

- 1 -

(52) CPC특허분류

A61K 35/768 (2013.01)
A61K 9/127 (2013.01)
A61P 37/00 (2018.01)
C07K 16/10 (2023.08)
C07K 16/20 (2013.01)

(72) 발명자

반 호에벤 닐

미국 워싱턴주 98102 시애틀 1616 이스트레이크 애
 비뉴 이스트 스위트 400

에라스무스 제시 에이치.

미국 워싱턴주 98102 시애틀 1616 이스트레이크 애
 비뉴 이스트 스위트 400

린 수잔 에스.

미국 워싱턴주 98102 시애틀 1616 이스트레이크 애
 비뉴 이스트 스위트 400

(30) 우선권주장

62/540,973	2017년08월03일	미국(US)
62/556,291	2017년09월08일	미국(US)
62/563,544	2017년09월26일	미국(US)
62/582,859	2017년11월07일	미국(US)
62/622,748	2018년01월26일	미국(US)
62/622,755	2018년01월26일	미국(US)
62/669,262	2018년05월09일	미국(US)
62/677,336	2018년05월29일	미국(US)
62/680,454	2018년06월04일	미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

생물활성제(bioactive agent)를 세포에 전달하기 위한 나노구조 지질 담체(nanostructured lipid carrier: NLC) 입자를 포함하는 조성물로서,

상기 NLC 입자는,

- (a) 액체상 지질과 고체상 지질의 혼합물을 포함하는 오일 코어,
- (b) 양이온성 지질을 포함하는 양이온성 성분,
- (c) 솔비탄 에스터(sorbitan ester)를 포함하는 소수성 계면활성제,
- (d) 친수성 계면활성제로서, 친수성 계면활성제 대 양이온성 성분 몰비는 0.2 내지 1.5인, 상기 친수성 계면활성제; 및
- (e) 생물활성제

를 포함하고,

상기 오일 코어는 스쿠알렌 및 트라이미리스틴을 포함하고;

상기 양이온성 지질은 1,2-다이올레일옥시-3-(트라이메틸암모니오프로판(DOTAP), N-[1-(2,3-다이올레일옥시)프로필]-N,N,N-트라이메틸암모늄 클로라이드(DOTMA), N,N-다이올레일-N,N-다이메틸암모늄 클로라이드(DODAC) 또는 1,2-다이올레일-sn-글리세로-3-에틸포스포콜린(DOEPIC)이고,

상기 솔비탄 에스터는 솔비탄 모노스테아레이트이고,

상기 친수성 계면활성제는 폴리소르베이트 80이고,

상기 생물활성제는 RNA, mRNA, 종양붕괴성 바이러스 RNA(oncolytic viral RNA), 비-암호화 RNA 또는 DNA인, 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 생물활성제는 NLC 입자와 회합되는(associated), 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 조성물은 상기 생물활성제를 상기 세포에 전달하는, 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 솔비탄 에스터는, 상기 솔비탄 에스터 없는 비교 가능한 조성물에 비해서 상기 생물활성제를 상기 세포에 전달하는 상기 조성물의 능력을 증가시키는 충분한 양으로 존재하는, 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 조성물은 대상체에게 유효량으로 투여된 경우, 상기 솔비탄 에스터가 결여된 비교 가능한 조성물이 상기 대상체에게 투여된 경우 유도된 항체 역가보다 더 높은 수준에서 항원에 대한 항체 역가를 유도하는, 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 양이온성 지질은 1,2-다이올레일옥시-3-(트라이메틸암모니오프로판(DOTAP)인, 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 NLC 입자의 평균 다분산지수가 0.1 내지 0.5인, 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 NLC 입자의 z-평균 직경이 20nm 내지 200nm, 20nm 내지 150nm, 20nm 내지 100nm, 20nm 내지 80nm, 또는 20nm 내지 60nm 또는 40nm 내지 200nm, 40nm 내지 150nm, 40nm 내지 100nm, 40nm 내지 80nm, 또는 40nm 내지 60nm인, 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 소수성 계면활성제는 1 내지 5의 친수성-친지성 밸런스(hydrophilic-lipophilic balance: HLB)값을 갖는 솔비탄 에스터인, 조성물.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 NLC 입자의 z-평균 직경이 40nm 내지 80nm인, 조성물.

청구항 11

제1항에 있어서, 0.05 내지 12의 오일 대 계면활성제 물비를 갖는, 조성물.

청구항 12

제1항에 있어서, 친수성 계면활성제 대 양이온성 성분 물 비가 0.5 내지 1인, 조성물.

청구항 13

제1항에 있어서, 0.2% w/v 내지 40% w/v의 액체상 지질, 0.1% w/v 내지 10% w/v의 고체상 지질, 0.2% w/v 내지 10% w/v의 양이온성 지질, 0.25% 내지 15% w/v의 솔비탄 에스터, 및 0.2% 내지 15% w/v의 친수성 계면활성제를 포함하는, 조성물.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항의 조성물을 제조하는 방법으로서,

- (a) 상기 고체상 지질, 상기 액체상 지질, 상기 양이온성 지질 및 상기 소수성 계면활성제를 혼합하여 오일상 혼합물을 형성시키는 단계;
 - (b) 상기 친수성 계면활성제와 물을 혼합하여 수성 상 혼합물을 형성시키는 단계;
 - (c) 상기 오일상 혼합물을 상기 수성 상 혼합물과 혼합하여 상기 NLC 입자를 형성시키는 단계; 및
 - (d) 상기 생물활성제가 비-공유 상호작용에 의해 또는 가역적 공유 상호작용에 의해 상기 NLC 입자의 표면과 결합되도록 상기 생물활성제를 상기 NLC 입자와 배합하는 단계
- 를 포함하는, 조성물을 제조하는 방법.

청구항 15

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 생물활성제는 RNA이고, 상기 RNA는 하나 이상의 TB 항원을 암호화하는, 조성물.

청구항 16

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 아쥘반트(adjuvant)를 더 포함하는, 조성물.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 아쥘반트는 TLR 작용제, Rig-I 작용제, 사포닌, 탄수화물, 탄수화물 중합체, 공액된 탄수화물, 전체 바이러스 입자, 바이러스-유사 입자, 바이러스 단편 및 세포 단편으로부터 선택되는, 조성물.

청구항 18

삭제

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

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

청구항 98

삭제

청구항 99

삭제

청구항 100

삭제

청구항 101

삭제

청구항 102

삭제

청구항 103

삭제

청구항 104

삭제

청구항 105

삭제

청구항 106

삭제

청구항 107

삭제

청구항 108

삭제

청구항 109

삭제

청구항 110

삭제

청구항 111

삭제

청구항 112

삭제

청구항 113

삭제

청구항 114

삭제

청구항 115

삭제

청구항 116

삭제

청구항 117

삭제

청구항 118

삭제

청구항 119

삭제

청구항 120

삭제

청구항 121

삭제

청구항 122

삭제

청구항 123

삭제

청구항 124

삭제

청구항 125

삭제

청구항 126

삭제

청구항 127

삭제

청구항 128

삭제

청구항 129

삭제

청구항 130

삭제

청구항 131

삭제

청구항 132

삭제

청구항 133

삭제

청구항 134

삭제

청구항 135

삭제

청구항 136

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 미국 가출원 제62/520,204호(출원일: 2017년 6월 15일); 제62/540,973호(출원일: 2017년 8월 3일); 제62/556,291호(출원일: 2017년 9월 8일); 제62/563,544호(출원일: 2017년 9월 26일); 제62/582,859호(출원일: 2017년 11월 7일); 제62/622,748호(출원일: 2018년 1월 26일); 제62/622,755호(출원일: 2018년 1월 26일); 제62/669,262호(출원일: 2018년 5월 9일); 제62/677,336호(출원일: 2018년 5월 29일); 및 제62/680,454호(출원일: 2018년 6월 4일)의 우선권의 이익을 주장하며; 이들의 각각은 모든 목적을 위하여 이들의 전문이 본 명세서에서 참고로 인용된다.

[0003] 분야

[0004] 본 개시내용은 일반적으로 약제학 및 백신 제형의 분야에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] 핵산 번역화는 기존의 또는 최근에 생긴 감염성 질환 위협에 대한 백신의 신속한 개발을 위하여 매력적인 전략이다. 핵산 백신 후보자는 공통 합성 방법에 의해 용이하게 발생되고, 새로운 감염성 질환의 출현의 수 주 내에 구성될 수 있다. 또한, 핵산 백신의 생물물리학적 특징이 발현된 항원과는 독립적이므로, 새로운 백신은 제조를 위한 최소 항원-특이적 공정 개발을 필요로 한다. 플라스미드 DNA 백신은 현재 선택적 감염성 질환을 위하여 개발 중에 있지만; 지금까지는, 연관된 합병증으로 인해 인간에서 사용하기 위하여 DNA 기반 백신은 승인되어 있지 않았다(McKay, Cope et al. 2014, Tregoning and Kinnear 2014).

[0006] RNA 기반 플랫폼을 이용하는 항원의 전달은 DNA 기반 플랫폼에 비해서 유망한 대안으로서 제안되었다. RNA의 과도적인 속성은 항원 전달을 위하여 바람직하고; 장기 백신 지속성의 위험은 DNA에 비해서 저감되고, 전달된 백신의 핵 전자는 단백질 제조에 요구되지 않는다. 그러나, RNA의 상대적인 불안정성 및 단일 mRNA 전사체로부터의 제한된 발현은 분야에서 및 상업적 개발을 위하여 이들 백신의 사용 및 대규모 분포를 어렵게 만든다. RNA 구조의 변형을 통해서 RNA 안정성을 개선시키기 위한 방법에 대한 풍부한 연구는 이 문제에 대한 여러 가지 해결책을 제공하였다(Tavernier, Andries et al. 2011, Youn and Chung 2015). 특히, RNA 기반 백신의

자체-증폭은, 항원 발현의 크기 및 지속기간을 개선시키는 잠재적인 기전을 입증하였다((Vander Veen, Harris et al. 2012, Ljungberg and Liljestrom 2015)에 검토됨).

[0007] 강한 면역 반응을 가능하게 하기 위하여, 리포솜 및 수중유 에멀션과 같은 제형은 전형적으로 RNA의 세포 내로의 전달을 증대시키는데 사용된다(Geall, Verma et al. 2012, Ulmer, Mason et al. 2012, Brito, Chan et al. 2014, Bogers, Oostermeijer et al. 2015, Brito, Kommareddy et al. 2015, Geall and Ulmer 2015). 또한, 이들 제형은 또한 약물 또는 기타 치료제의 세포 내로의 전달을 증대시키는데 사용될 수도 있다. 그러나, 리포솜 또는 수중유 에멀션, 예컨대, 양이온성 지질 에멀션(CNE)은 생리학적 환경에서 구조적으로 불안정적일 수 있고, 개별적인 성분들의 급속 노출로부터 독성의 가능성을 증가시킬 수 있다. 이러한 담체의 독성 잠재성은 또한 RNA 흡착에 요구되는 양이온성 인지질과 통상 회합된(associated) 화합물 또는 화합물 독성 문제일 수도 있다(Bertholet et al. 2010). 부가적으로, 수중유 에멀션(예컨대 크기, 표면 전하, 부형제의 화학적 속성 및 이들의 상대적 비)의 물리화학적 조성이 RNA 결합, 전달, 궁극적으로는 항원 발현에 어떻게 영향을 미치는지에 대한 제한된 이해가 있다.

[0008] 따라서, 세포에 핵산을 포함하는 생물활성제(bioactive agent)의 전달을 위한 다목적의 안정적인 안전한 시스템으로서 제공되도록 물리적으로 그리고 화학적으로 둘 다 적합한 제형 플랫폼에 대한 필요가 있다.

[0009] 특허 출원 및 특허 공보를 비롯한 본 명세서에 인용된 모든 문헌은, 마치 각 개별적인 문헌이 구체적으로 그리고 개별적으로 참고로 편입되도록 나타낸 것처럼, 이들의 전문이 참고로 본 명세서에 편입된다.

발명의 내용

[0010] 본 발명자들은 놀랍게도 생물활성제를 세포에 전달함에 있어서 효과적인 제형을 개발하였다. 따라서, 특히, 이러한 제형(또한 본 명세서에서 조성물이라고도 지칭됨) 및 이의 사용 방법이 본 명세서에서 제공된다. 이러한 제형은 나노구조 지질 담체(nanostructured lipid carrier: NLC)-기반 제형이다. 숙련된 전문가라면 NLC가 NLC 입자로 구성되는 것임을 이해할 것이다. NLC는 문헌[Beloqui et al., Nanomedicine. NBM 2016; 12: 143-161]에 기재되어 있다. 본 발명의 예시적인 NLC 입자는 (a) 액체상 지질과 고체상 지질을 포함하는 오일 코어, (b) 양이온성 지질, (c) 소수성 계면활성제(바람직하게는 솔비탄 에스터(sorbitan ester)(예컨대, 솔비탄 모노에스터, 다이에스터 또는 트라이에스터)), 및 (d) 친수성 계면활성제를 포함한다. 예시적인 조성물은 안정적이고 생물활성제를 세포에 전달 가능하다. 예를 들어, 면역 반응의 발생을 위하여 그리고/또는 대상체의 질환 및 건강 병태의 치료를 위하여 생물활성제의 전달이 가능하다.

[0011] 본 발명의 이들 및 기타 양상은 이하의 상세한 설명 및 첨부 도면의 참조 시 명백해질 것이다. 또한, 본 발명의 소정의 양상을 더욱 상세히 기재하는 각종 문헌이 본 명세서에 기술되며, 따라서 이들의 전문이 참고로 편입된다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1A 내지 도 1E는 CNE 제형과 NLC 제형 간의 안정성 비교를 도시한다. 5°C(도 1A), 25°C(도 1B), 37°C(도 1C), 60°C(도 1D) 및 80°C에서 저장된 NLC 제형인 CNE(QG386)와 QG752 간의 동적 광 산란(dynamic light scattering: DLS) 입자 크기(Malvern Zetasizer Z/ZS) 비교. 화살표는 단지 선으로 구별되는 것을 돕도록 포함된다.

도 2A 내지 도 2B는 동적 광 산란(DLS)을 이용해서 측정된 오일/계면활성제 또는 계면활성제/오일 비의 함수로서의 NLC의 z-평균 직경을 도시한다.

도 3A 내지 도 3E는 질소/포스페이트(N/P) 비의 함수로서 NLC에 결합된 RNA의 양을 결정하기 위하여 겔-지체 검정(gel-retardation assay: GRA)의 광학 농도측정 분석을 도시한다(도 3A). 도 3B 내지 도 3E는 QG942, QG963, QG807 및 QG843(QG843은 또한 본 명세서에서 CNE으로 지칭됨)에 대해서 N:P값의 함수로서 시험관내 SEAP 발현(상대 발광 단위(relative luminescence unit), RLU) 및 RNA-NLC 결합 곡선의 오버레이를 도시한다.

도 4A 내지 도 4C는 제형-RNA 복합체의 DLS 입자 크기(Z-평균, nm)와 다양한 질소 대 포스페이트(계산치) 비(도 4A), RNA 대 입자(이론적) 비(도 4B), 또는 DOTAP 대 RNA 질량비(계산치)(도 4C)와의 비교를 도시한다.

도 5는 상이한 양의 QG768 제형과 복합체화된 지카(Zika) 항원-발현 rvRNA의 단일 IM 투여 후 14일에 마우스(n=5/군)로부터의 중화 항체 역가를 도시한다. 중화 항체 역가는 80% 플라크 감소 중화 시험(plaque reduction

중화 test)(PRNT₈₀)에 의해 결정되었다. 유의성은 일원분산분석(One-way ANOVA)에 의해 결정되었다.

도 6은 제형과 복합체화(제형과 1:1(v/v) 혼합된 0.1 μ g RNA)되거나 또는 네이키드(naked)(식염수와 1:1 혼합된 0.1 μ g 또는 10 μ g RNA)된 RNA와의 근육내(IM) 투여 후에 마우스(N=5/군)로부터의 중화 항체 역가를 도시한다. 중화 항체 역가는 80% 플라크 감소 중화 시험(PRNT₈₀)에 의해 결정되었다. 유의성은 일원분산분석에 의해 결정되었다.

도 7A 내지 도 7E는 표시된 제형의 존재하에 인간 전혈 세포로부터의 케모카인 방출 수준을 도시한다. 케모카인 발현 수준은 다중 사이토카인 비드 어레이를 사용하여 Luminex 검정에 의해 결정되었다.

도 8A 내지 도 8B는 rvRNA를 시험관내에서 전달하기 위한 선택 제형의 능력을 도시한다. 293T 또는 BHK 세포는 양성 대조군으로서의 리포펙타민(lipofectamine)뿐만 아니라 표시된 제형을 사용해서 SEAP를 암호화하는 10ng (도 8A) 또는 100ng(도 8B) 중 한쪽의 rvRNA, 및 음성 대조군으로서의 10% 수크로스 용액을 이용해서 형질주입(transfect)하였다. 형질주입 후, 상청액을 수거하고, SEAP 활성도는 발광 검정을 이용해서 측정하였다.

도 9는 선택 제형을 위하여 생체내에서 단백질 발현의 반응속도론을 도시한다. C57BL/6 마우스에게는 10% 수크로스, CNE, QG807 또는 QG808로 제형화되고 SEAP를 암호화하는 1 μ g의 rvRNA를 IM 경로를 통해서 주사하였다. 식염수-주사된 마우스는 모의 대조군으로서 사용되었다. 혈청을 주사 후 3, 7, 14, 21 및 28일 후에 수거하고, SEAP 활성도는 발광 검정을 이용해서 측정하였다.

도 10은 제형 QG807에 대한 RNA 부하 최적화를 도시한다. SEAP를 암호화하는 rvRNA를 10% 수크로스 중에 x-축상에 표시된 각종 농도로 희석시키고 QG807과 1:1 비로 복합체화하였다. 이어서, 50 μ l 용적 중 1 μ g 또는 0.1 μ g 용량을 달성하기 위하여 제형화된 RNA를 희석시켰다. 이어서, C57BL/6 마우스에게 IM 경로를 통해서 각 용량으로 주사하고, 혈청을 주사 후 제3일 및 제8일에 수거하였다. 이어서, SEAP 활성도는 발광 검정에 의해 측정하였다.

도 11A 내지 도 11C. 도 11A 및 도 11B에 대해서, 모의 = 10% 수크로스, 네이키드 = 100ng의 미제형화된 SEAP rvRNA, CNE = CNE(Span 85 함유)와 복합체화된 SEAP rvRNA, QG768 = Span60을 함유하는 NLC, QG906 = Span80을 함유하는 NLC, QG808= Span85를 함유하는 NLC, SQ807= Span60을 함유하는 NLC. 도 11A는 유화제 조성물이 상이한 4가지 NLC 제형을, 단백질 발현을 증대시키는 이들의 능력에 대해서 CNE 또는 희석제와 비교하고, 이어서 분비된 알칼리성 포스파타제(secreted alkaline phosphatase: SEAP)를 암호화하는 RNA와 복합체화시킨 것을 도시한다. 100ng의 1회 근육내(IM) 주사(군당 n=3) 후 3일째에, 마우스로부터 혈청을 수거하고, SEAP 활성도를 검정하였다. 각 데이터 점이 이들의 평균 \pm 표준 편차(S.D.)와 함께 플로팅되어 있다. 도 11B는 ZIKV prM 및 E를 암호화하는 RNA와 복합체화된 (도 11A)에서 사용된 동일한 제형 및 중화 항체를 단일 100ng IM 주사(군당 n=5) 후에 14일째에 검정하였다. 데이터는 터키의 다중 비교 시험으로 일원분산분석에 의해 분석되었다(*p<0.05; CNE 또는 NLC Span 85와 비교된 NLC Span 60, ** p<0.008; NLC Span 80과 비교된 NLC Span 60, *** p=0.0007, NLC Span 80 또는 85와 비교된 CNE, 유의하지 않음). 도 11C는 ZIKV prM 및 E를 암호화하는 RNA와 복합체화된 2종의 상이한 소수성 계면활성제인 Span 85 및 Span 60 및 중화 항체로 구성되고 단일 100ng의 FM 주사 후 14일째에 검정된 CNE 또는 NLC를 도시한다. 데이터는 터키의 다중 비교 시험으로 다중 이원분산분석(multiple two-way ANOVA)으로 분석하였다. ** p < 0.0001.

도 12A 내지 도 12H. C57BL/6 마우스(n=9/군)을 1 μ g의 CNE- 또는 NLC-제형화된 RNA의 단일 IM 주사로 면역화시키고, 10 또는 1 μ g의 미제형화된 RNA와 비교하였다(도 12A). 중화 항체를 면역화 후 14일째에, 이어서 28일째에 평가하고, 군당 3마리의 마우스에게 각 백신의 두 번째 용량을 부스팅하였다(도 12B 내지 도 12F). 부스팅 후 46일째에, 비장을 수거하고, ZIKV prM 및 E 중 에피토프에 대응하는 CD8 펩타이드로 자극시켰다. 도 14G내지 도 14H: 단일 IM 투여로 면역화된 마우스(n=6/군)를 제30일에 시험감염(challenge)시키고 나서, 치명적 용량의 ZIKV와 함께, 단클론성 항체 투여에 의해 인터페론 알파 수용체의 봉쇄를 시행하였다. 플라크 검정 시험감염 후 4일째에, 생존율을 모니터링하면서(도 12H), 바이러스에 대해서 혈청을 검정하였다(도 12G). NLC₄는 QG807이다.

도 13A 내지 도 13B. C57BL/6 마우스(n=3/군)에게 400 μ g/ml의 RNA와 복합체화시킴으로써 QG807, QG924, QG925, QG941 또는 QG942로 미제형화 또는 제형화된 1 μ g의 SEAP RNA로 IM 주사하고, SEAP 발현을 그의 최적 40 μ g/ml의 RNA 농도에서 복합체화된 QG807과 비교하였다(도 13A). BUK 세포를 4시간 동안 각각의 높은 RNA-부하 제형의 1:20 희석액으로 인큐베이팅하고, 이어서 요오드화프로피듐 및 아넥신으로 염색하여, 사멸되거나 세포자멸사되고 있는 세포를 검출하였다. 이어서, 유동 세포분석법을 사용해서, 세포자멸사 또는 사멸되지 않은 세포의 비율을 정량화하였다(도 13B).

도 14는 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 또는 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 RNA로 복합체화된 QG807을 비교하는 생체내 SEAP 발현 데이터를 도시한다.

도 15A 내지 도 15D는 표시된 제형의 존재하에 인간 전혈 세포로부터 케모카인 방출 수준을 도시한다. 케모카인 발현 수준은 다중 사이토카인 비드 어레이를 사용하는 Luminex 검정에 의해 결정하였다.

도 16A 내지 도 16D. 도 16A는 예시적인 NLC 입자를 도시한다. 도 16B는 NLC_{v1} 및 CNE(QG386)의 강도 가중 크기 분포를 도시한다. 도 16C는 25°C에서 저장된 제형의 콜로이드 안정성을 평가하기 위하여 9개월에 걸쳐서 입자 크기(z -평균 직경) 발달을 도시한다. CNE(QG386)와 QG752, NLC_{v1} 제형 간의 동적 광 산란(DLS) 입자 크기(z -평균 직경, Malvern Zetasizer Z/ZS) 비교. 도 16D는 rvRNA가 분해로부터 보호된 계면활성제 상 중 비교적 낮은 Tween80 분획을 가진 NLC(35%의 총 계면활성제와 양이온성 지질 질량)에 의해 Rnase 보호를 도시한다.

도 17은 예시적인 NLC 제조 공정을 도시한다.

도 18A 내지 도 18B는 1 또는 2 용량의 NLC-제형화된 ZIKV rvRNA. C57BL/6 마우스($n=5/\text{군}$)에 의한 2 독립적인 실험 후의 중화 항체 반응의 지속성을 도시한다. NLC_{v1} 로 제형화된 1 또는 0.1 μg ZIKV rvRNA에 의한 FM 경로를 통해 제0일(도 18A)에 또는 제0일 및 제28일에(도 18B) 한번 면역화하고, 각종 시점에서의 중화 항체 역가를 10 또는 1 μg 의 미제형화된(네이키드) ZIKV rvRNA로 면역화된 마우스와 비교하였다. 데이터는 각 생물학적 복제의 평균 \pm S.D.로서 플로팅된다. 도 18A 내지 도 18B에서의 데이터의 Log_{10} 변환은, 제14일에 이들의 각각의 피크 역가에 대해서 각 군 이내에서 각 시점에서의 평균 PRNT_{80} 의 비교에서, 터키의 다중 비교 시험에 의한 일원분산 분석에 의해 분석하였다. 도 18A에서, 제14일에서의 역가와 비교한 88일 및 156일에서의 NLC_{v1} -1 μg 또는 네이키드-10 μg , *** $p<0.0001$, ** $p<0.001$; 도 18B에서, 제14일에서의 역가와 비교한 126일 및 209일에서의 NLC_{v1} -1 μg , 각각 * $p=0.05$, *** $p=0.0001$.

도 19A 내지 도 19B. 마우스를 NLC-제형화된 RNA의 FM 주사로 면역화시키고 제14일(도 19A) 및 제49일(도 19B)에 CD⁺ T 세포의 수준에 대해서 10 또는 1 μg 의 미제형화된 RNA 및 CNE와 비교하였다.

도 20A 내지 도 20E. 마우스를 표시된 용량에서 NLC-제형화된 RNA의 FM 주사로 면역화시켰다. NLC_{v2} (QG942)를 15 및 100의 N:P에서 ZIKV prM/E 암호화 rvRNA로 복합체화하고, 30, 10 및 3ng 용량을 단일 IM 주사($n=14/\text{군}$)을 통해서 C57BL/6 마우스에 투여하였으며, 14일 후에, PRNT_{80} (도 20A)에 의해 중화 항체 역가를 평가하기 위하여 출혈시키거나, 또는 모의 백신 접종된 마우스(비히클) 또는 100 또는 10ng 네이키드 rvRNA(수크로스)($n=14/\text{군}$), 또는 15의 N:P에서 NLC_{v1} ($n=14$) 또는 CNE($n=4$)와 제형화된 100ng에 비해서 총 비장세포 중 항원-특이적 B220⁺CD8⁺IFN γ ⁺ T 세포 퍼센트(도 20B)를 정량하기 위하여 안락사시켰다($n=4/\text{군}$)(도 20A 내지 도 20B). 데이터는 평균 \pm S.D.뿐만 아니라 개별적인 값으로서 제시된다.

면역화 후 30일에, 군당 나머지 10마리의 마우스를 ZIKV Dakar 균주 41525의 5 log_{10} PFU로 시험감염시키고 나서, 문헌[Smith et al., PLoS Negl Trop Dis. 11(1):e0005296 (2017)]에 기재된 타입 I 인터페론의 항체 봉쇄를 시행하고, 4시간 후에 채혈하여 플라크 검정에 의해 바이러스혈증을 정량하였다(도 20C). 데이터는 평균 \pm S.D.뿐만 아니라 개별적인 값으로서 제시된다. 마우스는 생존율(도 20D) 및 체중 감소(도 20E)에 대해서 매일 모니터링하였다. 도 20E에서의 데이터는 평균 \pm S.D.로서 제시된다. 도 20A 및 도 20C에서 데이터의 log_{10} 변환은 터키의 다중 비교 시험을 이용한 일원분산분석에 의해 분석되었다(대조군인 모의, 미제형화된 100 및 10ng 용량과, NLC_{v2} 제형화된 100, 30, 및 10ng 용량 간의 도 20A에서의 PRNT_{80} 역가, **** $p<0.0001$, 또는 CNE 제형화된 100ng, * $p=0.04$; NLC_{v2} 제형화된 100 및 30ng 용량과 CNE 제형화된 100ng 간의 역가, ** $p=0.006$; 대조군인 모의, 미제형화된 100 및 10ng 용량과, 모든 NLC_{v2} - 또는 NLC_{v1} -제형화된 용량 간의 도 20C에서의 바이러스혈증 역가, **** $p<0.0001$). 도 20E에서의 데이터는 터키의 다중 비교 시험을 이용한 이원분산분석에 의해 분석하였다(5 내지 10일에, 대조군 - 모의, 또는 100 및 10ng 네이키드 rvRNA와 모든 제형화된 군 간의 퍼센트 중량 변화, * $p<0.05$). 도 20A 내지 도 20C에서의 데이터는 두 독립적인 실험을 나타낸다.

도 21A 내지 도 21D는 ZIKV rvRNA의 설계 및 정량화를 도시한다. 도 21A는 T7 RNA 중합효소 프로모터의 제어 하에 백신 균주인 TC-83으로부터 유래된 베네수엘라 말뇌염 레플리콘(Venezuelan Equine Encephalitis replicon)을 암호화하는 플라스미드 DNA를 도시한다. 미번역 영역(UTR), 서브게놈(subgenomic: SG), 관심대상 유전자(gene of interest: GOI). 도 21B는 ZIKV 균주 H/PF/2013의 프리멤브레인(premembrane: prM) 및 외피

(envelope: E) 유전자 또는 분비된 인간 배아 알칼리성 포스포타제(SEAP)를 암호화하는 복제 바이러스 RNA의 설계를 도시한다. ZIKV 또는 SEAP rvRNA가 형질주입된 293 T 세포 상청액을 ZIKV에 대해서 다클론성 항체를 이용하는 도 21C 웨스턴 블롯 및/또는 도 21D 투과 전자 현미경에 의해 30% 수크로스를 통한 침강 후에 분석하였다.

도 22A 내지 도 22H는 유전자 발현, 면역원성 및 반응원성을 포함하는 생물학적 반응에 의해 NLC_{v2} 와 rvRNA 간의 물리적 관계를 매핑하는 도면이다. 시험관내 실험(도 22A 내지 도 22D)을 위하여, NLC_{v2} 를 각종 N:P 비에서 SEAP rvRNA와 복합체화하고, 위에서 기재된 바와 같은 SEAP 검정에 의해 유전자 발현(도 22A)을 측정하고, 동적 광산란에 의해 입자 크기(도 22B) 및 제타 전위(도 22C)를 측정하고, 겔 전기영동 후 밀도측정계에 의해 RNA 결합 퍼센트(도 22D)를 측정하였다. 도 22A 내지 도 22D에서의 데이터는 평균 \pm S.D.로 제시되고, 적어도 3가지 독립적인 실험을 나타낸다. C57BL/6 마우스와 연관된 생체내 실험을 위하여(도 22E 내지 도 22G), NLC_{v2} 를 3, 5.6, 15 및 37의 N:P에서 ZIKV 또는 SEAP rvRNA와 복합체화하고, 마우스(SEAP에 대해서 $n=3$ /군, 또는 ZIKV에 대해서 $n=5$ /군)에게 1000, 100 또는 10ng의 SEAP rvRNA 또는 1000 또는 100ng의 ZIKV rvRNA를 IM 경로를 통해서 주사하였다. 주사 후 3일에 SEAP 검정에 의해 SEAP 발현을 결정하는 한편(도 22E 내지 도 22G), ZIKV 중화 항체 역가는 주사 후 14일에 PRNT₈₀에 의해 결정하였다(도 22F 내지 도 22G). 반응원성을 결정하기 위하여(도 22H), 기니픽($n=4$ /군)에게 3, 5.6, 15 및 37의 N:P에서 NLC_{v2} 와 복합체화된 50 μ g ZIKV rvRNA를 ID 경로를 통해서 주사하고, 24시간 후에 플레어 직경(flare diameter)을 측정하였다. 도 22E 내지 도 22G에서의 SEAP 데이터는 평균 \pm S.D.로서 제시되고, 단일 실험으로부터 얻어진 한편, 도 22F 및 도 22G에서의 PRNT₈₀ 데이터는 평균 \pm S.D. 및 min/max 박스-위스커 플롯으로서 제시되고, 3가지 독립적인 실험을 나타낸다. 도 22H에서의 데이터는 단일 실험으로부터 얻어졌고, 평균 \pm S.D. 및 min/max 박스-위스커 플롯을 이용해서 개별적인 생물학적 복제로서 제시된다. 도 22G에서의 PRNT₈₀ 데이터의 log₁₀ 변환은 터키의 다중 비교 시험을 이용한 일원분산분석에 의해 분석하였다(N:P 37과 15 간의 역가, 유의하지 않음; N:P 15와 5.6 간의 역가, $**p=0.0033$). 도 22H에서의 데이터는 터키의 다중 비교 시험을 이용한 일원분산분석에 의해 분석하였다(N:P 37과 15 간의 플레어 직경, $***p=0.0004$; N:P 15와 5.6 또는 3 간의 플레어 직경, 유의하지 않음). 데이터에 의해 지원된 NLC와 rvRNA 간의 물리적 상호작용의 가정된 모델을 도시하는 카툰이 도 22D에 의해서 제시된다.

도 23A 내지 도 23E는 RNA 부하 용량/loading capacity)이 증대된 NLC_{v2} 의 특징을 도시한다. 도 23A는 DLS에 의해 측정된 바와 같은 입자 크기를 도시한다. 데이터는 Z-평균으로서 보고된다. 도 22B는 미처리 rvRNA(라인 2)와 NLC_{v2} rvRNA(라인 4) 또는 Rnase-처리된 rvRNA(라인 3)와 NLC_{v2} rvRNA(라인 5)의 변성 RNA 아가로스 겔 전기영동을 도시한다. 데이터는 3가지 독립적인 시험을 나타낸다. 도 23C는 rvRNA의 농도 증가에 따라 복합체화된 NLC_{v1} 또는 NLC_{v2} 의 변성 아가로스 겔 전기영동 후의 밀도측정 분석에 의해 측정된 바와 같이 NLC_{v1} 또는 NLC_{v2} 에 결합된 RNA의 퍼센트를 도시한다. 데이터는 3가지 독립적인 시험을 나타낸다. 도 23D는 SEAP rvRNA에 의한 다양한 N:P 비에서 복합체화된 NLC_{v1} 또는 NLC_{v2} 에 의한 24시간 인큐베이션 후에 BUK 세포 상청액 중에서의 SEAP 발현을 도시한다. 데이터는 3가지 생물학적 복제의 평균 \pm S.D.로서 나타내고, 3가지 독립적인 실험으로부터의 결과를 나타낸다. NLC_{v1} 데이터는 비교 목적을 위하여 도 23E로부터 재현되었다. 도 23E에 대해서, 기니픽($n=4$ /군)은 FM 또는 ID 경로를 통해서 단일 50 μ g 용량의 미세형화된 ZIKV rvRNA 또는 5, 또는 0.5 μ g의 NLC_{v1} -제형화된 ZIKV rvRNA로, 또는 50, 5, 또는 0.5 μ g의 NLC_{v2} 제형화된 ZIKV rvRNA로 면역화되었고, PRNT₈₀에 의해 측정된 바와 같은 혈청 중화 항체 역가는 28일 후에 검정되었다. 각 데이터점은 평균 \pm S.D.로도 보고된다. 데이터의 Log₁₀ 변환은 터키의 다중 비교 시험을 이용한 일원분산분석에 의해 분석하였다(IM을 통한 NLC_{v1} 제형과 NLC_{v2} 제형 간의 5 μ g 용량, $*p=0.05$, 또는 ID, $*p=0.04$).

도 24A 내지 도 24B. 도 24A는 상기 도 11C에서 수거된 혈청의 연속 회석에 의해 시험관내 ZIKV 중화를 도시한다. 각 혈청 회석은 평균 \pm S.D.로서 플로팅하고, 곡선은 S자형 비선형 회귀 모델을 사용해서 적합화시켰다. 데이터는 터키의 다중 비교 시험을 이용한 다중 이원분산분석에 의해 분석하였다(1/640 혈청 회석 NLC Span 60 대 CNE Span 85 및 CNE Span 60 대 CNE Span 85에서, $*p<0.05$; NLC Span 60 대 CNE Span 60, $**p<0.0001$). 도 24B는 스쿠알렌(squalene) 에멀션 중에 SPAN 60 또는 85를 함유하는 CNE와 또는 Span 60, 80 또는 85 및 스쿠알렌/dynasan을 함유하는 NLC, 또는 Span 60 및 Miglyol®/dynasan 에멀션을 함유하는 NLC와 N:P 15에서 복합체화되거나 또는 미세형화된(네이키드) 40ng ZIKV rvRNA와 함께 24시간 인큐베이션 후에 수거한 인간 말초 혈액 단핵 세포($n=6$ 명의 공여자)의 상청액 중의, ELISA에 의해 결정된 바와 같은 Mip-1 β 농도를 도시한다. 공여자

당 2개의 기술적 ELISA 복제가 수행되었고, 각 공여체의 평균은 6명의 공여자의 평균 \pm S.D.와 함께 플로팅된다. 데이터는 터키의 다중 비교 시험을 이용한 다중 일원분산분석에 의해 분석하였다(네이키드 또는 CNE-Span 85에 비해서 NLC-Span60-스쿠알렌 또는 NLC-Span85-스쿠알렌, ** $p < 0.005$).

도 25는 NLC_{v1} 또는 CNE로 제형화된 rvRNA의 생체내 전달 후의 단백질 발현의 반응속도론을 도시한다. SEAP를 암호화하는 rvRNA는 NLC_{v1}, CNE 또는 10% 수크로스(네이키드)로 제형화되었고 100ng을 C57BL/6마리의 마우스(n=3/군)에게 FM 경로를 통해서 투여하였다. 10% 수크로스 단독이 주입된 모의 마우스를 음성 대조군으로서 사용하였다. 마우스에서 3, 7, 14, 21 및 28일째에 채혈하고 혈청 SEAP 활성도를 SEAP 검정에 의해 측정하였다.

도 26은 NLC_{v1}의 rvRNA 부하 용량의 최적화를 도시한다. SEAP를 암호화하는 rvRNA를 10% 수크로스에 400, 300, 200, 100 및 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 최종 농도로 희석시키고, 온화하게 피펫팅함으로써 NLC_{v1}와 1:1로 복합체화하였다. CNE를 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 rvRNA와 1:1로 복합체화하였다. 이어서, 각 50 μl IM 주사 결과 100ng 용량이 되도록 투약하기 위하여 복합체화된 또는 미제형화된 rvRNA를 10% 수크로스에 희석시켰다. 이어서, 마우스를 3일 후에 채혈하고, SEAP 검정에 의해 혈청 SEAP 활성도를 측정하고, 모의-주사된 마우스와 비교하였다.

도 27은 혈청 SEAP 활성도에 대한 고-용량 NLC 중 스쿠알렌 농도 저감 효과를 도시한다. 30, 15, 7.5 및 3.75% w/v의 스쿠알렌으로 제조된 고-용량 NLC(3% w/v의 DOTAP 함유)를 SEAP를 암호화하는 rvRNA와 N:P 37에서 1:1로 복합체화하고 100ng을 C57BL/6마리의 마우스(n=3/군) 중 IM 경로를 따라서 투여하고, 3일 후에 혈청 SEAP 활성도를 측정하고, 미제형화된 rvRNA- 또는 모의-주사된 마우스와 비교하였다.

도 28A 내지 도 28G는 C57BL/6 마우스에서의 NLC_{v1}/rvRNA 복합체의 면역원성 및 효능을 도시한다. NLC_{v1}을, N:P 50에서 ZIKV prM/E를 암호화하는 mRNA 또는 rvRNA와 복합체화하고, 단일 1 μg 용량을 IM 주사를 통해서 C57BL/6 마우스(n=9/군)에게 투여하고, 14일 후에 채혈하여 모의 백신 접종된 마우스 또는 10 또는 1 μg 네이키드 rvRNA 또는 mRNA(n=9/군), 또는 N:P 50에서 CNE와 제형화된 1 μg rvRNA와 비교해서 PRNT₈₀에 의한 중화 항체 역가를 평가하였다(도 28A). 데이터는 평균 \pm S.D.뿐만 아니라 개별의 값으로서 제시된다. 면역화 후 30일에, 6마리의 마우스군을 문헌[Smith et al. PLoS Negl Trop Dis 11(1):e0005296 (2017)]에 기재된 바와 같이, 타입 I 인터페론의 항체 봉쇄 후에 5 log₁₀ PFU의 ZIKV Dakar 균주 41525로 시험감염시키고, 4일 후에 채혈하여 플라크 검정에 의해 바이러스혈증을 정량화하였다(도 28B). 마우스는 생존율(도 29C) 및 체중 감소(도 28D)에 대해서 매일 모니터링하였다. 군당 나머지 3마리의 마우스에게 30일째에 제2 면역화를 투여하여 부스팅후 CD8⁺ T-세포 반응을 평가하였다. 14일 후에, 마우스를 안락사시키고, 비장세포를 단리시키고, 염색하여, IFN γ ⁺(도 28E), CD107a⁺(도 28F), 또는 TNF α ⁺(도 28G)인 B220_{lo}CD8⁺ T 세포 %를 유동 세포분석법에 의해 정량화하였다(도 37).

도 29는 예시적인 융합 단백질인, 4종의 Mtb 항원/단백질: Rv3619, Rv2389, Rv3478 및 Rv1886(상위)을 포함하는 ID91 및 ID91을 암호화하는 알파 바이러스 레플리콘 설계를 도시한다. 레플리콘 작제물은 리포터 유전자로서 가우시아 루시페라제 신호(Gaussia luciferase signal)를 함유한다.

도 30A 내지 도 30B는 단백질 또는 RNA 기반 ID91 백신으로부터의 TH1 사이토카인-분비 CD4+/CD44+(도 30A) 또는 CD8+/CD44+ T 세포(도 30B)의 퍼센트를 도시한다. $P < 0.05$ 의 통계학적 유의성은 이원분산분석을 이용해서 분석하고 별표로 표기된다.

도 31A 내지 도 31D는 증식 또는 사이토카인-생산 CD4+ 모집단으로부터의 데이터를 도시한다. ID91 단백질/GLA-SE(청색) 또는 ID91 RNA/QG807(적색)로 면역화된 마우스로부터의 비장세포는, 배지, ID91 전체 단백질, 10 펩타이드-폴링된 ID91 오버랩 펩타이드 중 13개의 펩타이드 풀로 자극하였다.

도 32A 내지 도 32D는 증식 또는 사이토카인-생산 CD8+ 모집단으로부터의 데이터를 도시한다. ID91 단백질/GLA-SE(청색) 또는 ID91 RNA/QG807(적색)로 면역화된 마우스로부터의 비장세포를, 배지, ID91 전체 단백질, 10 펩타이드-폴링된 ID91 오버랩 펩타이드 중 13개의 펩타이드 풀로 자극하였다.

도 33A 내지 도 33B는 ID91 RNA에 의한 면역화가 ID91 단백질과 비교한 경우의 예방적 보호성이고 차분성 CD8+ T 세포 에피토프를 유도한 관찰 결과를 도시한다. 마우스의 코호트는 ID91 단백질+GLA-SE 또는 알파 바이러스 RNA 암호화 ID91 항원 중 하나로 3주 간격으로 2회 면역화되고, 비장세포를 단리시켜, ID91 펩타이드를 사용해서 시험관내에서 재자극시켰다. 히트맵의 강도 스케일은 각 풀(pool)에 대한 반응에서 CD4+(적색) 및 CD8+(청색) T 세포 증식 및 사이토카인 반응의 퍼센트를 나타낸다(도 30A). 도 33A에서, M = 배지 단독, ID91 =

ID91 단독, 및 PP1 내지 PP13은 펩타이드 풀 1 내지 13을 나타낸다. 우측상의 스케일은 CD4+ 또는 CD8+ 모집단으로부터의 증식 또는 사이토카인+ 세포의 퍼센트를 나타낸다. 도 33B는 Mtb H37Rv로 시험감염 후 3주에 폐 호모제네이트(homogenate)로부터 평가한 박테리아 부담을 도시한다. 마우스의 코호트는 RNA 제형에서 식염수, ID91 단백질 +GLA-SE, 또는 알파 바이러스 RNA 암호화 ID91 항원 중 어느 하나로 시험감염전 3주에 1회 면역화시켰다. 던넛(Dunnett) 다중 비교 시험을 이용하는 일원분산분석에 의해서 식염수와 비교해서 $P < 0.05$ 의 유의성은 별표로 표시된다.

도 34A 내지 도 34B는 지카(ZIKV) 또는 일본뇌염(JEV) 바이러스로부터 유래된 신호 서열을 비교한다. 도 34A는 prM의 상류에서 ZIKV 또는 JEV 신호 서열을 가진 ZIKV prM/E를 암호화하는 rvRNA의 설계를 도시한다. 도 34B는 ZIKV 또는 JEV 신호 서열을 가진 ZIKV prM/E를 암호화하는 rvRNA를 도시하며, 이는 10% 수크로스(네이키드)에 또는 양이온성 나노에멀션(CNE)으로 제형화시키고, 전자 $10\mu\text{g}$ 또는 후자 $1\mu\text{g}$ 을 IM 경로를 통해서 C57BL/6 마우스($n=5/\text{군}$)에 주사하고, 21일 후에 혈청에서 PRNT80 역가를 측정하였다. 이어서, 마우스를 2차 면역화로 부스팅하고 추가로 21일 후에 PRNT80 역가를 측정하였다.

도 35는 NLC 입자 크기(Z-평균(nm))에 대한 계면활성제 대 오일 물비의 효과를 도시한다. 계면활성제 대 오일 비는 오일의 양을 일정하게 유지하면서 총 계면활성제의 양을 변화시킴으로써 변화되었다. 실험 데이터는 1-상 지수 붕괴 방정식($R^2 = 0.972$)에 적합화되었다. 모든 제형은 동일한 조건(30,000 psi에서 10회 통과)하에 미세유동되었다.

도 36A 내지 도 36B는 생체내에서 RNase 시험감염으로부터의 보호 및 SEAP 발현 rvRNA의 전달에 대한 친수성 계면활성제의 효과를 도시한다. rvRNA는 10mM 시트르산염 완충제로 또는 이것 없이 제조된 70% 또는 35% 총 계면활성제 및 양이온성 지질로 제작된 NLC의 변동으로 복합체화하고, RNase 시험감염으로부터 rvRNA를 보호하는 이들의 능력에 대해서 평가하였다(도 36A). C57BL/6 마우스($n=3/\text{군}$)에게는 10% 수크로스(네이키드) 또는 70% 또는 35% 총 계면활성제 및 양이온성 지질로 제조된 NLC, 또는 CNE와 복합체화된 SEAP를 암호화하는 rvRNA를 투여하고, 혈청 SEAP 활성도는 3일 후에 측정되었다(도 36B).

도 37은 예시적인 유동 세포분석법 게이팅 전략을 도시한다.

도 38A 내지 도 38B는 제한 효소로 변형된 ID91의 예를 도시한다. 도 38A는 벡터 pET29를 도시하고, 도 38B는 벡터 pET28을 도시한다.

도 39A 내지 도 39E는, NLC 제형과 함께 또는 이것 없이 TLR3(Roboxxol, pIC:HMW) 및 RIG-I(SEVDI) 작용제에 의한 자극 후에 인간 PBMC-유래 DC에서의 선천적인 면역 신호전달을 도시한다. 6명의 인간 공여자로부터의 PBMC-DC는 NLC("QG942 제형화된") 또는 네이키드("미제형화된") 중 하나로 제형화된 폴리IC:HMW, RIBOXXOL 또는 SEVDI로 자극하였다. 제형-단독 대조군은 "배지 대조군"으로 표기된다. 37°C 및 5% CO_2 분위기에서 24시간 인큐베이션 후에, 상청액은 상업적으로 입수 가능한 ELISA 키트를 사용해서 선천적인 면역 마커의 농도에 대해서 검정하였다. 통계학적 분석은 시닥 다중 비교 시험(sidak's multiple comparisons test)을 이용해서 이원분산분석에 의해 수행되었다. P-값: * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$, **** $p < 0.0001$.

도 40은 RIBOXXOL 또는 pIC:HMW 아쥘반트(adjuvant)로 자극된 MM6 세포에서의 IFN α/β 의 유도를 도시한다. 세포를 네이키드 또는 제형화된 RNA 중 하나로 자극시켰으며; 제형 조성물은 표 XX에 제공되어 있다. 자극된 MM6 세포의 상청액으로부터의 IFN α/β 가 미자극 MM6 세포에 대해서 측정되었으며, HEK-블루 IFN α/β SEAP 리포터 세포주를 사용해서 결정하였다. 파선은 기지의 IFN α 농도의 첨가 후에 측정된 바와 같은 상대적인 자극에 대응한다.

도 41은 N:P 물비 및 RIBOXXOL 용량의 함수로서 IFN α/β 유도를 요약하는 히트맵을 도시한다.

도 42A 내지 도 42D는 NLC 또는 SE로 제형화된 dsRNA 아쥘반트의 투여 후에 사이토카인 발현을 도시한다.

도 43은 dsRNA 아쥘반트(TLR3 리간드) 및 NLC로 제형화된 SEAP의 투여 후에 감소된 SEAP 발현을 도시한다.

도 44A 내지 도 44B는 NLC, SE 또는 대조군으로 제형화된 VEErep-SEAP의 투여 후 IP-10(도 42A) 및 SEAP 발현(도 42B)을 도시한다. 도 42A에서, *** = $1\mu\text{g} + \text{QG942}$ 대 $1\mu\text{g}$ 네이키드의 통계학적 유의성. 도 42B에서, * = $1\mu\text{g} + \text{QG942}$ 대 $0.1\mu\text{g} + \text{QG942}$ 의 통계학적 유의성, ** = $0.1\mu\text{g} + \text{QG942}$ 대 $0.1\mu\text{g}$ SE 또는 네이키드의 통계학적 유의성, *** = $0.1\mu\text{g} + \text{QG942}$ 대 $0.1\mu\text{g}$ 네이키드의 통계학적 유의성. 도 45는 항원-특이적 항체 반응을 도시한다. C57BL/6 마우스에게는 표시된 아쥘반트 제형과 혼합된 $1\mu\text{g}$ LEISH-F2 단백질을 3주 간격으로 총 2회 주사하였다. 혈청을 제21일(부스터 면역화 전)에 수거하고, 이어서 제42일에 항원-특이적 IgG, IgG1 및 IgG2c 종점 역가를 ELISA에

의해 결정하였다. 데이터는 평균 및 SD, 군당 5마리의 마우스로서 표시된다.

도 46A 내지 도 46B는 T 세포 반응에 대한 Hiltonol® 제형의 효과를 도시한다. C57BL/6 마우스에게 표시된 아쥬반트 제형과 혼합된 1 μ g LEISH-F2 단백질을 3주 간격으로 총 2회 주사하였다. 최종 면역화 후 3주에, 비장을 제거하고 단일 세포를 현탁액을 제조하고 세포를 LEISH-F2 항원과 인큐베이션하고, 이어서 배양 상청액 중 사이토카인 함량을 ELISA에 의해 결정하였다. 데이터는 최소값 및 최대값으로서 제시하고, 박스는 25번째 및 75번째 백분위수를 도시하고, 평균은 박스 내에 수평 막대로 표시되어 있으며, 5마리의 마우스/군이다.

도 47A 내지 도 47E는 T 세포 반응에 대한 Hiltonol® 제형의 효과를 도시한다. C57BL/6 마우스에게 표시된 아쥬반트 제형과 혼합된 1 μ g LEISH-F2 단백질을 3주 간격으로 총 2회 주사하였다. 최종 면역화 후 3주에, 비장을 제거하고 단일 세포를 현탁액을 제조하고 세포를 F2 항원과 인큐베이션하고, 이어서 세포 표현형을 유동 세포분석법에 의해 결정하였다. 데이터는 각 마우스에 대해서 개별 지점으로서 제시되고, 평균 및 SEM은 각각 수평 막대와 수직 막대로 표시되어 있다. N = 5마리의 마우스/군.

도 48은 항원-특이적 항체 반응에 대한 Hiltonol® 제형의 효과를 도시한다. C57BL/6 마우스에게 표시된 아쥬반트 제형과 혼합된 1mg LEISH-F3+ 단백질을 1회 주사하였다. 면역화 후 4주에, 혈청을 수거하고 항원-특이적 IgG 종점 역가를 ELISA에 의해 결정하였다. 데이터는, 평균 및 SEM과 함께, 각 동물에 대해서 개별 시점에서 제시되어 있다. N = 5마리의 마우스/군.

도 49A 내지 도 49C는 T 세포 반응에 대한 Hiltonol® 제형의 효과를 도시한다. C57BL/6 마우스에게 표시된 아쥬반트 제형과 혼합된 1 μ g LEISH-F3+ 단백질로 1회 주사하였다. 면역화 후 4주에, 비장을 제거하고 단일 세포를 제작하였으며, 이 세포 현탁액을 F3+ 단백질 또는 MHCII-제한된 펩타이드(CD8 T 세포 에피토프)와 인큐베이션하고, 이어서 배양 상청액 중 사이토카인 함량을 ELISA에 의해 결정하였다. 데이터는 각 마우스에 대해서 개별 지점으로서 제시되어 있고, 평균 및 SEM이 각각 수평 막대와 수직 막대에 의해 표시되어 있다. N = 5마리의 마우스/군.

도 50A 내지 도 50G는 상이한 제형에 의한 면역원성 반응에 대한 항원 백신 전달의 영향을 도시한다.

도 51A 내지 도 51B는 상이한 제형에 의한 면역원성 반응에 대한 항원 백신 전달의 영향을 도시한다.

도 52A 내지 도 52C는 상이한 제형에 의한 면역원성 반응에 대한 항원 백신 전달의 영향을 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

서열의 설명

표 1은 본 명세서서 언급된 소정의 서열의 목록을 제공한다.

표 1

서열의 설명		
설명	서열	서열 번호
ID91	MTINYQFGDVEDAHGAMIRAQAGSLEAEHQAIISDVLTASDFW GGAGSAACQGFITQLGRNFQVIYEQANAHGQKVQAAGNNMA QTDSAVGSSWADDIDWDAIAQCESGGNWAANTGNGLYGGLQ ISQATWDSNGGVGSPAAASPQQIEVADNIMKTQGPWPKC SSCSQGDAPLGLTHILTFLLAETGGCSGSRDDVDFGALPPEI NSARMYAGPGSASLVAAAKMWDSVASDLFSAASAFQSVVWG LTVGSWIGSSAGLMAAAASPYVAWMSVTAGQAQLTAAQVRV AAAAYETAYRLTVPPPVIAENRTEMLTLATNLLGQNTPAIEA NQAAYSQMWGQDAEAMYGYAATAATATEALLPFEDAPLITN PGGLLEQAVAVEEAIDTAAANQLMNNVPQALQLAQPAQGV VPSSKLGGLWTAVSPHLSPLSNVSSIANNHMSMMGTGVSMTN TLHSMKGLAPAAAQAVETAENGWVWAMSSLSQLGSSLGSS GLGAGVAANLGRAASVGSLSVPPAWAAANQAVTPAARALPL TSLTSAAQTPAGHMLGGLPLGHSVNAGSGINNLRVPARAYAI PRTPAAGFSRPLPVEYLQVPSPSMGRDIKVQFQSGGNNSPAV YLLDGLRAQDDYNGWDINTPAFEWYYQSGLSIVMPVGGQSSF YSDWYSPACGKAGCQTYKWETFLTSELPQWLSANRAVKPTGS AAIGLSMAGSSAMILAAYHPQQFIYAGSLSALLDPSQGMGPSLI GLAMGDAGGYKAADMWGPSSDPAWERNPTQQIPKL VANN TRLWVYCGNGTPNELGGANIPAEFLENFVRSSNLKFQDAYNA AGGHNAVFNPNGTHSWEYWG AQLNAMKGDLQSSLGAG	1
Rv3619	MTINYQFGDVEDAHGAMIRAQAGSLEAEHQAIISDVLTASDFW GGAGSAACQGFITQLGRNFQVIYEQANAHGQKVQAAGNNMA QTDSAVGSSWA	2
Rv2389	DDIDWDAIAQCESGGNWAANTGNGLYGGLQISQATWDSNGG VGSPAAASPQQIEVADNIMKTQGPWPKCSSCSQGDAPLG SLTHILTFLLAETGGCSGSRDD	3
Rv3478	VVDFGALPPEINSARMYAGPGSASLVAAAKMWDSVASDLFSA ASAFQSVVWGLTVGSWIGSSAGLMAAAASPYVAWMSVTAGQ AQLTAAQVRVAAAAYETAYRLTVPPPVIAENRTEMLTLATN LLGQNTPAIEANQAAYSQMWGQDAEAMYGYAATAATATEAL LPFEDAPLITNPGGLLEQAVAVEEAIDTAAANQLMNNVPQALQ QLAQAQGVVPSSKLGGLWTAVSPHLSPLSNVSSIANNHMSM MGTGVSMTNTLHSMKGLAPAAAQAVETAENGWVWAMSSL GSQLGSSLGSSGLGAGVAANLGRAASVGSLSVPPAWAAANQA VTPAARALPLTSLTSAAQTPAGHMLGGLPLGHSVNAGSGINNA LRVPARAYAIPTPAAG	4
Rv1886	FSRPLPVEYLQVPSPSMGRDIKVQFQSGGNNSPAVYLLDGLR AQDDYNGWDINTPAFEWYYQSGLSIVMPVGGQSSFYSDWYSP ACGKAGCQTYKWETFLTSELPQWLSANRAVKPTGSAAGLSM	5

[0015]

	AGSSAMILAAYHPQQFIYAGSLSALLDPSQGMGPSLIGLAMGD AGGYKAADMWGPSSDPAWERNPTQQIPKLVANNTLWVYC GNGTPNELGGANIPAEFLENFVRSSNLKFQDAYNAAGGHNAV FNFPNGTHSWEYWGQQLNAMKGDLQSSLGAG	
pET29 팩터	HMTINYQFGDVIDAHGAMIRAQAGSLEAEHQAIISDVLASDF WGGAGSAACQGFITQLGRNFQVIYEQANAHGQKVQAAGNNM AQTDSAVGSSWADDIDWDAIAQCESGGNWAANTGNGLYGG QISQATWDSNGGVGSPAAASPOQQIEVADNIMKTQGGPAWPK CSSCSQGDAPLGSLLHILTLAAETGGCSGSRDDVVDGALPPE INSARMYAGPGSASLVAAAKMWDSVASDLFSAASAFQSVVW GLTVGSWIGSSAGLMAAAASPYVAWMSVTAGQAQLTAAQVR VAAAAYETAYRLTVPPPVIENRTEMLTLTATNLLGQNTPAIE ANQAAYSQMWDQDAEAMYGYAATAATATEALLPFEDAPLIT NPGGLLEQAVAVEEAIDTAAANQLMNNVPQALQQLAQPAQG VVPSSKLGGLWTAVSPLSPLSNVSSIANNHMSMMGTGVSM NTLHSMKGLAPAAAQAVETAENGWVWAMSSLSQLGSSLG SSGLGAGVAANLGRAASVGSLSVPPAWAAANQAVTPAARAL PLTSLTSAQTAPGHMLGGLPLGHSVNAGSGINNLRVPARA YAIPTPAAGFSRPLPEYLQVPSPSMGRDIKVQFQSGGNNSP AVYLLDGLRAQDDYNGWDINTPAFEWYYQSGLSIVMPVGGQ SSFYSDWYSPACGKAGCQTYKWETFLTSELQWLSANRAVKP TGSAIAGLSMAGSSAMILAAYHPQQFIYAGSLSALLDPSQGMG PSLIGLAMGDAGGYKAADMWGPSSDPAWERNPTQQIPKLV ANNTLWVYCGNGTPNELGGANIPAEFLENFVRSSNLKFQDA YNAAGGHNAVFNFPNGTHSWEYWGQQLNAMKGDLQSSLG AGKL	6
ID91	ACCATCAACTATCAATTCCGGGGACGTCGACGCTACGGCGC CATGATCCCGCTCAGGCCGGGTGCTGGAGGCCGAGCATC AGGCCATCATTCTGATGTGTTGACCGCAGTGACTTTTGGG GCGGCGCCGGTTCGGCGGCTGCCAGGGTTCATTACCCAG CTGGGCCGTAACTCCAGGTGATCTACGAGCAGGCCAACGC CCACGGGCGAGAAGGTGCAGGCTGCCGGCAACAACATGGCA CAAACCGACAGCGCCGTCGGCTCCAGCTGGGCCGACGACAT CGATTGGGACGCCATCGCGCAATGCGAATCCGGCGGCAATT GGGCGGCCAACACCGGTAACGGGTATACGGTGGTCTGCAG ATCAGCCAGGCGACGTGGGATTCCAACGGTGGTGTGGGTC GCCGGCGGCCGCGAGTCCCCAGCAACAGATCGAGGTCCGA GACAACATTATGAAAACCCAGGCCCGGGTGCCTGGCCGA AATGTAGTTCTGTAGTCAGGGAGACGACCGCTGGGCTCG CTCACCCACATCTGACGTTCCTCGCGGCCGAGACTGGAGG TTGTTGGGGAGCAGGGACGATGTGGTGGATTTCGGGGCGT TACCACCGGAGATCAACTCCGCGAGGATGTACGCCGGCCCG GGTTCGGCCTCGCTGGTGGCCGCGCGAAGATGTGGGACAG CGTGGCGAGTGACCTGTTTTCGGCCGCGTCGGCGTTTCAGTC GGTGGTCTGGGGTCTGACGGTGGGGTCTGGATAGGTTCTGT CGGCGGGTCTGATGGCGGCGCGGCTCGCCGTATGTGGCG TGGATGAGCGTCACCGCGGGGCAGGCCAGCTGACCGCCGC CCAGGTCCGGGTTGCTGCGGCGGCTACGAGACAGCGTATA GGCTGACGGTGCCCCCGCGGTGATCGCCGAGAACCGTACC GAACTGATGACGCTGACCGCGACCAACCTCTTGGGGCAAAA CACGCCGGCGATCGAGGCCAATCAGGCCGATACAGCCAG ATGTGGGGCCAAGACGCGGAGGCGATGTATGGCTACGCCG	7

[0016]

	CCACGGCGGCGACGGCGACCGAGGCGTTGCTGCCGTTTCGAG GACGCCCCACTGATACCAACCCCGGCGGGCTCCTTGAGCA GGCCGTCGCGGTTCGAGGAGGCCATCGACACCGCCGCGGCG AACCAAGTTGATGAACAATGTGCCCCAAGCGCTGCAACAGCT GGCCAGCCAGCGCAGGGCGTCGTACCTTCTTCCAAGCTGG GTGGGCTGTGGACGGCGGTCTCGCCGCATCTGTCCGCGCTC AGCAACGTCAGTTTCGATAGCCAACAACCATGTTCGATGAT GGGCACGGGTGTGTTCGATGACCAACACCTTGCACTCGATGT TGAAGGGCTTAGCTCCGGCGGCGGCTCAGGCCGTGAAACC GCGGCGGAAAACGGGGTCTGGGCGATGAGCTCGCTGGGCA GCCAGCTGGGTTCGTTCGCTGGGTTCCTCGGGTCTGGGCGCT GGGGTGGCCGCCAACTTGGGTCTGGGCGGCTCGGTTCGTTT GTTGTGGTGGCGCCAGCATGGGCGCGGCCAACAGGCGG TCACCCCGGCGGCGCGGGCGCTGCCGCTGACCAGCCTGACC AGCGCCGCCAAACCGCCCCGACACATGCTGGGCGGGCT ACCGCTGGGCGACTCGGTCAACGCCGCGCAGCGGTATCAACA ATCGCTGCGGGTGCCGGCACGGGCTACGCGATACCCGCG ACACCGGCCCGCGATTCTCCCGCGGGGCTGCCGGTCTGA GTACCTGCAGGTGCCGTGCCGTCGATGGGCGCGACATCA AGGTTCAAGTTCCAGAGCGGTGGGAACAACACCTGCGGTT TATCTGCTCGACGGCTGCGCGCCCAAGACGACTACAACGG CTGGGATATCAACACCCCGCGGTCGAGTGGTACTACAGT CGGGACTGTGATAGTATGCGCGGTGCGGCGGCGAGTCCAGC TTCTACAGCGACTGGTACAGCCCGGCTGCGGTAAGGCTGG CTGCCAGACTTACAAGTGGGAAACCTTCCTGACCAGCGAGC TGCCGCAATGGTTGTCCGCAACAGGGCCGTGAAGCCACC GGCAGCGCTGCAATCGGCTTGTTCGATGGCCGGCTCGTCGGC AATGATCTTGGCCGCTACACCCCGCAGCAGTTCATCTACG CCGGCTCGCTGTCCGGCCCTGCTGGACCCCTCTCAGGGGATG GGGCTAGCTGATCGGCTCGCGATGGGTGACGCCGCGCG TTACAAGGCCGACAGATGTGGGGTCCCTCGAGTGACCCGG CATGGGAGCGCAACGACCCCTACGCGAGCAGATCCCCAAGCTG GTCGCAAAACAACACCCGGCTATGGGTTATTGCGGGAACGG CACCCCGAACGAGTTGGGCGGTGCCAACATACCCGCCGAGT TCTTGAGAACTTCGTTCTGAGCAGCAACCTGAAGTTCCAG GATGCGTACAACGCCGCGGGCGGGCACAAACGCCGTGTTCAA CTTCCCGCCCAACGGCACGCACAGCTGGGAGTACTGGGGCG CTCAGCTCAACGCCATGAAGGGTGACCTGCAGAGTTTCGTTA GGCGCCGGCtgaagctt	
Rv3619	ACCATCAACTATCAATTCGGGGACGTCGACGCTCACGGCGC CATGATCCGCGCTCAGGCCGGGTGCTGGAGGCCGAGCATC AGGCCATCATTTCTGATGTGTTGACCGCGAGTGACTTTTGGG GCGGCGCCGTTTCGGCGGCTGCCAGGGGTTCAATACCCAG CTGGGCCGTAACCTCCAGGTGATCTACGAGCAGGCCAACGC CCACGGGCAGAAGGTGCAGGCTGCCGGCAACAACATGGCA CAAACCGACAGCGCCGTCGGCTCCAGCTGGGCC	8
Rv2389	GACGACATCGATTGGGACGCCATCGCGCAATGCGAATCCGG CGGCAATTGGGCGGCCAACACCGGTAACGGGTATACGGTG GTCTGCAGATCAGCCAGGCGACGTGGGATTCCAACGGTGGT GTCGGGTGCGCCGGCGGCGGAGTCCCCAGCAACAGATCGA GGTGCAGACAACATTATGAAAACCAAGGCCCGGGTGCGT GGCCGAAATGTAGTTCTTGTAGTCAGGGAGACGCACCGCTG	9

[0017]

	GGCTCGCTACCCACATCCTGACGTTCTCGCGGCCGAGAC TGGAGGTTGTTCCGGGAGCAGGGACGAT	
Rv3478	GTGGTGGATTTCCGGGCGTTACCACCGAGATCAACTCCGC GAGGATGTACGCCGGCCCGGGTTCGGCCTCGCTGGTGGCCG CCGCGAAGATGTGGGACAGCGTGGCGAGTGACCTGTTTTCG GCCGCTCGGCGTTTCAGTCGGTGGTCTGGGGTCTGACGGT GGGGTCTGGATAGGTTCGTCGGCGGGTCTGATGGCGGCGG CGGCCTCGCCGTATGTGGCGTGGATGAGCGTCACCGCGGGG CAGGCCAGCTGACCGCGGCCAGGTCCGGGTGCTGCGGC GGCCTACGAGACAGCGTATAGGCTGACGGTGCCCCGCGCG TGATCGCCGAGAACCGTACCGAACTGATGACGCTGACCGCG ACCAACCTCTTGGGGCAAAACACGCCGGCGATCGAGGCCA ATCAGGCCGCATACAGCCAGATGTGGGGCCAAGACGCGGA GGCGATGTATGGCTACGCCGCCACGGCGCGACGGCGACC GAGGCGTTGCTGCCGTTTCAGGACGCCCCACTGATCAACAA CCCCGGCGGGCTCCTTGAGCAGGCCGTGCGGGTCGAGGAGG CCATCGACACCGCCGCGGCGAACAGTTGATGAACAATGTG CCCCAAGCGCTGCAACAGCTGGCCAGCCAGCGCAGGGCGT CGTACCTTCTTCCAAGCTGGGTGGGCTGTGGACGGCGGTCT CGCCGCATCTGTCGCCGCTCAGCAACGTCAGTTCGATAGCC AACAACCATATGTCGATGATGGGCACGGGTGTGTCGATGAC CAACACCTTGCACTCGATGTTGAAGGGCTTAGTCCGGCGG CGGCTCAGGCCGTGGAACCGCGCGGAAAAACGGGGTCTG GGCGATGAGCTCGCTGGGCAGCCAGCTGGGTTCTGTCGCTGG GTTCTTCGGGTCTGGGCGCTGGGGTGGCCGCCAACTTGGGT CGGGCGGCTCGGTCGGTTCTGTTGTCGGTGCCGCCAGCATG GGCCGCGGCCAACAGGCGGTACCCCGCGCGCGCGGGCG CTGCCGCTGACCAAGCTGACCAAGCGCCGCCAAACGCCCC CGGACACATGCTGGGCGGGTACCCTGCGGCACTCGGTCA ACGCGGCGAGCGGTATCAACAATGCGCTGCGGGTGCCGGCA CGGGCCTACGCGATACCCCGCACACCGCGCGCCGGA	10
Rv1886	TTCTCCCGGCCGGGGCTGCCGGTCGAGTACCTGCAGGTGCC GTCGCCGTCGATGGGCCGCGACATCAAGGTTCAAGTCCAGA GCGGTGGGAACAACCTACCTGCGGTTTATCTGCTCGACGGC CTGCGCGCCCAAGACGACTACAACGGCTGGGATATCAACAC CCCGGCGTTTCAGTGGTACTACAGTCGGGACTGTCGATAG TCATGCCGGTTCGGCGGGCAGTCCAGCTTCTACAGCGACTGG TACAGCCCGGCTGCGGTAAGGCTGGCTGCCAGACTTACAA GTGGGAAACCTTCTGACCAAGCGAGCTGCCGCAATGGTTGT CCGCCAACAGGGCCGTGAAGCCACCGGCAGCGCTGCAATC GGCTTGTGATGGCCGGCTCGTCGGCAATGATCTTGGCCGC CTACACCCCCAGCAGTTCTATACGCCGGCTCGCTGTCGG CCCTGCTGGACCCCTCTCAGGGGATGGGGCTAGCCTGATC GGCCTCGCGATGGGTGACGCCGGCGTTACAAGGCCGAG ACATGTGGGGTCCCTCGAGTGACCCGGCATGGGAGCGCAAC GACCCTACGACGAGATCCCCAAGCTGGTCGCAACAACAC CCGGCTATGGGTTTATTGCGGGAACGGCACCCCGAACGAGT TGGGCGGTGCCAACATACCCGCCGAGTTCTTGGAGAACTTC GTTCTGAGCAGCAACCTGAAGTTCCAGGATGCGTACAACGC CGCGGGCGGGCACAACGCCGTGTTCAACTTCCCGCCCAACG GCACGCACAGCTGGGAGTACTGGGGCGCTCAGCTCAACGCC ATGAAGGGTGACCTGCAGAGTTCGTTAGGCGCCGGC	11

[0018]

pET29 벡터	catatgACCATCAACTATCAATTCTGGGGACGTCGACGCTCAG GCGCCATGATCCGCGCTCAGGCCGGGTCGCTGGAGGCCGAG CATCAGGCCATCATTTCTGATGTGTTGACCGCGAGTGACTTT TGGGGCGGCGCGGTTCTGGCGGCTGCCAGGGGTTCAATTAC CCAGCTGGGCGCTAACTTCCAGGTGATCTACGAGCAGGCCA ACGCCCACGGGCAGAAAGGTGCAGGCTGCCGGCAACAACAT GGCACAAACCGACAGCGCCGTCGGCTCCAGCTGGGCGGAC GACATCGATTGGGACGCCATCGCGCAATGCGAATCCGGCGG CAATTGGGCGGCCAACACCGGTAACGGGTTATACGGTGGTC TGCAGATCAGCCAGGCGACGTGGGATTCCAACGGTGGTGTC GGGTCTGCCGGCGGCGGAGTCCCCAGCAACAGATCGAGG TCGCAGACAACATTATGAAAACCCAAGGCCGGGTGCGTGG CCGAAATGTAGTTCTTGTAGTCAGGGAGACGCACCGCTGGG CTCGCTCACCCACATCCTGACGTTCTCGCGGCGGAGACTG GAGGTTGTTCTGGGGAGCAGGGACGATGTGGTGATTCTGGG GCGTTACACCGGAGATCAACTCCGCGAGGATGTACGCCGG CCCGGGTTCGGCCTCGCTGGTGGCCGCCGCGAAGATGTGGG ACAGCGTGGCGAGTGACCTGTTTTCTGGCCGCGTCGGCGTTT CAGTCGGTGGTCTGGGGTCTGACGGTGGGGTCGTGGATAGG TTCGTCGGCGGGTCTGATGGCGGCGGCGGCTCGCCGTATG TGGCGTGGATGAGCGTCAACGCGGGGCGAGGCCAGCTGACC GCCGCCAGGTCCGGGTTGCTGCGGCGGCTACGAGACAGC GTATAGGCTGACGGTGCCCCGCCGGTGATCGCCGAGAACC GTACCGAACTGATGACGCTGACCGCGACCAACCTCTGGGG CAAAACACGCCGCGGATCGAGGCCAATCAGGCCGCATACA GCCAGATGTGGGGCCAAGACGCGGAGGCGATGTATGGCTA CGCCGCCACGGCGGCGACGGCGACCGAGGCGTTGCTGCCGT TCGAGGACGCCCCACTGATACCAACCCCGGCGGGCTCCTT GAGCAGGCCGTCGCGGTGAGGAGGCCATCGACACCGCCG CGGCGAACCCAGTTGATGAACAATGTGCCCCAAGCGCTGCAA CAGCTGGCCAGCCAGCGCAGGCGCTCGTACCTTCTTCCAA GCTGGGTGGGCTGTGGACGGCGGTCTCGCCGCATCTGTGCG CGCTCAGCAACGTCAGTTCGATAGCCAACAACCATGTGCG ATGATGGGCACGGGTGTGTCGATGACCAACACCTTGCACTC GATGTTGAAGGGCTTAGTCCGGCGGCGGCTCAGGCCGTGG AAACCGCGCGGAAAACGGGGTCTGGGCGATGAGCTCGCT GGGCAGCCAGCTGGGTTCGTCGCTGGGTCTTCGGGTCTGG GCGCTGGGTGGCCGCCAACTGGGTGCGGCGGCTCGGTG GGTTCGTTGTGGTGCCGCCAGCATGGGCCGCGGCCAACCA GGCGGTACCCCGGCGGCGCGGGCGCTGCGCTGACCAAGCC TGACCAGCGCCGCCAAACCGCCCCGGACACATGCTGGGC GGGCTACCGCTGGGGCACTCGGTCAACGCCGGCAGCGGTAT CAACAATGCGCTGCGGGTGCCGGCACGGGCTACGCGATAC CCGCGACACCGGCCGCGGATTCTCCCGGCCGGGCTGCCG GTCGAGTACCTGCAGGTGCCGTGCGCTCGATGGGCCGCGA CATCAAGGTTCAAGTCCAGAGCGGTGGGAACAACCTACCTG CGGTTTATCTGCTCGACGGCTGCGCGCCCAAGACGACTAC AACGGCTGGGATATCAACACCCCGGCGTTGAGTGGTACTA CCAGTCGGGACTGTCGATAGTCATGCCGTCGGCGGGCAGT CCAGCTTCTACAGCGACTGGTACAGCCGGCTGCGGTAAG GCTGGCTGCCAGACTTACAAGTGGGAAACCTTCTGACCAG CGAGCTGCCGCAATGGTTGTCCGCCAACAGGGCCGTGAAGC	12
-------------	--	----

[0019]

	CCACCGGCAGCGCTGCAATCGGCTTGTCGATGGCCGGCTCG TCGGCAATGATCTTGCCCGCTACCACCCAGCAGTTCAT CTACGCCGGCTCGCTGTCGGCCCTGCTGGACCCCTCTCAGG GGATGGGGCCTAGCCTGATCGGCCTCGCGATGGGTGACGCC GGCGGTTACAAGGCCGACAGACATGTGGGGTCCCTCGAGTGA CCCGCATGGGAGCGCAACGACCCTACGCAGCAGATCCCCA AGCTGGTCGCAAAACAACCCGGCTATGGGTTTATTGCGGG AACGGCACCCCGAACGAGTTGGGCGGTGCCAACATACCCGC CGAGTTCTTGAGAACTTCGTTTCGTAGCAGCAACCTGAAGT TCCAGGATGCGTACAACGCCGCGGGCGGGCACAACGCCGT GTTCAACTTCCCGCCCAACGGCACGCACAGCTGGGAGTACT GGGGCGCTCAGCTCAACGCCATGAAGGGTGACCTGCAGAGT TCGTTAGGCGCCGGCtgaagctt	
JEVss-FWD	gctggcctccctggctgtgtgctattgcctgcctggagcaGCCGAGGTGACCAGGA GAGG	13
JEVss-REV	caatgattgatccggcactcctctgcccattggcgccggcGTGAGCTGGCGGCGG GTG	14
ZIKVss- FWD	ggaatcgtgggcctgctgctgaccacagcaatggcaGCCGAGGTGACCAGGAGA GG	15
ZIKVss- REV	CACGGATGTGTCTGCTCCTCTCCGCATGGCGGCGGGCTGAG CTGGCGGCGGGTG	16
ZIKV-prM- E-FWD	AATGGACTACGACATAGTCGCCGCCGCCATG	17
ZIKV-prM- E-REV	GCGGTTTTTGACAccgcggTCAGGCAGACACGGCG	18
Id91 에 피 토 프 1	HMTINYQFGDVDAHG	19
Id91 에 피 토 프 2	FGDVDAHGAMIRAQA	20
Id91 에 피 토 프 3	GAMIRAQAGSLEAEH	21
Id91 에 피 토 프 4	AGSLEAEHQAIISDV	22
Id91 에 피 토 프 5	HQAIISDVLTAADFV	23
Id91 에 피 토 프 6	VLTAADFVGGAGSAA	24
Id91 에 피 토 프 7	WGGAGSAACQGFITQ	25
Id91 에 피 토 프 8	ACQGFITQLGRNFQV	26
Id91 에 피 토 프 9	QLGRNFQVIYEQANA	27
Id91 에 피 토 프 10	VIYEQANAHGQKVQA	28
Id91 에 피 토 프 11	AHGQKVQAAGNNMAQ	29
Id91 에 피 토 프 12	AAGNNMAQTDSAVGS	30

[0020]

Id91 에 피 토 프 13	QTDSAVGSSWADDID	31
Id91 에 피 토 프 14	SSWADDIDWDAIAQC	32
Id91 에 피 토 프 15	DWDAIAQCESGGNWA	33
Id91 에 피 토 프 16	CESGGNWAANTGNGL	34
Id91 에 피 토 프 17	AANTGNGLYGGLQIS	35
Id91 에 피 토 프 18	LYGGLQISQATWDSN	36
Id91 에 피 토 프 19	SQATWDSNGGVGSPA	37
Id91 에 피 토 프 20	NGGVGSPAAASPQQQ	38
Id91 에 피 토 프 21	AAASPQQQIEVADNI	39
Id91 에 피 토 프 22	QIEVADNIMKTQGPG	40
Id91 에 피 토 프 23	IMKTQGPQAWPKCSS	41
Id91 에 피 토 프 24	GAWPKCSSCSQGDAP	42
Id91 에 피 토 프 25	SCSQGDAPLGSLTHI	43
Id91 에 피 토 프 26	PLGSLTHILTFLAAE	44
Id91 에 피 토 프 27	ILTFLAAETGGCSGS	45
Id91 에 피 토 프 28	ETGGCSGSRDDVVDF	46
Id91 에 피 토 프 29	SRDDVVDFGALPPEI	47
Id91 에 피 토 프 30	FGALPPEINSARMYA	48
Id91 에 피 토 프 31	INSARMYAGPGSASL	49
Id91 에 피 토 프 32	AGPGSASLVAAAKMW	50
Id91 에 피 토 프 33	LVAAAKMWDSVASDL	51
Id91 에 피 토 프 34	WDSVASDLFSAASAF	52
Id91 에 피 토 프 35	LFSAAAFQSVVWGL	53
Id91 에 피 토 프 36	FQSVVWGLTVGSWIG	54
Id91 에 피 토 프 37	LTVGSWIGSSAGLMA	55

[0021]

Id91 에피토프 38	GSSAGLMAAAASPYV	56
Id91 에피토프 39	AAAASPYVAWMSVTA	57
Id91 에피토프 40	VAWMSVTAGQAQLTA	58
Id91 에피토프 41	AGQAQLTAAQVRVAA	59
Id91 에피토프 42	AAQVRVAAAAYETAY	60
Id91 에피토프 43	AAAYETAYRLTVPPP	61
Id91 에피토프 44	YRLTVPPPVIAENRT	62
Id91 에피토프 45	PVIAENRTELMTLTA	63
Id91 에피토프 46	TELMTLTATNLLGQN	64
Id91 에피토프 47	ATNLLGQNTPAIEAN	65
Id91 에피토프 48	NTPAIEANQAAYSQM	66
Id91 에피토프 49	NQAAYSQMWGQDAEA	67
Id91 에피토프 50	MWGQDAEAMYGYAAT	68
Id91 에피토프 51	AMYGYAATAATATEA	69
Id91 에피토프 52	TAATATEALLPFEDA	70
Id91 에피토프 53	ALLPFEDAPLITNPG	71
Id91 에피토프 54	APLITNPGGLLEQAV	72
Id91 에피토프 55	GGLLEQAVAVEEAID	73
Id91 에피토프 56	VAVEEAIDTAAANQL	74
Id91 에피토프 57	DTAAANQLMNNVPQA	75
Id91 에피토프 58	LMNNVPQALQQLAQP	76
Id91 에피토프 59	ALQQLAQPAQGVVPS	77
Id91 에피토프 60	PAQGVVPSSKLGLW	78
Id91 에피토프 61	SSKLGLWTAVSPHL	79
Id91 에피토프 62	WTAVSPHLSPLSNVS	80

[0022]

Id91 에피토프 63	LSPLSNVSSIANNHM	81
Id91 에피토프 64	SSIANNHMSMMGTGV	82
Id91 에피토프 65	MSMMGTGVSMNTLH	83
Id91 에피토프 66	VSMTNTLHSMKGLA	84
Id91 에피토프 67	HSMLKGLAPAAQAVE	85
Id91 에피토프 68	PAAQAVETAENG	86
Id91 에피토프 69	ETAENGWAMSSLG	87
Id91 에피토프 70	WAMSSLSQLGSSL	88
Id91 에피토프 71	GSQLGSSLGSSGLA	89
Id91 에피토프 72	LGSSGLGAGVAANL	90
Id91 에피토프 73	AGVAANLGRAASVGS	91
Id91 에피토프 74	GRAASVGSLSVPPAW	92
Id91 에피토프 75	LSVPPAWAAANQAV	93
Id91 에피토프 76	WAAANQAVTPAARAL	94
Id91 에피토프 77	VTAAARALPLTSLTS	95
Id91 에피토프 78	LPLTSLTAAQTAPG	96
Id91 에피토프 79	SAAQTAPGHMLGGLP	97
Id91 에피토프 80	GHMLGGLPLGHSVNA	98
Id91 에피토프 81	PLGHSVNAGSGINNA	99
Id91 에피토프 82	AGSGINNALRVPARA	100
Id91 에피토프 83	ALRVPARAYAIPRTP	101
Id91 에피토프 84	AYAIPRTPAAGFSRP	102
Id91 에피토프 85	PAAGFSRPGLPVEYL	103
Id91 에피토프 86	PGLPVEYLQVPSPSM	104
Id91 에피토프 87	LQVPSPSMGRDIKVQ	105

[0023]

Id91 에피토프 88	MGRDIKVQFQSGGNN	106
Id91 에피토프 89	QFQSGGNNSPAVYLL	107
Id91 에피토프 90	NSPAVYLLDGLRAQD	108
Id91 에피토프 91	LDGLRAQDDYNGWDI	109
Id91 에피토프 92	DDYNGWDINTPAFEW	110
Id91 에피토프 93	INTPAFEWYYQSGLS	111
Id91 에피토프 94	WYYQSGLSIVMPVGG	112
Id91 에피토프 95	SIVMPVGGQSSFYSD	113
Id91 에피토프 96	GQSSFYSDWYSPACG	114
Id91 에피토프 97	DWYSPACGKAGCQTY	115
Id91 에피토프 98	GKAGCQTYKWETFLT	116
Id91 에피토프 99	YKWETFLTSELPQWL	117
Id91 에피토프 100	TSELPQWLSANRAVK	118
Id91 에피토프 101	LSANRAVKPTGSAAI	119
Id91 에피토프 102	KPTGSAAIGLSMAGS	110
Id91 에피토프 103	IGLSMAGSSAMILAA	111
Id91 에피토프 104	SSAMILAAYHPQQFI	112
Id91 에피토프 105	AYHPQQFIYAGSLSA	113
Id91 에피토프 106	IYAGSLSALLDPSQG	114
Id91 에피토프 107	ALLDPSQGMGPSLIG	115
Id91 에피토프 108	GMGPSLIGLAMGDAG	116
Id91 에피토프 109	GLAMGDAGGYKAADM	117
Id91 에피토프 110	GGYKAADMWGPSSDP	118
Id91 에피토프 111	MWGPSSDPAWERNDP	119
Id91 에피토프 112	PAWERNDPTQQIPKL	120

[0024]

Id91 에피토프 113	PTQQIPKLVANNTL	121
Id91 에피토프 114	LVANNTLWVYCGNG	122
Id91 에피토프 115	LWVYCGNGTPNELGG	123
Id91 에피토프 116	GTPNELGGANIPAEF	124
Id91 에피토프 117	GANIPAEFLENFVRS	125
Id91 에피토프 118	FLENFVRSSNLKFQD	126
Id91 에피토프 119	SSNLKFQDAYNAAGG	127
Id91 에피토프 120	DAYNAAGGHNAVFNF	128
Id91 에피토프 121	GHNAVFNFPPNGTHS	129
Id91 에피토프 122	FPPNGTHSWEYWGAQ	130
Id91 에피토프 123	SWEYWGAQLNAMKGD	131
Id91 에피토프 124	QLNAMKGDLQSSLGA	132
Id91 에피토프 125	AMKGDQLQSSLGAGKL	133

[0025]

[0026]

[0027]

설명

생물활성제를 세포에 전달하기 위한 조성물 및 이러한 전달 방법이 본 명세서에서 제공된다. NLC는 액체상 지질과 고체상 지질의 조합을 포함하는 코어를 갖는다. 완전히 고체 결정성 코어를 갖는 고체 지질 나노입자(lipid nanoparticle: LNP)와 대조적으로, NLC 내 혼합상 코어는 각종 구조의 활성 분자를 혼입시키는 더욱 융통성을 제공한다. 이론에 의해 얽매이길 원치 않지만, 조성물에 고체 지질의 첨가는 구조 통합성과 안정성을 지니는 NLC 코어를 생성하는 것으로 여겨진다. 본 발명의 NLC에 있어서, 혼합상 오일 코어는 계면활성제(전형적으로 솔비탄 에스테르와 친수성 계면활성제)와 양이온성 성분(전형적으로 양이온성 지질 또는 인지질)의 혼합물로 유화된다. 전형적으로, 생물활성제, 예컨대, 소분자 약물이 NLC의 오일 코어에 편입되었지만, 본 발명자들은 표면 표면에서 또는 그 부근에서 생물활성제, 예컨대, 음으로 하전된 분자(예컨대, RNA)와 상호작용할 수 있는 NLC를 합성하였다(즉, 생물활성제는 NLC에 의해 캡슐화되지 않는다). 본 발명자들은, NLC의 안정성, 세포에 핵산을 전달하는 기재된 NLC의 능력, 및 개별적으로 제조되고 저장되고 사용 직전에 혼합되는 핵산 생물활성제 및 NLC의 능력이 다수의 예방 또는 치료적 치료의 개발을 위하여 신속한 반응 핵산 플랫폼 기술로서 포함하는 각종 용도에서 이들 NLC의 사용을 허용하는 것을 발견하였다. 신속한 반응 핵산 전달 플랫폼은, NLC 조성물을 이용하는 유연한 시스템에 기반해서 핵산(예컨대, 복제 바이러스 RNA(rvRNA))을 전달하여 RNA 복제 및/또는 단백질 발현을 촉진시킨다(예컨대, 바이러스, 박테리아 또는 기생충 항원에 강인하고 신속한 면역 반응을 초래한다). 본 발명의 NLC 조성물은 연장된 시간 기간 동안 제작되고 비축될 수 있다. 이어서, 비축된 비히클은 최근 생겨난 질환 발병 또는 기타 공중 위생 이벤트 동안 핵산(예컨대, 보호 항원을 발현하는 합성 rvRNA)과 조합될 수 있다.

