(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0022050
(43) 공개일자 2025년02월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/39 (2006.01) *A61K 31/4745* (2006.01)
A61K 38/45 (2006.01) *A61K 47/26* (2017.01)
A61K 48/00 (2006.01) *A61P 37/04* (2006.01)
C12N 15/88 (2017.01) *C12N 9/12* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 39/39 (2013.01)
A61K 31/4745 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-7041463
(22) 출원일자(국제) 2023년05월12일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년12월13일
(86) 국제출원번호 PCT/US2023/066975
(87) 국제공개번호 WO 2023/220747
국제공개일자 2023년11월16일
(30) 우선권주장
63/341,984 2022년05월13일 미국(US)

(71) 출원인
코너 테라퓨틱스, 인크.
미국 02472 메사추세츠 워터타운 노스 비컨 스트리트 300 빌딩 39 스위트 202
(72) 발명자
고셀린, 에밀리
미국 02472 메사추세츠 워터타운 노스 비컨 스트리트 300 빌딩 39 스위트 202 코너 테라퓨틱스, 인크. 내
지바키, 다니아
미국 02472 메사추세츠 워터타운 노스 비컨 스트리트 300 빌딩 39 스위트 202 코너 테라퓨틱스, 인크. 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 이상남

전체 청구항 수 : 총 75 항

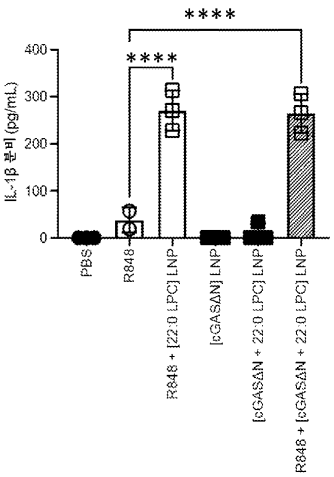
(54) 발명의 명칭 **구성적으로 활성인 시클릭 GMP-AMP 신타제를 코딩하는 핵산 및 이를 위한 면역원성 전달 비히클**

(57) 요 약

본 개시내용은 포유동물 대상체의 세포에서의 구성적으로 활성인 시클릭 GMP-AMP 신타제의 발현을 위한 조성물 및 mRNA 백신의 면역원성을 증진시키기 위한 그의 용도에 관한 것이다. mRNA는 지질 나노입자 (LNP)에 캡슐화될 수 있거나 또는 지질과 복합체화될 수 있다 (RNA-리포플렉스). 본 개시내용은 또한 리소포스파티딜콜린 (LPC) 화합물 및 병원체 인식 수용체 효능제 중 하나 또는 둘 다를 추가로 포함하는 조성물에 관한 것이다.

대 표 도

도 4A



(52) CPC특허분류
A61K 38/45 (2013.01)
A61K 47/26 (2013.01)
A61K 48/0033 (2013.01)
A61P 37/04 (2018.01)
C12N 15/88 (2013.01)
C12N 9/1288 (2013.01)
A61K 2039/53 (2013.01)
A61K 2039/55516 (2013.01)
A61K 2039/55555 (2013.01)

(72) 발명자
차우, 조나단
미국 02472 메사추세츠 워터타운 노스 비컨 스트리트 300 빌딩 39 스위트 202 코너 테라퓨틱스, 인크. 내
니키포로브, 아나스타샤
미국 02472 메사추세츠 워터타운 노스 비컨 스트리트 300 빌딩 39 스위트 202 코너 테라퓨틱스, 인크. 내
생업타, 데브루프
미국 02472 메사추세츠 워터타운 노스 비컨 스트리트 300 빌딩 39 스위트 202 코너 테라퓨틱스, 인크. 내

명 세 서

청구범위

청구항 1

지질 나노입자 (LNP)에 캡슐화된 mRNA를 포함하는 조성물로서, 여기서 mRNA는 구성적으로 활성인 시클릭 GMP-AMP 신타제 (cGAS)의 코딩 영역을 포함하고, LNP는 제1 인지질, 및 이온화가능한 지질, 페길화 지질, 구조적 지질, 제2 인지질, 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 지질을 포함하고, 여기서 제1 인지질은 단일 C13-C24 아실 쇄를 갖는 리소포스파티딜콜린 (LPC)을 포함하는 것인 조성물.

청구항 2

지질 나노입자 (LNP)에 캡슐화된 제1 mRNA 및 제2 mRNA를 포함하는 조성물로서, 여기서 제1 mRNA는 구성적으로 활성인 시클릭 GMP-AMP 신타제 (cGAS)의 코딩 영역을 포함하고, 제2 mRNA는 항원의 코딩 영역을 포함하고; LNP는 제1 인지질, 및 이온화가능한 지질, 페길화 지질, 구조적 지질, 제2 인지질, 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 지질을 포함하고, 여기서 제1 인지질은 단일 C13-C24 아실 쇄를 갖는 리소포스파티딜콜린 (LPC)을 포함하는 것인 조성물.

청구항 3

지질 나노입자 (LNP)에 캡슐화된 mRNA를 포함하는 조성물로서, 여기서 mRNA는 2A-유사 서열에 의해 분리된 제1 코딩 영역 및 제2 코딩 영역을 포함하고, 여기서 제1 코딩 영역은 구성적으로 활성인 시클릭 GMP-AMP 신타제 (cGAS)의 코딩 영역이고 제2 코딩 영역은 항원의 코딩 영역이거나, 또는 제1 코딩 영역은 항원의 코딩 영역이고 제2 코딩 영역은 구성적으로 활성인 시클릭 GMP-AMP 신타제 (cGAS)의 코딩 영역이고, LNP는 제1 인지질, 및 이온화가능한 지질, 페길화 지질, 구조적 지질, 제2 인지질, 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 지질을 포함하고, 여기서 제1 인지질은 단일 C13-C24 아실 쇄를 갖는 리소포스파티딜콜린 (LPC)을 포함하는 것인 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 지질이 이온화가능한 지질, 제2 인지질, 페길화 지질, 및 구조적 지질을 포함하는 것인 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 이온화가능한 지질이 하기를 포함하는 것인 조성물:

i) 8-[(2-히드록시에틸)[6-옥소-6-(운데실옥시)헥실]아미노]-옥탄산, 1-옥틸노닐 에스테르 (SM-102) 또는 그의 유사체 또는 유도체; 및/또는

ii) 6-((2-헥실데카노일)옥시)-N-(6-((2-헥실데카노일)옥시)헥실)-N-(4-히드록시부틸)헥산-1-아미늄 (ALC-0315) 또는 그의 유사체 또는 유도체; 및/또는

iii) (6Z,9Z,28Z,31Z)-헵타트리아콘타-6,9,28,31-테트라엔-19-일 4-(디메틸아미노)부타노에이트 (DLin-MC3-DMA) 또는 그의 유사체 또는 유도체.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 페길화 지질이 PEG-변형된 포스파티딜에탄올아민, PEG-변형된 포스파티드산, PEG-변형된 세라마이드, PEG-변형된 디알킬아민, PEG-변형된 디아실글리세롤, PEG-변형된 디알킬글리세롤, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 페길화 지질이 폴리에틸렌 글리콜 [PEG] 2000 디미리스토일 글리세롤 [DMG]을 포함하는 것인 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 구조적 지질이 콜레스테롤, 페코스테롤, 시토스테롤, 에르고스테롤, 캄페스테롤, 스티그마스테롤, 브라시카스테롤, 토마티딘, 우르솔산, 알파-토코페롤, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 조성물.

청구항 9

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 구조적 지질이 콜레스테롤을 포함하는 것인 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 인지질이 하기를 포함하는 것인 조성물:

i) 포스파티딜 콜린, 포스파티딜 에탄올아민, 포스파티딜 글리세롤, 포스파티딜 세린, 포스파티드산, 2-리소포스파티딜 콜린, 및 스핑고미엘린으로 이루어진 군으로부터 선택되는 친수성 머리 모이어티; 및

ii) 라우르산, 미리스트산, 미리스톨레산, 팔미트산, 팔미톨레산, 스테아르산, 올레산, 리놀레산, 알파-리놀렌산, 에루스산, 아라키드산, 아라키돈산, 피탄산, 에이코사펜타엔산, 베헨산, 도코사펜타엔산, 및 도코사헥사엔산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 지방산 꼬리 모이어티.

청구항 11

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 인지질이 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 조성물:

1,2-디리놀레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (DLPC),

1,2-디미리스토일-sn-글리세로-포스포콜린 (DMPC),

1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (DOPC),

1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (DPPC),

1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (DSPC),

1,2-디운데카노일-sn-글리세로-포스포콜린 (DUPC),

1-팔미토일-2-올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (POPC),

1,2-디-O-옥타데세닐-sn-글리세로-3-포스포콜린,

1-올레오일-2-콜레스테릴헤미숙시노일-sn-글리세로-3-포스포콜린,

1,2-디리놀레노일-sn-글리세로-3-포스포콜린,

1,2-디아라키도노일-sn-글리세로-3-포스포콜린,

1,2-디도코사헥사에노일-sn-글리세로-3-포스포콜린,

1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 (DOPE),

1,2-디피타노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민,

1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민,

1,2-디리놀레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민,

1,2-디리놀레노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민,

1,2-디아라키도노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민,

1,2-디도코사헥사에노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민,

1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포-rac-(1-글리세롤) 나트륨 염 (DOPG),

스핑고미엘린, 및

이들의 조합.

청구항 12

제11항에 있어서, 제2 인지질이 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (DSPC)을 포함하는 것인 조성물.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물이 적어도 하나의 부형제를 추가로 포함하는 것인 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서, 부형제가 수크로스를 포함하는 것인 조성물.

청구항 15

하기를 포함하는 조성물로서:

i) 하나 이상의 지질과 복합체화된 mRNA (RNA-리포플렉스); 및

ii) 단일 C13-C24 아실 쇄를 갖는 리소포스파티딜콜린 (LPC),

여기서 mRNA는 구성적으로 활성인 시클릭 GMP-AMP 신타제 (cGAS)의 코딩 영역을 포함하고, 하나 이상의 지질은 제1 지질 및 제2 지질을 포함하는 것인 조성물.

청구항 16

하기를 포함하는 조성물로서:

i) 하나 이상의 지질과 복합체화된 제1 mRNA 및 제2 mRNA (RNA-리포플렉스); 및

ii) 단일 C13-C24 아실 쇄를 갖는 리소포스파티딜콜린 (LPC),

여기서 제1 mRNA는 구성적으로 활성인 시클릭 GMP-AMP 신타제 (cGAS)의 코딩 영역을 포함하고, 제2 mRNA는 항원의 코딩 영역을 포함하고, 하나 이상의 지질은 제1 지질 및 제2 지질을 포함하는 것인 조성물.

청구항 17

하기를 포함하는 조성물로서:

i) 하나 이상의 지질과 복합체화된 mRNA (RNA-리포플렉스); 및

ii) 단일 C13-C24 아실 쇄를 갖는 리소포스파티딜콜린 (LPC),

여기서 mRNA는 2A-유사 서열에 의해 분리된 제1 코딩 영역 및 제2 코딩 영역을 포함하고, 제1 코딩 영역은 구성적으로 활성인 시클릭 GMP-AMP 신타제 (cGAS)의 코딩 영역이고 제2 코딩 영역은 항원의 코딩 영역이거나, 또는 제1 코딩 영역은 항원의 코딩 영역이고 제2 코딩 영역은 구성적으로 활성인 시클릭 GMP-AMP 신타제 (cGAS)의 코딩 영역이고, 하나 이상의 지질은 제1 지질 및 제2 지질을 포함하는 것인 조성물.

청구항 18

제15항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 지질이 양이온성 지질이고, 제2 지질이 중성 또는 음이온성 지질인 조성물.

청구항 19

제18항에 있어서, 양이온성 지질이 하기 중 하나 또는 둘 다를 포함하는 것인 조성물:

i) 1,2-디-O-옥타데세닐-3-트리메틸암모늄 프로판 (DOTMA) 또는 그의 유사체 또는 유도체; 및

ii) 1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄 프로판 (DOTAP) 또는 그의 유사체 또는 유도체.

청구항 20

제18항 또는 제19항에 있어서, 중성 또는 음이온성 지질이 하기를 포함하는 것인 조성물:

i) 1,2-디-(9Z-옥타데세노일)-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 (DOPE) 또는 그의 유사체 또는 유도체; 및/또는

ii) 콜레스테롤 또는 그의 유사체 또는 유도체; 및/또는

iii) 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (DOPC) 또는 그의 유사체 또는 유도체.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, LPC의 아실 쇄가 C21-C24 아실 쇄인 조성물.

청구항 22

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, LPC의 아실 쇄가 C22 아실 쇄인 조성물.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, LPC의 아실 쇄가 완전 포화된 것인 조성물.

청구항 24

제23항에 있어서, LPC가 1-베헤노일-2-히드록시-sn-글리세로-3-포스포콜린 [LPC(22:0)]을 포함하는 것인 조성물.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, TLR7/8 효능제를 추가로 포함하는 조성물.

청구항 26

제25항에 있어서, TLR7/8 효능제가 900 달톤 이하의 분자량을 갖는 소분자인 조성물.

청구항 27

제26항에 있어서, TLR7/8 효능제가 이미다조퀴놀린 화합물을 포함하는 것인 조성물.

청구항 28

제27항에 있어서, TLR7/8 효능제가 레시퀴모드 (R848)를 포함하는 것인 조성물.

청구항 29

제25항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, LPC가 LPC(22:0)를 포함하고, TLR7/8 효능제가 레시퀴모드 (R848)를 포함하는 것인 조성물.

청구항 30

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, mRNA 또는 제1 mRNA 및 제2 mRNA가 5' 비번역 영역 (5'UTR) 및 3' 비번역 영역 (3'UTR)을 포함하는 것인 조성물.

청구항 31

제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, mRNA가 5' 캡 구조를 포함하는 것인 조성물.

청구항 32

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, mRNA가 폴리A 꼬리를 포함하는 것인 조성물.

청구항 33

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, mRNA가 뉴클레오시드-변형된 mRNA인 조성물.

청구항 34

i) 항원의 코딩 영역, 및 ii) 구성적으로 활성인 시클릭 GMP-AMP 신타제 (cGAS)의 코딩 영역을 포함하는 핵산으

로서, 임의로 여기서 핵산은 mRNA이고, 임의로 여기서 핵산은 DNA인 핵산.

청구항 35

제34항의 핵산을 포함하는 발현 벡터.

청구항 36

제1항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 구성적으로 활성인 cGAS가 그의 야생형 대응물보다 더 큰 자기 DNA 반응성에 대한 경향성을 갖는 것인 조성물.

청구항 37

제1항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, cGAS가 아미노-말단 포스포이노시티드-결합 도메인이 없는 말단절단된 cGAS (cGAS ΔN)인 조성물.

청구항 38

제37항에 있어서, cGAS ΔN이 서열식별번호: 1의 아미노산 서열 또는 서열식별번호: 1과 적어도 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인 조성물.

청구항 39

제38항에 있어서, cGAS ΔN이 하기를 포함하는 것인 조성물:

(i) 서열식별번호: 2, 서열식별번호: 3, 서열식별번호: 4, 서열식별번호: 5, 서열식별번호: 6, 서열식별번호: 7 또는 서열식별번호: 8의 아미노산 서열, 또는 서열식별번호: 2, 서열식별번호: 3, 서열식별번호: 4, 서열식별번호: 5, 서열식별번호: 6, 서열식별번호: 7 또는 서열식별번호: 8과 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열; 또는

(ii) 서열식별번호: 9의 컨센서스 아미노산 서열.

청구항 40

제38항에 있어서, cGAS ΔN이 서열식별번호: 17의 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 것인 조성물.

청구항 41

제37항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, cGAS ΔN의 코딩 영역이 시작 코돈 (ATG)과 작동가능한 조합으로 존재하는 것인 조성물.

청구항 42

제1항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 항원이 종양 항원인 조성물.

청구항 43

제42항에 있어서, 종양 항원이 종양-연관 항원인 조성물.

청구항 44

제42항에 있어서, 종양 항원이 신생항원인 조성물.

청구항 45

제1항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 항원이 미생물 항원을 포함하는 것인 조성물.

청구항 46

제44항에 있어서, 미생물 항원이 바이러스 항원, 박테리아 항원, 원충 항원, 또는 진균 항원을 포함하는 것인 조성물.

청구항 47

제1항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 항원이 병원체의 표면 단백질 또는 그의 단편을 포함하는 것인 조성물.

청구항 48

제47항에 있어서, 병원체가 인간 대상체에서 질환을 유발할 수 있는 것인 조성물.

청구항 49

제47항 또는 제48항에 있어서, 병원체가 바이러스인 조성물.

청구항 50

제49항에 있어서, 바이러스가 SARS-CoV-2인 조성물.

청구항 51

제50항에 있어서, 항원이 SARS-CoV-2의 스파이크 (S) 당단백질이고, 임의로 여기서 스파이크 당단백질이 융합전 안정화된 변이체인 조성물.

청구항 52

제1항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물이 리포폴리사카라이드 (LPS) 또는 모노포스포릴 지질 A (MPLA)를 포함하지 않는 것인 조성물.

청구항 53

제1항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물이 산화된 1-팔미토일-2-아라키도노일-sn-글리세로-3-포스포릴콜린 (oxPAPC) 또는 oxPAPC의 종을 포함하지 않는 것인 조성물.

청구항 54

제53항에 있어서, 조성물이 2-[[(2R)-2-[(E)-7-카르복시-5-히드록시헵트-6-에노일]옥시-3-헥사데카노일옥시프로폭시]-히드록시포스포릴]옥시에틸-트리메틸아자늄 (HOdiA-PC), [(2R)-2-[(E)-7-카르복시-5-옥소헵트-6-에노일]옥시-3-헥사데카노일옥시프로필] 2-(트리메틸아자늄일)에틸 포스페이트 (KOdiA-PC), 1-팔미토일-2-(5-히드록시-8-옥소-옥테노일)-sn-글리세로-3-포스포릴콜린 (HOOA-PC), 2-[[(2R)-2-[(E)-5,8-디옥소옥트-6-에노일]옥시-3-헥사데카노일옥시프로폭시]-히드록시포스포릴]옥시에틸-트리메틸아자늄 (KOOA-PC), [(2R)-3-헥사데카노일옥시-2-(5-옥소펜타노일옥시)프로필] 2-(트리메틸아자늄일)에틸 포스페이트 (POVPC), [(2R)-2-(4-카르복시부타노일옥시)-3-헥사데카노일옥시프로필] 2-(트리메틸아자늄일)에틸 포스페이트 (PGPC), [(2R)-3-헥사데카노일옥시-2-[4-[3-[(E)-[2-[(Z)-옥트-2-에닐]-5-옥소시클로펜트-3-엔-1-일리덴]메틸]옥시란-2-일]부타노일옥시]프로필] 2-(트리메틸아자늄일)에틸 포스페이트 (PECPC), [(2R)-3-헥사데카노일옥시-2-[4-[3-[(E)-[3-히드록시-2-[(Z)-옥트-2-에닐]-5-옥소시클로펜틸리덴]메틸]옥시란-2-일]부타노일옥시]프로필] 2-(트리메틸아자늄일)에틸 포스페이트 (PEIPC) 및/또는 1-팔미토일-2-아젤라오일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (PAzePC)을 포함하지 않는 것인 조성물.

청구항 55

제1항 내지 제54항 중 어느 한 항의 조성물, 및 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 제약 제제.

청구항 56

과활성화된 수지상 세포의 생성 방법으로서, 수지상 세포를 제1항 내지 제54항 중 어느 한 항, 제25항 내지 제54항 중 어느 한 항의 조성물, 또는 제55항의 제제의 유효량과 접촉시켜 과활성화된 수지상 세포를 생성하는 것을 포함하고, 여기서 과활성화된 수지상 세포는 노출 약 48시간 이내에 세포 사멸을 겪지 않으면서 IL-1베타를 분비하는 것인 방법.

청구항 57

제56항에 있어서, 수지상 세포가

(i) 생체내에서 조성물과 접촉되거나; 또는

(ii) 생체외에서 조성물과 접촉되는 것인

방법.

청구항 58

제56항 또는 제57항에 있어서, 과활성화된 수지상 세포가

(i) 비자극된 수지상 세포 또는 비어있는 LNP와 접촉된 수지상 세포보다 더 높은 수준의 IL-6, TNFα, RANTES 및 IP-10 중 하나 이상을 분비하고/거나;

(ii) 더 높은 수준의 CCR7, CD40, CD80, CD83, CD86, MHC 부류 II, MHC 부류 I, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 세포 표면 마커를 발현하는 것인

방법.

청구항 59

제56항 내지 제58항 중 어느 한 항의 방법에 의해 생성된 적어도 10^3, 10^4, 10^5 또는 10^6개의 과활성화된 수지상 세포, 및 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 제약 제제.

청구항 60

항원에 대한 면역 반응을 자극하는 방법으로서, 제55항 또는 제59항의 제약 제제의 유효량을 이를 필요로 하는 개체에게 투여하여 항원에 대한 면역 반응을 자극하는 것을 포함하는 방법.

청구항 61

암을 치료하는 방법으로서, 제55항 또는 제59항의 제약 제제의 유효량을 이를 필요로 하는 개체에게 투여하여 암을 치료하는 것을 포함하는 방법.

청구항 62

비정상적 세포 증식을 억제하는 방법으로서, 제55항 또는 제59항의 제약 제제의 유효량을 이를 필요로 하는 개체에게 투여하여 비정상적 세포 증식을 억제하는 것을 포함하는 방법.

청구항 63

감염성 질환을 치료하거나 또는 예방하는 방법으로서, 제55항의 제약 제제의 유효량을 이를 필요로 하는 개체에게 투여하여 감염성 질환을 치료하거나 또는 예방하는 것을 포함하는 방법.

청구항 64

제63항에 있어서, 감염성 질환이 바이러스성 질환인 방법.

청구항 65

제63항에 있어서, 감염성 질환이 박테리아성 질환인 방법.

청구항 66

제56항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서, 수지상 세포가 포유동물 세포인 방법 또는 제약 제제.

청구항 67

제66항에 있어서, 포유동물 세포가 인간 세포인 방법 또는 제약 제제.

청구항 68

제60항 내지 제66항 중 어느 한 항에 있어서, 개체가 포유동물인 방법.

청구항 69

제68항에 있어서, 포유동물이 인간인 방법.

청구항 70

제68항에 있어서, 포유동물이 개 또는 고양이인 방법.

청구항 71

제1항 내지 제70항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 인지질이 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (DSPC)을 포함하고, 적어도 하나의 지질이 8-[(2-히드록시에틸)[6-옥소-6-(운데실옥시)헥실]아미노]-옥탄산, 1-옥틸노닐 에스테르 (SM-102) 또는 그의 유사체 또는 유도체, 및 콜레스테롤을 포함하는 것인 조성물, 제제, 또는 방법.

청구항 72

제71항에 있어서, 적어도 하나의 지질이 페길화 지질을 추가로 포함하고, 임의로 여기서 페길화 지질이 폴리에틸렌 글리콜 [PEG] 2000 디미리스토일 글리세롤 [DMG]을 포함하는 것인 조성물, 제제, 또는 방법.

청구항 73

제1항 내지 제72항 중 어느 한 항에 있어서, LNP가 약 250 나노미터 미만, 임의로 약 25 내지 약 250 나노미터, 임의로 약 50 내지 약 200 나노미터, 또는 임의로 약 75 내지 약 175 나노미터의 유효 직경을 갖는 것인 조성물, 제제, 또는 방법.

청구항 74

제73항에 있어서, LNP가 약 200 나노미터 미만의 유효 직경을 갖는 것인 조성물, 제제, 또는 방법.

청구항 75

제73항에 있어서, LNP가 약 150 나노미터 미만의 유효 직경을 갖는 것인 조성물, 제제, 또는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 2022년 5월 13일에 출원된 미국 가특허 출원 번호 63/341,984의 우선권을 주장하며, 이는 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0003] ASCII 텍스트 파일로서 서열 목록의 제출

[0004] 전자 서열 목록 (165532000240SEQLIST.xml; 크기: 22,341 바이트; 및 생성일: 2023년 5월 11일)의 내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0005] 분야

[0006] 본 개시내용은 포유동물 대상체의 세포에서의 구성적으로 활성인 시클릭 GMP-AMP 신타제의 발현을 위한 조성물 및 mRNA 백신의 면역원성을 증진시키기 위한 그의 용도에 관한 것이다. mRNA는 지질 나노입자 (LNP)에 캡슐화될 수 있거나 또는 지질과 복합체화될 수 있다 (RNA-리포플렉스(Lipoplex)). 본 개시내용은 또한 리소포스파티딜콜린 (LPC) 화합물 및 병원체 인식 수용체 효능제 중 하나 또는 둘 다를 추가로 포함하는 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0007] mRNA 화학 및 전달 시스템의 진보는 몇 가지 효과적인 mRNA COVID-19 백신의 신속한 생산을 가능하게 하였다

(Hou et al., Nature Review Materials, 6:1078-1094, 2021). 그러나, 최근의 보고는 SARS-CoV-2 스파이크 단백질에 대한 T 세포 반응성이 사전 SARS-CoV-2 감염을 갖는 개체에서보다 백신접종된 비감염된 개체에서 상당히 더 낮음을 밝혀내었다 (Naranbhai et al., Cell, 185:1-11, 2022). 이는 더 높은 수준의 SARS-CoV-2-반응성 CD4+ 및 CD8+ T 세포 면역 반응이 더 경도의 COVID-19 질환과 연관되는 것으로 밝혀졌다는 점을 고려하면 우려스럽다 (Rydyznski Moderbacher et al., Cell, 183(4):996-1012, 2020).

[0008] 따라서, mRNA 백신에 의해 유발되는 세포성 면역 반응을 증진시키기 위한 제제가 관련 기술분야에 필요하다. 특히, 핵산-코딩된 항원에 대한 적응성 면역 반응을 증가시키기에 적합한 아주반트가 요망된다.

