



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0024759
(43) 공개일자 2025년02월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/005 (2006.01) A01K 67/0275 (2024.01)
A61K 39/12 (2006.01) A61P 31/00 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/005 (2013.01)
A01K 67/0275 (2024.01)
(21) 출원번호 10-2024-7037974
(22) 출원일자(국제) 2023년04월18일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년11월14일
(86) 국제출원번호 PCT/US2023/065898
(87) 국제공개번호 WO 2023/205644
국제공개일자 2023년10월26일
(30) 우선권주장
63/332,606 2022년04월19일 미국(US)

(71) 출원인
레플리케이트 바이오사이언스, 인크.
미국 캘리포니아 샌디에고 소렌토 밸리 로드
11558 스위트 6 (우: 92121)
(72) 발명자
왕, 나다니엘 스티븐
미국 92121 캘리포니아 샌디에고 소렌토 밸리 로
드 11558 스위트 6 레플리케이트 바이오사이언스
인크. (내)
미야케-스토너, 시게키 조셉
미국 92121 캘리포니아 샌디에고 소렌토 밸리 로
드 11558 스위트 6 레플리케이트 바이오사이언스
인크. (내)
(74) 대리인
특허법인(유)남아이피그룹

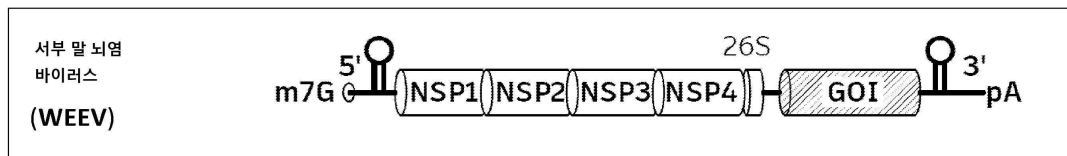
전체 청구항 수 : 총 58 항

(54) 발명의 명칭 변형된 서부 말 뇌염 바이러스 및 이의 용도

(57) 요약

본 개시는 변형된 바이러스 게놈 또는 자가-복제 RNA를 포함하는 핵산 분자, 이를 함유하는 약학적 조성물, 및 세포 배양물 또는 생체에서 원하는 생성물의 생산을 위한 이러한 핵산 분자 및 조성물의 용도를 포함하는 분자 바이러스학 분야에 관한 것이다. 또한, 약력학적 효과의 유도를 필요로 하는 대상체에서 약력학적 효과를 유도하기 위한 방법 뿐만 아니라 다양한 건강 상태를 예방 및/또는 치료하기 위한 방법이 제공된다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 39/12 (2013.01)

A61P 31/00 (2018.01)

C12N 15/86 (2013.01)

C12N 2760/16122 (2013.01)

C12N 2760/16134 (2013.01)

C12N 2770/36121 (2013.01)

C12N 2770/36143 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

변형된 서부 말 뇌염 바이러스(WEEV) 게놈 또는 자가-복제 RNA(srRNA)를 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물로서, 여기서 변형된 WEEV 게놈 또는 srRNA가 하나 이상의 바이러스 구조 단백질을 인코딩하는 핵산 서열의 적어도 일부가 없는, 핵산 작제물.

청구항 2

제1항에 있어서, 변형된 바이러스 게놈 또는 srRNA가 하나 이상의 바이러스 구조 단백질을 인코딩하는 핵산 서열의 실질적인 부분이 없는 핵산 작제물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 변형된 바이러스 게놈 또는 srRNA가 바이러스 구조 단백질을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하지 않는 핵산 작제물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 발현 카세트를 추가로 포함하고, 여기서 각각의 발현 카세트가 이중성 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된 프로모터를 포함하는, 핵산 작제물.

청구항 5

제4항에 있어서, 발현 카세트 중 적어도 하나가 이중성 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된 서브게놈(*sg*) 프로모터를 포함하는 핵산 작제물.

청구항 6

제5항에 있어서, *sg* 프로모터가 26S 서브게놈 프로모터인 핵산 작제물.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 WEEV 게놈 또는 srRNA의 적어도 하나의 비구조 단백질(nsP) 또는 이의 일부가 변형된 WEEV 게놈 또는 srRNA의 나머지에 비해 이중성인 핵산 작제물.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 이중성 nsP 또는 이의 일부를 인코딩하는 핵산 서열을 추가로 포함하는 핵산 작제물.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 비번역 영역(UTR)을 추가로 포함하는 핵산 작제물.

청구항 10

제9항에 있어서, UTR 중 적어도 하나가 이중성 UTR인 핵산 작제물.

청구항 11

제4항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 발현 카세트 중 적어도 하나가 관심 유전자(GOI)에 대한 코딩 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 12

제11항에 있어서, GOI가 치료용 폴리펩티드, 예방용 폴리펩티드, 진단용 폴리펩티드, 기능식품용 폴리펩티드,

산업용 효소, 및 리포터 폴리펩티드로 구성된 군으로부터 선택된 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산 작제물.

청구항 13

제11항 또는 제12항에 있어서, GOI가 항체, 항원, 면역 조절제, 효소, 신호전달 단백질, 및 사이토카인으로 구성된 군으로부터 선택된 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산 작제물.

청구항 14

제11항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, GOI의 코딩 서열이 참조 코딩 서열의 발현 수준보다 높은 수준의 발현을 위해 최적화된 핵산 작제물.

청구항 15

제11항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, GOI의 코딩 서열이 향상된 RNA 안정성을 위해 최적화된 핵산 작제물.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산 서열이 SEQ ID NO: 1 또는 SEQ ID NO: 2의 핵산 서열과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 서열 동일성을 갖는 핵산 작제물.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 따른 핵산 작제물을 포함하는 재조합 세포.

청구항 18

제17항에 있어서, 재조합 세포가 진핵 세포인 재조합 세포.

청구항 19

제18항에 있어서, 재조합 세포가 동물 세포인 재조합 세포.

청구항 20

제19항에 있어서, 동물 세포가 척추동물 세포 또는 무척추 동물 세포인 재조합 세포.

청구항 21

제20항에 있어서, 재조합 세포가 곤충 세포인 재조합 세포.

청구항 22

제21항에 있어서, 재조합 세포가 모기 세포인 재조합 세포.

청구항 23

제20항에 있어서, 재조합 세포가 포유동물 세포인 재조합 세포.

청구항 24

제20항에 있어서, 재조합 세포가 SV40에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 세포(COS-7), 인간 배아 신장 세포(예를 들어, HEK 293 또는 HEK 293 세포), 새끼 햄스터 신장 세포(BHK), 마우스 세르틀리 세포(예를 들어, TM4 세포), 원숭이 신장 세포(CV1), 인간 자궁경부 암종 세포(HeLa), 개 신장 세포(MDCK), 버팔로 래트 간 세포(BRL 3A), 인간 폐 세포(W138), 인간 간 세포(Hep G2), 마우스 유방 종양(MMT 060562), TRI 세포, FS4 세포, 중국 햄스터 난소 세포(CHO 세포), 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포(Vero 세포), 인간 A549 세포, 인간 자궁경부 세포, 인간 CHME5 세포, 인간 PER.C6 세포, NSO 무린 골수종 세포, 인간 표피양 후두 세포, 인간 섬유모세포 세포, 인간 HUH-7 세포, 인간 MRC-5 세포, 인간 근육 세포, 인간 내피 세포, 인간 성상세포, 인간 대식세포, 인간 RAW 264.7 세포, 마우스 3T3 세포, 마우스 L929 세포, 마우스 결합 조직 세포, 마우스 근육 세포, 및 토끼

신장 세포로 구성된 군으로부터 선택되는 재조합 세포.

청구항 25

제17항 내지 제24항 중 어느 한 항에 따른 적어도 하나의 재조합 세포 및 배양 배지를 포함하는 세포 배양물.

청구항 26

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 따른 핵산 작제물을 포함하는 트랜스제닉 동물.

청구항 27

제26항에 있어서, 동물이 척추 동물 또는 무척추 동물인 트랜스제닉 동물.

청구항 28

제26항에 있어서, 동물이 곤충인 트랜스제닉 동물.

청구항 29

제27항에 있어서, 동물이 포유동물인 트랜스제닉 동물.

청구항 30

제29항에 있어서, 포유동물이 비인간 포유동물인 트랜스제닉 동물.

청구항 31

관심 폴리펩티드를 생산하기 위한 방법으로서, (i) 제26항 내지 제30항 중 어느 한 항에 따른 트랜스제닉 동물을 사육하는 단계, 또는 (ii) 트랜스제닉 동물 또는 재조합 세포가 GOI에 의해 인코딩된 폴리펩티드를 생산하는 조건 하에 제12항 내지 제16항 중 어느 한 항에 따른 핵산 작제물을 포함하는 재조합 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 32

대상체에게 제12항 내지 제16항 중 어느 한 항에 따른 핵산 작제물을 투여하는 것을 포함하는 대상체에서 관심 폴리펩티드를 생산하기 위한 방법.

청구항 33

제29항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 척추 동물 또는 무척추 동물인 방법.

청구항 34

제29항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 곤충인 방법.

청구항 35

제29항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 포유동물 대상체인 방법.

청구항 36

제35항에 있어서, 포유동물 대상체가 인간 대상체인 방법.

청구항 37

제29항 내지 제36항 중 어느 한 항의 방법에 의해 생산된 재조합 폴리펩티드.

청구항 38

약학적으로 허용되는 부형제 및:

a) 제1항 내지 16항 중 어느 한 항의 핵산 작제물;

- b) 제17항 내지 제24항 중 어느 한 항의 재조합 세포; 및/또는
- c) 제37항의 재조합 폴리펩티드를 포함하는 약학적 조성물.

청구항 39

제38항에 있어서, 제1항 내지 제16항 중 어느 한 항의 핵산 작제물 및 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약학적 조성물.

청구항 40

제38항에 있어서, 제17항 내지 제24항 중 어느 한 항의 재조합 세포 및 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약학적 조성물.

청구항 41

제38항에 있어서, 제37항의 재조합 폴리펩티드 및 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약학적 조성물.

청구항 42

제38항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물이 리포솜, 지질-기반 나노입자(LNP), 폴리머 나노입자, 폴리플렉스, 바이러스 레플리콘 입자(VRP), 미소구체, 면역 자극 복합체(ISCOM), 생물활성 리간드의 컨쥬게이트, 또는 이들의 임의의 조합으로 제형화되는 약학적 조성물.

청구항 43

제38항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물이 면역원성 조성물인 약학적 조성물.

청구항 44

제43항에 있어서, 면역원성 조성물이 백신으로서 제형화되는 약학적 조성물.

청구항 45

제38항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물이 대상체에 대해 실질적으로 비면역원성인 약학적 조성물.

청구항 46

제38항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 약학적 조성물이 애주번트로서 제형화되는 약학적 조성물.

청구항 47

제38항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 약학적 조성물이 비강내 투여, 경막내 투여, 경피 투여, 복강내 투여, 근육내 투여, 기관내 투여, 결절내 투여, 종양내 투여, 관절내 투여, 정맥내 투여, 피하 투여, 질내 투여, 안내 투여, 직장 투여, 및 경구 투여 중 하나 이상을 위해 제형화되는 약학적 조성물.

청구항 48

약력학적 효과의 유도를 필요로 하는 대상체에서 약력학적 효과를 유도하기 위한 방법으로서, 상기 방법이

- a) 제1항 내지 16항 중 어느 한 항의 핵산 작제물;
- b) 제17항 내지 제24항 중 어느 한 항의 재조합 세포;
- c) 제37항의 재조합 폴리펩티드; 및/또는
- d) 제38항 내지 제47항 중 어느 한 항의 약학적 조성물을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 49

제48항에 있어서, 약력학적 효과가 면역원성 효과, 바이오마커 반응, 치료 효과, 예방 효과, 요망되는 효과, 바람직하지 않은 효과, 부작용, 및 질병 모델에서의 효과 중 하나 이상을 포함하는 방법.

청구항 50

제49항에 있어서, 약력학적 효과가 대상체에서 면역 반응을 유발하는 것을 포함하는 방법.

청구항 51

건강 병태의 예방 및/또는 치료를 필요로 하는 대상체에서 건강 병태를 예방 및/또는 치료하기 위한 방법으로서, 상기 방법이

- a) 제1항 내지 16항 중 어느 한 항의 핵산 작제물;
- b) 제17항 내지 제24항 중 어느 한 항의 재조합 세포;
- c) 제37항의 재조합 폴리펩티드; 및/또는
- d) 제38항 내지 제47항 중 어느 한 항의 약학적 조성물을 포함하는 조성물을 대상체에게 예방적으로 또는 치료적으로 투여하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 52

제51항에 있어서, 투여된 조성물이 대상체에서 면역 반응을 유발하는 방법.

청구항 53

제51항 또는 제52항에 있어서, 병태가 증식성 장애 또는 미생물 감염인 방법.

청구항 54

제51항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 증식성 장애 또는 미생물 감염과 관련된 병태를 갖거나 갖는 것으로 의심되는 방법.

청구항 55

제51항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서, 투여된 조성물이 대상체에서 인터페론의 생산을 증가시키는 방법.

청구항 56

제51항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물이 단일 요법(단독요법)으로서 또는 적어도 하나의 추가 요법과 조합된 제1 요법으로서 대상체에게 개별적으로 투여되는 방법.

청구항 57

제56항에 있어서, 적어도 하나의 추가 요법이 화학요법, 방사선요법, 면역요법, 호르몬 요법, 독소 요법, 표적 요법, 및 수술로 구성된 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 58

약력학적 효과를 유도하고/거나, 면역 반응을 유발하고/거나, 건강 병태 또는 미생물 감염의 예방 및/또는 치료를 위한 키트로서, 상기 키트가

- a) 제1항 내지 16항 중 어느 한 항의 핵산 작제물;
 - b) 제17항 내지 제24항 중 어느 한 항의 재조합 세포;
 - c) 제37항의 재조합 폴리펩티드; 및/또는
 - d) 제38항 내지 제47항 중 어느 한 항의 약학적 조성물
- 및 제48항 내지 제57항 중 어느 한 항의 방법을 수행하기 위한 설명서를 포함하는, 키트.

발명의 설명

기술 분야

배경 기술

발명의 내용

- [0001] 관련 출원에 대한 전후 참조
- [0002] [0001] 본 출원은 2022년 4월 19일에 출원된 미국 가특허 출원 일련 번호 63/332,606에 대한 우선권의 이익을 주장한다. 상기 참조된 출원의 개시는 임의의 도면을 포함하여 그 전체가 본원에 참조로 명백하게 포함된다.
- [0003] 서열 목록의 통합
- [0004] [0002] 첨부된 서열 목록의 자료는 이에 의해 본원에 참조로 포함된다. 2023 04 13 Sequence_Listing_ST26 058462 511001W0.xml로 명명된 첨부된 서열 목록 XML 파일은 2023년 4월 13일에 생성되었으며, 크기는 26,362 바이트이다.
- [0005] 분야
- [0006] [0003] 본 개시는 분자 바이러스학 및 면역학 분야에 관한 것이고, 특히 변형된 바이러스 계통 및 레플리콘, 예를 들어, 자가-복제 RNA(srRNA) 분자를 인코딩하는 핵산 분자, 이를 함유하는 약학적 조성물, 및 세포 배양물 또는 생체에서 원하는 생성물의 생산을 위한 이러한 핵산 분자 및 조성물의 용도에 관한 것이다. 또한, 약력학적 효과의 유도를 필요로 하는 대상체에서 약력학적 효과를 유도하기 위한 방법 뿐만 아니라 다양한 건강 병태를 예방 및/또는 치료하기 위한 방법이 제공된다.
- [0007] 배경
- [0008] [0004] 최근 몇 년 동안, 여러 상이한 그룹의 동물 바이러스가 상동성 재조합에 의해 또는 계통의 직접 공학을 통해 유전자 조작을 겪었다. DNA 및 RNA 바이러스 둘 모두에 대한 역유전학 시스템의 이용가능성은, 예를 들어, 백신, 발현 벡터, 항중양제, 유전자 요법 벡터, 및 약물 전달 비히클과 같은 재조합 바이러스의 사용에 대한 새로운 관점을 창출하였다.
- [0009] [0005] 예를 들어, 많은 바이러스-기반 발현 벡터가 배양된 재조합 세포에서 이중성 단백질의 발현을 위해 배치되었다. 예를 들어, 숙주 세포에서 유전자 발현을 위한 변형된 바이러스 벡터의 적용은 계속 확대되고 있다. 이와 관련하여 최근의 발전은 다중-서브유닛 단백질 복합체의 생산을 위한 기술 및 시스템의 추가 개발, 및 이중성 단백질 생산을 개선하기 위한 단백질-변형 효소의 공동-발현을 포함한다. 바이러스 발현 벡터 기술과 관련된 다른 최근의 진전은 유전자 발현을 제어하기 위한 많은 진보된 계통 공학 적용, 바이러스 벡터의 제조, 생체 내 유전자 요법 적용, 및 백신 전달 벡터의 생성을 포함한다.
- [0010] [0006] 그러나, 숙주 세포는 병원체 침입을 검출하고 대응하기 위해 복잡하고 강력한 메커니즘을 발달시킬 수 있는 것으로 보고되었다. 바이러스, 특히 병원성 바이러스는 감염 및 복제에 대한 이러한 세포 방어와 싸우기 위해 숙주 세포와 함께 진화했다고 추가로 보고되었다. 감염의 결과, 많은 숙주 세포는 바이러스 복제 및/또는 잠재적으로 추가 세포로 퍼질 수 있는 자손 바이러스 생산을 제어하기 위해 세포 단백질 번역 기구를 차단한다. 이러한 현상은 일반적으로 "선천성 면역 반응"으로 지칭된다. 감염된 세포는 또한 항바이러스 상태를 설정하고 감염을 제어하기 위해 국소적으로 및 전신적으로 다른 세포에 위험 신호를 보낸다. 이러한 세포 항바이러스 시스템은 숙주 세포에 이롭지만, 또한 유익한 백신 항원 또는 치료제를 발현하도록 설계된 자가-복제 RNA(srRNA)에 부정적인 영향을 미칠 수 있다. 예를 들어, 세포가 유익한 단백질을 발현하는 srRNA를 검출하고 이의 선천성 면역 방어 메커니즘을 활성화시키는 경우, 이러한 세포에서 유익한 단백질의 발현이 영향을 받을 수 있고 srRNA의 효능이 저하될 수 있다.
- [0011] [0007] 따라서, srRNA-기반 발현 플랫폼에서 관심 생성물을 발현시키기 위한 보다 효율적인 방법 및 시스템이 여전히 필요하다.
- [0012] 개요

- [0013] [0008] 본 개시는 일반적으로 증식성 장애 및 미생물 감염과 같은 다양한 건강 병태의 예방 및 관리에 사용하기 위한 재조합 핵산 작제물 및 이를 포함하는 약학적 조성물과 같은 면역-치료제의 개발에 관한 것이다. 특히, 하기에 더 상세히 기재된 바와 같이, 본 개시의 일부 구체예는 변형된 게놈 또는 레플리콘, 예를 들어, 바이러스의 하나 이상의 구조 단백질을 인코딩하는 바이러스 핵산 서열의 적어도 일부가 없는 알파바이러스 서부 말 뇌염 바이러스(WEEV)의 자가-복제 RNA(srRNA)를 인코딩하는 서열을 함유하는 핵산 작제물을 제공한다. 본원에 개시된 핵산 작제물 중 하나 이상을 포함하도록 조작된 재조합 세포 및 트랜스제닉 동물, 관심 분자(예를 들어, 관심 폴리펩티드)를 생산하기 위한 방법, 및 하기 중 하나 이상을 포함하는 약학적 조성물이 또한 개시된다: (a) 본 개시의 핵산 작제물, (b) 본 개시의 폴리펩티드, (c) 본 개시의 재조합 세포. 본 개시의 특정 양태에서, 약력학적 효과의 유도를 필요로 하는 대상체에서 약력학적 효과를 유도하기 위한, 및/또는 증식성 장애(예를 들어, 암) 및 감염을 포함하는 다양한 건강 병태의 예방 및/또는 치료를 위한 조성물 및 방법이 추가로 제공된다.
- [0014] [0009] 본 개시의 일 양태에서, 변형된 서부 말 뇌염 바이러스(WEEV) 게놈 또는 레플리콘, 예를 들어, 자가-복제 RNA(srRNA)를 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물이 본원에 제공되고, 여기서 변형된 WEEV 게놈 또는 레플리콘, 예를 들어, srRNA는 하나 이상의 바이러스 구조 단백질을 인코딩하는 핵산 서열의 적어도 일부가 없다.
- [0015] [0010] 본 개시의 핵산 작제물의 비제한적인 예시적인 구체예는 하기 특징 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 변형된 바이러스 게놈 또는 레플리콘, 예를 들어, srRNA는 하나 이상의 바이러스 구조 단백질을 인코딩하는 핵산 서열의 실질적인 부분이 없다. 일부 구체예에서, 변형된 바이러스 게놈 또는 레플리콘, 예를 들어, srRNA는 바이러스 구조 단백질을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하지 않는다. 일부 구체예에서, 본 개시의 핵산 분자는 하나 이상의 발현 카세트를 추가로 포함하고, 여기서 각각의 발현 카세트는 이중성 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된 프로모터를 포함한다. 일부 구체예에서, 발현 카세트 중 적어도 하나는 이중성 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된 서브게놈(*sg*) 프로모터를 포함한다. 일부 구체예에서, *sg* 프로모터는 26S 서브게놈 프로모터이다.
- [0016] [0011] 일부 구체예에서, 변형된 WEEV 게놈 또는 레플리콘, 예를 들어, srRNA의 적어도 하나의 비구조 단백질(*nsP*) 또는 이의 일부는 변형된 WEEV 게놈 또는 레플리콘, 예를 들어, srRNA의 나머지에 비해 이중성이다. 일부 구체예에서, 변형된 WEEV 게놈 또는 레플리콘, 예를 들어, srRNA는 이중성 *nsP* 또는 이의 일부를 인코딩하는 핵산 서열을 추가로 포함한다.
- [0017] [0012] 일부 구체예에서, 본 개시의 핵산 작제물은 하나 이상의 비번역 영역(UTR)을 추가로 포함한다. 일부 구체예에서, UTR 중 적어도 하나는 이중성 UTR이다.
- [0018] [0013] 일부 구체예에서, 발현 카세트 중 적어도 하나는 관심 유전자(GOI)에 대한 코딩 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, GOI는 치료용 폴리펩티드, 예방용 폴리펩티드, 진단용 폴리펩티드, 기능식품용 폴리펩티드, 산업용 효소, 및 리포터 폴리펩티드로 구성된 군으로부터 선택된 폴리펩티드를 인코딩한다. 일부 구체예에서, GOI는 항체, 항원, 면역 조절제, 효소, 신호전달 단백질, 및 사이토카인으로 구성된 군으로부터 선택된 폴리펩티드를 인코딩한다. 일부 구체예에서, GOI의 코딩 서열은 참조 코딩 서열의 발현 수준보다 높은 수준의 발현을 위해 최적화된다. 일부 구체예에서, GOI의 코딩 서열은 향상된 RNA 안정성을 위해 최적화된다.
- [0019] [0014] 일부 구체예에서, 본 개시의 핵산 작제물은 SEQ ID NO: 1 또는 SEQ ID NO: 2의 핵산 서열과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함한다.
- [0020] [0015] 일 양태에서, 본원에 개시된 바와 같은 핵산 작제물을 포함하는 재조합 세포가 본원에 제공된다. 일부 구체예에서, 재조합 세포는 진핵 세포이다. 일부 구체예에서, 재조합 세포는 동물 세포이다. 일부 구체예에서, 동물 세포는 척추 동물 세포 또는 무척추 동물 세포이다. 일부 구체예에서, 재조합 세포는 곤충 세포이다. 일부 구체예에서, 재조합 세포는 모기 세포이다. 일부 구체예에서, 재조합 세포는 포유동물 세포이다. 일부 구체예에서, 재조합 세포는 SV40에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 세포(COS-7), 인간 배아 신장 세포(예를 들어, HEK 293 또는 HEK 293 세포), 새끼 햄스터 신장 세포(BHK), 마우스 세르틀리 세포(예를 들어, TM4 세포), 원숭이 신장 세포(CV1), 인간 자궁경부 암종 세포(HeLa), 개 신장 세포(MDCK), 버팔로 래트 간 세포(BRL 3A), 인간 폐 세포(W138), 인간 간 세포(Hep G2), 마우스 유방 종양(MMT 060562), TRI 세포, FS4 세포, 중국 햄스터 난소 세포(CHO 세포), 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포(Vero 세포), 인간 A549 세포, 인간 자궁경부 세포, 인간 CHME5 세포, 인간 PER.C6 세포, NSO 무린 골수종 세포, 인간 표피양 후두 세포, 인간 섬유모세포 세포, 인간 HUH-7 세포, 인간 MRC-5 세포, 인간 근육 세포, 인간 내피 세포, 인간 성상세포, 인간 대식세포, 인간 RAW 264.7 세포,

마우스 3T3 세포, 마우스 L929 세포, 마우스 결합 조직 세포, 마우스 근육 세포, 및 토끼 신장 세포로 구성된 군으로부터 선택된다. 또한, 관련 양태에서, 본원에 개시된 바와 같은 적어도 하나의 재조합 세포 및 배양 배지를 포함하는 세포 배양물이 제공된다.

[0021] [0016] 또 다른 양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 핵산 작제물을 포함하는 트랜스제닉 동물이 본원에 제공된다. 일부 구체예에서, 트랜스제닉 동물은 척추 동물 또는 무척추 동물이다. 일부 구체예에서, 트랜스제닉 동물은 포유동물이다. 일부 구체예에서, 트랜스제닉 포유동물은 비인간 포유동물이다. 일부 구체예에서, 트랜스제닉 동물은 곤충이다. 일부 구체예에서, 트랜스제닉 곤충은 트랜스제닉 모기이다. 또 다른 양태에서, 관심 폴리펩티드를 생산하기 위한 방법이 본원에 제공되며, 여기서 방법은 (i) 본원에 개시된 바와 같은 트랜스제닉 동물을 사육하는 단계; 또는 (ii) 트랜스제닉 동물 또는 재조합 세포가 GOI에 의해 인코딩된 폴리펩티드를 생산하는 조건 하에 본원에 개시된 바와 같은 핵산 작제물을 포함하는 재조합 세포를 배양하는 단계를 포함한다.