[0028]

생물활성제와의 조합을 위하여 NLC를 제공하는 것에 부가해서, 또한 일단 조합되면 이들 NLC가 제공된다. 따라서, 몇몇 양상에 있어서, 생물활성제는 NLC와 회합된다. 생물활성제는 NLC-생물활성제 조성물의 투여에 의해서 필요할 때 대상체에게 전달될 수 있다.

[0029]

I. 정의

[0030]

이하의 용어는, 달리 표시되지 않는 한, 이하의 의미를 갖는다. 임의의 정의되지 않은 용어는 당분야에서 인정된 의미를 갖는다.

[0031]

본 설명에 있어서, 용어 "약" 및 "본질적으로 ..로 이루어진"은, 달리 표시되지 않는 한, 표시된 범위, 값 또는 구조의 $\pm 20\%$ 를 의미한다.

[0032]

대안(예컨대, "또는")의 사용은 대안 중 하나, 둘 다 또는 이들의 임의의 조합을 의미하는 것으로 이해되어야 한다.

[0033]

본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "포함한다"(include), "갖는다" 및 "포함한다"(comprise)는 동의어로 사용되고, 이 용어 및 이의 변형은 비제한적으로 해석되는 것으로 의도된다.

- [0034] 본 명세서에 사용되는 바와 같이 그리고 첨부된 청구범위에 있어서, 단수 형태는, 문맥이 달리 명확하게 나타내지 않는 한, 복수의 지시 대상을 포함한다.
- [0035] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 "거대분자"는 생물학적 또는 합성 기원의 펩타이드, 단백질, 올리고뉴클레오타이드 및 폴리뉴클레오타이드로 예시되지만 이들로 제한되지 않는 대형 분자를 지칭한다.
- [0036] 용어 "알킬"은 표시된 수의 탄소 원자를 함유하는 직쇄 또는 분지쇄, 비환식 또는 환식, 불포화 또는 포화 지방족 탄화수소를 의미한다. 불포화 알킬은 인접한 탄소 원자간의 적어도 하나의 이중 또는 삼중 결합을 함유한다.
- [0037] 용어 "폴리펩타이드", "펩타이드" 및 "단백질"은 임의의 길이의 아미노산의 중합체를 지칭하기 위하여 본 명세서에서 호환 가능하게 이용된다. 중합체는 선형 또는 분지형일 수 있고, 이는 변형된 뉴클레오타이드 또는 아미노산을 포함할 수 있으며, 비-뉴클레오타이드 또는 비-아미노산에 의해 중단될 수 있다. 이 용어는 또한 자연적으로 또는 개입; 예를 들어, 예를 들어, 다이설파이드 결합 형성, 글리코실화, 지질화, 아세틸화, 포스포릴화, 또는 임의의 다른 조작 또는 변형, 예컨대, 표지화 성분과의 접합에 의해 변형된 뉴클레오타이드 또는 아미노산 중합체를 포함한다. 또한 이 정의 내에, 예를 들어, 뉴클레오타이드 또는 아미노산(예를 들어, 비천연 아미노산 등을 포함)의 하나 이상의 유사체뿐만 아니라 당업계에 공지된 기타 변형을 함유하는 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드가 포함된다.
- [0038] 용어 "단리된"은 분자가 그의 천연 환경으로부터 제거된 것을 의미한다.
- [0039] "정제된"은 실험실 조건하에 초기에 합성 및/또는 증폭된 경우 및/또는 그의 천연 환경에 존재하는 것보다 더 순수한 형태로 존재하도록, 분자가 순도가 증가된 것을 의미한다. 순도는 상대적인 용어이고, 반드시 절대 순도를 의미하는 것은 아니다.
- [0040] 본 명세서에서 호환 가능하게 사용되는 바와 같은 "폴리뉴클레오타이드" 또는 "핵산"은, 임의의 길이의 뉴클레오타이드의 중합체를 지칭하고 DNA 및 RNA를 포함한다. 뉴클레오타이드는, 예를 들어, 데옥시리보뉴클레오타이드, 리보뉴클레오타이드, 변형된 뉴클레오타이드 또는 염기 및/또는 이들의 유사체, 또는 중합효소에 의해, 또는 합성 반응에 의해 DNA 또는 RNA에 혼입될 수 있는 임의의 기질을 포함한다. 폴리뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드, 예컨대, 메틸화된 뉴클레오타이드 및 이들의 유사체를 포함할 수 있다. 존재할 경우, 뉴클레오타이드 구조에 대한 변형은 중합체의 어셈블리 전후에 부여될 수 있다.
- [0041] "올리고뉴클레오타이드는," 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 일반적으로 짧은, 일반적으로 단일 가닥의, 일반적으로 적었지만, 반드시 약 200개 미만의 뉴클레오타이드 길이가 아닌 합성 폴리뉴클레오타이드를 지칭한다. 용어 "올리고뉴클레오타이드" 및 "폴리뉴클레오타이드"는 상호 배제되지 않는다. 폴리뉴클레오타이드에 대한 이상의 기재는 올리고뉴클레오타이드에 동등하고도 완전하게 적용 가능하다.
- [0042] "개체" 또는 "대상체"는 임의의 포유류이다. 포유류는 인간, 영장류, 농장 동물, 스포츠 동물, 애완동물(예컨대, 고양이, 개, 말), 및 설치류를 포함하지만, 이들로 제한되는 것은 아니다.
- [0043] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "레플리콘"은, 임의의 유전자 요소, 예를 들어, 그 자체의 통제하에 크게 복제 가능한 플라스미드, 코스미드, 백미드(bacmid), 파지 또는 바이러스를 포함한다. 레플리콘은 RNA 또는 DNA 중 어느 한 쪽일 수 있고 단일 또는 이중 가닥일 수 있다.
- [0044] 비타민 E는 토크페롤(TCP) 및 토크트라이에놀 둘 다를 지칭하고 천연형 또는 합성일 수 있다.
- [0045] 모노아실글리세롤은, 하이드록실기 중 하나가 장쇄 지방산으로 에스터화되는 3가 알코올 글리세롤의 에스터이다.
- [0046] 라우로일 폴리옥시글리세라이드는 글리세롤의 모노에스터, 다이에스터 및 트라이에스터, 및 전형적으로 약 300 내지 약 1500의 평균 상대 분자량을 가진 폴리에틸렌 글리콜의 모노에스터 및 다이에스터의 혼합물이다.
- [0047] 카프릭/카프릴릭 트라이글리세라이드는 글리세린과 카프릴산 카프르산의 혼합된 트라이에스터이다.
- [0048] 용어 액체상 지질은, 임의의 다른 성분과 혼합 전에, 주위 온도에서 액체인 지질을 지칭한다.
- [0049] 용어 고체상 지질은, 임의의 다른 성분과 혼합 전에, 주위 온도에서 고체인 지질을 지칭한다.
- [0050] 주위 온도는 15°C 내지 25°C이다.
- [0051] 글리세롤지질은 지방산에 에스터로 결합된 글리세롤로 구성된 지방 분자이다. 글리세롤지질은 트라이글리세라이

드 및 다이글리세라이드를 포함한다.

[0052] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 "솔비탄 에스터"는 솔비탄의 에스터를 지칭한다. 솔비탄은 하기 화학식 A으로 표시된 바와 같다:



[0053]

[0054] 특히 바람직한 솔비탄 에스터는 솔비탄 알킬 에스터이되, 여기서 알킬은 C_1 - C_{30} 알킬기, 바람직하게는 포화 또는 불포화 C_1 - C_{20} 알킬기, 더 바람직하게는 포화 또는 불포화 C_{10} - C_{20} 알킬기이다.

[0055] 본 발명의 실시는, 달리 나타내지 않는 한, 당업계의 기술 내인, 분자 생물학, 재조합 DNA, 생화학 및 화학의 통상의 기술을 이용할 것이다. 이러한 기술은 문헌에 완전히 설명되어 있다. 예컨대, 문헌[Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2nd Ed., Sambrook et al., ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press: (1989); DNA Cloning, Volumes I and II (D. N. Glover ed., 1985); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait ed., 1984); Mullis et al., 미국 특허 제4,683,195호; Nucleic Acid Hybridization (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); B. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning (1984); the treatise, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); 및 Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989)] 참조.

[0056] II. 나노구조 지질 담체

[0057] 본 개시내용은, 특히, 세포에 생물활성제를 전달하기 위한 NLC를 제공한다. NLC 조성물은 (a) 액체상 지질과 고체상 지질을 포함하는 오일 코어, (b) 양이온성 성분 (바람직하게는, 양이온성 지질 또는 인지질) (c) 소수성 계면활성제, 바람직하게는 솔비탄 에스터(예컨대, 솔비탄 모노에스터, 다이에스터, 또는 트라이에스터), 및 (d) 계면활성제(바람직하게는, 친수성 계면활성제)를 포함하는 NLC 입자로 구성된다. 본 발명의 NLC는 전형적으로 수성 상에 분산된 배합된 고체 지질과 액체 지질의 혼합물로 구성된 비구조적 또는 비정질 고체 지질 매트릭스를 포함한다. 계면활성제 중 1종 이상이 오일상에, 수성 상에 또는 오일 상과 수성 상 사이의 계면에 존재할 수 있다. 소정의 양상에 있어서 솔비탄 에스터와 양이온성 지질은 오일과 수성 상 간의 계면에 존재한다.

[0058] 본 발명자들은 청구된 NLC가 단백질-암호화 핵산, 예컨대, RNA를 전달함에 있어서 특히 효과적인 것을 발견하였다. 또한, NLC의 소정의 성분을 조합함으로써, 암호화된 단백질의 발현 수준이 증가될 수 있음을 발견하였다. 놀랍게도, 예시적인 NLC는 RNA를 효과적으로 전달할 수 있을 뿐만 아니라, 암호화된 단백질에 대한 면역 반응을 향상시킬 수도 있다.

[0059] A. 고체-상 및 액체-상 지질

[0060] NLC는 고체 지질과 액체 지질의 배합물로 구성된다. NLC에 이용될 액체 지질과 고체 지질은 비구조적 또는 비정질 고체 지질 매트릭스를 형성하고 안정적인 조성물을 형성할 수 있는 임의의 지질일 수 있다. 고체 대 액체의 중량비는, 예를 들어, 0.1:99.9 내지 99.9:0.1로 광범위하게 다양할 수 있다. 몇몇 예시적인 실시형태에 있어서, 고체 지질은 약 70:30 내지 약 99.9:0.1 또는 약 1:10 내지 약 1:30의 고체:액체 지질 중량비로 액체 지질과 혼합된다. 몇몇 양상에 있어서, 고체 지질은 약 1:16의 고체:액체 지질 중량비로 액체 지질과 혼합된다.

[0061] NLC-기반 조성물 또는 제형의 총 오일 코어 성분(고체 지질 + 액체 오일)은 전형적으로 약 0.2% 내지 약 50% (w/v)의 양으로 존재한다. 예를 들어, NLC는 약 0.2% 내지 약 50% (w/v) 오일 코어 성분, 0.2% 내지 약 40% (w/v) 오일 코어 성분, 약 0.2% 내지 약 30% (w/v) 오일 코어 성분, 약 0.2% 내지 약 20% (w/v) 오일 코어 성분, 약 0.2% 내지 약 15% (w/v) 오일 코어 성분, 약 0.2% 내지 약 10% (w/v) 오일 코어 성분, 약 0.2% 내지 약 9% (w/v) 오일 코어 성분, 약 0.2% 내지 약 8% (w/v) 오일 코어 성분, 약 0.2% 내지 약 7% (w/v) 오일 코어 성분, 약 0.2% 내지 약 6% (w/v) 오일 코어 성분, 약 0.2% 내지 약 5% (w/v) 오일 코어 성분, 약 0.2% 내지 약 4.3% (w/v) 오일 코어 성분, 약 0.3% 내지 약 20% (w/v) 오일 코어 성분, 약 0.4% 내지 약 20% (w/v) 오일 코어 성분, 약 0.5% 내지 약 20% (w/v) 오일 코어 성분, 약 1% 내지 약 20% (w/v) 오일 코어 성분, 약 2% 내지 약 20% (w/v) 오일 코어 성분, 약 3% 내지 약 20% (w/v) 오일 코어 성분, 약 4% 내지 약 20% (w/v) 오일 코어

성분, 약 5% 내지 약 20% (w/v) 오일 코어 성분, 약 0.5% (w/v) 오일 코어 성분, 약 1% (w/v) 오일 코어 성분, 약 1.5% (w/v) 오일 코어 성분, 약 2% (w/v) 오일 코어 성분, 약 2.5% (w/v) 오일 코어 성분, 약 3% (w/v) 오일 코어 성분, 약 3.5% (w/v) 오일 코어 성분, 약 4% (w/v) 오일 코어 성분, 약 4.3% (w/v) 오일 코어 성분, 약 5% (w/v) 오일 코어 성분, 또는 약 10% (w/v) 오일 코어 성분 또는 오일 코어 성분에 대해서 본 명세서에 기재된 임의의 다른 양 또는 범위를 포함할 수 있다. 특히 희석된 또는 농축된 제형을 고려할 경우, 더 높거나 또는 더 낮은 w/v 백분율이 본 명세서에서 상정된다.

[0062] NLC의 오일 코어는 액체상 지질을 포함한다. 바람직하게는, 반드시 필요하지는 않지만, 액체상 지질은 대사 가능한 비독성의 오일이고; 더 바람직하게는 알칸, 알켄, 알킨, 및 이들의 대응하는 산 및 알코올, 이들의 에터 및 에스터, 및 이들의 혼합물을 포함하지만, 이들로 제한되는 것은 아닌 약 6 내지 약 30개의 탄소 원자 중 하나이다. 오일은, 예를 들어, 대상체에게 투여될 수 있는 임의의 식물성 오일, 어유, 동물성 오일 또는 합성 방식으로 제조된 오일일 수 있다. 몇몇 양상에 있어서, 액체상 지질은 비대사 가능할 것이다.

[0063] 오일은, 예를 들어, 임의의 장쇄 알칸, 알켄 또는 알킨, 또는 유리산으로서의 산 또는 알코올 유도체, 이의 염 또는 에스터 예컨대, 모노-, 또는 다이- 또는 트라이에스터, 예컨대, 트라이글리세라이드, 및 1,2-프로판다이올 또는 유사한 폴리-하이드록시 알코올의 에스터일 수 있다. 알코올은 단일- 또는 다-작용성 산, 예를 들어, 아세트산, 프로판산, 시트르산 등을 이용해서 아크릴화될 수 있다. 오일이고 본 명세서에 기재된 기타 기준을 충족시키는 장쇄 알코올로부터 유래된 에터가 또한 사용될 수 있다.

[0064] 개별적인 알칸, 알켄 또는 알킨 모이어티 및 이의 산 또는 알코올 유도체는, 일반적으로 약 6 내지 약 40 또는 6 내지 약 30개의 탄소 원자를 가질 것이다. 모이어티는 직쇄 또는 분지쇄 구조를 가질 수 있다. 이것은 완전 포화될 수 있거나 또는 1개 이상의 이중 또는 삼중 결합을 가질 수 있다. 모노 또는 폴리에스터- 또는 에터계 오일이 이용되는 경우, 약 6 내지 약 40개의 탄소의 제한은 총 탄소 계수치가 아니라 개별적인 지방산 또는 지방 알코올 모이어티에 적용된다.

[0065] 동물, 어류 또는 식물 공급원으로부터의 임의의 적합한 오일이 사용될 수 있다. 식물성 오일용의 공급원은, 견과류, 종자 및 곡물을 포함하고, 적합한 오일은, 예를 들어, 땅콩유, 대두 오일, 코코넛 오일, 및 올리브 오일 등을 포함한다. 기타 적합한 종자 오일은 홍화유, 면실유, 해바라기 종자 오일, 참깨 종자 오일 등을 포함한다. 곡물군에 있어서, 옥수수유, 및 기타 시리얼 곡물의 오일, 예컨대, 밀, 귀리, 호밀, 쌀, 테프(teff), 라이밀 등이 또한 사용될 수 있다. 식물성 오일을 얻기 위한 수법은 잘 개발되어 있고 잘 알려져 있다. 이들 및 기타 유사한 오일의 조성물이, 예를 들어, 머크 인덱스(Merck Index), 식품, 영양 및 식품 기술에 대한 재료의 공급원에서 발견될 수 있다.

[0066] 대부분의 어류는 용이하게 회수될 수 있는 대사 가능한 오일을 함유한다. 예를 들어, 대구 간유, 상어 간유, 고래 기름, 예컨대, 경랍은 본 명세서에서 사용될 수 있는 몇 가지 어유를 예시한다. 다수의 분지쇄 오일은 5-탄소 아이소프렌 단위에서 생화학적으로 합성되고, 일반적으로 테페노이드(terpenoid)라 지칭된다. 아이소프레노이드로도 지칭되는 천연형 또는 합성 테페노이드는, 본 명세서에서 액체상 지질로서 사용될 수 있다. 분지된 불포화 테페노이드인 스쿠알렌이 본 명세서에서 특별히 바람직하다. 스쿠알렌의 주 공급원은 상어 간유이지만, 아마란스 종자, 쌀겨, 밀배아 및 올리브 오일을 포함하는 식물 오일(주로 식물성 오일)이 또한 적합한 공급원이다. 스쿠알렌에 대한 포화 유사체인 스쿠알렌이 또한 바람직하다. 어유, 예컨대, 스쿠알렌 및 스쿠알란(squalane)을 포함하는 오일은 상업적 공급원으로부터 용이하게 입수 가능하거나, 또는 당업계에 공지된 방법에 의해 얻어질 수 있다. 본 명세서에서 사용될 오일(예컨대, 스쿠알렌을 포함하는, 생체공학적 효모로부터 제조된 오일)은 또한 유전자 조작을 포함하는 합성 수단을 이용해서 제조될 수도 있다.

[0067] 본 발명에서 사용될 수 있는 예시적인 액체상 지질은, 예를 들어, 피마자유, 코코넛 오일, 옥수수유, 면실유, 달맞이꽃 오일, 어유, 포도씨유, 호호바 오일, 라드유, 아마인유, 올리브 오일, 땅콩유, 홍화유, 참깨유, 대두 오일, 스쿠알렌, 스쿠알란, 해바라기 오일, 밀배아유, 광유, 카프릭/카프릴릭 트라이글리세라이드(예컨대, Myglyol[®] 810, Myglyol[®] 812, Labrafac[™]), 비타민 E(예컨대, TOS, TPGS), 라우로일 폴리옥시글리세라이드(예컨대, Gelucire[®] 44/14), 모노아실글리세롤(예컨대, Myverol 18-99 K), 대두 레시틴(예컨대, Epikuron[™]200), 파네신(farnesene), 또는 이들의 조합물을 포함한다.

[0068] 액체상 지질은, 예를 들어, 스쿠알렌, 해바라기 오일, 대두 오일, 올리브 오일, 포도씨 오일, 스쿠알란, 카프릭/카프릴릭 트라이글리세라이드, 또는 이들의 조합물을 포함할 수 있다.

[0069] 액체상 지질은, 예를 들어, 스쿠알렌, 스쿠알렌, 카프릭/카프릴릭 트라이글리세라이드, 또는 이들의 조합물을

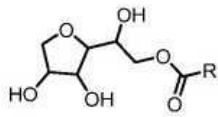
포함할 수 있다.

- [0070] 액체상 지질은, 예를 들어, 카프릭/카프릴릭 트라이글리세라이드, 비타민 E, 라우로일 폴리옥시글리세라이드, 모노아실글리세롤, 대두 레시틴, 스쿠알렌, 또는 스쿠알란 또는 이들의 조합물을 포함할 수 있다.
- [0071] 액체상 지질은, 예를 들어, 스쿠알렌, 스쿠알렌, 또는 파네신 또는 이들의 조합물을 포함할 수 있다.
- [0072] NLC의 오일 코어는 고체상 지질을 포함한다. 예를 들어, 글리세로지질(glycerolipid)을 포함하는 광범위한 고체상 지질이 사용될 수 있다. 예시적인 고체상 지질은, 예를 들어, 글리세릴 팔미토스테아레이트(Precitol ATO[®] 5), 글리세릴모노스테아레이트, 글리세릴 다이베헤네이트(Compritol[®] 888 ATO), 세틸 팔미테이트(Crodamol[™] CP), 스테아르산, 트라이팔미틴, 또는 미세결정성 트라이글리세라이드를 포함한다. 예시적인 미세결정성 트라이글리세라이드는 상표명 Dynasan[®] (예컨대, 트라이미리스틴(Dynasan[®] 114) 또는 트라이스테아린(Dynasan[®] 118) 또는 트라이팔미틴(Dynasan[®] 116)) 하에 판매되는 것들을 포함한다.
- [0073] 고체상 지질은, 예를 들어, 미세결정성 트라이글리세라이드, 예를 들어, 트라이미리스틴(Dynasan[®] 114) 또는 트라이스테아린(Dynasan[®] 118)으로부터 선택된 것일 수 있다.
- [0074] 바람직하게는, 오일 코어의 고체상 지질은 주위 온도에서 고체이다. 실내에 있을 때, 주위 온도는 전형적으로 15℃ 내지 25℃이다.
- [0075] 본 명세서에서 제공된 실시형태들 중 임의의 것에 있어서, 고체상 지질은 글리세로지질, 예를 들어, 미세결정성 트라이글리세라이드일 수 있다.
- [0076] 본 명세서에서 제공된 실시형태들 중 임의의 것에 있어서, 액체상 지질은 합성 또는 천연형 스쿠알렌일 수 있다.
- [0077] B. 양이온성 성분
- [0078] 본 명세서에 기재된 NLC는 양이온성 성분, 전형적으로 양이온성 지질을 포함한다. 양이온성 성분은 NLC 상의 표면 상에 음으로 하전된 생물활성제와 상호작용하는데 유용하다. NLC의 안정성을 교란시키지 않고 대상체에게 투여될 수 있는 음으로 하전된 생물활성제와 상호작용할 수 있는 임의의 양이온성 지질이 사용될 수 있다. 일반적으로, 양이온성 지질은 생리적 조건하에 양으로 하전되는 질소 원자를 함유한다. 적합한 양이온성 지질은, 염화 벤잘코늄(BAK), 벤제토늄 클로라이드, 세트림라이드(테트라데실트라이메틸암모늄 브로마이드 및 가능하게는 소량의 도데실트라이메틸암모늄 브로마이드 및 헥사데실트라이메틸 암모늄 브로마이드를 함유함), 세틸피리디늄 클로라이드(CPC), 세틸 트라이메틸암모늄 클로라이드(CTAC), 1차 아민, 2차 아민, 3차 아민, 예컨대, 제한 없이, N,N',N'-폴리옥시에틸렌(10)-N-탈로우-1,3-다이아미노프로판, 기타 4차 아민염, 예컨대, 제한 없이, 도데실트라이메틸암모늄 브로마이드, 헥사데실트라이메틸-암모늄 브로마이드, 혼합된 알킬-트라이메틸-암모늄 브로마이드, 벤질다이메틸도데실암모늄 클로라이드, 벤질다이메틸헥사데실-암모늄 클로라이드, 벤질트라이메틸암모늄 메톡사이드, 세틸다이메틸에틸암모늄 브로마이드, 다이메틸다이옥타데실 암모늄 브로마이드(DDAB), 메틸벤제토늄 클로라이드, 데카메토늄 클로라이드, 메틸 혼합된 트라이알킬 암모늄 클로라이드, 메틸 트라이옥틸암모늄 클로라이드, N,N-다이메틸-N-[2-(2-메틸-4-(1,1,3,3-테트라메틸부틸)-페녹시]-에톡시)에틸]-벤젠메탄아미늄 클로라이드(DEBDA), 다이알킬다이메틸암모늄염, [1-(2,3-다이올레일옥시)-프로필]-N,N,N-트라이메틸암모늄 클로라이드, 1,2-다이아실-3-(트라이메틸암모니오) 프로판(아실기=다이미리스토일, 다이팔미토일, 다이스테아로일, 다이올레일), 1,2-다이아실-3-(다이메틸암모니오)프로판(아실기=다이미리스토일, 다이팔미토일, 다이스테아로일, 다이올레일), 1,2-다이올레일-3-(4'-트라이메틸-아미니오)부타노일-sn-글리세롤, 1,2-다이올레일 3-석시닐-sn-글리세롤 콜린 에스터, 콜레스테릴(4'-트라이메틸암모니오) 부타노에이트), N-알킬 피리디늄염(예컨대 세틸 피리디늄 브로마이드 및 세틸피리디늄 클로라이드), N-알킬피페리디늄염, 다이카티온닉 볼라폼 전해질(dicationic bolaform electrolyte)(C12Me6; C12Bu6), 다이알킬글리세릴포스포릴콜린, 라이소레시틴, L-a 다이올레일포스파티딜에탄올아민, 콜레스테롤 헤미석시네이트 콜린 에스터, 리포폴리아민, 예컨대, 제한 없이, 다이옥타데실아미도글리실스퍼민(DOGS), 다이팔미토일 포스파티딜에탄올-아미도스퍼민(DPPES), 리포폴리-L(또는 D)-라이신(LPPL, LPDL), N-글루타릴포스파티딜에탄올아민에 접합된 폴리(L(또는 D)-라이신, 펜던트 아미노기(C12GluPhCnN+))를 가진 다이도데실 글루타메이트 에스터, 펜던트 아미노기(C14GluCnN+))를 가진 다이테트라데실 글루타메이트 에스터, 콜레스테롤의 양이온성 유도체, 예컨대, 제한 없이, 콜레스테릴-3P-옥시석신아미도에틸렌트라이메틸암모늄염, 콜레스테릴-3P-옥시석신아미도에틸렌트라이메틸아민, 콜레스테릴-3P-카복시아미도에틸렌트라이

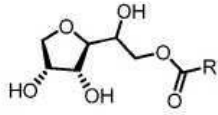
이메틸암모늄염, 콜레스테릴-3P-카복시아미도에틸렌다이메틸아민, 및 3- γ -[N-(N',N'-다이메틸아미노에탄카바모일)콜레스테롤](DC-콜레스테롤), 1,2-다이올레일옥시-3-(트라이메틸암모니오)프로판(DOTAP), 다이메틸다이옥타데실암모늄(DDA), 1,2-다이미리스토일-3-트라이메틸암모늄프로판(DMTAP), 다이팔미토일(C16:0)트라이메틸 암모늄 프로판(DPTAP), 다이스테아로일트라이메틸암모늄 프로판(DSTAP), 및 이들의 조합물을 포함한다.

- [0079] 본 발명에서 사용하는데 적합한 기타 양이온성 지질은, 예컨대, 미국 특허 공개 제2008/0085870호(2008년 4월 10일 간행) 및 제2008/0057080호(2008년 3월 6일 간행)에 기재되어 있다.
- [0080] 본 발명에서 사용하는데 적합한 기타 양이온성 지질은, 예컨대, WO 2011/076807의 표 6(112 내지 139 페이지)에 개시된 바와 같은 지질 E0001 내지 E0118 또는 E0119 내지 E0180(이 문헌은 또한 이들 양이온성 지질을 제조하는 방법 및 사용하는 방법도 개시하고 있음)을 포함한다. 추가의 적합한 양이온성 지질은 N-[1-(2,3-다이올레일옥시)프로필]-N,N,N-트라이메틸암모늄 클로라이드(DOTMA), N,N-다이올레일-N,N-다이메틸암모늄 클로라이드(DODAC), 1,2-다이올레일-sn-글리세로-3-에틸포스포콜린(DOEPIC), 1,2-다이올레일-3-다이메틸암모늄-프로판(DODAP), 1,2-다이리놀레일옥시-3-다이메틸아미노프로판(DLinDMA)을 포함한다.
- [0081] NLC는 본 명세서에 기재된 2종 이상의 양이온성 지질 중 1종 또는 임의의 조합물을 포함할 수 있다.
- [0082] 예시적인 실시형태에 있어서, 양이온성 지질은 1,2-다이올레일옥시-3-(트라이메틸암모니오)프로판(DOTAP), 3- β -[N-(N',N'-다이메틸아미노에탄)-카바모일]콜레스테롤(DC 콜레스테롤), 다이메틸다이옥타데실암모늄(DDA), 1,2-다이미리스토일-3-트라이메틸암모늄프로판(DMTAP), 다이팔미토일(C16:0)트라이메틸 암모늄 프로판(DPTAP), 다이스테아로일트라이메틸암모늄 프로판(DSTAP), WO 2011/076807의 표 6(112 내지 139 페이지)에 개시된 바와 같은 지질 E0001 내지 E0118 또는 E0119 내지 E0180, 및 이들의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0083] 다른 예시적인 실시형태에 있어서, 양이온성 지질은 1,2-다이올레일옥시-3-(트라이메틸암모니오)프로판(DOTAP), 3- β -[N-(N',N'-다이메틸아미노에탄)-카바모일]콜레스테롤(DC 콜레스테롤), 다이메틸다이옥타데실암모늄(DDA), 1,2-다이미리스토일-3-트라이메틸암모늄프로판(DMTAP), 다이팔미토일(C16:0)트라이메틸 암모늄 프로판(DPTAP), 다이스테아로일트라이메틸암모늄 프로판(DSTAP), N-[1-(2,3-다이올레일옥시)프로필]-N,N,N-트라이메틸암모늄 클로라이드(DOTMA), N,N-다이올레일-N,N-다이메틸암모늄 클로라이드(DODAC), 1,2-다이올레일-sn-글리세로-3-에틸포스포콜린(DOEPIC), 1,2-다이올레일-3-다이메틸암모늄-프로판(DODAP), 1,2-다이리놀레일옥시-3-다이메틸아미노프로판(DLinDMA), WO 2011/076807의 표 6(112 내지 139 페이지)에 개시된 바와 같은 지질 E0001 내지 E0118 또는 E0119 내지 E0180, 및 이들의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0084] 예시적인 양이온성 지질은 하기로부터 선택된다: 1,2-다이올레일옥시-3-(트라이메틸암모니오)프로판(DOTAP), 3- β -[N-(N',N'-다이메틸아미노에탄)-카바모일]콜레스테롤(DC 콜레스테롤), 다이메틸다이옥타데실암모늄(DDA), 1,2-다이미리스토일-3-트라이메틸암모늄프로판(DMTAP), 다이팔미토일(C16:0)트라이메틸 암모늄 프로판(DPTAP), 다이스테아로일트라이메틸암모늄 프로판(DSTAP), N-[1-(2,3-다이올레일옥시)프로필]-N,N,N-트라이메틸암모늄 클로라이드(DOTMA), N,N-다이올레일-N,N-다이메틸암모늄 클로라이드(DODAC), 1,2-다이올레일-sn-글리세로-3-에틸포스포콜린(DOEPIC), 1,2-다이올레일-3-다이메틸암모늄-프로판(DODAP), 1,2-다이리놀레일옥시-3-다이메틸아미노프로판(DLinDMA), 또는 이들의 조합물. 추가의 적합한 양이온성 지질은 당업자에게 공지되어 있을 수 있다.
- [0085] 소정의 실시형태에 있어서, NLC-기반 조성물 또는 제형은 약 0.5 mg/ml 내지 약 50 mg/ml의 양이온성 성분(예컨대, 양이온성 지질)을 포함한다. 소정의 실시형태에 있어서, 양이온성 지질은 DOTAP이다. NLC는, 예를 들어, 약 0.5 mg/ml 내지 약 25 mg/ml 또는 30 mg/ml DOTAP 또는 DOTAP에 대해서 본 명세서에 기재된 임의의 다른 양 또는 범위를 포함할 수 있다.
- [0086] 소정의 실시형태에 있어서, 양이온성 지질은 DC 콜레스테롤이다. 소정의 양상에 있어서, NLC는 DC 콜레스테롤을 약 0.1 mg/ml 내지 약 5 mg/ml의 DC 콜레스테롤로 포함할 수 있다. 소정의 실시형태에 있어서, 양이온성 지질은 DDA이다. NLC는, 예를 들어, 약 0.1 mg/ml 내지 약 5 mg/ml DDA를 포함할 수 있다. 소정의 실시형태에 있어서, 양이온성 지질은 DOTMA이다. NLC는, 예를 들어, 약 0.5 mg/ml 내지 약 25 또는 30 mg/ml DOTMA를 포함할 수 있다. 소정의 실시형태에 있어서, 양이온성 지질은 DOEPIC이다. NLC는, 예를 들어, 약 0.5 mg/ml 내지 약 25 mg/ml의 DOEPIC를 포함할 수 있다. 소정의 실시형태에 있어서, 양이온성 지질은 DSTAP이다. NLC는, 예를 들어, 약 0.5 mg/ml 내지 약 50 mg/ml의 DSTAP를 포함할 수 있다. 소정의 실시형태에 있어서, 양이온성 지질은 DODAC이다. NLC는, 예를 들어, 약 0.5 mg/ml 내지 약 50 mg/ml DODAC를 포함할 수 있다. 소정의 실시형태에 있어서, 양이온성 지질은 DODAP이다. NLC는, 예를 들어, 약 0.5 mg/ml 내지 약 50 mg/ml의 DODAP를 포함할 수 있다.

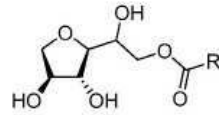
- [0087] 용적당 중량과 관련하여, 예시적인 NLC-기반 조성물 또는 제형은, 예를 들어, 약 0.05% w/v 내지 약 5 w/v 또는 약 10% w/v까지의 양이온성 성분(예컨대, 양이온성 지질 예컨대, DOTAP), 약 0.2% w/v 내지 약 10% w/v의 양이온성 성분(예컨대, 양이온성 지질 예컨대, DOTAP), 약 0.2% w/v 내지 약 5% w/v의 양이온성 성분(예컨대, 양이온성 지질 예컨대, DOTAP), 약 0.2% w/v 내지 약 2% w/v의 양이온성 성분(예컨대, 양이온성 지질 예컨대, DOTAP), 약 2% w/v 내지 10% w/v의 양이온성 성분(예컨대, 양이온성 지질 예컨대, DOTAP), 약 2% w/v 내지 약 5% w/v의 양이온성 성분(예컨대, 양이온성 지질 예컨대, DOTAP), 약 1% w/v 내지 약 5% w/v의 양이온성 성분(예컨대, 양이온성 지질 예컨대, DOTAP), 약 3% w/v 내지 약 5% w/v의 양이온성 성분(예컨대, 양이온성 지질 예컨대, DOTAP), 또는 약 3% w/v 내지 약 4% w/v의 양이온성 성분(예컨대, 양이온성 지질 예컨대, DOTAP) 또는 양이온성 성분에 대해서 본 명세서에 기재된 임의의 다른 양 또는 범위를 포함할 수 있다. 특히 희석된 또는 농축된 제형을 고려할 경우, 더 높거나 또는 더 낮은 w/v 백분율이 본 명세서에서 상정된다.
- [0088] 몇몇 경우에, 오일 코어에 가용성인 양이온성 지질을 사용하는 것이 바람직할 수도 있다. 예를 들어, DOTAP, DOEPC, DODAC 및 DOTMA는 스쿠알렌 또는 스쿠알란에 가용성이다. 다른 경우에, 오일 코어에 가용성이 아닌 양이온성 지질을 사용하는 것이 바람직할 수도 있다. 예를 들어, DDA 및 DSTAP는 스쿠알렌에 가용성이 아니다. 특정 지질이 오일에 가용성인지 불용성인지를 결정하고 따라서 적절한 오일 및 지질 조합을 선택하는 것은 당업계에 서의 지식 이내이다. 예를 들어, 용해도는 지질 및 오일의 구조에 기초하여 예측될 수 있다(예컨대, 지질의 용해도는 그의 꼬리의 구조에 의해 결정될 수 있다). 예를 들어, 1개 또는 2개의 불포화 지방산 사슬(예컨대, 올레일 꼬리)을 가진 지질, 예컨대, DOTAP, DOEPC, DODAC, DOTMA는, 스쿠알렌 또는 스쿠알란에 가용성인 반면; 포화 지방산 사슬(예컨대, 스테아로일 꼬리)을 가진 지질은 스쿠알렌에 가용성이 아니다. 대안적으로, 용해도는 포화된 용액을 형성하는 오일의 주어진 양에 용해되는 지질의 양에 따라 결정될 수 있다.
- [0089] NLC는 생물활성제와 혼합하기 전에 NLC의 순 표면 전하가 양성인 한 양이온성 지질과 조합하여 추가의 지질(즉, 천연 및 음이온성 지질)을 포함할 수 있다. NLC의 표면 전하를 측정하는 방법은 당업계에 공지되어 있고, 예를 들어, 동적 광 산란(DLS), 광자 상관 분광법(Photon Correlation Spectroscopy: PCS) 또는 겔 전기영동에 의해 측정된 바와 같은 것을 포함한다.
- [0090] C. 솔비탄 모노에스터
- [0091] 본 발명자들은, 솔비탄 에스터가 NLC에 첨가된 경우 생물활성제가 항원이거나 항원을 암호화하고 조성물이 대상체에게 투여되는 대상체에서 항원에 항체를 유도하고/하거나 세포에 생물활성제를 전달함에 있어서 NLC의 유효성을 증대시키는 작용을 할 수 있는 것을 발견하였다. 특히, 생활성 핵산에서 암호화된 단백질에 대한 면역 반응이 NLC에 사용된 솔비탄 에스터의 선택에 의해 조절될 수 있는 것을 발견하였다. 놀랍게도, 솔비탄 모노에스터의 사용은 NLC의 유효성을 증대시킴에 있어서 특히 유효한 것을 발견하였다. 몇몇 양상에 있어서, 솔비탄 모노에스터의 아실 사슬이 포화된다. 또한, 이론에 의해 얽매이길 원치 않지만, 놀랍게도 솔비탄 에스터, 및 특히, 솔비탄 모노에스터가, (예컨대, 생물활성제가 항원이거나 또는 항원을 암호화하고 조성물이 대상체에게 투여되는 대상체에서 항원에 항체를 유도함에 있어서) NLC의 아주반트 활성도의 유효성을 증대시키기 위하여 고체 지질(예컨대, 미세결정성 트라이글리세라이드)과 조합하여 작용하는 것을 발견하였다.
- [0092] 예시적인 솔비탄 모노에스터는 상표명 SPAN[®] 또는 ARLACEL[®] 하에 상업적으로 입수 가능하다. 본 명세서에서 사용하기 위한 예시적인 솔비탄 모노에스터는 화학식 I의 화합물 또는 이의 입체이성질체(화학식 Ia, Ib, Ic 또는 Id를 포함하지만, 이들로 제한되는 것은 아님)로서 표현될 수 있고, 여기서 R은 포화 또는 불포화 C₁-C₃₀ 알킬기, 바람직하게는 포화 또는 불포화 C₁-C₂₀ 알킬기, 더 바람직하게는 포화 또는 불포화 C₁₀-C₂₀ 알킬기이다. 예시적인 실시형태에 있어서, 알킬기는 비-환식이다. 예시적인 솔비탄 모노에스터는 또한 화학식 I, Ia, Ib, Ic 또는 Id의 위치 이성질체(예컨대, 하이드록시 작용기 중 하나가 에스터 작용기(예컨대, 알킬 에스터, 여기서 알킬은 포화 또는 불포화 C₁-C₃₀ 알킬기, 바람직하게는 포화 또는 불포화 C₁-C₂₀ 알킬기, 더 바람직하게는 포화 또는 불포화 C₁₀-C₂₀ 알킬기이고 R은 OH임)로 대체됨)를 포함한다. 당업자라면 예시적인 솔비탄 모노에스터가 화학식 I, Ia, Ib, Ic, Id의 염 형태(예컨대, 약제학적으로 허용 가능한 염) 및 이의 입체이성질체 또는 위치 이성질체일 수 있는 것이 이해될 것이다.



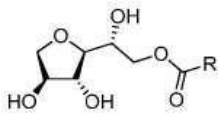
화학식 I



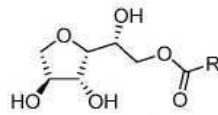
화학식 Ia



화학식 Ib

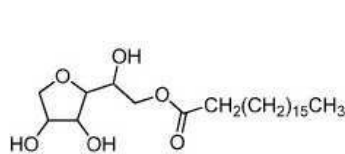


화학식 Ic

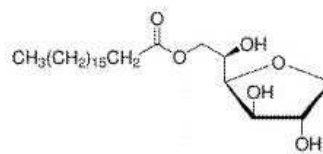


화학식 Id

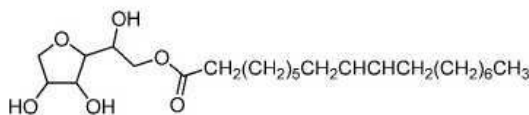
이와 관련하여 특히 바람직한 솔비탄 모노에스터는 솔비탄 모노스테아레이트(또한 Span[®] 60으로도 알려져 있고 이하에 도시됨) 및 솔비탄 모노올레레이트(Span[®] 80으로도 알려져 있고 이하에 도시됨)이지만, 다른 솔비탄 모노에스터(솔비탄 모노라우레이트(Span[®] 20), 솔비탄 모노팔미테이트(Span[®] 40)를 포함하지만, 이들로 제한되는 것은 아님)가 사용될 수 있다. 예시적인 솔비탄 모노스테아레이트는 화학식 II 또는 IIa 또는 이들의 염 형태로 표현되고, 예시적인 솔비탄 모노올레레이트는 화학식 III 또는 IIIa 또는 이들의 염 형태로 표현된다.



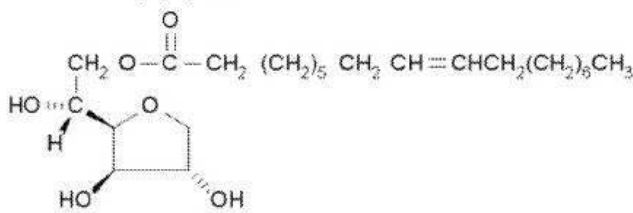
화학식 II



화학식 IIa



화학식 III



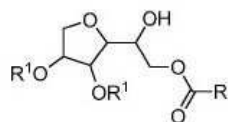
화학식 IIIa

NLC의 성분으로서 솔비탄 모노에스터를 제공하는 것 외에, 또한, 대안적인 솔비탄계 비-이온성 계면활성제를 비롯하여, 대안적인 소수성 계면활성제 대신에 솔비탄 모노에스터의 치환이 상정된다. 따라서, 또한 액체상 지질과 고체상 지질을 포함하는 오일 코어, 양이온성 성분(바람직하게는 양이온성 지질 또는 인지질), 소수성 계면활성제(예컨대, 솔비탄계 비-이온성 계면활성제를 포함하는 비-이온성 계면활성제) 및 친수성 계면활성제를 포함하는 NLC 입자가 제공된다. 솔비탄계 비-이온성 계면활성제는 솔비탄 모노에스터 이외의 솔비탄 에스터, 예를 들어, 솔비탄 다이에스터 및 솔비탄 트라이에스터, 예를 들어, 솔비탄 트라이올레레이트(SPAN85TM) 및 솔비탄 트라이스테아레이트(SPAN65TM)를 포함한다. 일반적으로, 비-이온성 계면활성제(솔비탄계 비-이온성 계면활성제 포함)는 1.8 내지 8.6의 친수성-친지성 밸런스(hydrophilic-lipophilic balance: HLB)를 가질 것이다. 솔비

탄 모노에스터를 포함하는 NLC에 대해서 본 명세서에서 제공된 실시형태의 모두가 적용 가능하고, 솔비탄 모노에스터 대신에 대안적인 소수성 계면활성제를 포함하는 NLC, 예컨대, 솔비탄 모노에스터 대신에 솔비탄 다이에스터 또는 트라이에스터를 포함하는 NLC가 상정된다. 솔비탄 다이에스터 및 트라이에스터 또는 기타 소수성 계면활성제는 솔비탄 모노에스터와 동일한 농도로 존재할 수 있다. 몇몇 양상에 있어서, 솔비탄 다이에스터 또는 트라이에스터의 아실 사슬이 포화될 것이다.

[0098] 일반적으로, 솔비탄 에스터(예컨대, 솔비탄 모노에스터)는 1 내지 9의 친수성-친지성 밸런스(HLB)값을 갖는다. 몇몇 실시형태에 있어서, 솔비탄 에스터(예컨대, 솔비탄 모노에스터)는 1 내지 5의 HLB값을 갖는다. 몇몇 실시형태에 있어서, 소수성 계면활성제는 약 4 내지 5의 HLB값을 갖는다.

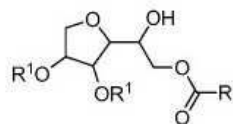
[0099] 본 명세서에서 사용하기 위한 예시적인 솔비탄 다이에스터는 이하의 화학식 IV의 화합물 또는 이의 입체이성질체(예컨대, 여기서 R은 포화 또는 불포화 C₁-C₃₀ 알킬기, 바람직하게는 포화 또는 불포화 C₁-C₂₀ 알킬기, 더 바람직하게는 포화 또는 불포화 C₁₀-C₂₀ 알킬기이고 R¹의 적어도 하나는 H인 한편, 다른 하나는 -C(=O)Y이고, 여기서 Y는 포화 또는 불포화 C₁-C₃₀ 알킬기, 바람직하게는 포화 또는 불포화 C₁-C₂₀ 알킬기, 더 바람직하게는 포화 또는 불포화 C₁₀-C₂₀ 알킬기임)로서 표시될 수 있다. 예시적인 실시형태에 있어서, 알킬기는 비-환식이다. 예시적인 솔비탄 다이에스터는 또한 화학식 IV의 위치 이성질체를 포함한다. 당업자는, 예시적인 솔비탄 다이에스터는 화학식 IV의 염 형태(예컨대, 약제학적으로 허용 가능한 염) 및 이의 입체이성질체 또는 위치 이성질체일 수 있음을 이해될 것이다.



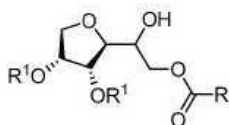
화학식 IV

[0100]

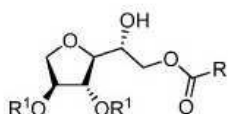
[0101] 본 명세서에서 사용하기 위한 예시적인 솔비탄 트라이에스터는 하기 화학식 V의 화합물 또는 이의 입체이성질체(화학식 Va, Vb 또는 Vc를 포함하지만, 이들로 제한되는 것은 아님)로서 표현될 수 있고, 여기서 R은 포화 또는 불포화 C₁-C₃₀ 알킬기, 바람직하게는 포화 또는 불포화 C₁-C₂₀ 알킬기, 더 바람직하게는 포화 또는 불포화 C₁₀-C₂₀ 알킬기이고, R¹은 -C(=O)Y이다(여기서 Y는 각 경우에 동일 또는 상이할 수 있고, 포화 또는 불포화 C₁-C₃₀ 알킬기, 바람직하게는 포화 또는 불포화 C₁-C₂₀ 알킬기, 더 바람직하게는 포화 또는 불포화 C₁₀-C₂₀ 알킬기이다). 예시적인 실시형태에 있어서, 알킬기는 비-환식이다. 예시적인 솔비탄 트라이에스터는 또한 화학식 V, Va, Vb, 또는 Vc의 위치 이성질체를 포함한다(예컨대, 하이드록시 작용기는 에스터 작용기로 대체되고(예컨대, 알킬이 포화 또는 불포화 C₁-C₃₀ 알킬기, 바람직하게는 포화 또는 불포화 C₁-C₂₀ 알킬기, 더 바람직하게는 포화 또는 불포화 C₁₀-C₂₀ 알킬기인 알킬 에스터), 알킬 에스터(예컨대, 고리 알킬 에스터 또는 비-고리 알킬 에스터) 중 하나가 하이드록시 작용기로 대체됨). 당업자라면 예시적인 솔비탄 트라이에스터가 화학식 V, Va, Vb, 또는 Vc의 염 형태(예컨대, 약제학적으로 허용 가능한 염) 및 이의 입체이성질체 또는 위치 이성질체일 수 있음을 이해할 것이다.



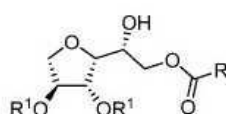
화학식 V



화학식 Va



화학식 Vb



화학식 Vc

[0102]

[0103] 입체이성질체에 관하여, 당업자라면, 솔비탄 에스터가 카이랄 중심을 가질 수 있고, 예를 들어, 라세미체, 라세

미 혼합물로서, 그리고 개별의 거울상입체이성질체 및 부분입체이성질체로서 존재할 수 있는 것임을 이해할 것이다.

[0104] 솔비탄계 비-이온성 계면활성제가 솔비탄 에스터인 실시형태에 있어서, 전형적으로, NLC-기반 조성물 또는 제형은, 전형적으로, 예를 들어, 약 0.1% 내지 약 15%의 솔비탄 에스터(w/v), 0.1% 내지 약 10%의 솔비탄 에스터(w/v), 0.1% 내지 약 5%의 솔비탄 에스터(w/v), 약 0.1% 내지 약 4%의 솔비탄 에스터(w/v), 약 0.1% 내지 약 2.5%의 솔비탄 에스터(w/v), 약 0.1% 내지 약 2%의 솔비탄 에스터(w/v), 0.1% 내지 약 1.5%의 솔비탄 에스터(w/v), 0.1% 내지 약 1%의 솔비탄 에스터(w/v), 0.1% 내지 약 0.5%의 솔비탄 에스터(w/v), 0.3% 내지 약 2.5%의 솔비탄 에스터(w/v), 약 0.3% 내지 약 2%의 솔비탄 에스터(w/v), 0.3% 내지 약 1.5%의 솔비탄 에스터(w/v), 0.3% 내지 약 1%의 솔비탄 에스터(w/v), 0.3% 내지 약 0.5%의 솔비탄 에스터(w/v) 또는 솔비탄 에스터에 대해서 본 명세서에 기재된 임의의 다른 양 또는 범위, 예컨대, 약 0.25% 내지 약 15%의 솔비탄 에스터를 함유한다. 몇몇 양상에 있어서, NLC-기반 조성물은 약 0.1%, 약 0.2%, 약 0.3%, 약 0.4%, 약 0.5%, 약 0.6%, 약 0.7%, 약 0.8%, 약 0.9%, 약 1%, 약 2%, 약 3% 또는 약 4%(w/v)의 솔비탄 에스터를 함유한다. 특히 희석된 또는 농축된 제형을 고려할 경우, 더 높거나 또는 더 낮은 w/v 백분율이 본 명세서에서 상정된다.

[0105] 따라서, 솔비탄 에스터가 솔비탄 모노에스터(예컨대, SPAN60™, SPAN80™)인 경우, NLC-기반 조성물 또는 제형은, 전형적으로, 예를 들어, 약 0.1% 내지 약 15%의 솔비탄 모노에스터(w/v), 0.1% 내지 약 10%의 솔비탄 모노에스터(w/v), 0.1% 내지 약 5%의 솔비탄 모노에스터(w/v), 약 0.1% 내지 약 4%의 솔비탄 모노에스터(w/v), 약 0.1% 내지 약 2.5%의 솔비탄 모노에스터(w/v), 약 0.1% 내지 약 2%의 솔비탄 모노에스터(w/v), 0.1% 내지 약 1.5%의 솔비탄 모노에스터(w/v), 0.1% 내지 약 1%의 솔비탄 모노에스터(w/v), 0.1% 내지 약 0.5%의 솔비탄 모노에스터(w/v), 0.3% 내지 약 2.5%의 솔비탄 모노에스터(w/v), 약 0.3% 내지 약 2%의 솔비탄 모노에스터(w/v), 0.3% 내지 약 1.5%의 솔비탄 모노에스터(w/v), 0.3% 내지 약 1%의 솔비탄 모노에스터(w/v), 0.3% 내지 약 0.5%의 솔비탄 모노에스터(w/v) 또는 솔비탄 모노에스터에 대해서 본 명세서에 기재된 임의의 다른 양 또는 범위, 예컨대, 약 0.25% 내지 약 15%의 솔비탄 모노에스터를 함유한다. 몇몇 양상에 있어서, NLC-기반 조성물 또는 제형은 약 0.1%, 약 0.2%, 약 0.3%, 약 0.4%, 약 0.5%, 약 0.6%, 약 0.7%, 약 0.8%, 약 0.9%, 또는 약 1%, 약 2%, 약 3% 또는 약 4% (w/v) 솔비탄 모노에스터를 함유한다. 특히 희석된 또는 농축된 제형을 고려할 경우, 더 높거나 또는 더 낮은 w/v 백분율이 본 명세서에서 상정된다.

[0106] 따라서, 솔비탄 에스터가 솔비탄 다이에스터인 경우, NLC-기반 조성물 또는 제형은, 전형적으로, 예를 들어, 약 0.1% 내지 약 15%의 솔비탄 다이에스터(w/v), 0.1% 내지 약 10%의 솔비탄 다이에스터(w/v), 0.1% 내지 약 5%의 솔비탄 다이에스터(w/v), 약 0.1% 내지 약 4%의 솔비탄 다이에스터(w/v), 약 0.1% 내지 약 2.5%의 솔비탄 다이에스터(w/v), 약 0.1% 내지 약 2%의 솔비탄 다이에스터(w/v), 0.1% 내지 약 1.5%의 솔비탄 다이에스터(w/v), 0.1% 내지 약 1%의 솔비탄 다이에스터(w/v), 0.1% 내지 약 0.5%의 솔비탄 다이에스터(w/v), 0.3% 내지 약 2.5%의 솔비탄 다이에스터(w/v), 약 0.3% 내지 약 2%의 솔비탄 다이에스터(w/v), 0.3% 내지 약 1.5%의 솔비탄 다이에스터(w/v), 0.3% 내지 약 1%의 솔비탄 다이에스터(w/v), 0.3% 내지 약 0.5%의 솔비탄 다이에스터(w/v) 또는 솔비탄 다이에스터에 대해서 본 명세서에 기재된 임의의 다른 양 또는 범위, 예컨대, 약 0.25% 내지 약 15%의 솔비탄 다이에스터를 함유한다. 몇몇 양상에 있어서, NLC-기반 조성물 또는 제형은 약 0.1%, 약 0.2%, 약 0.3%, 약 0.4%, 약 0.5%, 약 0.6%, 약 0.7%, 약 0.8%, 약 0.9%, 또는 약 1%, 약 2%, 약 3% 또는 약 4% (w/v)의 솔비탄 다이에스터를 함유한다. 특히 희석된 또는 농축된 제형을 고려할 경우, 더 높거나 또는 더 낮은 w/v 백분율이 본 명세서에서 상정된다.

[0107] 따라서, 솔비탄 에스터가 솔비탄 트라이에스터(예컨대, SPAN85™ 또는 SPAN65™)인 경우, NLC-기반 조성물 또는 제형은, 전형적으로, 예를 들어, 약 0.1% 내지 약 15%의 솔비탄 트라이에스터(w/v), 0.1% 내지 약 10%의 솔비탄 트라이에스터(w/v), 0.1% 내지 약 5%의 솔비탄 트라이에스터(w/v), 약 0.1% 내지 약 4%의 솔비탄 트라이에스터(w/v), 약 0.1% 내지 약 2.5%의 솔비탄 트라이에스터(w/v), 약 0.1% 내지 약 2%의 솔비탄 트라이에스터(w/v), 0.1% 내지 약 1.5%의 솔비탄 트라이에스터(w/v), 0.1% 내지 약 1%의 솔비탄 트라이에스터(w/v), 0.1% 내지 약 0.5%의 솔비탄 트라이에스터(w/v), 0.3% 내지 약 2.5%의 솔비탄 트라이에스터(w/v), 약 0.3% 내지 약 2%의 솔비탄 트라이에스터(w/v), 0.3% 내지 약 1.5%의 솔비탄 트라이에스터(w/v), 0.3% 내지 약 1%의 솔비탄 트라이에스터(w/v), 0.3% 내지 약 0.5%의 솔비탄 트라이에스터(w/v) 또는 솔비탄 트라이에스터에 대해서 본 명세서에 기재된 임의의 다른 양 또는 범위, 예컨대, 약 0.25% 내지 약 15%의 솔비탄 트라이에스터를 함유한다. 몇몇 양상에 있어서, NLC-기반 조성물 또는 제형은 약 0.1%, 약 0.2%, 약

0.3%, 약 0.4%, 약 0.5%, 약 0.6%, 약 0.7%, 약 0.8%, 약 0.9%, 약 1%, 약 2%, 약 3% 또는 약 4% (w/v)의 솔비탄 트라이에스터를 함유한다. 특히 희석된 또는 농축된 제형을 고려할 경우, 더 높거나 또는 더 낮은 w/v 백분율이 본 명세서에서 상정된다.

[0108] 예시적인 실시형태에 있어서, 솔비탄 에스터(예컨대, 솔비탄 모노에스터, 다이에스터 또는 트라이에스터)는 솔비탄 에스터를 결합하는 비교 가능한 조성물(예컨대, 솔비탄 모노에스터, 다이에스터 또는 트라이에스터 각각)에 비해서 생물활성제(예컨대, RNA)의 전달 및/또는 발현을 용이하게 하는 조성물의 능력을 증가시키기에 충분한 양으로 존재한다. 조성물이 대상체에게 유효량으로 투여되는 실시형태에 있어서, 조성물은 솔비탄 에스터를 결합하는 비교 가능한 조성물이 대상체에게 투여될 경우 또는 생물활성제가 NLC 없이 대상체에게 투여될 경우 유도된 항체 역가와 동등 또는 그보다 큰 항원에 대한 항체 역가를 유도할 수 있다. 몇몇 실시형태에 있어서, 조성물은 솔비탄 에스터를 결합하는 비교 가능한 조성물에 의해 대상체에서 유도된 면역 반응보다 더 높은 수준으로 대상체 내 면역 반응(예컨대, 중화 항체 역가)을 유도한다. 면역 반응은, 예를 들어, 선천적인, 세포 또는 항체 반응일 수 있다. 중화 항체 역가는, 제한 없이, 플라크 감소 중화 역가 분석을 비롯한, 당업자에게 공지된 임의의 검정법에 의해 결정될 수 있다(Ratnam, S et al. J. Clin. Microbiol (2011), 33 (4): 811-815; Timiryazova, T et al. Am J Trop Med Hyg (2013), 88(5): 962-970).

[0109] D. 계면활성제

[0110] 본 명세서에 기재된 NLC는, 솔비탄계 비-이온성 계면활성제(예컨대, 솔비탄 에스터) 이외에, 계면활성제를 포함한다. 생물학적 응용을 위하여 구체적으로 설계되고 이에 통상 사용되는 많은 계면활성제가 있다. 이러한 계면활성제는 4가지 기본적 형태, 즉, 음이온성, 양이온성, 쌍이온성 및 비이온성으로 분류되고, 본 발명에서 사용될 수 있다. 특히 유용한 계면활성제의 군은 친수성 비-이온성 계면활성제, 특히, 폴리옥시에틸렌 솔비탄 모노에스터 및 폴리옥시에틸렌 솔비탄 트라이에스터이다. 이들 재료는 폴리솔베이트(polysorbate)라 지칭되고, 상표명 TWEEN®하에 상업적으로 입수 가능하고, NLC를 제조하는데 유용하다. TWEEN® 계면활성제는 일반적으로 9.6 내지 16.7에 속하는 HLB값을 갖는다. TWEEN® 계면활성제는 상업적으로 입수 가능하다. 사용될 수 있는 기타 비-이온성 계면활성제는, 예를 들어, 라우릴, 아세틸, 스테아릴 및 올레일 알코올로부터 유래된 폴리옥시에틸렌 지방산 에터, 에틸렌 옥사이드와 장쇄 지방산의 반응에 의해 제조된 폴리옥시에틸렌 지방산, 폴리옥시에틸렌, 폴리올 지방산 에스터, 폴리옥시에틸렌 에터, 폴리옥시프로필렌 지방 에터, 폴리옥시에틸렌을 함유하는 밀랍 유도체, 폴리옥시에틸렌 라놀린 유도체, 폴리옥시에틸렌 지방 글리세라이드, 글리세롤 지방산 에스터 또는 기타 폴리옥시에틸렌 지방산, 12 내지 22개의 탄소 원자의 장쇄 지방산의 알코올 또는 에터 유도체이다.

[0111] 몇몇 실시형태에 있어서, 약 7 내지 16의 범위의 HLB값을 가진 비-이온성 계면활성제를 선택하는 것이 바람직하다. 이 값은 단일 비-이온성 계면활성제, 예컨대, TWEEN® 계면활성제의 사용을 통해서 얻어질 수 있거나, 또는 계면활성제의 배합물의 사용에 의해 달성될 수 있다. 소정의 실시형태에 있어서, NLC는 단일 비-이온성 계면활성제, 가장 특히, 에멀션 안정화 비-이온성 계면활성제로서 TWEEN® 계면활성제를 포함한다. 예시적인 실시형태에 있어서, 에멀션은 다르게는 폴리솔베이트 80(polysorbate 80)으로 공지된 TWEEN® 80을 포함한다.

[0112] NLC-기반 조성물 또는 제형은, 예를 들어, 약 0.01% 내지 약 15%의 계면활성제(w/v), 약 0.01% 내지 약 10%의 계면활성제(w/v) 약 0.01% 내지 약 5%의 계면활성제(w/v), 약 0.01% 내지 약 2.5%의 계면활성제, 약 0.01% 내지 약 2%의 계면활성제, 0.01% 내지 약 1.5%의 계면활성제, 0.01% 내지 약 1%의 계면활성제, 0.01% 내지 약 0.5%의 계면활성제, 0.05% 내지 약 0.5%의 계면활성제, 0.08% 내지 약 0.5%의 계면활성제, 약 0.08%의 계면활성제, 약 0.5%의 계면활성제, 약 0.6%의 계면활성제, 약 0.7%의 계면활성제, 약 0.8%의 계면활성제, 약 0.9%의 계면활성제, 또는 약 1%의 계면활성제, 또는 약 2%, 약 3%, 약 4%의 계면활성제 또는 계면활성제에 대해서 본 명세서에 기재된 임의의 다른 양 또는 범위를 함유할 수 있다. 특히 희석된 또는 농축된 제형을 고려할 경우, 더 높거나 또는 더 낮은 w/v 백분율이 본 명세서에서 상정된다.

[0113] 예를 들어, NLC 형성을 촉진시키고, 음으로 하전된 분자와 양이온성 입자 간의 복합체 형성을 향상시키고, 음으로 하전된 분자(예컨대, RNA 분자)의 적절한 방출을 용이하게 하고/하거나, 음으로 하전된 분자의 안정성을 증가(예컨대, RNA 분자의 분해를 방지)하는 성분을 비롯한 추가의 성분이 본 발명의 NLC에 포함될 수 있다.

[0114] NLC의 수성 상(연속상)은 전형적으로 완충된 염 용액(예컨대, 식염수) 또는 물이다. 완충된 염 용액은 전형적으로 염(예컨대, NaCl), 완충제(예컨대, 시트르산염 완충제)를 포함하는 수용액이고, 예를 들어, 오스몰농도 조정제(예컨대, 당류), 중합체, 계면활성제, 또는 이들의 조합물을 더 포함할 수 있다. 에멀션이 비경구 투여를 위하여 제형화된 경우, 긴장성, 즉, 오스몰농도가 바람직하지 않은 투여후 결과, 예컨대, 조성물의 투여후 팽윤 또는 신속한 흡수를 방지하기 위하여 통상의 생리적 유체와 본질적으로 동일하도록 최종 완충 용액을 구성하는

것이 바람직하다. 또한, 정상 생리적 조건과 적합한 pH를 유지시키기 위하여 수성 상을 완충시키는 것이 바람직하다. 또한, 소정의 경우에, NLC의 소정의 성분의 안정성을 확보하기 위하여 특정 수준에서 pH를 유지시키는 것이 바람직할 수 있다. 예를 들어, 등장성(즉, 신체 및 혈액의 정상 세포에서 동일한 침투 가능한 용질(예컨대, 염) 농도)이면서 등삼투성인 NLC를 제조하는 것이 바람직할 수 있다. 긴장성을 조절하기 위하여, NLC는 생리적 식염, 예컨대, 나트륨염을 포함할 수 있다. 몇몇 양상에 있어서, 염화나트륨(NaCl)은, 예를 들어, 약 0.9% (w/v)(생리 식염수)에서 사용될 수 있다. 존재할 수 있는 기타 염은, 예를 들어, 염화칼륨, 인산이수소칼륨, 인산이나트륨, 염화마그네슘, 염화칼슘 등을 포함할 수 있다. 비-이온성 등장화제는 또한 긴장성을 조절하는데 사용될 수 있다. 알도스로서 분류되는 단당류, 예컨대, 글루코스, 만노스, 아라비노스 및 리보스뿐만 아니라, 케토스로서 분류되는 단당류, 예컨대, 프럭토스, 소르보스 및 자일로스스가 본 발명에서 비-이온성 등장화제로서 사용될 수 있다. 수크로스, 말토스, 트레할로스 및 락토스와 같은 이당류가 또한 사용될 수 있다. 또한, 알디톨(비환식 폴리하이드록시 알코올, 또한 당 알코올이라고도 지칭됨), 예컨대, 글리세롤, 만니톨, 자일리톨 및 솔비톨이 본 발명에서 유용할 수 있는 비-이온성 등장화제이다. 비-이온성 긴장성 조절제는, 예를 들어, 사용되는 제제에 따라서, 약 0.1% 내지 약 10% 또는 약 1% 내지 약 10%의 농도로 존재할 수 있다.

[0115] 수성 상이 완충될 수 있다. 임의의 생리화적으로 허용 가능한 완충제, 예컨대, 물, 시트르산염 완충제, 인산염 완충제, 아세트산염 완충제, tris 완충제, 중탄산염 완충제, 탄산염 완충제, 석신산염 완충제 등이 본 명세서에서 이용될 수 있다. 수성 성분의 pH는 바람직하게는 4.0 내지 8.0 또는 약 4.5 내지 약 6.8일 것이다. 또 다른 예시적인 실시형태에 있어서, 수성 상은, 또는 완충제는, RNase-무함유 수 또는 DEPC 처리수를 이용해서 제조된다. 따라서, 몇몇 경우에, 에멀션 입자에 대해서 음으로 하전된 분자와의 복합체화를 간섭할 수도 있는 완충제 중의 높은 염이 회피된다. 다른 경우에, 완충제 중 소정량의 염이 포함될 수 있다.

[0116] 예시적인 실시형태에 있어서, 완충제는 약 5.0 내지 8.0의 pH를 가진 10mM 시트르산염 완충제, 예컨대, (시트르산나트륨)이다. 또 다른 예시적인 실시형태에 있어서, 수성 상은 또는 완충제는 RNase-무함유 수 또는 DEPC 처리수를 이용해서 제조된다. 다른 예시적인 실시형태에 있어서, 본 발명의 조성물은 시트르산염 완충제를 포함하지 않는다.

[0117] 수성 상은 또한 추가의 성분, 예컨대, 복합체화 후에 음으로 하전된 분자를 안정화시키는 수성 상 또는 분자의 삼투압농도를 변화시키는 분자를 포함할 수 있다. 바람직하게는, 수성 상의 삼투압농도는 비-이온성 등장화제, 예컨대, 당(예컨대, 트레할로스, 수크로스, 텍스트로스, 프럭토스, 환원성 팔라티노스 등), 당 알코올(예컨대, 만니톨, 솔비톨, 자일리톨, 에리트리톨, 락티톨, 말티톨, 글리세롤 등), 또는 이들의 조합물을 이용해서 조정되고 있다. 필요한 경우, 비이온성 중합체(예컨대, 폴리(알킬 글리콜), 예컨대, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 또는 폴리부틸렌 글리콜) 또는 비이온성 계면활성제가 사용될 수 있다.

[0118] E. 오일:계면활성제 비

[0119] 예시적인 NLC는 액체 오일과 고체 지질을 함유하는 소수성 코어, 및 수성 상으로부터 소수성 상(즉, 액체 오일과 고체 지질, 일괄적으로 여기서는 오일이라고 지칭됨)을 분리하는 계면을 구성하는 계면활성제(유화제(emulsifier) 또는 유화제(emulsifying agent)로도 지칭됨)로 구성된다. 계면활성제는 전형적으로 NLC 나노입자의 표면 상에 존재하므로, 이들의 양은 총 이용 가능한 표면적이라 기술한다. 다른 한편, 오일은 코어에 존재하고 주로 총 이용 가능한 용적에 기여한다. 계면활성제 대 오일 비를 증가시키는 것은 결과적으로 표면적(SA) 대 용적(V) 비를 증가시키고; 따라서 재료의 고정된 용적에 대해서, SA/V 비를 증가시키는 것은 NLC 입자 직경을 감소시키는 것으로 번역된다. 각종 성분의 w/v 백분율로 환산해서 예시적인 NLC 조성물을 기술하는 대신에 또는 이에 부가해서, 이들은 각종 성분의 몰비로 기재될 수 있다. 몇몇 양상에 있어서, 본 발명의 예시적인 NLC는, 약 0.05 내지 약 12 또는 약 0.05 내지 약 9 또는 약 0.05 내지 약 8 또는 약 0.05 내지 약 1 또는 약 0.1 내지 약 1의 오일 대 계면활성제 몰비를 갖는다. 본 발명자들은 오일 대 계면활성제 몰비를 저감시킴으로써, 더 작은 NLC가 합성될 수 있다는 것이 입증되었다. 또한, NLC 중의 오일의 양을 저감시킴으로써, 제형의 전위 독성이 저감될 수 있다. 다른 양상에 있어서, 본 발명의 예시적인 NLC는 약 0.5 내지 약 12, 약 0.5 내지 약 9, 1 내지 약 9, 약 2 내지 약 9, 약 3 내지 약 9, 약 4 내지 약 9, 약 4.5 내지 약 9, 또는 약 4.5 또는 약 5 내지 약 7의 오일 대 계면활성제 몰비를 갖는다. 예시적인 제형은 약 0.5, 약 1, 약 1.5, 약 2, 약 2.5, 약 3, 약 3.5, 약 4, 약 4.5, 약 5, 약 5.5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 약 10, 약 11, 또는 약 12의 오일 대 계면활성제 몰비를 갖는다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 오일 대 계면활성제 몰비는, (i) 오일 코어 지질의 몰에 대한 값에 도달하도록 오일 코어(고체상 지질 및 액체상 지질)를 구성하는 지질의 몰을 첨가하고, (ii) 계면활성제의 몰에 대한 값에 도달하도록 양이온성 성분(예컨대, DOTAP), 소수성 계면활성제(예컨대, 솔비탄 에스터) 및 친수성 계면활성제(tween 80)의 몰을 첨가하고, (iii) 오일 코어 지질의 몰을 계면활성제의 몰로 나눔으로써 결정된

다.

[0120] F. 친수성 계면활성제:양이온성 성분비

[0121] 본 발명자들은 친수성 계면활성제 대 양이온성 성분의 비가 RNAase 분해로부터의 보호 효과를 지니는 NLC의 능력에 영향을 미칠 수 있고 제형의 면역원성에 영향을 미칠 수 있는 것을 발견하였다. 특히, 본 발명자들은, 약 0.6의 Tween:DOTAP 비가 RNA 생물활성제의 전달과 발현을 위하여 일관된 결과를 얻는데 최적인 한편, 약 2.0 이상에서의 Tween:DOTAP 비는 이러한 점조도를 얻는데 최적인 아닌 것을 발견하였다. 따라서, 본 발명의 예시적인 NLC는 약 0.2 내지 약 1.5, 약 0.2 내지 약 1 또는 약 0.5 내지 약 1의 친수성 계면활성제:양이온성 성분(예컨대, 양이온성 지질) 비를 갖는다. Tween과 DOTAP이 조성물에 있을 경우, 본 발명의 예시적인 NLC는 약 0.2 내지 약 1.5, 약 0.2 내지 약 1 또는 약 0.5 내지 약 1의 Tween:DOTAP 비를 갖는다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 친수성 계면활성제:양이온성 성분 비는 (i) 친수성 계면활성제의 몰에 대한 값에 도달하도록 친수성 계면활성제의 물을 첨가하고, (ii) 양이온성 성분의 몰에 대한 값에 도달하도록 양이온성 성분의 물을 첨가하고, 그리고 (iii) 친수성 계면활성제의 물을 양이온성 성분의 몰로 나눔으로써 결정된다.

[0122] G. 부하 용량.

[0123] 본 발명자들은 NLC 제형의 부하 용량이 친수성 계면활성제 대 양이온성 성분의 비 및 제형에 존재하는 오일의 양을 조절함으로써 평균 NLC 입자 크기를 저감시키는 것에 의해서 조절될 수 있음을 발견하였다. 예시적인 NLC 제형의 RNA에 대한 부하 용량이 적어도 약 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNA, 적어도 약 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNA, 적어도 약 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNA, 적어도 약 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNA, 적어도 약 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNA, 적어도 약 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 또는 적어도 약 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNA이다. 20nm 내지 약 110nm, 약 20nm 내지 약 80nm, 약 20nm 내지 약 70nm, 약 20nm 내지 약 60nm의 평균 입자 크기를 갖는 NLC 제형은 전형적으로 증가된 부하 용량을 가졌다.

[0124] H. 예시적인 나노구조 담체 및 이의 w/v 백분율

[0125] 선택적인 예시적인 실시형태에 있어서, NLC 조성물은 약 0.2% w/v 내지 약 40% w/v의 액체상 지질, 약 0.02% w/v 내지 약 10% w/v의 고체상 지질, 약 0.2% w/v 내지 약 10% w/v의 양이온성 지질, 약 0.25% w/v 내지 약 5% w/v의 소수성 계면활성제(예컨대, 솔비탄 에스터), 및 약 0.2% w/v 내지 약 10% w/v, 약 0.2% w/v 내지 약 5% w/v, 약 0.5% w/v 내지 약 5% w/v 또는 약 0.5% w/v 내지 약 10% w/v의 친수성 계면활성제를 포함한다. 이 NLC 조성물은 본 명세서에서 제형 A로서 지칭된다. 제형 A의 임의의 양상에 있어서, 친수성 계면활성제는 0.2% w/v 내지 약 10% w/v, 0.2% w/v 내지 약 5% w/v, 0.5% w/v 내지 약 5% w/v 또는 약 0.5% w/v 내지 약 10% w/v로 존재할 수 있다.

[0126] 선택적인 예시적인 실시형태에 있어서, NLC 조성물은 약 0.2% w/v 내지 약 40% w/v의 액체상 지질, 약 0.1% w/v 내지 약 10% w/v의 고체상 지질, 약 0.2% w/v 내지 약 10% w/v의 양이온성 지질, 약 0.25% w/v 내지 약 5% w/v의 소수성 계면활성제(예컨대, 솔비탄 에스터), 및 약 0.2% w/v 내지 약 10% w/v, 약 0.2% w/v 내지 약 5% w/v, 약 0.5% w/v 내지 약 5% w/v 또는 약 0.5% w/v 내지 약 10% w/v의 친수성 계면활성제를 포함한다. 이 NLC 조성물은 본 명세서에서 제형 B로서 지칭된다. 제형 B의 임의의 양상에 있어서, 친수성 계면활성제는 0.2% w/v 내지 약 10% w/v, 0.2% w/v 내지 약 5% w/v, 0.5% w/v 내지 약 5% w/v 또는 약 0.5% w/v 내지 약 10% w/v로 존재할 수 있다.

[0127] 선택적인 예시적인 실시형태에 있어서, NLC 조성물은 약 0.2% w/v 내지 약 1% w/v의 액체상 지질, 약 0.02% w/v 내지 약 1% w/v의 고체상 지질, 약 2% w/v 내지 약 10% w/v의 양이온성 지질, 약 2% w/v 내지 약 5% w/v의 솔비탄 에스터, 및 약 2% w/v 내지 약 5% w/v의 친수성 계면활성제를 포함한다. 이 NLC 조성물은 본 명세서에서 제형 C로서 지칭된다.

[0128] 선택적인 예시적인 실시형태에 있어서, NLC 조성물은 약 2% w/v 내지 약 40% w/v의 액체상 지질, 약 0.1% w/v 내지 약 10% w/v의 고체상 지질, 약 0.2% w/v 내지 약 10% w/v의 양이온성 지질, 약 0.25% w/v 내지 약 5% w/v의 소수성 계면활성제(예컨대, 솔비탄 에스터), 및 약 0.2% w/v 내지 약 10% w/v, 약 0.2% w/v 내지 약 5% w/v, 약 0.5% w/v 내지 약 5% w/v 또는 약 0.5% w/v 내지 약 10% w/v의 친수성 계면활성제를 포함한다. 이 NLC 조성물은 본 명세서에서 제형 D로서 지칭된다. 제형 D의 임의의 양상에 있어서, 친수성 계면활성제는 0.2% w/v 내지 약 10% w/v, 0.2% w/v 내지 약 5% w/v, 약 0.5% w/v 내지 약 5% w/v 또는 약 0.5% w/v 내지 약 10% w/v의 친수성 계면활성제로 존재할 수 있다.

[0129] 선택적인 예시적인 실시형태에 있어서, NLC 조성물은 약 2% w/v 내지 약 10% w/v의 액체상 지질, 약 0.1% w/v 내지 약 10% w/v의 고체상 지질, 약 0.2% w/v 내지 약 10% w/v의 양이온성 지질, 약 0.25% w/v 내지 약 5% w/v

의 솔비탄 에스터, 및 약 0.2% w/v 내지 약 10% w/v 또는 약 0.2% w/v 내지 약 5% w/v의 친수성 계면활성제를 포함한다. 이 NLC 조성물은 본 명세서에서 제형 E로서 지칭된다. 제형 E의 임의의 양상에 있어서, 친수성 계면활성제는 0.2% w/v 내지 약 10% w/v 또는 약 0.2% w/v 내지 약 5% w/v를 존재할 수 있다.

[0130] 선택적인 예시적인 실시형태에 있어서, NLC 조성물은 약 2% w/v 내지 약 10% w/v의 액체상 지질, 약 0.1% w/v 내지 약 3% w/v의 고체상 지질, 약 1% w/v 내지 약 5% w/v의 양이온성 지질, 약 1% w/v 내지 약 5% w/v의 솔비탄 에스터, 및 약 1% w/v 내지 약 5% w/v의 친수성 계면활성제를 포함한다. 이 NLC 조성물은 본 명세서에서 제형 F로서 지칭된다.

[0131] 선택적인 예시적인 실시형태에 있어서, NLC 조성물은 약 2% w/v 내지 약 5% w/v의 액체상 지질, 약 0.1% w/v 내지 약 2% w/v의 고체상 지질, 약 2% w/v 내지 약 5% w/v의 양이온성 지질, 약 2% w/v 내지 약 5% w/v의 솔비탄 에스터, 및 약 2% w/v 내지 약 5% w/v의 친수성 계면활성제를 포함한다. 이 NLC 조성물은 본 명세서에서 제형 G로서 지칭된다.

[0132] 선택적인 예시적인 실시형태에 있어서, NLC 조성물은 약 2% w/v 내지 약 10% w/v의 액체상 지질, 약 0.1% w/v 내지 약 3% w/v의 고체상 지질, 약 0.2% w/v 내지 약 2% w/v의 양이온성 지질, 약 0.25% w/v 내지 약 2% w/v의 솔비탄 에스터, 및 약 0.2% w/v 내지 약 5% w/v 또는 약 0.5% w/v 내지 약 5% w/v의 친수성 계면활성제를 포함한다. 이 NLC 조성물은 본 명세서에서 제형 H로서 지칭된다. 제형 H의 임의의 양상에 있어서, 친수성 계면활성제는 약 0.2% w/v 내지 약 5% w/v 또는 약 0.5% w/v 내지 약 5% w/v로 존재할 수 있다.

[0133] 선택적인 예시적인 실시형태에 있어서, NLC 조성물은 약 2% w/v 내지 약 6% w/v의 액체상 지질, 약 0.1% w/v 내지 약 1% w/v의 고체상 지질, 약 0.2% w/v 내지 약 1% w/v의 양이온성 지질, 약 0.25% w/v 내지 약 1% w/v의 솔비탄 에스터, 및 약 0.2% w/v 내지 약 5% w/v 또는 약 0.5% w/v 내지 약 5% w/v의 친수성 계면활성제를 포함한다. 이 NLC 조성물은 본 명세서에서 제형 I로서 지칭된다. 제형 I의 임의의 양상에 있어서, 친수성 계면활성제는 약 0.2% w/v 내지 약 5% w/v 또는 약 0.5% w/v 내지 약 5% w/v로 존재할 수 있다.

[0134] 선택적인 예시적인 실시형태에 있어서, NLC 조성물은 약 2% w/v 내지 약 6% w/v의 액체상 지질, 약 0.1% w/v 내지 약 1% w/v의 고체상 지질, 약 0.2% w/v 내지 약 1% w/v의 양이온성 지질, 약 0.25% w/v 내지 약 1% w/v의 솔비탄 에스터, 및 약 0.2% w/v 내지 약 2% w/v 또는 약 0.2% 내지 약 1%의 친수성 계면활성제를 포함한다. 이 NLC 조성물은 본 명세서에서 제형 J로서 지칭된다.

[0135] 선택적인 예시적인 실시형태에 있어서, NLC 조성물은 약 2% w/v 내지 약 6% w/v의 액체상 지질, 약 0.1% w/v 내지 약 1% w/v의 고체상 지질, 약 0.2% w/v 내지 약 1% w/v의 양이온성 지질, 약 0.25% w/v 내지 약 1% w/v의 솔비탄 에스터, 및 약 0.2% w/v 내지 약 0.5% w/v 또는 0.2% w/v 내지 약 1% w/v의 친수성 계면활성제를 포함한다. 이 NLC 조성물은 본 명세서에서 제형 K로서 지칭된다. 제형 K의 임의의 양상에 있어서, 친수성 계면활성제는 약 0.2% w/v 내지 약 0.5% w/v 또는 0.2% w/v 내지 약 1% w/v로 존재할 수 있다.

[0136] 선택적인 예시적인 실시형태에 있어서, NLC 조성물은 약 10% w/v 내지 약 40% w/v의 액체상 지질, 약 1% w/v 내지 약 2% w/v의 고체상 지질, 약 2% w/v 내지 약 5% 양이온성 지질, 약 3 내지 약 5% w/v의 솔비탄 에스터, 및 약 3% w/v 내지 약 5% w/v의 친수성 계면활성제를 포함한다. 이 NLC 조성물은 본 명세서에서 제형 L로서 지칭된다.

[0137] 선택적인 예시적인 실시형태에 있어서, NLC 조성물은 약 10% w/v 내지 약 20% w/v의 액체상 지질, 약 0.5 내지 약 1.5%의 고체상 지질, 약 3% w/v 내지 약 4% w/v의 양이온성 지질, 약 3 내지 약 4% w/v의 솔비탄 에스터, 및 약 3% w/v 내지 약 5% w/v의 친수성 계면활성제를 포함한다. 이 NLC 조성물은 본 명세서에서 제형 M으로서 지칭된다.

[0138] 선택적인 예시적인 실시형태에 있어서, NLC 조성물은 약 15% w/v의 액체상 지질, 약 1%의 고체상 지질, 약 3%의 양이온성 지질, 약 3.7% w/v의 솔비탄 에스터, 및 약 3.7% w/v의 친수성 계면활성제를 포함한다. 이 NLC 조성물은 본 명세서에서 제형 N으로서 지칭된다.

[0139] 선택적인 예시적인 실시형태에 있어서, NLC 조성물은 약 30% w/v의 액체상 지질, 약 1.8%의 고체상 지질, 약 3%의 양이온성 지질, 약 3.7% w/v의 솔비탄 에스터, 및 약 3.7% w/v의 친수성 계면활성제를 포함한다. 이 NLC 조성물은 본 명세서에서 제형 O로서 지칭된다.

[0140] 선택적인 예시적인 실시형태에 있어서, NLC 조성물은 약 3 내지 약 4% w/v의 액체상 지질, 약 0.2% 내지 약 1%의 고체상 지질, 약 3% 내지 약 5%의 양이온성 지질, 약 3% 내지 약 5%의 솔비탄 에스터, 및 약 3 내지 약 5%의

친수성 계면활성제를 포함한다. 이 NLC 조성물은 본 명세서에서 제형 P로서 지칭된다.

