



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0090727
(43) 공개일자 2024년06월21일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/127 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01) A61K 9/19 (2006.01)
A61K 9/51 (2006.01) A61P 31/14 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 9/1272 (2013.01)
A61K 39/12 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2024-7016917
- (22) 출원일자(국제) 2022년10월19일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2024년05월21일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2022/047107
- (87) 국제공개번호 WO 2023/069498
국제공개일자 2023년04월27일
- (30) 우선권주장
63/270,964 2021년10월22일 미국(US)
(뒷면에 계속)

- (71) 출원인
세일 바이오메디슨스, 인크.
미국, 메사추세츠 02140, 캠프릿지, 스위트 601,
퍼스트 스트리트 140
- (72) 발명자
모사헵, 무니르
미국 02140 메사추세츠주 캠프릿지 스위트 300 아
콘 파크 드라이브 20
파텔, 시다스
미국 02140 메사추세츠주 캠프릿지 스위트 300 아
콘 파크 드라이브 20
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인더웨이브

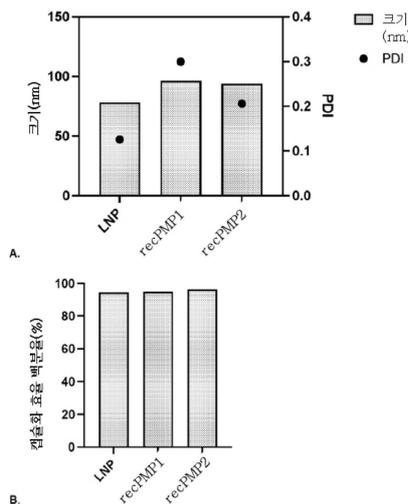
전체 청구항 수 : 총 70 항

(54) 발명의 명칭 MRNA 백신 조성물

(57) 요약

하나 이상의 항원성 폴리펩티드를 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 포함하고, 천연 지질 및 이온화 가능 지질을 포함하는 지질 재구성된 식물 전령 팩(LPMP) 내에 제형화된 핵산 백신 조성물이 본원에 개시된다. 또한 본 개시는 핵산 백신을 제조하는 방법을 포함하며, 상기 방법은 이온화 가능 지질의 존재 하에 정제된 PMP 지질을 포함하는 막을 재구성하여 이온화 가능 지질을 포함하는 LPMP를 생산하는 단계, 및 하나 이상의 항원성 폴리펩티드를 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 LPMP에 로딩하는 단계를 포함한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 9/19 (2013.01)
A61K 9/5176 (2013.01)
A61P 31/14 (2018.01)
A61K 2039/543 (2013.01)
A61K 2039/545 (2013.01)
A61K 2039/555 (2013.01)
A61K 2039/57 (2013.01)
A61K 2039/575 (2013.01)
C12N 2770/20034 (2013.01)

(72) 발명자

아라파, 예마드

미국 02140 메사추세츠주 캠프릿지 스위트 300 아
콘 파크 드라이브 20

보고라드, 로만

미국 02140 메사추세츠주 캠프릿지 스위트 300 아
콘 파크 드라이브 20

(30) 우선권주장

63/290,889 2021년12월17일 미국(US)
63/320,647 2022년03월16일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

핵산 백신으로서,

감염성 질환, 장애, 또는 병태를 유발하는 감염원으로부터 유래된 하나 이상의 항원성 폴리펩티드를 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 포함하고,

천연 지질 및 이온화 가능 지질을 포함하는 지질 재구성된 식물 전령 팩(LPMP) 내에 제형화되며, 여기서 이온화 가능 지질은 아래에 열거된 특성 중 2개 이상을 갖는, 핵산 백신:

- (i) 적어도 2개의 이온화 가능 아민;
- (ii) 적어도 3개의 지질 꼬리로서, 각각의 지질 꼬리는 길이가 적어도 6개의 탄소 원자인, 지질 꼬리;
- (iii) 약 4.5 내지 약 7.5의 pKa;
- (iv) 이온화 가능 아민 및 적어도 2개의 원자 사슬에 의해 분리된 이중유기기; 및
- (v) 적어도 10의 N:P 비율.

청구항 2

제1항에 있어서, 천연 지질은 레몬 또는 조류로부터 추출되는, 핵산 백신.

청구항 3

제1항에 있어서, LPMP는 스테롤 및 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)-지질 접합체를 추가로 포함하는, 핵산 백신.

청구항 4

제3항에 있어서, LPMP는 약 35:50:12.5:2.5의 몰비로 이온화 가능 지질:천연 지질:스테롤:PEG-지질을 포함하는, 핵산 백신.

청구항 5

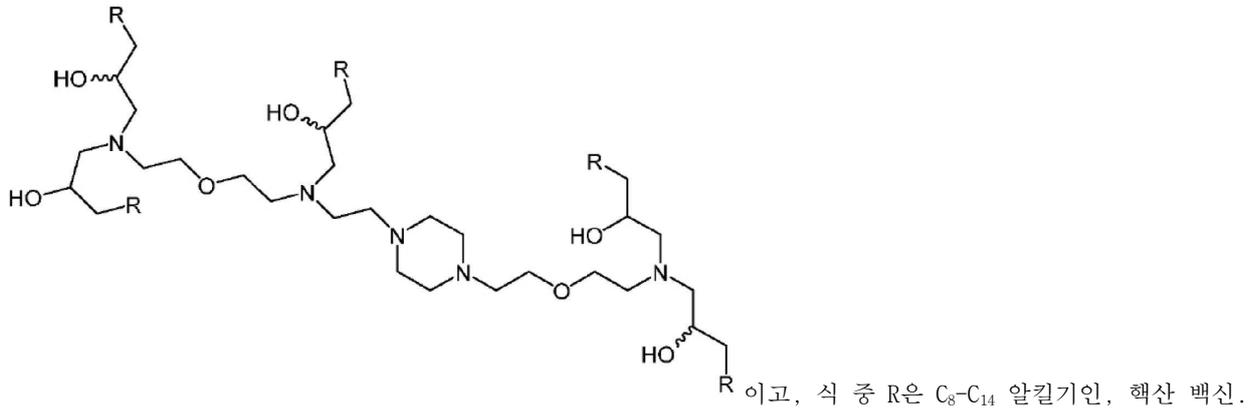
제3항에 있어서, LPMP는 약 35:20:42.5:2.5의 몰비로 이온화 가능 지질:천연 지질:스테롤:PEG-지질을 포함하는, 핵산 백신.

청구항 6

제1항에 있어서, 이온화 가능 지질은 1,1'-((2-(4-(2-((2-(비스(2-히드록시도데실)아미노)에틸)(2-히드록시도데실)아미노)에틸)피페라진-1-일)에틸)아자네디일)비스(도데칸-2-올)(C12-200), MD1(cKK-E12), OF2, EPC, ZA3-Ep10, TT3, LP01, 5A2-SC8, 지질 5, SM-102(지질 H), 및 ALC-315로 이루어진 군으로부터 선택되는, 핵산 백신.

청구항 7

제1항에 있어서, 이온화 가능 지질은



청구항 8

제1항에 있어서, 폴리뉴클레오티드는 mRNA인, 핵산 백신.

청구항 9

제1항에 있어서, 항원성 폴리펩티드는 코로나 바이러스 또는 이의 단편 또는 서브유닛인, 핵산 백신.

청구항 10

제9항에 있어서, 항원성 폴리펩티드는 메르스 바이러스(MERS-CoV), 사스 바이러스(SARS-CoV) 또는 이의 단편 또는 서브유닛의 스파이크 단백질(S)인, 핵산 백신.

청구항 11

제1항에 있어서, 항원성 폴리펩티드는 사스 바이러스 또는 이의 단편 또는 서브유닛인, 핵산 백신.

청구항 12

제11항에 있어서, 항원성 폴리펩티드는 SARS-CoV-2 스파이크 단백질 또는 SARS-CoV-2 스파이크 당단백질인, 핵산 백신.

청구항 13

제12항에 있어서, 항원성 폴리펩티드는 야생형 SARS-CoV-2 스파이크 당단백질인, 핵산 백신.

청구항 14

제8항에 있어서, mRNA는 다음으로부터 유래되는, 핵산 백신:

- (a) DNA 분자; 또는
- (b) T가 U로 치환된 RNA 분자.

청구항 15

제14항에 있어서, DNA 분자는 프로모터를 추가로 포함하는, 핵산 백신.

청구항 16

제15항에 있어서, 프로모터는 5' 미번역 영역(UTR)에 위치하는, 핵산 백신.

청구항 17

제14항에 있어서, 프로모터는 T7 프로모터, T3 프로모터, 또는 SP6 프로모터인, 핵산 백신.

청구항 18

제14항에 있어서, RNA 분자는 자가-복제 RNA 분자인, 핵산 백신.

청구항 19

제14항 또는 제18항에 있어서, RNA 분자는 5' 캡을 추가로 포함하는, 핵산 백신.

청구항 20

제19항에 있어서, 5' 캡은 캡 1 구조, 캡 1 (m6A) 구조, 캡 2 구조, 캡 3 구조, 캡 0 구조, 또는 이들의 임의의 조합을 갖는, 핵산 백신.

청구항 21

제8항에 있어서, mRNA는 이중 프롤린 안정화 돌연변이를 갖는 SARS-CoV-2 스파이크(S) 당단백질을 암호화하는 개방 해독 프레임(ORF)을 포함하는, 핵산 백신.

청구항 22

제21항에 있어서, 이중 프롤린 안정화 돌연변이는 야생형 SARS-CoV-2 S 당단백질의 K986 및 V987에 상응하는 위치에 존재하는, 핵산 백신.

청구항 23

제8항에 있어서, mRNA는 5' 미번역 영역(UTR) 및/또는 3' UTR을 포함하는, 핵산 백신.

청구항 24

제23항에 있어서, 5' UTR은 코작(Kozak) 서열을 포함하는, 핵산 백신.

청구항 25

제23항에 있어서, 3' UTR은 아미노-말단 분할 인핸서(AES)로부터 유래된 서열을 포함하는, 핵산 백신.

청구항 26

제23항에 있어서, 3' UTR은 미토콘드리아 암호화된 12S rRNA(mtRNRI)로부터 유래된 서열을 포함하는, 핵산 백신.

청구항 27

제8항에 있어서, mRNA는 폴리(A) 서열을 포함하는, 핵산 백신.

청구항 28

제27항에 있어서, 폴리(A) 서열은 30개의 아데노신 잔기의 서열, 10개-뉴클레오티드 링커 서열, 및 70개의 아데노신 잔기의 서열로 이루어진 110개-뉴클레오티드 서열인, 핵산 백신.

청구항 29

제1항에 있어서, LPMP는 리포플렉스, 리포솜, 지질 나노입자, 중합체 기반 담체, 엑소솜, 층상체, 미셀, 및 유화액으로 이루어진 군으로부터 선택된 친유성 모이어티인, 핵산 백신.

청구항 30

제1항에 있어서, LPMP는 양이온성 리포솜, 나노리포솜, 프로테오리포솜, 단층 리포솜, 다층 리포솜, 세라마이드 함유 나노리포솜, 및 다포성 리포솜으로 이루어진 군으로부터 선택된 리포솜인, 핵산 백신.

청구항 31

제1항에 있어서, LPMP는 지질 나노입자인, 핵산 백신.

청구항 32

제1항에 있어서, LPMP의 크기는 약 200nm 미만인, 핵산 백신.

청구항 33

제32항에 있어서, LPMP의 크기는 약 150nm 미만인, 핵산 백신.

청구항 34

제32항에 있어서, LPMP의 크기는 약 100nm 미만인, 핵산 백신.

청구항 35

제31항에 있어서, 지질 나노입자의 크기는 약 55nm 내지 약 80nm인, 핵산 백신.

청구항 36

제3항에 있어서, PEG-지질 접합체는 PEG-DMG 또는 PEG-PE인, 핵산 백신.

청구항 37

제36항에 있어서, PEG-지질 접합체는 PEG-DMG이고, 상기 PEG-DMG는 PEG2000-DMG 또는 PEG2000-PE인, 핵산 백신.

청구항 38

제1항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, LPMP는 다음을 포함하는, 핵산 백신:

약 20 몰% 내지 약 50 몰%의 이온화 가능 지질,

약 20 몰% 내지 약 60 몰%의 천연 지질,

약 7 몰% 내지 약 20 몰%의 스테롤, 및

약 0.5 몰% 내지 약 3 몰%의 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)-지질 접합체.

청구항 39

제38항에 있어서, LPMP는 다음을 포함하는, 핵산 백신:

약 35 몰%의 이온화 가능 지질,

약 50 몰%의 천연 지질,

약 12.5 몰%의 스테롤, 및

약 2.5 몰%의 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)-지질 접합체.

청구항 40

제1항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산 백신은 약 50:1 내지 약 10:1의 총 지질:폴리뉴클레오티드 중량비를 갖는 핵산 백신.

청구항 41

제40항에 있어서, 핵산 백신은 약 44:1 내지 약 24:1의 총 지질:폴리뉴클레오티드 중량비를 갖는 핵산 백신.

청구항 42

제40항에 있어서, 핵산 백신은 약 40:1 내지 약 28:1의 총 지질:폴리뉴클레오티드 중량비를 갖는, 핵산 백신.

청구항 43

제40항에 있어서, 핵산 백신은 약 38:1 내지 약 30:1의 총 지질:폴리뉴클레오티드 중량비를 갖는 핵산 백신.

청구항 44

제40항에 있어서, 핵산 백신은 약 37:1 내지 약 33:1의 총 지질:폴리뉴클레오티드 중량비를 갖는 핵산 백신.

청구항 45

제1항에 있어서, 약 7.0 내지 약 8.5의 pH에서 HEPES 또는 TRIS 완충액을 추가로 포함하는 핵산 백신.

청구항 46

제1항에 있어서, HEPES 또는 TRIS 완충액은 약 7mg/mL 내지 약 15mg/mL의 농도인, 핵산 백신.

청구항 47

제45항 또는 제46항에 있어서, 약 2.0mg/mL 내지 약 4.0mg/mL의 NaCl을 추가로 포함하는 핵산 백신.

청구항 48

제1항에 있어서, 하나 이상의 동결방지제를 추가로 포함하는 핵산 백신.

청구항 49

제1항에 있어서, 하나 이상의 동결방지제는 수크로오스, 글리세롤, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 핵산 백신.

청구항 50

제49항에 있어서, 핵산 백신은 약 70mg/mL 내지 약 110mg/mL 농도의 수크로오스 및 약 50mg/mL 내지 약 70mg/mL 농도의 글리세롤의 조합을 포함하는 핵산 백신.

청구항 51

제1항에 있어서, 핵산 백신은 동결건조된 조성물인 핵산 백신.

청구항 52

제51항에 있어서, 동결건조된 핵산 백신은 하나 이상의 동결방지제를 포함하는 핵산 백신.

청구항 53

제52항에 있어서, 동결건조된 핵산 백신은 폴록사머, 소르브산칼륨, 수크로오스, 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는 핵산 백신.

청구항 54

제53항에 있어서, 폴록사머는 폴록사머 188인, 핵산 백신.

청구항 55

제51항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서, 동결건조된 핵산 백신은 약 0.01 내지 약 1.0% w/w의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 핵산 백신.

청구항 56

제51항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서, 동결건조된 핵산 백신은 약 1.0 내지 약 5.0% w/w의 지질을 포함하는 핵산 백신.

청구항 57

제51항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서, 동결건조된 핵산 백신은 약 0.5 내지 약 2.5% w/w의 TRIS 완충액을 포함하는 핵산 백신.

청구항 58

제51항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서, 동결건조된 핵산 백신은 약 0.75 내지 약 2.75% w/w의 NaCl을 포함하는 핵산 백신.

청구항 59

제51항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서, 동결건조된 핵산 백신은 약 85 내지 약 95% w/w의 당을 포함하는 핵산 백신.

청구항 60

제59항에 있어서, 당은 수크로오스인, 핵산 백신.

청구항 61

제51항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서, 동결건조된 핵산 백신은 약 0.01 내지 약 1.0% w/w의 폴록사머를 포함하는 핵산 백신.

청구항 62

제61항에 있어서, 폴록사머는 폴록사머 188인, 핵산 백신.

청구항 63

제51항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서, 동결건조된 핵산 백신은 약 1.0 내지 약 5.0% w/w의 소르브산칼륨을 포함하는 핵산 백신.

청구항 64

제1항에 있어서, 감염원은 바이러스인, 핵산 백신.

청구항 65

제64항에 있어서, 감염원은 인플루엔자 바이러스, 코로나 바이러스, 모기-매개 바이러스, 간염 바이러스, 및 HIV 바이러스로 이루어진 군으로부터 선택된 바이러스인, 핵산 백신.

청구항 66

제1항에 있어서, 감염원은 호흡기 세포융합 바이러스, 리노바이러스, 아데노바이러스, 및 파라인플루엔자 바이러스로 이루어진 군으로부터 선택된 바이러스인, 핵산 백신.

청구항 67

핵산 백신을 제조하는 방법으로서, 다음 단계를 포함하는 방법:

이온화 가능 지질의 존재 하에 정제된 PMP 지질을 포함하는 막을 재구성하여 이온화 가능 지질을 포함하는 지질 재구성된 식물 전령 팩(LPMP)을 생산하는 단계로서, 상기 이온화 가능 지질은 아래에 열거된 특성 중 2개 이상을 갖는, 단계:

- (i) 적어도 2개의 이온화 가능 아민;
- (ii) 적어도 3개의 지질 꼬리로서, 각각의 지질 꼬리는 길이가 적어도 6개의 탄소 원자인, 지질 꼬리;
- (iii) 약 4.5 내지 약 7.5의 pKa;
- (iv) 이온화 가능 아민 및 적어도 2개의 원자 사슬에 의해 분리된 이중유기기; 및
- (v) 적어도 10의 N:P 비율, 및

감염성 질환, 장애, 또는 병태를 유발하는 감염원으로부터 유래된 하나 이상의 항원성 폴리펩티드를 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 LPMP에 로딩하는 단계.

청구항 68

감염성 질환, 장애, 또는 병태의 전염을 예방하거나 감소시키는 방법으로서,

제1항의 핵산 백신을 대상체에게 투여함으로써, 감염성 질환, 장애, 또는 병태의 전염을 예방하거나 감소시키는

단계를 포함하는 방법.

청구항 69

제68항에 있어서, 상기 방법은 상기 감염원이 백신접종된 숙주로부터 백신접종되지 않은 숙주로 전염되는 것을 방지하거나 감소시키는 방법.

청구항 70

제68항에 있어서, 상기 방법은 상기 감염원이 백신접종된 숙주로부터 다른 백신접종된 숙주로 전염되는 것을 방지하거나 감소시키는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] **관련 출원에 대한 상호 참조**

[0002] 본 출원은 2021년 10월 22일에 출원된 미국 가출원 제63/270,964호; 2021년 12월 17일에 출원된 미국 가출원 제 63/290,889호; 및 2022년 3월 16일에 출원된 미국 가출원 제63/320,647호에 대한 우선권의 이익을 주장하며, 동 문헌 모두는 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

배경 기술

[0003] 신종 코로나바이러스에 의해 야기되는 새롭게 출현하는 급성 호흡기 바이러스 감염은 공중 보건에 상당한 우려 사항이다. SARS-CoV-2 바이러스가 유발하는 대유행성 질환은 세계보건기구(WHO)에 의해 COVID-19(코로나바이러스 질환 2019)로 명명되었다. SARS-CoV-2에 의해 유발된 공중 보건 위기는 이들 바이러스에 대한 효과적이고 쉽게 확장 가능하며 안정적인 백신 전달을 신속하게 개발하는 것의 중요성을 강화한다.

[0004] 최근, RNA 백신이 큰 가능성을 보여주고 있다. 따라서, 보다 효과적이고 쉽게 확장 가능하며 안정적인 백신 전달을 위해 향상된 RNA 전달 시스템을 개발할 필요성이 존재한다.

발명의 내용

[0005] 일 양태에서, 감염성 질환, 장애, 또는 병태를 유발하는 감염원으로부터 유래된 하나 이상의 항원성 폴리펩티드를 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 핵산 백신이 본원에 제공된다. 하나 이상의 폴리뉴클레오티드는 천연 지질 및 이온화 가능 지질을 포함하는 지질 재구성된 식물 전령 팩(LPMP) 내에 제형화된다. 이온화 가능 지질은 아래에 열거된 특성 중 2개 이상을 갖는다:

[0006] (i) 적어도 2개의 이온화 가능 아민;

[0007] (ii) 적어도 3개의 지질 꼬리로서, 각각의 지질 꼬리는 길이가 적어도 6개의 탄소 원자인, 지질 꼬리;

[0008] (iii) 약 4.5 내지 약 7.5의 pKa;

[0009] (iv) 이온화 가능 아민 및 적어도 2개의 원자 사슬에 의해 분리된 이중유기기; 및

[0010] (v) 적어도 10의 N:P 비율.

[0011] 또 다른 양태에서, 핵산 백신을 제조하는 방법이 본원에 제공된다. 상기 방법은 이온화 가능 지질의 존재 하에 정제된 PMP 지질을 포함하는 막을 재구성하여, 이온화 가능 지질을 포함하는 지질 재구성된 식물 전령 팩(LPMP)을 생성하는 단계를 포함한다. 이온화 가능 지질은 아래에 열거된 특성 중 2개 이상을 갖는다:

[0012] (i) 적어도 2개의 이온화 가능 아민;

[0013] (ii) 적어도 3개의 지질 꼬리로서, 각각의 지질 꼬리는 길이가 적어도 6개의 탄소 원자인, 지질 꼬리;

[0014] (iii) 약 4.5 내지 약 7.5의 pKa;

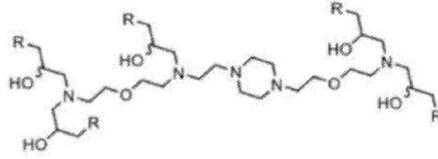
[0015] (iv) 이온화 가능 아민 및 적어도 2개의 원자 사슬에 의해 분리된 이중유기기; 및

[0016] (v) 적어도 10의 N:P 비율.

- [0017] 상기 방법은 감염성 질환, 장애, 또는 병태를 유발하는 감염원으로부터 유래된 하나 이상의 항원성 폴리펩티드를 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 LPMP에 로딩하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0018] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 하나 이상의 야생형 항원 또는 조작된 항원(또는 항원에 대한 항체)을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 작제물이다. 항원은 감염원으로부터 유래될 수 있다. 일부 구현예에서, 감염원은 바이러스, 예를 들어, 인플루엔자 바이러스, 코로나 바이러스, 모기-매개 바이러스, 간염 바이러스, 및 HIV 바이러스로 이루어진 군으로부터 선택된 바이러스이다. 일부 구현예에서, 감염원은 바이러스, 예를 들어, 호흡기 세포포용합 바이러스, 리노바이러스, 아데노바이러스, 또는 파라인플루엔자 바이러스이다. 예를 들어, 감염원은 바이러스의 하나 이상의 균주일 수 있다.
- [0019] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드에 의해 암호화된 항원성 폴리펩티드는 코로나 바이러스, 또는 이의 단편 또는 서브유닛이다. 일부 구현예에서, 항원성 폴리펩티드는 메르스 바이러스(MERS-CoV), 사스 바이러스(SARS-CoV), 또는 이의 단편 또는 서브유닛의 스파이크 단백질(S)이다.
- [0020] 일부 구현예에서, 항원성 폴리펩티드는 사스 바이러스, 또는 이의 단편 또는 서브유닛이다. 항원성 폴리펩티드는 SARS-CoV-2 스파이크 단백질 또는 SARS-CoV-2 스파이크 당단백질일 수 있다. 일 구현예에서, 항원성 폴리펩티드는 야생형 SARS-CoV-2 스파이크 당단백질이다.
- [0021] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 mRNA, siRNA 또는 siRNA 전구체, 마이크로RNA(miRNA) 또는 miRNA 전구체, 플라스미드, 다이스 기질 짧은 간섭 RNA(dsRNA), 짧은 헤어핀 RNA(shRNA), 비대칭 간섭 RNA(aiRNA), 펩티드 핵산(PNA), 모르폴리노, 잠김 핵산(LNA), 피위-상호작용 RNA(piRNA), 리보자임, 데옥시리보자임(DNAzyme), 압타머, 원형 RNA(circRNA), 가이드 RNA(gRNA), 또는 이들 RNA 중 어느 하나를 암호화하는 DNA 분자일 수 있다. 일 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 mRNA이다.
- [0022] 일부 구현예에서, mRNA는 (a) DNA 분자, 또는 (b) RNA 분자로부터 유래된다. mRNA에서, T는 U로 임의 치환된다.
- [0023] 일부 구현예에서, mRNA는 DNA 분자로부터 유래된다. DNA 분자는 프로모터를 추가로 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 프로모터는 T7 프로모터, T3 프로모터, 또는 SP6 프로모터이다. 일부 구현예에서, 프로모터는 5' UTR에 위치한다.
- [0024] 일부 구현예에서, mRNA는 RNA 분자이다. RNA 분자는 자가-복제 RNA 분자일 수 있다.
- [0025] 일부 구현예에서, mRNA는 RNA 분자이다. RNA 분자는 5' 캡을 추가로 포함할 수 있다. 5' 캡은 캡 1 구조, 캡 1 (m6A) 구조, 캡 2 구조, 캡 3 구조, 캡 0 구조, 또는 이들의 임의의 조합을 가질 수 있다.
- [0026] 일부 구현예에서, mRNA는 이중 프롤린 안정화 돌연변이를 갖는 SARS-CoV-2 스파이크(S) 당단백질을 암호화하는 개방 해독 프레임(open reading frame, ORF)을 포함한다. 일 구현예에서, 이중 프롤린 안정화 돌연변이는 야생형 SARS-CoV-2 S 당단백질의 K986 및 V987에 상응하는 위치에 존재한다.
- [0027] 일부 구현예에서, mRNA는 5' 미번역 영역(UTR) 및/또는 3' UTR을 포함한다.
- [0028] 일부 구현예에서, mRNA는 5' UTR을 포함한다. 5' UTR은 코작(Kozak) 서열을 포함할 수 있다.
- [0029] 일부 구현예에서, mRNA는 3' UTR을 포함한다. 일부 구현예에서, 3' UTR은 아미노-말단 분할 인헨서(AES)로부터 유래된 하나 이상의 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 3' UTR은 미토콘드리아 암호화된 12S rRNA(mtRNR1)로부터 유래된 서열을 포함한다.
- [0030] 일부 구현예에서, mRNA는 폴리(A) 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 폴리(A) 서열은 30개의 아데노신 잔기의 서열, 10개-뉴클레오티드 런칭 서열, 및 70개의 아데노신 잔기의 서열로 이루어진 110개-뉴클레오티드 서열이다.
- [0031] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 지질 재구성된 식물 전령 팩(LPMP)에 의해 캡슐화된다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 LPMP의 표면에 매립된다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 LPMP의 표면에 접합된다.
- [0032] 일부 구현예에서, LPMP는 지질 압출을 포함하는 방법에 의해 생산된다. 일부 구현예에서, LPMP는 수성상을 포함하는 미세유체 장치에서 PMP의 지질 추출물을 포함하는 용액을 가공하여 LPMP를 생산하는 단계를 포함하는 방법에 의해 생산된다. 일부 구현예에서, 수성상은 폴리뉴클레오티드를 포함한다.
- [0033] 일부 구현예에서, LPMP의 천연 지질은 레몬 또는 조류로부터 추출된다.
- [0034] 일부 구현예에서, LPMP의 이온화 가능 지질은 1,1'-((2-(4-(2-((2-(비스(2-히드록시도데실)아미노)에틸)(2-히드

록시도데실)아미노)에틸)피페라진-1-일)에틸)아자네디일)비스(도데칸-2-올)(C12-200), MD1(cKK-E12), OF2, EPC, ZA3-Ep10, TT3, LP01, 5A2-SC8, 지질 5, SM-102(지질 H), 및 ALC-315로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0035] 일 구현예에서, 이온화 가능 지질은 C12-200이다.



[0036] 일부 구현예에서, 이온화 가능 지질은, 기이다.

(1) 이고, 식 중 R은 C8-C14 알킬

[0037] 일부 구현예에서, 재구성은 스테롤의 존재 하에 수행됨으로써, 천연 지질, 이온화 가능 지질, 및 스테롤을 포함하는 LPMP를 생성한다. 일부 구현예에서, 스테롤은 콜레스테롤 또는 시토스테롤이다.

[0038] 일부 구현예에서, 재구성은 폐길화된 지질(또는 PEG-지질 접합체)의 존재 하에 수행됨으로써, 천연 지질, 이온화 가능 지질, 및 PEG-지질 접합체를 포함하는 LPMP를 생성한다. 일부 구현예에서, PEG-지질 접합체는 C14-PEG2k, C18-PEG2k, 또는 DMPE-PEG2k이다. 일부 구현예에서, PEG-지질 접합체는 PEG-DMG 또는 PEG-PE이다. 일부 구현예에서, PEG-DMG는 PEG2000-DMG 또는 PEG2000-PE이다.

[0039] 일부 구현예에서, LPMP는 스테롤 및 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)-지질 접합체를 추가로 포함한다.

[0040] 일부 구현예에서, LPMP는 다음을 포함한다:

[0041] 약 20 몰% 내지 약 50 몰%의 이온화 가능 지질,

[0042] 약 20 몰% 내지 약 60 몰%의 천연 지질,

[0043] 약 7 몰% 내지 약 20 몰%의 스테롤, 및

[0044] 약 0.5 몰% 내지 약 3 몰%의 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)-지질 접합체.

[0045] 일부 구현예에서, LPMP는 다음을 포함한다:

[0046] 약 35 몰%의 이온화 가능 지질,

[0047] 약 50 몰%의 천연 지질,

[0048] 약 12.5 몰%의 스테롤, 및

[0049] 약 2.5 몰%의 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)-지질 접합체.

[0050] 일 구현예에서, LPMP는 약 35:50:12.5:2.5의 몰비로 이온화 가능 지질:천연 지질:스테롤:PEG-지질을 포함한다.

일 구현예에서, LPMP는 약 35:20:42.5:2.5의 몰비로 이온화 가능 지질:천연 지질:스테롤:PEG-지질을 포함한다.

[0051] 일부 구현예에서, LPMP는 다음을 포함한다:

[0052] 레몬 또는 조류로부터 추출된 천연 지질,

[0053] C12-200,

[0054] 콜레스테롤, 및

[0055] DMPE-PEG2k.

[0056] 일 구현예에서, LPMP는 다음을 포함한다:

[0057] 레몬으로부터 추출된 천연 지질,

[0058] C12-200,

[0059] 콜레스테롤, 및

[0060] DMPE-PEG2k. LPMP는 C12-200:레몬 지질:콜레스테롤: DMPE-PEG2k를 약 35:50:12.5:2.5의 몰비로 포함한다.

- [0061] 일 구현예에서, LPMP는 다음을 포함한다:
- [0062] 조류로부터 추출된 천연 지질,
- [0063] C12-200,
- [0064] 콜레스테롤, 및
- [0065] DMPE-PEG2k. LPMP는 C12-200:조류 지질:콜레스테롤: DMPE-PEG2k를 약 35:20:42.5:2.5의 몰비로 포함한다.
- [0066] 일부 구현예에서, LPMP는 리포플렉스, 리포솜, 지질 나노입자, 중합체 기반 담체, 엑소솜, 층상체, 미셀, 및 유화액으로 이루어진 군으로부터 선택된 친유성 모이어티이다. 일 구현예에서, LPMP는 양이온성 리포솜, 나노리포솜, 프로테오리포솜, 단층 리포솜, 다층 리포솜, 세라미드 함유 나노리포솜, 및 다포성 리포솜으로 이루어진 군으로부터 선택된 리포솜이다. 일 구현예에서, LPMP는 지질 나노입자이다.
- [0067] 일부 구현예에서, LPMP의 크기는 약 200nm 미만이다. 일 구현예에서, LPMP의 크기는 약 150nm 미만이다. 일 구현예에서, LPMP의 크기는 약 100nm 미만이다. 일 구현예에서, LPMP의 크기는 약 55nm 내지 약 80nm이다.
- [0068] 일부 구현예에서, 핵산 백신은 약 50:1 내지 약 10:1의 총 지질:폴리뉴클레오티드 중량비를 갖는다. 일 구현예에서, 핵산 백신은 약 44:1 내지 약 24:1의 총 지질:폴리뉴클레오티드 중량비를 갖는다. 일 구현예에서, 핵산 백신은 약 40:1 내지 약 28:1의 총 지질:폴리뉴클레오티드 중량비를 갖는다. 일 구현예에서, 핵산 백신은 약 38:1 내지 약 30:1의 총 지질:폴리뉴클레오티드 중량비를 갖는다. 일 구현예에서, 핵산 백신은 약 37:1 내지 약 33:1의 총 지질:폴리뉴클레오티드 중량비를 갖는다.
- [0069] 일부 구현예에서, 핵산 백신, 예를 들어 수성상은 HEPES 또는 TRIS 완충액을 추가로 포함한다. HEPES 또는 TRIS 완충액의 pH는 약 7.0 내지 약 8.5일 수 있다. HEPES 또는 TRIS 완충액의 농도는 약 7mg/mL 내지 약 15mg/mL일 수 있다. 수성상은 약 2.0mg/mL 내지 약 4.0mg/mL의 NaCl을 추가로 포함할 수 있다.
- [0070] 일부 구현예에서, 핵산 백신, 예를 들어, 수성상은 물, PBS, 또는 구연산염 완충액을 포함한다. 일 구현예에서, 수성상은 pH가 약 3.2인 구연산염 완충액을 포함한다.
- [0071] 일부 구현예에서, 수성상 및 지질 용액은 3:1 부피비로 혼합된다.
- [0072] 일부 구현예에서, 핵산 백신은 하나 이상의 동결방지제를 추가로 포함한다. 하나 이상의 동결방지제는 수크로오스, 글리세롤, 또는 이들의 조합일 수 있다. 일 구현예에서, 핵산 백신은 약 70mg/mL 내지 약 110mg/mL 농도의 수크로오스 및 약 50mg/mL 내지 약 70mg/mL 농도의 글리세롤의 조합을 포함한다.
- [0073] 일부 실시예에서, 핵산 백신은 동결건조된 조성물이다. 동결건조된 핵산 백신은 하나 이상의 동결방지제를 포함할 수 있다. 동결건조된 핵산 백신은 폴록사머, 소르브산칼륨, 수크로오스, 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 일 구현예에서, 동결건조된 핵산 백신은 폴록사머, 예를 들어 폴록사머 188을 포함한다.
- [0074] 일부 구현예에서, 핵산 백신은 동결건조된 조성물이다. 일 구현예에서, 동결건조된 핵산 백신은 약 0.01 내지 약 1.0% w/w의 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일 구현예에서, 동결건조된 핵산 백신은 약 1.0 내지 약 5.0% w/w 지질을 포함한다. 일 구현예에서, 동결건조된 핵산 백신은 약 0.5 내지 약 2.5% w/w의 TRIS 완충액을 포함한다. 일 구현예에서, 동결건조된 핵산 백신은 약 0.75 내지 약 2.75% w/w의 NaCl을 포함한다. 일 구현예에서, 동결건조된 핵산 백신은 약 85 내지 약 95% w/w의 당, 예를 들어 수크로오스를 포함한다. 일 구현예에서, 동결건조된 핵산 백신은 약 0.01 내지 약 1.0% w/w의 폴록사머, 예를 들어 폴록사머 188을 포함한다. 일 구현예에서, 동결건조된 핵산 백신은 약 1.0 내지 약 5.0% w/w의 소르브산칼륨을 포함한다.
- [0075] 또한, 본 발명의 양태는 감염성 질환, 장애, 또는 병태의 전염을 예방하거나 감소시키는 방법을 제공한다. 상기 방법은 본 발명의 상기 양태에 기술된 핵산 백신을 대상체에게 투여함으로써, 감염성 질환, 장애, 또는 병태의 전염을 예방하거나 감소시키는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 감염성 질환, 장애, 또는 병태의 전염을 적어도 5%(예를 들어, 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100%)만큼 감소시킨다. 대안적으로, 상기 방법은 본 발명의 상기 양태에 기술된 핵산 백신을 대상체에게 투여함으로써, 다른 대상체에 대한 감염성 질환, 장애, 또는 병태의 전염 수준을 10% 미만(예를 들어, 5% 미만, 4% 미만, 3% 미만, 2% 미만, 1% 미만, 0.5% 미만, 0.4% 미만, 0.3% 미만, 0.2% 미만, 또는 0.1% 미만)으로 감소시키는 단계를 포함한다.
- [0076] **정의**

- [0077] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "유효량", "유효 농도", 또는 "유효한 농도"는 표적 유기체 내 또는 표적 유기체에 대하여, 인용된 결과에 영향을 미치거나 표적 수준(예를 들어, 미리 결정된 수준 또는 임계 수준)에 도달하기에 충분한 LPMP 또는 핵산 조성물의 양을 지칭한다.
- [0078] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "치료제"는 동물, 예를 들어 포유동물(예를 들어, 인간), 동물 병원균, 또는 병원균 벡터, 예컨대 항진균제, 항균제, 바이러스 박멸제, 항바이러스제, 살충제(insecticidal agent 또는 nematicidal agent), 구충제, 또는 곤충 기피제에 작용할 수 있는 제제를 지칭한다.
- [0079] 본원에서 정의된 바와 같이, 용어 "핵산" 및 "폴리뉴클레오티드"는 상호 교환 가능하며, 길이(예를 들어, 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 150, 200, 250, 500, 1000, 또는 그 이상의 핵산)에 관계없이 선형 또는 분지형, 단일 또는 이중 가닥, 또는 이들의 하이브리드인 RNA 또는 DNA를 지칭한다. 상기 용어는 또한 RNA/DNA 하이브리드를 포함한다. 뉴클레오티드는 통상적으로 포스포디에스테르 결합에 의해 핵산에 연결되지만, 용어 "핵산"은 또한 다른 유형의 결합 또는 골격(예를 들어, 무엇보다도, 포스포라미드, 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 0-메틸포스포로아미데이트, 모르폴리노, 잠김 핵산(LNA), 글리세롤 핵산(GNA), 트레오스 핵산(TNA), 및 펩티드 핵산(PNA) 결합 또는 골격)을 갖는 핵산 유사체를 포함한다. 핵산은 단일 가닥, 이중 가닥일 수 있거나, 단일 가닥 서열 및 이중 가닥 서열 둘 모두의 일부분을 함유할 수 있다. 핵산은 데옥시리보뉴클레오티드 및 리보뉴클레오티드의 임의의 조합뿐만 아니라, 예를 들어 아데닌, 티민, 시토신, 구아닌, 우라실, 및 변형 또는 비-정규 염기(예를 들어, 하이포크산틴, 크산틴, 7-메틸구아닌, 5,6-디하이드로 우라실, 5-메틸시토신, 및 5-하이드록시메틸시토신을 포함함)를 포함하는 염기의 임의의 조합을 함유할 수 있다.
- [0080] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "펩티드", "단백질," 또는 "폴리펩티드"는 길이(예를 들어, 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 40, 50, 100, 또는 그 이상의 아미노산), 번역 후 변형(예를 들어, 당질화 또는 인산화)의 여부, 또는, 예를 들어, 펩티드에 공유 결합되고, 예를 들어, 천연 단백질, 합성 또는 재조합 폴리펩티드 및 펩티드, 하이브리드 분자, 펩토이드, 또는 펩티드모방체를 포함하는 하나 이상의 비-아미노 아실기(예를 들어, 당, 지질 등)의 존재와 관계없이, 자연 발생 또는 비자연 발생 아미노산(D-아미노산 또는 L-아미노산)의 임의의 사슬을 포함한다.
- [0081] 본원에서 사용되는 바와 같이, 2개의 서열 사이의 "백분율 동일성"은 BLAST 2.0 알고리즘에 의해 결정되고, 이는 Altschul 등(1990)의 문헌[*J. Mol. Biol.* 215:403~410]에 기술되어 있다. BLAST 분석을 수행하기 위한 소프트웨어는 NCBI(National Center for Biotechnology Information)를 통해 공개적으로 이용 가능하다.
- [0082] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "식물"은 전체 식물, 식물 기관, 식물 조직, 종자, 식물 세포, 종자 및 이들의 자손을 지칭한다. 식물 세포는, 제한 없이, 씨앗, 현탁액 배양물, 배아, 분열 영역, 캘러스 조직, 잎, 뿌리, 새싹, 배우체, 포자체, 화분, 및 미세포자로부터의 세포를 포함한다. 식물 부분은 다음을 포함하지만 이에 한정되지 않는 분화된 조직 및 미분화된 조직을 포함한다: 뿌리, 줄기, 새싹, 잎, 화분, 씨앗, 과일, 수확된 농산물, 종양 조직, 수액(예를 들어, 목부수액 및 사부수액), 및 다양한 형태의 세포 및 배양물(예를 들어, 단일 세포, 원형질체, 배아, 및 캘러스 조직). 식물 조직은 식물 또는 식물 기관, 조직, 또는 세포 배양물 내에 존재할 수 있다.
- [0083] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "변형된 PMP" 또는 "변형된 LPMP"는, 미변형된 PMP 또는 LPMP에 비해 PMP 또는 LPMP 또는 이들의 일부 또는 구성물질의 세포 흡수(예를 들어, 동물 세포 흡수, 식물 세포 흡수, 박테리아 세포 흡수, 또는 진균 세포 흡수)를 증가시킬 수 있고; PMP 또는 LPMP에 의한 이중 작용제(예를 들어, 농업용 또는 치료제)의 세포로의 전달을 가능하게 하거나 증가시킬 수 있고/있거나, 이중 작용제(예를 들어, 농업용 또는 치료제)의 로딩(예를 들어, 로딩 효율 또는 로딩 용량)을 가능하게 하거나 증가시킬 수 있는 하나 이상의 이중 제제(예를 들어, 하나 이상의 외인성 지질, 예컨대 이온화 가능 지질, 예를 들어, 이온화 가능 지질 및 스테롤 및/또는 폐결화된 지질을 포함하는 PMP 또는 LPMP)를 포함하는 복수의 PMP 또는 LPMP를 포함하는 조성물을 지칭한다. PMP 또는 LPMP는 시험관 내 또는 생체 내에서 변형될 수 있다.
- [0084] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "미변형된 PMP" 또는 "미변형된 LPMP"는 PMP의 세포 흡수(예를 들어, 동물 세포 흡수, 식물 세포 흡수, 박테리아 세포 흡수, 또는 진균 세포 흡수)를 증가시킬 수 있는 이중 세포 흡수제가 결합된 복수의 PMP 또는 LPMP를 포함하는 조성물을 지칭한다.
- [0085] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "세포 흡수"는 동물 세포, 식물 세포, 박테리아 세포, 또는 진균 세포와 같은 세포에 의한 PMP 또는 LPMP 또는 이들의 일부 또는 구성성분(예를 들어, PMP 또는 LPMP에 의해 운반되는 폴

리뉴클레오티드)의 흡수를 지칭한다. 예를 들어, 흡수는 세포의 환경으로부터, 세포막, 세포벽, 세포의 기질 내로 또는 이에 걸쳐, 또는 세포의 세포내 환경 내로 PMP(예를 들어, LPMP) 또는 이의 구성성분의 일부를 전달하는 것을 포함할 수 있다. PMP(예를 들어, LPMP)의 세포 흡수는 활성 또는 수동 세포 메커니즘을 통해 발생할 수 있다. 세포 흡수는 전체 PMP(예를 들어, LPMP)가 세포에 의해 흡수되는, 예를 들어 세포내이입에 의해 흡수되는 양태를 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 폴리뉴클레오티드는 세포내이입 및 엔도솜 탈출 후에 표적 세포의 세포질에 노출된다. 일부 구현예에서, 변형된 LPMP(예를 들어, 이온화 가능 지질을 포함하는 LPMP, 예를 들어, 이온화 가능 지질 및 스테롤 및/또는 폐길화된 지질을 포함하는 LPMP)는 미변형된 LPMP에 비해 증가된 엔도솜 탈출률을 갖는다. 또한 세포 흡수는 PMP(예를 들어, LPMP)가 표적 세포의 막과 융합되는 양태를 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 폴리뉴클레오티드는 막 융합 후에 표적 세포의 세포질에 노출된다. 일부 구현예에서, LPMP는 미변형된 LPMP에 비해, 증가된 표적 세포의 막과의 융합율을 갖는다(예를 들어, 보다 융합성임).

[0086] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "세포 투과제"는 제제와 접촉하지 않은 세포에 비해, 증가된 세포 흡수를 촉진하는 방식으로 세포(예를 들어, 동물 세포, 식물 세포, 박테리아 세포, 또는 진균 세포)의 세포 벽, 세포의 기질, 또는 세포막의 특성(예를 들어, 투과성)을 변경하는 제제를 지칭한다.

[0087] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "식물 세포의 소포", "식물 EV", 또는 "EV"는 식물에서 자연적으로 발생하는 밀폐된 지질-이중층 구조를 지칭한다. 임의적으로, 식물 EV는 하나 이상의 식물 EV 마커를 포함한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "식물 EV 마커"는 부록에 열거된 식물 EV 마커 중 어느 하나를 포함하지만 이에 한정되지 않는, 식물 단백질, 식물 핵산, 식물 소분자, 식물 지질, 또는 이들의 조합과 같은 식물과 자연적으로 연관된 성분을 지칭한다. 일부 경우에, 식물 EV 마커는 식물 EV의 식별 마커이지만 살충제는 아니다. 일부 경우에, 식물 EV 마커는 식물 EV 및 또한 살충제(예를 들어, 복수의 PMP 또는 LPMP와 연관되거나 이에 의해 캡슐화되거나, 복수의 PMP 또는 LPMP와 직접 연관되거나 이에 의해 캡슐화되지 않음)의 식별 마커이다.

[0088] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "식물 전령 팩" 또는 "PMP"는, 식물 공급원 또는 분절, 부분, 또는 이의 추출물과 연관되고 식물, 식물 부분, 또는 식물 세포로부터 농축, 단리 또는 정제된 지질 또는 비지질 성분(예를 들어, 펩티드, 핵산, 또는 소분자)을 포함하되 농축 또는 단리가 하나 이상의 오염물 또는 원치 않는 성분을 공급원 식물로부터 제거하는, 식물 공급원 또는 분절, 부분, 또는 이의 추출물로부터 유래(예를 들어, 이로부터 농축, 단리, 또는 정제됨)되고 직경이 약 5~2000nm(예를 들어, 적어도 5~1000nm, 적어도 5~500nm, 적어도 400~500nm, 적어도 25~250nm, 적어도 50~150nm, 또는 적어도 70~120nm)인 지질 구조(예를 들어, 지질 이중층, 단층 구조, 다층 구조; 예를 들어, 소포성 지질 구조)를 지칭한다. PMP는 자연 발생 EV의 고도로 정제된 제제일 수 있다. 바람직하게는, 공급원 식물, 예를 들어, 식물 세포 벽 성분; 핵틴; 식물 소기관(예를 들어, 미토콘드리아; 엽록체, 백색체, 또는 녹말체와 같은 색소체; 및 핵); 식물 염색질(예를 들어, 식물 염색체); 또는 식물 분자 응집체(예를 들어, 단백질 응집체, 단백질-핵산 응집체, 지단백질 응집체, 또는 지질-단백질 구조)로부터 하나 이상의 오염물 또는 원치 않는 성분 중 공급원 식물로부터 오염물 또는 원치 않는 성분의 적어도 1% (예를 들어, 적어도 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 98%, 99%, 또는 100%)가 제거된다. 바람직하게는, PMP는 중량(w/w), 스펙트럼 영상화(투과율(%)), 또는 전도도(S/m)에 의해 측정 시, 공급원 식물의 하나 이상의 오염물 또는 원치 않는 성분에 비해, 적어도 30% 순수(예를 들어, 적어도 40% 순수, 적어도 50% 순수, 적어도 60% 순수, 적어도 70% 순수, 적어도 80% 순수, 적어도 90% 순수, 적어도 99% 순수, 또는 100% 순수)하다.