발명의 내용

[0009] 본 개시내용은 포유동물 대상체의 세포에서의 구성적으로 활성인 시클릭 GMP-AMP 신타제의 발현을 위한 조성물 및 mRNA 백신의 면역원성을 증진시키기 위한 그의 용도에 관한 것이다. mRNA는 지질 나노입자 (LNP)에 캡슐화될 수 있거나 또는 지질과 복합체화될 수 있다 (RNA-리포플렉스). 본 개시내용은 또한 리소포스파티딜콜린 (LPC) 화합물 및 병원체 인식 수용체 효능제 중 하나 또는 둘 다를 추가로 포함하는 조성물에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

[0010] **도 1**은 인간 (*호모 사피엔스*(*Homo sapiens*), 서열식별번호(SEQ ID NO): 1); 레서스 원숭이 (*마카카 물라타*(*Macaca mulatta*), 서열식별번호: 2); 올리브 개코원숭이 (*파피오 아누비스*(*Papio anubis*), 서열식별번호: 3); 북부 흰빰 긴팔원숭이 (*노마스쿠스 류코게니스*(*Nomascus leucogenys*), 서열식별번호: 4); 보통 긴팔원숭이 (*힐로바테스 라르*(*Hylobates lar*), 서열식별번호: 5); 수마트라 오랑우탄 (*퐁고 아벨리이*(*Pongo abelii*), 서열식별번호: 6); 침팬지 (*판 트로글로디테스*(*Pan troglodytes*), 서열식별번호: 7); 서부 고릴라 (*고릴라*(*Gorilla*), 서열식별번호: 8)를 포함하는 영장류 cGAS ΔN 단백질의 아미노산 서열; 및 cGAS ΔN 컨센서스 서열 (서열식별번호: 9)의 정렬이다.

도 2는 그의 아미노-말단 포스포이노시티드-결합 도메인의 제거에 의해 구성적으로 활성이도록 조작된 시클릭 GAMP-AMP 신타제 (cGAS)에 의한 인터페론 유전자 (STING) 선천성 면역 신호전달 경로의 자극제의 활성화를 도시하는 카툰이다. cGAS ΔN은 미토콘드리아에 국재화되며, 여기서 이는 DNA에 결합하여 cGAMP의 생성을 발생시킨다.

도 3A-3C는 22:0 LPC 및/또는 cGAS ΔN mRNA로 로딩된 지질 나노입자 (LNP)의 특징을 도시한다. **도 3A**는 22:0 LPC 및/또는 cGAS ΔN mRNA로 로딩된 LNP가 모두 150 nm 미만의 직경임을 제시한다. **도 3B**는 mRNA 로딩 효율 (이론적 로딩과 비교하여 실제 로딩)이 cGAS ΔN mRNA 단독으로 로딩된 LNP와 cGAS ΔN mRNA 및 22:0 LPC 둘 다로 로딩된 LNP 사이에 유사함을 제시한다. **도 3C**는 22:0 LPC 로딩 효율 (이론적 로딩과 비교하여 실제 로딩)이 22:0 LPC 단독으로 로딩된 LNP와 cGAS ΔN mRNA 및 22:0 LPC 둘 다로 로딩된 LNP 사이에 유사함을 제시한다. cGAS ΔN mRNA 및 22:0 LPC 둘 다로 로딩된 LNP ([cGAS ΔN + 22:0 LPC] LNP)로부터의 데이터는 대각선 줄무늬로 제시된다.

도 4A-4B는 22:0 LPC로 로딩된 LNP와 조합으로 R848로의 뮤린 수지상 세포 (DC)의 처리가 DC가 생존가능하게 남아 있으면서 IL-1β를 분비하는 능력에 의해 정의되는 과활성화를 초래함을 제시한다. 뮤린 골수-유래 수지상 세포 (BMDC)를 대조군 (PBS 또는 R848) 또는 R848의 존재 또는 부재 하에서 LNP와 48시간 동안 배양하였다. **도 4A**는 22:0 LPC로 로딩된 LNP ([22:0 LPC] LNP) 또는 cGAS ΔN mRNA 및 22:0 LPC 둘 다로 로딩된 LNP ([cGAS ΔN + 22:0 LPC] LNP)와 조합으로 R848로의 BMDC의 자극이 IL-1β의 분비를 유도함을 제시한다. 대조적으로, cGAS ΔN을 코딩하는 mRNA 단독으로 로딩된 LNP ([cGAS ΔN] LNP) 또는 [cGAS ΔN + 22:0 LPC] LNP로의 BMDC의 처리는 IL-1β 분비의 유도를 위해 충분히 자극성이지 않았다. **도 4B**는 세포 배양 상청액을 수집한 경우 LDH 방출의 측정을 통해 결정된 바와 같은 BMDC의 생존력을 제시한다. PBS 대조군에 비해, 대부분의 처리 조건은 세포 생존력의 감소를 유발한 [cGAS ΔN + 22:0 LPC] LNP로의 처리를 제외하고 상대적으로 유사한 수준의 세포 생존력을 발생시켰다. 다양한 처리 조건의 결과로서 시토카인 분비의 변화를 R848 단독으로의 처리와 비교하였다. $p<0.0001$****. 통계를 다중 비교를 위한 터키(Tukey) 사후 검정과 함께 1원 ANOVA를 사용하여 완료하였다. cGAS ΔN mRNA 및 22:0 LPC 둘 다로 로딩된 LNP ([cGAS ΔN + 22:0 LPC] LNP)로 처리된 DC로부터의 데이터는 대각선 줄무늬로 제시된다.

도 5A-5C는 뮤린 DC에 의한 시토카인 분비에 대한 다양한 처리의 효과를 제시한다. 뮤린 BMDC를 대조군 (PBS 또는 R848) 또는 R848의 존재 또는 부재 하에서 LNP와 48시간 동안 배양하였다. **도 5A** 및 **도 5B**는 다른 자극의

존재 또는 부재 하에서 R848로의 BDMC의 자극이 IL-6 및 TNFα의 분비를 유도함을 제시한다. **도 5C** 및 **도 5D**는 다른 자극의 존재 또는 부재 하에서 R848로의 BMDC의 자극이 RANTES 및 IP-10의 분비를 유도함을 제시한다. 흥미롭게도, [cGAS ΔN] LNP는 R848의 부재 하에서 RANTES 및 IP-10의 분비를 자극한 반면, R848의 부재 하에서의 [cGAS ΔN + 22:0 LPC] LNP는 그렇지 않았다. 다양한 처리 조건의 결과로서 시토카인 분비의 변화를 R848 단독으로의 처리와 비교하였다. P<0.05*, p<0.0001****. 통계를 다중 비교를 위한 터키 사후 검정과 함께 1원 ANOVA를 사용하여 완료하였다. cGAS ΔN mRNA 및 22:0 LPC 둘 다로 로딩된 LNP ([cGAS ΔN + 22:0 LPC] LNP)로 처리된 DC로부터의 데이터는 대각선 줄무늬로 제시된다.

도 6A-6C는 인간 단핵구-유래 수지상 세포 (moDC)가 cGAS/STING 신호전달 및 과활성화를 동시에 매개할 수 있음을 제시한다. 인간 moDC를 대조군 (PBS 또는 R848) 또는 R848의 존재 또는 부재 하에서 LNP와 48시간 동안 배양하였다. **도 6A**는 moDC가 LDH 방출의 측정에 의해 결정된 바와 같이 모든 처리 조건에 걸쳐 높은 수준의 생존력을 유지하였음을 제시한다. **도 6B**는 R848 및 22:0 LPC가 moDC에 의한 IL-1β 분비의 유도에 필요하고, LNP에의 cGAS ΔN mRNA의 첨가가 억제성이지 않았음을 제시한다. **도 6C**는 cGAS ΔN mRNA로 로딩된 LNP로의 moDC의 처리가 심지어 과활성화 자극 R848 및 22:0 LPC와 조합된 경우에도 IP-10 분비를 자극함을 제시한다. 다양한 처리 조건의 결과로서 시토카인 분비의 변화를 R848 단독으로의 처리와 비교하였다. P<0.05*, p<0.0001****. 통계를 다중 비교를 위한 터키 사후 검정과 함께 1원 ANOVA를 사용하여 완료하였다. cGAS ΔN mRNA 및 22:0 LPC 둘 다로 로딩된 LNP ([cGAS ΔN + 22:0 LPC] LNP)로 처리된 DC로부터의 데이터는 대각선 줄무늬로 제시된다.

도 7A-7C는 인간 moDC에 의한 세포 표면 마커 발현이 과활성화가 cGAS/STING 신호전달과 조합된 경우 유지 또는 상승됨을 제시한다. 인간 moDC를 대조군 (PBS 또는 R848) 또는 R848의 존재 또는 부재 하에서 LNP와 48시간 동안 배양한 후, DC 기능에 관여하는 세포 표면 단백질의 발현을 위해 염색하였다. **도 7A**는 다양한 처리 조건의 결과로서 moDC에 의한 림프절로의 세포 이동에 필요한 케모카인 수용체인 CCR7의 발현을 제시한다. **도 7B**는 T 세포 활성화 동안 T 세포-발현된 CD40L에 결속하고, 다양한 처리 조건의 결과로서 moDC에 의한 T 세포 활성화를 추가로 증진시키는 신호전달을 초래하는 수용체인 CD40의 발현을 제시한다. **도 7C**는 다양한 처리 조건의 결과로서 moDC에 의한 T 세포 활성화에 관여하는 DC 성숙의 마커인 CD83의 발현을 제시한다. 다양한 처리 조건의 결과로서 세포 표면 마커 발현의 변화를 R848 자극 단독과 비교하였다. P<0.05*, p<0.01**, <0.0001****. 통계를 다중 비교를 위한 터키 사후 검정과 함께 1원 ANOVA를 사용하여 완료하였다. cGAS ΔN mRNA 및 22:0 LPC 둘 다로 로딩된 LNP ([cGAS ΔN + 22:0 LPC] LNP)로 처리된 DC로부터의 데이터는 대각선 줄무늬로 제시된다.

도 8A-8D는 인간 moDC에 의한 항원 제시 및 공동-자극 분자의 발현이 과활성화가 cGAS/STING 신호전달과 조합되는 경우 유지 또는 상승됨을 제시한다. 인간 moDC를 대조군 (PBS 또는 R848) 또는 R848의 존재 또는 부재 하에서 LNP와 48시간 동안 배양한 후, DC 기능에 관여하는 세포 표면 단백질의 발현을 위해 염색하였다. 자극의 다양한 조합으로의 moDC의 처리는 PBS 대조군과 비교하여 CD80 (**도 8A**) 및 CD86 (**도 8B**) 공동-자극 분자의 상향조절을 발생시켰다. 중요하게는, moDC는 cGAS/STING 신호전달이 과활성화와 조합된 경우 높은 수준의 CD80 및 CD86 발현을 유지하였다. 자극의 다양한 조합으로의 moDC의 처리는 PBS 대조군과 비교하여 HLA-ABC (**도 8C**) 및 HLA-DR (**도 8D**)의 상향조절을 발생시켰다. HLA-ABC 및 HLA-DR은 항원을 각각 CD8+ T 세포 및 CD4+ T 세포에 제시한다. cGAS/STING 신호전달이 과활성화와 조합된 경우 (R848 + [cGAS ΔN + 22:0 LPC] LNP), HLA-ABC 및 HLA-DR 발현의 추가의 증가가 관찰되었다. 다양한 처리 조건의 결과로서 세포 표면 마커 발현의 변화를 R848 자극 단독과 비교하였다. P<0.05*, p<0.0001****. 통계를 다중 비교를 위한 터키 사후 검정과 함께 1원 ANOVA를 사용하여 완료하였다. cGAS ΔN mRNA 및 22:0 LPC 둘 다로 로딩된 LNP ([cGAS ΔN + 22:0 LPC] LNP)로 처리된 DC로부터의 데이터는 대각선 줄무늬로 제시된다.

도 9A는 본 개시내용의 지질-기반 mRNA 전달 비히클에 사용하기에 적합한 양이온성 및 이온화가능한 지질의 구조를 제시한다. **도 9B**는 본 개시내용의 지질-기반 mRNA 전달 비히클에 사용하기에 적합한 다른 유형의 지질의 구조를 제시한다. 또한, 본원에 참조로 포함되는 문헌 [Hou et al., Nature Review Materials, 6:1078-1094, 2021]을 참조한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0011] 본 개시내용은 포유동물 대상체의 세포에서의 구성적으로 활성인 시클릭 GMP-AMP 신타제의 발현을 위한 조성물 및 mRNA 백신의 면역원성을 증진시키기 위한 그의 용도에 관한 것이다. mRNA는 지질 나노입자 (LNP)에 캡슐화될 수 있거나 또는 지질과 복합체화될 수 있다 (RNA-리포플렉스). 본 개시내용은 또한 리소포스파티딜콜린 (LPC) 화합물 및 병원체 인식 수용체 효능제 중 하나 또는 둘 다를 추가로 포함하는 조성물에 관한 것이다.

[0012] 면역요법 또는 백신접종을 위해서와 같이 염증 반응을 유도하는 것이 요망될 수 있다. COVID-19 mRNA 백신

(SARS-CoV-2 항원을 코딩하는 mRNA로 로딩된 LNP를 포함함)은 감염의 빈도 및 중증도를 감소시키는데 있어서 효과적인 것으로 입증되었다. 본원에 기술된 바와 같이, cGAS-STING 선천성 면역 경로를 유도하는 것은 예시적인 실시양태에서 오브알부민 (OVA)인 단백질 항원을 코딩하는 mRNA로 로딩된 LNP를 포함하는 조성물을 보조한다. STING 신호전달은 모든 가능한 선천성 면역 신호전달 경로 중에서 특히 흥미로운데, 이는 일부 다른 신호전달 경로와는 달리, cGAS-STING 활성화는 번역 억제를 유도하지 않기 때문이다.

[0013] cGAS-STING 신호전달을 유도하기 위해, 구성적으로 활성이도록 그의 N-말단의 일부를 결여한 cGAS 돌연변이체가 디자인되었다 (cGASΔN). cGAS 돌연변이체를 코딩하는 mRNA를 세포 흡수 및 단백질 발현을 위해 LNP에 패키징하였다. cGASΔN을 코딩하는 LNP-패키징된 mRNA는 cGAS-STING 경로를 통해 면역 반응을 보조하는 능력을 갖는다. 중요하게는, 구성적으로 활성인 cGAS, 예컨대 cGASΔN을 코딩하는 mRNA의 포함은 염증성 신호를 증가시킴으로써 항원을 코딩하는 mRNA로 로딩된 LNP의 효력을 증가시킨다.

[0014] ***일반적 기술 및 정의***

[0015] 본 개시내용의 실시는, 달리 지시되지 않는 한, 관련 기술분야의 기술 내인 분자 생물학 (재조합 기술 포함), 미생물학, 세포 생물학, 생화학 및 면역학의 통상적인 기술을 이용할 것이다.

[0016] 본원에 및 첨부된 청구범위에 사용된 바와 같은 단수 형태는 달리 지시되지 않는 한, 복수 언급대상을 포함한다. 예를 들어, 부형제는 하나 이상의 부형제를 포함한다.

[0017] 본원에 사용된 바와 같은 "포함하는"이라는 어구는 개방형이며, 이는 이러한 실시양태가 추가의 요소를 포함할 수 있음을 지시한다. 대조적으로, "이루어진"이라는 어구는 폐쇄형이며, 이는 이러한 실시양태가 추가의 요소 (미량의 불순물 제외)를 포함하지 않음을 지시한다. "본질적으로 이루어진"이라는 어구는 부분적으로 폐쇄형이며, 이는 이러한 실시양태가, 이러한 실시양태의 기본적인 특징을 실질적으로 변화시키지 않는 요소를 추가로 포함할 수 있음을 지시한다.

[0018] 값에 관하여 본원에 사용된 바와 같은 "약"이라는 용어는 그 값의 90% 내지 110%를 포함한다 (예를 들어, 약 900 달톤의 분자량은 810 달톤 내지 990 달톤의 분자량을 지칭함).

[0019] 물질의 "유효량" 또는 "충분한 양"은 임상적 결과를 포함하여 유익하거나 원하는 결과를 가져오기에 충분한 양이며, 따라서, "유효량"은 그것이 적용되고 있는 맥락에 좌우된다. 예를 들어, 항원 및 구성적으로 활성인 cGAS를 코딩하는 하나 이상의 mRNA를 포함하는 면역원성 조성물을 투여하는 맥락에서, 유효량은 항원에 대한 면역 반응 (예를 들어, 항원-반응성 항체 및/또는 세포성 면역 반응)을 자극하기 위한 충분한 mRNA를 함유한다.

[0020] "개체" 및 "대상체"라는 용어는 포유동물을 지칭한다. "포유동물"은 인간, 비-인간 영장류 (예를 들어, 원숭이), 농장 동물, 스포츠 동물, 설치류 (예를 들어, 마우스 및 래트), 및 애완동물 (예를 들어, 개 및 고양이)을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 실시양태에서, 대상체는 인간 환자, 예컨대 암 및/또는 감염성 질환을 앓고 있는 인간 환자이다.

[0021] 면역원성 조성물에 관하여 본원에 사용된 바와 같은 "용량"이라는 용어는 임의의 시간에 대상체가 복용한 (대상체에게 투여된 또는 대상체가 받은) 면역원성 조성물의 측정된 부분을 지칭한다.

[0022] 본원에 사용된 바와 같은 "단리된" 및 "정제된"이라는 용어는 그것이 자연적으로 연관되는 적어도 하나의 성분으로부터 제거된 (예를 들어, 그의 원래 환경으로부터 제거된) 물질을 지칭한다. 예로서, 인지질에 관하여 사용되는 경우, 단리된 인지질은 박층 크로마토그래피, 또는 기체 크로마토그래피에 의해 결정된 바와 같이 적어도 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 순수하다. 추가의 예로서, 재조합 단백질에 관하여 사용되는 경우, 단리된 단백질은 단백질을 생성하는 숙주 세포의 배양 배지로부터 제거된 단백질을 지칭한다.

[0023] "제약 제제" 및 "제약 조성물"이라는 용어는 활성 성분의 생물학적 활성이 유효한 것을 허용하도록 하는 형태이며, 제제 또는 조성물이 투여될 개체에게 허용가능하지 않게 독성인 추가의 성분을 함유하지 않는 조제물을 지칭한다. 이러한 제제 또는 조성물은 멸균성인 것으로 의도된다.

[0024] 본원에 사용된 바와 같은 "부형제"는 이용되는 투여량 및 농도에서 그에 노출되는 세포 또는 포유동물에게 비독성인 제약상 허용되는 부형제, 담체, 비히클 또는 안정화제를 포함한다. 대개 생리학적으로 허용되는 부형제는 수성 pH 완충 용액이다.

[0025] "항원"이라는 용어는 항체에 의해 또는 T 세포 항원 수용체에 의해 특이적으로 결합되고 인식되는 물질을 지칭한다. 항원은 펩티드, 폴리펩티드, 단백질, 당단백질, 폴리사카라이드, 복합 탄수화물, 당, 강글리오시드, 지

질 및 인지질; 이들의 부분 및 이들의 조합을 포함할 수 있다. 본 개시내용의 맥락에서, "항원"이라는 용어는 전형적으로 mRNA 또는 DNA의 핵산 서열에 의해 코딩되는 폴리펩티드를 지칭한다. 폴리펩티드 항원은 바람직하게는 적어도 8개의 아미노산 잔기의 길이이고, 하나 이상의 번역후 변형을 포함할 수 있다.

[0026] "효능제"라는 용어는 가장 넓은 의미에서 사용되며, 수용체를 통해 신호전달을 활성화시키는 임의의 분자를 포함한다. 일부 실시양태에서, 효능제는 수용체에 결합한다. 예를 들어, TLR8 효능제는 TLR8에 결합하고 TLR8-신호전달 경로를 활성화시킨다.

[0027] "알킬"은 1가 포화 지방족 히드로카르빌 기를 지칭한다. Cx 알킬은 x개의 탄소 원자를 갖는 알킬 기를 지칭한다. Cx-Cy 알킬 또는 Cx-y 알킬은 x개 내지 y개의 탄소 원자 (경계값 포함)를 갖는 알킬 기를 지칭한다.

[0028] "알킬렌"은 2가 포화 지방족 히드로카르빌 기를 지칭한다.

[0029] "알케닐"은 적어도 하나의 이중 결합 (>C=C<)을 갖는 1가 히드로카르빌 기를 지칭한다. Cx 알케닐은 x개의 탄소 원자를 갖는 알케닐 기를 지칭한다. Cx-Cy 알케닐 또는 Cx-y 알케닐은 x개 내지 y개의 탄소 원자 (경계값 포함)를 갖는 알케닐 기를 지칭한다.

[0030] 반응 또는 파라미터의 "자극"은 관심 파라미터를 제외하고 그렇지 않다면 동일한 조건과 비교할 경우, 또는 대안적으로, 또 다른 조건과 비교하여 반응 또는 파라미터를 유발하는 것 및/또는 증진시키는 것 (예를 들어, TLR 효능제의 부재와 비교하여 TLR 효능제의 존재 하에서의 TLR-신호전달의 증가)을 포함한다. 예를 들어, 면역 반응의 "자극"은 반응의 증가를 의미한다. 측정되는 파라미터에 따라, 증가는 2배 내지 2,000배, 또는 5배 내지 500배 또는 그 초과, 또는 2, 5, 10, 50, 또는 100배 내지 500, 1,000, 2,000, 5,000, 또는 10,000배일 수 있다.

[0031] 반대로, 반응 또는 파라미터의 "억제"는 관심 파라미터를 제외하고 그렇지 않다면 동일한 조건과 비교할 경우, 또는 대안적으로, 또 다른 조건과 비교하여 반응 또는 파라미터를 감소시키는 것 및/또는 억제하는 것 (예를 들어, 위약 조성물의 투여 또는 치료 없음과 비교하여 본 개시내용의 조성물의 투여 후 비정상적 세포 증식의 감소)을 포함한다. 예를 들어, 면역 반응의 "억제"는 반응의 감소를 의미한다. 측정되는 파라미터에 따라, 감소는 2배 내지 2,000배, 또는 5배 내지 500배 또는 그 초과, 또는 2, 5, 10, 50, 또는 100배 내지 500, 1,000, 2,000, 5,000, 또는 10,000배일 수 있다.

[0032] "더 높은" 및 "더 낮은"이라는 상대적 용어는 관심 파라미터를 제외하고 그렇지 않다면 동일한 조건과 비교할 경우, 또는 대안적으로, 또 다른 조건과 비교하여 반응 또는 파라미터의 각각 측정가능한 증가 또는 감소를 지칭한다. 예를 들어, "더 높은 수준의 DC 과활성화"는 대조군 조건의 결과로서의 DC 과활성화의 수준 위로 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10배인 처리 조건의 결과로서의 DC 과활성화의 수준을 지칭한다. 마찬가지로, "더 낮은 수준의 DC 과활성화"는 대조군 조건의 결과로서의 DC 과활성화의 수준 아래로 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10배인 처리 조건의 결과로서의 DC 과활성화의 수준을 지칭한다.

[0033] 본원에 사용된 바와 같은 "면역화"라는 용어는 항원에 대한 포유동물 대상체의 면역 반응을 증가시키고 따라서 감염을 저항 또는 극복하고/거나 질환을 저항하는 그의 능력을 개선시키는 과정을 지칭한다.

[0034] 본원에 사용된 바와 같은 "백신접종"이라는 용어는 포유동물 대상체의 신체 내로의 백신의 도입을 지칭한다.

[0035] "아주반트"는 항원 또는 항원을 코딩하는 핵산을 포함하는 조성물에 첨가되는 경우, 노출 시 포유동물 수용자에서 항원에 대한 면역 반응을 증진시키거나 증강시키는 물질을 지칭한다.

[0036] 질환을 "치료하는 것" 또는 질환의 "치료"라는 용어는 임상적 결과를 포함하여 개체에서 유익하거나 원하는 결과를 얻기 위한 노력으로, 하나 이상의 치료제를 개체 (인간 또는 다른 것)에게 투여하는 것을 포함할 수 있는 프로토콜을 실행하는 것을 지칭한다. 유익하거나 원하는 임상적 결과는 질환의 하나 이상의 징후 또는 증상의 경감 또는 개선, 질환의 정도의 감소, 질환의 안정화된 (즉, 악화되지 않는) 상태, 질환의 확산의 방지, 질환 진행의 지연 또는 감속, 질환 상태의 개선 또는 완화, 및 관해 (부분적이든 전체적이든)를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. "치료"는 또한 치료를 받지 않은 개체의 예상 생존과 비교하여 연장된 생존을 의미할 수 있다. 또한, "치료하는 것" 및 "치료"는 치료제 또는 치료제들의 하나의 용량의 투여에 의해 일어날 수 있거나, 또는 치료제 또는 치료제들의 일련의 용량의 투여 시 일어날 수 있다. "치료하는 것" 또는 "치료"는 징후 또는 증상의 완전한 경감을 요구하지 않고, 치유를 요구하지 않으며, 구체적으로 개체에서 완화 효과만을 갖는 프로토콜을 포함한다. 질환 또는 장애를 "완화시키는 것"은 예상되는 비치료된 결과와 비교하여, 질환 또는 장애의 정도 및/또는 바람직하지 않은 임상적 징후가 감소되고/거나 질환 또는 장애의 진행의 시간 과정이 감속되는 것을

의미한다.

[0037] cGAS에 관하여 본원에 사용된 바와 같은 "구성적으로 활성인"이라는 용어는 천연 cGAS가 효소적 활성을 거의 내지 전혀 갖지 않는 일부 조건 하에서도, 세포질에서 DNA에 결합하고 cGAMP 합성을 촉매하는 cGAS 변이체를 지칭한다. 일부 바람직한 실시양태에서, "구성적으로 활성인 cGAS"는 "말단절단된 cGAS", 예컨대 N-말단 이상 도메인의 부재 하에서 C-말단 DNA-결합, 효소적 도메인을 포함하는 cGASΔN이다. 즉, cGASΔN은 전장 cGAS의 N-말단 이상 도메인에 의해 제공된 효소 활성의 조절이 없는 구성적으로 활성인 cGAS이다.

