



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0121752
(43) 공개일자 2023년08월21일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/51 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/215 (2006.01) A61K 47/14 (2017.01)
A61K 47/18 (2017.01) A61K 9/19 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 9/5123 (2013.01)
A61K 39/215 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2023-7020261
(22) 출원일자(국제) 2021년11월15일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2023년06월15일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2021/081675
(87) 국제공개번호 WO 2022/101470
국제공개일자 2022년05월19일
(30) 우선권주장
63/114,478 2020년11월16일 미국(US)
(뒷면에 계속)
- (71) 출원인
비온테크 에스이
독일 55131 마인츠 안 데어 골트그루베 12
- (72) 발명자
판즈너, 스테픈
독일 55131 마인츠 안 데어 골트그루베 12 비온테크 에스이 내
사힌, 우구르
독일 55131 마인츠 안 데어 골트그루베 12 비온테크 에스이 내
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
박장원

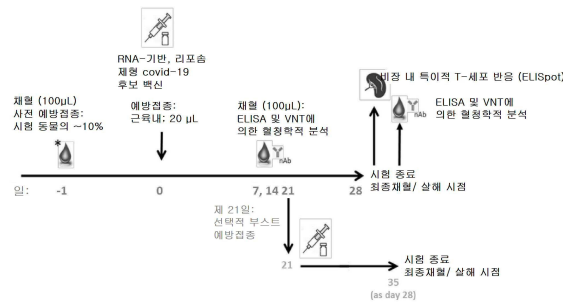
전체 청구항 수 : 총 92 항

(54) 발명의 명칭 RNA를 포함하는 LNP 조성물 및 이를 제조, 보관 및 사용하는 방법

(57) 요약

본 개시내용은 일반적으로 RNA를 포함하는 지질 나노입자(LNP) 조성물, 그러한 조성물을 제조 및 보관하는 방법, 및 치료 요법에서 이러한 조성물의 용도 분야에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 47/14 (2013.01)
A61K 47/18 (2013.01)
A61K 9/19 (2013.01)
A61P 31/14 (2018.01)
A61K 2039/53 (2013.01)
C12N 2770/20034 (2013.01)

(72) 발명자

크리이거, 요리트-얀

독일 55131 마인츠 안 데어 골트그루베 12 비온테
 크 에스이 내

탄키, 카우쉴

독일 55131 마인츠 안 데어 골트그루베 12 비온테
 크 에스이 내

바트나가, 바쿨 수보드

미국 매사추세츠 01810 앤도버 버트 로드 1 화이자
 인코포레이티드 내

다르바리, 라민

미국 매사추세츠 01810 앤도버 버트 로드 1 화이자
 인코포레이티드 내

루트라, 수미트

미국 매사추세츠 01810 앤도버 버트 로드 1 화이자
 인코포레이티드 내

체살로프, 세르게이

미국 매사추세츠 01810 앤도버 버트 로드 1 화이자
 인코포레이티드 내

(30) 우선권주장

63/115,588 2020년11월18일 미국(US)
 63/115,128 2020년11월18일 미국(US)
 PCT/EP2020/082602 2020년11월18일
 유럽특허청(EPO)(EP)
 63/135,723 2021년01월10일 미국(US)
 63/149,372 2021년02월15일 미국(US)
 PCT/EP2021/059460 2021년04월12일
 유럽특허청(EPO)(EP)

명세서

청구범위

청구항 1

수성상에 분산된 지질 나노입자(LNP)를 포함하는 조성물로서, LNP는 양이온적으로 이온화가능한 지질 및 RNA를 포함하고; 수성상은 버퍼 물질을 포함하는 시스템 및 1가 음이온을 포함하되, 상기 버퍼 물질은 트리스(히드록시메틸)아미노메탄(Tris) 및 그의 양성자화 형태, 비스(2-히드록시에틸)아미노-트리스(히드록시메틸)메탄(Bis-Tris-메탄) 및 그의 양성자화 형태, 및 트리에탄올아민(TEA) 및 그의 양성자화 형태로 이루어진 군으로부터 선택되고, 1가 음이온은 클로라이드, 아세테이트, 글리콜레이트, 락테이트, 모르폴리노에탄설폰산(MES)의 음이온, 3-(N-모르폴리노)프로판설폰산(MOPS)의 음이온 및 2-[4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-일]에탄설폰산(HEPES)의 음이온으로 이루어진 군으로부터 선택되며; 조성물 중 버퍼 물질의 농도는 최대 약 25 mM이고; 수성상에는 무기 포스페이트 음이온이 실질적으로 없고, 시트레이트 음이온이 실질적으로 없으며, 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA)의 음이온이 실질적으로 없는 것인 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 버퍼 물질이 Tris 및 그의 양성자화 형태인 조성물.

청구항 3

청구항 1 또는 2에 있어서, 조성물 중 버퍼 물질, 특히 Tris 및 그의 양성자화 형태의 농도는 최대 약 20 mM, 종기로는 최대 약 15 mM, 더욱 종기로는 최대 약 10 mM, 예컨대 약 10 mM인 조성물.

청구항 4

청구항 1 내지 3 중 어느 한 항에 있어서, 수성상에는 무기 설페이트 음이온 및/또는 카보네이트 음이온 및/또는 이염기성 유기산 음이온 및/또는 다염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없고, 특히 무기 설페이트 음이온, 카보네이트 음이온, 이염기성 유기산 음이온 및 다염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없는 것인 조성물.

청구항 5

청구항 1 내지 4 중 어느 한 항에 있어서, 1가 음이온은 클로라이드, 아세테이트, 글리콜레이트 및 락테이트로 이루어진 군으로부터 선택되고, 조성물 중 1가 음이온의 농도는 조성물 중 버퍼 물질의 농도와 기껏해야 동일하거나, 종기로는 그 이하이며, 예컨대 약 9 mM인 조성물.

청구항 6

청구항 1 내지 4 중 어느 한 항에 있어서, 1가 음이온은 MES, MOPS 및 HEPES의 음이온으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 조성물 중의 1가 음이온의 농도는 조성물 중의 버퍼 물질과 적어도 동일하거나, 종기로는 더 높은 것인 조성물.

청구항 7

청구항 1 내지 6 중 어느 한 항에 있어서, 조성물의 pH는 약 6.5 내지 약 8.0, 종기로는 약 6.9 내지 약 7.9, 예컨대 약 7.0 내지 약 7.8인 조성물.

청구항 8

청구항 1 내지 7 중 어느 한 항에 있어서, 물이 조성물의 주성분이고/이거나 조성물에 함유된 물 이외의 용매(들)의 총량이 약 0.5%(v/v) 미만인 조성물.

청구항 9

청구항 1 내지 8 중 어느 한 항에 있어서, 조성물의 삼투질농도는 최대 약 400×10^{-3} osmol/kg인 조성물.

청구항 10

청구항 1 내지 9 중 어느 한 항에 있어서, 조성물 중 RNA의 농도는 약 5 mg/l 내지 약 150 mg/l, 종기로는 약 10 mg/l 내지 약 130 mg/l, 더욱 종기로는, 약 30 mg/l 내지 약 120 mg/l인 조성물.

청구항 11

청구항 1 내지 10 중 어느 한 항에 있어서, 조성물은 종기로는 적어도 약 1% w/v의 농도의 동결방지제를 포함하고, 여기서 동결방지제는 종기로는 탄수화물 및 당 알코올로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 화합물을 포함하고, 더욱 종기로는 동결방지제는 수크로스, 글루코스, 글리세롤, 소르비톨 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되며, 더욱 종기로는 동결방지제는 수크로스 및/또는 글리세롤을 포함하는 것인 조성물.

청구항 12

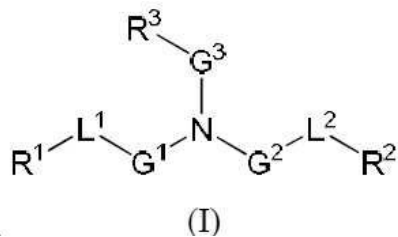
청구항 1 내지 10 중 어느 한 항에 있어서, 조성물은 실질적으로 동결방지제가 없는 것인 조성물.

청구항 13

청구항 1 내지 12 중 어느 한 항에 있어서, 양이온으로적으로 이온화가능한 지질은 생리학적 조건 하에서 양성자화될 수 있는 적어도 하나의 질소 원자를 포함하는 헤드 그룹을 포함하는 것인 조성물.

청구항 14

청구항 1 내지 13 중 어느 한 항에 있어서, 양이온적으로 이온화가능한 지질은 화학식(I)의 구조:



를 갖거나 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염, 호변이성질체, 전구약물 또는 입체이성질체인 조성물:

식 중,

L^1 또는 L^2 중 하나는 $-O(C=O)-$, $-(C=O)O-$, $-C(=O)-$, $-O-$, $-S(O)_x-$, $-S-S-$, $-C(=O)S-$, $SC(=O)-$, $-NR^aC(=O)-$, $-C(=O)NR^a-$, $NR^aC(=O)NR^a-$, $-OC(=O)NR^a-$ 또는 $-NR^aC(=O)O-$ 이고, L^1 또는 L^2 중 다른 하나는 $-O(C=O)-$, $-(C=O)O-$, $-C(=O)-$, $-O-$, $-S(O)_x-$, $-S-S-$, $-C(=O)S-$, $SC(=O)-$, $-NR^aC(=O)-$, $-C(=O)NR^a-$, $NR^aC(=O)NR^a-$, $-OC(=O)NR^a-$ 또는 $-NR^aC(=O)O-$ 또는 직접 결합이며;

G^1 및 G^2 는 각각 독립적으로 치환되지 않은 C_1-C_{12} 알킬렌 또는 C_2-C_{12} 알케닐렌;

G^3 은 C_1-C_{24} 알킬렌, C_2-C_{24} 알케닐렌, C_3-C_8 시클로알킬렌, C_3-C_8 시클로알케닐렌;

R^a 는 H 또는 C_1-C_{12} 알킬;

R^1 및 R^2 는 각각 독립적으로 C_6-C_{24} 알킬 또는 C_6-C_{24} 알케닐;

R^3 은 H, OR^5 , CN, $-C(=O)OR^4$, $-OC(=O)R^4$ 또는 $-NR^5C(=O)R^4$;

R^4 는 C_1-C_{12} 알킬;

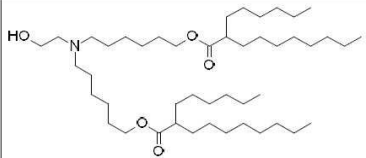
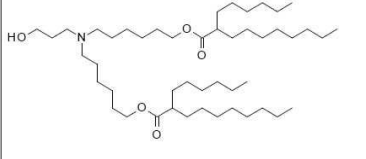
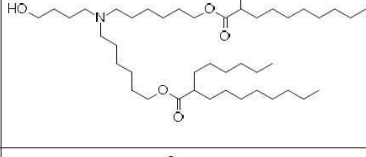
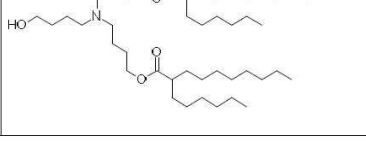
R^5 는 H 또는 C_1-C_6 알킬이고;

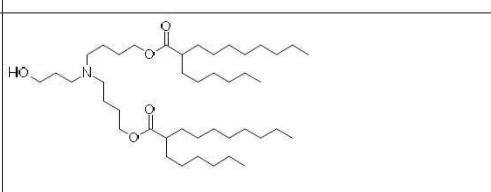
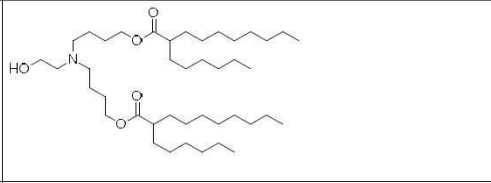
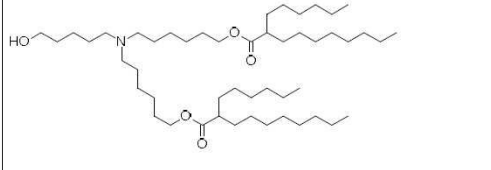
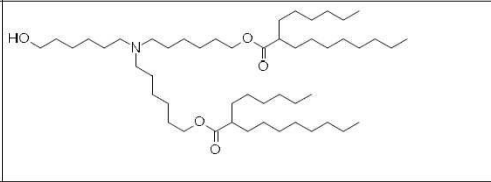
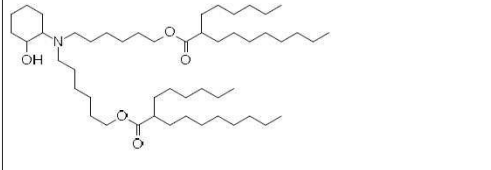
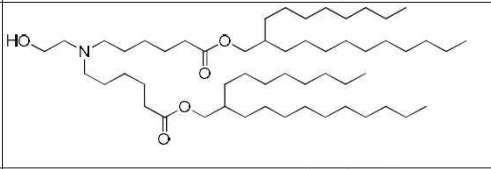
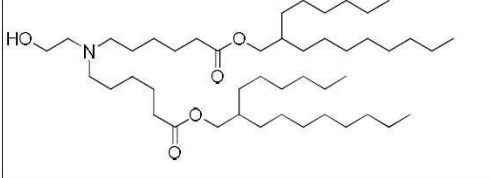
x는 0, 1 또는 2이다.

청구항 15

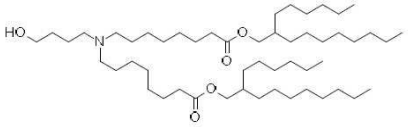
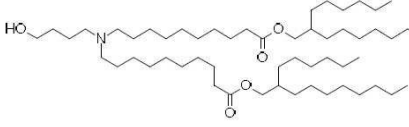
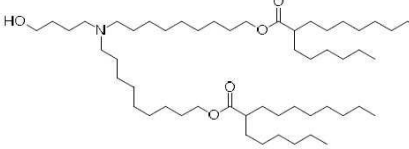
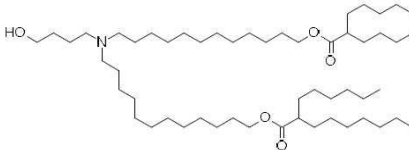
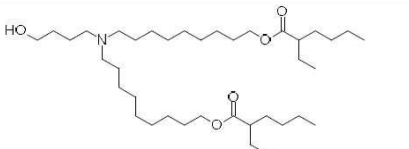
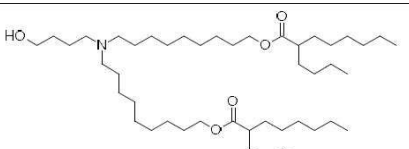
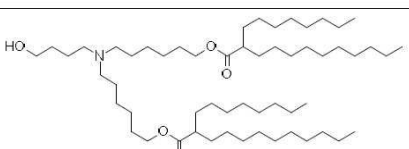
청구항 1 내지 13 중 어느 한 항에 있어서:

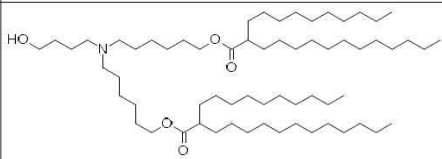
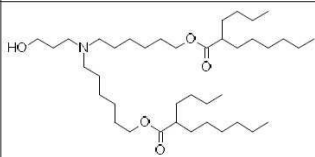
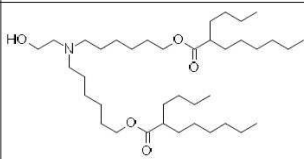
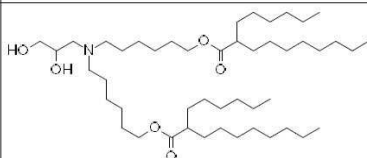
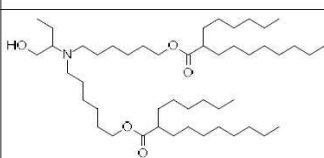
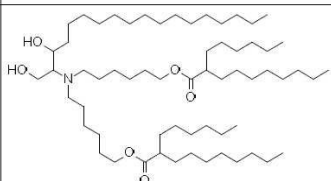
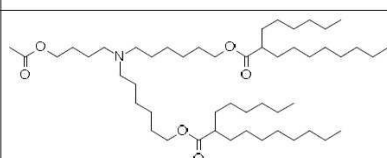
(a) 양이온적으로 이온화가능한 지질은 하기 구조 I-1 내지 I-36:

No.	구조
I-1	
I-2	
I-3	
I-4	

No.	구조
I-5	
I-6	
I-7	
I-8	
I-9	
I-10	
I-11	

No.	구조
I-12	
I-13	
I-14	
I-15	
I-16	
I-17	
I-18	
I-19	

No.	구조
I-20	
I-21	
I-22	
I-23	
I-24	
I-25	
I-26	

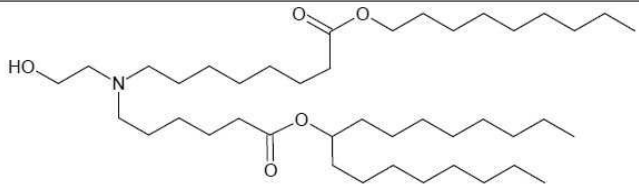
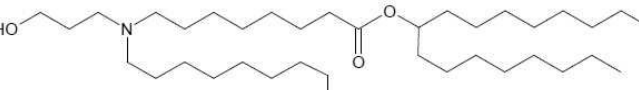
No.	구조
I-27	
I-28	
I-29	
I-30	
I-31	
I-32	
I-33	

No.	구조
I-34	
I-35	
I-36	

로부터 선택되고; 또는

(β) 양이온적으로 이온화가능한 지질은 하기 구조 A 내지 F:

No.	구조
A	
B	
C	
D	

No.	구조
E	
F	

로부터 선택되거나, 또는

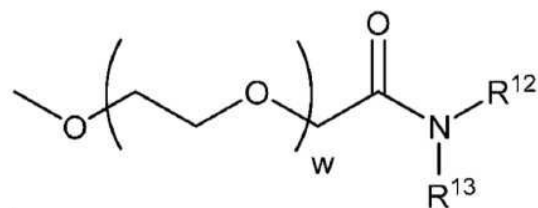
(γ) 양이온적으로 이온화가능한 지질은 구조 I-3을 갖는 지질인 조성물.

청구항 16

청구항 1 내지 15 중 어느 한 항에 있어서, LNP는 좋기로는 폴리머 공액 지질, 중성 지질, 스테로이드 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 추가 지질을 추가로 포함하고, 더욱 좋기로는 LNP는 양이온적으로 이온화가능한 지질, 폴리머 공액 지질, 중성 지질 및 스테로이드.

청구항 17

청구항 16에 있어서, 폴리머 공액 지질은 폐길화된 지질을 포함하고, 폐길화된 지질은 좋기로는 하기 구조를 갖거나:



또는 이의 약제학적으로 허용되는 염, 호변이성질체 또는 입체이성질체인 조성물:

식 중,

R^{12} 및 R^{13} 각각 독립적으로 10 내지 30개의 탄소 원자를 함유하는 직쇄 또는 분지쇄, 포화 또는 불포화 알킬 사슬이고, 여기서 알킬 사슬은 선택적으로 하나 이상의 에스테르 결합에 의해 중단되고; w 는 30~60 범위의 평균값을 갖는다.

청구항 18

청구항 16에 있어서, 폴리머 공액 지질은 폴리스아르코신-지질 공액체 또는 폴리스아르코신과 지질 유사 물질의 공액체를 포함하고, 여기서 폴리스아르코신-지질 공액체 또는 폴리스아르코신과 지질 유사 물질의 공액체는 좋기로는 폴리스아르코신-디아실글리세롤 공액체, 폴리스아르코신-디아킬옥시프로필 공액체, 폴리스아르코신-인지질 공액체, 폴리스아르코신-세라마이드 공액체 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 구성원인 조성물.

청구항 19

청구항 16 내지 18 중 어느 한 항에 있어서, 중성 지질은 인지질, 좋기로는 포스파티딜콜린, 포스파티딜에탄올아민, 포스파티딜글리세롤, 포스파티드산, 포스파티딜세린 및 스핑고미엘린으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 더욱 좋기로는 디스테아로일포스파티딜콜린(DSPC), 디올레오일포스파티딜콜린(DOPC), 디미리스토일포스파티딜콜린(DMPC), 디펜타데카노일 포스파티딜콜린, 디라우로일포스파티딜콜린, 디팔미토일포스파티딜콜린(DPPC), 디아라키도일포스파티딜콜린(DAPC), 디베헤노일포스파티딜콜린(DBPC), 디트리코사노일포스파티딜콜린(DTPC), 디리그

노세로일파티딜콜린(DLPC), 팔미토일올레일-포스파티딜콜(POPC), 1,2-디-O-옥타데세닐-sn-글리세로-3-포스포콜린(18:0 Diether PC), 1-올레오일-2-콜레스테릴헤미숙시노일-sn-글리세로-3-포스포콜린(OChemPC), 1-헥사데실-sn-글리세로-3-포스포콜린(C16 Lyso PC), 디올레오일포스파티딜에탄올아민(DOPE), 디스테아로일-포스파티딜에탄올아민(DSPE), 디팔미토일-포스파티딜에탄올아민(DPPE), 디미리스토일-포스파티딜에탄올아민(DMPE), 디라우로일-포스파티딜에탄올아민(DLPE), 및 디피타노일-포스파티딜에탄올아민(DPyPE)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 조성물.

청구항 20

청구항 16 내지 19 중 어느 한 항에 있어서, 스테로이드는 콜레스테롤과 같은 스테롤을 포함하는 조성물.

청구항 21

청구항 1 내지 20 중 어느 한 항에 있어서, 수성상은 킬레이트제를 포함하지 않는 것인 조성물.

청구항 22

청구항 1 내지 21 중 어느 한 항에 있어서, LNP는 조성물에 포함된 RNA의 약 75% 이상, 종기로는 약 80% 이상을 구성하는 것인 조성물.

청구항 23

청구항 1 내지 22 중 어느 한 항에 있어서, RNA는 LNP 내에 캡슐화되거나 LNP와 회합되는 조성물.

청구항 24

청구항 1 내지 23 중 어느 한 항에 있어서, RNA는 변형된 뉴클레오사이드를 우리딘 대신 포함하고, 여기서 변형된 뉴클레오사이드는 종기로는 슈도우리딘(ψ), N1-메틸-슈도우리딘(m1 ψ), 및 5- 메틸-우리딘(m5U)로부터 선택되는 것인 조성물.

청구항 25

청구항 1 내지 25 중 어느 한 항에 있어서, RNA는 5' 캡; 5' UTR; 3' UTR; 및 폴리-A 서열 중 적어도 하나, 종기로는 모두를 포함하는 조성물.

청구항 26

청구항 25에 있어서, 폴리-A 서열은 적어도 100개의 A 뉴클레오타이드를 포함하고, 폴리-A 서열은 종기로는 A 뉴클레오타이드의 중단된 서열인 조성물.

청구항 27

청구항 25 또는 26에 있어서, 5' 캡은 cap1 또는 cap2 구조인 조성물.

청구항 28

청구항 1 내지 27 중 어느 한 항에 있어서, RNA는 하나 이상의 폴리펩타이드를 인코딩하고, 하나 이상의 폴리펩타이드는 종기로는 대상체에서 항원에 대한 면역 반응을 유도하기 위한 에피토프를 포함하는 조성물.

청구항 29

청구항 28에 있어서, RNA는 SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 면역원성 변이체 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 면역원성 단편 또는 그의 면역원성 변이체를 포함하는 아미노산 서열을 인코딩하는 오픈 리딩 프레임(ORF)을 포함하는 조성물.

청구항 30

청구항 28 또는 29에 있어서, RNA는 SEQ ID NO: 1의 위치 986 및 987에서 프롤린 잔기 치환을 갖는 전장 SARS-CoV2 S 단백질 변이체를 인코딩하는 ORF를 포함하는 조성물.

청구항 31

청구항 29 또는 30에 있어서, SARS-CoV2 S 단백질 변이체는 SEQ ID NO: 7에 대해 적어도 80% 동일성을 갖는 조성물.

청구항 32

청구항 1 내지 31 중 어느 한 항에 있어서, 조성물은 냉동 형태인 조성물.

청구항 33

청구항 32에 있어서, 냉동된 조성물을 해동한 후의 RNA 무결성은 조성물이 냉동되기 전의 RNA 무결성과 비교하여 적어도 50%인 조성물.

청구항 34

청구항 32 또는 33에 있어서, 냉동된 조성물을 해동한 후 LNP의 크기($Z_{평균}$) 및/또는 크기 분포 및/또는 다분산 지수(PDI)는 조성물이 냉동되기 전의 LNP의 크기($Z_{평균}$) 및/또는 크기 분포 및/또는 PDI와 동일한 것인 조성물.

청구항 35

청구항 1 내지 31 중 어느 한 항에 있어서, 조성물은 액체 형태인 조성물.

청구항 36

최종 수성상에 분산된 LNP를 포함하는 조성물을 제조하는 방법으로서, LNP는 양이온적으로 이온화가능한 지질 및 RNA를 포함하고; 최종 수성상은 최종 버퍼 물질을 포함하는 최종 버퍼 시스템 및 및 최종 1가 음이온을 포함하되, 최종 버퍼 물질은 Tris 및 그의 양성자화 형태, Bis-Tris-메탄 및 그의 양성자화 형태, 및 TEA 및 그의 양성자화 형태로 이루어진 군으로부터 선택되고, 최종 1가 음이온은 클로라이드, 아세테이트, 글리콜레이트, 락테이트, MES의 음이온, MOPS의 음이온 및 HEPES의 음이온으로 이루어진 군으로부터 선택되며; 조성물 중 최종 버퍼 물질의 농도는 최대 약 25 mM이고; 최종 수성상은 무기 포스페이트 음이온이 실질적으로 없고, 시트레이트 음이온이 실질적으로 없으며, EDTA의 음이온이 실질적으로 없고;

상기 방법은

(I) 최종 수성상에 분산된 LNP를 포함하는 제형을 준비하는 단계로서, 여기서, LNP는 양이온적으로 이온화가능한 지질 및 RNA를 포함하는 것인 단계; 및

(II) 선택적으로 제형을 약 -10°C 이하로 냉동시키는 단계,

를 포함함으로써 조성물을 얻고,

여기서 단계(I)은

(a) 물과 1차 버퍼 시스템을 함유하는 RNA 용액을 준비하는 단계;

(b) 양이온적으로 이온화가능한 지질 및 존재하는 경우 하나 이상의 추가 지질을 포함하는 에탄올 용액을 제조하는 단계;

(c)(a)에서 제조된 RNA 용액을(b)에서 제조된 에탄올 용액과 혼합하여, 제1 버퍼 시스템을 포함하는 제1 수성상에 분산된 LNP를 포함하는 제1 중간 제형을 제조하는 단계; 및

(d) 최종 버퍼 시스템을 포함하는 최종 버퍼 수용액을 사용하여(c)에서 제조된 제1 중간 제형을 여과하는 단계를 포함함으로써 최종 수성상에 분산된 LNP를 포함하는 제형을 제조하는 방법.

청구항 37

청구항 36에 있어서, 단계(I)은 회석 및 여과로부터 선택되는 하나 이상의 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 38

청구항 36 또는 37에 있어서, 단계(I)은

(a') RNA 수용액을 제공하는 단계;

(b') 제1 버퍼 시스템을 포함하는 제1 버퍼 수용액을 제공하는 단계;

(c')(a')에서 제공된 RNA 수용액과(b')에 제공된 제1 버퍼 수용액을 혼합하여 물 및 제1 버퍼 시스템을 포함하는 RNA 용액을 제조하는 단계;

(d') 양이온적으로 이온화가능한 지질 및 존재하는 경우 하나 이상의 추가 지질을 포함하는 에탄올 용액을 제조하는 단계;

(e')(c')에서 제조된 RNA 용액을(d')에서 제조된 에탄올 용액과 혼합하여, 제1 버퍼 시스템을 포함하는 제1 수성상에 분산된 LNP를 포함하는 제1 중간 제형을 제조하는 단계;

(f') 선택적으로, 추가 버퍼 시스템을 포함하는 추가 버퍼 수용액을 사용하여(e')에서 제조된 제1 중간 제형을 여과함으로써, 추가 버퍼 시스템을 포함하는 추가 수성상에 분산된 LNP를 포함하는 추가 중간 제형을 제조하는 단계로서, 여기서 추가 버퍼 수용액은 제1 버퍼 수용액과 동일하거나 상이할 수 있는 단계;

(g') 선택적으로, 단계(f')를 1회 또는 2회 이상 반복하는 단계로서, 여기서 1 사이클의 단계(f') 후에 수득된 추가 버퍼 시스템을 포함하는 추가 수성상에 분산된 LNP를 포함하는 추가 중간 제형이 다음 사이클의 제1 중간 제형으로서 사용되고, 여기서 각 사이클에서 추가 버퍼 수용액은 제1 버퍼 수용액과 동일하거나 상이할 수 있는 것인 단계;

(h') 최종 버퍼 시스템을 포함하고, pH가 적어도 6.0인 최종 버퍼 수용액을 이용하여, 단계(f')가 없는 경우 단계(e')에서 얻은 제1 중간 제형을 여과하거나, 또는 단계(f')가 존재하고 단계(g')가 존재하지 않을 경우, 단계(f')에서 얻은 추가 중간 제형을 여과하거나, 또는 단계(f') 및(g')가 존재하는 경우, 단계(g')에서 얻은 추가 중간 제형을 여과하는 단계;

(i') 선택적으로, 단계(h')에서 얻은 제형을 희석 용액으로 희석하는 단계

를 포함함으로써, 최종 수성상에 분산된 LNP를 포함하는 제형을 제조하는 방법.

청구항 39

청구항 36 내지 38 중 어느 한 항에 있어서, 여과는 접선 흐름 여과 또는 정용여과, 종기로는 접선 흐름 여과인 방법.

청구항 40

청구항 36 내지 39 중 어느 한 항에 있어서,(II) 제형을 약 -10°C 이하로 냉동시키는 것을 포함하는 방법.

청구항 41

청구항 36 내지 40 중 어느 한 항에 있어서, 최종 버퍼 물질은 Tris 및 그의 양성자화 형태인 방법.

청구항 42

청구항 36 내지 41 중 어느 한 항에 있어서, 조성물 내의 최종 버퍼 물질, 특히 Tris 및 그의 양성자화 형태의 농도는 최대 약 20 mM, 종기로는 최대 약 15 mM, 더욱 종기로는 최대 약 10 mM, 예컨대 약 10 mM인 방법.

청구항 43

청구항 36 내지 42 중 어느 한 항에 있어서, 최종 수성상은 무기 설페이트 음이온 및/또는 카보네이트 음이온 및/또는 이염기성 유기산 음이온 및/또는 다염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없고, 특히 무기 설페이트 음이온, 카보네이트 음이온 이염기성 유기산 음이온 및 다염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없는 것인 방법.

청구항 44

청구항 36 내지 43 중 어느 한 항에 있어서,(i) 단계(a)에서 제조된 RNA 용액은 하나 이상의 이염기성 및/또는 다염기성 유기산 음이온을 추가로 포함하고, 단계(d)는 하나 이상의 이염기성 및/또는 다염기성 유기산 음이온을 제거하는 조건 하에서 수행되어, 최종 수성상에 분산된 LNP를 포함하는 제형을 생성하되, 상기 최종 수성상

에는 단계(a)에서 제조된 RNA 용액에 존재하는 하나 이상의 이염기성 및/또는 다염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없고; 또는(ii) 제1 수성 버퍼 용액 및 제1 수성상은 하나 이상의 이염기성 및/또는 다염기성 유기산 음이온을 포함하고 단계(f') 내지(h') 중 적어도 하나는 제1 중간체 제형 및/또는 추가 중간체 제형으로부터의 하나 이상의 이염기성 및/또는 다염기성 유기산 음이온을 제거하는 조건 하에서 수행되는 것인 방법.

청구항 45

청구항 36 내지 44 중 어느 하나의 있어서,(i) 단계(a)에서 얻은 RNA 용액은 6.0 미만, 좋기로는 최대 약 5.0, 더욱 좋기로는 최대 약 4.5의 pH를 갖고; 또는(ii) 제1 버퍼 수용액의 pH는 6.0 미만, 좋기로는 최대 약 5.0, 더욱 좋기로는 최대 약 4.5 이하인 방법.

청구항 46

청구항 44 또는 45에 있어서, 하나 이상의 이염기성 및/또는 다염기성 유기산 음이온은 시트레이트 음이온 및/또는 EDTA의 음이온을 포함하는 방법.

청구항 47

청구항 36 내지 43 중 어느 한 항에 있어서,

(i) 단계(a)에서 사용되는 제1 버퍼 시스템은 단계(d)에서 사용되는 최종 버퍼 물질 및 최종 1가 음이온을 포함하고, 좋기로는 단계(a)에서 사용되는 제1 버퍼 시스템의 버퍼 시스템 및 pH는 단계(d)에서 사용된 최종 버퍼 수용액의 버퍼 시스템 및 pH와 동일하고; 또는

(ii) 단계(b'),(f') 및(g')에서 사용되는 각각의 제1 버퍼 시스템 및 모든 추가 버퍼 시스템은 단계(h')에서 사용되는 최종 버퍼 물질 및 최종 1가 음이온을 포함하고, 좋기로는 단계(b'),(f') 및(g')에서 사용되는 각각의 제1 버퍼 수용액 및 모든 추가 버퍼 수용액의 버퍼 시스템 및 pH는 최종 버퍼 수용액의 버퍼 시스템 및 pH와 동일한 것인 방법.

청구항 48

청구항 36 내지 47 중 어느 한 항에 있어서, 최종 1가 음이온은 클로라이드, 아세테이트, 글리콜레이트 및 락테이트로 이루어진 군으로부터 선택되고, 조성물 중 최종 1가 음이온의 농도는 조성물 내의 최종 버퍼 물질의 농도와 기껏해야 동일하고, 좋기로는 그 미만, 예컨대 약 9 mM 미만인 방법.

청구항 49

청구항 36 내지 48 중 어느 한 항에 있어서, 최종 1가 음이온은 MES, MOPS 및 HEPES의 음이온으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 조성물 중 최종 1가 음이온의 농도는 조성물 중 최종 버퍼 물질의 농도와 적어도 동일하고, 좋기로는 그 보다 더 높은 방법.

청구항 50

청구항 36 내지 49 중 어느 한 항에 있어서, 조성물의 pH는 약 6.5 내지 약 8.0, 좋기로는 약 6.9 내지 약 7.9, 예컨대 약 7.0 내지 약 7.8인 방법.

청구항 51

청구항 36 내지 50 중 어느 한 항에 있어서, 물이 제형 및/또는 조성물의 주성분이고/이거나 조성물에 함유된 물 이외의 용매(들)의 총량은 약 0.5%(v/v) 미만인 방법.

청구항 52

청구항 36 내지 51 중 어느 한 항에 있어서, 조성물의 삼투질농도는 약 400×10^{-3} osmol/kg 이하인 방법.

청구항 53

청구항 36 내지 52 중 어느 한 항에 있어서, 여기서 조성물 중 RNA의 농도는 약 5 mg/l 내지 약 150 mg/l, 좋기로는 약 10 mg/l 내지 약 130 mg/l, 더욱 좋기로는 약 30mg/l 내지 약 120mg/l인 방법.

청구항 54

청구항 36 내지 53 중 어느 한 항에 있어서, (i) 단계(I)은(d)에서 제조된 제형을 희석 용액으로 희석하는 것을 추가로 포함하거나, 단계(i')가 존재하고, 여기서 희석 용액은 동결방지제를 포함하며; 및/또는(ii) 단계(I)에서 얻은 제형 및 조성물은 좋기로는 적어도 약 1% w/v의 농도로 동결방지제를 포함하고, 여기서 동결방지제는 좋기로는 탄수화물 및 당 알코올로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상을 포함하고, 더욱 좋기로는 동결방지제는 수크로스, 글루코스, 글리세롤, 소르비톨 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 더욱 좋기로는 동결방지제는 수크로스 및/또는 글리세롤을 포함하는 방법.

청구항 55

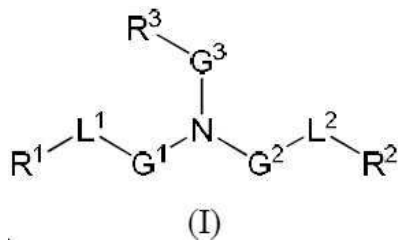
청구항 36 내지 53 중 어느 한 항에 있어서, 단계(I)에서 얻은 제형 및 조성물은 동결방지제가 실질적으로 없는 것인 방법.

청구항 56

청구항 36 내지 55 중 어느 한 항에 있어서, 양이온적으로 이온화가능한 지질은 생리학적 조건 하에서 양성자화될 수 있는 적어도 하나의 질소 원자를 포함하는 헤드 그룹을 포함하는 방법.

청구항 57

청구항 36 내지 56 중 어느 한 항에 있어서, 양이온적으로 이온화가능한 지질은 화학식(I)의 구조:



를 갖거나 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염, 호변이성질체, 전구약물 또는 입체이성질체인 방법:

식 중

L^1 또는 L^2 중 하나는 $-O(C=O)-$, $-(C=O)O-$, $-C(=O)-$, $-O-$, $-S(O)_x-$, $-S-S-$, $-C(=O)S-$, $SC(=O)-$, $-NR^aC(=O)-$, $-C(=O)NR^a-$, $NR^aC(=O)NR^a-$, $-OC(=O)NR^a-$ 또는 $-NR^aC(=O)O-$ 이고, L^1 또는 L^2 중 다른 하나는 $-O(C=O)-$, $-(C=O)O-$, $-C(=O)-$, $-O-$, $-S(O)_x-$, $-S-S-$, $-C(=O)S-$, $SC(=O)-$, $-NR^aC(=O)-$, $-C(=O)NR^a-$, $NR^aC(=O)NR^a-$, $-OC(=O)NR^a-$ 또는 $-NR^aC(=O)O-$ 또는 직접 결합이며;

G^1 및 G^2 는 각각 독립적으로 치환되지 않은 C_1-C_{12} 알킬렌 또는 C_2-C_{12} 알케닐렌;

G^3 는 C_1-C_{24} 알킬렌, C_2-C_{24} 알케닐렌, C_3-C_8 시클로알킬렌, C_3-C_8 시클로알케닐렌;

R^a 는 H 또는 C_1-C_{12} 알킬;

R^1 및 R^2 는 각각 독립적으로 C_6-C_{24} 알킬 또는 C_6-C_{24} 알케닐;

R^3 은 H, OR^5 , CN, $-C(=O)OR^4$, $-OC(=O)R^4$ 또는 $-NR^5C(=O)R^4$;

R^4 는 C_1-C_{12} 알킬;

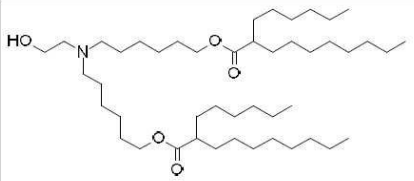
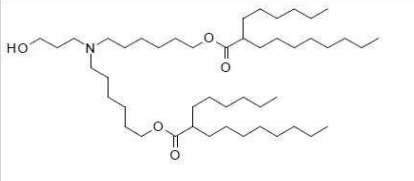
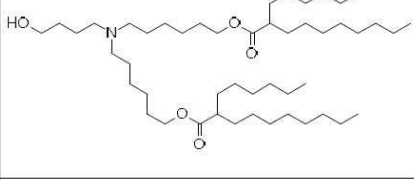
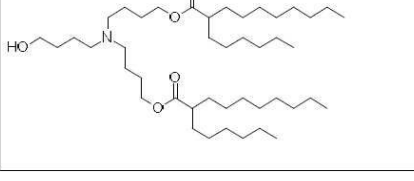
R^5 는 H 또는 C_1-C_6 알킬이며;

x는 0, 1 또는 2이다.

청구항 58

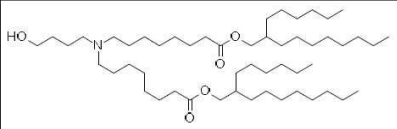
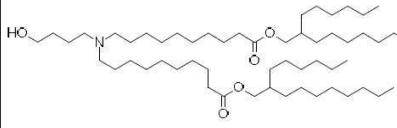
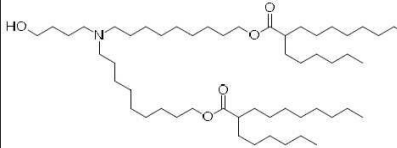
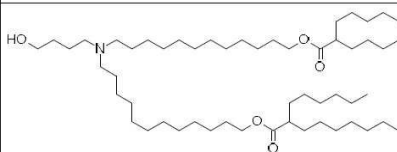
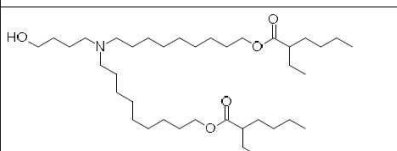
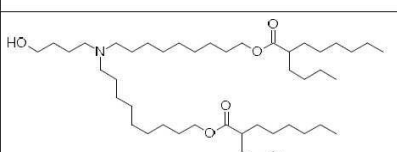
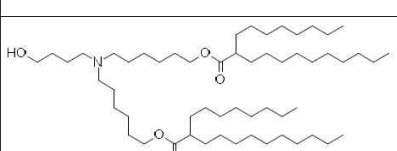
청구항 36 내지 56 중 어느 한 항에 있어서,

(a) 양이온적으로 이온화가능한 지질은 하기 구조 I-1 내지 I-36:

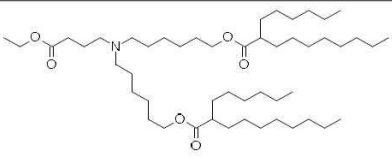
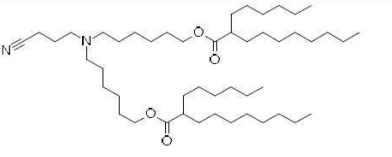
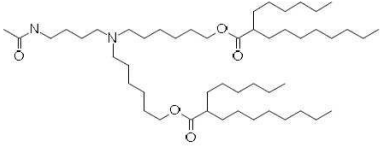
No.	구조
I-1	
I-2	
I-3	
I-4	

No.	구조
I-5	
I-6	
I-7	
I-8	
I-9	
I-10	
I-11	

No.	구조
I-12	
I-13	
I-14	
I-15	
I-16	
I-17	
I-18	
I-19	

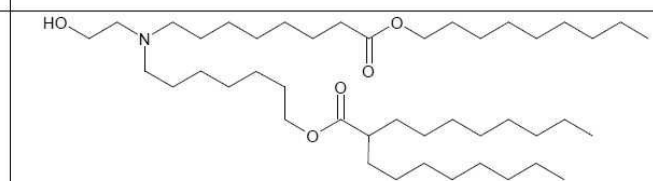
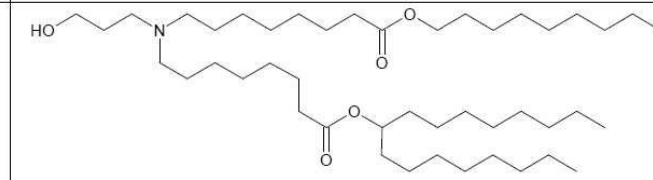
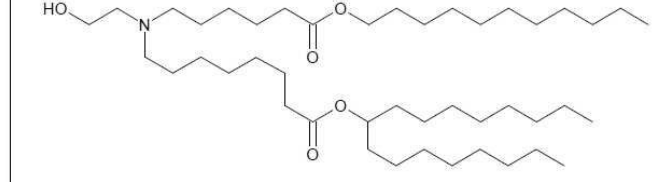
No.	구조
I-20	
I-21	
I-22	
I-23	
I-24	
I-25	
I-26	

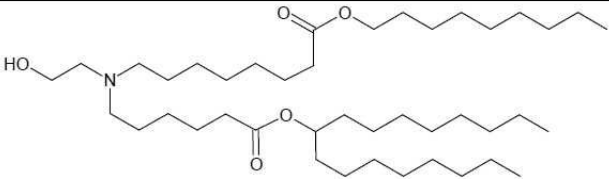
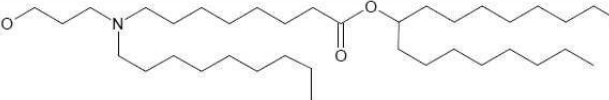
No.	구조
I-27	
I-28	
I-29	
I-30	
I-31	
I-32	
I-33	

No.	구조
I-34	
I-35	
I-36	

로부터 선택되고; 또는

(β) 양이온적으로 이온화가능한 지질은 하기 구조 A 내지 F:

No.	구조
A	
B	
C	
D	

No.	구조
E	
F	

로부터 선택되며; 또는

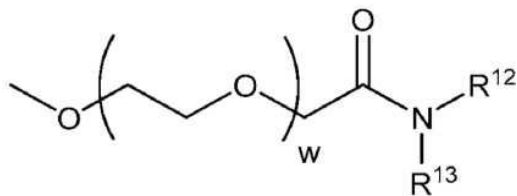
(γ) 양이온적으로 이온화가능한 지질은 구조 I-3을 갖는 지질인 방법.

청구항 59

청구항 36 내지 58 중 어느 한 항에 있어서, 단계(b) 또는(d')에서 제조된 에탄올계 용액은 하나 이상의 추가 지질을 추가로 포함하고 LNP는 하나 이상의 추가 지질을 추가로 포함하며, 여기서 하나 이상의 추가 지질은 좋기로는 폴리머 공액 지질, 중성 지질, 스테로이드 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 더욱 좋기로는 하나 이상의 추가 지질은 폴리머 공액 지질, 중성 지질 및 스테로이드를 포함하는 방법.

청구항 60

청구항 59에 있어서, 폴리머 공액 지질은 폐길화된 지질을 포함하고, 여기서 폐길화된 지질은 좋기로는 하기 구조



를 갖거나 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염, 호변이성질체 또는 입체이성질체인 방법:

식 중

R^{12} 및 R^{13} 은 각각 독립적으로 10 내지 30개의 탄소 원자를 함유하는 직쇄 또는 분지쇄, 포화 또는 불포화 알킬 사슬이고, 여기서 알킬 사슬은 선택적으로 하나 이상의 에스테르 결합에 의해 중단되고; w는 30~60 범위의 평균 값을 갖는다.

청구항 61

청구항 59에 있어서, 폴리머 공액 지질은 폴리스아르코신-지질 공액체 또는 폴리스아르코신과 지질 유사 물질의 공액체를 포함하고, 여기서 폴리스아르코신-지질 공액체 또는 폴리스아르코신과 지질 유사 물질의 공액체는 좋기로는 폴리스아르코신-디아실글리세롤 공액체, 폴리스아르코신-디아킬옥시프로필 공액체, 폴리스아르코신-인지질 공액체, 폴리스아르코신-세라마이드 공액체 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 구성원인 방법.

청구항 62

청구항 59 내지 61 중 어느 한 항에 있어서, 중성 지질은 인지질, 좋기로는 포스파티딜콜린, 포스파티딜에탄올아민, 포스파티딜글리세롤, 포스파티드산, 포스파티딜세린 및 스핑고미엘린으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 더욱 좋기로는 디스테아로일포스파티딜콜린(DSPC), 디올레오일포스파티딜콜린(DOPC), 디미리스토일포스파티딜콜린(DMPC), 디펜타데카노일 포스파티딜콜린, 디라우로일포스파티딜콜린, 디팔미토일포스파티딜콜린(DPPC), 디아

라키도일포스파티딜콜린(DAPC), 디베헤노일포스파티딜콜린(DBPC), 디트리코사노일포스파티딜콜린(DTPC), 디리그노세로일포티딜콜린(DLPC), 팔미토일올레일-포스파티딜콜(POPC), 1,2-디-O-옥타데세닐-sn-글리세로-3-포스포콜린(18:0 Diether PC), 1-올레오일-2-콜레스테릴헤미숙시노일-sn-글리세로-3-포스포콜린(OCheMSPC), 1-헥사데실-sn-글리세로-3-포스포콜린(C16 Lyso PC), 디올레오일포스파티딜에탄올아민(DOPE), 디스테아로일-포스파티딜에탄올아민(DSPE), 디팔미토일-포스파티딜에탄올아민(DPPE), 디미리스토일-포스파티딜에탄올아민(DMPE), 디라우로일-포스파티딜에탄올아민(DLPE), 및 디피타노일-포스파티딜에탄올아민(DPyPE)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 63

청구항 59 내지 62 중 어느 한 항에 있어서, 스테로이드는 콜레스테롤과 같은 스테롤을 포함하는 방법.

청구항 64

청구항 36 내지 63 중 어느 한 항에 있어서, 양이온적으로 이온화가능한 지질, 폴리머 공액 지질, 중성 지질 및 스테로이드는, 20% 내지 60%의 양이온적으로 이온화가능한 지질, 이온화 지질, 0.5% 내지 15%의 폴리머 공액 지질, 5% 내지 25%의 중성 지질, 및 25% 내지 55%의 스테로이드의 몰비, 종기로는 45% 내지 55%의 양이온적으로 이온화가능한 지질, 1.0% 내지 5%의 폴리머 공액 지질, 8% 내지 12%의 중성 지질 및 35% 내지 45%의 스테로이드의 몰비로 에탄올 용액 중에 존재하는 방법.

청구항 65

청구항 36 내지 64 중 어느 한 항에 있어서, 최종 수성상은 킬레이트제를 포함하지 않는 방법.

청구항 66

청구항 36 내지 65 중 어느 한 항에 있어서, LNP는 조성물에 포함된 RNA의 약 75% 이상, 종기로는 약 80% 이상을 구성하는 방법.

청구항 67

청구항 36 내지 66 중 어느 한 항에 있어서, RNA는 LNP 내에 캡슐화되거나 LNP와 회합되는 방법.

청구항 68

청구항 36 내지 67 중 어느 한 항에 있어서, RNA는 변형된 뉴클레오타이드를 우리딘 대신 포함하고, 여기서 변형된 뉴클레오타이드는 종기로는 슈도우리딘(ψ), N1-메틸-슈도우리딘(m1 ψ), 및 5- 메틸-우리딘(m5U)로부터 선택되는 방법.

청구항 69

청구항 36 내지 68 중 어느 한 항에 있어서, RNA는 다음, 즉: 5' 캡; 5' UTR; 3' UTR; 및 폴리-A 서열 중 적어도 하나, 종기로는 모두를 포함하는 방법.

청구항 70

청구항 69에 있어서, 폴리-A 서열은 적어도 100개의 A 뉴클레오타이드를 포함하고, 여기서 폴리-A 서열은 종기로는 A 뉴클레오타이드의 중단된 서열인 방법.

청구항 71

청구항 69 또는 70에 있어서, 5' 캡은 cap1 또는 cap2 구조인 방법.

청구항 72

청구항 36 내지 71 중 어느 한 항에 있어서, RNA는 하나 이상의 폴리펩타이드를 인코딩하고, 여기서 하나 이상의 폴리펩타이드는 종기로는 대상체에서 항원에 대한 면역 반응을 유도하기 위한 에피토프를 포함하는 방법.

청구항 73

청구항 72에 있어서, RNA는 SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 면역원성 변이체 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 면역원성 단편 또는 그의 면역원성 변이체를 포함하는 아미노산 서열을 인코딩하는 오픈 리딩 프레임(ORF)을 포함하는 방법.

청구항 74

청구항 72 또는 73에 있어서, RNA는 SEQ ID NO: 1의 위치 986 및 987에서 프롤린 잔기 치환을 갖는 전장 SARS-CoV2 S 단백질 변이체를 인코딩하는 ORF를 포함하는 방법.

청구항 75

청구항 73 또는 74에 있어서, SARS-CoV2 S 단백질 변이체는 SEQ ID NO: 7에 대해 적어도 80% 동일성을 갖는 방법.

청구항 76

청구항 36 내지 39 및 41 내지 75 중 어느 한 항에 있어서, 단계(II)를 포함하지 않는 방법.

청구항 77

청구항 36 내지 75 중 어느 하나의 방법에 따라 조성물을 제조하는 단계 및 조성물을 약 -90°C 내지 약 -10°C 범위의 온도, 예컨대 약 -90°C 내지 약 -40°C 또는 약 -25°C 내지 약 -10°C 의 온도에서 보관하는 단계를 포함하는, 조성물의 보관 방법.

청구항 78

청구항 77에 있어서, 조성물을 적어도 1주, 예컨대 적어도 2주, 적어도 3주, 적어도 4주, 적어도 1개월, 적어도 2개월, 적어도 3개월, 적어도 6개월, 적어도 12개월, 적어도 24개월 또는 적어도 36개월 동안 보관하는 방법.

청구항 79

청구항 36 내지 78 중 어느 하나의 방법에 따라 조성물을 제조하는 단계 및 상기 조성물을 약 0°C 내지 약 20°C 범위의 온도, 예컨대 약 1°C 내지 약 15°C , 약 2°C 내지 약 10°C , 또는 약 2°C 내지 약 8°C , 또는 약 5°C 의 온도에서 보관하는 것을 포함하는 조성물의 보관 방법.

청구항 80

청구항 79에 있어서, 조성물을 적어도 1주, 예컨대 적어도 2주, 적어도 3주, 적어도 4주, 적어도 1개월, 적어도 2개월, 적어도 3개월 또는 적어도 6개월 동안 보관하는 방법.

청구항 81

청구항 36 내지 80 중 어느 하나의 방법에 의해 제조될 수 있는 조성물.

청구항 82

청구항 81에 있어서, 냉동 형태인 조성물.

청구항 83

청구항 82에 있어서, 냉동된 조성물을 해동한 후의 RNA 무결성은 조성물이 냉동되기 전의 조성물의 RNA 무결성과 비교하여 적어도 50%인 조성물.

청구항 84

청구항 82 또는 83에 있어서, 냉동된 조성물을 해동한 후 LNP의 크기($Z_{\text{평균}}$) 및/또는 크기 분포 및/또는 다분산 지수(PDI)는 조성물이 냉동되기 전 LNP의 크기($Z_{\text{평균}}$) 및/또는 크기 분포 및/또는 PDI와 동일한 조성물.

청구항 85

청구항 81에 있어서, 액체 형태인 조성물.

청구항 86

청구항 85에 있어서, 적어도 1주 동안 조성물을 보관한 후 RNA 무결성은 보관 전 RNA 무결성과 비교하여 적어도 50%인 조성물.

청구항 87

청구항 85 또는 86에 있어서, 적어도 1주 동안 조성물을 보관한 후 LNP의 크기($Z_{\text{평균}}$) 및/또는 크기 분포 및/또는 다분산 지수(PDI)는 보관 전 LNP의 크기($Z_{\text{평균}}$) 및/또는 크기 분포 및/또는 PDI와 동일한 조성물.

청구항 88

청구항 36 내지 75, 77 및 78 중 어느 하나의 방법에 의해 제조된 냉동 조성물을 제공하는 단계, 및 상기 냉동 조성물을 해동함으로써 즉시 사용가능한 약제학적 조성물을 수득하는 것을 포함하는, 즉시 사용가능한 약제학적 조성물의 제조방법.

청구항 89

청구항 36 내지 39, 41 내지 76, 79 및 80 중 어느 하나의 방법에 의해 제조된 액체 조성물을 제공함으로써, 즉시 사용가능한 약제학적 조성물을 수득하는 단계를 포함하는, 즉시 사용가능한 약제학적 조성물의 제조방법.

청구항 90

청구항 88 또는 89의 방법에 의해 제조가능한 즉시 사용가능한 약제학적 조성물.

청구항 91

청구항 1 내지 35, 81 내지 87 및 90 중 어느 한 항에 있어서, 치료에 사용하기 위한 것인 조성물.

청구항 92

청구항 1 내지 35, 81 내지 87 및 90 중 어느 한 항에 있어서, 대상체에서 면역 반응을 유도하는데 사용하기 위한 것인 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 개시내용은 일반적으로 RNA를 포함하는 지질 나노입자(LNP) 조성물, 그러한 조성물을 제조 및 보관하는 방법, 및 요법에서 이러한 조성물의 용도 분야에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 외래 유전 정보를 표적 세포로 전달하기 위한 재조합 핵산(예컨대 DNA 또는 RNA)의 용도는 잘 알려져 있다. RNA를 사용하는 이점은 일시적인 발현과 비형질전환 특성을 포함한다. RNA는 발현되기 위해 핵으로 들어갈 필요가 없으며, 더구나 숙주 계놈에 통합될 수 없기 때문에 발암과 같은 다양한 위험을 제거한다.

[0003] 재조합 핵산은 이를 필요로 하는 대상체에게 네이키드 형태로 투여될 수 있다; 그러나, 일반적으로 재조합 핵산은 조성물을 사용하여 투여된다. 예를 들어, RNA는 RNA 및 나노입자 형성 비히클, 예를 들어 양이온성 지질(예를 들어 영구적으로 하전된 양이온성 지질), 양이온성 지질과 하나 이상의 추가 지질의 혼합물, 또는 양이온성 폴리머를 함유하는 소위 나노입자 제형에 의해 전달될 수 있다. 이러한 나노입자 제형의 운명은 다양한 주요 인자(예컨대 나노입자의 크기 및 크기 분포 등)에 의해 제어된다. 이러한 인자들은 예를 들어 2018년부터 FDA "리포솜 의약품 지침"에서 분석 및 지정해야 하는 특정 속성으로 언급되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0004] 현재 나노입자 제형의 임상 적용에 대한 제약은 균질하고 순수하며 특성이 잘 규명된 나노입자 제형의 부족에 있을 수 있다.
- [0005] 이온화가능한 지질을 포함하는 LNP는 다른 RNA 나노입자 제품과 비교하여 표적화 및 효능 태양에서 이점을 나타낼 수 있다. 그러나 일반적인 의약품 사용에 필요한 충분한 유효 기간을 확보하는 것은 어려운 일이다. 안정화를 위해 이온화가능한 지질을 포함하는 LNP는 -80°C 와 같은 훨씬 낮은 온도에서 냉동되어야 하는 것으로 알려져 있으며, 이는 콜드 체인에 상당한 문제를 제기하게 된다. 또는 5°C 와 같이 냉동 온도를 웃도는 온도에서만 보관할 수 있을 뿐인데, 이 경우 제한된 안정성만 얻을 수 있다.
- [0006] 용액 또는 LNP의 RNA는 느린 단편화를 겪는 것으로 알려져 있다. 또한, 인산염 버퍼 식염수(PBS)가 있는 경우 RNA는 번역을 위한 접근이 거의 불가능한 매우 안정적인 접힌 형태를 채택하는 경향이 있다. 이 안정한 RNA 접힘의 단편화 및 형성과 같은 두 가지 메커니즘은 모두 온도 의존적이며, 온전하고 접근가능한 RNA의 손실을 초래하여 액체 제품의 안정성을 제한한다; 그러나 이들은 냉동 상태에서는 본질적으로 존재하지 않는다.
- [0007] 따라서, 당업계에는 (i) 이온화가능한 지질 및 RNA를 포함하는 LNP를 포함하고, 안정하며 약제학적인 실무상 정규 기술에 순응하는 온도 범위, 특히 약 -25°C 또는 심지어 $+2$ 내지 $+20^{\circ}\text{C}$ 온도 범위의 액체 형태로 보관가능한 조성물 (ii) 즉시 사용할 수 있는 조성물; (iii) 좋기로는 반복적으로 냉동 및 해동될 수 있는 조성물; 및 (iv) 그러한 조성물을 제조하고 보관하는 방법에 대한 요구가 있다. 본 발명은 이들 및 다른 요구를 다룬다.
- [0008] 본 발명자들은 놀랍게도 본원에 기재된 조성물 및 방법이 상기 언급된 요건을 충족시킨다는 것을 발견하였다. 특히, 특정 버퍼 물질, 특히 Tris(히드록시메틸)아미노메탄(Tris) 및 그의 양성자화 형태를 저농도(예를 들어, 최대 약 25 mM)로 사용하고 무기 포스페이트 음이온 및 시트레이트 음이온 및 EDTA의 음이온을 배제함으로써, 안정하고 약 -25°C 에서 또는 심지어 액체 형태로 보관할 수 있는 조성물을 제조할 수 있음이 입증되었다.

과제의 해결 수단

[0009] 개요

- [0010] 제1 태양에서, 본 개시내용은 수성상에 분산된 지질 나노입자(LNP)를 포함하는 조성물을 제공하며, LNP는 양이온적으로 이온화가능한 지질 및 RNA를 포함하고; 수성상은 Tris 및 그의 양성자화 형태, 비스(2-히드록시에틸)아미노-Tris(히드록시메틸)메탄(Bis-Tris-메탄) 및 그의 양성자화 형태, 및 트리에탄올아민(TEA) 및 그의 양성자화 형태로 이루어진 군으로부터 선택된 버퍼 물질을 포함하는 버퍼 시스템과, 클로라이드, 아세테이트, 글리콜레이트, 락테이트, 모르폴리노에탄설폰산(MES)의 음이온, 3-(N-모르폴리노)프로판설폰산(MOPS)의 음이온 및 2-[4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-일]에탄설폰산(HEPES)의 음이온으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1가 음이온을 포함하되; 조성물 중 버퍼 물질의 농도는 최대 약 25 mM이고; 수성상에는 무기 포스페이트 음이온이 실질적으로 없고, 시트레이트 음이온이 실질적으로 없으며, 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA)의 음이온이 실질적으로 없다.
- [0011] 본 출원에서 입증된 바와 같이, LNP를 포함하는 조성물에서 PBS 대신에 상기 특정된 특정 버퍼 물질, 특히 Tris 및 그의 양성자화 형태에 기초한 버퍼 시스템을 사용하는 것은 매우 안정한 접힌 형태의 RNA의 형성을 억제한다. 또한, 본 출원은 놀랍게도 LNP 및 버퍼 시스템을 포함하는 조성물(여기서 LNP는 양이온적으로 이온화가능한 지질 및 RNA를 포함함)에서 버퍼 물질의 농도를 단순히 낮추는 것에 의해, 50 mM의 농도로 동일한 버퍼 물질을 포함하는 조성물에 비해, 냉동-해동-사이클 후 RNA 무결성이 개선된 RNA LNP 조성물을 얻을 수 있음을 입증한다. 따라서, 청구된 조성물은 개선된 안정성을 제공하고, 약제학적 관행에서 정규 기술에 순응하는 온도 범위에서 보관될 수 있고, 즉시 사용가능한 조성물을 제공한다.
- [0012] 제1 태양의 바람직한 구현예에서, 버퍼 물질은 Tris 및 그의 양성자화 형태, 즉 Tris 및 그의 양성자화 형태의 혼합물이다.
- [0013] 일 구현예에서, 1가 음이온은 클로라이드, 아세테이트, 글리콜레이트, 락테이트, 모르폴리노에탄설폰네이트 및 3-(N-모르폴리노)프로판설폰네이트로 이루어진 군으로부터, 또는 클로라이드, 아세테이트, 글리콜레이트, 락테이트, 모르폴리노 에탄설폰네이트, 및 2-[4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-일] 에탄설폰네이트로 이루어진 군으로부터, 좋기로는 클로라이드, 아세테이트, 락테이트 및 모르폴리노에탄설폰네이트로 이루어진 군으로부터, 더욱 좋기로는 클로라이드, 아세테이트 및 모르폴리노에탄설폰네이트로 이루어진 군으로부터, 또는 클로라이드, 아세테이트 및 락테이트, 예컨대 클로라이드 또는 아세테이트로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0014] 일 구현예에서, 버퍼 물질은 Tris 및 그의 양성자화 형태이고 1가 음이온은 클로라이드, 아세테이트, 글리콜레

이트, 락테이트, 모르폴리노에탄설포네이트 및 3-(N-모르폴리노)프로판설포네이트로 이루어진 군으로부터 선택되거나, 또는 클로라이드, 아세테이트, 글리콜레이트, 락테이트, 모르폴리노에탄설포네이트, 및 2-[4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-일]에탄설포네이트로 이루어진 군으로부터, 종기로는 클로라이드, 아세테이트, 락테이트 및 모르폴리노에탄설포네이트로 이루어진 군으로부터, 더욱 종기로는 클로라이드, 아세테이트 및 모르폴리노에탄설포네이트로 이루어진 군으로부터, 또는 클로라이드, 아세테이트 및 락테이트, 예컨대 클로라이드 또는 아세테이트로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0015] 제1 태양의 일 구현예에서, 조성물 중 버퍼 물질, 특히 Tris 및 그의 양성자화 형태의 총 농도는 최대 약 20 mM, 예컨대 최대 약 19 mM, 최대 약 18 mM, 최대 약 17 mM, 최대 약 16 mM, 최대 약 15 mM, 최대 약 14 mM, 최대 약 13 mM, 최대 약 12 mM, 최대 약 11 mM, 또는 최대 약 10 mM이다. 일 구현예에서, 조성물 중 버퍼 물질, 특히 Tris 및 그의 양성자화 형태의 하한은 적어도 약 1 mM, 종기로는 적어도 약 2 mM, 예컨대 적어도 약 3 mM, 적어도 약 4 mM, 적어도 약 5 mM, 적어도 약 6 mM, 적어도 약 7 mM, 적어도 약 8 mM, 또는 적어도 약 9 mM이다. 예를 들어, 버퍼 물질의 농도, 특히 조성물 중 Tris 및 그의 양성자화 형태의 전체 농도는 약 1 mM 내지 약 20 mM, 예를 들어 약 2 mM 내지 약 15 mM, 약 5 mM 내지 약 14 mM, 약 7 mM 내지 약 13 mM, 약 8 mM 내지 약 12 mM, 약 9 mM 내지 약 11 mM, 예컨대 약 10 mM일 수 있다.

[0016] 제1 태양의 일 구현예에서, 수성상에는 무기 설페이트 음이온 및/또는 카보네이트 음이온 및/또는 이염기성 유기산 음이온 및/또는 다염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없다. 첫 번째 하위 그룹에서는 이러한 기준 중 적어도 하나가 적용된다. 예를 들어, 이러한 첫 번째 하위 그룹의 일 구현예에서, 수성상에는 무기 설페이트 음이온이 실질적으로 없다. 이 첫 번째 하위 그룹의 추가 구현예에서, 수성상에는 실질적으로 카보네이트 음이온이 없다. 이 첫 번째 하위 그룹의 추가 구현예에서, 수성상에는 실질적으로 이염기성 유기산 음이온. 이 첫 번째 하위 그룹의 추가 구현예에서, 수성상에는 실질적으로 다염기성 유기산 음이온이 없다.

[0017] 제1 태양의 두 번째 하위 그룹에서 전술한 기준 중 적어도 두 가지가 적용된다. 예를 들어, 이 두 번째 하위 그룹의 일 구현예에서, 수성상에는 무기 설페이트 음이온이 실질적으로 없고 카보네이트 음이온이 실질적으로 없다. 이 두 번째 하위 그룹의 추가 구현예에서, 수성상에는 무기 설페이트 음이온이 실질적으로 없고 이염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없다. 이 두 번째 하위 그룹의 추가 구현예에서, 수성상에는 무기 설페이트 음이온이 실질적으로 없고 다염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없다. 이 두 번째 하위 그룹의 추가 구현예에서, 수성상에는 카보네이트 음이온이 실질적으로 없고 이염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없다. 이 두 번째 하위 그룹의 추가 구현예에서, 수성상에는 카보네이트 음이온이 실질적으로 없고 다염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없다. 이 두 번째 하위 그룹의 추가 구현예에서, 수성상에는 이염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없고 다염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없다.

[0018] 제1 태양의 세 번째 하위 그룹에서 위의 기준 중 적어도 세 가지가 적용된다. 예를 들어, 이 세 번째 하위 그룹의 일 구현예에서, 수성상은 무기 설페이트 음이온이 실질적으로 없고, 카보네이트 음이온이 실질적으로 없으며, 이염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없다. 이 세 번째 하위 그룹의 추가 구현예에서, 수성상은 무기 설페이트 음이온이 실질적으로 없고, 카보네이트 음이온이 실질적으로 없으며, 다염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없다. 이 세 번째 하위 그룹의 추가 구현예에서, 수성상은 무기 설페이트 음이온이 실질적으로 없고, 이염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없으며, 다염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없다. 이 세 번째 하위 그룹의 추가 구현예에서, 수성상은 카보네이트 음이온이 실질적으로 없고, 이염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없고, 다염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없다.

[0019] 제1 태양의 네 번째 하위 그룹에서는 위의 기준 중 적어도 네 가지가 적용된다. 즉, 이 네 번째 하위 그룹에서 수성상은 무기 설페이트 음이온이 실질적으로 없고, 카보네이트 음이온이 실질적으로 없으며, 이염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없고 다염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없다.

[0020] 제1 태양의 일 구현예(특히 제1 태양의 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째, 네 번째 하위 그룹의 일 구현예에서)에서, 조성물은 동결방지제를 포함한다. 제1 태양의 대안적인 구현예(특히 제1 태양의 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째, 네 번째 그룹의 일 구현예)에서, 조성물은 동결방지제가 실질적으로 없다. 따라서, 이들 구현예의 특징 예는 다음과 같다:

[0021] (1) 수성상에는 무기 설페이트 음이온이 실질적으로 없으며, 조성물은 동결방지제를 포함한다;

[0022] (2) 수성상에는 카보네이트 음이온이 실질적으로 없고, 조성물은 동결방지제를 포함한다;

[0023] (3) 수성상에는 이염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없고, 조성물은 동결방지제를 포함한다;

- [0024] (4) 수성상에는 다염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없고, 조성물은 동결방지제를 포함한다;
- [0025] (5) 수성상에는 실질적으로 무기 설페이트 음이온 및 카보네이트 음이온이 실질적으로 없고, 조성물은 동결방지제를 포함한다;
- [0026] (6) 수성상에는 무기 설페이트 음이온 및 이염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없고, 조성물은 동결방지제를 포함한다;
- [0027] (7) 수성상에는 무기 설페이트 음이온 및 다염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없고, 조성물은 동결방지제를 포함한다;
- [0028] (8) 수성상에는 카보네이트 음이온 및 이염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없고, 조성물은 동결방지제를 포함한다;
- [0029] (9) 수성상에는 카보네이트 음이온 및 다염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없고, 조성물은 동결방지제를 포함한다;
- [0030] (10) 수성상에는 이염기성 유기산 음이온 및 다염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없고, 조성물은 동결방지제를 포함한다;
- [0031] (11) 수성상에는 무기 설페이트 음이온, 카보네이트 음이온 및 이염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없고, 조성물은 동결방지제를 포함한다;
- [0032] (12) 수성상에는 무기 설페이트 음이온, 카보네이트 음이온 및 다염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없고, 조성물은 동결방지제를 포함한다;
- [0033] (13) 수성상에는 무기 설페이트 음이온, 이염기성 유기산 음이온 및 다염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없고, 조성물은 동결방지제를 포함한다;
- [0034] (14) 수성상에는 실질적으로 카보네이트 음이온, 이염기성 유기산 음이온 및 다염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없고, 조성물은 동결방지제를 포함한다;
- [0035] (15) 수성상에는 무기 설페이트 음이온, 카보네이트 음이온이 실질적으로 없으며, 이염기성 유기산 음이온, 및 다염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없고, 조성물은 동결방지제를 포함한다;
- [0036] (16) 수성상에는 무기 설페이트 음이온이 실질적으로 없고, 조성물에는 동결방지제가 실질적으로 없다;
- [0037] (17) 수성상에는 카보네이트 음이온이 실질적으로 없고, 조성물에는 동결방지제가 실질적으로 없다;
- [0038] (18) 수성상에는 이염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없고, 조성물에는 동결방지제가 실질적으로 없다;
- [0039] (19) 수성상에는 다염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없고, 조성물에는 동결방지제가 실질적으로 없다;
- [0040] (20) 수성상에는 무기 설페이트 음이온 및 카보네이트 음이온이 실질적으로 없으며, 조성물에는 동결방지제가 실질적으로 없다;
- [0041] (21) 수성상에는 무기 설페이트 음이온 및 이염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없으며, 조성물에는 동결방지제가 실질적으로 없다;
- [0042] (22) 수성상에는 무기 설페이트 음이온 및 다염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없으며, 조성물에는 동결방지제가 실질적으로 없다;
- [0043] (23) 수성상에는 카보네이트 음이온 및 이염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없고, 조성물에는 동결방지제가 실질적으로 없다;
- [0044] (24) 수성상에는 카보네이트 음이온 및 다염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없고, 조성물에는 동결방지제가 실질적으로 없다;
- [0045] (25) 수성상에는 이염기성 유기산 음이온 및 다염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없으며, 조성물에는 동결방지제가 실질적으로 없다;
- [0046] (26) 수성상에는 무기 설페이트 음이온, 카보네이트 음이온 및 이염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없고, 조성물에는 동결방지제가 실질적으로 없다;

- [0047] (27) 수성상에는 무기 설페이트 음이온, 카보네이트 음이온 및 다염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없고, 조성물에는 동결방지제가 실질적으로 없다;
- [0048] (28) 수성상에는 무기 설페이트 음이온, 이염기성 유기산 음이온 및 다염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없고, 조성물에는 동결방지제가 실질적으로 없다;
- [0049] (29) 수성상에는 카보네이트 음이온, 이염기성 유기산 음이온 및 다염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없고, 조성물에는 동결방지제가 실질적으로 없다;
- [0050] (30) 수성상에는 무기 설페이트 음이온, 카보네이트 음이온, 이염기성 유기산 음이온 및, 다염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없고, 조성물에는 동결방지제가 실질적으로 없다.
- [0051] 제1 태양의 일 구현예에서(특히 상기 열거된 구현예 (1) 내지 (30) 중 임의의 것과 같은 제1 태양의 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째 또는 네 번째 하위 그룹의 일 구현예에서), 조성물은 동결방지제를 포함하고, 상기 동결방지제는 탄수화물 및 당 알코올로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 화합물을 포함한다. 예를 들어, 동결방지제는 수크로스, 글루코스, 글리세롤, 소르비톨 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다. 제1 태양의 바람직한 구현예에서(특히 상기 열거된 구현예 (1) 내지 (30) 중 임의의 것과 같은 제1 태양의 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째 또는 네 번째 하위 그룹의 일 구현예에서), 조성물은 동결방지제로서 수크로스 및/또는 글리세롤을 포함한다.
- [0052] 제1 태양의 일 구현예에서(특히 상기 열거된 구현예 (1) 내지 (30) 중 임의의 것과 같은 제1 태양의 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째 또는 네 번째 하위 그룹의 일 구현예에서), 조성물은 동결방지제를 포함하고, 조성물 중 동결방지제의 농도는 적어도 1% w/v, 예컨대 적어도 2% w/v, 적어도 3% w/v, 적어도 4% w/v, 적어도 5% w/v, 적어도 6% w/v, 적어도 7% w/v, 적어도 8% w/v, 또는 적어도 9% w/v이다. 일 구현예에서, 조성물 중의 동결방지제의 농도는 최대 25% w/v, 예컨대 최대 20% w/v, 최대 19% w/v, 최대 18% w/v, 최대 17% w/v, 최대 16% w/v, 최대 15% w/v, 최대 14% w/v, 최대 13% w/v, 최대 12% w/v, 또는 최대 11% w/v이다. 일 구현예에서, 조성물 중 동결방지제의 농도는 1% w/v 내지 20% w/v, 예컨대 2% w/v 내지 19% w/v, 3% w/v 내지 18% w/v, 4% w/v 내지 17% w/v, 5% w/v 내지 16% w/v, 5% w/v 내지 15% w/v, 6% w/v 내지 14% w/v, 7% w/v 내지 13% w/v, 8% w/v 내지 12% w/v, 9% w/v 내지 11% w/v, 또는 약 10% w/v이다. 제1 태양의 일 구현예에서(특히 상기 열거된 구현예 (1) 내지 (30) 중 임의의 것과 같은 제1 태양의 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째 또는 네 번째 하위 그룹의 일 구현예에서), 조성물은 동결방지제를 5% w/v 내지 15% w/v, 예컨대 6% w/v 내지 14% w/v, 7% w/v 내지 13% w/v, 8% w/v 내지 12% w/v, 또는 9% w/v 내지 11% w/v, 또는 약 10% w/v의 농도로 포함한다.
- [0053] 제1 태양의 일 구현예에서(특히 상기 열거된 구현예 (1) 내지 (30) 중 임의의 것과 같은 제1 태양의 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째 또는 네 번째 하위 그룹의 일 구현예에서), 조성물은 동결방지제를 포함하고, 동결방지제는 조성물의 총 중량을 기준으로, 조성물의 삼투질농도를 약 50×10^{-3} osmol/kg 내지 약 400×10^{-3} osmol/kg (예컨대 약 50×10^{-3} osmol/kg 내지 약 390×10^{-3} osmol/kg, 약 60×10^{-3} osmol/kg 내지 약 380×10^{-3} osmol/kg, 약 70×10^{-3} osmol/kg 내지 약 370×10^{-3} osmol/kg, 약 80×10^{-3} osmol/kg 내지 약 360×10^{-3} osmol/kg, 약 90×10^{-3} osmol/kg 내지 약 350×10^{-3} osmol/kg, 약 100×10^{-3} osmol/kg 내지 약 340×10^{-3} osmol/kg, 약 120×10^{-3} osmol/kg 내지 약 330×10^{-3} osmol/kg, 약 140×10^{-3} osmol/kg 내지 약 320×10^{-3} osmol/kg, 약 160×10^{-3} osmol/kg 내지 약 310×10^{-3} osmol/kg, 약 180×10^{-3} osmol/kg 내지 약 300×10^{-3} osmol/kg, 또는 약 200×10^{-3} osmol/kg 내지 약 300×10^{-3} osmol/kg)의 범위로 결과시키는 농도로 존재한다.
- [0054] 제1 태양의 일 구현예에서(특히 상기 열거된 구현예 (1) 내지 (30) 중 임의의 것과 같은 제1 태양의 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째 또는 네 번째 하위 그룹의 일 구현예에서), 특히 버퍼 물질이 Tris 및 그의 양성자화 형태인 제1 태양의 구현예에서, 1가 음이온은 클로라이드, 아세테이트, 글리콜레이트 및 락테이트로 이루어진 군으로부터 선택되고, 1가 음이온의 농도(특히 모든 1가 음이온의 총 농도)는 조성물 내의 버퍼 물질의 농도와 기껏해야 동일하다. 예를 들어, 조성물 중 1가 음이온의 농도(특히 모든 1가 음이온의 총 농도)는 조성물 중 버퍼 물질의 농도보다 낮을 수 있다. 따라서, 조성물 중 버퍼 물질, 특히 Tris 및 그의 양성자화 형태의 농도가 최대 약 20 mM인 제1 태양의 구현예에서, 1가 음이온의 농도(특히 모든 1가 음이온의 총 농도)는 약 20 mM 이하, 예를 들어 20 mM 미만이다. 일반적으로, 조성물 중 클로라이드 및/또는 아세테이트와 같은 1가 음이온의 농도(특히 모든 1가 음이온의 총 농도)는 약 15 mM 미만, 예를 들어 약 14 mM 미만, 약 13 mM 미만, 약 12 mM 미만,

약 11 mM 미만, 약 10 mM 미만, 약 9 mM 미만, 약 8 mM 미만, 약 7 mM 미만, 약 6 mM 미만 또는 약 5 mM 미만 일 수 있다. 일 구현예에서, 조성물 중 클로라이드 농도는 상기 정의된 바와 같으며(예를 들어, 약 15 mM 미만 등), 조성물은 아세테이트를 포함하지 않는다. 대안적인 구현예에서, 조성물 내의 아세테이트 농도는 상기 정의된 바와 같으며(예를 들어, 약 15 mM 미만 등), 조성물은 클로라이드를 포함하지 않는다.

[0055] 제1 태양의 일 구현예에서(특히 상기 열거된 구현예 (1) 내지 (30) 중 임의의 것과 같은 제1 태양의 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째 또는 네 번째 하위 그룹의 일 구현예에서), 특히 버퍼 물질이 Tris 및 그의 양성자화 형태인 제1 태양의 구현예에서, 수성상 및/또는 조성물 중 나트륨 농도는 20 mM 미만, 예를 들어 약 15 mM 미만, 예를 들어 약 14 mM 미만, 약 13 mM 미만, 약 12 mM 미만, 약 11 mM 미만, 약 10 mM 미만, 약 9 mM 미만, 약 8 mM 미만, 약 7 mM 미만, 약 6 mM 미만, 또는 약 5 mM 미만이다.

[0056] 제1 태양의 일 구현예에서(특히 상기 열거된 구현예 (1) 내지 (30) 중 임의의 것과 같은 제1 태양의 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째 또는 네 번째 하위 그룹의 일 구현예에서), 특히 버퍼 물질이 Tris 및 그의 양성자화 형태인 제1 태양의 구현예에서, 1가 음이온은 MES, MOPS 및 HEPES의 음이온으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 조성물 중 1가 음이온의 농도(특히 모든 1가 음이온의 총 농도)는 조성물 중 버퍼 물질의 농도와 적어도 동일하다. 예를 들어, 조성물 내의 1가 음이온의 농도(특히 모든 1가 음이온의 총 농도)는 조성물 내의 버퍼 물질의 농도보다 높을 수 있다. 따라서, 조성물 중 버퍼 물질, 특히 Tris 및 그의 양성자화 형태의 농도가 최대 약 20 mM인 제1 태양의 구현예에서, 1가 음이온의 농도(특히 모든 1가 음이온의 총 농도)는 적어도 약 20 mM 이상, 예를 들어 20 mM 초과이다. 일반적으로, 조성물 내의 1가 음이온의 농도(특히 모든 1가 음이온의 총 농도)는 약 20 mM 초과, 예를 들어 약 21 mM 초과, 약 22 mM 초과, 약 23 mM 초과, 약 24 mM 초과, 약 25 mM 초과, 약 26 mM 초과, 약 27 mM 초과, 약 28 mM 초과, 약 29 mM 초과, 또는 약 30 mM 초과, 종기로는 최대 50 mM, 예를 들어 최대 45 mM, 최대 40 mM 또는 최대 35 mM이다.

[0057] 제1 태양의 일 구현예에서(특히 상기 열거된 구현예 (1) 내지 (30) 중 임의의 것과 같은 제1 태양의 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째 또는 네 번째 하위 그룹의 일 구현예에서), pH 조성물의 약 6.5 내지 약 8.0이다. 예를 들어, 조성물의 pH는 약 6.9 내지 약 7.9, 예컨대 약 7.0 내지 약 7.9, 약 7.1 내지 약 7.8, 약 7.2 내지 약 7.7, 약 7.3 내지 약 7.6, 약 7.4 내지 약 7.6, 또는 약 7.5일 수 있다.

[0058] 제1 태양의 일 구현예에서(특히 상기 열거된 구현예 (1) 내지 (30) 중 임의의 것과 같은 제1 태양의 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째 또는 네 번째 하위 그룹의 일 구현예에서), 조성물은 물을 주성분으로 포함하고/하거나 조성물에 함유된 물 이외의 용매(들)의 총량은 약 1.0%(v/v) 미만이다. 예를 들어, 조성물에 함유된 물의 양은 적어도 50% (w/w), 예컨대 적어도 적어도 55% (w/w), 적어도 60% (w/w), 적어도 65% (w/w), 적어도 70% (w/w), 적어도 75% (w/w), 적어도 80% (w/w), 적어도 85% (w/w), 적어도 90% (w/w), 또는 적어도 95% (w/w)이다. 특히, 조성물이 동결방지제를 포함하는 경우, 조성물에 함유된 물의 양은 적어도 50% (w/w), 예컨대 적어도 적어도 55% (w/w), 적어도 60% (w/w), 적어도 65% (w/w), 적어도 70% (w/w), 적어도 75% (w/w), 적어도 80% (w/w), 적어도 85% (w/w), 또는 적어도 90% (w/w)이다. 조성물에 동결방지제가 실질적으로 없는 경우, 조성물에 함유된 물의 양은 적어도 95%(w/w)일 수 있다. 추가로 또는 대안적으로, 조성물에 함유된 물 이외의 용매(들)의 총량은 약 1.0%(v/v) 미만, 예를 들어 약 0.9%(v/v) 미만, 약 0.8% 미만일 수 있다. (v/v), 약 0.7% 미만 (v/v), 약 0.6% 미만(v/v), 약 0.5% 미만(v/v), 약 0.4%(v/v) 미만, 약 0.3%(v/v) 미만, 약 0.2%(v/v) 미만, 약 0.1%(v/v) 미만, 약 0.05%(v/v) 미만 또는 약 0.01% 미만 (v/v)이다. 이와 관련하여, 정상적인 조건에서 액체인 동결방지제는 물 이외의 용매로 간주되지 않고 동결방지제로 간주된다. 즉, 조성물에 함유된 물 이외의 용매(들)의 총량이 약 1.0%(v/v) 미만일 수 있다는 상기 선택적 제한은 정상적인 조건에서 액체인 동결방지제에는 적용되지 않는다.

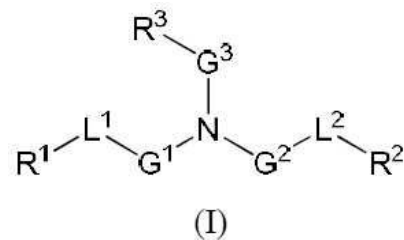
[0059] 제1 태양의 일 구현예에서(특히 상기 열거된 구현예 (1) 내지 (30) 중 임의의 것과 같은 제1 태양의 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째 또는 네 번째 하위 그룹의 일 구현예에서), 조성물의 삼투질농도(osmolarity)는 최대 약 400×10^{-3} osmol/kg, 예컨대 최대 약 390×10^{-3} osmol/kg, 최대 약 380×10^{-3} osmol/kg, 최대 약 370×10^{-3} osmol/kg, 최대 약 360×10^{-3} osmol/kg, 최대 약 350×10^{-3} osmol/kg, 최대 약 340×10^{-3} osmol/kg, 최대 약 330×10^{-3} osmol/kg, 최대 약 320×10^{-3} osmol/kg, 최대 약 310×10^{-3} osmol/kg, 또는 최대 약 300×10^{-3} osmol/kg이다. 조성물이 동결방지제를 포함하지 않는 경우, 조성물의 삼투질농도는 300×10^{-3} osmol/kg 미만, 예컨대 최대 약 250×10^{-3} osmol/kg, 최대 약 200×10^{-3} osmol/kg, 최대 약 150×10^{-3} osmol/kg, 최대 약 100×10^{-3} osmol/kg, 최대 약 50×10^{-3} osmol/kg, 최대 약 40×10^{-3} osmol/kg, 또는 최대 약 30×10^{-3} osmol/kg일

수 있다. 조성물이 동결방지제를 포함하는 경우, 조성물의 삼투질농도의 주요 부분이 동결방지제에 의해 제공되는 것이 바람직하다. 예를 들어, 동결방지제는 조성물 삼투질농도의 적어도 50%, 예컨대 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 또는 적어도 90%를 제공할 수 있다.

[0060] 제1 태양의 일 구현예에서(특히 상기 열거된 구현예 (1) 내지 (30) 중 임의의 것과 같은 제1 태양의 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째 또는 네 번째 하위 그룹의 일 구현예에서), 조성물 중 RNA의 농도는 약 5 mg/l 내지 약 150 mg/l이다. 예를 들어, 조성물 중 RNA의 농도는 약 10 mg/l 내지 약 140 mg/l, 예컨대 약 20 mg/l 내지 약 130 mg/l, 약 25 mg/l 내지 약 125 mg/l, 약 30 mg/l 내지 약 120 mg/l, 약 35 mg/l 내지 약 115 mg/l, 약 40 mg/l 내지 약 110 mg/l, 약 45 mg/l 내지 약 105 mg/l, 또는 약 50 mg/l 내지 약 100 mg/l일 수 있다.

[0061] 제1 태양의 일 구현예에서(특히 상기 열거된 구현예 (1) 내지 (30) 중 임의의 것과 같은 제1 태양의 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째 또는 네 번째 하위 그룹의 일 구현예에서), 버퍼 물질은 Tris 및 그의 양성자화 형태이고, 조성물의 pH는 약 6.5 내지 약 8.0이며, 조성물 중 RNA의 농도는 약 5 mg/l 내지 약 150 mg/l이다. 이 구현예에서, 조성물의 pH는 약 6.9 내지 약 7.9이고 조성물 중 RNA의 농도는 약 25 mg/l 내지 약 125 mg/l, 예컨대 약 30 mg/l 내지 약 120 mg/l인 것이 바람직하다. 청구된 조성물의 특히 바람직한 구현예에서, 버퍼 물질은 Tris 및 그의 양성자화 형태이고; 조성물의 pH는 약 6.9 내지 약 7.9이며; 조성물 중 RNA의 농도는 약 30 mg/l 내지 약 120 mg/l이고; 수성상은 실질적으로 무기 설페이트 음이온이 없고, 이염기성 유기산이 실질적으로 없으며, 다염기성 유기산이 실질적으로 없고; 조성물은 동결방지제를 포함한다. 청구된 조성물의 대안적인 특히 바람직한 구현예에서, 버퍼 물질은 Tris 및 그의 양성자화 형태이고; 조성물의 pH는 약 6.9 내지 약 7.9이며; 조성물 중 RNA의 농도는 약 30 mg/l 내지 약 120 mg/l이고; 수성상은 실질적으로 무기 설페이트 음이온이 없고, 이염기성 유기산이 실질적으로 없으며, 다염기성 유기산이 실질적으로 없고; 조성물에는 동결방지제가 실질적으로 없다.

[0062] 제1 태양의 일 구현예에서(특히 상기 열거된 구현예 (1) 내지 (30) 중 임의의 것과 같은 제1 태양의 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째 또는 네 번째 하위 그룹의 일 구현예에서), 양이온적으로 이온화가능한 지질은 생리학적 조건 하에서 양성자화될 수 있는 적어도 하나의 질소 원자를 포함하는 헤드 그룹을 포함한다. 예를 들어, 양이온적으로 이온화가능한 지질은 하기 화학식 (I)의 구조, 또는 약체학적으로 허용되는 그의 염, 호변이성질체, 전구약물 또는 입체이성질체를 가질 수 있다:

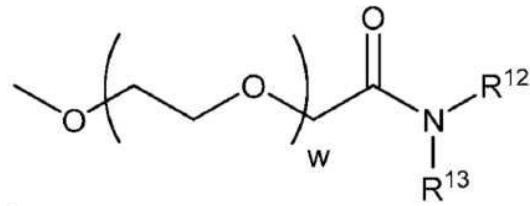


[0063] 식 중, L^1 , L^2 , G^1 , G^2 , G^3 , R^1 , R^2 , 및 R^3 은 본원에 정의된 바와 같다. 종기로는, 양이온적으로 이온화가능한 지질은 하기로부터 선택된다: 구조 I-1 내지 I-36(본원에 제시됨); 및/또는 구조 A 내지 F(본원에 제시됨); 및/또는 N,N-디메틸-2,3-디올레일옥시프로필아민(DODMA), 1,2-디올레오일-3-디메틸암모늄-프로판(DODAP), 헵타트리아콘타-6,9,28,31-테트라엔-19-일-4-(디메틸아미노)부타노에이트(DLin-MC3-DMA), 및 4-((디((9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디엔-1-일)아미노)옥시)-N,N-디메틸-4-옥소부탄-1-아민(DPL-14). 특히 바람직한 구현예에서, 양이온적으로 이온화가능한 지질은 구조 I-3을 갖는 지질이다.

[0065] 제1 태양의 일 구현예에서(특히 상기 열거된 구현예 (1) 내지 (30) 중 임의의 것과 같은 제1 태양의 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째 또는 네 번째 하위 그룹의 일 구현예에서), LNP는 하나 이상의 추가 지질을 추가로 포함한다. 종기로는, 하나 이상의 추가 지질은 폴리머 공액 지질, 중성 지질, 스테로이드 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 제1 태양의 바람직한 구현예에서(특히 상기 열거된 구현예 (1) 내지 (30) 중 임의의 것과 같은 제1 태양의 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째 또는 네 번째 하위 그룹의 일 구현예에서), LNP는 본원에 기술된 양이온적으로 이온화가능한 지질, 폴리머 공액 지질(예를 들어, 폐길화된 지질 또는 폴리사르코신-지질 공액체 또는 폴리사르코신과 지질 유사 물질의 공액체), 중성 지질(예를 들어, DSPC), 및 스테로이드(예를 들어, 콜레스테롤)을 포함한다.

[0066] LNP가 하나 이상의 추가 지질 중 하나로서 폴리머 공액 지질을 추가로 포함하는, 제1 태양의 일 구현예에서(특히 상기 열거된 구현예 (1) 내지 (30) 중 임의의 것과 같은 제1 태양의 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째 또는

네 번째 하위 그룹의 일 구현예에서), 폴리머 공액 지질은 폐길화된 지질이다. 예를 들어, 폐길화된 지질은 다음 구조를 갖거나, 또는 그의 약학적으로 허용되는 염, 호변이성질체 또는 입체이성질체일 수 있다:



[0067]

[0068]

식 중, R^{12} , R^{13} 및 w 는 본원에 정의된 바와 같다.

[0069]

LNP가 하나 이상의 추가 지질 중 하나로 폴리머 공액 지질을 추가로 포함하는 제1 태양의 일 구현예에서(특히 상기 열거된 구현예 (1) 내지 (30) 중 임의의 것과 같은 제1 태양의 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째 또는 네 번째 하위 그룹의 일 구현예에서), 폴리머 공액 지질은 폴리스아르코신-지질 공액체 또는 폴리스아르코신과 지질 유사 물질의 공액체이다. 예를 들어, 폴리스아르코신-지질 공액체 또는 폴리스아르코신과 지질 유사 물질의 공액체는 폴리스아르코신-디아실글리세롤 공액체, 폴리스아르코신- 디알킬옥시프로필 공액체, 폴리스아르코신-인지질 공액체, 폴리스아르코신-세라미드 공액체 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 구성원일 수 있다.

[0070]

LNP가 하나 이상의 추가 지질 중 하나로서 중성 지질을 추가로 포함하는 제1 태양의 일 구현예에서(특히 상기 열거된 구현예 (1) 내지 (30) 중 임의의 것과 같은 제1 태양의 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째 또는 네 번째 하위 그룹의 일 구현예에서), 중성 지질은 인지질이다. 그러한 인지질은 종기로는 포스파티딜콜린, 포스파티딜 에탄올아민, 포스파티딜글리세롤, 포스파티딘산, 포스파티딜세린 및 스펡고미엘린으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 인지질의 특정한 예에는 디스테아로일포스파티딜콜린(DSPC), 디올레오일포스파티딜콜린(DOPC), 디미리스토일포스파티딜콜린(DMPC), 디펜타데카노일포스파티딜콜린, 디라우로일포스파티딜콜린, 디팔미 토일포스파티딜콜린 (DPPC), 디아라키도일포스파티딜콜린(DAPC), 디베헤노일포스파티딜콜린(DBPC), 디트리코사노일포스파티딜콜린(DTPC), 디리그노세로일파티딜콜린 (DLPC), 팔미토일올레오일포스파티딜콜린(POPC), 1,2-디-0-옥타데세닐-sn-글리세로-3-포스포콜린(18:0 디에테르 PC), 1-올레오일-2-콜레스테릴헤미숙시노일-sn-글리세로-3-포스포콜린(OChemPC), 1-헥사데실-sn-글리세로-3-포스포콜린(C16 Lyso PC), 디올레오일포스파티딜 에탄올아민(DOPE), 디스테아로일-포스파티딜에탄올아민(DSPE), 디팔미토일-포스파티딜에탄올아민(DPPE), 디미리스토일-포스파티딜 에탄올아민(DMPE), 디라우로일- 포스파티딜 에탄올아민(DLPE), 및 디피타노일-포스파티딜에탄올아민(DPyPE)이 포함된다. 특히 바람직한 구현예에서, 중성 지질은 DSPC이다.

[0071]

LNP가 하나 이상의 추가 지질 중 하나로서 스테로이드를 추가로 포함하는 제1 태양의 일 구현예에서(특히 상기 열거된 구현예 (1) 내지 (30) 중 임의의 것과 같은 제1 태양의 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째 또는 네 번째 하위 그룹의 일 구현예에서), 스테로이드는 콜레스테롤과 같은 스테롤이다.

[0072]

제1 태양의 일 구현예에서(특히 상기 열거된 구현예 (1) 내지 (30) 중 임의의 것과 같은 제1 태양의 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째 또는 네 번째 하위 그룹의 일 구현예에서), 수성상은 킬레이트제를 포함하지 않는다.

[0073]

제1 태양의 일 구현예에서(특히 상기 열거된 구현예 (1) 내지 (30) 중 임의의 것과 같은 제1 태양의 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째 또는 네 번째 하위 그룹의 일 구현예에서), LNP는 조성물에 포함된 RNA의 약 75% 이상을 구성한다. 예를 들어, LNP는 조성물에 포함된 RNA의 적어도 약 76%, 예컨대 적어도 약 77%, 적어도 약 78%, 적어도 약 79%, 적어도 약 80%, 적어도 약 81%, 적어도 약 82%, 적어도 약 83%, 적어도 약 84%, 적어도 약 85%, 적어도 약 86%, 적어도 약 87%, 적어도 약 88%, 적어도 약 89%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 또는 적어도 약 95%를 구성한다.

[0074]

제1 태양의 일 구현예에서(특히 상기 열거된 구현예 (1) 내지 (30) 중 임의의 것과 같은 제1 태양의 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째 또는 네 번째 하위 그룹의 일 구현예에서), RNA(예컨대 mRNA)는 LNP 내에 캡슐화되거나 LNP와 결합된다.

[0075]

제1 태양의 일 구현예에서(특히 상기 열거된 구현예 (1) 내지 (30) 중 임의의 것과 같은 제1 태양의 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째 또는 네 번째 하위 그룹의 일 구현예에서), RNA(예컨대 mRNA)는 변형된 뉴클레오사이드를 우리딘 대신 포함한다. 예를 들어, 변형된 뉴클레오사이드는 슈도우리딘(ψ), N1-메틸-슈도우리딘($m1\psi$) 및 5-메틸-우리딘($m5U$)으로부터 선택될 수 있다.

- [0076] 제1 태양의 일 구현예에서(특히 상기 열거된 구현예 (1) 내지 (30) 중 임의의 것과 같은 제1 태양의 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째 또는 네 번째 하위 그룹의 일 구현예에서), RNA(예컨대 mRNA)는 다음 중 하나 이상을 포함한다: (a) cap1 또는 cap2 구조와 같은 5' 캡; (b) 5'UTR; (c) 3'UTR; 및 (d) 적어도 100개의 뉴클레오타이드를 포함하는 폴리-A 서열과 같은 폴리-A 서열, 여기서 폴리-A 서열은 종기로는 A 뉴클레오타이드의 중단된(interrupted) 서열이다.
- [0077] 제1 태양의 하나의 바람직한 구현예에서(특히 상기 열거된 구현예 (1) 내지 (30) 중 임의의 것과 같은 제1 태양의 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째 또는 네 번째 하위 그룹의 일 구현예에서), RNA(예컨대 mRNA)는 하나 이상의 폴리펩타이드를 인코딩한다. 예를 들어, 하나 이상의 폴리펩타이드는 대상에서 항원에 대한 면역 반응을 유도하기 위한 에피토프를 포함할 수 있다. 바람직한 구현예에서, RNA(예컨대 mRNA)는 SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 면역원성 변이체 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 면역원성 단편 또는 그의 면역원성 변이체를 포함하는 아미노산 서열을 인코딩하는 오픈 리딩 프레임(ORF)을 포함한다. 제1 태양의 일 구현예에서(특히 상기 열거된 구현예 (1) 내지 (30) 중 임의의 것과 같은 제1 태양의 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째 또는 네 번째 하위 그룹의 일 구현예에서), RNA(예컨대 mRNA)는 SEQ ID NO: 1의 위치 986 및 987에서 프롤린 잔기 치환을 갖는 전장 SARS-CoV2 S 단백질 변이체를 인코딩하는 ORF를 포함한다. 예를 들어, SARS-CoV2 S 단백질 변이체는 SEQ ID NO: 7에 대해 적어도 80% 동일성을 가질 수 있다.
- [0078] 제1 태양의 하나의 바람직한 구현예에서(특히 상기 열거된 구현예 (1) 내지 (30) 중 임의의 것과 같은 제1 태양의 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째 또는 네 번째 하위 그룹의 일 구현예에서), 조성물은 냉동된 형태이다. 종기로는, 예컨대 냉동된 조성물을 해동한 후 RNA 무결성은 -20℃에 보관된 냉동 조성물을 해동한 후 적어도 50%, 예컨대 적어도 52%, 적어도 54%, 적어도 55%, 적어도 56%, 적어도 58%, 또는 적어도 60%이다. 추가로 또는 대안적으로, 냉동된 조성물을 해동한 후 LNP의 크기($Z_{평균}$)(및/또는 크기 분포 및/또는 다분산 지수(PDI))는 조성물이 냉동되기 전의 LNP의 크기($Z_{평균}$)(및/또는 크기 분포 및/또는 PDI)와 동일하다. 일 구현예에서, 냉동된 조성물을 해동한 후 LNP의 크기($Z_{평균}$)는 약 50 nm 내지 약 500 nm, 종기로는 약 40 nm 내지 약 200 nm, 더욱 종기로는 약 40 nm 내지 약 120 nm이다. 일 구현예에서, 냉동된 조성물을 해동한 후 LNP의 PDI는 0.3 미만, 종기로는 0.2 미만, 더욱 종기로는 0.1 미만이다. 일 구현예에서, 냉동된 조성물을 해동한 후 LNP의 크기($Z_{평균}$)는 약 50 nm 내지 약 500 nm, 종기로는 약 40 nm 내지 약 200 nm, 더욱 종기로는 약 40 nm 및 약 120 nm이고, 냉동된 조성물을 해동한 후 LNP의 크기($Z_{평균}$)(및/또는 크기 분포 및/또는 PDI)는 냉동 전 LNP의 크기($Z_{평균}$)(및/또는 크기 분포 및 /또는 PDI)와 동일하다. 일 구현예에서, 냉동된 조성물을 해동한 후 LNP의 크기($Z_{평균}$)는 약 50 nm 내지 약 500 nm, 종기로는 약 40 nm 내지 약 200 nm, 더욱 종기로는 약 40 nm 및 약 120 nm이고, 냉동된 조성물의 해동 후 LNP의 PDI는 0.3 미만(종기로는 0.2 미만, 더욱 종기로는 0.1 미만)이다.
- [0079] 제1 태양의 하나의 대안적인 바람직한 구현예에서(특히 상기 열거된 구현예 (1) 내지 (30) 중 임의의 것과 같은 제1 태양의 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째 또는 네 번째 하위 그룹의 일 구현예에서), 조성물은 액체 형태이다. 종기로는, 액체 조성물의 RNA 무결성은 예를 들어 적어도 1주 동안 0℃ 이상에서 보관될 때 원하는 효과, 예를 들어 면역 반응을 유도하기에 충분하다. 예를 들어, 액체 조성물의 RNA 무결성은, 예를 들어, 적어도 1주 동안 0℃ 이상에서 보관될 때, 적어도 50%, 예컨대 적어도 52%, 적어도 54%, 적어도 55%, 적어도 56%, 적어도 58%, 또는 적어도 60%일 수 있다. 추가로 또는 대안적으로, 액체 조성물의 LNP의 크기($Z_{평균}$)(및/또는 크기 분포 및/또는 다분산도 지수(PDI))는 예를 들어 0℃ 이상에서 적어도 1주일 동안 보관시, 예를 들어, 면역 반응을 유도하는 것과 같은 원하는 효과를 생성하기에 충분하다. 예를 들어, 액체 조성물의 LNP의 크기($Z_{평균}$)(및/또는 크기 분포 및/또는 다분산 지수(PDI))는, 예를 들어, 적어도 1주 동안 0℃ 이상에서 보관 될 때, 초기 조성물, 즉 보관 전 LNP의 크기($Z_{평균}$)(및/또는 크기 분포 및/또는 PDI)와 동일하다. 일 구현예에서, 액체 조성물의 보관 후, 예를 들어 0℃ 이상에서 적어도 1주 동안 LNP의 크기($Z_{평균}$)는 약 50 nm 내지 약 500 nm, 종기로는 약 40 nm 내지 약 200 nm, 더욱 종기로는 약 40 nm 및 약 120 nm이다. 일 구현예에서, 액체 조성물의 보관 후, 예를 들어 0℃ 이상에서 적어도 1주 동안 보관 후, LNP의 PDI는 0.3 미만, 종기로는 0.2 미만, 더욱 종기로는 0.1 미만이다. 일 구현예에서, 예를 들어 적어도 1주 동안 0℃ 이상에서 액체 조성물의 보관 후 LNP의 크기($Z_{평균}$)는 약 50 nm 내지 약 500 nm, 종기로는 약 40 nm 내지 약 200 nm, 더욱 종기로는 약 40 nm 내지 약 120 nm이고, 액체 조성물의 보관 후, 예를 들어 적어도 1주 동안 0℃ 이상에서 보관 후 LNP의 크기($Z_{평균}$)(및/또는 크기 분포 및/또

는 PDI)는 보관 전 LNP의 크기($Z_{평균}$)(및/또는 크기 분포 및/또는 PDI)와 동일하다. 일 구현예에서, 예를 들어 적어도 1주 동안 0℃ 이상에서 액체 조성물의 보관 후 LNP의 크기($Z_{평균}$)는 약 50 nm 내지 약 500 nm, 종기로는 약 40 nm 내지 약 200 nm, 더욱 종기로는 약 40 nm 및 약 120 nm이고, 액체 조성물의 보관 후, 예를 들어 적어도 1주 동안 0℃ 이상에서 LNP의 PDI는 0.3 미만(종기로는 0.2 미만, 더 종기로는 0.1 미만)이다.

- [0080] 제2 태양에서, 본 발명은 최종 수성상에 분산된 LNP를 포함하는 조성물을 제조하는 방법을 제공하며, 여기서, LNP는 양이온적으로 이온화가능한 지질 및 RNA를 포함하고; 최종 수성상은 최종 1가 음이온 및 최종 버퍼 물질을 포함하는 버퍼 시스템을 포함하며, 최종 버퍼 물질은 Tris 및 그의 양성자화 형태, Bis-Tris-메탄 및 그의 양성자화 형태, 및 TEA 및 그의 양성자로 이루어진 군으로부터 선택되고, 최종 1가 음이온은 클로라이드, 아세테이트, 글리콜레이트, 락테이트, MES의 음이온, MOPS의 음이온 및 HEPES의 음이온으로 이루어진 군으로부터 선택되며; 조성물 중 최종 버퍼 물질의 농도는 최대 약 25 mM이고; 최종 수성상은 실질적으로 무기 포스페이트 음이온이 없고, 시트레이트 음이온이 실질적으로 없으며, EDTA의 음이온이 실질적으로 없다; 여기서 상기 방법은:
- [0081] (I) 최종 수성상에 분산된 LNP를 포함하는 제형을 준비하는 단계로서, 상기 LNP는 양이온적으로 이온화가능한 지질 및 RNA를 포함하는 단계; 및
- [0082] (II) 선택적으로 제형을 약 -10℃ 이하로 냉동시키는 단계
- [0083] 를포함함으로써 조성물을 얻고,
- [0084] 여기서 단계(I)는
- [0085] (a) 물과 1차 버퍼 시스템을 포함하는 RNA 용액을 준비하는 단계;
- [0086] (b) 양이온적으로 이온화가능한 지질 및 존재하는 경우 하나 이상의 추가 지질을 포함하는 에탄올 용액을 제조하는 단계;
- [0087] (c) (a)에서 제조된 RNA 용액을 (b)에서 제조된 에탄올 용액과 혼합하여 제1 버퍼 시스템을 포함하는 중간 수성상에 분산된 LNP를 포함하는 중간 제형을 제조하는 단계; 및
- [0088] (d) 최종 버퍼 시스템을 포함하는 최종 버퍼 수용액을 사용하여 (c)에서 제조된 제1 중간 제형을 여과하는 단계를 포함하며, 이에 의해 최종 수성상에 분산된 LNP를 포함하는 제형이 제조된다.
- [0089]
- [0090] 본 출원에서 입증된 바와 같이, LNP를 포함하는 조성물에서 PBS 대신에 상기 명시된 버퍼 물질, 특히 Tris 및 그의 양성자화 형태에 기초한 특정 버퍼 시스템을 사용하는 것은 매우 안정한 접힌 형태의 RNA의 형성을 억제한다. 또한, 본 출원은 놀랍게도 LNP 및 버퍼 시스템을 포함하는 조성물(여기서 LNP는 양이온적으로 이온화가능한 지질 및 RNA를 포함함)에서 버퍼 물질의 농도를 단순히 낮추는 것에 의해, 50 mM의 농도로 동일한 버퍼 물질을 포함하는 조성물에 비해, 냉동/해동 사이클 후 RNA 무결성이 개선된 LNP RNA 조성물을 얻을 수 있음을 입증한다. 따라서, 청구된 방법에 의해 제조된 조성물은 개선된 안정성을 제공하고, 약제학적 실무상 정규 기술을 준수하는 온도 범위에서 보관될 수 있으며, 즉시 사용가능한 제제를 제공한다.
- [0091] 제2 태양의 특히 바람직한 구현예에서, 최종 버퍼 물질은 Tris 및 그의 양성자화 형태, 즉 Tris와 그의 양성자화 형태의 혼합물이다.
- [0092] 제2 태양의 일 구현예에서, 최종 1가 음이온은 클로라이드, 아세테이트, 글리콜레이트, 락테이트, 모르폴리노에탄설포네이트 및 3-(N-모르폴리노)프로판설포네이트로 이루어진 군으로부터, 또는 클로라이드, 아세테이트, 글리콜레이트, 락테이트, 모르폴리노에탄설포네이트, 및 2-[4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-일] 에탄설포네이트로 이루어진 군으로부터, 종기로는 클로라이드, 아세테이트, 락테이트 및 모르폴리노에탄설포네이트로 이루어진 군으로부터, 더욱 종기로는 클로라이드, 아세테이트, 및 모르폴리노에탄설포네이트로 이루어진 군으로부터, 또는 클로라이드, 아세테이트 및 락테이트, 예컨대 클로라이드 또는 아세테이트로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0093] 일 구현예에서, 최종 버퍼 물질은 Tris 및 그의 양성자화 형태이고 최종 1가 음이온은 클로라이드, 아세테이트, 글리콜레이트, 락테이트, 모르폴리노에탄설포네이트 및 3-(N-모르폴리노)프로판설포네이트로 이루어진 군으로부터, 또는 클로라이드, 아세테이트, 글리콜레이트, 락테이트, 모르폴리노에탄설포네이트 및 2-[4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-일] 에탄설포네이트로 이루어진 군으로부터, 종기로는 클로라이드, 아세테이트, 락테이트 및 모르폴리노에탄설포네이트로 이루어진 군으로부터, 더욱 종기로는 클로라이드, 아세테이트, 락테이트 및 모르폴리노에탄설포네이트로 이루어진 군으로부터, 더욱 종기로는 클로라이드, 아세테이트 및 모르폴리노에탄설포네이트

트로 이루어진 군으로부터, 예컨대 클로라이드 또는 아세테이트로 이루어진 군으로부터 선택된다.

