



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년03월21일  
(11) 등록번호 10-2376245  
(24) 등록일자 2022년03월15일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 9/00 (2006.01) A61K 31/7115 (2006.01)  
A61K 38/18 (2006.01) A61K 47/02 (2006.01)  
A61K 47/12 (2006.01) A61K 9/08 (2006.01)  
A61P 17/02 (2006.01) A61P 9/10 (2006.01)  
C07K 14/475 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
A61K 9/0019 (2013.01)  
A61K 31/7115 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2019-7000227  
(22) 출원일자(국제) 2017년06월06일  
심사청구일자 2020년06월01일  
(85) 번역문제출일자 2019년01월03일  
(65) 공개번호 10-2019-0039066  
(43) 공개일자 2019년04월10일  
(86) 국제출원번호 PCT/US2017/036188  
(87) 국제공개번호 WO 2017/214175  
국제공개일자 2017년12월14일  
(30) 우선권주장  
62/346,979 2016년06월07일 미국(US)  
(뒷면에 계속)
- (56) 선행기술조사문헌  
JP2014511694 A\*  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌
- (73) 특허권자  
모더나티엑스, 인크.  
미국 02139 매사추세츠주 케임브리지 테크놀로지 스퀘어 200  
(72) 발명자  
파런더 라이프 칼슨  
스웨덴 에스이-431 83 뮐른달 아스트라제네카 에이비  
프리체 다니엘슨 레지나 데지레  
스웨덴 에스이-431 83 뮐른달 아스트라제네카 에이비  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
김진희, 김태홍

전체 청구항 수 : 총 20 항

심사관 : 강덕희

(54) 발명의 명칭 VEGF-A 폴리펩타이드를 인코딩하는 변형된 RNA, 이와 관련된 제제 및 용도

(57) 요약

본 개시는 VEGF-A 폴리펩타이드를 인코딩하는 변형된 RNA 분자 및 상기 변형된 RNA를 포함하는 제제에 관한 것이다. 추가로, 본 개시의 양태는 VEGF-A 요법에 반응성인 질병을 앓고 있는 대상체의 치료에 있어서 상기 변형된 RNA를 포함하는 제제의 제조 및 용도에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

**A61K 38/1866** (2013.01)  
**A61K 47/02** (2013.01)  
**A61K 47/12** (2013.01)  
**A61K 9/08** (2013.01)  
**A61P 17/02** (2018.01)  
**A61P 9/10** (2018.01)  
**C07K 14/475** (2013.01)

(72) 발명자

**헨슨 케니 미카엘**

스웨덴 에스이-431 83 뮐른달 아스트라제네카 에이비

**간 리밍**

스웨덴 에스이-431 83 뮐른달 아스트라제네카 에이비

**클라크 조나단**

스웨덴 171 65 스톡홀름 베르젤리우스 바그 35 카롤린스카 연구소

**에젤 안-샬롯 에바**

스웨덴 에스이-431 83 뮐른달 아스트라제네카 에이비

**치엔 케니스 렌달**

스웨덴 에스이 171 65 스톡홀름 베르젤리우스 바그 35 카롤린스카 연구소

(30) 우선권주장

62/411,091 2016년10월21일 미국(US)

62/432,005 2016년12월09일 미국(US)

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

SEQ ID NO: 2의 VEGF-A 폴리펩타이드를 인코딩하는 변형된 mRNA 및 시트레이트 식염수 완충제를 포함하는 조성물로서, 상기 시트레이트 식염수 완충제에는 실질적으로 2가 양이온이 없는 것인 조성물.

#### 청구항 2

약학적으로 허용 가능한 양의, SEQ ID NO: 2의 VEGF-A 폴리펩타이드를 인코딩하는 변형된 mRNA 및 시트레이트 식염수 완충제를 포함하는 제제로서, 상기 시트레이트 식염수 완충제에는 실질적으로 2가 양이온이 없는 것인 제제.

#### 청구항 3

제2항에 있어서, 시트레이트 식염수 완충제에는 실질적으로 칼슘 및 마그네슘이 없는 것인 제제.

#### 청구항 4

제2항에 있어서, 시트레이트 식염수 완충제가 칼슘 또는 마그네슘을 함유하지 않는 것인 제제.

#### 청구항 5

제2항에 있어서, 약학적으로 허용 가능한 부형제를 추가로 포함하고, 경우에 따라 상기 약학적으로 허용 가능한 부형제는 용매, 분산 매질, 희석제, 분산제, 현탁 보조제, 표면 활성제, 등장성제, 농조화 또는 유화 작용제, 보존제, 코어-셸 나노입자, 중합체, 펩타이드, 단백질, 세포, 히알루로니다제, 및 이들의 혼합물로부터 선택되는 것인 제제.

#### 청구항 6

SEQ ID NO: 2의 VEGF-A 폴리펩타이드를 인코딩하는 변형된 mRNA와 시트레이트 식염수 완충제를 조합하는 단계를 포함하는, 조성물 또는 제제의 제조 방법으로서, 상기 시트레이트 식염수 완충제에는 실질적으로 2가 양이온이 없고, 상기 조성물 또는 제제는 VEGF-A 요법에 반응성인 질병을 앓고 있는 대상체를 치료하는 데 효과적인 것인, 조성물 또는 제제의 제조 방법.

#### 청구항 7

제1항에 있어서, 요법에 사용하기 위한 것인 조성물.

#### 청구항 8

제1항에 있어서, VEGF-A 요법에 반응성인 질병의 치료 방법에 사용하기 위한 조성물로서, 선택적으로 상기 질병은 감소되거나 보존된 박출 분율을 갖는 심부전, 신장 질병, 피부 이식 및 조직 이식 관련 질병, 심근경색(MI)-후 심장 기능장애, 허혈성 심장병, 외상 또는 수술로 인한 혈관 손상, 당뇨병성 궤양을 포함하는 피부 궤양, 중증 하지 허혈, 폐 고혈압, 및 말초 동맥 질병으로부터 선택되는 것인 조성물.

#### 청구항 9

제8항에 있어서, 근육내, 피내, 피하, 심장내, 또는 심외막 경로를 통해, 간문맥 카테터를 통해, 관상 정맥동 카테터를 통해, 및/또는 치료되는 영역 내로의 직접 투여에 의해 대상체에게 투여되는 것인 조성물.

#### 청구항 10

제7항에 있어서, 심근경색(MI) 후 심근에서 심외막-유래 세포 활성화의 피크 시간에 투여되는 것인 조성물.

#### 청구항 11

제7항에 있어서, 심근경색(MI)-후 7일째, MI-후 10일째, MI-후 2주째, MI-후 3주째, 또는 MI-후 6주째에 투여되

는 것인 조성물.

#### 청구항 12

제7항에 있어서, 요법이, 감소된 박출 분율을 갖는 심근경색을 치료하거나 보존된 박출 분율을 갖는 심부전을 치료하는 것을 포함하는 것인 조성물.

#### 청구항 13

제12항에 있어서, 건강한 조직과 경색(infarcted) 조직 사이의 경계 구역에 주사되는 것인 조성물.

#### 청구항 14

제2항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 요법에 사용하기 위한 것인 제제.

#### 청구항 15

제2항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, VEGF-A 요법에 반응성인 질병의 치료 방법에 사용하기 위한 제제로서, 선택적으로 상기 질병은 감소되거나 보존된 박출 분율을 갖는 심부전, 신장 질병, 피부 이식 및 조직 이식 관련 질병, 심근경색(MI)-후 심장 기능장애, 허혈성 심장병, 외상 또는 수술로 인한 혈관 손상, 당뇨병성 궤양을 포함하는 피부 궤양, 중증 하지 허혈, 폐 고혈압, 및 말초 동맥 질병으로부터 선택되는 것인 제제.

#### 청구항 16

제15항에 있어서, 근육내, 피내, 피하, 심장내, 또는 심외막 경로를 통해, 간문맥 카테터를 통해, 관상 정맥동 카테터를 통해, 및/또는 치료되는 영역 내로의 직접 투여에 의해 대상체에게 투여되는 것인 제제.

#### 청구항 17

제14항에 있어서, 심근경색(MI) 후 심근에서 심외막-유래 세포 활성화의 피크 시간에 투여되는 것인 제제.

#### 청구항 18

제14항에 있어서, 심근경색(MI)-후 7일째, MI-후 10일째, MI-후 2주째, MI-후 3주째, 또는 MI-후 6주째에 투여되는 것인 제제.

#### 청구항 19

제14항에 있어서, 요법이, 감소된 박출 분율을 갖는 심근경색을 치료하거나 보존된 박출 분율을 갖는 심부전을 치료하는 것을 포함하는 것인 제제.

#### 청구항 20

제19항에 있어서, 건강한 조직과 경색(infarcted) 조직 사이의 경계 구역에 주사되는 것인 제제.

#### 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

## 발명의 설명

## 기술 분야

[0001] 본 개시는 VEGF-A 폴리펩타이드를 인코딩하는 변형된 RNA 및 상기 변형된 RNA를 포함하는 제제에 관한 것이다. 추가로, 본 개시의 양태는 VEGF-A 요법에 반응성인 질병을 앓고 있는 대상체의 치료에 있어서 변형된 RNA를 포함하는 제제의 제조 및 용도에 관한 것이다.

## 배경 기술

[0002] 혈관 내피 성장 인자 A(VEGF-A) 경로는 일반적으로 심혈관의 생리학적 기능, 특히 동맥신생의 조절에 있어서 중심적인 역할을 한다. VEGF-A의 역할은 일산화질소(NO) 신호전달의 활성화, 혈관 투과성, 종양 혈관신생, 동맥신생, 내피 복제, 및 다분화성 심혈관 전구체에 대한 세포 운명 스위치를 포함한다. 저분자 및 항체 둘 모두를 통

한 VEGF-A 경로의 저해가 선택된 형태의 암 및 황반 변성의 표준 치료가 되긴 하였지만, 평활근을 이완시키며, 새로운 혈관 형성을 촉진하고, 당뇨병성 혈관 합병증과 연관된 혈관 반응에서의 결함을 잠재적으로 역전시키는 것을 포함한 잠재적인 치료 효과를 위해 VEGF-A 경로를 증대시키는 잠재력을 열려는(unlock) 시도가 남아 있다.

[0003] 이와 같이, 임상적으로 추적 가능한 접근법이 표적 조직에서 VEGF-A의 공간적 및 시간적 발현을 조절할 수 있도록 하기 위해 다양한 수의 방법들이 시도되어 왔다. 그러나, 각각의 접근법은 유의한 단점을 가진다: 전신 VEGF-A 단백질 접근법은 유의한 저혈압을 초래할 수 있고, VEGF-A가 급속하게 분해되며; 바이러스-캡슐화된 및 네이키드(naked) VEGF-A DNA 플라스미드들은 단백질 발현의 시간적 조절을 제한하며, 생체내 발현의 효율은 고도로 가변적이고 비-용량-의존적일 수 있으며; 아데노바이러스 벡터는 면역계를 활성화시킬 수 있고; 네이키드 RNA는 불안정하며, 낮은 수준의 형질감염을 갖고, 또한 면역 활성화를 촉발시킬 수 있다. 그 결과, 이들 제한은 치료 플랫폼으로서의 VEGF-A의 적용성을 한정하였다.

[0004] 일부 과거의 연구들에서, 치료적 RNA, 예를 들어 siRNA의 생체내 용도는 mRNA를 분해로부터 보호할 뿐만 아니라 효율적인 형질감염을 위해 지질-나노입자(LNP)를 이용하는 데 의존해 왔다. 더욱이, 간 이외의 기관에서 RNAi 요법의 치료적 수준에 도달하려는 시도는 주입-관련 과민증 반응뿐만 아니라 간독성을 초래하였으며, 따라서 다른 기관계들에서 질병 요법을 위한 이들의 용도를 제한하였다(문헌[Rudin C. M. et al., Clin. Cancer Res., (2004) 10, 7244-7251]). 또한, 이들 LNP의 다른 변이체들은 선택된 경우에 치료적 용도를 위해 임상적으로 사용되어 왔지만, 용량-의존적 조직 손상을 유발할 수 있다(문헌[Coelho T. et al., N Engl J Med, (2013) 369, 819-829]). 일부 지질-기반 핵산 약학적 제제의 이러한 용량-의존적 독성 효과의 예로는, 주입-관련 반응, 예컨대 호흡곤란, 저산소증, 오한(rigor), 요통, 저혈압 및 간 손상이 있다. 더욱이, RNA 캡슐화 및 안정성을 개선하기 위해 양이온성 지질이 전형적으로 RNA 치료제, 예를 들어 siRNA의 지질 제제에 포함되는 한편, 일부 이러한 지질은 용량-의존적 독성, 예컨대 막 구조의 온전성(integrity)의 붕괴, 세포 용해 및 괴사, 및/또는 다수의 유전자들의 발현의 바람직하지 못한 방식으로의 변형을 나타낼 수 있다(문헌[Xue H.Y., Curr Pharm Des., (2015) 21(22):3140-7]). 전임상 및 임상 수준에서, 리포플렉스(lipoplex)의 용량-의존적 전신 독성이 또한, 잘-문서화되어 있다. 간에서 쿠퍼 세포에 의한 리포플렉스의 포착은 염증 반응을 촉발시킬 수 있으며, 이는 간에 피해를 주고 주요 간 기능 지표들에서 상승된 수준을 초래할 수 있다. 백혈구 감소증 및 혈소판 감소증이 또한, 발생할 수 있다(문헌[Zhang J., Adv Drug Deliv Rev., (2005) 57(5):689-698]). 더욱이, 리포펙타민은 면역/염증 반응 및 세포 사멸을 유발한다.

[0005] 이에, RNA의 잠재적인 면역원성 및 일부 LNP와 연관된 용량-의존적 독성을 피하기 위해, VEGF-A 요법에 반응성인 질병을 앓고 있는 대상체의 치료에서 VEGF-A 폴리펩타이드를 인코딩하는 변형된 RNA를 치료적으로 적절한 수준으로 전달하기 위해 이러한 변형된 RNA의 대안적인 저독성 제제가 요망되고 있다.

### 발명의 내용

[0006] 본 개시내용은 VEGF-A 폴리펩타이드를 인코딩하는 변형된 RNA, 및 이러한 변형된 RNA를 포함하는 제제에 관한 것이다. 또한, 단백질 발현, 저독성 치료제의 생성, 및 VEGF-A 요법에 반응성인 질병을 앓고 있는 대상체의 치료에 유용한 툴을 제공을 위한 이들 제제에서의 VEGF-A 변형된 RNA의 결과적인 이득이 개시되어 있다.

[0007] 본 개시내용의 소정의 실시형태는 하기 단락에 요약되어 있다. 이 목록은 단지 예시적이고, 본 개시내용에 의해 제공되는 모든 실시형태들을 총망라한 것은 아니다.

[0008] 실시형태 1. SEQ ID NO: 2의 VEGF-A 폴리펩타이드를 인코딩하는 변형된 RNA, 바람직하게는 SEQ ID NO: 1의 변형된 RNA, 및 완충제, 바람직하게는 시트레이트 식염수 완충제, 포스페이트-완충 식염수(PBS) 완충제 또는 트로메타민(THAM) 완충제를 포함하는 조성물로서, 여기서, 완충제에는 실질적으로 2가 양이온이 없는, 조성물.

[0009] 실시형태 2. 약학적으로 허용 가능한 양의, SEQ ID NO: 2의 VEGF-A 폴리펩타이드를 인코딩하는 변형된 RNA, 바람직하게는 SEQ ID NO: 1의 변형된 RNA, 및 완충제, 바람직하게는 시트레이트 식염수 완충제, 포스페이트-완충 식염수(PBS) 완충제 또는 트로메타민(THAM) 완충제를 포함하는 제제로서, 여기서, 완충제에는 실질적으로 2가 양이온이 없는, 제제.

[0010] 실시형태 3. 실시형태 2에 있어서, 실질적으로 2가 양이온이 없는 상기 완충제가 시트레이트 식염수 완충제인, 제제.

[0011] 실시형태 4. 실시형태 3에 있어서, 시트레이트 식염수 완충제에 실질적으로 칼슘 및 마그네슘이 없는, 제제.

[0012] 실시형태 5. 실시형태 3에 있어서, 시트레이트 식염수 완충제가 칼슘 또는 마그네슘을 함유하지 않는, 제제.

- [0013] 실시형태 6. 실시형태 2에 있어서, 약학적으로 허용 가능한 부형제를 추가로 포함하는, 제제.
- [0014] 실시형태 7. 실시형태 6에 있어서, 약학적으로 허용 가능한 부형제가 용매, 분산 매질, 희석제, 분산제, 현탁 보조제, 표면 활성제, 등장성제, 농조화 또는 유화 작용제, 보존제, 코어-셸 나노입자, 중합체, 펩타이드, 단백질, 세포, 히알루루니다제 및 이들의 혼합물로부터 선택되는, 제제.
- [0015] 실시형태 8. VEGF-A 요법에 반응성인 질병을 앓고 있는 대상체의 치료 방법으로서, 실시형태 1에 따른 조성물 및/또는 실시형태 2 내지 7 중 어느 한 실시형태에 따른 제제를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.
- [0016] 실시형태 9. 실시형태 8에 있어서, 상기 조성물 또는 제제 내에 실질적으로 2가 양이온이 없는 완충제가 시트레이트 식염수 완충제인, 방법.
- [0017] 실시형태 10. 실시형태 9에 있어서, 시트레이트 식염수 완충제에 실질적으로 칼슘 및 마그네슘이 없는, 방법.
- [0018] 실시형태 11. 실시형태 9에 있어서, 시트레이트 식염수 완충제가 칼슘 또는 마그네슘을 함유하지 않는, 방법.
- [0019] 실시형태 12. 실시형태 8에 있어서, 제제가 약학적으로 허용 가능한 부형제를 추가로 포함하는, 방법.
- [0020] 실시형태 13. 실시형태 12에 있어서, 약학적으로 허용 가능한 부형제가 용매, 분산 매질, 희석제, 분산제, 현탁 보조제, 표면 활성제, 등장성제, 농조화 또는 유화 작용제, 보존제, 코어-셸 나노입자, 중합체, 펩타이드, 단백질, 세포, 히알루루니다제 및 이들의 혼합물로부터 선택되는, 방법.
- [0021] 실시형태 14. 실시형태 8에 있어서, 질병이, 감소되거나 보존된 박출 분율을 갖는 심부전, 신장 질병, 피부 이식 및 조직 이식 관련 질병, MI-후 심장 기능장애, 허혈성 심장병, 외상 또는 수술로 인한 혈관 손상, 당뇨병성 궤양을 포함하는 피부 궤양, 중증 하지 허혈, 폐 고혈압 및 말초 동맥 질병으로부터 선택되는, 방법.
- [0022] 실시형태 15. 실시형태 8에 있어서, 질병이 감소되거나 보존된 박출 분율을 갖는 심부전인, 방법.
- [0023] 실시형태 16. 실시형태 8에 있어서, 질병이 MI-후 심장 기능장애인, 방법.
- [0024] 실시형태 17. 실시형태 8에 있어서, 질병이 허혈성 심장병인, 방법.
- [0025] 실시형태 18. 실시형태 8에 있어서, 질병이 외상 또는 수술로 인한 혈관 손상인, 방법.
- [0026] 실시형태 19. 실시형태 8에 있어서, 질병이 당뇨병성 궤양을 포함하는 피부 궤양인, 방법.
- [0027] 실시형태 20. 실시형태 8에 있어서, 질병이 중증 하지 허혈인, 방법.
- [0028] 실시형태 21. 실시형태 8에 있어서, 질병이 폐 고혈압인, 방법.
- [0029] 실시형태 22. 실시형태 8에 있어서, 질병이 말초 동맥 질병인, 방법.
- [0030] 실시형태 23. 실시형태 8에 있어서, 조성물 또는 제제가 근육내, 피내, 피하, 심장내 또는 심외막 경로를 통해, 간문맥 카테터를 통해, 관상 정맥동 카테터를 통해 및/또는 치료되는 영역 내로의 직접 투여에 의해 대상체에게 투여되는, 방법.
- [0031] 실시형태 24. 실시형태 8에 있어서, 조성물 또는 제제가 대상체에게 근육내 투여되는, 방법.
- [0032] 실시형태 25. 실시형태 8에 있어서, 조성물 또는 제제가 대상체에게 피내 투여되는, 방법.
- [0033] 실시형태 26. 실시형태 8에 있어서, 조성물 또는 제제가 대상체에게 피하 투여되는, 방법.
- [0034] 실시형태 27. 실시형태 8에 있어서, 조성물 또는 제제가 바람직하게는 다중 투여에서 고정된-투여량으로 대상체에게 심장내 또는 심외막 투여되는, 방법.
- [0035] 실시형태 28. 실시형태 8에 있어서, 조성물 또는 제제가 바람직하게는 다중 투여에서 고정된-투여량으로 대상체에게 간문맥 카테터를 통해 투여되는, 방법.
- [0036] 실시형태 29. 실시형태 8에 있어서, 조성물 또는 제제가 바람직하게는 다중 투여에서 고정된-투여량으로 대상체에게 관상 정맥동 카테터를 통해 투여되는, 방법.
- [0037] 실시형태 30. 실시형태 8에 있어서, 조성물 또는 제제가 바람직하게는 다중 투여에서 고정된-투여량으로 대상체에게 치료되는 영역 내로의 직접 투여에 의해 투여되는, 방법.
- [0038] 실시형태 31. 실시형태 8에 있어서, 조성물 또는 제제가 바람직하게는 시트레이트 식염수 완충제 내에서 제제화



되는, 0.1 내지 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 의 변형된 RNA의 농도를 포함하는, 방법.

- [0039] 실시형태 32. 실시형태 8에 있어서, 조성물 또는 제제가 바람직하게는 시트레이트 식염수 완충제 내에서 제제화되는, 1 내지 10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 의 변형된 RNA의 농도를 포함하는, 방법.
- [0040] 실시형태 33. 실시형태 8에 있어서, 조성물 또는 제제가 바람직하게는 시트레이트 식염수 완충제 내에서 제제화되는, 10 내지 50  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 의 변형된 RNA의 농도를 포함하는, 방법.
- [0041] 실시형태 34. 실시형태 9에 있어서, 시트레이트 식염수 완충제를 포함하는 조성물 또는 제제가 지질-기반 조성물 또는 제제보다 대상체에게 저독성인, 방법.
- [0042] 실시형태 35. 포유류 세포, 조직 또는 대상체에서 생리학적 과정의 조정 방법으로서, 상기 포유류 세포, 조직 또는 대상체를 실시형태 1에 따른 조성물 및/또는 실시형태 2 내지 7 중 어느 한 실시형태에 따른 제제와 접촉시키는 단계를 포함하는, 방법.
- [0043] 실시형태 36. 실시형태 35에 있어서, 조정이 혈관신생 유도, 혈관 세포 증식 자극, 심외막 유래 전구체 세포의 증식 증가 및/또는 운명 변경, 내피화 상향조절, 심장 재생 유도, 상처 치유용 조직 이식물의 혈관재생 증가, 혈관 기능 개선, 조직 관류 및 새로운 혈관 형성 증가, 흉터 조직 감소 및 심장 기능 개선으로부터 선택되는, 방법.
- [0044] 실시형태 37. 실시형태 35에 있어서, 조정이 혈관신생 유도를 포함하는, 방법.
- [0045] 실시형태 38. 실시형태 35에 있어서, 조정이 혈관 세포 증식 자극을 포함하는, 방법.
- [0046] 실시형태 39. 실시형태 35에 있어서, 조정이 심외막 유래 전구체 세포의 증식 증가 및/또는 운명 변경을 포함하는, 방법.
- [0047] 실시형태 40. 실시형태 35에 있어서, 조정이 내피화 상향조절을 포함하는, 방법.
- [0048] 실시형태 41. 실시형태 35에 있어서, 조정이 심장 재생 유도를 포함하는, 방법.
- [0049] 실시형태 42. 실시형태 35에 있어서, 조정이 상처 치유용 조직 이식물의 혈관재생 증가를 포함하는, 방법.
- [0050] 실시형태 43. 실시형태 35에 있어서, 조정이 혈관 기능 개선을 포함하는, 방법.
- [0051] 실시형태 44. 실시형태 35에 있어서, 조정이 조직 관류 및 새로운 혈관 형성 증가를 포함하는, 방법.
- [0052] 실시형태 45. 실시형태 35에 있어서, 조정이 흉터 조직 감소를 포함하는, 방법.
- [0053] 실시형태 46. 실시형태 35에 있어서, 조정이 심장 기능 개선을 포함하는, 방법.
- [0054] 실시형태 47. 실시형태 35에 있어서, 상기 조성물 또는 제제 내에 실질적으로 2가 양이온이 없는 완충제가 시트레이트 식염수 완충제인, 방법.
- [0055] 실시형태 48. 실시형태 47에 있어서, 시트레이트 식염수 완충제에 실질적으로 칼슘 및 마그네슘이 없는, 방법.
- [0056] 실시형태 49. 실시형태 47에 있어서, 시트레이트 식염수 완충제가 칼슘 또는 마그네슘을 함유하지 않는, 방법.
- [0057] 실시형태 50. 실시형태 35에 있어서, 조성물 또는 제제가 바람직하게는 시트레이트 식염수 완충제 내에서 제제화되는, 0.1 내지 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 의 변형된 RNA의 농도를 포함하는, 방법.
- [0058] 실시형태 51. 실시형태 35에 있어서, 조성물 또는 제제가 바람직하게는 시트레이트 식염수 완충제 내에서 제제화되는, 1 내지 10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 의 변형된 RNA의 농도를 포함하는, 방법.
- [0059] 실시형태 52. 실시형태 35에 있어서, 조성물 또는 제제가 바람직하게는 시트레이트 식염수 완충제 내에서 제제화되는, 10 내지 50  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 의 변형된 RNA의 농도를 포함하는, 방법.
- [0060] 실시형태 53. 포유류 세포 또는 조직 내에서 VEGF-A의 발현 방법으로서, 상기 포유류 세포 또는 조직을 실시형태 1에 따른 조성물 및/또는 실시형태 2 내지 7 중 어느 한 실시형태에 따른 제제와 접촉시키는 단계를 포함하는, 방법.
- [0061] 실시형태 54. 실시형태 53에 있어서, 상기 조성물 또는 제제 내에 실질적으로 2가 양이온이 없는 완충제가 시트레이트 식염수 완충제인, 방법.

- [0062] 실시형태 55. 실시형태 54에 있어서, 시트레이트 식염수 완충제에 실질적으로 칼슘 및 마그네슘이 없는, 방법.
- [0063] 실시형태 56. 실시형태 54에 있어서, 시트레이트 식염수 완충제가 칼슘 또는 마그네슘을 함유하지 않는, 방법.
- [0064] 실시형태 57. 실시형태 53에 있어서, 조성물 또는 제제가 바람직하게는 시트레이트 식염수 완충제 내에서 제제화되는, 0.1 내지 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 의 변형된 RNA의 농도를 포함하는, 방법.
- [0065] 실시형태 58. 실시형태 53에 있어서, 조성물 또는 제제가 바람직하게는 시트레이트 식염수 완충제 내에서 제제화되는, 1 내지 10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 의 변형된 RNA의 농도를 포함하는, 방법.
- [0066] 실시형태 59. 실시형태 53에 있어서, 조성물 또는 제제가 바람직하게는 시트레이트 식염수 완충제 내에서 제제화되는, 10 내지 50  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 의 변형된 RNA의 농도를 포함하는, 방법.
- [0067] 실시형태 60. 대상체에서 VEGF-A의 생성 방법으로서, 상기 대상체에게 실시형태 1에 따른 조성물 및/또는 실시형태 2 내지 7 중 어느 한 실시형태에 따른 제제를 투여하는 단계를 포함하는, 방법.
- [0068] 실시형태 61. 실시형태 60에 있어서, 상기 조성물 또는 제제 내에 실질적으로 2가 양이온이 없는 완충제가 시트레이트 식염수 완충제인, 방법.
- [0069] 실시형태 62. 실시형태 61에 있어서, 시트레이트 식염수 완충제에 실질적으로 칼슘 및 마그네슘이 없는, 방법.
- [0070] 실시형태 63. 실시형태 61에 있어서, 시트레이트 식염수 완충제가 칼슘 또는 마그네슘을 함유하지 않는, 방법.
- [0071] 실시형태 64. 실시형태 60에 있어서, 제제가 약학적으로 허용 가능한 부형제를 추가로 포함하는, 방법.
- [0072] 실시형태 65. 실시형태 64에 있어서, 약학적으로 허용 가능한 부형제가 용매, 분산 매질, 희석제, 분산제, 현탁보조제, 표면 활성제, 등장성제, 농조화 또는 유화 작용제, 보존제, 코어-셸 나노입자, 중합체, 펩타이드, 단백질, 세포, 히알루로니다제 및 이들의 혼합물로부터 선택되는, 방법.
- [0073] 실시형태 66. 실시형태 60에 있어서, 대상체가 VEGF-A 요법에 반응성인 질병을 앓고 있는, 방법.
- [0074] 실시형태 67. 실시형태 66에 있어서, 질병이, 감소되거나 보존된 박출 분율을 갖는 심부전, 신장 질병, 피부 이식 및 조직 이식 관련 질병, MI-후 심장 기능장애, 허혈성 심장병, 외상 또는 수술로 인한 혈관 손상, 당뇨병성 궤양을 포함하는 피부 궤양, 중증 하지 허혈, 폐 고혈압 및 말초 동맥 질병으로부터 선택되는, 방법.
- [0075] 실시형태 68. 실시형태 66에 있어서, 질병이 감소되거나 보존된 박출 분율을 갖는 심부전인, 방법.
- [0076] 실시형태 69. 실시형태 66에 있어서, 질병이 MI-후 심장 기능장애인, 방법.
- [0077] 실시형태 70. 실시형태 66에 있어서, 질병이 허혈성 심장병인, 방법.
- [0078] 실시형태 71. 실시형태 66에 있어서, 질병이 외상 또는 수술로 인한 혈관 손상인, 방법.
- [0079] 실시형태 72. 실시형태 66에 있어서, 질병이 당뇨병성 궤양을 포함하는 피부 궤양인, 방법.
- [0080] 실시형태 73. 실시형태 66에 있어서, 질병이 중증 하지 허혈인, 방법.
- [0081] 실시형태 74. 실시형태 66에 있어서, 질병이 폐 고혈압인, 방법.
- [0082] 실시형태 75. 실시형태 66에 있어서, 질병이 말초 동맥 질병인, 방법.
- [0083] 실시형태 76. 실시형태 60에 있어서, 조성물 또는 제제가 근육내, 피내, 피하, 심장내 또는 심외막 경로를 통해, 간문맥 카테터를 통해, 관상 정맥동 카테터를 통해 및/또는 치료되는 영역 내로의 직접 투여에 의해 대상체에게 투여되는, 방법.
- [0084] 실시형태 77. 실시형태 60에 있어서, 조성물 또는 제제가 대상체에게 근육내 투여되는, 방법.
- [0085] 실시형태 78. 실시형태 60에 있어서, 조성물 또는 제제가 대상체에게 피내 투여되는, 방법.
- [0086] 실시형태 79. 실시형태 60에 있어서, 조성물 또는 제제가 대상체에게 피하 투여되는, 방법.
- [0087] 실시형태 80. 실시형태 60에 있어서, 조성물 또는 제제가 바람직하게는 다중 투여에서 고정된-투여량으로 대상체에게 심장내 또는 심외막 투여되는, 방법.
- [0088] 실시형태 81. 실시형태 60에 있어서, 조성물 또는 제제가 바람직하게는 다중 투여에서 고정된-투여량으로 대상

체에게 간문맥 카테터를 통해 투여되는, 방법.

- [0089] 실시형태 82. 실시형태 60에 있어서, 조성물 또는 제제가 바람직하게는 다중 투여에서 고정된-투여량으로 대상 체에게 관상 정맥동 카테터를 통해 투여되는, 방법.
- [0090] 실시형태 83. 실시형태 60에 있어서, 조성물 또는 제제가 바람직하게는 다중 투여에서 고정된-투여량으로 대상 체에게 치료되는 영역 내로의 직접 투여에 의해 투여되는, 방법.
- [0091] 실시형태 84. 실시형태 60에 있어서, 조성물 또는 제제가 바람직하게는 시트레이트 식염수 완충제 내에서 제제 화되는, 0.1 내지 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 의 변형된 RNA의 농도를 포함하는, 방법.
- [0092] 실시형태 85. 실시형태 60에 있어서, 조성물 또는 제제가 바람직하게는 시트레이트 식염수 완충제 내에서 제제 화되는, 1 내지 10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 의 변형된 RNA의 농도를 포함하는, 방법.
- [0093] 실시형태 86. 실시형태 60에 있어서, 조성물 또는 제제가 바람직하게는 시트레이트 식염수 완충제 내에서 제제 화되는, 10 내지 50  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 의 변형된 RNA의 농도를 포함하는, 방법.
- [0094] 실시형태 87. 조성물 또는 제제의 제조 방법으로서, SEQ ID NO: 2의 VEGF-A 폴리펩타이드를 인코딩하는 변형된 RNA, 바람직하게는 SEQ ID NO: 1의 변형된 RNA를 완충제, 바람직하게는 시트레이트 식염수 완충제, 포스페이트-완충 식염수(PBS) 완충제 또는 트로메타민(THAM) 완충제와 함께 조성물 또는 제제 내로 조합하는 단계를 포함하고, 여기서, 완충제에는 실질적으로 2가 양이온이 없고, 조성물 또는 제제는 VEGF-A 요법에 반응성인 질병을 앓고 있는 대상체를 치료하기에 효과적인, 방법.
- [0095] 실시형태 88. 실시형태 87에 있어서, 시트레이트 식염수 완충제에 실질적으로 칼슘 및 마그네슘이 없는, 방법.
- [0096] 실시형태 89. 실시형태 87에 있어서, 시트레이트 식염수 완충제가 칼슘 또는 마그네슘을 함유하지 않는, 방법.
- [0097] 실시형태 90. 실시형태 87에 있어서, 조성물 또는 제제가 바람직하게는 시트레이트 식염수 완충제 내에서 제제 화되는, 0.1 내지 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 의 변형된 RNA의 농도를 포함하는, 방법.
- [0098] 실시형태 91. 실시형태 87에 있어서, 조성물 또는 제제가 바람직하게는 시트레이트 식염수 완충제 내에서 제제 화되는, 1 내지 10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 의 변형된 RNA의 농도를 포함하는, 방법.
- [0099] 실시형태 92. 실시형태 87에 있어서, 조성물 또는 제제가 바람직하게는 시트레이트 식염수 완충제 내에서 제제 화되는, 10 내지 50  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 의 변형된 RNA의 농도를 포함하는, 방법.
- [0100] 실시형태 93. 실시형태 87에 있어서, 시트레이트 식염수 완충제를 포함하는 조성물 또는 제제가 지질-기반 조성물 또는 제제보다 대상체에게 저독성인, 방법.
- [0101] 실시형태 94. 대상체에서 VEGF-A 치료의 독성의 감소 방법으로서, SEQ ID NO: 2의 VEGF-A 폴리펩타이드를 인코딩하는 변형된 RNA, 바람직하게는 SEQ ID NO: 1의 변형된 RNA를 완충제, 바람직하게는 시트레이트 식염수 완충제, 포스페이트-완충 식염수(PBS) 완충제 또는 트로메타민(THAM) 완충제와 함께 조성물 또는 제제 내로 제제화하는 단계를 포함하고, 여기서, 완충제에는 실질적으로 2가 양이온이 없는, 방법.
- [0102] 실시형태 95. 실시형태 94에 있어서, 시트레이트 식염수 완충제에 실질적으로 칼슘 및 마그네슘이 없는, 방법.
- [0103] 실시형태 96. 실시형태 94에 있어서, 시트레이트 식염수 완충제가 칼슘 또는 마그네슘을 함유하지 않는, 방법.
- [0104] 실시형태 97. SEQ ID NO: 2의 VEGF-A 폴리펩타이드를 인코딩하는 변형된 RNA, 바람직하게는 SEQ ID NO: 1의 변형된 RNA의 발생을 위한 시험관내 전사 주형을 포함하는 핵산 서열.
- [0105] 실시형태 98. 포유류 조직 또는 대상체에서 상처 치유의 증가 방법으로서, 상기 포유류 조직 또는 대상체를 실시형태 1에 따른 조성물 및/또는 실시형태 2 내지 7 중 어느 한 실시형태에 따른 제제와 접촉시키는 단계를 포함하는, 방법.
- [0106] 실시형태 99. 포유류 조직 또는 대상체에서 신혈관형성의 유도 방법으로서, 상기 포유류 조직 또는 대상체를 실시형태 1에 따른 조성물 및/또는 실시형태 2 내지 7 중 어느 한 실시형태에 따른 제제와 접촉시키는 단계를 포함하는, 방법.
- [0107] 실시형태 100. 포유류 조직 또는 대상체에서 혈관신생의 유도 방법으로서, 상기 포유류 조직 또는 대상체를 실시형태 1에 따른 조성물 및/또는 실시형태 2 내지 7 중 어느 한 실시형태에 따른 제제와 접촉시키는 단계를 포함하는, 방법.

- [0108] 실시형태 101. 포유류 조직 또는 대상체에서 혈관확장의 유도 방법으로서, 상기 포유류 조직 또는 대상체를 실시형태 1에 따른 조성물 및/또는 실시형태 2 내지 7 중 어느 한 실시형태에 따른 제제와 접촉시키는 단계를 포함하는, 방법.
- [0109] 실시형태 102. 포유류 조직 또는 대상체에서 혈류 상향조절의 유도 방법으로서, 상기 포유류 조직 또는 대상체를 실시형태 1에 따른 조성물 및/또는 실시형태 2 내지 7 중 어느 한 실시형태에 따른 제제와 접촉시키는 단계를 포함하는, 방법.
- [0110] 실시형태 103. 포유류 조직 또는 대상체에서 모세혈관 및/또는 세동맥 밀도의 증가 방법으로서, 상기 포유류 조직 또는 대상체를 실시형태 1에 따른 조성물 및/또는 실시형태 2 내지 7 중 어느 한 실시형태에 따른 제제와 접촉시키는 단계를 포함하는, 방법.
- [0111] 실시형태 104. 포유류 조직 또는 대상체에서 섬유증의 약화 방법으로서, 상기 포유류 조직 또는 대상체를 실시형태 1에 따른 조성물 및/또는 실시형태 2 내지 7 중 어느 한 실시형태에 따른 제제와 접촉시키는 단계를 포함하는, 방법.

### 도면의 간단한 설명

- [0112] 당업자는, 하기 기재된 도면이 단지 예시적인 목적을 위한 것임을 이해할 것이다. 도면은 본 교시의 범위를 어떠한 방식으로든 제한하려는 것이 아니다.

도 1a 및 도 1b: 실시예에 사용된 VEGF-A 변형된 RNA의 구조(도 1a) 및 서열(SEQ ID NO: 1, 도 1b)이다.

도 2a, 도 2b 및 도 2c: 더 높은 용량의 변형된 RNA의 형질감염은 인간 대동맥 평활근 세포에서 더 많은 VEGF-A 단백질의 생성을 초래하였다(도 2a). 인간 대동맥 평활근 세포에서 변형된 RNA에 의한 형질감염 후, VEGF-A 단백질 생성의 시간 경과이다(도 2b). 변형된 RNA에 의한 형질감염 후, 마우스 심장 섬유아세포(도 2c, 좌측 패널) 및 돼지 내피 세포(도 2c, 우측 패널)에서 VEGF-A 단백질 생성이다.

도 3a, 도 3b 및 도 3c: VEGF-A 변형된 RNA로부터 생성된 VEGF-A 단백질은 인간 내피 세포에서 VEGFR2의 인산화(도 3a) 및 인간 내피 세포에서 다운스트림 신호전달 경로 eNOS(도 3b) 및 마우스 심장 섬유아세포에서 Akt의 활성화(도 3c)를 유도하였다.

도 4a, 도 4b 및 도 4c: VEGF-A 변형된 RNA로부터 생성된 VEGF-A 단백질은 혈관신생 과정에서 몇몇 중대한 단계들에 영향을 미친다. VEGF-A 변형된 RNA에 의해 생성된 VEGF-A 단백질은 배양된 인간 내피 세포의 증식(도 4a) 및 이동(도 4b)을 증가시켰다. VEGF-A 변형된 RNA에 의해 생성된 VEGF-A 단백질은 내피 세포로 코팅된 비드와 함께 3D 배양물에서 혈관신생 싹 형성(angiogenic sprout formation)을 증가시켰다(도 4c).

도 5a, 도 5b 및 도 5c: 내피 세포로 코팅되고 대조군 배지로 처리된 비드(도 5a) 또는 변형된 RNA-생성된 VEGF-A를 포함하는 조건화된 배지(도 5b)로부터의 혈관신생 싹 형성의 이미지이다. 내피 세포로 코팅되고 변형된 RNA-생성된 VEGF-A로 처리된 비드로부터 혈관신생 싹 형성의 확대도이다(도 5c).

도 6a, 도 6b 및 도 6c: 시트레이트 식염수(도 6a), 리포펙타민 내에서 제제화된 LacZ 변형된 RNA(100  $\mu$ g, 도 6b) 또는 시트레이트 식염수 완충제 내에서 제제화된 LacZ 변형된 RNA(150  $\mu$ g, 도 6c)의 50  $\mu$ L 심장내 주사 후, 마우스 심장내에서 생성된  $\beta$ -갈락토시다제 효소를 가리키는 X-gal 염색의 비교이다.

도 7: 포스페이트-완충 식염수(PBS, n=3), 시트레이트 식염수(C/S, n=6) 또는 트로메타민 AKA 2-아미노-2-(하이드록시메틸)-1,3-프로판디올(THAM, n=3) 내에서 제제화된 파이어플라이(firefly) 루시페라제 변형된 RNA의 심장내 주사 후, 마우스 심장내에서 생성된 루시페라제 단백질의 평가이다. PBS, C/S 및 THAM 완충제(n=2/그룹)를 음성 대조군으로서 사용하였다.

도 8a, 도 8b, 도 8c 및 도 8d: 네이브(naive) 래트에서 15  $\mu$ g(원형), 150  $\mu$ g(정사각형) 또는 1800  $\mu$ g(삼각형)의 시트레이트 식염수-제제화된 VEGF-A 변형된 RNA의 심장내 주사 후, 상이한 시점들에서 VEGF-A 단백질의 심장 수준이다(도 8a). 심근경색을 앓고 있고 시트레이트/식염수 또는 VEGF-A 변형된 RNA(시트레이트/식염수 내에서 제제화된 150  $\mu$ g 또는 1800  $\mu$ g)를 심장내 주사한 래트에서 좌심실 박출 분율 및 경색 크기(좌심실 질량의 %로서)의 비교이다. 박출 분율(도 8b) 및 경색 크기(도 8c)는 경색 유도 및 주사 후 8일째에 심장 자기 공명 영상에 의해 평가되었다. 심근경색을 유도하고, 시트레이트/식염수, 또는 시트레이트/식염수 내에서 제제화된 VEGF-A 변형된 RNA를 심장내 주사한 후 1일째에 래트로부터 채혈한 정맥혈 내에서 심장 트로포닌 I(TnI)의 수준이다(도 8d).

도 9a 및 도 9b: LacZ 변형된 RNA(3개의 개별 주사 부위에서 100  $\mu$ g)를 심외막 주사한 괴팅겐 미니 돼지에서 좌심실 자유벽(free wall)으로부터 수합된 대표적인 시료이다. 조직을 주사 후 6시간째에 수합하고, 18시간 동안 X-gal 염색하였다. 좌측 시료는 리포펙타민 내에서 제제화된 LacZ 변형된 RNA를 주사한 조직(도 9a) 및 시트레이트/식염수 내에서 제제화된 LacZ 변형된 RNA를 주사한 우측 시료 조직(도 9b)에서의 염색을 각각 보여준다.

도 10: 괴팅겐 미니 돼지에서 다양한 용량의 VEGF-A 변형된 RNA를 심외막 주사한 후 6시간째에 돼지 좌심실 조직 시료에서 인간 VEGF-A 단백질이다.

도 11a, 도 11b, 도 11c, 도 11d, 도 11e, 도 11f 및 도 11g: 시트레이트 식염수 완충제에서 LacZ 및 루시페라제 변형된 RNA 심장 형질감염 및 번역이다. 75  $\mu$ g의 LacZ 변형된 RNA를 시트레이트 식염수 완충제와 함께 마우스 심장 내에 주사하였다.  $\beta$ -갈락토시다제의 생성은 심장의 좌심실 중 대략 10%에서 확인되었다(도 11a, 도 11c 및 도 11d에서의 대표적인 이미지). LacZ 변형된 RNA의 주사 후, 심장에서  $\beta$ -갈락토시다제의 생성을 보여주는 X-gal 염색의 확대도이다(도 11b). 루시페라제 변형된 RNA를 심장 내에 주사하였다. 루시페라제 프로브와의 RNA 인 시추 혼성화는 심근 내 주사 부위에서 루시페라제 변형된 RNA의 존재를 보여주었다(도 11e). 루시페라제 프로브와의 RNA 인 시추 혼성화의 확대도는 루시페라제 변형된 RNA의 존재를 보여준다(도 11f). 면역조직 화학은 루시페라제 변형된 RNA의 주사 후, 심근 내 주사 부위에서 루시페라제 단백질 발현을 보여주었다(도 11g).

도 12a, 도 12b 및 도 12c: 변형된 RNA를 시트레이트/식염수 완충제와 함께 심장에 주사한 후, VEGF-A 단백질 발현은 포화 가능하고(saturable), 다수의 종들에 걸쳐 유사한 약물동력학을 가진다. 시트레이트 식염수 완충제(NTB) 대 리포펙타민(LNP) 내에서 제제화된 VEGF-A 변형된 RNA의 단일 심장 주사 후, 마우스에서 72시간에 걸친 VEGF-A 단백질 약물동력학이다(도 12a). 시트레이트 식염수 내의 VEGF-A 변형된 RNA의 용량을 늘리면서 투약한 후, VEGF-A 단백질 수준의 중간 비교이다(도 12b). 증가하는 용량의 VEGF-A 변형된 RNA에 의해 생성된 VEGF-A 단백질의 래트 약물동력학이다. 72시간째에 생성된 VEGF-A 단백질의 곡선 아래 면적(AUC; area under the curve) 측정이다(도 12c).

도 13a 및 도 13b: 마우스, 래트 및 돼지에서 인간 VEGF-A 변형된 RNA의 심장내 주사 후, 인간 VEGF-A 단백질 생성의 평가이다. 시트레이트/식염수 내에서 제제화된 100  $\mu$ g VEGF-A 변형된 RNA의 심장내 주사 후, 마우스(채워진 정사각형), 래트(채워진 별표) 및 돼지(채워진 원형) 심장에서 생성된 VEGF-A 단백질의 규모 및 시간 프로파일이다(도 13a에서 0 내지 72시간; 및 도 13b에서 0 내지 192시간). 기하 평균 $\pm$ SD가 나타나 있다.

도 14: 심근경색을 앓고 있는 미니 돼지에서 좌심실 박출 분율(EF)에 미치는 인간 VEGF-A 변형된 RNA 및 제조합 인간 VEGF-A의 효과이다. EF의 연속적인 평가는 좌전 하행 관상동맥의 영구적인 폐색 이전(BF) 및 이후(AF)에 수행되었다. 개별 그룹의 돼지들에게 관상동맥 폐색 없이 sham 수술(sham procedure)을 처리하였다(열린 원형, n=5). 그런 다음, EF의 후속적인 평가를, 폐색 후 7일째에 연구 약물 주사 시(7D AF), 및 2개월 후에 1회 더 수행하였다(2 MO AF). 7D AF에서, 돼지에게 시트레이트/식염수(채워진 정사각형, n=8), 또는 자가-조립 나노섬유 내에서 제제화된 총 1 mg(채워진 원형, n=8) 또는 10 mg 용량의 VEGF-A 변형된 RNA(채워진 삼각형, n=8) 또는 제조합 인간 VEGF-A 단백질(채워진 다이아몬드, n=5)의 20회 심외막 주사(각각 100  $\mu$ L)를 각각 무작위로 제공하였다. \*, P<0.05 대 2 MO AF에서 시트레이트/식염수 대조군, \*\*, P<0.01 대 2 MO AF에서 시트레이트/식염수 대조군, †; P<0.001, 7 D AF로부터 2 MO AF까지의 변화를 비교, ††; P<0.0001, 7 D AF로부터 2 MO AF까지의 변화를 비교.

도 15: 심근경색 처리된 미니 돼지에서 시간 경과에 따른 최대 좌심실 압력 발달(dP/dt 최대)에 미치는 인간 VEGF-A 변형된 RNA 및 제조합 인간 VEGF-A의 효과이다. 심근경색을 유도하기 위해 미니 돼지를 좌전 하행 관상동맥의 영구 폐색 처리하였다. 개별 그룹의 돼지들에게 관상동맥 폐색 없이 sham 수술 처리하였다(열린 원형, n=5). 7일 후, 경색 돼지를, 시트레이트/식염수 비히클(2 mL, 채워진 정사각형), 또는 자가-조립 나노섬유 내에서 제제화된 1 mg(채워진 원형) 또는 10 mg(채워진 삼각형) VEGF-A 변형된 RNA 또는 제조합 인간 VEGF-A 단백질(200 ng)(채워진 다이아몬드)의 맹검 심외막 주사로 무작위로 처리하였다. 용량/부피를 경색-주변 영역에서 20회의 개별 주사(각각 100  $\mu$ L)로서 투여하였다. 좌심실 기능을 주사 후 2개월째에 침습적으로 측정하였다. 개별 데이터 및 평균 $\pm$ SEM이 나타나 있다.

도 16: 심근경색 처리된 미니 돼지에서 시간 경과에 따른 최소 좌심실 압력 발달(dP/dt 최소)에 미치는 인간 VEGF-A 변형된 RNA 및 제조합 인간 VEGF-A의 효과이다. 심근경색을 유도하기 위해 미니 돼지를 좌전 하행 관상동맥의 영구 폐색 처리하였다. 개별 그룹의 돼지들에게 관상동맥 폐색 없이 sham 수술 처리하였다(열린 원형, n=5). 7일 후, 경색 돼지를, 시트레이트/식염수 비히클(2 mL, 채워진 정사각형), 또는 자가-조립 나노섬유 내



에서 제제화된 1 mg(채워진 원형) 또는 10 mg(채워진 삼각형) VEGF-A 변형된 RNA 또는 재조합 인간 VEGF-A 단백질(200 ng)(채워진 다이아몬드)의 맹검 심외막 주사로 무작위로 처리하였다. 용량/부피를 경색-주변 영역에서 20회의 개별 주사(각각 100  $\mu$ L)로서 투여하였다. 좌심실 기능을 주사 후 2개월째에 침습적으로 측정하였다. 개별 데이터 및 평균 $\pm$ SEM이 나타나 있다.

도 17: 심근경색 처리된 미니 돼지에서 심장수축기 기능(수축력(inotropy), ESPVR)에 미치는 인간 VEGF-A 변형된 RNA 및 재조합 인간 VEGF-A의 효과이다. 심근경색을 유도하기 위해 미니 돼지를 좌전 하행 관상동맥의 영구 폐색 처리하였다. 개별 그룹의 돼지들에게 관상동맥 폐색 없이 sham 시술 처리하였다(열린 원형, n=5). 7일 후, 경색 돼지를, 시트레이트/식염수 비히클(2 mL, 채워진 정사각형), 또는 자가-조립 나노섬유 내에서 제제화된 1 mg(채워진 원형) 또는 10 mg(채워진 삼각형) VEGF-A 변형된 RNA 또는 재조합 인간 VEGF-A 단백질(200 ng)(채워진 다이아몬드)의 맹검 심외막 주사로 무작위로 처리하였다. 용량/부피를 경색-주변 영역에서 20회의 개별 주사(각각 100  $\mu$ L)로서 투여하였다. 좌심실 기능을 주사 후 2개월째에 침습적으로 측정하였다. 개별 데이터 및 평균 $\pm$ SEM이 나타나 있다.

도 18: 심근경색 처리된 미니 돼지에서 심장이완기 기능(컴플라이언스(compliance), EDPVR)에 미치는 인간 VEGF-A 변형된 RNA 및 재조합 인간 VEGF-A의 효과이다. 심근경색을 유도하기 위해 미니 돼지를 좌전 하행 관상동맥의 영구 폐색 처리하였다. 개별 그룹의 돼지들에게 관상동맥 폐색 없이 sham 시술 처리하였다(열린 원형, n=5). 7일 후, 경색 돼지를, 시트레이트/식염수 비히클(2 mL, 채워진 정사각형), 또는 자가-조립 나노섬유 내에서 제제화된 1 mg(채워진 원형) 또는 10 mg(채워진 삼각형) VEGF-A 변형된 RNA 또는 재조합 인간 VEGF-A 단백질(200 ng)(채워진 다이아몬드)의 맹검 심외막 주사로 무작위로 처리하였다. 용량/부피를 경색-주변 영역에서 20회의 개별 주사(각각 100  $\mu$ L)로서 투여하였다. 좌심실 기능을 주사 후 2개월째에 침습적으로 측정하였다. 개별 데이터 및 평균 $\pm$ SEM이 나타나 있다.

도 19: 심근경색 처리된 미니 돼지에서 전부하 동원성 박출 작업량(PRSW; preload recruitable stroke work)에 미치는 인간 VEGF-A 변형된 RNA 및 재조합 인간 VEGF-A의 효과이다. 심근경색을 유도하기 위해 미니 돼지를 좌전 하행 관상동맥의 영구 폐색 처리하였다. 개별 그룹의 돼지들에게 관상동맥 폐색 없이 sham 시술 처리하였다(열린 원형, n=5). 7일 후, 경색 돼지를, 시트레이트/식염수 비히클(2 mL, 채워진 정사각형), 또는 자가-조립 나노섬유 내에서 제제화된 1 mg(채워진 원형) 또는 10 mg(채워진 삼각형) VEGF-A 변형된 RNA 또는 재조합 인간 VEGF-A 단백질(200 ng)(채워진 다이아몬드)의 맹검 심외막 주사로 무작위로 처리하였다. 용량/부피를 경색-주변 영역에서 20회의 개별 주사(각각 100  $\mu$ L)로서 투여하였다. 좌심실 기능을 주사 후 2개월째에 침습적으로 측정하였다. 개별 데이터 및 평균 $\pm$ SEM이 나타나 있다.

도 20a, 도 20b 및 도 20c: 심근경색 처리된 미니 돼지에서 경색 크기에 미치는 인간 VEGF-A 변형된 RNA 및 재조합 인간 VEGF-A의 효과이다. 심근경색을 유도하기 위해 미니 돼지를 좌전 하행 관상동맥의 영구 폐색 처리하였다. 경색 크기는 시트레이트/식염수(채워진 정사각형), 또는 자가-조립 나노섬유 내에서 제제화된 1 mg(채워진 원형) 또는 10 mg(채워진 삼각형) VEGF-A 변형된 RNA 또는 재조합 인간 VEGF-A 단백질(200 ng)(채워진 다이아몬드)을 심외막 주사한 미니 돼지에서 전반적인 좌심실 경색 크기(슬라이스 2, 3, 4 및 5, 도 20a), 중간부 좌심실 경색 크기(슬라이스 3 및 4, 도 20b) 및 중심부 좌심실 경색 크기(슬라이스 4, 패널 도 20c)로서 제시되었다. 좌전 하행 관상동맥의 영구 폐색을 통해 심근경색을 유도한 후 7일째에 주사하였다. 경색 크기를 주사 후 2개월째에 측정하였다. 평균 $\pm$ SEM이 나타나 있다.

도 21: 실시예 14의 1상 동안 마우스의 체질량이다. 각각의 마우스의 체질량을 각각의 이미징 시점에서 기록하였다. 데이터는 평균 $\pm$ SEM으로 제시되었으며, 검정색 막대; 비히클 단일 주사되며, 빗금 막대; 비히클 이중 주사되며, 회색 막대; VEGF-A 변형된 RNA 단일 주사되고, 줄 그어진 막대; VEGF-A 변형된 RNA 이중 주사되며, \*; 이중 대 단일 주사된 비히클에 대해  $p < 0.05$ 이다.

도 22: 실시예 14에서 1상에서 마우스의 단식 및 급식 혈중 글루코스 측정이다. 제0일에, 혈중 글루코스를 4시간 단식 기간 후 측정하였다. 제18일에, 급식 혈중 글루코스를 측정하였다. 제시된 데이터는 평균 $\pm$ SEM이며, 검정색 막대; 비히클 단일 주사되며, 빗금 막대; 비히클 이중 주사되며, 회색 막대; VEGF-A 변형된 RNA 단일 주사되고, 줄 그어진 막대; VEGF-A 변형된 RNA 이중 주사되며, \*; VEGF-A 변형된 RNA 단일 주사 대 비히클 단일 주사에 대해  $p < 0.05$ 이다.

도 23: 실시예 14에서 1상에 대한 상처 치유 곡선이다. 3명의 관찰자로부터의 중앙값들의 평균 정규화된 개방된 상처 영역을 수술 후 일수(day)에 대해 플롯화한다. 제시된 데이터는 평균 $\pm$ SEM이며, \* 제6일에 VEGF-A 변형된 RNA 이중 주사(열린 정사각형) 대 비히클 단일(채워진 원형) 및 이중(열린 원형) 주사 각각, 및 제10일에

VEGF-A 변형된 RNA 이중 주사 vs. 비히클 이중 주사 각각에 대해  $p < 0.05$ 이다. 채워진 정사각형; VEGF-A 변형된 RNA 단일 주사이다.