[0038] **I. 구성적으로 활성인 시클릭 GMP-AMP 신타제**

[0039] 시클릭 GMP-AMP 신타제, 일명 cGAMP 신타제 또는 cGAS는 시토졸 DNA의 효소적 센서이다. cGAS는 그의 서열과 독립적으로 이중-가닥 DNA를 인식하여 이량체화, 액체-유사 액적의 형성 및 2차 전령 2'3'시클릭 GMP-AMP (cGAMP)의 생성을 발생시키며, 이는 STING에 결합하고 이를 활성화시켜 인터페론 및 다른 염증성 매개인자의 발현을 발생시킨다. 인간 cGAS는 N-말단 포스포이노시티드-결합 도메인 (잔기 1-59) 및 C-말단 DNA-결합 및 효소 도메인 (잔기 160-522)을 포함하여 522개의 아미노산의 길이이다 (Barnett et al., Cell, 176:1432-1446, 2019). 중요하게는, 인간 백혈병 단핵구성 세포주에서의 cGASΔN의 발현은 더 높은 수준의 인터페론 및 인터페론-자극된 유전자의 발현을 발생시키는 것으로 밝혀졌다 (Barnett, 상기 문헌, 2019).

[0040] 인간 cGAS의 아미노산 서열 (진뱅크(GenBank) 번호 NP_612450.2)은 다음과 같다:

[0041] MQPWHGKAMQRASEAGATAPKASARNARGAPMDPTESPAAPEAALPKAGKFGPARKSGSRQKKSAPDTQERPPVRATGARAKKAPQRAQDTQPSDATSAPGA
EGLEPPAAREPALSRAGSCRQRGARCSTKPRPPPGPWDVPSPGLPVSAPILVRRDAAPGASKLRAVLEKLKLSRDDISTAAGMVKGVVDHLLLRLKCDSAFR
GVGLLNTGSYYEHVKISAPNEFDVMFKLEVPRIQLEEYSNTRAYYFVKFKRNPKENPLSQFLEGEILSASKMLSKFRKIIKEEINDIKDTDVIMKRKRGGSP
AVTLLISEKISVDITLALESKSSWPASTQEGLRIQNWLSAKVRKQLRLKPFYLVPKHAKEGNGFQEETWRLSFSHIEKEILNNHGKSKTCCENKEEKCCRKD
CLKLMKYLLEQLKERFKDKKHLDKFSSYHVKTAFFHVCTQNPQDSQWDRKDLGLCFDNCVTYFLQCLRTEKLENYFIPEFNLFSSNLIDKRSKEFLTKQIEY
ERNNEFPVFDEF (서열식별번호: 10).

[0042] cGAS의 N-말단 도메인의 아미노산 서열은 다음과 같다:

[0043] MQPWHGKAMQRASEAGATAPKASARNARGAPMDPTESPAAPEAALPKAGKFGPARKSGSRQKKSAPDTQERPPVRATGARAKKAPQRAQDTQPSDATSAPGA
EGLEPPAAREPALSRAGSCRQRGARCSTKPRPPPGPWDVPSPGLPVSAPILVRRDAA (서열식별번호: 11).

[0044] cGAS (cGASΔN)의 C-말단 도메인의 아미노산 서열은 다음과 같다:

[0045] PGASKLRAVLEKLKLSRDDISTAAGMVKGVVDHLLLRLKCDSAFRGVGLLNTGSYYEHVKISAPNEFDVMFKLEVPRIQLEEYSNTRAYYFVKFKRNPKENP
LSQFLEGEILSASKMLSKFRKIIKEEINDIKDTDVIMKRKRGGSPAVTLLISEKISVDITLALESKSSWPASTQEGLRIQNWLSAKVRKQLRLKPFYLVPKH
AKEGNGFQEETWRLSFSHIEKEILNNHGKSKTCCENKEEKCCRKDCLKLMKYLLEQLKERFKDKKHLDKFSSYHVKTAFFHVCTQNPQDSQWDRKDLGLCFD
NCVTYFLQCLRTEKLENYFIPEFNLFSSNLIDKRSKEFLTKQIEYERNNEFPVFDEF (서열식별번호: 1).

[0046] 마우스 세포에서의 발현에 대해 코돈-최적화된 인간 cGASΔN을 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 서열식별번호: 17로서 제시된다. 이 뉴클레오티드 서열을 갖는 DNA 주형을 사용하여 LNP 내로 로딩된 인간 cGASΔN을 코딩하는 mRNA를 제조하고, 실시예에 기술된 바와 같이 시험하였다.

[0047] 본 개시내용의 조성물 및 방법은 mRNA 백신에 의해 유발되는 적응성 면역 반응을 개선시키기 위한 촉매 아주반트로서 구성적으로 활성인 cGAS를 코딩하는 핵산을 포함한다. 일부 바람직한 실시양태에서, 구성적으로 활성인 cGAS는 N-말단 포스포이노시티드-결합 도메인이 없는 말단절단된 cGAS (cGASΔN)이다. 일부 바람직한 실시양태에서, 구성적으로 활성인 cGAS는 C-말단 DNA-결합 및 효소 도메인을 포함하는 말단절단된 cGAS (cGASΔN)이다.

[0048] cGAS의 동족체는 동물계에 걸쳐 종에서 발현되며, cGAS 아미노산 서열은 고등 영장류에서 보존된다. 인간 cGAS의 c-말단 도메인의 아미노산 서열과 다중 비-인간 영장류 cGAS 단백질의 c-말단 도메인의 아미노산 서열의 정렬은 **도 1**에 제시된다.

[0049] **표 I. 클러스탈(Clustal) 12.1^에 의해 생성된 퍼센트 동일성 매트릭스**

#	종	1	2	3	4	5	6	7	8
1	엠._물라타	100.00	96.42	87.53	85.95	88.71	87.26	86.78	86.50
2	피._아누비스	96.42	100.00	87.53	86.23	88.98	88.09	87.88	87.33
3	엔._류코게니스	87.53	87.53	100.00	96.14	93.37	89.97	90.03	90.30
4	에이치._라르	85.95	86.23	96.14	100.00	92.31	88.92	88.98	88.71
5	피._아벨리이	88.71	88.98	93.37	92.31	100.00	93.07	93.39	92.84
6	피._트로글로디테스	87.26	88.09	89.97	88.92	93.07	100.00	97.51	96.95
7	에이치._사피엔스	86.78	87.88	90.03	88.98	93.39	97.51	100.00	98.35
8	지._고릴라	86.50	87.33	90.30	88.71	92.84	96.95	98.35	100.00

[0050]

[0051] ^이 표에서 수는 서열식별번호가 아니다.

[0052] 일부 바람직한 실시양태에서, 구성적으로 활성인 cGAS는 N-말단 도메인이 없는 말단절단된 인간 cGAS이다 (서열식별번호: 11). 일부 바람직한 실시양태에서, 구성적으로 활성인 cGAS는 C-말단 도메인을 포함하는 말단절단된 인간 cGAS이다 (서열식별번호: 1). 일부 바람직한 실시양태에서, cGAS ΔN은 서열식별번호: 1의 아미노산 서열 또는 서열식별번호: 1과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 바람직한 실시양태에서, cGAS ΔN은 서열식별번호: 2, 서열식별번호: 3, 서열식별번호: 4, 서열식별번호: 5, 서열식별번호: 6, 서열식별번호: 7 또는 서열식별번호: 8의 아미노산 서열, 또는 서열식별번호: 2, 서열식별번호: 3, 서열식별번호: 4, 서열식별번호: 5, 서열식별번호: 6, 서열식별번호: 7 또는 서열식별번호: 8과 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 바람직한 실시양태에서, cGAS ΔN은 서열식별번호: 9의 컨센서스 아미노산 서열을 포함한다. 형질감염된 세포에서의 발현을 위해, cGAS ΔN을 코딩하는 핵산은 시작 코돈 (ATG)과 작동가능한 조합으로 존재한다.

[0053] 기준 폴리펩티드 서열에 관하여 "퍼센트 (%) 서열 동일성"은 서열을 정렬하고, 필요한 경우 갭을 도입하여 최대 퍼센트 서열 동일성을 달성한 후, 및 임의의 보존적 치환을 서열 동일성의 일부로 간주하지 않고, 기준 폴리펩티드 서열에서의 아미노산 잔기와 동일한 후보 서열에서의 아미노산 잔기의 백분율로 정의된다. 퍼센트 아미노산 서열 동일성을 결정하는 목적을 위한 정렬은 관련 기술분야의 기술 내인 다양한 방식으로, 예를 들어, 공개적으로 입수가능한 컴퓨터 소프트웨어, 예컨대 BLAST, BLAST-2, ALIGN 또는 멕얼라인(Megalign) (DNASTAR) 소프트웨어를 사용하여 달성될 수 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 비교되는 서열의 전장에 걸쳐 최대 정렬을 달성하는데 필요한 임의의 알고리즘을 포함하여 서열을 정렬하기 위한 적절한 파라미터를 결정할 수 있다. 예를 들어, 주어진 아미노산 서열 B에 대한, 그와의, 또는 그에 대한 주어진 아미노산 서열 A의 % 서열 동일성 (대안적으로 주어진 아미노산 서열 B에 대한, 그와의, 또는 그에 대한 특정 % 서열 동일성을 갖거나 포함하는 주어진 아미노산 서열 A로 표현될 수 있음)은 하기와 같이 계산된다: 100 × 분율 X/Y, 여기서 X는 A 및 B의 그 프로그램의 정렬에서의 서열에 의한 동일한 매치로 점수화된 아미노산 잔기의 수이고, 여기서 Y는 B에서의 아미노산 잔기의 총 수이다. 아미노산 서열 A의 길이가 아미노산 서열 B의 길이와 동일하지 않은 경우, B에 대한 A의 % 서열 동일성은 A에 대한 B의 % 서열 동일성과 동일하지 않을 것임이 이해될 것이다.

[0054] **II. 항원을 코딩하는 mRNA**

[0055] 본 개시내용의 조성물 및 방법은 항원을 코딩하는 mRNA를 포함할 수 있거나, 또는 다른 방식으로 항원을 코딩하는 mRNA를 포함하는 제제와 함께 사용하기에 적합하다. 일부 실시양태에서, 항원은 단백질성 항원이다. "폴리펩티드" 및 "단백질"이라는 용어는 적어도 8개의 아미노산의 길이인 펩티드 쇄를 포함하는 항원에 관하여 본원에서 상호교환가능하게 사용된다. 일부 실시양태에서, 항원은 8 내지 1800개의 아미노산, 9 내지 1000개의 아미노산, 또는 10 내지 100개의 아미노산의 길이이다. 폴리펩티드는 예컨대 인산화, 히드록실화, 술폰화, 팔미토일화, 및/또는 글리코실화에 의해 번역후 변형될 수 있다.

[0056] 일부 실시양태에서, 항원은 적어도 하나의 전장 단백질의 아미노산 서열 또는 그의 단편을 포함하는 종양 항원이다. 일부 실시양태에서, 종양 항원은 종양단백질로부터의 아미노산 서열 또는 그의 단편을 포함한다. 일부 실시양태에서, 포유동물 항원은 신생항원이거나 또는 포유동물 대상체로부터의 정상 세포에 존재하는 유전자에 비해 돌연변이를 포함하는 유전자에 의해 코딩된다. 신생항원은 T 세포가 암 세포와 비-암 세포를 구별하는 것을 가능하게 하는데 특히 유용한 것으로 생각된다 (예를 들어, 문헌 [Schumacher and Schreiber, Science, 348:69-74, 2015] 참조). 다른 실시양태에서, 종양 항원은 바이러스 항원, 예컨대 암-유발 바이러스의 항원을 포함한다.

[0057] 일부 실시양태에서, 종양 항원은 2개 이상의 폴리펩티드를 포함하는 융합 단백질이고, 여기서 각각의 폴리펩티

드는 상이한 종양 항원으로부터의 아미노산 서열 또는 동일한 종양 항원으로부터의 비-인접 아미노산 서열을 포함한다. 이들 실시양태의 일부에서, 융합 단백질은 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드를 포함하고, 여기서 각각의 폴리펩티드는 동일한 종양 항원으로부터의 비-인접 아미노산 서열을 포함한다.

[0058] 일부 실시양태에서, 항원은 미생물 항원이다. 일부 실시양태에서, 미생물 항원은 바이러스 항원, 박테리아 항원, 원충 항원, 진균 항원, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 미생물 항원은 미생물의 표면 단백질 또는 다른 항원성 서브유닛을 포함한다.

[0059] 일부 바람직한 실시양태에서, mRNA는 코딩 영역의 5' 단부에 5' 비번역 영역 (5'UTR) 및 코딩 영역의 3' 단부에 3' 비번역 영역 (3'UTR)을 포함한다. 일부 바람직한 실시양태에서, mRNA는 5' 캡 구조 및 폴리A 꼬리 중 하나 또는 둘 다를 포함한다.

[0060] 일부 실시양태에서, mRNA는 리보솜 스키핑 서열, 예컨대 서열식별번호: 12로서 제시된 2A-유사 (2AL) 서열을 추가로 코딩한다. 추가적인 2AL 서열은 서열식별번호: 13, 서열식별번호: 14, 및 서열식별번호: 15에 제시된다. mRNA가 2개 이상의 코딩 영역을 포함하는 일부 실시양태에서, 코딩 영역은 2AL 서열에 의해 분리될 수 있다. 예를 들어, 2AL 서열은 구성적으로 활성인 시클릭 GMP-AMP 신타제 (cGAS)의 코딩 영역과 항원의 코딩 영역 사이에 위치할 수 있다 (예를 들어, cGAS ΔNs-2AL-항원 또는 항원-2AL-cGAS ΔN). 유사하게, mRNA가 2개 이상의 항원에 대한 코딩 영역을 포함하는 일부 실시양태에서, 코딩 영역은 2AL 서열에 의해 분리될 수 있다 (예를 들어, 항원1-2AL-항원2). 본 개시내용의 mRNA에 사용하기 위한 추가적인 2AL 서열은 관련 기술분야에 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Luke et al., J. Gen. Virol, 89:1036-1042, 2008] 참조, 도 2의 2AL 서열은 본원에 참조로 포함됨).

[0061] **III. 지질-기반 전달 비히클**

[0062] 본 개시내용의 조성물 및 방법은 mRNA 백신을 위한 지질-기반 전달 비히클을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 비히클은 지질 나노입자 (LNP)이다. 다른 실시양태에서, 비히클은 mRNA와 복합체를 형성하는 지질이다 (RNA-리포플렉스).

[0063] 일부 실시양태에서, LNP는 이온화가능한 지질, 양이온성 지질, 인지질, 페길화 지질, 구조적 지질, 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 지질을 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 지질은 이온화가능한 지질을 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 지질은 양이온성 지질을 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 지질은 인지질을 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 지질은 페길화 지질을 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 지질은 구조적 지질을 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 지질은 이온화가능한 지질, 인지질, 페길화 지질, 및 구조적 지질을 포함한다.

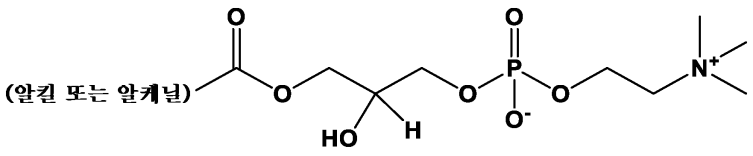
[0064] 일부 실시양태에서, RNA-리포플렉스의 지질 성분은 하나 이상의 지질을 포함한다. 일부 바람직한 실시양태에서, 하나 이상의 지질은 제1 지질 및 제2 지질을 포함하고, 여기서 제1 지질은 제2 지질과 별개이다. 일부 실시양태에서, 제1 지질은 양이온성 지질이고, 제2 지질은 중성 또는 음이온성 지질이다.

[0065] 본 개시내용의 지질-기반 mRNA 전달 비히클에 사용하기에 적합한 지질의 구조는 문헌 [Hou et al., Nature Review Materials, 6:1078-1094, 2021]의 도 2로부터 개조된 **도 9A** 및 **도 9B**에 도시된다.

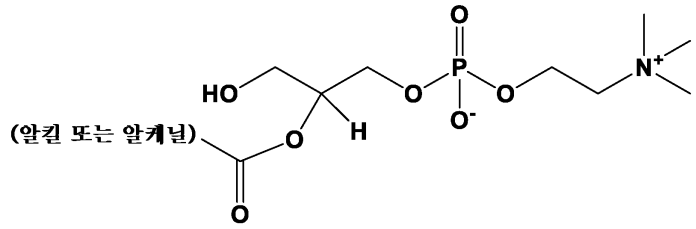
[0066] **IV. 리소포스파티딜콜린 화합물**

[0067] 본 개시내용의 조성물 및 방법은 인지질, 바람직하게는 리소포스파티딜콜린을 포함할 수 있다. "리소포스파티딜콜린" (LPC) 또는 "리소포스파티딜콜린 분자"는 글리세롤의 히드록실 기 상에 하나의 포스포콜린 기를 보유하고 글리세롤의 다른 2개의 히드록실 기 중 하나 상에 하나의 아실 기를 보유하는 글리세롤 분자를 지칭한다. 나머지 히드록실 기는 비치환된다.

[0068] 일부 실시양태에서, 단일 아실 쇄를 갖는 단리된 리소포스파티딜콜린 (LPC)은 하기 형태의 것이다:

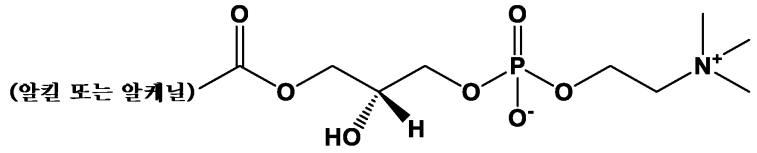
[0069] 

[0070] 또는



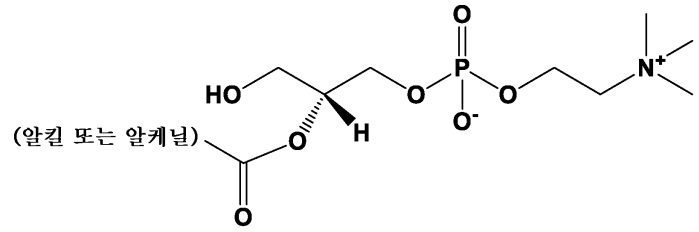
[0071]

[0072] 일부 실시양태에서, 단일 아실 쇄를 갖는 단리된 리소포스파티딜콜린 (LPC)은 하기 형태의 것이다:



[0073]

[0074] 또는



[0075]

[0076] 알킬 또는 알케닐 쇄는 카르보닐 탄소와 함께 알킬 또는 알케닐 쇄보다 1개의 탄소 원자가 더 긴 아실 쇄를 형성한다. 예를 들어, (C23 알킬)-C(=O)- 기는 C24 아실 쇄를 형성한다. 따라서, 기 "(알킬 또는 알킬렌)"이 C12-C23 알킬 기 (예컨대 C12-C19 알킬 기 또는 C20-C23 알킬 기)인 경우, (C12-C23 알킬-C(=O)- 기는 C13-C24 아실 쇄 (예컨대 C13-C20 아실 쇄 또는 C21-C24 아실 쇄)를 형성한다. 기 "(알킬 또는 알킬렌)"이 C12-C23 알케닐 기 (예컨대 C12-C19 알케닐 기 또는 C20-C23 알케닐 기)인 경우, (C12-C23 알케닐-C(=O)- 기는 C13-C24 아실 쇄 (예컨대 C13-C20 아실 쇄 또는 C21-C24 아실 쇄)를 형성한다. 아실 쇄는 알킬-함유 및 알케닐-함유 아실 기 사이를 구별하기 위해 포화 아실 또는 불포화 아실로 지칭될 수 있다. 표준 델타 표기 또는 오메가 표기는 불포화 아실 쇄에서 하나 이상의 이중 결합의 위치를 지시하는데 사용될 수 있다.

[0077] 본 개시내용의 리소포스파티딜콜린 (LPC) 화합물은 단일 아실 쇄를 가지며, 여기서 아실 쇄는 C13-C22 아실 쇄 또는 C13-C24 아실 쇄이다. 일부 실시양태에서, 아실 쇄는 C18-C22 아실 쇄 또는 C21-C24 아실 쇄이다. 일부 바람직한 실시양태에서, 아실 쇄는 C22 아실 쇄이다.

[0078] **V. 병원체 인식 수용체 효능제**

[0079] 본 개시내용의 조성물 및 방법은 추가의 병원체 인식 수용체 (PRR) 효능제를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, PRR 효능제는 톨-유사 수용체 (TLR), NOD-유사 수용체 (NLR), RIG-I-유사 수용체 (RLR), 또는 C-유형 렉틴 수용체 (CLR)의 효능제를 포함한다. 일부 실시양태에서, PRR 효능제는 TLR7/8 효능제를 포함한다.

[0080] **A. TLR7/8 효능제**

[0081] 본원에 사용된 바와 같은 "TLR7/8 효능제"라는 용어는 TLR7 및/또는 TLR8의 효능제를 지칭한다. 한 측면에서, TLR7/8 효능제는 TLR7 효능제이다. 또 다른 측면에서, TLR7/8 효능제는 TLR8 효능제이다. 추가의 측면에서, TLR7/8 효능제는 TLR7 및 TLR8 둘 다의 효능제이다. 본 개시내용의 TLR7/8 효능제는 LPC의 존재 하에서 인간 수지상 세포를 과활성화시키기에 적합하다.

[0082] 일부 측면에서, TLR7/8 효능제는 소분자이다. 일부 실시양태에서, TLR7/8 효능제는 900 달톤 이하의 분자량을 갖는 소분자, 또는 그의 염이다. 즉, 소분자 TLR7/8 효능제는 미국 FDA의 생물제제 평가 및 연구 센터에 의해 규제가능한 재조합 단백질 또는 합성 올리고뉴클레오티드와 같은 대분자가 아니다. 오히려 소분자 TLR7/8 효능제는 FDA의 약물 평가 및 연구 센터에 의해 규제가능하다. 일부 실시양태에서, 소분자는 약 90 내지 약 900 달

톤의 분자량을 갖는다. 일부 실시양태에서, TLR7/8 효능제는 이미다조퀴놀린 화합물을 포함한다. 일부 바람직한 실시양태에서, TLR7/8 효능제는 레시퀴모드 (R848)를 포함한다.

[0083] **B. 다른 PRR 효능제**

[0084] 일부 측면에서, 병원체 인식 수용체 (PRR) 효능제는 톨-유사 수용체 (TLR) 효능제를 포함하되, 단, TLR 효능제는 TLR7/8 효능제를 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, TLR 효능제는 TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR9 및 TLR13 중 하나 이상의 효능제를 포함한다. 일부 실시양태에서, PRR 효능제는 TLR2/6 효능제, 예컨대 Pam2CSK4이다. 다른 실시양태에서, TLR 효능제는 TLR4 효능제, 예컨대 모노포스포릴 지질 A (MPLA)이다. 그러나, 바람직한 실시양태에서, TLR 효능제는 TLR2, TLR4 및/또는 TLR9의 효능제가 아니다. 예를 들어, 바람직한 실시양태에서, TLR9 효능제는 TLR4 리간드, 예컨대 LPS (내독소)가 아니다.

[0085] 다른 측면에서, PRR 효능제는 NOD-유사 수용체 (NLR) 효능제를 포함한다. 추가의 측면에서, PRR 효능제는 RIG-I-유사 수용체 (RLR) 효능제를 포함한다. 추가적인 측면에서, PRR 효능제는 C-유형 렉틴 수용체 (CLR) 효능제를 포함한다.

[0086] **VI. 제약 제제**

[0087] 본 개시내용의 일부 조성물은 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 제약 제제이다. 본 개시내용의 제약 제제는 용액 또는 현탁액의 형태일 수 있다. 대안적으로, 제약 제제는 탈수된 고체 (예를 들어, 동결 건조된 또는 분무 건조된 고체)일 수 있다. 본 개시내용의 제약 제제는 바람직하게는 멸균성이고, 바람직하게는 본질적으로 내독소가 없다. "제약 제제"라는 용어는 본원에서 "의약품" 및 "의약"이라는 용어와 상호교환가능하게 사용된다. 일부 실시양태에서, 제약 제제는 제제의 의도된 목적에 기반하여 특정 비의 다양한 성분을 포함한다.

[0088] 본 개시내용의 제약상 허용되는 부형제는 예를 들어, 용매, 완충제, 긴장성 조정제, 벌크화제, 및 보존제를 포함한다 (예를 들어, 문헌 [Pramanick et al., Pharma Times, 45:65-77, 2013] 참조). 일부 실시양태에서, 제약 제제는 용매, 완충제, 긴장성 조정제, 및 벌크화제 중 하나 이상으로서 기능하는 부형제를 포함할 수 있다 (예를 들어, 염수 중 염화나트륨은 수성 비히클 및 긴장성 조정제 둘 다로서 역할을 할 수 있음).

[0089] 일부 실시양태에서, 제약 제제는 용매로서 수성 비히클을 포함한다. 적합한 비히클은 예를 들어 멸균수, 염수 용액, 포스페이트 완충 염수, 및 링거 용액을 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 등장성이다.

[0090] 제약 제제는 완충제를 포함할 수 있다. 완충제는 pH를 제어하여 프로세싱, 저장 및 임의로 재구성 동안 활성제의 분해를 억제한다. 적합한 완충제는 예를 들어 아세테이트, 시트레이트, 포스페이트 또는 술페이트를 포함하는 염을 포함한다. 다른 적합한 완충제는 예를 들어 아미노산, 예컨대 아르기닌, 글리신, 히스티딘, 및 리신을 포함한다. 완충제는 염산 또는 수산화나트륨을 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 완충제는 조성물의 pH를 6 내지 9의 범위 내로 유지한다. 일부 실시양태에서, pH는 6, 7 또는 8 (하한) 초과이다. 일부 실시양태에서, pH는 9, 8, 또는 7 (상한) 미만이다. 즉, pH는 약 6 내지 9의 범위이며, 여기서 하한은 상한보다 작다.

[0091] 제약 조성물은 긴장성 조정제를 포함할 수 있다. 적합한 긴장성 조정제는 예를 들어 덱스트로스, 글리세롤, 염화나트륨, 글리세린 및 만니톨을 포함한다.

[0092] 제약 제제는 벌크화제를 포함할 수 있다. 벌크화제는 제약 조성물이 투여 전에 동결건조되는 경우 특히 유용하다. 일부 실시양태에서, 벌크화제는 동결 또는 분무 건조 동안 및/또는 저장 동안 안정화 및 활성제의 분해의 방지를 보조하는 보호제이다. 적합한 벌크화제는 당 (모노-, 디- 및 폴리사카라이드), 예컨대 수크로스, 락토스, 트레할로스, 만니톨, 소르비탈, 글루코스 및 라피노스이다.