- [0141] 선택적인 예시적인 실시형태에 있어서, NLC 조성물은 약 0.2% w/v 내지 약 40% w/v의 액체상 지질, 약 0.1% w/v 내지 약 10% w/v의 고체상 지질, 약 0.2% w/v 내지 약 10% w/v의 양이온성 지질, 약 0.25% w/v 내지 약 15% w/v의 솔비탄 모노에스터, 및 약 0.5% w/v 내지 약 15% w/v의 친수성 계면활성제를 포함한다. 이 NLC 조성물은 본 명세서에서 제형 Q로서 지칭된다.
- [0142] 선택적인 예시적인 실시형태에 있어서, NLC 조성물은 약 4% w/v의 액체상 지질, 약 0.25% w/v의 고체상 지질, 약 0.4% w/v의 양이온성 지질, 약 0.5% w/v의 솔비탄 에스터, 및 약 2% w/v의 친수성 계면활성제를 포함한다. 이 NLC 조성물은 본 명세서에서 제형 R로서 지칭된다.
- [0143] 선택적인 예시적인 실시형태에 있어서, NLC 조성물은 약 4% w/v의 액체상 지질, 약 0.25% w/v의 고체상 지질, 약 0.4% w/v의 양이온성 지질, 약 0.5% w/v의 솔비탄 에스터, 및 약 0.5% w/v의 친수성 계면활성제를 포함한다. 이 NLC 조성물은 본 명세서에서 제형 S로서 지칭된다.
- [0144] 선택적인 예시적인 실시형태에 있어서, NLC 조성물은 약 3.75% w/v의 액체상 지질, 약 0.25% w/v의 고체상 지질, 약 3% w/v의 양이온성 지질, 약 3.7% w/v의 솔비탄 에스터, 및 약 3.7% w/v의 친수성 계면활성제를 포함한다. 이 NLC 조성물은 본 명세서에서 제형 T로서 지칭된다.
- [0145] 선택적인 예시적인 실시형태에 있어서, NLC 조성물은 약 3.75% w/v의 액체상 지질, 약 0.25% w/v의 고체상 지질, 약 1.5% w/v의 양이온성 지질, 약 3.7% w/v의 솔비탄 에스터, 및 약 1.5% w/v의 친수성 계면활성제를 포함한다. 이 NLC 조성물은 본 명세서에서 제형 U로서 지칭된다.
- [0146] 선택적인 예시적인 실시형태에 있어서, NLC 조성물은 약 4.75% w/v의 액체상 지질, 약 0.25% w/v의 고체상 지질, 약 0.5% w/v의 양이온성 지질, 약 0.5% w/v의 솔비탄 에스터, 및 약 0.4% w/v의 친수성 계면활성제를 포함한다. 이 NLC 조성물은 본 명세서에서 제형 V로서 지칭된다.
- [0147] 선택적인 예시적인 실시형태에 있어서, NLC 조성물은 약 0.2% w/v 내지 약 40% w/v의 액체상 지질, 약 0.2% w/v 내지 약 10% w/v의 양이온성 지질, 약 0.25% w/v 내지 약 5% w/v의 소수성 계면활성제(예컨대, 솔비탄 에스터), 및 약 0.2% w/v 내지 약 10% w/v, 약 0.2% w/v 내지 약 5% w/v, 약 0.5% w/v 내지 약 5% w/v 또는 약 0.5% w/v 내지 약 10% w/v의 친수성 계면활성제를 포함한다. 이 NLC 조성물은 본 명세서에서 제형 W로서 지칭된다. 제형 W의 임의의 양상에 있어서, 친수성 계면활성제는 0.2% w/v 내지 약 10% w/v, 0.2% w/v 내지 약 5% w/v, 0.5% w/v 내지 약 5% w/v 또는 약 0.5% w/v 내지 약 10% w/v로 존재할 수 있다.
- [0148] 당업자라면, 제형 A 내지 W를 비롯하여, 본 명세서에 기재된 NLC 조성물/제형 중 임의의 것이 본 발명에서 사용하기 위하여 희석될 수 있거나 농축될 수 있음을 이해할 것이다. 예를 들어, 전달을 위하여 생물활성제와 혼합된 경우, 제형은 혼합 공정에서 희석될 수 있다. NLC 조성물/제형은 예를 들어 1:2로 희석될 수 있다. 본 명세서에 기재된 NLC 조성물/제형의 모두는, 예를 들어, 약 2 내지 약 500배, 바람직하게는 약 2 내지 약 100배로 희석될 수 있다. 전형적으로, 항상 그런 것은 아니지만, 제형이 전달을 위하여 생물활성제(예컨대, RNA 또는 DNA)와 혼합될 경우 희석이 일어난다. 이들은, 예를 들어, 약 2배, 약 3배, 약 4배, 약 5배, 약 6배, 약 7배, 약 8배, 약 9배, 약 10배, 약 15배, 약 20배, 약 25배, 약 30배, 약 100배, 또는 약 500배로 희석될 수 있다. 숙련된 전문가에 의해 이해되는 바와 같이, 본 발명의 희석된 제형은 액체상 지질, 고체상 지질, 양이온성 성분, 소수성 계면활성제(예컨대, 솔비탄 에스터), 및 계면활성제(예컨대, 친수성 계면활성제)의 감소된 농도를 가질 것이지만, 액체상 지질 대 고체상 지질 대 양이온성 성분 대 소수성 계면활성제(예컨대, 솔비탄 에스터) 대 계면활성제의 비는 동일하게 유지될 것이다. 본 발명은 제형 A 내지 W뿐만 아니라 제형 A 내지 W의 희석된 버전도 제공한다. 몇몇 경우에, 이것은 생물활성제와 혼합된(예컨대, 생물활성제에 복합체화된) 희석된 제형이다. 예를 들어, 특히 바람직한 제형은 2배 희석된 제형 S 또는 제형 T이다. 이러한 희석된 제형 S는 약 2% w/v의 액체상 지질, 약 0.13% w/v의 고체상 지질, 약 0.2% w/v의 양이온성 지질, 약 0.25% w/v의 솔비탄 에스터, 및 약 0.25% w/v의 친수성 계면활성제를 포함한다. 이러한 희석된 제형 T는 약 1.88% w/v의 액체상 지질, 약 0.13% w/v의 고체상 지질, 약 1.5% w/v의 양이온성 지질, 약 1.85% w/v의 솔비탄 에스터, 및 약 1.85% w/v의 친수성 계면활성제이다.
- [0149] 대안적으로, 조성물/제형은, 예를 들어, 약 2 내지 약 30배, 바람직하게는 약 2 내지 약 20배로 농축될 수 있다. 이들은, 예를 들어, 약 2배, 약 3배, 약 4배, 약 5배, 약 6배, 약 7배, 약 8배, 약 9배, 약 10배, 약 15배, 약 20배, 약 25배 또는 약 30배로 농축될 수 있다. 따라서, 본 발명은 제형 A 내지 W뿐만 아니라 제형 A 내지 U의 농축된 버전도 제공한다.

- [0150] 제형 A 내지 V, 및 제형 A 내지 V의 희석된 및 농축된 제형을 포함하는 본 발명의 NLC 제형의 임의의 것에 대해서, 이하 및 이하의 임의의 조합은 하기를 적용할 수 있다: (i) 솔비탄 에스터가 솔비탄 모노에스터, 다이에스터, 또는 트라이에스터인 것; (ii) 솔비탄 에스터가 솔비탄 모노스테아레이트 또는 솔비탄 모노올레레이트 또는 솔비탄 모노라우레이트로부터 선택된 솔비탄 모노에스터, 또는 솔비탄 트라이올레레이트 또는 솔비탄 트라이스테아레이트로부터 선택된 솔비탄 트라이에스터인 것; (iii) 액체상 지질이 스쿠알렌인 것; (iv) 고체상 지질이 글리세로지질인 것; (v) 고체상 지질이 미세결정성 트라이글리세라이드인 것; (vi) 고체상 지질이 트라이미리스틴인 것; (vii) 양이온성 지질이 DOTAP인 것; (viii) 친수성 계면활성제가 폴리솔베이트 80(또한 Tween 80으로도 지칭됨)인 것; (ix) 솔비탄 에스터는 모노에스터이고, 액체상 지질이 스쿠알렌이고; 고체상 지질이 글리세로지질인 것; (x) 솔비탄 에스터가 모노에스터이고, 액체상 지질이 스쿠알렌이고; 고체상 지질이 글리세로지질이고; 양이온성 지질이 DOTAP이고, 친수성 계면활성제가 폴리솔베이트 80인 것; (xi) 솔비탄 에스터가 솔비탄 모노스테아레이트 또는 솔비탄 모노올레레이트 또는 솔비탄 모노라우레이트이고, 액체상 지질은 스쿠알렌이고; 고체상 지질은 트라이미리스틴이고; 양이온성 지질이 DOTAP이고, 친수성 계면활성제가 폴리솔베이트 80인 것; (xii) 솔비탄 에스터가 트라이에스터이고, 액체상 지질이 스쿠알렌이고; 고체상 지질이 글리세로지질인 것; (xiii) 솔비탄 에스터가 트라이에스터이고, 액체상 지질이 스쿠알렌이고; 고체상 지질이 글리세로지질이고; 양이온성 지질이 DOTAP이고, 친수성 계면활성제가 폴리솔베이트 80인 것; (xiv) 솔비탄 에스터가 솔비탄 트라이올레레이트 또는 솔비탄 트라이스테아레이트이고, 액체상 지질이 스쿠알렌이고; 고체상 지질이 트라이미리스틴이고; 양이온성 지질이 DOTAP이고, 친수성 계면활성제는 폴리솔베이트 80인 것.
- [0151] 본 발명은 또한 오일 대 계면활성제 비가 약 0.05 내지 약 12 또는 약 0.05 내지 약 9 또는 약 0.05 내지 약 8 또는 약 0.05 내지 약 1 또는 약 0.1 내지 약 1인, 바로 위의 단락인 단락 [00180](여기서의 단락은 PCT 공개 공보 상의 단락 번호임, 이하 마찬가지로)에서 위에서 나타난 것들을 비롯한, 제형 A 내지 Q를 제공한다. 또한 오일 대 계면활성제 물비가 약 0.5 내지 약 12, 약 1 내지 약 9, 약 2 내지 약 9, 약 3 내지 약 9, 약 4 내지 약 9, 약 4.5 내지 약 9, 또는 약 4.5 또는 약 5 내지 약 7인 단락 [00180]에서 위에서 나타난 것들을 비롯한, 제형 A 내지 Q를 제공한다.
- [0152] 본 발명은 친수성 계면활성제:양이온성 성분(예컨대, 양이온성 지질) 비가 약 0.2 내지 약 1 또는 약 0.5 내지 약 1인, 위에서 나타난 것들을 비롯한, 제형 A 내지 Q를 제공한다.
- [0153] 따라서, 몇몇 예시적인 NLC 조성물은, 오일 대 계면활성제 물비가 약 0.5 내지 약 12, 약 1 내지 약 9, 약 2 내지 약 9, 약 3 내지 약 9, 약 4 내지 약 9, 약 4.5 내지 약 9, 또는 약 4.5 또는 약 5 내지 약 7이고 친수성 계면활성제:양이온성 성분(예컨대, 양이온성 지질) 비가 약 0.2 내지 약 1.5인, 희석된 또는 농축된 제형 A, B, 또는 Q이다.
- [0154] 따라서, 몇몇 예시적인 NLC 조성물은, 오일 대 계면활성제 물비가 약 0.5 내지 약 12, 약 1 내지 약 9, 약 2 내지 약 9, 약 3 내지 약 9, 약 4 내지 약 9, 약 4.5 내지 약 9, 또는 약 4.5 또는 약 5 내지 약 7이고 친수성 계면활성제:양이온성 성분(예컨대, 양이온성 지질) 비가 약 0.2 내지 약 1인, 희석된 또는 농축된 제형 A, B, 또는 Q이다.
- [0155] 몇몇 예시적인 NLC 조성물은, 오일 대 계면활성제 물비가 약 0.5 내지 약 12, 약 1 내지 약 9, 약 2 내지 약 9, 약 3 내지 약 9, 약 4 내지 약 9, 약 4.5 내지 약 9, 또는 약 4.5 또는 약 5 내지 약 7이고 친수성 계면활성제:양이온성 성분(예컨대, 양이온성 지질) 비가 약 0.5 내지 약 1인, 희석된 또는 농축된 제형 A, B, 또는 Q이다.
- [0156] 몇몇 예시적인 NLC 조성물은, 오일 대 계면활성제 물비가 0.05 내지 약 12 또는 약 0.05 내지 약 9 또는 약 0.05 내지 약 8 또는 약 0.05 내지 약 1 또는 약 0.1 내지 약 1이고 친수성 계면활성제:양이온성 성분(예컨대, 양이온성 지질) 비가 약 0.5 내지 약 1.5인, 희석된 또는 농축된 제형 A, B, 또는 Q이다.
- [0157] 몇몇 예시적인 NLC 조성물은, 오일 대 계면활성제 물비가 0.05 내지 약 12 또는 약 0.05 내지 약 9 또는 약 0.05 내지 약 8 또는 약 0.05 내지 약 1 또는 약 0.1 내지 약 1이고 친수성 계면활성제:양이온성 성분(예컨대, 양이온성 지질) 비가 약 0.5 내지 약 1인, 희석된 또는 농축된 제형 A, B, 또는 Q이다.
- [0158] 본 발명은, NLC 입자의 평균 직경이 약 40nm 또는 50nm 내지 약 80nm, 약 40nm 또는 50nm 내지 약 70nm, 약 40nm 또는 50nm 내지 약 60nm인, 단락 [00180] 내지 [00187]에 기재된 제형의 전부를 포함하는 제형 A 내지 W를 제공한다.
- [0159] III. 나노구조 지질 담체의 물리화학적 특징

- [0160] A. 크기
- [0161] NLC의 크기는, x-선 및 레이저 회절, 동적 광 산란(DLS), CryoEM, 또는 Malvern Zetasizer를 포함하지만, 이들 로 제한되는 것은 아닌, 당업계에 공지된 수법에 의해 평가될 수 있다. 몇몇 실시형태에 있어서, NLC의 크기는 Z-평균 직경으로 지칭된다.
- [0162] NLC는 1 마이크로미터 이하의 평균 직경(즉, 수평균 직경)을 갖는다. NLC의 평균 입자 크기(즉, 수평균 직경)가 약 900nm 이하, 약 800nm 이하, 약 700nm 이하, 약 600nm 이하, 약 500nm 이하, 약 400nm 이하, 300nm 이하, 200nm 이하, 100nm 이하 또는 80nm 이하, 예를 들어, 약 50nm 내지 약 900nm, 약 50nm 내지 약 800nm, 약 50nm 내지 약 700nm, 약 50nm 내지 약 600nm, 약 50nm 내지 약 500nm, 약 50nm 내지 약 400nm, 약 50nm 내지 약 300 nm, 약 50nm 내지 약 200nm, 약 50nm 내지 약 175nm, 약 50nm 내지 약 150nm, 약 50nm 내지 약 125nm, 약 50nm 내지 약 100nm, 약 50nm 내지 약 80nm, 약 40nm 내지 약 80nm, 약 20nm 내지 약 80nm, 약 40nm 내지 약 80nm, 또는 약 40nm 내지 약 60nm인 것이 특히 바람직하다. 숙련된 전문가라면, NLC가 NLC 입자로 구성되는 것을 이해 할 것이다. 평균 입자 크기는 NLC를 구성하는 입자의 평균 직경을 지칭한다. NLC 입자의 평균 직경은 전형적으 로 약 40nm이고, 약 60nm이고, 약 80nm이고, 약 85nm이고, 약 90nm이고, 약 95nm이고, 약 100nm이고, 약 105nm 이고, 약 110nm이고, 약 115nm이고, 약 120nm이고, 약 125nm이고, 약 130nm이고, 약 135nm이고, 약 140nm이고, 약 145nm이고, 약 150nm이고, 약 155nm이고, 약 160nm이고, 약 165nm이고, 약 170nm이고, 약 175nm이고, 약 180nm이고, 약 185nm이고, 약 190nm이고, 약 195nm이고, 또는 약 200nm이다.
- [0163] 몇몇 양상에 있어서, NLC 입자의 평균 직경은 약 20nm 내지 약 200nm, 약 20nm 내지 약 150nm, 약 20nm 내지 약 110nm, 약 20nm 내지 약 80nm, 약 20nm 내지 약 70nm, 약 20nm 내지 약 60nm이다.
- [0164] 몇몇 양상에 있어서, NLC 입자의 평균 직경은 약 50nm 내지 약 200nm, 약 50nm 내지 약 150nm, 약 50nm 내지 약 110nm, 약 50nm 내지 약 80nm, 약 50nm 내지 약 70nm, 약 50nm 내지 약 60nm이다.
- [0165] 몇몇 양상에 있어서, NLC 입자의 평균 직경은 약 40nm 내지 약 80 또는 약 40nm 내지 약 60nm이다.
- [0166] 본 발명의 예시적인 NLC는 적어도 0.45 미크론 필터를 통해서 여과 가능하다. 예시적인 실시형태에 있어서, NLC 는 0.20 또는 0.22 미크론 필터를 통해서 여과 가능하다.
- [0167] B. 안정성
- [0168] 본 명세서에서 제공된 예시적인 NLC는 안정적이고, 사용의 용이성, 제조성, 수송성, 및 저장성을 가능하게 한다. 크기를 포함하지만, 이들로 제한되는 것은 아닌 NLC의 물리화학적 특징은 시간 경과에 따라서, 각종 온도 에서 그리고 각종 조건하에서 유지된다.
- [0169] 시간의 함수에 대한 입자 크기의 발달은 콜로이드 안정성 정보를 제공한다. 예시적인 안정적인 NLC 조성물은, 입자가 소정 시간(예컨대, 30일 또는 7일의 시간 기간)에 걸쳐서, 전형적으로 37, 25 또는 5°C로 제한되지 않는 상이한 온도에서 실질적으로 동일한 z-평균 직경 크기를 유지하는 것이다. 실질적으로 동일한 z-평균 직경 크기를 보유함으로써, 입자가 30일의 시간 기간에 걸쳐서 그의 원래의 크기의 20%, 15%, 10%, 5% 이내에 유지하는 것을 의미하는 것이다. 특히 안정적인 NLC 조성물은, 입자가 4°C, 25°C 또는 심지어 37°C에서 30일의 기간에 걸쳐서 실질적으로 동일한 z-평균 직경 크기를 보유하는 것이다.
- [0170] NLC의 안정성은 당업자에게 친숙한 기술에 의해 측정될 수 있다. 몇몇 실시형태에 있어서, 안정성은 시각적으로 관찰된다. 시각 검사는 미립자, 응결물(flocculence) 또는 응집물(aggregate)에 대한 검사를 포함할 수 있다. 전형적으로, 콜로이드성 안정성은, 예컨대, z-평균 직경을 측정함으로써 그리고 선택적으로 시간 경과에 따른 크기의 변화로, 또는 각종 온도에서 또는 소정의 조건 하에 표현되는 NLC의 입자 크기에 의해 결정된다. 몇몇 실시형태에 있어서, 안정성은 입자 크기의 증가를 평가함으로써 결정된다. 몇몇 실시형태에 있어서, 안정성은, 다분산지수(PDI)의 측정에 의해, 예를 들어, 동적 광 산란(DLS) 기술을 사용해서 결정된다. 다른 실시형태에 있 어서, 안정성은 DLS 기술을 사용해서 제타 전위의 측정에 의해 결정된다.
- [0171] 몇몇 실시형태에 있어서, NLC의 Z-평균 직경은 검정된 시간 기간에 걸쳐서 50% 미만, 40% 미만, 30% 미만, 25% 미만, 20% 미만, 15% 미만, 12% 미만, 10% 미만, 7% 미만, 5% 미만, 3% 미만, 1% 미만 증가한다.
- [0172] 몇몇 실시형태에 있어서 NLC의 다분산지수는 약 0.5에서, 약 0.4에서, 약 0.3에서, 약 0.2에서, 약 0.1에서 또 는 약 0.1 내지 약 0.5에서, 약 0.1 내지 약 0.4에서, 약 0.1 내지 약 0.3에서, 약 0.1 내지 약 0.2에서, 약 0.2 내지 약 0.4에서, 또는 약 0.2 내지 약 0.3에서 유지된다. 몇몇 바람직한 양상에 있어서, 다분산지수는 0.1

초과, 0.15 초과, 또는 0.2 초과이다.

- [0173] 본 발명의 예시적인 NLC-기반 조성물은 25℃에서 6개월 초과 동안 안정적이다(예컨대, 실질적으로 동일한 z-평균 직경 크기를 유지한다)
- [0174] IV. 생물활성제
- [0175] 몇몇 예시적인 실시형태에 있어서, 생물활성제를 전달하기 위하여, 본 발명의 제형은 1종 이상의 생물활성제와 혼합되거나 또는 다르게는 이와 제형화된다. 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 "생물활성제"는 본 개시내용의 제형에 의해 전달될 임의의 재료를 지칭하며, 제한 없이, 거대분자, 펩타이드, 단백질, 펩티도미메틱(peptidomimetics), 핵산, 올리고뉴클레오타이드, 테옥시리보뉴클레오타이드, 플라스미드 DNA, 환형 DNA, 선형 DNA, 단일-가닥 DNA, 변형된 DNA, 안티센스 DNA, 리보뉴클레오타이드, mRNA, 화학적으로 변형된 RNA, 비-암호화 RNA, miRNA, siRNA, tRNA, 리보솜 RNA, RNA 리보자임, 레플리콘 RNA, RNA 앵타머, DNA 앵타머, 이중-가닥 RNA, 염기-치환 RNA, 이노신-함유 RNA, 아쥘반트, 예컨대, TLR 작용제(예를 들어, TLR2, TLR3, TLR4, TLR 7, TLR8 및 TLR9 작용제), Rig-I 작용제, 사포닌, 탄수화물, 탄수화물 중합체, 공액된 탄수화물, 전체 바이러스 입자, 바이러스-유사 입자, 바이러스 단편 및 세포 단편을 포함할 수 있다. 비제한적인 예시적인 아쥘반트는 이중-가닥 RNA, RIBOXXOL, 폴리(I:C) 및 Hiltonol®(폴리-ICLC)를 포함한다. Hiltonol®(폴리-ICLC)은 카복시메틸셀룰로로스, 폴리이노신-폴리사이티딜산 이중-가닥 RNA, 및 폴리-L-라이신의 합성 복합체이다. RIBOXXOL은 어닐링된 50 bp RNA 듀플렉스(Riboxx GmbH)이다. 세포에 안전하게 전달될 수 있는 임의의 생물활성제는 본 발명의 NLC와 혼합될 수 있다. 음으로 하전된 분자가 전달될 경우, 몇몇 실시형태에 있어서, 양이온성 NLC 표면은 음으로 하전된 생물활성제와 상호작용함으로써, 분자를 NLC에 고정시킬 수 있다.
- [0176] 생물활성제로서 사용될 예시적인 음으로 하전된 분자는, 예를 들어, 펩타이드-함유 항원, 하나 이상의 펩타이드-함유 항원을 암호화하는 핵산 분자(예컨대, RNA 또는 DNA), 음으로 하전된 다당류, 음으로 하전된 소분자, 및 음으로 하전된 면역학적 아쥘반트를 포함한다. 음으로 하전된 면역학적 아쥘반트는, 예를 들어, 면역자극 올리고뉴클레오타이드(예컨대, CpG 올리고뉴클레오타이드), 단일-가닥 RNA, 소분자 면역 증강제(SMIP) 등을 포함한다. 음으로 하전된 소분자는, 예를 들어, 포스포네이트, 플루오로포스포네이트 등을 포함한다.
- [0177] 현재의 아쥘반트는 크기 Th2 편향된(biased), 예컨대, 명반(alum)이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 암 및 감염성 질환 표적(예컨대 결핵, 몇 가지 바이러스 질환 등)뿐만 아니라 알러지에 대한 백신에 대해서, Th1 편향을 촉진시키는 아쥘반트는 부적당한 요구이다. 이와 관련하여, 본 명세서에 기재된 바와 같이, 본 발명자들은, 예를 들어, TLR3 작용제에 대해서 Th1 편향을 촉진시키는 제형을 입증하였다. 이러한 제형은 IFN 감마 생산을 촉진시키고, IL-5를 하향 조절하고, Th1 바이어스가 요망되는 다양한 용도에 대해서 적합하다.
- [0178] 1종 이상의 생물활성제는 본 발명의 제형과 회합될 수 있다. 당업자는 생물활성제의 다양한 조합이, 제형, 예컨대, 제한되지 않지만, 다수의 RNA, 다수의 DNA, 정의된 물질의 하나 이상의 RNA 및 하나 이상의 단백질, 하나 이상의 DNA 및 하나 이상의 단백질, 및 하나 이상의 RNA 및 하나 이상의 DNA와 회합될 수 있는 것이 이해될 것이다. 몇몇 양상에 있어서, 하나의 생물활성제가 NLC의 오일 코어에 존재할 수 있는 한편, 다른 하나는 NLC의 표면과 회합된다. 예를 들어, 핵산은 NLC 표면과 회합될 수 있는 한편, 생물학적으로 활성인 소분자는 NLC의 오일 코어 내에 존재할 수 있다.
- [0179] 예시적인 실시형태에 있어서, 음으로 하전된 생물활성제는 양이온성 표면과의 회합에 의해 NLC와 복합체화된다. NLC 표면과 음으로 하전된 생물활성제의 회합은 비공유 또는 가역적 공유 상호작용일 수 있다.
- [0180] 또 다른 실시형태에 있어서, 소수성 생물활성제, 예컨대, 톨-유사 수용체 리간드(예컨대, TLR4 리간드)는 NLC 입자의 계면에서 오일 코어에서 혼입될 수 있다.
- [0181] A. RNA 분자
- [0182] 생물활성제가 RNA 분자인 실시형태에 있어서, RNA 분자는, 제한 없이, 항원, 항체, 독소, 성장 인자, 사이토카인 및 호르몬을 비롯하여 다양한 유형의 단백질을 암호화할 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 RNA 분자는 또한, 제한 없이, siRNA, miRNA, CRISPR 가이드 RNA, 리보자임 RNA, 헤어핀, RNA 앵타머, RNA 작용제, 및 면역조절 RNA를 비롯하여 비-암호화 RNA를 나타낼 수 있다.
- [0183] 예시적인 실시형태에 있어서, 음으로 하전된 RNA 분자는 양이온성 표면과의 회합에 의해 NLC와 복합체화된다. RNA 분자와 NLC 표면의 회합은 비-공유 또는 가역적 공유 상호작용일 수 있다.
- [0184] 예시적인 실시형태에 있어서, 생물활성제는 자가복제 RNA 분자이다. 자가복제 RNA 분자는 당업계에 잘 알려져

있고, 바이러스(예컨대, 알파바이러스, 플라비바이러스, 피코르나바이러스)로부터 유래된 복제 요소를 이용하고, 구조 바이러스 단백질을 관심대상 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열과 치환함으로써 생성될 수 있다. 자가복제 RNA 분자는 전형적으로 세포에 전달 후에 직접 번역될 수 있는 (+)-가닥 분자이고, 이 번역은 RNA-의존적 RNA 중합효소를 제공하며, 이어서 전이된 RNA로부터 안티센스 및 센스 전사물 둘 다를 생산한다. 따라서, 전이된 RNA는 다수의 딸 RNA의 생산을 초래한다. 동일 선형(co-linear) 서브게놈 전사물뿐만 아니라 이들 딸 RNA는, 암호화된 항원의 동소(*in situ*) 발현을 제공하도록 그 자체로 번역될 수 있거나, 또는 항원의 동소 발현을 제공하도록 번역되는 전이된 RNA와 동일한 센스를 가진 추가의 전사물을 제공하도록 번역될 수도 있다. 이 전사 서열의 전체적인 결과는 도입된 레플리콘 RNA의 수의 증폭이고, 이에 따라서 암호화된 항원은 세포의 주된 폴리펩타이드 산물이 된다.

[0185] 유리하게는, 세포의 번역 기구는 암호화된 유전자 산물, 예컨대, 단백질 또는 항원의 유의한 증가를 일으키도록 자가복제 RNA 분자에 의해 사용되며, 이는 세포에 축적될 수 있거나 또는 세포로부터 분비될 수 있다. 자가복제 RNA 분자는, 예를 들어, 톨-유사 수용체(TLR) 3, 7 및 8, 및 비 TLR 경로(예컨대, RIG-I, MD-5)를 RNA 복제 및 증폭, 그리고 번역의 산물에 의해 자극시킬 수 있는데, 이는 형질주입된 세포의 세포자멸사를 유도할 수도 있다.

[0186] 자가복제 RNA는, 예를 들어, 바이러스 레플리카제, 바이러스 프로테아제, 바이러스 헬리카제 및 기타 비구조 바이러스 단백질로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나 이상의 유전자를 함유할 수 있고, 또한 5'- 및 3'-단부 시스-활성 복제 서열, 및 필요한 경우, 목적하는 아미노산 서열(예컨대, 관심대상 항원)을 암호화하는 비상동 서열을 포함할 수 있다. 비상동 서열의 발현을 지시하는 서브게놈 프로모터가 자가복제 RNA에 포함될 수 있다. 필요한 경우, 비상동 서열(예컨대, 관심대상 항원)은, 펩타이드 자가복제 RNA에서의 리보솜 스킵핑 펩타이드 서열을 이용해서 또는 이것 없이, 다른 암호화 영역에 프레임내 융합될 수 있고/있거나, 내부 리보솜 도입 부위(internal ribosome entry site: IRES)의 통제 하에 있을 수 있다.

[0187] 소정의 실시형태에 있어서, 자가복제 RNA 분자는 바이러스-유사 입자에 캡슐화되지 않는다. 본 발명의 자가복제 RNA 분자는, 자가복제 RNA 분자가 감염성 바이러스 입자의 생산을 유도할 수 없도록 설계될 수 있다. 이것은, 예를 들어, 자가복제 RNA에서 바이러스 입자의 생산에 필요한 구조 단백질을 암호화하는 하나 이상의 바이러스를 생략함으로써, 달성될 수 있다. 예를 들어, 자가복제 RNA 분자가 알파 바이러스, 예컨대, 신드비스 바이러스(SIN), 쉼리키 삼립열 바이러스 및 베네수엘라 말머염 바이러스(VEE)에 기반되는 경우, 바이러스 구조 단백질, 예컨대, 캡시드(capsid: C) 및/또는 외피(E) 당단백질을 암호화하는 유전자가 생략될 수 있다.

[0188] 필요한 경우, 본 발명의 자가복제 RNA 분자는 또한 약독화되거나 맹독성인 감염성 바이러스 입자의 제조를 유도하거나, 또는 후속의 감염의 단일 라운드일 수 있는 바이러스 입자를 제조하도록 설계될 수 있다.

[0189] 이 방식으로 자가-복제를 달성하기 위한 하나의 적합한 시스템은 알파바이러스-기반 레플리콘을 사용하는 것이다. 알파바이러스는 토가비리과과의 유전적, 구조적 및 혈청학적으로 관련된 절지동물-유래 바이러스의 세트를 포함한다. 31개 종은, 신드비스 바이러스, 쉼리키 삼립열 바이러스, 로즈 리버 바이러스, 치쿤구니아 바이러스 및 베네수엘라 말머염 바이러스를 포함하는 알파바이러스속 내에 분류되었다. 그와 같이, 본 발명의 자가복제 RNA는 쉼리키 삼립열 바이러스(SFV), 신드비스 바이러스(SIN), 베네수엘라 말머염 바이러스(VEE), 로즈-리버 바이러스(RRV), 동부 말머염 바이러스, 치쿤구니아 바이러스, 또는 알파바이러스속에 속하는 기타 바이러스로부터 유래된 RNA 레플리카제를 혼입할 수 있다.

[0190] 알파바이러스-기반 "레플리콘" 발현 벡터가 본 발명에서 사용될 수 있다. 레플리콘 벡터는 DNA, RNA 및 재조합 레플리콘 입자를 포함하는 수 개의 포맷으로 사용될 수 있다. 그러한 레플리콘 벡터는, 예를 들어, 신드비스 바이러스(Xiong et al. (1989) Science 243: 1188-1191; Dubensky et al., (1996) J. Virol. 70:508-519; Hariharan et al. (1998) J. Virol. 72:950-958; Polo et al. (1999) PNAS 96:4598-4603), 쉼리키 삼립열 바이러스(Liljestrom (1991) Bio/Technology 9: 1356-1361; Berglund et al. (1998) Nat. Biotech. 16:562-565), 및 베네수엘라 말머염 바이러스(Pushko et al. (1997) Virology 239:389-401)를 포함하는 알파바이러스로부터 유래되었다. 알파바이러스-유래 레플리콘은 전체적인 특징(예컨대, 구조, 복제)이 일반적으로 상당히 유사하고, 개별 알파바이러스는 독특한 몇몇 특수한 특성(예컨대, 인터페론 감수성, 및 질환 프로파일)을 나타낼 수 있다. 따라서, 다른 바이러스과로부터 만들어진 키메라 알파바이러스 레플리콘이 또한 유용할 수도 있다.

[0191] 알파바이러스-기반 RNA 레플리콘은 전형적으로 세포에의 전달 후에 레플리카제(또는 레플리카제-전사효소)의 번역을 초래하는 (+)-가닥 RNA이다. 레플리카제는 폴리단백질로서 번역되며, 이 폴리단백질은 자가 분할되어, (+)-가닥 전이된 RNA의 게놈 (-)-가닥 카피를 생성하는 복제 복합체를 제공한다. 이들 (-)-가닥 전사물은 자체

로 번역되어 (+)-가닥 모 RNA의 추가의 카피를 제공할 수 있고 그리고 또한 항원을 암호화하는 서브게놈 전사물을 제공할 수 있다. 따라서 서브게놈 전사물의 번역은 감염된 세포에 의해 항원의 동소 발현을 초래한다. 적합한 알파바이러스 레플리콘은 신드비스 바이러스, 쉼리키 삼립열 바이러스, 동부 말뇌염 바이러스, 베네수엘라 말뇌염 바이러스 등으로부터의 레플리카제를 사용할 수 있다.

[0192] RNA 레플리콘은, 예를 들어, 하나 이상의 구조 단백질 유전자를 관심대상 산물을 암호화하는 선택된 비상동 핵산 서열로 대체하는 것에 의해 변형된, 피코르나바이러스, 토가바이러스(예컨대, 알파바이러스, 에컨대, 신드비스 바이러스, 쉼리키 삼립열 바이러스, 베네수엘라 말뇌염 바이러스, 또는 로즈 리버 바이러스), 플라비바이러스(예컨대, 황열 바이러스), 코로나바이러스, 파라믹소바이러스로부터의 RNA 게놈을 포함할 수 있다.

[0193] 몇몇 양상에 있어서, 레플리콘은, (i) 레플리콘으로부터 RNA를 번역할 수 있는 RNA-의존적 RNA 중합효소 및 (ii) 항원을 암호화할 것이다. 중합효소는, 예를 들어, 알파바이러스 단백질 nsP1, nsP2, nsP3 및 nsP4 중 하나 이상을 포함하는, 예를 들어, 알파바이러스 레플리카제일 수 있다. 천연 알파바이러스 게놈이 비-구조 레플리카제 폴리단백질에 부가해서 구조 비리온 단백질을 암호화하는 한편, 레플리콘이 알파바이러스 구조 단백질을 암호화하지 않는 것이 바람직하다. 따라서, 레플리콘은 RNA-함유 비리온의 생산이 아니라, 세포 내에 자체의 게놈 RNA 카피의 생산을 초래할 수 있다. 이들 비리온을 생산하는 불능이란, 야생형 알파바이러스와 달리, 바람직한 레플리콘이 감염성 형태에서 이 자체를 영속시킬 수 없는 것을 의미한다. 야생형 바이러스에서 영구화를 위하여 필요한 알파바이러스 구조 단백질은 바람직한 레플리콘으로부터 존재하지 않고, 이의 배치는 관심대상 항원을 암호화하는 유전자(들)에 의해 취해지므로, 서브게놈 전사물이 구조 알파바이러스 비리온 단백질이라기보다 오히려 항원을 암호화한다.

[0194] 본 발명에 유용한 레플리콘은, 예를 들어, 2개의 오픈 리딩 프레임(open reading frame)을 가질 수 있다. 일례에 있어서, 제1 (5') 오픈 리딩 프레임은 레플리카제를 암호화하고; 제2 (3') 오픈 리딩 프레임은 항원을 암호화한다. 몇몇 실시형태에 있어서 RNA는 에컨대 추가의 항원을 암호화하거나 또는 보조 폴리펩타이드를 암호화하기 위하여 추가의 (에컨대 상류) 오픈 리딩 프레임을 가질 수 있다.

[0195] 레플리콘은, 예를 들어, 5' 캡(에컨대, 7-메틸구아노신)을 가질 수 있고, 이는 종종 RNA의 생체내 번역을 증대시킬 수 있다. 몇몇 실시형태에 있어서, 레플리콘의 5' 서열은 암호화된 레플리카제와의 양립성을 확보하기 위하여 선택될 필요가 있을 수 있다.

[0196] 레플리콘은 3' 폴리-A 꼬리를 가질 수 있다. 이것은 또한 이의 3' 단부 부근에 폴리-A 중합효소 인식 서열(에컨대 AAUAAA)을 포함할 수 있다.

[0197] 레플리콘은 각종 길이를 가질 수 있지만, 이는 전형적으로 5000 내지 25000개 뉴클레오타이드, 에컨대 8000 내지 15000개 뉴클레오타이드, 또는 9000 내지 12000개 뉴클레오타이드 길이이다.

[0198] 레플리콘은 편리하게 시험관내 전사(IVT)에 의해 제조될 수 있다. IVT는 (예를 들어, 유전자 합성 및/또는 중합효소 연쇄-반응(PCR) 조작 방법에 의해) 합성적으로 작성되었거나, 또는 박테리아에서 플라스미드 형태로 작성되고 전파된 (cDNA) 주형을 사용할 수 있다. 예를 들어, DNA-의존적 RNA 중합효소(에컨대, 박테리오파지 T7, T3 또는 SP6 RNA 중합효소)는 DNA 주형으로부터 레플리콘을 전사하는데 사용될 수 있다. 적절한 캐핑 및 폴리-A 부가 반응은, (레플리콘의 폴리-A가 통상 DNA 주형 내에서 암호화되더라도) 필요에 따라서 이용될 수 있다. 이들 RNA 중합효소는 전사된 5' 뉴클레오타이드(들)에 대한 엄격한 요건을 가질 수 있고, 몇몇 실시형태에 있어서 이들 요건은, IVT-전사된 RNA가 그의 자체-암호화된 레플리카제에 대한 기질로서 효과적으로 기능할 수 있는 것을 보증하도록, 암호화된 레플리카제의 요건과 정합되어야 한다. 구체예는, 에컨대, 미국 특허 제5,814,482호 및 제6,015,686호뿐만 아니라, 국제 공개 번호 WO 97/38087, WO 99/18226 및 WO 02/26209에 기재된, 신드비스-바이러스-기반 플라스미드(pSIN), 에컨대, pSINCP를 포함한다. 이러한 레플리콘의 작제는, 일반적으로 미국 특허 제5,814,482호 및 제6,015,686호에 기재되어 있다.

[0199] 다른 양상에 있어서, 자가복제 RNA 분자는 알파바이러스 이외의 바이러스, 바람직하게는, 양성-가닥 RNA 바이러스, 피코르나바이러스, 플라비바이러스, 루비바이러스, 페스티바이러스, 헤파시바이러스, 칼리시바이러스, 또는 코로나바이러스로부터 유래되거나 또는 이에 기반한다. 적합한 야생형 알파바이러스 서열은 잘 알려져 있고, 서열 기탁소, 에컨대, American Type Culture Collection(메릴랜드주 록빌 소재)로부터 입수 가능하다. 적합한 알파바이러스의 대표적인 예는 아우라(Aura)(ATCC VR-368), 베baru 바이러스(Bebaru virus)(ATCC VR-600, ATCC VR-1240), 카바소우(Cabassou)(ATCC VR-922), 치쿤구냐 바이러스(ATCC VR-64, ATCC VR-1241), 동부 말 뇌척수막염 바이러스(ATCC VR-65, ATCC VR-1242), 포트 모건(Fort Morgan)(ATCC VR- 924), 게타 바이러스(Getah

virus)(ATCC VR-369, ATCC VR-1243), 키질라가크(Kyzylagach)(ATCC VR-927), 마야로(Mayaro)(ATCC VR-66), 마야로 바이러스(ATCC VR-1277), 미들버그(Middleburg)(ATCC VR-370), 무캄보 바이러스(Mucambo virus)(ATCC VR-580, ATCC VR-1244), 엔두무(Ndumu)(ATCC VR-371), 픽수나 바이러스(Pixuna virus)(ATCC VR-372, ATCC VR-1245), 로즈 리버 바이러스(ATCC VR-373, ATCC VR-1246), 쉼리키 삼립열(ATCC VR-67, ATCC VR-1247), 신드비스 바이러스(ATCC VR-68, ATCC VR-1248), 토네이트(Tonate)(ATCC VR- 925), 트리니티(Trinititi)(ATCC VR-469), 우나(Una)(ATCC VR-374), 베네수알레인 말 뇌척수막염(ATCC VR-69, ATCC VR-923, ATCC VR-1250 ATCC VR-1249, ATCC VR-532), 서부 말 뇌척수막염(ATCC VR-70, ATCC VR-1251, ATCC VR-622, ATCC VR-1252), 와타로아(Whataroa)(ATCC VR-926), 및 Y-62-33(ATCC VR-375)을 포함한다.

[0200] 다른 양상에 있어서, 자가복제 RNA 분자는 복제 가능 바이러스(replication competent virus)(예컨대, 종양붕괴성 바이러스(oncolytic virus))로부터 유래되거나 이에 기반한다. 종양붕괴성 바이러스는 우선적으로 암세포를 감염시키고 용해시킨다. 감염된 암 세포가 파괴됨에 따라서, 새로운 감염성 바이러스 입자 또는 비리온이 방출되어, 추가의 암 세포를 감염시키고 파괴시킬 수 있다. 따라서, 종양붕괴성 바이러스는 암 세포의 직접 파괴를 초래할 뿐만 아니라, 숙주 항암 면역 반응을 자극시킨다. 몇몇 실시형태에 있어서, 종양붕괴성 바이러스는 종양 - 또는 바이러스-연관 항원, 네오항원, 및/또는 펩타이드를 암호화할 수 있다. 적합한 종양붕괴성 바이러스는 당업계에 공지되어 있고, 서열 기탁소, 예컨대 American Type Culture Collection(메릴랜드주 록빌 소재)로부터 입수 가능하다. 적합한 종양붕괴성 바이러스의 대표적인 예는 폭스바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스, 레오바이러스, 레트로바이러스, 세네카바이러스, 홍역, 단순포진 바이러스, 뉴캐슬 질화 바이러스(NDV), 수포성 구내염 바이러스(VSV), 볼거리, 인플루엔자, 파코바이러스, 인간 한타 바이러스, 점액종 바이러스, 사이토메갈로바이러스(CMV), 렌티바이러스, 콕사키바이러스, 에코바이러스, 세네카 벨리 바이러스, 신드비스 바이러스, JX-594, p53 발현 바이러스, ONYX-15, Delta24, 텔레메라이신(Telemelysin), 텔레메라이신-GFP, 및 백시니아 등, 및 이들의 재조합 변이체를 포함하지만, 이들로 제한되는 것은 아니다. 몇몇 실시형태에 있어서, 종양붕괴성 바이러스는 종양 선택성을 위하여 유전자 조작된다. 다른 실시형태에 있어서, 종양붕괴성 바이러스는 천연형이다. 천연형 종양붕괴성 바이러스는 레오바이러스 및 세네카바이러스를 포함하지만, 이들로 제한되는 것은 아니다.

[0201] 본 발명의 자가복제 RNA 분자는 전형적으로 변형된 뉴클레오타이드를 사용해서 제조된 다른 유형의 RNA(예컨대 mRNA)보다 더 크다. 전형적으로, 본 발명의 자가복제 RNA 분자는 적어도 약 3 kb를 함유하고. 예를 들어, 자가복제 RNA는 적어도 약 4 kb, 적어도 약 5 kb, 적어도 약 6 kb, 적어도 약 7 kb, 적어도 약 8 kb, 적어도 약 9 kb, 적어도 약 10 kb, 적어도 약 11 kb, 적어도 약 12 kb 또는 12 kb 초과를 함유할 수 있다. 소정의 예에서, 자가복제 RNA는 약 4 kb 내지 약 12 kb, 약 5 kb 내지 약 12 kb, 약 6 kb 내지 약 12 kb, 약 7 kb 내지 약 12 kb, 약 8 kb 내지 약 12 kb, 약 9 kb 내지 약 12 kb, 약 10 kb 내지 약 12 kb, 약 11 kb 내지 약 12 kb, 약 5 kb 내지 약 11 kb, 약 5 kb 내지 약 10 kb, 약 5 kb 내지 약 9 kb, 약 5 kb 내지 약 8 kb, 약 5 kb 내지 약 7 kb, 약 5 kb 내지 약 6 kb, 약 6 kb 내지 약 12 kb, 약 6 kb 내지 약 11 kb, 약 6 kb 내지 약 10 kb, 약 6 kb 내지 약 9 kb, 약 6 kb 내지 약 8 kb, 약 6 kb 내지 약 7 kb, 약 7 kb 내지 약 11 kb, 약 7 kb 내지 약 10 kb, 약 7 kb 내지 약 9 kb, 약 7 kb 내지 약 8 kb, 약 8 kb 내지 약 11 kb, 약 8 kb 내지 약 10 kb, 약 8 kb 내지 약 9 kb, 약 9 kb 내지 약 11 kb, 약 9 kb 내지 약 10 kb, 또는 약 10 kb 내지 약 11 kb이다.

[0202] 본 발명의 자가복제 RNA 분자는 하나 이상의 유형의 변형된 뉴클레오타이드(예컨대, 슈도유리딘, N6-메틸아데노신, 5-메틸시티딘, 5-메틸유리딘)를 포함할 수 있다.

[0203] 자가복제 RNA 분자는, 단일 비상동 폴리펩타이드 항원, 또는 선택적으로, 서열의 각각이 아미노산 서열로서 표현될 경우 이의 동질성을 보유하도록 하는 방식으로 함께 연관된(예컨대, 일렬로 연결된) 2개 이상의 비상동 폴리펩타이드 항원을 암호화할 수 있다. 이어서, 자가복제 RNA로부터 생성된 비상동 폴리펩타이드는 융합 폴리펩타이드로서 생산될 수 있거나 또는 별개의 폴리펩타이드 또는 펩타이드 서열을 초래하는 방식으로 조작될 수 있다.

[0204] 본 발명의 자가복제 RNA는 하나 이상의 폴리펩타이드를 암호화할 수 있다. 이들 폴리펩타이드는 결합 단백질, 효소, 사이토카인, 케모카인, 호르몬 또는 다른 기능적 단백질로 이루어질 수 있다. 대안적으로, 이들 폴리펩타이드는 일정 범위의 에피토프, 바람직하게는 헬퍼 T-세포 반응 또는 세포독성 T-세포 반응 또는 둘 다를 유도할 수 있는 에피토프를 함유하는 항원으로 이루어질 수 있다.

[0205] 본 명세서에 기재된 자가복제 RNA 분자는 2개 이상의 오픈 리딩 프레임으로부터 다수의 뉴클레오타이드 서열을 발현하도록 조작될 수 있고, 이에 의해서 단백질, 예컨대, 사이토카인 또는 다른 면역 조절자와 함께 2개 이상

의 항체 서열 또는 2개 이상의 항원의 공-발현을 가능하게 하고, 이는 면역 반응의 발생을 증대시킬 수 있다. 이러한 자가복제 RNA 분자는, 예를 들어, 동시에, 예를 들어, 2가 또는 다가 백신을 생성하기 위하여 2개 이상의 상이한 단쇄 항체 서열, 중쇄 및 경쇄 항체 서열 또는 다수의 항원으로서 다양한 유전자 산물(예컨대, 단백질)의 생산에서 특히 유용할 수 있다.

[0206] 본 발명의 자가복제 RNA 분자는 임의의 적합한 방법을 이용해서 제조될 수 있다. 수 개의 적합한 방법이 변형된 뉴클레오타이드를 함유하는 RNA 분자를 제조하기 위하여 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 변형된 뉴클레오타이드를 함유하는 자가복제 RNA 분자는, 변형된 뉴클레오타이드의 RNA 분자 내로의 효율적인 편입을 허용하는, 적합한 DNA-의존적 RNA 중합효소, 예컨대, T7 파지 RNA 중합효소, SP6 파지 RNA 중합효소, T3 파지 RNA 중합효소 등, 또는 이들 중합효소의 돌연변이체를 이용해서 자가복제 RNA 분자를 암호화하는 DNA를 전사(예컨대, 시험관내 전사)함으로써 제조될 수 있다. 전사 반응은 뉴클레오타이드 및 변형된 뉴클레오타이드, 및 선택된 중합효소의 활성도를 지원하느 기타 성분, 예컨대, 적합한 완충제, 및 적합한 염을 함유할 것이다. 자가복제 RNA 내로의 뉴클레오타이드 유사체의 혼입은, 예를 들어, 이러한 RNA 분자의 안정성을 변경시키고, RNase에 대한 저항을 증가시키고, 적절한 숙주 세포 내로의 도입 후에 복제를 확립시키고(RNA의 "감염성"), 그리고/또는 선택적 및 적응적 면역 반응을 유도 또는 저감시키기 위하여 조작될 수 있다.

[0207] 적합한 합성 방법은, 본 발명의 자가복제 RNA 분자를 생성하기 위하여, 단독으로 또는 하나 이상의 다른 방법(예컨대, 재조합 DNA 또는 RNA 수법)과 조합하여 사용될 수 있다. 드 노보(de novo) 합성을 위한 적합한 방법은 당업계에 잘 알려져 있고, 특정 용도에 적응될 수 있다. 예시적인 방법은, 예를 들어, 적합한 보호기, 예컨대, CEM, β -사이아노에틸 포스포라미다이트 방법; 및 뉴클레오사이드 H-포스포네이트 방법을 이용하는 화학적 합성을 포함한다. 이들 화학 물질은 상업적으로 입수 가능한 자동화 핵산 합성기와 함께 사용하기 위하여 수행되거나 적응될 수 있다. 추가의 적합한 합성 방법은 문헌[Uhlmann et al. (1990) Chem Rev 90:544-84, 및 Goodchild J (1990) Bioconjugate Chem 1: 165]에 개시되어 있다. 핵산 합성은 또한 당업계에 잘 알려지고 통상적인 적합한 재조합 방법, 예컨대, 이러한 폴리뉴클레오타이드에 의해 암호화된 폴리뉴클레오타이드 및 유전자 산물의 클로닝, 처리 및/또는 발현을 이용해서 수행될 수 있다. 유전자 단편 및 합성 폴리뉴클레오타이드의 랜덤 단편화 및 PCR 리어셈블리에 의한 DNA 셔플링(shuffling)은 폴리뉴클레오타이드 서열을 설계하고 조작하는데 사용될 수 있는 공지된 수법의 예이다. 부위-지향 돌연변이 생성은, 핵산 및 암호화된 단백질을 변경하고, 예를 들어, 새로운 제한 부위를 삽입하고, 글리코실화 패턴을 변경하고, 코돈 선호도를 변화시키고, 스플라이스 변이체를 생성하고, 돌연변이를 도입하는 등에 사용될 수 있다. 핵산 서열의 전사, 번역 및 발현을 위한 적합한 방법은 당업계에 공지되어 있고 통상적이다.

[0208] 자가복제 RNA 분자에서 하나 이상의 변형된 뉴클레오타이드의 존재 및/또는 양은 임의의 적합한 방법을 이용해서 결정될 수 있다. 예를 들어, 자가복제 RNA는 (예컨대, 뉴클레아제 PI를 사용해서) 모노포스페이트로 소화될 수 있고 (예컨대, 적합한 포스파타제, 예컨대, CIAP를 사용해서) 탈포스포릴화될 수 있고, 얻어지는 뉴클레오사이드는 역상 HPLC에 의해 분석될 수 있다.

[0209] 선택적으로, 본 발명의 자가복제 RNA 분자는 하나 이상의 변형된 뉴클레오타이드를 포함할 수 있으므로, 자가복제 RNA 분자는, 변형된 뉴클레오타이드를 함유하지 않는 대응하는 자가복제 RNA 분자에 비해서 숙주 세포 (예컨대, 인간 세포) 내로의 도입 또는 진입 시 더 적은 면역조절 활성도를 가질 것이다.

[0210] 필요한 경우, 자가복제 RNA 분자는 당업자에게 공지된 다양한 시험관내 또는 생체내 시험 방법을 이용해서 이들의 치료 및 예방 특성을 확인하기 위하여 선별 또는 분석될 수 있다. 예를 들어, 자가복제 RNA 분자를 포함하는 백신들은 관심대상 특정 림프구 유형, 예컨대, B 세포, T 세포, T 세포주 및 T 세포 클론의 증식 또는 효과기 기능의 유도에 대한 그들의 효과에 대해서 시험될 수 있다. 예를 들어, 면역화된 마우스의 비장 세포는 분리될 수 있고, 세포독성 T 림프구는 폴리펩타이드 항원을 암호화하는 자가복제 RNA 분자를 함유하는 자가 표적 세포를 용해시키는 능력을 가질 수 있다. 또한, T 헬퍼 세포 분화는 항원 자극 후에 세포질 사이토카인 염색 및 유동 세포분석법에 의해 CD4+ T 세포에서 직접 또는 ELISA에 의해 TH1(IL-2 및 IFN- γ) 및/또는 TH2(IL-4 및 IL-5) 사이토카인의 증식 또는 생산을 측정함으로써 분석될 수 있다.

[0211] 폴리펩타이드 항원을 암호화하는 자가복제 RNA 분자는 또한, 예를 들어, 관심대상 항원에 특이적인 항체의 B 세포 생산의 유도에 의해 입증된 바와 같이, 호르몬 면역 반응을 유도하는 능력에 대해서 시험될 수 있다. 이들 검정은, 예를 들어, 면역화된 개체로부터 말초 B 림프구를 이용해서 수행될 수 있다. 이러한 검정 방법은 당업자에게 공지되어 있다. 본 발명의 자가복제 RNA 분자를 특성 규명하는데 사용될 수 있는 다른 검정법은 표적 세포에 의해 암호화된 항원의 발현을 검출하는 것을 포함할 수 있다. 예를 들어, FACS는 세포 표면 상에서 또는

세포내에서 항원 발현을 검출하는데 사용될 수 있다. FACS 선택의 또 다른 이점은, 상이한 수준의 발현에 대해서 분류할 수 있다는 점이며; 때때로 낮은 발현이 바람직할 수도 있다. 특정 항원을 발현하는 세포를 식별하기 위한 다른 적합한 방법은 플레이트 상의 단클론성 항체를 이용하는 패닝(panning) 또는 단클론성 항체로 코팅된 자성 비드를 이용하는 포획을 포함한다.

[0212] B. DNA 분자

[0213] 생물활성제가 DNA 분자인 실시형태에 있어서, DNA 분자는 항원, 항체, 독소, 성장 인자, 사이토카인 및 호르몬을 포함하지만, 이들로 제한되는 것은 아니다. DNA는, 제한 없이, 플라스미드 DNA, 환형 DNA, 선형 DNA, 단일-가닥 DNA, 변형된 DNA, 안티센스 DNA, 및 앵타머 DNA를 포함할 수 있다.

[0214] C. 항원

[0215] 본 명세서에 기재된 생물활성제는 항원을 암호화하는 핵산 분자(예컨대, DNA 또는 RNA)일 수 있다. 적합한 항원은 박테리아 항원, 바이러스 항원, 진균 항원, 원생동물 항원, 식물 항원, 암 항원, 또는 이들에 대한 조합을 포함하지만, 이들로 제한되는 것은 아니다. 항원은, 예를 들어, 알러지, 암, 감염성 질환, 또는 자가면역 질환에 포함될 수 있거나, 또는 이들로부터 유래될 수 있다.

[0216] 항원은 임의의 표적 에피토프, 분자(생물분자), 분자 복합체(생물분자를 함유하는 분자 복합체 포함), 세포이화어셈블리, 대상체의 면역반응성의 유도 또는 증대가 바람직한 세포 또는 조직일 수 있다. 흔히, 용어 항원은 관심대상 폴리펩타이드 항원을 지칭할 것이다. 소정의 실시형태에 있어서, 항원은, 감염, 암, 자가면역 질환, 알러지, 천식, 또는 항원-특이적 면역 반응의 자극이 바람직하거나 유익하게 되는 기타 임의의 병태와 연관된 감염성 병원체 및/또는 에피토프, 생물분자, 세포 또는 조직으로부터 유래될 수 있거나 또는 유래될 수도 있거나, 또는 이와 면역학적으로 교차 반응할 수 있다.

[0217] 소정의 실시형태는 적어도 하나의 감염성 병원체, 예컨대, 박테리아, 바이러스 또는 진균, 예를 들어, 악티노박테륨(*Actinobacterium*), 예컨대, 엠. 투베르쿨로시스(*M. Tuberculosis*) 또는 엠. 레프라에(*M. leprae*) 또는 또 다른 마이코박테륨; 박테리아, 예컨대, 에세리키아(*Escherichia*), 살모넬라(*Salmonella*), 네이세리아(*Neisseria*), 보렐리아(*Borrelia*), 클라미디아(*Chlamydia*), 클로스트리듐(*Clostridium*) 또는 보르데텔라(*Bordetella*) 속의 구성원; 바이러스, 예컨대, 단순 포진 바이러스, 인간 면역결핍 바이러스(human immunodeficiency virus: HIV, 예컨대, HIV-1 또는 HIV-2), 인플루엔자 바이러스, 파라인플루엔자 바이러스, 홍역 바이러스, 볼거리 바이러스, 풍진 바이러스, 코로나바이러스(예컨대, SARS 또는 MERS), 로타바이러스, 노로바이러스, 피코르나 바이러스(예컨대, 폴리오바이러스, 엔테로바이러스, 또는 콕사키 바이러스), 가축 병원체, 예를 들어, 고양이 면역결핍 바이러스(feline immunodeficiency virus: FIV), 사이토메갈로바이러스(cytomegalovirus), 바리셀라 조스터 바이러스(Varicella Zoster Virus), 간염 바이러스, 엡스타인 바 바이러스(Epstein Barr Virus: EBV), 플라비바이러스 바이러스(예컨대, 뎅기열 바이러스, 일본뇌염 바이러스, 황열 바이러스, 지카 바이러스, 포바산 바이러스(Powassan virus) 또는 진드기-매개 뇌염 바이러스), 헤니파 바이러스(henipah virus)(예컨대, 헨드라(hendra virus) 또는 니파 바이러스(nipah virus)), 분야바이러스(bunyavirus)(예컨대, 한타바이러스 또는 리프트 발리 열 바이러스(Rift valley fever virus)), 아레나바이러스(예컨대, 라사 바이러스(lassa virus), 주닌 바이러스(junin virus), 마추포 바이러스(machupo virus), 또는 구아나리토 바이러스(guanarito virus)), 필로바이러스(filovirus)(예컨대, 에볼라 바이러스 또는 마르부르그 바이러스(Marburg virus)), 리사바이러스(lyssavirus)(예컨대, 광견병 바이러스(Rabies virus)), 호흡기 세포 융합 바이러스(respiratory syncytial virus), 인간 유두종 바이러스(human papilloma virus: HPV) 및 사이토메갈로바이러스; 진균, 예컨대, 아스페질러스(*Aspergillus*), 블라스토마이세스(*Blastomyces*), 코시디오이데스(*Coccidioides*) 및 뉴모사이스티(*Pneumocysti*) 또는 효모, 예를 들어, 칸디다(*Candida*) 종, 예컨대, 씨. 알비칸스(*C. albicans*), 씨. 글라브라타(*C. glabrata*), 씨. 크루세이(*C. krusei*), 씨. 루시타니아에(*C. lusitaniae*), 씨. 트로피칼리스(*C. tropicalis*) 및 씨. 파랍실로시스(*C. parapsilosis*); 기생충, 예컨대, 원생동물, 예를 들어, 플라스모듐(*Plasmodium*) 종, 예를 들어, 피. 팔시파룸(*P. falciparum*), 피. 비박스(삼일열 말라리아 원충), 피. 말라리아에(*P. malariae*) 및 피. 오발레(*P. ovale*); 또는 또 다른 기생충, 예컨대, 아칸타모에바(*Acanthamoeba*), 엔타모에바 히스톨리티카(*Entamoeba histolytica*), 안지오스트롱길루스(*Angiostrongylus*), 스킴스토소마 만소니(*Schistosoma mansoni*), 스킴스토소마 하에마토비움(*Schistosoma haematobium*), 스킴스토소마 야포니쿰(*Schistosoma japonicum*), 크립토스포리듐(*Cryptosporidium*), 안킬로스토마(*Ancylostoma*), 엔타모에바 히스톨리티카(*Entamoeba histolytica*), 엔타모에바 콜리(*Entamoeba coli*), 엔타모에바 디스파르(*Entamoeba dispar*), 엔타모에바 하르트마니(*Entamoeba hartmanni*), 엔타모에바 폴레키

(*Entamoeba polecki*), 우체레리아 반크로프티(*Wuchereria bancrofti*), 기아르디아(*Giardia*) 및 리슈마니아(*Leishmania*)로부터 유래된 항원을 상정한다.

[0218] 몇몇 실시형태에 있어서, 항원은 인플루엔자-관련 항원이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 항원은 인플루엔자-초래 항원이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 항원은 인플루엔자 초래 바이러스로부터 유래된다. 일 실시형태에 있어서, 항원은 H5N1로부터의 헤마글루티닌(HA)을 포함한다. 일 실시형태에 있어서, 항원은 H5N1로부터의 뉴라미니다제를 포함한다.

[0219] 예를 들어, 소정의 실시형태에 있어서, 항원은 보렐리아 종으로부터 유래되고, 항원은 핵산, 병원체 유래 항원 또는 항원성 제제, 재조합으로 제조된 단백질 또는 펩타이드 및 키메라 융합 단백질을 포함할 수 있다. 하나의 이러한 항원은 OspA이다. OspA는 숙주 세포에서 이의 생합성에 의해 지질화된 형태의 완전 성숙 단백질(Lipo-OspA)일 수 있거나, 대안적으로 비지질화된 유도체(non-lipidated derivative)일 수 있다. 이러한 비지질화된 유도체는 인플루엔자 바이러스의 비구조적 단백질(NS1)의 처음의 81개 N-말단 아미노산을 갖는 비지질화된 NS1-OspA 융합 단백질 및 완전한 OspA 단백질을 포함하고, 또 다른 MDP-OspA는 3개의 추가의 N-말단 아미노산을 보유하는 OspA의 비지질화된 형태이다.

[0220] 소정의 실시형태에 있어서, 항원은 바이러스, 예컨대, HIV-1, (예컨대, tat, nef, gp120 또는 gp160), 인간 헤르페스 바이러스, 예컨대, gD 또는 이의 유도체 또는 즉각적 초기 단백질(Immediate Early protein), 예컨대, HSV1 또는 HSV2 유래의 ICP27, 사이토메갈로바이러스((특히, 인간)(예컨대, gB 또는 이의 유도체), 로타바이러스(생-약독화 바이러스(live-attenuated virus) 포함), 엡스타인 바 바이러스(예컨대, gp350 또는 이의 유도체), 바리셀라 조스터 바이러스(예컨대, gp1, II 및 IE63), 또는 간염 바이러스, 예컨대, B형 간염 바이러스(예를 들어, B형 간염 표면 항원 또는 이의 유도체), A형 간염 바이러스, C형 간염 바이러스 및 E형 간염 바이러스로부터, 또는 다른 바이러스 병원체, 예컨대, 파라믹소바이러스: 호흡기 세포융합 바이러스(예컨대, F 및 G 단백질 또는 이의 유도체), 파라인플루엔자 바이러스, 홍역 바이러스, 볼거리 바이러스, 인간 유두종 바이러스(예를 들어, HPV6, 11, 16, 18 등), 플라비바이러스(예를 들어, 뎅기열 바이러스, 일본 뇌염 바이러스, 황열 바이러스, 지카 바이러스, 포스와난 바이러스(Poswanan virus), 진드기-매개 뇌염 바이러스) 또는 인플루엔자 바이러스(예그 또는 MDCK 세포에서 성장한, 완전 생 또는 불활성화된 바이러스, 스플릿 인플루엔자 바이러스, 또는 완전 플루 비로솜(whole flu virosome)(문헌[Gluck, Vaccine, 1992, 10, 915-920]에 기재된 바와 같음) 또는 이의 정제된 또는 재조합 단백질, 예컨대, HA, NP, NA, PB1, PB2, PA, NS1 또는 M 단백질, 또는 이들의 조합)로부터 유래된다.

[0221] 소정의 다른 실시형태에 있어서, 항원은 하나 이상의 박테리아 병원체, 예컨대, 네이세리아 종, 예를 들어, 엔. 고노레아(*N. gonorrhea*) 및 엔. 메닝기티디스(*N. meningitidis*)(예를 들어, 피막 다당류 및 이의 접합체, 트랜스페린-결합 단백질, 락토펜 결합 단백질, PilC, 부착소); 에스. 피요게네스(*S. pyogenes*)(예를 들어, 엠 단백질 또는 이의 단편, C5A 프로테아제, 리포테이코산), 에스. 아갈락티에(*S. agalactiae*), 에스. 뮤탄스(*S. mutans*): 에이치. 두크레이(*H. ducreyi*); 모락셀라 종, 예를 들어, 브란하멜라 카타랄리스(*Branhamella catarrhalis*)로도 공지된 엠. 카타랄리스(예를 들어, 고분자량 및 저분자량 부착소 및 인바신); 보르데텔라 종, 예를 들어, 비. 페르투스시스(*B. pertussis*)(예를 들어, 페르탁틴, 페르투스시 독소 또는 이의 유도체, 섬모성 적혈구응집원, 아데닐레이트 시클라제, 펄브리아(*fimbriae*)), 비. 파라페르투스시스(*B. parapertussis*) 및 비. 브론키셉티카(*B. bronchiseptica*); 마이코박테리움 종, 예를 들어, 엠. 투베르쿨로시스(예를 들어, ESAT6, 항원 85A, -B 또는 -C), 엠. 보비스, 엠. 레프라이에, 엠. 아비움, 엠. 파라투베르쿨로시스, 엠. 스메그마티스; 레지오넬라 종, 예를 들어, 엘. 뉴모필라; 에스체리치아 종, 예를 들어, 장독소 이. 콜라이(예를 들어, 콜로니화 인자, 열-불안정 독소 또는 이의 유도체, 열 안정 독소 또는 이의 유도체), 장출혈 이. 콜라이, 장병원성 이. 콜라이(예를 들어, 쉬가 독소-유사 독소 또는 이의 유도체); 비브리오 종, 예를 들어, 브이. 콜레라(예를 들어, 콜레라 독소 또는 이의 유도체); 쉬겔라 종, 예를 들어, 에스. 손네이(*S. sonnei*), 에스. 디센테리아에(*S. dysenteriae*), 에스. 플렉스네리(*S. flexnerii*); 예르시니아 종(*Yersinia spp*), 예를 들어, 와이. 엔테로콜리티카(*Y. enterocolitica*)(예를 들어, Yop 단백질), 와이. 페스티스(*Y. pestis*), 와이. 슈도투베르쿨로시스(*Y. pseudotuberculosis*); 캄필로박터 종(*Campylobacter spp*), 예를 들어, 씨. 제주니(*C. jejuni*)(예를 들어, 독소, 부착소 및 인바신) 및 씨. 콜라이(*C. coli*); 살모넬라 종(*Salmonella spp*), 예를 들어, 에스. 티피(*S. typhi*), 에스. 파라티피(*S. paratyphi*), 에스. 콜레라에수이스(*S. choleraesuis*), 에스. 엔테리티디스(*S. enteritidis*); 리스테리아 종(*Listeria spp.*), 예를 들어, 엘. 모노사이토게네스(*L. monocytogenes*); 헬리코박터 종(*Helicobacter spp*), 예를 들어, 에이치. 파일로리(*H. pylori*)(예를 들어, 우레아제, 카탈라제, 공포형성 독소); 슈도모나스 종(*Pseudomonas spp*), 예를 들어, 피. 아에루기노사(*P. aeruginosa*); 스태필로코커스 종

(*Staphylococcus spp.*), 예를 들어, 에스. 아우레우스(*S. aureus*), 에스. 에피테르미디스(*S. epidermidis*); 엔테로코커스 종(*Enterococcus spp.*), 예를 들어, 이. 파에칼리스(*E. faecalis*), 이. 파에슘(*E. faecium*); 클로스트리듐 종(*Clostridium spp.*), 예를 들어, 씨. 테타니(*C. tetani*)(예를 들어, 과상풍 독소 및 이의 유도체), 씨. 보툴리눔(*C. botulinum*)(예를 들어, 보툴리눔 독소 및 이의 유도체), 씨. 디피실(*C. difficile*)(예를 들어, 클로스트리듐 독소 A 또는 B 및 이의 유도체); 바실러스 종(*Bacillus spp.*), 예를 들어, 비. 안트라시스(*B. anthracis*)(예를 들어, 보툴리눔 독소 및 이의 유도체); 코리네박테리움 종(*Corynebacterium spp.*), 예를 들어, 씨. 디프테리아에(*C. diphtheriae*)(예를 들어, 디프테리아 독소 및 이의 유도체); 보렐리아 종(*Borrelia spp.*), 예를 들어, 비. 부르그도르페리(*B. burgdorferi*)(예를 들어, OspA, OspC, DbpA, DbpB), 비. 가리니(*B. garinii*)(예를 들어, OspA, OspC, DbpA, DbpB), 비. 아프젤리(*B. afzelii*)(예를 들어, OspA, OspC, DbpA, DbpB), 비. 안데르소니(*B. andersonii*)(예를 들어, OspA, OspC, DbpA, DbpB), 비. 헤르메시(*B. hermsii*); 에를리키아 종(*Ehrlichia spp.*), 예를 들어, 이. 에퀴(*E. equi*) 및 인간 과립구 에를리히증(Human Granulocytic Ehrlichiosis)의 물질; 리케차 종(*Rickettsia spp.*), 예를 들어, 알. 리켓치(*R. rickettsii*); 클라미디아 종(*Chlamydia spp.*), 예를 들어, 씨. 트라초마티스(*C. trachomatis*)(예를 들어, MOMP, 헤파린 결합 단백질), 씨. 뉴모니아에(*E. coli*)(예를 들어, MOMP, 헤파린 결합 단백질), 씨. 프시타시(*C. psittaci*); 렘토스피라 종(*Leptospira spp.*), 예를 들어, 엘. 인테로간스(*L. interrogans*); 트레포네마 종(*Treponema spp.*), 예를 들어, 티. 팔리둠(*T. pallidum*)(예를 들어, 회귀 외막 단백질), 티. 덴티콜라(*T. denticola*), 티. 하이오디센테리에(*T. hyodysenteriae*); 또는 다른 박테리아 병원체로부터 유래된다.

[0222]

소정의 다른 실시형태에 있어서, 항원은 하나 이상의 기생충(예를 들어, 문헌[John, D.T. and Petri, W.A., Markell and Voge's Medical Parasitology-9th Ed., 2006, WB Saunders, Philadelphia; Bowman, D.D., Georgis' Parasitology for Veterinarians-8th Ed., 2002, WB Saunders, Philadelphia] 참조), 예컨대, 플라즈모듐 종(*Plasmodium spp.*), 예를 들어, 피. 팔시파룸(*P. falciparum*); 톡소플라스마 종(*Toxoplasma spp.*), 예를 들어, 티. 곤디(*T. gondii*)(예를 들어, SAG2, SAG3, Tg34); 엔타모에바 종, 예를 들어, 이. 히스토리티카(*E. histolytica*); 바베시아 종(*Babesia spp.*), 예를 들어, 비. 마이크로티(*B. microti*); 트리파노소마 종(*Trypanosoma spp.*), 예를 들어, 티. 크루지(*T. cruzi*); 기아르디아 종(*Giardia spp.*), 예를 들어, 지. 람블리아(*G. lamblia*); 레슈마니아 종, 예를 들어, 엘. 메이저(*L. major*); 뉴모사이스티스 종(*Pneumocystis spp.*), 예를 들어, 피. 카리니(*P. carinii*); 트리조모나스 종, 예를 들어, 티. 바기날리스(*T. vaginalis*); 또는 포유류를 감염시킬 수 있는 연충, 예컨대, (i) 선충 감염(엔테로비우스 베르미쿨라리스(*Enterobius vermicularis*), 아스카리스 룬브리코이데스(*Ascaris lumbricoides*), 트리추리스 트리추리아(*Trichuris trichuria*), 네카터 아메리카누스(*Necator americanus*), 안사일로스토마 듀오테날레(*Ancylostoma duodenale*), 우체레리아 반크로프티(*Wuchereria bancrofti*), 브루기아 말라위(*Brugia malayi*), 온초세르카 볼볼루스(*Onchocerca volvulus*), 드라칸쿨루스 메디넨시스(*Dracunculus medinensis*), 트리치넬라 스피랄리스(*Trichinella spiralis*) 및 스트롱길로이데스 스테르코랄리스(*Strongyloides stercoralis*)를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않음); (ii) 흡충 감염(스키스토소마 만소니(*Schistosoma mansoni*), 스키토소마 헤마토비움(*Schistosoma haematobium*), 스키토소마 야포니쿰(*Schistosoma japonicum*), 스키토소마 메콩기(*Schistosoma mekongi*), 오피스토르치스 시넨시스(*Opisthorchis sinensis*), 파라고니무스 종(*Paragonimus sp.*), 패시올라 헤파티카(*Fasciola hepatica*), 패시올라 마그나(*Fasciola magna*), 패시올라 기간티카(*Fasciola gigantica*)를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않음); 및 (iii) 촌충 감염(타에니아 사기나타(*Taenia saginata*) 및 타에니아 솔리움(*Taenia solium*)을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않음)으로부터 유래된다. 소정의 실시형태에서, 항원은 스키토소마 종, 스키토소마 만소니, 스키토소마 헤마토비움 및/또는 스키토소마 야포니쿰으로부터 유래되거나, 효모, 예컨대, 칸디다 종, 예를 들어, 씨. 알비칸스; 크립토코커스 종, 예를 들어, 씨. 네오포르만스로부터 유래된다.

[0223]

다른 특이적 항원은 엠. 투베르쿨로시스, 예를 들어, Th Ra12, Tb H9, Tb Ra35, Tb38-1, Erd 14, DPV, MTI, MSL, mTTC2 및 hTCC1(WO 99/51748)로부터 유래된다. 엠. 투베르쿨로시스에 대한 단백질은 또한 융합 단백질 및 엠. 투베르쿨로시스의 적어도 2개, 3개 또는 4개 또는 이것 초과 폴리펩타이드가 더 큰 단백질로 융합된 이의 변이체를 포함한다. 소정의 융합은 Ra12-TbH9-Ra35, Erd14-DPV-MTI, DPV-MTI-MSL, Erd14DPV-MTI-MSL-mTCC2, Erd14-DPV-MTI-MSL, DPV-MTI-MSL-mTCC2, TbH9-DPV-MTI(WO 99151748)를 포함한다. 사용될 수 있는 다른 항원은 US 제2010/0129391호 및 WO 제2008/124647호에 기재된 항원, 항원의 조합 및 융합 단백질을 포함한다. 하나의 예시적인 실시형태에서, 융합 단백질은 ID93이다. 하나의 예시적인 실시형태에서, 융합 단백질은 ID91(서열번호 1)이다.

[0224]

융합 단백질 ID91은 4종의 Mtb 단백질: Rv3619(독성 인자, EsX 패밀리의, 서열번호 2), Rv2389(저산소 상태에서 생산, 소생 인자 D 서열번호 3), Rv3478(PE/PPE 패밀리의 구성원, 서열번호 4) 및 Rv1886(Ag85A, 분비/막 단백

질; 마이콜틸트랜스페라제, 서열번호 5)의 융합을 포함한다(도 29). ID91에 포함된 Mtb 항원은 인간 모집단에서 면역원성을 확보하기 위하여 항원에 의한 자극 후에 PPD+ 공여자(PPD- 공여자는 아님)로부터의 인간 PBMC IFN- γ 분비 및 인간 서열 상동성의 결여에 기초하여 우선적으로 처리되었다(Bertholet et al., J Immunol. 181(11):7948-57 (2008)). 안정적인 에멀션(GLA-SE) 내 합성 톨-유사 수용체 4(TLR4) 작용제 글루코피라노실 지질 아유반트와 조합된 ID91 단백질은 전임상 마우스 모델에서 1회의 면역화 후 4주에 Mtb H37Rv에 대한 보호를 입증하고 있다(Orr et al., J Immunol. 193(6): 2911-18 (2014)). 이 소단위 백신에 의해, ID91에 대한 강한 TH1 반응(IFN- γ , TNF 및 IL-2)이 관찰되었다. 앞서 언급된 문헌 참조.

[0225] 몇몇 실시형태에 있어서, ID91은 당업자에게 잘 알려진 제한 효소를 포함할 수 있다. 예시적인 제한 효소는, NdeI, KpnI, BamHI, EcoRI 및/또는 HindIII를 포함하지만, 이들로 제한되는 것은 아니다. 예를 들어, 도 38A에서의 벡터 pET29, 및 도 38B에서의 서열번호 6 및 12, 및 벡터 pET28 참조.

[0226] 다른 특이적 항원은 클라미디아로부터 유래되고, 예를 들어, 고분자량 단백질(HWMP)(WO 99/17741), ORF3(EP 366 412) 및 추정상 막 단백질(putative membrane protein: Pmp)을 포함한다. 다른 클라미디아 항원은 WO 99128475에 기재된 균으로부터 선택될 수 있다. 소정의 항원은 스트렙토코커스 종, 예를 들어, 에스. 뉴모니아에(예를 들어, 피막 다당류 및 이의 접합체, PsaA, PspA, 스트렙톨리신, 콜린-결합 단백질) 및 단백질 항원 뉴몰리신(Biochem Biophys Acta, 1989, 67, 1007; Rubins et al., Microbial Pathogenesis, 25, 337-342), 및 이의 돌연변이체 해독된 유도체(WO 90/06951; WO 99/03884)로부터 유래될 수 있다. 다른 박테리아 백신은 헤모필루스 종, 예를 들어, 에이치. 인플루엔자 B형(예를 들어, PRP 및 이의 접합체), 비피막형 에이치. 인플루엔자, 예를 들어, OMP26, 고분자량 부착소, P5, P6, 단백질 D 및 지단백질 D, 및 펌브린 및 펌브린 유래된 펩타이드(미국 특허 제5,843,464호) 또는 다수의 카피 변이체 또는 이의 융합 단백질로부터 유래된 항원을 포함한다.

[0227] 다른 특이적 항원은 B형 간염으로부터 유래된다. B형 간염 표면 항원의 유도체는 당해 분야에 널리 공지되어 있고, 특히, 유럽 특허 출원 EP-A414 374; EP-A-0304 578 및 EP 198474에 기재된 PreS1, Pars2, S 항원을 포함한다.

[0228] 다른 실시형태에 있어서, 항원은 생식기 사마귀의 원인인 것으로 여겨지는 인간 유두종 바이러스(HPV)(HPV 6 또는 HPV 11 및 기타), 및 자궁경부암의 원인인 HPV 바이러스(HPV16, HPV18 및 기타)로부터 유래된다. 특정한 항원은 L1 입자 또는 캡소머, 및 HPV 6 및 HPV 11 단백질 E6, E7, L1 및 L2로부터 선택된 하나 이상의 항원을 포함하는 융합 단백질을 포함한다. 융합 단백질의 소정의 형태는 WO 96/26277에 개시된 L2E7 및 GB 9717953.5(PCT/EP98/05285)에 개시된 단백질D(1/3)-E7을 포함한다. 추가적인 가능한 항원은 HPV 16, 18, 33, 58 항원을 포함한다. 예를 들어, L1 또는 L2 항원 단량체, 또는 L1 또는 L2 항원은 바이러스 유사 입자(VLP)로서 함께 제시되거나, L1 단독 단백질은 VLP 또는 캡소머 구조에서 단독으로 제시된다. 이러한 항원, 바이러스 유사 입자 및 캡소머는 특히 공지되어 있다. 예를 들어, WO94/00152, WO94/20137, WO94/05792 및 WO93/02184를 참조한다.

[0229] 다른 실시형태에 있어서, 항원은 융합 단백질이다. 융합 단백질은, 예를 들어, 단독으로 또는 융합 단백질, 예컨대, E7, E2 또는 F5로서 포함될 수 있고, 특정한 실시형태는 L1E7 융합 단백질을 포함하는 VLP를 포함한다(WO 96/11272). 특정한 HPV 16 항원은 HPV 16으로부터 단백질 D-E6 또는 E7 융합을 형성하기 위한 단백질 D 운반체와 융합된 초기 단백질 E6 또는 F7, 또는 이들의 조합; 또는 E6 또는 E7과 L2의 조합(WO 96/26277)을 포함한다. 대안적으로, HPV 16 또는 18 초기 단백질 E6 및 E7은 단일 분자, 예를 들어, 단백질 D-E6/E7 융합에서 제시될 수 있다. 조성물은 예를 들어, 단백질 D-E6 또는 단백질 D-E7 융합 단백질 또는 단백질 D E6/E7 융합 단백질의 형태로 HPV 18 앞에 E6 및 E7 단백질 중 어느 하나 또는 둘 다를 임의로 함유할 수 있다. 조성물은 다른 HPV 균주, 예를 들어, 균주 HPV 31 또는 33으로부터의 항원을 추가적으로 포함할 수 있다.

[0230] 항원은 또한 말라리아를 야기하는 기생충으로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, 플라스모디아 팔시파룸으로부터의 항원은 RTS,S 및 TRAP를 포함한다. RTS는 B형 간염 표면 항원의 preS2 부분의 4개의 아미노산을 통해 B형 간염 바이러스의 표면(S) 항원에 연결된 피. 팔시파룸의 포자소체(circumsporozoite: CS) 단백질의 C 말단 부분을 실질적으로 모두 포함하는 하이브리드 단백질이다. 이의 완전한 구조는 영국 특허 출원 제9124390.7호로부터의 우선권을 주장하는 WO 93/10152로서 공개된 국제 특허 출원 제PCT/EP92/02591호에 개시되어 있다. 효모에서 발현될 때, RTS는 지단백질 입자로서 제조되고, 이것이 HBV로부터의 S 항원과 동시발현될 때, 이것은 RTS,S로서 공지된 혼합된 입자를 제조한다.

[0231] TRAP 항원은 WO 90/01496으로서 공개된 국제 특허 출원 제PCT/GB89/00895호에 기재되어 있다. 본 발명의 실시형태는 항원 제제가 RTS,S 및 TRAP 항원의 조합을 포함하는 말라리아 백신이다. 아마도 다단계 말라리아 백신의

성분인 후보인 다른 플라스모디아 항원은 플라스모뎀 종에서 피. 파시파룸 MSP1, AMA1, MSP3, EBA, GLURP, RAP1, RAP2, 세퀴스트린(Sequestrin), PfEMP1, Pf332, LSA1, LSA3, STARP, SALSA, PfEXP1, Pfs25, Pfs28, PFS27125, Pfs16, Pfs48/45, Pfs230 및 이들의 유사체이다.

[0232] 일 실시형태에 있어서, 항원은, 암의 면역요법적 치료에 유용할 수 있는 것처럼 암 세포로부터 유래된다. 예를 들어, 항원은 중앙 거부 항원, 예컨대, 전립선, 유방, 결장직장, 폐, 췌장, 신장 또는 흑색종 암에 대한 것일 수 있다. 예시적인 암 또는 암 세포 유래된 항원은 MAGE 1, 3 및 MAGE 4 또는 다른 MAGE 항원, 예컨대, WO99/40188에 개시된 것, PRAME, BAGE, Lage(NY Eos 1로도 공지됨) SAGE 및 HAGE(WO 99/53061) 또는 GAGE(Robbins and Kawakami, 1996 Current Opinions in Immunology 8, pp. 628-636; Van den Eynde et al., International Journal of Clinical & Laboratory Research (1997 & 1998); Correale et al. (1997), Journal of the National Cancer Institute 89, p. 293)를 포함한다. 암 항원의 이 비제한적인 예는 넓은 범위의 중앙 유형, 예컨대, 흑색종, 폐 암종, 육종 및 방광 암종에서 발견된다. 예를 들어, 미국 특허 제6,544,518호를 참조한다.

[0233] 다른 중앙-특이적 항원은, 많은 암의 치료에 유용한, 단백질을 운반하기 위한 중앙 특이적 또는 중앙 연관된 강 글리오사이드, 예컨대, GM2 및 GM3 또는 이들의 접합체; 또는 자가 펩타이드 호르몬, 예컨대, 전장 고나도트로 핀 호르몬 방출 호르몬(GnRH, WO 95/20600), 짧은 10개 아미노산 길이의 펩타이드를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 또 다른 실시형태에서, 전립선 항원, 예컨대, 전립선 특이적 항원(PSA), PAP, PSCA(예를 들어, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 95(4) 1735-1740 1998), PSMA, 또는 일 실시형태에서 프로스타제(Prostate)로도 공지된 항원을 사용한다(예를 들어, 문헌[Nelson, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1999) 96: 3114-3119; Ferguson, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999. 96, 3114-3119; WO 98/12302]; 미국 특허 제5,955,306호; WO 98/20117; 미국 특허 제5,840,871호 및 제5,786,148호; WO 00/04149). 다른 전립선 특이적 항원은 WO 98/137418 및 WO/004149로부터 공지되어 있다. 기타는 STEAP(PNAS 96 14523 14528 7-12 1999)이다.

[0234] 본 발명의 맥락에서 유용한 중앙 연관 항원은 Plu-1(*J Biol. Chem* 274 (22) 15633-15645, 1999), HASH-1, HASH-2, Cripto(Salomon et al Bioessays 199, 21:61-70, 미국 특허 제. 5,654, 140) 및 Criptin(미국 특허 제 5,981,215호)을 포함한다. 부가적으로, 암의 치료에서의 백신에 대해서 특히 연관된 항원은 또한 티로시나제 및 서비빈을 포함한다.

[0235] 다른 실시형태에 있어서, 본 발명의 조성물에서 사용되는 제제는, 병태, 예컨대, 만성 폐쇄성 폐질환(COPD)의 예방 및 치료를 위하여, 호흡기 질환, 예컨대, 박테리아 감염(예컨대 폐렴구균)에 의해 야기 또는 악화된 것과 연관된 항원을 포함한다. COPD는 만성 기관지염 및/또는 기종을 지닌 환자에서 비가역적 또는 부분 가역적 기도 폐색의 존재에 의해 생리학적으로 정의된다(*Am J Respir Crit Care Med*. 1995 Nov; 152(5 Pt 2):S77-121). COPD의 악화는 종종 박테리아(예컨대 폐렴구균) 감염을 일으킨다(*Clin Microbiol Rev*. 2001 Apr; 14(2):336-63).

[0236] D. 항체-암호화 핵산

[0237] 본 명세서에 기재된 생물활성제(예컨대, RNA)는, 선택적으로 하나 이상의 발현 대조 요소에 조작 가능하게 연결된 항체 및/또는 항체의 항원-결합 단편을 암호화할 수 있으므로, 대상체에서의 전달은 대상체에서 상기 항체 또는 항원-결합 단편의 생산을 초래한다. 몇몇 실시형태에 있어서, 생물활성제는 단일 오픈 리딩 프레임에서 중쇄 및 경쇄의 암호화 서열을 함유할 수 있다. 다른 실시형태에 있어서, 본 발명의 NLC는 2종의 생물활성제를 포함할 수 있는데, 여기서 1종의 생물활성제는 중쇄를 암호화하는 한편, 다른 1종은 경쇄를 암호화한다. 다른 실시형태에 있어서, 생물활성제는 과발현된 생물분자가 관심대상 항원에 결합되도록 짧은 가요성 폴리펩타이드 서열에 의해 연결된 중쇄 및 경쇄의 가변 영역의 암호화 서열을 함유할 수 있다. 몇몇 특정 실시형태에 있어서, 생산된 항체는 개체에서 면역 반응을 유도할 수 있다.

[0238] E. RNA 간섭

[0239] 몇몇 실시형태에 있어서, NLC와 연관된 생활성 폴리뉴클레오타이드는 비-암호화 RNA, 예컨대, RNA 간섭(RNAi) 폴리뉴클레오타이드이다. RNAi는 서열 특이적 방식에서 트랜스젠(transgene)의 메신저 RNA(mRNA) 전사물의 번역을 열화 또는 저해하도록 포유류 세포의 RNA 간섭 경로 기구와의 상호작용을 통해서 RNA 간섭을 유도할 수 있는 분자이다. 2개의 주된 RNAi 폴리뉴클레오타이드는 작은(또는 짧은) 간섭 RNA(siRNA) 및 마이크로 RNA(miRNA)이다. RNAi 폴리뉴클레오타이드는 siRNA, 마이크로RNA, 이중-가닥 RNA(dsRNA), 짧은 헤어핀 RNA(shRNA), 및 RNA 간섭을 유도할 수 있는 RNA를 암호화하는 발현 카세트를 포함하는 군으로부터 선택될 수 있다. siRNA는 전형적

으로 15 내지 50개의 염기쌍, 바람직하게는 21 내지 25개의 염기쌍을 함유하고 세포 내에서 발현된 표적 유전자 또는 RNA에서 암호화 서열과 동일한(완전하게 상보적인) 또는 거의 동일한(부분적으로 상보적인) 뉴클레오타이드 서열을 가진 이중 가닥 구조를 포함한다. siRNA는 다이뉴클레오타이드 3' 오버행(overhang)을 가질 수 있다. siRNA는 헤어핀 구조를 형성하는 2개의 어닐링된 폴리뉴클레오타이드 또는 단일 폴리뉴클레오타이드로 구성될 수 있다.

[0240] 마이크로RNA(miRNA)는 mRNA 표적의 파괴 또는 번역 억제를 지시하는 약 22개의 뉴클레오타이드 길이인 작은 비 암호화 RNA 유전자 산물이다. miRNA와 표적 mRNA 간의 상보성이 부분적이라면, 표적 mRNA의 번역이 억제된다. 상보성이 광범위하다면, 표적 mRNA는 절단된다. miRNA에 대해서, 복합체는 전형적으로 miRNA와 단지 부분적인 상동성을 공유하는 mRNA의 3' UTR에 통상 위치된 표적 부위에 결합한다. "종자 영역"- 표적과 완벽한 염기쌍짓기를 형성하는 miRNA의 5' 단부 상에서 약 일곱(7)개의 연속적인 뉴클레오타이드 -은 miRNA 특이성에서 주된 역할을 한다. mRNA에 RISC/miRNA 복합체의 결합은 단백질 번역의 억제 또는 mRNA의 절단 및 분해 중 하나를 초래할 수 있다.

