 핵산 서열은 메신저 RNA(mRNA)를 포함한다.

[0054] 본 발명에 따르면, 본원에 기재된 핵산 서열에 대한 상동성은 단순히 100% 서열 동일성에 제한되지 않는다. 다수의 핵산 서열은 명백하게 낮은 서열 동일성을 가짐에도 불구하고 서로 생화학적 동등성을 입증할 수 있다. 본 발명에서, 상동인 핵산 서열은 낮은 엄격성 조건 하에서 서로 혼성화되는 서열인 것으로 여겨진다(상기 Sambrook J. et al. 참조).

[0055] 예를 들어 발현 구조체에서 핵산 서열에 적용될 때, 용어 '작동적으로 연결된'은, 서열이 의도된 목적을 달성하기 위해 협동적으로 기능하도록 배열된 것을 나타낸다. 예로서, DNA 벡터에서, 프로모터 서열은 연결된 코딩 서열을 통해 종결 서열까지 진행되는 전사의 개시를 가능하게 한다. RNA 서열의 경우, 하나 이상의 비번역 영역(UTR)은 오픈 리딩 프레임(open reading frame, ORF)으로 지칭되는 연결된 단백질 코딩 서열과 관련하여 배열될 수 있다. 주어진 mRNA는 하나 초과 ORF, 소위 폴리스리스트로닉(polycistronic) RNA를 포함할 수 있다. UTR은 작동적으로 연결된 코딩 서열 ORF와 관련하여 5' 또는 3'에 위치할 수 있다. UTR은 자연에서 발견되는 mRNA 서열에서 전형적으로 발견되는 서열, 예컨대 코작(Kozak) 공통 서열, 개시 코돈, 시스-작용 조절 요소, polyA 꼬리, 내부 리보솜 진입 부위(internal ribosome entry site, IRES), mRNA 수명을 조절하는 구조, mRNA의 국소화를 지시하는 서열 등을 포함할 수 있다. mRNA는 동일하거나 상이한 다수의 UTR을 포함할 수 있다.

[0056] 본 발명의 맥락에서, 용어 '폴리펩티드의 발현'은, 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드 서열이 코딩되는 폴리펩티드의 생성을 나타낸다. 전형적으로, 이는 서열이 전달되는 세포의 리보솜 기구에 의한 공급된 mRNA 서열의 번역

을 포함한다.

- [0057] 본원에 사용된 바, 용어 '전달 입자'는, 캡슐화, 매트릭스 내 보유, 복합체의 형성 또는 다른 수단에 의해 치료 성분을 포함할 수 있고, 코딩 핵산 서열과 같은 치료 성분을 표적 세포로 전달할 수 있는 입자를 나타낸다. 전달 입자는 마이크로규모일 수 있지만, 특정 구현예에서, 이는 전형적으로 나노규모, 즉 나노입자일 수 있다. 나노입자의 크기는 전형적으로 적어도 50 nm(나노미터), 적합하게는 적어도 대략 100 nm, 전형적으로 최대 150 nm, 200 nm, 선택적으로 300 nm 이하의 직경이다. 본 발명의 하나의 구현예에서, 나노입자는 대략 적어도 60 nm의 평균 직경을 갖는다. 이러한 크기의 이점은, 이것이, 입자가 세망내피계(단핵 식세포계) 클리어런스(clearance)에 대한 임계값 미만이며, 즉 입자가 신체 방어 메커니즘의 일부로서 식세포에 의해 파괴되지 않을 정도로 작다는 것을 의미한다는 것이다. 이는 본 발명의 조성물에 대한 정맥내 전달 경로의 사용을 가능하게 한다.
- [0058] 나노입자의 조성물에 대한 가능한 대안에는, 폴리락트산(PLA), 폴리(락틱-코-글리콜산)(PLGA), 리포솜과 같은 지질- 또는 인지질계 입자; 콜라겐, 알부민, 젤라틴, 엘라스틴, 글리아딘, 케라틴, 레구민, 제인, 대두 단백질, 카제인과 같은 유단백질 등과 같은 단백질 및/또는 당단백질을 기반으로 하는 입자([Lohcharoenkal et al. BioMed Research International; Volume 2014 (2014)]); 및 금, 은, 알루미늄, 구리 산화물 등과 같은 금속 또는 금속성 화합물을 기반으로 하는 입자가 포함된다.
- [0059] 특히, 폴리에틸렌이민(PEI)을 포함하는 중합체가 핵산의 전달을 위해 조사되었다. 폴리(β -아미노 에스테르)(PBAE)로 구성된 나노입자 벡터가 또한 특히 폴리에틸렌 글리콜(PEG)과의 공제형(coformulation)에서 핵산 전달에 적합한 것으로 밝혀졌다([Kaczmarek JC et al Angew Chem Int Ed Engl. 2016; 55(44): 13808-13812]). 이러한 공제형 입자는 mRNA를 폐로 전달하는 데 사용되었다.
- [0060] 셀룰로오스, 키틴 및 키토산과 같은 다당류 및 이의 유도체를 기반으로 하는 입자가 또한 고려된다. 키토산은 생체 적합성, 낮은 독성 및 작은 크기와 같은 약물 전달에 유망한 특성을 갖는 이러한 물질을 포함하는 나노입자를 갖는, 키틴의 부분 탈아세틸화에 의해 수득된 양이온성 선형 다당류이다([Felt et al., Drug Development and Industrial Pharmacy, Volume 24, 1998 - Issue 11]). 상기 구성성분 사이의 조합이 사용될 수 있는 것으로 고려된다.
- [0061] US2010/0331234, US2011/0293703 및 US2015/0203439(이들 문헌은 본원에 참조로서 인용됨)에는, 아민과 에폭시드-말단화된 화합물의 반응에 의한 아미노알코올 리피도이드의 제조가 기재되어 있다. 복합체, 미셀, 리포솜 및 입자(나노입자 포함)는, 이러한 리피도이드로 제조될 수 있으며, 이들의 화학 구조는 '운반대상(cargo)', 예를 들어 코딩 mRNA와 같은 핵산을 인간 또는 동물 대상의 신체 내 표적 세포 유형에 전달하는 데 특히 적합하게 한다. 아미노알코올 리피도이드 화합물을 포함하는 전달 플랫폼은 주어진 순 음으로 하전된 운반대상 분자의 전달에 사용하기에 특히 적합하기 때문에, 양성자화에 이용 가능한 3차 아민은 양이온성 모이어티를 형성한다. 예를 들어, 아미노알코올 리피도이드 화합물은 DNA, RNA 또는 다른 폴리뉴클레오티드 운반대상을, 대상, 또는 표적 세포 또는 조직에 전달하기 위한 미립자 조성물의 제조에 사용될 수 있다. 적합한 입자는 마이크로입자, 나노입자, 리포솜 또는 미셀의 형태일 수 있다.
- [0062] 아미노알코올 리피도이드 기반 전달 입자는 코딩 mRNA와 같은 폴리뉴클레오티드 운반대상과 상호작용하는 데 이용 가능한 3차 아민을 갖는다. 폴리뉴클레오티드 또는 이의 유도체는, 폴리뉴클레오티드/리피도이드 복합체를 형성하기에 적합한 조건 하에서 아미노알코올 리피도이드 화합물과 접촉된다. 리피도이드는 바람직하게는 음으로 하전된 폴리뉴클레오티드와 복합체를 형성하도록 적어도 부분적으로 양성자화된다. 이러한 방식으로, 폴리뉴클레오티드/리피도이드 복합체는 운반대상 폴리뉴클레오티드를 세포 및 조직에 전달하는 데 유용한 입자를 형성한다. 특정 구현예에서, 다수의 아미노알코올 리피도이드 분자가 폴리뉴클레오티드 분자와 회합될 수 있다. 상기 복합체는 적어도 1개, 적어도 5개, 적어도 10개, 적어도 20개, 적어도 50개, 또는 적합하게는 적어도 100개의 아미노알코올 리피도이드 분자를 포함할 수 있다. 상기 복합체는 최대 10,000개, 최대 5000개, 최대 2000개, 최대 1000개, 최대 500개, 또는 전형적으로 최대 100개의 아미노알코올 리피도이드 분자를 포함할 수 있다.
- [0063] 당업자는 입자의 집단이 입자 크기 분포의 원리에 따른다는 것을 이해할 것이다. 입자 크기 분포를 설명하는 데 널리 사용되는 당업계에서 인정된 방법에는, 예를 들어 평균 직경, 및 주어진 샘플의 입자 크기 범위의 평균 직경을 나타내는 데 통상적으로 사용되는 D50 값과 같은 D 값이 포함된다. 특정 구현예에서, 나노입자의 직경은 10 내지 500 nm 범위이고, 보다 적합하게는 나노입자의 직경은 10 내지 1200 nm, 특히 50 내지 150 nm 범위이다. 일부 구현예에서, 나노입자는 적어도 약 10 nm, 적합하게는 적어도 약 30 nm의 평균 직경을 갖는다. 일부 구현예에서, 나노입자는 약 150 nm 미만 및 50 nm 초과 평균 직경을 갖는다.

- [0064] 입자는 전달 입자의 표적 세포 유형에의 결합을 용이하게 하는 표적화제와 추가로 회합될 수 있다. 본원에 사용된 바, 용어 '표적화된'은, 신체 내 특정 기관, 조직 또는 세포 유형 내 세포와 회합되고, 이의 트랜스페션을 촉진시키도록 의도된 전달 입자를 포함하는 것과 같은 대상 또는 조성물을 나타낸다. 특정 구현예에서, 전달 입자, 예컨대 전달 나노입자는, 운반대상을 특정 기관, 조직 또는 세포 유형에만 전달하도록 표적화될 수 있다. 표적화는, 예를 들어 표적화된 대상을 특정 조직에 직접 전달함으로써 지리적일 수 있거나, 또는 표적 세포 또는 조직과 우선적으로 회합하는 표적화제 또는 결합 모이어티를 통해 화학적으로 매개될 수 있다.
- [0065] 약학적 조성물을 특정 세포로 유도하는 다양한 표적화제가 당업계에 공지되어 있다(예를 들어, [Cotten et al. Methods Enzym. 217:618, 1993]; [Wagner et al. Advanced Drug Delivery Reviews, Volume 14, Issue 1, April-May 1994, 113-135]; [Fiume et al. Advanced Drug Delivery Reviews, Volume 14, Issue 1, April-May 1994, 51-65] 참조). 표적화제는 입자 전체에 걸쳐 포함될 수 있거나, 또는 표면 상에만 국한될 수 있다. 표적화제는 단백질, 펩티드, 탄수화물, 당단백질, 지질, 소분자, 핵산 등일 수 있다. 표적화제는 특정 세포 또는 조직을 표적화하는 데 사용될 수 있거나, 또는 입자의 세포내이입(endocytosis) 또는 식세포 작용을 촉진시키는 데 사용될 수 있다. 표적화제의 예에는, 비제한적으로, 항체, 항체 단편, 저밀도 지단백질(LDL), 트랜스페린, 아시알로당단백질, 인간 면역결핍 바이러스(HIV)의 gp120 외피 단백질, 탄수화물, 수용체 리간드, 시알산, 압타머 등이 포함된다. 표적화제가 입자 전체에 걸쳐 분포되어 있는 경우, 표적화제는 입자를 형성하는 데 사용되는 혼합물 또는 복합체에 포함될 수 있다. 표적화제가 표면 상에만 국한되어 있는 경우, 표적화제는, 예를 들어 공유 결합, 소수성, 수소 결합, 반 데르 발스(van der Waals), 비오틴-아비딘 연결 또는 다른 상호작용에 의해, 표준 화학 기술을 사용하여 형성된 입자와 회합될 수 있다.
- [0066] 본 발명의 특정 구현예의 미립자 조성물은 캡슐화된 mRNA 운반대상을 시간의 경과에 따라 적합하게 전달할 수 있으며, 이는 캡슐화 생분해성 비독성 중합체 또는 생체 적합성 재료의 특정한 선택 또는 형성에 의해 제어될 수 있다. 예를 들어, 미립자 조성물은 적어도 30 분, 적어도 1 시간, 적어도 2 시간, 적어도 6 시간, 적어도 12 시간 또는 적어도 1 일에 걸쳐 캡슐화된 mRNA 운반대상을 방출할 수 있다. 미립자 조성물은 최대 2 일, 최대 3 일 또는 최대 7 일에 걸쳐 캡슐화된 mRNA 운반대상을 방출할 수 있다.
- [0067] '병든 세포' 및/또는 '병든 조직'에서와 같이 본원에 사용된 바, 용어 '병든'은, 비정상, 건강하지 않은 또는 질환 병리를 나타내는 조직 및 기관(또는 이의 부분) 및 세포를 나타낸다. 예를 들어, 병든 세포는 바이러스, 박테리아, 프리온 또는 진핵생물 기생충에 감염될 수 있고; 유해한 돌연변이를 포함할 수 있고/있거나; 암성, 전암성, 종양성 또는 신생물성일 수 있다. 병든 세포는 다른 정상 또는 소위 건강한 세포와 비교하여 변경된 세포내 miRNA 환경을 포함할 수 있다. 특정 예에서, 병든 세포는 병리학적으로 정상이지만, 질환의 전구 상태를 나타내는 변경된 세포내 miRNA 환경을 포함할 수 있다. 병든 조직은 또 다른 기관 또는 기관계로부터의 병든 세포에 의해 침윤된 건강한 조직을 포함할 수 있다. 예로서, 다수의 염증성 질환은 다르게는 건강한 기관이 T 세포 및 호중구와 같은 면역 세포로 침윤된 병리를 포함한다. 추가의 예로서, 협착성 또는 경화성 병변에 영향을 받은 기관 및 조직은 건강한 및 병든 세포 두 가지를 근접하게 포함할 수 있다.
- [0068] 본원에 사용된 바, 용어 '암'은, 특정 조직에서 시작한 원발성 암, 또는 다른 곳으로부터의 전이에 의해 확산된 속발성 암일 수 있는, 악성 종양을 포함하는 조직 내 신생물을 나타낸다. 용어 암, 신생물 및 악성 종양은 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 암은 신생물 내 위치하거나 신생물과 관련된 특성을 갖는 조직 또는 세포를 나타낼 수 있다. 신생물은 전형적으로 정상 조직 및 정상 세포와 구별되는 특징을 갖는다. 이러한 특징 중에는, 비제한적으로, 역형성의 정도, 형태의 변화, 형상의 불규칙성, 감소된 세포 접착성, 전이 능력 및 증가된 세포 증식이 포함된다. '암'과 관련이 있고, 종종 이의 동의어인 용어에는, 육종, 암종, 악성 종양, 상피종, 백혈병, 림프종, 형질전환, 신생물 등이 포함된다. 본원에 사용된 바, 용어 '암'에는, 악성 암뿐 아니라, 전악성 및/또는 전암성 종양이 포함된다.
- [0069] '건강한 세포' 및/또는 '건강한 조직'에서와 같이 본원에 사용된 바, 용어 '건강한'은, 병들지 않고, 전형적으로 정상적인 기능적 표현형에 가까운 조직 및 기관(또는 이의 부분) 및 세포를 나타낸다. 본 발명의 맥락에서, 용어 '건강한'은, 예를 들어 종양에 의해 영향을 받은 조직 내 비신생물성 세포가 절대적인 의미에서 완전히 건강하지 않을 수 있기 때문에, 상대적이라는 것을 이해할 수 있다. 따라서, '건강하지 않은 세포'는 신생물성, 암성 또는 전암성이 아니지만, 예를 들어 경화성, 염증이 생긴, 또는 감염된, 또는 다르게는 병들어 있을 수 있는 세포를 나타내는 데 사용된다. 유사하게, '건강한 또는 건강하지 않은 조직'은, 전반적인 건강에 관계없이, 종양, 신생물성, 암성 또는 전암성 세포; 또는 상기 언급된 다른 질환이 없는 조직 또는 이의 부분을 나타내는 데 사용된다. 예를 들어, 암성 및 섬유성 조직을 포함하는 기관의 맥락에서, 섬유성 조직 내 포함된 세포는 암

성 조직에 비해 상대적으로 '건강한' 것으로 여겨질 수 있다.

[0070] 대안적인 구현예에서, 세포, 세포 유형, 조직 및/또는 기관의 건강 상태는 miRNA 발현의 정량화에 의해 결정된다. 암과 같은 특정 질환 유형에서, 특정 miRNA 종의 발현이 영향을 받으며, 영향을 받지 않은 세포에 비해 상향 또는 하향조절될 수 있다. miRNA 전사체에서의 이러한 차이는 상대적인 건강 상태를 식별하고/하거나, 건강한 세포, 세포 유형, 조직 및/또는 기관의 질환 상태로의 진행을 추적하는 데 사용될 수 있다. 질환 상태는 신생물성 세포로의 형질전환의 다양한 단계를 포함할 수 있다. 본 발명의 구현예에서, 주어진 기관 또는 기관계 내에 포함된 세포 유형의 miRNA 전사체에서의 차등 변이는, 상이한 세포 유형에서 단백질 발현을 제어하는 데 이용된다.

[0071] 본원에 사용된 바, 용어 '기관'은, '기관계'와 동의어이며, 생리학적, 해부학적, 항상성 또는 내분비 기능과 같은 생물학적 기능을 제공하기 위해 대상의 체내에 구획화될 수 있는 조직 및/또는 세포 유형의 조합을 나타낸다. 적합하게는, 기관 또는 기관계는 간 또는 췌장과 같은 혈관이 있는 내부 기관을 의미할 수 있다. 전형적으로, 기관은 기관의 표현형 특징을 나타내는 적어도 2가지 조직 유형 및/또는 복수의 세포 유형을 포함한다.

[0072] 본원에 사용된 바, 용어 '치료용 바이러스'는, 때때로 직접적인 바이러스 용해(종양 세포 붕괴)뿐 아니라, 숙주 항종양 반응의 자극에 의한 간접적인 사멸에 의해, 암 세포를 감염시키고 사멸시킬 수 있는 바이러스를 나타낸다. 종양 세포 붕괴성 바이러스는 흔히 건강한 세포에 비해, 암 세포를 포함하는 병든 세포에서 증가된 활성을 갖는 것을 특징으로 한다.

[0073] 종양 세포 붕괴성 바이러스의 예에는, 표 1에 제공된 것들 및 이의 하위유형이 포함된다.

표 1

종양 세포 붕괴성 바이러스	유형
수포성 구내염 바이러스	피막(enveloped) RNA
마라바 바이러스	피막 람다바이러스
폴리오 바이러스	비(非)피막 RNA
레오바이러스	비피막 RNA
홍역 바이러스	피막 RNA
뉴캐슬병 바이러스	피막 RNA
콕사키바이러스 A21	비피막 RNA
파코바이러스	비피막 DNA
제 1 형 단순포진 바이러스	피막 DNA
아데노바이러스	비피막 DNA

[0074]

[0075] 본 발명의 구현예에서, 바이러스는 볼티모어 바이러스 분류의 1 내지 7군 중 어느 하나로부터 선택될 수 있다 ([Baltimore D (1971) "Expression of animal virus genomes". Bacteriol Rev.35 (3): 235-41]). 본 발명의 특정 구현예에서, 적합한 바이러스는 이중 가닥 DNA 바이러스 계통을 갖는 것을 특징으로 하는 볼티모어 1군; 단일 가닥 양성 RNA 계통을 갖는 4군; 및 단일 가닥 음성 RNA 계통을 갖는 5군으로부터 선택될 수 있다.

[0076] 본원에 사용된 바, 용어 '병독성 유전자' 또는 '병독성 인자'는, 감염된 세포 내 종양 세포 붕괴성 바이러스와 같은 치료용 바이러스의 복제, 또는 감염된 세포의 용해를 돕는 유전자 또는 유전자 생성물을 나타낸다. 용어 '복제 인자'는, 본원에서 유사어로서 사용된다. 병독성 인자는 전형적으로 바이러스 계통에 의해 인코딩된 바이러스 유전자일 수 있다. 병독성 인자는 세포내 면역계 억제 및 회피, 바이러스 계통 복제, 비리온의 확산 또는 전염, 구조적 코트 단백질의 생성 또는 조립, 잠복 상태에서의 바이러스 활성화, 바이러스 잠복의 예방, 및 숙주 세포 처리의 인수와 같은 기능에 관여할 수 있다. 몇몇 병독성 인자는 바이러스 계통이 결합되어 있는 경우, 이러한 유전자의 기능을 보강할 수 있는 세포 또는 다른 등가물을 갖는다. 일부 바이러스는 이의 복제, 세포 용해 및 확산 능력을 증가시키는 외인성 병독성 유전자로 변형될 수 있다.

[0077] 본 발명의 특정 구현예에서, 상기 조성물은 종양에서 우선적으로 비리온 복제를 증강시키는 단백질 또는 폴리펩티드의 차등 발현을 통해, 기관 내 위치한 종양에서 바이러스의 종양 세포 붕괴 효능을 증강시키거나 유지한다. 본 발명의 추가의 구현예에서, 상기 조성물은 종양 내 숙주 면역 세포와 종양 세포 붕괴성 바이러스 사이의 상호작용을 제어하는 유전자 생성물을 인코딩할 수 있다. 또 다른 추가의 구현예에서, 본 발명의 조성물은 종양

세포 붕괴성 바이러스 활성의 차별적인 패턴뿐 아니라, 비리온을 통해, 외인성으로 또는 본 발명의 전달 입자를 통해 투여되는 면역 동시자극 분자의 발현을 조절하는 유전자 생성물을 제조하는 데 사용될 수 있다.

[0078] 본원에 사용된 바, 용어 '폴리펩티드'는, 자연적으로 또는 합성 수단에 의해 시험관내에서 생성되는, 펩티드 결합에 의해 연결된 아미노산 잔기의 중합체이다. 약 12개 미만의 아미노산 잔기 길이의 폴리펩티드는 전형적으로 "펩티드"로 지칭되고, 약 12개 내지 약 30개 아미노산 잔기 길이의 폴리펩티드는 "올리고펩티드"로 지칭될 수 있다. 본원에 사용된 바, 용어 "폴리펩티드"는, 자연 발생 폴리펩티드, 전구체 형태 또는 전구단백질의 생성물을 나타낸다. 폴리펩티드는 또한 성숙, 또는 비제한적으로, 글리코실화, 단백질분해 절단, 지질화, 신호 펩티드 절단, 프로펩티드 절단, 인산화 등을 포함할 수 있는 번역후 변형 과정을 거칠 수 있다. 용어 "단백질"은, 본원에서 하나 이상의 폴리펩티드 사슬을 포함하는 거대분자를 지칭하기 위해 사용된다.

[0079] 본원에 사용된 바, 용어 '유전자 생성물'은, 본원에 기재된 바와 같은 mRNA 구조체 내 포함된 코딩 서열 또는 ORF의 생성물을 나타낸다. 유전자 생성물은 폴리펩티드 또는 단백질을 포함할 수 있다. 폴리시스트로닉 mRNA 구조체는 다수의 유전자 생성물의 생성을 유도할 수 있다.