[0022] [0017] 또 다른 양태에서, 대상체에서 관심 폴리펩티드를 생산하기 위한 방법이 본원에 제공되며, 여기서 방법은 대상체에게 본원에 개시된 바와 같은 핵산 작제물을 투여하는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 대상체는 척추 동물 또는 무척추 동물이다. 일부 구체예에서, 대상체는 곤충이다. 일부 구체예에서, 곤충은 모기이다. 일부 구체예에서, 대상체는 포유동물 대상체이다. 일부 구체예에서, 포유동물 대상체는 인간 대상체이다. 또 다른 양태에서, 본 개시의 방법에 의해 생산된 재조합 폴리펩티드가 본원에 제공된다.

[0023] [0018] 또 다른 양태에서, 약학적으로 허용되는 부형제 및 a) 본 개시의 핵산 작제물; b) 본 개시의 재조합 세포; 및/또는 c) 본 개시의 재조합 폴리펩티드를 포함하는 약학적 조성물이 본원에 제공된다.

[0024] [0019] 본 개시의 약학적 조성물의 비제한적인 예시적인 구체예는 하기 특징 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 본원에 개시된 바와 같은 핵산 작제물 및 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 조성물이 본원에 제공된다. 일부 구체예에서, 본원에 개시된 바와 같은 재조합 세포 및 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 조성물이 본원에 제공된다. 일부 구체예에서, 조성물은 본원에 개시된 바와 같은 재조합 폴리펩티드 및 약학적으로 허용되는 부형제를 포함한다. 일부 구체예에서, 리포솜, 지질-기반 나노입자(LNP), 폴리머 나노입자, 폴리플렉스, 바이러스 레플리콘 입자(VRP), 미소구체, 면역 자극 복합체(ISCOM), 생물활성 리간드의 컨쥬게이트, 또는 이들의 임의의 조합으로 제형화된 조성물이 본원에 제공된다. 일부 구체예에서, 조성물은 면역원성 조성물이다. 일부 구체예에서, 면역원성 조성물은 백신으로서 제형화된다. 일부 구체예에서, 면역원성 조성물은 대상체에 대해 실질적으로 비면역원성이다. 일부 구체예에서, 약학적 조성물은 애주번트로서 제형화된다. 일부 구체예에서, 약학적 조성물은 비강내 투여, 경막내 투여, 경피 투여, 복강내 투여, 근육내 투여, 기관내 투여, 결절내 투여, 종양내 투여, 관절내 투여, 정맥내 투여, 피하 투여, 질내 투여, 안내 투여, 직장 투여, 및 경구 투여 중 하나 이상을 위해 제형화된다.

[0025] [0020] 또 다른 양태에서, 약력학적 효과의 유도를 필요로 하는 대상체에서 약력학적 효과를 유도하기 위한 방법이 본원에 제공되며, 상기 방법은 a) 본 개시의 핵산 작제물; b) 본 개시의 재조합 세포; c) 본 개시의 재조합 폴리펩티드; 및/또는 d) 본 개시의 약학적 조성물을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 약력학적 효과는 면역원성 효과, 바이오마커 반응, 치료 효과, 예방 효과, 요망되는 효과, 바람직하지 않은 효과, 부작용, 및 질병 모델에서의 효과 중 하나 이상을 포함한다. 일부 구체예에서, 약력학적 효과는 대상체에서 면역 반응을 유발하는 것을 포함한다.

[0026] [0021] 또 다른 양태에서, 건강 병태의 예방 및/또는 치료를 필요로 하는 대상체에서 건강 병태를 예방하고/거나 치료하기 위한 방법이 본원에 제공되며, 상기 방법은 a) 본 개시의 핵산 작제물; b) 본 개시의 재조합 세포; c) 본 개시의 재조합 폴리펩티드; 및/또는 d) 본 개시의 어느 하나의 약학적 조성물을 포함하는 조성물을 대상체에게 예방적으로 또는 치료적으로 투여하는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 투여된 조성물은 약력학적 효과를 유도한다. 일부 구체예에서, 약력학적 효과는 대상체에서 면역 반응을 유발하는 것을 포함한다.

[0027] [0022] 본 개시의 방법의 비제한적인 예시적인 구체예는 하기 특징 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 병태는 증식성 장애 또는 미생물 감염이다. 일부 구체예에서, 대상체는 증식성 장애 또는 미생물 감염과 관련된 병태를 갖거나 갖는 것으로 의심된다. 일부 구체예에서, 투여된 조성물은 대상체에서 인터페론의 생산을 증가시킨다. 일부 구체예에서, 조성물은 단일 요법(단독요법)으로서 또는 적어도 하나의 추가 요법과 조합된 제1 요법으로서 대상체에게 개별적으로 투여된다. 일부 구체예에서, 적어도 하나의 추가 요법은 화학요법, 방사선요법, 면역요법, 호르몬 요법, 독소 요법, 표적 요법, 및 수술로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0028] [0023] 또 다른 양태에서, 약력학적 반응을 유도하고/거나, 면역 반응을 유발하고/거나, 건강 병태 또는 미생

물 감염의 예방 및/또는 치료를 위한 키트가 본원에 제공되며, 상기 키트는 a) 본 개시의 핵산 작제물; b) 본 개시의 제조합 세포; c) 본 개시의 제조합 폴리펩티드; 및/또는 d) 본 개시의 약학적 조성물을 포함한다.

- [0029] [0024] 본원에 기술된 각각의 양태 및 구체에는 구체에 또는 양태의 맥락에서 명시적으로 또는 명백하게 제외되지 않는 한 함께 사용될 수 있다.
- [0030] [0025] 상기 개요는 단지 예시일 뿐이며 어떤 식으로든 제한하려는 의도가 아니다. 본원에 기재된 예시적인 구체에 및 특징에 추가하여, 본 개시의 추가 양태, 구체에, 목적 및 특징은 도면 및 상세한 설명 및 청구범위로부터 완전히 명백해질 것이다.
- [0031] 도면의 간단한 설명
- [0032] [0026] **도 1**은 본 개시의 일부 구체에에 따른 변형된 WEEV 게놈 설계의 비제한적인 예의 그래프 표현이며, 여기서 원래 바이러스의 바이러스 구조 단백질을 인코딩하는 핵산 서열은 완전히 결실되었다. 이 도면에 기재된 변형된 WEEV 설계는 WEEV 균주 Imperial로부터 유래된 천연 5' UTR 및 3' UTR을 함유하고, 26S 서브게놈 프로모터의 제어 하에 배치된 이중성 관심 유전자(GOI)를 추가로 함유한다. 비구조 단백질 nsP1, nsP2, nsP3, 및 nsP4에 대한 코딩 서열이 도시되어 있다.
- [0033] [0027] **도 2a-2b**는 본 개시의 일부 구체에에 따른 비제한적인 예시적인 WEEV srRNA 설계의 그래프 예시이며, 여기서 Imperial 균주로부터의 변형된 WEEV 게놈을 인코딩하는 서열이 플라스미드 DNA 벡터에 혼입되었고(**도 2a**), 이는 또한 예시적인 관심 유전자(GOI), 예를 들어, 인플루엔자 A 바이러스 H5N1의 헤마글루티닌 전구체(HA)에 대한 코딩 서열을 포함하였다(**도 2b**).
- [0034] 개시의 상세한 설명
- [0035] [0028] 제조합 세포에서, 예를 들어, 백신 및 치료용 폴리펩티드와 같은 이중성 분자를 발현시키는데 적합한 우수한 발현 가능성을 갖는 바이러스 발현 시스템이 특히 본원에 제공된다. 예를 들어, 본 개시의 일부 구체에는 변형된 게놈 또는 레플리콘, 예를 들어, 구조 단백질을 인코딩하는 원래 바이러스 서열의 적어도 일부가 결실된 서부 말 뇌염 바이러스(WEEV)의 srRNA를 함유하는, 예를 들어, 발현 작제물 및 벡터와 같은 핵산 작제물에 관한 것이다. 또한, 본 개시의 일부 구체에에서 이중성 폴리펩티드를 인코딩하는 하나 이상의 발현 카세트 포함하는 바이러스-기반 발현 벡터가 제공된다. 본원에 개시된 핵산 분자 중 하나 이상을 포함하도록 유전적으로 조작된 제조합 세포가 추가로 제공된다. 이러한 제조합 세포로부터 유래된 생체물질 및 제조합 생성물도 본 출원의 범위 내에 있다. 또한, 약력학적 효과의 유도를 필요로 하는 대상체에서 약력학적 효과를 유도하기 위한 조성물 및 방법 뿐만 아니라 다양한 건강 상태를 예방 및/또는 치료하기 위한 방법이 제공된다.
- [0036] [0029] RNA 바이러스(예를 들어, 알파바이러스)에 기반한 자가-복제 RNA(srRNA)는 강력한 발현 시스템으로서 사용될 수 있다. 예를 들어, 바이러스 발현 벡터로서 WEEV와 같은 알파바이러스를 사용하는 이점은 이들이 제조합 숙주 세포에서 다량의 이중성 단백질의 합성을 지시할 수 있다는 것임이 보고되어 있다. 다른 이점 중에서, 치료용 단일 사슬 항체와 같은 폴리펩티드는 생체내에서 높은 수준으로 발현되는 경우 가장 효과적일 수 있다. 또한, 배양물(생체외)에서 세포로부터 정제된 제조합 항체를 생산하기 위해, srRNA로부터 높은 단백질 발현은 항체 생성물의 전체 수율을 증가시킬 수 있다. 또한, 발현되는 단백질이 백신 항원인 경우, 높은 수준의 발현은 생체내에서 가장 강력한 약력학적 효과를 유도할 수 있다.
- [0037] [0030] 알파바이러스는 UTR, 구조 영역, 및 비구조 영역에 함유된 모티프를 활용하여 숙주 세포에서 이들의 복제에 영향을 미친다. 이러한 영역은 또한 숙주 세포 선천성 면역을 회피하는 메커니즘을 함유한다. 그러나, 알파바이러스 종들 사이에 상당한 차이가 보고되었다. 예를 들어, 신세계 및 구세계 알파바이러스는 바이러스 복제 복합체의 조립을 위해 세포 내에서 스트레스 과립, JAK-STAT 신호전달, FXR, 및 G3BP 단백질을 이용하기 위해 상이한 성분을 진화시켰다. 게놈의 어느 부분이 이러한 성분을 함유하는지도 알파바이러스마다 다르다. 예를 들어, PKR의 우회 활성화 및 EIF2알파의 후속 인산화는 신드비스와 같은 일부 구세계 알파바이러스에서 다운스트림 루프를 통해 수행되지만, 인식 가능한 DLP가 없는 치쿤구니아에서는 이 경로를 우회하는 것이 nsP4를 통해 수행되는 것으로 여겨진다. 또한, 개별 알파바이러스 사이의 변이를 넘어, 독성과 같은 특성의 변화를 설명할 수 있는 차이가 또한 알파바이러스의 균주 내에서 종종 존재한다. 예를 들어, 신세계 동부 말 뇌염 바이러스(EEEV)의 복제 및 남미 균주 사이의 서열 변이는 STAT1 경로를 조절하는 능력을 변화시켜 타입 I 인터페론의 차등 유도 및 결과적으로 독성의 변화를 초래한다. 추가의 예로서, 게놈 서열 차이(divergence)가 2.7% 미만인 북미 WEEV 분리주 세트를 사용한 마우스 연구는 0 내지 완전한 치사율 범위의 결과를 가졌다.
- [0038] [0031] 알파바이러스의 비구조 및 구조 영역에서 숙주 세포 약독화 인자의 차별적인 존재를 고려할 때, 합성

백터에서 이중성 유전자 발현을 가능하게 하기 위해 구조 유전자를 결실시키는 것은 개별 백터에 다양한 영향을 미칠 것이다. 비구조 영역에서 상이한 숙주 약독화 인자를 갖는 합성 레플리콘은 발현되는 이중성 유전자에 대한 면역 반응의 유발에서 차등적으로 우수할 것이다. 예를 들어, 숙주 세포 기능의 차단은 구세계 바이러스에서 nsP2와 관련이 있었지만, 신세계 바이러스(예를 들어, EEEV, VEEV, 및 WEEV)에서는 이러한 활성이 합성 백터에서 부분적으로 또는 전체적으로 결실된 캡시드 단백질(C)과 주로 관련이 있었다. nsP3 단백질의 초가변 도메인(HVD)은 각각의 알파바이러스에 특이적인 숙주-상호작용을 갖는다. 무엇보다도, EEEV nsP3는 세포 FXR 및 G3BP 단백질 패밀리를, DDX3, S100A4, IKK β , PGAM5, 및 세포골격 재구성 및 소포 트래피킹 단백질과 상호작용하는 것으로 나타났다. WEEV 비구조 단백질을 구체적으로 상세히 설명한 연구는 거의 없지만, WEEV의 계승 시퀀스는 이것이 EEEV와 SINV의 조상 사이의 재조합의 결과라는 것을 보여준다. WEEV nsP의 아미노산 동일성은 EEEV nsP와 80%+ 동일성을 갖는 것으로 보고되었지만, EEEV nsP를 WEEV nsP로 대체하면 약독화된 키메라가 발생하며, 이는 뉴클레오타이드 및 코딩 서열의 변화가 바이러스 수명 주기에 대한 일부 필수 활성을 유지하지만, 생물학적 활성에는 상당한 차이를 보인다는 것을 입증한다. EEEV 및 WEEV nsP가 이들의 광범위한 병원성에 기여한다는 공지되거나 기술되지 않은 메커니즘은 WEEV-기반 srRNA 백터가 백신 또는 생물요법 적용을 위한 이중성 단백질의 발현을 위해 별개의 진보된 백터를 만들 수 있음을 시사한다. 이러한 이전에 기술되지 않은 srRNA 백터가 주는 이점은 전혀 탐구되지 않았고 예측되지도 않았다.

[0039] 정의

[0040] [0032] 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용된 모든 기술 용어, 표기법, 및 기타 과학 용어 또는 전문용어는 본 출원이 속하는 분야의 숙련가에 의해 일반적으로 이해되는 의미를 갖도록 의도된다. 일부 경우에, 일반적으로 이해되는 의미를 갖는 용어가 명확성 및/또는 용이한 참조를 위해 본원에서 정의되며, 본원에 이러한 정의를 포함하는 것이 반드시 당 분야에서 일반적으로 이해되는 것과 실질적인 차이를 나타내는 것으로 해석되어서는 안된다. 본원에 기술되거나 언급된 많은 기술 및 절차는 당업자에 의해 통상적인 방법론을 사용하여 잘 이해되고 일반적으로 사용된다.

[0041] [0033] 단수 형태는 문맥상 달리 명백하게 나타내지 않는 한 복수의 지시대상을 포함한다. 예를 들어, 용어 "세포"는 이의 혼합물을 포함하는 하나 이상의 세포를 포함한다. "A 및/또는 B"는 "A", "B", "A 또는 B", 및 "A 및 B"의 모든 대안을 포함하기 위해 본원에서 사용된다.

[0042] [0034] 본원에서 사용되는 용어 "투여" 및 "투여하는"은 비강내, 경피, 정맥내, 동맥내, 근육내, 결절내, 복강내, 피하, 근육내, 경구, 질내, 및 국소 투여, 또는 이들의 조합을 포함하나 이에 제한되지 않는 투여 경로에 의한 생물학적 조성물 또는 제형의 전달을 지칭한다. 상기 용어는 의료 전문가에 의한 투여 및 자가 투여를 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0043] [0035] "세포", "세포 배양물" 및 "세포주"라는 용어는 특정 대상체 세포, 세포 배양물 또는 세포주 뿐만 아니라 배양의 이동 또는 계대 수에 관계없이 이러한 세포, 세포 배양물 또는 세포주의 자손 또는 잠재적 자손을 지칭한다. 모든 자손이 부모 세포와 정확히 동일하지는 않다는 것을 이해해야 한다. 이는 돌연변이(예를 들어, 유도 또는 우발 돌연변이) 또는 환경적 영향(예를 들어, 메틸화 또는 기타 후성적 변형)으로 인해 후속 세대에서 특정 변형이 발생할 수 있기 때문이며, 이러한 자손은 실제로 부모 세포와 동일하지 않을 수 있지만 자손이 원래의 세포, 세포 배양물 또는 세포주와 동일한 기능을 유지하는 한 본원에서 사용되는 용어의 범위 내에 여전히 포함된다.

[0044] [0036] 본 개시의 조성물, 예를 들어, 핵산 작제물(예를 들어, 레플리콘 작제물, 예를 들어, srRNA 작제물), 재조합 세포, 재조합 폴리펩티드, 및/또는 약학적 조성물의 "유효량", "치료적 유효량", 또는 "약학적 유효량"이라는 용어는 일반적으로 조성물이 부재하는 경우에 비해 조성물이 언급된 목적을 달성하는데(예를 들어, 조성물이 투여되는 효과를 달성하거나, 면역 반응을 자극하거나, 질병을 예방 또는 치료하거나, 질병, 장애, 감염, 또는 건강 병태의 하나 이상의 증상을 감소시키는데) 충분한 양을 지칭한다. "유효량"의 예는 "치료적 유효량"으로도 지칭될 수 있는 질병의 증상 또는 증상들의 치료, 예방 또는 감소에 기여하기에 충분한 양이다. 증상의 "감소"는 증상(들)의 중증도 또는 빈도의 감소 또는 증상(들)의 제거를 의미한다. "치료적 유효량"을 포함하는 조성물의 정확한 양은 치료 목적에 따라 달라질 것이며, 공지된 기술을 사용하여 당업자에 의해 확인될 수 있을 것이다(예를 들어, 문헌[Lieberman, *Pharmaceutical Dosage Forms* (vols. 1-3, 1992); Lloyd, *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding* (1999); Pickar, *Dosage Calculations* (1999); and Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 20th Edition, 2003, Gennaro, Ed., Lippincott, Williams & Wilkins] 참조).

- [0045] [0037] 용어 "작제물"은 이중 공급원으로부터의 하나 이상의 분리된 핵산 서열 또는 아미노산 서열을 포함하는 제조합 분자, 예를 들어, 제조합 핵산 또는 폴리펩티드를 지칭한다. 예를 들어, 폴리펩티드 작제물은 기원이 다른 2개 이상의 아미노산 서열이 단일 폴리펩티드 작제물에서 서로 작동 가능하게 연결된 키메라 폴리펩티드 분자일 수 있다. 유사하게, 핵산 작제물은 기원이 다른 2개 이상의 핵산 서열이 단일 핵산 분자로 조립된 키메라 핵산 분자일 수 있다. 따라서, 대표적인 핵산 작제물은 (1) 자연에서 서로 인접하여 발견되지 않는 조절 및 코딩 서열을 포함하는 핵산 서열(예를 들어, 뉴클레오타이드 서열 중 적어도 하나는 이의 다른 뉴클레오타이드 서열 중 적어도 하나와 관련하여 이중성임), 또는 (2) 자연적으로 인접하지 않은 기능성 RNA 분자 또는 단백질의 일부를 인코딩하는 서열, 또는 (3) 자연적으로 인접하지 않은 프로모터의 일부를 함유하는 임의의 작제물을 포함한다. 대표적인 핵산 작제물은 하나 이상의 핵산 서열이 작동 가능하게 연결된 핵산 분자를 포함하는, 게놈 통합 또는 자율 복제가 가능한 플라스미드, 코스미드, 바이러스, 자율 복제 폴리뉴클레오타이드 분자, 과지와 같은 임의의 공급원으로부터 유래된 임의의 제조합 핵산 분자, 선형 또는 원형, 단일-가닥 또는 이중-가닥 DNA 또는 RNA 핵산 분자를 포함할 수 있다. 본 개시의 핵산 작제물은 또한 작제물에 함유된 관심 핵산 서열의 발현을 지시하는데 필요한 요소를 포함할 수 있다. 이러한 요소는 관심 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된(전사를 지시하기 위해) 프로모터와 같은 제어 요소를 포함할 수 있고, 선택적으로 폴리아데닐화 서열을 포함한다.
- [0046] [0038] 본 개시의 일부 구체예에서, 하나 이상의 핵산 작제물은 단일 핵산 분자, 예를 들어, 단일 벡터 내에 혼입(예를 들어, 삽입)될 수 있거나, 2개 이상의 개별 핵산 분자, 예를 들어, 2개 이상의 개별 벡터 내에 혼입(예를 들어, 삽입)될 수 있다. 용어 "벡터"는 다른 핵산 분자를 전달 또는 수송할 수 있는 핵산 분자 또는 서열을 지칭하기 위해 본원에서 사용된다. 따라서, 용어 "벡터"는 DNA-기반 벡터 및 RNA-기반 벡터 둘 모두를 포함한다. 용어 "벡터"는 클로닝 벡터 및 발현 벡터 뿐만 아니라 바이러스 벡터 및 통합 벡터를 포함한다. "발현 벡터"는 조절 영역을 포함함으로써, 시험관내, 생체의 및/또는 생체내에서 DNA 서열 및 단백을 발현할 수 있는 벡터이다. 일부 구체예에서, 벡터는, 예를 들어, 플라스미드(DNA-기반 벡터) 또는 자가-복제 RNA 벡터와 같은 세포에서 자율 복제를 지시하는 서열을 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 벡터는 숙주 세포 DNA로의 통합을 허용하기에 충분한 서열을 포함할 수 있다. 유용한 벡터는, 예를 들어, 플라스미드(예를 들어, DNA 플라스미드 또는 RNA 플라스미드), 트랜스포손, 코스미드, 박테리아 인공 염색체, 및 바이러스 벡터를 포함한다. 일부 구체예에서, 본 개시의 벡터는 단일-가닥 벡터(예를 들어, ssDNA 또는 ssRNA)일 수 있다. 일부 구체예에서, 본 개시의 벡터는 이중-가닥 벡터(예를 들어, dsDNA 또는 dsRNA)일 수 있다. 일부 구체예에서, 벡터는 유전자 전달 벡터이다. 일부 구체예에서, 벡터는 유전자를 세포로 전달하기 위한 유전자 전달 비히클로서 사용된다. 일부 구체예에서, 본 개시의 벡터는 자가-복제 RNA(srRNA) 벡터이다.
- [0047] [0039] 작제물의 성분 이외에, 벡터는, 예를 들어, 하나 이상의 선택 가능한 마커, 하나 이상의 복제 기점, 예를 들어, 원핵 및 진핵 기점, 적어도 하나의 다중 클로닝 부위, 및/또는 세포의 게놈으로의 작제물의 안정적인 통합을 촉진하는 요소를 포함할 수 있다. 2개 이상의 작제물은 단일 벡터와 같은 단일 핵산 분자 내에 혼입될 수 있거나, 2개 이상의 개별 벡터와 같은 2개 이상의 개별 핵산 분자 내에 혼입될 수 있다. "발현 작제물"은 일반적으로 관심 뉴클레오타이드 서열에 작동 가능하게 연결된 적어도 제어 서열을 포함한다. 이러한 방식으로, 예를 들어, 발현될 뉴클레오타이드 서열과 작동 가능하게 연결된 프로모터는 세포에서의 발현을 위해 발현 작제물에 제공된다. 본 개시의 실시를 위해, 작제물 및 세포를 제조하고 사용하기 위한 조성물 및 방법은 당업자에게 공지되어 있다.
- [0048] [0040] 본원에서 사용되는 용어 "작동 가능하게 연결된"은 2개 이상의 요소, 예를 들어, 폴리펩티드 서열 또는 폴리뉴클레오타이드 서열 사이의 물리적 또는 기능적 연결을 나타내며, 이는 이들이 의도된 방식으로 작동하도록 허용한다. 예를 들어, 용어 "작동 가능하게 연결된"은 본원에 기재된 핵산 분자 또는 핵산 분자의 코딩 서열 및 프로모터 서열과 관련하여 사용될 때, 코딩 서열 및 프로모터 서열이 인-프레임으로(in-frame) 적절한 공간 및 거리에 있어 전사에 대한 전사 인자 또는 RNA 중합효소에 의한 각각의 결합 효과를 허용하는 것을 의미한다. 작동 가능하게 연결된 요소는 인접하거나 비인접할 수 있음을 이해해야 한다(예를 들어, 링커를 통해 서로 연결됨). 폴리펩티드 작제물의 맥락에서, "작동 가능하게 연결된"은 작제물의 기재된 활성을 제공하기 위해 아미노산 서열(예를 들어, 상이한 세그먼트, 부분, 영역, 또는 도메인) 사이의 물리적 연결(예를 들어, 직접 또는 간접적으로 연결됨)을 지칭한다. 본원에 개시된 폴리펩티드 또는 핵산 분자의 작동 가능하게 연결된 세그먼트, 부분, 영역, 및 도메인은 인접하거나 비인접할 수 있다(예를 들어, 링커를 통해 서로에 연결됨).
- [0049] [0041] 본원에서 사용되는 용어 "부분"은 분획을 지칭한다. 폴리뉴클레오타이드 서열 또는 아미노산 서열 또는 단백질과 같은 특정 구조와 관련하여, 이의 "부분"이라는 용어는 상기 구조의 연속적 또는 불연속적 분획을 지칭할 수 있다. 예를 들어, 아미노산 서열의 부분은 상기 아미노산 서열의 적어도 1%, 적어도 5%, 적어도 10%,

적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 및 적어도 90%의 아미노산을 포함한다. 추가로 또는 대안적으로, 부분이 불연속적 분획인 경우, 상기 불연속적 분획은 구조(예를 들어, 단백질의 도메인)의 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8개 이상의 부분을 포함하고, 각 부분은 구조의 연속적인 요소이다. 예를 들어, 아미노산 서열의 불연속적 분획은 상기 아미노산 서열의 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8개 이상, 예를 들어, 4개 이하의 부분을 포함할 수 있고, 여기서 각 부분은 아미노산 서열의 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5개의 연속 아미노산, 적어도 10개의 연속 아미노산, 적어도 20개의 연속 아미노산, 또는 적어도 30개의 연속 아미노산을 포함한다.