도 24: 실시예 14에서 1상으로부터의 상처 치유 곡선의 3차 스플라인 보간법(cubic spline interpolation)이다. 3차 스플라인 보간법을 구축하여, 수평 회색 파선에 의해 입증된 바와 같이 25%, 50% 및 75% 폐쇄까지의 시간을 어렵잡았다. 제시된 데이터는 3명의 관찰자로부터의 중앙값의 정규화된 개방된 상처 영역의 평균이다.  $\Phi$ ; VEGF-A 변형된 RNA 이중 주사(열린 정사각형) 대 비히클 단일 주사(채워진 원형)에 대해  $p < 0.05$ 이고,  $\#$ ; VEGF-A 변형된 RNA 이중 주사 대 비히클 이중 주사(열린 원형)에 대해  $p < 0.05$ 이다. 채워진 정사각형; VEGF-A 변형된 RNA 단일 주사이다.

도 25: 실시예 14의 1상에서 시점들 사이에서 퍼센트 상처 치유이다. 상처 폐쇄의 평균 퍼센트를 정규화된 상처 영역 데이터를 사용하여 각각의 시점들 사이에서 계산하였다. 제시된 데이터는 평균  $\pm$  SEM이며; \* 제3일 내지 제6일 동안 VEGF-A 변형된 RNA 이중 주사(줄 그어진 막대) 대 비히클 이중(빋금 막대) 및 단일 주사(검정색 막대) 각각에 대한 더 높은 평균 퍼센트 상처 폐쇄, 및 제10일 내지 제13일 동안 VEGF-A 변형된 RNA 단일 주사(회색 막대) vs. 비히클 이중 및 단일 주사 각각에 대한 더 낮은 평균 상처 폐쇄에 대해  $p < 0.05$ 이다.

도 26: 실시예 14에서 1상에서 상처의 헤마톡실린- 및 에오신-염색된 절편의 대표적인 이미지이다. A; 비히클 단일 주사되며, B; 비히클 이중 주사되며, C; VEGF-A 변형된 RNA 단일 주사되고, D; VEGF-A 변형된 RNA 이중 주사된다.

도 27: 실시예 14에서 1상에서 상처의 CD31 염색된 절편의 대표적인 이미지이다. 화살촉은 강한 CD31 염색 영역을 가리킨다. A) 단일 비히클, B) 이중 비히클, C) 단일 VEGF-A 변형된 RNA, D) 이중 VEGF-A 변형된 RNA이다.

도 28: 실시예 14에서 1상에서 CD31 염색의 정량화이다. 패널 A 내지 D는 대표적인 획득 이미지이고, 패널 E 내지 H는 CD31 양성 염색(갈색 채널)의 대표적인 역치 이미지이다. A 및 E; 단일 비히클, B 및 F; 이중 비히클, C 및 G; 단일 VEGF-A 변형된 RNA, D 및 H; 이중 VEGF-A 변형된 RNA, I; CD31 염색의 퍼센트 영역(검정색 픽셀에 의해 커버된 영역)의 정량화이다. 검정색 막대; 비히클 단일 주사되며, 빋금 막대; 비히클 이중 주사되며, 회색 막대; VEGF-A 변형된 RNA 단일 주사되고, 줄 그어진 막대; VEGF-A 변형된 RNA 이중 주사된다.

도 29: 실시예 14에서 웨스턴 블롯(1상)을 이용한 다운스트림 VEGF 신호전달 분석이다. 상부 패널; 제0일에 단일 용량의 비히클, 제0일 및 제3일에 이중 용량의 비히클, 제0일에 단일 용량의 VEGF-A 변형된 RNA 및 제0일 및 제3일에 이중 용량의 VEGF-A 변형된 RNA를 제공한 마우스 유래의 제18일 시료의 pAKT 및 AKT 블롯이다. 하부 패널; pAKT/AKT의 정량화된 비율은 치료군들 사이에서 통계학적 차이를 보여주지 않는다. 좌측 막대; 단일 비히클 주사, 좌측 중간 막대; 이중 비히클 주사, 우측 중간 막대; 단일 VEGF-A 변형된 RNA 주사, 우측 막대; 이중 VEGF-A 변형된 RNA 주사이다.

도 30: 실시예 14에서 1상으로부터 제18일에 수합된 마우스 상처에서 pVEGFR2, VEGFR2 및 VEGF-A의 웨스턴 블롯 분석이다. 상부 패널; 제0일에 단일 용량의 비히클, 제0일 및 제3일에 이중 용량의 비히클, 제0일에 단일 용량의 VEGF-A 변형된 RNA 및 제0일 및 제3일에 이중 용량의 VEGF-A 변형된 RNA를 제공한 마우스 유래의 제18일 시료의 pVEGFR2, VEGFR2 및 VEGFA 블롯이다. 하부 패널; pVEGFR2/VEGFR2의 정량화된 비율은 치료군들 사이에서 통계학적 차이를 보여주지 않는다. 좌측 막대; 단일 비히클 주사, 좌측 중간 막대; 이중 비히클 주사, 우측 중간 막대; 단일 VEGF-A 변형된 RNA 주사, 우측 막대; 이중 VEGF-A 변형된 RNA 주사이다.

도 31: 실시예 14에서 2상 동안 마우스의 체질량이다. 각각의 마우스의 체질량을 각각의 이미징 시점에서 기록하였다. 제시된 데이터는 평균  $\pm$  SEM이다. 좌측 막대; 비히클 이중 주사되고, 우측 막대; VEGF-A 변형된 RNA 이중 주사된다.

도 32: 실시예 14에서 2상에서 마우스의 단식 및 급식 혈중 글루코스는이다. 제0일에, 혈중 글루코스를 4시간 단식 기간 후 측정하였다. 제18일에, 급식 혈중 글루코스를 측정하였다. 제시된 데이터는 평균  $\pm$  SEM이다. 좌측 막대; 비히클 이중 주사되며, 우측 막대; VEGF-A 변형된 RNA 이중 주사된다.

도 33: 산소-민감성 나노입자의 생체내 적용의 도식이다. A) 전 두께(full thickness) 피부 상처 내에서 나노입자의 적용이다. 여기 시, 나노입자는 강한 실온 형광(B) 및 강한 산소-의존적 인광(C)을 방출한다. 비율측정(ratiometric) 이미지는 형광과 인광 사이의 비율로 구축되어, 상처 층(bed) 내에서 산소의 상대 수준을 보고한다(D).

도 34: 실시예 14에서 2상에서 상처층 내에서의 상대적인 산소화 수준의 비율측정 이미지이다. 각각의 시점에서

이중 비히클(상부 1/2) 및 이중 VEGF-A 변형된 RNA(하부 1/2) 처리된 상처에 대한 대표적인 광시야 및 비율측정 이미지이다. 상처 경계는 검정색으로 줄 그어져 있다.

도 35: 상처층에서 산소-민감성 나노입자로부터의 형광 및 인광의 이미지 분석을 통한 산소화의 정량화이다. 각각의 미가공 형광 대 인광 이미지의 평균 회색도를 상처층으로부터 계산하였다. 제시된 데이터는 평균±SEM이며, \*VEGF-A 변형된 RNA 이중 주사(우측 막대) 대 비히클 이중 주사(좌측 막대)에 대한 평균 회색도에 대해  $p < 0.05$ 이다.

도 36: 실시예 14에서 2상에 대한 상처 치유 곡선이다. 3명의 독립적인 관찰자들로부터의 중앙값들의 평균 정규화된 개방된 상처 영역을 수술 후 일수에 대해 플롯화한다. 제시된 데이터는 평균±SEM이며, \* 제6일에 VEGF-A 변형된 RNA 이중 주사(열린 정사각형) 대 비히클 이중 주사(열린 원형) 각각에 대한 더 낮은 개방된 상처 영역에 대해  $p < 0.05$ 이다. 곡선 아래 면적은 각각 비히클 이중 주사의 경우 641.31이었고, VEGF-A 변형된 RNA 이중 주사의 경우 604.35이었다.

도 37: 실시예 14에서 2상으로부터의 상처 치유 곡선의 3차 스플라인 보간법이다. 3차 스플라인 보간법을 구축하여, 회색 파선에 의해 입증된 바와 같이 25%, 50% 및 75% 폐쇄까지의 시간을 어렵잡았다. 제시된 데이터는 3명의 관찰자로부터의 중앙값의 정규화된 개방된 상처 영역의 평균이다. #; VEGF-A 변형된 RNA 이중 주사(열린 정사각형) 대 이중 비히클 주사(열린 원형)에 대해  $p < 0.05$ 이다.

도 38: 실시예 14의 2상에서 시점들 사이에서 퍼센트 상처 치유이다. 상처 폐쇄의 평균 퍼센트를 정규화된 상처 영역 데이터를 사용하여 각각의 시점들 사이에서 계산하였다. 제시된 데이터는 평균±SEM이며; \* 제3일 내지 제6일 동안 VEGF-A 변형된 RNA 이중 주사(우측 막대) 대 비히클 이중 주사(좌측 막대)에 대한 더 높은 평균 퍼센트 상처 폐쇄에 대해  $p < 0.05$ 이다.

도 39: 마우스 귀에서 고-용량 VEGF-A 변형된 RNA에 대한 혈관 반응의 광음향 현미경 검사이다. 첫번째 줄; 혈관 구조; 두번째 줄;  $SO_2(\%)$ ; 세번째 줄; 혈류 속도(mm/s)이다. 파선 원형; 주사 부위이다. 세번째 줄에서 화살표; 유의하게 상향조절된 혈류를 갖는 혈관이다. 첫번째 줄의 상부 상의 표지는 VEGF-A 변형된 RNA(100  $\mu$ g)의 피내 주사로부터의 시간을 가리킨다.

도 40: 고-용량 VEGF-A 변형된 RNA를 피내 주사한 마우스 귀에서 신혈관 형성 및 혈관신생이다. 100  $\mu$ g VEGF-A 변형된 RNA를 피내 주사한 마우스의 귀에서 신혈관(두번째 줄에서 화살표로 표시됨) 및 혈관신생의 줄-인 이미지이다. 줄-인 구역은 첫번째 줄에서 파선 정사각형에 의해 표시되어 있다. 첫번째 줄의 상부 상의 표지는 VEGF-A 변형된 RNA(100  $\mu$ g)의 피내 주사로부터의 시간을 가리킨다.

도 41: 마우스 귀에서 저-용량 VEGF-A 변형된 RNA에 대한 혈관 반응의 광음향 현미경 검사이다. 첫번째 줄; 혈관 구조; 두번째 줄;  $SO_2(\%)$ ; 세번째 줄; 혈류 속도(mm/s)이다. 파선 원형; 주사 부위이다. 첫번째 줄의 상부 상의 표지는 VEGF-A 변형된 RNA(10  $\mu$ g)의 피내 주사로부터의 시간을 가리킨다.

도 42: 마우스 귀에서 인간 재조합 VEGF-A 단백질에 대한 혈관 반응의 광음향 현미경 검사이다. 첫번째 줄; 혈관 구조; 두번째 줄;  $SO_2(\%)$ ; 세번째 줄; 혈류 속도(mm/s)이다. 파선 원형; 주사 부위이다. 첫번째 줄의 상부 상의 표지는 인간 재조합 VEGF-A 단백질(1  $\mu$ g)의 피내 주사로부터의 시간을 가리킨다. 명백한 유동 상향조절을 갖는 혈관은 세번째 줄에서 화살표로 표시되어 있다.

도 43: 마우스 귀에서 시트레이트/식염수에 대한 혈관 반응의 광음향 현미경 검사이다. 첫번째 줄; 혈관 구조; 두번째 줄;  $SO_2(\%)$ ; 세번째 줄; 혈류 속도(mm/s)이다. 파선 원형; 주사 부위이다. 첫번째 줄의 상부 상의 표지는 시트레이트/식염수(10  $\mu$ L)의 피내 주사로부터의 시간을 가리킨다.

도 44: 마우스 귀에서 혈관 반응에 미치는 VEGF-A 변형된 RNA, 인간 재조합 VEGF-A 단백질 및 시트레이트/식염수의 효과이다. 마우스 귀에서 VEGF-A 변형된 RNA(100  $\mu$ g, 채워진 정사각형), 인간 재조합 VEGF-A 단백질(1  $\mu$ g, 채워진 삼각형) 또는 시트레이트/식염수(10  $\mu$ L, 채워진 원형)의 피내 주사에 의해 유도된 급성 및 장기간 혈관 반응의 정량적 분석(혈관 직경, 좌측 패널 및 부피 혈류, 우측 패널)이다. 나타난 값들은 평균±SD이고,  $n=3$ /그룹이다.

도 45: 마우스 귀에서 VEGF-A 변형된 RNA의 주사 후, 미세혈관 유동 및 산소 포화도에 미치는 영향이다. VEGF-A 변형된 RNA(100  $\mu$ g)를 마우스 귀에 피내 주사하였다. 미세혈관 유동(패널 A) 및 산소 포화도(패널 B)를 주사 이전(기준선) 및 7일 후에 평가하였다.



도 46: 마우스 귀에서 재조합 인간 VEGF-A 단백질의 주사 후, 미세혈관 유동 및 산소 포화도에 미치는 영향이다. 재조합 인간 VEGF-A 단백질(1  $\mu$ g)을 마우스 귀에 피내 주사하였다. 미세혈관 유동(패널 A) 및 산소 포화도(패널 B)를 주사 이전(기준선) 및 7일 후에 평가하였다.

도 47: 마우스 귀에서 시트레이트/식염수 비히클의 주사 후, 미세혈관 유동 및 산소 포화도에 미치는 영향이다. 시트레이트/식염수 비히클(10  $\mu$ L)을 마우스 귀에 피내 주사하였다. 미세혈관 유동(패널 A) 및 산소 포화도(패널 B)를 주사 이전(기준선) 및 7일 후에 평가하였다.

도 48a 및 도 48b: 실시예 16에 대한 실험 디자인이 도 48a에 예시되어 있다. 실시예 16에 대한 VEGF-A 변형된 RNA 주사의 장소가 도 48b에 예시되어 있다.

도 49: VEGF-A 변형된 RNA를 피내 주사한 토끼로부터의 미세투석 용출액에서 인간 VEGF-A 농도이다. 토끼 뒷다리에 피내 삽입한 100 kDa 미세투석 프로브 유래의 용출액 내의 인간 VEGF-A의 농도이다. 제시된 값은 평균  $\pm$  SEM이다. 미세투석을 t=0 h에 시작하였고, VEGF-A 변형된 RNA 주사(각각 50  $\mu$ g)의 4회 id 주사를 t=1 h에 제공하였다. 점선은 정량화의 하한(LLOQ, 33.4 pg/mL)을 가리킨다. 2개의 프로브들을 각각의 토끼에 삽입하였으며, n=4 토끼였다.

도 50a, 도 50b 및 도 50c: 생체내에서 심근경색 처리된 돼지에서 인간 VEGF-A 변형된 RNA의 심장내 주사 후, 모세혈관 밀도(도 50a), 세동맥 밀도(도 50b) 및 섬유증(도 50c)에 미치는 효과이다. 미니 돼지를 좌전 하행 관상동맥의 영구 결찰 처리하고, 7일 후에 VEGF-A 변형된 RNA(1 mg, 채워진 회색 막대(n=8) 또는 10 mg, 빗금 막대(n=8)) 또는 시트레이트/식염수(채워진 검정색 막대, n=8)를 심외막 주사하였다. 개별 그룹의 동물들에게 삼 시술(관상동맥을 결찰하지 않고 심외막 주사를 제공하지 않았음(열린 막대, n=5)을 수행하였다. 결찰 후 2개월째에, 동물을 안락사시키고, 경색-주변(경계) 구역에서 모세혈관 밀도(도 50a)의 평가를 위해 심장 조직을 수합하였다. 평균  $\pm$  SEM이 나타나 있다. \*; P<0.05 및 \*\*\*; P<0.001 대 시트레이트/식염수-처리된 동물이다(원-웨이 ANOVA 및 듀넛 사후 검정(Dunnett's post test)). 도 50b에서, 결찰 후 2개월째에, 동물을 안락사시키고, 경색-주변(경계) 구역에서 세동맥 밀도의 평가를 위해 심장 조직을 수합하였다. 평균  $\pm$  SEM이 나타나 있다. \*\*; P<0.0 대 시트레이트/식염수-처리된 동물이다(원-웨이 ANOVA 및 듀넛 사후 검정). 도 50c에서, 결찰 후 2개월째에, 동물을 안락사시키고, 경색 영역으로부터 원거리에서 섬유증(콜라겐 침착)의 평가를 위해 심장 조직을 수합하였다. 평균  $\pm$  SEM이 나타나 있다. \*; P<0.05 및 \*\*; P<0.01 대 시트레이트/식염수-처리된 동물이다(원-웨이 ANOVA 및 듀넛 사후 검정).

도 51: 인간 대동맥 평활근 세포(hAoSMEC, 열린 원형) 및 유도 만능 세포 유래의 인간 심근세포(hiPS-CM, 채워진 삼각형)에서 VEGF-A 변형된 RNA 형질감염 후, 인간 VEGF-A 단백질 생성의 시간 프로파일이다. 데이터 평균  $\pm$  SEM이 나타나 있다.

도 52a 및 도 52b: 도 52a는 정상적인 비-경색 마우스 심장(대조군), 및 조직 수합 전 3일, 7일 또는 14일 동안 좌전 하행 관상동맥이 영구 폐색 처리된 심장에서 심외막-유래 세포(EPDC)의 마커로서 빌름스 종양 1 전사 인자(Wt-1)의 면역조직화학을 예시한다. 화살표는 Wt-1 발현을 가리킨다. 도 52b는 정상적인 비-경색 마우스 심장(대조군), 및 조직 수합 전 3일, 7일 또는 14일 동안 좌전 하행 관상동맥이 영구 폐색 처리된 심장에서 Wt-1<sup>+</sup> 세포의 발생 점수를 예시한다. MI; 심근경색이다. \*; P<0.05, \*\*\*; P<0.001 대 대조군, 각각의 연구 그룹 내에서 n=3-5이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0113] 지칭된 모든 참조문헌들은 이들 전체가 원용에 의해 본 명세서에 포함된다.

[0114] 본원에 나타난 개시내용의 많은 변형들 및 다른 실시형태들은, 이들 개시내용이 속한 당해 기술분야의 당업자에게 상기 설명 및 연관된 도면에 제시된 교시의 이득을 생각나게 할 것이다. 따라서, 개시내용은 개시된 특정한 실시형태로 제한되지 않고, 변형 및 다른 실시형태는 첨부된 청구항의 범위 내에 포함되고자 함을 이해한다. 특정한 용어가 본원에 이용되긴 하지만, 이들 용어는 단지 일반적이고 설명적인 의미로 사용되며 제한하려는 것이 아니다.

[0115] 단위, 접두사 및 부호는 이들의 SI 허용된 형태로 표시될 수 있다. 다르게 지시되지 않는 한, 각각 핵산은 좌측으로부터 우측으로 5'으로부터 3' 배향에서 기재되고; 아미노산 서열은 좌측으로부터 우측으로 아미노로부터 카르복시 배향에서 기재된다. 수치 범위는 해당 범위를 한정하는 숫자를 포함한다. 아미노산은 본원에서, 이들의 보편적으로 공지된 3개 글자 부호에 의해 또는 IUPAC-IUB 생화학적 명명법 위원회에 의해 권고된 1-글자 부호에

의해 지칭될 수 있다. 마찬가지로, 뉴클레오타이드는 이들의 보편적으로 허용된 단일-글자 코드로 지칭될 수 있다. 하기에서 정의된 용어들은 명세서를 전체적으로 참조하여 보다 완전히 정의된다.

[0116] **5.1. 정의**

[0117] 다르게 구체적으로 정의되지 않는 한, 본원에서 사용되는 모든 기술적 및 과학적 용어들은, 이러한 개시내용이 속한 당해 기술분야의 당업자에 의해 보편적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 다르게 언급되지 않는 한, 본원에서 이용되거나 고려되는 기술은 당업자에게 잘 공지된 표준 방법이다. 본 개시내용의 실시는 다르게 지시되지 않는 한, 미생물, 조직 배양, 분자생물학, 화학, 생화학 및 재조합 DNA 기술의 통상적인 기술들을 이용할 것이며, 이들 기술은 당업계에 포함된다. 물질, 방법 및 실시예는 단지 예시적이고 제한하는 것이 아니다. 하기 내용은 예시에 의해 제시되고, 개시내용의 범위를 제한하려는 것이 아니다.

[0118] 일부 실시형태에서, 명세서(여기에 청구항이 이들 전체에 포함됨)에 나타난 수치 파라미터는 특정 실시형태에 의해 수득되고자 하는 요망되는 특성에 따라 달라질 수 있는 근사치이다. 일부 실시형태에서, 수치 파라미터는 보고된 유효 숫자 자리수의 측면에서 일상적인 반올림(ordinary rounding) 기술을 적용함으로써 간주되어야 한다. 본 개시내용의 일부 실시형태의 광범위한 범위를 설정하는 수치 범위 및 파라미터가 근사치이긴 하지만, 특정한 실시예에 나타난 수치 값은 실행 가능한 한 정확하게 보고된다. 본 개시내용의 일부 실시형태에서 제시된 수치 값은 필수적으로 이들 각각의 시험 측정에서 발견된 표준 편차로 인한 소정의 오차를 함유할 수 있다. 본원에서 값들의 범위에 관한 언급은 단지, 해당 범위에 속하는 각각의 개별 값을 개별적으로 지칭하는 속기 방법(shorthand method)으로서 역할을 하고자 할 뿐이다. 본원에서 다르게 지시되지 않는 한, 각각의 개별 값은, 이러한 개별 값이 본원에서 개별적으로 언급되는 것처럼 명세서에 포함된다.

[0119] 편의상, 전체 출원(명세서, 실시예 및 첨부된 청구항 포함)에 이용된 소정의 용어들이 본원에서 수합된다. 다르게 정의되지 않는 한, 본원에서 사용되는 모든 기술적 및 과학적 용어들은 이러한 개시내용이 속한 당해 기술분야의 당업자에 의해 보편적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다.

[0120] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "투여"는 적어도 하나의 변형된 RNA를 포함하는 약학적 조성물 또는 약학적 제제를 요망되는 부위 또는 조직 위치에서, 이러한 약학적 조성물 또는 약학적 제제의 적어도 부분적인 국소화를 초래하는 방법 또는 경로에 의해 대상체 내로 위치화(placement)하는 것을 지칭한다. 일부 실시형태에서, 변형된 RNA를 포함하는 약학적 조성물 또는 약학적 제제는 대상체에서 효과적인 치료를 초래하는 임의의 적절한 경로에 의해, 즉, 대상체에서 요망되는 위치 또는 조직으로의 전달을 초래하는 투여에 의해 투여될 수 있으며, 이때, 변형된 RNA에 의해 발현되는 단백질 중 적어도 일부가 요망되는 표적 조직 또는 표적 세포 위치에 위치한다.

[0121] 투여는 근육내, 경동맥(transarterial), 복강내, 정맥내, 동맥내, 피하, 심실내, 피내, 심장내, 심외막, 간문맥 카테터를 통한, 관상 정맥동 카테터를 통한, 및/또는 치료되는 영역 내로의 직접 투여일 수 있다. 약학적 조성물은 투여-특이적 약학적 제제를 초래하는 각각의 투여 경로에 대해 특수 제제화된다.

[0122] 본원에 사용된 용어 "조성물"은 일반적으로, 어떤 것을 구성하는 적어도 2개의 파트들 또는 요소들의 조합을 의미하는 것으로 이해된다. 예를 들어, 본원에 사용된 바와 같이 조성물은 통상, 개시내용에 따른 적어도 하나의 폴리뉴클레오타이드, 1차 구축물 또는 변형된 RNA 및 적합한 담체 또는 부형제를 포함한다.

[0123] 용어 "포함하다," "가진다" 및 "수반하다"는 말단이 열린 연결 동사이다. 이들 동사 중 하나 이상의 임의의 형태 또는 시제, 예컨대 "포함한다", "포함하는", "가진다", "갖는", "수반한다" 및 "수반하는" 또한, 말단이 열려 있다. 예를 들어, 하나 이상의 단계를 "포함하는", "갖는" 또는 "수반하는" 임의의 방법은 이들 하나 이상의 단계만 소유하는 것으로 제한되지 않고, 다른 열거되지 않은 단계를 또한 망라할 수 있다. 유사하게는, 하나 이상의 특징을 "포함하는", "갖는" 또는 "수반하는" 임의의 조성물은 하나 이상의 특징만 소유하는 것으로 제한되지 않고, 다른 열거되지 않은 특징을 망라할 수 있다. 본원에 기재된 모든 방법들은 본원에서 다르게 지시되지 않는 한 또는 문맥상 명확하게 상충되지 않는 한, 임의의 적합한 순서로 수행될 수 있다. 본원에서 소정의 실시형태와 관련하여 제공된 임의의 및 모든 예들, 또는 예시적인 언어(예를 들어 "예컨대")의 사용은 단지 본 개시내용을 더 양호하게 예시하기 위한 것이고, 청구된 본 개시내용의 범위에 제한을 두지 않는다. 명세서 내의 어떤 언어도, 임의의 비-청구된 요소를 본 개시내용의 실행에 본질적임을 가리키는 것으로 간주되어서는 안된다.

[0124] 용어 "본질적으로 ~로 구성된"은 청구항의 범위를 명시된 물질 또는 단계 및 "기본적인 및 신규 특징(들)에 물질적으로 영향을 미치지 않는 것들"로 제한한다. 문헌[*In re Herz*, 537 F.2d 549, 551-52, 190 USPQ 461, 463(CCPA 1976)(오리지널에서 강조)(선행 기술의 유압 유체(hydraulic fluid)는 분산제를 필요로 하였으며, 이

러한 분산제는 청구자들이 주장하건대, "본질적으로 소정의 구성성분들로 구성된" 작동 유체로 제한되는 청구항으로부터 배제되었다.

- [0125] 용어 "~로 구성된"은 실시형태의 해당 설명에서 언급되지 않은 임의의 요소를 배제하는, 본원에 기재된 바와 같은 조성물, 방법 및 각각의 구성성분을 지칭한다.
- [0126] 용어 "질병" 또는 "장애"는 본원에서 상호호환적으로 사용되고, 병에 걸린 사람 또는 사람과 접촉한 사람에게 기능의 성능을 방해하거나 교란시키고/시키거나 증상, 예컨대 불편, 기능 장애, 고충 또는 심지어 사망을 유발하는 신체 또는 일부 기관의 상태에서의 임의의 변경을 지칭한다. 또한, 질병(disease) 또는 장애(disorder)는 디스템퍼(distemper), 약화(ailing), 질병(ailment), 만성병(malady), 병(sickness), 병(illness), 병(complaint), 가벼운 병(indisposition) 또는 병(affection)과 관련이 있을 수 있다.
- [0127] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "VEGF-A 요법에 반응성인 질병"은 VEGF-A 단백질을 포함하는 약학적 조성물 또는 약학적 제제 또는 VEGF-A 단백질을 생성할 수 있는 작용제, 예컨대 본원에 개시된 변형된 RNA의 투여 후, 하나 이상의 증상 또는 임상 마커의 개선을 보여주는 장애를 지칭한다. 대안적으로, 질병은, 이러한 질병의 진행이 VEGF-A 단백질을 포함하는 약학적 조성물 또는 약학적 제제 또는 VEGF-A 단백질을 생성할 수 있는 작용제의 투여에 의해 감소되거나 중단되는 경우, VEGF-A 요법에 "반응성"이다. 유익하거나 요망되는 임상 결과로는, 하나 이상의 증상(들)의 완화, 질병 범위의 축소, 안정화된(즉, 악화되지 않는) 질병 상태, 질병 진행의 지연 또는 늦춤, 질병 상태의 향상 또는 일시적 완화(palliation), 및 차도(remission)(부분적이거나 전체적이든지간에) 등이 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다.
- [0128] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "2가 양이온"은 포지티브 원자가가 2인 이온 화학종을 지칭한다. 예를 들어, 마그네슘 이온,  $Mg^{2+}$  및 칼슘 이온,  $Ca^{2+}$ 가 2가 양이온이다.
- [0129] "투여량 형태"는 약물(예를 들어 변형된 RNA)이 생성되고 분배되는 물리적 형태, 예컨대 정제, 캡슐(코팅형, 지연 방출형, 분산형 등), 연고 또는 주사제(injectable)(분말, 용액)이다.
- [0130] 구 "약물 생성물"은 활성 약물 성분(예를 들어 변형된 RNA)을, 일반적으로 그러나 필수적으로는 아니게, 불활성 성분과 함께 함유하는 완성된 투여량 형태, 예를 들어 정제, 캡슐, 용액 등을 의미한다.
- [0131] 본원에 사용된 바와 같이 용어 "유효량"은 질병 또는 장애의 적어도 하나 이상의 증상(들)을 감소시키거나 요망되는 효과를 제공하기에 충분한 치료제(예를 들어 변형된 RNA), 약학적 조성물 또는 약학적 제제의 양을 지칭한다. 예를 들어, 유효량은, 심혈관 질환, 또는 다른 질병 또는 장애를 갖는 전형적인 대상체에게 투여 시, 심장 기능장애 또는 다른 장애와 연관된 증상 또는 임상 마커에서 치료적으로 또는 예방적으로 유의한 감소를 초래하는 양일 수 있다.
- [0132] 본원에 사용된 바와 같이, 핵산 서열의 "발현"은 하기 사건들 중 하나 이상을 지칭한다: (1) DNA 서열로부터 (예를 들어 전사에 의한) RNA 주형의 생성; (2) (예를 들어 스플라이싱, 편집, 5' 캡 형성 및/또는 3' 말단 가공에 의한) RNA 전사물의 가공; (3) 폴리펩타이드 또는 단백질로의 RNA 번역; 및 (4) 폴리펩타이드 또는 단백질의 번역-후 변형.
- [0133] 본원에 사용된 바와 같이 용어 "제제" 또는 "약학적 제제"는 활성 약학적 성분(예를 들어 변형된 RNA)을, 특정 투여 경로를 통해 포유류(예를 들어 이를 필요로 하는 인간)에게 투여되기에 적합한 약학적으로 허용 가능한 담체/희석제/부형제와 함께 함유하는 약학적 혼합물 또는 용액을 포함하는 유형의 조성물을 지칭한다. 예를 들어, 본원에 사용된 바와 같이 "제제"는 많은 경로들 중 하나 이상의 경로를 통한 투여를 위해, 예컨대 근육내, 피내, 피하 또는 심장내 경로를 통해, 간문맥 카테터를 통해, 관상 정맥동 카테터를 통해 및/또는 치료되는 영역 내로의 직접 투여에 의한 투여에 적합한 전달제 및/또는 다른 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하도록 특정하게 제제화될 수 있다. 따라서, "제제"는 특정 투여 경로에 대해 특수하게 제제화된 조성물인 것으로 이해될 수 있다. 제제는 특정 투여량 형태에 존재하는 조성물일 수 있다.
- [0134] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "변형된 RNA"는 아데노신(A)((2R,3R,4S,5R)-2-(6-아미노-9H-퓨린-9-일)-5-(하이드록시메틸)옥솔란-3,4-디올), 구아노신(G)(2-아미노-9-[3,4-디하이드록시-5-(하이드록시메틸)옥솔란-2-일]-3H-퓨린-6-온), 시티딘(C)(4-아미노-1-[3,4-디하이드록시-5-(하이드록시메틸)테트라하이드로퓨란-2-일]피리미딘-2-온) 및 우라실(U)(1-[(3R,4S,5R)-3,4-디하이드록시-5-(하이드록시메틸)옥솔란-2-일]피리미딘-2,4-디온)과 비교하거나, RNA 분자 내에서 AMP, GMP, CMP 및 UMP와 비교하여 1개, 2개, 또는 2개 초과 뉴클레오타이드 변형을 함유하는 RNA 분자 또는 이의 일부를 지칭한다. 뉴클레오타이드 변형의 비제한적인 예는 본 명세서 어디에

나 제공된다. 그렇지 않으면 특정한 청구된 RNA의 뉴클레오타이드 서열이 천연적으로-존재하는 RNA 분자의 서열과 동일한 경우, 변형된 RNA는 천연 대응물에 존재하는 것과 상이한 적어도 하나의 변형을 갖는 RNA 분자인 것으로 이해된다. 차이는 뉴클레오사이드/뉴클레오타이드에 대한 화학적 변화, 또는 서열 내에서 해당 변화의 위치에 존재할 수 있다. 일 실시형태에서, 변형된 RNA는 변형된 메신저 RNA(또는 "변형된 mRNA")이다.

[0135] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "생리학적 과정의 조정"은 살아 있는 유기체들 및 이들의 파트, 예컨대 세포 또는 조직의 다양한 기능들 및 물리적 또는 화학적 작동의 제어를 지칭한다. 예를 들어 VEGF-A가 중심적인 역할을 하는 생리학적 과정의 경우, 이러한 조정은 혈관신생 유도, 혈관 세포 증식 자극, 심외막 유래 전구체 세포의 증식 증가 및/또는 운명 변경, 내피화 상향조절, 심장 재생 유도, 상처 치유용 조직 이식물의 혈관재생 증가, 혈관 기능 개선, 조직 관류 및 새로운 혈관 형성 증가, 흉터 조직 감소, 전부하 동원성 박출 작업량(PRSW) 증가, 최대 압력 발달 증가, 수축력 기능 증가, 좌심실 박출 분율(LVEF) 증가, 심장 기능장애와 연관된 바이오마커(예를 들어 NT-proBNP, BNP, hsTnT 및 hsTnI) 수준 저하, 경색 크기 감소, 심장 조직의 섬유증 감소 및/또는 심장 기능 개선을 포함할 수 있다.

[0136] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "핵산"은 이의 가장 광범위한 의미에서, 포스포디에스테르 결합을 통해 연결된 뉴클레오타이드들의 중합체를 포함하는 임의의 화합물 및/또는 성분을 포함한다. 이들 중합체는 종종 크기에 따라 올리고뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드로 지칭된다. 용어 "폴리뉴클레오타이드 서열" 및 "뉴클레오타이드 서열"은 또한, 본원에서 상호호환적으로 사용된다.

[0137] 본원에서, 구 "약학적으로 허용 가능한"은 본원에서, 타당한 의학적 판단의 범위 내에서 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응 또는 다른 문제점 또는 합병증 없이 인간 및 동물의 조직과 접촉시켜 사용하기에 적합하며, 합리적인 이득/위험비(benefit/risk ratio)에 상응하는 화합물, 물질, 조성물, 및/또는 투여량 형태를 지칭하는 데 이용된다. 식약청(예를 들어 EMA, US-FDA)은 가이드를 제공하고, 약학적으로 허용 가능한 화합물, 물질, 조성물, 및/또는 투여량 형태를 승인한다. 예들은 약전(Pharmacopeia)에 열거될 수 있다.

[0138] 구절 "약학적으로 허용 가능한 부형제"는 본원에서, 용매, 분산 매질, 희석제, 분산제, 현탁 보조제, 표면 활성제, 등장성제, 농조화 또는 유화 작용제, 보존제, 코어-셸 나노입자, 중합체, 펩타이드, 단백질, 세포, 히알루로니다제 및 이들의 혼합물로부터 선택되는 약학적으로 허용 가능한 물질을 지칭하는 데 이용된다. 일부 실시형태에서, 용매는 수성 용매이다.

[0139] 본원에 사용된 바와 같이, "폴리펩타이드"는 대부분 펩타이드 결합에 의해 함께 연결된 아미노산 잔기(천연 또는 비천연)들의 중합체를 의미한다. 본원에 사용된 바와 같이 이러한 용어는 임의의 크기, 구조 또는 기능의 단백질, 폴리펩타이드 및 펩타이드를 지칭한다. 폴리펩타이드는 단일 분자일 수 있거나, 다-분자(multi-molecular) 복합체, 예컨대 이량체, 삼량체 또는 사량체일 수 있다. 이들은 또한, 단일 사슬 또는 다중 사슬 폴리펩타이드, 예컨대 항체 또는 인슐린을 포함할 수 있고, 연관되거나 연결될 수 있다. 대부분의 보편적인 이황화 연결은 다중 사슬 폴리펩타이드에서 확인된다. 용어 폴리펩타이드는 또한, 하나 이상의 아미노산 잔기가 상응하는 천연 발생 아미노산의 인공적인 화학적 유사체인 아미노산 중합체에 적용될 수 있다.

[0140] 본원에 사용된 바와 같이, "단백질"은 본질적으로 20개의 아미노산들 중 임의의 아미노산으로 구성된 중합체이다. "폴리펩타이드"가 종종 비교적 큰 폴리펩타이드를 지칭하는 데 사용되고 "펩타이드"가 종종 작은 폴리펩타이드를 지칭하는 데 사용되더라도, 당업계에서 이들 용어의 용법은 중복되고 변화된다. 용어 "펩타이드(들)", "단백질(들)" 및 "폴리펩타이드(들)"는 이따금 본원에서 상호호환적으로 사용된다.

[0141] 본원에 사용된 바와 같이 용어 "재조합"은, 단백질이 "이종성 핵산"의 도입 또는 본래(native) 핵산의 변경에 의해 유전적으로 조작된 핵산의 사용을 통해 원핵 또는 진핵 발현 시스템으로부터 유래됨을 의미한다.

[0142] 용어 "통계학적으로 유의한" 또는 "유의하게"는 통계학적 유의성을 지칭한다. 이러한 용어는 차이가 존재하는 통계학적 증거를 지칭한다. 이러한 용어는, 귀무 가설(null hypothesis)이 실제로 참인 경우, 이러한 귀무 가설을 거절하기 위한 결정을 할 확률로서 정의될 수 있다. 결정은 종종, p-값을 사용하여 수행된다. 당업계에 잘 공지된 유의한 유의성의 임의의 다른 측정값이 사용될 수 있다.

[0143] 용어 "대상체" 및 "개체"는 본원에서 상호호환적으로 사용되고, 본원에 기재된 방법 및 조성물을 이용하는 예방적 치료를 포함한 치료가 제공되는 동물, 예를 들어 인간을 지칭한다. 특정 동물, 예컨대 인간 대상체에 특이적인 이들 질환 또는 질병 상태의 치료의 경우, 용어 "대상체"는 해당하는 특정 동물을 지칭한다.

[0144] 용어 "실질적으로 ~이 없는"은, 조성물 또는 제제가 특정한 원소를 유의한 양으로 갖지 않는 조건을 지칭한다. 예를 들어, 2가 양이온이 "실질적으로 없는" 조성물 또는 제제는 2가 양이온을 거의 함유하지 않거나 아예 함유



하지 않는다.

- [0145] 본원에 사용된 바와 같이, 질병, 장애 및/또는 질환을 "앓고 있는" 대상체 또는 개체는 질병, 장애 및/또는 질환의 하나 이상의 증상에 의해 진단을 받았거나 나타낸다. 일부 실시형태에서, 대상체는 질병, 장애 및/또는 질환을 앓을 위험에 있을 수 있다.
- [0146] 용어 "조직"은 함께 소정의 특수 기능을 수행하는 유사하게 특수화된 세포의 그룹 또는 층을 지칭한다. 용어 "조직-특이적인"은 특정한 조직 유래의 세포의 공급원이거나 특징을 한정(defining)하는 것을 지칭한다.
- [0147] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "치료하다", "치료" 또는 "치료하는"은 치유적 치료를 지칭하며, 여기서, 목적은 질병의 발달을 예방하거나 늦추는 것, 예컨대 심장 장애의 발달을 늦추는 것, 또는 혈관 질환, 질병 또는 장애, 예컨대 불충분하거나 바람직하지 못한 심장 기능을 특징으로 하는 임의의 장애의 적어도 하나의 부작용 또는 증상을 감소시키는 것이다.
- [0148] 이러한 개시내용은 본원에 기재된 특정 방법, 프로토콜 및 시약 등으로 제한되지 않고 이와 같이 변할 수 있는 것으로 이해되어야 한다. 본원에 사용되는 용어는 특정 실시형태만 기재하기 위한 것이고, 본 개시내용의 범위를 제한하려는 것이 아니며, 이러한 범위는 청구항에 의해서만 한정된다.
- [0149] **5.2. VEGF-A를 인코딩하는 변형된 RNA 폴리펩타이드**
- [0150] 시험관내, 생체내, 인 시추 또는 생체외이든지 간에, 핵산, 예를 들어 리보핵산(RNA)을 세포 내에 전달할 수 있는 것, 예컨대 핵산의 세포내 번역 및 인코딩된 관심 폴리펩타이드의 생성을 유발하는 것은 치료법, 진단법, 시약 분야에서 및 생물학적 검정법에 있어서 큰 관심을 끌고 있다.
- [0151] 천연 발생 RNA는 4개의 기본적인 리보뉴클레오타이드: ATP, CTP, UTP 및 GTP로부터 합성되지만, 전사-후 변형된 뉴클레오타이드를 함유할 수 있다. 나아가, 대략 100개의 상이한 뉴클레오타이드 변형이 RNA에서 식별되어 왔다 (문헌[Rozenski, J, Crain, P, and McCloskey, J., The RNA Modification Database: 1999 update, Nucl Acids Res, (1999) 27: 196-197]).
- [0152] 본 개시내용에 따르면, 이들 RNA는 바람직하게는, 당해 기술분야의 다른 RNA 분자의 결핍(deficiency)(예를 들어 투여 시, 내재성 면역 반응 및 급속한 분해를 활성화시킴)을 피하도록 변형된다. 따라서, 이들 폴리뉴클레오타이드는 변형된 RNA로서 지칭된다. 일부 실시형태에서, 변형된 RNA는 대상체에게 투여 시, 내재성 면역 반응을 피한다. 일부 실시형태에서, 변형된 RNA의 반감기는 비변형된 RNA와 비교하여 연장된다.
- [0153] 바람직한 실시형태에서, RNA 분자는 메신저 RNA(mRNA)이다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "메신저 RNA"(mRNA)는 시험관내, 생체내, 인 시추 또는 생체외에서 관심 폴리펩타이드를 인코딩하고 인코딩된 관심 폴리펩타이드를 생성하기 위해 번역될 수 있는 임의의 폴리뉴클레오타이드를 지칭한다.
- [0154] 전형적으로 도 1a에 도시된 바와 같이, mRNA 분자의 기본적인 구성성분은 적어도 하나의 코딩 구역, 5' 비번역 구역(UTR), 3' 비번역 구역(UTR), 5' 캡 및 폴리-(A) 꼬리를 포함한다. 이러한 야생형 모듈러(modular) 구조 상에서 구축 시, 본 개시내용은, 모듈러 체계를 유지하지만, 일부 실시형태에서 폴리뉴클레오타이드가 도입되는 세포의 내재성 면역 반응의 실질적인 유도의 결여(lack)를 포함하여 폴리뉴클레오타이드에 유용한 특성을 부여하는 하나 이상의 구조적 및/또는 화학적 변형 또는 변형을 포함하는 폴리뉴클레오타이드 또는 1차 RNA 구축물을 제공함으로써, 전형적인 mRNA 분자의 기능성의 범위를 확대시킨다.
- [0155] 변형된 RNA는 표준 RNA 뉴클레오타이드 사슬과 비교하여 임의의 유용한 변형, 예컨대 당, 뉴클레오타이드(예를 들어 뉴클레오타이드의 하나 이상의 변형, 예컨대 피리미딘 뉴클레오타이드의 원자를 선택적으로 치환된 아미노, 선택적으로 치환된 티올, 선택적으로 치환된 알킬(예를 들어 메틸 또는 에틸) 또는 할로(예를 들어 클로로 또는 플루오로)로 대체하거나 치환하는 것), 또는 뉴클레오타이드간 연결(예를 들어 포스포디에스테르 백본에 대한 하나 이상의 변형)을 포함할 수 있다. 변형된 RNA는 선택적으로 다른 작용제(예를 들어 RNAi-유도제, RNAi 작용제, siRNA, shRNA, miRNA, 안티센스 RNA, 리보자임, 촉매적 DNA, tRNA, 3중 나선 형성을 유도하는 RNA, 앵타머, 벡터 등)를 포함할 수 있다.
- [0156] 미국 특허 출원 공개 2014/0073687은 몇몇 유용한 변형을 갖는 예시적인 변형된 RNA, 예를 들어 5-메틸시티딘(5mC), N6-메틸아데노신(m6A), 3,2'-O-디메틸우리딘(m4U), 2-티오우리딘(s2U), 2' 플루오로우리딘, 슈도우리딘, 2'-O-메틸우리딘(Um), 2' 데옥시 우리딘(2' dU), 4-티오우리딘(s4U), 5-메틸우리딘(m5U), 2'-O-메틸아데노신(m6A), N6,2'-O-디메틸아데노신(m6Am), N6,N6,2'-O-트리메틸아데노신(m62Am), 2'-O-메틸시티딘(Cm), 7-메틸구아노신(m7G), 2'-O-메틸구아노신(Gm), N2,7-디메틸구아노신(m-2,7G), N2,N2,7-트리메틸구아노신(m-

2,2,7G)으로부터 선택되는 적어도 하나 이상의 변형된 뉴클레오타이드를 개시하고 있다. 추가의 변형은 2014년 10월 7일에 출원된 미국 특허 출원 공개 2015/0051268 및 2014년 2월 3일에 출원된 미국 특허 9,061,059에 기재되어 있다. 이에, 이들 변형들은 모두 이들 전체가 원용에 의해 본 명세서에 포함된다. 추가의 변형이 본원에 기재되어 있다.

[0157] 비제한적인 예로서, 일부 실시형태에서, 변형된 RNA는 예를 들어, N1-메틸-슈도-UMP를 형성하도록 변형된 적어도 하나의 우리딘 모노포스페이트(UMP)를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, N1-메틸-슈도-UMP는 0.1%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99.9% 및 100%의 서열 내에서 UMP 대신에 UMP의 퍼센트 내에서 존재한다. 일부 실시형태에서, 모든 UMP가 N1-메틸-슈도-UMP에 의해 대체되었다.

[0158] 일부 실시형태에서, 변형된 RNA는 예를 들어, 메틸-CMP를 형성하도록 변형된 적어도 하나의 시티딘 모노포스페이트(CMP)를 (추가로) 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 메틸-CMP는 0.1%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99.9% 및 100%로부터 선택되는 서열 내에서 CMP 대신에 CMP의 퍼센트 내에서 존재한다. 일부 실시형태에서, 모든 CMP가 5-메틸-CMP에 의해 대체되었다.

[0159] 일부 실시형태에서, 변형된 RNA는 N6-메틸-AMP를 형성하도록 변형된 적어도 하나의 아데노신 모노포스페이트(AMP)를 (추가로) 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, N6-메틸-AMP는 0.1%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99.9% 및 100%로부터 선택되는 서열 내에서 AMP 대신에 AMP의 퍼센트 내에서 존재한다. 일부 실시형태에서, 모든 AMP가 N6-메틸-AMP에 의해 대체되었다.

[0160] 일부 실시형태에서, 변형된 RNA는 7-메틸-GMP를 형성하도록 변형된 적어도 하나의 구아노신 모노포스페이트(GMP)를 (추가로) 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 7-메틸-GMP는 0.1%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99.9% 및 100%로부터 선택되는 서열 내에서 GMP 대신에 GMP의 퍼센트 내에서 존재한다. 일부 실시형태에서, 모든 GMP가 7-메틸-GMP에 의해 대체되었다.

[0161] 일부 실시형태에서, 변형된 RNA는 예를 들어 5-메틸시티딘(5mC), N6-메틸아데노신(m6A), 3,2'-O-디메틸우리딘(m4U), 2-티오우리딘(s2U), 2' 플루오로우리딘, 슈도우리딘, 2'-O-메틸우리딘(Um), 2' 데옥시 우리딘(2' dU), 4-티오우리딘(s4U), 5-메틸우리딘(m5U), 2'-O-메틸아데노신(m6A), N6,2'-O-디메틸아데노신(m6Am), N6,N6,2'-O-트리메틸아데노신(m62Am), 2'-O-메틸시티딘(Cm), 7-메틸구아노신(m7G), 2'-O-메틸구아노신(Gm), N2,7-디메틸구아노신(m-2,7G), N2,N2,7-트리메틸구아노신(m-2,2,7G) 및 N1-메틸-슈도우리딘 또는 이들의 임의의 조합으로부터 선택되는 적어도 하나 이상의 변형된 뉴클레오타이드를 (추가로) 포함할 수 있다. 각각의 확률 및 조합은 본 개시내용의 개별 실시형태를 나타낸다.

[0162] 일부 실시형태에서, 변형된 RNA는 5' 캡, 예컨대 5' 디구아노신 캡에 변형을 포함한다. 일부 실시형태에서, 변형된 RNA는 코딩 구역에 변형을 포함한다. 일부 실시형태에서, 변형된 RNA는 5' UTR에 변형을 포함한다. 일부 실시형태에서, 변형된 RNA는 3' UTR에 변형을 포함한다. 일부 실시형태에서, 변형된 RNA는 폴리-(A) 꼬리에 변형을 포함한다. 일부 실시형태에서, 변형된 RNA는 코딩 구역, 5' 캡, 5' UTR, 3' UTR 또는 폴리-(A) 꼬리에 대한 변형의 임의의 조합을 포함한다. 일부 실시형태에서, 변형된 RNA는 선택적으로, 알칼리 포스파타제로 처리될 수 있다.

[0163] 일부 실시형태에서, 변형된 RNA는 일반적으로 심혈관 생리학 기능, 특히 동맥신생의 조절에 중심적인 역할을 하는 VEGF 단백질들의 큰 패밀리 중 임의의 하나인 혈관 내피 성장 인자(VEGF) 폴리펩타이드를 인코딩한다(문헌 [Holmes D.I. et al., Genome Biol., (2005)6(2):209]). VEGF의 역할을 또한, 일산화질소(NO) 신호전달, 혈관 투과성, 발생(developmental) 및 산후(post-natal) 혈관신생, 종양 혈관신생, 동맥신생, 내피 복제의 활성화, 및 다분화성 심혈관 전구체에 대한 세포 운명 스위치로서의 역할을 포함한다.

[0164] 당업자는, 임의의 특정 VEGF 유전자에 대해 하나 이상의 변이체 또는 이소폼이 존재할 수 있음을 이해할 것이다. 본 개시내용에 따른 VEGF-A 폴리펩타이드의 비제한적인 예들은 표 1에 열거되어 있다. 당업자는, 표 1에 개시된 서열이 잠재적인 측면(flanking) 구역을 함유함을 이해할 것이다. 이들은 각각의 뉴클레오타이드 서열에서 오픈 리딩 프레임(open reading frame)의 5'(업스트림) 또는 3'(다운스트림) 방향으로 인코딩된다. 오픈 리딩 프레임은 뉴클레오타이드 참조 서열을 교차함으로써 한정적으로 및 구체적으로 개시된다. 또한, 하나 이상

의 이용 가능한 데이터베이스 또는 알고리즘을 이용함으로써 5' 또는 3' 측면 구역을 추가로 특징화하는 것이 가능하다. 데이터베이스는 NCBI 서열의 측면 구역 내에 함유된 특색에 주석을 달았으며, 이들은 당업계에서 입수 가능하다.

[0165] [표 1]

[0166] 호모 사피엔스 VEGF-A mRNA 이소폼

설명	NM Ref.	NP Ref.
호모 사피엔스 혈관 내피 성장 인자 A(VEGF-A), 전사물 변이체 1, mRNA	NM_001171623.1	NP_001165094.1
호모 사피엔스 혈관 내피 성장 인자 A(VEGF-A), 전사물 변이체 1, mRNA	NM_001025366.2	NP_001020537.2
호모 사피엔스 혈관 내피 성장 인자 A(VEGF-A), 전사물 변이체 2, mRNA	NM_001171624.1	NP_001165095.1
호모 사피엔스 혈관 내피 성장 인자 A(VEGF-A), 전사물 변이체 2, mRNA	NM_003376.5	NP_003367.4
호모 사피엔스 혈관 내피 성장 인자 A(VEGF-A), 전사물 변이체 3, mRNA	NM_001171625.1	NP_001165096.1
호모 사피엔스 혈관 내피 성장 인자 A(VEGF-A), 전사물 변이체 3, mRNA	NM_001025367.2	NP_001020538.2
호모 사피엔스 혈관 내피 성장 인자 A(VEGF-A), 전사물 변이체 4, mRNA	NM_001171626.1	NP_001165097.1
호모 사피엔스 혈관 내피 성장 인자 A(VEGF-A), 전사물 변이체 4, mRNA	NM_001025368.2	NP_001020539.2
호모 사피엔스 혈관 내피 성장 인자 A(VEGF-A), 전사물 변이체 4, mRNA	NM_001317010.1	NP_001303939.1
호모 사피엔스 혈관 내피 성장 인자 A(VEGF-A), 전사물 변이체 5, mRNA	NM_001171627.1	NP_001165098.1
호모 사피엔스 혈관 내피 성장 인자 A(VEGF-A), 전사물 변이체 5, mRNA	NM_001025369.2	NP_001020540.2
호모 사피엔스 혈관 내피 성장 인자 A(VEGF-A), 전사물 변이체 6, mRNA	NM_001171628.1	NP_001165099.1
호모 사피엔스 혈관 내피 성장 인자 A(VEGF-A), 전사물 변이체 6, mRNA	NM_001025370.2	NP_001020541.2
호모 사피엔스 혈관 내피 성장 인자 A(VEGF-A), 전사물 변이체 7, mRNA	NM_001171629.1	NP_001165100.1
호모 사피엔스 혈관 내피 성장 인자 A(VEGF-A), 전사물 변이체 7, mRNA	NM_001033756.2	NP_001028928.1
호모 사피엔스 혈관 내피 성장 인자 A(VEGF-A), 전사물 변이체 8, mRNA	NM_001171630.1	NP_001165101.1
호모 사피엔스 혈관 내피 성장 인자 A(VEGF-A), 전사물 변이체 8, mRNA	NM_001171622.1	NP_001165093.1
호모 사피엔스 혈관 내피 성장 인자 A(VEGF-A), 전사물 변이체 9, mRNA	NM_001204385.1	NP_001191314.1

[0167]

호모 사피엔스 혈관 내피 성장 인자 A(VEGF-A), 전사물 변이체 9, mRNA	NM_001204384.1	NP_001191313.1
호모 사피엔스 혈관 내피 성장 인자 A(VEGF-A), 전사물 변이체 10, mRNA	NM_001287044.1	NP_001273973.1

[0168]

[0169] 당업자는, VEGF-A 폴리펩타이드, 예를 들어 인간 VEGF-A 폴리펩타이드를 인코딩하는 RNA 분자가 표 1에 열거된

VEGF-A mRNA 이소폼에 따라 디자인될 수 있음을 이해할 것이다. 당업자는 일반적으로, 잔여 VEGF 패밀리 구성원들의 다수의 이소폼들에 친숙하다.

