



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0107146
(43) 공개일자 2024년07월08일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/155 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01) C07K 14/135 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
A61K 39/155 (2013.01)
A61P 31/14 (2018.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2024-7018527</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2022년11월04일
심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2024년06월03일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/IB2022/060639</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2023/079507
국제공개일자 2023년05월11일</p> <p>(30) 우선권주장
63/276,233 2021년11월05일 미국(US)
22315065.7 2022년03월16일
유럽특허청(EPO)(EP)</p> | <p>(71) 출원인
사노피
프랑스 75017 파리 아브뉴 드 라 그랑 아르메 46</p> <p>(72) 발명자
카시미로, 다닐로
미국 02140 매사추세츠 캠브리지 시드니 스트리트
38 사노피 파스퇴르 인크. 내
고파니, 하르딕 라제쉬브하이
프랑스 75008 파리 튀 라 보에티에 54 사노피 페
이턴트 디파트먼트 내
(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
양영준, 임근실</p> |
|---|--|

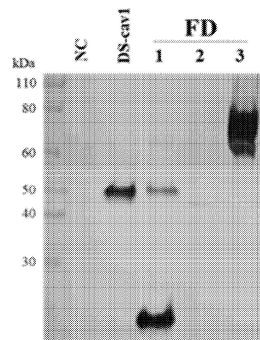
전체 청구항 수 : 총 43 항

(54) 발명의 명칭 **호흡기 세포융합 바이러스 RNA 백신**

(57) 요약

본 개시내용은 호흡기 세포융합 바이러스(RSV) F 단백질 항원을 인코딩하는 오픈 리딩 프레임(ORF)을 포함하는 메신저 RNA(mRNA)를 포함하는 RSV 백신 및 상기 백신을 투여함으로써 면역 반응을 유도하는 방법을 제공한다.

대표도



(52) CPC특허분류

C07K 14/135 (2013.01)
A61K 2039/53 (2013.01)
A61K 2039/54 (2013.01)
A61K 2039/545 (2013.01)
A61K 2039/55555 (2013.01)
A61K 2039/575 (2013.01)
C12N 2760/18534 (2013.01)

(72) 발명자

디나폴리, 조슈아

미국 02140 매사추세츠 캠브리지 시드니 스트리트
38 사노피 파스퇴르 인크. 내

장, 리농

미국 02140 매사추세츠 캠브리지 시드니 스트리트
38 사노피 파스퇴르 인크. 내

폴드만, 레베카 엘.

프랑스 75008 파리 튀 라 보에티에 54 사노피 페이
턴트 디콰트먼트 내

치부쿨라, 수드하

미국 02140 매사추세츠 캠브리지 시드니 스트리트
38 사노피 파스퇴르 인크. 내

갤리찬, 윌리엄 스콧

캐나다 엠2알 3티4 온타리오 토론토 웨스트 스틸레
스 애비뉴 1755 사노피 파스퇴르 리미티드 내

패링턴, 마크

미국 02140 매사추세츠 캠브리지 시드니 스트리트
38 사노피 파스퇴르 인크. 내

명세서

청구범위

청구항 1

호흡기 세포융합 바이러스(RSV) 백신으로서, RSV F 단백질 항원을 인코딩하는 오픈 리딩 프레임(ORF)을 포함하는 메신저 RNA(mRNA)를 포함하고, RSV F 단백질 항원은 SEQ ID NO: 3과 적어도 98% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 SEQ ID NO: 3의 아미노산 서열로 이루어지는, 호흡기 세포융합 바이러스(RSV) 백신.

청구항 2

제1항에 있어서, RSV F 단백질 항원은 융합전 단백질인, RSV 백신.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, ORF는 코돈 최적화된, RSV 백신.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, mRNA는 적어도 하나의 5' 비번역 영역(5' UTR), 적어도 하나의 3' 비번역 영역(3' UTR), 및 적어도 하나의 폴리아데닐화(폴리(A)) 서열을 포함하는, RSV 백신.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, mRNA는 적어도 하나의 화학적 변형을 포함하는, RSV 백신.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, mRNA에서 ура실 뉴클레오티드의 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 100%가 화학적으로 변형되는, RSV 백신.

청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, ORF에서 ура실 뉴클레오티드의 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 100%가 화학적으로 변형되는, RSV 백신.

청구항 8

제5항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 화학적 변형은 슈도우리딘, N1-메틸슈도우리딘, 2-티오우리딘, 4'-티오우리딘, 5-메틸시토신, 2-티오-1-메틸-1-데아자-슈도우리딘, 2-티오-1-메틸-슈도우리딘, 2-티오-5-아자-우리딘, 2-티오-디하이드로슈도우리딘, 2-티오-디하이드로우리딘, 2-티오-슈도우리딘, 4-메톡시-2-티오-슈도우리딘, 4-메톡시-슈도우리딘, 4-티오-1-메틸-슈도우리딘, 4-티오-슈도우리딘, 5-아자-우리딘, 디하이드로슈도우리딘, 5-메틸우리딘, 5-메틸우리딘, 5-메톡시우리딘, 및 2'-O-메틸 우리딘으로 이루어진 군으로부터 선택되는, RSV 백신.

청구항 9

제8항에 있어서, 화학적 변형은 슈도우리딘, N1-메틸슈도우리딘, 5-메틸시토신, 5-메톡시우리딘, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는, RSV 백신.

청구항 10

제8항에 있어서, 화학적 변형은 N1-메틸슈도우리딘인, RSV 백신.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, mRNA는 지질 나노입자(LNP)에 제형화되는, RSV 백신.

청구항 12

제11항에 있어서, LNP는 적어도 하나의 양이온성 지질을 포함하는, RSV 백신.

청구항 13

제12항에 있어서, 양이온성 지질은 생분해성인, RSV 백신.

청구항 14

제12항에 있어서, 양이온성 지질은 생분해성이 아닌, RSV 백신.

청구항 15

제12항에 있어서, 양이온성 지질은 절단 가능한, RSV 백신.

청구항 16

제12항에 있어서, 양이온성 지질은 절단 가능하지 않은, RSV 백신.

청구항 17

제12항에 있어서, 양이온성 지질은 OF-02, cKK-E10, GL-HEPES-E3-E10-DS-3-E18-1, GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10, 및 GL-HEPES-E3-E12-DS-3-E14로 이루어진 군으로부터 선택되는, RSV 백신.

청구항 18

제17항에 있어서, 양이온성 지질은 cKK-E10인, RSV 백신.

청구항 19

제17항에 있어서, 양이온성 지질은 GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10인, RSV 백신.

청구항 20

제11항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, LNP는 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 컨쥬게이션된(PEG화된) 지질, 콜레스테롤계 지질 및 헬퍼 지질을 추가로 포함하는, RSV 백신.

청구항 21

제11항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, LNP는:

35% 내지 55%의 몰비의 양이온성 지질;

0.25% 내지 2.75%의 몰비의 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 컨쥬게이션된(PEG화된) 지질,

20% 내지 45%의 몰비의 콜레스테롤계 지질, 및

5% 내지 35%의 몰비의 헬퍼 지질을 포함하고,

모든 몰비는 LNP의 총 지질 함량에 상대적인, RSV 백신.

청구항 22

제21항에 있어서, LNP는:

40%의 몰비의 양이온성 지질,

1.5%의 몰비의 PEG화된 지질,

28.5%의 몰비의 콜레스테롤계 지질, 및

30%의 몰비의 헬퍼 지질을 포함하는, RSV 백신.

청구항 23

제20항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, PEG화된 지질은 디미리스토일-PEG2000(DMG-PEG2000) 또는 2-[(폴리에틸렌 글리콜)-2000]-N,N-디테트라데실아세트아미드(ALC-0159)인, RSV 백신.

청구항 24

제20항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 콜레스테롤계 지질은 콜레스테롤인, RSV 백신.

청구항 25

제20항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 헬퍼 지질은 1,2-디올레오일-SN-글리세로-3-포스포에탄올아민(DOPE) 또는 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린(DSPC)인, RSV 백신.

청구항 26

제11항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, LNP는:

40%의 몰비의 GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10,

1.5%의 몰비의 DMG-PEG2000,

28.5%의 몰비의 콜레스테롤, 및

30%의 몰비의 DOPE를 포함하는, RSV 백신.

청구항 27

제11항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, LNP는:

40%의 몰비의 cKK-E10,

1.5%의 몰비의 DMG-PEG2000,

28.5%의 몰비의 콜레스테롤, 및

30%의 몰비의 DOPE를 포함하는, RSV 백신.

청구항 28

제11항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, LNP는 30 nm 내지 200 nm의 평균 직경을 갖는, RSV 백신.

청구항 29

제28항에 있어서, LNP는 80 nm 내지 150 nm의 평균 직경을 갖는, RSV 백신.

청구항 30

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, mRNA는 SEQ ID NO: 6에 제시된 핵산 서열에 대해 적어도 80% 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는, RSV 백신.

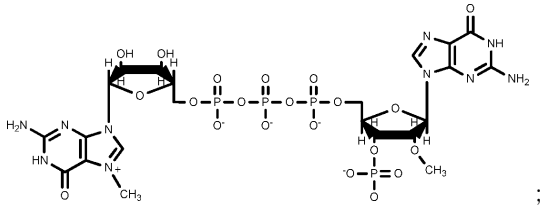
청구항 31

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, mRNA는 SEQ ID NO: 14에 제시된 핵산 서열에 대해 적어도 80% 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는, RSV 백신.

청구항 32

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, mRNA는 하기 구조적 요소들을 포함하는, RSV 백신:

(i) 하기 구조를 갖는 5' 캡:



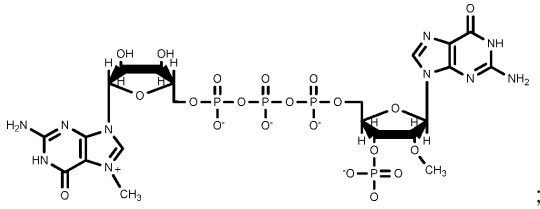
- (ii) SEQ ID NO: 10의 핵산 서열을 갖는 5' 비번역 영역(5' UTR);
- (iii) SEQ ID NO: 6의 핵산 서열을 갖는 단백질 코딩 영역;
- (iv) SEQ ID NO: 11의 핵산 서열을 갖는 3' 비번역 영역(3' UTR); 및
- (v) 폴리(A) 테일.

청구항 33

호흡기 세포융합 바이러스(RSV) 백신으로서, RSV F 단백질 항원을 인코딩하는 오픈 리딩 프레임(ORF)을 포함하는 메신저 RNA(mRNA)를 포함하고,

mRNA는 하기 구조적 요소를 포함하고:

- (i) 하기 구조를 갖는 5' 캡:



- (ii) SEQ ID NO: 10의 핵산 서열을 갖는 5' 비번역 영역(5' UTR);
- (iii) SEQ ID NO: 6의 핵산 서열을 갖는 단백질 코딩 영역;
- (iv) SEQ ID NO: 11의 핵산 서열을 갖는 3' 비번역 영역(3' UTR); 및
- (v) 폴리(A) 테일;

mRNA는

40%의 몰비의 GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10,

1.5%의 몰비의 DMG-PEG2000,

28.5%의 몰비의 콜레스테롤, 및

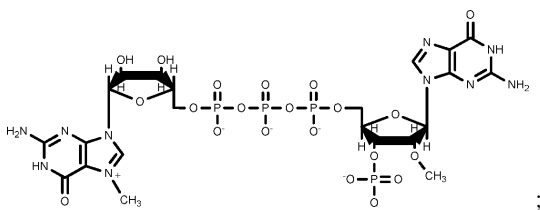
30%의 몰비의 DOPE를 포함하는 지질 나노입자(LNP)에서 제형화된, 호흡기 세포융합 바이러스(RSV) 백신.

청구항 34

호흡기 세포융합 바이러스(RSV) 백신으로서, RSV F 단백질 항원을 인코딩하는 오픈 리딩 프레임(ORF)을 포함하는 메신저 RNA(mRNA)를 포함하고,

mRNA는 하기 구조적 요소들을 포함하고:

- (i) 하기 구조를 갖는 5' 캡:



- (ii) SEQ ID NO: 10의 핵산 서열을 갖는 5' 비번역 영역(5' UTR);
- (iii) SEQ ID NO: 6의 핵산 서열을 갖는 단백질 코딩 영역;
- (iv) SEQ ID NO: 11의 핵산 서열을 갖는 3' 비번역 영역(3' UTR); 및
- (v) 폴리(A) 테일;

mRNA는

40%의 몰비의 cKK-E10,

1.5%의 몰비의 DMG-PEG2000,

28.5%의 몰비의 콜레스테롤, 및

30%의 몰비의 DOPE를 포함하는 지질 나노입자(LNP)에서 제형화된, 호흡기 세포융합 바이러스(RSV) 백신.

청구항 35

제1항 내지 제34항 중 어느 한 항의 RSV 백신을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, RSV에 대한 면역 반응을 유도하거나 대상체를 RSV 감염으로부터 보호하는 방법.

청구항 36

제35항에 있어서, 대상체는 SEQ ID NO: 1의 RSV F 단백질 항원을 인코딩하는 mRNA ORF를 포함하는 RSV 백신을 투여받은 대상체에 비해 RSV 백신 투여 후 RSV에 대한 중화 항체의 혈청 농도가 더 높은, 방법.

청구항 37

제35항에 있어서, 대상체는 단백질 RSV 백신을 투여받은 대상체에 비해 RSV 백신 투여 후 RSV에 대한 중화 항체의 혈청 농도가 유사한, 방법.

청구항 38

제37항에 있어서, 단백질 RSV 백신은 아주반트와 공동-투여되는, 방법.

청구항 39

제35항에 있어서, RSV 백신은 RSV F 단백질의 Ω 부위에 대해 결합 특이성을 갖는 항체의 혈청 농도를 증가시키는, 방법.

청구항 40

제35항에 있어서, 대상체는 SEQ ID NO: 2의 RSV F 단백질 항원을 인코딩하는 mRNA ORF를 포함하는 RSV 백신을 투여받은 대상체에 비해 RSV 백신 투여 후 RSV F 단백질의 부위 I 또는 부위 II에 대해 결합 특이성을 갖는 항체의 혈청 농도가 더 낮은, 방법.

청구항 41

제35항에 있어서, RSV 백신은 기존 RSV 면역을 갖고 있는 대상체의 중화 항체의 혈청 농도를 증가시키는, 방법.

청구항 42

제1항 내지 제34항 중 어느 한 항의 RSV 백신을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, RSV에 대한 면역 반응을 유도하거나 대상체를 RSV 감염으로부터 보호하기 위한 용도의 RSV 백신.

청구항 43

RSV에 대한 면역 반응을 유도하거나 대상체를 RSV 감염으로부터 보호하기 위한 의약의 제조에 있어서, 제1항 내지 제34항 중 어느 한 항의 RSV 백신의 용도.

발명의 설명

기술분야

관련 출원

- [0001] 관련 출원
- [0002] 본 출원은 각각의 전체 내용이 모든 목적에 대해 본 명세서에 참조로 포함되는 2021년 11월 5일에 출원된 미국 가출원 제63/276,233호, 및 2022년 3월 16일에 출원된 유럽 출원 제22315065.7호의 이익을 주장한다.

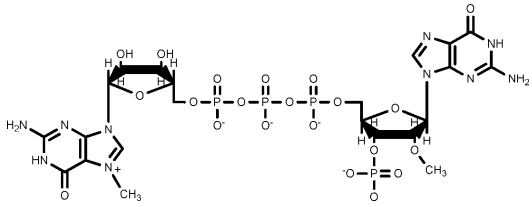
배경 기술

- [0003] 호흡기 세포융합 바이러스(RSV)는 유아의 중증 호흡기 질환의 주요 원인이고, 노인의 호흡기 병의 주요 원인이다. 수십 년의 연구에도 불구하고 RSV는 미충족 수요로 남아있는 백신이 필요하다. 융합후 입체형태에서 RSV F 항원을 사용하는 최근 임상 프로그램이 성인에서 충분한 효능을 이끌어 내지 못했다. 문헌[Faloon et al. (2017) JID 216: 1362-1370]을 참고한다. 그러나, 융합전 입체형태로 안정화된 RSV F 항원은 임상에서 실패한 융합후 항원보다 우수한 중화 반응을 이끌어낼 수 있다.
- [0004] RNA 기반 백신(예를 들어, mRNA 백신)은 최근 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2(SARS-CoV-2)에 대한 효과적인 백신 유형으로 부상하였다. 코로나바이러스감염증-19(COVID-19) mRNA 백신은 빠르고 안전하며 비용상 효율적인 생산 프로세스를 보여왔다. 전달 비히클, 예컨대, 지질 나노입자(LNP)와 종종 결합되는 COVID-19 mRNA 백신은 높은 효능을 달성할 수 있다. 효과적인 RSV 백신이 부족하기 때문에, RSV 감염에 대한 강력한 중화를 위해 RSV 전용합 F 단백질에 대해 강력한 면역 반응을 유도하는 RNA 기반 RSV 백신이 필요하다.

발명의 내용

- [0005] 일 양태에서, 본 개시내용은 호흡기 세포융합 바이러스(RSV) F 단백질 항원을 인코딩하는 오픈 리딩 프레임(ORF)을 포함하는 메신저 RNA(mRNA)를 포함하는 RSV 백신을 제공하고, RSV F 단백질 항원은 SEQ ID NO: 3과 적어도 98% 동일성(예를 들어, 98%, 99%, 또는 100% 동일성)을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 SEQ ID NO: 3의 아미노산 서열로 이루어진다.
- [0006] 특정 구현예에서, RSV F 단백질 항원은 융합전 단백질이다.
- [0007] 특정 구현예에서, ORF는 코돈 최적화된다.
- [0008] 특정 구현예에서, mRNA는 적어도 하나의 5' 비번역 영역(5' UTR), 적어도 하나의 3' 비번역 영역(3' UTR), 및 적어도 하나의 폴리아데닐화(폴리(A)) 서열을 포함한다.
- [0009] 특정 구현예에서, mRNA는 적어도 하나의 화학적 변형을 포함한다.
- [0010] 특정 구현예에서, mRNA에서 우라실 뉴클레오티드의 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 100%가 화학적으로 변형된다.
- [0011] 특정 구현예에서, ORF에서 우라실 뉴클레오티드의 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 100%가 화학적으로 변형된다.
- [0012] 특정 구현예에서, 화학적 변형은 슈도우리딘, N1-메틸슈도우리딘, 2-티오우리딘, 4'-티오우리딘, 5-메틸시토신, 2-티오-1-메틸-1-테아자-슈도우리딘, 2-티오-1-메틸-슈도우리딘, 2-티오-5-아자-우리딘, 2-티오-디하이드로슈도우리딘, 2-티오-디하이드로우리딘, 2-티오-슈도우리딘, 4-메톡시-2-티오-슈도우리딘, 4-메톡시-슈도우리딘, 4-티오-1-메틸-슈도우리딘, 4-티오-슈도우리딘, 5-아자-우리딘, 디하이드로슈도우리딘, 5-메틸우리딘, 5-메틸우리딘, 5-메톡시우리딘, 및 2'-O-메틸 우리딘으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0013] 특정 구현예에서, 화학적 변형은 슈도우리딘, N1-메틸슈도우리딘, 5-메틸시토신, 5-메톡시우리딘, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0014] 특정 구현예에서, 화학적 변형은 N1-메틸슈도우리딘이다.
- [0015] 특정 구현예에서, mRNA는 지질 나노입자(LNP)에 제형화된다.
- [0016] 특정 구현예에서, LNP는 적어도 하나의 양이온성 지질을 포함한다.
- [0017] 특정 구현예에서, 양이온성 지질은 생분해성이다. 특정 구현예에서, 양이온성 지질은 생분해성이 아니다.
- [0018] 특정 구현예에서, 양이온성 지질은 절단 가능하다. 특정 구현예에서, 양이온성 지질은 절단 가능하지 않다.

- [0019] 특정 구현예에서, 양이온성 지질은 OF-02, cKK-E10, GL-HEPES-E3-E10-DS-3-E18-1, GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10, 및 GL-HEPES-E3-E12-DS-3-E14로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0020] 특정 구현예에서, 양이온성 지질은 cKK-E10이다.
- [0021] 특정 구현예에서, 양이온성 지질은 GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10이다.
- [0022] 특정 구현예에서, LNP는 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 컨쥬게이션된(PEG화된) 지질, 콜레스테롤계 지질 및 헬퍼 지질을 추가로 포함한다.
- [0023] 특정 구현예에서, LNP는: 35% 내지 55%의 물비의 양이온성 지질; 0.25% 내지 2.75%의 물비의 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 컨쥬게이션된(PEG화된) 지질; 20% 내지 45%의 물비의 콜레스테롤계 지질; 및 5% 내지 35%의 물비의 헬퍼 지질을 포함하고, 모든 물비는 LNP의 총 지질 함량에 상대적이다.
- [0024] 특정 구현예에서, LNP는: 40%의 물비의 양이온성 지질, 1.5%의 물비의 PEG화된 지질, 28.5%의 물비의 콜레스테롤계 지질, 및 30%의 물비의 헬퍼 지질을 포함한다.
- [0025] 특정 구현예에서, PEG화된 지질은 디미리스토일-PEG2000(DMG-PEG2000) 또는 2-[(폴리에틸렌 글리콜)-2000]-N,N-디테트라데실아세트아미드(ALC-0159)이다.
- [0026] 특정 구현예에서, 콜레스테롤계 지질은 콜레스테롤이다.
- [0027] 특정 구현예에서, 헬퍼 지질은 1,2-디올레오일-SN-글리세로-3-포스포에탄올아민(DOPE) 또는 1,2-디스테아로일-SN-글리세로-3-포스포콜린(DSPC)이다.
- [0028] 특정 구현예에서, LNP는: 40%의 물비의 GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10, 1.5%의 물비의 DMG-PEG2000, 28.5%의 물비의 콜레스테롤, 및 30%의 물비의 DOPE를 포함한다.
- [0029] 특정 구현예에서, LNP는: 40%의 물비의 cKK-E10, 1.5%의 물비의 DMG-PEG2000, 28.5%의 물비의 콜레스테롤, 및 30%의 물비의 DOPE를 포함한다.
- [0030] 특정 구현예에서, LNP는 30 nm 내지 200 nm의 평균 직경을 갖는다. 특정 구현예에서, LNP는 80 nm 내지 150 nm의 평균 직경을 갖는다.
- [0031] 특정 구현예에서, mRNA는 SEQ ID NO: 6에 제시된 핵산 서열에 대해 적어도 80% 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함한다.
- [0032] 특정 구현예에서, mRNA는 SEQ ID NO: 14에 제시된 핵산 서열에 대해 적어도 80% 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함한다.
- [0033] 특정 구현예에서, mRNA는 하기 구조적 요소를 포함하고:
- [0034] (i) 하기 구조를 갖는 5' 캡:
-
- [0035] ;
- [0036] (ii) SEQ ID NO: 10의 핵산 서열을 갖는 5' 비번역 영역(5' UTR);
- [0037] (iii) SEQ ID NO: 6의 핵산 서열을 갖는 단백질 코딩 영역;
- [0038] (iv) SEQ ID NO: 11의 핵산 서열을 갖는 3' 비번역 영역(3' UTR); 및
- [0039] (v) 폴리(A) 테일.
- [0040] 일 양태에서, 본 개시내용은 호흡기 세포융합 바이러스(RSV) F 단백질 항원을 인코딩하는 오픈 리딩 프레임(ORF)을 포함하는 메신저 RNA(mRNA)를 포함하는 RSV 백신을 제공하고, mRNA는 하기 구조적 요소를 포함하고:
- [0041] (i) 하기 구조를 갖는 5' 캡:



[0042]

[0043] (ii) SEQ ID NO: 10의 핵산 서열을 갖는 5' 비번역 영역(5' UTR);

[0044] (iii) SEQ ID NO: 6의 핵산 서열을 갖는 단백질 코딩 영역;

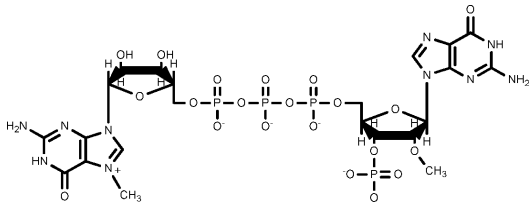
[0045] (iv) SEQ ID NO: 11의 핵산 서열을 갖는 3' 비번역 영역(3' UTR); 및

[0046] (v) 폴리(A) 테일;

[0047] mRNA는 40%의 몰비의 GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10, 1.5%의 몰비의 DMG-PEG2000, 28.5%의 몰비의 콜레스테롤, 및 30%의 몰비의 DOPE를 포함하는 지질 나노입자(LNP)에 제형화된다.

[0048] 일 양태에서, 본 개시내용은 호흡기 세포융합 바이러스(RSV) F 단백질 항원을 인코딩하는 오픈 리딩 프레임(ORF)을 포함하는 메신저 RNA(mRNA)를 포함하는 RSV 백신을 제공하고, mRNA는 하기 구조적 요소를 포함하고:

[0049] (i) 하기 구조를 갖는 5' 캡:



[0050]

[0051] (ii) SEQ ID NO: 10의 핵산 서열을 갖는 5' 비번역 영역(5' UTR);

[0052] (iii) SEQ ID NO: 6의 핵산 서열을 갖는 단백질 코딩 영역;

[0053] (iv) SEQ ID NO: 11의 핵산 서열을 갖는 3' 비번역 영역(3' UTR); 및

[0054] (v) 폴리(A) 테일;

[0055] mRNA는 40%의 몰비의 cKK-E10, 1.5%의 몰비의 DMG-PEG2000, 28.5%의 몰비의 콜레스테롤, 및 30%의 몰비의 DOPE를 포함하는 지질 나노입자(LNP)에 제형화된다.

[0056] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 상기에 기재된 RSV 백신을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, RSV에 대한 면역 반응을 유도하거나 대상체를 RSV 감염으로부터 보호하는 방법을 제공한다.

[0057] 특정 구현예에서, 대상체는 SEQ ID NO: 1의 RSV F 단백질 항원을 인코딩하는 mRNA ORF를 포함하는 RSV 백신을 투여받은 대상체에 비해 RSV 백신 투여 후 RSV에 대한 중화 항체의 혈청 농도가 더 높다.

[0058] 특정 구현예에서, 대상체는 단백질 RSV 백신을 투여받은 대상체에 비해 RSV 백신 투여 후 RSV에 대한 중화 항체의 혈청 농도가 유사하다.

[0059] 특정 구현예에서, 단백질 RSV 백신은 아쥬반트와 공동-투여된다.

[0060] 특정 구현예에서, RSV 백신은 RSV F 단백질의 부위 Ø에 대해 결합 특이성을 갖는 항체의 혈청 농도를 증가시킨다.

[0061] 특정 구현예에서, 대상체는 SEQ ID NO: 2의 RSV F 단백질 항원을 인코딩하는 mRNA ORF를 포함하는 RSV 백신을 투여받은 대상체에 비해 RSV 백신 투여 후 RSV F 단백질의 부위 I 또는 부위 II에 대해 결합 특이성을 갖는 항체의 혈청 농도가 더 높다.

[0062] 특정 구현예에서, RSV 백신은 기존 RSV 면역을 갖고 있는 대상체의 중화 항체의 혈청 농도를 증가시킨다.

[0063] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 상기에 기재된 RSV 백신을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, RSV에 대한 면역 반응을 유도하거나 대상체를 RSV 감염으로부터 보호하기 위한 RSV 백신을 제공한다.

[0064] 특정 구현예에서, 상기에 기재된 RSV 백신은 RSV에 대한 면역 반응을 유도하거나 대상체를 RSV 감염으로부터 보호하기 위한 의약의 제조에 사용된다.

도면의 간단한 설명

[0065] 본 개시내용의 상기 및 기타 특징 및 이점은 첨부된 도면과 함께 취해진 예시적인 구현예의 다음의 상세한 설명으로부터 보다 완전히 이해될 것이다.

도 1a 및 도 1b는 형질감염된 세포로부터의 FD1, FD2 및 FD3 단백질의 웨스턴 블롯 이미지를 도시한다. 6웰 플레이트에 시딩한 HEK293FT 세포를 MIRUS 키트 및 세포 용해물(FD1 및 FD3) 또는 세포 상층액(FD2)을 사용하여 3 µg의 mRNA로 형질감염시키고 형질감염 24시간 후 회수하였다(도 1a). FD1 mRNA는 단백질을 생산하기 위해 시험관내 전사(*in vitro* transcription, IVT) 키트를 사용하여 무세포 수단으로 평가하고 FD1 mRNA 형질감염된 세포의 단백질과 비교하였다. 회수한 샘플에 대해 웨스턴 블롯 분석을 수행하고 막을 5353C75 단클론성 항체로 염색하였다(도 1b).

도 2의 A 및 도 2의 B는 형질감염된 HEK 대 핵감염된 HSkMC의 웨스턴 블롯을 도시한다. 6웰 플레이트에 시딩한 HEK293FT 세포를 MIRUS 키트를 사용하여 5 µg의 mRNA로 형질감염시키고 세포 용해물(FD1 및 FD3) 또는 세포 상층액(FD2)을 형질감염 24시간 후에 회수하였다(도 2의 A). HSkM 세포를 Amaxa 기본 뉴클레오펙터 키트를 사용하여 5 µg의 mRNA로 핵감염시키고 세포 용해물(FD1 및 FD3) 또는 세포 상층액(FD2)을 핵감염 24시간 후에 회수하였다(도 2의 B). 회수한 샘플에 대해 웨스턴 블롯 분석을 수행하고 막을 5353C75 단클론성 항체로 염색하였다.

도 3은 형질감염된 HEK 세포의 면역염색을 도시한다. 24-웰 플레이트에 시딩한 HEK293FT 세포를 MIRUS 키트 세포를 사용하여 5 µg의 mRNA로 형질감염시켰다. 형질감염 24시간 후, 단클론성 항체 D25 및 Synagis를 형광 태그된 이차 항체와 함께 플레이트에 추가하고 Celigo를 사용하여 영상화하였다.

도 4a 및 도 4b는 나이브 비인간 영장류(naïve non-human primate, NHP)에서 선택된 RSV 항원의 면역원성을 도시한다. RSV F 단백질 항체 역가(도 4a) 및 RSV 미세중화 역가(도 4b)를 각각의 항원 조성물에 대해 0일차, 28일차 및 56일차에 측정하였다.

도 5는 세 종류의 공지된 RSV F 단백질 항체인 D25, Synagis(팔리비주맵) 및 131-2a에 대해 선택된 RSV 항원으로 면역화된 NHP의 혈청을 사용한 경쟁 ELISA의 결과를 도시한다.