[0050]

[0042] 세포, 핵산, 단백질, 또는 벡터와 관련하여 사용될 때 용어 "재조합"은 세포, 핵산, 단백질 또는 벡터가, 예를 들어, 실험실 방법에 의해 변형되었거나 그 결과인 것과 같이 인간 개입을 통해 변경되었거나 생산되었음을 나타낸다. 따라서, 예를 들어, 재조합 단백질 및 핵산은 실험실 방법에 의해 생산된 단백질 및 핵산을 포함한다. 재조합 단백질은 단백질의 천연(비-재조합 또는 야생형) 형태 내에서 발견되지 않는 아미노산 잔기를 포함할 수 있거나, 변형된, 예를 들어, 표지된 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 상기 용어는 펩티드, 단백질, 또는 핵산 서열에 대한 임의의 변형을 포함할 수 있다. 이러한 변형은 다음을 포함할 수 있다: 하나 이상의 아미노산, 데옥시리보뉴클레오타이드, 또는 리보뉴클레오타이드를 포함하는 펩티드, 단백질 또는 핵산 서열의 임의의 화학적 변형; 펩티드 또는 단백질에서 하나 이상의 아미노산의 첨가, 결실, 및/또는 치환; 융합 단백질, 예를 들어, 항체 단편을 포함하는 융합 단백질의 생성; 및 핵산 서열에서 하나 이상의 핵산의 첨가, 결실, 및/또는 치환. 세포와 관련하여 사용될 때 용어 "재조합"은 자연-발생 세포를 포함하려는 의도가 아니라, 만약 조작/변형되지 않았다면 존재하지 않았을 폴리펩티드 또는 핵산을 포함하거나 발현하도록 조작/변형된 세포를 포함하려는 것이다.

[0051]

[0043] 2개 이상의 핵산 또는 단백질과 관련하여 본원에서 사용되는 용어 "퍼센트 동일성"은 아래에 설명된 기본 파라미터를 갖는 BLAST 또는 BLAST 2.0 서열 비교 알고리즘을 사용하거나, 수동 정렬 및 육안 검사에 의해 측정시 동일하거나, 동일한 뉴클레오타이드 또는 아미노산의 특정 백분율(예를 들어, 비교 창 또는 지정된 영역에 대한 최대 대응에 대해 비교되고 정렬될 때, 특정 영역에 대해 약 60% 서열 동일성, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과 동일성)을 갖는 2개 이상의 서열 또는 하위서열을 지칭한다. 예를 들어, NCBI 웹 사이트 ncbi.nlm.nih.gov/BLAST를 참조한다. 이러한 서열은 이후 "실질적으로 동일한" 것으로 언급된다. 이 정의는 또한 쿼리 서열의 보체를 지칭하거나 이에 적용될 수 있다. 이러한 정의는 BLAST 알고리즘에 의해 수행되는 서열 비교를 포함하며, 여기서 알고리즘의 파라미터는 각각의 참조 서열의 전체 길이에 걸쳐 각각의 서열 사이에 가장 큰 일치치를 제공하도록 선택된다. 이 정의는 또한 결실 및/또는 첨가를 갖는 서열 뿐만 아니라 치환을 갖는 서열도 포함한다. 서열 동일성은 적어도 약 20개 아미노산 또는 뉴클레오타이드 길이의 영역, 또는 10-100개 아미노산 또는 뉴클레오타이드 길이의 영역, 또는 주어진 서열의 전체 길이에 걸쳐 계산될 수 있다. 서열 동일성은 GCS 프로그램 패키지(Devereux et al., Nucleic Acids Res (1984) 12:387), BLASTP, BLASTN, FASTA(Atschul et al., J Mol Biol (1990) 215:403)와 같은 공개된 기술 및 널리 이용 가능한 컴퓨터 프로그램을 사용하여 계산될 수 있다. 서열 동일성은 위스콘신 대학교 생명공학 센터(1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705)의 제네틱스 컴퓨터 그룹(Genetics Computer Group)의 서열 분석 소프트웨어 패키지(Atschul et al., J Mol Biol (1990) 215:403)와 같은 서열 분석 소프트웨어를 사용하여, 이의 기본 파라미터로 측정될 수 있다. 유사성 또는 동일성 아미노산 서열을 결정하기 위해 적합하게 사용될 수 있는 추가 방법은 Rosetta로부터의 구조-예측 점수를 포함하는 위치-특이적 구조-점수 매트릭스(P3SM)에 의존하는 것들 뿐만 아니라 이전에 문헌[Setcliff et al., Cell Host & Microbe 23(6), May 2018]에 기술된 대로 길이-정규화된 편집 거리에 기반한 것들을 포함한다.

[0052]

[0044] 본원에서 사용되는 용어 "약학적으로 허용되는 부형제"는 대상체에게 관심 화합물(들)을 투여하기 위한 약학적으로 허용되는 담체, 첨가제, 또는 희석제를 제공하는 임의의 적합한 물질을 지칭한다. 이와 같이, "약학적으로 허용되는 부형제"는 약학적으로 허용되는 희석제, 약학적으로 허용되는 첨가제, 및 약학적으로 허용되는 담체로 지칭되는 물질을 포함할 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "약학적으로 허용되는 담체"는 약제 투여에 적합한 식염수, 용매, 분산 매질, 코팅제, 항박테리아제 및 항진균제, 등장제 및 흡수 지연제 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 보충 활성 화합물(예를 들어, 항생제 및 추가 치료제)이 또한 조성물에 혼입될 수 있다.

[0053]

[0045] 본원에서 사용되는 "대상체" 또는 "개체"는 인간(예를 들어, 인간 개체) 및 비인간 동물과 같은 동물을 포함한다. 일부 구체예에서, "대상체" 또는 "개체"는 의사의 진료를 받는 환자이다. 따라서, 대상체는 관심 건강 상태(예를 들어, 암 또는 감염) 및/또는 건강 상태의 하나 이상의 증상을 갖거나, 가질 위험이 있거나, 갖는 것으로 의심되는 인간 환자 또는 개체일 수 있다. 대상체는 또한 진단 당시 또는 그 이후에 관심 건강 상태의

위험이 있는 것으로 진단된 개체일 수 있다. 용어 "비인간 동물"은 모든 척추동물, 예를 들어, 포유동물, 예를 들어, 설치류, 예를 들어, 마우스, 가축, 길들인 동물 및 애완동물, 비인간 영장류, 및 다른 포유동물, 예를 들어, 이를 테면, 양, 고양이, 개, 소, 닭, 및 비포유동물, 예를 들어, 양서류, 파충류 등을 포함한다.

[0054] [0046] 본원에 기재된 개시의 양태 및 구체예는 양태 및 구체예를 "포함하는", "구성되는", 및 "필수적 요소로 하여 구성되는(consisting essentially of)"을 포함하는 것으로 이해된다. 본원에서 사용되는 "포함하는"은 "포함하는", "함유하는", 또는 "특징으로 하는"과 동의어이고, 포괄적이거나 개방적이며, 추가의 언급되지 않은 요소 또는 방법 단계를 배제하지 않는다. 본원에서 사용되는 "구성된"은 청구된 조성물 또는 방법에 명시되지 않은 임의의 요소, 단계 또는 성분을 배제한다. 본원에서 사용되는 "필수적 요소로 하여 구성되는"은 청구된 조성물 또는 방법의 기본적인 신규한 특성에 실질적으로 영향을 미치지 않는 물질 또는 단계를 배제하지 않는다. 본원에서, 특히 조성물의 성분의 설명 또는 방법의 단계의 설명에서, 용어 "포함하는"의 모든 언급은 인용된 성분 또는 단계로 구성되고 필수적 요소로 하여 구성되는 그러한 조성물 및 방법을 포함하는 것으로 이해된다.

[0055] [0047] 명확성을 위해 별도의 구체예의 맥락에서 기술된 본 개시의 특정 특징은 또한 단일 구체예에서 조합하여 제공될 수 있음이 이해된다. 반대로, 간결함을 위해 단일 구체예의 맥락에서 기술된 본 개시의 다양한 특징은 또한 개별적으로 또는 임의의 적합한 하위조합으로 제공될 수 있다. 본 개시에 속하는 구체예의 모든 조합은 본 개시에 의해 구체적으로 포함되며, 각각의 및 모든 조합이 개별적이고 명시적으로 개시된 것처럼 본원에 개시된다. 또한, 다양한 구체예 및 이의 요소의 모든 하위조합이 또한 본 개시에 구체적으로 포함되며, 각각의 및 모든 이러한 하위조합이 개별적이고 명시적으로 본원에 개시된 것처럼 본원에 개시된다.

[0056] [0048] 값의 범위가 제공되는 경우, 각각의 중간 값은, 문맥상 달리 명확하게 나타내지 않는 한, 그 범위의 상한과 하한 및 그 언급된 범위 내의 임의의 다른 언급된 또는 중간 값 사이에 있는 하한 단위의 10분의 1까지 본 개시 내에 포함되는 것으로 이해된다. 이러한 더 작은 범위의 상한 및 하한은 언급된 범위 내에서 구체적으로 배제된 임의의 한계에 따라, 독립적으로 더 작은 범위에 포함될 수 있고, 또한 본 개시 내에 포함된다. 언급된 범위가 한계 중 하나 또는 둘 모두를 포함하는 경우, 포함된 한계 중 어느 하나 또는 둘 모두를 배제한 범위가 또한 본 개시에 포함된다.

[0057] [0049] 특정 범위는 본원에서 용어 "약"을 선행한 수치 값으로 제시되며, 이는 본원에서 사용된 바와 같이 대략의 통상적인 의미를 갖는다. 용어 "약"은 그 뒤에 오는 정확한 숫자 뿐만 아니라 용어 뒤에 오는 숫자에 가깝거나 대략적인 숫자에 대한 문자 그대로의 지지를 제공하기 위해 본원에서 사용된다. 어떤 숫자가 구체적으로 언급된 숫자에 가깝거나 대략적인지 여부를 결정할 때, 언급되지 않은 숫자에 가깝거나 대략적인 숫자는 그것이 제시된 맥락에서 구체적으로 언급된 숫자와 실질적으로 등가물을 제공하는 숫자일 수 있다. 근사의 정도가 문맥상 달리 명확하지 않은 경우, "약"은 제공된 값의 플러스 또는 마이너스 10% 이내 또는 가장 가까운 유효 숫자로 반올림됨을 의미하며, 모든 경우에 제공된 값을 포함한다. 일부 구체예에서, 용어 "약"은 지정된 값 $\pm$ 최대 10%, 최대 $\pm$ 5%, 또는 최대 $\pm$ 1%를 나타낸다.

[0058] [0050] 값의 범위가 제공되는 경우, 당업자는 본원에 개시된 모든 범위가 임의의 및 모든 가능한 하위범위 및 그 하위범위의 조합을 포함한다는 것을 이해한다. 열거된 모든 범위는 동일한 범위를 최소한 동일한 절반, 3분의 1, 4분의 1, 5분의 1, 10분의 1 등으로 분할할 수 있도록 충분히 설명된 것으로 용이하게 인식될 수 있다. 비제한적인 예로서, 본원에서 논의된 각 범위는 하위 1/3, 중간 1/3 및 상위 1/3 등으로 쉽게 분할될 수 있다. 또한 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, "최대", "적어도", "초과", "미만" 등과 같은 모든 언어는 언급된 숫자를 포함하고 위에서 논의한 바와 같이 후속하여 하위범위로 분류될 수 있는 범위를 지칭한다. 마지막으로, 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 범위는 각각의 개별 구성원을 포함한다. 따라서, 예를 들어, 1-3개의 물품을 갖는 그룹은 1, 2, 또는 3개의 물품을 갖는 그룹을 지칭한다. 유사하게, 1-5개의 물품을 갖는 그룹은 1, 2, 3, 4, 또는 5개의 물품을 갖는 그룹 등을 지칭한다.

[0059] [0051] (a), (b), (i) 등과 같은 제목은 단지 명세서 및 청구범위를 읽기 쉽게 하기 위해 제공된다. 명세서 또는 청구범위에서 제목의 사용은 단계 또는 요소가 알파벳 또는 숫자 순서 또는 제시된 순서로 수행될 것을 요구하지 않는다.

[0060] 서부 말 뇌염 바이러스(WEEV)

[0061] [0052] 서부 말 뇌염 바이러스(EEEV)는 토가바이러스과(*Togaviridae*) 과의 유전적, 구조적, 및 혈청학적으로 관련된 바이러스 그룹을 포함하고 그룹 IV 양성-센스 단일-가닥 RNA 바이러스로 분류되는 알파바이러스 속에 속하는 모기-매개 바이러스이다. 현재, 알파바이러스 속은 특히 신드비스 바이러스(SINV), 쉼리키 삼립 바이러스

(SFV), 로스 리버 바이러스(RRV), 베네수엘라 말 뇌염 바이러스(VEEV), 및 동부 말 뇌염 바이러스(EEEV)를 포함하며, 이들은 모두 밀접하게 관련되어 있으며, 포유동물, 설치류, 어류, 조류 종과 같은 다양한 척추동물, 및 인간 및 말과 같은 더 큰 포유동물 뿐만 아니라 곤충과 같은 무척추동물을 감염시킬 수 있다. WEEV의 한 가지 특이한 특징은 이것이 신드비스 바이러스(SINV)-유사 및 동부 말 뇌염 바이러스(EEEV)-유사 조상 사이의 고대 재조합 사건의 후손이라는 것이다.

[0062] [0053] WEEV 및 EEEV를 포함하는 알파바이러스 속은 널리 연구되어 왔으며 이러한 바이러스의 수명 주기, 복제 방식 등은 잘 특성화되어 있다. 이와 관련하여 더 많은 정보는, 예를 들어, 문헌[Corrin T. et al., Vector-Borne and Zoonotic Diseases, Vol. 21, No. 5, 2021]에서 찾을 수 있다. 또한, 알파바이러스는 동물 세포에서 매우 효율적으로 복제되는 것으로 나타났으며, 이는 동물 세포에서 단백질 및 핵산의 생산을 위한 벡터로서 가치가 있다. 종과 개체 사이의 전파는 주로 모기를 통해 발생하여, 알파바이러스를 아르보바이러스(Arboviruses)- 또는 절지동물-유래 바이러스의 수집에 기여하게 한다.

[0063] [0054] 이러한 알파바이러스 각각은 바이러스 스파이크 단백질을 함유하는 외피로 둘러싸인 뉴클레오캡시드에 봉입된 양성 극성의 단일 가닥 RNA 게놈을 갖는다. 알파바이러스 입자는 봉입되고, 구형인 경향이 있으며(약간 다형성이지만), 아이소메트릭 뉴클레오캡시드를 갖는다. 알파바이러스 게놈은 약 11-12 kb 길이의 양성 극성의 단일-가닥 RNA이며, 5' 캡, 3' 폴리-A 꼬리, 및 효소 기능을 갖는 비구조 단백질을 인코딩하는 제1 프레임 및 바이러스 구조 단백질(예를 들어, 캡시드 단백질 CP, E1 당단백질, E2 당단백질, E3 단백질 및 6K 단백질)을 인코딩하는 제2 프레임인 2개의 오픈 리딩 프레임(ORF)을 포함한다. 예를 들어, WEEV는 5'- 및 3'-비번역 영역(UTR)이 플랭킹되고 5' 말단에서 캡핑되고 3' 말단에서 폴리아데닐화된 2개의 오픈 리딩 프레임(ORF)을 포함하는 대략 11.5 kb의 단일-가닥, 포지티브-센스 RNA 게놈을 보유한다. WEEV는 주로 이의 일차 모기 벡터인 쿨렉스(*Culex*) 타르살리스(*tarsalis*)에 의해 농업 서식지에서 전파된다. 포유동물은 이차 주기에 참여할 수 있다. 인간과 말 둘 모두는 종말 숙주로 생각되지만, 당나귀 및 조랑말과 같은 일부 말과 동물이 낮은 수준 내지 중간 수준의 바이러스혈증(104 PFU/ml 약간 미만)을 발달시키며, 이로 인해 이러한 숙주는 동물유행 증폭에 기여할 수 있다. WEEV에 의한 인간 감염은 눈에 띄지 않는 증상(대다수)부터 독감-유사 증후군 내지 생명을 위협하는 뇌염 및 수막염에 이르기까지 다양하다. 증상 감염은 전형적으로 열, 두통, 메스꺼움, 구토, 식욕부진, 및 권태가 갑자기 나타난 후, 인지 증상, 쇠약, 및 수막 병발을 포함한다.

[0064] [0055] 알파바이러스 게놈의 5'측 2/3는 바이러스 RNA의 전사 및 복제에 필요한 다수의 비구조 단백질을 인코딩한다. 이러한 단백질은 RNA로부터 직접 번역되며 세포 단백질과 함께 바이러스 게놈 복제 및 서브게놈 RNA의 전사에 필수적인 RNA-의존성 RNA 중합효소를 형성한다. 4개의 비구조 단백질(nsP1-4)은 단일 다단백질로 생산되고 바이러스의 복제 기구를 구성한다. 다단백질의 처리는 고도로 조절된 방식으로 발생하며, P2/3 접합부에서의 절단은 게놈 복제 동안 RNA 주형 사용에 영향을 미친다. 이 부위는 좁고 갈라진 틈의 바닥에 위치하며 쉽게 접근할 수 없다. 절단되면, nsP3는 nsP2를 둘러싸는 고리 구조를 생성한다. 이들 2개의 단백질은 광범위한 계면을 갖는다. 비세포변성 바이러스 또는 온도 민감성 표현형을 생산하는 nsP2의 돌연변이는 P2/P3 계면 영역에서 클러스터링된다. nsP2 비세포변성 돌연변이의 위치 반대쪽에 있는 P3 돌연변이는 P2/3의 효율적인 절단을 방지한다. 이는 차례로 바이러스 RNA 생산 수준을 변경하는 RNA 감염성에 영향을 미칠 수 있다.

[0065] [0056] 게놈의 3'측 1/3은 바이러스 입자를 형성하는데 필요한 모든 구조 단백질의 번역을 위한 주형으로서의 역할을 하는 서브게놈 RNA를 포함한다: 코어 뉴클레오캡시드 단백질 C, 및 이중이량체로서 회합하는 외피 단백질 P62 및 E1. 바이러스 막-고정된 표면 당단백질은 수용체 인식 및 막 융합을 통한 표적 세포로의 진입을 담당한다. 서브게놈 RNA는 nsP4 단백질을 인코딩하는 RNA 서열의 3' 말단에 존재하는 p26S 서브게놈 프로모터로부터 전사된다. E2 및 E3으로의 P62의 단백질분해 성숙은 바이러스 표면의 변화를 야기한다. E1, E2, 및 때때로 E3와 함께, 당단백질 "스파이크"는 E1/E2 이량체 또는 E1/E2/E3 삼량체를 형성하며, 여기서 E2는 중심으로부터 정점으로 연장되고, E1은 정점 사이의 공간을 채우고, 존재하는 경우, E3는 스파이크의 원위 말단에 있다. 바이러스가 엔도솜의 산도에 노출되면, E1은 E2로부터 해리되어 E1 동중삼량체를 형성하며, 이는 세포 막 및 바이러스 막을 함께 구동하기 위한 융합 단계에 필요하다. 알파바이러스 당단백질 E1은 인플루엔자 바이러스 및 HIV에서 발견되는 클래스 I 융합 단백질과 구조적으로 상이한 클래스 II 바이러스 융합 단백질이다. E2 당단백질은 세포질 도메인을 통해 뉴클레오캡시드와 상호작용하는 기능을 하는 반면, 이의 엑토도메인은 세포 수용체 결합을 담당한다. WEEV를 포함하는 대부분의 알파바이러스는 말초 단백질 E3를 잃는 반면, 쉼리키 바이러스에서는 바이러스 표면과 연결된 상태로 남아 있다.

[0066] [0057] 대부분의 알파바이러스와 유사하게, WEEV 복제는 숙주 세포 내의 막 표면에서 일어난다. 감염 주기의 제1 단계에서, 게놈 RNA의 5' 말단은 게놈 RNA에 상보적인 음성 가닥을 생성하는 RNA 중합효소 활성을 갖는 다

단백질(nsP1-4)로 번역된다. 제2 단계에서, 음성 가닥은 각각 2개의 RNA의 생산을 위한 주형으로 사용된다: (1) 번역에 의해 다른 nsP 단백질을 생산하고 바이러스에 대한 계놈으로서 작용하는 이차 바이러스의 계놈에 상응하는 양성 계놈 RNA; 및 (2) 감염성 입자를 형성하는 바이러스의 구조 단백질을 인코딩하는 서브계놈 RNA. 양성 계놈 RNA/서브계놈 RNA 비율은 nsP1, nsP2, nsP3 및 nsP4에 대한 다단백질의 단백질분해 자가절단에 의해 조절된다. 실제로, 바이러스 유전자 발현은 두 단계로 일어난다. 첫 번째 단계에서, 양성 계놈 가닥 및 음성 가닥의 주요 합성이 있다. 두 번째 단계 동안, 서브계놈 RNA의 합성은 사실상 배타적이며, 이에 따라 다량의 구조 단백질이 생산된다.

[0067] 자가-복제 RNA

[0058] 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 용어 "자가-복제 RNA"는 허용 세포 내에서 자체의 증폭 또는 자가-복제를 지시하는데 필요한 모든 유전 정보를 함유하는 RNA 분자를 지칭한다. 따라서, srRNA는 때때로 "자가-증폭 RNA"(saRNA)로도 지칭된다. 일부 구체예에서, srRNA는 "레플리콘"이며, 이는 단위로 순차적으로 복제되는 DNA 또는 RNA의 선형 또는 원형 섹션일 수 있다. 레플리콘의 비제한적인 예는 "레플리콘 RNA" 또는 "RNA 레플리콘"을 포함한다. 자체의 복제를 지시하기 위해, srRNA는 일반적으로 (1) RNA 증폭 과정을 촉매화하기 위해 바이러스 또는 숙주 세포-유래 단백질, 핵산 또는 리보핵단백질과 상호작용할 수 있는 중합효소, 레플리카제, 또는 다른 단백질을 인코딩하고; (2) 서브계놈 RNA의 복제 및 전사에 필요한 시스-작용 RNA 서열을 함유한다. 이러한 서열은 복제 과정 동안 이의 자가-인코딩된 단백질, 또는 비-자가-인코딩된 세포-유래 단백질, 핵산 또는 리보핵단백질, 또는 이들 성분들 중 임의의 것 사이의 복합체에 결합될 수 있다. 본 개시의 일부 구체예에서, 레플리콘, 예를 들어, srRNA는 알파바이러스, 예를 들어, WEEV로부터 유래된다. 본 개시의 일부 구체예에서, 알파바이러스 srRNA 작제물(예를 들어, srRNA, saRNA, 또는 레플리콘 분자)은 일반적으로 하기 요소를 함유한다: 복제를 위해 시스로(in cis) 필요한 5' 바이러스 또는 결함이 있는-간접 RNA 서열(들), 생물학적으로 활성인 알파바이러스 비구조 단백질(예를 들어, nsP1, nsP2, nsP3, 및 nsP4)을 코딩하는 서열, 서브계놈 RNA(sgRNA)에 대한 서브계놈 프로모터(sg), 복제를 위해 시스로 필요한 3' 바이러스 서열, 및 선택적으로 폴리아데닐레이트 트랙(폴리(A)). 일부 경우에, 이중성 서열의 발현을 지시하는 서브계놈 프로모터(sg)는 본 개시의 srRNA 작제물에 포함될 수 있다.

[0059] 추가로, 용어 srRNA 분자(예를 들어, srRNA, saRNA, 또는 레플리콘 분자)는 일반적으로 양성 극성의 분자 또는 "메시지" 센스를 지칭하고, srRNA는 임의의 공지된 자연-발생 알파바이러스의 길이와 상이한 길이를 가질 수 있다. 본 개시의 일부 구체예에서, srRNA는 알파바이러스 구조 단백질 중 하나 이상에 대한 코딩 서열의 적어도 일부를 함유하지 않고/거나; 구조 유전자를 인코딩하는 서열은 이중성 서열로 치환될 수 있다. srRNA가 재조합 알파바이러스 입자로 패키징되는 그러한 경우에, 이는 입자 형성을 초래하는 알파바이러스 구조 단백질과의 상호작용을 개시하는 역할을 하는 하나 이상의 서열, 소위 패키징 신호를 함유할 수 있다.