[0080] 세포에의 mRNA의 직접적인 전달은, 세포 내 폴리펩티드 및/또는 단백질과 같은 목적하는 유전자 생성물의 직접적이며 제어 가능한 번역을 가능하게 한다. mRNA의 제공은 구체적으로 miRNA 매개 제어와 같은 세포 발현 조절 메커니즘(하기 특정 구현예에 상세하게 기재됨)의 사용을 가능하게 할뿐 아니라, 에피솜 또는 게놈에 삽입된 DNA 벡터가 제공될 수 있는 표적 세포의 전사체로의 잠재적인 영구적 변화보다는, 생성물의 유한하고 소진 가능한 공급을 나타낸다.

[0081] 본 발명의 구현예에서, 핵산 서열에 전체적으로 조직 특이성 및 안정성을 부여할 수 있는 하나 이상의 비번역 영역(UTR)과 작동적 조합으로 적어도 하나의 폴리펩티드를 코딩하는 서열을 포함하는 mRNA 서열이 제공된다. '조직 특이성'은, mRNA에 의해 인코딩된 단백질 생성물의 번역이 UTR의 존재에 따라 조절된다는 것을 의미한다. 조절은 mRNA의 단백질 생성물로의 검출 가능한 번역을 허용, 감소 또는 심지어 차단하는 것을 포함할 수 있다. UTR은 시스로, 즉 동일한 폴리뉴클레오타이드 가닥에서 mRNA에 직접 연결될 수 있다. 대안적인 구현예에서, 유전자 생성물을 코딩하는 제1 서열이 제공되고, 전체적으로 핵산 서열에 조직 특이성을 부여하는 하나 이상의 UTR을 포함하는, 제1 서열의 일부와 혼성화되는 추가의 제2 서열이 제공된다. 이러한 후반의 구현예에서, UTR은 유전자 생성물을 트랜스로 인코딩하는 서열에 작동적으로 연결된다.

[0082] 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 병들지 않은 간 조직, 예를 들어 건강한 간세포에서 유전자 생성물의 발현을 방지 또는 감소시키는 데 필요한 것으로서, 이에 작동적으로 연결된 관련 핵산 서열을 포함하는 mRNA가 제공된다. 이와 같이, 리보솜 모집 및 조직 특이적 발현에 필요한 5' 캡 및 UTR(전형적으로, 하지만 배타적으로 ORF의 3'에만 위치하지는 않음)뿐 아니라, ORF를 각각 정의하는 시작 및 중지 코돈을 포함하는 mRNA 구조체 또는 전사체가 제공된다. 구조체가 병들지 않은 간에 도입되는 경우, 유전자 생성물의 발현은 방지되거나 감소된다. 대조적으로, 간 내 포함된 신생물성 세포는 전형적으로 정상의 병들지 않은 간 세포 발현 패턴을 따르지 않아, 상당히 상이한 miRNA 전사체를 갖는다. 유전자 생성물은 이웃하는 건강한 간세포가 아닌 이러한 암 세포에서 특이적으로 번역된다. mRNA 구조체의 간 조직에의 전달은 본원에 기재된 바와 같은 미립자 전달 플랫폼을 통해 달성될 수 있다. 세포 유형 특이적 발현은 하기에 보다 상세하게 기재되는 바와 같은 마이크로RNA 조절 메커니즘을 통해 매개될 수 있다.

[0083] 본원에 정의된 바, '치료 성분' 또는 '치료제'는, 치료적 중재의 일부로서 개별 인간 또는 다른 동물에 투여될 때, 그러한 개별 인간 또는 다른 동물에 대한 치료 효과에 기여하는 분자, 물질, 세포 또는 유기체를 나타낸다. 치료 효과는 치료 성분 자체, 또는 치료적 중재의 또 다른 성분에 의해 야기될 수 있다. 치료 성분은 코딩 핵산 성분, 특히 mRNA일 수 있다. 코딩 핵산 성분은 하기 정의되는 바와 같은 치료 증강 인자를 코딩할 수 있다. 치료 성분은 또한 약물, 선택적으로 소분자 또는 단일클론 항체(또는 이의 단편)와 같은 화학요법 약물을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 치료 성분은 재조합적으로 변형된 면역 효과기 세포, 예를 들어 CAR-T 세포와 같은 세포를 포함할 수 있다. 본 발명의 다른 구현예에서, 치료제는 종양 세포 붕괴성 바이러스 또는 바이러스 벡터와 같은 치료용 바이러스를 포함한다.

[0084] 용어 '치료 효과'는, 대상에게 투여된 물질, 분자, 조성물, 세포 또는 유기체를 포함하는 약리학적 또는 치료적 활성제에 의해 야기된 동물 대상, 전형적으로 인간에서의 국소적 또는 전신적 효과를 나타내고, 용어 '치료적 중재'는, 이러한 물질, 분자, 조성물, 세포 또는 유기체의 투여를 나타낸다. 따라서, 이러한 용어는, 질환의 진단, 치유, 완화, 치료 또는 예방, 또는 동물 또는 인간 대상에서 바람직한 신체적 또는 정신적 발달 및 상태의 증강에 사용하도록 의도된 임의의 작용제를 의미한다. 구절 '치료적 유효량'은, 임의의 치료에 적용 가능한 합

리적인 이익/위험 비율로 목적하는 국소적 또는 전신적 효과를 생성하는 이러한 작용제의 양을 의미한다. 특정 구현예에서, 작용제의 치료적 유효량은 치료 지수, 용해도 등에 따라 달라질 것이다. 예를 들어, 본 발명의 특정 치료제는 이러한 치료에 적용 가능한 합리적인 이익/위험 비율을 생성하기에 충분한 양으로 투여될 수 있다. 암 치료의 특정 맥락에서, '치료 효과'는, 비제한적으로, 고형 종양 부피의 감소, 암 세포 수의 감소, 관찰된 전이 수의 감소, 수명의 증가, 암 세포 증식의 감소, 암 세포 생존의 감소, 종양 세포 마커 발현의 감소 및/또는 암성 병태와 관련된 다양한 생리학적 증상의 완화를 포함하는 다양한 수단에 의해 나타날 수 있다.

[0085] 하나의 구현예에서, 요법이 투여되는 대상은, 포유동물(예를 들어, 마우스, 래트, 영장류, 비(非)인간 포유동물, 가정용 동물 또는 가축, 예컨대 개, 고양이, 소, 말, 양, 염소 등)이며, 적합하게는 인간이다. 추가의 구현예에서, 대상은 암의 동물 모델이다. 예를 들어, 동물 모델은 인간-유래 암, 적합하게는 간암의 동소의 이종이식(orthotopic xenograft) 동물 모델일 수 있다.

[0086] 본 발명의 방법의 특정 구현예에서, 대상은 치료용 바이러스 요법, 화학요법, 방사선 요법, 표적화 요법 및/또는 항면역 체크포인트 요법과 같은 치료적 처치를 아직 받지 않았다. 또 다른 구현예에서, 대상은 상기 언급된 요법과 같은 치료적 처치를 받았다.

[0087] 추가의 구현예에서, 대상은 암성 또는 전암성 조직을 제거하는 수술을 받았다. 다른 구현예에서, 암성 조직은 제거되지 않았으며, 예를 들어 암성 조직이 신체의 수술 불가능한 영역, 예컨대 수술적 개입을 받는 경우 대상의 삶을 위태롭게 할 수 있는 조직, 또는 수술적 절차가 영구적인 상해의 상당한 위험을 야기할 수 있는 영역에 위치할 수 있다.

[0088] 일부 구현예에서, 제공된 mRNA는 '치료 증강 인자'를 코딩할 수 있다. 본 발명에 따르면, 치료 증강 인자는 주어진 세포, 적합하게는 표적 세포에 대한 치료 효과를 발휘하도록, 또 다른 병용투여된 치료제의 능력을 증강 또는 촉진시킬 수 있는 유전자 생성물 또는 폴리펩티드이다. 표적 세포 내에 또는 근처에 도입되는 경우, 치료 증강 인자의 발현은 병용투여된 치료제와 협력하여, 작용제의 치료 활성을 가능하게 하거나 증강시킬 수 있다. 일부 구현예에서, 치료 증강 인자는 암 세포를 용해시키는 병용투여된 종양 세포 붕괴성 바이러스의 능력을 증강시킬 수 있다. 본 발명의 다른 구현예에서, 치료 증강 인자는 대상 자체의 면역 반응을 돕거나 모집하기 위해 종양 미세환경의 변경에 영향을 미칠 수 있다. 이러한 후반의 구현예에서, 종양 미세환경의 변경은 종양 세포 붕괴성 바이러스 또는 CAR-T 또는 다른 입양 세포 기반 요법의 병용투여를 도울 수 있다. 일부 구현예에서, 치료 증강 인자는 전구약물을 활성 형태로 전환시킬 수 있다.

[0089] 다수의 치료 증강 인자는 본 발명의 특정 구현예에 따른 조성물에 조합될 수 있다. 이러한 구현예에서, 각각의 치료 증강 인자에 대한 코딩 서열은 별도의 mRNA 분자에 존재할 수 있다. 일부 구현예에서, 하나 초과분의 치료 증강 인자에 대한 서열은 동일한 mRNA 분자에 존재할 수 있다. 이러한 경우, 폴리시스트로닉 mRNA 분자는 내부 리보솜 진입 부위(IRES)와 같은 전부 코딩된 서열의 발현에 필요한 서열을 추가로 포함할 수 있다.

[0090] 다수의 상이한 mRNA 분자가 하나 이상의 전달 입자에 포함된 구현예에서, 각각의 전달 입자는 하나 또는 하나 초과분의 유형의 mRNA 분자를 포함할 수 있으며; 즉, 특정 구현예에서의 모든 전달 입자가 상기 구현예에 제공된 모든 mRNA 분자를 반드시 포함하지 않을 수 있다고 고려된다.

[0091] 본 발명의 특정 구현예의 mRNA 구조체는, 예를 들어 DNA 플라스미드일 수 있는 폴리뉴클레오타이드 발현 구조체로부터 합성될 수 있다. 이러한 발현 구조체는 mRNA 구조체의 전사가 일어날 수 있도록, 전사의 개시에 필요한 임의의 프로모터 서열 및 상응하는 종결 서열을 포함할 수 있다. 이러한 폴리뉴클레오타이드 발현 구조체는 본 발명의 구현예를 당연히 포함하는 것으로 고려된다.

[0092] mRNA에 의해 인코딩된 유전자 생성물은 전형적으로 펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질이다. 특정 단백질이 하나 초과분의 서브유닛으로 이루어지는 경우, mRNA는 하나 또는 하나 초과분의 서브유닛을 코딩할 수 있다.

[0093] mRNA에 의해 인코딩된 유전자 생성물은 치료 효과를 생성하는 데 적합한 임의의 유형일 수 있다. 암 치료의 맥락에서, mRNA에 의해 인코딩된 유전자 생성물은 적합하게는, 암 세포에 의해 발현될 때, 암 세포의 파괴를 야기하거나 돕는 유전자를 포함할 수 있다.

[0094] p53과 같은 종양 억제 유전자가 본 발명의 구조체에 의해 제공될 수 있다. p53은 세포자멸사 및 게놈 안정성을 포함하는 세포 과정에서 역할을 한다. 이는 게놈 손상에 반응하여 DNA 복구 과정의 활성화에 관여하며, 세포 성장 및 재생을 정지시킬 수 있다.

[0095] 발현될 때 세포가 세포자멸사 과정을 활성화시키도록 하는, 세포자멸사에 의한 세포 사멸을 촉진시키는 유전자,

소위 자살 유전자가, 또한 본 발명의 조성물 또는 구조체에 의해 제공될 수 있다. 암 세포는 종종 이러한 세포 자멸사-관련 유전자의 돌연변이된 및/또는 기능을 상실한 버전을 보유함으로써, 외부 신호에 대한 반응으로 세포자멸사를 거칠 수 없다. 자살 유전자 요법은 또한 비독성 화합물 또는 전구약물의 치명적인 약물로의 전환을 가능하게 하는 유전자의 도입을 나타낼 수 있다([Duarte et al. Cancer Letters, 2012]). 본 발명의 구현예에 따르면, 이러한 유전자 생성물은 신생물성 세포와 같은 병든 세포에 선택적으로 도입되어, 유도된 세포자멸사, 또는 다른 비독성 화합물 또는 전구약물의 전달에 의해 이를 파괴시킬 수 있다.

[0096] 본 발명의 특정 구현예에서, mRNA는 PD-1 수용체(CD279) 또는 이의 리간드 PD-L1(B7-H1; CD274) 및 PD-L2(B7-DC; CD273)의 저해제와 같은 프로그램화된 세포 사멸 경로의 저해제를 인코딩할 수 있다. 따라서, mRNA는 표적 기관 내 병든 또는 신생물성 세포 내 PD-1/PDL-1 또는 PD-1/PDL-2 축에 결합하거나, 다르게는 이의 기능을 방해하는 단백질 또는 폴리펩티드를 인코딩할 수 있다. 적합한 단백질 또는 폴리펩티드는, PD-1 수용체, PDL-1, PDL-2 또는 리간드와 수용체의 복합체에 결합하는, 단일클론 또는 다중클론일 수 있는 항체, 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 다른 항원 결합 마이크로단백질을 포함할 수 있다. 이러한 효과는 또한 또 다른 소위 면역 체크 포인트인, 세포독성 T 림프구 항원 4(CTLA4) 경로의 단백질 또는 폴리펩티드 저해제의 사용에 의해 관찰될 수 있다. 두 가지 경로 중 어느 하나 또는 둘 모두의 저해는, 환자의 건강에 긍정적으로 유익할 수 있는 종양 미세 환경 내 면역 반응의 변화를 유도하는 것으로 공지되어 있다. 또한, 대상에서 면역 반응을 조절함으로써, 본 발명의 조성물은 방사선요법 또는 화학요법과 같은 다른 항암 치료 접근법과의 조합 요법에서 특정한 유용성을 나타낼 수 있다. FDA 승인된 항-PD1 경로 저해제에는, 펄브롤리주맙(pembrolizumab) 및 니볼루맙(nivolumab)이 포함된다. 공지된 항-PDL-1 저해제에는, MPDL-3280A, BMS-936559 및 아테졸리주맙(atezolizumab)이 포함된다. 항-CTLA4 치료용 저해제에는, 이필리무맙(ipilimumab) 및 트레멜리무맙(tremelimumab)이 포함된다. 본 발명의 조성물은 세포의 차등 miRNA 환경을 이용하여, 이러한 프로그램화된 세포 사멸 경로의 저해제를 대상의 표적 기관 내 병든 세포에 선택적으로 전달하는 데 사용될 수 있다.

[0097] 키메라 항원 수용체 T-세포(CAR-T 세포)는 면역 세포, 전형적으로 암 세포를 표적으로 하는 수용체를 발현시키도록 변형된 T-림프구이다.

[0098] 생체외에서 생성된 자가 항원-특이적 T 세포의 이동을 포함하는 입양 면역요법은, 바이러스 감염 및 암을 치료하기 위한 유망한 전략이다. 입양 면역요법에 사용되는 T 세포는 유전 공학을 통해 항원-특이적 T 세포의 확장 또는 T 세포의 재배향에 의해 생성될 수 있다(예를 들어, [Park, T. S., S. A. Rosenberg, et al. (2011). "Treating cancer with genetically engineered T cells." Trends Biotechnol 29(11): 550-7] 참조).

[0099] 면역 효과기 세포로도 공지된 T 세포의 신규한 특이성은, 또한 유전자 이식 T 세포 수용체 또는 키메라 항원 수용체(CAR)의 유전자 이동을 통해 성공적으로 생성되었다(예를 들어, [Jena, B., G. Dotti, et al. (2010). "Redirecting T-cell specificity by introducing a tumor-specific chimeric antigen receptor." Blood 116(7): 1035-44] 참조). CAR은 적어도 3개의 부분으로 이루어진 합성 수용체이다: 세포외 항원 인식 도메인(엑토도메인으로도 공지됨), 막관통 도메인 및 세포내 T-세포 활성화 도메인(엔도도메인으로도 공지됨). 일부 구현예에서, 조작된 T 세포는, 예를 들어 건강한 세포에 영향을 미치지 않으면서 종양 세포를 선택적으로 표적화하는 T 세포의 하위유형인 감마 델타 T 세포와 같은 특정 부류의 T 세포를 포함한다. CAR은 림프종 및 고형 종양을 포함하는 다양한 악성 종양으로부터의 종양 세포의 표면에서 발현되는 항원에 대하여 T 세포를 성공적으로 재배향시켰다(상기 Jena, Dotti et al. 참조). 일부 구현예에서, 조작된 T 세포는, 적어도 CAR-T 세포가 CAR-의 존적 효과기 기능을 손상시키지 않으면서 이식편 대 숙주 반응을 방지하도록 내인성 $\alpha\beta$ T-세포 수용체(TCR)의 발현을 제거하도록 조작된, 자가 T 세포의 집단을 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된 T 세포는 적어도 동종이계 T 세포의 집단을 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된 T 세포는 적어도 자가 T 세포의 집단 및 동종이계 T 세포의 집단을 포함한다.

[0100] 일반적으로, 세포외 항원 인식 도메인은, 특정 표적, 전형적으로 종양-관련 표적과 결합하는 항체, 수용체 또는 리간드 도메인으로부터의 단일 융합 분자에서 하나 이상의 신호전달 도메인과 관련된 표적화 모이어티이다. 일부 구현예에서, 세포외 항원 인식 도메인은 가요성 링커에 의해 연결된 단일클론 항체의 경쇄 및 중쇄 가변 단편을 포함하는, 단쇄 항체(scFv)의 항원-결합 도메인의 단쇄 단편 변이체(scFv)이거나, 이에서 유도된다. 일부 구현예에서, 세포외 항원 인식 도메인은 링커, 예를 들어 IgG1 힌지 링커와 같은 가요성 링커에 의해 막관통 도메인에 연결된다. 일부 구현예에서, 막관통은 CD28 막관통 도메인이거나, 이에서 유도된다. 일부 구현예에서, 엔도도메인은, 예를 들어 CAR 변형된 T 세포의 생존을 증강시키고 이의 증식을 증가시킴으로써 면역 반응을 증강시키도록 설계된 동시자극 도메인, 및 목적하는 표적에 결합할 때 T 세포를 활성화시키도록 설계된 내부 T-세포 활성화 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 동시자극 도메인은 CD28 동시자극 도메인, OX-40(CD134) 동시

자극 도메인, ICOS 동시자극 도메인, 4-1BB(CD137) 동시자극 도메인 또는 이들의 임의의 조합이거나, 이에서 유도된다. 일부 구현예에서, 세포내 T-세포 활성화 도메인은 CD3 제타(CD3 ζ) 도메인 또는 이의 생물학적 활성 부분을 포함한다. 일부 구현예에서, T 세포 활성화는 염증성 사이토카인이 염증 및/또는 면역 반응을 촉진시키기 위해 T 세포에 의해 방출되는 면역 세포 활성화를 유도한다. 일부 구현예에서, T 세포 활성화는 세포독소가 암 세포 세포자멸사를 촉진시키기 위해 T 세포에 의해 방출되는 세포독성 활성을 유도한다. 일부 구현예에서, T 세포 활성화는 인터류킨이 세포 발달 및 분열을 촉진시키기 위해 T 세포에 의해 방출되는 증식을 유도한다. 일부 구현예에서, T 세포 활성화는 면역 세포 활성화, 세포독성 활성 및/또는 증식 중 적어도 2가지의 조합을 유도한다.

[0101] 일부 구현예에서, 세포의 항원 인식 도메인은 CD19에 특이적으로 결합한다. 대부분의 B-급성 림프모구성 백혈병(B-ALL)은 균일하게 CD19를 발현하지만, 비(非)조혈 세포뿐 아니라, 골수, 적혈구 및 T 세포, 및 골수 줄기 세포에서의 발현은 존재하지 않기 때문에, CD19는 면역요법의 매력적인 표적이다. B-세포 악성 종양에서 CD19를 표적으로 하는 임상 시험이 고무적인 항-종양 반응을 이용하여 진행되고 있다. 임상 시험에 평가되고 있는 현재 CAR-T 요법 중 다수는, CD19-특이적 마우스 단일클론 항체 FMC63의 scFv 영역에서 유도된 특이성을 갖는 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현시키도록 유전자 조작된 T 세포를 사용한다(예를 들어, [Nicholson, Lenton et al. (1997); "Construction and characterisation of a functional CD19 specific single chain Fv fragment for immunotherapy of B lineage leukaemia and lymphoma." Mol Immunol. 1997 Nov-Dec;34(16-17):1157-65]; [Cooper, Topp et al. (2003). "T-cell clones can be rendered specific for CD19: toward the selective augmentation of the graft-versus-B-lineage leukemia effect." Blood. 2003 Feb 15;101(4):1637-44]; Cooper, Jena et al. (2012) (국제 출원: W02013/126712) 참조).

[0102] 일부 구현예에서, 세포의 항원 인식 도메인은 CD22에 특이적으로 결합한다. CD22는 Siglec 패밀리의 렉틴에 속하며, 시알산을 이의 N-말단의 7개의 세포의 면역글로불린 도메인과 특이적으로 결합시키는 막관통 인당단백질(phosphoglycoprotein)이다. 이는 주로 B 세포 활성화 및 신호전달을 위한 저해 수용체로서 작용하며, B 세포와 T 세포 및 항원 제시 세포(APC)의 상호작용을 조절한다. CD19와 유사하게, CD22는 전구-B에서 성숙 B 세포 단계까지 B 림프모양 세포에 의해 명백하게 발현되는, B 세포 계통-제한 마커이다. 하지만, 이는 혈장 세포로의 분화 동안 손실된다. CD22는 급성 림프모구성 백혈병(ALL), 만성 림프구성 백혈병(CLL), 및 미만성 거대 B 세포 림프종과 같은 비호지킨 림프종(NHL)의 다양한 하위유형을 포함하는 대부분의 B 세포 악성 종양에서 보편적으로 발현된다. B 세포 악성 종양의 매력적인 치료 표적으로서 CD22를 표적화하는 것은, 항-CD22 단일클론 항체(예를 들어, 에프라투주맙(epratuzumab)) 및 면역독소(예를 들어, BL22, HA22)의 임상 시험에서의 긍정적인 결과에 의해 입증되었다. CD22는 항-CD19 CAR-T 세포로의 치료 후 CD19 발현을 소실한 모든 세포에서 발현되는 것으로 나타났다. 이는 항-CD22 CAR-T 세포를 항-CD19 CAR-T 세포와의 조합 및/또는 후속 요법에 적합하게 만든다.

[0103] 하지만, 다수의 임상 연구에서 암 치료를 위한 CAR T 세포의 임상 이동 가능성이 입증되었지만, 사이토카인-방출 증후군(CRS) 및 "종양 이외의 표적에 작용하는(on-target off-tumor)" 효과와 관련된 위험이 또한 제기되었다.

[0104] 본원에 제공된 mRNA 나노입자 전달 조성물은, CAR-T-세포의 안전성 및 효능을 개선시키는 데 유용하다. 예를 들어, 본원에 기재된 구현예의 mRNA 나노입자 전달 시스템은, 특정 면역 세포, 또는 CAR-T 세포와 같은 면역 세포의 변형된 서브세트를 종양 미세환경에 모집하는 데 사용될 수 있다. 또한, mRNA 나노입자 전달 시스템은 억제성 종양 환경에서 이의 항암 활성을 강화시키기 위해, 이러한 세포에서 이식편 대 숙주 질환을 회피하고/하거나 면역 체크포인트 유전자를 선택적으로 결실시키기 위해 내인성 T 세포 수용체(TCR)의 발현을 저해하는 데 사용될 수 있다(예를 들어, [Moffett, Coon, et al. (2017) "Hit-and-run programming of therapeutic cytoreagents using mRNA nanocarriers." Nature Communications. 8:389] 참조).