도 6a 및 도 6b는 RSV F ELISA 및 RSV 미세중화 검정에 의한 시노몰구스 마카크(*cynomolgus macaque*)에서의 면역 전 부스팅 효과를 도시한다. 부스팅된 원숭이에서 항-RSV-F 항체의 역가는 DS-Cav1 Pre-F 단백질을 결합 항원으로 사용하여 종점 ELISA로 측정하고 염소-항-인간 IgG로 검출하였다. 개별 동물(n = 6)의 관독값은 D0, D14 및 D28 시점에 대해 GMT +/- 95% 신뢰 구간(각각 위의 값 = GMT)으로 표시된다. 다중 비교를 위해 Tukey 사후 검정과 더불어 양방향 ANOVA로 통계 분석을 수행하였다(도 6a). Vero 세포의 96-웰 플레이트상의 백신접종된 원숭이의 연속 회석된 혈청과 혼합된 WT A2-GFP RSV 균주를 사용하여 RSV 중화 항체 역가를 미세중화 검정으로 측정하였다. 24시간 인큐베이션 후 형광 초점의 역 감소를 계산하여 역가를 결정하였다. 개별 동물(n = 6)의 관독값은 D0, D14 및 D28 시점에 대해 GMT +/- 95% 신뢰 구간(각각 위의 값 = GMT)으로 표시된다. 다중 비교를 위해 Tukey 사후 검정과 더불어 양방향 ANOVA로 통계 분석을 수행하였다(도 6b).

도 7는 mRNA를 발현하는 FD3F 단백질로 면역화된 NHP에서 RSV F 단백질 항체 역가를 도시한다. mRNA는 여러 양이온성 지질 중 하나를 함유하는 지질 나노입자(LNP)와 함께 전달되었다. 항체 역가는 각각의 항원 조성물에 대해 0일, 21일 및 35일에 측정되었다.

도 8은 mRNA를 발현하는 FD3 F 단백질로 면역화된 NHP에서 RSV 중화 역가를 도시한다. mRNA는 여러 양이온성 지질 중 하나를 함유하는 지질 나노입자(LNP)와 함께 전달되었다. 항체 역가는 각각의 항원 조성물에 대해 0일, 21일 및 35일에 측정되었다.

도 9의 A 및 도 9의 B는 나이브 마우스에서 선택된 RSV 항원의 면역원성을 도시한다. RSV F 단백질 항체 역가(도 9의 A) 및 RSV 미세중화 역가(도 9의 B)를 각각의 항원 조성물에 대해 0일차, 21일차 및 35일차에 측정하였다.

도 10a 및 도 10b는 모듈형 면역 시험관내 작제물(MIMIC®) 시스템에서 선택된 RSV 항원과의 Pre-F IgG 역가(도 10a) 및 Pre-F / Post-F 결합 비(도 10b)를 도시한다.

도 11은 기존 RSV 번역을 갖는 공여자에서 유래한 MIMIC® 시스템에서의 항-RSV 중화 역가를 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0066] 본 개시내용은 특히 RSV F 단백질을 인코딩하는 신규한 RNA(예를 들어, mRNA) 조성물 및 이를 이용한 백신접종 방법에 관한 것이다. 특히, 본 개시내용은 지질 나노입자(LNP)에 제형화된 RSV Pre-F 단백질을 인코딩하는 mRNA에 관한 것이다.
- [0067] I. 정의
- [0068] 본원에서 달리 정의되지 않는 한, 본 발명에 관해 사용된 과학적 및 기술적 용어는 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 의미를 갖는다. 예시적인 방법 및 물질이 아래에 기술되지만, 본원에 기술된 것과 유사하거나 동등한 방법 및 물질이 본 발명의 실시 또는 시험에 사용될 수도 있다. 충돌되는 경우, 정의를 비롯한 본 명세서가 우선할 것이다. 일반적으로, 본원에 기술되어 있는 세포 및 조직 배양, 분자 생물학, 바이러스학, 면역학, 미생물학, 유전학, 분석 화학, 합성 유기 화학, 의학 및 제약 화학, 단백질 및 핵산 화학 및 혼성화와 관련하여 사용되는 명명법 및 이들의 기법은 당해 기술분야에 잘 알려져 있고 흔히 사용되는 것이다. 효소 반응 및 정제 기법은 당분야에서 일반적으로 달성되는 바와 같이 또는 본원에 기재된 바와 같이, 제조업체의 사양에 따라 수행된다. 또한, 문맥상 달리 요구되지 않는 한, 단수형 용어는 복수를 포함할 것이고, 복수형 용어는 단수형을 포함할 것이다. 본 명세서 및 구현에 전반에 걸쳐, 단어 "갖다(have)" 및 "포함하다(comprise)", 또는 "가진다(has)", "갖는(having)", "포함한다(comprises)", 또는 "포함하는(comprising)"과 같은 변형은 언급된 정수 또는 정수의 균을 포함하고, 임의의 다른 정수 또는 정수의 균을 배제하지 않음을 암시하는 것으로 이해될 것이다. 본원에 언급된 모든 간행물 및 다른 참고문헌은 그 전체가 본원에 참고로 포함된다. 다수의 문헌이 본원에 인용되지만, 이 인용은 임의의 이들 문헌이 당업계의 통상적인 일반 지식의 일부를 형성함을 인정하는 것으로 간주되지 않는다.
- [0069] 단수 형태의 엔티티는 해당 엔티티 중 하나 이상을 지칭함에 유의해야 한다. 예를 들어 "뉴클레오티드 서열"은 하나 이상의 뉴클레오티드 서열을 나타내는 것으로 이해된다. 그러므로, 용어 "하나", "하나 이상" 및 "적어도 하나"는 본원에서 상호교환적으로 사용될 수 있다.
- [0070] 추가로, 본원에 사용된 "및/또는"은 두 가지의 명시된 개시내용 또는 구성요소의 각각을 다른 것과 함께 또는 다른 것 없이 구체적으로 개시하는 것으로서 간주되어야 한다. 따라서, 본원에서 "A 및/또는 B"와 같은 어구에서 사용된 용어 "및/또는"은 "A 및 B", "A 또는 B", "A"(단독) 및 "B"(단독)를 포함하는 것으로 의도된다. 마찬가지로, "A, B 및/또는 C"와 같은 어구에서 사용된 용어 "및/또는"은 하기의 양태 각각을 포함하는 것으로 의도된다: A, B 및 C; A, B 또는 C; A 또는 C; A 또는 B; B 또는 C; A 및 C; A 및 B; B 및 C; A(단독); B(단독); 및 C(단독).
- [0071] 본원에서 양태가 "포함하는(comprising)"이라는 말로 기재되는 경우, 다르게는 "이루어진(consisting of)" 및/또는 "본질적으로 이루어진(consisting essentially of)"이라는 용어로 기재된 유사한 양태도 제공되는 것으로 이해된다.
- [0072] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 용어 및 과학 용어는 본 개시내용이 관련된 분야의 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 예를 들어, 문헌[Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press; and the Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Press]은 본 개시내용에서 사용된 용어 중 많은 것의 일반적인 사전을 당업자에게 제공할 수 있다.
- [0073] 단위, 접두어 및 기호는 이들의 국제단위계(International System of Units, SI) 허용 형태로 표시된다. 수치 범위는 범위를 한정하는 수치를 포함한다. 달리 명시되지 않는 한, 아미노산-카르복시 배향에 있어서 아미노산 서열은 왼쪽에서 오른쪽으로 쓰여진다. 본원에 제공된 표제는 본 개시내용의 다양한 양태를 한정하지 않는다. 따라서, 바로 아래에 정의된 용어는 명세서 전체를 참조함으로써 더욱 완전하게 정의된다.
- [0074] 용어 "대략" 또는 "약"은 본원에서 대략, 거의, ~쯤, 또는 ~정도를 의미하는 것으로 사용된다. "약"이라는 용어가 수치 범위와 함께 사용되는 경우, 이는 명시된 수치값 위아래로 경계를 확장하여 해당 범위를 수식한다. 일반적으로, 용어 "약"은 표시 값의 위와 아래의 수치값을 예를 들어 10퍼센트의 차이만큼 위 또는 아래로(높게 또는 낮게) 수정할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 용어는 $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, $\pm 4\%$, $\pm 3\%$, $\pm 2\%$, $\pm 1\%$, $\pm 0.9\%$, \pm

0.8%, ±0.7%, ±0.6%, ±0.5%, ±0.4%, ±0.3%, ±0.2%, ±0.1%, ±0.05% 또는 ±0.01%만큼 표시된 수치값으로부터의 편차를 나타낸다. 일부 구현예에서, "약"은 ±10%만큼 표시된 수치값으로부터의 편차를 나타낸다. 일부 구현예에서, "약"은 ±5%만큼 표시된 수치값으로부터의 편차를 나타낸다. 일부 구현예에서, "약"은 ±4%만큼 표시된 수치값으로부터의 편차를 나타낸다. 일부 구현예에서, "약"은 ±3%만큼 표시된 수치값으로부터의 편차를 나타낸다. 일부 구현예에서, "약"은 ±2%만큼 표시된 수치값으로부터의 편차를 나타낸다. 일부 구현예에서, "약"은 ±1%만큼 표시된 수치값으로부터의 편차를 나타낸다. 일부 구현예에서, "약"은 ±0.9%만큼 표시된 수치값으로부터의 편차를 나타낸다. 일부 구현예에서, "약"은 ±0.8%만큼 표시된 수치값으로부터의 편차를 나타낸다. 일부 구현예에서, "약"은 ±0.7%만큼 표시된 수치값으로부터의 편차를 나타낸다. 일부 구현예에서, "약"은 ±0.6%만큼 표시된 수치값으로부터의 편차를 나타낸다. 일부 구현예에서, "약"은 ±0.5%만큼 표시된 수치값으로부터의 편차를 나타낸다. 일부 구현예에서, "약"은 ±0.4%만큼 표시된 수치값으로부터의 편차를 나타낸다. 일부 구현예에서, "약"은 ±0.3%만큼 표시된 수치값으로부터의 편차를 나타낸다. 일부 구현예에서, "약"은 ±0.2%만큼 표시된 수치값으로부터의 편차를 나타낸다. 일부 구현예에서, "약"은 ±0.1%만큼 표시된 수치값으로부터의 편차를 나타낸다. 일부 구현예에서, "약"은 ±0.05%만큼 표시된 수치값으로부터의 편차를 나타낸다. 일부 구현예에서, "약"은 ±0.01%만큼 표시된 수치값으로부터의 편차를 나타낸다.

- [0075] 본원에 사용된 용어 "메신저 RNA" 또는 "mRNA"는 적어도 하나의 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 지칭한다. 본원에 사용된 mRNA는 변형된 RNA 및 변형되지 않은 RNA 둘 모두를 포함한다. mRNA는 하나 이상의 코딩 영역 및 비-코딩 영역을 함유할 수 있다. 코딩 영역은 대안적으로 오픈 리딩 프레임(ORF)로 지칭된다. mRNA에서 비-코딩 영역은 5' 캡, 5' 비번역 영역(UTR), 3' UTR 및 폴리(A) 테일을 포함한다. mRNA는 천연 공급원으로부터 정제될 수 있고, 재조합 발현 시스템(예를 들어, *시خم관내* 전사)를 이용하여 생성되고, 선택적으로 정제되거나, 화학적으로 합성된다.
- [0076] 본원에 사용된 용어 "항원성 부위 Ø" 또는 "부위 Ø 에피토프"는 야생형 RSV F의 아미노산 잔기 62 내지 69 및 196 내지 209(SEQ ID NO: 1)를 포함하는, 융합전 RSV F 삼량체의 정점에 위치한 부위를 지칭한다. 부위 Ø 에피토프는 융합전 RSV F, 예컨대 D25 및 AM14에 대한 특이성을 갖는 항체에 대한 결합 부위이고, 부위 Ø 에피토프에 대한 항체의 결합은 RSV의 세포-표면 부착을 차단한다(예를 들어, 문헌[McLellan et al., Science, 340(6136): 1113-1117, 2013])을 참고한다). 재조합 인간 항-RSV 항체 D25(Creative Biolabs®; CAT #: PABL-322) 및 재조합 인간 항-RSV 항체 AM14(Creative Biolabs®; CAT #: PABL-321)는 각각 상업적으로 시판된다.
- [0077] 본원에 사용된 용어 "항원 안정성"은 시간 경과에 따른 또는 용액 내 항원의 안정성을 지칭한다.
- [0078] 본원에 사용된 용어 "공동 충전 치환"은 융합전 RSV F 삼량체에 존재하는 공동을 충전하기 위한 조작된 소수성 치환을 지칭한다.
- [0079] 본원에 사용된 용어 "F 단백질" 또는 "RSV F 단백질"은 바이러스 진입 동안 바이러스 외피와 숙주 세포막의 융합을 유도하는 역할을 하는 RSV의 단백질을 지칭한다.
- [0080] 본원에 사용된 용어 "RSV F 폴리펩티드" 또는 "F 폴리펩티드"는 F 단백질의 적어도 하나의 에피토프를 포함하는 폴리펩티드를 지칭한다.
- [0081] 본원에 사용된 용어 "글리칸 첨가"는 야생형 RSV F에 존재하지 않는 글리코실화 부위를 도입하는 돌연변이의 추가를 지칭하고, 이는 작제물 발현을 증가시키거나, 작제물 안정성을 증가시키거나, 융합전 및 융합후 입체형태간에 공유되는 에피토프를 차단하도록 조작될 수 있다. 글리칸 첨가를 포함하는 변형된 단백질은 더 많은 글리코실화를 가지므로 더 높은 분자량을 가질 것이다. 글리칸 첨가는 RSV F 폴리펩티드가 RSV F의 융합후 입체형태에 대한 항체를 유도하는 정도를 감소시킬 수 있다.
- [0082] 본원에 사용된 용어 "프로토머내 안정화 치환"은 RSV F 삼량체의 프로토머 내 상호작용을 안정화함으로써 융합전 입체형태를 안정화시키는 RSV F의 아미노산 치환을 지칭한다.
- [0083] 본원에 사용된 용어 "프로토머간 안정화 치환"은 RSV F 삼량체의 프로토머 내 서로와의 상호작용을 안정화함으로써 융합전 입체형태를 안정화시키는 RSV F의 아미노산 치환을 지칭한다.
- [0084] 본원에 사용된 용어 "프로테아제 절단"은 폴리펩티드 서열내 감수성 잔기(예를 들어, 리신 또는 아르기닌)의 단백질분해(종종 "클리핑"이라고도 함)를 지칭한다.
- [0085] 본원에 사용된 용어 "융합후"는 RSV F와 관련하여, 바이러스 및 세포막의 병합 후에 발생하는 RSV F의 안정한 입체형태를 지칭한다.
- [0086] 본원에 사용된 용어 "융합전"은 RSV F와 관련하여, 바이러스-세포 상호작용 전에 채택된 RSV F의 입체형태를 지

칭한다.

- [0087] 본원에 사용된 용어 "프로토머"는 올리고머 단백질의 구조적 단위를 지칭한다. RSV F의 경우, RSV F 삼량체의 개별 단위는 프로토머이다.
- [0088] 본원에 사용된 용어 "N-글리칸"은 단백질의 N(아스파라긴) 잔기의 아미드 질소에서 단백질에 부착된 당류 사슬을 지칭한다. 이와 같이, N-글리칸은 N-글리코실화 프로세스에 의해 형성된다. 이 글리칸은 다당류일 수 있다.
- [0089] 본원에 사용된 용어 "글리코실화"는 단백질에 당류 단위를 첨가하는 것을 지칭한다.
- [0090] 본원에 사용된 용어 "면역 반응"은 항원 또는 백신과 같은 자극제에 대한 면역계 세포, 예컨대 B 세포, T 세포, 수지상 세포, 대식세포 또는 다형핵구의 반응을 지칭한다. 면역 반응은 예를 들어, 인터페론 또는 사이토카인을 분비하는 상피 세포를 포함하여, 숙주 방어 반응에 관련된 신체의 임의의 세포를 포함할 수 있다. 면역 반응은 선천성 및/또는 적응성 면역 반응을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0091] 본원에 사용된 "보호 면역 반응"은 감염으로부터 대상체를 보호하는 (예를 들어, 감염을 예방하거나 감염과 관련된 질환의 발병을 예방하는) 면역 반응을 지칭한다. 면역 반응을 측정하는 방법은, 예를 들어, 림프구(예컨대, B 또는 T 세포)의 증식 및/또는 활성화, 사이토카인 또는 케모카인 분비, 염증, 항체 생산 등을 측정하는 것을 포함한다.
- [0092] 본원에 사용된 "항체 반응"은 항체가 생성되는 면역 반응이다.
- [0093] 본원에 사용된 "항원"은 (예를 들어, MHC 분자에 의해 제시될 때) 면역 반응을 유도하는 제제 및/또는 T 세포 수용체에 의해 결합되거나, 유기체에 노출되거나 투여될 때 (예를 들어, B 세포에 의해 생성되는) 항체에 결합되는 제제를 지칭한다. 일부 구현예에서, 항원은 유기체에서 체액 반응(예를 들어, 항원-특이적 항체의 생성 포함)을 유도한다. 대안적으로 또는 추가적으로, 일부 구현예에서, 항원은 유기체에서 (예를 들어, 수용체가 항원과 특이적으로 상호작용하는 T-세포를 포함하는) 세포 반응을 유도한다. 특정 항원은 표적 유기체(예를 들어, 마우스, 토끼, 영장류, 인간)의 하나 또는 여러 구성원에서 면역 반응을 유도할 수 있지만, 표적 유기체 종의 모든 구성원에서 그렇지는 않다. 일부 구현예에서, 항원은 표적 유기체 종의 구성원의 적어도 약 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%에서 면역 반응을 유도한다. 일부 구현예에서, 항원은 항체 및/또는 T 세포 수용체에 결합하고, 유기체에서 특정 생리학적 반응을 유도할 수 있거나 유도하지 않을 수 있다. 일부 구현예에서, 예를 들어, 항원은 이러한 상호작용이 *생체내*에서 발생하는지 여부에 관계없이 *시험관내* 항체 및/또는 T 세포 수용체에 결합할 수 있다. 일부 구현예에서, 항원은 특정 체액성 또는 세포성 면역의 생성물과 반응한다. 항원은 본원에 기재된 mRNA에 의해 인코딩된 RSV 폴리펩티드를 포함한다.
- [0094] 본원에 사용된 "아주반트"는 항원에 대한 면역 반응을 향상시키는 물질 또는 비히클을 지칭한다. 아주반트는 항원이 흡착된 미네랄(예를 들어, 명반, 수산화 알루미늄 또는 포스페이트)의 현탁액; 항원 용액이 광유 또는 물에 유화된 유중수형 또는 수중유형 에멀션(예를 들어, 프로인트(Freund)의 불완전 아주반트)를 제한없이 포함할 수 있다. 때때로 사멸된 마이코박테리아가 포함되어(예를 들어, 프로인트의 완전 아주반트), 항원성을 더욱 향상시킨다. 면역-자극 올리고뉴클레오티드(예를 들어, CpG 모티프)도 아주반트로서 사용될 수 있다(예를 들어, 미국 특허 제6,194,388호; 제6,207,646호; 제6,214,806호; 제6,218,371호; 제6,239,116호; 제6,339,068호; 제6,406,705호; 및 제6,429,199호 참고). 아주반트는 또한 톨-유사 수용체(TLR) 작용제 및 공동자극 분자와 같은 생물학적 분자를 포함할 수 있다.
- [0095] 본원에 사용된 "항원성 RSV 폴리펩티드"는 분자가 RSV에 대해 항원성인 충분한 길이의 RSV 아미노산 서열의 전부 또는 일부를 포함하는 폴리펩티드를 지칭한다.
- [0096] 본원에 사용된 "대상체"는 동물계의 모든 구성원을 지칭한다. 일부 구현예에서, "대상체"는 인간을 지칭한다. 일부 구현예에서, "대상체"는 비인간 동물을 지칭한다. 일부 구현예에서, 대상체는 포유동물, 새, 파충류, 양서류, 어류, 곤충 및/또는 벌레를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 특정 구현예에서, 비인간 대상체는 포유동물(예를 들어, 설치류, 마우스, 래트, 토끼, 원숭이, 개, 고양이, 양, 소, 영장류 및/또는 돼지)이다. 일부 구현예에서, 대상체는 트랜스제닉 동물, 유전적으로 조작된 동물 및/또는 클론일 수 있다. 특정 구현예에서, 대상체는 성인, 청소년 또는 유아이다. 일부 구현예에서, 용어 "개체" 또는 "환자"가 사용되고, "대상체"와 상호교환될 수 있도록 의도된다. 소정의 예시적 구현예에서, 대상체는 조산아(예를 들어, 재태기간이 37주 미만), 신생아(예를 들어, 생후 0-27일), 신생아 또는 유아(예를 들어, 생후 28일-23개월), 아동(예를 들어, 2세 내지 11세), 청소년(예를 들어, 12세 내지 17세), 성인(예를 들어, 18세 내지 50세 또는 18세 내지 64세) 또는 노인(예

를 들어, 65세 이상)이다. 예시적인 구현예에서, 대상체는 18세 내지 50세이다. 다른 예시적인 구현예에서, 대상체는 노인(예를 들어, 60세 이상의 성인)이다.

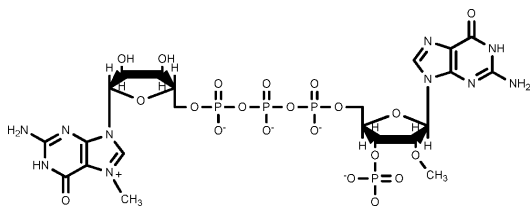
- [0097] 본원에 사용된 용어 "백신접종" 또는 "백신접종하다"는 예를 들어, 질환-유발제에 대한 면역 반응을 생성하도록 의도된 조성물의 투여를 지칭한다. 백신접종은 질환-유발 제제, 및/또는 하나 이상의 증상의 발현에 대한 노출 전, 동안 및/또는 후에, 그리고 일부 구현예에서 질환-유발 제제에 노출되기 전, 동안 및/또는 직후에 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 백신접종은 백신접종 조성물의 적절한 시간 간격을 둔 다회 투여를 포함한다.
- [0098] 본 개시내용은 각각 주어진 핵산 서열 또는 아미노산 서열(기준 서열)에 대해 특정 정도의 동일성을 갖는 핵산 서열(예를 들어, DNA 및 RNA 서열) 및 아미노산 서열을 기재한다.
- [0099] 두 핵산 서열 사이의 "서열 동일성"은 서열들 사이에 동일한 뉴클레오티드의 백분율을 나타낸다. 두 아미노산 서열 사이의 "서열 동일성"은 서열들 사이에 동일한 아미노산의 백분율을 나타낸다.
- [0100] 용어 "% 동일한", "% 동일성" 또는 유사한 용어는 특히 비교될 서열 간의 최적 정렬에서 동일한 뉴클레오티드 또는 아미노산의 백분율을 지칭하는 것으로 의도된다. 상기 백분율은 순전히 통계적이고, 두 서열 간의 차이는 비교될 서열의 전체 길이에 걸쳐 무작위로 분포될 수 있지만 반드시 그런 것은 아니다. 두 서열의 비교는 일반적으로 상응하는 서열의 국소 영역을 식별하기 위해, 세그먼트 또는 "비교 창"에 대해 최적 정렬 후에 상기 서열을 비교함으로써 수행된다. 비교를 위한 최적 정렬은 수동으로 수행될 수 있거나, 문헌[Smith and Waterman, 1981, *Adv. App. Math.* 2, 482]의 국소적 상동성 알고리즘에 의해, 문헌[Needleman and Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48, 443]의 국소적 상동성 알고리즘에 의해, 문헌[Pearson and Lipman, 1988, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 88, 2444]의 유사성 검색 알고리즘에 의해, 또는 이러한 알고리즘을 이용하는 컴퓨터 프로그램 (위스콘신 제네틱스 소프트웨어 패키지(Wisconsin Genetics Software Package) 내의 GAP, BESTFIT, FASTA, BLAST P, BLAST N 및 TFASTA, 미국 위스콘신주 매디슨 사이언스 드라이브 575 소재의 제네틱스 컴퓨터 그룹(Genetics Computer Group))에 의해 수행될 수 있다.
- [0101] 백분율 동일성은 비교될 서열이 대응하는 동일한 포지션의 수를 결정하고, 이 수를 비교된 포지션의 수(예를 들어, 기준 서열의 포지션 수)로 나누고, 이 결과에 100을 곱함으로써 획득된다.
- [0102] 일부 구현예에서, 동일성의 정도는 기준 서열 전체 길이의 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90% 또는 약 100%인 영역에 대해 제공된다. 예를 들어, 기준 핵산 서열이 200개의 뉴클레오티드로 구성되는 경우, 동일성의 정도는 적어도 약 100, 적어도 약 120, 적어도 약 140, 적어도 약 160, 적어도 약 180, 또는 약 200개의 뉴클레오티드에 대해, 일부 구현예에서 연속 뉴클레오티드에서 제공된다. 일부 구현예에서, 동일성의 정도는 기준 서열의 전체 길이에 대해 제공된다.
- [0103] 주어진 핵산 서열 또는 아미노산 서열에 대해 각각 특정 정도의 동일성을 갖는 핵산 서열 또는 아미노산 서열은 상기 주어진 서열의 적어도 하나의 기능적 특성을 가질 수 있고, 예를 들어, 일부 경우에는 상기 주어진 서열과 기능적으로 동일하다. 일부 구현예에서, 주어진 핵산 서열 또는 아미노산 서열에 대해 특정 정도의 동일성을 갖는 핵산 서열 또는 아미노산 서열은 상기 주어진 서열과 기능적으로 동등하다.
- [0104] 본원에 사용된 용어 "키트"는 하나 이상의 화합물 또는 조성물과 같은 관련 성분 및 용매, 용액, 완충액, 지침 또는 건조제와 같은 하나 이상의 관련 물질의 패키지 세트를 지칭한다.
- [0105] **II. RNA**
- [0106] 본 개시내용의 RSV 백신은 RSV F 단백질 항원을 인코딩하는 ORF를 포함하는 적어도 하나의 리보핵산(RNA)을 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, RNA는 RSV F 단백질 항원을 인코딩하는 ORF를 포함하는 메신저 RNA(mRNA)이다. 특정 구현예에서, RNA(예를 들어, mRNA)는 적어도 하나의 5' UTR, 3' UTR, 폴리(A) 테일, 및/또는 5' 캡을 추가로 포함한다.
- [0107] **II. A. 5' 캡**
- [0108] mRNA 5' 캡은 대부분의 진핵 세포에서 발견되는 뉴클레아제에 대한 저항성을 제공하고, 번역 효율을 촉진할 수 있다. 여러 유형의 5' 캡이 알려져 있다. 7-메틸구아노신 캡("m⁷G" 또는 "캡-0"이라고도 함)은 5' - 5' - 삼인산염 결합을 통해 첫 번째 전사된 뉴클레오티드에 연결된 구아노신을 포함한다.
- [0109] 5' 캡은 전형적으로 다음과 같이 추가된다: 첫째, RNA 말단 포스파타제는 5' 뉴클레오티드로부터 말단 포스페이트 기들 중 하나를 제거하여, 2개의 말단 포스페이트를 남기고; 그런 다음 구아노신 삼인산염(GTP)은 구아닐릴

트랜스퍼라제를 통해 말단 포스페이트에 추가되어, 5' 5' 5' 삼인산염 연결을 생성하고; 그런 다음, 구아닌의 7-질소는 메틸트랜스퍼라제에 의해 메틸화된다. 캡 구조의 예는 m7G(5')ppp, (5'(A,G(5')ppp(5')A, 및 G(5')ppp(5')G)을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 추가 캡 구조는 미국 공개 번호 US 2016/0032356 및 미국 공개 번호 US 2018/0125989에 기재되어 있고, 이는 본원에 참고로 포함된다.

[0110] 폴리뉴클레오타이드의 5'-캡핑은 하기 화학적 RNA 캡 유사체를 사용하여 시험관내-전사 반응 동안 부수적으로 완료되어 제조업체 프로토콜에 따라 5'-구아노신 캡 구조를 생성할 수 있다: 3'-O-Me-m7G(5')ppp(5')G(ARCA 캡); G(5')ppp(5')A; G(5')ppp(5')G; m7G(5')ppp(5')A; m7G(5')ppp(5')G; m7G(5')ppp(5')(2'OMeA)pG; m7G(5')ppp(5')(2'OMeA)pU; m7G(5')ppp(5')(2'OMeG)pG(New England BioLabs, Ipswich, MA; TriLink Biotechnologies). 변형된 RNA의 5'-캡핑은 백시니아 바이러스 캡핑 효소를 사용하여 전사 후 완료되어, 캡 0 구조: m7G(5')ppp(5')G를 생성할 수 있다. 캡 1 구조는 백시니아 바이러스 캡핑 효소 및 2'-O 메틸-트랜스퍼라제 둘 모두를 사용하여 생성되어: m7G(5')ppp(5')G-2'-O-메틸을 생성할 수 있다. 캡 2 구조는 2'-O 메틸-트랜스퍼라제를 사용하여 5'-끝에서 세번째 뉴클레오타이드의 2'-O-메틸화가 뒤따르는 캡 1 구조로부터 생성될 수 있다. 캡 3 구조는 2'-O 메틸-트랜스퍼라제를 사용하여 5'-끝에서 네번째 뉴클레오타이드의 2'-O-메틸화가 뒤따르는 캡 2 구조로부터 생성될 수 있다.

[0111] 특정 구현예에서, 본 개시내용의 mRNA는 3'-O-Me-m7G(5')ppp(5')G (ARCA 캡), G(5')ppp(5')A, G(5')ppp(5')G, m7G(5')ppp(5')A, m7G(5')ppp(5')G, m7G(5')ppp(5')(2'OMeA)pG, m7G(5')ppp(5')(2'OMeA)pU, 및 m7G(5')ppp(5')(2'OMeG)pG로 이루어진 군으로부터 선택되는 5' 캡을 포함한다.

[0112] 특정 구현예에서, 본 개시내용의 mRNA는 하기의 5' 캡을 포함한다:



[0113]

II. B. 비번역 영역(UTR)

[0114]

[0115] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 mRNA는 5' 및/또는 3' 비번역 영역(UTR)을 포함한다. mRNA에서, 5' UTR은 전사 시작 부위에서 시작하여 시작 코돈까지 계속되지만, 시작 코돈을 포함하지 않는다. 3' UTR은 정지 코돈 바로 다음에서 시작하여 전사 종료 신호까지 계속한다.

[0116]

일부 구현예에서, 본원에 개시된 mRNA는 mRNA의 안정성 또는 번역에 영향을 미치는 하나 이상의 요소를 포함하는 5' UTR을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 5' UTR은 약 10 내지 5,000개 뉴클레오타이드 길이일 수 있다. 일부 구현예에서, 5' UTR은 약 50 내지 500개 뉴클레오타이드 길이일 수 있다. 일부 구현예에서, 5' UTR은 적어도 약 10개 뉴클레오타이드 길이, 약 20개 뉴클레오타이드 길이, 약 30개 뉴클레오타이드 길이, 약 40개 뉴클레오타이드 길이, 약 50개 뉴클레오타이드 길이, 약 100개 뉴클레오타이드 길이, 약 150개 뉴클레오타이드 길이, 약 200개 뉴클레오타이드 길이, 약 250개 뉴클레오타이드 길이, 약 300개 뉴클레오타이드 길이, 약 350개 뉴클레오타이드 길이, 약 400개 뉴클레오타이드 길이, 약 450개 뉴클레오타이드 길이, 약 500개 뉴클레오타이드 길이, 약 550개 뉴클레오타이드 길이, 약 600개 뉴클레오타이드 길이, 약 650개 뉴클레오타이드 길이, 약 700개 뉴클레오타이드 길이, 약 750개 뉴클레오타이드 길이, 약 800개 뉴클레오타이드 길이, 약 850개 뉴클레오타이드 길이, 약 900개 뉴클레오타이드 길이, 약 950개 뉴클레오타이드 길이, 약 1,000개 뉴클레오타이드 길이, 약 1,500개 뉴클레오타이드 길이, 약 2,000개 뉴클레오타이드 길이, 약 2,500개 뉴클레오타이드 길이, 약 3,000개 뉴클레오타이드 길이, 약 3,500개 뉴클레오타이드 길이, 약 4,000개 뉴클레오타이드 길이, 약 4,500개 뉴클레오타이드 길이 또는 약 5,000개 뉴클레오타이드 길이이다.