- [0170] 일 실시형태에서, 본 개시내용은 VEGF-A 폴리펩타이드를 인코딩하는 변형된 RNA(예를 들어 SEQ ID NO: 2)를 제공한다. 일부 실시형태에서, 변형된 RNA는 VEGF-A 폴리펩타이드를 인코딩하며, 여기서, 변형된 RNA는 SEQ ID NO: 1을 포함한다. 일부 실시형태에서, 변형된 RNA는 5' 캡, 5' UTR, 3' UTR, 폴리(A) 꼬리 또는 이들의 임의의 조합을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 5' 캡, 5' UTR, 3' UTR, 폴리(A) 꼬리 또는 이들의 임의의 조합은 하나 이상의 변형된 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.
- [0171] 일부 실시형태에서, VEGF-A 폴리펩타이드를 인코딩하는 변형된 RNA는 도 1b에 도시된 바와 같은 구조를 가질 수 있으며, 이는 SEQ ID NO: 1이다.
- [0172] 일부 실시형태에서, 변형된 RNA는 VEGF 폴리펩타이드를 인코딩하며, 여기서, 변형된 RNA는 SEQ ID NO: 1의 핵산 서열 내에 하나 이상의 변형된 UMP 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, VEGF-A 폴리펩타이드를 인코딩하는 변형된 RNA는 예를 들어, N1-메틸-슈도-UMP를 형성하도록 변형된 적어도 하나의 UMP를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, N1-메틸-슈도-UMP는 0.1%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99.9% 및 100%로부터 선택되는 서열 내에서 UMP 대신에 UMP의 퍼센트 내에서 존재한다. 일부 실시형태에서, 모든 UMP가 N1-메틸-슈도-UMP에 의해 대체되었다.
- [0173] 일부 실시형태에서, 변형된 RNA는 VEGF 폴리펩타이드를 인코딩하며, 여기서, 변형된 RNA는 SEQ ID NO: 1의 핵산 서열 내에 하나 이상의 CMP 변형된 뉴클레오타이드를 (추가로) 포함한다. 일부 실시형태에서, VEGF-A 폴리펩타이드를 인코딩하는 변형된 RNA는 예를 들어, 메틸-CMP를 형성하도록 변형된 적어도 하나의 CMP를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 메틸-CMP는 0.1%, 2%, 3%, 4%, 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99.9% 및 100%로부터 선택되는 서열 내에서 CMP 대신에 CMP의 퍼센트 내에서 존재한다. 일부 실시형태에서, 모든 CMP가 5-메틸-CMP에 의해 대체되었다.
- [0174] 일부 실시형태에서, 변형된 RNA는 VEGF 폴리펩타이드를 인코딩하며, 여기서, 변형된 RNA는 SEQ ID NO: 1의 핵산 서열 내에 하나 이상의 AMP 변형된 뉴클레오타이드를 (추가로) 포함한다. 일부 실시형태에서, VEGF-A 폴리펩타이드를 인코딩하는 변형된 RNA는 예를 들어, N6-메틸-AMP를 형성하도록 변형된 적어도 하나의 AMP를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, N6-메틸-AMP는 0.1%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99.9% 및 100%로부터 선택되는 서열 내에서 AMP 대신에 AMP의 퍼센트 내에서 존재한다. 일부 실시형태에서, 모든 AMP가 N6-메틸-AMP에 의해 대체되었다.
- [0175] 일부 실시형태에서, 변형된 RNA는 VEGF 폴리펩타이드를 인코딩하며, 여기서, 변형된 RNA는 SEQ ID NO: 1의 핵산 서열 내에 하나 이상의 GMP 변형된 뉴클레오타이드를 (추가로) 포함한다. 일부 실시형태에서, 변형된 RNA는 예를 들어, 7-메틸-GMP를 형성하도록 변형된 적어도 하나의 GMP를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 7-메틸-GMP는 0.1%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99.9% 및 100%로부터 선택되는 서열 내에서 GMP 대신에 GMP의 퍼센트 내에서 존재한다. 일부 실시형태에서, 모든 GMP가 7-메틸-GMP에 의해 대체되었다.
- [0176] 일부 실시형태에서, 변형된 RNA는 VEGF 폴리펩타이드를 인코딩하며, 여기서, 변형된 RNA는 SEQ ID NO: 1의 핵산 서열 내에 하나 이상의 변형된 뉴클레오타이드를 (추가로) 포함한다. 일부 실시형태에서, VEGF-A 폴리펩타이드를 인코딩하는 변형된 RNA는 예를 들어, 5-메틸시티딘(5mC), N6-메틸아데노신(m6A), 3,2'-O-디메틸우리딘(m4U), 2-티오우리딘(s2U), 2' 플루오로우리딘, 슈도우리딘, 2'-O-메틸우리딘(Um), 2' 데옥시 우리딘(2' dU), 4-티오우리딘(s4U), 5-메틸우리딘(m5U), 2'-O-메틸아데노신(m6A), N6,2'-O-디메틸아데노신(m6Am), N6,N6,2'-O-트리메틸아데노신(m62Am), 2'-O-메틸시티딘(Cm), 7-메틸구아노신(m7G), 2'-O-메틸구아노신(Gm), N2,7-디메틸구아노신(m-2,7G), N2,N2,7-트리메틸구아노신(m-2,2,7G) 및 N1-메틸-슈도우리딘 또는 이들의 임의의 조합으로부터 선택되는 적어도 하나 이상의 변형된 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 각각의 확률 및 조합은 본 개시내용의 개별 실시형태를 나타낸다.
- [0177] **5.3. 변형된 RNA를 포함하는 조성물**
- [0178] 일부 실시형태는 개시된 변형된 RNA를 포함하는, 특정한 제제를 포함하여 조성물에 관한 것이다. 일부 실시형태에서, 제제는 약학적 유효량의 하나 이상의 변형된 RNA를 포함한다.
- [0179] 일부 실시형태에서, 약학적 조성물은 지질-기반 복합체, 에컨대 리포솜, 리포플렉스 및 지질 나노입자 내에 적



어도 하나 이상의 변형된 RNA를 포함할 수 있다. 일반적으로, 리포솜, 리포플렉스 또는 지질 나노입자는 이들 제제가 폴리뉴클레오타이드, 1차 구축물 또는 변형된 RNA에 의한 세포 형질감염을 증가시킬 수 있기 때문에 폴리뉴클레오타이드, 1차 구축물 또는 변형된 RNA 관련된 단백질 생성의 효능을 개선하는 데 사용될 수 있고/있거나; 인코딩된 단백질의 번역을 증가시키는 데 사용될 수 있다. 이러한 하나의 예는 폴리플렉스(polyplex) 플라즈미드 DNA의 효과적인 전신 전달을 할 수 있기 위해 지질 캡슐화의 용도를 수반한다(문헌[Heyes et al., Mol Ther. (2007) 15:713-720]; 그 전체가 원용에 의해 본 명세서에 포함됨). 리포솜, 리포플렉스 또는 지질 나노입자는 또한, 폴리뉴클레오타이드, 1차 구축물 또는 변형된 RNA의 안정성을 증가시키는 데 사용될 수 있다.

[0180] 이에 일부 실시형태에서, 변형된 RNA의 약학적 조성물은 리포솜을 포함한다. 리포솜은 주로 지질 이중층으로 구성될 수 있고 영양소 및 약학적 제제의 투여를 위해 전달 비히클로서 사용될 수 있는 인공-제조된 비히클이다. 리포솜은 상이한 크기를 가질 수 있으며, 예컨대 비제한적으로 직경이 수백 나노미터일 수 있고 좁은 수성 구획들에 의해 분리된 일련의 동심원적(concentric) 이중층들을 함유할 수 있는 멀티라멜라(multilamellar) 비히클(MLV), 직경이 50 nm 미만일 수 있는 작은 유니셀룰라(unicellular) 비히클(SUV), 및 직경이 50 내지 500 nm일 수 있는 큰 유니라멜라(unilamellar) 비히클(LUV)일 수 있다. 리포솜 디자인은, 건강하지 못한 조직에의 리포솜 부착을 개선하거나 비제한적으로 세포내이입(endocytosis)과 같은 사건을 활성화시키기 위해 읍소닌 또는 리간드를 포함할 수 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다. 리포솜은 약학적 조성물의 전달을 개선하기 위해 낮거나 높은 pH를 함유할 수 있다.

[0181] 일부 실시형태에서, 변형된 RNA의 약학적 조성물은 리포플렉스, 예컨대 비제한적으로, Silence Therapeutics사(영국 런던 소재)의 ATUPLEX™ 시스템, DACC 시스템, DBTC 시스템 및 다른 siRNA-리포플렉스 기술, STEMAGENT®사의 STEMFECT™(미국 메사추세츠주 케임브리지 소재) 및 핵산의 폴리에틸렌이민(PEI) 또는 프로타민-기반 표적화된 및 비-표적화된 전달을 포함한다(문헌[Aleku et al. Cancer Res., (2008) 68:9788-9798; Strumberg et al. Int J Clin Pharmacol Ther, (2012) 50:76-78; Santel et al., Gene Ther, (2006) 13:1222-1234; Santel et al., Gene Ther, (2006) 13:1360-1370; Gutbier et al., Pulm Pharmacol. Ther., (2010) 23:334-344; Kaufmann et al. Microvasc Res, (2010) 80:286-293; Weide et al. J Immuno Ther., (2009) 32:498-507; Weide et al. J Immunother., (2008) 31:180-188; Pascolo Expert Opin. Biol. Ther. 4:1285-1294; Fotin-Mleczek et al., J. Immunother, (2011)34:1-15; Song et al., Nature Biotechnol., (2005) 23:709-717; Peer et al., Proc Natl Acad Sci USA., (2007) 6; 104:4095-4100; deFougerolles Hum Gene Ther., (2008) 19:125-132]; 이들은 모두 그 전체가 원용에 의해 본 명세서에 포함됨).

[0182] 일부 실시형태에서, 변형된 RNA의 약학적 조성물은 고체 지질 나노입자를 포함한다. 고체 지질 나노입자(SLN)는 평균 직경이 10 내지 1000 nm인 구형일 수 있다. SLN은 친유성 분자를 용해시킬 수 있고 계면활성제 및/또는 유화제에 의해 안정화될 수 있는 고체 지질 코어 매트릭스를 가진다. 추가의 실시형태에서, 지질 나노입자는 자가-어셈블리 지질-중합체 나노입자일 수 있다(문헌[Zhang et al., ACS Nano, (2008), 2 (8), pp 1696-1702] 참조; 그 전체가 원용에 의해 본 명세서에 포함됨).

[0183] 추가의 지질-기반 조성물은 미국 특허 출원 공개 2015/0051268에 고찰되어 있으며; 그 전체가 원용에 의해 본 명세서에 포함된다. 이에 일부 실시형태에서, 본 개시내용에 따른 변형된 RNA의 약학적 제제는 미국 특허 출원 공개 2015/0051268에서 고찰된 바와 같이 지질-기반 제제 내에서 제제화된다.

[0184] 본 개시내용의 일부 실시형태에서, 변형된 RNA의 약학적 제제는 임의의 지질-기반 복합체(예컨대 리포솜, 리포플렉스 또는 지질 나노입자)를 포함하지 않고, 본원에서 네이키드 RNA 제제로 지칭된다. WO 2012/103985는, 네이키드 RNA가 2가 양이온, 바람직하게는 칼슘의 존재 하에 제제화되는 경우에만 세포에 침투할 수 있음을 제시하였다. 더욱이, 다른 연구들은, 네이키드 RNA 분자를 생체내에서 동물 조직 내로 향하게 하는 데에 칼슘이 필요함을 제시하고 보여주었다(문헌[Wolff J. A. et al., Science, (1999), 247, 1465-1468]). 유사하게는, Probst 등이, 생체내에서 네이키드 RNA의 주사가 주사 용액 중 칼슘의 존재에 강하게 의존함을 보여주었다(문헌[Probst J. et al., Gene Ther, (2007) 14, 1175-1180]). 이에, 네이키드 RNA를 세포 및 조직에 전달하는 것을 다루는 이들 연구는 제제 내에서의 칼슘의 필요성을 강하게 제시하였다.

[0185] 본 개시내용의 더욱 일부 실시형태에서, 네이키드 변형된 RNA는 포스페이트-완충 식염수(PBS) 완충제와 함께 제제화된다. 예를 들어, 변형된 RNA는 실질적으로 2가 양이온이 없는 pH 7.4 PBS 완충제와 함께 제제화될 수 있다. 일부 실시형태에서, 변형된 RNA는 실질적으로 칼슘 또는 마그네슘이 없는 pH 7.4 PBS 완충제와 함께 제제화될 수 있다. 일부 실시형태에서, 변형된 RNA는 칼슘 또는 마그네슘이 없는 pH 7.4 PBS 완충제와 함께 제제화될 수 있다.

- [0186] 일부 실시형태에서, 네이키드 변형된 RNA는 시트레이트 식염수 완충제와 함께 제제화된다. 예를 들어, 변형된 RNA는 실질적으로 2가 양이온이 없는 pH 7.0 시트레이트 식염수 완충제와 함께 제제화될 수 있다. 일부 실시형태에서, 변형된 RNA는 실질적으로 칼슘 또는 마그네슘이 없는 pH 7.0 시트레이트 식염수 완충제와 함께 제제화될 수 있다. 예를 들어, 변형된 RNA는 하이사이클론(Hyclone) 물 내에 10 mmol/L 시트레이트, 130 mmol/L 소듐 클로라이드를 함유하는 pH 7.0 시트레이트 식염수 완충제와 함께 제제화될 수 있으며, 여기서, 시트레이트 식염수 완충제는 칼슘 또는 마그네슘을 함유하지 않는다.
- [0187] 일부 실시형태에서, 네이키드 변형된 RNA는 트로메타민(THAM) 완충제와 함께 제제화된다. 예를 들어, 변형된 RNA는 실질적으로 2가 양이온이 없는 pH 8.0 THAM 완충제와 함께 제제화될 수 있다. 일부 실시형태에서, 변형된 RNA는 실질적으로 칼슘 또는 마그네슘이 없는 THAM 완충제와 함께 제제화될 수 있다. 일부 실시형태에서, 변형된 RNA는 칼슘 또는 마그네슘을 함유하지 않는 pH 8.0 THAM 완충제와 함께 제제화될 수 있다. 예를 들어, 변형된 RNA는 pH 8.0 THAM 완충제(트로메타민 AKA 2-아미노-2-(하이드록시메틸)-1,3-프로판디올, 300 mmol/L Tris-HCl)와 함께 제제화될 수 있으며, 여기서, THAM 완충제는 칼슘 또는 마그네슘을 함유하지 않는다.
- [0188] 일부 실시형태에서, 네이키드 RNA 약학적 제제는 약학적으로 허용 가능한 부형제를 추가로 포함할 수 있으며, 이러한 부형제로는 본원에 사용된 바와 같이, 요망되는 특정 투여량 형태에 적합한 바와 같은 임의의 및 모든 용매, 분산 매질, 희석제, 또는 다른 액체 비히클, 분산제 또는 현탁 보조제, 표면 활성제, 등장성제, 농조화 또는 유화 작용제, 보존제 등이 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다. 부형제로는 또한 제한 없이, 중합체, 코어-셸 나노입자, 펩타이드, 단백질, 세포, 히알루로니다제, 나노입자 모방체 및 이들의 조합 등이 있을 수 있다. 약학적 조성물의 제제화를 위한 다양한 부형제들 및 조성물의 제조 기술은 당업계에 공지되어 있다(문헌 [Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 22<sup>nd</sup> Edition, Edited by Allen, Loyd V., Jr, Pharmaceutical Press]; 이의 전체 내용은 원용에 의해 본 명세서에 포함됨). 종래의 부형제 배지의 사용은 임의의 종래의 부형제 배지가 예컨대 임의의 바람직하지 못한 생물학적 효과를 생성하거나 그렇지 않다면 약학적 조성물의 임의의 다른 구성성분(들)과 유해한 방식으로 상호작용함으로써 성분 또는 이의 유도체와 비용화성일 수 있을 경우를 제외하고는, 본 개시내용의 범위 내에 있는 것으로 고려될 수 있다.
- [0189] 일부 실시형태에서, 네이키드 RNA 제제는 약학적 유효량의 하나 이상의 변형된 RNA를 포함하며, 여기서 제제는 포스페이트-완충 식염수 완충제를 포함하고, 약학적으로 허용 가능한 부형제를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 약학적으로 허용 가능한 부형제는 용매, 분산 매질, 희석제, 분산제, 현탁 보조제, 표면 활성제, 등장성제, 농조화 또는 유화 작용제, 보존제, 코어-셸 나노입자, 중합체, 펩타이드, 단백질, 세포, 히알루로니다제 및 이들의 혼합물로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 용매는 수성 용매이다. 일부 실시형태에서, 용매는 비-수성 용매이다.
- [0190] 일부 실시형태에서, 네이키드 RNA 제제는 약학적 유효량의 하나 이상의 변형된 RNA를 포함하며, 여기서 제제는 THAM 완충제를 포함하고, 약학적으로 허용 가능한 부형제를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 약학적으로 허용 가능한 부형제는 용매, 분산 매질, 희석제, 분산제, 현탁 보조제, 표면 활성제, 등장성제, 농조화 또는 유화 작용제, 보존제, 코어-셸 나노입자, 중합체, 펩타이드, 단백질, 세포, 히알루로니다제 및 이들의 혼합물로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 용매는 수성 용매이다.
- [0191] 일부 실시형태에서, 네이키드 RNA 제제는 약학적 유효량의 하나 이상의 변형된 RNA를 포함하며, 여기서 제제는 시트레이트 식염수 완충제를 포함하고, 약학적으로 허용 가능한 부형제를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 약학적으로 허용 가능한 부형제는 용매, 분산 매질, 희석제, 분산제, 현탁 보조제, 표면 활성제, 등장성제, 농조화 또는 유화 작용제, 보존제, 코어-셸 나노입자, 중합체, 펩타이드, 단백질, 세포, 히알루로니다제 및 이들의 혼합물로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 용매는 수성 용매이다.
- [0192] 소정의 실시형태에서, 본 개시내용에 따른 변형된 RNA를 포함하는 제제는 지질-기반 복합체(예컨대 리포솜, 리포플렉스 및 지질 나노입자), 포스페이트-완충 식염수 완충제, THAM 완충제 또는 시트레이트 식염수 완충제 내에서 0.1 내지 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 의 농도로 존재한다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용에 따른 변형된 RNA를 포함하는 제제는 지질-기반 복합체(예컨대 리포솜, 리포플렉스 및 지질 나노입자), 포스페이트-완충 식염수 완충제, THAM 완충제 또는 시트레이트 식염수 완충제 내에서 1 내지 10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 의 농도로 제제화된다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용에 따른 변형된 RNA를 포함하는 제제는 지질-기반 복합체(예컨대 리포솜, 리포플렉스 및 지질 나노입자), 포스페이트-완충 식염수 완충제, THAM 완충제 또는 시트레이트 식염수 완충제 내에서 10 내지 50  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 의 농도로 제제화된다.

- [0193] 바람직한 실시형태에서, 본 개시내용에 따른 변형된 RNA를 포함하는 네이키드 RNA 제제는 시트레이트 식염수 완충제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 제제는 시트레이트 식염수 완충제 내에서 제제화되는, 0.1 내지 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 의 변형된 RNA의 농도를 포함한다. 일부 실시형태에서, 제제는 시트레이트 식염수 완충제 내에서 제제화되는, 1 내지 10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 의 변형된 RNA의 농도를 포함한다. 일부 실시형태에서, 제제는 시트레이트 식염수 완충제 내에서 제제화되는, 10 내지 50  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 의 변형된 RNA의 농도를 포함한다.
- [0194] 일부 실시형태에서, 시트레이트 식염수 완충제 내에서 제제화된 VEGF-A 폴리펩타이드를 인코딩하는 변형된 RNA를 포함하는 네이키드 RNA 제제는 대상체에게 지질-기반 제제보다 저독성이다.
- [0195] **5.4. VEGF-A 요법에 반응성인 질병을 앓고 있는 대상체의 치료**
- [0196] VEGF-A가 불충분하게 발현하는 대상체는 제한 없이, 감소되거나 보존된 박출 분율을 갖는 심부전, 신장 질병, 피부 이식 및 조직 이식 관련 질병, MI-후 심장 기능장애, 허혈성 심장병, 외상 또는 수술로 인한 혈관 손상, 당뇨병성 궤양을 포함하는 피부 궤양, 중증 하지 허혈, 폐 고혈압 및 말초 동맥 질병을 포함하여 많은 혈관 질병들을 앓을 수 있다. 본 개시내용의 목적은 VEGF-A 폴리펩타이드를 인코딩하는 하나 이상의 변형된 RNA의 직접적인 투여에 의해 VEGF-A 요법에 반응성인 질병을 앓고 있는 대상체를 치료하는 것이다. 일부 실시형태에서, 네이키드 VEGF-A RNA는 지질 및 칼슘 없이 시트레이트 식염수 완충제 내에서 대상체에게 투여된다.
- [0197] 일반적으로, 세포 내에 도입된 외인성 핵산은 내재성 면역 반응을 유도하여, 인터페론(IFN) 생성 및 세포 사멸을 초래한다. 그러나, 변형된 RNA는 이들 문제점 중 적어도 일부를 극복하였으며, 핵산, 예를 들어 리보핵산(RNA)을 생체내 또는 생체외에서 세포 내에 전달하기 위한, 예컨대 핵산의 세포내 번역 및 인코딩된 단백질의 생성을 유발하기 위한, 치료법, 진단법, 시약 및 생물학적 검정법에 있어서 큰 관심을 갖는다.
- [0198] 본원에 기재된 변형된 RNA, 및 이러한 변형된 RNA로부터 번역된 단백질은 치료제로서 사용될 수 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 변형된 RNA는 대상체에게 투여될 수 있으며, 여기서, 변형된 RNA는 임의의 VEGF 패밀리를 구성원의 치유적 단백질, 또는 이의 단편을 대상체에서 생성하기 위해 번역된다. 인간 및 다른 포유류에서 질병 또는 질환의 치료 방법이 제공된다. VEGF-A에 대해 본원에 기재된 모든 제제들은 기꺼이 임의의 다른 VEGF 패밀리를 구성원과 함께 사용될 수 있다.
- [0199] 일부 실시형태에서, VEGF-A 폴리펩타이드를 인코딩하는 하나 이상의 변형된 RNA를 포함하는 조성물 및 특정 제제는 질병, 예컨대 감소되거나 보존된 박출 분율을 갖는 심부전, 신장 질병, 피부 이식 및 조직 이식 관련 질병, MI-후 심장 기능장애, 허혈성 심장병, 외상 또는 수술로 인한 혈관 손상, 당뇨병성 궤양을 포함하는 피부 궤양, 치유 상처, 예컨대 열상(laceration), 중증 하지 허혈, 폐 고혈압 및 말초 동맥 질병의 치료에 사용될 수 있다.
- [0200] 일부 실시형태에서, VEGF-A 폴리펩타이드를 인코딩하는 하나 이상의 변형된 RNA를 포함하는 제제는 감소되거나 보존된 박출 분율을 갖는 심부전의 치료에 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, VEGF-A 폴리펩타이드를 인코딩하는 하나 이상의 변형된 RNA를 포함하는 제제는 MI-후 심장 기능장애의 치료에 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, VEGF-A 폴리펩타이드를 인코딩하는 하나 이상의 변형된 RNA를 포함하는 제제는 허혈성 심장병의 치료에 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, VEGF-A 폴리펩타이드를 인코딩하는 하나 이상의 변형된 RNA를 포함하는 제제는 외상 또는 수술로 인한 혈관 손상의 치료에 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, VEGF-A 폴리펩타이드를 인코딩하는 하나 이상의 변형된 RNA를 포함하는 제제는 당뇨병성 궤양을 포함하는 피부 궤양의 치료에 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, VEGF-A 폴리펩타이드를 인코딩하는 하나 이상의 변형된 RNA를 포함하는 제제는 상처 치유, 예를 들어 열상 치유에 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, VEGF-A 폴리펩타이드를 인코딩하는 하나 이상의 변형된 RNA를 포함하는 제제는 중증 하지 허혈에 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, VEGF-A 폴리펩타이드를 인코딩하는 하나 이상의 변형된 RNA를 포함하는 제제는 폐 고혈압의 치료에 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, VEGF-A 폴리펩타이드를 인코딩하는 하나 이상의 변형된 RNA를 포함하는 제제는 말초 동맥 질병의 치료에 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, VEGF-A 폴리펩타이드를 인코딩하는 하나 이상의 변형된 RNA를 포함하는 제제는 신장 질병의 치료에 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, VEGF-A 폴리펩타이드를 인코딩하는 하나 이상의 변형된 RNA를 포함하는 제제는 피부 이식 및 조직 이식 관련 질병의 치료에 사용될 수 있다.
- [0201] 개시내용의 다른 양태는 변형된 RNA를 포함하는 제제를 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것에 관한 것이다. 제제의 투여는 근육내, 경동맥(transarterial), 복강내, 정맥내, 동맥내, 피하, 심실내, 피내, 심장내, 심외막, 간문맥 카테터를 통해, 관상 정맥동 카테터를 통해, 및/또는 치료되는 영역 내로의 직접 투여될 수 있다.
- [0202] 그러나, 본 개시내용은 또한, 약물 전달 과학에서 가능하게는 진전을 고려한 임의의 적절한 경로에 의한 네이키



드 변형된 RNA 분자 또는 변형된 RNA 복합체, 및/또는 이의 약학적, 예방적 또는 진단적 제제의 전달을 포함한다.

[0203] 비제한적인 예로서, 일부 실시형태에서, 본 개시내용에 따른 제제는 대상체에게 근육내, 피내, 피하, 심장내 또는 심외막 경로, 간문맥 카테터를 통해, 관상 정맥동 카테터를 통해 및/또는 치료되는 영역 내로의 직접 투여에 의해 투여된다. 일부 실시형태에서, 제제는 대상체에게 근육내 투여된다. 일부 실시형태에서, 제제는 대상체에게 피내 투여된다. 일부 실시형태에서, 제제는 대상체에게 피하 투여된다.

[0204] 일부 실시형태에서, 제제는 바람직하게는 다중(예를 들어 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 또는 그 이상) 투여에서 고정된-투여량으로 대상체에게 심장내 투여된다. 일부 실시형태에서, 제제는 바람직하게는 다중(예를 들어 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 또는 그 이상) 투여에서 고정된-투여량으로 대상체에게 간문맥 카테터를 통해 투여된다. 일부 실시형태에서, 제제는 바람직하게는 다중(예를 들어 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 또는 그 이상) 투여에서 고정된-투여량으로 대상체에게 관상 정맥동 카테터를 통해 투여된다. 일부 실시형태에서, 제제는 바람직하게는 다중(예를 들어 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 또는 그 이상) 투여에서 고정된-투여량으로 대상체에게 치료되는 영역 내로의 직접 투여에 의해 투여된다. 예를 들어, 제제는 바람직하게는 다중(예를 들어 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 또는 그 이상) 투여에서 고정된-투여량으로 대상체에게 개심 수술(open heart surgery) 동안 피해를 입는 영역으로의 직접 주사에 의해 투여된다. 일부 실시형태에서, 제제는 바람직하게는 다중(예를 들어 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 또는 그 이상) 투여에서 고정된-투여량으로 대상체에게 심외막 투여된다. 예를 들어, 관상동맥 우회로 이식술(CABG)을 받는 환자에서, 제제는 바람직하게는 다중(예를 들어 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 또는 그 이상) 투여에서 고정된-투여량으로 환자에게 심장의 외부로부터 투여된다. 본 단락의 각각의 실시형태에서, "다중 투여"는 단기간(1 내지 5분), 중간 기간(6 내지 30분) 또는 장기간(30분 초과, 수시간 또는 심지어 수일)의 시간 간격만큼 서로 분리될 수 있다.

[0205] 제제는 질병, 장애 및/또는 질환을 치료하기에 효과적인 임의의 양의 투여를 사용하여 대상체에게 투여될 수 있다. 정확한 양은 대상체의 종, 연령 및 일반적인 상태, 질병의 중증도, 특정 제제, 이의 투여 방식, 이의 활성 방식 등에 따라 대상체마다 다를 것이다. 그러나, 제제의 총 일일 용법은 타당한 의학적 판단의 범위 내에서 당당이에 의해 결정될 수 있는 것으로 이해될 것이다. 임의의 특정 환자에 대한 구체적인 약학적으로 효과적인 용량 수준은 치료되는 질병 및 질병의 중증도; 이용되는 특정 화합물의 활성; 이용되는 특정 제제; 환자의 연령, 체중, 일반적인 건강 상태, 성별 및 식이요법; 이용되는 특정 화합물의 투여 시간, 투여 경로 및 배출 속도; 치료 기간; 이용되는 특정 화합물과 조합하거나 동시에 사용되는 약물(예를 들어 변형된 RNA); 및 의학 분야에 잘 공지된 유사한 인자들을 포함하여 여러 가지 인자들에 따라 다를 것이다.

[0206] 소정의 실시형태에서, 본 개시내용에 따른 제제는 대상체에게 투여되며, 여기서, 제제는 지질-기반 복합체(예컨대 리포솜, 리포플렉스 및 지질 나노입자)를 포함한다. 다른 실시형태에서, 네이키드 변형된 RNA는 포스페이트-완충 식염수 완충제, THAM 완충제 또는 시트레이트 식염수 완충제 내에서 투여된다. 다른 실시형태에서, 네이키드 변형된 RNA는 칼슘을 포함하여 2가 양이온의 부재 하에 투여된다. 바람직한 실시형태에서, 변형된 RNA를 포함하는 심장내 또는 피내 투여용 제제는 칼슘 또는 마그네슘을 함유하지 않는 시트레이트 식염수 완충제 내에서 제제화된다. 일부 실시형태에서, 제제는 시트레이트 식염수 완충제 내에서 제제화된 변형된 RNA의 농도를 0.1 내지 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 로 포함한다. 일부 실시형태에서, 제제는 시트레이트 식염수 완충제 내에서 제제화된 변형된 RNA의 농도를 1 내지 10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 로 포함한다. 일부 실시형태에서, 일부 실시형태에서, 제제는 시트레이트 식염수 완충제 내에서 제제화된 변형된 RNA의 농도를 10 내지 50  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 로 포함한다.

[0207] 소정의 실시형태에서, 본 개시내용에 따른 제제는 요망되는 치유적 또는 예방적 효과를 획득하기 위해, 1일 1회 이상, 1일 당 대상체 체중 당 변형된 RNA를 약 0.0001 mg/kg 내지 약 100 mg/kg, 약 0.001 mg/kg 내지 약 0.05 mg/kg, 약 0.005 mg/kg 내지 약 0.05 mg/kg, 약 0.001 mg/kg 내지 약 0.005 mg/kg, 약 0.05 mg/kg 내지 약 0.5 mg/kg, 약 0.01 mg/kg 내지 약 50 mg/kg, 약 0.1 mg/kg 내지 약 40 mg/kg, 약 0.5 mg/kg 내지 약 30 mg/kg, 약 0.01 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 0.1 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 또는 약 1 mg/kg 내지 약 25 mg/kg으로 전달하기에 충분한 투여량 수준에서 투여될 수 있다. 요망되는 투여량은 1일 3회, 1일 2회, 1일 1회, 2일마다, 3일마다, 1주마다, 2주마다, 3주마다, 4주마다, 또는 볼루스(bolus) 용량 또는 24시간 이내에 수초, 수분 또는 수시간 기간에 걸친 다중 투여에서 단일 용량으로서 1회 전달될 수 있다. 소정의 실시형태에서, 요망되는 투여량은 다중 투여(예를 들어 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 또는 그 이상의

투여)를 사용하여 전달될 수 있다.

[0208]

일부 실시형태에서, 본 개시내용에 따른 제제는 고정된-투여량 수준에서 투여될 수 있다. 예를 들어, 본 개시내용에 따른 제제는 투여 당 또는 총 용량 당 약 0.1 mg 내지 약 1 mg의 고정된-투여량 수준에서 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용에 따른 제제는 투여 당 또는 총 용량 당 약 1 mg 내지 약 10 mg의 고정된-투여량 수준에서 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용에 따른 제제는 투여 당 또는 총 용량 당 약 10 mg 내지 약 25 mg의 고정된-투여량 수준에서 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용에 따른 제제는 투여 당 또는 총 용량 당 약 25 mg 내지 약 50 mg의 고정된-투여량 수준에서 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용에 따른 제제는 투여 당 또는 총 용량 당 약 50 mg 내지 약 100 mg의 고정된-투여량 수준에서 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용에 따른 제제는 투여 당 또는 총 용량 당 약 0.1 mg 내지 약 25 mg의 고정된-투여량 수준에서 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용에 따른 제제는 바람직하게는 다중(예를 들어 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 또는 그 이상) 투여에서 고정된-투여량으로 투여될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 본 개시내용에 따른 제제는 바람직하게는 다중(예를 들어 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 또는 그 이상) 투여에서 투여 당 또는 총 용량 당 0.1 mg의 고정된-투여량으로 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용에 따른 제제는 바람직하게는 다중(예를 들어 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 또는 그 이상) 투여에서 투여 당 또는 총 용량 당 1 mg의 고정된-투여량으로 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용에 따른 제제는 바람직하게는 다중(예를 들어 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 또는 그 이상) 투여에서 투여 당 또는 총 용량 당 10 mg의 고정된-투여량으로 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용에 따른 제제는 바람직하게는 다중(예를 들어 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 또는 그 이상) 투여에서 투여 당 또는 총 용량 당 25 mg의 고정된-투여량으로 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용에 따른 제제는 바람직하게는 다중(예를 들어 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 또는 그 이상) 투여에서 투여 당 또는 총 용량 당 50 mg의 고정된-투여량으로 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용에 따른 제제는 바람직하게는 다중(예를 들어 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 또는 그 이상) 투여에서 투여 당 또는 총 용량 당 100 mg의 고정된-투여량으로 투여될 수 있다.

[0209]

일부 실시형태에서, 본 개시내용에 따른 제제는 대상체에게 투여되며, 여기서, 시트레이트 식염수 완충제 내에서 제제화된 VEGF-A 폴리펩타이드를 인코딩하는 네이키드 변형된 RNA를 포함하는 제제는 대상체에게 지질-기반 제제보다 저독성이다. 본 개시내용에 따른 제제에서 RNA 전달로 인한 독성의 평가는 당업계에 잘 공지된 방법에 의해 평가될 수 있다. 예를 들어, 양이온성 지질은 전형적으로, RNA 캡슐화 및 안정성을 개선하기 위해 RNA 치료제의 지질 제제에 포함된다. 그러나, 일부 양이온성 지질은 용량-의존적 방식에서, 막 구조의 온전성을 붕괴시키며, 세포 용해 및 괴사를 유발하고/하거나 다수의 유전자들의 발현을 바람직하지 못한 방식으로 변경시킬 수 있다(문헌[Xue H.Y., Curr Pharm Des., (2015) 21(22):3140-7]; 그 전체가 원용에 의해 본 명세서에 포함됨). 이에, 독성의 예는 본 개시내용에 따른 제제에서 RNA 전달로 인한 세포 용해 및 괴사 및/또는 다수의 유전자들의 발현 변경의 정도를 측정함으로써 평가될 수 있다. 전임상 및 임상 수준에서, 일부 리포플렉스의 전신 용량-의존적 독성은 잘 문서화되어 있다. 간에서 쿠퍼 세포에 의한 일부 리포플렉스의 포착은 염증 반응을 촉발시킬 수 있으며, 이는 간에 피해를 주고 주요 간 기능 지표에서 상승된 수준을 초래할 수 있다. 백혈구 감소증 및 혈소판 감소증이 또한, 발생할 수 있다(문헌[Zhang J., Adv Drug Deliv Rev., (2005) 57(5):689-698]; 그 전체가 원용에 의해 본 명세서에 포함됨). 이에, 독성의 예는 본 개시내용에 따른 제제에서 RNA 전달로 인한 염증 반응을 측정함으로써 평가될 수 있다. 또한, 독성의 예는 주입-관련 반응, 예컨대 호흡곤란, 저산소증, 오한(rigor), 요통, 저혈압 및 간 손상을 측정함으로써 평가될 수 있다.

[0210]

혈관 질병을 앓고 있는 대상체는, 하나 이상의 증상 또는 임상 마커가 감소된다면, 치료에 "반응성"이다. 대안적으로, 질병의 진행이 감소되거나 중단된다면, 치료가 작용중이다. 예를 들어, 심부전(HF)은, 심장이 약해지고, 혈액 및 산소에 대한 신체의 요구를 충족시키기에 충분한 혈액으로 채워지지 않거나 펌프질할 수 없는 경우 발생한다. 마찬가지로, 허혈성 심장병(IHD) 환자는 좁아진 심장 동맥에 의해 유발되는 심장 문제를 가진다. 동맥이 좁아지면, 더 적은 혈액 및 산소가 심장 근육에 도달한다. 미세혈관 기능장애, 기능적 혈관의 손실 및/또는 심장 조직의 손실의 결과로서, 환자에서 통상적으로 MI-후 심장 기능장애가 발병한다. 더욱이, 혈관 구조는 대체로 보편적으로, 침투성 외상 또는 수술에 의해 상처를 입는다. 당뇨병은 상처 치유의 많은 구성성분들을 손상시켜, 당뇨병성 환자의 상처 치유는 일반적으로, 혈관 기능장애로 인해 혈류를 변경시킨다. 이에, 당뇨병성 궤양을 포함하여 피부 궤양 환자는 통상적으로, 상처 치유를 감소시키거나 또는 지연시킨다. 중증 하지 허혈(CLI)은 동맥의 중증 폐색으로서, 사지(손, 발 및 다리)로의 혈류를 크게 감소시키고, 중증 통증 및 심지어

피부 궤양, 쓰라림(sore) 또는 괴저(gangrene)의 지점까지 진행된다. 폐 고혈압(PH 또는 PHTN)은 숨가쁨(shortness of breath), 현기증, 기절, 하지 부종(leg swelling) 및 다른 증상을 초래하는, 함께 폐 맥관구조로도 공지된 폐동맥, 폐정맥 또는 폐모세혈관에서의 혈압 증가이다. 말초 동맥 질병(PAD)은 다리, 위, 팔 및 머리로 가는 말초 동맥의 좁아짐이며 - 가장 보편적으로는 다리의 동맥에서의 좁아짐이다. 이들 질환은 일상적으로, 초음파심장검진법, 혈액 검사, 자기 공명 영상(MRI) 심전도법 및 다른 적합한 검사에 의한 확인과 더불어 다양한 신체 검사들을 기반으로 임상적으로 진단된다. 예를 들어, 유의한 혈관 손상의 진단은 클로즈(close) 신체 검사 및 이미징 검사에 달려 있다. 이에, 이들 질환 중 임의의 질환에 대한 치료는, 환자가 신체 검사에 의해 덜 중증의 증상 및/또는 초음파심장검진법, 혈액 검사, MRI, 심전도법 또는 임의의 다른 적합한 및/또는 일상적인 검사로부터의 검사 결과에서 개선을 보여주는 경우, 작용중이다.

- [0211] 일부 실시형태에서, 혈관 질병을 앓고 있는 대상체는 심근경색을 앓았다. 일부 실시형태에서, 대상체는 본원에 개시된 제제의 치료 전 약 1개월 이내에 심근경색을 앓았다.
- [0212] 일부 실시형태에서, 심근경색은 시간 경과에 따라 심외막-유래 세포(EPDC)의 활성화를 촉발시킨다. 일부 실시형태에서, 심근경색을 앓고 있는 대상체는 심근경색 후 수일째에, 바람직하게는 EPDC 활성화의 피크 시간에 본원에 개시된 제제로 치료된다. 일부 실시형태에서, 심근경색을 앓고 있는 대상체는 심근경색 후 약 7일째에 본원에 개시된 제제로 치료된다. 일부 실시형태에서, 심근경색을 앓고 있는 대상체는 심근경색 후 약 10일째에, 심근경색 후 2주째에, 심근경색 후 3주째에, 또는 심근경색 후 6주째에 본원에 개시된 제제로 치료된다.
- [0213] 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 조성물 또는 제제를 이용한 요법은 감소된 박출 분율을 갖는 심근 경색의 치료를 포함한다. 다른 실시형태에서, 요법은 보존된 박출 분율을 갖는 심부전의 치료를 포함한다. 일부 실시형태에서, 조성물 또는 제제는 건강한 조직과 경색 조직 사이의 경계 구역에 주사된다.
- [0214] 일부 실시형태에서, 혈관 질병을 앓고 있는 대상체는 또한, 관상동맥 질병, 고혈압, 당뇨병, 심방세동, 관막성 심장병, 심근병증 또는 감염을 앓고 있다.
- [0215] 일부 실시형태에서, 혈관 질병을 앓고 있는 대상체는 좌심실 기능장애를 앓고 있다. 일부 실시형태에서, 대상체는 약 40% 미만의 좌심실 박출 분율(LVEF)을 가진다. 일부 실시형태에서, 대상체는 약 45% 미만의 LVEF를 가진다.
- [0216] 일부 실시형태에서, 대상체는 감소되거나 보존된 박출 분율을 갖는 심부전을 앓고 있다. 일부 실시형태에서, 감소되거나 보존된 박출 분율을 갖는 심부전을 앓는 대상체는 뉴욕 심장 학회 기능적 분류(NYHAFC) 가이드라인의 II 내지 IV 단계(stage)로서 분류된다.
- [0217] 일부 실시형태에서, 대상체는 감소되거나 보존된 박출 분율을 갖는 심부전을 가리키는, 상승된 수준의 하나 이상의 바이오마커(예를 들어 NT-proBNP, BNP, hsTnT 또는 hsTnI)를 가진다. 일부 실시형태에서, 대상체는 상승된 BNP(b-유형 나트륨이뇨 펩타이드) 수준을 가진다. 일부 실시형태에서, 대상체는 약 100 pg/mL의 BNP 수준을 가진다. 일부 실시형태에서, 대상체는 약 100 내지 300 pg/mL의 BNP 수준을 가진다. 일부 실시형태에서, 대상체는 약 300 내지 600 pg/mL의 BNP 수준을 가진다. 일부 실시형태에서, 대상체는 약 600 pg/mL의 BNP 수준을 가진다. 일부 실시형태에서, 대상체는 약 600 내지 900 pg/mL의 BNP 수준을 가진다. 일부 실시형태에서, 대상체는 상승된 NT-proBNP(n-말단 프로 b-유형 나트륨이뇨 펩타이드) 수준을 가진다. 일부 실시형태에서, 대상체는 약 450 pg/mL의 NT-proBNP 수준을 가진다. 일부 실시형태에서, 대상체는 50세 미만이고, 약 450 pg/mL의 NT-proBNP 수준을 가진다. 일부 실시형태에서, 대상체는 약 900 pg/mL의 NT-proBNP 수준을 가진다. 일부 실시형태에서, 대상체는 약 50세 내지 75세이고, 약 900 pg/mL의 NT-proBNP 수준을 가진다. 일부 실시형태에서, 대상체는 약 1800 pg/mL의 NT-proBNP 수준을 가진다. 일부 실시형태에서, 대상체는 약 75세 미만이고, 약 1800 pg/mL의 NT-proBNP 수준을 가진다. 일부 실시형태에서, 대상체는 상승된 수준의 hsTnT(고 민감성 트로포닌 T)를 가진다. 일부 실시형태에서, 대상체는 상승된 수준의 hsTnI(고 민감성 트로포닌 I)를 가진다.
- [0218] 일부 실시형태에서, 대상체는 약 45% 미만의 LVEF를 가지며, 본원의 제제로 치료되기 전 약 1개월 이내에 심근 경색을 앓았다.
- [0219] 일부 실시형태에서, 대상체는 약 40% 미만의 LVEF를 갖는 감소되거나 보존된 박출 분율 및 적어도 약 600 pg/mL의 NT-proBNP 수준을 갖는 만성 허혈성 심부전을 앓고 있고, NYHAFC 가이드라인 상에서 II 내지 IV 단계로 분류된다.
- [0220] 추가로, 혈관 기능에 대한 분자적 측정은 일반적인 병리생리학의 개선을 평가하는 데 사용될 수 있다. 이들 측정의 예는 증강된 일산화질소(NO) 이용성, 증가된 혈관신생/동맥신생, 및 심장 조직으로의 줄기세포의 동원

(recruitment)을 포함한다. 따라서, 혈관 질병을 앓고 있는 환자는, 이러한 환자가 이들 측정에서 개선된 분자적 기능을 보여준다면, 치료에 "반응성"이다.

[0221] **5.5. 포유류 세포, 조직 또는 대상체에서 생리학적 과정의 조정**

[0222] 본 개시내용의 또 다른 양태는 포유류 세포, 조직 또는 대상체에서 생리학적 과정을 조정하기 위한 VEGF-A 폴리펩타이드를 인코딩하는 변형된 RNA를 포함하는 조성물 또는 특정 제제의 투여에 관한 것이다. 일부 실시형태에서, 포유류 세포, 조직 또는 대상체에서 생리학적 과정의 조정 방법은 포유류 세포, 조직 또는 대상체를 본 개시내용에 따른 변형된 RNA를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다. 비제한적인 예로서, 생리학적 과정의 조정은 혈관신생 유도, 혈관 세포 증식 자극, 심외막 유래 전구체 세포의 증식 증가 및/또는 운명 변경, 내피화 상향조절, 심장 재생 유도, 상처 치유용 조직 이식물의 혈관재생 증가, 혈관 기능 개선, 조직 관류 및 새로운 혈관 형성 증가, 흉터 조직 감소, 전부하 동원성 박출 작업량 증가, 최대 압력 발달 증가, 수축력 기능 증가, 좌심실 박출 분율 증가(예를 들어 약 5% 내지 10%만큼), 심장 기능장애와 연관된 바이오마커(예를 들어 NT-proBNP, BNP, hsTnT 및 hsTnI) 수준의 저하, 경색 크기 감소, 심장 조직의 섬유증 감소 및/또는 심장 기능 개선을 포함할 수 있다.

[0223] 세포, 조직 또는 대상체를 본원에 개시된 바와 같은 변형된 RNA와 접촉시키는 것과 관련해서 본원에 사용된 바와 같이 용어 "접촉시키는" 또는 "접촉시키다"는 변형된 RNA를 세포, 조직 또는 대상체와 만나게 하거나 매우 가깝게 근접시키는 것을 포함한다. 이에, 일부 실시형태에서, 구절 "접촉시키는"은 노출 방법을 지칭하며, 이는 직접적이거나 간접적일 수 있다. 일 방법에서, 이러한 접촉은 조성물을 당업계에 잘 공지된 임의의 수단을 통해 세포, 조직 또는 대상체 내로 직접적으로 주사하는 것을 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 접촉은 또한, 예컨대 조직을 둘러싼 국소 배지를 통한, 또는 당업계에 공지된 임의의 경로를 통한 간접 접촉을 포함한다. 각각의 확률은 본 개시내용의 개별 실시형태를 나타낸다.

[0224] 일부 실시형태에서, 포유류 세포, 조직 또는 대상체에서 혈관신생의 유도 방법은 포유류 세포, 조직 또는 대상체를 본 개시내용에 따른 변형된 RNA를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 조성물은 포스페이트-완충 식염수 완충제, THAM 완충제 또는 시트레이트 식염수 완충제 내에서 제제화된다. 바람직한 실시형태에서, 변형된 RNA를 포함하는 조성물은 시트레이트 식염수 완충제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 시트레이트 식염수 완충제에는 실질적으로 칼슘 및 마그네슘을 포함하여 2가 양이온이 없다. 일부 실시형태에서, 시트레이트 식염수 완충제는 칼슘 또는 마그네슘을 함유하지 않는다. 혈관신생 유도에 미치는 변형된 RNA의 효과는 당업계에 잘 공지된 방법에 의해 평가될 수 있다(예를 들어, 문헌[Lopez J.J. et al., Cardiovasc Res, (1998) 40, 272-281; Galiano R.D. et al., Am J Pathol., (2004) 164, 1935-1947; Lin Y.D. et al., Sci Transl Med., (2012) 4(146):146ra109; Zangi L. et al., Nat Biotechnol., (2013) 10, 898-907] 참조; 이들은 모두 원용에 의해 본 명세서에 포함됨).

[0225] 일부 실시형태에서, 포유류 세포, 조직 또는 대상체에서 혈관 세포 증식의 자극 방법은 포유류 세포, 조직 또는 대상체를 본 개시내용에 따른 변형된 RNA를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 조성물은 포스페이트-완충 식염수 완충제, THAM 완충제 또는 시트레이트 식염수 완충제 내에서 제제화된다. 바람직한 실시형태에서, 변형된 RNA를 포함하는 조성물은 시트레이트 식염수 완충제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 시트레이트 식염수 완충제에는 실질적으로 칼슘 및 마그네슘을 포함하여 2가 양이온이 없다. 일부 실시형태에서, 시트레이트 식염수 완충제는 칼슘 또는 마그네슘을 함유하지 않는다. 혈관 세포 증식 자극에 미치는 변형된 RNA의 효과는 당업계에 잘 공지된 방법에 의해 평가될 수 있다(예를 들어, 문헌[Galiano R.D. et al., Am J Pathol, (2004) 164, 1935-1947] 참조; 그 전체가 원용에 의해 본 명세서에 포함됨).

[0226] 일부 실시형태에서, 포유류 세포, 조직 또는 대상체에서 심외막 유래 전구체 세포의 증식을 증가시키고/시키거나 운명을 변경하는 방법은 포유류 세포, 조직 또는 대상체를 본 개시내용에 따른 변형된 RNA를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 조성물은 포스페이트-완충 식염수 완충제, THAM 완충제 또는 시트레이트 식염수 완충제 내에서 제제화된다. 바람직한 실시형태에서, 변형된 RNA를 포함하는 조성물은 시트레이트 식염수 완충제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 시트레이트 식염수 완충제에는 실질적으로 칼슘 및 마그네슘을 포함하여 2가 양이온이 없다. 일부 실시형태에서, 시트레이트 식염수 완충제는 칼슘 또는 마그네슘을 함유하지 않는다. 심외막 유래 전구체 세포의 증식 증가 및/또는 운명 변경에 미치는 변형된 RNA의 효과는 당업계에 잘 공지된 방법에 의해 평가될 수 있다(예를 들어, 문헌[Zangi L. et al., Nat Biotechnol., (2013) 10, 898-907] 참조; 그 전체가 원용에 의해 본 명세서에 포함됨).

[0227] 일부 실시형태에서, 포유류 세포, 조직 또는 대상체에서 내피화 상향조절 방법은 포유류 세포, 조직 또는 대상



체를 본 개시내용에 따른 변형된 RNA를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 조성물은 포스페이트-완충 식염수 완충제, THAM 완충제 또는 시트레이트 식염수 완충제 내에서 제제화된다. 바람직한 실시형태에서, 변형된 RNA를 포함하는 조성물은 시트레이트 식염수 완충제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 시트레이트 식염수 완충제에는 실질적으로 칼슘 및 마그네슘을 포함하여 2가 양이온이 없다. 일부 실시형태에서, 시트레이트 식염수 완충제는 칼슘 또는 마그네슘을 함유하지 않는다. 내피화 상황조절에 미치는 변형된 RNA의 효과는 당업계에 잘 공지된 방법에 의해 평가될 수 있다(예를 들어, 문헌[Galiano R.D. et al., Am J Pathol, (2004) 164, 1935-1947] 참조; 그 전체가 원용에 의해 본 명세서에 포함됨).

[0228] 일부 실시형태에서, 포유류 세포, 조직 또는 대상체에서 심장 재생 유도 방법은 포유류 세포, 조직 또는 대상체를 본 개시내용에 따른 변형된 RNA를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 조성물은 포스페이트-완충 식염수 완충제, THAM 완충제 또는 시트레이트 식염수 완충제 내에서 제제화된다. 바람직한 실시형태에서, 변형된 RNA를 포함하는 조성물은 시트레이트 식염수 완충제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 시트레이트 식염수 완충제에는 실질적으로 칼슘 및 마그네슘을 포함하여 2가 양이온이 없다. 일부 실시형태에서, 시트레이트 식염수 완충제는 칼슘 또는 마그네슘을 함유하지 않는다. 심장 재생 유도에 미치는 변형된 RNA의 효과는 당업계에 잘 공지된 방법에 의해 평가될 수 있다(예를 들어, 문헌[Zangi L. et al., Nat Biotechnol., (2013) 10, 898-907; Lin Y.D. et al., Sci Transl Med., (2012) 4(146):146ra109] 참조; 이들은 둘 모두 원용에 의해 본 명세서에 포함됨).

[0229] 일부 실시형태에서, 포유류 세포, 조직 또는 대상체에서 상처 치유용 조직 이식물의 혈관재생 증가 방법은 포유류 세포, 조직 또는 대상체를 본 개시내용에 따른 변형된 RNA를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 조성물은 포스페이트-완충 식염수 완충제, THAM 완충제 또는 시트레이트 식염수 완충제 내에서 제제화된다. 바람직한 실시형태에서, 변형된 RNA를 포함하는 조성물은 시트레이트 식염수 완충제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 시트레이트 식염수 완충제에는 실질적으로 칼슘 및 마그네슘을 포함하여 2가 양이온이 없다. 일부 실시형태에서, 시트레이트 식염수 완충제는 칼슘 또는 마그네슘을 함유하지 않는다. 상처 치유용 조직 이식물의 혈관재생 증가에 미치는 변형된 RNA의 효과는 당업계에 잘 공지된 방법에 의해 평가될 수 있다(예를 들어, 문헌[Tohyama H. et al., Chang Gung Med J, (2009) 32, 133-139; Chen J. et al., Exp Ther Med, (2012) 4, 430-434] 참조; 이들은 둘 모두 원용에 의해 본 명세서에 포함됨).

[0230] 일부 실시형태에서, 포유류 세포, 조직 또는 대상체에서 혈관 기능 개선 방법은 포유류 세포, 조직 또는 대상체를 본 개시내용에 따른 변형된 RNA를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 조성물은 포스페이트-완충 식염수 완충제, THAM 완충제 또는 시트레이트 식염수 완충제 내에서 제제화된다. 바람직한 실시형태에서, 변형된 RNA를 포함하는 조성물은 시트레이트 식염수 완충제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 시트레이트 식염수 완충제에는 실질적으로 칼슘 및 마그네슘을 포함하여 2가 양이온이 없다. 일부 실시형태에서, 시트레이트 식염수 완충제는 칼슘 또는 마그네슘을 함유하지 않는다. 혈관 기능 개선에 미치는 변형된 RNA의 효과는 당업계에 잘 공지된 방법에 의해 평가될 수 있다(예를 들어, 문헌[Lopez J.J. et al., Cardiovasc Res, (1998) 40, 272-281; Tio R.A. et al., Hum Gene Ther., (1999) 10, 2953-2960; Sato K. et al., J Am Coll Cardiol., (2001) 37, 616-23] 참조; 이들은 모두 원용에 의해 본 명세서에 포함됨).

[0231] 일부 실시형태에서, 포유류 세포, 조직 또는 대상체에서 조직 관류 및 새로운 혈관 형성의 증가 방법은 포유류 세포, 조직 또는 대상체를 본 개시내용에 따른 변형된 RNA를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 조성물은 포스페이트-완충 식염수 완충제, THAM 완충제 또는 시트레이트 식염수 완충제 내에서 제제화된다. 바람직한 실시형태에서, 변형된 RNA를 포함하는 조성물은 시트레이트 식염수 완충제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 시트레이트 식염수 완충제에는 실질적으로 칼슘 및 마그네슘을 포함하여 2가 양이온이 없다. 일부 실시형태에서, 시트레이트 식염수 완충제는 칼슘 또는 마그네슘을 함유하지 않는다. 조직 관류 및 새로운 혈관 형성 증가에 미치는 변형된 RNA의 효과는 당업계에 잘 공지된 방법에 의해 평가될 수 있다(예를 들어, 문헌[Chiappini C., et al., Nat Mater., (2015) 14, 532-539; Lin Y.D. et al., Sci Transl Med., (2012) 4(146):146ra109; Zangi L. et al., Nat Biotechnol., (2013) 10, 898-907] 참조; 이들은 모두 원용에 의해 본 명세서에 포함됨).

[0232] 일부 실시형태에서, 포유류 세포, 조직 또는 대상체에서 흉터 조직 감소 방법은 포유류 세포, 조직 또는 대상체를 본 개시내용에 따른 변형된 RNA를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 조성물은 포스페이트-완충 식염수 완충제, THAM 완충제 또는 시트레이트 식염수 완충제 내에서 제제화된다. 바람직한 실시형태에서, 변형된 RNA를 포함하는 조성물은 시트레이트 식염수 완충제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 시트레이트 식염수 완충제에는 실질적으로 칼슘 및 마그네슘을 포함하여 2가 양이온이 없다. 일부



실시형태에서, 시트레이트 식염수 완충제는 칼슘 또는 마그네슘을 함유하지 않는다. 흉터 조직 감소에 미치는 변형된 RNA의 효과는 당업계에 잘 공지된 방법에 의해 평가될 수 있다(예를 들어, 문헌[Rosano J.M. et al., Cardiovasc Eng Technol., (2012) 3, 237-247; Galiano R.D. et al., Am J Pathol, (2004) 164, 1935-1947; Lin Y.D. et al., Sci Transl Med., (2012) 4(146):146ra109; Zangi L. et al., Nat Biotechnol. (2013) 10, 898-907] 참조; 이들은 모두 원용에 의해 본 명세서에 포함됨).

[0233] 일부 실시형태에서, 포유류 세포, 조직 또는 대상체에서 심장 기능 개선 방법은 포유류 세포, 조직 또는 대상체를 본 개시내용에 따른 변형된 RNA를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 조성물은 포스페이트-완충 식염수 완충제, THAM 완충제 또는 시트레이트 식염수 완충제 내에서 제제화된다. 바람직한 실시형태에서, 변형된 RNA를 포함하는 조성물은 시트레이트 식염수 완충제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 시트레이트 식염수 완충제에는 실질적으로 칼슘 및 마그네슘을 포함하여 2가 양이온이 없다. 일부 실시형태에서, 시트레이트 식염수 완충제는 칼슘 또는 마그네슘을 함유하지 않는다. 심장 기능 개선에 미치는 변형된 RNA의 효과는 당업계에 잘 공지된 방법에 의해 평가될 수 있다(예를 들어, 문헌[Rosano J.M. et al., Cardiovasc Eng Technol., (2012) 3, 237-247; Lin Y.D. et al., Sci Transl Med., (2012) 4(146):146ra109; Zangi L. et al., Nat Biotechnol., (2013) 10, 898-907] 참조; 이들은 모두 원용에 의해 본 명세서에 포함됨).

[0234] 일부 실시형태에서, 포유류 세포, 조직 또는 대상체에서 전부하 동원성 박출 작업량(PRSW) 증가 방법은 포유류 세포, 조직 또는 대상체를 본 개시내용에 따른 변형된 RNA를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 조성물은 포스페이트-완충 식염수 완충제, THAM 완충제 또는 시트레이트 식염수 완충제 내에서 제제화된다. 바람직한 실시형태에서, 변형된 RNA를 포함하는 조성물은 시트레이트 식염수 완충제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 시트레이트 식염수 완충제에는 실질적으로 칼슘 및 마그네슘을 포함하여 2가 양이온이 없다. 일부 실시형태에서, 시트레이트 식염수 완충제는 칼슘 또는 마그네슘을 함유하지 않는다. 전부하 동원성 박출 작업량 증가에 미치는 변형된 RNA의 효과는 당업계에 잘 공지된 방법에 의해 평가될 수 있다(예를 들어, 문헌[Fenely et al., JACC, (1992), 19(7):1522-30] 참조).