[0060] 본 개시의 핵산 분자는 일반적으로 약 2 kb 내지 50 kb, 예를 들어, 약 5 kb 내지 약 40 kb, 약 5 kb 내지 약 30 kb, 약 5 kb 내지 약 20 kb, 또는 약 10 kb 내지 약 50 kb, 예를 들어, 약 15 kb 내지 30 kb, 약 20 kb 내지 약 50 kb, 약 20 kb 내지 약 40 kb, 약 5 kb 내지 약 25 kb, 또는 약 30 kb 내지 약 50 kb의 길이의 핵산 분자를 포함하는 임의의 길이의 핵산 분자일 수 있다. 일부 구체예에서, 핵산 분자는 적어도 6 kb의 길이이다. 일부 구체예에서, 핵산 분자는 약 6 kb 내지 약 20 kb이다. 본 개시의 레플리콘 작제물(예를 들어, srRNA 작제물)은 일반적으로 적어도 약 2 kb의 길이를 갖는다. 예를 들어, srRNA는 적어도 약 2 kb, 적어도 약 3 kb, 적어도 약 4 kb, 적어도 약 5 kb, 적어도 약 6 kb, 적어도 약 7 kb, 적어도 약 8 kb, 적어도 약 9 kb, 적어도 약 10 kb, 적어도 약 11 kb, 적어도 약 12 kb 또는 12 kb 초과 길이를 가질 수 있다. 일부 구체예에서, srRNA는 약 4 kb 내지 약 20 kb, 약 4 kb 내지 약 18 kb, 약 5 kb 내지 약 16 kb, 약 6 kb 내지 약 14 kb, 약 7 kb 내지 약 12 kb, 약 8 kb 내지 약 16 kb, 약 9 kb 내지 약 14 kb, 약 10 kb 내지 약 18 kb, 약 11 kb 내지 약 16 kb, 약 5 kb 내지 약 18 kb, 약 6 kb 내지 약 20 kb, 약 5 kb 내지 약 10 kb, 약 5 kb 내지 약 8 kb, 약 5 kb 내지 약 7 kb, 약 5 kb 내지 약 6 kb, 약 6 kb 내지 약 12 kb, 약 6 kb 내지 약 11 kb, 약 6 kb 약 10 kb, 약 6 kb 내지 약 9 kb, 약 6 kb 내지 약 8 kb, 약 6 kb 내지 약 7 kb, 약 7 kb 내지 약 11 kb, 약 7 kb 내지 약 10 kb, 약 7 kb 내지 약 9 kb, 약 7 kb 내지 약 8 kb, 약 8 kb 내지 약 11 kb, 약 8 kb 내지 약 10 kb, 약 8 kb 내지 약 9 kb, 약 9 kb 내지 약 11 kb, 약 9 kb 내지 약 10 kb, 또는 약 10 kb 내지 약 11 kb의 길이를 가질 수 있다. 일부 구체예에서, srRNA는 약 6 kb 내지 약 14 kb의 길이를 가질 수 있다. 일부 구체예에서, srRNA는 약 6 kb 내지 약 16 kb의 길이를 가질 수 있다.

[0071] 개시의 조성물

- [0072] [0061] 하기에 더 상세히 기재된 바와 같이, 본 개시의 일 양태는 변형된 바이러스 게놈 또는 srRNA를 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물에 관한 것이며, 여기서 변형된 게놈 또는 srRNA는 상응하는 비변형된 바이러스 게놈 또는 srRNA의 하나 이상의 구조 단백질을 인코딩하는 핵산 서열의 적어도 일부가 없다(예를 들어, 포함하지 않는다). 본 개시의 일부 구체예에는 비구조 단백질 nsP1, nsP2, nsP3, 및 nsP4에 대한 코딩 서열이 존재하지만, 하나 이상의 구조 단백질을 인코딩하는 서열의 적어도 일부 또는 전체가 부재하는 변형된 알파 바이러스 게놈 또는 srRNA를 제공한다. 또한, 본원에 개시된 바와 같은 핵산 작제물을 포함하도록 조작된 재조합 세포 및 세포 배양물이 제공된다.
- [0073] A. 핵산 작제물
- [0074] [0062] 하기에 더 상세히 기재된 바와 같이, 본 개시의 일 양태는 서부 말 뇌염 바이러스(WEEV)와 같은 알파바이러스의 변형된 게놈 또는 srRNA를 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 신규한 핵산 작제물에 관한 것이다. 예를 들어, 일부 구체예에서, 변형된 알파바이러스 게놈은 모 알파바이러스 게놈의 하나 이상의 게놈 영역에 결실(들), 치환(들), 및/또는 삽입(들)을 포함할 수 있다.
- [0075] [0063] 본 개시의 핵산 작제물(예를 들어, 레플리콘 작제물, 예를 들어, srRNA 작제물)의 비제한적인 예시적인 구체예는 하기 특징 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 핵산 작제물은 변형된 WEEV 게놈 또는 srRNA를 인코딩하는 핵산 서열을 포함하고, 여기서 변형된 WEEV 게놈 또는 srRNA는 변형되지 않은 WEEV 또는 srRNA의 하나 이상의 구조 단백질을 인코딩하는 핵산 서열의 적어도 일부가 없고, 예를 들어, 변형된 WEEV 게놈 또는 srRNA는 WEEV 구조 단백질 CP, E1, E2, E3, 및 6K 중 하나 이상에 대한 코딩 서열의 적어도 일부를 포함하지 않는다. 독성 및 비병원성 WEEV 균주 둘 모두가 적합하다. 본 개시의 조성물 및 방법에 적합한 WEEV 균주의 비제한적인 예는 WEEV California, McMillan, IMP181, Imperial, Imperial181, IMPR441, 71V-1658, AG80-646, BFS932, COA592, EP-6, E1416, BFS1703, BFS2005, BSF3060, BSF09997, CHLV53, KERN5547, 85452NM, Montana-64, S8-122, 및 TBT-235를 포함한다. 본 개시의 조성물 및 방법에 적합한 WEEV 균주의 추가 예는 5614, 93A27, 93A30, 93A38, 93A79, B628(C1 15), CBA87, CNTR34, C0921356, Fleming, Lake43, PV012357A, PV02808A, PV72102, R02PV001807A, R02PV002957B, R02PV003422B, R05PV003422B, R0PV003814A 및 R0PV003844A를 포함한다. 추가적인 적합한 WEEV 균주는 문헌[Bergren NA et al., J. Virol. 88(16): 9260-9267, Aug 2014, and in the Virus Pathogen Resource website (ViPR; which is publicly available at www.viprbrc.org/brc/vipr/genome_search.spg?method=SubmitForm&blockId=868&decorator=toga)]에 기술된 것들을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 일부 구체예에서, 변형된 WEEV 게놈 또는 srRNA는 WEEV 균주 Imperial로부터 유래된다.
- [0076] [0064] 본 개시의 핵산 작제물(예를 들어, 레플리콘 작제물, 예를 들어, srRNA 작제물)의 비제한적인 예시적인 구체예는 하기 특징 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 변형된 바이러스 게놈 또는 srRNA는 변형되지 않은 바이러스 게놈 또는 srRNA의 바이러스 구조 단백질 CP, E1, E2, E3, 및 6K 중 하나 이상을 인코딩하는 핵산 서열의 적어도 일부가 없다. 일부 구체예에서, 변형된 바이러스 게놈 또는 srRNA는 CP를 인코딩하는 전체 서열 또는 그 일부가 없다. 일부 구체예에서, 변형된 바이러스 게놈 또는 srRNA는 E1을 인코딩하는 전체 서열 또는 그 일부가 없다. 일부 구체예에서, 변형된 바이러스 게놈 또는 srRNA는 E2를 인코딩하는 전체 서열 또는 그 일부가 없다. 일부 구체예에서, 변형된 바이러스 게놈 또는 srRNA는 E3를 인코딩하는 전체 서열 또는 그 일부가 없다. 일부 구체예에서, 변형된 바이러스 게놈 또는 srRNA는 6K를 인코딩하는 전체 서열 또는 그 일부가 없다. 일부 구체예에서, 변형된 바이러스 게놈 또는 srRNA는 CP, E1, E2, E3, 및 6K의 조합을 인코딩하는 전체 서열 또는 그 일부가 없다. 본 개시의 일부 구체예는 변형되지 않은 WEEV 게놈 또는 srRNA의 비구조 단백질 nsP1, nsP2, nsP3, 및 nsP4에 대한 코딩 서열은 존재하지만, WEEV 게놈 또는 srRNA의 하나 이상의 구조 단백질(예를 들어, CP, E1, E2, E3, 및 6K)을 인코딩하는 전체 서열 또는 적어도 그 일부가 부재하는 변형된 WEEV 게놈 또는 srRNA를 제공한다. 본 개시의 일부 구체예는 변형되지 않은 WEEV 게놈 또는 srRNA의 비구조 단백질 nsP1, nsP2, nsP3, 및 nsP4에 대한 코딩 서열은 존재하지만, WEEV 게놈 또는 srRNA의 하나 이상의 구조 단백질(예를 들어, CP, E1, E2, E3, 및 6K)을 인코딩하는 전체 서열 또는 적어도 그 일부가 부재하는 변형된 WEEV 게놈 또는 srRNA를 제공한다.
- [0077] [0065] 일부 구체예에서, 변형된 바이러스 게놈 또는 srRNA는 하나 이상의 바이러스 구조 단백질을 인코딩하는 핵산 서열의 실질적인 부분이 없다. 당업자는 바이러스 구조 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산 서열의 실질적인 부분이, 당업자에 의한 서열의 수동 평가에 의해, 또는 BLAST와 같은 알고리즘을 사용한 컴퓨터-자동화 서열 비교 및 식별에 의해(예를 들어, 문헌["Basic Local Alignment Search Tool"; Altschul SF et al., J. Mol. Biol. 215:403-410, 1993] 참조), 그 폴리펩티드의 추정적 식별을 제공하기에 충분한 바이러스 구조 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산 서열을 포함할 수 있음을 이해할 것이다. 따라서, 뉴클레오티드 서열의 실질적인 부분은 그 서열

을 포함하는 핵산 단편의 특정 식별 및/또는 분리를 제공하기에 충분한 서열을 포함한다. 예를 들어, 핵산 서열의 실질적인 부분은 전장 핵산 서열의 적어도 약 20%, 예를 들어, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90%, 약 95%를 포함할 수 있다. 상기 기재된 바와 같이, 본 개시는 하나 이상의 바이러스 구조 단백질을 인코딩하는 부분적 또는 완전한 핵산 서열이 없는 핵산 분자 및 작제물을 제공한다. 본원에 개시된 바와 같은 서열의 이점을 누리는 숙련된 기술자는 본 개시의 조성물 및 방법에 대해 개시된 서열의 전부 또는 실질적인 부분을 용이하게 사용할 수 있다. 따라서, 본 출원은 본원에 개시된 바와 같은 완전한 서열, 예를 들어, 첨부된 서열 목록에 제시된 것들 뿐만 아니라 상기 정의된 바와 같은 서열의 실질적인 부분을 포함한다.

[0078] [0066] 일부 구체예에서, 변형된 바이러스 게놈 또는 srRNA는 바이러스 구조 단백질을 인코딩하는 전체 서열이 없으며, 예를 들어, 변형된 바이러스 게놈 또는 srRNA는 바이러스의 변형되지 않은 게놈 또는 srRNA의 구조 단백질을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하지 않는다.

[0079] [0067] 일부 구체예에서, 본 개시의 핵산 작제물은 하나 이상의 발현 카세트를 추가로 포함한다. 원칙적으로, 본원에 개시된 핵산 작제물은 일반적으로 임의의 수의 발현 카세트를 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 본원에 개시된 핵산 작제물은 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 또는 적어도 6개의 발현 카세트를 포함할 수 있다. 당업자는 용어 "발현 카세트"가 세포, 생체내 및/또는 생체외에서 코딩 서열의 적절한 전사 및/또는 번역을 지시하기에 충분한 조절 정보 및 코딩 서열을 함유하는 유전 물질의 작제물을 지칭한다는 것을 이해할 것이다. 발현 카세트는 원하는 숙주 세포 및/또는 대상체 또는 개체로의 표적화를 위해 벡터에 삽입될 수 있다. 따라서, 일부 구체예에서, 용어 발현 카세트는 용어 "발현 작제물"과 상호교환적으로 사용될 수 있다. 일부 구체예에서, 용어 "발현 카세트"는, 예를 들어, 프로모터 및/또는 종결 신호와 같은 조절 요소에 작동 가능하게 연결된 단백질 또는 기능성 RNA를 인코딩하는 유전자, 및 선택적으로, 유전자의 전사 또는 번역에 영향을 미치는 임의의 다른 핵산 서열 또는 이의 조합을 포함하는 핵산 작제물을 지칭한다.

[0080] [0068] 일부 구체예에서, 발현 카세트 중 적어도 하나는 이중성 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된 프로모터를 포함한다. 따라서, 본원에 제공된 바와 같은 핵산 작제물은, 예를 들어, 이중성 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된 조절 요소(예를 들어, 프로모터)를 포함하는 경우, 이중성 핵산 서열의 발현에 영향을 미칠 수 있는 발현 벡터로서의 용도를 찾을 수 있다. 일부 구체예에서, 발현 카세트 중 적어도 하나는 이중성 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된 서브게놈(sg) 프로모터를 포함한다. 일부 구체예에서, sg 프로모터는 26S 서브게놈 프로모터이다. 일부 구체예에서, 변형된 WEEV 게놈 또는 srRNA의 적어도 하나의 비구조 단백질(nsP) 또는 이의 일부는 변형된 WEEV 게놈 또는 srRNA의 나머지에 비해 이중성이다. 일부 구체예에서, 변형된 WEEV 게놈 또는 srRNA는 이중성 nsP 또는 이의 일부를 인코딩하는 핵산 서열을 추가로 포함한다. 일부 구체예에서, 본 개시의 핵산 분자는 하나 이상의 비번역 영역(UTR)을 추가로 포함한다. 일부 구체예에서, UTR 중 적어도 하나는 이중성 UTR이다.

[0081] [0069] 일부 구체예에서, 발현 카세트 중 적어도 하나는 관심 유전자(GOI)에 대한 코딩 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, GOI에 대한 코딩 서열은 단일 폴리펩티드(예를 들어, 단일유전자 PCI)를 포함하는 관심 폴리펩티드 작제물(PCI)에 대한 코딩 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, PCI에 대한 코딩 서열은 복수의 폴리펩티드, 예를 들어, 다중유전자 PCI(예를 들어, 이중유전자, 삼중유전자, 또는 사중유전자 등)에 대한 코딩 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 복수의 폴리펩티드의 각각의 코딩 서열은 별도의 프로모터 서열에 작동 가능하게 연결된다. 일부 구체예에서, 복수의 폴리펩티드의 코딩 서열은 단일 오픈 리딩 프레임 내에서(예를 들어, 폴리시스트론 ORF에서) 서로 작동 가능하게 연결된다. 일부 구체예에서, 폴리시스트론 ORF의 코딩 서열은 프로모터 서열에 작동 가능하게 연결된다. 일부 구체예에서, 프로모터 서열 중 적어도 하나는 서브게놈(sg) 프로모터이다. 일부 구체예에서, sg 프로모터는 26S 게놈 프로모터이다.

[0082] [0070] 일부 구체예에서, 복수의 폴리펩티드는 서로 직접적으로 또는 간접적으로(예를 들어, 하나 이상의 커넥터 서열을 통해) 연결될 수 있다. 예를 들어, 일부 구체예에서, 복수의 폴리펩티드는 서로 직접, 예를 들어, 서로 인접하게 연결될 수 있다. 일부 구체예에서, 복수의 폴리펩티드 중 적어도 2개(예를 들어, 2, 3, 4, 또는 5개)는 하나 이상의 커넥터 서열에 의해 서로 작동 가능하게 연결된다. 일부 구체예에서, 커넥터 서열의 길이 및 아미노산 조성은 PCI의 원하는 활성 또는 특성을 달성하기 위해 서로에 대한 폴리펩티드의 배향, 유연성, 및/또는 근접성을 변화시키도록 최적화될 수 있다. 일부 구체예에서, 복수의 커넥터 서열 중 하나의 커넥터 서열은 하나 이상의 자가단백질분해 펩티드 서열을 포함한다. 본 개시의 방법 및 조성물에 적합한 자가단백질분해 펩티드의 비제한적인 예는 칼슘-의존성 세린 엔도프로테아제(푸린), 돼지 테스코바이러스-1 2A(P2A), 구제역 바이러스(FMDV) 2A(F2A), 말 비염 A 바이러스(ERAV) 2A(E2A), 토세아 아시그나(Thosea asigna) 바이러스 2A(T2A), 세포질 다각체 바이러스 2A(BmCPV2A), 및 플라세리 바이러스 2A(BmIFV2A)로부터 유래된 자가단백질분해 절단 서

열을 포함한다. 일부 구체예에서, 복수의 폴리펩티드 중 적어도 2개는 P2A 자가단백질분해 절단 서열을 통해 서로 작동 가능하게 연결된다.

[0083] [0071] 일부 구체예에서, 복수의 폴리펩티드의 코딩 서열은 하나 이상의 내부 리보솜 진입 부위(IRES)에 의해 서로 작동 가능하게 연결된다. 본 개시의 방법 및 조성물에 적합한 IRES의 비제한적인 예는 바이러스 IRES 서열, 세포 IRES 서열, 및 인공 IRES 서열을 포함한다. 적합한 IRES 서열의 예는 카포시 육종-관련 헤르페스바이러스(KSHV) IRES, 간염 바이러스 IRES, 페스티바이러스 IRES, 크리파바이러스 IRES, 로팔로시폼 파디 바이러스 IRES, 섬유모세포 성장 인자 IRES, 혈소판-유래 성장 인자 IRES, 혈관 내피 성장 인자 IRES, 인슐린-유사 성장 인자 IRES, 피코르나바이러스 IRES, 뇌심근염 바이러스(EMCV) IRES, Pim-1 IRES, p53 IRES, Apaf-1 IRES, TDP2 IRES, L-myc IRES, 및 c-myc IRES를 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0084] [0072] 원칙적으로, 본 개시의 레플리콘 작제물(예를 들어, srRNA 작제물)에 의해 발현될 수 있는 적합한 폴리펩티드 및 PCI와 관련하여 특별한 제한은 없다. 본 개시의 조성물 및 방법에 적합한 예시적인 유형의 폴리펩티드는 미생물 단백질, 바이러스 단백질, 박테리아 단백질, 진균 단백질, 포유동물 단백질, 및 이들의 임의의 조합을 포함한다. 예를 들어, PCI는 사이토카인, 세포독소, 케모카인, 면역조절제, 전-아포토틱 인자, 항-아포토틱 인자, 호르몬, 분화 인자, 탈분화 인자, 면역 세포 수용체 또는 리포터, 또는 이들의 임의의 조합과 같은 하나 이상의 항원 분자 및/또는 생물치료 분자를 포함할 수 있다.

[0085] [0073] 일부 구체예에서, GOI의 코딩 서열은 증가된 안정성, 역가, 및 발현(예를 들어, 번역 효율)과 같은 원하는 특성을 위해 재설계, 리팩터링, 및/또는 최적화되며, 이는 차례로 생물치료제의 생산, 전달 및 투여의 영향을 최대화할 수 있다. 예를 들어, 일부 구체예에서, GOI의 코딩 서열은 참조 코딩 서열의 발현 수준보다 높은 수준, 예를 들어, 참조 코딩 서열보다 20% 더 높거나, 30% 더 높거나, 40% 더 높거나, 50% 더 높거나, 60% 더 높거나, 70% 더 높거나, 80% 더 높거나, 90% 더 높거나, 또는 95% 더 높은 수준의 발현을 위해 최적화된다. 일부 구체예에서, 참조 코딩 서열은 야생형 비최적화 서열이다. 뉴클레오타이드 서열의 서열-최적화와 관련하여, 유전 코드의 축퇴는 유전자로부터 생산된 폴리펩티드의 아미노산 서열이 변경되지 않게 하면서 유전자의 단백질 인코딩 서열의 적어도 하나의 염기를 다른 염기로 치환할 수 있는 가능성을 제공한다. 따라서, 본 개시의 핵산 작제물은 또한 유전 코드의 축퇴에 따른 치환에 의해 본원에 개시된 임의의 폴리뉴클레오타이드 서열로부터 변경된 임의의 염기 서열을 가질 수 있다. 코돈 사용법을 설명하는 참고문헌은 쉽게 공개적으로 이용 가능하다. 일부 구체예에서, 폴리뉴클레오타이드 서열 변이체는 다양한 이유로, 예를 들어, 특정 숙주에 대한 발현을 최적화하기 위해(예를 들어, 알파바이러스 mRNA에서 코돈 사용법을 인간, 비인간 영장류, 햄스터, 마우스, 또는 원숭이와 같은 다른 유기체에 의해 선호되는 것으로 변경) 생성될 수 있다. 따라서, 일부 구체예에서, GOI의 코딩 서열은 발현을 위해 최적화된 코돈의 사용을 통해 표적 숙주 세포에서의 발현을 위해 최적화된다. 숙주 세포 발현에 최적인 바람직한 코돈을 사용하여 GOI를 인코딩하는 합성 핵산 서열의 작제를 위한 기술은 숙주 세포 게놈의 천연 단백질을 인코딩하기 위한 코돈 사용법의 공통성 및 이들의 상대적 존재비를 당 분야에 잘 알려진 기술에 의해 분석하는 컴퓨터 방법에 의해 결정될 수 있다. 코돈 사용법 데이터베이스(예를 들어, <http://www.kazusa.or.jp/codon>)는 포유동물 세포 환경에서 코돈 최적화 서열의 생성에 사용될 수 있다. 또한, JCat Codon Optimization Tool(www.jcat.de), Integrated DNA Technologies(IDT) Codon Optimization Tool(<https://www.idtdna.com/CodonOpt>) 또는 Optimizer 온라인 코돈 최적화 도구(<http://genomes.urv.es/OPTIMIZER>)와 같은 다양한 소프트웨어 도구가 한 유기체로부터의 서열을 다른 숙주 유기체에 대한 최적 코돈 사용법으로 변환시키는데 이용될 수 있다. 이러한 합성 서열은 합성 핵산 분자의 작제에 대해 당 분야에 공지된 기술에 의해 작제될 수 있고, 다양한 상업적 벤더로부터 입수될 수 있다. 따라서, 일부 구체예에서, GOI의 코딩 서열은 참조 코딩 서열, 예를 들어, 코돈-최적화되지 않은 코딩 서열의 발현 수준보다 높은 수준의 발현을 위해 최적화된다. 일부 구체예에서, GOI의 코돈-최적화된 서열은 코돈 최적화되지 않은 참조 코딩 서열과 비교하여 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 100%만큼 증가된 발현 수준을 초래한다. 일부 구체예에서, GOI의 코돈-최적화된 서열은 코돈-최적화되지 않은 참조 코딩 서열과 비교하여 적어도 2배, 적어도 3배, 적어도 4배, 또는 적어도 5배만큼 증가된 발현 수준을 초래한다.

[0086] [0074] 일부 구체예에서, GOI의 코딩 서열은 향상된 RNA 안정성 및/또는 발현을 위해 최적화된다. RNA의 안정성은 일반적으로 RNA의 "반감기"와 관련이 있다. "반감기"는 분자의 활성, 양, 또는 수의 절반을 제거하는데 필요한 기간에 관한 것이다. 본 개시의 맥락에서, RNA의 반감기는 상기 RNA의 안정성의 지표이다. RNA의 반감기는 RNA의 "발현 기간"에 영향을 미칠 수 있다. RNA 안정성을 향상시키는데 사용하기 위한 원리, 전략, 및 방법에 관한 추가 정보는, 예를 들어, 문헌[Leppek K. et al., *Combinatorial optimization of mRNA structure*,

stability, and translation for RNA-based therapeutics (Nature Communications. Vol 13, Article No. 1536, March 2022)]에서 찾을 수 있다.