[0117]

일부 구현예에서, 본원에 개시된 mRNA는 폴리아데닐화 신호 중 하나 이상을 포함하는 3' UTR, mRNA의 세포내 위치 안정성에 영향을 미치는 단백질에 대한 결합 부위, 또는 miRNA에 대한 하나 이상의 결합 부위를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 3' UTR은 50 내지 5,000개 뉴클레오타이드 길이 또는 그 이상일 수 있다. 일부 구현예에서, 3' UTR은 50 내지 1,000개 뉴클레오타이드 길이 또는 그 이상일 수 있다. 일부 구현예에서, 3' UTR은 적어도 약 50개 뉴클레오타이드 길이, 약 100개 뉴클레오타이드 길이, 약 150개 뉴클레오타이드 길이, 약 200개 뉴클레오타이드 길이, 약 250개 뉴클레오타이드 길이, 약 300개 뉴클레오타이드 길이, 약 350개 뉴클레오타이드 길이, 약 400개 뉴클레오타이드 길이, 약 450개 뉴클레오타이드 길이, 약 500개 뉴클레오타이드 길이, 약 550개 뉴클레오타이드 길이, 약 600개 뉴클레오타이드 길이, 약 650개 뉴클레오타이드 길이, 약 700개 뉴클레오타이드 길이, 약 750개 뉴클레오타이드

용어는 마찬가지로 DNA 분자 내의 상응하는 서열(예를 들어, "폴리(T) 서열")에 관한 것이다.

[0130] 폴리(A) 테일은 약 10 내지 약 500개 아데노신 뉴클레오티드, 약 10 내지 약 200개 아데노신 뉴클레오티드, 약 40 내지 약 200개 아데노신 뉴클레오티드, 또는 약 40 내지 약 150개 아데노신 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 폴리(A) 테일의 길이는 적어도 약 10, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 또는 500개 아데노신 뉴클레오티드일 수 있다.

[0131] 핵산이 RNA인 일부 구현예에서, 핵산의 폴리(A) 테일은 RNA 시험관내 전사 동안 DNA 주형으로부터 얻어진다. 특정 구현예에서, 폴리(A) 테일은 DNA 주형으로부터 전사되지 않고 일반적인 화학적 합성 방법에 의해 시험관내에서 얻어진다. 다양한 구현예에서, 폴리(A) 테일은 상업적으로 입수가 가능한 폴리아데닐화 키트 및 상응하는 프로토콜을 사용한 RNA의 효소적 폴리아데닐화(RNA 시험관내 전사 후)에 의해, 또는 대안적으로, 고정된 폴리(A) 중합효소를 사용하여, 예를 들어, W02016/174271에 기재된 바와 같은 방법 및 수단을 사용하여, 생성된다.

[0132] 핵산은 효소적 폴리아데닐화에 의해 획득된 폴리(A) 테일을 포함할 수 있고, 대부분의 핵산 분자는 약 100개 (+/-20) 내지 약 500개 (+/-50) 또는 약 250개 (+/-20) 아데노신 뉴클레오티드를 포함한다.

[0133] 일부 구현예에서, 핵산은 주형 DNA로부터 유래된 폴리(A) 테일을 포함할 수 있고, 예를 들어, W02016/091391에 기재된 바와 같이, 효소적 폴리아데닐화에 의해 생성된 적어도 하나의 추가의 폴리(A) 테일을 추가로 포함할 수 있다.

[0134] 특정 구현예에서, 핵산은 적어도 하나의 폴리아데닐화 신호를 포함한다.

[0135] 다양한 구현예에서, 핵산은 적어도 하나의 폴리(C) 서열을 포함할 수 있다.

[0136] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "폴리(C) 서열"은 최대 약 200개의 시토신 뉴클레오티드의 시토신 뉴클레오티드의 서열인 것으로 의도된다. 일부 구현예에서, 폴리(C) 서열은 약 10 내지 약 200개 시토신 뉴클레오티드, 약 10 내지 약 100개 시토신 뉴클레오티드, 약 20 내지 약 70개 시토신 뉴클레오티드, 약 20 내지 약 60개 시토신 뉴클레오티드, 또는 약 10 내지 약 40개 시토신 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 폴리(C) 서열은 약 30개의 시토신 뉴클레오티드를 포함한다.

[0137] **II. D. 화학적 변형**

[0138] 본원에 개시된 mRNA는 변형되거나 변형되지 않을 수 있다. 일부 구현예에서, mRNA는 적어도 하나의 화학적 변형을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 개시된 mRNA는 전형적으로 RNA 안정성을 향상시키는 하나 이상의 변형을 함유할 수 있다. 예시적인 변형은 백본 변형, 당 변형, 또는 염기 변형을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 개시된 mRNA는 자연 발생 뉴클레오티드 및/또는 퓨린(아데닌(A) 및 구아닌(G)) 또는 피리미딘(티민(T), 시토신(C), 및 우라실(U))을 포함하지만, 이에 제한되지 않는 뉴클레오티드 유사체(변형된 뉴클레오티드)로부터 합성될 수 있다. 특정 구현예에서, 개시된 mRNA는 퓨린 및 피리미딘의 변형된 뉴클레오티드 유사체 또는 유도체, 예컨대, 예를 들어, 1-메틸-아데닌, 2-메틸-아데닌, 2-메틸티오-N-6-이소펜테닐-아데닌, N6-메틸-아데닌, N6-이소펜테닐-아데닌, 2-티오-시토신, 3-메틸-시토신, 4-아세틸-시토신, 5-메틸-시토신, 2,6-디아미노퓨린, 1-메틸-구아닌, 2-메틸-구아닌, 2,2-디메틸-구아닌, 7-메틸-구아닌, 이노신, 1-메틸-이노신, 슈도우라실 (5-우라실), 디하이드로-우라실, 2-티오-우라실, 4-티오-우라실, 5-카르복시메틸아미노메틸-2-티오-우라실, 5-(카르복시하이드록시메틸)-우라실, 5-플루오로-우라실, 5-브로모-우라실, 5-카르복시메틸아미노메틸-우라실, 5-메틸-2-티오-우라실, 5-메틸-우라실, N-우라실-5-옥시 아세트산 메틸 에스테르, 5-메틸아미노메틸-우라실, 5-메톡시아미노메틸-2-티오-우라실, 5'-메톡시카르보닐메틸-우라실, 5-메톡시-우라실, 우라실-5-옥시아세트산 메틸 에스테르, 우라실-5-옥시아세트산(v), 1-메틸-슈도우라실, 퀘오신, β-D-만노실-퀘오신, 포스포라미데이트, 포스포로티오에이트, 펩티드 뉴클레오티드, 메틸포스포네이트, 7-데아자구아노신, 5-메틸시토신, 및 이노신으로부터 합성될 수 있다.

[0139] 일부 구현예에서, 개시된 mRNA는 슈도우리딘, N1-메틸슈도우리딘, 2-티오우리딘, 4'-티오우리딘, 5-메틸시토신, 2-티오-1-메틸-1-데아자-슈도우리딘, 2-티오-1-메틸-슈도우리딘, 2-티오-5-아자-우리딘, 2-티오-디하이드로슈도우리딘, 2-티오-디하이드로우리딘, 2-티오-슈도우리딘, 4-메톡시-2-티오-슈도우리딘, 4-메톡시-슈도우리딘, 4-티오-1-메틸-슈도우리딘, 4-티오-슈도우리딘, 5-아자-우리딘, 디하이드로슈도우리딘, 5-메틸우리딘, 5-메틸우리딘, 5-메톡시우리딘, 및 2'-O-메틸 우리딘을 포함하지만, 이에 제한되지 않는 적어도 하나의 화학적 변형을 포함할 수 있다.

[0140] 일부 구현예에서, 화학적 변형은 슈도우리딘, N1-메틸슈도우리딘, 5-메틸시토신, 5-메톡시우리딘, 및 이들의 조

합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0141] 일부 구현예에서, 화학적 변형은 N1-메틸슈도우리딘을 포함한다.

[0142] 일부 구현예에서, mRNA에서 우라실 뉴클레오티드의 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 100%가 화학적으로 변형된다.

[0143] 일부 구현예에서, ORF에서 우라실 뉴클레오티드의 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 100%가 화학적으로 변형된다.

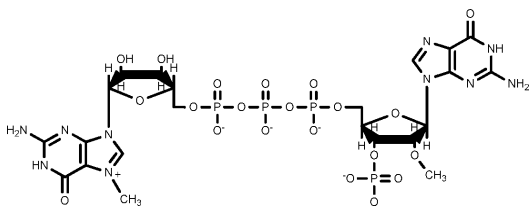
[0144] 이러한 유사체의 제조는 예를 들어, 미국 특허 제4,373,071, 미국 특허 제4,401,796, 미국 특허 제4,415,732, 미국 특허 제4,458,066, 미국 특허 제4,500,707, 미국 특허 제4,668,777, 미국 특허 제4,973,679, 미국 특허 제5,047,524, 미국 특허 제5,132,418, 미국 특허 제5,153,319, 미국 특허 제5,262,530, 및 미국 특허 제 5,700,642호에 기재되어 있다.

[0145] **II. E. mRNA 합성**

[0146] 본원에 개시된 mRNA는 임의의 다양한 방법에 따라 합성될 수 있다. 예를 들어, 본 개시내용에 따른 mRNA는 *시험관내* 전사(IVT)를 통해 합성될 수 있다. *시험관내* 전사를 위한 일부 방법은, 예를 들어, 문헌[Geall et al. (2013) Semin. Immunol. 25(2): 152-159]; 문헌[Brunelle et al. (2013) Methods Enzymol. 530:101-14]에 기재되어 있다. 간단히 말해서, IVT는 전형적으로 프로모터, 리보뉴클레오티드 삼인산염의 풀, DTT 및 마그네슘 이온을 포함할 수 있는 완충 시스템, 적당한 RNA 중합효소(예를 들어, T3, T7, 또는 SP6 RNA 중합효소), DNase I, 피로포스파타제 및/또는 RNase 저해제를 함유하는 선형 또는 원형 DNA 주형으로 수행된다. 정확한 조건은 특정 용도에 따라 다를 수 있다. 이들 시약의 존재는 일반적으로 최종 mRNA 생성물에서 바람직하지 않고, 이들 시약은 치료 용도에 적합한 깨끗하고/하거나 균질한 mRNA를 제공하기 위해 정제 또는 제거될 수 있는 불순물 또는 오염물로 간주될 수 있다. 일부 구현예에서 *시험관내* 전사 반응으로부터 제공된 mRNA가 바람직할 수 있지만, 박테리아, 진균, 식물 및/또는 동물로부터 생성된 야생형 mRNA를 포함하는 mRNA의 다른 공급원이 본 개시내용에 따라 사용될 수 있다.

[0147] 특정 구현예에서, mRNA는 하기 구조적 요소를 포함한다:

[0148] (i) 하기 구조를 갖는 5' 캡:



[0149]

[0150] (ii) SEQ ID NO: 10의 핵산 서열을 갖는 5' 비번역 영역(5' UTR);

[0151] (iii) SEQ ID NO: 6의 핵산 서열을 갖는 단백질 코딩 영역;

[0152] (iv) SEQ ID NO: 11의 핵산 서열을 갖는 3' 비번역 영역(3' UTR); 및

[0153] (v) 폴리(A) 테일.

[0154] 특정 구현예에서, 폴리(A) 테일은 약 10개 내지 약 500개 길이의 아데노신 뉴클레오티드를 갖는다.

[0155] **III. RSV F 단백질**

[0156] 호흡기 세포융합 바이러스(RSV)는 *뉴모비리대(Pneumoviridae)* 과에 속하는 네거티브-센스, 단일 가닥 RNA 바이러스이다. RSV는 호흡기 감염을 일으킬 수 있다. RSV는 표면에 당단백질(G 단백질), 작은 소수성 단백질(SH 단백질) 및 융합 단백질(F 단백질)이 있는 외피 바이러스이다.

[0157] RSV F 단백질은 바이러스 및 숙주 세포막의 융합을 담당하고, 적어도 3개의 입체형태(융합 전, 중간 및 융합 후 입체형태)를 취한다. 융합전 입체형태(융합-전, Pre-F)에서 F 단백질은 주요 항원성 부위 Ø가 노출된 삼량체 형태로 존재한다. 부위 Ø는 RSV-감염 대상체에 의해 생성된 중화 항체의 일차 표적 역할을 한다(문헌[Coultas et al., Thorax. 74: 986-993. 2019]; [McLellan et al., Science. 340(6136): 1113-7. 2013] 참고). Pre-F는 숙주 세포 표면의 표적에 결합한 후, 부위 Ø가 더 이상 노출되지 않는 입체형태 변화를 겪는다. Pre-F는 일시

적인 중간 입체형태로 전환되어, F 단백질이 숙주 세포막에 삽입될 수 있게 하여 바이러스와 숙주 세포막의 융합을 유도한다. 최종 입체형태 시프트(conformational shift)는 단백질의 더 안정적이고 늘어난 형태를 초래한다(융합후, Post-F). F 단백질의 부위 II 및 부위 IV는 Post-F에 특이적인 반면, 부위 I은 Pre-F 및 Post-F 입체형태 둘 모두에 존재한다(문헌[McLellan et al., J. Virol. 85(15): 7788-7796. 2011]).

- [0158] 항원성 RSV F 폴리펩티드를 인코딩하는 RNA(예를 들어, mRNA)가 본원에 제공된다.
- [0159] 일 양태에서, 본 개시내용은 호흡기 세포융합 바이러스(RSV) F 단백질 항원을 인코딩하는 오픈 리딩 프레임(ORF)을 포함하는 메신저 RNA(mRNA)를 포함하는 RSV 백신을 제공하고, RSV F 단백질 항원은 SEQ ID NO: 3과 적어도 98% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 SEQ ID NO: 3의 아미노산 서열로 이루어진다.
- [0160] 일부 구현예에서, ORF는 코돈 최적화된다. 본원에 사용된 "코돈 최적화된" 또는 "코돈 최적화"는 RNA의 안정성과 관련하고/하거나 대상체에서의 코돈 사용과 관련하여 더 유리할 수 있는 특정 코돈의 도입(동일한 아미노산을 인코딩하는 각각의 야생형 코돈과의 교환)을 지칭한다.
- [0161] 일부 구현예에서, Pre-F와 Post-F 사이에 공유되는 RSV F 단백질의 에피토프는 차단된다. 에피토프를 차단하면, 항원성 RSV F 폴리펩티드를 인코딩하는 RNA(예를 들어, mRNA)가 대상체에게 투여될 때 에피토프에 대한 항체 생성이 감소하거나 제거된다. 이것은 F의 특정 입체형태, 예컨대, 융합전 입체형태(예를 들어, 부위 Ø를 표적으로 하는 항체)에 특이적인 에피토프를 표적으로 하는 항체의 비율을 증가시킬 수 있다. F는 아직 세포에 들어가지 않은 바이러스에서 융합전 입체형태를 갖기 때문에, Pre-F를 표적으로 하는 항체의 증가된 비율은 더 높은 중화도를 제공할 수 있다(예를 들어, 본원에 기재된 바와 같이 중화 대 결합 비로 표현됨). 차단은 공유된 에피토프 근처에서 N-글리칸과 같은 부위가 큰 모이어티를 조작하여 달성될 수 있다. 예를 들어, 야생형 F에 존재하지 않는 N-글리코실화 부위는 예를 들어 적절한 잔기를 아스파라긴으로 돌연변이시킴으로써 추가될 수 있다. 일부 구현예에서, 차단된 에피토프는 RSV F의 항원성 부위 I의 에피토프이다. 일부 구현예에서, pre-F와 post-F 사이에 공유되는 2개 이상의 에피토프가 차단된다. 일부 구현예에서, RSV F의 항원성 부위 I의 2개 이상의 에피토프가 차단된다. 일부 구현예에서, 차단된 에피토프와 토폴로지적으로 중첩하는 하나 이상의 또는 모든 에피토프도 차단되고, 선택적으로, 차단된 에피토프는 RSV F의 항원성 부위 I의 에피토프이다.
- [0162] 일부 구현예에서, RSV F 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 1의 포지션 328, 348, 또는 507에 상응하는 하나 이상의 포지션(즉, E328N, S348N 또는 R507N)의 아스파라긴 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, RSV F 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 1의 포지션 328, 348, 또는 507에 상응하는 둘 이상의 포지션(즉, E328N, S348N 또는 R507N)의 아스파라긴 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, RSV F 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 1의 포지션 328, 348, 또는 507(즉, E328N, S348N 및 R507N)의 아스파라긴 치환을 포함한다.
- [0163] 이전에 기술한 바와 같이, 이러한 아스파라긴은 글리코실화 부위로 기능할 수 있는 것으로 밝혀졌다(본원에 참조로 포함되는 W02019/195291 참고). 더욱이, 어떤 특정한 이론에 구속되기를 원하지 않으면서, 이들 부위의 글리칸은 항원성 RSV F 폴리펩티드를 인코딩하는 RNA(예를 들어, mRNA)가 대상체에게 투여될 때 융합전 및 융합후 RSV F 단백질에 공통적인 에피토프를 포함하는 근처 에피토프에 대한 항체의 발달을 억제할 수 있다. 일부 구현예에서, SEQ ID NO: 1의 포지션 328, 348, 또는 507에 상응하는 아스파라긴의 글리코실화는 융합전 RSV F와 융합후 RSV F 사이에 공유되는 적어도 하나의 에피토프, 예컨대 항원성 부위 I의 에피토프를 차단한다. 융합전 및 융합후 RSV F 단백질에 공통적인 에피토프에 대한 항체의 개발을 억제하는 것은 부위 Ø 에피토프와 같은, 융합전 RSV F 단백질에 특이적인 에피토프에 대한 항체 개발을 지지할 수 있기 때문에 유익할 수 있고, 이는 다른 RSV F 에피토프에 대한 항체보다 효과적인 중화 활성을 가질 수 있다. 부위 Ø 에피토프는 SEQ ID NO: 1의 아미노산 잔기 62 내지 69 및 196 내지 209를 포함한다. 따라서, 일부 구현예에서, RSV F 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 1의 아미노산 잔기 62 내지 69 및 196 내지 209를 포함한다.
- [0164] 본원에 기재된 RSV F 폴리펩티드는 야생형 RSV F에 비해 상이한 길이의 결실 또는 치환을 가질 수 있음을 주목해야 한다. 예를 들어, SEQ ID NO: 1의 RSV F 폴리펩티드에서, 야생형 서열(SEQ ID NO: 1)의 포지션 98 내지 144는 GSGNVGL(SEQ ID NO: 15)로 대체되어, 40개의 아미노산이 순 제거되어, SEQ ID NO: 1의 포지션 328, 348, 또는 507이 SEQ ID NO: 3의 포지션 288, 308, 및 467에 상응하도록 한다. 대안적으로, SEQ ID NO: 3의 RSV F 폴리펩티드에서, 야생형 서열(SEQ ID NO: 1)의 포지션 98 내지 146은 GSGNVGLGG(SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 3의 포지션 98 내지 106)로 대체되어, 40개 아미노산이 순 제거되어, SEQ ID NO: 1의 포지션 328, 348, 또는 507이 SEQ ID NO: 3의 포지션 290, 310, 및 469에 상응하도록 한다.
- [0165] 일반적으로, 본원에 기재된 작제물의 포지션은 예를 들어, 표준 매개변수(EBLOSUM62 매트릭스, 깎 펄네티 10,

갭 확장 페널티 0.5)와 함께 Needleman-Wunsch 알고리즘을 사용하여, 쌍 정렬에 의해 SEQ ID NO: 1의 야생형 서열 상에 매핑될 수 있다. 또한 해당 포지션을 식별하기 위한 대안적인 접근법으로 본원에 제공된 구조적 정렬에 대한 설명을 참조한다.

- [0166] 일부 구현예에서, RSV F 폴리펩티드는 융합후 RSV F의 표면에 있는 것과 구조적으로 유사한 융합전 항원 상의 에피토프를 차단하는 글리칸을 추가하는 돌연변이를 포함한다. 일부 구현예에서, RSV F의 융합후 입체형태로 존재할 수 있는 에피토프를 특이적으로 차단하기 위해 글리칸이 첨가된다. 일부 구현예에서, RSV F의 융합후 입체형태로 존재할 수 있지만 RSV F의 융합전 입체형태로 존재하는 하나 이상의 에피토프에 영향을 미치지 않는 에피토프, 예컨대, 부위 Ø 에피토프를 차단하는 글리칸이 첨가된다.
- [0167] 일부 구현예에서, RSV F 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 2에 제시된 아미노산 서열에 대하여 적어도 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, 또는 99.5% 동일성을 갖는 서열을 포함한다.
- [0168] 일부 구현예에서, RSV F 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 3에 제시된 아미노산 서열에 대하여 적어도 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, 또는 99.5% 동일성을 갖는 서열을 포함한다.
- [0169] 일부 구현예에서, RSV F 폴리펩티드는 DS-CAV1 아미노산 치환(예를 들어, 문헌[McLellan et al., Science, 342(6158): 592-598, 2013]에 기재됨)을 포함하고, 상기에 기재된 아스파라긴 중 적어도 1, 2 또는 3개를 포함하는 추가의 변형들이 이루어진다. CAV1 돌연변이는 SEQ ID NO: 1에 비하여 S190F 및 V207L이다. DS 돌연변이는 SEQ ID NO: 1에 비하여 S155C 및 S290C이다.
- [0170] 일부 구현예에서, 아미노산 치환 또는 한 쌍의 아미노산 치환은 프로토머간 안정화 치환(들)이다. 프로토머간 안정화가 될 수 있는 예시적인 치환은 SEQ ID NO: 1의 포지션 넘버링을 사용하여 V207L; N228F; I217V 및 E218F; I221L 및 E222M; 또는 Q224A 및 Q225L이다.
- [0171] 일부 구현예에서, 아미노산 치환 또는 한 쌍의 아미노산 치환은 프로토머내 안정화이다. 프로토머내 안정화가 될 수 있는 예시적인 치환은 SEQ ID NO: 1의 포지션 넘버링을 사용하여 V220I; 및 A74L 및 Q81L이다.
- [0172] 일부 구현예에서, 아미노산 치환은 나선 안정화이고, 즉 RSV F의 나선 도메인을 안정화하는 것으로 예측된다. 나선 도메인의 안정화는 부위 Ø 에피토프의 안정성 및 일반적으로 RSV F의 융합전 입체형태의 안정성에 기여할 수 있다. 나선 안정화가 될 수 있는 예시적인 치환은 SEQ ID NO: 1의 포지션 넘버링을 사용하여 N216P 또는 I217P이다. SEQ ID NO: 1의 포지션 217은 SEQ ID NO: 3의 포지션 177에 상응한다.
- [0173] 일부 구현예에서, 아미노산 치환은 나선 캡핑이다. 일부 구현예에서, 아미노산 치환은 나선 PRO 캡핑이다. 나선 캡핑은 알파 나선에 있는 프롤린 잔기 돌연변이가 나선 형성을 방해할 수 있지만 나선 영역의 N-말단에 있는 프롤린은 PHI/PSI 결합 각도를 안정화하여 나선 형성을 유도하는 데 도움이 될 수 있다는 생물물리학적 관찰을 기반으로 한다. 나선 캡핑이 될 수 있는 예시적인 치환은 SEQ ID NO: 1의 포지션 넘버링을 사용하여 N216P 또는 I217P이다.
- [0174] 일부 구현예에서, 아미노산 치환은 DS-CAV1의 디설피드 돌연변이를 대체한다. 일부 구현예에서, DS-CAV1의 조작된 디설피드는 SEQ ID NO: 1의 포지션 넘버링을 사용하여 야생형(DS-CAV1의 C69S 및/또는 C212S 돌연변이)으로 복귀된다. 일부 구현예에서, DS-CAV1의 하나 이상의 C 잔기가 S 잔기로 대체되어, 디설피드 결합을 제거한다. 일부 구현예에서, SEQ ID NO: 1의 포지션 넘버링을 사용한 C69S 또는 C212S 치환은 디설피드 결합을 제거한다. 일부 구현예에서, RSV F 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 1의 포지션 넘버링을 사용한 C69S 및 C212S 둘 모두를 포함한다. 일부 구현예에서, 이러한 시스테인을 대체하여 디설피드 결합을 제거하면 RSV F 폴리펩티드의 감소(즉, 환원제로부터 전자의 수용)를 차단한다. 일부 구현예에서, SEQ ID NO: 1의 포지션 넘버링을 사용한 I217P 치환은 C69 및/또는 C212에서의 치환 대신 항원에 포함된다.
- [0175] 일부 구현예에서, 아미노산 치환은 트립신 또는 트립신-유사 프로테아제에 의한 단백질분해를 방지한다. 일부 구현예에서, 이러한 단백질분해를 방지하는 아미노산 치환은 RSV F의 헵타드 반복 영역 B(heptad repeat region, HRB) 영역에 있다.
- [0176] 야생형 HRB 영역을 포함하는 RSV F 폴리펩티드의 단백질분해와 일치하는 단편의 출현은 이 영역의 리신 또는 아르기닌이 단백질분해의 표적이 되고 있었음을 시사했다. K 또는 R 잔기를 제거하기 위한 아미노산 치환은 녹아웃(knockout, KO)이라고 할 수 있다. 일부 구현예에서, K 또는 R은 L 또는 Q에 대해 치환된다. 일부 구현예에서, K는 L 또는 Q에 대해 치환된다. 일부 구현예에서, RSV F 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 1의 포지션 넘버링을 사용한 K498L 및/또는 K508Q를 포함한다. SEQ ID NO: 3에서 상응하는 포지션은 각각 458 및 468이다. 일부

구현예에서, RSV F 폴리펩티드는 K498L 및 K508Q 둘 모두를 포함한다.

- [0177] 일부 구현예에서, 아미노산 치환은 글리칸을 추가한다. 일부 구현예에서, 아미노산 치환은 RSV F 폴리펩티드에 글리칸을 추가함으로써 글리코실화를 증가시킨다. 글리칸을 추가하기 위한 치환은 (추가 글리칸이 없는) 천연 글리코실화와 비교하여 조작된 글리코실화라고도 할 수 있다.
- [0178] 일부 구현예에서, 글리칸을 추가하기 위한 아미노산 치환은 N에 의한 치환이다. 일부 구현예에서, N에 의한 아미노산 치환은 N-연결 글리코실화를 허용한다. 일부 구현예에서, N에 의한 치환은 NxT/S 글리코실화 모티프를 형성하는, N에 대한 C-말단의 제2 아미노산 포지션에서 T 또는 S에 의한 치환을 수반한다. 일부 구현예에서, N은 표면-노출된다.
- [0179] RSV F 폴리펩티드의 전술한 치환 및 돌연변이 각각은 본원에 참고로 포함된 W02019/195291에 보다 상세히 기술된다.
- [0180] 일 양태에서, 본 개시내용은 호흡기 세포융합 바이러스(RSV) F 단백질 항원을 인코딩하는 오픈 리딩 프레임(ORF)을 포함하는 메신저 RNA(mRNA)를 포함하는 RSV 백신을 제공하고, RSV F 단백질 항원은 SEQ ID NO: 1에 제시된 아미노산 서열에 비하여 다음 치환 중 하나 이상을 포함한다:
 - [0181] 1) SEQ ID NO: 1의 아미노산 포지션 98 내지 146이 GSGNVGLGG(SEQ ID NO: 16)의 아미노산 서열로 대체된다;
 - [0182] 2) 아미노산 치환 S190F 및 V207L;
 - [0183] 3) 아미노산 치환 I217P;
 - [0184] 4) 아미노산 치환 E328N, S348N, 및 R507N;
 - [0185] 5) 아미노산 치환 L373R;
 - [0186] 6) 아미노산 치환 K498L; 및
 - [0187] 7) 아미노산 치환 K508Q.
- [0188] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 RSV F 단백질 항원을 인코딩하는 ORF를 포함하는 mRNA를 포함하는 RSV 백신을 제공하고, RSV F 단백질 항원은 SEQ ID NO: 1에 제시된 아미노산 서열에 비하여 다음 치환을 각각 포함한다:
 - [0189] 1) SEQ ID NO: 1의 아미노산 포지션 98 내지 146이 GSGNVGLGG(SEQ ID NO: 16)의 아미노산 서열로 대체된다;
 - [0190] 2) 아미노산 치환 S190F 및 V207L;
 - [0191] 3) 아미노산 치환 I217P;
 - [0192] 4) 아미노산 치환 E328N, S348N, 및 R507N;
 - [0193] 5) 아미노산 치환 L373R;
 - [0194] 6) 아미노산 치환 K498L; 및
 - [0195] 7) 아미노산 치환 K508Q.
- [0196] 특정 구현예에서, RSV F 단백질 항원은 막관통 도메인 및 IMITTHIVIVILLSLIAVGLLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNI AFSN(SEQ ID NO: 17)의 세포질 테일 아미노산 서열을 포함한다.
- [0197] 일부 구현예에서, mRNA는 SEQ ID NO: 4 내지 SEQ ID NO: 6에 제시된 핵산 서열 중 어느 하나에 대하여 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함한다.
- [0198] 일부 구현예에서, mRNA는 SEQ ID NO: 12 내지 SEQ ID NO: 14에 제시된 핵산 서열 중 어느 하나에 대하여 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함한다.
- [0199] **IV. 지질 나노입자(LNP)**
- [0200] 본 개시내용의 LNP는 4가지 범주의 지질을 포함할 수 있다: (i) 이온화 가능한 지질(예를 들어, 양이온성 지

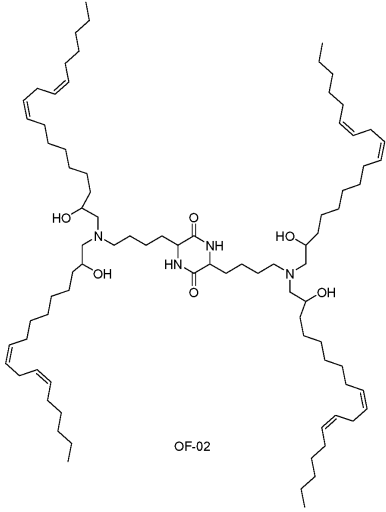
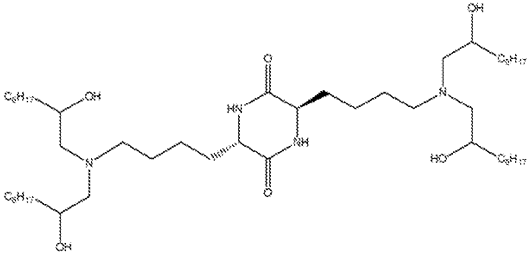
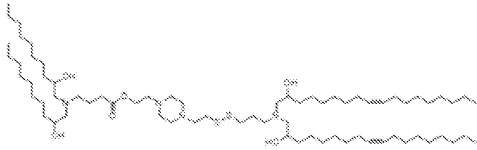
질); (ii) PEG화된 지질; (iii) 콜레스테롤계 지질(예를 들어, 콜레스테롤), 및 (iv) 헬퍼 지질.