- [0094] 일 구현예에서, 특히 냉동된 형태로 조성물을 제조하는 것이 바람직한 경우, 제2 태양의 방법은 (II) 제형을 약 10℃ 이하로 냉동시키는 것을 포함한다. 따라서, 이 구현예에서, 제2 태양의 방법을 수행하면 냉동된 형태의 조성물이 생성된다.
- [0095] 대안적인 구현예에서, 특히 액체 형태의 조성물을 제조하는 것이 요망되는 경우, 제2 태양의 방법은 단계 (II)를 포함하지 않는다. 따라서, 이 구현예에서, 제2 태양의 방법을 수행하면 액체 형태의 조성물이 생성된다.
- [0096] 제2 태양의 일 구현예에서, 단계 (I)은 단계 (c) 후에 접선 흐름 여과(tangential flow filtrating) 및 정용여과(diafiltrating)와 같은 회석 및 여과로부터 선택되는 하나 이상의 단계를 추가로 포함한다. 예를 들어, 회석 단계는 회석 용액을 중간 제형에 첨가하는 것을 포함할 수 있다. 이러한 회석 용액은 하나 이상의 추가 화합물 및 선택적으로 최종 버퍼 시스템을 포함할 수 있으며, 여기서 하나 이상의 추가 화합물은 동결방지제를 포함할 수 있다. 하나 이상의 여과 단계(단계 (d), (f'), (g') 및 (h')) 포함)는 원하지 않는 화합물(예컨대 에탄올 및/또는 하나 이상의 이염기성 및/또는 또는 다염기성 유기산)을 중간 제형으로부터 제거하고/제거하거나 중간 제형의 RNA 농도를 증가시키고/증가시키거나 중간 제형의 pH 및/또는 버퍼 시스템을 변화시키기 위해 사용될 수 있다. 이를 위해, 원치 않는 화합물을 함유하지 않는(불필요한 화합물이 중간 제형으로부터 세척되어 버퍼 수용액으로 들어가도록) 버퍼 수용액 및/또는 버퍼 수용액에 비해 고장성인 (물이 중간 제형으로부터 버퍼 수용액으로 흐르도록) 버퍼 수용액 및/또는 중간 제형의 pH 및/또는 버퍼 시스템 이외의 pH 및/또는 버퍼 시스템을 갖는 버퍼 수용액을 사용할 수 있다.
- [0097] 제2 태양의 바람직한 구현예에서, 단계(I)는 다음을 포함한다:
- [0098] (a') RNA 수용액을 제공하는 단계;
- [0099] (b') 제1 버퍼 시스템을 포함하는 제1 버퍼 수용액을 제공하는 단계;
- [0100] (c') (a')에서 제공된 RNA 수용액과 (b')에 제공된 제1 버퍼 수용액을 혼합하여 물 및 제1 버퍼 시스템을 포함하는 RNA 용액을 제조하는 단계;
- [0101] (d') 양이온적으로 이온화가능한 지질 및 존재하는 경우 하나 이상의 추가 지질을 포함하는 에탄올 용액을 제조하는 단계;
- [0102] (e') (c')에서 제조된 RNA 용액을 (d')에서 제조된 에탄올 용액과 혼합하여, 제1 버퍼 시스템을 포함하는 제1 수성상에 분산된 LNP를 포함하는 제1 중간 제형을 제조하는 단계;
- [0103] (f') 선택적으로, 추가 버퍼 시스템을 포함하는 추가 버퍼 수용액을 사용하여 (e')에서 제조된 제1 중간 제형을 여과함으로써, 추가 버퍼 시스템을 포함하는 추가 수성상에 분산된 LNP를 포함하는 추가 중간 제형을 제조하는 단계로서, 여기서 추가 버퍼 수용액은 제1 버퍼 수용액과 동일하거나 상이할 수 있는 단계;
- [0104] (g') 선택적으로, 단계 (f')를 1회 또는 2회 이상 반복하는 단계로서, 여기서 1 사이클의 단계 (f') 후에 수득된 추가 버퍼 시스템을 포함하는 추가 수성상에 분산된 LNP를 포함하는 추가 중간 제형이 다음 사이클의 제1 중간 제형으로서 사용되고, 여기서 각 사이클에서 추가 버퍼 수용액은 제1 버퍼 수용액과 동일하거나 상이할 수 있는 것인 단계;
- [0105] (h') 최종 버퍼 시스템을 포함하고, pH가 적어도 6.0인 최종 버퍼 수용액을 이용하여, 단계 (f')가 없는 경우 단계 (e')에서 얻은 제1 중간 제형을 여과하거나, 또는 단계 (f')가 존재하고 단계 (g')가 존재하지 않을 경우, 단계 (f')에서 얻은 추가 중간 제형을 여과하거나, 또는 단계 (f') 및 (g')가 존재하는 경우, 단계 (g')에서 얻은 추가 중간 제형을 여과하는 단계;
- [0106] (i') 선택적으로, 단계 (h')에서 얻은 제형을 회석 용액으로 회석하는 단계
- [0107] 를 포함함으로써, 최종 수성상에 분산된 LNP를 포함하는 제형을 제조한다.
- [0108] 제2 태양의 일 구현예에서, 조성물 중 최종 버퍼 물질의 농도, 특히 Tris 및 그의 양성자화 형태의 총 농도는 최대 약 20 mM, 예컨대 최대 약 19 mM, 최대 약 18 mM이다. mM, 최대 약 17 mM, 최대 약 16 mM, 최대 약 15 mM, 최대 약 14 mM, 최대 약 13 mM, 최대 약 12 mM, 최대 약 11 mM, 또는 최대 약 10 mM이다. 일 구현예에서, 조성물 중 최종 버퍼 물질, 특히 Tris 및 그의 양성자화 형태의 하한은 적어도 약 1 mM, 종기로는 적어도 약 2 mM, such as 적어도 약 3 mM, 적어도 약 4 mM, 적어도 약 5 mM, 적어도 약 6 mM, 적어도 약 7 mM, 적어도 약 8

mM, 또는 적어도 약 9 mM이다. 예를 들어, 조성물 중 최종 버퍼 물질의 농도, 특히 Tris 및 그의 양성자화 형태의 총 농도는 약 1 mM 내지 약 20 mM, 예컨대 약 2 mM 내지 약 15 mM, 약 5 mM 내지 약 14 mM, 약 7 mM 내지 약 13 mM, 약 8 mM 내지 약 12 mM, 약 9 mM 내지 약 11 mM, 예컨대 약 10 mM이다.

[0109] 제2 태양의 일 구현예에서, 최종 수성상에는 무기 설페이트 음이온 및/또는 카보네이트 음이온 및/또는 이염기성 유기산 음이온 및/또는 다염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없다. 제2 태양의 첫 번째 하위 그룹에서 이러한 기준 중 적어도 하나가 적용된다. 예를 들어, 제2 태양의 이러한 첫 번째 하위 그룹의 일 구현예에서, 최종 수성상에는 무기 설페이트 음이온이 실질적으로 없다. 제2 태양의 이러한 첫 번째 하위 그룹의 추가 구현예에서, 최종 수성상에는 카보네이트 음이온이 실질적으로 없다. 제2 태양의 이러한 첫 번째 하위 그룹의 추가 구현예에서, 최종 수성상에는 이염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없다. 제2 태양의 이러한 첫 번째 하위 그룹의 추가 구현예에서, 최종 수성상에는 실질적으로 다염기성 유기산 음이온이 없다.

[0110] 제2 태양의 두 번째 하위 그룹에서 위의 기준 중 적어도 두 가지가 적용된다. 예를 들어, 제2 태양의 이러한 두 번째 하위 그룹의 일 구현예에서, 최종 수성상은 실질적으로 무기 설페이트 음이온이 없고 카보네이트 음이온이 실질적으로 없다. 제2 태양의 이러한 두 번째 하위 그룹의 추가 구현예에서, 최종 수성상은 무기 설페이트 음이온이 실질적으로 없고 이염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없다. 제2 태양의 이러한 두 번째 하위 그룹의 추가 구현예에서, 최종 수성상은 무기 설페이트 음이온이 실질적으로 없고 다염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없다. 제2 태양의 이러한 두 번째 하위 그룹의 추가 구현예에서, 최종 수성상은 카보네이트 음이온이 실질적으로 없고 이염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없다. 제2 태양의 이러한 두 번째 하위 그룹의 추가 구현예에서, 최종 수성상은 실질적으로 이염기성 유기산 음이온이 없고 다염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없다.

[0111] 제2 태양의 세 번째 하위 그룹에서는 위의 기준 중 적어도 세 가지가 적용된다. 예를 들어, 제2 태양의 세 번째 하위 그룹의 일 구현예에서, 최종 수성상은 무기 설페이트 음이온이 실질적으로 없고, 카보네이트 음이온이 실질적으로 없고, 이염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없다. 제2 태양의 이러한 세 번째 하위 그룹의 추가 구현예에서, 최종 수성상은 무기 설페이트 음이온이 실질적으로 없고, 카보네이트 음이온이 실질적으로 없으며, 다염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없다. 제2 태양의 이 세 번째 하위 그룹의 추가 구현예에서, 최종 수성상은 무기 설페이트 음이온이 실질적으로 없고, 이염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없고, 다염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없다. 제2 태양의 이러한 세 번째 하위 그룹의 추가 구현예에서, 최종 수성상은 카보네이트 음이온이 실질적으로 없고, 이염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없고, 다염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없다.

[0112] 제2 태양의 네 번째 하위 그룹에서는 위의 기준 중 적어도 네 가지가 적용된다. 즉, 제2 태양의 이 네 번째 하위 그룹에서, 최종 수성상은 무기 설페이트 음이온이 실질적으로 없고, 카보네이트 음이온이 실질적으로 없고, 이염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없고, 다염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없다.

[0113] 제2 태양의 일 구현예(특히 상기 제2 태양의 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째 또는 네 번째 하위 그룹의 일 구현예)에서, 단계 (I)에서 얻은 제형 및/또는 조성물은 동결방지제를 포함한다.. 제2 태양의 대안적 구현예(특히 제2 태양의 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째 또는 네 번째 하위 그룹의 일 구현예에서)에서, 단계(I)에서 얻어진 제형 및/또는 조성물은 실질적으로 동결방지제가 없다. 따라서, 이들 구현예의 특정 예는 다음과 같다:

[0114] (1) 최종 수성상에는 무기 설페이트 음이온이 실질적으로 없으며, 단계 (I)에서 얻은 제형 및/또는 조성물은 동결방지제를 포함한다;

[0115] (2) 최종 수성상에는 카보네이트 음이온이 실질적으로 없으며, 단계 (I)에서 얻은 제형 및/또는 조성물은 동결방지제를 포함한다;

[0116] (3) 최종 수성상은 이염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없으며, 단계 (I)에서 얻은 제형 및/또는 조성물은 동결방지제를 포함한다.

[0117] (4) 최종 수성상에는 다염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없으며, 단계 (I)에서 얻은 제형 및/또는 조성물은 동결방지제를 포함한다;

[0118] (5) 최종 수성상은 실질적으로 무기 설페이트 음이온이 없고 카보네이트 음이온이 실질적으로 없으며, 단계 (I)에서 얻은 제형 및/또는 조성물은 동결방지제를 포함한다;

- [0119] (6) 최종 수성상은 무기 설페이트 음이온이 실질적으로 없고 이염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없으며, 단계 (I)에서 얻은 제형 및/또는 조성물은 동결방지제를 포함한다;
- [0120] (7) 최종 수성상은 무기 설페이트 음이온이 실질적으로 없고 다염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없으며, 단계 (I)에서 얻은 제형 및/또는 조성물은 동결방지제를 포함한다;
- [0121] (8) 최종 수성상은 카보네이트 음이온이 실질적으로 없고 이염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없으며, 단계 (I)에서 얻은 제형 및/또는 조성물은 동결방지제를 포함한다;
- [0122] (9) 최종 수성상은 카보네이트 음이온이 실질적으로 없고 다염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없으며, 단계 (I)에서 얻은 제형 및/또는 조성물은 동결방지제를 포함한다;
- [0123] (10) 최종 수성상은 이염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없고 다염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없으며, 단계 (I)에서 얻은 제형 및/또는 조성물은 동결방지제를 포함하고;
- [0124] (11) 최종 수성상은 무기 설페이트 음이온이 실질적으로 없고, 카보네이트 음이온이 실질적으로 없고 이염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없으며, 단계 (I)에서 얻은 제형 및/또는 조성물은 동결방지제를 포함한다;
- [0125] (12) 최종 수성상은 무기 설페이트 음이온이 실질적으로 없고, 카보네이트 음이온이 실질적으로 없으며 다염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없고, 단계 (I)에서 얻은 제형 및/또는 조성물은 동결방지제를 포함한다;
- [0126] (13) 최종 수성상은 무기 설페이트 음이온이 실질적으로 없고, 이염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없으며, 다염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없고, 단계 (I)에서 얻은 제형 및/또는 조성물은 동결방지제;
- [0127] (14) 최종 수성상은 카보네이트 음이온이 실질적으로 없고, 이염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없으며, 다염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없고, 단계 (I)에서 얻은 제형 및/또는 조성물은 동결방지제를 포함한다.;
- [0128] (15) 최종 수성상은 무기 설페이트 음이온이 실질적으로 없고, 카보네이트 음이온이 실질적으로 없으며, 이염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없고 다염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없으며, 단계 (I)에서 얻은 제형 및/또는 조성물은 동결방지제를 포함한다;
- [0129] (16) 최종 수성상에는 무기 설페이트 음이온이 실질적으로 없고, 단계 (I)에서 얻은 제형 및/또는 조성물에는 동결방지제가 실질적으로 없다;
- [0130] (17) 최종 수성상에는 카보네이트 음이온이 실질적으로 없으며, 단계 (I)에서 얻은 제형 및/또는 조성물에는 동결방지제가 실질적으로 없다;
- [0131] (18) 최종 수성상은 이염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없고, 및 단계 (I)에서 얻은 제형 및/또는 조성물에는 동결방지제가 실질적으로 없다;
- [0132] (19) 최종 수성상에는 다염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없으며, 단계 (I)에서 얻은 제형 및/또는 조성물에는 동결방지제가 실질적으로 없다;
- [0133] (20) 최종 수성상에는 무기 설페이트 음이온이 실질적으로 없고 카보네이트 음이온이 실질적으로 없으며, 단계 (I)에서 얻은 제형 및/또는 조성물에는 동결방지제가 실질적으로 없다;
- [0134] (21) 최종 수성상에는 무기 설페이트 음이온이 실질적으로 없고 이염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없으며, 단계 (I)에서 얻은 제형 및/또는 조성물에는 동결방지제가 실질적으로 없다;
- [0135] (22) 최종 수성상에는 무기 설페이트 음이온이 실질적으로 없고 다염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없으며, 단계 (I)에서 얻은 제형 및/또는 조성물에는 동결방지제가 실질적으로 없다;
- [0136] (23) 최종 수성상에는 카보네이트 음이온이 실질적으로 없고 이염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없으며, 단계 (I)에서 얻은 제형 및/또는 조성물에는 동결방지제가 실질적으로 없다;
- [0137] (24) 최종 수성상은 카보네이트 음이온이 실질적으로 없고 다염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없으며, 단계 (I)에서 얻은 제형 및/또는 조성물은 동결방지제가 실질적으로 없다;
- [0138] (25) 최종 수성상에는 실질적으로 이염기성 유기산 음이온이 없고 다염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없으며, 단계 (I)에서 얻은 제형 및/또는 조성물에는 동결방지제가 실질적으로 없다;
- [0139] (26) 최종 수성상은 무기 설페이트 음이온이 실질적으로 없고, 카보네이트 음이온이 실질적으로 없으며, 이염기

성 유기산 음이온이 실질적으로 없고, 단계 (I)에서 얻은 제형 및/또는 조성물에는 동결방지제가 실질적으로 없다;

[0140] (27) 최종 수성상은 무기 설페이트 음이온이 실질적으로 없고, 카보네이트 음이온이 실질적으로 없으며, 다염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없고, 단계 (I)에서 얻은 제형 및/또는 조성물은 동결방지제가 실질적으로 없다;

[0141] (28) 최종 수성상은 무기 설페이트 음이온이 실질적으로 없고, 이염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없으며, 다염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없고, 단계 (I)에서 얻은 제형 및/또는 조성물은 동결방지제가 실질적으로 없다;

[0142] (29) 최종 수성상은 카보네이트 음이온이 실질적으로 없고, 이염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없으며, 다염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없고, 단계 (I)에서 얻은 제형 및/또는 조성물은 동결방지제가 실질적으로 없다;

[0143] (30) 최종 수성상은 무기 설페이트 음이온이 실질적으로 없고, 카보네이트 음이온이 실질적으로 없으며, 이염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없고 다염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없으며, 단계 (I)에서 얻은 제형 및/또는 조성물은 동결방지제가 실질적으로 없다.

[0144] 단계 (I)에서 얻은 제형 및/또는 조성물이 동결방지제를 포함하는, 제2 태양의 일 구현예에서(특히 상기 열거된 구현예 (1) 내지 (30) 중 임의의 것과 같은 제2 태양의 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째 또는 네 번째 하위 그룹의 일 구현예에서), 상기 동결방지제는 탄수화물 및 당 알코올로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 화합물을 포함한다. 예를 들어, 동결방지제는 수크로스, 글루코스, 글리세롤, 소르비톨 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다. 제2 태양의 바람직한 구현예에서(특히 상기 열거된 구현예 (1) 내지 (30) 중 임의의 것과 같은 제2 태양의 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째 또는 네 번째 하위 그룹의 일 구현예에서), 단계 (I)에서 얻은 제형 및/또는 조성물은 동결방지제로서 수크로스 및/또는 글리세롤을 포함한다.

[0145] 단계 (I)에서 얻은 제형 및/또는 조성물이 동결방지제를 포함하는, 제2 태양의 일 구현예에서(특히 상기 열거된 구현예 (1) 내지 (30) 중 임의의 것과 같은 제2 태양의 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째 또는 네 번째 하위 그룹의 일 구현예에서), 제형 및/또는 조성물 중 동결방지제의 농도는 적어도 1% w/v, 예컨대 적어도 2% w/v, 적어도 3% w/v, 적어도 4% w/v, 적어도 5% w/v, 적어도 6% w/v, 적어도 7% w/v, 적어도 8% w/v 또는 적어도 9% w/v이다. 일 구현예에서, 제형 및/또는 조성물 중 동결방지제의 농도는 최대 25% w/v, 예컨대 최대 20% w/v, 최대 19% w/v, 최대 18% w/v, 최대 17% w/v, 최대 16% w/v, 최대 15% w/v, 최대 14% w/v, 최대 13% w/v, 최대 12% w/v, 또는 최대 11% w/v이다. 일 구현예에서, 제형 및/또는 조성물 중 동결방지제의 농도는 1% w/v 내지 20% w/v, 예컨대 2% w/v 내지 19% w/v, 3% w/v 내지 18% w/v, 4% w/v 내지 17% w/v, 5% w/v 내지 16% w/v, 5% w/v 내지 15% w/v, 6% w/v 내지 14% w/v, 7% w/v 내지 13% w/v, 8% w/v 내지 12% w/v, 9% w/v 내지 11% w/v, 또는 약 10% w/v이다. 제2 태양의 일 구현예에서(특히 상기 열거된 구현예 (1) 내지 (30) 중 임의의 것과 같은 제2 태양의 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째 또는 네 번째 하위 그룹의 일 구현예에서), 제형 및/또는 조성물은 동결방지제(특히, 수크로스 및/또는 글리세롤)를, 5% w/v 내지 15% w/v, 예컨대 6% w/v 내지 14% w/v, 7% w/v 내지 13% w/v, 8% w/v 내지 12% w/v, 또는 9% w/v 내지 11% w/v, 또는 약 10% w/v의 농도로 포함한다. 예를 들어, 제2 태양의 방법은 희석 용액을 사용하는 희석 단계를 포함할 수 있고, 여기서 희석 용액은 단계 (I)에서 수득된 제형 및/또는 조성물에서 동결방지제의 상기 농도를 달성하는데 충분한 양의 동결방지제를 포함한다.

[0146] 제2 태양의 일 구현예에서(특히 상기 열거된 구현예 (1) 내지 (30) 중 임의의 것과 같은 제2 태양의 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째 또는 네 번째 하위 그룹의 일 구현예에서), 단계 (I)에서 얻은 제형 및/또는 조성물은 동결방지제를 포함하고, 동결방지제는 제형/조성물의 총 중량을 기준으로 약 50×10^{-3} osmol/kg 내지 약 400×10^{-3} osmol/kg (예컨대 약 50×10^{-3} osmol/kg 내지 약 390×10^{-3} osmol/kg, 약 60×10^{-3} osmol/kg 내지 약 380×10^{-3} osmol/kg, 약 70×10^{-3} osmol/kg 내지 약 370×10^{-3} osmol/kg, 약 80×10^{-3} osmol/kg 내지 약 360×10^{-3} osmol/kg, 약 90×10^{-3} osmol/kg 내지 약 350×10^{-3} osmol/kg, 약 100×10^{-3} osmol/kg 내지 약 340×10^{-3} osmol/kg, 약 120×10^{-3} osmol/kg 내지 약 330×10^{-3} osmol/kg, 약 140×10^{-3} osmol/kg 내지 약 320×10^{-3} osmol/kg, 약 160×10^{-3} osmol/kg 내지 약 310×10^{-3} osmol/kg, 약 180×10^{-3} osmol/kg 내지 약 300×10^{-3} osmol/kg, 또는 약 200×10^{-3} osmol/kg 내지 약 300×10^{-3} osmol/kg)의 범위로 조성물의 삼투질농도를 초

래하는 농도로 존재한다. 예를 들어, 제2 태양의 방법은 희석 용액을 사용하는 희석 단계를 포함할 수 있고, 여기서 희석 용액은 단계 (I)에서 얻은 제형 및/또는 조성물에서 상기 삼투질농도 값을 달성하는데 충분한 양의 동결방지제를 포함한다.

[0147] 특히 최종 버퍼 물질이 Tris 및 그의 양성자화 형태인 제2 태양의 구현예와 같은, 제2 태양의 일 구현예에서(특히 상기 열거된 구현예 (1) 내지 (30) 중 임의의 것과 같은 제2 태양의 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째 또는 네 번째 하위 그룹의 일 구현예에서), 최종 1가 음이온은 클로라이드, 아세테이트, 글리콜레이트 및 락테이트로 이루어진 군으로부터 선택되고, 조성물 내 최종 1가 음이온의 농도(특히 모든 최종 1가 음이온의 총 농도)는 조성물 내의 최종 버퍼 물질의 농도와 기껏해야 동일하다. 예를 들어, 조성물 중 최종 1가 음이온의 농도(특히 모든 최종 1가 음이온의 총 농도)는 조성물 중 최종 버퍼 물질의 농도보다 낮을 수 있다. 따라서, 조성물 중 최종 버퍼 물질, 특히 Tris 및 그의 양성자화 형태의 농도가 최대 약 20 mM인 제2 태양의 구현예에서, 조성물 중 최종 1가 음이온의 농도(특히 모든 최종 1가 음이온의 총 농도)는 최대 약 20 mM, 예를 들어 20 mM 미만이다. 일반적으로, 조성물 중 클로라이드 및/또는 아세테이트와 같은 1가 음이온의 농도(특히 모든 1가 음이온의 총 농도)는 약 15 mM 미만, 예를 들어 약 14 mM 미만, 약 13 mM 미만, 약 12 mM 미만, 약 11 mM 미만, 약 10 mM 미만, 약 9 mM 미만, 약 8 mM 미만, 약 7 mM 미만, 약 6 mM 미만 또는 약 5 mM 미만일 수 있다. 일 구현예에서, 조성물 중 클로라이드 농도는 상기 정의된 바와 같으며(예를 들어, 약 15 mM 미만 등), 조성물은 아세테이트를 포함하지 않는다. 대안적인 구현예에서, 조성물 내의 아세테이트 농도는 상기 정의된 바와 같으며(예를 들어, 약 15 mM 미만 등), 조성물은 클로라이드를 포함하지 않는다.

[0148] 특히 최종 버퍼 물질이 Tris 및 그의 양성자화 형태인 제2 태양의 구현예와 같은 제2 태양의 일 구현예에서(특히 상기 열거된 구현예 (1) 내지 (30) 중 임의의 것과 같은 제2 태양의 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째 또는 네 번째 하위 그룹의 일 구현예에서), 수성상 및/또는 조성물 중의 나트륨 농도는 20 mM 미만, 예를 들어 약 15 mM 미만, 예를 들어 약 14 mM 미만, 약 13 mM 미만, 약 12 mM 미만, 약 11 mM 미만, 약 10 mM 미만, 약 9 mM 미만, 약 8 mM 미만, 약 7 mM 미만, 약 6 mM, 또는 약 5 mM 미만이다.

[0149] 특히 최종 버퍼 물질이 Tris 및 그의 양성자화 형태인 제2 태양의 구현예와 같은 제2 태양의 일 구현예에서(특히 상기 열거된 구현예 (1) 내지 (30) 중 임의의 것과 같은 제2 태양의 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째 또는 네 번째 하위 그룹의 일 구현예에서), 최종 1가 음이온은 MES, MOPS 및 HEPES의 음이온으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 조성물 중 최종 1가 음이온의 농도(특히 모든 최종 1가 음이온의 총 농도)는 조성물 중 최종 버퍼 물질의 농도와 적어도 동일하다. 예를 들어, 조성물 중 최종 1가 음이온의 농도(특히 모든 최종 1가 음이온의 총 농도)는 조성물 중 최종 버퍼 물질의 농도보다 높을 수 있다. 따라서, 조성물 중 최종 버퍼 물질, 특히 Tris 및 그의 양성자화 형태의 농도가 최대 약 20 mM인 제2 태양의 구현예에서, 최종 1가 음이온의 농도(특히 모든 최종 1가 음이온의 총 농도)는 적어도 약 20 mM 이상, 예를 들어 20 mM보다 높다. 일반적으로, 조성물 중 최종 1가 음이온의 농도 (특히 모든 최종 1가 음이온의 총 농도)는 약 20 mM 초과, 예를 들어 약 21 mM 초과, 약 22 mM 초과, 약 23 mM 초과, 약 24 mM 초과, 약 25 mM 초과, 약 26 mM 초과, 약 27 mM 초과, 약 28 mM 초과, 약 29 mM, 또는 약 30 mM 초과이고, 종기로는 최대 50 mM, 예컨대 최대 45 mM, 최대 40 mM 또는 최대 35 mM이다.

[0150] 제2 태양의 일 구현예에서(특히 상기 열거된 구현예 (1) 내지 (30) 중 임의의 것과 같은 제2 태양의 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째 또는 네 번째 하위 그룹의 일 구현예에서), pH 최종 버퍼 시스템의 pH(및 조성물의 pH)는 약 6.5 내지 약 8.0이다. 예를 들어, 조성물의 pH는 약 6.9 내지 약 7.9, 예컨대 약 7.0 내지 약 7.9, 약 7.1 내지 약 7.8, 약 7.2 내지 약 7.7, 약 7.3 내지 약 7.6, 약 7.4 및 약 7.6, 또는 약 7.5일 수 있다.

[0151] 제2 태양의 일 구현예에서(특히 상기 열거된 구현예 (1) 내지 (30) 중 임의의 것과 같은 제2 태양의 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째 또는 네 번째 하위 그룹의 일 구현예에서), 제1 버퍼 시스템(및 단계(a)에서 얻은 RNA 용액의 pH)은 6.0 미만, 종기로는 최대 약 5.5, 예컨대 최대 약 5.0, 최대 약 4.9, 최대 약 4.8, 최대 약 4.7, 최대 약 4.6, 또는 최대 약 4.5의 pH를 갖는다. 예를 들어, 제1 버퍼 시스템의 pH(및 단계 (a)에서 얻은 RNA 용액의 pH)는 약 3.5 내지 약 5.9, 예컨대 약 4.0 내지 약 5.5, 또는 약 4.5 내지 약 5.0일 수 있다. 이를 위해, 단계 (a)에서 얻은 RNA 용액은 하나 이상의 이염기성 및/또는 다염기성 유기산(예를 들어, 시트레이트 음이온 및/또는 EDTA의 음이온)을 추가로 포함할 수 있다. 이 구현예에서, 단계 (d)는 하나 이상의 이염기성 및/또는 다염기성 유기산을 제거하여, 하나 이상의 이염기성 및/또는 다염기성 유기산이 실질적으로 없는 최종 수성상에 분산된 LNP를 포함하는 제형을 생성하는 조건 하에서 수행되는 것이 바람직하다. 예를 들어, 이러한 조건은 단계 (c)에서 획득된 중간 수성상에 분산된 LNP를 포함하는 중간 제형을, 최종 버퍼 시스템(즉, 최종 버퍼 물질 및 최종 1가 음이온)을 포함하는 최종 버퍼 용액을 이용하여 점선 흐름 여과 또는 정용여과와 같은 적어도 하나의 여과 단계에 적용하는 것을 포함할 수 있으며, 여기서 최종 버퍼 용액은 하나 이상의 이염기성 및/또는 다염

기성 유기산을 함유하지 않는다(그리고 종기로는 에탄올을 함유하지 않는다). 대안적으로, 이러한 조건은 (i) 단계 (c)에서 수득된 중간 수성상에 분산된 LNP를 포함하는 중간 제형(즉, 제1 중간 제형)을, 추가 버퍼 시스템을 포함하는 추가 버퍼액을 이용하여 접선 흐름 여과 또는 정용여과와 같은 적어도 하나의 여과 단계에 적용함으로써, 추가 버퍼 시스템을 포함하는 추가 수성상에 분산된 LNP를 포함하는 추가 중간 제형을 제조하는 단계로서, 여기서 추가 버퍼 용액의 추가 버퍼 시스템은 단계 (a)에서 사용된 버퍼 시스템과 동일하거나 상이할 수 있는 단계; (ii) 선택적으로 단계 (i)를 1회 또는 2회 이상 반복하는 단계로서, 여기서 한 사이클의 단계 (i) 후에 수득된 추가 수성상에 분산된 LNP를 포함하는 추가 중간 제형이 다음 사이클의 제1 중간 제형으로 사용되고, 각 사이클에서 추가 버퍼 수용액의 추가 버퍼 시스템은 단계 (a)에서 사용된 제1 버퍼 시스템과 동일하거나 상이할 수 있는 단계; 및 (iii) 단계 (i)에서 얻은 중간 제형 (단계 (ii)가 존재하지 않는 경우) 또는 단계 (ii)에서 얻은 중간 제형(단계 (ii)가 존재하는 경우)을, 최종 버퍼 수용액을 이용하여 접선 흐름 여과 또는 정용여과와 같은 적어도 하나의 여과 단계에 적용하는 단계로서, 여기서 중간 및 최종 버퍼 수용액 중 적어도 하나(종기로는 중간 및 최종 버퍼 수용액 모두)는 하나 이상의 이염기성 및/또는 또는 다염기성 유기산을 함유하지 않는다(그리고 종기로는 에탄올을 함유하지 않음) 단계를 포함할 수 있다.

[0152] 마찬가지로, 단계 (I)이 단계 (a') 내지 (e') 및 (h')(및 선택적으로 단계 (f'), (g') 및 (i')) 중 하나 이상을 포함하는 것인 제2 태양의 일 구현예에서(특히 상기 열거된 구현예 (1) 내지 (30) 중 임의의 것과 같은 제2 태양의 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째 또는 네 번째 하위 그룹의 일 구현예에서), 제1 버퍼 수용액의 pH (및 단계 (c')에서 얻은 RNA 용액의 pH는)는 6.0 미만, 종기로는 최대 약 5.5, 예컨대 최대 약 5.0, 최대 약 4.9, 최대 약 4.8, 최대 약 4.7, 최대 약 4.6, 또는 최대 약 4.5이다. 예를 들어, 제1 버퍼 수용액의 pH(및 단계 (c')에서 얻은 RNA 용액의 pH)는 약 3.5 내지 약 5.9, 예컨대 약 4.0 내지 약 5.5, 또는 약 4.5 내지 약 5.0일 수 있다. 이를 위해, (b')에서 제공되는 제1 버퍼 수용액(및 제1 수성상)은 하나 이상의 이염기성 및/또는 다염기성 유기산(예를 들어, 시트레이트 음이온 및/또는 EDTA의 음이온)을 추가로 포함할 수 있다. 이 구현예에서, 단계 (f') 내지 (h') 중 적어도 하나는 제1 중간제 제형 및/또는 추가 중간제 제형으로부터 하나 이상의 이염기성 및/또는 다염기성 유기산을 제거하는 조건 하에서 수행됨으로 해서, 하나 이상의 이염기성 및/또는 다염기성 유기산이 실질적으로 없는 추가 수성상 또는 최종 수성상에 분산된 LNP를 포함하는 추가의 중간 제형을 초래하는 것이 바람직하다. 예를 들어, 이러한 조건은 추가 버퍼 수용액 및/또는 최종 버퍼 용액을 사용하는 것을 포함할 수 있으며, 여기서 추가 버퍼 수용액(들) 및 최종 버퍼 용액 중 적어도 하나(종기로는 추가 버퍼 수용액(들) 및 최종 버퍼 용액 모두)는 하나 이상의 이염기성 및/또는 다염기성 유기산을 함유하지 않는다(그리고 종기로는 에탄올을 함유하지 않는다). 일 구현예에서, 여과 단계는 접선 흐름 여과 또는 정용여과, 종기로는 접선 흐름 여과일 수 있다.

[0153] 제2 태양의 일 구현예에서(특히 상기 열거된 구현예 (1) 내지 (30) 중 임의의 것과 같은 제2 태양의 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째 또는 네 번째 하위 그룹의 일 구현예에서), 단계 (a)에서 사용되는 제1 버퍼 시스템은 단계 (d)에서 사용되는 최종 버퍼 물질 및 최종 1가 음이온을 포함하며, 종기로는 단계 (a)에서 사용되는 제1 버퍼 시스템의 버퍼 시스템 및 pH는 단계 (d)에서 사용되는 최종 버퍼 용액의 버퍼 시스템 및 pH와 동일한 것이 바람직하다. 예컨대, 제2 태양의 이 구현예에서는 오직 하나의 버퍼 수용액만이 사용된다.

[0154] 마찬가지로, 단계 (I)이 단계 (a') 내지 (e') 및 (h')(및 선택적으로 단계 (f'), (g') 및 (i')) 중 하나 이상을 포함하는 제2 태양의 일 구현예에서(특히 상기 열거된 구현예 (1) 내지 (30) 중 임의의 것과 같은 제2 태양의 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째 또는 네 번째 하위 그룹의 일 구현예에서), 단계 (b'), (f') 및 (g')에서 사용되는 각각의 제1 버퍼 시스템 및 모든 추가 버퍼 시스템은 단계 (h')에서 사용되는 최종 버퍼 물질 및 최종 1가 음이온을 포함하며, 종기로는 단계 (b'), (f') 및 (g')에서 사용되는 각각의 제1 버퍼 수용액과 모든 추가 버퍼 수용액의 버퍼 시스템 및 pH는 최종 버퍼 수용액의 버퍼 시스템 및 pH와 동일한 것이 바람직하다. 예를 들어, 제2 태양의 이 구현예의 단계 (b'), (f')(존재하는 경우), (g')(존재하는 경우) 및 (h')에서 사용되는 버퍼 수용액은 동일하다.

[0155] 제2 태양의 일 구현예에서(특히 상기 열거된 구현예 (1) 내지 (30) 중 임의의 것과 같은 제2 태양의 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째 또는 네 번째 하위 그룹의 일 구현예에서), 제형 및/또는 조성물은 주성분으로서 물을 포함하고/하거나 조성물에 함유된 물 이외의 용매(들)의 총량은 약 1.0%(v/v) 미만이다. 예를 들어, 제형 및/또는 조성물에 함유된 물의 양은 적어도 50%(w/w), 예컨대 적어도 55%(w/w), 적어도 60% (w/w), 적어도 65% (w/w), 적어도 70% (w/w), 적어도 75% (w/w), 적어도 80% (w/w), 적어도 85% (w/w), 적어도 90% (w/w), 또는 적어도 95% (w/w)일 수 있다. 특히, 제형 및/또는 조성물이 동결방지제를 포함하는 경우, 제형 및/또는 조성물에 함유된 물의 양은 적어도 50%(w/w), 예컨대 적어도 55% (w/w), 적어도 60% (w/w), 적어도 65% (w/w), 적어도 70%

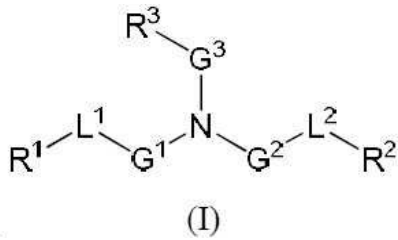
(w/w), 적어도 75% (w/w), 적어도 80% (w/w), 적어도 85% (w/w), 또는 적어도 90% (w/w)일 수 있다. 제형 및/또는 조성물에 동결방지제가 실질적으로 없는 경우, 제형 및/또는 조성물에 함유된 물의 양은 적어도 95%(w/w)일 수 있다. 추가로 또는 대안적으로, 조성물에 함유된 물 이외의 용매(들)의 총량은 약 1.0% (v/v), 예컨대 약 0.9% (v/v) 미만, 약 0.8% (v/v) 미만, 약 0.7% (v/v) 미만, 약 0.6% (v/v) 미만, 약 0.5% (v/v) 미만, 약 0.4% (v/v) 미만, 약 0.3% (v/v) 미만, 약 0.2% (v/v) 미만, 약 0.1% (v/v) 미만, 약 0.05% (v/v), 또는 약 0.01% (v/v) 미만일 수 있다. 이와 관련하여, 정상적인 조건에서 액체인 동결방지제는 물 이외의 용매로 간주되지 않고 동결방지제로 간주된다. 즉, 조성물에 함유된 물 이외의 용매(들)의 총량이 약 1.0%(v/v) 미만일 수 있다는 상기 선택적 제한은 정상적인 조건에서 액체인 동결방지제에는 적용되지 않는다.

[0156] 제2 태양의 일 구현예에서(특히 상기 열거된 구현예 (1) 내지 (30) 중 임의의 것과 같은 제2 태양의 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째 또는 네 번째 하위 그룹의 일 구현예에서), 조성물의 삼투질농도는 최대 약 400×10^{-3} osmol/kg, 예컨대 최대 약 390×10^{-3} osmol/kg, 최대 약 380×10^{-3} osmol/kg, 최대 약 370×10^{-3} osmol/kg, 최대 약 360×10^{-3} osmol/kg, 최대 약 350×10^{-3} osmol/kg, 최대 약 340×10^{-3} osmol/kg, 최대 약 330×10^{-3} osmol/kg, 최대 약 320×10^{-3} osmol/kg, 최대 약 310×10^{-3} osmol/kg, 또는 최대 약 300×10^{-3} osmol/kg이다. 조성물이 동결방지제를 포함하지 않는 경우, 조성물의 삼투질농도는 300×10^{-3} osmol/kg 미만, 예컨대 최대 약 250×10^{-3} osmol/kg, 최대 약 200×10^{-3} osmol/kg, 최대 약 150×10^{-3} osmol/kg, 최대 약 100×10^{-3} osmol/kg, 최대 약 50×10^{-3} osmol/kg, 최대 약 40×10^{-3} osmol/kg, 또는 최대 약 30×10^{-3} osmol/kg이다. 조성물이 동결방지제를 포함하는 경우, 조성물의 삼투질농도의 주요 부분이 동결방지제에 의해 제공되는 것이 바람직하다. 예를 들어, 동결방지제는 조성물의 삼투질농도의 적어도 50%, 예컨대 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 또는 적어도 90%를 제공할 수 있다.

[0157] 제2 태양의 일 구현예에서(특히 상기 열거된 구현예 (1) 내지 (30) 중 임의의 것과 같은 제2 태양의 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째 또는 네 번째 하위 그룹의 일 구현예에서), 조성물 중 RNA의 농도는 약 5 mg/l 내지 약 150 mg/l이다. 예를 들어, 조성물 중 RNA의 농도는 약 10 mg/l 내지 약 140 mg/l, 예컨대 약 20 mg/l 내지 약 130 mg/l, 약 25 mg/l 내지 약 125 mg/l, 약 30 mg/l 내지 약 120 mg/l, 약 35 mg/l 내지 약 115 mg/l, 약 40 mg/l 내지 약 110 mg/l, 약 45 mg/l 내지 약 105 mg/l, 또는 약 50 mg/l 내지 약 100 mg/l일 수 있다.

[0158] 제2 태양의 일 구현예에서(특히 상기 열거된 구현예 (1) 내지 (30) 중 임의의 것과 같은 제2 태양의 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째 또는 네 번째 하위 그룹의 일 구현예에서), 최종 버퍼 물질은 Tris 및 그의 양성자화 형태이고, 조성물의 pH는 약 6.5 내지 약 8.0이며, 조성물 중 RNA의 농도는 약 5 mg/l 내지 약 150 mg/l이다. 이 구현예에서, 조성물의 pH는 약 6.9 내지 약 7.9이고 조성물 중 RNA의 농도는 약 25 mg/l 내지 약 125 mg/l, 예컨대 약 30 mg/l 내지 약 120 mg/l인 것이 바람직하다. 제2 태양의 특히 바람직한 구현예에서, 버퍼 물질은 Tris 및 그의 양성자화 형태이고; 조성물의 pH는 약 6.9 내지 약 7.9이며; 조성물 중 RNA의 농도는 약 25 mg/l 내지 약 125 mg/l, 예컨대 약 30 mg/l 내지 약 120 mg/l이고; 최종 수성상은 설페이트 음이온, 이염기성 유기산 및 다염기성 유기산이 실질적으로 없으며; 조성물은 동결방지제를 포함한다. 제2 태양의 대안적인 특히 바람직한 구현예에서, 버퍼 물질은 Tris 및 그의 양성자화 형태이고; 조성물의 pH는 약 6.9 내지 약 7.9이며; 조성물 중 RNA의 농도는 약 25 mg/l 내지 약 125 mg/l, 예컨대 약 30 mg/l 내지 약 120 mg/l이고; 최종 수성상은 설페이트 음이온, 이염기성 유기산 및 다염기성 유기산이 실질적으로 없으며; 조성물에는 동결방지제가 실질적으로 없다.

[0159] 제2 태양의 일 구현예에서(특히 상기 열거된 구현예 (1) 내지 (30) 중 임의의 것과 같은 제2 태양의 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째 또는 네 번째 하위 그룹의 일 구현예에서), 양이온적으로 이온화가능한 지질은 생리학적 조건 하에서 양성자화될 수 있는 적어도 하나의 질소 원자를 포함하는 헤드 그룹을 포함한다. 예를 들어, 양이온적으로 이온화가능한 지질은 하기 화학식 (I)의 구조:



[0160]

[0161]

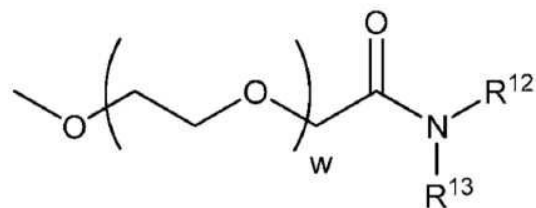
를 가지거나, 또는 약제학적으로 허용되는 그의 염, 호변이성질체, 전구약물 또는 입체이성질체일 수 있고, 식 중, L^1 , L^2 , G^1 , G^2 , G^3 , R^1 , R^2 , 및 R^3 은 본원에 정의된 바와 같다. 종기로는, 양이온적으로 이온화가능한 지질은 하기로부터 선택된다: 구조 I-1 내지 I-36(본원에 제시됨); 및/또는 구조 A 내지 F(본원에 제시됨); 및/또는 N,N-디메틸-2,3-디올레일옥시프로필아민(DODMA), 1,2-디올레오일-3-디메틸암모늄-프로판(DODAP), 헵타트리아콘타-6,9,28,31-테트라엔-19-일-4-(디메틸아미노)부타노에이트(DLin-MC3-DMA), 및 4-((디((9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디엔-1-일)아미노)옥시)-N,N-디메틸-4-옥소부탄-1-아민(DPL-14). 특히 바람직한 구현예에서, 양이온적으로 이온화가능한 지질은 구조 I-3을 갖는 지질이다.

[0162]

제2 태양의 일 구현예에서(특히 상기 열거된 구현예 (1) 내지 (30) 중 임의의 것과 같은 제2 태양의 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째 또는 네 번째 하위 그룹의 일 구현예에서), 단계 (b) 또는 (d')에서 제조된 에탄올 용액은 하나 이상의 추가적인 지질을 추가로 포함하고 LNP는 하나 이상의 추가 지질을 추가로 포함한다. 종기로는, 하나 이상의 추가 지질은 폴리머 공액 지질, 중성 지질, 스테로이드 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 제2 태양의 바람직한 구현예에서(특히 상기 열거된 구현예 (1) 내지 (30) 중 임의의 것과 같은 제2 태양의 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째 또는 네 번째 하위 그룹의 일 구현예에서), 하나 이상의 추가 지질은 폴리머 공액 지질(예를 들어, 폐결화된 지질 또는 폴리스아르코신-지질 공액체 또는 폴리스아르코신과 지질 유사 물질의 공액체), 중성 지질(예를 들어, DSPC), 및 스테로이드(예를 들어, 콜레스테롤)를 포함하여, LNP는 본원에 기술된 양이온적으로 이온화가능한 지질, 중합체 공액 지질(예를 들어, 폐결화된 지질 또는 폴리스아르코신-지질 공액체 또는 폴리스아르코신과 지질 유사 물질의 공액체), 중성 지질(예를 들어, DSPC), 및 스테로이드(예컨대 콜레스테롤)를 포함한다.

[0163]

하나 이상의 추가 지질이 폴리머 공액 지질을 추가로 포함하는, 제2 태양의 일 구현예에서(특히 상기 열거된 구현예 (1) 내지 (30) 중 임의의 것과 같은 제2 태양의 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째 또는 네 번째 하위 그룹의 일 구현예에서), 폴리머 공액 지질은 폐결화된 지질이다. 예를 들어, 폐결화된 지질은 다음 구조를 갖거나, 또는 그의 약학적으로 허용되는 염, 호변이성질체 또는 입체이성질체일 수 있다:



[0164]

[0165]

식 중, R^{12} , R^{13} 및 w 는 본원에 정의된 바와 같다.

[0166]

하나 이상의 추가 지질이 폴리머 공액 지질을 추가로 포함하는 제2 태양의 일 구현예에서(특히 상기 열거된 구현예 (1) 내지 (30) 중 임의의 것과 같은 제2 태양의 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째 또는 네 번째 하위 그룹의 일 구현예에서), 폴리머 공액 지질은 폴리스아르코신-지질 공액체 또는 폴리스아르코신과 지질 유사 물질의 공액체이다. 예를 들어, 폴리스아르코신-지질 공액체 또는 폴리스아르코신과 지질 유사 물질의 공액체는 폴리스아르코신-디아실글리세롤 공액체, 폴리스아르코신-디아실옥시프로필 공액체, 폴리스아르코신-인지질 공액체, 폴리스아르코신-세라미드 공액체 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 구성원일 수 있다.

[0167]

하나 이상의 추가 지질이 중성 지질을 포함하는 제2 태양의 일 구현예에서(특히 상기 열거된 구현예 (1) 내지 (30) 중 임의의 것과 같은 제2 태양의 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째 또는 네 번째 하위 그룹의 일 구현예에서), 중성 지질은 인지질이다. 그러한 인지질은 종기로는 포스파티딜콜린, 포스파티딜에탄올아민, 포스파티딜글리세롤, 포스파티딘산, 포스파티딜세린 및 스핑고미엘린으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 인지질의 특정 구현예에는 디스테아로일포스파티딜콜린(DSPC), 디올레오일포스파티딜콜린(DOPC), 디미리스토일포스파티딜콜린

(DMPC), 디펜타데카노일포스파티딜콜린, 디라우로일포스파티딜콜린, 디팔미 토일포스파티딜콜린 (DPPC), 디아라 키도일포스파티딜콜린(DAPC), 디베헤노일포스파티딜콜린(DBPC), 디트리코사노일포스파티딜콜린(DTPC), 디리그노 세로일파티딜콜린 (DLPC), 팔미토일올레오일포스파티딜콜린(POPC), 1,2-디-0-옥타데세닐-sn-글리세로-3-포스포 콜린(18:0 디에테르 PC), 1-올레오일-2-콜레스테릴헤미숙시노일-sn-글리세로-3-포스포콜린(OChemsPC), 1-헥사테 실-sn-글리세로-3-포스포콜린(C16 Lyso PC), 디올레오일포스파티딜 에탄올아민(DOPE), 디스테아로일-포스파티딜 에탄올아민(DSPE), 디팔미토일-포스파티딜에탄올아민(DPPE), 디미리스토일-포스파티딜에탄올아민(DMPE), 디라우 로일- 포스파티딜 에탄올아민(DLPE), 및 디피타노일-포스파티딜에탄올아민(DPyPE)이 포함된다. 특히 바람직한 구현예에서, 중성 지질은 DSPC이다.

[0168] 하나 이상의 추가 지질이 스테로이드를 포함하는 제2 태양의 일 구현예에서(특히 상기 열거된 구현예 (1) 내지 (30) 중 임의의 것과 같은 제2 태양의 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째 또는 네 번째 하위 그룹의 일 구현예에서), 스테로이드는 콜레스테롤과 같은 스테롤이다.

[0169] 제2 태양의 일 구현예에서(특히 상기 열거된 구현예 (1) 내지 (30) 중 임의의 것과 같은 제2 태양의 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째 또는 네 번째 하위 그룹의 일 구현예에서), 에탄올 용액은 양이온적으로 이온화가능한 지 질, 폴리머 공액 지질, 중성 지질 및 스테로이드를, 에탄올 용액 중 지질의 총 물량을 기준으로 20% 내지 60%의 양이온적으로 이온화가능한 지질, 0.5% 내지 15%의 폴리머 공액 지질, 5% 내지 25%의 중성 지질, 및 25% 내지 55%의 스테로이드의 몰 비로 포함한다. 예를 들어, 상기 몰 비는 에탄올 용액 중 지질의 총 물량을 기준으로 40% 내지 55%의 양이온적으로 이온화가능한 지질, 1.0% 내지 10%의 폴리머 공액 지질, 5% 내지 15%의 중성 지질, 및 30% 내지 50%의 스테로이드, 예컨대 45% 내지 55%의 양이온적으로 이온화가능한 지질, 1.0% 내지 5%의 폴리머 공액 지질, 8% 내지 12%의 중성 지질, 및 35% 내지 45%의 스테로이드일 수 있다.

[0170] 제2 태양의 일 구현예에서(특히 상기 열거된 구현예 (1) 내지 (30) 중 임의의 것과 같은 제2 태양의 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째 또는 네 번째 하위 그룹의 일 구현예에서), 최종 수성상은 킬레이트제를 포함하지 않는다.

[0171] 제2 태양의 일 구현예에서(특히 상기 열거된 구현예 (1) 내지 (30) 중 임의의 것과 같은 제2 태양의 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째 또는 네 번째 하위 그룹의 일 구현예에서), LNP는 조성물에 포함된 RNA의 약 75% 이상을 구성한다. 예를 들어, LNP는 조성물에 포함된 RNA의 적어도 약 76%, 예컨대 적어도 약 77%, 적어도 약 78%, 적어도 약 79%, 적어도 약 80%, 적어도 약 81%, 적어도 약 82%, 적어도 약 83%, 적어도 약 84%, 적어도 약 85%, 적어도 약 86%, 적어도 약 87%, 적어도 약 88%, 적어도 약 89%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 또는 적어도 약 95%를 구성한다.

[0172] 제2 태양의 일 구현예에서(특히 상기 열거된 구현예 (1) 내지 (30) 중 임의의 것과 같은 제2 태양의 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째 또는 네 번째 하위 그룹의 일 구현예에서), RNA(예컨대 mRNA)는 LNP 내에 캡슐화되거나 LNP와 결합된다.

[0173] 제2 태양의 일 구현예에서(특히 상기 열거된 구현예 (1) 내지 (30) 중 임의의 것과 같은 제2 태양의 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째 또는 네 번째 하위 그룹의 일 구현예에서), RNA(예컨대 mRNA)는 변형된 뉴클레오사이드를 우리딘 대신 포함한다. 예를 들어, 변형된 뉴클레오사이드는 슈도우리딘(ψ), N1-메틸-슈도우리딘(m1 ψ) 및 5-메틸-우리딘(m5U)으로부터 선택될 수 있다.

[0174] 제2 태양의 일 구현예에서(특히 상기 열거된 구현예 (1) 내지 (30) 중 임의의 것과 같은 제2 태양의 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째 또는 네 번째 하위 그룹의 일 구현예에서), RNA(예컨대 mRNA)는 다음 중 하나 이상을 포함한다: (a) cap1 또는 cap2 구조와 같은 5' 캡; (b) 5'UTR; (c) 3'UTR; 및 (d) 적어도 100개의 뉴클레오타이드를 포함하는 폴리-A 서열과 같은 폴리-A 서열, 여기서 폴리-A 서열은 종기로는 A 뉴클레오타이드의 중단된(interrupted) 서열이다.

[0175] 제2 태양의 하나의 바람직한 구현예에서(특히 상기 열거된 구현예 (1) 내지 (30) 중 임의의 것과 같은 제2 태양의 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째 또는 네 번째 하위 그룹의 일 구현예에서), RNA(예컨대 mRNA)는 하나 이상의 폴리펩타이드를 인코딩한다. 예를 들어, 하나 이상의 폴리펩타이드는 대상에서 항원에 대한 면역 반응을 유도하기 위한 에피토프를 포함할 수 있다. 바람직한 구현예에서, RNA(예컨대 mRNA)는 SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 면역원성 변이체 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 면역원성 단편 또는 그의 면역원성 변이체를 포함하는 아미노산 서열을 인코딩하는 오픈 리딩 프레임(ORF)을 포함한다. 제2 태양의 일 구현예에서(특히 상기 열거된 구현예 (1) 내지 (30) 중 임의의 것과 같은 제2 태양의 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째 또는 네 번째 하위 그룹의 일 구현

예에서), RNA(예컨대 mRNA)는 SEQ ID NO: 1의 위치 986 및 987에서 프롤린 잔기 치환을 갖는 전장 SARS-CoV2 S 단백질 변이체를 인코딩하는 ORF를 포함한다. 예를 들어, SARS-CoV2 S 단백질 변이체는 SEQ ID NO: 7에 대해 적어도 80% 동일성을 가질 수 있다.

[0176] 제3 태양에서, 본 발명은 제2 태양의 방법에 따라 조성물을 제조하는 단계 및 조성물을 약 -90℃ 내지 약 -10℃ 범위, 예컨대 약 -90℃ 내지 약 -40℃ 또는 약 -40℃ 내지 약 -25℃ 또는 약 -25℃ 내지 약 -10℃, 또는 약 -20℃의 온도에서 보관하는 것을 포함하는, 조성물을 보관하는 방법을 제공한다. 제3 태양의 일 구현예에서, 냉동된 조성물을 보관하는 것은 적어도 1주, 예컨대 적어도 2주, 적어도 3주, 적어도 4주, 적어도 1개월, 적어도 2개월, 적어도 3개월, 적어도 6개월, 적어도 12개월, 적어도 24개월, 또는 적어도 36개월, 총기로는 적어도 4주 동안이다. 제3 태양의 일 구현예에서, 냉동 조성물을 보관하는 것은 -20℃에서 적어도 4주, 총기로는 적어도 1개월, 더욱 총기로는 적어도 2개월, 더욱 총기로는 적어도 3개월, 더욱 총기로는 적어도 6개월 동안이다. 제3 태양의 일 구현예에서, 조성물은 -70℃에서 보관될 수 있다.

[0177] 제3 태양의 일 구현예에서, 조성물을 보관하는 방법은 단계 (II)(즉, 제제를 약 -10℃ 이하로 냉동시키는 것)를 포함하는 제2 태양의 방법에 따라 조성물을 제조하는 단계; 약 -90℃ 내지 약 -10℃ 범위의 온도에서 특정 기간 동안(예를 들어, 적어도 1주) 냉동된 조성물을 보관하는 단계; 및 냉동된 조성물을 약 0℃ 내지 약 20℃ 범위의 온도에서 특정 기간(예를 들어, 적어도 1주) 동안 보관하는 단계를 포함한다.

[0178] 제1 또는 제2 태양의 맥락에서 본 명세서에 기술된 임의의 구현예(특히 상기 열거된 제1 태양의 구현예 (1) 내지 (30) 중 임의의 것과 같은 제1 태양의 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째 또는 네 번째 하위 그룹의 일 구현예 또는 상기 열거된 제2 태양의 구현예 (1) 내지 (30) 중 임의의 것과 같은 제2 태양의 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째 또는 네 번째 하위 그룹의 일 구현예) 역시도 제3 태양의 임의의 구현예에 적용될 수 있다.

[0179] 제4 태양에서, 본 발명은 제2 태양의 방법에 따라 액체 조성물을 제조하는 단계 및 액체 조성물을 약 0℃ 내지 약 20℃ 범위, 예를 들어 약 1℃ 내지 약 15℃, 약 2℃ 내지 약 10℃, 또는 약 2℃ 내지 약 8℃, 또는 약 5℃의 온도에서 보관하는 것을 포함하는 조성물의 보관 방법을 제공한다. 제4 태양의 일 구현예에서, 액체 조성물을 보관하는 것은 적어도 1주, 예컨대 적어도 2주, 적어도 3주, 적어도 4주, 적어도 1개월, 적어도 2개월, 적어도 3개월, 또는 적어도 6개월, 총기로는 적어도 4주 동안이다. 제4 태양의 일 구현예에서, 액체 조성물의 보관은 5℃에서 적어도 4주, 총기로는 적어도 1개월, 더욱 총기로는 적어도 2개월, 더욱 총기로는 적어도 3개월, 더욱 총기로는 적어도 6개월 동안이다.

[0180] 제4 태양의 일 구현예에서, 조성물을 보관하는 방법은 단계 (II)(즉, 제형을 약 -10℃ 이하로 냉동시키는 단계); 및 약 0℃ 내지 약 20℃ 범위의 온도에서 일정 기간(예를 들어, 적어도 1주) 동안 냉동된 조성물을 보관하는 단계를 포함한다.

[0181] 제1, 제2 또는 제3 태양의 맥락에서 본원에 기술된 임의의 구현예(특히 상기 열거된 제1 태양의 구현예 (1) 내지 (30) 중 임의의 것과 같은 제1 태양의 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째 또는 네 번째 하위 그룹의 일 구현예 또는 상기 열거된 제2 태양의 구현예 (1) 내지 (30) 중 임의의 것과 같은 제2 태양의 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째 또는 네 번째 하위 그룹의 일 구현예)는 또한 제4 태양의 임의의 구현예에도 적용될 수 있는 것으로 이해된다.

[0182] 제5 태양에서, 본 개시내용은 제2, 제3 또는 제4 태양의 방법에 의해 제조가능한 조성물을 제공한다. 제5 태양의 일 구현예에서, 조성물은 총기로는 약 -90℃ 이상, 예를 들어 약 -90℃ 내지 약 -10℃의 온도에서 보관될 수 있는 냉동 형태일 수 있다. 예를 들어, 제5 태양의 냉동 조성물은 약 -90℃ 내지 약 -40℃ 또는 약 -40℃ 내지 약 -25℃ 또는 약 -25℃ 내지 약 -10℃, 또는 약 -20℃의 온도에서 보관될 수 있다. 제5 태양의 일 구현예에서, 조성물은 적어도 1주, 예컨대 적어도 2주, 적어도 3주, 적어도 4주, 적어도 1개월, 적어도 2개월, 적어도 3개월, 적어도 6개월, 적어도 12개월, 적어도 24개월, 또는 적어도 36개월, 총기로는 적어도 4주 동안 보관될 수 있다. 예를 들어, 냉동된 조성물은 -20℃에서 적어도 4주 이상, 총기로는 적어도 1개월, 더욱 총기로는 적어도 2개월, 더욱 총기로는 적어도 3개월, 더욱 총기로는 적어도 6개월 동안 보관될 수 있다.

[0183] 제5 태양의 일 구현예에서, 조성물이 냉동된 형태인 경우, 냉동된 조성물을 해동한 후, 예를 들어, -20℃에서 보관된 냉동 조성물을 해동한 후 RNA 무결성은 적어도 50%, 예컨대 적어도 52%, 적어도 54%, 적어도 55%, 적어도 56%, 적어도 58%, 또는 적어도 60%이다.

[0184] 추가로 또는 대안적으로, 조성물이 액체 형태인 제5 태양의 일 구현예에서, 냉동된 조성물의 해동 후 LNP의 크기($Z_{평균}$)(및/또는 크기 분포 및/또는 다분산 지수(PDI))는 조성물이 냉동되기 전의 LNP의 크기($Z_{평균}$)(및/또는 크

기 분포 및/또는 PDI)와 동일하다. 일 구현예에서, 냉동된 조성물의 해동 후 LNP의 크기($Z_{평균}$) 약 50 nm 내지 약 500 nm, 종기로는 약 40 nm 내지 약 200 nm, 더욱 종기로는 약 40 nm 및 약 120 nm이다. 일 구현예에서, 냉동된 조성물을 해동한 후 LNP의 PDI는 0.3 미만, 종기로는 0.2 미만, 더욱 종기로는 0.1 미만이다. 일 구현예에서, 냉동된 조성물을 해동한 후 LNP의 크기($Z_{평균}$)는 약 50 nm 내지 약 500 nm, 종기로는 약 40 nm 내지 약 200 nm, 더욱 종기로는 약 40 nm 및 약 120 nm이고, 냉동된 조성물을 해동한 후 LNP의 크기($Z_{평균}$)(및/또는 크기 분포 및/또는 PDI)는 냉동 전 LNP의 크기($Z_{평균}$)(및/또는 크기 분포 및/또는 PDI)와 동일하다. 일 구현예에서, 냉동된 조성물을 해동한 후 LNP의 크기($Z_{평균}$)는 약 50 nm 내지 약 500 nm, 종기로는 약 40 nm 내지 약 200 nm, 더욱 종기로는 약 40 nm 및 약 120 nm이고, 냉동된 조성물을 해동한 후 LNP의 PDI는 0.3 미만(종기로는 0.2 미만, 더욱 종기로는 0.1 미만)이다.

[0185] 제5 태양의 대안적인 구현예에서, 조성물은 액체 형태이다.

[0186] 제5 태양의 일 구현예에서, 조성물이 액체 형태인 경우, 액체 조성물의 RNA 무결성은 예를 들어 적어도 1주 동안 0℃ 이상에서 보관시, 원하는 효과를 생성하는데, 예를 들어, 면역 반응을 유도하는데 충분하다. 예를 들어, 액체 조성물의 RNA 무결성은, 예를 들어, 적어도 1주 동안 0℃ 이상에서 보관될 때, 적어도 50%, 예컨대 적어도 52%, 적어도 54%, 적어도 55%, 최소 56%, 최소 58% 또는 최소 60%일 수 있다.

[0187] 추가로 또는 대안적으로, 조성물이 액체 형태인 제5 태양의 일 구현예에서, 예를 들어, 적어도 1주 동안 0℃ 이상에서 보관시, 액체 조성물의 LNP의 크기($Z_{평균}$)(및/또는 크기 분포 및/또는 다분산 지수(PDI))는, 원하는 효과를 생성하는데, 예를 들어, 면역 반응을 유도하는데 충분하다. 예를 들어, 적어도 1주 동안 0℃ 이상에서 보관시, 액체 조성물의 LNP의 크기($Z_{평균}$)(및/또는 크기 분포 및/또는 다분산 지수(PDI))는, 초기 조성물, 즉 보관 전 LNP의 크기($Z_{평균}$)(및/또는 크기 분포 및/또는 PDI)와 동일하다. 일 구현예에서, 예를 들어 0℃ 이상에서 적어도 1주 동안 액체 조성물의 보관 후, LNP의 크기($Z_{평균}$)는 약 50 nm 내지 약 500 nm, 종기로는 약 40 nm 내지 약 200 nm, 더욱 종기로는 약 40 nm 및 약 120 nm이다. 일 구현예에서, 예를 들어 0℃ 이상에서 적어도 1주 동안 액체 조성물의 보관 후, LNP의 PDI는 0.3 미만, 종기로는 0.2 미만, 더욱 종기로는 0.1 미만이다. 일 구현예에서, 예를 들어 적어도 1주 동안 0℃ 이상에서 액체 조성물의 보관 후 LNP의 크기($Z_{평균}$)는 약 50 nm 내지 약 500 nm, 종기로는 약 40 nm 내지 약 200 nm, 더욱 종기로는 약 40 nm 및 약 120 nm이고, 예를 들어 적어도 1주 동안 0℃ 이상에서 액체 조성물의 보관 후, LNP의 크기($Z_{평균}$)(및/또는 크기 분포 및/또는 PDI)는 보관 전 LNP의 크기($Z_{평균}$)(및/또는 크기 분포 및/또는 PDI)와 동일하다. 일 구현예에서, 예를 들어 적어도 1주 동안 0℃ 이상에서 액체 조성물의 보관 후 LNP의 크기($Z_{평균}$)는 약 50 nm 내지 약 500 nm, 종기로는 약 40 nm 내지 약 200 nm, 더욱 종기로는 약 40 nm 및 약 120 nm이고, 예를 들어 적어도 1주 동안 0℃ 이상에서 액체 조성물의 보관 후, LNP의 PDI는 0.3 미만(종기로는 0.2 미만, 더 종기로는 0.1 미만)이다.

[0188] 제1, 제2, 제3 또는 제4 태양의 맥락에서 본 명세서에 기술된 임의의 구현예(특히 상기 열거된 제1 태양의 구현예 (1) 내지 (30) 중 임의의 것과 같은 제1 태양의 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째 또는 네 번째 하위 그룹의 일 구현예 또는 상기 열거된 제2 태양의 구현예 (1) 내지 (30) 중 임의의 것과 같은 제2 태양의 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째 또는 네 번째 하위 그룹의 일 구현예)는 제5 태양의 임의의 구현예에도 적용될 수 있는 것으로 이해된다.

[0189] 제6 태양에서, 본 개시내용은 즉시 사용가능한 약제학적 조성물의 제조 방법을 제공하며, 상기 방법은 제2 또는 제3 태양의 방법에 의해 제조된 냉동 조성물을 제공하는 단계 및 상기 냉동 조성물을 해동함으로써 즉시 사용가능한 약제학적 조성물을 획득하는 단계를 포함한다.

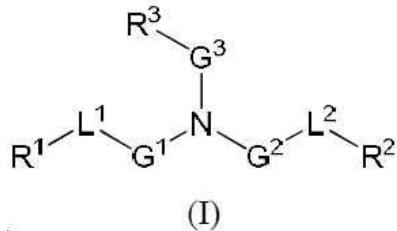
[0190] 제1, 제2, 제3, 제4 또는 제5 태양의 맥락에서 본 명세서에 기술된 임의의 구현예(특히 상기 열거된 제1 태양의 구현예 (1) 내지 (30) 중 임의의 것과 같은 제1 태양의 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째 또는 네 번째 하위 그룹의 일 구현예 또는 상기 열거된 제2 태양의 구현예 (1) 내지 (30) 중 임의의 것과 같은 제2 태양의 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째 또는 네 번째 하위 그룹의 일 구현예)는 제6 태양의 임의의 구현예에도 적용될 수 있는 것으로 이해된다.

[0191] 제7 태양에서, 본 개시내용은 즉시 사용가능한 약제학적 조성물의 제조 방법을 제공하며, 상기 방법은 제2 또는 제4 태양의 방법에 의해 제조된 액체 조성물을 제공함으로써 즉시 사용가능한 약제학적 조성물을 얻는 단계를

포함한다.

- [0192] 제1, 제2, 제3, 제4, 제5 또는 제6 태양의 맥락에서 본 명세서에 기술된 임의의 구현예(특히 상기 열거된 제1 태양의 구현예 (1) 내지 (30) 중 임의의 것과 같은 제1 태양의 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째 또는 네 번째 하위 그룹의 일 구현예 또는 상기 열거된 제2 태양의 구현예 (1) 내지 (30) 중 임의의 것과 같은 제2 태양의 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째 또는 네 번째 하위 그룹의 일 구현예)는 또한 제7 태양의 임의의 구현예에도 적용될 수 있는 것으로 이해된다.
- [0193] 제8 태양에서, 본 개시내용은 제6 또는 제7 태양의 방법에 의해 제조가능한 즉시 사용가능한 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0194] 제1, 제2, 제3, 제4, 제5, 제6 또는 제7 태양의 맥락에서 본 명세서에 기술된 임의의 구현예(특히 상기 열거된 제1 태양의 구현예 (1) 내지 (30) 중 임의의 것과 같은 제1 태양의 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째 또는 네 번째 하위 그룹의 일 구현예 또는 상기 열거된 제2 태양의 구현예 (1) 내지 (30) 중 임의의 것과 같은 제2 태양의 상기 첫 번째, 두 번째, 세 번째 또는 네 번째 하위 그룹의 일 구현예)는 또한 제8 태양의 임의의 구현예에도 적용될 수 있는 것으로 이해된다.
- [0195] 제9 태양에서, 본 개시내용은 치료에 사용하기 위한 제1, 제5 및 제8 태양 중 어느 하나의 조성물을 제공한다.
- [0196] 제1, 제2, 제3, 제4, 제5, 제6, 제7, 또는 제8 태양의 맥락에서 본 명세서에 기술된 임의의 구현예는 제9 태양의 임의의 구현예에도 적용될 수 있는 것으로 이해된다.
- [0197] 제10 태양에서, 본 개시내용은 면역 반응을 유도하는데 사용하기 위한 제1, 제5 및 제8 태양 중 어느 하나의 조성물을 제공한다.
- [0198] 제1, 제2, 제3, 제4, 제5, 제6, 제7, 제8, 또는 제9 태양과 관련하여 본 명세서에 기술된 임의의 구현예는 또한 제10 태양의 임의의 구현예에도 적용될 수 있는 것으로 이해된다.
- [0199] 추가 항목별 구현예는 다음과 같다:
- [0200] 1. 수성상에 분산된 지질 나노입자(LNP)를 포함하는 조성물로서, LNP는 양이온적으로 이온화가능한 지질 및 RNA를 포함하고; 수성상은 버퍼물질을 포함하는 시스템 및 1가 음이온을 포함하되, 상기 버퍼 물질은 트리스(히드록시메틸)아미노메탄 (Tris) 및 그의 양성자화 형태, 비스(2-히드록시에틸)아미노-트리스(히드록시메틸)메탄 (Bis-Tris-메탄) 및 그의 양성자화 형태, 및 트리에탄올아민 (TEA) 및 그의 양성자화 형태로 이루어진 군으로부터 선택되고, 1가 음이온은 클로라이드, 아세테이트, 글리콜레이트, 락테이트, 모르폴리노에탄설포산(MES)의 음이온, 3-(N-모르폴리노)프로판설포산(MOPS)의 음이온 및 2-[4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-일]에탄설포산(HEPES)의 음이온으로 이루어진 군으로부터 선택되며; 조성물 중 버퍼 물질의 농도는 최대 약 25 mM이고; 수성상에는 무기 포스페이트 음이온이 실질적으로 없고, 시트레이트 음이온이 실질적으로 없으며, 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA)의 음이온이 실질적으로 없는 것인 조성물.
- [0201] 2. 항목 1에 있어서, 버퍼 물질이 Tris 및 그의 양성자화 형태인 조성물.
- [0202] 3. 항목 1 또는 2에 있어서, 조성물 중 버퍼 물질, 특히 Tris 및 그의 양성자화 형태의 농도는 최대 약 20 mM, 좋기로는 최대 약 15 mM, 더욱 좋기로는 최대 약 10 mM, 예컨대 약 10 mM인 조성물.
- [0203] 4. 항목 1 내지 3 중 어느 하나에 있어서, 수성상에는 무기 설페이트 음이온 및/또는 카보네이트 음이온 및/또는 이염기성 유기산 음이온 및/또는 다염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없고, 특히 무기 설페이트 음이온, 카보네이트 음이온, 이염기성 유기산 음이온 및 다염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없는 것인 조성물.
- [0204] 5. 항목 1 내지 4 중 어느 하나에 있어서, 1가 음이온은 클로라이드, 아세테이트, 글리콜레이트 및 락테이트로 이루어진 군으로부터 선택되고, 조성물 중 1가 음이온의 농도는 조성물 중 버퍼 물질의 농도와 기껏해야 동일하거나, 좋기로는 그 이하이며, 예컨대 약 9 mM인 조성물.
- [0205] 6. 항목 1 내지 4 중 어느 하나에 있어서, 1가 음이온은 MES, MOPS 및 HEPES의 음이온으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 조성물 중의 1가 음이온의 농도는 조성물 중의 버퍼 물질과 적어도 동일하거나, 좋기로는 더 높은 것인 조성물.
- [0206] 7. 항목 1 내지 6 중 어느 하나에 있어서, 조성물의 pH는 약 6.5 내지 약 8.0, 좋기로는 약 6.9 내지 약 7.9, 예컨대 약 7.0 내지 약 7.8인 조성물.

- [0207] 8. 항목 1 내지 7 중 어느 하나에 있어서, 물이 조성물의 주성분이고/이거나 조성물에 함유된 물 이외의 용매(들)의 총량이 약 0.5%(v/v) 미만인 조성물.
- [0208] 9. 항목 1 내지 8 중 어느 하나에 있어서, 조성물의 삼투질농도는 최대 약 400×10^{-3} osmol/kg인 조성물.
- [0209] 10. 항목 1 내지 9 중 어느 하나에 있어서, 조성물 중 RNA의 농도는 약 5 mg/l 내지 약 150 mg/l, 좋기로는 약 10 mg/l 내지 약 130 mg/l, 더욱 좋기로는, 약 30 mg/l 내지 약 120 mg/l인 조성물.
- [0210] 11. 항목 1 내지 10 중 어느 하나에 있어서, 조성물은 좋기로는 적어도 약 1% w/v의 농도의 동결방지제를 포함하고, 여기서 동결방지제는 좋기로는 탄수화물 및 당 알코올로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 화합물을 포함하고, 더욱 좋기로는 동결방지제는 수크로스, 글루코스, 글리세롤, 소르비톨 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되며, 더욱 좋기로는 동결방지제는 수크로스 및/또는 글리세롤을 포함하는 것인 조성물.
- [0211] 12. 항목 1 내지 10 중 어느 하나에 있어서, 조성물은 실질적으로 동결방지제가 없는 것인 조성물.
- [0212] 13. 항목 1 내지 12 중 어느 하나에 있어서, 양이온으로적으로 이온화가능한 지질은 생리학적 조건 하에서 양성자화될 수 있는 적어도 하나의 질소 원자를 포함하는 헤드 그룹을 포함하는 것인 조성물.
- [0213] 14. 항목 1 내지 13 중 어느 하나에 있어서, 양이온으로적으로 이온화가능한 지질은 화학식 (I)의 구조:



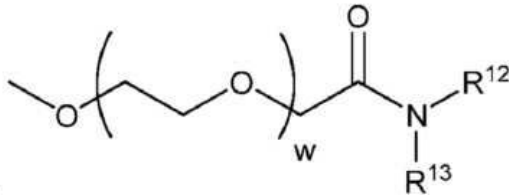
- [0214]
- [0215] 를 갖거나 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염, 호변이성질체, 전구약물 또는 입체이성질체인 조성물:
- [0216] 식 중,
- [0217] L^1 또는 L^2 중 하나는 $-O(C=O)-$, $-(C=O)O-$, $-C(=O)-$, $-O-$, $-S(O)_x-$, $-S-S-$, $-C(=O)S-$, $SC(=O)-$, $-NR^aC(=O)-$, $-C(=O)NR^a-$, $NR^aC(=O)NR^a-$, $-OC(=O)NR^a-$ 또는 $-NR^aC(=O)O-$ 이고, L^1 또는 L^2 중 다른 하나는 $-O(C=O)-$, $-(C=O)O-$, $-C(=O)-$, $-O-$, $-S(O)_x-$, $-S-S-$, $-C(=O)S-$, $SC(=O)-$, $-NR^aC(=O)-$, $-C(=O)NR^a-$, $NR^aC(=O)NR^a-$, $-OC(=O)NR^a-$ 또는 $-NR^aC(=O)O-$ 또는 직접 결합이며;
- [0218] G^1 및 G^2 는 각각 독립적으로 치환되지 않은 C_1-C_{12} 알킬렌 또는 C_2-C_{12} 알케닐렌;
- [0219] G^3 은 C_1-C_{24} 알킬렌, C_2-C_{24} 알케닐렌, C_3-C_8 시클로알킬렌, C_3-C_8 시클로알케닐렌;
- [0220] R^a 는 H 또는 C_1-C_{12} 알킬;
- [0221] R^1 및 R^2 는 각각 독립적으로 C_6-C_{24} 알킬 또는 C_6-C_{24} 알케닐;
- [0222] R^3 은 H, OR^5 , CN, $-C(=O)OR^4$, $-OC(=O)R^4$ 또는 $-NR^5C(=O)R^4$;
- [0223] R^4 는 C_1-C_{12} 알킬;
- [0224] R^5 는 H 또는 C_1-C_6 알킬이고;
- [0225] x는 0, 1 또는 2이다.
- [0226] 15. 항목 1 내지 13 중 어느 하나에 있어서:
- [0227] (a) 양이온으로적으로 이온화가능한 지질은 본원에 나타난 구조 I-1 내지 I-36으로부터 선택되고; 또는

[0228] (β) 양이온적으로 이온화가능한 지질은 본원에 나타낸 구조 A 내지 F로부터 선택되고; 또는

[0229] (γ) 양이온적으로 이온화가능한 지질은 본원에 나타낸 구조 I-3을 갖는 지질인 조성물.

[0230] 16. 항목 1 내지 15 중 어느 하나에 있어서, LNP는 종기로는 폴리머 공액 지질, 중성 지질, 스테로이드 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 추가 지질을 추가로 포함하고, 더욱 종기로는 LNP는 양이온적으로 이온화가능한 지질, 폴리머 공액 지질, 중성 지질 및 스테로이드.

[0231] 17. 항목 16에 있어서, 폴리머 공액 지질은 폐길화된 지질을 포함하고, 폐길화된 지질은 종기로는 하기 구조를 갖거나:



[0232] 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염, 호변이성질체 또는 입체이성질체인 조성물:

[0234] 식 중,

[0235] R^{12} 및 R^{13} 각각 독립적으로 10 내지 30개의 탄소 원자를 함유하는 직쇄 또는 분지쇄, 포화 또는 불포화 알킬 사슬이고, 여기서 알킬 사슬은 선택적으로 하나 이상의 에스테르 결합에 의해 중단되고; w는 30~60 범위의 평균값을 갖는다.

[0236] 18. 항목 16에 있어서, 폴리머 공액 지질은 폴리사르코신-지질 공액체 또는 폴리사르코신과 지질 유사 물질의 공액체를 포함하고, 여기서 폴리사르코신-지질 공액체 또는 폴리사르코신과 지질 유사 물질의 공액체는 종기로는 폴리사르코신-디아실글리세롤 공액체, 폴리사르코신-디아킬옥시프로필 공액체, 폴리사르코신-인지질 공액체, 폴리사르코신-세라마이드 공액체 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 구성원이다.

[0237] 19. 항목 16 내지 18 중 어느 하나에 있어서, 중성 지질은 인지질, 종기로는 포스파티딜콜린, 포스파티딜에탄올아민, 포스파티딜글리세롤, 포스파티드산, 포스파티딜세린 및 스핑고미엘린으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 더욱 종기로는 디스테아로일포스파티딜콜린(DSPC), 디올레오일포스파티딜콜린(DOPC), 디미리스토일포스파티딜콜린(DMPC), 디펜타데카노일 포스파티딜콜린, 디라우로일포스파티딜콜린, 디팔미토일포스파티딜콜린(DPPC), 디아라키도일포스파티딜콜린(DAPC), 디베헤노일포스파티딜콜린(DBPC), 디트리코사노일포스파티딜콜린(DTPC), 디리그노세로일파티딜콜린(DLPC), 팔미토일올레일-포스파티딜콜 (POPC), 1,2-디-O-옥타데세닐-sn-글리세로-3-포스포콜린 (18:0 Diether PC), 1-올레오일-2-콜레스테릴헤미숙시노일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (OChemSPC), 1-헥사데실-sn-글리세로-3-포스포콜린(C16 Lyso PC), 디올레오일포스파티딜에탄올아민(DOPE), 디스테아로일-포스파티딜에탄올아민(DSPE), 디팔미토일-포스파티딜에탄올아민(DPPE), 디미리스토일-포스파티딜에탄올아민(DMPE), 디라우로일-포스파티딜에탄올아민(DLPE), 및 디피타노일-포스파티딜에탄올아민(DPyPE)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 조성물.

[0238] 20. 항목 16 내지 19 중 어느 하나에 있어서, 스테로이드는 콜레스테롤과 같은 스테롤을 포함하는 조성물.

[0239] 21. 항목 1 내지 20 중 어느 하나에 있어서, 수성상은 킬레이트제를 포함하지 않는 것인 조성물.

[0240] 22. 항목 1 내지 21 중 어느 하나에 있어서, LNP는 조성물에 포함된 RNA의 약 75% 이상, 종기로는 약 80% 이상을 구성하는 것인 조성물.

[0241] 23. 항목 1 내지 22 중 어느 하나에 있어서, RNA는 LNP 내에 캡슐화되거나 LNP와 회합되는 조성물.

[0242] 24. 항목 1 내지 23 중 어느 하나에 있어서, RNA는 변형된 뉴클레오사이드를 우리딘 대신 포함하고, 여기서 변형된 뉴클레오사이드는 종기로는 슈도우리딘(ψ), N1-메틸-슈도우리딘(m 1ψ), 및 5- 메틸-우리딘(m5U)로부터 선택되는 것인 조성물.

[0243] 25. 항목 1 내지 25 중 어느 하나에 있어서, RNA는 5' 캡; 5' UTR; 3' UTR; 및 폴리-A 서열 중 적어도 하나, 종기로는 모두를 포함하는 조성물.

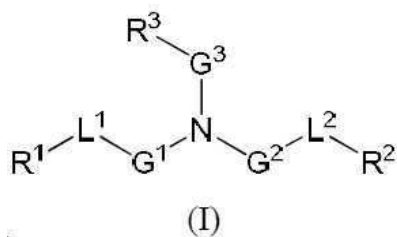
[0244] 26. 항목 25에 있어서, 폴리-A 서열은 적어도 100개의 A 뉴클레오타이드를 포함하고, 폴리-A 서열은 종기로는 A

뉴클레오타이드의 중단된 서열인 조성물.

- [0245] 27. 항목 25 또는 26에 있어서, 5' 캡은 cap1 또는 cap2 구조인 조성물.
- [0246] 28. 항목 1 내지 27 중 어느 하나에 있어서, RNA는 하나 이상의 폴리펩타이드를 인코딩하고, 하나 이상의 폴리펩타이드는 종기로는 대상체에서 항원에 대한 면역 반응을 유도하기 위한 에피토프를 포함하는 조성물.
- [0247] 29. 항목 28에 있어서, RNA는 SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 면역원성 변이체 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 면역원성 단편 또는 그의 면역원성 변이체를 포함하는 아미노산 서열을 인코딩하는 오픈 리딩 프레임(ORF)을 포함하는 조성물.
- [0248] 30. 항목 28 또는 29에 있어서, RNA는 SEQ ID NO: 1의 위치 986 및 987에서 프롤린 잔기 치환을 갖는 전장 SARS-CoV2 S 단백질 변이체를 인코딩하는 ORF를 포함하는 조성물.
- [0249] 31. 항목 29 또는 30에 있어서, SARS-CoV2 S 단백질 변이체는 SEQ ID NO: 7에 대해 적어도 80% 동일성을 갖는 조성물.
- [0250] 32. 항목 1 내지 31 중 어느 하나에 있어서, 조성물은 냉동 형태인 조성물.
- [0251] 33. 항목 32에 있어서, 냉동된 조성물을 해동한 후의 RNA 무결성은 조성물이 냉동되기 전의 RNA 무결성과 비교하여 적어도 50%인 조성물.
- [0252] 34. 항목 32 또는 33에 있어서, 냉동된 조성물을 해동한 후 LNP의 크기($Z_{평균}$) 및/또는 크기 분포 및/또는 다분산 지수(PDI)는 조성물이 냉동되기 전의 LNP의 크기($Z_{평균}$) 및/또는 크기 분포 및/또는 PDI와 동일한 것인 조성물.
- [0253] 35. 항목 1 내지 31 중 어느 하나에 있어서, 조성물은 액체 형태인 조성물.
- [0254] 36. 최종 수성상에 분산된 LNP를 포함하는 조성물을 제조하는 방법으로서, LNP는 양이온적으로 이온화가능한 지질 및 RNA를 포함하고; 최종 수성상은 최종 버퍼 물질을 포함하는 최종 버퍼 시스템 및 및 최종 1가 음이온을 포함하되, 최종 버퍼 물질은 Tris 및 그의 양성자화 형태, Bis-Tris-메탄 및 그의 양성자화 형태, 및 TEA 및 그의 양성자화 형태로 이루어진 군으로부터 선택되고, 최종 1가 음이온은 클로라이드, 아세테이트, 글리콜레이트, 락테이트, MES의 음이온, MOPS의 음이온 및 HEPES의 음이온으로 이루어진 군으로부터 선택되며; 조성물 중 최종 버퍼 물질의 농도는 최대 약 25 mM이고; 최종 수성상은 무기 포스페이트 음이온이 실질적으로 없고, 시트레이트 음이온이 실질적으로 없으며, EDTA의 음이온이 실질적으로 없고;
- [0255] 상기 방법은
- [0256] (I) 최종 수성상에 분산된 LNP를 포함하는 제형을 준비하는 단계로서, 여기서, LNP는 양이온적으로 이온화가능한 지질 및 RNA를 포함하는 것인 단계; 및
- [0257] (II) 선택적으로 제형을 약 -10℃ 이하로 냉동시키는 단계,
- [0258] 를 포함함으로써 조성물을 얻고,
- [0259] 여기서 단계 (I)은
- [0260] (a) 물과 1차 버퍼 시스템을 함유하는 RNA 용액을 준비하는 단계;
- [0261] (b) 양이온적으로 이온화가능한 지질 및 존재하는 경우 하나 이상의 추가 지질을 포함하는 에탄올 용액을 제조하는 단계;
- [0262] (c) (a)에서 제조된 RNA 용액을 (b)에서 제조된 에탄올 용액과 혼합하여, 제1 버퍼 시스템을 포함하는 제1 수성상에 분산된 LNP를 포함하는 제1 중간 제형을 제조하는 단계; 및
- [0263] (d) 최종 버퍼 시스템을 포함하는 최종 버퍼 수용액을 사용하여 (c)에서 제조된 제1 중간 제형을 여과하는 단계
- [0264] 를 포함함으로써 최종 수성상에 분산된 LNP를 포함하는 제형을 제조하는 방법.
- [0265] 37. 항목 36에 있어서, 단계 (I)은 회석 및 여과로부터 선택되는 하나 이상의 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [0266] 38. 항목 36 또는 37에 있어서, 단계 (I)은

- [0267] (a') RNA 수용액을 제공하는 단계;
- [0268] (b') 제1 버퍼 시스템을 포함하는 제1 버퍼 수용액을 제공하는 단계;
- [0269] (c') (a')에서 제공된 RNA 수용액과 (b')에 제공된 제1 버퍼 수용액을 혼합하여 물 및 제1 버퍼 시스템을 포함하는 RNA 용액을 제조하는 단계;
- [0270] (d') 양이온적으로 이온화가능한 지질 및 존재하는 경우 하나 이상의 추가 지질을 포함하는 에탄올 용액을 제조하는 단계;
- [0271] (e') (c')에서 제조된 RNA 용액을 (d')에서 제조된 에탄올 용액과 혼합하여, 제1 버퍼 시스템을 포함하는 제1 수성상에 분산된 LNP를 포함하는 제1 중간 제형을 제조하는 단계;
- [0272] (f') 선택적으로, 추가 버퍼 시스템을 포함하는 추가 버퍼 수용액을 사용하여 (e')에서 제조된 제1 중간 제형을 여과함으로써, 추가 버퍼 시스템을 포함하는 추가 수성상에 분산된 LNP를 포함하는 추가 중간 제형을 제조하는 단계로서, 여기서 추가 버퍼 수용액은 제1 버퍼 수용액과 동일하거나 상이할 수 있는 단계;
- [0273] (g') 선택적으로, 단계 (f')를 1회 또는 2회 이상 반복하는 단계로서, 여기서 1 사이클의 단계 (f') 후에 수득된 추가 버퍼 시스템을 포함하는 추가 수성상에 분산된 LNP를 포함하는 추가 중간 제형이 다음 사이클의 제1 중간 제형으로서 사용되고, 여기서 각 사이클에서 추가 버퍼 수용액은 제1 버퍼 수용액과 동일하거나 상이할 수 있는 것인 단계;
- [0274] (h') 최종 버퍼 시스템을 포함하고, pH가 적어도 6.0인 최종 버퍼 수용액을 이용하여, 단계 (f')가 없는 경우 단계 (e')에서 얻은 제1 중간 제형을 여과하거나, 또는 단계 (f')가 존재하고 단계 (g')가 존재하지 않을 경우, 단계 (f')에서 얻은 추가 중간 제형을 여과하거나, 또는 단계 (f') 및 (g')가 존재하는 경우, 단계 (g')에서 얻은 추가 중간 제형을 여과하는 단계;
- [0275] (i') 선택적으로, 단계 (h')에서 얻은 제형을 희석 용액으로 희석하는 단계
- [0276] 를 포함함으로써, 최종 수성상에 분산된 LNP를 포함하는 제형을 제조하는 방법.
- [0277] 39. 항목 36 내지 38 중 어느 하나에 있어서, 여과는 접선 흐름 여과 또는 정용여과, 종기로는 접선 흐름 여과인 방법.
- [0278] 40. 항목 36 내지 39 중 어느 하나에 있어서, (II) 제형을 약 -10℃ 이하로 냉동시키는 것을 포함하는 방법.
- [0279] 41. 항목 36 내지 40 중 어느 하나에 있어서, 최종 버퍼 물질은 Tris 및 그의 양성자화 형태인 방법.
- [0280] 42. 항목 36 내지 41 중 어느 하나에 있어서, 조성물 내의 최종 버퍼 물질, 특히 Tris 및 그의 양성자화 형태의 농도는 최대 약 20 mM, 종기로는 최대 약 15 mM, 더욱 종기로는 최대 약 10 mM, 예컨대 약 10 mM인 방법.
- [0281] 43. 항목 36 내지 42 중 어느 하나에 있어서, 최종 수성상은 무기 설페이트 음이온 및/또는 카보네이트 음이온 및/또는 이염기성 유기산 음이온 및/또는 다염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없고, 특히 무기 설페이트 음이온, 카보네이트 음이온 이염기성 유기산 음이온 및 다염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없는 것인 방법.
- [0282] 44. 항목 36 내지 43 중 어느 하나에 있어서, (i) 단계 (a)에서 제조된 RNA 용액은 하나 이상의 이염기성 및/또는 다염기성 유기산 음이온을 추가로 포함하고, 단계 (d)는 하나 이상의 이염기성 및/또는 다염기성 유기산 음이온을 제거하는 조건 하에서 수행되어, 최종 수성상에 분산된 LNP를 포함하는 제형을 생성하되, 상기 최종 수성상에는 단계 (a)에서 제조된 RNA 용액에 존재하는 하나 이상의 이염기성 및/또는 다염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없고; 또는 (ii) 제1 수성 버퍼 용액 및 제1 수성상은 하나 이상의 이염기성 및/또는 다염기성 유기산 음이온을 포함하고 단계 (f') 내지 (h') 중 적어도 하나는 제1 중간제 제형 및/또는 추가 중간제 제형으로부터의 하나 이상의 이염기성 및/또는 다염기성 유기산 음이온을 제거하는 조건 하에서 수행되는 것인 방법.
- [0283] 45. 항목 36 내지 44 중 어느 하나의 있어서, (i) 단계 (a)에서 얻은 RNA 용액은 6.0 미만, 종기로는 최대 약 5.0, 더욱 종기로는 최대 약 4.5의 pH를 갖고; 또는 (ii) 제1 버퍼 수용액의 pH는 6.0 미만, 종기로는 최대 약 5.0, 더욱 종기로는 최대 약 4.5 이하인 방법.
- [0284] 46. 항목 44 또는 45에 있어서, 하나 이상의 이염기성 및/또는 다염기성 유기산 음이온은 시트레이트 음이온 및/또는 EDTA의 음이온을 포함하는 방법.
- [0285] 47. 항목 36 내지 43 중 어느 하나에 있어서,

- [0286] (i) 단계 (a)에서 사용되는 제1 버퍼 시스템은 단계 (d)에서 사용되는 최종 버퍼 물질 및 최종 1가 음이온을 포함하고, 종기로는 단계 (a)에서 사용되는 제1 버퍼 시스템의 버퍼 시스템 및 pH는 단계 (d)에서 사용된 최종 버퍼 수용액의 버퍼 시스템 및 pH와 동일하고; 또는
- [0287] (ii) 단계 (b'), (f') 및 (g')에서 사용되는 각각의 제1 버퍼 시스템 및 모든 추가 버퍼 시스템은 단계 (h')에서 사용되는 최종 버퍼 물질 및 최종 1가 음이온을 포함하고, 종기로는 단계 (b'), (f') 및 (g')에서 사용되는 각각의 제1 버퍼 수용액 및 모든 추가 버퍼 수용액의 버퍼 시스템 및 pH는 최종 버퍼 수용액의 버퍼 시스템 및 pH와 동일한 것인 방법.
- [0288] 48. 항목 36 내지 47 중 어느 하나에 있어서, 최종 1가 음이온은 클로라이드, 아세테이트, 글리콜레이트 및 락테이트로 이루어진 군으로부터 선택되고, 조성물 중 최종 1가 음이온의 농도는 조성물 내의 최종 버퍼 물질의 농도와 기껏해야 동일하고, 종기로는 그 미만, 예컨대 약 9 mM 미만인 방법.
- [0289] 49. 항목 36 내지 48 중 어느 하나에 있어서, 최종 1가 음이온은 MES, MOPS 및 HEPES의 음이온으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 조성물 중 최종 1가 음이온의 농도는 조성물 중 최종 버퍼 물질의 농도와 적어도 동일하고, 종기로는 그 보다 더 높은 방법.
- [0290] 50. 항목 36 내지 49 중 어느 하나에 있어서, 조성물의 pH는 약 6.5 내지 약 8.0, 종기로는 약 6.9 내지 약 7.9, 예컨대 약 7.0 내지 약 7.8인 방법.
- [0291] 51. 항목 36 내지 50 중 어느 하나에 있어서, 물이 제형 및/또는 조성물의 주성분이고/이거나 조성물에 함유된 물 이외의 용매(들)의 총량은 약 0.5% (v/v) 미만인 방법.
- [0292] 52. 항목 36 내지 51 중 어느 하나에 있어서, 조성물의 삼투질농도는 약 400×10^{-3} osmol/kg 이하인 방법.
- [0293] 53. 항목 36 내지 52 중 어느 하나에 있어서, 여기서 조성물 중 RNA의 농도는 약 5 mg/l 내지 약 150 mg/l, 종기로는 약 10 mg/l 내지 약 130 mg/l, 더욱 종기로는 약 30mg/l 내지 약 120mg/l인 방법.
- [0294] 54. 항목 36 내지 53 중 어느 하나에 있어서, (i) 단계 (I)은 (d)에서 제조된 제형을 희석 용액으로 희석하는 것을 추가로 포함하거나, 단계 (i')가 존재하고, 여기서 희석 용액은 동결방지제를 포함하며; 및/또는 (ii) 단계 (I)에서 얻은 제형 및 조성물은 종기로는 적어도 약 1% w/v의 농도로 동결방지제를 포함하고, 여기서 동결방지제는 종기로는 탄수화물 및 당 알코올로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상을 포함하고, 더욱 종기로는 동결방지제는 수크로스, 글루코스, 글리세롤, 소르비톨 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 더욱 종기로는 동결방지제는 수크로스 및/또는 글리세롤을 포함하는 방법.
- [0295] 55. 항목 36 내지 53 중 어느 하나에 있어서, 단계 (I)에서 얻은 제형 및 조성물은 동결방지제가 실질적으로 없는 것인 방법.
- [0296] 56. 항목 36 내지 55 중 어느 하나에 있어서, 양이온적으로 이온화가능한 지질은 생리학적 조건 하에서 양성자화될 수 있는 적어도 하나의 질소 원자를 포함하는 헤드 그룹을 포함하는 방법.
- [0297] 57. 항목 36 내지 56 중 어느 하나에 있어서, 양이온적으로 이온화가능한 지질은 화학식 (I)의 구조:



- [0298]
- [0299] 를 갖거나 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염, 호변이성질체, 전구약물 또는 입체이성질체인 방법:
- [0300] 식 중

- [0301] L^1 또는 L^2 중 하나는 $-\text{O}(\text{C}=\text{O})-$, $-(\text{C}=\text{O})\text{O}-$, $-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{O}-$, $-\text{S}(\text{O})_{\text{x}}-$, $-\text{S}-\text{S}-$, $-\text{C}(=\text{O})\text{S}-$, $\text{SC}(=\text{O})-$, $-\text{NR}^{\text{a}}\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}^{\text{a}}-$, $\text{NR}^{\text{a}}\text{C}(=\text{O})\text{NR}^{\text{a}}-$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{NR}^{\text{a}}-$ 또는 $-\text{NR}^{\text{a}}\text{C}(=\text{O})\text{O}-$ 이고, L^1 또는 L^2 중 다른 하나는 $-\text{O}(\text{C}=\text{O})-$, $-(\text{C}=\text{O})\text{O}-$, $-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{O}-$, $-\text{S}(\text{O})_{\text{x}}-$, $-\text{S}-\text{S}-$, $-\text{C}(=\text{O})\text{S}-$, $\text{SC}(=\text{O})-$, $-\text{NR}^{\text{a}}\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}^{\text{a}}-$, $\text{NR}^{\text{a}}\text{C}(=\text{O})\text{NR}^{\text{a}}-$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{NR}^{\text{a}}-$ 또는

$\text{-NR}^a\text{C(=O)O-}$ 또는 직접 결합이며;

[0302] G^1 및 G^2 는 각각 독립적으로 치환되지 않은 $C_1\text{-}C_{12}$ 알킬렌 또는 $C_2\text{-}C_{12}$ 알케닐렌;

[0303] G^3 는 $C_1\text{-}C_{24}$ 알킬렌, $C_2\text{-}C_{24}$ 알케닐렌, $C_3\text{-}C_8$ 시클로알킬렌, $C_3\text{-}C_8$ 시클로알케닐렌;

[0304] R^a 는 H 또는 $C_1\text{-}C_{12}$ 알킬;

[0305] R^1 및 R^2 는 각각 독립적으로 $C_6\text{-}C_{24}$ 알킬 또는 $C_6\text{-}C_{24}$ 알케닐;

[0306] R^3 은 H, OR^5 , CN, -C(=O)OR^4 , -OC(=O)R^4 또는 $\text{-NR}^5\text{C(=O)R}^4$;

[0307] R^4 는 $C_1\text{-}C_{12}$ 알킬;

[0308] R^5 는 H 또는 $C_1\text{-}C_6$ 알킬이며;

[0309] x는 0, 1 또는 2이다.

[0310] 58. 항목 36 내지 56 중 어느 하나에 있어서,

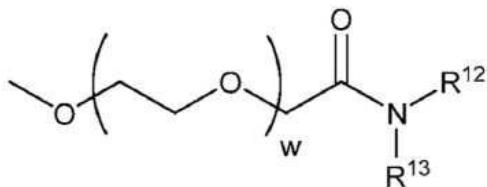
[0311] (α) 양이온적으로 이온화가능한 지질은 본원에 나타난 구조 I-1 내지 I-36으로부터 선택되고; 또는

[0312] (β) 양이온적으로 이온화가능한 지질은 본원에 나타난 구조 A 내지 F로부터 선택되며; 또는

[0313] (γ) 양이온적으로 이온화가능한 지질은 본원에 나타난 구조 I-3을 갖는 지질인 방법.

[0314] 59. 항목 36 내지 58 중 어느 하나에 있어서, 단계 (b) 또는 (d')에서 제조된 에탄올계 용액은 하나 이상의 추가 지질을 추가로 포함하고 LNP는 하나 이상의 추가 지질을 추가로 포함하며, 여기서 하나 이상의 추가 지질은 좋기로는 폴리머 공액 지질, 중성 지질, 스테로이드 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 더욱 좋기로는 하나 이상의 추가 지질은 폴리머 공액 지질, 중성 지질 및 스테로이드를 포함하는 방법.

[0315] 60. 항목 59에 있어서, 폴리머 공액 지질은 폐길화된 지질을 포함하고, 여기서 폐길화된 지질은 좋기로는 하기 구조



[0316]

[0317] 를 갖거나 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염, 호변이성질체 또는 입체이성질체인 방법:

[0318] 식 중

[0319] R^{12} 및 R^{13} 은 각각 독립적으로 10 내지 30개의 탄소 원자를 함유하는 직쇄 또는 분지쇄, 포화 또는 불포화 알킬 사슬이고, 여기서 알킬 사슬은 선택적으로 하나 이상의 에스테르 결합에 의해 중단되고; w는 30~60 범위의 평균 값을 갖는다.

[0320] 61. 항목 59에 있어서, 폴리머 공액 지질은 폴리스arco신-지질 공액체 또는 폴리스arco신과 지질 유사 물질의 공액체를 포함하고, 여기서 폴리스arco신-지질 공액체 또는 폴리스arco신과 지질 유사 물질의 공액체는 좋기로는 폴리스arco신-디아실글리세롤 공액체, 폴리스arco신-디아킬옥시프로필 공액체, 폴리스arco신-인지질 공액체, 폴리스arco신-세라마이드 공액체 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 구성원인 방법.

[0321] 62. 항목 59 내지 61 중 어느 하나에 있어서, 중성 지질은 인지질, 좋기로는 포스파티딜콜린, 포스파티딜에탄올 아민, 포스파티딜글리세롤, 포스파티드산, 포스파티딜세린 및 스펅고미엘린으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 더욱 좋기로는 디스테아로일포스파티딜콜린(DSPC), 디올레오일포스파티딜콜린(DOPC), 디미리스토일포스파티딜콜린(DMPC), 디펜타데카노일 포스파티딜콜린, 디라우로일포스파티딜콜린, 디팔미토일포스파티딜콜린(DPPC), 디아

라키도일포스파티딜콜린(DAPC), 디베헤노일포스파티딜콜린(DBPC), 디트리코사노일포스파티딜콜린(DTPC), 디리그노세로일포티딜콜린(DLPC), 팔미토일올레일-포스파티딜콜 (POPC), 1,2-디-O-옥타데세닐-sn-글리세로-3-포스포콜린 (18:0 Diether PC), 1-올레오일-2-콜레스테릴헤미숙시노일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (OChemsPC), 1-헥사데실-sn-글리세로-3-포스포콜린(C16 Lyso PC), 디올레오일포스파티딜에탄올아민(DOPE), 디스테아로일-포스파티딜에탄올아민(DSPE), 디팔미토일-포스파티딜에탄올아민(DPPE), 디미리스토일-포스파티딜에탄올아민(DMPE), 디라우로일-포스파티딜에탄올아민(DLPE), 및 디피타노일-포스파티딜에탄올아민(DPyPE)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

- [0322] 63. 항목 59 내지 62 중 어느 하나에 있어서, 스테로이드는 콜레스테롤과 같은 스테롤을 포함하는 방법.
- [0323] 64. 항목 36 내지 63 중 어느 하나에 있어서, 양이온적으로 이온화가능한 지질, 폴리머 공액 지질, 중성 지질 및 스테로이드는, 20% 내지 60%의 양이온적으로 이온화가능한 지질, 이온화 지질, 0.5% 내지 15%의 폴리머 공액 지질, 5% 내지 25%의 중성 지질, 및 25% 내지 55%의 스테로이드의 몰비, 총기로는 45% 내지 55%의 양이온적으로 이온화가능한 지질, 1.0% 내지 5%의 폴리머 공액 지질, 8% 내지 12%의 중성 지질 및 35% 내지 45%의 스테로이드의 몰비로 에탄올 용액 중에 존재하는 방법.
- [0324] 65. 항목 36 내지 64 중 어느 하나에 있어서, 최종 수성상은 킬레이트제를 포함하지 않는 방법.
- [0325] 66. 항목 36 내지 65 중 어느 하나에 있어서, LNP는 조성물에 포함된 RNA의 약 75% 이상, 총기로는 약 80% 이상을 구성하는 방법.
- [0326] 67. 항목 36 내지 66 중 어느 하나에 있어서, RNA는 LNP 내에 캡슐화되거나 LNP와 회합되는 방법.
- [0327] 68. 항목 36 내지 67 중 어느 하나에 있어서, RNA는 변형된 뉴클레오사이드를 우리딘 대신 포함하고, 여기서 변형된 뉴클레오사이드는 총기로는 슈도우리딘(ψ), N1-메틸-슈도우리딘(m1 ψ), 및 5- 메틸-우리딘(m5U)로부터 선택되는 방법.
- [0328] 69. 항목 36 내지 68 중 어느 하나에 있어서, RNA는 다음 중 적어도 하나, 총기로는 모두를 포함하는 방법: 5' 캡; 5' UTR; 3' UTR; 및 폴리-A 서열.
- [0329] 70. 항목 69에 있어서, 폴리-A 서열은 적어도 100개의 A 뉴클레오타이드를 포함하고, 여기서 폴리-A 서열은 총기로는 A 뉴클레오타이드의 중단된 서열인 방법.
- [0330] 71. 항목 69 또는 70에 있어서, 5' 캡은 cap1 또는 cap2 구조인 방법.
- [0331] 72. 항목 36 내지 71 중 어느 하나에 있어서, RNA는 하나 이상의 폴리펩타이드를 인코딩하고, 여기서 하나 이상의 폴리펩타이드는 총기로는 대상체에서 항원에 대한 면역 반응을 유도하기 위한 에피토프를 포함하는 방법.
- [0332] 73. 항목 72에 있어서, RNA는 SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 면역원성 변이체 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 면역원성 단편 또는 그의 면역원성 변이체를 포함하는 아미노산 서열을 인코딩하는 오픈 리딩 프레임(ORF)을 포함하는 방법.
- [0333] 74. 항목 72 또는 73에 있어서, RNA는 SEQ ID NO: 1의 위치 986 및 987에서 프롤린 잔기 치환을 갖는 전장 SARS-CoV2 S 단백질 변이체를 인코딩하는 ORF를 포함하는 방법.
- [0334] 75. 항목 73 또는 74에 있어서, SARS-CoV2 S 단백질 변이체는 SEQ ID NO: 7에 대해 적어도 80% 동일성을 갖는 방법.
- [0335] 76. 항목 36 내지 39 및 41 내지 75 중 어느 하나에 있어서, 단계 (II)를 포함하지 않는 방법.
- [0336] 77. 항목 36 내지 75 중 어느 하나의 방법에 따라 조성물을 제조하는 단계 및 조성물을 약 -90℃ 내지 약 -10℃ 범위의 온도, 예컨대 약 -90℃ 내지 약 -40℃ 또는 약 -25℃ 내지 약 -10℃의 온도에서 보관하는 단계를 포함하는, 조성물의 보관 방법.
- [0337] 78. 항목 77에 있어서, 조성물을 적어도 1주, 예컨대 적어도 2주, 적어도 3주, 적어도 4주, 적어도 1개월, 적어도 2개월, 적어도 3개월, 적어도 6개월, 적어도 12개월, 적어도 24개월 또는 적어도 36개월 동안 보관하는 방법.
- [0338] 79. 항목 36 내지 78 중 어느 하나의 방법에 따라 조성물을 제조하는 단계 및 상기 조성물을 약 0℃ 내지 약 20℃ 범위의 온도, 예컨대 약 1℃ 내지 약 15℃, 약 2℃ 내지 약 10℃, 또는 약 2℃ 내지 약 8℃, 또는 약 5℃의

온도에서 보관하는 것을 포함하는 조성물의 보관 방법. .

- [0339] 80. 항목 79에 있어서, 조성물을 적어도 1주, 예컨대 적어도 2주, 적어도 3주, 적어도 4주, 적어도 1개월, 적어도 2개월, 적어도 3개월 또는 적어도 6개월 동안 보관하는 방법.
- [0340] 81. 항목 36 내지 80 중 어느 하나의 방법에 의해 제조될 수 있는 조성물.
- [0341] 82. 항목 81에 있어서, 냉동 형태인 조성물.
- [0342] 83. 항목 82에 있어서, 냉동된 조성물을 해동한 후의 RNA 무결성은 조성물이 냉동되기 전의 조성물의 RNA 무결성과 비교하여 적어도 50%인 조성물.
- [0343] 84. 항목 82 또는 83에 있어서, 냉동된 조성물을 해동한 후 LNP의 크기($Z_{평균}$) 및/또는 크기 분포 및/또는 다분산 지수(PDI)는 조성물이 냉동되기 전 LNP의 크기($Z_{평균}$) 및/또는 크기 분포 및/또는 PDI와 동일한 조성물.
- [0344] 85. 항목 81에 있어서, 액체 형태인 조성물.
- [0345] 86. 항목 85에 있어서, 적어도 1주 동안 조성물을 보관한 후 RNA 무결성은 보관 전 RNA 무결성과 비교하여 적어도 50%인 조성물.
- [0346] 87. 항목 85 또는 86에 있어서, 적어도 1주 동안 조성물을 보관한 후 LNP의 크기($Z_{평균}$) 및/또는 크기 분포 및/또는 다분산 지수(PDI)는 보관 전 LNP의 크기($Z_{평균}$) 및/또는 크기 분포 및/또는 PDI와 동일한 조성물.
- [0347] 88. 항목 36 내지 75, 77 및 78 중 어느 하나의 방법에 의해 제조된 냉동 조성물을 제공하는 단계, 및 상기 냉동 조성물을 해동함으로써 즉시 사용가능한 약제학적 조성물을 수득하는 것을 포함하는, 즉시 사용가능한 약제학적 조성물의 제조방법.
- [0348] 89. 항목 36 내지 39, 41 내지 76, 79 및 80 중 어느 하나의 방법에 의해 제조된 액체 조성물을 제공함으로써, 즉시 사용가능한 약제학적 조성물을 수득하는 단계를 포함하는, 즉시 사용가능한 약제학적 조성물의 제조방법.
- [0349] 90. 항목 88 또는 89의 방법에 의해 제조가능한 즉시 사용가능한 약제학적 조성물.
- [0350] 91. 항목 1 내지 35, 81 내지 87 및 90 중 어느 하나에 있어서, 치료에 사용하기 위한 것인 조성물.
- [0351] 92. 항목 1 내지 35, 81 내지 87 및 90 중 어느 하나에 있어서, 대상체에서 면역 반응을 유도하는데 사용하기 위한 것인 조성물.
- [0352] 본 개시내용의 추가 태양이 본원에 개시된다.

도면의 간단한 설명

- [0353] 도 1은 BNT162b1 물질에 대한 생체내 분석의 개략도이다.
- 도 2는 모세관 전기영동으로 결정된 RNA 무결성을 보여준다. RNA LNP는 유기상에 첨가된 20 mM Tris를 사용하여 수성-에탄올 혼합 프로토콜에 의해 제조되었다. LNP는 Tris:아세테이트 (pH 4, pH 5.5 또는 pH 6.8)에서 생성되었고 생성된 1차 LNP는 분할되었다: 한 부분은 PBS(A)에 대해 투석하고; 다른 부분은 Tris:아세테이트 pH 7.4(B)에 대해 투석하였다. 비교를 위해, 유기상은 Tris를 수용하지 않았고, LNP는 pH 5.5의 Na-아세테이트 버퍼액에서 생성되었고 물질은 Tris:아세테이트 pH 7.4에 대해 투석되었다. 모든 샘플은 실온에서 50시간 동안 보관하였다.
- 도 3은 선택된 RNA LNP 조성물의 모폴로지를 나타낸다. 유리화된(vitrified) 샘플을 극저온 전자 현미경으로 분석하였다. d028 샘플의 경우 2.5배 더 높은 배율이 사용되었다.
- 도 4는 RNA LNP 조성물의 마우스 면역원성을 나타낸다. 1 μ g의 RNA LNP 조성물 D028(LNP A), D029(LNP B) 및 D030(LNP C)을 마우스에 근육내 주사하고, 참조 조성물(ATM) 및 식염수를 대조군으로 사용하였다. S1 단백질의 발현(좌측 패널) 및 S1 IgG의 생성(우측 패널)을 28일 동안 추적하였다. 모든 RNA LNP 조성물은 참조 조성물과 관련하여 서로 유사한 생물활성을 갖는다.
- 도 5는 RNA LNP 조성물 D028(A) 및 RNA LNP 조성물 D029(B) 및 D030(C)의 안정성을 보여준다. 사각형: 실온, 다이아몬드: 5°C, 삼각형: -20°C, 원 -70°C. 실선: 입자 크기, RNA 무결성 또는 RNA 함량; 점선: PDI, LMS(안정적인 접힌 RNA를 나타냄) 또는 RNA 캡슐화.

[0354]

[0355]

[0356]

[0357]

[0358]

[0360]

[0361]

[0362]

[0363]

[0364]

– 57 –

Switzerland, (1995)에 기술된 바와 같이 정의된다.