[0105] 일부 구현예에서, 코딩 mRNA 및 전달 입자는 대상에서 CAR-T 세포를 특정 부위로 유인하는 데 사용된다. 일부 구현예에서, 코딩 mRNA 및 전달 입자는 면역 세포의 종양 미세환경으로의 불충분한 이동을 극복하는 데 사용된다. 특정 케모카인에 대한 반응으로, 상이한 면역 세포 서브세트는 종양 미세환경으로 이동하여, 시공간적 방식으로 종양 면역 반응을 조절한다. 또한, 케모카인은 종양 미세환경에서 종양 세포 및 혈관 내피 세포를 포함하는 비면역 세포를 직접 표적화할 수 있으며, 이는 종양 세포 증식, 암 줄기 유사 세포 특성, 암 침습성 및 전이를 조절하는 것으로 나타났다. 일부 구현예에서, 면역 세포는 T 세포, 자연 살해(NK) 세포, B 세포, 대식세포 또는 수지상 세포와 같은 항원 제시 세포(APC), 또는 이들의 임의의 조합이다.

[0106] 일부 구현예에서, 코딩 mRNA 및 전달 입자는 CAR T 세포의 종양 미세환경으로의 불충분한 이동을 극복하기 위해

사용된다. 일부 구현예에서, 전달 입자는 종양 미세환경을 특이적으로 표적화하고, 코딩 mRNA는 CAR-T 세포를 종양 미세환경으로 유인하거나 다르게는 모집하는 유전자 생성물을 인코딩한다. 일부 구현예에서, 코딩 mRNA는 케모카인을 발현시킨다. 비제한적인 예로서, 코딩 mRNA는 CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL20, CCL22, CCL28, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, XCL1 및 이들의 임의의 조합과 같은 T-세포를 유인하는 케모카인을 인코딩할 수 있다. 자가면역 질환에서와 같이 반대의 효과를 목적으로 하는 경우, 코딩 mRNA는 상기 언급된 인자의 차단제, 안타고니스트 및/또는 저해제를 발현시킬 수 있다.

[0107] 일부 구현예에서, 코딩 mRNA 및 전달 입자는 종양 미세환경에서 코딩 mRNA를 일시적으로 발현시키는 데 사용된다. 일부 구현예에서, 코딩 mRNA는, 예를 들어 활성화된 T 세포 및 NK 세포와 같은 종양 반응에서의 면역 세포의 생존, 증식 및/또는 분화를 조절하는 데 관여하는 사이토카인 또는 다른 유전자 생성물을 인코딩한다. 비제한적인 예로서, 코딩 mRNA는 IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17, IL-33, IL-35, TGF-베타 및 이들의 임의의 조합과 같은 사이토카인을 인코딩할 수 있다. 다시, 자가면역 질환에서와 같이 반대의 효과를 목적으로 하는 경우, 코딩 mRNA는 상기 언급된 인자의 차단제, 안타고니스트 및/또는 저해제를 발현시킬 수 있다.

[0108] 본 발명의 일부 구현예에서, 코딩 mRNA 및 전달 입자는 코딩 mRNA의 일시적 발현을 제공하기 위해 CAR-T 또는 다른 입양 세포 요법과 함께 사용된다.

[0109] 일부 구현예에서, mRNA 나노입자 전달 시스템은 유전자-편집제를 코딩하는 mRNA를 표적 세포 집단에 전달한다. 일부 구현예에서, mRNA는 유전자 좌위를 표적으로 하고, 표적 세포 집단에서 하나 이상의 내인성 유전자 생성물의 발현을 방해하는 서열-특이적 뉴클레아제를 코딩한다. 일부 구현예에서, mRNA는 T 세포 수용체(TCR)-관련 유전자 좌위를 표적으로 하는 서열-특이적 뉴클레아제를 코딩함으로써, TCR에서 하나 이상의 도메인의 발현을 방해한다.

[0110] 일부 구현예에서, mRNA 나노입자 전달 조성물은 조작된 T 세포를 표적하는 표현형으로 프로그래밍하는 하나 이상의 작용제를 코딩하는 mRNA를 전달하는 데 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, mRNA 나노입자 전달 조성물은 표적하는 T 세포 표현형의 특징인 전사 패턴 및 마커를 유도하는 데 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, mRNA 나노입자 전달 조성물은 CAR-T 치료를 개선시키는 것으로 밝혀진, CD26L+ 중심 기억 T 세포(Tcm)의 발달을 촉진시키는 데 사용될 수 있다(예를 들어, 상기 Moffett, Coon 참조).

[0111] 일부 구현예에서, mRNA 나노입자 전달 조성물은, 예를 들어 T 세포에서 발견되는 표면 항원과 같은 T 세포 마커에 특이적인, 표면에 고정된 표적화 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 표면에 고정된 표적화 도메인은 나노입자를 T-세포에 선택적으로 결합시키고 수용체-유도 세포내이입을 개시하여, mRNA 나노입자 전달 조성물을 내재화시키는 항원에 특이적이다. 일부 구현예에서, 표면에 고정된 표적화 도메인은 CD3, CD8 또는 이들의 조합을 선택적으로 결합시킨다. 일부 구현예에서, 표면에 고정된 표적화 도메인은 CD3, CD8 또는 이들의 조합을 선택적으로 결합시키는 항체이거나, 이에서 유도된다.

[0112] 마이크로RNA(miRNA)는 각각 약 20 내지 25개의 뉴클레오타이드를 함유하는 비코딩 RNA의 부류이며, 이들 중 일부는 표적 mRNA의 3' 비번역 영역(3' UTR)에서 상보적 서열에 결합함으로써, 이의 침묵을 유도하여, 유전자 발현의 전사후 조절에 관여하는 것으로 여겨진다. 이러한 서열은 또한 본원에서 miRNA 결합 부위 또는 miRNA 결합 부위 서열로 지칭된다. 특정한 miRNA는 이의 발현에 있어서 고도로 조직-특이적이며; 예를 들어 miR-122 및 이의 변이체는 간에서 풍부하며 다른 조직에서는 드물게 발현된다([Lagos-Quintana (2002), Current Biology, Vol.12, Apr]).

[0113] 따라서, miRNA 시스템은 세포에 도입된 핵산이 표적 조직의 선택된 세포 유형에서 침묵되고, 다른 세포에서 발현될 수 있는 강력한 플랫폼을 제공한다. 특정한 주어진 miRNA 서열에 대한 결합 부위를 mRNA 구조체에, 특히 UTR의 5' 또는 3' 안에 또는 바로 옆에 포함시켜 표적 세포에 도입하면, 특정한 도입된 유전자의 발현은 일부 세포 유형에서 감소되거나 실질적으로 제거될 수 있지만, 다른 세포에서는 유지될 수 있다([Brown and Naldini, Nature Reviews Genetics volume 10, pages 578-585 (2009)]). 용어 '바로 옆'의 사용은, '매우 근접한' 또는 '매우 가까운'과 같은 용어와 동의어로 이해된다. UTR 서열의 5' 또는 3' 위치 결정을 언급할 때, 이는 전형적으로 약 20개 이하, 적합하게는 50개 이하의 개재 뉴클레오타이드 염기가 miRNA 결합 서열과 인접한 UTR 사이에 위치할 수 있는 변이체를 포함한다. 하나 또는 복수의 이러한 miRNA 결합 부위 서열이 mRNA 구조체에 포함될 수 있다고 고려된다. 복수의 miRNA 결합 부위 서열이 존재하는 경우, 이러한 복수는, 예를 들어 2개 초과, 3개 초과, 전형적으로 4개 초과,의 miRNA 결합 부위 서열을 포함할 수 있다. 이러한 miRNA 결합 부위 서열은 mRNA 구조체 내 특정 UTR의 3' 또는 5'내에, 순차적으로, 탠덤으로, 또는 선결된 위치에 배열될 수 있다.

[0114] miR-122는, 건강한 병들지 않은 간 조직에서 풍부함에도 불구하고, 대부분의 간암뿐 아니라, 병든 세포에서 감소된다([Braconi *et al.* 2011, *Semin Oncol*; 38(6): 752-763], [Brown and Naldini *Nature* 2009;10 578]). 상기 언급된 방법에 의해, 표적 조직이 간인 경우, 도입된 mRNA 서열의 번역은, miRNA-122 결합 부위(예를 들어, 서열번호 1)를 3' UTR 내에 또는 이에 인접하게 포함시킴으로써, 암성 간 세포에서 촉진되고, 트랜스펙션된 건강한 세포에서 감소되거나 실질적으로 제거될 수 있다고 확인되었다.

[0115] 도입된 폴리뉴클레오티드의 질환-특이적 발현의 맥락에서, 특정 질환에서 방해되는, 즉, 병들지 않은 세포와 비교하여 병든 세포(예컨대 종양 세포)에서 상향조절 또는 하향조절되는, 임의의 miRNA 서열에 대한 결합 서열이, 본 발명에서 사용하기에 적합한 것으로 간주된다. 표 2에는, 본 발명의 구현예에서 사용될 수 있는 이러한 유형의 종양-관련 miRNA 결합 서열의 예가 논의되어 있다. 하지만, 본 발명은, 주어진 miRNA 또는 miRNA 부류가 주어진 기관 또는 기관계 내에서 제2 세포 유형에 비해 제1 세포 유형에서 하향조절되는 경우로만 제한되지 않는다고 이해될 것이다. 반대로, 단지, 기관 또는 기관계 내 포함된 제1 세포 유형과 제2 세포 유형 사이에 조절 miRNA의 차등 발현 패턴이 존재한다는 것만이 요구된다. 이러한 세포에서 단백질 생성물의 상응하는 차등 번역을 가능하게 하기 위해, miRNA의 차등 발현이 본원에 기재된 조성물 및 방법을 사용하여 이용될 수 있다.

[0116] 건강한 세포와 암 세포 사이에서 유사한 차등 miRNA 발현에 대한 증거가 확인된 암의 예에는, 유방암([Nygaard *et al.*, *BMC Med Genomics*, 2009 Jun 9;2:35]), 난소암([Wyman *et al.*, *PloS One*, 2009;4(4):e5311]), 전립선암([Watahiki *et al.*, *PloS One*, 2011; 6(9):e24950]), 및 자궁경부암([Lui *et al.* *Cancer Research*, 2007 Jul 1;67(13):6031-43])이 포함된다. WO 2017/132552 A1에는, 다양한 암 세포에서 상이한 발현 수준을 갖는 광범위한 miRNA가 기재되어 있다.

표 2

조직/암 유형	연루된 miRNA	발현 프로파일	참고문헌
간	miRNA-122	암 세포에서 감소됨	Braconi, 2011, Brown, 2009
간	miRNA-125	간암종에서 감소됨	Coppola N. <i>Oncotarget</i> , 2017. Vol 8
뇌	miRNA-124a	교모세포종에서 감소됨	Mazzacurati L. <i>Moleculartherapy</i> 23, 2015
폐, 유방	Let-7	암 세포에서 감소됨	Edge RE <i>et al.</i> <i>Mol Ther</i> 2008;16:1437 Yu F. <i>Cell</i> 2007; 131(6):1109-23
췌장	miRNA-375	암 세포에서 감소됨	Song S, Zhou J <i>et al.</i> <i>Biomed Reports</i> : 393-398, 2013

[0117]

[0118] 췌장에서, miRNA-375 발현은 정상 췌장 세포에서는 높지만, 병든 및/또는 암성 조직에서는 유의하게 낮은 것으로 나타났다([Song, Zhou *et al.* 2013]). 이러한 발현은 암의 진행 단계와 관련이 있는 것으로 나타났으며, 더욱 진행된 암에서 발현은 추가로 감소되었다. 이는, miRNA-375가 3-포스포이노시티드-의존적 단백질 키나아제-1 (PDK1) mRNA를 표적화하여 PI 3-키나아제/PKB 캐스케이드에 영향을 미침으로써, 췌장 β-세포에서 글루코코스 유도 생물학적 반응의 조절에 관여하는 것으로 여겨진다([El Ouaamari *et al.* *Diabetes* 57:2708-2717, 2008]). miRNA-375의 항-증식 효과는 이러한 행동 추정 방식에 의해 암시되며, 이는 암 세포에서의 이의 하향조절을 설명할 수 있다.

[0119] 본 발명에 의해 공급된 mRNA 서열의 UTR은 표적 기관 내 세포 유형 중 하나에서 발현되는 UTR 서열의 일부 또는 전부와 유사성, 예를 들어 90% 초과 유사성을 갖도록 선택될 수 있다. 특정 세포 유형은 발현이 상향 또는 하향조절되는 유전자를 가질 수 있으며, UTR 서열은, 예를 들어 관련 mRNA 서열의 안정성 또는 분해를 촉진시킴으로써 이러한 조절을 매개할 수 있다.

[0120] 예로서, 암 세포에서 상향조절되는 것으로 공지된 유전자와 관련된 UTR은, 이러한 암 세포에서 이의 안정성 및 번역을 촉진시키는 miRNA 결합 부위 서열과 같은 하나 이상의 특징을 가질 수 있다. 유사한 서열을 공급된 mRNA 서열에 포함시키면, 비암성 또는 건강한 세포가 아닌, 암성 세포에서 안정성 및 번역이 개선될 수 있다.

[0121] 또한, 본 발명에 의해 치료하고자 하는 암은 표적 조직에서 속발성 암, 즉 표적 조직 이외의 다른 곳에서의 암

으로부터의 전이인 것으로 간주된다. 예를 들어, 간 전이는 식도암, 위암, 결장암, 직장암, 유방암, 신장암, 피부암, 췌장암 또는 폐암에서 비롯될 수 있으며, 선암종 또는 또 다른 유형의 암일 수 있다. 이러한 경우, 건강한, 비암성 및/또는 암성 세포에서 차등 발현을 제공하기 위해 대안적인 miRNA 서열이 선택될 필요가 있을 수 있다. 사실, 이러한 경우 전이된 세포의 상이한 조직 기원으로 인해, 후보 miRNA 서열의 선택이 증가될 수 있다.

[0122] 특정한 경우, 가능하게는, 표적 조직의 상이한 세포 유형에서 차등 발현을 나타내는 miRNA 서열에 대한 하나 초과 후보가 존재할 수 있다. 이러한 경우, 복수의 miRNA 결합 부위 서열이 mRNA 구조체에 포함되고, 이러한 서열이 실질적으로 상이한 서열일 수 있다는 것이 유리할 수 있다. 하지만, 복수의 miRNA 결합 부위 서열이 각각 실질적으로 동일한 서열일 수 있다고도 예상된다.

[0123] 병용 요법

[0124] 종양 세포 붕괴성 바이러스

[0125] 상기 언급된 바와 같이, 종양 세포 붕괴성 바이러스 요법은 때때로 직접적인 바이러스 용해에 의해, 또한 숙주 항-종양 반응의 자극에 의한 간접적인 사멸을 포함하는 방법에 의해, 암 세포를 감염시키고 사멸시키기 위해 바이러스를 사용하는 방법이다. 종양 세포 붕괴성 바이러스는 흔히 건강한 세포에 비해 암 세포에서 활성이 증가된 것을 특징으로 하지만, 건강한 세포에 대한 손상에 의해 야기된 표적의 효과가 보고되어 있다([Russell et al. Nature Biotechnology, 2012]).

[0126] 안전성을 증가시키고 표적의 효과를 감소시키기 위해, 종양 세포 붕괴성 바이러스는, 예를 들어 세포내 면역억제 및 회피, 바이러스 게놈 복제, 및 숙주 세포 과정의 인수와 같은 기능에 관여하는 병독성 인자 또는 유전자의 결실에 의해, 이의 병독성을 감소시키도록 변형되거나 선택될 수 있다. 백신접종에 사용되는 살아있는 바이러스의 안전한 형태의 역사적 생산은 약독화된 바이러스의 또 다른 공급원이다. 다른 경우, 특정 돌연변이 또는 심지어 부가적인 유전자는 특정한 종양 세포 붕괴성 바이러스에서 종양 세포 붕괴 활성을 증강시키는 것으로 밝혀졌다. 종양 세포 붕괴성 바이러스에서 통상적으로 부가된, 돌연변이된 또는 결실된 병독성 유전자의 비제한적인 예는, 표 3에서 확인할 수 있다.

표 3

종양 세포 붕괴성 바이러스	돌연변이	참고문헌
수포성 구내염 바이러스, 마라바바이러스	G 단백질(Q242R 돌연변이) M 단백질(L123W 돌연변이)	Brun et al 2010, Mol Ther.; 18(8): 1440-1449.
홍역 바이러스	NIS 유전자 - 인간 갑상선 요오드화물 동시수송체(symporter)	Aref et al 2016, Viruses, 8, 294
뉴캐슬병 바이러스	융합 단백질(F) 절단 부위	Vigil et al 2007 Cancer Res; 67: (17).
파보바이러스	NS 단백질 NS1	Marchini et al 2015 Virology Journal 12:6
제 1 형 단순포진 바이러스(HSV-1)	바이러스 리보뉴클레오티드 리덕타아제(ICP6) 비(非)활성화; 세린/트레오닌-단백질 키나아제(US3) 비활성화; ICP34.5 및 ICP47 비활성화(신경독성 및 면역회피); UL43 비활성화(세포 융합) 비활성화; UL49.5 비활성화(T-세포 회피) 비활성화; UL55 및 UL56	Liu et al (2003) Gene Therapy volume 10, 292-303; Goldsmith et al 1998J Exp Med. 187(3): 341-348;
아테노바이러스	E1B-55, E3, E1a 프로모터, E3 gp19kD, E1A 924bp), E1A, E3 및 E4 에서의 결실, E3 전체 결실, 키메라 ad3/Ad11p E2B 영역, E3-6.7K + gp19K E1A	Baker et al 2018, Cancers, 10, 201

[0127]

- [0128] 이러한 방식으로의 종양 세포 붕괴성 바이러스의 약독화 또는 변형은, 암 세포에 대한 종양 세포 붕괴성 바이러스의 선택성에서 역할을 수행할 수 있다: 발암 과정은 종종 암(예컨대 세포 분열 또는 세포자멸사를 조절함으로써), 및 바이러스 감염 둘 모두에 대하여 보호 역할을 하는 유전자의 비활성화를 포함하기 때문에, 기재된 바와 같이 약독화된 종양 세포 붕괴성 바이러스는 이러한 세포 내 통상의 항바이러스 유전자의 부재로 인해 암 세포에서 이의 병독성을 유지할 수 있다. 따라서, 건강한 세포에서, 약독화된 바이러스는 정상 항바이러스 반응에 대하여 방어할 수 없어, 제거되지만, 암 세포에는 이러한 반응이 없으며, 바이러스는 세포를 용해시킬 수 있다. 하지만, 우선적으로 암 세포에서 항바이러스 반응의 부분적 비활성화가 항바이러스 활성의 완전한 결핍보다 더 흔하고, ([Haralambieva et al, Mol. Ther., 2007])(이는 병독성이 이러한 세포에서 여전히 감소될 수 있음을 의미함), 두 번째로는 건강한 세포의 감염이 여전히 일어날 수 있기 때문에, 이러한 접근법은 거의 효과적이지 않다.
- [0129] 유사하게, 바이러스는 전형적으로 이의 게놈을 복제하기 위해 숙주 세포의 세포 기구를 이용하지만, 이러한 기구는 전형적으로 자체의 게놈을 복제하지 않는 건강한, 정지된, 비(非)복제성 세포에서 하향조절되기 때문에, 다수의 바이러스는 숙주 기구를 재활성화시키거나 이를 보상하는 유전자를 보유한다. 예를 들어, 리보뉴클레오티드 리덕타아제 효소는 리보뉴클레오티드로부터의 데옥시리보뉴클레오티드의 생성에 필요하며; 이러한 효소는 전형적으로 정지된 숙주 세포에서 하향조절되고, 몇몇 바이러스는 데옥시리보뉴클레오티드의 공급원을 갖도록 이러한 유형의 자체 효소에 대한 유전자를 보유한다. 암 세포를 복제하는 것은 이러한 효소를 재활성화시킬 수 있기 때문에, 자체의 리보뉴클레오티드 리덕타아제 효소 유전자가 결실된 약독화된 종양 세포 붕괴성 바이러스는, 암 세포에서 여전히 복제될 수 있다. 하지만, 상기와 유사한 이유로, 이러한 접근법은 감염으로부터 건강한 세포를 보호하거나, 암 세포에서 병독성을 회복시키는 데 완전히 효과적이지 않을 수 있다. 예를 들어, 종양에서 모든 세포가 임의의 주어진 시간에 복제되지 않으며, 따라서 충분한 데옥시리보뉴클레오티드가 대부분의 암 세포에서 바이러스 복제에 이용 가능하지 않을 수 있다.
- [0130] 상기에 이어서, 본 발명에 따른 조성물 또는 방법이 종양 세포 붕괴성 바이러스 요법과 함께 사용되는 경우, 본 발명의 구조체에 의해 제공된 치료 증강 인자는 암 세포에서 종양 세포 붕괴성 바이러스의 효능을 증가시키는, 예를 들어 바이러스의 복제, 또는 바이러스가 존재하는 세포를 용해시키는 바이러스의 능력을 증강시키는 인자일 수 있다. 특히, 종양 세포 붕괴성 바이러스가, 예를 들어 병독성 인자에 대한 하나 이상의 유전자의 결실에 의해 이의 기능을 약독화시키도록 변형된 경우, 치료 인자는 결실된 유전자를, 바이러스 유전자 생성물의 카피인 유전자 생성물, 또는 결실된 유전자와 실질적으로 상동성인 또는 다르게는 유전자의 결실을 보상하는 유전자 생성물에 대한 mRNA로 대체할 수 있다. 이러한 구현예에서, 본 발명에 의해 가능한 건강한 및 암성 세포에서의 차등 발현에 의해, 대체 유전자 생성물은 암 세포에서만 발현되어 건강한 세포가 아닌 암 세포에서 바이러스 활성 및 용해를 증강시킬 수 있으며, 여기서 제공된 mRNA의 발현은 miRNA 결합 부위의 존재에 의해 저해된다.
- [0131] 유사한 수단에 의해, 종양 세포 붕괴성 바이러스에 대한 세포의 내성을 증가시키는 인자를 코딩하는 mRNA는 건강한 세포에서 우선적으로 발현되어, 건강한 세포에 비해 암성 세포에서 다시 바이러스 활성을 촉진시킬 수 있다.
- [0132] 이러한 접근법의 이점은, 종양 세포 붕괴성 바이러스를 사용하는 이전의 치료법과 달리, 발암에 의해 어떤 세포 항바이러스 유전자 및 과정이 비활성화될 수 있는 지에도, 일부 암 세포에서는 활성화될 수 있지만 다른 세포에서는 활성화되지 않을 수 있는 세포 복제 과정에도 의존하지 않는다는 점이다. 그 결과, 병독성 유전자가 종양 세포 붕괴성 바이러스로부터 결실될 수 있는 더 큰 범위가 허용된다. 따라서, 종양 세포 붕괴성 바이러스는 건강한 세포 및 암세포에서 복제 활성이 완전히 결여되도록 변형될 수 있으며, 여기서 결실된 병독성 유전자의 기능이 본 발명의 수단에 의해 대체되는 경우, 바이러스는 완전한 효능으로 회복될 수 있다. 그 결과, 부작용은 감소시키고, 효능은 증가시킬 수 있다. 유사하게, 제공된 mRNA의 차등 발현은 암 세포와 건강한 세포 사이의 miRNA 발현 차이에 의존하기 때문에, 병독성은 모든 트랜스펙션된 암 세포뿐 아니라, 예를 들어 투여 시 복제되는 세포에서 회복될 수 있다.
- [0133] 특정 구현예에서, 종양 세포 붕괴성 바이러스는 헤르페스바이러스 패밀리의 일부인 HSV-1이다. HSV의 약독화된 버전은 바이러스 리보뉴클레오티드 리덕타아제를 인코딩하는 ICP6([Aghi et al, Oncogene, 2008]) 및/또는 세린/트레오닌-단백질 키나아제를 인코딩하는 US3에서 결핍되도록 조작 또는 선택될 수 있으며, 숙주 세포 세포자멸사를 차단하는 것을 포함하여 바이러스의 수명주기에서 몇 가지 역할을 한다([Kasuya et al, Cancer Gene Therapy, 2007]).