- [0087] [0075] GOI에 의해 인코딩되는 폴리펩티드는 일반적으로 임의의 폴리펩티드일 수 있고, 예를 들어, 치료용 폴리펩티드, 예방용 폴리펩티드, 진단용 폴리펩티드, 기능식품용 폴리펩티드, 산업용 효소, 및 리포터 폴리펩티드일 수 있다. 일부 구체예에서, GOI는 항체, 항원, 면역 조절제, 효소, 신호전달 단백질, 및 사이토카인으로 구성된 군으로부터 선택된 폴리펩티드를 인코딩한다. 일부 구체예에서, GOI는 미생물 단백질, 바이러스 단백질, 박테리아 단백질, 진균 단백질, 포유동물 단백질, 및 이들의 임의의 조합을 인코딩할 수 있다. 일부 구체예에서, GOI는 인플루엔자 A 바이러스 H5N1의 헤마글루티닌 전구체(HA)를 인코딩한다. GOI의 비제한적인 예는 G-CSF, GM-CSF, IL-1, IL-10, IL-10-유사, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-18BP, IL-1-유사, IL-1RA, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-20, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-6-유사, IL-7, IL-9, IL-21, IL-22, IL-33, IL-37, IL-38, LIF, 및 OSM을 포함하는 인터루킨 및 상호작용 단백질을 포함한다. 추가의 적합한 GOI는 인터페론(예를 들어, IFN- α , IFN- β , IFN- γ), TNF(예를 들어, CD154, LT- β , TNF- α , TNF- β , 4-1BBL, APRIL, CD70, CD153, CD178, GITRL, LIGHT, OX40L, TALL-1, TRAIL, TWEAK, 및 TRANCE), TGF- β (예를 들어, TGF- β 1, TGF- β 2, 및 TGF- β 3), 헤마토포이에틴(예를 들어, Epo, Tpo, Flt-3L, SCF, M-CSF, MSP), 케모카인 및 이들의 수용체(예를 들어, XCL1, XCL2, CCL1, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL8, CCL11, CCL13, CCL14, CCL15, CCL16, CCL17, CCL18, CCL19, CCL20, CCL21, CCL22, CCL23, CCL24, CCL25, CCL26, CCL27, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL4, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCL14, 및 CX3CL1), 면역억제성 유전자 생성물 및 관련 전사 인자(예를 들어, PECAM1, FCGR3A, FOS, NFkB1, JUN, HIF1A, PD-L1, mTOR, STAT5B, 및 STAT4)를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 본 개시의 조성물 및 방법에 적합한 추가의 GOI는 면역자극성 유전자 생성물(예를 들어, CD27/CD70, CD40, CD40L, B7.1, BTLA, MAVS, OX40, OX40L, RIG-I, 및 STING), 유전자의 약물 내성 돌연변이체/변이체, 예를 들어, ABCB1, ABCC1, ABCG2, AKT1, ALK, BAFF, BCR-ABL, BRAF, CCND1, cMET, EGFR, ERBB2, ERBB3, ERK2, ESR1, GRB2, KRAS, MDR1, MRP1, NTRK1, PDC4, P-gp, PI3K, PTEN, RET, ROS1, RSK1, RSK2, SHIP, 및 STK11을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 또한 본 개시의 조성물 및 방법에 적합한 것은 바이러스 단백질, 특히 스파이크 단백질, 섬유 단백질, 구조 단백질, 및 부착 단백질을 인코딩하는 서열을 포함한다.
- [0088] [0076] 일부 구체예에서, GOI는 항체 또는 항체 변이체(예를 들어, 단일 사슬 Fv, 이중특이적, 낙타과, Fab, 및 HCAb)를 인코딩할 수 있다. 일부 구체예에서, 항체는 암과 관련되거나 상향조절된 표면 분자, 또는 감염성 질환과 관련된 표면 분자를 표적화한다. 일부 구체예에서, 항체는 면역자극 기능을 갖거나 면역억제 기능을 갖는 표면 분자를 표적화한다.
- [0089] [0077] 일부 구체예에서, GOI는 결핍 또는 돌연변이가 질병 또는 건강 상태와 관련된 효소, 예를 들어, 이를 테면, 아갈시다제 베타, 아갈시다제 알파, 이미글루세라제, 탈리글루세라제 알파, 벨라글루세라제 알파, 알글루세라제, 세벨리파제 알파, 라로니다제, 이두르실파제, 엘로실파제 알파, 갈실파제, 알글루코시다제 알파, 및 CTFR을 인코딩할 수 있다.
- [0090] [0078] 일부 구체예에서, GOI는 항원 분자, 생물치료 분자, 또는 이들의 임의의 조합으로부터 선택된 폴리펩티드를 인코딩할 수 있다. 일부 구체예에서, GOI는 종양-관련 항원, 종양-특이적 항원, 신생항원, 및 이들의 임의의 조합으로부터 선택된 폴리펩티드를 인코딩할 수 있다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, TAA는 종양 세포 및 정상 세포, 또는 많은 정상 세포에 존재하지만, 종양 세포보다 훨씬 낮은 농도로 존재하는 분자, 예를 들어, 단백질을 포함한다. 대조적으로, TSA는 일반적으로 종양 세포에 존재하지만 정상 세포에는 없는 분자, 예를 들어, 단백질을 포함한다. 종양-관련 항원은 암 세포, 예를 들어, 유방암 세포, B 세포 림프종, 췌장암, 호지킨 림프종 세포, 난소암 세포, 전립선암 세포, 중피종, 폐암 세포, 비호지킨 B-세포 림프종(B-NHL) 세포, 난소암 세포, 전립선암 세포, 중피종 세포, 흑색종 세포, 만성 림프구성 백혈병 세포, 급성 림프구성 백혈병 세포, 신경모세포종 세포, 신경아교종, 아교모세포종, 결장직장암 세포 등과 관련된 항원일 수 있다. 또한, 일부 경우에, 종양-관련 항원은 비암성 세포에 의해서도 발현될 수 있다는 것이 이해될 것이다. 일부 구체예에서, GOI는 에스트로겐 수용체, 세포내 신호 전달기 효소, 및 인간 상피 성장 수용체로부터 선택된 폴리펩티드를 인코딩할 수 있다. 일부 구체예에서, GOI는 면역조절제, 혈관신생의 조절제, 세포외 기질의 조절제, 대사의 조절제, 신경학적 조절제, 및 이들의 임의의 조합으로부터 선택된 생물치료용 폴리펩티드를 인코딩할 수 있다. 일부 구체예에서, GOI는 케모카인, 인터페론, 인터루킨, 림포카인, 및 종양 괴사 인자로부터 선택된 사이토카인을 인코딩할 수 있다. 일부 구체예에서, GOI는 IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-15, IL-15, IL-17, IL-23, IL-27, IL-35, IFN γ 및 이들의 임의의 서브유닛으로부터

선택된 인터루킨을 인코딩할 수 있다. 일부 구체예에서, GOI는 IL-12A, IL-12B, IL-1RA, 및 이들의 임의의 조합으로부터 선택된 생물치료용 폴리펩티드를 인코딩할 수 있다.

- [0091] [0079] 일부 구체예에서, 본 개시의 핵산 작제물은 SEQ ID NO: 1의 핵산 서열과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 서열 동일성을 갖는 변형된 WEEV를 인코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 본 개시의 핵산 작제물은 SEQ ID NO: 2의 핵산 서열과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 서열 동일성을 갖는 변형된 WEEV를 인코딩하는 핵산 서열을 포함한다.
- [0092] [0080] 일부 구체예에서, 본 개시의 핵산 작제물은 SEQ ID NO: 1의 핵산 서열과 100% 서열 동일성을 갖는 변형된 WEEV를 인코딩하는 핵산 서열을 포함하고, 여기서 핵산 서열의 1, 2, 3, 4, 5개 이상의 뉴클레오티드는 상이한 뉴클레오티드로 치환될 수 있다. 일부 구체예에서, 본 개시의 핵산 작제물은 SEQ ID NO: 2의 핵산 서열과 100% 서열 동일성을 갖는 변형된 WEEV를 인코딩하는 핵산 서열을 포함하고, 여기서 핵산 서열의 1, 2, 3, 4, 5개 이상의 뉴클레오티드는 상이한 뉴클레오티드로 치환될 수 있다.
- [0093] [0081] 변형된 WEEV의 관심 서열과 높은 정도의 서열 동일성(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100%)을 갖는 핵산 서열은 본원에서 확인된 서열(예를 들어, SEQ ID NO: 1 또는 SEQ ID NO: 2) 또는 당 분야에 공지된 바와 같은 임의의 다른 것을 사용하여, 게놈 서열 분석, 하이브리드화, 및/또는 각각의 WEEV 게놈에서 확인된 서열로부터의 축퇴 프라이머 또는 유전자-특이적 프라이머를 이용한 PCR에 의해 확인 및/또는 분리될 수 있다.
- [0094] [0082] 일부 구체예에서, 본 개시의 핵산 작제물은 하나 이상의 어댑터 서열, 예를 들어, 클로닝 어댑터 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 하나 이상의 어댑터 서열은 하기 서열을 포함한다: 5'-CTGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGGACCT-3'(SEQ ID NO: 3). 일부 구체예에서, 하나 이상의 어댑터 서열은 하기 서열을 포함한다: 5'-GACCGCTACGCCCAATGACCGACCAGC-3'(SEQ ID NO: 4).
- [0095] [0083] 일부 구체예에서, 돌연변이(예를 들어, 침묵 돌연변이)는 *SapI* 및 *SpeI* 제한 효소 절단 부위와 같은 제한 효소 절단 부위를 제거하기 위해 본 개시의 핵산 작제물에 혼입될 수 있다(예를 들어, 실시예 1-3 참조). 예를 들어, 고유한 제한 효소 절단 부위(*SpeI*, 5'-A'CTAG,T-3')가 천연 WEEV 구조 유전자의 코딩 서열 대신에 혼입될 수 있다(여기서, 5' A는 구조 다단백질 ATG 개시 코돈의 위치와 일치하며, 3' T는 구조 다단백질 정지 코돈 TAA의 위치와 일치한다). 일부 구체예에서, 5' 어댑터 서열(예를 들어, SEQ ID NO: 3)은 *SpeI* 부위의 업스트림에 삽입될 수 있고, 3' 어댑터 서열(SEQ ID NO: 4)은 후속 Gibson Assembly® 절차를 위해 *SpeI* 부위의 다운스트림에 삽입될 수 있다(Gibson et al., *Nat. Methods* 6, 343-345, 2009). 일부 구체예에서, 프로모터 서열(예를 들어, 박테리오파지 T7 RNA 중합효소 프로모터)은 WEEV 게놈 서열의 업스트림에 포함될 수 있고, 다운스트림에는 폴리(A) 서열 다음에 제한 부위의 업스트림을 절단하는 제한 효소 절단 부위(예를 들어, *SapI*)가 함유될 수 있다. 이러한 제한 효소 절단 부위(*SapI*)의 바로 다운스트림에는 종결 서열(예를 들어, T7 종결 서열)에 이어 고유한 제한 효소 절단 부위(예를 들어, *NotI*)가 포함될 수 있다.
- [0096] [0084] 일부 실험에서, 하나 이상의 nsP를 인코딩하는 서열은 이중성 nsP로 대체된다. 일부 다른 실험에서, 하나 이상의 UTR을 인코딩하는 서열은 이중성 UTR로 대체된다.
- [0097] [0085] 이러한 새로운 핵산 작제물을 조립하고 특성화하는 분자 기술 및 방법은 본 출원의 실시예에 보다 자세히 기재되어 있다. 일부 구체예에서, 핵산 분자는 재조합 핵산 분자이다. 본원에서 사용되는 용어 재조합체는 간접적이지만 인간 조작의 결과인 임의의 분자(예를 들어, DNA, RNA, 폴리펩티드)를 의미한다. 비제한적인 예로서, cDNA는 시험관내 중합효소 반응(들)에 의해 생성되거나, 링커가 부착되거나, 클로닝 벡터 또는 발현 벡터와 같은 벡터에 통합된 임의의 핵산 분자와 마찬가지로, 재조합 DNA 분자이다. 비제한적인 예로서, 재조합 핵산 분자는 1) 예를 들어, 핵산 분자의 화학적 또는 효소적 기술을 사용하여(예를 들어, 화학적 핵산 합성의 사용에 의해, 또는 복제, 중합, 외핵분해 소화, 내핵분해 소화, 라이게이션, 역전사, 전사, 염기 변형(예를 들어, 메틸화 포함), 또는 재조합(상동성 및 부위-특이적 재조합 포함)을 위한 효소의 사용에 의해) 시험관내에서 합성 또는 변형되었고/거나; 2) 자연에서 결합되지 않은 결합된 뉴클레오티드 서열을 포함하고/거나; 3) 자연 발생 뉴클레오티드 서열과 관련하여 하나 이상의 뉴클레오티드가 결여되도록 분자 클로닝 기술을 사용하여 조작되었고/거나; 4) 자연 발생 뉴클레오티드 서열과 관련하여 하나 이상의 서열 변화 또는 재배열을 갖도록 분자 클로닝 기술을 사용하여 조작되었다.
- [0098] [0086] 일부 구체예에서, 본원에 개시된 핵산 분자는 재조합 DNA 기술(예를 들어, 중합효소 연쇄 반응(PCR) 증

폭, 클로닝 등) 또는 화학적 합성을 사용하여 생산된다. 본원에 개시된 바와 같은 핵산 분자는 천연 대립유전자 변이체 및 하나 이상의 뉴클레오타이드 잔기가 삽입, 결실 및/또는 치환된 (이러한 변형이 본원에 기재된 바와 같은 생물학적 활성을 달성하는데 있어서 원하는 특성을 제공하는 방식으로) 변형된 핵산 분자를 포함하나 이에 제한되지 않는 천연 핵산 분자 및 이의 상동체를 포함한다.

[0099] [0087] 자연-발생 핵산 서열의 변이체를 포함하는 핵산 분자는 당업자에게 공지된 다수의 방법을 사용하여 생산될 수 있다(예를 들어, 문헌[Sambrook et al., In: Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)] 참조). 핵산 분자의 서열은 고전적인 돌연변이 유발 기술 및 재조합 DNA 기술, 예를 들어, 비제한적으로, 부위-지정 돌연변이유발, 돌연변이를 유도하기 위한 핵산 분자의 화학적 처리, 핵산 단편의 제한 효소 절단, 핵산 단편의 라이게이션, 핵산 서열의 선택된 영역의 PCR 증폭 및/또는 돌연변이유발, 재조합 클로닝, 및 올리고뉴클레오타이드 혼합물의 화학적 합성 및 핵산 분자의 혼합물을 "구축"하기 위한 혼합물 기의 라이게이션을 포함하는 화학적 합성, 및 이들의 조합을 포함하나 이에 제한되지 않는 다양한 기술을 사용하여 이것이 유래되는 자연-발생 서열과 관련하여 변형될 수 있다. 핵산 분자 상동체는 핵산 분자에 의해 인코딩된 단백질 또는 srRNA의 기능에 대한 스크리닝에 의해 및/또는 야생형 유전자 또는 이의 단편과의 하이브리드화에 의해, 또는 표적 또는 야생형 핵산 분자 또는 서열과 상동성을 갖는 프라이머를 사용한 PCR에 의해 변형된 핵산 분자의 혼합물로부터 선택될 수 있다.

[0100] B. 재조합 세포

[0101] [0088] 본 개시의 핵산 작제물은 숙주 세포에 도입되어 핵산 분자를 함유하는 재조합 세포를 생산할 수 있다. 따라서, 본원에 기재된 바와 같은 변형된 WEEV 게놈을 인코딩하는 핵산 작제물을 함유하는 원핵 또는 진핵 세포도 본 개시의 특징이다. 관련 양태에서, 본원에 개시된 일부 구체예는 동물 세포와 같은 숙주 세포 내로 본원에 제공된 바와 같은 핵산 작제물을 도입한 다음, 형질전환된 세포를 선택 또는 스크리닝하는 것을 포함하는 세포를 형질전환시키는 방법에 관한 것이다. 본 개시의 핵산 작제물의 세포 내로의 도입은 당업자에게 공지된 방법, 예를 들어, 바이러스 감염, 트랜스펙션, 컨주게이션, 원형질체 융합, 리포펙션, 전기천공, 뉴클레오펙션, 칼슘 포스페이트 침전, 폴리에틸렌이민(PEI)-매개된 트랜스펙션, DEAE-덱스트란-매개된 트랜스펙션, 리포솜-매개된 트랜스펙션, 입자 총 기술, 직접 미세주사, 나노입자-매개된 핵산 전달 등에 의해 달성될 수 있다.

[0102] [0089] 일 양태에서, 본 개시의 일부 구체예는 재조합 세포, 예를 들어, 본원에 기재된 핵산 작제물을 포함하는 재조합 동물 세포에 관한 것이다. 핵산 작제물은 숙주 게놈에 안정적으로 통합될 수 있거나, 에피솜으로 복제될 수 있거나, 안정적이거나 일시적인 발현을 위한 미니-서클 발현 벡터로서 재조합 숙주 세포에 존재할 수 있다. 따라서, 본 개시의 일부 구체예에서, 핵산 작제물은 에피솜 단위로서 재조합 숙주 세포에서 유지되고 복제된다. 일부 구체예에서, 핵산 작제물은 재조합 세포의 게놈으로 안정적으로 통합된다. 고전적인 무작위 게놈 재조합 기술을 사용하거나 가이드 RNA 지시된 CRISPR/Cas9 또는 TALEN 게놈 편집을 사용하는 것과 같은 보다 정확한 게놈 편집 기술에 의해 안정적인 통합을 완료할 수 있다. 일부 구체예에서, 핵산 작제물은 안정적이거나 일시적인 발현을 위한 미니-서클 발현 벡터로서 재조합 숙주 세포에 존재한다.

[0103] [0090] 숙주 세포는 형질전환되지 않은 세포이거나 이미 적어도 하나의 핵산 분자로 트랜스펙션된 세포일 수 있다. 따라서, 일부 구체예에서, 숙주 세포는 적어도 하나의 핵산 분자로 유전적으로 조작(예를 들어, 형질도입 또는 형질전환 또는 트랜스펙션)될 수 있다.

[0104] [0091] 본원에 기재된 바와 같은 관심 폴리펩티드의 클로닝 또는 발현에 적합한 숙주 세포는 본원에 기재된 원핵 또는 진핵 세포를 포함한다. 따라서, 일부 구체예에서, 재조합 세포는 원핵 세포, 예를 들어, 박테리아 *E. coli*, 또는 진핵 세포, 예를 들어, 곤충 세포(예를 들어, 모기 세포 또는 Sf21 세포), 또는 포유동물 세포(예를 들어, COS 세포, NIH 3T3 세포, 또는 HeLa 세포)이다. 일부 구체예에서, 세포는 생체내 세포, 예를 들어, 생체 내의 재조합 세포, 예를 들어, 트랜스제닉 대상체의 세포이다. 일부 구체예에서, 대상체는 척추 동물 또는 무척추 동물이다. 일부 구체예에서, 대상체는 곤충이다. 일부 구체예에서, 대상체는 포유동물 대상체이다. 일부 구체예에서, 세포는 생체의 세포, 예를 들어, 치료 또는 절차를 위해 생체 또는 유기체로부터 개별 세포로서 또는 기관 또는 조직의 일부로서 추출된 후, 생체 또는 유기체로 다시 돌아온 세포이다. 일부 구체예에서, 세포는 시험관내 세포, 예를 들어, 저장소로부터 수득된 세포이다.

[0105] [0092] 일부 구체예에서, 재조합 세포는 진핵 세포이다. 일부 구체예에서, 재조합 세포는 동물 세포이다. 일부 구체예에서, 동물 세포는 척추 동물 세포 또는 무척추 동물 세포이다. 일부 구체예에서, 재조합 세포는 포유동물 세포이다. 일부 구체예에서, 재조합 세포는 SV40에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 세포(예를 들어, COS-7), 인간 배아 신장 세포(예를 들어, HEK 293 또는 HEK 293 세포), 새끼 햄스터 신장 세포(BHK), 마우스 세르톨

리 세포(예를 들어, TM4 세포), 원숭이 신장 세포(예를 들어, CV1), 인간 자궁경부 암종 세포(예를 들어, HeLa), 개 신장 세포(예를 들어, MDCK), 버팔로 래트 간 세포(예를 들어, BRL 3A), 인간 폐 세포 (예를 들어, W138), 인간 간 세포(예를 들어, Hep G2), 마우스 유방 종양(예를 들어, MMT 060562), TRI 세포, FS4 세포, 중국 햄스터 난소 세포(CHO 세포), 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포(예를 들어, Vero 세포), 인간 A549 세포, 인간 자궁경부 세포, 인간 CHME5 세포, 인간 PER.C6 세포, NSO 무린 골수종 세포, 인간 표피양 후두 세포, 인간 섬유모세포 세포, 인간 HUH-7 세포, 인간 MRC-5 세포, 인간 근육 세포, 인간 내피 세포, 인간 별아교 세포, 인간 대식세포, 인간 RAW 264.7 세포, 마우스 3T3 세포, 마우스 L929 세포, 마우스 결합 조직 세포, 마우스 근육 세포, 및 토끼 신장 세포로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0106] [0093] 일부 구체예에서, 재조합 세포는 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포(Vero 세포), 새끼 햄스터 신장(BHK) 세포, 중국 햄스터 난소 세포(CHO 세포), 인간 A549 세포, 인간 자궁경부 세포, 인간 CHME5 세포, 인간 표피양 후두 세포, 인간 섬유모세포, 인간 HEK-293 세포, 인간 HeLa 세포, 인간 HepG2 세포, 인간 HUH-7 세포, 인간 MRC-5 세포, 인간 근육 세포, 마우스 3T3 세포, 마우스 결합 조직 세포, 마우스 근육 세포, 및 토끼 신장 세포로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 구체예에서, 재조합 세포는 상기 기재된 세포로부터 유래된 세포(즉, 본원에 기재된 원래 세포의 유도체 세포), 예를 들어, 이를 테면, 원래 세포의 클론으로부터 확장된 세포, 원래 세포의 조작된 버전, 또는 광범위한 계대를 거치거나 다른 숙주를 통해 계대된 후 원래 세포의 재분류로부터 유래된 세포이다.

[0107] [0094] 일부 구체예에서, 재조합 세포는 곤충 세포, 예를 들어, 곤충 세포주의 세포이다. 일부 구체예에서, 재조합 세포는 Sf21 세포이다. 추가의 적합한 곤충 세포주는 곤충 목 디프테리아(Diptera), 레피도프테라(Lepidoptera) 및 헤미프테라(Hemiptera)로부터 확립된 세포주를 포함하나 이에 제한되지 않으며, 상이한 조직 공급원으로부터 유래될 수 있다. 일부 구체예에서, 재조합 세포는 나비목 곤충 세포주의 세포이다. 지난 수십 년 동안, 나비목 곤충 세포주의 이용 가능성은 10년 당 약 50주로 증가하였다. 이용 가능한 나비목 곤충 세포주에 관한 추가 정보는 예를 들어, 문헌[Lynn D.E., *Available lepidopteran insect cell lines*. Methods Mol Biol. 2007;388:117-38]에서 찾을 수 있으며, 이는 본원에 참조로 포함된다. 일부 구체예에서, 재조합 세포는 모기 세포, 예를 들어 아노펠레스(*Anopheles*)(*An.*), 컬렉스(*Culex*)(*Cx.*) 및 애데스(*Aedes*)(스테고미아(*Stegomyia*))(*Ae.*) 속 내의 모기 종의 세포이다. 본원에 기재된 조성물 및 방법에 적합한 예시적인 모기 세포주는 하기 모기 종으로부터의 세포주를 포함한다: 애데스 애집티(*Aedes aegypti*), 애데스 알보픽투스(*Aedes albopictus*), 애데스 슈도스쿠텔라리스(*Aedes pseudoscutellaris*), 애데스 트리세리아투스(*Aedes triseriatus*), 애데스 벅산스(*Aedes vexans*), 아노펠레스 감비아(*Anopheles gambiae*), 아노펠레스 스테펜시(*Anopheles stephensi*), 아노펠레스 알비마누스(*Anopheles albimanus*), 컬렉스 퀸쿠파스시아투스(*Culex quinquefasciatus*), 컬렉스 테일러리(*Culex theileri*), 컬렉스 트리태니오린쿠스(*Culex tritaeniorhynchus*), 컬렉스 비태니오린쿠스(*Culex bitaeniorhynchus*) 및 톡소린키테스 암보이넨시스(*Toxorhynchites amboinensis*). 적합한 모기 세포주는 비제한적으로 CCL-125, Aag-2, RML-12, C6/26, C6/36, C7-10, AP-61, A.t. GRIP-1, A.t. GRIP-2, UM-AVE1, Mos.55, Sua1B, 4a-3B, Mos.43, MSQ43 및 LSB-AA695BB를 포함한다. 일부 구체예에서, 모기 세포는 C6/26 세포주의 세포이다.

[0108] [0095] 또 다른 양태에서, 본원에 개시된 바와 같은 적어도 하나의 재조합 세포 및 배양 배지를 포함하는 세포 배양물이 본원에 제공된다. 일반적으로, 배양 배지는 본원에 기재된 세포를 배양하기 위한 임의의 적합한 배양 배지일 수 있다. 매우 다양한 상기 언급된 숙주 세포 및 종을 형질전환시키는 기술은 당 분야에 공지되어 있으며 기술 및 과학 문헌에 기재되어 있다. 따라서, 본원에 개시된 바와 같은 적어도 하나의 재조합 세포를 포함하는 세포 배양물이 또한 본 출원의 범위 내에 있다. 세포 배양물을 생성하고 유지하기 위한 적합한 방법 및 시스템은 당 분야에 공지되어 있다.

[0109] C. 트랜스제닉 동물

[0110] [0096] 또 다른 양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 핵산 작제물(예를 들어, 벡터, 레플리콘, 또는 srRNA 분자)을 포함하는 트랜스제닉 동물이 또한 제공된다. 일부 구체예에서, 트랜스제닉 동물은 척추 동물 또는 무척추 동물이다. 일부 구체예에서, 트랜스제닉 동물은 곤충이다. 일부 구체예에서, 곤충은 모기이다. 일부 구체예에서, 트랜스제닉 동물은 포유동물이다. 일부 구체예에서, 트랜스제닉 동물은 비인간 포유동물이다. 일반적으로, 본 개시의 트랜스제닉 동물은 당 분야에 공지된 임의의 비인간 동물일 수 있다. 일부 구체예에서, 본 개시의 비인간 동물은 비인간 영장류이다. 본 개시의 조성물 및 방법에 적합한 다른 동물 종은 (i) 트랜스제네시스(transgenesis)에 적합하고 (ii) 면역글로불린 유전자 세그먼트를 재배열하여 항체 반응을 생성할 수 있는 동물을 포함한다. 이러한 종의 예는 마우스, 래트, 햄스터, 토끼, 닭, 염소, 돼지, 양 및 소를 포함하나 이

에 제한되지 않는다. 본 개시의 조성물 및 방법에 적합한 비인간 동물의 추가적인 예는 실험실 동물(예를 들어, 마우스, 래트, 햄스터, 게르빌쥐, 기니피그 등), 가축(예를 들어, 말, 소, 돼지, 양, 염소, 오리, 거위, 닭 등), 길들인 동물 및 애완동물(예를 들어, 개, 고양이 등), 비인간 영장류(예를 들어, 유인원, 침팬지, 오랑우탄, 원숭이 등), 어류, 양서류(예를 들어, 개구리, 도롱뇽 등), 파충류(예를 들어, 뱀, 도마뱀 등), 및 다른 동물(예를 들어, 여우, 족제비, 토끼, 밍크, 비버, 담비, 수달, 세이불, 물개, 코요테, 친칠라, 사슴, 사향쥐, 주머니쥐 등)을 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0111] [0097] 일부 구체예에서, 트랜스제닉 동물은 곤충이다. 일부 구체예에서, 곤충은 모기이다. 일부 구체예에서, 본 개시의 트랜스제닉 동물은 키메라 트랜스제닉 동물이다. 일부 구체예에서, 본 개시의 트랜스제닉 동물은 본 개시의 하나 이상(예를 들어, 하나 이상, 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상 등)의 핵산 작제물을 함유하는 생식 세포 및 체세포를 갖는 트랜스제닉 동물이다. 일부 구체예에서, 하나 이상의 핵산 작제물은 트랜스제닉 동물의 게놈에 안정적으로 통합된다. 일부 구체예에서, 본 개시의 트랜스제닉 동물의 게놈은 본 개시의 하나 이상의 핵산 작제물의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15개 이상의 카피 중 임의의 것을 포함할 수 있다.