[0235] 일부 실시형태에서, 포유류 세포, 조직 또는 대상체에서 최대 압력 발달 증가 방법은 포유류 세포, 조직 또는 대상체를 본 개시내용에 따른 변형된 RNA를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 조성물은 포스페이트-완충 식염수 완충제, THAM 완충제 또는 시트레이트 식염수 완충제 내에서 제제화된다. 바람직한 실시형태에서, 변형된 RNA를 포함하는 조성물은 시트레이트 식염수 완충제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 시트레이트 식염수 완충제에는 실질적으로 칼슘 및 마그네슘을 포함하여 2가 양이온이 없다. 일부 실시형태에서, 시트레이트 식염수 완충제는 칼슘 또는 마그네슘을 함유하지 않는다. 최대 압력 발달 증가에 미치는 변형된 RNA의 효과는 당업계에 잘 공지된 방법, 예컨대 좌심실촬영법, 관상동맥 혈관조영술, 초음파심장검진법, MRI 스캔, CT 스캔, 게이트 심근관류(gated myocardial) SPEC 스캔 또는 게이트 심근관류 PET 스캔에 의해 평가될 수 있다.

[0236] 일부 실시형태에서, 포유류 세포, 조직 또는 대상체에서 수축력 기능 증가 방법은 포유류 세포, 조직 또는 대상체를 본 개시내용에 따른 변형된 RNA를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 조성물은 포스페이트-완충 식염수 완충제, THAM 완충제 또는 시트레이트 식염수 완충제 내에서 제제화된다. 바람직한 실시형태에서, 변형된 RNA를 포함하는 조성물은 시트레이트 식염수 완충제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 시트레이트 식염수 완충제에는 실질적으로 칼슘 및 마그네슘을 포함하여 2가 양이온이 없다. 일부 실시형태에서, 시트레이트 식염수 완충제는 칼슘 또는 마그네슘을 함유하지 않는다. 수축력 기능 증가에 미치는 변형된 RNA의 효과는 당업계에 잘 공지된 방법, 예컨대 좌심실촬영법, 관상동맥 혈관조영술, 초음파심장검진법, MRI 스캔, CT 스캔, 게이트 심근관류 SPEC 스캔 또는 게이트 심근관류 PET 스캔에 의해 평가될 수 있다.

[0237] 일부 실시형태에서, 포유류 심장 세포 또는 조직, 또는 대상체에서 좌심실 박출 분율(LVEF) 증가 방법은 포유류 세포, 조직 또는 대상체를 본 개시내용에 따른 변형된 RNA를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 조성물은 포스페이트-완충 식염수 완충제, THAM 완충제 또는 시트레이트 식염수 완충제 내에서 제제화된다. 바람직한 실시형태에서, 변형된 RNA를 포함하는 조성물은 시트레이트 식염수 완충제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 시트레이트 식염수 완충제에는 실질적으로 칼슘 및 마그네슘을 포함하여 2가 양이온이 없다. 일부 실시형태에서, 시트레이트 식염수 완충제는 칼슘 또는 마그네슘을 함유하지 않는다. 좌심실 박출 분율 증가에 미치는 변형된 RNA의 효과는 당업계에 잘 공지된 방법, 예컨대 좌심실촬영법, 관상동맥 혈관조영술, 초음파심장검진법, MRI 스캔, CT 스캔, 게이트 심근관류 SPEC 스캔 또는 게이트 심근관류 PET 스캔에 의해 평가될 수 있다. 일부 실시형태에서, LVEF는 약 4% 내지 10%만큼 증가된다. 일부 실시형태에서, LVEF는 약 5% 내지

8%만큼 증가된다.

- [0238] 일부 실시형태에서, 포유류 세포, 조직 또는 대상체에서 심장 기능장애와 연관된 하나 이상의 바이오마커(예를 들어 NT-proBNP, BNP, hsTnT 및 hsTnI)의 저하 방법은 포유류 세포, 조직 또는 대상체를 본 개시내용에 따른 변형된 RNA를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 조성물은 포스페이트-완충 식염수 완충제, THAM 완충제 또는 시트레이트 식염수 완충제 내에서 제제화된다. 바람직한 실시형태에서, 변형된 RNA를 포함하는 조성물은 시트레이트 식염수 완충제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 시트레이트 식염수 완충제에는 실질적으로 칼슘 및 마그네슘을 포함하여 2가 양이온이 없다. 일부 실시형태에서, 시트레이트 식염수 완충제는 칼슘 또는 마그네슘을 함유하지 않는다.
- [0239] 일부 실시형태에서, 포유류 세포, 조직 또는 대상체에서 경색 크기 감소 방법은 포유류 세포, 조직 또는 대상체를 본 개시내용에 따른 변형된 RNA를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 조성물은 포스페이트-완충 식염수 완충제, THAM 완충제 또는 시트레이트 식염수 완충제 내에서 제제화된다. 바람직한 실시형태에서, 변형된 RNA를 포함하는 조성물은 시트레이트 식염수 완충제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 시트레이트 식염수 완충제에는 실질적으로 칼슘 및 마그네슘을 포함하여 2가 양이온이 없다. 일부 실시형태에서, 시트레이트 식염수 완충제는 칼슘 또는 마그네슘을 함유하지 않는다. 일부 실시형태에서, 경색 크기가 감소된다. 일부 실시형태에서, 경색이 없어진다. 경색 크기에 미치는 변형된 RNA의 효과는 당업계에 잘 공지된 방법, 예컨대 좌심실촬영법, 관상동맥 혈관조영술, 초음파심장검진법, MRI 스캔, CT 스캔, 게이트 심근관류 SPEC 스캔 또는 게이트 심근관류 PET 스캔에 의해 평가될 수 있다.
- [0240] 일부 실시형태에서, 포유류 세포, 조직 또는 대상체에서 섬유증 감소 방법은 포유류 세포, 조직 또는 대상체를 본 개시내용에 따른 변형된 RNA를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 조성물은 포스페이트-완충 식염수 완충제, THAM 완충제 또는 시트레이트 식염수 완충제 내에서 제제화된다. 바람직한 실시형태에서, 변형된 RNA를 포함하는 조성물은 시트레이트 식염수 완충제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 시트레이트 식염수 완충제에는 실질적으로 칼슘 및 마그네슘을 포함하여 2가 양이온이 없다. 일부 실시형태에서, 시트레이트 식염수 완충제는 칼슘 또는 마그네슘을 함유하지 않는다. 일부 실시형태에서, 섬유증이 감소된다. 일부 실시형태에서, 섬유증이 없어진다. 섬유증에 미치는 변형된 RNA의 효과는 당업계에 잘 공지된 방법, 예컨대 좌심실촬영법, 관상동맥 혈관조영술, 초음파심장검진법, MRI 스캔, CT 스캔, 게이트 심근관류 SPEC 스캔 또는 게이트 심근관류 PET 스캔에 의해 평가될 수 있다.
- [0241] **5.6. 포유류 세포 또는 조직에서 VEGF-A의 발현**
- [0242] 본 개시내용의 또 다른 양태는 포유류 세포 또는 조직 내에서 생체내, 시험관내, 인 시추 또는 생체의 단백질 발현을 위한 VEGF-A 폴리펩타이드를 인코딩하는 변형된 RNA를 포함하는 조성물 또는 특정 제제의 투여에 관한 것이다.
- [0243] 일부 실시형태는 생체내, 시험관내 또는 생체외에서 포유류 세포 또는 조직을 변형된 RNA를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는, 포유류 세포 또는 조직에서 VEGF-A의 발현 방법에 관한 것이다.
- [0244] 일부 실시형태에서, 포유류 세포 또는 조직에서 VEGF-A의 발현 방법은 포유류 세포 또는 조직을 본 개시내용에 따른 변형된 RNA를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다.
- [0245] 일부 실시형태에서, 포유류 세포 또는 조직에서 VEGF-A의 발현 방법은 포유류 세포 또는 조직을 본 개시내용에 따른 변형된 RNA를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하며, 여기서, 조성물은 포스페이트-완충 식염수 완충제, THAM 완충제 또는 시트레이트 식염수 완충제 내에서 제제화된다. 바람직한 실시형태에서, 변형된 RNA를 포함하는 조성물은 시트레이트 식염수 완충제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 시트레이트 식염수 완충제에는 실질적으로 칼슘 및 마그네슘을 포함하여 2가 양이온이 없다. 일부 실시형태에서, 시트레이트 식염수 완충제는 칼슘 또는 마그네슘을 함유하지 않는다.
- [0246] 일부 실시형태에서, 포유류 세포 또는 조직 내에서 VEGF-A의 발현 방법은 이러한 포유류 세포 또는 조직을 본 개시내용에 따른 변형된 RNA를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하며, 여기서, 조성물은 시트레이트 식염수 완충제 내에서 제제화된 변형된 RNA의 농도를 0.1 내지 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 로 포함한다. 일부 실시형태에서, 조성물은 시트레이트 식염수 완충제 내에서 제제화된 변형된 RNA의 농도를 1 내지 10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 로 포함한다. 일부 실시형태에서, 조성물은 시트레이트 식염수 완충제 내에서 제제화된 변형된 RNA의 농도를 10 내지 50  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 로 포함한다.
- [0247] 일부 실시형태에서, 포유류 세포 또는 조직에서 VEGF-A의 발현 방법은 포유류 세포 또는 조직을 본 개시내용에

다른 변형된 RNA를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하며, 여기서, 조성물은 지질-기반 복합체(예컨대 리포솜, 리포플렉스 및 지질 나노입자) 내에서 제제화된다.

[0248] 일부 실시형태에서, 포유류 세포 또는 조직에서 VEGF-A의 발현 방법은 포유류 세포 또는 조직을 시트레이트 식염수 완충제 내에서 제제화된 변형된 RNA를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하며, 여기서, 조성물은 대상체에게 지질-기반 제제보다 저독성이다.

## [0249] 5.7. 대상체에서 VEGF-A의 생성 방법

[0250] 일부 실시형태는 본 개시내용에 따른 변형된 RNA를 포함하는 조성물 또는 특정 제제를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 VEGF-A의 생성 방법에 관한 것이다.

[0251] 비제한적인 예로서, 일부 실시형태에서, 대상체에서 VEGF-A의 생성 방법은 본 개시내용에 따른 변형된 RNA를 포함하는 제제를 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 제제는 시트레이트 식염수 완충제 내에서 제제화된다. 일부 실시형태에서, 제제는 약학적으로 허용 가능한 부형제를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 제제는 용매, 분산 매질, 희석제, 분산제, 현탁 보조제, 표면 활성제, 등장성제, 농조화 또는 유화 작용제, 보존제, 코어-셸 나노입자, 중합체, 펩타이드, 단백질, 세포, 히알루로니다제 및 이들의 혼합물로부터 선택되는 약학적으로 허용 가능한 부형제를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 용매는 수성 용매이다.

[0252] 일부 실시형태에서, 제제는 지질, 리피도이드(lipidoid), 리포솜, 지질 나노입자, 리포플렉스 및 이들의 혼합물로부터 선택되는 약학적으로 허용 가능한 부형제를 추가로 포함한다.

[0253] 일부 실시형태에서, 대상체에서 VEGF-A의 생성 방법은 본 개시내용에 따른 변형된 RNA를 포함하는 제제를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하며, 여기서, 대상체는 VEGF-A 요법에 반응성인 질병을 앓고 있다. 일부 실시형태에서, 대상체는 감소되거나 보존된 박출 분율을 갖는 심부전, 신장 질병, 피부 이식 및 조직 이식 관련 질병, MI-후 심장 기능장애, 허혈성 심장병, 외상 또는 수술로 인한 혈관 손상, 당뇨병성 궤양을 포함하는 피부 궤양, 중증 하지 허혈, 폐 고혈압 및 말초 동맥 질병으로부터 선택되는 질병을 앓고 있다. 일부 실시형태에서, 질병은 감소되거나 보존된 박출 분율을 갖는 심부전이다. 일부 실시형태에서, 질병은 MI-후 심장 기능장애이다. 일부 실시형태에서, 질병은 허혈성 심장병이다. 일부 실시형태에서, 질병은 외상 또는 수술로 인한 혈관 손상이다. 일부 실시형태에서, 질병은 당뇨병성 궤양을 포함하는 피부 궤양이다. 일부 실시형태에서, 질병은 중증 하지 허혈이다. 일부 실시형태에서, 질병은 폐 고혈압이다. 일부 실시형태에서, 질병은 말초 동맥 질병이다. 일부 실시형태에서, 질병은 신장 질병이다. 일부 실시형태에서, 질병은 피부 이식 및 조직 이식 관련 질병이다.

[0254] 일부 실시형태에서, 대상체에서 VEGF-A의 생성 방법은 본 개시내용에 따른 변형된 RNA를 포함하는 제제를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하며, 여기서, 제제는 대상체에게 근육내, 피내, 피하 또는 심장내 경로를 통해, 간문맥 카테터를 통해, 관상 정맥동 카테터를 통해 및/또는 치료되는 영역 내로의 직접 투여에 의해 투여된다. 일부 실시형태에서, 제제는 대상체에게 근육내 투여된다. 일부 실시형태에서, 제제는 대상체에게 피내 투여된다. 일부 실시형태에서, 제제는 대상체에게 피하 투여된다. 일부 실시형태에서, 제제는 바람직하게는 다중(예를 들어 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 또는 그 이상) 투여에서 고정된-투여량으로 대상체에게 심장내 투여된다. 일부 실시형태에서, 제제는 대상체에게 간문맥 카테터를 통해 투여된다. 일부 실시형태에서, 제제는 대상체에게 관상 정맥동 카테터를 통해 투여된다. 일부 실시형태에서, 제제는 대상체에게 치료되는 영역 내로의 직접 투여에 의해 투여된다.

[0255] 일부 실시형태에서, 대상체에서 VEGF-A의 생성 방법은 본 개시내용에 따른 변형된 RNA를 포함하는 제제를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하며, 여기서, 제제는 지질-기반 복합체(예컨대 리포솜, 리포플렉스 및 지질 나노입자), 포스페이트-완충 식염수 완충제, THAM 완충제 또는 시트레이트 식염수 완충제를 포함한다. 바람직한 실시형태에서, 변형된 RNA를 포함하는 제제는 시트레이트 식염수 완충제 내에서 제제화된다. 일부 실시형태에서, 시트레이트 식염수 완충제에 실질적으로 칼슘 및 마그네슘이 없다. 일부 실시형태에서, 시트레이트 식염수 완충제는 칼슘 또는 마그네슘을 함유하지 않는다.

[0256] 일부 실시형태에서, 대상체에서 VEGF-A의 생성 방법은 본 개시내용에 따른 변형된 RNA를 포함하는 제제를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하며, 여기서, 제제는 시트레이트 식염수 완충제 내에서 제제화된 변형된 RNA의 농도를 0.1 내지 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 로 포함한다. 일부 실시형태에서, 제제는 시트레이트 식염수 완충제 내에서 제제화된 변형된 RNA의 농도를 1 내지 10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 로 포함한다. 일부 실시형태에서, 제제는 시트레이트 식염수 완충제 내에서 제제화된 변형된 RNA의 농도를 10 내지 50  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 로 포함한다.

[0257] 일부 실시형태에서, 대상체에서 VEGF-A의 생성 방법은 본 개시내용에 따른 변형된 RNA를 포함하는 제제를 대상

체에게 투여하는 단계를 포함하며, 여기서, 제제는 시트레이트 식염수 완충제 내에 포함되고, 대상체에게 지질-기반 제제보다 저독성이다.

[0258] **5.8. 제제의 제조 방법**

[0259] 일부 실시형태는 본 개시내용에 따른 변형된 RNA를 지질-기반 복합체(예컨대 리포솜, 리포플렉스 및 지질 나노입자), 포스페이트-완충 식염수 완충제, THAM 완충제 또는 시트레이트 식염수 완충제와 조합하는 단계를 포함하는, 제제의 제조 방법에 관한 것이다.

[0260] 일부 실시형태는 변형된 RNA를 시트레이트 식염수 완충제와 조합하는 단계; 포유류 세포, 조직 또는 대상체에서 생리학적 과정을 조정하는 단계; 포유류 세포 또는 조직에서 VEGF-A를 발현시키는 단계; 및/또는 대상체에서 VEGF-A를 생성하는 단계를 포함하는, 제제의 제조 방법에 관한 것이며, 여기서, 제제는 VEGF-A 요법에 반응성인 질병을 앓고 있는 대상체의 치료에 효과적이다.

[0261] 일부 실시형태에서, 제제의 제조 방법은 본 개시내용에 따른 변형된 RNA를 시트레이트 식염수 완충제와 조합하는 단계를 포함하며, 여기서, 제제는 시트레이트 식염수 완충제 내에서 제제화된 변형된 RNA의 농도를 0.1 내지 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 로 포함한다. 일부 실시형태에서, 제제는 시트레이트 식염수 완충제 내에서 제제화된 변형된 RNA의 농도를 1 내지 10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 로 포함한다. 일부 실시형태에서, 제제는 시트레이트 식염수 완충제 내에서 제제화된 변형된 RNA의 농도를 10 내지 50  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 로 포함한다.

[0262] 일부 실시형태에서, 제제의 제조 방법은 변형된 RNA를 본 개시내용에 따른 시트레이트 식염수 완충제와 조합하는 단계를 포함하며, 여기서, 제제는 시트레이트 식염수 완충제이고, 대상체에게 지질-기반 제제보다 저독성이다.

[0263] 일부 실시형태에서, 제제의 제조 방법은 변형된 RNA를 본 개시내용에 따른 시트레이트 식염수 완충제와 조합하는 단계를 포함하며, 여기서 시트레이트 식염수 완충제에는 실질적으로 칼슘 및 마그네슘을 포함하여 2가 양이온이 없다. 일부 실시형태에서, 시트레이트 식염수 완충제는 칼슘 또는 마그네슘을 함유하지 않는다.

[0264] 일부 실시형태에서, 제제의 제조 방법은 변형된 RNA를 본 개시내용에 따른 시트레이트 식염수 완충제와 조합하는 단계를 포함하며, 여기서, 제제는 시트레이트 식염수 완충제를 포함하고, 약학적으로 허용 가능한 부형제를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 약학적으로 허용 가능한 부형제는 용매, 분산 매질, 희석제, 분산제, 현탁 보조제, 표면 활성제, 등장성제, 농조화 또는 유화 작용제, 보존제, 코어-셸 나노입자, 중합체, 펩타이드, 단백질, 세포, 히알루로니다제 및 이들의 혼합물로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 용매는 수성 용매이다.

[0265] 제제는 본 개시내용에 따른 많은 경로들을 통해 대상체에게 투여될 수 있다. 피내, 심장내, 피하 및 근육내 주사에 적합한 특수 제제는 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 활성 성분의 효과를 연장시키기 위해, 근육내 주사로부터 활성 성분의 흡수를 늦추는 것이 종종 바람직하다. 근육내 투여된 약물 형태의 지연된 흡수는 약물(예를 들어 변형된 RNA)을 오일 비히클 내에 용해시키거나 현탁시킴으로써 달성된다. 주사제 데포트 형태(depot form)는 생분해성 중합체, 예컨대 폴리락타이드-폴리글리콜라이드 내에서 약물(예를 들어 변형된 RNA)의 마이크로캡슐 매트릭스를 형성함으로써 제조된다. 중합체에 대한 약물의 비율 및 이용되는 특정 중합체의 성질에 따라, 약물 방출 속도는 조절될 수 있다. 다른 생분해성 중합체의 예는 폴리(오르토에스테르) 및 폴리(무수물)을 포함한다. 피내 및 피하 주사의 경우, 제제는 바람직하게는, 이들 제제가 피내 구획에 전달 시 면역 반응을 유도하지 않도록, 제제화된다. 첨가제는 피내 주사용 제제에 사용될 수 있고, 예를 들어 습윤제, 유화제 또는 pH 완충제를 포함한다. 피내 주사용 제제는 또한, 하나 이상의 다른 부형제, 예컨대 당류 및 폴리올을 함유할 수 있다. 심장내 주사의 경우, 제제는 바람직하게는, 이들 제제가 주사 바늘을 사용한 후 심장 근육 및 관상동맥에 추가의 피해를 유발하지 않도록 제제화된다. 심장내 주사에 적합한 제제는 본원에 제공된다.

[0266] **5.9. 변형된 RNA 조성물의 독성의 감소 방법**

[0267] 일부 실시형태는 변형된 RNA를 시트레이트 식염수 완충제와 함께 제제화하는 단계를 포함하는, 대상체에서 변형된 RNA 치료의 독성의 감소 방법에 관한 것이다. 일부 실시형태에서, 시트레이트 식염수 완충제와 함께 변형된 RNA의 제제는 대상체에게 지질-기반 제제보다 저독성이다. 일부 실시형태에서, 지질-기반 제제의 독성은 용량-의존적 독성이다. 일부 실시형태에서, 지질-기반 제제의 독성은 용량-제한적 독성이다.

[0268] 일부 실시형태에서, 대상체에서 치료의 독성의 감소 방법은 본 개시내용에 따른 변형된 RNA를 시트레이트 식염수 완충제와 함께 제제화하는 단계를 포함하고, 약학적으로 허용 가능한 부형제를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 약학적으로 허용 가능한 부형제는 용매, 분산 매질, 희석제, 분산제, 현탁 보조제, 표면 활성제, 등



장성제, 농조화 또는 유화 작용제, 보존제, 코어-셸 나노입자, 중합체, 펩타이드, 단백질, 세포, 히알루로니다제 및 이들의 혼합물로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 용매는 수성 용매이다. 일부 실시형태에서, 용매는 비-수성 용매이다.

[0269] 일부 실시형태에서, 대상체에서 치료의 독성의 감소 방법은 본 개시내용에 따른 변형된 RNA를 시트레이트 식염수 완충제와 함께 제제화하는 단계를 포함하며, 여기서, 대상체는 VEGF-A 요법에 반응성인 질병을 앓고 있다. 일부 실시형태에서, 대상체는 감소되거나 보존된 박출 분율을 갖는 심부전, 신장 질병, 피부 이식 및 조직 이식 관련 질병, MI-후 심장 기능장애, 허혈성 심장병, 외상 또는 수술로 인한 혈관 손상, 당뇨병성 궤양을 포함하는 피부 궤양, 중증 하지 허혈, 폐 고혈압 및 말초 동맥 질병으로부터 선택되는 질병을 앓고 있다. 일부 실시형태에서, 질병은 감소되거나 보존된 박출 분율을 갖는 심부전이다. 일부 실시형태에서, 질병은 MI-후 심장 기능장애이다. 일부 실시형태에서, 질병은 허혈성 심장병이다. 일부 실시형태에서, 질병은 외상 또는 수술로 인한 혈관 손상이다. 일부 실시형태에서, 질병은 당뇨병성 궤양을 포함하는 피부 궤양이다. 일부 실시형태에서, 질병은 중증 하지 허혈이다. 일부 실시형태에서, 질병은 폐 고혈압이다. 일부 실시형태에서, 질병은 말초 동맥 질병이다. 일부 실시형태에서, 질병은 말초 동맥 질병이다. 일부 실시형태에서, 질병은 신장 질병이다. 일부 실시형태에서, 질병은 피부 이식 및 조직 이식 관련 질병이다.

## [0270] 5.10. 핵산 서열

[0271] 일부 실시형태는 변형된 RNA의 발생을 위한 시험관내 전사 주형을 포함하는 핵산 서열에 관한 것이다. 일부 실시형태에서, 핵산 서열은 본 개시내용에 따른 변형된 RNA의 발생을 위해 시험관내 전사 주형을 포함한다.

[0272] 일단, 변형된 RNA의 발생을 위한 전사 주형이 이용 가능하면, 본 개시내용에 따른 변형된 RNA는 당업계에 잘 공지된 임의의 이용 가능한 기술에 따라 상업적으로 입수 가능한 출발 물질을 사용하여 제조될 수 있다(예를 들어, 미국 특허 출원 공개 2015/0051268; 미국 특허 8,710,200; 미국 특허 출원 공개 2013/0259923; 이들은 모두 원용에 의해 포함됨).

[0273] 청구항 목록의 모든 청구항들은 이들 전체가 추가의 실시형태로서 본 명세서에 원용에 의해 포함된다.

## [0274] 6. 실시예

### [0275] 6.1. 실시예 1

#### [0276] VEGF-A 변형된 RNA의 형질감염 및 VEGF-A 단백질의 생성

[0277] VEGF-A 변형된 RNA의 형질감염 잠재력을 조사하기 위해, 10,000개의 세포를 정기적인 배양 배지 내에서 96-웰 플레이트 내에 접종하였다. 변형된 RNA-생성된 VEGF-A를 함유하는 조건화된 배지를 제조하기 위해, 250,000개의 인간 제대 정맥 내피 세포(HUVEC)(스위스 바젤 소재의 Lonza)를 내피 성장 배지(EGM) 배지(Lonza) 내에서 6-웰 플레이트에 접종하였다. 다음날, 형질감염을 혈청-무함유 내피 기저 배지(EBM; endothelial basal medium) 배지(Lonza) 내에서 수행하였다. VEGF A 변형된 RNA(지시된 양)를 리포펙타민 2000(Invitrogen, 미국 캘리포니아주 칼즈배드 소재)과 제조업체의 지시사항에 따라 혼합하고, 세포에 첨가하였다. 형질감염 대조군으로서, 물과 혼합된 리포펙타민 2000을 사용하였다. 4시간 후, 형질감염 배지를 제거하고, 신선한 혈청-무함유 EBM 배지로 교환하고, 배지를 특정한 시점에서 수확하였다. 조건화된 배지를 24시간 후에 수확하고, -80℃에서 유지시켰다. 인간 VEGF A 농도를 하기 기재된 바와 같이 ELISA를 이용하여 측정하였다.

[0278] 형질감염 후 세포 배양 배지 내의 인간 VEGF-A의 양을 인간 VEGF-A ELISA 키트(Novex, invitrogen)를 제조업체의 지시사항에 따라 이용하여 측정하였다. 흡광도를 SpectraMax 판독기에서 450 nm에서 판독하고, 시료 내의 VEGF A 농도를 계산하였다.

[0279] 시험관내에서 VEGF-A 변형된 RNA를 세포 내로 모두 형질감염시키기 위해서는, 리포펙타민 2000이 필요하였다. VEGF-A 변형된 RNA는 다수의 인간 심장 세포 유형들 내로 형질감염될 수 있을 것이다. 변형된 RNA의 용량이 클수록 더 많은 VEGF-A 단백질이 생성되었다(도 2a). 변형된 RNA로부터의 단백질 생성은 형질감염 후 8시간째에 피크를 이루었고, 그런 다음 하락하였다(도 2b). 또한, 변형된 RNA 형질감염 및 단백질 생성은 종들에 걸쳐 작용하였고, 마우스 심장 섬유아세포 및 돼지 내피 세포가 둘 모두 형질감염될 수 있을 것이며, 이는 VEGF-A 단백질의 번역을 초래하였다(도 2c).

### [0280] 6.2. 실시예 2

#### [0281] 제조합 및 변형된 RNA-생성된 VEGF-A에 의한 VEGF 수용체 2 신호전달의 활성화

- [0282] 100,000개의 HUVEC을 EGM 배지 내에서 12-웰 플레이트 내에 접종하였다. 다음날, 세포를 EBM 내에서 24시간 동안 단식시키고(starve), 그런 다음 재조합(R&D Systems, 미국 미네소타주 미네아폴리스 소재) 또는 변형된 RNA-생성된(조건화된 배지로서 첨가됨) 100 ng/mL VEGF-A, 또는 VEGF-A가 없는 배지에 노출시켰다. 2분, 10분 및 20분 후 자극을 종료하고, 배지를 제거하였다. 총 단백질을, 프로테아제 및 포스포타제 저해제(Mesoscale Discovery, 미국 메릴랜드주 록빌 소재)를 함유하는 용해 완충제를 포함하는 배양된 세포로부터 제조하였다. 단백질 농도를 BCA 단백질 검정법 키트(Pierce, 미국 일리노이주 록퍼드 소재)를 제조업체의 프로토콜에 따라 사용하여 측정하였다.
- [0283] 15 µg의 단백질을 4% 내지 12% Bis-Tris 구배 겔 상에 로딩하고, 전기영동을 MES SDS 러닝 완충제(Invitrogen)를 사용하여 수행하였다. 분획화된 단백질을 폴리비닐 디플루오라이드(PVDF) 막(Invitrogen) 상으로 일렉트로블로팅(electroblot)하였다. 막을 TBS Tween(0.1%) 중 5% BSA 내에서 블라킹(block)하고, 후속해서 1차 항체와 함께 4°C에서 밤새 인큐베이션하였다. 사용된 1차 항체는 VEGF 수용체 2(VEGFR2), 인산화된 VEGFR2(p-VEGFR2), Akt, 인산화된 Akt(p-Akt), eNOS(모두 Cellsignaling, 미국 메사추세츠주 덴버 소재) 및 인산화된 eNOS(p-eNOS, BD Biosciences, 미국 뉴저지주 프랭클린 레이크스 소재)에 대한 것들이었다. 막을 호스 래디쉬 퍼옥시다제-표지된 2차 항체(Dako, 덴마크 글로스트럽 소재)와 함께 인큐베이션하고, 면역반응을 ECL 웨스턴 블로팅 기질(Pierce)을 사용하여 검출하였다. 화학발광 신호를 ChemiDoc Touch 이미징 시스템(BioRad, 미국 캘리포니아주 에르블레스 소재)을 사용하여 시각화하였다.
- [0284] 변형된 RNA로부터 생성된 VEGF-A 단백질이 활성이었음을 입증하기 위해, VEGF-A 변형된 RNA에 의해 형질감염된 세포 유래의 조건화된 배지를 배양된 세포에 첨가하였다. 이는 인간 내피 세포에서 주요 VEGF-A 수용체인 VEGF 수용체 2의 인산화를 초래하였다(도 3a). 또한, 조건화된 배지는 각각 인간 내피 세포에서 다운스트림 신호전달 경로 eNOS(도 3b) 및 마우스 심장 섬유아세포에서 Akt(도 3c)의 인산화를 유도하기도 하였다.
- [0285] **6.3. 실시예 3**
- [0286] **변형된 RNA 생성된 VEGF-A 단백질은 혈관신생 과정에서 몇몇 중대한 단계들을 자극한 활성 단백질이다**
- [0287] HUVEC를 EGM 배지(Lonza) 내에서 96-웰 플레이트에 1개 웰 당 3,000개 세포의 밀도로 접종하였다. 다음날, 배지를, 2% 태아 소 혈청(FBS) 및 재조합 VEGF-A(R&D Systems)가 보충된 기저 EBM 배지 또는 변형된 RNA-생성된 VEGF-A를 함유하며 2% FBS가 보충된 조건화된 배지로 교환하였다. VEGF-A 농도는 각각 10 ng/mL, 50 ng/mL 및 100 ng/mL이었다. VEGF-A가 없는 배지를 대조군으로서 사용하였다. 플레이트를 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 유지시키고, 2일 후, 4% 완충 포르말데하이드(Histolab, 스웨덴 예테보리 소재) 내에서 고정시키고, 핵을 Hoechst(Invitrogen)로 10분 동안 염색하였다. 핵 계수를 Image Express High Content 분석 시스템 내에서 확인하였다.
- [0288] HUVEC을 Cell Tracker Red(Molecular Probes, 미국 오리건주 유진 소재)를 제조업체의 지시사항에 따라 이용하여 염색하고, 24-웰 플레이트(Corning, 미국 뉴욕 소재) 내에서 8 µm 기공 크기를 갖는 FloroBlok 막이 있는 트랜스웰 인서트(transwell insert) 내에서 2% 혈청이 보충된 EBM 배지 내에 접종하였다. 2% 혈청과 함께 인간 재조합 VEGF-A(R&D Systems)를 함유하는 EBM, 또는 2% 혈청과 함께 변형된 RNA-생성된 VEGF-A를 함유하는 조건화된 배지를 하위 챔버(lower chamber)에 첨가하였다. 화학유인제(chemoattractant)로서의 VEGF-A를 각각 10 ng/mL 및 100 ng/mL의 농도에서 연구하였다. VEGF-A가 없는 배지를 대조군으로서 사용하였다. 24시간 후, 막의 하위면까지 이동한 세포를 Image Express High Content 분석 시스템을 이용하여 계수하였다.
- [0289] HUVEC을 EBM 내에서 Cytodex 3 마이크로담체 비드(GE Healthcare, 영국 리틀 첼폰트 소재)와 함께 혼합하고, 튜브를 37°C에서 유지시킨 다음, 정기적으로 가볍게 쳐서 균일하게 코팅되게 하였다. 4시간 후, 내피 세포로 코팅된 비드를 플라스크에 접종하고, 37°C 및 5% CO<sub>2</sub>에서 밤새 유지시켰다. 비드를, 아프로티닌(aprotinin)(0.15 단위/mL, Sigma Aldrich)을 함유하는 피브리노겐 용액(2 mg/mL, Sigma Aldrich, 미국 미주리주 세인트루이스 소재) 내에서 500 비드/mL에서 현탁시키고, 그런 다음, 96-웰 플레이트 내에서 트롬빈(0.625 단위/mL, Sigma Aldrich)을 함유하는 웰에 첨가하였다. 15분 후, 피브린 겔이 응괴(clot)를 형성하였고, 재조합 VEGF-A를 함유하는 EGM 배지 또는 변형된 RNA-생성된 VEGF-A를 함유하는 조건화된 배지를 첨가하였다. 대조군으로서, VEGF-A가 없는 배지를 사용하였다. 플레이트를 37°C 및 5% CO<sub>2</sub>에서 2일 동안 유지시켰으며, 이때 혈관신생 싹 형성을 평가하였다. 세포를 칼세인을 이용하여 30분 동안 염색하고, 플레이트를 Image Express High Content 분석 시스템 내에서 판독하고, 싹 형성을 확인하였다.

[0290] 도시된 바와 같이, 혈관신생 과정에서 몇몇 중대한 단계들은 변형된 RNA-생성된 VEGF-A 단백질에 의해 영향을 받았다. VEGF-A는 배양된 인간 내피 세포의 증식(도 4a) 및 이동(도 4b)을 증가시켰다. 또한, 내피 세포로 코팅된 비드를 함유하는 3D 배양물 내에서 혈관신생 싹 형성은 변형된 RNA-생성된 VEGF-A에 의해 증가되었다(도 4c 및 도 5). 중요하게는, 내피 세포에서, 변형된 RNA-생성된 VEGF-A 단백질은 재조합 VEGF-A 단백질과 비교하여 유사한 반응을 유도하였으며, 이는, 변형된 RNA-생성된 VEGF-A가 이의 특성 및 혈관신생에 영향을 미치는 능력을 보유함을 보여준다.

#### [0291] 6.4. 실시예 4

##### [0292] 마우스에서 LacZ 변형된 RNA의 단일 심장내 주사 후, $\beta$ -갈락토시다제 단백질의 평가

[0293] 수컷 C57B1/6 마우스(10 내지 12주령)를 이소플루란을 이용하여 마취시켰다. 좌측 흉곽 구역을 면도하고, 멸균시키고, 삽관 후, 심장을 좌측 개흉술을 통해 노출시켰다. 시트레이트/식염수(하이사이클론 물 중 10 mmol/L 시트레이트, 130 mmol/L 소듐 클로라이드, 소듐 하이드록사이드를 이용하여 pH는 대략 7.5로 조정됨) 또는 리포펙타민<sup>®</sup>(RNAiMAX 형질감염 시약, Thermo Fisher Scientific Inc. 미국 뉴욕 소재) 내에서 제제화된 LacZ 변형된 RNA를 좌심실 자유벽에서 심장의 정점으로부터 기부 방향으로 주사(50  $\mu$ L)하였다. 주사 후, 흉곽 및 피부를 봉합에 의해 닫고, 과량의 공기를 부드러운 가슴 압박에 의해 흉강으로부터 제거하였다. 후속적으로, 정상 호흡이 구축되었을 때, 마우스를 산소 호흡기로부터 연결해제하고, 이의 홈 케이지에 되돌려 놓았다. 심장 주사 후 예정된 시점에서, 마우스를 마취시키고, 가슴을 다시 열었다. 심장을 절제하고, 리포터  $\beta$ -갈락토시다제 효소의 형질감염 효율 및 존재를 5-브로모-4-클로로-3-인돌릴- $\beta$ -D-갈락토피라노사이드(X-gal) 염색에 의해 검사하였다. X-gal은 효소에 의해 가수분해되어, 활성  $\beta$ -갈락토시다제의 존재를 가리키는 강렬한 청색의 불용성 생성물을 제공한다. 간략하게는, 기관 또는 조직을 포스페이트 완충제 내에서 행구고, 4% 파라포름알데하이드 내에서 15분 동안 고정한다. 다음, 2 mmol/L  $MgCl_2$ , 0.01% 소듐 데옥시콜레이트 및 0.02% Nonidet P40을 함유하는 0.1 mmol/L 포스페이트(pH 7.3) 세척 완충제를 이용하여 3회(20 내지 30분) 세척하였다. 후속해서, 신선하게 제조된 X-gal 용액(5 mmol/L  $K_4Fe(CN)_6$ , 5 mmol/L  $K_3Fe(CN)_6$  및 1 mg/mL X-gal을 함유하는 포스페이트 세척 완충제)을 표본에 첨가한 다음, 이 표본을 호일에 싸고, 37°C에서 밤새 인큐베이션하였다. 그런 다음, 표본을 포스페이트 세척 완충제로 3회 세척하고, 사진 촬영하였다.

[0294] 좌측 개흉술 후, 마취된 마우스에게 시트레이트/식염수 또는 LacZ 변형된 RNA를 단일 심장내 주사하였다. 대략 24시간 후, 마우스를 안락사시키고, 심장을 절제하였다. 그런 다음, 심장을 밤새 X-gal 염색하였다. 도 6b 및 도 6c는 리포펙타민(도 6b) 또는 시트레이트/식염수 완충제(도 6c) 내에서 제제화된 변형된 RNA를 주사한 정점 영역에서 효율적이고 정성적으로 유사한  $\beta$  갈락토시다제 효소의 형질감염 및 생성을 예시한다. 시트레이트/식염수만 주사한 심장에서는 염색이 관찰되지 않았다(도 6a).

#### [0295] 6.5. 실시예 5

##### [0296] 네이브 마우스에서 루시퍼라제 변형된 RNA의 심장내 주사 후 루시퍼라제 단백질 발현의 평가

[0297] 수컷 C57B1/6 마우스(10 내지 12주령)를 케타민(10 mg/kg)과 자일라진(3.5 내지 4 mg/kg)의 혼합물을 복강내 주사를 통해 투여하여 마취시켰다. 좌측 흉곽 구역을 면도하고, 멸균시키고, 삽관 후, 심장을 좌측 개흉술을 통해 노출시켰다.

[0298] 파이어플라이 루시퍼라제 변형된 RNA를 하기 완충제와 함께 제제화하였다:

- [0299] 1. PBS 완충제(1xPBS, 칼슘 없음, 마그네슘 없음, pH 7.4)
- [0300] 2. 시트레이트 식염수 완충제(C/S, 하이사이클론 물 중 10 mmol/L 시트레이트, 130 mmol/L 소듐 클로라이드, pH 7.0)
- [0301] 3. THAM 완충제(트로메타민 AKA 2-아미노-2-(하이드록시메틸)-1,3-프로판디올), 300 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0)

[0302] 총 25  $\mu$ g의 루시퍼라제 변형된 RNA를 좌심실 자유벽에서 심장의 정점으로부터 기부 방향으로 주사(50  $\mu$ L)하였다. 주사 후, 흉곽 및 피부를 봉합에 의해 닫고, 과량의 공기를 부드러운 가슴 압박에 의해 흉강으로부터 제거하였다. 수술-후, 마우스에게 티파메졸(atipamezole) 하이드로클로라이드(1 mg/kg)의 복강내 주사 및 부프레노르핀(buprenorphine) 하이드로클로라이드(0.02 mg/kg)의 피하 주사를 제공하였다. 후속적으로, 정상 호흡이

구축되었을 때, 마우스를 산소 호흡기로부터 연결해제하고, 이의 홈 케이지에 되돌려 놓았다.

좌측 개흉술 후, 마취된 마우스에게 완충제 단독(PBS, C/S 또는 THAM 대조군), 또는 PBS, C/S 또는 THAM 완충제 내에서 제제화된 파이퍼라제 루시페라제 변형된 RNA를 단일 심장내 주사하였다. 심장을 생체발광 IVIS 이미지를 통한 루시페라제 단백질 발현 평가를 위해 절제하였다. 하기 제시된 결과는 2개의 시간차(staggered) 마우스 연구들의 조합이다. 표 2는 개별 미가공 IVIS 생체발광 유량값을 보고하고, 도 7은 모든 치료군들에 대한 그래프화된 평균값을 각각 예시한다.

[표 2]

대조군 완충제만 주사한 마우스 심장 또는 임의의 완충제 내에 제제화된 루시페라제 변형된 RNA를 주사한 마우스 심장에서의 미가공 IVIS 생체발광 데이터.

	평균 유량	n	#1	#2	#3	#4
C/S	6.24E+03	2	5.05E+03	7.42E+03		
C/S+Luc	6.43E+06	3	2.26E+06	1.41E+05	1.69E+07	
THAM	5.32E+03	2	4.03E+03	6.61E+03		
THAM+Luc	3.62E+06	3	1.82E+06	2.93E+06	6.10E+06	
PBS	1.02E+04	2	2.39E+03	1.79E+04		
PBS+Luc	1.01E+07	3	7.84E+06	3.14E+06	1.94E+07	
C/S+Luc	4.91E+06	3	2.49E+06	1.93E+06	1.03E+07	

도 7에 도시된 바와 같이, 루시페라제 단백질 발현이 루시페라제 변형된 RNA를 주사한 모든 심장들에서 검출되었으며, 반면, 음성 대조군(PBS, C/S 및 THAM)은 신호를 거의 보여주지 않거나 아예 보여주지 않는다. 이들 대조군에서 기준선 IVIS 생물발광 신호는 약 4 내지 7.5E+03 단위 생물발광 유량만큼 변동하고, 이는 광자/초(second)로서 표현된다. 루시페라제 신호에서 3 내지 4배 규모가 루시페라제 변형된 RNA를 주사한 모든 심장들에서 검출되었다. 다양한 완충제들 사이에 통계학적 차이는 검출되지 않았다.

## 6.6. 실시예 6

### 랫트에서 인간 VEGF-A 변형된 RNA의 심장내 주사 후 인간 VEGF-A 단백질 생성의 평가

수컷 Sprague Dawley 랫트(체중 250 내지 300 g)를 이소플루란을 이용하여 마취시키고, 무통을 위해 마카인(marcaine)(25 mg/kg) 및 부프레노르핀(0.05 mg/kg)을 피하 주사하였다. 좌측 흉곽 구역을 면도하고, 멸균시키고, 삽관 후, 심장을 제5 늑간 공간에서 좌측 개흉술을 통해 노출시켰다. 시트레이트 식염수(하이사이클론 물 중 10 mmol/L 시트레이트, 130 mmol/L 소듐 클로라이드, pH를 소듐 하이드록사이드를 이용해 대략 7.5로 조정함) 내에서 제제화된 인간 VEGF-A 변형된 RNA(1800, 150 또는 15 µg)를 좌심실 자유벽에서 라인을 따라 6개의 개별 주사(각각 15 µL, 총 부피 90 µL)로서 주사하였다. 주사 후, 흉곽 및 피부를 봉합에 의해 닫고, 과량의 공기를 부드러운 가슴 압박에 의해 흉강으로부터 제거하였다. 후속적으로, 정상 호흡이 구축되었을 때, 랫트를 산소 호흡기로부터 연결해제하고, 이의 홈 케이지로 되돌려 놓았다. 심장 주사 후 예정된 시점에서, 랫트를 마취시키고, 심장 조직 시료화를 위해 가슴을 다시 열었다. 심장을 절제하고, 우심실, 좌심방 및 우심방을 다듬었다. 주사 부위를 포함하여 가로방향(transverse) 슬라이스를 절제하고, 2개의 부분들로 나누었으며, 이들 부분을 액체 질소 내에서 급속 냉동시키고, VEGF-A 단백질의 분석 시까지 -80℃에 저장하였다. 별개의 조직 시료를 주사 부위로부터 원거리의 정점으로부터 음성 대조군으로서 취하였다.

마취시킨 랫트에게 3개의 상이한 용량(15, 150 또는 1800 µg)의, 시트레이트/식염수 내에서 제제화된 VEGF-A 변형된 RNA를 심장내 주사하였다. 각각의 용량을 좌심실 자유벽을 가로질러 하나의 단일 시점에서 6개의 별개의 주사로서 투여하였다. 동물을 주사 후 상이한 시점들에서 안락사시키고, 심장을 절제한 다음, VEGF-A 단백질 함량 분석을 위해 심실 조직을 수확하였다. 도 8a는 주사된 각각의 3개 용량에 대해 생성된 VEGF-A 단백질의 시간 프로파일 및 규모를 요약한 것이다. 알 수 있듯이, 단백질 생성은 용량 선형이지 않았고, 15 µg으로부터 150 µg까지 10배의 용량 증가는 곡선 아래 면적(AUC)에서만 1.6배 증가를 유발하였고, 유사한 AUC는 150 및 1800 µg 용량 그룹에 대해 관찰되었다(1.1배 차이).

## 6.7. 실시예 7



- [0313] 심근경색을 앓은 래트에서 인간 VEGF-A 변형된 RNA의 심장내 주사 후, 좌심실 기능 및 경색 크기에 미치는 효과
- [0314] 수컷 Sprague Dawley 래트(체중 250 내지 300 g)를 상기 기재된 바와 같이 마취시키고, 전처리한 다음, 개흉술을 실시하였다. 후속적으로, 동물을 좌전 하행 관상동맥의 영구 결찰 처리하여, 심근경색을 유도하였다. 결찰에 90  $\mu$ L의 시트레이트/식염수(하이사이클론 물 중 10 mmol/L 시트레이트, 130 mmol/L 소듐 클로라이드, pH를 소듐 하이드록사이드를 이용해 대략 7.5로 조정함), 또는 시트레이트/식염수 내에서 제제화된 150 또는 1800  $\mu$ g 인간 VEGF-A 변형된 RNA를 심장내 주사하였다. 전체 부피를 경색의 경계 구역을 따라 6회의 별개의 심외막 주사로서 전달하였다. 주사 후, 흉곽 및 피부를 봉합에 의해 닫고, 과량의 공기를 부드러운 가슴 압박에 의해 흉강으로부터 제거하였다. 후속적으로, 정상 호흡이 구축되면, 래트를 산소 호흡기로부터 연결해제하고, 이의 홈 케이지로 되돌려 놓았다.
- [0315] 시술 후 1일째 및 8일째에, 동물을 자기 공명 영상(MRI)을 통한 좌심실 기능 및 경색 크기의 평가를 위해 이미징 설비로 가져갔다. 더욱이, 시술 다음 날, 혈액 시료를, 심장 피해에 대한 바이오마커로서 심장 트로포닌 I(i-STAT<sup>®</sup> 심장 트로포닌 I 진단 검사, Abbott Point of Care Inc., 미국 일리노이주 60064 애봇 파크 소재)의 분석을 위해 꼬리 정맥으로부터 채혈하였다. MRI 스캐닝을 4.7 T의 장 강도(field strength)에서 전용 소동물 MRI 시스템을 사용하여 수행하였다. 이미지를 단축 배향에서 획득하였고, 좌심실을 커버하는 이미지들의 스택(stack)을 획득하였다. 심전도법을 심장 주기에서 특정한 기(phase)에서의 이미징을 촉발하는 데 사용하였다. 심장 기능을 이미지 시리즈로부터 평가하였으며, 1회 심박동 동안 좌심실 벽의 움직임을 나타내었다. 이미지 시리즈의 획득 시 사용된 영상 연쇄는, 10 ms의 횡단 반복(transversal repetition) 시간 및 25의 플립각(flip angle)을 가지고 기울기-에코(gradient-echo) 연쇄이었다. 좌심실의 부피를 전용 이미지 분석 소프트웨어를 사용하여 숙련된 관독자에 의해 상이한 시점들에서 수동 설계를 통해 평가하였다. 수축기말 부피(ESV) 및 확장기말 부피(EDV)를 가장 작은 좌심실 부피 및 가장 큰 좌심실 부피로서 식별하였다. 심장 기능을 반영하는 박출 분율(EF)을 식  $EF=(EDV-ESV)/EDV$ 를 통해 평가하였다. 심장 경색의 정도를 나타내는 이미지를 가돌리늄을 함유하는 조영제인 가도마이드(Gadodiamide)의 투여 후 획득하였다. 이미지 획득 전 10분째에, 0.3 mmol/kg 가도마이드를 꼬리-정맥 카테터를 통해 주사하였다. 영상을 기울기-에코 순서를 사용하여 수행하였으며, 여기서, 대조 제조(contrast preparation)는 반전 펄스(inversion pulse)의 사용을 포함하였다. 반복 시간은 최소 900 ms이었고, 플립각은 90이었다. 좌심실 벽(LVV) 및 경색(IV)의 부피를, 전용 이미지 분석 소프트웨어를 사용하여 숙련된 관독자에 의해 수동 설계를 통해 평가하였다. 좌심실 벽의 경색 분획으로서 표현되는 경색 크기(IS)는 식  $IS=IV/LVV$ 를 통해 확인하였다.
- [0316] 27마리의 래트를, 좌전 하행 관상동맥의 영구 결찰 및 시트레이트/식염수(n=8), 또는 시트레이트/식염수 내에서 제제화된 저(150  $\mu$ g, n=9) 또는 고(1800  $\mu$ g, n=10) 용량의 VEGF-A 변형된 RNA의 심장내 주사로 처리하였다. 동물을 8일 동안 놔두고, 좌심실 박출 분율 및 경색 크기에 미치는 효과를 경색 유도 후 제1일 및 제8일에 MRI에 의해 평가하였다. 심장 TnI를 심근세포 손상의 바이오마커로서 제1일에 정맥혈 내에서 측정하였다. 2개 용량의 VEGF-A 변형된 RNA가 생성된 VEGF-A를 유사한 양으로 제공하였기 때문에, 2개 그룹 모두로부터의 데이터를 효능 분석에서 풀링하였다. 시트레이트/식염수-처리된 래트와 비교하여, VEGF-A 변형된 RNA를 투여한 동물은 제8일에 유의하게 더 높은 좌심실 박출 분율(도 8b) 및 제1일에 더 낮은 수준의 심장 TnI(도 8d)를 가졌다. 더욱이, 활성적으로 처리된 래트는 비히클-처리된 래트와 비교하여 감소된 경색 크기를 갖는 경향이 있었다(도 8c).
- [0317] 6.8. 실시예 8
- [0318] 피팅겐 미니 돼지에서 LacZ 변형된 RNA 또는 인간 VEGF-A 변형된 RNA의 심장내 주사 후,  $\beta$ -갈락토시다제 및 인간 VEGF-A 단백질의 평가
- [0319] 밤새 단식시킨 암컷 피팅겐 미니 돼지(체중 약 25 kg)를 미다졸람 및 케타민의 근육내 주사를 통해 진정시켰다. 진정 후, 프로포폴에 의한 마취 유도를 위해 정맥내 라인을 귀 변연 정맥(auricular marginal vein)에 놓고, 돼지에 기관내(endotracheally) 삽관하였다. 그런 다음, 돼지를 실험실로 옮기고, 산소 호흡기에 연결하였다. 일반적인 마취는 주기적인 동맥혈 기체 모니터링과 함께 정밀 기화기(precision vaporizer) 및 순환 흡수 호흡 시스템을 통해 전달되는 이소플루란에 의해 유지하였다. 바이탈 사인(심박동수, 혈압, 호흡률, O<sub>2</sub> 맥박 산소측정계, ECG 및 체온)을 실험 전 기간에 걸쳐 연속적으로 모니터링하였다. 정맥내 유체 요법은 혈액 손실을 조정하거나 낮은 전신 혈압의 경우 조정된 속도로 시술 전 기간에 걸쳐 제공되었다. 심장을 노출시키는 좌측 개흉술을 수행하고, LacZ 변형된 RNA 또는 VEGF-A 변형된 RNA(다양한 부피 및 용량에서)를 심외막 표면으로부터 대략 5 mm 깊이에서 좌심실 자유벽에 주사하였다. 주사 부위를 작은 봉합으로 표시하고, 6시간 후, 심장을 절제하였다. 경벽(transmural) 조직 슬랩(slab)을 주사 부위에서 수합하고, 상기 기재된 바와 같이  $\beta$ -갈락

토시다제에 대해 X-gal 염색하였다. VEGF-A 단백질 분석을 위해, 각각의 조직 슬랩을 심외막으로부터 심장내막(endocardium)까지 6개의 별개의 표본들로 나누었다. 이들 표본을 액체 질소 내에서 급속 냉동하고, 하기 기재된 바와 같이 VEGF-A 분석까지 -80℃에서 저장하였다.

[0320] LacZ 또는 VEGF-A 변형된 RNA를 좌심실 자유벽에서 심외막 주사하고, 6시간 후에 조직을 X-gal 염색 또는 VEGF-A 단백질 분석을 위해 시료로 만들었다. LacZ 변형된 RNA를 투여한 돼지에서, β-갈락토시다제의 생성은, 시트레이트/식염수를 사용한 경우와 같이(도 9b) 리포펙타민을 형질감염 배지로서 사용한 경우(도 9a)에 정성적으로 유사하였다.

## [0321] 6.9. 실시예 9

### [0322] 심장 조직에서 인간 VEGF-A 단백질의 정량화

[0323] 포스파타제 저해제 I 및 II 및 프로테아제 저해제(Meso Scale Discovery (MSD), 미국 메릴랜드주 록빌 소재)를 함유하는 Tris 용해 완충제를 동결된 조직 생검에 첨가하고, 균질화 전에 대략 -20℃에서 동결시켰다. 그런 다음, 세라믹 비드(3 mm)를 첨가하고, 시료를 Precellys 균질기 장비를 사용하여 균질화하였다. 균질화물을 원심 분리하고, 상층액을 분석 전에 -80℃에 저장하였다.

[0324] VEGF-A 농도를 전기화학 발광 검출과 함께 샌드위치 면역검정법을 사용하여 확인하였다. MSD V-PLEX 사이토카인 패널 1(인간) VEGF-A 키트를 사용하여, 조직 균질화물 내에서 VEGF-A 농도를 측정하였다. 검정법을 키트 지시 사항에 따라 수행하였다. 표준을 키트 희석제를 이용하여 1/2로 연속적으로 희석시키고, 추가의 대조군을 각각의 배지 내에 포함시켜, 검정법 성능을 모니터링하였다. 시료를 분석 전 및 MSD Sector 600 장비 상에서의 플레이트 판독 전에 키트 희석제를 이용하여 최소 1/10로 희석시켰다.

[0325] 도 10은 시트레이트/식염수 내에서 제제화된 다양한 용량(50 내지 2000 μg/주사)의 VEGF-A 변형된 RNA의 심외막 주사 후 6시간째에 VEGF-A의 용량-의존적 생성을 요약한 것이다. 생성된 단백질의 수준은 주사된 저용량의 VEGF-A 변형된 RNA에서의 포화도를 가리키며, 이는 래트에서의 확인과 일치한다(도 8a).

## [0326] 6.10. 실시예 10

### [0327] 시트레이트 식염수 완충제 내에서 LacZ 및 루시페라제 변형된 RNA 심장 형질감염 및 번역

[0328] 도시된 바와 같이, 심장 주사를 이용하여 75 μg의 LacZ 인코딩 변형된 RNA를 대략 10%의 좌심실에서 형질감염시키고 번역시켰다(도 11a, 도 11b, 도 11c 및 도 11d). 루시페라제 변형된 RNA에 대한 RNA 인 시추 혼성화는 주사 부위에서의 심근의 염색 발현(도 11e 및 도 11f) 및 연속적인 절편에서 면역조직화학 분석을 통해 제시된 상관적인 루시페라제 단백질 발현을 보여주었다(도 11g).

## [0329] 6.11. 실시예 11

[0330] 변형된 RNA를 시트레이트 식염수 완충제와 함께 심장에 주사한 후, VEGF-A 단백질 발현은 포화 가능하고, 다수의 종들에 걸쳐 유사한 약물동력학을 가진다

[0331] VEGF-A 단백질 생성을 비교하기 위해, 시트레이트 식염수 완충제 중 150 μg의 VEGF-A 변형된 RNA, 및 RNAiMax(지질-기반 제제)를 전달 담체로서 사용하여 100 μg의 VEGF-A 변형된 RNA를 래트 심장 내로 주사하였다. 24시간 후, 시트레이트 식염수 완충제(NTB)가 함께 주사된 래트에서의 VEGF-A 단백질 수준은 RNAiMax가 함께 주사된 래트와 유사한 수준이었고, 약물동력학적 프로파일은 유사하였다(도 12a). 단백질 발현은 용량 제한적이었고, 포화 가능하였으며, 종들에 가로질러 관찰되었다(도 12b). 용량이 10배 증가한 경우, 곡선 아래 면적에서는 단지 1.6배 증가가 존재하였다(도 12c).