[0093] 제약 제제는 보존제를 포함할 수 있다. 적합한 보존제는 예를 들어 항산화제 및 항미생물제를 포함한다. 그러나, 바람직한 실시양태에서, 제약 제제는 멸균 조건 하에서 제조되고 단일 사용 용기에 존재하며, 따라서 보존제의 포함을 필요로 하지 않는다.

[0094] 본 개시내용의 제약 제제는 비경구 투여에 적합하다. 즉, 본 개시내용의 제약 제제는 장관 투여를 위해 의도되지 않는다 (예를 들어, 경구로, 위로, 또는 직장으로 의도되지 않음).

[0095] **VII. 사용 방법**

[0096] 일부 측면에서, 본 개시내용은 본원에 기술된 조성물 또는 제제 중 어느 하나의 사용 방법에 관한 것이다. 사용 방법은 면역 반응을 자극하는 것을 수반하는 복수의 용도에 적합하다. 일부 실시양태에서, 사용 방법은 암

을 치료하는 방법을 포함한다. 일부 실시양태에서, 사용 방법은 비정상적 세포 증식을 억제하는 방법을 포함한다. 일부 실시양태에서, 사용 방법은 감염성 질환을 치료하거나 또는 예방하는 방법을 포함한다. 방법은 본원에 기술된 제제 또는 조성물의 유효량을 이를 필요로 하는 개체에게 투여하여 특정 결과를 달성하는 것을 포함한다. 개체는 포유동물 대상체, 예컨대 인간 환자이다. 다른 실시양태에서, 개체는 비-인간 환자이다. 일부 실시양태에서, 개체는 개 환자이다. 즉, 일부 실시양태에서, 사용 방법은 임상적 용도를 수반하는 반면, 다른 실시양태에서 사용 방법은 전임상 및/또는 수의학 용도를 수반한다. 전임상 용도를 위해, 포유동물 대상체는 비-인간 영장류 (예를 들어, 원숭이 또는 유인원) 또는 설치류 (예를 들어, 마우스 또는 래트)일 수 있다. 수의학 용도를 위해, 포유동물 대상체는 농장 동물 (예를 들어, 소), 스포츠 동물 (예를 들어, 말), 또는 애완동물 (예를 들어, 반려 동물, 예컨대 개 또는 고양이)일 수 있다.

[0097] **A. 면역 반응의 자극**

[0098] 간략하게, 본 개시내용은 개체에서 면역 반응을 자극하는 방법으로서, 본원에 기술된 조성물 또는 제제를 개체에서 면역 반응을 자극하기에 충분한 양으로 개체에게 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 면역 반응을 "자극하는 것" (면역 반응을 "유발하는 것"과 상호교환가능하게 사용됨)은 드 노보 면역 반응을 유발하는 것 (예를 들어, 초기 백신접종 요법의 결과로서) 또는 기존의 면역 반응을 증진시키는 것 (예를 들어, 부스터 백신접종 요법의 결과로서)으로부터 발생할 수 있는 면역 반응을 증가시키는 것을 의미한다. 일부 실시양태에서, 면역 반응을 자극하는 것은 다음으로 이루어진 군 중 하나 이상을 포함한다: 시토카인 생성을 자극하는 것; B 림프구 증식을 자극하는 것; 인터페론 경로-연관 유전자 발현을 자극하는 것; 화학유인물질-연관 유전자 발현을 자극하는 것; 및 수지상 세포 DC 성숙을 자극하는 것. 면역 반응의 자극을 측정하는 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있다.

[0099] 예를 들어, 본 개시내용은 본원에 기술된 조성물 또는 제제를 개체에서 항원-특이적 면역 반응을 유도하기에 충분한 양으로 개체에게 투여함으로써 개체에서 항원-특이적 면역 반응을 유도하는 방법을 제공한다. 바람직한 실시양태에서, 조성물 또는 제제는 항원을 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물 또는 제제는 항원을 포함하는 개체의 조직에 투여된다. 면역 반응은 항원-특이적 항체 반응, 항원-특이적 세포독성 T 림프구 (CTL) 반응, 및 항원-특이적 헬퍼 T (Th) 세포 반응 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 항원-특이적 항체 반응을 "유도하는 것"은 항원-특이적 항체의 역가를 역치 수준, 예컨대 투여전 기준선 역가 또는 혈청보호적 수준 초과로 증가시키는 것을 의미한다. 항원-특이적 CTL 반응을 "유도하는 것"은 말초 혈액에서 발견되는 항원-특이적 CTL의 빈도를 투여전 기준선 빈도 초과로 증가시키는 것을 의미한다. 항원-특이적 Th 세포 반응을 "유도하는 것"은 말초 혈액에서 발견되는 항원-특이적 Th 세포의 빈도를 투여전 기준선 빈도 초과로 증가시키는 것을 의미한다.

[0100] 면역 반응의 분석 (정성적 및 정량적 둘 다)은 항원-특이적 항체 생성 (특이적 항체 하위부류를 측정하는 것 포함), 림프구의 특정 집단, 예컨대 B 세포 및 헬퍼 T 세포의 활성화, 시토카인, 예컨대 IFN-알파, IFN-감마, IL-6, IL-12의 생성 및/또는 히스타민의 방출을 측정하는 것을 포함하지만 이에 제한되지 않는 관련 기술분야에 공지된 임의의 방법에 의한 것일 수 있다. 항원-특이적 항체 반응을 측정하는 방법은 효소-결합 면역흡착 검정 (ELISA)을 포함한다. 림프구의 특정 집단의 활성화는 증식 검정에 의해, 및 형광-활성화 세포 분류 (FACS)로 측정될 수 있다. 시토카인의 생성은 또한 ELISA에 의해 측정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 면역 반응을 자극하는 방법은 단핵구-유래 수지상 세포 또는 말초 혈액 단핵 세포에 의한 인터류킨-1베타 (IL-1β) 분비, 인터페론-감마 (IFN-γ) 분비, 및/또는 종양 괴사 인자-알파 (TNF-α) 분비의 자극을 포함한다. 일부 바람직한 실시양태에서, 본 개시내용의 조성물과 접촉된 세포의 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70% 또는 75%는 접촉 후 40-56 시간 (또는 약 48시간)에서 생존가능하게 남아 있다.

[0101] 일부 실시양태에서, 방법은 항-종양 면역 반응을 자극하기에 적합하다. 다른 실시양태에서, 방법은 항-미생물 면역 반응을 자극하기에 적합하다. 일부 실시양태에서, 항-미생물 반응은 항-박테리아 면역 반응이다. 일부 실시양태에서, 항-미생물 반응은 항-진균 면역 반응이다. 일부 실시양태에서, 항-미생물 반응은 항-바이러스 면역 반응이다. 일부 실시양태에서, 항-미생물 반응은 항-원충 면역 반응이다.

[0102] **B. 질환의 치료 또는 예방**

[0103] 본 개시내용은 개체에서 질환을 치료하거나 또는 예방하는 방법으로서, 본원에 기술된 조성물 또는 제제를 개체에서 질환을 치료하거나 또는 예방하기에 충분한 양으로 개체에게 투여하는 것을 포함하는 방법을 추가로 제공한다. 일부 실시양태에서, 질환은 암이다. 일부 실시양태에서, 질환은 비정상적 세포 증식이다. 다른 실시양태에서, 질환은 감염성 질환이다.

[0104] 일부 실시양태에서, 방법은 개체에서 암을 치료하거나 또는 다른 방식으로 암을 갖는 포유동물 대상체를 치료하는 것을 수반한다. 일부 실시양태에서, 암은 혈액암, 예컨대 림프종, 백혈병, 또는 골수종이다. 다른 실시양태에서, 암은 비-혈액암, 예컨대 육종, 암종, 또는 흑색종이다. 일부 실시양태에서, 암은 악성이다.

[0105] 일부 실시양태에서, 방법은 개체에서 비정상적 세포 증식을 억제하는 것을 수반한다. "비정상적 세포 증식"은 양성 종양 또는 악성 종양의 증식을 지칭한다. 악성 종양은 전이성 종양일 수 있다.

[0106] 일부 실시양태에서, 방법은 개체에서 감염성 질환을 치료하거나 또는 예방하는 것을 수반한다. 일부 실시양태에서, 감염성 질환은 바이러스 감염에 의해 유발된다. 다른 실시양태에서, 감염성 질환은 박테리아 감염에 의해 유발된다. 추가의 실시양태에서, 감염성 질환은 진균 감염에 의해 유발된다. 또한 추가의 실시양태에서, 감염성 질환은 원충 감염에 의해 유발된다. 특히 중요한 것은 인간 뿐만 아니라 다른 동물, 예컨대 포유동물 또는 조류를 감염시키는 인수공통 병원체에 의해 유발되는 감염성 질환이다. 일부 실시양태에서, 인수공통 병원체는 중간 종 (벡터)을 통해 인간에게 전염된다.

[0107] **열거된 실시양태**

[0108] 1. 지질 나노입자 (LNP)에 캡슐화된 mRNA를 포함하는 조성물로서, 여기서 mRNA는 구성적으로 활성인 시클릭 GMP-AMP 신타제 (cGAS)의 코딩 영역을 포함하고, LNP는 제1 인지질, 및 이온화가능한 지질, 페길화 지질, 구조적 지질, 제2 인지질, 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 지질을 포함하고, 여기서 제1 인지질은 단일 C13-C24 아실 쇄를 갖는 리소포스파티딜콜린 (LPC)을 포함하는 것인 조성물.

[0109] 2. 지질 나노입자 (LNP)에 캡슐화된 제1 mRNA 및 제2 mRNA를 포함하는 조성물로서, 여기서 제1 mRNA는 구성적으로 활성인 시클릭 GMP-AMP 신타제 (cGAS)의 코딩 영역을 포함하고, 제2 mRNA는 항원의 코딩 영역을 포함하고; LNP는 제1 인지질, 및 이온화가능한 지질, 페길화 지질, 구조적 지질, 제2 인지질, 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 지질을 포함하고, 여기서 제1 인지질은 단일 C13-C24 아실 쇄를 갖는 리소포스파티딜콜린 (LPC)을 포함하는 것인 조성물.

[0110] 3. 지질 나노입자 (LNP)에 캡슐화된 mRNA를 포함하는 조성물로서, 여기서 mRNA는 2A-유사 서열에 의해 분리된 제1 코딩 영역 및 제2 코딩 영역을 포함하고, 여기서 제1 코딩 영역은 구성적으로 활성인 시클릭 GMP-AMP 신타제 (cGAS)의 코딩 영역이고 제2 코딩 영역은 항원의 코딩 영역이거나, 또는 제1 코딩 영역은 항원의 코딩 영역이고 제2 코딩 영역은 구성적으로 활성인 시클릭 GMP-AMP 신타제 (cGAS)의 코딩 영역이고, LNP는 제1 인지질, 및 이온화가능한 지질, 페길화 지질, 구조적 지질, 제2 인지질, 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 지질을 포함하고, 여기서 제1 인지질은 단일 C13-C24 아실 쇄를 갖는 리소포스파티딜콜린 (LPC)을 포함하는 것인 조성물.

[0111] 4. 실시양태 1 내지 3 중 어느 하나에 있어서, 적어도 하나의 지질이 이온화가능한 지질, 제2 인지질, 페길화 지질, 및 구조적 지질을 포함하는 것인 조성물.

[0112] 5. 실시양태 1 내지 4 중 어느 하나에 있어서, 이온화가능한 지질이 하기를 포함하는 것인 조성물:

[0113] i) 8-[(2-히드록시에틸)[6-옥소-6-(운데실옥시)헥실]아미노]-옥탄산, 1-옥틸노닐 에스테르 (SM-102) 또는 그의 유사체 또는 유도체; 및/또는

[0114] ii) 6-((2-헥실데카노일)옥시)-N-(6-((2-헥실데카노일)옥시)헥실)-N-(4-히드록시부틸)헥산-1-아미늄 (ALC-0315) 또는 그의 유사체 또는 유도체; 및/또는

[0115] iii) (6Z,9Z,28Z,31Z)-헵타트리아콘타-6,9,28,31-테트라엔-19-일 4-(디메틸아미노)부타노에이트 (DLin-MC3-DMA) 또는 그의 유사체 또는 유도체.

[0116] 6. 실시양태 1 내지 5 중 어느 하나에 있어서, 페길화 지질이 PEG-변형된 포스파티딜에탄올아민, PEG-변형된 포스파티드산, PEG-변형된 세라마이드, PEG-변형된 디알킬아민, PEG-변형된 디아실글리세롤, PEG-변형된 디알킬글리세롤, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 조성물.

[0117] 7. 실시양태 1 내지 5 중 어느 하나에 있어서, 페길화 지질이 폴리에틸렌 글리콜 [PEG] 2000 디미리스토일 글리세롤 [DMG]을 포함하는 것인 조성물.

[0118] 8. 실시양태 1 내지 7 중 어느 하나에 있어서, 구조적 지질이 콜레스테롤, 페코스테롤, 시토스테롤, 에르고스테롤, 캄페스테롤, 스티그마스테롤, 브라시카스테롤, 토마티딘, 우르솔산, 알파-토코페롤, 및 이들의 조합으로 이

루어진 군으로부터 선택되는 것인 조성물.

[0119] 9. 실시양태 1 내지 7 중 어느 하나에 있어서, 구조적 지질이 콜레스테롤을 포함하는 것인 조성물.

[0120] 10. 실시양태 1 내지 9 중 어느 하나에 있어서, 제2 인지질이 하기를 포함하는 것인 조성물:

[0121] i) 포스파티딜 콜린, 포스파티딜 에탄올아민, 포스파티딜 글리세롤, 포스파티딜 세린, 포스파티드산, 2-리소포스파티딜 콜린, 및 스핑고미엘린으로 이루어진 군으로부터 선택되는 친수성 머리 모이어티; 및

[0122] ii) 라우르산, 미리스트산, 미리스톨레산, 팔미트산, 팔미톨레산, 스테아르산, 올레산, 리놀레산, 알파-리놀렌산, 에루스산, 아라키드산, 아라키돈산, 피탄산, 에이코사펜타엔산, 베헨산, 도코사펜타엔산, 및 도코사헥사엔산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 지방산 꼬리 모이어티.

[0123] 11. 실시양태 1 내지 9 중 어느 하나에 있어서, 제2 인지질이 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 조성물:

[0124] 1,2-디리놀레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (DLPC),

[0125] 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-포스포콜린 (DMPC),

[0126] 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (DOPC),

[0127] 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (DPPC),

[0128] 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (DSPC),

[0129] 1,2-디운데카노일-sn-글리세로-포스포콜린 (DUPC),

[0130] 1-팔미토일-2-올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (POPC),

[0131] 1,2-디-O-옥타데세닐-sn-글리세로-3-포스포콜린,

[0132] 1-올레오일-2-콜레스테릴헤미숙시노일-sn-글리세로-3-포스포콜린,

[0133] 1,2-디리놀레노일-sn-글리세로-3-포스포콜린,

[0134] 1,2-디아라키도노일-sn-글리세로-3-포스포콜린,

[0135] 1,2-디도코사헥사에노일-sn-글리세로-3-포스포콜린,

[0136] 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 (DOPE),

[0137] 1,2-디피타노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민,

[0138] 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민,

[0139] 1,2-디리놀레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민,

[0140] 1,2-디리놀레노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민,

[0141] 1,2-디아라키도노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민,

[0142] 1,2-디도코사헥사에노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민,

[0143] 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포-rac-(1-글리세롤) 나트륨 염 (DOPG),

[0144] 스핑고미엘린, 및

[0145] 이들의 조합.

[0146] 12. 실시양태 11에 있어서, 제2 인지질이 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (DSPC)을 포함하는 것인 조성물.

[0147] 13. 실시양태 1 내지 12 중 어느 하나에 있어서, 조성물이 적어도 하나의 부형제를 추가로 포함하는 것인 조성물.

[0148] 14. 실시양태 13에 있어서, 부형제가 수크로스를 포함하는 것인 조성물.

[0149] 15. 하기를 포함하는 조성물로서:

[0150] i) 하나 이상의 지질과 복합체화된 mRNA (RNA-리포플렉스); 및

[0151] ii) 단일 C13-C24 아실 쇄를 갖는 리소포스파티딜콜린 (LPC),

[0152] 여기서 mRNA는 구성적으로 활성인 시클릭 GMP-AMP 신타제 (cGAS)의 코딩 영역을 포함하고, 하나 이상의 지질은 제1 지질 및 제2 지질을 포함하는 것인 조성물.

[0153] 16. 하기를 포함하는 조성물로서:

[0154] i) 하나 이상의 지질과 복합체화된 제1 mRNA 및 제2 mRNA (RNA-리포플렉스); 및

[0155] ii) 단일 C13-C24 아실 쇄를 갖는 리소포스파티딜콜린 (LPC),

[0156] 여기서 제1 mRNA는 구성적으로 활성인 시클릭 GMP-AMP 신타제 (cGAS)의 코딩 영역을 포함하고, 제2 mRNA는 항원의 코딩 영역을 포함하고, 하나 이상의 지질은 제1 지질 및 제2 지질을 포함하는 것인 조성물.

[0157] 17. 하기를 포함하는 조성물로서:

[0158] i) 하나 이상의 지질과 복합체화된 mRNA (RNA-리포플렉스); 및

[0159] ii) 단일 C13-C24 아실 쇄를 갖는 리소포스파티딜콜린 (LPC),

[0160] 여기서 mRNA는 2A-유사 서열에 의해 분리된 제1 코딩 영역 및 제2 코딩 영역을 포함하고, 제1 코딩 영역은 구성적으로 활성인 시클릭 GMP-AMP 신타제 (cGAS)의 코딩 영역이고 제2 코딩 영역은 항원의 코딩 영역이거나, 또는 제1 코딩 영역은 항원의 코딩 영역이고 제2 코딩 영역은 구성적으로 활성인 시클릭 GMP-AMP 신타제 (cGAS)의 코딩 영역이고, 하나 이상의 지질은 제1 지질 및 제2 지질을 포함하는 것인 조성물.

[0161] 18. 실시양태 15 내지 17 중 어느 하나에 있어서, 제1 지질이 양이온성 지질이고, 제2 지질이 중성 또는 음이온성 지질인 조성물.

[0162] 19. 실시양태 18에 있어서, 양이온성 지질이 하기 중 하나 또는 둘 다를 포함하는 것인 조성물:

[0163] i) 1,2-디-O-옥타데세닐-3-트리메틸암모늄 프로판 (DOTMA) 또는 그의 유사체 또는 유도체; 및

[0164] ii) 1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄 프로판 (DOTAP) 또는 그의 유사체 또는 유도체.

[0165] 20. 실시양태 18 또는 실시양태 19에 있어서, 중성 또는 음이온성 지질이 하기를 포함하는 것인 조성물:

[0166] i) 1,2-디-(9Z-옥타데세노일)-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 (DOPE) 또는 그의 유사체 또는 유도체; 및/또는

[0167] ii) 콜레스테롤 또는 그의 유사체 또는 유도체; 및/또는

[0168] iii) 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (DOPC) 또는 그의 유사체 또는 유도체.

[0169] 21. 실시양태 1 내지 20 중 어느 하나에 있어서, LPC의 아실 쇄가 C21-C24 아실 쇄인 조성물.

[0170] 22. 실시양태 1 내지 20 중 어느 하나에 있어서, LPC의 아실 쇄가 C22 아실 쇄인 조성물.

[0171] 23. 실시양태 1 내지 22 중 어느 하나에 있어서, LPC의 아실 쇄가 완전 포화된 것인 조성물.

[0172] 24. 실시양태 23에 있어서, LPC가 1-베헤노일-2-히드록시-sn-글리세로-3-포스포콜린 [LPC(22:0)]을 포함하는 것인 조성물.

[0173] 25. 실시양태 1 내지 24 중 어느 하나에 있어서, TLR7/8 효능제를 추가로 포함하는 조성물.

[0174] 26. 실시양태 25에 있어서, TLR7/8 효능제가 900 달톤 이하의 분자량을 갖는 소분자인 조성물.

[0175] 27. 실시양태 26에 있어서, TLR7/8 효능제가 이미다조퀴놀린 화합물을 포함하는 것인 조성물.

[0176] 28. 실시양태 27에 있어서, TLR7/8 효능제가 레시퀴모드 (R848)를 포함하는 것인 조성물.

[0177] 29. 실시양태 25 내지 28 중 어느 하나에 있어서, LPC가 LPC(22:0)를 포함하고, TLR7/8 효능제가 레시퀴모드 (R848)를 포함하는 것인 조성물.

[0178] 30. 실시양태 1 내지 29 중 어느 하나에 있어서, mRNA 또는 제1 mRNA 및 제2 mRNA가 5' 비번역 영역 (5'UTR)

및 3' 비번역 영역 (3'UTR)을 포함하는 것인 조성물.

[0179] 31. 실시양태 1 내지 30 중 어느 하나에 있어서, mRNA가 5' 캡 구조를 포함하는 것인 조성물.

[0180] 32. 실시양태 1 내지 31 중 어느 하나에 있어서, mRNA가 폴리A 꼬리를 포함하는 것인 조성물.

[0181] 33. 실시양태 1 내지 32 중 어느 하나에 있어서, mRNA가 뉴클레오시드-변형된 mRNA인 조성물.

[0182] 34. i) 항원의 코딩 영역, 및 ii) 구성적으로 활성인 시클릭 GMP-AMP 신타제 (cGAS)의 코딩 영역을 포함하는 핵산으로서, 임의로 여기서 핵산은 mRNA이고, 임의로 여기서 핵산은 DNA인 핵산.

[0183] 35. 실시양태 34의 핵산을 포함하는 발현 벡터.

[0184] 36. 실시양태 1 내지 35 중 어느 하나에 있어서, 구성적으로 활성인 cGAS가 그의 야생형 대응물보다 더 큰 자기 DNA 반응성에 대한 경향성을 갖는 것인 조성물.

[0185] 37. 실시양태 1 내지 36 중 어느 하나에 있어서, cGAS가 아미노-말단 포스포이노시티드-결합 도메인이 없는 말단절단된 cGAS (cGAS ΔN)인 조성물.

[0186] 38. 실시양태 37에 있어서, cGAS ΔN이 서열식별번호: 1의 아미노산 서열 또는 서열식별번호: 1과 적어도 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인 조성물.

[0187] 39. 실시양태 38에 있어서, cGAS ΔN이 하기를 포함하는 것인 조성물:

[0188] (i) 서열식별번호: 2, 서열식별번호: 3, 서열식별번호: 4, 서열식별번호: 5, 서열식별번호: 6, 서열식별번호: 7 또는 서열식별번호: 8의 아미노산 서열, 또는 서열식별번호: 2, 서열식별번호: 3, 서열식별번호: 4, 서열식별번호: 5, 서열식별번호: 6, 서열식별번호: 7 또는 서열식별번호: 8과 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열; 또는

[0189] (ii) 서열식별번호: 9의 컨센서스 아미노산 서열.

[0190] 40. 실시양태 38에 있어서, cGAS ΔN이 서열식별번호: 17의 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 것인 조성물.

[0191] 41. 실시양태 37 내지 40 중 어느 하나에 있어서, cGAS ΔN의 코딩 영역이 시작 코돈 (ATG)과 작동가능한 조합으로 존재하는 것인 조성물.

[0192] 42. 실시양태 1 내지 41 중 어느 하나에 있어서, 항원이 종양 항원인 조성물.

[0193] 43. 실시양태 42에 있어서, 종양 항원이 종양-연관 항원인 조성물.

[0194] 44. 실시양태 42에 있어서, 종양 항원이 신생항원인 조성물.

[0195] 45. 실시양태 1 내지 41 중 어느 하나에 있어서, 항원이 미생물 항원을 포함하는 것인 조성물.

[0196] 46. 실시양태 44에 있어서, 미생물 항원이 바이러스 항원, 박테리아 항원, 원충 항원, 또는 진균 항원을 포함하는 것인 조성물.

[0197] 47. 실시양태 1 내지 41 중 어느 하나에 있어서, 항원이 병원체의 표면 단백질 또는 그의 단편을 포함하는 것인 조성물.

[0198] 48. 실시양태 47에 있어서, 병원체가 인간 대상체에서 질환을 유발할 수 있는 것인 조성물.

[0199] 49. 실시양태 47 또는 실시양태 48에 있어서, 병원체가 바이러스인 조성물.

[0200] 50. 실시양태 49에 있어서, 바이러스가 SARS-CoV-2인 조성물.

[0201] 51. 실시양태 50에 있어서, 항원이 SARS-CoV-2의 스파이크 (S) 당단백질이고, 임의로 여기서 스파이크 당단백질이 융합전 안정화된 변이체인 조성물.

[0202] 52. 실시양태 1 내지 51 중 어느 하나에 있어서, 조성물이 리포폴리사카라이드 (LPS) 또는 모노포스포릴 지질 A (MPLA)를 포함하지 않는 것인 조성물.

[0203] 53. 실시양태 1 내지 52 중 어느 하나에 있어서, 조성물이 산화된 1-팔미토일-2-아라키도노일-sn-글리세로-3-포스포릴콜린 (oxPAPC) 또는 oxPAPC의 종을 포함하지 않는 것인 조성물.

[0204] 54. 실시양태 53에 있어서, 조성물이 2-[[(2R)-2-[(E)-7-카르복시-5-히드록시헵트-6-에노일]옥시-3-헥사데카노

일옥시프로폭시]-히드록시포스포릴]옥시에틸-트리메틸아자늄 (HOdiA-PC), [(2R)-2-[(E)-7-카르복시-5-옥소헵트-6-에노일]옥시-3-헥사데카노일옥시프로필] 2-(트리메틸아자늄일)에틸 포스페이트 (KOdiA-PC), 1-팔미토일-2-(5-히드록시-8-옥소-옥테노일)-sn-글리세로-3-포스포릴콜린 (HOOA-PC), 2-[[(2R)-2-[(E)-5,8-디옥소옥트-6-에노일]옥시-3-헥사데카노일옥시프로폭시]-히드록시포스포릴]옥시에틸-트리메틸아자늄 (KOOA-PC), [(2R)-3-헥사데카노일옥시-2-(5-옥소펜타노일옥시)프로필] 2-(트리메틸아자늄일)에틸 포스페이트 (POVPC), [(2R)-2-(4-카르복시부타노일옥시)-3-헥사데카노일옥시프로필] 2-(트리메틸아자늄일)에틸 포스페이트 (PGPC), [(2R)-3-헥사데카노일옥시-2-[4-[3-[(E)-[2-[(Z)-옥트-2-에닐]-5-옥소시클로펜트-3-엔-1-일리덴]메틸]옥시란-2-일]부타노일옥시]프로필] 2-(트리메틸아자늄일)에틸 포스페이트 (PECPC), [(2R)-3-헥사데카노일옥시-2-[4-[3-[(E)-[3-히드록시-2-[(Z)-옥트-2-에닐]-5-옥소시클로펜틸리덴]메틸]옥시란-2-일]부타노일옥시]프로필] 2-(트리메틸아자늄일)에틸 포스페이트 (PEIPC) 및/또는 1-팔미토일-2-아젤라오일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (PAzePC)을 포함하지 않는 것인 조성물.