[0201] A. 양이온성 지질

[0202] 이온화 가능한 지질은 mRNA 캡슐화를 촉진하고, 양이온성 지질일 수 있다. 양이온성 지질은 낮은 pH에서 양전하 환경을 제공하여 음전하 mRNA 약물 물질의 효율적인 캡슐화를 용이하게 한다. 예시적인 양이온성 지질은 하기 표 1에 나와 있다.

[0203] [표 1]

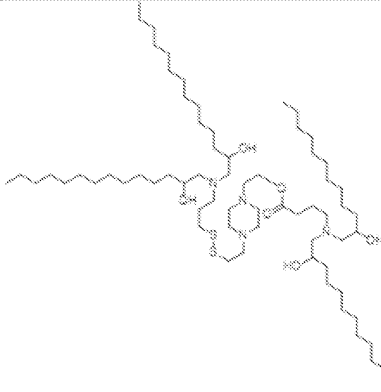
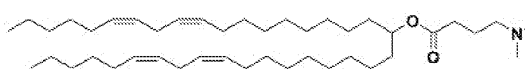
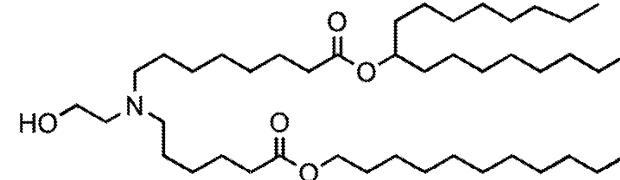
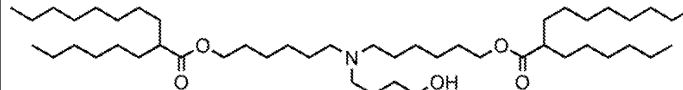
[0204] 이온화 가능한 지질

명칭	구조
OF-02 (ML7)	 <p style="text-align: center;">OF-02</p>
cKK-E10	
GL-HEPES-E3-E10-DS-3-E18-1 ((2-(4-(2-((3- (비스(Z)-2-	

[0205]

<p>하이드록시옥타데크 -9-엔-1-일)아미노) 프로필)디설파네일) 에틸)피페라진-1-일) 에틸 4-(비스(2- 하이드록시데실) 아미노) 부타노에이트)</p>	
<p>GL-HEPES-E3- E12-DS-4-E10</p> <p>(2-(4-(2-((3-(비스 (2-하이드록시데실) 아미노)부틸) 디설파네일)에틸) 피페라진-1-일)에틸 4-(비스(2- 하이드록시도데실) 아미노) 부타노에이트)</p>	 <p>The image shows a complex chemical structure of a dendritic dendronized poly(2-vinylpyridine) (D-PLGA) derivative. It features a central core with multiple hydroxyl groups and long alkyl chains, characteristic of a dendritic structure. The structure is highly branched and symmetrical, with a central core and multiple hydroxyl groups and long alkyl chains extending outwards.</p>
<p>GL-HEPES-E3- E12-DS-3-E14</p> <p>(2-(4-(2-((3-(비스 (2-하이드록시 테트라데실)아미노) 프로필)디설파네일) 에틸)피페라진-1-일) 에틸 4-(비스(2-</p>	

[0206]

<p>하이드록시도데실) 아미노) 부타노에이트)</p>	
<p>MC3</p>	
<p>SM-102 (9-헵타데카닐 8-((2-하이드록시에틸) [6-옥소-6- (운데실옥시)핵실] 아미노) 옥타노에이트)</p>	
<p>ALC-0315 [[4-하이드록시부틸) 아잔디일]디(핵산- 6,1-디일) 비스(2- 핵실데카노에이트)</p>	

[0207]

[0208]

양이온성 지질은 [ckkE10]/[OF-02], [(6Z,9Z,28Z,31Z)-헵타트리아콘타-6,9,28,31-테트라엔-19-일] 4-(디메틸아미노)부타노에이트(D-Lin-MC3-DMA); 2,2-디리놀레일-4-디메틸아미노에틸-[1,3]-디옥솔란(DLin-KC2-DMA); 1,2-디리놀레일옥시-N,N-디메틸-3-아미노프로판(DLin-DMA); 디((Z)-논-2-엔-1-일) 9-((4-(디메틸아미노)부타노일)옥시)헵타데칸디오에이트(L319); 9-헵타데카닐 8-((2-하이드록시에틸)[6-옥소-6-(운데실옥시)핵실]아미노)옥타노에이트(SM-102); [(4-하이드록시부틸)아잔디일]디(핵산-6,1-디일) 비스(2-핵실데카노에이트)(ALC-0315); [3-(디메틸아미노)-2-[(Z)-옥타덱-9-에노일]옥시프로필] (Z)-옥타덱-9-에노에이트(DODAP); 2,5-비스(3-아미노프로필아미노)-N-[2-[디(헵타데실)아미노]-2-옥소에틸]펜탄아미드(DOGS); [(3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-디메틸-17-[(2R)-6-메틸헵탄-2-일]-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-도데카하이드로-1H-사이클로펜타[a]페난트렌-3-일] N-[2-(디메틸아미노)에틸]카르바메이트(DC-Chol); 테트라키스(8-메틸노닐) 3,3',3'',3'''-(((메틸아잔디일) 비스(프로판-3,1-디일)비스(아잔트리일))테트라프로피오네이트(3060i10); 데실 (2-(디옥틸암모니오)에틸) 포스페이트(9A1P9); 에틸 5,5-디((Z)-헵타덱-8-엔-1-일)-1-(3-(피롤리딘-1-일)프로필)-2,5-디하이드로-1H-이미다졸-2-카르복실레이트(A2-Iso5-2DC18); 비스(2-(도데실디설파닐)에틸) 3,3'-((3-메틸-9-옥소-10-옥사-13,14-디티아-3,6-디아자헥사코실)아잔디일)디프로피오네이트(BAME-016B); 1,1'-((2-(4-(2-((2-비스(2-하이드록시도데실)아미노)에틸) (2-하이드록시도데실)아미노)에틸) 피페라진-1-일)에틸)아잔디일) 비스(도데칸-2-올)(C12-200); 3,6-비스(4-(비스(2-하이드록시도데실)아미노)부틸)피페라진-2,5-디온(cKK-E12); 헥사(옥탄-3-일) 9,9',9'',9''',9''''',9''''''-((((벤젠-1,3,5-트리카르보닐)이리스(아잔디일)) 트리스(프로판-3,1-디일)) 트리스(아잔트리일))헥사노나노에이트(FTT5); (((3,6-디옥소피페라진-2,5-디일)비스(부탄-4,1-디일))비스(아잔트리

일))테트라키스(에탄-2,1-디일)(9Z,9'Z,9''Z,9'''Z,12Z,12' Z,12''Z,12'''Z)-테트라키스 (옥타데카-9,12-디에노에이트)(OF-Deg-Lin); TT3; N¹,N³,N⁵-트리스(3-(디도데실아미노)프로필)벤젠-1,3,5-트리카르복사미드; N1-[2-((1S)-1-[(3-아미노프로필)아미노]-4-[디(3-아미노프로필)아미노]부틸카르복사미도)에틸]-3,4-디[올레일옥시]-벤즈아미드(MVL5); 헵타데칸-9-일 8-((2-하이드록시에틸)(8-(노닐옥시)-8-옥소옥틸)아미노)옥타노에이트(지질 5); 및 이들의 조합을 포함하는 군으로부터 선택될 수 있다.

[0209]

특정 구현예에서, 양이온성 지질은 생분해성이다.

[0210]

다양한 구현예에서, 양이온성 지질은 생분해성이 아니다.

[0211]

일부 구현예에서, 양이온성 지질은 절단 가능하다.

[0212]

특정 구현예에서, 양이온성 지질은 절단 가능하지 않다.

[0213]

양이온성 지질은 문헌[Dong et al. (PNAS. 111(11):3955-60. 2014)]; 문헌[Fenton et al. (Adv. Mater. 28:2939. 2016)]; 미국 특허 제9,512,073호; 및 미국 특허 제10,201,618호에 더 상세하게 기재되어 있고, 이들 각각은 본원에 참조로 포함된다.

[0214]

B. PEG화된 지질

[0215]

PEG화된 지질 성분은 나노입자의 입자 크기 및 안정성에 대한 제어를 제공한다. 그러한 성분의 첨가는 복잡한 응집을 방지할 수 있고, 순환 수명을 증가시키고 표적 조직으로의 지질-핵산 약제학적 조성물의 전달을 증가시키는 수단을 제공할 수 있다(문헌[Klibanov et al. FEBS Letters 268(1):235-7. 1990]). 이들 성분은 생체내에서 약제학적 조성물로부터 빠르게 교환되도록 선택될 수 있다(예를 들어, 미국 특허 제5,885,613호 참조).

[0216]

고려되는 PEG화된 지질은 C₆-C₂₀ (예를 들어, C₈, C₁₀, C₁₂, C₁₄, C₁₆, 또는 C₁₈) 길이의 알킬 사슬(들)을 갖는 지질에 공유 부착된 최대 5 kDa 길이의 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 사슬, 예컨대 유도체화된 세라마이드(예를 들어, N-옥타노일-스핑고신-1-[숙시닐(메톡시폴리에틸렌 글리콜)] (C8 PEG 세라마이드))를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, PEG화된 지질은 1,2-디미리스토일-rac-글리세로-3-메톡시폴리에틸렌 글리콜(DMG-PEG); 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-폴리에틸렌 글리콜(DSPE-PEG); 1,2-디라우로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-폴리에틸렌 글리콜(DLPE-PEG); 또는 1,2-디스테아로일-rac-글리세로-폴리에틸렌 글리콜(DSG-PEG), PEG-DAG; PEG-PE; PEG-S-DAG; PEG-S-DMG; PEG-cer; PEG-디알콕시프로필카르바메이트; 2-[(폴리에틸렌 글리콜)-2000]-N,N-디테트라데실아세트아미드(ALC-0159); 및 이들의 조합이다.

[0217]

특정 구현예에서, PEG는 고분자량, 예를 들어, 2000 내지 2400 g/mol을 갖는다. 특정 구현예에서, PEG는 PEG2000(또는 PEG-2K)이다. 특정 구현예에서, 본원의 PEG화된 지질은 DMG-PEG2000, DSPE-PEG2000, DLPE-PEG2000, DSG-PEG2000, C8 PEG2000, 또는 ALC-0159(2-[(폴리에틸렌 글리콜)-2000]-N,N-디테트라데실아세트아미드)이다. 특정 구현예에서, 본원의 PEG화된 지질은 DMG-PEG2000이다.

[0218]

C. 콜레스테롤계 지질

[0219]

콜레스테롤 성분은 나노입자 내의 지질 이중층 구조에 안정성을 제공한다. 일부 구현예에서, LNP는 하나 이상의 콜레스테롤계 지질을 포함한다. 적합한 콜레스테롤계 지질은 예를 들어: DC-Choi (N,N-디메틸-N-에틸카르복사미도콜레스테롤), 1,4-비스(3-N-올레일아미노-프로필)피페라진(문헌[Gao et al., *Biochem Biophys Res Comm.* (1991) 179:280]; [Wolf et al., *BioTechniques* (1997) 23:139]; 미국 특허 제5,744,335호), 이미다졸 콜레스테롤 에스테르("ICE"; W02011/068810), 시토스테롤(22,23-디하이드로스티그마스테롤), β-시토스테롤, 시토스타놀, 푸코스테롤, 스티그마스테롤(스티그마스타-5,22-디엔-3-올), 에르고스테롤; 데스모스테롤(3β-하이드록시-5,24-콜레스타디엔); 라노스테롤(8,24-라노스타디엔-3b-올); 7-데하이드로콜레스테롤(Δ5,7-콜레스테롤); 디하이드로라노스테롤(24,25-디하이드로라노스테롤); 자이모스테롤(5α-콜레스타-8,24-디엔-3β-올); 라토스테롤(5α-콜레스타-7-엔-3β-올); 디오스게닌((3β,25R)-스피로스트-5-엔-3-올); 캄페스테롤(캄페스트-5-엔-3β-올); 캄페스타놀(5α-캄페스탄-3b-올); 24-메틸렌 콜레스테롤(5,24(28)-콜레스타디엔-24-메틸렌-3β-올); 콜레스테릴 마가레이트(콜레스타-5-엔-3β-일 헵타데카노에이트); 콜레스테릴 올레이트; 콜레스테롤 스테아레이트 및 기타 변형된 형태의 콜레스테롤을 포함한다. 일부 구현예에서, LNP에 사용되는 콜레스테롤계 지질은 콜레스테롤이다.

[0220]

D. 헬퍼 지질

[0221]

헬퍼 지질은 LNP의 구조적 안정성을 향상시키고, 엔도솜 탈출에서 LNP를 돕는다. 그것은 mRNA 약물 페이로드의

흡수 및 방출을 향상시킨다. 일부 구현예에서, 헬퍼 지질은 약물 페이로드의 흡수 및 방출을 향상시키기 위한 용해성 특성들을 갖는 쓰비터이온성 지질이다. 헬퍼 지질의 예는 1,2-디올레오일-SN-글리세로-3-포스포에탄올아민(DOPE); 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린(DSPC); 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포-L-세린(DOPS); 1,2-디엘라이도일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(DEPE); 및 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린(DPOC), 디팔미토일포스파티딜콜린(DPPC), DMPC, 1,2-디라우로일-sn-글리세로-3-포스포콜린(DLPC), 1,2-디스테아로일포스파티딜에탄올아민(DSPE), 및 1,2-디라우로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(DLPE)이다.

[0222] 다른 예시적인 헬퍼 지질은 디올레오일포스파티딜콜린(DOPC), 디올레오일포스파티딜글리세롤(DOPG), 디팔미토일포스파티딜글리세롤(DPPG), 팔미토일올레오일포스파티딜콜린(POPC), 팔미토일올레오일-포스파티딜에탄올아민(POPE), 디올레오일-포스파티딜에탄올아민 4-(N-말레이미도메틸)-사이클로헥산-1-카르복실레이트(DOPE-mal), 디팔미토일 포스파티딜 에탄올아민(DPPE), 디미리스토일포스포에탄올아민(DMPE), 포스파티딜세린, 스펅고지질, 스펅고미엘린, 세라마이드, 세레브로시드, 강글리오시드, 16-O-모노메틸 PE, 16-O-디메틸 PE, 18-1-트랜스 PE, 1-스테아로일-2-올레오일-포스파티딜에탄올아민(SOPE), 또는 이들의 조합이다. 특정 구현예에서, 헬퍼 지질은 DOPE이다. 특정 구현예에서, 헬퍼 지질은 DSPC이다.

[0223] 다양한 구현예에서, 본 LNP는 (i) OF-02, cKK-E10, GL-HEPES-E3-E10-DS-3-E18-1, GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10, 또는 GL-HEPES-E3-E12-DS-3-E14로부터 선택된 양이온성 지질; (ii) DMG-PEG2000; (iii) 콜레스테롤; 및 (iv) DOPE를 포함한다.

[0224] **E. 지질 성분의 몰비**

[0225] 상기 성분들의 몰비는 mRNA 전달에서 LNP의 유효성에 중요하다. 양이온성 지질, PEG화된 지질, 콜레스테롤계 지질, 및 헬퍼 지질의 몰비는 A: B: C: D이고, 여기서 $A + B + C + D = 100\%$ 이다. 일부 구현예에서, 총 지질에 비한 LNP내 양이온성 지질(즉, A)의 몰비는 35 내지 55%, 예컨대 35 내지 50%(예를 들어, 38 내지 42%, 예컨대 40%, 또는 45 내지 50%)이다. 일부 구현예에서, 총 지질에 비한 PEG화된 지질 성분(즉, B)의 몰비는 0.25 내지 2.75%(예를 들어, 1 내지 2% 예컨대 1.5%)이다. 일부 구현예에서, 총 지질에 비한 콜레스테롤계 지질(즉, C)의 몰비는 20 내지 50%(예를 들어, 27 내지 30% 예컨대 28.5%, 또는 38 내지 43%)이다. 일부 구현예에서, 총 지질에 비한 헬퍼 지질(즉, D)의 몰비는 5 내지 35%(예를 들어, 28 내지 32%, 예컨대 30%, 또는 8 내지 12%, 예컨대 10%)이다. 일부 구현예에서, (PEG화된 지질 + 콜레스테롤) 성분은 헬퍼 지질과 동일한 물량을 갖는다. 일부 구현예에서, LNP는 1보다 큰 헬퍼 지질에 대한 양이온성 지질의 몰비를 함유한다.

[0226] 특정 구현예에서, 본 개시내용의 LNP는:

[0227] 35% 내지 55% 또는 40% 내지 50%의 몰비의 양이온성 지질(예를 들어, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 또는 55%의 몰비의 양이온성 지질);

[0228] 0.25% 내지 2.75% 또는 1.00% 내지 2.00%의 몰비의 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 컨쥬게이션된(PEG화된) 지질(예를 들어, 0.25%, 0.50%, 0.75%, 1.00%, 1.25%, 1.50%, 1.75%, 2.00%, 2.25%, 2.50%, 또는 2.75%의 몰비의 PEG화된 지질);

[0229] 20% 내지 50%, 25% 내지 45%, 또는 28.5% 내지 43%의 몰비의 콜레스테롤계 지질(예를 들어, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 또는 50%의 몰비의 콜레스테롤계 지질); 및

[0230] 5% 내지 35%, 8% 내지 30%, 또는 10% 내지 30%의 몰비의 헬퍼 지질(예를 들어, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 또는 35%의 몰비의 헬퍼 지질)을 포함하고,

[0231] 모든 몰비는 LNP의 총 지질 함량에 상대적이다.

[0232] 특정 구현예에서, LNP는: 40%의 몰비의 양이온성 지질; 1.5%의 몰비의 PEG화된 지질; 28.5%의 몰비의 콜레스테롤계 지질; 및 30%의 몰비의 헬퍼 지질을 포함한다.

[0233] 특정 구현예에서, PEG화된 지질은 디미리스토일-PEG2000(DMG-PEG2000)이다.

[0234] 다양한 구현예에서, 콜레스테롤계 지질은 콜레스테롤이다.

[0235] 일부 구현예에서, 헬퍼 지질은 1,2-디올레오일-SN-글리세로-3-포스포에탄올아민(DOPE)이다.

- [0236] 특정 구현예에서, LNP는: 35% 내지 55%의 몰비의 OF-02; 0.25% 내지 2.75%의 몰비의 DMG-PEG2000; 20% 내지 50%의 몰비의 콜레스테롤; 및 5% 내지 35%의 몰비의 DOPE를 포함한다.
- [0237] 특정 구현예에서, LNP는: 35% 내지 55%의 몰비의 cKK-E10; 0.25% 내지 2.75%의 몰비의 DMG-PEG2000; 20% 내지 50%의 몰비의 콜레스테롤; 및 5% 내지 35%의 몰비의 DOPE를 포함한다.
- [0238] 특정 구현예에서, LNP는: 35% 내지 55%의 몰비의 GL-HEPES-E3-E10-DS-3-E18-1; 0.25% 내지 2.75%의 몰비의 DMG-PEG2000; 20% 내지 50%의 몰비의 콜레스테롤; 및 5% 내지 35%의 몰비의 DOPE를 포함한다.
- [0239] 특정 구현예에서, LNP는: 35% 내지 55%의 몰비의 GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10; 0.25% 내지 2.75%의 몰비의 DMG-PEG2000; 20% 내지 50%의 몰비의 콜레스테롤; 및 5% 내지 35%의 몰비의 DOPE를 포함한다.
- [0240] 특정 구현예에서, LNP는: 35% 내지 55%의 몰비의 GL-HEPES-E3-E12-DS-3-E14; 0.25% 내지 2.75%의 몰비의 DMG-PEG2000; 20% 내지 50%의 몰비의 콜레스테롤; 및 5% 내지 35%의 몰비의 DOPE를 포함한다.
- [0241] 특정 구현예에서, LNP는: 35% 내지 55%의 몰비의 SM-102; 0.25% 내지 2.75%의 몰비의 DMG-PEG2000; 20% 내지 50%의 몰비의 콜레스테롤; 및 5% 내지 35%의 몰비의 DSPC를 포함한다.
- [0242] 특정 구현예에서, LNP는: 35% 내지 55%의 몰비의 ALC-0315; 0.25% 내지 2.75%의 몰비의 ALC-0159; 20% 내지 50%의 몰비의 콜레스테롤; 및 5% 내지 35%의 몰비의 DSPC를 포함한다.
- [0243] 특정 구현예에서, LNP는: 40%의 몰비의 OF-02; 1.5%의 몰비의 DMG-PEG2000; 28.5%의 몰비의 콜레스테롤; 및 30%의 몰비의 DOPE를 포함한다. 이 LNP 제형은 본원에서 "지질 A"로 명명된다.
- [0244] 특정 구현예에서, LNP는: 40%의 몰비의 cKK-E10; 1.5%의 몰비의 DMG-PEG2000; 28.5%의 몰비의 콜레스테롤; 및 30%의 몰비의 DOPE를 포함한다. 이 LNP 제형은 본원에서 "지질 B"로 명명된다.
- [0245] 특정 구현예에서, LNP는: 40%의 몰비의 GL-HEPES-E3-E10-DS-3-E18-1; 1.5%의 몰비의 DMG-PEG2000; 28.5%의 몰비의 콜레스테롤; 및 30%의 몰비의 DOPE를 포함한다. 이 LNP 제형은 본원에서 "지질 C"로 명명된다.
- [0246] 특정 구현예에서, LNP는: (40%의 몰비의 GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10; 1.5%의 몰비의 DMG-PEG2000; 28.5%의 몰비의 콜레스테롤; 및 30%의 몰비의 DOPE를 포함한다. 이 LNP 제형은 본원에서 "지질 D"로 명명된다.
- [0247] 특정 구현예에서, LNP는: 40%의 몰비의 GL-HEPES-E3-E12-DS-3-E14; 1.5%의 몰비의 DMG-PEG2000; 28.5%의 몰비의 콜레스테롤; 및 30%의 몰비의 DOPE를 포함한다. 이 LNP 제형은 본원에서 "지질 E"로 명명된다.
- [0248] 특정 구현예에서, LNP는: 50%의 몰비의 9-헵타데카닐 8-((2-하이드록시에틸)[6-옥소-6-(운데실옥시)헥실]아미노)옥타노에이트(SM-102); 10%의 몰비의 1,2-디스테아로일-*sn*-글리세로-3-포스포콜린(DSPC); 38.5%의 몰비의 콜레스테롤; 및 1.5%의 몰비의 1,2-디미리스토일-*rac*-글리세로-3-메톡시폴리에틸렌 글리콜-2000(DMG-PEG2000)을 포함한다.
- [0249] 특정 구현예에서, LNP는: 46.3%의 몰비의 (4-하이드록시부틸)아잔디일]디(헥산-6,1-디일) 비스(2-헥실데카노에이트)(ALC-0315); 9.4%의 몰비의 1,2-디스테아로일-*sn*-글리세로-3-포스포콜린(DSPC); 42.7%의 몰비의 콜레스테롤; 및 1.6%의 몰비의 2-[(폴리에틸렌 글리콜)-2000]-N,N-디테트라데실아세트아미드(ALC-0159)를 포함한다.
- [0250] 특정 구현예에서, LNP는: 47.4%의 몰비의 (4-하이드록시부틸)아잔디일]디(헥산-6,1-디일) 비스(2-헥실데카노에이트)(ALC-0315); 10%의 몰비의 1,2-디스테아로일-*sn*-글리세로-3-포스포콜린(DSPC); 40.9%의 몰비의 콜레스테롤; 및 1.7%의 몰비의 2-[(폴리에틸렌 글리콜)-2000]-N,N-디테트라데실아세트아미드(ALC-0159)를 포함한다.
- [0251] LNP 제형에 투입될 각각의 지질의 실제 양을 계산하기 위해, 양이온성 지질의 몰량은 먼저 원하는 N/P 비에 기초하여 결정되고, 여기서 N은 양이온성 지질에서 질소 원자의 수이고, P는 LNP에 의해 수송되는 mRNA의 포스페이트 기의 수이다. 다음으로, 각각의 다른 지질의 몰량은 양이온성 지질의 몰량과 선택된 몰비에 기초하여 계산된다. 그런 다음, 이러한 몰량은 각 지질의 분자량을 사용하여 중량으로 변환된다.
- [0252] **F. 완충액 및 다른 성분들**
- [0253] 핵산 및/또는 LNP를 안정화하기 위해 (예를 들어, 백신 제품의 유통기한을 연장하기 위해), LNP 약제학적 조성물의 투여를 용이하게 하기 위해, 및/또는 핵산의 생체내 발현을 향상시키기 위해, 핵산 및/또는 LNP는 하나 이상의 담체, 표적 리간드, 안정화 시약(예를 들어, 보존제 및 산화방지제), 및/또는 기타 약제학적으로 허용 가

능한 부형제와 조합하여 제형화될 수 있다. 이러한 부형제의 예는 파라벤, 티메로살, 티오메르살, 클로로부탄올, 벤즈알코늄 클로라이드 및 킬레이트제(예를 들어, EDTA)이다.

[0254] 본 개시내용의 LNP 조성물은 냉동 액체 형태 또는 동결건조 형태로 제공될 수 있다. 수크로스, 트레할로스, 글루코스, 만니톨, 만노스, 텍스트로스 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는 다양한 동결방지제가 사용될 수 있다. 동결방지제는 LNP 조성물의 5 내지 30%(w/v)를 구성할 수 있다. 일부 구현예에서, LNP 조성물은 예를 들어, 5 내지 30%(예를 들어, 10%)(w/v)의 트레할로스를 포함한다. 일단 동결방지제로 제형화되면, LNP 조성물은 -20°C 내지 -80°C에서 동결(또는 동결건조 및 동결보존)될 수 있다.

[0255] LNP 조성물은 완충 수용액으로 환자에게 제공될 수 있다 - 이전에 동결된 경우 해동되거나, 이전에 동결건조된 경우 병상에서 완충 수용액으로 재구성된다. 완충 용액은 등장성일 수 있고, 예를 들어, 근육내 또는 피내 주사에 적합할 수 있다. 일부 구현예에서, 완충 용액은 인산염 완충 식염수(PBS)이다.

[0256] **V. LNP 백신을 제조하기 위한 프로세스**

[0257] 본 LNP는 다양한 기법에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 다층 소포(multilamellar vesicles, MLV)는 적절한 용매에 지질을 용해시킴으로써 적절한 컨테이너 또는 용기의 내벽에 선택된 지질을 침착시킨 다음, 용매를 증발시켜 용기 내부의 박막을 남기거나 분무-건조와 같은 통상적인 기법에 따라 제조될 수 있다. 그런 다음 MLV를 형성시키는 보르텍싱 운동으로 수성 상이 용기에 첨가될 수 있다. 그런 다음, 단층 소포(unilamellar vesicle, ULV)는 다층 소포의 균질화, 초음파처리 또는 압출에 의해 형성될 수 있다. 또한, 단층 소포는 세제 제거 기법에 의해 형성될 수 있다.

[0258] US 2011/0244026, US 2016/0038432, US 2018/0153822, US 2018/0125989, 및 US 2021/0046192에 다양한 방법들이 기재되어 있고, LNP 백신을 제조하는 데 사용될 수 있다. 하나의 예시적인 프로세스는 US 2016/0038432에 기재된 바와 같이, 지질을 먼저 지질 나노입자로 미리 형성하지 않으면서 mRNA를 지질 혼합물과 혼합함으로써 mRNA를 캡슐화하는 것을 수반한다. 또다른 예시적인 프로세스는 US 2018/0153822에 기재된 바와 같이, 미리 형성된 LNP를 mRNA와 혼합함으로써 mRNA를 캡슐화하는 것을 수반한다.

[0259] 일부 구현예에서, mRNA-로드된 LNP를 제조하는 프로세스는 용액 중 하나 이상을 주위 온도보다 높은 온도까지 가열하는 단계를 포함하고, 상기 하나 이상의 용액은 미리 형성된 지질 나노입자를 포함하는 용액, mRNA를 포함하는 용액 및 LNP-캡슐화된 mRNA를 포함하는 혼합 용액이다. 일부 구현예에서, 프로세스는 혼합 단계 이전에, mRNA 용액 및 미리 형성된 LNP 용액 중 하나 또는 둘 모두를 가열하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 프로세스는 미리 형성된 LNP를 포함하는 용액, mRNA를 포함하는 용액 및 LNP-캡슐화된 mRNA를 포함하는 용액 중 하나 이상을 혼합 단계 동안 가열하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 프로세스는 혼합 단계 후에 LNP-캡슐화된 mRNA를 가열하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 용액 중 하나 이상이 가열되는 온도는 약 30°C, 37°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C, 또는 70°C이거나, 이보다 높다. 일부 구현예에서, 용액 중 하나 이상이 가열되는 온도는 약 25 내지 70°C, 약 30 내지 70°C, 약 35 내지 70°C, 약 40 내지 70°C, 약 45 내지 70°C, 약 50 내지 70°C, 또는 약 60 내지 70°C 범위이다. 일부 구현예에서, 온도는 약 65°C이다.

[0260] 본 개시내용에 적합한 mRNA 용액을 제조하기 위해 다양한 방법이 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, mRNA는 본원에 기재된 완충 용액에 직접 용해될 수 있다. 일부 구현예에서, mRNA 용액은 캡슐화를 위해 지질 용액과 혼합하기 전에 mRNA 스톱 용액을 완충 용액과 혼합함으로써 생성될 수 있다. 일부 구현예에서, mRNA 용액은 캡슐화를 위해 지질 용액과 혼합하기 직전에 mRNA 스톱 용액을 완충 용액과 혼합함으로써 생성될 수 있다. 일부 구현예에서, 적합한 mRNA 스톱 용액은 약 0.2 mg/ml, 0.4 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.6 mg/ml, 0.8 mg/ml, 1.0 mg/ml, 1.2 mg/ml, 1.4 mg/ml, 1.5 mg/ml, 또는 1.6 mg/ml, 2.0 mg/ml, 2.5 mg/ml, 3.0 mg/ml, 3.5 mg/ml, 4.0 mg/ml, 4.5 mg/ml, 또는 5.0 mg/ml 이상의 농도로 물 또는 완충액에 mRNA를 함유할 수 있다.