- [0134] 사이토카인
- [0135] 본원에 기재된 바와 같은 조성물 및 방법은 질환에 대한 면역 반응을 유도하도록 작용할 수 있는 것으로 고려된다. 특히, 면역 반응은 암 세포에 대해 유도될 수 있다. 발암 과정은 흔히 암 세포에 의해 생성되고 제시되는 항원에 대한 변화를 포함하여, 암 세포가 면역계를 회피하려고 하는 방식을 포함한다.
- [0136] 일부 구현예에서, 본 발명에 의해 제공된 mRNA는 이중특이적 T-세포 관여자(BiTE)인 단백질, 항-면역억제 단백질 또는 면역원성 항원을 인코딩하는 적어도 하나의 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 본원에 사용된 바, 용어 "항-면역억제 단백질"은, 면역억제 경로를 저해하는 단백질이다.
- [0137] 본 발명은 항-조절 T-세포(Treg) 단백질 또는 항-골수-유래 억제 세포(MDSC) 단백질인 항-면역억제 단백질을 코딩하는 mRNA를 공급하는 조성물을 포함한다. 일부 구현예에서, 항-면역억제 단백질은 VHH-유래 차단제 또는 VHH-유래 BiTE이다.
- [0138] 본원에 사용된 바, 용어 "면역원성 항원"은, 염증성 또는 면역원성 면역 반응을 증가시키는 단백질을 나타낸다. 특정 구현예, 항-면역억제 및 면역원성 항원은 항-종양 면역 반응을 유도한다. 이러한 단백질의 예에는, 면역 체크포인트 수용체(예를 들어 CTLA4, LAG3, PD1, PDL1 등)에 결합하여 이를 저해하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 전염증성 사이토카인(예를 들어, IFN γ , IFN α , IPN β , TNF α , IL-12, IL-2, IL-6, IL-8, GM-CSF 등), 또는 활성화 수용체(예를 들어, Fc γ RI, Fc γ IIa, Fc γ IIIa, 동시자극 수용체 등)에 결합하여 이를 활성화시키는 단백질이 포함된다. 특정 구현예에서, 상기 단백질은 EpCAM, 플레이트, IFN β , 항-CTLA-4, 항-PD1, A2A, 항-FGF2, 항-FGFR/FGFR2b, 항-SEMA4D, CCL5, CD137, CD200, CD38, CD44, CSF-1R, CXCL10, CXCL13, 엔도텔린 B 수용체, IL-12, IL-15, IL-2, IL-21, IL-35, ISRE7, LFA-1, NG2(SPEG4로도 공지됨), SMAD, STING, TGF β 및 VCAM1로부터 선택된다.
- [0139] 본 발명은 세포 기반 요법에 사용되는 표적화된 세포 집단에 기능성 거대분자를 코딩하는 mRNA를 공급하는 조성물을 포함한다. 일부 구현예에서, 표적화된 세포 집단은 유전자 조작된 T 세포 집단이다. 일부 구현예에서, 표적화된 세포 집단은 키메라 항원 수용체 T 세포(CAR-T 세포)의 집단이다.
- [0140] 코딩 mRNA 및 전달 입자는 면역 세포 집단 또는 면역 세포 집단의 조합을 대상의 특정 부위로 유인하는 데 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 코딩 mRNA 및 전달 입자는 면역 세포를 종양 미세환경으로 유인하는 데 사용된다. 일부 구현예에서, 코딩 mRNA 및 전달 입자는 면역 세포의 종양 미세환경으로의 불충분한 이동을 극복하는 데 사용된다. 일부 구현예에서, 면역 세포는 T 세포, 자연 살해(NK) 세포, B 세포, 대식세포 또는 수지상 세포와 같은 항원 제시 세포(APC), 또는 이들의 임의의 조합이다. 일부 구현예에서, 코딩 mRNA 및 전달 입자는 CAR-T 세포를 종양 미세환경으로 유인하는 데 사용된다.
- [0141] 코딩 mRNA 및 전달 입자는 CAR T 세포의 종양 미세환경으로의 불충분한 이동을 극복하기 위해 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 전달 입자는 종양 미세환경을 특이적으로 표적화하고, 코딩 mRNA는 CAR-T 세포를 종양 미세환경으로 유인하거나 다르게는 모집하는 유전자 생성물을 인코딩한다. 일부 구현예에서, 코딩 mRNA는 케모카인을 발현시킨다. 비제한적인 예로서, 코딩 mRNA는 CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL20, CCL22, CCL28, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, XCL1 및 이들의 임의의 조합과 같은 T-세포를 유인하는 케모카인을 인코딩할 수 있다. 자가면역 질환에서와 같이 반대의 효과를 목적으로 하는 경우, 코딩 mRNA는 상기 언급된 인자의 차단제, 안타고니스트 및/또는 저해제를 발현시킬 수 있다.
- [0142] 코딩 mRNA 및 전달 입자는 종양 미세환경에서 코딩 mRNA를 일시적으로 발현시키는 데 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 코딩 mRNA는, 예를 들어 활성화된 T 세포 및 NK 세포와 같은 종양 반응에서의 면역 세포의 생존, 증식 및/또는 분화를 조절하는 데 관여하는 사이토카인 또는 다른 유전자 생성물을 인코딩한다. 비제한적인 예로서, 코딩 mRNA는 IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17, IL-33, IL-35, TGF-베타 및 이들의 임의의 조합과 같은 사이토카인을 인코딩할 수 있다. 다시, 자가면역 질환에서와 같이 반대의 효과를 목적으로 하는 경우, 코딩 mRNA는 상기 언급된 인자의 차단제, 안타고니스트 및/또는 저해제를 발현시킬 수 있다.
- [0143] mRNA를 공급하는 조성물은 특정 세포 하위유형을 표적화하여, 이에 결합 시, 수용체-매개 세포내이입을 자극함으로써, 이들이 운반하는 합성 mRNA를 세포에 도입하여, 합성 mRNA를 발현시킬 수 있다. 전이 유전자의 핵 수송 및 전사가 필요하지 않기 때문에, 이러한 과정은 빠르고 효율적이다.
- [0144] 일부 구현예에서, mRNA 나노입자 전달 시스템은 유전자-편집제를 코딩하는 mRNA를 표적 세포 집단에 전달한다. 일부 구현예에서, mRNA는 유전자 좌위를 표적으로 하고, 표적 세포 집단에서 하나 이상의 내인성 유전자 생성물

의 발현을 방해하는 서열-특이적 뉴클레아제를 코딩한다. 일부 구현예에서, mRNA는 T 세포 수용체(TCR)-관련 유전자 좌위를 표적으로 하는 서열-특이적 뉴클레아제를 코딩함으로써, TCR에서 하나 이상의 도메인의 발현을 방해한다.

[0145] 일부 구현예에서, mRNA 나노입자 전달 조성물은 조작된 T 세포를 목적하는 표현형으로 프로그램화하는 하나 이상의 작용제를 코딩하는 mRNA를 전달하는 데 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, mRNA 나노입자 전달 조성물은 목적하는 T 세포 표현형의 특징인 전사 패턴 및 마커를 유도하는 데 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, mRNA 나노입자 전달 조성물은 CAR-T 치료를 개선시키는 것으로 밝혀진, CD26L+ 중심 기억 T 세포(Tcm)의 발달을 촉진시키는 데 사용될 수 있다(예를 들어, 상기 Moffett, Coon 참조). 일부 구현예에서, 상기 조성물은 표적 세포 집단에서 세포 분화를 제어하는 하나 이상의 전사 인자를 인코딩하는 mRNA를 공급한다. 일부 구현예에서, 전사 인자는 CD8 T-세포에서 발달 효과기 대 기억 전이를 제어하는 Foxo1이다.

[0146] 일부 구현예에서, mRNA 나노입자 전달 조성물은, 예를 들어 T 세포에서 발견되는 표면 항원과 같은 T 세포 마커에 특이적인, 표면에 고정된 표적화 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 표면에 고정된 표적화 도메인은 나노입자를 T-세포에 선택적으로 결합시키고 수용체-유도 세포내이입을 개시하여, mRNA 나노입자 전달 조성물을 내재화시키는 항원에 특이적이다. 일부 구현예에서, 표면에 고정된 표적화 도메인은 CD3, CD8 또는 이들의 조합을 선택적으로 결합시킨다. 일부 구현예에서, 표면에 고정된 표적화 도메인은 CD3, CD8 또는 이들의 조합을 선택적으로 결합시키는 항체이거나, 이에서 유도된다.

[0147] 본 발명의 수단에 의해, 상기 언급된 유전자 생성물의 차등 발현은 상이한 세포 유형, 예를 들어 건강한, 병들지 않은, 병든 및 암 세포에서 달성될 수 있다. 이러한 방법에 의해, 병들지 않은 또는 건강한 세포를 보존하면서, 병든 세포에 대하여 표적화된 면역 반응을 촉발시킬 수 있다.

[0148] 코딩 뉴클레오타이드 서열의 표적 세포에의 도입은 흔히 목적하는 물질을 세포의 공간에서 세포내 환경으로 이동시키는 전달제의 사용을 필요로 한다. 흔히, 이러한 전달제는 식세포 작용을 거치고/거치거나 표적 세포와 융합할 수 있는 전달 입자의 형태이다. 전달 입자는 매트릭스 또는 구조체 내 물질을 캡슐화하거나 포함시킴으로써 목적하는 물질을 함유할 수 있다.

[0149] 본 발명의 전달 입자는 표적 조직의 세포를 표적으로 할 수 있다. 이러한 표적화는 단백질, 펩티드, 탄수화물, 당단백질, 지질, 소분자, 핵산 등일 수 있는, 전달 입자의 표면 상의 표적화제에 의해 매개될 수 있다. 표적화제는 특정 세포 또는 조직을 표적화하는 데 사용될 수 있거나, 또는 입자의 세포내이입(endocytosis) 또는 식세포 작용을 촉진시키는 데 사용될 수 있다. "표적화제의 예에는, 비제한적으로, 항체, 항체 단편, 저밀도 지단백질(LDL), 트랜스페린, 아시알리코단백질(asialycorepotein), 인간 면역결핍 바이러스(HIV)의 gp120 외피 단백질, 탄수화물, 수용체 리간드, 시알산, 아파타머 등이 포함된다.

[0150] 전형적으로, 전달 입자는 아미노알코올 리피도이드를 포함한다. 이러한 화합물은 핵산의 전달에 특히 적합한, 나노입자, 리포좀 및 미셀을 포함하는 입자의 형성에 사용될 수 있다. 본 발명의 일부 구현예에 따른 입자를 포함하는 나노제형의 제조에 대한 예시적인 예는, 실시예에서 확인할 수 있다.

[0151] 대상에게 투여되는 경우, 치료 성분은 적합하게는 약학적으로 허용 가능한 비히클을 포함하는 조성물의 일부로서 투여된다. 허용 가능한 약학적 비히클은 물, 및 석유, 동물, 식물 또는 합성 기원의 것, 예컨대 땅콩유, 대두유, 광물유, 참기름 등을 포함하는 오일과 같은 액체일 수 있다. 약학적 비히클은 식염수, 아카시아검, 젤라틴, 전분 페이스트, 탈크, 케라틴, 콜로이드 실리카, 우레아 등일 수 있다. 또한, 보조제, 안정화제, 증점제, 윤활제 및 착색제가 사용될 수 있다. 대상에게 투여될 때, 약학적으로 허용 가능한 비히클은 멸균되는 것이 바람직하다. 물은 본 발명의 화합물이 정맥내로 투여될 때 적합한 비히클이다. 식염수 용액, 및 텍스트로오스 및 글리세롤 수용액이 또한, 특히 주사 용액용 액체 비히클로서 이용될 수 있다. 적합한 약학적 비히클에는, 또한 전분, 글루코오스, 락토오스, 수크로오스, 젤라틴, 맥아, 쌀, 밀가루, 초크, 실리카겔, 나트륨 스테아레이트, 글리세롤 모노스테아레이트, 탈크, 염화나트륨, 건조된 탈지유, 글리세롤, 프로필렌, 글리콜, 물, 에탄올 등과 같은 부형제가 포함된다. 약학적 조성물은, 목적하는 경우, 또한 미량의 습윤화 또는 유화제, 또는 완충제를 함유할 수 있다.

[0152] 본 발명의 약제 및 약학적 조성물은 액체, 용액, 현탁액, 겔, 변형된 방출 제형(예컨대 서방형 또는 지속방출형), 에멀전, 캡슐(예를 들어, 액체 또는 겔을 함유하는 캡슐), 리포좀, 마이크로입자, 나노입자 또는 당업계에 공지된 임의의 다른 적합한 제형의 형태를 취할 수 있다. 적합한 약학적 비히클의 다른 예는 [Remington's Pharmaceutical Sciences, Alfonso R. Gennaro ed., Mack Publishing Co. Easton, Pa., 19th

ed., 1995(예를 들어 1447 내지 1676 페이지 참조)]에 기재되어 있다.

- [0153] 본원에 기재된 임의의 화합물 또는 조성물의 경우, 치료적 유효량은 초기에 *시험관내* 세포 배양 검정으로부터 결정될 수 있다. 목표 농도는 본원에 기재되거나 당업계에 공지된 방법을 사용하여 측정 시, 본원에 기재된 방법을 달성할 수 있는 활성 성분(들)의 농도일 것이다.
- [0154] 당업계에 널리 공지된 바와 같이, 인간 대상에서 사용하기 위한 치료적 유효량은 또한 동물 모델로부터 결정될 수 있다. 예를 들어, 인간을 위한 용량은 동물에서 효과적인 것으로 확인된 농도를 달성하도록 제형화될 수 있다. 인간에서의 투여량은 상기 기재된 바와 같이 화합물 효과를 모니터링하고, 투여량을 상향 또는 하향 조절함으로써 조정될 수 있다. 상기 기재된 방법 및 다른 방법을 기반으로 인간에서 최대 효능을 달성하기 위한 용량의 조절은, 당업자의 능력 내에 있다.
- [0155] 본 발명의 구현에는 의약에 사용하기 위해 제형화된 조성물을 포함할 수 있는 것으로 고려된다. 이와 같이, 본 발명의 조성물을 생체 적합성 용액에 현탁시켜, 조직 내, 또는 환자 또는 동물의 신체 내 세포 상의 위치로 표적화될 수 있는 조성물을 형성할 수 있다(즉 상기 조성물은 *시험관내*, *생체외* 또는 *생체내*에서 사용될 수 있음). 적합하게는, 생체 적합성 용액은 인산염 완충 식염수 또는 임의의 다른 약학적으로 허용 가능한 담체 용액일 수 있다. 하나 이상의 부가적인 약학적으로 허용 가능한 담체(예컨대, 희석제, 아췌반트, 부형제 또는 비히클)가 약학적 조성물에서 본 발명의 조성물과 조합될 수 있다. 적합한 약학적 담체는 [E. W. Martin, 'Remington's Pharmaceutical Sciences']에 기재되어 있다. 본 발명의 약학적 제형 및 조성물은 조절 표준을 따르도록 제형화되고, 경구로, 정맥내로, 국소적으로, 종양내로 또는 피하로, 또는 다른 표준 경로를 통해 투여될 수 있다. 투여는 전신적 또는 국소적 또는 비강내 또는 척추강내일 수 있다.
- [0156] 나아가, 본 발명의 일부 구현예의 조성물은 별도로, 또는 대안적인 항종양 또는 다른 항암 치료 성분과 조합하여 투여되는 것으로 의도된다. 이러한 성분은 종양 세포 붕괴성 바이러스, 소분자 약물, 화학요법, 방사선요법제 또는 생물학적 제제를 포함할 수 있다. 상기 성분은 본 발명의 조성물과 동시에 투여될 수 있고, 전달 입자 내 포함될 수 있거나, 또는 임의의 적합한 수단에 의해 본 발명의 조성물의 투여 전후에 별도로 투여될 수 있다.
- [0157] 또한, 본 발명의 일부 구현예의 조성물은, 예를 들어 실험실 설정에서 *시험관내* 및/또는 *생체외* 방법에 사용될 수 있는 것으로 고려된다. *생체내* 방법의 예는, 본원에 기재된 바와 같은 전달 입자 및 mRNA 서열을 포함하는 조성물을 표적 *시험관내* 세포에 투여하여, mRNA 서열에 포함된 miRNA 결합 부위 서열이 표적 *시험관내* 세포 내 상이한 세포 유형에서 mRNA의 코딩 서열의 차등 발현을 가능하게 하는 방법이다. 유사하게, 본원에 기재된 바와 같은 전달 입자 및 mRNA 서열을 포함하는 조성물을 동물로부터 취한 표적 *생체외* 샘플에 투여하여, mRNA 서열에 포함된 miRNA 결합 부위 서열이 표적 샘플 내 상이한 세포 유형에서 mRNA의 코딩 서열의 차등 발현을 가능하게 하는 방법이 고려된다.
- [0158] 본 발명의 장치는 하기 실시예로 예시되지만, 이에 의해 제한되는 것은 아니다.
- [0159] 실시예
- [0160] 일반 프로토콜
- [0161] 세포주
- [0162] 인간 간암종(HCC) HepG2(ATCC[®] HB-8065[™]) 및 Hep3B(ATCC[®] HB-8064[™]) 세포는 ATCC에서 구입하였다. 세포를 이글 최소 필수 배지(Eagle's Minimum Essential Medium, EMEM)(Cellgro, USA), 10% FBS(Hyclone, USA), 스트렙토마이신(100 $\mu\text{g/mL}$) 및 페니실린(100 U/mL^{-1})(Cellgro) 중에서 5% CO_2 분위기 하 37°C에서 단층으로 배양하였다. HepG2 세포를 5 $\mu\text{g/cm}^2$ 의 콜라겐 농도로 콜라겐(Gibco, USA) 코팅된 플레이트 상에서 성장시켰다.
- [0163] HMCPP5(폴딩된(pooled) 플레이팅 가능한 인간 간세포; 5명의 개별 공여자로부터의 세포를 조합하여 생성된 플레이팅 가능한 1차 간세포의 혼합물)는 ThermoFisher Scientific(USA)에서 구입하였다. 세포를 5% FBS, 1 μM 텍사메타손 및 각테일 A(페니실린/스트렙토마이신, 인간 재조합 인슐린, GlutaMax 및 HEPES, pH 7.4)가 보충된 윌리엄 E 배지(Williams E Medium, WEM)에 플레이팅하였다. 플레이팅 24시간 후, WEM/각테일 A 배지를 0.1 μM 텍사메타손 및 각테일 B(페니실린/스트렙토마이신, ITS(인간 재조합 인슐린, 인간 트랜스페린, 아셀렌산, BSA, 리놀레산), GlutaMax 및 HEPES, pH 7.4)가 보충된 유지/인큐베이션 배지 WEM으로 변경하고, 5% CO_2 분위기 하 37°C에서 단층으로 배양하였다. 모든 실험 동안, 나노제형화된 mRNA로의 트랜스펙션 동안을 제외하고, 세포를

WEM/각테일 B 배지 중에서 배양하였다. WEM/각테일 B 배지를 3일마다 새로 교환하였다. HMCPP5 세포를 $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 의 단백질 농도로 콜라겐(Gibco) 코팅된 플레이트 상에서 성장시켰다.

[0164] Am112(마우스의 건강한 간세포)는 ATCC(USA)에서 구입하였다. 세포를 1×10^5 /웰의 밀도로 12-웰 플레이트에 씨딩하였다.

[0165] 벡터 구조체

[0166] pMRNA-CTx-mRNA 주형의 구축

[0167] 실험에 사용된 모든 mRNA의 시험관내 합성을 위한 플라스미드 pMRNA-CTx-mRNA 주형 형성 매트릭스를 상업적으로 입수 가능한 mRNAExpress™ mRNA 합성 키트(SBI, USA)에 따라 구축하였다. 모든 플라스미드를 대장균(Invitrogen, USA)에서 증식시키고, Qiagen Mini 또는 Maxi Kit(Qiagen, USA)를 사용하여 정제하였다. 모든 플라스미드의 제한 맵은 pDRAW32 소프트웨어(www.acaclone.com)를 사용하여 생성하였다.

[0168] 클로닝 방법 1 - 제한 엔도뉴클레아제

[0169] 도 2에 도시된 바와 같이, 유전자의 5'-말단의 ATG 코돈 또는 3'-말단의 중지 코돈(TAA, TAG, TGA) 직전에 최적의 번역을 위해 코작 서열이 측면에 있는 하나 이상의 유전자의 서열을, GeneArt 사에서 합성하고(코돈 최적화 없이), pMA-T-CTx-Gene으로서 도 2에 도시된, 플라스미드 DNA(DNA 플라스미드 또는 벡터로 지칭됨)로서 전달하였다. 코딩 서열이 측면에 있는 독점적 5' 및 3' UTR 영역은 모든 합성된 서열(첨부된 서열에는 제시되지 않음)에 포함되어 있었다. 5' UTR은 합성이며, 코작 서열을 함유하고, 3' UTR은 마우스 알파 글로빈 UTR을 기반으로 하며, 또한 120개 염기의 polyA 꼬리를 포함한다. pMRNA-CTx-mRNA로서 도 2에 도시된 합성 벡터를 생성하기 위해, 유전자 또는 유전자들을 함유하는 뉴클레오티드 단편을 제한 엔도뉴클레아제(여기서 EcoRI 및 NheI)를 사용하여 DNA 플라스미드로부터 절단하고, pMRNA 주형 플라스미드의 EcoRI/NheI 제한 부위로 서브클로닝하였으며, 여기서 주형 플라스미드는 T7 RNA 폴리머라아제, 5'- 및 3'-UTR, 및 polyA 서열에 의해 인식되는 T7 프로모터를 포함하였다.