[0089] 지질 재구성된 PMP(LPMP)가 본원에서 사용된다. 용어 "지질 재구성된 PMP" 및 "LPMP"는 식물 공급원으로부터 유래(예를 들어, 이로부터 농축, 단리, 또는 정제)된 지질 구조(예를 들어, 지질 이중층, 단층 구조, 다층 구조; 예를 들어, 소포성 지질 구조)로부터 유래된 PMP를 지칭하되, 지질 구조는 파괴(예를 들어, 지질 추출에 의해 파괴됨)되고, 표준 방법을 사용하여 액상(예를 들어, 카르고를 함유하는 액상)에서 재조합되거나 재구성, 예를 들어, 지질 막 수화 및/또는 용매 주입을 포함하는 방법에 의해 재구성되어 본원에 기술된 바와 같은 LPMP를 생산한다. 상기 방법은, 원하는 경우, 초음파 처리, 동결/해동 처리, 및/또는 지질 압출을 추가로 포함하여, 예를 들어, 재구성된 PMP의 크기를 감소시킬 수 있다. 대안적으로, LPMP는 미세유체 장치(예컨대 NanoAssembler® IGNITE™ 미세유체 기기(Precision NanoSystems))를 사용하여 생산될 수 있다.

[0090] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "양이온성 지질"은 양이온성 기(예를 들어, 양이온성 헤드 기)를 함유하는, 양으로 하전된 양친매성 분자(예를 들어, 지질 또는 리피도이드)를 지칭한다.

[0091] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "이온화 가능 지질"은 주어진 조건(예를 들어, pH) 하에서, 이온화, 예를 들어, 해리되어 하나 이상의 전하를 띤 종을 생산할 수 있는 기(예를 들어, 헤드 기)를 함유하는 양친매성 분자

(예를 들어, 지질 또는 리피도이드, 예를 들어, 합성 지질 또는 리피도이드)를 지칭한다.

- [0092] 놀랍게도, 다수의 불포화 부위, 예를 들어, 적어도 2개 또는 3개의 불포화 부위를 갖는 알킬 사슬을 포함하는 이온화 가능 지질이 막 유동성이 증가된 지질 입자를 형성하는 데 특히 유용하다는 것이 밝혀졌다. 본원에 사용하기에 적합한 다수의 이온화 가능 지질 및 관련 유사체는 미국 특허 공개 제20060083780호 및 제20060240554호; 미국 특허 제5,208,036호; 제5,264,618호; 제5,279,833호; 제5,283,185호; 제5,753,613호; 및 제5,785,992호; 및 PCT 공개 WO 96/10390에 개시되어 있으며, 동 문헌의 개시 내용은 모든 목적을 위해 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.
- [0093] 일부 구현예에서, 이온화 가능 지질은 해리되어 pH에 따라 양전하 형태로 존재할 수 있도록 이온화될 수 있다. 이온화 가능 지질의 이온화는 상이한 pH 조건 하에서 이온화 가능 지질을 포함하는 지질 나노입자의 표면 전하에 영향을 미친다. 지질 나노입자의 표면 전하는 궁극적으로, 지질 나노입자의 혈장 단백질 흡수, 혈액 제거, 및 조직 분포(Semple, S.C., 등, Adv. Drug Deliv Rev 32:3~17(1998))에 영향을 미칠 수 있을 뿐만 아니라 핵산의 세포내 전달에 영향을 미칠 수 있는 체내 분해성 비-이중층 구조(Hafez, I.M., 등, Gene Ther 8: 1188~1196(2001))를 형성하는 지질 나노입자의 능력에 영향을 미칠 수 있다.
- [0094] 일부 구현예에서, 이온화 가능 지질은, 예를 들어 생리학적 pH(예를 들어, pH 약 7)에서 일반적으로 중성이지만, 산성 pH 또는 염기성 pH에서 순 전하(들)를 운반할 수 있는 것들이다. 일 구현예에서, 이온화 가능 지질은 일반적으로 pH 약 7에서 중성이지만, 산성 pH에서 순 전하(들)를 운반할 수 있는 것들이다. 일 구현예에서, 이온화 가능 지질은 일반적으로 pH 약 7에서 중성이지만, 염기성 pH에서 순 전하(들)를 운반할 수 있는 것들이다.
- [0095] 일부 구현예에서, 이온화 가능 지질은 일반적으로 생리학적 pH(예를 들어, pH 약 7)에서 순 전하(들)를 운반하는 양이온성 지질 또는 음이온성 지질을 포함하지 않는다.
- [0096] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "리피도이드(lipidoid)"는 하나 이상의 지질 특성을 갖는 분자를 지칭한다.
- [0097] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "안정한 LPMP 제형"은 일정 기간(예를 들어, 적어도 24시간, 적어도 48시간, 적어도 1주일, 적어도 2주일, 적어도 3주일, 적어도 4주일, 적어도 30일, 적어도 60일, 또는 적어도 90일)에 걸쳐, 임의로 정의된 온도 범위(예를 들어, 적어도 24°C의 온도(예를 들어, 적어도 24°C, 25°C, 26°C, 27°C, 28°C, 29°C, 또는 30°C), 적어도 20°C(예를 들어, 적어도 20°C, 21°C, 22°C, 또는 23°C), 적어도 4°C(예를 들어, 적어도 5°C, 10°C, 또는 15°C), 적어도 -20°C(예를 들어, 적어도 -20°C, -15°C, -10°C, -5°C, 또는 0°C), 또는 -80°C(예를 들어, 적어도 -80°C, -70°C, -60°C, -50°C, -40°C, 또는 -30°C)에서 LPMP 제형 내 LPMP의 수(예를 들어, 생산 또는 제형화 시) 대비, 초기 LPMP의 수(예를 들어, 용액의 mL 당 LPMP)의 적어도 5%(예를 들어, 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100%)를 유지하거나; 임의로 정의된 온도 범위(예를 들어, 적어도 24°C의 온도(예를 들어, 적어도 24°C, 25°C, 26°C, 27°C, 28°C, 29°C, 또는 30°C), 적어도 20°C(예를 들어, 적어도 20°C, 21°C, 22°C, 또는 23°C), 적어도 4°C(예를 들어, 적어도 5°C, 10°C, 또는 15°C), 적어도 -20°C(예를 들어, 적어도 -20°C, -15°C, -10°C, -5°C, 또는 0°C), 또는 -80°C(예를 들어, 적어도 -80°C, -70°C, -60°C, -50°C, -40°C, 또는 -30°C)에서 LPMP(예를 들어, 생산 또는 제형화 시)의 초기 활성 대비, 이의 활성(예를 들어, 세포 벽 투과 활성 및/또는 LPMP 내 제형화된 mRNA의 활성)의 적어도 5%(예를 들어, 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100%)를 유지하는 LPMP 조성물을 지칭한다.

도면의 간단한 설명

- [0098] 도 1a는 실시예 2(표 2)에 따라 제조된 LNP의 입자와 비교하여, LPMP/SARS-CoV-2 A(recPMP1, recLemon) 및 LPMP/SARS-CoV-2 B(recPMP2, recAlgae)의 입자의 크기 및 다분산성을 보여준다. 도 1b는 실시예 2(표 2)에 따라 제조된 LNP의 캡슐화 효율과 비교하여, LPMP/SARS-CoV-2 A(recPMP1, recLemon) 및 LPMP/SARS-CoV-2 B(recPMP2, recAlgae)의 캡슐화 효율을 보여준다.
- 도 2a 내지 도 2c는 햄스터에서 단일 투여량의 LPMP/SARS-CoV-2 백신의 근육내 백신접종 후 6시간 및 24시간 차에, 사이토카인 IL6(도 2a), 케모카인 CXCL12(도 2b), 및 사이토카인 SCF(줄기 세포 인자)(도 2c)의 햄스터 혈청 내 수준을 도시한다. 2개의 백신 제형이 0일 차에 투여되었다: LPMP/SARS-CoV-2 A(recLemon LPMP, S mRNA 10 µg 함유함) 및 LPMP/SARS-CoV-2 B(recAlgae LPMP, S mRNA 10 µg 함유함). 대조군은 0일 차에 EPO mRNA가 투여된, 백신접종되지 않은 햄스터였다.

도 3a 및 도 3b는 햄스터에서 단일 투여량의 LPMP/SARS-CoV-2 백신의 근육내 백신접종 후 10일 차에, SARS-CoV-2의 S 항원(도 3a) 및 S1 RBD 항원(도 3b)에 특이적인 항체(IgG)의 햄스터 혈청 내 수준을 도시한다. 2개의 백신 제형이 0일 차에 투여되었다: LPMP/SARS-CoV-2 A(recLemon LPMP, S mRNA 10 µg 함유함) 및 LPMP/SARS-CoV-2 B(recAlgae LPMP, S mRNA 10 µg 함유함). 대조군은 0일 차에 EPO mRNA가 투여된, 백신접종되지 않은 햄스터였다.

도 4는 햄스터에서 LPMP/SARS-CoV-2 백신의 근육내 백신접종 후 21일 차에, SARS-CoV-2의 S1 RBD 항원에 특이적인 항체(IgG)의 햄스터 혈청 내 수준을 도시한다. 2가지 유형의 백신 제형이 상이한 투여량으로 0일 차에 투여되었다: LPMP/SARS-CoV-2 A(recLemon LPMP, S mRNA 10 µg, 20 µg 함유함) 및 LPMP/SARS-CoV-2 B(recAlgae LPMP, S mRNA 10 µg, 20 µg 함유함). 대조군은 0일 차에 EPO mRNA가 투여된, 백신접종되지 않은 햄스터였다.

도 5는 햄스터에서 LPMP/SARS-CoV-2 백신의 근육내 백신접종 후 35일 차에, SARS-CoV-2 원래 균주에 대한 중화 항체 역가의 햄스터 혈청 내 수준을 도시한다. 2가지 유형의 백신 제형이 상이한 투여량으로 0일 차에 투여되었다: LPMP/SARS-CoV-2 A(recLemon LPMP, S mRNA 10 µg, 20 µg 함유함) 및 LPMP/SARS-CoV-2 B(recAlgae LPMP, S mRNA 10 µg, 20 µg 함유함). 대조군은 0일 차에 EPO mRNA가 투여된, 백신접종되지 않은 햄스터였다.

도 6은 햄스터에서 LPMP/SARS-CoV-2 백신의 근육 내 백신접종 후 35일 차에, 햄스터의 비장 내에서 SARS-CoV-2의 S 항원에 대한 T 세포 반응의 결과를 도시한다. 2가지 유형의 백신 제형이 상이한 투여량으로 0일 차에 투여되었다: LPMP/SARS-CoV-2 A(recLemon LPMP, S mRNA 10 µg, 20 µg 함유함) 및 LPMP/SARS-CoV-2 B(recAlgae LPMP, S mRNA 10 µg, 20 µg 함유함). 대조군은 0일 차에 EPO mRNA가 투여된, 백신접종되지 않은 햄스터였다.

도 7a 내지 도 7d는 SARS-CoV-2 접종 후 일수의 함수로서 햄스터의 체중 감소 결과를 도시한다(28일 차에, 동물 당 10^5 pfu TCID₅₀의 비강내 투여량을 통해 투여됨). 2가지 유형의 백신 제형이 상이한 투여량으로 0일 차에 투여되었다: LPMP/SARS-CoV-2 A(recLemon LPMP, S mRNA 10 µg 함유함, 도 7a; S mRNA 20 µg 함유함, 도 7b) 및 LPMP/SARS-CoV-2 B(recAlgae LPMP, S mRNA 10 µg 함유함, 도 7c; S mRNA 20 µg 함유함, 도 7d). 대조군은 0일 차에 EPO mRNA가 투여된, 백신접종되지 않은 햄스터였다.

도 8은 SARS-CoV-2 접종 후 일수의 함수로서 햄스터의 체중 감소 결과를 도시한다(28일 차에, 동물 당 10^5 pfu TCID₅₀의 비강내 투여량을 통해 투여됨). LPMP/SARS-CoV-2 A(recLemon LPMP, S mRNA 10 µg 함유함) 백신 제형을 0일 차에 투여하였다. 대조군은 0일 차에 EPO mRNA가 투여된, 백신접종되지 않은 햄스터였다.

도 9는 SARS-CoV-2 접종 후 4일 차에 햄스터 폐 내의 감염성 바이러스 입자의 결과를 도시한다(28일 차에, 동물 당 10^5 pfu TCID₅₀의 비강내 투여량을 통해 투여됨). LPMP/SARS-CoV-2 A(recLemon LPMP, S mRNA 10 µg 함유함) 백신 제형을 0일 차에 투여하였다. 대조군은 0일 차에 EPO mRNA가 투여된, 백신접종되지 않은 햄스터였다.

도 10a 및 도 10b는 SARS-CoV-2 접종 후 4일 차에 햄스터의 폐(도 10a) 및 비강 점막(도 10b) 내의 바이러스 부하의 결과를 도시한다(28일 차에, 동물 당 10^5 pfu TCID₅₀의 비강내 투여량을 통해 투여됨). LPMP/SARS-CoV-2 A(recLemon LPMP, S mRNA 10 µg 함유함) 백신 제형을 0일 차에 투여하였다. 대조군은 0일 차에 EPO mRNA가 투여된, 백신접종되지 않은 햄스터였다.

도 11a 및 도 11b는 마우스에서 LPMP/SARS-CoV-2 백신의 경구 백신접종 후 12일 차에, 마우스의 비장(도 11a) 및 마우스의 파이어르판(도 11b)에서 SARS-CoV-2의 S 항원에 대한 T 세포 반응의 결과를 도시한다. LPMP/SARS-CoV-2 A(recLemon LPMP, S mRNA 200 µg 함유함) 백신 제형을 0일 차에 투여하였다. 대조군은 PBS였다.

도 12a는 마우스에서 LPMP/SARS-CoV-2 A(recLemon LPMP, S mRNA 0.1 µg, 10 µg 함유함)의 비강내 백신접종 후 12일 차에, 마우스에서 SARS-CoV-2의 S 항원에 대한 T 세포 반응의 결과를 도시한다. 도 12b는 마우스에서 LPMP/SARS-CoV-2 A(recLemon LPMP, S mRNA 0.1 µg, 10 µg 함유함)의 비강내 백신접종 후 12일 차에, 마우스의 혈액 내 사이토카인 TNF α의 수준을 도시한다. 대조군은 PBS였다.

도 13은 마우스에게 LPMP/mRNA 루시페라아제(mRNA 5 µg 함유함)의 투여량을 정맥내 투여한 후 4시간 차에 마우스(n=2)의 방사휘도를 측정함으로써 평가되는, 일정 기간(1일, 30일, 60일)에 걸쳐 4°C에서 보관된 LPMP/mRNA 제형의 안정성을 도시한다. LPMP/mRNA 루시페라아제 A(recLemon LPMP) 및 LPMP/mRNA 루시페라아제 B(recAlgae LPMP) 제형을 평가하였다.

도 14a는 일정 기간(1일, 7일)에 걸쳐 동결건조된 LPMP/mRNA 제형 및 동결건조되지 않은 LPMP/mRNA 제형의 안정성을 도시하며, 마우스에게 LPMP/mRNA 루시페라아제(mRNA 0.2mg/kg 함유함)의 투여량을 정맥내 투여한 후 6시간 차에 마우스의 이미지를 촬영하였다. RecLemon LPMP/mRNA 루시페라아제 및 recAlage LPMP/mRNA 루시페라아제 제형을 평가하였다. 도 14b는 4℃에서 동결건조된 LPMP/mRNA 제형의 안정성을 도시하며, 마우스에게 LPMP/mRNA 루시페라아제(mRNA 0.2mg/kg 함유함)의 투여량을 정맥내 투여한 후 6시간 차에 마우스의 이미지를 촬영하였다. RecLemon LPMP/mRNA 루시페라아제 제형을 평가하였다.

도 15는 마우스에서 근육내 경로(0.4mg/kg), 비강내 경로(0.4mg/kg), 및 경구 경로(8mg/kg)를 통한 LPMP/SARS-CoV-2 제형의 투여 후, 마우스에서 SARS-CoV-2의 S 항원에 대한 면역 반응을 도시한다. LPMP/SARS-CoV-2 A(recLemon LPMP, S mRNA 함유함) 백신 제형을 0일 차에 투여하였다. 대조군은 PBS였다.

도 16a 및 도 16b는 SARS-CoV-2 감염 후 일수의 함수로서 햄스터의 체중 감소 결과를 도시한다(반응식 4 참조).

도 17은 햄스터에서 LPMP/SARS-CoV-2 백신의 근육내 백신접종 후 35일 차(SARS-CoV-2를 이용한 비강내 접종 후 7일 차)에, SARS-CoV-2 델타 균주에 대한 중화 항체 역가의 햄스터 혈청 내 수준을 도시한다. 2가지 유형의 백신 제형이 상이한 투여량으로 0일 차에 투여되었다: LPMP/SARS-CoV-2 A(recLemon LPMP, S mRNA 10 µg, 20 µg 함유함) 및 LPMP/SARS-CoV-2 B(recAlgae LPMP, S mRNA 10 µg, 20 µg 함유함). 대조군은 0일 차에 EPO mRNA가 투여된, 모의 백신접종된 햄스터였다.

도 18a 내지 도 18c는 0일 차 및 21일 차에 마우스에게 LPMP/SARS-CoV-2 백신(recLemon LPMP, S mRNA 10 µg 함유함)의 2회 근육내 백신접종 후 49일 차, 4주 차에, SARS-CoV-2 원래 균주, 델타 및 오미크론 균주에 대한 마우스의 혈액 내 중화 항체 역가의 수준을 각각 도시한다. 대조군은 1회 투여량의 완충액을 투여받은, 모의 백신접종된 마우스였다.

도 19a 내지 도 19h는 마우스에게 단일 투여량의 LPMP/SARS-CoV-2 백신(recLemon LPMP, S mRNA 10 µg 함유함)을 근육내 백신접종 후 2시간, 6시간, 24시간, 및 48시간 차에, 마우스에서 사이토카인 및 케모카인 IFN-감마, IL-12, CXCL10, TNF-알파, IL-4, IL-5, IL-13, 및 IL-10의 전신 수준을 각각 도시한다. 대조군은 0일 차에 1회 투여량의 완충액을 투여받은, 미접종된 마우스였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0099] 감염성 질환, 장애, 또는 병태(예를 들어, SARS-CoV-2 항원과 같은 코로나바이러스 항원)의 항원에 대해 강력한 중화 항체를 유도하는 핵산 백신 조성물(예를 들어, 면역화/면역원성 조성물)이 본원에 제공된다. 이들 핵산 백신 조성물은 하나 이상의 항원성 폴리펩티드를 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드(예를 들어, 전령 RNA(mRNA)와 같은 RNA)를 포함고, 천연 지질 및 이온화 가능 지질을 포함하는 지질 재구성된 식물 전령 팩(LPMP) 내에 제형화된다. 항원성 폴리펩티드는 감염성 질환, 장애, 또는 병태를 유발하는 감염원으로부터 유래한다. PMP는 식물 세포의 소포(EV), 또는 이의 분절, 부분, 또는 추출물로부터 전체적으로 또는 부분적으로 생산된 지질 조립체이다. LPMP는 지질 구조가 파괴되고 액상으로 제조되거나 재구성되는 지질 구조로부터 유래된 PMP이다.

[0100] 본 개시는 또한 핵산 백신을 제조하는 방법을 포함하며, 상기 방법은 이온화 가능 지질의 존재 하에 정제된 PMP 지질을 포함하는 막을 재구성하여 이온화 가능 지질을 포함하는 LPMP를 생산하는 단계, 및 하나 이상의 항원성 폴리펩티드-변형된 식물 전령 팩(PMP)을 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드와 함께 LPMP에 로딩하는 단계를 포함한다.

[0101] **지질 재구성된 식물 전령 팩(LPMP)**

[0102] 식물 전령 팩(PMP)

[0103] PMP는 식물 EV, 또는 이의 분절, 부분, 또는 추출물(예를 들어, 지질 추출물)을 포함하는 지질(예를 들어, 지질 이중층, 단층, 또는 다층 구조) 구조이다. 식물 EV는 식물에서 자연적으로 발생하고 직경이 약 5nm 내지 2000nm 인 밀폐된 지질-이중층 구조를 지칭한다. 식물 EV는 다양한 식물 생물발생 경로로부터 유래할 수 있다. 자연에서, 식물 EV는 식물 아포플라스트와 같은 식물의 세포내 및 세포외 구획, 원형질막 외부에 위치하고 세포벽의 연속체 및 세포외 공간에 의해 형성된 구획에서 발견될 수 있다. 대안적으로, PMP는 식물 세포로부터 분비 시 세포 배양 배지에서 발견되는 풍부한 식물 EV일 수 있다. 식물 EV는 식물로부터 분리될 수 있어 본원에서 추가로 설명되는 다양한 방법에 의해 PMP를 제공할 수 있다. 또한, PMP는 임의적으로 생체 내 또는 시험관 내 도입

될 수 있는 치료제를 포함할 수 있다.

[0104] PMP는 식물 EV, 또는 이의 분절, 부분, 또는 추출물을 포함할 수 있다. 임의적으로, PMP는 또한 식물 EV로부터 유래된 지질 이외에 외인성 지질(예를 들어, 스테롤(예를 들어, 콜레스테롤 또는 시토스테롤), 이온화 가능 지질, 및/또는 폐길화된 지질)을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 식물 EV는 직경이 약 5nm 내지 1000nm이다. 예를 들어, PMP는 평균 직경이 약 5-50nm, 약 50-100nm, 약 100-150nm, 약 150-200nm, 약 200-250nm, 약 250-300nm, 약 300-350nm, 약 350-400nm, 약 400-450nm, 약 450-500nm, 약 500-550nm, 약 550-600nm, 약 600-650nm, 약 650-700nm, 약 700-750nm, 약 750-800nm, 약 800-850nm, 약 850-900nm, 약 900-950nm, 약 950-1000nm, 약 1000-1250nm, 약 1250-1500nm, 약 1500-1750nm, 또는 약 1750-2000nm인 식물 EV, 또는 이의 분절, 부분, 또는 추출물을 포함할 수 있다. 일부 경우에, PMP는 평균 직경이 약 5-950nm, 약 5-900nm, 약 5-850nm, 약 5-800nm, 약 5-750nm, 약 5-700nm, 약 5-650nm, 약 5-600nm, 약 5-550nm, 약 5-500nm, 약 5-450nm, 약 5-400nm, 약 5-350nm, 약 5-300nm, 약 5-250nm, 약 5-200nm, 약 5-150nm, 약 5-100nm, 약 5-50nm, 또는 약 5-25nm인 식물 EV, 또는 이의 분절, 부분, 또는 추출물을 포함한다. 소정의 경우에, 식물 EV, 또는 이의 분절, 부분, 또는 추출물은 평균 직경이 약 50-200nm이다. 소정의 경우에, 식물 EV, 또는 이의 분절, 부분, 또는 추출물은 평균 직경이 약 50-300nm이다. 소정의 경우에, 식물 EV, 또는 이의 분절, 부분, 또는 추출물은 평균 직경이 약 200-500nm이다. 소정의 경우에, 식물 EV, 또는 이의 분절, 부분, 또는 추출물은 평균 직경이 약 30-150nm이다.

[0105] 일부 경우에, PMP는 평균 직경이 적어도 5nm, 적어도 50nm, 적어도 100nm, 적어도 150nm, 적어도 200nm, 적어도 250nm, 적어도 300nm, 적어도 350nm, 적어도 400nm, 적어도 450nm, 적어도 500nm, 적어도 550nm, 적어도 600nm, 적어도 650nm, 적어도 700nm, 적어도 750nm, 적어도 800nm, 적어도 850nm, 적어도 900nm, 적어도 950nm, 또는 적어도 1000nm인 식물 EV, 또는 이의 분절, 부분, 또는 추출물을 포함할 수 있다. 일부 경우에, PMP는 평균 직경이 1000nm 미만, 950nm 미만, 900nm 미만, 850nm 미만, 800nm 미만, 750nm 미만, 700nm 미만, 650nm 미만, 600nm 미만, 550nm 미만, 500nm 미만, 450nm 미만, 400nm 미만, 350nm 미만, 300nm 미만, 250nm 미만, 200nm 미만, 150nm 미만, 100nm 미만, 또는 50nm 미만인 식물 EV, 또는 이의 분절, 부분, 또는 추출물을 포함할 수 있다. 당업계의 표준인 다양한 방법(예를 들어, 동적 광 산란 방법)이 식물 EV, 또는 이의 분절, 부분 또는 추출물의 입자 직경을 측정하는 데 사용될 수 있다.

[0106] 일부 경우에, PMP는 평균 표면적이 77nm^2 내지 $3.2 \times 10^6\text{nm}^2$ (예를 들어, 77nm^2 , 100nm^2 , 1000nm^2 , 1000nm^2 , $1 \times 10^4\text{nm}^2$, $1 \times 10^4\text{nm}^2$, $1 \times 10^5\text{nm}^2$, $1 \times 10^5\text{nm}^2$, 또는 $1 \times 10^6\text{nm}^2$ 내지 $3.2 \times 10^6\text{nm}^2$)인 식물 EV, 또는 이의 분절, 부분, 또는 추출물을 포함할 수 있다. 일부 경우에, PMP는 평균 부피가 65nm^3 내지 $5.3 \times 10^8\text{nm}^3$ (예를 들어, 65nm^3 , 100nm^3 , 1000nm^3 , 1000nm^3 , $1 \times 10^4\text{nm}^3$, $1 \times 10^4\text{nm}^3$, $1 \times 10^5\text{nm}^3$, $1 \times 10^5\text{nm}^3$, $1 \times 10^6\text{nm}^3$, $1 \times 10^6\text{nm}^3$, $1 \times 10^7\text{nm}^3$, $1 \times 10^7\text{nm}^3$, $1 \times 10^8\text{nm}^3$, $1 \times 10^8\text{nm}^3$, 또는 $5.3 \times 10^8\text{nm}^3$)인 식물 EV, 또는 이의 분절, 부분, 또는 추출물을 포함할 수 있다. 일부 경우에, PMP는 평균 표면적이 적어도 77nm^2 (예를 들어, 적어도 77nm^2 , 적어도 100nm^2 , 적어도 1000nm^2 , 적어도 $1 \times 10^4\text{nm}^2$, 적어도 $1 \times 10^5\text{nm}^2$, 적어도 $1 \times 10^6\text{nm}^2$, 또는 적어도 $2 \times 10^6\text{nm}^2$)인 식물 EV, 또는 이의 분절, 부분, 또는 추출물을 포함할 수 있다. 일부 경우에, PMP는 평균 부피가 적어도 65nm^3 (예를 들어, 적어도 65nm^3 , 적어도 100nm^3 , 적어도 1000nm^3 , 적어도 $1 \times 10^4\text{nm}^3$, 적어도 $1 \times 10^5\text{nm}^3$, 적어도 $1 \times 10^6\text{nm}^3$, 적어도 $1 \times 10^7\text{nm}^3$, 적어도 $1 \times 10^8\text{nm}^3$, 적어도 $2 \times 10^8\text{nm}^3$, 적어도 $3 \times 10^8\text{nm}^3$, 적어도 $4 \times 10^8\text{nm}^3$, 또는 적어도 $5 \times 10^8\text{nm}^3$)인 식물 EV, 또는 이의 분절, 부분, 또는 추출물을 포함할 수 있다.

[0107] 일부 경우에, PMP는 식물 EV, 또는 이의 분절, 추출물, 또는 부분과 동일한 크기를 가질 수 있다. 대안적으로, PMP는 PMP가 생산되는 초기 식물 EV와 상이한 크기를 가질 수 있다. 예를 들어, PMP는 직경이 약 5-2000nm인 직경을 가질 수 있다. 예를 들어, PMP는 평균이 직경이 약 5-50nm, 약 50-100nm, 약 100-150nm, 약 150-200nm, 약 200-250nm, 약 250-300nm, 약 300-350nm, 약 350-400nm, 약 400-450nm, 약 450-500nm, 약 500-550nm, 약 550-600nm, 약 600-650nm, 약 650-700nm, 약 700-750nm, 약 750-800nm, 약 800-850nm, 약 850-900nm, 약 900-950nm, 약 950-1000nm, 약 1000-1200nm, 약 1200-1400nm, 약 1400-1600nm, 약 1600-1800nm, 또는 약 1800-2000nm일 수 있다. 일부 경우에, PMP는 평균 직경이 적어도 5nm, 적어도 50nm, 적어도 100nm, 적어도 150nm, 적어도 200nm, 적어도 250nm, 적어도 300nm, 적어도 350nm, 적어도 400nm, 적어도 450nm, 적어도 500nm, 적어도 550nm, 적어도 600nm, 적어도 650nm, 적어도 700nm, 적어도 750nm, 적어도 800nm, 적어도 850nm, 적어도 900nm, 적어도 950nm, 적어도 1000nm, 적어도 1200nm, 적어도 1400nm, 적어도 1600nm, 적어도

1800nm, 또는 약 2000nm일 수 있다. 당업계의 표준인 다양한 방법(예를 들어, 동적 광 산란 방법)이 PMP의 입자 직경을 측정하는 데 사용될 수 있다. 일부 경우에, PMP의 크기는 치료제를 로딩한 후, 또는 PMP에 다른 변형이 이루어진 후에 결정된다.

[0108] 일부 경우에, PMP는 77nm^2 내지 $1.3 \times 10^7 \text{nm}^2$ (예를 들어, $77\text{~}100\text{nm}^2$, $100\text{~}1000\text{nm}^2$, $1000\text{~}1 \times 10^4 \text{nm}^2$, $1 \times 10^4\text{~}1 \times 10^5 \text{nm}^2$, $1 \times 10^5\text{~}1 \times 10^6 \text{nm}^2$, 또는 $1 \times 10^6\text{~}1.3 \times 10^7 \text{nm}^2$)의 표면적을 가질 수 있다. 일부 경우에, PMP는 65nm^3 내지 $4.2 \times 10^9 \text{nm}^3$ (예를 들어, $65\text{~}100\text{nm}^3$, $100\text{~}1000\text{nm}^3$, $1000\text{~}1 \times 10^4 \text{nm}^3$, $1 \times 10^4\text{~}1 \times 10^5 \text{nm}^3$, $1 \times 10^5\text{~}1 \times 10^6 \text{nm}^3$, $1 \times 10^6\text{~}1 \times 10^7 \text{nm}^3$, $1 \times 10^7\text{~}1 \times 10^8 \text{nm}^3$, $1 \times 10^8\text{~}1 \times 10^9 \text{nm}^3$, 또는 $1 \times 10^9\text{~}4.2 \times 10^9 \text{nm}^3$)의 평균 부피를 가질 수 있다. 일부 경우에, PMP는 적어도 77nm^2 (예를 들어, 적어도 77nm^2 , 적어도 100nm^2 , 적어도 1000nm^2 , 적어도 $1 \times 10^4 \text{nm}^2$, 적어도 $1 \times 10^5 \text{nm}^2$, 적어도 $1 \times 10^6 \text{nm}^2$, 또는 적어도 $1 \times 10^7 \text{nm}^2$)의 평균 표면적을 갖는다. 일부 경우에, PMP는 적어도 65nm^3 (예를 들어, 적어도 65nm^3 , 적어도 100nm^3 , 적어도 1000nm^3 , 적어도 $1 \times 10^4 \text{nm}^3$, 적어도 $1 \times 10^5 \text{nm}^3$, 적어도 $1 \times 10^6 \text{nm}^3$, 적어도 $1 \times 10^7 \text{nm}^3$, 적어도 $1 \times 10^8 \text{nm}^3$, 적어도 $1 \times 10^9 \text{nm}^3$, 적어도 $2 \times 10^9 \text{nm}^3$, 적어도 $3 \times 10^9 \text{nm}^3$, 또는 적어도 $4 \times 10^9 \text{nm}^3$)의 평균 부피를 갖는다.

[0109] 일부 경우에, PMP는 온전한 식물 EV를 포함할 수 있다. 대안적으로, PMP는 식물 EV의 소포의 전체 표면적의 분절, 부분, 또는 추출물(예를 들어, 소포의 전체 표면적의 100% 미만(예를 들어, 90% 미만, 80% 미만, 70% 미만, 60% 미만, 50% 미만, 40% 미만, 30% 미만, 20% 미만, 10% 미만, 10% 미만, 5% 미만, 또는 1% 미만)을 포함하는 분절, 부분, 또는 추출물)을 포함할 수 있다. 분절, 부분, 또는 추출물은 원주형 분절, 구형 분절(예를 들어, 반구형), 곡선형 분절, 선형 분절, 또는 평평한 분절과 같은 임의의 형상일 수 있다. 분절이 소포의 구형 분절인 경우, 구형 분절은 한 쌍의 평행선을 따라 구형 소포를 분할함으로써 발생하는 것, 또는 한 쌍의 비평행선을 따라 구형 소포를 분할함으로써 발생하는 것을 나타낼 수 있다. 따라서, 복수의 PMP는 복수의 온전한 식물 EV, 복수의 식물 EV 분절, 부분, 또는 추출물, 또는 온전한 식물 EV와 식물 EV의 분절의 혼합물을 포함할 수 있다. 당업자는 온전한 식물 EV 대 분할된 식물 EV의 비가 사용된 특정 분리 방법에 따라 달라질 것임을 이해할 것이다. 예를 들어, 식물 또는 이의 일부를 분쇄하거나 배합하는 것은 진공 침윤과 같은 비파괴적인 추출 방법보다 높은 백분율의 식물 EV 분절, 부분, 또는 추출물을 함유하는 PMP를 생산할 수 있다.

[0110] PMP가 식물 EV의 분절, 부분, 또는 추출물을 포함하는 경우, EV 분절, 부분, 또는 추출물은 온전한 소포의 평균 표면적보다 작은 평균 표면적, 예를 들어, 77nm^2 , 100nm^2 , 1000nm^2 , $1 \times 10^4 \text{nm}^2$, $1 \times 10^5 \text{nm}^2$, $1 \times 10^6 \text{nm}^2$, 또는 $3.2 \times 10^6 \text{nm}^2$ 미만의 평균 표면적을 가질 수 있다. 일부 경우에, EV 분절, 부분, 또는 추출물은 70nm^2 , 60nm^2 , 50nm^2 , 40nm^2 , 30nm^2 , 20nm^2 , 또는 10nm^2 미만의 표면적을 갖는다. 일부 경우에, PMP는 온전한 소포의 평균 부피보다 작은 평균 부피, 예를 들어, 65nm^3 , 100nm^3 , 1000nm^3 , $1 \times 10^4 \text{nm}^3$, $1 \times 10^5 \text{nm}^3$, $1 \times 10^6 \text{nm}^3$, $1 \times 10^7 \text{nm}^3$, $1 \times 10^8 \text{nm}^3$, 또는 $5.3 \times 10^8 \text{nm}^3$ 미만의 평균 부피를 갖는 식물 EV, 또는 이의 분절, 부분, 또는 추출물을 포함할 수 있다.

[0111] PMP가 식물 EV의 추출물을 포함하는 경우, 예를 들어, PMP가 식물 EV로부터 (예를 들어, 클로로포름으로) 추출된 지질을 포함하는 경우, PMP는 적어도 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 또는 99% 초과와 식물 EV로부터 (예를 들어, 클로로포름으로) 추출된 지질을 포함할 수 있다. 복수의 PMP는 식물 EV 분절 및/또는 식물 EV-추출 지질 또는 이들의 혼합물을 포함할 수 있다.

[0112] PMP의 생산

[0113] PMP는 식물 조직 또는 식물 세포를 포함하여 식물 또는 이의 부분에서 자연적으로 발생하는 식물 EV, 또는 이의 분절, 부분, 또는 추출물(예를 들어, 지질 추출물)로부터 생산될 수 있다. PMP를 생산하기 위한 예시적인 방법은 다음을 포함한다: (a) 식물 또는 이의 일부로부터 초기 시료를 제공하는 단계로서, 여기서 식물 또는 이의 일부는 EV를 포함하는, 단계; 및 (b) 초기 시료로부터 미정제 PMP 분획을 분리하는 단계로서, 여기서 미정제 PMP 분획은 초기 시료의 수준에 비해 식물 또는 이의 일부로부터 유래한 적어도 하나의 오염물 또는 원치 않는 성분의 수준이 감소된, 단계. 상기 방법은 다음을 포함하는 추가 단계를 추가로 포함할 수 있다: (c) 미정제 PMP 분획을 정제하여 복수의 순수 PMP를 생산하는 단계로서, 여기서 복수의 순수 PMP는 미정제 EV 분획의 수준에 비해 식물 또는 이의 일부로부터 유래한 적어도 하나의 오염물 또는 원치 않는 성분의 수준이 감소된, 단계. 각각의 생산 단계는 이하에서 더욱 상세히 논의된다. PMP의 분리 및 정제에 관한 예시적인 방법은, 예를 들어, Rutter 및 Innes의 문헌[*Plant Physiol.* 173(1): 728-741, 2017]; Rutter 등의 문헌[*Bio. Protoc.* 7(17):

e2533, 2017]; Regente 등의 문헌[*J of Exp. Biol.* 68(20): 5485~5496, 2017]; Mu 등의 문헌[Mol. Nutr. Food Res., 58, 1561~1573, 2014], 및 Regente 등의 문헌[*FEBS Letters*, 583: 3363-3366, 2009]에서 확인되며, 동 문헌의 각각은 본원에 참조로서 통합된다.

[0114] 일부 경우에, 복수의 PMP는 다음의 단계를 포함하는 공정에 의해 식물로부터 단리될 수 있다: (a) 식물 또는 이의 일부로부터 초기 시료를 제공하는 단계로서, 여기서 식물 또는 이의 일부는 EV를 포함하는, 단계; 및 (b) 초기 시료로부터 미정제 PMP 분획을 단리하는 단계로서, 여기서 미정제 PMP 분획은 초기 시료의 수준에 비해 식물 또는 이의 일부로부터 유래한 적어도 하나의 오염물 또는 원치 않는 성분의 수준(예를 들어, 적어도 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 98%, 99%, 또는 100% 만큼 감소된 수준)이 감소된, 단계; 및 (c) 미정제 PMP 분획을 정제하여 복수의 순수 PMP를 생산하는 단계로서, 여기서 복수의 순수 PMP는 미정제 EV 분획의 수준에 비해 식물 또는 이의 일부로부터 유래한 적어도 하나의 오염물 또는 원치 않는 성분의 수준(예를 들어, 적어도 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 98%, 99%, 또는 100% 만큼 감소된 수준)이 감소된, 단계.

[0115] PMP는 다양한 식물로부터 생산된 식물 EV, 또는 이의 분절, 부분, 또는 추출물을 포함할 수 있다. PMP는 속씨식물(외떡잎 식물 및 쌍떡잎 식물), 겉씨식물, 양치류, 부처손속, 속새류, 고생솔잎난류, 석송, 조류(예를 들어, 단세포 또는 다세포, 예를 들어, 고세균), 또는 이끼류를 포함하지만 이에 한정되지 않는 임의의 속의 식물(혈관 또는 비혈관)로부터 생산될 수 있다. 소정의 경우에, PMP는 혈관 식물, 예를 들어 외떡잎 식물 또는 쌍떡잎 식물 또는 겉씨식물을 사용하여 생산될 수 있다. 예를 들어, PMP는 다음을 사용하여 생산될 수 있다: 알팔파, 사과, 애기장대, 바나나, 보리, 유채속 종(예를 들어, 애기장대 또는 유채식물), 카놀라, 피마자씨, 치커리, 국화, 클로버, 코코아, 커피, 목화, 목화씨, 옥수수, 겨자과 식물, 크랜베리, 오이, 덴드로븀, 구갑룡, 유갑딤투스, 패스큐류, 아마, 글라디올러스, 백합과, 아마씨, 조, 머스크멜론, 겨자, 귀리, 기름야자나무, 지방종자, 파파야, 땅콩, 파인애플, 관상용 식물, 강낭콩속, 감자, 유채, 쌀, 호밀, 라이그라스류, 잇꽃, 참깨, 수수, 대두, 사탕무, 사탕수수, 해바라기, 딸기, 담배, 토마토, 잔디풀, 밀 또는 채소 작물 예컨대 상추, 셀러리, 브로콜리, 컬리플라워, 박과; 과일 및 견과류 나무, 예컨대 사과, 배, 복숭아, 오렌지, 자몽, 레몬, 라임, 아몬드, 피칸, 호두, 개암나무; 덩굴 식물, 예컨대 포도, 키위, 홉; 과일 관목 및 가시덤불, 예컨대 라즈베리, 블랙베리, 구스베리; 삼림수, 예컨대 물푸레나무, 소나무, 전나무, 단풍나무, 오크나무, 밤나무, 포플러나무; 및 알팔파, 카놀라, 피마자씨, 옥수수, 목화, 겨자과 식물, 아마, 아마씨, 겨자과 식물, 기름야자나무, 지방종자, 땅콩, 감자, 쌀, 잇꽃, 참깨, 대두, 사탕무, 해바라기, 담배, 토마토, 또는 밀.

[0116] PMP는 전체 식물(예를 들어, 전체 로제트 또는 묘목)을 사용하여 또는 대안적으로 하나 이상의 식물 부분(예를 들어, 잎, 씨앗, 뿌리, 과일, 식물, 수분, 체관부 수액, 또는 목질부 수액)으로부터 생산될 수 있다. 예를 들어, PMP는 새싹 식물 기관/구조(예를 들어, 잎, 줄기, 또는 관), 뿌리, 꽃, 및 꽃 기관/구조(예를 들어, 수분, 포, 꽃받침, 꽃잎, 수술, 심피, 꽃밥, 또는 밀씨), 씨앗(배아, 배젖, 또는 종피 포함함), 과일(원숙한 씨방), 수액(예를 들어, 체관부 수액 또는 목질부 수액), 식물 조직(예를 들어, 혈관 조직, 접지 조직, 조양 조직 등), 및 세포(예를 들어, 단일 세포, 원형질체, 배아, 캘러스 조직, 공변 세포, 알세포 등), 또는 이의 자손을 사용하여 생산될 수 있다. 예를 들어, 단리 단계는 (a) 식물 또는 이의 일부를 제공하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 예에서, 식물 부분은 애기장대 잎이다. 식물은 임의의 발달 단계에 있을 수 있다. 예를 들어, PMP는 묘목, 예를 들어, 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 7주, 또는 8주령 묘목(예를 들어, 애기장대 묘목)을 사용하여 생산될 수 있다. 다른 예시적인 PMP는 뿌리(예를 들어, 생강 뿌리), 과일 주스(예를 들어, 자몽 주스), 야채(예를 들어, 브로콜리), 수분(예를 들어, 올리브 수분), 체관부 수액(예를 들어, 애기장대 체관부 수액), 또는 목질부 수액(예를 들어, 토마토 식물 목질부 수액)을 사용하여 생산된 PMP를 포함할 수 있다.

[0117] 일부 구현예에서, PMP는 조류 또는 레몬으로부터 생산된다.

[0118] PMP는 다양한 방법에 의해 식물 또는 이의 일부를 사용하여 생산될 수 있다. 식물의 EV 함유 발포성 분획, 또는 분비된 EV(예를 들어, 세포 배양 배지)를 포함하는 PMP를 함유하는 다른 세포의 분획의 방출을 허용하는 임의의 방법이 본 방법에 적합하다. EV는 파괴적인 방법(예를 들어, 식물 또는 임의의 식물 부분의 분쇄 또는 배합) 또는 비파괴적인 방법(식물 또는 임의의 식물 부분의 세척 또는 진공 침윤)에 의해 식물 또는 식물 부분으로부터 분리될 수 있다. 예를 들어, 식물 또는 이의 일부는 진공 침윤, 분쇄, 배합되거나, 이들의 조합이 되어 식물 또는 식물 부분으로부터 EV를 단리하여 PMP를 생산할 수 있다. 예를 들어, 단리 단계는 (예를 들어, 소포 단리 완충액으로) 식물을 진공 침윤시켜, 발포성 분획을 방출하고 수집하는 단계를 포함할 수 있다. 대안적으로, 단리 단계는 EV를 방출하여 PMP를 생산하기 위해 식물을 분쇄하거나 배합하는 단계를 포함할 수 있다.