- [0365] 본 개시내용의 실시는 달리 나타내지 않는 한, 종래의 화학, 생화학, 세포 생물학, 면역학 및 해당 분야의 문헌에 설명된 재조합 DNA 기술을 사용할 것이다 (예를 들어, Organikum, Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin 1990; Streitwieser/Heathcook, "Organische Chemie", VCH, 1990; Beyer/Walter, "Lehrbuch der Organischen Chemie", S. Hirzel Verlag Stuttgart, 1988; Carey/Sundberg, "Organische Chemie", VCH, 1995; March, "Advanced Organic Chemistry", John Wiley & Sons, 1985; Rompp Chemie Lexikon, Falbe/Regitz (Hrsg.), Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 1989; Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, J. Sambrook et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 1989 참조).
- [0366] 문맥상 달리 요구되지 않는 한, 본 명세서 및 청구범위 전체에 걸쳐, 단어 "포함하다" 및 "포함하다" 및 "포함하는"과 같은 파생어는 언급된 구성원, 정수 또는 단계 또는 구성원, 정수 또는 단계의 그룹의 포함을 의미하는 것으로 이해되며, 그 밖의 구성원, 정수 또는 단계 또는 구성원, 정수 또는 단계의 그룹을 배제하지 않는다. "본질적으로 구성된"이라는 용어는 본질적으로 중요한 다른 구성원, 정수 또는 단계를 제외하는 것을 의미한다. "포함하는"이라는 용어는 "본질적으로 구성된"이라는 용어를 포괄하며, 이는 다시 "구성된"이라는 용어를 포함한다. 따라서, 본 출원에서 각각의 경우에, "포함하는"이라는 용어는 "본질적으로 구성된" 또는 "구성된"이라는 용어로 대체될 수 있다. 마찬가지로, 본 출원에서 각각의 경우에, 용어 "본질적으로 구성된"은 용어 "로 구성된"으로 대체될 수 있다.
- [0367] 용어 "a", "an" 및 "the" 및 본 개시내용을 기술하는 맥락에서(특히 청구범위의 맥락에서) 사용된 유사한 참조는 본원에서 달리 나타내거나 문맥 상 명백히 모순되지 않는 한 단수 및 복수 모두를 포괄하는 것으로 해석되어야 한다. 본 명세서에서 값의 범위에 대한 언급은 단지 범위 내에 속하는 각각의 별도의 값을 개별적으로 언급하는 속기 방법으로 사용하기 위한 것이다. 본 명세서에서 달리 나타내지 않는 한, 각 개별 값은 본 명세서에서 개별적으로 인용된 것처럼 명세서에 포함된다. 본 명세서에 기술된 모든 방법은 본 명세서에서 달리 나타내지 않거나 문맥상 명백히 모순되지 않는 한 임의의 적합한 순서로 수행될 수 있다. 본 명세서에서 제공되는 임의의 그리고 모든 예 또는 예시적인 언어(예를 들어, "와 같은")의 사용은 단지 본 개시를 더 잘 설명하기 위한 것이며 달리 청구된 본 개시의 범위를 제한하지 않는다. 명세서의 어떠한 언어도 본 발명의 실시예에 필수적인 임의의 청구되지 않은 요소를 나타내는 것으로 해석되어서는 아니된다.
- [0368] 본원에서 사용된 "및/또는"은 명시된 두 가지 특정 속성 또는 성분을 상호 존재 또는 부재 하에 각각 특정하여 기재하는 것으로 간주된다. 예를 들어, "X 및/또는 Y"는 (i) X, (ii) Y, 및 (iii) X 및 Y 각각의 구체적인 개시로서, 마치 각각이 본원에서 개별적으로 제시되는 것처럼 이해되어야 한다.
- [0369] 본 발명의 맥락에서, "약"이라는 용어는 해당 기능의 기술적 효과를 여전히 보장하기 위해 당업자가 이해할 정확도의 간격을 나타낸다. 이 용어는 일반적으로 표시된 수치로부터 $\pm 5\%$, $\pm 4\%$, $\pm 3\%$, $\pm 2\%$, $\pm 1\%$, $\pm 0.9\%$, $\pm 0.8\%$, $\pm 0.7\%$, $\pm 0.6\%$, $\pm 0.5\%$, $\pm 0.4\%$, $\pm 0.3\%$, $\pm 0.2\%$, $\pm 0.1\%$, $\pm 0.05\%$, 예를 들어 $\pm 0.01\%$ 의 편차를 나타낸다. 통상의 기술자에 의해 이해되는 바와 같이, 주어진 기술적 효과에 대한 수치에 대한 구체적인 이러한 편차는 기술적 효과의 특성에 따라 좌우될 것이다. 예를 들어, 자연적 또는 생물학적 기술적 효과는 일반적으로 인공적 또는 공학적 기술적 효과보다 그러한 편차가 더 클 수 있다.
- [0370] 본 명세서에서 값의 범위에 대한 언급은 단지 범위 내에 속하는 각각의 별도의 값을 개별적으로 언급하는 속기 방법으로 사용하기 위한 것이다. 본 명세서에서 달리 나타내지 않는 한, 각 개별 값은 본 명세서에서 개별적으로 인용된 것처럼 명세서에 포함된다.
- [0371] 본 명세서의 본문 전반에 걸쳐 여러 문서가 인용된다. 여기에서 인용된 각 문서(모든 특허, 특허 출원, 과학 간행물, 제조업체의 사양, 지침 등 포함)는 위 또는 아래에 관계 없이 전체 내용이 참조로 포함된다. 본 명세서의 어떤 것도 본 발명이 선행 발명에 의해 그러한 개시보다 선행할 자격이 없다는 것을 인정하는 것으로 해석되어서는 아니된다.
- [0372] **정의**
- [0373] 다음에서, 본 발명의 모든 태양에 적용되는 정의가 제공된다. 다음에 제시된 용어들은 달리 명시하지 않는 한 다음과 같은 의미를 갖는다. 정의되지 않은 용어는 당업계에서 인식되는 의미를 갖는다.
- [0374] 본원에 사용된 "감소시키다" 또는 "억제하다"와 같은 용어는 예를 들어 약 5% 이상, 약 10% 이상, 약 15% 이상, 약 20% 이상, 약 25% 이상, 약 30% 이상, 약 40% 이상, 약 50% 이상 또는 약 75% 이상의 수준의 전반적인 감소를 유발하는 능력을 의미한다. 용어 "억제하다" 또는 유사한 어구는 완전한 또는 본질적으로 완전한 억제, 즉 0

으로 또는 본질적으로 0으로의 감소를 포함한다.

- [0375] 일 구현예에서 "증가하다" 또는 "강화하다"와 같은 용어는 적어도 약 10%, 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 80%, 또는 적어도 약 100%의 증가 또는 강화와 관련된다.
- [0376] 본원에서 사용되는 "생리학적 pH"는 약 7.5의 pH를 의미한다.
- [0377] 본원에서 사용되는 "생리학적 조건"은 살아있는 대상체, 특히 인간의 조건(특히 pH 및 온도)을 지칭한다. 종기로는 생리학적 조건은 생리학적 pH 및/또는 약 37℃의 온도를 의미한다.
- [0378] 본 명세서에서 사용되는 "%(w/v)" (또는 "% w/v")는 밀리리터(ml) 단위의 총 용액 중 그램(g) 단위의 용질의 양을 백분율로 나타낸 농도 단위로서, 중량/부피%를 의미한다.
- [0379] 본 명세서에서 사용되는 "중량%" 또는 "%(w/w)" (또는 "% w/w")는 그램(g) 단위의 총 조성물의 총 중량 중 물질의 양(g)을 백분율로 나타낸 농도 단위로서, 중량 백분율을 의미한다.
- [0380] 2가 무기 이온, 특히 2가 무기 양이온의 존재와 관련하여, 킬레이트제의 존재로 인한 이들의 농도 또는 유효 농도(유리 이온의 존재)는 일 구현예에서 RNA의 분해를 방지할 정도로 충분히 낮다. 일 구현예에서, 2가 무기 이온의 농도 또는 유효 농도는 RNA 뉴클레오타이드들 간의 포스포디에스테르 결합의 가수분해를 위한 촉매 수준 미만이다. 일 구현예에서, 자유 2가 무기 이온의 농도는 20 μM 이하이다. 일 구현예에서, 자유 2가 무기 이온은 없거나 본질적으로 없다.
- [0381] "삼투질농도(osmolality)"는 용매 킬로그램당 용질의 오스몰(osmoles) 수로 표현되는 특정 용질의 농도를 말한다.
- [0382] "냉동"이라는 용어는 일반적으로 열을 제거하여 액체를 응고시키는 것과 관련이 있다.
- [0383] 입자, 특히 LNP를 포함하는 조성물/제형과 관련하여 본원에서 사용되는 용어 "수성상"은 이동상 또는 액체상, 즉 그 안에 용해된 모든 성분을 포함하지만 (공식적으로) 입자는 제외한 연속 수성상을 의미한다. 따라서, LNP와 같은 입자가 수성상에 분산되고 수성상에 화합물 X가 실질적으로 없다 함은, 실질적으로 및 현실적으로 실현 가능한 방식, 예를 들어 그 수성 조성물 중의 화합물 X의 함량이 1 중량% 미만인 것과 같은 방식으로, 수성상에 X가 없는 것이다. 그러나 이와 동시에, 수성상에 분산된 입자는 1 중량% 이상의 양으로 화합물 X를 포함할 수도 있다.
- [0384] 염기(예를 들어, Tris와 같은 유기 1차 아민)와 관련하여 본원에서 사용되는 "양성자화 형태"라는 표현은 염기의 짝산을 의미하며, 여기서 짝산은 탈양성자화에 의해 제거되어 염기가 되는 양성자를 함유한다. 예를 들어, Tris의 양성자화 형태는 화학식 $[H_3N(CH_2CH_2OH)_3]^+$ 이다. 본원에서 사용되는 "버퍼 물질"은 염기 및 그의 양성자화 형태의 혼합물(예를 들어, Tris와 $[H_3N(CH_2CH_2OH)_3]^+$ 의 혼합물)을 의미한다. 결과적으로, 조성물에 함유된 버퍼 물질의 양은 조성물 중 염기 및 짝산의 양의 합이다.
- [0385] 본 발명의 맥락에서 용어 "재조합"은 "유전공학을 통해 만들어진"을 의미한다. 일 구현예에서, 본 발명의 맥락에서 "재조합 개체"는 자연적으로 발생하지 않는다.
- [0386] 본 명세서에서 사용되는 "자연적으로 발생하는"이라는 용어는 개체가 자연에서 발견될 수 있다는 사실을 의미한다. 예를 들어, 유기체(바이러스 포함)에 존재하고 자연의 공급원에서 분리될 수 있으며 실험실에서 인간에 의해 의도적으로 변형되지 않은 펩타이드 또는 핵산은 자연적으로 발생한다. "자연에서 발견된"이라는 용어는 "자연에 존재하는"을 의미하며 알려진 물체 뿐만 아니라 아직 발견되지 않았거나 자연에서 분리되지 않았지만 미래에 천연 공급원으로부터 발견 및/또는 분리될 수 있는 객체를 포함한다.
- [0387] 본원에서 사용되는 용어 "실온" 및 "주위 온도"는 본원에서 상호 교환적으로 사용되며 적어도 약 15℃, 종기로는 약 15℃ 내지 약 35℃, 약 15℃ 내지 약 30℃, 약 15℃ 내지 약 25℃, 또는 약 17℃ 내지 약 22℃의 온도를 가리킨다. 그러한 온도는 15℃, 16℃, 17℃, 18℃, 19℃, 20℃, 21℃ 및 22℃를 포함한다.
- [0388] 용어 "알킬"은 포화 직쇄 또는 분지쇄 탄화수소의 모노라디칼을 의미한다. 종기로는, 알킬 기는 1 내지 12개(예컨대 1 내지 10개)의 탄소 원자, 즉 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12개의 탄소 원자를 포함하고, C₁₋₁₂ 알킬(C₁₋₁₀ 알킬로 약칭하는 탄소수 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 등), 더욱 종기로는 탄소수 1 내지 8개, 예컨대 1~6개 또는 1~4개의 탄소 원자를 포함한다. 예시적인 알킬기에는 메틸, 에틸, 프로필, 이소-프로필

(2-프로필 또는 1-메틸에틸이라고도 칭함), 부틸, 이소-부틸, tert-부틸, n-펜틸, 이소-펜틸, sec-펜틸, 네오-펜틸, 1,2-디메틸-프로필, 이소-아밀, n-헥실, 이소-헥실, sec-헥실, n-헵틸, 이소-헵틸, n-옥틸, 2-에틸-헥실, n-노닐, n-데실, n-운데실, n-도데실, 등이 포함된다. "치환된 알킬"은 알킬렌기의 하나 이상의 수소 원자(예를 들어, 알킬기에 결합된 수소 원자의 1 내지 최대 수, 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9개, 또는 최대 10개, 예컨대 1 내지 5, 1 내지 4, 또는 1 내지 3, 또는 1 또는 2개)가 수소가 아닌 치환기로 치환됨을 의미한다(두 개 이상의 수소 원자가 치환될 경우 치환기는 같거나 다를 수 있다). 종기로는, 수소 이외의 치환기는 본원에 명시된 바와 같이 1차 수준 치환기이다. 치환된 알킬의 예는 클로로메틸, 디클로로메틸, 플루오로메틸 및 디플루오로메틸을 포함한다.

[0389]

용어 "알킬렌"은 포화 직쇄 또는 분지쇄 탄화수소의 2라디칼을 의미한다. 종기로는, 알킬렌은 1 내지 12개(예컨대 1 내지 10개)의 탄소 원자, 즉 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12개의 탄소 원자(예컨대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 탄소 원자), 더 종기로는 1 내지 8개의 탄소 원자, 예컨대 1 내지 6 또는 1 내지 4개의 탄소 원자를 포함한다. 예시적인 알킬렌기에는 메틸렌, 에틸렌 (즉, 1,1-에틸렌, 1,2-에틸렌), 프로필렌 (즉, 1,1-프로필렌, 1,2-프로필렌 ($-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2-$), 2,2-프로필렌 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_2-$), 및 1,3-프로필렌), 부틸렌 이성질체 (예컨대, 1,1-부틸렌, 1,2-부틸렌, 2,2-부틸렌, 1,3-부틸렌, 2,3-부틸렌 (시스 또는 트랜스 또는 그의 혼합물), 1,4-부틸렌, 1,1-이소-부틸렌, 1,2-이소-부틸렌, 및 1,3-이소-부틸렌), 펜틸렌 이성질체 (예컨대, 1,1-펜틸렌, 1,2-펜틸렌, 1,3-펜틸렌, 1,4-펜틸렌, 1,5-펜틸렌, 1,1-이소-펜틸렌, 1,1-sec-펜틸, 1,1-네오-펜틸), the 헥실렌 이성질체 (예컨대, 1,1-헥실렌, 1,2-헥실렌, 1,3-헥실렌, 1,4-헥실렌, 1,5-헥실렌, 1,6-헥실렌, 및 1,1-이소헥실렌), 헵틸렌 이성질체 (예컨대, 1,1-헵틸렌, 1,2-헵틸렌, 1,3-헵틸렌, 1,4-헵틸렌, 1,5-헵틸렌, 1,6-헵틸렌, 1,7-헵틸렌, 및 1,1-이소헵틸렌), 옥틸렌 이성질체 (예컨대, 1,1-옥틸렌, 1,2-옥틸렌, 1,3-옥틸렌, 1,4-옥틸렌, 1,5-옥틸렌, 1,6-옥틸렌, 1,7-옥틸렌, 1,8-옥틸렌, 및 1,1-이소옥틸렌), 등이 포함된다. 3개 이상의 탄소 원자 및 각 말단에 자유 원자기를 갖는 직쇄 알킬렌 모이어티는 또한 다중 메틸렌(예를 들어, 1,4-부틸렌은 또한 테트라메틸렌으로 불릴 수 있음)으로 지정될 수 있다. 일반적으로, 위에 명시된 바와 같이 알킬렌 잔기에 대해 "일렌"이라는 어미를 사용하는 대신에 "디일"이라는 어미를 사용할 수도 있다 (예컨대 1,2-부틸렌은 부탄-1,2-디일이라고도 함). "치환된 알킬렌"은 알킬렌기의 하나 이상의 수소 원자(예를 들어, 알킬렌기에 결합된 수소 원자의 1 내지 최대 수, 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 또는 최대 10개, 예컨대 1 내지 5, 1 내지 4, 또는 1 내지 3, 또는 1 또는 2개)가 수소가 아닌 치환기로 치환됨을 의미한다(두 개 이상의 수소 원자가 치환될 때 치환기는 같거나 다를 수 있다). 종기로는, 수소 이외의 치환기는 본원에 명시된 바와 같이 1차 수준 치환기이다.

[0390]

"알케닐"이라는 용어는 하나 이상의 탄소-탄소 이중 결합을 갖는 불포화 선형 또는 분지형 탄화수소의 모노라디칼을 의미한다. 일반적으로 알케닐기의 탄소-탄소 이중 결합의 최대 수는 알케닐기의 탄소 원자 수를 2로 나누어 계산한 정수와 같을 수 있으며, 알케닐기의 탄소 원자 수가 홀수인 경우 2로 나눈 결과를 다음 정수로 반내림한다. 예를 들어, 9개의 탄소 원자를 갖는 알케닐기의 경우, 탄소-탄소 이중 결합의 최대 수는 4이다. 종기로는, 알케닐기는 1 내지 6(예컨대 1 내지 4), 즉 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의, 탄소-탄소 이중 결합을 갖는다. 종기로는, 알케닐기는 2 내지 12개(예컨대, 2 내지 10개)의 탄소 원자, 즉 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12개의 탄소 원자(예컨대, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 탄소 원자), 더욱 종기로는 2 내지 8개의 탄소 원자, 예컨대 2 내지 6개의 탄소 원자 또는 2 내지 4개의 탄소 원자를 갖는다. 따라서, 바람직한 구현예에서, 알케닐기는 C_{2-12} 알케닐로 약칭되는 2 내지 12개(예를 들어, 2 내지 10개)의 탄소 원자 및 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개 (예를 들어, 1, 2, 3, 4 또는 5개)의 탄소-탄소 이중 결합을 포함하며, 더욱 종기로는 2 내지 8개의 탄소 원자 및 1, 2, 3 또는 4개의 탄소-탄소 이중 결합, 예컨대 2 내지 6개의 탄소 원자 및 1, 2 또는 3개의 탄소-탄소 이중 결합 또는 2-4개의 탄소 원자와 1 또는 2개의 탄소-탄소 이중 결합을 포함한다. 탄소-탄소 이중 결합(들)은 시스(Z) 또는 트랜스(E) 배열될 수 있다. 예시적인 알케닐기에는 비닐, 1-프로페닐, 2-프로페닐(즉, 알릴), 1-부테닐, 2-부테닐, 3-부테닐, 1-펜테닐, 2-펜테닐, 3-펜테닐, 4-펜테닐, 1-헥세닐, 2-헥세닐, 3-헥세닐, 4-헥세닐, 5-헥세닐, 1-헵테닐, 2-헵테닐, 3-헵테닐, 4-헵테닐, 5-헵테닐, 6-헵테닐, 1-옥테닐, 2-옥테닐, 3-옥테닐, 4-옥테닐, 5-옥테닐, 6-옥테닐, 7-옥테닐, 1-노네닐, 2-노네닐, 3-노네닐, 4-노네닐, 5-노네닐, 6-노네닐, 7-노네닐, 8-노네닐, 1-데세닐, 2-데세닐, 3-데세닐, 4-데세닐, 5-데세닐, 6-데세닐, 7-데세닐, 8-데세닐, 9-데세닐, 1-운데세닐, 2-운데세닐, 3-운데세닐, 4-운데세닐, 5-운데세닐, 6-운데세닐, 7-운데세닐, 8-운데세닐, 9-운데세닐, 10-운데세닐, 1-도데세닐, 2-도데세닐, 3-도데세닐, 4-도데세닐, 5-도데세닐, 6-도데세닐, 7-도데세닐, 8-도데세닐, 9-도데세닐, 10-도데세닐, 11-도데세닐 등이 포함된다. 알케닐기가 질소 원자에 부착된 경우 이중 결합은 질소 원자에 대해 알파가 될 수 없다. "치환된 알케닐"은 알케닐기의 하나 이상의 수소 원자

(예를 들어, 알케닐기에 결합된 수소 원자의 1 내지 최대 수, 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 최대 10개, 예를 들어 1 내지 5, 1 내지 4, 또는 1 내지 3, 또는 1 또는 2개)가 수소 이외의 치환기로 대체됨을 의미한다(하나 이상의 수소 원자가 치환되는 경우 치환기는 같거나 다를 수 있다). 종기로는, 수소 이외의 치환기는 본원에 명시된 바와 같은 1차 수준 치환기이다.

[0391]

용어 "알케닐렌"은 적어도 하나의 탄소-탄소 이중 결합을 갖는 불포화 선형 또는 분지형 탄화수소의 디라디칼을 의미한다. 일반적으로 알케닐렌기의 탄소-탄소 이중 결합의 최대 수는 알케닐렌기의 탄소 원자 수를 2로 나누어 계산한 정수와 같을 수 있으며, 알케닐렌기의 탄소 원자 수가 홀수인 경우 2로 나눈 값을 다음 정수로 반올림한다. 예를 들어, 9개의 탄소 원자를 갖는 알케닐렌 그룹의 경우, 탄소 - 탄소 이중 결합의 최대 수는 4이다. 종기로는 알케닐렌기는 1 내지 6개(예컨대 1 내지 4개), 즉 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의, 탄소-탄소 이중 결합을 갖는다. 종기로는, 알케닐렌기는 2 내지 12개(예컨대, 2 내지 10개)의 탄소 원자, 즉 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12개의 탄소 원자(예컨대, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 탄소 원자), 더욱 종기로는 2 내지 8개의 탄소 원자, 예컨대 2 내지 6개의 탄소 원자 또는 2 내지 4개의 탄소 원자를 갖는다. 따라서, 바람직한 구현예에서, 알케닐렌기는 2 내지 12개(예컨대 2 내지 10개의 탄소) 원자 및 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개(예컨대 1, 2, 3, 4 또는 5개)의 탄소-탄소 이중 결합, 더욱 종기로는 2 내지 8개의 탄소 원자 및 1, 2, 3 또는 4개의 탄소-탄소 이중 결합, 예컨대 2 내지 6개의 탄소 원자 및 1, 2 또는 3개의 탄소-탄소 이중 결합, 또는 2개 내지 4개의 탄소 원자 및 1개 또는 2개의 탄소-탄소 이중 결합을 포함한다. 탄소-탄소 이중 결합(들)은 시스 (Z) 또는 트랜스 (E) 배열일 수 있다. 예시적인 알케닐렌기에는 에텐-1,2-디일, 비닐리텐(또한 에테닐리텐 이라고도 함), 1-프로펜-1,2-디일, 1-프로펜-1,3-디일, 1-프로펜-2,3-디일, 알릴리텐, 1-부텐-1,2-디일, 1-부텐-1,3-디일, 1-부텐-1,4-디일, 1-부텐-2,3-디일, 1-부텐-2,4-디일, 1-부텐-3,4-디일, 2-부텐-1,2-디일, 2-부텐-1,3-디일, 2-부텐-1,4-디일, 2-부텐-2,3-디일, 2-부텐-2,4-디일, 2-부텐-3,4-디일 등이 포함된다. 알케닐렌기가 질소 원자에 결합된 경우 이중 결합은 질소 원자에 대해 알파가 될 수 없다. "치환된 알케닐렌"은 알케닐렌기의 하나 이상의 수소 원자(예컨대 알케닐렌기에 결합된 수소 원자의 1 내지 최대 개수, 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 개, 또는 최대 10개, 예컨대 1 내지 5, 1 내지 4, 또는 1 내지 3, 또는 1 또는 2개)가 수소 이외의 치환기로 치환됨을 의미한다(두 개 이상의 수소 원자가 치환되는 경우 치환기는 같거나 다를 수 있다). 종기로는, 수소 이외의 치환기는 본원에 명시된 바와 같은 1차 수준 치환기이다.

[0392]

용어 "시클로알킬렌"은 "알킬렌"의 시클릭 비방향족 버전을 나타내며 제미날(geminal), 인접(vicinal) 또는 단리된(isolated) 디라디칼이다. 특정 구현예에서, 시클로알킬렌은 (i) 모노시클릭 또는 폴리시클릭(예컨대 바이시클릭 또는 트리시클릭)이고/이거나 (ii) 3 -내지 14원(즉, 3-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8-, 9-, 10-, 11-, 12-, 13-, 14원 또는 14원, 예를 들어 3원 내지 12원 또는 3원 내지 10원)이다. 일 구현예에서 시클로알킬렌은 모노-, 바이- 또는 트리시클릭 3 내지 14원(즉, 3-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8-, 9-, 10-, 11-, 12-, 13원 또는 14원, 예를 들어 3 -내지 12원 또는 3 내지 10원) 시클로알킬렌이다. 일반적으로, 상기 명시된 바와 같은 시클로알킬렌 모이어티에 대해 말단 "일렌"을 사용하는 대신에 말단 "디일"을 사용할 수 있다(예를 들어, 1,2-시클로프로필렌은 또한 시클로프로판-1,2-디일이라고도 함). 예시적인 시클로알킬렌기로는 시클로헥실렌, 시클로헵틸렌, 시클로프로필렌, 시클로부틸렌, 시클로펜틸렌, 시클로옥틸렌, 비시클로[3.2.1]옥틸렌, 비시클로[3.2.2]노닐렌 및 아다만타닐렌 (예를 들어, 트리시클로 [3.3.1.1^{3,7}] 데칸-2,2-디일)을 들 수 있다. "치환된 시클로알킬렌"은 알킬렌기의 하나 이상의 수소 원자(예를 들어, 시클로알킬렌기에 결합된 수소 원자의 1 내지 최대 개수, 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 최대 10개, 예를 들어 1 내지 5, 1 내지 4, 또는 1 내지 3, 또는 1 또는 2개)가 수소 이외의 치환기로 치환됨을 의미한다(하나 이상의 수소 원자가 치환되는 경우 치환기는 같거나 다름). 종기로는, 수소 이외의 치환기는 본원에 명시된 바와 같은 1차 수준 치환기이다.

[0393]

용어 "시클로알케닐렌"은 "알케닐렌"의 시클릭 비방향족 버전을 나타내며 제미날, 인접 또는 단리된 디라디칼이다. 일반적으로, 시클로알케닐렌기의 탄소-탄소 이중 결합의 최대 수는 시클로알케닐렌 그룹의 탄소 원자 수를 2로 나누어 계산한 정수와 같을 수 있으며, 시클로알케닐렌 그룹의 탄소 원자 수가 홀수인 경우, 2로 나눈 값을 다음 정수로 반올림한다. 예를 들어, 9개의 탄소 원자를 갖는 시클로알케닐렌기의 경우, 탄소 - 탄소 이중 결합의 최대 수는 4이다. 종기로는, 시클로알케닐렌기는 1 내지 6개(예컨대 1 내지 4개), 즉 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6 개의 탄소-탄소 이중 결합을 갖는다. 특정 구현예에서, 시클로알케닐렌은 (i) 모노시클릭 또는 폴리시클릭(예컨대 바이시클릭 또는 트리시클릭)이고/이거나 (ii) 3 -내지 14원(즉, 3-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8-, 9-, 10-, 11-, 12-, 13- 또는 14-원, 예를 들어 3 --12원 또는 3~10원) 시클로알케닐렌이다. 일 구현예에서 시클로알케닐렌은 모노-, 바이- 또는 트리시클릭 3 내지 14원(즉, 3-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8-, 9-, 10-, 11-, 12-, 13원 또는 14원,

예컨대 3-내지 12원 또는 3-내지 10원) 시클로알케닐렌이다. 예시적인 시클로알케닐렌 기는 시클로헥세닐렌, 시클로헵테닐렌, 시클로프로페닐렌, 시클로부테닐렌, 시클로펜테닐렌 및 시클로옥테닐렌을 포함한다. "치환된 시클로알케닐렌"은 시클로알케닐렌기의 하나 이상의 수소 원자(예를 들어, 시클로알케닐렌기에 결합된 수소 원자의 1-내지 최대 개수, 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 최대 10개, 예를 들어 1-내지 5, 1-내지 4, 또는 1-내지 3, 또는 1 또는 2개)가 수소 이외의 치환체로 치환됨을 의미한다(하나 이상의 수소 원자가 치환되는 경우 치환체는 같거나 다름). 종기로는, 수소 이외의 치환기는 본원에 명시된 바와 같은 1차 수준 치환기이다.

[0394] 탄화수소와 관련하여 사용되는 용어 "방향족"은 전체 분자가 방향족이어야 함을 의미한다. 예를 들어, 모노시클릭 아릴이 수소화되면(부분적으로 또는 완전히) 생성된 수소화된 시클릭 구조는 본 발명의 목적상 시클로알킬로 분류된다. 마찬가지로, 바이시클릭 또는 폴리시클릭 아릴(예컨대 나프틸)이 수소화되는 경우 생성된 수소화된 바이시클릭 또는 폴리시클릭 구조(예컨대 1,2-디히드로나프틸)는 본 발명의 목적상 시클로알킬로 분류된다(1,2-디히드로나프틸과 같이 하나의 고리여도, 여전히 방향족임).

[0395] 전형적인 1차 수준 치환체는 종기로는 C_{1-3} 알킬, 페닐, 할로젠, $-CF_3$, $-OH$, $-OCH_3$, $-SCH_3$, $-NH_{2-z}(CH_3)_z$, $-C(=O)OH$, 및 $-C(=O)OCH_3$ 로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기서 z 는 0, 1 또는 2이고 C_{1-3} 알킬은 메틸, 에틸, 프로필 또는 이소프로필이다. 특히 바람직한 1차 수준 치환체는 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, 할로젠(예컨대 F, Cl 또는 Br) 및 $-CF_3$, 예컨대 할로젠(예컨대, F, Cl, 또는 Br), 및 $-CF_3$ 으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0396] 냉동된 조성물과 관련하여 본원에서 사용되는 "냉동된 조성물을 해동한 후"라는 표현은 특성(예를 들어, 조성물에 함유된 LNP의 RNA 무결성 및/또는 크기($Z_{평균}$) 및/또는 크기 분포 및/또는 PDI)을 측정하기 전에 냉동된 조성물이 해동되어야 함을 의미한다.

[0397] "1가" 화합물은 관심 작용기를 오직 1개 갖는 화합물에 관한 것이다. 예를 들어, 1가 음이온은 종기로는 생리학적 조건 하에서 단지 하나의 음전하 그룹을 갖는 화합물에 관한 것이다.

[0398] "2가" 또는 "이염기성" 화합물은 2개의 관심 작용기를 갖는 화합물에 관한 것이다. 예를 들어, 이염기성 유기산에는 두 개의 산기가 있다.

[0399] "다가" 또는 "다염기" 화합물은 3개 이상의 관심 작용기를 갖는 화합물에 관한 것이다. 예를 들어, 다염기성 유기산에는 3개 이상의 산기가 있다.

[0400] "RNA 무결성(RNA integrity)"이라는 표현은 샘플에 포함된 RNA의 총량(즉, 단편화되지 않은 RNA 더하기 단편화된 RNA)에 대한 전장(즉, 단편화되지 않은) RNA의 백분율을 의미한다. RNA 무결성은 RNA를 크로마토그래피로 분리(예를 들어, 모세관 전기영동 사용)하고, 주요 RNA 피크의 피크 면적(즉, 전체 길이(즉, 단편화되지 않은) RNA의 피크 면적)을 구하고, 총 RNA의 피크 면적을 구한 다음, 주요 RNA 피크의 피크 면적을 총 RNA의 피크 면적으로 나누어 결정할 수 있다.

[0401] 용어 "동결방지제"는 냉동 단계 동안 제제의 활성 성분을 보호하기 위해 제제(예를 들어, 제형 또는 조성물)에 첨가되는 물질에 관한 것이다.

[0402] 본 발명에 따르면, 용어 "펩타이드"는 올리고- 및 폴리펩타이드를 포함하고 약 2개 이상, 약 3개 이상, 약 4개 이상, 약 6개 이상, 약 8개 이상, 약 10개 또는 그 이상, 약 13개 이상, 약 16개 이상, 약 20개 이상 및 최대 약 50개, 약 100개 또는 약 150개의 연속적인 아미노산들이 펩타이드 결합을 통해 서로 연결된 것을 의미한다. 용어 "단백질"은 큰 펩타이드, 특히 적어도 약 151개의 아미노산을 갖는 펩타이드를 지칭하지만, 용어 "펩타이드" 및 "단백질"은 일반적으로 동의어로 사용된다.

[0403] "치료 단백질"은 대상체에게 치료 유효량으로 제공될 때 대상체의 상태 또는 질병 상태에 대해 긍정적이거나 유리한 효과를 갖는다. 일 구현예에서, 치료용 단백질은 치유 또는 고식적 특성을 갖고 질병 또는 장애의 하나 이상의 증상의 경감, 경감, 경감, 역전, 개시 지연 또는 중증도를 감소시키기 위해 투여될 수 있다. 치료용 단백질은 예방적 특성을 가질 수 있으며 질병의 발병을 지연시키거나 그러한 질병 또는 병리학적 상태의 중증도를 줄이기 위해 사용될 수 있다. 용어 "치료 단백질"은 전체 단백질 또는 펩타이드를 포함하며, 또한 그의 치료 활성 단편을 지칭할 수 있다. 그것은 또한 단백질의 치료 활성 변이체를 포함할 수 있다. 치료 활성 단백질의 예는 백신접종용 항원 및 사이토카인과 같은 면역자극제를 포함하지만 이에 한정되지 않는다.

- [0404] 본 발명에서, 시험관내 또는 대상체에 존재할 수 있는 세포에 일단 흡수되거나 도입된, 즉 형질감염 또는 형질 도입된, 펩타이드 또는 단백질을 인코딩하는 RNA(예를 들어, mRNA)와 같은 핵산은 상기 펩타이드 또는 단백질의 발현을 초래하는 것이 바람직하다. 세포는 인코딩된 펩타이드 또는 단백질을 세포내에서(예를 들어, 세포질 및/또는 핵에서) 발현할 수 있고, 인코딩된 펩타이드 또는 단백질을 분비할 수 있거나, 또는 그것을 표면에서 발현할 수 있다.
- [0405] 본 개시내용에 따르면, "~을 발현하는 핵산" 및 "~을 인코딩하는 핵산"과 같은 용어 또는 유사한 용어는 본원에서 상호교환적으로 사용되며 특정 펩타이드 또는 폴리펩타이드와 관련하여, 그 핵산이 적절한 환경에 존재하는 경우, 종기로는 세포 내에서 상기 펩타이드 또는 폴리펩타이드를 발현하여 이를 생성할 수 있음을 의미한다.
- [0406] "부분(portion)"이라는 용어는 분획을 의미한다. 아미노산 서열 또는 단백질과 같은 특정 구조와 관련하여 그 의 "부분"이라는 용어는 상기 구조의 연속적 또는 불연속적 분획을 나타낼 수 있다.
- [0407] "일부(part)" 및 "단편(fragment)"이라는 용어는 본 명세서에서 상호교환적으로 사용되며 연속 요소를 지칭한다. 예를 들어, 아미노산 서열 또는 단백질과 같은 구조의 일부는 상기 구조의 연속적인 요소를 의미한다. 조성물과 관련하여 사용될 때, 용어 "일부"는 조성물의 한 부분을 의미한다. 예를 들어, 조성물의 일부는 상기 조성물의 0.1% 내지 99.9%(예를 들어, 0.1%, 0.5%, 1%, 5%, 10%, 50%, 90%, 또는 99%)의 특정한 한 부분일 수 있다.
- [0408] 아미노산 서열(펩타이드 또는 단백질)과 관련하여 "단편"은 아미노산 서열의 한 부분, 즉, N-말단 및/또는 C-말단에서 단축된 아미노산 서열을 나타내는 서열에 관한다. C-말단에서 단축된 단편(N-말단 단편)은 예를 들어 오픈 리딩 프레임의 3'-말단이 결여된 절단된 오픈 리딩 프레임의 번역에 의해 얻을 수 있다. N-말단에서 단축된 단편(C-말단 단편)은 절단된 오픈 리딩 프레임이 번역을 시작하는 역할을 하는 시작 코돈을 포함하는 한, 오픈 리딩 프레임의 5'-말단이 결여된 절단 오픈 리딩 프레임의 번역에 의해 예를 들어 얻을 수 있다. 아미노산 서열의 단편은 그 아미노산 서열로부터의 아미노산 잔기의 예컨대 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%를 포함한다. 아미노산 서열의 단편은 그 아미노산 서열의 종기로는 적어도 6개, 특히 적어도 8개, 적어도 12개, 적어도 15개, 적어도 20개, 적어도 30개, 적어도 50개 또는 적어도 100개의 연속 아미노산을 포함한다.
- [0409] 본 개시내용에 따르면, 펩타이드 또는 단백질의 한 부분 또는 단편은 종기로는 그것이 유래된 펩타이드 또는 단백질의 적어도 하나의 기능적 특성을 갖는다. 이러한 기능적 특성은 약리학적 활성, 다른 펩타이드 또는 단백질과의 상호작용, 효소 활성, 항체와의 상호작용 및 핵산의 선택적 결합을 포함한다. 예를 들어, 펩타이드 또는 단백질의 약리학적 활성 단편은 단편이 유래된 펩타이드 또는 단백질의 약리학적 활성 중 적어도 하나를 갖는다. 펩타이드 또는 단백질의 일부 또는 단편은 그 펩타이드 또는 단백질의 종기로는 적어도 6개, 특히 적어도 8개, 적어도 10개, 적어도 12개, 적어도 15개, 적어도 20개, 적어도 30개 또는 적어도 50개의 연속적인 아미노산 서열을 포함한다. 펩타이드 또는 단백질의 일부 또는 단편은 그 펩타이드 또는 단편의 종기로는 8개 이하, 특히 10개 이하, 12개 이하, 15개 이하, 20개 이하, 30개 이하 또는 55개 이하의 연속 아미노산 서열을 포함한다.
- [0410] 본원에서 "변이체"는 적어도 하나의 아미노산 변형으로 인해 모 아미노산 서열과 상이한 아미노산 서열을 의미한다. 모 아미노산 서열은 자연 발생 또는 야생형(WT) 아미노산 서열일 수 있거나, 야생형 아미노산 서열의 변형된 버전일 수 있다. 종기로는, 변이체 아미노산 서열은 모 아미노산 서열과 비교하여 적어도 하나의 아미노산 변형, 예를 들어 모 서열에 비해 1 내지 약 20개의 아미노산 변형, 종기로는 1 내지 약 10개 또는 1 내지 약 5개의 아미노산 변형을 갖는다.
- [0411] 본원에서 "야생형" 또는 "WT" 또는 "천연"은 대립형질 변이를 포함하여 자연에서 발견되는 아미노산 서열을 의미한다. 야생형 아미노산 서열, 펩타이드 또는 단백질에는 의도적으로 변형되지 않은 아미노산 서열이 있다.
- [0412] 본 발명의 목적상, 아미노산 서열(펩타이드, 단백질 또는 폴리펩타이드)의 "변이체"는 아미노산 삽입 변이체, 아미노산 부가 변이체, 아미노산 결실 변이체 및/또는 아미노산 치환 변이체를 포함한다. 용어 "변이체"는 모든 돌연변이, 스플라이스 변이체, 번역 후 변형된 변이체, 형태, 이소형, 대립형질 변이체, 중 변이체 및 중 상동체, 특히 자연적으로 발생하는 것들을 포함한다. 용어 "변이체"는 특히 아미노산 서열의 단편을 포함한다.
- [0413] 아미노산 삽입 변이체는 특정 아미노산 서열에서 단일 또는 2개 이상의 아미노산 삽입을 포함한다. 삽입을 갖는 아미노산 서열 변이체의 경우, 하나 이상의 아미노산 잔기가 아미노산 서열의 특정 부위에 삽입되지만, 결과물의 적절한 스크리닝을 통한 무작위 삽입도 가능하다. 아미노산 부가 변이체는 1개, 2개, 3개, 5개, 10개, 20개,

30개, 50개 이상의 아미노산과 같은 하나 이상의 아미노산의 아미노- 및/또는 카르복시-말단 융합을 포함한다. 아미노산 결실 변이체는 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 50개 이상의 아미노산을 제거하는 것과 같이 서열로부터 하나 이상의 아미노산을 제거하는 것을 특징으로 한다. 결실은 단백질의 임의의 위치에 있을 수 있다. 단백질의 N-말단 및/또는 C-말단 말단에서 결실을 포함하는 아미노산 결실 변이체는 또한 N-말단 및/또는 C-말단 절단 변이체로 불린다. 아미노산 치환 변이체는 서열에서 적어도 하나의 잔기가 제거되고 다른 잔기가 그 자리에 삽입되는 것을 특징으로 한다. 상동 단백질 또는 펩타이드 간에 보존되지 않는 아미노산 서열의 위치에 있는 변형 및/또는 아미노산을 유사한 특성을 갖는 다른 것으로 대체하는 것이 바람직하다. 종기로는, 펩타이드 및 단백질 변이체의 아미노산 변화는 보존적 아미노산 변화, 즉 유사하게 하전되거나 하전되지 않은 아미노산의 치환이다. 보존적 아미노산 변화는 측쇄와 관련된 아미노산 계열 중 하나의 치환을 포함한다. 자연적으로 발생하는 아미노산은 일반적으로 산성(아스파르트레이트, 글루타메이트), 염기성(라이신, 아르기닌, 히스티딘), 비극성(알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판), 비하전 극성(글리신, 아스파라긴, 글루타민, 시스테인, 세린, 트레오닌, 티로신) 아미노산의 4가지 계열로 나뉜다. 페닐알라닌, 트립토판 및 티로신은 때때로 함께 방향족 아미노산으로 분류된다. 일 구현예에서, 보존적 아미노산 치환은 하기 그룹 내의 치환을 포함한다:

[0414] - 글리신, 알라닌;

[0415] - 발린, 이소류신, 류신;

[0416] - 아스파르트 산, 글루탐산;

[0417] - 아스파라긴, 글루타민;

[0418] - 세린, 트레오닌;

[0419] - 라이신, 아르기닌; 그리고

[0420] - 페닐알라닌, 티로신.

[0421] 종기로는 주어진 아미노산 서열과 상기 주어진 아미노산 서열의 변이체인 아미노산 서열 간의 유사성, 종기로는 동일성의 정도는 적어도 약 60%, 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%이다. 유사성 또는 동일성의 정도는 참조 아미노산 서열의 전체 길이에 대해 종기로는 적어도 약 10%, 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90% 또는 약 100% 이다. 예컨대, 참조 아미노산 서열이 200개의 아미노산으로 구성된 경우, 유사성 또는 동일성 정도는 일부 예시적인 연속 아미노산에서, 적어도 약 20, 적어도 약 40, 적어도 약 60, 적어도 약 80, 적어도 약 100, 적어도 약 120, 적어도 약 140, 적어도 약 160, 적어도 약 180, 또는 약 200개 아미노산으로 주어진다. 일부 구현예에서, 유사성 또는 동일성의 정도는 참조 아미노산 서열의 전체 길이에 대해 주어진다. 서열 유사성, 종기로는 서열 동일성을 결정하기 위한 정렬은, 표준 설정, 예컨대 종기로는 EMBOSS::needle, Matrix: Blossum62, Gap Open 10.0, Gap Extend 0.5를 사용하여, 종기로는 최선의 서열 정렬을 사용하여, 공지의 틀을 이용하여 수행될 수 있다.

[0422] "서열 유사성"은 동일하거나 보존적 아미노산 치환을 나타내는 아미노산의 백분율을 나타낸다. 두 아미노산 서열 간의 "서열 동일성"은 서열 간에 동일한 아미노산의 백분율을 나타낸다. 2개의 핵산 서열 간의 "서열 동일성"은 그 서열들 간에 동일한 뉴클레오타이드의 백분율을 나타낸다.

[0423] 용어 "% 동일" 및 "% 동일성" 또는 유사한 용어는 특히 비교될 서열 사이의 최적 정렬에서 동일한 뉴클레오타이드 또는 아미노산의 백분율을 나타내는 것으로 의도된다. 상기 백분율은 순전히 통계적이며, 2개의 서열 사이의 차이는 비교될 서열의 전체 길이에 걸쳐 무작위로 분포될 수 있지만 반드시 그런 것은 아니다. 2개의 서열의 비교는 일반적으로 상응하는 서열의 국소 영역을 확인하기 위해 분절 또는 "비교 창"에 대해 최적 정렬 후 서열을 비교함으로써 수행된다. 비교를 위한 최적의 정렬은 수동으로, 또는 문헌 [Smith 및 Waterman, 1981, Ads App. Math. 2, 482]에 따른 국소 상동성 알고리즘의 도움으로, 문헌 [Neddleman 및 Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48, 443]에 따른 국소 상동성 알고리즘의 도움으로, 문헌 [Pearson 및 Lipman, 1988, Proc. Natl Acad. Sci. USA 88, 2444]에 따른 유사성 조사 알고리즘의 도움으로, 또는 상기 알고리즘을 사용하는 컴퓨터 프로그램(GAP, BESTFIT, FASTA, BLAST P, BLAST N 및 TFASTA in Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.)의 도움을 받아 수행될 수 있다. 일부 구현예에서, 2개의 서열의 퍼센트 동일성은 예컨대 United States National Center for Biotechnology Information (NCBI) 웹사이트(예컨대,

blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=blast2seq&LINK_LOC=align2seq)에서 이용가능한, BLASTN 또는 BLASTP 알고리즘을 이용하여 구한다. 일부 구현예에서, NCBI 웹사이트에서 BLASTN 알고리즘에 사용되는 알고리즘 매개변수는 다음을 포함한다: (i) 10으로 설정된 예상 임계값; (ii) 28로 설정된 단어 크기; (iii) 0으로 설정된 쿼리 범위의 최대 일치; (iv) 1, -2로 설정된 일치/불일치 점수; (v) 선형으로 설정된 갭 비용; 및 (vi) 사용되는 복잡도가 낮은 영역에 대한 필터. 일부 구현예에서, NCBI 웹사이트에서 BLASTP 알고리즘에 사용되는 알고리즘 매개변수는 다음을 포함한다: (i) 10으로 설정된 예상 임계값; (ii) 3으로 설정된 단어 크기; (iii) 0으로 설정된 쿼리 범위의 최대 일치; (iv) BLOSUM62로 설정된 매트릭스; (v) Existence: 11 Extension: 1로 설정된 갭 비용; 및 (vi) 조건부 구성 점수 매트릭스 조정.

- [0424] 퍼센트 동일성은 비교될 서열이 대응하는 동일한 위치의 수를 결정하고, 이 수를 비교된 위치의 수(예를 들어, 참조 서열 내의 위치의 수)로 나누고 이 결과에 100을 곱함으로써 얻어진다.
- [0425] 일부 구현예에서, 유사성 또는 동일성의 정도는 참조 서열의 전장의 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90% 또는 약 100%인 영역에 대해 주어진다. 예를 들어, 참조 핵산 서열이 200개의 뉴클레오타이드로 구성된 경우, 동일성 정도는 일부 구현예의 연속 뉴클레오타이드 중 약 100개 이상, 약 120개 이상, 약 140개 이상, 약 160개 이상, 약 180개 이상 또는 약 200개 뉴클레오타이드에 대해 제공된다. 일부 구현예에서, 유사성 또는 동일성의 정도는 참조 서열의 전체 길이에 대해 주어진다.
- [0426] 동종 아미노산 서열은 본 개시내용에 따라 아미노산 잔기의 적어도 40%, 특히 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90% 및 종기로는 적어도 95%, 적어도 98 또는 적어도 99% 동일성을 나타낸다.
- [0427] 본원에 기재된 아미노산 서열 변이체는 예를 들어 재조합 DNA 조작에 의해 당업자에 의해 쉽게 제조될 수 있다. 치환, 첨가, 삽입 또는 결실을 갖는 펩타이드 또는 단백질을 제조하기 위한 DNA 서열의 조작은 예컨대 Sambrook et al. (1989)에 자세히 설명되어 있다. 또한, 본원에 기재된 펩타이드 및 아미노산 변이체는 예를 들어 고상 합성 및 유사한 방법과 같은 공지된 펩타이드 합성 기술의 도움으로 쉽게 제조될 수 있다.
- [0428] 일 구현예에서, 아미노산 서열(펩타이드 또는 단백질)의 단편 또는 변이체는 종기로는 "기능적 단편" 또는 "기능적 변이체"이다. 아미노산 서열의 "기능적 단편" 또는 "기능적 변이체"라는 용어는 이것이 유래된 아미노산 서열의 기능적 특성과 동일하거나 유사한 하나 이상의 기능적 특성을 나타내는 임의의 단편 또는 변이체에 관한 것으로, 즉 기능적으로 동일하다. 항원 또는 항원성 서열과 관련하여, 하나의 특정 기능은 단편 또는 변이체가 유래된 아미노산 서열에 의해 나타나는 하나 이상의 면역원성 활성이다. 본원에서 사용되는 용어 "기능적 단편" 또는 "기능적 변이체"는 예를 들어 면역 반응을 유도하는 것과 같이 여전히 모 분자 또는 서열의 기능 중 하나 이상을 여전히 수행할 수 있으면서, 특히 모 분자의 아미노산 서열과 비교하여 하나 이상의 아미노산에 의해 변경된 아미노산 서열을 포함하는 변이체 분자 또는 서열을 지칭한다. 일 구현예에서, 모 분자 또는 서열의 아미노산 서열에서의 변형은 분자 또는 서열의 특성에 유의미한 영향을 미치거나 변경하지 않는다. 다른 구현예에서, 기능적 단편 또는 기능적 변이체의 기능은 감소될 수 있지만 여전히 유의미하게 존재할 수 있다. 예를 들어, 기능적 변이체의 면역원성은 모 분자 또는 서열의 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 또는 적어도 90%일 수 있다. 그러나, 다른 구현예에서, 기능적 단편 또는 기능적 변이체의 면역원성은 모 분자 또는 서열에 비해 향상될 수 있다.
- [0429] 지정된 아미노산 서열(펩타이드, 단백질 또는 폴리펩타이드)"로부터 유도된" 아미노산 서열(펩타이드, 단백질 또는 폴리펩타이드)은 첫 번째 아미노산 서열의 기원을 의미한다. 종기로는, 특정 아미노산 서열로부터 유도된 아미노산 서열은 그 특정 서열 또는 이의 단편과 동일하거나 본질적으로 동일하거나 상동인 아미노산 서열을 갖는다. 특정 아미노산 서열로부터 유도된 아미노산 서열은 그 특정 서열의 변이체 또는 이의 단편일 수 있다. 예를 들어, 본원에서 사용하기에 적합한 항원은 원하는 활성을 유지하면서 이들이 유래된 천연 발생 또는 천연 서열로부터 서열이 달라지도록 변경될 수 있음을 당업자는 이해할 것이다.
- [0430] "단리된"은 자연 상태에서 변경되거나 제거된 것을 의미한다. 예를 들어, 살아있는 동물에 자연적으로 존재하는 핵산 또는 펩타이드는 "단리된"것이 아니며, 자연 상태의 공존하는 물질로부터 부분적으로 또는 완전히 분리된 동일한 핵산 또는 펩타이드는 "단리된" 것이다. 단리된 핵산 또는 단백질은 실질적으로 정제된 형태로 존재할 수 있거나, 예를 들어 숙주 세포와 같은 비천연 환경에 존재할 수 있다. 바람직한 구현예에서, 본 발명에 사용된 RNA(예컨대 mRNA)는 실질적으로 정제된 형태이다. 일 구현예에서, 실질적으로 정제된 형태의 RNA(예컨대 mRNA)의 용액(종기로는 수용액)은 제1 버퍼 시스템을 함유한다.
- [0431] "유전적 변형" 또는 간단히 "변형"이라는 용어는 핵산으로 세포를 형질감염시키는 것을 포함한다. "형질감염"이

라는 용어는 핵산, 특히 RNA를 세포에 도입하는 것과 관련이 있다. 본 개시내용의 목적을 위해, "형질감염"이라는 용어는 또한 세포 내로 핵산의 도입 또는 그러한 세포에 의한 핵산의 흡수를 포함하며, 여기서 세포는 대상체, 예를 들어 환자에 존재할 수 있다. 따라서, 본 개시내용에 따르면, 본원에 기재된 핵산의 형질감염을 위한 세포는 시험관내 또는 생체내에서 존재할 수 있고, 예컨대, 세포는 환자의 장기, 조직 및/또는 유기체의 일부를 형성할 수 있다. 개시내용에 따르면, 형질감염은 일시적이거나 안정적인 수 있다. 형질감염의 일부 응용 분야에서는 형질감염된 유전 물질이 일시적으로만 발현된다면 충분하다. RNA는 인코딩된 단백질을 일시적으로 발현하기 위해 세포에 형질감염될 수 있다. 형질감염 과정에서 도입된 핵산은 일반적으로 핵 게놈에 통합되지 않기 때문에 외부 핵산은 유사분열을 통해 희석되거나 분해된다. 핵산의 에피 줌 증폭을 허용하는 세포는 희석 속도를 크게 감소시킨다. 형질감염된 핵산이 실제로 세포 및 그 딸세포의 게놈에 남아있는 것이 바람직하다면, 안정적인 형질감염이 일어나야 한다. 이러한 안정적인 형질감염은 형질감염을 위해 바이러스 기반 시스템 또는 트랜스포존 기반 시스템을 사용하여 달성할 수 있다. 일반적으로 항원을 인코딩하는 핵산은 일시적으로 세포에 형질감염된다. RNA는 인코딩된 단백질을 일시적으로 발현하기 위해 세포에 형질감염될 수 있다.

[0432] 본 개시내용에 따르면, 펩타이드 또는 단백질의 유사체는 그것이 유래되고 상기 펩타이드 또는 단백질의 적어도 하나의 기능적 특성을 갖는 상기 펩타이드 또는 단백질의 변형된 형태이다. 예를 들어, 펩타이드 또는 단백질의 약리학적 활성 유사체는 그 유사체가 유래된 펩타이드 또는 단백질의 약리학적 활성 중 적어도 하나를 갖는다. 이러한 변형은 임의의 화학적 변형을 포함하고 탄수화물, 지질 및/또는 단백질 또는 펩타이드와 같은 단백질 또는 펩타이드와 관련된 임의의 분자의 단일 또는 다중 치환, 결실 및/또는 추가를 포함한다. 일 구현예에서, 단백질 또는 펩타이드의 "유사체"는 글리코실화, 아세틸화, 인산화, 아미드화, 팔미토일화, 미리스토일화, 이소프레닐화, 지질화, 알킬화, 유도체화, 보호/차단기의 도입, 단백질분해 절단 또는 항체 또는 다른 세포 리간드에의 결합에 의해 야기되는 변형된 형태를 포함한다. "유사체"라는 용어는 또한 상기 단백질 및 펩타이드의 모든 기능적 화학적 등가물로 확장된다.

[0433] 본원에서 사용되는 "활성화" 또는 "자극"은 검출가능한 세포 증식을 유도하기에 충분히 자극된 T 세포와 같은 면역 이펙터 세포의 상태를 지칭한다. 활성화는 또한 신호전달 경로의 개시, 유도된 사이토카인 생산 및 검출가능한 이펙터 기능과 연관될 수 있다. "활성화된 면역 이펙터 세포"라는 용어는 무엇보다도 세포 분열을 겪고 있는 면역 이펙터 세포를 의미한다.

[0434] 용어 "프라이밍(priming)"은 T 세포와 같은 면역 이펙터 세포가 그의 특정 항원과 처음 접촉하고 이펙터 T 세포와 같은 이펙터 세포로 분화를 일으키는 과정을 의미한다.

[0435] "클론 확장" 또는 "확장"이라는 용어는 특정 개체가 증식되는 과정을 의미한다. 본 발명의 맥락에서, 상기 용어는 종기로는 면역 이펙터 세포가 항원에 의해 자극되고, 증식하고, 상기 항원을 인식하는 특정 면역 이펙터 세포가 증폭되는 면역학적 반응의 맥락에서 사용된다. 종기로는, 클론 확장은 면역 이펙터 세포의 분화를 유도한다.

[0436] 본 개시내용에 따른 "항원"은 면역 반응을 유도할 임의의 물질 및/또는 면역 반응 또는 세포 반응과 같은 면역 메커니즘이 지시되는 임의의 물질을 포함한다. 이것은 또한 항원이 항원 펩타이드로 가공되고 면역 반응 또는 면역 메커니즘이 특히 MHC 분자와 관련하여 제시되는 경우 하나 이상의 항원 펩타이드에 대해 지시되는 상황을 포함한다. 특히, "항원"은 항체 또는 T-림프구(T-세포)와 특이적으로 반응하는 임의의 물질, 종기로는 펩타이드 또는 단백질에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 용어 "항원"은 T 세포 에피토프와 같은 적어도 하나의 에피토프를 포함하는 임의의 분자를 포함한다. 종기로는, 본 발명의 맥락에서 항원은 선택적으로 처리 후, 면역 반응, 종기로는 항원(항원을 발현하는 세포 포함)에 특이적인 면역 반응을 유도하는 분자이다. 일 구현예에서, 항원은 질병 관련 항원, 예컨대 종양 항원, 바이러스 항원 또는 세균 항원, 또는 이러한 항원으로부터 유도된 에피토프이다.

[0437] 본 개시내용에 따르면, 면역 반응에 대한 후보인 임의의 적합한 항원이 사용될 수 있으며, 여기서 면역 반응은 체액성 및 세포성 면역 반응 모두일 수 있다. 본 개시내용의 일부 구현예의 맥락에서, 항원은 종기로는 항원에 대한 면역 반응을 일으키는 MHC 분자의 맥락에서 세포, 종기로는 항원 제시 세포에 의해 제시된다. 항원은 종기로는 자연 발생 항원에 해당하거나 그로부터 유래된 산물이다. 이러한 자연 발생 항원은 알레르겐, 바이러스, 박테리아, 진균, 기생충 및 기타 감염원 및 병원체를 포함하거나 그로부터 유도될 수 있거나 항원은 또한 종양 항원일 수 있다. 본 개시 내용에 따르면, 항원은 자연 발생 산물, 예를 들어 바이러스 단백질 또는 그의 일부에 해당할 수 있다.

[0438] "질병 관련 항원"이라는 용어는 가장 넓은 의미에서 질병과 관련된 임의의 항원을 지칭하는 데 사용된다. 질병

관련 항원은 숙주의 면역 체계를 자극하여 질병에 대한 세포 항원 특이적 면역 반응 및/또는 체액성 항체 반응을 일으키는 에피토프를 포함하는 분자이다. 질병 관련 항원에는 병원체 관련 항원, 즉 미생물에 의한 감염과 관련된 항원, 일반적으로 미생물 항원(예컨대 박테리아 또는 바이러스 항원), 또는 암, 일반적으로 종양, 예를 들어 종양 항원과 관련된 항원이 포함된다.

[0439] 바람직한 구현예에서, 항원은 종양 항원, 즉 종양 세포의 일부, 특히 세포내에서 또는 종양 세포의 표면 항원으로서 주로 발생하는 항원이다. 또 다른 구현예에서, 항원은 병원체-관련 항원, 즉 병원체, 예를 들어 바이러스, 박테리아, 단세포 유기체 또는 기생충으로부터 유래된 항원, 예를 들어 바이러스 리보핵단백질 또는 외피 단백질과 같은 바이러스 항원이다. 특히, 항원은 특히 T-세포 수용체 활성의 조절을 통해 면역계의 세포, 종기로는 CD4+ 및 CD8+ 림프구의 조절, 특히 활성화를 초래하는 MHC 분자에 의해 제시되어야 한다.

[0440] 용어 "종양 항원"은 세포질, 세포 표면 또는 세포 핵으로부터 유래될 수 있는 암 세포의 구성요소를 의미한다. 이 용어는 특히 세포 내에서 생성되거나 종양 세포에서 표면 항원으로 생성되는 항원을 의미한다. 예를 들어, 종양 항원에는 암 배아 항원, α 1-태아단백, 이소페리틴 및 태아 세포당단백질, α 2-H-철단백질 및 γ -태아단백질 뿐만 아니라 다양한 바이러스 종양 항원이 포함된다. 본 개시내용에 따르면, 종양 항원은 종기로는 유형 및/또는 발현 수준과 관련하여 종양 또는 암 뿐만 아니라 종양 또는 암 세포에 특징적인 임의의 항원을 포함한다.

[0441] 용어 "바이러스 항원"은 항원 특성을 갖는, 즉 개체에서 면역 반응을 유발할 수 있는 임의의 바이러스 성분을 지칭한다. 바이러스 항원은 바이러스 리보핵단백질 또는 외피 단백질일 수 있다.

[0442] 용어 "박테리아 항원"은 항원 특성을 갖는 임의의 박테리아 성분, 즉, 개인의 면역 반응을 유발할 수 있다. 박테리아 항원은 박테리아의 세포벽 또는 세포질 막에서 유래할 수 있다.

[0443] 용어 "에피토프"는 항원과 같은 분자 내의 항원 결정인자, 즉 면역 시스템에 의해 인식되는 분자의 일부 또는 단편, 예를 들어 특히 MHC 분자와 관련하여 제시될 경우 항체 T 세포 또는 B 세포에 의해 인식되는 항원 결정인자를 의미한다. 단백질의 에피토프는 종기로는 상기 단백질의 연속적 또는 불연속적 부분을 포함하고 종기로는 약 5 내지 약 100, 종기로는 약 5 내지 약 50, 더욱 종기로는 약 8 내지 약 10, 가장 종기로는 약 10 내지 약 25 개 아미노산 길이이며, 예를 들어, 에피토프는 종기로는 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 또는 25개 아미노산 길이인 것이 바람직하다. 본 발명의 맥락에서 에피토프는 T 세포 에피토프인 것이 특히 바람직하다.

[0444] "에피토프", "항원의 단편", "면역원성 펩타이드" 및 "항원 펩타이드"와 같은 용어는 본원에서 상호 교환적으로 사용되며 종기로는 항원에 대해 또는 그 항원을 발현하거나 포함하고 바람직하게 제시하는 세포에 대해 면역 반응을 유도할 수 있는 항원의 불완전한 표시(incomplete representation)와 관련된다. 종기로는, 이 용어는 항원의 면역원성 부분에 관한 것이다. 종기로는, 특히 MHC 분자와 관련하여 제시되는 경우 T 세포 수용체에 의해 인식되는(즉, 특이적으로 결합되는) 항원의 부분이다. 특정한 바람직한 면역원성 부분은 MHC 클래스 I 또는 클래스 II 분자에 결합한다. 용어 "에피토프"는 면역계에 의해 인식되는 항원과 같은 분자의 일부 또는 단편을 의미한다. 예를 들어, 에피토프는 T 세포, B 세포 또는 항체에 의해 인식될 수 있다. 항원의 에피토프는 항원의 연속적 또는 불연속적 부분을 포함할 수 있고 약 5 내지 약 100, 예를 들어 약 5 내지 약 50, 더 종기로는 약 8 내지 약 30, 가장 종기로는 약 8 내지 약 25개의 아미노산 길이일 수 있고, 예를 들어, 에피토프는 종기로는 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 또는 25개의 아미노산 길이일 수 있다. 일 구현예에서, 에피토프는 길이가 약 10 내지 약 25개 아미노산이다. 용어 "에피토프"는 T 세포 에피토프를 포함한다.

[0445] 용어 "T 세포 에피토프"는 MHC 분자와 관련하여 제시될 때 T 세포에 의해 인식되는 단백질의 일부 또는 단편을 의미한다. 용어 "주요 조직 적합성 복합체" 및 약어 "MHC"는 MHC 클래스 I 및 MHC 클래스 II 분자를 포함하고 모든 척추동물에 존재하는 유전자 복합체에 관한 것이다. MHC 단백질 또는 분자는 면역 반응에서 림프구와 항원 제시 세포 또는 질병 세포 사이의 신호전달에 중요하며, 여기서 MHC 단백질 또는 분자는 펩타이드 에피토프에 결합하여 T 세포 상의 T 세포 수용체에 의한 인식을 위해 제시한다. MHC에 의해 인코딩된 단백질은 세포의 표면에서 발현되며, 자가 항원(세포 자체로부터의 펩타이드 단편) 및 비자가 항원(예를 들어, 침입하는 미생물의 단편) 모두를 T 세포에 나타낸다. 클래스 I MHC/펩타이드 복합체의 경우, 결합 펩타이드는 전형적으로 약 8 내지 약 10개의 아미노산 길이이지만 더 길거나 더 짧은 펩타이드가 효과적일 수 있다. 클래스 II MHC/펩타이드 복합체의 경우, 결합 펩타이드는 전형적으로 약 10 내지 약 25개의 아미노산 길이이고 특히 약 13 내지 약 18개의 아미노산 길이인 반면, 더 길고 더 짧은 펩타이드가 효과적일 수 있다.

[0446] 펩타이드 및 단백질 항원은 예를 들어 5개 아미노산, 10개 아미노산, 15개 아미노산, 20개 아미노산, 25개 아미노산

노산, 30개 아미노산, 35개 아미노산, 40개 아미노산, 45개 아미노산 또는 50개의 아미노산 길이를 포함하는 2 내지 100개 아미노산일 수 있다. 일부 구현예에서, 펩타이드는 50개 이상의 아미노산일 수 있다. 일부 구현예에서, 펩타이드는 100개 이상의 아미노산일 수 있다.

- [0447] 펩타이드 또는 단백질 항원은 펩타이드 또는 단백질에 대한 항체 및 T 세포 반응을 발생시키는 면역계의 능력을 유도하거나 증가시킬 수 있는 임의의 펩타이드 또는 단백질일 수 있다.
- [0448] 일 구현예에서, 백신 항원, 즉 대상체에 대한 접종이 면역 반응을 유도하는 항원은 면역 이펙터 세포에 의해 인식된다. 종기로는, 면역 이펙터 세포에 의해 인식되는 경우 백신 항원은 적절한 공동 자극 신호의 존재 하에, 백신 항원을 인식하는 항원 수용체를 보유하는 면역 이펙터 세포의 자극, 프라이밍 및/또는 확장을 유도할 수 있는 것이 바람직하다. 본 개시내용의 구현예의 맥락에서, 백신 항원은 종기로는 세포, 종기로는 항원 제시 세포의 표면 상에 제시되거나 존재한다. 일 구현예에서, 항원은 질병에 걸린 세포(종양 세포 또는 감염된 세포와 같은)에 의해 제시된다. 일 구현예에서, 항원 수용체는 MHC와 관련하여 제시된 항원의 에피토프에 결합하는 TCR이다. 일 구현예에서, T 세포에 의해 발현되고/되거나 T 세포 상에 존재하는 경우, TCR이 항원 제시 세포와 같은 세포에 의해 제시된 항원에 결합하면 상기 T 세포의 자극, 프라이밍 및/또는 확장이 초래된다. 일 구현예에서, T 세포에 의해 발현되고/되거나 T 세포 상에 존재하는 경우, TCR이 병든 세포 상에 제시된 항원에 결합하면 병든 세포의 세포용해 및/또는 세포자멸사를 초래하고, 여기서 상기 T 세포는 종기로는 세포독성 인자, 예를 들어, 퍼포린 및 그랜자임을 방출한다.
- [0449] 일 구현예에서, 항원 수용체는 항원의 에피토프에 결합하는 항체 또는 B 세포 수용체이다. 일 구현예에서, 항체 또는 B 세포 수용체는 항원의 천연 에피토프에 결합한다.
- [0450] "세포 표면에서 발현되는 " 또는 "세포 표면과 회합된(associated with the cell surface)"이라는 용어는 항원과 같은 분자가 세포의 원형질막과 회합되고 위치하는 것을 의미하며, 여기서 분자의 적어도 일부는 상기 세포의 세포의 공간을 향하고, 상기 세포의 외부로부터, 예를 들어 세포 외부에 위치한 항체에 의해 접근가능하다. 이와 관련하여, 일부는 종기로는 4개 이상, 종기로는 8개 이상, 종기로는 12개 이상, 더욱 종기로는 20개 이상의 아미노산이다. 회합은 직접적이거나 간접적일 수 있다. 예를 들어, 회합은 하나 이상의 막관통 도메인, 하나 이상의 지질 앵커에 의해, 또는 임의의 다른 단백질, 지질, 사카라이드, 또는 세포의 원형질막의 외부 첨관에서 발견될 수 있는 다른 구조와의 상호작용에 의해 이루어질 수 있다. 예를 들어, 세포 표면과 회합된 분자는 세포 외 부분을 갖는 막관통 단백질일 수 있거나 막관통 단백질인 다른 단백질과 상호작용하여 세포 표면과 회합된 단백질일 수 있다.
- [0451] "세포 표면" 또는 "세포의 표면"은 당업계에서의 통상적인 의미에 따라 사용되며, 따라서 단백질 및 다른 분자에 의해 결합될 수 있는 세포 외부를 포함한다. 항원은 세포 표면에 위치하고 예를 들어 세포에 첨가된 항원 특이적 항체에 의해 접근가능한 경우, 세포 표면에서 발현된다.
- [0452] 본 발명의 맥락에서 "세포외 부분" 또는 "엑소도메인"은 세포의 세포외 공간을 향하고 종기로는 예컨대 세포 외부에 위치한 항체와 같은 분자의 결합에 의해, 상기 세포의 외부로부터 접근가능한 단백질과 같은 분자의 일부를 지칭한다. 종기로는, 상기 용어는 하나 이상의 세포외 루프 또는 도메인 또는 이의 단편을 의미한다.
- [0453] 용어 "T 세포" 및 "T 림프구"는 본원에서 상호교환적으로 사용되며 세포용해성 T 세포를 포함하는 T 헬퍼 세포(CD4+ T 세포) 및 세포독성 T 세포(CTL, CD8+ T 세포)를 포함한다. 용어 "항원-특이적 T 세포" 또는 유사한 용어는 특히, 항원 제시 세포 또는 MHC 분자의 문맥 상 암 세포와 같은 병든 세포의 표면 상에 제시될 때 T 세포가 표적이 되는 항원을 인식하고 바람직하게는 T 세포의 이펙터 기능을 발휘하는 T 세포에 관한 것이다. T 세포는 항원을 발현하는 표적 세포를 죽이는 경우 항원에 특이적인 것으로 간주된다. T 세포 특이성은 예를 들어 크롬 방출 검정 또는 증식 검정 내에서 임의의 다양한 표준 기술을 사용하여 평가할 수 있다. 또는 림포카인(예컨대 인터페론- γ)의 합성을 측정할 수 있다. 본 개시내용의 특정 구현예에서, RNA(특히 mRNA)는 적어도 하나의 에피토프를 인코딩한다.
- [0454] "표적"이라는 용어는 세포 면역 반응과 같은 면역 반응의 표적이 되는 세포 또는 조직과 같은 체제를 의미한다. 표적은 항원 또는 항원 에피토프, 즉 항원으로부터 유도된 펩타이드 단편을 제시하는 세포를 포함한다. 일 구현예에서, 표적 세포는 항원을 발현하고 종기로는 클래스 I MHC를 갖는 상기 항원을 제시하는 세포이다.
- [0455] "항원 가공"은 상기 항원의 단편인 가공 생성물로의 항원의 분해(예를 들어, 단백질의 펩타이드로의 분해) 및 세포, 종기로는 특정 T 세포에 대한 항원 제시 세포에 의한 제시를 위한 MHC 분자와 이들 단편 중 하나 이상의 회합(예를 들어, 결합을 통한)을 지칭한다.

- [0456] "항원-반응성 CTL"이라 함은 항원 또는 상기 항원으로부터 유도된 펩타이드에 반응하는 $CD8^+$ T-세포를 의미하며, 이는 항원 제시 세포의 표면 상에 클래스 I MHC로 제시된다.
- [0457] 본 개시내용에 따르면, CTL 반응성은 지속적인 칼슘 플럭스, 세포 분열, $IFN-\gamma$ 및 $TNF-\alpha$ 와 같은 사이토카인 생성, CD44 및 CD69와 같은 활성화 마커의 상향 조절 및 중앙 항원 발현 표적 세포의 특이적 세포용해 사멸을 포함할 수 있다.. CTL 반응성은 또한 CTL 반응성을 정확하게 나타내는 인공 리포터를 사용하여 결정될 수 있다.
- [0458] 용어 "면역 반응(immune response)" 및 "면역 반응(immune reaction)"은 본 명세서에서 통상적인 의미로 상호 교환적으로 사용되며 항원에 대한 통합된 신체 반응을 의미하고 좋기로는 세포성 면역 반응, 체액성 면역 반응 또는 둘 모두를 의미한다. 본 개시내용에 따르면, 항원, 세포 또는 조직과 같은 제제에 대한 "면역 반응" 또는 "면역 반응"이라는 용어는 제제에 대한 세포 반응과 같은 면역 반응에 관한 것이다. 면역 반응은 다양한 증식 또는 시험관내 사이토카인 생산 시험에서 검출될 수 있는, 하나 이상의 항원에 대한 항체 발생 및 항원 특이적 T-림프구, 좋기로는 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T-림프구, 더욱 좋기로는 $CD8^+$ T-림프구의 확장으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 반응을 포함할 수 있다.
- [0459] 본 발명의 맥락에서 "면역 반응을 유도하는 " 및 "면역 반응을 이끌어내는 "이라는 용어 및 유사한 용어는 면역 반응의 유도, 좋기로는 세포성 면역 반응, 체액성 면역 반응 또는 둘 다의 유도를 지칭한다. 면역 반응은 보호적/예방적(preventive)/예방적(prophylactic) 및/또는 치료적일 수 있다. 면역 반응은 임의의 면역원 또는 항원 또는 항원 펩타이드, 좋기로는 중앙 관련 항원 또는 병원체 관련 항원(예를 들어, 바이러스 (예컨대 인플루엔자 바이러스(A, B 또는 C), CMV 또는 RSV의 항원)에 대한 것일 수 있다. 이 문맥에서 "유도"는 유도 이전에 특정 항원 또는 병원체에 대한 면역 반응이 없었다는 것을 의미할 수 있지만, 유도 전 특정 항원 또는 병원체에 대해 특정 수준의 면역 반응이 있었고 유도 후에 상기 면역 응답성이 향상됨을 의미할 수도 있다. 따라서, 이 문맥에서 "면역 반응을 유도하는 것"은 "면역 반응을 강화하는 것"도 포함한다. 좋기로는, 개체에서 면역 반응을 유도한 후, 상기 개체는 감염성 질병 또는 암성 질병과 같은 질병이 발병하는 것으로부터 보호되거나 질병 상태가 면역 반응을 유도함으로써 개선된다.
- [0460] 용어 "세포 면역 반응", "세포 반응", "세포-매개 면역" 또는 유사한 용어는 클래스 I 또는 클래스를 갖는 항원의 발현 및/또는 제시를 특징으로 하는 세포에 대한 세포 반응을 포함하는 것을 의미한다. II MHC, 세포 반응은 "조력자" 또는 "살해자" 역할을 하는 T 세포 또는 T 림프구라고 하는 세포와 관련이 있다. 보조 T 세포($CD4^+$ T 세포라고도 함)는 면역 반응을 조절하고 킬러 세포(세포독성 T 세포, 세포용해 T 세포, $CD8^+$ T 세포 또는 CTL이라고도 함)가 질병 세포와 같은 세포를 죽임으로써 중심적인 역할을 한다.
- [0461] 용어 "체액성 면역 반응"은 궁극적으로 중화 및/또는 제거하는 제제 및 유기체에 대한 반응으로 항체가 생성되는 살아있는 유기체에서의 과정을 의미한다. 항체 반응의 특이성은 단일 특이성의 항원에 결합하는 막 결합 수용체를 통해 T 및/또는 B 세포에 의해 매개된다. 적절한 항원이 결합하고 다양한 다른 활성화 신호를 받으면 B 림프구가 분열하여 기억 B 세포와 항체 분비 형질 세포 클론을 생성하며, 이들 각각은 항원 수용체에 의해 인식된 것과 동일한 항원 에피토프를 인식하는 항체를 생성한다. 기억 B 림프구는 나중에 특정 항원에 의해 활성화될 때까지 휴면 상태를 유지한다. 이들 림프구는 기억의 세포 기반을 제공하고 특정 항원에 다시 노출될 때 항체 반응의 결과적 확장을 제공한다.
- [0462] 본원에서 사용되는 용어 "항체"는 항원 상의 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있는 면역글로불린 분자를 의미한다. 특히, 용어 "항체"는 이황화 결합에 의해 상호 연결된 적어도 2개의 중(H)쇄 및 2개의 경(L)쇄를 포함하는 당단백질을 지칭한다. 용어 "항체"는 모노클로날 항체, 재조합 항체, 인간 항체, 인간화 항체, 키메라 항체 및 이들의 조합을 포함한다. 각 중쇄는 중쇄 가변 영역(VH)과 중쇄 불변 영역(CH)으로 구성된다. 각 경쇄는 경쇄 가변 영역(VL)과 경쇄 불변 영역(CL)으로 구성된다. 가변 영역 및 불변 영역은 본원에서 각각 가변 도메인 및 불변 도메인으로도 지칭된다. VH 및 VL 영역은 상보성 결정 영역(CDR)이라고 하는 초가변 영역으로 더 세분될 수 있으며, 프레임워크 영역(FR)이라고 하는 보다 보존된 영역이 산재되어 있다. 각각의 VH 및 VL은 아미노 말단에서 카복시 말단까지: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4의 순서로 배열된 3개의 CDR과 4개의 FR로 구성된다. VH의 CDR은 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3이라고 하고, VL의 CDR은 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3이라고 한다. 중쇄 및 경쇄의 가변 영역에는 항원과 상호작용하는 결합 도메인이 포함되어 있다. 항체의 불변 영역은 중쇄 불변 영역(CH) 및 경쇄 불변 영역(CL)을 포함하며, 여기서 CH는 불변 도메인 CH1, 힌지 영역 및 불변 도메인 CH2 및 CH3(아미노 말단에서 카복시 말단으로, 다음 순서로 배열된다: CH1, CH2, CH3). 항체의 불변 영역은 면역계의 다양한 세포(예를 들어, 이펙터 세포) 및 고전적 보체 시스템의 제1 성분(C1q)을 포함하는 숙주 조직 또는 인자

에 대한 면역글로불린의 결합을 매개할 수 있다. 항체는 천연 공급원 또는 재조합 공급원으로부터 유래된 온전한 면역글로불린일 수 있고 온전한 면역글로불린의 면역활성 부분일 수 있다. 항체는 일반적으로 면역글로불린 분자의 사량체이다. 항체는 예를 들어 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체, Fv, Fab 및 F(ab)₂ 뿐만 아니라 단일 사슬 항체 및 인간화 항체를 포함하는 다양한 형태로 존재할 수 있다.

[0463] 용어 "면역글로불린"은 면역글로불린 슈퍼패밀리의 단백질, 종기로는 항체 또는 B 세포 수용체(BCR)와 같은 항원 수용체에 관한 것이다. 면역글로불린은 특징적인 면역글로불린(Ig) 접힘(fold)을 갖는 구조적 도메인, 즉 면역글로불린 도메인을 특징으로 한다. 이 용어는 가용성 면역글로불린 뿐만 아니라 막결합 면역글로불린을 포괄한다. 막 결합 면역글로불린은 일반적으로 BCR의 일부인 표면 면역글로불린 또는 막 면역글로불린이라고도 한다. 가용성 면역글로불린은 일반적으로 항체라고 한다. 면역글로불린은 일반적으로 여러 사슬, 일반적으로 이황화 결합을 통해 연결된 두 개의 동일한 중쇄와 두 개의 동일한 경쇄를 포함한다. 이들 사슬은 주로 V_L(가변 경쇄) 도메인과 같은 면역글로불린 도메인으로 구성된다. C_L(불변 경쇄) 도메인, V_H(가변 중쇄) 도메인 및 C_H(불변 중쇄) 도메인 C_H1, C_H2, C_H3, 및 C_H4와 같은, 면역글로불린 도메인으로 구성된다. 상이한 부류의 항체, 즉 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM을 설명하는 5 가지 종류의 포유동물 면역글로불린 중쇄, 즉 α, δ, ε 및 μ가 존재한다. 가용성 면역글로불린의 중쇄와 달리 막 또는 표면 면역글로불린의 중쇄는 카르복시 말단에 막관통 도메인과 짧은 세포질 도메인을 포함한다. 포유류에는 두 가지 유형의 경쇄, 즉 람다와 카파가 있다. 면역글로불린 사슬은 가변 영역과 불변 영역을 포함한다. 불변 영역은 본질적으로 면역글로불린의 상이한 이소타입 내에서 보존되며, 여기서 가변 부분은 고도로 다양하며 항원 인식을 설명한다.

[0464] "백신접종(vaccination)" 및 "면역화(immunization)"라는 용어는 치료적 또는 예방적 이유로 개인을 치료하는 과정을 설명하며 하나 이상의 면역원(들) 또는 항원(들) 또는 이의 유도체를, 특히 이를 코딩하는 본원에 설명된 바와 같은, RNA 형태(특히 mRNA)로 개체에 투여하여, 상기 하나 이상의 면역원(들) 또는 항원(들)의 제시를 특징으로 하는 상기 하나 이상의 면역원(들) 또는 항원(들) 또는 세포에 대한 면역 반응을 자극하는 공정에 관련된 것이다.

[0465] "항원의 제시를 특징으로 하는 세포" 또는 "항원을 제시하는 세포" 또는 "항원 제시 세포의 표면에 항원을 제시하는 MHC 분자" 또는 유사한 표현은 질병 세포, 특히 종양 세포 또는 감염된 세포, 또는 MHC 분자, 종기로는 MHC 클래스 I 및/또는 MHC 클래스 II 분자, 가장 종기로는 MHC 클래스 I의 맥락에서 직접적으로 또는 처리 후에 항원 또는 항원 펩타이드를 제시하는 항원 제시 세포 분자를 의미한다.

[0466] 본 발명의 맥락에서, 용어 "전사"는 DNA 서열의 유전자 코드가 RNA(특히 mRNA)로 전사되는 과정에 관한 것이다. 이어서 RNA(특히 mRNA)는 펩타이드 또는 단백질로 번역될 수 있다.

[0467] RNA와 관련하여 용어 "발현" 또는 "번역"은 세포의 리보솜에서 mRNA 가닥이 아미노산 서열의 조립을 지시하여 펩타이드 또는 단백질을 만드는 과정에 관한 것이다.

[0468] 용어 "선택적" 또는 "선택적으로"는 이후에 설명되는 사건, 상황 또는 조건이 발생하거나 발생하지 않을 수 있음을 의미하고, 이 용어는 상기 사건, 상황 또는 조건이 발생하는 경우 및 발생하지 않는 경우를 포함한다.

[0469] 본원에 기술된 특정 화합물의 전구약물은 개인에게 투여시 생리학적 조건 하에서 화학적 전환을 거쳐 특정 화합물을 제공하는 화합물이다. 또한 전구약물은 생체의 환경에서 화학적 또는 생화학적 방법에 의해 특정 화합물로 전환될 수 있다. 예를 들어, 전구약물은 예를 들어 적절한 효소 또는 화학 시약과 함께 경피 패치 보관소에 배치될 때 특정 화합물로 천천히 전환될 수 있다. 예시적인 전구약물은 생체내에서 가수분해가능한 에스테르(특정 화합물에 함유된 알코올 또는 카르복시기를 사용함) 또는 아마이드(특정 화합물에 함유된 아미노 또는 카르복시기를 사용함)이다. 구체적으로, 특정 화합물에 함유되고 적어도 하나의 수소 원자를 갖는 임의의 아미노기는 전구약물 형태로 전환될 수 있다. 전형적인 N-전구약물 형태는 카르바메이트, 만니히 염기, 에나민 및 에나미논을 포함한다.

[0470] "이성질체"는 동일한 분자식을 갖지만 구조("구조 이성질체") 또는 작용기 및/또는 원자의 기하학적(공간적) 위치("입체이성질체")에서 다른 화합물이다. "거울상이성질체"는 서로 겹쳐지지 않는 거울상인 한 쌍의 입체이성질체이다. "라세미 혼합물" 또는 "라세미체"는 같은 양의 한 쌍의 거울상 이성질체를 포함하고 접두사(±)로 표시된다. "부분입체이성질체"는 중첩되지 않고 서로 거울상이 아닌 입체이성질체이다. "호변 이성질체"는 개별 원자 또는 원자 그룹의 이동으로 인해 순수한 경우에도 자발적으로 그리고 가역적으로 서로 상호 변환되는 동일한 화학 물질의 구조 이성질체이다. 즉, 호변이성질체는 서로 동적 화학 평형 상태에 있다. 호변 이성질체의 예

는 케토-에놀-호변 이성질체의 이성질체이다. "컨포머"는 형식적으로 단일 결합에 대한 회전만으로 상호전환될 수 있는 입체이성질체이며, 특히 시클로헥산의 의자, 반의자, 보트 및 트위스트-보트와 같은 (헤테로)시클릭 고리의 여러가지 다른 3차원 형태로 이어지는 것을 포함한다.

[0471] "평균 직경"이라는 용어는 소위 누적 알고리즘을 사용하는 데이터 분석과 함께 동적 광 산란(DLS)에 의해 측정된 입자의 평균 유체역학적 직경을 말하며, 결과로서 길이의 차수를 갖는 소위 $Z_{\text{평균}}$ 값 및 차원이 없는 다분산 지수(PDI)를 제공한다(Koppel, D., J. Chem. Phys. 57, 1972, pp 4814-4820, ISO 13321). 본원에서 입자의 "평균 직경", "직경" 또는 "크기는 이 $Z_{\text{평균}}$ 값과 동의어로 사용된다.

[0472] "다분산 지수"는 종기로는 "평균 직경"의 정의에서 언급된 바와 같이 소위 누적 분석에 의한 동적 광 산란 측정에 기초하여 계산된다. 특정 전체 조건 하에서 나노 입자 앙상블의 크기 분포 측정값으로 사용할 수 있다.

[0473] 회전축에 대한 입자의 "회전 반경"(여기서는 R_g 로 약칭함)은 입자의 전체 질량이 집중된 것으로 가정하는 경우 회전축으로부터 한 지점의 방사상 거리이로서, 주어진 축에 대한 관성 모멘트는 실제 질량 분포와 동일하다. 수학적으로 R_g 는 입자의 질량 중심 또는 주어진 축에서 입자 구성 요소의 평균 제곱근 거리이다. 예를 들어, 질량 중심으로부터 고정된 거리 s_i 에 위치한 질량 m_i ($i = 1, 2, 3, \dots, n$)의 n 질량 원소로 구성된 거대분자의 경우, R_g 는 모든 질량 요소에 대한 s_i^2 의 질량 평균의 제곱근이며 다음과 같이 계산할 수 있다.

$$R_g = \left(\sum_{i=1}^n m_i \cdot s_i^2 / \sum_{i=1}^n m_i \right)^{1/2}$$

[0474]

[0475] 회전 반경은 예를 들어 광산란을 사용하여 실험적으로 결정하거나 계산할 수 있다. 특히 작은 산란 벡터 $\vec{q}$ 의 경우 구조 함수 S 는 다음과 같이 정의된다.

$$S(\vec{q}) \approx N \cdot \left(1 - \frac{q^2 \cdot R_g^2}{3} \right)$$

[0476]

[0477] 여기서 N 은 성분의 수(Guinier의 법칙)이다.

[0478] 특히 입자의 정량적 크기 분포와 관련하여 "D10 값"은 입자의 10%가 이 값보다 작은 직경을 갖는 직경이다. D10 값은 입자 집단 내에서 가장 작은 입자의 비율을 설명하는 수단이다(예컨대 필드 흐름 분류에서 얻은 입자 피크 내에서).

[0479] 특히 입자의 정량적 크기 분포와 관련하여 "D50 값"은 입자의 50%가 이 값보다 작은 직경을 갖는 직경이다. D50 값은 입자 집단의 평균 입자 크기를 설명하는 수단이다(예컨대 필드 흐름 분류에서 얻은 입자 피크 내에서).

[0480] 특히 입자의 정량적 크기 분포와 관련하여 "D90 값"은 입자의 90%가 이 값보다 작은 직경을 갖는 직경이다. "D95", "D99" 및 "D100" 값은 해당 의미를 갖는다. D90, D95, D99 및 D100 값은 입자 집단 내에서 더 큰 입자의 비율을 설명하는 수단이다(예컨대 필드 흐름 분류에서 얻은 입자 피크 내에서).

[0481] "유체역학적 반경"("스톡스 반경" 또는 "스톡스-아인슈타인 반경"이라고도 함)은 상기 입자와 동일한 속도로 확산하는 가상의 단단한 구의 반경이다. 유체 역학적 반경은 크기뿐만 아니라 용매 효과도 고려하여 입자의 이동성과 관련이 있다. 예를 들어, 더 강한 수화작용을 가진 더 작은 하전 입자는 더 약한 수화작용을 가진 더 큰 하전 입자보다 더 큰 유체역학적 반경을 가질 수 있다. 이는 작은 입자가 용액을 통과할 때 더 많은 수의 물 분자를 유인하기 때문이다. 용매 내 입자의 실제 치수는 직접 측정할 수 없기 때문에 유체역학적 반경은 스톡스-아인슈타인 방정식으로 정의할 수 있다.

$$R_h = \frac{k_B \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot D}$$

[0482]

[0483] 여기서 k_B 는 볼츠만 상수이고; T 는 온도이고; η 는 용매의 점도이고; D 는 확산 계수이다. 확산 계수는 예를 들어 동적 광 산란(DLS)을 사용하여 실험적으로 결정될 수 있다. 따라서, 입자 또는 입자 집단의 유체역학적 반경

(예를 들어, 본원에 개시된 바와 같은 제형 또는 조성물에 함유된 LNP와 같은 입자의 유체역학적 반경 또는 이러한 제형 또는 조성물을 필드-유동 분류하여 얻은 입자 피크의 유체역학적 반경)를 구하는 한 가지 방법은 상기 입자 또는 입자 집단의 DLS 신호(예를 들어 본원에 개시된 바와 같은 제형 또는 이러한 제형 또는 조성물을 필드-유동 분류하여 얻은 입자 피크의 DLS 신호)를 측정하는 것이다.

[0484] 본원에서 사용되는 용어 "응집체"는 입자의 클러스터에 관한 것이며, 여기서 입자는 동일하거나 매우 유사하고 비공유 방식으로(예를 들어, 이온 상호작용, H 브리지 상호작용, 쌍극자 상호 작용 및 /또는 반데르발스 상호작용) 서로 들러붙는다.

[0485] 본원에서 사용되는 "광 산란"이라는 표현은 빛이 통과하는 매질의 국부적 불균일성으로 인해 빛이 하나 이상의 경로에 의해 직선 궤적에서 벗어나도록 강제되는 물리적 과정을 의미한다.

[0486] 용어 "UV"는 자외선을 의미하고 10 nm 내지 400 nm의 파장, 즉 가시광선보다 짧고 X-선보다 긴 전자기 스펙트럼의 대역을 나타낸다.

[0487] 본원에서 사용되는 표현 "다각도 광 산란(multi-angle light scattering)" 또는 "MALS"는 샘플에 의해 산란된 광을 다수의 각도로 측정하는 기술에 관한 것이다. 이와 관련하여 "다각도"는 산란광이 예를 들어 선택된 특정 각도를 포함하는 범위에 걸쳐 이동된 단일 검출기 또는 특정 각도 위치에 고정된 검출기 어레이에 의해 측정된 바와 같이 상이한 이산 각도에서 검출될 수 있음을 의미한다. 바람직한 일 구현예에서, MALS에 사용되는 광원은 레이저 소스(MALLS: 다중 각도 레이저 광산란)이다. 입자를 포함하는 조성물의 MALS 신호에 기초하고 적절한 방식(예를 들어, Zimm 플롯, Berry 플롯, 또는 Debye 플롯)을 사용함으로써 플롯, 회전 반경(R_g)를 구할 수 있고, 따라서 상기 입자의 크기를 결정하는 것이 가능하다. 종기로는 Zimm 플롯은 다음 방정식을 사용하는 그래픽 표현이다.

$$\frac{R_{\theta}}{K^*c} = M_w P(\theta) - 2A_2 c M_w^2 P^2(\theta)$$

[0488]

[0489] 식 중 c 는 용매 내 입자의 질량 농도(g/mL)이고; A_2 는 두 번째 비리얼 계수(mol mL/g^2)이며; $P(\theta)$ 는 각도에 대한 산란광 강도의 의존성과 관련된 폼 팩터이고; R_{θ} 는 초과 레일리 비율(cm^{-1})이고; K^* 는 $4\pi^2 n_0 (dn/dc)^2 \lambda_0^{-4} N_A^{-1}$ 과 동일한 광학 상수이며, 여기서 n_0 는 입사 방사선(진공) 파장에서 용매의 굴절률이고, λ_0 은 입사 방사선(진공) 파장(nm), N_A 는 아보가드로 수(mol^{-1}), dn/dc 는 시차 굴절률 증분(mL/g)이다 (예컨대 Buchholz et al. (Electrophoresis 22 (2001), 4118-4128); B.H. Zimm (J. Chem. Phys. 13 (1945), 141; P. Debye (J. Appl. Phys. 15 (1944): 338; 및 W. Burchard (Anal. Chem. 75 (2003), 4279-4291 참조). 종기로는 Berry 플롯은 다음과 같이 계산된다.

$$\sqrt{\frac{R_{\theta}}{K^*c}}$$

[0490]

[0491] 여기서 c , R_{θ} 및 K^* 는 상기 정의된 바와 같다. 종기로는 Debye 플롯은 다음 과 같이 계산된다.

$$\frac{K^*c}{R_{\theta}}$$

[0492]

[0493] 여기서 c , R_{θ} 및 K^* 는 상기 정의된 바와 같다.

[0494] 본원에서 "동적 광산란" 또는 "DLS"라는 표현은 특히 입자의 유체역학적 반경과 관련하여 입자의 크기 및 크기 분포 프로파일을 결정하는 기술을 의미한다. 일반적으로 레이저인 단색 광원은 편광판을 통해 샘플로 발사된다. 산란된 빛은 두 번째 편광판을 통과하여 감지되고 결과 이미지가 스크린에 투사된다. 용액의 입자는 빛에 부딪혀 모든 방향으로 빛을 회절시킨다. 입자에서 회절된 빛은 건설적으로(밝은 영역) 간섭하거나 파괴적으로(어두운 영역) 간섭할 수 있다. 이 프로세스는 짧은 시간 간격으로 반복되며 결과로 생성된 스펙클 패턴 세트는 시간

경과에 따라 각 지점에서 빛의 강도를 비교하는 자동 상관기에 의해 분석된다.

- [0495] 본원에서 사용되는 "정적 광산란" 또는 "SLS"라는 표현은 특히 입자의 회전 반경 및/또는 입자의 물 질량과 관련하여 입자의 크기 및 크기 분포 프로파일을 결정하는 기술을 의미한다. 일반적으로 레이저인 고강도 단색광이 입자를 포함하는 용액에서 발사된다. 하나 또는 여러 개의 검출기가 하나 또는 여러 각도에서 산란 강도를 측정하는 데 사용된다. 반경의 모든 거대 분자에 대한 물 질량과 크기를 모두 정확하게 측정하려면 각도 의존성이 필요하다. 따라서 다각도 광 산란(MALS) 또는 다각도 레이저 광 산란(MALLS)으로 알려진, 입사광의 방향과 관련된 여러 각도에서의 동시 측정이 일반적으로 정적 광산란의 표준 구현 방식으로 간주된다.
- [0496] 용어 "핵산"은 데옥시리보핵산(DNA), 리보핵산(RNA), 이들의 조합 및 이들의 변형된 형태를 포함한다. 이 용어는 게놈 DNA, cDNA, mRNA, 재조합 생산 및 화학적 합성 분자를 포함한다. 핵산은 단일 가닥 또는 이중 가닥 및 선형 또는 공유 결합 원형 폐쇄 분자로 존재할 수 있다. 핵산은 단리될 수 있다. 용어 "단리된 핵산"은 본 개시 내용에 따라 핵산이 (i) 예를 들어 DNA에 대한 폴리머라제 연쇄 반응(PCR) 또는 시험관내 전사(예를 들어, RNA 폴리머라제를 사용)를 통해 시험관내에서 증폭되거나, (ii) 클로닝에 의해 재조합적으로 생성되거나, (iii) 예를 들어, 겔 전기영동에 의한 절단 및 분리에 의해 정제되거나, 또는 (iv) 예를 들어, 화학적 합성에 의해 합성됨을 의미한다.
- [0497] 용어 "뉴클레오사이드" (본원에서 "N"으로 약칭함)는 인산기가 없는 뉴클레오타이드로 생각할 수 있는 화합물에 관한 것이다. 뉴클레오사이드가 당(예를 들어, 리보스 또는 데옥시리보스)에 연결된 핵염기인 반면, 뉴클레오타이드는 뉴클레오사이드와 하나 이상의 인산기로 구성된다. 뉴클레오사이드의 예는 시티딘, 우리딘, 슈도우리딘, 아데노신 및 구아노신을 포함한다.
- [0498] 일반적으로 자연 발생 핵산을 구성하는 5개의 표준 뉴클레오사이드는 우리딘, 아데노신, 티미딘, 시티딘 및 구아노신이다. 5개의 뉴클레오사이드는 일반적으로 각각 하나의 문자 코드 U, A, T, C 및 G로 축약된다. 그러나 티미딘은 우리딘에서 발견되는 리보푸라노스 고리가 아닌 2'-데옥시리보푸라노스 모이어티를 포함하기 때문에 "dT" ("d"는 "데옥시"를 나타냄)로 더 일반적으로 표시된다. 이는 티미딘이 리보핵산(RNA)이 아닌 데옥시리보핵산(DNA)에서 발견되기 때문이다. 반대로, 우리딘은 DNA가 아닌 RNA에서 발견된다. 나머지 3개의 뉴클레오사이드는 RNA와 DNA 모두에서 발견될 수 있다. RNA에서 이들은 A, C 및 G로 표시되는 반면 DNA에서는 dA, dC 및 dG로 표시된다.
- [0499] 변형된 퓨린(A 또는 G) 또는 피리미딘(C, T 또는 U) 염기 모이어티는 종기로는 하나 이상의 알킬기, 더 종기로는 하나 이상의 C₁₋₄ 알킬기, 훨씬 더 종기로는 하나 이상의 메틸 그룹에 의해 변형된다. 변형된 퓨린 또는 피리미딘 염기 모이어티의 예로는 N⁷-알킬-구아닌, N⁶-알킬-아데닌, 5-알킬-시토신, 5-알킬-우라실, 및 N(1)-알킬-우라실, 예컨대 N⁷-C₁₋₄ 알킬-구아닌, N⁶-C₁₋₄ 알킬-아데닌, 5-C₁₋₄ 알킬-시토신, 5-C₁₋₄ 알킬-우라실, 및 N(1)-C₁₋₄ 알킬-우라실, 종기로는 N⁷-메틸-구아닌, N⁶-메틸-아데닌, 5-메틸-시토신, 5-메틸-우라실, 및 N(1)-메틸-우라실을 들 수 있다.
- [0500] 본원에서 "DNA"라는 용어는 데옥시리보뉴클레오타이드 잔기를 포함하는 핵산 분자에 관한 것이다. 바람직한 구현예에서, DNA는 데옥시리보뉴클레오타이드 잔기의 전부 또는 대부분을 함유한다. 본원에 사용된 "데옥시리보뉴클레오타이드"는 β-D-리보푸라노실기의 2'-위치에 히드록실기가 결여된 뉴클레오타이드를 말한다. DNA는 제한 없이 이중 가닥 DNA, 단일 가닥 DNA, 부분적으로 정제된 DNA와 같은 단리된 DNA, 본질적으로 순수한 DNA, 합성 DNA, 재조합으로 생성된 DNA 및 하나 이상의 뉴클레오타이드의 추가, 삭제, 치환 및/또는 변경에 의해 자연적으로 발생하는 DNA와 다른 변형된 DNA를 포함한다. 이러한 변경은 내부 DNA 뉴클레오타이드 또는 DNA 말단(들)에 비뉴클레오타이드 물질을 추가하는 것을 의미할 수 있다. 또한 DNA의 뉴클레오타이드는 화학적으로 합성된 뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드와 같은 비표준 뉴클레오타이드일 수 있음이 여기에서 고려된다. 본 발명의 경우, 이들 변경된 DNA는 자연 발생 DNA의 유사체로 간주된다. 분자 내 데옥시리보뉴클레오타이드 잔기의 함량이, 분자 내 뉴클레오타이드 잔기의 총 수에 기초하여 50% 초과(예컨대 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%)이면, 그 분자는 "대다수의 데옥시리보뉴클레오타이드 잔기"를 함유하는 것이다. 분자 내 뉴클레오타이드 잔기의 총 수는 모든 뉴클레오타이드 잔기의 합이다(뉴클레오타이드 잔기가 표준(즉, 자연 발생) 뉴클레오타이드 잔기이건 또는 이의 유사체인지 여부에 상관없음).
- [0501] DNA는 재조합 DNA일 수 있고 핵산, 특히 cDNA의 클로닝에 의해 얻어질 수 있다. cDNA는 RNA의 역전사에 의해 얻

을 수 있다.

[0502]

RNA

[0503]

본 명세서에서 용어 "RNA"는 리보뉴클레오타이드 잔기를 포함하는 핵산 분자를 의미한다. 바람직한 구현예에서, RNA는 리보뉴클레오타이드 잔기의 전부 또는 대부분을 함유한다. 본원에서 "리보뉴클레오타이드"라 함은 β-D-리보푸라노실기의 2'-위치에 히드록실기를 갖는 뉴클레오타이드를 의미한다. RNA는 제한 없이 이중 가닥 RNA, 단일 가닥 RNA, 단리된 RNA, 예를 들어 부분적으로 정제된 RNA, 본질적으로 순수한 RNA, 합성 RNA, 재조합으로 생산된 RNA, 그리고 하나 이상의 뉴클레오타이드의 추가, 삭제, 치환 및/또는 변경에 의해 천연 발생 RNA와 다른 변형된 RNA를 포함한다. 이러한 변경은 내부 RNA 뉴클레오타이드 또는 RNA 말단(들)에 비뉴클레오타이드 물질의 추가를 의미할 수 있다. 또한 RNA의 뉴클레오타이드는 화학적으로 합성된 뉴클레오타이드 또는 데옥시뉴클레오타이드와 같은 비표준 뉴클레오타이드일 수 있음이 고려된다.

[0504]

본 발명의 경우, 이들 변경/변형된 뉴클레오타이드는 자연 발생 뉴클레오타이드의 유사체라고 할 수 있고, 이러한 변경/변형 뉴클레오타이드를 함유하는 상응하는 RNA(즉, 변경/변형 RNA)는 자연 발생 RNA의 유사체라고 할 수 있다. 분자 내 리보뉴클레오타이드 잔기의 함량이, 분자 내 뉴클레오타이드 잔기의 총 수에 기초하여 50% 초과(예컨대 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%)이면, 그 분자는 "대다수의 리보뉴클레오타이드 잔기"를 함유하는 것이다. 분자 내 뉴클레오타이드 잔기의 총 수는 모든 뉴클레오타이드 잔기의 합이다(뉴클레오타이드 잔기가 표준(즉, 자연 발생) 뉴클레오타이드 잔기이건 또는 이의 유사체인지 여부에 상관없음).

[0505]

"RNA"는 mRNA, tRNA, 리보솜 RNA(rRNA), 작은 핵 RNA(snRNA), 자가 증폭 RNA(saRNA), 단일 가닥 RNA(ssRNA), dsRNA, 억제 RNA(예컨대 안티센스 ssRNA, 작은 간섭 RNA(siRNA) 또는 마이크로RNA(miRNA)), 활성화 RNA(예컨대 작은 활성화 RNA) 및 면역자극 RNA(isRNA)를 포함한다.

[0506]

바람직한 구현예에서, RNA는 펩타이드 또는 단백질을 인코딩하는 오픈 리딩 프레임(ORF)을 포함한다.

[0507]

용어 "시험관내 전사" 또는 "IVT"는 전사(즉, RNA의 생성)가 무세포 방식으로 수행됨을 의미한다. 즉, IVT는 살아있는/배양된 세포를 사용하지 않고 오히려 세포에서 추출된 전사 기구(예를 들어, 세포 용해물 또는 RNA 폴리머라제(종기로는 T7, T3 또는 SP6 폴리머라제)를 포함하는 이의 단리된 성분)를 사용한다.

[0508]

본 명세서에서 "mRNA"는 "메신저-RNA"를 의미하며, DNA 주형을 이용하여 생성할 수 있는 "전사체"로서 펩타이드 또는 단백질을 인코딩할 수 있다. 전형적으로, mRNA는 5'-UTR, 펩타이드/단백질 코딩 영역 및 3'-UTR을 포함한다. 본 발명의 맥락에서, mRNA는 종기로는 DNA 주형으로부터 시험관내 전사(IVT)에 의해 생성된다. 전술한 바와 같이, 시험관내 전사 방법론은 당업자에게 공지되어 있고, 다양한 시험관내 전사 키트가 상업적으로 이용가능하다.

[0509]

mRNA는 단일 가닥이지만 이중 나선을 형성하기 위해 mRNA의 일부가 접히고 쌍을 이루는 자체 보완적 서열을 포함할 수 있다.

[0510]

본 개시내용에 따르면, "dsRNA"는 이중 가닥 RNA를 의미하고 2개의 부분적으로 또는 완전히 상보적인 가닥을 갖는 RNA이다.

[0511]

바람직한 구현예에서, mRNA는 펩타이드 또는 단백질을 인코딩하는 RNA 전사체에 관한 것이다.

[0512]

일 구현예에서, 종기로는 펩타이드 또는 단백질을 코딩하는 RNA는 적어도 45개 뉴클레오타이드(예를 들어, 적어도 60, 적어도 90, 적어도 100, 적어도 200, 적어도 300, 적어도 400, 적어도 500, 적어도 600, 적어도 700, 적어도 800, 적어도 900, 적어도 1,000, 적어도 1,500, 적어도 2,000, 적어도 2,500, 적어도 3,000, 적어도 3,500, 적어도 4,000, 적어도 4,500, 적어도 5,000, 적어도 6,000, 적어도 7,000, 적어도 8,000, 적어도 9,000 개 뉴클레오타이드), 종기로는 최대 15,000개, 예를 들어 최대 14,000개, 최대 13,000개, 최대 12,000개 뉴클레오타이드, 최대 11,000개 뉴클레오타이드 또는 최대 10,000개 뉴클레오타이드 길이를 갖는다.

[0513]

일 구현예에서, RNA(예컨대 mRNA)는 5' 비번역 영역(5'-UTR), 펩타이드 코딩 영역 및 3' 비번역 영역(3'-UTR)을 함유한다. 일부 구현예에서, RNA(예컨대 mRNA)는 시험관내 전사 또는 화학적 합성에 의해 생산된다. 일 구현예에서, RNA(예컨대 mRNA)는 DNA 주형을 사용하는 시험관내 전사에 의해 생성된다. 시험관내 전사 방법론은 당업자에게 공지되어 있다; 예를 들어, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, J. Sambrook et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 1989 참조. 또한, 예컨대 Thermo

Fisher Scientific (예컨대 TranscriptAid™ T7 키트, MEGAscript® T7 키트, MAXIsript®), New England Biolabs Inc. (예컨대 HiScribe™ T7 키트, HiScribe™ T7 ARCA mRNA 키트), Promega (예컨대 RiboMAX™, HeLaScribe®, Riboprobe® 시스템), Jena Bioscience (예컨대 SP6 또는 T7 전사 키트), 및 Epicentre (예컨대 AmpliScribe™)로부터 다양한 시험관내 전사 키트를 예를 들어 상업적으로 입수할 수 있다. 변형된 RNA(예컨대 mRNA)를 제공하기 위해, 변형된 자연 발생 뉴클레오타이드, 비-자연 발생 뉴클레오타이드 및/또는 변형 비-자연 발생 뉴클레오타이드와 같은 상응하게 변형된 뉴클레오타이드를 합성(종기로는 시험관내 전사)하는 동안 통합할 수 있고, 또는 전사 후 변형이 mRNA에 영향을 미치거나 추가될 수 있다.

[0514] 일 구현예에서, RNA(예컨대 mRNA)는 시험관내 전사된 RNA(IVT-RNA)이고 적절한 DNA 주형의 시험관내 전사에 의해 수득될 수 있다. 전사 조절을 위한 프로모터는 임의의 RNA 폴리머라제에 대한 임의의 프로모터일 수 있다. RNA 폴리머라제의 특정 예는 T7, T3 및 SP6 RNA 폴리머라제이다. 종기로는, 시험관내 전사는 T7 또는 SP6 프로모터에 의해 제어된다. 시험관내 전사를 위한 DNA 주형은 핵산, 특히 cDNA를 클로닝하고 이를 시험관내 전사를 위한 적절한 벡터에 도입함으로써 얻을 수 있다. cDNA는 RNA의 역전사에 의해 얻을 수 있다.

[0515] 본 개시내용의 특정 구현예에서, RNA(예컨대 mRNA)는 "레플리콘 RNA"(예컨대 "레플리콘 mRNA") 또는 간단히 "레플리콘", 특히 "자가 복제 RNA"(예컨대 "자가 복제 mRNA") 또는 "자가 증폭 RNA"(또는 "자가 증폭 mRNA")이다. 하나의 특히 바람직한 구현예에서, 레플리콘 또는 자기 복제 RNA(예를 들어 자기 복제 mRNA)는 ssRNA 바이러스, 특히 알파바이러스와 같은 양가닥 ssRNA 바이러스로부터 유도되거나 그로부터 유도된 요소를 포함한다. 알파바이러스는 양가닥(positive-stranded) RNA 바이러스의 전형적인 대표자이다. 알파바이러스는 감염된 세포의 세포질에서 복제한다(알파바이러스 수명 주기를 검토하려면 Jose et al., Future Microbiol., 2009, vol. 4, pp. 837-856 참조). 많은 알파바이러스의 전체 게놈 길이는 일반적으로 11,000~12,000개의 뉴클레오타이드 범위이며 게놈 RNA는 일반적으로 5'-캡과 3' 폴리(A) 테일을 가지고 있다. 알파바이러스의 게놈은 비구조 단백질(바이러스 RNA의 전사, 변형 및 복제 및 단백질 변형에 관여)과 구조 단백질(바이러스 입자 형성)을 인코딩한다. 게놈에는 일반적으로 두 개의 오픈 리딩 프레임(ORF)이 있다. 4개의 비구조 단백질(nsP1~nsP4)은 일반적으로 게놈의 5' 말단 근처에서 시작하는 첫 번째 ORF에 의해 함께 인코딩되는 반면, 알파바이러스 구조 단백질은 첫 번째 ORF의 하류에서 발견되고 게놈의 3' 말단 근처에서 확장되는 두 번째 ORF에 의해 함께 인코딩된다. 일반적으로 첫 번째 ORF는 두 번째 ORF보다 크며 비율은 대략 2:1이다. 알파바이러스에 감염된 세포에서 비구조 단백질을 인코딩하는 핵산 서열만 게놈 RNA에서 번역되는 반면, 구조 단백질을 인코딩하는 유전 정보는 진행 메신저 RNA(mRNA)와 유사한 RNA 분자인 서브게놈 전사체에서 번역 가능 하다 (mRNA; Gould et al., 2010, Antiviral Res., vol. 87 pp. 111-124). 감염 후, 즉 바이러스 수명 주기의 초기 단계에서 (+) 가닥 게놈 RNA는 비구조적 폴리-단백질(nsP1234)을 인코딩하는 오픈 리딩 프레임의 번역을 위한 메신저 RNA처럼 직접 작용한다. 알파바이러스 유래 벡터는 외부 유전 정보를 표적 세포 또는 표적 유기체로 전달하기 위해 제안되었다. 간단한 접근법에서, 알파바이러스 구조 단백질을 인코딩하는 오픈 리딩 프레임은 관심 있는 단백질을 인코딩하는 오픈 리딩 프레임으로 대체된다. 알파바이러스 기반 트랜스-복제 시스템은 두 개의 단리된 핵산 분자에 있는 알파바이러스 뉴클레오타이드 서열 요소에 의존한다: 하나의 핵산 분자는 바이러스 레플리카제를 인코딩하고, 다른 핵산 분자는 트랜스에서 상기 레플리카제에 의해 복제될 수 있다(따라서 지정 트랜스-복제 시스템). 트랜스-복제는 주어진 숙주 세포에서 이들 핵산 분자 둘 다의 존재를 필요로 한다. 레플리카제에 의해 트랜스로 복제될 수 있는 핵산 분자는 알파바이러스 레플리카제에 의한 인식 및 RNA 합성을 가능하게 하는 특정 알파바이러스 서열 요소를 포함해야 한다.

[0516] 본 발명의 일 구현예에서, RNA(예컨대 mRNA)는, 예를 들어 그의 안정성을 증가시키고/시키거나 번역 효율을 증가시키고/시키거나 번역원성을 감소시키고/시키거나 세포독성을 감소시키기 위해 하나 이상의 변형을 함유한다. 예를 들어, RNA(예컨대 mRNA)의 발현을 증가시키기 위해, 종기로는 발현된 펩타이드 또는 단백질의 서열을 변경하지 않고 코딩 영역, 즉 발현된 펩타이드 또는 단백질을 코딩하는 서열 내에서 변형될 수 있다. 이러한 변형은 예를 들어 WO 2007/036366 및 PCT/EP2019/056502에 기재되어 있고 다음을 포함한다: 5'-캡 구조; 자연 발생 폴리(A) 테일의 확장 또는 절단; 상기 RNA의 코딩 영역과 관련되지 않은 UTR의 도입과 같은 5'- 및/또는 3'-비번역 영역(UTR)의 변경; 하나 이상의 천연 발생 뉴클레오타이드를 합성 뉴클레오타이드로 교체; 및 코돈 최적화(예를 들어, RNA의 GC 함량을 변경, 종기로는 증가시키기 위해). 본 개시내용에 따른 변형된 mRNA의 맥락에서 용어 "변형"은 종기로는 상기 RNA에 자연적으로 존재하지 않는 mRNA(예컨대 mRNA)의 임의의 변형에 관한 것이다.