[0112] [0098] 트랜스제닉 비인간 동물을 제조하기 위한 접근법 및 방법은 당 분야에 공지되어 있다. 예시적인 방법은 전핵 미세주사, DNA 미세주사, 초기 배아로의 렌티바이러스 벡터 매개된 DNA 전달 및 정자-매개된 트랜스제네시스, 동물 정자(예를 들어, 돼지에서)로의 아데노바이러스 매개된 DNA의 도입, 레트로바이러스 벡터(예를 들어, 조류 종), 체세포 핵 전달(예를 들어, 염소에서)을 포함한다. 트랜스제닉 가축의 제조에 관한 최신 기술은 문헌[Niemann, H. et al. (2005) Rev. Sci. Tech. 24:285-298]에서 검토된다. 일부 구체예에서, 본 개시의 트랜스제닉 비인간 숙주 동물은 외인성 핵산을 비인간 동물의 게놈으로 도입하기 위한 당 분야에 공지된 표준 방법을 사용하여 제조된다. 일부 구체예에서, 본 개시의 트랜스제닉 동물은 고전적인 무작위 게놈 재조합 기술을 사용하거나 가이드 RNA 지시된 CRISPR/Cas 게놈 편집, 또는 NgAgo(나트로노박테리움 그레고리이(*Natronobacterium gregoryi*) 아고노트)에 의한 DNA 유도된 엔도뉴클레아제 게놈 편집, 또는 TALEN 게놈 편집(전사 활성화제-유사 이펙터 뉴클레아제)으로 생성될 수 있다. 일부 구체예에서, 본 개시의 트랜스제닉 동물은 트랜스제닉 미세주사 기술을 사용하여 제조될 수 있고, 상동성 재조합 기술의 사용을 필요로 하지 않으므로 상동성 재조합을 사용하는 접근법보다 제조 및 선택이 더 용이한 것으로 간주된다. 일부 구체예에서, 트랜스제닉 동물은 본원에 개시된 관심 단백질을 생산한다.

[0113] [0099] 본 개시의 트랜스제닉 비인간 숙주 동물은 외인성 핵산을 비인간 동물의 게놈으로 도입하기 위한 당 분야에 공지된 표준 방법을 사용하여 제조된다. 일부 구체예에서, 본 개시의 비인간 동물은 비인간 영장류이다. 본 개시의 조성물 및 방법에 적합한 다른 동물 종은 (i) 트랜스제네시스에 적합하고 (ii) 면역글로불린 유전자 세그먼트를 재배열하여 항체 반응을 생성할 수 있는 동물을 포함한다. 이러한 종의 예는 마우스, 래트, 햄스터, 토끼, 닭, 염소, 돼지, 양 및 소를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 트랜스제닉 비인간 동물을 제조하기 위한 접근법 및 방법은 당 분야에 공지되어 있다. 예시적인 방법은 전핵 미세주사, DNA 미세주사, 초기 배아로의 렌티바이러스 벡터 매개된 DNA 전달 및 정자-매개된 트랜스제네시스, 동물 정자(예를 들어, 돼지에서)로의 아데노바이러스 매개된 DNA의 도입, 레트로바이러스 벡터(예를 들어, 조류 종), 체세포 핵 전달(예를 들어, 염소에서)을 포함한다. 트랜스제닉 가축의 제조에 관한 최신 기술은 문헌[Niemann, H. et al. (2005) Rev. Sci. Tech. 24:285-298]에서 검토된다.

[0114] [0100] 일부 구체예에서, 동물은 척추 동물 또는 무척추 동물이다. 일부 구체예에서, 동물은 곤충이다. 일부 구체예에서, 곤충은 모기이다. 일부 구체예에서, 동물은 포유동물 대상체이다. 일부 구체예에서, 포유동물은 비인간 동물이다. 일부 구체예에서, 포유동물은 비인간 영장류이다. 일부 구체예에서, 본 개시의 트랜스제닉 동물은 고전적인 무작위 게놈 재조합 기술을 사용하거나 가이드 RNA 지시된 CRISPR/Cas 게놈 편집, 또는 NgAgo(나트로노박테리움 그레고리이 아고노트)에 의한 DNA 유도된 엔도뉴클레아제 게놈 편집, 또는 TALEN 게놈 편집(전사 활성화제-유사 이펙터 뉴클레아제)으로 생성될 수 있다. 일부 구체예에서, 본 개시의 트랜스제닉 동물은 트랜스제닉 미세주사 기술을 사용하여 제조될 수 있고, 상동성 재조합 기술의 사용을 필요로 하지 않으므로 상동성 재조합을 사용하는 접근법보다 제조 및 선택이 더 용이한 것으로 간주된다. 또 다른 양태에서, 관심 폴리펩티드를 생산하기 위한 방법이 본원에 제공되며, 여기서 방법은 (i) 본원에 개시된 바와 같은 트랜스제닉 동물을 사육하는 단계; 또는 (ii) 트랜스제닉 동물 또는 재조합 세포가 GOI에 의해 인코딩된 폴리펩티드를 생산하는 조건 하에 본원에 개시된 바와 같은 핵산 작제물을 포함하는 재조합 세포를 배양하는 단계를 포함한다. 또 다른 양태에서, 대상체에서 관심 폴리펩티드를 생산하기 위한 방법이 본원에 제공되며, 여기서 방법은 대상체에게 본원에 개시된 바와 같은 핵산 작제물을 투여하는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 대상체는 척추 동물 또는 무척추 동물이다. 일부 구체예에서, 대상체는 곤충이다. 일부 구체예에서, 곤충은 모기이다. 일부 구체예에서, 대상체

는 포유동물 대상체이다. 일부 구체예에서, 포유동물 대상체는 인간 대상체이다. 따라서, 본원에 개시된 방법의 의해 생산된 재조합 폴리펩티드도 본 개시의 범위 내에 있다.

[0115] [0101] 재조합 폴리펩티드를 생산하기 위한 개시된 방법의 비제한적인 예시적인 구체예는 하기 특징 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 본 개시의 재조합 폴리펩티드를 생산하기 위한 방법은 생산된 폴리펩티드를 분리 및/또는 정제하는 것을 추가로 포함한다. 일부 구체예에서, 본 개시의 재조합 폴리펩티드를 생산하기 위한 방법은 반감기를 증가시키기 위해 생산된 폴리펩티드를 구조적으로 변형시키는 것을 추가로 포함한다.

[0116] D. 약학적 조성물

[0117] [0102] 본 개시의 핵산 작제물, 재조합 세포, 재조합 폴리펩티드는 약학적 조성물을 포함하는 조성물에 혼입될 수 있다. 이러한 조성물은 일반적으로 본원에 기술되고 제공되는 핵산 작제물, 재조합 세포, 재조합 폴리펩티드 중 하나 이상과, 담체와 같은 약학적으로 허용되는 부형제를 포함한다. 일부 구체예에서, 본 개시의 조성물은 면역 질환 또는 미생물 감염(예를 들어, 바이러스 감염, 미세진균 감염, 또는 박테리아 감염)과 같은 건강 병태의 예방, 치료, 또는 관리를 위해 제형화된다. 예를 들어, 본 개시의 조성물은 예방적 조성물, 치료적 조성물, 또는 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약학적 조성물, 또는 이들의 혼합물로서 제형화될 수 있다. 일부 구체예에서, 본 개시의 조성물은 백신으로서 사용하기 위해 제형화된다. 일부 구체예에서, 본 출원의 조성물은 애주번트로서 사용하기 위해 제형화된다.

[0118] [0103] 따라서, 일 양태에서, 약학적으로 허용되는 부형제 및 a) 본 개시의 핵산 작제물; b) 본 개시의 재조합 세포; 및/또는 c) 본 개시의 재조합 폴리펩티드를 포함하는 약학적 조성물이 본원에 제공된다.

[0119] [0104] 본 개시의 약학적 조성물의 비제한적인 예시적인 구체예는 하기 특징 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 본원에 개시된 바와 같은 핵산 작제물 및 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 조성물이 본원에 제공된다. 일부 구체예에서, 본원에 개시된 바와 같은 재조합 세포 및 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 조성물이 본원에 제공된다. 일부 구체예에서, 조성물은 본원에 개시된 바와 같은 재조합 폴리펩티드 및 약학적으로 허용되는 부형제를 포함한다.

[0120] [0105] 일부 구체예에서, 본 개시의 핵산 작제물(예를 들어, 벡터 또는 srRNA 분자)은 네이키드 형태로 사용되거나 전달 비히클과 함께 제형화될 수 있다. 본 개시의 조성물 및 방법에 적합한 예시적인 전달 비히클은 전달을 촉진하고/거나 면역 반응을 향상시킬 수 있는 리포솜(예를 들어, 중성 또는 음이온성 리포솜), 미소구체, 면역 자극 복합체(ISCOMS), 지질-기반 나노입자(LNP), 고체 지질 나노입자(SLN), 폴리플렉스(polyplexes), 폴리머 나노입자, 바이러스 레플리콘 입자(VRP), 또는 생물활성 리간드와의 컨쥬게이션을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 이러한 화합물은 당업자에게 용이하게 이용 가능하며; 예를 들어, 문헌[Liposomes: A Practical Approach, RCP New Ed, IRL press (1990)]을 참조한다. 리포솜 이외의 애주번트 등이 또한 사용되며 당 분야에 공지되어 있다. 애주번트는 항원(예를 들어, 핵산 작제물, 벡터, srRNA 분자)을 국소 침착물에 격리시킴으로써 빠른 분산으로부터 이를 보호할 수 있거나, 대식세포 및 면역 시스템의 다른 성분에 대해 화학주성인 인자를 분비하도록 숙주를 자극하는 물질을 함유할 수 있다.

[0121] [0106] 본 개시의 조성물은 이의 의도된 투여 경로에 적합한 포맷, 예를 들어, 리포솜, 지질-기반 나노입자(LNP), 폴리머 나노입자, 폴리플렉스, 바이러스 레플리콘 입자(VRP), 미소구체, 면역 자극 복합체(ISCOM), 생물활성 리간드의 컨쥬게이트, 또는 이들의 임의의 조합으로 제형화될 수 있다. 따라서, 일부 구체예에서, 본 개시의 조성물은 리포솜으로 제형화된다.

[0122] [0107] 일부 구체예에서, 본 개시의 조성물은 지질-기반 나노입자(LNP)로 제형화된다. 본원에 기재된 전달 시스템에 적합한 지질의 예시적인 유형은 양이온성 지질, 이온화 가능한 양이온성 지질, 음이온성 지질, 중성 지질, 및 이들의 조합을 포함한다.

[0123] [0108] 일부 구체예에서, 본 개시의 LNP는 하나 이상의 이온화 가능한 지질을 포함할 수 있다. 본 개시의 조성물 및 방법에 적합한 예시적인 이온화 가능한 지질은 PCT 공보 W02020252589A1 및 W0202100041A1, 및 문헌[Love K.T. et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, Feb. 2, 2010 107 (5) 1864-1869]에 기재된 것들을 포함하며, 이들은 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0124] [0109] 따라서, 일부 구체예에서, 본 개시의 LNP는 문헌[Love K.T. et al., 2010 supra]에 기재된 하나 이상의 지질 화합물, 예를 들어, C16-96, C14-110, 및 C12-200을 포함한다. 일부 구체예에서, LNP는 ALC-0315, C12-200, LN16, MC3, MD1, SM-102, 및 이들의 임의의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된 이온화 가능한 양이온

성 지질을 포함한다. 일부 구체예에서, 본 개시의 LNP는 C12-200을 포함한다.

- [0125] [0110] 일부 구체예에서, 본 개시의 LNP는 하나 이상의 양이온성 지질을 포함한다. 적합한 양이온성 지질은 98N12-5, C12-200, C14-PEG2000, DLin-KC2-DMA(KC2), DLin-MC3-DMA(MC3), XTC, MD1, 및 7C1을 포함하나 이에 제한되지 않는다.
- [0126] [0111] 일부 구체예에서, 본 개시의 LNP는 하나 이상의 중성 지질을 포함한다. 상기 기재된 바와 같이, "구조적 지질" 또는 "헬퍼 지질"로도 공지된 중성 지질이 또한 일부 구체예에서 지질 제형 및 지질 입자에 혼입될 수 있다. 지질 제형 및 지질 입자는 하나 이상의 구조적 지질을 조성물의 약 10 내지 40 Mol%로 포함할 수 있다. 적합한 구조적 지질은 제조 동안 입자의 형성을 지원한다. 구조적 지질은 생리학적 pH에서 음이온성, 비하전성 또는 중성 썬비터이온성 형태로 존재하는 다수의 지질 중 중 임의의 하나를 지칭한다. 대표적인 구조적 지질은 디아실포스파티딜콜린, 디아실포스파티딜에탄올아민, 디아실포스파티딜글리세롤, 세라마이드, 스펡고미엘린, 디하이드로스펙고미엘린, 세팔린, 및 세레브로시드를 포함한다.
- [0127] [0112] 예시적인 구조적 지질은 썬비터이온성 지질, 예를 들어, 디스테아로일포스파티딜콜린(DSPC), 디올레오일포스파티딜콜린(DOPC), 디팔미토일포스파티딜콜린(DPPC), 디올레오일-포스파티딜에탄올아민(DOPE), 팔미토일올레오일포스파티딜콜린(POPC), 팔미토일올레오일-포스파티딜에탄올아민(POPE) 및 디올레오일-포스파티딜에탄올아민 4-(N-말레이미도메틸)-사이클로헥산-1-카르복실레이트(DOPE-mal), 디팔미토일 포스파티딜 에탄올아민(DPPE), 디미리스토일포스포에탄올아민(DMPE), 디스테아로일-포스파티딜에탄올아민(DSPE), 16-0-모노메틸 PE, 16-0-디메틸 PE, 18-1-트랜스 PE, 1-스테아로일-2-올레오일-포스파티딜에탄올 아민(SOPE), 및 1,2-디엘라이도일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(트랜스 DOPE)을 포함한다.
- [0128] [0113] 또 다른 구체예에서, 구조적 지질은 생리학적 pH에서 음으로 하전된 임의의 지질일 수 있다. 이러한 지질은 포스파티딜글리세롤, 예를 들어, 디올레오일포스파티딜글리세롤(DOPG), 디팔미토일포스파티딜글리세롤(DPPG), 팔미토일올레이올포스파티딜글리세롤(POPG), 카디오리핀, 포스파티딜이노시톨, 디아실포스파티딜세린, 디아실포스파티드산, 및 중성 지질에 결합된 다른 음이온성 변형 기를 포함한다. 다른 적합한 구조적 지질은 당 지질(예를 들어, 모노시알로강글리오시드 GM1)을 포함한다.
- [0129] [0114] 본 개시의 조성물 및 방법에 적합한 비제한적인 중성 지질은 DPSC, DPPC, POPC, DOPE, 및 SM을 포함한다. 일부 구체예에서, 본 개시의 LNP는 PCT 공보 WO2020252589A1 및 WO2021000041A1에 기재된 하나 이상의 이온화 가능한 지질 화합물을 포함하며, 이들은 전문이 본원에 참조로 포함된다.
- [0130] [0115] 일부 구체예에서, 본 개시의 LNP는 C12-200, C14-PEG2000, DOPE, DMG-PEG2000, DSPC, DOTMA, DOSPA, DOTAP, DMRIE, DC-콜레스테롤, DOTAP-콜레스테롤, GAP-DMORIE-DPyPE, 및 GL67A-DOPE-DMPE-폴리에틸렌 글리콜(PEG)로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 지질을 포함한다.
- [0131] [0116] 본원에 개시된 전달 시스템이 LNP를 포함하는 일부 구체예에서, LNP 전달 시스템에서 지질 대 핵산의 질량비는 약 100:1 내지 약 3:1, 약 70:1 내지 10:1, 또는 16:1 내지 4:1이다. 일부 구체예에서, LNP 전달 시스템에서 지질 대 핵산의 질량비는 약 16:1 내지 4:1이다. 일부 구체예에서, LNP 전달 시스템에서 지질 대 핵산의 질량비는 약 20:1이다. 일부 구체예에서, LNP 전달 시스템에서 지질 대 핵산의 질량비는 약 8:1이다. 일부 구체예에서, 지질-기반 나노입자(LNP)는 약 1000 nm, 약 500 nm, 약 250 nm, 약 200 nm, 약 150 nm, 약 100 nm, 약 75 nm, 약 50 nm, 또는 약 25 nm 미만의 평균 직경을 갖는다. 일부 구체예에서, LNP는 약 70 nm 내지 100 nm 범위의 평균 직경을 갖는다. 일부 구체예에서, LNP는 약 88 nm 내지 약 92 nm, 82 nm 내지 약 86 nm, 또는 약 80 nm 내지 약 95 nm 범위의 평균 직경을 갖는다.
- [0132] [0117] 안정화제는 혼합물의 무결성을 보장하기 위해 지질 제형 구체예에 포함될 수 있다. 안정화제는 분자 사이의 소수성-친수성 상호작용을 파괴하거나 형성하는 것을 돕는 분자의 부류이다. 적합한 안정화제는 폴리소르베이트 80(Tween 80으로도 공지됨, IUPAC 명칭 2-[2-[3,4-비스(2-하이드록시에톡시)옥솔란-2-일]-2-(2-하이드록시에톡시)에톡시]에틸 옥타텍-9-에노에이트), Myrj52(폴리옥시에틸렌(40) 스테아레이트), 및 Brij™ S10(폴리옥시에틸렌(10) 스테아릴 에테르)를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 폴리에틸렌 글리콜 컨쥬게이션된 지질이 또한 사용될 수 있다. 안정화제는 단독으로 또는 서로 조합하여 사용될 수 있다.
- [0133] [0118] 일부 구체예에서, 안정화제는 전체 지질 혼합물의 약 0.1 내지 3 Mol%를 포함한다. 일부 구체예에서, 안정화제는 전체 지질 혼합물의 약 0.5 내지 2.5 Mol%를 포함한다. 일부 구체예에서, 안정화제는 2.5 Mol%를 초과하여 존재한다. 일부 구체예에서, 안정화제는 5 Mol%로 존재한다. 일부 구체예에서, 안정화제는 10 Mol%로 존재한다. 일부 구체예에서, 안정화제는 약 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7,

1.8, 1.9, 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5 등이다. 다른 구체예에서, 안정화제는 지질 혼합물의 2.6-10 Mol%이다. 다른 구체예에서, 안정화제는 지질 혼합물의 10 Mol%를 초과하여 존재한다.

[0134] [0119] 스테로이드는 또한 특정 적용을 위해 지질 조성물에 포함될 수 있고, 이로부터 제조된 지질 입자는 콜레스테롤 및 피토스테롤과 같은 스테롤을 포함한다.

[0135] [0120] 일부 구체예에서, 본 개시의 조성물은 폴리머 나노입자로 제형화된다. 본 개시의 조성물 및 방법에 적합한 폴리머의 예는 본원에 참조로 포함된 문헌[Jiang X et al. (*Polymeric nanoparticles for RNA delivery*. Encyclopedia of Nanomaterials, 2021)]에서 찾을 수 있다. 본 개시의 조성물 및 방법에 적합한 예시적인 폴리머는 양이온성 폴리머, 비양이온성 폴리머, 및 이들의 조합을 포함한다. 일부 구체예에서, 본 개시의 폴리머 나노입자는 천연-유래 양이온성 폴리머를 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 천연-유래 양이온성 폴리머는 키토산, 젤라틴, 텍스트란, 셀룰로스, 사이클로텍스트린, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 양이온성 폴리머는 합성 양이온성 폴리머일 수 있다. 일부 구체예에서, 합성 양이온성 폴리머는 폴리에틸렌아민(PEI), 폴리-L-리신(PLL), 폴리(아미노산)(PAA), 폴리(아미도아민)(PAMAM), 폴리(아미노-코-에스테르)(PAE), 폴리(2-N,N-디메틸아미노에틸메타크릴레이트), 폴리(베타-아미노 에스테르)(PBAE), 이미다졸-함유 폴리머, 3차-아민 함유 폴리머, 폴리(2-(디메틸아미노)에틸 메타크릴레이트), 폴리-N-(2-하이드록시-프로필)메타크릴아미드, 폴리아미도아민 덴드리머, 양이온성 글리코폴리머, 또는 이들의 유도체를 포함할 수 있다.

[0136] [0121] 일부 구체예에서, 비양이온성 폴리머는 음으로 하전되거나(즉, 음이온성) 전자적으로 중성이다. 일부 구체예에서, 비양이온성 폴리머는 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 폴리에스테르(예를 들어, 폴리락트산(PLA), 폴리(락트산-코-글리콜산)(PLGA), 폴리 글리콜산(PGA), 폴리카프로락톤(PCL), 및 폴리사르코신(pSar), 또는 이들의 유도체를 포함한다.

[0137] [0122] 일부 구체예에서, 폴리머는 수용성 및/또는 생분해성일 수 있다. 일부 구체예에서, 폴리머 나노입자는 하기 중 하나 이상을 포함한다: 폴리-(?-L-글루타밀글루타민)(PGGA), 폴리-(?-L-아스파르트글루타민)(PGAA), 폴리-L-락트산(PLLA), 폴리-(락트산-코-글리콜산)(PLGA), 폴리알킬시아노아크릴레이트(PACA), 폴리안하이드라이드, 폴리하이드록시산, 폴리프로필무페레이트, 폴리아미드, 폴리아세탈, 폴리에테르, 폴리에스테르, 폴리(오르토에스테르), 폴리시아노아크릴레이트, [N-(2-하이드록시프로필)메타크릴아미드](HPMA) 코폴리머, 폴리비닐 알코올, 폴리우레탄, 폴리포스파젠, 폴리아크릴레이트, 폴리우레아, 폴리아민 폴리엡실론-카프로락톤(PCL), 및 이들의 코폴리머.

[0138] [0123] 일부 구체예에서, 조성물은 면역원성 조성물, 예를 들어, 대상체에서 면역 반응을 자극할 수 있는 조성물이다. 일부 구체예에서, 면역원성 조성물은 백신으로서 제형화된다. 일부 구체예에서, 약학적 조성물은 애주변트로서 제형화된다.

[0139] [0124] 일부 구체예에서, 면역원성 조성물은 생물치료제, 예를 들어, 생물활성을 갖는 다양한 분자의 유전자 전달을 위한 비히클로서 제형화된다. 생물치료제의 비제한적인 예는 사이토카인, 케모카인, 및 다른 가용성 면역조절제, 효소, 펩티드 및 단백질 효능제, 펩티드 및 단백질 길항제, 호르몬, 수용체, 항체 및 항체-유도체, 성장 인자, 전사 인자, 및 유전자 침묵/편집 분자를 포함한다. 일부 구체예에서, 약학적 조성물은 애주변트로서 제형화된다.

[0140] [0125] 일부 구체예에서, 면역원성 조성물은 실질적으로 비면역원성이거나 최소 면역원성이다(예를 들어, 대상체에서 면역 반응을 최소로 자극하는 조성물). 일부 구체예에서, 비면역원성 또는 최소 면역원성 조성물은 생물치료제로서 제형화된다. 일부 구체예에서, 약학적 조성물은 비강내 투여, 경피 투여, 경막내 투여, 복강내 투여, 근육내 투여, 기관내 투여, 결절내 투여, 종양내 투여, 관절내 투여, 정맥내 투여, 피하 투여, 질내 투여, 안내 투여, 직장 투여, 및 경구 투여 중 하나 이상을 위해 제형화된다.

[0141] [0126] 주사용으로 적합한 약학적 조성물은 멸균 수용액 또는 분산액 및 멸균 주사용 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 멸균 분말을 포함한다. 정맥내 투여를 위해, 적합한 담체는 생리 식염수, 정균수, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, N.J.), 또는 인산염 완충 염수(PBS)를 포함한다. 이러한 경우, 조성물은 멸균되어야 하고 쉽게 주사할 수 있을 정도로 유동적이어야 한다. 이는 제조 및 저장 조건 하에 안정적일 수 있고, 미생물, 예를 들어, 박테리아 및 진균의 오염 작용에 대해 보존될 수 있다. 담체는, 예를 들어, 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등) 및 이들의 적합한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 적절한 유동성은, 예를 들어, 레시틴과 같은 코팅제의 사용에 의해, 분산액의 경우 요구되는 입자 크기의 유지에 의해, 그리고 소듐 도데실 설페이트와 같은 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수

있다. 미생물 작용의 예방은 다양한 항박테리아제 및 항진균제, 예를 들어, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 아스코르브산, 티메로살 등에 의해 달성될 수 있다. 많은 경우에, 조성물에 등장제, 예를 들어, 당, 폴리알코올, 예를 들어, 만니톨, 소르비톨, 및/또는 소듐 클로라이드를 포함시키는 것이 일반적일 것이다. 주사용 조성물의 연장된 흡수는 조성물 내에 흡수를 지연시키는 제제, 예를 들어, 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴을 포함시킴으로써 발생될 수 있다.

[0142] [0127] 멸균 주사용 용액은 필요에 따라 상기 열거된 성분 중 하나 또는 성분의 조합과 함께 적절한 용매 중에 필요량의 활성 화합물을 혼입시킨 다음, 여과 멸균하여 제조될 수 있다. 일반적으로, 분산액은 기본 분산 매질 및 상기 열거된 것들로부터의 필요한 다른 성분을 함유하는 멸균 비히클에 활성 화합물을 혼입시킴으로써 제조된다.

[0143] [0128] 일부 구체예에서, 본 개시의 약학적 조성물은 에어로졸, 스프레이, 미스트, 액체, 또는 분말과 같은 흡입용으로 제형화된다. 흡입에 의한 투여는 건조 분말 또는 에어로졸 제형의 형태일 수 있고, 이는 흡입 장치, 예를 들어, 마이크로스프레이, 가압 계량 용량 흡입기, 또는 분무기의 사용을 통해 대상체(예를 들어, 환자)에 의해 흡입된다.

[0144] [0129] 일부 구체예에서, 조성물은 비강내 투여, 경막내 투여, 경피 투여, 근육내 투여, 결절내 투여, 정맥내 투여, 복강내 투여, 경구 투여, 질내, 또는 두개내 투여 중 하나 이상을 위해 제형화된다. 일부 구체예에서, 투여된 조성물은 대상체에서 인터페론의 생산을 증가시킨다. 일부 구체예에서, 투여된 조성물은 대상체에서 하나 이상의 전염증성 분자의 생산을 유도한다. 일부 구체예에서, 하나 이상의 전염증성 분자는 인터페론 감마($IFN\gamma$), 사이토카인, $TNF-\alpha$, GM-CSF, 및 $MIP1\alpha$, 그랜자임 B, 그랜자임 A, 퍼포린, 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다.