- [0119] 식물 EV를 단리하여 PMP를 생산할 때, PMP는 분리되거나 미정제 PMP 분획(예를 들어, 발포성 분획) 내로 수집될 수 있다. 예를 들어, 분리 단계는 원심분리(예를 들어, 차동 원심분리 또는 초원심분리) 및/또는 여과를 사용하여 복수의 PMP를 미정제 PMP 분획으로 분리하여 식물 조직 부스러기 또는 식물 세포를 포함하는 큰 오염물로부터 식물 PMP-함유 분획을 분리하는 단계를 포함할 수 있다. 이와 같이, 미정제 PMP 분획은 식물 또는 식물 부분으로부터의 초기 시료와 비교하여, 식물 조직 부스러기 또는 식물 세포를 포함하는 큰 오염물의 수가 감소될 것이다. 사용된 방법에 따라, 미정제 PMP 분획은 식물 또는 식물 부분으로부터의 초기 시료와 비교하여 감소된 수준의 식물 세포 소기관(예를 들어, 핵, 미토콘드리아, 또는 엽록체)을 추가로 포함할 수 있다.
- [0120] 일부 경우에, 단리 단계는 원심분리(예를 들어, 차동 원심분리 또는 초원심분리) 및/또는 여과를 사용하여 복수의 PMP를 미정제 PMP 분획으로 분리하여 식물 세포 또는 세포 부스러기로부터 PMP-함유 분획을 분리하는 단계를 포함할 수 있다. 이러한 경우에, 미정제 PMP 분획은 공급원 식물 또는 식물 부분으로부터의 초기 시료와 비교하여 식물 세포 또는 세포 부스러기의 수가 감소될 것이다.
- [0121] 미정제 PMP 분획은 추가적인 정제 방법에 의해 추가로 정제되어 복수의 순수 PMP를 생성할 수 있다. 예를 들어, 미정제 PMP 분획은, 예를 들어 밀도 구배(요오드산올 또는 수크로오스)를 사용하는 초원심분리 및/또는 응집된 성분을 제거하기 위한 다른 접근법(예를 들어, 침전 또는 크기 배제 크로마토그래피)의 사용에 의해 다른 식물 성분으로부터 분리될 수 있다. 생성된 순수 PMP는 이전의 분리 단계 동안 생성된 하나 이상의 분획에 비해 또는 미리 설정된 임계 수준, 예를 들어 상업용 출시 사양에 비해 공급원 식물로부터의 오염물 또는 다른 원치 않는 성분(예를 들어, 하나 이상의 비-PMP 성분, 예컨대 단백질 응집체, 핵산 응집체, 단백질-핵산 응집체, 유리 지단백질, 지질-단백질 구조, 핵, 세포 벽 성분, 세포 소기관, 또는 이들의 조합)의 수준이 감소할 수 있다. 예를 들어, 순수 PMP는 초기 시료의 수준에 비해 식물 소기관 또는 세포 벽 성분의 수준(예를 들어, 약 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 또는 100% 초과 만큼; 또는 약 2배, 4배, 5배, 10배, 20배, 25배, 50배, 75배, 100배, 또는 100배 초과 만큼)이 감소할 수 있다. 일부 경우에, 순수 PMP는 하나 이상의 비-PMP 성분, 예컨대 단백질 응집체, 핵산 응집체, 단백질-핵산 응집체, 유리 지단백질, 지질-단백질 구조, 핵, 세포 벽 성분, 세포 소기관, 또는 이들의 조합이 실질적으로 없다(예를 들어, 검출 불가능한 수준임). PMP는 농도가, 예를 들어, 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} , 2×10^{11} , 3×10^{11} , 4×10^{11} , 5×10^{11} , 6×10^{11} , 7×10^{11} , 8×10^{11} , 9×10^{11} , 1×10^{12} , 2×10^{12} , 3×10^{12} , 4×10^{12} , 5×10^{12} , 6×10^{12} , 7×10^{12} , 8×10^{12} , 9×10^{12} , 1×10^{13} , 또는 1×10^{13} PMPs/mL 초과일 수 있다.
- [0122] 예를 들어, PMP로부터 단백질 응집체가 제거될 수 있다. 예를 들어, PMP는 용액 중 단백질 응집체를 침전시키기 위해 (예를 들어, pH 프로브를 사용하여 측정했을 때) 다양한 pH로 취해질 수 있다. pH는, 예를 들어 수산화나트륨 또는 염산을 첨가하여, 예를 들어, pH 3, pH 5, pH 7, pH 9, 또는 pH 11로 조정될 수 있다. 용액이 명시된 pH에 도달하면, 이를 여과하여 미립자를 제거할 수 있다. 대안적으로, PMP는 Polymin-P 또는 Praestol 2640과 같은 하전된 중합체의 첨가를 통해 응집될 수 있다. 간략하게, Polymin-P 또는 Praestol 2640을 용액에 첨가하고 임펠러로 혼합한다. 그런 다음, 용액을 여과하여 미립자를 제거할 수 있다. 대안적으로, 응집체는 염 농도를 증가시킴으로써 가용화될 수 있다. 예를 들어, NaCl은, 예를 들어 1mol/L가 될 때까지 PMP에 첨가될 수 있다. 그런 다음, 용액을 여과하여 PMP를 단리할 수 있다. 대안적으로, 응집체는 온도를 증가시킴으로써 가용화된다. 예를 들어, PMP는 용액이 5분 동안, 예를 들어 50°C의 균일한 온도에 도달할 때까지 혼합 하에 가열될 수 있다. 그런 다음, PMP 혼합물을 여과하여 PMP를 단리할 수 있다. 대안적으로, PMP 용액으로부터의 가용성 오염물은 표준 절차에 따라 크기 배제 크로마토그래피 컬럼에 의해 분리될 수 있으며, 여기서 PMP는 제1 분획에서 용리되는 반면, 단백질 및 리보핵단백질 및 일부 지단백질은 나중에 용리된다. 단백질 응집체 제거의 효율은 BCA/Bradford 단백질 정량화를 통해 단백질 응집체의 제거 전후 단백질 농도를 측정하고 비교함으로써 결정될 수 있다.
- [0123] 본원에 기술된 임의의 생산 방법은 당업계에 공지된 임의의 정량적 또는 정성적 방법으로 보충되어 생산 공정의 임의의 단계에서 PMP를 특성화하거나 식별할 수 있다. PMP는 다양한 분석 방법에 의해 특성화되어 PMP 수율, PMP 농도, PMP 순도, PMP 조성, 또는 PMP 크기를 추정할 수 있다. PMP는 PMP의 시각화, 정량화, 또는 정성적 특성화(예를 들어, 조성물의 식별)를 가능하게 하는 당업계에 공지된 다수의 방법, 예컨대 현미경(예를 들어, 투과 전자 현미경), 동적 광 산란, 나노입자 추적, 분광법(예를 들어, 푸리에 변환 적외선 분석), 또는 질량 분광 분석(단백질 및 지질 분석)에 의해 평가될 수 있다. 소정의 경우에, 방법(예를 들어, 질량 분광법)은 부록에 개시된 마커와 같이 PMP 상에 존재하는 식물 EV 마커를 식별하는 데 사용될 수 있다. PMP 분획의 분석 및 특성화를 돕기 위해, PMP는 추가로 표지되거나 염색될 수 있다. 예를 들어, PMP는 3,3'-디핵실옥사카르보시아닌 요오

트화물(DIOC₆), 형광 친유성 염료, PKH67(Sigma Aldrich); Alexa Fluor® 488(Thermo Fisher Scientific), 또는 DyLight™ 800(Thermo Fisher)으로 염색될 수 있다. 정교한 형태의 나노입자 추적이 없는 경우, 이러한 비교적 간단한 접근법은 총 막 함량을 정량화하고 PMP의 농도를 간접적으로 측정하는 데 사용될 수 있다(Rutter 및 Innes의 문헌[*Plant Physiol.* 173(1): 728-741, 2017]; Rutter 등의 문헌[*Bio. Protoc.* 7(17): e2533, 2017]) 보다 정확한 측정을 위해, 그리고 PMP의 크기 분포를 평가하기 위해, 나노입자 추적이 사용될 수 있다.

[0124] 생산 공정 동안, PMP는 임의적으로 PMP가 대조군 또는 초기 시료의 EV 수준에 비해 증가된 농도(예를 들어, 약 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 또는 100% 초과 만큼; 또는 약 2배, 4배, 5배, 10배, 20배, 25배, 50배, 75배, 100배, 또는 100배 초과 만큼)이도록 제조될 수 있다. PMP는 PMP 조성물의 약 0.1% 내지 약 100%, 예컨대 약 0.01% 내지 약 100%, 약 1% 내지 약 99.9%, 약 0.1% 내지 약 10%, 약 1% 내지 약 25%, 약 10% 내지 약 50%, 약 50% 내지 약 99%, 또는 약 75% 내지 약 100% 중 어느 하나로 PMP를 구성할 수 있다. 일부 경우에, 조성물은, (예를 들어, 형광 표지된 지질을 측정함으로써) 예를 들어, wt/vol, PMP 단백질 조성물 백분율, 및/또는 지질 조성물 백분율에 의해 측정됐을 때, 0.1%, 0.5%, 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 그 이상의 PMP 중 적어도 하나를 포함한다. 일부 경우에, 농축된 제제는 상업적 생성물로서 사용되며, 예를 들어, 최종 사용자는 실질적으로 낮은 농도의 활성 성분을 갖는 희석제를 사용할 수 있다. 일부 구현예에서, 조성물은 농업용 농축 제형, 예를 들어 초저 부피 농축 제형으로서 제형화된다.

[0125] 지질 재구성된 식물 전령 팩(LPMP)

[0126] 지질 재구성된 PMP(LPMP)가 본원에서 사용된다. LPMP는 식물 공급원으로부터 유래(예를 들어, 이로부터 농축, 단리, 또는 정제)된 지질 구조(예를 들어, 지질 이중층, 단층 구조, 다층 구조; 예를 들어, 소포성 지질 구조)로부터 유래된 PMP를 지칭하되, 지질 구조는 파괴(예를 들어, 지질 추출에 의해 파괴됨)되고, 표준 방법을 사용하여 액상(예를 들어, 카르고를 함유하는 액상)에서 재조합되거나 재구성, 예를 들어, 지질 막 수화 및/또는 용매 주입을 포함하는 방법에 의해 재구성되어 본원에 기술된 바와 같은 LPMP를 생산한다. 상기 방법은, 원하는 경우, 초음파 처리, 동결/해동 처리, 및/또는 지질 압출을 추가로 포함하여, 예를 들어, 재구성된 PMP의 크기를 감소시킬 수 있다. 대안적으로, LPMP는 미세유체 장치(예컨대 NanoAssemblr® IGNITE™ 미세유체 기기 (Precision NanoSystems))를 사용하여 생산될 수 있다.

[0127] 일부 구현예에서, LPMP는 다음 단계를 포함하는 공정에 의해 생산된다: (a) 복수의 정제된 PMP(예를 들어, 본원의 섹션 IA에 기술된 바와 같이 정제된 PMP)를 제공하는 단계; (b) 복수의 PMP를 처리하여 지질 막을 생성하는 단계; (c) 유기 용매 또는 용매 조합으로 지질 막을 재구성하여 지질 용액을 생성하는 단계; 및 (d) 수성 상을 포함하는 미세유체 장치에서 단계 (c)의 지질 용액을 처리하여 LPMP를 생산하는 단계.

[0128] 일부 경우에, 복수의 PMP를 처리하여 지질 막을 제조하는 단계는 복수의 PMP로부터 지질을 추출하는 단계, 예를 들어, Bligh-Dyer 방법(Bligh 및 Dyer의 문헌[*J Biolchem Physiol.* 37: 911-917, 1959])을 사용하여 지질을 추출하는 단계를 포함한다. 추출된 지질은 스탁 용액, 예를 들어 클로로포름:메탄올 중 용액으로서 제공될 수 있다. 지질 막을 생성하는 단계는, 예를 들어 불활성 가스(예를 들어, 질소) 스트림으로 용매를 증발시키는 것을 포함할 수 있다.

[0129] 천연 지질

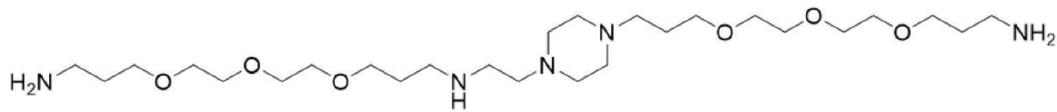
[0130] LPMP는 식물 공급원(예를 들어, 레몬 또는 조류)으로부터의 지질 구조로부터 유래된 10% 내지 100%의 지질을 포함할 수 있고, 예를 들어, 식물 공급원으로부터의 지질 구조로부터 유래된 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 100%의 지질을 함유할 수 있다. LPMP는 식물 공급원(예를 들어, 레몬 또는 조류)으로부터의 지질 구조에 존재하는 지질 종의 전부 또는 분획을 포함할 수 있으며, 예를 들어, 식물 공급원으로부터의 지질 구조에 존재하는 지질 종의 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 100%를 함유할 수 있다. LPMP는 식물 공급원(예를 들어, 레몬 또는 조류)으로부터의 지질 구조에 존재하는 단백질 종을 전혀 포함하지 않거나, 이의 분획 또는 전부를 포함할 수 있고, 예를 들어, 식물 공급원(예를 들어, 레몬 또는 조류)으로부터의 지질 구조에 존재하는 단백질 종의 0%, 1% 미만, 5% 미만, 10% 미만, 15% 미만, 20% 미만, 30% 미만, 40% 미만, 50% 미만, 60% 미만, 70% 미만, 80% 미만, 90% 미만, 100% 미만, 또는 100%를 함유할 수 있다. 일부 경우에, LPMP의 지질 이중층은 단백질을 함유하지 않는다. 일부 경우에, LPMP의 지질 구조는 식물 공급원으로부터의 지질 구조에 비해 감소된 양의 단백질을 함유한다.

- [0131] 일부 구현예에서, LPMP의 천연 지질은 레몬 또는 조류로부터 추출된다.
- [0132] 외인성 지질
- [0133] LPMP는 변형되어 미변형된 LPMP에 비해 세포 흡수(예를 들어, 동물 세포 흡수(예를 들어, 포유동물 세포 흡수, 예를 들어, 인간 세포 흡수) 식물 세포 흡수, 박테리아 세포 흡수, 또는 진균 세포 흡수)를 증가시킬 수 있는 이중 제제(예를 들어, 세포 투과제)를 포함할 수 있다. 예를 들어, 변형된 LPMP는 이온화 가능 지질과 같은 식물 세포 투과제를 포함(예를 들어, 이와 로딩, 예를 들어 캡슐화하거나 이에 접합됨)하거나, 이와 함께 제형화(예를 들어, 이를 포함하는 용액에 현탁되거나 재현탁됨)될 수 있다. 변형된 LPMP 각각은 적어도 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 90% 초과 이온화 가능 지질을 포함할 수 있다.
- [0134] LPMP는 하나 이상의 외인성 지질, 예를 들어, 식물에 외인성인 지질(예를 들어, LPMP가 생산되는 식물 또는 식물 부분이 아닌 공급원으로부터 유래함)을 포함할 수 있다. LPMP의 지질 조성물은 0%, 1% 미만, 또는 적어도 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 95% 초과 외인성 지질을 포함할 수 있다. 일부 예에서, 외인성 지질(예를 들어, 이온화 가능 지질)을 제제 중 총 지질의 25% 또는 40%(w/w)의 양으로 첨가한다. 일부 예에서, 외인성 지질은 단계 (b) 이전에 제제에 첨가, 예를 들어 단계 (b) 이전에 추출된 PMP 지질과 혼합된다.
- [0135] 예시적인 외인성 지질은 이온화 가능 지질을 포함한다.
- [0136] 또한 외인성 지질은 양이온성 지질을 포함할 수 있다.
- [0137] 일부 경우에, 외인성 지질은 다음으로부터 선택된 이온화 가능 지질 또는 양이온성 지질일 수 있다: 1,1'-((2-(4-(2-((2-(비스(2-히드록시도데실)아미노)에틸)(2-히드록시도데실)아미노)에틸)피페라진-1-일)에틸)아자네디일)비스(도데칸-2-올)(C12-200), DLin-MC3-DMA(MC3), 디올레오일-3-트리메틸암모늄 프로판(DODAP), DC-콜레스테롤, DOTAP, 에틸 PC, GL67, DLin-KC2-DMA(KC2), MD1(cKK-E12), OF2, EPC, ZA3-Ep10, TT3, LP01, 5A2-SC8, 지질 5(Moderna), 양이온성 스펀아미드 아미노 지질, 양친매성 양성이온성 아미노 지질, DODAC, DOBAQ, YSK05, DOBAT, DOBAQ, DOPAT, DOMPAQ, DOAAQ, DMAP-BLP, DLinDMA, DODMA, DOTMA, DSDMA, DOSPA, DODAC, DOBAQ, DMRIE, DOTAP-콜레스테롤, GL67A, 및 98N12-5 또는 이들의 조합.
- [0138] 일부 구현예에서, 외인성 지질은 다음으로부터 선택된 이온화 가능 지질 또는 양이온성 지질일 수 있다: C12-200, MC3, DODAP, DC-콜레스테롤, DOTAP, 에틸 PC, GL67, KC2, MD1, OF2, EPC, ZA3-Ep10, TT3, LP01, 5A2-SC8, 지질 5(Moderna), 양이온성 스펀아미드 아미노 지질, 및 양친매성 양성이온성 아미노 지질, 또는 이들의 조합. 일부 구현예에서, 이온화 가능 지질은 C12-200, MC3, DODAP, 및 DC-콜레스테롤, 또는 이들의 조합으로부터 선택된다. 일부 경우에, 이온화 가능 지질은 이온화 가능 지질이다. 일부 구현예에서, 이온화 가능 지질은 1,1'-((2-(4-(2-((2-(비스(2-히드록시도데실)아미노)에틸)(2-히드록시도데실)아미노)에틸)피페라진-1-일)에틸)아자네디일)비스(도데칸-2-올)(C12-200) 또는 (6Z,9Z,28Z,31Z)-헵타트리아콘타-6,9,28,31-테트라엔-19-일 4-(디메틸아미노)부타노에이트, DLin-MC3-DMA(MC3)이다. 일부 경우에, 외인성 지질은 양이온성 지질이다. 일부 구현예에서, 양이온성 지질은 DC-콜레스테롤 또는 디올레오일-3-트리메틸암모늄 프로판(DOTAP)이다.
- [0139] 일부 경우에, LPMP는 적어도 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 90% 초과 이온화 가능 지질을 포함한다.
- [0140] 일부 경우에, LPMP는 적어도 0.1%, 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 또는 90% 초과 이온화 가능 지질, 예를 들어 1%~10%, 10%~20%, 20%~30%, 30%~40%, 40%~50%, 50%~60%, 60%~70%, 70%~80%, 또는 80%~90%의 이온화 가능 지질, 예를 들어 약 30%~75%의 이온화 가능 지질(예를 들어, 약 30%~75%의 이온화 가능 지질)의 물비를 포함한다. 일부 구현예에서, LPMP는 25% C12-200을 포함한다. 일부 구현예에서, LPMP는 35% C12-200의 물비를 포함한다. 일부 구현예에서, LPMP는 50% C12-200의 물비를 포함한다. 일부 구현예에서, LPMP는 40% MC3을 포함한다. 일부 구현예에서, LPMP는 50% C12-200의 물비를 포함한다. 일부 구현예에서, LPMP는 20% 또는 40% DC-콜레스테롤을 포함한다.
- [0141] 일부 구현예에서, LPMP는 25% 또는 40% DOTAP를 포함한다.
- [0142] 제제는 전체적으로 LPMP의 흡수를 증가시킬 수 있거나, LPMP에 의해 운반되는 LPMP(예를 들어, 핵산 백신)의 일부 또는 성분의 흡수를 증가시킬 수 있다. 세포 흡수가 증가되는 정도는 조성물이 전달되는 식물 또는 식물 부분, LPMP 제형, 및 LPMP에 이루어진 다른 변형에 따라 달라질 수 있다. 예를 들어, 변형된 LPMP는 미변형된 LPMP에 비해 적어도 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 100%의 세포 흡수

(예를 들어, 동물 세포 흡수, 식물 세포 흡수, 박테리아 세포 흡수, 또는 진균 세포 흡수)가 증가될 수 있다. 일부 경우에, 증가된 세포 흡수는 미변형된 LPMP에 비해 적어도 2배, 4배, 5배, 10배, 100배, 또는 1000배 증가된 세포 흡수이다.

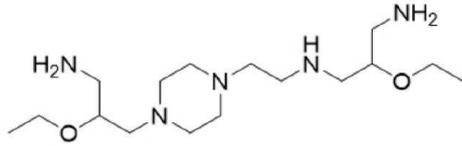
- [0143] 일부 구현예에서, 이온화 가능 지질로 변형된 LPMP는 이온화 가능 지질로 변형되지 않은 LPMP보다 음으로 하전된 폴리뉴클레오티드를 더 효율적으로 캡슐화한다. 일부 양태에서, 이온화 가능 지질로 변형된 LPMP는 이온화 가능 지질로 변형되지 않은 LPMP에 비해 생체분포를 변경하였다. 일부 양태에서, 이온화 가능 지질로 변형된 LPMP는 이온화 가능 지질로 변형되지 않은 LPMP에 비해 표적 세포의 엔도솜 막과의 융합을 변경(예를 들어, 증가)하였다.
- [0144] *이온화 가능 지질*
- [0145] 일부 구현예에서, 이온화 가능 지질은 아래에 열거된 특성 중 적어도 하나(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 또는 5개 모두)를 갖는다:
- [0146] (i) 적어도 2개의 이온화 가능 아민(예를 들어, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 또는 6개 초과)의 이온화 가능 아민, 예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 또는 12개 초과)의 이온화 가능 아민);
- [0147] (ii) 적어도 3개의 지질 꼬리(예를 들어, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 또는 6개 초과)의 지질 꼬리, 예를 들어, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 또는 12개 초과)의 지질 꼬리)로서, 여기서 각각의 지질 꼬리는 독립적으로 길이가 적어도 6개의 탄소 원자(예를 들어, 길이가 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개, 적어도 10개, 적어도 11개, 적어도 12개, 적어도 13개, 적어도 14개, 적어도 15개, 적어도 16개, 적어도 17개, 적어도 18개, 또는 18개 초과)의 탄소 원자, 예를 들어 길이가 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 또는 25개 초과)의 탄소 원자)인 지질 꼬리;
- [0148] (iii) 약 4.5 내지 약 7.5의 산 해리 상수(pKa)(예를 들어, 약 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 5.0, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7.0, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 또는 7.5의 산 해리 상수(pKa)(예를 들어, 약 6.5 내지 약 7.5의 pKa(예를 들어, 약 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7.0, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 또는 7.5의 pKa)));
- [0149] (iv) 이온화 가능 아민 및 이종유기기; 및
- [0150] (v) 적어도 10의 N:P(이온화 가능 지질의 아민: mRNA의 인산염) 비율;
- [0151] 일부 구현예에서, 이온화 가능 지질은 1'-((2-(4-(2-((2-(비스(2-히드록시도데실)아미노)에틸)(2-히드록시도데실)아미노)에틸)피페라진-1-일)에틸)아자네디일)비스(도데칸-2-올)(C12-200), MD1(cKK-E12), OF2, EPC, ZA3-Ep10, TT3, LP01, 5A2-SC8, 지질 5(Moderna), 및 98N12-5로부터 선택되지 않는다.
- [0152] 일부 구현예에서, 이온화 가능 지질은 1,1'-((2-(4-(2-((2-(비스(2-히드록시도데실)아미노)에틸)(2-히드록시도데실)아미노)에틸)피페라진-1-일)에틸)아자네디일)비스(도데칸-2-올)(C12-200), MD1(cKK-E12), OF2, EPC, ZA3-Ep10, TT3, LP01, 5A2-SC8, 지질 5, SM-102(지질 H), 및 ALC-315로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0153] 일부 구현예에서, 이온화 가능 지질은 이온화 가능 아민 및 이종유기기이다. 일부 구현예에서, 이종유기기는 히드록실이다. 일부 구현예에서, 이종유기기는 수소 결합 공여자를 포함한다. 일부 구현예에서, 이종유기기는 수소 결합 수용체를 포함한다. 일부 구현예에서, 이종유기기는 -OH, -SH, -(CO)H, -CO₂H, -NH₂, -CONH₂, 임의 치환된 C₁-C₆ 알콕시, 또는 불소이다.
- [0154] 일부 구현예에서, 이온화 가능 지질은 이온화 가능 아민 및 적어도 2개의 원자 사슬에 의해 분리된 이종유기기이다.
- [0155] 일부 구현예에서, 이온화 가능 지질은 다음 식 I로 표시된다:

[0169] 일부 구현예에서, 아민 코어는 다음의 구조를 갖는다:



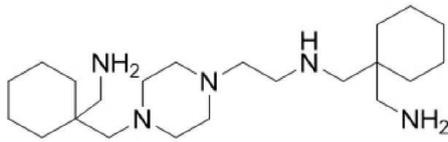
[0170]

[0171] 일부 구현예에서, 아민 코어는 다음의 구조를 갖는다:



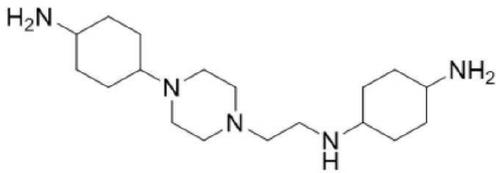
[0172]

[0173] 일부 구현예에서, 아민 코어는 다음의 구조를 갖는다:



[0174]

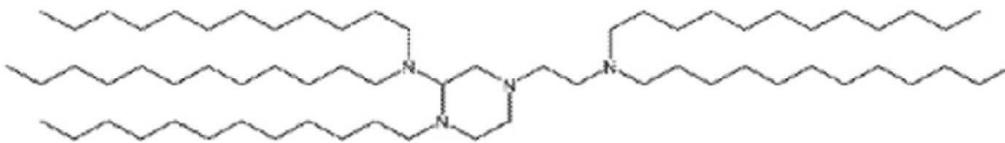
[0175] 일부 구현예에서, 아민 코어는 다음의 구조를 갖는다:



[0176]

[0177] 핵산 백신에 사용하기에 적합한 다른 지질 및 이의 제조 및 사용 방법은 국제 특허 공개 WO 2016/118725에 기술된 것과 같은 지질을 포함하며, 동 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

[0178] 소정의 구현예에서, 핵산 백신 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:



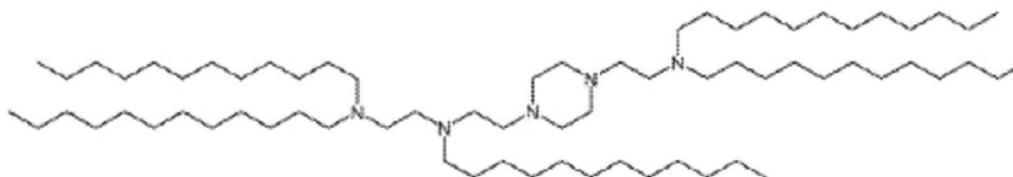
[0179]

로 허용 가능한 염을 포함한다.

및 이의 약학적으로

[0180] 핵산 백신에 사용하기에 적합한 다른 지질 및 이의 제조 및 사용 방법은 국제 특허 공개 WO 2016/118724에 기술된 것과 같은 지질을 포함하며, 동 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

[0181] 소정의 구현예에서, 핵산 백신 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:



[0182]

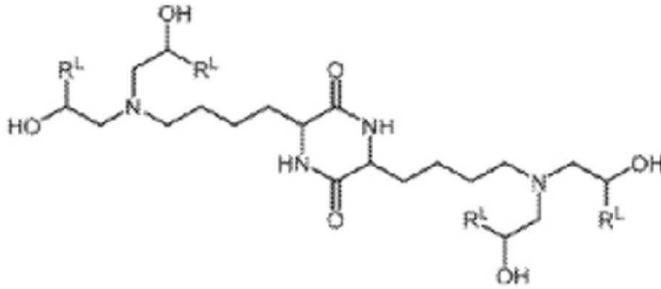
로 허용 가능한 염을 포함한다.

및 이의 약학적으로

[0183] 핵산 백신에 사용하기에 적합한 다른 지질 및 이의 제조 및 사용 방법은 14,25-디트리데실 15,18,21,24-테트라아자-옥타트리아콘탄의 식을 갖는 지질 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

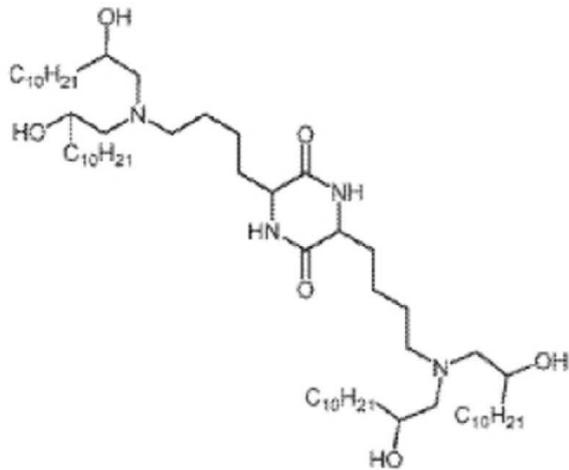
[0184] 핵산 백신에 사용하기에 적합한 다른 지질 및 이의 제조 및 사용 방법은 국제 특허 공개 WO 2013/063468 및 WO 2016/205691에 기술된 것과 같은 지질을 포함하며, 동 문헌 각각은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

[0185] 일부 구현예에서, 핵산 백신 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음 식의 지질:



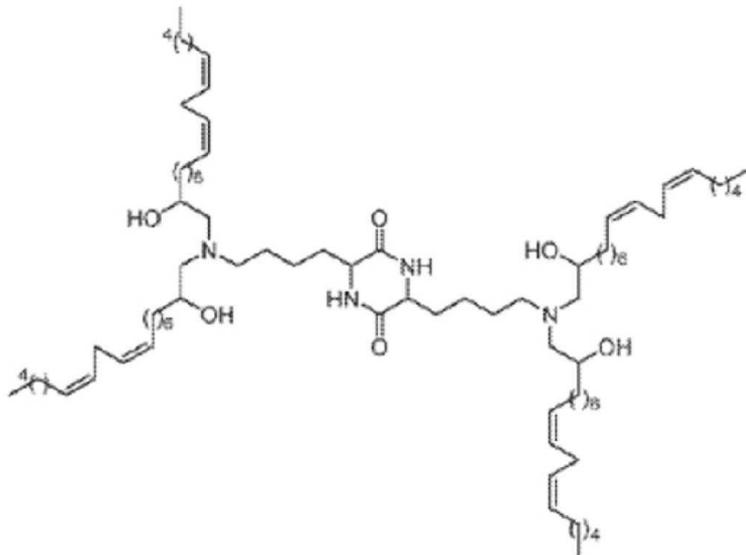
[0186] , 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하고, 여기서 R^L의 각각의 경우는 독립적으로 임의 치환된 C6-C40 알케닐이다.

[0187] 소정의 구현예에서, 핵산 백신 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:



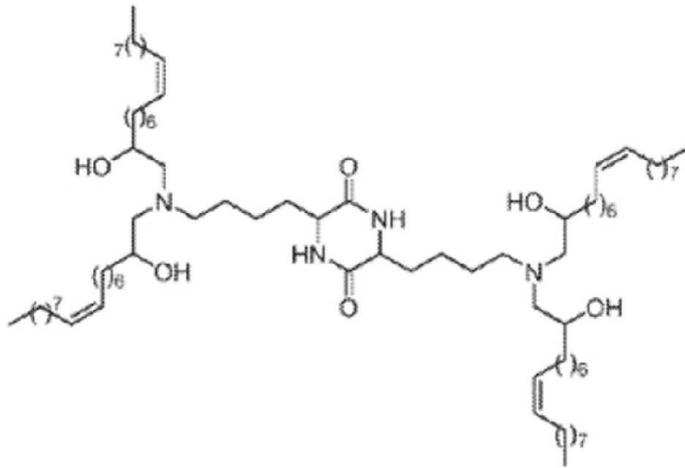
[0188] , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0189] 소정의 구현예에서, 핵산 백신 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:



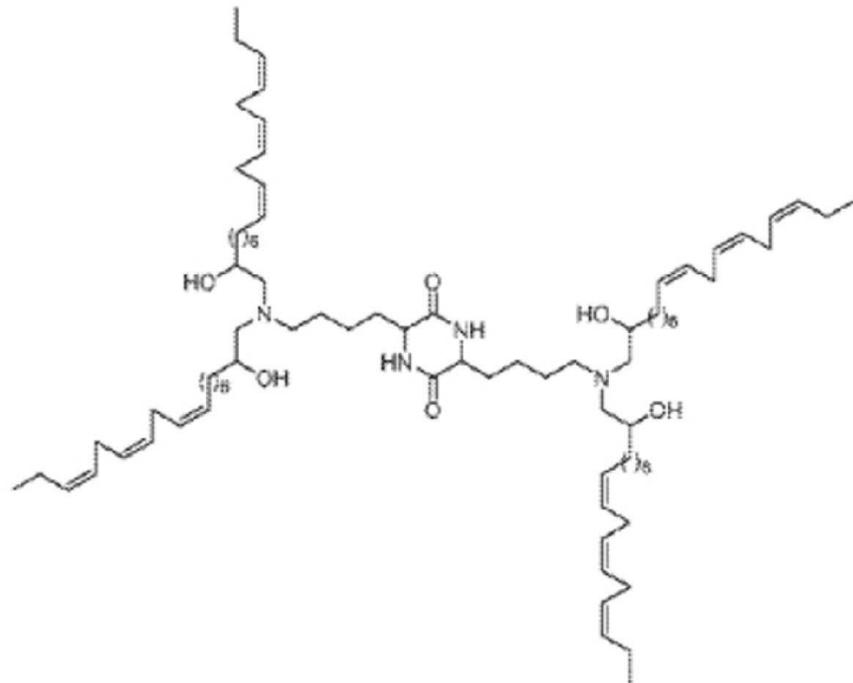
[0190] , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0191] 소정의 구현예에서, 핵산 백신 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질을 포함한다:



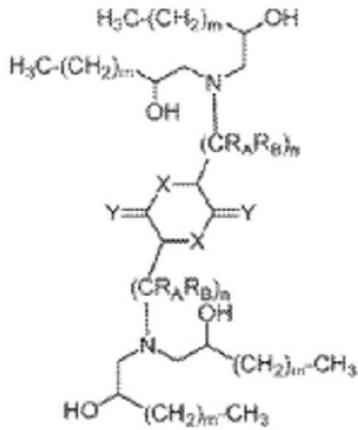
[0192] , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0193] 소정의 구현예에서, 핵산 백신 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:



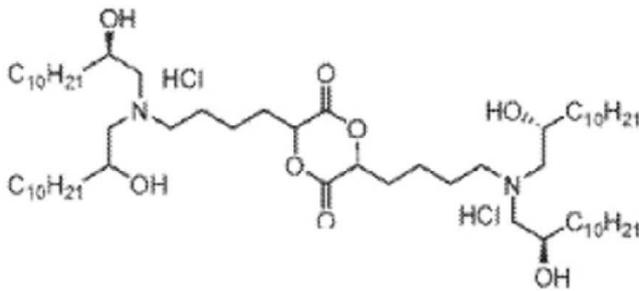
[0194] , 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0195] 핵산 백신에 사용하기에 적합한 다른 지질 및 이의 제조 및 사용 방법은 국제 특허 공개 WO 2015/184256에 기술된 것과 같은 지질을 포함하며, 동 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다. 일부 구현예에서, 핵산 백신 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음 식의 지질:



[0196] , 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하되, 여기서 각각의 X는 독립적으로 O 또는 S이고; 각각의 Y는 독립적으로 O 또는 S이고; 각각의 m은 독립적으로 0 내지 20이고; 각각의 n은 독립적으로 1 내지 6이고; 각각의 R_A 는 독립적으로 수소, 임의 치환된 C1-50 알킬, 임의 치환된 C2-50 알케닐, 임의 치환된 C2-50 알키닐, 임의 치환된 C3-10 카르보시클릴, 임의 치환된 3원 내지 14원 헤테로시클릴, 임의 치환된 C6-14 아릴, 임의 치환된 5원 내지 14원 헤테로아릴 또는 할로겐이고; 각각의 R_B 는 독립적으로 수소, 임의 치환된 C1-50 알킬, 임의 치환된 C2-50 알케닐, 임의 치환된 C2-50 알키닐, 임의 치환된 C3-10 카르보시클릴, 임의 치환된 3원 내지 14원 헤테로시클릴, 임의 치환된 C6-14 아릴, 임의 치환된 5원 내지 14원 헤테로아릴 또는 할로겐이다.

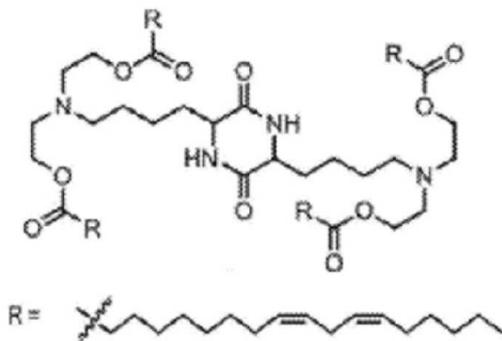
[0197] 소정의 구현예에서, 핵산 백신 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질, "표적 23":



[0198] , (표적 23) 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

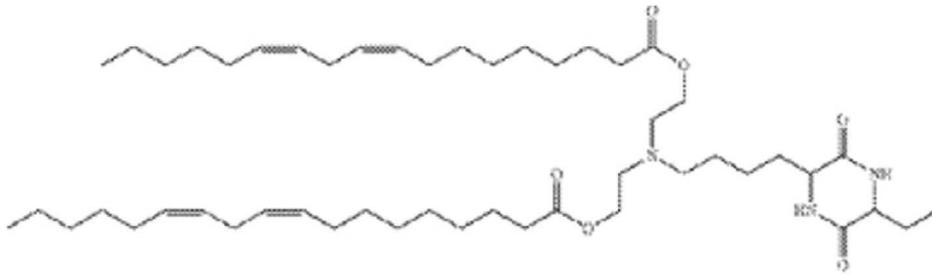
[0199] 핵산 백신에 사용하기에 적합한 다른 지질 및 이의 제조 및 사용 방법은 국제 특허 공개 WO 2016/004202에 기술된 것과 같은 지질을 포함하며, 동 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

[0200] 일부 구현예에서, 핵산 백신 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:



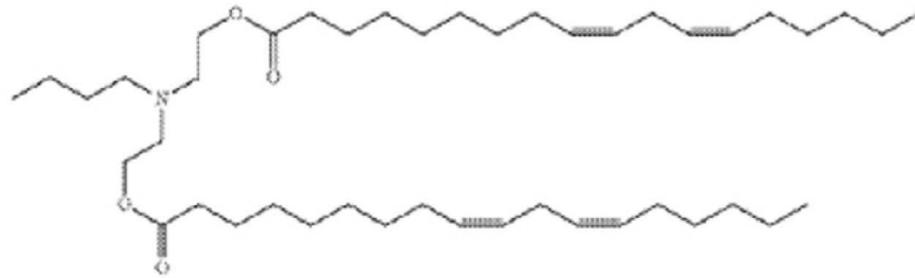
[0201] , 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0202] 일부 구현예에서, 핵산 백신 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:



[0203] , 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

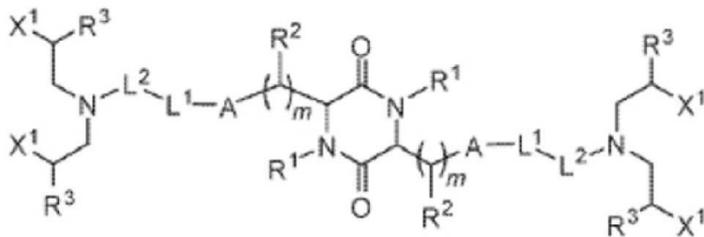
[0204] 일부 구현예에서, 핵산 백신 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:



[0205] , 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

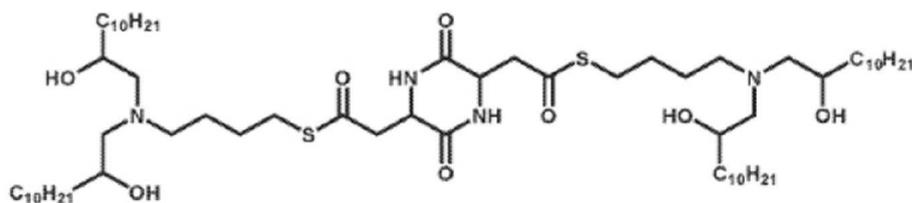
[0206] 핵산 백신에 사용하기에 적합한 다른 지질 및 이의 제조 및 사용 방법은 미국 특허 가출원 제62/758,179호에 기술된 것과 같은 지질을 포함하며, 동 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

[0207] 일부 구현예에서, 핵산 백신 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음 식의 지질:



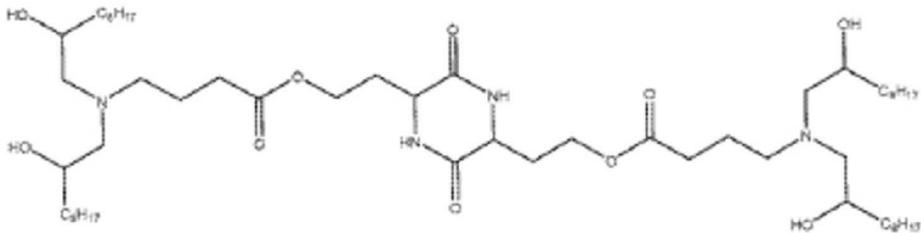
[0208] , 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하되, 각각의 R^1 및 R^2 는 독립적으로 H 또는 C1-C6 지방족이고; 각각의 m 은 독립적으로 1 내지 4의 값을 갖는 정수이고; 각각의 A 는 독립적으로 공유 결합 또는 아릴렌이고; 각각의 L^1 은 독립적으로 에스테르, 티오에스테르, 이황화물, 또는 무수물기이고; 각각의 L^2 는 독립적으로 C2-C10 지방족이고; 각각의 X^1 은 독립적으로 H 또는 OH이고; 각각의 R^3 은 독립적으로 C6-C20 지방족이다.

[0209] 일부 구현예에서, 핵산 백신 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음 식의 지질:



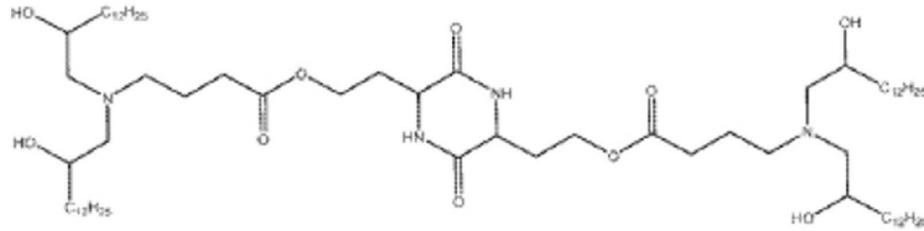
[0210] (화합물 1), 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0211] 일부 구현예에서, 핵산 백신 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음 식의 지질:



[0212] (화합물 2), 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

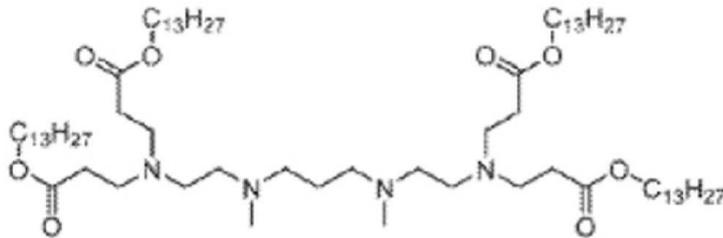
[0213] 일부 구현예에서, 핵산 백신 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음 식의 지질:



[0214] (화합물 3), EH는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0215] 핵산 백신에 사용하기에 적합한 다른 지질 및 이의 제조 및 사용 방법은 J. McClellan, M. C. King의 문헌[Cell 2010, 141, 210~217] 및 Whitehead 등의 문헌[Nature Communications(2014) 5:4277]에 기술된 것과 같은 지질을 포함하며, 동 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

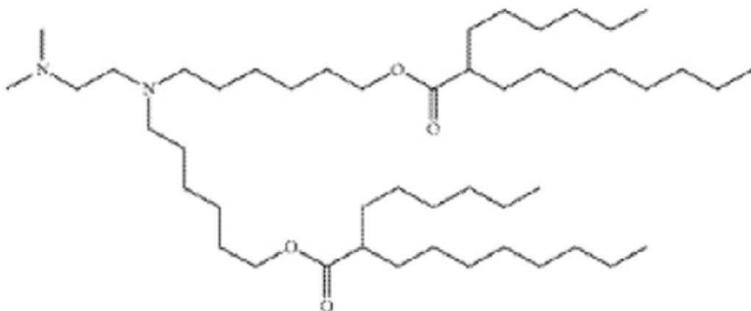
[0216] 소정의 구현예에서, 핵산 백신의 지질 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:



[0217] , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

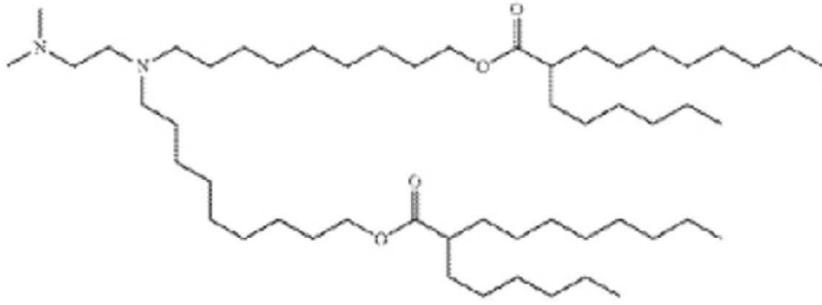
[0218] 핵산 백신에 사용하기에 적합한 다른 지질 및 이의 제조 및 사용 방법은 국제 특허 공개 WO 2015/199952에 기술된 것과 같은 지질을 포함하며, 동 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

[0219] 일부 구현예에서, 핵산 백신 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:



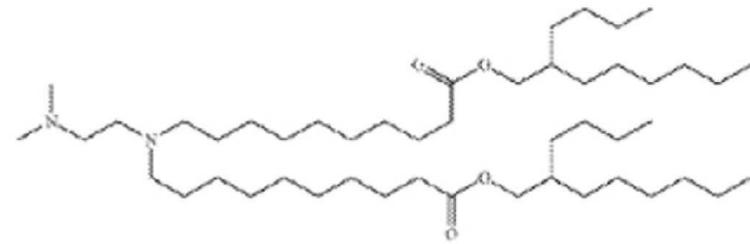
[0220] , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0221] 일부 구현예에서, 핵산 백신 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:



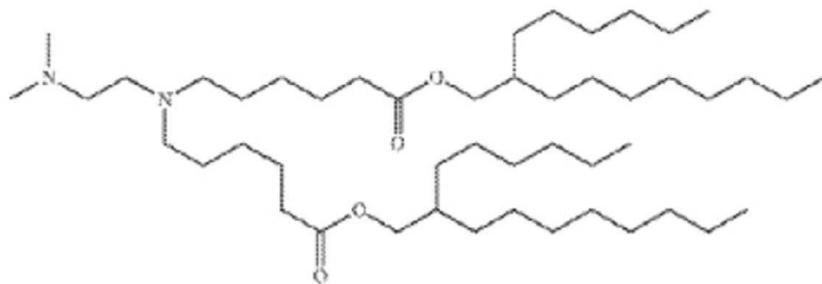
[0222] , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0223] 일부 구현예에서, 핵산 백신 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:



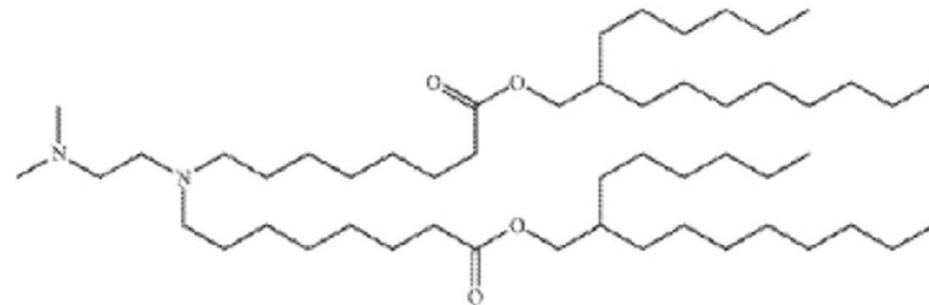
[0224] , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0225] 일부 구현예에서, 핵산 백신 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:



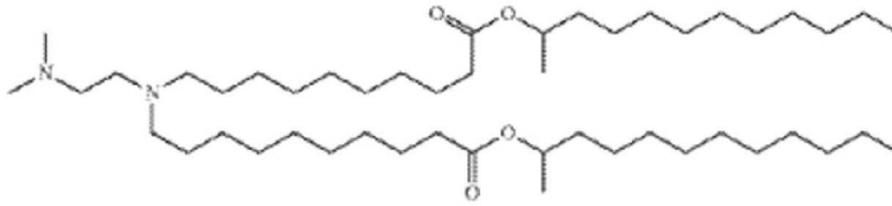
[0226] , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0227] 일부 구현예에서, 핵산 백신 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:



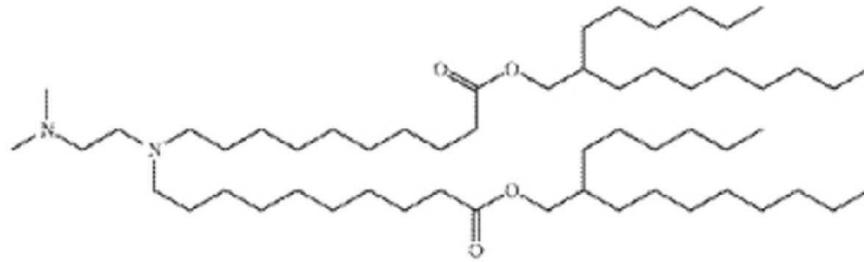
[0228] , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0229] 일부 구현예에서, 핵산 백신 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:



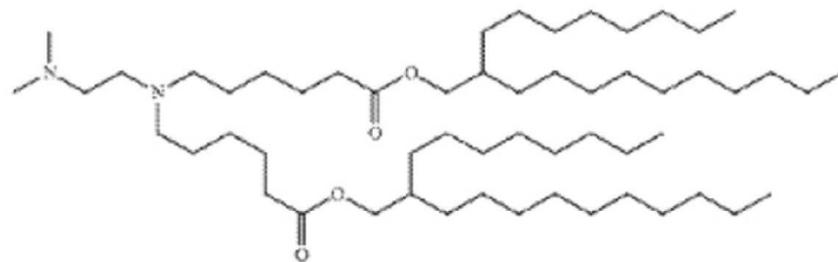
[0230] 가능한 염을 포함한다. , 및 이의 약학적으로 허용

[0231] 일부 구현예에서, 핵산 백신 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:



[0232] , 및 이의 약학적으로 허용 가
능한 염을 포함한다.