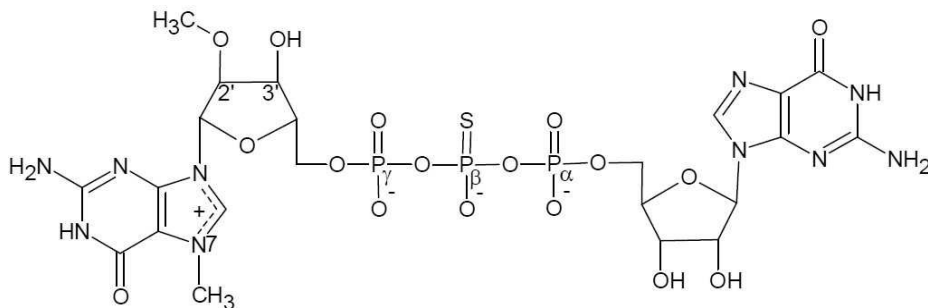
[0517] 일부 구현예에서, RNA(예컨대 mRNA)는 5'-캡 구조를 포함한다. 일 구현예에서, mRNA는 캡핑되지 않은 5'-트리포스페이트를 갖지 않는다. 일 구현예에서, RNA(예컨대 mRNA)는 통상적인 5'-캡 및/또는 5'-캡 유사체를 포함할

수 있다. 용어 "통상적인 5'-캡"은 mRNA 분자의 5'-말단에서 발견되는 캡 구조를 말하며 일반적으로 그의 트리포스페이트 부분을 통해 mRNA의 다음 뉴클레오타이드의 5'-말단에 연결된 구아노신 5'-트리포스페이트(Gppp)로 구성된다(즉, 구아노신은 5'에서 5' 트리포스페이트 연결을 통해 mRNA의 나머지 부분에 연결됨). 구아노신은 위치 N⁷에서 메틸화될 수 있다 (캡 구조 m⁷Gppp가 됨). 용어 "5'-캡 유사체"는 통상적인 5'-캡을 기반으로 하지만, 역방향으로 5'-캡 유사체의 통합을 피하기 위해(이러한 5'-캡 유사체는 역방향 캡 유사체(ARCA)라고도 함), m⁷ 구아노신 구조의 2'- 또는 3'-위치에서 변형된 5'-캡을 의미한다. 특히 바람직한 5'-캡 유사체는 포스페이트 브릿지의 브릿징 및 비브릿징 산소에서 하나 이상의 치환을 갖는 것들, 예컨대 PCT/EP2019/056502에 기재된 바와 같은, β-포스페이트에서 포스포로티오에이트 변형된 5'-캡 유사체(예컨대 m₂^{7,2'0}G(5')ppSp(5')G (베타-S-ARCA 또는 β-S-ARCA라 칭함)이다. 본원에 기술된 바와 같은 5'-캡 구조를 갖는 RNA(예컨대 mRNA)를 제공하는 것은 상응하는 5'-캡 화합물의 존재 하에 DNA 주형의 시험관내 전사에 의해 달성될 수 있으며, 여기서 상기 5'-캡 구조는 생성된 RNA(예컨대 mRNA) 가닥에 공동-전사적으로 통합되거나, 또는 RNA(예컨대 mRNA)는 예를 들어 시험관내 전사에 의해 생성될 수 있으며, 5'-캡 구조는 캡핑 효소, 예를 들어 백시니아 바이러스의 캡핑 효소를 사용하여 전사 후 mRNA에 부착될 수 있다.

[0518] 일부 구현예에서, RNA(예컨대 mRNA)는 m₂^{7,2'0}G(5')ppSp(5')G (특히 그의 D1 부분입체이성질체), m₂^{7,3'0}G(5')ppp(5')G, 및 m₂^{7,3'-0}Gppp(m₁^{2'-0})ApG로 이루어진 군으로부터 선택되는 5'-캡 구조를 포함한다.

[0519] 일부 구현예에서, RNA(예컨대 mRNA)는 cap0, cap1, 또는 cap2, 종기로는 cap1 또는 cap2를 포함한다. 본 발명에 따르면, 용어 "cap0"은 구조 "m⁷GpppN"을 의미하며, 여기서 N은 위치 2'에 OH 모이어티를 갖는 임의의 뉴클레오사이드이다. 본 발명에 따르면, 용어 "cap1"은 구조 "m⁷GpppNm"을 의미하며, 여기서 Nm은 위치 2'에 OCH₃ 모이어티를 포함하는 임의의 뉴클레오사이드이다. 본 개시내용에 따르면, 용어 "cap2"는 구조 "m⁷GpppNmNm"을 의미하며, 여기서 각각의 Nm은 독립적으로 위치 2'에 OCH₃ 모이어티를 갖는 임의의 뉴클레오사이드이다.

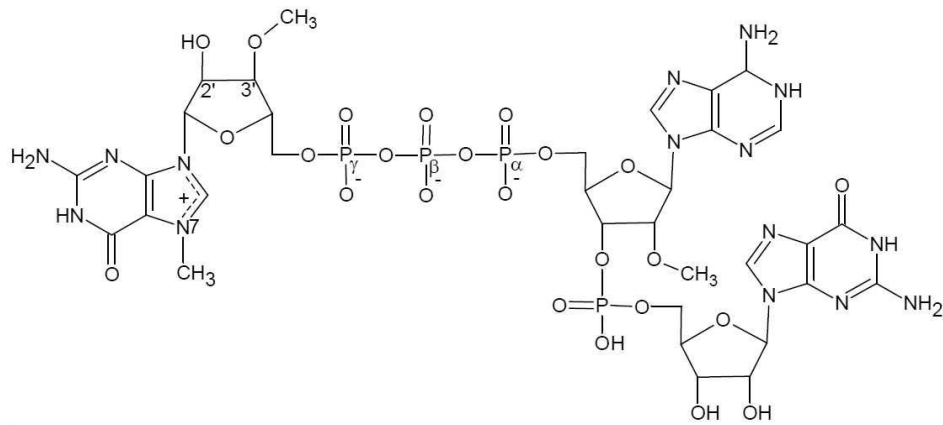
[0520] 베타-S-ARCA(β-S-ARCA)의 D1 부분입체이성질체는 다음 구조를 갖는다:



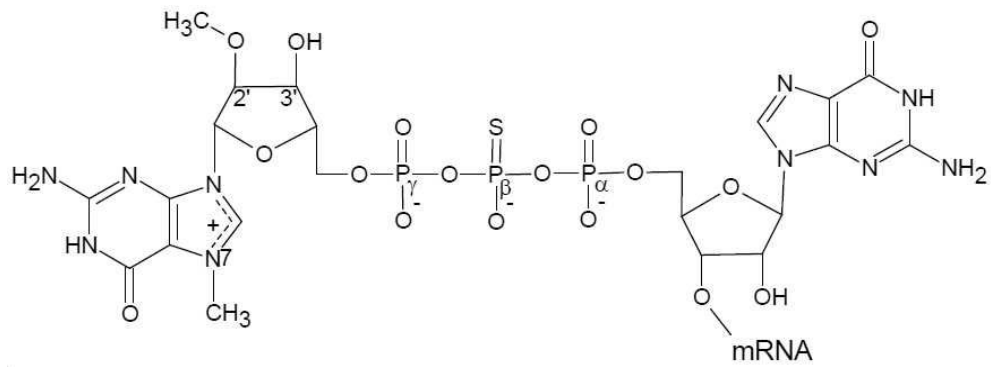
[0521]

[0522] "베타-S-ARCA의 D1 부분입체이성질체" 또는 "베타-S-ARCA(D1)"는 베타-S-ARCA의 D2 부분입체이성질체(β-S-ARCA(D2))와 비교하여 HPLC 컬럼에서 먼저 용출되며 따라서 더 짧은 체류 시간을 나타내는, 베타-S-ARCA의 부분입체이성질체이다. HPLC는 종기로는 분석용 HPLC이다. 일 구현예에서, 종기로는 5μm, 4.6 x 250 mm 형식의 Supelcosil LC-18-T RP 컬럼이 분리를 위해 사용되며, 이에 따라 1.3 mL/min의 유속이 적용될 수 있다. 일 구현예에서, 암모늄 아세테이트 중 메탄올의 구배, 예를 들어, 15분 이내에 pH = 5.9인 0.05M 암모늄 아세테이트 중 메탄올의 0-25% 선형 구배가 사용된다. UV-검출(VWD)은 260 nm에서 수행될 수 있고 형광 검출(FLD)은 280 nm에서 여기 및 337 nm에서 검출로 수행될 수 있다.

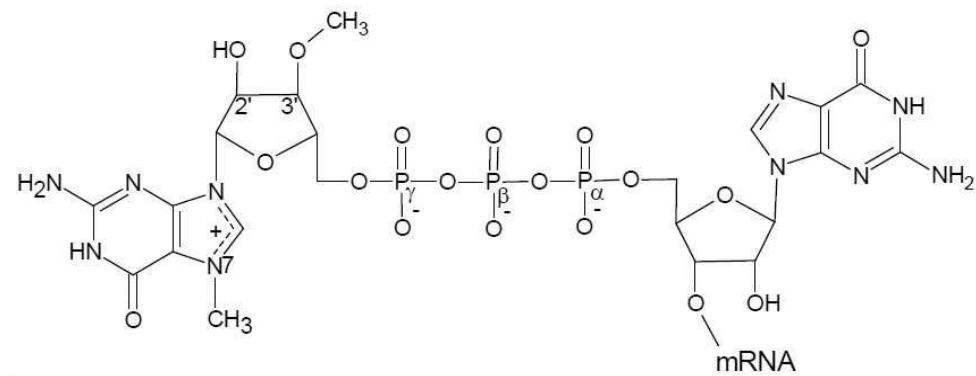
[0523] cap1의 빌딩 블록인 5'-캡 아날로그 m₂^{7,3'-0}Gppp(m₁^{2'-0})ApG (m₂^{7,3'0}G(5')ppp(5')m^{2'-0}ApG라고도 칭함)은 다음 구조를 갖는다.



β -S-ARCA 및 mRNA를 포함하는 예시적인 cap0 mRNA는 다음 구조를 갖는다:



$m_2^{7,3'0}$ G(5')ppp(5')G 및 mRNA를 포함하는 예시적인 cap0 mRNA는 다음 구조를 갖는다:



5개 내지 50개, 10개 내지 30개, 또는 10개 내지 20개 뉴클레오타이드일 수 있다.

- [0536] 일부 구현예에서, A 뉴클레오타이드 이외의 뉴클레오타이드는 그의 3'-말단에서 폴리-A 테일 측면에 위치(flank)하지 않는다. 즉, 폴리-A 테일은 그의 3'-말단에서 A 이외의 뉴클레오타이드에 의해 마스킹되거나 팔로우되지 않는다.
- [0537] 일 구현예에서, 폴리-A 서열은 적어도 100개의 뉴클레오타이드를 포함한다. 일 구현예에서, 폴리-A 서열은 SEQ ID NO: 14의 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나 이로 구성된다. 일 구현예에서, 폴리-A 서열은 SEQ ID NO: 14의 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는다.
- [0538] 일부 구현예에서, 본 개시내용에 사용된 RNA(예컨대 mRNA)는 5'-UTR 및/또는 3'-UTR을 포함한다. 용어 "번역되지 않은(비번역) 영역" 또는 "UTR"은 전사되지만 아미노산 서열로 번역되지 않는 DNA 분자 내의 영역, 또는 mRNA 분자와 같은 RNA 분자 내의 상응하는 영역에 관한 것이다. 번역되지 않은 영역(UTR)은 오픈 리딩 프레임(5'-UTR)의 5'(상류) 및/또는 오픈 리딩 프레임(3'-UTR)의 3'(하류)에 존재할 수 있다. 5'-UTR(존재하는 경우)은 단백질 인코딩 영역의 시작 코돈의 상류인 5'-말단에 위치한다. 5'-UTR은 5'-캡(존재하는 경우)의 하류, 예를 들어 5'-캡에 직접 인접한다. 3'-UTR이 존재하는 경우 단백질 코딩 영역의 종결 코돈 하류인 3'-말단에 위치하지만, 용어 "3'-UTR"은 종기로는 폴리-A 서열을 포함하지 않는다. 따라서, 3'-UTR은 폴리-A 서열(존재하는 경우)의 업스트림, 예를 들어 폴리-A 서열에 직접 인접한다. RNA(종기로는 mRNA) 분자의 3'- 비번역 영역에 3'-UTR을 통합하면 번역 효율이 향상될 수 있다. 이러한 3'-UTR을 두 개 이상(종기로는 헤드-투-테일 방향으로 배열됨; 예컨대 Holtkamp *et al.*, Blood 108, 4009-4017 (2006) 참조) 통합함으로써 상승 효과가 얻어질 수 있다. 3'-UTR은 이들이 도입되는 RNA(종기로는 mRNA)에 대해 자가 또는 이중일 수 있다. 한 특정 구현예에서 3'-UTR은 알파2-글로빈, 알파1-글로빈 또는 베타-글로빈, 종기로는 베타-글로빈, 더욱 종기로는 인간 베타-글로빈의 유전자 또는 mRNA와 같은 글로빈 유전자 또는 mRNA로부터 유도된다. 예를 들어, RNA(종기로는 mRNA)는 기존의 3'-UTR을 글로빈 유전자, 예컨대 알파2- 글로빈, 알파1-글로빈, 베타-글로빈, 종기로는 베타-글로빈, 더욱 종기로는 인간 베타-글로빈로부터 유도된 3'-UTR을 하나 이상, 종기로는 2개 카피로 대체하거나 이들 카피를 삽입함으로써 변형될 수 있다.
- [0539] 일부 구현예에서, 본 개시내용에 사용된 RNA(예컨대 mRNA)는 SEQ ID NO: 12의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 5' UTR, 또는 SEQ ID NO: 12의 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.
- [0540] 일부 구현예에서, 본 개시내용에 사용된 RNA(예컨대 mRNA)는 SEQ ID NO: 13의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 5' UTR, 또는 SEQ ID NO: 13의 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.
- [0541] RNA(예컨대 mRNA)는 그의 안정성을 증가시키고/시키거나 번역원성을 감소시키고/시키거나 세포독성을 감소시키기 위해 변형된 리보뉴클레오타이드를 가질 수 있다. 예를 들어, 일 구현예에서, 본원에 기재된 RNA(예컨대 mRNA) 내의 우리딘은 변형된 뉴클레오사이드에 의해 (부분적으로 또는 완전히, 종기로는 완전히) 대체된다. 일부 구현예에서, 변형된 뉴클레오사이드는 변형된 우리딘이다.
- [0542] 일부 구현예에서, 우리딘을 대체하는 변형된 우리딘은 슈도우리딘(Ψ), N1-메틸-슈도우리딘(m1 Ψ), 5-메틸-우리딘(m5U), 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0543] 일부 구현예에서, RNA(예컨대 mRNA)에서 우리딘을 (부분적으로 또는 완전히, 종기로는 완전히) 대체하는 변형된 뉴클레오사이드는 3-메틸-우리딘 (m3U), 5-메톡시-우리딘 (mo5U), 5-아자-우리딘, 6-아자-우리딘, 2-티오-5-아자-우리딘, 2-티오-우리딘 (s2U), 4-티오-우리딘 (s4U), 4-티오-슈도우리딘, 2-티오-슈도우리딘, 5-히드록시-우리딘 (ho5U), 5-아미노알릴-우리딘, 5-할로-우리딘 (예컨대, 5-요오도-우리딘 or 5-브로모-우리딘), 우리딘 5-옥시아세트산 (cmo5U), 우리딘 5-옥시아세트산 메틸 에스테르 (mcmo5U), 5-카르복시메틸-우리딘 (cm5U), 1-카르복시메틸-슈도우리딘, 5-카르복시히드록시메틸-우리딘 (chm5U), 5-카르복시히드록시메틸-우리딘 메틸 에스테르 (mchm5U), 5-메톡시카르보닐메틸-우리딘 (mcm5U), 5-메톡시카르보닐메틸-2-티오-우리딘 (mcm5s2U), 5-아미노메틸-2-티오-우리딘 (nm5s2U), 5-메틸아미노메틸-우리딘 (mnm5U), 1-에틸-슈도우리딘, 5-메틸아미노메틸-2-티오-우리딘 (mnm5s2U), 5-메틸아미노메틸-2-셀레노-우리딘 (mnm5se2U), 5-카르바모일메틸-우리딘 (ncm5U), 5-카르복시메틸아미노메틸-우리딘 (cmnm5U), 5-카르복시메틸아미노메틸-2-티오-우리딘 (cmnm5s2U), 5-프로피닐-우리딘, 1-프로피닐-슈도우리딘, 5-타우리노메틸-우리딘 (τ m5U), 1-타우리노메틸-슈도우리딘, 5-타우리노메틸-2-티오-우리딘(τ m5s2U), 1-타우리노메틸-4-티오-슈도우리딘, 5-메틸-2-티오-우리딘 (m5s2U), 1-메

틸-4-티오-슈도우리딘 (m1s4ψ), 4-티오-1-메틸-슈도우리딘, 3-메틸-슈도우리딘 (m3ψ), 2-티오-1-메틸-슈도우리딘, 1-메틸-1-데아자-슈도우리딘, 2-티오-1-메틸-1-데아자-슈도우리딘, 디히드로우리딘 (D), 디히드로슈도우리딘, 5,6-디히드로우리딘, 5-메틸-디히드로우리딘 (m5D), 2-티오-디히드로우리딘, 2-티오-디히드로슈도우리딘, 2-메톡시-우리딘, 2-메톡시-4-티오-우리딘, 4-메톡시-슈도우리딘, 4-메톡시-2-티오-슈도우리딘, N1-메틸-슈도우리딘, 3-(3-아미노-3-카르복시프로필)우리딘 (acp3U), 1-메틸-3-(3-아미노-3-카르복시프로필)슈도우리딘 (acp3ψ), 5-(이소펜테닐아미노메틸)우리딘 (inm5U), 5-(이소펜테닐아미노메틸)-2-티오-우리딘 (inm5s2U), α-티오-우리딘, 2'-O-메틸-우리딘 (Um), 5,2'-O-디메틸-우리딘 (m5Um), 2'-O-메틸-슈도우리딘 (øm), 2-티오-2'-O-메틸-우리딘 (s2Um), 5-메톡시카르보닐메틸-2'-O-메틸-우리딘 (mcm5Um), 5-카르바모일메틸-2'-O-메틸-우리딘 (ncm5Um), 5-카르복시메틸아미노메틸-2'-O-메틸-우리딘 (cmrm5Um), 3,2'-O-디메틸-우리딘 (m3Um), 5-(이소펜테닐아미노메틸)-2'-O-메틸-우리딘 (inm5Um), 1-티오-우리딘, 테옥시티미딘, 2'-F-아라-우리딘, 2'-F-우리딘, 2'-OH-아라-우리딘, 5-(2-카르보메톡시비닐) 우리딘, 5-[3-(1-E-프로페닐아미노)우리딘, 또는 기술분야에 알려진 그 밖의 임의의 변형된 우리딘 중 어느 하나 또는 그 이상이다.

[0544] 슈도우리딘(우리딘을 부분적으로 또는 완전히, 종기로는 완전히 대체함)에 의해 변형된 RNA(종기로는 mRNA)는 본원에서 "ψ-변형된"으로 지칭되는 반면, 용어 "m1ψ-변형된"은 RNA(종기로는 mRNA)가 N(1)-메틸슈도우리딘(우리딘을 부분적으로 또는 완전히, 종기로는 완전히 대체함)을 함유함을 의미한다. 또한, 용어 "m5U-변형된"은 RNA(종기로는 mRNA)가 5-메틸우리딘(우리딘을 부분적으로 또는 완전히, 종기로는 완전히 대체함)을 함유함을 의미한다. 이러한 ψ- 또는 m1ψ- 또는 m5U-변형 RNA는 일반적으로 변형되지 않은 형태에 비해 감소된 면역원성을 나타내므로 면역 반응의 유도를 피하거나 최소화해야 하는 응용 분야에서 선호된다.

[0545] 본 개시내용에 사용된 RNA(종기로는 mRNA)의 코돈은 예를 들어 RNA의 GC 함량을 증가시키기 위해 및/또는 펩타이드가 있는 세포(또는 대상체)에서 드문 코돈을 대체하기 위해 추가로 최적화될 수 있다. 또는 관심 단백질은 상기 세포(또는 대상체)에서 동의어인 빈번한 코돈인 코돈에 의해 발현될 것이다. 일부 구현예에서, 본 개시내용에 사용된 RNA에 의해 인코딩되는 아미노산 서열은 야생형 코딩 서열에 비해 그의 G/C 함량이 증가되고/증가되거나 코돈-최적화된 코딩 서열에 의해 인코딩된다. 이것은 또한 코딩 서열의 하나 이상의 서열 영역이 야생형 코딩 서열의 상응하는 서열 영역과 비교하여 G/C 함이 증가되고/증가되거나 코돈-최적화된 구현예를 포함한다. 일 구현예에서, 코돈-최적화 및/또는 G/C 함량의 증가는 종기로는 코딩된 아미노산 서열의 서열을 변화시키지 않는다.

[0546] 용어 "코돈-최적화"는 종기로는 핵산 분자에 의해 코딩되는 아미노산 서열을 변경하지 않고 숙주 유기체의 전형적인 코돈 사용을 반영하기 위해 핵산 분자의 코딩 영역에서 코돈의 변경을 지칭한다. 본 개시내용의 맥락 내에서, 코딩 영역은 종기로는 본원에 기재된 RNA(종기로는 mRNA)를 사용하여 치료될 대상체에서 최적의 발현을 위해 코돈-최적화된다. 코돈 최적화는 번역 효율이 세포 내 tRNA 발생 빈도에 따라 결정된다는 사실을 기반으로 한다. 따라서, RNA(종기로는 mRNA)의 서열은 자주 발생하는 tRNA가 이용가능한 코돈이 "최소 코돈" 대신에 삽입 되도록 변형될 수 있다.

[0547] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 RNA(종기로는 mRNA)의 코딩 영역의 구아노신/시토신(G/C) 함량은 야생형 RNA의 상응하는 코딩 서열의 G/C 함량에 비해 증가되며, 여기서 RNA(종기로는 mRNA)에 의해 인코딩된 아미노산 서열은 종기로는 야생형 RNA에 의해 인코딩된 아미노산 서열과 비교하여 변형되지 않는 것이 바람직하다. RNA 서열의 이러한 변형은 번역될 임의의 RNA 영역의 서열이 그 RNA(종기로는 mRNA)의 효율적인 번역을 위해 중요하다는 사실에 기초한다. 증가된 G(구아노신)/C(시토신) 함량을 갖는 서열은 증가된 A(아데노신)/U(우라실) 함량을 갖는 서열보다 더 안정하다. 여러 코돈이 하나의 동일한 아미노산을 코딩한다는 사실(소위 유전자 코드의 축퇴)과 관련하여 안정성에 가장 유리한 코돈을 결정할 수 있다(소위 대체 코돈 사용). RNA(종기로는 mRNA)에 의해 인코딩되는 아미노산에 따라, 야생형 서열과 비교하여 RNA 서열의 변형에 대한 다양한 가능성이 있다. 특히, A 및/또는 U 뉴클레오타이드를 포함하는 코돈은 동일한 아미노산을 인코딩하지만 A 및/또는 U를 포함하지 않거나 A 및/또는 U 뉴클레오타이드의 함량이 더 낮은 다른 코돈으로 이러한 코돈을 대체함으로써 변형될 수 있다..

[0548] 다양한 구현예에서, 본 명세서에 기재된 mRNA의 코딩 영역의 G/C 함량은 야생형 RNA의 코딩 영역의 G/C 함량과 비교할 때 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 55% 또는 그 이상 증가된다.

[0549] 전술한 변형의 조합, 즉, 5'-캡 구조의 통합, 폴리-A 서열의 통합, 폴리-A 서열의 언마스킹, 5'- 및/또는 3'-UTR의 변경(예를 들어, 하나 이상의 3'-UTR의 통합), 하나 이상의 자연 발생 뉴클레오타이드를 합성 뉴클레오타이드로 대체하는 것(예를 들어, 시티딘을 5-메틸 시티딘으로 및/또는 우리딘을 슈도우리딘(ψ) 또는 N(1)-메틸 슈도우리딘(m1ψ) 또는 5-메틸시티딘으로 대체하는 것) 및 코돈 최적화는 RNA(종기로는 mRNA)의 안정성 및 번역

효율 증가에 상승적인 영향을 미친다. 따라서, 바람직한 구현예에서, 본 개시내용에 사용된 RNA(종기로는 mRNA), 특히 본원에 개시된 면역 반응을 유도하기 위한 항원 또는 에피토프를 코딩하는 RNA(종기로는 mRNA)는 상기 언급된 변형들, 즉: (i) 5'-캡 구조의 통합, (ii) 폴리-A 서열의 통합, 폴리-A 서열의 언마스킹; (iii) 5'- 및/또는 3'-UTR의 변경(예컨대 하나 이상의 3'-UTR 통합); (iv) 하나 이상의 천연 발생 뉴클레오타이드를 합성 뉴클레오타이드로 대체(예를 들어, 시티딘을 5-메틸시티딘으로 및/또는 우리딘을 슈도우리딘(Ψ) 또는 N(1)-메틸슈도우리딘(m1 Ψ) 또는 5-메틸우리딘(m5U)으로 대체), 및 (v) 코돈 최적화 중 적어도 두 가지, 적어도 세 가지, 적어도 4 가지 또는 5 가지 모두의 조합을 포함한다. 일 구현예에서, RNA는 cap1 또는 cap2, 종기로는 cap1 구조를 포함한다. 일 구현예에서, 폴리-A 서열은 적어도 100개의 뉴클레오타이드를 포함한다. 일 구현예에서, 폴리-A 서열은 SEQ ID NO: 14의 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나 이로 구성된다. 일 구현예에서, SEQ ID NO: 12의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 5' UTR, 또는 SEQ ID NO: 12의 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열. 일 구현예에서, 3' UTR은 SEQ ID NO: 13의 뉴클레오타이드 서열, 또는 SEQ ID NO: 13의 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0550] 본 개시내용의 일부 태양은 본원에 개시된 RNA(종기로는 mRNA)의 특정 세포 또는 조직으로의 표적화된 전달을 포함한다. 일 구현예에서, 본 개시내용은 림프계, 특히 이차 림프 기관, 보다 구체적으로 비장을 표적화하는 것을 포함한다. 림프계, 특히 2차 림프 기관, 특히 비장을 표적화하는 것은, 투여되는 RNA(종기로는 mRNA)가 면역 반응을 유도하기 위한 항원 또는 에피토프를 인코딩하는 RNA(종기로는 mRNA)인 경우 특히 바람직하다. 일 구현예에서, 표적 세포는 비장 세포이다. 일 구현예에서, 표적 세포는 비장에서 전문 항원 제시 세포와 같은 항원 제시 세포이다. 일 구현예에서, 표적 세포는 비장의 수지상 세포이다. "림프계"는 순환계의 일부이며 림프를 운반하는 림프관 네트워크를 포함하는 면역계의 중요한 부분이다. 림프계는 림프관, 림프관의 전도 네트워크 및 순환하는 림프로 구성된다. 일차 또는 중추 림프 기관은 미성숙 전구 세포에서 림프구를 생성한다. 흉선과 골수는 일차 림프 기관을 구성한다. 림프절과 비장을 포함하는 이차 또는 말초 림프 기관은 성숙한 나일브 림프구를 유지하고 적응 면역 반응을 시작한다.

[0551] 지질 기반 RNA(mRNA와 같은) 전달 시스템은 내재적으로 간을 선호한다. 간 축적은 간 맥관 구조 또는 지질 대사(리소솜 및 지질 또는 콜레스테롤 공액체)의 불연속적인 특성에 의해 발생한다. 일 구현예에서, 표적 장기는 간이고 표적 조직은 간 조직이다. 이러한 표적 조직으로의 전달은 특히, 이 장기 또는 조직에 mRNA 또는 인코딩된 펩타이드 또는 단백질의 존재가 요구되는 경우 및/또는 다량의 인코딩된 펩타이드 또는 단백질 및/또는 발현이 요구되는 경우 및/또는 특히 상당한 양의 인코딩된 펩타이드 또는 단백질의 전신적 존재가 바람직하거나 요구되는 경우 선호된다.

[0552] 일 구현예에서, 본원에 기술된 RNA LNP 조성물의 투여 후, RNA의 적어도 일부가 표적 세포 또는 표적 장기에 전달된다. 일 구현예에서, RNA의 적어도 일부는 표적 세포의 세포질로 전달된다. 일 구현예에서, RNA는 펩타이드 또는 단백질을 인코딩하는 RNA(종기로는 mRNA)이고 RNA는 표적 세포에 의해 번역되어 펩타이드 또는 단백질을 생산한다. 일 구현예에서, 표적 세포는 간 세포이다. 한 구체예에서, 표적 세포는 근육 세포이다. 일 구현예에서, 표적 세포는 내피 세포이다. 일 구현예에서 표적 세포는 종양 세포 또는 종양 미세환경 내의 세포이다. 일 구현예에서, 표적 세포는 혈액 세포이다. 일 구현예에서, 표적 세포는 림프절의 세포이다. 일 구현예에서, 표적 세포는 폐의 세포이다. 일 구현예에서, 표적 세포는 혈액 세포이다. 일 구현예에서, 표적 세포는 피부 세포이다. 일 구현예에서, 표적 세포는 비장 세포이다. 일 구현예에서, 표적 세포는 비장에서 전문 항원 제시 세포와 같은 항원 제시 세포이다. 일 구현예에서, 표적 세포는 비장의 수지상 세포이다. 일 구현예에서, 표적 세포는 T 세포이다. 일 구현예에서, 표적 세포는 B 세포이다. 일 구현예에서, 표적 세포는 NK 세포이다. 일 구현예에서, 표적 세포는 단핵구이다. 따라서, 본원에 기술된 RNA LNP 조성물은 그러한 표적 세포에 RNA(종기로는 mRNA)를 전달하기 위해 사용될 수 있다. 따라서, 본 개시내용은 또한 본원에 기술된 RNA LNP 조성물을 대상체에 투여하는 것을 포함하는 대상체의 표적 세포에 RNA(종기로는 mRNA)를 전달하는 방법에 관한 것이다. 일 구현예에서, RNA는 표적 세포의 세포질로 전달된다. 일 구현예에서, RNA는 펩타이드 또는 단백질을 인코딩하는 RNA(종기로는 mRNA)이고 RNA는 표적 세포에 의해 번역되어 펩타이드 또는 단백질을 생산한다.

[0553] "인코딩"은 생물학적 프로세스에서, 뉴클레오타이드의 정의된 서열(즉, rRNA, tRNA 및 mRNA) 또는 아미노산의 정의된 서열을 갖는 다른 폴리머 및 거대분자의 합성시 주형 역할을 하기 위한, 유전자, cDNA 또는 RNA(종기로는 mRNA)와 같은 폴리뉴클레오타이드에서 특정 뉴클레오타이드 서열의 고유한 특성을 말한다. 따라서, 그 유전자에 상응하는 RNA(종기로는 mRNA)의 전사 및 번역이 세포 또는 다른 생물학적 시스템에서 단백질을 생산한다면 유전자는 그 단백질을 인코딩하는 것이다. 뉴클레오타이드 서열이 RNA 서열과 동일하고 일반적으로 서열 목록에

제공되는 코딩 가닥과 유전자 또는 cDNA의 전사를 위한 주형으로 사용되는 비인코딩 가닥은 둘 다 그 유전자 또는 cDNA의 단백질 또는 다른 산물을 인코딩한다고 칭할 수 있다.

[0554] 일 구현예에서, 본 개시내용에 사용된 RNA(종기로는 mRNA)는 하나 이상의 폴리펩타이드, 예를 들어 펩타이드 또는 단백질을, 종기로는 약학적 활성 펩타이드 또는 단백질을 코딩하는 핵산 서열(예를 들어, ORF)을 포함한다.

[0555] 바람직한 일 구현예에서, 본 발명에 사용된 RNA(종기로는 mRNA)는 펩타이드 또는 단백질, 종기로는 약학적 활성 펩타이드 또는 단백질을 인코딩하는 핵산 서열(예를 들어, ORF)을 포함하고, 특히 세포나 대상으로 옮겨지는 경우 상기 펩타이드 또는 단백질을 발현할 수 있다. 따라서, 본 발명에서 사용되는 RNA(종기로는 mRNA)는 종기로는 펩타이드 또는 단백질, 종기로는 약제학적 활성 펩타이드 또는 단백질을 인코딩하는 코딩 영역(ORF)을 포함한다. 이와 관련하여, "오픈 리딩 프레임" 또는 "ORF"는 개시 코돈으로 시작하여 정지 코돈으로 끝나는 코돈의 연속적인 스트레치이다. 약제학적 활성 펩타이드 또는 단백질을 인코딩하는 이러한 RNA(종기로는 mRNA)는 본원에서 "약제학적 활성 RNA"(또는 "약제학적 활성 mRNA")로도 지칭된다.

[0556] 본 개시내용에 따르면, 용어 "약제학적 활성 펩타이드 또는 단백질"은 펩타이드 또는 단백질의 발현이 예를 들어 질병이나 장애의 증상의 개선에 도움이 되는 개체의 치료에 사용될 수 있는 펩타이드 또는 단백질을 의미한다. 종기로는, 약제학적 활성 펩타이드 또는 단백질은 치료 또는 완화 특성을 가지며 질환 또는 장애의 하나 이상의 증상의 완화, 경감, 경감, 반전, 개시 지연 또는 중증도를 감소시키기 위해 투여될 수 있다. 종기로는, 약제학적 활성 펩타이드 또는 단백질은 치료 유효량으로 개체에게 투여될 때 개체의 상태 또는 질병 상태에 대해 긍정적이거나 유리한 효과를 갖는다. 약제학적 활성 펩타이드 또는 단백질은 예방적 특성을 가질 수 있으며 질병 또는 장애의 개시를 지연시키거나 이러한 질병 또는 장애의 중증도를 감소시키기 위해 사용될 수 있다. 용어 "약학적 활성 펩타이드 또는 단백질"은 전체 단백질 또는 폴리펩타이드를 포함하며, 또한 그의 약학적 활성 단편을 지칭할 수 있다. 이것은 또한 펩타이드 또는 단백질의 약제학적 활성 유사체를 포함할 수 있다.

[0557] 약제학적 활성 펩타이드 및 단백질의 특정 예로는 사이토카인, 호르몬, 부착 분자, 면역글로불린, 면역학적 활성 화합물, 성장 인자, 프로테아제 억제제, 효소, 수용체, 세포자멸사 조절인자, 전사 인자, 종양 억제 단백질, 구조적 단백질, 리프로그래밍 인자, 게놈 공학 단백질 및 혈액 단백질을 들 수 있으나 이에 한정되지 않는다.

[0558] 용어 "사이토카인"은 약 5 내지 20kDa의 분자량을 갖고 세포 신호전달(예를 들어, 주변분비, 내분비 및/또는 자가분비 신호전달)에 참여하는 단백질에 관한 것이다. 특히 사이토카인은 방출되면 방출 장소 주변의 세포 거동에 영향을 미친다. 사이토카인의 예로는 림포카인, 인터루킨, 케모카인, 인터페론 및 종양 괴사 인자(TNF)가 있다. 본 발명에 따르면 사이토카인은 호르몬이나 성장인자를 포함하지 않는다. 사이토카인은 (i) 일반적으로 호르몬보다 훨씬 더 다양한 농도로 작용하고 (ii) 일반적으로 광범위한 세포에서 생성된다는 점에서 호르몬과 다르다(거의 모든 유핵 세포가 사이토카인을 생성할 수 있음). 인터페론은 일반적으로 항바이러스, 항증식 및 면역 조절 활성을 특징으로 한다. 인터페론은 조절된 세포 표면의 인터페론 수용체에 결합하여 세포 내에서 바이러스 복제를 방지함으로써 세포 내 유전자의 전사를 변경 및 조절하는 단백질이다. 인터페론은 두 가지 유형으로 분류할 수 있다. IFN-감마는 유일한 II형 인터페론이다; 다른 모든 것은 I형 인터페론이다. 사이토카인의 특정 예는 에리스로포이에틴(EPO), 콜로니 자극 인자(CSF), 과립구 콜로니 자극 인자(G-CSF), 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자(GM-CSF), 종양 괴사 인자(TNF), 골 형성 단백질(BMP), 인터페론 알파(IFN α), 인터페론 베타(IFN β), 인터페론 감마(INF γ), 인터루킨 2(IL-2), 인터루킨 4(IL-4), 인터루킨 10(IL-10), 인터루킨 11(IL-11), 인터루킨 12(IL-12) 및 인터루킨 21(IL-21)을 포함한다.

[0559] 일 구현예에서, 약학적 활성 펩타이드 또는 단백질은 대체 단백질을 포함한다. 이 구현예에서, 본 발명은 단백질 대체를 필요로 하는 장애(예를 들어, 단백질 결핍 장애)를 갖는 대상체의 치료 방법을 제공하며, 이 방법은 대상체에게 대체 단백질을 인코딩하는 본 명세서에 기술된 바와 같은 RNA를 투여하는 것을 포함한다. "단백질 대체"라는 용어는 단백질(이의 기능적 변이체 포함)이 결핍된 대상체에게 단백질을 도입하는 것을 의미한다. 이 용어는 또한 단백질을 필요로 하거나 단백질 제공에 의해 이익을 얻는, 예를 들어 단백질 부족을 앓고 있는 대상체에게 단백질을 도입하는 것을 의미한다. 용어 "단백질 결핍을 특징으로 하는 장애"는 단백질의 부재 또는 불충분한 양에 의해 야기되는 병리를 나타내는 임의의 장애를 지칭한다. 이 용어는 생물학적으로 불활성인 단백질 생성물을 초래하는 단백질 접합 장애, 즉 형태 장애를 포함한다. 단백질 부족은 전염병, 면역 억제, 장기 부전, 선 문제, 방사선 질환, 영양 결핍, 중독 또는 기타 환경적 또는 외부적 모욕과 관련될 수 있다.

[0560] 용어 "호르몬"은 분비선에 의해 생성되는 신호전달 분자의 부류에 관한 것이며, 여기서 신호전달은 일반적으로 다음 단계를 포함한다: (i) 특정 조직에서 호르몬의 합성; (ii) 저장 및 분비; (iii) 호르몬을 그의 표적으로 수송; (iv) 수용체에 의한 호르몬의 결합; (v) 신호의 중계 및 증폭; 및 (vi) 호르몬 분해. 호르몬은 사이토카

인에 비해 (1) 호르몬은 일반적으로 덜 가변적인 농도로 작용하고 (2) 일반적으로 특정 종류의 세포에서 생성된다는 점에서 사이토카인과 다르다. 일 구현예에서, "호르몬"은 펩타이드 또는 단백질 호르몬, 예컨대 인슐린, 바소프레신, 프로락틴, 부신피질자극 호르몬(ACTH), 갑상선 호르몬, 성장 호르몬(예컨대 인간 성장 호르몬 또는 소의 소마토트로핀), 옥시토신, 심방-나트륨 이뇨제 펩타이드(ANP), 글루카곤, 소마토스타틴, 콜레시스토킨, 가스트린 및 랩틴이다.

[0561] "부착 분자(adhesion molecules)"라는 용어는 세포 표면에 위치하고 다른 세포 또는 세포의 기질(ECM)과 세포의 결합에 관여하는 단백질에 관한 것이다. 부착 분자는 전형적으로 막관통 수용체이고 칼슘-비의존성(예를 들어, 인테그린, 면역글로불린 슈퍼패밀리, 림프구 귀소 수용체) 및 칼슘-의존성(카드헤린 및 셀렉틴)으로 분류될 수 있다. 부착 분자의 특정한 예는 인테그린, 림프구 귀소 수용체, 셀렉틴(예를 들어, P-셀렉틴) 및 어드레신이다.

[0562] 인테그린은 또한 신호 형질도입에 관여한다. 특히, 리간드 결합 시 인테그린은 세포 신호전달 경로, 예를 들어 수용체 티로신 키나아제(RTK)와 같은 막관통 단백질 키나아제의 경로를 조절한다. 이러한 조절은 세포 성장, 분열, 생존 또는 분화 또는 세포 사멸로 이어질 수 있다. 인테그린의 특정한 예는 다음을 포함한다: $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_7\beta_1$, $\alpha_L\beta_2$, $\alpha_M\beta_2$, $\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_V\beta_1$, $\alpha_V\beta_3$, $\alpha_V\beta_5$, $\alpha_V\beta_6$, $\alpha_V\beta_8$, $\alpha_6\beta_4$.

[0563] 용어 "면역글로불린" 또는 "면역글로불린 슈퍼패밀리"는 세포의 인식, 결합 및/또는 접착 과정에 관여하는 분자를 의미한다. 이 슈퍼패밀리에 속하는 분자는 면역글로불린 도메인 또는 접힘으로 알려진 영역을 포함하는 특징을 공유한다. 면역글로불린 슈퍼패밀리의 구성원으로는 항체(예컨대 IgG), T 세포 수용체(TCR), 주요 조직 적합성 복합체(MHC) 분자, 공동 수용체(예컨대 CD4, CD8, CD19), 항원 수용체 부속 분자(예컨대, CD-3 γ , CD3- δ , CD-3 ϵ , CD79a, CD79b), 공동 자극 또는 억제 분자(예컨대 CD28, CD80, CD86), 등을 들 수 있다.

[0564] 용어 "면역학적 활성 화합물"은 종기로는 면역 세포의 성숙을 유도 및/또는 억제하고, 사이토카인 생합성을 유도 및/또는 억제하고/하거나 B 세포에 의한 항체 생산을 자극하여 체액성 면역을 변경함으로써 면역 반응을 변경하는 임의의 화합물에 관한 것이다. 면역학적 활성 화합물은 항바이러스 및 항종양 활성을 포함하나 이에 한정되지 않는 강력한 면역자극 활성을 가지며, 또한 예컨대 광범위한 TH2 매개 질병을 치료하는데 유용한, TH2 면역 반응으로부터 면역 반응을 쉬프트 시키는 것과 같은, 면역 반응의 다른 측면을 하향조절할 수도 있다. 면역학적 활성 화합물은 백신 아ジュ반트로서 유용할 수 있다. 면역학적 활성 화합물의 특정한 예에는 인터루킨, 콜로니 자극 인자(CSF), 과립구 콜로니 자극 인자(G-CSF), 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자(GM-CSF), 에리트로포이에틴, 종양 괴사 인자(TNF), 인터페론, 인테그린을 포함한다, 어드레신, 셀렉틴, 귀소 수용체 및 항원, 특히 종양 관련 항원, 병원체 관련 항원(예컨대 박테리아, 기생충 또는 바이러스 항원), 알레르겐 및 자가항원이 포함된다. 바람직한 면역학적 활성 화합물은 백신 항원, 즉 대상체에 접종하여 면역 반응을 유도하는 항원이다.

[0565] 용어 "자가항원" 또는 "자기-항원"은 대상체의 신체 내에서 기원하고(즉, 자가항원은 "자가유래 항원"이라고도 부를 수 있음) 이러한 신체의 정상 부분에 대해 비정상적으로 강력한 면역 반응을 일으키는 항원을 의미한다. 이러한 자가항원에 대한 왕성한 면역반응은 "자가면역질환"의 원인이 될 수 있다.

[0566] "알레르겐"이라는 용어는 대상체의 체외에서 기원하는 항원(즉, 알레르겐은 "이종 항원"이라고도 칭할 수 있다)의 일종으로, 대상체의 면역 체계가 비정상적으로 왕성한 면역 반응을 일으키는 항원을 말하는 것으로, 이것은 달리 대상체에게 해가 되지 않을 감지된 위협에 맞서 싸운다. "알레르기"는 알레르겐에 대한 이러한 활발한 면역 반응에 의해 발생하는 질병이다. 알레르겐은 일반적으로 면역글로불린 E(IgE) 반응을 통해 아토피 환자에게서 I형 과민 반응을 자극할 수 있는 항원이다. 알레르겐의 특정 예에는 땅콩 단백질(예컨대 Ara h 2.02), 오브 알부민, 잔디 꽃가루 단백질(예컨대 Phl p 5), 먼지 진드기의 단백질(예컨대 Der p 2)이 포함된다.

[0567] 용어 "성장 인자"는 세포 성장, 증식, 치유 및/또는 세포 분화를 자극할 수 있는 분자를 의미한다. 일반적으로 성장 인자는 세포 사이에서 신호전달 분자 역할을 한다. "성장 인자"라는 용어는 표적 세포 표면의 특정 수용체에 결합하는 특정 사이토카인 및 호르몬을 포함한다. 성장 인자의 예로는 뼈 형성 단백질(BMP), 섬유아세포 성장 인자(FGF), VEGFA와 같은 혈관 내피 성장 인자(VEGF), 표피 성장 인자(EGF), 인슐린 유사 성장 인자, 에프린, 대식세포 콜로니 자극 인자, 과립구 콜로니-자극 인자, 과립구 대식세포 콜로니-자극 인자, 뉴레 굴린, 뉴로트로핀 (예컨대 뇌 유래 신경 영양 인자(BDNF), 신경 성장 인자(NGF)), 태반 성장 인자(PGF), 혈소판 유래 성장 인자(PDGF), 레날라제(RNLS)(항-세포자멸사 생존인자), T 세포 성장 인자(TCGF), 트롬보포이에틴(TPO), 형질 전환 성장 인자(형질 전환 성장 인자 알파(TGF- α), 형질 전환 성장 인자 베타(TGF- β)), 및 종양 괴사 인자-알파(TNF- α)를 들 수 있다. 일 구현예에서, "성장 인자"는 펩타이드 또는 단백질 성장 인자이다.

[0568] 용어 "프로테아제 억제제"는 프로테아제의 기능을 억제하는 분자, 특히 펩타이드 또는 단백질을 의미한다. 프로

테아제 억제제는 억제되는 프로테아제(예를 들어, 아스파르트산 프로테아제 억제제) 또는 그들의 작용 기전(예를 들어, 세르핀과 같은 자살 억제제)에 의해 분류될 수 있다. 프로테아제 억제제의 특정한 예는 알파 1-항트립신, 아프로티닌 및 베스타틴과 같은 세르핀을 포함한다.

[0569] "효소"라는 용어는 화학 반응을 가속화하는 거대분자 생물학적 촉매를 의미한다. 다른 촉매와 마찬가지로 효소는 그들이 촉매하는 반응에서 소비되지 않으며 상기 반응의 평형을 변경하지 않는다. 다른 많은 촉매와 달리 효소는 훨씬 더 구체적이다. 일 구현예에서, 효소는 개체의 항상성에 필수적이며, 예를 들어, 효소의 임의의 오작동(특히 돌연변이, 결실 또는 생산 감소 중 임의의 것에 의해 야기될 수 있는 감소된 활성)은 질병을 초래한다. 효소의 예로는 단순 헤르페스 바이러스 1형 티미딘 키나아제(HSV1-TK), 헥소사미니다아제, 페닐알라닌 히드록실라아제, 슈도콜린에스테라아제 및 락타아제가 있다.

[0570] "수용체"라는 용어는 세포 외부로부터 신호(특히 리간드라고 하는 화학적 신호)를 수신하는 단백질 분자를 의미한다. 수용체에 대한 신호(예컨대 리간드)의 결합은 세포의 일부 반응, 예를 들어 키나아제의 세포내 활성화를 유발한다. 수용체에는 막관통 수용체(예컨대 이온 채널 연결(이온성) 수용체, G 단백질 연결(대사성) 수용체 및 효소 연결 수용체) 및 세포내 수용체(예컨대 세포질 수용체 및 핵 수용체)가 포함된다. 수용체의 특정 예는 스테로이드 호르몬 수용체, 성장 인자 수용체, 및 P-선택틴 당단백질 리간드-1(PSGL-1)과 같은 펩타이드 수용체(즉, 그의 리간드가 펩타이드인 수용체)를 포함한다. 용어 "성장 인자 수용체"는 성장 인자에 결합하는 수용체를 의미한다.

[0571] 용어 "세포자멸사 조절인자"는 세포자멸사를 조절하는, 즉 세포자멸사를 활성화하거나 억제하는 분자, 특히 펩타이드 또는 단백질을 의미한다. 세포자멸사 조절인자는 미토콘드리아 기능을 조절하는 것과 카스파제를 조절하는 것의 두 가지 광범위한 부류로 분류할 수 있다. 첫 번째 부류는 미토콘드리아 막 전위의 손실 및/또는 시토크롬 C와 같은 프로-세포자멸사 단백질의 시토크로미 방출을 방지함으로써 미토콘드리아 완전성을 보존하는 역할을 하는 단백질(예를 들어, BCL-2, BCL-xL)을 포함한다. 또한 이 첫 번째 부류에는 시토크롬 C의 방출을 촉진하는 세포자멸사 촉진 단백질(예컨대 BAX, BAK, BIM)이 속한다. 두 번째 부류에는 세포자멸사 단백질의 억제제(예컨대 XIAP) 또는 카스파제의 활성화를 차단하는 FLIP과 같은 단백질이 포함된다.

[0572] 용어 "전사 인자"는 특히 특정 DNA 서열에 결합함으로써 DNA로부터 메신저 RNA로 유전 정보의 전사 속도를 조절하는 단백질에 관한 것이다. 전사 인자는 평생 동안 세포 분열, 세포 성장 및 세포 사멸; 배아 발생 중 세포 이동 및 조직화; 및/또는 호르몬과 같은 세포 외부로부터의 신호에 반응하여 이를 조절할 수 있다. 전사 인자는 일반적으로 전사 인자에 의해 조절되는 유전자에 인접한 특정 DNA 서열에 결합하는 적어도 하나의 DNA 결합 도메인을 포함한다. 전사 인자의 특정한 예는 MECP2, FOXP2, FOXP3, STAT 단백질 패밀리와 HOX 단백질 패밀리를 포함한다.

[0573] 용어 "종양 억제 단백질"은 분자, 특히 암 경로의 한 단계로부터 세포를 보호하는 펩타이드 또는 단백질에 관한 것이다. 종양 억제 단백질(일반적으로 해당 종양 억제 유전자에 의해 인코딩됨)은 세포 주기의 조절에 대한 약화 또는 억제 효과를 나타내고/거나 세포자멸사를 촉진한다. 이들의 기능은 다음 중 하나 이상일 수 있다: 세포 주기의 지속에 필수적인 유전자의 억제; 세포 주기와 DNA 손상의 커플링(손상된 DNA가 세포에 존재하는 한 세포 분열이 일어나지 않아야 함); 손상된 DNA를 복구할 수 없는 경우 세포자멸사의 개시; 전이 억제(예를 들어, 종양 세포의 분산 방지, 접촉 억제의 상실 차단 및 전이 억제); 및 DNA 수리. 종양 억제 단백질의 특정 예에는 p53, 포스포타제 및 텐신 상동체(P TEN), SWI/SNF(SWIT ch /Sucrose Non-Fermentable), von Hippel-Lindau 종양 억제 인자(pVHL), 선종성 용종증 대장균(APC), CD95, 종양원성 5의 억제(ST5), 종양원성 5의 억제(ST5), 종양원성 14의 억제(ST14) 및 Yippee-유사 3(YPEL3).

[0574] "구조 단백질"이라는 용어는 달리 유동적인 생물학적 구성요소에 강성 및 경직성을 부여하는 단백질을 의미한다. 구조 단백질은 대부분 섬유질(예컨대 콜라겐 및 엘라스틴)이지만 구형일 수도 있다(예컨대 액틴 및 튜불린). 일반적으로 구형 단백질은 모노머로서 가용성이지만 중합되어 예를 들어 세포골격을 구성할 수 있는 긴 섬유를 형성한다. 다른 구조 단백질은 기계적 힘을 생성할 수 있는 운동 단백질(예컨대 미오신, 키네신 및 다이네인)과 계면활성제 단백질이다. 구조 단백질의 특정한 예는 콜라겐, 계면활성제 단백질 A, 계면활성제 단백질 B, 계면활성제 단백질 C, 계면활성제 단백질 D, 엘라스틴, 튜불린, 액틴 및 미오신을 포함한다.

[0575] 용어 "리프로그래밍 인자" 또는 "리프로그래밍 전사 인자"는 분자, 특히 펩타이드 또는 단백질에 관한 것으로, 임의로 추가 리프로그래밍 인자와 같은 추가 제제와 함께 체세포에서 발현시, 상기 체세포의 줄기 세포 특성, 특히 만능성을 갖는 세포로의 리프로그래밍 또는 탈분화를 유도한다. 리프로그래밍 인자의 특정한 예는 OCT4, SOX2, c-MYC, KLF4, LIN28 및 NANOG를 포함한다.

- [0576] "유전체 공학 단백질"이라는 용어는 개체의 게놈에서 DNA를 삽입, 삭제 또는 대체할 수 있는 단백질에 관한 것이다. 게놈 공학 단백질의 특정한 예는 메가뉴클레아제, 징크 핑거 뉴클레아제(ZFN), 전사 활성화제-유사 이펙터 뉴클레아제(TALEN) 및 군집 규칙적으로 간격을 둔 짧은 회문 반복-CRISPR-관련 단백질 9(CRISPR-Cas9)를 포함한다.
- [0577] 용어 "혈액 단백질"은 대상체의 혈장, 특히 건강한 대상체의 혈장에 존재하는 펩타이드 또는 단백질에 관한 것이다. 혈액 단백질은 수송(예컨대 알부민, 트랜스페린), 효소 활성(예컨대 트롬빈 또는 세룰로플라스민), 혈액 응고(예컨대 피브리노겐), 병원체에 대한 방어(예컨대 보체 성분 및 면역글로불린), 프로테아제 억제제(예를 들어, 알파 1-항트립신) 등과 같은 다양한 기능을 갖는다. 혈액 단백질의 특정 예에는 트롬빈, 혈청 알부민, 인자 VII, 인자 VIII, 인슐린, 인자 IX, 인자 X, 조직 플라스미노겐 활성화제, 단백질 C, 폰 빌레브란트 인자, 안티트롬빈 III, 글루코세레브로시다제, 에리스로포이에틴, 과립구 콜로니 자극 인자(G-CSF), 변형 인자 VIII 및 항응고제가 포함된다.
- [0578] 따라서, 일 구현예에서, 약학적 활성 펩타이드 또는 단백질은 (i) 종기로는 에리트로포이에틴(EPO), 인터루킨 4(IL-2) 및 인터루킨 10(IL-11)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 사이토카인과, 더욱 종기로는 EPO; (ii) 부작 분자, 특히 인테그린; (iii) 면역글로불린, 특히 항체; (iv) 면역학적 활성 화합물, 특히 항원; (v) 호르몬, 특히 바소프레신, 인슐린 또는 성장 호르몬; (vi) 성장 인자, 특히 VEGFA; (vii) 프로테아제 억제제, 특히 알파 1-항트립신; (viii) 효소, 종기로는 단순 헤르페스 바이러스 1형 티미딘 키나아제(HSV1-TK), 핵소사미니다아제, 페닐알라닌 히드록실라아제, 슈도콜린에스테라아제, 췌장 효소 및 락타아제로 이루어진 군으로부터 선택됨; (ix) 수용체, 특히 성장 인자 수용체; (x) 세포자멸사 조절제, 특히 BAX; (xi) 전사 인자, 특히 FOXP3; (xii) 종양 억제 단백질, 특히 p53; (xiii) 구조 단백질, 특히 계면활성제 단백질 B; (xiv) 재프로그래밍 인자, 예를 들어, OCT4, SOX2, c-MYC, KLF4, LIN28 및 NANOG로 이루어진 군으로부터 선택됨; (xv) 게놈 공학 단백질, 특히 클러스터된 규칙적인 간격의 짧은 회문 반복-CRISPR-연관 단백질 9(CRISPR-Cas9); 및 (xvi) 혈액 단백질, 특히 피브리노겐이다.
- [0579] 일 구현예에서, 약학적 활성 펩타이드 또는 단백질은 하나 이상의 항원 또는 하나 이상의 에피토프를 포함한다. 즉, 펩타이드 또는 단백질을 대상체에게 투여하면 대상체에서 하나 이상의 항원 또는 하나 이상의 에피토프에 대한 면역 반응이 유발되며, 이는 치료적이거나 부분적으로 또는 완전히 보호적일 수 있다.
- [0580] 특정 구현예에서, RNA(종기로는 mRNA)는 적어도 하나의 에피토프를 인코딩한다.
- [0581] 특정 구현예에서, 에피토프는 종양 항원으로부터 유래된다. 종양 항원은 일반적으로 다양한 암에서 발견되는 것으로 알려진 "표준"항원일 수 있다. 종양 항원은 또한 개인의 종양에 특이적이고 이전에 면역 체계에 의해 인식된 바 없는 "신생 항원(neo-antigen)"일 수 있다. 신생 항원 또는 신생 에피토프는 암 세포의 게놈에서 아미노산 변화를 초래하는 하나 이상의 암 특이적 돌연변이로 인해 발생할 수 있다. 종양 항원의 비제한적인 예로는: p53, ART-4, BAGE, 베타-카테닌/m, Bcr-abL CAMEL, CAP-1, CASP-8, CDC27/m, CDK4/m, CEA, CLAUD-6, CLAUDIN-18.2 및 CLAUDIN-12와 같은 클라우딘 패밀리의 세포 표면 단백질, c-MYC, CT, Cyp-B, DAM, ELF2M, ETV6-AML1, G250, GAGE, GnT-V, Gap 100, HAGE, HER-2/neu, HPV-E7, HPV-E6, HAST-2, hTERT (또는 hTRT), LAGE, LDLR/FUT, MAGE-A, 종기로는 MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A7, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A 10, MAGE-A 11, 또는 MAGE-A12, MAGE-B, MAGE-C, MART-1/Melan-A, MC1R, Myosin/m, MUC1, MUM-1, MUM-2, MUM-3, NA88-A, NF1, NY-ESO-1, NY-BR-1, p190 마이터 BCR-abL, Pml/RARa, PRAME, 프로테아제 3, PSA, PSM, RAGE, RU1 또는 RU2, SAGE, SART-1 또는 SART-3, SCGB3A2, SCP1, SCP2, SCP3, SSX, SURVIVIN, TEL/AML1, TPI/m, TRP-1, TRP-2, TRP-2/INT2, TPTE, WT, 및 WT-1을 들 수 있다.
- [0582] 암 돌연변이는 개인마다 다르다. 따라서, 새로운 에피토프(네오-에피토프)를 인코딩하는 암 돌연변이체는 백신 조성물 및 면역요법의 개발에서 매력적인 표적이 된다. 종양 면역 요법의 효능은 숙주 내에서 강력한 면역 반응을 유도할 수 있는 암 특이적 항원 및 에피토프의 선택에 달려 있다. RNA는 환자에게 환자 특이적 종양 에피토프를 전달하는 데 사용될 수 있다. 비장에 상주하는 수지상 세포(DC)는 면역원성 에피토프 또는 종양 에피토프와 같은 항원의 RNA 발현에 특히 관심 있는 항원 제시 세포를 나타낸다. 다중 에피토프의 사용은 종양 백신 조성물에서 치료 효능을 촉진하는 것으로 나타났다. 종양 유사체의 신속한 시퀀싱은 본원에 기술된 mRNA에 의해, 예를 들어 단일 폴리펩타이드로서 코딩될 수 있는 개별화된 백신을 위한 다중 에피토프를 제공할 수 있으며, 여기서 에피토프는 선택적으로 링커에 의해 단리된다. 본 개시내용의 특정 구현예에서, mRNA는 적어도 1개의 에피토프, 적어도 2개의 에피토프, 적어도 3개의 에피토프, 적어도 4개의 에피토프, 적어도 5개의 에피토프, 적어도 6개의 에피토프, 적어도 7개의 에피토프, 적어도 8개의 에피토프, 적어도 9개의 에피토프 또는 적어도 10개의

에피토프를 인코딩한다. 예시적인 구현예는 적어도 5개의 에피토프를 인코딩하는 mRNA("펜타토프"라고 함) 및 적어도 10개의 에피토프를 인코딩하는 mRNA("데카토프"라고 함)를 포함한다.

- [0583] 특정 구현예에서, 에피토프는 병원체 관련 항원, 특히 바이러스 항원으로부터 유도된다. 일 구현예에서, 에피토프는 SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 면역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 면역원성 단편 또는 그의 면역원성 변이체로부터 유도된다. 따라서, 일 구현예에서, 본 발명에 사용된 RNA(종기로는 mRNA)는 SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 면역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 면역원성 단편 또는 그의 면역원성 변이체를 포함하는 아미노산 서열을 인코딩한다. 일 구현예에서, RNA는 SEQ ID NO:1의 위치 986 및 987에서 프롤린 잔기 치환을 갖는 전장 SARS-CoV2 S 단백질 변이체를 인코딩하는 ORF를 포함한다. 일 구현예에서, SARS-CoV2 S 단백질 변이체는 SEQ ID NO:7에 대해 적어도 80% 동일성 (예컨대 적어도 85% 동일성, 적어도 90% 동일성, 적어도 91% 동일성, 적어도 92% 동일성, 적어도 93% 동일성, 적어도 94% 동일성, 적어도 95% 동일성, 적어도 96% 동일성, 적어도 97% 동일성, 적어도 98% 동일성, 또는 적어도 99% 동일성)을 갖는다.
- [0584] 일 구현예에서, SARS-CoV-2 S 단백질의 면역원성 단편은 SARS-CoV-2 S 단백질의 S1 서브유닛 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 S1 서브유닛의 수용체 결합 도메인(RBD)을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 개시내용에 사용된 RNA (예를 들어, mRNA)는 SARS-CoV-2 S 단백질의 수용체-결합 부분을 포함하는 폴리펩타이드를 인코딩하는 오픈 리딩 프레임에 포함하며, 이 RNA는 상기 폴리펩타이드의 세포내 발현에 적합하다. 일부 구현예에서, 이러한 인코딩된 폴리펩타이드는 완전한 S 단백질을 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, 인코딩된 폴리펩타이드는 예를 들어 SEQ ID NO: 5에 나타난 바와 같은 수용체 결합 도메인(RBD)을 포함한다. 일부 구현예에서, 인코딩된 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 29 또는 31에 따른 펩타이드를 포함한다.
- [0585] 일 구현예에서, SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 면역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 면역원성 단편 또는 그의 면역원성 변이체를 포함하는 아미노산 서열은 다량체 복합체, 특히 삼량체 복합체를 형성할 수 있다. 이를 위해, SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 면역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 면역원성 단편 또는 그의 면역원성 변이체를 포함하는 아미노산 서열은, SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 면역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 면역원성 단편 또는 그의 면역원성 변이체를 포함하는 아미노산 서열의 다량체 복합체, 삼량체 복합체를 형성할 수 있는 도메인을 포함할 수 있다. 일 구현예에서, 다량체 복합체의 형성을 허용하는 도메인은 삼량체화 도메인, 예를 들어 본원에 기술된 삼량체화 도메인을 포함한다.
- [0586] 일 구현예에서, 본 명세서에서 정의된 삼량체화 도메인은 SEQ ID NO: 10의 아미노산 3 내지 29의 아미노산 서열을 포함하는 서열 또는 그의 기능적 변이체를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 일 구현예에서, 본 명세서에서 정의된 삼량체화 도메인은 SEQ ID NO: 10의 아미노산 서열을 포함하는 서열 또는 그의 기능적 변이체를 포함하나 이에 한정되지 않는다.
- [0587] 일 구현예에서, 삼량체화 도메인은 SEQ ID NO: 10의 아미노산 3 내지 29의 아미노산 서열, SEQ ID NO: 10의 아미노산 3 내지 29의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열, 또는 SEQ ID NO: 10의 아미노산 3 내지 29의 아미노산 서열, 또는 SEQ ID NO: 10의 아미노산 3 내지 29의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열의 기능적 단편을 포함한다. 일 구현예에서, 삼량체화 도메인은 SEQ ID NO: 10의 아미노산 3 내지 29의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0588] 일 구현예에서, 삼량체화 도메인을 인코딩하는 RNA는 (i) SEQ ID NO: 11의 뉴클레오타이드 7 내지 87의 뉴클레오타이드 서열, SEQ ID NO: 11의 뉴클레오타이드 7 내지 87의 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열, 또는 SEQ ID NO: 11의 뉴클레오타이드 7 내지 87의 뉴클레오타이드 서열의 단편, 또는 SEQ ID NO: 11의 뉴클레오타이드 7 내지 87의 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하고/포함하거나 (ii) SEQ ID NO: 10의 아미노산 3 내지 29의 아미노산 서열을 포함하는 아미노산 서열, SEQ ID NO: 10의 아미노산 3 내지 29의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열, 또는 SEQ ID NO: 10의 아미노산 3 내지 29의 아미노산 서열의 기능적 단편, 또는 SEQ ID NO: 10의 아미노산 3 내지 29의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 아미노산 서열을 인코딩한다. 일 구현예에서, 삼량체화 도메인 (i)을 인코딩하는 RNA는 SEQ ID NO: 11의 뉴클레오타이드 7 내지 87의 뉴클레오타이드 서열을 포함하고; 및/또는 (ii) SEQ ID NO: 10의 아미노산 3 내지 29의 아미노산 서열을 포함하는 아미노산 서열을 인코딩한다.
- [0589] 일부 구현예에서, SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 면역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 면역원성 단편 또는

는 그의 면역원성 변이체(예를 들어, 본원에 기재된 바와 같음)을 인코딩하는 RNA에 의해 발현되는 RBD 항원은, 예를 들어 그의 면역원성을 증가시키기 위해 T4-피브리틴 유래 "폴돈(foldon)" 삼량체화 도메인의 첨가에 의해 변형될 수 있다.

- [0590] 일 구현예에서, SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 면역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 면역원성 단편 또는 그의 면역원성 변이체를 포함하는 아미노산 서열은 코돈-최적화되고/되거나, 그의 G/C 함량이 야생형 코딩 서열에 비해 증가된 코딩 서열에 의해 인코딩되며, 여기서 코돈 최적화 및/또는 G/C 함량의 증가는 좋기로는 인코딩된 아미노산 서열의 서열을 변화시키지 않는 것이 바람직하다.
- [0591] 일 구현예에서,
- [0592] (i) SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 면역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 면역원성 단편 또는 그의 면역원성 변이체를 인코딩하는 RNA는, SEQ ID NO: 2, 8 또는 9의 뉴클레오타이드 979~1584의 뉴클레오타이드 서열, SEQ ID NO: 2, 8 또는 9의 뉴클레오타이드 979 내지 1584의 뉴클레오타이드 서열에 대해, 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열, SEQ ID NO: 2, 8 또는 9의 뉴클레오타이드 979~1584의 뉴클레오타이드 서열의 단편, 또는 SEQ ID NO: 2, 8 또는 9의 뉴클레오타이드 979~1584의 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하고/포함하거나;
- [0593] (ii) SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 면역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 면역원성 단편 또는 그의 면역원성 변이체는, SEQ ID NO: 1의 아미노산 327~528의 아미노산 서열, SEQ ID NO: 1의 아미노산 327~528의 아미노산 서열에 대해, 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열, 또는 SEQ ID NO: 1의 아미노산 327~528의 아미노산 서열의 면역원성 단편, 또는 SEQ ID NO: 1의 아미노산 327~528의 아미노산 서열에 대해, 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0594] 일 구현예에서,
- [0595] (i) SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 면역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 면역원성 단편 또는 그의 면역원성 변이체를 인코딩하는 RNA는, SEQ ID NO: 2, 8 또는 9의 뉴클레오타이드 49~2055의 뉴클레오타이드 서열, SEQ ID NO: 2, 8 또는 9의 뉴클레오타이드 49~2055의 뉴클레오타이드 서열에 대해, 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열, SEQ ID NO: 2, 8 또는 9의 뉴클레오타이드 49~2055의 뉴클레오타이드 서열의 단편, 또는 SEQ ID NO: 2, 8 또는 9의 뉴클레오타이드 49~2055의 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하고/포함하거나;
- [0596] (ii) SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 면역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 면역원성 단편 또는 그의 면역원성 변이체는, SEQ ID NO: 1의 아미노산 17~685의 아미노산 서열, SEQ ID NO: 1의 아미노산 17~685의 아미노산 서열에 대해, 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열, 또는 SEQ ID NO: 1의 아미노산 17~685의 아미노산 서열의 면역원성 단편, 또는 SEQ ID NO: 1의 아미노산 17~685의 아미노산 서열에 대해, 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0597] 일 구현예에서,
- [0598] (i) SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 면역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 면역원성 단편 또는 그의 면역원성 변이체를 인코딩하는 RNA는, SEQ ID NO: 2, 8 또는 9의 뉴클레오타이드 49~3819의 뉴클레오타이드 서열, SEQ ID NO: 2, 8 또는 9의 뉴클레오타이드 49~3819의 뉴클레오타이드 서열에 대해, 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열, SEQ ID NO: 2, 8 또는 9의 뉴클레오타이드 49~3819의 뉴클레오타이드 서열의 단편, 또는 SEQ ID NO: 2, 8 또는 9의 뉴클레오타이드 49~3819의 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하고/포함하거나;
- [0599] (ii) SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 면역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 면역원성 단편 또는 그의 면역원성 변이체는, SEQ ID NO: 1 또는 7의 아미노산 17~1273의 아미노산 서열, SEQ ID NO: 1 또는 7의 아미노산 17~1273의 아미노산 서열에 대해, 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열, 또는 SEQ ID NO: 1 또는 7의 아미노산 17~1273의 아미노산 서열의 면역원성 단편, 또는 SEQ ID NO: 1

또는 7의 아미노산 17-1273의 아미노산 서열에 대해, 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

- [0600] 일 구현예에서, SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 면역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 면역원성 단편 또는 그의 면역원성 변이체를 포함하는 아미노산 서열은 분비 신호 펩타이드를 포함한다.
- [0601] 일 구현예에서, 분비 신호 펩타이드는 SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 면역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 면역원성 단편 또는 그의 면역원성 변이체에 종기로는 N-말단에 융합된다.
- [0602] 일 구현예에서,
- [0603] (i) 분비 신호 펩타이드를 인코딩하는 RNA는, SEQ ID NO: 2, 8 또는 9의 뉴클레오타이드 1 내지 48의 뉴클레오타이드 서열, SEQ ID NO: 2, 8 또는 9의 뉴클레오타이드 1 내지 48의 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열, 또는 SEQ ID NO: 2, 8 또는 9의 뉴클레오타이드 1 내지 48의 뉴클레오타이드 서열의 단편, 또는 SEQ ID NO: 2, 8 또는 9의 뉴클레오타이드 1 내지 48의 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하고/포함하거나
- [0604] (ii) 분비 신호 펩타이드는, SEQ ID NO: 1의 아미노산 1-16의 아미노산 서열, SEQ ID NO: 1의 아미노산 1-16의 아미노산 서열에 대해, 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열, 또는 SEQ ID NO: 1의 아미노산 1-16의 아미노산 서열의 기능성 단편, 또는 SEQ ID NO: 1의 아미노산 1-16의 아미노산 서열에 대해, 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0605] 일 구현예에서, SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 면역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 면역원성 단편 또는 그의 면역원성 변이체를 인코딩하는 RNA는
- [0606] (i) SEQ ID NO: 6의 뉴클레오타이드 서열, SEQ ID NO: 6의 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열, 또는 SEQ ID NO: 6의 뉴클레오타이드 서열의 단편, 또는 SEQ ID NO: 6의 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하고/포함하거나
- [0607] (ii) SEQ ID NO: 5의 아미노산 서열, SEQ ID NO: 5의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열, 또는 SEQ ID NO: 5의 아미노산 서열의 면역원성 단편, 또는 SEQ ID NO: 5의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 인코딩한다.
- [0608] 일 구현예에서, SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 면역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 면역원성 단편 또는 그의 면역원성 변이체를 인코딩하는 RNA는
- [0609] (i) SEQ ID NO: 4의 뉴클레오타이드 서열, SEQ ID NO: 4의 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열, 또는 SEQ ID NO: 4의 뉴클레오타이드 서열의 단편, 또는 SEQ ID NO: 4의 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하고/포함하거나
- [0610] (ii) SEQ ID NO: 3의 아미노산 서열, SEQ ID NO: 3의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열, 또는 SEQ ID NO: 3의 아미노산 서열의 면역원성 단편, 또는 SEQ ID NO: 3의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 인코딩한다.
- [0611] 일 구현예에서, SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 면역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 단편 또는 그의 면역원성 변이체를 인코딩하는 RNA는 (i) SEQ ID NO: 4의 뉴클레오타이드 서열을 포함하고/포함하거나 (ii) SEQ ID NO: 3의 아미노산 서열을 포함하는 아미노산 서열을 인코딩한다.
- [0612] 일 구현예에서, SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 면역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 면역원성 단편 또는 그의 면역원성 변이체를 인코딩하는 RNA는
- [0613] (i) SEQ ID NO: 30의 뉴클레오타이드 54-716의 뉴클레오타이드 서열, SEQ ID NO: 30의 뉴클레오타이드 54-716의 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클

레오타이드 서열, 또는 SEQ ID NO: 30의 뉴클레오타이드 54-716의 뉴클레오타이드 서열의 단편, 또는 SEQ ID NO: 30의 뉴클레오타이드 54-716의 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하고/포함하거나

- [0614] (ii) SEQ ID NO: 29의 아미노산 1-221의 아미노산 서열, SEQ ID NO: 29의 아미노산 1-221의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열, 또는 SEQ ID NO: 29의 아미노산 1-221의 아미노산 서열의 번역원성 단편, 또는 SEQ ID NO: 29의 아미노산 1-221의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 인코딩한다.
- [0615] 일 구현예에서, SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 번역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 번역원성 단편 또는 그의 번역원성 변이체를 인코딩하는 RNA는 (i) SEQ ID NO: 30의 뉴클레오타이드 54-716의 뉴클레오타이드 서열을 포함하고/포함하거나 (ii) SEQ ID NO: 29의 아미노산 1-221의 아미노산 서열을 포함하는 아미노산 서열을 인코딩한다.
- [0616] 일 구현예에서, SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 번역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 번역원성 단편 또는 그의 번역원성 변이체를 인코딩하는 RNA는
- [0617] (i) SEQ ID NO: 32의 뉴클레오타이드 54-725의 뉴클레오타이드 서열, SEQ ID NO: 32의 뉴클레오타이드 54-725의 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열, 또는 SEQ ID NO: 32의 뉴클레오타이드 54-725의 뉴클레오타이드 서열의 단편, 또는 SEQ ID NO: 32의 뉴클레오타이드 54-725의 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하고/포함하거나
- [0618] (ii) SEQ ID NO: 31의 아미노산 1-224의 아미노산 서열, SEQ ID NO: 31의 아미노산 1-224의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열, 또는 SEQ ID NO: 31의 아미노산 1-224의 아미노산 서열의 번역원성 단편, 또는 SEQ ID NO: 31의 아미노산 1-224의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 인코딩한다.
- [0619] 일 구현예에서, SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 번역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 번역원성 단편 또는 그의 번역원성 변이체를 인코딩하는 RNA는
- [0620] (i) SEQ ID NO: 17, 21, 또는 26의 뉴클레오타이드 서열, SEQ ID NO: 17, 21, 또는 26의 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열, 또는 SEQ ID NO: 17, 21, 또는 26의 뉴클레오타이드 서열의 단편, 또는 SEQ ID NO: 17, 21, 또는 26의 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하고/포함하거나
- [0621] (ii) SEQ ID NO: 5의 아미노산 서열, SEQ ID NO: 5의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열, 또는 SEQ ID NO: 5의 아미노산 서열의 번역원성 단편, 또는 SEQ ID NO: 5의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 인코딩한다.
- [0622] 일 구현예에서, SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 번역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 번역원성 단편 또는 그의 번역원성 변이체를 인코딩하는 RNA는 (i)는 SEQ ID NO: 17, 21, 또는 26의 뉴클레오타이드 서열을 포함하고/포함하거나 (ii) SEQ ID NO: 5의 아미노산 서열을 포함하는 아미노산 서열을 인코딩한다.
- [0623] 일 구현예에서, 백신 항원은 SEQ ID NO: 18의 아미노산 서열, SEQ ID NO: 18의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열, 또는 SEQ ID NO: 18의 아미노산 서열의 번역원성 단편, 또는 SEQ ID NO: 18의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 백신 항원은 SEQ ID NO: 18의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0624] 일 구현예에서, 백신 항원은 SEQ ID NO: 29의 아미노산 1 내지 257의 아미노산 서열, SEQ ID NO: 29의 아미노산 1 내지 257의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열, 또는 SEQ ID NO: 29의 아미노산 1 내지 257의 아미노산 서열의 번역원성 단편, 또는 SEQ ID NO: 29의 아미노산 1 내지 257의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

- [0625] 일 구현예에서, SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 면역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 면역원성 단편 또는 그의 면역원성 변이체를 인코딩하는 RNA는
- [0626] (i) SEQ ID NO: 30의 뉴클레오타이드 54-824의 뉴클레오타이드 서열, SEQ ID NO: 30의 뉴클레오타이드 54-824의 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열, 또는 SEQ ID NO: 30의 뉴클레오타이드 54-824의 뉴클레오타이드 서열의 단편, 또는 SEQ ID NO: 30의 뉴클레오타이드 54-824의 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하고/포함하거나
- [0627] (ii) SEQ ID NO: 29의 아미노산 1-257의 아미노산 서열, SEQ ID NO: 29의 아미노산 1-257의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열, 또는 SEQ ID NO: 29의 아미노산 1-257의 아미노산 서열의 면역원성 단편, 또는 SEQ ID NO: 29의 아미노산 1-257의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 인코딩한다.
- [0628] 일 구현예에서, SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 면역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 면역원성 단편 또는 그의 면역원성 변이체를 인코딩하는 RNA는 (i) SEQ ID NO: 30의 뉴클레오타이드 54 내지 824의 뉴클레오타이드 서열을 포함하고/포함하거나, (ii) SEQ ID NO: 29의 아미노산 1 내지 257의 아미노산 서열을 포함하는 아미노산 서열을 인코딩한다.
- [0629] 일 구현예에서, 백신 항원은 SEQ ID NO: 31의 아미노산 1 내지 260의 아미노산 서열, SEQ ID NO: 31의 아미노산 1 내지 260의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열, 또는 SEQ ID NO: 31의 아미노산 1 내지 260의 아미노산 서열의 면역원성 단편, 또는 SEQ ID NO: 31의 아미노산 1 내지 260의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0630] 일 구현예에서, SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 면역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 면역원성 단편 또는 그의 면역원성 변이체를 인코딩하는 RNA는
- [0631] (i) SEQ ID NO: 32의 뉴클레오타이드 54-833의 뉴클레오타이드 서열, SEQ ID NO: 32의 뉴클레오타이드 54-833의 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열, 또는 SEQ ID NO: 32의 뉴클레오타이드 54-833의 뉴클레오타이드 서열의 단편, 또는 SEQ ID NO: 32의 뉴클레오타이드 54-833의 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하고/포함하거나
- [0632] (ii) SEQ ID NO: 31의 아미노산 1-260의 아미노산 서열, SEQ ID NO: 31의 아미노산 1-260의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열, 또는 SEQ ID NO: 31의 아미노산 1-260의 아미노산 서열의 면역원성 단편, 또는 SEQ ID NO: 31의 아미노산 1-260의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 인코딩한다.
- [0633] 일 구현예에서, SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 면역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 면역원성 단편 또는 그의 면역원성 변이체를 인코딩하는 RNA는 (i)는 SEQ ID NO: 32의 뉴클레오타이드 54-833의 뉴클레오타이드 서열을 포함하고/하거나 (ii) SEQ ID NO: 31의 아미노산 1-260의 아미노산 서열을 포함하는 아미노산 서열을 인코딩한다.
- [0634] 일 구현예에서, 백신 항원은 SEQ ID NO: 29의 아미노산 20 내지 257의 아미노산 서열, SEQ ID NO: 29의 아미노산 20 내지 257의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열, 또는 SEQ ID NO: 29의 아미노산 20 내지 257의 아미노산 서열의 면역원성 단편, 또는 SEQ ID NO: 29의 아미노산 20 내지 257의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0635] 일 구현예에서, SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 면역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 면역원성 단편 또는 그의 면역원성 변이체를 인코딩하는 RNA는
- [0636] (i) SEQ ID NO: 30의 뉴클레오타이드 111-824의 뉴클레오타이드 서열, SEQ ID NO: 30의 뉴클레오타이드 111-824의 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열, 또는 SEQ ID NO: 30의 뉴클레오타이드 111-824의 뉴클레오타이드 서열의 단편, 또는 SEQ ID NO: 30의 뉴클레오타이드 111-824의 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%,

또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하고/포함하거나

- [0637] (ii) SEQ ID NO: 29의 아미노산 20-257의 아미노산 서열, SEQ ID NO: 29의 아미노산 20-257의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열, 또는 SEQ ID NO: 29의 아미노산 20-257의 아미노산 서열의 번역원성 단편, 또는 SEQ ID NO: 29의 아미노산 20-257의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 인코딩한다.
- [0638] 일 구현예에서, 백신 항원은 SEQ ID NO: 31의 아미노산 23 내지 260의 아미노산 서열, SEQ ID NO: 31의 아미노산 23 내지 260의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열, 또는 SEQ ID NO: 31의 아미노산 23 내지 260의 아미노산 서열의 번역원성 단편, 또는 SEQ ID NO: 31의 아미노산 23 내지 260의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0639] 일 구현예에서, SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 번역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 번역원성 단편 또는 그의 번역원성 변이체를 인코딩하는 RNA는
- [0640] (i) SEQ ID NO: 32의 뉴클레오타이드 120-833의 뉴클레오타이드 서열, SEQ ID NO: 32의 뉴클레오타이드 120-833의 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열, 또는 SEQ ID NO: 32의 뉴클레오타이드 120-833의 뉴클레오타이드 서열의 단편, 또는 SEQ ID NO: 32의 뉴클레오타이드 120-833의 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하고/포함하거나
- [0641] (ii) SEQ ID NO: 31의 아미노산 23-360의 아미노산 서열, SEQ ID NO: 31의 아미노산 23-360의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열, 또는 SEQ ID NO: 31의 아미노산 23-360의 아미노산 서열의 번역원성 단편, 또는 SEQ ID NO: 31의 아미노산 23-360의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 인코딩한다.
- [0642] 일 구현예에서, SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 번역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 번역원성 단편 또는 그의 번역원성 변이체를 인코딩하는 RNA는 (i) SEQ ID NO: 32의 뉴클레오타이드 120 내지 833의 뉴클레오타이드 서열을 포함하고/포함하거나 (ii) SEQ ID NO: 31의 아미노산 23 내지 260의 아미노산 서열을 포함하는 아미노산 서열을 인코딩한다.
- [0643] 특정 구현예에 따르면, 막관통 도메인은 직접적으로 또는 링커, 예를 들어 글리신/세린 링커를 통해 SARS-CoV-2 S 단백질, 이의 변이체 또는 이의 단편, 즉 항원성 펩타이드 또는 단백질에 융합된다. 따라서, 일 구현예에서, 막관통 도메인은 전술한 백신 항원에 포함된 SARS-CoV-2 S 단백질 또는 그의 번역원성 단편(항원성 펩타이드 또는 단백질)으로부터 유래된 전술한 아미노산 서열에 융합된다(전술한 바와 같이 신호 펩타이드 및/또는 삼량체화 도메인에 선택적으로 융합될 수 있음). 이러한 막관통 도메인은 항원성 펩타이드 또는 단백질의 C-말단에 위치하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 종기로는, 이러한 막관통 도메인은 존재하는 경우 삼량체화 도메인의 C-말단에 위치하지만, 이에 한정되지 않는다. 일 구현예에서, 삼량체화 도메인은 SARS-CoV-2 S 단백질, 이의 변이체 또는 이의 단편, 즉 항원성 펩타이드 또는 단백질과 막관통 도메인 사이에 존재한다. 본원에 정의된 바와 같은 막관통 도메인은 종기로는 RNA에 의해 인코딩되는 항원성 펩타이드 또는 단백질의 세포막으로의 고정을 허용한다.
- [0644] 일 구현예에서, 본원에서 정의된 막관통 도메인 서열은 SARS-CoV-2 S 단백질의 막관통 도메인 서열, 특히 SEQ ID NO: 1의 아미노산 1207-1254의 아미노산 서열을 포함하는 서열 또는 이의 기능적 변이체를 포함하나 이에 한정되지 않는다.
- [0645] 일 구현예에서, 막관통 도메인 서열은 SEQ ID NO: 1의 아미노산 1207 내지 1254의 아미노산 서열, 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%를 갖는 아미노산 서열을 포함한다. SEQ ID NO: 1의 아미노산 1207 내지 1254의 아미노산 서열과 85% 또는 80% 동일성, 또는 SEQ ID NO: 1의 아미노산 1207 내지 1254의 아미노산 서열의 기능적 단편, 또는 SEQ ID NO: 1의 아미노산 1207 내지 1254의 아미노산 서열과 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열에서 일 구현예에서, 막관통 도메인 서열은 SEQ ID NO: 1의 아미노산 1207 내지 1254의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0646] 일 구현예에서, 막관통 도메인 서열을 인코딩하는 RNA는 (i) SEQ ID NO: 2, 8 또는 9의 뉴클레오타이드 3619-3762의 뉴클레오타이드 서열, SEQ ID NO: 2, 8 또는 9의 뉴클레오타이드 3619-3762의 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열, 또는 SEQ ID

NO: 2, 8 또는 9의 뉴클레오타이드 3619-3762의 뉴클레오타이드 서열의 단편, 또는 SEQ ID NO: 2, 8 또는 9의 뉴클레오타이드 3619-3762의 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하고/포함하거나 (ii) SEQ ID NO: 1의 아미노산 1207-1254의 아미노산 서열, SEQ ID NO: 1의 아미노산 1207-1254의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열, 또는 SEQ ID NO: 1의 아미노산 1207-1254의 아미노산 서열의 기능성 단편, 또는 SEQ ID NO: 1의 아미노산 1207-1254의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 인코딩한다. 일 구현예에서, 막관통 도메인 서열은 (i) SEQ ID NO: 2, 8 또는 9의 뉴클레오타이드 3619-3762의 뉴클레오타이드의 뉴클레오타이드 서열을 포함하고/포함하거나 (ii) SEQ ID NO: 1의 아미노산 1207-1254의 아미노산 서열을 포함하는 아미노산 서열을 인코딩한다.

[0647] 일 구현예에서, 백신 항원은 SEQ ID NO: 29의 아미노산 1-311의 아미노산 서열, SEQ ID NO: 29의 아미노산 1-311의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열, 또는 SEQ ID NO: 29의 아미노산 1-311의 아미노산 서열의 면역원성 단편, 또는 SEQ ID NO: 29의 아미노산 1-311의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 백신 항원은 SEQ ID NO: 29의 아미노산 1-311의 아미노산 서열을 포함한다.

[0648] 일 구현예에서, SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 면역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 면역원성 단편 또는 그의 면역원성 변이체를 인코딩하는 RNA는

[0649] (i) SEQ ID NO: 30의 뉴클레오타이드 54-986의 뉴클레오타이드 서열, SEQ ID NO: 30의 뉴클레오타이드 54-986의 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열, 또는 SEQ ID NO: 30의 뉴클레오타이드 54-986의 뉴클레오타이드 서열의 단편, 또는 SEQ ID NO: 30의 뉴클레오타이드 54-986의 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하고/포함하거나

[0650] (ii) SEQ ID NO: 29의 아미노산 1-311의 아미노산 서열, SEQ ID NO: 29의 아미노산 1-311의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열, 또는 SEQ ID NO: 29의 아미노산 1-311의 아미노산 서열의 면역원성 단편, 또는 SEQ ID NO: 29의 아미노산 1-311의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 인코딩한다.

[0651] 일 구현예에서, SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 면역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 면역원성 단편 또는 그의 면역원성 변이체를 인코딩하는 RNA는 (i) SEQ ID NO: 30의 뉴클레오타이드 54-986의 뉴클레오타이드 서열을 포함하고/포함하거나 (ii) SEQ ID NO: 29의 아미노산 1-311의 아미노산 서열을 포함하는 아미노산 서열을 인코딩한다.

[0652] 일 구현예에서, 백신 항원은 SEQ ID NO: 31의 아미노산 1-314의 아미노산 서열, SEQ ID NO: 31의 아미노산 1-314의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열, 또는 SEQ ID NO: 31의 아미노산 1-314의 아미노산 서열의 면역원성 단편, 또는 SEQ ID NO: 31의 아미노산 1-314의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 백신 항원은 SEQ ID NO: 29의 아미노산 1-311의 아미노산 서열을 포함한다.

[0653] 일 구현예에서, SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 면역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 면역원성 단편 또는 그의 면역원성 변이체를 인코딩하는 RNA는

[0654] (i) SEQ ID NO: 32의 뉴클레오타이드 54-995의 뉴클레오타이드 서열, SEQ ID NO: 32의 뉴클레오타이드 54-995의 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열, 또는 SEQ ID NO: 32의 뉴클레오타이드 54-995의 뉴클레오타이드 서열의 단편, 또는 SEQ ID NO: 32의 뉴클레오타이드 54-995의 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하고/포함하거나

[0655] (ii) SEQ ID NO: 31의 아미노산 1-314의 아미노산 서열, SEQ ID NO: 31의 아미노산 1-314의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열, 또는 SEQ ID NO: 31의 아미노산 1-314의 아미노산 서열의 면역원성 단편, 또는 SEQ ID NO: 31의 아미노산 1-314의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 인코딩한다.

[0656] 일 구현예에서, SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 면역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 면역원성 단편 또는

그의 번역원성 변이체를 인코딩하는 RNA는 (i) SEQ ID NO: 32의 뉴클레오타이드 54-995의 뉴클레오타이드 서열을 포함하고/포함하거나 (ii) SEQ ID NO: 31의 아미노산 1-314의 아미노산 서열을 포함하는 아미노산 서열을 인코딩한다.

- [0657] 일 구현예에서, 백신 항원은 SEQ ID NO: 29의 아미노산 20-311의 아미노산 서열, SEQ ID NO: 29의 아미노산 20-311의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열, SEQ ID NO: 29의 아미노산 20-311의 아미노산 서열의 번역원성 단편, SEQ ID NO: 29의 아미노산 20-311의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 백신 항원은 SEQ ID NO: 29의 아미노산 20-311의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0658] 일 구현예에서, SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 번역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 번역원성 단편 또는 그의 번역원성 변이체를 인코딩하는 RNA는
- [0659] (i) SEQ ID NO: 30의 뉴클레오타이드 111-986의 뉴클레오타이드 서열, SEQ ID NO: 30의 뉴클레오타이드 111-986의 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열, 또는 SEQ ID NO: 30의 뉴클레오타이드 111-986의 뉴클레오타이드 서열의 단편, 또는 SEQ ID NO: 30의 뉴클레오타이드 111-986의 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하고/포함하거나
- [0660] (ii) SEQ ID NO: 29의 아미노산 20-311의 아미노산 서열, SEQ ID NO: 29의 아미노산 20-311의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열, 또는 SEQ ID NO: 29의 아미노산 20-311의 아미노산 서열의 번역원성 단편, 또는 SEQ ID NO: 29의 아미노산 20-311의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 인코딩한다.
- [0661] 일 구현예에서, SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 번역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 번역원성 단편 또는 그의 번역원성 변이체를 인코딩하는 RNA는 (i) SEQ ID NO: 30의 뉴클레오타이드 111-986의 뉴클레오타이드 서열을 포함하고/포함하거나 (ii) SEQ ID NO: 29의 아미노산 20-311의 아미노산 서열을 포함하는 아미노산 서열을 인코딩한다.
- [0662] 일 구현예에서, 백신 항원은 SEQ ID NO: 31의 아미노산 23-314의 아미노산 서열, SEQ ID NO: 31의 아미노산 23-314의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열, SEQ ID NO: 31의 아미노산 23-314의 아미노산 서열의 번역원성 단편, SEQ ID NO: 31의 아미노산 23-314의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 백신 항원은 SEQ ID NO: 31의 아미노산 23-314의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0663] 일 구현예에서, SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 번역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 번역원성 단편 또는 그의 번역원성 변이체를 인코딩하는 RNA는
- [0664] (i) SEQ ID NO: 32의 뉴클레오타이드 120-995의 뉴클레오타이드 서열, SEQ ID NO: 32의 뉴클레오타이드 120-995의 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열, 또는 SEQ ID NO: 32의 뉴클레오타이드 120-995의 뉴클레오타이드 서열의 단편, 또는 SEQ ID NO: 32의 뉴클레오타이드 120-995의 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하고/포함하거나
- [0665] (ii) SEQ ID NO: 31의 아미노산 23-314의 아미노산 서열, SEQ ID NO: 31의 아미노산 23-314의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열, 또는 SEQ ID NO: 31의 아미노산 23-314의 아미노산 서열의 번역원성 단편, 또는 SEQ ID NO: 31의 아미노산 23-314의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 인코딩한다.
- [0666] 일 구현예에서, SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 번역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 번역원성 단편 또는 그의 번역원성 변이체를 인코딩하는 RNA는 (i) SEQ ID NO: 29의 뉴클레오타이드 120-995의 뉴클레오타이드 서열을 포함하고/포함하거나 (ii) SEQ ID NO: 31의 아미노산 23-314의 아미노산 서열을 포함하는 아미노산 서열을 인코딩한다.
- [0667] 일 구현예에서, SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 번역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 번역원성 단편 또는 그의 번역원성 변이체를 인코딩하는 RNA는
- [0668] (i) SEQ ID NO: 30의 뉴클레오타이드 서열, SEQ ID NO: 30의 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 99%, 98%,

97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열, 또는 SEQ ID NO: 30의 뉴클레오타이드 서열의 단편, 또는 SEQ ID NO: 30의 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하고/포함하거나

[0669] (ii) SEQ ID NO: 29의 아미노산 서열, SEQ ID NO: 29의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열, 또는 SEQ ID NO: 29의 아미노산 서열의 번역원성 단편, 또는 SEQ ID NO: 29의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 인코딩한다.

[0670] 일 구현예에서, 백신 항원을 코딩하는 RNA는 (i)는 SEQ ID NO: 30의 뉴클레오타이드 서열을 포함하고/포함하거나 (ii) SEQ ID NO: 29의 아미노산 서열을 포함하는 아미노산 서열을 인코딩한다.

[0671] 일 구현예에서, SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 번역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 번역원성 단편 또는 그의 번역원성 변이체를 인코딩하는 RNA는

[0672] (i) SEQ ID NO: 32의 뉴클레오타이드 서열, SEQ ID NO: 32의 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열, 또는 SEQ ID NO: 32의 뉴클레오타이드 서열의 단편, 또는 SEQ ID NO: 32의 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하고/포함하거나

[0673] (ii) SEQ ID NO: 31의 아미노산 서열, SEQ ID NO: 31의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열, 또는 SEQ ID NO: 31의 아미노산 서열의 번역원성 단편, 또는 SEQ ID NO: 31의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 인코딩한다.

[0674] 일 구현예에서, SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 번역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 번역원성 단편 또는 그의 번역원성 변이체를 인코딩하는 RNA는 (i) SEQ ID NO: 32의 뉴클레오타이드 서열을 포함하고/포함하거나 (ii) SEQ ID NO: 31의 아미노산 서열을 포함하는 아미노산 서열을 인코딩한다.

[0675] 일 구현예에서, 백신 항원은 SEQ ID NO: 28의 아미노산 서열, SEQ ID NO: 28의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열, 또는 SEQ ID NO: 28의 아미노산 서열의 번역원성 단편, 또는 SEQ ID NO: 28의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 백신 항원은 SEQ ID NO: 28의 아미노산 서열을 포함한다.

[0676] SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 번역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 번역원성 단편 또는 그의 번역원성 변이체를 인코딩하는 RNA는

[0677] (i) SEQ ID NO: 27의 뉴클레오타이드 서열, SEQ ID NO: 27의 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열, 또는 SEQ ID NO: 27의 뉴클레오타이드 서열의 단편, 또는 SEQ ID NO: 27의 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하고/포함하거나

[0678] (ii) SEQ ID NO: 28의 아미노산 서열, SEQ ID NO: 28의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열, 또는 SEQ ID NO: 28의 아미노산 서열의 번역원성 단편, 또는 SEQ ID NO: 28의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 인코딩한다.

[0679] 일 구현예에서, SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 번역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 번역원성 단편 또는 그의 번역원성 변이체를 인코딩하는 RNA는 (i) SEQ ID NO: 27의 뉴클레오타이드 서열을 포함하고/포함하거나 (ii) SEQ ID NO: 28의 아미노산 서열을 포함하는 아미노산 서열을 인코딩한다.

[0680] 일 구현예에서, 전술한 백신 항원은 전술한 백신 항원에 포함된 SARS-CoV-2 S 단백질 또는 그의 번역원성 단편 (항원성 펩타이드 또는 단백질)으로부터 유래된 전술한 아미노산 서열로 구성되거나 필수적으로 구성되는 SARS-CoV-2 코로나바이러스 스파이크(S) 단백질의 연속 서열을 포함한다 일 구현예에서, 전술한 백신 항원은 220개 이하의 아미노산, 215개 이하의 아미노산, 210개 이하의 아미노산 또는 205개 이하의 아미노산의 SARS-CoV-2 코로나바이러스 스파이크(S) 단백질의 연속 서열을 포함한다.

- [0681] 일 구현예에서, SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 면역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 면역원성 단편 또는 그의 면역원성 변이체를 인코딩하는 RNA는 본원에서 BNT162b1 (RBP020.3), BNT162b2 (RBP020.1 또는 RBP020.2)로 설명된 뉴클레오타이드 변형 메신저 RNA(modRNA)이다. 일 구현예에서, SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 면역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 면역원성 단편 또는 그의 면역원성 변이체를 인코딩하는 RNA는 본원에서 RBP020.2로 기술된 뉴클레오타이드 변형 메신저 RNA(modRNA)이다.
- [0682] 일 구현예에서, SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 면역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 면역원성 단편 또는 그의 면역원성 변이체를 인코딩하는 RNA는 뉴클레오타이드 변형 메신저 RNA(modRNA)이며 (i) SEQ ID NO: 21의 뉴클레오타이드 서열, SEQ ID NO: 21의 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하고/포함하거나 (ii) SEQ ID NO: 5의 아미노산 서열, 또는 SEQ ID NO: 5의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 인코딩한다. 일 구현예에서, SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 면역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 면역원성 단편 또는 그의 면역원성 변이체를 인코딩하는 RNA는 뉴클레오타이드 변형 메신저 RNA(modRNA)이고 (i) SEQ ID NO: 21의 뉴클레오타이드 서열을 포함하고/포함하거나; (ii) SEQ ID NO: 5의 아미노산 서열을 포함하는 아미노산 서열을 인코딩한다.
- [0683] 일 구현예에서, SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 면역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 면역원성 단편 또는 그의 면역원성 변이체를 인코딩하는 RNA는 뉴클레오타이드 변형 메신저 RNA(modRNA)이며 (i) SEQ ID NO: 19 또는 20의 뉴클레오타이드 서열, SEQ ID NO: 19 또는 20의 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하고/포함하거나 (ii) SEQ ID NO: 7의 아미노산 서열, 또는 SEQ ID NO: 7의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 인코딩한다. 일 구현예에서, SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 면역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 면역원성 단편 또는 그의 면역원성 변이체를 인코딩하는 RNA는 뉴클레오타이드 변형 메신저 RNA(modRNA)이고 (i) SEQ ID NO: 19 또는 20의 뉴클레오타이드 서열을 포함하고/포함하거나; (ii) SEQ ID NO: 7의 아미노산 서열을 포함하는 아미노산 서열을 인코딩한다.
- [0684] 일 구현예에서, SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 면역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 면역원성 단편 또는 그의 면역원성 변이체를 인코딩하는 RNA는 뉴클레오타이드 변형 메신저 RNA(modRNA)이며 (i) SEQ ID NO: 20의 뉴클레오타이드 서열, SEQ ID NO: 20의 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하고/포함하거나 (ii) SEQ ID NO: 7의 아미노산 서열, 또는 SEQ ID NO: 7의 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 인코딩한다. 일 구현예에서, SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 면역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 면역원성 단편 또는 그의 면역원성 변이체를 인코딩하는 RNA는 뉴클레오타이드 변형 메신저 RNA(modRNA)이고 (i) SEQ ID NO: 20의 뉴클레오타이드 서열을 포함하고/포함하거나; (ii) SEQ ID NO: 7의 아미노산 서열을 포함하는 아미노산 서열을 인코딩한다.
- [0685] 일 구현예에서, SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 면역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 면역원성 단편 또는 그의 면역원성 변이체를 인코딩하는 RNA는 (i) SEQ ID NO: 32의 뉴클레오타이드 54-725의 뉴클레오타이드 서열을 포함하고/포함하거나 (ii) SEQ ID NO: 31의 아미노산 1-224의 아미노산 서열을 포함하는 아미노산 서열을 인코딩한다.
- [0686] SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 면역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 면역원성 단편 또는 그의 면역원성 변이체를 인코딩하는 RNA의 일 구현예에서, 상기 RNA는 전술한 RNA 변형 중 하나 이상, 즉 5'-캡 구조의 통합, 폴리-A 서열의 통합, 폴리-A 서열의 언마스킹, 5'- 및/또는 3'-UTR의 변경(예컨대 또는 하나 이상의 3'-UTR의 통합), 하나 이상의 천연 발생 뉴클레오타이드를 합성 뉴클레오타이드로 대체(예를 들어, 시티딘을 5-메틸시티딘으로 및/또는 우리딘을 슈도우리딘(Ψ) 또는 N(1)-메틸슈도우리딘(m1 Ψ) 또는 5-메틸우리딘(m5U)으로 대체) 및 코돈 최적화를 포함한다. 일 구현예에서, 상기 RNA는 전술한 변형, 즉, (i) 5'-캡 구조의 통합, (ii) 폴리-A 서열의 통합, 폴리-A 서열의 언마스킹; (iii) 5'- 및/또는 3'-UTR의 변경(예컨대 하나 이상의 3'-UTR 통합); (iv) 하나 이상의 천연 발생 뉴클레오타이드를 합성 뉴클레오타이드(예를 들어, 시티딘을 5-메틸시티딘으로 및/또는 우리딘을 슈도우리딘(Ψ) 또는 N(1)-메틸슈도우리딘(m1 Ψ) 또는 5-메틸우리딘(m5U)으로 대체) 및 (v) 코돈 최적화의 조합, 총기로는 상기 언급된 변형 중 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상 또는 5개 모두의 조합을 포함한다.
- [0687] SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 면역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 면역원성 단편 또는 그의 면역원성

변이체를 인코딩하는 RNA의 일 구현예에서, 상기 RNA는 변형된 RNA, 특히 안정화된 mRNA이다. 일 구현예에서, 상기 RNA는 적어도 하나의 우리딘 대신에 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다. 일 구현예에서, 상기 RNA는 우리딘 대신, 예를 들어 각각의 우리딘 대신에 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다. 일 구현예에서, 변형된 뉴클레오타이드는 슈도우리딘(ψ), N1-메틸-슈도우리딘(m 1ψ) 및 5-메틸-우리딘(m $5U$)으로부터 독립적으로 선택된다. 일 구현예에서, 상기 RNA는 5' 캡, 종기로는 cap1 또는 cap2 구조, 더욱 종기로는 cap1 구조를 포함한다. 일 구현예에서, 상기 RNA는 SEQ ID NO: 12의 뉴클레오타이드 서열, 또는 SEQ ID NO: 12의 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 5' UTR을 포함한다. 일 구현예에서, 상기 RNA는 SEQ ID NO: 13의 뉴클레오타이드 서열, 또는 SEQ ID NO: 13의 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 3' UTR을 포함한다. 일 구현예에서, 상기 RNA는 폴리-A 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 폴리-A 서열은 적어도 100개의 뉴클레오타이드를 포함한다. 일 구현예에서, 폴리-A 서열은 SEQ ID NO: 14의 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나 이로 구성된다.

[0688] SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 면역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 면역원성 단편 또는 그의 면역원성 변이체를 인코딩하는 RNA의 일 구현예에서, 상기 변이체는 RBD에서 돌연변이(예를 들어, SEQ ID NO: 1과 비교하여, 비제한적인 예로서 Q321L, V341I, A348T, N354D, S359N, V367F, K378R, R408I, Q409E, A435S, N439K, K458R, I472V, G476S, S477N, V483A, Y508H, H519P, 등) 및/또는 스파이크 단백질에서의 돌연변이(예를 들어, SEQ ID NO: 1과 비교하여 비제한적인 예로서 D614G 등)를 포함한다. 당업자에게는 다양한 스파이크 변이체 및/또는 이를 문서화하는 리소스(예컨대 https://cov.lanl.gov/components/sequence/COV/int_sites_tbls.comp)에서 발견되고 COVID-19 바이러스 게놈 분석 파이프라인에 의해 유지되는 Spike의 돌연변이 사이트 표)(2020년 8월 24일에 마지막으로 액세스)에 대해 잘 알려져 있으며, 본 명세서를 읽으면 본 명세서에 기술된 RNA 조성물 및/또는 방법이, 예방접종된 대상체에서 그러한 변이체 및/또는 그의 조합 중 임의의 것 또는 모두에 대해 중화 활성을 나타내는 혈청을 유도하는 능력을 특징으로 할 수 있음을 이해할 것이다.

[0689] SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 면역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 면역원성 단편 또는 그의 면역원성 변이체를 인코딩하는 RNA의 일 구현예에서, 상기 변이체는 SEQ ID NO: 1과 비교하여 스파이크 단백질의 위치 501에 돌연변이를 포함하며 선택적으로 SEQ ID NO: 1과 비교하여 하나 이상의 추가 돌연변이(예를 들어, 비제한적인 예로서 H69/V70 결실, Y144 결실, A570D, D614G, P681H, T716I, S982A, D1118H, D80A, D215G, E484K, A701V, L18F, R246I, K417N, L242/A243/L244 결실 등)를 포함할 수 있다.

[0690] SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 면역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 면역원성 단편 또는 그의 면역원성 변이체를 인코딩하는 RNA의 일 구현예에서, 상기 변이체는 "Variant of Concern 202012/01" (VOC-202012/01; B.1.1.7 계통이라고도 함)을 포함한다. 이 변종은 이전에 Public Health England에서 2020년 12월에 조사 중인 첫 번째 변종(VUI-202012/01)으로 지정되었지만 우려 변종(VOC-202012/01)으로 재분류되었다. VOC-202012/01은 SARS-CoV-2의 변종으로 2020년 10월 영국에서 COVID-19 대유행 기간 동안 지난달에 채취한 샘플에서 처음 발견되었으며 12월 중순까지 빠르게 확산되기 시작하였다. 이는 영국에서 COVID-19 감염률의 상당한 증가와 관련이 있다. 이러한 증가는 적어도 부분적으로 인간 세포에서 ACE2에 결합하는 데 필요한 스파이크 당단백질의 수용체 결합 도메인 내부의 N501Y 변화 때문인 것으로 생각된다. VOC-202012/01 변종은 23개의 돌연변이, 즉: 13개의 비동의 돌연변이, 4개의 결실 및 6개의 동의어 돌연변이로 정의된다(즉, 단백질을 변화시키는 17개의 돌연변이와 그렇지 않은 6개의 돌연변이가 있다). VOC 202012/01의 스파이크 단백질 변화에는 결실 69-70, 결실 144, N501Y, A570D, D614G, P681H, T716I, S982A 및 D1118H가 포함된다. VOC-202012/01에서 가장 중요한 변화 중 하나는 아미노산 위치 501에서 아스파라긴(N)에서 티로신(Y)으로의 변화인 N501Y인 것으로 보인다. 이 돌연변이는 단독으로 또는 N 말단 도메인(NTD)에서 위치 69/70에서 결실과 조합하여 바이러스의 전염성을 증강시킬 수 있다.

[0691] 따라서, SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 면역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 면역원성 단편 또는 그의 면역원성 변이체를 인코딩하는 RNA의 특정 구현예에서, 상기 변이체는 다음 돌연변이를 포함하는 SARS-CoV-2 스파이크 변이체를 포함한다: SEQ ID NO: 1과 비교하여 결실 69-70, 결실 144, N501Y, A570D, D614G, P681H, T716I, S982A 및 D1118H.

[0692] SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 면역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 면역원성 단편 또는 그의 면역원성 변이체를 인코딩하는 RNA의 일 구현예에서, 상기 변이체는 변이체 "501.V2"를 포함한다. 이 변종은 2020년 10월 샘플에서 처음 관찰되었으며, 그 이후로 501.V2 변종을 가진 300건 이상의 사례가 2020년 12월에 바이러스의 지배적인 형태였던 남아프리카의 전체 게놈 시퀀싱(WGS)에 의해 확인되었다. 예비 결과는 이 변형이 증가된 전파성을 가질 수 있음을 나타낸다. 501.V2 변이체는 D80A, D215G, E484K, N501Y 및 A701V를 포함한 다중 스파이크

단백질 변화로 정의되며, 보다 최근에 수집된 바이러스는 L18F, R246I, K417N 및 결실 242-244와 같은 추가 변화를 갖는다.

- [0693] 따라서, SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 면역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 면역원성 단편 또는 그의 면역원성 변이체를 인코딩하는 RNA의 특정 구현예에서, 상기 변이체는 SEQ ID NO: 1과 비교하여 다음 돌연변이, 즉: D80A, D215G, E484K, N501Y 및 A701V과, 선택적으로 SEQ ID NO: 1과 비교하여 다음 돌연변이: L18F, R246I, K417N, 및 결실 242-244를 갖는 SARs-CoV-2 스파이크 변이체를 포함한다. 상기 SARs-CoV-2 스파이크 변이체는 또한 SEQ ID NO: 1과 비교하여 D614G 돌연변이를 포함할 수도 있다.
- [0694] SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 면역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 면역원성 단편 또는 그의 면역원성 변이체를 인코딩하는 RNA의 일 구현예에서, 상기 변이체는 SEQ ID NO: 1과 비교하여 스파이크 단백질에서 H69/V70 결실을 포함하는 SARs-CoV-2 스파이크 변이체를 포함한다. 상기 SARs-CoV-2 스파이크 변이체는 또한 SEQ ID NO: 1과 비교하여 하나 이상의 추가 돌연변이를 포함할 수 있다(SEQ ID NO: 1과 비교하여, 비제한적인 예로서, Y144 결실, N501Y, A570D, D614G, P681H, T716I, S982A, D1118H, D80A, D215G, E484K, A701V, L18F, R246I, K417N, L242/A243/L244 결실, Y453F, I692V, S1147L, M1229I). 특정 구현예에서, 상기 SARs-CoV-2 스파이크 변이체는 다음 돌연변이를 포함한다: SEQ ID NO: 1과 비교하여 결실 69-70, 결실 144, N501Y, A570D, D614G, P681H, T716I, S982A 및 D1118H.
- [0695] SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 면역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 면역원성 단편 또는 그의 면역원성 변이체를 인코딩하는 RNA의 일 구현예에서, 상기 변이체는 변이체 "클러스터 5"(Danish State Serum Institute (SSI)에서는 ΔFVI-스파이크라고도 함)를 포함한다. 이것은 덴마크의 North Jutland에서 발견되었으며 밍크 농장을 통해 밍크에서 인간으로 퍼진 것으로 여겨진다. 클러스터 5에서는 바이러스의 스파이크 단백질에서 여러 가지 다른 돌연변이가 확인되었다. 특정 돌연변이에는 69-70델타HV(단백질의 69번째 및 70번째 위치에서 히스티딘 및 발린 잔기의 결실), Y453F(위치 453에서 티로신에서 페닐알라닌으로의 변화), I692V(위치 692에서 이소류신에서 발린으로의 변화), M1229I(위치 1229에서 메티오닌에서 이소류신으로), 및 선택적으로 S1147L(위치 1147에서 세린에서 류신으로)가 포함된다.
- [0696] 따라서, SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 면역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 면역원성 단편 또는 그의 면역원성 변이체를 인코딩하는 RNA의 특정 구현예에서, 상기 변이체는 다음 돌연변이를 포함하는 SARs-CoV-2 스파이크 변이체를 포함한다: SEQ ID NO: 1과 비교하여 결실 69-70, Y453F, I692V, M1229I 및 선택적으로 S1147L.
- [0697] SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 면역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 면역원성 단편 또는 그의 면역원성 변이체를 인코딩하는 RNA의 일 구현예에서, 상기 변이체는 SEQ ID NO: 1과 비교하여 스파이크 단백질에서 D614G 돌연변이와 같은, SEQ ID NO: 1과 비교하여 위치 614에서의 돌연변이를 포함하는 SARs-CoV-2 스파이크 변이체를 포함한다. SEQ ID NO: 1과 비교하여 스파이크 단백질의 위치 614에서 돌연변이를 포함하는 상기 SARs-CoV-2 스파이크 변이체는 또한 SEQ ID NO: 1과 비교하여 하나 이상의 추가 돌연변이를 포함할 수도 있다(SEQ ID NO: 1과 비교하여 비제한적인 예로서, H69/V70 결실, Y144 결실, N501Y, A570D, P681H, T716I, S982A, D1118H, D80A, D215G, E484K, A701V, L18F, R246I, K417N, L242/A243/L244 결실, Y453F, I692V, S1147L, M1229I 등).
- [0698] SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 면역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 면역원성 단편 또는 그의 면역원성 변이체를 인코딩하는 RNA의 일 구현예에서, 상기 변이체는 하기 돌연변이를 포함하는 SARs-CoV-2 스파이크 변이체를 포함한다: SEQ ID NO: 1과 비교하여 결실 69-70, 결실 144, N501Y, A570D, D614G, P681H, T716I, S982A 및 D1118H.
- [0699] SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 면역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 면역원성 단편 또는 그의 면역원성 변이체를 인코딩하는 RNA의 일 구현예에서, 상기 변이체는 하기 돌연변이를 포함하는 SARs-CoV-2 스파이크 변이체를 포함한다: SEQ ID NO: 1과 비교하여 D80A, D215G, E484K, N501Y, A701V 및 D614G 및 선택적으로 SEQ ID NO: 1과 비교하여 L18F, R246I, K417N 및 결실 242-244.
- [0700] SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 면역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 면역원성 단편 또는 그의 면역원성 변이체를 인코딩하는 RNA의 일 구현예에서, 상기 변이체는 SEQ ID NO: 1과 비교하여 스파이크 단백질의 위치 501 및 614에서의 돌연변이를 포함하는, SARs-CoV-2 스파이크 변이체를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 SARs-CoV-2 스파이크 변이체는 SEQ ID NO: 1과 비교하여 스파이크 단백질에서 N501Y 돌연변이 및 D614G 돌연변이를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 SARs-CoV-2 스파이크 변이체는 SEQ ID NO: 1과 비교하여 하나 이상의 추가 돌연변이(SEQ ID NO: 1과 비교하여 예를 들어, H69/V70 deletion, Y144 deletion, A570D, P681H, T716I, S982A,

D1118H, D80A, D215G, E484K, A701V, L18F, R246I, K417N, L242/A243/L244 deletion, Y453F, I692V, S1147L, M1229I 등).