## [0332] 6.12. 실시예 12

### [0333] 마우스, 래트 및 돼지에서 인간 VEGF-A 변형된 RNA의 심장내 주사 후, 인간 VEGF-A 단백질 생성의 평가

[0334] VEGF-A 단백질 생성을 비교하기 위해, 시트레이트 식염수 완충제 중 150 μg의 VEGF-A 변형된 RNA, 및 RNAiMax(지질-기반 제제)를 전달 담체로서 사용하여 100 μg의 VEGF-A 변형된 RNA를 래트 심장 내로 주사하였다. 24시간 후, 래트에서의 VEGF-A 단백질 수준과 함께, 수컷 C57B1/6 마우스(10 내지 12주령)를 이소플루란을 이용하여 마취시켰다. 좌측 흉곽 구역을 면도하고, 멸균시키고, 삽관 후, 심장을 좌측 개흉술을 통해 노출시켰다. 시트레이트 식염수(하이사이클론 물 중 10 mmol/L 시트레이트, 130 mmol/L 소듐 클로라이드, pH를 소듐 하이드록사이드를 이용해 대략 7.5로 조정함) 내에서 제제화된 100 μg VEGF-A 변형된 RNA(인간 VEGF-A 단백질(VEGF-A)을

인코딩함)를 좌심실 자유벽에서 심장의 정점으로부터 기부 방향으로 주사(50  $\mu$ L)하였다. 주사 후, 흉곽 및 피부를 봉합에 의해 닫고, 과량의 공기를 부드러운 가슴 압박에 의해 흉강으로부터 제거하였다. 후속적으로, 정상 호흡이 구축되었을 때, 마우스를 산소 호흡기로부터 제거하고, 이의 홈 케이지에 되돌려 놓았다. 심장 주사 후 예정된 시점에서, 마우스를 마취시키고, 심장 조직 시료화를 위해 가슴을 다시 열었다. 심장을 절제하고, 우심실, 좌심방 및 우심방을 다듬었다. 잔여 심장 조직(즉, 좌심실 자유벽 및 심실내 중격)을 액체 질소 내에서 급속 냉동시키고, 하기 기재된 바와 같이 VEGF-A 단백질의 분석 시까지  $-80^{\circ}\text{C}$ 에 저장하였다.

[0335] 수컷 Sprague Dawley 래트(체중 250 내지 300 g)를 이소플루란을 이용하여 마취시키고, 무통을 위해 마카인(25 mg/kg) 및 부프레노르핀(0.05 mg/kg)을 피하 주사하였다. 좌측 흉곽 구역을 면도하고, 멸균시키고, 삽관 후, 심장을 제5 늑간 공간에서 좌측 개흉술을 통해 노출시켰다. 시트레이트 식염수(하이사이클론 물 중 10 mmol/L 시트레이트, 130 mmol/L 소듐 클로라이드, pH를 소듐 하이드록사이드를 이용해 대략 7.5로 조정함) 내에서 제제화된 인간 VEGF-A 변형된 RNA(100  $\mu$ g)를 좌심실 자유벽에서 라인을 따라 3개의 개별 주사(각각 20  $\mu$ L, 총 부피 60  $\mu$ L)로서 주사하였다. 주사 후, 흉곽 및 피부를 봉합에 의해 닫고, 과량의 공기를 부드러운 가슴 압박에 의해 흉강으로부터 제거하였다. 후속적으로, 정상 호흡이 구축되었을 때, 래트를 산소 호흡기로부터 연결해 제하고, 이의 홈 케이지로 되돌려 놓았다. 심장 주사 후 예정된 시점에서, 래트를 마취시키고, 심장 조직 시료화를 위해 가슴을 다시 열었다. 심장을 절제하고, 우심실, 좌심방 및 우심방을 다듬었다. 주사 부위를 포함하여 가로방향 슬라이스를 절제하고, 2개의 부분들로 나누었으며, 이들 부분을 액체 질소 내에서 급속 냉동시키고, 하기 기재된 바와 같이 VEGF-A 단백질의 분석 시까지  $-80^{\circ}\text{C}$ 에 저장하였다.

[0336] 밤새 단식시킨 암컷 피팅겐 미니 돼지(체중 약 25 kg)를 미다졸람 및 케타민의 근육내 주사를 통해 진정시켰다. 진정 후, 프로포폴에 의한 마취 유도를 위해 정맥내 라인을 귀 변연 정맥에 놓고, 돼지에 기관내 삽관하였다. 그런 다음, 돼지를 실험실로 옮기고, 산소 호흡기에 연결하였다. 일반적인 마취는 주기적인 동맥혈 기체 모니터링과 함께 정밀 기화기 및 순환 흡수 호흡 시스템을 통해 전달되는 이소플루란에 의해 유지하였다. 바이탈 사인(심박동수, 혈압, 호흡률,  $\text{O}_2$  맥박 산소측정계, ECG 및 체온)을 실험 전 기간에 걸쳐 연속적으로 모니터링하였다. 정맥내 유체 요법은 혈액 손실을 조정하거나 낮은 전신 혈압의 경우 조정된 속도로 시술 전 기간에 걸쳐 제공되었다. 심장을 노출시키는 좌측 개흉술을 수행하고, VEGF-A 변형된 RNA(시트레이트 식염수(하이사이클론 물 중 10 mmol/L 시트레이트, 130 mmol/L 소듐 클로라이드, pH를 소듐 하이드록사이드를 이용해 대략 7.5로 조정함) 내에서 제제화된 100  $\mu$ g)를 심외막 표면으로부터 대략 5 mm 깊이에서 좌심실 자유벽에 주사하였다. 주사 부위를 작은 봉합으로 표시하고, 6시간 후, 심장을 절제하였다. 경벽 조직 슬랩을 수합하였다. VEGF-A 단백질 분석을 위해, 각각의 조직 슬랩을 심외막으로부터 심장내막까지 6개의 별개의 표본들로 나누었다. 이들 표본을 액체 질소 내에서 급속 냉동하고, 하기 기재된 바와 같이 VEGF-A 분석까지  $-80^{\circ}\text{C}$ 에서 저장하였다.

[0337] 도 13a 및 도 13b에 예시된 바와 같이, 생성된 단백질의 양은 주사 후 6시간 및 12시간째에 대략 피크를 이루었고, 생성된 VEGF A 단백질의 규모 및 시간 프로파일은 종들에 걸쳐 유사하였다. 인간 VEGF-A 단백질은 래트에서 주사 후 192시간째에 여전히 심장 조직에서 관찰되었다(도 13b).

### [0338] 6.13. 실시예 13

[0339] **심근경색을 앓은 돼지에서 인간 VEGF-A 변형된 RNA의 심장내 주사 후, 좌심실 기능 및 경색 크기에 미치는 효과**

[0340] 임의의 성별의 34마리의 성적으로 성숙한 Lanyu 미니 돼지(대략 5월령)를 밤새 단식시키고, 마취시킨 다음, 기관내 삽관하고, 산소, 공기 및 이소플루란의 혼합물로 호흡기를 통해 인위적으로 환기시켰다. 바이탈 사인(심박동수, 혈압, 호흡률,  $\text{O}_2$  맥박 산소측정계, ECG 및 체온)을 실험 전 기간에 걸쳐 연속적으로 모니터링하였다. 정맥내 유체 요법은 혈액 손실을 조정하거나 낮은 전신 혈압의 경우 조정된 속도로 시술 전 기간에 걸쳐 제공되었다. 심장을 노출시키는 좌측 개흉술을 수행하고, 중간부-좌전 하행 관상동맥의 영구 폐색을, 동맥이 폐색되지 않은 5마리(삼 그룹)를 제외하고는 모든 돼지들에서 수행하였다. 후속적으로, 가슴을 닫고, 돼지를 이의 펜 토(pen to)에 되돌려 놓은 후 대략 2시간 동안 집중치료실로 옮겼다. 수술 전후에, 진통제 및 항생제를 투여하여, 통증을 경감시키고 감염을 예방하였다.

[0341] 처음 수술 후 7일째에, 돼지를 상기 기재된 바와 같이 제2 수술을 위해 준비해 두고, 수술실로 다시 보냈다. 준비 후, 경색 돼지를 시트레이트/식염수(n=8), VEGF-A 변형된 RNA 저용량(1 mg, n=8), VEGF-A 변형된 RNA 고용량(10 mg, n=8), 또는 자가-조립 나노섬유 내에서 제제화된 재조합 인간 VEGF-A 단백질(n=5)를 이용한 맹검 치료로 무작위로 나누었다. 나노섬유 구조물은 임상용으로 승인을 받지 않긴 했지만, 양성 대조군 요법으로서



포함시켰다(문헌[Lin Y.D. et al., Science Transl Med, (2012) 4:146ra109]; 그 전체가 원용에 의해 본 명세서에 포함됨). 좌측 개흉술 후, 연구 약물을 경색-주변/경색 영역에서 분포된 20회의 심외막 주사로서 투여하였으며, 각각의 주사 부피는 100  $\mu$ L이었다. 시술 후, 돼지를 상기 기재된 바와 같이 치료하였고, 종결 실험을 수행하기 전 2개월 동안 회복되도록 놔두었다.

[0342] 연구 전 기간에 걸쳐, 좌심실 기능의 연속적인 측정을 초음파심장검진법에 의해 평가하였다. 따라서, 심근경색의 유도 직전 및 직후, 연구 약물의 심장내 주사 직전 및 안락사 시에, 단힌-가슴의 돼지에서 마취 하에 측정을 수행하였다. 심장 기능을 3.5 MHz 프로브와 함께 Vivid Q(GE Healthcare, 노르웨이 호르텐 소재)를 사용하여 2D 초음파심장검진법에 의해 평가하였다. 돼지를 좌측 측면의 누운 자세로 놓았다. 복장뼈주위 장축 단면도(parasternal long-axis view)를 M 방식(mode)에 의해 획득하여, 좌심실 박출 분율을 도출하기 위해 좌심실 부피를 측정하였다. 연구 종료(즉, 연구 약물 투여 후 2개월째) 시, 돼지를 상기 기재된 바와 같이 마취시키고, 우측 경동맥 카테터화를 통해 좌심실 강(cavity)에 위치한 압력-부피 루프 기록 카테터(Millar Instruments, 미국 텍사스주 휴스턴 소재)에 의한 침습적인 혈류역학 평가를 위해 기계를 설치하였다. 혈류역학 데이터를 상업적인 소프트웨어(AD Instruments)를 이용하여 분석하였다. 혈류역학 평가 후, 돼지를 안락사시키고, 심장을 수합하였다. 심장을 3회 세척하고, 정점으로부터 유두근 수준까지 5개의 슬라이스로 가공하였다. 각각의 슬라이스에 대해 이미지를 촬영하고, 경색 크기를 상업적인 소프트웨어(ImageJ)를 사용하여 추정하였다. 경색 크기를, 전체 심실의 영역 마이너스(-) 내부 공간의 영역의 퍼센트로서 계산하였다.

[0343] 좌심실 박출 분율(EF)의 연속적인 평가를 연구 과정 동안 수행하였다. 도 14에서 알 수 있듯이, 좌전 하행 관상동맥의 영구 폐색은 대략 65%로부터 45% 미만까지의 EF의 즉각적인 감소와 연관이 있었으며, 연구 약물을 주사하였을 때 폐색 후 7일째에 감소는 유지되었다. 삼 시술 처리된 돼지에서는 이러한 감소가 관찰되지 않았다. 주사 후 2개월째에, VEGF-A 변형된 RNA 또는 자가-조립 나노섬유 내에서 제제화된 재조합 VEGF-A 단백질을 투여한 돼지는 시트레이트/식염수-주사된 돼지와 비교하여 개선된 EF를 갖는 것으로 관찰되었다. 주사일로부터 연구 종료 시까지 EF의 변화를 비교할 때, 시트레이트/식염수 그룹이 아니라 VEGF-A 변형된 RNA 그룹 및 VEGF-A 단백질 그룹 둘 모두에서 통계학적으로 유의한 개선이 관찰되었다. 연구 종료 시 수행한 좌심실 기능의 침습적인 혈류역학 평가는, 각각 시간 경과에 따른 최대 좌심실 압력 발달(dP/dt<sub>최대</sub>, 도 15), 시간 경과에 따라 최소 압력 발달(dP/dt<sub>최소</sub>, 도 16), 수축기말 압력 부피 관계식(ESPVR, 도 17), 이완기말 압력 부피 관계식(EDPVR, 도 18) 및 전부하 동원성 박출 작업량(PRSW, 도 19)의 차이에 의해 입증된 바와 같이 유사한 개선을 보여주었다.

[0344] 경색 크기는 연구 종료 시 조직을 수합한 후 측정하였고, 전반적인 좌심실 경색 크기(슬라이스 2, 3, 4 및 5, 도 20a), 중간부 좌심실 경색 크기(슬라이스 3 및 4, 도 20b) 및 중심부 좌심실 경색 크기(슬라이스 4, 도 20c)로서 정량화하였다. 도 20a, 도 20b 및 도 20c에서 알 수 있듯이, VEGF-A 변형된 RNA뿐만 아니라 VEGF-A 단백질/나노섬유 치료는 시트레이트/식염수-치료된 돼지와 비교하여 경색 크기의 용량-의존적 감소와 연관이 있었다.

## [0345] 6.14. 실시예 14

### [0346] 당뇨병성 마우스에서 상처 치유 모델에서 인간 VEGF-A 변형된 RNA의 생체내 효과

[0347] 이 실험의 목적은, 인간 VEGF-A 변형된 RNA가 지연된 피부 상처 치유의 당뇨병성 마우스 모델에서 대생물활성(bioactivity)을 나타내는지 확인하는 것이었다. 2개의 시도들을, 점 돌연변이로 인해 랩틴 수용체 발현에 결핍을 가지고 건강한 대조군 마우스와 비교하여 지연된 피부 상처 치유를 경험하는 db/db 마우스를 사용하여 수행하였다. db/db 마우스는 상처 치유 가속화를 목적으로 한 다양한 치료의 치유적 효능을 시험하기 위해 공개된 문헌에서 광범위하게 사용되어 왔다. 제1 시도인 1상은 32마리의 수컷 db/db 마우스를 포함하였고, 1) 상처 치유 속도에 미치는 인간 VEGF-A 변형된 RNA의 효과를 평가하며, 2) 치료가 육아 조직 형성에서 비정상상을 유발하였는지 확인하고, 3) 육아 조직에서의 혈관질(vascularity)에 미치는 인간 VEGF-A 변형된 RNA의 효과를 확인하도록 디자인되었다. 제2 시도인 2상은 7마리의 수컷 db/db 마우스를 포함하였고, 신규 봉소-기반 산소-감지 나노입자의 비열측정 영상을 사용하여 시간 경과에 따른 상처의 산소화를 평가하도록 디자인되었다. 간략하게는, 시도의 첫날(제0일)에, 1 cm 직경 전체-두께 피부 상처를 각각의 마우스의 등 부분 상에 수술적으로 만들고, 인간 VEGF-A 변형된 RNA 또는 비히클 대조군(n=8 마우스/그룹)을 상처 주변부에서 즉각 피내 주사하였다. 하위세트의 마우스(n=8 마우스/그룹)에서, 인간 VEGF-A 변형된 RNA 또는 비히클 대조군을 또한, 제3일에 전달하였다. 상처를 테가덤(Tegaderm)을 사용하여 밴드처리(bandage)하고, 마우스를 케이지에 개별적으로 가두었다. 상처의 연속적인 사진들을 후속적인 시점에서 획득하고, 종결 종점(제18일)에서, 상처 조직을 수합하고, 면역조직화학(내피 세포의 경우 CD31+ 염색 및 헤마톡실린 및 에오신(H&E) 염색)을 위해 가공하였다. 2상에서, 단지 제0일

및 제3일에서 투약을 수행한 점을 제외하고는 1상과 유사한 실험 시술 후 산소-감지 나노입자를 상처층에 국소 전달한 후 형광 및 인광의 연속적인 이미지들을 획득하였다. 1상의 결과는, 인간 VEGF-A 변형된 RNA(제0일에 100  $\mu$ g 및 제3일에 100  $\mu$ g)의 순차적인 투약이 비히클 대조군의 순차적인 투약과 비교하여 제6일 및 제10일에 개방된 상처 영역을 유의하게( $p<0.05$ ) 감소시켰으며, 한편 인간 VEGF-A 변형된 RNA 또는 비히클 대조군의 단일 투약은 그러지 않았음을 보여주었다. 초기 시점들(제3일 내지 제6일) 사이에서의 상처 폐쇄의 평균 퍼센트는 비히클 대조군과 비교하여 유의하게 증가되었다. 육아 조직에서 CD31+ 염색은 또한, 인간 VEGF-A 변형된 RNA의 순차적인 투약을 받는 마우스에서 증가되었다. 2상에서, 제6일에 상처에서의 산소 수준 또한, 이중-주사된 비히클 그룹과 비교하여 100  $\mu$ g의 인간 VEGF-A 변형된 RNA의 2회의 순차적인 용량을 받는 마우스에서 유의하게( $p<0.05$ ) 증가되었다. 이 실험은, 당뇨병성 마우스의 등 부분의 피부 상처를 인간 VEGF-A 변형된 RNA의 순차적인 투약으로 치료하는 것이 상처 치유의 초기의(early) 보다 임상적으로-관련된 기(phase) 동안에 상처 치유를 유의하게 가속화함을 지지한다. 가속화된 치유는 초기 시점에서 육아 조직의 혈관화의 증가 및 상처층의 증가된 산소화에 의해 동반된다.

#### 시험 화합물 및 제제

시험 화합물	인간 VEGF-A 변형된 RNA(도 1B)(실시에 14를 수반하는 도면에 나타낸 바와 같은 VEGF-A 변형된 RNA)
제제	시트레이트/식염수(10 mmol/L/130 mmol/L, pH 7.5)

#### 시험 시스템

시험 시스템의 선택에 대한 타당한 이유	사용된 db/db 마우스는 II형 당뇨병의 구축된 모델이고, 방대한 보고들이 야생형 마우스와 비교하여 저하된 상처 치유를 기재하고 있다. db/db 마우스의 저하된 상처 치유는 시험 약물 대생물활성(bioactivity)에 대한 더 긴 치유 기간을 허용한다.
계통	B6.BKS(D)- <i>Lepr<sup>db</sup></i> /J(db/db 마우스)
성별	수컷
동물의 총 마리 수	39(1상: 32 마우스, 2상: 7 마우스)

# 연구 디자인

용량(들)	1상; 1개 주사 부위 당 25 µg VEGF-A 변형된 RNA(각각의 주사 시점에 총 4개의 부위, 총 100 µg/동물). VEGF-A 변형된 RNA 농도 2.5 µg/µL.  1상; 10 mmol/L 시트레이트, NaCl 130 mmol/L의 10 µL 비히클 주사  2상; 각각의 이미징 시점에 대해 1 mg/mL 나노입자 용액 50 µL
투여 부위(들)	상처 주변부의 4개의 위치에서 피내 주사된 10 µL의 VEGF-A 변형된 RNA 또는 비히클(총 40 µL)  2상의 경우 각각의 이미징 시점에서 대략 50 µL의 나노입자 용액이 첨가됨.
투여 경로(들) 및 빈도	제0일 및 제3일에 VEGF-A 변형된 RNA 또는 비히클의 피내 주사. 제0일: 0, 90, 180 및 270° 위치에서 주사됨. 제3일: 45, 135, 225 및 315° 위치에서 주사됨. 제3일 이후에는 주사되지 않음. 각각의 이미징 시점(0, 3, 6, 10, 13 및 18일)에서 상처에 국소 적용된 나노입자 용액.
치료 기간	18일
수/그룹	1상; 8 마우스/그룹 2상; 3 및 4 마우스/그룹(하기 참조)
그룹의 수	1상 4개 그룹 그룹 1; 단일 비히클 주사(제0일, n=8, 1 마리의 마우스는 연구 종료 전에 사망함) 그룹 2; 이중 비히클 주사(제0일 및 제3일, n=8) 그룹 3; 단일 인간 VEGF-A 변형된 RNA 주사(제0일, n=8) 그룹 4; 이중 인간 VEGF-A 변형된 RNA 주사(제0일 및 제3일, n=8, 1 마리의 마우스는 연구 종료 전에 사망함)  2상(나노입자와 함께) 2개 그룹 그룹 1; 이중 비히클 주사(제0일 및 제3일, n=4)

[0350]

	그룹 2; 이중 인간 VEGF-A 변형된 RNA 주사(제0일 및 제3일, n=3)
--	---

[0351]

[0352]

## 실험 절차

[0353]

실험을 2개의 시도인 1상 및 2상으로 나누었다. 1상은 당뇨병성 상처 치유의 맥락에서 인간 VEGF-A 변형된 RNA의 대생물활성을 평가하는 데에만 초점을 맞추었다. 2상은 다시, 동일한 상처 치유 모델에서 인간 VEGF-A 변형된 RNA의 대생물활성을 시험하였을 뿐만 아니라 상처층 내에서의 산소화를 확인하기 위해 산소-민감성 나노입자의 용도를 이용하였다. 하기 열거된 시술은 다르게 주지되지 않는 한, 2개의 시도들에 공통적이다.

[0354]

전 두께 피부 상처(제0일): 마우스를 2% 흡입성 이소플루란/산소 혼합물을 이용하여 마취시키고, 그런 다음, 수술 전에 제모하고 멸균시켰다. 1 cm 직경 원형을 마우스의 등 부분 상에 스텐실을 사용하여 표시하였다. 피부(진피 및 표피 포함)를 윤곽선을 그린 영역으로부터 조심스럽게 절제하여, 전 두께 피부 상처를 형성하였다. 인

간 VEGF-A 변형된 RNA 또는 비히클을 피내 주사하였다. 진통제(부프레노르핀, 0.1 mg/kg)를 수술 후에 투여하고, 상처를 테가덤 드레싱 및 자가-접착 랩(wrap)으로 커버하였다.

[0355] 피내 주사(제0일 및 제3일): 10  $\mu$ L x 4의 인간 VEGF-A 변형된 RNA 또는 비히클(상기에 윤곽선을 그림)을 피부 절제 직후 주사하였다. 제0일(상처를 낸 날)에, 인간 VEGF-A 변형된 RNA 또는 비히클을 상처 주변부 부근으로 0°, 90°, 180° 및 270° 위치에서 피부의 진피층 내로 주사하였다. 제3일에, 인간 VEGF-A 변형된 RNA 또는 비히클을 상처 주변부 부근으로 45°, 135°, 225° 및 315° 위치에서 피내 주사하여, 동일한 위치에서 2회 주사되는 것을 피하였다.

[0356] 이미징 절차(제0일, 제3일, 제6일, 제10일, 제13일 및 제18일): 상처를 이미징하기 전에 자가-접착 랩 및 테가덤 드레싱을 제거하였다. 체질량을 이미징 전에 매일 기록하였다(제0일, 제3일, 제6일, 제10일, 제13일 및 제18일). 이미지를 상처 위의 고정된 거리에서 12 메가픽셀 카메라를 이용하여 획득하였으며, 한편 마우스를 2% 흡입성 이소플루란/산소 혼합물을 이용하여 마취시켰다. 이미징 후, 상처를 새로운 테가덤 드레싱으로 커버하고, 기존의 자가-접착 랩을 이용하여 랩핑하였다(나노입자 이미징을 수행해야 하지 않는 한).

[0357] 산소-민감성 나노입자를 이용한 이미징 절차(제0일, 제3일, 제6일, 제10일, 제13일 및 제18일): 산소 수준에 대한 이미징을 2상에서만 수행하였다. 상기 기재된 바와 같이 이미징 후, 마우스를 마취시킨 채로 유지시키고, 주문 디자인된 이미징 플랫폼이 있는 온도 조절된 현미경 스테이지 상에 놓았다. M-JPEG를 1) 봉소-기반 나노입자(BNP)의 적용 전에 상처의 10개 프레임(3개 프레임/초에서 획득), 및 2) 상처층 내에서 50  $\mu$ L의 나노입자 용액의 과용(superfusion) 후 60개 프레임(3개 프레임/초에서 획득)으로 구성된 각각의 상처에 대해 UV 조명 하에 획득하였다. 이미징 후, 상처를 새로운 테가덤 드레싱으로 커버하고, 기존의 자가-접착 랩으로 랩핑하였다.

[0358] 상처 산소화 이미지 분석: 산소 수준에 대한 이미징을 2상에서만 수행하였다. UV-조명 상처 이미지(상기 기재된 바와 같이 획득)를 주문 기재 MATLAB 프로그램을 사용하여 분석하였다. 백그라운드 신호를 계수하기 위해, 상처층 내에서 선택된 지점들을 나노입자의 첨가 전에 적색 및 청색 채널 강도에 대해 분석하였다. 이들 백그라운드 강도 값을, 나노입자의 첨가 후 획득된 적색 및 청색 강도 값들로부터 뺀다. 적색 채널 강도에 대한 청색 채널 강도의 비율을 각각의 픽셀에 대해 컴퓨터화하여, 인광(산소의 존재 하에 퀀칭(quench)됨)에 대한 형광(BNP의 존재 하에 일정함)의 비율을 나타내었다. 그런 다음, 비율측정 이미지를, 형광-대-인광 비율을 시공간적으로 해상하기(resolve) 위해 비율 경계(ratio bound)까지 등급화된(scale) 256-값 색상 지도를 사용하여 정성적으로 나타내었다. 상처층 내에서 산소의 양을 정량화하기 위해, 미가공 청색 및 적색 채널 강도 값들을 사용하여, 회색스케일 이미지(저 산소; 검정색 픽셀, 고 산소; 백색 픽셀)를 구축하였다. 상처층을 관심 영역으로 선택하고, 평균을 정량화하였으며, 회색 픽셀 값을 ImageJ 소프트웨어를 사용하여 정량화하였다.

[0359] 조직의 수합, 조직학적 절편화 및 염색(제18일): 마우스를 CO<sub>2</sub> 질식을 통해 안락사시키고, 최종 이미지는 상처의 획득이었다. 상처 중심부 부근의 1.5 cm x 1.5 cm 영역을 절제하고, 3개의 별개의 분석을 위해 세로방향으로 1/3로 나누었다. 1/3의 조직을 액체 질소 내에서 급속 냉동시키고, 다운스트림 VEGF 신호전달 단백질의 평가를 위해 보내었다. 중간 1/3의 조직을 10% 포르말린에서 1주일 동안 고정하고, 파라핀 포매를 위해 가공하였다. 5  $\mu$ m 절편을 절단하고, 헤마톡실린 및 에오신(H&E)으로 염색하고 CD31에 대해 염색하였다(Santa Cruz Biotechnology, sc-1506, PECAM-1 (M-20)).

[0360] 혈중 글루코스 측정(제0일 및 제18일): 제0일에 처음 상처를 내기 전에, 모든 마우스들을 음식 없이 페이퍼 베딩 케이지 내에서 4시간 동안 단식시켰다. 상처를 내기 전에 초기 단식 글루코스 측정을 수행하였다. 제18일에 혈액을 수합하면서, 비단식 글루코스 측정을 수행하였고, 적은 양의 혈액 시료를 시료화하였다.

[0361] 데이터 분석

[0362] 상처 영역 정량화: 시도 1 및 2에 대한 시점. ImageJ를 사용하여, 관찰자들은 주변부 상처를 추적하였고, ImageJ는 열린 상처의 영역을 계산하였다. 관찰자들의 판단 사이에서의 차이를 고려하기 위해, 3개의 상처 영역들의 중앙값을 각각의 상처에 대해 기록하였다. 각각의 시점에서의 상처 영역을 초기 상처 영역(제0일)에 대해 정규화하여, 초기 상처 크기들 사이에서의 최소 차이를 고려하였다. 데이터를 반복 측정 2-웨이 ANOVA를 사용하여 통계학적으로 분석하였으며, 이때 유의성은  $p < 0.05$ 에서 주장되었다. 이들 데이터의 3차 스플라인 보간법을 수행하여, 각각 상처의 25%, 50% 및 75% 폐쇄까지의 추정된 시간을 컴퓨터화하였다. 시점들 사이에서 치유 평균 퍼센트를, 잔여 상처 영역의 이전의 퍼센트로부터 잔여 상처 영역의 퍼센트를 뺄으로써 계산하였다. 데이터를 반복 측정 2-웨이 ANOVA를 사용하여 분석하였으며, 이때 유의성은  $p < 0.05$ 에서 주장되었다.

[0363] CD31 염색 분석(1상): 상처 조직의 조직학적 단면을 CD31에 대해 면역염색하였고, 40x 대물렌즈가 있는 투과광



현미경을 사용하여 이미지화하였다. 갈색 채널(양성 CD31 표지화)을 백색 및 검정색까지 역치화하여, 백그라운드 및 비-특이적인 표지화를 제거하였다. CD31 양성 염색의 역치 퍼센트 영역을  $n=3$ 인 각각의 치료군에 대해 계산하였다.

- [0364] 헤마톡실린 및 에오신 염색 분석(1상): 각각의 상처 유래의 파라핀 절편을 H&E를 이용하여 염색하고, 4x 대물렌즈를 사용하는 투과광 현미경을 사용하여 이미지화하였다. 육아 조직을 시각적으로 조사하여, 표피의 두께 및 연속성, 육아 조직의 단면적(폭 및 두께), 및 임의의 비정상적인 조직, 예컨대 혈관종의 존재 또는 부재를 정성적으로 평가하였다.
- [0365] 다운스트림 VEGF 신호전달 분석(웨스턴 블롯)(1상): 피부 조직 시료를 RIPA 용해 완충제(sc-24948, Santa Cruz Biotechnology, 미국 캘리포니아주 산타크루즈 소재)를 이용하여 균질화하고, 원심분리하고, 상층액의 단백질 농도를 Bradford 단백질 검정법(#5000112, Bio-Rad, 미국 캘리포니아주 에르쿨레스 소재)에 의해 확인하였다. 총 단백질 30  $\mu$ g을 폴리아크릴아미드 겔(#3450124, Bio-Rad, 미국 캘리포니아주 에르쿨레스 소재) 상에 로딩하고, 막(#1620232, Bio-Rad, 미국 캘리포니아주 에르쿨레스 소재)으로 옮겼다. 막을 하기 항체를 이용하여 프로브하였다: 항-pAKT 항체(S473, #4060, Cell Signaling, 미국 메사추세츠주 덴버스 소재) 및 항-AKT 항체(#4691, Cell Signaling Technology, 미국 메사추세츠주 덴버스 소재), 항-토끼 IgG 2차 항체(IRDye 800CW, LI-COR biosciences, 미국 네브래스카주 링컨 소재). pAKT 및 AKT 밴드의 정량화를 ImageJ 프로그램 29를 사용하여 수행하였다.
- [0366] 체질량 및 혈중 글루코스 분석: 체질량 및 혈중 글루코스 수준을 반복 측정 2-웨이 ANOVA를 사용하여 통계학적으로 분석하였으며, 이때 유의성은  $p<0.05$ 에서 주장되었다.
- [0367] 산소 정량화 분석(2상): 미가공 나노입자 이미지의 평균 회색도를 반복 측정 2-웨이 ANOVA를 사용하여 통계학적으로 분석하였으며, 이때 유의성은  $p<0.05$ 에서 주장되었다.
- [0368] 결과
- [0369] 상처 영역 측정(1상)으로부터의 결과
- [0370] 1상에 포함된 모든 그룹들에서 db/db 마우스에 대한 체질량을 도 21에 나타낸다. 체질량은, 제13일에 유의한( $p<0.05$ ) 차이가 있었던 단일 주사된 비히클 그룹 및 단일 주사된 VEGF-A 변형된 RNA 그룹을 제외하고는 모든 시점들에서 모든 그룹들에 대해 유사하였다. 이러한 차이는 연구 결과에 영향을 갖지 않는 것으로 생각된다.
- [0371] 제0일 및 제18일에 모든 그룹들에 대해 db/db 마우스에서 단식 및 급식 글루코스 수준을 도 22에 나타낸다. 모든 그룹들은, 제0일에 85 mg/dL의 유의한( $p<0.05$ ) 차이가 있었던 단일 주사된 비히클 그룹 및 단일 주사된 VEGF-A 변형된 RNA 그룹을 제외하고는 유사하였다. 이러한 차이는 연구 결과에 영향을 갖지 않는 것으로 생각된다.
- [0372] 18일간의 관찰 시간 동안 상처 영역의 측정 결과를 도 23 내지 도 25에 나타낸다. 개방된 상처 영역의 폐쇄의 측면에서, 제0일에 단일 주사된 VEGF-A 변형된 RNA 그룹 용량은 18일의 관찰 시간 동안 이의 단일 주사된 비히클 등가물과 비교하여 임의의 유의한 효과를 보여주지 않았다. 한편, 제0일 및 제3일에 VEGF-A 변형된 RNA로 이중 주사된 그룹은, 각각 71%의 개방된 상처 영역을 가진 제6일 및 49%의 개방된 상처 영역을 가진 제10일의 이중 주사된 비히클 그룹과 비교하여, 55% 개방된 상처 영역을 가진 제6일 및 27% 개방된 상처 영역을 가진 제10일에 유의하게( $p<0.05$ ) 더 신속한 폐쇄를 보여주었다(도 23). 곡선 아래 면적은 각각 비히클 단일 주사의 경우 962.83이었으며, 비히클 이중 주사의 경우 998.21이었고, VEGF-A 변형된 RNA 단일 주사의 경우 895.12이었으며, VEGF-A 변형된 RNA 이중 주사의 경우 792.79이었다. 25% 폐쇄까지의 시간은 각각 단일 주사된 비히클의 경우 6.2일, 이중 주사된 비히클의 경우 5.4일, 단일 주사된 VEGF-A 변형된 RNA의 경우 5.1일 및 이중 주사된 VEGF-A 변형된 RNA의 경우 4.2일이었다(도 24). 50% 폐쇄까지의 시간은 각각 단일 주사된 비히클의 경우 8.9일, 이중 주사된 비히클의 경우 9.8일, 단일 주사된 VEGF-A 변형된 RNA의 경우 7.8일 및 이중 주사된 VEGF-A 변형된 RNA의 경우 6.3일이었다(도 24). 75% 폐쇄까지의 시간은 각각 단일 주사된 비히클의 경우 12.3일, 이중 주사된 비히클의 경우 13.7일, 단일 주사된 VEGF-A 변형된 RNA의 경우 12.5일 및 이중 주사된 VEGF-A 변형된 RNA의 경우 10.4일이었다(도 24). 시점들 사이에서 상처 폐쇄의 평균 퍼센트를 비교하였을 때, 이중 주사된 VEGF-A 변형된 RNA 그룹은 제3일 내지 제6일에, 이중 주사된 비히클 그룹의 경우 20% 변화한 것과 비교하여 40% 변화로 유의한( $p<0.05$ ) 차이를 보여주었으며, 한편, 단일 주사된 VEGF-A 변형된 RNA 그룹은 단일 주사된 비히클 그룹과 비교하여 유의성을 보여주지 않았다(도 25).

- [0373] 조직학적 평가(1상)로부터의 결과
- [0374] 제18일에 상처 영역의 H&E-염색된 절편으로부터의 대표적인 결과를 도 26에 나타낸다. 이러한 염색은 비정상적인 조직 구조의 임의의 징후 없이 정상적인 육아 조직을 보여주었다. 도 27에서, 대표적인 CD31 양성 염색은 각각 단일 및 이중 주사된 비히클 및 VEGF-A 변형된 RNA 후, 상처 영역 절편에 대해 보여진다. 도 28에 보여진 상처 영역에서 내피 세포-기반 혈관의 정량화는 각각 단일( $3.2 \pm 0.6$ ) 및 이중( $3.2 \pm 0.6$ ) 주사된 비히클과 비교하여, 단일( $4.3 \pm 4.0$ , 평균 $\pm$ SD) 및 이중( $8.4 \pm 4.4$ ) 주사된 VEGF-A 변형된 RNA 둘 모두에 대해 CD31 양성 염색을 갖는 역치 퍼센트 영역을 증가시켰다.
- [0375] 웨스턴 블롯을 이용하는 다운스트림 VEGF 신호전달 분석(1상)
- [0376] 제18일에 AKT 및 VEGFR2를 포함하여 다운스트림 VEGF 신호전달의 분석 결과를 도 29 및 도 30에 나타낸다. 이들 결과는 제18일(연구 종료)에 임의의 진행중인 다운스트림 신호전달을 보여주지 않았다.
- [0377] 산소 감지 나노입자를 이용한 측정 결과(2상)
- [0378] 2상에서 2개의 그룹, 즉, 이중 주사된 비히클 및 VEGF-A 변형된 RNA에 포함된 db/db 마우스에 대한 체질량을 도 31에서 시간의 함수로서 나타낸다. 체질량은 모든 시점들에서 모든 그룹들에 대해 유사하였다. 2상에서 이중 주사된 비히클 및 VEGF-A 변형된 RNA에 대한 db/db 마우스에서 각각 제0일 및 제18일에 단식 및 급식 글루코스 수준을 도 32에 나타낸다. 단식 및 급식 글루코스 수준은 2개 그룹 모두에서 유사하였다.
- [0379] 2상에서, 산소 민감성 나노입자를 상처 내로 투입하여, 산소화를 추정하였다. 도 33에서, 나노입자 산소 정량화를 증가하는 기술의 도식도를 나타낸다. 실온에서 여기 후, 나노입자는 청색 채널 신호에 의해 포착된 형광 및 적색 신호 채널에 의해 포착된 산소-의존적 인광을 방출한다. 이들 신호를 함께 합한 경우, 그 결과는 상처에서의 상대 산소화의 이미지이다. 도 34에서, 이중 주사된 비히클 마우스 및 이중 주사된 VEGF-A 변형된 RNA 마우스에 대한 대표적인 이미지를 시간의 함수로서 나타낸다. 황색 및 적색은 제3일에 이미, 이중 주사된 비히클 마우스와 비교하여 이중 주사된 VEGF-A 변형된 RNA 마우스의 상처 영역에서 더 두드러진다. 제6일에, 이중 주사된 비히클 그룹과 비교하여 이중 주사된 VEGF-A 변형된 RNA 그룹에 대해 산소화에 있어서 유의한( $p < 0.05$ ) 증가가 존재한다(도 35).
- [0380] 18일의 관찰 시간 동안 상처 영역의 측정 결과를 도 36 내지 38에 나타낸다. 제0일 및 제3일에 이중 주사된 VEGF-A 변형된 RNA 그룹은 제6일에 각각 62% 개방된 상처 영역을 갖는 이중 주사된 비히클 그룹과 비교하여 45% 개방된 상처 영역을 갖고 있어서 유의하게( $p < 0.05$ ) 더 신속한 폐쇄를 보여주었다. 25% 폐쇄까지의 시간은 각각 이중 주사된 비히클의 경우 3.4일이고 이중 주사된 VEGF-A 변형된 RNA의 경우 3.8일이었다. 50% 폐쇄까지의 시간은 각각 이중 주사된 비히클의 경우 7.1일이고 이중 주사된 VEGF-A 변형된 RNA의 경우 5.6일이었다. 75% 폐쇄까지의 시간은 각각 이중 주사된 비히클의 경우 8.9일이고 이중 주사된 VEGF-A 변형된 RNA의 경우 7.8일이었다. 시점들 사이에서 상처 폐쇄의 평균 퍼센트를 비교할 때, 이중 주사된 VEGF-A 변형된 RNA 그룹은 제3일 내지 제6일에 각각 14% 변화를 갖는 이중 주사된 비히클 그룹과 비교하여 40% 변화를 가져서 유의한( $p < 0.05$ ) 차이를 보여주었다.
- [0381] 결론
- [0382] 손상 후 제0일 및 제3일 둘 모두에서 상처 주변부 부근의 4개의 주사 부위 상에 나누어진 100  $\mu$ g VEGF-A 변형된 RNA의 피내 투여는 제6일 내지 제10일에 비히클 대조군과 비교하여 db/db 마우스에서 개방된 상처 영역을 유의하게 감소시켰다.
- [0383] 손상 후 제0일 및 제3일 둘 모두에서 상처 주변부 부근의 4개의 주사 부위 상에 나누어진 100  $\mu$ g VEGF-A 변형된 RNA의 피내 투여는 초기 시점(제3일 내지 제6일) 사이에서 비히클 대조군과 비교하여 상처 폐쇄의 평균 퍼센트를 유의하게 증가시켰다.
- [0384] 손상 후 제0일 및 제3일 둘 모두에서 상처 주변부 부근의 4개의 주사 부위 상에 나누어진 100  $\mu$ g VEGF-A 변형된 RNA의 피내 투여는 제18일에 비히클 대조군과 비교하여, 및 초기 시점(제10일)에서 VEGF-A 변형된 RNA만 투여된 것과 비교하여 육아 조직의 조직학적 단면에서 CD31+ 면역염색 영역을 증가시킨다.
- [0385] 손상 후 제0일 및 제3일 둘 모두에서 상처 주변부 부근의 4개의 주사 부위 상에 나누어진 100  $\mu$ g VEGF-A 변형된 RNA의 피내 투여는 제6일에 비히클 대조군과 비교하여 상처에서의 산소 양을 유의하게 증가시킨다.
- [0386] **6.15. 실시예 15**

[0387] 생체내에서 마우스 귀에서 혈류역학 및 신혈관형성에 미치는 인간 VEGF-A 변형된 RNA의 효과의 광음향 현미경 검사

[0388] 이 실험에서, 인간 VEGF-A 변형된 RNA(VEGF-A 변형된 RNA)에 대한 급성 및 만성 혈관 반응을 생체내에서 건강한 마우스 귀에서 모니터링하였다. 다중-파라미터 광음향 현미경 검사(PAM) 기술을 적용하여, 혈관 직경, 헤모글로빈의 산소 포화도( $sO_2$ ), 혈류 및 신혈관형성에 미치는 VEGF-A 변형된 RNA의 효과를 동력학적으로 특징화하였다. VEGF-A 변형된 RNA, 재조합 인간 VEGF-A 단백질 및 시트레이트/식염수/비히클에 대한 반응의 사이드-바이-사이드(side-by-side) 및 정량적 비교를 수행하였다. 더욱이, 반응의 용량 의존성을, 고-용량( $100 \mu g/\text{귀}$ ) 및 저-용량( $10 \mu g/\text{귀}$ ) VEGF-A 변형된 RNA에 의해 유도된 결과들을 비교함으로써 알아보았다. 연구는, VEGF-A 변형된 RNA가 주사 후 머지않아(30분 내지 6시간) 주사 부위 부근에서 국소 혈류의 뚜렷한 상향조절을 유도하였음을 보여주었다. 또한, 저-용량 VEGF-A 변형된 RNA, VEGF-A 단백질 또는 시트레이트/식염수를 주사한 귀에서가 아니라, 고-용량 VEGF-A 변형된 RNA의 주사 후 7일 내지 14일째에 유의한 모세혈관 혈관신생 및 신혈관형성을 유지하였다. 더욱이, VEGF-A 변형된 RNA는 주사 부위의 미세혈관 혈류 다운스트림에서 놀랍고 공간적으로 국한된 상향조절을 유도하였으며, 이는 인간 재조합 VEGF-A 단백질에 대한 고도로 농축된 반응과는 확연하게 상이하였다.

[0389] 본 연구의 목적은 생체내에서 건강한 마우스 귀에서 혈관 직경, 헤모글로빈의 산소 포화도( $sO_2$ ), 혈류 및 신혈관형성에 미치는 VEGF-A 변형된 RNA의 효과를 다중-파라미터 광음향 현미경 검사(PAM) 기술에 의해 동력학적으로 특징화하는 것이었다.

#### 화합물 및 제제

시험 화합물	인간 VEGF-A 변형된 RNA(도 1B)(실시에 15를 수반하는 도면에 나타낸 바와 같은 VEGF-A 변형된 RNA)
제제	시트레이트/식염수( $10 \text{ mmol/L}/130 \text{ mmol/L}$ , pH 6.5)

[0390]

[0391] 대조군/참조 화합물은 미국 미네소타주 55413 미니애폴리스 614 맥킨리 플레이스 NE 소재의 R&D Systems Inc의 재조합 인간 VEGF-A<sub>165</sub> 단백질이다.

#### 시험 시스템

시험 시스템의 선택에 대한 타당한 이유	모든 동물 실험들을 다중-파라미터 PAM(Ning et al 2015)을 사용하여 수행하였음. 이것이 지금까지, 혈류, 관류, 산소 포화도 및 신혈관형성을 생체내에서 동적으로 및 포괄적으로 특징화할 수 있는 유일하게 이용 가능한 현미경 플랫폼이고, 따라서 이 연구에 이상적으로 적합함.
계통	C57BL/6
성별	암컷
동물의 총 마리 수	12

[0392]

## 연구 디자인

용량(들)	시트레이트/식염수; NA 고-용량 VEGF-A 변형된 RNA; 100 $\mu$ g 중간-용량 VEGF-A 변형된 RNA; 30 $\mu$ g 저-용량 VEGF-A 변형된 RNA; 10 $\mu$ g VEGF-A 단백질; 1 $\mu$ g
투여 부피(들)	10 $\mu$ L
투여 경로(들) 및 빈도 투여	피내, 단일 주사
치료 기간	급성(5분 미만)
수/그룹	1 내지 3
그룹의 수	5
개별 동물 식별 번호/참조 번호	그룹 1, 고-용량(HD) VEGF-A 변형된 RNA 주사됨, 3 마우스: HD no.1, HD no. 2, HD no.3 그룹 2, 저-용량(LD) VEGF-A 변형된 RNA 주사됨, 2 마우스: LD no.1, LD no. 2 그룹 3, 중간-용량(MD) VEGF-A 변형된 RNA 주사됨, 1 마우스: MD no.1 그룹 4, VEGF-A 단백질(P) 주사됨, 3 마우스: P no.1, P no.2, P no.3 그룹 5, 시트레이트/식염수 주사됨, 3 마우스: C/S no.1, C/S no.2, C/S no.3

[0393]

[0394]

### 실험 절차

[0395]

완전히 비-침습적인 마우스 귀 이미징을 위해, 혈관 직경,  $sO_2$ , 혈류, 혈관신생 및 신혈관형성에 미치는 상이한 약물들의 효과를 시간-경과 모니터링하기 위해 동일한 마우스를 반복적으로 이미징화할 수 있다. 마우스 귀의 기준선 이미지를 연구 약물의 피내 주사 전에 획득하였다. 그런 다음, 약물-치료된 귀를 6시간 동안 모니터링하여 급성 혈관 반응을 포착하였고, 제7일에 재이미징화하여 만성 혈류역학 반응 및 가능한 신혈관형성을 기록하였다. VEGF-A 변형된 RNA-유도된 혈관 리모델링의 지속성을 검사하기 위해, 고-용량 VEGF-A 변형된 RNA로 치료된 마우스를 각각 제14일, 제21일 및 제28일에 추가로 이미징화하였다.

[0396]

상세한 PAM 영상 프로토콜은 하기와 같았다: 마우스를 3% 이소플루란 흡입 기체(체중에 따라, 전형적인 유속 1 내지 1.5 L/분)가 충전된 작은 챔버 내에서 마취시켰다. 마취를 실험 전 기간에 걸쳐 1.5% 이소플루란에서 유지시켰다. 의료-등급의 공기를 흡입 기체로서 사용하여, 마우스를 정상적인 생리학적 상태에서 유지시켰다. 순수한 산소는, 정맥혈 산소화를 정상적인 생리학적 수준보다 높게 상승시키고 PAM 측정에 편견을 갖게 하기 때문에 적합하지 않다. 후속적으로, 마우스를 마취 챔버로부터 부근의 정위(stereotaxic) 스테이지로 옮겼다. 마우스의 체온을 가열 패드를 사용하여 37°C에서 유지시켰다. 정위 스테이지에 위치시킨 후, 초음파 젤 층을 이미징화되는 귀의 표면 상에 적용하였다. 젤 내에 공기 방울이 가워지는 것을 피하도록 주의하였다. 그런 다음, 귀를 탈이온수로 채워진 탱크 아래에 두고, 초음파 젤이 폴리에틸렌의 박막에 의해 커버된 탱크 하부와 부드럽게 접촉할 때까지 서서히 상승시켰다. 연고를 눈에 도포하여, 건조 및 우연적인 레이저 피해를 예방하였다. 그런 다음, 음향 렌즈가 물 탱크에 침지될 때까지 이미징 헤드를 낮추었다. 렌즈 아래에 가두어진 임의의 공기 방울을 제거하였다. 따라서, 상부로부터 하부까지 수직방향으로 셋업은 음향 렌즈, 물 탱크, 초음파 젤 및 마우스 귀를 포함하였다. 그런 다음, 레이저 플루언스(laser fluence)를 체크하여, 미국 표준 위원회의 레이저 안전성 표준(즉, 20 mJ/cm<sup>2</sup>) 내에서 작동되도록 보장하였다. 이미지 획득 후, 마우스 귀를 탈이온수로 세척하고, 이의 홈 케이스로 되돌려 놓았다.

[0397]

3개의 혈관 파라미터들을 다중-파라미터 PAM에 의해 동시에 획득하였다(문헌[Ning et al., Simultaneous photoacoustic microscopy of microvascular anatomy, oxygen saturation, and blood flow. Opt Lett, 2015, 40:910-913]). 각각의 시료화 위치에서 PAM-획득 미가공 광음향 신호의 힐베르트(Hilbert)-변환에 의해 혈관 해



부하를 직접적으로 발생시켰다. 혈관  $sO_2$ 를 이중-과장 여기를 이용하여 획득하여, 이들의 광학 흡수 스펙트럼을 통해 옥시- 및 데옥시-헤모글로빈을 구별하였다. 532 nm에서 획득된 100개의 연속적인 A-라인들을 상관관계지음으로써, 혈류 속도를 정량화하였다. 상관관계 분석에 대한 시간창(time window)을 10 ms로 설정하였다. 컴퓨터화된 상관관계 계수의 시간 경과를 2차 지수적 감쇠(second-order exponential decay)를 따르고, 혈류 속도에 선형적으로 비례하는 붕괴 상수를 유동 정량화를 위해 추출하였다. 나아가, 개별 혈관의 평균 직경,  $sO_2$  및 혈류를 문서화된 혈관 분절화 알고리즘의 도움을 받아 추출하였다(문헌[Soetikno et al., Vessel segmentation analysis of ischemic stroke images acquired with photoacoustic microscopy. Proc. SPIE, 2012, 8223:822345]). 각각의 그룹 내의 상이한 동물들의 측정을 통계학적 분석을 위해 조합하였다.

[0398] 데이터 분석

[0399] 나타낸 결과는 평균±SD이다. 시트레이트/식염수, VEGF-A 변형된 RNA 및 인간 재조합 VEGF-A 단백질 치료된 마우스 사이에서 정량적 차이를 조사하기 위해, 반복 측정을 위한 혼합 모델을 통계학적 분석의 수행에 사용하였다. 공분산 매트릭스의 자기회귀 구조를 갖는 개별 인터셉트(intercept) 모델을 기준선으로부터의 혈관 직경 또는 부피 유동 차이에 피팅시켰다. 추가로, 기준선 혈관 직경 또는 부피 유동을 임의의 차이에 대해 보정하기 위한 공변량으로서 사용하였다.

[0400] 결과

[0401] 고용량의 VEGF-A 변형된 RNA를 3마리의 건강한 마우스의 귀에 피내 주사하였다. 혈관 구조,  $sO_2$  및 혈류의 대표적인 시간-경과 PAM 이미지를 도 39에 나타낸다. 주사 후 머지않아(즉, 6시간 이하), 혈관  $sO_2$  및 혈류에서의 유의한 상향조절을 모든 3마리의 마우스에서 주사 부위 주변부에서 관찰하였다. 제7일, 제14일, 제21일 및 제28일에 반복적으로 획득된 PAM 이미지는, 이전에 상향조절된  $sO_2$ 가 점차적으로 다시 퇴보하였고, 한편 혈류는 기준선을 증가하여 유지되었음을 보여주었다. 혈류에서 지속된 상향조절 외에도, 놀라운 혈관신생 및 신혈관형성이 3개의 고-용량 VEGF-A 변형된 RNA-주사된 귀들 중 2개에서 관찰되었다(도 40). PAM 이미지에서 이들 신혈관의 강한 대조는, 이들 신혈관이 적혈구와 함께 고도로 관류되었음을 내포한다. 구체적으로는 도 40에 나타낸 바와 같이, 신혈관은 주사 후 14일째에 나타났으며, 제21일에 퇴보하였고, 제28일에 "사라졌다". 유사하게는, 제2 고-용량 마우스에서, 신혈관은 주사 후 제7일에 나타났고, 제14일에 "사라졌다". 신혈관의 "퇴보/사라짐"은 혈액 관류의 손실로 인한 것일 가능성이 컸다.

[0402] 감소된 VEGF-A 변형된 RNA 투여량이 혈류 상향조절 및 신혈관형성을 유도할 수 있는지 알아보기 위해, 더 낮은 용량의 VEGF-A 변형된 RNA(30  $\mu$ g 및 10  $\mu$ g)에 대한 혈관 반응을 평가하였다. 30  $\mu$ g VEGF-A 변형된 RNA를 주사한 1 마리의 마우스에서,  $sO_2$  및 혈류에서 덜 지속된 상향조절이 유도되었고, 이는 제14일에 기준선으로 다시 퇴보하였다. 주사 부위 주변으로 모세혈관 혈관신생을 생성할 수 있더라도, 두드러진 신혈관형성은 관찰되지 않았다. 2 마리의 마우스에서 VEGF-A 변형된 RNA 투여량을 훨씬 더 낮게(10  $\mu$ g까지) 감소시켜도, 추가의 약화된 혈관 반응이 초래되었다(도 41). 구체적으로, 혈관  $sO_2$  및 혈류에서 급성 상향조절은 약간 더 약하고 덜 지속되었으며(제7일에 기준선으로 다시 퇴보하였음), 주목할 만한 신혈관형성 또는 혈관신생이 관찰되지 않았다. 이들 결과는 추가로, VEGF-A 변형된 RNA에 대한 혈관 반응의 용량 의존성을 확인시켜 준다.

[0403] 비교를 위해, 인간 재조합 VEGF-A 단백질에 대한 혈관 반응을 3 마리의 마우스에서 연구하였다(도 42). 고-용량 및 중간-용량의 VEGF-A 변형된 RNA와 유사하게, VEGF-A 단백질은 7일의 모니터링 기간 전체에 걸쳐 국소  $sO_2$  및 혈류에서 지속된 상향조절을 유도하였다. 그러나, 오로지 매우 온건한(moderate) 모세혈관 혈관신생만 제7일에 3 마리의 마우스 중 2 마리에서 관찰되었고, 신혈관은 모든 경우에 관찰되지 않았다.

[0404] 마지막으로, 3개의 대조군 실험을 수행하여, 시트레이트/식염수에 대한 혈관 반응을 검사하였다. 도 43에 나타낸 바와 같이, 국소  $sO_2$  및 혈류는 주사 후 머지않아 약간 상향조절되었으며, 이는 간질액압 증가로 인한 가능성이 크고, 제7일까지 기준선 수준으로 되돌아 갔다. 혈관신생, 신혈관형성, 또는 염증 반응이 관찰되지 않았다.

[0405] 혈관 분절화를 사용하여, 고-용량 VEGF-A 변형된 RNA, 인간 재조합 VEGF-A 단백질 및 시트레이트/식염수에 대한 혈관 반응을 추가로 정량적으로 비교하였으며, 도 44에 예시한다. VEGF-A 변형된 RNA 및 VEGF-A 단백질의 주사 후 머지않아 급성 및 두드러진 혈관확장 및 유동 상향조절을 관찰하였다. 혈관 직경 및 혈류에서의 온건한 반응을 또한, 시트레이트/식염수 주사에 대한 반응에서 관찰하였고, 이는 간질액압의 증가로 인한 결과일 가능성이 컸다. 반응으로서, 혈관 직경(4개의 혈관들에 걸친 평균)에서 기준선(주사-전)으로부터의 변화를 치료, 및 대조

군으로서 간주되는 시트레이트/식염수에 대해 시간 경과에 걸쳐 비교하였다. 치료와 시간 사이의 상호작용은 통계학적으로 유의하였다( $p < 0.0001$ ). 모든 치료는 제7일에 서로 통계학적으로 상이하였고( $p = 0.0009$ ), VEGF-A 변형된 RNA 및 인간 재조합 VEGF-A 단백질은 6시간째에 식염수와 상이하였다( $p = 0.004$ ). 유사한 분석을 기준선(4개의 혈관들에 걸친 평균)으로부터의 부피 유동의 변화에 대해 수행하였다. 부피 유동의 변화를 치료, 및 대조군으로서 간주되는 시트레이트/식염수에 대해 시간 경과에 걸쳐 비교하였다. 치료와 시간 사이의 상호작용은 통계학적으로 유의하였다( $p = 0.02$ ). 제7일에, VEGF-A 변형된 RNA 및 인간 재조합 VEGF-A 단백질은 시트레이트/식염수와 상이하였다( $p = 0.0015$ ). 주사 후 7일째에, 시트레이트/식염수 그룹에서 혈관 직경 및 혈류는 기준선으로 되돌아갔고, 이는 VEGF-A 변형된 RNA 및 인간 재조합 VEGF-A 단백질 그룹에서 지속된 혈관확장 및 유동 상향조절과 놀라운 대조를 이루었다.