[0205] 55. 실시양태 1 내지 54 중 어느 하나의 조성물, 및 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 제약 제제.

[0206] 56. 과활성화된 수지상 세포의 생성 방법으로서, 수지상 세포를 실시양태 1 내지 54 중 어느 하나, 실시양태 25 내지 54 중 어느 하나의 조성물, 또는 실시양태 55의 제제의 유효량과 접촉시켜 과활성화된 수지상 세포를 생성하는 것을 포함하고, 여기서 과활성화된 수지상 세포는 노출 약 48시간 이내에 세포 사멸을 겪지 않으면서 IL-1 베타를 분비하는 것인 방법.

[0207] 57. 실시양태 56에 있어서, 수지상 세포가

[0208] (i) 생체내에서 조성물과 접촉되거나; 또는

[0209] (ii) 생체외에서 조성물과 접촉되는 것인

[0210] 방법.

[0211] 58. 실시양태 56 또는 실시양태 57에 있어서, 과활성화된 수지상 세포가

[0212] (i) 비자극된 수지상 세포 또는 비어있는 LNP와 접촉된 수지상 세포보다 더 높은 수준의 IL-6, TNFα, RANTES 및 IP-10 중 하나 이상을 분비하고/거나;

[0213] (ii) 더 높은 수준의 CCR7, CD40, CD80, CD83, CD86, MHC 부류 II, MHC 부류 I, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 세포 표면 마커를 발현하는 것인

[0214] 방법.

[0215] 59. 실시양태 56 내지 58 중 어느 하나의 방법에 의해 생성된 적어도 10^3, 10^4, 10^5 또는 10^6개의 과활성화된 수지상 세포, 및 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 제약 제제.

[0216] 60. 항원에 대한 면역 반응을 자극하는 방법으로서, 실시양태 55 또는 실시양태 59의 제약 제제의 유효량을 이를 필요로 하는 개체에게 투여하여 항원에 대한 면역 반응을 자극하는 것을 포함하는 방법.

[0217] 61. 암을 치료하는 방법으로서, 실시양태 55 또는 실시양태 59의 제약 제제의 유효량을 이를 필요로 하는 개체에게 투여하여 암을 치료하는 것을 포함하는 방법.

[0218] 62. 비정상적 세포 증식을 억제하는 방법으로서, 실시양태 55 또는 실시양태 59의 제약 제제의 유효량을 이를 필요로 하는 개체에게 투여하여 비정상적 세포 증식을 억제하는 것을 포함하는 방법.

[0219] 63. 감염성 질환을 치료하거나 또는 예방하는 방법으로서, 실시양태 55의 제약 제제의 유효량을 이를 필요로 하는 개체에게 투여하여 감염성 질환을 치료하거나 또는 예방하는 것을 포함하는 방법.

[0220] 64. 실시양태 63에 있어서, 감염성 질환이 바이러스성 질환인 방법.

[0221] 65. 실시양태 63에 있어서, 감염성 질환이 박테리아성 질환인 방법.

[0222] 66. 실시양태 56 내지 62 중 어느 하나에 있어서, 수지상 세포가 포유동물 세포인 방법 또는 제약 제제.

[0223] 67. 실시양태 66에 있어서, 포유동물 세포가 인간 세포인 방법 또는 제약 제제.

[0224] 68. 실시양태 60 내지 66 중 어느 하나에 있어서, 개체가 포유동물인 방법.

[0225] 69. 실시양태 68에 있어서, 포유동물이 인간인 방법.

[0226] 70. 실시양태 68에 있어서, 포유동물이 개 또는 고양이인 방법.

[0227] 71. 실시양태 1 내지 70 중 어느 하나에 있어서, 제2 인지질이 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (DSPC)을 포함하고, 적어도 하나의 지질이 8-[(2-히드록시에틸)[6-옥소-6-(운데실옥시)헥실]아미노]-옥탄산, 1-옥틸노닐 에스테르 (SM-102) 또는 그의 유사체 또는 유도체, 및 콜레스테롤을 포함하는 것인 조성물, 제제, 또는 방법.

[0228] 72. 실시양태 71에 있어서, 적어도 하나의 지질이 페길화 지질을 추가로 포함하고, 임의로 여기서 페길화 지질이 폴리에틸렌 글리콜 [PEG] 2000 디미리스토일 글리세롤 [DMG]을 포함하는 것인 조성물, 제제, 또는 방법.

[0229] 73. 실시양태 1 내지 72 중 어느 하나에 있어서, LNP가 약 250 나노미터 미만, 임의로 약 25 내지 약 250 나노미터, 임의로 약 50 내지 약 200 나노미터, 또는 임의로 약 75 내지 약 175 나노미터의 유효 직경을 갖는 것인 조성물, 제제, 또는 방법.

[0230] 74. 실시양태 73에 있어서, LNP가 약 200 나노미터 미만의 유효 직경을 갖는 것인 조성물, 제제, 또는 방법.

[0231] 75. 실시양태 73에 있어서, LNP가 약 150 나노미터 미만의 유효 직경을 갖는 것인 조성물, 제제, 또는 방법.

[0232] **실시예**

[0233] 약어: BMDC (골수-유래 수지상 세포); CDS (시토졸 DNA 센서); 시클릭 GMP-AMP 신타제 (cGAS); CLR (C-유형 렉틴 수용체); DAMP (손상-연관 분자 패턴); DC (수지상 세포); dLN (배수 림프절); DLS (동적 광 산란); DMG-PEG-2000 (폴리에틸렌 글리콜 [PEG] 2000 디미리스토일 글리세롤 [DMG]; DSPC (1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린); ELSD (증발 광 산란 검출기); FLT3L (Fms-관련 티로신 키나제 3 리간드); GFP (녹색 형광 단백질); GV (GenVoy ILM™ 제제); (HOdiA-PC (1-팔미토일-2-(5-히드록시-8-옥소-6-옥텐디오일)-sn-글리세로-3-포스파티딜콜린); HOOA-PC (1-팔미토일-2-(5-히드록시-8-옥소옥트-6-에노일)-sn-글리세로-3-포스포콜린); IFNɣ (인터페론-감마); IL-1b/IL1-베타/IL-1β (인터류킨-1베타); KOdiA-PC (1-(팔미토일)-2-(5-케토-6-옥텐-디오일) 포스파티딜콜린); KOOA-PC (1-팔미토일-(5-케토-8-옥소-6-옥테노일)-sn-글리세로-3-포스포콜린); LNP (지질 나노입자); LPC/Lyso PC (리소포스파티딜콜린); Lyso PC(22:0) (1-베헤노일-2-히드록시-sn-글리세로-3-포스포콜린); LPS (리포폴리사카라이드); MC3 ((6Z,9Z,28Z,31Z)-헵타트리아콘타-6,9,28,31-테트라엔-19-일 4-(디메틸아미노)부타노에이트, 일명 DLin-MC3-DMA); mcg 또는 μg (마이크로그램); moDC (단핵구-유래 수지상 세포); MPLA (모노포스포릴 지질 A); NLR (NOD-유사 수용체); OVA (오브알부민); oxPAPC (산화된 1-팔미토일-2-아라키도닐-sn-글리세로-3-포스포릴콜린); PAMP (병원체-연관 분자 패턴); PBMC (말초 혈액 단핵 세포); PGPC (1-팔미토일-2-글루타릴-sn-글리세로-3-포스포콜린); POVPC (1-팔미토일-2-(5'-옥소-발레로일)-sn-글리세로-3-포스포콜린); PRR (병원체 인식 수용체); RLR (RIG-I-유사 수용체); R848 (레시퀴모드); SC (피하로); STING (인터페론 유전자의 자극제); TNFα (종양 괴사 인자-알파); 및 TLR (톨-유사 수용체).

[0234] 본 개시내용은 명확성 및 이해의 목적을 위해 예시 및 실시예에 의해 일부 상세하게 기술되었지만, 특정 변화 및 변형이 실시될 수 있음이 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백할 것이다. 따라서, 하기 실시예는 첨부된 청구범위에 의해 기술되는 본 개시내용의 범주를 제한하는 것으로 해석되지 않아야 한다.

[0235] **실시예 1: 단일 아실 쇄를 갖는 리소포스파티딜콜린 (LPC)과 TLR7/8 효능제의 조합은 포유동물 말초 혈액 단핵 세포를 과활성화시킨다**

[0236] 이 실시예는 소분자 PAMP와 조합으로 지질 DAMP로의 개 및 인간 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)의 과활성화를 기술한다.

[0237] **재료 및 방법**

[0238] 전혈로부터의 PBMC의 단리. PBMC를 피콜-파크 플러스(Ficoll-Paque PLUS) (시티비아(Cytivia))를 이용한 밀도 구배 원심분리를 사용하여 전혈로부터 단리하였다. 전혈을 PBS로 1:1 희석하고, 피콜-파크 플러스의 상부에 층상화하고, 1000 xg에서 30분 동안 실온에서 원심분리하였다. PBMC를 수집하고, PBS에서 2회 세척하고, 액크 (Ack) 용해 완충제 (론자(Lonza))와 인큐베이션하여 임의의 나머지 적혈구를 제거하였다.

[0239] 세포 배양 및 자극. 단리 직후, PBMC를 10% FBS, 50 단위/mL 페니실린, 50 mg/mL 스트렙토마이신, 2 mM L-글루타민, 1 mM 피루브산나트륨, 및 50 mM 베타-메르캅토에탄올을 함유하는 RPMI 배지 (R10 배지)에 플레이팅하였다. 세포를 96-웰 평저 조직 배양 플레이트에 웰당 $1x10^5$개 (개 세포) 또는 $1x10^6$개 (인간 세포)로 플레이팅하

였다. 동결건조된 박시그레이드(Lyophilized Vaccigrade) R848 (인비보젠(Invivogen))를 재구성하고, 제조업체의 권장사항에 따라 희석하고, 1 μg/mL의 최종 농도로 세포에 첨가하였다. 직후, 22:0 LYSO PC를 82.5 μM의 최종 농도로 세포에 첨가하였다. 추가적인 선천성 효능제를 R10 배지에서 제조업체의 권장사항에 따라 희석하고, 하기와 같이 세포에 첨가하였다: 인간 GM-CSF (페프로테크(Peprotech))를 10 ng/mL의 최종 농도로 첨가하고; 2'3' cGAMP (인비보젠)를 15 μg/mL의 최종 농도로 첨가하고; LPS, 혈청형 055:B5 (엔조 라이프 사이언시스(Enzo Life Sciences))를 1 μg/mL의 최종 농도로 첨가하고; 수산화백반 (인비보젠)을 30 μg/mL의 최종 농도로 첨가하였다. 세포를 37℃, 5% CO_2에서 2일 동안 인큐베이션하였다. 이어서 세포 배양물을 종점 분석에 사용하였다.

[0240] 종점 분석. PBMC를 2일 동안 PAMP 및 DAMP와 배양한 후, 상청액 및 세포 샘플을 분석을 위해 수집하였다. 배양물 중의 세포를 400xg에서 5분 동안 원심분리에 의해 펠릿화하였다. 웰 중의 배지 부피의 절반은 효소-결합 면역흡착 검정 (ELISA) 또는 루미트(Lumit)™ 생물발광 검정에 의한 시토카인 정량화를 위해 수집한 반면, 나머지 배지 및 세포는 대사 활성을 평가함으로써 세포 생존력를 정량화하는데 사용하였다.

[0241] 시토카인 분비의 정량화. 인간 PBMC로부터의 IL-1β 분비를 하기 키트 중 하나를 사용하여 평가하였다: ELISA 맥스 디럭스 세트(MAX Deluxe Set) 인간 IL-1β 키트 (바이오레전드(Biolegend)), 인비트로젠(Invitrogen) 인간 IL-1β 키트, 또는 루미트™ 인간 IL-1β 면역검정 (프로메가(Promega)). 인간 PBMC로부터의 IFNγ 분비를 ELISA 맥스 디럭스 세트 인간 IFNγ (바이오레전드)를 사용하여 평가하고, 인간 PBMC로부터의 TNFα 분비를 인간 TNFα 비코팅 ELISA 키트 (인비트로젠)를 사용하여 평가하였다. ELISA를 제조업체의 지시서에 따라 하기 변형으로 수행하였다: i) 인큐베이션을 위한 총 샘플 + 완충제 부피를 100 μL에서 50 μL로 감소시키고; ii) 상부 표준물을 7.8 pg/mL까지 2배 희석으로 500 pg/mL로 제조하고; iii) 샘플 인큐베이션을 오비탈 쉐이커 상에서 4C에서 밤새 완료하였다. 루미트™ 검정을 제조업체의 지시서에 따라 수행하였다. 개 PBMC로부터의 IL-1β 분비를 개 IL-1β/IL-1F2 듀오세트(DuoSet) ELISA (알앤디(R&D))를 사용하여 제조업체의 지시서에 따라 하기 변형으로 수행하였다: i) 인큐베이션을 위한 총 샘플 + 완충제 부피를 100 μL에서 50 μL로 감소시키고; ii) 샘플 인큐베이션을 오비탈 쉐이커 상에서 4℃에서 밤새 완료하였다. 모든 ELISA에 대해, 흡광도를 스펙트라맥스(Spectramax) M5e 플레이트 판독기 (몰리큘라 디바이시스(Molecular Devices))를 사용하여 570 nm 보정으로 450 nm에서 측정하였다. 루미트™ 검정을 위해, 발광을 500 ms의 적분 시간으로 스펙트라맥스 M5e 플레이트 판독기 (몰리큘라 디바이시스)를 사용하여 모든 파장에 대해 측정하였다. 상청액 중의 시토카인 농도를 결정하기 위해, 샘플 농도를 그래프패드 프리즘(GraphPad Prism) 9 (그래프패드 소프트웨어(GraphPad Software)) 상에서 4PL 분석을 통해 표준 곡선을 사용하여 내삽하였다. 이어서 샘플의 내삽된 결과를 상청액에 대해 수행된 임의의 희석에 대해 조정하였다.

[0242] 세포 생존력의 정량화. 세포 생존력을 셀타이터-글로(CellTiter-Glo) 발광 세포 생존력 검정 (프로메가)을 사용하여 대사적으로 활성인 세포의 지표인 ATP의 존재를 정량화함으로써 평가하였다. 대사 활성을 제조업체의 지시서에 따라 평가하였다. 셀타이터-글로 시약을 세포 펠릿과 혼합하고, 이어서 새로운 배지를 흰색, 불투명 96-웰 플레이트에 옮겼다. 발광을 500 ms의 적분 시간을 사용하여 스펙트라맥스 M5e 플레이트 판독기 (몰리큘라 디바이시스) 상에서 모든 파장에 대해 측정하였다. 퍼센트 생존력을 R848로 처리된 PBMC의 대조군 조건에 비해 계산하였다.

[0243] 통계적 분석. 각각의 조건에 대해, 각각의 공여자로부터의 세포를 삼중으로 시험을 위해 플레이팅하였다. 시토카인 정량화를 위해, 삼중실험 값을 내삽을 위해 사용하고, 데이터를 총 농도 (pg/mL) 또는 R848 단독의 대조군 조건에 비한 공여자당 배수 변화로서 플롯팅하였다. 생존력 정량화를 위해, 각각의 공여자 삼중실험을 평균하고, 평균을 하나의 공여자 측정으로서 사용하였다. 다중 공여자를 시험하였으며, 컬럼 그래프 상의 각각의 데이터 점은 공여자에 대한 값을 나타낸다. 시험 조건의 차이에 대해 시험하기 위해, 시험 결과를 R848 단독의 대조군 조건과 비교하였다. P-값을 던넷(Dunnett) 검정을 사용한 다중 비교를 위한 보정과 함께 혼합-효과 1원 ANOVA를 사용하여 계산하였다.

[0244] **결과 - 22:0 LYSO PC 및 R848로의 처리는 개 PBMC를 과활성화시킨다**

[0245] 22:0 LYSO PC (DAMP) 및 TLR7/8 효능제 R848 (PAMP)의 조합은 인간 moDC에서 강력한 과자극 활성을 갖는 것으로 밝혀졌다. 이 과자극 활성이 다른 임상적으로 관련된 종으로 번역되는지 여부를 평가하기 위해, 개 전혈로부터 단리된 PBMC를 과활성화시키는 22:0 LYSO PC + R848의 능력을 평가하였다. 각각의 데이터 세트에 대해, 본 파이드(bone fide) 개 moDC를 유도하는데 이용가능한 개-특이적 시약의 결여로 인해 moDC 대신 다중 공여자로부터의 PBMC를 사용하였다. 간략하게, PBMC를 밀도 구배 원심분리를 사용하여 전혈로부터 단리하고, 이어서

관심 과활성화 자극과 함께 2일 동안 배양하였다.

[0246] 배양에서 2일 후, 과활성화를 세포 배양 상청액 중의 IL-1β의 정량화 및 세포 생존력의 측정에 의해 평가하였다. 22:0 LYSO PC 및 R848로 함께 처리된 경우, 개 PBMC는 시험된 모든 다른 자극과 비교하여 mL당 농도 뿐만 아니라 R848 단독에 비한 공여자당 배수 변화 둘 다로서 대등하거나 더 높은 수준의 IL-1β를 분비하였다. PBMC의 5-10%를 구성하는 단핵구가 R848로의 활성화에 반응하여 IL-1β를 방출할 수 있음을 제시하는 이전의 연구와 일치하게, 개 PBMC는 비처리된 세포와 비교하여 R848 단독으로 IL-1β 분비의 수준을 상승시켰다. LPS + 백반의 피롭토시스 조합은 예상된 바와 같이 높은 수준의 IL-1β를 유발하였다. 특히, PGPC + R848은 R848 단독과 비교하여 유사한 수준의 IL-1β를 유발하였지만, GM-CSF도 2'3'cGAMP도 비처리된 세포와 비교하여 개 PBMC로부터 유의한 IL-1β 분비를 유도하지 않았다.

[0247] IL-1β는 세포 배양 상청액에서 개 PBMC의 과활성화 후 1일에 검출될 수 있지만, IL-1β 분비 후 지속성 있는 생존력을 보장하기 위해 과활성화 후 2일에 세포 생존력을 평가하였다. 22:0 LYSO + R848은 상대적 세포 생존력을 유의하게 감소시키지 않았다. 흥미롭게도, R848과 조합으로 PGPC는 개 PBMC에 대해 다소 독성인 것으로 입증되었지만, 이는 인간 moDC 또는 인간 PBMC에 대해서는 독성인 것으로 관찰되지 않았다. 함께 이들 데이터는 22:0 LYSO + R848이 과활성화를 지시하는 높은 수준의 개 PBMC로부터의 IL-1β 분비를 유발함을 입증한다.

[0248] **결과 - 22:0 LYSO PC 및 R848로의 처리는 인간 PBMC를 과활성화시킨다**

[0249] 과활성화 실험을 또한 인간 공여자로부터 수득된 전혈로부터 단리된 PBMC로 수행하였다. 간략하게, PBMC를 다중 인간 공여자로부터 밀도 구배 원심분리에 의해 전혈로부터 단리하고, 관심 과활성화 자극과 함께 2일 동안 배양하였다.

[0250] 인간 PBMC는, 인간 moDC 및 개 PBMC와 같이, 시험된 모든 다른 자극보다 더 높거나 대등한 수준으로 IL-1β를 분비하였다. 개 PBMC와 유사하게, 인간 PBMC는 단핵구 활성화로 인해 R848 단독에 반응하여 IL-1β를 분비하였고, 이는 22:0 LYSO PC의 첨가에 의해 상승되었다. LPS + 백반의 피롭토시스 조합은 예상된 바와 같이 높은 수준의 IL-1β를 유발하였다. 개 PBMC에서의 관찰과 일치하게, PGPC + R848은 R848 단독보다 실질적으로 더 높은 수준의 IL-1β를 유도하지 않았다. GM-CSF는 비처리된 세포에 의해 생성된 배경 수준을 유의하게 초과하는 인간 PBMC로부터의 IL-1β 분비의 수준을 유도하지 않았다.

[0251] 인간 PBMC의 생존력을 또한 IL-1β 분비 후 인간 PBMC의 지속성 있는 생존력을 보장하기 위해 과활성화 후 2일에 평가하였다. 임의의 자극으로의 처리 후 인간 PBMC 생존력의 유의한 감소는 관찰되지 않았다. 함께 이들 데이터는 인간 및 개 PBMC 둘 다가 22:0 LYSO PC + R848에 의해 과활성화됨을 입증한다. 흥미롭게도, 개 PBMC는 PGPC + R848에 의해서보다 22:0 LYSO PC + R848에 의해 더 큰 정도로 과활성화된다.

[0252] 활성화된 인간 PBMC는 IL-1β에 추가로 다른 시토카인을 분비할 수 있기 때문에, 세포 배양 상청액에서의 염증유발성 시토카인 IFNɣ 및 TNFα의 분비를 과활성화 후 2일에 측정하였다. 22:0 LYSO PC + R848의 조합은 시험된 모든 다른 자극과 비교하여 R848 단독에 비해 IFNɣ 분비 및 TNFα 분비 둘 다에서 공여자당 가장 높은 배수 변화를 유도하였다. 특히, LPS + 백반은 높은 수준의 인간 PBMC로부터의 IL-1β 분비를 유도하였지만, 이 자극의 조합은 IFNɣ 또는 TNFα 분비의 배수 증가를 유도하지 않았다. 더욱이, GM-CSF도 2'3'cGAMP도 R848 단독에 비해 IFNɣ 분비의 실질적인 배수 변화를 유발하지 않았다. 이들 데이터는 22:0 LYSO PC + R848의 조합이 인간 PBMC로부터의 염증유발성 시토카인 IFNɣ 및 TNFα의 분비를 유도하는데 있어서 우수함을 지시한다.

[0253] **실시예 2: cGASΔN mRNA 및 22:0 LPC 둘 다는 지질 나노입자 (LNP) 내로 로딩될 수 있다**

[0254] **재료 & 방법**

[0255] *재료.* LNP를 위한 지질은 카이만 케미칼스(Cayman Chemicals) (SM102) 또는 아반티(Avanti) (22:0 LPC, DSPC, DMG-PEG2000)로부터 구입하였다. 콜레스테롤은 시그마(Sigma)로부터 구입하였다. cGASΔN mRNA는 맞춤형 주문하고, 선형화된 주형 DNA로부터 시험관내 전사를 통해 합성하였다 (트리링크(Trilink)). 인간 cGASΔN 서열을 뮤린 세포에서의 발현을 위해 코돈 최적화하였으며, 합성 뉴클레오티드 서열은 서열식별번호: 17로서 제시된다. mRNA 서열을 N1-메틸슈도우리딘 염기 변형, 및 120 잔기 폴리A 꼬리를 갖도록 트리링크의 독점적 클린 캡(Clean Cap) mRNA 기술을 사용하여 캡핑하였다. 서열은 Bbsl 제한 효소 부위를 함유한다. 서열 정보를 사용하여 플라스미드를 수립하고, 그로부터 mRNA를 합성적으로 합성하였다. mRNA를 합성 후 포스파타제 처리하였다.

[0256] *LNP 합성.* 지질 나노입자 (LNP)를 맞춤형 LNP 지질 믹스를 사용하여 제조하였다 (**표 2-1**). cGASΔN mRNA를 시트르산나트륨 완충제, pH 4에서 0.02 mg/mL로 제조하였다. 맞춤형 LNP 지질 믹스를 12.5 mM로 제조하였다.

mRNA/22:0 LPC의 비를 각각의 성분의 시험관내 활성을 결정한 이전의 실험에 기반하여 선택하였다. LNP를 나노어셈블러 이그나이트(NanoAssemblr Ignite) 기기 (프리시전 나노시스템즈(Precision Nanosystems))를 사용하여 합성하였다. 에탄올 중 지질을 12 mL/분의 유속을 사용하여 mRNA 용액과 1:3 부피 비로 개별적으로 배합하였다. LNP를 10 부피의 포스페이트 완충 염수 (PBS), pH 7.4에서 세척하여 잔류 에탄올을 제거하고, 이어서 아미콘(Amicon) 10K MWCO 원심분리 필터를 사용하여 농축시켰다. LNP를 사용 전에 0.2 μm 필터를 통해 여과하였다.

[0257] **표 2-1. LNP 제제**

	22:0 LPC LNP	cGASΔN LNP	22:0 LPC + cGASΔN LNP
지질 믹스			
SM102	40%	40%	40%
DSPC	0%	35%	0%
콜레스테롤	28.5%	28.5%	28.5%
DMG-PEG2000	1.5%	1.5%	1.5%
22:0 LPC	35%	0%	35%
mRNA	N/A	cGASΔN	cGASΔN

[0258]

[0259] *LNP 특징규명.* LNP 내로의 mRNA의 로딩을 리보그린(RiboGreen) 검정 (써모피셔(ThermoFisher))을 사용하여 제조업체의 프로토콜에 따라 정량화하였다. 샘플을 표준 곡선의 범위 내에 해당하도록 희석하였다. LNP를 트리톤(Triton) X-100을 사용하여 용해시켜 LNP 내로의 mRNA의 캡슐화를 평가하였다. 총 mRNA 및 캡슐화된 mRNA 둘 다를 정량화하였다. LNP의 크기를 나노브루크 옴니(NanoBrook Omni) (브루크하벤(Brookhaven)) 상에서 동적 광산란 (DLS)을 사용하여 평가하였다. LNP를 PBS에 1:10 희석한 후, DLS 상에서 실행하였다. 3회의 90초 측정을 각각의 샘플에 대해 기록하였다.