- [0701] SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 면역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 면역원성 단편 또는 그의 면역원성 변이체를 인코딩하는 RNA의 일 구현예에서, 상기 변이체는 다음 돌연변이를 포함하는 SARs-CoV-2 스파이크 변이체를 포함한다: SEQ ID NO: 1과 비교하여 결실 69-70, 결실 144, N501Y, A570D, D614G, P681H, T716I, S982A 및 D1118H.
- [0702] SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 면역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 면역원성 단편 또는 그의 면역원성 변이체를 인코딩하는 RNA의 일 구현예에서, 상기 변이체는 다음 돌연변이를 포함하는 SARs-CoV-2 스파이크 변이체를 포함한다: SEQ ID NO: 1과 비교하여 D80A, D215G, E484K, N501Y, A701V 및 D614G 및 선택적으로 SEQ ID NO: 1과 비교하여 L18F, R246I, K417N 및 결실 242-244.
- [0703] SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 면역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 면역원성 단편 또는 그의 면역원성 변이체를 인코딩하는 RNA의 일 구현예에서, 상기 변이체는 SEQ ID NO: 1과 비교하여 스파이크 단백질에서 E484K 돌연변이와 같은, SEQ ID NO: 1과 비교하여 스파이크 단백질에서 위치 484의 돌연변이를 포함하는 SARs-CoV-2 스파이크 변이체를 포함한다. 일부 구현예에서 상기 SARs-CoV-2 스파이크 변이체는 SEQ ID NO: 1과 비교하여 하나 이상의 추가 돌연변이를 포함할 수 있다(SEQ ID NO: 1과 비교하여 비제한적인 예로서, H69/V70 deletion, Y144 deletion, N501Y, A570D, D614G, P681H, T716I, S982A, D1118H, D80A, D215G, A701V, L18F, R246I, K417N, L242/A243/L244 deletion, Y453F, I692V, S1147L, M1229I, T20N, P26S, D138Y, R190S, K417T, H655Y, T1027I, V1176F 등).
- [0704] SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 면역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 면역원성 단편 또는 그의 면역원성 변이체를 인코딩하는 RNA의 일 구현예에서, 상기 변이체는 다음 돌연변이를 포함하는 SARs-CoV-2 스파이크 변이체를 포함한다: SEQ ID NO: 1과 비교하여 D80A, D215G, E484K, N501Y, 및 A701V, 및 선택적으로: SEQ ID NO: 1과 비교하여 L18F, R246I, K417N 및 결실 242-244번 결실. 상기 SAR -CoV-2 스파이크 변이체는 SEQ ID NO: 1과 비교하여 D614G 돌연변이를 포함할 수도 있다.
- [0705] SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 면역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 면역원성 단편 또는 그의 면역원성 변이체를 인코딩하는 RNA의 일 구현예에서, 상기 변이체는 브라질(리언) 변종으로 알려진, 변종 계통 B.1.1.248을 포함한다. SARS-CoV-2의 이 변종은 P.1 계통으로 명명되었으며 17개의 고유한 아미노산 변화를 갖고, 그 중 10개는 N501Y 및 E484K를 포함하여 스파이크 단백질에 있다. B.1.1.248은 B.1.1.28에서 유래되었다. E484K는 B.1.1.28 및 B.1.1.248 모두에 있다. B.1.1.248은 다수의 S-단백질 다형성[L18F, T20N, P26S, D138Y, R190S, K417T, E484K, N501Y, H655Y, T1027I, V1176F]을 가지며 남아프리카 공화국으로부터 선행된 변종에 대해 특정 주요 RBD 위치(K417, E484, N501)와 유사하다.
- [0706] 따라서, SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 면역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 면역원성 단편 또는 그의 면역원성 변이체를 인코딩하는 RNA의 특정 구현예에서, 상기 변이체는 하기 돌연변이를 포함하는 SARs-CoV-2 스파이크 변이체를 포함한다: SEQ ID NO: 1과 비교하여 L18F, T20N, P26S, D138Y, R190S, K417T, E484K, N501Y, H655Y, T1027I 및 V1176F.
- [0707] SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 면역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 면역원성 단편 또는 그의 면역원성 변이체를 인코딩하는 RNA의 일 구현예에서, 상기 변이체는 SEQ ID NO: 1과 비교하여 스파이크 단백질에서 N501Y 돌연변이 및 E484K 돌연변이와 같이, SEQ ID NO: 1과 비교하여 스파이크 단백질에서 위치 501 및 484에서의 돌연변이를 포함한다. 일부 구현예에서 상기 SARs-CoV-2 스파이크 변이체는 SEQ ID NO: 1과 비교하여 하나 이상의 추가 돌연변이를 포함할 수 있다(SEQ ID NO: 1과 비교하여 예를 들어, H69/V70 deletion, Y144 deletion, A570D, D614G, P681H, T716I, S982A, D1118H, D80A, D215G, A701V, L18F, R246I, K417N, L242/A243/L244 deletion, Y453F, I692V, S1147L, M1229I, T20N, P26S, D138Y, R190S, K417T, H655Y, T1027I, V1176F 등,).
- [0708] SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 면역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 면역원성 단편 또는 그의 면역원성 변이체를 인코딩하는 RNA의 일 구현예에서, 상기 변이체는 다음 돌연변이를 포함하는 SARs-CoV-2 스파이크 변이체를 포함한다: SEQ ID NO: 1과 비교하여 D80A, D215G, E484K, N501Y 및 A701V, 및 선택적으로 SEQ ID NO: 1과 비교하여: L18F, R246I, K417N, 및 결실 242-244.
- [0709] SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 면역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 면역원성 단편 또는 그의 면역원성 변이체를 인코딩하는 RNA의 일 구현예에서, 상기 변이체는 하기 돌연변이를 포함하는 SARs-CoV-2 스파이크 변이

체를 포함한다: SEQ ID NO: 1과 비교하여 L18F, T20N, P26S, D138Y, R190S, K417T, E484K, N501Y, H655Y, T1027I 및 V1176F.

- [0710] SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 면역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 면역원성 단편 또는 그의 면역원성 변이체를 인코딩하는 RNA의 일 구현예에서, 상기 변이체는 SEQ ID NO: 1과 비교하여 스파이크 단백질에서 위치 501, 484 및 614에서의 돌연변이, 예컨대 SEQ ID NO: 1과 비교하여 스파이크 단백질에서 N501Y 돌연변이, E484K 돌연변이 및 D614G 돌연변이를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 SARS-CoV-2 스파이크 변이체는 SEQ ID NO: 1과 비교하여 하나 이상의 추가 돌연변이를 포함할 수 있다(SEQ ID NO: 1과 비교하여 예컨대 비제한적인 예로서, H69/V70 deletion, Y144 deletion, A570D, P681H, T716I, S982A, D1118H, D80A, D215G, A701V, L18F, R246I, K417N, L242/A243/L244 deletion, Y453F, I692V, S1147L, M1229I, T20N, P26S, D138Y, R190S, K417T, H655Y, T1027I, V1176F 등).
- [0711] SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 면역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 면역원성 단편 또는 그의 면역원성 변이체를 인코딩하는 RNA의 일 구현예에서, 상기 변이체는 다음 돌연변이를 포함하는 SARS-CoV-2 S 스파이크 변이체를 포함한다: SEQ ID NO: 1과 비교하여 D80A, D215G, E484K, N501Y, A701V 및 deletion 242-244, 및 선택적으로: SEQ ID NO: 1과 비교하여 L18F, R246I, 및 K417N. 상기 SARS-CoV-2 S 스파이크 변이체는 또한 SEQ ID NO: 1과 비교하여 D614G 돌연변이도 포함할 수 있다.
- [0712] SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 면역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 면역원성 단편 또는 그의 면역원성 변이체를 인코딩하는 RNA의 일 구현예에서, 상기 변이체는 SEQ ID NO: 1과 비교하여 스파이크 단백질에서 L242/A243/L244 결실을 포함하는 SARS-CoV-2 스파이크 변이체를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 SARS-CoV-2 스파이크 변이체는 SEQ ID NO: 1과 비교하여 하나 이상의 추가 돌연변이를 포함할 수 있다(SEQ ID NO: 1과 비교하여 비제한적인 예로서 H69/V70 deletion, Y144 deletion, N501Y, A570D, D614G, P681H, T716I, S982A, D1118H, D80A, D215G, E484K, A701V, L18F, R246I, K417N, Y453F, I692V, S1147L, M1229I, T20N, P26S, D138Y, R190S, K417T, H655Y, T1027I, V1176F 등).
- [0713] SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 면역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 면역원성 단편 또는 그의 면역원성 변이체를 인코딩하는 RNA의 일 구현예에서, 상기 변이체는 다음 돌연변이를 포함하는 SARS-CoV-2 스파이크 변이체를 포함한다: SEQ ID NO: 1과 비교하여 D80A, D215G, E484K, N501Y, A701V 및 결실 242-244, 및 선택적으로: SEQ ID NO: 1과 비교하여 L18F, R246I 및 K417N. 상기 SARS-CoV-2 스파이크 변이체는 SEQ ID NO: 1과 비교하여 D614G 돌연변이를 포함할 수도 있다.
- [0714] SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 면역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 면역원성 단편 또는 그의 면역원성 변이체를 인코딩하는 RNA의 일 구현예에서, 상기 변이체는 예를 들어 SEQ ID NO: 1과 비교하여 스파이크 단백질에서 K417N 또는 K417T 돌연변이와 같이, SEQ ID NO: 1과 비교하여 스파이크 단백질에서 위치 417의 돌연변이를 포함하는 SARS-CoV-2 스파이크 변이체를 포함한다. 일부 구현예에서 상기 SARS-CoV-2 스파이크 변이체는 SEQ ID NO: 1과 비교하여 하나 이상의 추가 돌연변이를 포함한다(SEQ ID NO: 1과 비교하여 비제한적인 예로서, H69/V70 deletion, Y144 deletion, N501Y, A570D, D614G, P681H, T716I, S982A, D1118H, D80A, D215G, E484K, A701V, L18F, R246I, L242/A243/L244 deletion, Y453F, I692V, S1147L, M1229I, T20N, P26S, D138Y, R190S, H655Y, T1027I, V1176F 등).
- [0715] SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 면역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 면역원성 단편 또는 그의 면역원성 변이체를 인코딩하는 RNA의 일 구현예에서, 상기 변이체는 다음 돌연변이를 포함하는 SARS-CoV-2 스파이크 변이체를 포함한다: SEQ ID NO: 1과 비교하여 D80A, D215G, E484K, N501Y, A701V 및 K417N, 및 선택적으로: SEQ ID NO: 1과 비교하여 L18F, R246I 및 결실 242-244. 상기 SARS-CoV-2 스파이크 변이체는 또한 SEQ ID NO: 1과 비교하여 D614G 돌연변이를 포함할 수 있다.
- [0716] SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 면역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 면역원성 단편 또는 그의 면역원성 변이체를 인코딩하는 RNA의 일 구현예에서, 상기 변이체는 다음 돌연변이를 포함하는 SARS-CoV-2 스파이크 변이체를 포함한다: SEQ ID NO: 1과 비교하여 L18F, T20N, P26S, D138Y, R190S, K417T, E484K, N501Y, H655Y, T1027I, 및 V1176F.
- [0717] SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 면역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 면역원성 단편 또는 그의 면역원성 변이체를 인코딩하는 RNA의 일 구현예에서, 상기 변이체는 SEQ ID NO: 1과 비교하여 스파이크 단백질에서 K417N 또는 K417T 돌연변이 및 E484K 및/또는 N501Y 돌연변이와 같이, SEQ ID NO: 1과 비교하여 스파이크 단백질에서

위치 417 및 484 및/또는 501에서의 돌연변이를 포함하는, SARs-CoV-2 스파이크 변이체를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 SARs-CoV-2 스파이크 변이체는 SEQ ID NO: 1과 비교하여 하나 이상의 추가 돌연변이를 포함할 수 있다(SEQ ID NO: 1과 비교하여 비제한적인 예로서, H69/V70 deletion, Y144 deletion, A570D, D614G, P681H, T716I, S982A, D1118H, D80A, D215G, A701V, L18F, R246I, L242/A243/L244 deletion, Y453F, I692V, S1147L, M1229I, T20N, P26S, D138Y, R190S, H655Y, T1027I, V1176F 등).

- [0718] SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 면역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 면역원성 단편 또는 그의 면역원성 변이체를 인코딩하는 RNA의 일 구현예에서, 상기 변이체는 다음 돌연변이를 포함하는 SARs-CoV-2 스파이크 변이체를 포함한다: SEQ ID NO: 1과 비교하여 D80A, D215G, E484K, N501Y, A701V 및 K417N, 및 선택적으로: SEQ ID NO: 1과 비교하여 L18F, R246I 및 결실 242-244. 상기 SARs-CoV-2 스파이크 변이체는 또한 SEQ ID NO: 1과 비교하여 D614G 돌연변이를 포함할 수 있다.
- [0719] SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 면역원성 변이체, 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 면역원성 단편 또는 그의 면역원성 변이체를 인코딩하는 RNA의 일 구현예에서, 상기 변이체는 다음 돌연변이를 포함하는 SARs-CoV-2 스파이크 변이체를 포함한다: L18F, T20N, P26S, D138Y, R190S, K417T, E484K, N501Y, H655Y, T1027I, 및 V1176F.
- [0720] 본원에 기술된 SARs-CoV-2 스파이크 변이체는 SEQ ID NO: 1과 비교하여 D614G 돌연변이를 포함하거나 포함하지 않을 수 있다.
- [0721] 본 개시내용의 일 구현예에서, 항원(예컨대 종양 항원 또는 백신 항원)은 종기로는 단일 가닥의 5' 캡핑된 RNA(종기로는 mRNA)로 투여되며, 이는 상기 RNA가 투여되는 대상체의 세포로 유입시 각각의 단백질로 번역된다. 종기로는, RNA는 안정성 및 번역 효율 측면에서 최대 효율을 위해 최적화된 구조 요소를 함유한다(5' 캡, 5' UTR, 3' UTR, 폴리(A) 서열).
- [0722] 일 구현예에서, 베타-S-ARCA(D1)는 RNA의 5'-말단에서 특정 캡핑 구조로서 이용된다. 일 구현예에서, $m_2^{7,3'-0}$ Gppp($m_1^{2'-0}$)ApG는 RNA의 5'-말단에서 특이적 캡핑 구조로서 이용된다. 일 구현예에서, 5'-UTR 서열은 인간 알파-글로빈 mRNA로부터 유래되고 번역 효율을 증가시키기 위해 최적화된 'Kozak 서열'을 선택적으로 갖는다. 일 구현예에서, "아미노 말단 인헨서 오브 스플릿"(AES) mRNA(F라 칭함) 및 미토콘드리아 인코딩된 12S 리보솜 RNA(I라 칭함)로부터 유도된 2개의 서열 요소(FI 요소)의 조합은 코딩 서열과 폴리(A) 서열 사이에 위치되어 더 높은 최대 단백질 수준과 mRNA의 장기간 지속성을 보장한다. 일 구현예에서, 인간 베타-글로빈 mRNA로부터 유래된 2개의 반복된 3'-UTR은 코딩 서열과 폴리(A) 서열 사이에 배치되어 더 높은 최대 단백질 수준 및 mRNA의 연장된 지속성을 보장한다. 일 구현예에서, 길이가 110개 뉴클레오타이드이고, 30개 아데노신 잔기의 스트레치에 이어서 10개 뉴클레오타이드 링커 서열 및 또 다른 70개 아데노신 잔기로 이루어진 폴리(A) 서열이 사용된다. 이 폴리(A) 서열은 RNA 안정성과 번역 효율을 향상시키도록 설계되었다.
- [0723] SARS-CoV-2 S 단백질, 그의 면역원성 변이체 또는 SARS-CoV-2 S 단백질의 면역원성 단편 또는 그의 면역원성 변이체를 인코딩하는 세 가지 다른 RNA 플랫폼의 구현예를 이하에 설명한다.
- [0724] 일반적으로, 본원에 기재된 백신 RNA는 5'에서 3'으로 다음 구조 중 하나를 포함할 수 있다:
- [0725] Cap-5'-UTR-백신 항원-인코딩 서열-3'-UTR-Poly(A)
- [0726] 또는
- [0727] 베타-S-ARCA(D1)-hAg -Kozak-백신 항원-인코딩 서열-FI-A30L70.
- [0728] 일반적으로, 본원에 기재된 백신 항원은 N-말단에서 C-말단까지 다음 구조 중 하나를 포함할 수 있다:
- [0729] 신호 서열-RBD-삼량체화 도메인
- [0730] 또는
- [0731] 신호 서열-RBD-삼량체화 도메인-막관통 도메인.
- [0732] RBD 및 삼량체화 도메인은 링커, 특히 아미노산 서열 GSPGSGSGS(SEQ ID NO: 33)를 갖는 링커와 같은 GS 링커에 의해 분리될 수 있다. 삼량체화 도메인 및 막관통 도메인은 링커, 특히 아미노산 서열 GSGSGS(SEQ ID NO: 34)를 갖는 링커와 같은 GS 링커에 의해 분리될 수 있다.
- [0733] 신호 서열은 본원에 설명된 신호 서열일 수 있다. RBD는 본원에 기재된 바와 같은 RBD 도메인 일 수 있다. 삼량

체화 도메인은 본원에 기술된 삼량체화 도메인일 수 있다. 막관통 도메인은 본원에 기재된 바와 같은 막관통 도메인일 수 있다.

- [0734] 일 구현예에서,
- [0735] 신호 서열은 SEQ ID NO: 1의 아미노산 1 내지 16 또는 1 내지 19의 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO: 31의 아미노산 1 내지 22의 아미노산 서열, 또는 이 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고,
- [0736] RBD는 SEQ ID NO: 1의 아미노산 327 내지 528의 아미노산 서열, 또는 이 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며,
- [0737] 삼량체화 도메인은 SEQ ID NO: 10의 아미노산 3 내지 29의 아미노산 서열 또는 이 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고; 및
- [0738] 삼량체화 도메인은 SEQ ID NO: 1의 아미노산 1207 내지 1254의 아미노산 서열, 또는 이 아미노산 서열에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0739] 일 구현예에서,
- [0740] 신호 서열은 SEQ ID NO: 1의 아미노산 1 내지 16 또는 1 내지 19의 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO: 31의 아미노산 1 내지 22의 아미노산 서열을 포함하고,
- [0741] RBD는 SEQ ID NO: 1의 아미노산 327 내지 528의 아미노산 서열을 포함하며,
- [0742] 삼량체화 도메인은 SEQ ID NO: 10의 아미노산 3 내지 29의 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO: 10의 아미노산 서열을 포함하고; 그리고
- [0743] 막관통 도메인은 SEQ ID NO: 1의 아미노산 1207 내지 1254의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0744] 전술한 RNA 또는 전술한 백신 항원을 인코딩하는 RNA는 변형되지 않은 우리딘 함유 mRNA(uRNA), 뉴클레오사이드 변형 mRNA(modRNA) 또는 자가 증폭 RNA(saRNA)일 수 있다. 일 구현예에서, 전술한 RNA 또는 전술한 백신 항원을 인코딩하는 RNA는 뉴클레오사이드 변형된 mRNA(modRNA)이다.
- [0745] 변형되지 않은 우리딘 메신저 RNA(uRNA)
- [0746] 변형되지 않은 메신저 RNA(uRNA)의 활성 원리는 세포에 들어갈 때 번역되는 단일 가닥 mRNA이다. 코로나바이러스 백신 항원을 인코딩하는 서열(즉, 오픈 리딩 프레임)에 더하여, 각각의 uRNA는 종기로는 안정성 및 번역 효율 관점에서 RNA의 최대 효능을 위해 최적화된 공통 구조 요소를 함유하는 것이 바람직하다(5'-캡, 5'-UTR, 3'-UTR, 폴리(A)-테일). 바람직한 5' 캡 구조는 베타-S-ARCA(D1)(m₂^{7,2'-0}GppSpG)이다. 바람직한 5'-UTR 및 3'-UTR은 SEQ ID NO: 12의 뉴클레오타이드 서열 및 SEQ ID NO: 13의 뉴클레오타이드 서열을 각각 포함한다. 바람직한 폴리(A)-테일은 SEQ ID NO: 14의 서열을 포함한다.
- [0747] 이 플랫폼의 다른 구현예는 다음과 같다:
- [0748] RBL063.1(SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 7)
- [0749] 구조 베타-S-ARCA(D1)-hAg-Kozak-S1S2-PP-FI-A30L70
- [0750] 인코딩된 항원 SARS-CoV-2의 바이러스 스파이크 단백질(S1S2 단백질) (S1S2 전장 단백질, 서열 변이체)
- [0751] RBL063.2(SEQ ID NO: 16; SEQ ID NO: 7)
- [0752] 구조 베타-S-ARCA(D1)-hAg-Kozak-S1S2-PP-FI-A30L70
- [0753] 인코딩된 항원 SARS-CoV-2의 바이러스 스파이크 단백질(S1S2 단백질) (S1S2 전장 단백질, 서열 변이체)
- [0754] BNT162a1; RBL063.3(SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 5)
- [0755] 구조 베타-S-ARCA(D1)-hAg-Kozak-RBD-GS-피브리틴-FI-A30L70
- [0756] 인코딩된 항원 SARS-CoV-2의 바이러스 스파이크 단백질(S 단백질)(S1S2 단백질의 부분 서열, 수용체 결합 도메인(RBD))

- [0757] 이와 관련하여 "hAg-Kozak"은 번역 효율성을 높이기 위해 최적화된 Kozak을 갖는 인간 알파-글로빈 mRNA의 5'-UTR 서열을 의미한다; "S1S2 단백질"/"S1S2 RBD"는 SARS-CoV-2의 각 항원을 인코딩하는 서열을 의미한다; "FI 요소"는 3'-UTR이 "아미노 말단 인핸서 오브 스플릿"(AES) mRNA(F라 칭함) 및 미토콘드리아 인코딩된 12S 리보솜 RNA(I라 칭함)로부터 유래된 2개의 서열 요소의 조합임을 의미한다. 이들은 RNA 안정성을 부여하고 총 단백질 발현을 증가시키는 서열에 대한 생체의 선택 과정에 의해 확인되었다; "A30L70"은 110개 뉴클레오타이드 길이의 폴리(A)-테일을 의미하며, 30개 아데노신 잔기의 스트레치에 이어 10개 뉴클레오타이드 링커 서열 및 수지상 세포에서 RNA 안정성 및 번역 효율을 향상시키도록 설계된 또 다른 70개 아데노신 잔기로 구성된다. "GS"는 글리신-세린 링커, 즉 융합 단백질에 일반적으로 사용되는 아미노산 글리신(G) 및 세린(S)으로 주로 구성된 짧은 링커 펩타이드를 인코딩하는 서열을 의미한다.
- [0758] 뉴클레오사이드 변형 메신저 RNA(modRNA)
- [0759] 뉴클레오사이드 변형된 메신저 RNA(modRNA) 약물의 활성 원리는 세포에 들어갈 때 번역되는 단일 가닥 mRNA이다. 코로나바이러스 백신 항원을 인코딩하는 서열(즉, 오픈 리딩 프레임)에 더하여, 각 modRNA는 uRNA(5'-캡, 5'-UTR, 3'-UTR, 폴리(A)-테일)로서 RNA의 최대 효능에 최적화된 공통 구조 요소를 포함한다. uRNA와 비교하여 modRNA는 우리딘 대신 1-메틸-슈도우리딘을 포함한다. 바람직한 5' 캡 구조는 $m_2^{7,3'-0}Gppp(m_1^{2'-0})ApG$ 이다. 바람직한 5'-UTR 및 3'-UTR은 각각 SEQ ID NO: 12의 뉴클레오타이드 서열 및 SEQ ID NO: 13의 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 바람직한 폴리(A)-테일은 SEQ ID NO: 14의 서열을 포함한다. 시험관내 전사 반응 동안 생성된 dsRNA 오염물을 감소시키기 위해 modRNA에 추가 정제 단계가 적용된다.
- [0760] 이 플랫폼의 다른 구현에는 다음과 같다.
- [0761] BNT162b2; RBP020.1 (SEQ ID NO: 19; SEQ ID NO: 7)
- [0762] 구조 $m_2^{7,3'-0}Gppp(m_1^{2'-0})ApG$ -hAg-Kozak-S1S2-PP-FI-A30L70
- [0763] 인코딩된 항원 SARS-CoV-2의 바이러스 스파이크 단백질(S1S2 단백질)(S1S2 전장 단백질, 서열 변이체)
- [0764] BNT162b2; RBP020.2(SEQ ID NO: 20; SEQ ID NO: 7)
- [0765] 구조 $m_2^{7,3'-0}Gppp(m_1^{2'-0})ApG$ -hAg-Kozak-S1S2-PP-FI-A30L70
- [0766] 인코딩된 항원 SARS-CoV-2의 바이러스 스파이크 단백질(S1S2 단백질)(S1S2 전장 단백질, 서열 변이체)
- [0767] BNT162b1; RBP020.3(SEQ ID NO: 21; SEQ ID NO: 5)
- [0768] 구조 $m_2^{7,3'-0}Gppp(m_1^{2'-0})ApG$ -hAg-Kozak-S1S2-PP-FI-A30L70
- [0769] 인코딩된 항원 SARS-CoV-2의 바이러스 스파이크 단백질(S1S2 단백질)(부분 서열, 피브리틴에 융합된 S1S2 단백질의 수용체 결합 도메인(RBD))
- [0770] BNT162b3c(SEQ ID NO: 29; SEQ ID NO: 30)
- [0771] 구조 $m_2^{7,3'-0}Gppp(m_1^{2'-0})ApG$ -hAg-Kozak-RBD-GS-피브리틴-GS-TM-FI-A30L70
- [0772] 인코딩된 항원 SARS-CoV-2의 바이러스 스파이크 단백질(S1S2 단백질)(부분 서열, S1S2 단백질의 막관통 도메인(TM)에 융합된 피브리틴에 융합된 S1S2 단백질의 수용체 결합 도메인(RBD)); 항원 서열의 N-말단에 있는 내인성 S1S2 단백질 분비 신호 펩타이드(aa 1-19)
- [0773] BNT162b3d(SEQ ID NO: 31; SEQ ID NO: 32)
- [0774] 구조 $m_2^{7,3'-0}Gppp(m_1^{2'-0})ApG$ -hAg-Kozak-RBD-GS-피브리틴-GS-TM-FI-A30L70
- [0775] 인코딩된 항원 SARS-CoV-2의 바이러스 스파이크 단백질(S1S2 단백질)(부분 서열, S1S2 단백질의 막관통 도메인(TM)에 융합된 피브리틴에 융합된 S1S2 단백질의 수용체 결합 도메인(RBD)); 항원 서열의 N-말단에 있는 번역글로불린 분비 신호 펩타이드(aa 1-22)
- [0776] 자가 증폭 RNA(sarNA)

- [0777] 자가-증폭 mRNA(saRNA) 약물의 활성 원리는 단일 가닥 RNA로, 이것은 세포에 유입시 자체 증폭되어, 이후 코로나바이러스 백신 항원이 번역된다. 종기로는 단일 단백질을 코딩하는 uRNA 및 modRNA와 대조적으로, saRNA의 코딩 영역은 2개의 오픈 리딩 프레임(ORF)을 포함한다. 5'-ORF는 베네수엘라 말 뇌염 바이러스(VEEV) RNA 의존성 RNA 폴리머라제(복제효소)와 같은 RNA 의존성 RNA 폴리머라제를 인코딩한다. 레플리카제 ORF 다음에는 서브게놈 프로모터와 항원을 인코딩하는 두 번째 ORF가 3'에 온다. 또한, saRNA UTR은 자가 증폭에 필요한 5' 및 3' 보존 서열 요소(CSE)를 포함한다. saRNA는 uRNA (5'-캡, 5'-UTR, 3'-UTR, 폴리(A)-테일)로서 RNA의 최대 효능에 최적화된 공통 구조 요소를 포함한다. saRNA는 종기로는 우리딘을 함유한다. 바람직한 5' 캡 구조는 베타-S-ARCA(D1) ($m_2^{7,2'-0}$ GppSpG)이다.
- [0778] saRNA의 세포질 전달은 알파바이러스 유사 수명 주기를 시작한다. 그러나 saRNA는 게놈 패키징 또는 세포 진입에 필요한 알파바이러스 구조 단백질을 인코딩하지 않으므로 복제 가능 바이러스 입자의 생성이 불가능할 가능성이 매우 높다. 복제에는 DNA를 생성하는 중간 단계가 포함되지 않는다. 따라서 saRNA의 사용/흡수는 표적 세포 내에서 게놈 통합 또는 기타 영구적인 유전자 변형의 위험을 제기하지 않는다. 또한, saRNA 자체는 dsRNA 중간체의 인식을 통해 선천적 면역 반응을 효과적으로 활성화하여 지속적인 복제를 방지한다.
- [0779] 이 플랫폼의 다른 구현에는 다음과 같다.
- [0780] *RBS004.1(SEQ ID NO: 24; SEQ ID NO: 7)*
- [0781] 구조 베타-S-ARCA(D1)-레플리카제-S1S2-PP-FI-A30L70
- [0782] 인코딩된 항원 SARS-CoV-2의 바이러스 스파이크 단백질(S 단백질)(S1S2 전장 단백질, 서열 변이체)
- [0783] *RBS004.2(SEQ ID NO: 25; SEQ ID NO: 7)*
- [0784] 구조 베타-S-ARCA(D1)-레플리카제-S1S2-PP-FI-A30L70
- [0785] 인코딩된 항원 SARS-CoV-2의 바이러스 스파이크 단백질(S 단백질)(S1S2 전장 단백질, 서열 변이체)
- [0786] *BNT162c1; RBS004.3(SEQ ID NO: 26; SEQ ID NO: 5)*
- [0787] 구조 베타-S-ARCA(D1)-레플리카제-RBD-GS-피브리틴-FI-A30L70
- [0788] 인코딩된 항원 SARS-CoV-2의 바이러스 스파이크 단백질(S 단백질)(S1S2 단백질의 부분 서열, 수용체 결합 도메인(RBD))
- [0789] *RBS004.4(SEQ ID NO: 27; SEQ ID NO: 28)*
- [0790] 구조 베타-S-ARCA(D1)-레플리카제-RBD-GS-피브리틴-TM-FI-A30L70
- [0791] 인코딩된 항원 SARS-CoV-2의 바이러스 스파이크 단백질(S 단백질)(S1S2 단백질의 부분 서열, 수용체 결합 도메인(RBD))
- [0792] SARS-CoV-2의 인코딩된 항원 바이러스 스파이크 단백질(S 단백질)(S1S2 단백질의 부분 서열, 수용체 결합 도메인(RBD))
- [0793] 또한, 분비 신호 펩타이드(sec)는 종기로는 sec가 N 말단 태그로 번역되는 방식으로 항원-인코딩 영역에 융합될 수 있다. 일 구현예에서, sec는 S 단백질의 분비 신호 펩타이드에 해당한다. 융합 단백질에 일반적으로 사용되는 아미노산 글리신(G) 및 세린(S)으로 주로 구성된 짧은 링커 펩타이드를 코딩하는 서열이 GS/링커로 사용될 수 있다.
- [0794] 일 구현예에서, 항원(예컨대 종양 항원 또는 백신 항원)을 인코딩하는 RNA(종기로는 mRNA)는 항원을 제공하도록 처리된 대상체의 세포에서 발현된다. 일 구현예에서, RNA는 대상체의 세포에서 일시적으로 발현된다. 일 구현예에서, RNA는 시험관내에서 전사된다. 일 구현예에서, 항원의 발현은 세포 표면에서 일어난다. 일 구현예에서, 항원은 MHC와 관련하여 발현 및 제시된다. 일 구현예에서, 항원의 발현은 세포의 공간으로, 즉 항원이 분비된다.
- [0795] 항원 분자 또는 이의 가공 산물, 예를 들어 이의 단편은 면역 이펙터 세포에 의해 운반되는 BCR 또는 TCR과 같은 항원 수용체 또는 항체에 결합할 수 있다.
- [0796] 펩타이드 및 단백질 항원을 인코딩하는 RNA(예컨대 mRNA)를 투여함으로써 본 개시내용에 따라 대상체에게 제공

되는 펩타이드 및 단백질 항원은(여기서 항원은 백신 항원임), 상기 펩타이드 또는 단백질이 제공되는 대상체에서 좋기로는 면역 반응, 예컨대 체액성 및/또는 세포성 면역 반응을 유도한다. 상기 면역 반응은 좋기로는 표적 항원에 대한 것이다. 따라서, 백신 항원은 표적 항원, 이의 변이체 또는 이의 단편을 포함할 수 있다. 일 구현예에서, 이러한 단편 또는 변이체는 면역학적으로 표적 항원과 동일하다. 본 개시내용과 관련하여, 용어 "항원의 단편" 또는 "항원의 변이체"는 면역 반응이 항원을 표적화하는(즉, 표적 항원) 면역 반응의 유도를 초래하는 물질, 즉 항원을 의미 한다. 따라서, 백신 항원은 표적 항원에 상응하거나 이를 포함할 수 있거나, 표적 항원의 단편에 상응하거나 이를 포함할 수 있거나, 또는 표적 항원 또는 이의 단편에 상동인 항원에 상응하거나 이를 포함할 수 있다. 따라서, 본 발명에 따르면, 백신 항원은 표적 항원의 면역원성 단편 또는 표적 항원의 면역원성 단편과 상동인 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 본 개시내용에 따른 "항원의 면역원성 단편"은 좋기로는 표적 항원에 대한 면역 반응을 유도할 수 있는 항원의 단편에 관한 것이다. 백신 항원은 제조함 항원일 수 있다.

[0797] 용어 "면역학적으로 동등한"은 면역학적으로 동등한 아미노산 서열과 같은 면역학적으로 동등한 분자가 동일하거나 본질적으로 동일한 면역학적 특성을 나타내고/나타내거나 예컨대 면역 효과의 종류 면에서 동일하거나 본질적으로 동일한 면역학적 효과를 발휘한다는 것을 의미한다. 본 발명의 맥락에서, "면역학적으로 동등한"이라는 용어는 좋기로는 면역화에 사용되는 항원 또는 항원 변이체의 면역학적 효과 또는 특성과 관련하여 사용된다. 예를 들어, 대상체의 면역계에 노출되었을 때 상기 아미노산 서열이 참조 아미노산 서열과 반응하는 특이성을 갖는 면역 반응을 유도한다면, 아미노산 서열은 참조 아미노산 서열과 면역학적으로 동일하다.

[0798] 일 구현예에서, 본 개시내용에 사용된 RNA(좋기로는 mRNA)는 비면역원성이다. 면역자극제를 인코딩하는 RNA는 아췌반트 효과를 제공하기 위해 본 발명에 따라 투여될 수 있다. 면역자극제를 인코딩하는 RNA는 표준 RNA 또는 비면역원성 RNA일 수 있다.

[0799] 본원에서 사용되는 용어 "비면역원성 RNA"(예컨대 "비면역원성 mRNA")는 예를 들어, 포유동물에 투여시 면역계에 의한 반응을 유도하지 않거나, 또는 비면역원성 RNA를 비면역원성으로 만드는 변형 및 처리를 거치지 않은 점에서만 상이한 동일한 RNA에 의해 유도되었을 것보다, 즉, 표준 RNA(stdRNA)에 의해 유도되었을 것보다 약한 반응을 유도하는 RNA를 지칭한다. 바람직한 일 구현예에서, 본원에서 변형된 RNA(modRNA)로도 지칭되는 비면역원성 RNA는, 선천적 면역 수용체의 RNA-매개된 활성화를 억제하는 변형된 뉴클레오사이드를 RNA에 통합하고 이중 가닥 RNA(dsRNA)를 제거함으로써 비면역원성이 된다.

[0800] 변형된 뉴클레오사이드의 통합에 의해 비 면역원성 RNA(특히 mRNA)를 비면역원성으로 만들기 위해, 어떠한 변형된 뉴클레오사이드든지, RNA의 면역원성을 낮추거나 억제하는 한 사용될 수 있다. 선천적 면역 수용체의 RNA-매개 활성화를 억제하는 변형된 뉴클레오사이드가 특히 바람직하다. 일 구현예에서, 변형된 뉴클레오사이드는 하나 이상의 우리딘을 변형된 핵염기를 포함하는 뉴클레오사이드로 대체하는 것을 포함한다. 일 구현예에서, 변형된 핵염기는 변형된 우라실이다. 일 구현예에서, 변형된 핵염기를 포함하는 뉴클레오사이드는 3-메틸-우리딘(m3U), 5-메톡시-우리딘(mo5U), 5-아자-우리딘, 6-아자-우리딘, 2-티오-5-아자-우리딘, 2-티오-우리딘(s2U), 4-티오-우리딘(s4U), 4-티오-슈도우리딘, 2-티오-슈도우리딘, 5-히드록시-우리딘(ho5U), 5-아미노알릴-우리딘, 5-할로-우리딘(예컨대, 5-요오도-우리딘or 5-브로모-우리딘), 우리딘 5-옥시아세트산(cmo5U), 우리딘 5-옥시아세트산 메틸 에스테르(mcmo5U), 5-카르복시메틸-우리딘(cm5U), 1-카르복시메틸-슈도우리딘, 5-카르복시히드록시메틸-우리딘(chm5U), 5-카르복시히드록시메틸-우리딘 메틸 에스테르(mchm5U), 5-메톡시카르보닐메틸-우리딘(mcm5U), 5-메톡시카르보닐메틸-2-티오-우리딘(mcm5s2U), 5-아미노메틸-2-티오-우리딘(nm5s2U), 5-메틸아미노메틸-우리딘(mnm5U), 1-에틸-슈도우리딘, 5-메틸아미노메틸-2-티오-우리딘(mnm5s2U), 5-메틸아미노메틸-2-셀레노-우리딘(mnm5se2U), 5-카르바모일메틸-우리딘(ncm5U), 5-카르복시메틸아미노메틸-우리딘(cmmn5U), 5-카르복시메틸아미노메틸-2-티오-우리딘(cmmn5s2U), 5-프로피닐-우리딘, 1-프로피닐-슈도우리딘, 5-타우리노메틸-우리딘(τ m5U), 1-타우리노메틸-슈도우리딘, 5-타우리노메틸-2-티오-우리딘(τ m5s2U), 1-타우리노메틸-4-티오-슈도우리딘, 5-메틸-2-티오-우리딘(m5s2U), 1-메틸-4-티오-슈도우리딘(m1s4 ψ), 4-티오-1-메틸-슈도우리딘, 3-메틸-슈도우리딘(m3 ψ), 2-티오-1-메틸-슈도우리딘, 1-메틸-1-데아자-슈도우리딘, 2-티오-1-메틸-1-데아자-슈도우리딘, 디히드로우리딘(D), 디히드로슈도우리딘, 5,6-디히드로우리딘, 5-메틸-디히드로우리딘(m5D), 2-티오-디히드로우리딘, 2-티오-디히드로슈도우리딘, 2-메톡시-우리딘, 2-메톡시-4-티오-우리딘, 4-메톡시-슈도우리딘, 4-메톡시-2-티오-슈도우리딘, N1-메틸-슈도우리딘, 3-(3-아미노-3-카르복시프로필)우리딘(acp3U), 1-메틸-3-(3-아미노-3-카르복시프로필)슈도우리딘(acp3 ψ), 5-(이소펜테닐아미노메틸)우리딘(inm5U), 5-(이소펜테닐아미노메틸)-2-티오-우리딘(inm5s2U), α -티오-우리딘, 2'-O-메틸-우리딘(Um), 5,2'-O-디메틸-우리딘(m5Um), 2'-O-메틸-슈도우리딘($\emptyset$ m), 2-티오-2'-O-메틸-우리딘(s2Um), 5-메톡시카르보닐메틸-2'-O-메틸-우리딘(mcm5Um), 5-카르바모일메틸-2'-O-메틸-우리딘(ncm5Um), 5-카르복시메

틸아미노메틸-2'-O-메틸-우리딘 (cmnm5Um), 3,2'-O-디메틸-우리딘 (m3Um), 5-(이소펜테닐아미노메틸)-2'-O-메틸-우리딘 (inm5Um), 1-티오-우리딘, 테옥시티미딘, 2'-F-아라-우리딘, 2'-F-우리딘, 2'-OH-아라-우리딘, 5-(2-카르보메톡시비닐) 우리딘, 및 5-[3-(1-E-프로페닐아미노)우리딘으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 특히 바람직한 일 구현예에서, 변형된 핵염기를 포함하는 뉴클레오사이드는 슈도우리딘(ψ), N1-메틸-슈도우리딘(m ψ) 또는 5-메틸-우리딘(m5U), 특히 N1-메틸-슈도우리딘이다.

[0801] 일 구현예에서, 하나 이상의 우리딘을 변형된 핵염기를 포함하는 뉴클레오사이드로 대체하는 것은 우리딘의 적어도 1%, 적어도 2%, 적어도 3%, 적어도 4%, 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 25%, 적어도 50%, 적어도 75%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%를 대체하는 것을 포함한다.

[0802] T7 RNA 폴리머라제를 사용하여 시험관내 전사(IVT)에 의해 RNA(종기로는 mRNA)를 합성하는 동안, 이중 가닥 RNA(dsRNA)를 포함한 상당한 양의 비정상적 산물이 효소의 비전통적인 활성으로 인해 생성된다. dsRNA는 염증성 사이토카인을 유도하고 이펙터 효소를 활성화하여 단백질 합성을 억제한다. dsRNA는 예를 들어 비다공성 또는 다공성 C-18 폴리스티렌-디비닐벤젠(PS-DVB) 매트릭스를 사용하는 이온쌍 역상 HPLC에 의해 IVT RNA와 같은 RNA에서 제거될 수 있다. 대안적으로, ssRNA가 아닌 dsRNA를 특이적으로 가수분해하는 대장균 RNaseIII를 사용하는 효소 기반 방법을 사용하여 IVT RNA 제제에서 dsRNA 오염 물질을 제거할 수 있다. 또한 셀룰로오스 물질을 이용하여 dsRNA와 ssRNA를 분리할 수 있다. 일 구현예에서, RNA 제제는 셀룰로스 물질과 접촉되고, ssRNA는 셀룰로스 물질에 대한 dsRNA의 결합을 허용하고 셀룰로스 물질에 대한 ssRNA의 결합을 허용하지 않는 조건 하에서 셀룰로스 물질로부터 분리된다. ssRNA를 제공하기 위한 적합한 방법은 예를 들어 WO 2017/182524에 개시되어 있다.

[0803] 본원에서 사용되는 용어 "제거하다" 또는 "제거"는 dsRNA와 같은 제2 물질 집단의 근접성으로부터 분리되는 비면역성 RNA와 같은 제1 물질 집단의 특성을 지칭하며, 여기서 제1 물질의 개체군에 반드시 제2 물질이 없는 것은 아니며, 제2 물질의 개체군에 반드시 제1 물질이 없는 것은 아니다. 그러나, 제2 물질 집단의 제거를 특징으로 하는 제1 물질 집단은 제1 물질과 제2 물질의 분리되지 않은 혼합물과 비교할 때 제2 물질의 함량이 상당히 낮다.

[0804] 일 구현예에서, 비면역원성 RNA로부터 dsRNA(특히 mRNA)의 제거는 비면역원성 RNA 중 RNA의 10% 미만, 5% 미만, 4% 미만, 3% 미만, 2% 미만, 1% 미만, 0.5% 미만, 0.3%, 또는 0.1% 미만이 dsRNA인 방식으로 dsRNA를 제거하는 것을 포함한다. 일 구현예에서, 비면역원성 RNA(특히 mRNA)는 dsRNA가 없거나 본질적으로 없다. 일부 구현예에서, 비면역원성 RNA(특히 mRNA) 조성물은 단일 가닥 뉴클레오사이드 변형된 RNA의 정제된 제제를 포함한다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 단일 가닥 뉴클레오사이드 변형된 RNA(특히 mRNA)의 정제된 제제는 이중 가닥 RNA(dsRNA)가 실질적으로 없다. 일부 구현예에서, 정제된 제제는 다른 모든 핵산 분자(DNA, dsRNA 등)에 비해, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5% 또는 적어도 99.9% 단일 가닥 뉴클레오사이드 변형 RNA이다.

[0805] 일 구현예에서, 비면역원성 RNA(특히 mRNA)는 동일한 서열을 갖는 표준 RNA 보다 더 효율적으로 세포에서 번역된다. 일 구현예에서, 번역은 변형되지 않은 대응물에 비해 2배의 인자로 향상된다. 일 구현예에서, 번역은 3배 증강된다. 일 구현예에서, 번역은 4배 증강된다. 일 구현예에서, 번역은 5배 증강된다. 일 구현예에서, 번역은 6배 증강된다. 일 구현예에서, 번역은 7배 증강된다. 일 구현예에서, 번역은 8배 증강된다. 일 구현예에서, 번역은 9배 증강된다. 일 구현예에서, 번역은 10배 증강된다. 일 구현예에서, 번역은 15배 증강된다. 일 구현예에서, 번역은 20배 증강된다. 일 구현예에서, 번역은 50배 증강된다. 일 구현예에서, 번역은 100배 증강된다. 일 구현예에서, 번역은 200배 증강된다. 일 구현예에서, 번역은 500배 증강된다. 일 구현예에서, 번역은 1000배 증강된다. 일 구현예에서, 번역은 2000배 증강된다. 일 구현예에서, 증강 배수는 10-1000배이다. 일 구현예에서, 증강 배수는 10-100배이다. 일 구현예에서, 증강 배수는 10-200배이다. 일 구현예에서, 증강 배수는 10-300배이다. 일 구현예에서, 증강 배수는 10-500배이다. 일 구현예에서, 증강 배수는 20-1000배이다. 일 구현예에서, 증강 배수는 30-1000배이다. 일 구현예에서, 증강 배수는 50-1000배이다. 일 구현예에서, 증강 배수는 100-1000배이다. 일 구현예에서, 증강 배수는 200-1000배이다. 일 구현예에서, 번역은 임의의 다른 상당한 양 또는 양의 범위만큼 증강된다.

[0806] 일 구현예에서, 비면역원성 RNA(특히 mRNA)는 동일한 서열을 갖는 표준 RNA 보다 현저히 적은 선천적 면역원성을 나타낸다. 일 구현예에서, 비면역원성 RNA(특히 mRNA)는 그의 변형되지 않은 대응물보다 2배 더 적은 선천적 면역 반응을 나타낸다. 일 구현예에서, 선천적 면역원성은 3배 감소된다. 일 구현예에서, 선천적 면역원성은 4배 감소된다. 일 구현예에서, 선천적 면역원성은 5배 감소된다. 일 구현예에서, 선천적 면역원성은 6배 감소된다.

다. 일 구현예에서, 선천적 면역원성은 7배 감소된다. 일 구현예에서, 선천적 면역원성은 8배 감소된다. 일 구현예에서, 선천적 면역원성은 9배 감소된다. 일 구현예에서, 선천적 면역원성은 10배 감소된다. 일 구현예에서, 선천적 면역원성은 15배 감소된다. 일 구현예에서, 선천적 면역원성은 20배 감소된다. 일 구현예에서, 선천적 면역원성은 50배 감소된다. 일 구현예에서, 선천적 면역원성은 100배 감소된다. 일 구현예에서, 선천적 면역원성은 200배 감소된다. 일 구현예에서, 선천적 면역원성은 500배 감소된다. 일 구현예에서, 선천적 면역원성은 1000배 감소된다. 일 구현예에서, 선천적 면역원성은 2000배 감소된다.

[0807] 용어 "선천적 면역원성이 현저하게 감소한다" 함은 선천적 면역원성의 검출가능한 감소를 의미한다. 일 구현예에서, 상기 용어는 유효량의 비면역원성 RNA(특히 mRNA)가 검출가능한 선천적 면역 반응을 유발하지 않고 투여될 수 있도록 하는 감소를 의미한다. 일 구현예에서, 상기 용어는 비면역원성 RNA(특히 mRNA)가 비면역원성 RNA에 의해 인코딩되는 단백질의 생성을 검출가능하게 감소시키기에 충분한 선천적 면역 반응을 유도하지 않고 반복적으로 투여될 수 있도록 하는 감소를 지칭한다. 일 구현예에서, 감소는 비면역원성 RNA(특히 mRNA)가 비면역원성 RNA에 의해 인코딩되는 단백질의 검출가능한 생산을 제거하기에 충분한 선천적 면역 반응을 유도하지 않고 반복적으로 투여될 수 있도록 한다.

[0808] "면역원성"은 인간 또는 다른 동물의 체내에서 면역 반응을 유발하는 RNA와 같은 외부 물질의 능력이다. 선천적 면역 체계는 상대적으로 비특이적이고 즉각적인 면역 체계의 구성 요소이다. 이것은 적응 면역 체계와 함께 척추동물 면역 체계의 두 가지 주요 구성 요소 중 하나이다.

[0809] 본원에 사용된 "내인성"은 유기체, 세포, 조직 또는 시스템으로부터 또는 그 내부에서 생성된 임의의 물질과 관련됨을 의미한다.

[0810] 본원에서 사용되는 용어 "외인성"은 유기체, 세포, 조직 또는 시스템으로부터 도입되거나 외부에서 생성되는 임의의 물질과 관련됨을 의미한다.

[0811] 본원에서 사용되는 용어 "발현"은 특정 뉴클레오타이드 서열의 전사 및/또는 번역으로 정의된다.

[0812] 본원에서 사용되는 용어 "연결된", "융합된" 또는 "융합"은 상호교환적으로 사용된다. 이들 용어는 두 개 이상의 요소 또는 구성 요소 또는 도메인을 결합하는 것을 의미한다.

[0813] 지질 나노입자

[0814] 상이한 유형의 RNA 함유 입자들이 미립자 형태의 RNA 전달에 적합한 것으로 이전에 기술된 바 있다(cf., eg., Kaczmarek, JC et al., 2017, Genome Medicine 9, 60). 비바이러스성 RNA 전달 수단의 경우, RNA의 나노입자 캡슐화는 물리적으로 RNA를 분해로부터 보호하고 특정 화학에 따라 세포 흡수 및 엔도솜 탈출을 도울 수 있다.

[0815] 고분자 및 지질과 같은 양친화성을 띤 분자와 음전하를 띤 핵산 사이의 정전기적 상호작용이 입자 형성에 관여한다. 이로 인해 핵산 입자가 착화되고 자발적으로 형성된다.

[0816] 본 발명의 맥락에서, "입자"라는 용어는 분자 또는 분자 복합체, 특히 입자 형성 화합물에 의해 형성된 구조화된 실체에 관한 것이다. 종기로는, 입자는 하나 이상의 유형의 양친매성 물질(예를 들어, 양친매성 지질, 양친매성 폴리머 및/또는 양친매성 단백질/폴리펩타이드)로 만들어진 외피(예를 들어, 하나 이상의 층 또는 라멜라)를 함유한다. 이와 관련하여, "양친매성 물질"이라는 표현은 그 물질이 친수성 및 친유성 특성을 모두 가짐을 의미한다. 외피는 또한 양친매성일 필요가 없는 추가 물질(예를 들어, 추가 지질 및/또는 추가 폴리머)을 포함할 수 있다. 따라서, 입자는 모노라멜라 또는 멀티라멜라 구조일 수 있으며, 여기서 하나 이상의 층 또는 라멜라를 구성하는 물질은 양친매성일 필요가 없는 추가 물질(예컨대 추가 지질 및/또는 추가 폴리머)과 선택적으로 조합된 하나 이상의 유형의 양친매성 물질(특히 양친매성 지질, 양친매성 폴리머 및/또는 양친매성 단백질/폴리펩타이드로 이루어진 군으로부터 선택됨)을 포함한다. 일 구현예에서, "입자"라는 용어는 마이크로 또는 나노 크기의 콤팩트 구조와 같은 마이크로 또는 나노 크기의 구조에 관한 것이다. 이와 관련하여 "마이크로 크기"라는 용어는 입자의 세 가지 외부 치수가 모두 마이크로 스케일, 즉 1 ~ 5 μm 에 있음을 의미한다. 본 개시 내용에 따르면, "입자"라는 용어는 리포플렉스 입자(LPXS), 지질 나노입자(LNP), 폴리플렉스 입자, 리포폴리플렉스 입자, 바이러스 유사 입자(VLP) 및 이들의 혼합물(예를 들어, 둘 이상의 입자 유형의 혼합물 예컨대, LPX와 VLP의 혼합물 또는 LNP와 VLP의 혼합물)을 포함한다.

[0817] "핵산 입자"는 핵산을 관심 표적 부위(예를 들어, 세포, 조직, 장기 등)에 전달하기 위해 사용될 수 있다. 핵산 입자는 하나 이상의 양이온성 지질 또는 양이온적으로 이온화가능한 지질 또는 지질 유사 물질, 프로타민과 같은 하나 이상의 양이온성 폴리머, 또는 이들의 혼합물 및 핵산으로부터 형성될 수 있다. 핵산 입자에는 지질 나

노입자(LNP) 기반 및 리포플렉스(LPX) 기반 제형이 포함된다.

- [0818] 양이온성 지질 또는 양이온적으로 이온화가능한 지질 또는 지질 유사 물질 및/또는 양이온성 폴리머는 핵산과 함께 결합하여 응집체를 형성하고, 이 응집체는 콜로이드적으로 안정한 입자를 생성하는 것으로 여겨지지만, 특정 이론에 구애되는 것은 아니다.
- [0819] 일 구현예에서, 본원에 기술된 입자는 양이온적으로 이온화가능한 지질 이외에 적어도 하나의 지질 또는 지질 유사 물질을 추가로 포함한다.
- [0820] 일부 구현예에서, 핵산 입자(특히 RNA LNP와 같은 RNA 입자(예를 들어, mRNA LNP와 같은 mRNA 입자))는 하나 이상의 유형의 핵산 분자를 포함하며, 여기서 핵산 분자의 분자 파라미터는, 물 질량 또는 분자 구조, 캡핑, 코딩 영역 또는 기타 특징과 같은 기본 구조 요소와 관련하여 서로 유사하거나 상이할 수 있다.
- [0821] 본 개시내용에서 사용된 바와 같이, "나노입자"는 본원에 기술된 바와 같은 핵산(특히 mRNA) 및 적어도 하나의 양이온성 지질을 포함하는 입자를 말하며, 여기서 입자의 3개의 외부 치수는 모두 나노스케일, 즉 적어도 약 1 nm 및 약 1000 nm 미만(종기로는, 10 내지 990 nm, 예컨대 15 내지 900 nm, 20 내지 800 nm, 30 내지 700 nm, 40 내지 600 nm, 또는 50 내지 500 nm)이다. 종기로는 가장 긴 축과 가장 짧은 축이 크게 다르지 않은 것이 바람직하다. 종기로는 입자의 크기는 직경이다.
- [0822] 본원에 기재된 핵산 입자(특히 RNA LNP)는 약 0.5 미만, 약 0.4 미만, 약 0.3 미만, 약 0.2 미만, 약 0.1 미만 또는 약 0.05 미만의 다분산 지수(PDI)를 나타낼 수 있다. 예로서, 핵산 입자는 약 0.01 내지 약 0.4 또는 약 0.1 내지 약 0.3 범위의 다분산 지수를 나타낼 수 있다.
- [0823] 본 발명의 맥락에서, 용어 "리포플렉스 입자"는 본원에 기술된 양친매성 지질, 특히 양이온성 양친매성 지질 및 핵산(특히 mRNA와 같은 RNA)을 함유하는 입자에 관한 것이다. 양전하를 띤 리포솜(하나 이상의 양친매성 지질, 특히 양이온성 양친매성 지질로 만들어짐)과 음전하를 띤 핵산(특히 mRNA와 같은 RNA) 사이의 정전기적 상호작용은 핵산 리포플렉스 입자의 복합체화 및 자발적 형성을 초래한다. 양전하 리포솜은 일반적으로 DOTMA와 같은 양이온 성 양친매성 지질 및 DOPE와 같은 추가 지질을 사용하여 합성될 수 있다. 일 구현예에서, 핵산(특히 mRNA와 같은 RNA) 리포플렉스 입자는 나노입자이다.
- [0824] "지질 나노입자"라는 용어는 나노 크기의 지질 함유 입자에 관한 것이다.
- [0825] 본 발명의 맥락에서, 용어 "폴리플렉스 입자"는 양친매성 폴리머, 특히 양이온성 양친매성 폴리머 및 본원에 기술된 핵산(특히 mRNA와 같은 RNA)을 함유하는 입자에 관한 것이다. 양하전된 양이온성 양친매성 폴리머와 음하전된 핵산(특히 mRNA와 같은 RNA) 사이의 정전기적 상호작용은 핵산 폴리플렉스 입자의 복합체화 및 자발적 형성을 초래한다. 폴리플렉스 입자의 제조에 적합한 양전하 양친매성 폴리머는 프로타민, 폴리에틸렌민, 폴리-L-리신, 폴리-L-아르기닌 및 히스톤을 포함한다. 일 구현예에서, 핵산(특히 mRNA와 같은 RNA) 폴리플렉스 입자는 나노입자이다.
- [0826] 용어 "리포폴리플렉스 입자"는 본원에 기재된 양친매성 지질(특히 양이온성 양친매성 지질), 본원에 기재된 양친매성 폴리머(특히 양이온성 양친매성 폴리머) 및 본원에 기재된 핵산(특히 mRNA와 같은 RNA)을 함유하는 입자에 관한 것이다.. 일 구현예에서, 핵산(특히 mRNA와 같은 RNA) 리포폴리플렉스 입자는 나노입자이다.
- [0827] 용어 "바이러스-유사 입자"(본원에서는 VLP로 약칭함)는 바이러스와 매우 유사하지만 상기 바이러스의 유전 물질을 포함하지 않으므로 비감염성인 분자를 의미한다. 종기로는, VLP는 본원에 기재된 바와 같은 핵산(종기로는 RNA)을 함유하고, 상기 핵산(종기로는 RNA)은 VLP가 유래된 바이러스(들)에 대해 이중성이다. VLP는 바이러스 구조 단백질의 개별 발현을 통해 합성될 수 있으며, 이는 바이러스 유사 구조로 자가 조립될 수 있다. 일 구현예에서, 상이한 바이러스로부터의 구조적 캡시드 단백질의 조합을 사용하여 재조합 VLP를 생성할 수 있다. VLP는 B형 간염 바이러스(HBV)(작은 HBV 유래 표면 항원(HBsAg)), 파코바이러스과(예컨대 아데노 관련 바이러스), Papillomaviridae (예컨대 HPV), 레트로바이러스과(예컨대 HIV), 플라비바이러스과(예컨대 C형 간염 바이러스) 및 박테리오파지(예컨대 Q β , AP205)를 비롯한 광범한 바이러스과의 구성원들로부터 생성될 수 있다.
- [0828] 용어 "핵산 함유 입자"는 핵산(특히 mRNA와 같은 RNA)이 결합된 본원에 기술된 바와 같은 입자에 관한 것이다. 이와 관련하여, 핵산(특히 mRNA와 같은 RNA)은 입자의 외부 표면(표면 핵산(특히 표면 mRNA와 같은 표면 RNA))에 부착될 수 있고/있거나 입자(캡슐화된 핵산) 내에 함유될 수 있다(캡슐화된 핵산(특히 캡슐화된 mRNA와 같은 캡슐화된 RNA)).
- [0829] 일 구현예에서, 본 발명의 방법 및 용도에 이용되는 입자는 약 10 내지 약 2000 nm, 예컨대 적어도 약 15 nm

(종기로는 적어도 약 20 nm, 적어도 약 25 nm, 적어도 약 30 nm, 적어도 약 35 nm, 적어도 약 40 nm, 적어도 약 45 nm, 적어도 약 50 nm, 적어도 약 55 nm, 적어도 약 60 nm, 적어도 약 65 nm, 적어도 약 70 nm, 적어도 약 75 nm, 적어도 약 80 nm, 적어도 약 85 nm, 적어도 약 90 nm, 적어도 약 95 nm, 또는 적어도 약 100 nm) 및 /또는 최대 1900 nm (종기로는 최대 약 1900 nm, 최대 약 1800 nm, 최대 약 1700 nm, 최대 약 1600 nm, 최대 약 1500 nm, 최대 약 1400 nm, 최대 약 1300 nm, 최대 약 1200 nm, 최대 약 1100 nm, 최대 약 1000 nm, 최대 약 950 nm, 최대 약 900 nm, 최대 약 850 nm, 최대 약 800 nm, 최대 약 750 nm, 최대 약 700 nm, 최대 약 650 nm, 최대 약 600 nm, 최대 약 550 nm, 또는 최대 약 500 nm), 종기로는 약 20 내지 약 1500 nm, 예컨대 약 30 내지 약 1200 nm, 약 40 내지 약 1100 nm, 약 50 내지 약 1000 nm, 약 60 내지 약 900 nm, 약 70 내지 800 nm, 약 80 내지 700 nm, 약 90 내지 600 nm, 또는 약 50 내지 500 nm 또는 약 100 내지 500 nm의 범위, 예컨대 10 내지 1000 nm, 15 내지 500 nm, 20 내지 450 nm, 25 내지 400 nm, 30 내지 350 nm, 40 내지 300 nm, 50 내지 250 nm, 60 내지 200 nm, 또는 70 내지 150 nm의 범위의 크기(종기로는 직경, 즉, 회전 반경(Rg) 값의 2배 또는 유체역학적 반경의 2배와 같은 반경의 2배)를 갖는다.

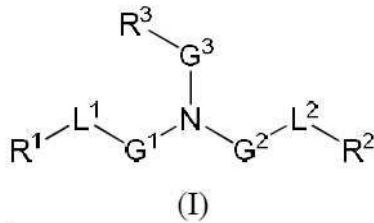
- [0830] RNA 지질 입자(특히 mRNA LNP와 같은 RNA LNP)와 관련하여 N/P 비율은 RNA의 인산염 기 수에 대한 지질의 질소 기의 비율을 제공한다. 질소 원자(pH에 따라 다름)는 일반적으로 양전하를 띠고 인산기는 음전하를 띠기 때문에 이것은 전하 비율과 관련이 있다. 전하 평형이 존재하는 N/P 비율은 pH에 따라 다르다. 지질 제형은 양전하를 띤 나노입자가 형질감염에 유리한 것으로 간주되기 때문에 4 초과 내지 12까지의 N/P 비율에서 자주 형성된다. 이 경우 RNA는 나노입자에 완전히 결합된 것으로 간주된다.
- [0831] 본원에 기재된 핵산 입자(특히 mRNA LNP와 같은 RNA LNP)는 적어도 하나의 양이온성 지질 또는 양이온적으로 이온화가능한 지질 및/또는 적어도 하나의 양이온성 폴리머로부터 콜로이드를 얻고 핵산 입자를 얻기 위해 콜로이드를 핵산과 혼합하는 것을 포함할 수 있는 광범위한 방법을 사용하여 제조될 수 있다.
- [0832] 본원에서 사용되는 용어 "콜로이드"는 분산된 입자가 침강하지 않는 균질한 혼합물 유형에 관한 것이다. 혼합물의 불용성 입자는 입자 크기가 1 내지 1000 나노미터인 미세한 입자이다. 혼합물은 콜로이드 또는 콜로이드 현탁액으로 불릴 수 있다. 때때로 "콜로이드"라는 용어는 전체 현탁액이 아니라 혼합물 내의 입자만을 가리킨다.
- [0833] 적어도 하나의 양이온성 지질 또는 양이온적으로 이온화가능한 지질 및/또는 적어도 하나의 양이온성 폴리머를 포함하는 콜로이드의 제조를 위해, 리포솜 소포를 제조하기 위해 통상적으로 사용되고 적절하게 조정되는 방법이 본원에서 적용 가능하다. 리포솜 소포를 제조하기 위해 가장 일반적으로 사용되는 방법은 다음과 같은 기본 단계를 공유한다: (i) 유기 용매에서 지질 용해, (ii) 생성된 용액의 건조, 및 (iii) 건조된 지질의 수화(다양한 수성 매질 사용).
- [0834] 필름 수화 방법에서 지질은 먼저 적절한 유기 용매에 용해되고 건조되어 플라스크 바닥에 얇은 필름이 생성된다. 얻어진 지질 필름은 적절한 수성 매질을 사용하여 수화되어 리포솜 분산액을 생성한다. 또한 추가 다운사이징 단계가 포함될 수 있다.
- [0835] 역상 증발은 수성상과 지질을 함유하는 유기상 사이에 유증수 에멀전의 형성을 수반하는 리포솜 소포를 제조하기 위한 필름 수화에 대한 대체 방법이다. 시스템 균질화를 위해서는 이 혼합물의 간단한 초음파 처리가 필요하다. 감압하에서 유기상을 제거하면 이후에 리포솜 현탁액으로 바뀌는 유백색 젤이 생성된다.
- [0836] "에탄올 주입법"이란 지질을 포함하는 에탄올 용액을 바늘을 통해 수용액에 빠르게 주입하는 방법을 말한다. 이 작용은 용액 전체에 지질을 분산시키고 지질 구조 형성, 예를 들어 리포솜 형성과 같은 지질 소포 형성을 촉진한다. 일반적으로, 본원에 기술된 핵산(특히 mRNA와 같은 RNA) 리포플렉스 입자는 핵산(특히 mRNA와 같은 RNA)을 콜로이드성 리포솜 분산액에 첨가함으로써 얻을 수 있다. 에탄올 주입 기술을 사용하여, 이러한 콜로이드성 리포솜 분산액은 일 구현예에서 다음과 같이 형성된다: 양이온적으로 이온화가능한 지질 및 추가 지질과 같은 지질을 포함하는 에탄올 용액을 교반하면서 수용액에 주입한다. 일 구현예에서, 본원에 기술된 핵산(특히 mRNA와 같은 RNA) 리포플렉스 입자는 압출 단계 없이 얻을 수 있다.
- [0837] "압출하다" 또는 "압출"이라는 용어는 고정된 단면 프로파일을 갖는 입자의 생성을 의미한다. 특히 이 용어는 정의된 포어를 갖는 필터를 통해 입자를 강제로 통과시킴으로써 입자를 축소(다운사이징)하는 것을 가리킨다.
- [0838] 콜로이드를 제조하기 위해 본 발명에 따라 유기 용매가 없는 특성을 갖는 다른 방법 역시도 사용될 수 있다.
- [0839] LNP는 일반적으로 이온화가능한 양이온성 지질, 인지질과 같은 중성 지질, 콜레스테롤과 같은 스테로이드 및 폴리머 공액 지질의 네 가지 구성 요소를 포함한다. 각 구성 요소는 페이로드 보호를 담당하고 효과적인 세포 내

전달을 가능하게 한다. LNP는 에탄올에 용해된 지질을 버퍼 수용액에서 핵산과 빠르게 혼합하여 준비할 수 있다.

- [0840] 상이한 유형의 핵산 함유 입자는 미립자 형태의 핵산 전달에 적합한 것으로 이전에 기술되었다(예를 들어, Kaczmarek, JC et al., 2017, Genome Medicine 9, 60 참조). 비바이러스성 핵산 전달 비히클의 경우, 핵산의 나노입자 캡슐화는 물리적으로 핵산이 분해되는 것을 방지하고 특정 화학에 따라 세포 흡수 및 엔도솜 탈출을 도울 수 있다.
- [0841] 바람직한 일 구현예에서, 본원에 기술된 RNA 및 적어도 하나의 양이온적으로 이온화가능한 지질을 포함하는 LNP는 하나 이상의 추가 지질을 추가로 포함한다.
- [0842] 일 구현예에서, 본원에 기술된 적어도 하나의 양이온적으로 이온화가능한 지질 및 RNA를 포함하는 LNP는 (a) 물 및 제1 버퍼 시스템을 함유하는 RNA 용액을 제조하는 단계; (b) 양이온적으로 이온화가능한 지질 및 존재하는 경우 하나 이상의 추가 지질을 포함하는 에탄올 용액을 제조하는 단계; (c) (a)에서 제조된 RNA 용액을 (b)에서 제조된 에탄올 용액과 혼합하여, 제1 버퍼 시스템을 포함하는 제1 수성상에 분산된 LNP를 포함하는 제1 중간 제형을 제조하는 단계; 및 (d) 최종 버퍼 시스템을 포함하는 최종 버퍼 수용액을 사용하여 (c)에서 제조된 제1 중간 제형을 여과함으로써 최종 버퍼 시스템을 포함하는 최종 수성상에 분산된 LNP를 포함하는 제형을 제조하는 단계를 포함한다. 단계 (c) 후에 접선 흐름 여과 또는 정용여과와 같은 회석 및 여과로부터 선택되는 하나 이상의 단계가 뒤따를 수 있다. 일 구현예에서, 제1 버퍼 시스템은 최종 버퍼 시스템과 상이하다. 대안적인 구현예에서, 제1 버퍼 시스템과 최종 버퍼 시스템은 동일하다.
- [0843] 대안적인 일 구현예에서, 본원에 기술된 적어도 하나의 양이온적으로 이온화가능한 지질 및 RNA를 포함하는 LNP는 (a') 양이온적으로 이온화가능한 지질 및 존재하는 경우 수성상에서 하나 이상의 추가 지질의 리포솜 또는 콜로이드 제제를 제조하는 단계; (b') 물과 버퍼 시스템을 포함하는 RNA 용액을 준비하는 단계; 및 (c') (a')에서 제조된 리포솜 또는 콜로이드 제제를 (b')에서 제조된 mRNA 용액과 혼합하는 단계에 의해 제조된다. 단계 (c') 후에 접선 흐름 여과와 같은 회석 및 여과로부터 선택되는 하나 이상의 단계가 뒤따를 수 있다.
- [0844] 본 개시내용은 RNA(특히 RNA를 포함하는 LNP)를 포함하는 입자 및 RNA와 회합하여 핵산 입자를 형성하는 적어도 하나의 양이온적으로 이온화가능한 지질을 포함하는 조성물을 기술한다. RNA 입자는 입자에 대한 비공유 상호작용에 의해 상이한 형태로 복합화된 RNA를 포함할 수 있다. 본원에 기술된 입자는 바이러스 입자, 특히 감염성 바이러스 입자가 아니며, 즉 세포를 바이러스로 감염시킬 수 없다.
- [0845] 적합한 양이온적으로 이온화가능한 지질은 핵산 입자를 형성하고 "입자 형성 성분" 또는 "입자 형성제"라는 용어에 포함되는 것들이다. "입자 형성 성분" 또는 "입자 형성제"라는 용어는 핵산 입자를 형성하기 위해 핵산과 회합하는 임의의 성분을 가리킨다. 이러한 구성요소는 핵산 입자의 일부가 될 수 있는 모든 구성요소를 포함한다.
- [0846] 양이온적으로 이온화가능한 지질 (Cationically ionizable lipids)
- [0847] 본원에 기술된 핵산 입자(특히 RNA LNP)는 입자 형성체로서 적어도 하나의 양이온적으로 이온화가능한 지질을 포함한다. 본원에서 사용하기 위해 고려되는 양이온적으로 이온화가능한 지질은 핵산에 정전기적으로 결합할 수 있는 임의의 양이온적으로 이온화가능한 지질 또는 지질 유사 물질을 포함한다. 일 구현예에서, 본원에서 사용하기 위해 고려되는 양이온적으로 이온화가능한 지질은 예컨대, 핵산과 복합체를 형성하거나 핵산이 둘러싸이거나 캡슐화되는 소포를 형성함으로써, 핵산과 회합될 수 있다. .
- [0848] 본원에 사용된 "양이온성 지질" 또는 "양이온성 지질 유사 물질"은 순 양전하를 갖는 지질 또는 지질 유사 물질을 의미한다. 양이온성 지질 또는 지질 유사 물질은 정전기적 상호작용에 의해 음전하를 띤 핵산에 결합한다. 일반적으로, 양이온성 지질은 스테롤, 아실 사슬, 디아실 또는 그 이상의 아실 사슬과 같은 친유성 부분을 가지며, 지질의 헤드 그룹은 전형적으로 양전하를 띤다.
- [0849] 특정 구현예에서, 양이온성 지질 또는 지질 유사 물질은 특정 pH, 특히 산성 pH에서만 순 양전하를 가지며, 상이한, 종기로는 생리적 pH와 같은 더 높은 pH에서는 순 양전하를 갖지 않고, 종기로는 전하를 갖지 않으며, 즉, 중성인 것이 바람직하다. 이러한 이온화가능한 거동은 생리학적 pH에서 양이온을 유지하는 입자와 비교하여 엔도솜 탈출을 돕고 독성을 감소시켜 효능을 향상시키는 것으로 생각된다.
- [0850] 본원에서 사용된 바와 같이, "양이온적으로 이온화가능한 지질"은 순 양전하를 갖거나 중성인 지질 또는 지질 유사 물질, 즉 영구적으로 양이온이 아닌 지질을 의미한다. 따라서, 양이온적으로 이온화가능한 지질이 용해되는 조성물의 pH에 따라, 양이온적으로 이온화가능한 지질은 양전하를 띠거나 중성이다.

[0851] 일 구현예에서, 양이온적으로 이온화가능한 지질은 바람직하게는 생리학적 조건 하에서 양전하를 띠거나 양성자화될 수 있는 적어도 하나의 질소 원자(N)를 포함하는 헤드 그룹을 포함한다.

[0852] 양이온적으로 이온화가능한 지질의 예는 예를 들어 WO 2016/176330 및 WO 2018/078053에 개시되어 있다. 일부 구현예에서, 양이온적으로 이온화가능한 지질은 다음 화학식 (I)의 구조:



[0853]

[0854] 를 갖거나 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염, 호변이성질체, 전구약물 또는 입체이성질체이며, 식 중:

[0855] L^1 및 L^2 중 하나는 $-O(C=O)-$, $-(C=O)O-$, $-C(=O)-$, $-O-$, $-S(O)_x-$, $-S-S-$, $-C(=O)S-$, $-SC(=O)-$, $-NR^aC(=O)-$, $-C(=O)NR^a-$, $NR^aC(=O)NR^a-$, $-OC(=O)NR^a-$ 또는 $-NR^aC(=O)O-$ 이고, L^1 및 L^2 중 다른 하나는 $-O(C=O)-$, $-(C=O)O-$, $-C(=O)-$, $-O-$, $-S(O)_x-$, $-S-S-$, $-C(=O)S-$, $SC(=O)-$, $-NR^aC(=O)-$, $-C(=O)NR^a-$, $NR^aC(=O)NR^a-$, $-OC(=O)NR^a-$ 또는 $-NR^aC(=O)O-$ 또는 직접 결합이며;

[0856] G^1 및 G^2 는 각각 독립적으로 치환되지 않은 C_1-C_{12} 알킬렌 또는 C_2-C_{12} 알케닐렌;

[0857] G^3 은 C_1-C_{24} 알킬렌, C_2-C_{24} 알케닐렌, C_3-C_8 시클로알킬렌, C_3-C_8 시클로알케닐렌;

[0858] R^a 는 H 또는 C_1-C_{12} 알킬;

[0859] R^1 및 R^2 는 각각 독립적으로 C_6-C_{24} 알킬 또는 C_6-C_{24} 알케닐;

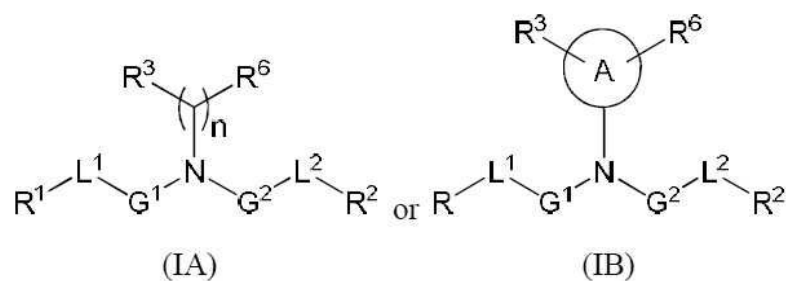
[0860] R^3 은 H, OR^5 , CN, $-C(=O)OR^4$, $-OC(=O)R^4$ 또는 $-NR^5C(=O)R^4$;

[0861] R^4 는 C_1-C_{12} 알킬;

[0862] R^5 는 H 또는 C_1-C_6 알킬이고;

[0863] x는 0, 1 또는 2이다.

[0864] 화학식 (I)의 상기 구현예 중 일부에서, 지질은 하기 구조 (IA) 또는 (IB) 중 하나를 갖는다:



[0865]

[0866] 식 중:

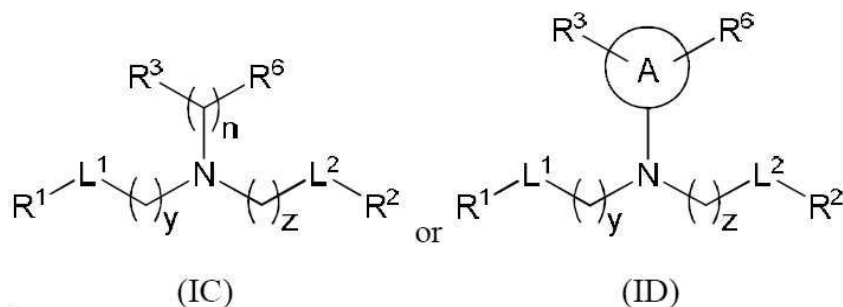
[0867] A는 3 내지 8원 시클로알킬 또는 시클로알킬렌기이고;

[0868] R^6 은 각 경우에 독립적으로 H, OH 또는 C_1-C_{24} 알킬이며;

[0869] n은 1에서 15까지의 정수이다.

[0870] 화학식 (I)의 상기 구현예 중 일부에서, 지질은 구조 (IA)를 갖고, 또 다른 구현예에서 지질은 구조 (IB)를 갖는다.

[0871] 화학식 (I)의 다른 구현예에서, 지질은 하기 구조 (IC) 또는 (ID) 중 하나를 갖는다:

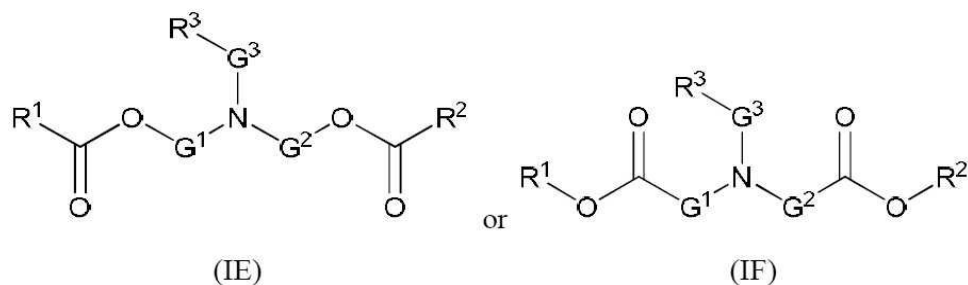


[0872]

[0873] 식 중 y 및 z 는 각각 독립적으로 1 내지 12 범위의 정수이다.

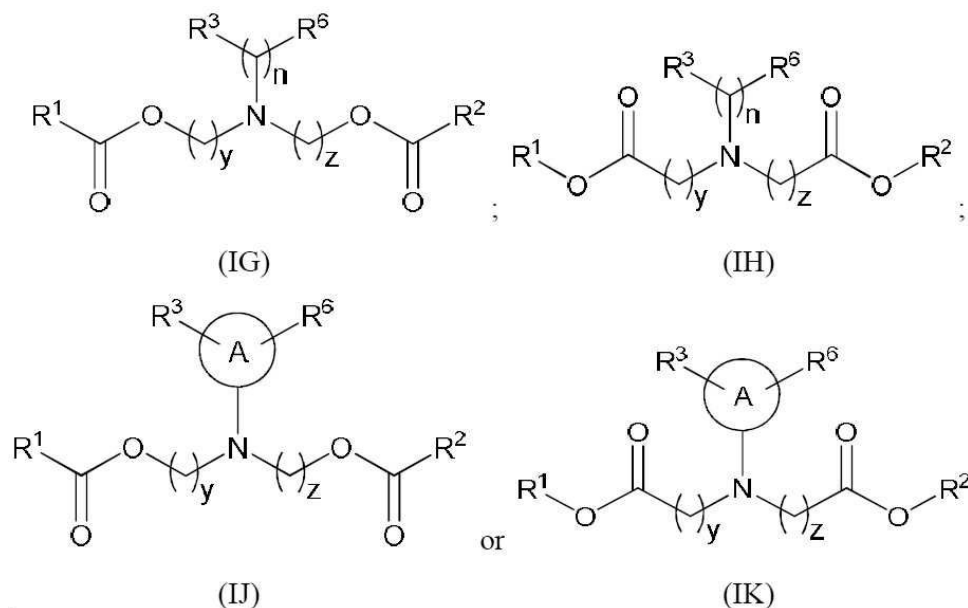
[0874] 임의의 전술한 화학식 (I)의 구현예에서, L^1 및 L^2 는 $-\text{O}(\text{C}=\text{O})-$ 이다. 예를 들어, 일부 구현예에서 L^1 및 L^2 는 $-\text{O}(\text{C}=\text{O})-$ 이다. 전술한 일부 상이한 구현예들 중에서, L^1 및 L^2 는 각각 독립적으로 $-(\text{C}=\text{O})\text{O}-$ 또는 $-\text{O}(\text{C}=\text{O})-$ 이다. 예를 들어, 일부 구현예에서 L^1 및 L^2 각각은 $-(\text{C}=\text{O})\text{O}-$ 이다.

[0875] 화학식 (I)의 일부 상이한 구현예에서, 지질은 하기 구조 (IE) 또는 (IF) 중 하나를 갖는다:



[0876]

[0877] 화학식 (I)의 전술한 일부 구현예에서, 지질은 하기 구조 (IG), (IH), (IJ) 또는 (IK) 중 하나를 갖는다:



[0878]

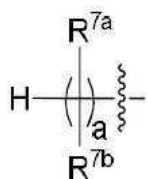
[0879] 화학식 (I)의 전술한 일부 구현예에서, n 은 2 내지 12, 예를 들어 2 내지 8 또는 2 내지 4 범위의 정수이다. 예를 들어, 일부 구현예에서 n 은 3, 4, 5 또는 6이다. 일부 구현예에서 n 은 3이다. 일부 구현예에서 n 은 4이다. 일부 구현예에서 n 은 5이다. 일부 구현예에서 n 은 6이다.

[0880] 화학식 (I)의 앞선 일부 다른 구현예에서, y 및 z 는 각각 독립적으로 2 내지 10 범위의 정수이다. 예를 들어, 일부 구현예에서, y 및 z 는 각각 독립적으로 4 내지 9 또는 4 내지 6의 정수이다.

[0881] 화학식 (I)의 상기 구현예 중 일부에서, R^6 은 H이다. 전술한 다른 구현예에서, R^6 은 C_1 - C_{24} 알킬이다. 또 다른 구현예에서, R^6 은 OH이다.

[0882] 화학식 (I)의 일부 구현예에서, G^3 은 치환되지 않는다. 다른 구체예에서, G^3 은 치환된다. 다양한 상이한 구체예에서, G^3 은 선형 C_1 - C_{24} 알킬렌 또는 선형 C_2 - C_{24} 알케닐렌이다.

[0883] 화학식 (I)의 일부 다른 상기 구현예에서, R^1 또는 R^2 , 또는 양자 모두는 C_6 - C_{24} 알케닐이다. 예를 들어, 일부 구현예에서, R^1 및 R^2 각각은 독립적으로 다음 구조를 갖는다:

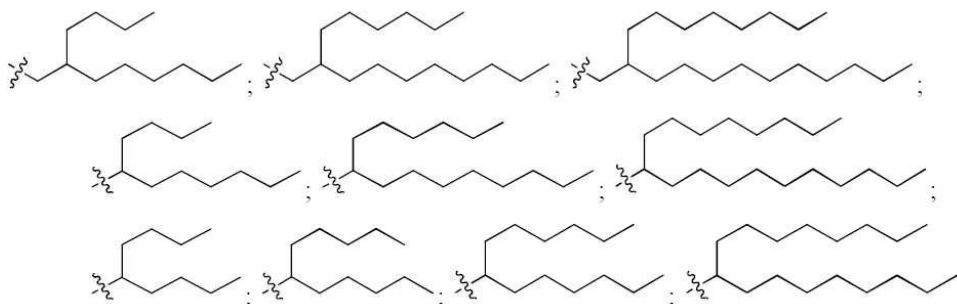


[0884] 식 중:
[0885] R^{7a} 및 R^{7b} 는 각 경우에 독립적으로 H 또는 C_1 - C_{12} 알킬이고; 그리고
[0886] a 는 2에서 12까지의 정수이며,

[0887] 여기서 R^{7a} , R^{7b} 및 a 는, R^1 및 R^2 가 각각 독립적으로 6 내지 20개의 탄소 원자를 포함하도록 선택된다. 예를 들어, 일부 구현예에서 a 는 5 내지 9 또는 8 내지 12 범위의 정수이다.

[0888] 화학식 (I)의 일부 다른 상기 구현예에서, R^{7a} 중 적어도 한 경우는 H이다. 예를 들어, 일부 구현예에서, R^{7a} 는 각각의 경우에 H이다. 전술한 것의 다른 상이한 구체예에서, R^{7b} 중 적어도 하나의 발생은 C_1 - C_8 알킬이다. 예를 들어, 일부 구현예에서, C_1 - C_8 알킬은 메틸, 에틸, n -프로필, 이소-프로필, n -부틸, 이소-부틸, $tert$ -부틸, n -헥실 또는 n -옥틸이다.

[0889] 화학식 (I)의 상이한 구현예에서, R^1 또는 R^2 , 또는 양자 모두는 하기 구조 중 하나를 갖는다:



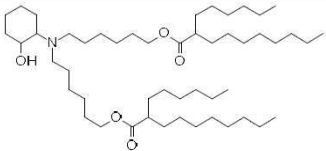
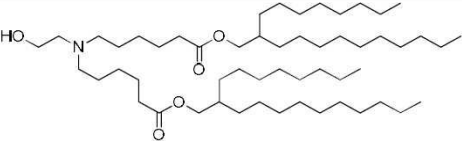
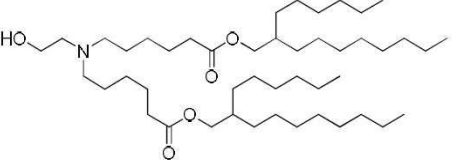
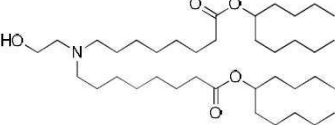
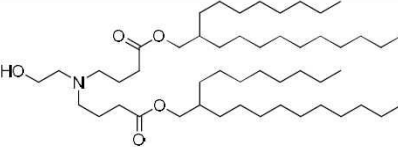
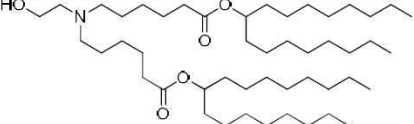
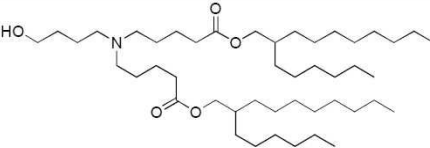
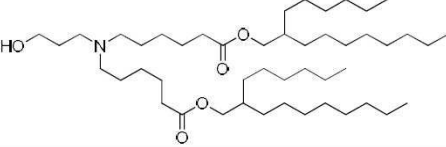
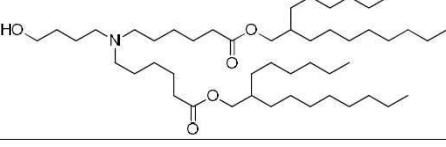
[0890] 화학식 (I)의 상기 구현예 중 일부에서, R^3 은 OH, CN, $-C(=O)OR^4$, $-OC(=O)R^4$ 또는 $-NHC(=O)R^4$ 이다. 일부 구현예에서, R^4 는 메틸 또는 에틸이다.

[0891] 다양한 상이한 구현예에서, 화학식 (I)의 양이온성 지질은 하기 제시된 구조 중 하나를 갖는다.

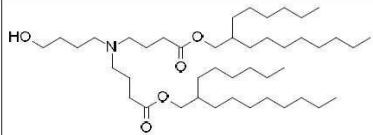
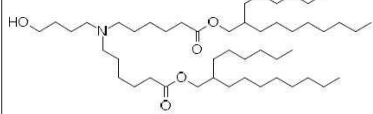
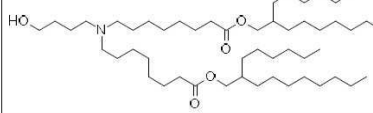
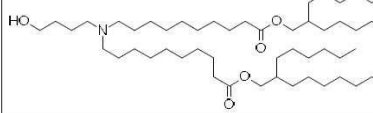
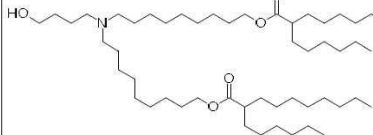
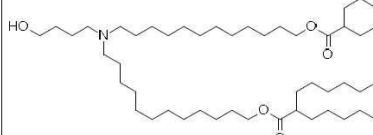
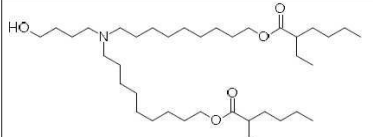
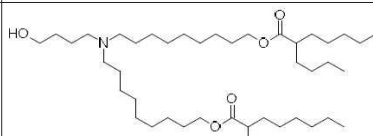
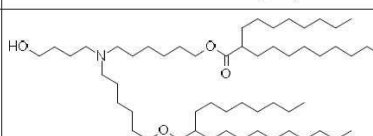
[0894] 화학식 (I)의 대표적인 화합물.

No.	구조
I-1	
I-2	
I-3	
I-4	
I-5	
I-6	
I-7	
I-8	

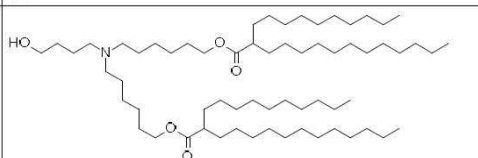
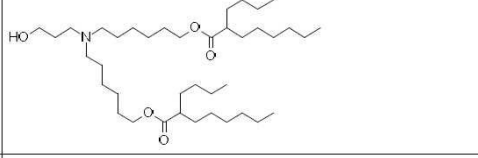
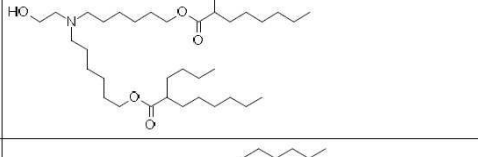
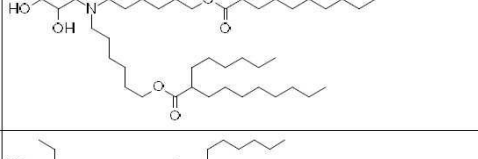
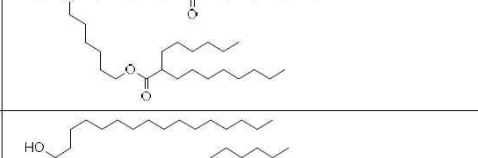
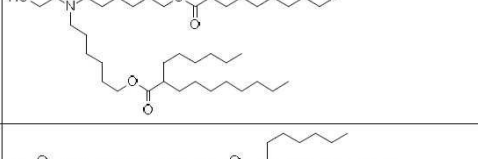
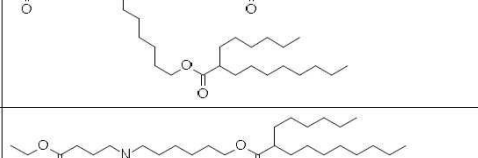
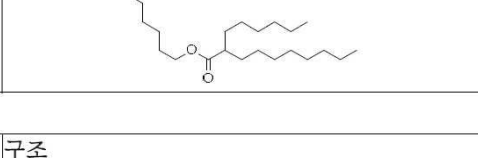
[0895]

No.	구조
I-9	
I-10	
I-11	
I-12	
I-13	
I-14	
I-15	
I-16	
I-17	

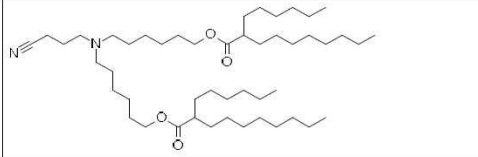
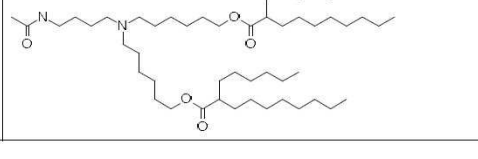
[0896]

No.	구조
I-18	
I-19	
I-20	
I-21	
I-22	
I-23	
I-24	
I-25	
I-26	

[0897]

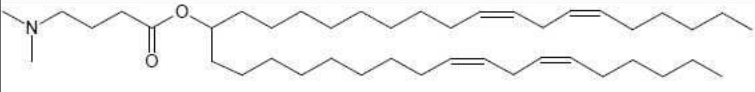
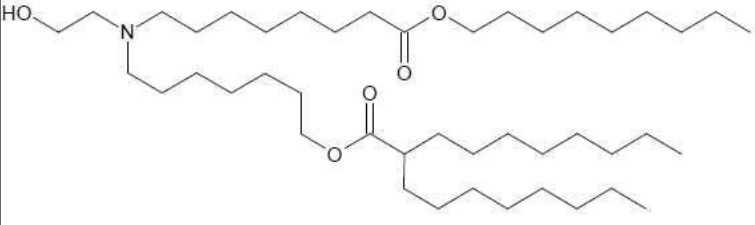
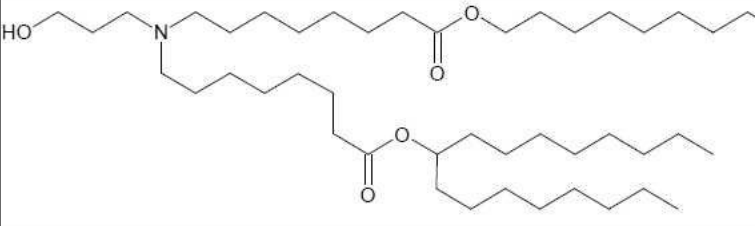
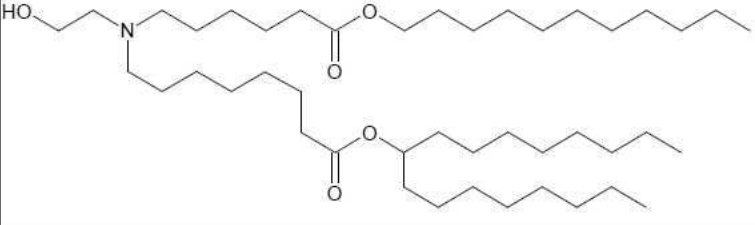
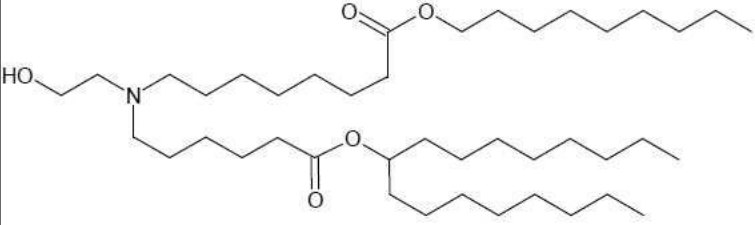
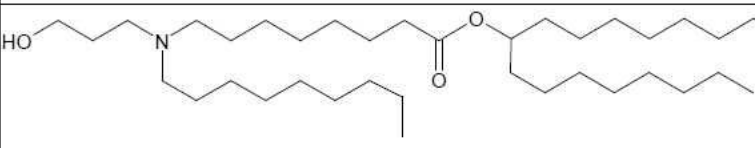
No.	구조
I-27	
I-28	
I-29	
I-30	
I-31	
I-32	
I-33	
I-34	

[0898]

No.	구조
I-35	
I-36	

[0899]

[0900] 다양한 상이한 구현예에서, 양이온적으로 이온화가능한 지질은 아래 표에 제시된 구조 중 하나를 갖는다.

No.	구조
A	
B	
C	
D	
E	
F	

[0901]

[0902] 다양한 상이한 구현예에서, 양이온적으로 이온화가능한 지질은 N,N-디메틸-2,3-디올레일옥시프로필아민(DODMA), 1,2-디올레오일-3-디메틸암모늄-프로판(DODAP), 헵타트리아콘타-6,9,28,31-테트라엔-19-일-4-(디메틸아미노)부타노에이트(DLin-MC3-DMA), 및 4-((디((9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디엔-1-일))아미노)옥시)-N,N-디메틸-4-옥소부탄-1-아민(DPL-14)로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0903]

양이온적으로 이온화가능한 지질의 추가 예로는 3-(N-(N',N'-디메틸아미노에탄)-카르바모일)콜레스테롤(DC-Chol), 1,2-디올레오일-3-디메틸암모늄-프로판(DODAP); 1,2-디아실옥시-3-디메틸암모늄 프로판; 1,2-디알킬옥시-3-디메틸암모늄 프로판, 1,2-디스테아릴옥시-N,N-디메틸-3-아미노프로판(DSDMA), 1,2-디리놀레일옥시-N,N-디메틸아미노프로판(DLinDMA), 1,2-디리놀레닐옥시-N,N-디메틸아미노프로판(DLenDMA), 디옥타데실아미도글리실 스퍼민(DOGS), 3-디메틸아미노-2-(콜레스트-5-엔-3-베타-옥시부탄-4-옥시)-1-(시스,시스-9,12-옥타데카디에녹시)프로판(CLinDMA), 2-[5'-(콜레스트-5-엔-3-베타-옥시)-3'-옥사펜톡시]-3-디메틸-1-(시스,시스-9',12'-옥타데카디엔옥시)프로판(CpLinDMA), N,N-디메틸-3,4-디올레일옥시벤질아민(DMOBA), 1,2-N,N'-디올레일카르바미-3-디메틸아미노프로판(DOcarbDAP), 2,3-디리놀레오일옥시-N,N-디메틸프로필아민(DLinDAP), 1,2-N,N'-디리놀레일카르바미-3-디메틸아미노프로판(DLincarbDAP), 1,2-디리놀레오일카르바미-3-디메틸아미노프로판(DLinCDAP), 2,2-디리

놀레일-4-디메틸아미노메틸-[1,3]-디옥솔란(DLin-K-DMA), 2,2-디리놀레일-4-디메틸아미노에틸-[1,3]-디옥솔란(DLin-K-XT2-DMA), 2,2-디리놀레일-4-(2-디메틸아미노에틸)-[1,3]-디옥솔란(DLin-KC2-DMA), 헵타트리아콘타-6,9,28,31-테트라엔-19-일-4-(디메틸아미노)부타노에이트(DLin-MC3-DMA), 2-({8-[(3 β)-콜레스트-5-엔-3-일옥시]옥틸}옥시)-N,N-디메틸-3-[(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디엔-1-일옥시]프로판-1-아민(옥틸-CLinDMA), 1,2-디미리스토일-3-디메틸암모늄-프로판(DMDAP), 1,2-디팔미토일-3-디메틸암모늄-프로판(DPDAP), N1-[2-((1S)-1-[(3-아미노프로필)아미노]-4-[디(3-아미노-프로필)아미노]부틸카르복사미도)에틸]-3,4-디[올레일옥시]-벤즈아미드(MVL5), 디((Z)-논-2-엔-1-일) 8,8'-(((2(디메틸아미노)에틸)티오)카르보닐)아잔디일)디옥타노에이트(ATX), N,N-디메틸-2,3-비스(도데실옥시)프로판-1-아민(DLDMA), N,N-디메틸-2,3-비스(테트라데실옥시)프로판-1-아민(DMDMA), 디((Z)-논-2-엔-1-일)-9-((4-(디메틸아미노부타노일)옥시)헵타데칸디오에이트(L319), N-도데실-3-((2-도데실카르바모일-에틸)-(2-[2-도데실카르바모일-에틸]-2-{(2-도데실카르바모일-에틸)-[2-(2-도데실카르바모일-에틸아미노)-에틸]-아미노)-에틸아미노)프로피온아미드(리피도이드 98N12-5), 1-[2-[비스(2-히드록시도데실)아미노]에틸]-[2-[4-[2-[비스(2-히드록시도데실)아미노]에틸]피페라진-1-일]에틸]아미노]도데칸-2-올(리피도이드 C12-200)을 들 수 있으나 이에 국한되지 않는다.

[0904] 바람직한 일 구현예에서, 양이온적으로 이온화가능한 지질은 구조 I-3을 갖는다.

[0905] 일부 구현예에서, 양이온적으로 이온화가능한 지질은 입자에 존재하는 전체 지질의 약 10 mol% 내지 약 100 mol%, 약 20 mol% 내지 약 100 mol%, 약 30 mol% 내지 약 100 mol%, 약 40 mol% 내지 약 100 mol%, 또는 약 50 mol% 내지 약 100 mol%를 포함할 수 있다.

[0906] 본원에 기술된 입자(특히 RNA LNP)가 양이온적으로 이온화가능한 지질 및 하나 이상의 추가 지질을 포함하는 일 구현예에서, 양이온적으로 이온화가능한 지질은 입자에 존재하는 총 지질의 약 10 mol% 내지 약 80 mol%, 약 20 mol% 내지 약 60 mol%, 약 25 mol% 내지 약 55 mol%, 약 30 mol% 내지 약 50 mol%, 약 35 mol% 내지 약 45 mol%, 또는 약 40 mol%를 포함한다.

[0907] 일 구현예에서, 본원에 기술된 입자(특히 RNA LNP)는 40 내지 55 mol 퍼센트, 40 내지 50 mol 퍼센트, 41 내지 49 mol 퍼센트, 41 내지 48 mol 퍼센트, 42 내지 48 mol 퍼센트, 43 내지 48 mol 퍼센트, 44 내지 48 mol 퍼센트, 45 내지 48 mol 퍼센트, 46 내지 48 mol 퍼센트, 47 내지 48 mol 퍼센트, 또는 47.2 내지 47.8 mol 퍼센트의 양이온적으로 이온화가능한 지질을 포함한다. 일 구현예에서, 입자(특히 RNA LNP)는 약 47.0, 47.1, 47.2, 47.3, 47.4, 47.5, 47.6, 47.7, 47.8, 47.9 또는 48.0 mol%의 양이온적으로 이온화가능한 지질을 포함한다.

[0908] 추가 지질

[0909] 본원에 기술된 입자(특히 RNA LNP)는 또한 양이온적으로 이온화가능한 지질 이외의 지질 또는 지질 유사 물질, 즉 비양이온성 지질 또는 지질 유사 물질(비양이온적으로 이온화가능한 지질 또는 지질 유사 물질 포함)을 포함할 수 있다. 집합적으로, 음이온성 및 중성 지질 또는 지질 유사 물질은 본 명세서에서 비양이온성 지질 또는 지질 유사 물질로 지칭된다. 양이온적으로 이온화가능한 지질 외에 콜레스테롤 및 지질과 같은 다른 소수성 부분을 첨가하여 핵산 입자의 제형을 최적화하면 입자 안정성 및 핵산 전달의 효능이 향상될 수 있다.

[0910] 용어 "지질" 및 "지질-유사 물질"은 본원에서 하나 이상의 소수성 모이어티 또는 그룹 및 선택적으로 또한 하나 이상의 친수성 모이어티 또는 그룹을 포함하는 분자로 광범위하게 정의된다. 소수성 모이어티 및 친수성 모이어티를 포함하는 분자는 또한 종종 양친매성으로 표시된다. 지질은 일반적으로 물에 잘 녹지 않는다. 수성 환경에서 양친매성 특성으로 인해 분자는 조직화된 구조와 다른 단계로 자가 조립할 수 있다. 이러한 단계 중 하나는 수성 환경에서 소포, 다층/ 단층 리포솜 또는 막에 존재하는 지질 이중층으로 구성된다. 소수성은 비제한적인 예로서, 장쇄 포화 및 불포화 지방족 탄화수소 그룹 및 하나 이상의 방향족, 지환족 또는 헤테로시클릭 기(들)에 의해 치환된 그룹을 포함하는, 비극성 그룹을 포함하는 것에 의해 부여될 수 있다. 친수성 기는 극성 및/또는 하전된 기를 포함할 수 있고 탄수화물, 포스페이트, 카르복실, 설페이트, 아미노, 설프히드릴, 니트로, 히드록실 및 기타 유사한 그룹을 포함할 수 있다.

[0911] 본원에서 사용되는 "양친매성"이라는 용어는 극성 부분과 비극성 부분을 모두 갖는 분자를 의미한다. 종종 양친매성 화합물은 긴 소수성 테일에 부착된 극성 헤드를 가지고 있다. 일부 구현예에서, 극성 부분은 물에 용해되는 반면, 비극성 부분은 물에 불용성이다. 또한, 극성 부분은 형식적인 양전하 또는 형식적인 음전하를 가질 수 있다. 대안적으로, 극성 부분은 공식적인 양전하 및 음전하를 모두 가질 수 있으며, 썬비터온 또는 내부 염일 수 있다. 본 발명의 목적상, 양친매성 화합물은 하나 또는 다수의 천연 또는 비천연 지질 및 지질 유사 화합물일 수 있지만, 이에 한정되지 않는다.

- [0912] "지질 유사 물질", "지질 유사 화합물" 또는 "지질 유사 분자"라는 용어는 구조적으로 및/또는 기능적으로 지질과 관련되지만 엄격한 의미에서 지질로 간주되지 않을 수 있는 물질에 관한 것이다. 예를 들어, 상기 용어는 수성 환경에서 소포, 다층/ 단일층 리포솜, 또는 막에 존재할 때 양친매성 층을 형성할 수 있는 화합물을 포함하고, 계면 활성제, 또는 친수성 부분과 소수성 부분을 모두 갖는 합성 화합물을 포함한다. 일반적으로 말하면, 이 용어는 지질과 유사하거나 유사하지 않을 수 있는 상이한 구조 조직을 갖는 친수성 및 소수성 부분을 포함하는 분자를 의미한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "지질"은 본원에서 달리 나타내거나 문맥에 의해 명백히 모순되지 않는 한 지질 및 지질 유사 물질을 모두 포함하는 것으로 해석되어야 한다.
- [0913] 양친매성 층에 포함될 수 있는 양친매성 화합물의 구체적인 예는 인지질, 아미노지질 및 스펡고지질을 포함하지만 이에 한정되지 않는다.
- [0914] 특정 구현예에서, 양친매성 화합물은 지질이다. "지질"이라는 용어는 물에 불용성이지만 많은 유기 용매에 용해되는 것을 특징으로 하는 유기 화합물 군을 의미한다. 일반적으로 지질은 지방산, 글리세로지질, 글리세로인지질, 스펡고지질, 사카로지질, 폴리케타이드(케토아실 소단위의 응축에서 유래), 스테롤 지질 및 프레놀 지질(이소프렌 소단위의 응축에서 유래)의 8가지 범주로 나눌 수 있다. "지질"이라는 용어는 때때로 지방의 동의어로 사용되지만 지방은 트리글리세라이드라고 하는 지질의 하위 그룹이다. 지질은 또한 지방산 및 이의 유도체(트리-, 디-, 모노글리세리드 및 인지질 포함)와 같은 분자뿐만 아니라 스테로이드, 즉 콜레스테롤 또는 이의 유도체와 같은 스테롤 함유 대사산물을 포함한다. 콜레스테롤 유도체의 비제한적인 예로는 콜레스타놀, 콜레스타논, 콜레스테논, 코프로스타놀, 콜레스테릴-2'-히드록시에틸 에테르, 콜레스테릴-4'-히드록시부틸 에테르, 토코페롤 및 이의 유도체, 및 이의 혼합물을 들 수 있다.
- [0915] 지방산 또는 지방산 잔기는 카르복실산 그룹으로 끝나는 탄화수소 사슬로 만들어진 다양한 분자 그룹이다. 이 배열은 분자에 극성, 친수성 말단 및 비극성, 물에 불용성인 소수성 말단을 부여한다. 일반적으로 4개에서 24개 사이의 탄소 길이를 갖는 탄소 사슬은 포화되거나 불포화될 수 있으며 산소, 할로젠, 질소 및 황을 포함하는 작용기에 부착될 수 있다. 지방산이 이중 결합을 포함하는 경우 분자의 구성에 상당한 영향을 미치는 시스 또는 트랜스 기하 이성질체의 가능성이 있다. 시스-이중 결합은 지방산 사슬을 구부러지게 하는데, 이는 사슬에 더 많은 이중 결합이 결합되는 효과이다. 지방산 범주의 다른 주요 지질 부류는 지방 에스테르 및 지방 아미드이다.
- [0916] 글리세로지질은 일치환, 이치환 및 삼치환 글리세롤로 구성되며, 가장 잘 알려진 것은 트리글리세라이드라고 하는 글리세롤의 지방산 트리아스테르이다. "트리아실글리세롤"이라는 단어는 때때로 "트리글리세라이드"와 동의어로 사용된다. 이러한 화합물에서 글리세롤의 3개의 히드록실 그룹은 각각 일반적으로 서로 다른 지방산에 의해 에스테르화된다. 글리세로지질의 추가 하위 부류는 글리코시드 결합을 통해 글리세롤에 부착된 하나 이상의 당 잔기의 존재를 특징으로 하는 글리코실글리세롤로 표시된다.
- [0917] 글리세로인지질은 에스테르 연결에 의해 두 개의 지방산 유래 "테일"과 인산 에스테르 연결에 의해 하나의 "헤드"그룹에 연결된 글리세롤 코어를 포함하는 양친매성 분자(소수성 및 친수성 영역 모두 포함)이다. 일반적으로 인지질이라고 하는 글리세로인지질(스펙고미엘린도 인지질로 분류됨)의 예로는 포스파티딜콜린(PC, GPCCho 또는 레시틴이라고도 함), 포스파티딜에탄올아민(PE 또는 GPEtn) 및 포스파티딜세린(PS 또는 GPSer)이 있다.
- [0918] 스펡고지질은 일반적인 구조적 특징인 스펡고이드 베이스 백본을 공유하는 복합 화합물 계열이다. 포유동물의 주요 스펡고이드 베이스는 일반적으로 스펡고신이라고 한다. 세라마이드(N-아실-스펙고이드 베이스)는 아미드 연결된 지방산을 가진 스펡고이드 염기 유도체의 주요 하위 부류이다. 지방산은 일반적으로 탄소수 16~26개의 사슬 길이를 가진 포화 또는 단일불포화 지방산이다. 포유류의 주요 포스포스펙고지질은 스펡고미엘린(세라마이드 포스포콜린)인 반면, 곤충은 주로 세라마이드 포스포에탄올아민을 함유하고 진균은 피토세라마이드 포스포이노시톨과 만노스 함유 헤드를 갖는다. 글리코스펙고지질은 글리코시드 결합을 통해 스펡고이드 염기에 연결된 하나 이상의 당 잔기로 구성된 다양한 분자 계열이다. 이들의 예는 세레브로시드 및 강글리오사이드와 같은 단순하고 복잡한 글리코스펙고지질이다.
- [0919] 콜레스테롤 및 그 유도체 또는 토코페롤 및 그 유도체와 같은 스테롤 지질은 글리세로인지질 및 스펡고미엘린과 함께 막 지질의 중요한 성분이다.
- [0920] 사카로지질(Saccharolipids)은 지방산이 당 백본에 직접 연결되어 막 이중층과 호환되는 구조를 형성하는 화합물을 설명한다. 사카로지질에서 당류는 글리세롤 지질과 글리세로인지질에 존재하는 글리세롤 백본을 대체한다. 가장 친숙한 사카로지질은 그람 음성 박테리아에서 리포다당류의 지질 A 성분의 아실화된 글루코사민 전구

체이다. 전형적인 지질 A 분자는 글루코사민의 이당류로, 7개나 되는 지방산 아실 사슬로 유도체화된다. 대장균에서 성장에 필요한 최소 리포다당류는 2개의 3-데옥시-D-만노-옥톨로손산(Kdo) 잔기로 글리코실화된 글루코사민의 헥사아실화 이당류인 Kdo2-지질 A이다.