[0261] 일부 구현예에서, mRNA 스톱 용액은 펌프를 사용하여 완충 용액과 혼합된다. 예시적인 펌프는 기어 펌프, 연동 펌프 및 원심 펌프를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 전형적으로, 완충 용액은 mRNA 스톱 용액보다 더 큰 속도로 혼합된다. 예를 들어, 완충 용액은 mRNA 스톱 용액의 속도보다 적어도 1x, 2x, 3x, 4x, 5x, 6x, 7x, 8x, 9x, 10x, 15x, 또는 20x 더 큰 속도로 혼합될 수 있다. 일부 구현예에서, 완충 용액은 약 100 내지 6000 ml/분 (예를 들어, 약 100 내지 300 ml/분, 300 내지 600 ml/분, 600 내지 1200 ml/분, 1200 내지 2400 ml/분, 2400 내지 3600 ml/분, 3600 내지 4800 ml/분, 4800 내지 6000 ml/분, 또는 60 내지 420 ml/분) 범위의 유속으로 혼합된다. 일부 구현예에서, 완충 용액은 약 60 ml/분, 100 ml/분, 140 ml/분, 180 ml/분, 220 ml/분, 260 ml/분, 300 ml/분, 340 ml/분, 380 ml/분, 420 ml/분, 480 ml/분, 540 ml/분, 600 ml/분, 1200 ml/분, 2400

ml/분, 3600 ml/분, 4800 ml/분, 또는 6000 ml/분 이상의 유속으로 혼합된다.

- [0262] 일부 구현예에서, mRNA 스톱 용액은 약 10 내지 600 ml/분 (예를 들어, 약 5 내지 50 ml/분, 약 10 내지 30 ml/분, 약 30 내지 60 ml/분, 약 60 내지 120 ml/분, 약 120 내지 240 ml/분, 약 240 내지 360 ml/분, 약 360 내지 480 ml/분, 또는 약 480 내지 600 ml/분) 범위의 유속으로 혼합된다. 일부 구현예에서, mRNA 스톱 용액은 약 5 ml/분, 10 ml/분, 15 ml/분, 20 ml/분, 25 ml/분, 30 ml/분, 35 ml/분, 40 ml/분, 45 ml/분, 50 ml/분, 60 ml/분, 80 ml/분, 100 ml/분, 200 ml/분, 300 ml/분, 400 ml/분, 500 ml/분, 또는 600 ml/분 이상의 유속으로 혼합된다.
- [0263] 원하는 mRNA를 지질 나노입자에 혼입하는 프로세스를 "로딩"이라고 한다. 예시적인 방법은 문헌[Lasic et al., *FEBS Lett.* (1992) 312:255-8]에 기재되어 있다. LNP-혼입된 핵산은 지질 나노입자의 이중층 막 내에서 지질 나노입자의 내부 공간에 완전히 또는 부분적으로 위치하거나, 지질 나노입자 막의 외부 표면과 혼합될 수 있다. 지질 나노입자로의 mRNA의 혼입은 본원에서 "캡슐화"라고도 지칭되고, 핵산은 지질 나노입자의 내부 공간 내에 완전히 또는 실질적으로 함유된다.
- [0264] 적합한 LNP는 다양한 크기로 제조될 수 있다. 일부 구현예에서, 지질 나노입자의 감소된 크기는 mRNA의 보다 효율적인 전달과 관련이 있다. 적당한 LNP 크기의 선택은 표적 세포 또는 조직의 부위 및 어느 정도 지질 나노입자가 제조되는 용도를 고려할 수 있다.
- [0265] 다양한 방법이 지질 나노입자 집단의 크기결정에 이용가능하다. 다양한 구현예에서, 본원의 바람직한 방법은 Zetasizer Nano ZS(Malvern Panalytical)를 이용하여 LNP 입자 크기를 측정한다. 한 프로토콜에서, 10 μ l의 LNP 샘플이 990 μ l의 10% 트레할로스와 혼합된다. 이 용액은 큐벳에 넣은 다음, Zetasizer 기계에 넣는다. z-평균 직경(nm), 또는 누적 평균은 샘플의 LNP에 대한 평균 크기로 간주된다. Zetasizer 기계는 동적 광산란(dynamic light scattering, DLS) 및 자기 상관 함수의 누적 분석을 사용하여 다분산 지수(polydispersity index, PDI)를 측정하는 데에도 사용될 수 있다. 평균 LNP 직경은 형성된 LNP의 초음파 처리에 의해 감소될 수 있다. 간헐적인 초음파 처리 주기는 준탄성광산란(quasi-elastic light scattering, QELS) 평가와 번갈아 가며 효율적인 지질 나노입자 합성을 가이드할 수 있다.
- [0266] 일부 구현예에서, 대부분의 정제된 LNP, 즉, LNP의 약 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 초과가 약 70 내지 150 nm (예를 들어, 약 145 nm, 약 140 nm, 약 135 nm, 약 130 nm, 약 125 nm, 약 120 nm, 약 115 nm, 약 110 nm, 약 105 nm, 약 100 nm, 약 95 nm, 약 90 nm, 약 85 nm, 또는 약 80 nm)의 크기를 갖는다. 일부 구현예에서, 실질적으로 모든 (예를 들어, 80 또는 90% 초과)의 정제된 지질 나노입자가 약 70 내지 150 nm (예를 들어, 약 145 nm, 약 140 nm, 약 135 nm, 약 130 nm, 약 125 nm, 약 120 nm, 약 115 nm, 약 110 nm, 약 105 nm, 약 100 nm, 약 95 nm, 약 90 nm, 약 85 nm, 또는 약 80 nm)의 크기를 갖는다.
- [0267] 특정 구현예에서, LNP는 30 내지 200 nm의 평균 직경을 갖는다.
- [0268] 다양한 구현예에서, LNP는 80 내지 150 nm의 평균 직경을 갖는다.
- [0269] 일부 구현예에서, 본 조성물 중 LNP는 150 nm 미만, 120 nm 미만, 100 nm 미만, 90 nm 미만, 80 nm 미만, 70 nm 미만, 60 nm 미만, 50 nm 미만, 30 nm 미만, 또는 20 nm 미만의 평균 크기를 갖는다.
- [0270] 일부 구현예에서, 본 조성물 중 LNP의 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 초과가 약 40 내지 90 nm (예를 들어, 약 45 내지 85 nm, 약 50 내지 80 nm, 약 55 내지 75 nm, 약 60 내지 70 nm) 또는 약 50 내지 70 nm (예를 들어, 약 55 내지 65 nm) 범위의 크기를 가지고, 분무를 통한 폐 전달용으로 적합하다.
- [0271] 일부 구현예에서, 본 개시내용에 의해 제공되는 약제학적 조성물 중 LNP의 분산도 또는 분자 크기의 이질성(PDI) 측정치는 약 0.5 미만이다. 일부 구현예에서, LNP는 약 0.5 미만, 약 0.4 미만, 약 0.3 미만, 약 0.28 미만, 약 0.25 미만, 약 0.23 미만, 약 0.20 미만, 약 0.18 미만, 약 0.16 미만, 약 0.14 미만, 약 0.12 미만, 약 0.10 미만, 또는 약 0.08 미만의 PDI를 갖는다. PDI는 전술한 바와 같이 Zetasizer 기계에 의해 측정될 수 있다.
- [0272] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 약제학적 조성물 중 정제된 LNP의 약 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 초과는 각 개별 입자 내에서 mRNA를 캡슐화한다. 일부 구현예에서, 실질적으로 모든 (예를 들어, 80% 또는 90% 초과)의 약제학적 조성물 중 정제된 지질 나노입자는 각 개별 입자 내에서 mRNA를 캡슐화한다. 일부 구현예에서, 지질 나노입자는 50% 내지 99%; 또는 약 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 98%,

또는 99% 초과 캡슐화 효율을 갖는다. 전형적으로, 본원에서 사용하기 위한 지질 나노입자는 적어도 90% (예를 들어, 적어도 91%, 92%, 93%, 94%, 또는 95%)의 캡슐화 효율을 갖는다.

[0273] 일부 구현예에서, LNP는 1 내지 10의 N/P 비를 갖는다. 일부 구현예에서, 지질 나노입자는 1 초과, 약 1, 약 2, 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 또는 약 8의 N/P 비를 갖는다. 특정 구현예에서, 본원의 전형적인 LNP는 4의 N/P 비를 갖는다.

[0274] 일부 구현예에서, 본 개시내용에 따른 약제학적 조성물은 적어도 약 0.5 µg, 1 µg, 5 µg, 10 µg, 100 µg, 500 µg, 또는 1000 µg의 캡슐화된 mRNA를 함유한다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 약 0.1 µg 내지 1000 µg, 적어도 약 0.5 µg, 적어도 약 0.8 µg, 적어도 약 1 µg, 적어도 약 5 µg, 적어도 약 8 µg, 적어도 약 10 µg, 적어도 약 50 µg, 적어도 약 100 µg, 적어도 약 500 µg, 또는 적어도 약 1000 µg의 캡슐화된 mRNA를 함유한다.

[0275] 일부 구현예에서, mRNA는 화학적 합성 또는 DNA 주형의 시험관내 전사(IVT)에 의해 제조될 수 있다. mRNA를 제조하고 정제하는 예시적인 프로세스는 실시예 1에 기재되어 있다. IVT 프로세스인 이 프로세스에서, cDNA 주형은 mRNA 전사물을 생산하기 위해 사용되고 DNA 주형은 DNase에 의해 분해된다. 전사물은 심층 여과 및 접선류 여과(TFF)에 의해 정제된다. 정제된 전사물은 캡과 테일을 첨가하여 추가로 변형되고, 변형된 RNA는 심층 여과 및 TFF에 의해 다시 정제된다.

[0276] 그런 다음 mRNA는 수성 완충액에서 준비되고, LNP의 지질 성분을 함유하는 양친매성 용액과 혼합된다. LNP의 4가지 지질 성분을 용해시키기 위한 양친매성 용액은 알코올 용액일 수 있다. 일부 구현예에서, 알코올은 에탄올이다. 수성 완충액은 예를 들어 시트레이트, 포스페이트, 아세테이트 또는 숙신산염 완충액일 수 있고, 약 3.0 내지 7.0, 예를 들어, 약 3.5, 약 4.0, 약 4.5, 약 5.0, 약 5.5, 약 6.0, 또는 약 6.5의 pH를 가질 수 있다. 완충액은 염(예를 들어, 나트륨, 칼륨 및/또는 칼슘 염)과 같은 다른 성분을 함유할 수 있다. 특정한 구현예에서, 수성 완충액은 1 mM 시트레이트, 150 mM NaCl, pH 4.5를 갖는다.

[0277] mRNA-LNP 조성물을 제조하기 위한 예시적이고 비제한적인 프로세스는 제어된 균질 방식으로 완충된 mRNA 용액을 에탄올 중의 지질 용액과 혼합하는 단계를 수반하고, 여기서 지질:mRNA의 비율은 혼합 프로세스 내내 유지된다. 이 예시적인 예에서, mRNA는 시트르산 일수화물, 시트르산 삼나트륨 이수화물 및 염화나트륨을 함유하는 수성 완충액 내에 체지된다. mRNA 용액이 용액(1 mM 시트레이트 완충액, 150 mM NaCl, pH 4.5)에 첨가된다. 네 가지 지질(예를 들어, 양이온성 지질, PEG화된 지질, 콜레스테롤계 지질, 및 헬퍼 지질)의 지질 혼합물이 에탄올에 용해된다. mRNA 수용액과 에탄올 지질 용액은 거의 "무펄스" 펌프 시스템을 갖춘 "T" 혼합기에서 4:1의 부피비로 혼합된다. 그런 다음 생성된 혼합물에는 이후 다운스트림 정제 및 완충액 교환이 가해진다. 완충액 교환은 투석 카세트 또는 TFF 시스템을 사용하여 수행될 수 있다. TFF는 T-mix 프로세스를 통한 형성 직후 생성된 초기 LNP를 농축 및 완충액-교환하는 데 사용될 수 있다. 다이아필트레이션 프로세스는 투과 흐름과 동일한 속도로 적절한 완충액을 첨가하여 부피를 일정하게 유지하는 연속 작업이다.

[0278] **VI. mRNA-LNP RSV 백신의 패키징 및 용도**

[0279] mRNA-LNP 백신은 비경구(예를 들어, 근육내, 피내 또는 피하) 투여 또는 비인두(예를 들어, 비강내) 투여를 위해 제형화되거나 패키징될 수 있다. 다양한 구현예에서, mRNA-LNP 백신은 폐 투여를 위해 제형화되거나 패키징될 수 있다. 다양한 구현예에서, mRNA-LNP 백신은 정맥내 투여를 위해 제형화되거나 패키징될 수 있다. 백신 조성물은 즉석 제형의 형태일 수 있고, 여기서 LNP 조성물은 동결건조되고 사용 직전에 생리학적 완충액(예를 들어, PBS)으로 재구성된다. 백신 조성물은 또한 수용액 또는 냉동 수용액의 형태로 운송 및 제공될 수 있고, 재구성 없이 대상체에게 직접 투여될 수 있다(이전에 냉동된 경우, 해동 후).

[0280] 따라서, 본 개시내용은 단일 컨테이너에 mRNA-LNP 백신을 제공하거나, 하나의 컨테이너(예를 들어, 제1 컨테이너)에 mRNA-LNP 백신을 제공하고 또 다른 컨테이너(예를 들어, 제2 컨테이너)에 재구성을 위한 생리학적 완충액을 제공하는 키트와 같은 제조 물품을 제공한다. 컨테이너(들)는 단회-사용 투여량 또는 다회-사용 투여량을 함유할 수 있다. 컨테이너(들)는 전처리된 유리 바이알 또는 앰플일 수 있다. 제조 물품은 사용 지침도 포함할 수 있다.

[0281] 특정 구현예에서, mRNA-LNP 백신은 근육내(IM) 주사에 사용하기 위해 제공된다. 백신은 예를 들어 상완의 삼각근에 대상체에게 주사될 수 있다. 일부 구현예에서, 백신은 사전 충전형 시린지 또는 주사기(예를 들어, 단일 챔버 또는 다중 챔버)에 제공된다. 일부 구현예에서, 백신은 흡입에 사용하기 위해 제공되고, 미리 채워진 펌프, 에어로졸기 또는 흡입기에 제공된다.

[0282] mRNA-LNP 백신은 예방적 유효량, 즉 충분한 시간(예를 들어, 1년, 2년, 5년, 10년, 또는 평생) 동안 표적 병원체에 대해 충분한 면역 보호를 제공하는 양으로 이를 필요로 하는 대상체에게 투여될 수 있다. 예를 들어, 충분한 면역 보호는 병원체에 의한 감염과 관련된 증상의 예방 또는 완화일 수 있다. 일부 구현예에서, 백신의 다회 용량(예를 들어, 2회 용량)은 원하는 예방 효과를 달성하기 위해 이를 필요로 하는 대상체에게 투여된다(예를 들어, 주사된다). 용량(예를 들어, 1차(prime) 및 부스터 용량)은 적어도 예를 들어, 2주, 3주, 4주, 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 1년, 2년, 5년, 또는 10년의 간격만큼 분리될 수 있다.

[0283] **VII. 벡터**

[0284] 일 양태에서, 본원에 개시된 mRNA 조성물을 포함하는 벡터가 본원에 개시된다. 관심 단백질을 인코딩하는 RNA 서열(예를 들어, RSV F 단백질을 인코딩하는 mRNA)은 다양한 유형의 벡터로 클로닝될 수 있다. 예를 들어, 핵산은 플라스미드, 파지미드, 파지 유도체, 동물 바이러스 및 코스미드를 포함하지만 이에 제한되지 않는 벡터로 클로닝될 수 있다. 특별한 관심 벡터에는 발현 벡터, 복제 벡터, 프로브 생성 벡터, 시퀀싱 벡터 및 시험관내 전사에 최적화된 벡터가 포함될 수 있다.

[0285] 특정 구현예에서, 벡터는 숙주 세포에서 mRNA를 발현하는 데 사용될 수 있다. 다양한 구현예에서, 벡터는 IVT에 대한 주형으로 사용될 수 있다. 치료 용도에 적합한 최적으로 번역된 IVT mRNA의 작제는 문헌[Sahin, et al. (2014). Nat. Rev. Drug Discov. 13, 759-780]; 문헌[Weissman (2015). Expert Rev. Vaccines 14, 265-281]에 상세하게 개시되어 있다.

[0286] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 벡터는 5'에서 3'으로 적어도 다음을 포함할 수 있다: RNA 중합효소 프로모터; 5' UTR을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열; ORF를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열; 3' UTR을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열; 및 적어도 하나의 RNA 앵타머를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열. 일부 구현예에서, 본원에 개시된 벡터는 폴리(A) 서열 및/또는 폴리아데닐화 신호를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다.

[0287] 다양한 RNA 중합효소 프로모터가 알려져 있다. 일부 구현예에서, 프로모터는 T7 RNA 중합효소 프로모터일 수 있다. 다른 유용한 프로모터에는 T3 및 SP6 RNA 중합효소 프로모터가 포함되지만 이에 제한되지 않는다. T7, T3 및 SP6 프로모터에 대한 공통 뉴클레오티드 서열이 알려져 있다.

[0288] 또한, 본원에 개시된 벡터 또는 RNA 조성물을 포함하는 숙주 세포(예를 들어, 포유류 세포, 예를 들어 인간 세포)가 본원에 개시된다.

[0289] 폴리뉴클레오티드는 임의의 다수의 다양한 방법, 예를 들어 전기천공법(Amaxa Nucleofector-II(Amaxa Biosystems, Cologne, Germany)), (ECM 830)(BTX)(Harvard Instruments, Boston, Mass.) 또는 Gene Pulser II(BioRad, Denver, Colo.), Multiporator(Eppendorf, Hamburg, Germany), 리포펙션을 이용한 양이온성 리포솜 매개 형질감염, 중합체 캡슐화, 펩티드 매개 형질감염, "유전자 총"과 같은 바이올리스틱(biolistic) 입자 전달 시스템(예를 들어, 문헌[Nishikawa, et al. (2001). Hum Gene Ther. 12(8):861-70], 또는 TransIT-RNA 형질감염 키트(Mirus, Madison, WI)를 포함하지만, 이에 제한되지 않는 상업적으로 이용 가능한 방법을 사용하여 표적 세포로 도입될 수 있다.

[0290] 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포에 도입하기 위한 화학적 수단에는 거대분자 복합체, 나노캡슐, 미소구체, 비드와 같은 콜로이드 분산 시스템과 수중유 에멀션, 마이셀, 혼합 마이셀 및 리포솜을 비롯한 지질 기반 시스템이 포함된다. 시험관내 및 생체내 전달 비히클로 사용하기 위한 예시적인 콜로이드 시스템은 리포솜(예를 들어, 인공 막 소포)이다.

[0291] 외인성 핵산을 숙주 세포에 도입하거나 세포를 본 개시내용의 저해제에 노출시키는 데 사용되는 방법에 관계없이, 숙주 세포에서 mRNA 서열의 존재를 확인하기 위해 다양한 검정이 수행될 수 있다.

[0292] **VIII. 자가-복제 RNA 및 트랜스-복제 RNA**

[0293] 자가-복제 RNA:

[0294] 일 양태에서, RSV F 단백질을 인코딩하는 자가-복제 RNA가 본원에 개시된다.

[0295] 자가-복제 RNA는 예를 들어 알파바이러스로부터 유래된 복제 요소를 사용하고 구조적 바이러스 단백질을 관심 단백질(예를 들어, RSV F 단백질)을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열로 대체함으로써 생산될 수 있다. 자가-복제 RNA는 전형적으로 세포에 전달된 후 직접 번역될 수 있는 양성 가닥 분자이고, 이 번역은 전달된 RNA로부터 안

티센스 및 센스 전사체 둘 모두를 생성하는 RNA 의존성 RNA 중합효소를 제공한다. 따라서, 전달된 RNA는 여러 딸 RNA의 생성으로 이어진다. 이러한 딸 RNA와 동일 선상의 하위 계놈 전사체는 자체적으로 번역되어 인코딩된 항원(즉, RSV F 단백질 항원)의 *제자리* 발현(in situ expression)을 제공할 수 있거나, 전사되어 전달된 RNA와 동일한 의미를 갖는 추가 전사체를 제공할 수 있고, 이는 번역되어 항원의 *제자리* 발현을 제공한다. 이러한 서열의 전사의 전체적인 결과로, 도입된 레플리콘 RNA의 수가 크게 증폭되고, 따라서 인코딩된 항원은 세포의 주요 폴리펩티드 생성물이 된다.

[0296] 이러한 방식으로 자가-복제를 달성하는 데 적합한 시스템 중 하나는 알파바이러스 기반 레플리콘을 사용하는 것이다. 이들 레플리콘은 세포에 전달된 후 복제효소(또는 복제효소-전사효소)의 번역을 유도하는 양성 가닥(양성 센스 가닥) RNA이다. 복제효소는 자동 절단되어 전달된 양성 가닥 RNA의 계놈 가닥 복제본을 생성하는 복제 복합체를 제공하는 다단백질로 번역된다. 이러한 음성(-) 가닥 전사체는 그 자체로 전사되어 양성 가닥 모 RNA의 추가 복제본을 제공하고 또한 항원을 인코딩하는 하위 계놈 전사체를 제공할 수 있다. 따라서 하위 계놈 전사체의 번역은 감염된 세포에 의한 항원의 *제자리* 발현을 유도한다. 적합한 알파바이러스 레플리콘은 Sindbis 바이러스, Semliki 숲 바이러스, 동부 말 뇌염 바이러스, 베네수엘라 말 뇌염 바이러스 등의 복제효소를 사용할 수 있다. 돌연변이체 또는 야생형 바이러스 서열이 사용될 수 있다, 예를 들어, VEEV의 약독화 TC83 돌연변이가 레플리콘에서 사용되었다. 다음의 참조를 참고: WO2005/113782(본원에 참고로 포함됨).

[0297] 일 구현예에서, 본원에 기재된 각각의 자가-복제 RNA는 (i) 자가-복제 RNA 분자로부터 RNA를 전사할 수 있는 RNA 의존성 RNA 중합효소 및 (ii) RSV F 단백질 항원을 인코딩한다. 중합효소는 예를 들어 알파바이러스 단백질 nsP1, nsP2, nsP3 및 nsP4 중 하나 이상을 포함하는 알파바이러스 복제효소일 수 있다. 천연 알파바이러스 계놈은 비구조적 복제효소 다단백질에 더하여 구조적 비리온 단백질을 인코딩하는 반면, 특정 구현예에서 자가-복제 RNA 분자는 알파바이러스 구조 단백질을 인코딩하지 않는다. 따라서, 자가-복제 RNA는 세포 내에서 자신의 계놈 RNA 복제본을 생성할 수 있지만 RNA를 포함하는 비리온을 생성하지는 않는다. 이러한 비리온을 생산할 수 없다는 것은 야생형 알파바이러스와 달리 자가-복제 RNA 분자가 감염 형태로 영속될 수 없음을 의미한다. 야생형 바이러스에서 영속하는 데 필요한 알파바이러스 구조 단백질은 본 개시내용의 자가-복제 RNA에는 없고, 그 자리는 관심 번역원을 인코딩하는 유전자(들)이 차지하여, 하위 계놈 전사체가 구조적 알파바이러스 비리온 단백질보다는 번역원을 인코딩한다. 자가-복제 RNA는 본원에 참고로 포함된 WO 2011005799에 더 상세히 기재되어 있다.

[0298] 트랜스-복제 RNA:

[0299] 일 양태에서, RSV F 단백질을 인코딩하는 트랜스-복제 RNA가 본원에 개시된다.

[0300] 트랜스-복제 RNA는 상기에 기재된 자가-복제 RNA와 유사한 요소를 가지고 있다. 그러나 트랜스-복제 RNA의 경우 두 개의 별도 RNA 분자가 사용된다. 제1 RNA 분자는 상기에 기재된 RNA 복제효소(예를 들어, 알파바이러스 복제효소)를 인코딩하고, 제2 RNA 분자는 관심 단백질(예를 들어, RSV F 단백질 항원)을 인코딩한다. RNA 복제효소는 제1 및 제2 RNA 분자 중 하나 또는 둘 모두를 복제함으로써 관심 단백질을 인코딩하는 RNA 분자의 복제 수를 크게 증가시킬 수 있다. 트랜스-복제 RNA는 본원에 참고로 포함된 WO 2017162265에 더 상세히 기재되어 있다.

[0301] **IX. 약제학적 조성물**

[0302] 본 개시내용에 따라 정제된 RNA는 예를 들어 백신으로 사용하기 위한 약제학적 조성물의 성분으로서 유용할 수 있다. 이들 조성물은 전형적으로 RNA 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함할 것이다. 본 개시내용의 약제학적 조성물은 또한 소분자 번역강화제(예를 들어, TLR 작용제)와 같은 하나 이상의 추가 성분을 포함할 수 있다. 본 개시내용의 약제학적 조성물은 또한 리포솜, 수중유 에멀션 또는 마이크로입자와 같은 RNA 전달 시스템을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 지질 나노입자(LNP)를 포함한다. 특정 구현예에서, 조성물은 LNP 내에 캡슐화된 항원 인코딩 핵산 분자를 포함한다.

[0303] **X. 백신접종 방법**

[0304] 본원에 개시된 RSV 백신은 RSV F 단백질에 대한 면역 반응을 유도하기 위해 대상체에게 투여될 수 있고, 대상체의 항-항원 항체 역가는 본원에 개시된 RSV 백신을 접종하지 않은 대상체의 항-항원 항체 역가에 비해 또는 RSV에 대한 대체 백신에 비해 백신접종 후 증가된다. "항-항원 항체"는 항원에 특이적으로 결합하는 혈청 항체이다.

[0305] 일 양태에서, 본 개시내용은 본원에 기재된 RSV 백신을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, RSV에 대한 면역 반응을 유도하거나 대상체를 RSV 감염으로부터 보호하는 방법을 제공한다. 본 개시내용은 또한 RSV에 대한 면역 반응을 유도하거나 RSV 감염으로부터 대상체를 보호하는 데 사용하기 위한 본원에 기재된 RSV 백신을 제공한다.

본 개시내용은 또한 RSV에 대한 면역 반응을 유도하거나 RSV 감염으로부터 대상체를 보호하기 위한 백신의 제조에 사용하기 위한 본원에 기재된 RSV mRNA를 제공한다.

[0306] 특정 구현예에서, 대상체는 SEQ ID NO: 1의 RSV F 단백질 항원을 인코딩하는 mRNA ORF를 포함하는 RSV 백신을 투여받은 대상체에 비해 RSV 백신 투여 후 RSV에 대한 중화 항체의 혈청 농도가 더 높다.

[0307] 특정 구현예에서, 대상체는 아주반트와 공동-투여되는 RSV 단백질 백신을 투여받은 대상체에 비해 RSV 백신 투여 후 RSV에 대한 중화 항체의 혈청 농도가 유사하다.

[0308] 특정 구현예에서, RSV 백신은 RSV F 단백질의 부위 Ø에 대해 결합 특이성을 갖는 항체의 혈청 농도를 증가시킨다.

[0309] 특정 구현예에서, 대상체는 SEQ ID NO: 2의 RSV F 단백질 항원을 인코딩하는 mRNA ORF를 포함하는 RSV 백신을 투여받은 대상체에 비해 RSV 백신 투여 후 RSV F 단백질의 부위 I 또는 부위 II에 대해 결합 특이성을 갖는 항체의 혈청 농도가 더 낮다.

[0310] 특정 구현예에서, RSV 백신은 기존 RSV 면역을 갖고 있는 대상체의 중화 항체의 혈청 농도를 증가시킨다.

[0311] 본 발명이 보다 잘 이해될 수 있도록, 하기 실시예가 기술된다. 이들 실시예는 단지 예시를 위한 것이고, 어떠한 방식으로든 본 발명의 범주를 제한하는 것으로 간주되어서는 안 된다.

[0312] **실시예**

[0313] 구체적인 구현예에 대한 전문적인 설명은 당업계 내의 지식을 적용함으로써 다른 사람이 본 개시내용의 일반적인 개념을 벗어나지 않고도 과도한 실험 없이 이러한 구체적인 구현예를 다양한 응용예에 맞도록 용이하게 수정 및/또는 조정할 수 있는 개시내용의 일반적인 속성을 완전히 밝힐 것이다. 따라서, 본원에 제시된 교시 및 지침에 기초하여 이러한 조정 및 수정은 개시된 구현예의 균등물의 의미 및 범위 내에 있는 것으로 의도된다. 본원에서 의 표현 또는 용어는 본원의 용어 또는 표현이 본 발명의 교시 및 지침에 비추어 당업자에 의해 해석될 수 있도록 기술하기 위한 것이며 한정하기 위한 것이 아님을 이해해야 한다.

[0314] 실시예 1: RSV F 단백질을 인코딩하는 mRNA

[0315] mRNA 기반 백신으로 시험하기 위해 세 가지 다른 RSV F 단백질을 선택하였다. FD1로 명명된 F 단백질은 WT RSV F 단백질에 해당한다. FD2로 명명된 F 단백질은 막관통 도메인 및 세포질 테일이 결합되고 C 말단 피브리틴 삼량체화 도메인(T4 폴돈으로도 알려짐)을 함유하는 가용성 RSV F 단백질에 해당한다. FD3으로 명명된 F 단백질은 융합전 RSV F 단백질에 해당한다. RSV F 단백질 각각에 대한 아미노산 서열을 하기에 열거하였다.

[0316] FD1:

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKKNK
 CNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELLQMLMSTQATNNRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSK
 KRKRFLGFLGLVGSIAISGVAVSKVLHLEGEVNIKISALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLK
 NYIDKQLLPIVINKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLLEITREFSVNAGVTTTPVSTYMLTNSSELLSLIND
 MPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLYVYVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKE
 GSNICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKY
 DCKIMTSKTDVSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTL
 YYVNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSPDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDHELLHNVNAGKST
 TNIMITTTIIIVILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNIASFN (SEQ ID NO: 1)

[0317]

[0318]

FD2:

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKKNK
 CNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTEQLQLMQSTQATNNRARRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLISK
 KRKRFLGFLGLVGSASIAVAVSKVLHLEGEVKNIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLK
 NYIDKQLLPVINKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTTTPVSTYMLTNSSELLSLIND
 MPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKE
 GSNICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTPSEVNLCNVDIFNPKY
 DCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFNNGCDYVSNKGVDTVSVGNTL
 YYVNKQEGKSLYVKGEPINIFYDPLVFPSPDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDHELLSAIGGYIPEA
 PRDGGAYVRKDGGEWVLLSTFL (SEQ ID NO: 2)

[0319]

[0320]

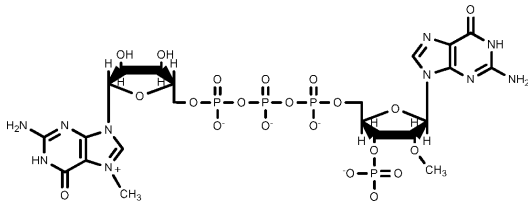
FD3:

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENK
 CNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTEQLQLMGSGNVGLGGAIASGVAVSKVLHLEGEVKNIKSALL
 STNKAVVSLNNGVSVLTFKVLDLKNYIDKQLLPILNKQSCSISNPETVIEFQQKNNRLEITREFSV
 NAGVTTTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPL
 YGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKNGSNICLTRDRGWYCDNAGNVSFFPQAETCKVQSNRVFCD
 TMNSRTPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTF
 FNNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGKSLYVKGEPINIFYDPLVFPSPDEFDASISQVNELI
 NQSLAFINQSDHELLHVNAGKSTTNIMITIIIVIIIVILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNI
 AFSN (SEQ ID NO: 3)

[0321]

[0322]

본원에 기재된 mRNA는 RSV F 단백질 항원을 인코딩하는 오픈 리딩 프레임(ORF), 적어도 하나의 5' 비번역 영역 (5' UTR), 적어도 하나의 3' 비번역 영역(3' UTR), 및 적어도 하나의 폴리아데닐화(폴리(A)) 서열을 포함한다. mRNA는 하기 구조를 갖는 5' 캡을 추가로 포함한다:



[0323]

[0324]

RSV F 단백질을 인코딩하는 각각의 mRNA 오픈 리딩 프레임(ORF)에 대한 핵산 서열을 하기에 열거하였다.