[0241] F. CRISPR RNA

[0242] 몇몇 실시형태에 있어서, NLC 제형은 CRISPR/Cas9 게놈 편집의 sgRNA(synthetic short guide RNA)를 포함하고, 이에 따라서 관심대상 유전자를 표적화한다. CRISPR(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat)는 서열 분석된 박테리아의 대략 40% 및 서열 분석된 고세균류의 90%의 게놈에서 발견되는 다수의 짧은 동향 반복체(short direct repeat)를 함유하는 좌위이다. CRISPR는, 외인성 유전자 요소, 예컨대, 플라스미드 및 파지에 저항성을 부여한다는 점에서, 원핵 면역계로서 작용한다. CRISPR 시스템은 후천 면역성의 형태를 제공한다. 소위 스페이서라 불리는 외래 DNA의 짧은 세그먼트가 CRISPR 반복체들 간의 게놈에 혼입되고, 과거 노출의 메모리로서 역할한다. 이어서, CRISPR 스페이서는 진핵생물 유기체에서 RNAi와 유사한 방식으로 외인성 유전자 요소를 인식하고 침묵하는데 사용된다. 타입 II CRISPR/Cas9 시스템에서의 필수 단백질 성분인 Cas9는 CRISPR RNA(crRNA) 및 트랜스-활성화 crRNA(tracrRNA)라 불리는 두 RNA와 복합체화된 경우 활성 엔도뉴클레아제를 형성함으로써, 파지 또는 플라스미드의 침습 시에 외래 유전자 요소를 슬라이싱하여 숙주 세포를 보호한다.

[0243] CRISPR/Cas9 시스템에 기초한 RNA-유도 엔도뉴클레아제는 진핵생물 게놈 편집을 이용하였다. 본 발명의 소정의 실시형태에 있어서, 생물활성제는 sgRNA 및/또는 Cas9 엔도뉴클레아제를 암호화하는 RNA이다. 몇몇 실시형태에 있어서, RNA는 Cas9를 암호화하는 1개 이상의 폴리뉴클레오타이드 및 2개의 유도 RNA를 포함하며, 하나의 유도 RNA는 5' 이중-가닥 브레이크(DSB) 좌위의 세그먼트와 상동성인 스페이서 서열을 포함하고, 제2 유도 RNA는 3' DSB 좌위의 세그먼트에 상보적인 스페이서 서열을 포함한다. 두 유도 RNA는 단일-분자 유도 RNA(tracrRNA 및 crRNA를 포함)로서 제공될 수 있거나, 또는 어느 한쪽 또는 둘 다는 별개의 분자라기보다 오히려 서로 연결되지 않은 crRNA 및 tracrRNA를 포함하는 이중-분자 유도 RNA로서 제공될 수 있다.

[0244] G. 폴리펩타이드

[0245] 몇몇 실시형태에 있어서, 1종 이상의 생물활성제는 폴리펩타이드이다. 폴리펩타이드는 전장 단백질 또는 이의 단편일 수 있다. 몇몇 실시형태에 있어서, 폴리펩타이드는 펩타이드이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 폴리펩타이드는 융합 단백질이다. 몇몇 특정 실시형태에 있어서, 융합 단백질은 개체에게 투여 시 면역 반응을 유도할 수 있다. 몇몇 실시형태에 있어서, 폴리펩타이드는 위에서 더욱 기재된 바와 같은 항원이다. 폴리펩타이드는, 예를 들어, 재조합 발현을 비롯하여, 당업자에게 공지된 임의의 적합한 방법에 의해 제조될 수 있다.

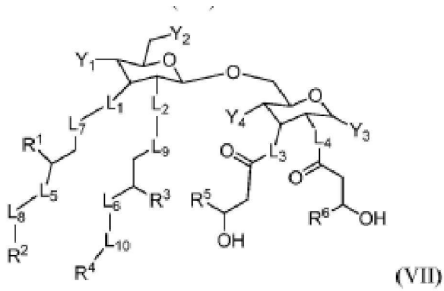
[0246] H. 소분자

[0247] 소정의 실시형태에 있어서, 본 개시내용은 일반적으로 1종 이상의 생물활성제가 약물 전달용의 소분자 또는 치료제인 NLC 조성물에 관한 것이다. 약물 분자 및 NLC의 긴밀한 회합은 약물 물리화학적 특성, 계면활성제 유형 및 농도, 지질 유형, 및 제조 방법에 의해 영향받을 수 있다. 소정의 실시형태에 있어서, 소분자 약물은 NLC에 의해 캡슐화되어, 높은 약물 용해도를 제공하는 오일 코어의 액체 지질 상 성분에 의해 가능하게 한다(Beloqui, A., et al. Nanomedicine 2016; 12(1): 143-161).

[0248] 본 명세서에서 제공된 NLC 조성물은, 제한 없이, 피부, 경피, 경구, 비강내, 폐 또는 안과 투여 경로를 비롯한 다양한 투여 경로를 통한 약물 전달에 적합할 수 있다.

[0249] I. 호르몬

- [0250] 몇몇 실시형태에 있어서, NLC와 회합된 1종 이상의 생물활성제는 호르몬 또는 호르몬의 유사체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드이다. 몇몇 실시형태에 있어서, NLC는 호르몬에 접합된 지질을 포함한다. 호르몬은 인간 성장 호르몬, 아데노코르티코트로핀, 고나도트로핀 방출 호르몬, 옥시토신, 황체형성-호르몬-방출-호르몬, 난포 자극 호르몬, 인슐린, 인슐린-유사 성장 인자, 랩틴, 부갑상선 호르몬, 갑상선 자극 호르몬, 또는 이들의 일부의 조합을 포함하는 군으로부터 선택될 수 있다. 소정의 실시형태에 있어서, NLC 제형은 위에서 기재된 바와 같이 소분자 치료 화합물과 조합하여 호르몬 또는 호르몬의 유사체를 포함한다.
- [0251] J. 아쥬반트
- [0252] 몇몇 실시형태에 있어서, NLC는 백신 전달용이며, 생물활성제 중 하나 이상은 아쥬반트이거나, 또는 대안적으로, 본 명세서에서 제공된 NLC 조성물은 아쥬반트와 공동-투여될 수 있다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 아쥬반트는 면역 반응을 증대 또는 강화시키는 물질을 지칭한다. 면역 반응은, 예를 들어, 외인성 항원에 대한 항원-특이적 면역 반응일 수 있다.
- [0253] 많은 아쥬반트는 신속한 이화작용, 예컨대, 수산화알루미늄 또는 광유, 및 면역 반응의 자극제, 예컨대, 지질 A(천연 또는 합성)으로부터 항원을 보호하도록 설계된 물질을 함유한다. 적합한 아쥬반트는, 예를 들어, 프로인트의 불완전 아쥬반트(Freund's Incomplete Adjuvant) 및 완전 아쥬반트(Complete Adjuvant)(Difco Laboratories, 미시간주 디트로이트 소재); Merck Adjuvant 65(Merck and Company, Inc., 뉴저지주 라호웨이 소재); AS-2 및 이의 유도체(SmithKline Beecham, 펜실베이니아주 필라델피아); CWS, TDM, Leif, 알루미늄염, 예컨대, 수산화알루미늄 겔(alum) 또는 인산알루미늄; 칼슘, 철 또는 아연의 염; 아실화 티로신의 불용성 현탁액; 아실화 당; 양이온성 또는 음이온성으로 유도체화된 다당류; 폴리포스파젠; 생분해성 미소구체; 모노포스포릴 지질 A 및 퀴 A(quil A)로서 상업적으로 입수 가능하다. 사이토카인, 예컨대, GM-CSF 또는 인터류킨-2, -7, 또는 -12가 또한 아쥬반트로서 사용될 수 있다.
- [0254] 소정의 예시적인 조성물은 Th1 유형의 면역 반응을 우세하게 유도하도록 설계된 아쥬반트 시스템을 이용한다. 높은 수준의 Th1-유형 사이토카인(예컨대, IFN- γ , TNF α , IL-2 및 IL-12)은 투여된 항원에 대해서 세포 매개 면역 반응의 유도를 선호하는 경향이 있다. 이와 대조적으로, 높은 수준의 Th2-유형 사이토카인(예컨대, IL-4, IL-5, IL-6 및 IL-10)은 호르몬 면역 반응의 유도를 선호하는 경향이 있다. 본 명세서에서 제공된 바와 같은 조성물의 적용 후에, 환자는 Th1- 및 Th2-유형 반응을 포함하는 면역 반응을 지원할 수 있다. 반응이 주로 Th1-유형인 예시적인 실시형태 내에서, Th1-유형 사이토카인의 수준은 Th2-유형 사이토카인의 수준보다 더 큰 정도로 증가할 것이다. 이들 사이토카인의 수준은 표준 검정을 이용해서 용이하게 평가될 수 있다. 사이토카인의 패밀리 검토를 위하여, 문헌[Mossman & Coffman, Ann. Rev. Immunol. 7: 145-173 (1989)] 참조.
- [0255] 주로 Th1-유형 반응을 유도하는데 사용하기 위한 소정의 아쥬반트는, 예를 들어, 알루미늄염과 함께 모노포스포릴 지질 A, 예를 들어, 3-테-O-아크릴화 모노포스포릴 지질 A(3D-MPLTM)와의 조합물을 포함한다(미국 특허 제 4,436,727호; 제4,877,611호; 제4,866,034호; 및 제4,912,094호). CpG-함유 올리고뉴클레오타이드(여기서 CpG 다이뉴클레오타이드는 비메틸화됨)는 또한 주로 Th1 반응을 유도한다. 이러한 올리고뉴클레오타이드는 잘 알려져 있고, 예를 들어, WO 96/02555, WO 99/33488 및 미국 특허 제6,008,200호 및 제5,856,462호에 기재되어 있다. 면역자극 DNA 서열은 또한 예를 들어 문헌[Sato et al., Science 273 :352 (1996)]에 기재되어 있다. 또 다른 예시적인 아쥬반트는 사포닌, 예컨대, 퀴 A(Quil A), 또는 이의 유도체, 예컨대, QS21 및 QS7(Aquila Biopharmaceuticals Inc., 매사추세츠 프레이밍햄 소재); 에스신(Escin); 디기토닌(Digitonin); 또는 집소필라(Gypsophila) 또는 케노포덤 퀴노사포닌을 포함한다. 기타 예시적인 제형은 본 개시내용의 아쥬반트 조합물, 예를 들어, QS21, QS7, 퀴 A, 0-에스신 또는 디기토닌을 포함하는 이하의 군 중 적어도 2종의 조합물에서의 하나 초과를 포함한다.
- [0256] 본 개시내용의 맥락에서 유용한 기타 예시적인 아쥬반트는 톨-유사 수용체 작용제, 예컨대, TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR7/8, TLR9 작용제 등을 포함한다. 또 다른 예시적인 아쥬반트는 이미노퀴모드, 가디퀴모드, 레지퀴모드 및 관련된 화합물을 포함한다.
- [0257] 다른 실시형태에 있어서, 아쥬반트는, 미국 특허 제8,609,114호 또는 제8,722,064호(이들의 개시내용은 이들의 전문이 참고로 본 명세서에 편입됨)에 기재된 바와 같은 글루코피라노실 지질 A(GLA) 아쥬반트이다.
- [0258] 예를 들어, 소정의 실시형태에 있어서, TLR4 작용제는 하기 화학식 (VII)의 구조를 갖는 합성 GLA 아쥬반트 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염이다:



[0259]

[0260] 식 중:

[0261] L_1, L_2, L_3, L_4, L_5 및 L_6 은 동일 또는 상이하고, 독립적으로 $-O-$, $-NH-$ 또는 $-(CH_2)-$ 이고;

[0262] L_7, L_8, L_9 및 L_{10} 은 동일 또는 상이하고, 독립적으로 존재하지 않거나 또는 $-C(=O)-$ 이고;

[0263] Y_1 은 산 작용기이고;

[0264] Y_2 및 Y_3 은 동일 또는 상이하고, 독립적으로 $-OH$, $-SH$, 또는 산 작용기이고;

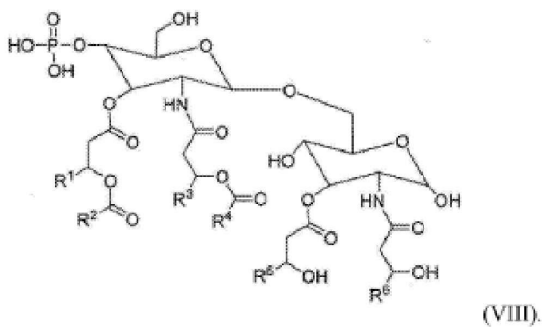
[0265] Y_4 는 $-OH$ 또는 $-SH$ 이고;

[0266] R_1, R_3, R_5 및 R_6 은 동일 또는 상이하고, 독립적으로 C_{8-13} 알킬이고;

[0267] R_2 및 R_4 는 동일 또는 상이하고, 독립적으로 C_{6-11} 알킬이다.

[0268] 합성 GLA 구조의 몇몇 실시형태에 있어서, R^1, R^3, R^5 및 R^6 은 C_{10} 알킬이고; R^2 및 R^4 는 C_8 알킬이다. 소정의 실시형태에 있어서, R^1, R^3, R^5 및 R^6 은 C_{11} 알킬이고; R^2 및 R^4 는 C_9 알킬이다.

[0269] 예를 들어, 소정의 실시형태에 있어서, TLR4 작용제는 하기 화학식 (VIII)의 구조를 갖는 합성 GLA 아뉴반트 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염이다:



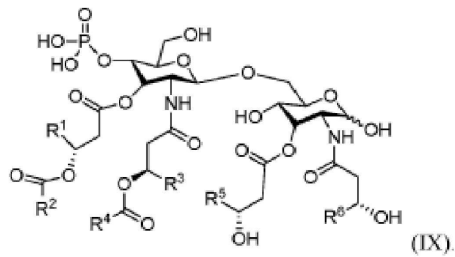
[0270]

[0271] 상기 GLA 구조의 소정의 실시형태에 있어서, R^1, R^3, R^5 및 R^6 은 $C_{11}-C_{20}$ 알킬이고; R^2 및 R^4 는 $C_{12}-C_{20}$ 알킬이다.

또 다른 구체적인 실시형태에 있어서, GLA는 R^1, R^3, R^5 및 R^6 이 C_{11} 알킬이고; R^2 및 R^4 가 C_{13} 알킬인 위에서 기재된 화학식을 갖는다. 또 다른 구체적인 실시형태에 있어서, GLA는 R^1, R^3, R^5 및 R^6 이 C_{10} 알킬이고; R^2 및 R^4 가 C_8 알킬인 위에서 기재된 화학식을 갖는다.

[0272] 또 다른 구체적인 실시형태에 있어서, GLA는 R^1, R^3, R^5 및 R^6 이 $C_{11}-C_{20}$ 알킬이고; R^2 및 R^4 가 C_9-C_{20} 알킬인 위에서 기재된 화학식을 갖는다. 소정의 실시형태에 있어서, R^1, R^3, R^5 및 R^6 은 C_{11} 알킬이고; R^2 및 R^4 는 C_9 알킬이다.

[0273] 소정의 실시형태에 있어서, TLR4 작용제는 하기 화학식 (IX)의 구조를 갖는 합성 GLA 아뉴반트 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염이다:



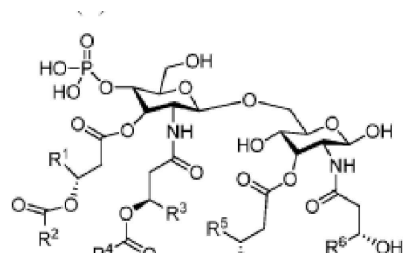
[0274]

[0275]

상기 GLA 구조의 소정의 실시형태에 있어서, R^1 , R^3 , R^5 및 R^6 은 C_{11} - C_{20} 알킬이고; R^2 및 R^4 는 C_9 - C_{20} 알킬이다.
소정의 실시형태에 있어서, R^1 , R^3 , R^5 및 R^6 은 C_{11} 알킬이고; R^2 및 R^4 는 C_9 알킬이다.

[0276]

소정의 실시형태에 있어서, TLR4 작용제는 하기 화학식 (X)의 구조를 갖는 합성 GLA 아류반트이다:



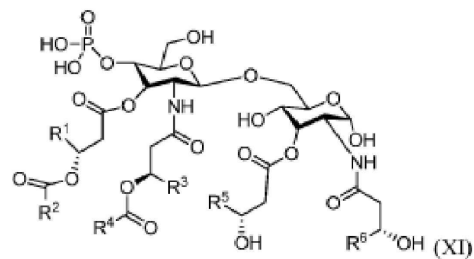
[0277]

[0278]

상기 GLA 구조의 소정의 실시형태에 있어서, R^1 , R^3 , R^5 및 R^6 은 C_{11} - C_{20} 알킬이고; R^2 및 R^4 는 C_9 - C_{20} 알킬이다.
소정의 실시형태에 있어서, R^1 , R^3 , R^5 및 R^6 은 C_{11} 알킬이고; R^2 및 R^4 는 C_9 알킬이다.

[0279]

소정의 실시형태에 있어서, TLR4 작용제는 하기 화학식 (XI)의 구조를 갖는 합성 GLA 아류반트 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염이다:



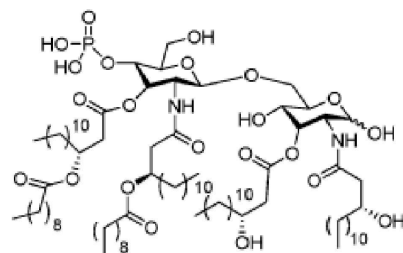
[0280]

[0281]

상기 GLA 구조의 소정의 실시형태에 있어서, R^1 , R^3 , R^5 및 R^6 은 C_{11} - C_{20} 알킬이고; R^2 및 R^4 는 C_9 - C_{20} 알킬이다.
소정의 실시형태에 있어서, R^1 , R^3 , R^5 및 R^6 은 C_{11} 알킬이고; R^2 및 R^4 는 C_9 알킬이다.

[0282]

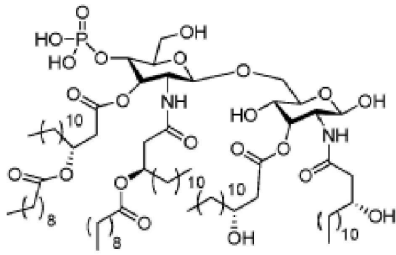
소정의 실시형태에 있어서, TLR4 작용제는 하기 구조를 갖는 합성 GLA 아류반트 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염이다:



[0283]

[0284]

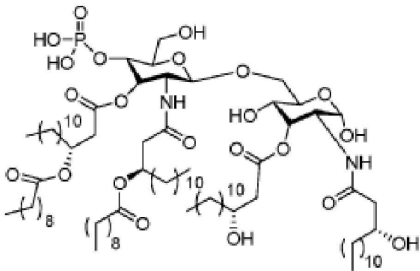
소정의 실시형태에 있어서, TLR4 작용제는 하기 구조를 갖는 합성 GLA 아류반트 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염이다:



[0285]

[0286]

소정의 실시형태에 있어서, TLR4 작용제는 하기 구조를 갖는 합성 GLA 아유반트 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염이다:



[0287]

[0288]

또 다른 실시형태에 있어서, 약독화된 지질 A 유도체(ALD)는 본 명세서에서 기재된 조성물에 혼입된다. ALD는 분자가 더 적은 또는 상이한 지질 A의 부작용을 나타내도록 변형 또는 작제된 지질 A-유사 분자이다. 이들 부작용은 닭 배아 50% 치명적 용량 검정(CELD50)에서 평가된 바와 같이 발열원성, 국소 슈바르츠만 반응성(local Shwarzman reactivity) 및 독성을 포함한다. 본 개시내용에 따라서 유용한 ALD는 모노포스포릴 지질 A(MLA 또는 MPL) 및 3-테아실화 모노포스포릴 지질 A(3D-MLA 또는 3D-MPL)를 포함한다. MLA(MPL) 및 3D-MLA(3D-MPL)는 공지되어 있어, 본 명세서에서 자세히 기재될 필요는 없다.

[0289]

위에서의 TLR4 작용제 화합물에서, 전체적인 변화는 분자 내 작용기에 따라서 결정될 수 있다. 예를 들어, 포스페이트기는 포스페이트기의 이온화 상태에 따라서 음으로 하전되거나 중성일 수 있다.

[0290]

V. 생물활성제 및 나노구조 지질 담체를 포함하는 예시적인 조성물을 제조하는 방법

[0291]

본 명세서에서 제공된 바와 같이, 본 명세서에 기재된 NLC를 제조하는 방법은 (a) 고체상 지질, 액체상 지질, 양이온성 지질 및 소수성 계면활성제(예컨대, 솔비탄 에스터)를 혼합하여 오일상 혼합물을 형성하는 단계; (b) 친수성 계면활성제와 물을 혼합하여 수성 상을 형성하는 단계; 및 (c) 오일상 혼합물을 수성 상 혼합물과 혼합하여 NLC를 형성하는 단계를 포함한다. 몇몇 실시형태에 있어서, 추가의 단계는 생물활성제가 비-공유 상호작용에 의해 또는 가역적 공유 상호작용에 의해 NLC의 표면과 연관되도록 생물활성제를 NLC와 배합하는 단계를 포함한다. 이러한 실시형태는 생물활성제가 음으로 하전된, 예컨대, RNA 분자 또는 DNA 분자인 것이 바람직하다. 생물활성제 상의 음 하전은 NLC에서의 양이온성 지질과 상호작용함으로써, 음으로 하전된 생물활성제를 NLC와 회합시킨다. 다른 실시형태에 있어서, 생물활성제가 소수성인 경우, 단계 (a)에서의 성분과 배합하여 오일상 혼합물의 부분을 형성한다. 몇몇 실시형태에 있어서, 생물활성제는 공유 상호작용을 통해서 NLC의 표면의 성분에 부착될 수 있다.

[0292]

고체상 지질, 액체상 지질, 양이온성 지질, 및 소수성 계면활성제(예컨대, 솔비탄 에스터)를 혼합하여 오일상 혼합물을 형성하는 것은, 예를 들어, 가열 및 초음파처리에 의해 달성될 수 있다. 오일상 혼합물을 수성 상 혼합물과 혼합하는 것은, 예를 들어, 제한 없이 고전단 유화 및 미세 유동화를 비롯하여 다양한 유화 방법에 의해 달성될 수 있다.

[0293]

VI. 조성물 나노구조 지질 담체를 포함하는 조성물

[0294]

본 명세서에서 기재된 NLC 조성물을 포함하는, 제형, 조성물 및 약제학적 조성물이 본 명세서에서 제공된다.

[0295]

NLC 및 생물활성제를 포함하는 조성물은 선택적으로 약제학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함한다.

[0296]

본 명세서에서 기재된 조성물은 임의의 백신 접종, 치료 또는 진단 목적을 위하여 대상체에게 투여될 수 있다.

[0297]

본 명세서에서 약제학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제와 더 조합하여 본 발명에 개시된 조성물을

포함하는 약제학적 조성물이 제공된다.

- [0298] 본 명세서에서 제공된 특히 바람직한 실시형태에 있어서, 본 명세서에서 제공된 NLC 및 약제학적 조성물은 0.45 미크론 필터를 통해서 여과 가능하다. 몇몇 실시형태에 있어서, 약제학적 조성물은 0.20 미크론 필터를 통해서 여과 가능하다. 몇몇 실시형태에 있어서, 약제학적 조성물은 0.22 미크론 필터를 통해서 여과 가능하다.
- [0299] 일 실시형태에 있어서, 본 발명은 NLC 및 연관된 생물활성제를 포함하는 조성물을 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다. 이러한 조성물은, 질환 또는 다른 병태, 예컨대, 유기체에 의한 감염을 진단, 치료 또는 예방하기 위한 목적으로, 면역 반응, 예컨대, 비-특이적 면역 반응 또는 항원-특이적 면역 반응을 자극하기 위하여 대상체에게 투여될 수 있다.
- [0300] 몇몇 다른 실시형태에 있어서, 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제와 조합하여 본 명세서에 기재된 조성물을 포함하는 백신 조성물이다. 예시적인 담체는 통상 이용되는 투약량 및 농도에서 수용자에게 비독성이다.
- [0301] 몇몇 양상에 있어서, 본 명세서에서 제공된 약제학적 조성물은, 예를 들어, 대상체에서 면역 반응을 일으키기 위하여, 대상체에서 반응을 일으키도록 대상체에게 투여된다. 전형적으로, 치료적 유효량이 대상체에게 투여된다.
- [0302] 용어 "유효량" 또는 "치료적 유효량"은, 예컨대, 목적하는 면역 반응을 생성하기에 충분한 목적하는 효과를 달성하거나 또는 적어도 부분적으로 달성하기에 충분한 양을 지칭한다. 유효량의 NLC 또는 약제학적 조성물은 "유효 용법"에서 투여된다. 용어 "유효 용법"이란 목적하는 효과를 달성하는데 적합한 투약량 빈도와 투여 중인 조성물의 양의 조합을 지칭한다.
- [0303] 실제 투약량 수준은, 환자에 대한 독성 없이, 특정 환자에 대한 바람직한 반응, 조성물 및 투여 형태를 달성하는데 유효한 양을 얻기 위하여 변화될 수 있다. 선택된 투약량 수준은 이용된 특정 조성물, 연령, 성별, 체중, 병태, 치료 중인 대상체의 일반적 건강 및 과거의 병력, 및 의료 분야에서 잘 알려진 기타 인자와 조합하여 각종 약동학적 인자에 따라서 좌우될 것이다.
- [0304] 본 명세서에서 제공된 예시적인 치료적 실시형태에 있어서, 약 1 μ g/kg 내지 약 10 mg/kg의 치료적 약제학적 조성물의 투약량이 투여된다. 투여의 횟수 및 빈도는 대상체의 반응에 따라서 좌우될 것임은 당업자에게 명백할 것이다.
- [0305] 본 명세서에서 제공된 예시적인 백신-기반 실시형태에 있어서, 약 1 μ g 내지 100 μ g의 항원 또는 0.1 μ g 내지 10mg의, 항원을 암호화하는 핵산은, 투여에 대해서 투여될 것이다. 본 발명의 예시적인 제형은 약 0.1 μ g, 약 1 μ g, 약 5 μ g 또는 약 10 μ g 내지 약 500 μ g의 레플리콘 RNA의 인간 용량을 허용한다. 본 발명의 예시적인 제형은 약 5 μ g 내지 약 20 μ g의 레플리콘 RNA의 인간 용량을 허용한다.
- [0306] 투여의 횟수 및 빈도는 대상체의 반응에 따라서 좌우될 것임은 당업자에게 명백할 것이다. 예시적인 제형은 최소한 1회의 면역화 후에 치료적 효능을 허용한다.
- [0307] 치료적 용도를 위한 "약제학적으로 허용 가능한 담체"는 약제학적 분야에서 잘 알려져 있으며, 예를 들어, 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A.R. Gennaro edit. 1985)]에 기재되어 있다. 예를 들어, 생리적 pH에서 멸균 식염수 및 인산염-완충 식염수가 사용될 수 있다. 보존제, 안정화제, 염료 및 심지어 향료는 약제학적 조성물에서 제공될 수 있다. 예를 들어, 벤조산나트륨, 솔브산 및 *p*-하이드록시벤조산의 에스터가 보존제로서 첨가될 수 있다. 상기 문헌 1449 참조. 또한, 항산화제 및 현탁제가 사용될 수 있다. 상기 문헌 참조.
- [0308] 약제학적 조성물은 조성물이 환자에게 투여되는 것을 허용하는 임의의 형태일 수 있다. 예를 들어, 조성물은 고체, 액체 또는 기체(에어로졸)의 형태일 수 있다. 전형적인 투여 경로는, 제한 없이, 경구, 국소, 비경구, 설하, 협측, 직장, 질, 정맥내, 피부내, 경피, 비강내, 점막내, 폐 또는 피하를 포함한다. 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 비경구는 이온영동, 초음파영동, 열, 경피 투여, 또한 피하 주사, 정맥내, 근육내, 흉골내, 해면체내, 척수강내, 관내(intrameatal), 요도내 주사 또는 주입 수법을 포함한다. 몇몇 실시형태에 있어서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 조성물(백신 및 약제학적 조성물 포함)은 이온영동, 미세공동화(microcavitation), 초음파영동, 제트 주사 또는 마이크로니들로부터 선택된 수법에 의해 피부내에 투여된다. 하나의 바람직한 실시형태에 있어서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 조성물은 이스라엘의 네스치오에 소재한 NanoPass Technologies Ltd.에 의해 제조된 마이크로니들 디바이스, 예컨대, MicronJet600을 이용해서 피부내에 투여된다(예컨대, 미국

특허 제6,533,949호 및 제7,998,119호 및 문헌[Yotam, et al., Human vaccines & immunotherapeutics 11(4): 991-997 (2015)](이들 각각은 이들의 전문이 참고로 본 명세서에 편입됨) 참조).

- [0309] 약제학적 조성물은 대상체에 대한 조성물의 투여 시 여기에 함유된 활성 성분이 생물학적으로 이용 가능하도록 제형화될 수 있다. 대상체에게 투여될 조성물은 하나 이상의 투약량 단위의 형태를 취하며, 여기서, 예를 들어, 정제는 단일 투약량 단위일 수 있고, 에어로졸 형태의 본 발명의 하나 이상의 화합물은 복수의 투약량 단위를 유지할 수 있다.
- [0310] 경구 투여를 위하여, 부형제 및/또는 결합제가 존재할 수 있다. 그 예는 수크로스, 카올린, 글리세린, 전분, 텍스트린, 알긴산나트륨, 카복시메틸셀룰로스 및 에틸 셀룰로스이다. 착색제 및/또는 착향제가 존재할 수 있다. 코팅 셀이 사용될 수 있다.
- [0311] 조성물은 액체, 예컨대, 엘릭시르, 시럽, 용액, 에멀션 또는 현탁액의 형태일 수 있다. 액체는 2가지 예로서 경구 투여를 위한 또는 주사에 의한 전달을 위한 것일 수 있다. 경구 투여를 위하여 의도된 경우, 조성물은 감미료, 보존제, 염료/착색제 및 향 증강제 중 하나 이상을 함유할 수 있다. 니들 및 시린지 또는 니들 없는 제트 주사에 의한 주사에 의해 투여되도록 의도된 조성물에 있어서, 계면활성제, 보존제, 습윤제, 분산제, 현탁제, 완충제, 안정화제 및 등장화제 중 하나 이상이 포함될 수 있다.
- [0312] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 액체 약제학적 조성물은, 용액, 현탁액 또는 기타 유사한 형태이든지 간에, 이하의 담체 또는 부형제 중 하나 이상을 포함할 수 있다: 멸균 희석제, 예컨대, 주사용수, 식염수 용액, 바람직하게는, 생리 식염수, 링거액, 등장성 염화나트륨, 고정유, 예컨대, 스쿠알렌, 스쿠알란, 광유, 만니드 모노올레에이트, 콜레스테롤, 및/또는 합성 모노 또는 다이글리세라이드(용매 또는 현탁 매질로서 작용할 수 있음), 폴리에틸렌 글리콜, 글리세린, 프로필렌 글리콜 또는 다른 용매; 항세균제, 예컨대, 벤질 알코올 또는 메틸 파라벤; 항산화제, 예컨대, 아스코르브산 또는 중아황산나트륨; 킬레이트제, 예컨대, 에틸렌다이아민테트라아세트산; 완충제, 예컨대, 아세테이트, 시트레이트, 또는 포스페이트 및 등장성의 조정을 위한 물질, 예컨대, 염화나트륨 또는 텍스트로스.
- [0313] 또 다른 실시형태에 있어서, 본 개시내용의 조성물은 에어로졸화될 수 있는 방식으로 제형화된다.
- [0314] 또한, 약제학적 조성물 중 다른 성분, 예컨대, 알루미늄염, 유중수 에멀션, 생분해성 오일 비히클, 수중수 에멀션, 생분해성 마이크로캡슐, 및 리포솜을 포함하지만, 이들로 제한되는 것은 아닌 전달 비히클을 포함하는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 비히클에 사용하기 위한 추가의 면역자극 물질(코-아주반트)의 예는 또한 위에서 기재된 바와 같고 N-아세틸틸라밀-L-알라닌-D-아이스글루타민(MDP), 글루칸, IL-12, GM-CSF, 감마 인터페론 및 IL-12를 포함할 수 있다.
- [0315] 당업자에게 공지된 임의의 적합한 담체가 본 개시내용의 약제학적 조성물에 사용될 수 있지만, 담체의 유형은 투여 방식 및 지속된 방출이 바람직한지에 따라 달라질 것이다. 비경구 투여, 예컨대, 피하 주사를 위하여, 담체는 물, 식염수, 알코올, 지방, 왁스 또는 완충제를 포함할 수 있다. 경구 투여를 위하여, 상기 담체 또는 고체 담체 중 임의의 것, 예컨대, 만니톨, 락토스, 전분, 스테아르산 마그네슘, 나트륨 사카린, 톨검, 셀룰로스, 글루코스, 수크로스 및 탄산마그네슘이 이용될 수 있다. 생분해성 미소구체(예컨대, 폴리락트산 갈락타이드)는 또한 본 발명의 약제학적 조성물용의 담체로서 이용될 수 있다. 적합한 생분해성 미소구체는, 예를 들어, 미국 특허 제4,897,268호 및 제5,075,109호에 개시되어 있다. 이와 관련하여, 미소구체는 대략 25 미크론 초과인 것이 바람직하다.
- [0316] 약제학적 조성물은 또한 희석제, 예컨대, 완충제, 항산화제, 예컨대, 아스코르브산, 폴리펩타이드, 단백질, 아미노산, 글루코스, 수크로스 또는 텍스트린을 포함하는 탄수화물, 킬레이트제, 예컨대, EDTA, 글루타티온 및 기타 안정화제 및 부형제를 함유할 수 있다. 중성 완충 식염수 또는 비특이적 혈청 알부민스킬린(albumiskiln)과 혼합된 식염수는 예시적인 적절한 희석제이다. 예를 들어, 산물은 적절한 부형제 용액(예컨대, 수크로스)을 희석제로서 이용하는 동결건조제로서 제형화될 수 있다.
- [0317] 약제학적 조성물은 국소 투여를 위하여 의도될 수 있는데, 이 경우에, 담체는 용액, 에멀션, 연고 또는 겔 기제를 적절하게 포함할 수 있다. 기제는, 예를 들어, 하기 중 하나 이상을 포함할 수 있다: 바셀린, 라놀린, 폴리에틸렌 글리콜, 밀랍, 광유, 희석제, 예컨대, 물 및 알코올, 및 유화제 및 안정화제. 증점제는 국소 투여를 위한 약제학적 조성물에 존재할 수 있다. 경피 투여를 위해 의도된 경우, 조성물은 경피 패치 또는 이온영동 디바이스를 포함할 수 있다. 국소 제형은 항원(예컨대, GLA-항원 백신 조성물) 또는 GLA(예컨대, 면역학적 아주반트 조성물; GLA는 Avanti Polar Lipids, Inc.(엘라매마주 엘라베스터 소재)로부터 입수 가능함; 예컨대, 제품 번호

699800)의 약 0.1 내지 약 10% w/v(단위 용적당 중량)의 농도를 함유할 수 있다.

- [0318] 조성물은, 예컨대, 직장에서 용해되어 약물을 방출할 수 있는 좌제의 형태로 직장 투여를 위해 의도될 수 있다. 직장 투여용의 조성물은 유기성 기제를 적합한 비자극 부형제로서 함유할 수 있다. 이러한 염기는, 제한 없이, 라놀린, 코코어 버터 및 폴리에틸렌 글리콜을 포함한다. 본 발명의 방법에서, 약제학적 조성물/아주반트는 삼입물(들), 비드(들), 시간조절-방출 제형(들), 패치(들) 또는 신속-방출 제형(들)의 사용을 통해서 투여될 수 있다.
- [0319] 선택적으로, 긴장성을 조절하기 위하여, NLC는 생리적 식염, 예컨대, 나트륨염. 염화나트륨(NaCl)을 포함할 수 있고, 예를 들어, 약 0.9% (w/v)(생리 식염수)에서 사용될 수 있다. 존재할 수 있는 기타 염은 염화칼륨, 인산 이수소칼륨, 인산이나트륨, 염화마그네슘, 염화칼슘 등을 포함한다. 비-이온성 등장화제는 또한 긴장성을 조절하는데 사용될 수 있다. 알도스, 예컨대, 글루코스, 만노스, 아라비노스 및 리보스로서 분류된 단당류뿐만 아니라 케토스, 예컨대, 프럭토스, 소르보스 및 자일로스로서 분류된 것들이 본 명세서에 개시된 조성물에서 비-이온성 등장화제로서 사용될 수 있다. 이당류, 예컨대, 수크로스, 말토스, 트레할로스 및 락토스가 또한 사용될 수 있다. 또한, 알디톨(비환식 폴리하이드록시 알코올, 또한 당 알코올이라 지칭됨), 예컨대, 글리세롤, 만니톨, 자일리톨, 및 솔비톨은, 본 명세서에 개시된 조성물에서 유용한 비-이온성 등장화제이다. 비-이온성 긴장성 조절제는, 사용되는 제제에 따라서, 약 0.1% 내지 약 10% 또는 약 1% 내지 약 10%의 농도로 존재할 수 있다. NLC가 비경구 투여를 위하여 제형화된다면, NLC 조성물의 삼투압농도를 정상 생리적 유체와 동일하게 하고, 투여후 결과, 예컨대, 조성물의 투여후 팽윤 또는 신속한 흡수를 예방하는 것이 바람직하다.
- [0320] 선택적으로, NLC는 트레할로스, 수크로스, 만니톨, 솔비톨, Avicel PHI 02(미세결정성 셀룰로스), Avicel RC591(미세결정성 셀룰로스와 나트륨 카복시메틸 셀룰로스의 혼합물), Mircrocelac[®](락토스와 Avicel의 혼합물), 또는 이들의 조합물을 포함하는 동결보호제로 제형화될 수 있다. 선택적으로, NLC는 보존제, 예컨대, Hydrolite 5로 제형화될 수 있다.
- [0321] VII. 안정적인 에멀션
- [0322] 몇몇 실시형태에 있어서, 안정적인 에멀션이 제공되는데, 여기서 안정적인 에멀션은 적어도 1종의 아주반트를 포함한다. 안정적인 에멀션으로 제형화될 수 있는 비제한적인 예시적인 아주반트는 TLR3 작용제 및 Rig-I 작용제를 포함한다. 비제한적인 예시적인 이러한 아주반트는 이중-가닥 RNA, RIBOXXOL, 폴리(I:C) 및 Hiltonol[®]을 포함한다.
- [0323] 몇몇 실시형태에 있어서, 안정적인 에멀션(SE)은 수중유 에멀션이다. 몇몇 이러한 실시형태에 있어서, 수중유 에멀션은 수중 스쿠알렌 에멀션이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 에멀션은 항산화제, 예컨대, 알파-토코페롤(비타민 E, 예컨대, EP 0 382 271 B1 참조)을 포함한다. WO 95/17210 및 WO 99/11241은 스쿠알렌, 알파-토코페롤 및 TWEEN[®] 80에 기반한 에멀션을 논의한다. WO 99/12565는 오일상에 스테롤의 첨가에 의해 이들 스쿠알렌 에멀션에 대한 개선을 논의한다.
- [0324] WO08/153541은 2 내지 10%의 오일, 예컨대, 스쿠알렌의 범위; 그리고 존재할 경우, 0.01 내지 0.1%의 알파 토코페롤; 및 0.3 내지 3%의 계면활성제, 예컨대, 폴리옥시에틸렌 솔비탄 모노올레이트 또는 폴록사머 188(Poloxamer 188)(폴리옥시에틸렌과 폴리옥시프로필렌의 공중합체)로 존재하는 성분의 양을 통상 갖는 바와 같은 수중유 에멀션을 논의한다. 오일:계면활성제의 비는 에멀션의 안정성을 향상시키기 위하여 1 이하일 수 있다. Span 85는 또한 약 1%의 수준에서 존재할 수 있다. 몇몇 경우에, 백신이 안정화제를 더 함유하는 것이 유리할 수도 있다. 일 실시형태에 있어서, 안정화제는 트라이글리세라이드, 예컨대, 트라이카프릴린(C₂₇H₅₀O₆)(예컨대, WO 98/56414 참조)일 수 있다. 몇몇 실시형태에 있어서, 수중유 에멀션은 0.5% 내지 5%, 또는 0.5% 내지 5%, 또는 0.5% 내지 3%, 또는 1% 내지 3%의 글리세롤을 포함한다. 몇몇 실시형태에 있어서, 수중유 에멀션은 0.5% 내지 5%, 또는 0.5% 내지 5%, 또는 0.5% 내지 3%, 또는 1% 내지 3%의 1,2-다이미리스토일-sn-글리세로-3-포스포콜린(DMPC)을 포함한다. 비제한적인 예시적인 수중유 에멀션은 본 명세서에서 실시예에서 논의된다.
- [0325] 수 에멀션 중 안정적인 오일 내에서 발견된 오일 액적의 크기는 바람직하게는 1 미크론 미만이고, 광자 상관 분광법에 의해 측정된 바와 같이 실질적으로 30 내지 600nm, 바람직하게는 실질적으로 대략 30 내지 500nm의 직경, 가장 바람직하게는 실질적으로 150 내지 500nm의 직경, 특히 약 150nm의 직경의 범위일 수 있다. 이와 관련하여, 개수로 80%의 오일 액적은 바람직한 범위 내이어야 하고, 더 바람직하게는 개수로 90% 초과, 가장 바람직하게는 95% 초과인 오일 액적이 규정된 크기 범위 내이다. 본 발명의 오일 에멀션에 존재하는 오일의 양은 통

상 2 내지 10%의 범위 내의 오일, 예컨대, 스쿠알렌; 존재할 경우, 2 내지 10%의 알파 토크페롤; 및 0.3 내지 3%의 계면활성제, 예컨대, 폴리옥시에틸렌 솔비탄 모노올레이트이다. 바람직하게는 오일:알파 토크페롤의 비는, 더욱 안정적인 에멀션을 제공하므로 1보다 크다. Span 85는 또한 약 1%의 수준에서 존재할 수 있다. 몇몇 경우에, 본 발명의 백신이 안정화제를 더 함유하게 되는 것이 유리할 수 있다.

[0326] 수 에멀션 중 오일을 제조하는 방법은 당업자에게 잘 공지되어 있다. 통상, 방법은 오일상을 계면활성제, 예컨대, PBS/TWEEN80® 용액과 혼합하고 나서, 호모지나이저를 이용해서 균질화를 행하는 것을 포함한다. 예를 들어, 시린지 니들을 통해서 혼합물을 1회, 2회 또는 그 이상 통과시키는 것을 포함하는 방법은, 적은 용적의 액체를 균질화시키는데 적합할 것이다. 균등하게, 미세유동화기(MHOS 미세유동 기계(microfluidics machine), 6 bar의 최대 압력 입력(약 850 bar의 출력 압력)에서 2분의 기간 동안 최대 50회 통과)에서의 유화 공정은 더 작은 또는 다 큰 용적의 에멀션을 제조하도록 적용될 수 있었다. 이 적용은 제조가 요구되는 직경의 오일 액적으로 달성될 때까지 얻어지는 에멀션의 측정을 포함하는 관례적인 실험에 의해 달성될 수 있었다.

[0327] VIII. 본 개시내용의 조성물을 이용하는 방법

[0328] A. 치료제

[0329] 몇몇 실시형태에 있어서, 제제는 치료 목적에 유용하다. 따라서, 몇몇 실시형태에 있어서, 기재된 조성물은 본 명세서에서 제공된 NLC를 포함하고, 질환, 병태 또는 장애의 치료를 위하여 생물활성제를 더 포함한다.

[0330] 몇몇 실시형태에 있어서, 제제는 알리지, 암, 감염성 질환, 자가면역, 또는 중독의 치료 또는 예방에 유용하다. 몇몇 실시형태에 있어서 제제는 면역 반응을 자극, 증대 및/또는 조절하는데 유용하다.

[0331] 개시된 실시형태의 몇몇 양상에 있어서, 조성물은 암 항원 또는 암 항원을 암호화하는 핵산을 포함한다. 몇몇 실시형태에 있어서, 백신 조성물은 종양 연관 항원 발현, 예컨대, HER-2/neu 발현 또는 기타 암-특이적 또는 암-연관 항원을 특징으로 하는 임의의 암에 대해서 유용하게 되는 암 항원을 포함한다.

[0332] 본 개시내용의 소정의 실시형태에 따른 조성물 및 방법은 또한 숙주의 또는 대상체의 면역계가 "자가 조직, 세포, 생물분자(예컨대, 펩타이드, 폴리펩타이드, 단백질, 당단백질, 리포단백질, 단백질질, 지질, 당지질, 핵산, 예컨대, RNA 및 DNA, 올리고당, 다당류, 프로테오글리칸, 글리코사미노글리칸 등, 및 대상체 세포 및 조직의 기타 분자 성분) 또는 에피토프(예컨대, 특이적인 면역학적으로 정의된 인식 구조, 예컨대, 항체 가변 영역 상보성 결정 영역(CDR)에 의해 또는 T 세포 수용체 CDR에 의해 인식된 것)에 대해서 지향되는 면역 반응을 유해하게 매개하는 질환, 병태 또는 장애를 포함하는, 자가면역 질환의 예방 또는 치료에 사용될 수 있다.

[0333] 따라서, 자가면역 질환은 정상적 자가 조직에 대해서 지향된 어느 하나의 사례에 있는 세포 또는 항체와 연루된 비정상 면역 반응에 의해 특성구명된다. 포유류에서의 자가면역 질환은 일반적으로 2개의 상이한 부류로 분류된다: 세포-매개 질환(즉, T-세포) 또는 항체-매개 장애. 세포-매개 자가면역 질환의 비-제한적인 예는 다발성 경화증, 류마티스 관절염, 하시모토 갑상선염, 제I형 진성 당뇨병(청소년성 발병 당뇨병) 및 자가면역 포도막 망막염을 포함한다. 항체-매개 자가면역 장애는, 중증근무력증, 전신성 홍반 루푸스(또는 SLE), 그레이브스병, 자가면역 용혈성 빈혈, 자가면역 혈소판감소증, 자가면역 천식, 저온글로불린혈증, 혈전성 혈소판감소성 자반, 원발성 담즙성 경화증 및 악성 빈혈을 포함하지만, 이들로 제한되는 것은 아니다. 전신성 홍반 루푸스와 연관된 항원(들)은 소형 핵 리보핵산 단백질(snRNP)이고; 그레이브스 병은 티로트로핀 수용체, 티로글로불린 및 갑상선 상피 세포의 기타 성분이고; 수포창은 카드헤린-유사 수포창 항원 예컨대, 데스모글레인 3(desmoglein 3) 및 기타 부착 분자이고; 혈전성 혈소판감소성 자반은 혈소판의 항원이다.

[0334] 본 명세서에서 제공된 조성물은, 예를 들어, 결핵에 대한 방어 면역을 유도하는데 사용될 수 있고, 하나 이상의 마이코박테륨 단백질의 적어도 하나의 면역원성 부분을 함유하는 폴리펩타이드 및 이러한 폴리펩타이드를 암호화하는 DNA 및 RNA 분자의 용도를 포함한다. 또한, 이러한 화합물은 마이코박테륨 감염에 대한 면역화를 위한 백신 및/또는 약제학적 조성물로 제형화될 수 있다.

[0335] 다른 실시형태에 있어서, 본 개시내용의 조성물은, 병태, 예컨대, 만성 폐쇄성 폐질환(COPD)의 예방 및 치료를 위하여, 호흡기 질환, 예컨대, 박테리아 감염(예컨대 폐렴구균)에 의해 야기 또는 악화된 것과 연관된 항원을 포함한다.

[0336] 직접적인 생체내 절차 이외에, 세포가 숙주로부터 제거되고, 변형되고, 동일한 또는 또 다른 숙주 동물에 배치되는 생체의 절차를 이용할 수 있다. 생체의 환경에서 조직 세포로의 항원-암호화 핵산 분자의 도입을 위하여 위에서 기재된 임의의 조성물을 사용할 수 있다는 것은 명확할 것이다. 흡수의 바이러스, 물리적 및 화학적 방

법을 위한 프로토콜은 당해 분야에 잘 알려져 있다.

[0337] 몇몇 실시형태에 있어서, 본 개시내용의 조성물은 대상체에서 면역 반응을 부스팅 또는 증대시키는데 사용된다. 몇몇 이러한 실시형태에 있어서, 생물활성제는 아췌반트이다. 비제한적인 예시적인 아췌반트는 TLR 작용제 (TLR2, TLR3, TLR4, TLR7, TLR8 및 TLR9 작용제 포함), RIG-I 작용제, 사포닌, 탄수화물, 탄수화물 중합체, 공액된 탄수화물, 전체 바이러스 입자, 바이러스-유사 입자, 바이러스 단편 및 세포 단편을 포함한다. 이러한 아췌반트의 예는, 이중-가닥 RNA, RIBOXXOL, 폴리(I:C) 및 Hiltonol®을 포함하지만, 이들로 제한되는 것은 아니다. 몇몇 실시형태에 있어서, 조성물은 안정적인 에멀션 및/또는 나노구조 지질 담체를 포함한다. 몇몇 실시형태에 있어서, 조성물은 안정적인 에멀션 및/또는 스쿠알렌을 포함하는 나노구조 지질 담체를 포함한다. 본 발명자들은, 스쿠알렌-기반 제형이, 예를 들어, TLR3 작용제를 예방 밖으로 강력하게 하는 것을 발견하였다.

[0338] 몇몇 바람직한 양상에 있어서, 본 개시내용의 조성물은 숙주, 환자에서 또는 세포 배양액에서, 면역 반응을 증대 또는 유도하는데 유용하다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "대상체"는 임의의 포유류를 지칭한다. 환자는 감염성 질환, 암, 예컨대, 유방암, 또는 자가면역 질환을 앓고 있을 수 있거나, 또는 정상(즉, 검출 가능한 질환 및/또는 감염이 없음)일 수 있다. "세포 배양액"은 면역계의 면역적격(immunocompetent) 세포 또는 단리된 세포(T 세포, 대식세포, 단핵구, B 세포 및 수지상 세포를 포함하지만, 이들로 제한되는 것은 아님)를 함유하는 임의의 제제이다. 이러한 세포는 당업자에게 잘 알려진 각종 수법 중 어느 하나(예컨대, 피콜-하이펙 밀도 원심분리(Ficoll-hypaque density centrifugation))에 의해 단리될 수 있다. 세포는 (만드는 아니지만) 암을 앓고 있는 환자로부터 단리된 것일 수 있고, 치료 후에 환자에게 재도입될 수 있다.

[0339] B. 백신

[0340] 따라서, 본 개시내용은 면역 반응을 시작할 수 있는 숙주에서 면역 반응을 변화(즉, 예를 들어, 당업자에게 친숙한 바와 같은 적절한 대조군에 비해서, 통계학적으로 유의한 방식으로 증감)시키기 위한 조성물을 제공한다. 당업자에게 알려진 바와 같이, 면역 반응은 숙주의 면역 상태의 임의의 활성 변화일 수 있고, 이러한 변화는 숙주 면역 상태의 유지 및/또는 조절에 관여하는 하나 이상의 조직, 기관, 세포 또는 분자의 구조 또는 기능의 임의의 변화일 수 있다. 전형적으로, 면역 반응은, 예컨대, 하기의 생체내 또는 시험관내 결정을 포함하지만 이것으로 제한되지 않는 각종 잘 알려진 파라미터 중 임의의 것일 수 있다: 가용성 면역글로불린 또는 항체; 가용성 매개체, 예컨대, 사이토카인, 림포카인, 케모카인, 호르몬, 성장 인자 등뿐만 아니라 기타 가용성 소렙타이드, 탄수화물, 뉴클레오타이드 및/또는 지질 매개체; 면역계의 세포의 변화된 기능 또는 구조 특성에 의해 결정된 바와 같은 세포 활성화 상태 변화, 예를 들어, 세포 증식, 변화된 이동성, 특화된 활성도의 유도, 예컨대, 특정 유전자 발현 또는 세포독성 거동; 변화된 표면 항원 발현 프로파일 또는 세포자멸사(예정 세포사)의 개시를 포함하는 면역계의 세포에 의한 세포 분화; 또는 면역 반응의 존재가 검출될 수 있는 임의의 기타 기준.

[0341] 본 개시내용의 조성물에 의한 면역 반응의 유도의 결정은 당업자가 용이하게 친숙하게 될 많은 잘 알려진 면역학적 검정에 의해 확립될 수 있다. 이러한 검정은, 반드시 필수는 아니지만, 하기의 생체내 또는 시험관내 결정을 포함하지만, 이들로 제한되는 것은 아니다: 가용성 항체; 가용성 매개체, 예컨대, 사이토카인, 림포카인, 케모카인, 호르몬, 성장 인자 등뿐만 아니라 기타 가용성 작은 펩타이드, 탄수화물, 뉴클레오타이드 및/또는 지질 매개체; 면역계의 세포의 변화된 기능 또는 구조 특성에 의해 결정된 바와 같은 세포 활성화 상태 변화, 예를 들어, 세포 증식, 변화된 이동성, 특화된 활성도의 유도, 예컨대, 특정 유전자 발현 또는 세포독성 거동; 변화된 표면 항원 발현 프로파일 또는 세포자멸사(예정 세포사)의 개시를 포함하는 면역계의 세포에 의한 세포 분화. 이들 및 유사한 검정을 수행하기 위한 절차는 광범위하게 알려져 있고, 예를 들어, Lefkovits(Immunology Methods Manual: The Comprehensive Sourcebook of Techniques, 1998; 또한 문헌[Current Protocols in Immunology] 참조; 또한, 예컨대, 문헌[Weir, Handbook of Experimental Immunology, 1986 Blackwell Scientific, Boston, MA; Mishell and Shigii (eds.) Selected Methods in Cellular Immunology, 1979 Freeman Publishing, San Francisco, CA; Green and Reed, 1998 Science 281: 1309] 및 이들 속에 인용된 문헌들 참조)에서 찾을 수 있다.

[0342] 항원-반응성 T 세포의 증식의 검출은 각종 공지된 수법에 의해 달성될 수 있다. 예를 들어, T 세포 증식은 DNA 합성 속도를 측정함으로써 검출될 수 있고, 항원 특이성은 후보 항원-반응성 T 세포가 노출되는 자극(예를 들어, 특정의 목적하는 항원- 또는 대조군 항원-펩스식 항원 제시 세포 등)을 제어함으로써 결정될 수 있다. 증식되도록 자극된 T 세포는 증가된 DNA 합성 속도를 나타낸다. DNA 합성 속도를 측정하기 위한 전형적인 방식은, 예를 들어, 새롭게 합성된 DNA에 혼입된 뉴클레오타이드 전구체인 삼중수소화 티미딘에 의해 T 세포의 배양물을 펄스 표지화하는 것에 의한다. 혼입된 삼중수소화 티미딘의 양은 액체 섬광 분광광도계를 사용하여 결정될 수

있다. T 세포 증식을 검출하는 다른 방식은 인터루킨-2(IL-2) 생산, Ca²⁺ 플럭스, 또는 염료 흡수, 예컨대, 3-(4,5-다이메틸티아졸-2-일)-2,5-다이페닐-테트라졸륨의 증가를 측정하는 것을 포함한다. 대안적으로, 림포카인(예컨대, 인터페론-감마)의 합성은 측정될 수 있거나, 또는 특정한 항원에 반응할 수 있는 T 세포의 상대 개수는 정량화될 수 있다.

[0343] 항원-특이적 항체 생산의 검출은, 예를 들어, 시험관내 방법론, 예컨대, 방사면역검정법(RIA), 효소 연결 면역흡착 검정법(ELISA), 평형 투석 또는 고상 면역블로팅, 예를 들어, 웨스턴 블로팅을 이용하여 본 개시내용에 따른 백신으로 치료된 숙주로부터 샘플(예를 들어, 면역글로불린 함유 샘플, 예컨대, 혈청, 혈장 또는 혈액)을 평가함으로써 달성될 수 있다. 실시형태에 있어서, ELISA 검정법은, 예를 들어, 검정법의 감수성을 증대시키기 위해 항원에 특이적인 고체상 단클론성 항체에 의한 표적 항원의 항원-포획 고정화를 더 포함할 수 있다. 가용성 매개체(예를 들어, 사이토카인, 케모카인, 림포카인, 프로스타글란딘 등)의 정교함은 예를 들어, 상업적 공급원(예컨대, Sigma(미주리주 세인트 루이스 소재); 또한 R&D Systems 2006 카탈로그, R&D Systems(미네소타주 미니애폴리스 소재) 참조)으로부터 용이하게 이용 가능한 방법, 장치 및 시약을 이용하여 효소 연결 면역흡착 검정법(ELISA)에 의해 또한 용이하게 결정될 수 있다.

[0344] 당해 분야에 잘 알려진 통상의 검정법을 이용해서 임의의 수의 다른 면역학적 파라미터를 모니터링할 수 있다. 이것은 잘 확립된 마커 항원 시스템, 면역조직화학 또는 다른 관련 검정법을 이용하는, 예를 들어, 항체 독립적 세포-매개 세포독성(ADCC) 검정, 2차 시험관내 항체 반응, 다양한 말초 혈액 또는 림프구 단핵 세포 하위집단의 흐름 면역세포 형광분석을 포함할 수 있다. 이들 및 기타 검정법은, 예를 들어, 문헌[Rose et al. (Eds.), Manual of Clinical Laboratory Immunology, 5th Ed., 1997 American Society of Microbiology, Washington, DC]에서 발견될 수 있다.

[0345] 따라서, 본 명세서에서 제공된 조성물은 Th1-유형 T 림프구 반응, TH2-유형 T 림프구 반응, 세포독성 T 림프구(CTL) 반응, 항체 반응, 사이토카인 반응, 림포카인 반응, 케모카인 반응 및 염증성 반응으로부터 선택된 적어도 하나의 면역 반응을 숙주에서 유도 또는 증대시킬 수 있는 것이 상정된다 소정의 실시형태에 있어서, 면역 반응은 사이토카인이 인터페론-감마(IFN- γ), 종양 괴사 인자-알파(TNF- α)로부터 선택된 하나 또는 복수의 사이토카인의 제조, 인터루킨이 IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-16, IL-18 및 IL-23으로부터 선택된 하나 또는 복수의 인터루킨의 제조, 케모카인이 MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, CCL2, CCL4, CCL5, CXCL1 및 CXCL5로부터 선택된 하나 또는 복수의 케모카인의 제조 및 기억 T 세포 반응, 기억 B 세포 반응, 효과기 T 세포 반응, 세포독성 T 세포 반응 및 효과기 B 세포 반응으로부터 선택된 림프구 반응 중 적어도 하나를 포함할 수 있다.

[0346] C. 진단제

[0347] 몇몇 실시형태에 있어서 생물활성제는 진단제이다. 따라서, 이들 실시형태에 있어서, 기재된 조성물은 본 명세서에서 제공된 NLC를 포함하고, 진단제를 더 포함하며, 임의의 질환, 병태 또는 장애의 진단에 유용하다.

[0348] 몇몇 실시형태에 있어서, 진단제는 암의 검출에 유용하다. 조성물 및 방법은 본 명세서에 기재된 암을 발병시킬 위험을 갖거나 이의 위험이 있는 것으로 의심되는 대상체를 식별하기 위하여 당업계에 공지되어 있다. 암을 가질 위험이 있거나 이러한 위험이 있는 것으로 의심되는 대상체에서의 암의 진단은 광범위한 당업계에서 수용되는 방법론 중 임의의 것에 의해 달성될 수 있는데, 이것은 임상적 제시, 암의 진행도, 암의 유형 및 기타 인자를 비롯하여 각종 인자에 따라서 다양할 수 있다. 암 진단의 예는, 환자 샘플(예컨대, 혈액, 피부 생검, 기타 조직 생검, 수술 시편 등)의 조직병리학적, 조직세포화학적, 면역조직세포화학적 및 면역조직병리학적 검사, 정의된 유전자(예컨대, 핵산) 마커용의 PCR 시험, 이러한 항원을 보유하는 순환 암-연관 항원 또는 세포에 대한 또는 정의된 특이성의 항체에 대한 혈청학적 시험, 또는 당업자에게 친숙한 기타 방법론을 포함한다.

[0349] 몇몇 실시형태에 있어서, 진단제는 자가면역 질환의 검출에 유용하다. 따라서, 자가 면역항체의 검출은 자가면역 질환의 존재 또는 이를 발병할 위험의 조기 발견 또는 인식을 허용한다. 이들 지견에 기초하여, 자가항원에 대한 각종 자가항체가 발견되었고, 자가항원에 대한 자가항체는 임상 시험에서 측정되었다.

[0350] 일 실시형태에 있어서, 진단제는 감염성 질환의 검출에 유용하다. 조성물 및 방법은 본 명세서에 기재된 바와 같은 감염성 병원체에 의한 감염을 지니거나 이를 지닐 위험이 있는 것으로 의심되는 대상체를 식별하기 위하여 당업계에 공지되어 있다.

[0351] 예를 들어, 박테리아인 마이코박테륨 튜베르쿨로시스는 결핵(TB)을 구분한다. 따라서, 몇몇 실시형태에 있어서, 본 명세서에 기재된 NLC의 임의의 것을 포함하는 조성물은 결핵을 진단하기 위한 제제를 더 포함한다.

- [0352] 몇몇 실시형태에 있어서, 본 명세서에 기재된 NLC의 임의의 것을 포함하는 조성물은 말라리아를 진단하기 위한 제제를 더 포함한다.
- [0353] 감염 후 민감한 포유류의 혈장 내로 분비된 단백질 또는 단백질의 단편인 종-특이적 삼일열말라리아 원충 말라리아 펩타이드 항원을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 당업계에 기재된 바 있고, 이때, 단클론성 또는 다클론성 항체가 이들 항원에 대해서 지향되어 있다. 펩타이드 항원, 단클론성 항체 및/또는 다클론성 항체는 말라리아를 진단할 뿐만 아니라, 삼일열말라리아 원충, 즉, 플라스모듐 비박스(*Plasmodium vivax*)이 감염을 담당하는 종인지의 여부를 결정하기 위하여 사용되는 검정법에서 이용된다. 종-특이적 피. 비박스(*P. vivax*) 물질 펩타이드 항원은 또한, 이들 항원에 대해서 단클론성 또는 다클론성 항체가 지향된 바와 같이, 감염 후 민감한 포유류 숙주의 혈장 내로 분배된 단백질 또는 단백질의 단편인 것으로 보고된 바 있다. 펩타이드 항원, 단클론성 항체 및/또는 다클론성 항체는, 말라리아를 진단할 뿐만 아니라, 플라스모듐 비박스가 감염을 담당하는 종인지의 여부를 결정하기 위하여 사용되는 검정법에서 이용된다.
- [0354] 재조합 플라스모듐 팔시파룸(*Plasmodium falciparum*)(3D7) AMA-1 엑토도메인은 또한 천연형 분자의 접힘 및 다이설파이드 브리지를 유지하는 고도로 정제된 단백질을 생산하는 방법에 의해 발현되었다. 재조합 AMA-1은 진단 시약으로서, 항체 제조에 사용하기 위하여, 그리고 백신으로서 유용하다. 천연형 분자의 접힘 및 다이설파이드 브리지를 유지하는 재조합 플라스모듐 팔시파룸(3D7) MSP-142의 발현 및 정제는 마찬가지로 공지되어 있다. 재조합 MSP-142는 진단 시약으로서, 항체 제조에 사용하기 위하여, 그리고 백신으로서 유용하다.
- [0355] 몇몇 실시형태에 있어서, 본 명세서에 기재된 NLC의 임의의 것을 포함하는 조성물은 리슈만편모충증을 진단하기 위하여 유용한 제제를 더 포함한다.
- [0356] 몇몇 실시형태에 있어서, 본 명세서에 기재된 NLC의 임의의 것을 포함하는 조성물은 HIV를 진단하는데 유용한 제제를 더 포함한다.
- [0357] IX. 면역 반응을 발생하는 방법
- [0358] 대상체에서 면역 반응을 발생시키는 방법이 본 명세서에서 제공되되, 해당 방법은, 이를 필요로 하는 대상체에 게 치료적 유효량의 본 명세서에 기재된 조성물을 투여하는 단계를 포함하되, 여기서 생물활성제는 단백질 항원 또는 단백질 항원을 암호화하는 핵산 분자이다. 예시적인 실시형태에 있어서, 생물활성제는 단백질 항원을 암호화하는 RNA(예컨대, mRNA) 또는 DNA 분자이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 면역 반응을 부스팅 또는 증대시키는 방법이 제공되되, 여기서 생물활성제는 아췌반트이다.
- [0359] 치료적 유효량의 조성물의 투여의 전형적인 경로는, 제한 없이, 경구, 국소, 비경구, 설하, 협측, 직장, 질, 정맥내, 피부내, 경피, 비강내, 점막내 또는 피하를 포함한다. 몇몇 예시적인 실시형태에 있어서, 조성물의 투여는 근육내, 안구, 비경구 또는 폐이다.
- [0360] 예시적인 실시형태에 있어서, 본 명세서에 개시된 조성물은 백신 조성물이고 백신으로서 사용된다. 본 명세서에서 기재된 조성물은 대상체에서의 면역 반응(비-특이적 반응 및 항원-특이적 반응 포함)을 발생시키는데 사용될 수 있다. 몇몇 실시형태에 있어서, 면역 반응은 전신 면역 반응을 포함한다. 몇몇 실시형태에 있어서, 면역 반응은 점막 면역 반응을 포함한다. 면역 반응의 발생은 면역 반응의 자극, 면역 반응의 부스팅 또는 면역 반응의 증대를 포함한다.
- [0361] 본 명세서에서 기재된 조성물은 바이러스에 대한 방어 면역을 증대시키는데 사용될 수 있다. 이러한 바이러스 및 바이러스 항원은, 예를 들어, HIV-1(예컨대, tat, nef, gp120 또는 gp160), 인간 헤르페스 바이러스, 예컨대, gD 또는 이의 유도체 또는 즉각적 초기 단백질, 예컨대, HSV1 또는 HSV2 유래의 ICP27, 사이토메갈로바이러스((특히, 인간)(예컨대, gB 또는 이의 유도체), 로타바이러스(생-약독화 바이러스 포함), 엡스타인 바 바이러스(예컨대, gp350 또는 이의 유도체), 바리셀라 조스터 바이러스(예컨대, gp1, II 및 IE63), 또는 간염 바이러스, 예컨대, B형 간염 바이러스(예를 들어, B형 간염 표면 항원 또는 이의 유도체), A형 간염 바이러스, C형 간염 바이러스 및 E형 간염 바이러스로부터, 또는 다른 바이러스 병원체, 예컨대, 파라믹소바이러스: 호흡기 세포융합 바이러스(예컨대, F 및 G 단백질 또는 이의 유도체), 파라인플루엔자 바이러스, 홍역 바이러스, 볼거리 바이러스, 인간 유두종 바이러스(예를 들어, HPV6, 11, 16, 18 등), 플라비바이러스(예를 들어, 뎅기열 바이러스, 일본 뇌염 바이러스, 황열 바이러스, 지카 바이러스, 포스와난 바이러스(Poswanan virus), 진드기-매개 뇌염 바이러스) 또는 인플루엔자 바이러스(예그 또는 MDCK 세포에서 성장한 완전 생 또는 불활성화된 바이러스, 스플릿 인플루엔자 바이러스, 또는 완전 플루 비로솜(whole flu virosome)(문헌[Gluck, Vaccine, 1992, 10, 915-920]에 기재된 바와 같음) 또는 이의 정제된 또는 재조합 단백질, 예컨대, HA, NP, NA, PB1, PB2, PA, NS1

또는 M 단백질, 또는 이들의 조합을 포함한다.

[0362]

본 명세서에서 기재된 조성물은, 하나 이상의 박테리아 병원체, 예컨대, 네이세리아 종, 예를 들어, 엔. 고노레아 및 엔. 메닝기티디스(예를 들어, 피막 다당류 및 이의 접합체, 트랜스페린-결합 단백질, 락토펜 결합 단백질, PilC, 부착소); 에스. 피요게네스(예를 들어, 엠 단백질 또는 이의 단편, C5A 프로테아제, 리포테이코산), 에스. 아갈락티에, 에스. 뮤탄스: 에이치. 두크레이; 모락셀라 종, 예를 들어, 브란하멜라 카타랄리스로도 공지된 엠. 카타랄리스(예를 들어, 고분자량 및 저분자량 부착소 및 인바신); 보르데텔라 종, 예를 들어, 비. 페르투스(예를 들어, 페르타틴, 페르투스 독소 또는 이의 유도체, 섬모성 적혈구응집원, 아데닐레이트 시클라제, 펄브라에), 비. 파라페르투스 및 비. 브론키셉티카; 마이코박테륨 종, 예를 들어, 엠. 투베르쿨로시스(예를 들어, ESAT6, 항원 85A, -B 또는 -C), 엠. 보비스, 엠. 레프라에, 엠. 아비움, 엠. 파라투베르쿨로시스, 엠. 스메그마티스; 레지오넬라 종, 예를 들어, 엘. 뉴모필라; 에스체리치아 종, 예를 들어, 장독소 이. 콜라이(예를 들어, 콜로니화 인자, 열-불안정 독소 또는 이의 유도체, 열-안정 독소 또는 이의 유도체), 장출혈 이. 콜라이, 장병원성 이. 콜라이(예를 들어, 쉬가 독소-유사 독소 또는 이의 유도체); 비브리오 종, 예를 들어, 브이. 콜레라(예를 들어, 콜레라 독소 또는 이의 유도체); 쉬겔라 종, 예를 들어, 에스. 손네이, 에스. 디센테리아에, 에스. 플렉스네리; 에르시니아 종, 예를 들어, 와이. 엔테로콜리티카(예를 들어, Yop 단백질), 와이. 페스티스, 와이. 슈도투베르쿨로시스; 캄필로박터 종, 예를 들어, 씨. 제주니(예를 들어, 독소, 부착소 및 인바신) 및 씨. 콜리; 살모넬라 종, 예를 들어, 에스. 티피. 에스. 파라티피, 에스. 콜레라에수이스, 에스. 엔테리티디스; 리스테리아 종, 예를 들어, 엘. 모노사이토게네스; 헬리코박터 종, 예를 들어, 에이치. 파일로리(예를 들어, 우레아제, 카탈라제, 공포형성 독소); 슈도모나스 종, 예를 들어, 피. 아에루기노사; 스태필로코커스 종, 예를 들어, 에스. 아우레우스, 에스. 에피테르미디스; 엔테로코커스 종, 예를 들어, 이. 파에칼리스, 이. 파에슈; 클로스트리듐 종, 예를 들어, 씨. 테타니(예를 들어, 과산폭 독소 및 이의 유도체), 씨. 보툴리눔(예를 들어, 보툴리눔 독소 및 이의 유도체), 씨. 디피실(예를 들어, 클로스트리듐 독소 A 또는 B 및 이의 유도체); 바실러스 종, 예를 들어, 비. 안트라시스(예를 들어, 보툴리눔 독소 및 이의 유도체); 코리네박테륨 종, 예를 들어, 씨. 디프테리아에(예를 들어, 디프테리아 독소 및 이의 유도체); 보렐리아 종, 예를 들어, 비. 부르그도르페리(예를 들어, OspA, OspC, DbpA, DbpB), 비. 가리니(예를 들어, OspA, OspC, DbpA, DbpB), 비. 아프젤리(예를 들어, OspA, OspC, DbpA, DbpB), 비. 안테르소니(예를 들어, OspA, OspC, DbpA, DbpB), 비. 헤름시; 에를리키아 종, 예를 들어, 이. 에퀴 및 인간 과립구 에를리히증의 물질; 리케차 종, 예를 들어, 알. 리켓치; 클라미디아 종, 예를 들어, 씨. 트라초마티스(예를 들어, MOMP, 헤파린 결합 단백질), 씨. 뉴모니아에(예를 들어, MOMP, 헤파린 결합 단백질), 씨. 프시타시; 랩토스피라 종, 예를 들어, 엘. 인테로간스; 트레포네마 종, 예를 들어, 티. 팔리둠(예를 들어, 회귀 외막 단백질), 티. 덴티콜라, 티. 하이오디센테리에; 또는 다른 박테리아 병원체에 대한 방어 면역을 증대시키는데 사용될 수 있다.

[0363]

본 명세서에서 기재된 조성물은 하나 이상의 기생충(예를 들어, 문헌[John, D.T. and Petri, W.A., Markell and Voge's Medical Parasitology-9th Ed., 2006, WB Saunders, Philadelphia; Bowman, D.D., Georgis' Parasitology for Veterinarians-8th Ed., 2002, WB Saunders, Philadelphia] 참조), 예컨대, 플라스모듐 종, 예를 들어, 피. 팔시파름; 톡소플라스마 종, 예를 들어, 티. 곤디(예를 들어, SAG2, SAG3, Tg34); 엔타모에바 종, 예를 들어, 이. 히스톨리티카; 바베시아 종, 예를 들어, 비. 마이크로티; 트리파노소마 종, 예를 들어, 티. 크루지; 기아르디아 종, 예를 들어, 지. 람블리아; 레슈마니아 종, 예를 들어, 엘. 메이; 뉴모사이스티스 종, 예를 들어, 피. 카리니; 트리초모나스 종, 예를 들어, 티. 바기날리스; 또는 포유류를 감염시킬 수 있는 연충, 예컨대, (i) 선충 감염(엔테로비우스 베르미쿨라리스, 아스카리스 롬브리코이데스, 트리추리스 트리추리아, 네카터 아메리카누스, 안사일로스토마 듀오테날레, 우체렐리아 반크로프티, 브루기아 말라위, 온초세르카 볼볼루스, 드라칸쿨루스 메디넨시스, 트리치넬라 스피랄리스 및 스트론길로이데스 스테르코랄리스를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않음); (ii) 흡충 감염(스키스토소마 만소니, 스키토소마 헤마토비움, 스키토소마 야포니쿰, 스키토소마 메쿰기, 오피스토르치스 시넨시스, 파라고니무스 종, 패시올라 헤파티카, 패시올라 마그나, 패시올라 기간티카를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않음); 및 (iii) 촌충 감염(타에니아 사기나타 및 타에니아 솔리움을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않음)에 대한 방어 면역을 증대시키는데 사용될 수 있다. 소정의 실시형태에서, 항원은 스키토소마 종, 스키토소마 만소니, 스키토소마 헤마토비움 및/또는 스키토소마 야포니쿰으로부터 유래되거나, 효모, 예컨대, 칸디다 종, 예를 들어, 씨. 알비칸스; 크립토코커스 종, 예를 들어, 씨. 네오포르만스로부터 유래된다. 감염성 병원체, 예컨대, 박테리아, 바이러스 또는 진균, 예를 들어, 악티노박테륨, 예컨대, 엠. 투베르쿨로시스 또는 엠. 레프라에 또는 또 다른 마이코박테륨; 박테리아, 예컨대, 살모넬라, 네이세리아, 보렐리아, 클라미디아 또는 보르데텔라 속의 구성원; 바이러스, 예컨대, 단순 포진 바이러스, 인간 면역결핍 바이러스(HIV), 고양이 면역결핍 바이러스(FIV), 사이토메갈로바이러스, 바리셀라 조스터 바이러스,

간염 바이러스, 엡스타인 바 바이러스(EBV), 지카 바이러스(ZIKV), 호흡기 세포융합 바이러스, 인간 유두종 바이러스(HPV) 및 사이토메갈로바이러스; HIV 예컨대, HIV-1 또는 HIV-2; 진균, 예컨대, 아스페르길러스, 블라스토 마이세스, 코시디오이테스 및 뉴모사이스티 또는 효모, 예를 들어, 칸디다 종, 예컨대, 씨. 알비칸스, 씨. 글라 브라타, 씨. 크루세이, 씨. 루시타니아에, 씨. 트로피칼리스 및 씨. 파랍실로시스; 기생충, 예컨대, 원생동물, 예를 들어, 플라스모듐 종, 예를 들어, 피. 팔시파룸, 피. 비박스, 피. 말라리아에 및 피. 오발레; 또는 또 다른 기생충, 예컨대, 아칸타모에바, 엔타모에바 히스톨리티카, 안지오스트론길루스, 스킴스토소마 만소니, 스킴스토 소마 하에마토비움, 스킴스토소마 야포니쿰, 크립토스포리듐, 안킬로스토마, 엔타모에바 히스톨리티카, 엔타모 에바 콜라이, 엔타모에바 디스파르, 엔타모에바 하르트마니, 엔타모에바 폴레키, 우체레리아 반크로프티, 기아 르디아 및 리슈마니아로부터 유래된다.

[0364] 본 발명의 조성물이 생물활성제를 효과적으로 전달할 수 있는지 그리고/또는 대상체에서 바람직한 효과를 가질 수 있는지를 결정하는 방법은 당업계에 공지되어 있어, 여기서 상세히 기재되지 않는다. 일 양상에 있어서, 항 원에 대한 면역 반응은 점막 부위로부터 또는 혈액 샘플에서 투여(예컨대, 전신 IgM, IgG (IgG1, IgG2a 외) 또는 IgA) 전 후에 수준 항원-특이적 항체를 모니터링함으로써 결정될 수 있다. 세포 면역 반응은 또한 항원 자극 후에 T 및 B 세포 기능을 평가함으로써 투여 후에 모니터링될 수 있다.

[0365] 핵산 분자(예컨대, RNA)가 단백질 항원을 암호화하는 경우 본 명세서에 개시된 조성물 또는 백신의 면역원성을 평가하는 또 다른 방법은 면역블로팅 및/또는 마이크로어레이에 의해서 환자 혈청 또는 점막 분비를 선별하기 위하여 재조합 단백질 항원을 발현시키는 것이다. 단백질과 환자 샘플 간의 양성 반응은 환자가 당해 단백질로 의 면역 반응을 시작한 것을 나타낸다. 이 방법은 또한 단백질 항원 내에서 면역우세 항원 및/또는 에피토프를 식별하는데 사용될 수 있다.

[0366] 조성물의 효능은 관심대상 감염 병원균의 적절한 동물 모델을 시험감염시킴으로써 생체내에서 결정될 수 있다.

[0367] 본 명세서에서 제공된 실시형태에 있어서, 대상체는 포유류(예컨대, 농장 동물(소, 돼지, 염소, 말 등), 애완동물(고양이, 개 등) 및 설치류(랫트, 마우스 등)를 포함하는 동물, 또는 인간)이다. 일 실시형태에 있어서, 대상 체는 인간이다. 또 다른 실시형태에 있어서, 대상체는 비인간 포유류이다. 또 다른 실시형태에 있어서, 비인간 포유류는 개, 소 또는 말이다.

[0368] X. 생물활성제를 세포에 전달하는 방법

[0369] 본 명세서에서는 생물활성제를 세포에 전달하는 방법이 제공되며, 해당 방법은 세포를 본 명세서에 기재된 조성 물과 접촉시키는 단계를 포함한다. 몇몇 실시형태에 있어서, 생물활성제는 핵산이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 세포를 조성물과 접촉시키는 단계는 세포가 대상체 내의 것인 대상체에게 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 이러한 방법은 면역 반응의 발생을 위하여 항원 또는 항원-암호화 핵산의 전달에 유용하다. 이러한 방법은 또한 질환 및 건강 병태의 치료를 위하여 항체-암호화 핵산, 단백질 또는 소분자 약물, 호르몬, 비-암호화 RNA 분자, 및 기타 생물활성제의 전달에 유용하다.

[0370] 생물활성제를 세포에 전달하기 위한 본 명세서에 기재된 방법은, 제한 없이, 암, 예컨대, 수막종, 간세포 암종, 췌장 종양; 알러지; 진균, 박테리아, 또는 기생충 질환을 포함하는 감염성 질환; 건선 및 관절염을 포함하는 염 증성 질환 및 심방-심실 기형; 자가면역 질환; 및 신경 질환을 포함하는, 질환 및 건강 병태의 치료에서의 용도 를 발견할 수 있다.

[0371] 대상체에게 조성물을 투여하는 단계를 포함하되, 세포가 대상체 내의 것인, 조성물을 세포에 전달하는 방법의 실시형태에서, 치료적 유효량의 조성물의 전형적인 투여 경로는, 제한 없이, 경구, 국소, 비경구, 설하, 협측, 설하, 직장, 질, 정맥내, 피부내, 경피, 비강내, 근육내 또는 피하를 포함한다. 바람직한 실시형태에 있어서, 조성물의 투여는 근육내, 비경구, 또는 피부내에 행해진다. 이러한 실시형태에 있어서, 대상체는 포유류(예컨대, 농장 동물(소, 돼지, 염소, 말 등), 애완동물(고양이, 개 등) 및 설치류(랫트, 마우스 등)를 포 함하는 동물, 또는 인간)이다. 일 실시형태에 있어서, 대상체는 인간이다. 또 다른 실시형태에 있어서, 대상체 는 비인간 포유류이다. 또 다른 실시형태에 있어서, 비인간 포유류는 개, 소 또는 말이다.

[0372] 몇몇 실시형태에 있어서, 다수의 전달 모드가 보다 큰 면역 반응을 얻기 위하여 사용될 수 있다. 예를 들어, 조 성물은 1, 2, 3 또는 4회 투여될 수 있다. 몇몇 실시형태에 있어서, 1회 이상의 투여는 소위 "초회감작-부스 텅"(prime-boost) 프로토콜의 일부로서 일어날 수 있다. 몇몇 실시형태에 있어서, "초회감작-부스텅" 접근법은 상이한 벡터 또는 다회 용량을 통해서 동일 항원에 존재하는 수개의 스테이지에서의 투여를 포함한다. 몇몇 실 시형태에 있어서, 투여는 2회 초과, 예컨대, 3회, 4회 등일 수 있고, 이에 따라서 처음의 초회감작 투여 후에 1

회 초과의 부스팅 투여를 수행한다. 다수의 벡터 또는 용량이 투여되면, 이들은, 예를 들어, 1주, 2주, 3주, 1개월, 6주, 2개월, 3개월, 6개월, 1년, 또는 그 이상만큼 서로 분리될 수 있다. 몇몇 실시형태에 있어서, 초회감작-부스팅 접근법은 RNA 스테이지와 단백질 스테이지를 포함한다. RNA 스테이지는, 예를 들어, 항원성 단백질을 암호화하는 유전자를 보유하는 RNA의 투여, RNA의 항원으로의 번역, 및 대상체에서의 대응하는 항체의 생산을 포함할 수 있다. 단백질 스테이지는, 예를 들어, 단백질의 형태로 직접 항원의 투여를 포함할 수 있다. 몇몇 실시형태에 있어서, 대상체는 네오항원을 암호화하는 종양불괴성 바이러스(NLC로 또는 NLC 없이 제형화될 수 있음)가 투여(예컨대, 이것으로 초회감작)되고, 이어서 네오항원을 암호화하는 RNA 작제물을 포함하는 NLC가 투여(예컨대, 이것으로 부스팅)된다.

[0373] XI. RNA의 피부내 전달(선택적으로 MicronJet600™을 통해서)

[0374] MicronJet600®은, 각각 길이가 600 마이크로미터(0.6mm)인 3개의 마이크로니들이 장비된 작은 플라스틱 디바이스이다. 이 디바이스는 표준 니들 대신에 임의의 표준 시린지 상에 장착될 수 있다. 마이크로니들 자체는 실리콘 결정으로 만들어지고, 생체적합성 UV 경화 접착제를 사용하여 이들의 폴리카보네이트 엄기에 행으로 절단 후 일체화(접착)된다.

[0375] 피부내 전달은, 1mm 미만 또는 1000 미크론의 높이; 더 바람직하게는 500 내지 750 미크론의 높이를 가진 마이크로니들의 사용에 의해 행하였다.

[0376] 마이크로니들 주사 디바이스는 바람직하게는 니들, 전형적으로 3개의 마이크로니들을 갖는다.

[0377] 마이크로니들 주사 디바이스는 "하향"(베벨 다운(bevel down))으로 대면하며, 즉, 주사 개구가 피부 내로 더 깊이 대면하고, 베벨 업(bevel up)은 아니다. 이것에 의해 누설 없이 신뢰성 있는 주사를 가능하게 한다. 주사 방향은 바람직하게는 베이스/어댑터의 가시적 또는 기계적 특징부에 의해 규정된다.

[0378] 마이크로니들 주사는 얇은 피부 및 표피 내로 수행된다. 이것은 효율적인 발현 및 면역화를 허용한다.

[0379] 마이크로니들에 의한 주사 깊이는 전형적으로 약 100 내지 750 미크론, 더 바람직하게는 약 300 내지 400 미크론이고; 이것은 대조적으로 규칙적인 니들, 또는 티가 미니 또는 마이크로니들이며, 이는 전형적으로 피부의 심층으로 또는 피부 아래로 전달한다.

[0380] 주사 각도는 바람직하게는 약 45도(전형적으로 $\pm 20^\circ$, 더 바람직하게는 $\pm 10^\circ$)이고, 이는 표준 니들, 및 다른 수직 마이크로니들에 대해서 얇은 주사점을 가능하게 한다.

[0381] 본 명세서에서는, rvRNA(레플리콘 RNA)를 포함하는 RNA를 동물 또는 인간 환자(예컨대, 대상체)에게 전달하는 시스템 및 방법이 제공되되, 해당 방법은, 피부의 표피 또는 진피에 피부의 표면으로부터 약 100 내지 약 700 미크론의 깊이로 RNA(예컨대, rvRNA)를 투여하는 것을 포함한다. 유효량의 RNA가 RNA에 의해 암호화된 단백질의 발현을 가능하게 하도록 전달될 것이다. 단백질은 본 명세서에 기재된 바와 같은 항원일 수 있고, 예를 들어, 백신 성분일 수 있다.

[0382] RNA는 하나 이상의 마이크로니들을 포함하는 피부내 전달 디바이스로 투여될 수 있으며; 여기서 피부내 전달 디바이스는 얇은 피부내 전달을 위하여 설계된다.

[0383] RNA는, 전문이 본 명세서에 참조로 편입되는 US6533949 및/또는 US7998119의 교시내용에 따라서 피부내 전달 디바이스를 이용해서 투여될 수 있다.

[0384] 본 명세서에 기재된 제형 및/또는 조성물을 함유하는 RNA 중 임의의 것이 본 명세서에 기재된 바와 같은 마이크로니들 디바이스를 통해서 피부내로 투여될 수 있다. 예를 들어, 피부내 전기천공 전달 디바이스를 비롯한, RNA의 전달을 위한 기타 피부내 디바이스가 또한 이용될 수 있다. 몇몇 바람직한 실시형태에 있어서, RNA의 전달은 대상체에서 면역 반응을 발생시킬 것이다.

[0385] XII. 세포에 RNA의 전달을 최적화시키기 위한 방법

[0386] 본 명세서에서는 세포를 포함하는 대상체에서 생산된 항체 역가를 최적화시키는 질소(N) 대 포스페이트(P)의 몰비를 선택하는 단계를 포함하는, 세포에 RNA의 전달을 최적화시키기 위한 방법이 제공된다. 예시적인 실시형태에 있어서, RNA-NLC 결합의 해석 및 RNA-암호화된 단백질의 대응하는 시험관내 발현을 제공하기 위하여 실제 N 대 P 비가 사용된다. 예시적인 N 대 P 몰비는 1 내지 200, 1 내지 100, 바람직하게는 1 내지 50, 더 바람직하게는 약 5 내지 약 50 또는 약 5 내지 약 40일 수 있다. 몇몇 예시적인 실시형태에 있어서, N 대 P 몰비는 1 내지 15 또는 1 내지 7일 수 있다.