- [0921] 폴리케타이드는 지방산 신타아제와 기계론적 특징을 공유하는 반복적인 다중모듈 효소뿐만 아니라 고전적 효소에 의한 아세틸 및 프로피오닐 서브유닛의 중합에 의해 합성된다. 이들은 동물, 식물, 박테리아, 곰팡이 및 해양 공급원의 많은 수의 이차 대사 산물 및 천연 산물로 구성되며 구조적 다양성이 크다. 많은 폴리케타이드는 백본이 종종 글리코실화, 메틸화, 히드록실화, 산화 또는 기타 과정에 의해 추가로 변형되는 환형 분자이다.
- [0922] 본 개시내용에 따르면, 지질 및 지질 유사 물질은 양이온성, 음이온성 또는 중성일 수 있다. 중성 지질 또는 지질 유사 물질은 선택된 pH에서 전하를 띠지 않거나 중성의 썬비터이온 형태로 존재한다.
- [0923] 양이온 지질 또는 양이온적으로 이온화가능한 지질 및 지질 유사 물질은 RNA에 정전기적으로 결합하는 데 사용될 수 있다. 양이온적으로 이온화가능한 지질 및 지질 유사 물질은 종기로는 산성 pH에서만 양전하를 띤 물질이다. 이러한 이온화가능한 거동은 생리학적 pH에서 양이온을 유지하는 입자와 비교하여 엔도솜 탈출을 돕고 독성을 감소시켜 효능을 향상시키는 것으로 생각된다. 입자는 또한 비양이온성 지질 또는 지질 유사 물질을 포함할 수 있다. 집합적으로, 음이온성 및 중성 지질 또는 지질 유사 물질은 본 명세서에서 비양이온성 지질 또는 지질 유사 물질로 지칭된다. 이온화가능한 지질/양이온성 지질 또는 지질 유사 물질에 더해, 콜레스테롤 및 지질과 같은 다른 소수성 모이어티를 추가하여 RNA 입자의 제형을 최적화하면 입자 안정성이 향상되고 RNA 전달의 효능이 크게 향상될 수 있다.
- [0924] 핵산 입자의 전체 전하에 영향을 미치거나 영향을 미치지 않을 수 있는 하나 이상의 추가 지질이 통합될 수 있다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 추가 지질은 비양이온성 지질 또는 지질 유사 물질이다. 비양이온성 지질은 예를 들어 하나 이상의 음이온성 지질 및/또는 중성 지질을 포함할 수 있다. 본원에서 사용되는 "음이온성 지질"은 선택된 pH에서 음전하를 띠는 임의의 지질을 의미한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "중성 지질"은 선택된 pH에서 전하를 띠지 않거나 중성 양쪽이온 형태로 존재하는 임의의 다수의 지질 종을 의미한다.
- [0925] 특정 구현예에서, 본원에 기술된 핵산 입자(특히 RNA LNP)는 양이온적으로 이온화가능한 지질 및 하나 이상의 추가 지질을 포함한다.
- [0926] 이론에 구애됨이 없이, 하나 이상의 추가 지질의 양과 비교하여 양이온적으로 이온화가능한 지질의 양은 중요한 핵산 입자 특성, 예를 들어 핵산의 전하, 입자 크기, 안정성, 조직 선택성 및 생물활성에 영향을 미칠 수 있다. 따라서, 일부 구현예에서, 양이온적으로 이온화가능한 지질 대 하나 이상의 추가 지질의 몰비는 약 10:0 내지 약 1:9, 약 4:1 내지 약 1:2, 또는 약 3:1 내지 약 1:1이다.
- [0927] 일 구현예에서, 본원에 기술된 핵산 입자(특히 RNA LNP)에 포함된 하나 이상의 추가 지질은 다음 중 하나 이상을 포함한다: 중성 지질, 스테로이드, 폴리머 공액 지질 및 이들의 조합.
- [0928] 일 구현예에서, 하나 이상의 추가 지질은 인지질인 중성 지질을 포함한다. 종기로는, 인지질은 포스파티딜콜린, 포스파티딜에탄올아민, 포스파티딜글리세롤, 포스파티드산, 포스파티딜세린 및 스핑고미엘린으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 사용될 수 있는 특정 인지질은 포스파티딜콜린, 포스파티딜에탄올아민, 포스파티딜글리세롤, 포스파티딘산, 포스파티딜세린 또는 스핑고미엘린을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 이러한 인지질은 특히
- [0929] 디아실포스파티딜콜린, 예컨대 디스테아로일포스파티딜콜린 (DSPC), 디올레오일포스파티딜콜린 (DOPC), 디미리스토일포스파티딜콜린 (DMPC), 디펜타데카노일포스파티딜콜린, 디라우로일 포스파티딜콜린, 디팔미토일 포스파티딜콜린 (DPPC), 디아라키도일 포스파티딜콜린 (DAPC), 디베헤노일 포스파티딜콜린 (DBPC), 디트리코사노일 포스파티딜콜린 (DTPC), 디리그노세로일파티딜콜린 (DLPC), 팔미토일올레오일-포스파티딜콜린 (POPC), 1,2-디-0-옥타데세닐-sn-글리세로-3-포스포콜린 (18:0 Diether PC), 1-올레오일-2-콜레스테릴헤미술시노일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (OChemSPC), 1-헥사데실-sn-글리세로-3-포스포콜린 (C16 Lyso PC) 및 포스파티딜에탄올아민, 특히 디아실포스파티딜에탄올아민, 예컨대 디올레오일포스파티딜에탄올아민 (DOPE), 디스테아로일-포스파티딜에탄올아민 (DSPE), 디팔미토일-포스파티딜에탄올아민 (DPPE), 디미리스토일-포스파티딜에탄올아민 (DMPE), 디라우로일-포스파티딜에탄올아민 (DLPE), 디피타노일-포스파티딜에탄올아민 (DPyPE), 1,2-디-(9Z-옥타데세노일)-sn-글리세로-3-포스포콜린 (DOPG), 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포-(1'-rac-글리세롤) (DPPG), 1-팔미토일-2-올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 (POPE), N-팔미토일-D-에리스로-스핑고실포스포틸콜린 (SM), 및 상이한 소수성 사슬을 갖는 추가 포스파티딜에탄올아민 지질을 포함한다. 일 구현예에서, 중성 지질은 DSPC, DOPC, DMPC, DPPC, POPC, DOPE, DOPG, DPPG, POPE, DPPE, DMPE, DSPE, 및 SM으로 이루어진 군으로부터 선택된

다. 일 구현예에서, 중성 지질은 DSPC, DPPC, DMPC, DOPC, POPC, DOPE 및 SM으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일 구현예에서, 중성 지질은 DSPC이다.

[0930] 따라서, 일 구현예에서, 본원에 기술된 핵산 입자(특히 RNA LNP)는 양이온적으로 이온화가능한 지질 및 DSPC를 포함한다.

[0931] 일 구현예에서, 중성 지질은 5 내지 15 mol%, 7 내지 13 mol%, 또는 9 내지 11 mol% 범위의 농도로 본원에 기술된 입자(특히 RNA LNP)에 존재한다. 일 구현예에서, 중성 지질은 본원에 기재된 입자(특히 RNA LNP)에 존재하는 총 지질의 약 9.5, 10 또는 10.5 몰%의 농도로 존재한다.

[0932] 일 구현예에서, 스테로이드는 콜레스테롤이다. 따라서, 일 구현예에서, 핵산 입자(특히 RNA LNP)는 양이온적으로 이온화가능한 지질 및 콜레스테롤을 포함한다.

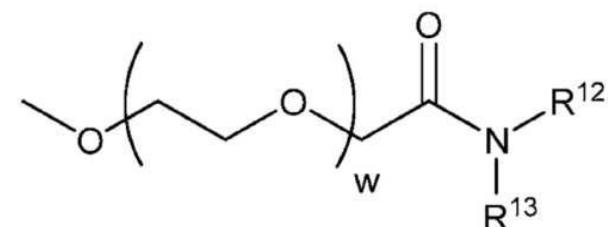
[0933] 일 구현예에서, 스테로이드는 30 내지 50 mol%, 35 내지 45 mol% 또는 38 내지 43 mol% 범위의 농도로 입자(특히 RNA LNP)에 존재한다. 일 구현예에서, 스테로이드는 본원에 기술된 입자(특히 RNA LNP)에 존재하는 총 지질의 약 40, 41, 42, 43, 44, 45 또는 46 몰%의 농도로 존재한다.

[0934] 바람직한 특정 구현예에서, 본원에 기술된 핵산 입자(특히 RNA LNP)는 DSPC 및 콜레스테롤을 종기로는 상기 주어진 농도로 포함한다.

[0935] 일부 구현예에서, 중성 지질(특히, 하나 이상의 인지질) 및 스테로이드(특히, 콜레스테롤)을 합한 농도는 본원에 기술된 핵산 입자(특히 RNA LNP)에 존재하는 총 지질의 약 0 mol% 내지 약 90 mol%, 약 0 mol% 내지 약 80 mol%, 약 0 mol% 내지 약 70 mol%, 약 0 mol% 내지 약 60 mol%, 또는 약 0 mol% 내지 약 50 mol%, 예컨대 약 20 mol% 내지 약 80 mol%, 약 25 mol% 내지 약 75 mol%, 약 30 mol% 내지 약 70 mol%, 약 35 mol% 내지 약 65 mol%, 또는 약 40 mol% 내지 약 60 mol%를 포함할 수 있다.

[0936] 일 구현예에서, 폴리머 공액 지질은 폐길화된 지질 또는 폴리사르코신-지질 공액체 또는 폴리사르코신과 지질 유사 물질의 공액체이다.

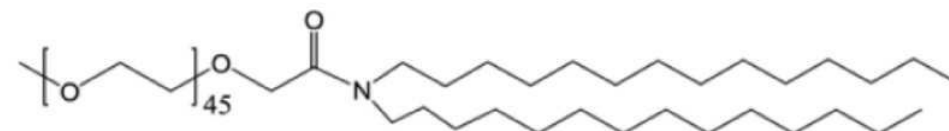
[0937] 용어 "폐길화 지질"은 지질 부분과 폴리에틸렌 글리콜 부분을 모두 포함하는 분자를 의미한다. 폐길화 지질은 당업계에 공지되어 있다. 일 구현예에서, 폴리머 공액 지질은 폐길화된 지질이다. 일 구현예에서, 폐길화된 지질은 하기 구조:



[0938]

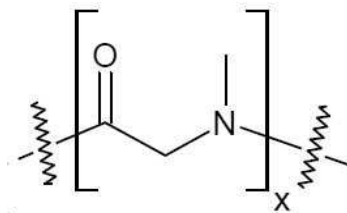
[0939] 를 갖거나 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염, 호변이성질체 또는 입체이성질체이며, 여기서 R^{12} 및 R^{13} 은 각각 독립적으로 10 내지 30개의 탄소 원자를 함유하는 직쇄 또는 분지쇄, 알킬 또는 알케닐 사슬이고, 여기서 알킬 또는 알케닐 사슬은 임의로 하나 이상의 에스테르 결합에 의해 중단되고; w 는 30 내지 60 범위의 평균값을 갖는다. 일 구현예에서, R^{12} 및 R^{13} 은 각각 독립적으로 12 내지 16개의 탄소 원자를 함유하는 직쇄, 포화 알킬 사슬이다. 일 구현예에서, w 는 40 내지 55 범위의 평균 값을 갖는다. 일 구현예에서, 평균 w 는 약 45이다. 일 구현예에서, R^{12} 및 R^{13} 은 각각 독립적으로 약 14개의 탄소 원자를 함유하는 직쇄형, 포화 알킬 사슬이고, w 의 평균 값은 약 45이다.

[0940] 일 구현예에서, 폐길화된 지질은 2-[(폴리에틸렌 글리콜)-2000]-N,N-디테트라데실아세트아미드/2-[2-(ω -메톡시(폴리에틸렌글리콜2000)에톡시)-N,N-디테트라데실아세트아미드로서, 예를 들어, 다음 구조를 갖는다:

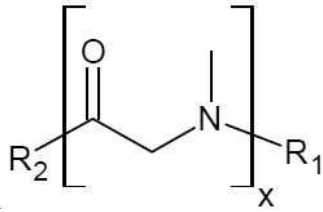


[0941]

- [0942] 일 구현예에서, 본원에 기술된 핵산 입자(특히 RNA LNP)는 양이온적으로 이온화가능한 지질 및 폐길화된 지질, 예를 들어 상기 정의된 바와 같은 폐길화된 지질을 포함한다.
- [0943] 일 구현예에서, 폐길화된 지질은 본원에 기술된 입자(특히 RNA LNP)에 존재하는 총 지질의 1 내지 10 mol%, 1 내지 5 mol%, 또는 1 내지 2.5 mol% 범위의 농도로 존재한다.
- [0944] 일 구현예에서, 폴리머 공액 지질은 폴리스아르코신-지질 공액체 또는 폴리스아르코신과 지질 유사 물질, 즉 폴리스아르코신(폴리(N- 메틸글리신))을 포함하는 지질 또는 지질 유사 물질의 공액체이다. 폴리스아르코신은 아세틸화(중성 말단기) 또는 다른 기능화된 말단기를 포함할 수 있다. RNA-지질 입자의 경우, 일 구현예에서 폴리스아르코신은 입자에 포함된 비양이온성 지질 또는 지질 유사 물질에 공액되고, 종기로는 공유 결합된다.
- [0945] 특정 구현예에서, 폴리스아르코신의 말단기는 양전하 또는 음전하와 같은 특정 특성을 부여하는 하나 이상의 분자 모이어티, 또는 입자를 특정 세포 유형, 세포 집합체, 또는 조직에 배향시키는 표적화제에 의해 관능화될 수 있다.
- [0946] 다양한 적합한 표적화제가 당업계에 공지되어 있다. 표적화제의 비제한적인 예로는 펩타이드, 단백질, 효소, 핵산, 지방산, 호르몬, 항체, 탄수화물, 단당류, 올리고당류 또는 다당류, 펩티도글리칸, 글리코펩타이드 등을 들 수 있다. 예를 들어, 표적 세포 표면의 항원에 결합하는 여러 가지 다른 물질을 사용할 수 있다. 표적 세포 표면 항원에 대한 항체는 일반적으로 표적에 대해 필요한 특이성을 나타낼 것이다. 항체에 더하여, Fab, Fab', F(ab')₂ 또는 scFv 단편 또는 단일-도메인 항체(예를 들어, 낙타류 VHH 단편)와 같은 적합한 면역반응성 단편 역시도 사용될 수 있다. 표적화 메커니즘을 형성하는데 사용하기에 적합한 많은 항체 단편이 당업계에서 이미 이용가능하다. 마찬가지로, 표적 세포의 표면 상의 임의의 수용체에 대한 리간드가 표적화제로 적합하게 사용될 수 있다. 여기에는 원하는 표적 세포의 표면에서 발견되는 세포 표면 수용체, 단백질 또는 당단백질에 특이적으로 결합하는 천연 또는 합성의 작은 분자 또는 생체 분자가 포함된다.
- [0947] 특정 구현예에서, 폴리스아르코신은 2 내지 200, 2 내지 190, 2 내지 180, 2 내지 170, 2 내지 160, 2 내지 150, 2 내지 140, 2 내지 130, 2 내지 120, 2 내지 110, 2 내지 100, 2 내지 90, 2 내지 80, 2 내지 70, 5 내지 200, 5 내지 190, 5 내지 180, 5 내지 170, 5 내지 160, 5 내지 150, 5 내지 140, 5 내지 130, 5 내지 120, 5 내지 110, 5 내지 100, 5 내지 90, 5 내지 80, 5 내지 70, 10 내지 200, 10 내지 190, 10 내지 180, 10 내지 170, 10 내지 160, 10 내지 150, 10 내지 140, 10 내지 130, 10 내지 120, 10 내지 110, 10 내지 100, 10 내지 90, 10 내지 80, 또는 10 내지 70개의 사르코신 단위를 포함한다.
- [0948] 특정 구체예에서, 폴리스아르코신은 하기 일반식(II)을 포함한다:



- [0949]
- [0950] 식 중 x는 사르코신 단위의 수를 나타낸다. 폴리스아르코신은 결합 중 하나를 통해 입자 형성 성분 또는 소수성 성분에 연결될 수 있다. 폴리스아르코신은 다른 결합을 통해 H, 친수성 기, 이온화 기 또는 표적 부분과 같은 기능 부분에 대한 링커에 연결될 수 있다.
- [0951] 폴리스아르코신은 지질 또는 지질 유사 물질과 같은 임의의 입자 형성 성분에 공액, 특히 공유 결합 또는 연결될 수 있다. 폴리스아르코신-지질 공액체는 폴리스아르코신이 양이온성 지질 또는 양이온적으로 이온화가능한 지질 또는 추가 지질과 같은 본원에 기술된 바와 같은 지질에 공액된 분자이다. 대안적으로, 폴리스아르코신은 양이온적으로 이온화가능한 지질 또는 하나 이상의 추가 지질과 상이한 지질 또는 지질 유사 물질에 공액된다.
- [0952] 특정 구현예에서, 폴리스아르코신-지질 공액체 또는 폴리스아르코신과 지질 유사 물질의 공액체는 하기 일반식(IIa)을 포함한다:



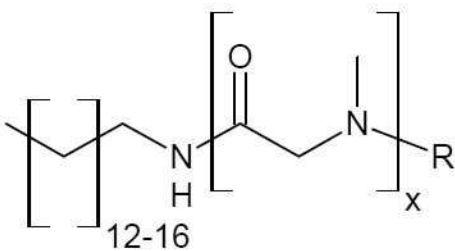
[0953]

[0954]

식 중 R_1 및 R_2 중 하나는 소수성 기를 포함하고 다른 하나는 H, 친수성 기, 이온화 기, 또는 선택적으로 표적 부분을 포함하는 작용기이다. 일 구현예에서, 소수성 기는 종기로는 10 내지 50, 10 내지 40, 또는 12 내지 20 개의 탄소 원자를 포함하는 선형 또는 분지형 알킬 기 또는 아릴 기를 포함한다. 일 구현예에서, 소수성 기를 포함하는 R_1 또는 R_2 는 하나 이상의 선형 또는 분지형 알킬 기에 연결된 헤테로원자, 특히 N과 같은 모이어티를 포함한다.

[0955]

특정 구현예에서, 폴리사르코신-지질 공액체 또는 폴리사르코신과 지질 유사 물질의 공액체는 하기 일반식 (IIb)를 포함한다:



[0956]

[0957]

식 중 R은 H, 친수성 기, 이온화 기 또는 선택적으로 표적 부분을 포함하는 작용기이다.

[0958]

일반식 (IIa) 및 (IIb)에서 기호 "x"는 사르코신 단위의 수를 나타내며 본원에서 정의된 바와 같은 수일 수 있다.

[0959]

특정 구현예에서, 폴리사르코신-지질 공액체 또는 폴리사르코신과 지질 유사 물질의 공액체는 폴리사르코신-디아실글리세롤 공액체, 폴리사르코신-디알킬옥시프로필 공액체, 폴리사르코신-인지질 공액체, 폴리사르코신-세라마이드 공액체 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 구성원이다.

[0960]

전형적으로, 폴리사르코신 모이어티는 2 내지 200, 5 내지 200, 5 내지 190, 5 내지 180, 5 내지 170, 5 내지 160, 5 내지 150, 5 내지 140, 5 내지 130, 5 내지 120, 5 내지 110, 5 내지 100, 5 내지 90, 5 내지 80, 10 내지 200, 10 내지 190, 10 내지 180, 10 내지 170, 10 내지 160, 10 내지 150, 10 내지 140, 10 내지 130, 10 내지 120, 10 내지 110, 10 내지 100, 10 내지 90, 또는 10 내지 80개의 사르코신 단위를 갖는다.

[0961]

따라서, 일 구현예에서, 본원에 기술된 핵산 입자(특히 RNA LNP)는 양이온적으로 이온화가능한 지질 및 폴리사르코신-지질 공액체 또는 폴리사르코신과 지질 유사 물질의 공액체, 예를 들어 폴리사르코신-지질 공액체 또는 상기 정의된 바와 같은 지질 유사 물질과 폴리사르코신의 공액체를 포함한다.

[0962]

특정 예에서, 폴리사르코신-지질 공액체는 본원에 기술된 핵산 입자(특히 RNA LNP)에 존재하는 총 지질의

[0963]

약 0.2 mol% 내지 약 50 mol%, 약 0.25 mol% 내지 약 30 mol%, 약 0.5 mol% 내지 약 25 mol%, 약 0.75 mol% 내지 약 25 mol%, 약 1 mol% 내지 약 25 mol%, 약 1 mol% 내지 약 20 mol%, 약 1 mol% 내지 약 15 mol%, 약 1 mol% 내지 약 10 mol%, 약 1 mol% 내지 약 5 mol%, 약 1.5 mol% 내지 약 25 mol%, 약 1.5 mol% 내지 약 20 mol%, 약 1.5 mol% 내지 약 15 mol%, 약 1.5 mol% 내지 약 10 mol%, 약 1.5 mol% 내지 약 5 mol%, 약 2 mol% 내지 약 25 mol%, 약 2 mol% 내지 약 20 mol%, 약 2 mol% 내지 약 15 mol%, 약 2 mol% 내지 약 10 mol%, 또는 약 2 mol% 내지 약 5 mol%를 포함할 수 있다.

[0964]

일부 구현예에서, 하나 이상의 추가 지질은 다음 성분 중 하나를 종기로는 각각 상기 주어진 농도로 포함한다: (1) 중성 지질; (2) 스테로이드; (3) 폴리머 공액 지질; (4) 중성 지질과 스테로이드의 혼합물; (5) 중성 지질과 고분자 공액 지질의 혼합물; (6) 스테로이드와 폴리머 공액 지질의 혼합물; 또는 (7) 중성 지질, 스테로이드 및 폴리머 공액 지질의 혼합물. 일부 구현예에서, 하나 이상의 추가 지질은 다음 성분 중 하나를, 종기로는 각각 상기 주어진 농도로 포함한다: (1) 인지질; (2) 콜레스테롤; (3) 폐길화된 지질; (4) 인지질과 콜레스테롤의

혼합물; (5) 인지질과 폐길화된 지질의 혼합물; (6) 콜레스테롤과 폐길화된 지질의 혼합물; 또는 (7) 인지질, 콜레스테롤 및 폐길화된 지질의 혼합물.

- [0965] 따라서, 바람직한 구현예에서, 본원에 기술된 핵산 입자(특히 RNA LNP)는 양이온적으로 이온화가능한 지질 및 다음 지질 또는 지질 혼합물 중 하나를, 종기로는 각각 상기 주어진 농도로 포함한다: (1) 중성 지질; (2) 스테로이드; (3) 폴리머 공액 지질; (4) 중성 지질과 스테로이드의 혼합물; (5) 중성 지질과 고분자 공액 지질의 혼합물; (6) 스테로이드와 폴리머 공액 지질의 혼합물; 또는 (7) 중성 지질, 스테로이드 및 폴리머 공액 지질의 혼합물. 하나의 특정 구현예에서, 양이온적으로 이온화가능한 지질은 40 내지 50 mol%의 농도로 존재하고; 중성 지질은 5 내지 15 mol%의 농도로 존재하며; 스테로이드는 35 내지 45 mol%의 농도로 존재하고; 폴리머 공액 지질은 1 내지 10 mol%의 농도로 존재하며, 여기서 RNA는 LNP 내에 캡슐화되거나 LNP와 회합된다.
- [0966] 보다 바람직한 구현예에서, 본원에 기술된 핵산 입자(특히 RNA LNP)는 양이온적으로 이온화가능한 지질 및 다음 지질 또는 지질 혼합물 중 하나를, 종기로는 각각 상기 주어진 농도로 포함한다: (1) 인지질; (2) 콜레스테롤; (3) 폐길화된 지질; (4) 인지질과 콜레스테롤의 혼합물; (5) 인지질과 폐길화된 지질의 혼합물; (6) 콜레스테롤과 폐길화된 지질의 혼합물; 또는 (7) 인지질, 콜레스테롤 및 폐길화된 지질의 혼합물. 하나의 특정 구현예에서, 양이온적으로 이온화가능한 지질은 40 내지 50 mol%의 농도로 존재하고; 인지질은 5 내지 15 mol%의 농도로 존재하며; 콜레스테롤은 35 내지 45 mol%의 농도로 존재하고; 폐길화된 지질은 1 내지 10 몰%의 농도로 존재하며, 여기서 RNA는 LNP 내에 캡슐화되거나 LNP와 회합된다.
- [0967] N/P 값은 종기로는 적어도 약 4이다. 일부 구현예에서, N/P 값은 4 내지 20, 4 내지 12, 4 내지 10, 4 내지 8, 또는 5 내지 7의 범위이다. 일 구현예에서, N/P 값은 약 6이다.
- [0968] 본 명세서에 기술된 LNP는 일 구현예에서 약 30 nm 내지 약 200 nm, 또는 약 60 nm 내지 약 120 nm 범위의 평균 직경을 가질 수 있다.
- [0969] 일반적으로, 본원에 기재된 RNA를 포함하는 LNP(또는 "RNA LNP")는 관심 표적 부위(예를 들어, 세포, 조직, 기관 등)에 RNA를 전달하는 데 사용될 수 있는 "RNA-지질 입자"이다. RNA-지질 입자는 전형적으로 양이온적으로 이온화가능한 지질(예컨대 구조 I-3을 갖는 지질) 및 하나 이상의 추가 지질, 예컨대 인지질(예컨대 DSPC), 스테로이드(예컨대 콜레스테롤 또는 이의 유사체)와 및 폴리머 공액 지질(예컨대, 폐길화된 지질 또는 폴리사르코신-지질 공액체 또는 폴리사르코신과 지질 유사 물질의 공액체)로부터 형성된다..
- [0970] 양이온적으로 이온화가능한 지질 및 하나 이상의 추가 지질은 RNA와 함께 결합하여 콜로이드적으로 안정한 입자를 형성하고, 여기서 핵산은 지질 매트릭스에 결합되는 것으로 여겨지지만, 특정 이론에 구애되는 것은 아니다.
- [0971] 일부 구현예에서, RNA-지질 입자는 하나 이상의 유형의 RNA 분자를 포함하며, 여기서 RNA 분자의 분자 매개변수는 분자 구조, 캡핑, 코딩 영역 또는 기타 속성과 같은 기본 구조 요소 또는 물 질량과 관련하여 서로 유사하거나 상이할 수 있다.
- [0972] 일부 구현예에서, RNA-지질 LNP(예컨대 mRNA-지질 LNP)는 RNA에 더하여 (i) 입자 내 존재하는 총 지질의 약 10 mol% 내지 약 80 mol%, 약 20 mol% 내지 약 60 mol%, 약 25 mol% 내지 약 55 mol%, 약 30 mol% 내지 약 50 mol%, 약 35 mol% 내지 약 45 mol%, 또는 약 40 mol%를 포함할 수 있는 양이온적으로 이온화가능한 지질, (ii) 입자 내 존재하는 총 지질의 약 0 mol% 내지 약 90 mol%, 약 20 mol% 내지 약 80 mol%, 약 25 mol% 내지 약 75 mol%, 약 30 mol% 내지 약 70 mol%, 약 35 mol% 내지 약 65 mol%, 또는 약 40 mol% 내지 약 60 mol%를 포함할 수 있는 중성 지질 및/또는 스테로이드(예컨대, 하나 이상의 인지질 및/또는 콜레스테롤), 및 (iii) 폴리머 공액 지질(예컨대, 입자 내 존재하는 총 지질의 1 mol% 내지 10 mol%, 1 mol% 내지 5 mol%, 또는 1 mol% 내지 2.5 mol%를 포함할 수 있는 폐길화 지질; 또는 입자 내 존재하는 총 지질의 약 0.2 mol% 내지 약 50 mol%, 약 0.25 mol% 내지 약 30 mol%, 약 0.5 mol% 내지 약 25 mol%, 약 0.75 mol% 내지 약 25 mol%, 약 1 mol% 내지 약 25 mol%, 약 1 mol% 내지 약 20 mol%, 약 1 mol% 내지 약 15 mol%, 약 1 mol% 내지 약 10 mol%, 약 1 mol% 내지 약 5 mol%, 약 1.5 mol% 내지 약 25 mol%, 약 1.5 mol% 내지 약 20 mol%, 약 1.5 mol% 내지 약 15 mol%, 약 1.5 mol% 내지 약 10 mol%, 약 1.5 mol% 내지 약 5 mol%, 약 2 mol% 내지 약 25 mol%, 약 2 mol% 내지 약 20 mol%, 약 2 mol% 내지 약 15 mol%, 또는 약 2 mol% 내지 약 5 mol%를 포함할 수 있는 폴리사르코신-지질 공액체)를 포함한다.
- [0973] 특정의 바람직한 구현예에서, 중성 지질은 입자에 존재하는 총 지질의 약 5 mol% 내지 약 50 mol%, 약 5 mol% 내지 약 45 mol%, 약 5 mol% 내지 약 40 mol%, 약 5 mol% 내지 약 35 mol%, 약 5 mol% 내지 약 30 mol%, 약 5 mol% 내지 약 25 mol%, 또는 약 5 mol% 내지 약 20 mol%의 인지질을 포함한다.

- [0974] 특정의 바람직한 구현예에서, 스테로이드는 입자에 존재하는 총 지질의 약 10 mol% 내지 약 80 mol%, 약 10 mol% 내지 약 70 mol%, 약 15 mol% 내지 약 65 mol%, 약 20 mol% 내지 약 60 mol%, 약 25 mol% 내지 약 55 mol%, 또는 약 30 mol% 내지 약 50 mol%의 콜레스테롤 또는 이의 유도체를 포함한다.
- [0975] 특정의 바람직한 구현예에서, 중성 지질 및 스테로이드는 (i) 입자에 존재하는 총 지질의 약 5 mol% 내지 약 50 mol%, 약 5 mol% 내지 약 45 mol%, 약 5 mol% 내지 약 40 mol%, 약 5 mol% 내지 약 35 mol%, 약 5 mol% 내지 약 30 mol%, 약 5 mol% 내지 약 25 mol%, 또는 약 5 mol% 내지 약 20 mol%의 DSPC와 같은 인지질; 및 (ii) 입자에 존재하는 총 지질의 약 10 mol% 내지 약 80 mol%, 약 10 mol% 내지 약 70 mol%, 약 15 mol% 내지 약 65 mol%, 약 20 mol% 내지 약 60 mol%, 약 25 mol% 내지 약 55 mol%, 또는 약 30 mol% 내지 약 50 mol%의 콜레스테롤과 같은 콜레스테롤 또는 그의 유도체의 혼합물을 포함한다. 비제한적 예로서, 인지질과 콜레스테롤의 혼합물을 포함하는 mRNA LNP는 입자에 존재하는 총 지질의 약 5 mol% 내지 약 50 mol%, 약 5 mol% 내지 약 45 mol%, 약 5 mol% 내지 약 40 mol%, 약 5 mol% 내지 약 35 mol%, 약 5 mol% 내지 약 30 mol%, 약 5 mol% 내지 약 25 mol%, 또는 약 5 mol% 내지 약 20 mol%의 DSPC 및 입자에 존재하는 총 지질의 약 10 mol% 내지 약 80 mol%, 약 10 mol% 내지 약 70 mol%, 약 15 mol% 내지 약 65 mol%, 약 20 mol% 내지 약 60 mol%, 약 25 mol% 내지 약 55 mol%, 또는 약 30 mol% 내지 약 50 mol%의 콜레스테롤을 포함할 수 있다.
- [0976] 일부 구현예에서, RNA-지질 입자는 RNA에 더하여 (i) 입자 내 존재하는 총 지질의 약 10 mol% 내지 약 80 mol%, 약 20 mol% 내지 약 60 mol%, 약 25 mol% 내지 약 55 mol%, 약 30 mol% 내지 약 50 mol%, 약 35 mol% 내지 약 45 mol%, 또는 약 40 mol%를 포함할 수 있는 양이온적으로 이온화가능한 지질(예컨대 구조 I-3을 갖는 지질), (ii) 입자 내 존재하는 총 지질의 약 5 mol% 내지 약 50 mol%, 약 5 mol% 내지 약 45 mol%, 약 5 mol% 내지 약 40 mol%, 약 5 mol% 내지 약 35 mol%, 약 5 mol% 내지 약 30 mol%, 약 5 mol% 내지 약 25 mol%, 또는 약 5 mol% 내지 약 20 mol%를 포함할 수 있는 DSPC, (iii) 입자 내 존재하는 총 지질의 약 10 mol% 내지 약 80 mol%, 약 10 mol% 내지 약 70 mol%, 약 15 mol% 내지 약 65 mol%, 약 20 mol% 내지 약 60 mol%, 약 25 mol% 내지 약 55 mol%, 또는 약 30 mol% 내지 약 50 mol%를 포함할 수 있는 콜레스테롤 및 (iv) 입자 내 존재하는 총 지질의 1 mol% 내지 10 mol%, 1 mol% 내지 5 mol%, 또는 1 mol% 내지 2.5 mol%를 포함할 수 있는 폐결화된 지질; 또는 (iv') 입자 내 존재하는 총 지질의 약 0.2 mol% 내지 약 50 mol%, 약 0.25 mol% 내지 약 30 mol%, 약 0.5 mol% 내지 약 25 mol%, 약 0.75 mol% 내지 약 25 mol%, 약 1 mol% 내지 약 25 mol%, 약 1 mol% 내지 약 20 mol%, 약 1 mol% 내지 약 15 mol%, 약 1 mol% 내지 약 10 mol%, 약 1 mol% 내지 약 5 mol%, 약 1.5 mol% 내지 약 25 mol%, 약 1.5 mol% 내지 약 20 mol%, 약 1.5 mol% 내지 약 15 mol%, 약 1.5 mol% 내지 약 10 mol%, 약 1.5 mol% 내지 약 5 mol%, 약 2 mol% 내지 약 25 mol%, 약 2 mol% 내지 약 20 mol%, 약 2 mol% 내지 약 15 mol%, 약 2 mol% 내지 약 10 mol%, 또는 약 2 mol% 내지 약 5 mol%의 폴리사르코신-지질 공액체를 포함한다.
- [0977] 본원에 개시된 RNA LNP는 일 구현예에서 약 30 nm 내지 약 1000 nm, 약 30 nm 내지 약 800 nm, 약 30 nm 내지 약 700 nm, 약 30 nm 내지 약 600 nm, 약 30 nm 내지 약 500 nm, 약 30 nm 내지 약 450 nm, 약 30 nm 내지 약 400 nm, 약 30 nm 내지 약 350 nm, 약 30 nm 내지 약 300 nm, 약 30 nm 내지 약 250 nm, 약 30 nm 내지 약 200 nm, 약 30 nm 내지 약 190 nm, 약 30 nm 내지 약 180 nm, 약 30 nm 내지 약 170 nm, 약 30 nm 내지 약 160 nm, 약 30 nm 내지 약 150 nm, 약 50 nm 내지 약 500 nm, 약 50 nm 내지 약 450 nm, 약 50 nm 내지 약 400 nm, 약 50 nm 내지 약 350 nm, 약 50 nm 내지 약 300 nm, 약 50 nm 내지 약 250 nm, 약 50 nm 내지 약 200 nm, 약 50 nm 내지 약 190 nm, 약 50 nm 내지 약 180 nm, 약 50 nm 내지 약 170 nm, 약 50 nm 내지 약 160 nm, 또는 약 50 nm 내지 약 150 nm 범위의 평균 직경을 갖는다.
- [0978] 특정 구현예에서, 본원에 기재된 RNA LNP는 약 40 nm 내지 약 800 nm, 약 50 nm 내지 약 700 nm, 약 60 nm 내지 약 600 nm, 약 70 nm 내지 약 500 nm, 약 80 nm 내지 약 400 nm, 약 150 nm 내지 약 800 nm, 약 150 nm 내지 약 700 nm, 약 150 nm 내지 약 600 nm, 약 200 nm 내지 약 600 nm, 약 200 nm 내지 약 500 nm, 또는 약 200 nm 내지 약 400 nm 범위의 평균 직경을 갖는다.
- [0979] 예를 들어, 본원에 기술된 방법에 의해 제조된, 본원에 기재된 RNA LNP는, 약 0.5 미만, 약 0.4 미만, 약 0.3 미만, 약 0.2 미만, 약 0.1 미만 또는 약 0.05 이하의 다분산 지수를 나타낸다. 예로서, RNA LNP는 약 0.05 내지 약 0.2, 예컨대 약 0.05 내지 약 0.1 범위의 다분산 지수를 나타낼 수 있다.
- [0980] 본 개시내용의 특정 구현예에서, 본원에 기술된 RNA LNP의 RNA는 약 2 mg/1 내지 약 5 g/1, 약 2 mg/1 내지 약 2 g/1, 약 5 mg/1 내지 약 2 g/1, 약 10 mg/1 내지 약 1 g/1, 약 50 mg/1 내지 약 0.5 g/1 또는 약 100 mg/1 내지 약 0.5 g/1의 농도이다. 특정 구현예에서, RNA는 약 5 mg/1 내지 약 150 mg/1, 약 0.005 mg/mL 내지 약 0.09 mg/mL, 약 0.005 mg/mL 내지 약 0.08 mg/mL, 약 0.005 mg/mL 내지 약 0.07 mg/mL, 약 0.005 mg/mL 내지

약 0.06 mg/mL, 또는 약 0.005 mg/mL 내지 약 0.05 mg/mL의 농도이다.

- [0981] RNA 입자를 포함하는 조성물/제형
- [0982] 본원에 기술된 조성물/제제는 RNA LNP, 종기로는 다수의 RNA LNP를 포함한다. 용어 "다수의 RNA LNP" 또는 "다수의 RNA-지질 입자"는 특정 개수의 입자 집단을 의미한다. 특정 구현예에서, 이 용어는 10 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} , 10^{14} , 10^{15} , 10^{16} , 10^{17} , 10^{18} , 10^{19} , 10^{20} , 10^{21} , 10^{22} 개, 또는 10^{23} 개 이상의 입자로 된 집단을 가리킨다.
- [0983] 일 구현예에서, 본원에 기재된 조성물/제제는 4000/ml 미만, 종기로는 최대 3500/ml, 예를 들어 최대 3400/ml, 최대 3300/ml, 최대 3200/ml, 최대 3100/ml 또는 최대 3000/ml의 양으로 $10\mu\text{m}$ 이상의 크기를 갖는 입자를 포함한다.
- [0984] 다수의 입자가 전술한 범위의 임의의 부분 또는 그 안의 임의의 범위를 포함할 수 있음이 당업자에게 명백할 것이다.
- [0985] 일부 구현예에서, 본 명세서에 기술된 조성물은 액체 또는 고체이며, 고체는 냉동된 형태를 말한다.
- [0986] 본 발명자들은 놀랍게도 LNP를 포함하는 조성물에서 PBS 대신에 Tris, 비스-Tris-메탄 또는 TEA, 특히 Tris에 기초한 버퍼액을 사용하는 것이 매우 안정한 집힌 형태의 RNA의 형성을 억제한다는 것을 발견하였다.
- [0987] 또한, 본 출원은 (i) 50 mM 농도의 버퍼 시스템 및 (ii) 양이온적으로 이온화가능한 지질 및 RNA를 포함하는 LNP를 포함하는 조성물을 냉동-해동 주기로 처리하는 것이 RNA 무결성의 상당한 손실을 야기하는 반면, 놀랍게도, 조성물 내의 버퍼 물질의 농도를 단순히 낮추는 것만으로도 냉동-해동 사이클 후, 개선된 RNA 무결성을 갖는 RNA LNP 조성물을 얻을 수 있음을 입증한다. 따라서, 청구된 조성물은 개선된 안정성을 제공하고, 약학 관행에서 정규 기술에 순응하는 온도 범위에서 보관될 수 있고, 즉시 사용가능한 제형을 제공한다.
- [0988] 또한, RNA LNP 조성물의 수성상에 특정 다가 음이온(특히 무기 포스페이트 음이온, 시트레이트 음이온 및 EDTA의 음이온, 및 선택적으로 무기 셀레이트 음이온, 카보네이트 음이온, 이염기성 유기산 음이온 및/또는 다염기성 유기산 음이온)이 존재하면, 놀랍게도 조성물이 냉동된 다음 해동시(즉, 조성물이 적어도 일회의 냉동-해동 주기를 거칠 때) 입자 크기의 증가가 초래될 수 있고, 본원에 개시된 바와 같은 Tris, 비스-Tris-메탄 또는 TEA에 기초한 버퍼를 포함하고 그 수성상에 그러한 2가 및/또는 다가 음이온이 실질적으로 없는 RNA 조성물은 입자 크기를 증가시키지 않고 냉동 및 해동될 수 있는 것으로 밝혀졌다.
- [0989] 따라서, 본 발명에 따르면, 본원에 기술된 조성물의 수성상은 실질적으로 무기 포스페이트 음이온이 없고, 시트레이트 음이온이 실질적으로 없으며, EDTA 음이온이 실질적으로 없고, 종기로는 셀레이트 음이온 및/또는 카보네이트 음이온 및/또는 이염기성 유기산 음이온 및/또는 다염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없다. 일 구현예에서, 본원에 기재된 조성물의 수성상은 종기로는 무기 포스페이트 음이온, 시트레이트 음이온, EDTA의 음이온, 무기 셀레이트 음이온, 카보네이트 음이온, 이염기성 유기산 음이온 및 다염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없다.
- [0990] "X가 실질적으로 없는"이라는 표현은 실질적으로 실현가능한 방식으로 혼합물(예를 들어, 본원에 기술된 조성물 또는 제형의 수성상)에 X가 없음을 의미한다. 예를 들어, 혼합물에 X가 실질적으로 없는 경우, 혼합물 중 X의 양은 혼합물의 총 중량에 기초하여, 1 중량% 미만(예를 들어, 0.5 중량% 미만, 0.4 중량% 미만, 0.3 중량% 미만, 0.2 중량% 미만, 0.1 중량% 미만, 0.09 중량% 미만, 0.08 중량% 미만, 0.07 중량% 미만, 0.06 중량% 미만, 0.05 중량% 미만, 0.04 중량% 미만, 0.03 중량% 미만, 0.02 중량% 미만, 0.01 중량% 미만, 0.005 중량% 미만, 0.001 중량% 미만)일 수 있다.
- [0991] 따라서, 본 명세서에 기술된 RNA LNP 조성물의 수성상에 무기 포스페이트 음이온이 실질적으로 없는 경우, RNA LNP 조성물의 수성상 중 무기 포스페이트 음이온의 양은 수성상의 총 중량을 기준으로, 1중량% 미만(예를 들어, 0.5 중량% 미만, 0.4 중량% 미만, 0.3 중량% 미만, 0.2 중량% 미만, 0.1 중량% 미만, 0.09 중량% 미만, 0.08 중량% 미만, 0.07 중량% 미만, 0.06 중량% 미만, 0.05 중량% 미만, 0.04 중량% 미만, 0.03 중량% 미만, 0.02 중량% 미만, 0.01 중량% 미만, 0.005 중량% 미만, 0.001 중량% 미만)인 것이 바람직하다.
- [0992] 본원에 기술된 RNA LNP 조성물의 수성상에 시트레이트 음이온이 실질적으로 없는 경우, RNA LNP 조성물의 수성상 중 시트레이트 음이온의 양은 수성상의 총 중량을 기준으로, 1 중량% 미만(예를 들어, 0.5 중량% 미만, 0.4 중량% 미만, 0.3 중량% 미만, 0.2 중량% 미만, 0.1 중량% 미만, 0.09 중량% 미만, 0.08 중량% 미만, 0.07 중량% 미만, 0.06 중량% 미만, 0.05 중량% 미만, 0.04 중량% 미만, 0.03 중량% 미만, 0.02 중량% 미만, 0.01 중량% 미만, 0.005 중량% 미만, 0.001 중량% 미만)인 것이 바람직하다.

% 미만, 0.06 중량% 미만, 0.05 중량% 미만, 0.04 중량% 미만, 0.03 중량% 미만, 0.02 중량% 미만, 0.01 중량% 미만, 0.005 미만 중량%, 0.001 중량% 미만)인 것이 바람직하다.

[0993] 본원에 기술된 RNA LNP 조성물의 수성상에 EDTA의 음이온이 실질적으로 없는 경우, RNA LNP 조성물의 수성상 중 EDTA의 음이온의 양은 수성상의 총 중량을 기준으로, 1중량% 미만(예를 들어, 0.5 중량% 미만, 0.4 중량% 미만, 0.3 중량% 미만, 0.2 중량% 미만, 0.1 중량% 미만, 0.09 중량% 미만, 0.08 중량% 미만, 0.07 중량% 미만, 0.06 중량% 미만, 0.05 중량% 미만, 0.04 중량% 미만, 0.03 중량% 미만, 0.02 중량% 미만, 0.01 중량% 미만, 0.005 미만 중량%, 0.001 중량% 미만)인 것이 바람직하다.

[0994] 본 명세서에 기술된 RNA LNP 조성물의 수성상에 무기 설페이트 음이온이 실질적으로 없는 경우, RNA LNP 조성물의 수성상 중 무기 설페이트 음이온의 양은 수성상의 총 중량을 기준으로, 1중량% 미만(예를 들어, 0.5 중량% 미만, 0.4 중량% 미만, 0.3 중량% 미만, 0.2 중량% 미만, 0.1 중량% 미만, 0.09 중량% 미만, 0.08 중량% 미만, 0.07 중량% 미만, 0.06 중량% 미만, 0.05 중량% 미만, 0.04 중량% 미만, 0.03 중량% 미만, 0.02 중량% 미만, 0.01 중량% 미만, 0.005 미만 중량%, 0.001 중량% 미만)인 것이 바람직하다.

[0995] 본 명세서에 기술된 RNA LNP 조성물의 수성상에 카보네이트 음이온이 실질적으로 없는 경우, RNA LNP 조성물의 수성상 중 카보네이트의 양은 수성상의 총 중량을 기준으로, 1중량% 미만(예를 들어, 0.5 중량% 미만, 0.4 중량% 미만, 0.3 중량% 미만, 0.2 중량% 미만, 0.1 중량% 미만, 0.09 중량% 미만, 0.08 중량% 미만, 0.07 중량% 미만, 0.06 중량% 미만, 0.05 중량% 미만, 0.04 중량% 미만, 0.03 중량% 미만, 0.02 중량% 미만, 0.01 중량% 미만, 0.005 미만 중량%, 0.001 중량% 미만)인 것이 바람직하다.

[0996] 본원에 기술된 RNA LNP 조성물의 수성상에 이염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없는 경우, RNA LNP 조성물의 수성상 중 이염기성 유기산 음이온의 양은 수성상의 총 중량을 기준으로, 1중량% 미만(예를 들어, 0.5 중량% 미만, 0.4 중량% 미만, 0.3 중량% 미만, 0.2 중량% 미만, 0.1 중량% 미만, 0.09 중량% 미만, 0.08 중량% 미만, 0.07 중량% 미만, 0.06 중량% 미만, 0.05 중량% 미만, 0.04 중량% 미만, 0.03 중량% 미만, 0.02 중량% 미만, 0.01 중량% 미만, 0.005 미만 중량%, 0.001 중량% 미만)인 것이 바람직하다.

[0997] 본원에 기술된 RNA LNP 조성물의 수성상에 다염기성 유기산 음이온이 실질적으로 없는 경우, RNA LNP 조성물의 수성상 중 다염기성 유기산 음이온의 양은 수성상의 총 중량을 기준으로, 1중량% 미만(예를 들어, 0.5 중량% 미만, 0.4 중량% 미만, 0.3 중량% 미만, 0.2 중량% 미만, 0.1 중량% 미만, 0.09 중량% 미만, 0.08 중량% 미만, 0.07 중량% 미만, 0.06 중량% 미만, 0.05 중량% 미만, 0.04 중량% 미만, 0.03 중량% 미만, 0.02 중량% 미만, 0.01 중량% 미만, 0.005 미만 중량%, 0.001 중량% 미만)인 것이 바람직하다.

[0998] 본원에서 사용되는 표현 "무기 포스페이트 음이온"은 무기 포스페이트 음이온을 함유하고 수성 매질에서 용해될 때 무기 포스페이트 음이온을 방출하는 임의의 화합물을 의미한다. 무기 포스페이트 음이온을 함유하고 수성 매질에서 용해될 때 무기 포스페이트 음이온을 방출하는 화합물의 예에는 인산 및 인산의 염, 인산의 공액체, 및 이러한 공액체의 염, 예컨대 디포스페이트, 트리포스페이트 등이 포함된다. 종기로는, "무기 포스페이트 음이온"이라는 표현은 인산과 하나 이상의 유기 알코올의 에스테르를 포함하지 않는다. 따라서, 종기로는 "무기 포스페이트 음이온"이라는 표현은 뉴클레오타이드, 올리고뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드를 포함하지 않는다.

[0999] "시트레이트 음이온"이라는 표현은 시트레이트 음이온을 함유하고 수성 매질에서 용해될 때 시트레이트 음이온을 방출하는 임의의 화합물을 의미한다. 시트레이트 음이온을 함유하고 수성 매질에서 용해될 때 시트레이트 음이온을 방출하는 화합물의 예는 시트르산 및 시트르산 염을 포함한다.

[1000] "EDTA의 음이온"이라는 표현은 EDTA의 음이온을 함유하고 수성 매질에서 용해될 때 EDTA의 음이온을 방출하는 임의의 화합물을 의미한다. EDTA의 음이온을 함유하고 수성 매질에 용해될 때 음이온을 방출하는 화합물의 예에는 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA) 및 EDTA의 염이 포함된다.

[1001] "무기 설페이트 음이온"이라는 표현은 무기 설페이트 음이온을 함유하고 수성 매질에 용해될 때 무기 설페이트 음이온을 방출하는 임의의 화합물을 의미한다. 무기 설페이트 음이온을 함유하고 수성 매질에 용해될 때 무기 설페이트 음이온을 방출 하는 화합물의 예로는 황산 및 설페이트가 있다. 종기로는, "무기 설페이트 음이온"이라는 표현은 황산과 하나 이상의 유기 알코올의 에스테르를 포함하지 않는다.

[1002] "카보네이트 음이온"이라는 표현은 카보네이트 음이온(즉, HCO_3^- 및 CO_3^{2-})을 함유하고 수성 매질에서 용해될 때 카보네이트 음이온을 방출하는 임의의 화합물을 의미한다. 카보네이트 음이온을 함유하고 수성 매질에서 용해될

때 카보네이트 음이온을 방출하는 화합물의 예는 이산화탄소 및 카보네이트의 수용액을 포함한다. 종기로는, "카보네이트 음이온"이라는 표현은 하나 이상의 유기 알코올과의 카보네이트 에스테르를 포함하지 않는다.

- [1003] "이염기성 유기산 음이온"이라는 표현은 유리 형태(즉, 양성자화), 무수물 형태 또는 염 형태인 2개의 산기를 함유하는 임의의 유기 화합물을 의미한다. 이와 관련하여 "산기"라는 용어는 카르복실산 또는 황산기를 의미한다. 종기로는, "이염기성 유기산"이라는 표현은 카르복실기 또는 설페이트기와 하나 이상의 유기 알코올의 에스테르를 포함하지 않는다. 이염기성 유기산의 예는 옥살산, 말산 및 타르타르산을 포함한다.
- [1004] "다염기성 유기산 음이온"이라는 표현은 유리 형태(즉, 양성자화), 무수물 형태 또는 염 형태인 3개 이상의 산기를 함유하는 임의의 유기 화합물을 의미한다. 이와 관련하여 "산기"라는 용어는 카르복실산 또는 황산기를 의미한다. 종기로는, "다염기성 유기산"이라는 표현은 카르복실기 또는 설페이트기와 하나 이상의 유기 알코올의 에스테르를 포함하지 않는다. 다염기성 유기산의 한 예는 시트르산을 포함한다.
- [1005] 입자(예컨대 LNP)의 크기($Z_{\text{평균}}$)와 관련하여 본원에서 사용되는 "동일하다"는 표현은 가공 단계 후(예를 들어, 냉동/해동 사이클 후) 조성물에 함유된 입자의 $Z_{\text{평균}}$ 값이 가공 단계 전(예를 들어, 냉동/해동 사이클 전) 입자의 $Z_{\text{평균}}$ 값 $\pm 30\%$ (종기로는 $\pm 25\%$, 더 종기로는 $\pm 24\%$, 예컨대 $\pm 20\%$, $\pm 15\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$ 또는 $\pm 1\%$)에 해당함을 의미한다. 예를 들어, 아직 냉동/해동 사이클을 거치지 않은 조성물에 함유된 입자(예컨대 LNP)의 크기($Z_{\text{평균}}$) 값이 90 nm이고, 냉동/해동 사이클을 거친 조성물에 함유된 입자의 크기($Z_{\text{평균}}$)이 115 nm이면, 냉동/해동 사이클 후, 즉 냉동된 조성물의 해동 후 입자의 크기($Z_{\text{평균}}$)는 냉동/해동 사이클 전, 즉 조성물의 냉동 전 입자의 크기($Z_{\text{평균}}$)와 동일한 것으로 간주된다. 입자(예컨대 LNP)의 크기 분포 또는 PDI와 관련하여 본원에서 사용되는 "~와 동일(equal to)"이라는 표현은 그에 따라 해석되어야 한다. 예를 들어, 아직 냉동/해동 사이클을 거치지 않은 조성물에 함유된 입자(예컨대 LNP)의 PDI 값이 0.30이고 냉동/해동 사이클을 거친 조성물에 함유된 입자(예컨대 LNP)의 PDI 값이 0.38인 경우, 냉동/해동 사이클 후, 즉 냉동된 조성물을 해동한 후 입자의 PDI는 냉동/해동 사이클 전, 즉 조성물을 냉동하기 전 입자의 PDI와 동일한 것으로 간주된다.
- [1006] 본원에 기술된 조성물은 또한 제품 품질의 실질적인 손실, 특히 예를 들어 응집, 입자 붕괴, RNA 분해 및/또는 다른 유형의 손상을 감소시키거나 방지하기 위해 보관 및/또는 냉동 동안 RNA 활성의 실질적인 손실을 피하기 위해 안정화제로서 동결방지제 및/또는 계면활성제를 포함할 수 있다.
- [1007] 일 구현예에서, 동결방지제는 탄수화물이다. 본원에서 사용되는 용어 "탄수화물"은 단당류, 이당류, 삼당류, 올리고당류 및 다당류를 지칭하고 포함한다.
- [1008] 일 구현예에서, 동결방지제는 단당류이다. 본원에서 사용되는 용어 "단당류"는 더 간단한 탄수화물 단위로 가수분해될 수 없는 단일 탄수화물 단위(예를 들어, 단순당)를 의미한다. 예시적인 단당류 동결방지제는 글루코스, 프럭토스, 갈락토스, 자일로스, 리보스 등을 포함한다.
- [1009] 일 구현예에서, 동결방지제는 이당류이다. 본원에 사용된 용어 "이당류"는 글리코시드 결합, 예를 들어 1-4 연결 또는 1-6 연결을 통해 함께 결합된 2개의 단당류 단위에 의해 형성된 화합물 또는 화학적 부분을 의미한다. 이당류는 두 개의 단당류로 가수분해될 수 있다. 예시적인 이당류 동결방지제는 수크로스, 트레할로즈, 락토즈, 말토즈 등을 포함한다.
- [1010] 용어 "삼당류"는 하나의 분자를 형성하기 위해 함께 연결된 3개의 당을 의미한다. 삼당류의 예는 라피노스 및 멜레지토스를 포함한다.
- [1011] 일 구현예에서, 동결방지제는 올리고당류이다. 본원에 사용된 용어 "올리고당류"는 선형, 분지형 또는 환형 구조를 형성하도록, 글리코시드 결합, 예를 들어 1-4 또는 1-6 연결을 통해 함께 결합된 3 내지 약 15개, 종기로는 3 내지 약 10개의 단당류 단위에 의해 형성된 화합물 또는 화학적 모이어티를 지칭한다. 예시적인 올리고당 동결방지제는 시클로덱스트린, 라피노스, 멜레지토스, 말토티리오스, 스타키오스, 아카보스 등을 포함한다. 올리고당은 산화되거나 환원될 수 있다.
- [1012] 일 구현예에서, 동결방지제는 환형 올리고당류이다. 본원에 사용된 용어 "환형 올리고당"은 시클릭 구조를 형성하기 위해, 글리코시드 결합, 예를 들어 1-4 연결 또는 1-6 연결을 통해 함께 결합된 3 내지 약 15개, 종기로는 6, 7, 8, 9 또는 10개의 단당류 단위에 의해 형성된 화합물 또는 화학적 모이어티를 지칭한다. 예시적인 환형 올리고당류 동결방지제는 α 시클로덱스트린, β 시클로덱스트린 또는 γ 시클로덱스트린과 같은 이산

(discrete) 화합물인 환형 올리고당류를 포함한다.

- [1013] 다른 예시적인 환형 올리고당 동결방지제는 더 큰 분자 구조에 시클로텍스트린 부분을 포함하는 화합물, 예를 들어 환형 올리고당 모이어티를 함유하는 폴리머를 포함한다. 환형 올리고당은 산화되거나 환원될 수 있으며, 예를 들어 디카르보닐 형태로 산화될 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "시클로텍스트린 모이어티"는 폴리머와 같은 더 큰 분자 구조에 통합되거나 그 일부인 시클로텍스트린(예를 들어, α , β 또는 γ 시클로텍스트린)과 디칼을 의미한다. 시클로텍스트린 모이어티는 하나 이상의 다른 모이어티에 직접 또는 선택적인 링커를 통해 결합될 수 있다. 시클로텍스트린 모이어티는 예를 들어 디카르보닐 형태로 산화되는 것과 같이 산화되거나 환원될 수 있다.
- [1014] 탄수화물 동결방지제, 예를 들어 환형 올리고당류 동결방지제는 유도체화된 탄수화물일 수 있다. 예를 들어, 일 구현예에서, 동결방지제는 유도체화된 환형 올리고당류, 예를 들어 유도체화된 시클로텍스트린, 예를 들어 2-히드록시프로필- β -시클로텍스트린, 예를 들어 부분 에테르화된 시클로텍스트린(예를 들어 부분 에테르화된 β 시클로텍스트린)이다.
- [1015] 예시적인 동결방지제는 다당류이다. 본원에 사용된 용어 "다당류"는 선형, 분지형 또는 환형 구조 형성을 위해, 글리코시드 연결을 통해, 예를 들어 1-4 연결 또는 1-6 연결을 통해 함께 결합되어 형성된 화합물 또는 화학적 모이어티를 가리키며, 백본 구조의 일부로 다당류를 포함하는 폴리머를 포함한다. 백본에서 다당류는 선형 또는 환형일 수 있다. 예시적인 다당류 동결방지제는 글리코젠, 아밀라제, 셀룰로스, 텍스트란, 말토텍스트린 등을 포함한다.
- [1016] 일 구현예에서, 동결방지제는 당 알코올이다. 본원에서 사용되는 용어 "당 알코올"은 2개 이상의 탄소 원자 및 각 탄소 원자에 부착된 1개의 히드록실기를 함유하는 유기 화합물을 의미한다. 전형적으로, 당 알코올은 당으로부터 유도되고(예를 들어, 당의 수소화에 의해) 수용성 고체이다. 본원에서 사용되는 "당"이라는 용어는 단맛이 나는 가용성 탄수화물을 의미한다. 당 알코올의 예는 에틸렌 글리콜, 글리세롤, 에리트리톨, 트라이톨, 아라비톨, 자일리톨, 리비톨, 만니톨, 소르비톨, 갈락티톨, 푸시톨, 이디톨, 이노시톨, 볼레미톨, 이소말트, 말티톨, 락티톨, 말토트리톨, 말토테트라이트 및 폴리글리시톨을 포함한다. 일 구현예에서, 당 알코올은 화학식 $\text{HOCH}_2(\text{CHOH})_n\text{CH}_2\text{OH}$ 를 갖거나, (여기서 n 은 0 내지 22(예를 들어, 0, 1, 2, 3 또는 4)임), 또는 그의 환형 변이체(이는 공식적으로 당 알코올의 탈수에 의해 유도되어 환형 에테르를 생성한다(예컨대 이소소르비드는 소르비톨의 환형 탈수 변종임))이다.
- [1017] 일 구현예에서, 동결방지제는 글리세롤 및/또는 소르비톨이다.
- [1018] 일 구현예에서, RNA LNP 조성물은 동결방지제로서 수크로스를 포함할 수 있다. 수크로스는 조성물의 동결방지를 촉진하여 핵산(특히 RNA) 입자 응집을 방지하고 조성물의 화학적 및 물리적 안정성을 유지하는 기능을 한다. 특정 구현예는 본 개시내용에서 수크로스의 대안적인 동결방지제를 고려한다. 대체 안정화제는 글루코스, 글리세롤 및 소르비톨을 포함하나 이에 한정되지 않는다.
- [1019] 바람직한 동결방지제는 수크로스, 글루코스, 글리세롤, 소르비톨 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 바람직한 구현예에서, 동결방지제는 수크로스 및/또는 글리세롤을 포함한다. 더 바람직한 구현예에서, 동결방지제는 수크로스이다.
- [1020] 일 구현예에서, 본원에 기술된 RNA LNP 조성물은 적어도 1% w/v, 예컨대 적어도 2% w/v, 적어도 3% w/v, 적어도 4% w/v, 적어도 5% w/v, 적어도 6% w/v, 적어도 7% w/v, 적어도 8% w/v 또는 적어도 9% w/v의 농도로 동결방지제를 포함한다. 일 구현예에서, 조성물 중의 동결방지제의 농도는 최대 25% w/v, 예를 들어 최대 20% w/v, 최대 19% w/v, 최대 18% w/v, 최대 17% w/v, 최대 16% w/v, 최대 15% w/v, 최대 14% w/v, 최대 13% w/v, 최대 12% w/v 또는 최대 11% w/v이다. 일 구현예에서, 조성물 중 동결방지제의 농도는 1% w/v 내지 20% w/v, 예컨대 2% w/v 내지 19% w/v, 3% w/v 내지 18% w/v, 4% w/v 내지 17% w/v, 5% w/v 내지 16% w/v, 5% w/v 내지 15% w/v, 6% w/v 내지 14% w/v, 7% w/v 내지 13% w/v, 8% w/v 내지 12% w/v, 9% w/v 내지 11% w/v, 또는 약 10% w/v이다. 일 구현예에서, 본원에 기술된 RNA LNP 조성물은 동결방지제(특히 수크로스 및/또는 글리세롤)을 5% w/v 내지 15% w/v, 예컨대 6% w/v 내지 14% w/v, 7% w/v 내지 13% w/v, 8% w/v 내지 12% w/v, 또는 9% w/v 내지 11% w/v의 (총) 농도, 또는 약 10% w/v의 농도로 포함한다.
- [1021] 종기로는, 본원에 기술된 RNA LNP 조성물은 조성물 총 중량에 기초하여, 조성물의 삼투질 농도를 약 50×10^{-3} osmol/kg 내지 약 1 osmol/kg (예컨대 약 100×10^{-3} osmol/kg 내지 약 900×10^{-3} osmol/kg, 약 120×10^{-3}

osmol/kg 내지 약 800×10^{-3} osmol/kg, 약 140×10^{-3} osmol/kg 내지 약 700×10^{-3} osmol/kg, 약 160×10^{-3} osmol/kg 내지 약 600×10^{-3} osmol/kg, 약 180×10^{-3} osmol/kg 내지 약 500×10^{-3} osmol/kg, 또는 약 200×10^{-3} osmol/kg 내지 약 400×10^{-3} osmol/kg), for example, 약 50×10^{-3} osmol/kg 내지 약 400×10^{-3} osmol/kg (예컨대 약 50×10^{-3} osmol/kg 내지 약 390×10^{-3} osmol/kg, 약 60×10^{-3} osmol/kg 내지 약 380×10^{-3} osmol/kg, 약 70×10^{-3} osmol/kg 내지 약 370×10^{-3} osmol/kg, 약 80×10^{-3} osmol/kg 내지 약 360×10^{-3} osmol/kg, 약 90×10^{-3} osmol/kg 내지 약 350×10^{-3} osmol/kg, 약 100×10^{-3} osmol/kg 내지 약 340×10^{-3} osmol/kg, 약 120×10^{-3} osmol/kg 내지 약 330×10^{-3} osmol/kg, 약 140×10^{-3} osmol/kg 내지 약 320×10^{-3} osmol/kg, 약 160×10^{-3} osmol/kg 내지 약 310×10^{-3} osmol/kg, 약 180×10^{-3} osmol/kg 내지 약 300×10^{-3} osmol/kg, 또는 약 200×10^{-3} osmol/kg 내지 약 300×10^{-3} osmol/kg)로 결과시키는 농도로 동결방지제를 포함한다.

[1022] 바람직한 일 구현예에서, RNA LNP 조성물/제제는 좋기로는 본원에 명시된 양/농도로 동결방지제로서 수크로스 및 버퍼 물질로서 Tris를 포함한다.

[1023] 하나의 대안적인 바람직한 구현예에서, RNA LNP 조성물/제형은 동결방지제가 실질적으로 없으며, 예를 들어 이들은 어떠한 동결방지제도 함유하지 않는다.

[1024] 본 개시내용의 특정 구현예는 본원에 기술된 RNA LNP 조성물/제제에서 킬레이트제의 사용을 고려한다. 킬레이트제는 금속 이온과 적어도 2개의 배위 공유 결합을 형성할 수 있는 화학적 화합물을 말하며, 이로써 안정한 수용성 복합체를 생성한다. 이론에 구애됨이 없이, 킬레이트제는 자유 2가 이온의 농도를 감소시키며, 그렇지 않으면 본 개시내용에서 가속화된 RNA 분해를 유도할 수 있다. 적합한 킬레이트제의 예로는 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA), EDTA의 염, 데스페리옥사민 B, 테페록사민, 디티오카르바트륨, 페니실라민, 펜테테이트 칼슘, 펜테트산의 나트륨염, 석시머, 트리엔틴, 니트릴로트리아세트산, 트랜스-디아미노시클로헥산테트라아세트산(DCTA), 디에틸렌트리아민펜타아세트산(DTPA) 및 비스(아미노에틸) 글리콜에테르-N,N',N'-테트라아세트산을 들 수 있으나 이에 한정되지 않는다. 특정 구현예에서, 킬레이트제는 EDTA 또는 EDTA의 염이다. 예시적인 구현예에서, 킬레이트제는 EDTA 이나트륨 이수화물이다. 일부 구현예에서, EDTA는 약 0.05 mM 내지 약 5 mM, 약 0.1 mM 내지 약 2.5 mM 또는 약 0.25 mM 내지 약 1 mM의 농도이다.

[1025] 바람직한 대안적 구현예에서, 본원에 기재된 RNA LNP 조성물/제형의 수성상은 킬레이트제를 포함하지 않는다. 예를 들어, 본원에 기재된 RNA LNP 조성물/제형이 킬레이트제를 포함하는 경우, 상기 킬레이트제는 LNP에만 존재하는 것이 바람직하다.

[1026] 약제학적 조성물

[1027] 본원에 기술된 RNA LNP 조성물은 치료적 또는 예방적 치료를 위한 약제학적 조성물 또는 약제로서 또는 제조에 유용하다.

[1028] 본원에 기술된 RNA LNP는 임의의 적합한 약제학적 조성물의 형태로 투여될 수 있다.

[1029] 용어 "약제학적 조성물"은 좋기로는 약제학적으로 허용되는 담체, 희석제 및/또는 부형제와 함께 치료 유효 제제를 포함하는 조성물에 관한 것이다. 상기 약제학적 조성물은 대상체에게 상기 약제학적 조성물을 투여함으로써 질병 또는 장애의 중증도를 치료, 예방 또는 감소시키는데 유용하다. 본 발명의 맥락에서, 약제학적 조성물은 본원에 기재된 바와 같은 RNA LNP를 포함한다.

[1030] 본 발명의 약제학적 조성물은 하나 이상의 아쥬반트를 포함할 수 있거나 하나 이상의 아쥬반트와 함께 투여될 수 있다. 용어 "아쥬반트"는 면역 반응을 연장, 강화 또는 가속화하는 화합물에 관한 것이다. 아쥬반트는 오일 에멀전(예컨대 프로인트 아쥬반트), 미네랄 화합물(예컨대 백일해 독소), 박테리아 생성물(예컨대 보르데텔라 퍼투시스 독소) 또는 면역 자극 복합체와 같은 이질적인 그룹의 화합물을 포함한다. 아쥬반트의 예로는 LPS, GP96, CpG 올리고데옥시뉴클레오타이드, 성장 인자, 및 사이토카인, 예컨대 모노카인, 림포카인, 인터루킨, 케모카인을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 케모카인은 IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, INF- α , INF- γ , GM-CSF, LT- α 일 수 있다. 추가로 공지된 아쥬반트는 수산화 알루미늄, 프로인트 아쥬반트 또는 Montanide® ISA51과 같은 오일이다. 본 개시내용에 사용하기 위한 다른 적합한 아쥬반트는 Pam3Cys와 같은 리포펩타이드 뿐만 아니라 친유성 성분, 예컨대 사포닌, 트레할로스-6,6-디베헤네이트(TDB), 모

노포스포릴 지질-A(MPL), 모노마이콜로일 글리세롤(MMG), 또는 글루코피라노실 지질 아쥬반트(GLA)를 포함한다.

- [1031] 본 발명의 약제학적 조성물은 냉동된 형태 또는 "즉시 사용가능한 형태"(예컨대 해동, 재조성 또는 희석 등의 어떠한 가공도 없이, 대상체에게 즉시 투여될 수 있는, 특히 액체 형태)일 수 있다. 따라서, 보관 가능한 형태의 약제학적 조성물을 투여하기 전에, 이 보관 가능한 형태는 즉시 사용가능한 형태 또는 투여 가능한 형태로 처리되거나 전달되어야 한다. 예를 들어, 냉동된 약제학적 조성물은 해동되어야 한다. 즉시 사용가능한 주사제는 바이알, 앰플 또는 주사기와 같은 용기에 담겨 제공될 수 있으며 용기에는 하나 이상의 용량이 포함될 수 있다.
- [1032] 일 구현예에서, 약제학적 조성물은 냉동된 형태이고 약 -90°C 이상, 예를 들어 약 -90°C 내지 약 -10°C 의 온도에서 보관될 수 있다. 예를 들어, 본원에 기술된 냉동된 약제학적 조성물(예컨대, 제2, 제3 또는 제6 태양의 방법에 의해 제조된 냉동 조성물, 또는 제5, 제8, 제9 또는 제10 태양의 냉동 조성물)은 약 -90°C 내지 약 -10°C , 예컨대 약 -90.5°C 내지 약 -40°C 또는 약 -40°C 내지 약 -25°C , 또는 약 -25°C 내지 약 -10°C 의 온도 범위 약 -10°C 또는 약 -20°C 의 온도에서 보관될 수 있다.
- [1033] 냉동 형태의 약제학적 조성물의 일 구현예에서, 약제학적 조성물은 적어도 1주, 예컨대 적어도 2주, 적어도 3주, 적어도 4주, 적어도 1개월, 적어도 2개월 동안 보관될 수 있다. 적어도 3개월, 적어도 6개월, 적어도 12개월, 적어도 24개월, 또는 적어도 36개월, 종기로는 적어도 4주 동안 보관될 수 있다. 예를 들어, 냉동된 약제학적 조성물은 20°C 에서 4주 이상, 종기로는 1개월 이상, 더욱 종기로는 2개월 이상, 더욱 종기로는 3개월 이상, 더욱 종기로는 6개월 이상 동안 보관될 수 있다.
- [1034] 냉동 형태의 약제학적 조성물의 일 구현예에서, 냉동된 약제학적 조성물을 해동한 후, 예를 들어, -20°C 에서 보관된 냉동 조성물을 해동한 후 RNA 무결성은 적어도 50%, 예를 들어 적어도 52%, 적어도 54%, 적어도 55%, 적어도 56%, 적어도 58% 또는 적어도 60%이다.
- [1035] 냉동 형태의 약제학적 조성물의 일 구현예에서, 냉동된 약제학적 조성물을 해동한 후 LNP의 크기($Z_{\text{평균}}$) 및/또는 크기 분포 및/또는 PDI는 냉동 전 LNP의 크기($Z_{\text{평균}}$) 및/또는 크기 분포 및/또는 PDI와 동일하다. 예를 들어, 즉시 사용가능한 약제학적 조성물이 본원에 기술된 냉동된 약제학적 조성물로부터 제조되는 경우, 즉시 사용가능한 약제학적 조성물에 함유된 LNP의 크기($Z_{\text{평균}}$) 및/또는 크기 분포 및/또는 PDI는, 냉동 전 냉동된 약제학적 조성물에 함유된 LNP의 크기($Z_{\text{평균}}$) 및/또는 크기 분포 및/또는 PDI와 동일한 것이 바람직하다(예를 들어 제2 태양의 방법의 (I) 단계에서 제조된 제형 중에 함유된 것과 같은).
- [1036] 일 구현예에서, 약제학적 조성물은 액체 형태이고 약 0°C 내지 약 20°C 범위의 온도에서 보관될 수 있다. 예를 들어, 본원에 기술된 액체 약제학적 조성물(예를 들어, 제2, 제4 또는 제7 태양의 방법에 의해 제조된 액체 조성물, 또는 제5, 제8, 제9 또는 제10 태양의 액체 조성물)은 약 1°C 내지 약 15°C 범위, 예컨대 약 2°C 내지 약 10°C , 또는 약 2°C 내지 약 8°C , 또는 약 5°C 의 온도에서 보관될 수 있다.
- [1037] 액체 형태의 약제학적 조성물의 일 구현예에서, 약제학적 조성물은 적어도 1주, 예컨대 적어도 2주, 적어도 3주, 적어도 4주, 적어도 1개월, 적어도 2개월, 적어도 3개월 또는 적어도 6개월, 종기로는 적어도 4주 동안 보관될 수 있다. 예를 들어, 액체 약제학적 조성물은 5°C 에서 적어도 4주, 종기로는 적어도 1개월, 더욱 종기로는 적어도 2개월, 더욱 종기로는 적어도 3개월, 더욱 종기로는 적어도 6개월 동안 보관될 수 있다.
- [1038] 액체 형태의 약제학적 조성물의 일 구현예에서, 액체 조성물의 RNA 무결성은 예를 들어 적어도 1주 동안 0°C 이상에서 보관될 때 원하는 효과, 예를 들어 면역 반응을 유도하기에 충분하다. 예를 들어, 액체 조성물의 RNA 무결성은, 예를 들어, 적어도 1주 동안 0°C 이상에서 보관될 때, 초기 조성물의 RNA 무결성, 즉 조성물이 보관되기 전의 RNA 무결성과 비교하여 적어도 50%, 예컨대 적어도 52%, 적어도 54%, 적어도 55%, 적어도 56%, 적어도 58% 또는 적어도 60%일 수 있다.
- [1039] 액체 형태의 약제학적 조성물의 태양의 일 구현예에서, 예를 들어, 적어도 1주 동안 0°C 이상에서 보관시, 약제학적 조성물의 LNP의 크기($Z_{\text{평균}}$)(및/또는 크기 분포 및/또는 다분산 지수(PDI))는, 원하는 효과를 생성하는데, 예를 들어, 면역 반응을 유도하는데 충분하다. 예를 들어, 적어도 1주 동안 0°C 이상에서 보관시, 약제학적 조성물의 LNP의 크기($Z_{\text{평균}}$)(및/또는 크기 분포 및/또는 다분산 지수(PDI))는, 초기 조성물, 즉 보관 전 LNP의 크기($Z_{\text{평균}}$)(및/또는 크기 분포 및/또는 PDI)와 동일하다. 일 구현예에서, 예를 들어 0°C 이상에서 적어도 1주 동안 약제학적 조성물의 보관 후, LNP의 크기($Z_{\text{평균}}$)는 약 50 nm 내지 약 500 nm, 종기로는 약 40 nm 내지 약 200 nm,

더욱 좋기로는 약 40 nm 및 약 120 nm이다. 일 구현예에서, 예를 들어 0℃ 이상에서 적어도 1주 동안 약제학적 조성물의 보관 후, LNP의 PDI는 0.3 미만, 좋기로는 0.2 미만, 더욱 좋기로는 0.1 미만이다. 일 구현예에서, 예를 들어 적어도 1주 동안 0℃ 이상에서 약제학적 조성물의 보관 후 LNP의 크기($Z_{평균}$)는 약 50 nm 내지 약 500 nm, 좋기로는 약 40 nm 내지 약 200 nm, 더욱 좋기로는 약 40 nm 및 약 120 nm이고, 예를 들어 적어도 1주 동안 0℃ 이상에서 약제학적 조성물의 보관 후, LNP의 크기($Z_{평균}$) (및/또는 크기 분포 및/또는 PDI)는 보관 전 LNP의 크기($Z_{평균}$) (및/또는 크기 분포 및/또는 PDI)와 동일하다. 일 구현예에서, 예를 들어 적어도 1주 동안 0℃ 이상에서 약제학적 조성물의 보관 후 LNP의 크기($Z_{평균}$)는 약 50 nm 내지 약 500 nm, 좋기로는 약 40 nm 내지 약 200 nm, 더욱 좋기로는 약 40 nm 및 약 120 nm이고, 예를 들어 적어도 1주 동안 0℃ 이상에서 약제학적 조성물의 보관 후, LNP의 PDI는 0.3 미만(좋기로는 0.2 미만, 더 좋기로는 0.1 미만)이다.

[1040] 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 일반적으로 "약제학적 유효량" 및 "약제학적으로 허용되는 제제"로 적용된다.

[1041] 용어 "약제학적으로 허용되는"은 약제학적 조성물의 활성 성분의 작용과 상호작용하지 않는 물질의 무독성을 의미한다.

[1042] 용어 "약제학적 유효량"은 단독으로 또는 추가 용량과 함께 원하는 반응 또는 원하는 효과를 달성하는 양을 의미한다. 특정 질병을 치료하는 경우, 원하는 반응은 좋기로는 질병 경과의 억제와 관련된다. 이는 질병의 진행을 늦추는 것, 특히 질병의 진행을 방해하거나 역전시키는 것을 포함한다. 질병의 치료에서 원하는 반응은 또한 상기 질병 또는 상기 상태의 개시의 지연 또는 예방일 수 있다. 본원에 기재된 입자 또는 약제학적 조성물의 유효량은 치료될 상태, 질병의 중증도, 연령, 생리학적 상태, 크기 및 체중, 치료 기간, 유형을 포함하는 환자의 개별 매개변수에 따라 달라질 것이다. 수반되는 요법(존재하는 경우), 특정 투여 경로 및 유사한 요인. 따라서, 본원에 기술된 입자 또는 약제학적 조성물의 투여 용량은 이러한 다양한 매개변수에 따라 달라질 수 있다. 환자의 반응이 초기 용량으로 불충분한 경우, 더 높은 용량(또는 더 국소화된 상이한 투여 경로에 의해 달성된 사실상 더 높은 용량)이 사용될 수 있다.

[1043] 특정 구현예에서, 본 개시내용의 약제학적 조성물 (예를 들어, 면역원성 조성물, 즉, 면역 반응을 유도하기 위해 사용될 수 있는 약제학적 조성물)은 용기, 예를 들어, 바이알에 일회 용량으로서 제형화된다. 일부 구현예에서, 면역원성 조성물은 바이알에서 다회 용량 제형으로서 제형화된다. 일부 구현예에서, 다회 용량 제형은 바이알당 적어도 2회 용량을 포함한다. 일부 구현예에서, 다회 용량 제형은 바이알당 총 2-20회 용량, 예를 들어 바이알당 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12회 용량을 포함한다. 바이알. 일부 구현예에서, 바이알의 각 용량은 부피가 동일하다. 일부 구현예에서, 1차 용량은 후속 용량과 부피가 상이하다.

[1044] "안정한" 다회 용량 제형은 좋기로는 허용할 수 없는 수준의 미생물 성장을 나타내지 않으며, 활성 생물학적 분자 성분(들)의 분해 또는 분해가 실질적으로 없거나 전혀 없다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "안정한" 면역원성 조성물은 대상체에게 투여될 때 원하는 면역학적 반응을 유도할 수 있는 제형을 포함한다.

[1045] 본 발명의 약제학적 조성물은 버퍼(특히, 약제학적 조성물이 제조된 RNA LNP 조성물/제제로부터 유도됨), 보존제, 및 선택적으로 다른 치료제를 함유할 수 있다. 일 구현예에서, 본 개시내용의 약제학적 조성물, 특히 즉시 사용가능한 약제학적 조성물은 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 담체, 희석제 및/또는 부형제를 포함한다.

[1046] 본 발명의 약제학적 조성물에 사용하기에 적합한 방부제는 벤잘코늄 클로라이드, 클로로부탄올, 파라벤 및 티메로살을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[1047] 본 명세서에서 용어 "부형제"는 본 발명의 약제학적 조성물에 존재할 수 있지만 활성 성분은 아닌 물질을 의미한다. 부형제의 예는 담체, 결합제, 희석제, 윤활제, 증점제, 표면 활성제, 방부제, 안정제, 유화제, 버퍼, 향미제 또는 착색제를 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[1048] "약제학적으로 허용되는 염"은 예를 들어 염산, 아세트산, 락트산, 2-(N-모폴리노)에탄설포산(MES), 3-(N-모폴리노)프로판설포산(MOPS), 2-[4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-일]에탄설포산(HEPES) 또는 벤조산과 같은 약제학적으로 허용되는 산을 사용하여 형성될 수 있는 산부가염을 포함한다. 또한, 적합한 약제학적으로 허용되는 염은 알칼리 금속 염(예를 들어, 나트륨 또는 칼륨 염); 알칼리 토금속 염(예를 들어, 칼슘 또는 마그네슘 염); 암모늄(NH_4^+); 및 적합한 유기 리간드(예를 들어, 4차 암모늄 및 아민 양이온)로 형성된 염을 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용되는 염의 예시적인 예는 선행 기술에서 찾을 수 있다; 예를 들어, SM Berge et al.,

"Pharmaceutical Salts", J. Pharm. Sci., 66, pp. 1-19(1977)). 약제학적으로 허용되지 않는 염은 약제학적으로 허용되는 염의 제조에 사용될 수 있으며 본 발명에 포함된다.

[1049] "회석제"라는 용어는 회석제 및/또는 회석제에 관한 것이다. 또한, "회석제"라는 용어는 유체, 액체 또는 고체 현탁액 및/또는 혼합 매질 중 임의의 하나 이상을 포함한다. 적합한 회석제의 예는 에탄올 및 물을 포함한다.

[1050] 용어 "담체"는 약제학적 조성물의 투여를 용이하게 하거나, 향상시키거나 가능하게 하기 위해 활성 성분과 조합되는 천연, 합성, 유기, 무기일 수 있는 성분을 지칭한다. 본원에서 사용되는 담체는 대상체에 투여하기에 적합한 하나 이상의 상용성 고체 또는 액체 충전제, 회석제 또는 캡슐화 물질일 수 있다. 적합한 담체는 멸균수, 링거, 링거 락테이트, 멸균 염화나트륨 용액, 등장 식염수, 폴리알킬렌 글리콜, 수소화 나프탈렌 및 특히 생체적합성 락타이드 폴리머, 락타이드/글리콜라이드 코폴리머 또는 폴리옥시에틸렌/폴리 옥시-프로필렌 코폴리머를 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[1051] 치료용으로 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 회석제는 약학 분야에 잘 알려져 있으며, 예를 들어 Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co.(A. R Gennaro edit. 1985)에 설명되어 있다.

[1052] 약제학적 담체, 부형제 또는 회석제는 의도된 투여 경로 및 표준 약제학적 관행에 따라 선택될 수 있다.

[1053] 약제학적 조성물의 투여 경로

[1054] 일 구현예에서, 즉시 사용가능한 약제학적 조성물과 같은 본원에 기재된 조성물은 정맥내, 동맥내, 피하, 피내, 진피, 결절내, 근육내 또는 종양내로 투여될 수 있다. 특정 구현예에서, (약제학적) 조성물은 국소 투여 또는 전신 투여용으로 제형화된다. 전신 투여는 위장관을 통한 흡수를 수반하는 장관 투여 또는 비경구 투여를 포함할 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "비경구 투여"는 정맥 주사와 같이 위장관을 통하는 것 이외의 임의의 방식으로 투여하는 것을 의미한다. 바람직한 구현예에서, (약제학적) 조성물, 특히 즉시 사용가능한 약제학적 조성물은 전신 투여용으로 제형화된다. 다른 바람직한 구현예에서, 전신 투여는 정맥내 투여에 의한 것이다. 또 다른 바람직한 구현예에서, (약제학적) 조성물, 특히 즉시 사용가능한 약제학적 조성물은 근육내 투여용으로 제형화된다.

[1055] 약제학적 조성물의 용도

[1056] 본원에 기술된 RNA 입자는 다양한 질병, 특히 펩타이드 또는 단백질을 대상체에게 제공하면 치료 또는 예방 효과가 나타나는 질병의 치료 또는 예방 치료에 사용될 수 있다. 예를 들어, 바이러스로부터 유래된 항원 또는 에피토프의 제공은 상기 바이러스에 의해 야기된 바이러스성 질환의 치료 또는 예방에 유용할 수 있다. 종양 항원 또는 에피토프의 제공은 암 세포가 상기 종양 항원을 발현하는 암 질환의 치료에 유용할 수 있다. 기능성 단백질 또는 효소의 제공은 예를 들어 리소좀 축적 질환(예컨대 뮤코다당증) 또는 인자 결핍에서 기능 장애 단백질을 특징으로 하는 유전적 장애의 치료에 유용할 수 있다. 사이토카인 또는 사이토카인-융합물의 제공은 종양 미세환경을 조절하는데 유용할 수 있다.

[1057] 용어 "질병"(본원에서"장애"라고도 함)은 개인의 신체에 영향을 미치는 비정상적인 상태를 의미한다. 질병은 종종 특정 증상 및 징후와 관련된 의학적 상태로 해석된다. 질병은 전염병과 같은 원래 외부 요인에 의해 발생하거나 자가 면역 질환과 같은 내부 기능 장애로 인해 발생할 수 있다. 인간에서 "질병"은 영향을 받는 개체에 있어서 통증, 기능부전, 고통, 사회적 문제 또는 사망을 유발하는 모든 상태 또는 그 개체와 접촉하는 사람들에게 있어서 유사한 문제를 유발하는 상태를 지칭하기 위해 더 광범위하게 사용되는 경우가 많다. 이 넓은 의미에서 이 용어는 부상, 장애, 장애, 증후군, 감염, 고립된 증상, 비정상적인 거동, 및 구조와 기능의 비정형 변이를 포함하는 반면, 다른 맥락에서 다른 목적을 위해 이들은 구별 가능한 범주로 간주될 수 있다. 질병은 일반적으로 신체적으로 뿐만 아니라 정서적으로도 개인에게 영향을 미친다. 많은 질병에 걸리고 생활하면 삶에 대한 관점과 성격이 바뀔 수 있기 때문이다.

[1058] 본 문맥에서, "치료", "치료하는 " 또는 "치료적 개입"이라는 용어는 질병 또는 장애와 같은 상태를 퇴치할 목적으로 대상체를 관리 및 보호하는 것과 관련된다. 이 용어는 증상 또는 합병증을 완화하기 위해, 질병, 장애 또는 상태의 진행을 지연시키기 위해, 또는 증상 및 합병증의 완화 또는 경감, 및/또는 질병, 장애 또는 상태를 치료 또는 제거하고 상태를 예방하는 것을 포함하며, 예방은 질병, 상태 또는 장애 퇴치를 목적으로 개체를 관리하고 돌보는 것으로 이해되어야 하며, 증상 또는 합병증의 발병을 예방하기 위한 활성 화합물의 투여를 포함한다.

[1059] "치료적 치료"라는 용어는 건강 상태를 개선하고/하거나 개체의 수명을 연장(증가)시키는 모든 치료에 관한 것

이다. 상기 치료는 개체에서 질병을 제거하고, 개체에서 질병의 발달을 정지시키거나 늦추며, 개체에서 질병의 발달을 억제하거나 늦추고, 개체에서 증상의 빈도 또는 중증도를 감소시키고/시키거나, 현재 질병을 앓고 있거나 또는 이전에 질병을 앓은 적이 있는 개체에서 재발을 감소시킬 수 있다.

- [1060] "예방적(prophylactic) 치료" 또는 "예방적(preventive) 치료"라는 용어는 개체에서 질병이 발생하는 것을 방지하기 위한 모든 치료와 관련된다. 용어 "예방적 치료" 또는 "예방적 치료"는 본원에서 상호교환적으로 사용된다.
- [1061] "개체" 및 "대상체"라는 용어는 본 명세서에서 상호교환적으로 사용된다. 이 용어는 인간이나 다른 포유류(예컨대 마우스, 쥐, 토끼, 개, 고양이, 소, 돼지, 양, 말 또는 영장류), 또는 조류(닭), 물고기 또는 질병 또는 장애(예컨대 암, 감염성 질병)에 걸리거나 걸리기 쉽지만 질병 또는 장애가 있거나 없을 수 있거나 예방접종과 같은 예방적 개입이 필요할 수 있는, 또는 단백질 대체와 같은 개입이 필요할 수 있는 다른 동물 종을 가리킨다. 많은 구현예에서, 개체는 인간이다. 별도의 언급이 없는 한, "개체" 및 "대상체"라는 용어는 특정 연령을 나타내지 않으며, 따라서 성인, 노인, 어린이 및 신생아를 포함한다. 본 개시내용의 구현예에서, "개체" 또는 "대체"는 "환자"이다.
- [1062] 용어 "환자"는 치료를 위한 개인 또는 대상체, 특히 질병에 걸린 개인 또는 대상체를 의미한다.
- [1063] 본 개시내용의 일 구현예에서, 목적은 백신접종에 의해 감염성 질병에 대한 보호를 제공하는 것이다.
- [1064] 본 개시내용의 일 구현예에서, 목적은 분비된 치료 단백질, 예컨대 항체, 이중특이적 항체, 사이토카인, 사이토카인 융합 단백질, 효소를 대상체, 특히 이를 필요로 하는 대상체에게 제공하는 것이다.
- [1065] 본 개시내용의 일 구현예에서, 목적은 에리스로포이에틴, 인자 VII, 폰 빌레브란트 인자, β -갈락토시다아제, 알파-N-아세틸글루코사미니다아제의 생산과 같은 단백질 대체 요법을 대상체, 특히 그의 치료를 필요로 하는 대상체에게 제공하는 것이다.
- [1066] 본 개시내용의 일 구현예에서, 목적은 혈액 내 면역 세포를 조절/재프로그래밍하는 것이다.
- [1067] 당업자는 면역요법 및 백신접종의 원리 중 하나가 치료하고자 하는 질병과 면역학적으로 관련이 있는 항원 또는 에피토프로 대상체를 면역화함으로써 질병에 대한 면역보호 반응이 생성된다는 사실에 기초한다는 것을 알 것이다. 따라서, 본원에 기술된 약제학적 조성물은 면역 반응을 유도하거나 향상시키는데 적용 가능하다. 따라서 본원에 기술된 약제학적 조성물은 항원 또는 에피토프와 관련된 질병의 예방적 및/또는 치료적 치료에 유용하다.
- [1068] "면역화" 또는 "백신접종"이라는 용어는 예를 들어 치료 또는 예방 목적으로 면역 반응을 유도할 목적으로 개체에게 항원을 투여하는 과정을 설명한다.
- [1069] 본원에 언급된 문서 및 연구의 인용은 전술한 내용이 적절한 선행 기술임을 인정하는 것으로 의도되지 않는다. 이들 문서의 내용에 대한 모든 진술은 출원인이 사용할 수 있는 정보를 기반으로 하며 이들 문서 내용의 정확성에 대한 어떠한 승인도 구성하지 않는다.
- [1070] 본 발명의 설명(후술하는 실시예 포함)은 당업자가 다양한 구현예를 만들고 사용할 수 있도록 제시된다. 특정 장치, 기술 및 응용 프로그램에 대한 설명은 예제로만 제공된다. 본 명세서에 기재된 예에 대한 다양한 수정은 당업자에게 용이하게 명백할 것이며, 본 명세서에 정의된 일반적인 원리는 다양한 구현예의 사상 및 범위를 벗어나지 않고 다른 예 및 응용에도 적용될 수 있다. 따라서, 다양한 구현예는 본 명세서에 기술되고 도시된 예에 한정되도록 의도된 것이 아니며 청구범위와 부합하는 범위에 따른 것이다.
- [1071] **실시예**
- [1072] **방법**
- [1073] *RNA LNP의 제조*
- [1074] 제조 프로토콜은 양이온적으로 이온화가능한 지질에 대한 예로 지질 I-3을 사용하여 여기에 설명되어 있다. 다른 양이온적으로 이온화가능한 지질에도 동일한 프로토콜이 적용된다. 따라서, 양이온적으로 이온화가능한 지질과 RNA 사이의 비율(N/P 비율), 예를 들어 음전하 과잉을 포함하는 더 높거나 더 낮은 N/P 비율을 갖는 다른 제형도 기술된 바와 같이 제조되고 안정화될 수 있다. 또한, 다른 지질 비율(인지질, 콜레스테롤, 폴리머 공액 지질)뿐만 아니라 다른 유형의 폴리머 공액 지질(예를 들어, 폴리스아르코신 지질)이 사용될 수 있다. 프로토콜은 폴리머 공액 지질이 없는 제품에도 적용된다.

- [1075] RNA LNP는 수성-에탄올 혼합 프로토콜에 의해 준비되었다. 간단히 말해서, 수성 버퍼 조건(예컨대 50 mM 시트레이트, pH 4.0)에서 RNA(예컨대 SARS-CoV-2 S 단백질을 포함하는 아미노산 서열을 인코딩하는 BNT162b2)를, 지질 I-3, DSPC, 콜레스테롤 및 2-[(폴리에틸렌 글리콜)-2000]-N,N-디 테트라데실아세트아미드 (각각 47.5:10:40.7:1.8의 몰비)를 포함하는 에탄올계 지질 혼합물과, RNA 3부 및 지질 혼합물 1부의 부피비의 비율로 혼합한다. 혼합은 T 혼합 요소를 사용하는 표준 펌프 기반 설정을 사용하여 이루어진다. 지질 나노입자 미가공 콜로이드를 버퍼 2부(예를 들어, 시트레이트 버퍼 50 mM, pH 4.0)로 추가로 희석한다. 총 유량은 400 ~ 2000 mL/min(예컨대 720 mL/min)이다. 이렇게 얻어진 1차 LNP 산물을, 버퍼 교환 및 에탄올 제거를 위해 버퍼(예컨대 PBS 버퍼 pH 7.4(대조군) 또는 Tris 버퍼 10 또는 50 mM pH 7.4 또는 다른 버퍼)에 대해 점선 흐름 여과를 추가로 수행한다. 정용여과 완료 후 제형을 농축한다. 이어서, 버퍼 교환된 RNA LNP 제형을 예를 들어, 수크로스가 보충된 PBS(대조군) 또는 수크로스가 보충된 Tris 버퍼 10 또는 50 mM pH 7.4로 희석하여, LNP 제형의 최종 RNA 농도 0.1 내지 0.5mg/ml 및 수크로스 함량 10% w/v가 되도록 한다. RNA LNP 제형의 샘플을 5℃ 또는 실온에서 보관하거나 상이한 온도(예를 들어, -5℃, 20℃, -70℃ 및/또는 -80℃)에서 냉동 보관하였다.
- [1076] *LNP 크기 및 다분산도*
- [1077] RNA LNP 제형/조성물(또는 이의 샘플) 중 LNP의 평균 입자 크기 및 크기 분포는 동적 광 산란(DLS)에 의해 평가된다. 이 방법은 입자 크기를 결정하기 위해 173° 에서 후방 산란을 사용하는 입자 크기 측정기를 사용한다. 결과는 입자의 $Z_{\text{평균}}$ 크기 및 다분산 지수로 보고된다. 다분산 값은 측정된 $Z_{\text{평균}}$ 크기 주변의 적합 로그 정규 분포의 폭을 설명하는 데 사용되며 입자 크기 조정 소프트웨어 내에서 독점 수학적 계산을 사용하여 생성된다. 크기 및 다분산성에 대한 결과는 각각 nm 및 다분산 지수 값으로 보고된다.
- [1078] *RNA 무결성*
- [1079] RNA 무결성은 모세관 전기영동에 의해 결정된다. Triton™ X-100/에탄올로 처리된 RNA-LNP는 모세관에 포함된 젤 매트릭스에 적용된다. RNA와 그 유도체, 분해물 및 불순물은 크기에 따라 분리된다. 젤 매트릭스는 CCD 검출기에 의해 검출되는 청색 LED-유도 형광에 의한 검출을 가능하게 하는 RNA 성분에 특이적으로 결합하는 형광 염료를 함유한다. 여기 파장은 470 nm이다. RNA의 무결성은 주요 RNA 피크의 피크 면적을 검출된 총 피크 면적과 비교하여 결정된다.
- [1080] *RNA 함량 및 캡슐화*
- [1081] RNA 함량은 세제 Triton™ X-100으로 LNP를 파괴한 다음 분광형광광도계를 사용하여 RNA 결합 형광 염료 RiboGreen®의 신호를 기반으로 총 RNA 함량을 측정하여 결정된다. RNA 캡슐화는 Triton™ X-100의 부재(유리 RNA) 및 존재(총 RNA)에서 LNP 샘플의 RiboGreen® 신호를 비교하여 계산된다. RNA 함량 및 캡슐화에 대한 결과는 각각 mg/mL 및 백분율로 보고된다.
- [1082] *지질 실체 및 지질 함량*
- [1083] HPLC-CAD 분석은 분취액 중 4가지 지질(I-3, DSPC, 콜레스테롤 및 2-[(폴리에틸렌 글리콜)-2000]-N,N-디테트라데실아세트아미드) 모두를 분해하는 방법을 사용하여 지질의 실체와 농도를 결정한다. 개별 지질 실체는 참조 표준의 보유 시간과 보유 시간을 비교하여 결정된다. 각 개별 지질의 농도는 참조 표준에서 생성된 각각의 5점 보정 곡선에 대한 샘플 영역 응답에 의해 결정되며 피크 검출은 하전 에어로졸 검출기(CAD)를 사용하여 수행된다. 지질 실체 및 지질 함량에 대한 결과는 참조 표준과 비교한 상대적 보유 시간 및 mg/mL로 각각 보고된다.
- [1084] *전자현미경*
- [1085] 완전히 처리되고 냉동된(-80℃) 샘플을 실온(RT)이 되게 하였다. 각 샘플 5μl를 금 그리드(ULTRAuFoil 2/1, Quantifoil Micro Tools, Jena, Germany)에 적용 하고 과량의 액체를 종이에 자동으로 블로팅하였다. 샘플을 크리오박스(Carl Zeiss NTS GmbH, Oberkochen, Germany)에서 -180℃의 액체 에탄에서 급속-냉동시켰다. 과량의 에탄을 제거하고 샘플을 Gatan 626 극저온 이송 홀더(Gatan Pleasanton, USA)를 사용하여 120kV에서 작동하는 사전 냉각 극저온 전자 현미경 Philips CM120(네덜란드 아인트호벤)으로 즉시 옮겨 저선량 조건에서 관찰하였다. 이미지는 2k CMO 카메라(F216 TVIPS, Gauting, Germany)를 사용하여 기록되었다. 노이즈 감소를 위해 프레임당 4개의 이미지를 평균화하였다.
- [1086] *시험관내 발현(IVE)*
- [1087] 단백질 발현(예를 들어, 스파이크 단백질 발현)은 일상적인 견고성을 증가시키기 위해 현재 추가 평가를 받고

있는 특성화 검정을 사용하여 측정된다. 먼저, LNP 샘플을 표시된 RNA 수준(비포화 농도)으로 HEK-293T 세포에 첨가한다. 단백질 발현은 항-단백질 모노클로날 항체(예를 들어, 항-스파이크 단백질 수용체 결합 도메인(RBD) 토끼 모노클로날 항체)를 사용하여 측정한다. 결합된 항-단백질 항체(예를 들어, 결합된 항-RBD 항체)에 대해 양성 신호를 갖는 세포의 수를 정량화함으로써 발현을 측정한다.

[1088] 마우스 면역원성

[1089] 5 마리의 암컷 BALB/c 마우스로 구성된 5개 그룹을 1 μ g 용량 수준의 제형화된 약물 제품으로 1회(제0일) 면역화하거나, 버퍼 단독(대조군)으로 20 μ L 용량 수준으로 면역화한다. ELISA 및 슈도바이러스 기반 중화 검정(pVNT)에 의해 항체 면역 반응을 분석하기 위해 3주 동안 매주 1회(제7일, 제14일 및 제21일) 채혈한다. 연구 종료 시(제28일), 혈액을 수집한 다음 동물을 안락사시켜 비장을 수집하고 ELISpot 및 세포내 사이토카인 염색(ICS)에 의한 비장 세포의 T 세포 반응 추가 분석을 수행한다. 도 1 참조.

[1090] 실시예 1

[1091] RNA LNP를 유기상에 첨가된 20 mM Tris를 사용하여 수성-에탄올 혼합 프로토콜에 의해 제조하였다. LNP를 50 mM Tris:아세테이트 pH 4, pH 5.5 또는 pH 6.8에서 생성하고 생성된 1차 LNP는 분할하였다: 한 부분은 PBS에 대해 투석하고(A); 다른 부분은 50 mM Tris:아세테이트 pH 7.4(B)에 대해 투석하였다(B). 비교를 위해, 유기상은 Tris를 수용하지 않았고, LNP는 50 mM Na-아세테이트 버퍼 pH 5.5에서 생물질은 50 mM Tris:아세테이트 pH 7.4에 대해 물질을 투석하였다. 모든 샘플은 실온에서 50시간 동안 보관하였다. 모세관 전기영동을 사용하여 전술한 바와 같이 RNA 무결성을 측정하였다. 결과를 도 2A 및 B에 나타내었다.

[1092] 양이온적으로 이온화가능한 지질, 특히 지질 1-3 및 PBS를 함유하는 RNA LNP 조성물은 매우 안정한 접힌 형태의 RNA를 채택한다(약 2190초에서 주 피크의 테일링으로 검출 가능). 이는 LNP가 PBS 이외의 버퍼(예컨대 Tris)에서, 즉 PBS 부재 하에 제조된 경우에도 마찬가지이며 투석 동안 버퍼가 PBS로 교환되었다. 도 2A 참조. 이들 모든 샘플에서 이 매우 안정적인 접힌 형태의 RNA의 양은 18% 내지 21% 였다.

[1093] 그러나, (다가 PBS 대신에) 1가 버퍼 물질인 Tris를 조성물에(즉, 즉시 사용가능한 조성물로 제형화시, 약물 제품이 보관, 운송 및 투여되는 제제에) 사용하면, 매우 안정한 접힌 형태의 RNA 형성이 억제된다; 도 2B 참조.

[1094] 따라서, 이러한 결과로부터, 투석 중에 Tris를 첨가하는 것으로도, 매우 안정한 접힌 형태의 RNA의 형성을 억제하는데 충분하다는 결론을 내릴 수 있다. 이와 대조적으로, LNP 제조 공정의 상류 부분에만 Tris를 첨가하는 것은 1차 LNP 제형이 PBS에 대해 투석될 경우 매우 안정한 접힌 형태의 RNA의 형성으로부터 보호하지 못한다.

[1095] 실시예 2

[1096] Tris가 RNA의 매우 안정한 접힌 형태의 형성을 억제하는 바람직한 1가 버퍼 물질임을 확인한 후, 본 발명자들은 특히 냉동-해동 사이클 동안 콜로이드 안정성과 관련하여 조성물 성분을 최적화하기로 하였다.

[1097] (i) 1가 음이온(아세테이트, 글리콜레이트 또는 락테이트), (ii) 2가 또는 부분 2가 음이온(타르트레이트, 포스페이트, 카보네이트) 또는 (iii) 즙비터이온(HEPES 및 MES)을 포함하는 화합물을 버퍼 물질로서 Tris와 조합하고 LNP의 콜로이드 안정성을 시간 경과에 따라 또는 -20℃에서 냉동-해동 사이클 동안 결정하였다. 결과를 표 2에 나타내었다.

표 2 - Tris 및 선택된 음이온을 포함하는 버퍼에서 LNP의 콜로이드 안정성

		25C					5C					-20C					-70C			
		18.12.2020	26.12.2020	4.1.2021	21.1.21		18.12.2020	26.12.2020	4.1.2021	22.1.21		18.12.2020	4.1.2021	5.1.21	6.1.21	22.1.21		18.12.2020	22.1.21	
		0	8	8	17	83	0	8	17	83	0	FT1	FT2	FT3	FT3	83	0	83		
Suc 0	T50 Hac	100%	96%	94%	100%		100%	100%	104%	99%	100%	101%	96%	104%	100%		100%	96%		Hac
Suc 120	T45 Hac	100%	100%	93%	98%		100%	101%	101%	99%	100%	104%	104%	107%	101%		100%	96%		
Suc 240	T40 Hac	100%	102%	98%	101%		100%	101%	104%	97%	100%	101%	107%	108%	98%		100%	97%		
Suc 360	T35 Hac	100%	101%	98%	101%		100%	102%	104%	99%	100%	105%	112%	108%	98%		100%	95%		
Suc 480	T30 Hac	100%	103%	98%	103%		100%	101%	106%	99%	100%	103%	108%	105%	99%		100%	95%		
Suc 600	T25 Hac	100%	100%	98%	101%		100%	99%	107%	97%	100%	99%	104%	99%	95%		100%	89%		
Suc 0	T50 Lac	100%	96%	96%	99%		100%	102%	105%	95%	100%	98%	105%	108%	97%		100%	98%		Lac
Suc 120	T45 Lac	100%	99%	101%	100%		100%	102%	100%	102%	100%	106%	108%	108%	101%		100%	102%		
Suc 240	T40 Lac	100%	101%	97%	103%		100%	99%	103%	99%	100%	105%	108%	114%	100%		100%	99%		
Suc 360	T35 Lac	100%	101%	99%	103%		100%	100%	103%	100%	100%	102%	110%	108%	104%		100%	97%		
Suc 480	T30 Lac	100%	106%	101%	106%		100%	104%	100%	100%	100%	103%	108%	110%	104%		100%	98%		
Suc 600	T25 Lac	100%	101%	100%	103%		100%	99%	103%	98%	100%	99%	103%	100%	95%		100%	92%		
Suc 0	T50 Gly	100%	91%	98%	75%		100%	95%	98%	75%	100%	124%	131%	104%	100%		100%	122%		Gly
Suc 120	T45 Gly	100%	105%	102%	78%		100%	101%	106%	77%	100%	113%	117%	92%	87%		100%	80%		
Suc 240	T40 Gly	100%	103%	102%	79%		100%	104%	101%	77%	100%	107%	113%	89%	82%		100%	81%		
Suc 360	T35 Gly	100%	102%	99%	77%		100%	102%	100%	78%	100%	107%	111%	85%	82%		100%	77%		
Suc 480	T30 Gly	100%	103%	103%	80%		100%	102%	101%	80%	100%	106%	114%	87%	81%		100%	76%		
Suc 600	T25 Gly	100%	102%	101%	80%		100%	100%	97%	76%	100%	101%	107%	84%	85%		100%	71%		
Suc 0	T50 Pi	100%	98%	97%	99%		100%	96%	101%	101%	100%	NO	NO	NO	NO		100%	83%		Pi
Suc 120	T45 Pi	100%	98%	96%	98%		100%	98%	103%	100%	100%	NO	NO	NO	NO		100%	141%		
Suc 240	T40 Pi	100%	107%	102%	100%		100%	100%	101%	102%	100%	NO	128%	142%	139%		100%	111%		
Suc 360	T35 Pi	100%	102%	103%	103%		100%	100%	103%	101%	100%	110%	114%	122%	120%		100%	101%		
Suc 480	T30 Pi	100%	105%	105%	103%		100%	102%	101%	99%	100%	109%	117%	116%	116%		100%	101%		
Suc 600	T25 Pi	100%	103%	99%	103%		100%	103%	103%	100%	100%	109%	115%	113%	105%		100%	98%		
Suc 0	HEPES 50 T	100%	104%	100%	103%		100%	102%	102%	101%	100%	113%	125%	131%	115%		100%	140%		HEPES
Suc 120	HEPES 45 T	100%	103%	101%	100%		100%	99%	100%	99%	100%	109%	119%	129%	106%		100%	104%		
Suc 240	HEPES 40 T	100%	103%	100%	102%		100%	99%	101%	100%	100%	112%	118%	124%	115%		100%	101%		
Suc 360	HEPES 35 T	100%	101%	100%	100%		100%	97%	100%	95%	100%	103%	115%	123%	107%		100%	101%		
Suc 480	HEPES 30 T	100%	101%	100%	102%		100%	97%	100%	94%	100%	105%	113%	118%	107%		100%	102%		
Suc 600	HEPES 25 T	100%	105%	100%	103%		100%	97%	97%	97%	100%	112%	115%	122%	113%		100%	98%		
Suc 0	MES 50 T	100%	102%	101%	97%		100%	100%	100%	97%	100%	108%	106%	102%	99%		100%	100%		MES
Suc 120	MES 45 T	100%	100%	100%	100%		100%	99%	100%	99%	100%	101%	104%	108%	100%		100%	96%		
Suc 240	MES 40 T	100%	102%	102%	100%		100%	106%	102%	101%	100%	106%	108%	107%	104%		100%	99%		
Suc 360	MES 35 T	100%	100%	101%	101%		100%	101%	101%	99%	97%	100%	102%	104%	101%		100%	99%		
Suc 480	MES 30 T	100%	106%	99%	103%		100%	100%	101%	95%	100%	104%	102%	105%	99%		100%	97%		
Suc 600	MES 25 T	100%	109%	102%	113%		100%	102%	103%	100%	100%	109%	108%	108%	105%		100%	97%		
Suc 0	50 HCO3	100%	101%	104%	101%		100%	102%	102%	102%	100%	132%	NO	141%	NO		100%	169%		HCO3
Suc 120	45 HCO3	100%	98%	98%	101%		100%	99%	98%	99%	100%	NO	137%	150%	136%		100%	109%		
Suc 240	40 HCO3	100%	100%	102%	100%		100%	102%	102%	102%	100%	114%	124%	136%	122%		100%	102%		
Suc 360	35 HCO3	100%	104%	101%	101%		100%	102%	101%	99%	103%	109%	110%	115%	114%		100%	103%		
Suc 480	30 HCO3	100%	100%	98%	105%		100%	101%	99%	113%	100%	108%	110%	111%	104%		100%	98%		
Suc 600	25 HCO3	100%	102%	102%	106%		100%	101%	99%	98%	100%	110%	108%	108%	108%		100%	103%		
Suc 0	50 Tart	100%	99%	99%	99%		100%	99%	101%	97%	100%	138%	146%	142%	132%		100%	165%		Tart
Suc 120	45 Tart	100%	101%	99%	101%		100%	100%	100%	99%	100%	154%	151%	163%	139%		100%	112%		
Suc 240	40 Tart	100%	102%	97%	101%		100%	99%	98%	98%	100%	115%	125%	130%	122%		100%	112%		
Suc 360	35 Tart	100%	105%	103%	105%		100%	102%	102%	101%	100%	109%	117%	119%	114%		100%	104%		
Suc 480	30 Tart	100%	105%	99%	107%		100%	103%	101%	103%	100%	109%	118%	119%	106%		100%	101%		
Suc 600	25 Tart	100%	104%	104%	110%		100%	101%	99%	102%	100%	113%	114%	114%	114%		100%	105%		

LNP(50 mM Tris:Hac pH 5.5에서 형성, 50 mM Tris:Hac pH 7.4에서 TFF)를 왼쪽 열에 나열된 매트릭스로 10배 희석하였다. 물질들을 상단에 표시된 온도와 시간 동안 인큐베이션하였다. LNP의 입자 크기는 원래 크기를 기준으로 표현된다. 90%에서 110% 사이의 값은 안정적인 것으로 간주되는 물질을 나타낸다. Suc = 수크로스 농도 (mM), T= Tris, Hac =아세트산, Lac=락트산, Gly=글리콜산, Pi=무기 인산염, HEPES=히드록시에틸피페라진 에탄 설펜산, MES=모르폴리노에탄설펜산, Tart=타르타르산.