[0325]

FD1 mRNA ORF:

AUGGAAUUGCUGAUCCUCAAAGCGAACGCAAUACCCACUAUCCUCACUGCGGUCACCUU
 CUGCUUUUGCGAGCGGACAGAACAUCACCGAAGAAUUCUACCAAUCUACUUGCUCGCCCG
 UGUCCAAGGGUUACCUUGCUCGCCUGAGGACCGGAUGGUACACUUCGUGAUUACCAU
 UGAGUUGUCGAAUAUCAAGAAGAACAAGUGCAACGGAACCGAUGCUAAGGUCAAGCUGA
 UCAAGCAGGAGCUGGACAAGUACAAGAAUGCUGUGACCGAGCUGCAGCUGCUGAUGCA
 GUCCACUCAAGCCACCAACAUCGCGCCCCGGCGGGAACUCCAAGGUUCAUGAACUACA
 CCUUGAACAAACGCCAAGAAAACGAACGUGACCCUGUCCAAGAAGCGCAAGCGCAGAUUC
 CUUGGCUUCCUUCUGGGCGUCGGUAGCGCCAUCGCCUCCGGCGUGGGCCGUCAGCAAG
 GUCCUGCACCUCGAGGGAGAAGUCAACAAGAUUAAGAGCGCCCUGCUGUCCACCAACAA
 GGCCGUGGUGUCGCUAUCAAACGGCGUCAGCGUACUGACCCAGCAAAGUGCUGGAUCUC
 AAGAACUACAUIUGAUUAGCAACUCCUCCCUAUCGUGAAUAAGCAGAGCUGUUCGAUUUC
 CAACUUCGAGACUGUGAUUUGAAUUCAGCAGAAGAACAACCGGCUGCUGGAAAUUACCA
 GAGAAUUCAGCGUGAAUUGCCGGAGUCACUACCCCGUGUCCACCUACAUGCUGACAAAC
 UCCGAGCUGCUGAGCCUGAUACAACGAUAUGCCGAUUACCAACGACCAGAAGAAGCUGAU
 GUCGAACAACGUGCAGAUUCGUGCGCCAGCAGUCCUACUCAUAUCAUGUCGAUCAUAAGG
 AAGAGGUCCUGGCCUACGUGGUGCAGCUUCCUCUGUACGGCGUGAUUUGACACUCCGUG
 UUGGAAACUGCACACUAGUCCCCUGUGCACUACUAAACCCAAGGAGGGCAGCAAUAUCU
 GCCUGACUCGGACCGAUAGAGGCUGGUACUGUGAUUACGCCGGUCCGUGUCCUUCUUCU
 CCCGCAAGCCGAGACUUGCAAAGUGCAGAGCAACCGGGUGUUCUGUGACACUAUGAACU
 CACUGACCUUGCCGAGCGAAGUCAACCUUUGCAACGUGGACAUCUUUAACCCUAAAUAAC
 GACUGCAAGAUCAUGACCUCCAAGACCGACGUGUCGAGCUCAGUGAUUACUUCGCUGG
 GAGCCAUUGUGUCCUGCUACGGGAAAACCAAGUGCACGGCCUCAAACAAGAACCGGGGU
 AUCAUUUAGACCUUCUCCAACGGCUGCGACUAUGUGUCCAACAAGGGGGUGGACACUGU
 GUCCGUGGGAAACACCUUGUAUUACGUGAACAAGCAGGAGGGAAAGUCCCUACGUGA
 AGGGCGAACC CAUCAUCAAUUUCUACGACCCGCUUGUUCUCCUCCGAUGAAUUCGAC
 GCAUCCAUCUCACAAGUCAACGAAAAGAUUAACCAGUCCUGGCUUUCAUUCGCAAGUC
 CGACGAACUGCUCCAUAACGUAACGCUGGAAAGUCCACCACCAACAUCAUGAUCACCA
 CGAUCAUUUUGUGAUCAUCGUAUCCUGCUGUCACUGAUAGCAGUGGGACUGCUCCU
 CUACUGCAAAGCGCGGUCGACCCAGUGACACUCUCGAAGGACCAGCUGUCCGGGAUC
 AACAAUCGCGUUUUCGAACUGA (SEQ ID NO: 4)

[0326]

[0327]

FD2 mRNA ORF:

AUGGAACUCCUGAUCCUGAAGGCCAAUGCUAUCACUACCAUCCUGACUGCCGUCACCUU
 CUGCUUCGCCUCCGGACAAAUAUCACUGAAGAAUUUUACCAAAGCACCUGUAGCGCGG
 UGUCCAAGGGAUACCUAGAGCGCUCUGAGGACCGGAUGGUACACCAGCGUGAUUACCAU
 CGAGCUGAGUAACAUCAAGAAGAACAAGUGCAACGGGACCGAUGCUAAGGUCAAGUUGA

[0328]

UCAACAAGAGCUCGACAAGUACAAGAACGCCGUGACUGAGCUGCAGCUGCUGAUGCAG
 UCAACUCAGGCCACCAACAACCGGGCCAGACGGGAACUGCCGAGAUUCAUGAACUACAC
 CCUGAACAAACGCCAAAAAGACCAACGUGACCCUGUCCAAGAAGAGAAAGCGCCGGUUC
 UGGGUUUCUGCUUGGCGUGGGAUCAGCAAUCGCGUCCGGAGUGGCAGUGUCCAAGG
 UCUUGCACCUCGAGGGCGAAGUGAACAAGAUCAAGUCCGCGCUUCUGUCGACCAACAAG
 GCCGUCGUUUCUGUCGAACGGAGUGUCGUCACGAGCAAAGUGCUCGACCUGA
 AGAACUACAUCGACAAACAGCUGCUGCCCAUCGUCAACAAGCAGAGCUGCAGCAUCUCA
 AACAUUGAAACCGUGAUCGAGUUCAGCAGAAGAACAACCGCCUGCUCGAGAUUACCAG
 AGAGUUUUCGUGAACGCCGGCGUGACCACCCCGGUGUCGACCUACAUGCUCACAAA
 UCGGAACUUCUCUCCUGAUUAAUGACAUGCCCAUUAACGAUCAGAAAAAGCUGAU
 GUCGAACAAUGUGCAGAUUGUGCGCCAGCAGUCCUACUCCAUCAUGUCCAUCAUUAAGG
 AAGAGGUCCUGGCCUACGUGGUGCAGUUGCCGUGUACGGUGUCAUCGAUACCCCCUG
 CUGGAAGCUCCAUAUCUUCGCCCCUGUGUACUACCAACACCAAGGAAGGCUCCAACAUCU
 GCCUGACCCGGACGGAUCGCGGCUGGUACUGUGACAAUGCCGGAUCCGUGUCGUUCU
 CCCGCAAGCGGAGACUUGCAAAGUGCAGUCCAACCGGGUGUUCUGUGACACUAUGAAC
 UCCUGACUCUGCCGUCCGAAGUCAACCUCUGCAACGUGGACAUUUUCAUCCAAAAUA
 CGACUGCAAGAUAAUGACCUCCAAGACUGACGUGUCAUCGUCCGUGAUCACAUCUCUGG
 GAGCCAUUGUCUCCUGCUACGGAAGACUAAGUGCACCGCUGCAACAAGAACAGGGGC
 AUUAUCAAGACCUUCAGCAACGGUUGCGACUAUGUGUCCAACAAGGGCGUGGAUACCGU
 GUCCGUGGGCAACACCUUGUACUACGUGAACAAGCAGGAGGGGAAGUCCCUUAUGUG
 AAGGGGGAGCCAAUCAUUAACUUAUACGACCCCUUGGUGUUCUAGCGACGAGUUCG
 ACGCCUCAUCUCUCAAGUCAACGAAAAGAUCAACCAGAGCCUCGCCUUAUCCGCAAG
 UCCGAUGAACUGCUGCAGCCAUUGGGGUUACAUCCUGAGGCCCCUCGGGACGGAC
 AGGCAUACGUCCGCAAGGACGGCGAAUGGGUGCUGCUUAGCACCUUCCUCUAA (SEQ ID
 NO: 5)

[0329]

FD3 mRNA ORF:

AUGGAACUGCUGAUCUCAAAGCCAACGCAAUCACCACCAUUCUCACCCGUGUGACCUU
 CUGCUUCGCAUCGGGGCAGAACAUCACUGAAGAGUUUUACCAGAGCACUUGCAGCGCG
 GUGUCAAGGGUUACCUUCCGCACUGCGGACCGGAUGGUACACUUCGUGAUCACCA
 UUGAGCUCAGCAACAUCAAGGAAAACAAGUGCAAUGGCACCGACGCCAAGGUCAAGCUG
 AUCAAACAAGAACUGGACAAGUACAAGAACGCCGUGACAGAAUUGCAGCUCCUGAUGGG
 AUCCGAAACGUCGGUCUGGGCGGAGCCAUCGCGAGUGGAGUGGCUGUGUCCAAGGUC
 UUGCACCUCGAGGGAGAAGUGAACAAGAUCAAGUCCGCGCUGCUGUCAACGAACAAGGC
 CGUGGUGUCCUGUCUACGGCGUCAGCGUGCUGACGUUCAAGGUCCUGGACCUGAAG
 AAUUAUUGACAAGCAGCUGCUGCCCAUCCUCAACAAGCAAUCCUGCUCCAUCUCCAA

[0331]

CCCCGAAACCGUGAUCGAGUUCAGCAGAAGAACAACCGCCUGCUGGAAUUAUCUCGCG
 AGUUCUCUGUGAAUGCCGGCGUGACCACCCUGUGUCCACCUACAUGCUGACCAACUC
 CGAGCUUCUCUCCUUAUCAUGACAUGCCUAUCACGAACGACCAGAAGAAGCUGAUGU
 CGAACAAACGUGCAGAUUGUGCGGCAGCAGUCAUACAGCAUCAUGUCGAUCAUCAAGGAA
 GAAGUGCUGGGCUACGUGGUGCAACUCCCGCUGUACGGCGUCAUCGAUACCCCGUGCU
 GGAAGCUGCACACCUCGCCUUUGUGUACCACCAACACCAAGAACGGAUCCAACAUCUGC
 UUAACCCGGACUGAUCGGGGUUGGUACUGCGACAACGCCGGGAAUGUUUCGUUCUUC
 CACAAGCCGAGACUUGUAAAAGUGCAGUCAAACAGAGUGUUCUGUGACCCAUGAACUCG
 AGAACCCUGCCCAGCGAAGUGAACCUUGUGUACGUCGACAUCUUUAACCCAAAAUACGA
 UUGCAAGAUUAUGACCAGCAAAACCGACGUGUCCUCCUCCGUGAUAAACAAGCCUGGGGG
 CGAUUGUGUCAUGCUACGGAAAGACUAAGUGCACCGCCUCGAACAAGAACC GCGGCAUC
 AUUAAGACUUUCUGAAUGGUUGCGACUAUGUGUCCAACAAGGGCGUGGAUACUGUGU
 CAGUCGGAAUACUCUUUACUACGUGAACAAGCAGGAGGGGAAAAGCCUCUACGUGAAG
 GGAGAGCCUAAUUAUCAACUUUJACGAUCCGCUJGGUJUCCCGUCCGACGAUUUCGACG
 CCAGCAUCAGCCAAGUCAACGAGCUGAUUAACCAGUCCCUJCGCCUJCAUCAACCAAUCC
 GACGAGCUCCUGCAUAACGUGAACGCCGAAAGUCCACCACCAUCAUGAUCACUAC
 UAUUAUCAUCGUGAUCUACUGCAUCCUGCUGAGCCUGAUJGCUGUGGGCCUGUUGCUG
 UAUJGCAAAGCCAGGUCCACCCCGGUCACCCUGUCGAAGGAUCAGCUGUCCGGAUCAA
 CAACAUJGCCUUCUCCAACUAA (SEQ ID NO: 6)

[0332]

RSV F 단백질을 인코딩하는 각각의 DNA 주형에 대한 핵산 서열을 하기에 열거하였다.

[0333]

FD1 DNA:

[0334]

ATGGAATTGCTGATCCTCAAAGCGAACGCAATCACCCTATCCTACTGCGGTACCTTCT
 GCTTTGCGAGCGGACAGAACATCACCGAAGAATTCTACCAATCTACTTGCTCCGCCGTGTC
 CAAGGGTTACCTGTCCGCCCTGAGGACCGGATGGTACACTTCCGTGATTACCATTGAGTTG
 TCGAATATCAAGAAGAACAAGTGAACGGAACCGATGCTAAGGTCAAGCTGATCAAGCAGG
 AGCTGGACAAGTACAAGAATGCTGTGACCGAGCTGCAGCTGCTGATGCAGTCCACTCAAG
 CCACCAACAATCGCGCCCGGCGGGAACCTCCAAGGTTTCATGAACTACACCTTGAACAACG
 CCAAGAAAACGAACGTGACCCTGTCCAAGAAGCGCAAGCGCAGATTCTTGCTTCTTCT
 GGGCGTCCGTAGCGCCATCGCCTCCGGCGTGGCCGTCAGCAAGGTCCTGCACCTCGAGG
 GAGAAGTCAACAAGATTAAGAGCGCCCTGCTGTCCACCAACAAGGCCGTGGTGTGCGTAT
 CAAACGGCGTCAGCGTACTGACCAGCAAAGTGTGGATCTCAAGAATACTTACATTGATAAGCA
 ACTCCTCCCTATCGTGAATAAGCAGAGCTGTTTCGATTTCCAACATCGAGACTGTGATTGAAT
 TCCAGCAGAAGAACAACCGGCTGCTGGAATTACCAGAGAATTCAGCGTGAATGCCGGAG
 TCACTACCCCGTGTCCACCTACATGCTGACAACTCCGAGCTGCTGAGCCTGATCAACGA
 TATGCCGATTACCAACGACCAGAAGAAGCTGATGTGCAACAACGTGCAGATCGTGCGCCA
 GCAGTCTACTCAATCATGTGATCATCAAGGAAGAGTCTTGGCCTACGTGGTGCAGCTT
 CCTCTGTACGGCGTGATTGACACTCCGTGTTGGAACTGCACACTAGTCCCCTGTGACTA
 CTAACACCAAGGAGGGCAGCAATATCTGCCTGACTCGGACCGATAGAGGCTGGTACTGTG
 ATAACGCCGGGTCCGTGTCTTCTTCCCGCAAGCCGAGACTTGCAAAGTGCAGAGCAACC
 GGGTGTCTGTGACACTATGAACTCACTGACCTTGCCGAGCGAAGTCAACCTTTGCAACGT
 GGACATCTTTAACCTAAATACGACTGCAAGATCATGACCTCCAAGACCGACGTGTGAGC
 TCAGTGATTACTTCGCTGGGAGCCATTGTGTCTGCTACGGGAAAACCAAGTGCACGGCCT
 CAAACAAGAACCAGGGGTATCATTAAAGACCTTCTCCAACGGCTGCGACTATGTGTCCAACAA
 GGGGGTGGACACTGTGTCCGTGGGAAACACCTTGTATTACGTGAACAAGCAGGAGGGAAA
 GTCCCTCTACGTGAAGGGCGAACCCATCATCAATTTCTACGACCCGCTCGTGTTCCTCC
 GATGAATTCGACGCATCCATCTCACAAGTCAACGAAAAGATTAACCAGTCCCTGGCTTTTCAT
 TCGCAAGTCCGACGAACTGCTCCATAACGTCAACGCTGGAAAGTCCACCACCAACATCATG
 ATCACCACGATCATTATTGTGATCATCGTCATCCTGCTGTCACTGATAGCAGTGGGACTGCT
 CCTCTACTGCAAAGCGCGGTGACCCAGTGACACTCTCGAAGGACCAGCTGTCCGGGAT
 CAACAACATCGCGTTTTTGAAGTGA (SEQ ID NO: 7)

[0336]

[0337]

FD2 DNA:

ATGGAACTCCTGATCCTGAAGGCCAATGCTATCACTACCATCCTGACTGCCGTACCTTCT
 GCTTCGCCTCCGGACAAAATATCACTGAAGAATTTTACCAAAGCACCTGTAGCGCGGTGTC
 CAAGGGATACCTGAGCGCTCTGAGGACCGGATGGTACACCAGCGTGATTACCATCGAGCT
 GAGTAACATCAAGAAGAACAAGTGCAACGGGACCGATGCTAAGGTCAAGTTGATCAAACAA
 GAGCTCGACAAGTACAAGAACGCCGTGACTGAGCTGCAGCTGCTGATGCAGTCAACTCAG
 GCCACCAACAACCGGGCCAGACGGGAAGTCCCGAGATTCATGAACTACACCCTGAACAAC
 GCCAAAAAGACCAACGTGACCCTGTCCAAGAAGAGAAAGCGCCGGTTCTCTGGGTTTCCTG
 CTTGGCGTGGGATCAGCAATCGCGTCCGGAGTGCCAGTGTCCAAGGTCTTGCACCTCGAG
 GGCGAAGTGAACAAGATCAAGTCCGCGCTTCTGTGACCAACAAGGCCGTGTTTTCCCTG
 TCGAACGGAGTGTCCGTGCTCAGGAGCAAAGTGCTCGACCTGAAGAACTACATCGACAAA
 CAGCTGCTGCCATCGTCAACAAGCAGAGCTGCAGCATCTCAAACATTGAAACCGTGATCG
 AGTTCAGCAGAAGAACAACCGCCTGCTCGAGATTACCAGAGAGTTTTCCGTGAACGCCG
 GCGTGACCACCCCGGTGTGCGACCTACATGCTCACAAATTCGGAACCTTCTCTCCCTGATTAA
 TGACATGCCATTACTAACGATCAGAAAAAGCTGATGTGCAACAATGTGCAGATTGTGCGC
 CAGCAGTCCACTCCATCATGTCCATCATTAAGGAAGAGGTCTGGCCTACGTGGTGCAGT
 TGCCGCTGTACGGTGTGATCGATACCCCTGCTGGAAGCTCCATACTTCGCCCTGTGTAC
 TACCAACACCAAGGAAGGCTCCAACATCTGCCTGACCCGGACGGATCGCGGCTGGTACTG

[0338]

TGACAAATGCCGGATCCGTGTGTTCTTCCCGCAAGCGGAGACTTGCAAAGTGCAGTCCAA
 CCGGGTGTCTGTGACACTATGAACTCCCTGACTCTGCCGTCCGAAGTCAACCTCTGCAAC
 GTGGACATTTTCAATCCAAAATACGACTGCAAGATAATGACCTCCAAGACTGACGTGTCATC
 GTCCGTGATCACATCTCTGGGAGCCATTGTCTCCTGCTACGAAAGACTAAGTGCACCGC
 GTCGAACAAGAACAGGGGCATTATCAAGACCTTCAGCAACGGTTGCGACTATGTGTCCAAC
 AAGGGCGTGGATACCGTGTCCGTGGGCAACACCTTGTACTACGTGAACAAGCAGGAGGGG
 AAGTCCCTTTATGTGAAGGGGAGCCAATCATTAACCTTTTACGACCCCTGGTGTTCCTA
 GCGACGAGTTGACGCGCTCAATCTCTCAAGTCAACGAAAAGATCAACCAGAGCCTCGCCTT
 CATCCGCAAGTCCGATGAACTGCTGTCAGCCATTGGGGTTACATCCCTGAGGCCCTCG
 GGACGGACAGGCATACGTCCGCAAGGACGGCGAATGGGTGCTGCTTAGCACCTTCTCTA

[0339]

A (SEQ ID NO: 8)

- [0340] FD3 DNA:
 ATGGAAGTCTGATCCTCAAAGCCAACGCAATCACCACCATTCTCACCCTGTGACCTTCT
 GCTTCGCATCGGGCAGAACATCACTGAAGAGTTTTACCAGAGCACTTGCAGCGCGGTGT
 CAAAGGGTTACCTTTCCGCACTGCGGACCGGATGGTACTACTCCGTGATCACCATTGAGCT
 CAGCAACATCAAGGAAAACAAGTGCAATGGCACCGACGCCAAGGTCAAGCTGATCAAACA
 AGAACTGGACAAGTACAAGAACGCCGTGACAGAATTGCAGCTCCTGATGGGATCCGAAA
 CGTCGGTCTGGGCGGAGCCATCGCGAGTGGAGTGGCTGTGTCCAAGGTCTTGCACCTCG
 AGGGAGAAGTGAACAAGATCAAGTCCGCGCTGCTGTCAACGAACAAGGCCGTGGTGTCCC
 TGTCTAACGGCGTCAGCGTGTGACGTTCAAGGTCTGGACCTGAAGAATTACATTGACAA
 GCAGCTGCTGCCATCCTCAACAAGCAATCCTGCTCCATCTCCAACCCCGAAACCGTGATC
 GAGTTCCAGCAGAAGAACAACCGCCTGCTGGAAATACTCGCGAGTTCTCTGTGAATGCCG
 GCGTGACCACCCCTGTGTCCACCTACATGCTGACCAACTCCGAGCTTCTCTCCCTTATCAA
 TGACATGCCTATCACGAACGACCAGAAGAAGCTGATGTCGAACAACGTGCAGATTGTGCG
 GCAGCAGTCATACAGCATCATGTGATCATCAAGGAAGAAGTGTGGCGTACGTGGTGCA
 ACTCCCGCTGTACGGCGTCATCGATACCCCGTGTGGAAGCTGCACACCTCGCCTTTGTG
 TACCACCAACACCAAGAACGGATCCAACATCTGCTTAACCCGGACTGATCGGGGTTGGTAC
 TGCGACAACGCCGGGAATGTTTTCGTTCTTCCACAAGCCGAGACTTGTAAGTGCAGTCAA
 ACAGAGTGTCTGTGACACCATGAACTCGAGAACCCTGCCAGCGAAGTGAACCTGTGTAA
 CGTCGACATCTTTAACCCAAAATACGATTGCAAGATTATGACCAGCAAAACCGACGTGTCT
 CCTCCGTGATAACAAGCCTGGGGGCGATTGTGTATGCTACGGAAAGACTAAGTGCACCG
 CCTCGAACAGAACC CGGCATCATTAGACTTTCTCGAATGGTTGCGACTATGTGTCCAA
 CAAGGGCGTGGATACTGTGTCAGTCGGGAATACTCTTTACTACGTGAACAAGCAGGAGGG
 GAAAAGCCTTACGTGAAGGGGAGGCCTATTATCAACTTTTACGATCCGCTGGTGTCCCCG
 TCCGACGAATTGACGCCAGCATCAGCCAAGTCAACGAGCTGATTAACCAAGTCCCTCGCCT
 TCATCAACCAATCCGACGAGCTCCTGCATAACGTGAACGCCGAAAAGTCCACCACCAACAT
 CATGATCACTACTATTATCATCGTGATCATCGTCATCCTGCTGAGCCTGATTGCTGTGGGCC
 TGTTGCTGTATTGCAAAGCCAGGTCCACCCCGTCCACCTGTGGAAGGATCAGCTGTCCG
 GAATCAACAACATTGCCTTCTCCAATAA (SEQ ID NO: 9)
- [0341] 5'UTR 및 3'UTR에 대한 핵산 서열을 하기에 열거하였다.
- [0344] 5'UTR:
 GGACAGAUCCUGGAGACGCCAUCCACGCUGUUUUGACCUCCAUAGAAGACACCGGG
 ACCGAUCCAGCCUCCGCGGCCGGGAACGGUGCAUUGGAACGCGGAUUCGCCGUGCCAA
 GAGUGACUCACCGUCCUUGACACG_(SEQ ID NO: 10)
- [0345] 3'UTR:
 CGGGUGGCAUCCUGUGACCCUCCCGAGUGCCUCUCCUGGCCUGGAAGUUGCCACU
 CCAGUGCCCACCAGCCUUGUCCUAAUAAAAUUAAGUUGCAUC (SEQ ID NO: 11)
- [0347] RSV F 단백질을 인코딩하는 각각의 전장 mRNA에 대한 핵산 서열을 하기에 열거하였다.
- [0348]

[0349]

FD1 mRNA:

GGACAGAU CGCCUGGAGACGCCAUCCACGCUGUUUUGACCUCCA UAGAAGACACCGGG
 ACCGAUCCAGCCUCCGCGGCCGGGAACGGUGCAUUGGAACGCGGAUUC CCGUGCCAA
 GAGUGACUCACCGUCCUUGACACGAUGGAAUUGCUGAUCCUCAAAGCGAACGCAAUCAC
 CACUAUCCUCACUGCGGUACCCUUCUGCUUUUGCGAGCGGACAGAACAUCACCGAAGAAU
 UCUACCAAUCUACUUGCUCCGCCGUGUCCAAGGGUUACCUGUCCGCCUGAGGACCGG
 AUGGUACACUUC CGUGAUUACCAUUGAGUUGUCGAAUAUCAAGAAGAACAAGUGCAACG
 GAACCGAUGC UAAGGUCAAGCUGAUCAAGCAGGAGCUGGACAAGUACAAGAAUGCUGUG
 ACCGAGCUGCAGCUGCUGAUGCAGUCCACUCAAGCCACCAACAAUCGCGCCCGCGGG
 AACUCCCAAGGUUCAUGAACUACCCUUGAACACGCAAGAAAACGAACGUGACCCUG
 UCCAAGAAGCGCAAGCGCAGAUUCCUUGGCUUCCUUCUGGGCGUCGGUAGCGCCAUCG
 CCUCCGGCGUGGCCGUCAGCAAGGUCCUGCACCU CGAGGGAGAAGUCAACAAGAUUAA
 GAGCGCCUGCUGUCCACCAACAAGGCCGUGGUGUCGCUAUCAAACGGCGUCAGCGUA
 CUGACCAGCAAAGUGCUGGAUCUCAAGAACUACA UUGAUAAAGCAACUCCUCCCUAUCGU
 GAAUAAGCAGAGCUGUUCGAUJUCCAACAUCGAGACUGUGAUUGAAUUC CAGCAGAAGA
 ACAACCGGCUGCUGGAAAUUACCAGAGAAUUCAGCGUGAAUGCCGGAGUCACUACCCCC
 GUGUCCACCUACAUGCUGACAAACUCCGAGCUGCUGAGCCUGAUCAACGAUAUGCCGAU
 UACCAACGACCAGAAGAGCUGAUGUCGAACAACGUGCAGAU CGUGCGCCAGCAGUCCU
 ACUCAAUCAUGUCGAUCAUCAAGGAAGAGGUCCUGGCCUACGUGGUGCAGCUUCCUCU

[0350]

GUACGGCGUGAUUGACACUCCGUGUUGGAAACUGCACACUAGUCCCCUGUGCACUACU
 AACACCAAGGAGGGCAGCAAUAUCUGCCUGACUCGGACCGAUAGAGGCUGGUACUGUG
 AUAACGCCGGUCCGUGUCCUUCUUC CCGCAAGCCGAGACUUGCAAAGUGCAGAGCAA
 CCGGGUGUUCUGUGACACUAUGAACUCACUGACCUUGCCGAGCGAAGUCAACCUUUGC
 AACGUGGACAUCUUAACCCUAAAUACGACUGCAAGAUCAUGACCUCCAAGACCGACGU
 GUCGAGCUCAGUGAUUACUUCGCUGGGAGCCAUUGUGUCCUGCUACGGGAAAACCAAG
 UGCACGGCCUCAACAAGAACC GGGUAUCAUUAAGACCUUCUCCAACGGCUGCGACUA
 UGUGUCCAACAAGGGGUGGACACUGUGUCCGUGGGAAACACCUUGUAUUACGUGAAC
 AAGCAGGAGGGAAAGUCCUUCUACGUGAAGGGCGAACC CAUCAUCAAUUUCUACGACCC
 GCUCGUGUUC CCGAUGAAUUCGACGCAUCCAUCUCACAAGUCAACGAAAAGAUUA
 ACCAGUCCCUGGCUUUCAUUCGCAAGUCCGACGAACUGCUCCAUAACGUCAACGCUGGA
 AAGUCCACCACCAUCAUGAUCACCACGAUCAUUAUUGUGAUCAUCGUCAUCCUGCU
 GUCACUGAUAGCAGUGGGACUGCUCCUCUACUGCAAAGCGCGGUCGACCC CAGUGACA
 CUCUCGAAGGACCAGCUGUCCGGGAUCAACAACAU CGCGUUUUCGAACUGACGGGUGG
 CAUCCCUUGACCCCUCC CAGUGCCUCUCCUGGCCUUGGAAGUUGCCACUCCAGUGC
 CCACCAGCCUUGUCCUAUAAAAUUAAGUUGCAUC (SEQ ID NO: 12)

[0351]

[0352]

FD2 mRNA:

GGACAGAU CGCCUGGAGACGCCAUCCACGCUGUUUUGACCUCCAUAGAAGACACCGGG
 ACCGAUCCAGCCUCCGCGGCCGGGAACGGUGCAUUGGAACGCGGAUUC CCGUGCCAA
 GAGUGACUCACCGUCCUUGACACGAUGGAACUCCUGAUCCUGAAGGCCAAUGCUAUCAC
 UACCAUCCUGACUGCCGUCACCUUCUGCUUCGCCUCCGGACAAAUAUCACUGAAGAAU
 UUUACCAAAGCACCUGUAGCGCGGUGUCAAGGGAUACCUAGAGCGCUCUGAGGACCGG
 AUGGUACACCAGCGUGAUUACCAUCGAGCUGAGUAACAUCAAGAAGAACAAUGCAACG
 GGACCGAUGC UAAGGUCAAGUUGAUCAAACAAGAGCUCGACAAGUACAAGAACGCCGUG
 ACUGAGCUGCAGCUGCUGAUGCAGUCAACUCAGGCCACCAACAACCGGGCCAGACGGG
 AACUGCCGAGAUUCAUGAACUACCCUGAACACGCAAAAAGACCAACGUGACCCUG
 UCCAAGAAGAGAAAAGCGCCGGUUCUGGGUUUCUGCUUUGCGUGGGAU CAGCAAUCG
 CGUCCGGAGUGGCAGUGUCCAAGGUCUUGCACCU CGAGGGCGAAGUGAACAA GAUCAA
 GUCCGCGCUUCUGUCGACCAACAAGGCCGUCGUUUC CUGUCGAACGGAGUGUCCGUG
 CUCACGAGCAAAGUGCUCGACCUGAAGAACUACAUCGACAAAACAGCUCGUCGCCCAUCGU
 CAACAAGCAGAGCUGCAGCAUCUCAAAAUUGAAACCGUGAUCGAGUUC CAGCAGAAGA
 ACAACCGCCUGCUCGAGAUUACCAGAGAGUUUUC CUGUAACGCCGGCGUGACCACCCC
 GGUGUCGACCUACAUGCUCACAAAUCGGAACUUCUCUCC CUGAUUAAUGACAUGCCCA
 UUACUAACGAUCAGAAAAAGCUGAUGUCGAACAAUGUCGAGAUUGUGCGCCAGCAGUCC
 UACUCCAUCAUGUCCAUCAUUAAGGAAGAGGUCCUGGCCUACGUGGGUGCAGUUGCCCGC
 UGUACGGUGUCAUCGAUAC CCCCUGCUGGAAGCUCCAUAUCUUCGCCCCUGUGUACUAC
 CAACACCAAGGAAGGCUCCAACAUCUGCCUGACCCGGACGGAUCGCGGCUGGUACUGU
 GACAAUGCCGGAUCCGUGUCGUUCUUC CCGCAAGCGGAGACUUGCAAAGUCGAGUCCA
 ACCGGGUGUUCUGUGACACUAUGAACUCC CUGACUCUGCCGUC CCGAAGUCAACCUCUG
 CAACGUGGACAUUUUCAUCCAAAUAACGACUGCAAGAUAAUGACC UCCAAGACUGACG
 UGUCAUCGUCCGUGAUCACAUCUCUGGGAGCCAUUGUCUCCUGCUACGGAAAGACUAA
 GUGCACCGCGUCGAACAAGAACAGGGGCAUUAUCAAGACCUUCAGCAACGGUUGCGACU
 AUGUGUCCAACAAGGGCGUGGAUACCGUGUCCGUGGGCAACACCUUGUACUACGUGAA
 CAAGCAGGAGGGGAAGUCCCUUUAUGUGAAGGGGGAGCCAAUCAUUAACUUUACGACC
 CCCUGGUGUUC CUCUAGCGACGAGUUCGACGCCUCAAUUCUCAAGUCAACGAAAAGAUC
 AACCGAGCCUCGCCUUCAUCCGCAAGUCCGAUGAACUGCUGUCAGCCAUUGGGGGUU
 ACAUCCUGAGGCCCCUCGGGACGGACAGGCAUACGUCCGCAAGGACGGCGAAUGGGU
 GCUGCUUAGCACCUUCCUCUAACGGGUGGCAUCC CUGUGACCCCUCC CAGUGCCUCU
 CCUGGCCUGGAAGUUGCCACUCCAGUGCC CACCAGCCUUGUCCUAAUAAAAUUAAGUU
 GCAUC (SEQ ID NO: 13)

[0353]

[0354]

[0355]

FD3 mRNA:

GGACAGAUCCGCGGAGACGCCAUCCACGCUGUUUUGACCUCUAGAAAGACACCGGG
 ACCGAUCCAGCCUCCGCGGCCGGGAACGGUGCAUUGAACGCGGAUUCGCGUGCCAA
 GAGUGACUCACCGUCCUUGACACGAUGAACUGCUGAUCCUAAAGCCAACGCAAUCAC
 CACCAUUCUCACCGCUGUGACCUUCUGCUUCGCAUCGGGGCAGAACAUCACUGAAGAGU
 UUUACCAGAGCACUUGCAGCGCGGUGUCAAGGGUUACCUUUCGACUGCGGACCGG
 AUGGUACACUUCGUGAUACCAUUGAGCUCAGCAACAUAAGGAAACAAGUGCAAUG
 GCACCGACGCCAAGGUCAAGCUGAUCAAACAAGAACUGGACAAGUACAAGAACGCCGUG
 ACAGAAUUGCAGCUCUGAUGGAUCCGGAACGUCGUGUGGGCGGAGCCAUCGCGA
 GUGGAGUGGCUGUGUCCAAGGUCUUGCACCUCGAGGGAGAAGUGAACAAGAUCAAGUC
 CGCGCUGCUGUCAACGAACAAGGCCGUGGUGUCCUGUCUACCGGCGUCAGCGUGCUG
 ACGUUCAAGGUCCUGGACCUAAGAAUUACAUUGACAAGCAGCUGCUGCCAUCCUCAA
 CAAGCAAUCCUGCUCUCCAUCUCAAACCCCGAAACCGUGAUCGAGUUCAGCAGAAGAACA
 ACCGCCUGCUGGAAAUUACUCGCGAGUUCUCUGUGAAUGCCGGCGUGACCACCCUGU
 GUCCACCUACAUGCUGACCAACUCCGAGCUUCUCUCCUUAUCAUGACAUGCCUAUCA
 CGAACGACCAGAAGAAGCUGAUGUCGAACAACGUCGAGAUUGUGCGGCAGCAGUCAUAC
 AGCAUCAUGUCGAUCAUCAAGGAAGAAGUGCUGGCGUACGUGGUGCAACUCCCGCUGU
 ACGGCGUCAUCGAUACCCCGUGCUGGAAGCUGCACACCUCGCCUUUGUGUACCACCAA
 CACCAAGAACGGAUCCAACAUCUGCUUAACCCGGACUGAUCGGGGUUGGUACUGCGACA
 ACGCCGGGAAUGUUUCGUUCUCCCAAGCCGAGACUUGUAAAGUGCAGUCAAACAGA
 GUGUUCUGUGACACCAUGAACUCGAGAACCCUGCCCAGCGAAGUGAACCUGUGUAACGU
 CGACAUUUUAACCCAAAAUACGAUUGCAAGAUUAUGACCAGCAAACCCGACGUGUCCU
 CCUCCGUGAUACAAGCCUGGGGGCGAUUGUGUCAUGCACGGAAGACUAAGUGCAC
 CGCCUCGAACAAGAACC GCGGCAUCAUUAAGACUUCUCGAAUGGUUGCGACUAUGUGU
 CCAACAAGGGCGUGGAUACUGUGUCAGUCGGAAUACUCUUUACUACGUGAACAAGCAG
 GAGGGGAAAAGCCUUCGUGAAGGGGAGGCCUUAUUAUCAACUUUUACGAUCCGCUGG
 UGUUCCCGUCCGACGAUUCGACGCCAGCAUCAGCCAAGUCAACGAGCUGAUUAACCG
 UCCUCGCUUCAUCAACCAAUCCGACGAGCUCUCCUGCAUAACGUGAACGCCGGAAGUC
 CACCACCAACAUCAUGAUCACUACUUAUUAUCAUCGUGAUAUCGUAUCCUGCUGAGCC
 UGAUUGCUGUGGGCCUGUUGCUGUAUUGCAAAGCCAGGUCCACCCCGGUCACCCUGUC
 GAAGGAUCAGCUGUCCGGAUCAACAACAUUGCCUUCUCCAACUAACGGGUGGCAUCCC
 UGUGACCCUCCCGAGUGCCUCUCCUGGCCUGGAAGUUGCCACUCCAGUGCCCACCA
 GCCUUGUCCUAAUAAAAUUAAGUUGCAUC (SEQ ID NO: 14)

[0356]

GUGUUCUGUGACACCAUGAACUCGAGAACCCUGCCCAGCGAAGUGAACCUGUGUAACGU
 CGACAUUUUAACCCAAAAUACGAUUGCAAGAUUAUGACCAGCAAACCCGACGUGUCCU
 CCUCCGUGAUACAAGCCUGGGGGCGAUUGUGUCAUGCACGGAAGACUAAGUGCAC
 CGCCUCGAACAAGAACC GCGGCAUCAUUAAGACUUCUCGAAUGGUUGCGACUAUGUGU
 CCAACAAGGGCGUGGAUACUGUGUCAGUCGGAAUACUCUUUACUACGUGAACAAGCAG
 GAGGGGAAAAGCCUUCGUGAAGGGGAGGCCUUAUUAUCAACUUUUACGAUCCGCUGG
 UGUUCCCGUCCGACGAUUCGACGCCAGCAUCAGCCAAGUCAACGAGCUGAUUAACCG
 UCCUCGCUUCAUCAACCAAUCCGACGAGCUCUCCUGCAUAACGUGAACGCCGGAAGUC
 CACCACCAACAUCAUGAUCACUACUUAUUAUCAUCGUGAUAUCGUAUCCUGCUGAGCC
 UGAUUGCUGUGGGCCUGUUGCUGUAUUGCAAAGCCAGGUCCACCCCGGUCACCCUGUC
 GAAGGAUCAGCUGUCCGGAUCAACAACAUUGCCUUCUCCAACUAACGGGUGGCAUCCC
 UGUGACCCUCCCGAGUGCCUCUCCUGGCCUGGAAGUUGCCACUCCAGUGCCCACCA
 GCCUUGUCCUAAUAAAAUUAAGUUGCAUC (SEQ ID NO: 14)

[0357]

[0358]

RSV F mRNA 단백질 발현:

[0359]

FD1, FD2 및 FD3 mRNA 작제물의 단백질 발현을 평가하였다. mRNA 작제물을 인간 배아 신장 세포(human embryonic kidney cell, HEK)에 형질감염시키고, 웨스턴 블롯으로의 분석을 위해 24시간 후에 세포 용해물 또는 상층액을 회수하였다. 도 1a는 형질감염된 세포로부터 회수되고 5353C75 마우스 단클론성 항체를 사용하여 검출된 단백질의 웨스턴 블롯 이미지를 나타낸다. FD1 작제물은 DS-Cav1 단백질 대조군을 기준으로 약 50 kDa의 예상 분자량(MW)에서 중등 강도의 밴드를 생성했지만, 30 kDa 미만에서도 매우 조밀한 밴드가 존재하였다. FD2 밴드는 적절한 MW에서 발현되었지만 FD1의 50 kDa 밴드보다 밀도가 실질적으로 낮았으며 이는 더 낮은 발현을 시사한다. FD3 밴드는 훨씬 더 크고 60 내지 80 kDa에서 번졌고, 이는 FD3가 글리코실화된 단백질이라는 점과 일치한다. FD2와 FD3 모두 FD1과 같이 30 kDa 미만에서 단백질 밴드를 발현하지 않았다. FD1에서 관찰된 저분자량 밴드를 조사하기 위해 mRNA에 대해 시험관내 번역을 수행하였다. 도 1b에 나타낸 바와 같이, "FD1 - T"로 표시한 레인의 FD1 mRNA의 HEK 형질감염된 단백질과 "FD1 - IVT"로 표시한 레인의 FD1 mRNA의 시험관내 번역 생성물을 사용하여 웨스턴 블롯을 준비하였다. 이 블롯의 FD1 - IVT 레인에서 작은 MW 밴드의 발현이 결여된 것은 작은 MW 밴드가 HEK 세포에 의한 단백질 프로세싱 문제에 기인한 것일 수 있음을 시사한다.

[0360]

FD1에 의한 저분자량 밴드 발현을 추가로 조사하고 mRNA 로트 간의 일관성을 확보하기 위해 3가지 FD 작제물 모두에 대해 새로 전사된 mRNA의 2개 로트를 준비하였다. 도 2의 A 및 도 2의 B에 나타낸 바와 같이, 이들 mRNA는 HEK 세포에 형질감염되었을 뿐만 아니라 인간 골격근 세포(human skeletal muscle cell, HSkMC)에 핵감염되었

다.

- [0361] 마지막으로, 세포 표면 발현 및 알려진 항원성 부위에 대한 단클론성 항체의 결합을 평가하기 위해 막 결합 FD1 및 FD3 작제물에 대해 면역염색을 수행하였다. HEK 세포를 FD1 또는 FD3 mRNA로 형질감염시키고 형질감염 24시간 후 단클론성 항체로 프로빙하였다. **도 3**에 나타낸 바와 같이, 두 작제물 모두 부위 II 특이적 단클론성 항체로 프로빙할 때 신호가 높았음에도 불구하고, FD3 형질감염된 세포와는 달리, FD1 작제물은 부위 0 특이적 단클론성 항체 D25로 프로빙할 때 배경(모의 형질감염됨(mock transfected))에 비해 신호가 거의 없었다. 이는 FD1 형질감염된 세포의 표면에서 발현되는 RSV-F 단백질이 가장 높은 중화 가능성을 갖는 항원성 부위를 나타내지 않음을 시사한다. 예상치 못한 밴딩 패턴을 보여주는 웨스턴 블롯과 더불어(예를 들어, **도 1a**, **도 1b**, **도 2의 A** 및 **도 2의 B**), 이러한 데이터는 FD1이 *생체내*에서 효과적인 보호를 유도하지 못할 수 있으며 이를 확인하기 위해 면역원성 테스트를 수행해야 함을 시사한다.
- [0362] 실시예 2: 마우스에서 RSV F 단백질을 인코딩하는 mRNA의 면역원성
- [0363] 전술한 RSV F 단백질 FD1, FD2 및 FD3을 인코딩하는 mRNA의 면역원성을 면역화되지 않은(나이브) 마우스에서 테스트하였다. 각 mRNA는 지질 나노입자(LNP)로 캡슐화하였다.
- [0364] 마우스당 1 µg의 용량으로 각 LNP-mRNA 조성물을 나이브 마우스에 투여하였다. 대조군으로서, 융합된 F 단백질 나노입자(Pre-F-NP)를 alum-85 아류반트와 함께 마우스에 투여하였다. Alum-85(알하이드로겔-85라고도 알려짐)는 수산화알루미늄 기반 아류반트의 일종이다. Pre-F-NP는 Pre-F 단백질의 C 말단에 있는 페리틴 도메인을 활용하고, 각 페리틴 도메인은 다른 페리틴 도메인과 자가조립되어 구형 나노입자를 형성한다. 주사 후 0일차, 21일차 및 35일차에, 면역화된 마우스에서 혈청을 채취하였다. RSV F 단백질 항체 역가(**도 9의 A**) 및 RSV 미세중화 역가(**도 9의 B**)를 측정하였다. 항체 역가를 다음과 같이 측정하였다: ELISA 플레이트를 1 µg/ml의 RSV 융합된 F 단백질로 코팅하였다. 차단 후, 플레이트는 1:1000 내지 1:729,000의 희석 범위로 각 혈청 샘플이 연속 희석되었다. 그런 다음 겨자무과산화효소에 컨주게이션된 항-마우스 이차 항체를 사용하여 플레이트를 검출한 후, Pierce 1-Step Ultra TMB-ELISA 기질 용액을 사용하여 시각화하였다. 그런 다음 SpectraMax 플레이트 판독기에서 플레이트를 450 nm에서 판독했다. 역가는 광학 밀도 0.2 초과가 되는 최고 혈청 희석으로 보고되었다.
- [0365] RSV 미세중화 역가를 다음과 같이 측정하였다: Vero 세포(ATCC CCL-81)를 감염 하루 전에 형광 판독에 적합한 96-웰 플레이트에 웰당 30,000개 세포로 시딩하였다. 혈청 샘플을 열 불활성화하고 1:20 내지 1:81,920로 4배 연속 희석하였다. 희석된 혈청을 녹색 형광 단백질 리포터를 발현하는 RSV 균주 A2와 1:1로 혼합하고 1시간 동안 인큐베이션하였다. 혈청-바이러스 혼합물을 24시간 동안 인큐베이션된 세포 플레이트에 첨가하였다. 그런 다음 플레이트를 고용량 이미저(imager)에서 판독하고 형광 사례를 정량화하였다. 혈청 50% 중화 역가를 SoftMax GxP로 4-매개변수 로지스틱 회귀를 사용하여 계산하였다.
- [0366] FD1, FD2 및 FD3 mRNA 중에서, 데이터는 FD1 및 FD3 mRNA가 마우스에서 가장 높은 RSV F-단백질 결합 항체 역가를 유도했고, FD2 및 FD3 mRNA가 가장 높은 RSV 중화를 유도했음을 보여준다.
- [0367] 실시예 3: 모듈형 면역 시험관내 작제물(MIMIC®) 시스템에서 RSV F 단백질을 인코딩하는 mRNA의 면역원성
- [0368] MIMIC® 시스템은 개별 공여자의 순환 면역 세포를 사용하여 각 개인의 인간 면역 반응을 개괄한다. RSV에 대한 인간 노출 이력은 MIMIC® B 세포 림프 조직 증가(Lymphoid Tissue Equivalent, LTE) 모듈을 개발하는 데 사용되는 인간 공여자 세포의 면역 집단에서 나타난다. 이 모듈을 사용하면 순환 림프구의 "회상(recall)" 반응을 측정할 수 있고, 이는 RSV에 대하여 기존 면역을 가진 인간 집단의 면역화 중에 예상되는 상황이다. MIMIC® 시스템은 문헌[Higbee et al. (Altern. Lab Anim. 37: Suppl 1: 19-27. 2009)]에 추가로 기재되어 있고, 이는 본원에 참고로 포함된다. mRNA-LNP 조성물을 MIMIC® 시스템으로 인큐베이션하였다. 각각의 LNP는 40% 양이온성 지질 F, 30% 인지질 DOPE, 1.5% PEG화된 지질 PEG2000, 및 28.5% 콜레스테롤로 조성되었다.
- [0369] FD1, FD2 및 FD3의 항체 반응을 확인하기 위해 MIMIC® B 세포 LTE에 0.37 µg의 mRNA-LNP 용량을 사용하였다. 14일 후, MIMIC® 상층액을 채취하고 Pre-F 및 Post-F에 대한 항체 결합에 관하여 Luminex 기반 항체 포렌식 검정으로 테스트하였다.
- [0370] Pre-F NP를 대조군으로 하여, FD1, FD2 및 FD3 mRNA 각각에 대해 항-Pre-F 단백질 IgG의 역가를 측정하였다. **도 10a**에 나타낸 바와 같이, 세 가지 mRNA 각각은 항-Pre-F 단백질 IgG의 생산을 강력하게 자극하였다. 항-Pre-F/항-Post-F 항체 비 역시 측정하였다. **도 10b**에 나타낸 바와 같이, FD3 mRNA는 FD1 또는 FD2 mRNA보다 항-Pre-F 항체 생성을 보다 크게 자극하였다.

- [0371] 상기에 기재된 자극으로 MIMIC® 시스템에서 유도된 중화 항체 역가를 측정하였다. 도 11에 나타낸 바와 같이, FD1, FD2 및 FD3 mRNA 각각은 높은 항-RSV 중화 역가를 자극하였다.
- [0372] 실시예 4: 비인간 영장류(Non-Human Primate, NHP)에서 RSV F 단백질을 인코딩하는 mRNA의 면역원성
- [0373] 면역원성 실험은 NHP에서 수행하였다. 각 mRNA는 40% 양이온성 지질 OF-02, 30% 인지질 DOPE, 1.5% PEG화 지질 DMG PEG2000 및 28.5% 콜레스테롤로 구성된 LNP("지질 A" LNP 제형)로 캡슐화하였다.
- [0374] 각 LNP-mRNA 조성물은 동물당 10 µg의 용량으로 나이브 NHP에 투여하였다. 대조군으로서 Pre-F-NP를 AF03 아췌반트와 함께 NHP에 투여하였다. AF03은 문헌[Kluckner et al. (J. Pharma. Scien. 101(12): 4490-4500. 2012)]에 추가로 기재된 스쿠알렌계 에멀션 아췌반트이다. 주사 후 0일차, 28일차 및 56일차에, 면역화된 NHP에서 혈청을 채취하였다. RSV F 단백질 항체 역가(도 4a) 및 RSV 미세중화 역가(도 4b)를 측정하였다. 데이터는 세 가지 mRNA 모두 높은 RSV F-단백질 결합 항체 역가를 유도했고, FD2 및 FD3 mRNA는 NHP에서 가장 높은 RSV 중화를 유도했음을 보여준다.
- [0375] Pre-F NP로 사전 면역화된 NHP에서도 면역원성 실험을 수행하였다. 각 mRNA는 나이브 NHP에서 앞서 사용된 것과 동일한 LNP로 캡슐화하였다.
- [0376] 면역화된 NHP에서 생성된 항-RSV F 단백질 항체는 경쟁 ELISA를 통해 추가로 특성 분석하였다. 면역화된 NHP의 혈청을 사용하여 세 가지 다른 항-RSV F 단백질 항체와 경쟁하는 혈청의 능력을 결정하였다. 항체 D25는 Pre-F 단백질의 부위 Ø에 결합한다(문헌[McLellan et al., Science. 340(6136): 1113-7. 2013]). 항체 Synagis(팔리비주맵)는 부위 II에 결합한다(문헌[Johnson et al. J. Infect. Dis. 176(5): 1215-24. 1997]). 항체 131-2a는 부위 I에 결합한다(문헌[Widjaja et al. J. Virol. 90(13): 5965-5977.2016]). 도 5에 도시된 바와 같이, FD3 mRNA 또는 아췌반트와 함께 Pre-F NP로 면역화된 NHP로부터의 혈청은, D25 항체의 경우 높은 Log₂ IT₅₀ 값에 의해 입증되는 바와 같이, 높은 부위 Ø 항체를 나타냈다. 더욱이, 제한된 부위 I(융합후 F 단백질이 바람직함, 131-2a) 또는 부위 II(Synagis) 항체를 생성하였다. 이는 융합전 F 단백질 형성을 촉진하고 덜 생산적인 에피토프를 차폐하는 글리코실화 부위를 도입하는 FD3 설계의 F 단백질에 대한 변형에 의한 것으로 보인다. 이를 통해 부위 Ø에서 가장 강력한 에피토프에 다시 면역의 초점을 맞출 수 있다.
- [0377] FD3와는 대조적으로, FD2 mRNA는 유사한 수준의 부위 Ø, II 및 I 특이적 항체를 유도하였다. 유사한 결과가 문헌[Espeseth et al. (npj Vaccines. 5(1): 16. 2020)]에서도 관찰되었다. 부위 II 항체는 부위 Ø 항체보다 덜 강력하다. 더욱이, 부위 I로부터의 덜 효과적인 항체는 잠재적으로 중화 활성에 영향을 미치거나 감염을 향상시킬 수 있다.
- [0378] 면역 전 NHP 평가:
- [0379] FD2와 FD3를 비교할 때 고려해야 할 또 다른 요소는 백신접종된 개체에서 메모리 B 세포 회상 반응을 유도하는 능력이다. 가용성 단백질, 예컨대, FD2 작제물에 의해 생성된 것은 일반적으로 B 세포 수용체(B cell receptor, BCR)를 교차 연결하고 메모리 B 집단을 활성화하는 데 있어서 막 결합 단백질에 비해 효율적이지 않다(문헌 [Kowalski et al. Molecular Therapy. 27(4): 710-728. 2019; Maruggi et al. Molecular Therapy. 27(4): 757-772. 2019; Pardi et al. Nature Reviews Drug Discovery. 17(4): 261-279. 2018]). FD2 작제물을 사용한 백신접종은 마우스 및 원숭이의 나이브 집단에서 강력한 RSV 중화 항체 반응을 생성했지만, FD2 작제물은 가용성 RSV-F 단백질을 생성하므로 부스팅 반응을 평가하기 위해 면역 전 집단에서 시험해야 한다. 이를 시험하기 위해 이전에 아췌반트와 함께 RSV Pre-F NP로 백신접종된 원숭이 12마리를 사용하여, 면역 전 상태(RSV-F ELISA에 의함) 및 이전 연구 참여를 기준으로 두 개의 그룹(n = 6)으로 나누었다. 면역 전 부스팅 연구를 위해 선택된 동물은 이전에 아췌반트가 첨가된 RSV pre-F NP 서브유닛 백신으로 면역화하였다. 간단히 말하면, 마지막 면역화 날짜가 면역 전 부스팅 연구 시작으로부터 적어도 6개월 전인 세 개의 연구를 선택하였다. 이들 세 개 연구에서 적격하고 이용가능한 모든 동물을 ELISA로 RSV 역가에 대해 스크리닝하였고 12마리의 동물을 면역 전 부스팅 연구를 위해 선택하였다. RSV 역가, 성별 및 이전 연구 참여를 기준으로 동물을 FD2 또는 FD3 부스팅군에 배치하였다.
- [0380] 한 시험군 5 µg의 FD2 mRNA-LNP(지질 A LNP 제형)로 부스팅하였고 다른 시험군은 5 µg의 FD3 mRNA-LNP(지질 A LNP 제형)로 추가 접종하였다. D0, D14 및 D28에 혈액을 채취하고 혈청을 RSV-F ELISA 및 RSV MNA로 평가하여 각각 항체 결합 및 중화 항체의 배수 증가를 결정하였다. 도 6a에 나타낸 결합 항체 역가 및 도 6b에 나타낸 중화 항체 역가 둘 모두 D0에서 D14까지 FD2 및 FD3 부스팅군에 대하여 유의미하게 증가했지만(p < 0.001), D14 및 D28 간에는 변화가 없었다. FD2 및 FD3에 의해 유도된 반응 사이에는 차이가 관찰되지 않았고, 이는 두 작제

물 모두 면역 전 개체를 효과적으로 부스팅시킬 수 있음을 시사한다.

[0381] 실시예 5: 양이온성 지질 스크리닝

[0382] LNP에서 상이한 양이온성 지질의 효과를 LNP-캡슐화된 RSV F 단백질 mRNA에 대해 시험하였다. 양이온성 지질인 cKK-E10, OF-02, GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10, GL-HEPES-E3-E12-DS-3-E14, 및 GL-HEPES-E3-E10-DS-3-E18-1을 시험하였다. 각각의 LNP는 5개의 양이온성 지질들 중 하나의 40%, 30% 인지질 DOPE, 1.5% PEG화된 지질 DMG-PEG2000, 및 28.5% 콜레스테롤로 조성되었다. 산업 벤치마크로 간주되는, 양이온성 지질 MC3을 갖는 LNP도 사용하였다(문헌[Jayaraman et al. Angew Chem Int Ed. 51:8529-33. 2012]).

[0383] 시험한 LNP의 특성은 아래의 표 2에 나타내었다.

[0384] [표 2]

[0385] 시험한 LNP의 특성

특성	지질 A	지질 B	지질 C	지질 D	지질 E	MC3
외형	반투명	반투명	반투명	반투명	반투명	반투명
캡슐화(%)	93	99	88	90	94	98
크기(nm)	89	101	103	87	74	89
다분산 지수(PDI)	0.119	0.207	0.119	0.139	0.186	0.147
pH	4.8	5.5	5.5	5.4	4.6	4.5

[0386] LNP-FD3 mRNA 조성물을 NHP에 투여하였다. 여섯 마리의 시노물구스 마카크 그룹에 상기 LNP로 캡슐화된 5 µg 용량의 mRNA, 또는 Al(OH)₃으로 아췌반트된 10 µg 용량의 RSV Pre-F NP 서브유닛 대조군 백신을 D0 및 D21에 근육내(IM) 주사로 투여했다. 원숭이는 각각의 백신 투여 전에 뿐만 아니라 마지막 백신접종 후 2주(D35)에 채혈하였다. 도 7에 나타난 바와 같이, 시험된 모든 양이온성 지질은 알루미늄 아췌반트를 갖는 Pre-F NP와 유사한 수준으로 항-RSV F 단백질 항체의 생산을 효과적으로 유도하였다.

[0388] 도 8에 나타난 바와 같이, 시험된 모든 양이온성 지질은 알루미늄 아췌반트를 갖는 Pre-F NP와 유사한 수준으로 효과적인 RSV 중화 역가를 생성하였다.

[0389] 도 7 및 도 8의 누적 결과는 하기 표 3 및 표 4에 나타내었다.

[0390] [표 3]

[0391] 면역 반응의 정도

LNP 제형	중화 역가	배수 대 MC3
지질 A	9.86	23.43
지질 B	10.03	26.35
지질 C	8.509	9.18
지질 E	6.929	3.07
지질 D	8.894	11.99
MC3	5.308	1.00
Pre-F NP	10.97	50.56

[0393] [표 4]

[0394] 면역 반응의 품질

LNP 제형	항체 역가	중화 역가	항체 역가 / 중화 역가 비
지질 A	15.58	9.86	52.71
지질 B	15.56	10.03	46.21
지질 C	14.67	8.51	71.51
지질 E	13.27	6.93	81.01
지질 D	14.71	8.89	56.49
MC3	11.3	5.31	63.56
Pre-F NP	17.59	10.97	98.36

[0396] 항체 역가/중화 역가 비에 대한 값이 낮을수록 면역 반응의 더 나은 품질이 입증된다. 여기서 양이온성 지질을 함유한 LNP인 cKK-E10은 가장 우수한 면역 반응 품질을 보인 반면, 모든 양이온성 지질은 비-mRNA 백신인 Pre-F NP에 비해 우수한 면역 반응 품질을 보였다.

[0397] 실시예 6: 18세 내지 50세 또는 60세 이상의 성인 참가자를 대상으로 LNP cKK-E10 또는 LNP GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10으로 제형화된 RSV mRNA 백신 후보의 안전성과 면역원성을 평가하기 위한 제1/2상, 무작위 배정, 이중 맹검, 위약-대조, 다중 아암 용량 결정 연구.

[0398] 연구 근거

[0399] 본원에 기술된 임상 시험은 RSV mRNA LNP 백신의 안전성과 면역원성을 시험한다. RSV mRNA LNP 백신은 센티넬 (Sentinel) 코호트에서는 18 내지 50세, 그리고 주 및 부스터 코호트에서는 60세 이상의 건강한 성인에게 세 가지 다른 용량(즉, 저용량, 중간 용량, 고용량)으로 투여되는 두 가지의 캡슐화된 LNP 제형(즉, cKK-E10 또는 GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10을 함유하는 LNP) 중 하나에 RSV mRNA를 포함한다. RSV mRNA LNP 백신은 근육내(IM) 투여용 바이알에 담긴 액체 냉동 용액으로 제공된다.

[0400] 간단한 개요

[0401] 본 연구의 목적은 센티넬 코호트에서는 18 내지 50세, 그리고 주 및 부스터 코호트에서는 60세 이상의 건강한 성인 참가자에서 두 가지 서로 다른 지질 나노입자(LNP)(즉, cKK-E10 또는 GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10을 함유하는 LNP)로 제형화된 호흡기 세포융합 바이러스(RSV) 메신저 리보핵산(mRNA) 백신 후보를 세 가지 용량 수준으로 단일 근육내(IM) 주사하는 것의 안전성과 면역원성을 평가하는 것이다. 본 연구의 일차 목적은 두 가지의 LNP(cKK-E10 및 GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10)를 사용하여 용량 수준군(저용량, 중간 용량, 고용량) 전반에 걸쳐 안전성과 면역원성 프로파일을 평가하는 것이다. 또한, 본 연구에서는 연구 집단의 서브세트를 대상으로 일차 백신접종 12개월 후에 실시되는 부스터 백신접종의 안전성과 면역원성을 평가한다. 각 참가자의 참여 지속기간은 센티넬 및 주 코호트의 경우 12개월이고 부스터 코호트에 등록된 서브세트 참가자의 경우 전체적으로 24개월이다.

[0402] [표 5]

[0403] 연구 아암 요약

아암 수:	7	
아암 라벨	아암 설명	아암 유형
시험군 1: 센티넬 및 주 코호트	근육내 주사를 통한 RSV mRNA LNP cKK-E10 백신(저용량)의 1회 주사	실험
시험군 2: 센티넬 및 주 코호트	근육내 주사를 통한 RSV mRNA LNP GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10 백신(저용량)의 1회 주사	실험
시험군 3: 센티넬 및 주 코호트	근육내 주사를 통한 RSV mRNA LNP cKK-E10 백신(중간 용량)의 1회 주사	실험
시험군 4: 센티넬 및 주 코호트	근육내 주사를 통한 RSV mRNA LNP GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10 백신(중간 용량)의 1회 주사	실험
시험군 5: 센티넬 및 주 코호트	근육내 주사를 통한 RSV mRNA LNP cKK-E10 백신(고용량)의 1회 주사	실험
시험군 6: 센티넬 및 주 코호트	근육내 주사를 통한 RSV mRNA LNP GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10 백신(고용량)의 1회 주사	실험
시험군 7: 주, 센티넬 및 부스터 코호트	근육내 주사를 통한 위약의 1회 주사	위약 대조군

[0404]

[0405] 목적

[0406] 일차 목적. 일차 목적은 cKK-E10을 포함하는 LNP 또는 GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10을 포함하는 LNP에 캡슐화된 본원에 기재된 RSV mRNA 백신의 세 가지 다른 용량 수준(즉, 저용량, 중간 용량, 고용량)의 안전성 및 면역원성 프로파일을 평가하는 것이다.