[0406] 국소화된 주사에 대한 미세혈관 반응의 공간 의존성을 추가로 조사하였다. 이를 위해, 직경이  $50 \mu\text{m}$  초과인 모든 주요 혈관들을 혈관 분절화를 사용하여 제거하고, 후속적으로, 잔여 마이크로 혈관을 마이크로분절로 나누었다. 그런 다음, 미세혈관  $\text{sO}_2$  및 혈류를, 개별 마이크로 분절들의 값을 중첩시킴으로써 조직 수준까지 확대시켰다. 중첩에서 가중 인자를, 마이크로분절의 중심(centroid)과 관심 조직의 위치 사이의 거리의 역수(reciprocal)로서 정의하였다. VEGF-A 변형된 RNA의 주사 전(즉, 기준선)에 획득된 조직-수준 유동 및  $\text{sO}_2$  지도를 제7일에 획득된 것으로부터 빼면, 주사 부위의 미세혈관 혈류 다운스트림에서 놀랍고(즉, 약 4배) 공간적으로 국한된 상향조절을 보여주었으며(도 45), 반면 미세혈관  $\text{sO}_2$ 에서의 변화는 온건하였다(도 45). 대조적으로, 미세혈관 유동에서 VEGF-A 단백질-유도된 상향조절은 덜 두드러졌고, 주사 부위를 주변으로 더욱 농축되었으며(도 46), 그러나, 미세혈관  $\text{sO}_2$ 에서의 증가는 더욱 유의하였다. 예상된 바와 같이, 식염수 주사에 대한 미세혈관 반응은 제7일에 없어졌다(도 47).

[0407] 결론

[0408] 다중-파라미터 광음향 현미경 검사 및 혈관 분절화를 사용하여, VEGF-A 변형된 RNA, 인간 재조합 VEGF-A 단백질 및 시트레이트/식염수의 피내 주사에 대한 시공간적 혈관 반응을 모니터링하고 비교하였다. VEGF-A 변형된 RNA는 생체내에서 용량-의존적, 두드러진 및 지속된 혈관확장, 유동 상향조절, 모세혈관 혈관신생 및 신혈관형성을 유도할 수 있는 것으로 언급되었다. 더욱이, VEGF-A 변형된 RNA는 주사 부위의 미세혈관 혈류 다운스트림에서 놀랍고 공간적으로 국한된 상향조절을 유도하였으며, 이는 인간 재조합 VEGF-A 단백질에 대한 고도로 농축된 반응과 확연하게 상이하였다.

[0409] **6.16. 실시예 16**

[0410] **생체내에서 토끼에서 VEGF-A 변형된 RNA의 피내 주사 후, 인간 VEGF-A 단백질의 발현 및 검출**

[0411] 이 실험에서, 시트레이트/식염수 내에서 제제화된 인간 VEGF-A 변형된 RNA(VEGF-A 변형된 RNA)의 피내(id) 주사 후, 토끼 피부에서 VEGF-A 단백질의 생성을 미세투석 기술을 이용하여 연구하였다.

[0412] 2개의 미세투석 프로브를 4 마리의 마취된 토끼 각각에서 좌측 뒷다리 상에 id 삽입하였다.  $t = 0$ 시간(h)에서, 미세투석 프로브 둘 모두에 대한 회복 시간을 시작하였다. 1시간 후, VEGF-A 변형된 RNA(각각  $50 \mu\text{L}$  및  $50 \mu\text{g}$ )의 4회 주사를 각각의 미세투석-프로브에 근접하여 제공하였다. 단백질-함유 용출액을  $t = 2$  h에 시작하여  $t = 6$  h 이하 동안 매시간마다 얼음 상에서 수합하였다. 마지막 용출액 수합 후, 주사 부위 주변의 영역을 절제하였다.

[0413] VEGF-A 변형된 RNA를 주사한 후 3시간째에, 검출 가능한 수준( $218 \pm 155$ , 평균  $\pm$  SEM)의 인간 VEGF-A를 8개의 프로브들 중 3개로부터의 용출액 내에서 확인하였다. 상응하게는, 주사 후 4시간 및 5시간째에, VEGF-A 단백질을 각각 8개의 프로브들 중 5개, 및 8개의 프로브들 중 5개의 용출액에서 검출하였다. 관찰된 농도에서의 큰 변화에도 불구하고; 단백질 수준은 이들 시점에서 안정 상태를 유지하는 경향이 있었다(각각  $369 \pm 217$  및  $360 \pm 203 \text{ pg/mL}$ ).

[0414] 인간 VEGF-A 단백질은 VEGF-A 변형된 RNA의 id 주사 후 3시간 내지 5시간째에 토끼 피부에서 미세투석 기술을 이용하여 검출될 수 있는 것으로 결론내려진다.



## 화합물 및 제제

시험 화합물	인간 VEGF-A 변형된 RNA(도 1B)(실시에 16을 수반하는 도면에 나타낸 바와 같은 VEGF-A 변형된 RNA)
제제	시트레이트/식염수(10 mmol/L/130 mmol/L, pH 6.5)

## 시험 시스템

종	토끼
성별	수컷
동물의 총 마리 수	4

## 연구 디자인

용량(들)	각각의 프로브-부위에서 4개의 주사로 나눈, 총 200 $\mu$ g VEGF-A 변형된 RNA 1마리 동물 당 미세투석 프로브: 2
투여 부위(들)	각각의 프로브-부위에서 4 x 50 $\mu$ L
투여 경로(들) 및 빈도 투여	피내
치료 기간	급성
수/그룹	4
그룹의 수	1

## 실험 절차

마취 및 항상성의 유지: 뉴질랜드 화이트(NZW) 수컷 토끼를 케타민(5 mg/kg, Ketalar®, Pfizer AB, 스웨덴 솔렌투나 소재) 및 메토토미딘(0.15 mg/kg, Domitor®, Orion Pharma, 핀란드 에스포 소재)을 각각 정맥내 볼루스 주사 투여하고, 후속해서 유지 주입(11 및 0.33 mg/kg\*h)함으로써 마취시켰다. 토끼에 삽관술을 실시하고, 실내 공기와 10% O<sub>2</sub>의 혼합물을 Servo 산소 호흡기(900D, Siemens Elema, 스웨덴 솔나 소재)를 이용하여 인위적으로 환기시켰다. 호흡률을 30 사이클/분에서 일정하게 유지시켰다. 실험 전 및 실험 동안에, 동맥혈에서의 혈액 기체 및 pH를 혈액 기체 분석기(ABL800 Flex, Radiometer, 덴마크 코펜하겐 소재)에 의해 측정하고, 필요하다면 일호흡량(tidal volume)을 조정함으로써 토끼에 대한 정상적인 생리학적 범위 내에 속하도록 조정하였다. 동물에 커버를 씌우고 외부 가열에 의해 직장 온도를 38°C와 39.5°C 사이에서 유지시켰다.

동물 준비: 마취제 투여용 경피 폴리에틸렌 카테터(Venflon 0.8 mm, Viggo, 스웨덴 헬싱보리 소재)를 좌측 귀상의 변연 정맥(marginal vein) 내로 삽입하였다. 폴리에틸렌 카테터(Intramedic PE-90 Clay Adams, Becton Dickinson, 미국 메릴랜드주 스팅스 소재)를 각각 동맥 혈압 기록(압력 변환기에 의해, Peter von Berg Medizintechnik GmbH, 독일 키르호시온/에글하르팅 소재) 및 혈액 시료화를 위해 우측 경동맥 내로 삽입하였다. 혈압 측정으로부터의 신호를 컴퓨터 및 소프트웨어(PharmLab V6.6, AstraZeneca R&D 스웨덴 뮐른달 소재)를 사용하여 기록하고, 시료화하였다. 좌측 뒷다리 상의 털을 전기 면도기를 이용하여 제거하였다.

미세투석: 2개의 100 kDa 선형 미세투석 프로브, 즉, 각각의 실험에서 A 및 B(66 선형 카테터 & 66 하이 컷 오프 선형 카테터, M Dialysis AB, 스웨덴 스톡홀름 함마르뷔 소재)를 공급업체에 의해 제공된 지시사항에 따라 토끼의 좌측 뒷다리의 상위부 상에 id 삽입하였다. 미세투석 프로브를 0.5  $\mu$ L/분 생리학적 식염수(9 mg/mL, Fresenius Kabi AG, 독일 바트 훔부르크 소재)를 이용하여 관류시키고, 용출액 시료를 얼음 상에서 예비-칭량된 0.5 mL 튜브(Protein LoBind, Eppendorf AG, 독일 함부르크 소재)에서 수합하였다. 투석막과 수합 튜브 유출구 사이의 죽은 공간은 약 1.5  $\mu$ L이었다. 각각의 용출액의 부피를 확인하였고, 포스페이트 완충 식염수(PBS pH 7.4, gibco® by life technologies™, 영국 페이즐리 소재) 중 2% 소 혈청 알부민(BSA, A7979, Sigma-Aldrich, 미국 미주리주 세인트루이스 소재)을 1:1 조건에서 첨가하였다. 시료를 분석 시까지 -80°C에 저장하였

다.

- [0422] 실험 프로토콜: 실험 디자인은 도 48a에 예시되어 있다. t=0 h에, 2개의 미세투석 프로브 둘 모두에 대한 회수 기간을 시작하였다. 1시간 후(즉, t=1 h), 회수 용출액을 수합하고, 후속적으로 미세투석-프로브 부위에서 4회의 주사를 도 48b에 도시된 바와 같이 수행하였다. 단백질-함유 용출액을 t=2 h로부터 t=6 h까지 매시간마다 수합하고, 상기 기재된 바와 같이 취급하였다. 연구 종료 시, 동물을 치사 iv 용량의 펜토바르비탈 소듐(Allfatal vet, Omnidea AB, 스웨덴 스톡홀름 소재)에 의해 안락사시켰다.
- [0423] 미세투석 용출액 내에서 인간 VEGF-A 단백질의 평가: Gyrolab 플랫폼을, 미세투석 용출액 시료 내에서 발현된 인간 VEGF-A 농도를 확인하는 데 사용하였다. Gyrolab은 마이크로구조 웰을 갖는 친화성 유동-스루(through) 포맷을 사용한다(Gyros, 스웨덴 옉살라 소재). 친화성 포착 컬럼을 스트렙타비딘 코팅된 물질(Gyros)과 함께 함유하는 96 마이크로구조 웰들로 구성된 Gyrolab bioaffy 1000 CD를 사용하였다. 우선, 인간 VEGF A에 대한 비오틴화된 포착 폴리클로날 항체(AF-293-NA, R&D Systems, 영국 애빙던 소재)를 스트렙타비딘 컬럼 상에 고정하였으며, 여기서 시료는 회전 중력(rotation gravity)에 의해 유동 스루하고, 분석물은 항체 상에 포착된다. 그런 다음, 인간 VEGF-A에 대한 Alexa-표지된 검출 항체(R&D Systems)를 컬럼을 통해 유동시켰고, 형광 강도를 리간드의 정량화에 사용하였다. 표준 곡선을 5개의 파라미터 선형 피트를 사용하여 만들었고, 시료 농도를 표준 곡선으로부터 이들의 흡광도에 따라 계산하였다. 16.7 pg/mL 내지 12170 pg/mL 범위의 표준 곡선을 MSD 희석제 9(Meso Scale Discovery, 미국 메릴랜드주 록빌 소재) 중 인간 VEGF-A165(293-VE-010, R&D Systems)를 이용하여 제조하였다. 품질 대조군을 MSD 희석제 9 중 인간 VEGF-A165(영국 국립 생물학적 표준 및 관리 위원회, 영국 하트퍼드셔주 소재)의 WHO 표준으로부터 제조하였다. 모든 표준, QC 및 시료들을 분석 전에 REXXIP HN-max(Gyros)와 1:1로 혼합하였다.
- [0424] 데이터 분석: 결과는 평균±SEM으로서 제시된다.
- [0425] 결과
- [0426] 4 마리의 토끼들(각각 2 마리에 프로브 A 및 B를 삽입함)로부터의 개별 인간 VEGF-A 단백질 수준을 도 49에서 평균±SEM으로서 제시한다. VEGF-A 변형된 RNA를 주사한 후 3시간째에, 검출 가능한 수준( $218 \pm 155$ , 평균±SEM)의 인간 VEGF-A가 8개의 프로브들 중 3개 유래의 용출액에서 확인되었다. 상응하게는, 주사 후 4시간 및 5시간째에, VEGF-A 단백질을 각각 8개의 프로브들 중 5개, 및 8개의 프로브들 중 5개 유래의 용출액에서 검출하였다. 관찰된 농도에서의 큰 변화에도 불구하고, 단백질 수준은 이들 시점에서 안정 상태를 유지하는 경향이 있었다(각각  $369 \pm 217$  및  $360 \pm 203$  pg/mL).
- [0427] 결론
- [0428] 미세투석 기술을 이용하여 검출된 인간 VEGF-A 단백질은 VEGF-A 변형된 RNA의 피내 주사 후 3시간 내지 5시간째에 토끼 피부에서 발현된다.
- [0429] 6.17. 실시예 17
- [0430] 생체내에서 심근경색을 앓은 돼지에서 인간 VEGF-A 변형된 RNA의 심장내 주사 후, 모세혈관 및 세동맥 밀도 및 섬유증에 미치는 효과
- [0431] 모세혈관 및 세동맥 밀도 및 섬유증에 미치는 VEGF-A 변형된 RNA(1 또는 10 mg), 시트레이트/식염수(2 mL) 또는 삼 시술의 효과의 평가를 Lanyu 미니-돼지에서 수행하였다.
- [0432] 모세혈관 및 세동맥 밀도 측정법: 연구 종료 후, 경색-주변 영역 유래의 조직 시료를 4°C에서 4% 파라포름알데하이드 내에서 적어도 24시간 동안 고정한다. 파라핀 포매하였다. 절편화 후, 탈파라핀화 및 재수화, 항원 복구를, 10 mmol/L 소듐 시트레이트 완충제(pH 6) 내에서 10분 동안 끓임으로써 수행하였다. 그런 다음, 절편을 항-심장 트로포닌 I(1:200, DSHB, 미국 아이오와주 아이오와 소재), 항-이소레시틴(1:100, Invitrogen, 미국 캘리포니아주 칼즈배드 소재) 및 SM-22 α(1:200, Abcam, 영국 캠브리지 소재)와 함께 밤새 인큐베이션하였다. 3회 세척 후, 절편을 관련된 Alexa Fluor 488 또는 568 항체(Invitrogen)와 함께 인큐베이션하였다. 핵을 4',6-디아미디노-2-페닐인돌(DAPI, Sigma-Aldrich, 미국 미주리주 세인트루이스 소재)을 이용하여 염색하였다. 마운팅 후, 모세혈관 및 세동맥 밀도를, 경색-주변 구역을 따라 무작위로 선택된 3개의 영역들에서 촬영된 이미지(200x 배율)로부터 수동적으로 계수하고 평균을 넘으로써 계산하였다.
- [0433] 섬유증 측정: 경색/경색-주변 영역으로부터 원거리의 시료를 경색-주변 영역 시료에 대해 상기 기재된 바와 같이 가공하였다. 콜라겐 침착의 함수로서 섬유증을 Masson's 트리크롬 염색을 사용하여 확인하였다. 3개의 무작

위로 선택된 영역들로부터의 이미지를 각각의 절편에 대해 광시야 현미경(200x 배율)을 사용하여 촬영한 다음, 정량화하고(AxioVision, Zeiss, 독일 쾰른 소재) 평균을 내었다.

[0434] **결과**

[0435] 도 50a 및 도 50b는 심근경색의 유도 후 2개월째에 평가된 경색-주변(경계) 구역에서 모세혈관 및 세동맥 밀도에 미치는 삼 시술, 또는 VEGF-A 변형된 RNA(1 또는 10 mg) 또는 시트레이트/식염수(2 mL)의 주사의 효과를 예시하고 있다. 제시된 바와 같이, VEGF-A 변형된 RNA의 주사는 시트레이트/식염수의 주사와 비교하여, 모세혈관 및 세동맥 밀도에서 용량-의존적이고 통계학적으로 유의한 증가와 연관이 있었다.

[0436] VEGF-A 변형된 RNA 대 시트레이트/식염수의 주사는 경색 영역으로부터 원거리에서 수합된 조직 시료에서 콜라겐 함량(즉, 섬유증)을 통계학적으로 유의하게 약화시키는 것으로 나타났다(도 50c).

[0437] **6.18. 실시예 18**

[0438] **시험관내에서 인간 VEGF-A 변형된 RNA 형질감염 후, VEGF-A 단백질 생성의 시간 경로**

[0439] VEGF-A 변형된 RNA 형질감염 후 인간 VEGF-A 단백질 생성의 시간 프로파일을 조사하기 위해, 10,000개의 인간 대동맥 평활근 세포(hAoSMC, Lonza, 스위스 바젤 소재) 또는 유도 만능 세포 유래의 20,000개의 인간 심근세포(hiPS-CM, Cellular Dynamics, 미국 위스콘신주 매디슨 소재)를 96-웰 플레이트 내에, 성장 인자(SmGM-2, Lonza)가 보충된 평활근 세포 기저 배지 또는 완전히 보충된 심근세포 유지 배지(Cellular Dynamics) 내에서 각각 접종하였다. 다음날, 형질감염을 혈청-무함유 배지 내에서 수행하고, 250 ng VEGF-A 변형된 RNA를 리포펙타민 2000(Invitrogen, 미국 캘리포니아주 칼라바도 소재)과 제조업체의 지시사항에 따라 혼합하고, 세포에 첨가하였다. 물과 혼합된 리포펙타민 2000을 형질감염 대조군으로서 사용하였다. 배지를 8시간마다 신선한 배지로 교환하고, 인간 VEGF-A 단백질을 상이한 시점에서 ELISA를 이용하여 상층액 내에서 측정하였다.

[0440] VEGF-A 변형된 RNA로부터 생성된 인간 VEGF-A 단백질의 규모는 인간 대동맥 평활근 세포 및 인간 심근세포 둘 모두에서 형질감염 후 대략 8시간째에 피크를 이루었고, 이후 낮은 수준 방향으로 하락하였다(도 51). 형질감염 후 32시간째에, 단백질은 검출되지 않거나 매우 낮은 수준으로 검출되었다.

[0441] **6.19. 실시예 19**

[0442] **마우스에서 심근경색 후 심의막-유래 세포 팽창의 시간 경과**

[0443] 수컷 C57BL/6 마우스를 이소플루란을 이용하여 마취시키고, 삽관술을 실시한 다음, 산소 호흡기에 연결하고, 공기 및 산소(80/20%)가 보충된 2.5% 내지 3% 이소플루란을 이용하여 인위적으로 환기시켰다. 가열된 작동 표 및 가열 램프에 의해 직장 온도를 37.5°C에서 유지시켰다. 후속적으로, 가슴을 면도하고, 심박동수 및 ECG 평가를 위해 ECG 바늘 전극을 발바닥에 삽입하였다. 피부에 절개를 만들고, 가슴 근육을 조심스럽게 분리한 다음, 가슴 견인기 삽입(chest retractor insertion)을 위해 제4의 늑골사이 공간을 열었다. 심막(pericardium)을 부드럽게 절단하고, 7-0 실크 묶음실(silk ligature)을, 영구 폐색을 위해 좌심방 바로 아래의 좌전 하행 관상동맥 주변에 놓았다. 시각적인 조사(봉합으로부터 원거리에서 좌심실의 창백해짐) 및 ECG의 ST-상승을 통해 허혈증을 확인하였다. 대조군 동물은 동맥 폐색 처리하지 않았다. 그런 다음, 늑골 및 피부를 6-0 흡수 봉합사를 이용하여 닫았다. 진통제(부프레노르핀, 0.05 mg/kg, 10 mL/kg)를 피하 제공하고, 마우스를 이의 케이지에서 전기 가열 패드 상에서 회복하도록 놔두었다. 마우스를 심근경색(MI)-후 제3일, 제7일 및 제14일에 안락사시켰다. 심장을 절제한 다음, 식염수에 행군 후 포르말린 고정하였다. 심의막-유래 세포(EPDC) 활성화를 면역조직화학을 통해 빌름스 중량 단백질 1(Wt-1) 발현에 의해 평가하였다.

[0444] 포르말린-고정된 심장을 정점으로부터 기부까지 1 mm 슬라이스로 가로방향으로 슬라이스하였다. 심장 슬라이스를 에탄올 및 자일렌 내에서 탈수시키고, 파라핀 내에서 포매한 다음, 마지막으로 4  $\mu$ m 슬라이스로 절편화하였다. EPDC의 마커로서 Wt-1에 대한 면역조직화학을, Wt-1에 대한 토끼 폴리클로날항체(희석율 1:200, Calbiochem, 미국 캘리포니아주 샌디에고 소재)를 사용하여 Ventana Discovery XT 자동염색기(autostainer) 내에서 수행하였다. 모든 시약들은 Ventana 제품(Roche, 스위스 바젤 소재)이었다. Wt-1 양성(Wt-1<sup>+</sup>) 세포를 수동적인 점수 시스템에 의해 맹검 평가하였다. 점수는 하기와 같이, 0; Wt-1<sup>+</sup> 세포 없음, 1; 희박한 수의 Wt-1<sup>+</sup> 양성 세포, 2; 심장 내 특정한 수준에 위치한 단일층 내의 몇몇 Wt-1<sup>+</sup> 양성 세포, 3; 심장 내 몇몇 수준에 위치한 온전한 수의 Wt-1<sup>+</sup> 양성 세포, 및 4; 심장 내 몇몇 수준에 위치한 두터운 층 내의 광범위한 수의 Wt-1<sup>+</sup> 양성 세

포로서 정의되었다.

[0445] 몇몇 Wt-1<sup>+</sup> EPDC는 대조군인 비-경색 심장의 심외막에서 확인되었다(도 52a). MI의 유도 후, Wt-1<sup>+</sup> EPDC는 활성화되었고, 팽창하였으며, MI-후 7일째에 그 수가 피크에 도달하였다(도 52b).

[0446] 7. 서열 목록

[0447] 7.1. SEQ ID NO: 1: 실시예에 사용되는 VEGF-A를 인코딩하는 변형된 RNA

5' <sup>7Me</sup>G<sub>ppp</sub> G<sub>2'OMe</sub> GGAAAUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAUAUAAGA  
GCCACCAUGAACUUUCUGCUGUCUUGGGUGCAUUGGAGCCUUGCCUUGCU  
GCUCUACCUCACCAUGCCAAGUGGUCCCAGGCUGCACCCAUGGCAGAAGG  
AGGAGGGCAGAAUCAUCACGAAGUGGUGAAGUUAUGGAUGUCUAUCAGC  
GCAGCUACUGCCAUCCAAUCGAGACCCUGGUGGACAUUCUCCAGGAGUACC  
CUGAUGAGAUCGAGUACAUCUUAAGCCAUCCUGUGUGCCCCUGAUGCGA  
UGCGGGGGCUGCUGCAAUGACGAGGGGCCUGGAGUGUGUGCCCACUGAGGA  
GUCCAACAUCACCAUGCAGAUUAUGCGGAUCAAAACCUCACCAAGGCCAGCA  
CAUAGGAGAGAUGAGCUUCCUACAGCACAAACAAUGUGAAUGCAGACCAA  
AGAAAGAUAGAGCAAGACAAGAAAAUCCCUGUGGGCCUUGCUCAGAGCGG  
AGAAAGCAUUUGUUUGUACAAGAUCGCGAGACGUGUAAAUGUCCUGCAA  
AAACACAGACUCGCGUUGCAAGGCGAGGCAGCUUGAGUAAACGAACGUA  
CUUGCAGAUUGUACAAGCCGAGGCGGUGAUAAUAGGCUGGAGCCUCGGUG  
GCCAUGCUCUUGGCCCUUGGGCCUCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUCCUGC  
ACCCGUACCCCGUGGUCUUAUAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGCAAAAAA  
AA  
AAUCUAG<sub>3'</sub>  
H<sup>+</sup> (SEQ ID NO: 1)

[0448] 여기서:

[0450] A, C, G & U= 각각 AMP, CMP, GMP & N1-메틸-슈도UMP

[0451] Me = 메틸

[0452] p = 무기 포스페이트

[0453] 7.1. SEQ ID NO: 2: 인간 VEGF-A 이소폼 VEGF-165의 아미노산 서열

MNFLLSVHWSLALLLYLHHAKWSQAAPMAEGGGQNHHEVVKFMDVYQRSY  
CHPIETLVDFQEYPDEIEYIFKPSVPLMRCGGCCNDEGLECVPTESNITMQIMR  
IKPHQGQHIGEMSFLQHNKCECRPKKDRARQENPCGPCSERRKHLFVQDPQTCK  
CCKNTDSRCKARQLELNERTCRCDKPRR (SEQ ID NO: 2)

[0455] 7.3. 루시퍼라제 mRNA 구축물

루시퍼라제 mRNA 구축물 (실시예 5 제지 10)	
연구 표적 명칭	루시퍼라제
연구 폴리펩타이드 명칭	파이어플라이 루시퍼라제
주목: 하기 mRNA 서열에서, A, C, G & U = 각각 AMP, CMP, GMP & N1-메틸-슈도UMP임	

[0456]



Cap	Cap, 백시나 캡핑 효소
5' UTR	GGGAAAUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAG AAGAAAUAUAAGAGCCACC (SEQ ID NO: 3)
mRNA 구축물의 ORF (정지 코돈 제외)	AUGGAAGAUGCGAAGAACAUAAGAAGG GACCUGCCCCGUUUUACCCUUGGAGGAC GGUACAGCAGGAGAACAGCUCCACAAGG CGAUGAAACGCUACGCCCUGGUCCCCGGA ACGAUUGCGUUUACCGAUGCACAUAUUG AGGUAGACAUCACAUACGCAGAAUACUU CGAAAUUGUCGGUGAGGCUGGCGGAAGCG AUGAAGAGAUUAUGGUCUUAACACUAAUC ACCGCAUCGUGGUGUGUUCGGAGAACUC AUUGCAGUUUUUCAUGCCGGUCCUUGGA GCACUUUUUCAUCGGGGUCGCAGUCGCGCC AGCGAACGACAUCUACAAUGAGCGGGAA CUCUUGAAUAGCAUGGGAAUCUCCAGC CGACGGUCGUGUUUGUCUCCAAAAAGGG GCUGCAGAAAAUCCUCAACGUGCAGAAAG AAGCUCCCCCAUUAUUCAAAAGAUCAUCA UUAUGGAUAGCAAGACAGAUUACCAAGG GUUCCAGUCGAUGUAUACCUUUGUGACA UCGCAUUUGCCGCCAGGGUUUAACGAGU AUGACUUCGUCCCCGAGUCAUUUGACAG AGAUA AAAACCAUCGCGCUGAUUAUGAAU UCCUCGGGUAGCACCGGUUUGCCAAAGG GGGUGGCGUUGCCCCACCGCACUGCUUGU GUGCGGUUCUCGCACGCUAGGGAUCCUA UCUUUGGUAAUCAGAUCAUUC CCGACAC AGCAAUCCUGUCCGUGGUACCUUUUCAU CACGGUUUUGGCAUGUUCACGACUCUCG GCUAUUUUGAUUUGCGGUUUCAGGGUCGU ACUUAUGUAUCGGUUCGAGGAAGAACUG UUUUUGAGAUCCUUGCAAGAUUACAAGA UCCAGUCGGCCCUCUUGUGCCAACGCUU UUCUCAUUCUUUGCGAAAUCGACACUUA UUGAUAAAGUAUGACCUUUCCAAUCUGCA UGAGAUUGCCUCAGGGGGAGCGCCGCUU AGCAAGGAAGUCGGGGAGGCAGUGGCCA AGCGCUUCCACCUUCCCGGAAUUCGGCAG GGAUACGGGUCACGAGACAACAUC CG CGAUCCUUAUCACGCCCAGGGUGACGA UAAGCCGGGAGCCGUCGGAAAAGUGGUC CCCUUCUUUGAAGCCAAGGUCGUAGACC UCGACACGGGAAAAACCCUCGGAGUGAA

[0457]

	CCAGAGGGGCGAGCUCUGCGUGAGAGGG CCGAUGAUGAUGUCAGGUUACGUGAAUA ACCCUGAAGCGACGAAUGCGCUGAUCGA CAAGGAUGGGUGGUUGCAUUCGGGAGAC AUUGCCUAUUGGGAUGAGGAUGAGCACU UCUUUAUCGUAGAUCGACUUAAGAGCUU GAUCAAUACAAAGGCUAUCAGGUAGCG CCUGCCGAGCUCGAGUCAAUCCUGCUCCA GCACCCCAACAUUUUCGACGCCGGAGUGG CCGGGUUGCCCGAUGACGACGCGGGUGA GCUGCCAGCGGCCGUGGUAGUCCUCGAAC AUGGGAAAACAAUGACCGAAAAGGAGAU CGUGGACUACGUAGCAUCACAAGUGACG ACUGCGAAGAAACUGAGGGGAGGGGUAG UCUUUGUGGACGAGGUCCCGAAAGGCUU GACUGGGAAGCUUGACGCUCGCAAAUUC CGGGAAAUCCUGAUUAAGGCAAAGAAAG GCGGGAAAAUCGCUGUC (SEQ ID NO: 4)
3' UTR	UGAUAAUAGGCUGGAGCCUCGGUGGCCA UGCUCUUGCCCCUUGGGCCUCCCCCAG CCCCUCCUCCCCUCCUGCACCCGUACCC CCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGG GCGGC (SEQ ID NO: 5)
상응하는 아미노산 서열	MEDAKNIKKGPAPFYPLEDGTAGEQLHKAM KRYALVPGTIAFTDAHIEVDITYAEYFEMSV RLAEAMKRYGLNTNHRIVVCSENSLQFFMP VLGALFIGVAVAPANDIYNERELLNSMGISQ PTVVVFVSKGLQKILNVQKKLPILQKHIIMDSK TDYQGFQSMYTFVTSHLPPGFNEYDFVPESF DRDKTIALIMNSSGSTGLPKGVALPHRTACV RFSHARDPIFGNQIIPDTAILSVPFHHGFGM FTTLGYLICGFRVVLMYRFEEELFLRSLQDY KIQSALLVPTLFSEFAKSTLIDKYDLSNLHEIA SGGAPLSKEVGEAVAKRFHLPGIRQGYGLTE TTSAILITPEGDDKPGAVGKVVPFEAKVVD LDTGKTLGVNQRGELCVRGPMIMSGYVNNP EATNALIDKDGWLHSGDIAYWDEDEHFFIV DRLKSLIKYKGYQVAPAELESILLQHPNIFDA GVAGLPDDDAGELPAAVVVLEHGKTMTEK EIVDYVASQVTTAKKLRGGVVFVDEVPGKL TGKLDARKIREILIKAKKGGKIAV (SEQ ID NO: 6)
폴리(A) 꼬리	100 nt

[0458]



[0459]

7.4. LacZ mRNA 구축물

LacZ mRNA 구축물 (실기예 4, 8 및 10)	
주목: 하기 mRNA 서열에서, A, C, G & U = 각각 AMP, CMP, GMP & N1-메틸-슈도UMP임.	
뉴클레오타이드 서열 (5' UTR, ORF, 3' UTR)	UCAAGCUUUUUGGACCCUCGUACAGAAGC UAAUACGACUCACUAUAGGGAAAUAAGA GAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAUAUAA GAGCCACCAUGGCCUUGGCUGUCGUCCUG CAAAGAAGAGAUUGGGAAAAUCCUGGAG UUACGCAACUGAAUAGACUCGCCGCACA UCCACCGUUCGCGUCCUGGCGAAAUAGCG AAGAAGCGCGGACCGACAGACCUUCGCA GCAGCUGCGCUCUCUCAACGGGGAAUGG CGGUUCGCAUGGUUUCGGGCUCCUGAGG CAGUCCCGGAAAGCUGGCUCGAGUGCGA CCUCCCGGAAGCCGAUACGGUGGUGGUG CCGUCAAAUUGGCAAAUGCAUGGAUACG ACGCCCCCAUCUACACCAACGUCACUUA CCUAUCACCGUGAAUCCCCCAUUCGUCCC GACUGAGAACCCGACUGGAUGCUACAGC CUGACCUUUAACGUGGACGAGUCGUGGC UGCAAGAAGGGCAGACUCGCAUCAUUUU CGACGGAGUCAACUCCGCGUCCAUCUUU GGUGUAACGGACGGUGGGUGGGAUACGG GCAGGACUCCAGGCUGCCGAGCGAAUUC GACUUGUCAGCCUCCUGCGCGCCGGCGA AAACCGCCUGGCUGUCAUGGUCCUUAGA UGGUCGGAUGGCUCGUACCUGGAGGAUC AGGACAUGUGGAGGAUGUCAGGGAUCUU CCGGGGAUGUCUCGCUGCUCCACAAGCCAA CUACCCAGAUCUCCGACUUUCAUGUGGCC ACCCGCUUCAACGAUGACUUCAGCAGGGC GGUUCUGGAAGCCGAGGUGCAA AUGUGC GGAGAACUGAGGGACUACCUCCGCGUGA CUGUCUCGCUCUGGCAGGGUGAAACCCA AGUGGCUUCAGGCACUGCACCGUUCGGA GGAGAAAUCAUCGACGAACGGGGAGGAU ACGCCGAUCGCGUCACCCUGCGCCUCAU GUGGAAAAUCCGAAACUGUGGUCGGCAG AAAUCCCUAAUUUGUACCGGGCCGUGGU GGAGCUGCACACCGCCGACGGAACUCUGA UCGAGGCCGAGGCAUGCGAUGUGGGAUU

[0460]

	<p>             CCGCGAGGUCCGCAUCGAAAAUGGACUG              CUUCUGCUUAAUGGCAAACCGCUGCUCA              UCCGCGGAGUGAACAGACACGAGCAUCA              CCCGUGCACGGUCAGGUCAUGGAUGAA              CAGACUAUGGUGCAAGACAUCUGCUGA              UGAAACAAAAACAACUUAACGCCGUUCG              GUGCUCCCAUUACCCUAAUCACCCGUUGU              GGUAUACCCUUUGCGAUCCGUACGGCCU              CUACGUGGUGGACGAAGCGAACAUCGAG              ACUCACGGAAUGGUCCCUAUGAACCGCCU              CACUGACGACCCGAGGUGGCUCGCGCAA              UGUCGGAACGAGUGACUCGGAUGGUGCA              GAGGGACCGCAACCAUCCGUCGGUGAUA              AUCUGGUCGCUGGGGAACGAAUCUGGCC              ACGGAGCUAACCACGAUGCGCUGUACCGC              UGGAUUAAGUCCGUGGACCCAAGCCGGC              CCGUCCAGUACGAAGGAGGUGGUGCUGA              UACCACUGCAACCGACAUCAUCUGCCCAA              UGUAUGCGCGGGUGGAUGAGGACCAACC              UUUCCCGCGCGUGCCAAAGUGGUCCAUC              AAGAAAUGGCUCUCGCUGCCCGGAGAAA              CGCGCCCGCUGAUCCUGUGCGAAUAUGCG              CACGCUAUGGGAAAUUCACUGGGGGGAU              UUGCGAAGUACUGGCAGGCUUUUCGACA              GUACCCGAGACUCCAGGGUGGCUUCGUG              UGGGACUGGGUUGACCAGAGCCUCAUCA              AAUACGAUGAAAACGGCAACCCAUGGUC              CGCGUACGGCGGAGACUUUGGAGACACC              CCUAACGAUCGCCAGUUCUGCAUGAACG              GCCUGGUGUUCGCCGACAGAACUCCGCAU              CCAGCCCUUACUGAGGCUAAGCACCAACA              ACAGUUCUCCAGUUCAGACUGUCGGGG              CAAACGAUCGAAGUGACUCCGAAUACC              UCUUCCGGCAUUCGGACAACGAGUUGCU              GCACUGGAUGGUCGCCCUGGAUGGAAAG              CCCUCGCCUCCGGAGAAGUGCCGCUCGA              CGUGGCGCCGCAGGGAAAGCAGUUGAUC              GAGUUGCCGGAACUGCCACAGCCCGAGUC              AGCAGGACAGCUCUGGCUUACCGUCAGA              GUCGUGCAGCCAAAUGCCACCGCCUGGUC              GGAGGCAGGACAUAUUUCAGCCUGGCAG              CAGUGGCGCCUCGCCGAGAAUCUGAGCG              UGACCUUGCCAGCAGCCUCACACGCCAUU              CCGCAUCUGACCACGUCCGAAAUGGACUU              UUGUAUCGAACUGGGGAAUAAGCGCUGG              CAGUUCAUUCGGCAAUCAGGCUUCCUGU           </p>
--	--

[0461]

	<p>CCCAGAUGUGGAUUGGUGACAAGAAGCA  GCUCCUGACCCCGCUGCGCGAUCAGUUCA  CUCGCGCCCCACUUGACAACGACAUUGGC  GUGAGCGAGGCCACGCGUAUCGAUCCAA  ACGCUUGGGUGGAGCGCUGGAAGGCGGC  UGGCCACUAUCAGGCGGAGGCCGCGCUC  UGCAGUGUACCGCGGAUACCCUCGCAGAC  GCCGUUCUGAUUACCACGGCGCAUGCCUG  GCAACACCAGGGAAAAGACCCUGUUUAUC  AGCCGCAAAACUUACCGGAUCGAUGGCA  GCGGCCAAAUGGCGAUCACUGUGGACGU  CGAGGUGGCAUCAGACACUCCACACCCAG  CACGGAUCGGACUCAAUUGCCAACUGGC  UCAAGUGGCUGAGAGAGUCAAUUGGCUG  GGCCUCGGCCCCCAAGAGAACUACCCUGA  UCGGCUUACUGCCGCAUGCUUUGACCGG  UGGGAUCUGCCUCUGUCGGAUAUGUACA  CCCCCUACGUGUCCCCAUCCGAGAACGGU  CUGAGAUGCGGUACUAGGGAGUUGAACU  ACGGACCGCACCAAUGGAGGGGGGACUU  UCAGUUAACAUCUCAAGAUACAGCCAG  CAGCAAUUGAUGGAAACCUCGCACCGGC  AUCUCUUGCAUGCAGAGGAAGGGACCUG  GCUGAACAUCAUGGAUUCCACAUGGGA  AUUGGUGGGGAUGACUCCUGGUCCCCUA  GCGUGUCCGCGGAACUUCAGCUGUCCGCC  GGCCGGUACCACUACCAGCUCGUGUGGU  GUCAAAAGUGAUAAUAGGCUGGAGCCUC  GGUGGCCAUGCUUCUUGCCCCUUGGGCCU  CCCCCAGCCCCUCCUCCCCUCCUGCAC  CCGUACCCCCGUGGUCUUUGAAUAAAGU  CUGAGUGGGCGGCUCUAGA (SEQ ID NO: 7)</p>
ORF 아미노산 서열	<p>MALAVVLQRRDWENPGVTQLNRLAAHPPF  ASWRNSEEARTDRPSQQLRSLNGEWRFAWF  PAPEAVPESWLECDLPEADTVVVPSNWQMH  GYDAPIYTNVTYPITVNPPFVPTENPTGCYSL  TFNVDES WLQEGQTRIIFDGVNSAFHLWCNG  RWVGYGQDSRLPSEFDLSAFLRAGENRLAV  MVLRWSDGSYLEQDMWRMSGIFRDVSL  HKPTTQISDFHVATRFNDDFSRAVLEAEVQM  CGELRDYLRVTVSLWQGETQVASGTAPFGG  EIIDERGGYADRVTLRLNVENPKLWSAEIPN  LYRAVVELHTADGTLIEAEACDVGFREVRIE  NGLLLLNGKPLLIRGVNRHEHHPLHGQVMD  EQTMVQDILLMKQNNFNNAVRC SHYPNHPL  WYTLCDRYGLYVVDEANIETHGMVPMNRL</p>

[0462]

	<p>TDDPRWLPAMSERVTRMVQRDRNHPSVIIW  SLGNESGHGANHDALYRWIKSVDPSPVQY  EGGGADTTATDIICPMYARVDEDQPPAVPK  WSIKKWLSLPGETRPLILCEYAHAMGNSLGG  FAKYWQAFRQYPRLQGGFVWDWVDQSLIK  YDENGNPWSAYGGDFGDTPNDRQFCMNGL  VFADRTPHPALTEAKHQQQFFQFRLSGQTIE  VTSEYLFRHSDNELLHWMVALDGKPLASGE  VPLDVAPQGKQIIEPELPQESAGQLWLTV  RVVQPNATAWSEAGHISAWQQWRLAENLS  VTLPAASHAIPHLTTSEMDFCIELGNKRWF  NRQSGFLSQMWIGDKKQLLTPLRDQFTRAPL  DNDIGVSEATRIPNAWVERWKAAGHYQAE  AALLQCTADTLADAVLITTAHAWQHKGKTL  FISRKTYRIDGSGQMAITVDVEVASDTPHPA  RIGLNCQLAQVAERNWLGLGPQENYPDRL  TAACFDRWDLPLSDMYTPYVFPSENGLRG  TRELNYGPHQWRGDFQFNISRYSQQQLMET  SHRHLLHAEETWLNIDGFHMGIGGDDSW  PSVSAELQLSAGRYHYQLVWCQK (SEQ ID  NO: 8)</p>
ORF 뉴클레오타이드 서열	<p>AUGGCCUUGGCUGUCGUCCUGCAAAGAA  GAGAUUGGGAAAAUCCUGGAGUUACGCA  ACUGAAUAGACUCGCCGCACAUCCACCGU  UCGCGUCCUGGCGAAAUAGCGAAGAAGC  GCGGACCGACAGACCUUCGCAGCAGCUGC  GCUCUCUCAACGGGGAAUGGCGGUUCGC  AUGGUUUCGGCUCUGAGGCAGUCCCG  GAAAGCUGGCUCGAGUGCGACCUCCCGG  AAGCCGAUACGGUGGUGGUGCCGUCAAA  UUGGCAAAUGCAUGGAUACGACGCCCC  AUCUACACCAACGUCACUUACCCUAUCAC  CGUGAAUCCCCCAUUCGUCCCGACUGAGA  ACCCGACUGGAUGCUACAGCCUGACCUUU  AACGUGGACGAGUCGUGGCUGCAAGAAG  GGCAGACUCGCAUCAUUUUCGACGGAGU  CAACUCCGCGUCCAUCUUUGGUGUAAC  GGACGGUGGGUGGGAUACGGGCAGGACU  CCAGGCUGCCGAGCGAAUUCGACUUGUC  AGCCUUCUGCGCGCCGGCGAAAACCGCC  UGGCUGUCAUGGUCCUUAGAUGGUCCGA  UGGCUCGUACCUGGAGGAUCAGGACAUG  UGGAGGAUGUCAGGGAUCUUCGCGGAUG  UCUCGCUGCUCCACAAGCCAACUACCCAG  AUCUCCGACUUUCAUGUGGCCACCCGCUU  CAACGAUGACUUCAGCAGGGCGGUUCUG</p>

[0463]

	GAAGCCGAGGUGCAAAUGUGCGGAGAAC UGAGGGACUACCUCGCGUGACUGUCUC GCUCUGGCAGGGUGAAACCCAAGUGGCU UCAGGCACUGCACCGUUCGGAGGAGAAA UCAUCGACGAACGGGGAGGAUACGCCGA UCGCGUCACCCUGCGCCUCAUUGUGGAAA AUCCGAAACUGUGGUCGGCAGAAAUCCC UAAUUUGUACCGGGCCGUGGUGGAGCUG CACACCGCCGACGGAACUCUGAUCGAGGC CGAGGCAUGCGAUGUGGGAUUCCGCGAG GUCCGCAUCGAAAUGGACUGCUUCUGC UUAAUGGCAAACCGCUGCUCAUCCGCGG AGUGAACAGACACGAGCAUACCCGCUGC ACGGUCAGGUCAUGGAUGAACAGACUUAU GGUGCAAGACAUCCUGCUGAUGAAACAA AACAAUUAACGCCGUUCGGUGCUCCCA UUACCCUAAUCACCCGUUGUGGUUAUACCC UUUGCGAUCGGUACGGCCUCUACGUGGU GGACGAAGCGAACAUCGAGACUCACGGA AUGGUCCCUAUGAACCGCCUCACUGACGA CCCGAGGUGGCUCCCGGCAUUGUCGGAAC GAGUGACUCGGAUGGUGCAGAGGGACCG CAACCAUCCGUCGGUGAUAAUCUGGUCC CUGGGGAACGAAUCUGGCCACGGAGCUA ACCACGAUGCGCUGUACCGCUGGAUUA GUCCGUGGACCCAAGCCGGCCCGUCCAGU ACGAAGGAGGUGGUGCUGAUACCACUGC AACCGACAUCAUCUGCCCAAUGUAUGCGC GGGUGGAUGAGGACCAACCUUCCCGGC GGUGCCAAAGUGGUCCAUAAGAAAUUGG CUCUCGCUGCCCGGAGAAACGCGCCCGCU GAUCCUGUGCGAAUAUGCGCACGCUAUG GGAAAUUCACUGGGGGGAUUUGCGAAGU ACUGGCAGGCUUUUCGACAGUACCCGAG ACUCCAGGGUGGCUUCGUGUGGGACUGG GUUGACCAGAGCCUCAUCAAUACGAUG AAAACGGCAACCCAUGGUCCGCGUACGGC GGAGACUUUGGAGACACCCCUAACGAUC GCCAGUUCUGCAUGAACGGCCUGGUGUU CGCCGACAGAACUCCGCAUCCAGCCCUUA CUGAGGCUAAGCACCAACAACAGUUCUU CCAGUUCAGACUGUCGGGGCAAACGAUC GAAGUGACUCCGAAUACCUCUCCGGC AUUCGGACAACGAGUUGCUGCACUGGAU GGUCGCCCUGGAUGGAAAGCCCCUCGCCU CCCGAGAAGUGCCGCUCGACGUGGCGCCG
--	--

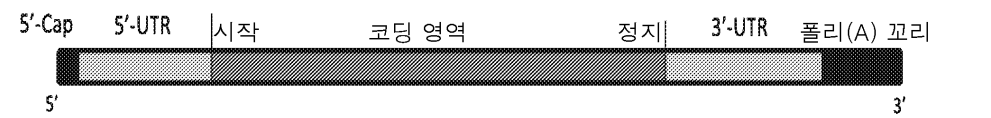
[0464]



	CAGGGAAAGCAGUUGAUCGAGUUGCCGG AACUGCCACAGCCCGAGUCAGCAGGACAG CUCUGGCUUACCGUCAGAGUCGUGCAGCC AAAUGCCACCGCCUGGUCGGAGGCAGGA CAUAUUUCAGCCUGGCAGCAGUGGCGCC UCGCCGAGAAUCUGAGCGUGACCUUGCC AGCAGCCUCACACGCCAUUCCGCAUCUGA CCACGUCCGAAAUGGACUUUUGUAUCGA ACUGGGGAAUAAGCGCUGGCAGUUCAAU CGGCAAUCAGGCUUCCUGUCCCAGAUU GGAUUGGUGACAAGAAGCAGCUCCUGAC CCCGCUGCGCGAUCAGUUCACUCGCGCCC CACUUGACAACGACAUUGGCGUGAGCGA GGCCACGCGUAUCGAUCCAAACGCUUGG GUGGAGCGCUGGAAGGCGGCUGGCCACU AUCAGGCGGAGGCCGCGCUCCUGCAGUG UACCGCGGAUACCCUCGCAGACGCCGUUC UGAUUACCACGGCGCAUGCCUGGCAACAC CAGGGAAAGACCCUGUUUAUCAGCCGCA AAACUUACCGGAUCGAUGGCAGCGGCCA AAUGGCGAUCACUGUGGACGUCGAGGUG GCAUCAGACACUCCACACCCAGCACGGAU CGGACUCAAUUGCCAACUGGCUCAAGUG GCUGAGAGAGUCAAUUGGCUGGGCCUCG GCCCCAAGAGAACUACCCUGAUCGGCUU ACUGCCGCAUGCUUUGACCGGUGGGAUC UGCCUCUGUCGGAUAUGUACACCCCUAC GUGUUCCCAUCCGAGAACGGUCUGAGAU GCGGUACUAGGGAGUUGAACUACGGACC GCACCAUUGGAGGGGGGACUUUCAGUUC AACAUCAAGAUACAGCCAGCAGCAAU UGAUGGAAACCUCGCACCGGCAUCUCUU GCAUGCAGAGGAAGGGACCUGGCUGAAC AUCGAUGGAUCCACAUGGGAAUUGGUG GGGAUGACUCCUGGUCCCCUAGCGUGUCC GCGGAACUUCAGCUGUCCGCCGGCCGGUA CCACUACCAGCUCGUGUGGUGUCAAAG (SEQ ID NO: 9)
--	--

도면

도면1a

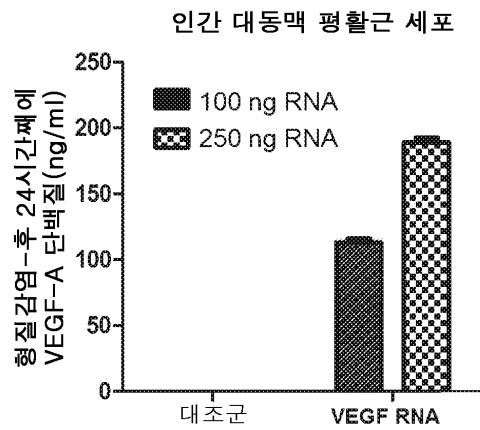


# 도면1b

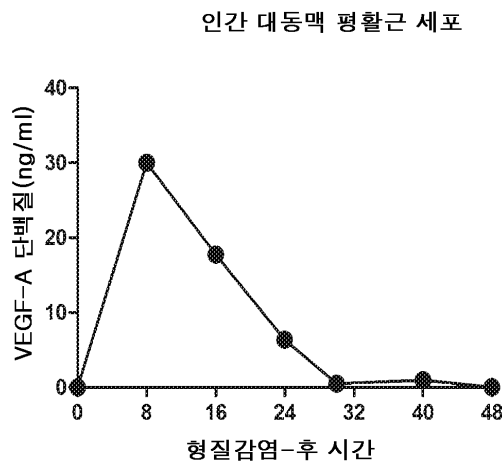
5' <sup>7Me</sup> G<sub>ppp</sub> G<sub>2'OMe</sub> GGAAUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAUAUAAGAGCCACCAUGAACUUUCUGCUGUCUUG  
GGUGCAUUGGAGCCUUGCCUUGCUGCUCUACCUCCACCAUGCCAAAGUGGUCCAGGCUGCACCCAUGGCAGAAG  
GAGGAGGGCAGAAUCAUCACGAAGUGGUGAAGUJCAUGGAUGUCUUAUCAGCGCAGCUACUGCCAUCCAUCGAG  
ACCCUGGUGGACAUUCUCCAGGAGUACCCUGAUGAGAUUCGAGUACAUUCUUAAGCCAUCCUGUGUGCCCCUGAU  
GCGAUGCGGGGGCUGCUGCAAUGACGAGGGCCUGGAGUGUGUGCCACUGAGGAGUCCAACAUCACCAUGCAG  
AUUAUUGCGGAUCAAAACCUCACCAAGGCCAGCACAUAAGGAGAGAUAGCUUCCUACAGCACAACAAUUGUGAAUGC  
AGACCAAGAAAGAUAGAGCAAGACAAGAAAAUCCUGUGGGCCUUGCUCAGAGCGGAGAAAGCAUUUGUUUGUA  
CAAGAUCCGCAGACGUGUAAAUGUUCUGCAAAAAACACAGACUCGCGUUGCAAGGCGAGGCAGCUUGAGUUAAC  
GAACGUACUUGCAGAUUGACAAGCCGAGGCGGUGAUAAUAGGCUUGGAGCCUCGGUGGCCAUGCUUCUUGCCCC  
UUGGGCCUCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUCCUGCACCCCGUACCCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGG  
CGGCAA  
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAUCUAG<sub>OH</sub> 3'