- [0387] XIII. 키트 및 제조 물품
- [0388] 또한 소정의 실시형태에 있어서 하나 이상의 용기에 제공될 수 있는, 본 명세서에 기재된 나노구조 지질 담체(NLC) 및 조성물을 포함하는 키트가 상정된다. 일 실시형태에 있어서, 조성물의 성분은 둘 이상의 용기에 있을 수 있다. 바람직한 실시형태에 있어서, NLC가 하나의 용기에 제공되고, 생물활성제가 또 다른 용기에 제공된다.
- [0389] 몇몇 실시형태에 있어서, 키트의 하나의 바이알은 본 명세서에서 제공된 NLC를 포함하고, 키트의 제2 바이알은 RNA 분자를 함유한다. 몇몇 실시형태에 있어서, 키트는 선택적 성분을 수용하는 제3 바이알을 포함한다.
- [0390] 본 발명의 키트는 본 명세서에 기재된 바와 같이 사용하기 위한 설명서 또는 바이알에 수용된 재료를 혼합하기 위한 설명서를 더 포함할 수 있다. 몇몇 실시형태에 있어서, 바이알 내 재료는 건조 또는 동결 건조되어 있다. 몇몇 실시형태에 있어서, 바이알 내 재료는 액체이다.
- [0391] 이러한 키트 실시형태에 따른 용기는, 임의의 적합한 용기, 베셀(vessel), 바이알, 앰플, 튜브, 컵, 박스, 병, 플라스크, 단지(jar), 접시, 단일-웰 또는 다수-웰 장치의 웰, 저장소, 탱크 등, 또는 본 명세서에 개시된 조성물이 배치, 저장 및/또는 수송되고, 접근되어 내용물을 제거할 수 있는 기타 디바이스일 수 있다. 전형적으로, 이러한 용기는 의도된 용도와 호환 가능하고 수용된 내용물의 회수가 용이하게 달성되는 재료로 이루어질 수 있다. 이러한 용기의 비-제한적인 예는, 유리 및/또는 플라스틱 밀봉된 또는 재밀봉 가능한 튜브 및 앰플, 예를 들어, 고무 격막을 갖는 것 또는 니들 및 주사기를 사용한 내용물의 배출에 적합한 다른 밀봉 수단을 포함한다. 이러한 용기는, 예를 들어, 용기로부터의 재료의 효율적인 회수를 허용하고/하거나, 예컨대, 분해 조건, 예컨대, 자외선 또는 온도 극한으로부터, 또는 미생물 오염물질을 포함하는 원치 않는 오염물질의 도입으로부터 재료를 보호하는 재료로 제조될 수 있거나 이에 의해 코팅될 수 있는, 유리 또는 화학적으로 상용성인 플라스틱 또는 수지에 의해 제조될 수 있다. 용기는 바람직하게는 멸균성 또는 멸균 처리 가능하고, 본 명세서에 기재된 백신 조성물 및/또는 면역학적 아주반트 조성물 및/또는 항원 및/또는 재조합 발현 작제물 등을 현탁 또는 용해 시키는데 사용될 수 있는 재료로 만들어진다.
- [0392] XIV. 예시적인 실시형태
- [0393] 실시형태 1. 생물활성제를 세포에 전달하기 위한 나노구조 지질 담체(NLC) 입자를 포함하는 조성물로서, NLC 입자는,
- [0394] (a) 액체상 지질과 고체상 지질의 혼합물을 포함하는 오일 코어,
- [0395] (b) 양이온성 성분, 바람직하게는 양이온성 지질,
- [0396] (c) 소수성 계면활성제, 바람직하게는 솔비탄 에스터, 및
- [0397] (d) 계면활성제, 바람직하게는 친수성 계면활성제
- [0398] 를 포함하는, 조성물.
- [0399] 실시형태 2. 생물활성제가 NLC 입자와 회합되는, 실시형태 1의 조성물.
- [0400] 실시형태 3. 조성물이 생물활성제를 세포에 전달하는, 실시형태 1 또는 실시형태 2의 조성물.
- [0401] 실시형태 4. 소수성 계면활성제가 솔비탄 에스터이고, 솔비탄 에스터 없는 비교 가능한 조성물에 비해서 생물활성제를 세포에 전달하는 조성물의 능력을 증가시키는 충분한 양으로 존재하는, 실시형태 1 내지 3 중 어느 하나의 조성물.
- [0402] 실시형태 5. 생물활성제가 단백질이거나 또는 생물활성제가 단백질을 암호화하는, 실시형태 1 내지 4 중 어느 하나의 조성물.
- [0403] 실시형태 6. 생물활성제가 단백질 항원이거나 또는 생물활성제가 단백질 항원을 암호화하는, 실시형태 1 내지 4 중 어느 하나의 조성물.
- [0404] 실시형태 7. 조성물이 항원에 대해서 대상체에서 면역 반응을 유도하는, 실시형태 6의 조성물.
- [0405] 실시형태 8. 항원이 감염, 암 또는 자가면역 질환과 연관된 감염성 병원체 및/또는 에피토프, 생물분자, 세포 또는 조직으로부터 유래되거나 또는 이와 면역 교차 반응성인, 실시형태 6 또는 7의 조성물.
- [0406] 실시형태 9. 소수성 계면활성제가 솔비탄 에스터이고, 솔비탄 에스터는 솔비탄 에스터 없는 비교 가능한 조성물에 비해서 항원에 대한 면역 반응을 유도하는 조성물의 능력을 증가시키는 충분한 양으로 존재하는, 실시형태 6

내지 8 중 어느 하나의 조성물.

- [0407] 실시형태 10. 조성물이, 대상체에게 유효한 양으로 투여될 경우, 생물활성제가 NLC 없이 대상체에게 투여될 경우 유도된 면역 반응과 동일하거나 더 큰 항원에 대한 면역 반응을 유도하는, 실시형태 6 내지 9 중 어느 하나의 조성물.
- [0408] 실시형태 11. 소수성 계면활성제가 솔비탄 에스테리고, 조성물이, 대상체에게 유효한 양으로 투여될 경우, 솔비탄 에스테르가 결여된 비교 가능한 조성물이 대상체에게 투여될 경우 유도된 항체 역가보다 더 높이 수준에서 항원에 대한 항체 역가를 유도하는, 실시형태 6 내지 10 중 어느 하나의 조성물.
- [0409] 실시형태 12. 소수성 계면활성제가 솔비탄 에스테리고, 조성물이 솔비탄 에스테르를 결여하는 비교 가능한 조성물에 의해 대상체에서 유도된 중화 항체 역가보다 더 높이 수준에서 대상체에서의 중화 항체 역가를 유도하는, 실시형태 6 내지 11 중 어느 하나의 조성물.
- [0410] 실시형태 13. 생물활성제가 RNA 또는 DNA인, 실시형태 1 내지 12 중 어느 하나의 조성물.
- [0411] 실시형태 14. 생물활성제가 mRNA인, 실시형태 1 내지 12 중 어느 하나의 조성물.
- [0412] 실시형태 15. 생물활성제가 중앙봉괴성 바이러스 RNA인, 실시형태 1 내지 12 중 어느 하나의 조성물.
- [0413] 실시형태 16. RNA가 레플리콘인, 실시형태 13 또는 14의 조성물.
- [0414] 실시형태 17. RNA가 항원을 암호화하는, 실시형태 13 내지 16 중 어느 하나의 조성물.
- [0415] 실시형태 18. RNA가 항체를 암호화하는, 실시형태 13 내지 16 중 어느 하나의 조성물.
- [0416] 실시형태 19. RNA가 비-암호화 RNA인, 실시형태 13 내지 16 중 어느 하나의 조성물.
- [0417] 실시형태 20. 액체상 지질이 대사 가능한, 실시형태 1 내지 19 중 어느 하나의 조성물.
- [0418] 실시형태 21. 액체상 지질이 식물성 오일, 동물성 오일 또는 합성 방식으로 제조된 오일인, 실시형태 1 내지 20 중 어느 하나의 조성물.
- [0419] 실시형태 22. 액체상 지질이 어유인, 실시형태 1 내지 21 중 어느 하나의 조성물.
- [0420] 실시형태 23. 액체상 지질이 카프릭/카프릴릭 트라이글리세라이드, 비타민 E, 라우로일 폴리옥시글리세라이드, 모노아실글리세롤, 대두 레시틴, 스쿠알렌, 또는 스쿠알란 또는 이들의 조합물인, 실시형태 1 내지 20 중 어느 하나의 조성물.
- [0421] 실시형태 24. 액체상 지질이 스쿠알렌, 해바라기 오일, 대두 오일, 올리브 오일, 포도씨 오일, 스쿠알란, 카프릭/카프릴릭 트라이글리세라이드, 또는 이들의 조합물인, 실시형태 1 내지 21 중 어느 하나의 조성물.
- [0422] 실시형태 25. 액체상 지질이 천연형 또는 합성 터페노이드인, 실시형태 1 내지 21 중 어느 하나의 조성물.
- [0423] 실시형태 26. 액체상 지질이 스쿠알렌인, 실시형태 1 내지 21 중 어느 하나의 조성물.
- [0424] 실시형태 27. 고체상 지질이 글리세로지질인, 실시형태 1 내지 26 중 어느 하나의 조성물.
- [0425] 실시형태 28. 고체상 지질이 미세결정성 트라이글리세라이드인, 실시형태 1 내지 26 중 어느 하나의 조성물.
- [0426] 실시형태 29. 미세결정성 트라이글리세라이드가 트라이미리스틴인, 실시형태 28의 조성물.
- [0427] 실시형태 30. 양이온성 성분이 1,2-다이올레일옥시-3-(트라이메틸암모니오)프로판(DOTAP), 3β -[N-(N',N'-다이메틸아미노에탄)-카바모일]콜레스테롤(DC 콜레스테롤), 다이메틸다이옥타데실암모늄(DDA), 1,2-다이미리스토일-3-트라이메틸암모늄프로판(DMTAP), 다이팔미토일(C16:0)트라이메틸 암모늄 프로판(DPTAP), 다이스테아로일트라이메틸암모늄 프로판(DSTAP), N-[1-(2,3-다이올레일옥시)프로필]-N,N,N-트라이메틸암모늄 클로라이드(DOTMA), N,N-다이올레일-N,N-다이메틸암모늄 클로라이드(DODAC), 1,2-다이올레일-sn-글리세로-3-에틸포스포콜린(DOEPCL), 1,2-다이올레일-3-다이메틸암모늄-프로판(DODAP) 및 1,2-다이리놀레일옥시-3-다이메틸아미노프로판(DLinDMA), 및 이들의 조합물로부터 선택된 양이온성 지질인, 실시형태 1 내지 29 중 어느 하나의 조성물.
- [0428] 실시형태 31. 양이온성 지질이 1,2-다이올레일옥시-3-(트라이메틸암모니오)프로판(DOTAP)인, 실시형태 30의 조성물.
- [0429] 실시형태 32. 친수성 계면활성제가 폴리에틸렌 글리콜인, 실시형태 1 내지 31 중 어느 하나의 조성물.

- [0430] 실시형태 33. 친수성 계면활성제가 폴리옥시에틸렌 솔비탄 에스터인, 실시형태 32의 조성물.
- [0431] 실시형태 34. NLC 입자의 평균 다분산지수가 0.1 내지 약 0.5인, 실시형태 1 내지 33 중 어느 하나의 조성물.
- [0432] 실시형태 35. NLC 입자의 평균 다분산지수가 0.2 내지 약 0.5인, 실시형태 1 내지 33 중 어느 하나의 조성물.
- [0433] 실시형태 36. NLC 입자의 평균 다분산지수가 약 0.2 내지 약 0.4 또는 약 0.1 내지 약 0.4인, 실시형태 1 내지 33 중 어느 하나의 조성물.
- [0434] 실시형태 37. NLC 입자의 평균 다분산지수가 약 0.2 내지 약 0.3, 또는 약 0.1 내지 약 0.3인, 실시형태 1 내지 33 중 어느 하나의 조성물.
- [0435] 실시형태 38. NLC 입자의 z -평균 직경이 약 40nm 내지 약 60nm인, 실시형태 1 내지 37 중 어느 하나의 조성물.
- [0436] 실시형태 39. NLC 입자의 z -평균 직경이 약 20nm 내지 약 200nm, 약 20nm 내지 약 150, 약 20nm 내지 약 100nm, 약 20nm 내지 약 80nm, 또는 약 20nm 내지 약 60nm 또는 약 40nm 내지 약 200nm, 약 40nm 내지 약 150, 약 40nm 내지 약 100nm, 약 40nm 내지 약 80nm, 또는 약 40nm 내지 약 60nm인, 실시형태 1 내지 37 중 어느 하나의 조성물.
- [0437] 실시형태 40. 소수성 계면활성제가 1 내지 5의 친수성-친지성 밸런스(HLB)값을 솔비탄 에스터인, 실시형태 1 내지 39 중 어느 하나의 조성물.
- [0438] 실시형태 41. 소수성 계면활성제가 4 내지 5의 HLB값을 갖는 솔비탄 에스터인, 실시형태 40의 조성물.
- [0439] 실시형태 42. 소수성 계면활성제가 솔비탄 에스테리고 솔비탄 에스터가 솔비탄 모노에스터인, 실시형태 1 내지 40 중 어느 하나의 조성물.
- [0440] 실시형태 43. 소수성 계면활성제가 솔비탄 에스테리고 솔비탄 에스터가 솔비탄 모노스테아레이트인, 실시형태 1 내지 40 중 어느 하나의 조성물.
- [0441] 실시형태 44. 소수성 계면활성제가 솔비탄 에스테리고 솔비탄 에스터가 솔비탄 모노올레레이트인, 실시형태 1 내지 40 중 어느 하나의 조성물.
- [0442] 실시형태 45. NLC 입자의 z -평균 직경이 약 40nm 내지 약 80nm인, 실시형태 1 내지 44 중 어느 하나의 조성물.
- [0443] 실시형태 46. NLC 입자의 z -평균 직경이 약 40nm 내지 약 60nm인, 실시형태 1 내지 44 중 어느 하나의 조성물.
- [0444] 실시형태 47. 약 0.5 내지 약 12, 더 바람직하게는 약 0.5 내지 약 9의 오일 대 계면활성제 물비를 갖는, 실시형태 1 내지 46 중 어느 하나의 조성물.
- [0445] 실시형태 48. 약 0.5 내지 약 1의 오일 대 계면활성제 물비를 갖는, 실시형태 1 내지 46 중 어느 하나의 조성물.
- [0446] 실시형태 49. 약 0.2 내지 약 1.5의 친수성 계면활성제 대 양이온성 성분 비를 갖는, 실시형태 1 내지 48 중 어느 하나의 조성물.
- [0447] 실시형태 50. 약 0.2 내지 약 1의 친수성 계면활성제 대 양이온성 성분 비를 갖는, 실시형태 1 내지 48 중 어느 하나의 조성물.
- [0448] 실시형태 51. RNA에 대한 부하 용량이 적어도 약 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNA인, 실시형태 1 내지 50 중 어느 하나의 조성물.
- [0449] 실시형태 52. 소수성 계면활성제가 솔비탄 에스테리고 솔비탄 에스터 솔비탄 트라이에스터인, 실시형태 1 내지 51 중 어느 하나의 조성물.
- [0450] 실시형태 53. 소수성 계면활성제가 솔비탄 에스테리고 솔비탄 에스터가 솔비탄 트라이올레레이트인, 실시형태 1 내지 51 중 어느 하나의 조성물.
- [0451] 실시형태 54. 약 0.2% w/v 내지 약 40% w/v의 액체상 지질, 약 0.1% w/v 내지 약 10% w/v의 고체상 지질, 약 0.2% w/v 내지 약 10% w/v의 양이온성 지질, 약 0.25% w/v 내지 약 5% w/v의 솔비탄 모노에스터, 및 약 0.5% w/v 내지 약 10% w/v의 친수성 계면활성제를 포함하는, 실시형태 1 내지 51 중 어느 하나의 조성물.
- [0452] 실시형태 55. 약 2% w/v 내지 약 40% w/v의 액체상 지질, 약 0.1% w/v 내지 약 10% w/v의 고체상 지질, 약 0.2% w/v 내지 약 10% w/v의 양이온성 지질, 약 0.25% w/v 내지 약 5% w/v의 솔비탄 모노에스터, 및 약 0.5%

w/v 내지 약 10% w/v의 친수성 계면활성제를 포함하는, 실시형태 1 내지 51 중 어느 하나의 조성물.

- [0453] 실시형태 56. 약 10% w/v 내지 약 40% w/v의 액체상 지질, 약 1 내지 약 2% w/v의 고체상 지질, 약 2 내지 약 5% w/v의 양이온성 지질, 약 3 내지 약 5% w/v의 솔비탄 에스터, 및 약 3% w/v 내지 약 5% w/v의 친수성 계면활성제를 포함하는, 실시형태 1 내지 53 중 어느 하나의 조성물.
- [0454] 실시형태 57. 약 15% w/v의 액체상 지질 및 약 1% w/v의 고체상 지질, 또는 약 30% w/v의 액체상 지질 및 약 1.8% w/v의 고체상 지질, 및 약 3% w/v의 양이온성 지질, 약 3.7% w/v의 솔비탄 에스터, 및 약 3.7% w/v의 친수성 계면활성제를 포함하는, 실시형태 1 내지 53 중 어느 하나의 조성물.
- [0455] 실시형태 58. 약 2% w/v 내지 약 6% w/v의 액체상 지질, 약 0.1% w/v 내지 약 1% w/v의 고체상 지질, 약 0.2% w/v 내지 약 1% w/v의 양이온성 지질, 약 0.25% w/v 내지 약 1% w/v의 솔비탄 모노에스터, 및 약 0.5% w/v 내지 약 5% w/v의 친수성 계면활성제를 포함하는, 실시형태 1 내지 53 중 어느 하나의 조성물.
- [0456] 실시형태 59. 약 3.75% w/v의 액체상 지질, 약 0.25% w/v의 고체상 지질, 약 3% w/v의 양이온성 지질, 약 3.7% w/v의 솔비탄 에스터, 및 약 3.7% w/v의 친수성 계면활성제를 포함하는, 실시형태 1 내지 53 중 어느 하나의 조성물.
- [0457] 실시형태 60. 약 0.2% w/v 내지 약 40% w/v의 액체상 지질, 약 0.1% w/v 내지 약 10% w/v의 고체상 지질, 약 0.2% w/v 내지 약 10% w/v의 양이온성 지질, 약 0.25% w/v 내지 약 5% w/v의 솔비탄 에스터, 및 약 0.2% w/v 내지 약 10% w/v의 친수성 계면활성제를 포함하는, 실시형태 1 내지 53 중 어느 하나의 조성물.
- [0458] 실시형태 61. 약 0.2% w/v 내지 약 40% w/v의 액체상 지질, 약 0.1% w/v 내지 약 10% w/v의 고체상 지질, 약 0.2% w/v 내지 약 10% w/v의 양이온성 지질, 약 0.25% 내지 약 15% w/v의 솔비탄 에스터, 및 약 0.2% 또는 약 0.5% 내지 약 15% w/v의 친수성 계면활성제를 포함하는, 실시형태 1 내지 53 중 어느 하나의 조성물.
- [0459] 실시형태 62. 약 2% w/v 내지 약 40% w/v의 액체상 지질, 약 0.1% w/v 내지 약 10% w/v의 고체상 지질, 약 0.2% w/v 내지 약 10% w/v의 양이온성 지질, 약 0.25% w/v 내지 약 5% w/v의 솔비탄 에스터, 및 약 0.2% w/v 내지 약 10% w/v의 친수성 계면활성제를 포함하는, 실시형태 1 내지 53 중 어느 하나의 조성물.
- [0460] 실시형태 63. 약 2% w/v 내지 약 6% w/v의 액체상 지질, 약 0.1% w/v 내지 약 1% w/v의 고체상 지질, 약 0.2% w/v 내지 약 1% w/v의 양이온성 지질, 약 0.25% w/v 내지 약 1% w/v의 솔비탄 모노에스터, 및 약 0.2% w/v 내지 약 5% w/v의 친수성 계면활성제를 포함하는, 실시형태 1 내지 53 중 어느 하나의 조성물.
- [0461] 실시형태 64. 약 4% w/v의 액체상 지질, 약 0.25% w/v의 고체상 지질, 약 0.4% w/v의 양이온성 지질, 약 0.5% w/v의 솔비탄 에스터, 및 약 0.5% w/v의 친수성 계면활성제를 포함하는, 실시형태 1 내지 53 중 어느 하나의 조성물.
- [0462] 실시형태 65. 실시형태 54항 내지 64 중 어느 하나의 조성물의 희석된 또는 농축된 형태를 포함하는, 조성물.
- [0463] 실시형태 66. 실시형태 54항 내지 64 중 어느 하나의 조성물이 2 내지 30배로 희석된, 실시형태 65의 조성물.
- [0464] 실시형태 67. 실시형태 54항 내지 64 중 어느 하나의 조성물이 2 내지 20배로 희석된, 실시형태 65의 조성물.
- [0465] 실시형태 68. 실시형태 54항 내지 64 중 어느 하나의 조성물이 2배로 희석된, 실시형태 65의 조성물.
- [0466] 실시형태 69. 실시형태 54항 내지 64 중 어느 하나의 조성물이 2 내지 30배로 농축된, 실시형태 65의 조성물.
- [0467] 실시형태 70. 실시형태 54항 내지 64 중 어느 하나의 조성물이 2 내지 10배로 농축된, 실시형태 65의 조성물.
- [0468] 실시형태 71. 액체상 지질이 천연형 또는 합성 터페노이드인, 실시형태 54 내지 70 중 어느 하나의 조성물.
- [0469] 실시형태 72. 액체상 지질이 천연형 또는 합성 스쿠알렌인, 실시형태 54 내지 70 중 어느 하나의 조성물.
- [0470] 실시형태 73. 고체상 지질이 글리세로지질인, 실시형태 54 내지 72 중 어느 하나의 조성물.
- [0471] 실시형태 74. 고체상 지질이 미세결정성 트라이글리세라이드인, 실시형태 54 내지 72 중 어느 하나의 조성물.
- [0472] 실시형태 75. 고체상 지질이 트라이미리스틴인, 실시형태 54 내지 72 중 어느 하나의 조성물.
- [0473] 실시형태 76. 양이온성 지질이 DOTAP인, 실시형태 54 내지 75 중 어느 하나의 조성물.
- [0474] 실시형태 77. 솔비탄 에스터가 솔비탄 모노스테아레이트인, 실시형태 54 내지 76 중 어느 하나의 조성물.

- [0475] 실시형태 78. 솔비탄 에스터가 솔비탄 모노올레에이트인, 실시형태 54 내지 76 중 어느 하나의 조성물
- [0476] 실시형태 79. 솔비탄 에스터가 솔비탄 트라이올레에이트인, 실시형태 54 내지 76 중 어느 하나의 조성물.
- [0477] 실시형태 80. 친수성 계면활성제가 폴리솔베이트인, 실시형태 54 내지 77 중 어느 하나의 조성물.
- [0478] 실시형태 81. 친수성 계면활성제가 폴리솔베이트 80인, 실시형태 54 내지 77 중 어느 하나의 조성물.
- [0479] 실시형태 82. 오일 코어가 천연형 또는 합성 스쿠알렌 및 글리세로지질을 포함하고, 양이온성 지질이 DOTAP이고, 솔비탄 에스터가 솔비탄 모노스테아레이트 또는 솔비탄 모노올레에이트이고, 친수성 계면활성제가 폴리솔베이트인, 실시형태 1 내지 20, 34 내지 41, 45 내지 51, 및 54 내지 70 중 어느 하나의 조성물.
- [0480] 실시형태 83. 오일 코어가 스쿠알렌 및 트라이미리스틴을 포함하고, 양이온성 지질이 DOTAP이고, 솔비탄 에스터가 솔비탄 모노스테아레이트이고, 친수성 계면활성제가 폴리솔베이트 80인, 실시형태 1 내지 20, 34 내지 41, 45 내지 51, 및 54 내지 70 중 어느 하나의 조성물.
- [0481] 실시형태 84. NLC가 약 2% w/v 내지 약 40% w/v의 스쿠알렌, 약 0.1% w/v 내지 약 10% w/v의 트라이미리스틴, 약 0.2% w/v 내지 약 10% w/v의 DOTAP, 약 0.25% w/v 내지 약 5% w/v의 솔비탄 모노스테아레이트, 및 약 0.5% w/v 내지 약 10% w/v의 폴리솔베이트 80을 포함하는, 실시형태 83의 조성물.
- [0482] 실시형태 85. NLC가 약 2% w/v 내지 약 6% w/v의 스쿠알렌, 약 0.1% w/v 내지 약 1% w/v의 트라이미리스틴, 약 0.2% w/v 내지 약 1% w/v의 DOTAP, 약 0.25% w/v 내지 약 1% w/v의 솔비탄 모노스테아레이트, 및 약 0.5% w/v 내지 약 5% w/v의 폴리솔베이트 80을 포함하는, 실시형태 83의 조성물
- [0483] 실시형태 86. NLC가 약 3.75% w/v의 스쿠알렌, 약 0.25% w/v의 트라이미리스틴, 약 3% w/v의 DOTAP, 약 3.7% w/v의 솔비탄 모노스테아레이트, 및 약 3.7% w/v의 폴리솔베이트 80을 포함하는, 실시형태 85의 조성물.
- [0484] 실시형태 87. 오일 코어가 천연형 또는 합성 스쿠알렌 및 글리세로지질을 포함하고, 양이온성 지질이 DOTAP이고, 솔비탄 에스터가 솔비탄 모노스테아레이트 또는 솔비탄 모노올레에이트 또는 솔비탄 트라이올레에이트이고, 친수성 계면활성제가 폴리솔베이트인, 실시형태 1 내지 20, 34 내지 41, 45 내지 51, 및 54 내지 70 중 어느 하나의 조성물.
- [0485] 실시형태 88. 오일 코어가 스쿠알렌 및 트라이미리스틴을 포함하고, 양이온성 지질이 DOTAP이고, 솔비탄 에스터가 솔비탄 모노스테아레이트 또는 솔비탄 모노올레에이트 또는 솔비탄 트라이올레에이트이고, 친수성 계면활성제가 폴리솔베이트 80인, 실시형태 1 내지 20, 34 내지 41, 45 내지 51, 및 54 내지 70 중 어느 하나의 조성물.
- [0486] 실시형태 89. NLC가 약 2% w/v 내지 약 40% w/v의 스쿠알렌, 약 0.1% w/v 내지 약 10% w/v의 트라이미리스틴, 약 0.2% w/v 내지 약 10% w/v의 DOTAP, 약 0.25% w/v 내지 약 5% w/v의 솔비탄 모노스테아레이트 또는 솔비탄 모노올레에이트 또는 솔비탄 트라이올레에이트, 및 약 0.2% w/v 내지 약 10% w/v의 폴리솔베이트 80을 포함하는, 실시형태 87 또는 실시형태 88의 조성물.
- [0487] 실시형태 90. NLC가 약 2% w/v 내지 약 6% w/v의 스쿠알렌, 약 0.1% w/v 내지 약 1% w/v의 트라이미리스틴, 약 0.2% w/v 내지 약 1% w/v의 DOTAP, 약 0.25% w/v 내지 약 1% w/v의 솔비탄 모노스테아레이트 또는 솔비탄 모노올레에이트 또는 솔비탄 트라이올레에이트, 및 약 0.2% w/v 내지 약 5% w/v의 폴리솔베이트 80을 포함하는, 실시형태 87 또는 실시형태 88의 조성물.
- [0488] 실시형태 91. NLC가 약 4% w/v의 스쿠알렌, 약 0.25% w/v의 트라이미리스틴, 약 0.4% w/v의 DOTAP, 약 0.5% w/v의 솔비탄 모노스테아레이트 또는 솔비탄 모노올레에이트 또는 솔비탄 트라이올레에이트, 및 약 0.5% w/v의 폴리솔베이트 80을 포함하는, 실시형태 87 또는 실시형태 88의 조성물.
- [0489] 실시형태 92. 면역 반응의 발생을 필요로 하는 대상체에게 치료적 유효량의 실시형태 1 내지 91 중 어느 하나의 조성물을 투여하는 단계를 포함하되, 생물활성제가 단백질 항원, 또는 단백질 항원을 암호화하는 핵산 분자인, 대상체에서 면역 반응을 발생시키는 방법.
- [0490] 실시형태 93. 생물활성제가 RNA인, 실시형태 92의 방법.
- [0491] 실시형태 94. 조성물의 투여가 근육내, 비경구 또는 피부내로 행해지는, 실시형태 92 또는 93의 방법.
- [0492] 실시형태 95. 대상체에서 면역 반응을 발생시키는 방법으로서, (a) 면역 반응의 발생을 필요로 하는 대상체에게 치료적 유효량의, 단백질 항원을 암호화하는 종양붕괴성 바이러스를 투여하는 단계, 및 (b) 대상체에게 치료적

유효량의 실시형태 1 내지 91 중 어느 하나의 조성물을 투여하는 단계를 포함하되, 생물활성제가 단백질 항원, 또는 단백질 항원을 암호화하는 핵산 분자인, 대상체에서 면역 반응을 발생시키는 방법.

- [0493] 실시형태 96. (a)의 투여와 (b)의 투여가 적어도 1주, 적어도 2주, 적어도 3주, 적어도 1개월, 적어도 6주, 적어도 2개월, 적어도 3개월, 적어도 6개월, 또는 적어도 1년 간격으로 일어나는, 실시형태 95의 방법.
- [0494] 실시형태 97. 세포를 실시형태 1 내지 91 중 어느 하나의 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는, 생물활성제를 세포에 전달하는 방법.
- [0495] 실시형태 98. 생물활성제가 핵산인, 실시형태 97의 방법.
- [0496] 실시형태 99. 세포를 조성물과 접촉시키는 단계가 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함하고, 세포가 대상체 내에 있는 것인, 실시형태 97 또는 실시형태 98의 방법.
- [0497] 실시형태 100. 세포를 포함하는 대상체에서 생산된 항체 역가를 최적화시키는 생물활성제 대 NLC의 물비를 선택하는 단계를 포함하는, 세포에 생물활성제의 전달을 최적화시키기 위한 방법.
- [0498] 실시형태 101. NLC가 실시형태 1 내지 91 중 어느 하나의 NLC 입자인, 실시형태 100의 방법.
- [0499] 실시형태 102. 실시형태 1 내지 91 중 어느 하나의 조성물을 제조하는 방법으로서,
- [0500] (a) 고체상 지질, 액체상 지질, 양이온성 지질 및 소수성 계면활성제를 혼합하여 오일상 혼합물을 형성시키는 단계;
- [0501] (b) 친수성 계면활성제와 물을 혼합하여 수성 상 혼합물을 형성시키는 단계;
- [0502] (c) 오일상 혼합물을 수성 상 혼합물과 혼합하여 NLC 입자를 형성시키는 단계; 및
- [0503] (d) 선택적으로, 생물활성제가 비-공유 상호작용에 의해 또는 가역적 공유 상호작용에 의해 NLC 입자의 표면과 회합되도록 생물활성제를 NLC 입자와 배합하는 단계를 포함하는, 조성물을 제조하는 방법.
- [0504] 실시형태 103. 생물활성제가 RNA이고, RNA가 하나 이상의 TB 항원을 암호화하는, 실시형태 1 내지 91 중 어느 하나의 조성물.
- [0505] 실시형태 104. RNA가 Rv3619, Rv2389, Rv3478 및 Rv1886으로부터 선택된 하나 이상의 TB 항원을 암호화하는, 실시형태 103의 조성물.
- [0506] 실시형태 105. RNA가 TB 항원인 Rv3619, Rv 2389, Rv3478 및 Rv1886을 암호화하는, 실시형태 104의 조성물.
- [0507] 실시형태 106. 생물활성제가 RNA이고, RNA가 하나 이상의 TB 항원을 암호화하는, 실시형태 92 내지 99 중 어느 하나의 방법.
- [0508] 실시형태 107. RNA가 Rv3619, Rv 2389, Rv3478 및 Rv1886으로부터 선택된 하나 이상의 TB 항원을 암호화하는, 실시형태 106의 방법.
- [0509] 실시형태 108. RNA가 TB 항원인 Rv3619, Rv 2389, Rv3478 및 Rv1886을 암호화하는, 실시형태 107의 방법.
- [0510] 실시형태 109. 생물활성제가 아쥘반트(adjuvant)인, 실시형태 1 내지 91 중 어느 하나의 조성물.
- [0511] 실시형태 110. 아쥘반트가 TLR 작용제, Rig-I 작용제, 사포닌, 탄수화물, 탄수화물 중합체, 공액된 탄수화물, 전체 바이러스 입자, 바이러스-유사 입자, 바이러스 단편 및 세포 단편으로부터 선택되는, 실시형태 109의 조성물.
- [0512] 실시형태 111. 아쥘반트가 TLR 작용제 및 Rig-I 작용제로부터 선택되는, 실시형태 110의 조성물.
- [0513] 실시형태 112. TLR 작용제가 TLR2, TLR3, TLR4, TLR7, TLR8 또는 TLR9 작용제인, 실시형태 111의 조성물.
- [0514] 실시형태 113. TLR 작용제가 TLR3 작용제인, 실시형태 111의 조성물.
- [0515] 실시형태 114. 생물활성제가 이중-가닥 RNA, RIBOXXOL, 폴리(I:C) 및 Hiltonol®로부터 선택되는, 실시형태 109 내지 112 중 어느 하나의 조성물.
- [0516] 실시형태 115. 안정적인 에멀션에 아쥘반트를 포함하는 조성물로서, 아쥘반트가 TLR3 작용제 및 Rig-I 작용제로부터 선택되고, 안정적인 에멀션이 수중유 에멀션인, 조성물.

- [0517] 실시형태 116. 에멀션이 2 내지 10%의 오일을 포함하는, 실시형태 115의 조성물.
- [0518] 실시형태 117. 오일이 스쿠알렌인, 실시형태 115 또는 116의 조성물.
- [0519] 실시형태 118. 수중유 에멀션이 0.01 내지 0.1%의 알파 토크페놀을 포함하는, 실시형태 115 내지 117 중 어느 하나의 조성물.
- [0520] 실시형태 119. 오일 대 알파 토크페놀의 비가 1보다 큰, 실시형태 118의 조성물.
- [0521] 실시형태 120. 수중유 에멀션이 0.3 내지 3%의 계면활성제를 포함하는, 실시형태 115 내지 118 중 어느 하나의 조성물.
- [0522] 실시형태 121. 계면활성제가 폴리옥시에틸렌 솔비탄 모노올레에이트 또는 폴록사머 188(폴리옥시에틸렌과 폴리옥시프로필렌의 공중합체)인, 실시형태 120의 조성물.
- [0523] 실시형태 122. 수중유 에멀션이 약 1%의 Span 85를 포함하는, 실시형태 115 내지 121 중 어느 하나의 조성물.
- [0524] 실시형태 123. 수중유 에멀션이 0.5% 내지 5%, 또는 0.5% 내지 5%, 또는 0.5% 내지 3%, 또는 1% 내지 3%의 1,2-다이미리스토일-sn-글리세로-3-포스포콜린(DMPC)을 포함하는, 실시형태 115 내지 121 중 어느 하나의 조성물.
- [0525] 실시형태 124. 수중유 에멀션이 0.5% 내지 5%, 또는 0.5% 내지 5%, 또는 0.5% 내지 3%, 또는 1% 내지 3%의 글리세롤을 포함하는, 실시형태 115 내지 123 중 어느 하나의 조성물.
- [0526] 실시형태 125. 면역 반응의 발생 또는 증대를 필요로 하는 대상체에게 치료적 유효량의 제109항 내지 제124항 중 어느 한 항의 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 면역 반응을 발생 또는 증대시키는 방법.
- [0527] 실시형태 126. 면역 반응이 대상체가 아췌반트를 단독으로 투여받는 경우의 면역 반응보다 더 큰, 실시형태 125의 방법.
- [0528] 실시형태 127. 조성물의 투여가 근육내, 비경구 또는 피부내로 행해지는, 실시형태 125 또는 실시형태 126의 방법.
- [0529] 실시형태 128. (a) 아췌반트 및 (b) 수중유 에멀션 또는 나노입자 지질 담체(NLC) 입자를 포함하되, 수중유 에멀션 또는 NLC 입자가 스쿠알렌을 포함하는, 조성물.
- [0530] 실시형태 129. 아췌반트가 TLR 작용제, Rig-I 작용제, 사포닌, 탄수화물, 탄수화물 중합체, 공액된 탄수화물, 전체 바이러스 입자, 바이러스-유사 입자, 바이러스 단편 및 세포 단편으로부터 선택되는, 실시형태 128의 조성물.
- [0531] 실시형태 130. 아췌반트가 TLR 작용제 및 Rig-I 작용제로부터 선택되는, 실시형태 129의 조성물.
- [0532] 실시형태 131. TLR 작용제가 TLR2, TLR3, TLR4, TLR7, TLR8 또는 TLR9 작용제인, 실시형태 130의 조성물.
- [0533] 실시형태 132. TLR 작용제가 TLR3 작용제인, 실시형태 131의 조성물.
- [0534] 실시형태 133. 생물활성제가 이중-가닥 RNA, RIBOXXOL, 폴리(I:C) 및 Hiltonol®로부터 선택되는, 실시형태 128 내지 132 중 어느 하나의 조성물.
- [0535] 실시형태 134. 면역 반응의 발생 또는 증대를 필요로 하는 대상체에게 치료적 유효량의 실시형태 128 내지 133 중 어느 하나의 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 면역 반응을 발생 또는 증대시키는 방법.
- [0536] 실시형태 135. 면역 반응이 대상체가 아췌반트를 단독으로 투여받는 경우의 면역 반응보다 더 큰, 실시형태 134의 방법.
- [0537] 실시형태 136. 조성물의 투여가 근육내, 비경구 또는 피부내로 행해지는, 실시형태 134 또는 실시형태 135의 방법.
- [0538] 이하의 실시예는 제한으로써가 아니라 예시로서 제공된다.
- [0539] **실시예**
- [0540] 실시예 1: NLC 제형의 개발
- [0541] 나노구조 지질 담체(NLC) 조성물은 유화제의 조합물을 이용해서 제조하고, 얻어진 조성물의 안정성은 저장 조건

(5℃)하에 입자 크기 측정을 이용해서 평가하였다. 오일상은 스쿠알렌 - 오일 코어의 액체상 - 비-이온성 솔비탄 에스터 계면활성제, 솔비탄 트라이올레레이트(Span® 85) 또는 솔비탄 모노스테아레이트(Span® 60) 중 하나, 양이온성 지질 DOTAP(N-[1-(2,3-다이올레오일옥시)프로필]-N,N,N-트라이메틸암모늄 클로라이드), 및 NLC 제형의 경우에, 고체 지질(글리세릴 트라이미리스테이트 - Dynasan® 114)로 구성되었다. 수성 상은 비-이온성 페길화(PEGylated) 계면활성제 Tween® 80을 함유하는 10mM 시트르산나트륨 삼수화물 완충제였다.

[0542] 실시예에서 묘사된 제형의 구성은 이하의 표 2에 나타낸다:

표 2

대표적인 제형의 조성물

ID	액체 오일 % (W/V)	고체 오일 % (W/V)	친수성 계면활성제 % (W/V)	솔비탄 에스터	양이온성 지질 % (W/V)	오일 대 계면 활성제 몰비	Tween 80:DOT AP 몰비
QG386 (CNE)	4.3% 스쿠알렌	-	0.5% Tween 80	0.5% Span 85	0.4% DOTAP	6.9	
QG711	4.08% 스쿠알렌	0.25% Dynasan 114	2% Tween 80	-	0.4% DOTAP	4.8	
QG752	4.08% 스쿠알렌	0.25 % Dynasan 114	2% Tween 80	0.5% Span 85	0.4% DOTAP	3.9	
QG762	4.08% 스쿠알렌	0.25% Dynasan 114	2% Tween 80	0.25% Span 85	0.4% DOTAP	4.3	
QG766	5% 스쿠알렌	-	2% Tween 80	0.5% Span 85	0.4% DOTAP	4.6	2.53
QG868	5% 스쿠알렌	-	2% Tween 80	0.5% Span 60	0.4% DOTAP	3.7	2.53
QG767	4.08% 스쿠알렌	0.25% Dynasan 114	2% Tween 80	0.5% Span 80	0.4% DOTAP	3.1	
QG768 또는 QG863	4.08% 스쿠알렌	0.25% Dynasan 114	2% Tween 80	0.5% Span60	0.4% DOTAP	3.1	2.53
QG769	4.37% 포도씨유	0.25% Dynasan 114	2% Tween 80	0.5% Span 85	0.4% DOTAP		

[0543]

QG866	4.37% 포도씨유	0.25% Dynasan 114	2% Tween 80	0.5% Span 60	0.4% DOTAP		
QG770	4.49% Myglyol 810	0.25% Dynasan 114	2% Tween 80	0.5% Span 85	0.4% DOTAP		
QG865	4.49% Myglyol 810	0.25% Dynasan 114	2% Tween 80	0.5% Span 60	0.4% DOTAP		
QG807	4.08% 스쿠알렌	0.25% Dynasan 114	0.5% Tween 80	0.5% Span60	0.4% DOTAP	5.5	0.63
QG808	4.08% 스쿠알렌	0.25% Dynasan 114	0.5% Tween 80	0.5% Span 85	0.4% DOTAP	6.8	
QG906	4.08% 스쿠알렌	0.25% Dynasan 114	0.5% Tween 80	0.5% Span 80	0.4% DOTAP	4.7	
QG925	15 % 스쿠알렌	0.9% Dynasan 114	3.7% Tween 80	3.7% Span60	3% DOTAP	2.4	0.63
QG912	2.03 % 스쿠알렌	0.125% Dynasan 114	0.5% Tween 80	0.5% Span60	0.4% DOTAP	2.4	
QG924	30 % 스쿠알렌	1.85% Dynasan 114	3.7% Tween 80	3.7% Span 60	3% DOTAP	4.8	0.63
QG911	4.05 % 스쿠알렌	0.25 % Dyanasan 114	0.5 % Tween 80	0.5 % Span 60	0.4 % DOTAP	4.8	
QG941	7.50% 스쿠알렌	0.24% Dynasan 114	3.7% Tween 80	3.7% Span 60	3% DOTAP	1.2	0.63
QG942 (NCL _{v2})	3.75% 스쿠알렌	0.24% Dynasan 114	3.7% Tween 80	3.7% Span 60	3% DOTAP	0.6	0.63
QG963	3.75% 스쿠알렌	0.24% Dynasan 114	1.5% Tween 80	3.7% Span 60	1.5% DOTAP	0.8	
NCL _{vi}	4.75% 스쿠알렌	0.25% Dynasan 114	0.5% Tween 80	0.5% Span 60	0.4% DOTAP		

*QG386은 종래 기술의 양이온성 나노에멀션 (또한 본 명세서에서 CNE라 지칭됨) 이고; 제형은 선택적으로 10mM 시트르산염으로 완충된다.

[0544]

[0545]

NLC 제형을 합성하기 위하여, 우선 가용화를 용이하게 하기 위하여 초음파 수욕(70±5℃)에 배치된 블렌드 베셀에서 액체상 지질, 고체상 지질, 양으로 하전된 지질 및 소수성 계면활성제를 혼합함으로써 오일상을 제조하였다. 수성 상의 제조는 초음파 주사용수(WFI) 또는 수성 완충제, 예컨대, 10mM 시트르산나트륨 삼수화물 중에서 친수성 계면활성제, 바람직하게는 Tween 80의 희석물을 수반하고, 이어서 완전한 용해를 위하여 교반하였다. 수성 조성물을, 오일상과 배합하기 전에, 예를 들어, 배스 소니케이터(bath sonicator)에서 60 내지 70℃로 가열하였다. 몇몇 경우에, 2개의 상을 둘 다 배스 소니케이터에서 60℃로 개별적으로 가열하였다. 고전단 믹서는 복합 혼합물의 고전단에 의해 오일 상과 수성 상을 조합하는데 사용하였다. 배합 속도는 고속 실험실 유화제 (Silverson Machines, Inc.)에서 5,000 RPM, 또는 최대 10,000 RPM으로 점차로 증가시키고, 이어서 10분 내지 1시간의 기간 동안 혼합하여, 마이크론-크기의 오일 액적을 함유하는 조질의 혼합물을 제조하였다. Silverson 혼합 프로브의 위치 결정은 오일의 균일한 분산 및 완전한 유화를 위하여 필요에 따라 조정하였다. 추가의 입자 크기 저감은 M-110P 마이크로유동화기(Microfluidics, Corp.)에서 고전단 균질화에 의해 달성되었다. NLC 입자는 M-110P 마이크로유동화기 재료 프로세서(Microfluidics, Corp.)를 이용해서 조질의 에멀션으로부터 얻었다. 각 에멀션은 30,000 psi에서 45℃에서 마이크로유동화기 상에서 대략 5회 통과 동안 처리되었다. 최종 pH는 6.5 내지 6.8이었다. 얻어진 NLC 입자 현탁액은 최종 NLC 제형을 수집하고 2 내지 8℃에서 저장하기 위하여 0.2μm 평균 필터(예컨대, 0.2μm 폴리테트라플루오로에틸렌 막 시린지 필터)를 이용해서 염색하고, 이어서 입자 크기를 평가하였다.

[0546]

NLC(비복합체화 NLC)의 안정성을 평가하기 위하여, 각 제형에 대해서 평균 유체역학적 직경(Z-평균) 및 다분산 지수(PDI)는 5℃에서 다양한 저장 시간 후에 동적 광 산란(DLS)을 이용해서 측정하였다(표 3).

표 3

대표적인 제형의 입자 크기 및 다분산지수 측정							
ID	(b), (c) 및 (d) 칼럼에 대한 안정성 온도 및 시간	(b) Z-평균 [nm]	(c) 다분산 지수 (PDI)	(d) 제타 전위 (mV)	(e) 및 (f) 칼럼에 대한 안정성 온도 및 시간	(e) Z-평균 [nm]	(f) 다분산 지수 (PDI)
QG770	합성에서	92.1	0.241		t=2주에 5℃	100.3	0.224
QG769	합성에서	105.8	0.223			시험 안함	시험 안함
QG768	합성에서	105.4	0.27		t=1개월에 5℃	105.4	0.271
QG767	합성에서	106.9	0.261		t=1개월에 5℃	108.3	0.264
QG762	합성에서	110.7	0.258			시험 안함	시험 안함
QG752	합성에서	79.4	0.284		t=1개월에 5℃	75.7	0.27
QG808	합성에서	111.5	0.228		t=1개월에 5℃	108.5	0.218
QG807	합성에서	107.0	0.248		t=1개월에 5℃	106.9	0.234
QG906	합성에서	105.0	0.068		t=1개월에 5℃	105.0	0.067
QG386 (CNE)	합성에서	97.23	0.056	13.1 ±3.25	t=1개월에 5℃	103.1	0.095
QG912	합성에서	63.06	0.117		t=1개월에 5℃		
QG925	합성에서	58.57	0.149		t=1개월에 5℃	48.53	0.221
QG942 (NLC _{v2})	합성에서	40.6	0.198	28.4 ±1.27			
NLC _{v1}	합성에서	91.90	0.17	15.6 ±0.12			

도 1A 내지 도 1E는 상이한 온도에서 제형의 동적 광 산란(Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, Ltd.)을 이용해서 측정된 Z-평균 직경을 비교한다. 제형은 삼중 체제로 물로 1:100으로 희석시키고, 일회용 폴리스타이렌 큐벳(SOP 파라미터: 재료 RI = 1.59, 분산제 RI (물) = 1.33, T = 25℃, 점도 (물) = 0.887 cP, 측정 각도 = 173° 후방산란, 측정 위치 = 4.65 mm, 자동 감쇠)에서 측정하였다. 제타 전위 측정에 대해서, 제형은 세 별로 1:100으로 희석시키고, 일회용 DTS1070(Malvern instruments, Ltd.) 접이식 모세관 셀에 장입, 즉, 부하하였다. 이하의 SOP 파라미터가 사용되었다: 재료 RI = 1.59, 분산제 RI (물) = 1.33, 점도 (물) = 0.887 cP, T = 25℃, 자동 감쇠 및 전압 선택. 3회 측정/복제(9회 총 측정)로부터 평균된 각 제형에 대한 강도-가중 Z-평균 직경, PDI 및 제타 전위값은 표 3에 보고되어 있다. 상이한 N:P 값에서 제형화된 RNA(LC±RNA 또는 CNE±RNA 복합체)의 입자 크기는 384-웰 플레이트 구성에서 Zetasizer Auto Plate Sampler(APS, Malvern Instruments, Ltd.)를 이용해서 세 별로 측정하였다. 상이한 N:P 값에서 제형화된 RNA의 제타 전위는 제형 단독에 대해서 위에서 기재된 방법에 따라서 세 별로 측정되었다. NLC 결합능은 겔 지연 검정을 사용해서 결정되었다. 간략히 요약하면, NLC와 rvRNA 복합체는 다양한 N:P 값에서 제조되었고 1% 아가로스 겔에서와 같이 전기영동시켰다. 표준 농도는 겔에서 이동하는 미결합 또는 과잉의 rvRNA를 정량하는데 이용되었다.

도 16B는, 제조 시 NLC 제형과 CNE 제형 간의 동적 광 산란(DLS)을 이용하여 측정된 입자 크기 분포를 비교한다. 장기간 콜로이드 안정성이 신속 반응 시나리오에서 비축에 적합한 제형을 개발하기 위하여 본 발명자들에게 전제조건이므로, 본 발명자들은 25℃에서 저장된 제형의 평균 입자 직경을 모니터링하였다. NLC의 입자 직경은, 3개월 후에 30%, 9개월 저장 후에 350% 증가한 CNE에 비해서 적어도 9개월 동안 거의 변하지 않았다(3% 미만의 변화)(도 16C). 소수성 솔비탄 에스터(Span), 친수성 에톡실화 솔비탄 에스터(Tween) 및 양이온성 지질 DOTAP를 포함하는 비이온성 계면활성제는, 콜로이드 안정성을 보존하는데 중요하며, 이들의 계면 압력으로 인해, 생물물리학적 상호작용을 지배하는 주된 역할을 한다. 그 결과, 본 발명자들은 rvRNA 보호, 단백질 발현 및 면역원성을 매개함에 있어서 계면활성제의 역할을 실험적으로 해명하고자 추구하였다. 다양한 물리화학적 특성의 NLC를 고압 미세유동화 공정을 이용해서 합성하였다("방법"란 참조). 앞서 간행된 방법(문헌[Brito et al. Mol. Ther. 22(12):2118-29 (2014)] 참조)에 따라서 사내에서 제조된 예시적인 NLC 제형 및 CNE 제형의 조성물은, 표 2에 요약되어 있다. 계면활성제-대-오일(S:O) 몰비의 증가는 입자 크기를 저감시키는데(도 35), 이는 본 발명자들이 DLS에 의해 측정된 바와 같이 40nm 내지 100nm의 범위의 Z-평균 직경을 갖는 단봉형 NLC를 생성하는 것을 가능하게 하였다. 제타 전위는 DOTAP의 양과 상관 관계가 있으며, 이는 0.4% w/v의 DOTAP에 의해 대략 +15 mV에서 3.0% w/v의 DOTAP에 의해 +28mV로 증가하고 있다.

- [0550] 시간의 함수로서의 입자 크기의 발달은 콜로이드 안정성 정보를 제공한다. 5℃ 및 25℃에서의 인큐베이션은 전형적인 저장 조건(도 1A 및 도 1B)을 자극하고, 37℃는 생리학적 온도를 자극하고(도 1C), 60℃ 및 80℃는 콜로이드 안정성을 가속시키고 제형 간의 차별화를 돕기 위하여 높은 열 스트레스에 제형을 노출시킨다(도 1D 및 도 1E). NLC 제형 QG807은, 그 시기에 입수 가능한 가장 최신의 데이터에 기초하여, 60℃에서 적어도 1개월 동안 안정적이다. 다른 한편, 양이온성 나노에멀션(CNE) QG386의 입자 크기는 60℃에서 단지 7일의 인큐베이션 후에 3배 이상을 증가하였다. 60℃에서의 입자 크기 데이터는 CNE에 비해서 유의하게 개선된 콜로이드 안정성을 지닌다. 도 1D 참조.
- [0551] 실시예 2: NLC 입자 크기 및 오일:계면활성제 비의 평가
- [0552] NLC는 액체 오일과 고체 지질을 함유하는 소수성 코어, 및 소수성 상-액체 오일과 고체 지질, 본 명세서에서 일괄적으로 오일로서 지칭됨 -을 수성 상으로부터 분리하는 계면을 구성하는 계면활성제(또한 유화제 또는 유화제로 지칭됨)로 구성된다. 계면활성제는 NLC 나노입자의 표면 상에 존재하므로, 이들의 양은 총 이용 가능한 표면적이라 기술한다. 다른 한편, 오일은 코어에 존재하고 주로 총 이용 가능한 용적에 기여한다. 계면활성제 대 오일 비를 증가시키는 것은 결과적으로 표면적(SA) 대 용적(V) 비를 증가시키고; 따라서 재료의 고정된 용적에 대해서, SA/V 비를 증가시키는 것은 NLC 입자 직경을 감소시키는 것으로 번역된다. 후자는 도 2A 내지 도 2B에 실험적으로 입증되고 - NLC는 상이한 오일/계면활성제 비이지만 동일한 처리 조건하에 제조되었으며, 결과적으로 오일/계면활성제의 증가에 따라서 입자 크기의 증가를 초래한다. 입자 크는 오일/계면활성제($R^2 = 0.97$)에 대해서 선형으로 관련되고; 대안적으로, 입자 크기는 계면활성제/오일 비에 대해서 역비례 관계에 있다($R^2 = 0.97$).
- [0553] 실시예 3: N/P 비의 결정
- [0554] 질소 대 포스페이트(N/P) 비는 RNA-NLC 복합체를 형성하도록 이용 가능한 양이온성 질소(양하전)와 음이온성 포스페이트기(음하전)의 몰 화학량론의 이론적 표현이다. NLC에서 이용된 양이온성 지질 DOTAP 클로라이드(N-[1-(2,3-다이올레오일옥시)프로필]-N,N,N-트라이메틸암모늄 클로라이드)는 4차 트라이메틸암모늄 헤드 기를 함유하고 pH와는 독립적인 양하전을 보유한다. 각 DOTAP 분자가 하나의 트라이메틸암모늄 헤드 기를 함유하므로, 질소 농도(또는 양하전의 양)는 DOTAP 농도와 본질적으로 동등하다. 다른 한편, RNA 카피 내 각 리보뉴클레오타이드 모노포스페이트는 리보뉴클레오타이드 모노포스페이트의 평균 분자[DOTAP] 중량으로 정규화된 RNA 농도에 대략
- $$N/P = \frac{[DOTAP]}{[RNA]/339.5}$$
- 비례하는 단일 1로 구성된다(339.5 g/mol). 따라서, 여기서 [DOTAP] 및 [RNA]는 각각 DOTAP 및 RNA의 몰 농도이다.
- [0555] 또한, 이론적 N/P의 함수로서 NLC에 대한 RNA 결합은 겔 지체 검정(GRA)를 이용해서 특성 규명된다. 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서의 RNA는 미희석 제형 또는 희석된 제형과 1:1 (v/v) 혼합되었다. 제형 희석 인자는 1/2 내지 1/1600의 범위였다. 출발 DOTAP 농도에 따라서, N/P 비는, 예를 들어, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 RNA를 QG807(0.4% w/v의 DOTAP)와 복합체화하여 800-배 희석된 경우 0.12 내지 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 RNA를 미희석 QG942(3% w/v의 DOTAP)와 복합체화한 경우 대략 750의 범위였다. RNA-NLC 혼합물은 얼음 위에서 30분 동안 복합화될 수 있고, 이어서 1% 아가로스 겔 중 약 1시간 동안 120V에서 전기영동되었다. RNA 밴드의 광학 농도측정 분석은 N/P의 함수로서 NLC 제형에 결합된 RNA의 상대적인 양을 결정하도록 수행되었다(도 3A). QG807 및 QG911을 제외하고, NLC에 결합된 % RNA는 N/P 1 미만에서의 0%에서부터 1 초과에서의 거의 100%까지 첨예한 전이를 겪는다. 이론적으로 등물의 양하전 및 음하전인 N/P 1에서, 대략 50% RNA는 NLC에 결합된다. 후자는 RNA-NLC 결합 반응이 동등한 양의 결합 대 미결합 RNA인 조건에서 N/P 1 부근에서 평형인 것을 시사한다.
- [0556] RNA-NLC 결합이 전달 및 발현과 어떻게 상관 관계가 있는 것을 알기 위하여, 본 발명자들은 SEAP-발현 레플리콘을 이용해서 시험관내 실험을 수행하였다. SEAP 레플리콘은 QG807, QG843, QG942 또는 QG963 제형과 복합체화되었다. 각 제형에 대한 N/P 비는 도 3A에 도시된 바와 같이 동일한 방식으로 변하였다. 구체적으로 QG942, QG963 및 QG843에 대해서, 도 3B 내지 도 3E에서의 SEAP 데이터는, 각 제형에 대한 피크 발현이 RNA-NLC 결합 곡선이 거의 동일함에도 불구하고 상이한 것을 나타낸다.
- [0557] 본 발명자들은 또한 NLC_{v2}의 다양한 희석이 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ SEAP rvRNA와 복합체화되어 일정 범위의 N:P 몰비로 되는 시험관내 실험을 수행하였다. 이어서, 이들 RNA/제형 복합체는, 시험관내 SEAP 발현, 입자 크기, 제타 전위 및 RNA 결합을 측정함으로써 물리적으로 그리고 생물학적으로 특성규명되었다(도 22A 내지 도 22D). 이 결과는 최

대 RNA 결합과 대응하는 최적 SEAP 발현 수준, 및 일정한 양의 제타 전위이지만 입자 크기의 최소 증가를 초래하는 N:P 비가 있는 것을 나타낸다. 동일한 제형에 대해서, 항원 발현과 면역원성 간에 상관 관계가 있는 것을 고려하면(문헌[Pepini et al., J. Immunol. 160:1877 (2017)] 참조), 본 발명자들은, 피크 SEAP 발현에 상당하는 N:P 비에서 유사한 nAb 역가(도 22에서 회색으로 음영처리된 영역)를 예상할 수 있는 것으로 가정하였다.

[0558] 단백질 발현, 반응원성 및 면역원성의 관점에서 생체내에서 NLC_{v2}를 특성규명하기 위하여, 본 발명자들은, 가해진 최적 영역 외부의 시험관내 SEAP 활성도 $\geq 5.8 \log_{10}$ RLU(100, 37, 15, 5.6) 및 3의 N:P와 상관 관계가 있는 것을 비롯하여 4 내지 5 N:P 비를 시험하기 위하여 택하였다. 단백질 발현을 특성규명하기 위하여, C57BL/6 마우스에게 각 N:P 비에서 1000, 100 및 10ng 용량의 SEAP rvRNA로 IM 주사하였다. 반응원성을 특성 규명하기 위하여, 각 N:P에서 NLC_{v2}와 복합체화된 50 μ g의 rvRNA를 또한 기니픽에서 ID 경로를 통해서 주사하고, 플레어 직경을 측정하였다. 주사 후 24시간에, 마우스를 채혈하여 혈청 SEAP 활성도를 측정하고, 기니픽 주사 부위를 측정하였다(도 22E 내지 도 22H). 면역원성을 특성 규명하기 위하여, ZIKV rvRNA를 각 N:P에서 NLC_{v2}와 복합체화하고, 1000ng 또는 100ng을 마우스에서 EVI 경로를 통해서 전달하였다. 이어서, 마우스는 14일 후에 채혈하여 nAb 역가를 정량하였다(도 22F 및 도 22G 참조).

[0559] 생체내 SEAP 발현에서 시작하여, 최적 N:P 비는 용량에 의존하며, 1000ng 용량에 대해서 최적 N:P 15, 100ng 용량에 대해서 37, 10ng 용량에 대해서 100이다(도 22E). 예상된 바와 같이, 면역원성은 비교된 2가지 용량에서 SEAP 발현과 상관 관계가 있는 것을 나타내었다(도 22F 및 도 22G). 1000ng 용량에서, 본 발명자들은 N:P 비에서 SEAP 활성도와 유사한 시험된 N:P 비의 임의의 것에서 nAb 역가의 유의차를 검출하지 않았다(도 22F). 100ng 용량에서, 본 발명자들은 N:P 비 37과 15 간에 nAb 역가에 유의차가 관찰되지 않았고 SEAP 활성도에 유의차가 없고 약간 있지만, 역가의 유의한 저감은 SEAP 활성도와 유사한 방식으로 N:P 비 15와 5.6 간에 발생하였다(도 22G). 반응원성의 관점에서, 본 발명자들은, N:P 비가 37에서 15까지 2.5배 저감된 경우 플레어 직경의 유의한 저감을 관찰하였다(도 22H). 중요하게는, 이들 데이터는 37에서 15까지 N:P 2.5배의 저감이 반응원성을 유의하게 저감시키지만 특히 더 높은 rvRNA 용량에서 항원 발현 수준 및 후속의 면역원성에 최소로 영향을 미치는 것을 시사한다. 사실상, 15 및 37의 N:P 값에서, 용량-절약 효과는 1000ng 용량과 100ng 용량 간에 SEAP 활성도의 유의차가 없는 것처럼 관찰되었다(도 22E). 용량 간의 SEAP 활성도의 최대 차이는 낮은 N:P 비에서 관찰되었다(도 22E).

[0560] 이론적 RNA/입자 비가 RNA-제형 복합체의 물리적 상태를 예측하는지를 평가하기 위하여, 모델 10 kb RNA의 고정량(1 μ g)과 함께 다양한 양으로 혼합된 3가지 제형, QG752, QG768 및 QG386의 유체역학적 직경(z -평균; nm)을 비교하였다. 모든 제형에 대한 유체역학적 크기는 제형 회색을 증가, 즉, N/P를 감소(도 4A) 또는 RNA/입자를 증가(도 4B) 또는 DOTAP/RNA를 감소(도 4C)시킴에 따른 대략 벨 곡선-형상 프로파일을 나타낸다. 동일한 양의 DOTAP(0.4% w/v)를 함유하는 모든 제형에도 불구하고, RNA와 교차 결합된 클러스터링된 NLC 입자를 잠재적으로 나타내는 입자 크기의 피크는, 상이한 N/P 비(도 4A) - QG768 및 QG386(40-배 제형 회색 또는 0.01% w/v의 DOTAP)에 대해서 대략 3 및 QG752(100-배 제형 회색 또는 0.004% w/v의 DOTAP)에 대해서 대략 1에서 관찰된다. 그러나, 이 차이는 출발하는 입자 크기의 차이를 고려하고 Z -평균을 RNA/입자 비의 함수로서 플로팅(도 4B)한 후에 조정된다 - 모든 제형에 대한 피크 입자 크기는 NLC 입자당 대략 1 내지 2개의 RNA 카피에서 관찰된다. QG752의 출발하는 평균 입자 크기(75nm)가 QG386 및 QG768(대략 100nm) 둘 다보다 작으므로, 이것은 더 높은 표면적/용적 비를 갖고, 따라서 QG386 및 QG768와 유사한 RNA/입자 비를 얻기 위하여 더욱 회색(더 낮은 N/P)을 필요로 한다. 일반적으로, 화학적 조성물이 일정하게 유지된다면, 입자 크기의 감소는 표면적/용적 비를 증가시키고, 결과적으로 입자 농도를 증가시킬 것이다. 산술적으로, 후자의 원리는 다음과 같이 요약된다: 제형 A 및 B가 동일한 화학적 조성 및 구형 기하 형태 공유하지만 상이한 직경 d_A 및 d_B 를 각각 갖고 $d_A > d_B$ 이면, 제형 B는 $(d_A/d_B)^3$ 의 인자만큼 제형 A보다 더 큰 입자 농도를 갖는다.

[0561] 또한, 이 RNA-제형 입자 크기 데이터는 겔 지체 검정(GRA)에서 결정된 바와 같이 RNA를 결합하는 제형의 능력과 상관 관계가 있다. GRA는 임의의 미결합 또는 유리 RNA가 인가된 전압하에 겔에 분리될 경우 대조군 미제형화된 또는 네이키드 RNA와 일치하고 이동할 것이라는 원리에 기초하며; 따라서, 표준 겔 전기영동 조건에서 RNA에 결합하고 이를 고정화하는 제형의 능력을 평가한다. GRA는 에티듐 브로마이드(EtBr)로 염색된 자체-함유된 프리-캐스트(pre-cast) 1.2% 아가로스 겔(E-gel®, 1.2% 범용 아가로스, ThermoFisher Scientific)에서 가동하였다. RNA가 NLC 제형 QG768과 복합체화된 경우, 2.3보다 높은 모든 N/P 비에서 고정화된 채로 유지되고, 이는 QG768에 대해서 RNA-제형 입자 크기 프로파일의 최대를 포함하는 상승 영역(왼쪽에서 오른쪽으로 이동)에 대응한다

(도 4A). 미결합 RNA의 양은 N/P 비가 0.9 이하임에 따라서 점차로 증가되었고, 이는 도 2A에서 감소 영역(왼쪽에서 오른쪽으로 이동)에 대응한다. 따라서, 입자 크기는 결합능과 상관관계가 있고, 최소 제형 용량을 이용해서 RNA 복합체화 및 전달을 최적화시키는 방법으로서 사용될 수 있다. RNA/입자 비가 면역원성에 어떻게 영향을 미치는 지를 연구하기 위하여, 마우스(n=5/군)에게 상이한 비율로 QG768과 복합체화된 ZIKV rvRNA를 IM 조사하고, 14일 후에 ZIKV 중화 항체(PRNT₈₀ 역가)를 측정하였다.

[0562] 실시예 4: 지카 백신 후보자로서의 NLC 제형의 평가

[0563] 물리적 안정성을 입증한 리드(lead) 후보자 NLC 제형은, VEEV 구조 유전자가 ZIKV PrM-E 카세트에 대체된 베네수엘라 말뇌염 바이러스의 균주(VEEV, 균주 TC83)로부터 유래된 합성 복제 바이러스 RNA(rvRNA)와 조합되었다. RNA 레플리콘 시스템은 비상동 초회감작-부스팅 전략을 용이하게 하기 위하여 개발되었다. 제형화된 rvRNA는 통상의 니들을 이용해서 근육내 경로를 통해서 투여되었다. 수 개의 NLC 제형은 생체내에서 강한 면역 반응을 촉진시켰다.

[0564] 재료 및 방법

[0565] 세포 배양

[0566] 에이. 알보픽투스 모스quito스(*A. albopictus mosquitoes*)로부터 유래된 C6/36 세포(American Type Culture Collection(ATCC)), 메틸렌드주 록빌 소재)는, 10% (V/V) 열-불활성화 소태아 혈청(FBS), 피루브산나트륨(1mM), 페니실린(100 U/ml), 스트렙토마이신(100 µg/ml), 및 1% (v/v) 트립토스 포스페이트 브로쓰(broth)(Sigma, 미주리주의 세인트루이스 소재)를 함유하는 돌베코의 최소 필수 배지(DMEM)에서 5% CO₂, 29°C에서 유지되었다. Vero, BHK-21 및 293T 세포(ATCC, 버지니아주 머내서스 소재)는 10% (V/V) 열-불활성화 FBS, 피루브산나트륨(1mM), 페니실린(100U/ml), 및 스트렙토마이신(100 µg/ml)을 함유하는 DMEM에서 5% CO₂, 37°C에서 전파되었다. 모든 세포주는 또한 마이코플라즈마 오염물에 대해서 시험되었다.

[0567] 플라스미드 작제물

[0568] SP6 프로모터에 이어서 5' 및 3' 미번역 영역(UTR) 및 베네수엘라 말뇌염 바이러스(VEEV) 균주 TC-83의 비구조 유전자(도 21A)뿐만 아니라 pSP6-VEE-Rep-GFP라 불리는 VEEV 서브게놈 프로모터의 제어하에 증대된 GFP를 암호화하는 플라스미드는 Scott Weaver 박사에 의해 기꺼이 제공되었다. 분비된 인간 배아 알칼리성 포스파타제(SEAP)를 암호화하는 대조 리포터 rvRNA가 또한 설계되었다(도 21B).

[0569] 이어서, SP6 프로모터는 pT7-VEE-Rep-GFP라 불리는 표준 클로닝 수법을 이용해서 T7 프로모터로 대체되었다. 프렌치 폴리네시아 지카 바이러스(French Polynesian Zika virus)(ZIKV) 균주 H/PF/2013로부터의 코돈-최적화된 prM 유전자 및 E 유전자를 암호화하는 단편이 합성되었고 pUC57(Genscript)에 클로닝되었다. 이어서, Q5 돌연변이 생성 키트(New England Biolabs)를 사용해서, 코자크 서열(kozak sequence)을 삽입하고 이어서 이하의 프라이머: JEVss-FWD(gctggcctccctggctgtggtcattgcctgcctggagcaGCCGAGGTGACCAGGAGAGG; 서열번호 13), 및 JEVss-REV(cacatgattgatccggcactcctcttgcccatggcgcggtGTGAGCTGGCGCGGGTG; 서열번호 14), 또는 ZIKVss-FWD(ggaatcgtggcgctgtgtgaccacagcaatggcaGCCGAGGTGACCAGGAGAGG; 서열번호 15), 및 ZIKVss-REV(cacgatgtgtctgctcctctcgcgatggcgcggtGTGAGCTGGCGCGGGTG; 서열번호 16)를 사용해서 이형(heterotypic) 일본뇌염 바이러스(JEV) 또는 상류 동형(upstream homotypic) ZIKV 신호 서열(ss)을 삽입하였다. 그 후, JEVss 또는 ZIKVss에 이어서 ZIKV prM 유전자 및 E 유전자를 암호화하는 이 조합된 단편은 프라이머인 ZIKV-prM-E-FWD(AATGGACTACgacatagtcgcccgcgcatg; 서열번호 17) 및 ZIKV-prM-E-REV(GCGGTTTTTGACAccgcggTCAGGCAGACACGGCG; 서열번호 18)로 PCR 증폭되고, 주입 효소 믹스(infusion enzyme mix)(Clontech)를 이용해서 pT7-VEE-Rep-GFP에서의 PflFI 부위와 SacII 부위 사이에서 클로닝되어, pT7-VEE-Rep-JEVss-ZIKV-prM-E 또는 pT7-VEE-Rep-ZIKVss-ZIKV-prM-E 플라스미드를 얻는다. pT7-VEE-Rep-SEAP는 PCR 증폭에 의해 작제되고, 위에서 기재된 바와 같이 pT7-VEE-Rep-GFP에서의 PflFI 부위와 SacII 부위 사이에서 클로닝되었다(도 21B). 모든 플라스미드는 생거-서열분석(Sanger-sequencing)에 의해 확인되었다.

[0570] RNA 생산

[0571] 탑 10 셀(Top 10 cell)(Invitrogen)에서의 변환 및 증폭 및 맥시-프렙 키트(maxi-prep kits)(Qiagen)를 이용한 단리 후에, 플라스미드는 NotI 효소(New England Biolabs)로 제한 소화에 의해 선형화되었고 페놀-클로로폼을 이용해서 정제되었다. 이어서, RNA는 T7 메가스크립트(megascript) 키트(Invitrogen)를 사용한 시험관내 전사에 이어서 염화리튬 석출을 시행하고, 백신시아 캐핑 키트(Vaccinia capping kit)(New England Biolabs)로 캐핑하

였다. 이어서, 캐핑된 전사물이 염화리튬에서 석출되었고, 뉴클레아제-무함유 수에 $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 최종 농도로 재현탁시키고 아가로스-젤 전기영동에 의해 분석하였다. 모든 RNA를 분취하고 -80°C 에서 저장하였다.

[0572] RNase 시험감염

[0573] ZIKV-rvRNA를 각각 N:P 비 50 및 15에서 NLC_{v1} 및 NLC_{v2} 와 복합체화하고 얼음 위에서 30분 동안 배치하였다. 뉴클레아제-무함유 수를 이용하여 NLC_{v2} 복합체를 희석시킨 후에, $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 $1 \mu\text{g}$ 의 rvRNA를 함유하는 복합체는 50ng 의 RNase A(Thermo Scientific)로 30분 동안 실온에서 처리하고 나서, $5 \mu\text{g}$ 의 재조합 Proteinase K(Thermo Scientific)로 55°C 에서 10분 동안 인큐베이션하였다. 이어서, RNA를 동등 용적의 25:24:1의 페놀:클로로폼:아 이소아밀 알코올(Invitrogen)을 이용해서 추출하였다. 보텍싱 후에, 샘플을 $17,000 \times g$ 에서 15분 동안 원심분리하였다. 상청액을 수거하고, 글리옥살 로드 염료(Glyoxal load dye)(Invitrogen)와 1:1로 혼합하고, 50°C 에서 15분 동안 가열하였다. 등가량의 200ng 의 RNA를 부하하고 노던 맥스 글리 러닝 버퍼(Northern Max Gly running buffer)(Invitrogen) 중 변성된 150ml 의 1% 아가로스젤 상에서 120V 에서 45분 동안 가동하였다. 젤을 ChemiDoc™ MP 영상화 시스템(BioRad)을 이용해서 영상화하였다. 무손상 rvRNA 밴드의 강도를, RNase 및 프로테 이나제 K 처리가 시행되지 않은 복합체로부터 페놀:클로로폼:아 이소아밀 추출된 RNA와 비교하였다. 추가의 대조 군은 200ng rvRNA 부하에서 프로테이나제 K 처리 및 RNase와 함께 또는 이것 없이 rvRNA를 포함하였다.

[0574] 시험관내 및 생체내 실험에 대한 복합체화 조건

[0575] N:P 최적화 실험에서, NLC_{v1} 또는 NLC_{v2} 를 10mM 시트르산염 완충제에 연속 희석시키고, 뉴클레아제-무함유 10% 수크로스 용액(이온성 제제, 예컨대, 식염수르 사용하는 일 없이 등장성을 유지) 중 $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ 로 희석된 rvRNA와 1:1 복합체화하였다. rvRNA를 제형에 첨가하고, 서서히 위아래로 피페팅하여 완전한 혼합을 보증하였다. 복합체를 얼음 위에서 30분 동안 인큐베이션하여, 일정 N:P 몰비로 만든다. 이어서, 이들 복합체를 10% 수크로스에 더 희석시켜, 목적하는 용량을 달성하였다. 인간 PBMC의 시험관내 자극을 위하여, 복합체화된 제형을 1:125로 희석시켰다. N:P 50에서 NLC_{v1} 또는 CNE를 사용하는 백신 접종 연구를 위하여, rvRNA는 10% 수크로스 중 $40 \mu\text{g}/\text{ml}$ 로 희석시키고, 제형과 1:1 복합체화하였다. NLC_{v2} 가 N:P 37에서 이용된 기니픽 연구를 위하여, rvRNA를 10% 수크로스에 $400 \mu\text{g}/\text{ml}$ 로 희석시키고, 제형과 1:1 복합체화하였다. N:P 15에서 NLC_{v2} 를 이용하는 백신 연구에 대해서, rvRNA를 10% 수크로스에 $1000 \mu\text{g}/\text{ml}$ 로 희석시키고, 제형과 1:1 복합체화하였다. 이어서, 복합체를 순수하게 이용하거나 또는 목적하는 용량을 위하여 10% 수크로스에 희석시켰다.

[0576] ZIKV VLP 특성규명

[0577] ZIKV-rvRNA는 N:P 50에서 NLC_{v1} 과 복합체화하고 100ng 을 OptiMem 배지에서 4시간 동안 6-웰 플레이트에서 293T 세포의 단일층 상에서 인큐베이션하고 나서, 완전 배지로 교체하고 최종 20시간 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 상청액을 수거하고, 20% 수크로스 용액 상에 오버랩하고, $100,000 \times g$ 에서 10°C 에서 2시간 동안 초원심분리에 의해 펠릿화하였다(OPTIMA MAX-XP, Beckman, 인디애나주의 인디애나폴리스 소재). 이어서 펠릿을 PBS에 재현탁시키고, SDS-PAGE 및 웨스턴 블롯에 의해 분석하였다. 나이트로셀룰로스막으로 이동 후 ZIKV 단백질을 검출하기 위하여, 항-ZIKV 마우스 면역 복수(WRCEVA, UTMB)를 2차 시약의 1:5000 희석 및 1:4000 희석에서 이용하였으며, 염소 항-마우스 IgG-URP(Southern Biotech)를 이용해서 단백질 밴드를 가시화하였다. 투과 전자 현미경(TEM) 평가를 위하여, 상기 293T 상청액을 $100,000 \times g$ 에서 10°C 에서 2시간 동안 초원심분리에 의해서 70% 수크로스 쿠션 상에 20% 수크로스 용액을 통해서 펠릿화하였다. 이어서 중간기를 수거하고, 100-kDa Amicon 필터(Millipore, 매사추세츠주 빌레리카 소재)를 통한 여과에 의해 수크로스를 PBS로 대체하였다. ZIKV prM/E를 암호화하는 본 발명자들의 rvRNA가 기능성이고 ZIKV 바이러스-유사 입자(VLP)의 분비를 유도하는 것을 확인하기 위하여, 미희석 여과액의 액적을 300-매시 홀리 카본 그리드(holey carbon grid) 상에 건조시키고, 유라닐 아세테이트로 염색하고, 웨스턴 블롯(도 21C) 및 전자 현미경(도 21D)에 의해 ZIKV VLP의 존재에 대해서 200 kV FEI TEM에서 조사하였다.

[0578] SEAP 검정

[0579] 제형화된 rvRNA로부터 단백질 발현을 특성 규명하기 위하여, 본 발명자들은 SEAP 리포터 시스템을 이용하였다. BHK 세포를 제형화된 SEAP rvRNA와 함께 인큐베이션한 후 24시간에, 상청액을 수거하고, SEAP 활성도를 제조사의 지시(ThermoFisher)에 따라서 NovaBright™ Phospha-Light™ 검정에 의해 측정하였다. 도 23D 참조.

[0580] 중화 항체 역가

- [0581] ZIKV 균주 FSS 13025를 대조군 바이러스로서 이용해서 앞서 기재된 바와 같이(Beaty et al., Arboviruses, Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections, Schmidt NJJ, Emmons RWW, Eds., Am. Public Health Assoc., Washington, DC, pp. 797-855 (1989)), 80 퍼센트 플라크-저감 중화 시험(PRNT₈₀)을 Vero 세포에 대해서 수행하였다. 간략히 요약하면, ZIKV FSS 13025의 스톱을 대략 1×10^3 플라크-형성 단위/밀리리터(PFU/ml)로 희석시키고, 역가를 Vero 세포 상에서 플라크 검정에 의해 확인하였다. 샘플을 56℃에서 30 분 동안 열-불활성화하고, 이어서 1% FBS를 함유하는 DMEM에서 연속 희석시켰다. 이어서, 모든 희석된 샘플을 대략 200 PFU의 ZIKV의 첨가에 의해 추가의 2-배로 희석시키고, 혼합하고, 37℃에서 1시간 동안 인큐베이팅하고, 이어서 6-웰 플레이트(Costar)에서 Vero 세포의 90% 컨플루언트 단일층으로 이동시키고, 37℃에서 1시간 동안 인큐베이팅하였다. 1% 비필수 아미노산, 1% L-글루타민 및 1% 젠타마이신과 함께 DMEM 중 1% 아가로스를 함유하는 오버레이를 각 웰에 피펫팅하고, 플레이트를 37℃에서 3일 동안 인큐베이팅하였다. 이어서, 세포를 10% 폼알데하이드에 고정시키고, 결정 크리스탈 염색 후에 플라크를 가시화하였다.
- [0582] 계속된 개발을 위하여 단일 ZIKV rvRNA 작제물을 다운 선택하기 위하여, 본 발명자들은 천연형뿐만 아니라 JEV 신호 서열을 가진 ZIKV prM/E를 암호화하는 rvRNA 간의 중화 항체(nAb) 반응을 비교하였다. 천연형 ZIKV 신호 서열 작제물은 단일 용량 후 100% 혈청전환을 유도하였고, JEV 신호 서열을 암호화하는 rvRNA에 비해서 2회 용량 후에 유의하게 더 높은 nAb 역가를 유도하였다(도 34A 내지 B).
- [0583] 인간 말초 혈액 단핵 세포 검정
- [0584] 인간 공여자와 연루된 연구는 Western Institutional Review Board에 의해서 승인되었다. 해파린화된 전혈은 정보 동의 시 6명의 정상 공여자로부터 얻었고, 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)는 앞서 기재된 바와 같이 단리시켰다. 문헌[Seubert et al., J Immunol. 180(8):5402-12 (2008)] 참조. 혈청-무함유 RPMI 150 μ l 용적당 1백만개 세포를 U자형-바닥 TC 등급 96-웰 플레이트에서 평판 배양하고, 이 세포에 50 μ l 용적에서 제형/rvRNA 복합체를 첨가하고, 37℃에서 인큐베이팅하였다. 24시간 후에, 플레이트를 1.8K rpm에서 10분 동안 원심분리하고, 상청액을 수거하고, -20℃에서 저장하였다. Mip-1 β ELISA를 앞서 기재된 바와 같이 수행하였다. 문헌[Seubert et al., J Immunol. 180(8):5402-12 (2008)] 참조.
- [0585] 동물 연구
- [0586] 모든 동물 연구는 Infectious Disease Research Institute Institutional Animal Care and Use Committee에 의해 승인받았다. 동물 연구가 수행되는 시설은 Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care, International에 의해 인가되고, [Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, National Research Council, 2011]에 기재된 지침에 따른다. 모든 샘플 크기는 LD100 시험감염 용량 및 일측 피서의 추출 시험(one-sided Fisher's exact test)을 이용해서 $\alpha=0.05$ 를 갖는 후속의 생존율 0.99 대 0.01을 가정하여 파워 분석에 기초해서 결정되었다. 마우스는 각각의 군으로 비특이적으로 그리고 맹검으로 분포시켰다. 연구 개시 전에 배제 기준은 확립되지 않았다.
- [0587] 기니픽에서의 면역원성 및 내성을 평가하기 위하여, 400 내지 450g의 Hartley 기니픽(Charles River)에 총 용적 250 μ l에서 뒤쪽 사두근 근육에 ZIKV prM/E를 암호화하는 rvRNA 및 NLC를 함유하는 1:1 혼합물로 Nanopass MicronJet600 니들(Nanopass Technologies, Ltd.)을 사용해서 IM 또는 피부내(ID) 백신접종하였다. 24시간 후에, ID 주사-부위 플레어의 직경을 측정하였다. 혈액을 대퇴정맥을 통해서 도면에 나타난 시점에서 수집하고, 혈청을 저속 원심분리 후에 수거하고, PRNT₈₀ 역가가 위에서 기재된 바와 같이 수행될 때까지 -20℃에서 저장하였다.
- [0588] 통계학
- [0589] 통계학적 분석은 GraphPad Prism 소프트웨어(버전 7.0c) 및 RStudio(버전 0.99.491)를 이용해서 수행되었다. 데이터 분포 및 변량은 qq플롯 및 박스플롯 분석에 의해 변환으로 또는 변환 없이 정규성 및 유사성에 대해서 평가되었다. 터키의 다중 비교 시험을 이용하는 일원 및 이원분산분석이 사용되었다.
- [0590] 실시예 5: 전혈 검정
- [0591] 방출 케모카인을 방출하도록 인간 전혈 세포를 자극하는 NLC 제형의 능력을 평가하기 위하여, 인간 전혈 검정을 수행하였다. 해파린화된 전혈을 8명의 정상 공여자로부터 얻었다. 표지된 제형(5%의 오일에서의 스톱)을 전혈에 첨가하였다(최종 0.4%의 오일). 전혈을 37℃-CO₂에서 24시간 동안 인큐베이팅하였다. 혈장 상청액을 흡인해내고

베타-케모카인 CCL2 및 CCL4 및 호중구-동원 케모카인 CXCL1, CXCL5 및 CXCL8에 대해서 검정하였다. Q386은 전혈의 전제에서 불안정한 것으로 발견되어 데이터 수집을 하지 못하였다. 인간 전혈 세포는 시험된 다른 제형에 비해서 QG768에 대한 반응에서 더 높은 수준의 케모카인을 방출하였다(도 7A 내지 E).

[0592] 실시예 6: 시험관내 NLC-rvRNA 복합체의 물리적 특성규명.

[0593] 본 발명자들은 RNase A의 존재 유무에서 다양한 조성물의 NLC와 함께 rvRNA를 인큐베이팅하고 변성 아가로스 겔 전기영동을 이용해서 추출된 RNA의 무결성을 평가하였다. 본 발명자들은, 소정 조성 요건이 RNA 보호에 대해서 필수였고; 구체적으로, 비교적 높은 Tween 80 함량(70%의 총 계면활성제 및 양이온성 지질 질량)을 가진 NLC가 RNase 분해에 대해서 보호되지 않았고(도 36A) 생체내에서 rvRNA를 전달하지 못했을 있던 것(도 36B)을 확립하였다. 역으로, 계면활성제 상(35%의 총 계면활성제 및 양이온성 지질 질량)에서 비교적 낮은 Tween 80 분획을 가진 NLC는 rvRNA를 분해로부터 보호하였다(도 2D). 그 결과, 후속의 연구는 총 계면활성제 분획의 35% 이하의 Tween 80을 함유하는 NLC(이하에 NLC_{v1}로 지칭됨)로 수행하였다. 다음에, 본 발명자들은, 질소(N) 대 포스페이 트(P) 몰비(N:P)에 의해 측정된 바와 같이 복합체화 조건을 최적화하고, 시험관내 형질주입을 최적화하고자 하였다. CNE 또는 NLC_{v1} 제형을 SEAP를 암호화하는 rvRNA와 일정 범위의 N:P 값에서 복합체화하고, 100ng의 각 rvRNA 복합체를 BHK 세포와 함께 하룻밤 인큐베이팅하였다. 본 발명자들은 NLC_{v1}과 CNE 간의 N:P의 함수로서 SEAP 발현을 비교하였다(도 2E). N:P가 증가함에 따라서, 본 발명자들은 N:P < 50에서 NLC_{v1}에 비해서 CNE에 의해 유의하게 높은 발현을 갖는 SEAP의 용량 증가 수준을 관찰하였다. 그러나, N:P 대략 50에서, CNE에 의한 SEAP 발현이 최고였고, N:P > 50에서 감소되었고, 잠재적으로 세포독성으로 인해 유의한 세포 탈착에 의해 입증되었다. 흥미롭게도, N:P 대략 50에서, NLC_{v1}군에서의 SEAP 발현은 CNE과 유사하였고, 계속적으로 증가되었다. NLC_{v1}과 CNE 간의 하류 비교 연구를 위하여, 본 발명자들은 N:P 50을 이용해서, 시험관내에서 유사한 SEAP 발현 수준을 초래하였다.

[0594] 실시예 7: rvRNA를 전달하고 단백질 발현을 초래하는 능력에 대한 선택 제형의 평가

[0595] 도시되지 않은 데이터에서, 제형 QG767 및 QG768이 Tween의 농도를 낮춤으로써 개선될 수 있었던 것이 결정되었다. 이들 제형을 이용할 경우 관찰된 항체 역가는 몇 마리의 비반응성 마우스에 따라 가변적이었다. 이들 제형에서의 (제형 QG807, 808 및 906에서 도달되는) Tween의 저감은 PRNT₈₀ 역가의 증가, 및 100% 혈청전환을 초래 하였다.

[0596] NLC_{v1} 및 NLC_{v2}를 특성규명하는 본 발명자들의 연구에 있어서, 본 발명자들은 최적 N:P 50 초과 내지 15의 감소를 관찰하였다(도 23D). 그 감소에 부수적으로, S:O 몰비가 0.18에서 1.68까지 증가되었으며, 입자 크기가 대략 100nm에서 대략 40nm로 저감되었다(표 2). NLC_{v1}과 NLC_{v2} 간의 총 오일 함량은 단지 약간 상이하며(대략 20%), 이론적으로, 구형 기하학적 형태를 가정할 때, 입자 크기의 대략 2.5-배만큼의 감소는 나노입자의 수의 대략 12-배 증가에 상당한다. 이것은 마찬가지로 NLC_{v2}의 보다 작은 크기 및 이론적으로 더 많은 수의 나노입자가 표면-결합된 rvRNA 카피를 더 많은 수의 세포에 분포하는 것을 가능하게 한다.