[0407] 이차 목적. 이차 목적은 다음을 평가하기 위한 것이다: (1) 참가자의 서브세트에서 일차 백신접종 12개월 후에 이루어지는 부스터 백신접종의 안전성 프로파일; (2) 일차 백신접종 3, 6 및 12개월 후의 면역 반응 지속성; 및

(3) 참가자의 서브세트에서 일차 백신접종 후 12개월 동안 부스터 백신접종 후 면역 반응의 지속성.

[0408] 중점. 일차 및 이차 목적이 만족되는지 시험하기 위해 일차 및 이차 중점을 설정하였다. 아래 표 6 및 표 7에 각각 일차 및 이차 중점에 대한 설명과 평가 시간 프레임 을 요약하였다.

[0409] [표 6]

[0410] 일차 연구 중점의 요약

중점 표제	중점 설명	평가 시간 프레임
즉각적인 유해 사례(adverse event, AE)의 존재	즉각적인 즉각 유해 사례를 경험한 참가자의 수	백신접종 후 30 분 이내
예측된 주사 부위 또는 전신 반응의 존재	다음 을 보고한 참가자의 수: - 주사 부위 반응: 통증, 홍반 및 부기 - 전신 반응: 발열, 두통, 권태감, 근육통, 관절통 및 오한	백신접종 후 7 일 이내
예측되지 않은 AE 의 존재	예측되지 않은 AE 를 경험한 참가자의 수	백신접종 후 28 일 이내
의료진이 검진한 유해 사례(medically attended adverse event, MAAE)의 존재	MAAE 를 경험한 참가자의 수	백신접종 후 28 일 이내
심각한 유해 사례(serious adverse event, SAE)의 존재	SAE 를 경험한 참가자의 수	12 개월
특별 관심 대상 유해 사례(adverse event of special interest, AESI)	AESI 를 경험한 참가자의 수	12 개월
범위를 벗어난 생물학적 시험 결과의 존재	생물학적 안전성 평가 값이 정상 범위를 벗어난 참가자 수(시험을 수행하는 실험실 기준)	백신접종 후 7 일 이내
일차 백신접종 후 중화 항체(neutralizing antibody, nAb) 역가의 기하 평균 역가(Geometric Mean Titer, GMT)	일차 백신접종 후 중화 항체(nAb) 역가	1 일차 및 29 일차

[0411]

[0412] [표 7]

[0413] 이차 연구 중점의 요약

중점 표제	중점 설명	평가 시간 프레임
부스터 백신접종 후 즉각적인 유해 사례의 존재	즉각적인 즉각 유해 사례를 경험한 참가자의 수	백신접종 후 30 분 이내
부스터 백신접종 후 예측된 주사 부위 또는 전신 반응의 존재	다음을 보고한 참가자의 수: - 주사 부위 반응: 통증, 홍반 및 부기 - 전신 반응: 발열, 두통, 권태감, 근육통, 관절통 및 오한	백신접종 후 7 일 이내
부스터 백신접종 후 예측되지 않은 AE의 존재	예측되지 않은 AE 를 경험한 참가자의 수	백신접종 후 28 일 이내
부스터 백신접종 후 의료진이 검진한 유해 사례의 존재	MAAE 를 경험한 참가자의 수	백신접종 후 28 일 이내
부스터 백신접종 후 심각한 유해 사례의 존재	SAE 를 경험한 참가자의 수	부스터 연구 전체에 걸쳐 대략 12 개월
부스터 백신접종 후 특별 관심 유해 사례의 존재	AESI 를 경험한 참가자의 수	부스터 연구 전체에 걸쳐 대략 12 개월
부스터 백신접종 후 범위를 벗어난 생물학적 시험 결과의 존재	생물학적 안전성 평가 값이 정상 범위를 벗어난 참가자 수(시험을 수행하는 실험실 기준)	백신접종 후 7 일 이내
백신접종 전(D01) 및 일차 백신접종 28 일 후의 RSV-A 혈청 nAb 역가	백신접종 전(D01), 28 일차(D29), 일차 백신접종 3, 6 및 12 개월 후의 RSV-A 혈청 nAb 역가	1 일차, 29 일차, 3 개월차, 6 개월차, 및 12 개월차
일차 백신접종 후 혈청 항-F 면역글로불린 G(IgG) 항체(Ab) 역가의 GMT	백신접종 전(D01), 28 일차(D29), 일차 백신접종 후 3, 6, 12 개월차의 혈청 항-F 면역글로불린 G(IgG) 항체(Ab) 역가	1 일차, 29 일차, 3 개월차, 6 개월차, 및 12 개월차
부스터 백신접종 후 RSV-A 혈청 nAb 의 GMT	부스터 백신접종 전, 28 일차 및 부스터 백신접종 후 3, 6, 12 개월차에 RSV-A 혈청 nAb 역가(기하 평균 역가로 표시)	부스터 후 1 일차, 29 일차, 3 개월차, 6 개월차, 및 12 개월차
부스터 백신접종 후 혈청 항-F 면역글로불린 G(IgG) 항체(Ab) 역가의 GMT	부스터 백신접종 전, 28 일차 및 부스터 백신접종 후 3, 6, 12 개월차의 혈청 항-F 면역글로불린(IgG) 항체 Ab 역가(기하 평균 역가로 표시)	부스터 후 1 일차, 29 일차, 3 개월차, 6 개월차, 및 12 개월차

[0414]

[0415] 연구 집단

[0416] 포함 및 배제 기준

[0417] **포함 기준.** 포함 당일 18 내지 50세의 센티넬 코호트, 포함 당일 60세 이상의 주 및 부스터 코호트. 여성 참가자는 임신 중 또는 모유 수유 중이지 않고 가임기가 아닌 경우 참가 자격이 있다. 가임기가 아닌 여성으로 간주 되려면 여성은 폐경 후 적어도 1년인 상태이거나 수술적으로 불임 상태여야 한다. 모든 예정된 방문에 참석하고 모든 연구 절차를 준수할 수 있어야 한다. 사전 동의서에 서명하고 날짜를 기재해야 한다

[0418] **배제 기준.** 참가자는 임의의 다음 기준이 적용되는 경우에 연구에서 제외한다: 선천성 또는 후천성 면역결핍으로 알려졌거나 의심되는 경우; 또는 지난 6개월 이내에 면역 억제 요법, 예컨대, 항암 화학요법 또는 방사선 치료를 받은 경우; 또는 장기간의 전신 코르티코스테로이드 요법(지난 3개월 이내에 2주 이상 연속으로 프레드니손 또는 이와 동등한 요법); 연구 중재 구성 요소(예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜 및 폴리소르베이트)에 대해 알려진 전신 과민증; 연구에 사용된 연구 중재 또는 동일한 성분을 함유한 제품에 대한 생명을 위협하는 반응의 병력; mRNA COVID-19 백신 투여 후 알러지 반응(예를 들어, 아나필락시스); 지난 12개월 동안 임상적, 혈청학적 또는 미생물학적으로 진단된 RSV 관련 병의 병력; 심근염, 심낭염 및/또는 심근심막염의 이전 병력; 조사자의 판단에 따른 IM 주사 금지를 요하는 혈소판 감소증 또는 출혈 장애; 근육내 주사 금지를 요하는, 출혈 장애, 또는 선정 전 3주 동안 항응고제를 투여 받은 경우; 조사자의 의견으로 연구 수행 또는 완료를 방해할 수 있는 단계에 있는 만성 병; 조사자의 의견으로 연구 수행 또는 완료를 방해할 수 있는 알코올, 처방약 또는 약물 남용; 연구 중재 시행 전 4주 이내에 mRNA 백신 이외의 백신을 접종했거나 연구 중재 시행 후 4주 이내에 mRNA 백신

이외의 백신을 접종할 예정인 경우; 연구 중재 시행 전 60일 이내에 mRNA 백신을 접종했거나 연구 중재 시행 후 60일 이내에 mRNA 백신을 접종할 예정인 경우; 연구용 백신으로 RSV에 대해 이전 예방접종을 받은 경우; 지난 3개월 동안 면역글로불린, 혈액 또는 혈액 유래 제품을 투여 받은 경우; 최초 채혈 전 72시간 이내에 경구 또는 주사로 항생제 요법을 받은 경우; 연구 등록 시점(또는 최초 연구 중재 시행 전 4주) 또는 본 연구 기간 동안 백신, 약물, 의료 디바이스 또는 의료 절차를 조사하는 다른 임상 연구에 참여하고 있거나 참여할 계획인 경우; 행정명령이나 법원 명령에 의해 자유를 박탈당한 경우, 긴급상황에 처한 경우, 비자발적으로 입원한 경우; FDA 승인/검증된 검사로 검출된 인간 면역결핍 바이러스(HIV), B형 간염 바이러스 표면 항원(hepatitis B virus surface antigen, HBsAg), B형 간염 코어 항체(hepatitis B core antibody, HBcAb), C형 간염 바이러스 항체(hepatitis C virus antibody, HCV Ab) 또는 양성 SARS-CoV-2 RTPCR 또는 항원 검사로 자가 보고되거나 문서화된 경우; 또는 제안된 연구에 직접 참여하는 조사자 또는 연구 센터의 직원으로 식별되거나, 제안된 연구에 직접 참여하는 조사자 또는 직원의 직계 가족 구성원(즉, 부모, 배우자, 친자녀 또는 입양 자녀)으로 식별된 경우.

[0419] 참가자당 지속기간

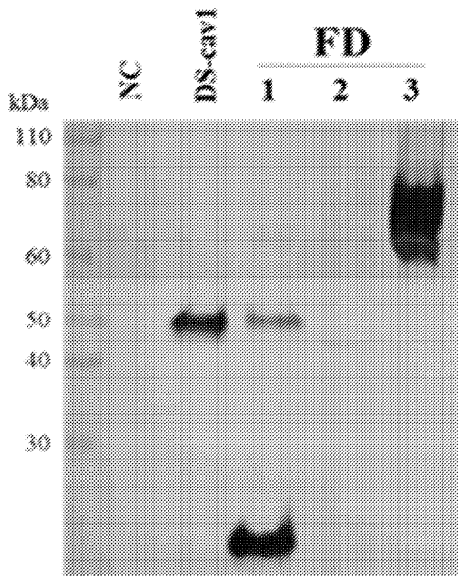
[0420] 각 참가자의 참여 지속기간은 센터별 및 주 코호트의 경우 12개월이고 부스터 코호트에 등록된 서브세트 참가자의 경우 전체적으로 24개월이다. 센터별 코호트(1회 근육내(IM) 주사) 참가자는 백신접종 후 12개월 동안 추적 관찰된다. 주 코호트(1회 IM 주사) 참가자는 백신접종 후 12개월 동안 추적 관찰된다. 부스터 코호트(1차 백신접종 12개월 후에 1회 IM 주사) 참가자는 부스터 용량 투여 후 12개월 동안 추적 관찰된다.

[0421] 본 개시내용의 다른 구현에는 본 명세서의 고려 및 본원에 개시된 본 개시내용의 실시예에 의해 당업자에게 명백해질 것이다. 명세서 및 실시예는 단지 예시적인 것으로 간주되고 본 개시내용의 진정한 범주 및 사상은 다음의 청구범위에 의해 나타나는 것으로 의도된다.

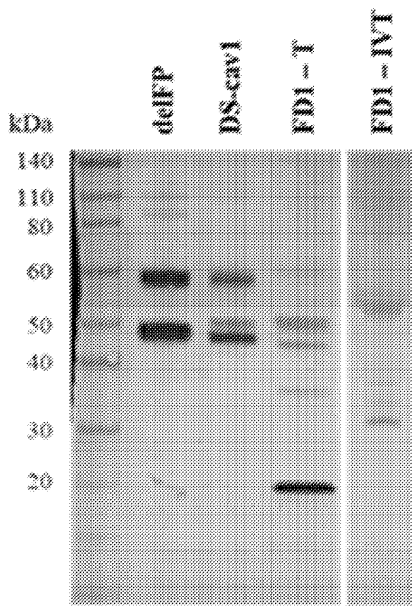
[0422] 본원에 인용된 모든 특허 및 간행물은 본원에 그 전체가 참고로 포함된다.

도면

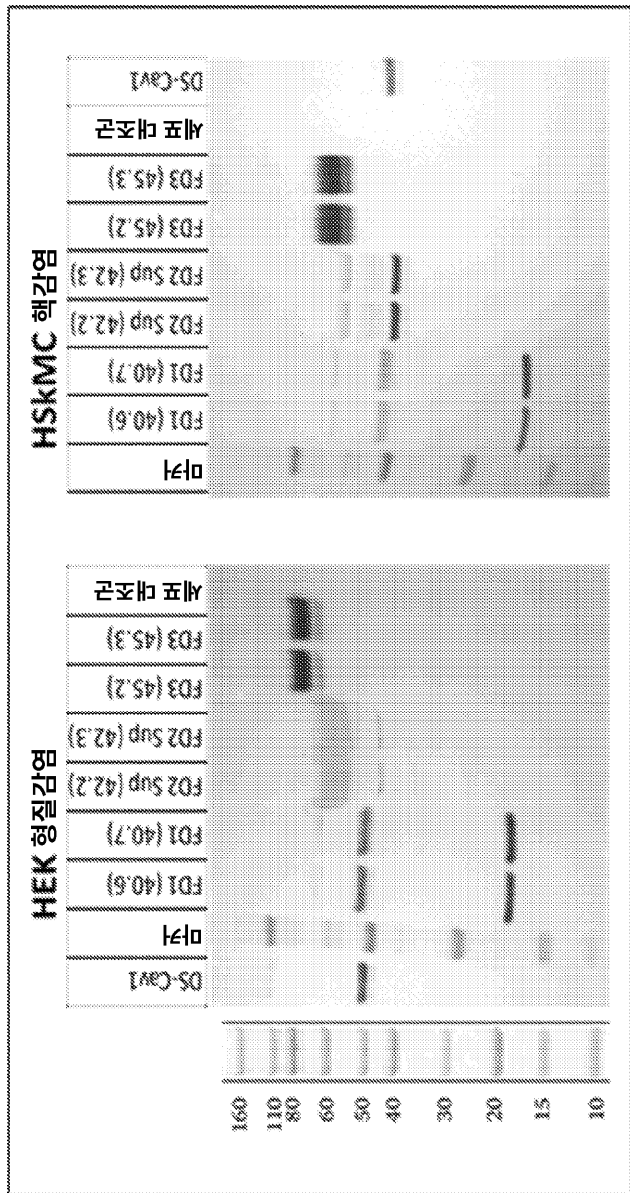
도면1a



도면1b



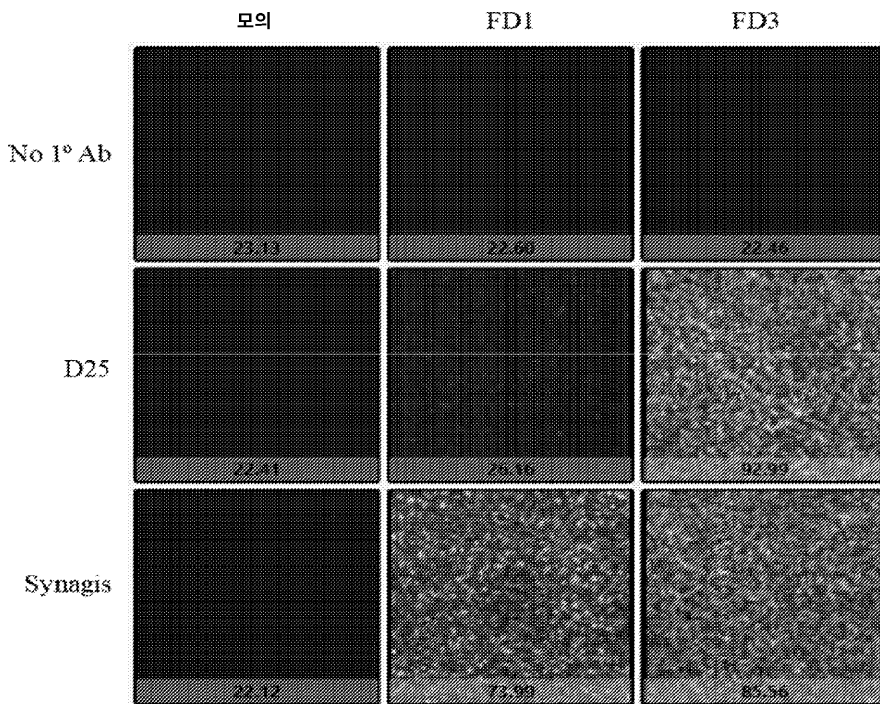
도면2



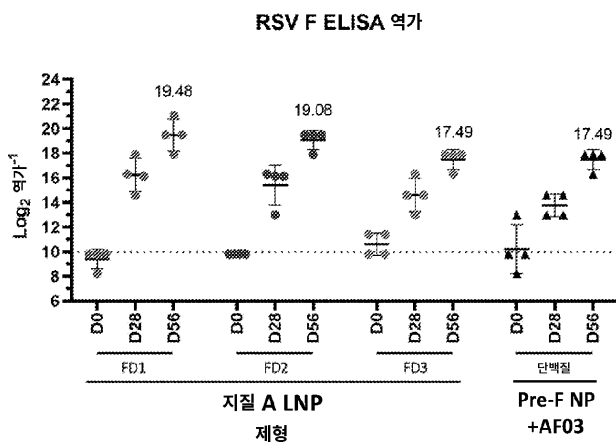
B

A

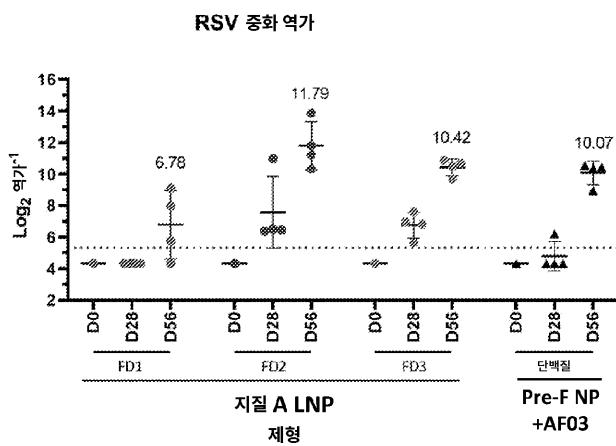
도면3



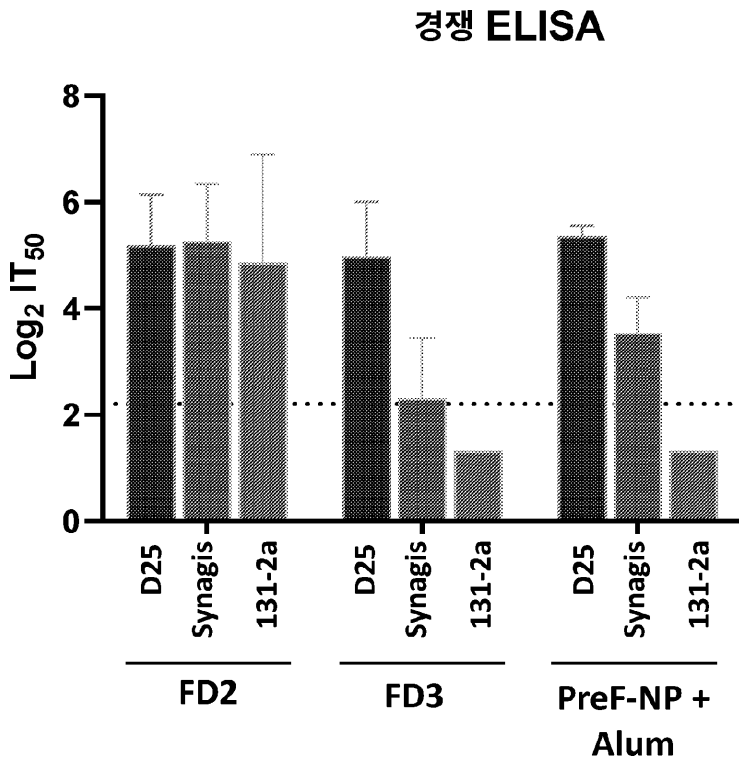
도면4a



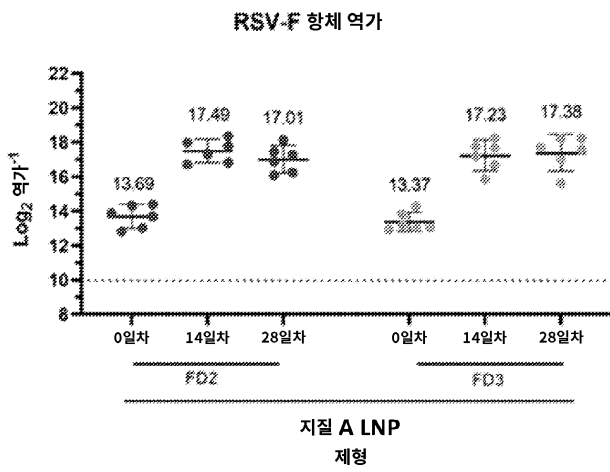
도면4b



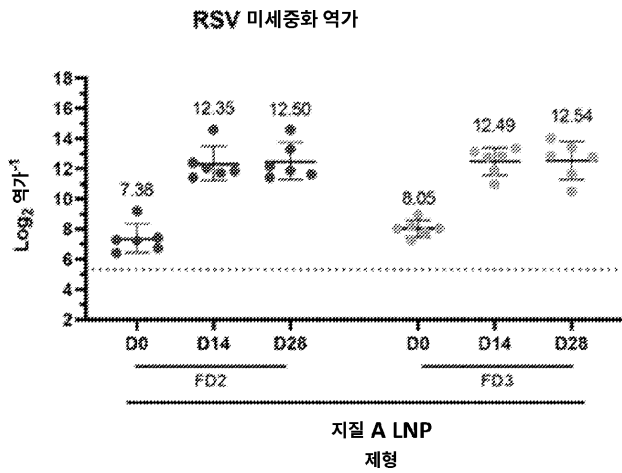
도면5



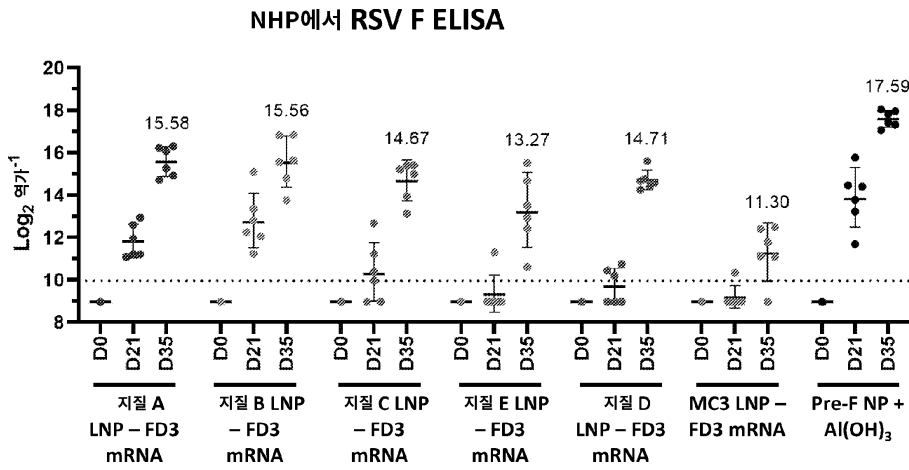
도면6a



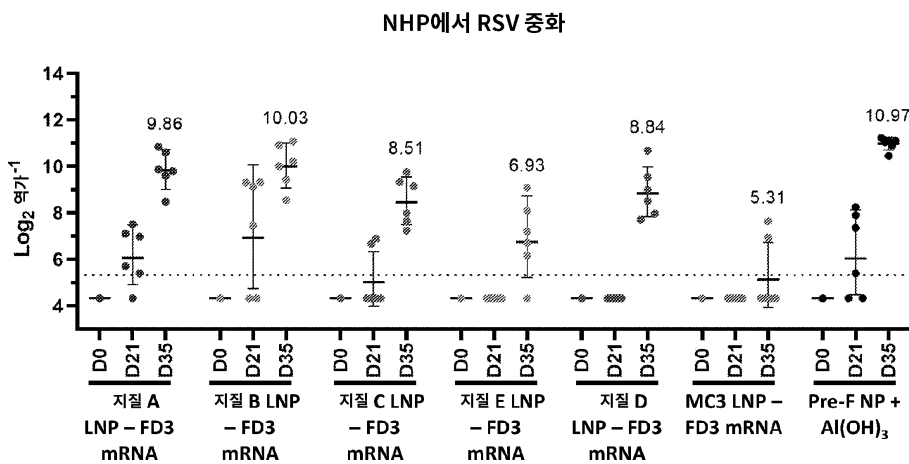
도면6b



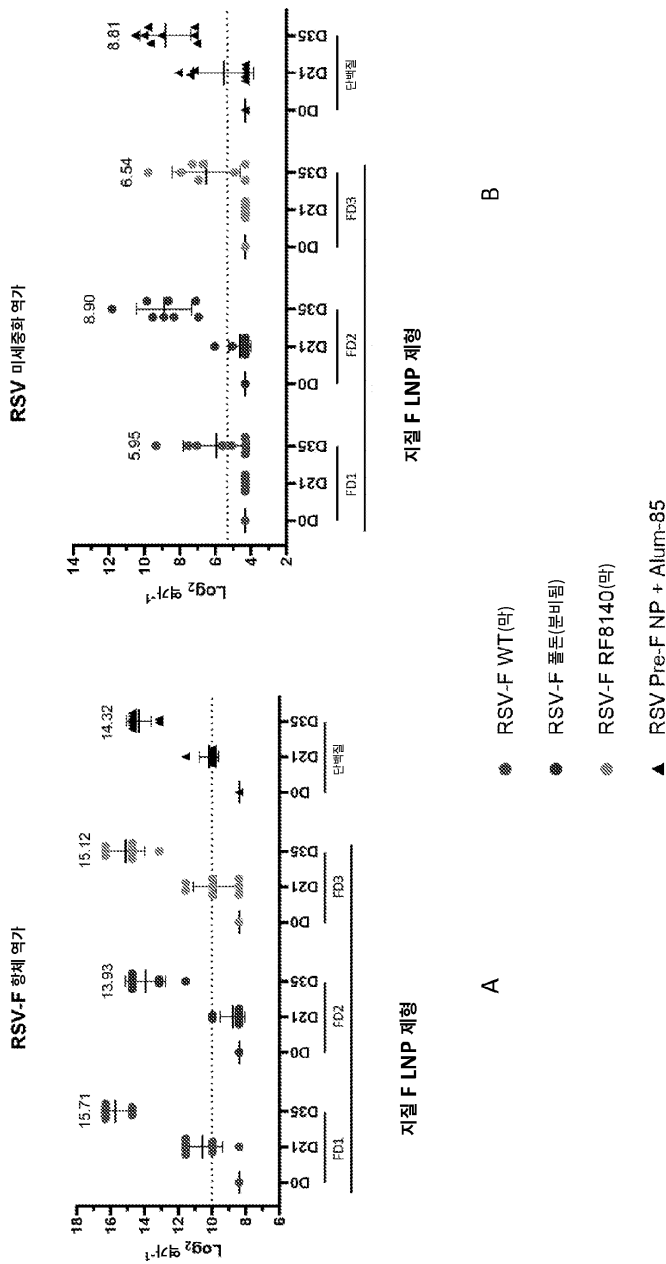
도면7



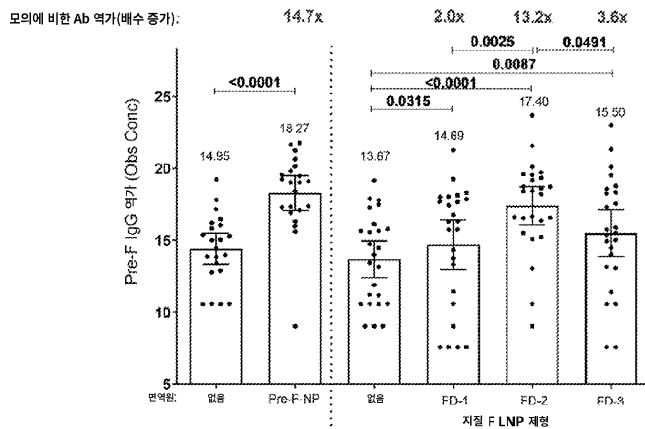
도면8



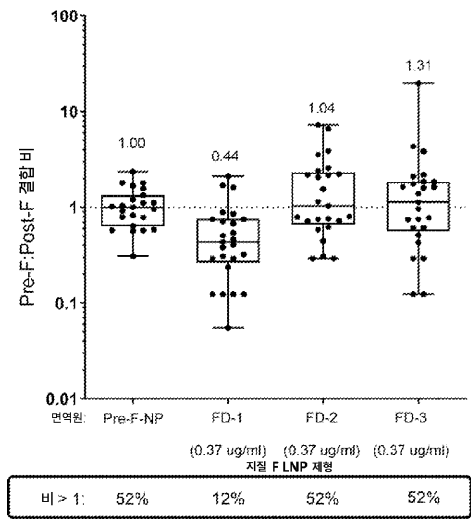
도면9



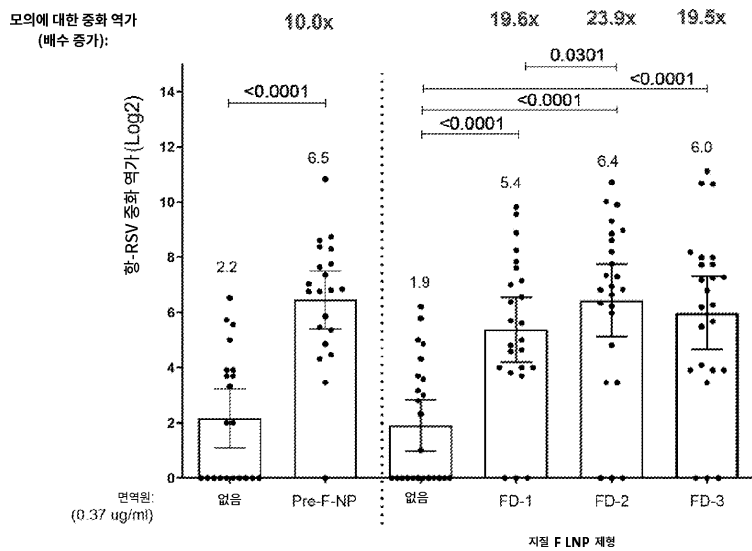
도면10a



도면10b



도면11



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.