[0170] 클로닝 방법 2 - 저온 융합

[0171] 클로닝 방법 1에서와 같이 코작 서열 및 중지 코돈(TAA, TAG, TGA)이 측면에 있는 하나 이상의 유전자의 서열을, GeneArt 사에서 합성하고(코돈 최적화 없이), 상기 기재된 바와 동일한 이러한 플라스미드의 백본을 갖는 플라스미드 DNA pMAT-CTx-Gene으로서 전달하였다. pMRNA-CTx-mRNA 주형 벡터를 구축하기 위해, 저온 융합 클로닝 키트(SBI, USA)를 이용하였다. 간략하게, DNA 플라스미드로부터의 유전자 서열을 특정 프라이머를 이용하여 PCR로 증폭시켰는데, 여기서 프라이머는 유전자 서열의 각각의 말단에 14개 염기 상동성의 연장을 부가하였다. 이러한 14개 염기는 5'과 3' UTR 사이에 위치한 다중클로닝 부위에서 제한 엔도뉴클레아제 절단을 이용한 주형 플라스미드의 소화에 의해 생성된 선형화 벡터의 말단과 상동성이되도록 설계되었다. 합성 벡터를 생성하기 위해, 예측된 PCR 생성물을 PCR 정제 키트(Qiagen, USA)로 정제하고, 제조업자의 프로토콜에 따라 저온 융합 반응(상동성 재조합) 후 pMRNA 주형 플라스미드에 혼입시켰다.

[0172] miRNA 결합 부위 서열을 함유하는 주형의 구축

[0173] miRNA 결합 부위 서열을 포함하는 mRNA 서열의 생성을 위해(miR-122를 사용한 이의 예가 도 3에 도시되어 있음), 3가지 변이체를 생성하는 예시적인 방법이 하기에 논의된다. 변이체 1에서, miRNA 결합 부위 서열의 2개의 카피는 중지 코돈과 3' UTR의 +1 위치 사이에 포함되어 있다. 변이체 2에서, miRNA 결합 부위 서열의 2개의 카피는 3' UTR의 시작 또는 5' 말단에 포함되어 있고, 변이체 3에서, miRNA 결합 부위 서열의 2개의 카피는 3' UTR의 말단 또는 3' 말단에 포함되어 있다.

[0174] 도 4에는, 예시 단백질 B로서, 대략 1400개 염기 쌍의 유전자를 사용한, 이러한 3가지 변이체를 포함하는 합성 벡터의 예가 도시되어 있다.

[0175] 변이체 1

[0176] 도 5에 도시된 바와 같이, 상기 방법에서와 같이 코작 서열 및 중지 코돈(TAA, TAG, TGA)이 측면에 있고, 중지 코돈 후 miRNA 결합 부위 서열의 2개의 카피를 추가로 포함하는 하나 이상의 유전자의 서열을, GeneArt 사에서 합성하고(코돈 최적화 없이), 상기 기재된 바와 동일한 이러한 플라스미드의 백본을 갖는 pMAT-CTx-Gene을 플라스미드(여기서 다시 단백질 A로 도시됨) DNA로서 전달하였다. 이어서, 이러한 서열을 주형 플라스미드에 클로

닝하여, 상기 기재된 방법 중 어느 것에 의해 합성 벡터를 생성하였다.

[0177] 변이체 2 및 3

[0178] 상기 방법에서와 같이 코작 서열 및 중지 코돈(TAA, TAG, TGA)이 측면에 있고, 추가로 이러한 영역의 시작/5' 말단(변이체 2, 도 6에 도시된 바와 같음), 또는 이러한 영역의 말단/3' 말단(변이체 3, 도 7에 도시된 바와 같음)에 miRNA 결합 부위 서열의 2개의 카피를 포함하는 3' UTR를 포함하는 하나 이상의 유전자의 서열을, GeneArt 사에서 합성하고(코돈 최적화 없이), 상기 기재된 바와 동일한 이러한 플라스미드의 백본을 갖는 pMAT-CTx-Gene을 플라스미드 DNA로서 전달하였다. 이어서, 이러한 서열을 주형 플라스미드에 클로닝하여, 공급된 DNA 서열로부터의 3' UTR이 최종 합성 벡터에 존재할 수 있도록(이는 miRNA 결합 부위 서열을 함유하기 때문에), 주형 벡터로부터 3' UTR을 제거하기 위해 제한 효소를 선택하여(여기서 EcoRI 및 NotI) 변형시킨, 상기 기재된 방법 중 어느 것에 의해 합성 벡터를 생성하였다.

[0179] 시험관내 mRNA 합성을 이용한 mRNA의 시험관내 전사(IVT)

[0180] miRNA-변형된 3' UTR의 존재 유무 하에서의 mRNA의 IVT를 수행하기 위해, 상업적으로 입수 가능한 mRNAExpress™ mRNA 합성 키트를 사용하였다. IVT 벡터를 대한 DNA 주형을 상기 제시된 프로토콜에 기재된 바와 같이 구축하였다. 시험관내 mRNA 합성 절차를 제조업자의 프로토콜에 따라 수행하였다. 간략하게, polyA 꼬리를 특정 5' 및 3' 프라이머(키트와 함께 제공됨)와의 PCR 반응을 사용하여 DNA 서열에 추가하였다. 시험관내 전사 동안, DNA 주형 상에 합성된 mRNA를 항-역 캡 유사체(anti-reverse cap analog, ARCA)-변형된 뉴클레오타이드(5'-메틸시티딘-5'-트리포스페이트)로 캡핑하였다. 캡 유사체인 슈도우리딘-5'-트리포스페이트 및 polyA 꼬리를 시험관내 전사된 mRNA에 혼입시켜, 안정성을 증강시키고 숙주 세포의 면역 반응을 감소시켰다.

[0181] DMP^{CTx} 및 mRNA의 제형의 합성

[0182] Combined Therapeutics의 전달 및 조절 플랫폼(DMP^{CTx}) 제형은, 이온화 가능한 지질 유사 물질 C12-200, 인지질 DOPE, 콜레스테롤 및 지질-고정된 폴리에틸렌 글리콜 C14-PEG-DSPE2000 혼합물의 다성분 나노입자이다. 이러한 DMP^{CTx} 의 특정 조성, 및 C12-200:mRNA의 특정 중량비(10:1), 및 지질유사 물질, 인지질, 콜레스테롤 및 PEG의 몰 [%] 조성은 (표 4) 최적화되었고, 생체내에서 제형의 높은 효율이 확인되었다([Kauffman K.J., Nano Letter. 2015, 15, 7300-7306]). 이러한 예시적인 성분의 화학 구조는 도 8에 도시되어 있다.

[0183] DMP^{CTx} 를 합성하기 위해, 도 9a에 도시된 바와 같은, C12-200(WuXi, China)의 에탄올성 용액(Mix A), 인지질 DOPE(1,2-디올레일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민)(Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA), 콜레스테롤(Sigma, USA) 및 C14-PEG-DSPE2000(Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA) 및 (10 mM 시트레이트, pH 4.5) 중 mRNA (Mix B)의 완충 수용액을 제조하였다. 에탄올성 Mix A 및 수성 Mix B를 시린지 펌프 및 미세유체 칩 장치를 사용하여 3:1 비로 혼합/조합하였다([Chen D, et al J. Am. Chem. Soc. 2012, 134 (16), 6948-6951]). 미세유체 칩으로부터의 나노제형화된 mRNA의 알코올성 용액을 1.5 mL 튜브에 수집하였다.

표 4

화합물	중량비	제형 몰 조성[%]
C12-200:mRNA	10:1	n/a
C12:200	n/a	35
DOPE		16
콜레스테롤		46.5
C14-PEG-DSPE200		2.5

[0184]

[0185] 제형화 후 알코올을 제거하기 위해, DMP^{CTx} -mRNA 혼합물을 Slide-A-Lyzer® 투석 카세트 G2로 옮기고, PBS 중에서 자기 교반기 상에서 실온에서 4 시간 동안 투석하였다. 이어서, 18 게이지의, 1-인치 경사진 니들을 갖는 시린지를 사용하여 제형화된 mRNA를 새로운 1.5 mL 튜브에 옮기고, 특징분석을 준비하였다.

[0186] mRNA 캡슐화의 효능을 계산하기 위해, RiboGreen RNA 검정(Invitrogen)을 제조업자의 프로토콜에 따라 사용하였다. 지질 나노입자의 다분산도(PDI) 및 크기를 동적 광 산란(ZetaPALS, Brookhaven, Instruments)을 사용하여 측정하였다. DMP^{CTx}의 표면 전하(제타 전위)를 동일한 기기를 사용하여 측정하였다. 링커(서열번호 2)로 연결되고, 코딩 mRNA 서열의 중지 코돈 후 삽입된 miR-122 서열의 2개의 카피를 포함하거나 포함하지 않는 mRNA 서열의 용액을, 각각, 1.05 및 1 mg/ml 스톱으로부터 제조하였다. 대략 25 kDa의 인간 단백질인 단백질 A의 서열인 mCherry(mCh) 서열을 포함하는 mRNA 서열의 캡슐화 후 파라미터의 예는, Combined Therapeutics의 전달 및 조절 플랫폼(DMP^{CTx})의 크기, 캡슐화 효율 및 다분산도를 포함하여, 표 5에 제시되어 있다. DMP^{CTx}에 따른 전달 입자의 예시적인 다이어그램은 도 9b에서 확인할 수 있다.

표 5

mRNA	제형	농도(ug/mL)	캡슐화 효능(%)	크기 (nm)	다분산도
단백질 A - 022	C12-200	202	78	93	0.12
US3 - 052		172	78	93	0.12
mCherry - 062		120	76	96	0.12

[0187]

[0188] 전달된 mRNA 구조체의 시험관내 차등 발현

[0189] 표적 세포를 구조체 mRNA로 성공적으로 트랜스펙션시키고, 이어서 상이한 세포 유형에서 차등 발현을 유도하는 본 발명의 잠재력을 조사하기 위해, miRNA-122 결합 부위로 변형된 DMP^{CTx} mRNA 플랫폼을, 간암종의 모델에 사용하였다.

[0190] 세포주의 트랜스펙션

[0191] 형광 이미지화 및 정량화

[0192] 인간 간암종 세포주인 HepG2 및 Hep3B의 단일 트랜스펙션을 하기와 같이 수행하였다: 트랜스펙션 하루 전, HepG2 및 Hep3B 세포를, 각각, 2.7×10^5 /웰 및 2×10^5 /웰(EMEM/10%FCS)의 밀도로 12-웰 플레이트에 별도로 씨딩하였다. 다음 날, 세포를 PBS 단독의 비히클 대조군, 0.5 μ g/웰의 mRNA-mCherry-DMP^{CTx} 또는 0.5 μ g/웰의 mRNA-mCherry-122-DMP^{CTx} (서열번호 3을 포함하는 서열)로 트랜스펙션시켰다. 트랜스펙션은, 필요한 경우 배양된 세포의 온전한 혼합물을 이용하여, 웰의 배양된 배지에 mRNA-DMP^{CTx}를 직접 첨가함으로써 수행하였다.

[0193] HMCPP5(폴딩된 플레이팅 가능한 인간 간세포)의 단일 트랜스펙션을 하기와 같이 수행하였다: 트랜스펙션 하루 전, HMCPP5 세포를 2.5×10^5 /웰(WEM/각테일 B)의 밀도로 12-웰 플레이트에 씨딩하였다. 다음 날, 세포를 DMP^{CTx}(PBS)의 비히클 대조군, 0.5 μ g/웰의 mRNA-mCherry-DMP^{CTx} 또는 0.5 μ g/웰의 mRNA-mCherry-122-DMP^{CTx}로 트랜스펙션시켰다. 트랜스펙션은, 필요한 경우 배양된 세포의 온전한 혼합물을 이용하여, 웰의 배양된 배지에 mRNA-DMP^{CTx}를 직접 첨가함으로써 수행하였다. HMCPP5의 트랜스펙션 동안, WEM/각테일 B 배지에 5% FBS를 보충하였다. 트랜스펙션을 상기 간암 세포에 대하여 기재된 방식으로 수행하였다. 트랜스펙션 24시간 후, 배지를 다시 WEM/각테일 B로 변경하였다.

[0194] 건강한 인간 간세포에서 miRNA-122의 구성적 활성 및 발현을 평가하기 위해, HMCPP5 세포의 다중 트랜스펙션을 하기와 같이 수행하였다: HMCPP5 세포를 상기와 같이 씨딩 및 배양하고, mRNA-mCherry-DMP^{CTx} 또는 mRNA-mCherry-122-DMP^{CTx}로, 각각의 트랜스펙션 사이에 48시간의 간격을 두고, 총 3회(MPT) 트랜스펙션시켰다. 트랜스펙션은 상기 기재된 바와 같이, HMCPP5의 단일 트랜스펙션에 대하여 기재된 바와 동일한 방식으로 수행하였다.

[0195] 마우스의 건강한 간세포(Aml12, ATCC, USA)의 단일 트랜스펙션을 하기와 같이 수행하였다: 트랜스펙션 하루 전, Aml12 세포를 1×10^5 /웰의 밀도로 12-웰 플레이트에 씨딩하였다. 다음 날, 세포를 DMP^{CTx}(PBS)의 비히클 대조군, 0.5 μ g/웰의 mRNA-mCherry-DMP^{CTx} 또는 0.5 μ g/웰의 mRNA-mCherry-122-DMP^{CTx}로 트랜스펙션시켰다. 트랜스펙션

은, 필요한 경우 배양된 세포의 온건한 혼합물을 이용하여, 웰의 배양된 배지에 mRNA-DMP^{CTx}를 직접 첨가함으로써 수행하였다.

[0196] 트랜스펙션 후, 상기 세포주에서의 mCherry 발현을 형광 이미지화 시스템(EVOS® FL Imaging Systems 적용)을 사용하여 검출하였다. 트랜스펙션 16, 24, 48, 72, 96 및 144 시간 후, mCherry 형광을 나타내는 사진을 찍었다.

[0197] mCherry 형광 신호의 정량화는 배양 플레이트(mRNA-mCherry, mRNA-mCherry-122) 상의 3개의 무작위화된 필드로부터 ImageJ 소프트웨어(NIH, USA)를 사용하여 수행하였다. 도 10b, 11 및 12b에는, 이러한 정량화의 결과가 도시되어 있다. mCherry 트랜스펙션된 웰의 픽셀 수를 100%(mCherry 형광)로 설정하였다. 통계적 유의성은 스튜던트 *t*-검정(Student *t*-test)을 사용하여 결정하였다. 결과는 평균 \pm SD로 제시된다. 유의한 차이는 0.05 미만의 *p*값으로 정의되었다. 별표는 mRNA-mCherry-122로 트랜스펙션된 세포와 비교하여, mRNA-mCherry로 트랜스펙션된 세포에서의 mCherry 형광의 통계적으로 유의한 차이를 나타낸다(*****p* < 0.0001, ****p* < 0.001, ***p* < 0.01, **p* < 0.05).

[0198] 실시예 1: miRNA-122 조절에 의한 종양-특이적 유전자 발현

[0199] miRNA-122는 풍부한 간-특이적 miRNA이며, 이의 발현은 Hep3B 및 HepG2와 같은 인간 원발성 간암종(HCC) 및 HCC 유래 세포주에서 유의하게 감소된다. 본 연구의 목적은 miRNA-122 표적화 서열(예를 들어, 서열번호 2, 도 3의 상부, 변이체 1에 도시된 바와 같음)의 삽입에 의한 mRNA 서열의 3'-비번역 영역(UTR)의 변형이, 번역 억제 및/또는 탈아데닐화, 이어서 시험된 HCC 세포주가 아닌 정상 간세포에서 외인성 mRNA의 디캡핑(decapping)을 초래할 수 있다는 것을 입증하는 것이었다.

[0200] 건강한 간세포에서 내인성 miRNA-122 활성을 조사하기 위해, HMCPP5 세포(폴링된 플레이팅 가능한 인간 간세포, 5명의 개별 공여체로부터의 세포를 조합하여 생성된 플레이팅 가능한 1차 간세포의 혼합물임)를 관심 도입 유전자로서 mCherry(적색 형광 단백질)를 사용하여 상기 일반 프로토콜에 따라 제조된 mRNA-mCherry 또는 mRNA-mCherry-122로 트랜스펙션시킨 후, mCherry(적색 형광 단백질)를 시간의 경과에 따라 발현시켰다. 도 10a에 도시된 바와 같이, mCherry(mCh) 발현을 트랜스펙션 48시간 후에 형광 현미경으로 분석하였다. 트랜스펙션 후 전체 시간 동안, mCherry 발현을 mRNA-mCherry로 트랜스펙션된(즉, miR-122 서열을 도입하기 위한 3'UTR 변형을 갖지 않는) HMCPP5 세포에서 관찰하였으며, 이는 성공적인 트랜스펙션 및 번역을 나타낸다. 대조적으로, miRNA-122 양성인 것으로 공지된 건강한 간세포에서, mRNA-mCherry-122의 발현은 트랜스펙션되지 않은 대조군 세포에서 볼 수 있는 바와 비교하여, 심지어 트랜스펙션 3일 후에도, 실질적으로 검출 가능하지 않은 수준으로 하향조절되었다. 이는, 3' UTR에 삽입된 mRNA-mCherry-122(변이체 1)에서 miRNA-122 표적화 서열의 존재가 mRNA의 번역을 막는 것으로 나타났는데, 이는 아마도 수용체 세포에서의 번역 억제에 의한 것으로 보인다.

[0201] 이러한 세포에 의해 나타난 형광 신호의 정량화는 상기를 확인시켜 주었다. 도 10b에 도시된 바와 같이, 형광 강도는 mRNA-mCherry로 트랜스펙션된 세포에 비해, mRNA-mCherry-122로 트랜스펙션된 건강한 세포에서 극적으로 감소하였다.

[0202] 상기 실험에서 수득된 결과는, miRNA-122의 고유한 발현 및 miRNA-122 표적화된 서열(변이체 1)과의 공동국소화가 건강한 간세포에서 단백질 발현을 효과적으로 조절하여, 종양-특이적 유전자 발현을 유의하게 증가시킬 수 있다는 것을 보여주었다. 하기 실험에서, HMCPP5 세포에서 miRNA-122의 구성적 발현 및 활성을 평가하였다. HMCPP5 세포를 mRNA-mCherry 또는 mRNA-mCherry-122로, 매회 48시간의 간격으로, 총 3회 트랜스펙션시켰다. 제 1 트랜스펙션 6일 후(즉, 마지막 트랜스펙션 48시간 후), mCherry의 발현을 형광 현미경으로 결정하였다. 상기 와 같이, mRNA-mCherry 구조체로 트랜스펙션된 세포는 투명하고 붉은 형광을 나타냈지만, mRNA-mCherry-122 구조체로 트랜스펙션된 세포는 그렇지 않았다. 도 11에서, mRNA-mCherry-122로 트랜스펙션된 세포와 mRNA-mCherry로 트랜스펙션된 세포 사이의 비교가, 단일(ST) 및 다중-트랜스펙션된 세포(MPT) 둘 모두에 대하여, 최종 트랜스펙션 후 5일의 기간에 걸쳐 제시되어 있다. 다중-트랜스펙션된 세포는 단일-트랜스펙션된 세포와 같은 mRNA-mCherry-122로 트랜스펙션될 때 형광 강도의 동일한 급격한 감소를 나타내는 것으로 볼 수 있으며, 여기서 다중 트랜스펙션 후 효과가 더 오래 지속되었다. 예상한 바와 같이, 이는, miRNA 제어 메커니즘에 의해 유도된 차등 발현 효과가 반복된 트랜스펙션 사건에 대하여 강하며, 이러한 메커니즘을 유도하기 위해 세포 내 이용 가능한 miRNA-122의 양은 이러한 시간 프레임에서 소진되지 않음을 나타낸다.

[0203] 인간 간암종 Hep3B 및 간모세포종 HepG2 세포주를 사용하여 내인성 miRNA-122 활성 효과를 조사하기 위해, 상기 와 유사한 실험을 수행하였다. 세포를 mRNA 서열인 mRNA-mCherry, mRNA-mCherry-122(변이체 1)로 트랜스펙션시

키거나, 또는 대조군 트랜스펙션시켰다. 상기와 같이, 48시간 후, 도 10a에 도시된 바와 같이, 형광 현미경을 사용하여 트랜스펙션된 Hep3B 및 HepG2 세포에서 mCherry의 발현을 결정하였다. Hep3B 세포(도 10a, 중간 컬럼)에서, mCherry 형광은 mRNA-mCherry 및 mRNA-mCherry-122 트랜스펙션된 세포주 둘 모두에서 명백하게 나타났으며, 이는 miRNA-122 매개 번역 억제가 이러한 세포에서 활성이 아님을 나타낸다. HepG2 세포에서, mCherry 형광은 mRNA-mCherry 트랜스펙션된 세포주에서 명백하게 나타났지만, mRNA-mCherry-122 트랜스펙션된 세포에서는 일부 형광만이 명백했는데, 이는 단지 부분적으로 감소된 것으로 정상 간세포에서 보이는 것보다 유의하게 더 큰 것으로 나타났다. mRNA-mCherry-122 트랜스펙션된 세포주에서 mCherry 형광의 정량화가, Hep3B 세포에서는 형광의 감소가 나타나지 않음을 나타내지만, HepG2 세포에서는 약 50%의 감소가 보임을 나타내는, 추가의 증거가 도 10b에 도시되어 있다.

[0204] HepG2 세포에서 보이는 부분 하향조절은, 이러한 세포주로부터의 세포가 잔류 miRNA-122 활성을 보유하는 것으로 나타났기 때문에, 번역에 대한 miRNA-122 매개 효과를 추가로 암시한다([Demonstration of the Presence of the "Deleted" MIR122 Gene in HepG2 Cells, PLoS One. 2015; 10(3)]).

[0205] miRNA-122는 척추동물 중 사이에서 강하게 보존되며, 인간에서와 같이, miRNA-122의 감소된 수준은 마우스에서의 간세포 암종과 관련이 있다(Kutay et al, 2006). 따라서, miRNA-122 활성의 내인성 효과를 마우스의 건강한 간세포 세포주 Aml12를 사용하여 조사하였다.

[0206] 건강한 마우스 간세포를 또한 상기 기재된 mRNA-Cherry 서열, 즉 DMP^{CTx}에 캡슐화된 mRNA-mCherry 또는 mRNA-mCherry-122로 트랜스펙션시켰다. mCherry 형광에 대한 miRNA-122 결합 부위 서열 삽입의 유사한 영향이, 트랜스펙션 24시간 및 72시간 후에 관찰되었다.

[0207] 도 12a에 도시된 바와 같이, mRNA-mCherry로의 트랜스펙션 후 형광이 관찰되었다. mRNA-mCherry-122로의 트랜스펙션 후 형광의 현저한 감소가 나타났지만, 일부 신호는 여전히 볼 수 있었다.

[0208] 트랜스펙션 24시간 및 72시간 후 mCherry 형광의 정량화를, 각각의 처리군으로부터의 배양 플레이트 상에서 3개의 무작위화된 웰스에서 수행하였으며(도 12b), 이는 mRNA-mCherry-122로 트랜스펙션될 때, 70% 초과 번역 억제가 관찰되었음을 보여주었다.

[0209] 예비 결론으로서, 상기 실시예는, 나노입자 전달 시스템의 이중 표적화 특징, 및 mRNA 구조체 내 miRNA-122 표적 서열의 내포가, 건강한 간세포에 비해 간암종 및 간모세포종 세포에서 단백질 생성물의 상당히 유의한 차등 발현을 획득하는 데 충분함을 보여준다. 차등 발현의 관찰은 인간 및 마우스 세포주 둘 모두에서 명백하였다.