표 2에 제시된 데이터로부터 명백한 바와 같이, 1가 음이온 아세테이트, 락테이트 및 MES의 존재는 콜로이드의 붕괴 없이 RNA LNP 조성물의 동결을 용이하게 한다. 중요한 점은 콜로이드 안정성이 최대 3번의 동결-해동 사이클 플러스 -20℃에서 89일의 후속 기간 또는 5℃에서의 동일한 후속 기간까지 확장된다는 점이다.

그러나, 부분적 또는 완전한 2가 이온 카보네이트, 인산염 및 타르트레이트의 존재는 냉동 동안 콜로이드 안정성이 결여된 RNA LNP 조성물을 야기한다.

요약하면, LNP는 Tris를 양이온으로서 함유하고 아세테이트, 락테이트 또는 MES로부터 선택된 1가 음이온을 함유하는 버퍼에서는 -20℃에서 콜로이드적으로 안정하지만, 이염기성 및/또는 다염기성 유기산의 존재 하에서는 안정하지 않다는 결론을 내릴 수 있다. 콜로이드 안정성에는 반복된 냉동-해동 사이클 및 연장된 보관 기간 또는 두 요인의 조합이 포함된다.

실시예 3

다음 3가지 RNA LNP 조성물을 제조하였다:

- D028

LNP를 50 mM 시트레이트 pH 4.0에서 형성하고 전술한 바와 같이 처리하였다. 50 mM Tris:아세테이트 pH 7.4를 TFF 동안 도입하고 제형을 희석하여 0.5 mg/mL 농도의 RNA 또는 300 mM 수크로스를 추가로 포함하는 동일한 버퍼에서 0.1 mg/mL의 RNA 농도를 제공하였다.

- D 029

D029의 경우, 50 mM Tris:아세테이트 pH 6.9의 단일 버퍼를LNP 형성, TFF 및 희석에 사용하였다. 300 mM 수크로스를 위와 같이 첨가하였다.

- D030

LNP를 50 mM Tris:아세테이트 pH 5.5에서 형성하고 동일한 버퍼액을 사용하여 전술한 바와 같이 처리하였다. TFF 및 희석은 D028에 대해 수행된 것과 같이 수행되었다.

[1111] 생성된 RNA LNP 조성물의 특징을 표 3에 요약하였다.

표 3 – RNA LNP 조성물 D028, D029 및 D030의 특성

	D028		D029		D030	
	RNA 농도 [mg/mL]		RNA 농도 [mg/mL]		RNA 농도 [mg/mL]	
	0.1	0.5	0.1	0.5	0.1	0.5
크기 [nm]	76	75	67	66	70	69
PDI	0.11	0.11	0.11	0.14	0.07	0.07
캡슐화 [%]	96	94	96	96	95	96
RNA 무결성 [%]	68	68	67	70	66	70
RNA 함량 [mg/mL]	0.11	0.49	0.09	0.51	0.10	0.50

[1112] 표 3에서 알 수 있듯이 RNA LNP 조성은 서로 필적할만 하다.

[1114] 저온 전자 현미경을 사용하여 RNA LNP 조성물을 추가로 특징화하였다. 그 결과를 도 3에 나타내었다. 도 3에서 볼 수 있는 바와 같이, 모든 RNA LNP 조성물은 주로 30 내지 110 nm의 구형 소포로 충전된 것으로 설명되는 공통된 모폴로지를 공유한다. 외부 이중층이 자주 관찰된다.

[1115] 모든 RNA LNP 조성물은 또한 마우스에서 시험했을 때 생물학적 활성 면에서 참조와 필적 가능하다. 발현된 S1 단백질의 양과 S1 특이적 항체에 대한 IgG 농도는 도 4에 도시된 것과 유사하다. 제21일에 D028에 대한 S1 특이적 항체의 수준이 더 낮다는 것은 제14일 및 제28일 역가와 S1 발현의 관점에서 볼 때 비정상적인 값으로 간주된다.

[1116] 본 개시내용의 하나의 목적은 개선된 안정성을 갖는 RNA LNP 조성물의 개발이므로 안정성과 관련된 중요한 품질 속성을 분석하였다. RNA LNP 조성물 D028, D029 및 D030로부터의 샘플을 -70°C 내지 실온 범위의 온도에서 보관하고 IVE 분석을 통해 이들의 물리화학적 특성 및 활성에 대해 특성화하였다. 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[1117] 도 5A는 모든 온도 수준에서 RNA LNP 조성물 D028의 콜로이드 안정성을 입증한다. 여기에는 LNP 구조의 물리적 안정성과 재료의 전체 RNA 함량이 포함된다. RNA의 무결성은 예상대로 온도 의존 방식으로 붕괴되지만 12주 후에도 여전히 사양 내에 있다. 중요한 것은, 12주 전체 기간 동안 실온에 노출된 경우에도 이 RNA LNP 조성물에는 매우 안정한 접힌 형태의 RNA의 형성이 본질적으로 없다는 것이다.

[1118] RNA LNP 조성물 D029 및 D030은 유사한 패턴의 안정성을 특징으로 한다. 어떤 보관 조건도 콜로이드 안정성, 물리적 무결성 또는 물질의 함량에 영향을 미치지 않는다. RNA 무결성은 12주 동안 +5°C에 노출되었을 때 사양 한계 내에서 유지된다. 도 5B 및 5C 참조.

[1119] 요약하면, Tris 및 아세테이트를 포함하는 버퍼 시스템을 사용하는 RNA LNP 조성물은 형태학, 마우스 면역원성 및 방출 시 및 안정성 동안의 물리화학적 특성 면에서 유사하다.

[1120] 실시예 4

[1121] 이 실시예는 i) 버퍼 농도 및 (ii) 버퍼 물질로서 Tris에 대한 상대 음이온이 RNA LNP 조성물의 콜로이드 안정성 및 RNA 무결성에 효과를 분석한다.

[1122] 이를 위해, RNA LNP 제형을 D028에 기초하여 생성하고, Tris:아세테이트 10 mM 및 50 mM 뿐만 아니라 Tris:HCl 10 mM 및 50 mM에 대해 투석하고, 생성된 RNA LNP 조성물을 그들의 콜로이드 및 RNA 안정성과 관련하여 분석하였다. 특히, RNA LNP 조성물을 액체 또는 냉동 형태로 최대 49일 동안 배양하였다. 5°C에서의 데이터는 19일 동안만 수집되었지만, 실시예 2에 제시된 결과에서 예상되는 바와 같이 실온에서의 결과와 일치한다. 결과를 도 6 및 7에 도시하였다.

[1123] 도 6에서 알 수 있는 바와 같이, -20°C에 보관된 RNA LNP 조성물의 입자 크기는 10 mM 강도를 갖는 버퍼에서 보관되었을 때 액체 샘플로부터 약간 분리되기 시작했고, 50 mM 버퍼의 경우에는 완전한 콜로이드 안정성을 제공하였다. RNA는 아세테이트 또는 클로라이드와 같은 1가 음이온을 갖는 Tris 버퍼에서 제형화시, RNA LNP 조성물 매트릭스의 버퍼 강도에 민감하다는 결론을 내릴 수 있다.

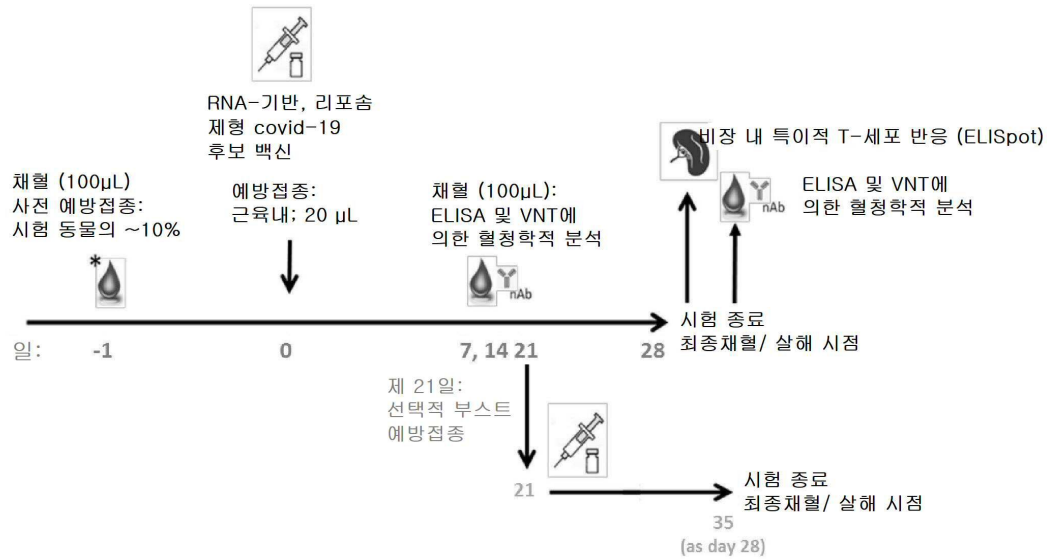
[1124] 도 7에서 알 수 있는 바와 같이, 10 mM의 버퍼 강도를 갖는 RNA LNP 조성물은 50 mM 버퍼에서 제형화된 조성물에 비해 더 안정하였다. 이러한 결과는 음이온 유형과 무관하다. 냉동된 물질에 대해서도 상이한 분해율이 관찰

되었다.

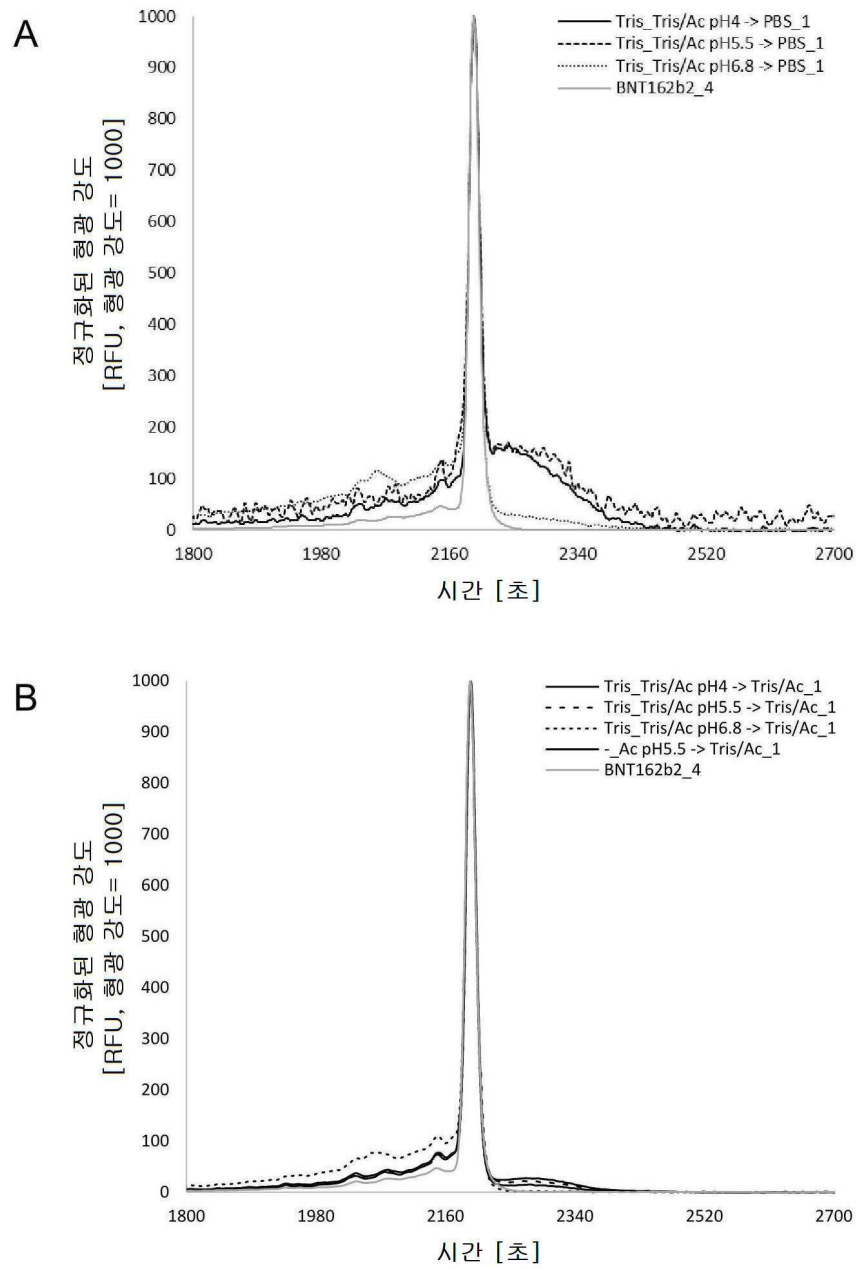
[1125] 요약하면, RNA 안정성은 아세테이트 또는 클로라이드와 같은 1가 음이온을 갖는 Tris 버퍼액에서 제형화될 경우 RNA LNP 조성물의 버퍼 강도에 민감하다.

도면

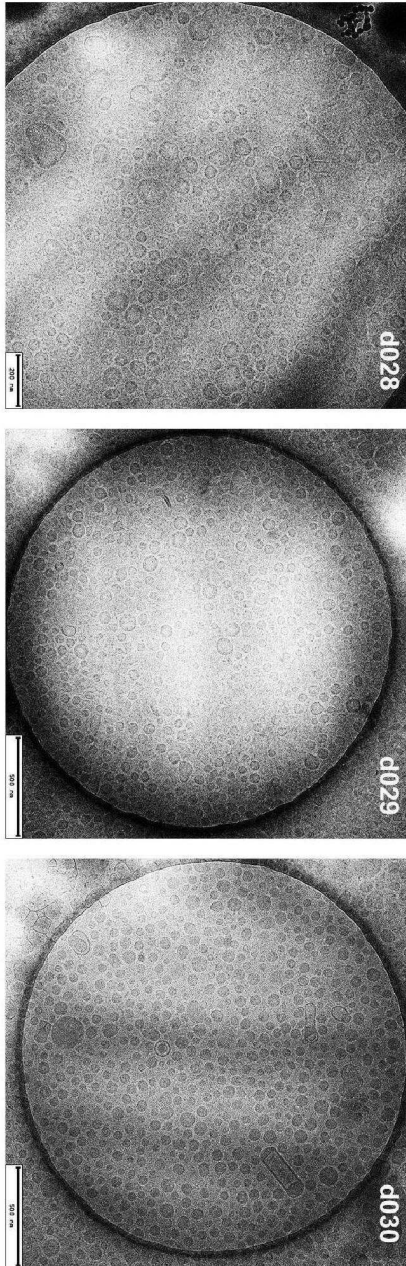
도면1



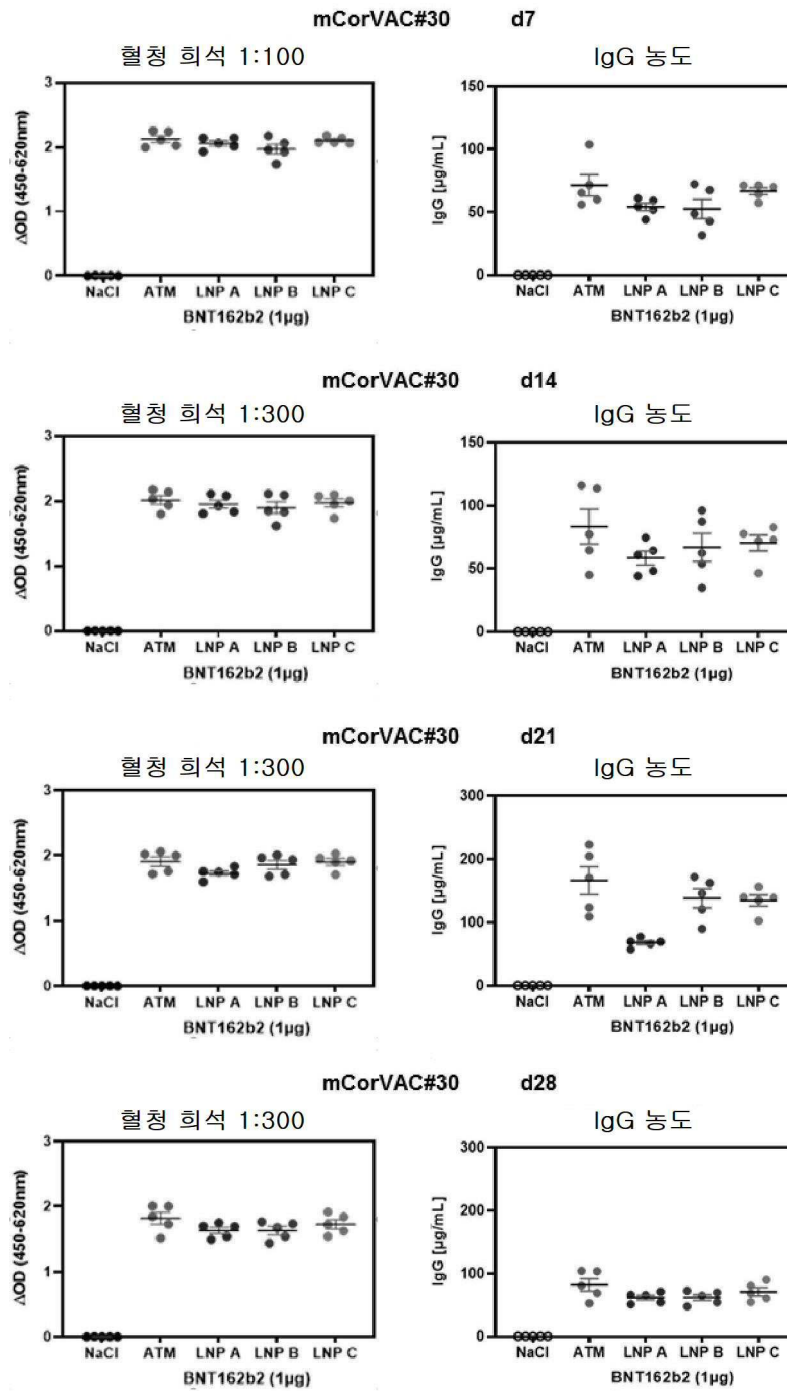
도면2



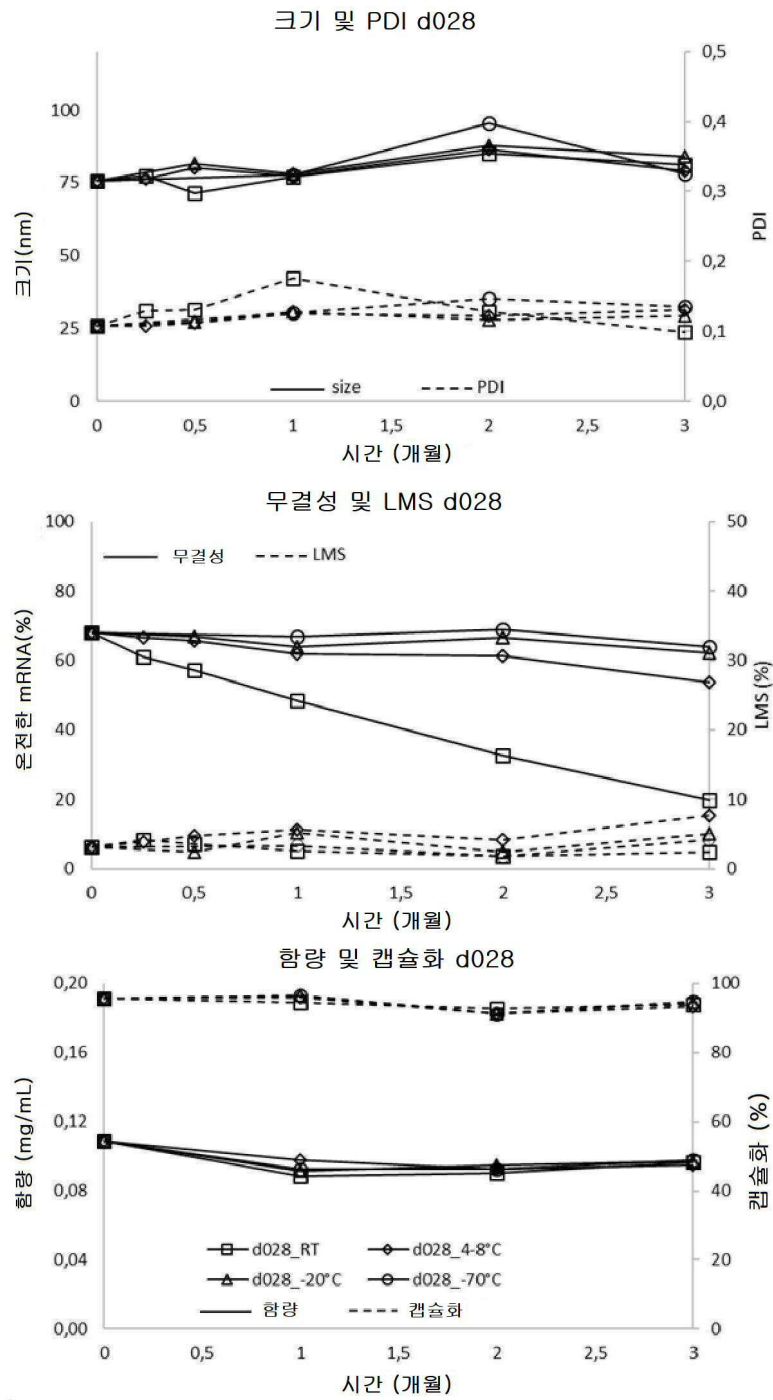
도면3



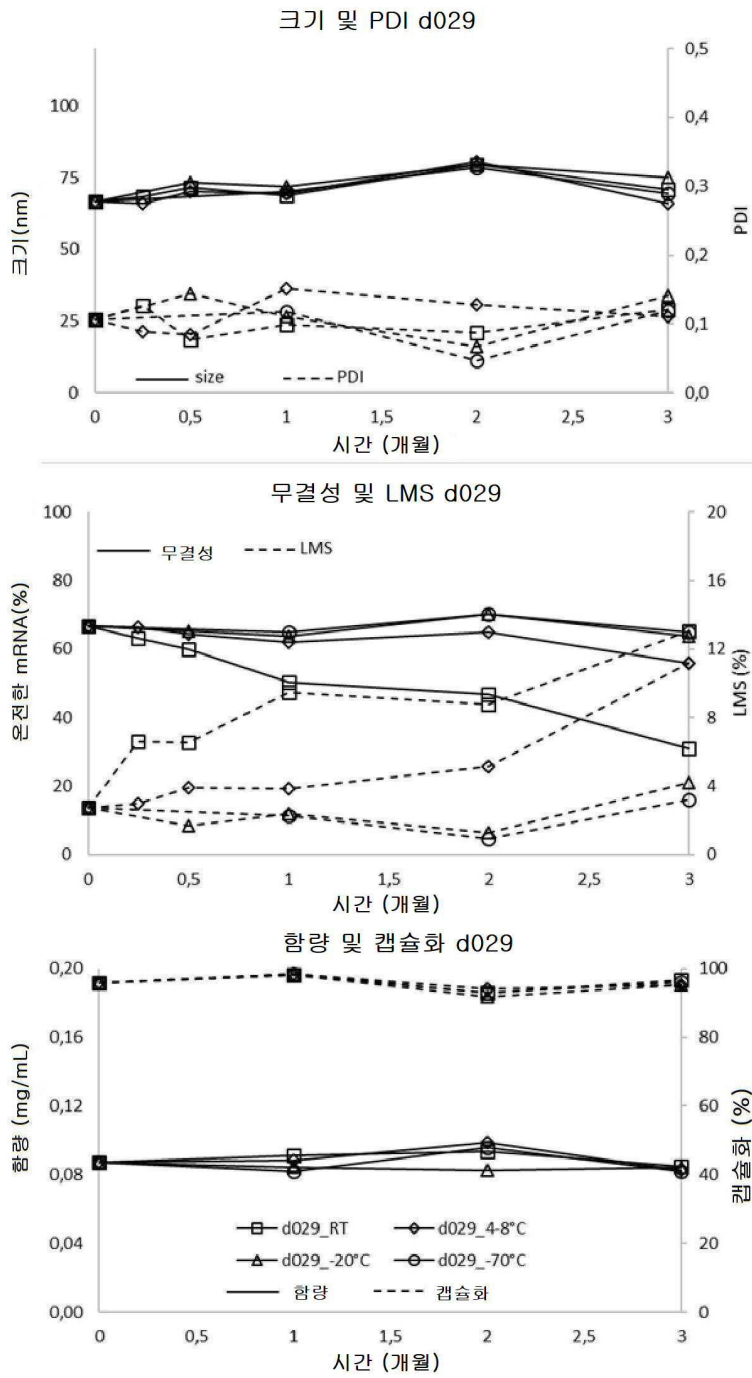
도면4



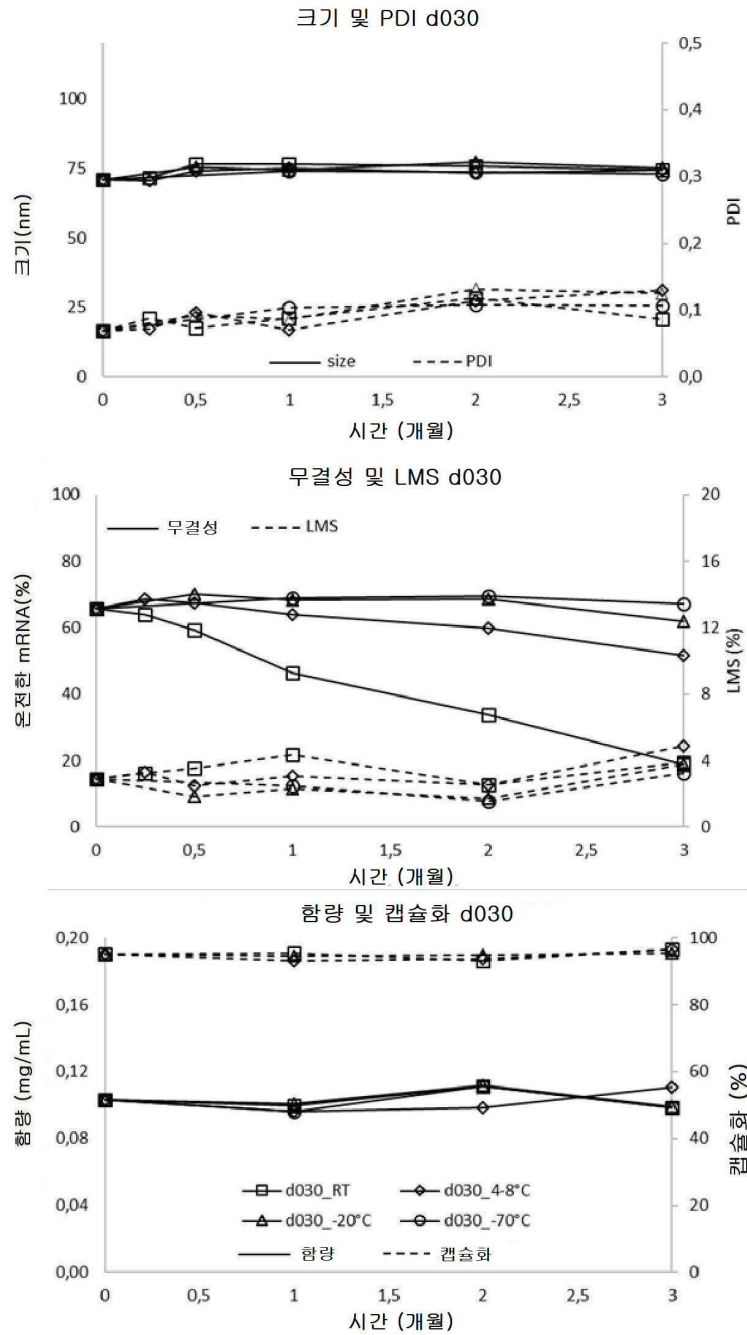
도면5a



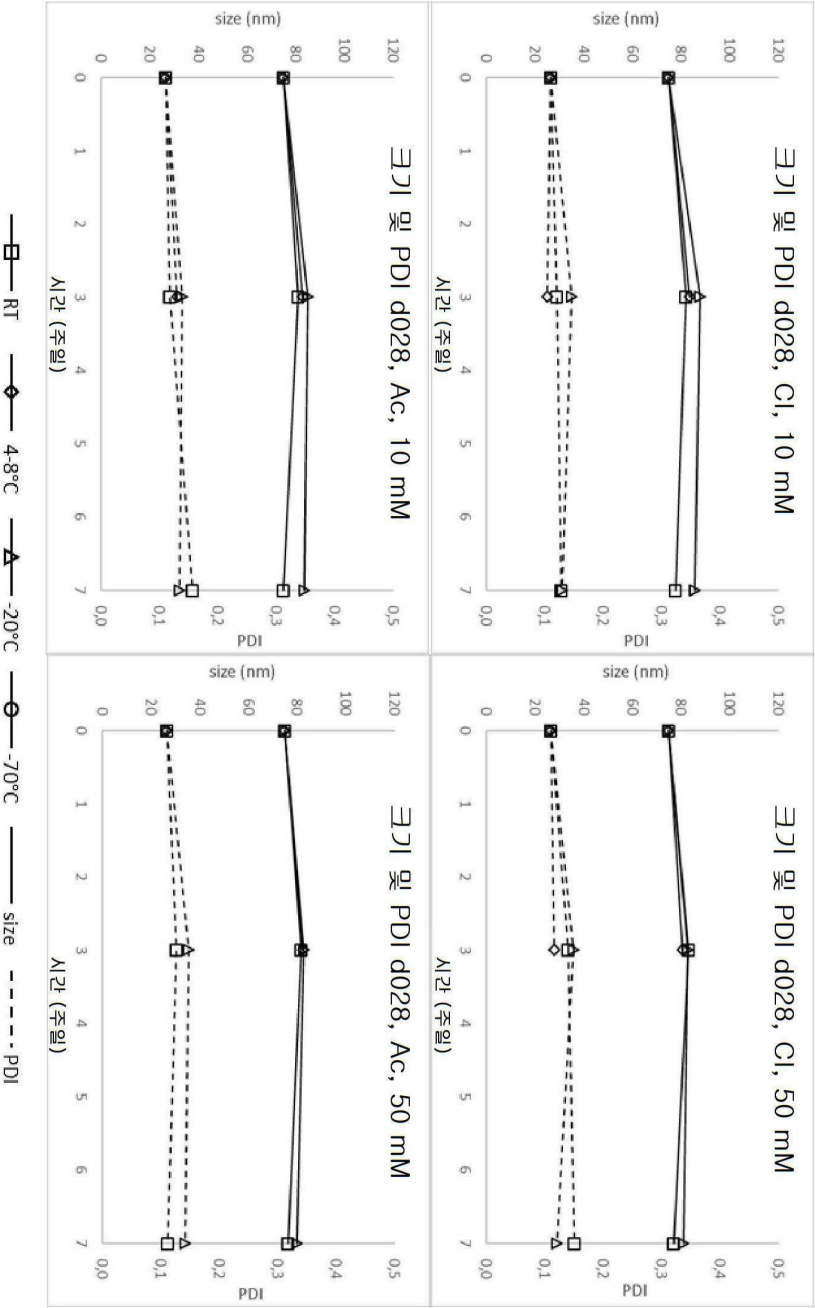
도면5b



도면5c



도면6



도면7

FIII	공급원	버퍼	강도	-20C				+5C				RT		
				T7	T19	T49		T7	T19			T7	T19	T49
RNA	DS Ref			75.9				75.9				75.9		
	d028	CI	50	63.8	58.6	49.1		63.8	59.5			58.5	44.4	19.1
	d028	CI	10	61.8	63.1	60.6		64.4	59.4			60.8	49.8	28.7
	d028	Ac	50	64.5	62.0	48.8		61.2	57.7			57.6	42.3	16.3
LMS	d028	Ac	10	64.1	61.9	60.2		64.0	59.3			60.4	47.5	24.1
	d028	CI	50	4.0	4.0	2.8		3.8	4.3			4.6	3.6	1.6
	d028	CI	10	4.0	4.1	3.6		4.3	5.5			5.6	6.1	4.9
	d028	Ac	50	4.5	4.2	2.9		4.1	4.3			4.3	3.3	1.3
Frag	d028	Ac	10	4.2	5.2	3.8		4.2	5.0			5.4	5.4	5.2
	d028	CI	50	31.5	36.1	45.5		32.1	35.0			35.8	50.6	75.9
	d028	CI	10	32.9	31.6	34.9		30.9	33.7			32.7	42.6	65.3
	d028	Ac	50	30.3	32.9	46.0		33.6	36.5			37.2	53.1	78.9
	d028	Ac	10	31.0	31.5	34.8		31.2	34.2			33.5	45.7	68.2

서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> BioNTech SE

<120> LNP COMPOSITIONS COMPRISING RNA AND METHODS FOR PREPARING, STORING AND USING THE SAME

<130> 674-403 PCT2

<150> US 63/114,478

<151> 2020-11-16

<150> US 63/115,128
 <151> 2020-11-18
 <150> US 63/115,588
 <151> 2020-11-18
 <150> PCT/EP2020/082602
 <151> 2020-11-18
 <150> US 63/135,723
 <151> 2021-01-10
 <150> US 63/149,372
 <151> 2021-02-15
 <150> PCT/EP2021/059460
 <151> 2021-04-12
 <160> 34
 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 1273
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> S protein
 <400> 1

Met Phe Val Phe Leu Val Leu Leu Pro Leu Val Ser Ser Gln Cys Val
 1 5 10 15
 Asn Leu Thr Thr Arg Thr Gln Leu Pro Pro Ala Tyr Thr Asn Ser Phe
 20 25 30
 Thr Arg Gly Val Tyr Tyr Pro Asp Lys Val Phe Arg Ser Ser Val Leu
 35 40 45
 His Ser Thr Gln Asp Leu Phe Leu Pro Phe Phe Ser Asn Val Thr Trp
 50 55 60
 Phe His Ala Ile His Val Ser Gly Thr Asn Gly Thr Lys Arg Phe Asp
 65 70 75 80
 Asn Pro Val Leu Pro Phe Asn Asp Gly Val Tyr Phe Ala Ser Thr Glu
 85 90 95
 Lys Ser Asn Ile Ile Arg Gly Trp Ile Phe Gly Thr Thr Leu Asp Ser

100 105 110
Lys Thr Gln Ser Leu Leu Ile Val Asn Asn Ala Thr Asn Val Val Ile

115 120 125
Lys Val Cys Glu Phe Gln Phe Cys Asn Asp Pro Phe Leu Gly Val Tyr

130 135 140
Tyr His Lys Asn Asn Lys Ser Trp Met Glu Ser Glu Phe Arg Val Tyr

145 150 155 160
Ser Ser Ala Asn Asn Cys Thr Phe Glu Tyr Val Ser Gln Pro Phe Leu

165 170 175
Met Asp Leu Glu Gly Lys Gln Gly Asn Phe Lys Asn Leu Arg Glu Phe

180 185 190
Val Phe Lys Asn Ile Asp Gly Tyr Phe Lys Ile Tyr Ser Lys His Thr

195 200 205
Pro Ile Asn Leu Val Arg Asp Leu Pro Gln Gly Phe Ser Ala Leu Glu

210 215 220
Pro Leu Val Asp Leu Pro Ile Gly Ile Asn Ile Thr Arg Phe Gln Thr

225 230 235 240
Leu Leu Ala Leu His Arg Ser Tyr Leu Thr Pro Gly Asp Ser Ser Ser

245 250 255
Gly Trp Thr Ala Gly Ala Ala Ala Tyr Tyr Val Gly Tyr Leu Gln Pro

260 265 270
Arg Thr Phe Leu Leu Lys Tyr Asn Glu Asn Gly Thr Ile Thr Asp Ala

275 280 285
Val Asp Cys Ala Leu Asp Pro Leu Ser Glu Thr Lys Cys Thr Leu Lys

290 295 300
Ser Phe Thr Val Glu Lys Gly Ile Tyr Gln Thr Ser Asn Phe Arg Val

305 310 315 320
Gln Pro Thr Glu Ser Ile Val Arg Phe Pro Asn Ile Thr Asn Leu Cys

325 330 335
Pro Phe Gly Glu Val Phe Asn Ala Thr Arg Phe Ala Ser Val Tyr Ala

340 345 350

Trp Asn Arg Lys Arg Ile Ser Asn Cys Val Ala Asp Tyr Ser Val Leu
355 360 365

Tyr Asn Ser Ala Ser Phe Ser Thr Phe Lys Cys Tyr Gly Val Ser Pro
370 375 380

Thr Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Thr Asn Val Tyr Ala Asp Ser Phe
385 390 395 400

Val Ile Arg Gly Asp Glu Val Arg Gln Ile Ala Pro Gly Gln Thr Gly
405 410 415

Lys Ile Ala Asp Tyr Asn Tyr Lys Leu Pro Asp Asp Phe Thr Gly Cys
420 425 430

Val Ile Ala Trp Asn Ser Asn Asn Leu Asp Ser Lys Val Gly Gly Asn
435 440 445

Tyr Asn Tyr Leu Tyr Arg Leu Phe Arg Lys Ser Asn Leu Lys Pro Phe
450 455 460

Glu Arg Asp Ile Ser Thr Glu Ile Tyr Gln Ala Gly Ser Thr Pro Cys
465 470 475 480

Asn Gly Val Glu Gly Phe Asn Cys Tyr Phe Pro Leu Gln Ser Tyr Gly
485 490 495

Phe Gln Pro Thr Asn Gly Val Gly Tyr Gln Pro Tyr Arg Val Val Val
500 505 510

Leu Ser Phe Glu Leu Leu His Ala Pro Ala Thr Val Cys Gly Pro Lys
515 520 525

Lys Ser Thr Asn Leu Val Lys Asn Lys Cys Val Asn Phe Asn Phe Asn
530 535 540

Gly Leu Thr Gly Thr Gly Val Leu Thr Glu Ser Asn Lys Lys Phe Leu
545 550 555 560

Pro Phe Gln Gln Phe Gly Arg Asp Ile Ala Asp Thr Thr Asp Ala Val
565 570 575

Arg Asp Pro Gln Thr Leu Glu Ile Leu Asp Ile Thr Pro Cys Ser Phe
580 585 590

Gly Gly Val Ser Val Ile Thr Pro Gly Thr Asn Thr Ser Asn Gln Val

595 600 605
 Ala Val Leu Tyr Gln Asp Val Asn Cys Thr Glu Val Pro Val Ala Ile
 610 615 620
 His Ala Asp Gln Leu Thr Pro Thr Trp Arg Val Tyr Ser Thr Gly Ser

 625 630 635 640
 Asn Val Phe Gln Thr Arg Ala Gly Cys Leu Ile Gly Ala Glu His Val
 645 650 655
 Asn Asn Ser Tyr Glu Cys Asp Ile Pro Ile Gly Ala Gly Ile Cys Ala
 660 665 670
 Ser Tyr Gln Thr Gln Thr Asn Ser Pro Arg Arg Ala Arg Ser Val Ala
 675 680 685
 Ser Gln Ser Ile Ile Ala Tyr Thr Met Ser Leu Gly Ala Glu Asn Ser

 690 695 700
 Val Ala Tyr Ser Asn Asn Ser Ile Ala Ile Pro Thr Asn Phe Thr Ile
 705 710 715 720
 Ser Val Thr Thr Glu Ile Leu Pro Val Ser Met Thr Lys Thr Ser Val
 725 730 735
 Asp Cys Thr Met Tyr Ile Cys Gly Asp Ser Thr Glu Cys Ser Asn Leu
 740 745 750
 Leu Leu Gln Tyr Gly Ser Phe Cys Thr Gln Leu Asn Arg Ala Leu Thr

 755 760 765
 Gly Ile Ala Val Glu Gln Asp Lys Asn Thr Gln Glu Val Phe Ala Gln
 770 775 780
 Val Lys Gln Ile Tyr Lys Thr Pro Pro Ile Lys Asp Phe Gly Gly Phe
 785 790 795 800
 Asn Phe Ser Gln Ile Leu Pro Asp Pro Ser Lys Pro Ser Lys Arg Ser
 805 810 815
 Phe Ile Glu Asp Leu Leu Phe Asn Lys Val Thr Leu Ala Asp Ala Gly

 820 825 830
 Phe Ile Lys Gln Tyr Gly Asp Cys Leu Gly Asp Ile Ala Ala Arg Asp
 835 840 845

Leu Ile Cys Ala Gln Lys Phe Asn Gly Leu Thr Val Leu Pro Pro Leu
 850 855 860
 Leu Thr Asp Glu Met Ile Ala Gln Tyr Thr Ser Ala Leu Leu Ala Gly
 865 870 875 880
 Thr Ile Thr Ser Gly Trp Thr Phe Gly Ala Gly Ala Ala Leu Gln Ile
 885 890 895
 Pro Phe Ala Met Gln Met Ala Tyr Arg Phe Asn Gly Ile Gly Val Thr
 900 905 910
 Gln Asn Val Leu Tyr Glu Asn Gln Lys Leu Ile Ala Asn Gln Phe Asn
 915 920 925
 Ser Ala Ile Gly Lys Ile Gln Asp Ser Leu Ser Ser Thr Ala Ser Ala
 930 935 940
 Leu Gly Lys Leu Gln Asp Val Val Asn Gln Asn Ala Gln Ala Leu Asn
 945 950 955 960
 Thr Leu Val Lys Gln Leu Ser Ser Asn Phe Gly Ala Ile Ser Ser Val
 965 970 975
 Leu Asn Asp Ile Leu Ser Arg Leu Asp Lys Val Glu Ala Glu Val Gln
 980 985 990
 Ile Asp Arg Leu Ile Thr Gly Arg Leu Gln Ser Leu Gln Thr Tyr Val
 995 1000 1005
 Thr Gln Gln Leu Ile Arg Ala Ala Glu Ile Arg Ala Ser Ala Asn
 1010 1015 1020
 Leu Ala Ala Thr Lys Met Ser Glu Cys Val Leu Gly Gln Ser Lys
 1025 1030 1035
 Arg Val Asp Phe Cys Gly Lys Gly Tyr His Leu Met Ser Phe Pro
 1040 1045 1050
 Gln Ser Ala Pro His Gly Val Val Phe Leu His Val Thr Tyr Val
 1055 1060 1065
 Pro Ala Gln Glu Lys Asn Phe Thr Thr Ala Pro Ala Ile Cys His
 1070 1075 1080
 Asp Gly Lys Ala His Phe Pro Arg Glu Gly Val Phe Val Ser Asn

1085 1090 1095
 Gly Thr His Trp Phe Val Thr Gln Arg Asn Phe Tyr Glu Pro Gln
 1100 1105 1110
 Ile Ile Thr Thr Asp Asn Thr Phe Val Ser Gly Asn Cys Asp Val
 1115 1120 1125
 Val Ile Gly Ile Val Asn Asn Thr Val Tyr Asp Pro Leu Gln Pro

1130 1135 1140
 Glu Leu Asp Ser Phe Lys Glu Glu Leu Asp Lys Tyr Phe Lys Asn
 1145 1150 1155
 His Thr Ser Pro Asp Val Asp Leu Gly Asp Ile Ser Gly Ile Asn
 1160 1165 1170
 Ala Ser Val Val Asn Ile Gln Lys Glu Ile Asp Arg Leu Asn Glu
 1175 1180 1185
 Val Ala Lys Asn Leu Asn Glu Ser Leu Ile Asp Leu Gln Glu Leu

1190 1195 1200
 Gly Lys Tyr Glu Gln Tyr Ile Lys Trp Pro Trp Tyr Ile Trp Leu
 1205 1210 1215
 Gly Phe Ile Ala Gly Leu Ile Ala Ile Val Met Val Thr Ile Met
 1220 1225 1230
 Leu Cys Cys Met Thr Ser Cys Cys Ser Cys Leu Lys Gly Cys Cys
 1235 1240 1245
 Ser Cys Gly Ser Cys Cys Lys Phe Asp Glu Asp Asp Ser Glu Pro

1250 1255 1260
 Val Leu Lys Gly Val Lys Leu His Tyr Thr
 1265 1270

<210> 2

<211> 3819

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Coding Sequence

<400> 2

auguuugugu uucuugugcu gcugccucuu gugucuucuc agugugugaa uuugacaaca

60

agaacacagc ugccaccagc uuauacaaau ucuuuuacca gaggagugua uuauccugau	120
aaaguguuuu gaucuuucug gcuacacagc acacaggacc uguuucugcc auuuuuuagc	180
aaugugacau gguuucaugc aaaucaugug ucuggaacaa auggaacaaa aagauuuugau	240
aauccugugc ugccuuuuua ugauggagug uauuuugcuu caacagaaaa gucaaaauuu	300
auuagaggau ggauuuuugg aacaacacug gauucuaaaa cacagucucu gcugauuugug	360
aaauaugcaa caauuguggu gauuaaagug ugugaauuuc aguuuuguaa ugauccuuuu	420
cugggagugu auuauacaaa aaauaauaaa ucuuggaugg aaucugaauu uagaguguaa	480
uccucugcaa auaauuguac auuugaauau gugucucagc cuuuucugau ggauccugaa	540
ggaaaacagg gcauuuuuaa aaucugaga gaauuugugu uuaaaaaauu ugauggauau	600
uuuaaaaauu auucuaaaca cacaccaauu aaauuaguga gagaucugcc ucagggaauu	660
ucugcucugg aaccucuggu ggauccugca auuggcauuu auauuacaag auuucagaca	720
cugcuggcuc ugcacagauc uuauucugaca ccuggagauu cuucucugc auggacagcc	780
ggagcugcag cuuauuuugu gggcuauucug cagccaagaa cauuucugcu gaaauauauu	840
gaaaauggaa caauuacaga ugcuguggau ugugcucugg auccucuguc ugaaacaaaa	900
uguacauuaa aaucuuuuac aguggaaaaa ggcauuuauc agacaucaaa uuuuagagug	960
cagccaacag aaucuuuuu gagauuuuca aaauuacaa aucugugucc auuuggagaa	1020
guguuuuauug caacaagauu ugcaucugug uaugcaugga auagaaaaag aaauucuaau	1080
uguguggcug auuauucugu gcuguaauau agugcuucuu uuuccacauu uaaauguuau	1140
ggagugucuc caacaaaaau aaaugauuuu uguuuuacaa auguguauuc ugauucuuuu	1200
gugaucagag gugaugaagu gagacagauu gccccggac agacaggaaa aaugcugau	1260
uacaauuaca aacugccuga ugauuuuaca ggauugugua uugcuuggaa uucuaauauu	1320
uuagaauuaa aagugggagg aaauuacaau uaucuguaca gacuguuuag aaaaucuuu	1380
cugaaaccuu uugaaagaga uauuucaaca gaaauuuauc aggcuggauc aacaccuugu	1440
aauggagugg aaggauuuua uuguuuuuuu ccuuuacaga gcuauugauu ucagccaacc	1500
aauggugugg gauaucagcc auauagagug guggugcugu cuuuugaacu gcugcaugca	1560
ccugcaacag uguguggacc uaaaaaauu acaauuuuag ugaauuuuaa augugugaau	1620
uuuaauuuua auggaauaac aggaacagga gugcugacag aaucuaauaa aaaaauucug	1680
ccuuuucagc aguuuggcag agauauugca gauaccacag augcagugag agauccucag	1740
acauuagaaa uucuggaauu uacaccuugu ucuuuugggg gugugucugu gauuacaccu	1800
ggaacaaaua caucuaaua gguggcugug cuguaucagg augugaauug uacagaagug	1860

ccaguggcaa uucaugcaga ucagcugaca ccaacaugga gaguguauuc uacaggaucu	1920
aauguguuuc agacaagagc aggaugucug auuggagcag aacaugugaa uaaauucuau	1980
gaaugugaua uuccaauugg agcaggcguu ugugcaucu aucagacaca gacaaaaucc	2040
ccaaggagag caagaucugu ggcaucucag ucuauuuug cauacaccau gucucuggga	2100
gcagaaaau cuugggcaua uucuaauau ucuauugcua uuccaacaaa uuuuaccuu	2160
ucugugacaa cagaaaauu accugugucu augacaaaa caucugugga uuguaccaug	2220
uacauuugug gagauucuac agaauuguu aaucugcugc ugcaguauug aucuuuuugu	2280
acacagcuga auagagcuu aacaggaaau gcuguggaac aggauaaaaa uacacaggaa	2340
guguuugcuc aggugaaaca gauuuacaaa acaccaccaa uuaaagauuu uggaggauuu	2400
aauuuuagcc agauucugcc ugauccuucu aaaccuucua aaagauuuu uauugaagau	2460
cugcuguuuu auaaagugac acuggcagau gcaggauuuu uuaaacagua uggagauugc	2520
cugggugaua uugcugcaag agaucugauu ugugcucaga aauuuauug acugacagug	2580
cugccuccuc ugcugacaga ugaaaugauu gcucaguaca caucugcuu acuggcugga	2640
acaauuacaa gcggauggac auuuggagcu ggagcugcuc ugcagauucc uuuugcaug	2700
cagauggcuu acagauuuu uggauuugga gugacacaga auguguuaua ugaaaaucag	2760
aaacugauug caaaucaguu uaaucugca auuggcaaaa uucaggauuc ucugucuucu	2820
acagcuucug cucugggaaa acugcaggau guggugaauc agaauacaca ggcacugau	2880
acucugguga aacagcuguc uagcauuuu ggggcauuu cuucugugcu gaaugauuu	2940
cugucuagac uggauaaagu ggaagcugaa gugcagauug auagacugau cacaggaaga	3000
cugcagucuc ugcagacuua ugugacacag cagcugauua gagcugcuga aauuagagcu	3060
ucugcuauuc uggcugcuac aaaaauugcu gaaugugugc ugggacaguc aaaaagagug	3120
gauuuuugug gaaaaggaua ucaucugaug ucuuuuccac agucugcucc acauggagug	3180
guguuuuuac augugacaua ugugccagca caggaaaaga auuuuaccac agcaccagca	3240
auuugucaug auggaaaagc acauuuucca agagaaggag uguuuugugc uaauggaaca	3300
cauugguuug ugacacagag aaauuuuuu gaaccucaga uuaauacaac agauaaauaca	3360
uuugugucag gaaauguga uguggugauu ggaauuguga auaauacagu guaугaucu	3420
cugcagccag aacuggauc uuuuaaagaa gaacuggaau aauuuuuuaa aaucacaca	3480
ucuccugaug uggaauuagg agauuuuucu ggaaucaaug caucuguggu gaauauucag	3540
aaagaaaauug auagacugaa ugaaguggcc aaaaauucuga augaaucucu gauugaucug	3600

caggaacuug gaaaauuga acaguacauu aaauggccuu gguacauuug gcuuggauuu 3660
 auugcaggau uauuugcaau ugugauggug acauuuangu uauguuguau gacaucaugu 3720
 uguucuuguu uaaaaggaug uguuucuugu ggaagcuguu guaaaauuga ugaagaugau 3780
 ucugaaccug uguuuuuaagg agugaaauug cauucaca 3819

<210> 3

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> S Protein RBD Fusion

<400> 3

Met Phe Val Phe Leu Val Leu Leu Pro Leu Val Ser Ser Gln Cys Val
 1 5 10 15

Val Arg Phe Pro Asn Ile Thr Asn Leu Cys Pro Phe Gly Glu Val Phe
 20 25 30

Asn Ala Thr Arg Phe Ala Ser Val Tyr Ala Trp Asn Arg Lys Arg Ile
 35 40 45

Ser Asn Cys Val Ala Asp Tyr Ser Val Leu Tyr Asn Ser Ala Ser Phe
 50 55 60

Ser Thr Phe Lys Cys Tyr Gly Val Ser Pro Thr Lys Leu Asn Asp Leu
 65 70 75 80

Cys Phe Thr Asn Val Tyr Ala Asp Ser Phe Val Ile Arg Gly Asp Glu
 85 90 95

Val Arg Gln Ile Ala Pro Gly Gln Thr Gly Lys Ile Ala Asp Tyr Asn
 100 105 110

Tyr Lys Leu Pro Asp Asp Phe Thr Gly Cys Val Ile Ala Trp Asn Ser
 115 120 125

Asn Asn Leu Asp Ser Lys Val Gly Gly Asn Tyr Asn Tyr Leu Tyr Arg
 130 135 140

Leu Phe Arg Lys Ser Asn Leu Lys Pro Phe Glu Arg Asp Ile Ser Thr
 145 150 155 160

Glu Ile Tyr Gln Ala Gly Ser Thr Pro Cys Asn Gly Val Glu Gly Phe
 165 170 175

Asn Cys Tyr Phe Pro Leu Gln Ser Tyr Gly Phe Gln Pro Thr Asn Gly
180 185 190

Val Gly Tyr Gln Pro Tyr Arg Val Val Val Leu Ser Phe Glu Leu Leu
195 200 205

His Ala Pro Ala Thr Val Cys Gly Pro Lys
210 215

<210> 4

<211> 654

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Coding Sequence

<400> 4

auguuugugu uucuugugcu gcugccucuu gugucuucuc aguguguggu gagauuucca 60

aaauuuacaa aucugugucc auuuggagaa guguuuaaag caacaagauu ugcaucugug 120

uaugcaugga auagaaaaag aaauucuaau uguguggcug auuauucugu gcuguauaa 180

agugcuucuu uuuccacauu uaaauguuau ggagugucuc caacaaaauu aaaugauuu 240

uguuuuacaa auguguaugc ugauucuuuu gugaucagag gugaugaagu gagacagauu 300

gcccccgac agacaggaaa aaugcugau uacaauuaca aacugccuga ugauuuuaca 360

ggauguguga uugcuuggaa uucuaauaau uuagauucua aagugggagg aaauuacaa 420

uauuguuaca gacuguuuag aaaaucuuu cugaaaccuu uugaaagaga uauuucaaca 480

gaaauuuuac aggcuggauc aacaccuugu aauggagugg aaggauuuua uuguuuuuu 540

ccauuacaga gcuauuggauu ucagccaacc aauggugugg gauaucagcc auauagagug 600

guggugcugu cuuuugaacu gcugcaugca ccugcaacag uguguggacc uaaa 654

<210> 5

<211> 266

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> S Protein RBD Fusion

<400> 5

Met Phe Val Phe Leu Val Leu Leu Pro Leu Val Ser Ser Gln Cys Val

1 5 10 15

Val Arg Phe Pro Asn Ile Thr Asn Leu Cys Pro Phe Gly Glu Val Phe

20 25 30
 Asn Ala Thr Arg Phe Ala Ser Val Tyr Ala Trp Asn Arg Lys Arg Ile
 35 40 45
 Ser Asn Cys Val Ala Asp Tyr Ser Val Leu Tyr Asn Ser Ala Ser Phe
 50 55 60

 Ser Thr Phe Lys Cys Tyr Gly Val Ser Pro Thr Lys Leu Asn Asp Leu
 65 70 75 80
 Cys Phe Thr Asn Val Tyr Ala Asp Ser Phe Val Ile Arg Gly Asp Glu
 85 90 95
 Val Arg Gln Ile Ala Pro Gly Gln Thr Gly Lys Ile Ala Asp Tyr Asn
 100 105 110
 Tyr Lys Leu Pro Asp Asp Phe Thr Gly Cys Val Ile Ala Trp Asn Ser
 115 120 125

 Asn Asn Leu Asp Ser Lys Val Gly Gly Asn Tyr Asn Tyr Leu Tyr Arg
 130 135 140
 Leu Phe Arg Lys Ser Asn Leu Lys Pro Phe Glu Arg Asp Ile Ser Thr
 145 150 155 160
 Glu Ile Tyr Gln Ala Gly Ser Thr Pro Cys Asn Gly Val Glu Gly Phe
 165 170 175
 Asn Cys Tyr Phe Pro Leu Gln Ser Tyr Gly Phe Gln Pro Thr Asn Gly
 180 185 190

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

 Ser Leu Glu Val Leu Phe Gln Gly Pro Gly
 260 265

<210> 6

<211> 798

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Coding Sequence

<400> 6

auguuugugu uucuugugcu gcugccucu gugucuucuc aguguguggu gagauuucca 60
 aaauuuacaa aucugugucc auuuggagaa guuuuuuauug caacaagauu ugcaucugug 120
 uaugcaugga auagaaaaag aauuucuaau uguguggcug auuauucugu gcuguauauu 180
 agugcuucuu uuuccacauu uaaauguuau ggagugucuc caacaaaauu aaugauuuu 240
 uguuuuacaa auguguaugc ugauucuuuu gugaucagag gugaugaagu gagacagauu 300

gcccccgac agacaggaaa aauugcugau uacaauuaca aacugccuga ugauuuuaca 360
 ggauguguga uugcuuggaa uucuaauauu uuagauucua aagugggagg aaauuacauu 420
 uaucuguaca gacuguuuag aaaaucuuu cugaaaccuu uugaaagaga uauuucaaca 480
 gaaauuuuac aggcuggauc aacaccuugu aauggagugg aaggauuuu uuguuuuuu 540
 ccuuuacaga gcuauggauu ucagccaacc aauggugugg gauaucagcc auauagagug 600
 guggugcugu cuuuugaacu gcugcaugca ccugcaacag uguguggacc uaaaggcucc 660
 cccggcuccg gcuccggauc ugguuauuuu ccugaagcuc caagagaugg gcaagcuuac 720

guucguaaag auggcgaug gguauuacuu ucuaccuuu uaggccgguc ccuggaggug 780
 cuguuccagg gccccggc 798

<210> 7

<211> 1273

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> S Protein Variant

<400> 7

Met Phe Val Phe Leu Val Leu Leu Pro Leu Val Ser Ser Gln Cys Val

1 5 10 15

Asn Leu Thr Thr Arg Thr Gln Leu Pro Pro Ala Tyr Thr Asn Ser Phe

20 25 30

Thr Arg Gly Val Tyr Tyr Pro Asp Lys Val Phe Arg Ser Ser Val Leu

35 40 45

His Ser Thr Gln Asp Leu Phe Leu Pro Phe Phe Ser Asn Val Thr Trp
 50 55 60
 Phe His Ala Ile His Val Ser Gly Thr Asn Gly Thr Lys Arg Phe Asp
 65 70 75 80
 Asn Pro Val Leu Pro Phe Asn Asp Gly Val Tyr Phe Ala Ser Thr Glu
 85 90 95

 Lys Ser Asn Ile Ile Arg Gly Trp Ile Phe Gly Thr Thr Leu Asp Ser
 100 105 110
 Lys Thr Gln Ser Leu Leu Ile Val Asn Asn Ala Thr Asn Val Val Ile
 115 120 125
 Lys Val Cys Glu Phe Gln Phe Cys Asn Asp Pro Phe Leu Gly Val Tyr
 130 135 140
 Tyr His Lys Asn Asn Lys Ser Trp Met Glu Ser Glu Phe Arg Val Tyr
 145 150 155 160

 Ser Ser Ala Asn Asn Cys Thr Phe Glu Tyr Val Ser Gln Pro Phe Leu
 165 170 175
 Met Asp Leu Glu Gly Lys Gln Gly Asn Phe Lys Asn Leu Arg Glu Phe
 180 185 190
 Val Phe Lys Asn Ile Asp Gly Tyr Phe Lys Ile Tyr Ser Lys His Thr
 195 200 205
 Pro Ile Asn Leu Val Arg Asp Leu Pro Gln Gly Phe Ser Ala Leu Glu
 210 215 220

 Pro Leu Val Asp Leu Pro Ile Gly Ile Asn Ile Thr Arg Phe Gln Thr
 225 230 235 240
 Leu Leu Ala Leu His Arg Ser Tyr Leu Thr Pro Gly Asp Ser Ser Ser
 245 250 255
 Gly Trp Thr Ala Gly Ala Ala Ala Tyr Tyr Val Gly Tyr Leu Gln Pro
 260 265 270
 Arg Thr Phe Leu Leu Lys Tyr Asn Glu Asn Gly Thr Ile Thr Asp Ala
 275 280 285

 Val Asp Cys Ala Leu Asp Pro Leu Ser Glu Thr Lys Cys Thr Leu Lys

290 295 300
 Ser Phe Thr Val Glu Lys Gly Ile Tyr Gln Thr Ser Asn Phe Arg Val
 305 310 315 320
 Gln Pro Thr Glu Ser Ile Val Arg Phe Pro Asn Ile Thr Asn Leu Cys
 325 330 335
 Pro Phe Gly Glu Val Phe Asn Ala Thr Arg Phe Ala Ser Val Tyr Ala
 340 345 350

 Trp Asn Arg Lys Arg Ile Ser Asn Cys Val Ala Asp Tyr Ser Val Leu
 355 360 365
 Tyr Asn Ser Ala Ser Phe Ser Thr Phe Lys Cys Tyr Gly Val Ser Pro
 370 375 380
 Thr Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Thr Asn Val Tyr Ala Asp Ser Phe
 385 390 395 400
 Val Ile Arg Gly Asp Glu Val Arg Gln Ile Ala Pro Gly Gln Thr Gly
 405 410 415

 Lys Ile Ala Asp Tyr Asn Tyr Lys Leu Pro Asp Asp Phe Thr Gly Cys
 420 425 430
 Val Ile Ala Trp Asn Ser Asn Asn Leu Asp Ser Lys Val Gly Gly Asn
 435 440 445
 Tyr Asn Tyr Leu Tyr Arg Leu Phe Arg Lys Ser Asn Leu Lys Pro Phe
 450 455 460
 Glu Arg Asp Ile Ser Thr Glu Ile Tyr Gln Ala Gly Ser Thr Pro Cys
 465 470 475 480

 Asn Gly Val Glu Gly Phe Asn Cys Tyr Phe Pro Leu Gln Ser Tyr Gly
 485 490 495
 Phe Gln Pro Thr Asn Gly Val Gly Tyr Gln Pro Tyr Arg Val Val Val
 500 505 510
 Leu Ser Phe Glu Leu Leu His Ala Pro Ala Thr Val Cys Gly Pro Lys
 515 520 525
 Lys Ser Thr Asn Leu Val Lys Asn Lys Cys Val Asn Phe Asn Phe Asn
 530 535 540

Gly Leu Thr Gly Thr Gly Val Leu Thr Glu Ser Asn Lys Lys Phe Leu
 545 550 555 560
 Pro Phe Gln Gln Phe Gly Arg Asp Ile Ala Asp Thr Thr Asp Ala Val
 565 570 575
 Arg Asp Pro Gln Thr Leu Glu Ile Leu Asp Ile Thr Pro Cys Ser Phe
 580 585 590
 Gly Gly Val Ser Val Ile Thr Pro Gly Thr Asn Thr Ser Asn Gln Val
 595 600 605

 Ala Val Leu Tyr Gln Asp Val Asn Cys Thr Glu Val Pro Val Ala Ile
 610 615 620
 His Ala Asp Gln Leu Thr Pro Thr Trp Arg Val Tyr Ser Thr Gly Ser
 625 630 635 640
 Asn Val Phe Gln Thr Arg Ala Gly Cys Leu Ile Gly Ala Glu His Val
 645 650 655
 Asn Asn Ser Tyr Glu Cys Asp Ile Pro Ile Gly Ala Gly Ile Cys Ala
 660 665 670

 Ser Tyr Gln Thr Gln Thr Asn Ser Pro Arg Arg Ala Arg Ser Val Ala
 675 680 685
 Ser Gln Ser Ile Ile Ala Tyr Thr Met Ser Leu Gly Ala Glu Asn Ser
 690 695 700
 Val Ala Tyr Ser Asn Asn Ser Ile Ala Ile Pro Thr Asn Phe Thr Ile
 705 710 715 720
 Ser Val Thr Thr Glu Ile Leu Pro Val Ser Met Thr Lys Thr Ser Val
 725 730 735

 Asp Cys Thr Met Tyr Ile Cys Gly Asp Ser Thr Glu Cys Ser Asn Leu
 740 745 750
 Leu Leu Gln Tyr Gly Ser Phe Cys Thr Gln Leu Asn Arg Ala Leu Thr
 755 760 765
 Gly Ile Ala Val Glu Gln Asp Lys Asn Thr Gln Glu Val Phe Ala Gln
 770 775 780
 Val Lys Gln Ile Tyr Lys Thr Pro Pro Ile Lys Asp Phe Gly Gly Phe

785 790 795 800

Asn Phe Ser Gln Ile Leu Pro Asp Pro Ser Lys Pro Ser Lys Arg Ser

805 810 815

Phe Ile Glu Asp Leu Leu Phe Asn Lys Val Thr Leu Ala Asp Ala Gly

820 825 830

Phe Ile Lys Gln Tyr Gly Asp Cys Leu Gly Asp Ile Ala Ala Arg Asp

835 840 845

Leu Ile Cys Ala Gln Lys Phe Asn Gly Leu Thr Val Leu Pro Pro Leu

850 855 860

Leu Thr Asp Glu Met Ile Ala Gln Tyr Thr Ser Ala Leu Leu Ala Gly

865 870 875 880

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

885 890 895

Pro Phe Ala Met Gln Met Ala Tyr Arg Phe Asn Gly Ile Gly Val Thr

900 905 910

Gln Asn Val Leu Tyr Glu Asn Gln Lys Leu Ile Ala Asn Gln Phe Asn

915 920 925

Ser Ala Ile Gly Lys Ile Gln Asp Ser Leu Ser Ser Thr Ala Ser Ala

930 935 940

Leu Gly Lys Leu Gln Asp Val Val Asn Gln Asn Ala Gln Ala Leu Asn

945 950 955 960

Thr Leu Val Lys Gln Leu Ser Ser Asn Phe Gly Ala Ile Ser Ser Val

965 970 975

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

980 985 990

Ile Asp Arg Leu Ile Thr Gly Arg Leu Gln Ser Leu Gln Thr Tyr Val

995 1000 1005

Thr Gln Gln Leu Ile Arg Ala Ala Glu Ile Arg Ala Ser Ala Asn

1010 1015 1020

Leu Ala Ala Thr Lys Met Ser Glu Cys Val Leu Gly Gln Ser Lys

1025 1030 1035

Arg Val Asp Phe Cys Gly Lys Gly Tyr His Leu Met Ser Phe Pro
1040 1045 1050

Gln Ser Ala Pro His Gly Val Val Phe Leu His Val Thr Tyr Val
1055 1060 1065

Pro Ala Gln Glu Lys Asn Phe Thr Thr Ala Pro Ala Ile Cys His
1070 1075 1080

Asp Gly Lys Ala His Phe Pro Arg Glu Gly Val Phe Val Ser Asn
1085 1090 1095

Gly Thr His Trp Phe Val Thr Gln Arg Asn Phe Tyr Glu Pro Gln
1100 1105 1110

Ile Ile Thr Thr Asp Asn Thr Phe Val Ser Gly Asn Cys Asp Val
1115 1120 1125

Val Ile Gly Ile Val Asn Asn Thr Val Tyr Asp Pro Leu Gln Pro
1130 1135 1140

Glu Leu Asp Ser Phe Lys Glu Glu Leu Asp Lys Tyr Phe Lys Asn
1145 1150 1155

His Thr Ser Pro Asp Val Asp Leu Gly Asp Ile Ser Gly Ile Asn
1160 1165 1170

Ala Ser Val Val Asn Ile Gln Lys Glu Ile Asp Arg Leu Asn Glu
1175 1180 1185

Val Ala Lys Asn Leu Asn Glu Ser Leu Ile Asp Leu Gln Glu Leu
1190 1195 1200

Gly Lys Tyr Glu Gln Tyr Ile Lys Trp Pro Trp Tyr Ile Trp Leu
1205 1210 1215

Gly Phe Ile Ala Gly Leu Ile Ala Ile Val Met Val Thr Ile Met
1220 1225 1230

Leu Cys Cys Met Thr Ser Cys Cys Ser Cys Leu Lys Gly Cys Cys
1235 1240 1245

Ser Cys Gly Ser Cys Cys Lys Phe Asp Glu Asp Asp Ser Glu Pro
1250 1255 1260

Val Leu Lys Gly Val Lys Leu His Tyr Thr

1265	1270	
<210>	8	
<211>	3819	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Coding Sequence	
<400>	8	
auguuugugu uucuugugcu gcugccucuu gugucuucuc agugugugaa uuugacaaca	60	
agaacacagc ugccaccagc uuauacaaau uuuuuuacca gaggagugua uuauccugau	120	
aaaguguuuu gaucuucugu gcugcacagc acacaggacc uguuucugcc auuuuuuagc	180	
aaugugacau gguuucaugc aaaucaugug ucuggaacaa auggaacaaa aagauuuugau	240	
aauccugugc ugccuuuuua ugauaggagug uauuuugcuu caacagaaaa gucaaaauuu	300	
auuagaggau ggauuuuugg aacaacacug gauucuaaaa cacagucucu gcugauugug	360	
aaauaugcaa caaauugguu gauuaaagug ugugaauuuc aguuuuguaa ugauccuuuu	420	
cugggagugu auuauacaaa aaauaauaaa ucuuggaugg aaucugaauu uagaguguau	480	
uccucugcaa auaauuguac auuugaauau gugucucagc cuuuucugau ggauccuggaa	540	
ggaaaacagg gcauuuuuaa aaauucugaga gaauuuugugu uuaaaaaauu ugauggauau	600	
uuuaaaaauu auucuaaaca cacaccaauu aaauuaguga gagaucugcc ucagggaauu	660	
ucugcucugg aaccucuggu ggauccugca auuggcauuu auauuacaag auuucagaca	720	
cugcuggcuc ugcacagauc uuauucugaca ccuggagauu cuucucugc auggacagcc	780	
ggagcugcag cuuauuauu gggcuauucug cagccaagaa cauuucugcu gaaauauauu	840	
gaaaauaggaa caauuacaga ugcuguggau ugugcucugg auccucuguc ugaaacaaaa	900	
uguacauuaa aaucuuuuac aguggaaaaa ggcauuuauc agacaucuaa uuuuagagug	960	
cagccaacag aaucuuuuu gagauuuuca aaauuacaa aucugugucc auuuggagaa	1020	
guguuuuauug caacaagauu ugcaucugug uaugcaugga auagaaaaag aaauucuaau	1080	
uguguggcug auuauucugu gcuguauauu agugcuucuu uuuccacauu uaaauuguau	1140	
ggagugucuc caacaaaauu aaauuuuuu uuuuuuacaa auguguauugc ugauuuuuu	1200	
gugaucagag gugaugaagu gagacagauu gccccggac agacaggaaa aaugcugau	1260	
uacaauuaca aacugccuga ugauuuuaca ggauugugua uugcuuggaa uucuaauau	1320	
uuagauucua aagugggagg aaauuacaa uaucuguaca gacuuuuag aaaaucuuu	1380	
cugaaaccuu uugaaagaga uauuucaaca gaaauuuuac aggcuggauc aacaccuugu	1440	

aauggagugg aaggauuuuaa uuguuuuuuu ccauuacaga gcuauaggauu ucagccaacc	1500
aauggugugg gauaucagcc auauagagug guggugcugu cuuuugaacu gcugcaugca	1560
ccugcaacag uguguggacc uaaaaaau cu acauuuuag ugaauuuuaa augugugaau	1620
uuuaauuuuaa auggauuaac aggaacagga gugcugacag aaucuaauaa aaaaauucug	1680
ccuuuucagc aguuuggcag agauauugca gauaccacag augcagugag agauccucag	1740
acauuagaaa uucuggauau uacaccuugu ucuuuugggg gugugucugu gauuacaccu	1800
ggaacaaaau caucuaauca gguggcugug cuguaucagg augugaauug uacagaagug	1860
ccaguggcaa uucaugcaga ucagcugaca ccaacaugga gaguguauuc uacaggaucu	1920
aauguguuuc agacaagagc aggaugucug auuggagcag aacaugugaa uauuucuuau	1980
gaaugugaua uucaauugg agcaggcauu ugugcaucuu aucagacaca gacaaauucc	2040
ccaaggagag caagaucugu ggcaucucag ucuuuuuug cauacaccuau gucucuggga	2100
gcagaaaauu cuguggcaua uucuaauaau ucuauugcua uucaaaaaa uuuuaccuau	2160
ucugugacaa cagaaaauuu accugugucu augacaaaaa caucugugga uuguaccaug	2220
uacauuugug gagauucua acagauguu uaaucugcugc ugcaguauug aucuuuuugu	2280
acacagcuga auagagcuu aacaggaauu gcuguggaac aggaauaaaa uacacaggaa	2340
guguuugcuc agguuagaa cauuuacaaa acaccacca uuaaagauuu uggaggauuu	2400
aaauuagcc agauucugc ugaucuuu aaaccuucua aaagauuuu uauugaagau	2460
cugcuguuuu auaaagugac acuggcagau gcaggauuuu uuaaacagua uggagauugc	2520
cugggugaua uugcugcaag agaucugauu ugugcucaga aauuuuauug acugacagug	2580
cugccuccuc ugcugacaga ugaaugauu gcucaguaca caucugcuu acuggcugga	2640
acaauuacaa gcggauggac auuuggagcu ggagcugcuc ugcagauucc uuuugcaaug	2700
cagauggcuu acagauuuua uggaauugga gugacacaga auguguuua ugaaaaucag	2760
aaacugauug caaaucaguu uauuucugca auuggcaaaa uucaggauuc ucugucuucu	2820
acagcuucug cucugggaaa acugcaggau guggugaauc agaauagcaca ggcacugaau	2880
acucugguga aacagcuguc uagcauuuuu ggggcauuu cuucugugcu gaaugauuu	2940
cugucuagac uggauccucc ugaagcugaa ggcagauug auagacugau cacaggaaga	3000
cugcagucuc ugcagacuua ugugacacag cagcugauua gagcugcuga aauuagagcu	3060
ucugcuauuc uggcugcuac aaaaaugucu gaaugugugc ugggacaguc aaaaagagug	3120
gauuuuuugug gaaaaggaua ucaucugaug ucuuuuccac agucugcucc acauggagug	3180
guguuuuuac augugacaua ugugccagca caggaaaaga auuuuaccac agcaccagca	3240
auuugucaug auggaaaagc acauuuucca agagaaggag uguuuguguc uaauggaaca	3300

cauugguuug ugacacagag aaauuuuuau gaaccucaga uuauuacaac agauaaauaca	3360
uuugugucag gaaaauuguga uguggugauu ggaauuguga auaauacagu guaugaucca	3420
cugcagccag aacuggauuc uuuuaaagaa gaacuggaua aaauuuuuaa aaauacaca	3480
ucuccugaug uggaauuagg agauuuuucu ggaaucaaug caucuguggu gaauauucag	3540
aaagaaaauug auagacugaa ugaaguggcc aaaaaucuga augaauucuc gauugaucug	3600
caggaacuug gaaaauauga acaguacauu aaauggccuu gguacauuug gcuuggauuu	3660
auugcaggau uauuugcaau ugugauggug acauuuauu uauuguuau gacaucaugu	3720
uguucuuugu uaaaaggauu uguuucuuu ggaagcuguu guaaaauuga ugaagaugau	3780
ucugaaccug uguuuuuagg agugaaauug cauucaca	3819
<210> 9	
<211> 3819	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Coding Sequence	
<400> 9	
auguucgugu uccuggugcu gcugccucug guguccagcc agugugugaa ccugaccacc	60
agaacacagc ugccuccagc cuacaccaac agcuuuacca gaggcgugua cuaccccgac	120
aagguguuca gauccagcgu gcugcacucu acccaggacc uguuccugcc uuucucagc	180
aacgugaccu gguuccacgc cauccagcug uccggcacca auggcaccaa gagauucgac	240
aaccccgugc ugcccuucaa cgacggggug uacuuugcca gcaccgagaa guccaacauc	300
aucagaggcu ggaucuucgg caccacacug gacagcaaga cccagagccu gcugaucgug	360
aacaacgcca ccaacguggu caucaaagug ugcgaguucc aguucugcaa cgaccccuuc	420
cugggcgucu acuaccacaa gaacaacaag agcuggaugg aaagcgaguu ccggguguauc	480
agcagcgcca acaacugcac cuucgaguac guguccagc cuuuccugau ggaccuggaa	540
ggcaagcagg gcaacuuaa gaaccugcgc gaguucgugu uuaagaacau cgacggcuac	600
uuaagaucu acagcaagca caccucuuc aaccucgugc gggaucugcc ucaggguuc	660
ucugcucugg aaccccuugu ggaucugccc aucggcauca acauacccg guuucagaca	720
cugcuggccc ugcacagaag cuaccugaca ccuggcgaua gcagcagcgg auggacagcu	780
ggugccgccg cuuacuaugu gggcuaccug cagccuagaa ccuuccugcu gaaguacaac	840
gagaacggca ccaucaccga cgccguggau ugugcucugg auccucugag cgagacaaag	900
ugcaccuga aguuccuac cguggaaaag ggcaucuacc agaccagcaa cuuccgggug	960

cagccccaccg aauccaucgu gcgguucccc aaauacacca aucugugccc cuucggcgag	1020
guguucaaug ccaccagauu cgccucugug uacgccugga accggaagcg gaucagcaau	1080
ugcguggccg acuacuccgu gcuguacaac uccgccagcu ucagcaccuu caagugcuac	1140
ggcguguccc cuaccaagcu gaacgaccug ugcuuacaaa acguguacgc cgacagcuuc	1200
gugauccggg gagaugaagu gcggcagauu gccccuggac agacaggcaa gaucgccgac	1260
uacaacuaca agcugcccga cgacuucacc ggcuuguga uugccuggaa cagcaacaac	1320
cuggacucca aagucggcgg caacuacaau uaccuguacc ggcuuuuccg gaaguccaau	1380
cugaagcccu ucgagcggga cauccacc gagaucuauc aggccggcag caccuccuug	1440
aacggcgugg aaggcuucaa cugcuacuuc ccacugcagu ccuacggcuu ucagcccaca	1500
aauggcgugg gcuaucagcc cuacagagug guggugcuga gcuucgaacu gcugcaugcc	1560
ccugccacag ugugcgcccc uaagaaaagc accaauucg ugaagaaca augcgugaac	1620
uucaacuua acggccugac cggcaccggc gugcugacag agagcaaca gaaguuccug	1680
ccauuccagc aguuuggccg ggauaucgcc gauaccacag acgccguuag agaucccag	1740
acacuggaaa uccuggacau caccuccuugc agcuucggcg gagugucugu gaucacccu	1800
ggcaccaaca ccagcaaua gguggcagug cuguaccagg acgugaacug uaccgaagug	1860
cccguggcca uucacgccga ucagcugaca ccuacauggc ggguguacuc caccggcagc	1920
aauguguuuc agaccagagc cggcugucug aucggagccg agcacgugaa caauagcuac	1980
gagugcgaca ucccacugc gcuggaauc ugcgccagcu accagacaca gacaaacagc	2040
ccucggagag ccagaagcgu ggccagccag agcaucauug ccuacacaau gucucugggc	2100
gccgagaaca gcguggccua cuccaacaac ucuauvcua ucccaccaa cuucaccauc	2160
agcgugacca cagagaucuu gccugugucc augaccaaga ccagcgugga cugcaccag	2220
uacaucugcg gcgauuccac cgagugcucc aaccugcugc ugcaguacgg cagcuucugc	2280
accagcuga auagagcccu gacagggauc gccguggaac aggacaagaa caccaagag	2340
guguucgccc aagugaagca gaucuaaag accccuccua ucaaggacuu cggcgguuc	2400
aaauucagcc agauucugc cgauccuagc aagcccagca agcggagcuu caucaggagc	2460
cugcuguua acaaagugac acuggccgac gccggcuua ucaagcagua uggcgauugu	2520
cugggcgaca uugccgccg ggauucgauu ugcgccaga aguuuacgg acugacagug	2580
cugccuccuc ucugaccga ugagaugauc gcccaguaca caucugcccu gcuggccggc	2640
acaauacaaa gcggcuggac auuuggagca ggcgccgcuc ugcagaucuu cuuugcuau	2700
cagauggccu accgguucaa cggcaucgga gugaccaga augugcugua cgagaaccag	2760
aagcugauc ccaaccaguu caacagcgcc aucggcaaga uccaggacag ccugagcagc	2820

acagcaagcg cccugggaaa gcugcaggac guggucaacc agaauGCCa ggcacugaac 2880

accuGGuCa agcagcuguc cuccaacuuc ggCGccauca gcucugugcu gaacgauauc 2940

cugagcagac uggaccucc ugagGCCgag gugcagaucg acagacugau cacaggcaga 3000

cugcagagcc uccagacaua cGugaccag cagcugauca gagccGCCga gauuagagcc 3060

ucugccaauc uggccGCCca caagaugucu gaguguguc uggGCCagag caagagagug 3120

gacuuuugcg gcaagggcua ccaccugaug agcuuccuc agucugccc ucacggcgug 3180

guguuucugc acgugacaua ugugcccgcu caagagaaga auuuccacc cgcuccagcc 3240

aucugccacg acggcaaagc ccacuuuccu agagaaggcg uguucguguc caacggcacc 3300

cauGGuucg ugacacagcg gaacuucuaC gagccccaga ucauaccac cgacaacacc 3360

uucgugugug gcaacugcga cgucgugauc ggcauuguga acaauaccgu guacgaccu 3420

cugcagcccG agcuggacag cuucaaaagag gaacuggaca aguacuuuaa gaaccacaca 3480

agccccgacg uggaccuggg cgauaucagc ggaaucuaug ccagcgucgu gaacauccag 3540

aaagagaucg accggcugaa cgagguggcc aagaauCuga acgagagccu gaucgaccug 3600

caagaacugg ggaaguacga gcaguacauC aaguggcccu gguacaucug gcugggcuuu 3660

aucGCCgacg ugauugccau cgugaugguc acaauaucgC uguuugcau gaccagcugc 3720

uguagcugcc ugaagggcug uguuagcugu ggCagcugcu gcaaguucga cGaggacgau 3780

ucugagcccG ugcugaaggG cgugaaacug cacuacaca 3819

<210> 10

<211> 41

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Foldon Sequence

<400> 10

Gly Ser Gly Tyr Ile Pro Glu Ala Pro Arg Asp Gly Gln Ala Tyr Val

1 5 10 15

Arg Lys Asp Gly Glu Trp Val Leu Leu Ser Thr Phe Leu Gly Arg Ser

20 25 30

Leu Glu Val Leu Phe Gln Gly Pro Gly

35 40

<210> 11

<211> 123

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Coding Sequence

<400> 11

ggaucugguu auauuccuga agcuccaaga gaugggcaag cuuacguucg uaaagauggc 60

gaaugggauu uacuuccuac cuuuuuaggc cggucccugg aggugcuguu ccagggccccc 120

ggc 123

<210> 12

<211> 47

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5'-UTR

<400> 12

aacuaguauu cuucuggucc ccacagacuc agagagaacc cgccacc 47

<210> 13

<211> 278

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3'-UTR

<400> 13

cugguacugc augcacgcaa ugcuagcugc cccuuucccg uccuggguac cccgagucuc 60

ccccgaccuc gggucccagg uaugcuccca ccuccaccug cccacucac caccucugcu 120

aguuccagac accucccaag cacgcagcaa ugcagcucaa aacgcuuagc cuagccacac 180

ccccacggga aacagcagug auuaaccuuu agcaauaaac gaaaguuuua cuaagcuaua 240

cuaaccccag gguuggucaa uuucgugcca gccacacc 278

<210> 14

<211> 110

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> A30L70

<400> 14

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa gcuaugacu aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 60

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 110

<210> 15

<211> 4282

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RBL063.1

<400> 15

gggcgaacua guauucuucu ggucgccaca gacucagaga gaacccgcca ccauguuugu	60
guuucuugug cugcugccuc uugugucuuc ucagugugug aauuugacaa caagaacaca	120
gcugccacca gcuuauacaa auucuuuuac cagaggagug uauuauccug auaaaguguu	180
uagauucuucu gugcugcaca gcacacagga ccuguuucug ccauuuuuuu gcaaugugac	240
augguuucau gcaauucaug ugucuggaac aaauuggaaca aaaagauuug auaauccugu	300
gcugccuuuu aaugauggag uguauuuuugc uucaacagaa aagucaauua uuuuagagg	360
auggauuuuu ggaacaacac uggauucuaa aacacagucu cugcugauug ugaauaaugc	420
aacaaaugug gugauuuuag ugugugaauu ucaguuuugu aaugauccuu uucugggagu	480
guauuauacac aaaaaauaau aaucuuugau ggaauucugaa uuuagagugu auuccucugc	540
aaaauuuugu acauuugaau augugucuca gccuuuucug auggaucugg aaggaaaaca	600
gggcauuuuu aaaaauucuga gagaauuugu guuuuuuuuu auugauggau auuuuuuuuu	660
uuauucuaaa cacacaccaa uuaauuuagu gagagauucug ccucagggau uuucugcucu	720
ggaaccucug guggaucugc caauuggcau uauuauuaca agauuucaga cacugcuggc	780
ucugcacaga ucuuauucuga caccuggaga uucuuucuucu ggauaggacag ccggagcugc	840
agcuuauuuu gugggcuauc ugcagccaag aacauuucug cugaaauua augaaaugg	900
aacaauuaca gaugcugugg auugugcucu ggauccucug ucugaaacaa aauguacauu	960
aaaauuuuu acaguggaaa aaggcauuua ucagacaucu aauuuuagag ugcagccaac	1020
agaaucuuuu gugagauuuc caaaauuuac aaauucugugu ccauuuggag aaguguuuua	1080
ugcaacaaga uuugcaucug uguaugcaug gaauagaaaa agaauuucua auuguguggc	1140
ugauuauucu gugcuguuaa auagugcuuc uuuuuccaca uuuuuuuuu auggaguguc	1200
uccaacaaaa uuuuauuuu uauuuuuuac aaauuguuu gcugauucuu uugugaucag	1260
aggugaugaa gugagacaga uugccccgg acagacagga aaaaugcug auuacauua	1320
caaacugccu gaugauuuuu caggauugugu gauugcuugg aaucuaaua auuagauuc	1380
uaaaguggga ggaaauuaca auuauucgua cagacuguuu agaaaaucaa aucugaaacc	1440
uuuugaaaga gauauuucaa cagaaauuu ucaggcugga ucaacaccuu guaauggagu	1500

ggaaggauuu aauguuuuu uuccauuaca gagcuauuga uuucagccaa ccaauggugu	1560
gggauuacag ccuuauagag ugguggugcu gucuuuugaa cugcugcaug caccugcaac	1620
agugugugga ccuaaaaaau cuacaaaauu agugaaaaau aauguguga auuuuuuuu	1680
uaauggauua acaggaacag gagugcugac agaaucauu aaaaaauuc ugccuuuua	1740
gcaguuuggc agagauauug cagauaccac agaugcagug agagauccuc agacauuaga	1800
aauucuggau auuacaccuu guucuuuugg gggugugucu gugauuacac cuggaacaaa	1860
uacaucauu cagguggcug ugcuguauca ggaugugaau uguacagaag ugccaguggc	1920
aaaucaugca gaucagcuga caccaacaug gagaguguau ucuacaggau cuauuguuu	1980
ucagacaaga gcaggauugc ugauuggagc agaacaugug aauuuuucuu augaauguga	2040
uauuccaauu ggagcaggca uuugugcauc uuauacagaca cagacaaaau cccaaggag	2100
agcaagauuc guggcaucuc agucuuuuu ugcauacacc augucucugg gagcagaaaa	2160
uucuguggca uauucuaaua auucuuuugc uauuccaaca aauuuuacca uuucugugac	2220
aacagaaaau uuaccugugu cuaugacaaa acaucugug gauuguacca uguacauuug	2280
uggagauucu acagaauuu cuauucugcu gcugcaguau ggaucuuuuu guacacagcu	2340
gaauagagcu uuaacaggaa uugcugugga acaggauaaa aaucacagg aaguguuugc	2400
ucaggugaaa cagauuuaca aaacaccacc aauuuuagau uuuggaggau uuaauuuuag	2460
ccagauucug ccugauccuu cuaaaccuuc uaaaagauu uuuaugaaug aucugcuguu	2520
uaauaaugug acacuggcag augcaggauu uauuuuacag uauggagauu gccuggguga	2580
uauugcugca agagaucuga uuugugcuca gaaauuuuau ggacugacag ugcugccucc	2640
ucugcugaca gaugaaauga uugcucagua cacaucugcu uuacuggcug gaacaauuac	2700
aagcggaugg acuuuuggag cuggagcugc ucugcagauu ccuuuugcaa ugcagauggc	2760
uuacagauuu aauggaauug gagugacaca gaauguguua uaugaaauc agaaacugau	2820
ugcaauacag uuuaauucug caauuggcaa aaucaggau ucucugucu cuacagcuuc	2880
ugcucuggga aaucugcagg auguggugaa ucagaaugca caggcacuga auacucuggu	2940
gaaacagcug ucuagcauu uuggggcaau uucuuucugug cugaauauga uucugucuag	3000
acuggauccu ccugaagcug aagugcagau ugauagacug aucacaggaa gacugcaguc	3060
ucugcagacu uaugugacac agcagcugau uagagcugcu gaaauuagag cuucugcuaa	3120
ucuggcugcu aaaaaauu cugaauugug gcugggacag ucaaaaagag uggauuuuug	3180
uggaaaagga uaucaucuga ugucuuuucc acagucugcu ccacauaggag ugguguuuuu	3240
acauugagca uaugugccag cacaggaaaa gaaauuuuacc acagcaccag cauuuugua	3300
ugauggaaaa gcacauuuu caagagaagg aguguuugug ucuaauaggaa cacauugguu	3360

ugugacacag agaaaauuuu augaaccuca gauuuuuaca acagauaaua cauuuguguc	3420
aggaaaaugu gaugugguga uuggaaugu gaauaaauaca guguaugauc cacugcagcc	3480
agaacuggau ucuuuuaaag aagaacugga uaaaauuuuu aaaaaucaca cauccuccga	3540
uguggauuuu ggagauuuu cuggaaucua ugcaucugug gugaauauuc agaaagaaau	3600
ugauagacug aaugaagugg ccaaaaaucu gaauagaucu cugauugauc ugcaggaacu	3660
uggaaaaauu gaacaguaca uaaaauaggc uugguacauu ugguuuggau uuauugcagg	3720
auuuuuugca auugugaugg ugacaauuuu guuauuguu augacaucau guuguucuug	3780
uuuuuuagg uuguuuucu guggaagcug uuuaaaaau gaugaagaug auucugaacc	3840
uguguuuuuu ggagugaaau ugcauuacac augaugacuc gagcugguac ugcaugcacg	3900
caaugcuagc ugccccuuuc ccguccuggg uaccccgagu cucccccgac cucggguccc	3960
agguaugcuc ccaccuccac cugccccacu caccaccucu gcuaguucca gacaccuccc	4020
aagcacgcag caaugcagcu caaaacgcuu agccuagcca cacccccacg ggaaacagca	4080
gugauuaacc uuugcaaua aacgaauguu uaacuaagcu auacuaacc caggguuugu	4140
cauuuucgug ccagccacac ccuggagcua gcaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4200
aagcauaua cuaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4260
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa	4282
<210> 16	
<211> 4282	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> RBL063.2	
<400> 16	
gggcgaacua guauuuucu gguccccaca gacucagaga gaacccgcca ccauguucgu	60
guuccuggug cugcugccuc ugguguccag ccagugugug aaccugacca ccagaacaca	120
gcugccucca gccuacacca acagcuuuac cagaggcgug uacuaccg acaagguguu	180
cagauccagc gugcugcacu cuaccagga ccuguuccug ccuuuuuca gcaacugac	240
cugguuccac gccauccagc uguccggcac caauggcacc aagagauucg acaaccgcu	300
gcugcccuuc aacgacgggg uguacuugc cagcaccgag aaguccaaca uaucagagg	360
cuggaucuuc ggcaccacac uggacagcaa gaccagagc cugcugaucg ugaacaacgc	420
caccaacgug gucaucaaag ugugcgaguu ccaguucugc aacgaccccu uccugggcgu	480
cuacuaccac aagaacaaca agagcuggau ggaaagcgag uuccgggugu acagcagcgc	540

caacaacugc accuucgagu acguguccca gccuuuccug auggaccugg aaggcaagca	600
gggcaacuuc aagaaccugc gcgaguucgu guuuuagaac aucgacggcu acuucaagau	660
cuacagcaag cacacccua ucaaccucgu gcgggaucug ccucagggcu ucucugcucu	720
ggaacccug guggaucugc ccaucggcau caacaucacc cgguuucaga cacugcuggc	780
ccugcacaga agcuaccuga caccuggcga uagcagcagc ggauggacag cuggugccgc	840
cgcuuacuau gugggcuacc ugcagccuag aaccuuccug cugaaguaca acgagaacgg	900
caccaucacc gacgccgugg auugugcucu ggauccucug agcgagaca agugcacccu	960
gaaguccuuc accguggaaa agggcaucua ccagaccagc aacuuccggg ugcagcccac	1020
cgaauccauc gugcgggucc ccaauaucac caaucugugc cccuucggcg agguguucaa	1080
ugccaccaga uugccucug uguacgccug gaaccggaag cggauacga auugcuggc	1140
cgacuacucc gugcuguaca acuccgccag cuucagcacc uucaagugcu acggcguguc	1200
ccuaccaag cugaacgacc ugugcuucac aaacguguac gccgacagcu ucgugaucg	1260
gggagaugaa gugcggcaga uugccccugg acagacaggc aagaucgccg acuacaacua	1320
caagcugccc gacgacuua ccggcugugu gauugccugg aacagcaaca accuggacuc	1380
caaagucggc ggcaacuaca auuaccugua ccggcuguuc cggaagucca aucugaagcc	1440
cuucgagcgg gacaucucca ccgagauca ucaggccggc agcaccuuu gaaacggcgu	1500
ggaagguuc aacugcuacu ucccacugca guccuacggc uuucagcca caaaggcgu	1560
gggcuauacg ccuacagag ugguggugcu gagcuucgaa cugcugaug cccugccac	1620
agugucggc ccuaagaaaa gcaccaauu cgugaagaac aaauugcuga acuucaacuu	1680
caacggccug accggcaccg gcgugcugac agagagcaac aagaaguucc ugccauucca	1740
gcaguuggc cggaauauc ccgauaccac agacgccguu agagaucucc agacacugga	1800
aaucggac aucacccuu gcagcuucgg cggagugucu gugaucacc cuggcaccaa	1860
caccagcau cagguggcag ugcuguacca ggacgugaac uguaccgaag ugcccuggc	1920
cauucacgcc gaucagcuga caccuacaug gcggguguac uccaccggca gaauguguu	1980
ucagaccaga gccggcuguc ugaucggagc cgagcacgug aacaauagcu acgagucga	2040
caucccauc ggcgcuggaa ucugcgccag cuaccagaca cagacaaaca gccucggag	2100
agccagaagc guggccagcc agagcaucau ugccuacaca augucucugg gcgccgagaa	2160
cagcugggc uacuccaaca acucuauagc uaucacacc aacuaccca ucagcgugac	2220
cacagagauc cugccugugu ccaugaccaa gaccagcgug gacugacca uguacaucug	2280
cggcgauucc accgagugcu ccaaccugcu gcugcaguac ggcagcuuc gcaccagcu	2340
gaauagagcc cugacaggga ucgccgugga acaggacaag aacaccaag agguguucg	2400

ccaagugaag cagauucuaca agacccccucc uaucaaggac uucggcggcu ucaauuucag	2460
ccagauucug cccgauccua gcaagcccag caagcggagc uucaucgagg accugcuguu	2520
caacaaagug acacuggccg acgccggcuu caucaagcag uauggcgauu gucugggcga	2580
cauugccgcc agggauucuga uuugcgccca gaaguuaac ggacugacag ugcugccucc	2640
ucugcugacc gaugagauga ucgccagua cacaucugcc cugcuggccg gcacaauac	2700
aagcggcugg acauuuggag caggcgccgc ucugcagauc cccuugcua ugcagauggc	2760
cuaccgguuc aacggcaucg gagugacca gaauugcug uacgagaacc agaagcugau	2820
cgccaaccag uucaacagc ccaucggcaa gauccaggac agccugagca gcacagcaag	2880
cgcccuggga aagcugcagg acguggucaa ccagaaucc caggcacuga acaccuggu	2940
caagcagcug uccuccaacu ucggcgccau cagcucugug cugaacgaua uccugagcag	3000
acuggacccu ccugaggccg agguucagau cgacagacug aucacaggca gacugcagag	3060
ccuccagaca uacugaccc agcagcugau cagagccgcc gagauuagag ccucugccaa	3120
ucuggccgcc accaagaugu cugagugugu gcugggccag agcaagagag uggacuuuug	3180
cggcaagggc uaccaccuga ugagcuucc ucagucugcc ccucacggcg ugguguuucu	3240
gcacugaca uauugcccg cucaagagaa gaauuucacc accgcuccag ccaucugcca	3300
cgacggcaaa gccacuuuc cuagagaagg cguguucgug uccaacggca cccauugguu	3360
cgugacacag cggaacuucu acgagcccca gaucauacc accgacaaca ccuucguguc	3420
uggcaaucg gacugcuga ucggcauugu gaacaauacc guguacgacc cucugcagcc	3480
cgagcuggac agcuucaaag aggaacugga caaguacuuu aagaaccaca caagccccga	3540
cguggaccug ggcgauauca gcggaaauca ugccagcguc gugaacaucc agaaagagau	3600
cgaccggcug aacgagggg ccaagaauuc gaacgagagc cugaucgacc ugcaagaacu	3660
ggggaaguac gacgaguaca ucaaguggcc cugguacauc uggcugggcu uuaucgccgg	3720
acugauugcc aucgugaugg ucacaauc auuguguugc augaccagcu gcuguagcug	3780
ccugaagggc uguuguagcu guggcagcug cugcaaguuc gacgaggacg auucugagcc	3840
cgugcugaag ggcgugaaac ugcacuacac augaugacuc gagcugguac ugcaugcacg	3900
caaugcuagc ugccccuuuc ccguccuggg uaccccgagu ccccccgac cucggguccc	3960
agguaugcuc ccaccuccac cugccccacu caccaccuc gcuaguucca gacaccucc	4020
aagcacgcag caaugcagcu caaaacgcu agccuagcca cacccccag ggaaacagca	4080
gugauuaacc uuugcaaua aacgaaaguu uaacuaagcu auacuaacc caggguuggu	4140

caauuucgug ccagccacac ccuggagcua gcaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4200

aagcauauga cuaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4260

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa 4282

<210> 17

<211> 1261

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RBL063.3

<400> 17

gggcgaacua guauuucuuc ggucgccaca gacucagaga gaacccgcca ccauguuugu 60

guuucugugug cugcugccuc uugugucuuc ucagugugug gugagauuuc caaaauuuac 120

aaaucugugu ccauuuggag aaguguuuua ugcaacaaga uuugcaucug uguaugcaug 180

gaauagaaaa agaauuucua auuguguggc ugauuuuucu gugcuguaua auagugcuuc 240

uuuuuccaca uuuuuuuuu auggaguguc uccaacaaaa uuuuuuuuu uauuuuuuac 300

aaaugugua ugcugauucuu uugugaucag aggugaugaa gugagacaga uggcccccg 360

acagacagga aaaaauugcug auuacaauua caaacugccu gaugauuuua caggauugug 420

gauugcuugg aaucuaaua auuuagauuc uaaaguggga ggaaauuaca auuauucgua 480

cagacuguuu agaaaauca aucugaaacc uuugaaaga gauuuuua cagaaauuuu 540

ucaggcugga ucaacaccuu guaauggagu ggaaggauuu aaauuuuuu uuccauuaca 600

gagcuauuga uuucagccaa ccaauugugu gggaauaucag ccuuauagag ugguggugcu 660

gucuuuuuga cugcugcaug caccugcaac agugugugga ccuaaaggcu cccccggcuc 720

cggcuccgga ucugguuua uuccugaagc uccaagagau gggcaagcuu acguucguua 780

agauggcgaa ugguuuuuu uuucuaccuu uuuaaggccg ucccuggagg ugcuguuucca 840

gggccccggc ugaugacucg agcugguacu gcaugcacgc aaugcuagcu gccccuuucc 900

cguccugggu accccgaguc uccccgacc ucggguccca gguaugcucc caccuccacc 960

ugccccacuc accaccucug cuaguuccag acaccucca agcacgcagc aaugcagcuc 1020

aaaacgcuua gccuagccac accccacagg gaaacagcag ugaauuaccu uuagcaauaa 1080

acgaaaguuu aacuaagcua uacuaacccc agguuugguc aaauucgugc cagccacacc 1140

cuggagcuag caaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa agcauugac uaaaaaaaaa 1200

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1260

a 1261

<210> 18

<211> 250

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> S Protein RBD Fusion

<400> 18

Val Arg Phe Pro Asn Ile Thr Asn Leu Cys Pro Phe Gly Glu Val Phe
1 5 10 15

Asn Ala Thr Arg Phe Ala Ser Val Tyr Ala Trp Asn Arg Lys Arg Ile
20 25 30

Ser Asn Cys Val Ala Asp Tyr Ser Val Leu Tyr Asn Ser Ala Ser Phe
35 40 45

Ser Thr Phe Lys Cys Tyr Gly Val Ser Pro Thr Lys Leu Asn Asp Leu
50 55 60

Cys Phe Thr Asn Val Tyr Ala Asp Ser Phe Val Ile Arg Gly Asp Glu
65 70 75 80

Val Arg Gln Ile Ala Pro Gly Gln Thr Gly Lys Ile Ala Asp Tyr Asn
85 90 95

Tyr Lys Leu Pro Asp Asp Phe Thr Gly Cys Val Ile Ala Trp Asn Ser
100 105 110

Asn Asn Leu Asp Ser Lys Val Gly Gly Asn Tyr Asn Tyr Leu Tyr Arg
115 120 125

Leu Phe Arg Lys Ser Asn Leu Lys Pro Phe Glu Arg Asp Ile Ser Thr
130 135 140

Glu Ile Tyr Gln Ala Gly Ser Thr Pro Cys Asn Gly Val Glu Gly Phe
145 150 155 160

Asn Cys Tyr Phe Pro Leu Gln Ser Tyr Gly Phe Gln Pro Thr Asn Gly
165 170 175

Val Gly Tyr Gln Pro Tyr Arg Val Val Val Leu Ser Phe Glu Leu Leu
180 185 190

His Ala Pro Ala Thr Val Cys Gly Pro Lys Gly Ser Pro Gly Ser Gly

195	200	205	
Ser Gly Ser Gly Tyr Ile Pro Glu Ala Pro Arg Asp Gly Gln Ala Tyr			
210	215	220	
Val Arg Lys Asp Gly Glu Trp Val Leu Leu Ser Thr Phe Leu Gly Arg			
225	230	235	240
Ser Leu Glu Val Leu Phe Gln Gly Pro Gly			
	245	250	
<210> 19			
<211> 4283			
<212> RNA			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> RBP020.1			
<400> 19			
agaauaaacu aguauucuc uggucacac agacucagag agaaccgcc accauguuug			60
uguuucuuugu gcugcugccu cuugugucuu cucagugugu gaauuugaca acaagaacac			120
agcugccacc agcuuauaca aaauuuuuu ccagaggagu guauuauccu gauaaagugu			180
uuagaucuuu ugucugcac agcacacagg accuguuuu gccauuuuu agcaauguga			240
caugguuua ugcaauucau gugucuggaa caaauugaac aaaaagauuu gauaaucug			300
ugcugccuuu uaaugaugga gugauuuug cuucaacaga aaagucuuu auuuuagag			360
gauggauuuu uggaacaaca cuggauucua aaacacaguc ucugcugauu gugaauaau			420
caacaaauu ggugauuaaa gugugugaau uucaguuuug uaaugaucuu uuucugggag			480
uguauuauc aaaaaauau aaauucugga uggaauucua auuuagagug uauuccucug			540
caauuaauug uacauuugaa uaugugucuc agccuuuuu gauggaucug gaaggaaaac			600
agggaauuu uaaaaaucug agagaauuug uguuuuuuuu uauugaugga uuuuuuuuu			660
uuuauucua acacacacca auuaauuuag ugagagauu gccucaggga uuucugcuc			720
uggaaccucu gguggaucug ccaauuggca uuaauuuuac aagauuucag acacugcugg			780
cucugcacag aucuuauuc agaccuggag auucuuucuu uggauggaca gccggagcug			840
cagcuauua ugugggcua cuugagccaa gaacauuuc gcugaaauu aaugaaaug			900
gaacauuuc agaucugug gauugucuc uggaucucu gucugaaaca aauguaucuu			960
uaaaauuuu uacaguggaa aaaggcauuu aucagacauc uauuuuuga gucagccaa			1020
cagaucuuu ugugaguuu ccaauuuu caaucugug uccauuuga gaaguuuuu			1080

augcaacaag auuugcaucu guguaugcau ggaauagaaa aagaauuucu aaauugugugg	1140
cugauuuuuc ugugcuguau aaauagucuu cuuuuuccac auuuuuuugu uauggagugu	1200
cuccaacaaa auuuuauugu uuauguuuua caaaugugua ugcugauucu uuugugauc	1260
gaggugauga agugagacag auugcccccgc gacagacagg aaaaauugcu gauuacaauu	1320
acaaacugcc ugaugauuuu acaggaugug ugauugcuug gaauucuaau aauiuagauu	1380
cuaaaguggg aggaaauuac aauiuucugu acagacuguu uagaaaauca aaucugaaac	1440
cuuuugaaag agauuuuua acagaaauu aucaggcugg aucaacaccu uguaauggag	1500
uggaaggauu uaaauuguuu uuuccauuac agagcuauug auuucagcca accauggug	1560
ugggauauca gccauauaga gugguggugc ugucuuuuga acugcugcau gcaccugcaa	1620
cagugugugg accuaaaaaa ucuacaaau uagugaaaaa uaaaugugug aauiuuuuu	1680
uuauuggauu aacaggaaca ggagugcuga cagaaucau uaaaaauuu cugccuuuuc	1740
agcaguugg cagagauuu gcagauacca cagaugcagu gagagauc cu cagacauuag	1800
aaauucugga uuuuacaccu uguucuuuug gggguguguc ugugauuaca ccuggaacaa	1860
auacaucau ucagguggcu gugcuguauc aggaugugaa uuguacagaa gugccagugg	1920
caauucaugc agaucagcug acaccaacau ggagagugua uucucagga ucuaugugu	1980
uucagacaag agcaggaugu cugauuggag cagaacauu gaauuuuucu uauaauugug	2040
auauuccauu uggagcaggc auuugugcu cuuauagac acagacaaau ucccaagga	2100
gagcaaguc uguggcaucu cagucuuua uugcauacac caugucucug ggagcagaaa	2160
auucuguggc auauucuaau aaucuaauug cuauuccaac aauiuuuacc auucuguga	2220
caacagaaau uuuaucugug ucuauagaa aaacaucugu ggauuguacc auguacauuu	2280
guggagauuc uacagaaugu ucuauucugc ugucugagua uggauuuuu uguacacagc	2340
ugaauagagc uuuaacagga auugcugugg aacaggauaa aaauacacag gaaguguuug	2400
cucaggugaa acagauuuac aaacaccac cauuuuuaga uuuggagga uuuauiuuu	2460
gccagauucu gccuaguccu ucuuuuuccu cuuuuagauc uuuuuugaa gaucugcugu	2520
uuuuuuuagu gacacuggca gaugcaggau uuuuuuuaca guauggagau ugccugggug	2580
auauugcugc aagagaucug auuugugcuc agaauiuuu uggacugaca gugcugccuc	2640
cucugcugac agauuuuug auugcucagu acacaucugc uuuaucugcu ggaacauuu	2700
caagcggau gacauuugga gcuggagcug cucugcagau uccuuuugca augcagaugg	2760
cuuacagauu uauuggaauu ggagugacac agaauuguu auauuuuuu cagaaacuga	2820
uugcaauca guuuuuuucu gcauuuggca aaauucagga uucucugucu ucuacagcu	2880
cugcucuggg aaacugcag gaugugguga aucagaugc acaggcacug aaucucugg	2940

ugaaacagcu gucuagcaau uuuggggcaa uuucuucugu gcugaaugau auucugucua	3000
gacuggaucc uccugaagcu gaagugcaga uugauagacu gaucacagga agacugcagu	3060
cucugcagac uuaugugaca cagcagcuga uuagagcugc ugaaaauaga gcuucugcua	3120
aucuggcugc uacaaaaaug ucugaaugug ugcugggaca gucaaaaaga guggauuuuu	3180
guggaaaagg auaucaucug augucuuuuc cacagucugc uccacaugga gugguguuuu	3240
uacaugugac auaugugcca gcacaggaaa agaauuuuac cacagcacca gcaauuuguc	3300
augauggaaa agcacauuuu ccaagagaag gaguguuuugu gucuaaugga acacauuggu	3360
uugugacaca gagaaaauuu uaugaaccuc agauuuuuac aacagauauu acauuugugu	3420
caggaaaaug ugauguggug auuggaaug ugaauaauc aguguaugau ccacugcagc	3480
cagaacugga uucuuuuuua gaagaacugg auaaaauuuu uaaaaaucac acaucuccug	3540
auguggauuu aggagauauu ucuggaauca augcaucugu ggugaauuuu cagaaagaaa	3600
uugauagacu gaaugaagug gccaaaauc ugaaugaauuc ucugauugau cugcaggaac	3660
uuggaaaaua ugaacaguac auuuuauugc cuugguacau uuggcuugga uuuauugcag	3720
gauuuauugc auuugugaug gugacaauua uguuuauug uaugacauca uguuguucuu	3780
guuuuuuagg auguuguucu uguggaagcu guuguuuuu ugaugaagau gauucugaac	3840
cuguguuuua aggagugaaa uugcauuaca caugaugacu cgagcuggua cugcaugcac	3900
gcaaugcuag cugcccccuu cccguccugg guaccccgag ucucccccga ccucgggucc	3960
cagguaugcu cccaccucca ccugccccac ucaccaccuc ugcuauguucc agaccuccc	4020
caagcacgca gcaaugcagc ucaaaacgcu uagccuagcc acacccccac gggaaacagc	4080
agugauuuac cuuuagcaau aaacgaaagu uuaacuaagc uauacuaacc ccaggguugg	4140
ucaauuucgu gccagccaca ccugggagcu agcaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4200
aaagcauug acuaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4260
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaa	4283
<210> 20	
<211> 4283	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> RBP020.2	
<400> 20	
agaauaaacu aguauucuuu uggucuccac agacucagag agaaccgcc accauguucg	60
uguuccuggu gcugcugccu cuggugucca gccagugugu gaaccugacc accagaacac	120

agcugccucc agccuacacc aacagcuuua ccagaggcgu guacuacccc gacaaggugu	180
ucagauccag cgugcugcac ucuaccagg accuguuccu gccuuucuuc agcaacguga	240
ccugguucca cgccauccac guguccggca ccaauggcac caagagauuc gacaaccccg	300
ugcugcccuu caacgacggg guguacuuug ccagcaccga gaaguccaac aucaucagag	360
gcuggaucuu cggcaccaca cuggacagca agaccagag ccugcugauc gugaacaacg	420
ccaccaacgu ggucacaaa gugugcgagu uccaguucug caacgacccc uuccugggcg	480
ucuacuacca caagaacaac aagagcugga uggaaagcga guuccgggug uacagcagcg	540
ccaacaacug caccuucgag uacgugucc agccuuuccu gauggaccug gaaggcaagc	600
agggcaacuu caagaaccug cgcgaguucg uguuuagaa caucgacggc uacuuaaga	660
ucuacagcaa gcacaccccu aucaaccucg ugcgggaucu gccucagggc uucucugcuc	720
uggaaccccu gguggaucug cccaucggca ucaacaucac ccgguuucag acacugcugg	780
cccugcacag aagcuaccug acaccuggcg auagcagcag cggauggaca gcuggugccg	840
ccgcuuacua ugugggcuac cugcagccua gaaccuuccu gcugaaguac aacgagaacg	900
gcaccaucac cgacgccgug gauugugcuc uggauccucu gagcgagaca aagugcacc	960
ugaaguccuu caccgugaa aagggaucu accagaccag caacuuccgg gugcagccca	1020
ccgaauccau cgugcgguuc cccaauauca ccaaucugug ccccuucggc gagguuua	1080
augccaccag auucgccuc guguacgccu ggaaccggaa gcggaucagc aaugcgugg	1140
ccgacuacuc cgugcuguac aacuccgcca gcuucagcac cuucaagugc uacggcgugu	1200
cccuaccaa gcugaacgac cugugcuua caaacgugua cgccgacagc uucgugauc	1260
ggggagauga agugcggcag auugccccug gacagacagg caagaucgcc gacuacaacu	1320
acaagcugcc cgacgacuuc accggcugug uguuugccug gaacagcaac aaccuggacu	1380
ccaaagucgg cggaacuac aaauaccugu accggcuguu ccggaagucc aaucugaagc	1440
ccuucgagcg ggacaucucc accgagaucu aucaggccgg cagcaccccu uguaacggcg	1500
uggaaggcuu caacugcuac uucccacugc aguccuacgg cuuucagccc aaaauggcg	1560
ugggcuauc gccuacaga gugguggugc ugagcuucga acugcugcau gccccugcca	1620
cagugugcgg ccuaagaaa agcaccaauc ucgugaagaa caaaucgug aacuuaacu	1680
ucaacggccu gaccggcacc ggcgugcuga cagagagcaa caagaaguuc cugccauucc	1740
agcaguugg ccgggauauc gccgauacca cagacgccgu uagagaucac cagacacugg	1800
aaaucugga caucaccccu ugcagcuucg gcggaguguc ugugaucacc ccuggcacca	1860
acaccagcaa ucagguggca gugcuguacc aggacgugaa cuguaccgaa gugcccgugg	1920

ccaauacacgc cgaucagcug acaccuacau ggcgggugua cuccaccggc agcaaugugu	1980
uucagaccag agccggcgugu cugaucggag ccgagcacgu gaacaauagc uacgagugcg	2040
acaucuccau cggcgcguga aucugcgcca gcuaccagac acagacaaac agcccucgga	2100
gagccagaag cguggccagc cagagcauca uugccuacac aaugucucug ggcgccgaga	2160
acagcguggc cuacuccaac aacucuauug cuauccccac caacuucacc aucagcguga	2220
ccacagagau ccugccugug uccaugacca agaccagcgu ggacugcacc auguacauu	2280
gcggcgauuc caccgagugc uccaaccugc ugcugcagua cggcagcuuc ugcaccagc	2340
ugaauagagc ccugacaggg aucgccgugg aacaggacaa gaacaccaa gagguguucg	2400
ccaagugaa gcagauacuac aagaccccuc cuaucaagga cuucggcggc uucauuuua	2460
gccagauucu gcccgauccu agcaagccca gcaagcggag cuucaucgag gaccugcugu	2520
ucaacaaagu gacacugggc gacgccggcu ucaucaagca guauggcgau ugucuggcg	2580
acaaugccgc cagggaucug auuugcgccc agaaguuaa cggacugaca gugcugccuc	2640
cucugcugac cgaugagaug aucgcccagu acacaucugc ccugcugggc ggcacaauc	2700
caagcggcug gacauuugga gcaggcgccg cucugcagau ccccuuugcu augcagaugg	2760
ccuaccgguu caacgggauc ggagugaccc agaauugcu guacgagaac cagaagcuga	2820
ucgccaacca guucaacagc gccaucggca agauccagga cagccugagc agcacagcaa	2880
gcgcccgagg aaagcugcag gacgugguca accagaauug ccaggcacug aacaccugg	2940
ucaagcagcu guccuccaac uucggcgcca ucagcucugu gcugaacgau auccugagca	3000
gacuggaccc uccugaggcc gaggugcaga ucgacagacu gaucacaggc agacugcaga	3060
gccuccagac auacgugacc cagcagcuga ucagagccgc cgagauuaga gccucugcca	3120
aucugggcgc caccaagaug ucugagugug ugcugggcca gagcaagaga guggacuuu	3180
gcggcaaggg cuaccaccug augagcuucc cucagucugc cccucacggc gugguguuuc	3240
ugcagugac auauugucc gcucaagaga agaauuucac caccgcucca gccaucugcc	3300
acgacggcaa agcccacuuu ccuagagaag gcguguucgu guccaacggc acccauuggu	3360
ucgugacaca gcggaacuuc uacgagcccc agaucaucac caccgacaac accuucgugu	3420
cuggcaacug cgacgucgug aucggcauug ugaacaauac cguguacgac ccucugcagc	3480
ccgagcugga cagcuucaa gaggaacugg acaaguacuu uaagaaccac acaagccccg	3540
acguggaccu gggcgauauc agcggaauc augccagcgu cgugaacauc cagaaagaga	3600
ucgaccggcu gaacgaggug gccaaagauc ugaacgagag ccugaucgac cugcaagaac	3660

uggggaagua cgagcaguac aucaaguggc ccugguacau cuggcugggc uuuaucgccg 3720
 gacugauugc caucgugaug gucacauca ugcuguguug caugaccagc ugcuguagcu 3780
 gccugaaggg cuguuguagc uguggcagcu gcugcaaguu cgacgaggac gauucugagc 3840
 ccgugcugaa gggcgugaaa cugcacuaca caugaugacu cgagcuggua cugcaugcac 3900
 gcaaugcuag cugcccccuuu ccguccugg guaccccgag ucucucccga ccucgggucc 3960
 cagguaugcu cccaccucca ccugccccac ucaccaccuc ugcuguuucc agacaccucc 4020
 caagcacgca gcaaugcagc ucaaacgcu uagccuagcc acacccccac gggaaacagc 4080

 agugauuaac cuuuagcaau aaacgaaagu uuaacuaagc uauacuaacc ccagguugg 4140
 ucaauuucgu gccagccaca ccugggagcu agcaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4200
 aaagcauug acuaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4260
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaa 4283