[0597] rvRNA를 시험관내에서 전달하는 능력에 대해서 다양한 제형 조성물을 평가하기 위하여, 분비된 알칼리성 포스포 타제(SEAP)를 암호화하는 리포터 rvRNA를 생성하였다. 293 T 또는 BHK-21 세포에, 음성 및 양성 대조군으로서, 각각 CNE, QG807, QG808, QG906로, 또는 10% 수크로스 또는 리포펙타민 2000으로 제형화된, 10 또는 100ng의, SEAP를 암호화하는 rvRNA를 형질주입하고, 형질주입 후 24시간에 상청액을 수거하고, SEAP 활성도에 대해서 검정하였다(도 8A 내지 도 8B). SEAP 발현에 대한 세포- 및 용량-매개 효과는 형질주입-매개 SEAP 발현에 더욱 불응성인 293T 세포를 이용해서 다양한 제형에 대해서 관찰되었다. BUK 세포에서, QG807, QG808 또는 QG906으로 제형화된 100ng의 rvRNA는 CNE에 비해서 더 높은 수준의 SEAP 발현을 초래한 반면, 더 낮은 용량의 RNA, CNE 및 QG906 제형은 더 높은 SEAP 발현을 초래하였다. SEAP 활성도는 제조사(ThermoFisher)의 지시에 따라서 NovaBright™ Phospha-Light™ 검정법에 의해 측정되었다.

[0598] 다음에, 생체내 단백질 발현의 반응속도론을 CNE, QG807, QG808 또는 10% 수크로스 중에 제형화된 SEAP를 암호화하는 rvRNA로 근육내 주사 후 평가하고, 주사 후 각종 시점에서 SEAP 발현 수준을 모의-주사된 마우스와 비교 하였다(도 9). CNE, QG807 및 QG808에서의 제형화된 RNA는 주사 후 6일째의 피크에서 10% 수크로스-제형화된 RNA와 비교해서 33- 내지 36-배 더 높은 SEAP 활성도로 시간 경과에 따른 매우 유사한 발현 프로파일을 입증하였다. 21일에, 모든 군은 SEAP 활성도의 배경 수준으로 복귀되었다.

- [0599] 최종적으로, QG807의 RNA 부하 용량은 다양한 농도의 rvRNA와 1:1로 제형을 복합체화함으로써 평가하였다. 이어서, 복합체화 반응 후에, 제형화된 RNA를 20 또는 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 최종 농도로 희석시키고, 각각의 50 μl 를 각각 최종 용량 1 및 0.1 μg 에 대해서 C57BL/6 마우스에 근육내 경로를 통해서 주사하였다. 이어서, 혈청을 주사 후 제3일 및 제8일에 수거하고, SEAP 활성도에 대해서 검정하였다(도 10). 1 μg 용량에 대해서, 시험된 최저 RNA 농도(40 $\mu\text{g}/\text{ml}$)는 최고 수준의 SEAP 활성도를 초래하였다. 보다 낮은 농도는 주사 용적 제약으로 인해 이 용량에서 시험될 수 없었다. 그러나, 더 낮은 농도의 효과는 0.1 μg 용량에 대해서 관찰될 수 있었다. 이 데이터로부터, 최적 부하 용량이 40 내지 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 RNA인 것으로 결론내릴 수 있다.
- [0600] 실시예 8: 제형은 전달과는 독립적으로 면역원성을 증대시키기 위하여 변형될 수 있다
- [0601] 제형은 전달과는 독립적으로 면역원성을 증대시키도록 변형될 수 있고, 이들이 증대는 고체 지질의 존재에 좌우된다. 다양한 높은-퍼센트의 친수성 계면활성제-함유 NLC를 이용한 자극 후 시험관내 전혈 케모카인 방출 검정으로부터의 데이터에 기초하여, 본 발명자들은, 낮은-퍼센트의 친수성 계면활성제 조성물과 함께, NLC에 존재하는 상이한 소수성 계면활성제가 생체내에서 면역 반응을 구별하여 조절할 수 있었음을 가정하였다. 이 가설을 시험하기 위하여, 높은 비율의 친수성 계면활성제(2% tween 80)를 가진 1가지의 NLC, 및 낮은 비율의 친수성 계면활성제(0.5% tween 80)와 상이한 비율의 소수성 계면활성제(Span 85, Span 80 및 Span 60)를 가진 3가지의 NLC를 분비된 알칼리성 포스파타제(SEAP)를 암호화하는 RNA 또는 ZIKV prM 및 E 유전자를 암호화하는 RNA 중 어느 한쪽과 복합체화하였다. 본 발명자들은 그 결과 콜로이드 안정성에 대한 어떠한 유해한 효과도 관찰하지 못하였다. 단일 100ng EVI 용량을 C57B1/6 마우스에 투여하고, CNE-제형화된 또는 미제형화된 RNA(도 11A)와 비교하였다. 주사 후 3일에 수거한 혈청에 대한 SEAP 검정에 의해 측정된 바와 같이, 단백질 발현은, 낮은 퍼센트의 친수성 계면활성제(0.5% tween 80)를 함유하는 RNA-제형화된 NLC에서 25-배를 넘어 증대되었지만, 혈청 중 발현 수준은 상이한 소수성 계면활성제를 함유하는 RNA-제형화된 NLC 또는 CNE-제형화된 RNA 간에 상이하지 않았다(도 11A).
- [0602] 이와 대조적으로, 본 발명자들은 각 NLC-제형화된 RNA 간에 중화 항체 반응의 유의차를 관찰하였다(도 11B). QG768(2% tween 80을 함유)로 제형화된 RNA로 면역화된 마우스에서 관찰된 낮은 중화 항체 반응은 마찬가지로 낮은 항원 발현 수준에 기인할 수 있었지만, CNE와 QG906, QG808 또는 QG807 간에 관찰된 차이는 마찬가지로 항원 발현의 차이에 기인하지 않는다. QG906, QG808 및 QG807이 단지 각각 Span 80, Span 85 또는 Span 60을 함유하는 소수성 계면활성제 조성물과 상이하므로, 관찰된 면역원성 차이는 이 성분에 기인할 수 있었다. 흥미롭게도, 오일 조성물 중 NLC와는 상이한 CNE는, 전자가 단지 스쿠알렌으로 구성된 한편, 후자가 스쿠알렌 및 dynasan인 고체 지질 둘 다로 구성된 경우, CNE와 동일한 소수성 계면활성제(Span 85)를 함유하는 QG808과는 상당히 상이하지 않았다. As CNE 및 QG808이 단지 이들의 오일 조성물에서만 다르므로(즉, 후자가 고체 지질인 dynasan의 첨가를 지님), 본 발명자들은 이어서 제형화된 RNA의 면역원성에 대해서 CNE 내 Span 85를 Span 60으로 교체하는 효과를 시험하였다. Span 85 또는 Span 60 중 어느 한쪽을 가진 CNE는 ZIKV prM 및 E 유전자를 암호화하는 RNA로 복합체화되었고, Span 85 또는 Span 60으로 구성된 NLC로 제형화된 RNA와 비교하였고, 단일 100ng EVI 주사에 의해 C57B1/6 마우스에 투여하였다. 면역화 후 14일에, 중화 항체(nAb) 역가의 유의한 증가는 Span 85가 Span 60으로 대체된 경우 NLC들 간에 단지 관찰되었으며, 이것은 고체 오일 성분의 중요성을 나타낸다(도 11C). 상이한 제형군 간의 SEAP 발현 수준이 동일하므로(도 11A), nAb 역가의 차이는 마찬가지로 소수성 계면활성제 동질성의 차이로 인한 것이었다. CNE와 NLC_{v1} 간의 단백질 발현 수준이 시간 경과에 따라서 변화되지 않는 것을 확인하기 위하여, 본 발명자들은 100ng의 제형화된 또는 미제형화된 SEAP rvRNA로 C57BL/6을 면역화시키고, 주사 후 3, 7, 14, 21 및 28에 수거된 혈청에서 SEAP 활성도를 측정한 바(도 25), CNE군과 NLC_{v1}군 간에 유의차가 관찰되지 않았다.
- [0603] 실시예 9: NLC-제형화된 RNA는 단일-용량 면역원성 및 효능을 제공한다
- [0604] 상기 데이터에 기초하여, 본 발명자들은 QG807(Span60)로 모든 하류 실험을 수행하였다. NLC-제형화된 RNA의 단일 용량에 의해 유도된 면역 반응의 유효성을 시험하기 위하여, 본 발명자들은 1 μg 의 CNE- 또는 NLC-제형화된 RNA로 마우스를 면역화시키고 면역원성 및 효능을 10 μg 또는 1 μg 의 미제형화된 RNA와 비교하였다. 본 발명자들의 이전의 실험에서 관찰된 바와 같이, 본 발명자들은 CNE-제형화된 또는 네이키드 RNA군에 비해서 NLC-제형화된 군에서 단일 면역화 후 14일에 유의하게 더 높은 중화 항체 반응을 보였다(도 2A). 그러나, 1 μg 용량은 이전의 실험에서 본 0.1 μg 용량에 비해서 전체적인 중화 항체 역가를 저감시켰다(도 11B). 본 발명자들은 이어서 후속 실험에서 이들 지견을 반복하였다.

- [0605] 예를 들어, C57BL/6을 NLC_{v1}(Span 60을 소수성 계면활성제로서 사용)로 제형화된 1 또는 0.1 μ g의 rvRNA로 면역화시키고, 두 별개의 실험(여기서 하나의 실험은 초회감작후 nAb 역가를 평가한 한편 다른 하나의 실험은 제28일에 부스팅 백신 접종을 포함하였음)에서 미제형화된 10배 더 높은 용량과 비교하였다. 마우스를 주기적으로 채혈하고 nAb 역가를 PRNT₈₀에 의해 평가하였다(도 18A 내지 B). 두 실험에서, 본 발명자들은 제14일에 피크 nAb 역가를 관찰한 바, 0.1 μ g의 제형화된 용량은 1 μ g의 제형화된 용량보다 유의하게 더 높은 역가를 유도하였다. 그러나, 단일 투여 후 제88일 및 제156일에, 0.1 μ g의 제형화된 군은, 10 μ g의 미제형화된 군과 마찬가지로, 제14일에 피크 역가에 비해서 nAb 역가의 유의한 하락을 나타낸 한편, 1 μ g의 제형화된 군은 유의한 역가 변화를 보이지 않았다(도 18A). 부스터 면역화 후, 본 발명자들은, 0.1 μ g의 제형화된 군에서 제28일에 부스터 면역화에 의해서도 제14일, 제126일 및 제209일 사이에 유의한 nAb 역가 붕괴를 관찰한 반면, 1 μ g의 제형화된 군은 유의한 역가 변화를 보이지 않았다(도 18B).
- [0606] 부스터 면역화 후의 수축후 T 세포 반응을 평가하기 위하여, 본 발명자들은 각각의 백신 제형으로 각 군의 마우스의 서브세트를 부스팅하고 46일 후에 비장을 수거하고 ZIKV prM 및 E에서 CD8 에피토프에 대응하는 펩타이드의 폴로 비장세포를 자극시켰다(Muthumani *et al*, 2016; Elong Ngonu *et al*, 2017)(도 12B 내지 F). 유의차가 활성화된 CD4 T 세포에 대해서 관찰되지 않았지만(도 12B, 도 12C), NLC-제형화된 RNA는 CNE- 또는 미-제형화된 RNA에 비해서 유의하게 더 높은 수준의 INF γ ⁺ 및 CD107a⁺ CD8⁺ T 세포를 유도하였다(도 12D, 12E). NLC-제형화된 RNA가 CNE-제형화된 RNA에 비해서 유의하게 더 높은 수준의 TNF- α ⁺ CD8⁺ T 세포를 유도하지 않았지만, 이들 활성화된 CD8⁺ T 세포의 수준은 미제형화된 RNA군보다 유의하게 더 높았다(도 12F). 이어서, 부스팅되지 않은 나머지 마우스는 단일 면역화 후 30일에 시험감염되었다. 이용된 시험감염 모델은 이미 기재되어 있고(Smith *et al*, 2017), ZIKV Dakar 균주 41525에 대한 이들 면역적 마우스의 감수성(susceptibility)을 증가시키기 위하여 시험감염 전 제1일 그리고 시험감염 후 제1일과 제4일에 인터페론 알파 수용체(IFNAR) 차단 단클론성 항체의 투여를 포함한다.
- [0607] 본 발명자들의 최적화된 백신 플랫폼의 면역원성 및 효능을 평가하기 위하여, NLC_{v2}를 최소 반응성이지만 면역원성인 N:P 비에서의 rvRNA로 복합체화하고, N:P 15에서 NLC_{v2}로 복합체화된 100, 30, 10 및 3ng을 IM 경로를 통해서 C57BL/6 마우스를 면역화시키는데 사용하고(n=14/군), 본 발명자들은, 이들 조성물에 대해서 차선인, 동일한 N:P에서의 100ng의 NLC_{v1}-(n=14) 또는 CNE-(n=4) 제형화된 rvRNA로 면역화된 마우스에 대한 반응을 비교하였다. 최적 N:P에서의 NLC_{v1}과 CNE를 비교하는 개별의 연구가 도 28에 요약되어 있다. 100 및 10ng의 미제형화된 용량을 대조군으로서의 모의 백신 접종과 함께 투여하였다(n=14/군). 단일 투여 후 2주에, 마우스를 채혈하여 PRNT₈₀에 의한 nAb 역가를 정량화하고 군당 4마리의 마우스를 안락사시켜서 비장세포를 분리시키고, ZIKV prM/E에서의 류틴 CD8⁺ T 세포 에피토프에 대응하는 펩타이드의 폴로 자극시키고(34, 50), T-세포 반응을 유동세포분석법에 의해 측정하였다(도 20A 내지 B).
- [0608] 본 발명자들은 100, 30 및 10ng 용량을 공급받은 NLC_{v2} 제형화된 군에서 100% 혈청전환만을 관찰하였으며, 평균 PRNT₈₀ 역가는 각각 1:604, 1:302 및 1:113이었다. 본 발명자들은, 차선의 N:P 비에서 제형화된 100ng NLCY 군과 유사한, 3ng 용량군에서 25% 혈청전환을 관찰하였다. CNE-제형화된 군은 N:P 15에서 NLC_{v1}보다 유의하게 더 양호하게 수행되었고, 보다 낮은 N:P 비에서 증대된 시험관내 SEAP 발현과 상관 관계가 있지만(도 3C), 동일한 N:P에서 NLC_{v2}로 제형화된 동일 용량은 nAb 역가에서 대략 13배 증가를 초래하였다(평균 PRNT₈₀ 1:604 대 1:48, p<0.0001).
- [0609] CD8⁺ T 세포 반응의 관점에서, 본 발명자들은, NLC_{v2}로 제형화된 100 및 30ng의 단일 용량을 공급받은 마우스에서 모의 백신 접종에 비해서 B220_{lo}CD8⁺IFN γ ⁺ T 세포의 유의한 백분율을 관찰하였다. 이들 반응은 N:P 50에서 NLC_{v1}로 제형화된 1 μ g의 2회 용량에 비해서 유의하게 저감되었으며(도 28E), 이는 초회감작-부스팅 포맷이 앞서 설명된 바와 같이 세포 면역 반응을 증대시킬 수 있는 것을 확인하고 있다. 문헌[Knudsen *et al.*, J Virol. 88(21): 12438-51 (2014)] 참조.
- [0610] 최종적으로, 군당 나머지 10마리의 마우스는 위에서 기재된 바와 같이 단일 투여 후 30일에 시험감염시키고, 4일 후에 채혈하여 플라크 검정에 의해 바이러스혈증을 정량화하였다(도 20C). 마우스는 질환의 증상 및 체중 감소에 대해서 매일 모니터링하였다(도 20D 내지 E). 시험감염전 중량의 20% 초과를 손실하거나 반사상태인 것으

로 나타난 임의의 마우스는 표시된 시점에서 안락사시켰다(도 20D). 모든 모의 및 미제형화된 100ng 백신접종된 마우스는 높은 수준의 바이러스혈증(2.6 내지 $5.8 \log_{10}$ PFU/ml)을 경험한 반면 10ng 미제형화된 군에서 10마리의 마우스 중 1마리가 검출 가능한 바이러스혈증으로부터 보호되었다(검출 한계 = 50 PFU/ml). NLC_{v2} 군에서, 100, 30 및 10ng 용량은 검출 가능한 바이러스혈증으로부터 100% 보호되었고, 3ng 용량은 10마리 중 6마리의 마우스를 보호하였다. 차선의 N:P에서 제형화된 100ng NLC_{v1}군에서 10마리 중 1마리의 동물이 바이러스혈증으로부터 보호되지 않았다. NLC_{v2}로 제형화된 3ng 용량을 비롯하여 모든 NLC_{v1} 및 NLC_{v2} 군은 유의한 체중 감소 및 사망으로부터 보호되었다. 미제형화된 군은, 시험감염 후 10일 후에 모의 백신 접종 군에서의 100% 사망에 비해서, 100 및 10ng 용량군 각각에서 시험감염 후 최대 30일까지 시험감염 후 단지 10% 및 20% 생존하고 유의한 체중 감소를 경험하였다.

[0611] 두 용량에서의 미제형화된 RNA는 바이러스혈증으로부터 모든 마우스를 완전히 보호할 수 없었지만, CNE 및 NLC-제형화된 RNA는 둘 다 검출 가능한 바이러스혈증으로부터 완전한 보호를 입증하였다(검출 한계 = 50 플라크 형성 단위/ml)(도 12G). 생존율의 관점에서, 모두 1 μ g 용량(미제형화된, CNE-제형화된 또는 NLC-제형화된)은 100%의 마우스를 사망으로부터 보호한 한편, 모의-백신접종된 마우스에서의 17% 생존율과 비교해서 80%의 10 μ g의 미제형화된 RNA 백신접종된 마우스가 생존하였다.

[0612] 면역적격 마우스의 면역원성

[0613] 면역적격 마우스 모델에서 단백질 발현 또는 면역원성평가하기 위하여, 군당 5마리의 4-주령 암컷 C57B1/6 마우스(Charles River)에, 총 용적 50 μ l로 RNA를 함유하는 1:1 혼합물로 제형을 뒤쪽 사두근 근육에 근육내(IM)로 백신접종하였다. 각종 시점에서, 혈액을 안구 뒤 경로를 통해서 채혈하고, 저속 원심분리 후 혈청을 수거하여, 위에서 기재된 바와 같이 PRNT₈₀ 역가가 결정될 때까지 -20°C에서 저장하였다. 근육내 단일 면역화 후에, 제형(/QG767 및 /QG768)을 주사한 마우스는, 솔비탄 모노에스터(예컨대, Span)를 결합하는 다른 제형 또는 대조 제형으로 면역화된 마우스와 비교해서, 플라크 감소 중화 시험(PRNT₈₀) 검정에 의해 측정된 바와 같이 면역화후 14일에 높은 역가 ZIKV 중화 항체를 나타내었다.

[0614] 실시예 10: 부하 용량 및 전달을 증대시키기 위하여 NLC에 대한 추가의 변형.

[0615] NLC의 액체 오일 성분인 스쿠알렌이 카스파제- 및 IL-18-의존적 인플라마존 활성화를 포함하는 염증성 경로를 활성화시키는 것은 이미 입증되어 있었다(Desbien *et al.*, 2015; 미공개 데이터). 바이러스 복제가 이들 이벤트에 의해 부정적으로 영향을 미치므로(Chen *et al.*, 2015), 본 발명자들은, 본 발명자들의 NLC의 RNA-부하 용량을 증대시키기 위하여 DOTAP 농도를 증가시키는 한편 스쿠알렌 함량을 저감시키고자 하였다. 이것을 생체내에서 시험하기 위하여, 본 발명자들은, 각 제형 간에 스쿠알렌의 농도를 저감시키고 QG807의 것보다 더 높지만 모두 DOTAP의 동일한 높은 농도를 함유하는, 4개의 추가의 높은 RNA-부하 제형인 QG924, QG925, QG941 및 QG942를 생성하였다. 이어서, 본 발명자들은 40 μ g/ml에서 QG807과 SEAP-발현 레플리콘을 복합체화하고, 400 μ g/ml에서 10배 더 높은 RNA 농도에서 복합체화된 QG807, QG924, QG925, QG941 및 QG942에 1 μ g IM 용량 후 제3일에 SEAP 발현을 비교하고 동일한 1 μ g EVI 용량에서 전달하였다(도 13A). 400 μ g/ml에서 RNA와 복합체화된 QG807이 40 μ g/ml에서 RNA와 복합체화된 QG807에 비해서, 유효한 1 μ g 용량을 전달할 수 없었던 반면, 400 μ g/ml의 RNA로 복합체화된 QG942는 40 μ g/ml에서 복합체된 QG807로 동일 용량 전달된 것과 비교해서 1 μ g 용량 후에 유사한 SEAP 발현 수준을 생성하였다.

[0616] 상기 실험에서, NLC_{v1} 또는 CNE는, 1) 50 μ l 주사 용적에서 1 μ g RNA 용량을 고려하고, 그리고 2) 시험관내(도 3C) 및 생체내(도 26) 최적 SEAP 발현을 초래한, 최저 농도였던 40 μ g/ml의 RNA(N:P = 50)로 1:1 혼합하였다. 그러나, 50의 N:P 값은 비교적 대과잉의 제형으로 변형되고, 이는 증가된 용량 조건에서 제형-연관된 내성 위험을 제기하며; 유화된 스쿠알렌 및 DOTAP(일반적으로 양이온성 지질)는 면역자극제이고, 높은 양이 염증성 및 국소 반응원성을 유도할 수 있다. 문헌[Lv *et al.* J Control Release. 114(1): 100-9 (2006); Desbien *et al.*, Eur J Immunol. 45(2):407-17 (2015)] 참조. 그 결과, 본 발명자들은 유의하게 더 낮은 N:P 값에서 높은 RNA 용량을 전달할 수 있는 NLC 제형을 설계하고 합성하고자 하였다. 얻어진 제형은 NLC_{v1}의 더욱 물리화학적으로 별개인 버전인 유도체였고, 후속적으로 NLC_{v2}로 지칭되며; 물리화학적 특성이 표 2에 요약되어 있다. NLC_{v2}의 개시 전에, 본 발명자들은 RNA 부하 용량을 증가시키기 위하여 NLC_{v1}의 고도로 농축된 버전을 제조하였으며 - 몇몇은 30% w/v로 높은 스쿠알렌 및 1.8% w/v의 Dynasan 114를 함유하지만 동일한 S:O 비를 갖는다. 후자는 본 발명자들로 하여금 증가된 나노입자 농도로 인해서 RNA 부하 용량을 증가시키는 한편, 나노입자 크기 및 화학적

조성을 일정하게 유지하게 하였다. 이 접근법은 높은 양의 RNA의 부하의 실질적인 제한을 극복하는 한편, 과잉의 제형의 사용을 피하지 못하였다. 그 결과, 후속 버전에서, 본 발명자들은 스쿠알렌 및 Dynasan 114의 양을 각각 3.75% w/v의 스쿠알렌 및 0.24%의 dynasan 114로 낮게 저감시킨 한편, 총 계면활성제 조성물 ([DOTAP]+[Span 60]+[Tween 80]) 및 비([DOTAP]:[Span 60]:[Tween 80])를 일정하게 유지하면서, NLC_{v1}에 비해서 NLC_{v2}에서 S:O 비를 9-배(0.18 내지 1.68)로 효율적으로 증가시켰다. 흥미롭게도, 본 발명자들은 SEAP rvRNA로 복합체화된 이들 제형을 생체내에서 선별한 경우, 본 발명자들은 스쿠알렌 농도의 감소에 따라서 SEAP 발현의 증가를 관찰하였다(도 27). 이러한 비교적 높은 S:O 비로 인해, NLC_{v2}는, DLS에 의해 측정된 바와 같이, NLC_{v1}에 비해서 대략 40nm의 평균 직경, 입자 크기의 거의 2-배 저감을 나타내었다(도 23A). NLC_{v1}과 마찬가지로, NLC_{v2}는 RNase 분해로부터 rvRNA를 보호하였다(도 23B). NLC_{v2}의 증가된 부하 용량을 확인하기 위하여, 본 발명자들은 상승된 농도의 rvRNA를 NLC_{v1} 또는 NLC_{v2}(용적으로 1:1)와 복합체화하고, 전기영동 겔 지체 검정에 의해 미결합 RNA를 정량화하였다(도 23C). 100%의 RNA가 100 µg/ml 미만의 rvRNA 농도(N:P > 20)에서 NLC_{v1}에 결합된 반면, NLC_{v2}는 최대 10 mg/ml의 rvRNA 농도에서 100% RNA-결합을 나타내었다.

[0617] 세포사에 대한 스쿠알렌을 저감시키는 효과를 시험하기 위하여, 본 발명자들은 4시간 동안 각각 높은 RNA-부하 제형의 1:20 희석으로 하룻밤 BHK 세포를 인큐베이션하고 이어서 요오드화프로피듐(PI) 및 아넥신 염색에 의해 세포사에 대해서 검정하여, 세포자멸사를 받지 않은 생세포를 유동 세포분석법에 의해 정량화하였다(도 13B). 본 발명자들은 QG942 처리된 세포에서 최고량의 생세포를 관찰하였고, 이는 최저 농도의 스쿠알렌과 상관관계가 있는 한편 각 제형 간의 모든 다른 성분이 동일하게 유지되었다.

[0618] 최대 SEAP 발현을 시험관내에서 초래하는 최적 N:P를 평가하기 위하여, 본 발명자들은, 위에서 기재된 바와 같이, 각종 N:P 비에서 SEAP-rvRNA와 NLC_{v2}를 복합체화하고, 100ng rvRNA 용량을 BHK 세포와 함께 하룻밤 인큐베이션하였다. 본 발명자들은, NLC_{v1}에 비해서 NLC_{v2}에 대해서 NLC_{v2}에 대해서 NLC_{v1}에 대해서 100 초과에서 15 내지 37로 최적 N:P의 적어도 대략 5배 저감을 관찰하였다(도 23D). 흥미롭게도, NLC_{v2}에 대한 최대 SEAP 발현 수준은 또한 NLC_{v1}에 비해서 대략 2.5배 증대되었다. 최종적으로, CNE에 비해서(도 3C), NLC_{v2}는 N:P 값의 약 1/3에서 최대 SEAP 발현에서 거의 10-배 증가를 제공하였다.

[0619] 본 발명자들은 다음에 본 발명자들이 커다란 설치류 모델에서 항-ZIKV 중화 항체를 유도할 수 있었는지를 알아 보기 위하여 400 내지 450g의 Hartley 기니픽(Charles River)을 이용해서 QG942를 면역원성 연구에 전방으로 이동시켰다. 이 연구에서, 본 발명자들은, 400 µg/ml의 농도(10-배 더 높은 농도)에서 RNA와 함께 QG942(NLC_{v2})를 부하하고, 250µl의 총 용적에서 뒤쪽 사두근 근육에서 ZIKV prM/E를 암호화하는 rvRNA 및 NLC를 함유하는 1:1 혼합물로 40 µg/ml의 RNA에서 QG807로 부하된 5 및 0.5µg 용량의 RNA로 Nanopass MicronJet600 니들(Nanopass Technologies, Ltd.) 경로를 이용해서 EVI 또는 피부내(ID)를 통해서 50, 5 및 0.5µg 용량을 비교하였다. 본 발명자들은 또한 50µg의 미제형화된 RNA를 대조군으로서 포함하였다. 24시간 후에, IM/ID 주사-부위 플레어의 직경을 측정하였다. 혈액을 대퇴정맥을 통해서 도면의 범례에 표시된 시점에서 수거하고, 저속 원심분리 후에 혈청을 수거하고, PRNT₈₀ 역가가 위에서 기재된 바와 같이 결정될 때까지 -20℃에서 저장하였다. 단일 면역화 후 14일에, 본 발명자들은, 본 발명자들이 QG807에서 달성할 수 없었던 최고 50µg 용량의 RNA를 전달함에 있어서 성공적인 것을 나타내는 용량-의존적 중화 항체 반응을 관찰하였다. 부가적으로, 본 발명자들은, 28일 후에 검정된 경우 QG942 또는 QG807에 의해 전달된 5µg 용량과 0.5µg 용량 간에 어떠한 유의차도 관찰하지 못했지만, QG942의 약간의 선호 경향은 스쿠알렌의 저하가 유리할 수 있었던 것을 시사할 수 있다. 본 발명자들은, 용량-반응 경향을 관찰하였지만, 용량들 간에 유의차가 없었으며, IM 50, 5, 및 0.5µg 용량은 각각 1:761, 1:452 및 1:226의 평균 PRNT₈₀ 역가를 초래한 한편, ID 용량은 각각 1:905, 1:380 및 1:269의 평균 PRNT₈₀ 역가를 초래하였다. 도 23E 참조. 흥미롭게도, 유의차가 5µg rvRNA 용량에서 NLC_{v1}-제형화된 군과 NLC_{v2}-제형화된 군 간에 관찰되었고, NLC_{v2}-제형화된 rvRNA는 ID 또는 IM 투여 경로에서 각각 대략 4- 또는 대략 8-배 더 높은 nAb 역가를 유도하였다. 참조로, 이들 N:P 비에서의 시험관내 SEAP는 NLC_{v1}에 비해서 NLC_{v2}에서 대략 8.4배 증대되었다(도 23D). 단백질 발현, 반응원성 및 면역원성의 관점에서 NLC_{v2}를 생체내에서 특성구명하기 위하여, 본 발명자들은, 가정된 최적 영역 외부에서, 시험관내 SEAP 활성도 > 5.8 log₁₀ RLU(100, 37, 15, 5.6), 및 N:P 3과 상관 관계가 있는 것을 비롯하여, 4 내지 5 N:P 비를 시험하도록 택하였다. 단백질 발현을 특성구명하기 위

하여, C57BL/6 마우스에게 1000, 100 및 10ng 용량의 SEAP rvRNA를 각 N:P 비에서 FM 주사하였다. 반응원성을 특성규명하기 위하여, 각 N:P에서 NLC_{v2}와 복합체된 50 μ g의 rvRNA를 또한 기니픽에서 ID 경로를 통해서 주사하고 플레이트 직경을 측정하였다. 주사 후 24시간에, 마우스를 채혈하여 혈청 SEAP 활성도를 측정하고 기니픽 주사 부위를 측정하였다(도 22E 내지 H). 면역원성을 특성규명하기 위하여, ZIKV rvRNA는 각 N:P에서 NLC_{v2}와 복합체화하고, 1000ng 또는 100ng을 마우스에서 FM 경로를 통해서 전달하였다. 이어서, 마우스를 14일 후에 채혈하여 nAb 역가를 정량화하였다(도 22F 내지 G).

[0620] 생체내 SEAP 발현에서 시작하여, 최적 N:P 비는 용량에 따르며, 1000ng 용량에 대해서 최적 N:P 15, 100ng 용량에 대해서 37, 10ng 용량에 대해서 100이 된다(도 22E). 예상되는 바와 같이, 면역원성은 본 발명자들이 비교한 두 용량에서 SEAP 발현과 상관관계가 있는 것을 나타낸다(도 22F 내지 G). 1000ng 용량에서, 본 발명자들은 N:P 비에서 SEAP 활성도와 유사한, 시험된 N:P 비의 임의의 것으로 nAb 역가의 유의차를 검출하지 못하였다(도 22F). 100ng 용량에서, 본 발명자들은 N:P 비 37과 15 사이에서 nAb 역가에 유의차가 관찰되지 않았고, SEAP 활성도에 유의차가 없지만 약간 있고, 그러나 역가의 유의한 저감은 SEAP 활성도와 유사한 방식으로 N:P 비 15와 5.6 간에 일어났다(도 22G). 반응원성의 관점에서, 본 발명자들은 N:P 비가 37에서 15로 2.5배 저감된 경우 플레이트 직경의 유의한 저감이 관찰되었다(도 22H). 중요하게는, 이들 데이터는 N:P 2.5-배를 37에서 15로 저감시키는 것이 반응원성을 상당히 저감시키지만 항원 발현 수준, 이어서 면역원성에 특히 더 높은 rvRNA 용량에서 최소로 영향을 미치는 것을 시사한다. 사실상, 15 및 37의 N:P값에서, 1000ng 용량과 100ng 용량 간에 SEAP 활성도의 유의차가 없기 때문에 용량-절약 효과가 관찰되었다(도 22E). 용량 간 SEAP 활성도의 가장 큰 차이는 낮은 N:P 비에서 관찰되었다(도 22E).

[0621] 실시예 11. 부하 용량 및 RNA 전달

[0622] 전달하다 10 μ g RNA를 50 μ l 주사 용적(200 μ g/ml의 RNA 농도)에서 전달하기 위하여, 본 발명자들은 QG807과 비교해서 증가된 부하 용량을 가진 NLC를 제조하였다. 도 14는 QG807과 400 μ g/ml의 RNA를 1:1(v/v) 복합체화하는 (N/P 대략 4.8) 것이 네이키드 또는 미세형화된 RNA에 비해서 생체내 SEAP 발현을 유의하게 개선시키지 않았음을 나타낸다. 다른 한편, QG807은 1 또는 0.1 μ g의 RNA - 10 μ g 용량에서 40 μ g/ml의 RNA와 1:1 (v/v)로 복합체화할 경우(N/P 대략 48) 양호한 SEAP 발현을 제공한다. 이것은, 10 μ g의 RNA를 전달하기 위하여, 본 발명자들이 NLC의 부하 용량을 증가시킬 필요가 있었음을 시사하였다.

[0623] 부하 용량을 증가시키기 위하여, 본 발명자들은 평균 NLC 입자 크기를 저감시키는 한편 총 용적을 일정하게 유지시키는 것이 NLC 입자의 총 수를 이론적으로 증가시켜야 하고, 따라서 RNA 결합 부위의 증가로 해석해야 한다는 것을 가정하였다. 그 결과, 본 발명자들은, 10mM 시트르산염이 제조 동안 첨가되고 더 작은 평균 입자 직경을 달성하기 위하여 (QG807에 대해서 30,000 psi에서의 5회 통과에 비해서) 30,000 psi에서 10회 통과에 대해서 미세유동화된 것을 제외하고, QG807과 비교적 유사한 조성물을 공유하는 QG911을 제조하였다. QG911의 최종 Z-평균 입자 직경이 87nm였으며, 이것은 QG807보다 대략 17% 더 적다(Z-평균 = 105nm).

[0624] 입자 크기를 더욱 감소시키기 위하여, 본 발명자들은 QG911보다 오일/계면활성제 비를 절반으로 하는 QG912를 제조하였다. 계면활성제의 총량에 비해서 오일의 양을 저감시키는 것은 NLC 입자의 표면적(SA) 대 용적(V) 비를 증가시키고 따라서 입자 크기를 감소시킨다. 이 원리는 도 2A 내지 도 2B에서 실험적으로 확인된다 - 상이한 오일/계면활성제 비를 갖는 NLC는 30,000 psi에서 10회 통과에 대해서 미세유동화되었다. QG912의 더 낮은 오일/계면활성제 비는 Z-평균 직경을 63nm로 저감시키는 것을 도왔다.

[0625] 시험관내 SEAP 발현 데이터(데이터 미제시)는, QG911 및 QG912가 둘 다 QG807보다 더 높은 RNA 부하 용량을 촉진시켰고 - QG911 및 QG912에 대해서 최적의 SEAP 발현이 QG807에 대한 40 μ g/ml와 비교해서 대략 100 μ g/ml의 RNA인 것을 나타내었다. 100 μ g/ml 초과 RNA를 장입하기 위하여, 본 발명자들은 총 NLC 농도를 증가시켰고, QG924(Z-평균 = 110.6nm) 및 QG925(Z-평균 = 58.6nm)를 제조하였다. QG924 및 QG925는 둘 다 각각 QG911 및 QG912와 동일한 오일/계면활성제 비를 공유하지만, 대략 7.4배 더 농축된다. 시험관내 SEAP 발현은, NLC 농도를 7.4배 증가시키는 것이 RNA 부하 용량의 더 한층의 증가를 초래하였고(연구 N1006-214) - QG924에 대한 최적 부하 용량이 대략 200 μ g/ml였고 QG925가 대략 400 μ g/ml 이상인 것을 나타내었다. QG925가 QG924보다 스쿠알렌을 절반으로 그리고 더 작은 평균 입자 크기를 가지므로, 본 발명자들은 스쿠알렌 함량 또는 입자 크기 또는 이들의 조합의 감소가 더 높은 발현을 촉진시키는 것을 가정하였다. 이 가정을 더욱 뒷받침하기 위하여, 본 발명자들은 7.5% w/v의 스쿠알렌(오일/계면활성제 = 1.2) 및 3.75% w/v의 스쿠알렌(오일/계면활성제 = 0.6)을 각각 지니는 QG941 및 QG942를 제조하였다. QG924, QG925, QG941 및 QG942를 가진 생체내 SEAP 발현 실험은 오일/계면

활성제의 감소가 1 μ g RNA 용량에서의 발현의 증가와 상관 관계가 있는 것을 나타내었다.

[0626]

실시에 12. 다양한 SPAN에 의한 전혈 검정

재료:

명칭	설명	유형
QG752	4.75%스쿠알렌, 0.25% Dynasan 114, 0.5% Span 85, 2% Tween 80	나노구조 지질 담체
QG766	5%스쿠알렌, 0.4% DOTAP, 0.5% Span 85, 2% Tween 80	에멀션
QG767	4.75%스쿠알렌, 0.25% Dynasan 114, 0.4% DOTAP, 0.5% Span 80, 2% Tween 80	나노구조 지질 담체
QG863	4.05% w/v스쿠알렌, 0.25% w/v Dynasan 114, 0.43% w/v DOTAP, 0.5% w/v span 60, 2% tween 80	나노구조 지질 담체
QG868	5%스쿠알렌, 0.4% DOTAP, 0.5% Span 60, 2% Tween 80 SLN	에멀션
QG983	4.05% w/v스쿠알렌, 0.25% w/v dynasan 114, 0.4% w/v DOTAP, 0.5% w/v span 65, 2% w/v tween 80	나노구조 지질 담체
QG984	4.05% w/v스쿠알렌, 0.25% w/v dynasan 114, 0.4% w/v DOTAP, 0.5% w/v span 40, 2% w/v tween 80	나노구조 지질 담체
QG985	4.05% w/v스쿠알렌, 0.25% w/v dynasan 114, 0.4% w/v DOTAP, 0.5% w/v span 20, 2% w/v tween 80	나노구조 지질 담체
QG986	4.05% w/v스쿠알렌, 0.4% w/v DOTAP, 0.5% w/v span 80, 2% w/v Tween 80	에멀션
QG987	4.05% w/v스쿠알렌, 0.4% w/v DOTAP, 0.5% w/v span 65, 2% w/v Tween 80	에멀션
QG988	4.05% w/v스쿠알렌, 0.4% w/v DOTAP, 0.5% w/v span 40, 2% w/v tween 80	에멀션
QG989	4.05% w/v스쿠알렌, 0.4% DOTAP, 0.5% span 20, 2% tween 80	에멀션

[0627]

[0628]

제형을 관류-등급 식염수로 1:10 희석시켰다. 50 μ l \times 16의 각 희석액을 96-웰 U자형-바닥 조직-등급 배양 플레이트에 평판 배양하였다. 8명의 공여자로부터의 200 μ l의 해파린화된 전혈을 두 벌로 각 제형에 첨가하였다. 37 $^{\circ}$ C-CO₂에서 24시간 동안 인큐베이팅한 후에, 혈장 상청액을 제거하고 IL-6, IL-8(CXCL8), MCP-1(CCL2) 및 Mip-1b(CCL4)에 대해서 검정하였다.

[0629]

span 60(솔비탄 모노스테아레이트)- QG863 -을 함유하는 NLC 제형은 QG983(Span 65를 가진 NLC) 및 QG987(Span 65를 가진 CNE)(p < 0.0001; 일원분산분석 및 터키의 다중 비교 시험) 이외에 모든 군보다 유의하게 더 높은 케모카인을 유도한다. Span 65는 Span 60의 트리아세틸화된 버전인 솔비탄 트라이스테아레이트이다. 그 결과는 완전 포화된 C18 아실 사슬(스테아레이트기)을 함유하는 솔비탄 에스터, 구체적으로는 NLC 조성물 중의 모노아실화된 버전(Span 60)이 다수의 케모카인의 방출을 촉진시키기 위하여 가장 바람직한 것을 시사한다(도 15A 내지 도 15D).

[0630]

실시에 13. 단일 면역화의 평가

[0631]

VEEV 레플리콘 RNA 발현 ZIKV PrM-E는 QG807(1:1 혼합물, RNA 농도 400ng/ μ l)로 제형화되었고, 근육내 경로를 통해서 C57B1/6 마우스(n=5/군)을 면역화시키는데 사용되었다(50 μ l 제형화된 RNA/주사/마우스). 혈청을 주사후 표시된 시점에서 수집하고, PRNT 검정에 의해 ZIKV 중화 역가에 대해서 검정하였다.

[0632]

단일 주사 후에, rvRNA 단독(10 μ g 또는 1 μ g 용량)으로 면역화된 동물은 주사 후 제14일에 피크 역가를 지니며, 이는 그후 감소되고, 제85일에 검출 가능하지 않았다. 이와 대조적으로, QG807 제형화된 rvRNA로 면역화된 동물은 제85일에 측정 가능한 지속적인 역가를 지녔으며, 1 μ g의 rvRNA를 공급받은 동물의 경우에, 제14일에 측정된 역가에 비해서 감소되지 않았다. 유사한 패턴은 RNA의 2회 주사를 받은 동물에서 관찰되었고; (10% 수크로스 중) rvRNA를 단독으로 공급받은 동물은 역가의 부스트를 나타내었는데, 이는 제42일에 피크였고, 제120일에 검출 불가능한 수준으로 감소되었다. 이와 대조적으로, QG807 제형화된 rvRNA를 공급받은 동물은 제42일에 관찰된 것과 비교해서 지속적인 역가를 지녔다(도 18A 내지 B).

[0633]

실시에 14. CD8 T-세포 유도

[0634]

마우스를 근육내 경로를 통해서 QG807 제형화된 VEEV-TC83 RNA 발현 ZIKV PrM-E 백신으로 2회(D0,D28) 면역화시켰다. 마우스(n=3/군)를 부스팅 후 제14일 또는 제49일에 안락사시키고, 유동 세포분석법을 이용해서 비장세포를 ZIKV-특이적 CD8⁺ T-세포에 대해서 염색하였다. 인터페론 γ (IFN γ +) 또는 CD 107을 발현하는 B220⁺CD8⁺ T-세포의 유도는 rvRNA가 주사된 모든 동물에서 부스팅 후 제14일에 관찰되었다. 제49일에, QG807 제형화된 RNA

로 면역화된 동물은 RNA-단독 면역화에 비해서 CD8+ T-세포의 상당히 높은 수준을 가졌다. (**** p<0.0001, 일원분산분석, 도 19A 내지 B).

[0635] 실시예 15. 저-용량 RNA 보호

[0636] C57B1/6 마우스는 ZIKV-PrM-E를 발현하는 복제 (rvRNA)로 면역화되었다. RNA를 표시된 용량에서 10% 수크로스에 또는 QG942와 조합하여 주사하였다. 주사후 28일에, 말초 혈청을 ZIKV 중화 항체 역가에 대해서 검정하고, 비장 세포를 재자극 후에 항원 특이적 CD8+ T-세포의 존재에 대해서 검정하였다. 제형 의존적인 역가의 유의한 증가가 100ng의 RNA(일원분산분석)에서 관찰될 수 있었고; 제형화된 RNA는 동일 용량에서 RNA 단독보다 유의하게 더 높은 중화 항체 및 CD8+ T-세포 역가를 유도하였다. 모의 면역화된 대조 동물에 대한 유의한 증가는 또한 30ng의 RNA에서 관찰될 수 있었다. 항체의 유도는 또한 10ng에서 관찰되었지만, 이들은 대조군에 비해서 유의하지 않았다(도 20A 내지 B).

[0637] 실시예 16. 항체 전달

[0638] 레플리콘 골격의 항체 전달 클론을 프로모터의 하류에서 항체 서열의 삽입에 의해 생성하였다. IgVH 및 IgVL 가변 영역 및 불변 영역을 2A 서열 또는 내부 리보솜 도입 부위(IRES)에 의해 분리될 수 있다. 항체 중쇄 및 경쇄를 함유하는 케핑된 RNA의 형질주입은 기능적 결합 항체를 초래하였다. 이들 농도는 10 μ g와 100 μ g 간의 RNA 용량/웰에서 관찰되었다.

[0639] 시험관내 항체의 검출 후에, 마우스의 실험을 수행하였다. 간략히 요약하면, IgVH 유전자와 IgVL 유전자가 IRES에 의해 분리된 항체 작제물을 N:P 비 15에서 QG942와 복합체화하였다. 5 μ g 또는 50 μ g의 용량이 100 μ L의 총 용적에서 근육내 주사를 통해서 주사하였다(50 μ L/다리). 혈청은 주사후 7일에 수거하고, 정량적인 ELISA를 이용해서 항원 특이적 항체에 대해서 검정되었다. 50 μ g의 QG942 제형화된 rvRNA의 주사는, 5 μ g의 네이키드 RNA의 주사보다 더 큰 항체 역가를 초래하였다.

[0640] 실시예 17: 중화 항체 및 CD4+ T-세포 유도

[0641] 프로토타입 NLC 제형인 QG807와 조합된 ID91 레플리콘(도 29)은 마이코박테륨 투베르쿨로시스(mtb) H37Rv의 저용량 에어로졸이 부여된 마우스에서의 ID91+GLA-SE 소단위 백신과 비교되었다. C57BL/6 마우스(n=3/군)의 코호트는, 알파 바이러스 골격 및 QG807 상의 1 μ g ID91-RNA의 백신 또는 0.5 μ g ID91 단백질 및 5 μ g GLA-SE의 백신 중 하나로 3주 간격으로 2회 i.m. 면역화되었다(초회감작/부스팅). 비장세포를 최종 면역화 후 2주에 단리시키고 하나의 전체 96 웰 플레이트에 대해서 배지 단독, ID91 전체 단백질, 2개의 상이한 ID91 펩타이드-폴딩된 ID91 오버래핑 펩타이드 중 하나, 또는 P + I(합계 = 16)를 사용해서 6시간 동안 시험관내에서 재자극시켰다. 이하의 표 4 참조. 이어서 ICS가 수행되었다.

표 4

[0642]

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	1-1	1-2	1-3	1-1	1-2	1-3	2-1	2-2	2-3	2-1	2-2	2-3
A	배지			펩타이드 풀 #6			배지			펩타이드 풀 #6		
B	P+I			펩타이드 풀 #7			P+I			펩타이드 풀 #7		
C	ID91 단백질			펩타이드 풀 #8			ID91 단백질			펩타이드 풀 #8		
D	펩타이드 풀 #1			펩타이드 풀 #9			펩타이드 풀 #1			펩타이드 풀 #9		
E	펩타이드 풀 #2			펩타이드 풀 #10			펩타이드 풀 #2			펩타이드 풀 #10		
F	펩타이드 풀 #3			펩타이드 풀 #11			펩타이드 풀 #3			펩타이드 풀 #11		
G	펩타이드 풀 #4			펩타이드 풀 #12			펩타이드 풀 #4			펩타이드 풀 #12		
H	펩타이드 풀 #5			펩타이드 풀 #13			펩타이드 풀 #5			펩타이드 풀 #13		

[0643] rvRNA 및 단백질 ID91 백신으로 면역화된 마우스는 CD8+ 또는 CD4+ T 세포 반응을 유도하였다(도 30A 내지 B, 31A 내지 D 및 32A 내지 D). 차등적인 우세한 ID91 에피토프의 인식에 의한 강인한 항원 발현은, ID91 단백질/GLA-SE 아류반트 또는 ID91 rvRNA에 의한 면역화에 따라서 입증되었다. 상기 문헌 참조. ID91 단백질/GLA-SE 백신에 대해서, 두 CD4 에피토프 및 CD8 에피토프가 식별되었다. 펩타이드 풀 번호 2, 4, 10, 12 및 13은 ID91 단백질/GLA-SE 면역화된 C57BL/6 마우스에서 양호한 증식 및 사이토카인-생산 CD4+ T 세포를 유도하였다. 한편, 펩타이드 풀 번호 3, 4, 10, 11 및 12는 ID91 단백질/GLA-SE 면역화된 C57BL/6 마우스에서 양호한 증식 및 사

이토카인-생산 CD8⁺ T 세포를 유도하였다. ID91 소단위 Rv3478은 CD4 및 CD8 T 세포 둘 다에 대해서 우세한 에피토프를 함유할 수 있다. ID91 RNA + QG807 백신은 CD4 에피토프보다는 오히려 CD8 에피토프를 주로 생성하였다. 펩타이드 풀 번호 8, 9, 10, 12, 13은 ID91 RNA + QG807 면역화된 C57BL/6 마우스에서 양호한 증식 및 사이토카인-생산 CD8⁺ T 세포를 유도하였다. ID91 소단위 Rv1886은 CD8⁺ T 세포에 대해서 가장 우세한 에피토프를 함유한다.

[0644] 표 5는 8개의 아미노산 서열이 오버래핑된 15량체의 ID91의 에피토프 매핑을 도시한다(각각 서열번호 19 내지 133의 에피토프).

표 5

(서열번호에 대해서는 표 1 참조).

1	HMTINYQFGDVDAHG	51	AMYGYAATAAT ATEA	101	LSANRAVKPTGSAA I
2	FGDVDAHGAMIRAQA	52	TAATATEALLPFE DA	102	KPTGSAAIGLSMAG S
3	GAMIRAQAGSLEAEH	53	ALLPFEDAPLITNP G	103	IGLSMAGSSAMILA A
4	AGSLEAEHQAIISDV	54	APLITNPGGLLEQ AV	104	SSAMILAAYHPQQFI
5	HQAIISDVLTAADF	55	GGLLEQAVAVEE AID	105	AYHPQQFIYAGSL S
6	VLTAADFVGGAGSAA	56	VAVEEAIDTAAA NQL	106	IYAGSLSALLDPSQ G
7	WGGAGSAACQGFITQ	57	DTAAANQLMNN VPQA	107	ALLDPSQGMGPSLI G

[0645]

8	ACQGFITQLGRNFQV	58	LMNNVPQALQQL AQP	108	GMGPSLIGLAMGDA G
9	QLGRNFQVIYEQANA	59	ALQQLAQPAQGV VPS	109	GLAMGDAGGYKAA DM
10	VIYEQANAHGQKVQA	60	PAQGVVPSSKLG GLW	110	GGYKAADMWGPSS DP
11	AHGQKVQAAGNNMAQ	61	SSKLGGLWTAVS PHL	111	MWGPSSDPAWERN DP
12	AAGNNMAQTDSAVGS	62	WTAVSPHLSPLSN VS	112	PAWERNDPTQQIPK L
13	QTDSAVGSSWADDID	63	LSPLSNVSSIANN HM	113	PTQQIPKLVANNTR L
14	SSWADDIDWDIAQC	64	SSIANNHMSMMG TGV	114	LVANNTRLWVYCG NG
15	DWDIAQCESGGNWA	65	MSMMGTGVSMT NTLH	115	LWVYCGNGTPNEL GG
16	CESGGNWAANTGNGL	66	VSMTNTLHSMK GLA	116	GTPNELGGANIPAEF
17	AANTGNGLYGGLQIS	67	HSMLKGLAPAAA QAVE	117	GANIPAEFLENFVRS
18	LYGGLQISQATWDSN	68	PAAAQAVETAEE NGV	118	FLENFVRSSNLKFQ D
19	SQATWDSNGGVGSPA	69	ETAAENGWAMS SLG	119	SSNLKFQDAYNAAG G
20	NGGVGSPAAASPQQQ	70	VWAMSSLGSQLG SSL	120	DAYNAAGGHNAVF NF
21	AAASPQQQIEVADNI	71	GSQLGSSLGSSGL GA	121	GHNAVFNFPPNGTH S
22	QIEVADNIMKTQGP	72	LGSSGLGAGVAA NLG	122	FPPNGTHSWEYWG AQ
23	IMKTQPGAWPKCSS	73	AGVAANLGRAAS VGS	123	SWEYWGAQLNAM KGD
24	GAWPKCSSCSQGDAP	74	GRAASVGSLSVPP AW	124	QLNAMKGDQLSSL GA
25	SCSQGDAPLGLSLTHI	75	SLSVPPAWAAAN QAV	125	AMKGDQLSSLGAG KL
26	PLGSLTHILTFLEAE	76	WAAANQAVTPA ARAL		
27	ILTFLEAETGGCSGS	77	VTAPAARALPLTSL TS		
28	ETGGCSGSRDDVVDF	78	LPLTSLTSAAQTA PG		
29	SRDDVVDFGALPPEI	79	SAAQTAPGHMLG GLP		
30	FGALPPEINSARMYA	80	GHMLGGLPLGHS VNA		
31	INSARMYAGPGSASL	81	PLGHSVNAGSGIN NA		
32	AGPGSASLVAAAKMW	82	AGSGINNALRVPA RA		
33	LVAAAKMWDSVASDL	83	ALRVPARAYAIPR		

[0646]

			TP		
34	WDSVASDLFSAASAF	84	AYAIPRTPAAGFS RP		
35	LFSAAAFQSVVWGL	85	PAAGFSRPLPVE YL		
36	FQSVVWGLTVGSWIG	86	PGLPVEYLQVPSP SM		
37	LTVGSWIGSSAGLMA	87	LQVPSPMGRDIK VQ		
38	GSSAGLMAAAASPYV	88	MGRDIKVQFQSG GNN		
39	AAAASPYVAWMSVTA	89	QFQSGGNNSPAV YLL		
40	VAWMSVTAGQAQLTA	90	NSPAVYLLDGLR AQD		
41	AGQAQLTAAQVRVAA	91	LDGLRAQDDYNG WDI		
42	AAQVRVAAAAYETAY	92	DDYNGWDINTPA FEW		
43	AAAYETAYRLTVPPP	93	INTPAFEWYYQSG LS		
44	YRLTVPPPVIENRT	94	WYYQSGLSIVMP VGG		
45	PVIAENRTEMLTLTA	95	SIVMPVGGQSSFY SD		
46	TEMLTLTATNLLGQN	96	GQSSFYSDWYSP ACG		
47	ATNLLGQNTPAIEAN	97	DWYSPACGKAGC QTY		
48	NTPAIEANQAAYSQM	98	GKAGCQTYKWET FLT		
49	NQAAYSQMWGQDAEA	99	YKWETFLTSELPQ WL		
50	MWGQDAEAMYGYAA T	10 0	TSELPQWLSANR AVK		

[0647]

[0648]

암컷 C57BL/6 마우스(n=4/군)의 코호트를 식염수, ID91+GLA-SE 또는 ID91-RNA 백신으로 1회 i.m. 경로에 의해 면역화시키고, 세포 표현형의 평가를 위하여 3주 후에 비장을 수거하였다. 그 결과는 CD4+/CD44+의 백분율, 또는 IFN γ , IL-2 및 TNF α 를 발현하는 CD8+ T 세포의 백분율로서 표현된다(도 33 A). p<0.05의 통계학적 유의성은 이원분산분석을 이용해서 분석하였고, 별표로 묘사되어 있다. 1회의 면역화 후에, ID91+GLA-SE(단백질) 백신은 IFN α , TNF 및 IL-2의 유도를 특징으로 하는 TH1 CD4 T 세포 반응을 유도한 반면, ID91-RNA 백신은 유의한 CD4+ IL-2 반응을 유도할 수 있었다. 어떠한 백신도 이 실험에서 1회의 면역화 후에 유의한 CD8+ T 세포 반응을 일으키지 않았다.

[0649]

Mtb H37Rv에 대한 효능은 또한 생체내에서 입증되었다. 암컷 C57BL/6 마우스(n=7/군)의 코호트는 Mtb H37Rv로 시험감염되기 3주 전에, 1 μ g의 ID91+GLA-SE, 알파 바이러스 골격 상의 ID91-RNA 작제물, 또는 식염수로 한번 면역화시켰다. 박테리아 부하는 Mtb H37Rv로 시험감염 후 3주에 폐 호모제네이트로부터 평가하였다(도 33B). 그 결과는 3주 시험감염 후 3주에 마우스의 폐 내에서 Log 10 박테리아 계수치(집락 형성 단위: CFU)를 나타낸다. 식염수와 비교한 p<0.05의 유의성은 던넛 다중 비교 시험에 의한 일원분산분석을 이용해서 분석하고 별표로 묘사되어 있다. ID91+GLA-SE 및 ID91-RNA 백신은 둘 다, 감염 후 3주에 폐 내에서 박테리아 부하의 감소로 측정된 바와 같이 Mtb H37Rv에 의한 감염에 대해서 1회 면역화 후에 유효하였다.

[0650]

실시예 18. 핵산 수용체의 NLC 제형화된 리간드에 의한 시험관내 자극

[0651]

바이러스 유전 물질을 모방하도록 조작된 핵산 작용제는 강력한 선천적인 면역 자극제이며, 암 및 감염성 질환에 대한 TH1-편향된 적응 면역 반응을 촉진시킬 수 있다. 문헌[Temizoz et al., Curr Opin Pharmacol 41: 104-113 (2018); Iurescia et al., Front Immunol 9:711 (2018); Reed et al., Nat Med 19(12): 1597-608 (2013)]. 구조 및 위치에 따라서, 핵산 작용제는 엔도솜(TLR3, TLR7/8, TLR9) 또는 사이토솔(RLR, STING-I) 센서 중 하나와 결합하여 인터페론 및 기타 화학주성 사이토카인 생산을 자극시킨다. TLR3 및 RIG-I 센서는 또한 MHC I 단백질에 대한 항원의 교차-제시를 촉진시키는 것으로 알려져 있고, 따라서 항원-특이적 세포독성 T 림프구(CTL)를 형성하도록 숙성된 CD8+ T 세포를 활성화시킨다. 문헌[Jelinek et al., J Immunol 186(4):2422-9 (2011); Hochheiser et al., J Immunol 196(6):2439-43 (2016); Schmidt et al., Front Immunol 9:898 (2018)] 참조. 여기서 본 발명자들은, 나노구조 지질 담체(NLC)로 제형화된 TLR3(dsRNA) 및 RIG-I(5' 단부에서 트라이포스페이트에 의한 dsRNA) 작용제가 두 주된, 인간 PBMC-유래 수지상 세포, 및 모노-mac-6(MM6) 세포주에

서 네이키드 작용제에 대해서 시험관내 케모카인 유도를 유의하게 증대시키는 것을 입증하였다.

[0652] **재료:** 폴리(I:C):HMW는 TLR3 및 RIG-I/MDA5 경로를 활성화시킬 수 있는 합성 dsRNA 유사체이고, Invivogen으로부터 구입되었다. RIBOXXOL은 Riboxx GmbH로부터 구입한 50 bp 합성 TLR3 dsRNA 작용제이다. SEVDI(센다이 바이러스 결함 간섭)는 5'-트라이포스페이트 말단기를 가진 dsRNA RIG-I 작용제이고, 앞서 간행된 프로토콜에 따라서 합성되었다[Martinez-Gil et al., J Virol 87(3): 1290-300 (2013)]. NLC 제형은, Corden Pharma로부터의 DOTAP(N-[1-(2,3-다이올레오일옥시)프로필]-N,N,N-트라이메틸암모늄 클로라이드), Sasol Limited로부터의 Dynasan® 114(글리세릴 트라이미리스테이트), 및 Sigma-Aldrich로부터의, 스쿠알렌, Span® 60(솔비탄 모노스테아레이트), Tween® 80(에톡실화 솔비탄 모노올레에이트) 및 시트르산나트륨 이수화물을 포함하는, 상업적으로 입수 가능한 시약을 이용해서 IDRI에 의해 제조되었다.

[0653] **NLC 제조 방법:** 스쿠알렌, 고체 지질 글리세릴 트라이미리스테이트(Dynasan® 114), 비-이온성 계면활성제 솔비탄 모노스테아레이트(Span® 60) 및 양이온성 지질 DOTAP로 이루어진 오일상을 100ml 비이커에 제조하고 예열된 물 배취에서 60℃로 가열하였다. 10mM 시트르산나트륨 이수화물 및 비이온성 계면활성제 Tween® 80으로 이루어진 수성 상은 별도의 100ml 비이커에서 제조하고 60℃로 평형화시켰다. 고체 성분의 완전한 용해 후, 수성 상을 오일 상에 첨가함으로써 오일 상과 수성 상을 배합하였다. 이상성(biphasic) 혼합물을 고속 실험실 유회제(Silverson Machines, Inc.)와 균질화하여 마이크론-크기의 NLC 액적을 생성하였다. 조질의 NLC 혼합물을 30,000 psi에서 10회의 별개의 통과 동안 M-110P 마이크로유동화기(microfluidizer)(Microfluidics, Corp.)에서 더욱 처리하였다. 동적 광 산란(DLS)에 의해 측정된 바와 같은 최종 입자 크기는 40 내지 50nm(z-평균 직경)였고 다분산지수(PDI)는 0.1 내지 0.2였다. 마세 유동화된 제형은 0.2µm 폴리에터설폰막 시린지 필터로 최종적으로 여과시키고, 2 내지 8℃에서 저장하였다. 예시적인 NLC 제형(QG942)의 물리화학적 특성은 표 6에 제공되어 있다.

표 6

NLC 로트번호	DOTAP [%w/v]	Span 60 [%w/v]	Tween 80 [%w/v]	스쿠알렌[% w/v]	Dynasan 114[%w/v]	Z-평균[nm] (PDI)	제타 전위 [mV]	pH
QG942	3.0	3.7	3.7	3.75	0.25	40.55 (0.20)	28.4±1.27	5.78

[0655] **PBMC-DC 자극 방법:** RNA 아췌반트를 다양한 질소:포스페이트(N:P) 비에서 NLC와 혼합하고 얼음 위에서 30분 동안 인큐베이션에 의해 정전기적으로-연관된 복합체를 형성할 수 있다. 평판 배양된 세포를 다양한 RNA 용량에서 복합체화된 재료로 자극하여, 용량 반응 곡선을 생성하였다. 도 39A 내지 E에서, 6명의 인간 공여자로부터의 PBMC-DC를 NLC("QG942 제형화된") 또는 네이키드("미제형화된")와 제형화된 폴리IC:HMW, RIBOXXOL 또는 SEVDI로 자극하였다. 제형-단독 대조군은 "배지 대조군"이라 표기된다. 37℃ 및 5% CO₂ 분위기에서 24시간 인큐베이션 후에, 상청액을 상업적으로 입수 가능한 ELISA 키트를 사용해서 선천적인 면역 마커의 농도에 대해서 검정하였다. 통계학적 분석은 시다 다중 비교 시험을 이용해서 이원분산분석에 의해 수행하였다. P-값: * p < 0.05, ** p < 0.005, *** p < 0.0005, **** p < 0.0001.

[0656] **MM6 세포에서의 제형 스크린:** RIBOXXOL 및 pIC:HMW를 N:P 15에서 표 7의 예시적인 양이온성 제형으로 복합체화하고, MM6 세포로 하룻밤 인큐베이팅하고 그 후 상청액을 수거하고 IFN α/β에 대해서 검정하였다(도 40). NLC 제형화된 RIBOXXOL로 자극된 MM6 세포는 미자극 대조군에 비해서 20 내지 30배 더 많은 IFN α/β 분비를 유도하였다. NLC 제형화된 RIBOXXOL에 의한 IFN α/β 유도의 상세한 분석은 히트맵에 요약되어 있다(도 41).

표 7

명칭	설명	제조일에 Z-평균 [nm](PDI)
QG942	나노구조 지질 담체	40.55 (0.198)
QG843	Brito 등에 따라서 제조된 양이온성 나노에멀션(CNE)	95.04 (0.092)
QH007	2mg/ml 키토산(Sigma 카탈로그 번호 448877)으로 안정화된 4mg Ca/ml 수산화인회석 나노입자(Sigma-Aldrich 카탈로그 번호 900194)	101.3 (0.164)
QH005	2 mg/ml 키토산(Polysciences 카탈로그 번호 21161)으로 안정화된 4mg Ca/ml 수산화인회석 나노입자(Sigma-Aldrich 카탈로그 번호 900194)	91.8 (0.177)
QH006	2 mg/ml 키토산 (Sigma 카탈로그 번호 448869)으로 안정화된 4mg Ca/ml 수산화인회석 나노입자(Sigma-Aldrich 카탈로그 번호 900194)	77.93 (0.184)

QH008	2 mg/ml 키토산(Sigma 카탈로그 번호 419419)으로 안정화된 4mg Ca/ml 수산화인회석 나노입자(Sigma-Aldrich 카탈로그 번호 900194)	93.69 (0.186)
QH009	인산염 완충제로 처리되고 나서, 1 mg/ml 키토산(Polysciences 카탈로그 번호 21161)으로 안정화된 2mg Al/ml Alhydrogel	294.1 (0.217)
QH142	인산염 완충제로 처리하고 나서, 1 mg/ml 키토산(Sigma 카탈로그 번호 419419)으로 안정화된 2mg Al/ml Alhydrogel	304.8 (0.291)
QH141	인산염 완충제로 처리되고 나서, 1 mg/ml 키토산(Sigma 카탈로그 번호 448877)으로 안정화된 2mg Al/ml Alhydrogel	318.3 (0.288)
QH140	인산염 완충제로 처리되고 나서, 1 mg/ml 키토산(Sigma 카탈로그 번호 448869)으로 안정화된 2mg Al/ml Alhydrogel	347.4 (0.307)
QH115	7.5 mg/ml 폴리아크릴산(Polysciences 카탈로그 번호 06519)으로 안정화된 9mg Al/ml Alhydrogel	72.2 (0.200)
QH011	30 mg/ml 폴리아크릴산(Sigma 카탈로그 번호 53 5931)으로 안정화된 9mg Al/ml Alhydrogel	77.28 (0.144)

[0658] 이중-가닥 RNA(dsRNA) 아유반트는 NLC(WG942)와 제형화함으로써 증대된다. SEAP를 암호화하는 레플리콘 RNA(ssRNA)는 dsRNA(시험된 dsRNA는 톨-유사 수용체 3(TLR3) 리간드, 예컨대, 폴리(IC)(Poly(IC))(Invivogen으로부터의 dsRNA의 합성 1.5 내지 1.8kb 유사체), RIBOXXOL(Riboxx로부터의 50bp 합성 dsRNA), SEVDI(시험관내 전사된 대략 550 bp 센다이 바이러스 결합 간섭 RNA)를 포함) 또는 배지 대조군과 공동-제형화시켜 단백질 발현에 대한 아유반트 자극의 효과를 평가하였다(도 35A 내지 E 및 36A 내지 D).

[0659] dsRNA 아유반트는 HEK293 세포에서 SEAP 발현을 억제시킨 것을 발견하였다. 예컨대, 도 37(SEAP + TLR3 리간드+ NLC를 암호화하는 베네수엘라 말뇌염 바이러스(VEE) 레플리콘(VEErep)) 참조. 또한, 인간 DC에서의 VEErep 번역은 배지 함유 저장된 10% 혈청에서 시험관내 형질주입하여, SEAP 및 IP-10의 증가된 발현을 입증하였다(도 38A 내지 B).

[0660] 실시예 19: 면역원성 반응의 증대

[0661] 아유반트, 예컨대, TLR3 리간드에 대한 면역원성 반응은 또한 안정적인 수중유 에멀션, 예컨대, 스쿠알렌을 포함하는 에멀션과의 제형에 의해, 개별적으로 또는 NLC의 사용에 부가해서 증대될 수 있다. 이하의 실험은 Hiltonol®에 의해 지지된 면역원성 반응에 대한 제형의 영향을 조사한다. Hiltonol®(폴리-ICLC)는 카복시메틸 셀룰로스, 폴리이노신-폴리사이티딜산 이중-가닥 RNA 및 폴리-L-라이신의 합성 복합체이다.

[0662] 표 8에서의 제형군당 5마리의 마우스는 항원-특이적 항체 반응(종점 역가로서 표현됨) 및 비장의 항원-특이적 리콜(recall)(항원에 의한 4일 인큐베이션에 이어서 사이토카인 ELISA에 의해 결정)을 생성하는데 사용되었다. 글루코피라노실 지질 A(GLA)와 관련된 합성 지질-A(synthetic lipid-A: SLA) 유도체는 문헌[Coler et al., PLoS one 6(1):e16333 (2011)]에 이미 기재되어 있었다. SLA는 안정적인 수중유 에멀션(SE)과 배합하여(문헌 [Van Hoven et al., PLoS One. 11(2): e0149610 (2016)] 참조), SLA-SE 함유 스쿠알렌을 형성하였다.

표 8

[0663]

군	F2 단백질	Hiltonol® 용량	제형(혼합물)
1(단백질 제어군)	1 μ g	--	식염수
2(기준선 Hiltonol® 대조군)	1 μ g	10	식염수
3(100 μ g 알루미늄/마우스)	1 μ g	--	nanoAlum 2/PEG
4	1 μ g	10	nanoAlum 2/PEG
5	1 μ g	--	SE
6	1 μ g	10	SE
7(양성 대조군)	1 μ g	--	SLA-SE
8(음성 대조군)	--	--	--

SLA = 합성 지질 A; SE = 안정적인 에멀션; nanoAlum 2/PEG = nAlum PEG200-DSPE.

[0664] 상기 표 8 및 하기 표 10 내지 13의 안정적인 에멀션(SE)은 이하의 표 9의 예시적인 제형을 포함하고 다음과 같이 제조되었다. SE는 다이미리스토일 포스파티딜콜린 및 폴록사머로 유화된 대사가능 오일(스쿠알렌)으로 이루어진다. 에멀션 액적은 직경이 대략 100nm이고 단분산이다. 5x 농축물을 제조하는 것은 면역화 직전에 백신 항원과 혼합하는 것을 허용한다. SE를 제조하기 위하여, 오일상과 수성 상은 개별적으로 제조하였다. 오일상에 대

해서, 0.76g의 다이미리스토일 포스파티딜콜린(DMPC) 분말을 3.4g의 스쿠알렌에 첨가하였다. DMPC 및 오일을 수용하는 병을 DMPC가 오일에 분산될 때까지 70℃로 가열된 초음파 수욕에 배치하였다. 수성 상에 대해서, 제1 인산암모늄, 제1 인산암모늄, 폴록사머 188 및 글리세롤을 초순수에 첨가하고, 초음파처리하여 pH 6.25에서 27mM 암모늄 인산염 완충제, 25 mg/ml 글리세롤 및 0.4 mg/ml 폴록사머 188을 함유하는 수성 상을 제조하였다. 이어서, 오일 상(10 용적%)과 수성 상(90 용적%)을 합하여 (¼ 인치 관형 혼합 조립체 및 정사각형 구멍 고전단 스크린 혼합 헤드를 구비한 Silverson L5M-A를 이용해서) 7,000 내지 10,000 rpm에서 10분 동안 고전단 혼합함으로써 가공 처리해서 조질의 에멀션을 형성하였다. 이어서, 조질의 에멀션을 (예컨대, M-110P Microfluidics® 프로세서를 이용해서) 30,000 psi에서 16회 주기 동안 고압 균질화에 의해 처리하고, 10℃로 설정된 재순환 냉각기에서 수냉시켰다. 최종 제형을 0.2-µm PVDF 막을 통해서 연동 펌프를 통해 일정 흐름하에 여과하고, 바이알에 채웠다. 특성 규명은 가스 크로마토그래피에 의한 스쿠알렌의 정량화, 대전된 에어로졸 검출을 이용하는 FIPLC에 의한 DMPC의 정량화, 동적 광 산란에 의한 입자 크기의 측정, pH의 측정 및 시각적 외관의 평가를 포함하였다. 모든 값은 예상된 범위 내였다. 제형은 주사를 위하여 10% 내지 2%로 희석시켰다.

표 9

성분	농도
수성 상	90.0% v/vol
글리세롤	1.8% v/vol
제1 인산암모늄	23.67mM
제2 인산암모늄	1.296mM
스쿠알렌	10.0% v/vol
폴록사머 188(폴리옥시에틸렌과 폴리옥시프로필렌의 공중합체)	0.09% w/vol
1,2-다이미리스틸-sn-글리세로-3 -포스포콜린(DMPC)	1.9% w/vol

[0665]

마우스를 0.1ml의 총 용적으로 재조합 LEISH-F2 단백질 + 아쥬반트 제형으로 면역화시켰다. 마우스를 주사 간에 3주 간격으로 2회 피하 면역화시켰다. 전체 1 µg/용량 단백질 및 10 µg/용량 Hiltonol®의 꼬리의 기저에 주사하였다. 면역화 후, 혈액을 채혈하고, 혈청을 준비하고, 면역화가 반응을 유도했는지의 여부를 결정하기 위하여 항원-특이적 항체 반응에 대해서 분석하였다. 면역화된 마우스로부터의 혈청을 적정하여, 종점 역가(면역화되지 않은 마우스로부터의 혈청에 의해 결정된 역치를 초과하는 최종 광학 밀도(OD)값)를 구하였다. 항원-특이적 항체 반응은 특이적 항원, 또한 IgG2 및 IgG1 아이소형에 대해서 총 IgG에 대해 분석하여 임의의 면역 편향(IFN γ 가 IgG2a/c 반응을 자극하는 한편 IL-4/5가 IgG1 반응을 자극하는 것을 고려)을 밝혔다(도 45).

[0666]

최종 면역화 후 21일에, 동물을 죽이고, 그의 비장을 제거하였다. 단일 세포 현탁액을 준비하고, 2×10^5 개 세포/웰을 10 mg/ml 재조합 항원(LEISH-F2 항원)과 인큐베이션하여 항원-특이적 리콜 반응을 평가하였다. 4일 후 배양 상청액으로의 사이토카인의 분비는 제조사의 지시(eBioScience)에 따라서 사이토카인 ELISA에 의해 결정하였다. 도 46A 및 도 47A에서 JL-5 참조. T_{helper1} 프로파일은 IFN γ 분비에 의해 특성규명되었다(도 46B 및 도 47B). 또한 도 47C에서 IFN γ + TNFα, 도 47C에서 CD 154+, 도 47E에서 그랜자임(Granzyme) B+를 참조한다.

[0667]

초회감작 후, Hiltonol® 단독과 달리, SE 또는 nanoalum 중 Hiltonol®의 혼합물 제형은 항원-특이적 항체를 유도하였다. 부스팅 후, Hiltonol®/SE는 가장 강한 항원-특이적 IgG2c 반응을 제공하였다. 또한, SE 또는 nanoalum 중 Hiltonol®의 혼합물 제형은 항원-특이적 IFN γ 리콜 반응을 유도하였다.

[0668]

유사한 결과는 항원-특이적 항체 반응(종점 역가로서 표현됨) 및 비장 세포의 항원-특이적 리콜(항원에 의한 4일 인큐베이션에 이어서 사이토카인 ELISA에 의해 결정됨)을 발생시키는데 사용되는 표 13에서의 제형당 7마리의 암컷 마우스로 또 다른 연구에서 입증되었다. (데이터 미제시)

[0669]

표 13

군	F2단백질 (µl)	Hiltonol® 용량(µl)	제형 (µl)	식염수 (µl)
1(양성 대조군)	14	0	0	686
2(기준선 Hiltonol® 대조군)	14	35	0	651
3	14	0	350 Alum	336
4	14	35	350 Alum	301
5	14	0	175 nanoAlum	511

[0670]

6	14	35	175 nanoAlum	476
7	14	0	140 SE	546
8	14	35	140 SE	511
9	14	0	140 SLA-SE	546
10(음성 대조군)	0	0	0	700
• Hiltonol®(10 μ g) 2 mg/ml, Alum = (100 μ g) AL007 2 mg/ml, nanoAlum = (100 μ g) nAlum PEG2000-DSPE 4 mg/ml.				

[0671] C75BL/6 마우스(군당 5마리)를 또한 0.1ml의 총 용적의 제조합 LEISH-F3+ 단백질 + 아췌반트 제형으로 면역화시켰다. 마우스를 표 9의 각종 제형으로 50, 10 또는 2 mg/용량 Hiltonol® 및 총 1 mg/용량 단백질로 마우스의 목의 목덜미에 100 μ l의 주사에 의해 1회 경피로 면역화시켰다.

표 10

군	F3+(NSDC)단백질	Hiltonol® 용량	제형 (혼합물)
1(음성 대조군)	--	--	--
2(단백질 대조군)	1 μ g	--	식염수
3(상위 Hiltonol® 대조군)	1 μ g	50	식염수
4(중위 Hiltonol® 대조군)	1 μ g	10	식염수
5(하위 Hiltonol® 대조군)	1 μ g	2	식염수
6	1 μ g	10	nanoAlum 2, PEG
7	1 μ g	2	nanoAlum 2, PEG
8(제형 대조군)	1 μ g	--	nanoAlum 2, PEG
9	1 μ g	10	SE
10	1 μ g	2	SE
11(제형 대조군)	1 μ g	--	SE

[0673] 면역화 후에, 채혈하고, 혈청을 준비하고, 면역화가 반응을 유도했는지를 결정하기 위하여 항원-특이적 항체 반응에 대해서 분석하였다. 면역화된 마우스로부터의 혈청을 적정하여 종점 역가(면역화되지 않은 마우스로부터 혈청에 의해 결정된 역치보다 더 큰 최종 광학 밀도(OD)값)를 발견하였다. 항원-특이적 항체 반응은 LEISH-F3+ 항원에 대해서 총 IgG에 대해 분석한다(도 48 내지 도 49).

[0674] 초회감작 후, SE 또는 nanoalum 중 Hiltonol®의 혼합물 제형은 Ag Hiltonol® 단독보다 더 큰 항원-특이적 항체 반응을 유도하였으며, SE 중 Hiltonol®의 혼합물 제형은 Hiltonol® 및 Ag/Hiltonol®/nanoalum 중 ag에 비해서 항원-특이적 IFNg 리콜 반응을 증대시켰다. 이 연구는 또한 CD8 T 세포가 Ag/Hiltonol®/SE에 의한 초회감작에 의해 발생할 수 있는 것을 입증하였고, 용량-부족은 25배 초과를 나타내고, SE 중 2 μ g Hiltonol®은 50 μ g 초과 미제형화된 Hiltonol®의 반응을 유도하였다(도 48 내지 도 51).

[0675] 또 다른 연구에 있어서, 면역원성 반응에 대한 항원 백신 전달의 영향을 C75BL/6 마우스에 표 10의 제형의 단일 투여(초회감작)로 조사하였다. 도 50 참조.

표 11

군	F3+(NSDC)단백질	TLR3 작용제	TLR3 작용제 용량(μ g)	제형 (혼합물)
1(음성 대조군)	--	--	--	--
2(단백질 대조군)	1 μ g	--	--	식염수
3	1 μ g	폴리I:C LMW	10	식염수
4	1 μ g	폴리I:C LMW	10	SE
5(폴리I:C HMW 대조군)	1 μ g	폴리I:C HMW	10	식염수
6	1 μ g	폴리I:C HMW	10	SE
7(폴리I:C 저용량)	1 μ g	폴리I:C LMW	2	SE
8(폴리I:C 저용량)	1 μ g	폴리I:C HMW	2	SE
9(제형 대조군)	1 μ g	--	--	SE

[0677] 다른 연구에서, C75BL/6 마우스(군당 5마리, 초회감작 후 면역 반응에 대해서 5마리, 부스팅 후 5마리)에게 표 11의 제형 중 하나를 투여하고 면역원성 반응에 대한 항원 백신 전달의 영향을 조사하였다.

표 12

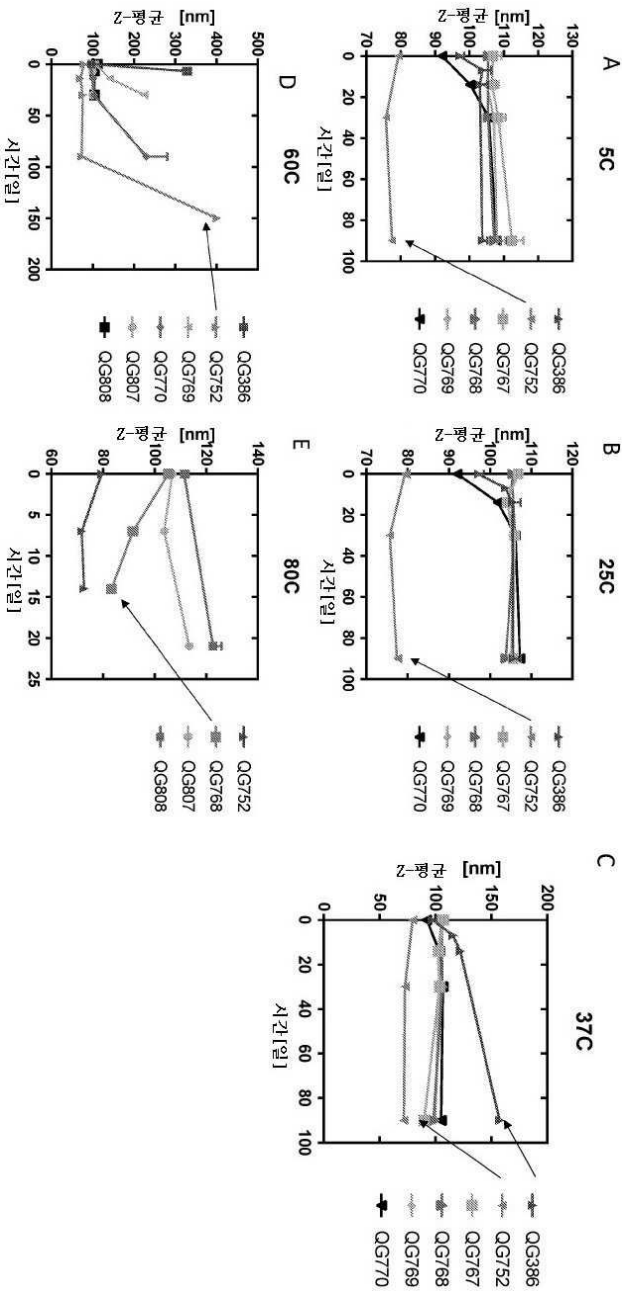
[0678]

군	F3+(NSDC) 단백질	TLR3 작용제	TLR3 작용제 용량(μ g)	제형 (혼합물)
1(음성 대조군)	--	--	--	--
2(단백질 대조군)	1 μ g	--	--	식염수
3(상위 Hiltonol® 대조군)	1 μ g	Hiltonol®	50	식염수
4(중위 Hiltonol® 대조군)	1 μ g	Hiltonol®	10	식염수
5(하위 Hiltonol® 대조군)	1 μ g	Hiltonol®	2	식염수
6	1 μ g	Hiltonol®	10	SE
7	1 μ g	Hiltonol®	2	SE
8(폴리I:C LMW 대조군)	1 μ g	폴리I:C LMW	10	식염수
9	1 μ g	폴리I:C LMW	10	SE
10	1 μ g	폴리I:C LMW	2	SE
11(폴리I:C HMW 대조군)	1 μ g	폴리I:C HMW	10	식염수
12	1 μ g	폴리I:C HMW	10	SE
13	1 μ g	폴리I:C HMW	2	SE
14(제형 대조군)	1 μ g	--	--	SE

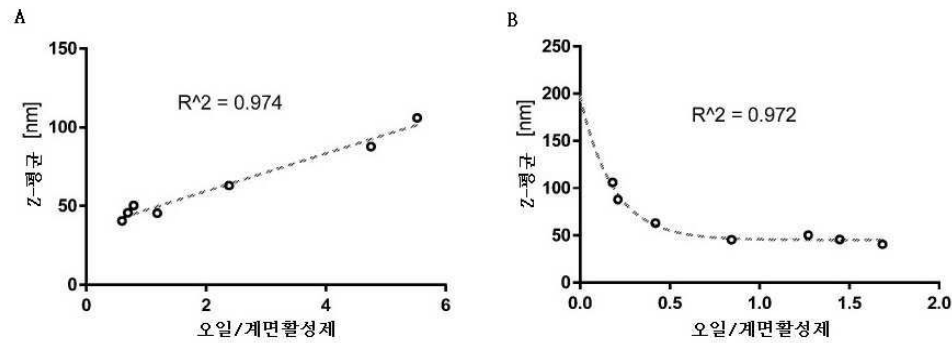
[0679] Hiltonol®의 SE 제형은 항원-특이적 IFN γ 유도에 대해서 용량 부족을 초래하였고, IL-5 반응의 억제를 초래하였다(도 51 내지 52). MHC I-제한된 펩타이드(C+B)에 대한 반응은 관찰되지 않았다(도 52B).