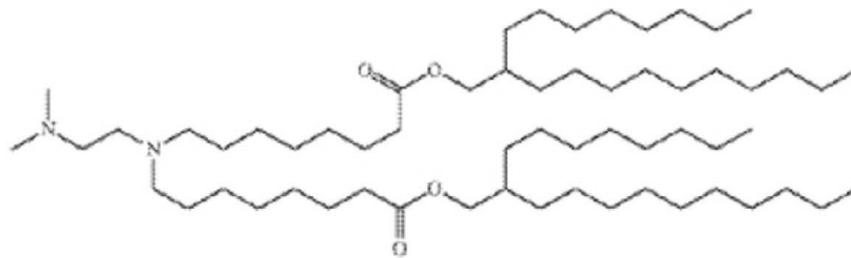
[0233] 일부 구현예에서, 핵산 백신 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:



[0234]

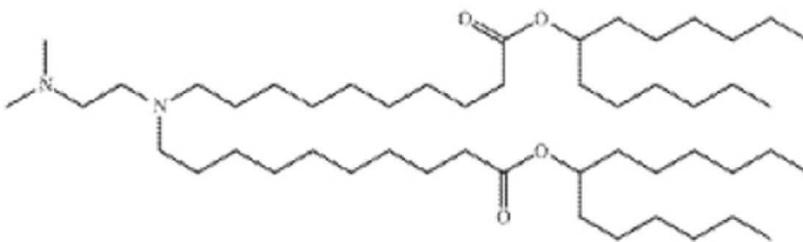
[0235] 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0236] 일부 구현예에서, 핵산 백신 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:



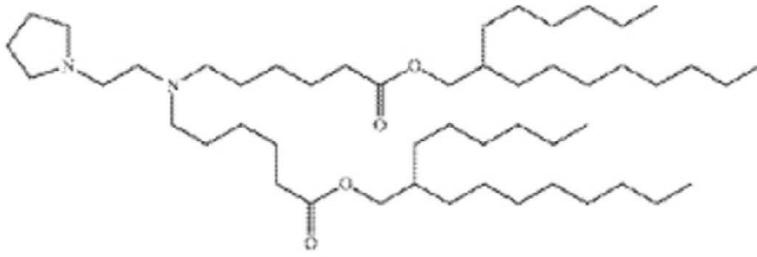
[0237] 한 염을 포함한다. , 및 이의 약학적으로 허용 가능

[0238] 일부 구현예에서, 핵산 백신 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:



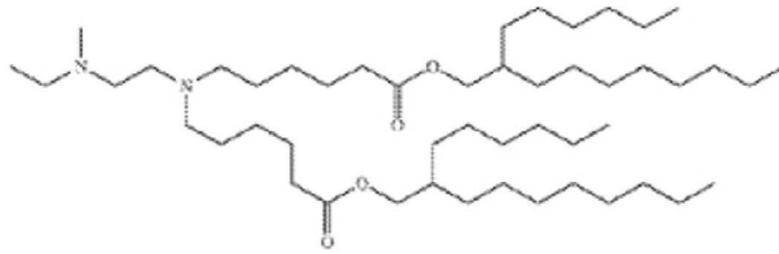
[0239] , 및 이의 약학적으로 허용 가능
한 염을 포함한다.

[0240] 일부 구현예에서, 핵산 백신 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:



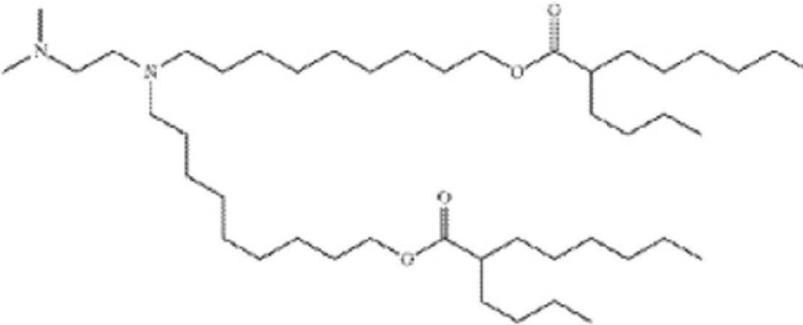
[0241] , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0242] 일부 구현예에서, 핵산 백신 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:



[0243] 을 포함한다. , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염

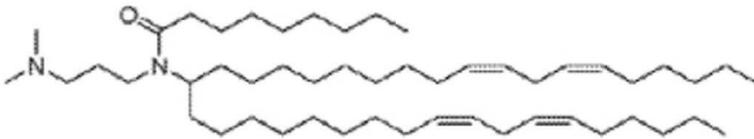
[0244] 일부 구현예에서, 핵산 백신 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:



[0245] , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

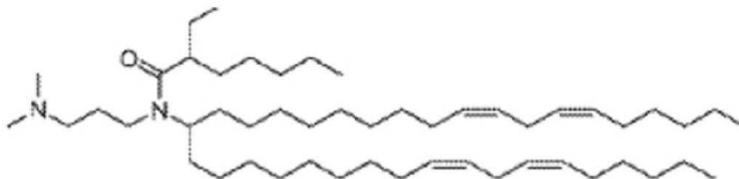
[0246] 핵산 백신에 사용하기에 적합한 다른 지질 및 이의 제조 및 사용 방법은 국제 특허 공개 WO 2017/004143에 기술된 것과 같은 지질을 포함하며, 동 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

[0247] 일부 구현예에서, 핵산 백신 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:



[0248] , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

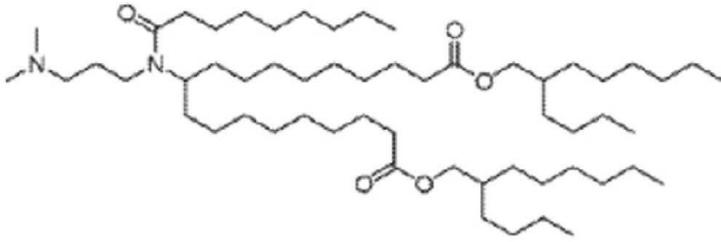
[0249] 일부 구현예에서, 핵산 백신 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:



[0250] , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을

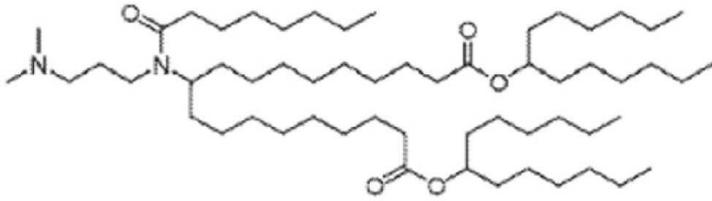
포함한다.

[0251] 일부 구현예에서, 핵산 백신 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:



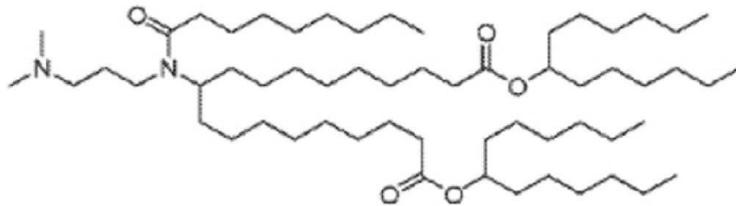
[0252] , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0253] 일부 구현예에서, 핵산 백신 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:



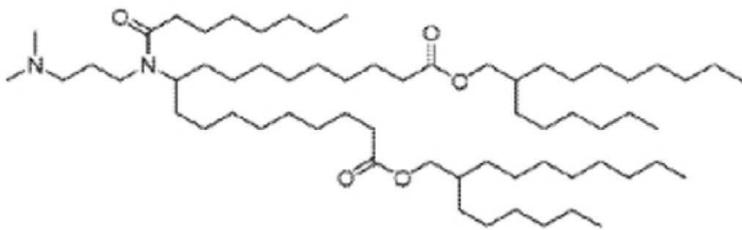
[0254] , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0255] 일부 구현예에서, 핵산 백신 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:



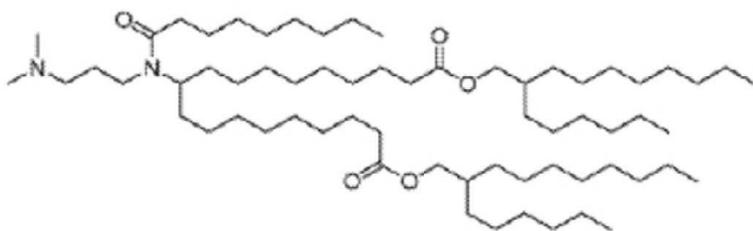
[0256] , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0257] 일부 구현예에서, 핵산 백신 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:



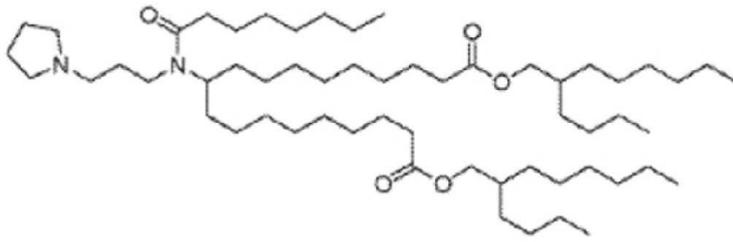
[0258] , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0259] 일부 구현예에서, 핵산 백신 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:



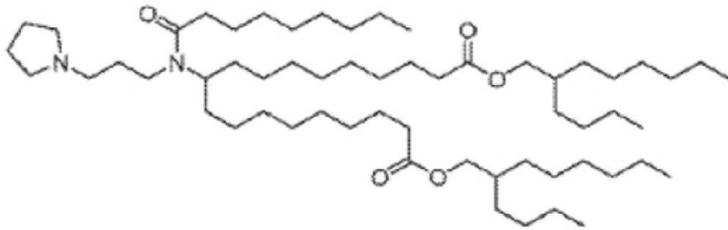
[0260] , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0261] 일부 구현예에서, 핵산 백신 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:



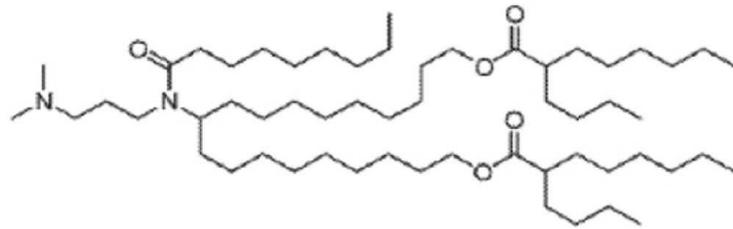
[0262] , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0263] 일부 구현예에서, 핵산 백신 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:



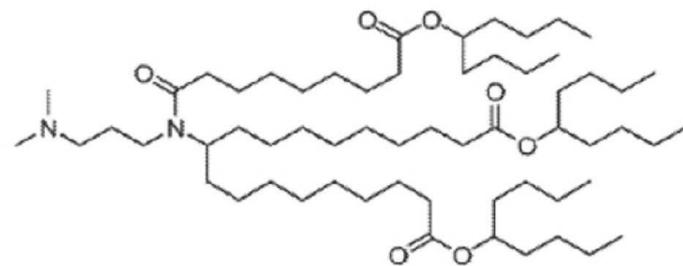
[0264] , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0265] 일부 구현예에서, 핵산 백신 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:



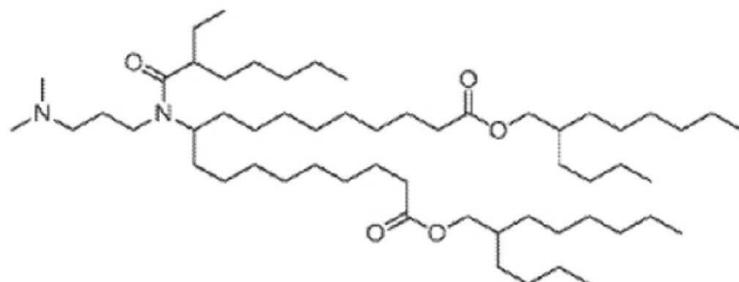
[0266] , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0267] 일부 구현예에서, 핵산 백신 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:



[0268] , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

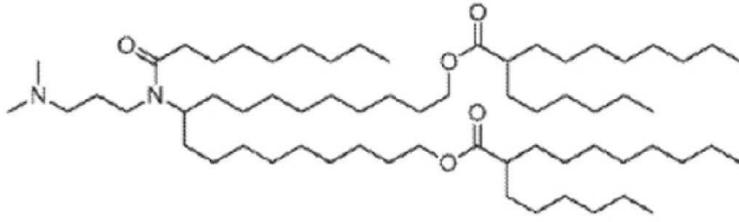
[0269] 일부 구현예에서, 핵산 백신 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:



[0270] , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

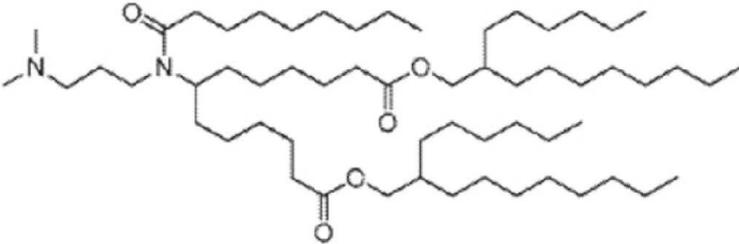
함한다.

[0271] 일부 구현예에서, 핵산 백신 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:



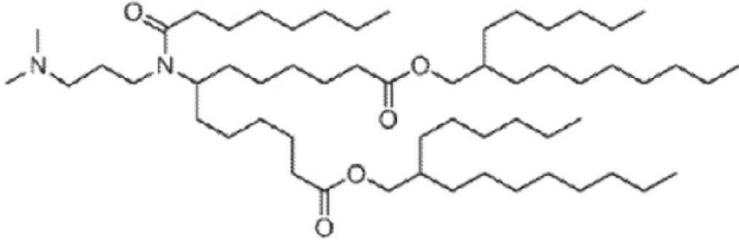
[0272] , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0273] 일부 구현예에서, 핵산 백신 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:



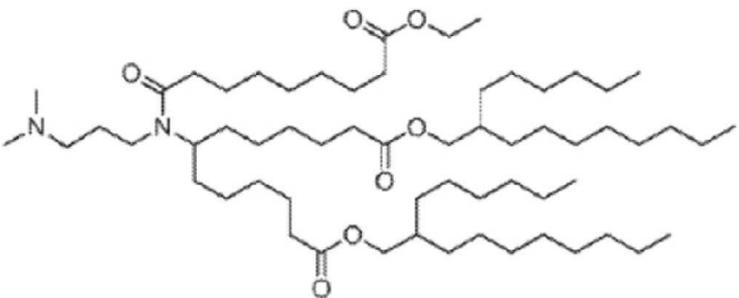
[0274] , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0275] 일부 구현예에서, 핵산 백신 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:



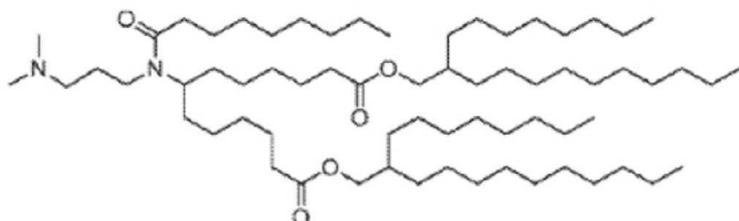
[0276] , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0277] 일부 구현예에서, 핵산 백신 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:



[0278] , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0279] 일부 구현예에서, 핵산 백신 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:

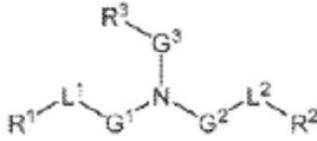


[0280] , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

함한다.

[0281] 핵산 백신에 사용하기에 적합한 다른 지질 및 이의 제조 및 사용 방법은 국제 특허 공개 WO 2017/075531에 기술된 것과 같은 지질을 포함하며, 동 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

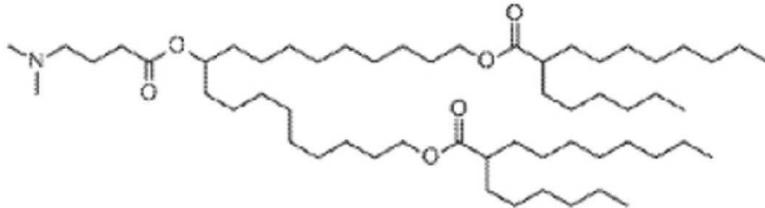
[0282] 일부 구현예에서, 핵산 백신 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음 식의 지질:



[0283]

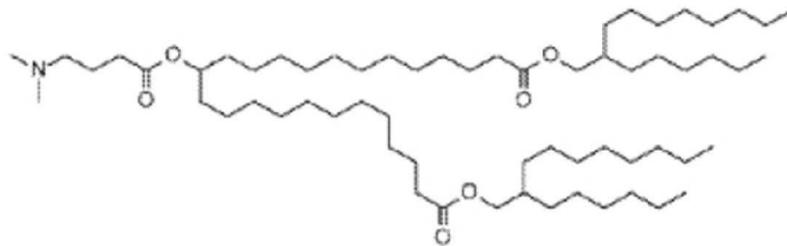
[0284] 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하되, L^1 또는 L^2 중 하나는 $-O(C=O)-$, $-(C=O)O-$, $-C(=O)-$, $-O-$, $-S(O)_x$, $-S-S-$, $-C(=O)S-$, $-SC(=O)-$, $-NR^aC(=O)-$, $-C(=O)NR^a-$, $NR^aC(=O)NR^a-$, $-OC(=O)NR^a-$, 또는 $-NR^aC(=O)O-$ 이고; L^1 또는 L^2 중 다른 하나는 $-O(C=O)-$, $-(C=O)O-$, $-C(=O)-$, $-O-$, $-S(O)_x$, $-S-S-$, $-C(=O)S-$, $SC(=O)-$, $-NR^aC(=O)-$, $-C(=O)NR^a-$, $NR^aC(=O)NR^a-$, $-OC(=O)NR^a-$ 또는 $-NR^aC(=O)O-$ 또는 직접 결합이고; G^1 및 G^2 는 각각 독립적으로 미치환된 C_1-C_{12} 알킬렌 또는 C_1-C_{12} 알케닐렌이고; G^3 은 C_1-C_{24} 알킬렌, C_1-C_{24} 알케닐렌, C_3-C_8 시클로알킬렌, C_3-C_8 시클로알케닐렌이고; R^a 는 H 또는 C_1-C_{12} 알킬이고; R^1 및 R^2 는 각각 독립적으로 C_6-C_{24} 알킬 또는 C_6-C_{24} 알케닐이고; R^3 은 H, OR^5 , CN, $-C(=O)OR^4$, $-OC(=O)R^4$ 또는 $-NR^5C(=O)R^4$ 이고; R^4 는 C_1-C_{12} 알킬이고; R^5 는 H 또는 C_1-C_6 알킬이고; x 는 0, 1, 또는 2이다.

[0285] 핵산 백신에 사용하기에 적합한 다른 지질 및 이의 제조 및 사용 방법은 국제 특허 공개 WO 2017/117528에 기술된 것과 같은 지질을 포함하며, 동 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다. 일부 구현예에서, 핵산 백신 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:



[0286] , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

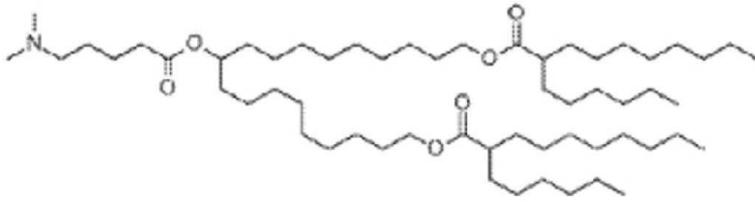
[0287] 일부 구현예에서, 핵산 백신 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:



[0288]

[0289] 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

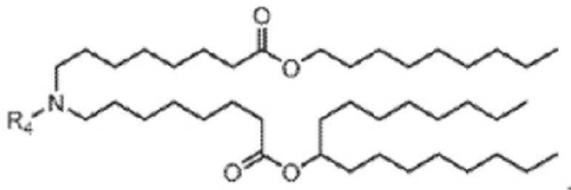
[0290] 일부 구현예에서, 핵산 백신 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:



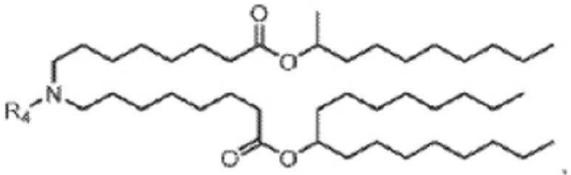
[0291] 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0292] 핵산 백신에 사용하기에 적합한 다른 지질 및 이의 제조 및 사용 방법은 국제 특허 공개 WO 2017/049245에 기술된 것과 같은 지질을 포함하며, 동 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

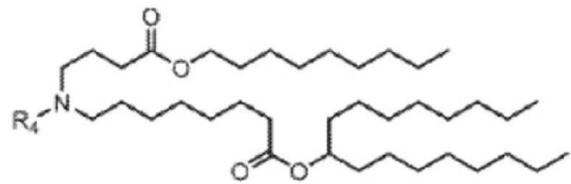
[0293] 일부 구현예에서, 핵산 백신의 지질 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음 식 중 하나의 화합물:



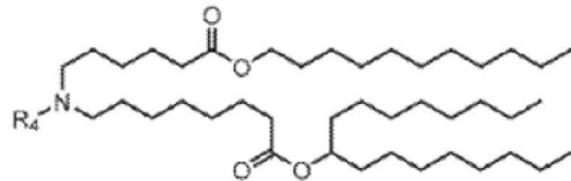
[0294]



[0295]

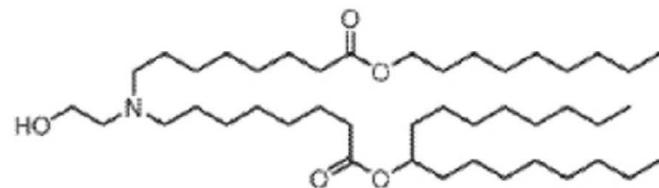


[0296]



[0297] , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다. 이들 4개의 식 중 어느 하나의 경우, R₄는 독립적으로 -(CH₂)_nQ 및 -(CH₂)_nCHQR로부터 선택되고; Q는 of -OR, -OH, -(CH₂)_nN(R)₂, -OC(O)R, -CX₃, -CN, -N(R)C(O)R, -N(H)C(O)R, -N(R)S(O)₂R, -N(H)S(O)₂R, -N(R)C(O)N(R)₂, -N(H)C(O)N(R)₂, -N(H)C(O)N(H)(R), -N(R)C(S)N(R)₂, -N(H)C(S)N(R)₂, -N(H)C(S)N(H)(R), 및 헤테로시클로 이루어진 군으로부터 선택되고; n은 1, 2, 또는 3이다.

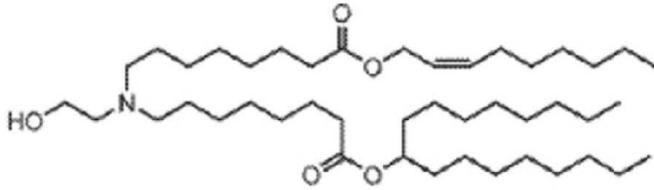
[0298] 소정의 구현예에서, 핵산 백신 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:



[0299]

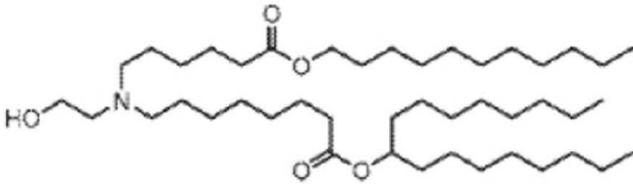
, 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0300] 소정의 구현예에서, 핵산 백신 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:



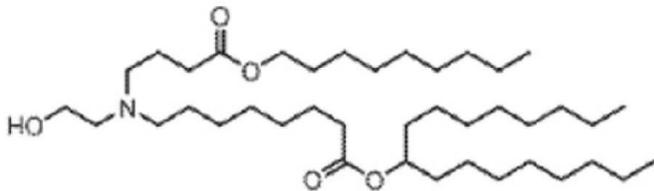
[0301] , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0302] 소정의 구현예에서, 핵산 백신 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:



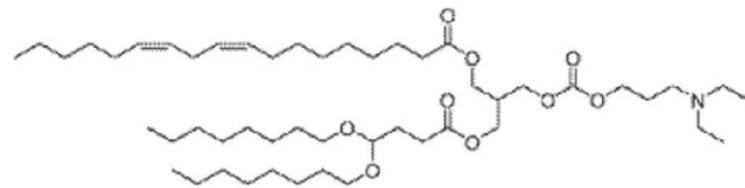
[0303] , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0304] 소정의 구현예에서, 핵산 백신 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:



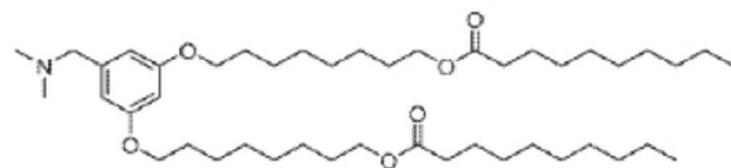
[0305] , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0306] 핵산 백신에 사용하기에 적합한 다른 지질 및 이의 제조 및 사용 방법은 국제 특허 공개 WO 2017/173054 및 WO 2015/095340에 기술된 것과 같은 지질을 포함하며, 동 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다. 소정의 구현예에서, 핵산 백신 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:



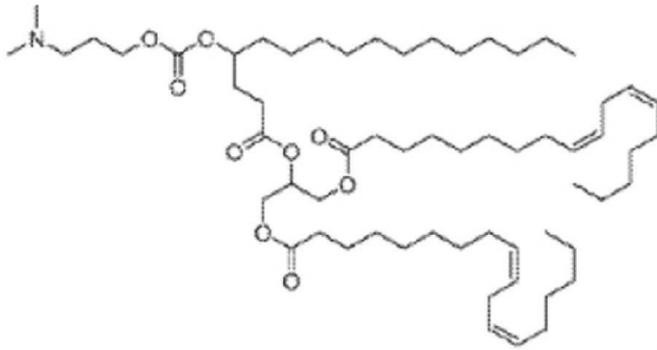
[0307] , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0308] 소정의 구현예에서, 핵산 백신 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:



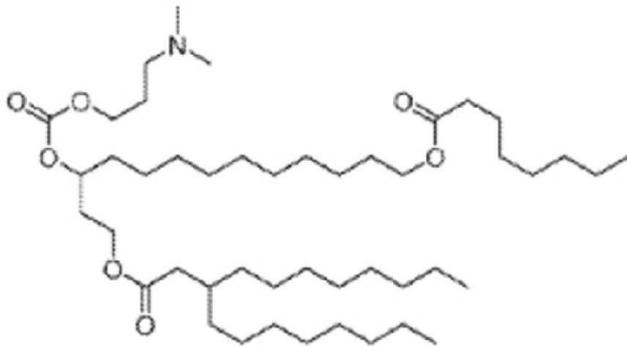
[0309] , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0310] 소정의 구현예에서, 핵산 백신 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:



[0311] , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0312] 소정의 구현예에서, 핵산 백신 및 이의 제조 및 사용 방법은 다음의 화합물 구조를 갖는 지질:



[0313] , 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0314] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 LPMP는 W02016118724, W02016118725, W02016187531, W02017176974, W02018078053, W02019027999, W02019036030, W02019089828, W02019099501, W02020072605, W02020081938, W02020118041, W02020146805, 또는 W02020219876에 기술된 바와 같은 이온화 가능 지질을 포함하거나, 이에 기술된 바와 같이 제형화되거나, 이에 기술된 바와 같은 조성물을 포함하거나 이에 의해 포함될 수 있고, 동 문헌의 각각은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

[0315] 기타 지질 및 기타 제제

[0316] 외인성 지질은 세포 투과제일 수 있고, LPMP에 의한 세포로의 폴리펩티드의 전달을 증가시킬 수 있고/있거나 폴리펩티드의 로딩(예를 들어, 로딩 효율 또는 로딩 용량)을 증가시킬 수 있다. 추가의 예시적인 외인성 지질은 스테롤 및 폐길화된 지질을 포함한다.

[0317] LPMP는 다른 성분(예를 들어, 지질, 예를 들어, 스테롤, 예를 들어, 콜레스테롤; 또는 소분자)으로 변형되어 LPMP의 기능적 특성 및 구조적 특성을 추가로 변경할 수 있다. 예를 들어, LPMP는 LPMP의 안정성(예를 들어, 실온에서 적어도 1일 동안 및/또는 4°C에서 적어도 1주일 동안 안정적임)을 증가시키는 안정화 분자로 추가로 변형될 수 있다.

[0318] 일부 구현예에서, LPMP는 스테롤, 예를 들어 시토스테롤, 시토스타놀, β-시토스테롤, 7α-하이드록시콜레스테롤, 프로그네놀론, 콜레스테롤(예를 들어, 난소 콜레스테롤 또는 식물로부터 단리된 콜레스테롤), 스티그마스테롤, 캄페스테롤, 푸코스테롤, 또는 임의의 스테롤의 유사체(예를 들어, 글리코시드, 에스테르, 또는 펩티드)로 변형된다. 일부 예에서, 외인성 스테롤은 단계 (b) 이전에 제제에 첨가, 예를 들어 단계 (b) 이전에 추출된 PMP 지질과 혼합된다. 외인성 스테롤은, 예를 들어, 제제 중 총 지질 및 스테롤의 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 90%(w/w)를 초과하는 양으로 첨가될 수 있다.

[0319] 일부 구현예에서, 스테롤은 콜레스테롤 또는 시토스테롤이다. 일부 경우에, LPMP는 적어도 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 또는 60% 초과 스테롤(예를 들어, 콜레스테롤 또는 시토스테롤), 예를 들어, 1%~10%, 10%~20%, 20%~30%, 30%~40%, 40%~50%, 또는 50%~60%의 스테롤의 몰비를 포함한다. 일부 구현예에서, LPMP는 약 35%~50%의 스테롤(예를 들어, 콜레스테롤 또는 시토스테롤), 예를 들어, 약 36%, 38.5%, 42.5%, 또는 46.5%의 스테롤의 몰비를 포함한다. 일부 구현예에서, LPMP는 약 20%~40%의 스테롤의 몰비

를 포함한다.

- [0320] 일부 구현예에서, 스테롤로 변형된 LPMP는 스테롤로 변형되지 않은 LPMP에 비해 안정성을 변경(예를 들어, 안정성을 증가)시킨다. 일부 양태에서, 스테롤로 변형된 LPMP는 스테롤로 변형되지 않은 LPMP에 비해 표적 세포의 막과 더 큰 융합율을 갖는다.
- [0321] 일부 경우에, LPMP는 외인성 지질 및 외인성 스테롤을 포함한다.
- [0322] 일부 구현예에서, LPMP는 폐길화된 지질로 변형된다. 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 길이는 1kDa 내지 10kDa로 다양할 수 있고; 일부 양태에서는, 2kDa의 길이를 갖는 PEG가 사용된다. 일부 구현예에서, 폐길화된 지질은 C14-PEG2k, C18-PEG2k, 또는 DMPE-PEG2k이다. 일부 경우에, LPMP는 적어도 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 0.6%, 0.7%, 0.8%, 0.9%, 1%, 1.1%, 1.2%, 1.3%, 1.4%, 1.5%, 1.6%, 1.7%, 1.8%, 1.9%, 2%, 2.1%, 2.2%, 2.3%, 2.4%, 2.5%, 2.6%, 2.7%, 2.8%, 2.9%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 또는 50% 초과 폐길화된 지질(예를 들어, C14-PEG2k, C18-PEG2k, 또는 DMPE-PEG2k), 예를 들어 0.1%~0.5%, 0.5%~1%, 1%~1.5%, 1.5%~2.5%, 2.5%~3.5%, 3.5%~5%, 5%~10%, 10%~20%, 20%~30%, 30%~40%, 또는 30%~50%의 폐길화된 지질의 몰비를 포함한다. 일부 구현예에서, LPMP는 약 0.1%~10%의 폐길화된 지질(예를 들어, C14-PEG2k, C18-PEG2k, 또는 DMPE-PEG2k), 예를 들어 약 1%~3%의 폐길화된 지질, 예를 들어 약 1.5% 또는 약 2.5%의 폐길화된 지질의 몰비를 포함한다. 일부 구현예에서, 폐길화된 지질로 변형된 LPMP는 폐길화된 지질로 변형되지 않은 LPMP에 비해 안정성을 변경(예를 들어, 안정성을 증가)시킨다. 일부 구현예에서, 폐길화된 지질로 변형된 LPMP는 폐길화된 지질로 변형되지 않은 LPMP에 비해 입자 크기가 변경된다. 일부 구현예에서, 폐길화된 지질로 변형된 LPMP는 폐길화된 지질로 변형되지 않은 LPMP보다 식균될 가능성이 적다. 또한, 폐길화 지질의 첨가는 GI 관의 안정성에 영향을 미치고 점액을 통한 입자 이동을 향상시킬 수 있다. PEG는 표적화 모이어티를 부착하는 방법으로서 사용될 수 있다.
- [0323] 일부 구현예에서, LPMP는 이온화 가능 지질(예를 들어, C12-200 또는 MC3) 및 스테롤(예를 들어, 콜레스테롤 또는 시토스테롤) 및 폐길화된 지질(예를 들어, C14-PEG2k, C18-PEG2k, 또는 DMPE-PEG2k) 중 하나 또는 둘 모두로 변형된다.
- [0324] 일부 구현예에서, 변형된 LPMP는 약 5%~50%의 LPMP 지질(예를 들어, 약 10%~20% LPMP 지질, 예를 들어 약 10%, 12.5%, 16%, 또는 20% LPMP 지질)의 몰비; 약 30%~75% 이온화 가능 지질(예를 들어, 약 35% 또는 약 50% 이온화 가능 지질)의 몰비; 약 35%~50% 스테롤(예를 들어, 약 36%, 38.5%, 42.5%, 또는 46.5% 스테롤)의 몰비; 및 약 0.1%~10% 폐길화된 지질(예를 들어, 약 1%~3% 폐길화된 지질, 예를 들어, 약 1.5% 또는 약 2.5% 폐길화된 지질)의 몰비를 포함한다.
- [0325] 일부 구현예에서, 변형된 LPMP는 5%~60% LPMP 지질(예를 들어, 약 10%~20%, 20%~30%, 30%~40%, 40%~50%, 또는 50%~60% LPMP 지질, 예를 들어, 약 10%, 12.5%, 16%, 20%, 30%, 40%, 50%, 또는 60% LPMP 지질)의 몰비; 약 25%~75% 이온화 가능 지질(예를 들어, 약 35% 또는 약 50% 이온화 가능 지질)의 몰비; 약 10%~50% 스테롤(예를 들어, 약 10%, 12.5%, 14%, 16%, 18%, 20%, 36%, 38.5%, 42.5%, 또는 46.5% 스테롤)의 몰비; 및 약 0.1%~10% 폐길화된 지질(예를 들어, 약 0.5%~5% 폐길화된 지질, 예를 들어, 약 1%~3% 폐길화된 지질, 또는 약 1.5% 또는 약 2.5% 폐길화된 지질)의 몰비를 포함한다.
- [0326] 일부 구현예에서, 이온화 가능 지질, LPMP 지질, 스테롤, 및 폐길화된 지질은 변형된 PMP 중 지질의 약 25%~75%, 약 20%~60%, 약 10%~45%, 및 약 0.5%~5%를 각각 포함한다.
- [0327] 일부 구현예에서, 이온화 가능 지질, LPMP 지질, 스테롤, 및 폐길화된 지질은 변형된 PMP 중 지질의 약 30%~75%, 약 20%~50%, 약 10%~45%, 및 약 1%~5%를 각각 포함한다.
- [0328] 일부 구현예에서, 이온화 가능 지질, LPMP 지질, 스테롤, 및 폐길화된 지질은 변형된 PMP 중 지질의 약 35%~75%, 약 20%~50%, 약 10%~45%, 및 약 1%~5%를 각각 포함한다.
- [0329] 일부 구현예에서, 이온화 가능 지질, LPMP 지질, 스테롤, 및 폐길화된 지질은 약 35:50:12.5:2.5의 몰비로 제형화된다.
- [0330] 일부 구현예에서, 이온화 가능 지질, LPMP 지질, 스테롤, 및 폐길화된 지질은 약 35:50:11.5:3.5의 몰비로 제형화된다.
- [0331] 일부 구현예에서, 이온화 가능 지질, LPMP 지질, 스테롤, 및 폐길화된 지질은 약 35:20:42.5:2.5의 몰비로 제형

화된다.

- [0332] 일부 구현예에서, 이온화 가능 지질(및/또는 양이온성 지질) 및 스테롤 및/또는 폐길화된 지질로 변형된 LPMP는 이온화 가능 지질(및/또는 양이온성 지질) 및 스테롤 및/또는 폐길화된 지질로 변형되지 않은 LPMP보다 음으로 하전된 카르고(예를 들어, 핵산)을 보다 효율적으로 캡슐화한다. 변형된 LPMP는 카르고(예를 들어, 핵산, 예를 들어 RNA 또는 DNA)에 대한 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, 또는 99% 초과인 캡슐화 효율, 예를 들어 5%~30%, 30%~50%, 50%~70%, 70%~80%, 80%~90%, 90%~95%, 또는 95%~100%의 캡슐화 효율을 가질 수 있다.
- [0333] 변형된 LPMP의 세포 흡수는 당업계에 공지된 다양한 방법에 의해 측정될 수 있다. 예를 들어, LPMP 또는 이의 성분은 단리된 세포에서 검출되어 흡수를 확인할 수 있는 마커(예를 들어, 형광 마커)로 표지될 수 있다.
- [0334] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 LPMP 제형은 2개 이상의 상이한 변형된 LPMP를 포함하고, 예를 들어, 상이한 미변형된 LPMP(예를 들어, 2개 이상의 상이한 식물 공급원으로부터의 미변형된 LPMP)로부터 유래된 변형된 LPMP를 포함하고/하거나, 상이한 중 및/또는 상이한 비율의 이온화 가능 지질, 스테롤, 및/또는 폐길화된 지질을 포함하는 변형된 LPMP를 포함한다.
- [0335] 일부 경우에, 지질 막이 용해되는 유기 용매는 디메틸포름아미드:메탄올(DMF:MeOH)이다. 대안적으로, 유기 용매 또는 용매 조합은, 예를 들어, 아세토니트릴, 아세톤, 에탄올, 메탄올, 디메틸포름아미드, 테트라하이드로푸란, 1-부탄올, 디메틸 설폭시드, 아세토니트릴:에탄올, 아세토니트릴:메탄올, 아세톤:메탄올, 메틸 삼차-부틸 에테르:프로판올, 테트라하이드로푸란:메탄올, 디메틸 설폭시드:메탄올, 또는 디메틸포름아미드:메탄올일 수 있다.
- [0336] 수성 상은 임의의 적합한 용액, 예를 들어 구연산염 완충액(예를 들어, 약 3.2의 pH를 갖는 구연산염 완충액), 물, 또는 인산염 완충 식염수(PBS)일 수 있다. 수성 상은 핵산(예를 들어, siRNA 또는 siRNA 전구체(예를 들어, dsRNA), miRNA 또는 miRNA 전구체, mRNA, 또는 플라스미드(pDNA)) 또는 소분자를 추가로 포함할 수 있다.
- [0337] 지질 용액 및 수성 상은 임의의 적절한 비율로 미세유체 장치에서 혼합될 수 있다. 일부 예에서, 수성 상 및 지질 용액은 3:1 부피비로 혼합된다.
- [0338] LPMP는 임의적으로 추가 제제, 예를 들어, 세포 투과제, 치료제, 폴리뉴클레오티드, 폴리펩티드, 또는 소분자를 포함할 수 있다. LPMP는 다양한 방식으로 추가 제제를 운반하거나 이와 결합하여, 예를 들어 제제를 캡슐화하거나, 지질 이중층 구조 내에 제제를 삽입하거나, 지질 이중층 구조의 표면과 제제를 결합(예를 들어, 접합에 의해)시킴으로써 표적 식물로 제제를 전달할 수 있다. 핵산 분자는 생체 내(예를 들어, 식물 내) 또는 시험관 내(예를 들어, 조직 배양 내, 세포 배양 내, 또는 합성적으로 삽입된) LPMP에 삽입될 수 있다.
- [0339] 제타 전위
- [0340] 이온화 가능 지질(예를 들어, C12-200 또는 MC3) 및 임의로 양이온성 지질(예를 들어, DC-콜레스테롤 또는 DOTAP)을 포함하는 LPMP는, 예를 들어, 카르고가 부재할 때 -30mV 초과의 제타 전위, 카르고가 부재할 때 -20mV 초과, -5mV 초과, 0mV 초과, 또는 약 30mV의 제타 전위를 가질 수 있다. 일부 예에서, LPMP는 카르고가 부재할 때 음의 제타 전위, 예를 들어 0mV 미만, -10mV 미만, -20mV 미만, -30mV 미만, -40mV 미만, 또는 -50mV 미만의 제타 전위를 갖는다. 일부 예에서, LPMP는 카르고가 부재할 때 양의 제타 전위, 예를 들어 0mV 초과, 10mV 초과, 20mV 초과, 30mV 초과, 40mV 초과, 또는 50mV 초과의 제타 전위를 갖는다. 일부 예에서, LPMP는 약 0의 제타 전위를 갖는다.
- [0341] LPMP의 제타 전위는 당업계에 공지된 임의의 방법을 사용하여 측정될 수 있다. 일반적으로 제타 전위는 간접적으로 측정, 예를 들어 당업계에 공지된 방법 및 기술, 예를 들어 전기영동 이동성 또는 동적 전기영동 이동성을 사용하여 수득된 데이터로부터 이론적 모델을 사용하여 계산된다. 통상적으로 전기영동 이동성은 마이크로 전기영동, 전기영동 광 산란, 또는 조정 가능한 저항 펄스 감지를 사용하여 측정된다. 전기영동 광 산란은 동적 광 산란에 기초한다. 통상적으로, 제타 전위는 광자 상관 분광법 또는 준탄성 광 산란으로도 알려진 동적 광 산란(DLS) 측정을 통해 접근 가능하다.
- [0342] 식물 EV-마커
- [0343] 핵산 백신 내의 LPMP 및 이의 제조 및 사용 방법은 식물 EV를 사용하고/하거나 이의 분절, 부분, 또는 추출물을 포함하여 생산되고 있는 것으로서 LPMP를 식별하는 다양한 마커를 가질 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "식물 EV-마커"는 식물과 자연적으로 연관되고, 식물 단백질, 식물 핵산, 식물 소분자, 식물 지질, 또는 이들의 조합과 같은 식물 내에서 식물 EV 내로 또는 그 상으로 삽입되는 성분을 지칭한다. 식물 EV-마커의

예는, 예를 들어, Rutter 및 Innes의 문헌[*Plant Physiol.* 173(1): 728-741, 2017]; Raimondo 등의 문헌 [*Oncotarget.* 6(23): 19514, 2015]; Ju 등의 문헌[*Mol. Therapy.* 21(7):1345-1357, 2013]; Wang 등의 문헌 [*Molecular Therapy.* 22(3): 522-534, 2014]; 및 Regente 등의 문헌[*J of Exp. Biol.* 68(20): 5485-5496, 2017]에서 확인할 수 있고 각각의 동 문헌은 본원에 참조로서 통합된다.

[0344] 적합한 식물 EV-마커의 추가 예는 국제 특허 출원 공개 WO 2021/041301에 기재되고 열거된 것들을 포함하며, 동 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

[0345] 제제(예를 들어, 핵산)의 로딩

[0346] LPMP는 치료제(예를 들어, 핵산 분자)를 포함하도록 변형되어 핵산 백신을 형성한다. LPMP는 다양한 방식으로 이러한 제제를 운반하거나 이와 결합하여, 예를 들어 제제를 캡슐화하거나, 지질 이중층 구조 내에 성분을 삽입하거나, LPMP의 지질 이중층 구조의 표면과 성분을 결합(예를 들어, 접합에 의해)시킴으로써 표적 유기체(예를 들어, 표적 동물)로 제제를 전달할 수 있다. 일부 경우에, 제제는 본원에 기술된 바와 같이 LPMP 제형에 포함된다.

[0347] 제제는 LPMP와 제제 사이의 결합을 직접적으로 또는 간접적으로 허용하는, 당업계에 공지된 임의의 방법에 의해 LPMP 내에 또는 LPMP 상에 삽입되거나 로딩될 수 있다. 제제는 생체 내 방법에 의해 (예를 들어, 식물 내에서, 예를 들어, 제제를 포함하는 유전자식 식물로부터의 LPMP의 생산을 통해), 또는 시험관 내 방법에 의해 (예를 들어, 조직 배양 내에서, 또는 세포 배양 내에서), 또는 생체 내 및 시험관 내 방법 둘 모두에 의해 LPMP에 삽입될 수 있다.

[0348] 일부 경우에, LPMP는 시험관 내에 로딩된다. 물질은 비제한적으로 물리적, 화학적, 및/또는 생물학적 방법(예를 들어, 조직 배양물 또는 세포 배양물)을 사용하여 LPMP 상에 또는 LPMP 내에 로딩될 수 있다(예를 들어, 이에 의해 캡슐화될 수 있음). 예를 들어, 제제는 전기천공, 초음파처리, 수동 확산, 교반, 지질 추출, 또는 압출 중 하나 이상에 의해 LPMP 내로 도입될 수 있다. 일부 경우에, 제제는 미세유체 장치를 사용하여, 예를 들어, LPMP 지질이 유기 상으로 제공되는 방법을 사용하여 LPMP에 삽입되고, 이중 작용제는 수성 상으로 제공되며, 유기 상 및 수성 상은 미세유체 장치에서 조합되어 이중 작용제를 포함하는 LPMP를 생성한다. 로딩된 LPMP는 (예를 들어, 소분자를 평가하는) HPLC, (예를 들어, 단백질을 평가하는) 면역블롯팅; 및/또는 (예를 들어, 뉴클레오티드를 평가하는) 정량적 PCR과 같은 다양한 방법을 사용하여 평가되어 로딩된 제제의 존재 또는 수준을 확인할 수 있다. 그러나, 당업자는 관심 물질을 LPMP에 로딩하는 것은 상기 예시된 방법에 한정되지 않는다는 것을 이해해야 한다.