여기서:  
A, C, G & U = 각각 AMP, CMP, GMP & N1-메틸-슈도UMP임  
Me = 메틸  
p = 무기 포스페이트

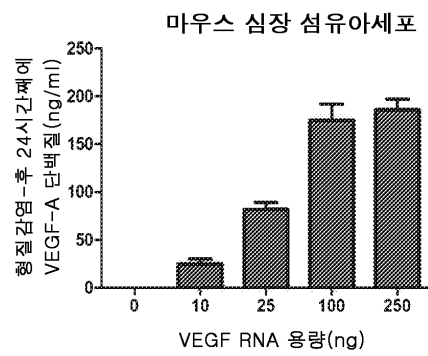
# 도면2a



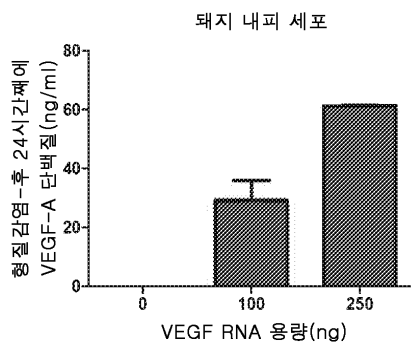
# 도면2b



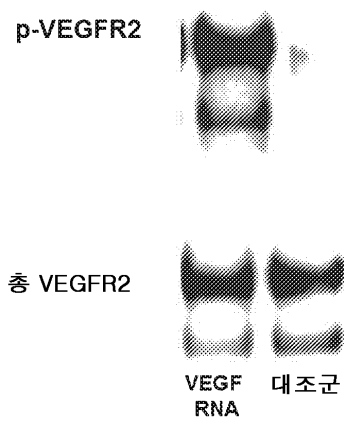
도면2c



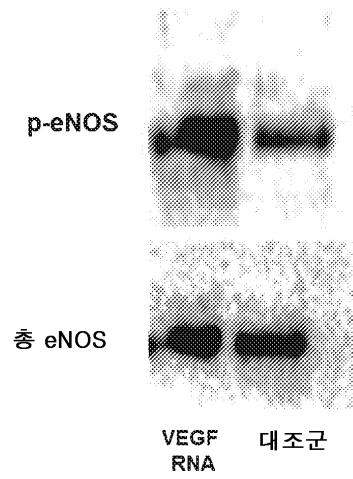
도면2d



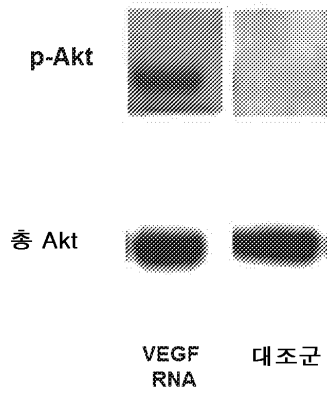
도면3a



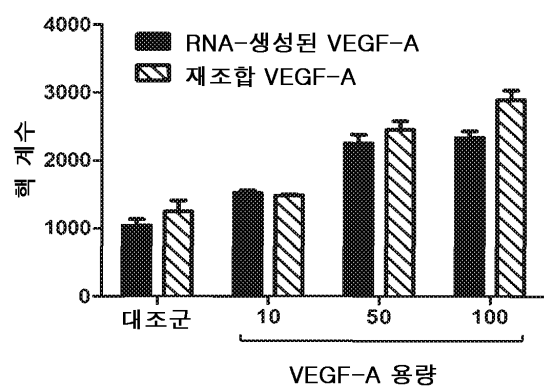
도면3b



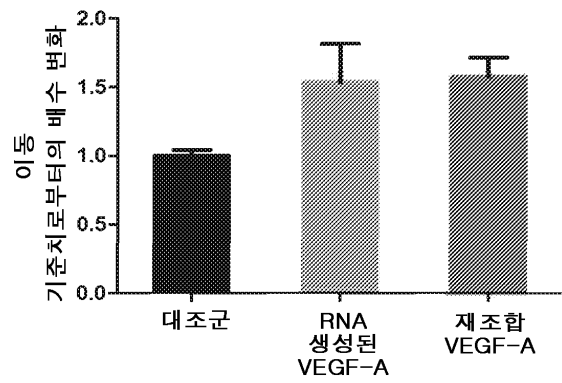
도면3c



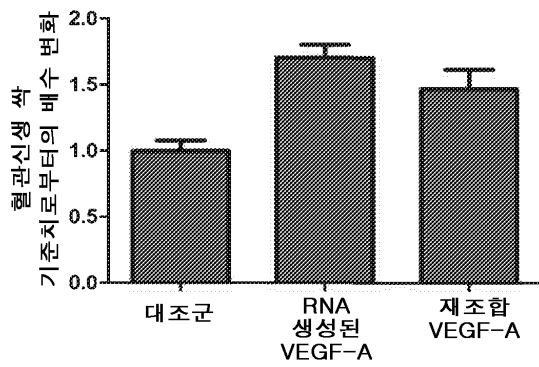
도면4a



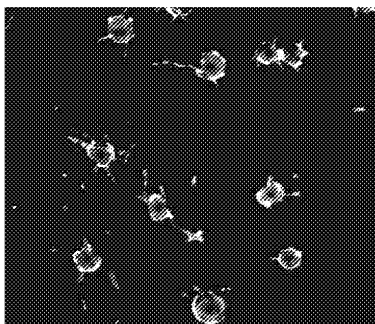
도면4b



도면4c



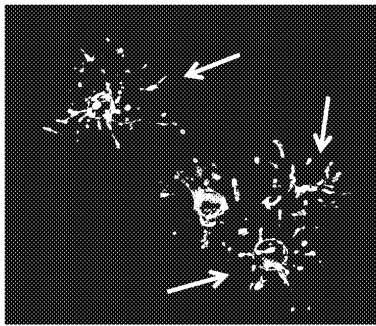
도면5a



대조군

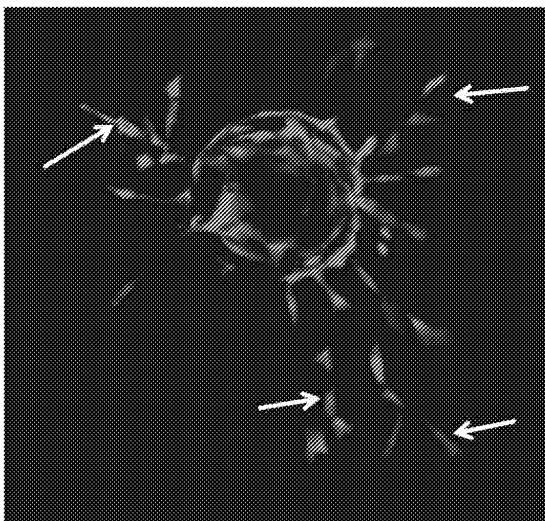


도면5b



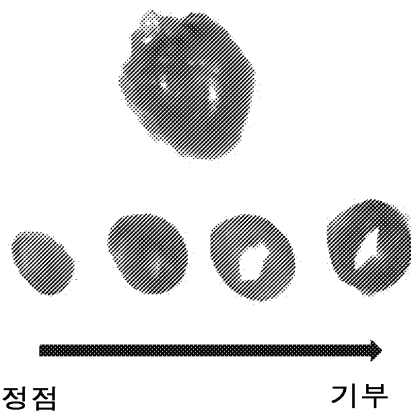
RNA-생성된  
VEGF-A

도면5c

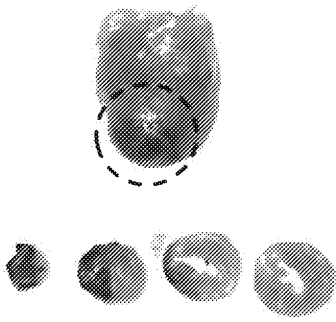


RNA-생성된 VEGF-A

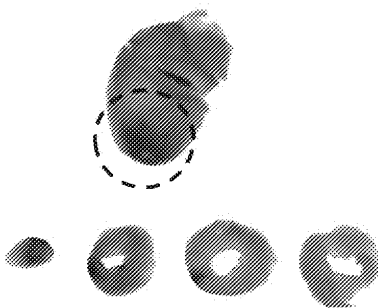
도면6a



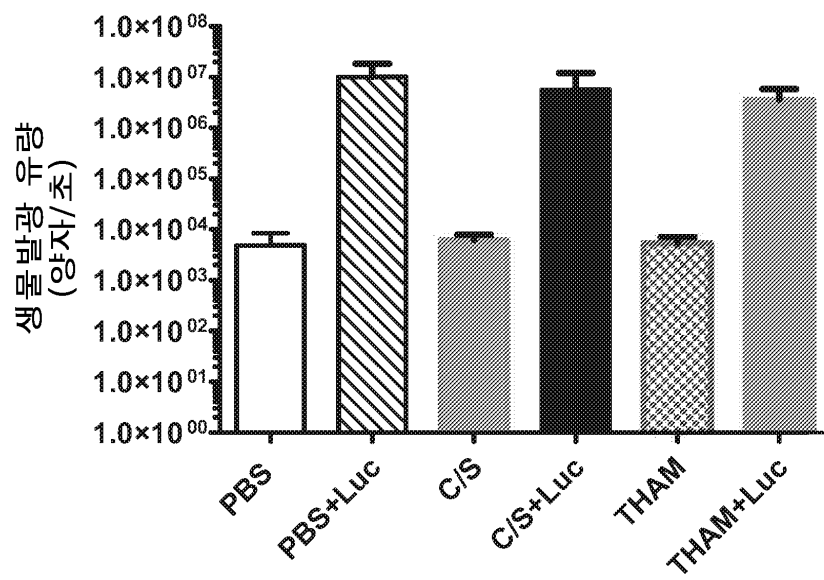
도면6b



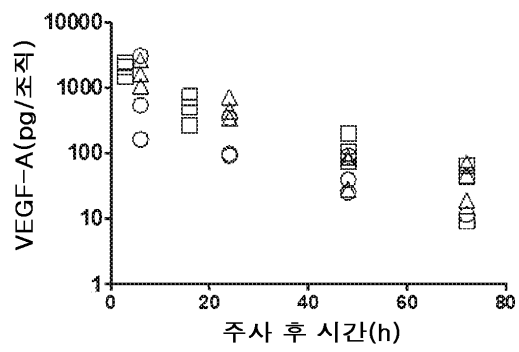
도면6c



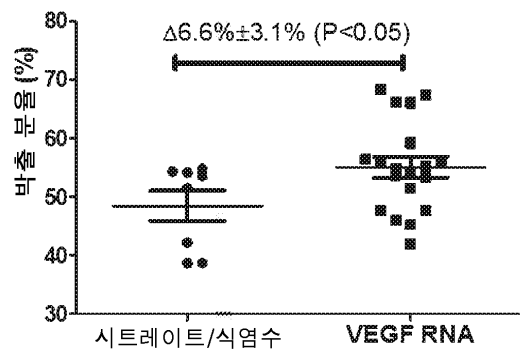
도면7



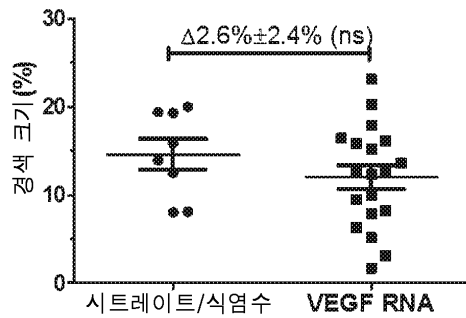
도면8a



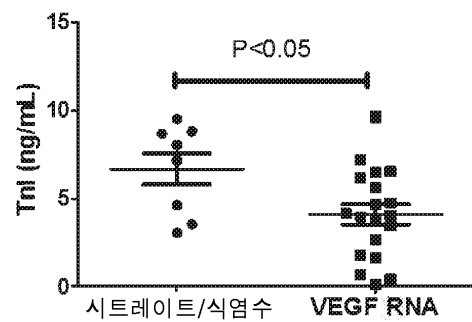
도면8b



도면8c



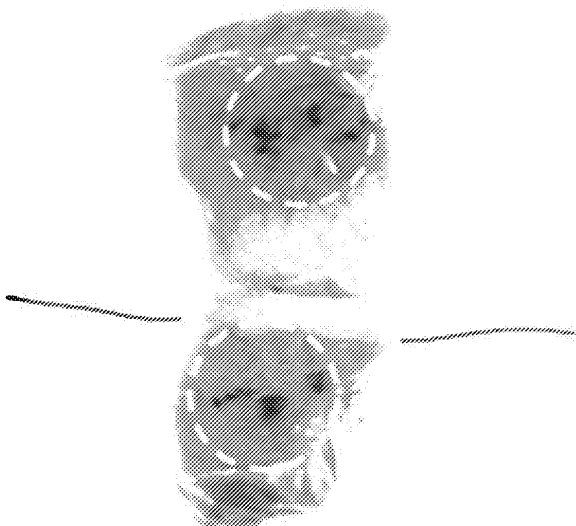
도면8d



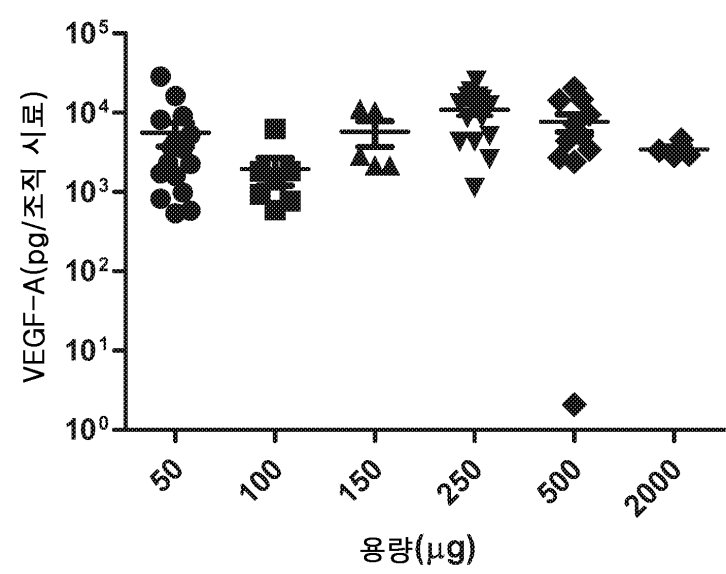
도면9a



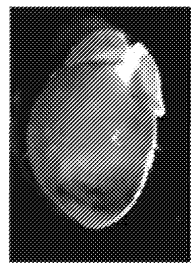
도면9b



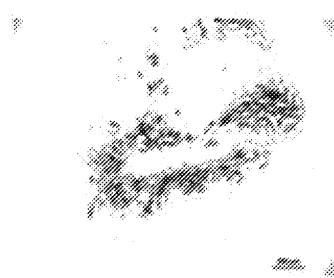
도면10



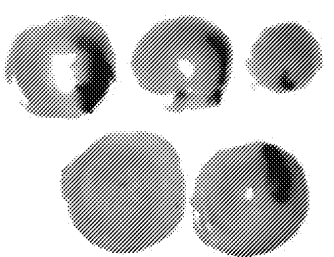
도면11a



도면11b

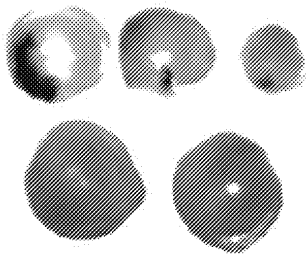


도면11c

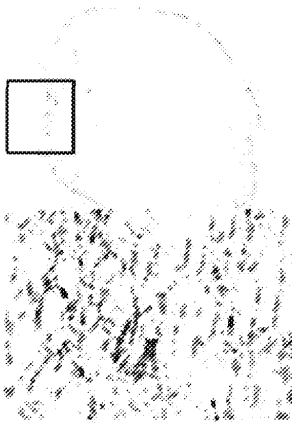




도면11d

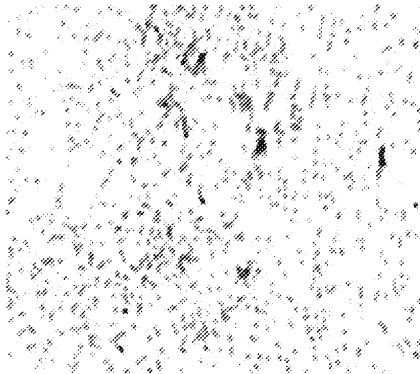


도면11e

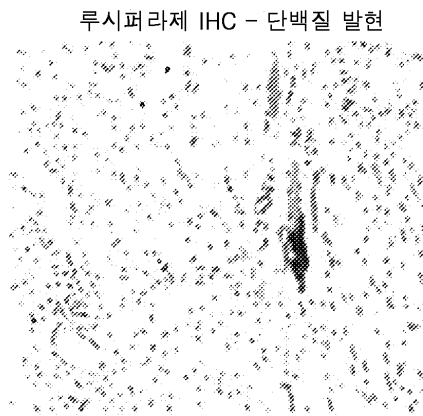


도면11f

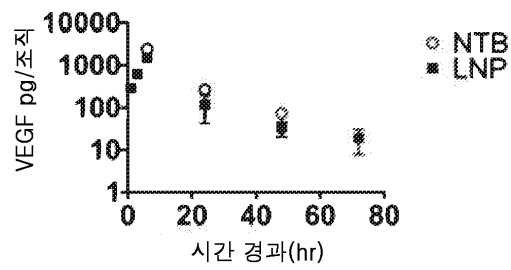
루시퍼라제 ISH - mRNA 발현



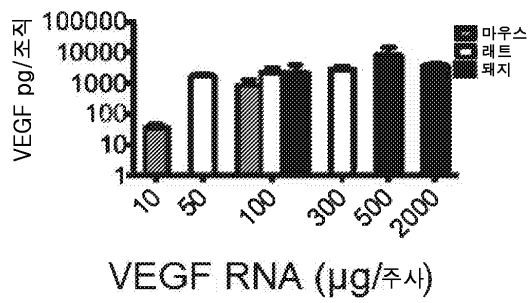
도면11g



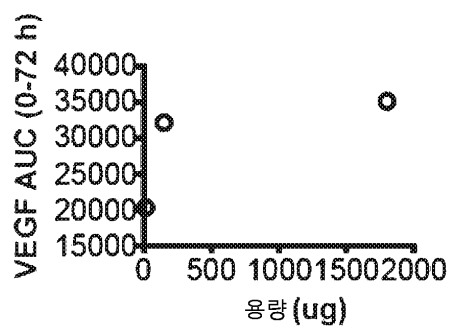
도면12a



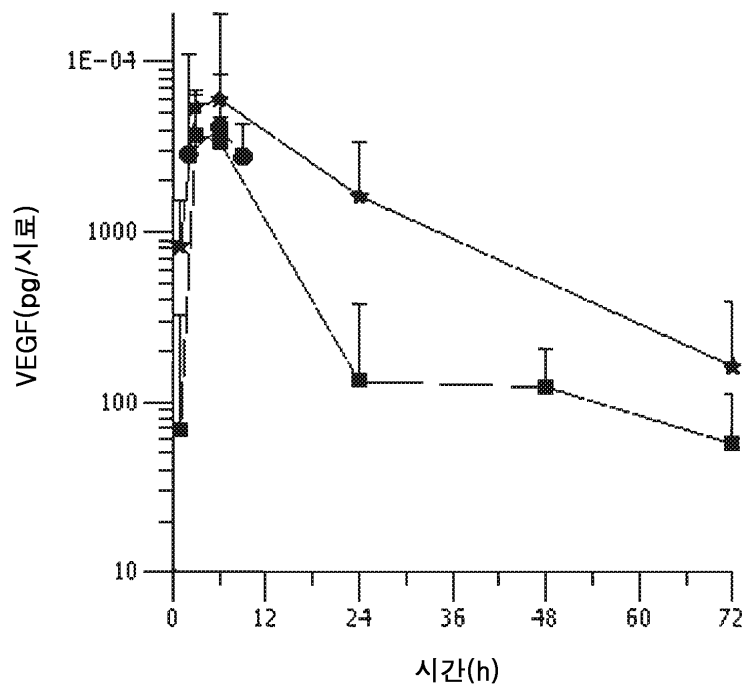
도면12b



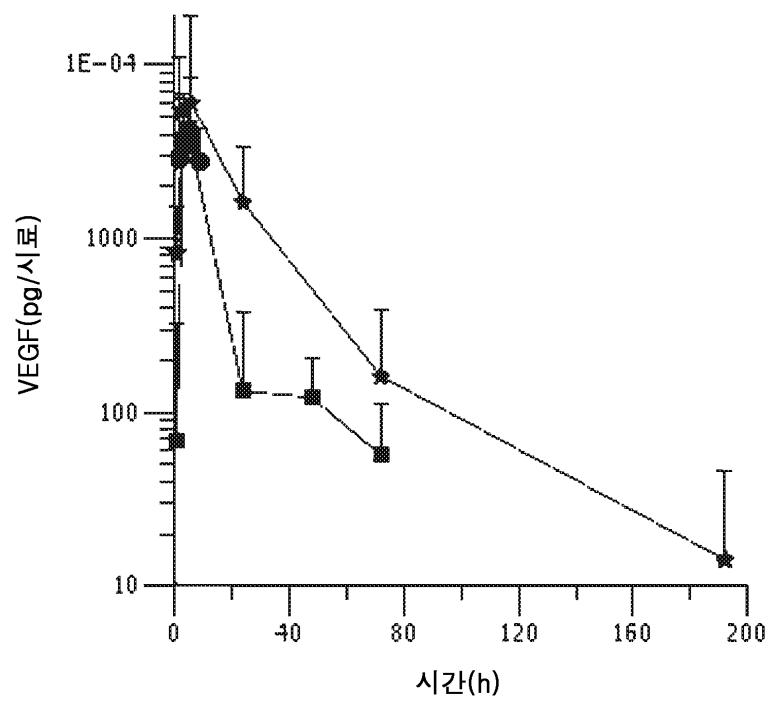
도면12c



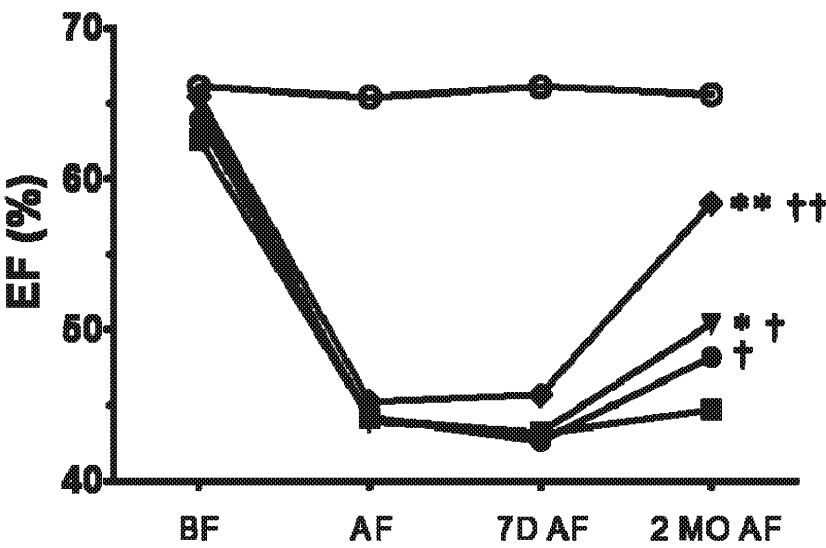
도면13a



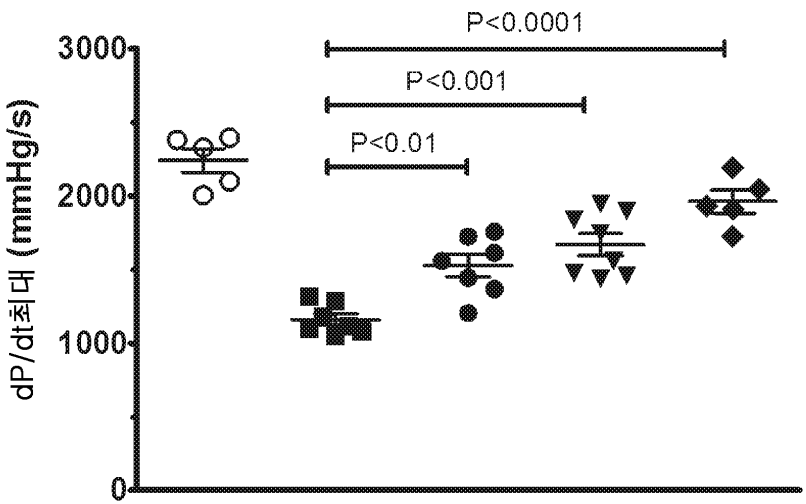
도면13b



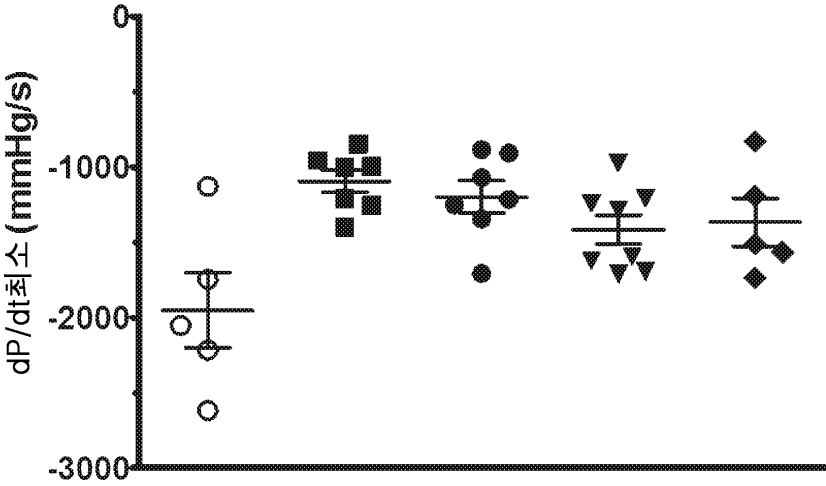
도면14



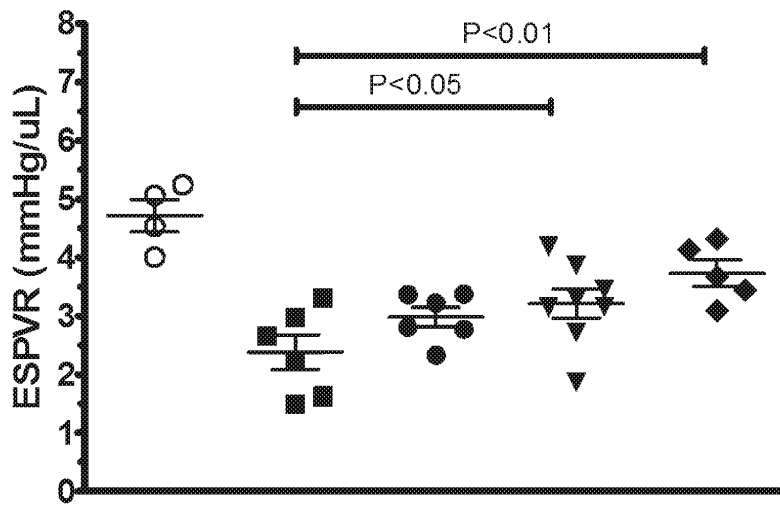
도면15



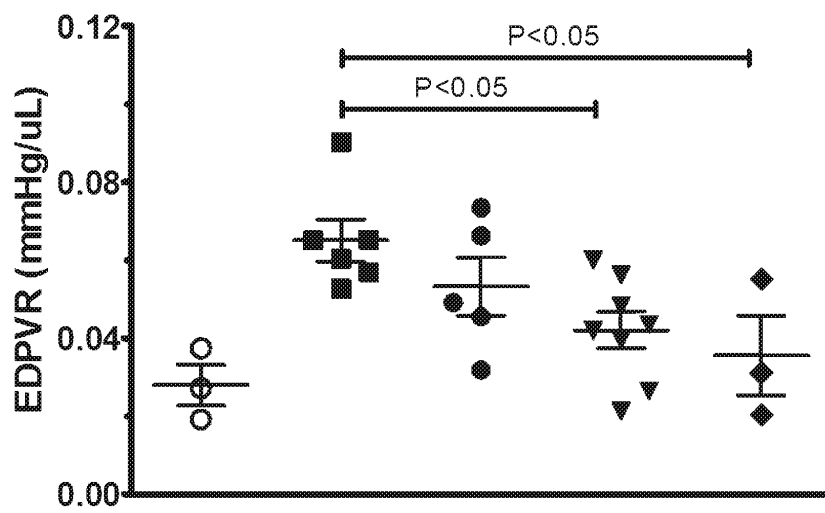
도면16



도면17

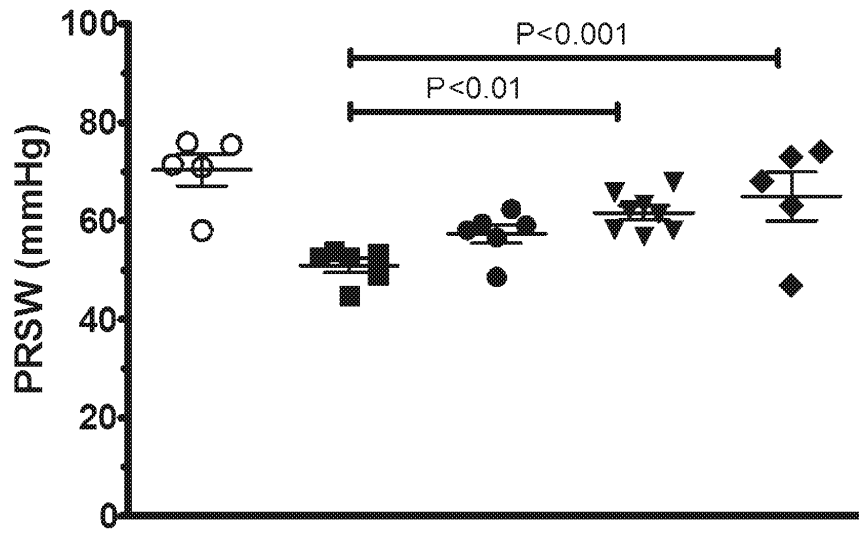


도면18

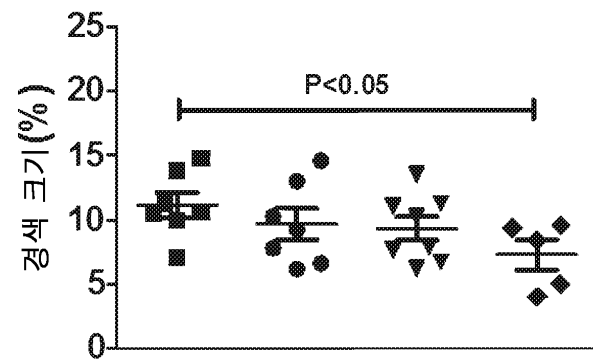




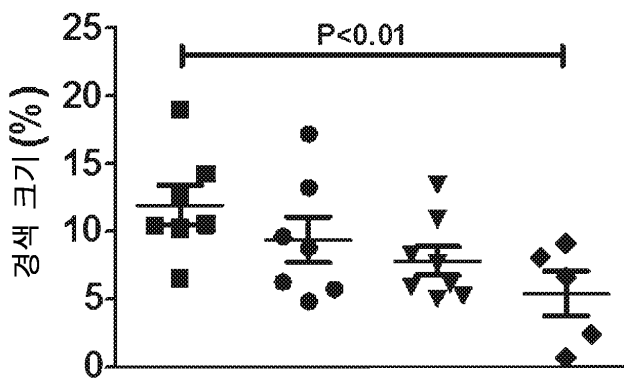
도면19



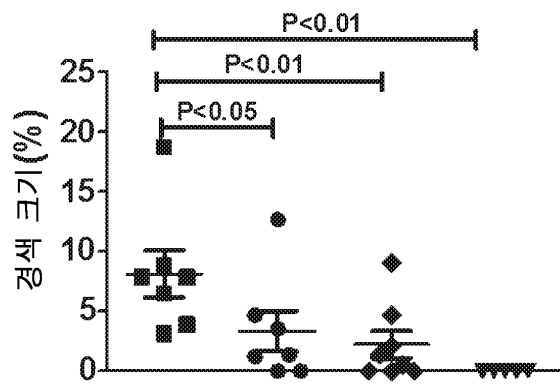
도면20a



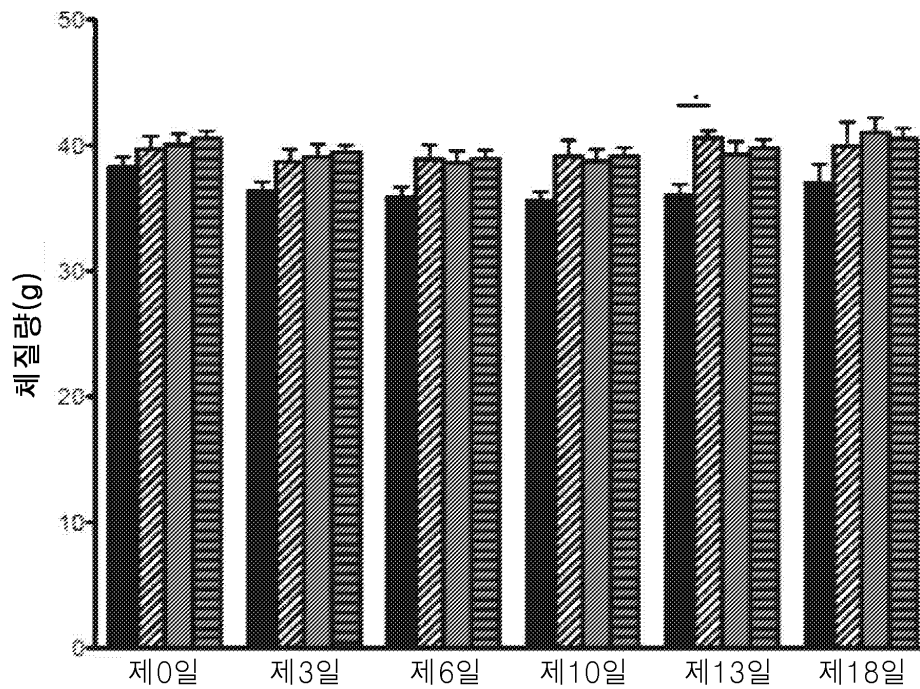
도면20b



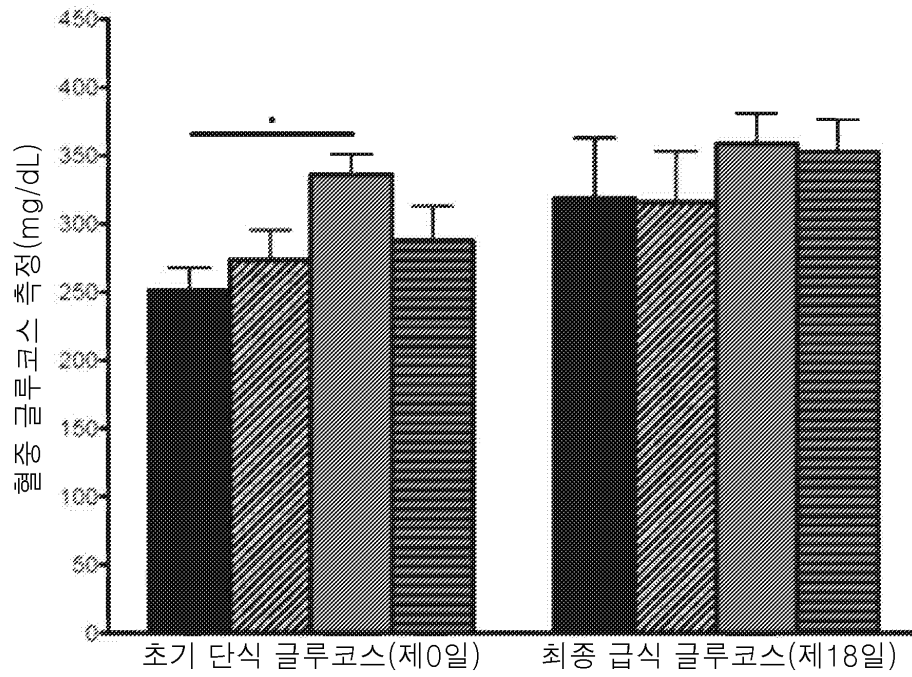
도면20c



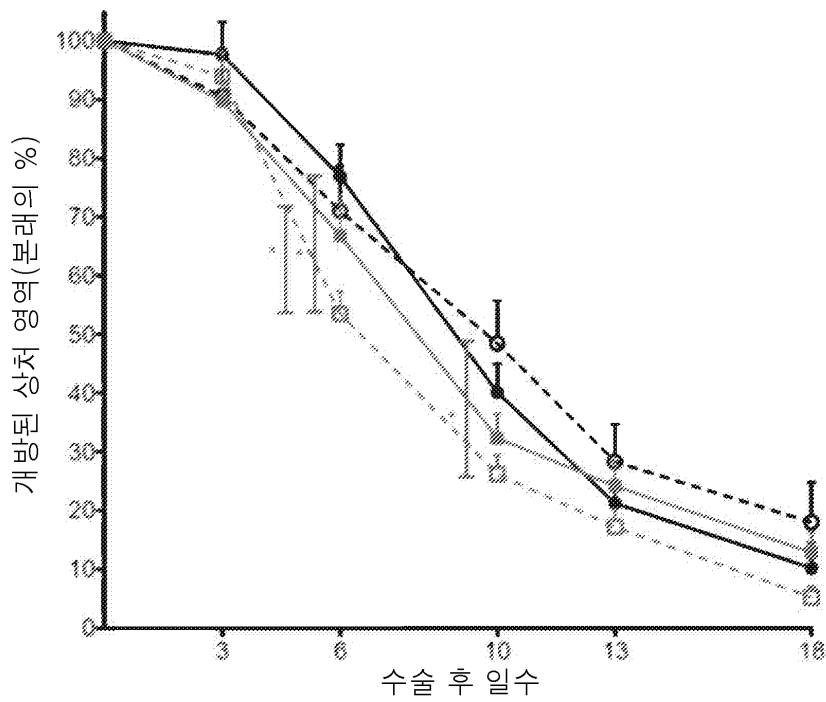
도면21



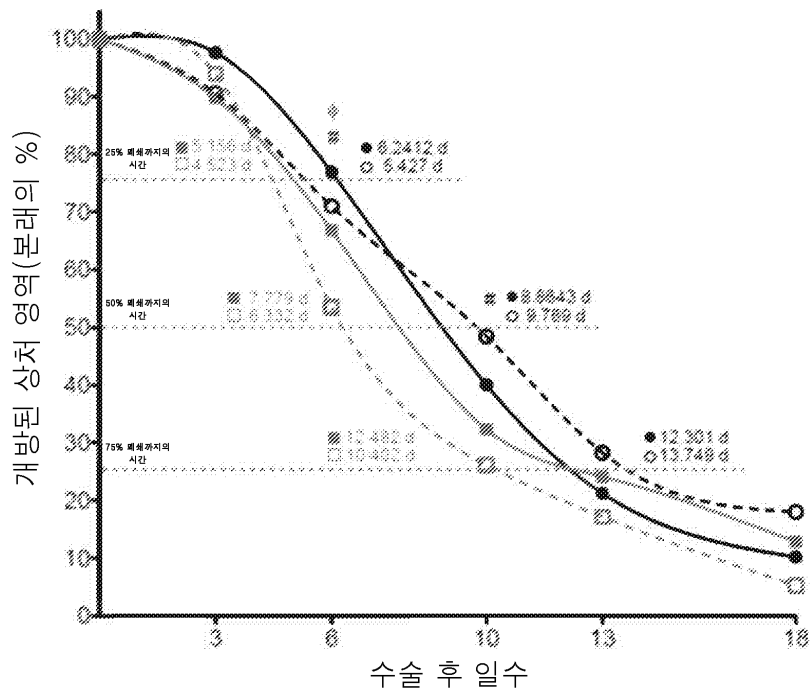
도면22



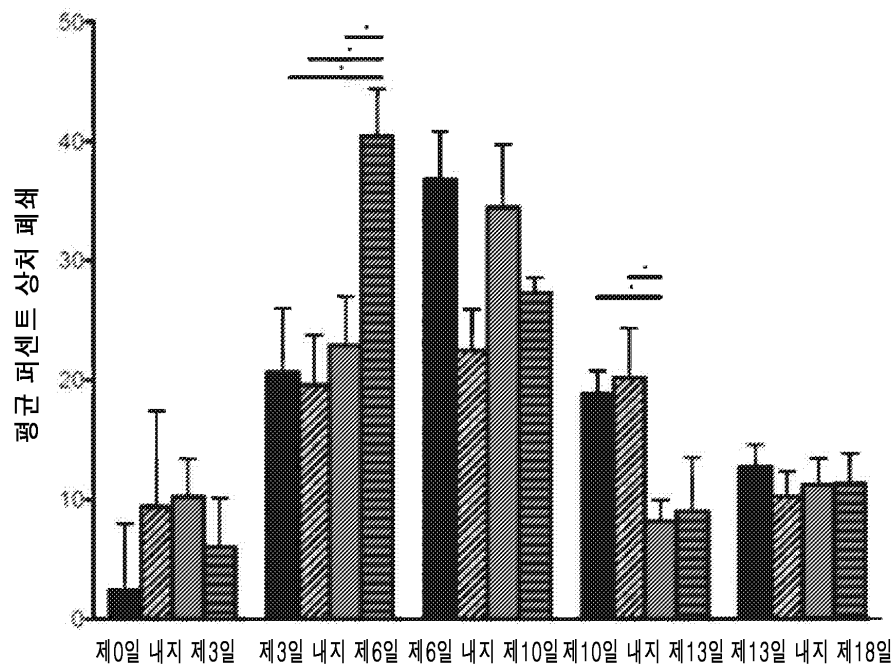
도면23



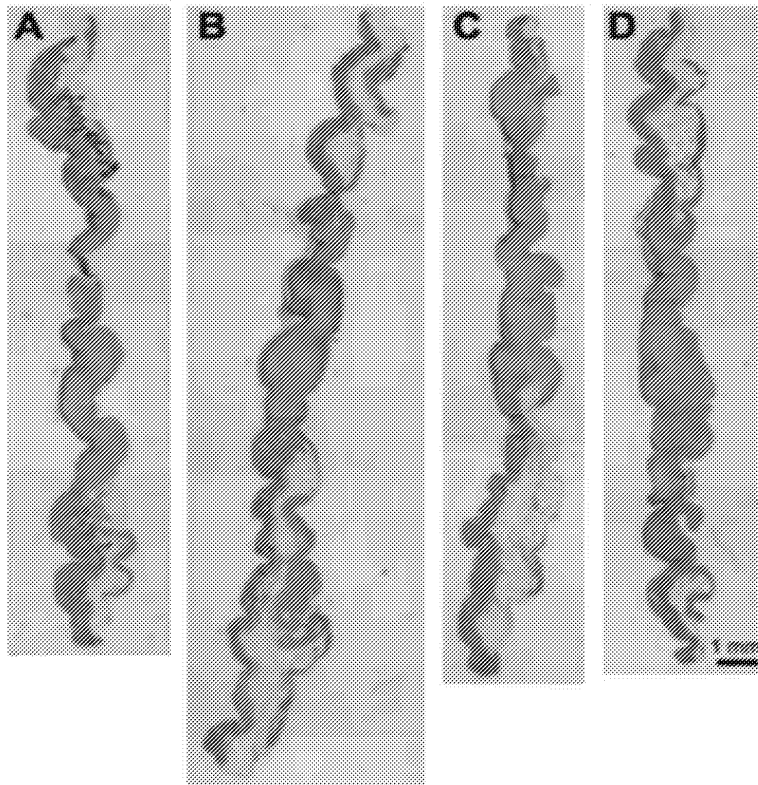
도면24



도면25

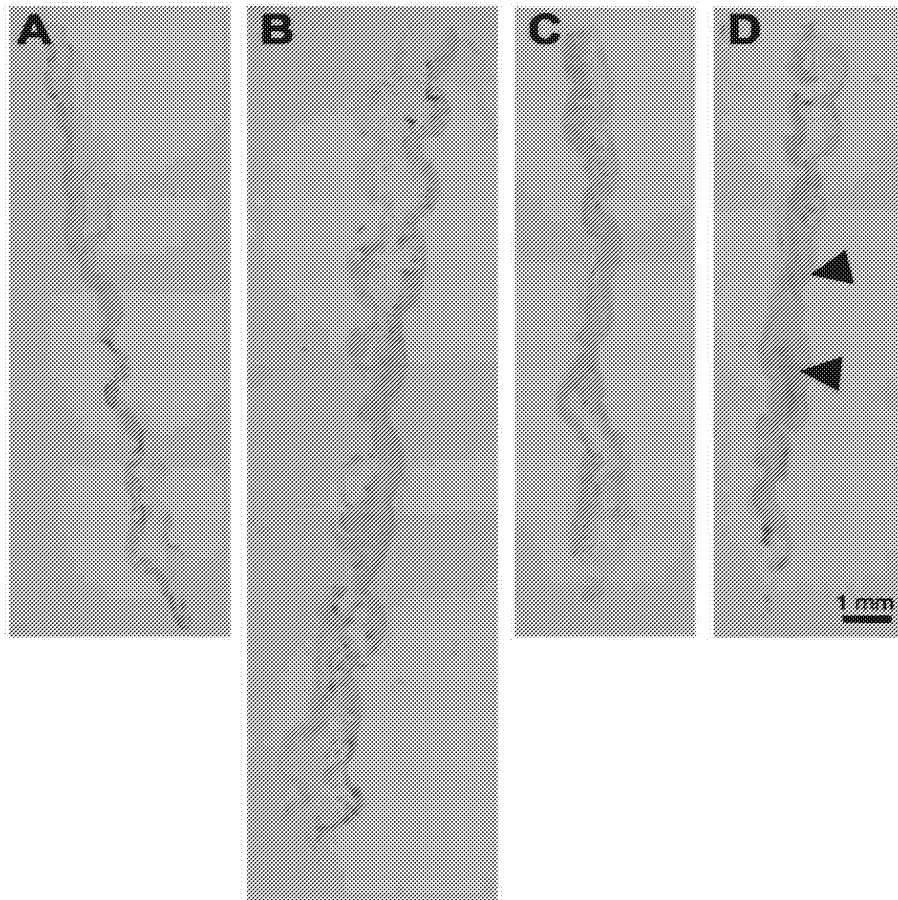


도면26

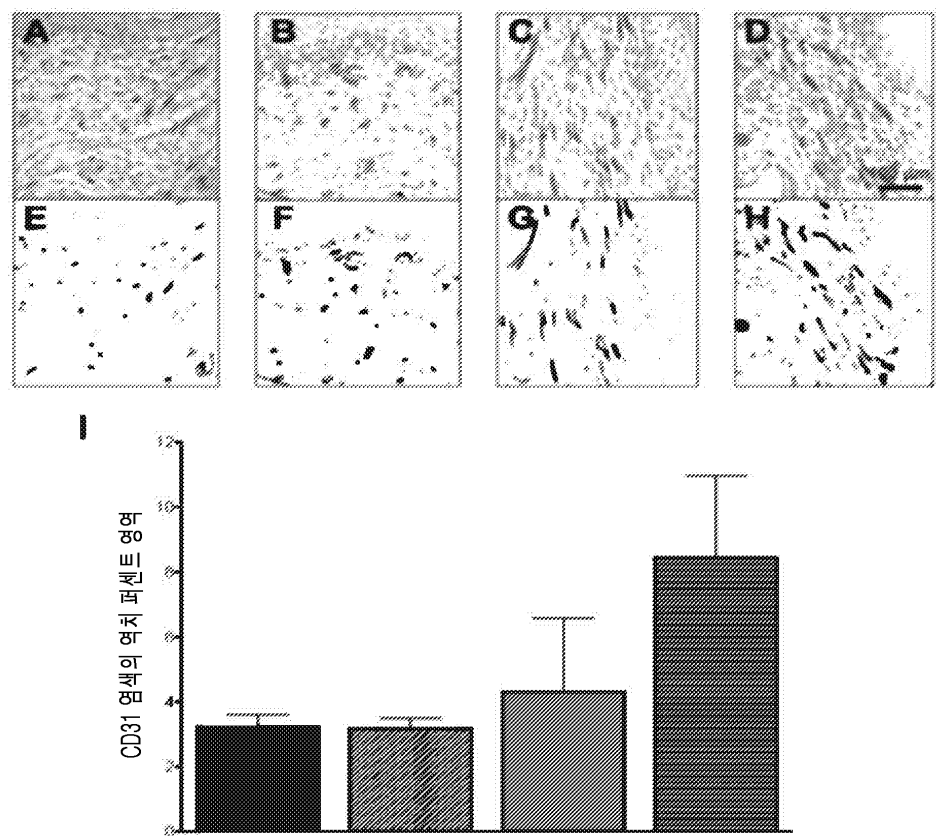




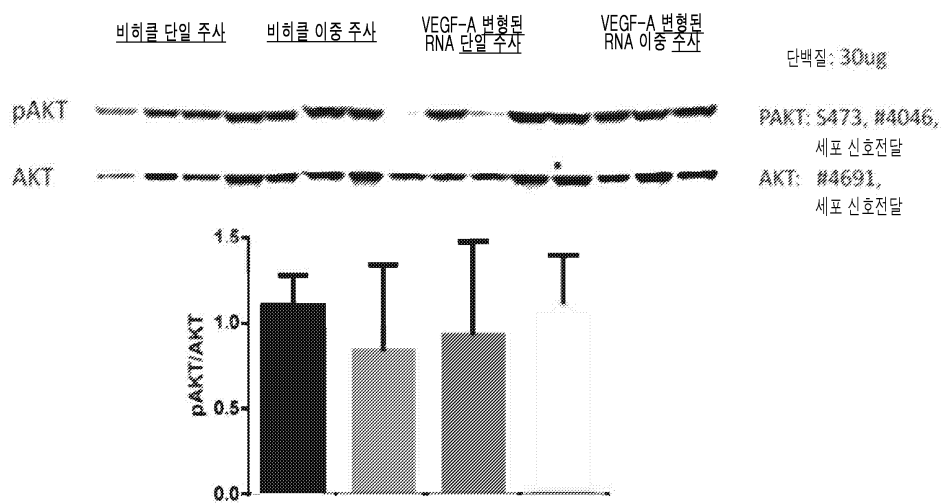
도면27



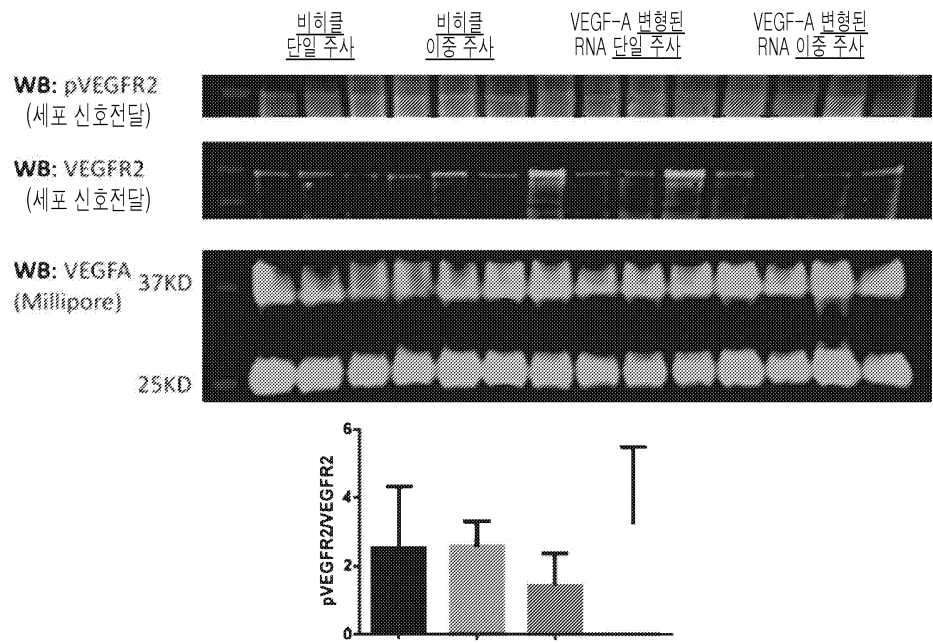
도면28



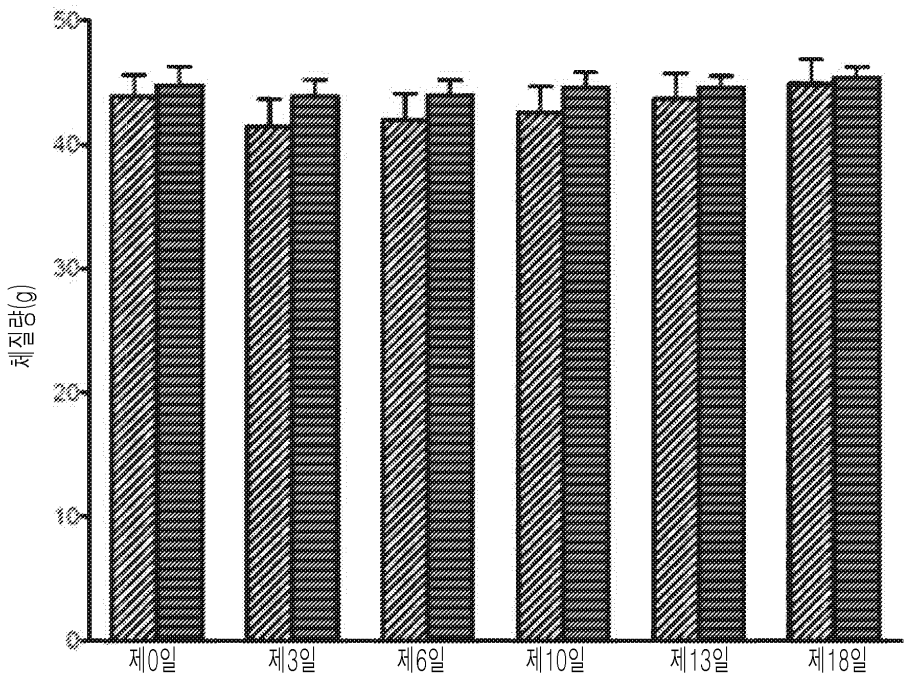
도면29



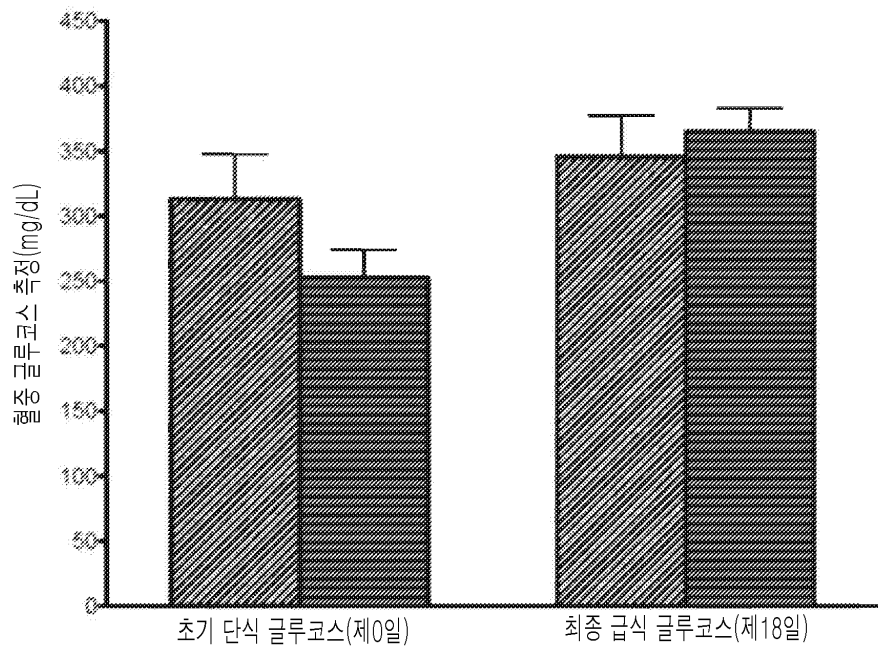
도면30



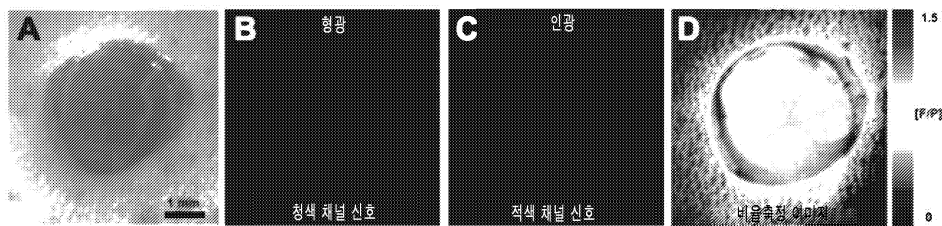
도면31



도면32

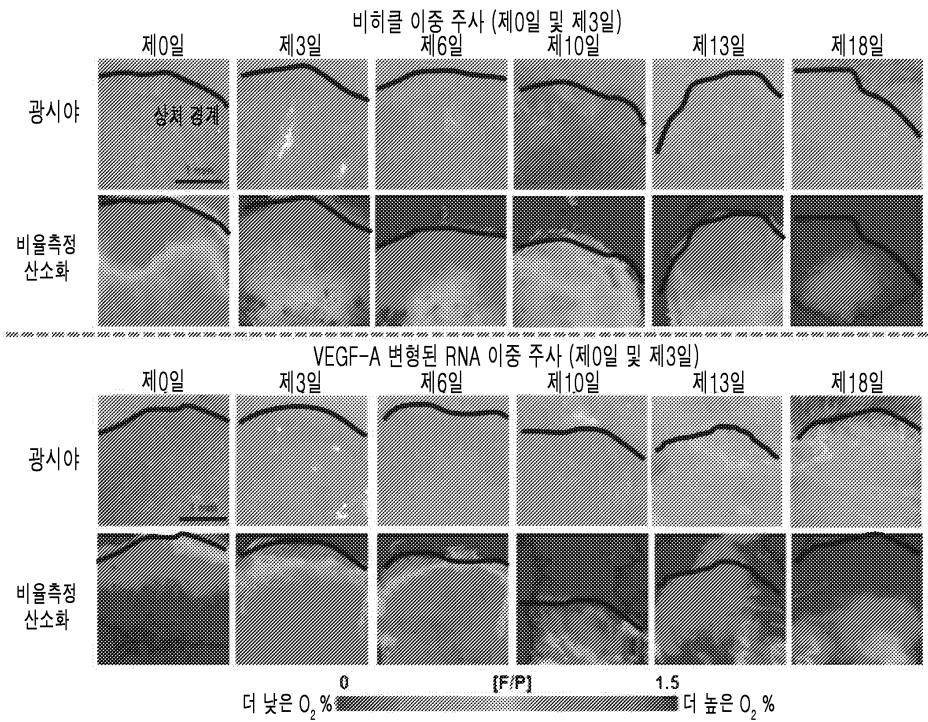


도면33

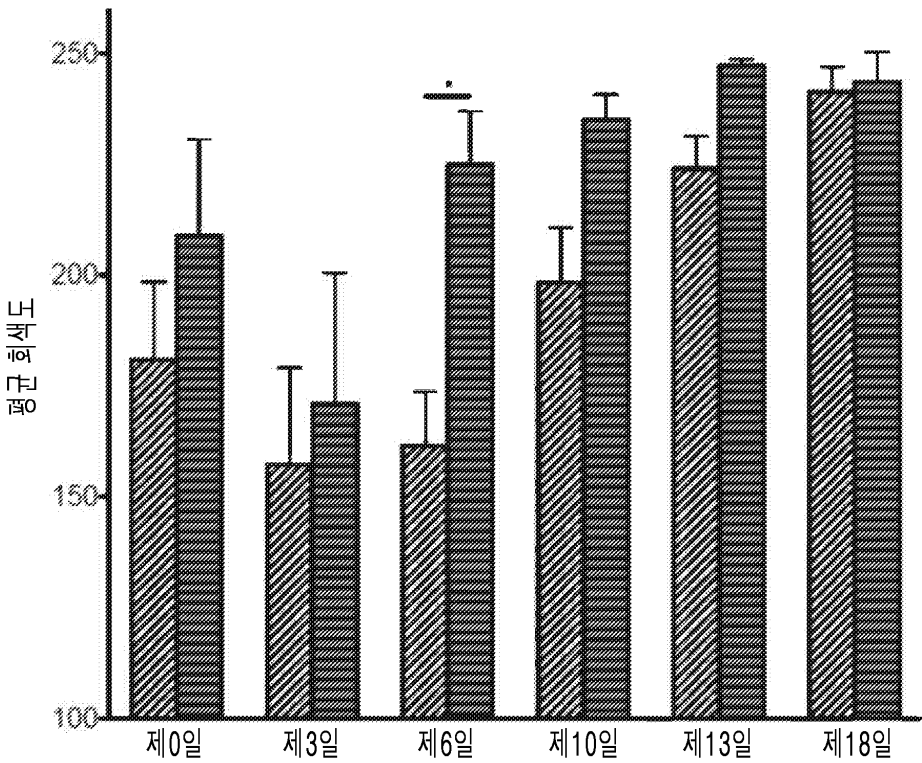




도면34

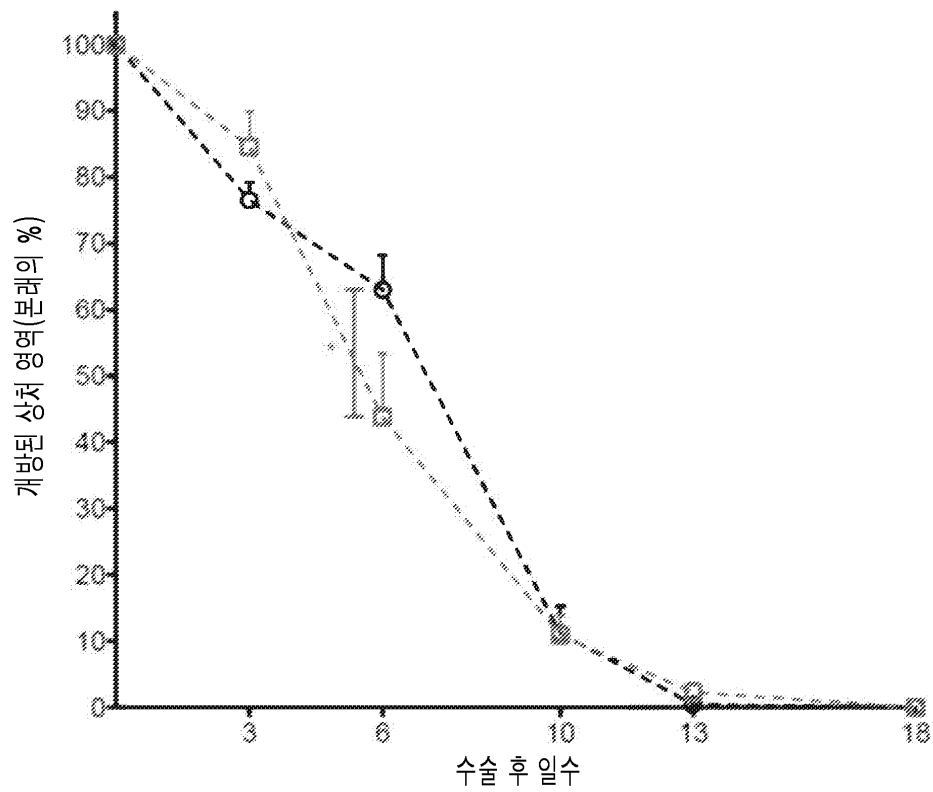


도면35

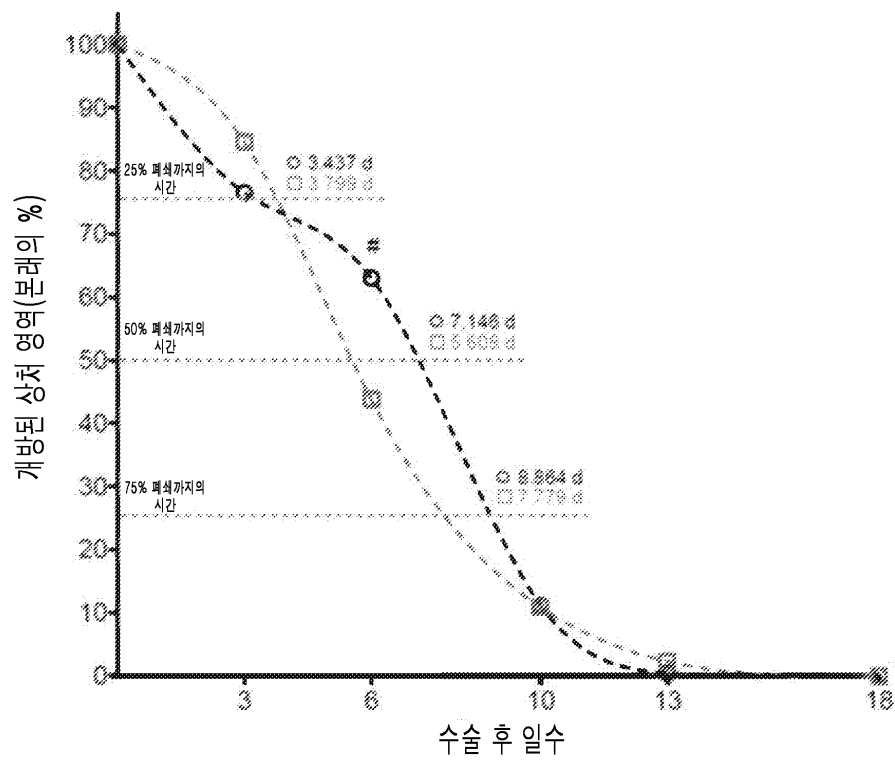




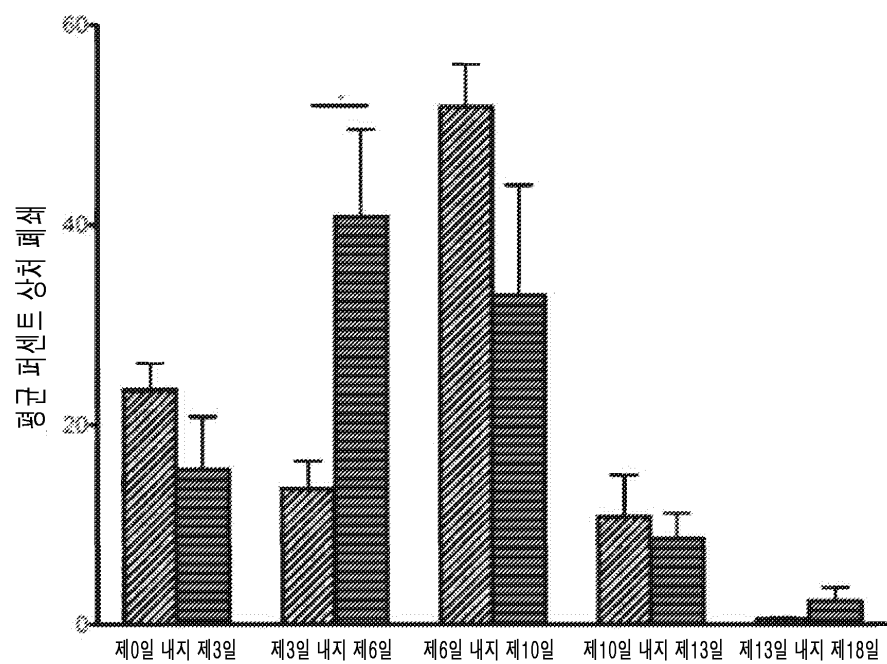
도면36



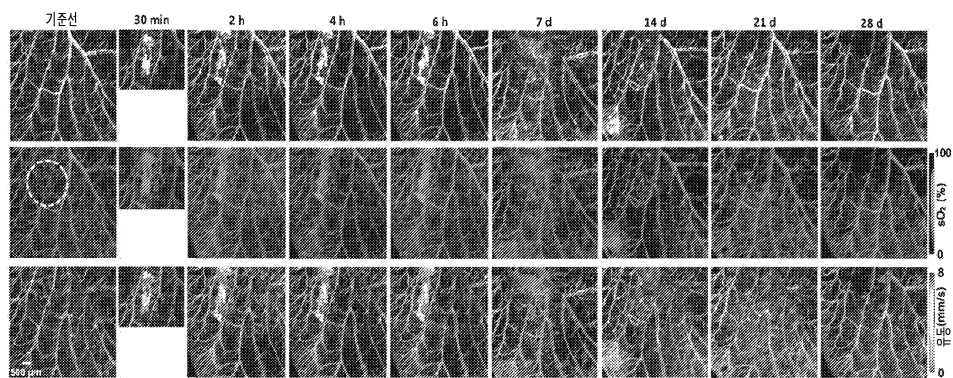
도면37



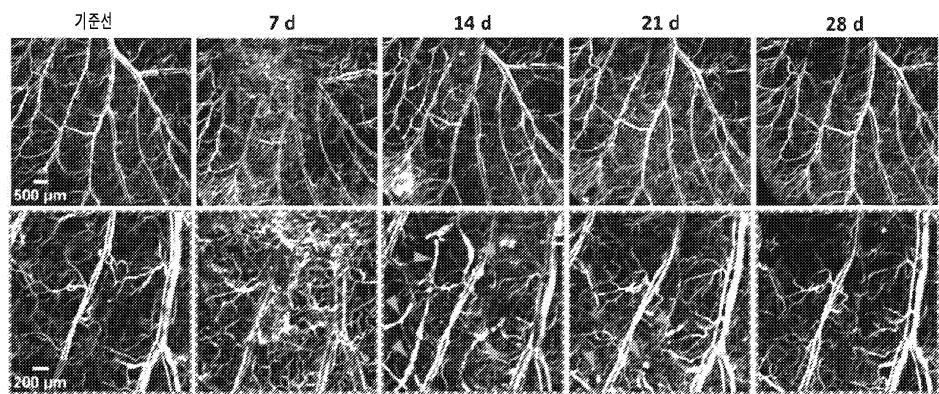
도면38



도면39

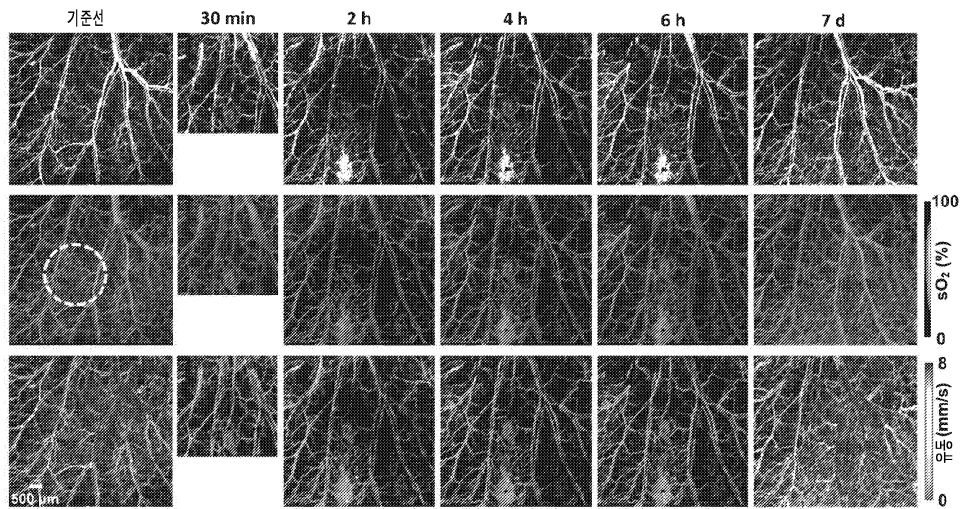


도면40

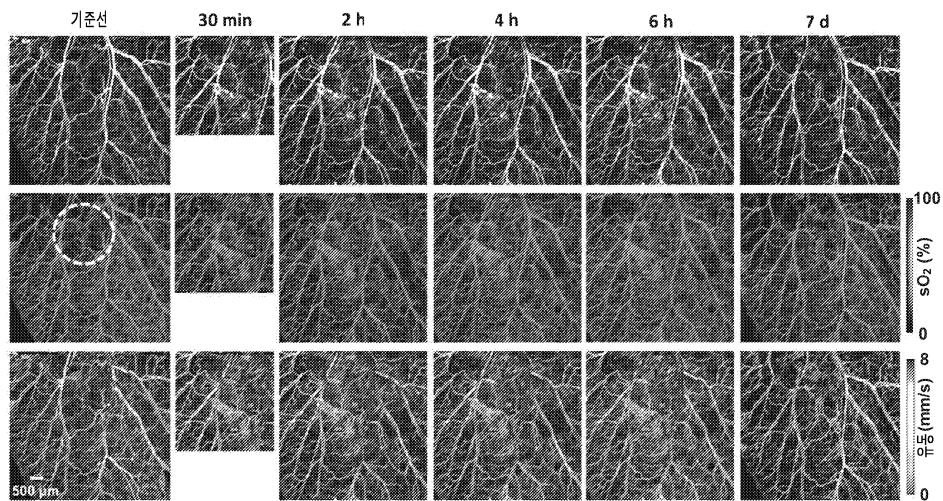




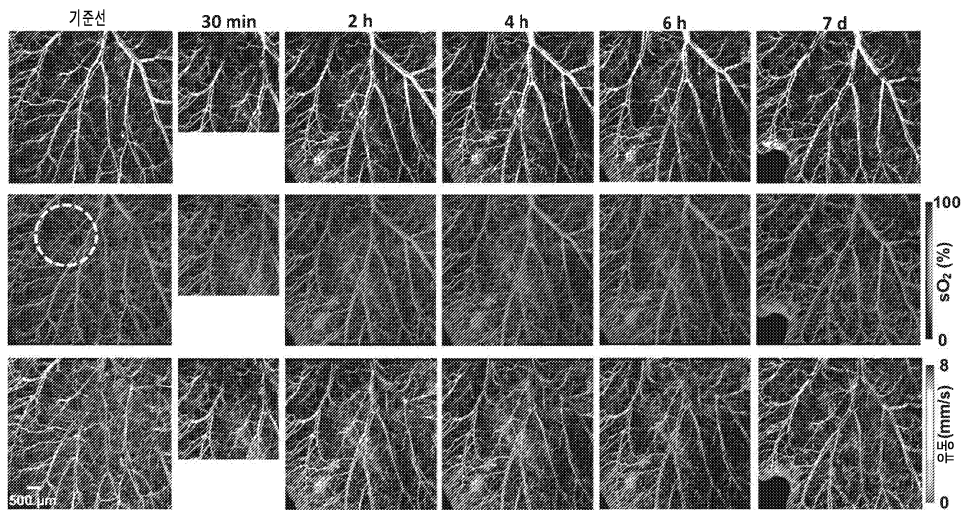
도면41



도면42

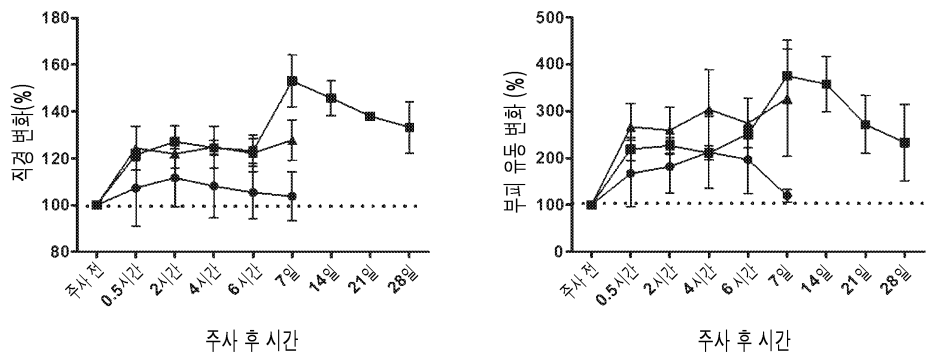


도면43

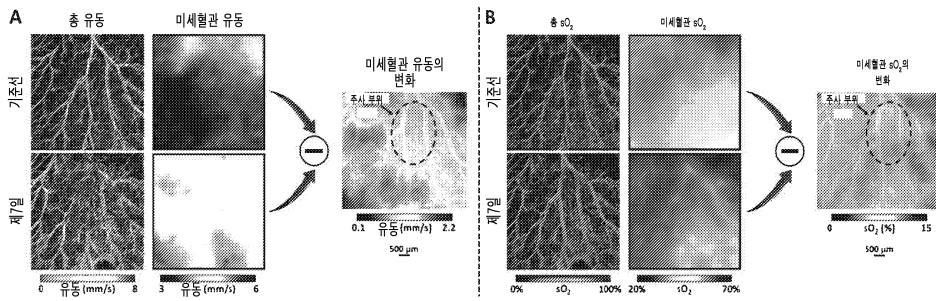




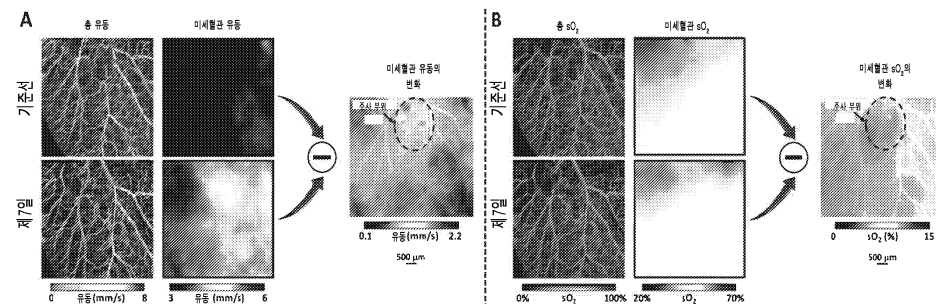
도면44



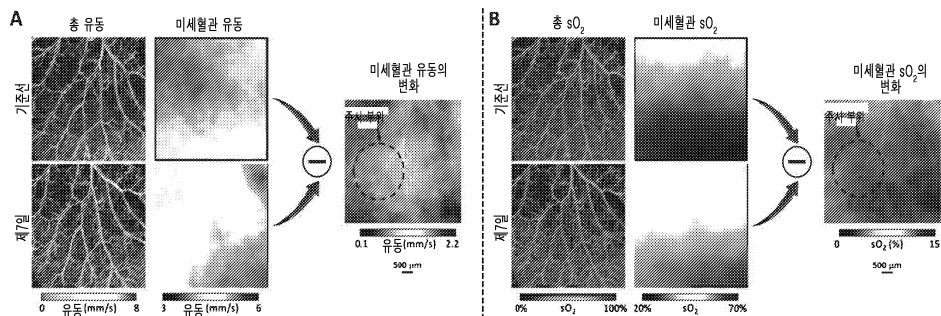
도면45



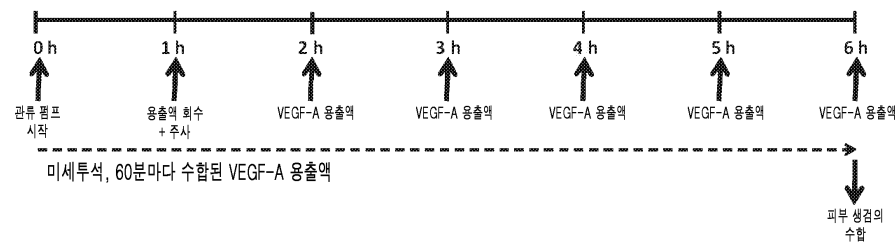
도면46



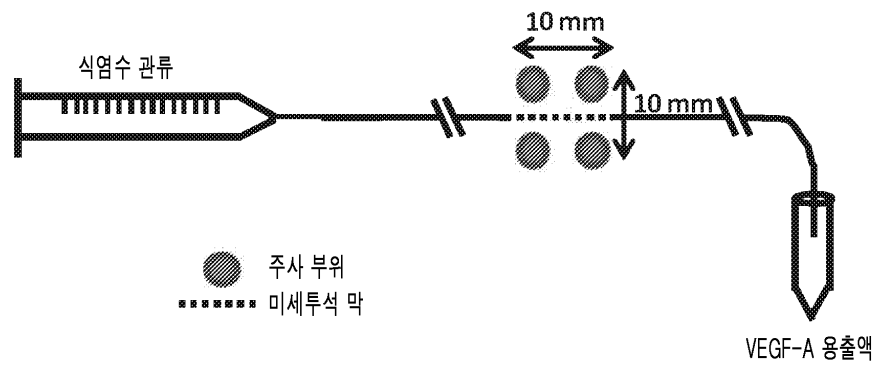
도면47



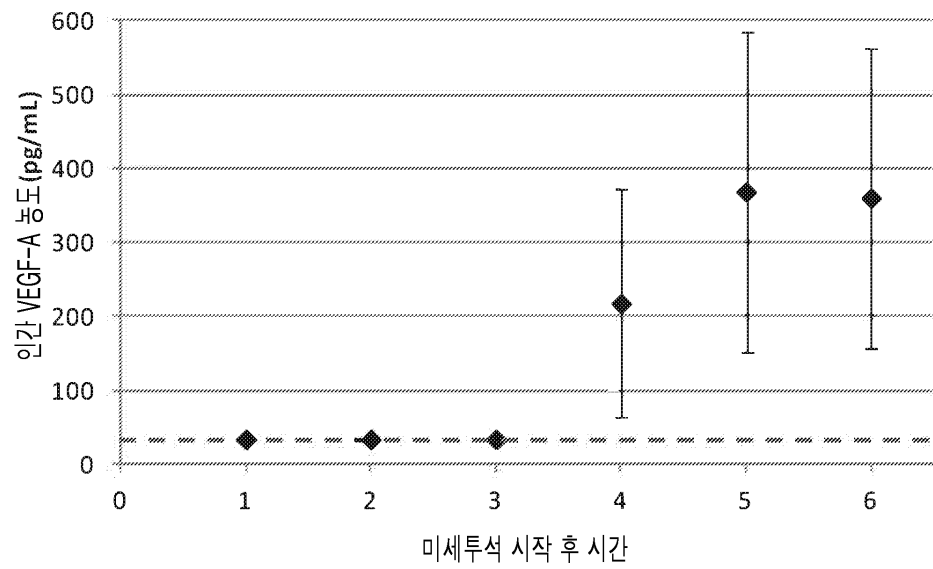
도면48a



도면48b

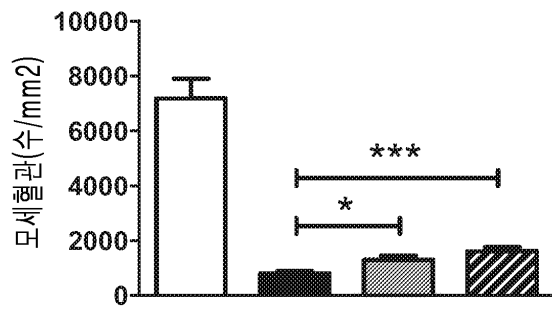


도면49

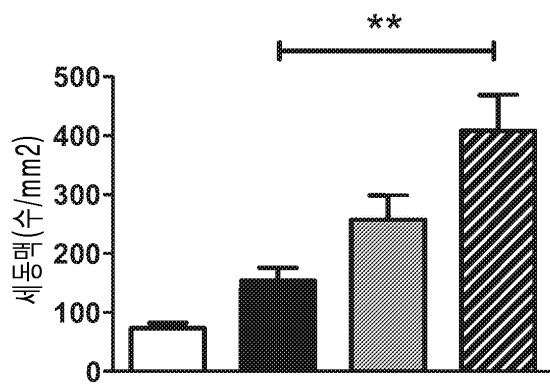




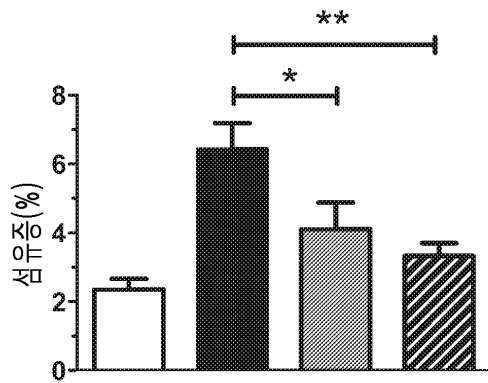
도면50a



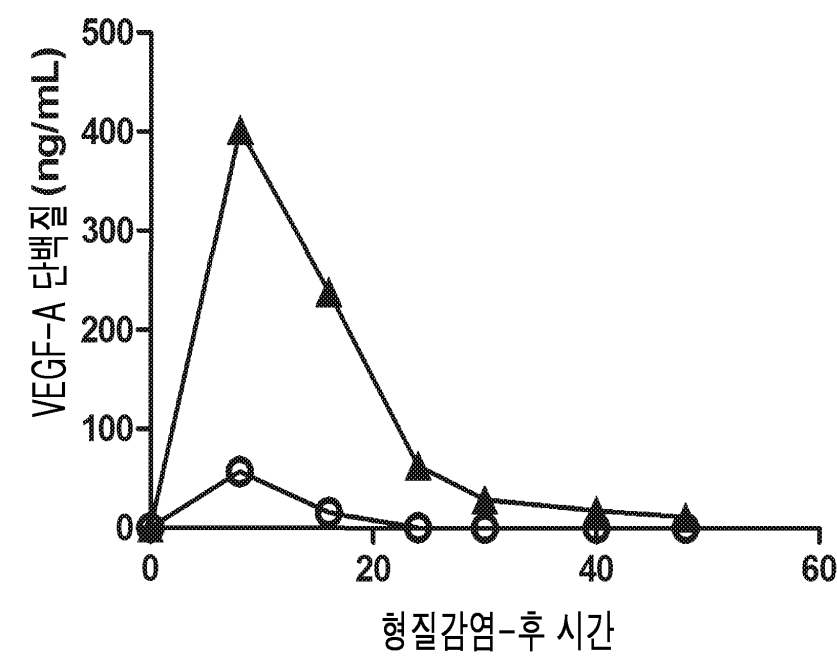
도면50b



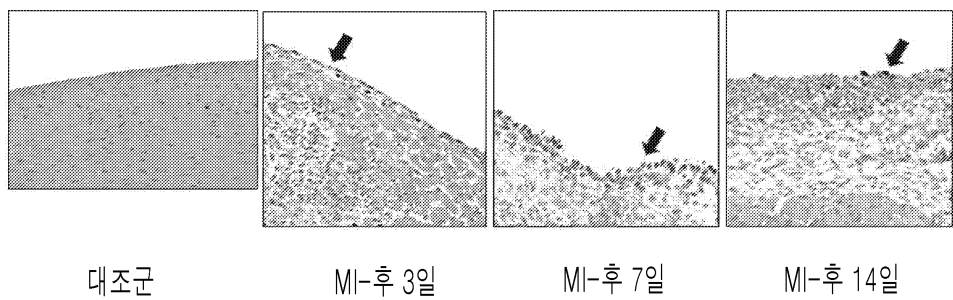
도면50c



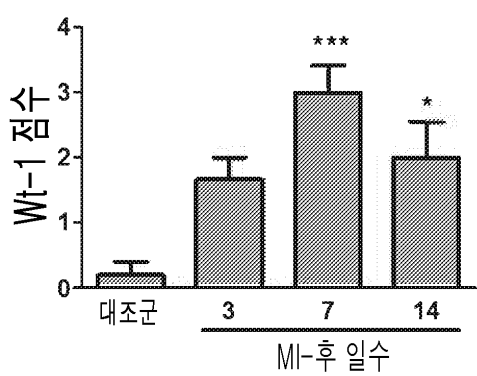
도면51



도면52a



도면52b



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> ModernaTX, Inc.

<120> mRNA Encoding for VEGF and Methods of Use Thereof  
 <130> 200369-WO-PCT  
 <150> US 62/346,979  
 <151> 2016-06-07  
 <150> US 62/411,091  
 <151> 2016-10-21  
 <150> US 62/432,005  
 <151> 2016-12-09  
 <160> 9  
 <170> PatentIn version 3.5  
 <210> 1  
 <211> 845  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Modified RNA encoding VEGF-A  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (1)..(1)  
 <223> 5' 7MeGppp, wherein Me = methyl and p = inorganic phosphate

<220><221> misc\_feature  
 <222> (1)..(845)  
 <223> A = AMP, C = CMP, G = GMP, U = N1-methyl-pseudoUMP  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (2)..(2)  
 <223> G2'OMe, wherein Me is methyl  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (845)..(845)  
 <223> GOH 3'

<400> 1  
 ggggaaaaua gagagaaaag aagaguaaga agaaaauaaa gagccaccac gaacuuucug 60  
 cugucuuggg ugcauuggag ccuugccuug cugcucuacc uccaccaugc caaguggucc 120  
 caggcugcac ccauggcaga aggaggaggg cagaaucauc acgaaguggu gaaguucaug 180  
 gaugucuauc agcgcagcua cugccaacca aucgagaccc ugguggacau cuuccaggag 240

uaccugaug agaucgagua caucuuaag ccauccugug ugccccugau gcgaugcggg 300  
ggcugcugca augacgaggg ccuggagugu gugccacug aggaguccaa caucaccaug 360  
cagauuaugc ggaucaaac ucaccaaggc cagcacauag gagagaugag cuuccuacag 420  
cacaacaaau gugaaugcag accaaagaaa gauagagcaa gacaagaaaa ucccuguggg 480  
ccuugcucag agcggagaaa gcauuuguuu guacaagauc cgcagacgug uaaauguucc 540  
ugcaaaaaca cagacucgcg uugcaaggcg aggcagcuug aguuaaacga acguacuugc 600  
agaugugaca agccgaggcg gugauauag gcuggagccu cgguggccau gcuucuugcc 660

ccuugggccu cccccagcc ccuccuccc uuccugcacc cguaccccg uggucuuuga 720  
auaaagucug agugggcggc aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa 780  
aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa 840  
ucuag 845

<210> 2

<211> 191

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu Ala Leu Leu Leu

1 5 10 15

Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro Met Ala Glu Gly

20 25 30

Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln

35 40 45

Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu

50 55 60

Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu

65 70 75 80

Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro

85 90 95

Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His

100 105 110

Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys

115 120 125

Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu Asn Pro Cys Gly  
 130 135 140

Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys His Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr

145 150 155 160

Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln

165 170 175

Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg

180 185 190

<210> 3

<211> 47

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Firefly luciferase 5' UTR

<220><221> misc\_feature

<222> (1)..(47)

<223> A = AMP, C = CMP, G = GMP, U = N1-methyl-pseudoUMP

<400> 3

gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauuaag agccacc 47

<210> 4

<211> 1650

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Firefly luciferase ORF of mRNA construct (excluding the stop  
 codon)

<220><221> misc\_feature

<222> (1)..(1650)

<223> A = AMP, C = CMP, G = GMP, U = N1-methyl-pseudoUMP

<400> 4

auggaagaug cgaagaacau caagaaggga ccugccccgu uuuacccuuu ggaggacggu 60

acagcaggag aacagcucca caaggcgaug aaacgcuaag cccugguccc cggaacgauu 120

gcguuuaccg augcacauau ugagguagac aucacauacg cagaauacuu cgaaaugucg 180

gugaggcugg cggaagcgau gaagagauau ggucuuuaca cuaaucaccg caucguggug 240



uguucggaga acucauugca guuuuucaug ccgguccuug gagcacuuuu caucgggguc 300  
 gcagucgcgc cagcgaacga caucuacaau gagcgggaac ucuugaauag caugggaauc 360  
 ucccagccga cgugcguguu ugucuccaaa aaggggcugc agaaaauccu caacgugcag 420  
 aagaagcucc ccuuuuuuaa aaagaucac auuauaggaua gcaagacaga uuaccaaggg 480  
 uuccagucga uguauaccuu ugugacaucg cauuugccgc caggguuuua cgagauagac 540  
  
 uucgucccg agucauuuga cagagauaaa accaucgcgc ugauuauagaa uuccucgggu 600  
 agcaccgggu ugccaaaggg gguggcguug cccaccgca cugcuugugu gcggguucucg 660  
 cacgcuaggg auccuauuuu ugguaaucag aucauuuccg acacagcaau ccuguccgug 720  
 guacuuuuu aucacgguuu uggcauguuc acgacucucg gcuauuugau uugcgguuuc 780  
 agggucguac uuauauucg guucgaggaa gaacuuuuu ugagauccuu gcaagauuac 840  
 aagauccagu cgccccuccu ugugccaacg cuuuucucuu uuuuugcgaa aucgacacuu 900  
 auugauaagu augaccuuuc caaucugcau gagauugccu cagggggagc gccgcuuagc 960  
  
 aaggaagucg gggaggcagu ggccaagcgc uuccaccuuc ccggaauucg gcagggauac 1020  
 gggcucacgg agacaacauc cgcgauccuu aucacgcccg agggugacga uaagccggga 1080  
 gccgucggaa aaguggucc cuucuugaa gccaaggucg uagaccucga cacgggaaaa 1140  
 acccucggag ugaaccagag gggcgagcuc ugcgugagag ggccgaugau caugucaggu 1200  
 uacgugaaua acccugaagc gacgaauucg cugaucgaca aggaugggug guugcauucg 1260  
 ggagacauug ccuuuuggga ugaggauag cacuucuuua ucguagaucg acuuuagagc 1320  
 uugaucaauu acaaaggcua ucagguagcg ccugccgagc ucgagucaau ccugcuccag 1380  
  
 caccacaaca uuucgacgc cggaguggcc ggguugcccg augacgacgc gggugagcug 1440  
 ccagcggccg ugguaguccu cgaacauggg aaaacaauga ccgaaaagga gaucguggac 1500  
 uacguagcau cacaagugac gacugcgaag aaacugaggg gagggguagu cuuuguggac 1560  
 gagguccga aaggcuugac ugggaagcuu gacgcucgca aaauccggga aaucugauu 1620  
 aaggcaaaga aaggcggga aaucgcuguc 1650  
  
 <210> 5  
 <211> 119  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Firefly luciferase 3' UTR  
 <220><221> misc\_feature  
  
 <222> (1)..(119)

<223> A = AMP, C = CMP, G = GMP, U = N1-methyl-pseudoUMP

<400> 5

ugauauagg cuggagccuc gguggccaug cuucuugccc cuugggccuc cccccagccc 60

cuccucuccu uccugcaccu guacccccgu ggucuuugaa uaaagucuga gugggcggc 119

<210> 6

<211> 550

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Firefly luciferase

<400> 6

Met Glu Asp Ala Lys Asn Ile Lys Lys Gly Pro Ala Pro Phe Tyr Pro

1 5 10 15

Leu Glu Asp Gly Thr Ala Gly Glu Gln Leu His Lys Ala Met Lys Arg

20 25 30

Tyr Ala Leu Val Pro Gly Thr Ile Ala Phe Thr Asp Ala His Ile Glu

35 40 45

Val Asp Ile Thr Tyr Ala Glu Tyr Phe Glu Met Ser Val Arg Leu Ala

50 55 60

Glu Ala Met Lys Arg Tyr Gly Leu Asn Thr Asn His Arg Ile Val Val

65 70 75 80

Cys Ser Glu Asn Ser Leu Gln Phe Phe Met Pro Val Leu Gly Ala Leu

85 90 95

Phe Ile Gly Val Ala Val Ala Pro Ala Asn Asp Ile Tyr Asn Glu Arg

100 105 110

Glu Leu Leu Asn Ser Met Gly Ile Ser Gln Pro Thr Val Val Phe Val

115 120 125

Ser Lys Lys Gly Leu Gln Lys Ile Leu Asn Val Gln Lys Lys Leu Pro

130 135 140

Ile Ile Gln Lys Ile Ile Ile Met Asp Ser Lys Thr Asp Tyr Gln Gly

145 150 155 160

Phe Gln Ser Met Tyr Thr Phe Val Thr Ser His Leu Pro Pro Gly Phe

165 170 175

Asn Glu Tyr Asp Phe Val Pro Glu Ser Phe Asp Arg Asp Lys Thr Ile  
 180 185 190  
 Ala Leu Ile Met Asn Ser Ser Gly Ser Thr Gly Leu Pro Lys Gly Val  
 195 200 205  
 Ala Leu Pro His Arg Thr Ala Cys Val Arg Phe Ser His Ala Arg Asp  
 210 215 220  
 Pro Ile Phe Gly Asn Gln Ile Ile Pro Asp Thr Ala Ile Leu Ser Val  
 225 230 235 240  
 Val Pro Phe His His Gly Phe Gly Met Phe Thr Thr Leu Gly Tyr Leu  
 245 250 255  
 Ile Cys Gly Phe Arg Val Val Leu Met Tyr Arg Phe Glu Glu Glu Leu  
 260 265 270  
 Phe Leu Arg Ser Leu Gln Asp Tyr Lys Ile Gln Ser Ala Leu Leu Val  
 275 280 285  
 Pro Thr Leu Phe Ser Phe Phe Ala Lys Ser Thr Leu Ile Asp Lys Tyr  
 290 295 300  
 Asp Leu Ser Asn Leu His Glu Ile Ala Ser Gly Gly Ala Pro Leu Ser  
 305 310 315 320  
 Lys Glu Val Gly Glu Ala Val Ala Lys Arg Phe His Leu Pro Gly Ile  
 325 330 335  
 Arg Gln Gly Tyr Gly Leu Thr Glu Thr Thr Ser Ala Ile Leu Ile Thr  
 340 345 350  
 Pro Glu Gly Asp Asp Lys Pro Gly Ala Val Gly Lys Val Val Pro Phe  
 355 360 365  
 Phe Glu Ala Lys Val Val Asp Leu Asp Thr Gly Lys Thr Leu Gly Val  
 370 375 380  
 Asn Gln Arg Gly Glu Leu Cys Val Arg Gly Pro Met Ile Met Ser Gly  
 385 390 395 400  
 Tyr Val Asn Asn Pro Glu Ala Thr Asn Ala Leu Ile Asp Lys Asp Gly  
 405 410 415  
 Trp Leu His Ser Gly Asp Ile Ala Tyr Trp Asp Glu Asp Glu His Phe

420 425 430  
Phe Ile Val Asp Arg Leu Lys Ser Leu Ile Lys Tyr Lys Gly Tyr Gln

435 440 445  
Val Ala Pro Ala Glu Leu Glu Ser Ile Leu Leu Gln His Pro Asn Ile

450 455 460  
Phe Asp Ala Gly Val Ala Gly Leu Pro Asp Asp Asp Ala Gly Glu Leu

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

485 490 495  
Glu Ile Val Asp Tyr Val Ala Ser Gln Val Thr Thr Ala Lys Lys Leu

500 505 510  
Arg Gly Gly Val Val Phe Val Asp Glu Val Pro Lys Gly Leu Thr Gly

515 520 525  
Lys Leu Asp Ala Arg Lys Ile Arg Glu Ile Leu Ile Lys Ala Lys Lys

530 535 540  
Gly Gly Lys Ile Ala Val

545 550

<210> 7

<211> 3274

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> LacZ nucleotide sequence (5' UTR, ORF, 3' UTR)

<220><221> misc\_feature

<222> (1)..(3274)

<223> A = AMP, C = CMP, G = GMP, U = N1-methyl-pseudoUMP

<400> 7

ucaagcuuuu ggaccucgu acagaagcua auacgacuca cuauaggga auaagagaga 60

aaagaagagu aagaagaaau auaagagcca ccauggccuu ggcugucguc cugcaaagaa 120

gagauuggga aaauccugga guuacgcaac ugaauagacu cgccgcacau ccaccguucg 180

cguccggcg aaauagcgaa gaagcgcgga ccgacagacc uucgcagcag cugcgucuc 240

ucaacgggga auggcgguuc gcaugguuuc cggcuccuga ggcagucccg gaaagcuggc 300

ucgagugcga ccuccggga gccgauacgg uggugugcc gucaauugg caaauugcaug 360

gauacgacgc ccccaucuaac accaaccguca cuuacccuau caccgugaau ccccauucg 420  
 ucccgacuga gaacccgacu ggaugcuaca gccugaccuu uaacguggac gagucguggc 480  
 ugcaagaagg gcagacucgc aucauuuucg acggagucuaa cuccgcguuc caucuuggu 540  
  
 guaacggacg guggguggga uacgggcagg acuccaggcu gccgagcgaa uucgacuugu 600  
 cagccuuccu gcgcgccggc gaaaaccgcc uggcugucuu gguccuuga ugguccggaug 660  
 gcucguaccu ggaggauacg gacaugugga ggaugucagg gaucuuccgg gaugucucgc 720  
 ugcuccacaa gccaaacuacc cagaucuccg acuuucaugu ggccacccgc uucaacgaug 780  
 acuucagcag ggccguucug gaagccgagg ugcaaaugug cggagaacug agggacuacc 840  
 uccgcgugac ugucucgcuc uggcaggug aaaccaagu ggcuucaggc acugcaccgu 900  
 ucggaggaga aaucacgac gaacggggag gauacgccga ucgcgucacc cugcgccuca 960  
  
 auguggaaaa uccgaaacug ugguccgagc aaucccuua uuuguaccgg gccguggugg 1020  
 agcugcacac cgccgacgga acucgaucg agcccgaggc augcgaugug ggauuccgcg 1080  
 agguccgcau cgaauugga cugcuucugc uuaauugcaa accgcugcuc aucccgagg 1140  
 ugaacagaca cgagcauac ccgcugcacg gucaggucuu ggauaacag acuauggugc 1200  
 aagacaucuu gcugaugaaa caaaacaacu ucaacgccgu ucggugcucc cauuaccua 1260  
 aucacccguu gugguauacc cuuugcgau gguacggccu cuacguggug gacgaagcga 1320  