 <210> 21
 <211> 1262
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> RBP020.3
 <400> 21

 agaauaaacu aguauucuc uggucuccac agacucagag agaaccgcc accauguuug 60
 uguuucuuu gcugcugccu cuugugucuu cucagugugu ggugagauuu ccaauauua 120

 caaaucugug uccaauugga gaaguguuuu augcaacaag auuugcaucu gugaugcau 180
 ggaauagaaa aagaauuuc aaugugugg cugauuuuuc ugugcuguau aauagugcuu 240
 cuuuuuccac auuuuuuugu uauggagugu cuccaacaaa auuuuauug uuauguuuuu 300
 caaaugugua ugcugauucu uuugugauca gaggugauga agugagacag auugcccccg 360
 gacagacagg aaaaauugc guuacaaau acaaacugcc ugaugauuuu acaggauug 420
 ugauugcuug gaauucuaau auuuuagauu cuaaaguggg aggaauuac aaauaucugu 480
 acagacuguu uagaaaauca aaucugaaac cuuuugaaag agauuuuua acagaaauu 540

 aucaggcugg aucaacaccu uguaauggag uggaaggauu uauuuguuau uuuccauuac 600
 agagcuagg auuucagcca accauggug ugggauauca gccauauaga gugguggugc 660
 ugucuuuuga acugcugcau gcaccugcaa cagugugugg accuaaaggc uccccggcu 720
 ccggcuccgg aucgguuau auuccugaag cuccaagaga ugggcaagcu uacguucgua 780
 aagauggcga augguauua cuuucuaacu uuuuaggccg guccugag gugcuguucc 840
 agggccccgg cugaugacuc gagcugguac ugcaugcacg caaugcuagc ugccccuuc 900

ccguccuggg uaccccgagu cucccccgac cucggguccc agguaugcuc ccaccuccac 960

cugccccacu caccaccucu gcuaguucca gacaccuccc aagcacgcag caaugcagcu 1020

caaaacgcuu agccuagcca cacccccacg ggaacagca gugauuacc uuagcaua 1080

aacgaaugu uaacuaagcu auacuaacc cagguuggu cauuucgug ccagccacac 1140

ccuggagcua gcaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aagcauuga cuaaaaaaaa 1200

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1260

aa 1262

<210> 22

<211> 1879

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Viral Protein

<400> 22

Met Glu Lys Val His Val Asp Ile Glu Glu Asp Ser Pro Phe Leu Arg

1 5 10 15

Ala Leu Gln Arg Ser Phe Pro Gln Phe Glu Val Glu Ala Lys Gln Val

20 25 30

Thr Asp Asn Asp His Ala Asn Ala Arg Ala Phe Ser His Leu Ala Ser

35 40 45

Lys Leu Ile Glu Thr Glu Val Asp Pro Ser Asp Thr Ile Leu Asp Ile

50 55 60

Gly Ser Ala Pro Ala Arg Arg Met Tyr Ser Lys His Lys Tyr His Cys

65 70 75 80

Ile Cys Pro Met Arg Cys Ala Glu Asp Pro Asp Arg Leu Tyr Lys Tyr

85 90 95

Ala Thr Lys Leu Lys Lys Asn Cys Lys Glu Ile Thr Asp Lys Glu Leu

100 105 110

Asp Lys Lys Met Lys Glu Leu Ala Ala Val Met Ser Asp Pro Asp Leu

115 120 125

Glu Thr Glu Thr Met Cys Leu His Asp Asp Glu Ser Cys Arg Tyr Glu

130 135 140

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

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

 Ser Trp His Leu Pro Ser Val Phe His Leu Arg Gly Lys Gln Asn Tyr
 260 265 270
 Thr Cys Arg Cys Glu Thr Ile Val Ser Cys Asp Gly Tyr Val Val Lys
 275 280 285
 Arg Ile Ala Ile Ser Pro Gly Leu Tyr Gly Lys Pro Ser Gly Tyr Ala
 290 295 300
 Ala Thr Met His Arg Glu Gly Phe Leu Cys Cys Lys Val Thr Asp Thr
 305 310 315 320

 Leu Asn Gly Glu Arg Val Ser Phe Pro Val Cys Thr Tyr Val Pro Ala
 325 330 335
 Thr Leu Cys Asp Gln Met Thr Gly Ile Leu Ala Thr Asp Val Ser Ala
 340 345 350
 Asp Asp Ala Gln Lys Leu Leu Val Gly Leu Asn Gln Arg Ile Val Val
 355 360 365
 Asn Gly Arg Thr Gln Arg Asn Thr Asn Thr Met Lys Asn Tyr Leu Leu
 370 375 380

 Pro Val Val Ala Gln Ala Phe Ala Arg Trp Ala Lys Glu Tyr Lys Glu

385 390 395 400
 Asp Gln Glu Asp Glu Arg Pro Leu Gly Leu Arg Asp Arg Gln Leu Val
 405 410 415
 Met Gly Cys Cys Trp Ala Phe Arg Arg His Lys Ile Thr Ser Ile Tyr
 420 425 430
 Lys Arg Pro Asp Thr Gln Thr Ile Ile Lys Val Asn Ser Asp Phe His
 435 440 445

 Ser Phe Val Leu Pro Arg Ile Gly Ser Asn Thr Leu Glu Ile Gly Leu
 450 455 460
 Arg Thr Arg Ile Arg Lys Met Leu Glu Glu His Lys Glu Pro Ser Pro
 465 470 475 480
 Leu Ile Thr Ala Glu Asp Val Gln Glu Ala Lys Cys Ala Ala Asp Glu
 485 490 495
 Ala Lys Glu Val Arg Glu Ala Glu Glu Leu Arg Ala Ala Leu Pro Pro
 500 505 510

 Leu Ala Ala Asp Val Glu Glu Pro Thr Leu Glu Ala Asp Val Asp Leu
 515 520 525
 Met Leu Gln Glu Ala Gly Ala Gly Ser Val Glu Thr Pro Arg Gly Leu
 530 535 540
 Ile Lys Val Thr Ser Tyr Ala Gly Glu Asp Lys Ile Gly Ser Tyr Ala
 545 550 555 560
 Val Leu Ser Pro Gln Ala Val Leu Lys Ser Glu Lys Leu Ser Cys Ile
 565 570 575

 His Pro Leu Ala Glu Gln Val Ile Val Ile Thr His Ser Gly Arg Lys
 580 585 590
 Gly Arg Tyr Ala Val Glu Pro Tyr His Gly Lys Val Val Val Pro Glu
 595 600 605
 Gly His Ala Ile Pro Val Gln Asp Phe Gln Ala Leu Ser Glu Ser Ala
 610 615 620
 Thr Ile Val Tyr Asn Glu Arg Glu Phe Val Asn Arg Tyr Leu His His
 625 630 635 640

Ile Ala Thr His Gly Gly Ala Leu Asn Thr Asp Glu Glu Tyr Tyr Lys
 645 650 655
 Thr Val Lys Pro Ser Glu His Asp Gly Glu Tyr Leu Tyr Asp Ile Asp
 660 665 670
 Arg Lys Gln Cys Val Lys Lys Glu Leu Val Thr Gly Leu Gly Leu Thr
 675 680 685
 Gly Glu Leu Val Asp Pro Pro Phe His Glu Phe Ala Tyr Glu Ser Leu
 690 695 700

 Arg Thr Arg Pro Ala Ala Pro Tyr Gln Val Pro Thr Ile Gly Val Tyr
 705 710 715 720
 Gly Val Pro Gly Ser Gly Lys Ser Gly Ile Ile Lys Ser Ala Val Thr
 725 730 735
 Lys Lys Asp Leu Val Val Ser Ala Lys Lys Glu Asn Cys Ala Glu Ile
 740 745 750
 Ile Arg Asp Val Lys Lys Met Lys Gly Leu Asp Val Asn Ala Arg Thr
 755 760 765

 Val Asp Ser Val Leu Leu Asn Gly Cys Lys His Pro Val Glu Thr Leu
 770 775 780
 Tyr Ile Asp Glu Ala Phe Ala Cys His Ala Gly Thr Leu Arg Ala Leu
 785 790 795 800
 Ile Ala Ile Ile Arg Pro Lys Lys Ala Val Leu Cys Gly Asp Pro Lys
 805 810 815
 Gln Cys Gly Phe Phe Asn Met Met Cys Leu Lys Val His Phe Asn His
 820 825 830

 Glu Ile Cys Thr Gln Val Phe His Lys Ser Ile Ser Arg Arg Cys Thr
 835 840 845
 Lys Ser Val Thr Ser Val Val Ser Thr Leu Phe Tyr Asp Lys Lys Met
 850 855 860
 Arg Thr Thr Asn Pro Lys Glu Thr Lys Ile Val Ile Asp Thr Thr Gly
 865 870 875 880
 Ser Thr Lys Pro Lys Gln Asp Asp Leu Ile Leu Thr Cys Phe Arg Gly

885

890

895

Trp Val Lys Gln Leu Gln Ile Asp Tyr Lys Gly Asn Glu Ile Met Thr

900

905

910

Ala Ala Ala Ser Gln Gly Leu Thr Arg Lys Gly Val Tyr Ala Val Arg

915

920

925

Tyr Lys Val Asn Glu Asn Pro Leu Tyr Ala Pro Thr Ser Glu His Val

930

935

940

Asn Val Leu Leu Thr Arg Thr Glu Asp Arg Ile Val Trp Lys Thr Leu

945

950

955

960

Ala Gly Asp Pro Trp Ile Lys Thr Leu Thr Ala Lys Tyr Pro Gly Asn

965

970

975

Phe Thr Ala Thr Ile Glu Glu Trp Gln Ala Glu His Asp Ala Ile Met

980

985

990

Arg His Ile Leu Glu Arg Pro Asp Pro Thr Asp Val Phe Gln Asn Lys

995

1000

1005

Ala Asn Val Cys Trp Ala Lys Ala Leu Val Pro Val Leu Lys Thr

1010

1015

1020

Ala Gly Ile Asp Met Thr Thr Glu Gln Trp Asn Thr Val Asp Tyr

1025

1030

1035

Phe Glu Thr Asp Lys Ala His Ser Ala Glu Ile Val Leu Asn Gln

1040

1045

1050

Leu Cys Val Arg Phe Phe Gly Leu Asp Leu Asp Ser Gly Leu Phe

1055

1060

1065

Ser Ala Pro Thr Val Pro Leu Ser Ile Arg Asn Asn His Trp Asp

1070

1075

1080

Asn Ser Pro Ser Pro Asn Met Tyr Gly Leu Asn Lys Glu Val Val

1085

1090

1095

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

1100

1105

1110

Thr Gly Arg Val Tyr Asp Met Asn Thr Gly Thr Leu Arg Asn Tyr

1115

1120

1125

Asp Pro	Arg Ile	Asn Leu	Val	Pro Val	Asn Arg	Arg	Leu Pro	His
1130				1135			1140	
Ala Leu	Val Leu	His His	Asn	Glu His	Pro Gln	Ser	Asp Phe	Ser
1145				1150			1155	
Ser Phe	Val Ser	Lys Leu	Lys	Gly Arg	Thr Val	Leu	Val Val	Gly
1160				1165			1170	
Glu Lys	Leu Ser	Val Pro	Gly	Lys Met	Val Asp	Trp	Leu Ser	Asp
1175				1180			1185	
Arg Pro	Glu Ala	Thr Phe	Arg	Ala Arg	Leu Asp	Leu	Gly Ile	Pro
1190				1195			1200	
Gly Asp	Val Pro	Lys Tyr	Asp	Ile Ile	Phe Val	Asn	Val Arg	Thr
1205				1210			1215	
Pro Tyr	Lys Tyr	His His	Tyr	Gln Gln	Cys Glu	Asp	His Ala	Ile
1220				1225			1230	
Lys Leu	Ser Met	Leu Thr	Lys	Lys Ala	Cys Leu	His	Leu Asn	Pro
1235				1240			1245	
Gly Gly	Thr Cys	Val Ser	Ile	Gly Tyr	Gly Tyr	Ala	Asp Arg	Ala
1250				1255			1260	
Ser Glu	Ser Ile	Ile Gly	Ala	Ile Ala	Arg Gln	Phe	Lys Phe	Ser
1265				1270			1275	
Arg Val	Cys Lys	Pro Lys	Ser	Ser Leu	Glu Glu	Thr	Glu Val	Leu
1280				1285			1290	
Phe Val	Phe Ile	Gly Tyr	Asp	Arg Lys	Ala Arg	Thr	His Asn	Pro
1295				1300			1305	
Tyr Lys	Leu Ser	Ser Thr	Leu	Thr Asn	Ile Tyr	Thr	Gly Ser	Arg
1310				1315			1320	
Leu His	Glu Ala	Gly Cys	Ala	Pro Ser	Tyr His	Val	Val Arg	Gly
1325				1330			1335	
Asp Ile	Ala Thr	Ala Thr	Glu	Gly Val	Ile Ile	Asn	Ala Ala	Asn
1340				1345			1350	
Ser Lys	Gly Gln	Pro Gly	Gly	Gly Val	Cys Gly	Ala	Leu Tyr	Lys

1355	1360	1365
Lys Phe Pro Glu Ser Phe Asp	Leu Gln Pro Ile Glu	Val Gly Lys
1370	1375	1380
Ala Arg Leu Val Lys Gly Ala	Ala Lys His Ile Ile	His Ala Val
1385	1390	1395
Gly Pro Asn Phe Asn Lys Val	Ser Glu Val Glu Gly	Asp Lys Gln
1400	1405	1410
Leu Ala Glu Ala Tyr Glu Ser	Ile Ala Lys Ile Val	Asn Asp Asn
1415	1420	1425
Asn Tyr Lys Ser Val Ala Ile	Pro Leu Leu Ser Thr	Gly Ile Phe
1430	1435	1440
Ser Gly Asn Lys Asp Arg Leu	Thr Gln Ser Leu Asn	His Leu Leu
1445	1450	1455
Thr Ala Leu Asp Thr Thr Asp	Ala Asp Val Ala Ile	Tyr Cys Arg
1460	1465	1470
Asp Lys Lys Trp Glu Met Thr	Leu Lys Glu Ala Val	Ala Arg Arg
1475	1480	1485
Glu Ala Val Glu Glu Ile Cys	Ile Ser Asp Asp Ser	Ser Val Thr
1490	1495	1500
Glu Pro Asp Ala Glu Leu Val	Arg Val His Pro Lys	Ser Ser Leu
1505	1510	1515
Ala Gly Arg Lys Gly Tyr Ser	Thr Ser Asp Gly Lys	Thr Phe Ser
1520	1525	1530
Tyr Leu Glu Gly Thr Lys Phe	His Gln Ala Ala Lys	Asp Ile Ala
1535	1540	1545
Glu Ile Asn Ala Met Trp Pro	Val Ala Thr Glu Ala	Asn Glu Gln
1550	1555	1560
Val Cys Met Tyr Ile Leu Gly	Glu Ser Met Ser Ser	Ile Arg Ser
1565	1570	1575
Lys Cys Pro Val Glu Glu Ser	Glu Ala Ser Thr Pro	Pro Ser Thr
1580	1585	1590

Leu	Pro	Cys	Leu	Cys	Ile	His	Ala	Met	Thr	Pro	Glu	Arg	Val	Gln
1595			1600			1605								
Arg	Leu	Lys	Ala	Ser	Arg	Pro	Glu	Gln	Ile	Thr	Val	Cys	Ser	Ser
1610			1615			1620								
Phe	Pro	Leu	Pro	Lys	Tyr	Arg	Ile	Thr	Gly	Val	Gln	Lys	Ile	Gln
1625			1630			1635								
Cys	Ser	Gln	Pro	Ile	Leu	Phe	Ser	Pro	Lys	Val	Pro	Ala	Tyr	Ile
1640			1645			1650								
His	Pro	Arg	Lys	Tyr	Leu	Val	Glu	Thr	Pro	Pro	Val	Asp	Glu	Thr
1655			1660			1665								
Pro	Glu	Pro	Ser	Ala	Glu	Asn	Gln	Ser	Thr	Glu	Gly	Thr	Pro	Glu
1670			1675			1680								
Gln	Pro	Pro	Leu	Ile	Thr	Glu	Asp	Glu	Thr	Arg	Thr	Arg	Thr	Pro
1685			1690			1695								
Glu	Pro	Ile	Ile	Ile	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Asp	Ser	Ile	Ser	Leu
1700			1705			1710								
Leu	Ser	Asp	Gly	Pro	Thr	His	Gln	Val	Leu	Gln	Val	Glu	Ala	Asp
1715			1720			1725								
Ile	His	Gly	Pro	Pro	Ser	Val	Ser	Ser	Ser	Ser	Trp	Ser	Ile	Pro
1730			1735			1740								
His	Ala	Ser	Asp	Phe	Asp	Val	Asp	Ser	Leu	Ser	Ile	Leu	Asp	Thr
1745			1750			1755								
Leu	Glu	Gly	Ala	Ser	Val	Thr	Ser	Gly	Ala	Thr	Ser	Ala	Glu	Thr
1760			1765			1770								
Asn	Ser	Tyr	Phe	Ala	Lys	Ser	Met	Glu	Phe	Leu	Ala	Arg	Pro	Val
1775			1780			1785								
Pro	Ala	Pro	Arg	Thr	Val	Phe	Arg	Asn	Pro	Pro	His	Pro	Ala	Pro
1790			1795			1800								
Arg	Thr	Arg	Thr	Pro	Ser	Leu	Ala	Pro	Ser	Arg	Ala	Cys	Ser	Arg
1805			1810			1815								
Thr	Ser	Leu	Val	Ser	Thr	Pro	Pro	Gly	Val	Asn	Arg	Val	Ile	Thr

1820 1825 1830
 Arg Glu Glu Leu Glu Ala Leu Thr Pro Ser Arg Thr Pro Ser Arg
 1835 1840 1845
 Ser Val Ser Arg Thr Ser Leu Val Ser Asn Pro Pro Gly Val Asn
 1850 1855 1860

Arg Val Ile Thr Arg Glu Glu Phe Glu Ala Phe Val Ala Gln Gln
 1865 1870 1875
 Gln

<210> 23

<211> 613

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Viral Protein

<400> 23

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

Leu Glu Arg Thr Glu Leu Glu Ile Ser Tyr Ala Pro Arg Leu Asp Gln
 35 40 45
 Glu Lys Glu Glu Leu Leu Arg Lys Lys Leu Gln Leu Asn Pro Thr Pro
 50 55 60
 Ala Asn Arg Ser Arg Tyr Gln Ser Arg Lys Val Glu Asn Met Lys Ala
 65 70 75 80
 Ile Thr Ala Arg Arg Ile Leu Gln Gly Leu Gly His Tyr Leu Lys Ala
 85 90 95

Glu Gly Lys Val Glu Cys Tyr Arg Thr Leu His Pro Val Pro Leu Tyr
 100 105 110
 Ser Ser Ser Val Asn Arg Ala Phe Ser Ser Pro Lys Val Ala Val Glu
 115 120 125
 Ala Cys Asn Ala Met Leu Lys Glu Asn Phe Pro Thr Val Ala Ser Tyr

130 135 140
 Cys Ile Ile Pro Glu Tyr Asp Ala Tyr Leu Asp Met Val Asp Gly Ala
 145 150 155 160

 Ser Cys Cys Leu Asp Thr Ala Ser Phe Cys Pro Ala Lys Leu Arg Ser
 165 170 175
 Phe Pro Lys Lys His Ser Tyr Leu Glu Pro Thr Ile Arg Ser Ala Val
 180 185 190
 Pro Ser Ala Ile Gln Asn Thr Leu Gln Asn Val Leu Ala Ala Ala Thr
 195 200 205
 Lys Arg Asn Cys Asn Val Thr Gln Met Arg Glu Leu Pro Val Leu Asp
 210 215 220

 Ser Ala Ala Phe Asn Val Glu Cys Phe Lys Lys Tyr Ala Cys Asn Asn
 225 230 235 240
 Glu Tyr Trp Glu Thr Phe Lys Glu Asn Pro Ile Arg Leu Thr Glu Glu
 245 250 255
 Asn Val Val Asn Tyr Ile Thr Lys Leu Lys Gly Pro Lys Ala Ala Ala
 260 265 270
 Leu Phe Ala Lys Thr His Asn Leu Asn Met Leu Gln Asp Ile Pro Met
 275 280 285

 Asp Arg Phe Val Met Asp Leu Lys Arg Asp Val Lys Val Thr Pro Gly
 290 295 300
 Thr Lys His Thr Glu Glu Arg Pro Lys Val Gln Val Ile Gln Ala Ala
 305 310 315 320
 Asp Pro Leu Ala Thr Ala Tyr Leu Cys Gly Ile His Arg Glu Leu Val
 325 330 335
 Arg Arg Leu Asn Ala Val Leu Leu Pro Asn Ile His Thr Leu Phe Asp
 340 345 350

 Met Ser Ala Glu Asp Phe Asp Ala Ile Ile Ala Glu His Phe Gln Pro
 355 360 365
 Gly Asp Cys Val Leu Glu Thr Asp Ile Ala Ser Phe Asp Lys Ser Glu
 370 375 380

Asp Asp Ala Met Ala Leu Thr Ala Leu Met Ile Leu Glu Asp Leu Gly
 385 390 395 400
 Val Asp Ala Glu Leu Leu Thr Leu Ile Glu Ala Ala Phe Gly Glu Ile
 405 410 415

Ser Ser Ile His Leu Pro Thr Lys Thr Lys Phe Lys Phe Gly Ala Met
 420 425 430
 Met Lys Ser Gly Met Phe Leu Thr Leu Phe Val Asn Thr Val Ile Asn
 435 440 445
 Ile Val Ile Ala Ser Arg Val Leu Arg Glu Arg Leu Thr Gly Ser Pro
 450 455 460
 Cys Ala Ala Phe Ile Gly Asp Asp Asn Ile Val Lys Gly Val Lys Ser
 465 470 475 480

Asp Lys Leu Met Ala Asp Arg Cys Ala Thr Trp Leu Asn Met Glu Val
 485 490 495
 Lys Ile Ile Asp Ala Val Val Gly Glu Lys Ala Pro Tyr Phe Cys Gly
 500 505 510
 Gly Phe Ile Leu Cys Asp Ser Val Thr Gly Thr Ala Cys Arg Val Ala
 515 520 525
 Asp Pro Leu Lys Arg Leu Phe Lys Leu Gly Lys Pro Leu Ala Ala Asp
 530 535 540

Asp Glu His Asp Asp Asp Arg Arg Arg Ala Leu His Glu Glu Ser Thr
 545 550 555 560
 Arg Trp Asn Arg Val Gly Ile Leu Ser Glu Leu Cys Lys Ala Val Glu
 565 570 575
 Ser Arg Tyr Glu Thr Val Gly Thr Ser Ile Ile Val Met Ala Met Thr
 580 585 590
 Thr Leu Ala Ser Ser Val Lys Ser Phe Ser Tyr Leu Arg Gly Ala Pro
 595 600 605

Ile Thr Leu Tyr Gly
 610

<210> 24

<211> 11917

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RBS004.1

<400> 24

gaugggcggc gcaugagaga agcccagacc aauuaccuac ccaaaaugga gaaaguucac	60
guugacaucg aggaagacag ccgauuccuc agagcuuugc agcggagcuu cccgcaguuu	120
gagguagaag ccaagcaggu cacugauaau gaccaugcua augccagagc guuuucgcau	180
cuggcuucaa aacugaucga aacggaggug gacccaucg acacgauccu ugacauugga	240
agugcgcccg cccgcagaau guauucuaag cacaaguauc auuguaucug uccgaugaga	300
ugugcggaag auccggacag auuguauaag uaugcaacua agcugaagaa aaacuguaag	360
gaaauaacug auaaggaaau ggacaagaaa augaaggagc ucgccgccgu caugagcgac	420
ccugaccugg aaacugagac uaugugccuc cagcagcagc agucgugucg cuacgaaggg	480
caagucgugc uuuaccagga uguauacgag guugacggac cgacaagucu cuaucaccaa	540
gccauaaagg gaguuagagu cgccuacugg auaggcuuug acaccacccc uuuuauuuu	600
aagaacuugg cuggagcaua uccaucuauc ucuaccaacu gggccgacga aaccguguua	660
acggcucgua acauaggccu augcagcucu gacguuaugg agcggucacg uagagggaug	720
uccauucuaa gaaagaagua uuugaaacca uccaacaug uucuauucuc uguuggcucg	780
accaucuaac acgaaaagag ggacuuacug aggagcuggc accugccguc uguauuucac	840
uuacuggca agcaaaaaua cacaugucgg ugugagacua uaguuaugu cgacggguac	900
gucguuaaaa gaauagcuau caguccaggc cuguauaggga agccuucagg cuaugcugcu	960
acgaugcacc gcgagggauu cuugugcugc aaagugacag acacauugaa cggggagagg	1020
gucucuuuuc ccgugugcac guaugugcca gcuacauugu gugaccaaau gacuggcaua	1080
cuggcaacag augucagucg ggacgacgag caaaaacugc ugguugggcu caaccagcgu	1140
auagucguca acggucgcac ccagagaaac accauuacca ugaaaaaua ccuuuugccc	1200
guaguggccc aggcuuuugc uaggugggca aaggaaauua aggaagauca agaagauaa	1260
aggccacuag gacuacgaga uagacaguua gucauggggu guuguugggc uuuuagaagg	1320
cacaagauaa caucuauuaa uaagcgcccg gauacccaaa ccaucauca agugaacagc	1380
gauuuccacu cauucgugcu gccaggaua ggcaguaaca cauuggagau cgggcugaga	1440
acaagaauc ggaauuuu agaggagcac aaggagccgu caccucucau uaccgccgag	1500
gacguacaag aagcuagug cgacgccgau gaggcuagg aggugcguga agccgaggag	1560

uugcgcgag	cucuaccacc	uuuggcagcu	gauguagagg	agcccacucu	ggaagccgau	1620
gucgacuuga	uguuacaaga	ggcuggggcc	ggcucagugg	agacaccucg	uggcuugaua	1680
aagguuacca	gcuacgcugg	cgaggacaag	aucggcucuu	acgcugugcu	uucuccgcag	1740
gcuguacuca	agagugaaaa	auuaucuugc	auccaccuc	ucgcugaaca	agucauagug	1800
auaacacacu	cuggccgaaa	agggcguuau	gccguggaac	cauaccaugg	uaaaguagug	1860
gugccagagg	gacaugcaau	acccguccag	gacuuucaag	cucugaguga	aagugccacc	1920
auuguguaca	acgaacguga	guucguaaac	agguaccugc	accauauugc	cacacaugga	1980
ggagcgcu	acacugauga	agaauuuuac	aaaacuguca	agcccagcga	gcacgacggc	2040
gaauaccugu	acgacaucga	caggaaacag	ugcgucaaga	aagagcuagu	cacugggcua	2100
gggcucacag	gcgagcuggu	cgauccuccc	uuccaugaa	ucgccuacga	gagucugaga	2160
acacgaccag	ccgcuccuua	ccaaguacca	accauagggg	uguauggcgu	gccaggauca	2220
ggcaagucug	gcaucauuua	aagcgaguc	acaaaaaag	aucuaguggu	gagcgccaag	2280
aaagaaaacu	gugcagaaau	uuaaaggac	gucaagaaaa	ugaaagggcu	ggacgucaau	2340
gccagaacug	uggacucagu	gcucuugaau	ggaugcaaac	accccguaga	gaccucguau	2400
auugacgagg	cuuuugcuug	ucaugcaggu	acucucagag	cgcucauagc	cauuuaaaga	2460
ccuaaaaagg	cagugcucug	cggagauccc	aaacagugcg	guuuuuuuaa	caugaugugc	2520
cugaaagugc	auuuuaacca	cgagauuugc	acacaagucu	uccacaaaag	caucucucgc	2580
cguugcacua	aaucugugac	uucggucguc	ucaaccuugu	uuuacgaca	aaaaaugaga	2640
acgacgaauc	cgaagagac	uaagauugug	auugacacua	ccggcaguac	caaaccuaag	2700
caggacgauc	ucauucucac	uuguuucaga	ggguggguga	agcaguugca	aaugauuac	2760
aaaggcaacg	aaauaauagc	ggcagcugcc	ucucaagggc	ugacccguua	agguguguau	2820
gccguucggu	acaaggugaa	ugaaaauccu	cuguacgcac	ccaccucaga	acaugugaac	2880
guccuacuga	cccgcacgga	ggaccgcauc	guguggaaaa	cacuagccgg	cgaccaugg	2940
auaaaaacac	ugacugccaa	guaccucggg	aauuucacug	ccacgauaga	ggaguggcaa	3000
gcagagcaug	augccaucau	gaggcacau	uuggagagac	cggaccuac	cgacgucuuc	3060
cagaauaagg	caaacgugug	uugggccaag	gcuuuagugc	cggugcugaa	gaccgcuggc	3120
auagacauga	ccacugaaca	auggaacacu	guggauuuuu	uugaaacgga	caaagcucac	3180
ucagcagaga	uaguauugaa	ccaacuau	gugagguucu	uuggacucga	ucuggacucc	3240
ggucuauuuu	cugcaccac	uguuccguua	uccauuagga	auaaucacug	ggauaacucc	3300
ccgucgccua	acauguacgg	gcugaauaaa	gaaguggucc	gucagcucuc	ucgcagguac	3360
ccacaacugc	cucgggcagu	ugccacuggu	agagucuaug	acaugaacac	ugguacacug	3420

cgcauuuug auccgcgcgcau aaaccuagua ccuguaaaca gaagacugcc ucaugcuuuu	3480
guccuccacc auaaugaaca cccacagagu gacuuuuuuu cauucgucag caaaauugaag	3540
ggcagaacug uccugguggu cggggaaaag uuuccgucc caggcaaaau gguugacugg	3600
uugucagacc ggccugaggc uaccuucaga gcucggcugg auuuaggcau cccaggugau	3660
gugcccaau augacauau auuuguuau gugaggacc cauauaaaua ccaucacuau	3720
cagcagugug aagaccaugc cauuaagcua agcauguuga ccaagaaagc augucugcau	3780
cugaauccc ggcgaaccug ugucagcaua gguuuugguu acgcugacag ggccagcgaa	3840
agcaucauug gugcuauagc gcggcaguuc aaguuuuccc gaguaugcaa accgaaaucc	3900
ucacuugagg agacggaagu ucuguuuuga uucauugggu acgaucgcaa ggcccguacg	3960
cacaauccuu acaagcuau aucaaccuug accaacaauu auacagguuc cagacuccac	4020
gaagccggau gugcaccuc auaucaugug gugcgagggg auauugccac ggccaccgaa	4080
ggagugauua uaaugcugc uaacagcaa ggacaaccug gcggaggggu gugcggagcg	4140
cuguauaaga aaaucccga aaguucgau uuacagccga ucgaaguagg aaaagcgca	4200
cuggucaaag gugcagcuaa acauaucau caugccguag gaccaaacu caacaauguu	4260
ucggagguug aaggugacaa acaguuggca gaggcuaug aguccaucg uaagauugc	4320
aacgaaaca auuacaaguc aguagcgauu ccacuguugu ccaccggcau cuuuuccggg	4380
aacaaagau gacuaacca aucauugaac cauugcuga cagcuuuga caccacugau	4440
gcagauguag ccuauuacug cagggacaag aaauuggaaa ugacucuaa ggaagcagug	4500
gcuaggagag aagcagugga ggagauaugc auauccgacg auucuucagu gacagaaccu	4560
gaugcagagc uggugaggg gcauccaag aguucuuug cuggaaggaa ggguacagc	4620
acaagcgaug gcaaaacuu cucauuuug gaagggacca aguuuacca ggcggccaag	4680
gauauagcag aaauuaugc cauguggccc guugcaacgg aggccaauga gcagguaugc	4740
augauauucc ucggagaaag caugagcagu auuagguca aaugccccgu cgaggagucg	4800
gaagccucca caccaccuag cagcugccu ugcuugugca uccaugccau gacuccagaa	4860
agaguacagc gccuaaaagc cucacgucca gaacaaaua cugugugcuc auccuuucca	4920
uugccgaagu auagaauac uggugugcag aagauccaau gcucccagcc uauauuguuc	4980
ucaccgaaag ugccugcgua uauucaucca aggaaguauc ucguggaaac accaccgua	5040
gacgagacuc cggagccauc ggcagagaac caauccacag aggggacacc ugaacaacca	5100
ccacuuauaa ccgaggaua gaccaggacu agaacgccug agccgauc aucaagaaga	5160
gaagaagaag auagcauag uuugcugua gaugggccga cccaccaggu gcugcaugc	5220
gaggcagaca uucacgggcc gccucugua ucuagcucu ccugguccau uccucaugca	5280

uccgacuuug auguggacag uuuaucuaa cuugacaccc uggagggagc uagcgugacc 5340

agcggggcaa cgucagccga gacuaacucu uacuucgcaa agaguaugga guuucuggcg 5400

cgaccggugc cugcgccucg aacaguauuc aggaaccuc cacaucgcc uccgcgcaca 5460

agaacaccgu cacuugcacc cagcagggcc ugcuccagaa ccagccuagu uuccaccccg 5520

ccaggcguga auagggugau cacuagagag gagcucgaag cgcuuacccc gucacgcacu 5580

ccuagcaggu cggucuccag aaccagccug gucuccaacc cgccaggcgu aaauagggug 5640

auuacaagag aggaguuga ggcuucgua gcacaacaac aaugacgguu ugaugcgggu 5700

gcuaacauu uuuccuccga caccggucuaa gggcauuuac aacaaaaauc aguaaggcaa 5760

acggugcuau ccgaaguggu guuggagagg accgaauugg agauuucgua ugccccgcgc 5820

cucgaccaag aaaaagaaga auuacuacgc aagaaauuac aguuaaucc cacaccugcu 5880

aacagaagca gauaccaguc caggaaggug gagaacauga aagccauaac agcuagacgu 5940

auucugcaag gccuagggca uuauugaag gcagaaggaa aaguggagug cuaccgaacc 6000

cugcauccug uuccuuugua uucaucuagu gugaaccgug cccuuucaag ccccaagguc 6060

gcaguggaag ccuguaacgc cauguugaaa gagaacuuuc cgacuguggc uucuuacugu 6120

auuuuuccag aguacgaugc cuauuuggac augguugacg gagcuucaug cugcuuagac 6180

acugccaguu uuugcccugc aaagcugcgc agcuuuccaa agaaacacuc cuauuuggaa 6240

cccacaauc gaucggcagu gccuucagcg auccagaaca cgcuccagaa cguccuggca 6300

gcugccacaa aaagaaauug caaugucacg caaagagag aaaugccgu auuggauucg 6360

gcggccuuua auguggaau cuucaagaaa uaugcgugua auaaugaaau uugggaaacg 6420

uuuaaagaaa accccaucag gcuuacugaa gaaaacgugg uaaauuacau uaccaauua 6480

aaaggaccaa aagcugcugc ucuuuuugcg aagacacua auuugaauau guugcaggac 6540

auaccaaugg acagguuugu aauggacuua aagagagacg ugaaagugac uccaggaaca 6600

aaacauacug aagaacggcc caagguacag gugauccagg cugccgaucc gcuagcaaca 6660

gcguaucugu gcggaaucca ccgagagcug guuaggagau uaaaugcggu ccugcuuccg 6720

aacaucaua cacuguuuga uaugcggcu gaagacuuug acgcuauuau agccgagcac 6780

uuccagccug gggauugugu ucuggaaacu gacaucgcu cguuugauaa aagugaggac 6840

gagccaugg cucugaccgc guuaaugauu cuggaagacu uaggugugga cgagagcug 6900

uugacgcuga uugaggcggc uuucggcgaa auuucacaa uacauuugc cacuaaaacu 6960

aaaauuuuu ucggagccau gaugaaaacu ggaauuucc ucacacuguu ugugaacaca 7020

gucauuuaca uuguauucgc aagcagagug uugagagaac ggcuaaccgg aucaccaugu	7080
gcagcauua uuggagauga caauaucgug aaaggaguca aaucggacaa auuaauggca	7140
gacagugcgc ccaccugguu gaauauggaa gucaagauua uagaugcugu ggugggcgag	7200
aaagcgccuu auuucugugg aggguuuuuu uugugugacu ccgugaccgg cacagcgugc	7260
cguguggcag acccccuaaa aagcguguuu aagcuaggca aaccucggc agcagacgau	7320
gaacaugaug augacaggag aagggcuuug caugaggagu caacacgcug gaaccgagug	7380
gguaauuuu cagagcugug caaggcagua gaaucaaggu augaaaccgu aggaacuucc	7440
aucauaguuu ugcccaugac uacucuagcu agcaguguua aaucuuucag cuaccugaga	7500
ggggcccccua uaacucucua cggcuaaccu gaauaggacua cgacauaguc uaguccgcca	7560
agacuaguuu guuuguguuu cuugugcugc ugccucuugu gucuucucag ugugugaauu	7620
ugacaacaag aacacagcug ccaccagcuu auacaaauuc uuuuaccaga ggaguguauu	7680
auccugauaa aguguuuaga ucuucugugc ugcacagcac acaggaccug uuucugccau	7740
uuuuuagcaa ugugacaugg uuucaugcaa uucauguguc uggaacaaau ggaacaaaaa	7800
gauuugauaa uccugugcug ccuuuuuauug auggagugua uuugcuuca acagaaaagu	7860
caauuuuuu uagaggauug auuuuuggaa caacacugga uucuaaaaca cagucucugc	7920
ugauugugaa uaaugcaaca aaugugguga uuaaagugug ugaauuucag uuuguaaug	7980
auccuuuucu gggaguguau uaucacaaaa auauuuuuu uuggauaggaa ucugaauuuu	8040
gaguguauuc cucugcaaaa aauguuacau uugaauaugu gucucagccu uuucugaugg	8100
aucuggaagg aaaacagggc aaauuuuuuu aucugagaga auuuguguuu aaaaauuug	8160
auggauuuu uaaaauuuu ucuuuuacac caccauuuuu uuugugaga gaucugccuc	8220
agggauuuu ugcucuggaa ccucuggugg aucugccaau uggaauuuu auuacaagau	8280
uucagacacu gcuggcucug cacagaucuu aucugacacc uggaauuuu ucuucuggau	8340
ggacagccgg agcugcagcu uauuauugg gcuaucugca gccaagaaca uuucugcuga	8400
aaauuuuuga aaauuggaaca auuacagau cuguggauug ugcucuggau ccucugucug	8460
aaacaaaug uacauuuuuu ucuuuuacag uggaauuagg cauuuauucag acaucuuuuu	8520
uuagagugca gccaacagaa ucuauuguga gauuuccaaa uauuacaaa cuuguccau	8580
uuggagaagu guuuuauuga acaagauuug caucugugua ugcauggaau agaaaaagaa	8640
uuucuuuuu uguggcugau uauucugugc uguuuuuuug ugcuuuuuu uccacuuuuu	8700
aauguuauug agugucucca acauuuuuuu augauuuuug uuuuacaaa guguaugcug	8760
auucuuuuu gaucagaggu gaugaaguga gacagauugc ccccgagacag acaggaaaaa	8820
uugcugauua cauuuacaaa cugccugaug auuuuacagg augugugauu gcuuggauu	8880

cuaauuuuuu agauucuaaa gugggaggaa auuacaauua ucuguacaga cuguuuagaa	8940
aaucaaaucu gaaaccuuuu gaaagagaua uuucaacaga aauuuuacag gcuggaucaa	9000
caccuuguaa uggaguggaa ggauuuuuuu guuuuuuucc auuacagagc uauggauuuc	9060
agccaaccaa ugguguggga uaucagccau auagaguggu ggugcugucu uuugaacugc	9120
ugcaugcacc ugcaacagug uguggaccua aaaaaucuaa aaaaauagug aaaaauuuu	9180
gugugaauuu uauuuuuuuu ggauuacag gaacaggagu gcugacagaa ucuaauaaaa	9240
auuuucugcc uuucagcag uuuggcagag auauugcaga uaccacagau gcagugagag	9300
auccucagac auuagaaauu cuggauuuua caccuuguuc uuugggggu gugucuguga	9360
uuacaccugg acaaaauaca ucuaaucagg uggcugugcu guaucaggau gugaaugua	9420
cagaagugcc aguggcauu caugcagau agcugacacc acauggaga gugauuucua	9480
caggaucaaa uguguuucag acaagagcag gaugucugau uggagcagaa caugugaaua	9540
auucuuuuga augugauuu ccaauuggag caggcauuug ugcaucuau cagacacaga	9600
caauuuccc aaggagagca agaucugugg caucucaguc uauuuuugca uacaccaugu	9660
cucugggagc agaaaauuu guggcauuu cuauuuuuu uauugcuau ccaacaaauu	9720
uuaccuuuc ugugacaaca gaaauuuuac cugugucua gacaaaaa ucuguggauu	9780
guaccaugua cauuuugga gauucacag aauguucua ucugcugcug caguauggau	9840
cuuuuugua acagcugaau agagcuuuu caggaaugc uguggaacag gaaaaaaaua	9900
cacaggaagu guuugcugag gugaacaga uuuaaaaac accaccauu aaagauuuug	9960
gaggauuuua uuuuagccag auucugccug auccuucua accuucuaa agaucuuuu	10020
uugaagauu gcuguuuuu aaagugacac uggcagaugc aggaauuuu aaacaguaug	10080
gagauugccu ggugauuuu gcugcaagag aucugauuug ugcucagaaa uuuuauugac	10140
ugacagugcu gccuccucug cugacagaug aaugauugc ucaguacaca ucugcuuuac	10200
uggcuggaac aauuacaagc ggauggacau uggagcugc agcugcucug cagauuccuu	10260
uugcaaugca gauggcuuac agauuuuau gaauuggagu gacacagaau guguuuuuug	10320
aaaaucagaa acugauugca aaucaguuu auucugcaau uggcauuuu caggauucuc	10380
ugucuucua agcuucugcu cugggaaaac ugcaggauu ggugaauac aaugcacagg	10440
cacugaauac ucuggugaaa cagcugucua gcauuuuuug ggcauuuuu ucugucuga	10500
augauuuuu gucuagacug gaucuccug aagcugaagu gcagauugau agacugauca	10560
caggaagacu gcagucucug cagacuuuug ugacacagca gcugauuaga gcugcugaaa	10620
uuagagcuuc ugcuaauucg gcugcuacaa aaugucuga augugucug ggacagucua	10680
aaagagugga uuuuugugga aaaggauuac aucugaugc uuuccacag ucuguccac	10740

auggaguggu guuuuuacau gugacauaug ugccagcaca ggaaaagaau uuuaccacag	10800
caccagcaau uugucaugau ggaaaagcac auuuuccaag agaaggagug uuugugucua	10860
auggaacaca uggguuugug acacagagaa auuuuuuaga accucagauu auuacaacag	10920
auaaauacau ugugucagga aaauugaug ugguuauugg aaauugaaau aaucacagugu	10980
augauccacu gcagccagaa cuggauucuu uuaaagaaga acuggauaaa uuuuuuuuuu	11040
aucacacaucc uccugaugug gauuuaggag auuuuucugg aaucacagca ucugugguga	11100
auauucagaa agaaaugau agacugaaug aaguggccaa aaucugaaau gaucucuga	11160
uugaucugca ggaacuugga aaauaugaac aguacauuaa auggccuugg uacauuuggc	11220
uuggauuuau ugcaggauua auugcaauug ugauggugac aaauauguaa uguuguaua	11280
caucauguug uucuuuuuu aaaggauguu guucuuugg aagcuuguu aauuuugaug	11340
aagaugauuc ugaaccugug uaaaaaggag ugaaauugca uuacacaua ugacucgagc	11400
ugguacugca ugcacgcau gcuagcugcc ccuuuccgu ccuggguacc ccgagucucc	11460
cccgaaccug ggucccaggu augcuccac cuccaccugc cccacucacc accucugcua	11520
guuccagaca ccuccaagc acgcagcaau gcagcucaaa acgcuuagcc uagccacacc	11580
cccacgggaa acagcaguga uuaaccuuu gcaauaaacg aaaguuuac uaagcuauac	11640
uaaccccagg guuggucaau uucgugccag ccacaccgcg gccgcaugaa uacagcagca	11700
auuggcaagc ugcuuacaua gaacucgcgg cgauuggcau gccgccuuu aauuuuuuu	11760
uuuuuuuuu uuuuuuuu cgaaucgga uuuuuuuu auuuuuuua aaaaaaaaa	11820
aaaaaaaaa aaaaaagca uagacuuaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa	11880
aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaa	11917
<210> 25	
<211> 11917	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> RBS004.2	
<400> 25	
gaugggcggc gcaugagaga agcccagacc aaauaccuac ccaaaugga gaaaguucac	60
guugacaucg aggaagacag ccuauuccuc agagcuuugc agcggagcuu cccgcaguuu	120
gagguagaag ccaagcaggu cacugauaau gaccaugcua augccagagc guuuucgcau	180
cuggcuucaa aacugaucga aacggaggug gaccuauccg acacgauccu ugacauugga	240
agugcgcccg cccgcagaau guauucuaag cacaaguauc auugauaucg uccgaugaga	300

ugugcggaag auccggacag auuguauaag uaugcaacua agcugaagaa aaacuguaag	360
gaaauaacug auaaggaauu ggacaagaaa augaaggagc ucgccgccgu caugagcgac	420
ccugaccugg aaacugagac uaugugccuc cacgacgacg agucgugucg cuacgaaggg	480
caagucgcug uuuaccagga uguauacgcg guugacggac cgacaagucu cuaucaccaa	540
gccaaauaagg gaguuagagu cgccuacugg auaggcuuug acaccacccc uuuuauuuu	600
aagaacuugg cuggagcaua uccaucauac ucuaccaacu gggccgacga aaccguguua	660
acggcucgua acauaggccu augcagcucu gacguuauagg agcggucacg uagagggaug	720
uccauucuaa gaaagaagua uuugaaacca uccaacaauug uucuaaucuc uguuggcucg	780
accaucuaacc acgaaaagag ggacuuacug aggagcuggc accugccguc uguauuucac	840
uuacguggca agcaaaaaua cacaugucgg ugugagacua uaguuauguug cgacggguac	900
gucguuaaaa gaauagcuau caguccaggc cuguauggga agccuucagg cuaugcugcu	960
acgaugcacc gcgagggauu cuugucguc aaagugacag acacauugaa cggggagagg	1020
gucucuuuuc ccgugugcac guaugugcca gcuacauugu gugaccaaa gacuggcuaa	1080
cuggcaacag augucagucg ggacgacgcg caaaaacugc ugguugggcu caaccagcgu	1140
auagucguca acggucgcac ccagagaaac accaaauacca ugaaaaaua cccuuugccc	1200
guaguggccc aggcuuuugc uaggugggca aaggaaaua aggaagauca agaagaugaa	1260
aggccacuag gacuacgaga uagacaguua gucauggggu guuguugggc uuuuagaagg	1320
cacaagauaa caucuauuuu uaagcgcccg gauacccaaa ccacaucaaa agugaacagc	1380
gauuuccacu cauucgugcu gcccaggaua ggaguuaca cauuggagau cgggcugaga	1440
acaagaaucg ggaauuuu agaggagcac aaggagccgu caccucucua uaccgccgag	1500
gacguacaag aagcuaagug cgcagccgau gaggcuuagg aggugcguga agccgaggag	1560
uugcgcgag cucuaccacc uuuggcagcu gauguuagg agcccacucu ggaagccgau	1620
gucgacuuga uguuacaaga ggcuggggcc ggcucagugg agacaccucg ugguugaua	1680
aagguuacca gcuacgcugg cgaggacaag aucggcucuu acgcugugcu uucuccgag	1740
gcuguacuca agagugaaaa auuauucugc auccaccuc ucgcugaaca agucauagug	1800
auaacacacu cuggccgaaa agggcguaau gccguggaac cauaccaug uaaaguagug	1860
gugccagagg gacaugcaau acccguccag gacuuucaag cucugaguga aagugccacc	1920
auuguguaca acgaacguga guucguaaac agguaccugc accauauugc cacacaugga	1980
ggagcgcuca acacugauga agaauuuuac aaaacugua agcccagcga gcacgacggc	2040
gaauaccugu acgacaucga caggaaacag ugcgucaaga aagagcuagu cacugggcua	2100

gggcucacag gcgagcuggu cgauccuccc uucaugaau ucgccuacga gagucugaga	2160
acacgaccag ccgcuccuua ccaaguacca accauagggg uguauggcgu gccaggauca	2220
ggcaagucug gcaucauuua aagcgaguc accaaaaaag aucuaguggu gagcgccaag	2280
aaagaaaacu gugcagaaau uauaaggac gucaagaaaa ugaaaggcgu ggacgucaau	2340
gccagaacug uggacucagu gcucuugaau ggauagcaaac accccguaga gaccuguaau	2400
auugacgagg cuuuugcuug ucaugcaggu acucucagag cgcucauagc cauuuaaga	2460
ccuaaaaagg cagugcucug cggagauccc aaacagugcg guuuuuuuaa caugaugugc	2520
cugaaagugc auuuuaacca cgagauuugc acacaagucu uccacaaaag caucucugc	2580
cguugcacua aaucugugac uucggucguc ucaaccuugu uuuacgacaa aaaaugaga	2640
acgacgauc cgaagagac uaagauugug auugacacua ccggcaguac caaacuaag	2700
caggacgauc ucauucucac uuguuucaga ggguggguga agcaguugca aaugauuac	2760
aaaggcaacg aaauaagac ggcagcugcc ucucaagggc ugacccguaa aggugugua	2820
gccguucggu acaaggugaa ugaaaauccu cuguacgcac ccaccucaga acaugugaac	2880
guccuacuga cccgcacgga ggaccgcauc guguggaaaa cacuagccgg cgaccaug	2940
auaaaaacac ugacugccaa guaccuggg aauuucacug ccacgauaga ggaguggcaa	3000
gcagagcaug augccaucau gaggcacauc uuggagagac cggaccuac cgacgucuuc	3060
cagaauaagg caaacgugug uugggccaag gcuuugugc cggugcugaa gaccgcuggc	3120
auagacuga ccacugaaca auggaacacu guggauuuuu uugaaacgga caaagcucac	3180
ucagcagaga uaguauugaa ccaacuaugc gugagguucu uuggacucga ucggacucc	3240
ggucuauuuu cugcaccac uguuccguua uccauuagga auaaucacug ggauaacucc	3300
ccgucgccua acaugacgg gcugaauaaa gaaguggucc gucagcucuc ucgcagguac	3360
ccacaacugc cucgggcagu ugccacuggu agagucuaug acaugaacac ugguacacug	3420
cgcauuuug auccgcgcau aaaccuagua ccuguaaaca gaagacugcc ucaugcuua	3480
guccuccacc auaaagaaca cccacagagu gacuuuucuu cauucgucag caaaugaag	3540
ggcagaacug uccuguggu cggggaaaag uuguccgucc caggcaaaa gguugacug	3600
uugucagacc ggccugaggc uaccuucaga gcucggcugg auuuaggcau cccaggugau	3660
gugcccaau augacauau auuuguuaau gugaggacc cauauaaa ccaucacuau	3720
cagcagugug aagaccaugc cauaagcua agcauguuga ccaagaaagc augucgcau	3780
cugaauccc gcggaaccug ugucagcaua gguuauuguu acgcugacag gccagcgaa	3840

agcaucauug gugcuauagc gcggcaguuc aaguuuuccc gaguaugcaa accgaaaucc	3900
ucacuugagg agacggaagu ucuguuugua uucauugggu acgaucgcaa gggccguacg	3960
cacaauccuu acaagcuauac aucaaccuug accaacaauuu auacagguuc cagacuccac	4020
gaagccggau gugcaccuc auaucaugug gugcgagggg auauugccac ggccaccgaa	4080
ggagugauua uaaaugcugc uaacagcaaa ggacaaccug gcggaggggu gugcggagcg	4140
cuguauaaga aaaucccgga aaguucgau uuacagccga ucgaaguagg aaaagcgga	4200
cuggucaaag gugcagcuua acauaucauu caugccguag gaccaaacu caacaaguu	4260
ucggagguug aaggugacaa acaguuggca gaggcuaug aguccaucg uaagauuguc	4320
aacgauaaca auuacaaguc aguagcgauu ccacuguugu ccaccggcau cuuuuccggg	4380
aacaagauc gacuaacca aucauugaac cauugcuga cagcuuuga caccacugau	4440
gcagaugaug ccuuauacug cagggacaag aaauuggaaa ugacucuaa ggaagcagug	4500
gcuaggagag aagcagugga ggagauaugc auauccgacg auucucagu gacagaaccu	4560
gaugcagagc uggugagggg gcauccaag aguucuuug cuggaaggaa gggcuacagc	4620
acaagcgaug gcaaaacuuu cucauuuug gaagggacca aguucacca ggcggccaag	4680
gauauagcag aaauuaugc caugggccc guugcaacgg aggccauga gcagguaugc	4740
auguauaucc ucggagaaag caugagcagu auuaggucga aaugccccgu cgaggagucg	4800
gaagccucca caccaccuag cagcugccu ugcuugugca uccaugccau gacuccagaa	4860
agaguacagc gccuaaagc cucacugca gaacaaaua cugugugcuc auccuuucca	4920
uugccgaagu auagaauac uggugugcag aagauccaau gcucccagcc uauauuguuc	4980
ucaccgaaag ugccugcguu uauucaucca aggaaguauc ucguggaaac accaccggu	5040
gacgagacuc cggagccauc ggcagagaac caauccacag aggggacacc ugaacaacca	5100
ccacuauuaa ccgaggaua gaccaggacu agaaccguc agccgauc auccgaagaa	5160
gaagaagaag auagcauagc uuugcugua gauggcccga cccaccaggu gcugcaaguc	5220
gaggcagaca uucacgggccc gccucugua ucuagcuau ccugguccau uccuauuca	5280
uccgacuuug auguggacag uuuauccau cuugacacc uggagggagc uagcgugacc	5340
agcggggcaa cgucagccga gacuaacuc uacuucgca agaguaugga guuucuggcg	5400
cgaccggugc cugcgccugc aacaguauuc aggaaccuc cacaucggc uccgcgcaca	5460
agaacaccgu cacuugcacc cagcagggcc ugcuccagaa ccagccuagu uuccaccccg	5520
ccaggcguga auaggugau cacuagagag gagcucgaag cgcuuacccc gucacgcacu	5580
ccuagcaggu cggucuccag aaccagccug gucucaacc cgccaggcgu aaauaggug	5640
auuacaagag aggaguuga ggcguucgua gcacaacaac aaugacggu ugaugcggu	5700

gcuaacauu uuuccuccga caccggucac gggcauuuac aacaaaaauc aguaaggcaa	5760
acggugcuau ccgaaguggu guuggagagg accgaauugg agauuucgua ugccccgcgc	5820
cucgaccaag aaaaagaaga auuacuacgc aaaaaauac aguuuuuucc cacaccugcu	5880
aacagaagca gauaccaguc caggaaggug gagaacauga aagccauaac agcuagacgu	5940
auucugcaag gccuagggca uuauuugaag gcagaaggaa aaguggagug cuaccgaacc	6000
cugcauccug uuuccuuugua uucaucuagu gugaaccgug ccuuuucag ccccaagguc	6060
gcaguggaag ccuguaacgc cauguugaaa gagaacuuuc cgacuguggc uucuuacugu	6120
auuuuuccag aguacgaugc cuuuuuggac augguugacg gagcuuacug cugcuuagac	6180
acugccaguu uuugcccugc aaagcugcgc agcuuuccaa agaaacacuc cuuuuuggaa	6240
cccacauac gaucggcagu gccuucagcg auccagaaca cgcuccagaa cguccuggca	6300
gcugccacaa aaagaaaauug caaugucacg caaagagag aauugcccgu auuggauucg	6360
gcggccuuua auguggaauug cuucaagaaa uaugcgugua auaaugaaua uugggaaacg	6420
uuuaaagaaa accccaucag gcuuacugaa gaaaacgugg uaaaauacau uaccaaaaua	6480
aaaggaccaa aagcugcugc ucuuuuugcg aagacacaua auuugaauau guugcaggac	6540
auaccaauug acagguuugu aauggacuua aagagagacg ugaaagugac uccaggaaac	6600
aaacauacug aagaacggcc caagguacag gugaucagg cugccgaucc gcuagcaaca	6660
gcguauucgu gcggaaucac ccgagagcug guuaggagau uaaaugcggu ccugcuuccg	6720
aacauucau cacuguuuga uaugucggcu gaagacuuug acgcuauuau agccgagcac	6780
uuccagccug gggauugugu ucuggaaacu gacauccgu cguuugauaa aagugaggac	6840
gacgccauug cucugaccgc guuaaugauu cuggaagacu uaggugugga cgcagagcug	6900
uugacgcuga uugagggcgc uuucggcgaa auuuucaua uacauuugcc cacuaaaacu	6960
aaaauuaau ucggagccau gaugaaacu ggaauuucc ucacacuguu ugugaacaca	7020
gucuuuaa uuguauucgc aagcagagug uugagagaac ggcuaaccgg aucaccaugu	7080
gcagcauua uuggagauga caauaucgug aaaggaguca aaucggacaa auuaauggca	7140
gacaggugcg ccaccugguu gaauauggaa gucaagaua uagaugcugu ggugggcgag	7200
aaagcgcuu auuucugugg aggguuuuu uugugugacu ccgugaccgg cacagcgugc	7260
cguguggcag accccuuaa aaggcuuuu aagcuaggca aaccucuggc agcagacgau	7320
gaacaugaug augacaggag aagggcuuug caugaggagu caacacgcug gaaccgagug	7380
gguaauuuu cagagcugug caagcgagua gaaucaaggu augaaaccgu aggaacuucc	7440
aucauaguu ugcccaugac uacucuagcu agcaguguua aaucuuucag cuaccugaga	7500
ggggcccccua uaacucucua cggcuuaccu gaauaggacua cgacauaguc uaguccgcca	7560

agacuaguau guucguguuc cuggugcugc ugccucuggu guccagccag ugugugaacc	7620
ugaccaccag aacacagcug ccuccagccu acaccaacag cuuuaccaga ggcguguacu	7680
accccgacaa gguguucaga uccagcgugc ugcacucuac ccaggaccug uuccugccuu	7740
ucuucagcaa cgugaccugg uuccacgcca uccacguguc cggcaccaau ggcaccaaga	7800
gauucgacaa ccccgugcug ccuuaacg acggggugua cuuugccagc accgagaagu	7860
ccaacaucau cagaggcugg aucuucggca ccacacugga cagcaagacc cagagccugc	7920
ugaucgugaa caacgccacc aacuggguca ucaaagugug cgaguuccag uucugcaacg	7980
accccuuccu gggcgucuac uaccacaaga acaacaagag cuggauggaa agcgaguucc	8040
ggguguacag cagcgccaac aacugcaccu ucgaguacgu guccagccu uuccugaugg	8100
accuggaagg caagcagggc aacuucaaga accugcgcgga guucguguuu aagaacaucg	8160
acggcuacuu caagaucuac agcaagcaca ccccuaucaa ccucgugcgg gaucugccuc	8220
agggcuucuc ugucuggaa ccccgugug aucugccau cggcaucaac aucaccggu	8280
uucagacacu gcuggccug cacagaagcu accugacacc uggcgauagc agcagcggau	8340
ggacagcugg ugccgccgcu uacuauugg gcuaccugca gccuagaacc uuccugcuga	8400
aguacaacga gaacggcacc aucaccgacg ccguggauug ugucuggau ccucugagcg	8460
agacaaagug caccugaag uccuucaccg uggaaggg caucuaccag accagcaacu	8520
uccgggugca gccaccgaa uccaucgugc gguucccaa uaucaccau cugugcccu	8580
ucggcgaggu guucaaugcc accagauucg ccucugugua cgccuggaac cggaagcga	8640
ucagcaauug cgugccgac uacuccgugc uguacaacuc cgccagcuuc agcaccuua	8700
agugcuacgg cgugucccu accaagcuga acgaccugug cuucacaaac guguacgccg	8760
acagcuucgu gaucgggga gaugaagugc ggagauugc ccuggacag acaggcaaga	8820
ucgccgacua caacuacaag cugcccgacg acuucaccg cugugugauu gccuggaaca	8880
gcaacaaccu ggacuccaaa gucggcgga acuacaaua ccuguaccgg cuguuccgga	8940
agucaauuc gaagcccuuc gagcgggaca uuccaccga gaucuaucag gccggcagca	9000
cccuuguaa cggcguggaa ggcuucaacu gcuacuucc acugcagucc uacggcuuuc	9060
agcccacaaa ugccgugggc uaucagccu acagaguggu ggugcugagc uucgaacugc	9120
ugcaugcccc ugccacagug ugccggccua agaaaagcac caaucugug aagaacaaau	9180
gcgugaacuu caacucaac ggccugaccg gcaccggcg gcugacagag agcaacaaga	9240
aguuccugcc auuccagcag uuugccggg auaucgccga uaccacagac gccguuagag	9300

auccccagac acuggaaauc cuggacauca ccccuugcag cuucggcgga gugucuguga	9360
ucacccucgg caccaacacc agcaaucagg uggcagugcu guaccaggac gugaacugua	9420
ccgaagugcc cguggccaau cagcccgau agcugacacc uacaugcgcg guguaucucca	9480
ccggcagcaa uguguuucag accagagccg gcugucugau cggagccgag cacgugaaca	9540
auagcuacga gugcgacauc cccaucggcg cuggaaucug cgccagcuac cagacacaga	9600
caaacagccc ucggagagcc agaagcgugg ccagccagag caucauugcc uacacaaugu	9660
cucugggcg cgagaacagc guggccuacu ccaacaacuc uaucgcuauc cccaccaacu	9720
ucaccaucag cgugaccaca gagaucugc cuguguccau gaccaagacc agcguggacu	9780
gcaccaugua caucugcgcg gauuccaccg agugcuccaa ccugcugcug caguacggca	9840
gcuucugcac ccagcugaau agagcccuga cagggaucgc cguggaacag gacaagaaca	9900
cccaagaggu guucgcccc a gugaagcaga ucuacaagac ccuccuauc aaggacuucg	9960
gcggcuucaa uuucagccag auucugcccg auccuagcaa gcccagcaag cggagcuuca	10020
ucgaggaccu gcuguuac aaagugacac uggccgacgc cgguucauc aagcaguaug	10080
gcgauugucu gggcgacaau gccgccaggg aucugauuug cgcccagaag uuaacggac	10140
ugacagugcu gccuccucug cugaccgaug agaugaucgc ccaguacaca ucugcccugc	10200
uggccggcac aaucacaagc ggcuggacau uuggagcagg cgccgcucug cagaucuccu	10260
uugcuauca gauggccuac cgguucaacg gcaucggagu gaccagaau gugcuguacg	10320
agaaccagaa gcugaucgcc aaccaguua acagcgccau cggcaagauc caggacagcc	10380
ugagcagcac agcaagcgcc cugggaaagc ugcaggacgu gguaaccag aaugcccagg	10440
cacugaacac ccuggucaag cagcuguccu ccaacuucgg cgccaucagc ucugugcuga	10500
acgauauccu gagcagacug gaccuccug aggccgaggu gcagaucgac agacugauca	10560
caggcagacu gcagagccuc cagacauacg ugacccagca gcugaucaga gccgccgaga	10620
uuagagccuc ugccaauucg gccgccacca agaugucuga gugugugcug ggccagagca	10680
agagagugga cuuuugcgcg aaggguacc accugaugag cuuccucag ucugcccuc	10740
acggcguggu guuucugcac gugacauaug ugcccgcua agagaagaau uucaccaccg	10800
cuccagccau cugccacgac ggcaaagccc acuuuccuag agaaggcgug uucgugucca	10860
acggcaccca uggguucgug acacagcgga acuuucacga gcccagauc aucaccaccg	10920
acaacaccuu cgugucggc aacugcgacg ucgugaucgg cauugugaac aaucaggugu	10980
acgaccucuc gcagcccag cuggacagcu ucaaagagga acuggacaag uacuuuaaga	11040
accacacaag ccccgacgug gaccuggcg auaucagcg aaucaugcc agcgucguga	11100
acaucagaa agagaucgac cggcugaacg agguggccaa gaucugaac gagagccuga	11160

ucgaccugca agaacugggg aaguacgagc aguacaucaa guggcccugg uacaucuggc 11220

ugggcuuuau cgccggacug auugccaucg ugauggucac aaucaugcug uguugcauga 11280

ccagcugcug uagcugccug aagggcuguu guagcugugg cagcugcugc aaguucgacg 11340

aggacgauuc ugagcccug cugaagggcg ugaacugca cuacacauga ugacucgagc 11400

ugguacugca ugcacgcaau gcuagcugcc ccuuucccg ccuggguacc ccgagucucc 11460

cccgaccugc ggucccaggu augcucccac cuccaccugc cccacucacc accucugcua 11520

guuccagaca ccuccaagc acgcagcaau gcagcucaaa acgcuuagcc uagccacacc 11580

cccacgggaa acagcaguga uuaaccuuua gcaauaaacg aaaguuuac uaagcuauac 11640

uaaccccagg guuggucaau uucgugccag ccacaccgcg gccgcaugaa uacagcagca 11700

auuggcaagc ugcuuacaua gaacucgcgg cgauuggcau gccgccuuaa aauuuuuuu 11760

uuauuuuuuc uuucuuuuuc cgaaucggau uuuguuuua auuuuucaaa aaaaaaaaa 11820

aaaaaaaaa aaaaaagca uaugacuaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa 11880

aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaa 11917

<210> 26

<211> 8896

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RBS004.3

<400> 26

gaugggcggc gcaugagaga agcccagacc aauuaccuac ccaaaugga gaaaguucac 60

guugacaucg aggaagacag ccuauccuc agagcuuugc agcggagcuu cccgcaguuu 120

gagguagaag ccaagcaggu cacugauaau gaccaugcua augccagagc guuuucgcau 180

cuggcuucaa aacugaucga aacggaggug gacccaucg acacgauccu ugacauugga 240

agugcggccg cccgcagaau guauucuaag cacaaguauc auuguauugc uccgaugaga 300

ugugcggaag auccggacag auuguauaag uaugcaacua agcugaagaa aaacuguaag 360

gaaauaacug auaaggaaau ggacaagaaa augaaggagc ucgccgccgu caugagcgac 420

ccugaccugg aaacugagac uaugugccuc cagcagcagc agucgugucg cuacgaaggg 480

caagucgcug uuuaccagga uguauacgcg guugacggac cgacaagucu cuaucaccaa 540

gccauaagg gaguuagagu cgccuacugg auaggcuuug acaccacccc uuuuauuuu 600

aagaacuugg cuggagcaua uccaucauac ucuaccaacu gggccgacga aaccguguua 660

acggcucgua acauaggccu augcagcucu gacguuauug agcggucacg uagagggaug 720

uccauucuaa gaaagaagua uuugaacca uccaacaaug uucuaucuc uguuggcucg	780
accaucuaac acgaaaagag ggacuuacug aggagcuggc accugccguc uguauuucac	840
uuacguggca agcaaaaaua cacaugucgg ugugagacua uaguuaugu cgacggguac	900
gucguuaaaa gaauagcuau caguccaggc cuguauugga agccuucagg cuaugcugcu	960
acgaugcacc gcgagggauu cuugugcugc aaagugacag acacauugaa cggggagagg	1020
gucucuuuuc ccgugugcac guaugugcca gcuacauugu gugaccaaau gacuggcuaa	1080
cuggcaacag augucagugc ggacgacgcg caaaaacugc ugguugggcu caaccagcgu	1140
auagucguca acgguggcac ccagagaaac accaaaucca ugaaaaaaua ccuuuugccc	1200
guaguggccc aggcuuuugc uaggugggca aaggaauaua aggaagauca agaagaugaa	1260
aggccacuag gacuacgaga uagacaguua gucauggggu guuguugggc uuuuagaagg	1320
cacaagauaa caucuauuuu uaagcgcccg gauacccaaa ccaucauca agugaacagc	1380
gauuuccacu cauucgugcu gcccaggaua ggcaguaaca cauuggagau cgggcugaga	1440
acaagaaucg ggaauuguu agaggagcac aaggagccgu caccucucua uaccgccgag	1500
gacguacaag aagcuagugc cgcagccgau gaggcuagag aggugcguga agccgaggag	1560
uugcgcgag cuuaccacc uuuggcagcu gauguagagg agcccacucu ggaagccgau	1620
gucgacuuga uguuacaaga ggcuggggcc ggcucagugg agacaccucg ugguugaua	1680
aagguuacca gcuacgucg caggagacaag aucggcucu acgcugugcu uucuccgag	1740
gcuguacuca agagugaaaa auuauucugc auccaccuc ucgcugaaca agucauagug	1800
auaacacacu cuggccgaaa agggcguuau gccguggaac cauaccaug uaaaguagug	1860
gugccagagg gacaugcau acccguccag gacuuucaag cucugaguga aagugccacc	1920
auuguguaca acgaacguga guucguaac agguaccugc accauauugc cacacaugga	1980
ggagcgcuca acacugauga agaauuuuac aaaacugua agcccagcga gcacgacggc	2040
gaauaccugu acgacaucga caggaaacag ugcgucaaga aagagcuagu cacugggcua	2100
gggcucacag gcgagcuggu cgauccuccc uucaugaau ucgccuacga gagucugaga	2160
acacgaccag ccgucuccua ccaaguacca accauagggg uguauggcgu gccaggauca	2220
ggcaagucug gcaucauuua aagcgaguc accaaaaag aucuaguggu gagcgccaag	2280
aaagaaaacu gucgagaaau uuaaaggac gucaagaaaa ugaaagggcu ggacgucaau	2340
gccagaacug uggaucucagu gcucuugaau ggaugcaaac accccguaga gaccugua	2400
auugacgagg cuuuugcuug ucaugcaggu acucucagag cgcucuaagc cauuuaaaga	2460
ccuaaaaagg cagugcucug cggagauccc aaacagugcg guuuuuuuua caugauguc	2520
cugaaagucg auuuuaacca cgagauuugc acacaaguc uccacaaaag caucucgcg	2580

cguugcacua aaucugugac uucggucguc ucaaccuugu uuuacgacaa aaaaugaga	2640
acgacgauc cgaaagagac uaagauugug auugacacua ccggcaguac caaacuaag	2700
caggacgauc ucauucucac uuguuucaga ggguggguga agcaguugca aaugauuac	2760
aaaggcaacg aaauaugac ggcagcugcc ucucaagggc ugacccguua agguguguau	2820
gccguucggu acaaggugaa ugaaaauccu cuguacgcac ccaccucaga acaugugaac	2880
guccuacuga cccgcacgga ggaccgcauc guguggaaaa cacuagccgg cgaccaugg	2940
auaaaaacac ugacugccaa guaccugggg aauuucacug ccacgauaga ggaguggcaa	3000
gcagagcaug augccaucac gaggcacauc uuggagagac cggaccuac cgacgucuuc	3060
cagaauaagg caaacgugug uugggccaag gcuuagugc cggugcugaa gaccgcuggc	3120
auagacauga ccacugaaca auggaacacu guggauuuu uugaaacgga caaagcucac	3180
ucagcagaga uaguauugaa ccaacuauuc gugagguucu uuggacucga ucuggacucc	3240
ggucuauuuu cugcaccac uguuccguua uccaauagga auaaucacug ggauaacucc	3300
ccgucgccua acauguacgg gcugaauaaa gaaguggucc gucagcucuc ucgcagguac	3360
ccacaacugc cucgggcagu ugccacuggu agagucuaug acaugaacac ugguacacug	3420
cgcauuuug auccgcgcau aaaccuagua ccuguaaaca gaagacugcc ucaugcuua	3480
guccuccacc auaaugaaca cccacagagu gacuuuucuu cauucgucag caauugaag	3540
ggcagaacug uccugguggu cggggaaaag uuguccguc caggcaaaa gguugacugg	3600
uugucagacc ggccugaggc uaccuucaga gcucggcugg auuuaggcau cccaggugau	3660
gugcccaau augacauau auuuguuau gugaggacc cauauaaa ccaucacuau	3720
cagcagugug aagaccauc cauuagcua agcauguuga ccaagaaagc augucugau	3780
cugaauccc gcggaaccug ugucagcau gguuauuggu acgcugacag ggccagcgaa	3840
agcaucauug gucuauagc gcggcaguuc aaguuuucc gaguaugca accgaaaucc	3900
ucacuugagg agacggaagu ucuguuugua uucauugggu acgaucgaa ggcccguacg	3960
cacaauccu acaagcuau aucaaccuug accaacaauu auacagguuc cagacuccac	4020
gaagccggau ggcacccuc auaucaugug ggcgagggg auauugccac ggccaccgaa	4080
ggagugauua uaaugcugc uacagcaaa ggacaaccug gcggagggggu ggcggagcg	4140
cuguauaaga aaaucccga aaguucgau uuacagccga ucgaaguagg aaaagcgca	4200
cuggucaaag ggcagcuua acauaucau caugccguag gacaaacuu caacaaguu	4260
ucggagguug aaggugacaa acaguuggca gagguuauug aguccaucg uaagauugc	4320
aacgauaaca auuacaagc aguagcgau ccacugugu ccaccggcau cuuuccggg	4380

aacaaagauc gacuaaccca aucauugaac cauuugcuga cagcuuuaga caccacugau 4440

gcagauaguag ccuauuacug cagggacaag aaaugggaaa ugacucucua ggaagcagug 4500

gcuaggagag aagcagugga ggagauaugc auauccgacg auucucagu gacagaaccu 4560

gaugcagagc uggugagggg gcauccaag aguucuuugg cuggaaggaa ggguacagc 4620

acaagcgaug gcaaaacuuu cucauuuug gaagggacca aguuuacca ggcggccaag 4680

gauauagcag aaauuaugc caugugggcc guugcaacgg aggccaauga gcagguaugc 4740

auguauaucc ucggagaaaag caugagcagu auuaggucga aaugccccgu cgaggagucg 4800

gaagccucca caccaccuag cagcgugccu ugcuuugca uccaugccau gacuccagaa 4860

agaguacagc gccuaaaagc cucacgucca gaacaaaua cugugugcuc auccuuucca 4920

uugccgaagu auagaauac uggugugcag aagauccaau gcucccagcc uauauuguuc 4980

ucaccgaaag ugccugcgua uauucaucca aggaaguauc ucguggaaac accaccggu 5040

gacgagacuc cggagccauc ggcagagaac caauccacag aggggacacc ugaacaacca 5100

ccacuuauaa ccgaggauga gaccaggacu agaacgccug agccgaucan caucgaagaa 5160

gaagaagaag auagcauag uuugcuguca gauggcccga cccaccaggu gcugcaaguc 5220

gaggcagaca uucacgggcc gccucugua ucuagcucan ccugguccau uccucaugca 5280

uccgacuuug auguggacag uuuauccaau cuugacaccc uggagggagc uagcgugacc 5340

agcggggcaa cgucagccga gacuaacuc uacuucgcaa agaguaugga guuucuggcg 5400

cgaccggugc cugcgccucg aacaguauuc aggaaccuc cacaucggc uccgcgcaca 5460

agaacaccgu cacuugcacc cagcagggcc ugcuccagaa ccagccuagu uccaccccg 5520

ccaggcguga auaggugau cacuagagag gaggucgaag cgcuuaccc gucacgcacu 5580

ccuagcaggu cgucuccag aaccagccug gucucaacc cgccagcgcu aaauagggug 5640

auuacaagag aggaguuga ggcguucgua gcacaacaac aaugacgguu ugaugcggu 5700

gcuaacacu uuuccuccga caccggucaa gggcauuuac aacaaaauc aguaaggcaa 5760

acggugcuau ccgaaguggu guuggagagg accgaauugg agauuucgua ugccccgcg 5820

cucgaccaag aaaaagaaga auuacuacg aagaaauuac aguuaaucc cacaccugcu 5880

aacagaagca gauaccaguc caggaggug gagaacaua aagccauaac agcuagacgu 5940

auucugcaag gccuaggga uuauuugaag gcagaaggaa aaguggagug cuaccgaacc 6000

cugcauccug uuccuuugua uucaucagu gugaaccgug ccuuuuaag cccaagguc 6060

gcaguggaag ccguaacgc cauguugaaa gagaacuuuc cgacugggc uucuuacugu 6120

auuuuuccag aguacgaugc cuuuuuggac augguugacg gagcuucaug cugcuuagac	6180
acugccaguu uuugcccugc aaagcugcgc agcuuuccaa agaaacacuc cuuuuuggaa	6240
cccacaauac gaucggcagu gccuucagcg auccagaaca cgcuccagaa cguccuggca	6300
gcugccacaa aaagaaaauug caaugucacg caaaugagag aaaugcccg auuggauucg	6360
gcggccuuua auguggaaug cuucaagaaa uaugcgugua auaaugaaua uugggaaacg	6420
uuuaagaaa accccaucag gcuuacugaa gaaaacgugg uaaauuacau uaccaaaaua	6480
aaaggaccaa aagcugcugc uuuuuugcg aagacacaua auuugaauau guugcaggac	6540
auaccaaugg acagguuuug aauggacuua aagagagacg ugaaagugac uccaggaaca	6600
aaacauacug aagaacggcc caagguacag gugauccagg cugccgauc gcuaagcaaca	6660
gcguauucgu gcggaaucca ccgagagcug guuaggagau uaaauccggu ccugcuuccg	6720
aacauucau cacuguuuga uaugucggcu gaagacuug acgcuauuau agccgagcac	6780
uuccagccug gggauugugu ucuggaaacu gacaucgcu cguuugaua aagugaggac	6840
gacgccaugg cucugaccgc guuaaugauu cuggaagacu uaggugugga cgcagagcug	6900
uugacgcuga uugaggcggc uuucggcgaa auuucacaa uacauuugcc cacuaaaacu	6960
aaaauuuuu ucggagccau gaugaaaacu ggaauuucc ucacacuguu ugugaacaca	7020
gucauuuaca uuuaaucgc aagcagagug uuagagagaac ggcuuaccgg aucaccaugu	7080
gcagcauua uuggagauga caauaucgug aaaggaguca aaucggacaa auuaauggca	7140
gacaggugcg ccaccugguu gaauauggaa gucaagaua uagaugcugu ggugggag	7200
aaagcgccuu auuucugugg aggguuuuu uuugugacu ccgugaccgg cacagcgugc	7260
cgugggcag accccuuaa aaggcuguu aagcuaggca aaccucggc agcagacgau	7320
gaacaugaug augacaggag aagggcuuug caugaggagu caacacgcug gaaccgagug	7380
gguaucuuu cagagcugug caagcagua gaaucaaggu augaaaccgu aggaacuucc	7440
aucuauguu uggccaugac uacucuagcu agcaguguua aaucauucag cuaccugaga	7500
ggggcccuu uaacucucua cggcuuaccu gaauaggacua cgacauaguc uaguccgca	7560
agacuaguau guuuguguu cuugugcugc ugccucuugu gucuucucag ugugugguga	7620
gauuucaaa uauuacaaau cuguguccau uuggagaagu guuuuauca acaagauuug	7680
caucugugua ugcauggaau agaaaaagaa uuucuaauug uguggcugau uauucugugc	7740
uguauauag ugcuuuuu uccacuuua aauguuagg agugucucca acaaaauua	7800
augauuuuug uuuuacaaau guguaugcug auucuuuuu gaucagaggu gaugaaguga	7860
gacagauugc ccccgacag acaggaaaaa uugcugauua cauuuacaa cugccugaug	7920
auuuuacagg augugugauu gcuuggaau cuauuuuuu agauucuaa gugggaggaa	7980

auuacaaaua ucuguacaga cuguuuagaa aaucaaaucu gaaaccuuuu gaaagagaua	8040
uuucaacaga aauuuuacag gcuggaucac caccuuguaa uggaguggaa ggauuuuuuu	8100
guuuuuuucc auuacagagc uauggaauuc agccaaccaa ugguguggga uaucagccau	8160
auagaguggu ggugcugucu uuugaacugc ugcaugcacc ugcaacagug uguggaccua	8220
aaggcucccc cggcuccggc uccggaucug guuuuuuucc ugaagcucca agagaugggc	8280
aagcuuacgu ucguaaaagau ggcgaauggg uauuacuuuc uaccuuuuua ggccgguccc	8340
uggagggugcu guuccagggc cccggcugau gacucgagcu gguacugcau gcacgcaaug	8400
cuagcugccc cuuuuccguc cuggguaccc cgagucucucc cggaccucgg gucccaggua	8460
ugcucccacc uccaccugcc ccacucacca ccucugcuag uuccagacac cuccaagca	8520
cgcagcaaug cagcuaaaa cgcuuagccu agccacaccc ccacgggaaa cagcagugau	8580
uaaccuuuag caauaaacga aaguuuuacu aagcuauacu aaccccaggg uuggucauuu	8640
ucgugccagc cacaccgagg ccgcaugaau acagcagcaa uggcaagcu gcuuacauag	8700
aacucgaggc gauuggcaug ccgcuuuuuu auuuuuuuuu uauuuuuuuu uuucuuuucc	8760
gaauccggaau uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaagcau	8820
augacuaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	8880
aaaaaaaaaa aaaaaa	8896
<210> 27	
<211> 9079	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> RBS004.4	
<400> 27	
gaugggaggc gcaugagaga agcccagacc aauuaccuac ccaaaugga gaaaguucac	60
guugacaucg aggaagacag ccuauuccuc agagcuuugc agcggagcuu cccgcaguuu	120
gagguagaag ccaagcaggu cacugauauu gaccaugcua augccagagc guuuucgcau	180
cuggcuucaa aacugaucga aacggaggug gacccaucg acacgauccu ugacauugga	240
agucgcccc cccgcagaau guauucuaag cacaaguauc auuguauucg uccgaugaga	300
ugucgggaag auccggacag auuguauaag uaugcaacua agcugaagaa aaacuguaag	360
gaaauaacug auaaggaauu ggacaagaaa augaaggagc ucgcccggcu caugagcgac	420
ccugaccugg aaacugagac uaugugccuc cagcagcagc agucgugucg cuacgaaggg	480
caagucgcug uuuaaccagga uguauacgcg guugacggac cgacaagucu cuaucacaa	540

gccaauaagg gaguuagagu cgccuacugg auaggcuuug acaccacccc uuuuauuuuu	600
aagaacuugg cuggagcaua uccaucauac ucuaccaacu gggccgacga aaccguguua	660
acggcucgua acauaggccu augcagcucu gacguuauagg agcggucacg uagagggaug	720
uccauucuaa gaaagaagua uuugaaacca uccaacaauug uucuauucuc uguuggcucg	780
accaucuaac acgaaaagag ggacuuacug aggagcuggc accugccguc uguauuucac	840
uuacguggca agcaaaaaua cacaugucgg ugugagacua uaguuuaguug cgacggguac	900
gucguuaaaa gaauagcuau caguccaggc cuguauugga agccuucagg cuaugcugcu	960
acgaugcacc gcgagggauu cuugucugc aaagugacag acacauugaa cggggagagg	1020
gucucuuuuc ccgugugcac guaugugcca gcuacauugu gugacaaaau gacuggcaua	1080
cuggcaacag augucagugc ggacgacgcg caaaaacugc ugguugggcu caaccagcgu	1140
auagucguca acggugcgc cagagaaaac accaaauacca ugaaaaaaua ccuuuugccc	1200
guaguggccc aggcauuugc uaggugggca aaggaaauua aggaagauca agaagaugaa	1260
aggccacuag gacuacgaga uagacaguua gucaugggggu guuguugggc uuuuagaagg	1320
cacaagauaa caucuauuuu uaagcgcccg gauacccaaa ccaucaucaa agugaacagc	1380
gauuuccacu cauucgugcu gccaggaua ggcaguaaca cauuggagau cgggcugaga	1440
acaagaaucg gaaaauguu agaggagcac aaggagccgu caccucucau uaccgccgag	1500
gacguacaag aagcuaagug cgagcccgau gaggcuuagg aggugcguga agccgaggag	1560
uugcgcgag cucuaccacc uuuggcagcu gauguuagg agcccacucu ggaagccgau	1620
gucgacuuga uguuacaaga ggcuggggcc ggcucagugg agacaccucg ugguugaua	1680
aagguuacca gcuacgcugg cgaggacaag aucggcucu acgcugugcu uucuccgag	1740
gcuguacuca agagugaaaa auuaucuugc auccaccuc ucgcugaaca agucauagug	1800
auaacacacu cuggccgaaa agggcguuau gccguggaac cauaccaug uaaaguagug	1860
gugccagagg gacaugcau acccguccag gacuuucaag cucugaguga aagugccacc	1920
auuguguaca acgaacguga guucguaaac agguaccugc accauauugc cacacaugga	1980
ggagcgcuca acacugauga agaauuuuac aaaacuguca agcccagcga gcacgacggc	2040
gaauaccugu acgacaucga caggaaacag ugcgucaaga aagagcuagu cacugggcua	2100
gggcucacag gcgagcuggu cgauccuccc uucaugaau ucgccuacga gagucugaga	2160
acacgaccag ccgucuccua ccaaguacca accauagggg uguauggcgu gccaggauca	2220
ggcaagucug gcaucauuua aagcgaguc accaaaaaag aucuaguggu gagcgccaag	2280
aaagaaaacu gugcagaaa uauaaggac gucaagaaaa ugaaagggcu ggacgucaau	2340
gccagaacug uggacucagu gcucuugaau ggaugcaaac accccguaga gaccugauu	2400

auugacgagg cuuuugcuug ucaugcaggu acucucagag cgcucauagc cauuaaaga	2460
ccuaaaaagg cagugcucug cggagauccc aaacagugcg guuuuuuuua caugaugugc	2520
cugaaagugc auuuuaacca cgagauuugc acacaagucu uccacaaaag caucucucgc	2580
cguggcacua aaucugugac uucggucguc ucaaccuugu uuuaacgaca aaaaugaga	2640
acgacgaau cgaagagac uaagauugug auugacacua ccggcaguac caaaccuaag	2700
caggacgauc ucauucucac uuguuucaga ggguggguga agcaguugca aaugauuac	2760
aaaggcaacg aaauaagac ggcagcugcc ucucaagggc ugacccguua agguguguau	2820
gccguucggu acaaggugaa ugaaaauccu cuguacgcac ccaccucaga acaugugaac	2880
guccuacuga cccgcacgga ggaccgcauc guguggaaaa cacuagccgg cgaccaugc	2940
auaaaaacac ugacugccaa guaccugggg aauuucacug ccacgauaga ggaguggcaa	3000
gcagagcaug augccaaucau gaggcacau cuggagagac cggaccuac cgacgucuuc	3060
cagaauaagg caaacgugug uugggccaag gcuuugugc cggugcugaa gaccgcuggc	3120
auagacauga ccacugaaca auggaacacu guggauuuuu uugaaacgga caaagcucac	3180
ucagcagaga uaguauugaa ccaacuugc gugagguucu uggacucga ucggacucc	3240
ggucuauuuu cugcaccac uguuccguua uccaauagga auaaucacug ggauaacucc	3300
ccgucgccua acauguacgg gcugaauaaa gaaguggucc gucagcucuc ucgcagguac	3360
ccacaacugc cucgggcagu ugccacuggu agagucuaug acaugaacac uggucacug	3420
cgcauuuug auccgcgcua aaaccuagua ccuguaaaca gaagacugcc ucaugcuua	3480
guccuccacc auaaugaaca cccacagagu gacuuuucu cauucgucag caauugaag	3540
ggcagaacug uccugguggu cggggaaaag uuugccguc caggcaaaau gguugacugg	3600
uugucagacc ggccugaggc uaccuucaga gcucggcugg auuuaggcau cccaggugau	3660
gugcccaau augacauau auuuguuau gugaggacc cauuaaaau ccaucacuau	3720
cagcagugug aagaccaug cauuaagcua agcauguuga ccaagaaagc augucgcau	3780
cugaaucgg gcggaaccug ugucagcaua gguuauuggu acgcugacag ggccagcgaa	3840
agcauauug gugcuauagc gcggcaguuc aaguuuucc gaguugcaa accgaaaucc	3900
ucacuugagg agacggaagu ucuguuuua uucauugggu acgaucgcaa ggcgcguacg	3960
cacaauccu acaagcuauc aucaaccuug accaacaauu auacagguuc cagacuccac	4020
gaagccggau ggcacccuc auaucaugug ggcgagggg auauugccac ggccaccgaa	4080
ggagugauua uaaugcugc uaacagcaaa ggacaaccug gcggaggggu ggcggagcg	4140
cuguauaaga aaaucccgga aaguucgau uuacagccga ucgaaguagg aaaagcgca	4200

cuggucaaag gugcagcuaa acauaucauu caugccguag gaccaaacuu caacaaaguu	4260
ucggagguug aaggugacaa acaguuggca gaggcuuuug aguccaucgc uaagauuguc	4320
aacgauaaca auuacaaguc aguagcgauu ccacuguuugu ccaccggcgu cuuuuccggg	4380
aacaaagauc gacuaaccca aucauugaac cauugcuga cagcuuuga caccacugau	4440
gcagauguag ccuuuacug cagggaacaag aaauuggaaa ugacucuaa ggaagcagug	4500
gcuaggagag aagcagugga ggagauaugc auauccgacg auucucagu gacagaaccu	4560
gaugcagagc uggugagggg gcauccaag aguucuuugg cuggaaggaa ggguacagc	4620
acaagcgaug gcaaaacuuu cucauuuug gaagggaaca aguuuaccca ggcggccaag	4680
gauauagcag aaauuaaugc caugggccc guugcaacgg aggccaauga gcagguaugc	4740
auguauuucc ucggagaaag caugagcagu auuaggucga aaugccccgu cgaggagucg	4800
gaagccucca caccaccuag cagcugccu ugcuugugca uccaugccau gacuccagaa	4860
agaguacagc gccuaaaagc cucacgucca gaacaaaua cugugugcuc auccuuucca	4920
uugccgaagu auagaauac uggugugcag aagauccaau gcucccagcc uauauuguuc	4980
ucaccgaaag ugccugcgua uauucaucca aggaagauac ucguggaaac accaccggu	5040
gacgagacuc cggagccauc ggcagagaac caauccacag aggggacacc ugaacaacca	5100
ccacuuaaua ccgaggaua gaccaggacu agaacgccug agccgaucan caucgaagaa	5160
gaagaagaag auagcauag uuugcugua gaugggccga cccaccaggu gcugcaaguc	5220
gaggcagaca uucacgggcc gccucugua ucuagcuau ccugguccau uccuauugca	5280
uccgacuuug auguggacag uuuauccaua cuugacacc uggagggagc uagcgugacc	5340
agcggggcaa cgucagccga gacuaacuc uacuucgaa agaguaugga guuucuggcg	5400
cgaccggugc cugcgccug aacaguauuc aggaaccuc cacaucggc uccgcgcaca	5460
agaacaccgu cacuugcacc cagcagggcc ugcuccagaa ccagccuagu uuccaccccg	5520
ccaggcguga auaggguuau cacuagagag gaggcugaag cgcuuacccc gucacgcacu	5580
ccuagcaggu cggucuccag aaccagccug gucucaacc cgccagcggu aaauagggu	5640
auuacaagag aggaguuga ggcguucgua gcacaacaac aaugacgggu ugaugcggu	5700
gcuaacacu uuuccuccga caccgguaa gggaauuac aacaaaauc aguaaggcaa	5760
acggugcuau ccgaaguggu guuggagagg accgaauugg agauuucgua ugccccgcgc	5820
cucgaccaag aaaaagaaga auuacuacgc aagaaauuac aguuaaucc cacaccugcu	5880
aacagaagca gauaccaguc cagggaaggug gagaacauga aagccauaac agcuagacgu	5940

auucugcaag gccuagggca uuauuugaag gcagaaggaa aaguggagug cuaccgaacc	6000
cugcauccug uuccuuugua uucaucuagu gugaaccgug cccuuucaag ccccaagguc	6060
gcaguggaag ccuguaacgc cauguugaaa gagaacuuuc cgacuguggc uucuuacugu	6120
auuuuuccag aguacgaugc cuauuuggac augguugacg gagcuucaug cugcuuagac	6180
acugccaguu uuugcccugc aaagcugcgc agcuuuccaa agaaacacuc cuauuuggaa	6240
cccacaauac gaucggcagu gccuucagcg auccagaaca cgcuccagaa cguccuggca	6300
gcugccacaa aaagaaaauug caaugucacg caaauagagag aaugcccgu auuggauucg	6360
gcggccuuua auguggaauug cuucaagaaa uaugcgugua auauagaaua uugggaaacg	6420
uuuaaagaaa accccaucag gcuuacugaa gaaaacgugg uaaauuacau uaccaaaua	6480
aaaggaccaa aagcugcugc ucuuuuugcg aagacacaua auuugaauau guugcaggac	6540
auaccaaugg acagguuuu aauggacuua aagagagacg ugaaagugac uccaggaaca	6600
aaacauacug aagaacggcc caagguacag gugauccagg cugccgaucc gcuagcaaca	6660
gcguauucugu gcggaaucga cagagagcug guuaggagau uaaaugcggu ccugcuuccg	6720
aacauucaua cacuguuuga uaugucggcu gaagacuug acgcuauuau agccgagcac	6780
uuccagccug gggauugugu ucuggaaacu gacaucgcu cguuugaua aagugaggac	6840
gacgccaugg cucugaccgc guuaaugauu cuggaagacu uaggugugga cgcagagcug	6900
uugacgcuga uugaggcggc uuucggcgaa auuucacua uacauuugcc cacuaaaacu	6960
aaaauuaau ucggagccau gaugaaacu ggaauguucc ucacacuguu ugugaacaca	7020
gucauuuaca uuguaaucgc aagcagagug uugagagaac ggcuuaccgg aucaccaugu	7080
gcagcauua uuggagauga caauaucgug aaaggaguca aaucggacaa auuaauggca	7140
gacaggugcg ccaccugguu gaauauggaa gucaagauua uagaugcugu ggugggcgag	7200
aaagcgcuu auuucugugg aggguuuuu uugugugacu ccgugaccgg cacagcgugc	7260
cguguggcag accccuuaa aaggcuguuu aagcuaggca aaccucuggc agcagacgau	7320
gaacaugaug augacaggag aagggcuuug caugaggagu caacacgcug gaaccgagug	7380
ggauuucuu cagagcugug caaggcagua gaaucaaggu augaaaccgu aggaacuucc	7440
aucauaguu ugccaugac uacucuagcu agcaguguua aaucuuucag cuaccugaga	7500
ggggcccuu uaacucucua cggcuuaccu gaauaggacua cgacauaguc uaguccgca	7560
agacuaguau guuuguguuu cuugucgugc ugccucuugu gucuucucag ugugugguga	7620
gauuuccaaa uuuuacaaau cuguguccau uuggagaagu guuuuauuca acaagauuug	7680
caucugugua ugcauggaau agaaaaagaa uuucuaauug uguggcugau uauucugugc	7740
uguauaaauag ugcuuuuuu uccacauua aauguuauug agugucucca acaaaauua	7800

augauuuuug uuuuacaaau guguaugcug auucuuuugu gaucagaggu gaugaaguga 7860
gacagauugc ccccgacag acaggaaaaa uugcugauua cauuuacaaa cugccugaug 7920
auuuuacagg augugugauu gcuuggaaau cuaauauuuu agauucuaaa gugggaggaa 7980
auuacaaaua ucuguacaga cuguuuagaa aaucaaaucu gaaaccuuuu gaaagagaua 8040

uuucaacaga aauuuauacag gcuggaucua caccuuguaa uggaguggaa ggauuuauuu 8100
guuuuuuucc auuacagagc uauggauuuc agccaaccaa ugguguggga uaucagccau 8160
auagaguggu ggugcugucu uuugaacugc ugcaugcacc ugcaacagug ugggaccua 8220
aaggcucucc cggcuccggc uccggaucug guuauuuucc ugaagcucca agagaugggc 8280
aagcuuacgu ucguaaagau ggcgauggg uauuacuuuc uaccuuuuua ggaagcggca 8340
gcggauauga acaguacauu aaauggccuu gguacauuug gcuuggauuu auugcaggau 8400
uaauugcaau ugugauggug acauuuauu uauguuguau gacaucaugu uguucuuguu 8460

uaaaaggauug uguuucuugu ggaagcuguu guaaaauuga ugaagaugau ucugaaccug 8520
uguuuuuagg agugaaauug cauuacacau gaugacucga gcugguacug caugcacgca 8580
augcuagcug ccccuuuucc guccugggua ccccgagucu ccccgaccu cggguccag 8640
guaugcucc accuccacu gccccacuca ccaccucugc uaguuccaga caccuccaa 8700
gcacgcagca augcagcuca aaacguuag ccuagccaca ccccgacggg aaacagcagu 8760
gauuaaccuu uagcaauaaa cgaaaguuua acuaagcuau acuaaccca ggguugguca 8820
auuucgugcc agccacaccg cggccgcaug aaucagcag caauuggcaa gcugcuuaca 8880

uagaacucgc ggcgauuggc augccgccuu aaaaauuua uuuuuuuuu ucuuuuuuu 8940
uccgaauagg auuuuguuuu uauuuuuca aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaaag 9000
cauauagcua aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa 9060
aaaaaaaaa aaaaaaaaa 9079

<210> 28

<211> 327

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Vaccine Antigen

<400> 28

Met Phe Val Phe Leu Val Leu Leu Pro Leu Val Ser Ser Gln Cys Val

1 5 10 15

Val Arg Phe Pro Asn Ile Thr Asn Leu Cys Pro Phe Gly Glu Val Phe

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

 Cys Phe Thr Asn Val Tyr Ala Asp Ser Phe Val Ile Arg Gly Asp Glu
 85 90 95
 Val Arg Gln Ile Ala Pro Gly Gln Thr Gly Lys Ile Ala Asp Tyr Asn
 100 105 110
 Tyr Lys Leu Pro Asp Asp Phe Thr Gly Cys Val Ile Ala Trp Asn Ser
 115 120 125
 Asn Asn Leu Asp Ser Lys Val Gly Gly Asn Tyr Asn Tyr Leu Tyr Arg
 130 135 140

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

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

Gly Phe Ile Ala Gly Leu Ile Ala Ile Val Met Val Thr Ile Met Leu
 275 280 285
 Cys Cys Met Thr Ser Cys Cys Ser Cys Leu Lys Gly Cys Cys Ser Cys
 290 295 300
 Gly Ser Cys Cys Lys Phe Asp Glu Asp Asp Ser Glu Pro Val Leu Lys
 305 310 315 320
 Gly Val Lys Leu His Tyr Thr
 325

<210> 29

<211> 311

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> BNT162b3c

<400> 29

Met Phe Val Phe Leu Val Leu Leu Pro Leu Val Ser Ser Gln Cys Val
 1 5 10 15
 Asn Leu Thr Val Arg Phe Pro Asn Ile Thr Asn Leu Cys Pro Phe Gly
 20 25 30
 Glu Val Phe Asn Ala Thr Arg Phe Ala Ser Val Tyr Ala Trp Asn Arg
 35 40 45
 Lys Arg Ile Ser Asn Cys Val Ala Asp Tyr Ser Val Leu Tyr Asn Ser
 50 55 60

Ala Ser Phe Ser Thr Phe Lys Cys Tyr Gly Val Ser Pro Thr Lys Leu
 65 70 75 80
 Asn Asp Leu Cys Phe Thr Asn Val Tyr Ala Asp Ser Phe Val Ile Arg
 85 90 95
 Gly Asp Glu Val Arg Gln Ile Ala Pro Gly Gln Thr Gly Lys Ile Ala
 100 105 110
 Asp Tyr Asn Tyr Lys Leu Pro Asp Asp Phe Thr Gly Cys Val Ile Ala
 115 120 125

Trp Asn Ser Asn Asn Leu Asp Ser Lys Val Gly Gly Asn Tyr Asn Tyr
 130 135 140

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

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

Leu Gly Ser Gly Ser Gly Ser Glu Gln Tyr Ile Lys Trp Pro Trp Tyr
 260 265 270
 Ile Trp Leu Gly Phe Ile Ala Gly Leu Ile Ala Ile Val Met Val Thr
 275 280 285
 Ile Met Leu Cys Cys Met Thr Ser Cys Cys Ser Cys Leu Lys Gly Cys
 290 295 300
 Cys Ser Cys Gly Ser Cys Cys
 305 310

<210> 30

<211> 1397

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> BNT162b3c

<400> 30

agaauaaacu aguauucuuc uggucacac agacucagag agaaccgcc accauguuug	60
uguuucuugu gcugcugccu cuugugucuu cucagugugu gaauuugaca gugagauuuc	120
caaaauuac aaucugugu ccauuuggag aaguguuuua ugcaacaaga uuugcaucug	180
uguaugcaug gaauagaaaa agaauuucua auuguguggc ugauuuuucu gugcuguaua	240

auagugcuuc uuuuuccaca uuuuuuuguu auggaguguc uccaacaaaa uuuuuuuguu	300
uauuuuuuac aaauuguuau gcugauucuu uugugaucag aggugaugaa gugagacaga	360
uugcccccg acagacagga aaaaauugcug auuacaauua caaacugccu gaugauuuua	420
caggaugugu gauugcuugg aaucuaaua auuuagauuc uaaaguggga ggaaauuaca	480
auuauucgua cagacuguuu agaaaaucaa aucugaaacc uuuugaaaga gauuuucaa	540
cagaaauuuu ucaggcugga ucaacaccuu guaauggagu ggaaggauuu aauguuuuu	600
uuccauuaca gagcuauuga uuucagccaa ccauggugu gggauaucag ccuuauagag	660
uggugugcu guuuuuugaa cugcugcug caccugcaac agugugugga ccuaaggcu	720
cccccgccuc cggcuccgga ucugguuua uuccugaagc uccaagagau gggcaagcuu	780
acguucguua agauggcgaa uggguuuuac uuucuccuu uuuaggaagc ggcagcggau	840
cugaacagua cauuuuuagg ccuugguaca uuuggcuugg auuuuuugca ggauuuuuug	900
caauugugau ggugacaauu auguuuuguu guaugacau auguuguucu uguuuuuuag	960
gauguuguuc uuguggaagc uguuguugau gacucgagcu gguacugcau gcacgcaug	1020
cuagcugccc cuuuuccguc cuggguaccc cgagucucucc cggaccucgg gucccaggua	1080
ugcucccacc uccaccugcc ccacucacca ccucugcuag uuccagacac cuccaagca	1140
cgcagcaug cagcuaaaa cgcuuagccu agccacaccc ccacgggaaa cagcagugau	1200
uaacuuuag cauuuuuagc aaguuuuacu aagcuauacu aacccaggg uuggucauu	1260
ucgugccagc cacaccugc agcuagcaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaagca	1320
uauagcuaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1380
aaaaaaaaaa aaaaaaa	1397
<210> 31	
<211> 314	
<212> PRT	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> BNT162b3d	
<400> 31	
Met Asp Trp Ile Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Gly Ala Ala Thr Gly	
1 5 10 15	
Ala His Ser Gln Met Gln Val Arg Phe Pro Asn Ile Thr Asn Leu Cys	
20 25 30	
Pro Phe Gly Glu Val Phe Asn Ala Thr Arg Phe Ala Ser Val Tyr Ala	

35 40 45
 Trp Asn Arg Lys Arg Ile Ser Asn Cys Val Ala Asp Tyr Ser Val Leu
 50 55 60
 Tyr Asn Ser Ala Ser Phe Ser Thr Phe Lys Cys Tyr Gly Val Ser Pro
 65 70 75 80
 Thr Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Thr Asn Val Tyr Ala Asp Ser Phe

 85 90 95
 Val Ile Arg Gly Asp Glu Val Arg Gln Ile Ala Pro Gly Gln Thr Gly
 100 105 110
 Lys Ile Ala Asp Tyr Asn Tyr Lys Leu Pro Asp Asp Phe Thr Gly Cys
 115 120 125
 Val Ile Ala Trp Asn Ser Asn Asn Leu Asp Ser Lys Val Gly Gly Asn
 130 135 140
 Tyr Asn Tyr Leu Tyr Arg Leu Phe Arg Lys Ser Asn Leu Lys Pro Phe

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

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

 275 280 285

Met Val Thr Ile Met Leu Cys Cys Met Thr Ser Cys Cys Ser Cys Leu

290

295

300

Lys Gly Cys Cys Ser Cys Gly Ser Cys Cys

305

310

<210> 32

<211> 1406

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> BNT162b3d

<400> 32

agaauaaacu aguauucuuu uggucacac agacucagag agaaccgcc accauggauu 60

ggauuuggag aaucuguuu cucgugggag ccgcuacagg agccacucc cagaugcagg 120

ugagauuuu aaauuuuaca aaucuguguc cauugggaga aguuuuuuu gcaacaagau 180

uugcaucugu guaugcaugg aaugaaaaa gaaauucuaa uuguguggcu gauuauucug 240

ugcuguauaa uagugcuucu uuuccacau uuaaauuuu uggagugucu ccaacaaaau 300

uaaauuuuu auguuuuaca aauguguaug cugauuuuuu ugugaucaga ggugaugaag 360

ugagacagau ugccccgga cagacaggaa aaauugcuga uuacaauuac aaacugccug 420

augauuuuac aggaugugug auugcuugga auucuaauaa uuugauuuu aaagugggag 480

gaaauuacaa uuauucguac agacuguuu gaaaaucaaa ucugaaaccu uuugaaagag 540

auuuuucaac agaaauuuu caggcuggau caacaccuug uaauggagug gaaggauuuu 600

auuguuuuu uccauuacag agcuauuggau uucagccaac caauggugug ggauaucagc 660

cauauagagu gguggugcug uuuuuugaac ugcugcaugc accugcaaca guguguggac 720

cuaaaggcuc ccccgccucc ggcuccggau cugguuuuu uccugaagcu ccaagagaug 780

ggcaagcuu cguucguaaa gaugcgcaau ggguuuuuu uucuaacuuu uuaggaagcg 840

gcagcggauc ugaacaguac auuuuauagg cuugguacau uugguuuga uuuauugcag 900

gauuuuuugc aaugugaug gugacauuu uuuuuuuug uauagacaua uguuuuuuu 960

guuuuuuagg auguuguuu uuggaagcu guuuuuuag acucgagcug guacugcaug 1020

cacgcaaugc uagcugcccc uuucccgucc ugguuacccc gagucucucc cgaccucggg 1080

ucccaggauu gcuccaccu ccaccugccc cacucaccac cucugcuagu uccagacacc 1140

uccaagcac gcagcaaugc agcucaaaa gcuuagccua gccacacccc cacgggaaac 1200

agcagugauu aaccuuuagc aaauaacgaa aguuuuuac agcuauuac accccagggu 1260

uggucauuuu cgugccagcc acaccugga gcuagcaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa 1320

aaaaaagcau augacuaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1380

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 1406

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 33

Gly Ser Pro Gly Ser Gly Ser Gly Ser

1 5

<210> 34

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 34

Gly Ser Gly Ser Gly Ser

1 5