도면

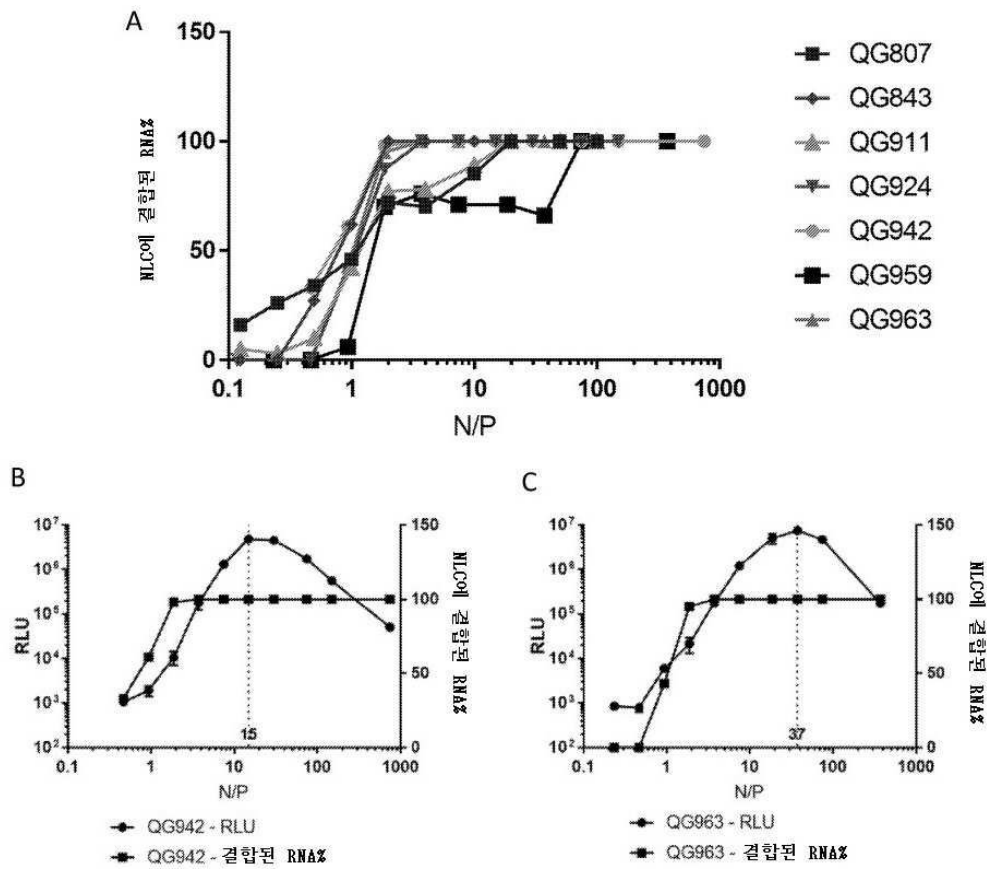
도면1



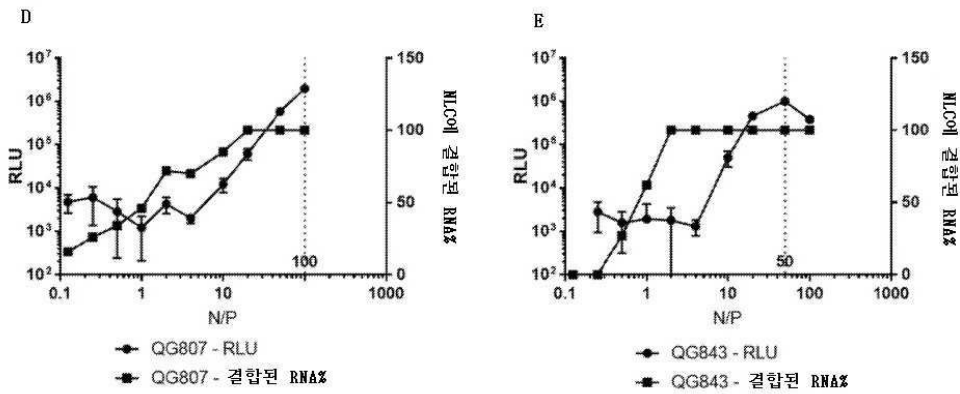
도면2



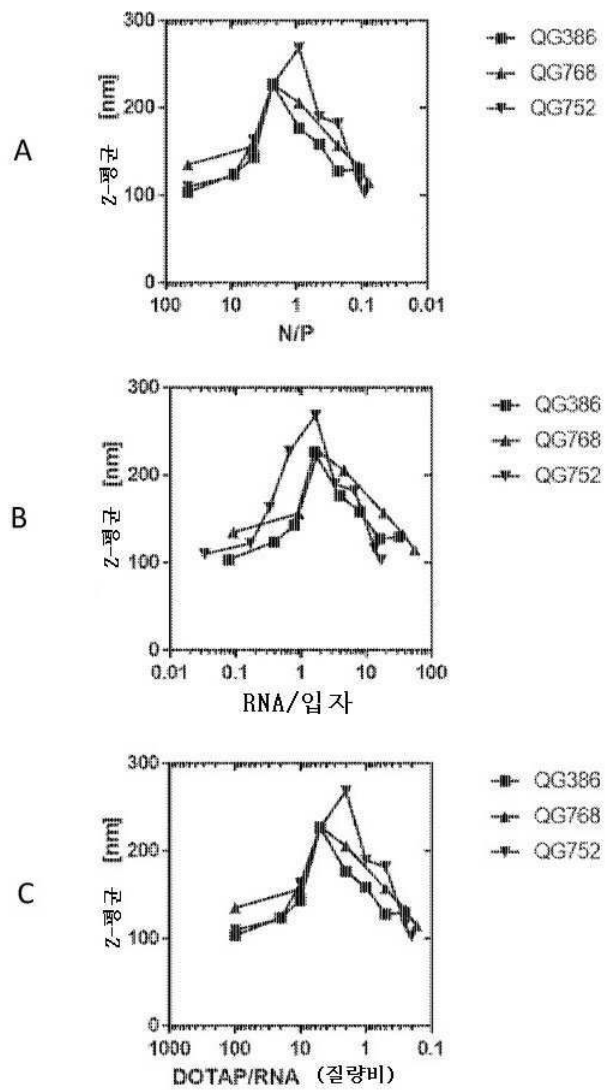
도면3ac



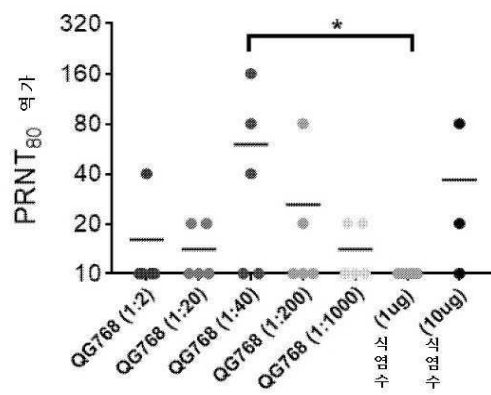
도면3de



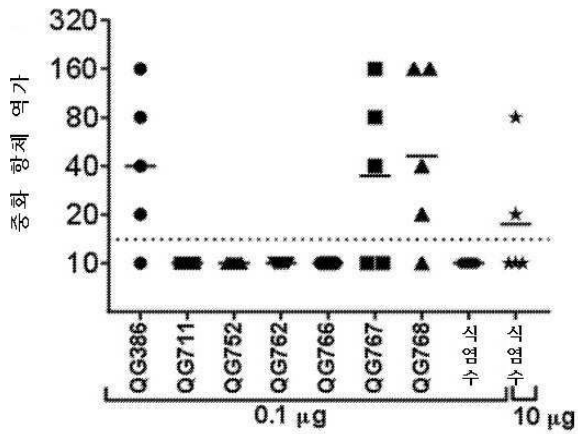
도면4



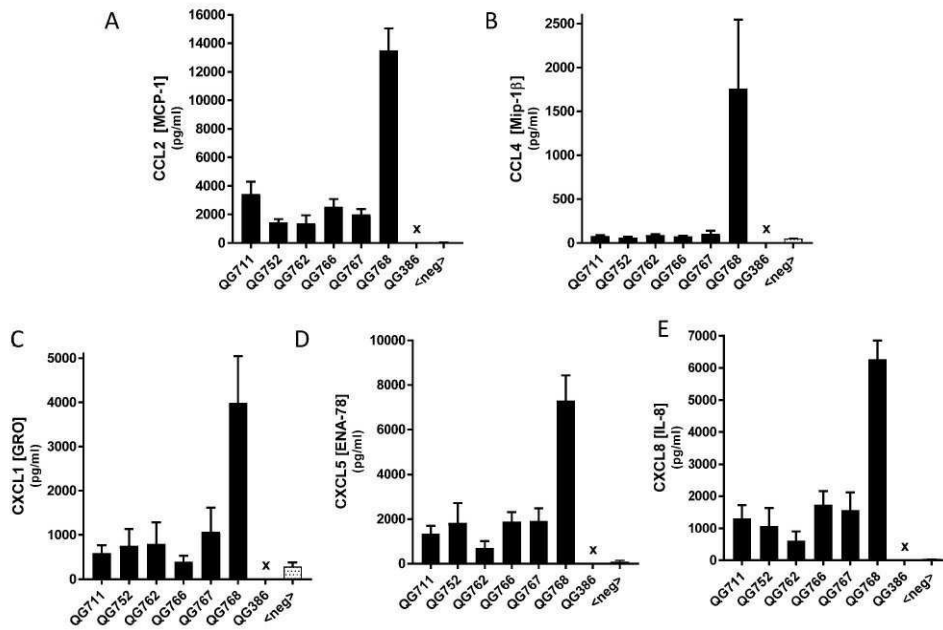
도면5



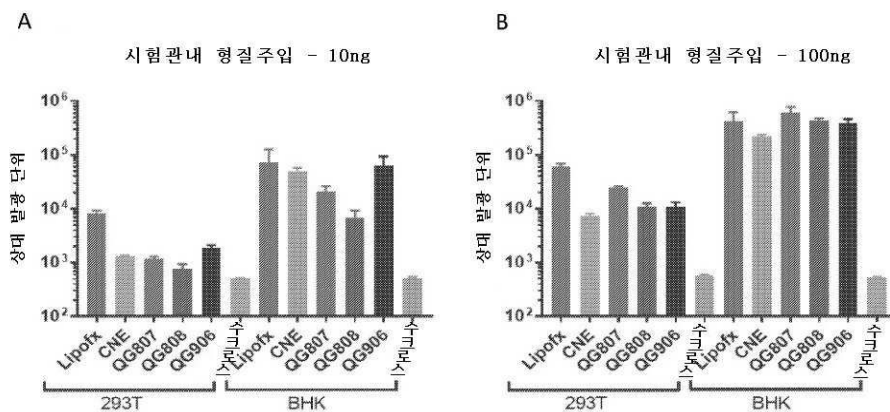
도면6



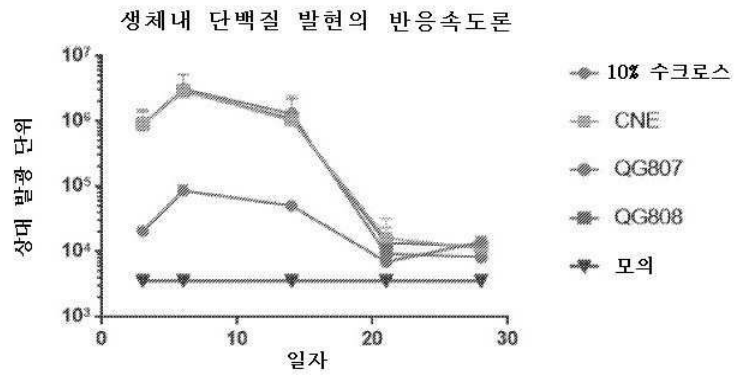
도면7



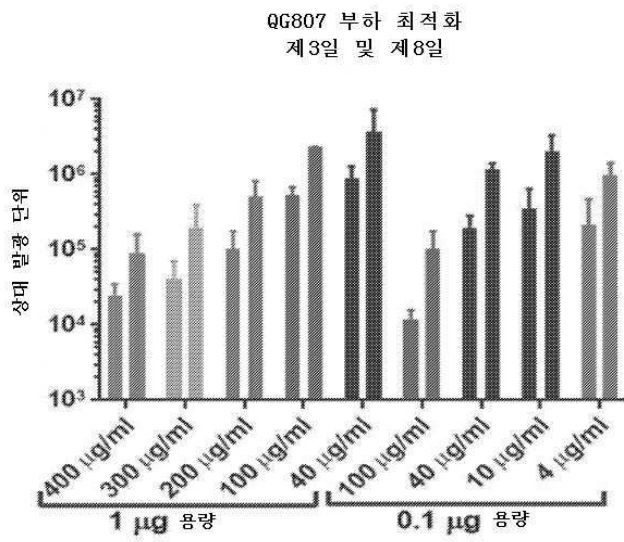
도면8



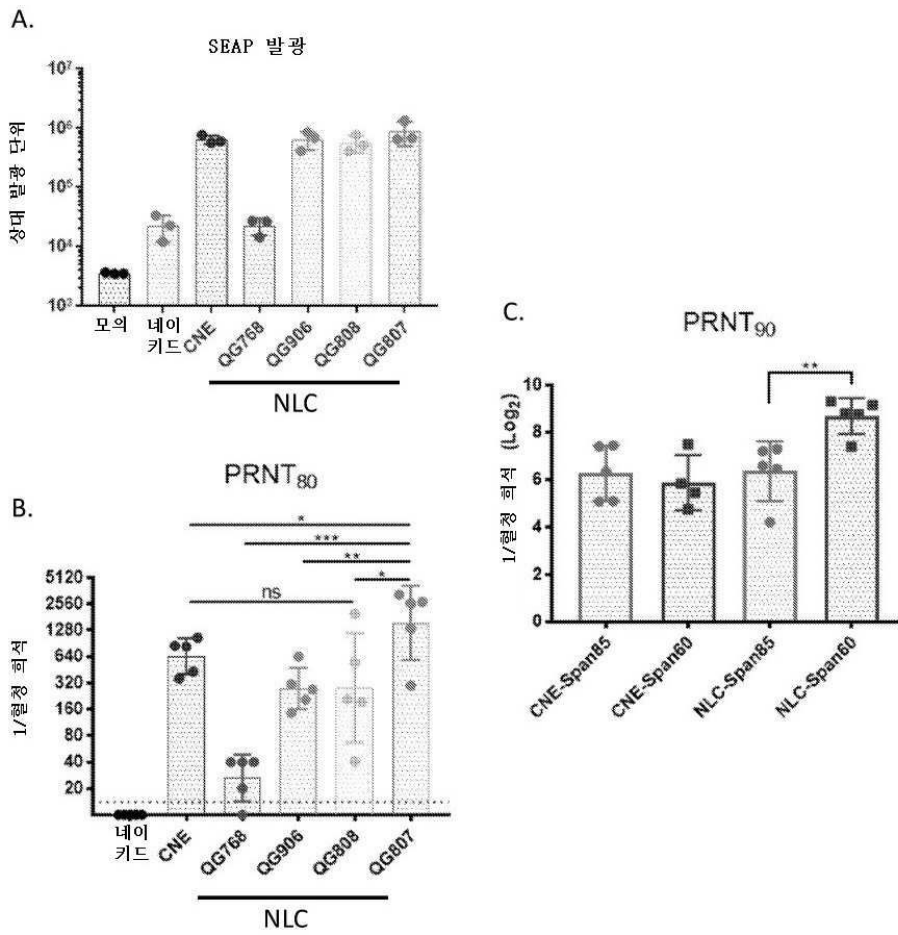
도면9



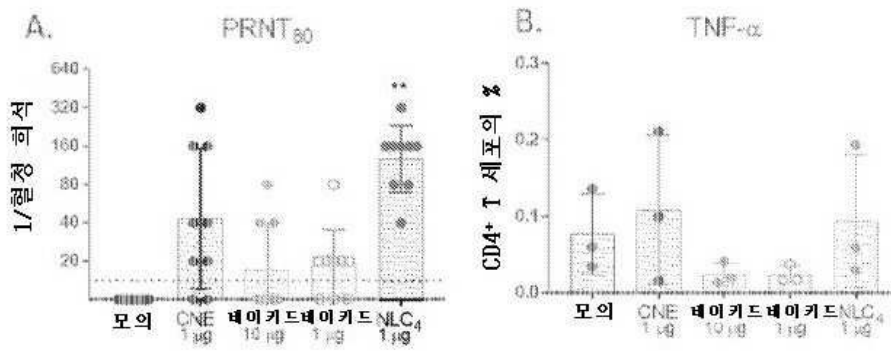
도면10



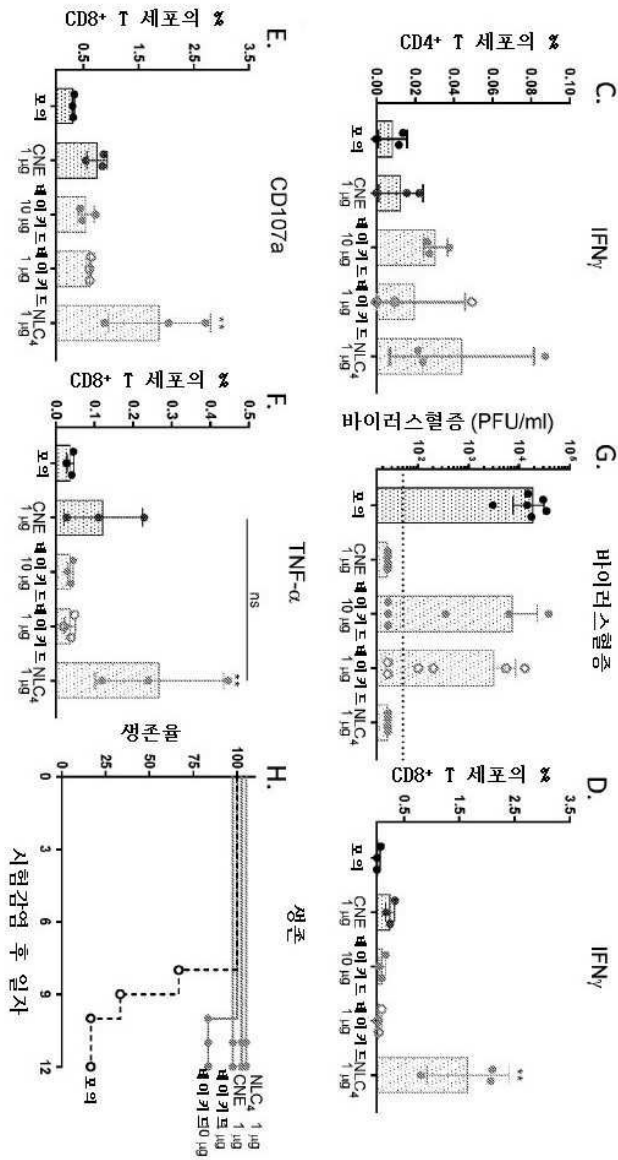
도면11



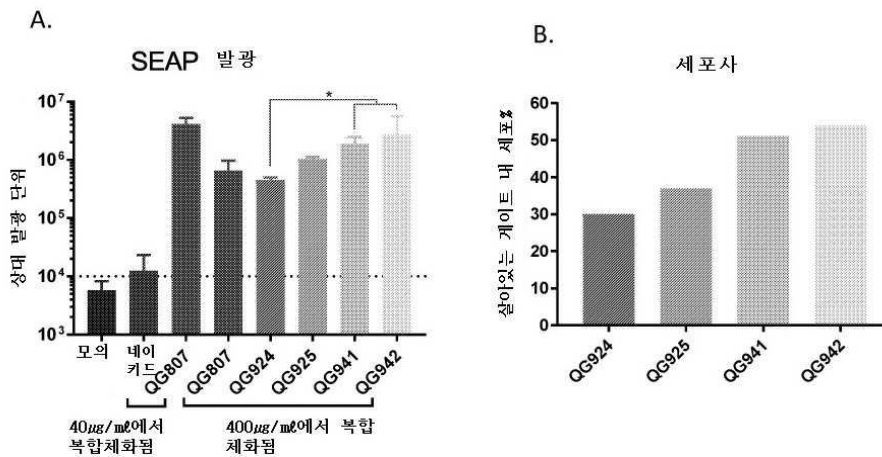
도면12ab



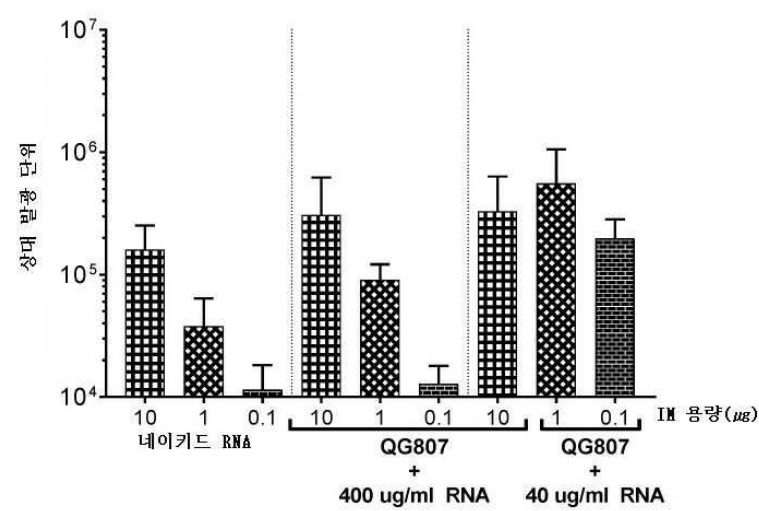
도면12ch



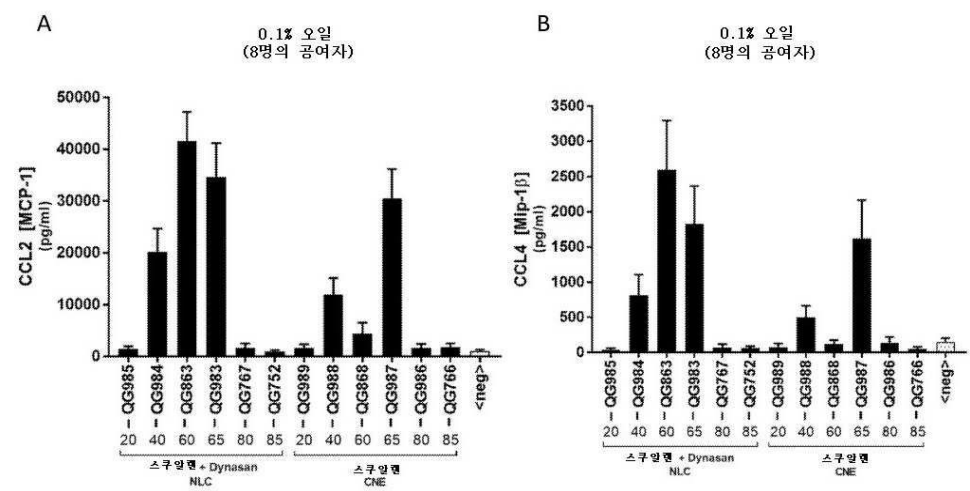
도면13



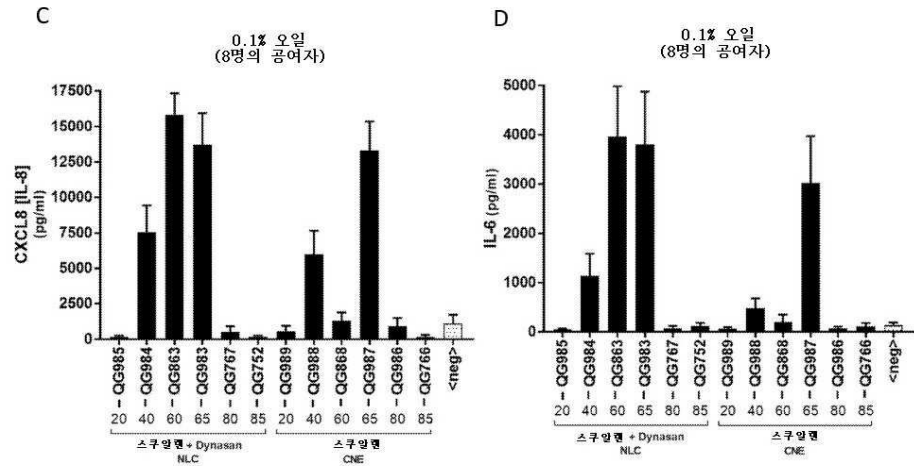
도면14



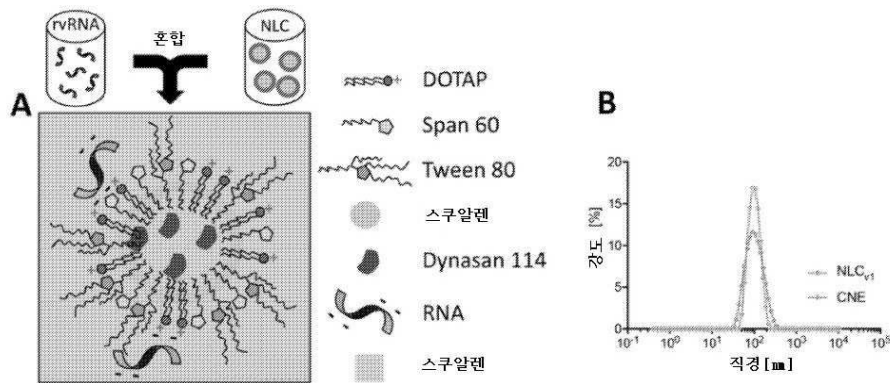
도면15ab



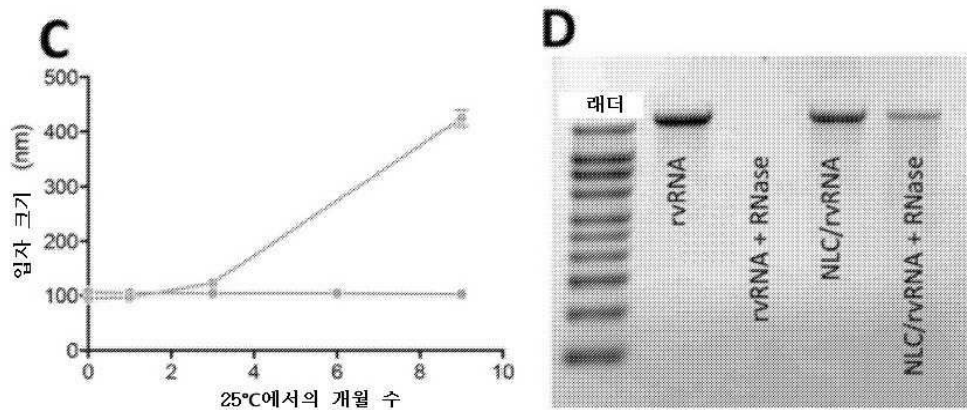
도면15cd



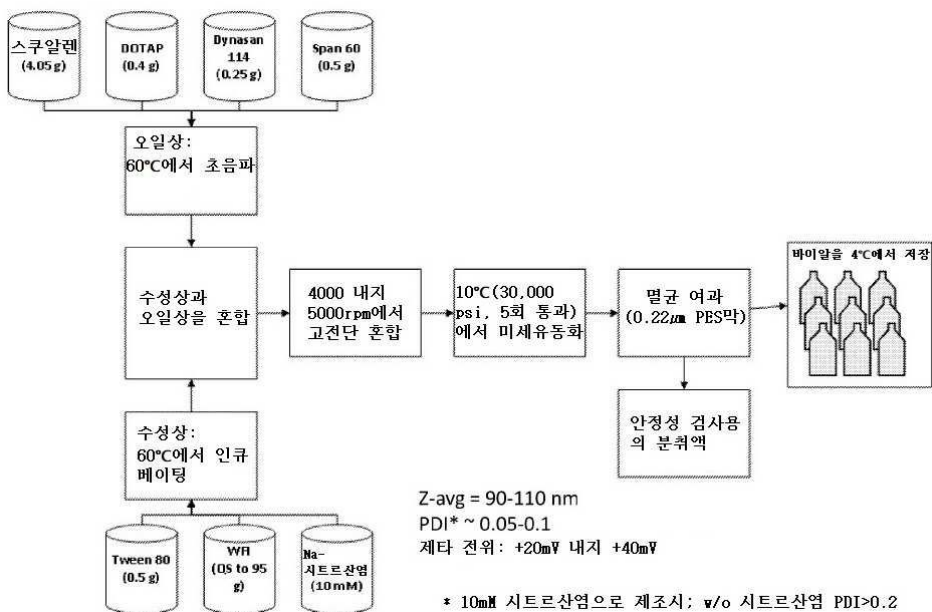
도면16ab



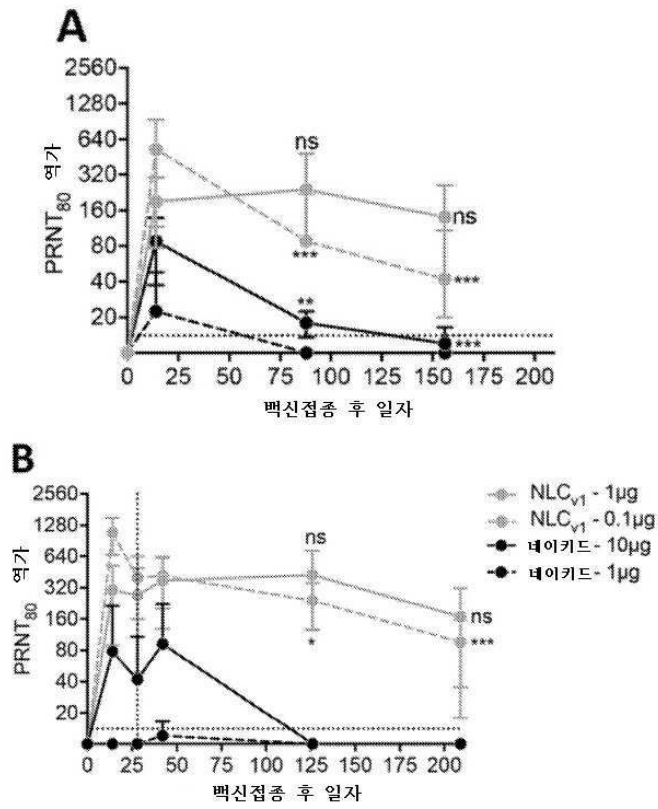
도면16cd



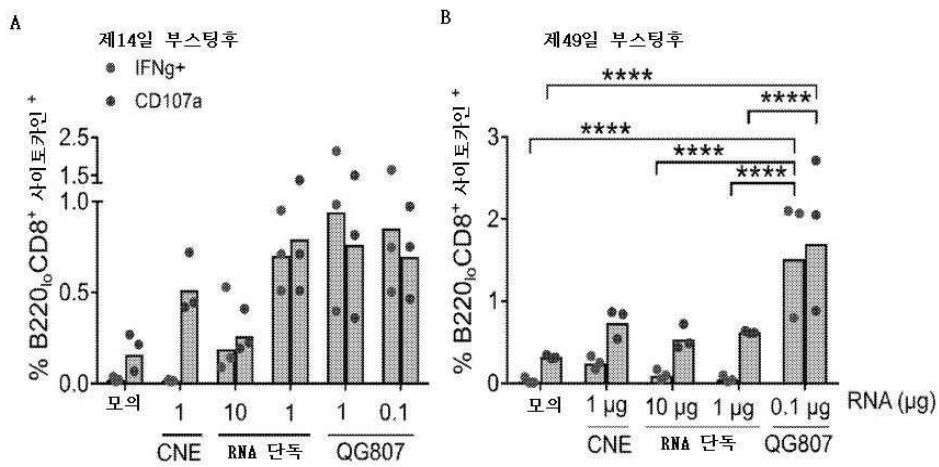
도면17



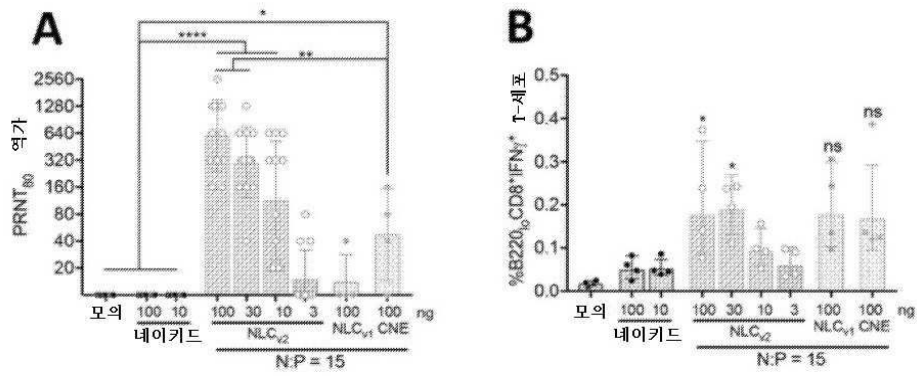
도면18



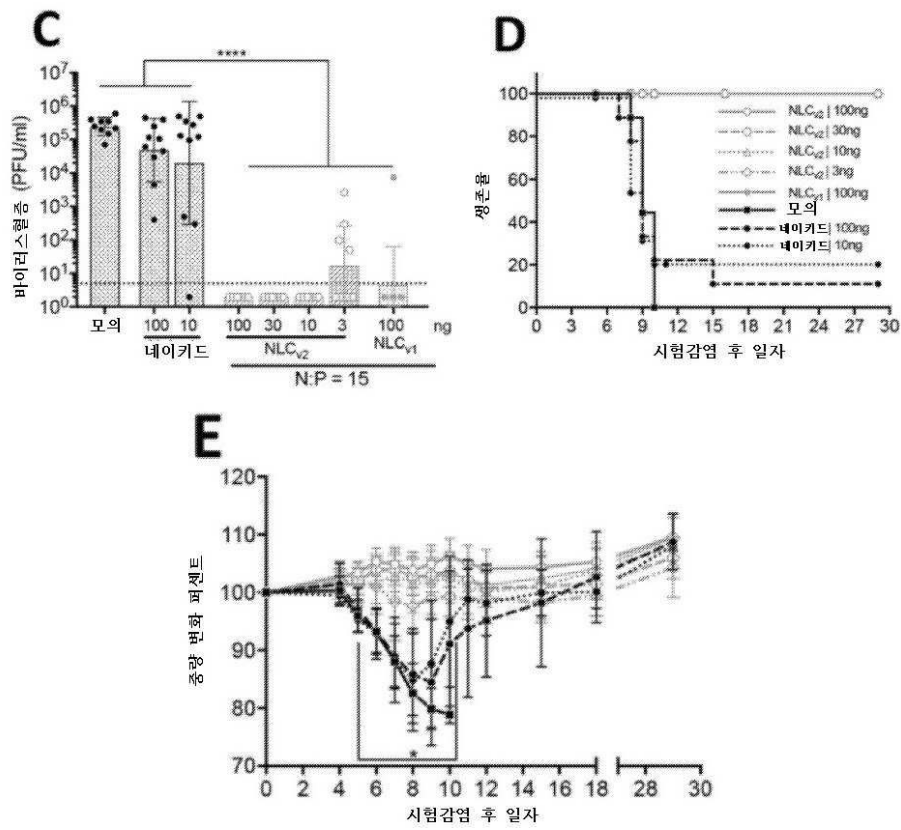
도면19



도면20ab

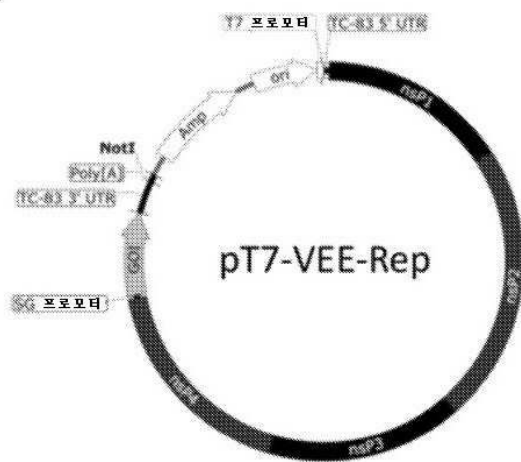


도면20ce

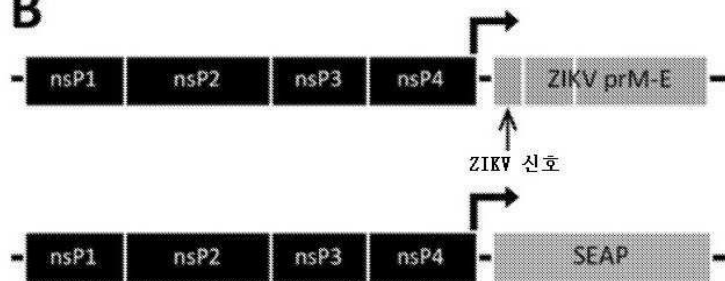


도면21ab

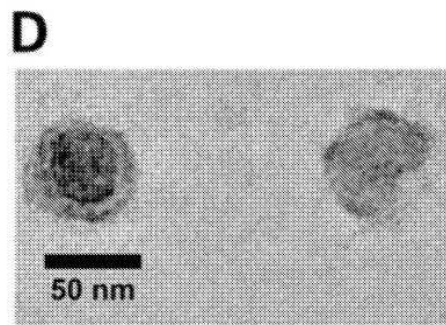
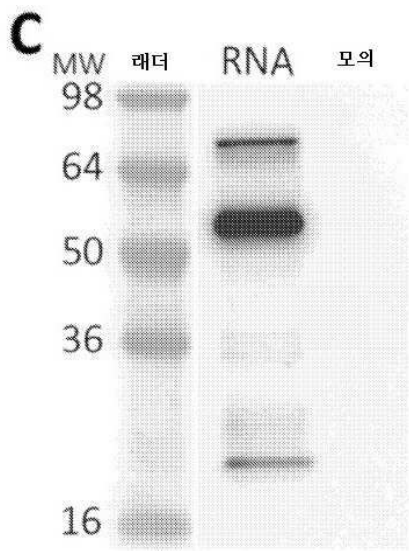
A