[0349] 일부 경우에, 제제는 LPMP에 접합될 수 있으며, 여기서 제제는 LPMP에 간접적으로 또는 직접적으로 연결되거나 결합된다. 예를 들어, 하나 이상의 제제가 (예를 들어, 공유 결합 또는 이온 결합에 의해) LPMP의 지질 이중층에 직접 결합되도록 하나 이상의 제제가 LPMP에 화학적으로 연결될 수 있다. 일부 경우에, LPMP에 대한 다양한 제제의 접합은 먼저 하나 이상의 제제를 적절한 용매에서 적절한 가교제(예를 들어, 일반적으로 일차 아민과의 아미드 결합을 위한 카르복실 활성화제로서 사용되고 또한 인산염기와 반응하는 N-에틸카르보-디이미드("EDC"))와 혼합함으로써 달성될 수 있다. 제제가 가교제에 부착될 수 있게 하기에 충분한 인큐베이션 기간 후, 가교제/제제 혼합물은 LPMP와 조합될 수 있고, 이어서 또 다른 인큐베이션 기간 후, 수크로오스 구배(및, 예를 들어 8, 30, 45, 및 60% 수크로오스 구배)를 수행하여 LPMP에 접합된 제제로부터 유리 제제 및 유리 LPMP를 분리할 수 있다. 혼합물을 수크로오스 구배와 조합하는 단계, 및 수반되는 원심분리 단계의 일부로서, 제제에 접합된 LPMP는 수크로오스 구배에서 밴드로서 보여지므로, 접합된 LPMP는 그런 다음 수집, 세척, 및 본원에 기술된 바와 같이 사용하기에 적합한 용액에 용해될 수 있다.

[0350] 일부 경우에, LPMP는, 예를 들어 식물로 LPMP 전달 전후에 제제와 안정적으로 결합된다. 다른 경우에, LPMP는, 예를 들어 식물로 LPMP 전달 후에 제제가 LPMP로부터 해리되도록 제제와 연관된다.

[0351] LPMP는 특정 제제 또는 용도에 따라, 다양한 농도의 제제와 함께 로딩되거나 이와 제형화될 수 있다. 예를 들어, 일부 경우에, 본원에 개시된 LPMP 제형이 약 0.001, 0.01, 0.1, 1.0, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 또는 95(또는 약 0.001 내지 95의 임의의 범위) 또는 그 이상의 중량%의 제제를 포함하도록 LPMP가 로딩되거나 제형화된다. 일부 경우에, LPMP 제형이 약 95, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1.0, 0.1, 0.01, 0.001(또는 약 95 내지 0.001의 임의의 범위) 이하의 중량%의 제제를 포함하도록 LPMP가 로딩되거나 제형화된다. 예를 들어, LPMP 제형은 약 0.001 내지 약 0.01 중량%, 약 0.01 내지 약 0.1 중량%, 약 0.1 내지 약 1 중량%, 약 1 내지 약 5 중량%, 또는 약 5 내지 약 10 중

량%, 약 10 내지 약 20 중량%의 제제를 포함할 수 있다. 일부 경우에, LPMP는 약 1, 5, 10, 50, 100, 200, 또는 500, 1,000, 2,000(또는 약 1 내지 2,000의 임의의 범위) 또는 그 이상의 $\mu\text{g/ml}$ 의 제제와 로딩될 수 있거나 이로 제형화된다. 본 발명의 LPMP는 약 2,000, 1,000, 500, 200, 100, 50, 10, 5, 1(또는 약 2,000 내지 1의 임의의 범위) 이하의 $\mu\text{g/ml}$ 의 제제와 로딩될 수 있거나 이로 제형화될 수 있다.

[0352] 일부 경우에, 본원에 개시된 LPMP 제형은 적어도 0.001 중량%, 적어도 0.01 중량%, 적어도 0.1 중량%, 적어도 1.0 중량%, 적어도 2 중량%, 적어도 3 중량%, 적어도 4 중량%, 적어도 5 중량%, 적어도 6 중량%, 적어도 7 중량%, 적어도 8 중량%, 적어도 9 중량%, 적어도 10 중량%, 적어도 15 중량%, 적어도 20 중량%, 적어도 30 중량%, 적어도 40 중량%, 적어도 50 중량%, 적어도 60 중량%, 적어도 70 중량%, 적어도 80 중량%, 적어도 90 중량%, 또는 적어도 95 중량%의 제제를 포함하도록 LPMP가 로딩되거나 제형화된다. 일부 경우에, LPMP는 적어도 $1\mu\text{g/ml}$, 적어도 $5\mu\text{g/ml}$, 적어도 $10\mu\text{g/ml}$, 적어도 $50\mu\text{g/ml}$, 적어도 $100\mu\text{g/ml}$, 적어도 $200\mu\text{g/ml}$, 적어도 $500\mu\text{g/ml}$, 적어도 $1,000\mu\text{g/ml}$, 적어도 $2,000\mu\text{g/ml}$ 의 제제와 로딩되거나 이와 제형화될 수 있다.

[0353] 일부 경우에, LPMP는 제제를 포함하거나 이로 이루어진 용액에 LPMP를 현탁, 예를 들어 격력한 혼합에 의해 LPMP를 현탁 또는 재현탁함으로써 제제와 제형화된다. 제제(예를 들어, 세포 투과제, 예를 들어 핵산, 효소, 세제, 이온성, 형광성, 또는 쌍성이온성 액체, 또는 이온화 가능 지질)는, 예를 들어, 용액의 1% 미만 또는 적어도 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 100%를 포함할 수 있다.

[0354] 약학적 제형

[0355] 변형된 LPMP는, 예를 들어, 동물(예를 들어, 인간)에게 투여하기 위한 약학적 조성물(즉, 핵산 백신 조성물)로 제형화된다. 약학적 조성물은 약학적으로 허용 가능한 희석제, 담체, 및/또는 부형제와 함께 동물(예를 들어, 인간)에게 투여될 수 있다. 투여 방식 및 투여량에 따라, 본원에 기술된 방법의 약학적 조성물은 용이한 전달을 가능하게 하는 적절한 약학적 조성물로 제형화될 것이다. 단일 투여량은 필요에 따라 단위 투여량 형태일 수 있다.

[0356] 일부 구현예에서, 투여량은 0.005mg/kg , 0.01mg/kg , 0.05mg/kg , 0.1mg/kg , 0.2mg/kg , 0.3mg/kg , 0.4mg/kg , 0.5mg/kg , 1mg/kg , 2mg/kg , 3mg/kg , 4mg/kg , 5mg/kg , 6mg/kg , 7mg/kg , 8mg/kg , 9mg/kg , 10mg/kg , 또는 그 이상이다.

[0357] 일부 구현예에서, 백신은 1회, 2회, 3회, 4회, 또는 그 이상 투여된다.

[0358] LPMP/핵산 백신은, 예를 들어, 동물에게 경구 투여, 비강내 투여, 정맥내 투여(예를 들어, 주사 또는 주입), 근육내 투여, 또는 피하 투여용으로 제형화될 수 있다. 주사 가능한 제형의 경우, 다양한 효과적인 약학적 담체가 당업계에 공지되어 있다(예를 들어, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 22판, (2012) 및 ASHP Handbook on Injectable Drugs, 18판, (2014) 참조함).

[0359] 적절한 약학적으로 허용 가능한 담체 및 부형제는 사용된 투여량 및 농도에서 수용자에게 무독성이다. 허용 가능한 담체 및 부형제는 인산염, 구연산염, HEPES, 및 TAE와 같은 완충액, 아스코르브산 및 메티오닌과 같은 항산화제, 헥사메트늄 염화물, 옥타데실디메틸벤질 염화암모늄, 레조르시놀, 및 염화벤잘코늄과 같은 보존제, 인간 혈청 알부민, 젤라틴, 텍스트란, 및 면역글로불린과 같은 단백질, 폴리비닐피롤리돈과 같은 친수성 중합체, 글리신, 글루타민, 히스티딘, 및 리신과 같은 아미노산, 및 포도당, 만노오스, 수크로오스, 및 소르비톨과 같은 탄수화물을 포함할 수 있다. LPMP/핵산 백신은 종래의 약학적 관행에 따라 제형화될 수 있다. 제형 중 화합물의 농도는 투여될 활성제(예를 들어, LPMP 및 핵산)의 투여량, 및 투여 경로를 포함하는 다수의 인자에 따라 달라질 것이다.

[0360] 동물에게 경구 투여하기 위해, LPMP/핵산 백신은 경구 제형의 형태로 제조될 수 있다. 경구 사용을 위한 제형은 약학적으로 허용 가능한 비독성 부형제와의 혼합물에 활성 성분(들)을 함유하는 정제, 캡슐, 시럽, 또는 경구 액체 투여 형태를 포함할 수 있다. 이들 부형제는, 예를 들어, 불활성 희석제 또는 충전제(예를 들어, 수크로오스, 소르비톨, 당, 만니톨, 미정질 셀룰로오스, 감자 전분을 포함하는 전분, 탄산칼슘, 염화나트륨, 락토오스, 인산칼슘, 황산칼슘, 또는 인산나트륨); 파립화제 및 붕해제(예를 들어, 미정질 셀룰로오스를 포함하는 셀룰로오스 유도체, 감자 전분을 포함하는 전분, 크로스카멜로오스 나트륨, 알긴산염, 또는 알긴산); 결합제(예를 들어, 수크로오스, 포도당, 소르비톨, 아카시아, 알긴산, 알긴산 나트륨, 젤라틴, 전분, 전호화 전분, 미정질 셀룰로오스, 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨, 메틸셀룰로오스, 하이드록시프로필 메틸셀룰로오스, 에틸셀룰로오스, 폴리비닐피롤리돈, 또는 폴리에틸렌 글리콜); 및 윤활제, 활택제, 및 유착 방지제(예를 들어, 스테아린산마그네슘, 스테아린산 아연, 스테아르산, 실리카, 수소화된 식물성 오일, 또는

활석)일 수 있다. 다른 약학적으로 허용 가능한 부형제는 착색제, 향미제, 가소제, 습윤제, 완충제 등일 수 있다. 또한 경구 사용을 위한 제형은 씹을 수 있는 정제, 씹을 수 없는 정제, 캡슐, 캡슐(예를 들어, 활성 성분이 불활성 고형 회석제와 혼합되는 경질 젤라틴 캡슐, 또는 활성 성분이 물 또는 오일 매질과 혼합되는 연질 젤라틴 캡슐)로서 단위 투여 형태로 제공될 수 있다. 또한 본원에 개시된 조성물은 즉시 방출형, 연장 방출형, 또는 지연 방출형 제형을 추가로 포함할 수 있다.

[0361] 동물에게 비경구 투여하기 위해, LPMP/핵산 백신은 액체 용액 또는 현탁액의 형태로 제형화되고, 비경구 경로(예를 들어, 피하, 정맥내, 또는 근육내)에 의해 투여될 수 있다. 약학적 조성물은 주사용 또는 주입용으로 제형화될 수 있다. 비경구 투여용 약학적 조성물은 멸균 용액 또는 임의의 약학적으로 허용 가능한 액체를 비히클로서 사용하여 제형화될 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 비히클은 멸균수, 생리 식염수, 또는 세포 배양 배지(예를 들어, DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium), α -MEM(α -Modified Eagles Medium), 및 F-12 배지)를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 제형화 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어, Gibson 편집한 문헌[Pharmaceutical Preformulation and Formulation(2판) Taylor & Francis Group, CRC Press (2009)]을 참조한다.

[0362] **폴리뉴클레오티드**

[0363] LPMP/핵산 백신은 하나 이상의 핵산 분자, 예를 들어, 하나 이상의 야생형 또는 조작된 단백질, 펩티드, 또는 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 예시적인 폴리뉴클레오티드, 예를 들어 폴리뉴클레오티드 작제물은 RNA 폴리뉴클레오티드, 예를 들어 mRNA를 암호화하는 항원을 포함한다.

[0364] 본원에서 사용될 수 있는 폴리펩티드의 예는 효소(예를 들어, 대사 재조합효소, 헬리카아제, 인테그라아제, RNase, DNase, 또는 유비퀴틴화 단백질), 기공 형성 단백질, 신호 전달 리간드, 세포 침투 펩티드, 전사 인자, 수용체, 항체, 나노바디, 유전자 편집 단백질(예를 들어, CRISPR-Cas 시스템, TALEN, 또는 아연 핑거), 리보단백질, 단백질 압타머, 또는 샤페론을 포함할 수 있다.

[0365] 본원에 포함된 폴리펩티드는 자연 발생 폴리펩티드 또는 재조합적으로 생산된 변이체를 포함할 수 있다. 일부 경우에, 폴리펩티드는 기능적 단편 또는 이의 변이체(예를 들어, 효소적으로 활성인 단편 또는 이의 변이체)일 수 있다. 예를 들어, 폴리펩티드는, 예를 들어 특정 영역 또는 전체 서열에 걸쳐 본원에 기술된 폴리펩티드 또는 자연 발생 폴리펩티드의 서열에 대해 적어도 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 본원에 기술된 폴리펩티드 중 어느 하나의 기능적 활성 변이체일 수 있다. 일부 경우에, 폴리펩티드는 관심 단백질과 적어도 50%(예를 들어, 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 99%, 또는 그 이상)의 동일성을 가질 수 있다.

[0366] LPMP/핵산 백신은 임의의 수 또는 유형(예를 들어, 부류)의 폴리펩티드, 예컨대 1개의 폴리펩티드, 2개, 3개, 4개, 5개, 10개, 15개, 20개, 또는 그 이상의 폴리펩티드 중 적어도 약 하나를 포함할 수 있다. LPMP/핵산 백신 내에서 각각의 폴리펩티드의 적절한 농도는 효능, 폴리펩티드의 안정성, 제형에서 구별되는 폴리펩티드의 수, 및 제형의 적용 방법과 같은 인자에 따라 달라진다. 일부 경우에, 액체 제형 내 각각의 폴리펩티드는 약 0.1ng/mL 내지 약 100mg/mL이다. 일부 경우에, 고형 제형 내 각각의 폴리펩티드는 약 0.1ng/g 내지 약 100mg/g이다.

[0367] 펩티드를 암호화하는 핵산

[0368] 일부 경우에, LPMP/핵산 백신은 폴리펩티드를 암호화하는 이중 핵산을 포함한다. 폴리펩티드를 암호화하는 핵산의 길이는 약 10개 내지 약 50,000개의 뉴클레오티드(nts), 약 25개 내지 약 100개의 nts, 약 50개 내지 약 150개의 nts, 약 100개 내지 약 200개의 nts, 약 150개 내지 약 250개의 nts, 약 200개 내지 약 300개의 nts, 약 250개 내지 약 350개의 nts, 약 300개 내지 약 500개의 nts, 약 10개 내지 약 1000개의 nts, 약 50개 내지 약 1000개의 nts, 약 100개 내지 약 1000개의 nts, 약 1000개 내지 약 2000개의 nts, 약 2000개 내지 약 3000개의 nts, 약 3000개 내지 약 4000개의 nts, 약 4000개 내지 약 5000개의 nts, 약 5000개 내지 약 6000개의 nts, 약 6000개 내지 약 7000개의 nts, 약 7000개 내지 약 8000개의 nts, 약 8000개 내지 약 9000개의 nts, 약 9000개 내지 약 10,000개의 nts, 약 10,000개 내지 약 15,000개의 nts, 약 10,000개 내지 약 20,000개의 nts, 약 10,000개 내지 약 25,000개의 nts, 약 10,000개 내지 약 30,000개의 nts, 약 10,000개 내지 약 40,000개의 nts, 약 10,000개 내지 약 45,000개의 nts, 약 10,000개 내지 약 50,000개의 nts, 또는 이들 사이의 임의의 범위일 수 있다.

- [0369] 또한 LPMP/핵산 백신은 관심 핵산 서열의 활성 변이체를 포함할 수 있다. 일부 경우에, 핵산의 변이체는, 예를 들어 특정 영역에 걸쳐 또는 전체 서열에 걸쳐 관심 핵산의 서열에 대해 적어도 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는다. 일부 경우에, 본 발명은 본원에 기술된 바와 같은 핵산 변이체에 의해 암호화된 활성 폴리펩티드를 포함한다. 일부 경우에, 핵산 변이체에 의해 암호화된 활성 폴리펩티드는, 예를 들어 특정 영역 또는 전체 아미노산 서열에 걸쳐 관심 폴리펩티드 또는 자연 유래 폴리펩티드 서열의 서열에 대해 적어도 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는다.
- [0370] 단백질을 암호화하는 핵산을 발현시키기 위한 특정 방법은 적절한 프로모터의 조절 하에 곤충, 효모, 식물, 박테리아, 또는 다른 세포를 포함하는 세포에서의 발현을 포함할 수 있다. 발현 벡터는 전사되지 않은 요소, 예컨대 복제 기원, 적절한 프로모터 및 인핸서, 및 다른 5' 또는 3' 측부 비 전사 서열, 및 5' 또는 3' 미번역 서열, 예컨대 필요한 리보솜 결합 부위, 폴리아데닐화 부위, 스플라이스 공여자 및 수용자 부위, 및 종결 서열을 포함할 수 있다. SV40 바이러스 계놈으로부터 유래된 DNA 서열, 예를 들어, SV40 기원, 초기 프로모터, 인핸서, 스플라이스, 및 폴리아데닐화 부위는 이중 DNA 서열의 발현에 필요한 다른 유전적 요소를 제공하는 데 사용될 수 있다. 박테리아, 진균, 효모 및 포유류 세포 숙주와 함께 사용하기 위한 적절한 클로닝 및 발현 벡터는 Green 등의 문헌[Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4판, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012]에 기술되어 있다.
- [0371] 재조합 방법을 사용한 유전적 변형은 일반적으로 당업계에서 공지되어 있다. 바람직한 유전자를 코딩하는 핵산 서열은 당업계에 공지된 재조합 방법을 사용하여, 예를 들어 유전자를 발현하는 세포로부터 라이브러리를 스크리닝함으로써, 이를 포함하는 것으로 알려진 벡터로부터 유전자를 유도함으로써, 또는 표준 기술을 사용하여 이를 함유하는 세포 및 조직으로부터 직접 단리함으로써 획득될 수 있다. 대안적으로, 관심 유전자는 클로닝되기보다는 합성적으로 생산될 수 있다.
- [0372] 통상적으로 천연 핵산 또는 합성 핵산의 발현은 관심 유전자를 암호화하는 핵산을 프로모터에 작동 가능하게 연결하고 작제물을 발현 벡터에 삽입시킴으로써 달성된다. 발현 벡터는 박테리아에서의 복제 및 발현에 적합할 수 있다. 또한 발현 벡터는 진핵생물에서의 복제 및 통합에 적합할 수 있다. 통상적인 클로닝 벡터는 바람직한 핵산 서열의 발현에 유용한 전사 및 번역 종결자, 개시 서열, 및 프로모터를 함유한다.
- [0373] 추가 프로모터 요소, 예를 들어 인핸서는 전사 개시의 빈도를 조절한다. 통상적으로, 이들은 시작 부위의 상류에 있는 영역 30~110 염기쌍(bp)에 위치하지만, 다수의 프로모터가 최근에 시작 부위의 하류에 기능적 요소 또한 함유하는 것으로 나타났다. 프로모터 요소 사이의 간격은 종종 가요성이어서, 요소가 서로에 대해 반전되거나 이동될 때 프로모터 기능이 보존된다. 티미딘 키나아제(tk) 프로모터에서, 프로모터 요소 사이의 간격은 활성이 감소하기 시작하기 전에 50bp까지 증가될 수 있다. 프로모터에 따라, 개별 요소는 전사를 활성화하기 위해 협력적으로 또는 독립적으로 기능할 수 있는 것으로 보인다.
- [0374] 적절한 프로모터의 일례는 즉각적인 초기 거대세포바이러스(CMV) 프로모터 서열이다. 이러한 프로모터 서열은 작동 가능하게 연결된 임의의 폴리뉴클레오티드 서열의 높은 수준의 발현을 유도할 수 있는 강한 구성적 프로모터 서열이다. 적합한 프로모터의 또 다른 예는 신장성장인자-1 α (EF-1 α)이다. 그러나 다음을 포함하지만 이에 한정되지 않는 다른 구성 프로모터 서열이 또한 사용될 수 있다: 유인원 바이러스 40(SV40) 초기 프로모터, 마우스 유방 종양 바이러스(MMTV), 인간 면역 결핍 바이러스(HIV) 긴 말단 반복(LTR) 프로모터, MoMuLV 프로모터, 조류 백혈병 바이러스 프로모터, Epstein-Barr 바이러스 즉시 초기 프로모터, Rous 육종 바이러스 프로모터, 및 인간 유전자 프로모터, 예컨대 이에 한정되지는 않지만, 액틴 프로모터, 미오신 프로모터, 헤모글로빈 프로모터, 및 크레아틴 키나아제 프로모터.
- [0375] 대안적으로, 프로모터는 유도성 프로모터일 수 있다. 유도성 프로모터의 사용은 이러한 발현이 바람직할 때 작동 가능하게 연결되는 폴리뉴클레오티드 서열의 발현을 발동시키거나, 발현이 바람직하지 않을 때 발현을 발동시키지 않는 분자 스위치를 제공한다. 유도성 프로모터의 예는 메탈로티오닌 프로모터, 글루코코르티코이드 프로모터, 프로그스테론 프로모터, 및 테트라사이클린 프로모터를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0376] 또한 도입될 발현 벡터는 선택성 마커 유전자 또는 리포터 유전자 또는 둘 모두를 함유하여 바이러스 벡터를 통해 형질감염되거나 감염되도록 하는 세포 집단으로부터 발현 세포의 식별 및 선택을 용이하게 할 수 있다. 다른 양태에서, 선택성 마커는 별도의 DNA 조각 상에서 운반될 수 있고 공동 형질감염 절차에 사용될 수 있다. 선택성 마커 및 리포터 유전자 둘 모두는 적절한 조절 서열이 측면에 위치하여 숙주 세포에서의 발현을 가능하게 할

수 있다. 유용한 선택성 마커는, 예를 들어 네오 등과 같은 항생제-저항성 유전자를 포함한다.

- [0377] 리포터 유전자는 잠재적으로 형질전환된 세포를 식별하고 조절 서열의 기능을 평가하는 데 사용될 수 있다. 일반적으로, 리포터 유전자는 수용자 공급원에 존재하지 않거나 수용자 공급원에 의해 발현되지 않으며, 발현이 일부 쉽게 검출 가능한 특성, 예를 들어 효소 활성에 의해 나타나는 폴리펩티드를 암호화하는 유전자이다. 리포터 유전자의 발현은 DNA가 수용자 세포 내로 도입된 후 적절한 시간에 분석된다. 적절한 리포터 유전자는 루시페라아제, 베타-갈락토시다아제, 클로람페니콜 아세틸 트랜스퍼라아제, 분비된 알칼리 인산분해효소, 또는 녹색 형광 단백질 유전자를 암호화하는 유전자를 포함할 수 있다(예를 들어, Ui-Tei 등의 문헌[FEBS Letters 479:79-82, 2000]). 적절한 발현 시스템은 잘 알려져 있으며 공지된 기술을 사용하여 제조되거나 상업적으로 취득될 수 있다. 일반적으로, 리포터 유전자의 가장 높은 발현 수준을 보여주는 최소 5' 측부 영역을 갖는 작체물은 프로모터로서 식별된다. 이러한 프로모터 영역은 리포터 유전자에 연결될 수 있고, 프로모터 유도 전사를 조절하는 능력에 대해 제제를 평가하는 데 사용될 수 있다.
- [0378] 일부 경우에, 유기체는 유전적으로 변형되어 하나 이상의 단백질의 변경할 수 있다. 하나 이상의 단백질의 발현은 특정 시간, 예를 들어 유기체의 발생 또는 분화 상태 동안 변형될 수 있다. 하나의 경우에, 하나 이상의 단백질, 예를 들어 활성, 구조, 또는 기능에 영향을 미치는 단백질의 발현을 변경하기 위한 조성물이 제공된다. 하나 이상의 단백질의 발현은 특정 위치(들)로 제한되거나 유기체 전체에 걸쳐 확산될 수 있다.
- [0379] *mRNA*
- [0380] LPMP/핵산 백신은 mRNA 분자, 예를 들어 폴리펩티드를 암호화하는 mRNA 분자를 포함할 수 있다. mRNA 분자는 합성이고 (예를 들어, 화학적으로) 변형될 수 있다. mRNA 분자는 시험관 내에서 화학적으로 합성되거나 전사될 수 있다. mRNA 분자는 플라스미드, 예를 들어 바이러스 벡터, 박테리아 벡터, 또는 진핵생물 발현 벡터 상에 배치될 수 있다. 일부 예에서, mRNA 분자는 형질감염, 전기천공, 또는 형질도입(예를 들어, 아데노바이러스 또는 렌티바이러스 형질도입)에 의해 세포로 전달될 수 있다.
- [0381] 일부 경우에, 본원에 기술된 변형된 관심 RNA 제제는 변형된 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드를 갖는다. 이러한 변형은 공지되어 있고, 예를 들어 WO 2012/019168에 기술되어 있다. 추가 변형은, 예를 들어 WO 2015/038892; WO 2015/038892; WO 2015/089511; WO 2015/196130; WO 2015/196118, 및 WO 2015/196128 A2에 기술되어 있으며, 동 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.
- [0382] 일부 경우에, 관심 폴리펩티드를 암호화하는 변형된 RNA는 하나 이상의 말단 변형, 예를 들어, 5' 캡 구조 및/또는 (예를 들어, 100 내지 200개 뉴클레오타이드 길이의) 폴리-A 꼬리를 갖는다. 5' 캡 구조는 Cap0, Cap1, ARCA, 이노신, N1-메틸-구아노신, 2'플루오로-구아노신, 7-데아자-구아노신, 8-옥소-구아노신, 2-아미노-구아노신, LNA-구아노신, 및 2-아지도-구아노신으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 일부 경우에, 변형된 RNA는 또한 적어도 하나의 코작 서열을 포함하는 5' UTR 및 3' UTR을 함유한다. 이러한 변형은 공지되어 있고, 예를 들어 WO 2012/135805 및 WO 2013/052523에 기술되어 있으며, 동 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다. 추가적인 말단 변형은, 예를 들어 WO 2014/164253, 및 WO 2016/011306, WO 2012/045075, 및 WO 2014/093924에 기술되어 있으며, 동 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다. 적어도 하나의 화학적 변형을 포함할 수 있는 캡핑된 RNA 분자(예를 들어, 변형된 mRNA)를 합성하기 위한 키메라 효소는 WO 2014/028429에 기술되어 있으며, 동 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.
- [0383] 일부 경우에, 변형된 mRNA는 고리화되거나 연결되어, 폴리-A 결합 단백질과 5'-말단 결합 단백질 사이의 상호작용을 보조하기 위한 번역 적격 분자를 생성할 수 있다. 고리화 또는 연결 메커니즘은 적어도 3개의 상이한 경로를 통해 발생할 수 있다: 1) 화학적 경로, 2) 효소적 경로, 및 3) 리보자임 촉매된 경로. 새롭게 형성된 5'-/3'- 결합은 분자내 또는 분자간 발생할 수 있다. 이러한 변형은, 예를 들어 WO 2013/151736에 기술되어 있다.
- [0384] 변형된 RNA를 제조하고 정제하는 방법은 당업계에 공지되고 개시되어 있다. 예를 들어, 변형된 RNA는 시험관 내 전사(IVT) 효소 합성만을 사용하여 제조된다. IVT 폴리뉴클레오타이드를 제조하는 방법은 당업계에 공지되어 있고 WO 2013/151666, WO 2013/151668, WO 2013/151663, WO 2013/151669, WO 2013/151670, WO 2013/151664, WO 2013/151665, WO 2013/151671, WO 2013/151672, WO 2013/151667 및 WO 2013/151736에 기술되어 있으며, 동 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다. 정제 방법은, RNA 전사체가 표면에 결합하도록 하는 조건 하에서 복수의 티미딘 또는 이의 유도체 및/또는 복수의 우라실 또는 이의 유도체(폴리T/U)와 결합된 표면과 샘플을 접촉 시킴으로써 폴리A 꼬리를 포함하는 RNA 전사체를 정제하고 정제된 RNA 전사체를 표면으로부터 용리하는 단계(WO 2014/152031); 확장 가능한 방법(WO 2014/144767)을 통해 길이가 최대 10,000개의 뉴클레오타이드인 더 긴 RNA를

분리시키는 이온(예를 들어, 음이온) 교환 크로마토그래피를 사용하는 단계; 및 변형된 mRNA 샘플을 DNase 처리 (WO 2014/152030)하는 단계를 포함한다.

[0385] 변형된 RNA의 제형은 공지되어 있고, 예를 들어 WO 2013/090648에 기술되어 있다. 예를 들어, 제형은 나노입자, 폴리(락트-코-글리콜산)(PLGA) 미소구체, 리피도이드, 리포플렉스, 리포솜, 중합체, 탄수화물(단리당 포함), 양이온성 지질, 피브린 겔, 피브린 하이드로겔, 피브린 글루, 피브린 밀봉제, 피브리노겐, 트롬빈, 신속하게 제거되는 지질 나노입자(reLNP) 및 이들의 조합일 수 있지만, 이에 한정되지 않는다.

[0386] 인간 질환, 항체, 바이러스, 및 다양한 생체 내 환경 분야에서 폴리펩티드를 암호화하는 변형된 RNA가 공지되어 있고, 예를 들어 국제 공개 번호 WO 2013/151666, WO 2013/151668, WO 2013/151663, WO 2013/151669, WO 2013/151670, WO 2013/151664, WO 2013/151665, WO 2013/151736의 표 6; 국제 공개 번호 WO 2013/151672의 표 6 및 표 7; 국제 공개 번호 WO 2013/151671의 표 6, 표 178, 및 표 179; 국제 공개 번호 WO 2013/151667의 표 6, 표 185, 및 표 186에 기술되어 있으며, 동 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다. 전술한 것 중 어느 하나는 IVT 폴리뉴클레오티드, 키메라 폴리뉴클레오티드 또는 원형 폴리뉴클레오티드로서 합성될 수 있고, 각각은 하나 이상의 변형된 뉴클레오티드 또는 말단 변형을 포함할 수 있다.

[0387] 억제 RNA

[0388] 일부 경우에, LPMP/핵산 백신은, 예를 들어 RNA 간섭(RNAi) 경로를 통해 작용하는 억제 RNA 분자를 포함한다. 일부 경우에, 억제 RNA 분자는 식물에서 유전자 발현 수준을 감소시키고/시키거나 식물에서 단백질의 수준을 감소시킨다. 일부 경우에, 억제 RNA 분자는 식물 유전자의 발현을 억제한다. 예를 들어, 억제 RNA 분자는 식물에서 유전자를 표적화하는 짧은 간섭 RNA 또는 이의 전구체, 짧은 헤어핀 RNA, 및/또는 마이크로RNA 또는 이의 전구체를 포함할 수 있다. 소정의 RNA 분자는 RNA 간섭(RNAi)의 생물학적 과정을 통해 유전자 발현을 억제할 수 있다. RNAi 분자는 통상적으로 15-50개의 염기쌍(예컨대, 약 18-25개의 염기쌍)을 함유하고 세포 내에서 발현된 표적 유전자의 코딩 서열과 동일하거나(또는 상보성) 거의 동일한(또는 실질적으로 상보성) 핵염기 서열을 갖는 RNA 또는 RNA-유사 구조를 포함한다. RNAi 분자는 짧은 간섭 RNA(siRNA), 이중 가닥 RNA(dsRNA), 짧은 헤어핀 RNA(shRNA), 중이중체, 다이스 기질, 및 다가 RNA 간섭(미국 특허 제8,084,599호, 제8,349,809호, 제8,513,207호, 및 제9,200,276호에 기술되어 있으며, 동 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다)을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 억제 RNA 분자는 시험관 내에서 화학적으로 합성되거나 전사될 수 있다.

[0389] 억제 RNA 분자의 추가 예시는 국제 특허 출원 공개 WO 2021/041301에 상세히 기술된 것들을 포함하며, 동 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

[0390] 유전자 편집

[0391] 일부 경우에, LPMP/핵산 백신은 유전자 편집 시스템의 성분을 포함할 수 있다. 예를 들어, 제제는 식물의 유전자에 변경(예를 들어, 삽입, 결실(예를 들어, 녹아웃), 전위, 반전, 단일 지점 돌연변이, 또는 다른 돌연변이)을 도입할 수 있다. 예시적인 유전자 편집 시스템은 징크 핑거 뉴클레아제(ZFN), 전사 활성화화제-유사 효과기-기반 뉴클레아제(TALEN), 및 군집화된 조절 간격 짧은 회문 반복(CRISPR) 시스템을 포함한다. ZFN, TALEN, 및 CRISPR-기반 방법은, 예를 들어 Gaj 등의 문헌[Trends Biotechnol. 31(7):397-405, 2013]에 기술되어 있다.

[0392] 유전자 편집 시스템의 성분 및 공정에 대한 추가 설명은 국제 특허 출원 공개 WO 2021/041301에서 확인할 수 있으며, 동 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

[0393] **바이러스 감염용 핵산 백신**

[0394] LPMP/핵산 백신은 하나 이상의 항원성 폴리펩티드를 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)를 포함하여 다양한 바이러스 감염을 방지한다. 하나 이상의 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)는 감염성 질환, 장애, 또는 병태, 예를 들어 RNA 바이러스에 의해 야기된 바이러스 감염을 유발하는 감염원으로부터 유래된 하나 이상의 항원성 폴리펩티드를 암호화한다.

[0395] 일부 구현예에서, LPMP/핵산 백신 내의 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)는 후술하는 바와 같이 다양한 유형 및 계통의 바이러스의 하나 이상의 야생형 항원 또는 조작된 항원(또는 항원에 대한 항체)을 암호화한다.

[0396] 바이러스 감염.

[0397] LPMP/핵산 백신은 다음을 포함하지만 이에 한정되지 않는 바이러스 감염과 연관된 감염성 질환, 장애, 또는 병태를 퇴치하는 데 적절할 수 있다: 급성열성인두염, 인두결막염, 유행성각결막염, 유아 위장염, 콕사키 감염,

염성 단핵구증, 버킷 림프종, 급성 간염, 만성 간염, 간경변, 간세포암종, 원발성 HSV-1 감염(예를 들어, 소아의 치은구내염, 성인의 편도선염 및 인두염, 각결막염), 잠복성 HSV-1 감염(예를 들어, 음순 헤르페스 및 입술 헤르페스), 원발성 HSV-2 감염, 잠복성 HSV-2 감염, 무균성 수막염, 감염단핵구증, 세포거대봉입병, 카포시 육종, 다발성 성병, 원발성 삼출성 림프종, AIDS, 인플루엔자, 라이 증후군, 홍역, 감염후 뇌척수염, 볼거리, 증식성 상피 병변(예를 들어, 일반, 편평, 발바닥 및 항문생식기 사마귀, 후두 유두종, 표피이형성증), 자궁경부암종, 편평세포암종, 크루프, 폐렴, 기관지염, 감기, 소아마비, 광견병, 세기관지염, 폐렴, 인플루엔자 유사 증후군, 폐렴을 동반한 중증 세기관지염, 독일홍역, 선천성 풍진, 수두, 및 대상포진.

[0398] 예시적인 바이러스 감염원은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된 바이러스 균주를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다: 아데노바이러스; 단순 포진 1형; 단순포진 2형; 뇌염 바이러스, 유두종 바이러스, 수두-대상포진 바이러스; 엡스타인(Epstein-barr) 바이러스; 인간 거대세포바이러스; 인간 헤르페스바이러스 8형; 인유두종 바이러스; BK 바이러스; JC 바이러스; 침연두; 소아마비 바이러스, B형 간염 바이러스; 인간 보카바이러스; 파보바이러스 B19; 인간 정상 바이러스; 노워크(Norwalk) 바이러스; 콕사키바이러스; A형 간염 바이러스; 소아마비바이러스; 라이노바이러스; 중증급성호흡기증후군 바이러스; C형 간염 바이러스; 황열병 바이러스; 뎅기열 바이러스; 웨스트나일 바이러스; 풍진 바이러스; E형 간염 바이러스; 인간 면역결핍 바이러스(HIV); A형 또는 B형 인플루엔자 바이러스; 과나리토 바이러스; 준인바이러스; 라사바이러스; 마추포 바이러스; 사비아 바이러스; 크림-콩고 출혈열 바이러스; 에볼라 바이러스; 마르부르크 바이러스; 홍역 바이러스; 볼거리 바이러스; 파라인플루엔자 바이러스; RS 바이러스; 인간 메타뉴모바이러스; 헨드라 바이러스; 니파 바이러스; 광견병 바이러스; D형 간염; 로타바이러스; 오르비바이러스; 콜티바이러스; 한타바이러스, 중동 호흡기 코로나바이러스; 치쿤구니야 바이러스 또는 바나 바이러스.

[0399] 감염원은 다음 표의 바이러스로 이루어진 군으로부터 선택된 바이러스 군주일 수 있다.

아데노바이러스
바나 바이러스
BK 바이러스
치쿤구니아 바이러스
콜티바이러스
콕사키바이러스
크림-콩고 출혈열 바이러스
덴기열 바이러스
에볼라 바이러스
뇌염 바이러스
일본 뇌염 바이러스
동부 말 뇌염
엡스타인-바르(Epstein-barr) 바이러스
과나리토 바이러스
한타 바이러스
단순 포진 1형
단순 포진 2형
인간 헤르페스바이러스 8형
대상포진(수두대상포진; 대상포진) 바이러스
A형 간염 바이러스
B형 간염 바이러스
C형 간염 바이러스
D형 간염
E형 간염 바이러스
헨드라 바이러스
인간 정상 바이러스
인간 보카바이러스
인간 거대세포바이러스
인간 엔테로바이러스
인간 엔테로바이러스 68
인간 엔테로바이러스 71
인간 메타뉴모바이러스
인간 면역결핍 바이러스(HIV)
인플루엔자 바이러스
파라인플루엔자 바이러스
JC 바이러스
주닌 바이러스
라사 바이러스
마추포 바이러스
마르부르크 바이러스
홍역 바이러스
볼거리 바이러스
니파 바이러스
노워크 바이러스
오르비바이러스
유두종바이러스

[0400]

인간 유두종바이러스(HPV)
파보바이러스 B19
쇼아마비 바이러스
광견병 바이러스
리노 바이러스
로타바이러스
풍진 바이러스
호흡기 세포융합 바이러스(RSV)
중증 급성 호흡기 증후군(SARS) 바이러스
중동 호흡기 증후군 코로나(MERS) 바이러스
SARS-CoV-2
천연두
사비아 바이러스
소포성 액산테르나바이러스
웨스트 나일 바이러스
황열병 바이러스
지카 바이러스

[0401]

[0402] 다른 적절한 바이러스 감염증 및 바이러스 감염원은 미국 특허 출원 공개 US2019/0015501 및 미국 특허 제 11,007,260호에 기술되어 있으며, 동 문헌 모두는 그 전체가 참조로서 통합된다.

- [0403] 모기 매개 바이러스
- [0404] **덴기**. 일부 구현예에서, LPMP/핵산 백신 내 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)는 덴기 바이러스(플라비 바이러스)의 균주를 암호화한다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)는 E 단백질 도메인 III(DENV1-4 탠덤 mRNA), E 단백질 도메인 I/II 힌지 영역(DENV1-4 개별 mRNA), prM 단백질(DENV1-4 탠덤 또는 개별 mRNA), 및 C 단백질(DENV1-4 탠덤 또는 단일 mRNA)을 암호화한다.
- [0405] **치쿤구니아(Chikungunya)** 바이러스. 일부 구현예에서, LPMP/핵산 백신 내 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)는 치쿤구니아 바이러스의 균주를 암호화한다. 일부 구현예에서, 항원성 폴리펩티드는 C, E1, E2, E3, 6K, 및 C-E3-E2-6K-E1로 이루어진 균으로부터 선택된 치쿤구니아 외피 및/또는 캡시드 항원성 폴리펩티드를 암호화한다.
- [0406] 일부 구현예에서, LPMP/핵산 백신 내 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)는 다음의 균주 및 단리체로부터 선택된 치쿤구니아 폴리펩티드를 암호화한다: TA53, SA76, UG82, 37997, IND-06, 로스(Ross), S27, M-713424, E1-A226V, E1-T98, IND-63-WB1, 깁스(Gibbs) 63-263, TH35, 1-634029, AF15561, IND-73-MH5, 653496, C0392-95, P0731460, MY0211MR/06/BP, SV0444-95, K0146-95, TSI-GSD-218-VR1, TSI-GSD-218, M127, M125, 6441-88, MY0031MR/06/BP, MY0021MR/06/BP, TR206/H804187, MY/06/37348, MY/06/37350, NC/2011-568, 1455-75, RSU1, 0706aTw, InDRE51CHIK, PR-S4, AMA2798/H804298, Hu/85/NR/001, PhH15483, 0706aTw, 0802aTw, MY0191MR/06/BP, PR-S6, PER160/H803609, 99659, JKT23574, 0811aTw, CHIK/SBY6/10, 2001908323-BDG E1, 2001907981-BDG E1, 2004904899-BDG E1, 2004904879-BDG E1, 2003902452-BDG E1, DH 130003, 0804aTw, 2002918310-BDG E1, JC2012, 치크시(chik-sy), 3807, 3462, Yap 13-2148, PR-S5, 0802aTw, MY0191MR/06/Bp, 0706aTw, PhH15483, Hu/85/NR/001, CHIKV-13-112A, InDRE 4CHIK, 0806aTw, 0712aTw, 3412-78, Yap 13-2039, LEIV-CHIKV/Moscow/1, DH130003, 및 20039.
- [0407] **지카(Zika)** 바이러스. 일부 구현예에서, LPMP/핵산 백신 내 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)는 지카 바이러스(플라비 바이러스)의 균주를 암호화한다. 일부 구현예에서, LPMP/핵산 백신 내 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)는 MR 766, SPH2015, 및 ACD75819로 이루어진 균으로부터 선택된 ZIKV 혈청형으로부터의 ZIKV 폴리펩티드를 암호화한다.
- [0408] **베네수엘라 말 뇌염(Venezuelan Equine Encephalitis, VEE)** 바이러스. 일부 구현예에서, LPMP/핵산 백신 내 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)는 VEE 바이러스의 균주를 암호화한다.
- [0409] LPMP/핵산 백신 내 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)는 그 전체가 참조로서 본원에 통합되는 미국 특허 제 11,007,260호에 기술된 것과 같이, 모기-매개 바이러스의 추가 유형의 바이러스 및 균주, 또는 이의 단편을 암호화할 수 있다.
- [0410] 인플루엔자
- [0411] 일부 구현예에서, LPMP/핵산 백신 내 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)는 인플루엔자 바이러스의 균주를 암호화한다. 일부 구현예에서, LPMP/핵산 백신 내 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)는 인플루엔자 A 또는 인플루엔자 B의 균주 또는 이들의 조합을 암호화한다. 일부 구현예에서, 인플루엔자 A 또는 인플루엔자 B의 균주는 조류, 돼지, 말, 개, 인간, 또는 비인간 영장류와 연관된다.
- [0412] 일부 구현예에서, LPMP/핵산 백신 내 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)는 헤마글루티닌 단백질 또는 이의 단편을 암호화한다. 일부 구현예에서, 헤마글루티닌 단백질은 H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, H16, H17, H18, 또는 이의 단편이다. 일부 구현예에서, 헤마글루티닌 단백질은 헤드 도메인(HA1)을 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, 헤마글루티닌 단백질은 헤드 도메인(HA1)의 일부를 포함한다. 일부 구현예에서, 헤마글루티닌 단백질은 세포질 도메인을 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, 헤마글루티닌 단백질은 세포질 도메인의 일부를 포함한다.
- [0413] 일부 구현예에서, LPMP/핵산 백신 내 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)는 절단된 헤마글루티닌 단백질을 암호화한다. 일부 구현예에서, 절단된 헤마글루티닌 단백질은 막관통 도메인의 일부를 포함한다. 일부 구현예에서, 바이러스는 H1N1, H3N2, H5N1, H7N9, 및 H10N8로 이루어진 균으로부터 선택된다.
- [0414] LPMP/핵산 백신 내 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)는 그 전체가 참조로서 본원에 통합되는 미국 특허 출원 공개 제2019/0015501호에 기술된 것과 같이, 인플루엔자 바이러스의 추가 유형의 바이러스 및 균주 또는 이의 단편을 암호화할 수 있다.