[0210] 실시예 2: 종양-특이적 유전자 발현 후 단백질 발현 수준

[0211] 또 다른 실험에서, 웨스턴 블롯팅(Western blotting)을 이용하여 하기와 같이 트랜스펙션 후 궁극적으로 나타난 단백질 발현 수준을 결정하였다.

[0212] 세포주의 트랜스펙션 및 면역블롯 - 단백질 A

[0213] 예시적인 25 kDa 인간 단백질('단백질 A'로 표시됨)의 종양 특이적 발현 수준을 평가하기 위해, 간암 세포(HepG2 및 Hep3B) 및 건강한 간세포(HMCP5) 둘 모두를 12-웰 플레이트에 씨딩하고, mCherry 트랜스펙션에 대하여 실시예 1에서 상기 기재된 바와 같이, 0.5 μg/웰의, 인간 단백질 A를 발현하는 나노제형화된 mRNA, 25 kDa(mRNA-A-DMP^{CTx}), 또는 3' UTR(서열번호 2)에 2개의 miRNA122 결합 서열을 포함하는 인간 단백질 A(대략 25 kDa의 인간 단백질을 발현하는 mRNA인 변이체 1(mRNA-A-miRNA122-DMP^{CTx}))로 트랜스펙션시켰다. 트랜스펙션 24시간 후, 총 단백질 추출 후 면역블롯을 수행하였다.

[0214] 면역블롯의 경우, 배양 배지를 제거하고, 세포를 냉각된 PBS(Cellgro)로 세척하고, 세포 펠릿을 프로테아제 억제제(Sigma)의 각테일을 갖는 RIPA(방사성 면역 침전 검정(radioimmunoprecipitation assay)) 완충액(Boston Bioproducts)에 용해시켰다. 단백질 농도는 비색 브래드포드(Bradford) 검정으로 결정하였다. 총 10 mg의 단백질을 Novex™ 4-12% 미니 겔(ThermoFisher Scientific)로 분리하고, 전기블롯팅(iBlot® 2 Gel Transfer Device, Invitrogen)에 의해 PVDF(폴리비닐리덴 디플루오라이드) 막으로 옮겼다. TBS-Tween 20(Boston Bioproducts) 중의 5% 무지방 분유로 차단한 후, 막을 항-단백질 A 항체(1:2000, Abcam) 또는 β-액틴(세포 신호전달)과 함께 4°C에서 밤새 인큐베이션한 후, 적절한 HRP(홀스래디쉬 퍼옥시다아제)-컨쥬게이션된 염소 항-토끼 2차 항체(1:10000; Abcam)와 함께 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 단백질-항체 복합체를, 각각, Clarity™ Western ECL 기질(Bio Rad) 및 LI-COR® 시스템(LI-COR)을 사용하여 가시화 및 이미지화하였다.

- [0215] 상기 결과는 도 13에서 확인할 수 있으며, 트랜스펙션 후 DMP^{CTx}에 캡슐화된 구조체가 제시되어 있다:
- [0216] 도 13의 레인 1, 4 및 7: 비히클(모의군 처리, PBS 단독),
- [0217] 도 13의 레인 2, 5 및 8: mRNA-A(단백질 A에 대한 서열을 포함하는 mRNA), 및
- [0218] 도 13의 레인 3, 6 및 9: mRNA-A-122 구조체(도 3에 도시된 바와 같이, 변이체 1위치에 삽입된 단백질 A 및 miRNA122에 대한 서열을 포함함).
- [0219] 상기 기재된 바와 같이, 레인 1 내지 3의 건강한 간세포(HMCPP5), 레인 7 내지 9의 간암종 모델 Hep3B, 및 레인 4 내지 6의 간모세포종 모델 HepG2로부터의 세포에서, 웰 당 0.5 μ g mRNA-DMP^{CTx}을 사용하여 트랜스펙션을 수행하였다. 트랜스펙션 24시간 후 각각의 세포주로부터 단백질을 추출하였다. 10 μ g의 단백질을 각각의 레인에 로딩하고, 2개의 독립적인 실험으로부터 데이터를 취하였다. 단백질 A는, mRNA-A로 트랜스펙션될 때, 모든 시험된 세포주에서 검출되었으며, 이는 성공적인 트랜스펙션이 달성되었음을 나타낸다. mRNA-A-122로 트랜스펙션되는 경우, Hep3B 및 HepG2 세포가 아닌, 건강한 간세포에서만 번역 억제가 관찰되었으며(레인 3, 6 및 9), 이는 miRNA-122가 시험된 간암 세포에서 이의 기능을 수행하지 않음을 나타낸다. 하지만, mRNA-A-122로 트랜스펙션된 HepG2 세포의 경우, 단백질 A의 발현은 실시예 1에서 mCherry 발현에 대하여 이전에 확인된 패턴과 유사한, mRNA-A로 트랜스펙션된 세포에 비해 약간 하향조절되었다. 이는 HepG2 세포에서 불완전한 하향조절을 나타내는 증강된 노출 사진(하부)에서 명백하게 볼 수 있다. HepG2 세포에서 보이는 부분 하향조절은, 이러한 세포주로부터의 세포가 잔류 miRNA-122 활성을 보유하는 것으로 나타났기 때문에, 번역에 대한 miRNA-122 매개 효과를 추가로 암시한다([Demonstration of the Presence of the "Deleted" MIR122 Gene in HepG2 Cells, PLoS One. 2015; 10(3)]).
- [0220] 요약하면, 간-특이적 miRNA-122 표적 서열의 삽입에 의한 3'UTR mRNA의 변형은, 정상 인간 간세포가 아닌, 간암종 Hep3B 및 간모세포종 HepG2에 대한 mRNA 번역을 유의하게 제한할 수 있다.
- [0221] **실시예 3: 시험관내 종양 세포 붕괴성 바이러스 병용 요법**
- [0222] 본 발명의 방법에 의해 허용되고 상기 실시예에 제시된, 제공된 mRNA 구조체의 차등 발현은, 본원에서 종양 세포 붕괴성 바이러스 요법과 조합으로 사용될 수 있다고 기재되어 있다. 특히, 종양 세포 붕괴성 바이러스가 병독성 유전자를 제거하여, 건강한 세포에서 이의 복제 능력을 약독화시키도록 변형된 경우, 본 발명은 암 세포와 같은 병든 세포에서, 유전자 또는 이의 등가물의 기능을 회복시키는 데 사용될 수 있다. 는이러한 가능성을 조사하기 위해, US3이 결핍된 종양 세포 붕괴성 바이러스 HSV-1(R7041)([Leopardi et al, 1997, PNAS 94; 7891-7896] 참조)와, US3을 코딩하고 miRNA-122 결합 부위로 변형된 mRNA 구조체를 제공하는 DMP^{CTx} 플랫폼의 조합을, 간암종의 모델(서열번호 4)에 사용하였다.
- [0223] **일반 프로토콜:**
- [0224] 세포 배양
- [0225] 인간 간암종(HCC) HepG2 및 Hep3B 세포를 이글 최소 필수 배지(EMEM, Cellgro, USA), 10 % FBS, 스트렙토마이신(100 μ g/mL) 및 페니실린(100 U/mL-1) 중에서, 5% CO₂의 분위기 하 37°C에서 단층으로 배양하였다. HepG2 세포를 5 μ g/cm²의 콜라겐 농도로 콜라겐 코팅된 플레이트 상에서 성장시켰다.
- [0226] 바이러스 제조
- [0227] 동결된 R7041 바이러스를 37°C의 수조에서 해동시키고, 30초 동안 초음파조(Q500 초음파 분산기, Qsonica, USA)를 사용하여 초음파처리한 후, 얼음으로 옮겨 사용 준비를 하였다.
- [0228] **인간 HCC에 대한 R7041 단독의 독성**
- [0229] US3 돌연변이체 R7041 바이러스는 사실상 건강한 세포에 대하여 비병원성(apatogenic)인 것으로 여겨지며(Leopardi et al. 1997), 심지어 면역결핍 무흉선 마우스에서도 양호한 안전성을 보여주었다([Liu et al. 2007, Clin Cancer Res 2007;13(19)]). 간암종 세포에 대한 R7041 바이러스의 효능의 기준선을 확립하기 위해, 모델 세포주를 종양 세포 붕괴성 바이러스 단독으로 처리하였다. Hep3B 및 HepG2 세포주로부터의 세포를, 각각, 웰 당 15,000 및 17,000개로 96-웰 플레이트에, 삼중으로, 씨딩하였다.
- [0230] 24시간 후, 세포를 MOI 0.37 내지 0.0001694의, 바이러스의 3배 연속 희석액으로 감염시켰다. 감염 96시간 후,

시험된 세포주의 생존력을 공급업자의 지침(CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, USA)에 따라 MTS 검정으로 측정하였다. 96-웰 플레이트 판독기(BioTek, Cytation 3, USA)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. GraphPad Prism 7.03을 사용하여 용량-반응 곡선 및 50% 유효 용량 값(ED₅₀)을 획득하였다.

[0231] 도 14에 도시된 바와 같이, Hep3B 및 HepG2 세포주는 둘 모두, 각각, ED₅₀이 0.01 및 0.02 MOI로, R7041에 대한 유사한 감수성을 나타냈다. 하지만, Hep3B 세포주가 HepG2 세포보다 R7041에 약간 더 민감한 것으로 나타났다.

[0232] **인간 HCC 생존력에 대한 R7041 및 mRNA-DMP^{CTx}의 조합 효과**

[0233] 인간 간암종 세포에 대한 R7041 바이러스 및 mRNA-US3-DMP^{CTx}의 조합 효과를 평가하기 전에, 본 발명자들은, MTS 검정으로 측정 시, Hep3B 및 HepG2 세포의 0.04 µg/mL mRNA-US3의 mRNA-US3-DMP^{CTx}로의 트랜스펙션이 세포 생존력에 유의한 영향을 미치지 않음을 확인하였다.

[0234] Hep3B 및 HepG2 세포를, 각각, 웰 당 15,000 및 17,000개로 96-웰 플레이트에, 3중으로, 씨딩하였다. 24시간 후, 세포를 MOI 0.37내지 0.0001694의, 바이러스의 3배 연속 희석액으로 감염시켰다. 시험된 세포주를 모두, 도 15에 도시된 실험 시간선에 따라 R7041로의 감염 24 및 48시간 후, 고정된 용량의 0.04 µg/mL mRNA-US3-DMP^{CTx}로 2회 트랜스펙션시켰다. 트랜스펙션 3일 후, 시험된 세포주의 생존력을 상기 기재된 바와 같이 MTS로 측정하였다. 시험된 인간 HCC 둘 모두에서, 2가지 상이한 화합물: 종양 세포 붕괴성 R7041 및 비독성 용량의 mRNA-US3-DMP^{CTx}(0.04 µg/mL)의 조합은, 도 16에 도시된 바와 같이, 낮은 바이러스 역가에서 유의하게 종양 파괴를 증강시켰다. 이러한 도면에서, 생존력에 대한 효과는 0.04 µg/mL로의 mRNA-US3-DMP^{CTx} 단독(γ-축 교차), 다양한 희석액으로의 R7041 단독(희색 삼각형/다이아몬드) 및 조합(흑색 원)에 대하여 도시되어 있다.

[0235] 상기 실시예는, 병독성 유전자가 결실된 약독화된 종양 세포 붕괴성 바이러스와, 결실된 유전자에 대하여 차등적으로 발현된 대체물 공급의 조합이, 시험관내 종양 세포 붕괴성 바이러스 요법의 효능을 유의하게 증가시킬 수 있음을 나타낸다. 특히, 본 발명의 조성물과의 조합 시 낮은 바이러스 역가에서 더 큰 효과가 나타났다.

[0236] **실시예 4: 전달된 형광 단백질 mCherry mRNA 구조체의 생체내 발현**

[0237] 생체내 접근법에 대한 본 발명의 적용 가능성을 결정하기 위해, 동소의 인간 간세포 암종의 마우스 모델을 사용하였다. miRNA-122 결함 부위에 의해 유도된 자등 발현은 시험관내 건강한 마우스 Am112 간 세포에 적용 가능한 것으로 상기(실시예 1 참조)에 제시되어 있다.

[0238] **동소의 인간 간세포 암종(HCC) 모델**

[0239] **동물**

[0240] 6 내지 8 주령의 암컷(CB17/Ics-PrkdcSCID/IcrIcoCr1) Fox Chase SCID 마우스는 Charles River(UK)에서 구입하였다. 모든 생체내 절차는 영국 CrownBio의 연구 동물 관리 소위원회(Subcommittee on Research Animal Care)에 의해 승인되었다.

[0241] **세포**

[0242] 동소의 HCC 모델을 생성하기 위해, 반딧불이 루시페라아제를 발현하는 인간 Hep3B 세포주의 생물발광 변이체(Hep3B-cLuX)를 사용하였다. 세포를 10% 열 불활성화된 FBS, 2 mM L-글루타민, 1% NEAA가 보충된 EMEM 배지(Sigma, UK)에서 배양하고; 세포를 매주 2 µg/mL 푸로마이신(Puromycin)(Sigma)으로 처리하였다.

[0243] **간내 주사 및 종양 성장 모니터링**

[0244] 마취 하에, 20 µL의 1:1 PBS:MatrigelTM에 현탁시킨 인간 Hep3B-cLuX 세포(2x10⁶개)를 29G 니들을 사용하여 간의 상부 좌엽에 주사하였다. 주사 부위를 흡수성 젤라틴 스폰지(AGS)를 사용하여 덮고, AGS를 손상시키지 않으면서 간을 복강내로 다시 위치시키고, 피부를 봉합하였다. 생물발광 이미지화(BLI)로 종양 성장을 주 2회 확인하였다.

[0245] 간략하게, 마우스를 마취시키고, 150 mg/kg D-루시페린을 이미지화 15분 전에 피하 주사하였다. Living Image 4.3.1 소프트웨어(Caliper LS, US)를 사용하여 BLI 이미지를 캡처하고 처리하였다. 마우스를 주 3회 무게를 재

거나, 또는 투약 전 주 1회 무게를 잰다. 지시된 날에, 마우스를 희생시키고, 간을 2 또는 4% 파라포름알데히드 용액(PFA)으로 고정시킨 후, 추가의 조직병리학적 분석을 위해 OCT(최적 절단 온도 화합물 - 포매 배지)에서 동결시켰다.

[0246] **mRNA의 형성 및 종양 표적화 효율의 평가**

[0247] mCherry 서열을 포함하는 mRNA 서열, 및 miRNA-122(서열번호 3)를 포함하는 mCherry 서열을, 상기 'DMP^{CTx}의 형성 및 mRNA의 제형화' 단락 및 표 4에 기재된 바와 같이 제형화하였다. 선택적 종양 표적화 및 병들지 않은 간 세포의 보존을 위해, 제형화된 mRNA를 동소의 간암을 갖는 마우스의 꼬리 정맥에 주사하였다. 간략하게, 20 μ L의 1:1 PBS:MatrigelTM에 현탁시킨 2×10^6 개의 인간 Hep3B-cLuX 세포를 상기 기재된 바와 같이 간의 상부 좌엽에 주사하였다. 이어서, 종양 성장을 또한 상기와 같이 BLI 이미지화로 모니터링하였다. 8일 후, 종양이 확립되었을 때($BLI \geq 6 \times 10^6$), 마우스 당 20 μ g의 제형화된 mRNA-mCherry-DMP^{CTx}, mRNA-mCherry-122-DMP^{CTx} 또는 mRNA-A-122-DMP^{CTx}를 꼬리 정맥을 통해 주사하고, 혈류를 되돌림으로써 전달 입자가 간에 전달되도록 하였다. 24 시간 후, 마지막 BLI를 수행하고, 마우스를 안락사시키고, 간을 절제하고, 국소화된 간 병변에서 *생체외* BLI에 의해 이미지화하였다.

[0248] **조직학**

[0249] 간략하게, *생체외* 이미지화 후, 종양을 갖는 간의 좌엽을 제거하고, 2% PFA로 고정시키고, 4°C의 30% 수크로오스 용액(PBS 중; pH 7.4)에 침지시키고, OCT에 포매하고, 드라이아이스 배스를 이용하여 사전 냉각시킨 이소펜탄 중에 동결시킨 후, -80°C에서 보관하였다. 5 μ m 동결된 절편(Leica CM300, USA)을 DAPI(VECTASHIELD, Vector Laboratories, USA) 또는 H&E(헤마톡실린 및 에오신) 염색으로 핵 대조염색하였다. 형광 현미경 및/또는 소프트웨어를 사용하여 종양 및 건강한 간에서의 mCherry 대 mCherry-122 발현 수준을 결정하여 종양 표적화를 평가하였다. 종양성 및 건강한 조직을 H&E 염색으로 결정하였다.

[0250] 모의군 및 mRNA-mCherry-DMP^{CTx} 및 mRNA-mCherry-122-DMP^{CTx} 처리된 마우스에 대한 BLI 이미지화에 의해 모니터링된 종양 성장의 예. 동물에게 D-루시페린을 피하 주사하고, 15분 후 이미지화하였다. 신호는 도 17a(상단 패널)에 도시된 바와 같이 동물의 중앙부에만 존재하였고, 제시된 동물은 조성물로의 처리 전이었다. 중앙부에서 유사한 강도를 갖는 모든 동물을 해부하고, 간을 *생체외*에서 이미지화하였다(도 17a, 하단 패널). 종양을 갖는 간의 좌엽을 절개하고, DAPI로 대조염색하였다. 형광 현미경을 사용하여, 도 17b에 도시된 바와 같이, 제형화된 mRNA의 주사 24시간 후 건강한 간 세포 및 간 종양 세포에서 mCherry의 발현을 결정하였다. 마우스를 mRNA-mCherry-DMP^{CTx}로 처리했을 때, 건강한 간세포에서 mCherry 형광이 검출되었다(도 17b, 중간 패널). mRNA-mCherry-122-DMP^{CTx} (변이체 1)로 처리했을 때, 번역 억제가 관찰되었다(도 17b, 좌측 패널). 도 17b는, (좌측에서 우측으로) 모의군 처리, mRNA-mCherry-DMP^{CTx} 및 mRNA-mCherry-122-DMP^{CTx} 마우스로부터의 건강한 간 세포를 나타낸다.

[0251] 결론적으로, 본 발명의 조성물은 *생체내* 투여될 수 있고, 표적화된 간 세포를 성공적으로 트랜스펙션시킬 수 있다. miRNA 결합 부위로 변형되는 경우, 병들지 않은 세포와 종양 세포에서 차등 발현이 달성될 수 있다.

[0252] **실시예 5: 간에서 병들지 않은 조직과 병든 조직 사이에서의 전달된 US3 mRNA 구조체의 *생체내* 차등 발현**

[0253] 실시예 4에 기재된 *생체내* 마우스 모델을 US3 mRNA DMP^{CTx} miRNA-122 구조체를 포함하는 전달 입자 조성물의 투여에 적용하였다. Hep3B 인간 암을 함유하는 마우스의 간에서의 US3의 차등 발현을, 항 US3 다중클론 항체와 함께 면역조직화학을 사용하여 분석하였다. 결과는 도 18에 도시되어 있으며, 여기서 종양 세포(더 진한 염색)와 병들지 않은 세포(더 밝은 염색) 사이에 US3 단백질 수준의 가시적인 차이가 존재함을 확인할 수 있다. 차등 발현은 병리학자에 의해 독립적으로 검증된 바와 같이, 종양의 경계를 추적한다. 따라서, 본 발명의 조성물은 포유동물 대상에서 *생체내* 잠재적인 치료 증강 인자의 차등 발현을 성공적으로 유도할 수 있다고 결론지을 수 있다.

[0254] **면역조직화학**

[0255] 신선한 동결된 절편을 5 μ m(미크론)으로 절단하고, 대략 1시간 동안 공기 건조시킨 후, 4% 파라포름알데히드로 실온(RT)에서 15분 동안 고정시켰다. 절편을 흐르는 수돗물로 세척하고, PBS-0.1%Tween으로 옮겼다. 절편을

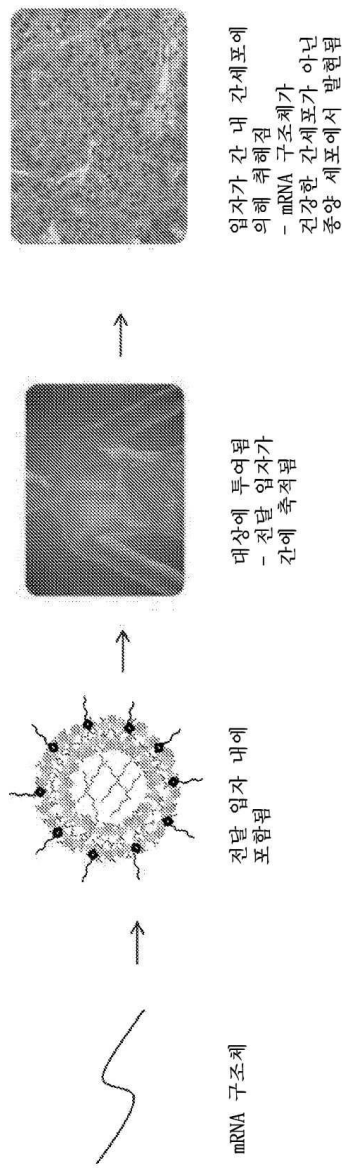
2.5% 정상 말 혈청(즉시 사용 가능한 것, ImmPRESS HRP 항-토끼 IgG 퍼옥시다아제 중합체 검출 키트, 벡터 MP-7401)과 함께 20분 동안 인큐베이션하였다. 슬라이드를 배수하고, 1:400으로 희석된 US3에 대한 1차 항체(Acris AP55266SU-N)와 함께 인큐베이션하였다. 항체를 PBS-0.1%Tween으로 희석하고, 음성 대조군을 포함시켰는데, 음성 대조군은 1차 항체를 생략하고, 슬라이드를 항체 희석제 PBS-0.1%Tween과 함께 실온에서 1시간 동안 인큐베이션한 것이었다. 슬라이드를 PBS-0.1%Tween으로 세척하고, 내생성 퍼옥시다아제를 엘가 워터(elga water)로 희석된 0.3% 과산화수소로 10분 동안 차단하였다. 슬라이드를 PBS-0.1%Tween으로 세척하고, ImmPress 항-토끼 IgG 시약(즉시 사용 가능한 것, ImmPRESS HRP 항-토끼 IgG 퍼옥시다아제 중합체 검출 키트, 벡터 MP-7401)과 함께 실온에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 슬라이드를 PBS-0.1%Tween으로 세척하고, 색소원 ImmPACT DAB(ImmPACT DAB 퍼옥시다아제(HRP) 기질, 벡터 SK-4105)과 함께 5분 동안 인큐베이션한 후, 엘가 워터로 세척하고, 메이어(Mayer)의 헤마톡실린으로 적절하게 대조염색하였다. 추가로 엘가 워터로 간단히 세척하고, 청색을 흐르는 수돗물에서 5분 동안 세척하였다. 슬라이드를 탈수하고, 깨끗하게 하고, 고정시킨 후(95% IMS, 99%IMS x2 및 자일렌 x2), 커버슬립으로 덮었다.