[0145] 개시의 방법

[0146] [0130] 본원에 기재된 치료 조성물 중 어느 하나, 예를 들어, 핵산 작제물, 재조합 세포, 재조합 폴리펩티드, 및/또는 약학적 조성물의 투여는 관련 건강 상태, 예를 들어, 증식성 장애(예를 들어, 암), 감염성 질환(예를 들어, 급성 감염, 만성 감염, 또는 바이러스 감염), 희귀 질환, 및/또는 자가면역 질환, 및/또는 염증성 질환의 치료에 사용될 수 있다. 일부 구체예에서, 본원에 기재된 바와 같은 핵산 작제물, 재조합 세포, 재조합 폴리펩티드, 및/또는 약학적 조성물은 이를 필요로 하는 대상체에서 약력학적 효과를 조절, 예를 들어, 유도 또는 억제하는데 유용할 수 있다. 일부 구체예에서, 약력학적 효과는 대상체에서 면역 반응을 유발하는 것을 포함한다. 약력학적 효과의 비제한적인 예는 면역원성 효과, 바이오마커 반응, 치료 효과, 예방 효과, 요망되는 효과, 바람직하지 않은 효과, 부작용, 및 질병 모델에서의 효과를 포함한다. 따라서, 본 개시의 일 양태는 약력학적 효과의 조절을 필요로 하는 대상체에서 약력학적 효과를 조절하기 위한 방법에 관한 것이고, 상기 방법은 (a) 본원에 기재된 바와 같은 핵산 작제물; (c) 본원에 기재된 바와 같은 재조합 세포; (c) 본원에 기재된 바와 같은 재조합 폴리펩티드; 및 (d) 본원에 기재된 바와 같은 약학적 조성물 중 하나 이상을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 약력학적 효과는 면역원성 효과, 바이오마커 반응, 치료 효과, 예방 효과, 요망되는 효과, 바람직하지 않은 효과, 부작용, 및 질병 모델에서의 효과 중 하나 이상을 포함한다.

[0147] [0131] 일부 구체예에서, 본원에 기재된 바와 같은 핵산 작제물, 재조합 세포, 재조합 폴리펩티드, 및/또는 약학적 조성물은 하나 이상의 관련 건강 상태 또는 질병을 갖거나, 갖는 것으로 의심되거나, 발병 위험이 높을 수 있는 대상체를 치료하는 방법에 사용하기 위해 치료제에 혼입될 수 있다. 따라서, 또 다른 양태에서, 대상체에서 건강 상태를 예방하거나 치료하기 위한 방법이 본원에 제공되고, 상기 방법은 (a) 본원에 기재된 바와 같은 자가-복제 RNA 작제물; (b) 본원에 기재된 바와 같은 핵산; (c) 본원에 기재된 바와 같은 재조합 세포; 및 (d) 본원에 기재된 바와 같은 약학적 조성물 중 하나 이상을 포함하는 조성물을 대상체에게 예방적으로 또는 치료적으로 투여하는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 투여된 조성물은 대상체에서 면역 반응을 유발한다. 일부 구체예에서, 투여된 조성물은 대상체에서 하나 이상의 전염증성 분자의 생산을 유도한다. 일부 구체예에서, 하나 이상의 전염증성 분자는 인터페론 감마($IFN\gamma$), 사이토카인, $TNF-\alpha$, GM-CSF, 및 $MIP1\alpha$, 그랜자임 B, 그랜자임 A, 퍼포린, 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다. 일부 구체예에서, 대상체는 이전에 하나 이상의 요법으로 치료된 적이 있고 상기 하나 이상의 요법에 대해 적어도 부분적인 내성이 발달하였다.

[0148] [0132] 예시적인 건강 상태 또는 질병은 암, 면역 질환, 자가면역 질환, 염증성 질환, 유전자 요법, 유전자 대체, 심혈관 질환, 연령-관련 병리, 희귀 질환, 급성 감염, 및 만성 감염을 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 일부 구체예에서, 대상체는 의사의 진료를 받는 환자이다.

- [0149] [0133] 본 개시의 방법에 적합한 자가면역 질환의 예는 류마티스 관절염, 골관절염, 스틸병, 가족성 지중해열, 전신 경화증, 다발성 경화증, 강직성 척추염, 하시모토 갑상선증, 전신 홍반성 루푸스, 쇼그렌 증후군, 당뇨병성 망막병증, 당뇨병성 혈관병증, 당뇨병성 신경통, 췌도염, 건선, 원형 탈모증, 온냉 자가면역 용혈성 빈혈(AIHA), 악성 빈혈, 급성 염증 질환, 자가면역 부신염, 만성 염증성 탈수초 다발신경병증(CIDP), 람버트-이튼 증후군, 태선 경화증, 라임병, 그레이브스병, 베체트병, 메니에르병, 반응성 관절염(라이터 증후군), 처그-스트라우스 증후군, 코간 증후군, CREST 증후군, 보통 천포창 및 낙엽 천포창, 물집유사 천포창, 다발근육통증, 다발근육염, 원발성 담관 간경화증, 췌장염, 복막염, 건선성 관절염, 류마티스열, 사르코이드증, 쇼르겐센 증후군(Sjorgensen syndrome), 경피증, 복강병, 강직 증후군, 타카야수 동맥염, 일과성 글루텐 불내증, 자가면역 포도막염, 백반증, 다발연골염, 포진피부염(DH) 또는 듀링병, 섬유근육통, 굿파스처 증후군, 길랭-바레 증후군, 하시모토 갑상선염, 자가면역 간염, 염증성 장 질환(IBD), 크론병, 궤양성 대장염, 중증 근무력증, 면역 복합 장애, 사구체신염, 결절 다발동맥염, 항-인지질 증후군, 다분비선 자가면역 증후군, 특발성 폐 섬유증, 특발성 저혈소판 자색반병(IT), 두드러기, 자가면역 불임, 청소년 류마티스 관절염, 사르코이드증, 및 자가면역 심근병증을 포함하나 이에 제한되지 않는다.
- [0150] [0134] 본 개시의 방법에 적합한 감염의 비제한적인 예는 바이러스, 예를 들어, 인간 면역결핍 바이러스(HIV), B형 간염 바이러스(HBV), B형 간염 바이러스(HCV), 사이토메갈로바이러스(CMV), 호흡기 세포융합 바이러스(RSV), 인유두종바이러스(HPV), 엡스타인-바 바이러스(EBV), 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2(SARS-CoV2), 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스(SARS-CoV), 중동 호흡기 증후군(MERS), 인플루엔자 바이러스, 및 에볼라 바이러스에 의한 감염을 포함한다. 본 개시의 방법에 적합한 추가적인 감염은 세포내 기생충, 예를 들어, 리슈마니아(*Leishmania*), 리케차(*Rickettsia*), 클라미디아(*Chlamydia*), 콕시엘라(*Coxiella*), 플라즈모디움(*Plasmodium*), 브루셀라(*Brucella*), 마이코박테리아, 리스테리아(*Listeria*), 톡소플라스마(*Toxoplasma*) 및 트리파노소마(*Trypanosoma*)에 의한 감염을 포함한다. 일부 구체예에서, 레플리콘 작제물, srRNA 작제물, 핵산 작제물, 재조합 세포, 및/또는 약학적 조성물은 면역 질환, 자가면역 질환, 또는 염증성 질환, 예를 들어, 이를 테면, 사구체신염, 염증성 장 질환, 신염, 복막염, 건선성 관절염, 골관절염, 스틸병, 가족성 지중해열, 전신 경피증 및 경화증, 염증성 장 질환(IBD), 크론병, 궤양성 대장염, 급성 폐 손상, 수막염, 뇌염, 포도막염, 다발성 골수종, 사구체신염, 신염, 천식, 죽상동맥경화증, 백혈구 부착 결핍, 다발성 경화증, 레이노 증후군, 쇼그렌 증후군, 소아 발병 당뇨병, 라이터병, 베체트병, 면역 복합 신염, IgA 신장병증, IgM 다발신경병증, 면역-매개 저혈소판증, 중증 근무력증, 루푸스 신염, 홍반성 루푸스, 류마티스 관절염(RA), 강직성 척추염, 천포창, 그레이브스병, 하시모토 갑상선염, 소혈관 혈관염, 오피스 증후군, 만성 신부전, 자가면역 갑상선 질환, 급성 감염성 단핵구증, HIV, 헤르페스 바이러스 관련 질병, 인간 바이러스 감염, 코로나바이러스, 다른 엔테로바이러스, 헤르페스 바이러스, 인플루엔자 바이러스, 파라인플루엔자 바이러스, 호흡기 세포융합 바이러스 또는 아데노바이러스 감염, 박테리아 패혈, 상처, 패혈증, 뇌졸중/뇌부종, 허혈-재관류 손상, 및 C형 간염의 치료 및/또는 예방에 유용할 수 있다.
- [0151] [0135] 본 개시의 방법에 적합한 염증성 질환의 비제한적인 예는 천식, 염증성 장 질환(IBD), 만성 대장염, 비장비대, 및 류마티스 관절염과 같은 염증성 질환을 포함한다.
- [0152] [0136] 일부 구체예에서, 건강 상태는 증식성 장애 또는 미생물 감염(예를 들어, 박테리아 감염, 미세진균 감염, 또는 바이러스 감염)이다. 일부 구체예에서, 대상체는 증식성 장애 또는 미생물 감염(예를 들어, 박테리아 감염, 미세진균 감염, 또는 바이러스 감염)과 관련된 병태를 갖거나 갖는 것으로 의심된다.
- [0153] [0137] 일부 구체예에서, 건강 상태는 희귀 질환, 예를 들어, The Orphan Drug Act(www.fda.gov/patients/rare-diseases-fda)에 의해 정의된 바와 같이, 미국에서 200,000명 미만의 사람들에게 영향을 미치는 질환 또는 병태 및/또는 염증성 장애 및/또는 자가면역 장애이다. 일부 구체예에서, 대상체는 염증성 장애 및/또는 자가면역 장애 및/또는 희귀 질환(예를 들어, 가족성 지중해열 또는 성인 발병 스틸병을 포함하나 이에 제한되지 않음)과 관련된 병태를 갖거나 갖는 것으로 의심된다.
- [0154] [0138] 일부 구체예에서, 개시된 조성물은 이의 의도된 투여 경로에 적합하도록 제형화된다. 예를 들어, 본 개시의 핵산 작제물(예를 들어, 레플리콘 작제물, 예를 들어, srRNA 작제물), 재조합 세포, 재조합 폴리펩티드, 및/또는 약학적 조성물은 경구 또는 흡입에 의해 제공될 수 있지만, 비경구 경로를 통해 투여될 가능성이 더 높다. 비경구 투여 경로의 예는, 예를 들어, 근육내, 종양내, 안내, 정맥내, 결절내, 피내, 피하, 경피(국소), 경점막, 질내, 및 직장 투여를 포함한다. 일부 구체예에서, 조성물은 근육내 투여된다. 일부 구체예에서, 조성물은 종양내 투여된다. 비경구 적용에 사용되는 용액 또는 현탁액은 다음 성분을 포함할 수 있다: 주사용수, 식염수, 고정유, 폴리에틸렌 글리콜, 글리세린, 프로필렌 글리콜 또는 다른 합성 용매와 같은 멸균 희석제; 벤질 알

코울 또는 메틸 파라벤과 같은 항박테리아제; 아스코르브산 또는 소듐 바이셀파이트와 같은 항산화제; 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA)과 같은 킬레이트제; 아세테이트, 시트레이트, 포스페이트, 트리스, 수크로스와 같은 완충제, 및 소듐 클로라이드 또는 텍스트로스와 같은 긴장성 조정제. pH는 일염기성 및/또는 이염기성 소듐 포스페이트, 염산 또는 소듐 하이드록사이드와 같은 산 또는 염기로 조정될 수 있다(예를 들어, pH 약 7.2-7.8, 예를 들어, 7.5). 비경구 제제물은 앰플, 일회용 주사기 또는 유리 또는 플라스틱으로 제조된 다회 용량 바이알에 포함될 수 있다.

[0155] [0139] 본 개시의 이러한 대상 핵산 작제물, 재조합 세포, 재조합 폴리펩티드, 및/또는 약학적 조성물의 투여량, 독성 및 치료 효능은, 예를 들어, LD₅₀(집단의 50%에게 치사적인 용량) 및 ED₅₀(집단의 50%에서 치료적으로 효과적인 용량)을 결정하기 위한 세포 배양물 또는 실험 동물에서의 표준 약학적 절차에 의해 결정될 수 있다. 독성 효과와 치료 효과 사이의 용량 비율이 치료 지수이며, 이는 LD₅₀/ED₅₀ 비율로 표현될 수 있다. 높은 치료 지수를 나타내는 화합물이 일반적으로 적합하다. 독성 부작용을 나타내는 화합물이 사용될 수 있지만, 감염되지 않은 세포에 대한 잠재적인 손상을 최소화하여 부작용을 감소시키기 위해 이러한 화합물을 감염된 조직 부위로 표적화하는 전달 시스템을 설계하는데 주의를 기울여야 한다.

[0156] [0140] 예를 들어, 세포 배양 검정 및 동물 연구로부터 수득된 데이터는 인간에게 사용하기 위한 투여량 범위를 공식화하는데 사용될 수 있다. 이러한 화합물의 투여량은 일반적으로 독성이 거의 또는 전혀 없는 ED₅₀을 포함하는 순환 농도 범위 내에 있다. 투여량은 사용된 투여 형태 및 사용된 투여 경로에 따라 이 범위 내에서 달라질 수 있다. 본 개시의 방법에 사용된 임의의 화합물에 대해, 치료적 유효 용량은 초기에 세포 배양 검정으로부터 추정될 수 있다. 용량은 세포 배양물에서 결정된 바와 같은 IC₅₀(예를 들어, 증상의 절반-최대 억제를 달성하는 시험 화합물의 농도)을 포함하는 순환 혈장 농도 범위를 달성하도록 동물 모델에서 공식화될 수 있다. 이러한 정보는 인간에서 유용한 용량을 보다 정확하게 결정하는데 사용될 수 있다. 혈장 수준은, 예를 들어, 고정능 액체 크로마토그래피에 의해 측정될 수 있다.

[0157] [0141] 본원에 기재된 치료 조성물, 예를 들어, 핵산 작제물, 예를 들어, srRNA 작제물, 재조합 세포, 재조합 폴리펩티드, 및/또는 약학적 조성물은 1일 1회 이상 내지 주 1회 이상(격일로 1회 포함)으로 투여될 수 있다. 당업자는 질병의 중증도, 이전 치료, 대상체의 전반적인 건강 상태 및/또는 연령, 및 존재하는 다른 질병을 포함하나 이에 제한되지는 않는 특정 요인이 대상체를 효과적으로 치료하는데 필요한 투여량 및 시기에 영향을 미칠 수 있음을 인지할 것이다. 또한, 치료적 유효량의 본 개시의 해당 다가 폴리펩티드 및 다가 항체로 대상체를 치료하는 것은 단일 치료를 포함할 수 있거나, 일련의 치료를 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 조성물은 5일 동안 8시간마다 투여된 후, 2 내지 14일, 예를 들어, 9일의 휴지 기간을 두고, 이어서 추가 5일 동안 8시간마다 투여될 수 있다. 핵산 작제물(예를 들어, 레플리콘 작제물, 예를 들어, srRNA 작제물) 및 재조합 폴리펩티드와 관련하여, 본 개시의 핵산 작제물 또는 재조합 폴리펩티드의 치료적 유효량(예를 들어, 유효 투여량)은 선택된 핵산 작제물 또는 재조합 폴리펩티드에 의존한다. 일부 경우에, 약 0.001 내지 0.1 mg/환자 체중 kg 범위의 단일 용량이 투여될 수 있다. 일부 구체예에서, 약 0.005, 0.01, 0.05 mg/kg이 투여될 수 있다. 일부 구체예에서, 약 0.03 µg 내지 300 µg/환자 체중 kg 범위의 단일 용량이 투여될 수 있다. 일부 구체예에서, 약 0.3 mg 내지 3 mg/환자 체중 kg 범위의 단일 용량이 투여될 수 있다.

[0158] [0142] 상기 논의된 바와 같이, 치료적 유효량은 질병 또는 감염과 같은 건강 병태를 갖거나, 갖는 것으로 의심되거나, 가질 위험이 있는 대상체에 투여될 때 특정 효과를 촉진하기에 충분한 치료 조성물의 양을 포함한다. 일부 구체예에서, 유효량은 질병 또는 감염의 증상 발생을 예방 또는 지연시키거나, 질병 또는 감염의 증상 진행을 변경시키거나(예를 들어, 비제한적으로, 질병 또는 감염의 증상 진행을 늦추는 것), 또는 질병 또는 감염의 증상을 역전시키기에 충분한 양을 포함한다. 임의의 주어진 경우에 대해, 적절한 유효량은 일상적인 실험을 사용하여 당업자에 의해 결정될 수 있음이 이해된다.

[0159] [0143] 질병 또는 감염의 치료를 위한 개시된 치료 조성물을 포함하는 치료의 효능은 숙련된 임상의학에 의해 결정될 수 있다. 그러나, 치료는 질병 또는 감염의 징후 또는 증상 중 적어도 임의의 하나 또는 전부가 개선되거나 완화되는 경우 효과적인 것으로 간주된다. 효능은 또한 입원 또는 의학적 개입의 필요성(예를 들어, 질병 또는 감염의 진행이 중단되거나 적어도 느려짐)에 의해 평가되는 바와 같이 개체가 악화되지 않는 것으로 측정될 수 있다. 이들 지표를 측정하는 방법은 당업자에게 공지되어 있고/거나 본원에 기재되어 있다. 치료는 대상체 또는 동물(일부 비제한적인 예는 인간 또는 포유동물을 포함함)의 질병 또는 감염의 임의의 치료를 포함하고, (1) 질병 또는 감염의 억제, 예를 들어, 증상의 진행을 저지시키거나 늦추는 것; 또는 (2) 질병 또는 감염의 경감, 예를 들어, 증상의 퇴행을 야기하는 것; 및 (3) 증상 발생의 가능성을 예방하거나 감소시키는 것을 포함한다.

다.

- [0160] [0144] 일부 구체예에서, 본 개시의 핵산 작제물(예를 들어, 레플리콘 작제물, 예를 들어, srRNA 작제물), 재조합 세포, 재조합 폴리펩티드, 및/또는 약학적 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 갖는 조성물로 면역 반응을 자극하기에 효과적인 양으로 대상체에게 투여될 수 있다. 일반적으로, 대상체는 초기 일련의 주사(또는 아래에 설명된 다른 경로 중 하나를 통한 투여)를 통해 면역화되고 후속하여 원래 일련의 투여에 의해 제공된 보호를 증가시키기 위해 부스터가 제공될 수 있다. 초기 일련의 주사 및 후속 부스터는 대상체에서 면역 반응을 자극하는데 필요한 대로 이러한 용량 및 기간에 걸쳐 투여된다. 일부 구체예에서, 투여된 조성물은 대상체에서 인터페론의 생산을 증가시킨다. 개시된 방법의 일부 구체예에서, 대상체는 포유동물이다. 일부 구체예에서, 포유동물은 인간 대상체이다.
- [0161] [0145] 상기 기재된 바와 같이, 주사용으로 적합한 약학적으로 허용되는 담체는 멸균 수용액(수용성인 경우) 또는 분산액 및 멸균 주사액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 멸균 분말을 포함한다. 이러한 경우, 조성물은 멸균되어야 하고 쉽게 주사할 수 있을 정도로 유동적이어야 한다. 조성물은 제조 및 저장 조건 하에 더 안정적이어야 하고, 미생물, 예를 들어, 박테리아 및 진균의 오염 작용에 대해 보존되어야 한다. 담체는, 예를 들어, 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 이들의 적합한 혼합물, 및 식물성 오일을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 적절한 유동성은, 예를 들어, 코팅제, 예를 들어, 레시틴의 사용에 의해, 분산액의 경우 필요한 입자 크기의 유지에 의해, 그리고 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 미생물 작용의 예방은 다양한 항박테리아제 및 항진균제, 예를 들어, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 아스코르브산, 티메로살 등에 의해 달성될 수 있다.
- [0162] [0146] 멸균 주사용 용액은 필요에 따라 상기 열거된 성분 중 하나 또는 조합과 함께 적절한 용매 중에 필요량의 핵산 작제물, 재조합 세포 및/또는 재조합 폴리펩티드를 혼입시킨 다음, 여과 멸균하여 제조될 수 있다.
- [0163] [0147] 핵산 작제물, 재조합 세포, 재조합 폴리펩티드, 및/또는 약학적 조성물이 상기 기재된 바와 같이 적절하게 보호되는 경우, 이들은, 예를 들어, 불활성 희석제 또는 동화 가능한 식용 담체와 함께 경구 투여될 수 있다. 핵산 작제물, 재조합 세포, 재조합 폴리펩티드, 및/또는 약학적 조성물 및 다른 성분은 또한 경질 또는 연질 셀 젤라틴 캡슐에 봉입되거나, 정제로 압축되거나, 개체의 식이에 직접 혼입될 수 있다. 경구 치료 투여를 위해, 활성 화합물은 부형제와 함께 혼입될 수 있고, 섭취 가능한 정제, 협측 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭시르, 현탁액, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 사용될 수 있다.
- [0164] [0148] 일부 구체예에서, 본 개시의 핵산 작제물 및 재조합 폴리펩티드는 지질-기반 나노입자(LNP)에 의해 세포 또는 대상체에 전달될 수 있다. LNP는 일반적으로 바이러스 입자보다 덜 면역원성이다. 많은 인간은 바이러스 입자에 대한 기존 면역을 갖지만 LNP에 대한 기존 면역은 존재하지 않는다. 또한, LNP에 대한 적응성 면역 반응이 발생하지 않아 LNP의 반복 투여가 가능할 수 있다.
- [0165] [0149] LNP에 사용하기 위해 여러 상이한 이온화 가능한 양이온성 지질이 개발되었다. 이들은 특히 C12-200, MC3, LN16, 및 MD1을 포함한다. 예를 들어, 한 유형의 LNP에서, GalNAc 모이어티는 LNP의 외부에 부착되고 아시알로당단백질 수용체를 통해 간으로의 흡수를 위한 리간드로서 작용한다. 임의의 이러한 양이온성 지질은 본 개시의 핵산 작제물 및 재조합 폴리펩티드를 간에 전달하기 위해 LNP를 제형화하는데 사용될 수 있다.
- [0166] [0150] 일부 구체예에서, LNP는 1000 nm, 500 nm, 250 nm, 200 nm, 150 nm, 100 nm, 75 nm, 50 nm, 또는 25 nm 미만의 직경을 갖는 임의의 입자를 지칭한다. 대안적으로, 나노입자는 1-1000 nm, 1-500 nm, 1-250 nm, 25-200 nm, 25-100 nm, 35-75 nm, 또는 25-60 nm의 크기 범위일 수 있다.
- [0167] [0151] LNP는 양이온성, 음이온성, 또는 중성 지질로부터 제조될 수 있다. 푸소제닉 인지질 DOPE 또는 막 성분 콜레스테롤과 같은 중성 지질은 트랜스펙션 활성 및 나노입자 안정성을 향상시키기 위해 '헬퍼 지질'로서 LNP에 포함될 수 있다. 양이온성 지질의 한계는 낮은 안정성 및 빠른 제거로 인한 낮은 효능 뿐만 아니라 염증 또는 항염증 반응의 발생을 포함한다. LNP는 또한 소수성 지질, 친수성 지질, 또는 소수성과 친수성 지질 둘 모두를 가질 수 있다.
- [0168] [0152] 당 분야에 공지된 다수의 지질 또는 지질의 조합이 LNP를 생산하는데 사용될 수 있다. LNP를 생산하는데 사용하기에 적합한 지질의 비제한적인 예는 DOTMA, DOSPA, DOTAP, DMRIE, DC-콜레스테롤, DOTAP-콜레스테롤, GAP-DMORIE-DPyPE, 및 GL67A-DOPE-DMPE-폴리에틸렌 글리콜(PEG)을 포함한다. 양이온성 지질의 비제한적인 예는 98N12-5, C12-200, Dlin-KC2-DMA(KC2), Dlin-MC3-DMA(MC3), XTC, MD1, 및 7C1을 포함한다. 중성 지질의 비제한적인 예는 DPSC, DPPC, POPC, DOPE, 및 SM을 포함한다. PEG-변형된 지질의 비제한적인 예는

PEG-DMG, PEG-CerC14, 및 PEG-CerC20을 포함한다.