- [0415] 코로나바이러스
- [0416] **베타코로나바이러스.** 일부 구현예에서, LPMP/핵산 백신 내 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)는 베타코로나바이러스(BetaCoV)의 스파이크 단백질(S), 또는 이의 단편 또는 서브유닛을 포함하는 펩티드/단백질을 암호화한다.
- [0417] 일부 구현예에서, LPMP/핵산 백신 내 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)는 베타코로나바이러스(BetaCoV)의 스파이크 단백질(S), 또는 이의 단편 또는 서브유닛을 포함하는 펩티드/단백질을 암호화하는 개방 해독 프레임을 포함한다.
- [0418] LPMP/핵산 백신 내 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)는 그 전체가 참조로서 본원에 통합되는 미국 특허 제 10,933,127호에 기술된 것과 같이, 상이한 유형의 베타코로나바이러스 및 베타코로나바이러스의 균주, 또는 이의 단편을 암호화할 수 있다.
- [0419] **중동 호흡기 증후군 코로나바이러스.** 일부 구현예에서, LPMP/핵산 백신 내 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)는 MERS 코로나바이러스의 스파이크 단백질(S), 스파이크 S1 단편(S1), 외피 단백질(E), 막 단백질(M), 및/또는 뉴클레오캡시드 단백질(N), 또는 이들 단백질 중 어느 하나의 단편 또는 변이체를 암호화한다.
- [0420] LPMP/핵산 백신 내 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)는 그 전체가 참조로서 본원에 통합되는 미국 특허 출원 공개 US2019/0351048에 기술된 것과 같이, MERS 코로나바이러스의 상이한 균주 또는 이의 단편을 암호화할 수 있다.
- [0421] SARS-CoV-2
- [0422] 일부 구현예에서, LPMP/핵산 백신 내 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)는 SARS-CoV-2의 하나 이상의 야생형 항원 또는 조작된 항원(또는 항원에 대한 항체)을 암호화한다.
- [0423] 일부 구현예에서, LPMP/핵산 백신 내 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)의 개방 해독 프레임은 SARS-CoV-2의 하나 이상의 야생형 항원 또는 조작된 항원(또는 항원에 대한 항체)을 암호화한다. 일부 구현예에서, 개방 해독 프레임은 코돈 최적화된다.
- [0424] 일부 구현예에서, LPMP/핵산 백신 내 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)는 SARS-CoV-2 바이러스의 스파이크 단백질(S), 막(M) 단백질, 외피(E) 단백질, 및/또는 뉴클레오캡시드(NC) 단백질, 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함하는 펩티드/단백질을 암호화한다.
- [0425] 일부 구현예에서, LPMP/핵산 백신 내 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)는 SARS-CoV-2 바이러스의 스파이크 단백질(S), 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함하는 펩티드/단백질을 암호화한다. 일부 구현예에서, LPMP/핵산 백신 내 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)는 SARS-CoV-2 바이러스의 스파이크 단백질(S) 및 전장 스파이크 단백질 미만의 적어도 1개 또는 2개의 도메인을 포함하는 펩티드/단백질을 암호화한다.
- [0426] 일부 구현예에서, LPMP/핵산 백신 내 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)는 이중 프롤린 안정화 돌연변이를 갖는 SARS-CoV-2 스파이크(S) 단백질을 암호화하는 개방 해독 프레임(ORF)을 포함한다.
- [0427] 일부 구현예에서, LPMP/핵산 백신(또는 이의 개방 해독 프레임) 내 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)는 다음으로 이루어진 균으로부터 선택된 SARS-CoV-2 바이러스의 균주 또는 변이체를 암호화한다:
- [0428] 알파(B.1.1.7, Q.1-Q.8 계통),
- [0429] 베타(B.1.351, B.1.351.2, B.1.351.3 계통),
- [0430] 델타
- [0431] 감마(P.1, P.1.1, P.1.2 계통)
- [0432] 엡실론(B.1.427, B.1.429 계통)
- [0433] 에타트(B.1.525 계통)
- [0434] 이오타(B.1.526 계통)
- [0435] 카파(B.1.617.1 계통)
- [0436] B.1.617.3

- [0437] 람다(C.37 계통)
- [0438] 무(mu)(B.1.621, B.1.621.1 계통)
- [0439] 제타(P.2 계통).
- [0440] 오미크론
- [0441] 일부 구현예에서, LPMP/핵산 백신(또는 이의 개방 해독 프레임) 내 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)는 SARS-CoV-2 스파이크(S) 단백질 및/또는 RBD 또는 이의 단편을 암호화한다. 일부 구현예에서, S 항원 및/또는 이의 RBD 항원 단편은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된 RBD 내에 하나 이상의 돌연변이를 포함한다: K417N 또는 K417T, N439N, N440K, G446V, L452R, Y453F, S477G, 또는 S477N, E484Q, 또는 E484K, F490S, N501S, 또는 N501Y, D614G, Q677P, 또는 Q677H, P681H, 또는 P681R.
- [0442] 일부 구현예에서, LPMP/핵산 백신(또는 이의 개방 해독 프레임) 내 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)는 SARS-CoV-2 스파이크(S) 단백질 및/또는 RBD 또는 이의 단편을 암호화한다. 일부 구현예에서, S 항원은, 예를 들어 K986P 및 V987P 돌연변이(S-2P 변이체) 및 다른 프롤린 치환, 특히 F817P, A892P, A899P, 및 A942P를 포함하는 스파이크 삼량체를 안정화시키는 돌연변이를 포함하며, 이는 함께 조합되어 다수의 프롤린 변이체, 특히 헥사프롤린 변이체(HexaPro)를 획득할 수 있다.
- [0443] 일부 구현예에서, LPMP/핵산 백신(또는 이의 개방 해독 프레임) 내 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)는 SARS-CoV-2 스파이크(S) 단백질 및/또는 RBD 또는 이의 단편을 암호화한다. 일부 구현예에서, S 항원은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 돌연변이를 포함한다: 치환 L18F, T20N, P26S, D80A, D138Y, R190S, D215G, A570D, D614G, H655Y, P681H, A701V, T716I, S982A, T1027I, D1118H, 및 V1176F; 및 결실 델타 69~70, 델타 144, 델타 242~244, 및 델타 246~252.
- [0444] 일부 구현예에서, LPMP/핵산 백신(또는 이의 개방 해독 프레임) 내 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)는 SARS-CoV-2 스파이크(S) 단백질 및/또는 RBD 또는 이의 단편을 암호화한다. 일부 구현예에서, S 항원 또는 이의 RBD 항원 단편은 다음의 돌연변이를 포함한다: N501Y; E484K and N501Y ; K417T, 또는 K417N, E484K, 및 N501Y ; K417N, N439N, Y453F, S477N, E484K, F490S, 및 N501Y ; K417N, N439N, L452R, S477N, E484K, F490S, 및 N501Y.
- [0445] 추가 돌연변이는 WO 2021/154763A1에서 확인할 수 있으며, 동 문헌은 그 전체가 참조로서 통합된다.
- [0446] 핵산 서열
- [0447] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드에 의해 암호화된 항원성 폴리펩티드는 코로나 바이러스, 또는 이의 단편 또는 서브유닛이다. 일부 구현예에서, 항원성 폴리펩티드는 메르스 바이러스(MERS-CoV), 사스 바이러스(SARS-CoV), 또는 이의 단편 또는 서브유닛의 스파이크 단백질(S)이다.
- [0448] 일부 구현예에서, 항원성 폴리펩티드는 사스 바이러스, 또는 이의 단편 또는 서브유닛이다. 항원성 폴리펩티드는 SARS-CoV-2 스파이크 단백질 또는 SARS-CoV-2 스파이크 당단백질일 수 있다.
- [0449] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 mRNA, siRNA 또는 siRNA 전구체, 마이크로RNA(miRNA) 또는 miRNA 전구체, 플라즈미드, 다이스서 기질 짧은 간섭 RNA(dsRNA), 짧은 헤어핀 RNA(shRNA), 비대칭 간섭 RNA(aiRNA), 펩티드 핵산(PNA), 모르폴리노, 잠김 핵산(LNA), 피위-상호작용 RNA(piRNA), 리보자임, 데옥시리보자임(DNAzyme), 압타머, 원형 RNA(circRNA), 가이드 RNA(gRNA), 또는 이들 RNA 중 어느 하나를 암호화하는 DNA 분자일 수 있다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 mRNA이다.
- [0450] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 코로나바이러스 항원 변이체(예를 들어, 안정화된 융합 전 스파이크 단백질과 같은 변이 삼량체 스파이크 단백질)를 암호화한다. 항원 변이체 또는 다른 폴리펩티드 변이체는 이들의 아미노산 서열이 야생형, 천연, 또는 기준 서열과 상이한 분자를 지칭한다. 항원/폴리펩티드 변이체는 천연 또는 기준 서열과 비교했을 때, 아미노산 서열 내의 소정의 위치에 치환, 결실, 및/또는 삽입을 가질 수 있다. 일반적으로, 변이체는 야생형, 천연, 또는 기준 서열과 적어도 50%의 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, 변이체는 야생형, 천연, 또는 기준 서열과 적어도 80% 또는 적어도 90%의 동일성을 공유한다.
- [0451] 본 개시의 핵산에 의해 암호화된 변이체 항원/폴리펩티드는, 예를 들어 대상체에서 면역원성을 향상시키고, 이들의 발현을 향상시키고/하거나, 이들의 안정성 또는 PK/PD 특성을 개선하는 다수의 바람직한 특성 중 어느 하나를 부여하는 아미노산 변화를 함유할 수 있다. 변이체 항원/폴리펩티드는 일상적인 돌연변이 유발 기술을 사

용하여 제조될 수 있고, 적절하게 분석되어 이들이 바람직한 특성을 갖는지 여부를 결정할 수 있다. 발현 수준 및 면역원성을 결정하기 위한 검정은 당업계에 잘 알려져 있고, 예시적인 이러한 검정은 실시예 섹션에 제시되어 있다. 유사하게, 단백질 변이체의 PK/PD 특성은 당업계에서 인식되는 기술을 사용하여, 예를 들어 시간 경과에 따라 백신접종된 대상체에서 항원의 발현을 결정하고/하거나 유도된 면역 반응의 내구성을 조사함으로써 측정될 수 있다. 변이체 핵산에 의해 암호화된 단백질(들)의 안정성은 요소 변성 시 열 안정성 또는 안정성을 분석함으로써 측정될 수 있거나, 인실리코 예측을 사용하여 측정될 수 있다. 이러한 실험 및 인실리코 결정을 위한 방법은 당업계에 공지되어 있다.

[0452] 용어 "동일성"은 서열을 비교함으로써 결정할 때, 2개 이상의 폴리펩티드(예를 들어, 항원) 또는 폴리뉴클레오티드(핵산)의 서열 사이의 관계를 지칭한다. 또한 동일성은 2개 이상의 아미노산 잔기 또는 핵산 잔기의 스트링 사이의 일치하는 수에 의해 결정했을 때, 서열 간의 또는 서열 사이의 서열 관련성의 정도를 지칭한다. 동일성은 특정 수학적 모델 또는 컴퓨터 프로그램(예를 들어, "알고리즘")에 의해 처리된 간격 정렬(존재하는 경우)을 갖는 2개 이상의 서열 중 더 작은 서열 사이의 동일한 일치율을 측정한다. 관련 항원 또는 핵산의 동일성은 공지된 방법에 의해 용이하게 계산될 수 있다. 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드 서열에 적용되는 "동일성율(%)"은 최대 동일성율을 달성하기 위해, 서열을 정렬하고, 필요한 경우에 간격을 도입한 후, 제2 서열의 아미노산 서열 또는 핵산 서열의 잔기와 동일한 후보 아미노산 또는 핵산 서열에서의 잔기(아미노산 잔기 또는 핵산 잔기)의 백분율로서 정의된다. 정렬을 위한 방법 및 컴퓨터 프로그램은 당업계에 잘 알려져 있다. 동일성은 동일성율의 계산에 따라 달라지지만 계산에 도입된 간격 및 페널티로 인해 값이 상이할 수 있음을 이해할 것이다. 일반적으로, 특정 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드(예를 들어, 항원)의 변이체는 본원에 기술된 서열 정렬 프로그램 및 파라미터에 의해 결정되고 당업자에게 공지된 바와 같은 특정 기준 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드와 적어도 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 미만의 서열 동일성을 갖는다. 이러한 정렬 툴은 BLAST 제품군의 것들을 포함한다(Stephen F. Altschul, 등의 문헌[(1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402]). 또 다른 널리 사용되는 국소 정렬 기술은 Smith-Waterman 알고리즘에 기반한다(Smith, T.F. & Waterman, M.S의 문헌[(1981) "Identification of common molecular subsequences." *J. Mol. Biol.* 147:195-197]). 동적 프로그래밍에 기초한 일반적인 글로벌 정렬 기술은 Needleman-Wunsch 알고리즘이다(Needleman, S.B. & Wunsch, C.D의 문헌[(1970) "A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequences of two proteins." *J. Mol. Biol.* 48:443-453]). 보다 최근에는, Needleman-Wunsch 알고리즘을 포함하여 다른 최적 글로벌 정렬 방법보다 빠르게 뉴클레오티드 및 단백질 서열의 글로벌 정렬을 생성하는 고속 최적 글로벌 서열 정렬 알고리즘(FOGSAA)이 개발되었다.

[0453] 이와 같이, 기준 서열, 특히 본원에 개시된 폴리펩티드(예를 들어, 항원) 서열에 대해 치환, 삽입, 및/또는 첨가, 결실, 및 공유 변형을 함유하는 펩티드 또는 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 본 개시의 범주 내에 포함된다. 예를 들어, 하나 이상의 리신과 같은 서열 태그 또는 아미노산이 펩티드 서열에 (예를 들어, N-말단 또는 C-말단 말단에서) 첨가될 수 있다. 서열 태그는 펩티드 검출, 정제, 또는 국소화에 사용될 수 있다. 리신은 펩티드 용해도를 증가시키거나 비오틴화할 허용하는 데 사용될 수 있다. 대안적으로, 펩티드 또는 단백질의 아미노산 서열의 카르복시 말단 영역 및 아미노 말단 영역에 위치한 아미노산 잔기는 절단된 서열을 제공하기 위해 임의로 결실될 수 있다. 대안적으로, 소정의 아미노산(예를 들어, C-말단 잔기 또는 N-말단 잔기)은, 예를 들어 가용성이거나 고품 지지체에 연결된 더 큰 서열의 일부로서 서열의 발현과 같은 서열의 사용에 따라 결실될 수 있다. 일부 구현예에서, 신호 서열, 종결 서열, 막관통 도메인, 링커, 다량체화 도메인(예를 들어, 폴드온(foldon) 영역) 등을 위한 (또는 이를 암호화하는) 서열은 동일하거나 유사한 기능을 달성하는 대안적인 서열로 치환될 수 있다. 일부 구현예에서, 단백질의 코어 내의 공동은, 예를 들어 더 큰 아미노산을 도입함으로써 충진되어 안정성을 개선할 수 있다. 다른 구현예에서, 매립된 수소 결합 네트워크는 소수성 잔류물로 대체되어 안정성을 개선할 수 있다. 또 다른 구현예에서, 당질화 부위는 제거되고 적절한 잔기로 대체될 수 있다. 이러한 서열은 당업자에게 쉽게 식별 가능하다. 또한, 본원에 제공된 서열 중 일부는, 예를 들어 RNA(예를 들어, mRNA) 백신의 제조에 사용하기 전에 결실될 수 있는 서열 태그 또는 말단 펩티드 서열을 (예를 들어, N-말단 또는 C-말단 말단에) 함유한다는 것을 이해해야 한다.

[0454] 또한 당업자에게 의해 인식되는 바와 같이, 단백질 단편, 기능성 단백질 도메인, 및 상동성 단백질은 관심 코로나 바이러스 항원의 범위 내에 있는 것으로 간주된다. 예를 들어, 기준 단백질의 임의의 단백질 단편(기준 항원 서열보다 짧지만 그 외에는 동일한 적어도 하나의 아미노산 잔기를 갖는 폴리펩티드 서열을 의미함)이 면역원성이며 코로나바이러스에 대한 보호 면역 반응을 부여하는 경우, 해당 단편이 제공될 수 있다. 기준 단백질과 동일

하지만 절단된 변이체에 더하여, 일부 구현예에서, 항원은 본원에 제공되거나 참조된 서열 중 어느 하나에 도시된 바와 같이, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 또는 그 이상의 돌연변이를 포함한다. 항원/항원성 폴리펩티드는 길이가 약 4개, 6개, 또는 8개 아미노산 내지 전장 단백질의 범위일 수 있다.

[0455] 일부 구현예에서, 항원성 폴리펩티드는 구조적 단백질이다. 일부 구현예에서, 항원성 폴리펩티드는 스파이크 단백질, 외피 단백질, 뉴클레오캡시드 단백질, 또는 막 단백질이다. 일부 구현예에서, 항원성 폴리펩티드는 안정화된 융합 전 스파이크 단백질이다. 일부 구현예에서, mRNA는 변이 삼량체 스파이크 단백질을 암호화하는 개방해독 프레임(ORF)을 포함한다. 삼량체 스파이크 단백질은, 예를 들어 안정화된 융합 전 스파이크 단백질을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 안정화된 융합 전 스파이크 단백질은 이중 프롤린(S2P) 돌연변이이다.

[0456] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)는 코로나바이러스 항원(예를 들어, 안정화된 융합 전 스파이크 단백질과 같은 변이 삼량체 스파이크 단백질)을 암호화하는 개방해독 프레임(ORF)을 갖는다. 일부 구현예에서, RNA(예를 들어, mRNA)는 5' UTR, 3' UTR, 폴리(A) 꼬리, 및/또는 5' 캡 유사체를 추가로 포함한다.

[0457] 일부 구현예에서, mRNA는 5' 미번역 영역(UTR) 및/또는 3' UTR을 포함한다.

[0458] 전령 RNA(mRNA)는 (적어도 하나의) 단백질(아미노산의 자연 발생, 비-자연 발생, 또는 변형된 중합체)을 암호화하고, 번역되어 시험관 내, 생체 내, 제자리, 또는 생체 외에서 암호화된 단백질을 생산할 수 있는 임의의 RNA이다. 당업자는 달리 언급되지 않는 한, 본 출원에 제시된 핵산 서열이 대표적인 DNA 서열에서 "T"를 인용할 수 있지만, 서열이 RNA(예를 들어, mRNA)를 나타내는 경우, "T"는 "U"로 치환될 것임을 이해할 것이다. 따라서, 본원에 개시되고 특정 서열 식별 번호에 의해 식별된 DNA 중 어느 하나는 또한 DNA에 상보적인 상응하는 RNA(예를 들어, mRNA) 서열을 개시하며, 여기서 DNA 서열 각각의 "T"는 "U"로 치환된다.

[0459] 일부 구현예에서, mRNA는 (a) DNA 분자; 또는 (b) RNA 분자로부터 유래된다. mRNA에서, T는 U로 임의 치환된다.

[0460] 개방해독 프레임(ORF)은 시작 코돈(예를 들어, 메티오닌(ATG 또는 AUG))으로 시작하여 정지 코돈(예를 들어, TAA, TAG, 또는 TGA, 또는 UAA, UAG, 또는 UGA)으로 끝나는 DNA 또는 RNA의 연속적인 신장이다. 통상적으로 ORF는 단백질을 암호화한다. 본원에 개시된 서열은 추가 요소, 예를 들어, 5' 및 3' UTR을 추가로 포함할 수 있지만, ORF와 달리 이들 요소가 반드시 본 개시의 폴리뉴클레오티드에 존재할 필요는 없다.

[0461] **안정화 요소**

[0462] 자연 발생 전령 mRNA 분자는 5'-캡 구조 또는 3'-폴리(A) 꼬리와 같은 다른 구조적 특징에 더하여, 미번역 영역(UTR)을 포함하지만 이에 한정되지 않는 안정화 요소를 이들의 5'-말단(5' UTR) 및/또는 3'-말단(3' UTR)에서 함유할 수 있다. 통상적으로 5' UTR 및 3' UTR 둘 모두는 게놈 DNA로부터 전사되고 조기 성숙한 mRNA의 요소이다. 5'-캡 및 3'-폴리(A) 꼬리와 같은 성숙한 mRNA의 특징적인 구조적 특징은 일반적으로 mRNA 가공 동안 전사된 (조기 성숙한) mRNA에 첨가된다.

[0463] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 적어도 하나의 변형을 갖는 적어도 하나의 항원성 폴리펩티드, 적어도 하나의 5' 말단 캡을 암호화하는 개방해독 프레임(ORF)을 가지며, 지질 나노입자 내에 체형화된다. 다음의 화학적 RNA 캡 유사체를 사용하여 시험관 내 전사 반응 동안 폴리뉴클레오티드의 5'-캡핑이 부수적으로 완료되어 제조자 프로토콜에 따른 5'-구아노신 캡 구조를 생성할 수 있다: 3'-O-Me-m7G(5')ppp(5') G [the ARCA cap]; G(5')ppp(5')A; G(5')ppp(5')G; m7G(5')ppp(5')A; m7G(5')ppp(5')G(New England BioLabs, Ipswich, MA). Vaccinia Vims 캡핑 효소를 사용하여 변형된 RNA의 5'-캡핑이 전사 후 완료되어 "캡 0" 구조를 생성할 수 있다: m7G(5')ppp(5')G (New England BioLabs, Ipswich, MA). 캡 1 구조는 Vaccinia Vims 캡핑 효소 및 2'-O 메틸-전이효소 둘 다를 사용하여 m7G(5')ppp(5')G-2'-O-메틸을 생성하여 생성될 수 있다. 캡 2 구조는 캡 1 구조에서 생성된 후, 이어서 2'-O 메틸-전이효소를 사용하여 5'-끝에서 세번째(antepenultimate) 뉴클레오티드의 2'-O 메틸화에 의해 생성될 수 있다. 캡 3 구조는 캡 2 구조에서 생성된 후, 2'-O 메틸-전이효소를 사용하여 5'-끝에서 네번째(preantepenultimate) 뉴클레오티드의 2'-O 메틸화에 의해 생성될 수 있다. 효소는 제조업 공급원으로부터 유래할 수 있다.

[0464] 통상적으로 3'-폴리(A) 꼬리는 전사된 mRNA의 3' 말단에 첨가된 아데닌 뉴클레오티드의 신장된 부분이다. 일부 경우에, 이는 최대 약 400개의 아데닌 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 3'-폴리(A) 꼬리의 길이는 개별 mRNA의 안정성과 관련하여 필수 요소일 수 있다.

[0465] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 안정화 요소를 포함한다. 안정화 요소는, 예를 들어 히스톤 줄기-루프를 포함할 수 있다. 32kDa 단백질인 줄기-루프 결합 단백질(SLBP) 식별되었다. 이는 핵 및 세포질 모두에서 히스톤

메시지의 3'-말단에 있는 히스톤 줄기-루프와 연관된다. 이의 발현 수준은 세포 주기에 의해 조절되며; 이는 히스톤 mRNA 수준이 또한 상승할 때, S기 동안 피크에 도달한다. 단백질은 U7 snRNP에 의한 히스톤 mRNA 전구체의 효율적인 3'-말단 처리에 필수적인 것으로 나타났다. SLBP는 처리 후 줄기-루프와 계속해서 결합되고, 그런 다음 성숙한 히스톤 mRNA가 세포질의 히스톤 단백질로 번역되는 것을 자극한다. SLBP의 RNA 결합 도메인은 후생동물 및 원생동물을 통해 보존되며; 히스톤 줄기-루프에 대한 이의 결합은 루프의 구조에 의존한다. 최소 결합 부위는 줄기-루프에 대해 적어도 3개의 뉴클레오티드 5' 및 2개의 뉴클레오티드 3'를 포함한다.

[0466] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)는 코딩 영역, 적어도 하나의 히스톤 줄기-루프, 및 임의로 폴리(A) 서열 또는 폴리아데닐화 신호를 포함한다. 폴리(A) 서열 또는 폴리아데닐화 신호는 일반적으로 암호화된 단백질의 발현 수준을 향상시켜야 한다. 일부 구현예에서, 암호화된 단백질은 히스톤 단백질, 리포터 단백질(예를 들어, 루시페라아제, GFP, EGFP, b-갈락토시다아제, EGFP), 또는 마커 또는 선택 단백질(예를 들어, 알파-글로빈, 갈락토키나아제, 및 크산틴:구아닌 포스포리보실 전이효소(GPT))가 아니다.

[0467] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)는 폴리(A) 서열 또는 폴리아데닐화 신호 및 적어도 하나의 히스톤 줄기-루프의 조합을 포함하지만, 둘 모두가 자연에서의 대안적인 메커니즘을 나타내더라도 상승적으로 작용하여 개별 요소 중 어느 하나에서 관찰된 수준을 넘어서 단백질 발현을 증가시킨다. 폴리(A) 및 적어도 하나의 히스톤 줄기-루프의 조합의 상승 효과는 폴리(A) 서열의 요소의 순서 또는 길이에 의존하지 않는다. 일부 구현예에서, RNA(예를 들어, mRNA)는 히스톤 하류 요소(HDE)를 포함하지 않는다. "히스톤 하류 요소"(HDE)는 히스톤 mRNA 전구체를 성숙한 히스톤 mRNA로 가공하는 데 관여하는 U7 snRNA에 대한 결합 부위를 나타내는, 자연 발생 줄기-루프의 약 15개 내지 20개의 뉴클레오티드의 3'의 퓨린-풍부 폴리뉴클레오티드 신장을 포함한다. 일부 구현예에서, 핵산은 인트론을 포함하지 않는다.

[0468] 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)는 변형되거나 변형되지 않을 수 있거나 활성화되거나 불활성화될 수 있는 인핸서 및/또는 프로모터 서열을 함유하거나 함유하지 않을 수 있다. 일부 구현예에서, 히스톤 줄기-루프는 일반적으로 히스톤 유전자로부터 유래되고, 스페이서에 의해 분리된 2개의 이웃된 부분적 또는 전체적으로 역상보성인 서열 사이에 분자 내 염기 쌍형성을 포함하고, 이 스페이서는 구조의 루프를 형성하는 짧은 서열로 이루어진다. 통상적으로 쌍을 이루지 않은 루프 영역은 줄기 루프 요소 중 어느 하나와 염기 쌍을 이룰 수 없다. 이는 많은 RNA 이차 구조의 주요 성분이지만 단일 가닥 DNA에도 존재할 수 있는 것과 같이 RNA에서 더 자주 발생한다. 줄기-루프 구조의 안정성은 일반적으로 쌍을 이룬 영역의 길이, 불일치 또는 벌지(bulge)의 수, 및 염기 조성에 좌우한다. 일부 구현예에서, 워블 염기쌍(비-왓슨-크릭(Watson-Crick) 염기쌍)이 발생할 수 있다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 히스톤 줄기-루프 서열은 15개 내지 45개 뉴클레오티드의 길이를 포함한다.

[0469] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)는 제거된 하나 이상의 AU-풍부 서열을 갖는다. 때때로 AURES로 지칭되는 이들 서열은 3'UTR에서 발견되는 불안정화 서열이다. AURES는 RNA 백신으로부터 제거될 수 있다. 대안적으로, AURES는 RNA 백신에 남아 있을 수 있다.

[0470] 신호 펩티드

[0471] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)는 코로나바이러스 항원에 융합된 신호 펩티드를 암호화하는 ORF를 갖는다. 통상적으로, 단백질의 N-말단 15~60개의 아미노산을 포함하는 신호 펩티드는 분비 경로 상의 막을 가로지르는 전위에 필요하므로, 따라서 분비 경로에 대한 진핵생물 및 원핵생물 모두에서 대부분의 단백질의 진입을 보편적으로 제어한다. 진핵생물에서, 초기 전구체 단백질(전-단백질)의 신호 펩티드는 리보솜을 거친 소포체(ER) 막으로 유도하고, 가공을 위해 성장하는 펩티드 사슬의 수송을 개시한다. ER 처리는 성숙한 단백질을 생산하며, 여기서 신호 펩티드는 통상적으로 숙주 세포의 ER-거주 신호 펩티다아제에 의해 전구체 단백질로부터 절단되거나, 이들은 절단되지 않은 상태로 유지되고 막 앵커로서 기능한다. 또한 신호 펩티드는 세포막에 대한 단백질의 표적화를 용이하게 할 수 있다. 신호 펩티드는 15~60개 아미노산의 길이를 가질 수 있다. 예를 들어, 신호 펩티드는 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개, 30개, 31개, 32개, 33개, 34개, 35개, 36개, 37개, 38개, 39개, 40개, 41개, 42개, 43개, 44개, 45개, 46개, 47개, 48개, 49개, 50개, 51개, 52개, 53개, 54개, 55개, 56개, 57개, 58개, 59개, 또는 60개 아미노산의 길이를 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 신호 펩티드는 20~60개, 25~60개, 30~60개, 35~60개, 40~60개, 45~60개, 50~60개, 55~60개, 15~55개, 20~55개, 25~55개, 30~55개, 35~55개, 40~55개, 45~55개, 50~55개, 15~50개, 20~50개, 25~50개, 30~50개, 35~50개, 40~50개, 45~50개, 15~45개, 20~45개, 25~45개, 30~45개, 35~45개, 40~45개, 15~40개, 20~40개, 25~40개, 30~40개, 35~40개, 15~35개, 20~35개, 25~35개, 30~35개, 15~30개, 20~30개, 25~30개, 15~25개, 20~25개, 또는 15~20개 아미노산의 길이를 갖는다.

- [0472] (자연에서 코로나바이러스 항원 이외의 유전자의 발현을 조절하는) 이중 유전자로부터의 신호 펩티드는 당업계에 공지되어 있고, 바람직한 특성에 대해 시험된 다음 본 개시의 핵산에 삽입될 수 있다. 일부 구현예에서, 신호 펩티드는 WO 2021/154763에 기술된 것들을 포함할 수 있으며, 동 문헌은 그 전체가 참조로서 통합된다.
- [0473] **융합 단백질**
- [0474] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)는 항원성 융합 단백질을 암호화한다. 따라서, 암호화된 항원 또는 항원들은 함께 결합된 2개 이상의 단백질(예를 들어, 단백질 및/또는 단백질 단편)을 포함할 수 있다. 대안적으로, 단백질 항원이 융합되는 단백질은 그 자체에 대한 강한 면역 반응을 촉진하지 않고, 오히려 코로나바이러스 항원에 대한 강한 면역 반응을 촉진한다. 일부 구현예에서, 항원성 융합 단백질은 각각의 원래 단백질로부터 기능적 특성을 보유한다.
- [0475] **스캐폴드(Scaffold) 모이어티**
- [0476] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)는 스캐폴드 모이어티에 연결된 코로나바이러스 항원을 포함하는 융합 단백질을 암호화한다. 일부 구현예에서, 이러한 스캐폴드 모이어티는 본 개시의 핵산에 의해 암호화된 항원에 바람직한 특성을 부여한다. 예를 들어, 스캐폴드 단백질은, 예를 들어 항원의 구조를 변경하고, 항원의 흡수 및 처리를 변경하고/하거나, 항원이 결합 파트너에 결합하게 함으로써 항원의 면역원성을 개선할 수 있다.
- [0477] 일부 구현예에서, 스캐폴드 모이어티는 면역계의 다양한 세포와의 최적의 상호작용을 위한 매우 적절한 크기 범위인 10~150nm의 직경을 갖는, 고도로 대칭적이고, 안정적이고, 구조적으로 구성된 단백질 나노입자로 자가 조립될 수 있는 단백질이다. 일부 구현예에서, 바이러스 단백질 또는 바이러스 유사 입자는 안정한 나노입자 구조를 형성하는 데 사용될 수 있다. 이러한 바이러스 단백질의 예는 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 스캐폴드 모이어티는 B형 간염 표면 항원(HBsAg)이다. HBsAg는 ~22nm의 평균 직경을 가지며 핵산이 결합되어 비감염성인 구형 입자를 형성한다(Lopez-Sagaseta, J. 등의 문헌[Computational and Structural Biotechnology Journal 14 (2016) 58~68]). 일부 구현예에서, 스캐폴드 모이어티는 24~31nm 직경의 입자의 B형 간염 핵심 항원(HBcAg) 자가-조립체로서, 이는 HBV에 감염된 인간 간으로부터 수득된 바이러스 핵과 유사하다. HBcAg는 자기-조립으로 생산되고, 180 또는 240 프로토머에 상응하는 300 Å 직경 및 360 Å 직경의 상이한 크기의 나노입자의 2가지 부류로 생산된다. 일부 구현예에서, 코로나바이러스 항원은 HBsAG 또는 HBcAG에 융합되어, 코로나바이러스 항원을 나타내는 나노입자의 자가-조립을 용이하게 한다.
- [0478] 일부 구현예에서, 박테리아 단백질 플랫폼이 사용될 수 있다. 이들 자가-조립 단백질의 비제한적인 예는 페리틴(ferritin), 루마진(lumazine), 및 엔캡슐린(encapsulin)을 포함한다.
- [0479] 페리틴은 세포내 철분 축적이 주요 기능인 단백질이다. 페리틴은 24개의 서브유닛으로 제조되며, 각각은 4-알파-나선 다발로 구성되고, 이는 팔면체 대칭을 갖는 4차 구조로 자가-조립된다(Cho K.J. 등의 문헌[J Mol Biol. 2009; 390:83~98]). 페리틴의 여러 가지 고해상도 구조가 결정되어, 헬리코박터 파일로리 페리틴이 24개의 동일한 프로토머로 제조되는 반면, 동물에서는 단독으로 조립하거나 상이한 비율과 함께 24개의 서브유닛의 입자로 조합할 수 있는 페리틴 경쇄 및 중쇄가 존재한다(Granier T. 등의 문헌[J Biol Inorg Chem. 2003; 8:105~111]; Fawson D.M. 등의 문헌[Nature. 1991; 349:541~544]). 페리틴은 강력한 열 안정성 및 화학적 안정성을 갖는 나노입자로 자가-조립된다. 따라서, 페리틴 나노입자는 항원을 운반하고 노출시키는 데 매우 적합하다.
- [0480] 또한 푸마진 합성효소(FS)는 항원 디스플레이를 위한 나노입자 플랫폼으로서 매우 적합하다. 리보플라빈의 생합성에서 끝에서 두 번째 촉매 단계를 담당하는 FS는 고세균류, 박테리아, 진균류, 식물, 및 유박테리아를 포함하는 광범위한 유기체에 존재하는 효소이다(Weber S.E.의 문헌[Flavins and Flavoproteins. Methods and Protocols, Series: Methods in Molecular Biology. 2014]). FS 단량체는 150개 아미노산 길이며, 베타-시트와 그 측면에 위치하는 직렬 알파-나선으로 구성된다. FS에 대해 다수의 상이한 4차 구조가 보고되었는데, 이는 호모펜타머(homopentamers)에서 150 Å 직경의 캡시드를 형성하는 12개의 펜타머(pentamers)의 대칭 어셈블리에 이르기까지 형태학적 다양성을 예시한다. 심지어 100개를 초과하는 서브유닛의 FS 케이지가 기술되었다(Zhang X. 등[J Mol Biol. 2006; 362:753~770]).
- [0481] 또한, 열친매성 써모토가 마리티마(Thermotoga maritima)로부터 단리된 신규한 단백질 케이지 나노입자인 엔캡슐린은 자가-조립 나노입자의 표면에 항원을 제시하는 플랫폼으로서 사용될 수 있다. 엔캡슐린은 각각 20nm 및 24nm의 내경 및 외경을 갖는 얇고 정20면체대칭 T=1 대칭 케이지 구조를 갖는 동일한 31kDa 단량체의 60개 사본으로부터 조립된다(Sutter M. 등[Nat Struct Mol Biol. 2008, 15: 939~947]). T. 마리티마에서의 엔캡슐린의

정확한 기능은 아직 명확하게 이해되지 않았지만, 최근에 이의 결정 구조가 해결되었고, 그 기능은 산화 스트레스 반응에 관여하는 DyP(다이 탈색 퍼옥시다아제) 및 Flp(페리틴 유사 단백질)와 같은 단백질을 캡슐화하는 세포 구획으로서 가정되었다(Rahmanpour R. 등[FEBS J. 2013, 280: 2097~2104]).

[0482] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 폴돈 도메인에 융합된 코로나바이러스 항원(예를 들어, SARS-CoV-2 S 단백질)을 암호화한다. 폴돈 도메인은, 예를 들어 박테리오파지 T4 피브리틴으로부터 수득될 수 있다(예를 들어, Tao Y, 등의 문헌[Structure. 1997 Jun 15; 5(6):789~98] 참조함).

[0483] 링커 및 절단성 펩티드

[0484] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)는 본원에서 융합 단백질로서 지칭되는 하나 초과 펩티드를 암호화한다. 일부 구현예에서, mRNA는 융합 단백질의 적어도 하나 또는 각각의 도메인 사이에 위치한 링커를 추가로 암호화한다. 링커는, 예를 들어 절단성 링커 또는 프로테아제-민감성 링커일 수 있다. 일부 구현예에서, 링커는 F2A 링커, P2A 링커, T2A 링커, E2A 링커, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 2개의 A 펩티드로서 지칭되는 이러한 자가-절단 펩티드 링커 계열은 당업계에 기술되어 있다(예를 들어, Kim, J.H. 등의 문헌[(2011) PLoS ONE 6:e18556] 참조함). 일부 구현예에서, 링커는 F2A 링커이다. 일부 구현예에서, 융합 단백질은 다음의 구조를 갖는 개재 링커를 갖는 3개의 도메인을 함유한다: 도메인-링커-도메인-링커-도메인.

[0485] 당업계에 공지된 절단성 링커는 본 개시와 관련하여 사용될 수 있다. 예시적인 이러한 링커는 F2A 링커, T2A 링커, P2A 링커, E2A 링커를 포함한다(예를 들어, WO2017/127750 참조하고, 동 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합됨). 당업자는 당업계에서 인식된 다른 링커가 본 개시의 작제물에 사용하기에 적합할 수 있음을 이해할 것이다(예를 들어, 본 개시의 핵산에 의해 암호화됨). 당업자는 마찬가지로, 다른 폴리시스트론 작제물(동일한 분자 내에서 하나 초과 항원/펩티드를 별도로 암호화하는 mRNA)이 본원에 제공된 바와 같이 사용하기에 적합할 수 있음을 이해할 것이다.

[0486] 서열 최적화

[0487] 일부 구현예에서, 본 개시의 항원을 암호화하는 ORF는 코돈 최적화된다. 코돈 최적화 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 본원에 제공된 서열 중 임의의 하나 이상의 ORF는 코돈 최적화될 수 있다. 일부 구현예에서, 코돈 최적화는 표적 유기체 및 숙주 유기체에서 코돈 빈도를 일치시키는 데 사용되어 적절한 접합을 보장할 수 있고; GC 함량을 편향시키는 데 사용되어 mRNA 안정성을 증가시키거나 이차 구조를 감소시킬 수 있고; 유전자 구성 또는 유전자 발현을 손상시킬 수 있는 직렬 반복 코돈 또는 염기 런(run)을 최소화하는 데 사용될 수 있고; 전사 및 번역 조절 영역을 맞춤화하는 데 사용될 수 있고; 단백질 수송 서열을 삽입하거나 제거하는 데 사용될 수 있고; 암호화된 단백질 내 번역 전 변형 부위(예를 들어, 당질화 부위)를 제거/첨가하는 데 사용될 수 있고; 단백질 도메인을 첨가, 제거, 또는 서플하는 데 사용될 수 있고; 제한 부위를 삽입하거나 삭제하는 데 사용될 수 있고; 리보솜 결합 부위 및 mRNA 분해 부위를 변형하는 데 사용될 수 있고; 번역률을 조절하는 데 사용되어 다양한 단백질 도메인이 적절하게 접할 수 있도록 할 수 있거나; 폴리뉴클레오티드 내 문제 이차 구조를 감소시키거나 제거하는 데 사용될 수 있다. 코돈 최적화 도구, 알고리즘, 및 서비스는 당업계에 공지되어 있으며, 비제한적인 예는 GeneArt(Life Technologies), DNA2.0(Menlo Park CA), 및/또는 독점적인 방법으로부터의 서비스를 포함한다. 일부 구현예에서, 개방 해독 프레임(ORF) 서열은 최적화 알고리즘을 사용하여 최적화된다.

[0488] 일부 구현예에서, 코돈 최적화된 서열은 자연 발생 서열 ORF 또는 야생형 서열 ORF(예를 들어, 코로나바이러스 항원을 암호화하는 자연 발생 mRNA 서열 또는 야생형 mRNA 서열)와 95% 미만의 서열 동일성을 공유한다. 일부 구현예에서, 코돈 최적화된 서열은 자연 발생 서열 또는 야생형 서열(예를 들어, 코로나바이러스 항원을 암호화하는 자연 발생 mRNA 서열 또는 야생형 mRNA 서열)과 90% 미만의 서열 동일성을 공유한다. 일부 구현예에서, 코돈 최적화된 서열은 자연 발생 서열 또는 야생형 서열(예를 들어, 코로나바이러스 항원을 암호화하는 자연 발생 mRNA 서열 또는 야생형 mRNA 서열)과 85% 미만의 서열 동일성을 공유한다. 일부 구현예에서, 코돈 최적화된 서열은 자연 발생 서열 또는 야생형 서열(예를 들어, 코로나바이러스 항원을 암호화하는 자연 발생 mRNA 서열 또는 야생형 mRNA 서열)과 80% 미만의 서열 동일성을 공유한다. 일부 구현예에서, 코돈 최적화된 서열은 자연 발생 서열 또는 야생형 서열(예를 들어, 코로나바이러스 항원을 암호화하는 자연 발생 mRNA 서열 또는 야생형 mRNA 서열)과 75% 미만의 서열 동일성을 공유한다.

[0489] 일부 구현예에서, 코돈 최적화된 서열은 자연 발생 서열 또는 야생형 서열(예를 들어, 코로나바이러스 항원을 암호화하는 자연 발생 mRNA 서열 또는 야생형 mRNA 서열)과 65% 내지 85%(예를 들어, 약 67% 내지 약 85% 또는

약 67% 내지 약 80%)의 서열 동일성을 공유한다. 일부 구현예에서, 코돈 최적화된 서열은 자연 발생 서열 또는 야생형 서열(예를 들어, 코로나바이러스 항원을 암호화하는 자연 발생 mRNA 서열 또는 야생형 mRNA 서열)과 65% 내지 75% 또는 약 80%의 서열 동일성을 공유한다.

[0490] 일부 구현예에서, 코돈 최적화된 서열은 코돈 최적화되지 않은 서열에 의해 암호화된 코로나바이러스 항원보다 번역원성이거나 번역원성이 더 큰 항원(예를 들어, 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 100%, 또는 적어도 200% 이상)을 암호화한다. 포유류 숙주 세포 내로 형질감염될 때, 변형된 mRNA는 12~18시간, 또는 18시간 초과, 예를 들어, 24시간, 36시간, 48시간, 60시간, 72시간, 또는 72시간 초과인 안정성을 가지며, 포유류 숙주 세포에 의해 발현될 수 있다.

[0491] 일부 구현예에서, 코돈 최적화된 RNA는 G/C의 수준이 향상된 것일 수 있다. 핵산 분자(예를 들어, mRNA)의 G/C 함량은 RNA의 안정성에 영향을 미칠 수 있다. 증가된 양의 구아닌(G) 및/또는 시토신(C) 잔기를 갖는 RNA는 다량의 아데닌(A) 및 티민(T) 또는 우라실(U) 뉴클레오티드를 함유하는 RNA보다 기능적으로 더 안정적일 수 있다. 예로서, W002/098443은 번역된 영역에서 서열 변형에 의해 안정화된 mRNA를 함유하는 약학적 조성물을 개시한다. 유전자 코드의 퇴행으로 인해, 변형은 생성된 아미노산을 변화시키지 않으며 더 큰 RNA 안정성을 촉진하는 것들에 대해 기존의 코돈을 치환함으로써 작용한다. 접근법은 RNA의 코딩 영역으로 제한된다.

[0492] *화학적으로 변형되지 않은 뉴클레오티드*

[0493] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)는 화학적으로 변형되지 않으며, 아데노신, 구아노신, 시토신, 및 우리딘으로 이루어진 표준 리보뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)의 뉴클레오티드 및 뉴클레오시드는 전사된 RNA에 존재하는 것들(예를 들어, A, G, C, 또는 U)과 같은 표준 뉴클레오시드 잔기를 포함한다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)의 뉴클레오티드 및 뉴클레오시드는 DNA에 존재하는 것들(예를 들어, dA, dG, dC, 또는 dT)과 같은 표준 데옥시리보뉴클레오시드를 포함한다.

[0494] *화학적 변형*

[0495] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)는 코로나바이러스 항원을 암호화하는 개방 해독 프레임에 갖는 RNA를 포함하며, 핵산은 표준(미변형)이거나 당업계에 공지된 바와 같이 변형될 수 있는 뉴클레오티드 및/또는 뉴클레오시드를 포함한다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)의 뉴클레오티드 및 뉴클레오시드는 변형된 뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드를 포함한다. 이러한 변형된 뉴클레오티드 및 뉴클레오시드는 변형된 자연 발생 뉴클레오티드 및 뉴클레오시드일 수 있거나 변형된 비자연 발생 뉴클레오티드 및 뉴클레오시드일 수 있다. 이러한 변형은 당업계에서 인식되는 바와 같이 뉴클레오티드 및/또는 뉴클레오시드의 당, 골격, 또는 핵염기 부분에 있는 것들을 포함할 수 있다.

[0496] 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)의 핵산은 표준 뉴클레오티드 및 뉴클레오시드, 자연 발생 뉴클레오티드 및 뉴클레오시드, 비자연 발생 뉴클레오티드 및 뉴클레오시드, 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다.

[0497] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드의 핵산(예를 들어, DNA 핵산 및 RNA 핵산, 예컨대 mRNA 핵산)은 다양한(하나 초과) 상이한 유형의 표준 및/또는 변형된 뉴클레오티드 및 뉴클레오시드를 포함한다. 일부 구현예에서, 핵산의 특정 영역은 하나, 둘 이상의 (임의적으로 상이한) 유형의 표준 및/또는 변형된 뉴클레오티드 및 뉴클레오시드를 함유한다.

[0498] 일부 구현예에서, 세포 또는 유기체 내로 도입된 변형된 RNA 핵산(예를 들어, 변형된 mRNA 핵산)은 표준 뉴클레오티드 및 뉴클레오시드를 포함하는 변형되지 않은 핵산에 비해 세포 또는 유기체에서 감소된 분해를 각각 보여준다.

[0499] 일부 구현예에서, 세포 또는 유기체 내로 도입된 변형된 RNA 핵산(예를 들어, 변형된 mRNA 핵산)은 표준 뉴클레오티드 및 뉴클레오시드를 포함하는 변형되지 않은 핵산에 비해 세포 또는 유기체에서 각각 감소된 번역원성(예를 들어, 감소된 선천적 반응)을 보여줄 수 있다.

[0500] 일부 구현예에서, 핵산(예를 들어, mRNA 핵산과 같은 RNA 핵산)은 핵산의 합성 또는 합성 후 동안 도입되어 바람직한 기능 또는 특성을 달성하는 비천연 변형된 뉴클레오티드를 포함한다. 변형은 뉴클레오티드간 결합, 퓨린 또는 피리미딘 염기, 또는 당에 존재할 수 있다. 변형은 화학적 합성으로 또는 사슬의 말단 또는 사슬의 다른 곳에서 중합효소 효소로 도입될 수 있다. 핵산의 영역 중 어느 하나는 화학적으로 변형될 수 있다.

[0501] 본 개시는 핵산(예를 들어, mRNA 핵산과 같은 RNA 핵산)의 변형된 뉴클레오시드 및 뉴클레오티드를 제공한다.

"뉴클레오시드"는 당 분자(예를 들어, 펜토스 또는 리보오스) 또는 이의 유도체를 유기 염기(예를 들어, 퓨린 또는 피리미딘) 또는 이의 유도체(본원에서 "핵염기"로도 지칭됨)와 조합하여 함유하는 화합물을 지칭한다. "뉴클레오티드"는 인산염기를 포함하는 뉴클레오시드를 지칭한다. 변형된 뉴클레오티드는, 예를 들어 화학적으로, 효소적으로, 또는 제조합적으로와 같은 임의의 유용한 방법에 의해 합성되어 하나 이상의 변형된 또는 비천연 뉴클레오시드를 포함할 수 있다. 핵산은 연결된 뉴클레오시드의 영역 또는 영역들을 포함할 수 있다. 이러한 영역은 가변 백분 결함을 가질 수 있다. 결함은 표준 인산디에스테르 결합일 수 있으며, 이러한 경우 핵산은 뉴클레오티드의 영역을 포함할 것이다.

[0502] 변형된 뉴클레오티드 염기 쌍형성은 표준 아데노신-티민, 아데노신-우라실, 또는 구아노신-시토신 염기쌍 뿐만 아니라, 비표준 또는 변형된 염기를 포함하는 뉴클레오티드 및/또는 변형된 뉴클레오티드 사이에 형성된 염기쌍을 포함하되, 예를 들어, 적어도 하나의 화학적 변형을 갖는 핵산에서 수소 결합 공여자 및 수소 결합 수용자의 배열은 비표준 염기와 표준 염기 사이 또는 2개의 상보적 비표준 염기 구조 사이의 수소 결합을 허용한다. 이러한 비표준 염기 쌍형성의 일례는 변형된 뉴클레오티드 이노신과 아데닌, 시토신, 또는 우라실 간의 염기 쌍형성이다. 염기/당 또는 링커의 임의의 조합은 본 개시의 핵산에 통합될 수 있다.

[0503] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)는 핵산의 하나 이상의 또는 모든 우리딘 위치에서 우리딘을 포함한다. 일부 구현예에서, mRNA는 특정 변형에 대해 균일하게 변형(예를 들어, 완전히 변형, 전체 서열에 걸쳐 변형)된다. 예를 들어, 핵산은 1-메틸-슈도우리딘으로 균일하게 변형될 수 있으며, 이는 mRNA 서열 내의 모든 우리딘 잔기가 1-메틸-슈도우리딘으로 대체됨을 의미한다. 유사하게, 핵산은 서열에 존재하는 임의의 유형의 뉴클레오시드 잔기에 대해 전술한 것들과 같은 변형된 잔기로 치환함으로써 균일하게 변형될 수 있다.

[0504] 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)의 핵산은 분자의 전체 길이를 따라 부분적으로 또는 완전히 변형될 수 있다. 예를 들어, 하나 이상 또는 전부 또는 주어진 유형의 뉴클레오티드(예를 들어, 퓨린 또는 피리미딘, 또는 A, G, U, C 중 임의의 하나 또는 전부)는 본 개시의 핵산에서, 또는 이의 소정의 서열 영역에서(예를 들어, 폴리(A) 꼬리를 포함하거나 배제하는 mRNA에서) 균일하게 변형될 수 있다. 일부 구현예에서, 본 개시의 핵산(또는 이의 서열 영역)에서의 모든 뉴클레오티드 X는 변형된 뉴클레오티드이며, 여기서 X는 뉴클레오티드 A, G, U, C 중 어느 하나, 또는 조합 A+G, A+U, A+C, G+U, G+C, U+C, A+G+U, A+G+C, G+U+C, 또는 A+G+C 중 어느 하나일 수 있다.