[0256]

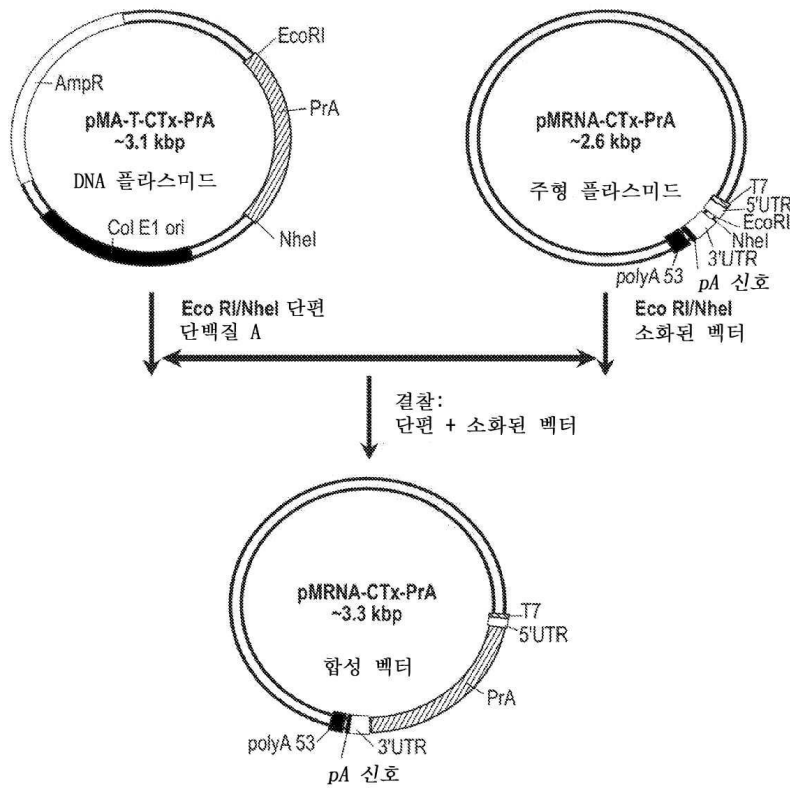
본 발명의 특정 구현예가 본원에 상세하게 개시되어 있지만, 이는 예로서 및 단지 예시의 목적으로 개시된 것이다. 상기 언급된 구현예는 하기에 첨부된 청구범위의 범위를 제한하고자 의도된 것이 아니다. 본 발명자들은, 청구범위에 의해 한정되는 본 발명의 사상 및 범위를 벗어나지 않는 한, 다양한 치환, 변경 및 변형이 이루어질 수 있음을 고려한다.