- [0169] [0153] 일부 구체예에서, 지질은 LNP를 생산하기 위해 임의의 수의 물비로 조합될 수 있다. 또한, 폴리뉴클레오티드(들)는 LNP를 생산하기 위해 광범위한 물비로 지질(들)과 조합될 수 있다.
- [0170] [0154] 일부 구체예에서, 본원에 기재된 치료 조성물, 예를 들어, 핵산 작제물, 재조합 세포, 재조합 폴리펩티드, 및/또는 약학적 조성물은 암, 자가면역 질환, 및/또는 감염을 갖거나, 갖는 것으로 의심되거나, 발병 위험이 높을 수 있는 대상체를 예방하거나 치료하는 방법에 사용하기 위해 치료 조성물에 혼입된다.
- [0171] [0155] 일부 구체예에서, 본원에 기재된 치료 조성물, 예를 들어, 핵산 작제물, 재조합 세포, 재조합 폴리펩티드, 및/또는 약학적 조성물은 미생물 감염을 갖거나, 갖는 것으로 의심되거나, 발병 위험이 높을 수 있는 대상체를 예방하거나 치료하는 방법에 사용하기 위해 치료 조성물에 혼입된다. 일부 구체예에서, 미생물 감염은 박테리아 감염이다. 일부 구체예에서, 미생물 감염은 진균 감염이다. 일부 구체예에서, 미생물 감염은 바이러스 감염이다.
- [0172] 추가 요법
- [0173] [0156] 일부 구체예에서, 본 개시에 따른 조성물은 단일 요법(단독요법) 또는 적어도 하나의 추가 요법(예를 들어, 제2 요법)과 조합된 제1 요법으로서 대상체에 개별적으로 투여된다. 일부 구체예에서, 제2 요법은 화학요법, 방사선요법, 면역요법, 호르몬 요법, 독소 요법, 표적 요법 및 수술로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 구체예에서, 제2 요법은 화학요법, 방사선요법, 면역요법, 호르몬 요법, 독소 요법 및 수술로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 구체예에서, 제1 요법 및 제2 요법은 병용하여 투여된다. 일부 구체예에서, 제1 요법은 제2 요법과 동시에 투여된다. 일부 구체예에서, 제1 요법 및 제2 요법은 순차적으로 투여된다. 일부 구체예에서, 제1 요법은 제2 요법 전에 투여된다. 일부 구체예에서, 제1 요법은 제2 요법 후에 투여된다. 일부 구체예에서, 제1 요법은 제2 요법 전 및/또는 후에 투여된다. 일부 구체예에서, 제1 요법 및 제2 요법은 교대로 투여된다. 일부 구체예에서, 제1 요법 및 제2 요법은 단일 제형으로 함께 투여된다.
- [0174] 키트
- [0175] [0157] 또한, 본원에 기재된 방법의 실시를 위한 다양한 키트 뿐만 아니라 이를 제조하고 사용하기 위한 서면 설명서가 본원에 제공된다. 특히, 본 개시의 일부 구체예는 약력학적 효과를 조절하기 위한 키트를 제공한다. 본 개시의 일부 구체예는 대상체에서 면역 반응을 유발하기 위한 키트를 제공한다. 일부 다른 구체예는 이를 필요로 하는 대상체에서 건강 병태의 예방을 위한 키트에 관한 것이다. 일부 다른 구체예는 이를 필요로 하는 대상체에서 건강 병태를 치료하는 방법을 위한 키트에 관한 것이다. 예를 들어, 일부 구체예에서, 본원에 제공되고 기재된 바와 같은 핵산 작제물, 재조합 세포, 재조합 폴리펩티드, 및/또는 약학적 조성물 중 하나 이상 뿐만 아니라 이를 제조하고 사용하기 위한 서면 설명서를 포함하는 키트가 본원에 제공된다.
- [0176] [0158] 일부 구체예에서, 본 개시의 키트는 제공된 핵산 작제물, 재조합 세포, 재조합 폴리펩티드, 및/또는 약학적 조성물 중 임의의 하나를 대상체에 투여하는데 유용한 하나 이상의 수단을 추가로 포함한다. 예를 들어, 일부 구체예에서, 본 개시의 키트는 제공된 핵산 작제물, 재조합 세포, 재조합 폴리펩티드, 및/또는 약학적 조성물 중 임의의 하나를 대상체에 투여하는데 사용되는 하나 이상의 주사기(사전 충전형 주사기 포함) 및/또는 카테터(사전 충전형 주사기 포함)를 추가로 포함한다. 일부 구체예에서, 키트는 원하는 목적을 위해, 예를 들어, 이를 필요로 하는 대상체에서 병태를 진단, 예방, 또는 치료하기 위해 다른 키트 성분과 동시에 또는 순차적으로 투여될 수 있는 하나 이상의 추가 치료제를 가질 수 있다.
- [0177] [0159] 상기 기재된 임의의 키트는 하나 이상의 추가 시약을 추가로 포함할 수 있으며, 여기서 이러한 추가 시약은 회색 완충제, 재구성 용액, 세척 완충제, 대조군 시약, 대조군 발현 벡터, 음성 대조군, 양성 대조군, 본 개시의 제공된 핵산 작제물, 재조합 세포, 재조합 폴리펩티드 및/또는 본 개시의 약학적 조성물의 시험관내 생산에 적합한 시약으로부터 선택될 수 있다.
- [0178] [0160] 일부 구체예에서, 키트의 성분은 별도의 용기에 있을 수 있다. 일부 다른 구체예에서, 키트의 성분은 단일 용기에서 조합될 수 있다. 따라서, 본 개시의 일부 구체예에서, 키트는 하나의 용기(예를 들어, 멸균 유리 또는 플라스틱 바이알에) 본원에 제공되고 기재된 바와 같은 핵산 작제물, 재조합 세포, 재조합 폴리펩티드, 및/또는 약학적 조성물 중 하나 이상을 포함하고 다른 용기(예를 들어, 멸균 유리 또는 플라스틱 바이알에) 추가 치료제를 포함한다.
- [0179] [0161] 다른 구체예에서, 키트는, 선택적으로 단일 공통 용기의 약학적 조성물에, 함께 제형화된 하나 이상의

추가 치료제와 조합된 본 개시의 하나 이상의 핵산 작제물, 재조합 세포, 및/또는 재조합 폴리펩티드를 포함하는 본원에 기재된 조성물의 조합을 포함한다.

[0180] [0162] 키트가 대상체에 대한 비경구 투여를 위한 약학적 조성물을 포함하는 경우, 키트는 이러한 투여를 수행하기 위한 장치(예를 들어, 주사 장치 또는 카테터)를 포함할 수 있다. 예를 들어, 키트는 본 개시의 하나 이상의 핵산 작제물, 재조합 세포, 재조합 폴리펩티드, 및/또는 약학적 조성물을 함유하는 상기 논의된 바와 같은 하나 이상의 피하 바늘 또는 다른 주사 장치를 포함할 수 있다.

[0181] [0163] 일부 구체예에서, 키트의 성분은 별도의 용기에 있을 수 있다. 일부 다른 구체예에서, 키트의 성분은 단일 용기에서 조합될 수 있다.

[0182] [0164] 일부 구체예에서, 키트는 본원에 기재된 방법을 실시하기 위해 키트의 성분을 사용하기 위한 설명서를 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 키트는 약학적 조성물 및 투여 형태에 관한 정보를 포함하는 패키지 삽입물을 키트에 포함할 수 있다. 일반적으로, 이러한 정보는 환자와 의사가 동봉된 약학적 조성물 및 투여 형태를 효과적이고 안전하게 사용하는데 도움이 된다. 예를 들어, 본 개시의 조합에 관한 다음 정보가 삽입물에 제공될 수 있다: 약동학, 약력학, 임상 연구, 효능 파라미터, 적응증 및 사용법, 금기, 경고, 주의사항, 부작용, 과다투여, 적절한 투여량 및 투여, 공급 방법, 적절한 보관 조건, 참조, 제조업체/유통자 정보 및 지적 재산권 정보.

[0183] [0165] 상기 방법을 실시하기 위한 설명서는 일반적으로 적합한 기록 매체에 기록된다. 예를 들어, 설명서는 종이 또는 플라스틱 등과 같은 기재 상에 인쇄될 수 있다. 설명서는 패키지 삽입물로서 키트에, 키트의 용기 또는 이의 구성 요소의 라벨링(예를 들어, 패키징 또는 서브 패키징과 관련됨) 등에 존재할 수 있다. 설명서는 적합한 컴퓨터 판독 가능 저장 매체, 예를 들어, CD-ROM, 디스켓, 플래시 드라이브 등에 존재하는 전자 저장 데이터 파일로서 존재할 수 있다. 일부 경우에, 실제 설명서는 키트에 존재하지 않지만, 원격 소스(예를 들어, 인터넷을 통해)로부터 설명서를 얻기 위한 수단이 제공될 수 있다. 이 구체예의 예는 설명서를 볼 수 있고/있거나 설명서를 다운로드할 수 있는 웹 주소를 포함하는 키트이다. 설명서와 마찬가지로, 설명서를 얻기 위한 수단이 적합한 기재에 기록될 수 있다.

[0184] [0166] 본 개시에 언급된 모든 간행물 및 특허 출원은 각각의 개별적 간행물 또는 특허 출원이 참조로 포함되는 것으로 구체적이고 개별적으로 지시된 것과 동일한 정도로 본원에 참조로 포함된다.

[0185] [0167] 본원에 인용된 어떠한 참고문헌도 선행 기술을 구성하는 것으로 인정하는 것은 아니다. 참고문헌에 대한 논의는 저자가 주장하는 바를 나타내며, 출원인은 인용된 문서의 정확성과 적절성에 대해 이의를 제기할 권리를 지닌다. 비록 과학 저널 기사, 특허 문서 및 텍스트북을 포함하는 다수의 정보 출처가 본원에서 언급되지만, 이러한 언급이 임의의 이러한 문서가 당 분야의 보통의 일반 지식의 일부를 형성한다고 인정하는 것은 아니다.

[0186] [0168] 본원에 제공된 일반적인 방법에 대한 논의는 단지 예시를 위한 것이다. 다른 대안적인 방법 및 대안은 본 개시의 검토시 당업자에게 명백할 것이며, 본 출원의 사상 및 범위 내에 포함되어야 한다.

[0187] [0169] 추가 구체예는 예시의 방식으로 제공되고 본 개시 또는 청구범위를 어떤 방식으로든 제한하지 않도록 의도된 하기 실시예에서 더욱 상세하게 개시된다.

[0188] 실시예

[0189] [0170] 본 발명의 실시는 달리 지시되지 않는 한, 당업자에게 잘 알려진 분자 생물학, 미생물학, 세포 생물학, 생화학, 핵산 화학 및 면역학의 통상적인 기술을 사용할 것이다. 이러한 기술은 문헌[Sambrook, J., & Russell, D. W. (2012). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (4th ed.). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory and Sambrook, J., & Russel, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed.). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory (jointly referred to herein as "Sambrook"); Ausubel, F. M. (1987). *Current Protocols in Molecular Biology*. New York, NY: Wiley (including supplements through 2014); Bollag, D. M. et al. (1996). *Protein Methods*. New York, NY: Wiley-Liss; Huang, L. et al. (2005). *Nonviral Vectors for Gene Therapy*. San Diego: Academic Press; Kaplitt, M. G. et al. (1995). *Viral Vectors: Gene Therapy and Neuroscience Applications*. San Diego, CA: Academic Press; Lefkovits, I. (1997). *The Immunology Methods Manual: The Comprehensive Sourcebook of Techniques*. San Diego, CA: Academic Press; Doyle, A. et al. (1998). *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology*. New York, NY: Wiley; Mullis, K. B., Ferre, F. & Gibbs, R.

(1994). *PCR: The Polymerase Chain Reaction*. Boston: Birkhauser Publisher; Greenfield, E. A. (2014). *Antibodies: A Laboratory Manual* (2nd ed.). New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; Beaucage, S. L. et al. (2000). *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*. New York, NY: Wiley, (including supplements through 2014); and Makrides, S. C. (2003). *Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells*. Amsterdam, NL: Elsevier Sciences B.V.]과 같은 문헌에 충분히 설명되어 있고, 이들의 개시는 본원에 참조로 포함된다.

[0190] [0171] 추가 구체예는 예시의 방식으로 제공되고 본 개시 또는 청구범위를 어떤 방식으로든 제한하지 않도록 의도된 하기 실시예에서 더욱 상세하게 개시된다.

[0191] 실시예 1

[0192] WEEV 백터의 작제

[0193] [0172] 이 실시예는 후속하여 관심 유전자(예를 들어, 인플루엔자 A 바이러스 H5N1의 헤마글루티닌 전구체 H A)를 발현하는 WEEV 백터의 작제에 사용되는 기본 WEEV 백터(예를 들어, 이중성 유전자 없음)를 작제하기 위해 수행된 실험을 설명한다.

[0194] [0173] 기본 WEEV 백터(즉, 관심 이중성 유전자가 없음)를 다음과 같이 작제한다: 기본 WEEV 백터(예를 들어, **도 2a** 참조)는 몇 가지 변형을 통해 참조 서열(Genbank GQ287641)로부터 4개의 약 4 kb 부분으로 새롭게 합성된다. 참조 서열에서 모호한 뉴클레오티드 할당은 인코딩된 잔기에 대한 동의 코돈과 일치하는 뉴클레오티드에 할당된다. 침묵 돌연변이는 *SapI* 및 *SpeI* 제한 효소 절단 부위를 제거하기 위해 혼입된다. 고유한 제한 효소 절단 부위(*SpeI*, 5'-A'CTAG,T-3')가 천연 WEEV 구조 유전자의 코딩 서열 대신에 혼입될 수 있다(여기서, 5' A는 구조 다단백질 ATG 개시 코돈의 위치와 일치하며, 3' T는 구조 다단백질 정지 코돈 TAA의 위치와 일치한다). 5' 어댑터 서열(5'-CTGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGGACCT-3'; SEQ ID NO: 3)을 *SpeI* 부위의 업스트림에 삽입하고, 3' 어댑터 서열(5'-GACCGCTACGCCCAATGACCCGACCAGC-3'; SEQ ID NO: 4)을 후속 Gibson Assembly® 절차를 위해 *SpeI* 부위의 다운스트림에 삽입한다(Gibson et al., *Nat. Methods* 6, 343-345, 2009). 박테리오파지 T7 RNA 중합효소 프로모터(5'-TAATACGACTCACTATAG-3'; SEQ ID NO: 5)는 WEEV 게놈 서열의 업스트림에 포함되고, 다운스트림에는 폴리(A) 서열에 이어 인식 부위의 업스트림을 절단하는 *SapI* 부위가 함유될 수 있다. *SapI* 부위의 바로 다운스트림에는 T7 종결 서열(5'-AACCCCTCTCTAAACGGAGGGGTTTTTT-3'; SEQ ID NO: 6)이 있고 이어서 고유한 제한 효소 절단 부위(*NotI*, 5'-GC'GGCC,GC-3')가 있다. 상기 부분들을 선형화된 pYL 백본 및 4개의 합성 단편으로 5-조각 Gibson Assembly® 반응에서 조합하여 WEEV 기본 백터를 생성한다.

[0195] [0174] 일부 실험에서, 하나 이상의 nsP를 인코딩하는 서열은 이중성 nsP로 대체된다. 일부 다른 실험에서, 하나 이상의 UTR을 인코딩하는 서열은 이중성 UTR로 대체된다.

[0196] [0175] 이중성 유전자를 함유하는 WEEV 백터의 작제는 다음과 같이 수행된다: **도 2b**에 기재된 WEEV 백터는 *SpeI* 분해에 의해 **도 2a**의 빈 WEEV 백터의 선형화에 의해 작제된다. 인플루엔자(Genbank AY651334)로부터의 헤마글루티닌(HA) 유전자를 *in silico* 인간 발현에 대해 코돈 최적화/리팩토링하고 새롭게(IDT) 합성한다. HA 유전자의 말단에 5' 및 3' 어댑터 서열을 첨가한 프라이머를 사용하여 합성 생성물을 증폭시킨다. 본해 생성물 및 PCR 생성물을 Gibson Assembly® 절차에 의해 조합하여 최종 백터를 생성한다.

[0197] 실시예 2

[0198] 변형된 WEEV 백터의 시험관내 평가

[0199] [0176] 이 실시예는 상기 실시예 1에 기재된 합성 WEEV srRNA 작제물의 발현 수준을 평가하고, 이의 임의의 차등 거동(예를 들어, 복제 및 단백질 발현)을 조사하기 위해 수행된 시험관내 실험을 설명한다.

[0200] [0177] 이러한 실험에서, WEEV 균주 Imperial로부터 유래된 합성 srRNA 작제물을 설계하고 후속하여 평가한다.

[0201] [0178] 시험관내 전사: RNA는 5' ARCA 캡(HiScribe™ T7 ARCA mRNA 키트, NEB)이 있는 박테리오파지 T7 중합효소에 의해 *SapI*-선형화된 플라스미드 주형으로부터 시험관내 전사에 의해 또는 캡이 없는 전사(HiScribe™ T7 High Yield RNA 합성 키트, NEB) 후 5' 캡 1 추가(Vaccinia Capping System, mRNA Cap 2'-O-메틸트랜스퍼라제, NEB)에 의해 제조된다. 이후 페놀/클로로포름 추출 또는 컬럼 정제(Monarch® RNA Cleanup 키트, NEB)를 사용하여 RNA를 정제한다. RNA 농도는 260 nm에서의 흡광도에 의해 결정된다(Nanodrop, Thermo Fisher Scientific).

[0202] [0179] 복제: RNA를 전기천공에 의해 BHK-21 또는 Vero 세포(예를 들어, 4D-Nucleofector™, Lonza)로 형질전

환한다. 형질전환 15-20시간 후에, 세포를 고정 및 투과화(eBioscience™ Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set, Invitrogen)하고 후속하여 PE-컨쥬게이션된 항-dsRNA 마우스 모노클로날 항체(J2, Scicons)를 사용하여 염색하여 형광 유세포 측정에 의해 개별 세포에서 dsRNA의 평균 형광 강도(MFI) 및 dsRNA+ 세포의 빈도를 정량화한다.

[0203] [0180] 단백질 발현: RNA를 전기천공에 의해 BHK-21 또는 Vero 세포(예를 들어, 4D-Nucleofector™, Lonza)로 형질전환한다. 형질전환 15-20시간 후에, 세포를 고정 및 투과화(eBioscience™ Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set, Invitrogen)하고 APC-컨쥬게이션된 항-HA 마우스 모노클로날 항체(2B7, Abcam)를 사용하여 염색하여 형광 유세포 분석에 의해 개별 세포에서 HA 단백질을 발현하는 세포의 빈도 및 HA 단백질의 평균 형광 강도(MFI)를 정량화한다.

[0204] [0181] 추가 실험: BHK-21 또는 Vero 세포는 RNA의 전기천공 전에 재조합 인터페론(IFN)의 적정 곡선으로 전처리되고, 백터에 대한 복제 및 단백질 발현에 대한 영향은 상기 기재된 검정을 사용하여 측정된다.

[0205] [0182] 일부 실험에서, BHK-21 세포는 WEEV srRNA 작제물로 형질전환된다. 표적 GOI가 없는 WEEV srRNA를 전기천공에 의해 형질전환시키고, 형질전환 20시간 후에, 형질전환된 세포를 고정시키고, 투과화하고, PE-컨쥬게이션된 항-dsRNA 마우스 모노클로날 항체(J2, Scicons)를 사용하여 염색하여 형광 유세포 분석에 의해 dsRNA+ 세포의 빈도를 정량화한다. 또한, 표적 GOI에 대한 코딩 서열을 포함하는 WEEV srRNA를 BHK-21 세포로 유사하게 형질전환시키고, dsRNA 검출 이외에, APC-컨쥬게이션된 항-GOI 모노클로날 항체를 사용하여 트랜스진 발현을 검출하였다. 항-dsRNA 및 항-GOI 항체 둘 모두에 의한 개별 세포의 양성 염색은 본원에 기재된 변형된 WEEV 설계가 생존 가능한 합성 srRNA이고 RNA 복제를 겪고 트랜스진을 발현할 수 있음을 입증한다.

[0206] 실시예 3

[0207] 변형된 WEEV 백터의 생체내 평가

[0208] [0183] 이 실시예는 상기 실시예 1 및 2에 기재된 합성 WEEV srRNA 작제물(예를 들어, 제형화되지 않은 백터 및 LNP 제형화된 백터 둘 모두)로 백신화 후 면역 반응을 평가하기 위해 수행된 생체내 실험을 설명한다.

[0209] [0184] 이러한 실험에서, WEEV 균주 Imperial로부터 유래된 합성 srRNA 작제물을 설계하고 후속하여 평가한다.

[0210] [0185] 마우스 및 주사. 암컷 C57BL/6 또는 BALB/c 마우스를 Envigo, Charles River Labs 또는 Jackson Laboratories에서 구입한다. 투여 당일, 0.1-10 µg의 물질을 둘 모두의 대퇴사두근에 분할하여 근육내 주사한다. 백터는 염수에서 제형화되지 않거나, LNP-제형화되거나, 폴리머-제형화되어 투여된다. 연구 과정 전반에 걸쳐 체중 및 다른 일반적인 관찰에 대해 동물을 모니터링한다. 면역원성 연구를 위해, 동물에게 0일 및 21일에 투여한다. 35일에 비장을 수집하고, 14 및 35일에 혈청을 분리한다. 단백질 발현 연구를 위해, 동물에게 0일에 투여하고, 단백질 발현 또는 생물발광을 1, 3, 및/또는 7일에 평가한다. WEEV srRNA 작제물이 루시페라제와 같은 리포터 단백질을 인코딩하는 일부 실험에서, 루시페라제 활성의 생체내 영상화는 지시된 시점에 IVIS 시스템을 사용하여 수행된다. WEEV srRNA 작제물이 분비된 단백질을 인코딩하는 일부 실험에서, 전신 수준은 혈청 ELISA에 의해 측정된다.

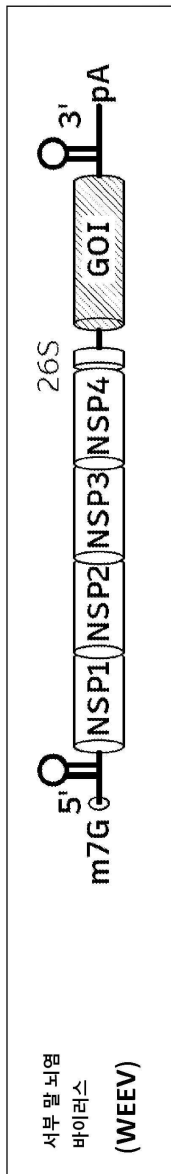
[0211] [0186] LNP 제형화. 일부 실험에서, srRNA를 미세유체 믹서를 사용하여 지질 나노입자로 제형화하고, 입자 크기, 동적 광 산란을 이용한 다분산성 및 캡슐화 효율에 대해 분석한다. 이러한 실험에서, 광범위한 물비의 지질이 LNP 입자를 제형화하는데 사용된다. 이러한 실험에 사용된 지질의 예시적인 물비는 35% C12-200, 46.5% 콜레스테롤, 2.5% PEG-2K, 및 16% DOPE일 수 있다.

[0212] [0187] ELISpot. HA-특이적 T 세포 반응의 크기를 측정하기 위해, 제조업체의 지침에 따라 마우스 IFN γ ELISpot PLUS 키트(HRP)(MabTech)를 사용하여 IFN γ ELISpot 분석을 수행한다. 이러한 실험에서, 비장세포는 분리되고, 예를 들어, WEEV srRNA 작제물에 의해 인코딩된 관심 단백질에 대한 T 세포 에피토프를 나타내는 펩티드를 함유하는 배지에서 5×10^6 개 세포/mL와 같은 적합한 농도로 재현탁된다. 또한, 이러한 실험에는 모의 자극으로 사용되는 DMSO 뿐만 아니라, 예를 들어, PMA/이오노마이신과 같은 하나 이상의 양성 대조군이 포함된다.

[0213] [0188] 항체. 총 HA-특이적 IgG를 측정하기 위한 항체 반응을 제조업체의 지침에 따라 Alpha Diagnostic International의 ELISA 키트를 사용하여 측정한다. 본 개시의 특정 대안이 개시되었지만, 다양한 변형 및 조합이 가능하고 첨부된 청구범위의 진정한 사상 및 범위 내에서 고려된다는 것이 이해되어야 한다. 따라서, 본원에 제시된 정확한 요약 및 개시를 제한하려는 의도는 없다.

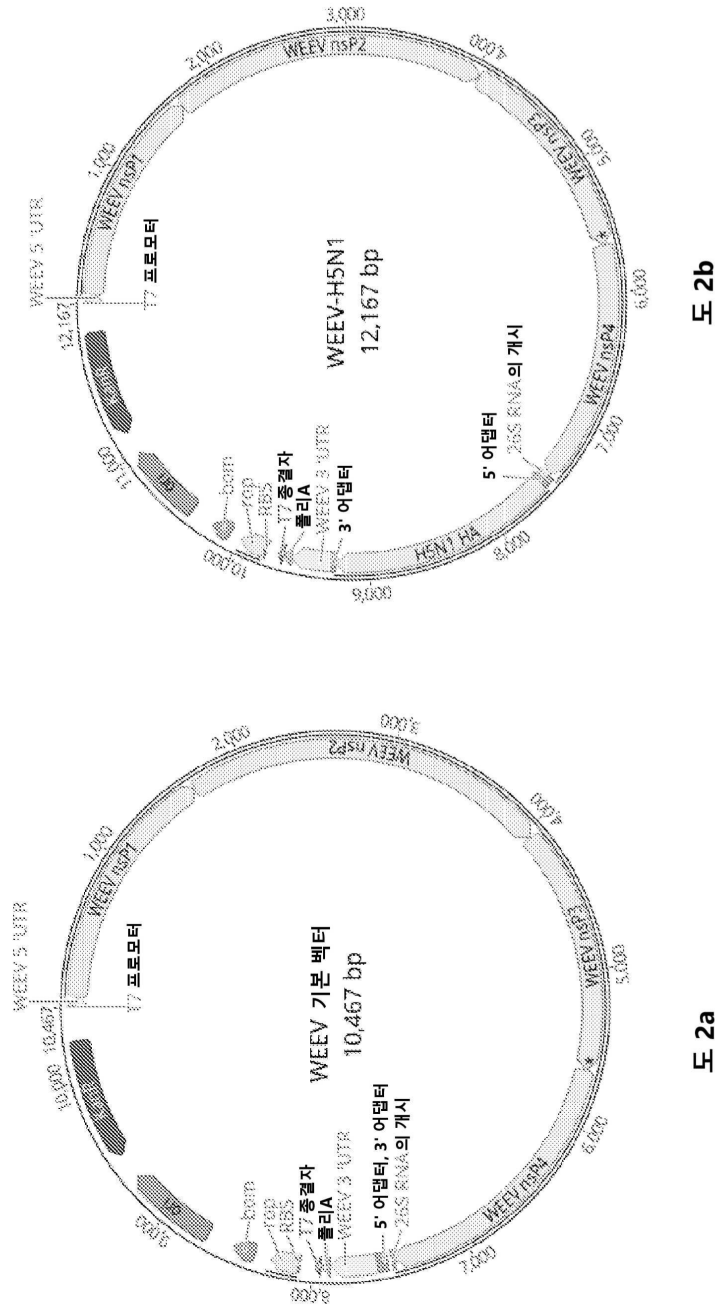
도면

도면1



도면2

변형된 WEEV 기본 벡터 및 Imperial 균주로부터의 GOI- 인코딩 벡터



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.