[0505] 핵산은 (전체 뉴클레오티드 함량과 관련하여, 또는 하나 이상 유형의 뉴클레오티드와 관련하여, 즉, A, G, U, 또는 C 중 임의의 하나 이상) 약 1% 내지 약 100%의 변형된 뉴클레오티드 또는 임의의 중간 백분율(예를 들어, 1% 내지 20%, 1% 내지 25%, 1% 내지 50%, 1% 내지 60%, 1% 내지 70%, 1% 내지 80%, 1% 내지 90%, 1% 내지 95%, 10% 내지 20%, 10% 내지 25%, 10% 내지 50%, 10% 내지 60%, 10% 내지 70%, 10% 내지 80%, 10% 내지 90%, 10% 내지 95%, 10% 내지 100%, 20% 내지 25%, 20% 내지 50%, 20% 내지 60%, 20% 내지 70%, 20% 내지 80%, 20% 내지 90%, 20% 내지 95%, 20% 내지 100%, 50% 내지 60%, 50% 내지 70%, 50% 내지 80%, 50% 내지 90%, 50% 내지 95%, 50% 내지 100%, 70% 내지 80%, 70% 내지 90%, 70% 내지 95%, 70% 내지 100%, 80% 내지 90%, 80% 내지 95%, 80% 내지 100%, 90% 내지 95%, 90% 내지 100%, 및 95% 내지 100%)을 함유할 수 있다. 임의의 잔여 백분율은 변형되지 않은 A, G, U, 또는 C의 존재에 의해 설명되는 것으로 이해될 것이다.

[0506] mRNA는 적어도 1% 내지 최대 100%의 변형된 뉴클레오티드, 또는 임의의 중간 백분율, 예컨대 적어도 5%의 변형된 뉴클레오티드, 적어도 10%의 변형된 뉴클레오티드, 적어도 25%의 변형된 뉴클레오티드, 적어도 50%의 변형된 뉴클레오티드, 적어도 80%의 변형된 뉴클레오티드, 또는 적어도 90%의 변형된 뉴클레오티드를 함유할 수 있다. 예를 들어, 핵산은 변형된 우라실 또는 시토신과 같은 변형된 피리미딘을 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 핵산 중 우라실의 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 25%, 적어도 50%, 적어도 80%, 적어도 90% 또는 100%가 변형된 우라실(예를 들어, 5-치환된 우라실)로 치환된다. 변형된 우라실은 단일 고유 구조를 갖는 화합물로 대체될 수 있거나, 상이한 구조(예를 들어, 2개, 3개, 4개 이상의 고유 구조)를 갖는 복수의 화합물로 대체될 수 있다. 일부 구현예에서, 핵산 중 시토신의 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 25%, 적어도 50%, 적어도 80%, 적어도 90% 또는 100%가 변형된 시토신(예를 들어, 5-치환된 시토신)으로 치환된다. 변형된 시토신은 단일 고유 구조를 갖는 화합물로 대체될 수 있거나, 상이한 구조(예를 들어, 2개, 3개, 4개 이상의 고유 구조)를 갖는 복수의 화합물로 대체될 수 있다.

[0507] 미번역 영역(UTR)

[0508] 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)는 미번역 영역으로서 작용하거나 기능하는 하나 이상의 영역 또는 부분을 포함할 수 있다. mRNA가 적어도 하나의 관심 항원을 암호화하도록 설계된 경우, 핵산은 이들 미번역 영역(UTR)

중 하나 이상을 포함할 수 있다. 핵산의 야생형 미번역 영역은 전사되지만 번역되지는 않는다. mRNA에서, 5' UTR은 전사 시작 부위에서 시작하여 시작 코돈까지 계속되지만, 시작 코돈을 포함하지 않는 반면, 3' UTR은 정지 코돈 다음부터 시작되어 전사 종결 신호까지 계속된다. 핵산 분자의 안정성 및 번역의 관점에서, UTR에 의해 수행되는 조절 역할에 대한 증거가 증가하고 있다. UTR의 조절 특징은 본 개시의 폴리뉴클레오티드에 삽입되어 무엇보다도 분자의 안정성을 향상시킬 수 있다. 또한 특정 특징들이 추가되어, 전사체가 바람직하지 않은 기관 부위로 잘못 전달되는 경우에 전사체의 제어된 하향 조절을 보장할 수 있다. 다양한 5' UTR 서열 및 3' UTR 서열이 당업계에 공지되어 있고 이용 가능하다.

[0509] 5' UTR은 시작 코돈(리보솜에 의해 번역된 mRNA 전사체의 제1 코돈)으로부터 바로 상류(5')에 있는 mRNA의 영역이다. 5' UTR은 단백질을 암호화하지 않는다(비암호화임). 천연 5' UTR은 번역 개시에 역할을 하는 특징을 갖는다. 이들은 일반적으로 리보솜이 많은 유전자의 번역을 개시하는 과정에 관여하는 것으로 알려진 코작 서열과 같은 시그니처를 보유한다. 코작 서열은 컨센서스 CCR(A/G)CCAUGG를 가지며, 여기서 R은 시작 코돈(AUG)의 상류에 있는 퓨린(아데닌 또는 구아닌) 3개의 염기이며, 이어서 또 다른 'G'가 이어진다. 또한 5' UTR은 신장 인자 결합에 관여하는 이차 구조를 형성하는 것으로 알려져 있다.

[0510] 일부 구현예에서, 5' UTR은 이중 UTR, 즉 상이한 ORF와 연관된 자연에서 발견되는 UTR이다. 다른 구현예에서, 5' UTR은 합성 UTR, 즉 자연에서 발생하지 않는다. 합성 UTR은 이들의 특성을 개선하도록 돌연변이된 UTR, 예를 들어 유전자 발현을 증가시키는 UTR 뿐만 아니라 완전히 합성인 UTR을 포함한다. 예시적인 5' UTR은 제노푸스 또는 인간 유래 a-글로빈 또는 b-글로빈(8278063; 9012219), 인간 시토크롬 b-245 폴리펩티드, 및 히드록시스테로이드(17b) 탈수소효소, 및 담배 에칭 바이러스(U.S.8278063, 9012219, 동 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합됨)를 포함한다. CMV 즉시-조기 1(IE1) 유전자(US2014/0206753, WO2013/185069, 동 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합됨), 서열 GGGAUCCUACC(WO2014/144196)가 또한 사용될 수 있다. 또 다른 구현예에서, TOP 유전자의 5' UTR은 5' TOP 모티프(올리고피리미딘 관)(예를 들어, WO/2015/101414, WO2015/101415, WO/2015/062738, WO2015/024667, WO2015/024667)가 결합된 TOP 유전자의 5' UTR이고; 리보솜 단백질 대형 32(L32) 유전자(WO/2015/101414, WO2015/101415, WO/2015/062738)로부터 유래된 5' UTR 요소, 히드록시스테로이드(17-b) 탈수소효소 4 유전자(HSD17B4)의 5' UTR로부터 유래된 5' UTR 요소(WO2015/024667), 또는 ATP5A1의 5' UTR로부터 유래된 5' UTR 요소(WO2015/024667)가 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 5' UTR 대신에 내부 리보솜 진입 부위(IRES)가 사용된다.

[0511] 3' UTR은 정지 코돈(번역의 종결을 신호하는 mRNA 전사체의 코돈)으로부터 바로 하류(3')에 있는 mRNA의 영역이다. 3' UTR은 단백질을 암호화하지 않는다(비암호화임). 천연 3' UTR 또는 야생형 3' UTR은 내장된 아테노신 및 우리딘의 신장을 갖는 것으로 알려져 있다. 이들 AU 풍부 시그니처는 높은 전환율을 갖는 유전자에서 특히 흔하다. 이들의 서열 특징 및 기능적 특성에 기초하여, AU 풍부 요소(ARE)는 3개의 부류로 분리될 수 있다(Chen 등의 문헌(1995)): 클래스 I ARE는 U-풍부 영역 내에 AUUA 모티프의 여러 분산된 사본을 함유한다. C-Myc 및 MyoD는 클래스 I ARE를 포함한다. 클래스 II ARE는 둘 이상의 중첩된 UUAUUUA(U/A)(U/A) 9량체를 갖는다. 이러한 유형의 ARE를 함유하는 분자는 GM-CSF 및 TNF- α 를 포함한다. 클래스 III ARE는 덜 잘 정의되어 있다. 이들 U 풍부 영역은 AUUA 모티프를 함유하지 않는다. c-Jun 및 미오게닌은 이 부류의 2개의 잘 연구된 예이다.

[0512] ARE에 결합하는 대부분의 단백질은 전령을 불안정하게 하는 것으로 알려져 있는 반면, ELAV 계열의 구성원, 가장 주목할 만한 HuR은 mRNA의 안정성을 증가시키는 것으로 문서화되어 있다. HuR은 모든 세 가지 부류의 ARE에 결합한다. HuR 특이적 결합 부위를 핵산 분자의 3' UTR로 조작하는 것은 HuR 결합으로 이어져 생체 내에서 메시지를 안정화시킬 것이다.

[0513] 3' UTR AU 풍부 요소(ARE)의 도입, 제거, 또는 변형은 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)의 안정성을 조절하는데 사용될 수 있다. 특이적 핵산을 조작할 때, ARE의 하나 이상의 사본이 도입되어 본 개시의 핵산을 덜 안정하게 하여, 이에 따라 번역을 제한하고 생성된 단백질의 생산을 감소시킬 수 있다. 마찬가지로, ARE는 식별되고 제거되거나 돌연변이되어 세포내 안정성을 증가시키고, 이에 따라 생성된 단백질의 번역 및 생산을 증가시킬 수 있다. 형질감염 실험은 본 개시의 핵산을 사용하여 관련 세포주에서 수행될 수 있고, 단백질 생산은 형질감염 후 다양한 시점에 분석될 수 있다. 예를 들어, 세포는 상이한 ARE-조작 분자와 함께, 관련 단백질에 대한 ELISA 키트를 사용하고 형질감염 후 6시간, 12시간, 24시간, 48시간 및 7일차에 생성된 단백질을 분석함으로써 형질감염될 수 있다.

[0514] 3' UTR은 이중 또는 합성일 수 있다. 3' UTR과 관련하여, 제노푸스 b-글로빈 UTR 및 인간 b-글로빈 UTR을 포함하여 글로빈 UTR이 당업계에 공지되어 있다(8278063, 9012219, US2011/0086907). 2개의 순차적인 인간 b-글로

빈 3' UTR을 머리에서 꼬리로 클로닝함으로써 일부 세포 유형에서 안정성이 향상된 변형된 b-글로빈 작제물이 개발되었으며 당업계에서 잘 알려져 있다(US2012/0195936, WO2014/071963). 또한, a2-글로빈, a1-글로빈, UTR, 및 이의 돌연변이체도 당업계에서 공지되어 있다(WO2015/101415, WO2015/024667). 비특히 문헌의 mRNA 작제물에 기술된 다른 3' UTR은 CYBA(Ferizi 등의 문헌(2015)) 및 알부민(Thess 등의 문헌(2015))을 포함한다. 다른 예시적인 3' UTR은 (야생형 또는 변형된) 소 또는 인간 성장 호르몬(WO2013/185069, US2014/0206753, WO2014152774), 토끼 b 글로빈 및 B형 간염 바이러스(HBV), a-글로빈 3' UTR 및 바이러스 VEEV 3' UTR 서열의 것을 포함하고, 또한 당업계에서 공지되어 있다. 일부 구현예에서, 서열 UUUGAAUU(WO2014/144196)가 사용된다. 일부 구현예에서, 인간 및 마우스 리보솜 단백질의 3' UTR이 사용된다. 다른 예는 rps93'UTR (WO2015/101414), FIG4 (WO2015/101415), 및 인간 알부민 7(WO2015/101415)을 포함한다.

[0515] 당업자는 이중 또는 합성인 5' UTR이 임의의 바람직한 3' UTR 서열과 함께 사용될 수 있음을 이해할 것이다. 예를 들어, 이중 5' UTR은 이중 3' UTR을 갖는 합성 3' UTR과 함께 사용될 수 있다.

[0516] 또한 비UTR 서열은 핵산 내의 영역 또는 하위 영역으로서 사용될 수 있다. 예를 들어, 인트론 또는 인트론 서열의 일부는 본 개시의 핵산의 영역에 통합될 수 있다. 인트론 서열의 삽입은 단백질 생산뿐만 아니라 핵산 수준을 증가시킬 수 있다.

[0517] 특징부의 조합은 측부 영역에 포함될 수 있고, 다른 특징부 내에 포함될 수 있다. 예를 들어, ORF는 강력한 코작 번역 개시 신호를 함유할 수 있는 5' UTR 및/또는 폴리-A 꼬리의 템플릿화된 첨가를 위한 올리고(dT) 서열을 포함할 수 있는 3' UTR이 측면에 위치할 수 있다. 5' UTR은 미국 특허 출원 공개 제2010/0293625호 및 PCT/US2014/069155에 기술된 5' UTR과 같은 동일하고/하거나 상이한 유전자로부터의 제1 폴리뉴클레오티드 단편 및 제2 폴리뉴클레오티드 단편을 포함할 수 있으며, 동 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다. 임의의 유전자로부터의 임의의 UTR은 핵산의 영역에 삽입될 수 있음을 이해해야 한다. 또한, 임의의 공지된 유전자의 다수의 야생형 UTR이 사용될 수 있다. 또한, 야생형 영역의 변이체가 아닌 인공 UTR을 제공하는 것 본 개시의 범주 내에 있다. 이들 UTR 또는 이의 일부는 이들이 선택된 전사체와 동일한 배향으로 배치될 수 있거나 배향 또는 위치에서 변경될 수 있다. 따라서, 5' UTR 또는 3' UTR은 반전, 단축, 연장될 수 있고, 하나 이상의 다른 5' UTR 또는 3' UTR로 제조될 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, UTR 서열에 관한 용어 "변경된"은 UTR이 기준 서열과 관련하여 어떤 방식으로든 변경되었음을 의미한다. 예를 들어, 3' UTR 또는 5' UTR은 전술한 바와 같은 배향 또는 위치의 변화에 의해 야생형 UTR 또는 천연 UTR에 대해 변경될 수 있거나, 추가 뉴클레오티드의 포함, 뉴클레오티드의 결실, 뉴클레오티드의 교환 또는 전위에 의해 변경될 수 있다. "변경된" UTR(3' 또는 5')을 생성하는 이들 변화 중 어느 하나는 변이체 UTR을 포함한다.

[0518] 일부 구현예에서, 5' UTR 또는 3' UTR과 같은 이중, 삼중, 또는 사중 UTR이 사용될 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "이중" UTR은 동일한 UTR의 2개의 사본이 직렬로 또는 실질적으로 직렬로 인코딩되는 것이다. 예를 들어, 이중 베타-글로빈 3' UTR은 미국 특허 공개 제2010/0129877호에 기술된 바와 같이 사용될 수 있으며, 동 문헌의 내용은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

[0519] 또한, 패턴된 UTR을 갖는 것이 본 개시의 범주 내에 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "패턴된 UTR"은 반복 또는 교번 패턴을 반영하는 UTR, 예컨대 ABABAB 또는 AABBAABBAABB 또는 ABCABCABC 또는 이의 변이체가 1회, 2회, 또는 3회를 초과하여 반복되는 UTR이다. 이들 패턴에서, 각각의 문자, A, B, 또는 C는 뉴클레오티드 수준에서 상이한 UTR을 나타낸다.

[0520] 일부 구현예에서, 인접 영역은 단백질이 공통 기능, 구조, 특징부, 또는 특성을 공유하는 전사체의 계열로부터 선택된다. 예를 들어, 관심 폴리펩티드는 특정 세포, 조직에서 발현되거나 발생 중 어느 시점에 발현되는 단백질 계열에 속할 수 있다. 이들 유전자 중 어느 하나의 UTR은 동일하거나 상이한 단백질 계열의 임의의 다른 UTR과 교환되어 새로운 폴리뉴클레오티드를 생성할 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "단백질 계열"은 적어도 하나의 기능, 구조, 특징부, 국소화, 기원, 또는 발현 패턴을 공유하는 2개 이상의 관심 폴리펩티드의 균을 지칭하기 위해 가장 넓은 의미로 사용된다.

[0521] 또한 미번역 영역은 번역 인핸서 요소(TEE)를 포함할 수 있다. 비제한적인 예로서, TEE는 그 전체가 참조로서 본원에 통합된 미국 출원 제2009/0226470호에 기술된 것들 및 당업계에 공지된 것들을 포함할 수 있다. 본원에 기술된 폴리뉴클레오티드를 암호화하는 RNA cDNA의 시험관 내 전사는 시험관 내 전사(IVT) 시스템을 사용하여 전사될 수 있다. RNA의 시험관 내 전사는 당업계에 공지되어 있으며 국제 공개 WO 2014/152027에 기술되어 있고, 동 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다. 일부 구현예에서, 본 개시의 RNA는 WO 2018/053209 및 WO 2019/036682에 기술된 방법 중 임의의 하나 이상에 따라 제조되며, 동 문헌의 각각은 참조로서 본원에 통합

된다.

- [0522] 일부 구현예에서, RNA 전사체는 시험관 내 전사 반응에서 증폭되지 않은 선형화된 DNA 템플릿을 사용하여 생성되어 RNA 전사체를 생성한다. 일부 구현예에서, 템플릿 DNA는 단리된 DNA이다. 일부 구현예에서, 템플릿 DNA는 cDNA이다. 일부 구현예에서, cDNA는 RNA 폴리뉴클레오티드, 예를 들어, 비제한적으로 코로나바이러스 mRNA의 역전사에 의해 형성된다. 일부 구현예에서, 세포, 예를 들어 박테리아 세포, 예를 들어 대장균, 예를 들어 DH-1 세포는 플라스미드 DNA 템플릿으로 형질감염된다. 일부 구현예에서, 형질감염된 세포는 플라스미드 DNA를 복제하도록 배양된 다음, 단리되고 정제된다. 일부 구현예에서, DNA 템플릿은 RNA 중합효소 프로모터, 예를 들어, 관심 유전자의 5'에 위치하고 이에 작동 가능하게 연결된 T7 프로모터를 포함한다.
- [0523] 일부 구현예에서, 시험관 내 전사 템플릿은 5' 미번역(UTR) 영역을 암호화하고, 개방 해독 프레임을 함유하고, 3' UTR 및 폴리(A) 꼬리를 암호화한다. 특정 핵산 서열 조성물 및 시험관 내 전사 템플릿의 길이는 템플릿에 의해 암호화된 mRNA에 따라 달라질 것이다.
- [0524] "5' 미번역 영역"(UTR)은 폴리펩티드를 암호화하지 않는 시작 코돈(즉, 리보솜에 의해 번역된 mRNA 전사체의 제 1 코돈)으로부터 바로 상류(즉, 5')에 있는 mRNA의 영역을 지칭한다. RNA 전사체가 생성될 때, 5' UTR은 프로모터 서열을 포함할 수 있다. 이러한 프로모터 서열은 당업계에 공지되어 있다. 이러한 프로모터 서열은 본 개시의 백신에 존재하지 않을 것임을 이해해야 한다.
- [0525] "3' 미번역 영역"(UTR)은 폴리펩티드를 암호화하지 않는 정지 코돈(즉, 번역의 종결을 신호하는 mRNA 전사체의 코돈)으로부터 바로 하류(즉, 3')에 있는 mRNA의 영역을 지칭한다.
- [0526] "개방 해독 프레임"은 시작 코돈(예를 들어, 메티오닌(ATG))으로 시작하여 정지 코돈(예를 들어, TAA, TAG, 또는 TGA)으로 끝나는 DNA의 연속 신장이며 폴리펩티드를 암호화한다.
- [0527] "폴리(A) 꼬리"는 다수의 연속적인 아데노신 일인산염을 함유하는 3' UTR로부터 하류에, 예를 들어 바로 하류(즉, 3')에 있는 mRNA의 영역이다. 폴리(A) 꼬리는 10개 내지 300개의 아데노신 일인산염을 함유할 수 있다. 예를 들어, 폴리(A) 꼬리는 10개, 20개, 30개, 40개, 50개, 60개, 70개, 80개, 90개, 100개, 110개, 120개, 130개, 140개, 150개, 160개, 170개, 180개, 190개, 200개, 210개, 220개, 230개, 240개, 250개, 260개, 270개, 280개, 290개, 또는 300개의 아데노신 일인산염을 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 폴리(A) 꼬리는 50개 내지 250개의 아데노신 일인산염을 함유한다. 관련 생물학적 환경(예를 들어, 세포 내, 생체 내)에서, 폴리(A) 꼬리는, 예를 들어 세포질에서의 효소 분해로부터 mRNA를 보호하는 기능을 하며, 전사 종결 및/또는 핵으로부터의 mRNA의 내보내기 및 번역을 돕는다.
- [0528] 일부 구현예에서, 핵산은 200개 내지 3,000개의 뉴클레오티드를 포함한다. 예를 들어, 핵산은 200개 내지 500개, 200개 내지 1000개, 200개 내지 1500개, 200개 내지 3000개, 500개 내지 1000개, 500개 내지 1500개, 500개 내지 2000개, 500개 내지 3000개, 1000개 내지 1500개, 1000개 내지 2000개, 1000개 내지 3000개, 1500개 내지 3000개, 또는 2000개 내지 3000개의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다.
- [0529] 통상적으로 시험관 내 전사 시스템은 전사 완충액, 뉴클레오티드 트리포스페이트(NTP), RNase 억제제 및 중합효소를 포함한다.
- [0530] NTP는 자체적으로 제조될 수 있거나, 공급업체로부터 선택될 수 있거나, 본원에 기술된 바와 같이 합성될 수 있다. NTP는 천연 및 비천연(변형된) NTP를 포함하는 본원에 기술된 것들로부터 선택될 수 있지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0531] 임의의 수의 RNA 중합효소 또는 변이체가 본 개시의 방법에 사용될 수 있다. 중합효소는 파지 RNA 중합효소, 예를 들어 T7 RNA 중합효소, T3 RNA 중합효소, SP6 RNA 중합효소, 및/또는 비제한적으로 화학적으로 변형된 핵산 및/또는 뉴클레오티드 포함하여 변형된 핵산 및/또는 변형된 뉴클레오티드를 삽입할 수 있는 중합효소와 같은 돌연변이 중합효소로부터 선택될 수 있지만, 이에 한정되지 않는다. 일부 구현예는 DNase의 사용을 배제한다.
- [0532] 일부 구현예에서, RNA 전사체는 효소 캡핑을 통해 캡핑된다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)는 5' 말단 캡, 예를 들어 7mG(5')ppp(5')N1mpNp를 포함한다.
- [0533] *화학적 합성*
- [0534] 고체상 화학 합성. 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)는 고체상 기술을 사용하여 전체적으로 또는 부분적으로 제조될 수 있다. 핵산의 고체상 화학 합성은 분자가 고체 지지체 상에 고정되고 반응물 용액에서 단계별로 합성

되는 자동화된 방법이다. 고체상 합성은 핵산 서열에서 화학적 변형의 부위 특이적 도입에 유용하다.

- [0535] 액상 화학 합성. 단량체 빌딩 블록의 순차적 첨가에 의한 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)의 합성은 액상으로 수행될 수 있다.
- [0536] 합성 방법의 조합. 위에서 논의된 합성 방법은 각각 자체적인 장점 및 한계를 갖는다. 한계를 극복하기 위해 이들 방법을 조합하는 시도들이 수행되었다. 이러한 방법의 조합은 본 개시의 범위 내에 있다. 효소 결합과 조합하여 고체상 또는 액상 화학적 합성을 사용하면 화학적 합성만으로는 수득할 수 없는 장쇄 핵산을 생성하는 효율적인 방법을 제공한다.
- [0537] *핵산 영역 또는 하위 영역의 결합*
- [0538] 또한 리가아제에 의한 핵산 조립이 사용될 수 있다. DNA 또는 RNA 리가아제는 포스포디에스테르 결합의 형성을 통해 폴리뉴클레오티드 사슬의 5' 말단 및 3' 말단의 분자간 결합을 촉진한다. 키메라 폴리뉴클레오티드 및/또는 원형 핵산과 같은 핵산은 하나 이상의 영역 또는 하위 영역의 결합에 의해 제조될 수 있다. DNA 단편은 리가아제-촉매 반응에 의해 결합되어 상이한 기능을 갖는 재조합 DNA를 생성할 수 있다. 하나는 5' 포스포릴기를 갖고 또 다른 하나는 유리 3' 히드록실기를 갖는 2개의 올리고데옥시뉴클레오티드는 DNA 리가아제에 대한 기질로서 작용한다.
- [0539] *정제*
- [0540] 본원에 기술된 핵산의 정제는 핵산 세정, 품질 보증, 및 품질 관리를 포함할 수 있지만, 이에 한정되지 않는다. 세정은 당업계에 공지된 방법, 예컨대 비제한적으로 AGENCOURT® 비드(Beckman Coulter Genomics, Danvers, MA), 폴리-T 비드, LNATM 올리고-T 포획 프로브(EXIQON® Inc, Vedbaek, Denmark), 또는 HPLC 기반 정제 방법, 예컨대 비제한적으로 강한 음이온 교환 HPLC, 약한 음이온 교환 HPLC, 역상 HPLC(RP-HPLC), 및 소수성 상호작용 HPLC(HIC-HPLC)에 의해 수행될 수 있다. 용어 "정제된"은 "정제된 핵산"과 같은 핵산과 관련하여 사용될 때 적어도 하나의 오염물로부터 분리된 것을 지칭한다. "오염물"은 부적합하거나, 불순하거나, 열등하게 하는 또 다른 임의의 물질이다. 따라서, 정제된 핵산(예를 들어, DNA 및 RNA)은 자연에서 발견되는 것과 상이한 형태 또는 환경, 또는 처리 방법 또는 정제 방법을 거치게 하기 전에 존재하는 것과 상이한 형태 또는 환경에서 존재한다.
- [0541] 품질 보증 및/또는 품질 관리 점검은 겔 전기영동, UV 흡광도, 또는 분석 HPLC와 같은 방법을 사용하여 수행될 수 있지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0542] 일부 구현예에서, 핵산은 역전사효소-PCR을 포함하지만 이에 한정되지 않는 방법에 의해 시퀀싱될 수 있다.
- [0543] *정량화*
- [0544] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)는 엑소솜에서 또는 하나 이상의 체액으로부터 유래될 때 정량화될 수 있다. 체액은 말초 혈액, 혈청, 혈장, 복수, 소변, 뇌척수액(CSF), 가래, 타액, 골수, 윤활액, 방수, 양수, 귀지, 모유, 기관지 폐포 세척액, 정액, 전립선액, 쿠퍼액 또는 사정 전 체액, 땀, 배설물, 모발, 눈물, 낭종액, 흉막액 및 복막액, 심낭액, 림프, 유미즙(chyme, chyle), 담즙, 간질액, 월경, 고름, 피지, 구토, 질 분비물, 점막 분비물, 대변수, 채장액, 부비강으로부터의 세정액, 기관지폐 흡인물, 포배 공동 유체, 및 제대혈을 포함한다. 대안적으로, 엑소솜은 폐, 심장, 채장, 위, 장, 방광, 신장, 난소, 고환, 피부, 결합, 유방, 전립선, 뇌, 식도, 간, 및 태반으로 이루어진 군으로부터 선택된 기관으로부터 회수될 수 있다.
- [0545] 검정은 작제물 특이적 프로브, 세포 계측법, qRT-PCR, 실시간 PCR, PCR, 유세포 계측법, 전기영동, 질량 분광분석, 또는 이들의 조합을 사용하여 수행될 수 있는 반면, 엑소솜은 효소 결합 면역흡착 검정(ELISA) 방법과 같은 면역조직화학적 방법을 사용하여 단리될 수 있다. 또한 엑소솜은 크기 배제 크로마토그래피, 밀도 구배 원심분리, 차등 원심분리, 나노막 한외여과, 면역흡수성 포획, 친화도 정제, 미세유체 분리, 또는 이들의 조합에 의해 단리될 수 있다.
- [0546] 이들 방법은 연구원에게 남아 있거나 전달된 핵산의 수준을 실시간으로 모니터링할 수 있는 능력을 제공한다. 일부 구현예에서, 이는 본 개시의 핵산이 구조적 변형 또는 화학적 변형으로 인해 내인성 형태와 상이하기 때문에 가능하다.
- [0547] 일부 구현예에서, 핵산은 자외선 가시 분광법(UV/Vis)과 같은 방법을 사용하여 정량화될 수 있지만, 이에 한정되지 않는다. UV/Vis 분광계의 비제한적인 예는 NANODROP® 분광계(ThermoFisher, Waltham, MA)이다. 정량화된 핵산은 핵산의 크기가 적절한지 여부를 결정하고, 핵산의 분해가 발생하지 않았음을 확인하기 위해 분석될 수

있다. 핵산의 분해는 아가로오스 겔 전기영동, HPLC 기반 정제 방법, 예컨대 비제한적으로 강한 음이온 교환 HPLC, 약한 음이온 교환 HPLC, 역상 HPLC(RP-HPLC), 및 소수성 상호작용 HPLC(HIC-HPLC), 액체 크로마토그래피-질량 분광분석(LCMS), 모세관 전기영동(CE), 및 모세관 겔 전기영동(CGE)과 같은 방법에 의해 확인될 수 있지만, 이에 한정되지 않는다.

[0548] 다가 백신

[0549] 본원에 제공된 바와 같이, LPMP/핵산 백신은 동일하거나 상이한 종의 2개 이상의 항원을 암호화하는 RNA 또는 다수의 RNA를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, LPMP/핵산 백신은 2개 이상의 코로나바이러스 항원을 암호화하는 RNA 또는 다수의 RNA를 포함한다. 일부 구현예에서, RNA는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 또는 그 이상의 코로나바이러스 항원을 암호화할 수 있다.

[0550] 일부 구현예에서, 항원을 암호화하는 2개 이상의 상이한 RNA(예를 들어, mRNA)는 동일한 지질 나노입자로 제형화될 수 있다. 다른 구현예에서, 항원을 암호화하는 2개 이상의 상이한 RNA는 별도의 지질 나노입자(각각의 RNA는 단일 지질 나노입자로 제형화됨)로 제형화될 수 있다. 그런 다음, 지질 나노입자는 조합되어 단일 백신 조성물로서 투여될 수 있거나(예를 들어, 다수의 항원을 암호화하는 다수의 RNA를 포함함), 별도로 투여될 수 있다.

[0551] 병용 백신

[0552] 본원에 제공된 바와 같이, LPMP/핵산 백신은 동일하거나 상이한 바이러스 균주의 2개 이상의 항원을 암호화하는 RNA 또는 다수의 RNA를 포함할 수 있다. 또한, 하나 이상의 코로나바이러스 및 상이한 유기체의 하나 이상의 항원(들)을 암호화하는 RNA를 포함하는 조합 백신이 본원에 제공된다. 따라서, 본 개시의 백신은 동일한 균주/종의 하나 이상의 항원, 또는 상이한 균주/종의 하나 이상의 항원, 예를 들어 코로나바이러스 감염 위험이 높은 동일한 지리적 영역에서 발견되는 유기체 또는 개인이 코로나바이러스에 노출될 때 노출될 가능성이 있는 유기체에 대한 면역을 유도하는 항원을 표적으로 하는 조합 백신일 수 있다.

[0553] 백신 투여

[0554] 일부 구현예에서, LPMP/핵산 백신은 대상체(예를 들어, 인간 대상체와 같은 포유류 대상체)에게 투여될 수 있고, RNA 폴리뉴클레오티드는 생체 내에서 번역되어 항원성 폴리펩티드(항원)를 생산한다. 조성물(예를 들어, RNA를 포함함)의 "유효량"은 적어도 부분적으로 표적 조직, 표적 세포 유형, 투여 수단, RNA의 물리적 특성(예를 들어, 변형된 뉴클레오시드의 길이, 뉴클레오티드 조성물, 및/또는 정도), 백신의 다른 성분, 및 대상체의 연령, 체중, 신장, 성별, 및 전반적인 건강과 같은 다른 결정인자에 기초한다. 통상적으로, LPMP/핵산 백신의 유효량은 대상체의 세포에서 항원 생성의 함수로서 유도되거나 증강된 면역 반응을 제공한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 화학적 변형을 갖는 RNA 폴리뉴클레오티드를 함유하는 조성물의 유효량은 동일한 항원 또는 펩티드 항원을 암호화하는 상응하는 미변형 폴리뉴클레오티드를 함유하는 조성물보다 더 효율적이다. 항원 생산의 증가는 세포 형질감염의 증가(RNA 백신으로 형질감염된 세포의 백분율), 폴리뉴클레오티드로부터의 단백질 번역 및/또는 발현의 증가, 핵산 분해의 감소(예를 들어, 변형된 폴리뉴클레오티드로부터의 단백질 번역의 증가된 지속 시간에 의해 입증됨), 또는 숙주 세포의 변경된 항원 특이적 면역 반응에 의해 입증될 수 있다.

[0555] 용어 "약학적 조성물"은 활성제를 담체, 불활성 물질 또는 활성 물질과 조합하여, 조성물을 생체 내 또는 생체 외에서 진단적 용도 또는 치료적 용도에 특히 적합하게 하는 것을 지칭한다. 대상체에게 투여한 후 또는 대상체에게 "약학적으로 허용 가능한 담체"는 바람직하지 않은 생리학적 효과를 야기하지 않는다. 약학적 조성물의 담체는 또한 활성 성분과 상용성이고 이를 안정화시킬 수 있다는 의미에서 "허용 가능한" 것이어야 한다. 하나 이상의 가용화제는 활성제의 전달을 위한 약학적 담체로서 사용될 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 담체의 예는 투여 형태로서 사용할 수 있는 조성물을 달성하기 위한 생체적합적 비히클, 보조제, 첨가제, 및 희석제를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 다른 담체의 예는 콜로이드성 실리콘 산화물, 스테아린산 마그네슘, 셀룰로오스, 및 라우릴 황산 나트륨을 포함한다. 추가의 적절한 약학적 담체 및 희석제뿐만 아니라 이의 사용을 위한 약학적 필요성은 Remington's Pharmaceutical Sciences에 기술되어 있다.

[0556] 일부 구현예에서, LPMP/핵산 백신은 코로나바이러스 감염의 치료 또는 예방에 사용될 수 있다. LPMP/핵산 백신은 활성 면역화 계획의 일부로서 건강한 개체에게 예방적으로 또는 치료적으로 투여되거나, 인큐베이션 단계 동안 또는 증상 발생 후 활성 감염 동안 감염 초기에 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포, 조직, 또는 대상체에게 제공된 RNA의 양은 면역 예방에 효과적인 양일 수 있다.

[0557] LPMP/핵산 백신은 다른 예방적 화합물 또는 치료적 화합물과 함께 투여될 수 있다. 비제한적인 예로서, 예방적 화합물 또는 치료 화합물은 보조제 또는 부스터일 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 백신과 같은 예방적

조성물을 지칭할 때, 용어 "부스터"는 예방적(백신) 조성물의 추가 투여를 지칭한다. 부스터(또는 부스터 백신)는 예방적 조성물의 초기 투여 후에 투여될 수 있다. 예방적 조성물의 초기 투여와 부스터의 초기 투여 사이의 투여 시간은 1분, 2분, 3분, 4분, 5분, 6분, 7분, 8분, 9분, 10분, 15분, 20분, 35분, 40분, 45분, 50분, 55분, 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 7시간, 8시간, 9시간, 10시간, 11시간, 12시간, 13시간, 14시간, 15시간, 16시간, 17시간, 18시간, 19시간, 20시간, 21시간, 22시간, 23시간, 1일, 36시간, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 1주, 10일, 2주, 3주, 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 10개월, 11개월, 1년, 18개월, 2년, 3년, 4년, 5년, 6년, 7년, 8년, 9년, 10년, 11년, 12년, 13년, 14년, 15년, 16년, 17년, 18년, 19년, 20년, 25년, 30년, 35년, 40년, 45년, 50년, 55년, 60년, 65년, 70년, 75년, 80년, 85년, 90년, 95년, 또는 99년 초과일 수 있지만, 이에 한정되지 않는다. 예시적인 구현예에서, 예방적 조성물의 초기 투여와 부스터의 초기 투여 사이의 투여 시간은 1주, 2주, 3주, 1개월, 2개월, 3개월, 6개월, 또는 1년일 수 있지만, 이에 한정되지 않는다.

[0558] 일부 구현예에서, LPMP/핵산 백신은 당업계에서 공지된 불활성화된 백신의 투여와 유사하게 근육내, 비강내, 또는 피내 투여될 수 있다.

[0559] LPMP/핵산 백신은 감염의 유발물 또는 충족되지 않은 의학적 요구의 정도 또는 수준에 따라 다양한 환경에서 사용될 수 있다. 비제한적인 예로서, RNA 백신은 다양한 감염성 질환을 치료 및/또는 예방하는 데 사용될 수 있다. RNA 백신은, 상업적으로 이용 가능한 백신보다 훨씬 더 큰 항체 역가를 생성하고, 더 양호한 중화 면역을 생성하고, 더 지속적인 면역 반응을 생성하고/하거나, 반응을 더 일찍 생성한다는 점에서 우수한 특성을 갖는다.

[0560] **키트**

[0561] 또한 본 발명은 본원에 기술된 PMP 조성물을 갖는 용기를 포함하는 키트를 제공한다. 키트는 본 발명의 방법에 따라 PMP 조성물을 식물에게 적용하거나 전달하기 위한 지침 물질을 추가로 포함할 수 있다. 당업자는 본 발명의 방법의 PMP 조성물을 적용하기 위한 지침이 임의의 형태의 지시일 수 있음을 이해할 것이다. 이러한 지침은 서면 지침 자료(라벨, 소책자, 팜플릿 등), 구두 지침 자료(오디오 카세트 또는 CD 등), 또는 영상 지침(비디오 테이프 또는 DVD 등)을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다.

[0562] **실시예**

[0563] 이제 본 발명은 일반적으로 설명될 것이며, 이는 단지 본 발명의 소정의 양태 및 구현예를 예시하기 위한 목적으로만 포함되고 본 발명을 한정하려는 의도가 아닌 다음의 실시예를 참조하여 보다 쉽게 이해될 것이다.

[0564] **실시예 1: LPMP의 제조 및 변형 및 mRNA를 갖는 LPMP 제형화**

[0565] 식물 전령 핵(PMP)의 제조, 지질 재구성된 식물 전령 핵(LPMP)을 제조하기 위한 PMP의 변형, 및 mRNA를 갖는 PMP 및 LPMP의 제형화는 그 전체가 참조로서 본원에 통합되는 국제 특허 출원 공개 WO 2021/041301에 개시된 방법을 사용하여 달성될 수 있다.

[0566] 특히, 그 전체가 참조로서 본원에 통합되는 국제 특허 출원 공개 WO 2021/041301의 실시예 1 내지 17에 개시된 모든 실험 프로토콜은 다음을 포함한다: 실시예 1: 식물로부터 식물 전령 핵의 단리; 실시예 2: 정제된 식물 전령 핵(PMP)의 생산; 실시예 3: 식물 전령 핵 특성화; 실시예 4: 식물 전령 핵 안정성의 특성화; 실시예 5: 카르고와 함께 PMP 로딩; 실시예 6: 이온성 액체와 함께 PMP의 제형화에 의한 PMP 세포 흡수 증가; 실시예 7: 이온화 가능 지질을 사용한 PMP의 변형; 실시예 8: 미세유체가 포함된 LPMP의 제형화; 실시예 9: 이온화 가능 지질을 사용하여 지질 재구성된 PMP 내로 mRNA 로딩 및 전달; 실시예 10: 이온화 가능 지질 변형을 동반하거나 동반하지 않은 자연 PMP 및 재구성된 PMP의 세포 흡수; 실시예 11: 양이온성 지질을 갖는 PMP의 제형화에 의한 PMP 세포 흡수 증가; 실시예 12: 양이온성 지질을 사용한 PMP의 변형; 실시예 13: 양이온성 지질을 사용한 지질 재구성된 PMP 내로 mRNA 로딩 및 전달; 실시예 14: 양이온성 지질 변형을 동반하거나 동반하지 않은 자연 PMP 및 재구성된 PMP의 세포 흡수; 실시예 15: 양이온성 지질 GL67 및 에틸 PC를 사용한 로딩 개선; 실시예 16: mRNA 로딩을 위한 지질 비율의 최적화; 및 실시예 17: 플라즈미드 로딩을 위한 지질 비율의 최적화.

[0567] **실시예 2: 백신의 제조.**

[0568] **폴리뉴클레오티드의 제조 및 특성화**

[0569] 폴리뉴클레오티드 및/또는 이의 부분 또는 영역의 제조는 국제 특허 출원 공개 WO 2014/152027에 개시된 방법을 사용하여 달성될 수 있고, 동 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다. 정제 방법은 국제 특허 출원 공개

W02014/152030 및 W02014/152031에 교시된 방법을 포함할 수 있고, 동 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다. 폴리뉴클레오티드의 검출 방법 및 특성화 방법은 국제 특허 출원 공개 W02014/144039에 교시된 바와 같이 수행될 수 있고, 동 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다. 폴리뉴클레오티드의 특성화는 폴리뉴클레오티드 맵핑, 역전사효소 시퀀싱, 전하 분포 분석, RNA 불순물의 검출, 또는 전술한 것 중 2개 이상의 임의의 조합을 사용하여 달성될 수 있다. "특성화"는, 예를 들어 RNA 전사체 서열의 결정, RNA 전사체 순도의 결정, 또는 RNA 전사체의 전하 이질성의 결정을 포함한다. 이러한 방법은, 예를 들어 국제 특허 출원 공개 W02014/144711 및 W02014/144767에 교시되어 있고, 동 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

[0570] mRNA 설계 및 변형에 대한 추가적인 세부 사항은 WO 2021/154763 및 WO 2021/188969에서 확인할 수 있고, 동 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

[0571] **SARS-CoV-2 바이러스 생산**

[0572] 원래 EVAg(European Virus Archive global)(GISAID EPI_ISL_417879, <https://www.european-virus-archive.com/virus/sars-cov-2-strain-slovakiask-bmc52020>)에 의해 제공된, Vero E6/TMPRSS2 세포 상에서 생산되고 역가화된 SARS-CoV-2 균주 "Slovakia/SK-BMC5/2020"을 햄스터 감염에 사용하였다. 균주는 GH 클레이드에 속하였다.

[0573] 바이러스 생산이 50×10^6 개의 Vero E6/TMPRSS2 세포가 시딩된 T175 플라스크에서 40mL의 최종 부피로 수행되었다. ViCe11 장치에 의한 0.25% 트리판 블루 배제 검정에 의해 세포 수 및 생존력을 평가하였다. 48시간의 감염 기간 후(0.001-0.005 MOI의 SARS-CoV-2 바이러스 포함), 세포병원성 효과가 현미경 관찰로 확인되었다. 배양 상청액을 수확하고, 원심분리하고(5000g에서 5분), 분취하였다(1mL 분취).

[0574] 바이러스 스톡 TCID50 역가를 Vero E6/TMPRSS2 세포에서 결정하였다. 시험 약 2시간 전에, 세포를 200 μ L의 완전 성장 배지(DMEM 10% FCS)의 부피로 웰 당 2×10^4 개의 세포 밀도로 96-웰 플레이트에 도달하였다. 세포를 37°C에서 1시간 동안 바이러스 스톡의 연속 희석물(8-복제물; 1차 희석물 1:100; 5배 연속 희석물)로 감염시켰다. 신선한 배지를 72시간 동안 첨가한 다음 제공자 프로토콜(Promega, 기준 번호 G5430)에 따라 MTS/PMS 검정을 수행한다. ELISA 플레이트 판독기를 사용하여 플레이트를 판독하고 데이터를 기록하였다. 감염성은 Spearman-Kärber 공식에 기초하여 TCID50/mL/72시간으로 나타내었다.

[0575] **SARS-CoV-2 스파이크(S) mRNA 서열**

[0576] 본 연구는 햄스터 및/또는 마우스에서 SARS-CoV-2 항원과 같은 코로나바이러스 항원(예를 들어, 스파이크(S) 단백질)을 암호화하는 표 1의 mRNA를 포함하는 후보 코로나바이러스 백신의 면역원성을 시험하도록 설계되었다.

[표 1] SARS-CoV-2 스파이크(S) mRNA 서열(변형된 캡 포함)

요소	설명	위치
캡	변형된 5'-캡 1 구조 ($m^7G^+m^3$ -5'-ppp-5'-Am)	1~2
5'-UTR	최적화된 코작 서열을 갖는 인간 알파-글로빈 RNA로부터 유래된 5'-미번역 영역	3~54
sig	S 당단백질 신호 펩티드(확장된 리더 서열), 이는 초기 폴리펩티드 사슬을 소포체 내로 전위시키는 것을 안내한다.	55~102
S 단백질_돌연변이	S 당단백질이 항원적으로 최적의 융합 전 형태로 유지되는 것을 보장하기 위해 돌연변이 K986P 및 V987P 를 함유하는 전장 SARS-CoV-2 스파이크(S) 당단백질을 암호화하는 코돈 최적화된 서열; 정지 코돈: 3874-3879(밀줄)	103~3879
3'-UTR	3' 미번역 영역은 분할된(AES) mRNA 의 아미노-말단 인핸서 및 미토콘드리아 암호화된 12S 리보솜 RNA 로부터 유래된 2 개의 서열 요소를 포함하여 RNA 안정성 및 높은 총 단백질 발현을 부여한다.	3880~4174
폴리(A)	30 개의 아데노신 잔기의 신장에 이어서 10 개의 뉴클레오티드 링커 서열 및 또 다른 70 개의 아데노신 잔기로 이루어진 110 개의 뉴클레오티드 폴리(A)-꼬리.	4175~4284

[0577]

[0578]

SARS-CoV-2 S mRNA를 갖는 LPMP의 제형화

[0579]

일반 프로토콜 및 실험 설계

[0580]

식물 전령 팩(PMP)의 제조, 및 지질 재구성된 식물 전령 팩(LPMP)을 제조하기 위한 PMP의 변형, 및 mRNA를 갖는 PMP 및 LPMP의 제형의 프로토콜 및 상세한 실험 절차는 실시예 1에서 논의되었으며, 이는 국제 특허 출원 공개 WO 2021/041301의 실시예 1 내지 17에 개시된 모든 실험 프로토콜을 열거하며, 동 문헌 모두는 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다. 본 실시예에서 mRNA와 함께 제형화된 PMP, LPMP, 및 PMP, 또는 LPMP를 제조할 때 이들 프로토콜 및 상세한 실험 절차를 따랐다.