도면

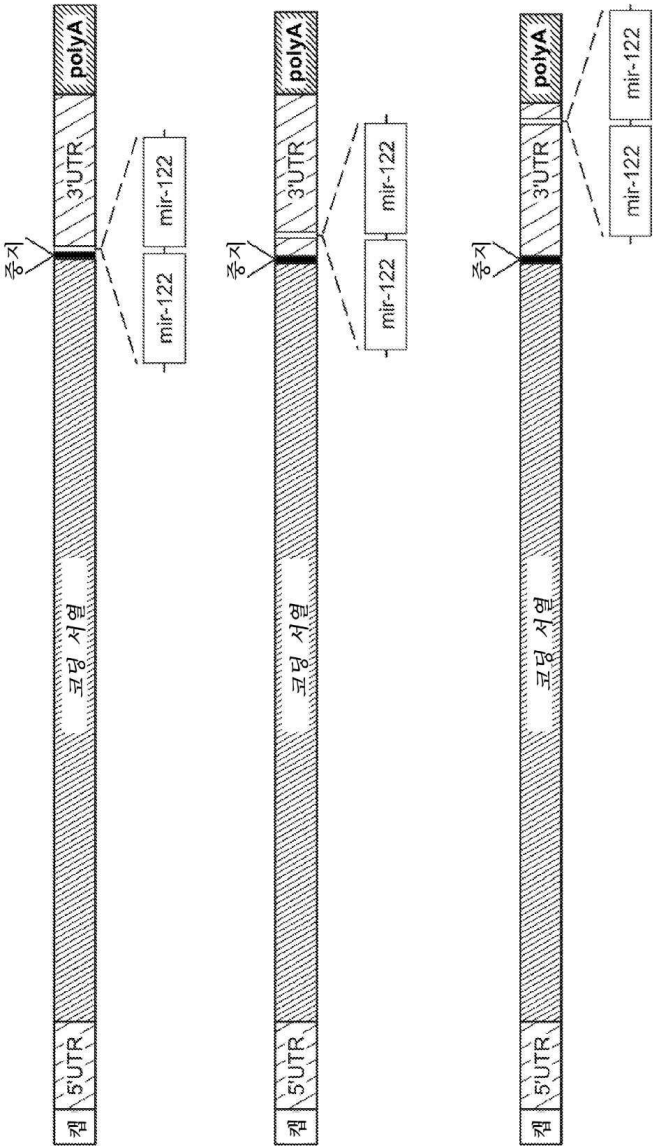
도면1



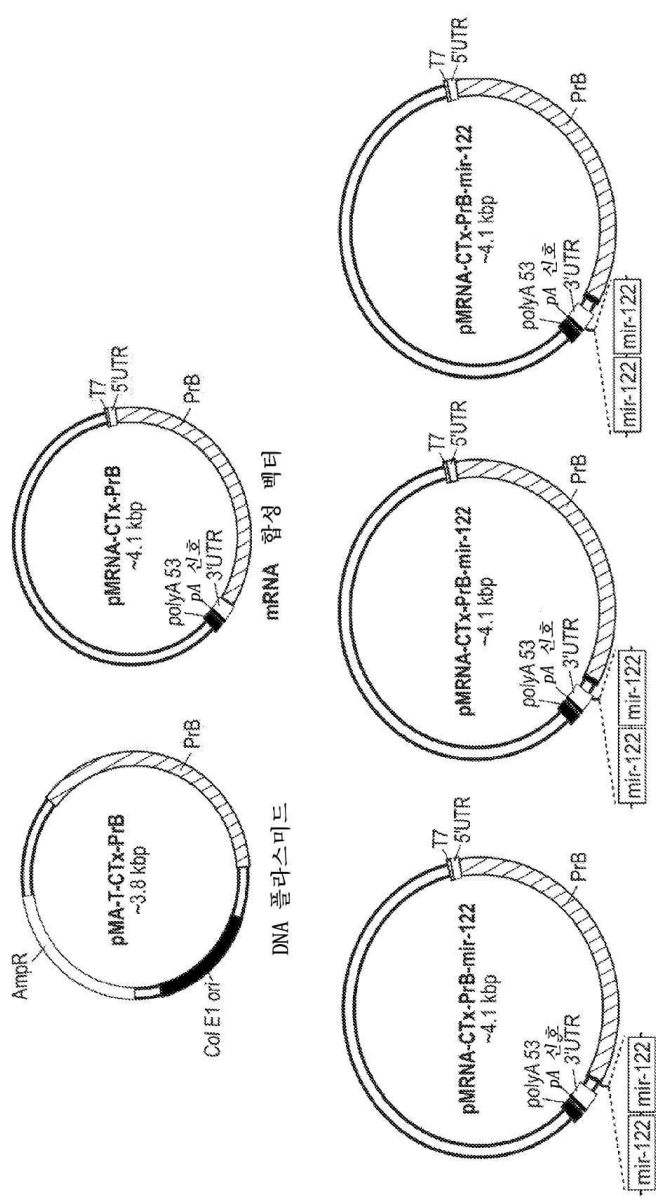
도면2



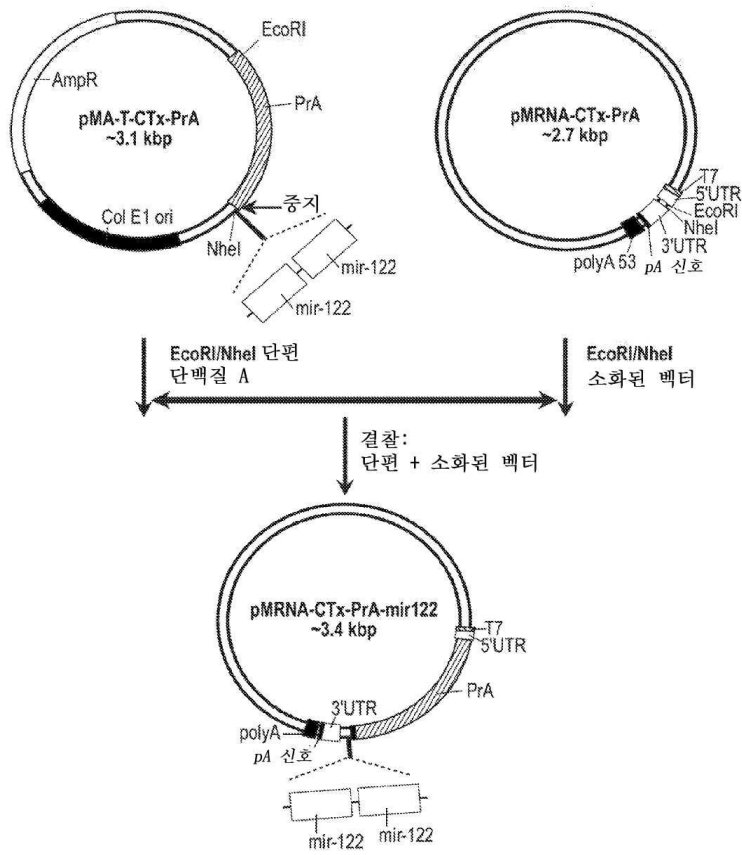
도면3



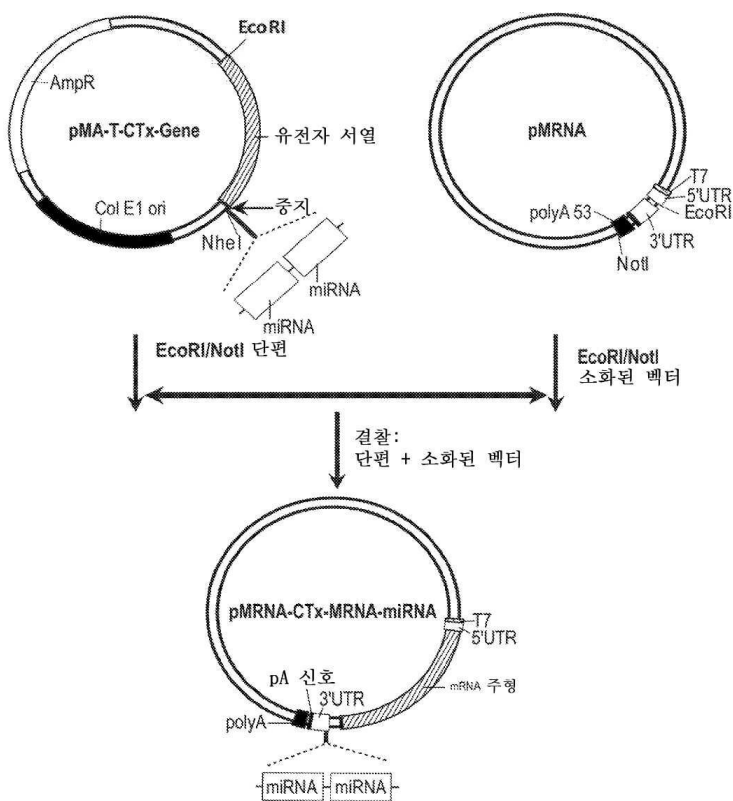
도면4



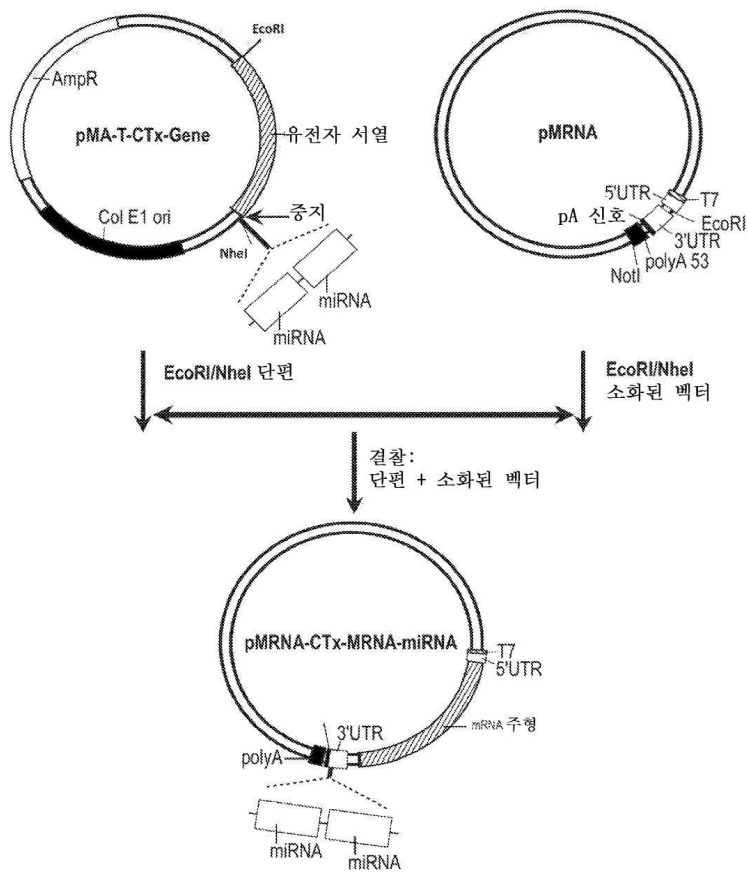
도면5



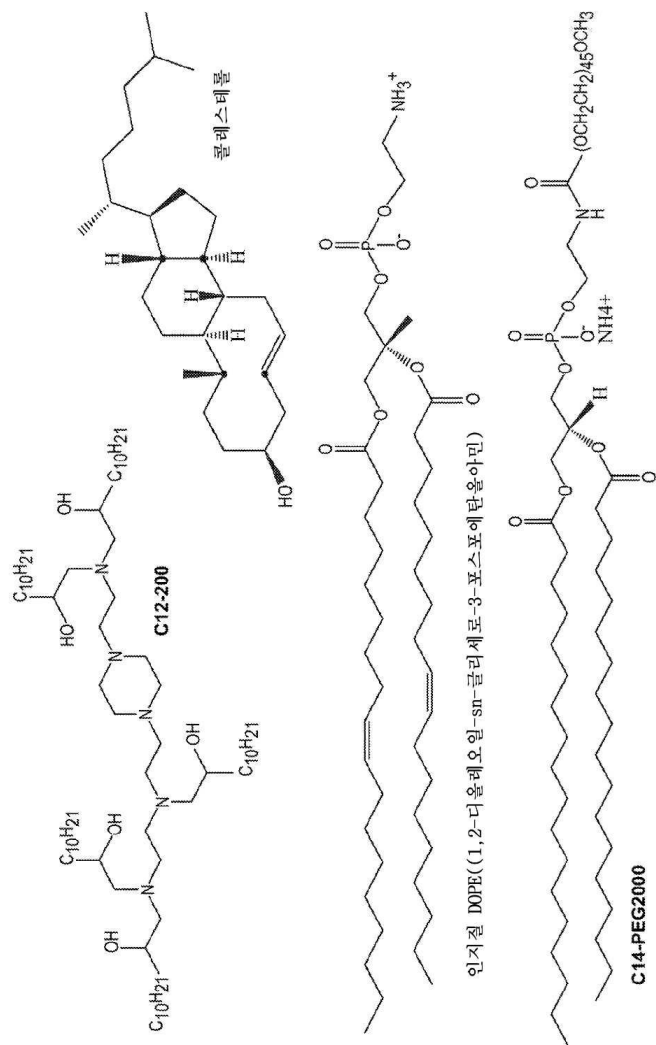
도면6



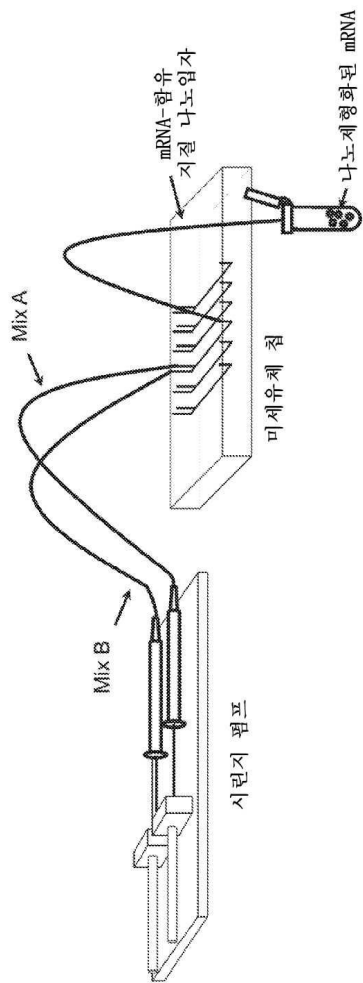
도면7



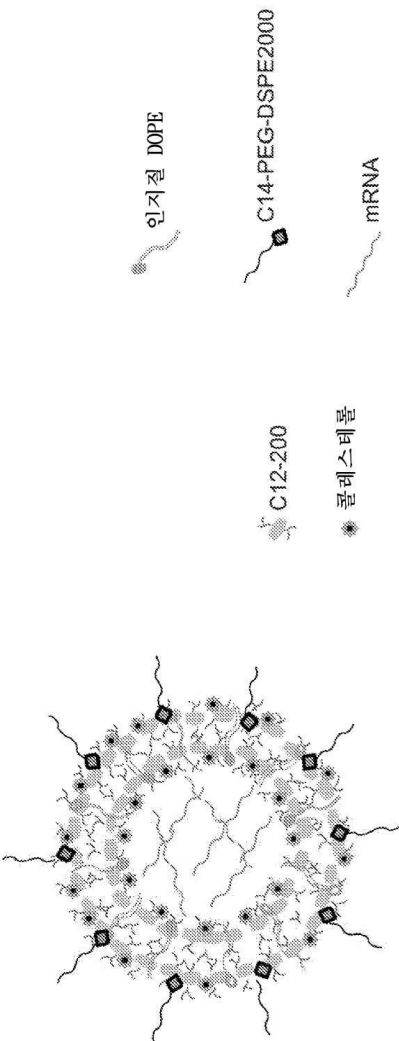
도면8



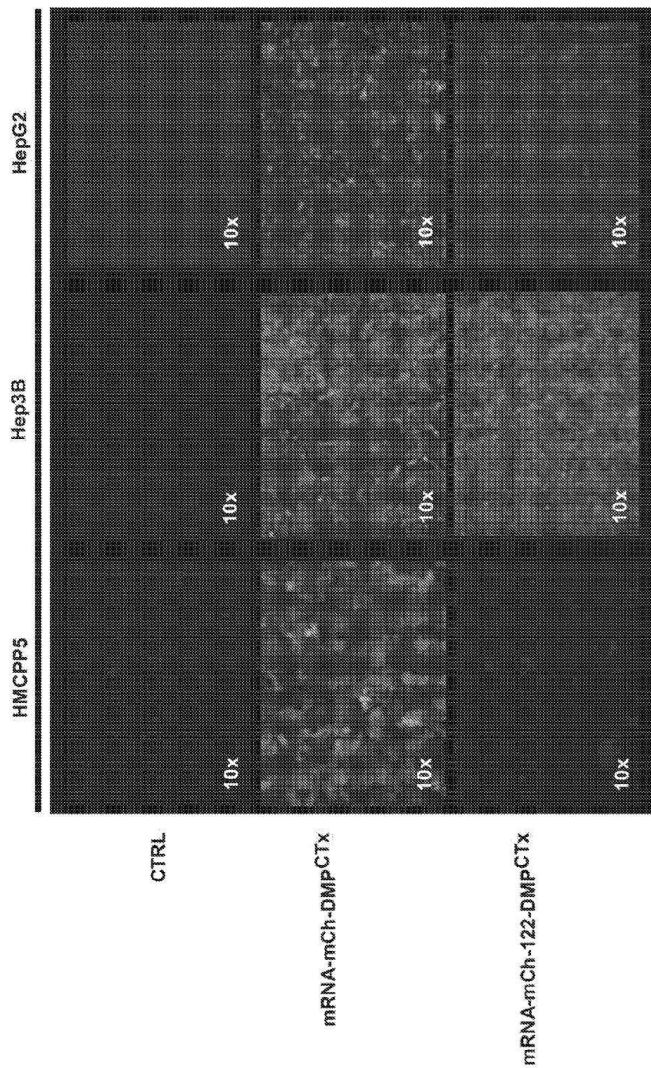
도면9a



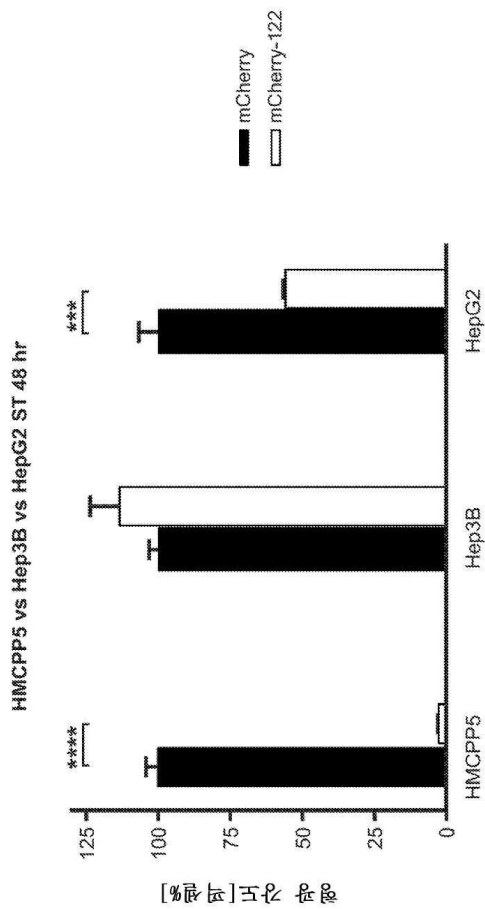
도면9b



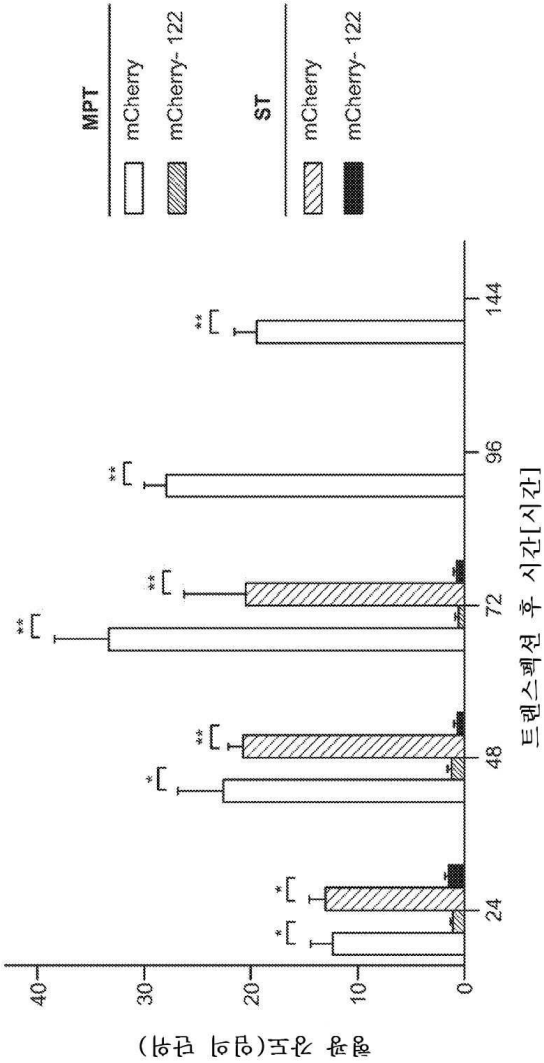
도면10a



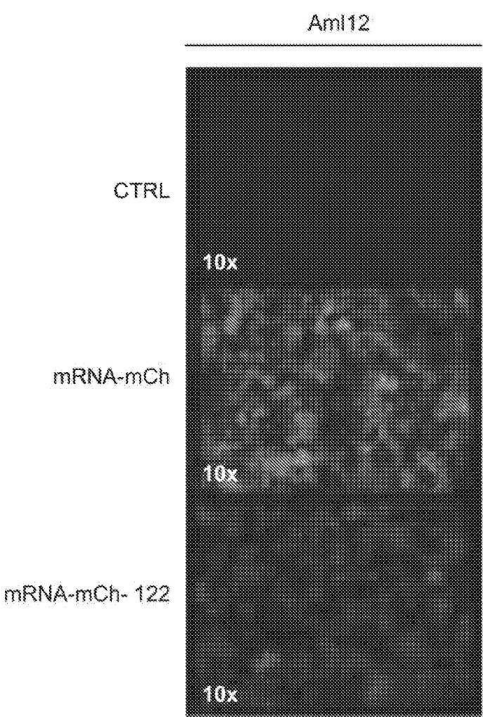
도면10b



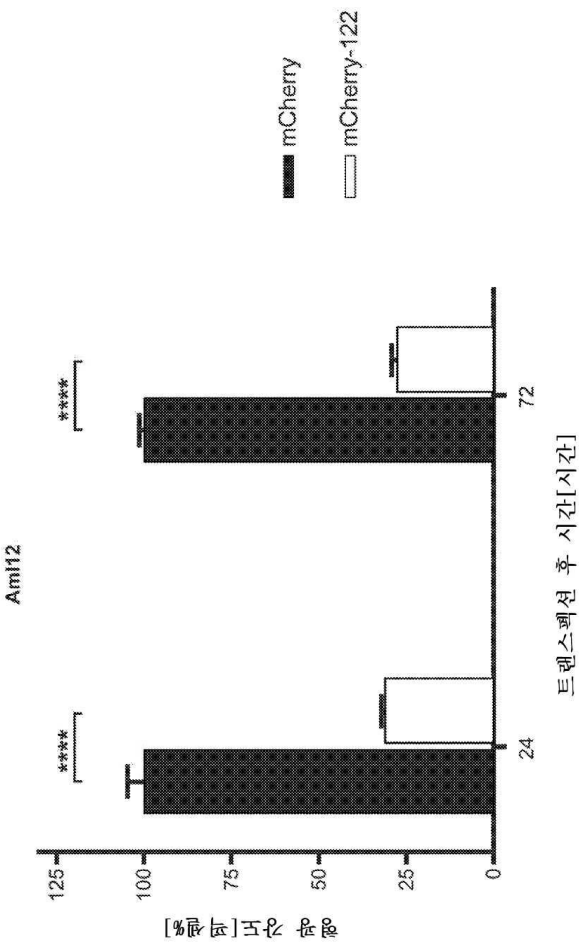
도면11



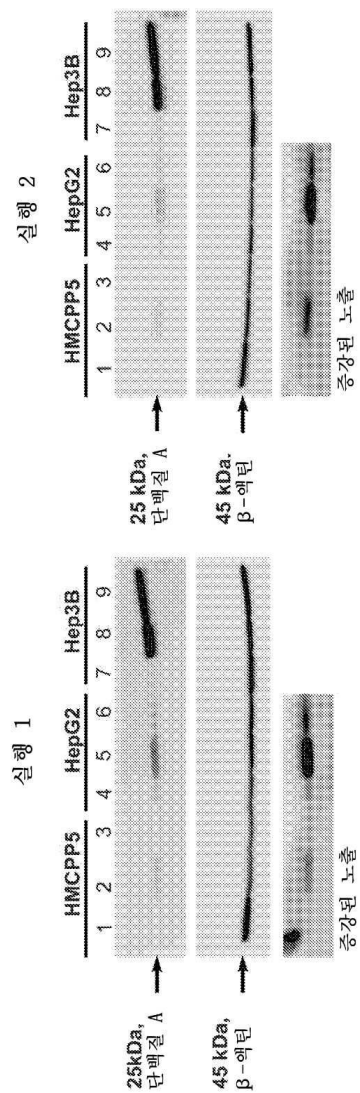
도면12a



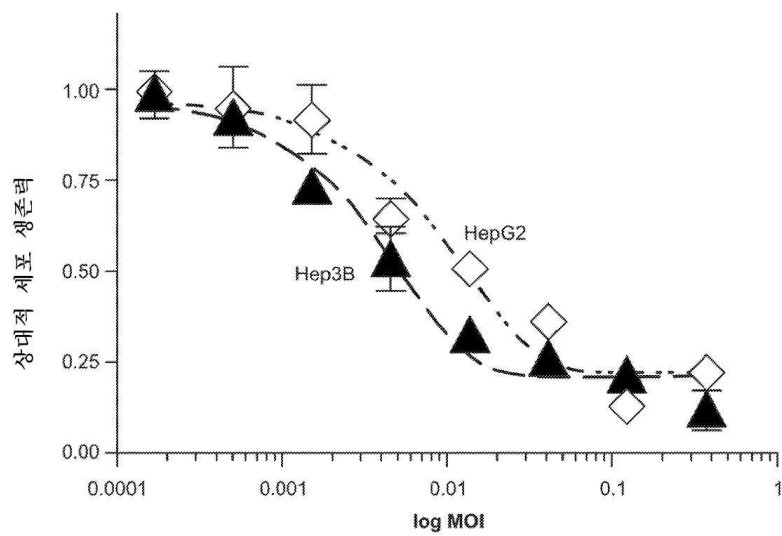
도면12b



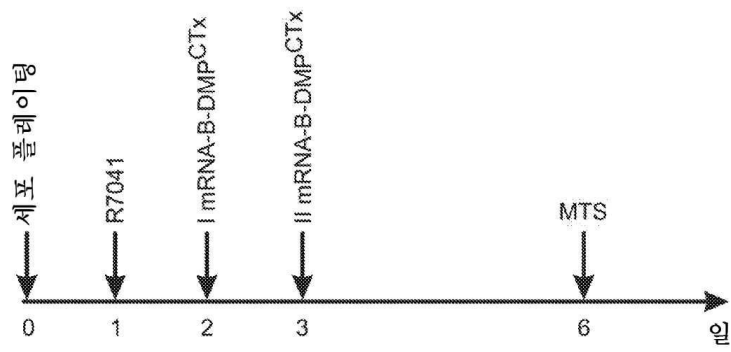
도면13



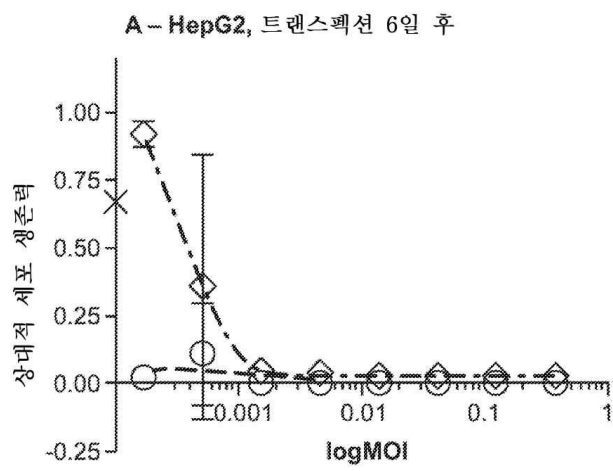
도면14



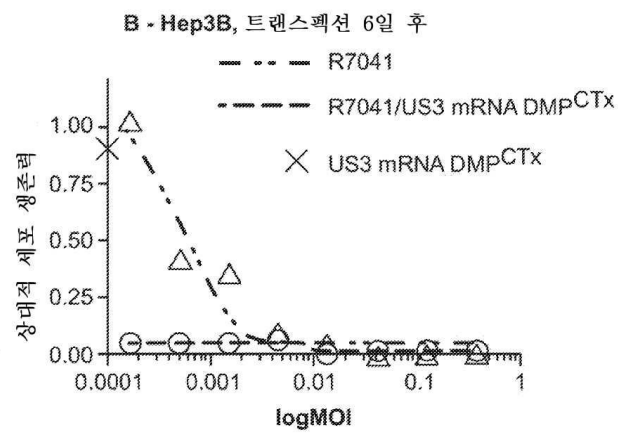
도면15



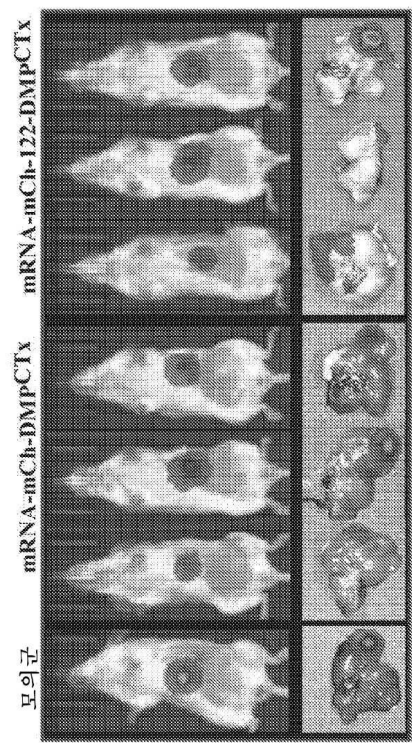
도면16a



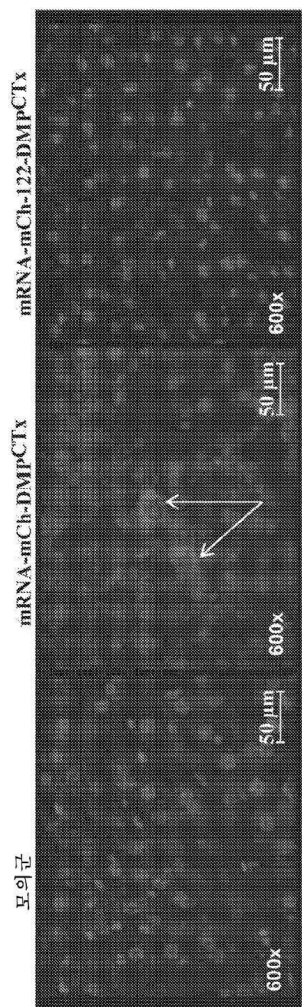
도면16b



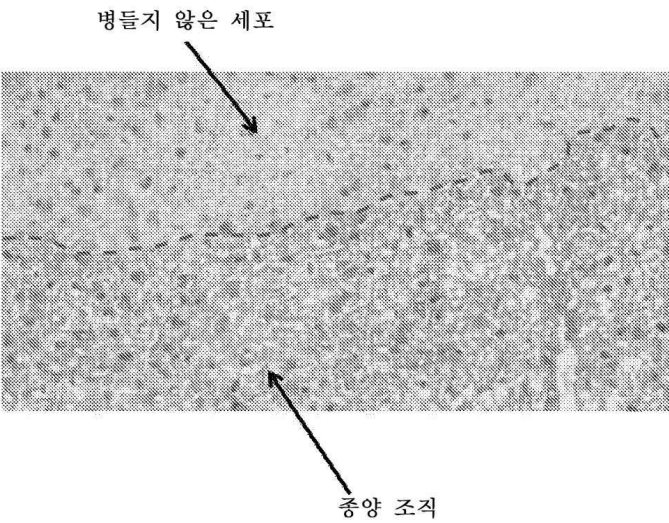
도면17a



도면17b



도면18



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Combined Therapeutics

<120> COMPOSITIONS AND PROCESSES FOR TARGETED DELIVERY, EXPRESSION AND MODULATION OF CODING RIBONUCLEIC ACIDS IN TISSUE

<130> P44379W0

<150> US62632056

<151> 2018-02-19

<150> GB1714430.4

<151> 2017-09-07

<160> 5

<170> BiSSAP 1.3.6

<210> 1

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> single miR122 binding site

<400> 1

aacgccauua ucacacuaaa ua

22

<210> 2

<211> 50

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 2x miR-122 binding sites with linker

<400> 2

aacgccauua ucacacuaaa uauuuaaaaa cgccauuau acacuaaaaua

50

<210> 3

<211> 761

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mCherry sequence with 2x miR-122 binding sequence and linker

<400> 3

auggugagca agggcgagga ggauaacaug gccaucauca aggaguucan gcgcuaaag

60

gugcacaugg agggcuccgu gaacggccac gaguucgaga ucgagggcga gggcgagggc

120

cgcccuacg agggcaccca gaccgccaag cugaagguga ccaaggguagg ccccuagccc	180
uucgccuggg acauccuguc ccucaguuc auguacggcu ccaaggccua cgugaagcac	240
cccgcgcaca ucccgcacua cuugaagcug uccuuccccg agggcuucaa gugggagcgc	300
gugaugaacu ucgaggacgg cggcguggug accgugaccc aggacuccuc ccugcaggac	360
ggcgaguua ucuacaaggu gaagcugcgc ggcaccaacu ucccuccga cggccccgua	420
augcagaaga agaccauggg cugggaggcc uccuccgagc ggauuaccc cgaggacggc	480
gcccugaagg gcgagaucaa gcagaggcug aagcugaagg acggcggcca cuacgacgu	540
gaggucaaga ccaccuacaa ggccaagaag cccgugcagc ugcccggcgc cuacaacguc	600
aacaucaagu uggacauac cucccacaac gaggacuaca ccaucgugga acaguacgaa	660
cgcgccgagg gccgccacuc caccggcggc auggacgagc uguacaagua aaacgccauu	720
aucacacuaa auuuuuuuuu acgccauuuu cacacuuuu a	761
<210> 4	
<211> 1496	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> US3 with 2x miR-122 binding sites and linker	
<400> 4	
auggccuguc gaaaguuuug ucgcguuuac gggggacagg gcaggaggaa ggaggaggcc	60
gucccgccgg agacaaagcc gucccgggug uuuccuauug gcccuuuuu uacccagcc	120
gaggacgcu gccuggacuc cccgcccccg gagaccccca aaccuucca caccacacca	180
cccggcgauu ccgagcgccu gugucaucug caggagaucc uggcccagau guacgaaac	240
caggacuacc ccuagagga cgaacccagc gcggaucccg cggacgaugu cgacgaggac	300
gccccggagc acguggccua uccggaggaa uacgcagagg agcuuuuuu gcccggggac	360
gcgcccgguc ccuuuauagg ggccaacgac cacaucuccc ccccgugugg cgcaucuccc	420
cccggauuac gacgacgcag ccgggaugag auuggggcca cgggaauuac cgcggaagaa	480
cuggacgcca uggacaggga ggcggcucga gccaucagcc gcggcggcaa gccccucg	540
accauggcca agcuggugac uggcaugggc uuuaagaucc acggagcgcu cccccagga	600
ucggagggggu gugucuuga cagcagccac ccagauuacc cccaacgggu aaucgugaag	660
gcgggggugu acacgagcag gagccacgag gcgcgacugc ugaggcgacu ggaccacccc	720
gcgauccugc ccuccugga ccugcauguc gucuccgggg ucacuguguc gguccucucc	780

aaguaccagg ccgaccugua uaccuauug aguaggcgcc ugaacccgcu gggacgccc 840
cagaucgcag cggucucucc gcagcuccua agcgccguug acuacauuca ccgccagggc 900
auuauccacc gcgacauuaa gaccgaaaau auuuuuauua acacccccga ggacauuugc 960

cugggggacu uuggugccgc gugcuucgug caggguuccc gaucaagccc cuucccuac 1020
ggaaucgccc gaaccaucga caccaacgcc ccgagggucc ugaccgggga uccguauacc 1080
accaccgucg acauuuggag cgccggucug gugaucuucg agacugccgu ccacaacgcg 1140
uccuuguucu cgccccccg cgccccaaa agggggcccg gcgacaguca gaucacccgc 1200
aucauccgac agggccaggu ccacguugac gaguuuuccc cgcauccaga aucgcgccuc 1260
accucgcgcu accgcucucc cgcgccgggg aacaauccgc cgccguacac ccgaccggcc 1320
uggaccgcu acuacaagau ggacauagac gucgaauauc ugguuugcaa agcccucacc 1380

uucgacggcg cgcuucgccc cagcgccgca gagcugcuu guuugccgcu guuuaacag 1440
aaaugaaacg ccuuuauac acuaaaauu uaaaaacgcc auuauacac uaaaua 1496

<210> 5
<211> 3466
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> ICP6 with 2x miRNA-122 binding site sequences
<400> 5

augauggcca gccgcccagc cgcauccucu cccgucgaag cgcgggcccc gguuggggga 60
caggaggccg gcggccccag cgcagccacc cagggggagg ccgccggggc ccucucgcc 120
cacggccacc acguguacug ccagcgaguc aauggcguga uggugcuuuc cgacaagacg 180

cccgggucg cguccuaccg caucagcgau agcaacuug uccaauugg uuccaacugc 240
accaugauua ucgacggaga cgugguugcg gggcgcccc aggacccggg ggccgcggca 300
uccccgcuc ccuucguugc ggugacaaac aucggagccg gcagcgacgg cgggaccgcc 360
gucguugcau ucgggggaac ccacagucgc ucggcgggga cgucuaccgg uaccagacg 420
gccgacgucc cagccgaggc ccuugggggc cccccuccuc cucccgcuu caccugggg 480
ggcggcuguu gcuccugucg cgacacacgg cgccgcucug cgguauucgg gggggagggg 540
gaucgucg gccccgcgga guucgucucg gacgaccggu cguccgauuc cgacucggau 600

gacucggagg acaccgacuc ggagacgcug ucacacgccu ccucggacgu guccggcggg 660
gccacguacg acgacgcccc ugacuccgau ucguaucgg augacuccu gcagauagau 720

ggccccgugu gucgcccug gaggcaaugac accgcgcccc uggauguuug ccccgggacc	780
cccgccccgg gcgccgacgc cggugguucc ucagcgguag acccacacgc gccgacgaca	840
ggggccggcg cuggucuugc ggccgauccc gccguggccc gggacgacgc ggaggggcuu	900
ucggaccccc ggccacgucu gggaacgggc acggccuacc ccguccccc ggaacucacg	960
cccgagaacg cggaggccgu ggcgcgcuuu cugggagaug ccgugaaccg cgaaccgcg	1020
cucaugcugg aguacuuuug ccgguugcgc cgcgaggaaa ccaagcgugu cccccagg	1080
acauucugca gccccucg ccucacggag gacgacuuug ggcuucucua cuacgcgcuc	1140
guggagaugc agcgcugug ucuggacguu ccuccguucc cgccgaacgc auacaugccc	1200
uauuauuca gggaguuug gacgcggcug gucaacgggu ucaagccgu ggugagccgg	1260
uccguucgcc uuuaaccgau ccuggggguu cuggugcacc ugcggauccg gacccgggag	1320
gccuccuuug aggagugguu gcgauccaag gaaguggccc uggacuuug ccugacggaa	1380
aggcuucgcg agcacgaagc ccagcuggug auccuggccc aggcucugga ccuuuacgac	1440
ugucugaucc acagcacacc gcacacgcug gucagcggg ggcucauac ggcccugaag	1500
uagaggagu uuuaaccuaa gcgcuuugc gggcacuaca uggaguccgu cuuccagau	1560
uacaccgcga ucgccgcuu uuugccugc cgggccacgc gcggcaugcg ccacaucgc	1620
cuggggcgag aggggucgug gugggaaug uucaaguuc uuuuccaccg ccucucgac	1680
caccagaugc uaccgucgac ccccgcaug cugaaccugg ggacccgca cuacuacac	1740
uccagcugcu accugguaa cccccaggc accacaaaca aggcgaccu gcgggccauc	1800
accagcaacg ucagugccau ccucgccgc aacgggggca ucgggcuau cgugcaggcg	1860
uuuaacgacu ccggccccgg gaccgccagc gucaugccc cccucaaaggu ccucgacucg	1920
cuggugcgcg gcacacaa agagagcgcg guccgaccg gcgcgugcg guaccuggag	1980
ccguggcaca ccgacgugc ggccgugcuc cggauaagg ggguccucg cggcgaagag	2040
gcccagcgcu gcgacaau cuucagcgcc cucuggaug cagaccugu uuuaagcgc	2100
cugauucgcc accuggacgg cgagaagaac gucaaugga ccguuucga cggggacacc	2160
agcaugcgc ucgccgacu ucacggggag gaguucgaga agcucuacca gcaccucgag	2220
gucauggggu ucggcgagca gauaccuac caggagcugg ccuauggcau ugugcgagu	2280
gcggccacga ccgggagccc cuucgucaug uucaaagac cggugaaccg ccacuacau	2340
uacgacacc agggggcgcc caucgccgc uccaaccu gcaccgagau cguccauccg	2400
gccuccaagc gaucagugg ggucgcaau cugggaagcg ugaauugc ccgaugcguc	2460
uccaggcaga cguuugacu uggggcgcc cgcgacgcc ugcaggcgug cgugcugaug	2520
gugaacauc ugaucgacg cagcuacaa cccacgccc agugcaccg cggcaacgac	2580

aaccugcggu ccaugggaau cggcaugcag ggccugcaca cggccugccu gaagcugggg	2640
cuggaucugg agucugccga auuucaggac cugaacaaac acaucgccga ggugaugcug	2700
cugucggcga ugaagaccag caacgcgcug ugcguucgcg gggcccgucc cuucaaccac	2760
uuuaagcgca gcauguaucg cgccggccgc uuucacuggg agcgcuuucc ggacgcccgg	2820
ccgcgguacg agggcgagug ggagaucua cgccagagca ugaugaaaca cggccugcgc	2880
aacagccagu uuugcgccu gaugcccacc gccgccucgg cgcagaucuc ggacgucagc	2940
gagggcuuug ccccccuguu caccaaccug uuuagcaagg ugacccggga cggcgagacg	3000
cugcgcccca acacgcuccu gcuaaaggaa cuggaacgca cguuuagcgg gaagcgccuc	3060
cuggagguga uggacaguuc gacgccaagc agugguccgu ggcgcaggcg cucccgugcc	3120
uggagcccac ccaccccuc cggcgauuca agaccgcguu ugacuacgac cagaaguugc	3180
ugaucgaccu gugugcgga cgcgccccu acgucgacca uagccaauc augaccugu	3240
augucacgga gaaggcgga cggaccucc cagccuccac ccugguccgc cuucuggucc	3300
acgcuaauaa gcgcggacua aaaacaggga uguacuacug caagguucgc aaggcgacca	3360
acagcggggu cuuugcggc gacgacaaca uuugucgac gagcugcgcg cuguagaacg	3420
ccaauaucac acuaauauu uaaaaacgcc auuauacac uaaaua	3466