[0260] **결과**

[0261] *LNP는 cGASΔN mRNA 또는 22:0 LPC 중 어느 하나로 로딩된 LNP와 유사한 수준으로 cGASΔN mRNA 및 22:0 LPC로 로딩될 수 있다.* 모든 LNP - 22:0 LPC LNP, cGASΔN LNP, 및 cGASΔN + 22:0 LPC LNP -는 유사한 크기를 나타내며, 모든 LNP는 < 150 nm의 크기 (**도 3A**)로 상대적으로 균일한 분포 (PDI <0.3)를 갖는다. cGASΔN LNP 및 cGASΔN + 22:0 LPC 로딩된 LNP는 유사한 mRNA 로딩 수준을 나타내었지만, 22:0 LPC를 또한 LNP에 첨가한 경우 전체 로딩 효율 (실제/이론적 로딩)의 약간의 감소가 있었다 (**도 3B**). 22:0 LPC LNP 및 cGASΔN + 22:0 LPC LNP는 22:0 LPC에 대한 유사한 로딩 수준 및 효율 (실제/이론적)을 나타내었다 (**도 3C**).

[0262] **실시예 3: 마우스 수지상 세포는 cGASΔN을 코딩하는 mRNA 및 과활성화 자극으로의 처리에 의해 고유한 활성화 상태를 달성한다**

[0263] **재료 & 방법**

[0264] *뮤린 골수-유래 수지상 세포 (BMDC)의 생성.* 다리 대퇴골 및 경골을 마우스로부터 제거하고, 가위로 커팅하고, 멸균 튜브 내로 플러싱하였다. 골수 현탁액을 액크 용해 완충제로 1분 동안 처리하고, 이어서 40 μm 세포 여과기에 통과시켰다. 세포를 카운팅하고, 10% FBS, 페니실린 및 스트렙토마이신, 및 L-글루타민 및 피루브산나트륨의 보충물을 함유하는 완전 IMDM으로 이루어진 배지 (I10)에 재현탁시켰다. 이어서 세포를 P12 플레이트에 웰당 8E6개의 골수 세포로 플레이팅하였다. 재조합 마우스 FLT3L (밀테니(Miltenyi))을 배양물에 200 ng/mL로 첨가하였다. 분화된 세포를 제9일에 후속 검정을 위해 사용하였다. 분화의 효율을 비디(BD) 심포니(Symphony) A3을 사용하여 유동 세포계측법에 의해 모니터링하였으며, $CD11c^{+}MHC\text{-}II^{+}$ 세포는 통상적으로 살아있는 세포의 80% 초과였다. 각각의 실험에 대해, 5 내지 15마리의 마우스를 사용하여 골수로부터 DC를 생성하였다.

[0265] *뮤린 BMDC의 과활성화 및 cGASΔN 전달.* BMDC를 분화 후 9일에 수거하고, PBS로 세척하고, 완전 IMDM 배지 (I10)에 $2x10^{5}$개 세포/웰의 농도로 재-플레이팅하였다. 세포를 100 μM로 22:0 LPC LNP로 로딩된 LNP의 존재 또는 부재 하에서, 및 ~1 μg/mL로 cGASΔN mRNA의 존재 또는 부재 하에서 배양하였다 (**표 3-1**). 특정 조건에서, R848을 1 μg/mL 최종 농도로 첨가하였다. 자극 후 48시간에, 상청액을 시토카인 분비 평가를 위해 수집하였다. BMDC에 의한 IL-1β 시토카인 분비를 샌드위치 ELISA (인비트로젠)를 사용하여 제조업체의 지시서에 따라 측정하였다. 추가적인 시토카인을 레전드플렉스(LEGENDplex) 마우스 항-바이러스 반응 패널 (바이오레전드)을 사용하여 제조업체의 지시서에 따라 측정하였다. CyQUANT LDH 세포독성 검정 (인비트로젠)을 사용하여 제조업체의 지시서에 따라 새로운 상청액 내로의 LDH 방출을 측정함으로써 세포 생존력을 평가하였다.

[0266] **표 3-1. 뮤린 BMDC의 시험관내 투여**

	22:0 LPC LNP	cGASΔN LNP	22:0 LPC + cGASΔN LNP
22:0 LPC 용량	100 μM	N/A	100 μM
mRNA 용량	N/A	0.91 μg/mL	0.91 μg/mL

[0267]

[0268] **결과**

[0269] 이전의 연구에서, 본 발명자들은 R848 및 22:0 LPC를 사용한 DC 과활성화가 전사 인자 NF-kB를 활성화시켜, 염증성 시토카인, 예컨대 IL-6 및 TNFα의 생성을 발생시킴을 밝혀내었다. 추가적으로, NLRP3 인플라마솜은 활성화되어, IL-1β 생성을 발생시킨다. 이들 세포성 반응과 별개로, cGAS 활성화 및 생성된 STING 신호전달은 전사 인자 IRF3을 활성화시키며, 이는 NF-kB와 일부 유전자를 공동-조절하지만 또한 NF-kB와 독립적으로 고유한 유전자 세트를 조절한다. cGASΔN은 구성적으로 활성인 변형된 cGAS이다. 22:0 LPC의 존재 및 부재 하에서 cGASΔN mRNA로 제제화된 LNP를 사용하여, 본 발명자들은 cGAS 신호전달 및 과활성화가 염증성 신호의 상보적 세트를 유도할 수 있다고 가설화하였다.

[0270] 본 발명자들의 가설을 시험하기 위해, 마우스 골수 세포를 FLT3L을 사용하여 DC로 분화시켰다. 이어서 BMDC를 R848, 22:0 LPC, 및 cGASΔN mRNA로 다양한 조합으로 자극하였다. 실시예 2에 기술된 바와 같이, cGASΔN mRNA 및 22:0 LPC는 별개로 또는 조합으로 LNP에서 제제화되었다.

[0271] *R848 및 [cGASΔN + 22:0 LPC] LNP로 처리된 Flt3L BMDC는 과활성화될 수 있다.* DC를 R848 + [cGASΔN + 22:0 LPC] LNP로의 처리에 반응하여 과활성화되는 그들의 잠재성에 대해 평가하였으며; 과활성화는 DC가 생존가능하게 남아 있으면서 IL-1β를 분비하는 능력을 특징으로 하였다. PBS로 처리된 (비자극된) 또는 R848로만 처리된 DC는 IL-1β를 최소로 생성하거나 또는 전혀 생성하지 않았다. 예상된 바와 같이, R848 및 22:0 LPC 처리를 조합하는 것은 48시간 이후 IL-1β 생성을 발생시켰다 (**도 4A**). cGASΔN mRNA-함유 LNP를 사용한 세포의 처리는 IL-1β를 유도하지 않았다. 22:0 LPC와 조합된 cGASΔN 처리는 또한 IL-1β 방출을 발생시키지 않았다 (**도 4A**). cGAS/STING 신호전달은 성숙 IL-1β의 22:0 LPC-매개 방출에 필요한 IL-1β 단백질의 프로-형태를 생성하는데 불충분할 가능성이 높다. 그러나, 모든 3가지 자극, 즉, R848, cGASΔN, 및 22:0 LPC를 조합하는 것은 IL-1β의 방출을 발생시켰다 (**도 4A**). 이 결과는 cGASΔN 처리가 과활성화를 억제하지 않았음을 입증하였다. 다음으로, 세포 생존력을 LDH 방출 검정을 사용하여 평가하여 세포가 과활성화이고 피롭토시스가 아니었음을 확인하였다. 시험된 처리 조건에 걸쳐, DC는 비자극된 세포와 유사한 생존력 프로파일을 가졌으며, 이는 DC가 과활성화임을 확인시켜 주었다 (**도 4B**). 함께, 이들 데이터는 DC가 R848, 22:0 LPC, 및 cGASΔN mRNA로 동시에 처리되고 과활성화할 수 있음을 시사한다.

[0272] *[cGASΔN 및 22:0 LPC] LNP + R848 처리는 Flt3L BMDC에서 NF-kB 신호전달 및 cGAS-STING 경로를 활성화시킨다.* 개별적 자극의 활성을 추가로 확인하기 위해, IL-6 및 TNFα 생성을 정량화하였다. 이들 2가지 유전자는 주로 NF-kB에 의해 및 따라서 R848 자극에 의해 조절된다. R848을 처리로서 첨가한 경우, IL-6 및 TNFα가 생성되었다 (**도 5A-5B**). R848에 22:0 LPC를 함유하는 LNP로의 처리를 첨가하는 것은 IL-6 및 TNFα 분비 둘 다를 증가시켰다. cGASΔN 단독은 IL-6 및 TNFα 분비를 자극하지 않았다 (**도 5A-5B**). cGAS/STING 신호전달은 주로 IRF3을 활성화시키고, NF-kB는 활성화시키지 않는다. 또한, cGAS/STING 신호전달에 의해 조절되는 것으로 공지된 RANTES 및 IP-10의 분비를 측정하였다. PBS로 처리된 (비자극된) 세포는 RANTES 또는 IP-10을 발현하지 않았다. 대조적으로, cGASΔN 자극은 RANTES 및 IP-10의 발현을 유도하였으며, 이는 본 발명자들의 mRNA 전사체가 세포에 성공적으로 전달되고 발현된 활성 cGAS를 코딩하였음을 확인시켜 주었다 (**도 5C-5D**). 예상치 않게, cGASΔN을 22:0 LPC와 함께 전달한 경우, RANTES 및 IP-10 발현은 단일 cGASΔN 처리와 비교하여 억제되었다. 세포를 단독으로 또는 과활성화에서 22:0 LPC와 조합으로 R848로 자극한 경우, 세포는 RANTES 및 IP-10을 생성하였으며, 22:0 LPC-매개 억제는 관찰되지 않았다. cGASΔN을 22:0 LPC와 조합한 경우 관찰된 놀라운 억제에도 불구하고, 모든 3가지를 조합하는 것은 RANTES 및 IP-10의 발현을 발생시켰다 (**도 5C-5D**).

[0273] 종합하면, R848, 22:0 LPC, 및 cGASΔN의 다양한 조합으로의 뮤린 DC의 처리는 몇 가지 사실을 입증하였다. 첫째로, cGASΔN mRNA는 DC 내로의 전달을 위해 LNP에서 성공적으로 제제화되었고, 단백질로 번역되었다. cGASΔN 단백질은 RANTES 및 IP-10 생성을 유도하는 처리의 능력에 의해 지시된 바와 같이 활성이었다. 둘째로, 과활성화 자극과 조합으로, cGASΔN 처리는 주요 과활성화 시토카인 IL-1β의 분비를 감소시키지 않았다. 마지막으로, 세포를 모든 3가지 자극으로 자극한 경우, 하나의 자극에 의해 조절되는 염증성 유전자는 다른 2가지 자극

의 효과에 의해 손상되지 않았다. 이들 데이터는 cGAS△N 처리가 과활성화 자극과 조합되어 DC가 둘 다의 과정의 염증성 환경을 동시에 생성하도록 지시할 수 있음을 입증한다. 이 조합은 면역 반응에서 잠재적 이점을 가질 수 있는 고유한 DC 활성화 상태를 초래한다.

[0274] **실시예 4: cGAS△N 및 과활성화 자극으로의 인간 수지상 세포의 처리는 NLRP3 인플라마솜 및 cGAS-STING 경로의 활성화를 발생시킨다**

[0275] **재료 & 방법**

[0276] *인간 단핵구 유래 수지상 세포 (moDC) 생성.* 인간 단핵구를 스트레이트프롬 류코팍(StraightFrom Leukopak) CD14 마이크로비드 키트를 사용하여 제조업체의 지시서에 따라 밀테니 인크.(Miltenyi Inc.) (미국 캘리포니아주 산 호세)로부터 구입한 류코팍(Leukopak)으로부터 단리하였다. 이어서 단핵구를 분취하고, 10% 디메틸 술폭시드를 함유하는 소 태아 혈청에서 동결시켰다. 단핵구-유래 수지상 세포 (moDC) 배양물로의 연구를 위해, 단핵구를 해동시키고, 10% FBS, 50 단위/mL 페니실린, 50 mg/mL 스트렙토마이신, 2 mM L-글루타민, 1 mM 피루브산나트륨, 50 mM 베타-메르캅토에탄올, 10 mM HEPES, 및 깁코(Gibco) MEM 비-필수 아미노산을 함유하는 RPMI 배지 (R10 배지)에서 배양하였다. 단핵구를 moDC로 분화시키기 위해, 재조합 인간 GM-CSF (50 ng/mL) 및 IL-4 (25 ng/mL)를 R10 배지에 첨가하였다. 세포를 GM-CSF 및 IL-4와 6일 동안 배양하고, 제3일에 추가적인 세포를 GM-CSF 및 IL-4를 함유하는 R10 배지로 공급하였다. 분화의 제6일에, moDC를 사용을 위해 수집하고, 일부를 염색하여 성공적인 분화를 확인한다. 통상적으로, BD 심포니 A3을 사용한 유동 세포계측법에 의해 살아있는 세포의 >80%는 CD11c+CD209+이다.

[0277] *moDC의 과활성화 및 cGAS△N 전달.* 단핵구로부터의 분화 후 6일에, moDC를 수집하고 카운팅하였다. 세포를 96-웰 플레이트에 100,000개 세포/웰로 플레이팅하였다. moDC를 1ug/mL R848, 및 22:0 LPC 및/또는 cGAS△N mRNA를 함유하는 LNP로 처리하였다. 자극 후 48시간에, 세포 배양 상청액을 수집하였다. 시토카인 발현을 레전드플렉스 인간 항-바이러스 반응 패널 (바이오레전드)을 사용하여 제조업체의 지시서에 따라 측정하였다. CyQUANT LDH 세포독성 검정 (인비트로젠)을 사용하여 제조업체의 지시서에 따라 새로운 상청액 내로의 LDH 방출을 측정함으로써 세포 생존력을 평가하였다. 세포를 수집하고, 염색하여 T 세포 활성화에 관여하는 DC 분자의 발현을 측정하였으며, 예컨대 CD40, CD80, CD83, CD86, CCR7, HLA-ABC, 및 HLA-DR 발현을 BD 심포니 A3을 사용하여 유동 세포계측법에 의해 평가하였다.

[0278] **결과**

[0279] 본 발명자들은 cGAS△N-매개 STING 신호전달을 과활성화와 조합하는 것이 현재 이용가능한 옵션보다 더 우수한 보호를 제공할 수 있는 면역요법 및 백신을 수립하는 것을 도울 수 있다고 가설화하였다. 따라서, 본 발명자들은 cGAS△N 요법을 인간 DC에 대한 과활성화와 조합하는 것을 시험하였다. DC의 공급원으로서, 인간 단핵구를 재조합 GM-CSF 및 IL-4를 함유하는 R10 배지에서 6일 동안 배양함으로써 DC로 분화시켰다. 세포는 제6일에 CD11c 및 CD209 염색에 의해 DC인 것으로 확인되었으며, 세포를 본 발명자들의 3가지 관심 자극으로의 처리를 위해 사용하였다: R848, 22:0 LPC 및 cGAS△N.

[0280] *R848 및 [cGAS△N + 22:0 LPC] LNP로 처리된 moDC는 과활성화되고 cGAS-STING 경로 활성화를 허용한다.* 본 발명자들은 먼저 뮤린 DC를 사용하여 얻어진 주요 결론을 확인함으로써 시작하였다. 이들 3가지 처리 (R848, 22:0 LPC, 및 cGAS△N)의 조합은 PBS로 처리된 (비자극된) DC와 비교하여 인간 DC 생존력에 대한 유사한 영향을 가졌다 (**도 6A**). IL-1β 방출을 측정한 경우, 본 발명자들은 PBS (자극 없음) 또는 R848로의 처리가 IL-1β를 최소로 생성하였음을 관찰하였다 (**도 6B**). 예상된 바와 같이, LNP를 통해 전달된 R848 및 22:0 LPC의 조합은 IL-1β 분비를 유도하였다. 마우스와 유사하게, 단독으로 또는 22:0 LPC와 조합으로 cGAS△N 처리는 IL-1β의 분비를 유도하지 않았다 (**도 6B**). cGAS△N을 R848 및 22:0 LPC의 과활성화 조합과 조합한 경우, IL-1β 분비는 유지 또는 증가되었다 (**도 6B**). LNP에서 제제화된 cGAS△N mRNA가 신호전달을 유도할 수 있음을 보장하기 위해 IP-10 분비를 정량화하였다. cGAS△N 처리 단독은 IP-10 발현을 유도하였다. 뮤린 데이터와 대조적으로, cGAS△N LNP에의 22:0 LPC의 첨가는 IP-10 발현을 억제하지 않았다 (**도 6C**). 또한, 뮤린 데이터와 대조적으로, R848 처리 (단독으로 또는 22:0 LPC와 조합으로)는 IP-10 발현을 유도하는데 불충분하였다 (**도 6C**). 모든 3가지 자극을 조합한 경우, cGAS△N, R848, 및 22:0 LPC는 IP-10 발현을 유도할 수 있었다 (**도 6C**). 제시된 공여자에 대해, cGAS△N 처리 단독과 비교하여 모든 3가지 자극을 조합한 경우 IP-10의 감소가 관찰되었다. 그러나, 이 감소는 시험된 4명의 공여자에서 일관되게 관찰되지는 않았다. 이 감소와 무관하게, cGAS△N, R848, 및 22:0 LPC의 조합은 비자극된 조건에서 검출된 것보다 유의하게 더 높은 IP-10 발현을 발생시켰다 (**도 6C**). 종합하면, 이들 결과는 뮤린 DC에서와 같이, 인간 DC는 또한 과활성화되면서 cGAS/STING 활성화를 매개할

수 있음을 시사하였다.

[0281] *R848 및 [cGAS∆N + 22:0 LPC] LNP로 처리된 moDC는 T 세포 활성화에 필요한 표면 단백질을 상향조절한다.* 특이적 시토카인 환경의 생성 외에, DC는 T 세포의 활성화에 중요한 세포 표면 단백질을 발현할 필요가 있다. 한 이러한 단백질은 말초 조직으로부터 이들이 T 세포를 프라이밍할 수 있는 림프절로의 DC 트래피킹에 필요한 케모카인 수용체 CCR7이다. DC를 R848, 22:0 LPC 및 cGAS∆N의 다양한 조합으로 처리한 후 CCR7 발현을 위해 염색하였다. 이전에 관찰된 바와 같이, R848 단독으로의 처리는 CCR7 발현을 증가시켰으며, 22:0 LPC와 조합으로 R848로의 과활성화 처리는 CCR7의 추가의 증가를 초래하였다 (**도 7A**). cGAS∆N 처리는 또한 비자극된 세포와 비교하여 CCR7 발현을 증가시켰으며, 22:0 LPC의 첨가는 CCR7 발현에 대한 유의한 효과를 갖지 않았다 (**도 7A**). 흥미롭게도, cGAS∆N 처리를 R848 및 22:0 LPC와 조합하는 것은 CCR7 발현의 가장 큰 이동을 발생시켰다 (**도 7A**). 중요하게는, cGAS∆N을 과활성화와 조합하는 것은 CCR7 발현을 억제하지 않았으며, 증가된 CCR7 발현은 림프절로의 DC의 더 효율적인 이동을 가능하게 할 수 있었다.

[0282] 본 발명자들은 그의 기능에 중요한 수지상 세포 상의 다른 주요 세포 표면 단백질을 조사하는 것으로 진행하였다. CD40은 CD4 T 세포 상의 CD40L에 결속하고 궁극적으로 T 세포 반응을 증진시키는 수용체이다. CD83은 또한 T 세포 활성화에 관여하며 DC 활성화의 지표로서 통상적으로 사용된다. 비자극된 세포와 비교하여, DC를 22:0 LPC의 존재 또는 부재 하에서 R848로 처리한 경우 CD40 발현은 상향조절되었으며, 세포를 22:0 LPC의 존재 또는 부재 하에서 cGAS∆N으로 처리한 경우 추가의 증진이 관찰되었다 (**도 7B**). cGAS 신호전달을 과활성화와 조합하는 것은 또한 비자극된 세포와 비교하여 CD40 발현의 증가를 초래하였다 (**도 7B**). CD83 발현은 CD40 염색과 비교하여 더 가변적이지만, 다시 cGAS∆N 처리를 과활성화 처리와 조합하는 것은 CD83의 발현을 제거하지 않았다 (**도 7C**).

[0283] CD80 및 CD86은 항원 제시 동안 T 세포에 결속하는 공동자극 분자이며, 제시된 비-자기 항원이 사실 위험하다는 확증적 신호로서 역할을 한다. DC를 R848 또는 cGAS∆N으로 활성화시키는 경우 또는 DC를 R848 및 22:0 LPC로 과활성화시키는 경우, CD80 및 CD86 발현이 증가한다 (**도 8A-8B**). cGAS∆N 및 과활성화 처리를 조합하는 경우, DC는 비자극된 세포와 비교하여 CD80 및 CD86을 계속 상향조절한다 (**도 8A-8B**). 따라서, 둘 다의 세포성 과정이 결부되는 경우, DC는 여전히 T 세포에게 공동-자극 신호를 공급할 수 있다.

[0284] 마지막으로, DC를 항원을 각각 CD8 및 CD4 T 세포에 제시하는 부류 I 및 부류 II MHC 분자인 HLA-ABC 및 HLA-DR에 대해 염색하였다. 비자극된 세포와 비교하여, 22:0 LPC의 첨가의 존재 또는 부재 하에서의 R848 처리는 HLA-ABC의 발현을 증가시켰다 (**도 8C**). 22:0 LPC의 존재 또는 부재 하에서의 cGAS∆N으로의 DC의 처리는 또한 HLA-ABC 발현에 대한 유사한 효과를 가졌다 (**도 8C**). 놀랍게도, cGAS∆N 처리 및 과활성화를 조합하는 경우, 다른 자극 조합과 비교하여 HLA-ABC의 유의한 증가가 관찰되었다. HLA-DR 염색을 분석한 경우, R848 처리는 비자극된 세포와 비교하여 HLA-DR 발현을 증가시키는 것으로 관찰되었다 (**도 8D**). 이어서 R848 및 22:0 LPC의 조합으로 과활성화하는 경우 추가의 증가가 관찰되었다 (**도 8D**). cGAS∆N 처리는 R848 처리 단독보다 또는 과활성화의 일부로서 더 효과적이었다 (**도 8D**). cGAS∆N 처리에 22:0 LPC을 첨가하는 것은 cGAS∆N 처리 단독과 비교하여 HLA-DR 발현을 추가로 증진시켰다 (**도 8D**). 마지막으로, cGAS∆N 처리를 과활성화와 조합하는 것은 모든 실험 조건의 가장 높은 HLA-DR 발현을 초래하였다 (**도 8D**). 모든 3가지 자극을 조합하는 것은 T 세포에 대한 더 효과적인 항원 제시를 가능하게 할 수 있는 MHC 부류 I 및 부류 II 분자의 가장 높은 발현을 발생시켰다.

[0285] 인간 DC를 사용한 연구는 이들이 일반적으로 마우스 DC와 비교하여 cGAS∆N, R848, 및 22:0 LPC에 대해 유사하게 반응함을 시사한다. 한 가지 예상치 않은 차이는 세포를 22:0 LPC의 존재 또는 부재 하에서 cGAS∆N으로 처리한 경우였다. 마우스 DC는 22:0 LPC를 첨가한 경우 IP-10의 억제를 나타낸 반면, 인간 DC는 동일한 결과를 갖지 않았다. 보다 중요하게는, cGAS∆N, R848, 및 22:0 LPC를 조합하는 것은 인간 DC가 과활성화하고 시토카인, 예컨대 IL-1β 및 IP-10을 생성하는 것을 방지하지 않았다. T 세포 활성화에 관여하는 주요 단백질의 세포 표면 발현에 대한 인간 DC의 추가의 분석은 3가지 자극의 조합이 발현을 억제하지 않았음을 입증하였다. 이들 단백질은 여전히 유도가능하였으며, 일부 경우, 예컨대 HLA-ABC 및 HLA-DR에서, 발현은 cGAS∆N 처리 단독 또는 과활성화와 비교하여 추가로 증가되었다. 종합하면, 인간 DC의 처리로부터 수집된 이들 데이터는 cGAS∆N 처리가 과활성화와 조합되어 2가지 과정이 서로 보완하는 세포 상태를 유도할 수 있으며 적응성 면역 반응의 유도를 위한 세포 기능에 대한 상가적 효과를 잠재적으로 가질 수 있음을 시사한다.

[0286] **실시예 5: 면역 반응을 개선시키기 위한 백신접종 전략으로서 cGAS∆N mRNA 및 과활성화의 조합**

[0287] cGAS∆N을 코딩하는 mRNA를 이용함으로써, DC는 활성화되어 T 세포 이펙터 반응을 촉진시키는 화학 신호를 생성할 수 있다. DC의 과활성화는 화학 신호의 상보적 세트를 생성한다. 특히, 과활성화는 염증유발성 시토카인을

유도하고 기억 T 세포 형성을 위한 중요한 시토카인인 그들의 시토카인 레퍼토리 IL-1β에 첨가한다. cGAS/STING 신호전달 및 과활성화에 결부되는 자극을 조합함으로써, 염증성 신호의 보다 넓은 세트가 생성되어 DC에 의해 개시되는 면역 반응을 최대화할 수 있다.

[0288] 이 모델을 시험하기 위해, 아주반트로서 cGASΔN, R848, 및 22:0 LPC의 다양한 조합을 이용하는 백신접종 전략을 생체내에서 비교한다. 백신접종의 목표는 관심 항원 또는 관심 항원의 복합체 공급원 (예를 들어, 모델 항원, 종양-연관 항원, 신생항원, 미생물-유래 항원 등)에 대한 면역 반응을 지정하는 것이다. 면역 반응은 널리 확립된 면역학적 방법 및 통상적인 시약 (예를 들어, 사량체 염색, ELISpot 검정, ELISA, 유동 세포계측법 등)을 사용하여 용이하게 검출된다. 면역원성 조성물은 예를 들어 관심 항원을 코딩하는 mRNA 전사체를 지질 나노입자 (LNP) 내로 로딩함으로써 제조된다. 이들 LNP는 적응성 면역 반응의 개시를 위한 생체내에서의 관심 항원의 발현을 달성하기 위한 포유동물 대상체에의 투여에 적합하다.