 acaucgagac ucacggaug gucccuuga accgccuac ugacgaccg agguccguc 1380  
  
 cggcaauguc ggaacgagug acucggaug ugacaggga ccgcaaccu ccgucgguga 1440  
 uaaucugguc gcuggggaac gaauccggc acggagcuua ccacgaugcg cuguaccgu 1500  
 ggauuaaguc cguggacca agccggcccg uccaguacga aggagguggu gcugauacca 1560  
 cugcaaccga cauacucgc ccaauguaug cgccggugga ugaggacaa ccuuuccgg 1620  
 cggugccaaa gugguccauc aagaaauggc ucucgcugcc cggagaaacg cccccguga 1680  
 uccugucga auaugcgac gcuauaggaa auucacuggg gggauuugcg aaguacggc 1740  
 aggcuuuucg acaguaccg agacuccagg guggcuucgu gugggacug guugaccaga 1800  
  
 gccucauaa auacgaugaa aacggcaacc caugguccgc guacggcgga gacuuuggag 1860  
 acacccuaa cgaucgccag uucugcauga acggccuggu guucgccgac agaaccgc 1920  
 auccgccc uacugaggcu aagcaccaac aacaguucuu ccaguucaga cugucggggc 1980  
 aaacgaucga agugacuucc gaauaccucu uccggcauuc ggacaacgag uugcugcacu 2040  
 ggauggucgc ccuggaugga aagccccucg ccuccggaga agugccgcuc gacguggcgc 2100  
 cgagggaaa gcaguugauc gaguugccgg aacugccaca gcccaguca gcaggacagc 2160



ucuggcuuac cgucagaguc gugcagccaa augccaccgc cuggucggag gcaggacaua	2220
uuucagccug gcagcagugg cgccucgccg agaaucugag cgugaccuug ccagcagccu	2280
cacacgccau uccgcaucug accacguccg aaauggacuu uuguaucgaa cuggggaaua	2340
agcgcuggca guucaaucgg caaucaggcu uccugucca gauguggauu ggugacaaga	2400
agcaguccu gaccccgucg cgcgaucaugu ucacucgcgc cccacuugac aacgacauug	2460
gcgugagcga ggccacgcgu aucgauccea acgcuugggu ggagcgcugg aaggcggcug	2520
gccacuaucg ggccggaggcc gcgcuccugc aguguaccgc ggauaccuc gcagacgccg	2580
uucugauuac cacggcgcau gccuggcaac accagggaag gaccuguuu aucagccgca	2640
aaacuuaccg gaucgauggc agcggccaaa uggcgaucau uguggacguc gagguggcau	2700
cagacacucc acaccagca cggaucggac ucaauugcca acuggcucua guggcugaga	2760
gagucaauug gcuggggcuc ggcccccaag agaacuacc ugaucggcuu acugccgcau	2820
gcuuugaccg gugggaucug ccucugucgg auauguacac cccuacgug uucccauccg	2880
agaacggucu gagauccggu acuagggagu ugaacuaccg accgcacaa uggagggggg	2940
acuuucagu caacauca agauacagc agcagcauu gauggaaacc ugcaccggc	3000
aucucuugca ugcagaggaa gggaccugc ugaacaucga uggauuccac augggauug	3060
guggggauga cuccuggucc ccuagcgugu ccgcggaacu ucagcugucc gccggccggu	3120
accacuacca gcucgugugg ugucaaaagu gauaaauaggc uggagccucg guggccaugc	3180
uucuuugccc uggggcucc cccagcccc uccuccuuu ccugcaccg uacccccgug	3240
gucuuugaau aaagucugag ugggcggcuc uaga	3274
<210> 8	
<211> 1019	
<212> PRT	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> LacZ	
<400> 8	
Met Ala Leu Ala Val Val Leu Gln Arg Arg Asp Trp Glu Asn Pro Gly	
1 5 10 15	
Val Thr Gln Leu Asn Arg Leu Ala Ala His Pro Pro Phe Ala Ser Trp	
20 25 30	
Arg Asn Ser Glu Glu Ala Arg Thr Asp Arg Pro Ser Gln Gln Leu Arg	
35 40 45	

Ser Leu Asn Gly Glu Trp Arg Phe Ala Trp Phe Pro Ala Pro Glu Ala  
50 55 60

Val Pro Glu Ser Trp Leu Glu Cys Asp Leu Pro Glu Ala Asp Thr Val  
65 70 75 80

Val Val Pro Ser Asn Trp Gln Met His Gly Tyr Asp Ala Pro Ile Tyr  
85 90 95

Thr Asn Val Thr Tyr Pro Ile Thr Val Asn Pro Pro Phe Val Pro Thr  
100 105 110

Glu Asn Pro Thr Gly Cys Tyr Ser Leu Thr Phe Asn Val Asp Glu Ser  
115 120 125

Trp Leu Gln Glu Gly Gln Thr Arg Ile Ile Phe Asp Gly Val Asn Ser  
130 135 140

Ala Phe His Leu Trp Cys Asn Gly Arg Trp Val Gly Tyr Gly Gln Asp  
145 150 155 160

Ser Arg Leu Pro Ser Glu Phe Asp Leu Ser Ala Phe Leu Arg Ala Gly  
165 170 175

Glu Asn Arg Leu Ala Val Met Val Leu Arg Trp Ser Asp Gly Ser Tyr  
180 185 190

Leu Glu Asp Gln Asp Met Trp Arg Met Ser Gly Ile Phe Arg Asp Val  
195 200 205

Ser Leu Leu His Lys Pro Thr Thr Gln Ile Ser Asp Phe His Val Ala  
210 215 220

Thr Arg Phe Asn Asp Asp Phe Ser Arg Ala Val Leu Glu Ala Glu Val  
225 230 235 240

Gln Met Cys Gly Glu Leu Arg Asp Tyr Leu Arg Val Thr Val Ser Leu  
245 250 255

Trp Gln Gly Glu Thr Gln Val Ala Ser Gly Thr Ala Pro Phe Gly Gly  
260 265 270

Glu Ile Ile Asp Glu Arg Gly Gly Tyr Ala Asp Arg Val Thr Leu Arg  
275 280 285

Leu Asn Val Glu Asn Pro Lys Leu Trp Ser Ala Glu Ile Pro Asn Leu

290                      295                      300  
 Tyr Arg Ala Val Val Glu Leu His Thr Ala Asp Gly Thr Leu Ile Glu  
 305                      310                      315                      320  
 Ala Glu Ala Cys Asp Val Gly Phe Arg Glu Val Arg Ile Glu Asn Gly  
                          325                      330                      335  
  
 Leu Leu Leu Leu Asn Gly Lys Pro Leu Leu Ile Arg Gly Val Asn Arg  
                          340                      345                      350  
 His Glu His His Pro Leu His Gly Gln Val Met Asp Glu Gln Thr Met  
                          355                      360                      365  
 Val Gln Asp Ile Leu Leu Met Lys Gln Asn Asn Phe Asn Ala Val Arg  
                          370                      375                      380  
 Cys Ser His Tyr Pro Asn His Pro Leu Trp Tyr Thr Leu Cys Asp Arg  
 385                      390                      395                      400  
  
 Tyr Gly Leu Tyr Val Val Asp Glu Ala Asn Ile Glu Thr His Gly Met  
                          405                      410                      415  
 Val Pro Met Asn Arg Leu Thr Asp Asp Pro Arg Trp Leu Pro Ala Met  
                          420                      425                      430  
 Ser Glu Arg Val Thr Arg Met Val Gln Arg Asp Arg Asn His Pro Ser  
                          435                      440                      445  
 Val Ile Ile Trp Ser Leu Gly Asn Glu Ser Gly His Gly Ala Asn His  
                          450                      455                      460  
  
 Asp Ala Leu Tyr Arg Trp Ile Lys Ser Val Asp Pro Ser Arg Pro Val  
 465                      470                      475                      480  
 Gln Tyr Glu Gly Gly Gly Ala Asp Thr Thr Ala Thr Asp Ile Ile Cys  
                          485                      490                      495  
 Pro Met Tyr Ala Arg Val Asp Glu Asp Gln Pro Phe Pro Ala Val Pro  
                          500                      505                      510  
 Lys Trp Ser Ile Lys Lys Trp Leu Ser Leu Pro Gly Glu Thr Arg Pro  
                          515                      520                      525  
  
 Leu Ile Leu Cys Glu Tyr Ala His Ala Met Gly Asn Ser Leu Gly Gly  
                          530                      535                      540

Phe Ala Lys Tyr Trp Gln Ala Phe Arg Gln Tyr Pro Arg Leu Gln Gly  
 545                      550                      555                      560  
 Gly Phe Val Trp Asp Trp Val Asp Gln Ser Leu Ile Lys Tyr Asp Glu  
                          565                      570                      575  
 Asn Gly Asn Pro Trp Ser Ala Tyr Gly Gly Asp Phe Gly Asp Thr Pro  
                          580                      585                      590  
  
 Asn Asp Arg Gln Phe Cys Met Asn Gly Leu Val Phe Ala Asp Arg Thr  
                          595                      600                      605  
 Pro His Pro Ala Leu Thr Glu Ala Lys His Gln Gln Gln Phe Phe Gln  
                          610                      615                      620  
 Phe Arg Leu Ser Gly Gln Thr Ile Glu Val Thr Ser Glu Tyr Leu Phe  
 625                      630                      635                      640  
 Arg His Ser Asp Asn Glu Leu Leu His Trp Met Val Ala Leu Asp Gly  
                          645                      650                      655  
  
 Lys Pro Leu Ala Ser Gly Glu Val Pro Leu Asp Val Ala Pro Gln Gly  
                          660                      665                      670  
 Lys Gln Leu Ile Glu Leu Pro Glu Leu Pro Gln Pro Glu Ser Ala Gly  
                          675                      680                      685  
 Gln Leu Trp Leu Thr Val Arg Val Val Gln Pro Asn Ala Thr Ala Trp  
                          690                      695                      700  
 Ser Glu Ala Gly His Ile Ser Ala Trp Gln Gln Trp Arg Leu Ala Glu  
 705                      710                      715                      720  
  
 Asn Leu Ser Val Thr Leu Pro Ala Ala Ser His Ala Ile Pro His Leu  
                          725                      730                      735  
 Thr Thr Ser Glu Met Asp Phe Cys Ile Glu Leu Gly Asn Lys Arg Trp  
                          740                      745                      750  
 Gln Phe Asn Arg Gln Ser Gly Phe Leu Ser Gln Met Trp Ile Gly Asp  
                          755                      760                      765  
 Lys Lys Gln Leu Leu Thr Pro Leu Arg Asp Gln Phe Thr Arg Ala Pro  
                          770                      775                      780  
  
 Leu Asp Asn Asp Ile Gly Val Ser Glu Ala Thr Arg Ile Asp Pro Asn

785                      790                      795                      800  
Ala Trp Val Glu Arg Trp Lys Ala Ala Gly His Tyr Gln Ala Glu Ala  
                                 805                      810                      815  
Ala Leu Leu Gln Cys Thr Ala Asp Thr Leu Ala Asp Ala Val Leu Ile  
                                 820                      825                      830  
Thr Thr Ala His Ala Trp Gln His Gln Gly Lys Thr Leu Phe Ile Ser  
                                 835                      840                      845  
  
Arg Lys Thr Tyr Arg Ile Asp Gly Ser Gly Gln Met Ala Ile Thr Val  
                                 850                      855                      860  
Asp Val Glu Val Ala Ser Asp Thr Pro His Pro Ala Arg Ile Gly Leu  
865                      870                      875                      880  
Asn Cys Gln Leu Ala Gln Val Ala Glu Arg Val Asn Trp Leu Gly Leu  
                                 885                      890                      895  
Gly Pro Gln Glu Asn Tyr Pro Asp Arg Leu Thr Ala Ala Cys Phe Asp  
                                 900                      905                      910  
  
Arg Trp Asp Leu Pro Leu Ser Asp Met Tyr Thr Pro Tyr Val Phe Pro  
                                 915                      920                      925  
Ser Glu Asn Gly Leu Arg Cys Gly Thr Arg Glu Leu Asn Tyr Gly Pro  
                                 930                      935                      940  
His Gln Trp Arg Gly Asp Phe Gln Phe Asn Ile Ser Arg Tyr Ser Gln  
945                      950                      955                      960  
Gln Gln Leu Met Glu Thr Ser His Arg His Leu Leu His Ala Glu Glu  
                                 965                      970                      975  
  
Gly Thr Trp Leu Asn Ile Asp Gly Phe His Met Gly Ile Gly Gly Asp  
                                 980                      985                      990  
Asp Ser Trp Ser Pro Ser Val Ser Ala Glu Leu Gln Leu Ser Ala Gly  
                                 995                      1000                      1005  
Arg Tyr His Tyr Gln Leu Val Trp Cys Gln Lys  
                                 1010                      1015

<210> 9

<211> 3057

<212> RNA



<213> Artificial Sequence

<220><223> LacZ ORF nucleotide sequence

<220><221> misc\_feature

<222> (1)..(3057)

<223> A = AMP, C = CMP, G = GMP, U = N1-methyl-pseudoUMP

<400> 9

auggccuugg cugucguccu gcaaagaaga gauugggaaa auccuggagu uacgcaacug	60
aaauagacug cgcacaucc accguucgcg uccuggcgaa auagcgaaga agcgcggacc	120
gacagaccuu cgcagcagcu ggcgcucuc aacggggaau ggcgguucgc augguuuccg	180
gcuccugagg cagucccgga aagcuggcuc gagugcgacc ucccgggaagc cgauacggug	240
guggugccgu caaaauggca aaugcaugga uacgacgccc ccaucucac caacgucacu	300
uaccuauca ccgugaaucc ccuauucguc ccgacugaga acccgacugg augcuacagc	360
cugaccuuua acguggacga gucguugcug caagaagggc agacucgcau cauuuucgac	420
ggagucaacu ccgcuucca ucuuuggugu aacggacggu gggugggaa cgggcaggac	480
uccaggcugc cgagcgaauu cgacuugua gccuuccugc gcgcggcgga aaaccgccug	540
gcugucaugg uccuuagaug gucggauagg ucguaccugg aggaucagga cauguggagg	600
augucaggga ucuuccggga ugucucgucg cuccacaagc caacuacca gaucuccgac	660
uuucaugugg ccacccguu caacgaugac uucagcaggg cgguucugga agccgaggug	720
caaaugugcg gagaacugag ggacuaccuc cgcgugacug ucucgcucug gcagggugaa	780
acccaagugg cuucaggcac ugcaccguuc ggaggagaaa ucaucgacga acggggagga	840
uacgccgauc gcgucacccu gcgccucaau guggaaaauc cgaacugug gucggcagaa	900
aucccuauu uguaccgggc cgugguggag cugcacaccg ccgacggaac ucugaucgag	960
gccgaggcau gcgauguggg auuccgcgag guccgcaucg aaaauggacu gcuucugcuu	1020
aauggcaaac cgcugcucua ccgcggagug aacagacacg agcaucaccc gcugcacggu	1080
caggucaugg augaacagac uauuggugaa gacaucugc ugaugaaaca aaacaacuuc	1140
aacgccguuc ggugcucca uuaccuauu caccguugu gguauaccu uugcgauagg	1200
uacggccucu acguggugga cgaagcgaac aucgagacuc acggaauugu ccuaugaac	1260
cgccucacug acgacccgag guggcucccg gcaaugucgg aacgagugac ucggauggug	1320
cagagggacc gcaaccaucc gucggugaua aucuggucgc uggggaacga aucuggccac	1380
ggagcuaucc acgaugcgcu guaccgucg auuaaguccg uggaccaag ccggcccugc	1440
caguacgaag gagguggugc ugauaccacu gcaaccgaca ucaucugccc aaugaugcg	1500

cggguggaug aggaccaacc uuucccggcg gugccaaagu gguccaucaa gaaauggcuc	1560
ucgcugcccc gagaaacgcg cccgcugauc cugugcgaau augcgcacgc uaugggaaau	1620
ucacuggggg gauuugcgaa guacuggcag gcuuuucgac aguacccgag acuccagggu	1680
ggcuucgugu gggacugggu ugaccagagc cucaucaaau acgaugaaaa cggcaaccca	1740
ugguccgcgu acggcggaga cuuuggagac accccuaacg aucgccaguu cugcaugaac	1800
ggccuggugu ucgccgacag aacuccgcau ccagcccuua cugaggcuua gcaccaacaa	1860
caguucuucc aguucagacu gucggggcaa acgaucgaag ugacuuccga auaccucuuc	1920
cggcauucgg acaacgaguu gcugcacugg auggucgccc uggauggaaa gccccucgcc	1980
uccggagaag ugccgcucga cguggcgccg cagggaaagc aguugaucga guugccggaa	2040
cugccacagc ccgagucagc aggacagcuc ugguuuaccg ucagagucgu gcagccaaau	2100
gccaccgccu ggucggaggc aggacauuu ucagccuggc agcaguggcg ccucgccgag	2160
aaucugagcg ugaccuugcc agcagccuca cacgccauuc cgcaucugac cacguccgaa	2220
auggacuuuu guaucgaacu ggggaauaag cgucggcagu ucaauccgca aucaggcuuc	2280
cugucccaga uguggauugg ugacaagaag cagcuccuga ccccgucgcg cgaucaguuc	2340
acucgcgccc cacuugacaa cgacauuggc gugagcgagg ccacgcgau cgauccaaac	2400
gcuugggugg agcgcuggaa ggcggcuggc cacuauagg cgaggccgc gcuccugcag	2460
uguaccgcgg auaccucgc agacgccguu cugauuacca cggcgcaugc cuggcaacac	2520
cagggaaaga cccguuuuau cagccgcaaa acuuaccgga ucgauggcag cggccaaug	2580
gcgaucacug uggacgucga gguggcauca gacacuccac acccagcacg gaucggacuc	2640
aauugccaac uggcucaagu ggcugagaga gucaauuggc ugggccucgg cccccaagag	2700
aacuaccug aucggcuuac ugccgcaugc uuugaccggu gggaucugcc ucugucggau	2760
auguacccc ccuacguguu cccauccgag aacggucuga gaugcgguac uagggaguug	2820
aacuacggac cgcaccaaug gaggggggac uuucaguuca acaucuag auacagccag	2880
cagcaauuga uggaaccuc gcaccggcau cucuugcaug cagaggaagg gaccuggcug	2940
aacaucgaug gauuccacau gggaauuggu ggggaugacu ccuggucucc uagcgugucc	3000
gcggaacuuc agcuguccgc cggccgguac cacuaccagc ucguguggug ucaaaag	3057