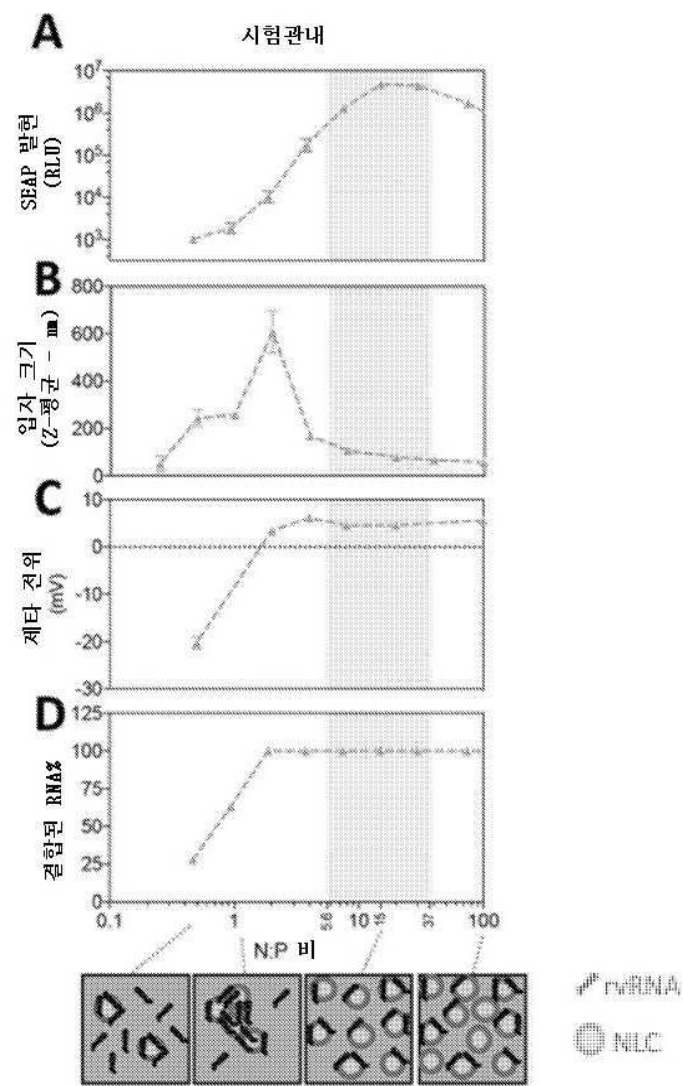
B



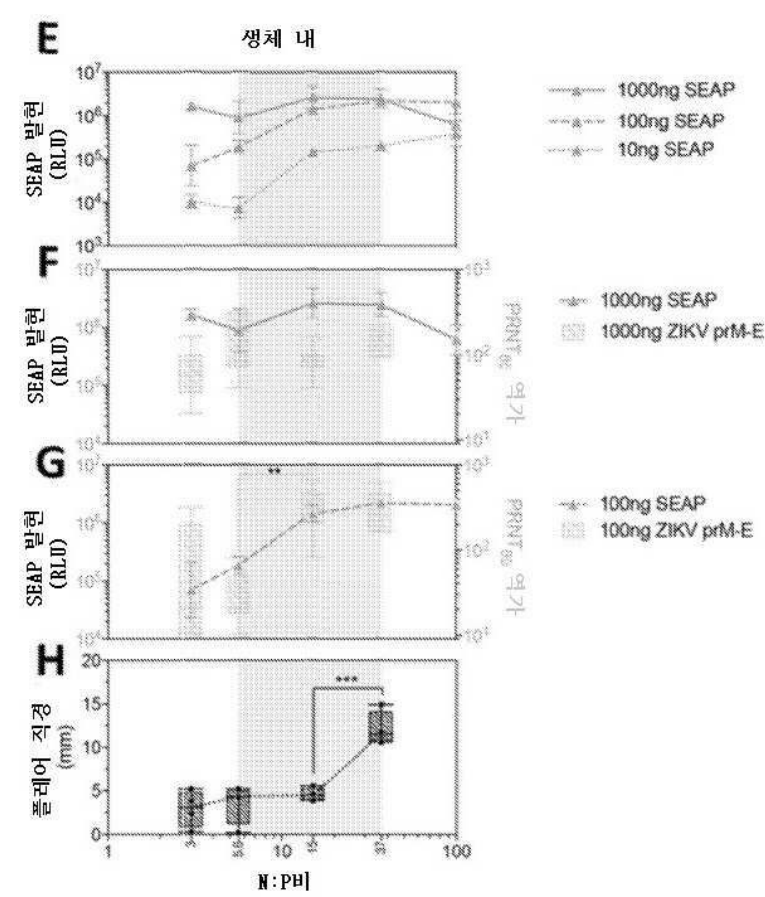
도면21cd



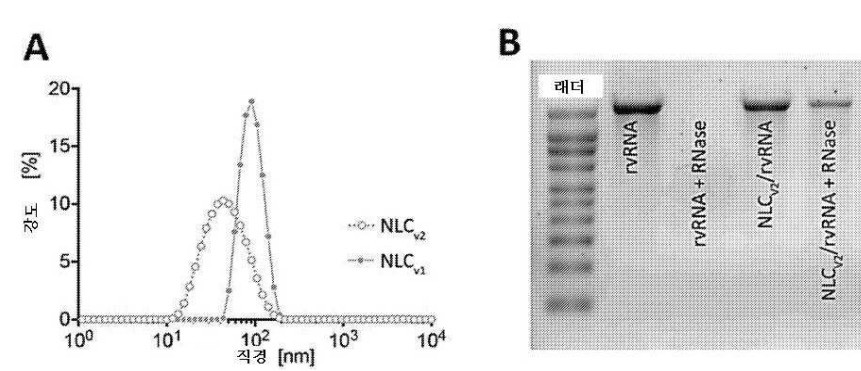
도면22ad



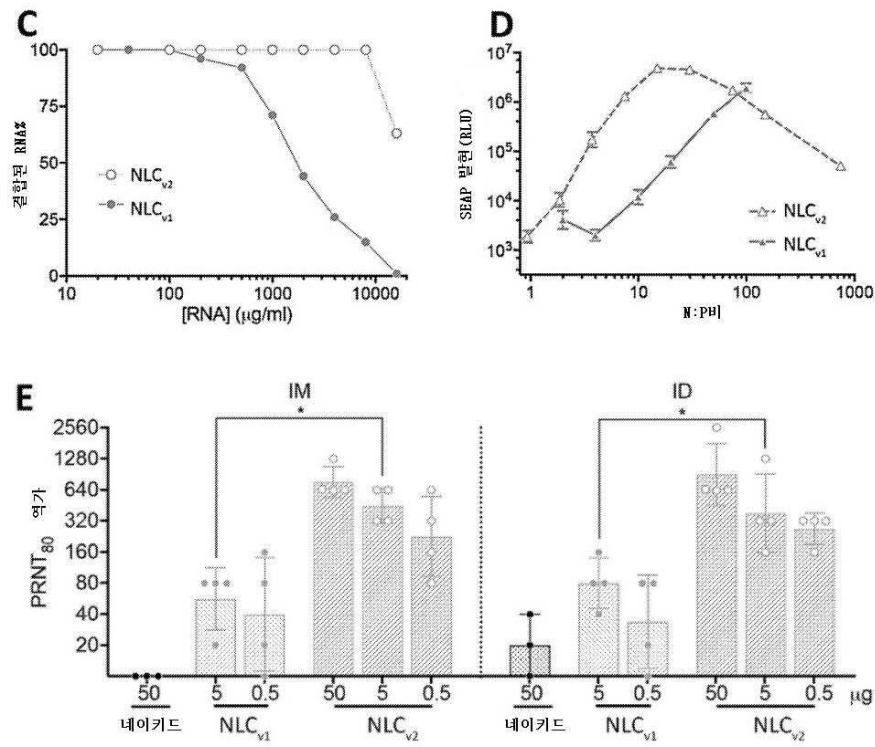
도면22eh



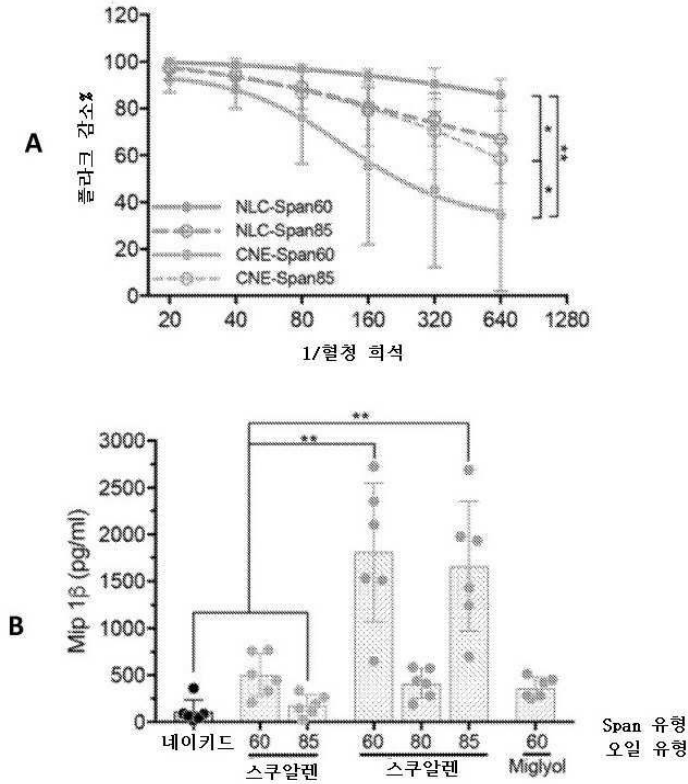
도면23ab



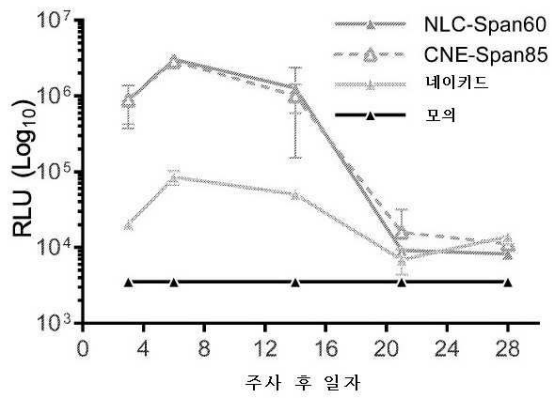
도면23ce



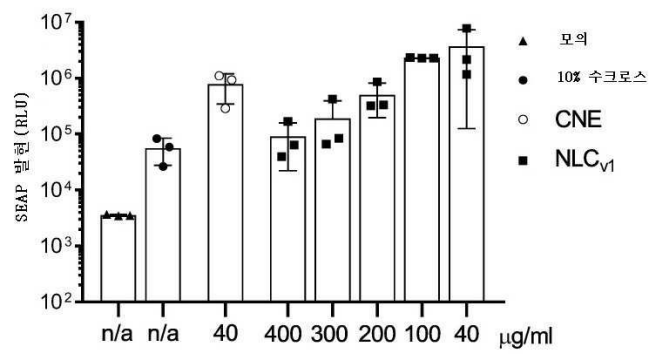
도면24



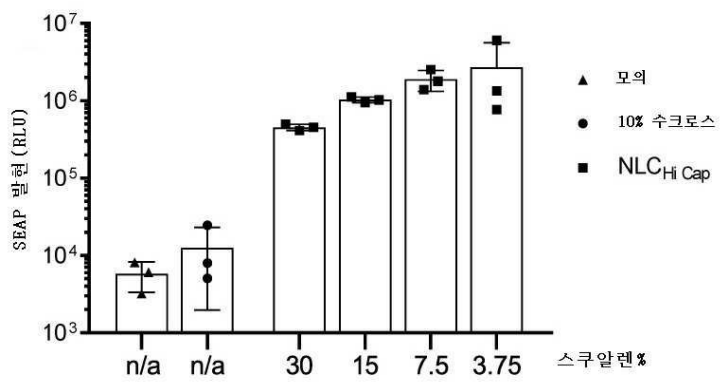
도면25



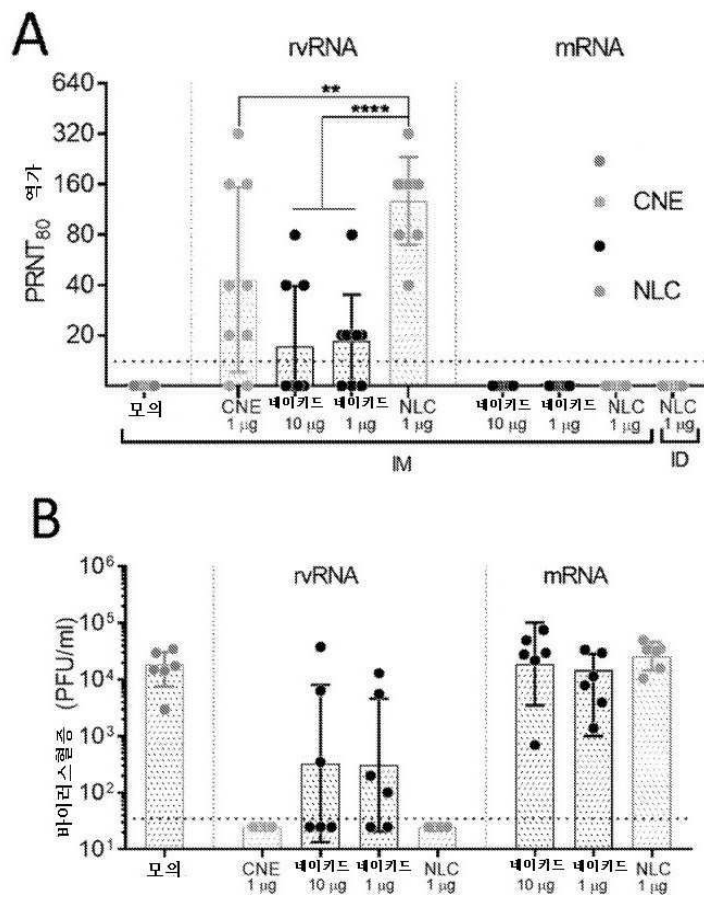
도면26



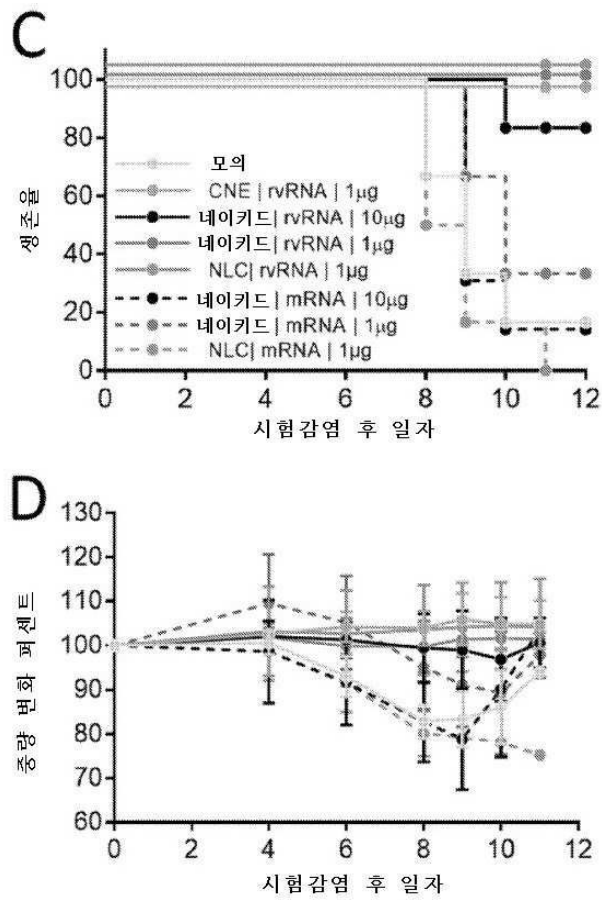
도면27



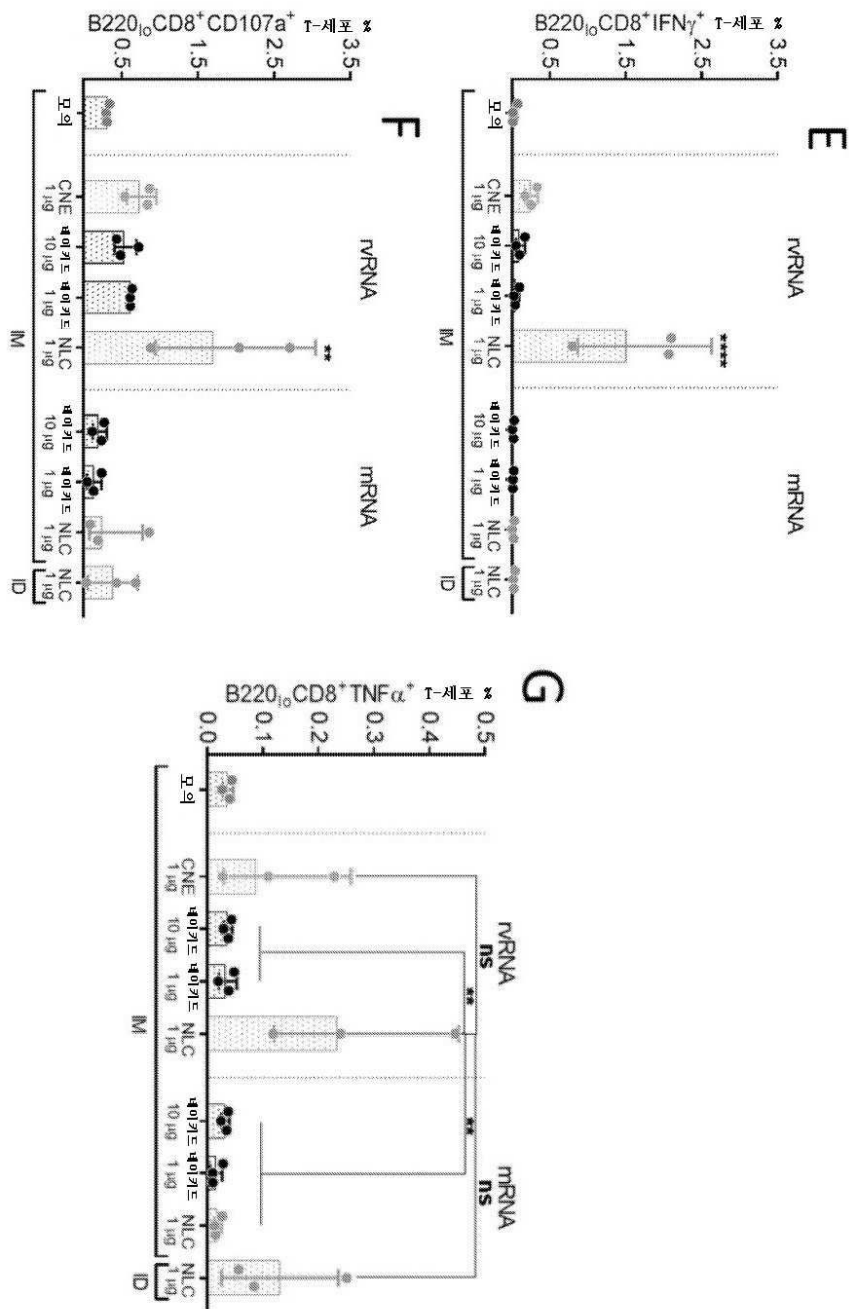
도면28ab



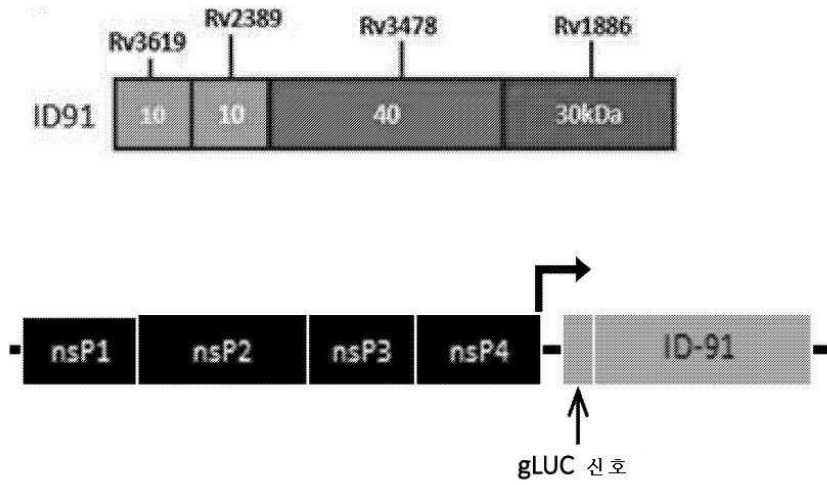
도면28cd



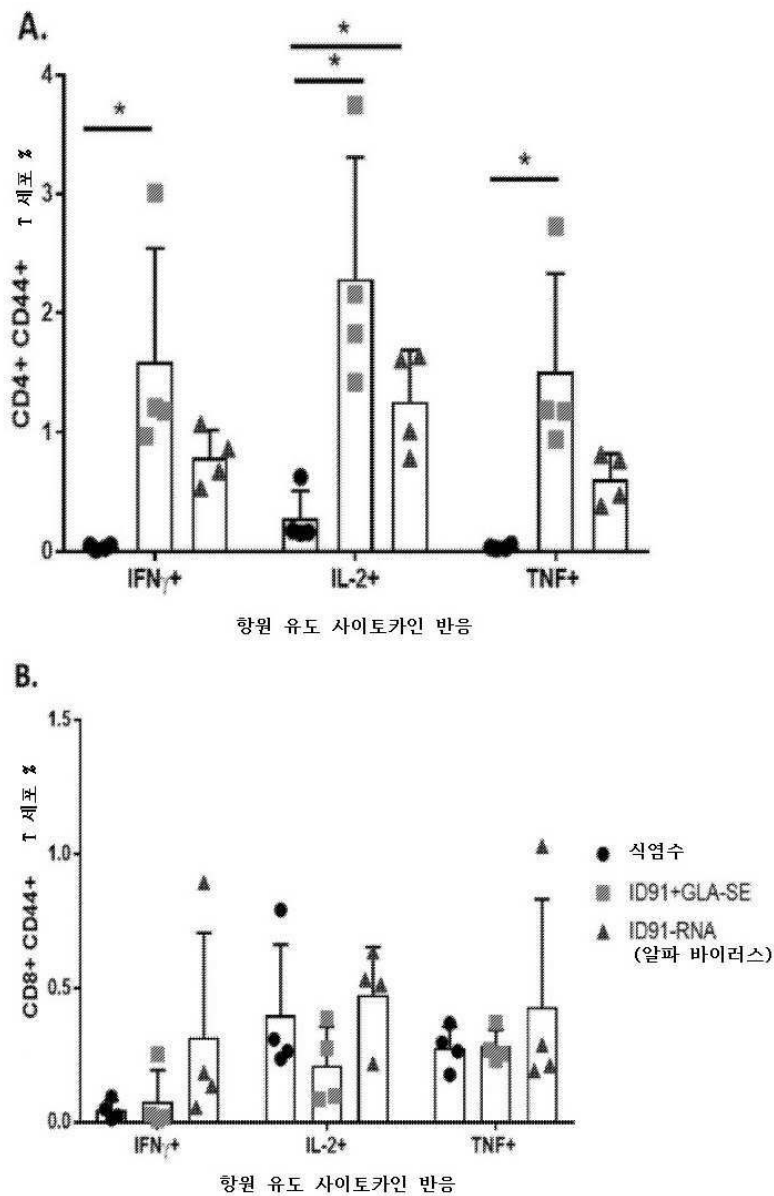
도면28eg



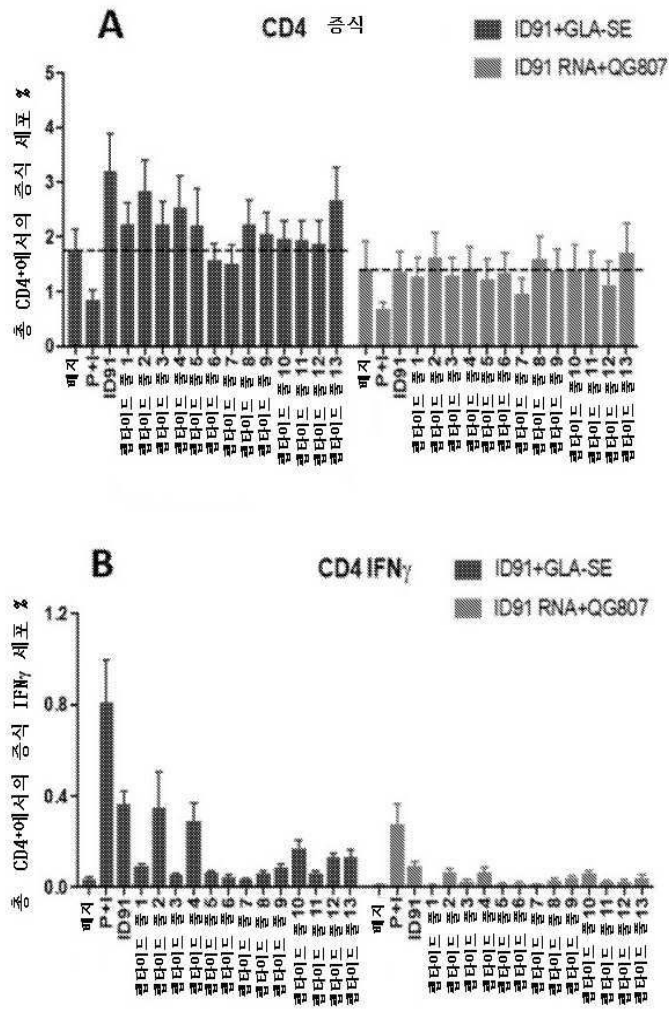
도면29



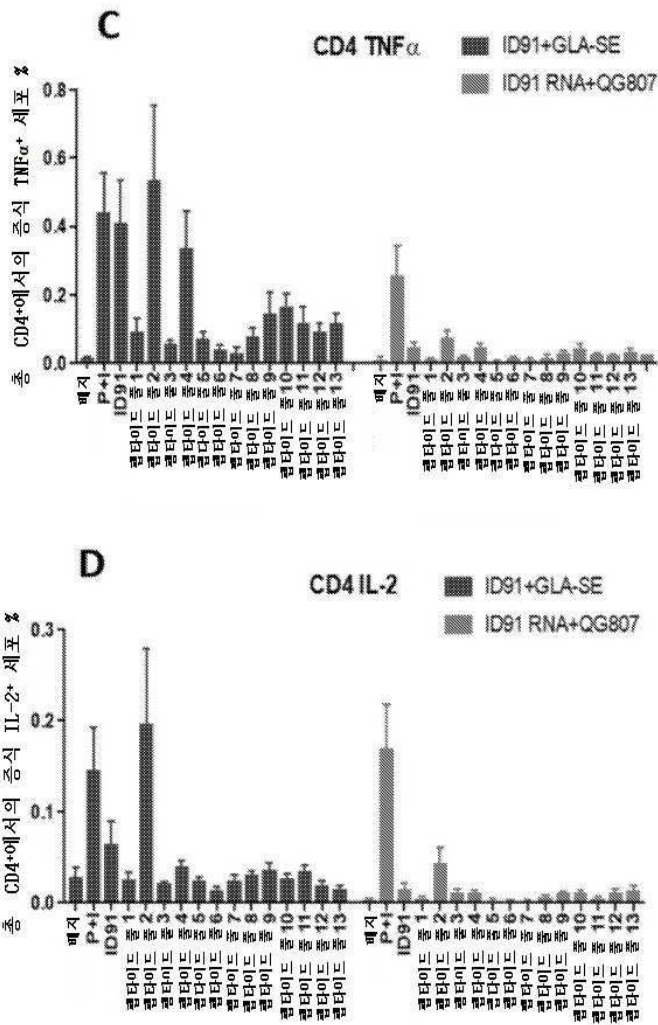
도면30



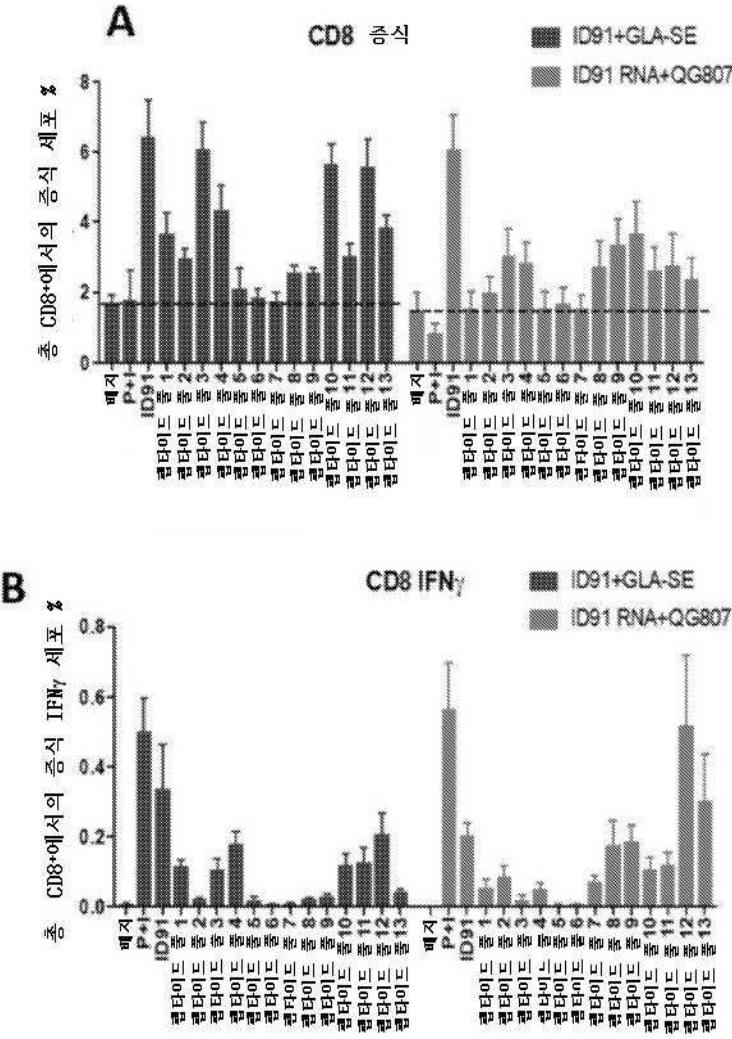
도면31ab



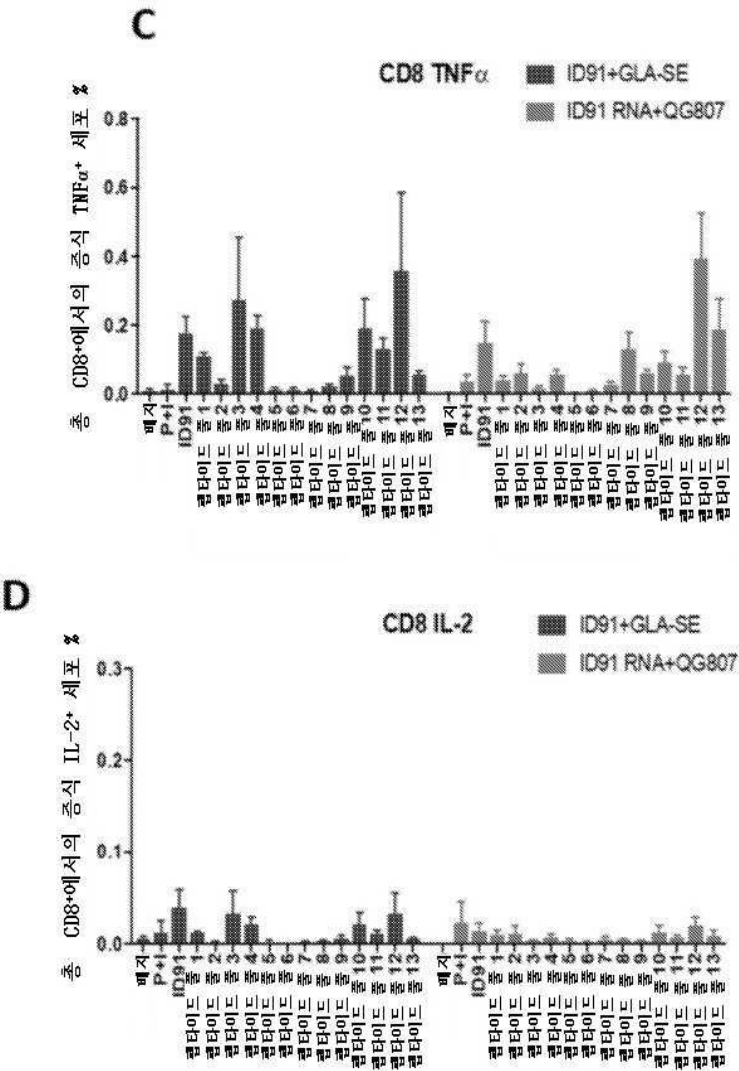
도면31cd



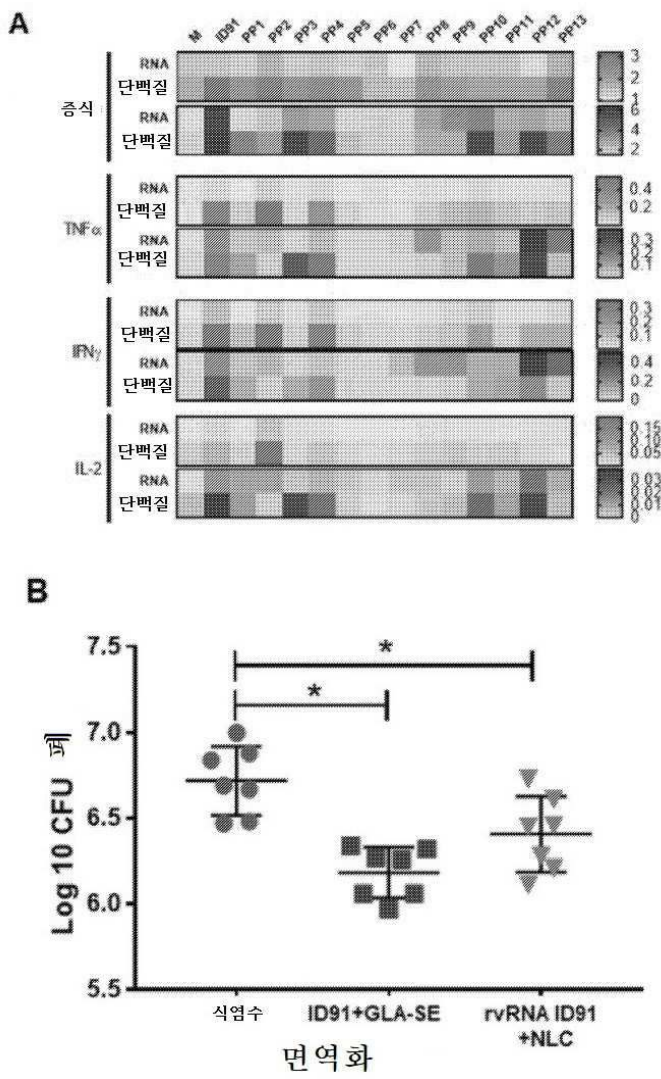
도면32ab



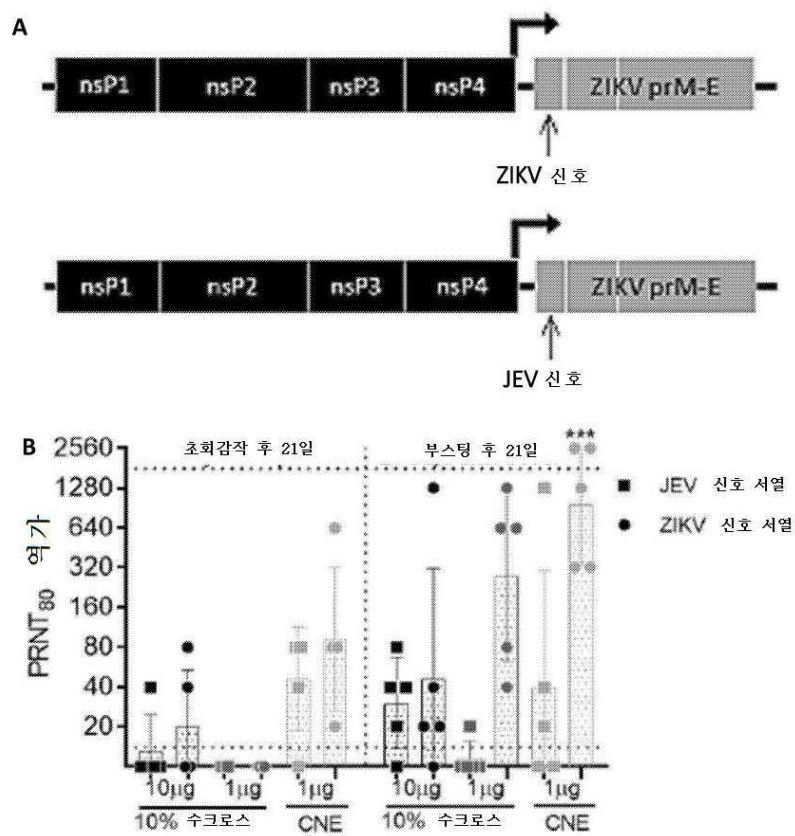
도면32cd



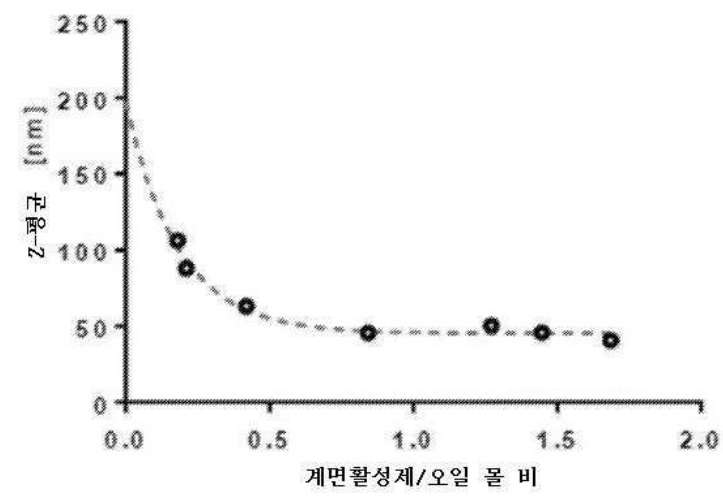
도면33



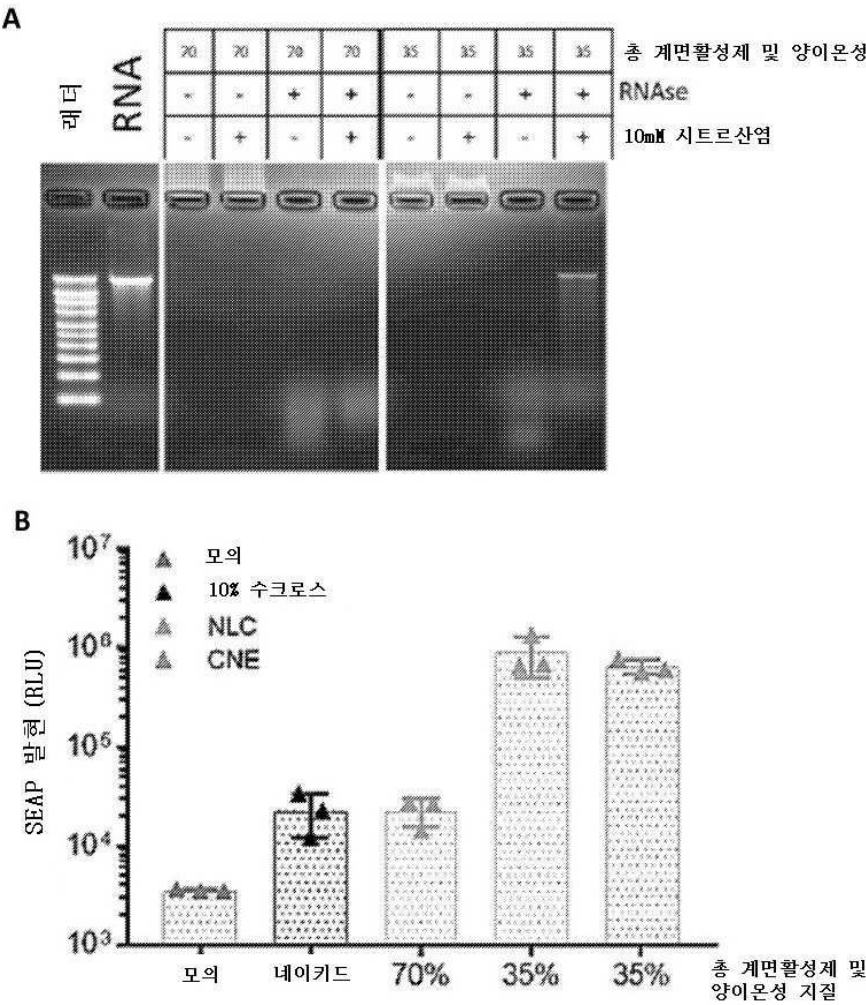
도면34



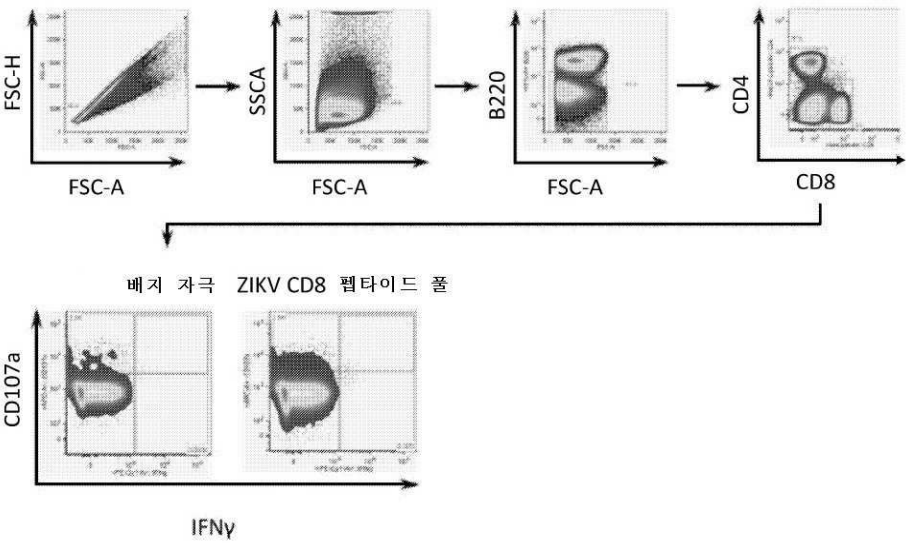
도면35



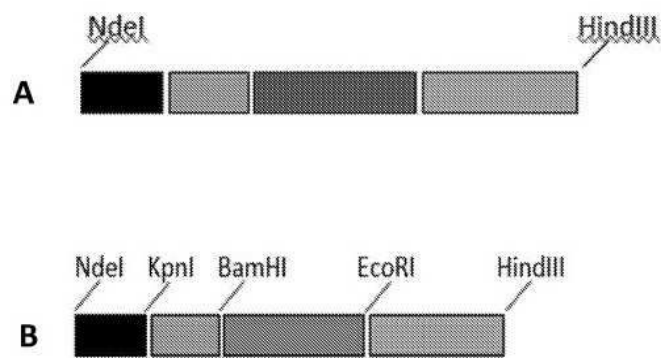
도면36



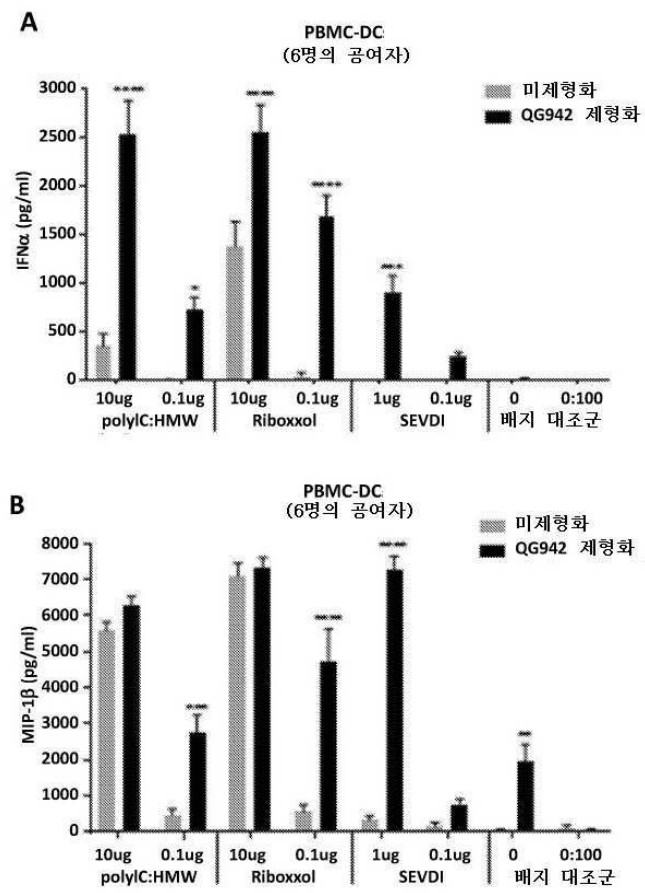
도면37



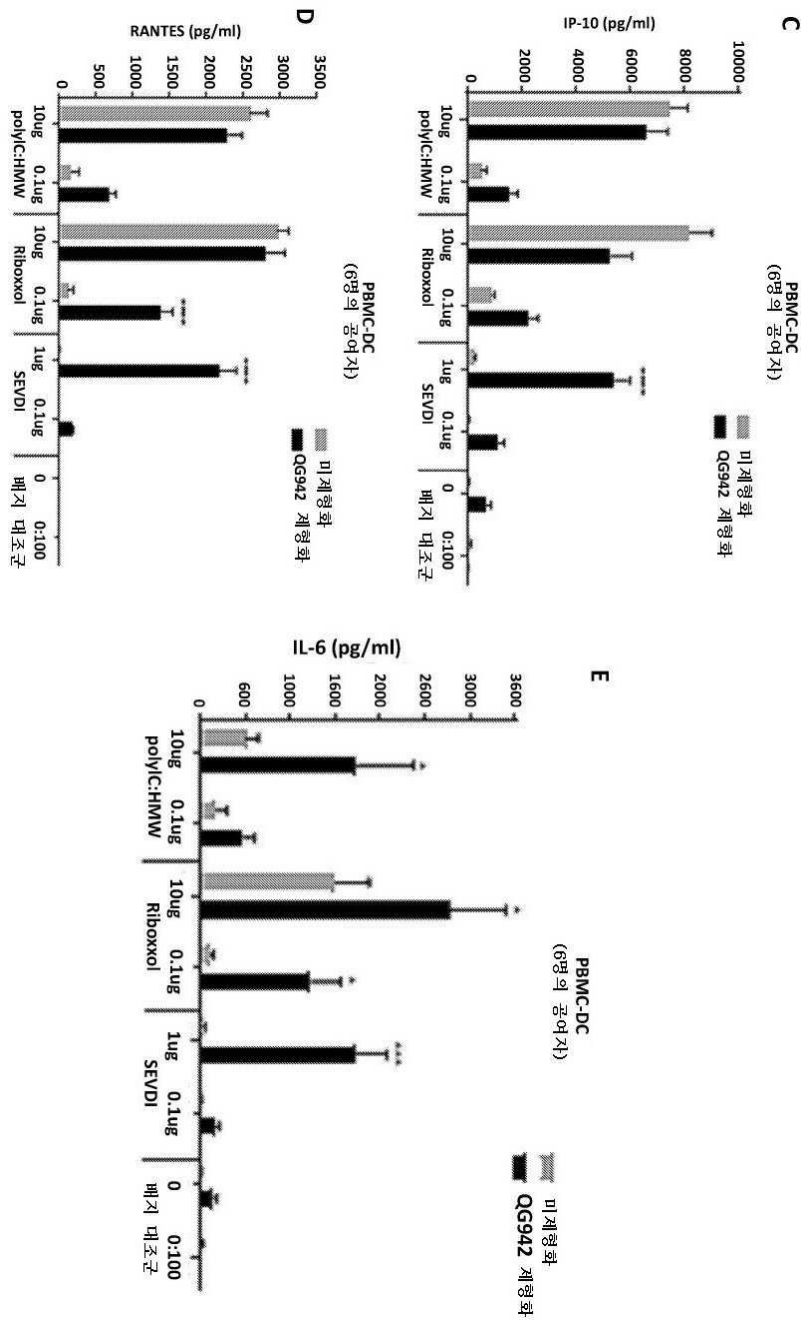
도면38



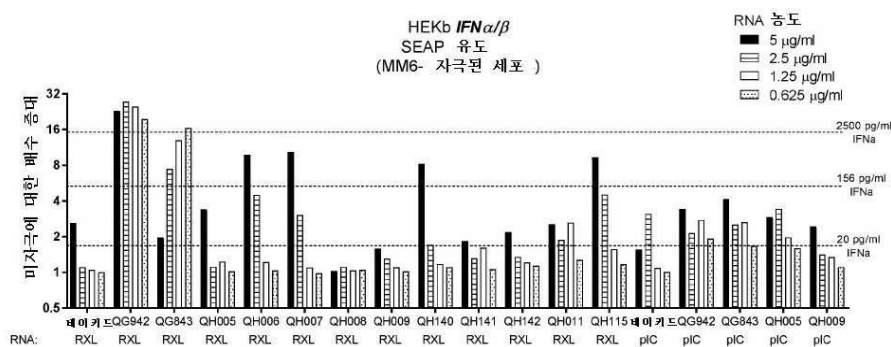
도면39ab



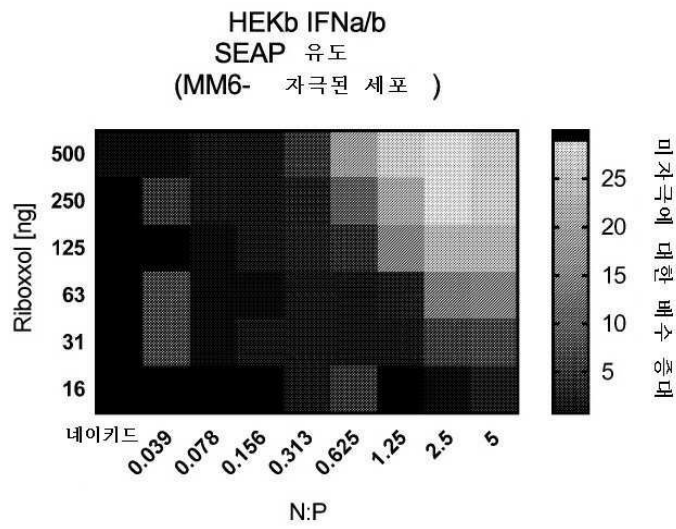
도면39ce



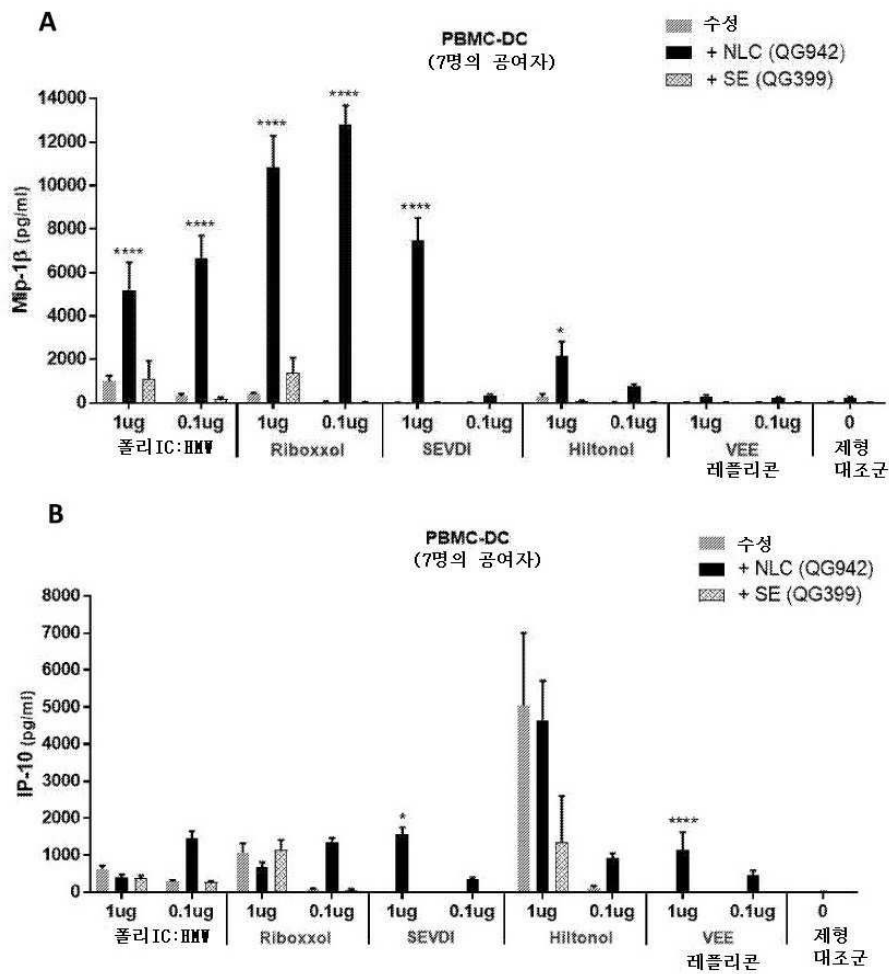
도면40



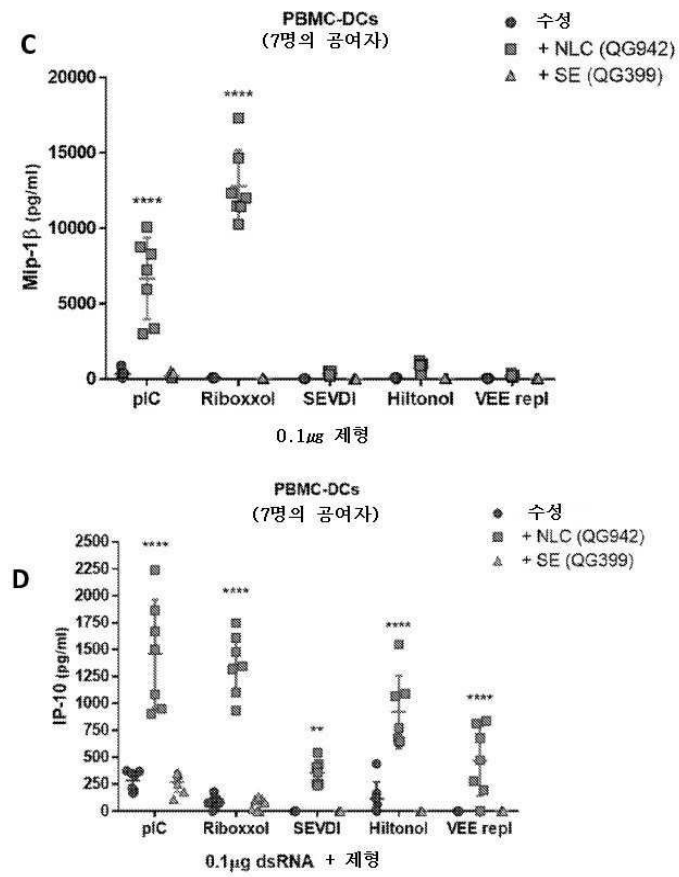
도면41



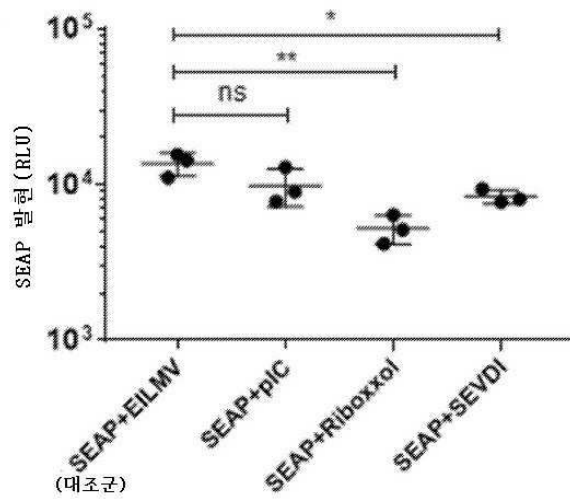
도면42ab



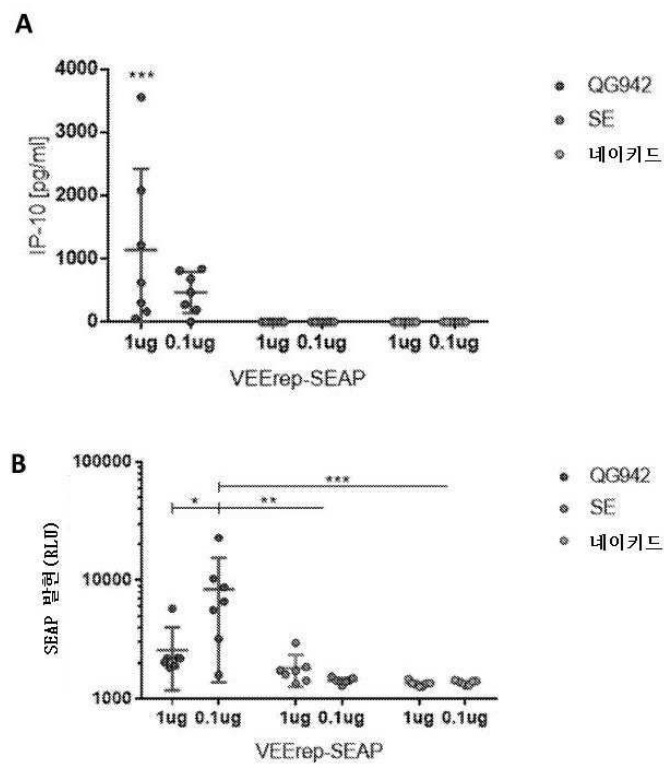
도면42cd



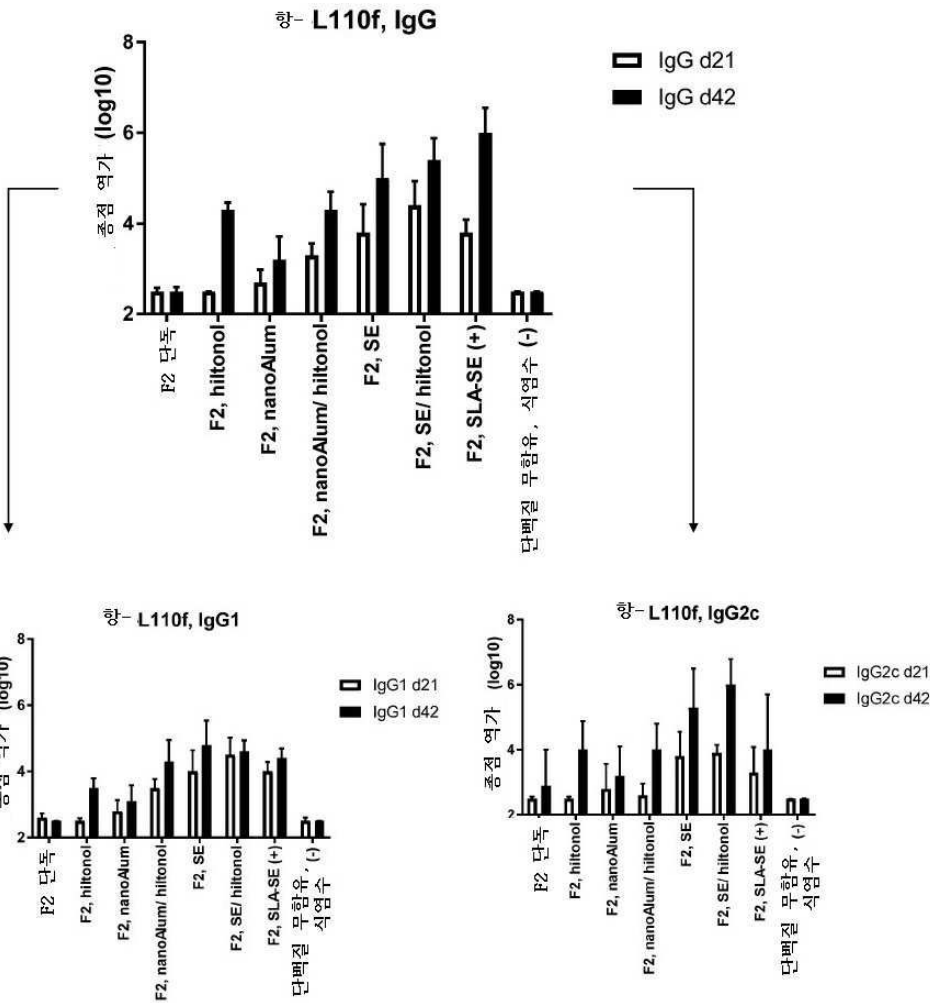
도면43



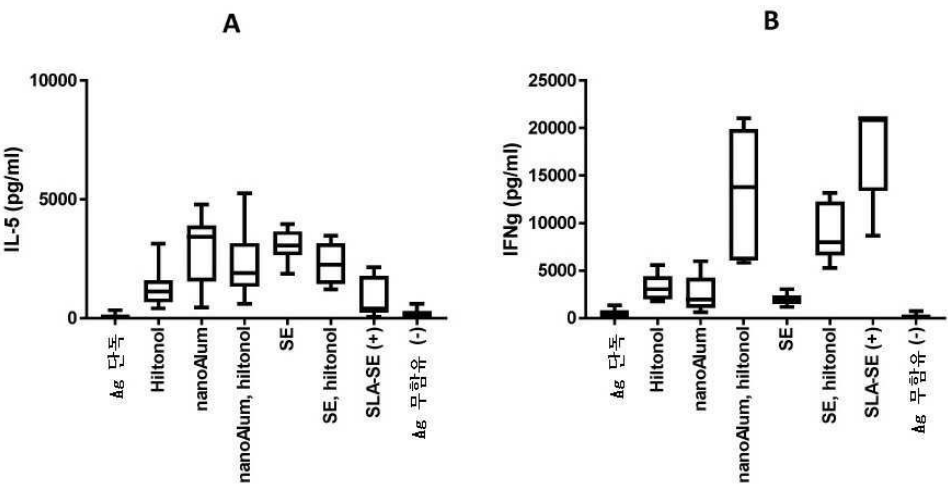
도면44



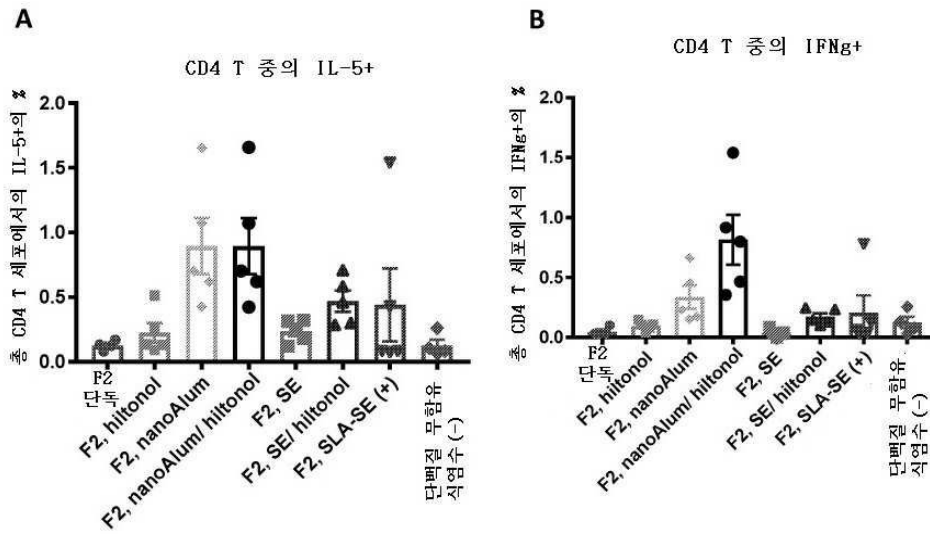
도면45



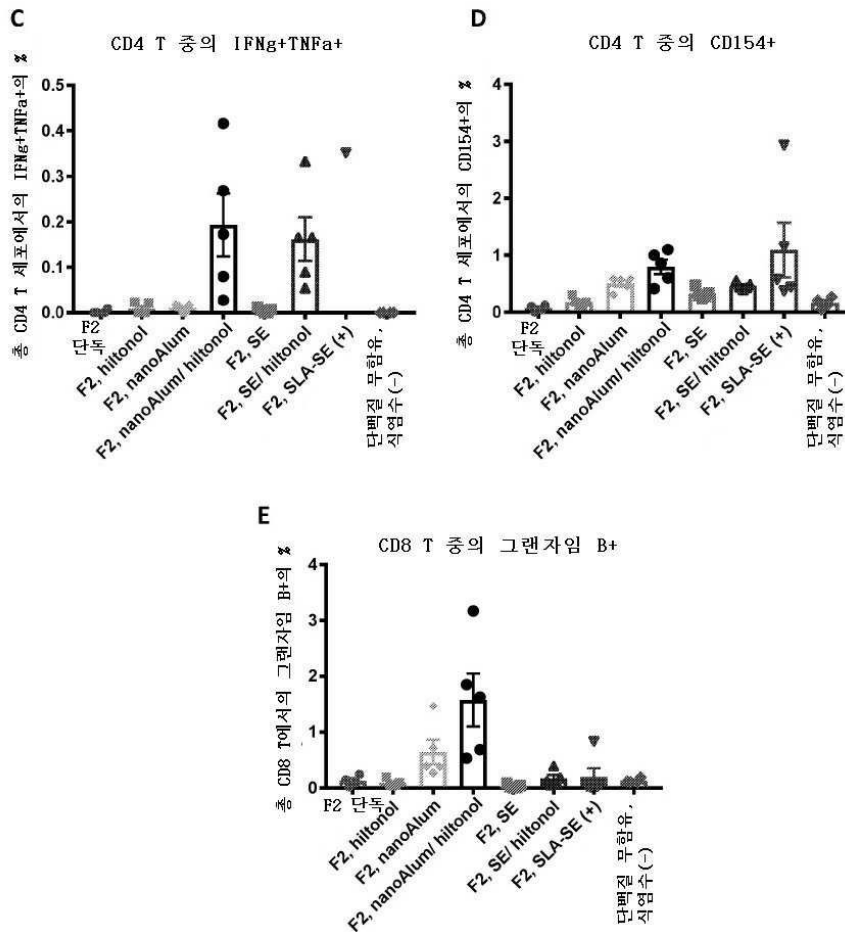
도면46



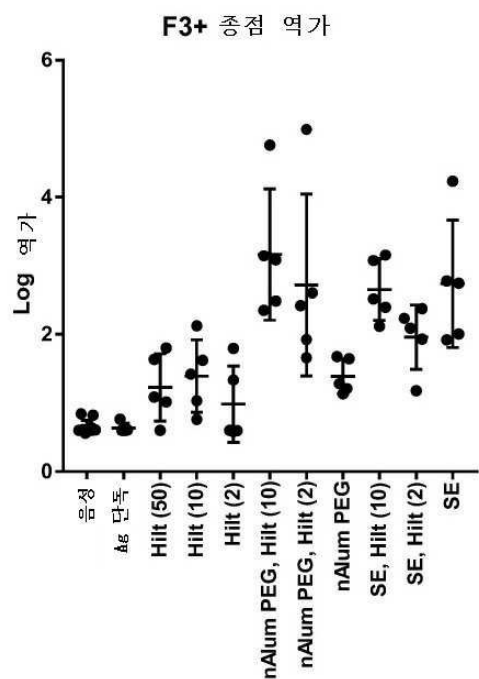
도면47ab



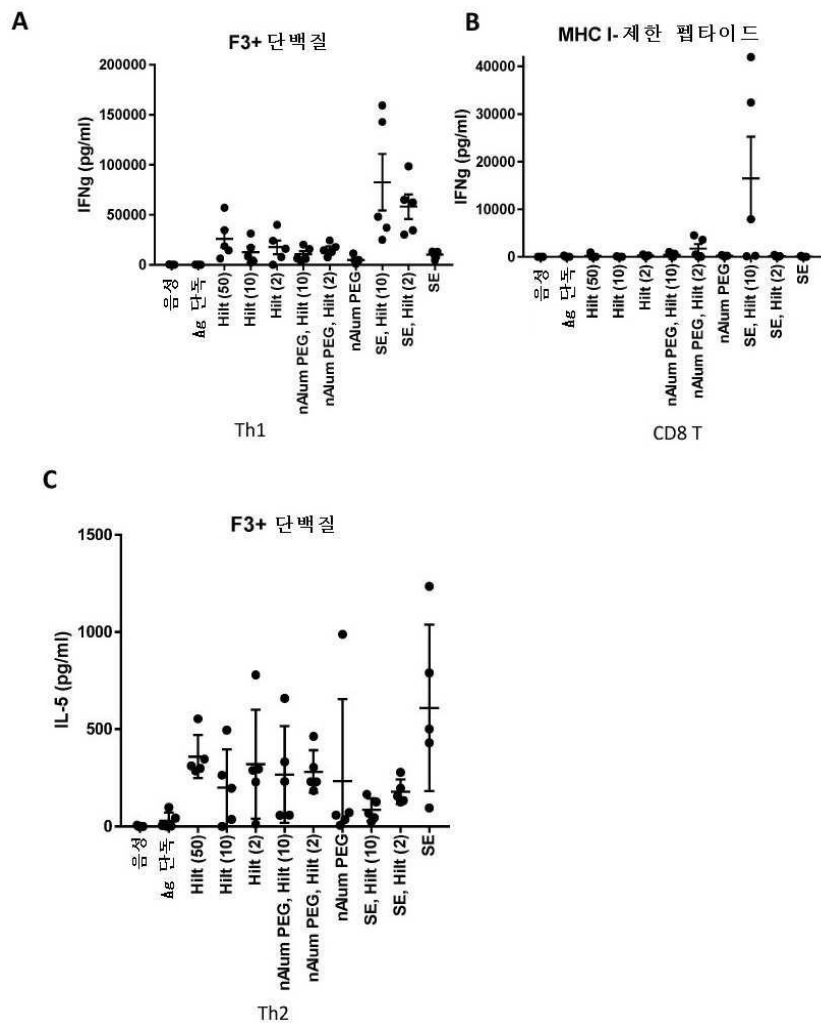
도면47ce



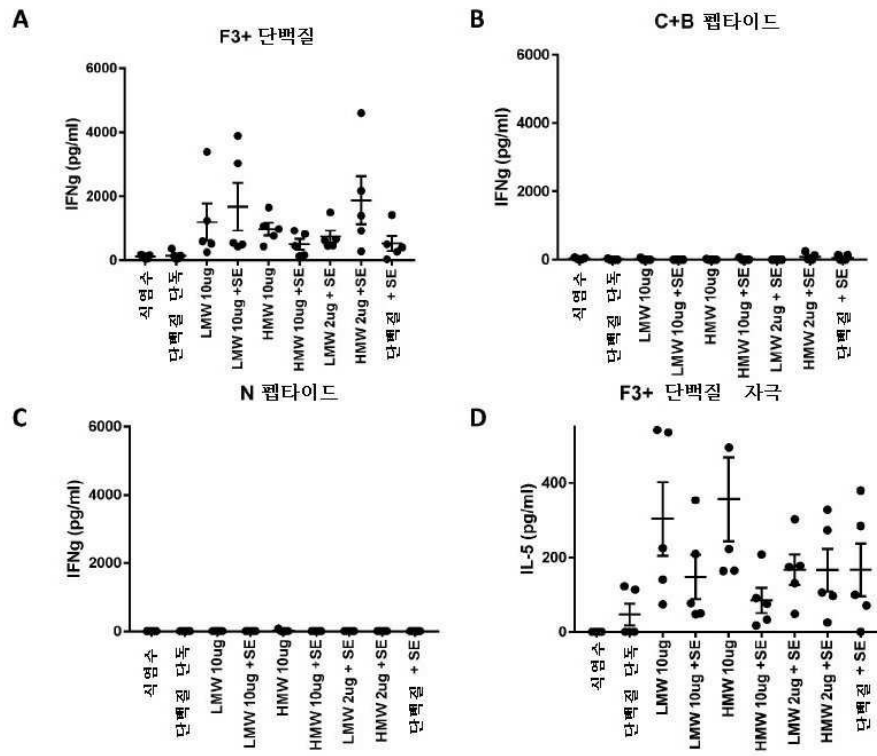
도면48



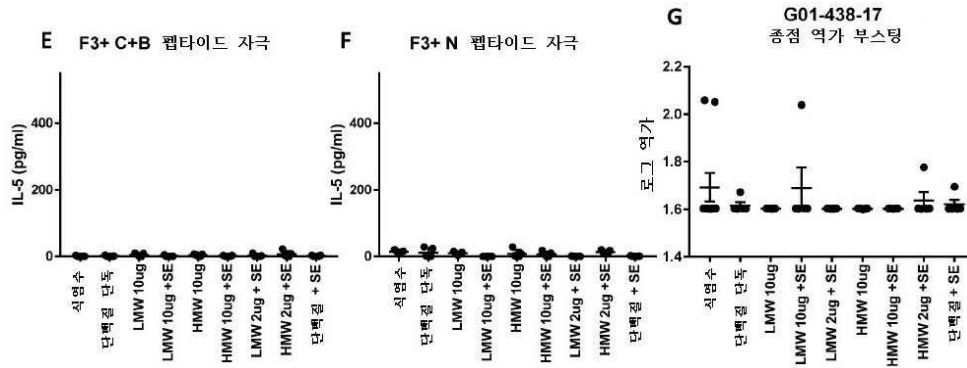
도면49



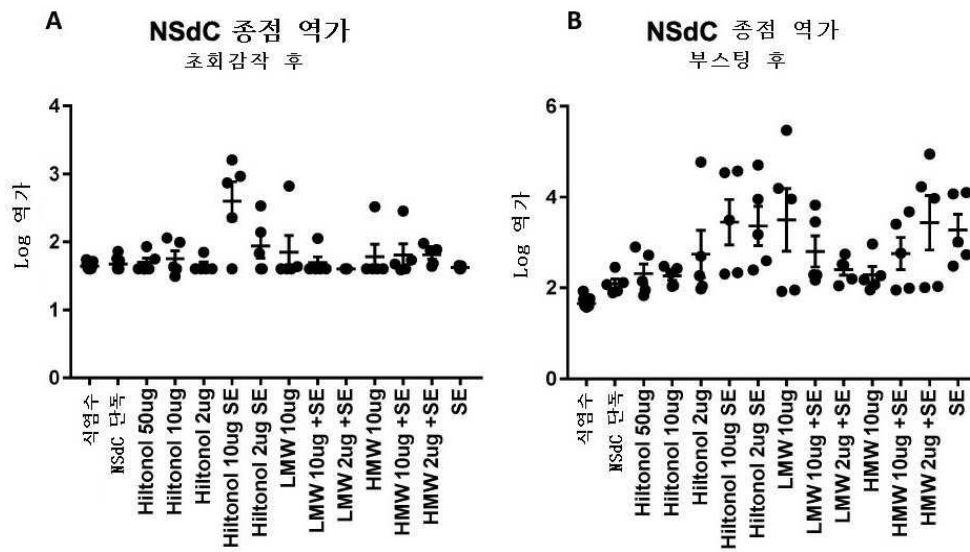
도면50ad



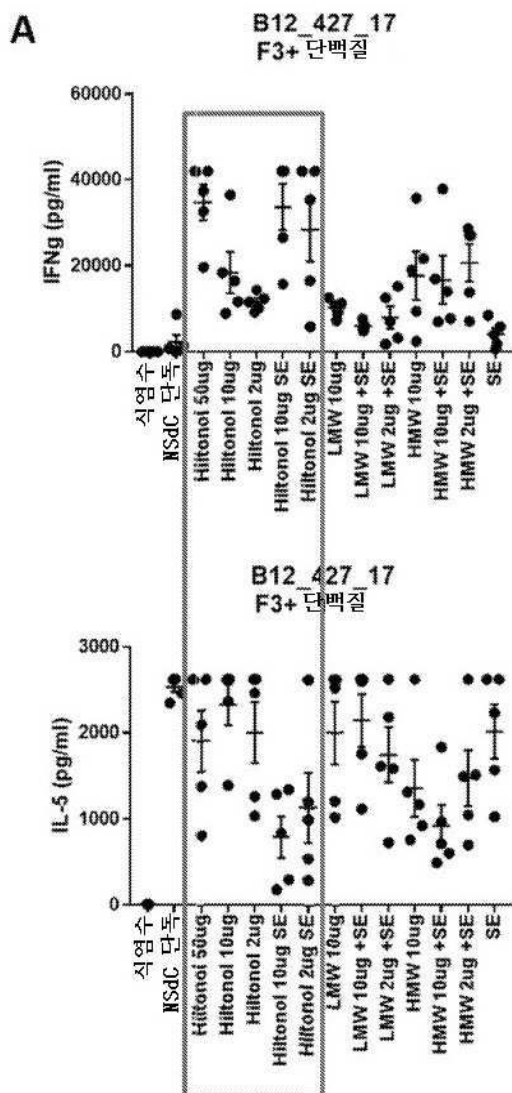
도면50eg



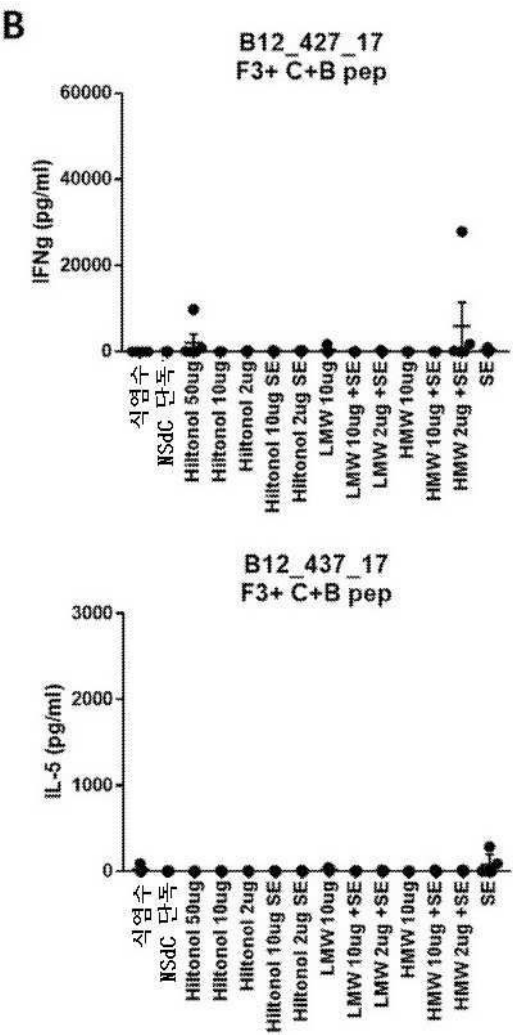
도면51



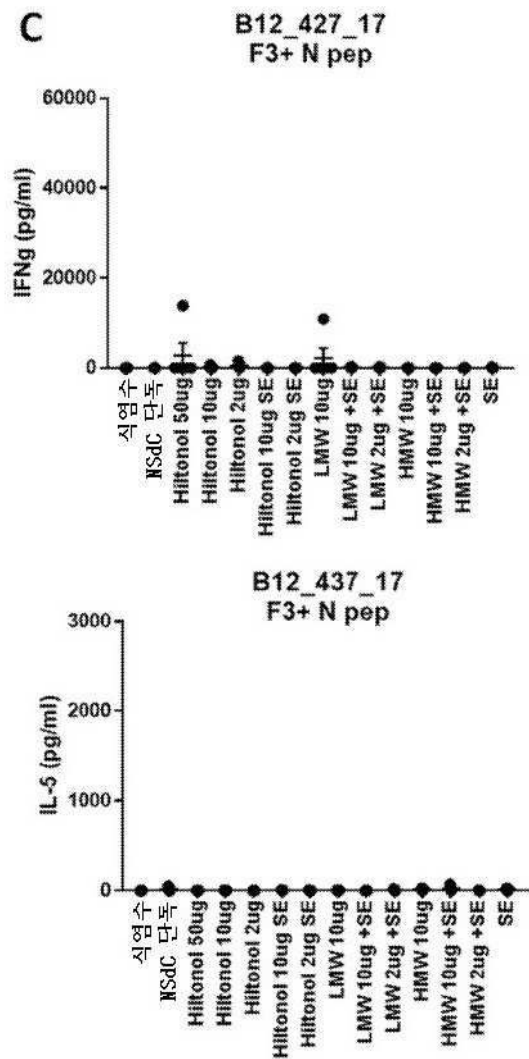
도면52a



도면52b



도면52c



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> Infectious Disease Research Institute
- <120> NANOSTRUCTURED LIPID CARRIERS AND STABLE EMULSIONS AND USES THEREOF
- <130> W02018232257
- <140> PCT/US2018/037783
- <141> 2018-06-15
- <150> US 62/520,204
- <151> 2017-06-15
- <150> US 62/540,973
- <151> 2017-08-03

<150> US 62/556,291

<151> 2017-09-08

<150> US 62/563,544

<151> 2017-09-26

<150> US 62/582,859

<151> 2017-11-07

<150> US 62/622,748

<151> 2018-01-26

<150> US 62/622,755

<151> 2018-01-26

<150> US 62/669,262

<151> 2018-05-09

<150> US 62/677,336

<151> 2018-05-29

<150> US 62/680,454

<151> 2018-06-04

<160> 143

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 877

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Fusion protein ID91

<400> 1

Met Thr Ile Asn Tyr Gln Phe Gly Asp Val Asp Ala His Gly Ala Met

1 5 10 15

Ile Arg Ala Gln Ala Gly Ser Leu Glu Ala Glu His Gln Ala Ile Ile

20 25 30

Ser Asp Val Leu Thr Ala Ser Asp Phe Trp Gly Gly Ala Gly Ser Ala

35 40 45

Ala Cys Gln Gly Phe Ile Thr Gln Leu Gly Arg Asn Phe Gln Val Ile

50 55 60

Tyr Glu Gln Ala Asn Ala His Gly Gln Lys Val Gln Ala Ala Gly Asn

65					70				75				80			
Asn	Met	Ala	Gln	Thr	Asp	Ser	Ala	Val	Gly	Ser	Ser	Trp	Ala	Asp	Asp	
				85				90				95				
Ile	Asp	Trp	Asp	Ala	Ile	Ala	Gln	Cys	Glu	Ser	Gly	Gly	Asn	Trp	Ala	
				100				105				110				
Ala	Asn	Thr	Gly	Asn	Gly	Leu	Tyr	Gly	Gly	Leu	Gln	Ile	Ser	Gln	Ala	
				115				120				125				
Thr	Trp	Asp	Ser	Asn	Gly	Gly	Val	Gly	Ser	Pro	Ala	Ala	Ala	Ser	Pro	
				130				135				140				
Gln	Gln	Gln	Ile	Glu	Val	Ala	Asp	Asn	Ile	Met	Lys	Thr	Gln	Gly	Pro	
145				150				155				160				
Gly	Ala	Trp	Pro	Lys	Cys	Ser	Ser	Cys	Ser	Gln	Gly	Asp	Ala	Pro	Leu	
				165				170				175				
Gly	Ser	Leu	Thr	His	Ile	Leu	Thr	Phe	Leu	Ala	Ala	Glu	Thr	Gly	Gly	
				180				185				190				
Cys	Ser	Gly	Ser	Arg	Asp	Asp	Val	Val	Asp	Phe	Gly	Ala	Leu	Pro	Pro	
				195				200				205				
Glu	Ile	Asn	Ser	Ala	Arg	Met	Tyr	Ala	Gly	Pro	Gly	Ser	Ala	Ser	Leu	
210				215				220								
Val	Ala	Ala	Ala	Lys	Met	Trp	Asp	Ser	Val	Ala	Ser	Asp	Leu	Phe	Ser	
225				230				235				240				
Ala	Ala	Ser	Ala	Phe	Gln	Ser	Val	Val	Trp	Gly	Leu	Thr	Val	Gly	Ser	
				245				250				255				
Trp	Ile	Gly	Ser	Ser	Ala	Gly	Leu	Met	Ala	Ala	Ala	Ala	Ser	Pro	Tyr	
				260				265				270				
Val	Ala	Trp	Met	Ser	Val	Thr	Ala	Gly	Gln	Ala	Gln	Leu	Thr	Ala	Ala	
				275				280				285				
Gln	Val	Arg	Val	Ala	Ala	Ala	Ala	Tyr	Glu	Thr	Ala	Tyr	Arg	Leu	Thr	
290				295				300								
Val	Pro	Pro	Pro	Val	Ile	Ala	Glu	Asn	Arg	Thr	Glu	Leu	Met	Thr	Leu	
305				310				315				320				

Thr Ala Thr Asn Leu Leu Gly Gln Asn Thr Pro Ala Ile Glu Ala Asn
325 330 335

Gln Ala Ala Tyr Ser Gln Met Trp Gly Gln Asp Ala Glu Ala Met Tyr
340 345 350

Gly Tyr Ala Ala Thr Ala Ala Thr Ala Thr Glu Ala Leu Leu Pro Phe
355 360 365

Glu Asp Ala Pro Leu Ile Thr Asn Pro Gly Gly Leu Leu Glu Gln Ala
370 375 380

Val Ala Val Glu Glu Ala Ile Asp Thr Ala Ala Ala Asn Gln Leu Met
385 390 395 400

Asn Asn Val Pro Gln Ala Leu Gln Gln Leu Ala Gln Pro Ala Gln Gly
405 410 415

Val Val Pro Ser Ser Lys Leu Gly Gly Leu Trp Thr Ala Val Ser Pro
420 425 430

His Leu Ser Pro Leu Ser Asn Val Ser Ser Ile Ala Asn Asn His Met
435 440 445

Ser Met Met Gly Thr Gly Val Ser Met Thr Asn Thr Leu His Ser Met
450 455 460

Leu Lys Gly Leu Ala Pro Ala Ala Ala Gln Ala Val Glu Thr Ala Ala
465 470 475 480

Glu Asn Gly Val Trp Ala Met Ser Ser Leu Gly Ser Gln Leu Gly Ser
485 490 495

Ser Leu Gly Ser Ser Gly Leu Gly Ala Gly Val Ala Ala Asn Leu Gly
500 505 510

Arg Ala Ala Ser Val Gly Ser Leu Ser Val Pro Pro Ala Trp Ala Ala
515 520 525

Ala Asn Gln Ala Val Thr Pro Ala Ala Arg Ala Leu Pro Leu Thr Ser
530 535 540

Leu Thr Ser Ala Ala Gln Thr Ala Pro Gly His Met Leu Gly Gly Leu
545 550 555 560

Pro Leu Gly His Ser Val Asn Ala Gly Ser Gly Ile Asn Asn Ala Leu

565	570	575
Arg Val Pro Ala Arg Ala Tyr Ala Ile Pro Arg Thr Pro Ala Ala Gly		
580	585	590
Phe Ser Arg Pro Gly Leu Pro Val Glu Tyr Leu Gln Val Pro Ser Pro		
595	600	605
Ser Met Gly Arg Asp Ile Lys Val Gln Phe Gln Ser Gly Gly Asn Asn		
610	615	620
Ser Pro Ala Val Tyr Leu Leu Asp Gly Leu Arg Ala Gln Asp Asp Tyr		
625	630	635
Asn Gly Trp Asp Ile Asn Thr Pro Ala Phe Glu Trp Tyr Tyr Gln Ser		
645	650	655
Gly Leu Ser Ile Val Met Pro Val Gly Gly Gln Ser Ser Phe Tyr Ser		
660	665	670
Asp Trp Tyr Ser Pro Ala Cys Gly Lys Ala Gly Cys Gln Thr Tyr Lys		
675	680	685
Trp Glu Thr Phe Leu Thr Ser Glu Leu Pro Gln Trp Leu Ser Ala Asn		
690	695	700
Arg Ala Val Lys Pro Thr Gly Ser Ala Ala Ile Gly Leu Ser Met Ala		
705	710	715
Gly Ser Ser Ala Met Ile Leu Ala Ala Tyr His Pro Gln Gln Phe Ile		
725	730	735
Tyr Ala Gly Ser Leu Ser Ala Leu Leu Asp Pro Ser Gln Gly Met Gly		
740	745	750
Pro Ser Leu Ile Gly Leu Ala Met Gly Asp Ala Gly Gly Tyr Lys Ala		
755	760	765
Ala Asp Met Trp Gly Pro Ser Ser Asp Pro Ala Trp Glu Arg Asn Asp		
770	775	780
Pro Thr Gln Gln Ile Pro Lys Leu Val Ala Asn Asn Thr Arg Leu Trp		
785	790	795
Val Tyr Cys Gly Asn Gly Thr Pro Asn Glu Leu Gly Gly Ala Asn Ile		
805	810	815

Pro Ala Glu Phe Leu Glu Asn Phe Val Arg Ser Ser Asn Leu Lys Phe
820 825 830
Gln Asp Ala Tyr Asn Ala Ala Gly Gly His Asn Ala Val Phe Asn Phe
835 840 845
Pro Pro Asn Gly Thr His Ser Trp Glu Tyr Trp Gly Ala Gln Leu Asn
850 855 860

Ala Met Lys Gly Asp Leu Gln Ser Ser Leu Gly Ala Gly
865 870 875

<210> 2

<211> 94

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 2

Met Thr Ile Asn Tyr Gln Phe Gly Asp Val Asp Ala His Gly Ala Met
1 5 10 15
Ile Arg Ala Gln Ala Gly Ser Leu Glu Ala Glu His Gln Ala Ile Ile
20 25 30
Ser Asp Val Leu Thr Ala Ser Asp Phe Trp Gly Gly Ala Gly Ser Ala

35 40 45
Ala Cys Gln Gly Phe Ile Thr Gln Leu Gly Arg Asn Phe Gln Val Ile
50 55 60
Tyr Glu Gln Ala Asn Ala His Gly Gln Lys Val Gln Ala Ala Gly Asn
65 70 75 80
Asn Met Ala Gln Thr Asp Ser Ala Val Gly Ser Ser Trp Ala
85 90

<210> 3

<211> 105

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 3

Asp Asp Ile Asp Trp Asp Ala Ile Ala Gln Cys Glu Ser Gly Gly Asn
1 5 10 15

Trp Ala Ala Asn Thr Gly Asn Gly Leu Tyr Gly Gly Leu Gln Ile Ser
 20 25 30
 Gln Ala Thr Trp Asp Ser Asn Gly Gly Val Gly Ser Pro Ala Ala Ala
 35 40 45
 Ser Pro Gln Gln Gln Ile Glu Val Ala Asp Asn Ile Met Lys Thr Gln
 50 55 60

Gly Pro Gly Ala Trp Pro Lys Cys Ser Ser Cys Ser Gln Gly Asp Ala
 65 70 75 80
 Pro Leu Gly Ser Leu Thr His Ile Leu Thr Phe Leu Ala Ala Glu Thr
 85 90 95
 Gly Gly Cys Ser Gly Ser Arg Asp Asp
 100 105

<210> 4

<211> 393

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 4

Val Val Asp Phe Gly Ala Leu Pro Pro Glu Ile Asn Ser Ala Arg Met
 1 5 10 15

Tyr Ala Gly Pro Gly Ser Ala Ser Leu Val Ala Ala Ala Lys Met Trp
 20 25 30
 Asp Ser Val Ala Ser Asp Leu Phe Ser Ala Ala Ser Ala Phe Gln Ser
 35 40 45
 Val Val Trp Gly Leu Thr Val Gly Ser Trp Ile Gly Ser Ser Ala Gly
 50 55 60
 Leu Met Ala Ala Ala Ala Ser Pro Tyr Val Ala Trp Met Ser Val Thr
 65 70 75 80

Ala Gly Gln Ala Gln Leu Thr Ala Ala Gln Val Arg Val Ala Ala Ala
 85 90 95
 Ala Tyr Glu Thr Ala Tyr Arg Leu Thr Val Pro Pro Pro Val Ile Ala
 100 105 110
 Glu Asn Arg Thr Glu Leu Met Thr Leu Thr Ala Thr Asn Leu Leu Gly

115	120	125	
Gln Asn Thr Pro Ala Ile Glu Ala Asn Gln Ala Ala Tyr Ser Gln Met			
130	135	140	
Trp Gly Gln Asp Ala Glu Ala Met Tyr Gly Tyr Ala Ala Thr Ala Ala			
145	150	155	160
Thr Ala Thr Glu Ala Leu Leu Pro Phe Glu Asp Ala Pro Leu Ile Thr			
165	170	175	
Asn Pro Gly Gly Leu Leu Glu Gln Ala Val Ala Val Glu Glu Ala Ile			
180	185	190	
Asp Thr Ala Ala Ala Asn Gln Leu Met Asn Asn Val Pro Gln Ala Leu			
195	200	205	
Gln Gln Leu Ala Gln Pro Ala Gln Gly Val Val Pro Ser Ser Lys Leu			
210	215	220	
Gly Gly Leu Trp Thr Ala Val Ser Pro His Leu Ser Pro Leu Ser Asn			
225	230	235	240
Val Ser Ser Ile Ala Asn Asn His Met Ser Met Met Gly Thr Gly Val			
245	250	255	
Ser Met Thr Asn Thr Leu His Ser Met Leu Lys Gly Leu Ala Pro Ala			
260	265	270	
Ala Ala Gln Ala Val Glu Thr Ala Ala Glu Asn Gly Val Trp Ala Met			
275	280	285	
Ser Ser Leu Gly Ser Gln Leu Gly Ser Ser Leu Gly Ser Ser Gly Leu			
290	295	300	
Gly Ala Gly Val Ala Ala Asn Leu Gly Arg Ala Ala Ser Val Gly Ser			
305	310	315	320
Leu Ser Val Pro Pro Ala Trp Ala Ala Ala Asn Gln Ala Val Thr Pro			
325	330	335	
Ala Ala Arg Ala Leu Pro Leu Thr Ser Leu Thr Ser Ala Ala Gln Thr			
340	345	350	
Ala Pro Gly His Met Leu Gly Gly Leu Pro Leu Gly His Ser Val Asn			
355	360	365	

Ala Gly Ser Gly Ile Asn Asn Ala Leu Arg Val Pro Ala Arg Ala Tyr

370 375 380

Ala Ile Pro Arg Thr Pro Ala Ala Gly

385 390

<210> 5

<211> 285

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 5

Phe Ser Arg Pro Gly Leu Pro Val Glu Tyr Leu Gln Val Pro Ser Pro

1 5 10 15

Ser Met Gly Arg Asp Ile Lys Val Gln Phe Gln Ser Gly Gly Asn Asn

20 25 30

Ser Pro Ala Val Tyr Leu Leu Asp Gly Leu Arg Ala Gln Asp Asp Tyr

35 40 45

Asn Gly Trp Asp Ile Asn Thr Pro Ala Phe Glu Trp Tyr Tyr Gln Ser

50 55 60

Gly Leu Ser Ile Val Met Pro Val Gly Gly Gln Ser Ser Phe Tyr Ser

65 70 75 80

Asp Trp Tyr Ser Pro Ala Cys Gly Lys Ala Gly Cys Gln Thr Tyr Lys

85 90 95

Trp Glu Thr Phe Leu Thr Ser Glu Leu Pro Gln Trp Leu Ser Ala Asn

100 105 110

Arg Ala Val Lys Pro Thr Gly Ser Ala Ala Ile Gly Leu Ser Met Ala

115 120 125

Gly Ser Ser Ala Met Ile Leu Ala Ala Tyr His Pro Gln Gln Phe Ile

130 135 140

Tyr Ala Gly Ser Leu Ser Ala Leu Leu Asp Pro Ser Gln Gly Met Gly

145 150 155 160

Pro Ser Leu Ile Gly Leu Ala Met Gly Asp Ala Gly Gly Tyr Lys Ala

165 170 175

Ala Asp Met Trp Gly Pro Ser Ser Asp Pro Ala Trp Glu Arg Asn Asp

180 185 190
 Pro Thr Gln Gln Ile Pro Lys Leu Val Ala Asn Asn Thr Arg Leu Trp
 195 200 205
 Val Tyr Cys Gly Asn Gly Thr Pro Asn Glu Leu Gly Gly Ala Asn Ile
 210 215 220
 Pro Ala Glu Phe Leu Glu Asn Phe Val Arg Ser Ser Asn Leu Lys Phe
 225 230 235 240
 Gln Asp Ala Tyr Asn Ala Ala Gly Gly His Asn Ala Val Phe Asn Phe
 245 250 255

 Pro Pro Asn Gly Thr His Ser Trp Glu Tyr Trp Gly Ala Gln Leu Asn
 260 265 270
 Ala Met Lys Gly Asp Leu Gln Ser Ser Leu Gly Ala Gly
 275 280 285
 <210> 6
 <211> 880
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pET29 vector
 <400> 6
 His Met Thr Ile Asn Tyr Gln Phe Gly Asp Val Asp Ala His Gly Ala
 1 5 10 15
 Met Ile Arg Ala Gln Ala Gly Ser Leu Glu Ala Glu His Gln Ala Ile

 20 25 30
 Ile Ser Asp Val Leu Thr Ala Ser Asp Phe Trp Gly Gly Ala Gly Ser
 35 40 45
 Ala Ala Cys Gln Gly Phe Ile Thr Gln Leu Gly Arg Asn Phe Gln Val
 50 55 60
 Ile Tyr Glu Gln Ala Asn Ala His Gly Gln Lys Val Gln Ala Ala Gly
 65 70 75 80
 Asn Asn Met Ala Gln Thr Asp Ser Ala Val Gly Ser Ser Trp Ala Asp

85 90 95

Asp Ile Asp Trp Asp Ala Ile Ala Gln Cys Glu Ser Gly Gly Asn Trp
 100 105 110
 Ala Ala Asn Thr Gly Asn Gly Leu Tyr Gly Gly Leu Gln Ile Ser Gln
 115 120 125
 Ala Thr Trp Asp Ser Asn Gly Gly Val Gly Ser Pro Ala Ala Ala Ser
 130 135 140
 Pro Gln Gln Gln Ile Glu Val Ala Asp Asn Ile Met Lys Thr Gln Gly

 145 150 155 160
 Pro Gly Ala Trp Pro Lys Cys Ser Ser Cys Ser Gln Gly Asp Ala Pro
 165 170 175
 Leu Gly Ser Leu Thr His Ile Leu Thr Phe Leu Ala Ala Glu Thr Gly
 180 185 190
 Gly Cys Ser Gly Ser Arg Asp Asp Val Val Asp Phe Gly Ala Leu Pro
 195 200 205
 Pro Glu Ile Asn Ser Ala Arg Met Tyr Ala Gly Pro Gly Ser Ala Ser

 210 215 220
 Leu Val Ala Ala Ala Lys Met Trp Asp Ser Val Ala Ser Asp Leu Phe
 225 230 235 240
 Ser Ala Ala Ser Ala Phe Gln Ser Val Val Trp Gly Leu Thr Val Gly
 245 250 255
 Ser Trp Ile Gly Ser Ser Ala Gly Leu Met Ala Ala Ala Ala Ser Pro
 260 265 270
 Tyr Val Ala Trp Met Ser Val Thr Ala Gly Gln Ala Gln Leu Thr Ala

 275 280 285
 Ala Gln Val Arg Val Ala Ala Ala Ala Tyr Glu Thr Ala Tyr Arg Leu
 290 295 300
 Thr Val Pro Pro Pro Val Ile Ala Glu Asn Arg Thr Glu Leu Met Thr
 305 310 315 320
 Leu Thr Ala Thr Asn Leu Leu Gly Gln Asn Thr Pro Ala Ile Glu Ala
 325 330 335
 Asn Gln Ala Ala Tyr Ser Gln Met Trp Gly Gln Asp Ala Glu Ala Met

340 345 350
 Tyr Gly Tyr Ala Ala Thr Ala Ala Thr Ala Thr Glu Ala Leu Leu Pro
 355 360 365
 Phe Glu Asp Ala Pro Leu Ile Thr Asn Pro Gly Gly Leu Leu Glu Gln
 370 375 380
 Ala Val Ala Val Glu Glu Ala Ile Asp Thr Ala Ala Ala Asn Gln Leu
 385 390 395 400
 Met Asn Asn Val Pro Gln Ala Leu Gln Gln Leu Ala Gln Pro Ala Gln

 405 410 415
 Gly Val Val Pro Ser Ser Lys Leu Gly Gly Leu Trp Thr Ala Val Ser
 420 425 430
 Pro His Leu Ser Pro Leu Ser Asn Val Ser Ser Ile Ala Asn Asn His
 435 440 445
 Met Ser Met Met Gly Thr Gly Val Ser Met Thr Asn Thr Leu His Ser
 450 455 460
 Met Leu Lys Gly Leu Ala Pro Ala Ala Ala Gln Ala Val Glu Thr Ala

 465 470 475 480
 Ala Glu Asn Gly Val Trp Ala Met Ser Ser Leu Gly Ser Gln Leu Gly
 485 490 495
 Ser Ser Leu Gly Ser Ser Gly Leu Gly Ala Gly Val Ala Ala Asn Leu
 500 505 510
 Gly Arg Ala Ala Ser Val Gly Ser Leu Ser Val Pro Pro Ala Trp Ala
 515 520 525
 Ala Ala Asn Gln Ala Val Thr Pro Ala Ala Arg Ala Leu Pro Leu Thr

 530 535 540
 Ser Leu Thr Ser Ala Ala Gln Thr Ala Pro Gly His Met Leu Gly Gly
 545 550 555 560
 Leu Pro Leu Gly His Ser Val Asn Ala Gly Ser Gly Ile Asn Asn Ala
 565 570 575
 Leu Arg Val Pro Ala Arg Ala Tyr Ala Ile Pro Arg Thr Pro Ala Ala
 580 585 590

Gly Phe Ser Arg Pro Gly Leu Pro Val Glu Tyr Leu Gln Val Pro Ser

595 600 605

Pro Ser Met Gly Arg Asp Ile Lys Val Gln Phe Gln Ser Gly Gly Asn

610 615 620

Asn Ser Pro Ala Val Tyr Leu Leu Asp Gly Leu Arg Ala Gln Asp Asp

625 630 635 640

Tyr Asn Gly Trp Asp Ile Asn Thr Pro Ala Phe Glu Trp Tyr Tyr Gln

645 650 655

Ser Gly Leu Ser Ile Val Met Pro Val Gly Gly Gln Ser Ser Phe Tyr

660 665 670

Ser Asp Trp Tyr Ser Pro Ala Cys Gly Lys Ala Gly Cys Gln Thr Tyr

675 680 685

Lys Trp Glu Thr Phe Leu Thr Ser Glu Leu Pro Gln Trp Leu Ser Ala

690 695 700

Asn Arg Ala Val Lys Pro Thr Gly Ser Ala Ala Ile Gly Leu Ser Met

705 710 715 720

Ala Gly Ser Ser Ala Met Ile Leu Ala Ala Tyr His Pro Gln Gln Phe

725 730 735

Ile Tyr Ala Gly Ser Leu Ser Ala Leu Leu Asp Pro Ser Gln Gly Met

740 745 750

Gly Pro Ser Leu Ile Gly Leu Ala Met Gly Asp Ala Gly Gly Tyr Lys

755 760 765

Ala Ala Asp Met Trp Gly Pro Ser Ser Asp Pro Ala Trp Glu Arg Asn

770 775 780

Asp Pro Thr Gln Gln Ile Pro Lys Leu Val Ala Asn Asn Thr Arg Leu

785 790 795 800

Trp Val Tyr Cys Gly Asn Gly Thr Pro Asn Glu Leu Gly Gly Ala Asn

805 810 815

Ile Pro Ala Glu Phe Leu Glu Asn Phe Val Arg Ser Ser Asn Leu Lys

820 825 830

Phe Gln Asp Ala Tyr Asn Ala Ala Gly Gly His Asn Ala Val Phe Asn

835	840	845	
Phe Pro Pro Asn Gly Thr His Ser Trp Glu Tyr Trp Gly Ala Gln Leu			
850	855	860	
Asn Ala Met Lys Gly Asp Leu Gln Ser Ser Leu Gly Ala Gly Lys Leu			
865	870	875	880
<210> 7			
<211> 2637			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> Fusion protein ID91			
<400> 7			
accatcaact atcaattcgg ggacgtcgac gctcacggcg ccatgatccg cgctcaggcc	60		
gggtcgtctgg aggccgagca tcaggccatc atttctgatg tgttgaccgc gactgacttt	120		
tggggcggcg ccggttcggc ggccctgccag gggttcatta cccagctggg ccgtaacttc	180		
caggtgatct acgagcaggc caacgcccac gggcagaagg tgcaggctgc cggcaacaac	240		
atggcacaaa ccgacagcgc cgtcggctcc agctgggccg acgacatcga ttgggacgcc	300		
atcgcgcaat gcgaatccgg cggcaattgg gcggccaaca ccggtaacgg gttatacgg	360		
ggtctgcaga tcagccaggc gacgtgggat tccaacggtg gtgtcgggtc gccggcggcc	420		
gcgagtcgcc agcaacagat cgaggtcgca gacaacatta tgaaaacca aggcccggt	480		
gcgtggccga aatgtagttc ttgtagtcag ggagacgcac cgctgggctc gtcacccac	540		
atcctgacgt tcctcgccgc cgagactgga ggttggttcgg ggagcaggga cgatgtggtg	600		
gatttcgggg cgtaaccacc ggagatcaac tcgcgagga tgtacgccg cccgggttcg	660		
gcctcgtctgg tggccgccgc gaagatgtgg gacagcgtgg cgagtgcct gttttcggcc	720		
gcgtcggcgt ttcagtcggt ggtctggggt ctgacggtgg ggtcgtggat aggttcgtcg	780		
gcgggtctga tggcggcggc ggccctgccg tatgtggcgt ggatgagcgt caccgcgggg	840		
caggccacgc tgaccgccgc ccaggtccgg gttgctgcgg cggcctacga gacagcgtat	900		
aggctgacgg tgccccgcc ggtgatcgcc gagaaccgta ccgaactgat gacgctgacc	960		
gcgaccaacc tcttggggca aaacacgccg gcgatcgagg ccaatcaggc cgcatacagc	1020		
cagatgtggg gccaaagacgc ggaggcgtat tatggctacg ccgccacggc ggcgacggcg	1080		
accgaggcgt tgctgccgtt cgaggacgcc cactgatca ccaaccccg cgggctcctt	1140		
gagcaggccg tcgcggtcga ggaggccatc gacaccgccg cggcgaacca gttgatgaac	1200		

aatgtgcccc aagcgtgca acagctggcc cagccagcgc agggcgtcgt accttcttcc	1260
aagctgggtg ggctgtggac ggcgtctctg ccgcattctgt cgcgcctcag caacgtcagt	1320
tcgatagcca acaaccacat gtcgatgatg ggcacgggtg tgtcgatgac caacaccttg	1380
cactcgatgt tgaagggtt agctccggcg gcggctcagg ccgtggaaac cgcggcggaa	1440
aacggggtct gggcgatgag ctgcgtgggc agccagctgg gttcgtcgt gggttcttctg	1500
ggctctggcg ctggggtggc cgccaacttg ggtcgggcgg cctcggtcgg ttcgttgctg	1560
gtgccccag catgggccgc ggccaaccag gcggtcacc cggcggcgcg ggcgctgccg	1620
ctgaccagcc tgaccagcgc cgcccaaac gcccccggac acatgctggg cgggctaccg	1680
ctggggcact cggtaacgc cggcagcggg atcaacaatg cgctcgggt gccggcacgg	1740
gcctacgca taccgcgac accggccgc ggattctccc ggccggggct gccggtcag	1800
tacctgcagg tgccgtcgcc gtcgatgggc cgcgacatca aggttcagtt ccagagcgg	1860
gggaacaact cactgcggg ttatctgtc gacggcctgc gcgccaaga cgactacaac	1920
ggctgggata tcaacacccc ggcgttcgag tggtaactacc agtcgggact gtcgatagtc	1980
atgccggtcg gcgggcagtc cagttctac agcgactgg acagcccgc ctgcggtgag	2040
gctggctgcc agacttaca gtgggaaacc ttctgacca gcgagctgcc gcaatggttg	2100
tccccaaca gggccgtgaa gccaccggc agcgtgcaa tcggcttgct gatggccggc	2160
tcgtcggcaa tgatcttggc cgcctaccac cccagcagtc tatctacgc cggctcgtg	2220
tcggccctgc tggaccctc tcaggggatg gggcctagcc tgatcggcct cgcgatgggt	2280
gacgcggcg gttacaaggc cgcagacatg tggggtccct cgagtgacc ggcattgggag	2340
cgcaacgacc ctacgcagca gatcccaag ctggtcgaa acaacaccg gctatgggtt	2400
tattcgggga acggcaccgc gaacgagttg ggcggtgcca acataccgc cgagttcttg	2460
gagaacttcg ttcgtagcag caacctgaag ttccagatg cgtacaacgc cgcgggcggg	2520
cacaacgccg tgttcaactt cccgccaac ggcacgcaca gctgggagta ctggggcgct	2580
cagctcaacg ccatgaaggg tgacctgcag agttcgtag gcgccggtg aaagctt	2637
<210> 8	
<211> 279	
<212> DNA	
<213> Mycobacterium tuberculosis	
<400> 8	
accatcaact atcaattcgg ggacgtcgac gtcacggcg ccatgatccg cgctcaggcc	60
gggtcgtcgg aggccgagca tcaggccatc atttctgatg tgttgaccgc gactgacttt	120

tggggcggcg ccggttcggc ggcctgccag gggttcatta cccagctggg ccgtaacttc 180
caggtgatct acgagcaggc caacgcccac gggcagaagg tgcaggctgc cggcaacaac 240
atggcacaaa ccgacagcgc cgtcggctcc agctgggcc 279

<210> 9
<211> 315
<212> DNA
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 9

gacgacatcg attgggacgc catcgcgcaa tgcgaatccg gcggcaattg ggcgccaac 60

accggtaacg ggtatatacg tggctcgcag atcagccagg cgacgtggga ttccaacggt 120
ggtgtcgggt cgcggcgccg cgcgagtcac cagcaacaga tcgaggtcgc agacaacatt 180
atgaaaaccc aaggcccggtg tgcgtggccg aaatgtagtt cttgtagtca gggagacgca 240
ccgctgggct cgtcaccca catcctgacg ttctctcgcg ccgagactgg aggttggttcg 300
gggagcaggg acgat 315

<210> 10
<211> 1179
<212> DNA
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 10

gtggtggatt tcggggcggt accaccggag atcaactccg cgaggatgta cgccggcccg 60

ggttcggcct cgctggtggc cgccgcgaag atgtgggaca gcgtggcgag tgacctgttt 120
tcggcccgct cggcggttca gtcggtggtc tggggtctga cggcggggtc gtggataggt 180
tcgtcggcgg gtctgatggc ggcggcgccg tcgccgtatg tggcgtggat gagcgtcacc 240
gcggggcagg cccagctgac cgccgcccag gtccgggttg ctgcggcgcc ctacagaca 300
gcgtataggc tgacggtgcc cccgccggtg atcgccgaga accgtaccga actgatgacg 360
ctgaccgca ccaacctctt ggggcaaaac acgccggcga tcgaggccaa tcaggccgca 420
tacagccaga tgtggggcca agacgcggag gcgatgtatg gctacgccgc caccggcgcg 480

acggcgaccg aggcgttgct gccgttcgag gacgccccac tgatcaccaa ccccgcgggg 540
ctccttgagc agcccgctgc ggtcaggag gccatcgaca ccgcccgcc gaaccagttg 600
atgaacaatg tgcccaagc gctgcaacag ctggcccgag cagcgaggcg cgtcgtacct 660
tcttccaagc tgggtgggct gtggacggcg gtctcgccgc atctgtcgcc gtcagcaac 720
gtcagttcga tagccaacaa ccacatgtcg atgatgggca cgggtgtgtc gatgaccaac 780

accttgcaact cgatgttgaa gggcttagct ccggcggcgg ctcaggccgt ggaaaccgcg	840
gcggaaaacg gggctctggc gatgagctcg ctgggcagcc agctgggttc gtcgctgggt	900
tcttcgggtc tgggcgctgg ggtggccgcc aacttgggtc gggcggcctc ggtcggttcg	960
ttgtcgggtc cgccagcatg ggccgcggcc aaccaggcgg tcaccccgcc ggcgcgggcg	1020
ctgccgtga ccagcctgac cagcggccgc caaacccccc ccggacacat gctgggcggg	1080
ctaccgtgg ggcaactcgt caacccggc agcggatatca acaatgcgt gcgggtgccg	1140
gcacgggcct acgcgatacc ccgcacaccg gccgcggga	1179
<210> 11	
<211> 855	
<212> DNA	
<213> Mycobacterium tuberculosis	
<400> 11	
ttctcccgcc cggggctgcc ggtcgagtac ctgcaggtgc cgtcgccgtc gatgggccgc	60
gacatcaagg ttcaattcca gagcgggtggg aacaactcac ctgcggttta tetgctcgac	120
ggcctgcgcg cccaagacga ctacaacggc tgggatatca acaccccgcc gttcgagtgg	180
tactaccagt cgggactgtc gatagtcatg ccggtcggcg ggcagtcag cttctacagc	240
gactggtaca gcccgccctg ccgtaaggct ggctgccaga cttacaagt ggaaaccttc	300
ctgaccagcg agctgccga atggttgtcc gccaacaggg ccgtgaagcc caccggcagc	360
gctgcaatcg gcttgtcgat ggccggctcg tcggcaatga tcttggccgc ctaccacccc	420
cagcagttca tctacgccg ctcgctgtcg gccctgctgg acccctctca ggggatgggg	480
cctagcctga tcggcctcgc gatgggtgac gccggcgggtt acaaggccgc agacatgtgg	540
ggtcctctga gtgaccggc atgggagcgc aacgacctc cgcagcagat ccccaagctg	600
gtcgcaaaca acacccggct atgggtttat tgcgggaacg gcaccccgaa cgagttgggc	660
ggtgccaaca tacccgccga gttcttggag aacttcgttc gtagcagca cctgaagtgc	720
caggatgcgt acaacgccgc gggcgggcac aacgccgtgt tcaacttccc gcccaacggc	780
acgcacagct gggagtactg gggcgtcag ctcaaccca tgaagggtga cctgcagagt	840
tcgttaggcg ccggc	855
<210> 12	
<211> 2643	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> pET29 vector

<400> 12

catatgacca tcaactatca attcggggac gtcgacgctc acggcgccat gatccgcgct	60
caggccgggt cgctggaggc cgagcatcag gccatcattt ctgatgtgtt gaccgcgagt	120
gacttttggg gcggcgccgg ttcggcggcc tgccagggggt tcattacca gctgggccgt	180
aattccagg tgatctacga gcaggccaac gcccacgggc agaagggtgca ggctgccggc	240
aacaacatgg cacaaacga cagcgccgtc ggctccagct gggccgacga catcgattgg	300
gacgccatcg cgcaatgcga atccggcggc aattgggcgg ccaacaccgg taacgggtta	360
tacggtggtc tgcagatcag ccaggcgacg tgggattcca acggtggtgt cgggtcgccg	420
gcggcccgga gtccccagca acagatcgag gtcgcagaca acattatgaa aaccaaggc	480
ccgggtgcgt ggccgaaatg tagttcttgt agtcaggag acgcaccgt gggctcgctc	540
accacatcc tgacgttctt cgccggcgag actggagggt gttcggggag caggacgat	600
gtggtggtt tcggggcggt accaccggag atcaactccg cgaggatgta cggcgcccg	660
ggttcggcct cgctggtggc gcgcggaag atgtgggaca gcgtggcgag tgacctgttt	720
tcggcccgct cggcggttca gtcggtggtc tggggtctga cggtggggtc gtggataggt	780
tcgtcggcgg gtctgatggc ggccggcgcc tcgccgtatg tggcgtggat gagcgtcacc	840
gcggggcagg ccagctgac gcgcggccag gtccgggttg ctgcggcgcc ctacgagaca	900
gcgtataggc tgacggtgcc cccgccgtg atcgccgaga accgtaccga actgatgacg	960
ctgaccgca ccaacctctt ggggcaaac acgccggcga tcgaggcaa tcaggccgca	1020
tacagccaga tgtggggcca agacgaggag gcgatgtatg gctacgccg cacggcggcg	1080
acggcgaccg aggcgttctt gccgttcgag gacgccccac tgatcacaa ccccgcggg	1140
ctccttgagc aggcgctgc ggtcgaggag gccatcgaca ccgcccggc gaaccagttg	1200
atgaacaatg tgcccaagc gctgcaacag ctggcccagc cagcgaggc cgtcgtacct	1260
tcttccaagc tgggtgggt gtggacggcg gtctcgccg atctgtgcc gtcagcaac	1320
gtcagttcga tagccaaca ccacatgtcg atgatgggca cgggtgtgtc gatgaccaac	1380
accttgact cgatgttgaa gggcttagct ccggcgcgcg ctgaggccgt ggaaaccgcg	1440
gcggaaaacg gggctgggc gatgagctcg ctgggcagcc agctgggttc gtcgtgggt	1500
tcttcgggtc tggcgctgg ggtggccgc aacttgggtc gggcggcctc ggtcggttcg	1560
ttgtcggtgc cgccagcatg ggccgcggc aaccaggcgg tcaccccggc ggcgcgggcg	1620
ctgccgtga ccagctgac cagcgccgc caaacgccc ccggacacat gctgggcggg	1680
ctaccgtgg ggactcggt caacccggc agcggtatca acaatgcgt gcgggtgccg	1740

gcacgggcct acgcgatacc ccgcacaccg gccgccggat tctcccggcc ggggctgccg 1800
gtcagtagtacc tgcagggtgcc gtcgccgtcg atgggccgcg acatcaaggt tcagttccag 1860
agcgggtggga acaactcacc tgcggtttat ctgctcgacg gcctgcgcgc ccaagacgac 1920
tacaacggct gggatatcaa caccgccgcg ttcgagtggg actaccagtc gggactgtcg 1980
atagtcatgc cggtcggcgg gcagtcacgc ttctacagcg actggtacag cccggcctgc 2040

ggtaaggctg gctgccagac ttacaagtgg gaaaccttcc tgaccagcga gctgccgcaa 2100
tggttgtccg ccaacagggc cgtgaagccc accggcagcg ctgcaatcgg cttgtcgatg 2160
gccggctcgt cggcaatgat cttggccgcc taccaccccc agcagttcat ctacgccggc 2220
tcgctgtcgg cctgtctgga cccctctcag gggatggggc ctacgctgat cggcctcgcg 2280
atgggtgacg ccggcgggta caaggccgca gacatgtggg gtcctctgag tgaccgggca 2340
tgggagcgca acgacctac gcagcagatc cccaagctgg tcgcaaaca caccgggcta 2400
tgggtttatt gcgggaacgg caccgccaac gagttgggcg gtgccaacat acccgccgag 2460

ttcttggaga acttcgttcg tagcagcaac ctgaagtcc aggatgcgta caacgccgcg 2520
ggcgggcaca acgacctgtt caacttcccg cccaacggca cgcacagctg ggagtactgg 2580
ggcgtctcagc tcaacgcat gaagggtgac ctgcagagtt cgtaggcgc cggctgaaag 2640
ctt 2643

<210> 13

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> JEVss-FWD

<400> 13

gtcggcctcc ctggctgtgg tcattgcctg cgtgggagca gccgaggtga ccaggagagg 60

<210> 14

<211> 59

<212>

> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> JEVss-REV

<400> 14

cacatgattg atccggcact cctcttgccc atggcggcgg cgtgagctgg cggcgggtg 59

<210> 15

<211> 56

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ZIKVss-FWD
 <400> 15
 ggaatcgtgg gcctgctgct gaccacagca atggcagccg aggtgaccag gagagg 56
 <210> 16
 <211> 54
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ZIKVss-REV
 <400> 16
 cacggatgtg tctgctcctc tccgcatggc ggcggtgtga gctggcggtg ggtg 54
 <210>
 > 17
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ZIKV-prM-E-FWD
 <400> 17
 aatggactac gacatagtcg ccgccgcat g 31
 <210> 18
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ZIKV-prM-E-REV
 <400> 18
 gcggtttttg acaccgcggt caggcagaca cggtg 35
 <210> 19
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Id91 epitope 1
 <400> 19
 His Met Thr Ile Asn Tyr Gln Phe Gly Asp Val Asp Ala His Gly

1 5 10 15

<210> 20

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 2

<400> 20

Phe Gly Asp Val Asp Ala His Gly Ala Met Ile Arg Ala Gln Ala

1 5 10 15

<210> 21

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 3

<400> 21

Gly Ala Met Ile Arg Ala Gln Ala Gly Ser Leu Glu Ala Glu His

1 5 10 15

<210> 22

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 4

<400> 22

Ala Gly Ser Leu Glu Ala Glu His Gln Ala Ile Ile Ser Asp Val

1 5 10 15

<210> 23

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 5

<400> 23

His Gln Ala Ile Ile Ser Asp Val Leu Thr Ala Ser Asp Phe Trp

1 5 10 15

<210> 24

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 6

<400> 24

Val Leu Thr Ala Ser Asp Phe Trp Gly Gly Ala Gly Ser Ala Ala

1 5 10 15

<210> 25

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 7

<400> 25

Trp Gly Gly Ala Gly Ser Ala Ala Cys Gln Gly Phe Ile Thr Gln

1 5 10 15

<210> 26

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 8

<400> 26

Ala Cys Gln Gly Phe Ile Thr Gln Leu Gly Arg Asn Phe Gln Val

1 5 10 15

<210> 27

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 9

<400> 27

Gln Leu Gly Arg Asn Phe Gln Val Ile Tyr Glu Gln Ala Asn Ala

1 5 10 15

<210> 28

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 10

<400> 28

Val Ile Tyr Glu Gln Ala Asn Ala His Gly Gln Lys Val Gln Ala

1 5 10 15

<210> 29

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 11

<400> 29

Ala His Gly Gln Lys Val Gln Ala Ala Gly Asn Asn Met Ala Gln

1 5 10 15

<210> 30

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 12

<400> 30

Ala Ala Gly Asn Asn Met Ala Gln Thr Asp Ser Ala Val Gly Ser

1 5 10 15

<210> 31

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 13

<400> 31

Gln Thr Asp Ser Ala Val Gly Ser Ser Trp Ala Asp Asp Ile Asp

1 5 10 15

<210> 32

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 14

<400> 32

Ser Ser Trp Ala Asp Asp Ile Asp Trp Asp Ala Ile Ala Gln Cys

1 5 10 15

<210> 33

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 15

<400> 33

Asp Trp Asp Ala Ile Ala Gln Cys Glu Ser Gly Gly Asn Trp Ala

1 5 10 15

<210> 34

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 16

<400> 34

Cys Glu Ser Gly Gly Asn Trp Ala Ala Asn Thr Gly Asn Gly Leu

1 5 10 15

<210> 35

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 17

<400> 35

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

1 5 10 15

<210> 36

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 18

<400> 36

Leu Tyr Gly Gly Leu Gln Ile Ser Gln Ala Thr Trp Asp Ser Asn

1 5 10 15

<210> 37

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 19

<400> 37

Ser Gln Ala Thr Trp Asp Ser Asn Gly Gly Val Gly Ser Pro Ala

1 5 10 15

<210> 38

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 20

<400> 38

Asn Gly Gly Val Gly Ser Pro Ala Ala Ala Ser Pro Gln Gln Gln

1 5 10 15

<210> 39

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 21

<400> 39

Ala Ala Ala Ser Pro Gln Gln Gln Ile Glu Val Ala Asp Asn Ile

1 5 10 15

<210> 40

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 22

<400> 40

Gln Ile Glu Val Ala Asp Asn Ile Met Lys Thr Gln Gly Pro Gly

1 5 10 15

<210> 41

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 23

<400> 41

Ile Met Lys Thr Gln Gly Pro Gly Ala Trp Pro Lys Cys Ser Ser

1 5 10 15

<210> 42

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 24

<400> 42

Gly Ala Trp Pro Lys Cys Ser Ser Cys Ser Gln Gly Asp Ala Pro

1 5 10 15

<210> 43

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 25

<400> 43

Ser Cys Ser Gln Gly Asp Ala Pro Leu Gly Ser Leu Thr His Ile

1 5 10 15

<210> 44

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 26

<400> 44

Pro Leu Gly Ser Leu Thr His Ile Leu Thr Phe Leu Ala Ala Glu

1 5 10 15

<210> 45

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 27

<400> 45

Ile Leu Thr Phe Leu Ala Ala Glu Thr Gly Gly Cys Ser Gly Ser

1 5 10 15

<210> 46

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 28

<400> 46

Glu Thr Gly Gly Cys Ser Gly Ser Arg Asp Asp Val Val Asp Phe

1 5 10 15

<210> 47

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 29

<400> 47

Ser Arg Asp Asp Val Val Asp Phe Gly Ala Leu Pro Pro Glu Ile

1 5 10 15

<210> 48

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 30

<400> 48

Phe Gly Ala Leu Pro Pro Glu Ile Asn Ser Ala Arg Met Tyr Ala

1 5 10 15

<210> 49
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Id91 epitope 31
 <400> 49
 Ile Asn Ser Ala Arg Met Tyr Ala Gly Pro Gly Ser Ala Ser Leu
 1 5 10 15

<210> 50
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Id91 epitope 32
 <400> 50
 Ala Gly Pro Gly Ser Ala Ser Leu Val Ala Ala Ala Lys Met Trp
 1 5 10 15

<210> 51
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Id91 epitope 33
 <400> 51
 Leu Val Ala Ala Ala Lys Met Trp Asp Ser Val Ala Ser Asp Leu
 1 5 10 15

<210> 52
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Id91 epitope 34
 <400> 52
 Trp Asp Ser Val Ala Ser Asp Leu Phe Ser Ala Ala Ser Ala Phe
 1 5 10 15

<210> 53

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 35

<400> 53

Leu Phe Ser Ala Ala Ser Ala Phe Gln Ser Val Val Trp Gly Leu

1 5 10 15

<210> 54

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 36

<400> 54

Phe Gln Ser Val Val Trp Gly Leu Thr Val Gly Ser Trp Ile Gly

1 5 10 15

<210> 55

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 37

<400> 55

Leu Thr Val Gly Ser Trp Ile Gly Ser Ser Ala Gly Leu Met Ala

1 5 10 15

<210> 56

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 38

<400> 56

Gly Ser Ser Ala Gly Leu Met Ala Ala Ala Ala Ser Pro Tyr Val

1 5 10 15

<210> 57

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 39

<400> 57

Ala Ala Ala Ala Ser Pro Tyr Val Ala Trp Met Ser Val Thr Ala

1 5 10 15

<210> 58

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 40

<400> 58

Val Ala Trp Met Ser Val Thr Ala Gly Gln Ala Gln Leu Thr Ala

1 5 10 15

<210> 59

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 41

<400> 59

Ala Gly Gln Ala Gln Leu Thr Ala Ala Gln Val Arg Val Ala Ala

1 5 10 15

<210> 60

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 42

<400> 60

Ala Ala Gln Val Arg Val Ala Ala Ala Tyr Glu Thr Ala Tyr

1 5 10 15

<210> 61

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 43

<400> 61

Ala Ala Ala Tyr Glu Thr Ala Tyr Arg Leu Thr Val Pro Pro Pro

1 5 10 15

<210> 62

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 44

<400> 62

Tyr Arg Leu Thr Val Pro Pro Pro Val Ile Ala Glu Asn Arg Thr

1 5 10 15

<210> 63

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 45

<400> 63

Pro Val Ile Ala Glu Asn Arg Thr Glu Leu Met Thr Leu Thr Ala

1 5 10 15

<210> 64

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 46

<400> 64

Thr Glu Leu Met Thr Leu Thr Ala Thr Asn Leu Leu Gly Gln Asn

1 5 10 15

<210> 65

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 47

<400> 65

Ala Thr Asn Leu Leu Gly Gln Asn Thr Pro Ala Ile Glu Ala Asn

1 5 10 15

<210> 66

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 48

<400> 66

Asn Thr Pro Ala Ile Glu Ala Asn Gln Ala Ala Tyr Ser Gln Met

1 5 10 15

<210> 67

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 49

<400> 67

Asn Gln Ala Ala Tyr Ser Gln Met Trp Gly Gln Asp Ala Glu Ala

1 5 10 15

<210> 68

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 50

<400> 68

Met Trp Gly Gln Asp Ala Glu Ala Met Tyr Gly Tyr Ala Ala Thr

1 5 10 15

<210> 69

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 51

<400> 69

Ala Met Tyr Gly Tyr Ala Ala Thr Ala Ala Thr Ala Thr Glu Ala

1 5 10 15

<210> 70

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 52

<400> 70

Thr Ala Ala Thr Ala Thr Glu Ala Leu Leu Pro Phe Glu Asp Ala

1 5 10 15

<210> 71

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 53

<400> 71

Ala Leu Leu Pro Phe Glu Asp Ala Pro Leu Ile Thr Asn Pro Gly

1 5 10 15

<210> 72

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 54

<400> 72

Ala Pro Leu Ile Thr Asn Pro Gly Gly Leu Leu Glu Gln Ala Val

1 5 10 15

<210> 73

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 55

<400> 73

Gly Gly Leu Leu Glu Gln Ala Val Ala Val Glu Glu Ala Ile Asp

1 5 10 15

<210> 74

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 56

<400> 74

Val Ala Val Glu Glu Ala Ile Asp Thr Ala Ala Ala Asn Gln Leu

1 5 10 15

<210> 75

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 57

<400> 75

Asp Thr Ala Ala Ala Asn Gln Leu Met Asn Asn Val Pro Gln Ala

1 5 10 15

<210> 76

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 58

<400> 76

Leu Met Asn Asn Val Pro Gln Ala Leu Gln Gln Leu Ala Gln Pro

1 5 10 15

<210> 77

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 59

<400> 77

Ala Leu Gln Gln Leu Ala Gln Pro Ala Gln Gly Val Val Pro Ser

1 5 10 15

<210> 78

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 60

<400> 78

Pro Ala Gln Gly Val Val Pro Ser Ser Lys Leu Gly Gly Leu Trp

1 5 10 15

<210> 79

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 61

<400> 79

Ser Ser Lys Leu Gly Gly Leu Trp Thr Ala Val Ser Pro His Leu

1 5 10 15

<210> 80

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 62

<400> 80

Trp Thr Ala Val Ser Pro His Leu Ser Pro Leu Ser Asn Val Ser

1 5 10 15

<210> 81

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 63

<400> 81

Leu Ser Pro Leu Ser Asn Val Ser Ser Ile Ala Asn Asn His Met

1 5 10 15

<210> 82

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 64

<400> 82

Ser Ser Ile Ala Asn Asn His Met Ser Met Met Gly Thr Gly Val

1 5 10 15

<210> 83

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 65

<400> 83

Met Ser Met Met Gly Thr Gly Val Ser Met Thr Asn Thr Leu His

1 5 10 15

<210> 84

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 66

<400> 84

Val Ser Met Thr Asn Thr Leu His Ser Met Leu Lys Gly Leu Ala

1 5 10 15

<210> 85

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 67

<400> 85

His Ser Met Leu Lys Gly Leu Ala Pro Ala Ala Ala Gln Ala Val Glu

1 5 10 15

<210> 86

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 68

<400> 86

Pro Ala Ala Ala Gln Ala Val Glu Thr Ala Ala Glu Asn Gly Val

1 5 10 15

<210> 87

<211> 15

<212> PRT

<213

> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 69

<400> 87

Glu Thr Ala Ala Glu Asn Gly Val Trp Ala Met Ser Ser Leu Gly

1 5 10 15

<210> 88

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 70

<400> 88

Val Trp Ala Met Ser Ser Leu Gly Ser Gln Leu Gly Ser Ser Leu

1 5 10 15

<210> 89

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 71

<400> 89

Gly Ser Gln Leu Gly Ser Ser Leu Gly Ser Ser Gly Leu Gly Ala

1 5 10 15

<210> 90

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 72

<400> 90

Leu Gly Ser Ser Gly Leu Gly Ala Gly Val Ala Ala Asn Leu Gly

1 5 10 15

<210> 91

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 73

<400> 91

Ala Gly Val Ala Ala Asn Leu Gly Arg Ala Ala Ser Val Gly Ser

1 5 10 15

<210> 92

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 74

<400> 92

Gly Arg Ala Ala Ser Val Gly Ser Leu Ser Val Pro Pro Ala Trp

1 5 10 15

<210> 93

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 75

<400> 93

Ser Leu Ser Val Pro Pro Ala Trp Ala Ala Ala Asn Gln Ala Val

1 5 10 15

<210> 94

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 76

<400> 94

Trp Ala Ala Ala Asn Gln Ala Val Thr Pro Ala Ala Arg Ala Leu

1 5 10 15

<210> 95

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 77

<400> 95

Val Thr Pro Ala Ala Arg Ala Leu Pro Leu Thr Ser Leu Thr Ser

1 5 10 15

<210> 96

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 78

<400> 96

Leu Pro Leu Thr Ser Leu Thr Ser Ala Ala Gln Thr Ala Pro Gly

1 5 10 15

<210> 97

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 79

<400> 97

Ser Ala Ala Gln Thr Ala Pro Gly His Met Leu Gly Gly Leu Pro

1 5 10 15

<210> 98

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 80

<400> 98

Gly His Met Leu Gly Gly Leu Pro Leu Gly His Ser Val Asn Ala

1 5 10 15

<210> 99

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 81

<400> 99

Pro Leu Gly His Ser Val Asn Ala Gly Ser Gly Ile Asn Asn Ala

1 5 10 15

<210> 100

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 82

<400> 100

Ala Gly Ser Gly Ile Asn Asn Ala Leu Arg Val Pro Ala Arg Ala

1 5 10 15

<210> 101

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 83

<400> 101

Ala Leu Arg Val Pro Ala Arg Ala Tyr Ala Ile Pro Arg Thr Pro

1 5 10 15

<210> 102

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 84

<400> 102

Ala Tyr Ala Ile Pro Arg Thr Pro Ala Ala Gly Phe Ser Arg Pro

1 5 10 15

<210> 103

<211> 15

<212> PRT

<213>

Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 85

<400> 103

Pro Ala Ala Gly Phe Ser Arg Pro Gly Leu Pro Val Glu Tyr Leu

1 5 10 15

<210> 104

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 86

<400> 104

Pro Gly Leu Pro Val Glu Tyr Leu Gln Val Pro Ser Pro Ser Met

1 5 10 15

<210> 105

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 87

<400> 105

Leu Gln Val Pro Ser Pro Ser Met Gly Arg Asp Ile Lys Val Gln

1 5 10 15

<210> 106

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 88

<400> 106

Met Gly Arg Asp Ile Lys Val Gln Phe Gln Ser Gly Gly Asn Asn

1 5 10 15

<210> 107

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 89

<400> 107

Gln Phe Gln Ser Gly Gly Asn Asn Ser Pro Ala Val Tyr Leu Leu

1 5 10 15

<210> 108

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 90

<400> 108

Asn Ser Pro Ala Val Tyr Leu Leu Asp Gly Leu Arg Ala Gln Asp

1 5 10 15

<210> 109

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 91

<400> 109

Leu Asp Gly Leu Arg Ala Gln Asp Asp Tyr Asn Gly Trp Asp Ile

1 5 10 15

<210> 110

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 92

<400> 110

Asp Asp Tyr Asn Gly Trp Asp Ile Asn Thr Pro Ala Phe Glu Trp

1 5 10 15

<210> 111

<211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Id91 epitope 93
 <400> 111
 Ile Asn Thr Pro Ala Phe Glu Trp Tyr Tyr Gln Ser Gly Leu Ser
 1 5 10 15
 <210> 112
 <211> 15
 <212> PRT
 <213>
 Artificial Sequence
 <220><223> Id91 epitope 94
 <400> 112
 Trp Tyr Tyr Gln Ser Gly Leu Ser Ile Val Met Pro Val Gly Gly
 1 5 10 15
 <210> 113
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Id91 epitope 95
 <400> 113
 Ser Ile Val Met Pro Val Gly Gly Gln Ser Ser Phe Tyr Ser Asp
 1 5 10 15
 <210> 114
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Id91 epitope 96
 <400> 114
 Gly Gln Ser Ser Phe Tyr Ser Asp Trp Tyr Ser Pro Ala Cys Gly
 1 5 10 15
 <210> 115
 <211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 97

<400> 115

Asp Trp Tyr Ser Pro Ala Cys Gly Lys Ala Gly Cys Gln Thr Tyr

1 5 10 15

<210> 116

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 98

<400> 116

Gly Lys Ala Gly Cys Gln Thr Tyr Lys Trp Glu Thr Phe Leu Thr

1 5 10 15

<210> 117

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 99

<400> 117

Tyr Lys Trp Glu Thr Phe Leu Thr Ser Glu Leu Pro Gln Trp Leu

1 5 10 15

<210> 118

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 100

<400> 118

Thr Ser Glu Leu Pro Gln Trp Leu Ser Ala Asn Arg Ala Val Lys

1 5 10 15

<210> 119

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 101

<400> 119

Leu Ser Ala Asn Arg Ala Val Lys Pro Thr Gly Ser Ala Ala Ile

1 5 10 15

<210> 120

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 102

<400> 120

Lys Pro Thr Gly Ser Ala Ala Ile Gly Leu Ser Met Ala Gly Ser

1 5 10 15

<210> 121

<211> 15

<212> PRT

<213>

> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 103

<400> 121

Ile Gly Leu Ser Met Ala Gly Ser Ser Ala Met Ile Leu Ala Ala

1 5 10 15

<210> 122

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 104

<400> 122

Ser Ser Ala Met Ile Leu Ala Ala Tyr His Pro Gln Gln Phe Ile

1 5 10 15

<210> 123

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 105

<400> 123

Ala Tyr His Pro Gln Gln Phe Ile Tyr Ala Gly Ser Leu Ser Ala

1 5 10 15

<210> 124

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 106

<400> 124

Ile Tyr Ala Gly Ser Leu Ser Ala Leu Leu Asp Pro Ser Gln Gly

1 5 10 15

<210> 125

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 107

<400> 125

Ala Leu Leu Asp Pro Ser Gln Gly Met Gly Pro Ser Leu Ile Gly

1 5 10 15

<210> 126

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 108

<400> 126

Gly Met Gly Pro Ser Leu Ile Gly Leu Ala Met Gly Asp Ala Gly

1 5 10 15

<210> 127

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 109

<400> 127

Gly Leu Ala Met Gly Asp Ala Gly Gly Tyr Lys Ala Ala Asp Met

1 5 10 15

<210> 128

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 110

<400> 128

Gly Gly Tyr Lys Ala Ala Asp Met Trp Gly Pro Ser Ser Asp Pro

1 5 10 15

<210> 129

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 111

<400> 129

Met Trp Gly Pro Ser Ser Asp Pro Ala Trp Glu Arg Asn Asp Pro

1 5 10 15

<210> 130

<211> 15

<212> PRT

<213>

> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 112

<400> 130

Pro Ala Trp Glu Arg Asn Asp Pro Thr Gln Gln Ile Pro Lys Leu

1 5 10 15

<210> 131

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 113

<400> 131

Pro Thr Gln Gln Ile Pro Lys Leu Val Ala Asn Asn Thr Arg Leu

1 5 10 15

<210> 132

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 114

<400> 132

Leu Val Ala Asn Asn Thr Arg Leu Trp Val Tyr Cys Gly Asn Gly

1 5 10 15

<210> 133

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 115

<400> 133

Leu Trp Val Tyr Cys Gly Asn Gly Thr Pro Asn Glu Leu Gly Gly

1 5 10 15

<210> 134

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 116

<400> 134

Gly Thr Pro Asn Glu Leu Gly Gly Ala Asn Ile Pro Ala Glu Phe

1 5 10 15

<210> 135

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 117

<400> 135

Gly Ala Asn Ile Pro Ala Glu Phe Leu Glu Asn Phe Val Arg Ser

1 5 10 15

<210> 136

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 118

<400> 136

Phe Leu Glu Asn Phe Val Arg Ser Ser Asn Leu Lys Phe Gln Asp

1 5 10 15

<210> 137

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 119

<400> 137

Ser Ser Asn Leu Lys Phe Gln Asp Ala Tyr Asn Ala Ala Gly Gly

1 5 10 15

<210> 138

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 120

<400> 138

Asp Ala Tyr Asn Ala Ala Gly Gly His Asn Ala Val Phe Asn Phe

1 5 10 15

<210> 139

<211> 15

<212> PRT

<213>

> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 121

<400> 139

Gly His Asn Ala Val Phe Asn Phe Pro Pro Asn Gly Thr His Ser

1 5 10 15

<210> 140

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 122

<400> 140

Phe Pro Pro Asn Gly Thr His Ser Trp Glu Tyr Trp Gly Ala Gln

1 5 10 15

<210> 141

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 123

<400> 141

Ser Trp Glu Tyr Trp Gly Ala Gln Leu Asn Ala Met Lys Gly Asp

1 5 10 15

<210> 142

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 124

<400> 142

Gln Leu Asn Ala Met Lys Gly Asp Leu Gln Ser Ser Leu Gly Ala

1 5 10 15

<210> 143

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Id91 epitope 125

<400> 143

Ala Met Lys Gly Asp Leu Gln Ser Ser Leu Gly Ala Gly Lys Leu

1 5 10 15