[0289] 이 실험의 목적은 LNP 중의 mRNA로서 전달된 cGASΔN이 모델 항원에 대한 면역 반응을 개선시키는 백신 아주반트로서 사용될 수 있는지 여부를 시험하는 것이다. cGASΔN, R848, 및 22:0 LPC는 데 노보 T 세포 활성화 및 기억 T 세포 재활성화를 증진시킴으로써 DC 기능을 개선시키는 것으로 구상된다. 이들 개선은 이펙터 및 기억 T 세포 반응에 대한 양성 하류 효과를 가질 수 있다. 개선된 T 세포 활성화는 또한 B 세포가 T 세포 결속을 요구하는 배 중심 반응을 겪는 경우 B 세포에 대한 추가의 양성 하류 효과를 가질 수 있다.

[0290] **표 5-1. 면역화 전략**

그룹	항원	DC 자극	선천성 경로	이펙터 반응	기억 반응
1	없음	[GFP] 대조군 LNP	없음	-	-
2	OVA	[GFP] 대조군 LNP	없음	+	-
3	OVA	R848 + [GFP] 대조군 LNP	NFkB	+	-
4	OVA	R848 + [22:0 LPC] LNP	NFkB NLRP3	++	++
5	OVA	[cGASΔN] LNP	IRF3	+++	+
6	OVA	[cGASΔN + 22:0 LPC] LNP	IRF3	+++	+
7	OVA	R848 + [cGASΔN] LNP	NFkB NLRP3 IRF3	++++	+++
8	OVA	R848 + [cGASΔN + 22:0 LPC] LNP	NFkB NLRP3 IRF3	+++++	++++

[0291]

[0292] **방법**

[0293] *[cGASΔN + 22:0 LPC] LNP 플러스 LNP 중 mRNA 항원을 이용한 생체내 면역화.* C57BL/6J 마우스를 **표 5-1**에 상세화된 바와 같이 LNP로 피하로 면역화한다. OVA mRNA-로딩된 LNP를 사용하여, 아주반트 cGASΔN mRNA 또는 비-아주반트화 GFP mRNA 중 어느 하나를 함유하는 LNP와 조합으로, 생체내에서 OVA 항원의 생성을 위한 전사체를 전달한다. OVA mRNA 용량은 5 μg/마우스로 고정되는 반면, 아주반트 cGASΔN mRNA는 약 1.5 μg/마우스로 투여되고, 22:0 LPC는 약 60 μg/마우스로 투여된다 (**표 5-1**). 마우스에게 제0일에 1차 면역화를 제공하며, 제7일에 동일한 용량의 부스트 면역화를 제공한다. 단기 이펙터 반응의 평가를 위해, 제14일에, 혈액 및 2차 림프 기관을 수집한다. 장기 기억 반응의 평가를 위해, 제40일에, 혈액 및 2차 림프 기관을 수집한다. 혈액을 항체 및 T 세포 반응의 측정을 위해 수집한다. 혈청은 혈청 분리 튜브를 사용하여 혈액으로부터 수집하는 반면, 세포 분석을 위한 혈액은 K2EDTA 튜브를 사용하여 수집한다. 혈액 수집 후, 마우스를 안락사시키고, 배수 림프절 및 비장을 수집하고, 단일 세포 현탁액으로 프로세싱한다. 예상되는 반응은 **표 5-1**에 제시된다.

[0294] *OVA-특이적 T 세포 사량체 평가.* OVA LNP 면역화를 받은 마우스의 혈액 및 배수 림프절 중의 OVA-특이적 T 세포를 1차 면역화 후 14일 및 40일에 평가한다. 오브알부민 (OVA)의 MHC-I-제한된 T 세포 에피토프인 SIINFEKL (서열식별번호: 17)에 대해 특이적인 CD8+ T 세포를 SIINFEKL-사량체 염색을 사용하여 혈액 및 dLN에서 정량화한다. 간략하게, 적혈구를 RBC 용해 완충제를 사용하여 용해시키며, 혈액에서 모든 RBC를 제거하기 위해 용해를 2회 완료한다. 세포를 세척하고, 이어서 생존력 (살아있는/죽은), SIINFEKL-사량체 결합 (MBL), 및 CD3, CD4, 및 CD8 발현을 위해 염색한다. 세포를 4% 파라포름알데히드로 고정시키고, 카운팅 비드를 첨가한 후, 총

세포 카운트를 결정하기 위해 실행한다. 데이터를 비디 FACS 심포니를 사용하여 수집하고, 플로우조 (비디)를 사용하여 분석한다.

[0295] *이펙터 및 기억 T 세포 측정.* T 이펙터 및 T 기억 세포의 빈도를 OVA LNP 면역화를 받은 마우스의 혈액 및 배수 림프절에서 유동 세포계측법에 의해 평가한다. 간략하게, 세포 현탁액을 CD3, CD4, CD8, CD62L 및 CD44 항체로 염색하여 T 이펙터 세포 ($CD44^{Low}CD62L^{neg}$) 및 T 기억 세포 ($CD44^{high}CD62L^{+}$)의 빈도를 비디 FACS 심포니 기기를 사용하여 측정하고, 데이터를 플로우조 (비디)를 사용하여 분석한다.

[0296] *OVA-특이적 항체 평가.* OVA LNP 면역화를 받은 마우스의 혈청 중의 OVA-특이적 항체를 1차 면역화 후 14일 및 40일에 평가한다. OVA-특이적 총 IgG, IgG1, 및 IgG2b를 ELISA에 의해 평가한다. 간략하게, ELISA 플레이트를 10 μg/mL 엔도핏(Endofit) 오브알부민 (인비보젠)으로 밤새 코팅하고, 이어서 세척하고, 2% 소 혈청 알부민으로 차단한다. 플레이트를 다시 세척하고, 이어서 혈청을 플레이트에 총 7회의 혈청 희석에 대해 1:500 희석, 이어서 1:5 희석으로 첨가한다. 샘플을 세척하고, 이어서 HRP (서던 바이오테크(Southern Biotech))에 접합된 IgG, IgG1, 또는 IgG2b에 대해 특이적인 검출 항체와 인큐베이션하여 각각 총, Th2-사행 또는 Th1-사행 OVA-특이적 항체를 검출한다. 플레이트를 세척하고, 이어서 TMB와 인큐베이션하고, 색상 전개가 완료되면 정지 용액을 첨가한다.

[0297] *OVA-특이적 T 세포 반응.* OVA-특이적 T 세포 반응을 2차 림프 기관 활성으로부터 결정한다. 면역화 후, 배수 림프절 및 비장을 초기 (제14일) 및 후기 (제40일) 시점에서 마우스로부터 수집한다. 수거된 림프절 및 비장을 단일 세포 현탁액으로 해리시키며, 이를 ELISPOT 검정에 사용한다. ELISPOT을 사용하여 각각 Th1 및 Th2 반응을 지시하는 T 세포에 의한 IFNγ 및 IL-5 분비를 검출한다. 배수 림프절 및 비장으로부터의 세포를 10% FBS, 50 단위/mL 페니실린, 50 mg/mL 스트렙토마이신, 2 mM L-글루타민, 1 mM 피루브산나트륨, 50 mM 베타-메르캅토에탄올, 10 mM HEPES, 및 깁코 MEM 비-필수 아미노산을 함유하는 RPMI 배지 (R10 배지)에 플레이팅한다. 세포를 96 웰 ELISPOT 플레이트에 200,000개 세포/웰로 플레이팅하고, 10 mcg/mL OVA 펩티베이터 또는 1 mcg/mL OVA 펩티드 항원으로 재자극한다. 대조군으로서, 추가적인 플레이팅된 세포를 비자극된 채 남겨 두거나 또는 무관한 항원 (백신접종에 사용되지 않음)으로 자극한다. 검정의 완료는 재자극에 반응하는 T 세포이 수를 정량화하는 방법으로서, 시토카인이 T 세포에 의해 분비된 경우 시각적으로 정량화될 수 있는 스폿을 발생시킨다.

[0298] **결과**

[0299] 단기 (백신접종 후 2주) 및 장기 (백신접종 후 >4주) 적응성 T 세포 면역을 평가하기 위한 상기 기술된 검정을 사용하여, 이펙터 및 기억 반응을 분석한다. **표 5-1**은 연구에 포함되는 실험 그룹을 열거한다. 음성 대조군으로서, 그룹 1의 마우스는 항원-특이적 면역 반응이 거의 내지 전혀 유발되지 않을 것으로 예상되는 기준선으로서 역할을 하는 항원을 함유하지 않고 아주반트를 함유하지 않는 샴 주사를 받는다. 그룹 2 마우스는 표준 LNP 백신접종 프로토콜을 나타내는 LNP에서 제제화된 모델 항원 (OVA)을 코딩하는 mRNA를 받는다. 나머지 그룹은 모두 아주반트와 조합으로 OVA를 코딩하는 mRNA로 로딩된 LNP를 받는다. 투여되는 자극의 유형에 따라, 하기 중 하나 이상이 예상된다: i) 세포를 활성화함 (NFkB 신호전달을 유도함); ii) DC를 과활성화함 (NLRP3 경로 활성화를 유도함); 및 iii) DC에서 IRF3 신호전달을 유도함. 예를 들어, 그룹 4 마우스는 R848 + 22:0 LPC를 받으며, 이는 NFkB 경로에 추가로 NLRP3 경로를 활성화시키는 DC를 과활성화시켜 통상적인 염증유발성 시토카인 분비 (IL-6 및 TNFα) 및 IL-1β 생성을 초래할 것으로 예상된다. 그룹 5 마우스는 cGASΔN을 코딩하는 LNP를 받으며, 이는 IRF3을 통해 유형 I IFN 반응을 유도할 것으로 예상된다. 그룹 6 및 그룹 7의 마우스는 3가지 자극 중 2가지를 받는 반면, 그룹 8의 마우스는 모든 3가지 자극 (R848, 22:0 LPC, 및 cGASΔN)을 받는다.

[0300] 생체내에서의 cGASΔN 발현은 이펙터 면역 반응을 매개하는데 특히 유익한 DC 신호를 자극하는 것으로 구상된다. 과활성화 조건은 또한 비록 유형 I IFN 신호전달의 부재 하에서도 이펙터 반응에 유익한 것으로 구상된다. 추가적으로, 과활성화-유도된 IL-1β 신호전달은 개선된 기억 형성을 초래한다. 따라서, cGAS 신호전달 및 과활성화를 조합함으로써, 매우 강한 이펙터 반응 및 지속가능한 기억 반응이 유발될 것으로 구상된다. 샴 처리로 면역화함으로써 (그룹 1), 이펙터 및 기억 반응은 거의 내지 전혀 관찰되지 않을 가능성이 높고, 단독으로 또는 R848과 조합으로 항원 mRNA로 면역화하는 것 (그룹 2 및 3)은 작은 이펙터 반응 및 최소의 기억 형성을 초래할 것으로 구상된다. 그룹 4 처리는 DC를 과활성화시키며 그룹 2 처리에 비해 개선일 것으로 예상된다. 그에 비해, 그룹 5 및 그룹 6 처리는 단지 DC에서의 cGAS 신호전달에만 결부되며, 따라서 강한 이펙터 반응을 초래하지만, 그룹 4 처리보다는 덜 지속가능한 기억 반응을 초래할 것으로 구상된다. 그룹 7은 과활성화 처리 조건이다. 그룹 7 및 그룹 8은 이들이 cGAS 및 과활성화 경로 둘 다와 결부됨을 고려하여 가장 우수한 이펙터 및 기억 반응을 생성할 것으로 구상된다. 과활성화 지질은 NLRP3 활성화 외의 세포성 과정과 결부되기 때

문에, 22:0 LPC를 포함하는 그룹 8 처리는 우수한 이펙터 및 기억 반응을 발생시킬 것으로 구상된다.

[0301] 3가지 아주반트화 자극은 다양한 방식으로 제제화될 수 있다. 예를 들어, cGAS ΔN mRNA는 단독으로 또는 22:0 LPC와 조합으로 LNP에 캡슐화될 수 있다. R848은 LNP 내의, 또는 다른 자극 중 하나 또는 둘 다를 함유하는 LNP 내의 개별 성분으로서 투여될 수 있다. 또한, 자극의 투여의 연대는 다양할 수 있다. 예를 들어, cGAS ΔN mRNA-로딩된 LNP와 조합으로 항원 mRNA-로딩된 LNP 및 R848을 프라임 주사로서 투여하여 유형 I IFN을 통한 강한 이펙터 신호를 제공하고, 이어서 22:0 LPC-로딩된 LNP와 조합으로 항원 mRNA-로딩된 LNP 및 R848의 부스트 주사를 투여하여 지속가능한 면역을 생성하는데 필요한 기억 신호를 제공하는 것이 유익할 수 있다.

[0302] 백신접종에 대한 T 및 B 세포 반응을 연구하는 것은 과활성화와 cGAS 신호전달을 조합하는 것이 항원-특이적 면역 반응의 개선을 발생시킬 것임을 입증하는 것으로 구상되는 생체내 데이터를 생성한다. 다양한 DC 자극의 투여가 B 세포 반응에 영향을 미치는 방법의 평가는 면역화된 마우스의 혈청에서 총 항원-특이적 IgG 항체, 뿐만 아니라 항체 이소타입, 예컨대 IgG1 (TH2 반응과 연관됨) 및 IgG2b (TH1 반응과 연관됨)를 측정함으로써 달성된다. cGAS ΔN LNP를 사용한 이전의 연구에 기반하여, 본 발명자들은 항원을 코딩하는 mRNA 및 cGAS ΔN을 코딩하는 mRNA로 로딩된 LNP로 면역화된 마우스가 TH1-사행 반응을 발생시킬 것으로 예상된다고 예상한다.

서열

SEQ ID NO:1
>인간
PGASKLRAVLEKLKLSRDDISTAAGMVKGVVDHLLLRLKCDSAFRGVGLLN
TGSYYEHVKISAPNEFDVMFKLEVPRIQLEEYSNTRAYYFVKFKRNPKENPLSQFLEGEILSASKMLSKF
RKIIKEEINDIKDTDVIMKRKRGGSPAVTLLISEKISVDITLALESKSSWPASTQEGLRIQNWLSAKVRK
QLRLKPFYLVPKHAKEGNGFQEETWRLSFSHIEKEILNNHGKSKTCCENKEEKCCRKDCLKLMKYLLEQL
KERFKDKKHLDKFSSYHVKTAFFHVCTQNPQDSQWDRKDLGLCFDNCVTYFLQCLRTEKLENYFIPEFNL
FSSNLIDKRSKEFLTKQIEYERNNEFPVFDEF

SEQ ID NO:2
>엠._물라타
PGARKLRAVLEKLRLSHQDISKAAKVVNGVVGHLLRRLKCEPEFGGVEQLH
TGSYYEHVKISAPNEFDVMFKLQVPRIQLEEYSDTGAYYFVKFKRNPEGNPLSLFLEDEILSASKMLSKF
RKIIKEEINNIKDVQPDADVIMKRKRPGSPAVTLLINKEISVDITLALELKTSWPASTQEGLAIKNWLSA
KVRQQLRLKPFYLVPKHAKEGNGFQEETWRLSFSHIEKEILSNHGKSKTCCENKEMKCCRKDCLKLMKYL
LEQLKEKFKDKKHLDKFSSYHVKTAFFHLCTENPQDSQWDPKDLGLCFDNCVTYFLECLRTEQLKNYFIP
GFNLFSSNLIDKTSKEFLSKQIEYERNNEFPVFGEF

SEQ ID NO:3
>피._아누비스
PGARKLRAVLEKLRLSHQDISKAAKVVNGVVGHLLHRLKCESEFEGVEQLH
TGSYYEHVKISAPNEFDVMFKLQVPRIQLEEYSDTGAYYFVKFKRNPKGNPLSQFLEDEILSASKMLSQF
RKIIKEEINNIKDTDVIMKRKRRGSPAVTLLINKEISVDITLALELKTSWPASTQEGLAIKNWLSAKVRQ
QLRLKPFYLVPKHAKEGNGFQEETWRLSFSHIEKEILSNHGKSKTCCENKEMKCCRKDCLKLMKYLLEQL
KEKFKDKKHLDKFSSYHVKTAFFHLCTENPQDSQWDPKDLGLCFDNCVTHFLQCLRTEKLANYFIPGFNL
FSSNLIDKSSKEFLSKQIEYERNNEFPVFGEF

SEQ ID NO:4
>엔._류코게니스
PGARKLRAVLEKLKLSRQEISEAAEVVNGVVDHLLRRLQKCDSEFRGVGLLRTGSYYEH
VKISAPNEFDVMFKLEVPRIQLEEYSNTGAYYFVKFKRNPKENPLSQFLEGEILSASKMLSKFRKIIKEE
INNIKDTDVIMKRKRGGSPAVTLLISEKISVDITLALESNSNSWPASTQEGLPIKDWLSGKVRRQLRLKP
FYLVPKHAKEGNGFQEETWRLSFSHIEKEILNNHGKTKTCCENKNVKCCRKDCLKLMKYLLEQLKERFKD
KKHLDKFSSYHVKTAFFHVCTENPQDSQWDPKNLGFCFDKCVIYFLKCLRTEQLGNYFIPGFNLFSSNLI
DKRSKEFLSKQIEYERNNEYPVFG

SEQ ID NO:5
>에이치_라르
PGARKLPAVLEKLKLSRQ
EICEAAEVVNGVVDHLLRRLQKCDSEFRGVGLLRTGSYYEHVKISAPNEFDVMFKLEVPRIQLEEYSNTG
AYYFVKFKRNPKENPLCQFLEGEILSASKMLSKFRKIIKEEINNIKDTDVILKRKRGGSPAVTLLISEKI
SVDITLALESKSSSWPASTQEGLPIKDWLSGKVRTQLRLKPFYLVPKHAKEGNGFQEETWRLSFSHIEKE
ILNNHGETKTCCENKKVKCCRKDCLKLMKYLLEQLKERFKDKKHLDKFSSYHVKTAFFHVCTENPKDSQW
DPKDLGLCFDKCVIYFLQCLSTEQLGNYFIPGFNLFSSNLIDKRSKEFLSKQIEYERNNEYPVFGKC

[0303]

SEQ ID NO:6
>피._아벨리이
PGASKLRAVLEKLKLSRLEISKAAEVVNRVVDHLLRRLQKYNSEFRGVGLLRT
GSYYEHVKISAPNEFDVMFKLEVPRIQLEEYSNTGAYYFVKFKRNPKENPLSQFLEGEILSASKMLSKFR
KIIKEEINNIKDTDVIMKRKRGGSPAVTLLISEEISVDITLALESKSSWPASTQEGLPIKNWLSAKVRKQ
LRLKPFYLVPKHAKEGNGFQEETWRLSFSHIEKEILNNHGKSKTCCEDKEVKCCRKDCLKLMKYLLEQLK
ERFKDKKHLDKFSSYHVKTAFFHVCTQNPQDSQWDPKDLGLCFDNCVTYFLQCLRTEQLGNYFIPGFNLF
SSNLIDKRSKEFLTKQIEYERNNEFPVFDEF

SEQ ID NO:7
>피._트로글로디테스
PGASKLRAVLEKLKLSRDDISTAAGMVKGVVDHLLLRLKCDSAFRGVGLLN
TGSYYEHVKISAPNEFDVMFKLEVPRIQLEEYSNTRAYYFVKFKRNPKENPLSQFLEGEILSASKMLSKF
RKIIKEEINNIKDVIMKRKRGGSPAVTLLISEKISVDITLALESKSSWPASTQEGLPIKNWLSAKVRKQL
RLKPFYLVPKHAKEGNGFQEETWRLSFSHIEKEILNNHGKSKTCCEIKEAKCCRKDCLKLMKYLLEQLKE
KFKDKKHLDKFSSYHVKTAFFHVCTENPQDSQWDRKDLGLCFDNCVTYFLQCLRIEKLENYFIPEFNLFS
SDLIDKRSKEFLTKQIEYERNNEFPVFDEF

SEQ ID NO:8
>지._고릴라
PGASKLRAVLEKLKLSRDDISTAAGMVKGVVDHLLLRLKCDSAFRGVGLLN
TGSYYEHVKISAPNEFDVMFKLEVPRIQLEEYSNTRAYYFVKFKRNPKENPLSQFLEGEILSASKMLSKF
RKIIKEEINNIKDTDVIMKRKRGGSPAVTLLISEKISVDITLALESKSSWPASTQEGLRIQNWLSAKVRR
QLRLKPFYLVPKHAKEGNGFQEETWRLSFSHIEKEILNNHGKSKTCCENKEAKCCRKDCLKLMKYLLEQL
KERFKDKKHLDKFSSYHVKTAFFHVCTQNPQDSQWDRKQLGLCFDNCVTYFLQCLRTERLENYFIPEFNL
FSRNLIDKRSKEFLTKQIEYERNNEFPVFDEF

SEQ ID NO:9
>CGASΔN_컨센서스
PGAXKLXAVLEKLXLSXXXIXXAAXXVXXVVXHLLXRLXXXXXXFXGVXXLX
TGSYYEHVKISAPNEFDVMFKLXVPRIQLEEYSXTXAYYFVKFKRNPXXNPLXXFLEXEILSASKMLSXF
RKIIKEEINXIKXXXXXXDVIXKRKRXGSPAVTLLIXXXISVDITLALEXXXXSWPASTQEGLXIXXWLS
XKVRXQLRLKPFYLVPKHAKEGNGFQEETWRLSFSHIEKEILXNHGXXKTCCEXKXXKCCRKDCLKLMKY
LLEQLKEXFKDKKHLDKFSSYHVKTAFFHXCTXNPXDSQWDXKXLGXCFDXCVTXFLXCLXXEXLXNYFI
PXFNLFSXXLIDKXSKEFLXKQIEYERNNEXPVFXXX

SEQ ID NO:10
>인간CGAS_전장
MQPWHGKAMQRASEAGATAPKASARNARGAPMDPTESPAAPEAALPKAGKFGPARKSGSRQKKSAPDTQE
RPPVRATGARAKKAPQRAQDTQPSDATSAPGAEGLEPPAAREPALSRAGSCRQRGARCSTKPRPPPGPWD
VPSPGLPVSAPILVRRDAAPGASKLRAVLEKLKLSRDDISTAAGMVKGVVDHLLLRLKCDSAFRGVGLLN
TGSYYEHVKISAPNEFDVMFKLEVPRIQLEEYSNTRAYYFVKFKRNPKENPLSQFLEGEILSASKMLSKF
RKIIKEEINDIKDTDVIMKRKRGGSPAVTLLISEKISVDITLALESKSSWPASTQEGLRIQNWLSAKVRK
QLRLKPFYLVPKHAKEGNGFQEETWRLSFSHIEKEILNNHGKSKTCCENKEEKCCRKDCLKLMKYLLEQL
KERFKDKKHLDKFSSYHVKTAFFHVCTQNPQDSQWDRKDLGLCFDNCVTYFLQCLRTEKLENYFIPEFNL
FSSNLIDKRSKEFLTKQIEYERNNEFPVFDEF

SEQ ID NO:11
>인간CGAS_N-말단

[0304]

MQPWHGKAMQRASEAGATAPKASARNARGAPMDPTESPAAPEAALPKAGKFGPARKSGSRQKKSAPDTQE
RPPVRATGARAKKAPQRAQDTQPSDATSAPGAEGLEPPAAREPALSRAGSCRQRGARCSTKPRPPPGPWD
VPSPGLPVSAPILVRRDAA

SEQ ID NO:12
>토세아 아시그나 바이러스 T2A 리보솜-스키핑 펩티드
[GSG]EGRGSLLTCGDVEENPGP

SEQ ID NO:13
>돼지 테스코바이러스-1 P2A 리보솜-스키핑 펩티드
[GSG]ATNFSLLKQAGDVEENPGP

SEQ ID NO:14
>말 A형 비염 바이러스 E2A 리보솜-스키핑 펩티드
[GSG]QCTNYALLKLAGDVESNPGP

SEQ ID NO:15
>구제역 바이러스 F2A 리보솜-스키핑 펩티드
[GSG]VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP

SEQ ID NO:16
>갈루스 갈루스 오브알부민 펩티드
SIINFEKL

SEQ ID NO:17
>합성 CGASΔN
ATGCCCGGCGCCAGCAAGCTGAGGGCCGTGCTGGAGAAGCTGAAGCTGAGCAGGGACGACATCAGCACCG
CCGCCGGCATGGTGAAGGGCGTGGTGGACCACCTGCTGCTGAGGCTGAAGTGCGACAGCGCCTTCAGGGG
CGTGGGCCTGCTGAACACCGGCAGCTACTACGAGCACGTGAAGATCAGCGCCCCCAACGAGTTCGACGTG
ATGTTCAAGCTGGAGGTGCCCAGGATCCAGCTGGAGGAGTACAGCAACACCAGGGCCTACTACTTCGTGA
AGTTCAAGAGGAACCCCAAGGAGAACCCCCTGAGCCAGTTCCTGGAGGGCGAGATCCTGAGCGCCAGCAA
GATGCTGAGCAAGTTCAGGAAGATCATCAAGGAGGAGATCAACGACATCAAGGACACCGACGTGATCATG
AAGAGGAAGAGGGGCGGCAGCCCCGCCGTGACCCTGCTGATCAGCGAGAAGATCAGCGTGGACATCACCC
TGGCCCTGGAGAGCAAGAGCAGCTGGCCCGCCAGCACCCAGGAGGGCCTGAGGATCCAGAACTGGCTGAG
CGCCAAGGTGAGGAAGCAGCTGAGGCTGAAGCCCTTCTACCTGGTGCCCAAGCACGCCAAGGAGGGCAAC
GGCTTCCAGGAGGAGACCTGGAGGCTGAGCTTCAGCCACATCGAGAAGGAGATCCTGAACAACCACGGCA
AGAGCAAGACCTGCTGCGAGAACAAGGAGGAGAAGTGCTGCAGGAAGGACTGCCTGAAGCTGATGAAGTA
CCTGCTGGAGCAGCTGAAGGAGAGGTTCAAGGACAAGAAGCACCTGGACAAGTTCAGCAGCTACCACGTG
AAGACCGCCTTCTTCCACGTGTGCACCCAGAACCCCCAGGACAGCCAGTGGGACAGGAAGGACCTGGGCC
TGTGCTTCGACAACTGCGTGACCTACTTCCTGCAGTGCCTGAGGACCGAGAAGCTGGAGAACTACTTCAT
CCCCGAGTTCAACCTGTTCAGCAGCAACCTGATCGACAAGAGGAGCAAGGAGTTCCTGACCAAGCAGATC
GAGTACGAGAGGAACAACGAGTTCCCCGTGTTCGACGAGTTCTAATGA

[0305]

도면

도면1i

```
엠_몰라타          PGARKLRAVLEKLRLSHQDISKAAKVVNGVVGHLLRRLK-CEPEFGGVEQLHTGSYYEHV  59
피_아누비스        PGARKLRAVLEKLRLSHQDISKAAKVVNGVVGHLLHRLK-CESEFEGVEQLHTGSYYEHV  59
엔_류코게니스      PGARKLRAVLEKLKLSRQEISEAAEVVNGVVDHLLRRLQKCDSEFRGVGLLRTGSYYEHV  60
에이치_라르        PGARKLPAVLEKLKLSRQEICEAAEVVNGVVDHLLRRLQKCDSEFRGVGLLRTGSYYEHV  60
피_아벨리이        PGASKLRAVLEKLKLSRLEISKAAEVVNRVVDHLLRRLQKYNSEFRGVGLLRTGSYYEHV  60
피_트로글로디테스  PGASKLRAVLEKLKLSRDDISTAAGMVKGVVDHLLLRLK-CDSAFRGVGLLNTGSYYEHV  59
지_고릴라          PGASKLRAVLEKLKLSRDDISTAAGMVKGVVDHLLLRLK-CDSAFRGVGLLNTGSYYEHV  59
에이치_사피엔스    PGASKLRAVLEKLKLSRDDISTAAGMVKGVVDHLLLRLK-CDSAFRGVGLLNTGSYYEHV  59
                   *** ** ******:**: :*. ** :*: **.*** **:  :  * **  *.********
컨센서스           PGAxKLxAVLEKLxLSxxxIxxAAxxVxxVVxHLLxRLxxxxxxFxGVxxLxTGSYYEHV

엠_몰라타          KISAPNEFDVMFKLQVPRIQLEEYSDTGAYYFVKFKRNPEGNPLSLFLEDEILSASKMLS  119
피_아누비스        KISAPNEFDVMFKLQVPRIQLEEYSDTGAYYFVKFKRNPKGNPLSQFLEDEILSASKMLS  119
엔_류코게니스      KISAPNEFDVMFKLEVPRIQLEEYSNTGAYYFVKFKRNPKENPLSQFLEGEILSASKMLS  120
에이치_라르        KISAPNEFDVMFKLEVPRIQLEEYSNTGAYYFVKFKRNPKENPLCQFLEGEILSASKMLS  120
피_아벨리이        KISAPNEFDVMFKLEVPRIQLEEYSNTGAYYFVKFKRNPKENPLSQFLEGEILSASKMLS  120
피_트로글로디테스  KISAPNEFDVMFKLEVPRIQLEEYSNTRAYYFVKFKRNPKENPLSQFLEGEILSASKMLS  119
지_고릴라          KISAPNEFDVMFKLEVPRIQLEEYSNTRAYYFVKFKRNPKENPLSQFLEGEILSASKMLS  119
에이치_사피엔스    KISAPNEFDVMFKLEVPRIQLEEYSNTRAYYFVKFKRNPKENPLSQFLEGEILSASKMLS  119
                   **************:**********:* **********: ***. ***.**********
컨센서스           KISAPNEFDVMFKLxVPRIQLEEYSxTxAYYFVKFKRNPxxNPLxxFLExEILSASKMLS

엠_몰라타          KFRKIIKEEINNIKDVQPDADVIMKRKRPGSPAVTLLINKEISVDITLALELK-TSWPAS  178
피_아누비스        QFRKIIKEEINNIKD----TDVIMKRKRRGSPAVTLLINKEISVDITLALELK-TSWPAS  174
엔_류코게니스      KFRKIIKEEINNIKD-----TDVIMKRKRGGSPAVTLLISEKISVDITLALESNSNSWPAS  176
에이치_라르        KFRKIIKEEINNIKD----TDVILKRKRGGSPAVTLLISEKISVDITLALESKSSSWPAS  176
피_아벨리이        KFRKIIKEEINNIKD-----TDVIMKRKRGGSPAVTLLISEEISVDITLALESK-SSWPAS  175
피_트로글로디테스  KFRKIIKEEINNIK------DVIMKRKRGGSPAVTLLISEKISVDITLALESK-SSWPAS  172
지_고릴라          KFRKIIKEEINNIKD----TDVIMKRKRGGSPAVTLLISEKISVDITLALESK-SSWPAS  174
에이치_사피엔스    KFRKIIKEEINDIKD----TDVIMKRKRGGSPAVTLLISEKISVDITLALESK-SSWPAS  174
                   :**********:**      ***;**** *********.::********** : .*****
컨센서스           xFRKIIKEEINxIKxxxxxxDVIxKRKRxGSPAVTLLIxxxISVDITLALExxxxSWPAS

엠_몰라타          TQEGLAIKNWLSAKVRQQLRLKPFYLVPKHAKEGNGFQEETWRLSFSHIEKEILSNHGKS  238
피_아누비스        TQEGLAIKNWLSAKVRQQLRLKPFYLVPKHAKEGNGFQEETWRLSFSHIEKEILSNHGKS  234
엔_류코게니스      TQEGLPIKDWLSGKVRRQLRLKPFYLVPKHAKEGNGFQEETWRLSFSHIEKEILNNHGKT  236
에이치_라르        TQEGLPIKDWLSGKVRTQLRLKPFYLVPKHAKEGNGFQEETWRLSFSHIEKEILNNHGET  236
피_아벨리이        TQEGLPIKNWLSAKVRKQLRLKPFYLVPKHAKEGNGFQEETWRLSFSHIEKEILNNHGKS  235
피_트로글로디테스  TQEGLPIKNWLSAKVRKQLRLKPFYLVPKHAKEGNGFQEETWRLSFSHIEKEILNNHGKS  232
지_고릴라          TQEGLRIQNWLSAKVRRQLRLKPFYLVPKHAKEGNGFQEETWRLSFSHIEKEILNNHGKS  234
에이치_사피엔스    TQEGLRIQNWLSAKVRKQLRLKPFYLVPKHAKEGNGFQEETWRLSFSHIEKEILNNHGKS  234
                   ***** *:;***.*** ************************************.***::
컨센서스           TQEGLxIxxWLSxKVRxQLRLKPFYLVPKHAKEGNGFQEETWRLSFSHIEKEILxNHGxx
```

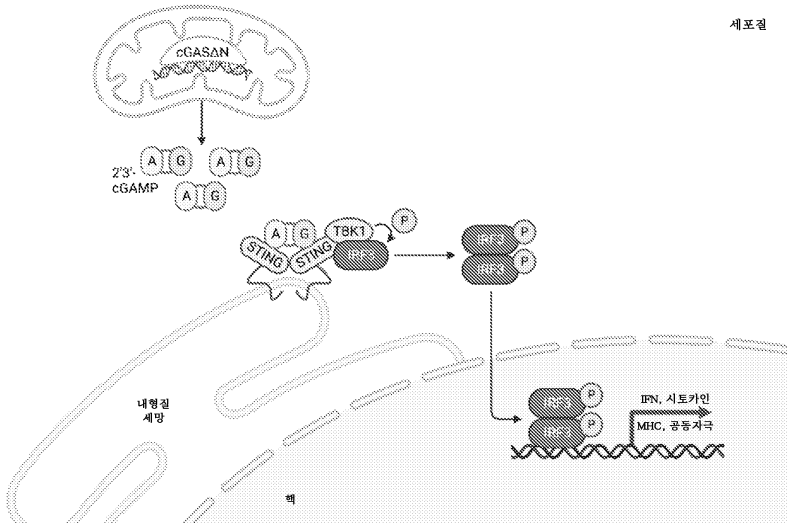
도면1ii

```
엠_몰라타          KTCCENKEMKCCRKDCLKLMKYLLEQLKEKFKDKKHLDKFSSYHVKTAFFHLCTENPQDS  298
피_아누비스        KTCCENKEMKCCRKDCLKLMKYLLEQLKEKFKDKKHLDKFSSYHVKTAFFHLCTENPQDS  294
엔_류코게니스      KTCCENKNVKCCRKDCLKLMKYLLEQLKERFKDKKHLDKFSSYHVKTAFFHVCTENPQDS  296
에이치_라르        KTCCENKKVKCCRKDCLKLMKYLLEQLKERFKDKKHLDKFSSYHVKTAFFHVCTENPKDS  296
피_아벨리이        KTCCEDKEVKCCRKDCLKLMKYLLEQLKERFKDKKHLDKFSSYHVKTAFFHVCTQNPQDS  295
피_트로글로디테스  KTCCEIKEAKCCRKDCLKLMKYLLEQLKEKFKDKKHLDKFSSYHVKTAFFHVCTENPQDS  292
지_고릴라          KTCCENKEAKCCRKDCLKLMKYLLEQLKERFKDKKHLDKFSSYHVKTAFFHVCTQNPQDS  294
에이치_사피엔스    KTCCENKEEKCCRKDCLKLMKYLLEQLKERFKDKKHLDKFSSYHVKTAFFHVCTQNPQDS  294
                   ***** *: ********************:**********************:**:**:**
컨센서스           KTCCExKxxKCCRKDCLKLMKYLLEQLKExFKDKKHLDKFSSYHVKTAFFHxCTxNPxDS

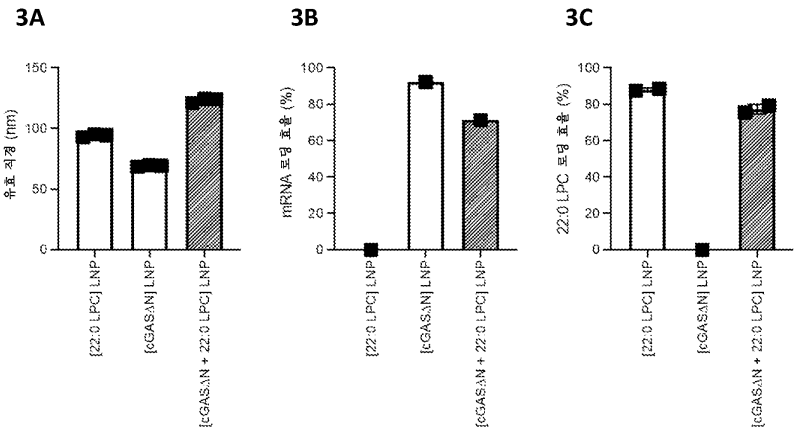
엠_몰라타          QWDPKDLGLCFDNCVTYFLECLRTEQLKNYFIPGFNLFSSNLIDKTSKEFLSKQIEYERN  358
피_아누비스        QWDPKDLGLCFDNCVTHFLQCLRTEKLANYFIPGFNLFSSNLIDKSSKEFLSKQIEYERN  354
엔_류코게니스      QWDPKNLGFCFDKCVIYFLKCLRTEQLGNYFIPGFNLFSSNLIDKRSKEFLSKQIEYERN  356
에이치_라르        QWDPKDLGLCFDKCVIYFLQCLSTEQLGNYFIPGFNLFSSNLIDKRSKEFLSKQIEYERN  356
피_아벨리이        QWDPKDLGLCFDNCVTYFLQCLRTEQLGNYFIPGFNLFSSNLIDKRSKEFLTKQIEYERN  355
피_트로글로디테스  QWDRKDLGLCFDNCVTYFLQCLRIEKLENYFIPEFNLFSSDLIDKRSKEFLTKQIEYERN  352
지_고릴라          QWDRKQLGLCFDNCVTYFLQCLRTERLENYFIPEFNLFSRNLIDKRSKEFLTKQIEYERN  354
에이치_사피엔스    QWDRKDLGLCFDNCVTYFLQCLRTEKLENYFIPEFNLFSSNLIDKRSKEFLTKQIEYERN  354
                   *** *:**:***:** :**:**  *:* ***** ***** :**** *****:********
컨센서스           QWDxKxLGxCFDxCVIxFLxCLxxExLxNYFIPxFNLFSxxLIDKxSKEFLxKQIEYERN

엠_몰라타          NEFPVFGEF        367
피_아누비스        NEFPVFGEF        363
엔_류코게니스      NEYPVFG--        363
에이치_라르        NEYPVFGKC        365
피_아벨리이        NEFPVFDEF        364
피_트로글로디테스  NEFPVFDEF        361
지_고릴라          NEFPVFDEF        363
에이치_사피엔스    NEFPVFDEF        363
                   **:***.
컨센서스                NExPVFxxx
```

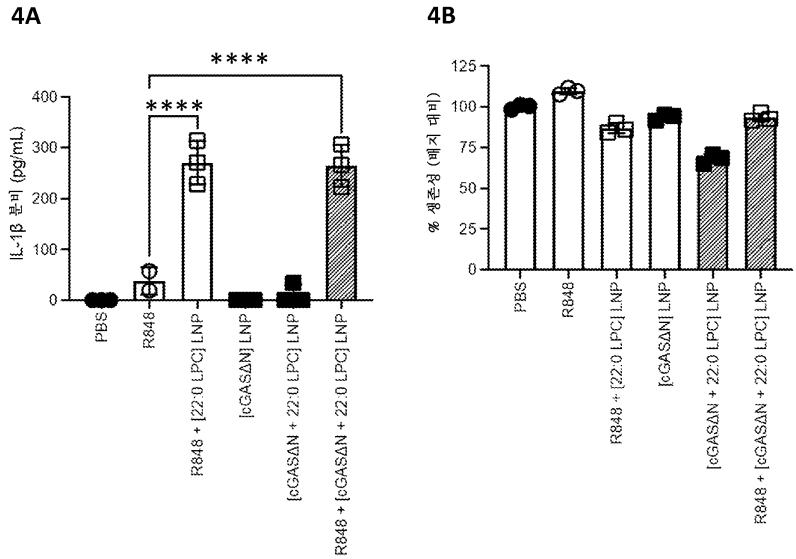
도면2


세포질
cGASΔN
2'3'-cGAMP
A G A G
A G
STING STING
A G TBK1 P
IRF3
P
P
IRF3
내형질 세망
핵
IRF3 P
P
IRF3
IFN, 시토카인
MHC, 공동자극

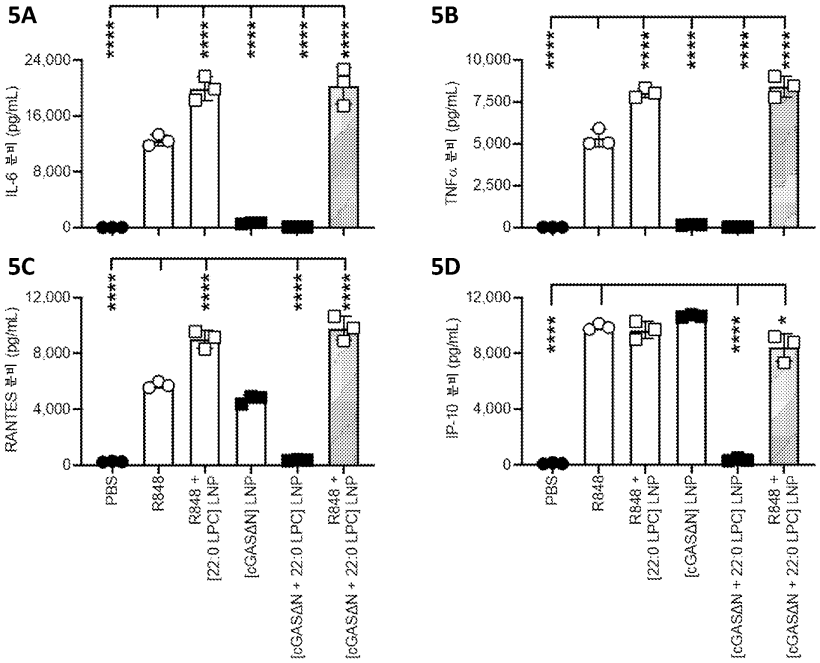
도면3


3A
3B
3C
유효 직경 (nm)
150
100
50
0
mRNA 포장 효율 (%)
100
80
60
40
20
0
22:0 LPC 포장 효율 (%)
100
80
60
40
20
0
[22:0 LPC] LNP
[cGASΔN] LNP
[cGASΔN + 22:0 LPC] LNP

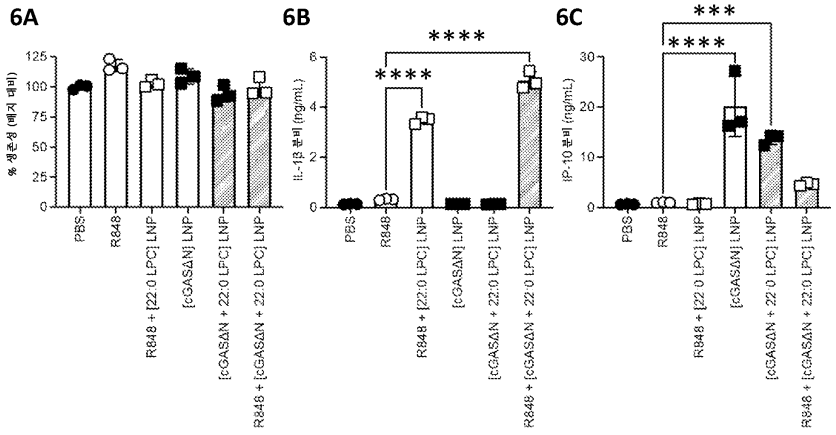
도면4


4A
4B
IL-1β 분비 (pg/mL)
400
300
200
100
0
****
****
% 생존성 (베지 대비)
125
100
75
50
25
0
PBS
R848
R848 + [22:0 LPC] LNP
[cGASΔN] LNP
[cGASΔN + 22:0 LPC] LNP
R848 + [cGASΔN + 22:0 LPC] LNP

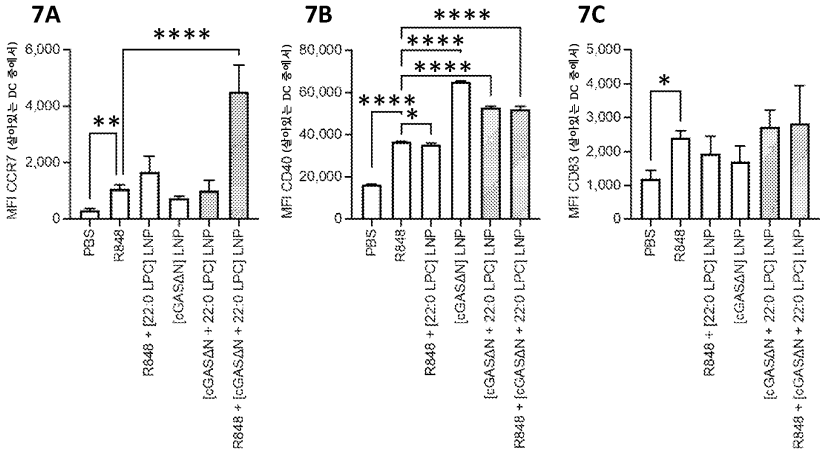
도면5


5A
IL-6 분비 (pg/mL)
24,000
16,000
8,000
0
5B
TNFα 분비 (pg/mL)
10,000
7,500
5,000
2,500
0
5C
RANTES 분비 (pg/mL)
12,000
8,000
4,000
0
5D
IP-10 분비 (pg/mL)
12,000
8,000
4,000
0
****
*
PBS
R848
R848 + [22:0 LPC] LNP
[cGASΔN] LNP
[cGASΔN + 22:0 LPC] LNP
R848 + [cGASΔN + 22:0 LPC] LNP

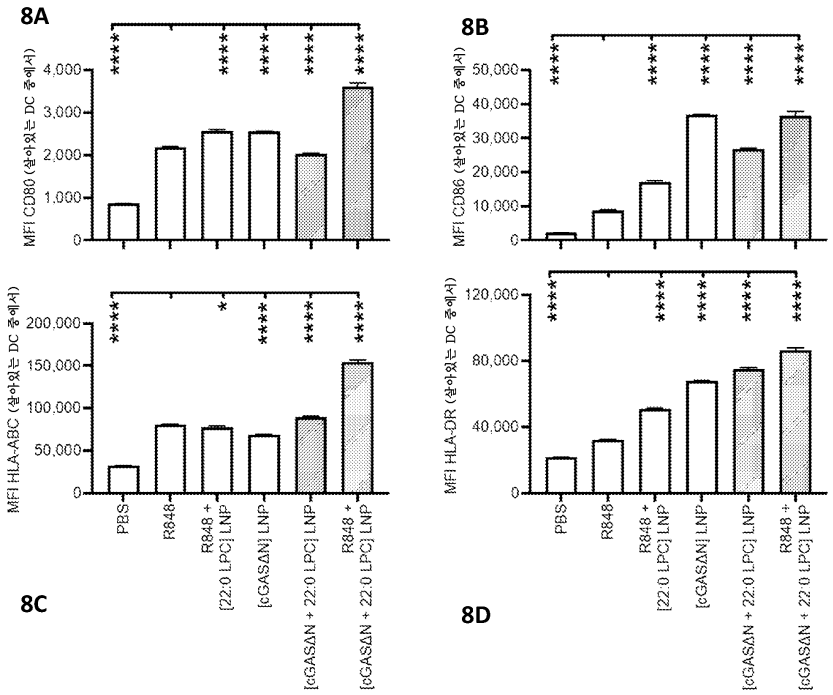
도면6


6A
% 생존성 (베지 대비)
125
100
75
50
25
0
6B
IL-1β 분비 (ng/mL)
6
4
2
0
6C
IP-10 분비 (ng/mL)
30
20
10
0
***
****
PBS
R848
R848 + [22:0 LPC] LNP
[cGASΔN] LNP
[cGASΔN + 22:0 LPC] LNP
R848 + [cGASΔN + 22:0 LPC] LNP

도면7

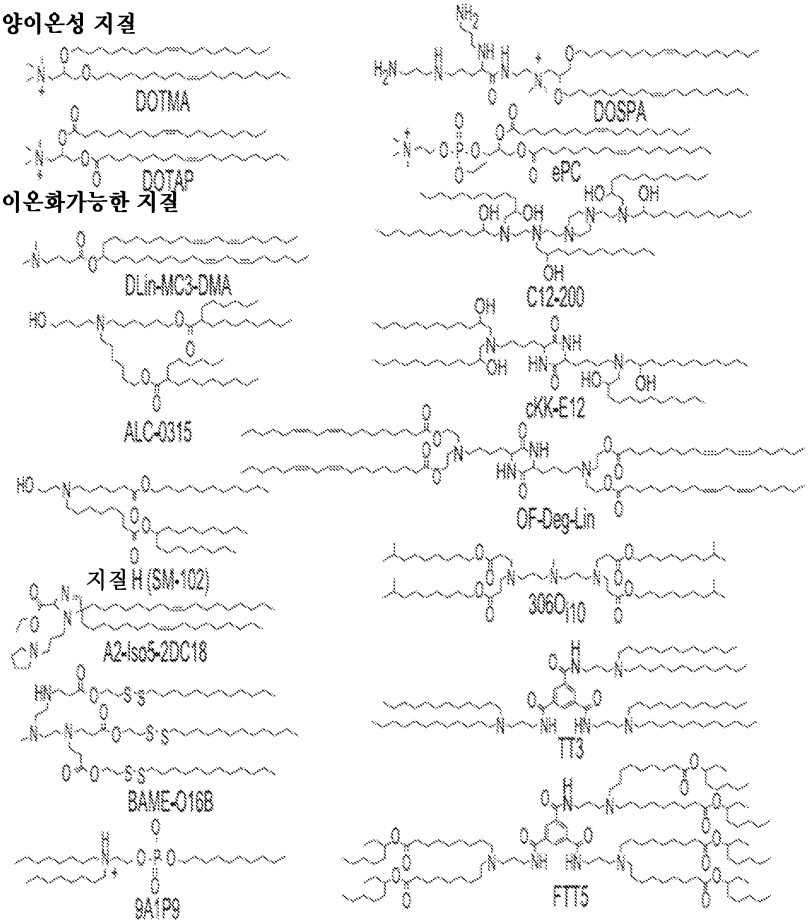

7A
7B
7C
MFI CCR7 (살아있는 DC 중에서)
MFI CD40 (살아있는 DC 중에서)
MFI CD83 (살아있는 DC 중에서)
PBS
R848
R848 + [22:0 LPC] LNP
[cGASΔN] LNP
[cGASΔN + 22:0 LPC] LNP
R848 + [cGASΔN + 22:0 LPC] LNP

도면8


8A
8B
8C
8D
MFI CD80 (살아있는 DC 중에서)
MFI CD86 (살아있는 DC 중에서)
MFI HLA-ABC (살아있는 DC 중에서)
MFI HLA-DR (살아있는 DC 중에서)
PBS
R848
R848 + [22:0 LPC] LNP
[cGASΔN] LNP
[cGASΔN + 22:0 LPC] LNP
R848 + [cGASΔN + 22:0 LPC] LNP

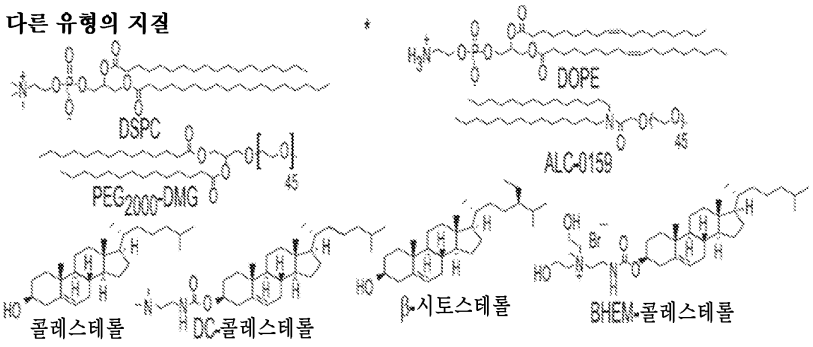
도면9i

9A


양이온성 지질
DOTMA
DOTAP
DOSPA
ePC
이온화가능한 지질
DLin-MC3-DMA
C12-200
ALC-0315
cKK-E12
OF-Deg-Lin
지질 H (SM-102)
306O10
A2-Iso5-2DC18
TT3
BAME-O16B
FTT5
9A1P9

도면9ii

9B


다른 유형의 지질
DSPC
PEG2000-DMG
DOPE
ALC-0159
콜레스테롤
DC-콜레스테롤
β-시토스테롤
BHEM-콜레스테롤

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.