[0581]

간략하게, 레몬 및 조류로부터 미정제 식물 전령 팩(PMP)의 단리 및 정제, 및 이들 PMP의 특성화는 실시예 1에 기술된 식물 공급원에 대한 실험 설계 및 프로토콜을 따랐다. 식물로부터 식물 전령 팩의 단리; 실시예 2. 정제된 식물 전령 팩(PMP)의 생산; 실시예 3. 식물 전령 팩 특성화; 및 실시예 4. 식물 전령 팩 안정성의 특성화, 국제 특허 출원 공개 WO 2021/041301의 전부로서, 동 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

[0582]

콜레스테롤 및 PEG-지질을 갖는 천연 PMP 또는 재구성된 레몬 LPMP 또는 조류 LPMP의 변형은 실시예 6에 기술된 식물 공급원에 대한 실험 설계 및 프로토콜을 따랐다. 이온성 액체와 함께 PMP의 제형화에 의한 PMP 세포 흡수 증가; 실시예 7. 이온화 가능 지질을 사용한 PMP의 변형; 실시예 10. 이온화 가능 지질 변형을 동반하거나 동반하지 않은 자연 PMP 및 재구성된 PMP의 세포 흡수; 실시예 11. 양이온성 지질을 갖는 PMP의 제형화에 의한 PMP 세포 흡수 증가; 실시예 12. 양이온성 지질을 사용한 PMP의 변형; 및 실시예 14. 양이온성 지질 변형을 동반하거나 동반하지 않은 천연 PMP 및 재구성된 PMP의 세포 흡수, 국제 특허 출원 공개 WO 2021/041301호로서, 동 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

[0583]

mRNA를 갖는 PMP 및 레몬-지질-재구성된 LPMP 또는 조류-지질-재구성된 LPMP의 제형화는 실시예 5에 기술된 핵산 로딩에 대한 실험 설계 및 프로토콜을 따랐다. 카르고와 함께 PMP 로딩; 실시예 8. 미세유체가 포함된 LPMP의 제형화; 실시예 9. 이온화 가능 지질을 사용하여 지질-재구성된 PMP 내로 mRNA 로딩 및 전달; 실시예 13. 양이온성 지질을 사용하여 지질-재구성된 PMP 내로 mRNA 로딩 및 전달; 실시예 15. 양이온성 지질 GL67 및 에틸 PC를 사용한 로딩 개선; 실시예 16. mRNA 로딩을 위한 지질 비율의 최적화; 및 실시예 17. 플라즈미드 로딩을 위한 지질 비율의 최적화, 국제 특허 출원 공개 WO 2021/041301의 전부로서, 동 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

[0584]

LPMP/mRNA 백신의 제형

- [0585] 본 실시예에는 이온화 가능 지질, 스테롤, 및 PEG 지질로 제형화된 레몬 지질 재구성된 LPMP 및 조류 지질 재구성된 LPMP의 제형화하여 LPMP/mRNA 백신 제형에 대한 mRNA(예를 들어, SARS-CoV-2 스파이크(S) mRNA 서열)를 캡슐화를 하는 것을 기술한다. 예를 들어, 아래 표 2에 도시된 바와 같이, 레몬 지질 재구성된 LPMP를 갖는 LPMP/mRNA 백신은 통상적으로 A로 지칭되고, 조류 지질 재구성된 LPMP를 갖는 LPMP/mRNA 백신은 통상적으로 B로 지칭된다.
- [0586] 본 실시예에서, 레몬 PMP 지질 및 조류 PMP 지질을 PMP 천연 지질로서 사용하였고; C12-200 [1,1'-((2-(4-(2-((2-(비스(2-히드록시도데실)아미노)에틸)(2-히드록시도데실)아미노)에틸)피페라진-1-일)에틸)아자네디일)비스(도데칸-2-올))]을 이온화 가능 지질로서 사용하였고; 콜레스테롤(14:0)을 스테롤로서 사용하였고; DMPE-PEG2k를 폐길화된 지질 모델로서 사용하였고, SARS-CoV-2 스파이크(S) mRNA 서열(본원에 기술됨)을 로딩된 mRNA로서 사용하였다.
- [0587] **LNP 제형.** 대조군으로서 LNP(지질 나노입자) 제형을 제조하여 이온화 가능 지질:구조적 지질:스테롤:PEG-지질(C12-200:DOPE:콜레스테롤(14:0):DMPE-PEG2k)을 각각 35:16:46.5:2.5의 몰비로 생성하였다. 이러한 제형을 제조하기 위해, 상기 지질을 에탄올에 용해시키고, 상기 몰비로 혼합하고, 에탄올(유기상)에 희석하여 5.5mM의 총 지질 농도를 획득하였다. mRNA 용액(수성상)을 RNase-무함유 물 및 100mM 구연산염 완충액 pH 3으로 제조하여 50mM 구연산염 완충액의 최종 농도를 획득하였다. 제형을 15:1의 이온화 가능 지질 질소:mRNA 인산염(N:P) 비율로 이온화 가능 지질 대 mRNA로 유지시켰다.
- [0588] **LPMP 제형.** 재구성된 레몬(recLemon) LPMP 제형을 제조하여 이온화 가능 지질:천연 지질:스테롤:PEG-지질(C12-200:레몬 지질:콜레스테롤(14:0):DMPE-PEG2k)을 각각 35:50:12.5:2.5의 몰비로 생성하였다. 이러한 제형을 제조하기 위해, 상기 지질을 에탄올에 용해시켰고, 단 레몬 지질은 예외로서 4:1 DMF:메탄올에 용해시켰다. 그런 다음, 지질을 상기 몰비로 혼합하고, 희석하여 5.5mM의 총 지질 농도를 획득하였다. mRNA 용액(수성상)을 RNase-무함유 물 및 100mM 구연산염 완충액 pH 3으로 제조하여 50mM 구연산염 완충액의 최종 농도를 획득하였다.
- [0589] 재구성된 조류(recAlgae) LPMP 제형을 제조하여 이온화 가능 지질:천연 지질:스테롤:PEG-지질(C12-200:조류 지질:콜레스테롤(14:0):DMPE-PEG2k)을 각각 35:20:42.5:2.5의 몰비로 생성하였다. 이러한 제형을 제조하기 위해, 상기 지질을 에탄올에 용해시켰고, 단 조류 지질은 예외로서 4:1 DMF:메탄올에 용해시켰다. 그런 다음, 지질을 상기 몰비로 혼합하고, 희석하여 5.5mM의 총 지질 농도를 획득하였다. mRNA 용액(수성상)을 RNase-무함유 물 및 100mM 구연산염 완충액 pH 3으로 제조하여 50mM 구연산염 완충액의 최종 농도를 획득하였다.
- [0590] 지질 혼합물 및 mRNA 용액을 NanoAssemblr Ignite(Precision Nanosystems) 상에서 각각 1:3 부피비로 9mL/분의 총 유속으로 혼합하였다. 그런 다음, 생성된 제형을 Slide-A-Lyzer G2 투석 카세트(10k MWCO) 내로 로딩하고, 4 시간 동안 실온에서 부드럽게 교반하면서 1xPBS의 샘플 부피의 200배로 투석하였다. PBS 용액을 새로 갈고, 제형을 4°C에서 적어도 14시간 동안 부드럽게 교반하면서 추가로 투석하였다. 그런 다음, 투석된 제형을 수집하고 3000xg(Amicon Ultra 원심분리 필터, 100k MWCO)에서 원심분리하여 농축시켰다.
- [0591] 농축된 입자는 Zetasizer Ultra(Malvern Panalytical)를 사용하여 크기, 다분산성, 및 입자 농도에 대해 특성화하였다. 결과가 도 1a에 도시되어 있다. mRNA 캡슐화 효율은 Quant-iT RiboGreen RNA 검정 키트(ThermoFisher Scientific)로 특성화하였다. 결과가 도 1b에 도시되어 있다. 입자를 바람직한 mRNA 농도로 희석하여 PBS 중 최종 10% 수크로오스 용액을 획득하였다. 그런 다음, 제형을 액체 질소에서 급속 냉동시켰다.

[0592] mRNA를 갖는 생성된 제형은 표 2에 나타나 있다.

[표 2] mRNA를 갖는 제형

제형	이온화 가능: 구조적: PEG-지질 몰비	이온화 가능: 구조적: 스테롤: 가능	구조적	스테롤	PEG-지질	mRNA 카르고	N: P	크기 (nm)	PDI	캡슐화 백분율(%)	효율
LNP	35:16:46.5:2.5	C12-200	DOPE	콜레스테롤	DMPE-PEG2k	SARS-CoV-2 mRNA		78.47	0.126	94.4	
LPMP/SARS-CoV-2 A(recPMP1)	35:50:12.5:2.5	C12-200	천연 레몬 지질	유래 콜레스테롤	DMPE-PEG2k	SARS-CoV-2	15:1	96.49	0.300	94.8	
LPMP/SARS-CoV-2 B(recPMP2)	35:20:42.5:2.5	C12-200	천연 조류 지질	유래 콜레스테롤	DMPE-PEG2k	SARS-CoV-2		93.96	0.206	96.3	

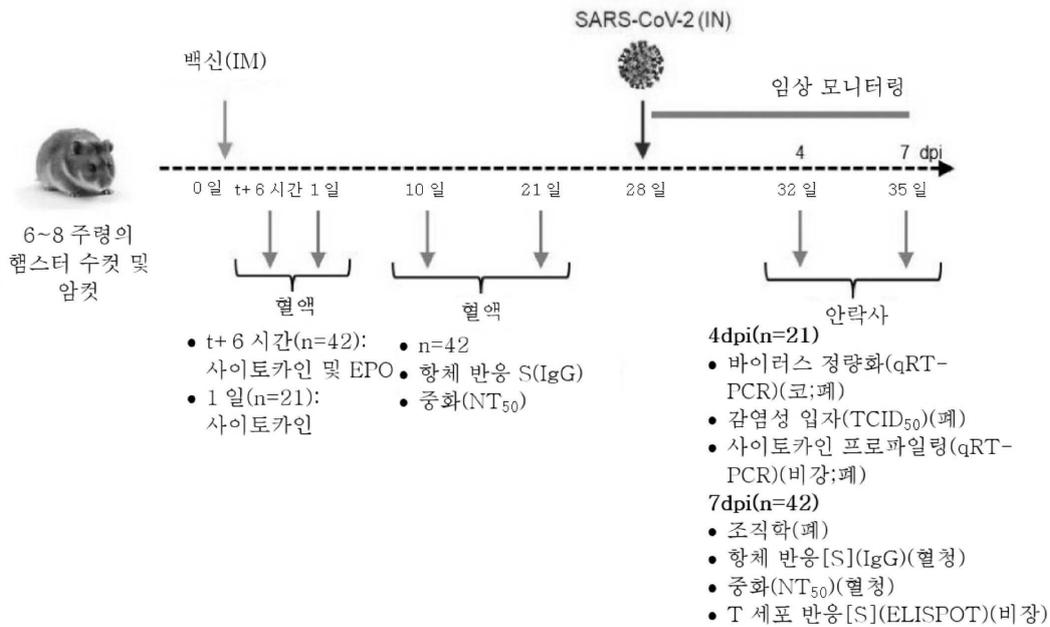
[0593]

[0594] 실시예 3: 백신접종 및 코로나바이러스 접종 설계

[0595] LPMP/SARS-CoV-2 백신 제형을 실시예 2에 따라 획득하였다.

[0596] 예시된 시험 샘플은 SARS-CoV-2(LPMP/SARS-CoV-2 A)을 갖는 재구성된 레몬(recLemon) LPMP 제형 및 SARS-CoV-2(LPMP/SARS-CoV-2 B)을 갖는 재구성된 조류(recAlgae) LPMP 제형이었다.

[0597] LPMP/SARS-CoV-2 백신의 단일 근육내 백신접종 및 LPMP/SARS-CoV-2 백신을 투여받은 햄스터의 SARS-CoV2 접종 의 설계가 반응식 1에 도시되어 있다.



반응식 1

[0598]

[0599] 치료 일정

[0600] 반응식 1에서 나타난 바와 같이, 수용 시 6 내지 8주령의 건강한 골든 시리아 햄스터(암컷)를 획득하였다. 동물을 청량한 다음, 아래 표 3에 나타난 바와 같이 균으로 균질하게 할당하였다.

[0601] 시험 샘플(대조군 벡터 및 백신 벡터)을 동결 용액으로서 제공하고 -20℃에서 보관하였다. 접종은 투여 전 -4℃에서 밤새 해동한 후 수행하였다. 시험 샘플(대조군 벡터 및 백신 벡터)을 표 3의 치료 일정에 따라 근육내(IM) 경로를 사용하여 한 마리의 상부 대퇴부에 주사하였다.

[표 3] 치료 일정

군	동물 번호	시험	투여(IM)	투여량/주사	총 수량****	바이러스 (IN,	종료시점
A (n=14)	7	recLemon LPMP + mRNA-EPO*	0 일 차에 1 회 투여	50µL	0.46mL	10 ⁵ pfu	32 일 (4dpi)
	7	recLemon LPMP + mRNA-EPO	0 일 차에 1 회 투여	50µL	0.46mL	10 ⁵ pfu	35 일 (7dpi)
B (n=14)	7	recLemon LPMP + mRNA-S** (1 회 투여량)	0 일 차에 1 회 투여	50µL	0.46mL	10 ⁵ pfu	32 일 (4dpi)
	7	recLemon LPMP + mRNA-S (1 회 투여량)	0 일 차에 1 회 투여	50µL	0.46mL	10 ⁵ pfu	35 일 (7dpi)
C (n=7)	7	recLemon LPMP + mRNA-S (2 회 투여량)	0 일 차에 1 회 투여	50µL	0.46mL	10 ⁵ pfu	35 일 (7dpi)
D (n=7)	7	recAlgae LPMP + mRNA-S*** (1 회 투여량)	0 일 차에 1 회 투여	50µL	0.46mL	10 ⁵ pfu	35 일 (7dpi)
E (n=7)	7	recAlgae LPMP + mRNA-S (2 회 투여량)	0 일 차에 1 회 투여	50µL	0.46mL	10 ⁵ pfu	35 일 (7dpi)

[0602]

[0603]

* recLemon LPMP + mRNA-EPO: 대조군 벡터 (백신 미접종)

[0604]

** recLemon LPMP + mRNA-S: 백신 벡터 (recLemon LPMP/SARS-CoV-2 백신)

[0605]

** recAlgae LPMP + mRNA-S: 백신 벡터 (recAlgae LPMP / SARS-CoV-2 백신)

[0606]

****는 30%의 시험 산물 과량(평균 햄스터 중량 120g)을 포함함.

[0607]

SARS-CoV-2 바이러스 접종 전 혈액 채취

[0608]

4개 시점(0일 t+6시간/1일/10일/21일)에, 이소플루란 마취된 동물의 경정맥에서 천공을 통해 혈액을 채취하였다. 약 300 µL의 혈액을 혈전 활성화제가 있는 수집 튜브로 옮기고 30분 동안 응고시켰다. 그런 다음, 튜브를 원심분리하여(2000g, 10분, 실온) 약 150 µL의 혈청을 수득하였다.

[0609]

0일(t+6시간), 10일, 및 21일 차: 소정의 동물 군에 대해 혈액 샘플링 절차를 수행하고 35일(7dpi; n=42) 차에 안락사시켰다. 표 3을 참조한다.

[0610]

1일 차: 소정의 동물 군에 대해 혈액 샘플링 절차를 수행하고 32일(4dpi; n=21) 차에 안락사시켰다. 표 3을 참조한다.

[0611]

혈청 샘플을 초기 사이토카인 및 EPO 발현(0일 t+6시간/1일) 또는 다중 ELISA 및 중화 검정에 의한 항체 반응을 평가하기 위해 추가로 사용할 때까지 -80°C에서 프로필렌 튜브에 보관하였다.

[0612]

SARS-CoV-2 접종(28일 차)

[0613]

모든 동물은 28일 차에 SARS-CoV-2를 투여받았으며, 이소플루란 마취된 동물에게 총 부피 70 µL(콧구멍 당 35 µL)로 비강내 경로(IN)로 투여되었다. 동물 당 10⁵ pfu TCID₅₀의 비강내 투여량을 투여하였다.

[0614]

동물의 32일 차 종결(4dpi)

[0615]

표 3에 나타낸 바와 같이, 동물의 소정의 군(n=21)은 32일 차(즉, 감염 후 4일차, dpi)에 최종 안락사되었다.

[0616]

밤새 4°C에서 RNA에 조직을 배치하여 비강 및 폐(우측 폐 상부 엽) 조직을 수집한 다음, qRT-PCR에 의한 바이러스 부하 및 사이토카인 반응 프로파일링의 정량화를 위해 RNA 추출할 때까지 -80°C에서 보관하였다. 중간, 대동맥 후, 및 하부 우측 폐 엽을 액체 질소(튜브 당 하나의 엽)에서 급속 냉동시킨 다음, 바이러스 감염성 입자(TCID₅₀)의 정량화 때까지 -80°C에서 보관하였다.

[0617]

동물의 35일 차 종결(7dpi)

[0618]

나머지 동물(n=42)이 35일 차에 최종 안락사되었다(즉, 7dpi). 폐 및 비강 채취 전에 (혈청 샘플 제조를 위해) 최대 말단 혈액 샘플링을 수행하였다.

[0619]

조직학을 위해 좌측 폐를 적어도 24시간 동안 포르말린에 넣어 두었다.

- [0620] 비장을 ELISPOT IFN γ 검정에 추가로 사용하였다.
- [0621] 혈청 샘플을 다중 ELISA 및 중화 검정에 의한 항체 반응을 평가하기 위해 추가로 사용할 때까지 -80°C 에서 프로 필렌 튜브에 보관하였다.
- [0622] **혈청 사이토카인 및 EPO 정량화를 위한 ELISA**
- [0623] 혈청 중 사이토카인 및 EPO 수준(ELISA)을 정량화하고 2개의 시점(0일 t+6시간 및 1일)에 모니터링하였다.
- [0624] EPO를 U-PLEX 인간 EPO 검정 키트(MSD, 참조 K151VXK)를 사용하여 시점(0일 t+6시간)에 평가하였다.
- [0625] IL-6을 햄스터 인터류킨 6, IL-6 IL-6 ELISA 키트(Cusabio, 참조 CSB-E14304Ha)를 사용하여 2개의 시점(0일 t+6시간 및 1일)에 평가하였다.
- [0626] 다른 사이토카인(예를 들어, CXCL-12, SCF, IFN γ , TNF α , IL2, IL4, MCP1, 및 IL18)을 2개의 시점(0일 t+6시간 및 1일)에 평가하였다. 상응하는 ELISA 키트를 이들 사이토카인 수준을 모니터링하는 데 사용하였다.
- [0627] **다중 ELISA에 의한 항체 반응 평가(10/21/35일 차)**
- [0628] SARS-CoV-2에 대한 항체 반응(IgG)의 분석을 Meso Scale Discovery(키트 K15383U)의 V-PLEX SARS-CoV-2 패널 2 플레이트를 사용하여 수행하였다. 다중 접근법을 사용하여 SARS-CoV-2의 S, RBD, 및 N 항원을 표적화하는 햄스터 항체에 대한 반응을 정량화하였다.
- [0629] 플레이트를 96-웰 플레이트의 웰 내의 스폿 상의 항원과 제공하였다. 샘플 내의 항체는 스폿 상의 항원에 결합하고, MSD SULFO-TAG와 접합된 항-햄스터 IgG 항체를 검출에 사용하였다. MSD SULFO-TAG로부터 방출된 광을 측정하는 MESO Quickplex SQ120 이미지 상에서 플레이트를 판독하였다.
- [0630] 스폿 1: SARS-CoV-2 스파이크 = T4 삼량체화 도메인을 갖는 가용성 엑토도메인; C-말단 Strep-Tag 및 His-Tag.
- [0631] 스폿 3: SARS-CoV-2 뉴클레오캡시드 = 전장 뉴클레오캡시드; C-말단 His-Tag.
- [0632] 스폿 10: 스파이크 서열의 SARS-CoV-2 S1 RBD = R319-F541; C-말단 His-Tag.
- [0633] **중화 항체 반응 평가(10/21/35일 차)**
- [0634] 혈청 샘플을 Vero E6/TMPRSS2 세포를 사용한 생 SARS-CoV-2 세포병원성 기반 검정을 사용하여 다음과 같이 분석하였다:
- [0635] Vero E6/TMPRSS2 세포를 계수하고, ViCell 장치에 의한 0.25% 트리판 블루 배제 검정에 의해 이들의 생존력을 평가하였다. 시험 약 16시간 전에, 세포를 $200\ \mu\text{L}$ 의 완전 성장 배지의 부피로 웰 당 2×10^4 개의 세포 밀도로 96-웰 플레이트에 도말하였다.
- [0636] 중화 항체를 함유하는 열 불활성화(56°C 에서 30분) 혈청을 먼저 연속 희석한 다음(3배 단계), SARS-CoV-2 바이러스의 웰 당 0.01 MOI와 실온에서 30분 동안 혼합하여(1:1 v:v) 혈청 내 항체가 바이러스에 결합할 수 있도록 하였다. 바이러스와의 혼합물 후의 제1 최종 혈청 희석물은 1:5였다.
- [0637] 바이러스-항체 혼합물($50\ \mu\text{L}$)을 Vero E6/TMPRSS2 세포에 첨가하고(세포 성장 배지를 제거한 후), 바이러스가 표적 세포를 감염시킬 수 있도록 37°C , 5% CO_2 에서 2시간 동안 인큐베이션하였다.
- [0638] 그 후, $150\ \mu\text{L}$ 의 완전 세포 성장 배지(2% FBS 함유)를 각각의 웰에 첨가하였다. 그런 다음, 플레이트를 37°C , 5% CO_2 에서 48시간 동안 인큐베이션하였다.
- [0639] 프로토콜(Promega, 참조번호 G5430)에 따라 수행된 CellTiter 96® Aqueous 비방사성 세포 증식 검정을 사용하여 플레이트의 재현을 수행하여 증식 검정에서 생존 세포의 수를 결정하였다.
- [0640] $100\ \mu\text{L}$ 의 상청액을 제거한 후, $100\ \mu\text{L}$ 의 신선한 배지 및 $20\ \mu\text{L}$ 의 MTS/PMS 시약을 첨가하였다. ELISA 플레이트 판독기를 사용하여 플레이트를 판독하였다.
- [0641] 중화 항체 역가(NT50)는 바이러스 감염성의 50% 이하 억제력을 제공하는 최고 혈청 희석의 역수로서 정의된다.
- [0642] **항-SARS-CoV-2/S T 세포 반응의 ELISPOT IFN γ 평가(35일 차)**
- [0643] SARS-CoV-2 항원에 대한 T 세포 반응을 햄스터 ELISPOT IFN γ 검정(Mabtech, 참조 번호 3102-2A)에서 평가하였

다.

[0644] 11개의 아미노산이 중첩되는 특정 15mer 펩티드 스캔 풀(JPT; PepMix SARS-COV2 스파이크, 참조 PM-WCPV-S-2)을 사용하여 SARS-CoV-2 스파이크 단백질에 대한 T-세포 반응을 평가하였다.

[0645] 비장세포를 세포 여과기 상에서 단리하고, 적혈구 용해 전후에 70 μm 필터 상에서 여과하였다. 살아있는 비장세포를 계수하고, ViCell 장치에 의한 0.25% 트리판 블루 배제 검정에 의해 이들의 생존력을 평가하였다.

[0646] ELISPOT 검정은 2개의 세포 밀도(웰 당 200x103개 및 60x103개의 세포)로 3회 수행하여, 상이한 조건을 비교하였다: 배지 단독; PMA(20ng/mL) 및 양성 대조군으로서 이오노마이신(1 μM) 혼합물; 펩티드 풀(2 μg/mL). PMA/이오노마이신 양성 대조군의 경우, 더 낮은 세포 밀도가 사용되었다(웰 당 60x103개 및 20x103개의 세포).

[0647] ELISPOT 발생 후 24시간 차에, IFN γ 생성 세포를 밝혀냈다. AID(#ELR08) ELISPOT 플레이트 판독기를 사용하여 플레이트를 분석하였다.

[0648] **임상 모니터링-동물 체중**

[0649] 동물 체중을 백신접종 후 주 1회, 그 다음 SARS-CoV-2 감염 후 매일 모니터링하였다.

[0650] **계능 qRT-PCR(32일 차)(4dpi)에 의한 폐 및 비장 조직에서의 바이러스 부하 결정**

[0651] RT-qPCR에 의한 바이러스 부하의 정량화는 바이러스 ORF1ab 유전자를 사용하여 폐 및 비장 조직에서 수행하였다.

[0652] 바이러스 RNA의 추출은 Macherey Nagel NucleoSpin 96 RNA, RNA 정제용 96-웰 키트를 사용하여 수행하였다(참조 740709.4). RNA를 qRT-PCR까지 -80°C에서 냉동시켰다.

[0653] Applied Biosystem의 고품량 cDNA 역전사 키트(참조 번호 4368813)로 RT를 수행하였다.

[0654] 정량적 PCR에 의한 cDNA 정량화는 ORF1ab 유전자를 표적화하는 프라이머 조건으로 수행하였다. Applied Biosystem의 QuantStudio 7 Flex 및 인접한 소프트웨어를 사용하여 증폭을 수행하였다.

프라이머 및 프로브	
명칭	서열 (5'-3')
ORF1ab 유전자/nCoV	
ORF1ab_Fw	CCGCAAGGTTCTTCTTCGTAAG
ORF1ab_Rv	TGCTATGTTTAGTGTTCCAGTTTTC

[0655]

[0656] **폐에서의 바이러스 TCID₅₀ 결정 (32일 차)(4dpi)**

[0657] 50% 세포독성(TCID₅₀) 검정을 유발하는 조직 배양 감염성 투여량은 바이러스 스톱의 감염성을 평가하기 위한 정량적 방법이다. 하나의 TCID₅₀은 세포의 50%의 사멸을 유발하는 병원균의 양으로 정의되므로(Reed 및 Muench, 1938), TCID₅₀은 배양물에서 세포를 사멸시키는 바이러스의 능력에 의존한다. 감염성을 Spearman-Kärber 공식에 기초하여 TCID₅₀/mL/48시간으로 나타내었다.

[0658] Vero E6/TMPRSS2 세포를 계수하고, ViCell 장치에 의한 0.25% 트리판 블루 배제 검정에 의해 이들의 생존력을 평가하였다.

[0659] 시험 1일 전에, 세포를 200 μL의 완전 성장 배지(DMEM 10% FCS)의 부피로 웰 당 2x10⁴개의 세포 밀도로 96-웰 플레이트에 도말하였다.

[0660] 세포를 37°C에서 1시간 동안 폐 균질물의 연속 희석물(3회)로 감염시켰다. 신선한 배지를 48시간 동안 첨가하였다.

[0661] 세포 감염 후 48시간 차에, 프로토콜(Promega 참조 번호 G5430)에 따라 MTS/PMS 분석을 수행하였다. 모든 상층액을 폐기한 후, 100 μL의 신선한 배지 및 20 μL의 MTS/PMS 시약을 배양 웰에 첨가하였다. 최대 4시간 후, Elisa 플레이트 판독기를 사용하여 플레이트를 판독하고 데이터를 기록하였다(음성 세포 대조군에서의 OD 값 >

1.500).

[0662] **실시예 4: 햄스터의 백신접종 및 코로나바이러스 접종**

[0663] 2개의 백신 제형을 실시예 2에 따라 제조하였다: LPMP/SARS-CoV-2 A(SARS-CoV-2가 포함된 재구성된 레몬(recLemon) LPMP 제형) 및 LPMP/SARS-CoV-2 B(SARS-CoV-2가 포함된 재구성된 조류(recAlgae) LPMP 제형).

[0664] 백신접종 및 코로나바이러스 접종 프로토콜은 실시예 3에 기술된 것들이었다. 이들 LPMP/SARS-CoV-2 제형의 투여는 표 3에 도시된 치료 일정에 기초하였고, 이들 햄스터의 백신접종 및 SARS-CoV-2 접종의 결과를 도 2 내지 도 10에 도시하였다.

[0665] **혈청 사이토카인**

[0666] 햄스터에서 LPMP/SARS-CoV-2 백신의 단일 투여량의 근육내 백신접종 후, 6시간 및 24시간 차에 햄스터의 혈청에서 사이토카인 IL6(도 2a), 케모카인 CXCL12(도 2b), 및 사이토카인 SCF(줄기 세포 인자)(도 2c)의 수준을 평가하고 모니터링하였다. 결과는 도 2에 도시되어 있으며, 이는 LPMP/SARS-CoV-2 백신의 단일 투여량의 근육내 백신접종이 햄스터에서 백신접종 후 6시간 및 24시간 차에 전염증성 사이토카인 및 케모카인을 유도하였음을 나타낸다. 투여 후 6시간 및 24시간 차에 햄스터 혈장에서 IFN γ , IL2, IL4, MCP1, TNF α , 및 IL18의 검출 가능한 수준은 발견되지 않았다. 그러나, LPMP/SARS-CoV-2 A(10 μ g) 및 LPMP/SARS-CoV-2 B(10 μ g) 둘 다는 투여 후 6시간 및 24시간 차에 일정 수준의 전염증성 사이토카인 IL6(도 2a) 및 케모카인 CXCL12(도 2b)를 유도하였다. 또한 LPMP/SARS-CoV-2 A(10 μ g) 및 LPMP/SARS-CoV-2 B(10 μ g) 둘 다는 투여 후 6시간 및 24시간 차에 일정 수준의 사이토카인 SCF(줄기 세포 인자)(도 2c)를 유도하였다.

[0667] **항체 및 중화 항체 반응**

[0668] 햄스터에서 LPMP/SARS-CoV-2 백신의 근육내 백신접종 후, 10일, 21일, 및 35일 차에 햄스터의 혈청에서 SARS-CoV-2의 S 및 S1 RBD 항원을 표적화하는 항체 반응(IgG)을 평가하였다.

[0669] 도 3a 및 도 3b는 햄스터에서 백신접종 후 10일차에 LPMP/SARS-CoV-2 백신의 단일 투여량의 근육내 백신접종이 높은 수준의 S 특이적 IgG 및 S1 RBD 특이적 IgG를 유도하였음을 보여준다. LPMP/SARS-CoV-2 백신에 의해 유도된 SARS-CoV-2 특이적 항체의 검출된 높은 수준이 SARS-CoV-2 감염된 햄스터에서 관찰된 수준에 매우 근접했다. 2개의 백신 제형 중에서, LPMP/SARS-CoV-2 A(레몬-유래 LPMP) 백신은 햄스터에서 백신접종 후 10일 차에 더 높은 수준의 SARS-CoV-2 특이적 항체를 유도하였다.

[0670] 도 4는 LPMP/SARS-CoV-2 백신의 근육내 백신접종이 햄스터에서 백신접종 후 21일 차에 매우 높은 수준의 S1 RBD 특이적 IgG를 유도하였음을 보여준다. LPMP/SARS-CoV-2 백신에 의해 유도된, 검출된 SARS-CoV-2 특이적 항체의 높은 수준은 SARS-CoV-2 감염된 햄스터에서 관찰된 수준에 매우 근접했다. 또한, LPMP/SARS-CoV-2 백신은 비교적 낮은 LPMP/SARS-CoV-2 백신 투여량(LPMP/SARS-CoV-2 B, 20 μ g)에서도 매우 높은 역가의 RBD 특이적 항체(21일 차 역가: 10^7)를 유도하였다.

[0671] 도 5 및 도 17은 LPMP/SARS-CoV-2 백신의 근육내 백신접종이 햄스터에서 다수의 바이러스 변이체에 효과적인 LPMP/SARS-CoV-2 백신의 근육내 백신접종 후 35일 차에 햄스터의 혈청에서 강력한 중화 항체 역가를 유도하였음을 보여준다.

[0672] **항-SARS-CoV-2/S T 세포 반응**

[0673] 도 6은 LPMP/SARS-CoV-2 백신의 근육내 백신접종이 SARS-CoV2 스파이크 단백질 특이적 T 세포를 유도하였음을 보여준다.

[0674] **LPMP/SARS-CoV-2 백신으로 햄스터를 백신접종하여 SARS-CoV-2 접종으로부터 햄스터를 보호**

[0675] SARS-CoV-2 접종으로부터 햄스터를 보호하는 LPMP/SARS-CoV-2 백신의 능력이 도 7 내지 도 10에 도시되어 있다.

[0676] 도 7a 내지 도 7d는 LPMP/SARS-CoV-2 백신접종된 햄스터가 강력한 백신-유도 면역 반응을 나타냈고, 체중 감소로 측정했을 때 SARS-CoV2 접종으로부터 보호되었음을 보여준다. LPMP/SARS-CoV-2 A 및 LPMP/SARS-CoV-2 B 제형 모두의 경우, 단일 투여량(10 μ g)의 근육내 백신접종이 SARS-CoV-2 접종으로부터 햄스터를 보호하였다.

[0677] 도 8에 도시된 바와 같이, LPMP/SARS-CoV-2 A 백신 제형의 단일 투여량(10 μ g)의 근육내 백신접종은 햄스터에서 강력한 백신-유도 면역 반응을 나타냈고, 최상의 벤치마크(11% 체중 감소)와 유사한, SARS-CoV-2 접종으로부터

햄스터에서 보호를 달성하였다.

[0678] 도 9에 도시된 바와 같이, LPMP/SARS-CoV-2 A 백신 제형의 단일 투여량(10 µg)의 근육내 백신접종은 감염 후 4일 차에 햄스터에서 강력한 백신-유도 면역 반응을 나타냈고, 폐에서 감염성 바이러스 입자(바이러스 TCID₅₀에 의해 결정됨)를 상당히 감소시킴으로써 SARS-CoV-2 접종으로부터 햄스터를 보호하였다.

[0679] 도 10a 및 도 10b,에 도시된 바와 같이, LPMP/SARS-CoV-2 A 백신 제형의 단일 투여량(10 µg)의 근육내 백신접종은 감염 후 4일 차에 햄스터에서 강력한 백신-유도 면역 반응을 나타냈고, 폐(도 10a) 및 비강 점막(도 10b)에서 바이러스 부하를 상당히 감소시킴으로써 SARS-CoV-2 접종으로부터 햄스터를 보호하였다.

[0680] 종합적으로, 도 8 내지 도 10은 LPMP/SARS-CoV-2 A 백신 제형의 단일 투여량(10 µg)의 근육내 백신접종이 체중 감소, 폐 내의 감염성 바이러스 입자, 및 폐 및 비강 점막 모두의 바이러스 부하에 의해 측정했을 때, SARS-CoV2 접종으로부터 햄스터를 효과적으로 보호하였음을 나타낸다.

[0681] **실시예 5: 마우스의 백신접종 및 코로나바이러스 접종**

[0682] 특정되지 않은 경우, 백신접종 및 코로나바이러스 접종 프로토콜 및 면역 반응의 특성화는 사용된 동물이 본 실시예에서는 마우스였다는 점을 제외하고는 실시예 3에 기술된 것과 유사하였다.

[0683] 2개의 백신 제형을 실시예 2에 따라 제조하였다: LPMP/SARS-CoV-2 A 및 LPMP/SARS-CoV-2 B. 대조군은 PBS였다.

[0684] **경구 투여량**

[0685] 3마리의 마우스에게 LPMP/SARS-CoV-2 A(S mRNA 200 µg 함유함)를 단일 투여량으로 경구 투여하였다. 항-SARS-CoV-2/S T 세포 반응을 12일 차에 ELISPOT IFN γ 검정에서 평가하였다. 항체 반응(IgM, IgG, IgA)을 각각 12일 및 21일 차에 다중 ELISA에 의해 평가하였다.

[0686] 도 11a 및 도 11b는 마우스에서 LPMP/SARS-CoV-2(S mRNA 200 µg 함유함)의 경구 백신접종 후 12일 차에, 마우스의 비강(도 11a) 및 마우스의 파이어르판(도 11b)에서 SARS-CoV-2의 S 항원에 대한 T 세포 반응의 결과를 도시한다. 결과는 LPMP/SARS-CoV-2 A 백신 제형의 단일 투여량의 경구 백신접종이 마우스에서 전신 및 점막 SARS-CoV-2 면역 반응을 유도하였음을 나타낸다. 또한 LPMP/SARS-CoV-2 A 백신 제형의 단일 투여량의 경구 백신접종이 파이어르판에서 점막 및 세포독성 CD4 및 CD8 T 세포를 유도하였다.

[0687] 또한, LPMP/SARS-CoV-2 백신의 경구 백신접종은 또한 마우스에서 백신접종 후 12일 차에 높은 수준의 S 특이적 IgM을 유도하였고, 마우스에서 백신접종 후 21일 차에 낮은 수준의 항원 특이적 IgG를 유도하였다. 또한 유사한 경구 백신접종 연구는 마우스의 장 및 폐에서 낮은 수준의 IgA를 나타냈다.

[0688] **비강내 투여량**

[0689] 3마리의 마우스에게 LPMP/SARS-CoV-2 A 백신접종(S mRNA 0.1 µg, 10 µg 함유함)의 단일 투여량을 비강내 투여하였다. 항-SARS-CoV-2/S T 세포 반응을 12일 차에 ELISPOT IFN γ 검정에서 평가하였다. 혈중(ELISA) 사이토카인 수준(예를 들어, TNF α)을 12일 차에 정량화하였다.

[0690] 도 12a는 마우스에서 LPMP/SARS-CoV-2 A(S mRNA 0.1 µg, 10 µg 함유함)의 비강내 백신접종 후 12일 차에, 마우스에서 SARS-CoV-2의 S 항원에 대한 T 세포 반응의 결과를 도시한다. 도 12b는 마우스에서 LPMP/SARS-CoV-2 A(S mRNA 0.1 µg, 10 µg 함유함)의 비강내 백신접종 후 12일 차에, 마우스의 혈액 내 사이토카인 TNF α의 수준을 도시한다.

[0691] 결과는 LPMP/SARS-CoV-2 A 백신 제형의 단일 투여량의 비강내 백신접종이 면역화 후 12일 차에 전신 SARS-CoV2 스파이크 특이적 T 세포를 유도하였음을 나타낸다.

[0692] **근육내 투여량**

[0693] 마우스에게 LPMP/SARS-CoV-2 A 백신접종(S mRNA 10 µg 함유함)의 단일 투여량 또는 2회 투여량을 근육내 투여하였다. SARS-CoV-2의 원 변이체(위싱턴), 델타 변이체, 및 오크론 변이체에 대한 중화 항체 역가를 측정하였다. 0일 차에 마우스에게 10 µg의 투여량을 투여하고, 21일 차에 동일한 2차 투여량을 투여한 다음, 2차 투여 후 4주 차인 49일 차에 항체 역가를 측정하였다. (MSD를 통해 측정된) 혈중 사이토카인 수준을 LPMP/SARS-CoV-2 A 백신접종(S mRNA 10 µg 함유함)의 단일 근육내 투여량의 투여 후 2시간, 6시간, 24시간, 및 48시간 차에 정량화하였다.

[0694] 도 18은 LPMP/SARS-CoV-2 백신의 근육내 백신접종이 마우스의 혈액에서 강력한 중화 항체 역가를 유도하였고, SARS-CoV2의 다수의 변이체에 대해 광범위하게 중화할 수 있음을 보여준다.

[0695] 도 19는 마우스에서 LPMP/SARS-CoV-2 A(S mRNA 10 µg 함유)의 근육내 백신접종 후 2시간, 6시간, 24시간, 및 48시간 차에, 마우스의 혈액 내 다수의 순환 사이토카인 및 케모카인의 증가된 수준을 통해 강력한 면역 반응을 보여준다. 증가된 사이토카인 중 다수는 T 세포 반응 및 항체 클래스 전환에 중요하며, 둘 다 감염원에 대한 면역을 얻는 데 필요한 중요한 양태이다.

[0696] **실시예 6. LPMP/mRNA 제형의 안정성**

[0697] 마우스에게 LPMP/mRNA 루시페라아제(mRNA 5 µg 함유)의 투여량을 정맥내 투여한 후 4시간 차에, 마우스(n=2)의 방사휘도를 측정함으로써 LPMP/mRNA 제형의 안정성을 평가하였다. 투여 및 측정이 LPMP/mRNA 제형(액체 형태)을 일정 기간(1일, 30일, 60일)에 걸쳐 4°C에서 보관한 후 수행되었다.

[0698] 도 13에 나타낸 바와 같이, LPMP/mRNA 제형은 액체 형태로 4°C에서 안정적이었다.

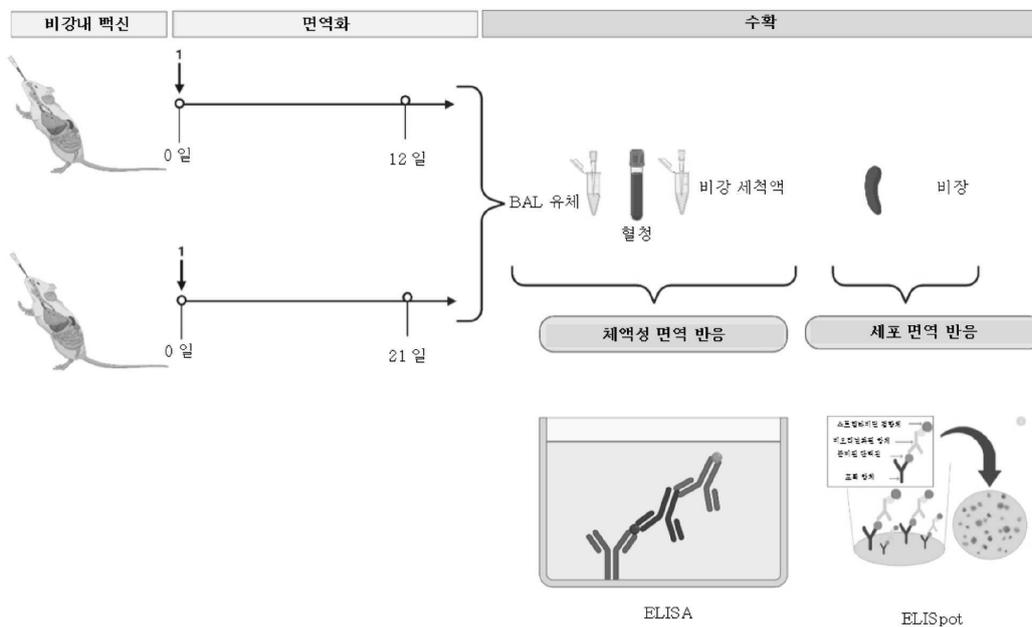
[0699] 또한, 도 14a 및 도 14b는 동결건조의 유무와 관계없이, 일정 기간(1일, 7일)에 걸쳐 4°C에서의 LPMP/mRNA 제형의 안정성을 도시하며, 마우스의 이미지는 마우스에게 LPMP/mRNA 루시페라아제(mRNA 0.2mg/kg 함유)의 투여량을 정맥내 투여한 후 6시간 차에 촬영되었다. 도 14a 및 도 14b에 도시된 바와 같이, LPMP/mRNA 제형은 4°C 안정성을 달성하는 데 필요한 경우 동결건조될 수 있다.

[0700] **실시예 7. 마우스의 LPMP/mRNA 제을 사용한 비강내 백신접종**

[0701] LPMP/SARS-CoV-2 백신 제형을 실시예 2에 따라 수득하였다.

[0702] 예시된 시험 샘플은 SARS-CoV-2를 갖는 재구성된 레몬(recLemon) LPMP 제형(recLecom LPMP/SARS-CoV-2)이었다.

[0703] LPMP/SARS-CoV-2 백신이 투여된 마우스의 LPMP/SARS-CoV-2 백신의 단일 비강내 백신접종의 설계가 반응식 2에 도시되어 있다.



반응식 2

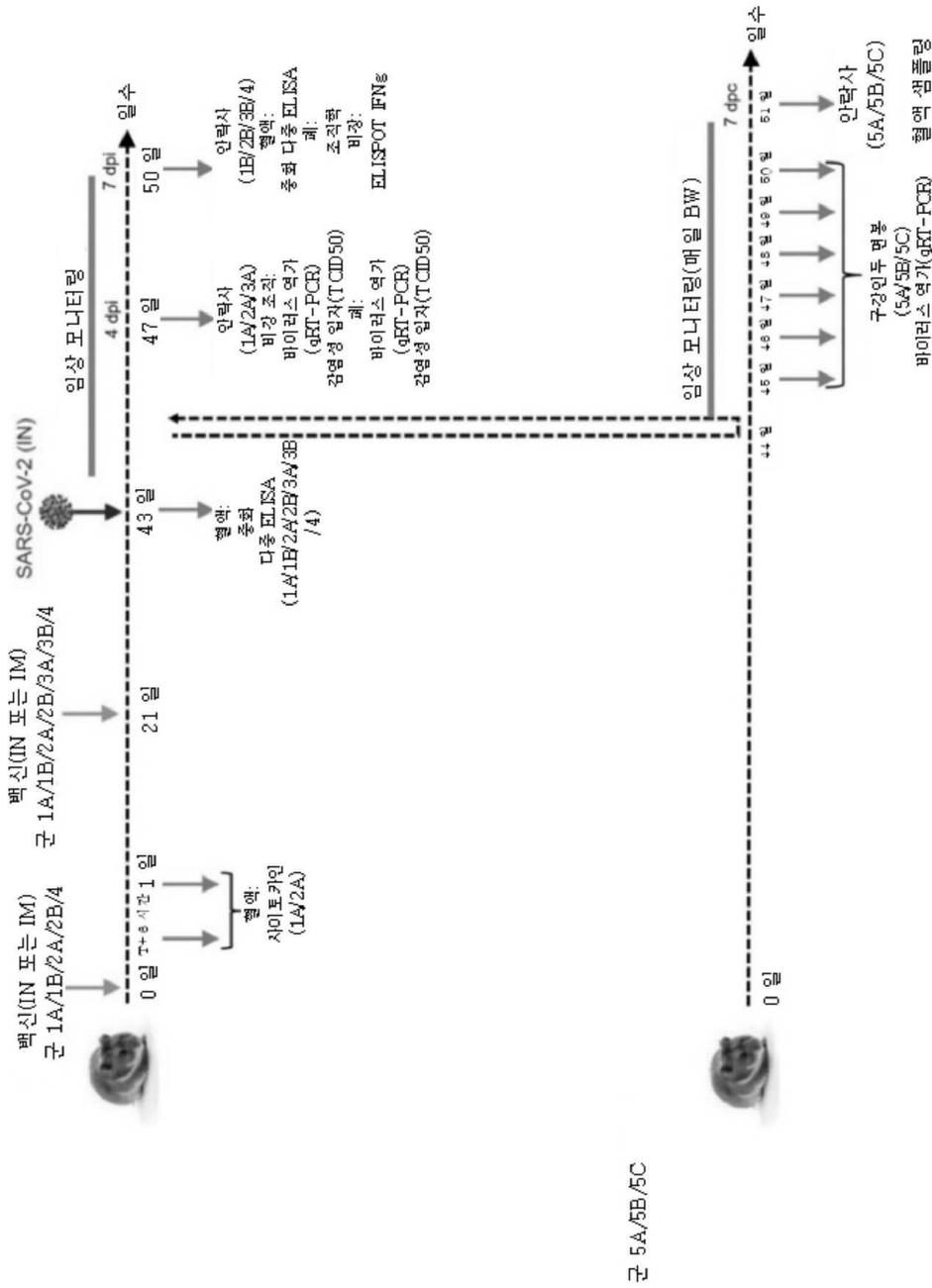
[0704]

[0705] 점막 경로를 통해 지질 재구성 LPMP 백신 제형의 효율을 조사하기 위해, 마우스에게 LPMP/SARS-CoV-2(전장 S1 당단백질을 암호화하는 mRNA)를 비강내 투여하였다. 효과기 및 기억 단계에서 S-단백질 mRNA를 암호화하는 LPMP/SARS-CoV-2 백신의 면역원성을 조사하기 위해, 마우스에게 0일 차에 투여하고, 마우스를 각각 12일 차 또는 21일 차에 안락사시켰다. 혈액, 비강 세척액, 기관지 폐포 세척액(BAL) 유체 및 비장을 수집하고 수확하여 항원 특이적 T 세포 및 B 세포 반응에 대해 조사하였다.

[0706] 항원-특이적 T 세포에 대한 조직을 조사하기 위해, ELISpot을 사용하였다. 간략하게, 비장으로부터의 단일 세포 현탁액을 S-단백질 펩티드로 펄스화된 비장세포 또는 펄스화되지 않은 비장세포와 함께 밤새 공동 배양하였다.

ELISpot을 사용하여 공동 배양된 단일 세포 현탁액 비장을 단일 세포에 대해 분비된 효과기 사이토카인(IFN γ , TNF α)의 빈도에 대해 정량적으로 측정하였다.

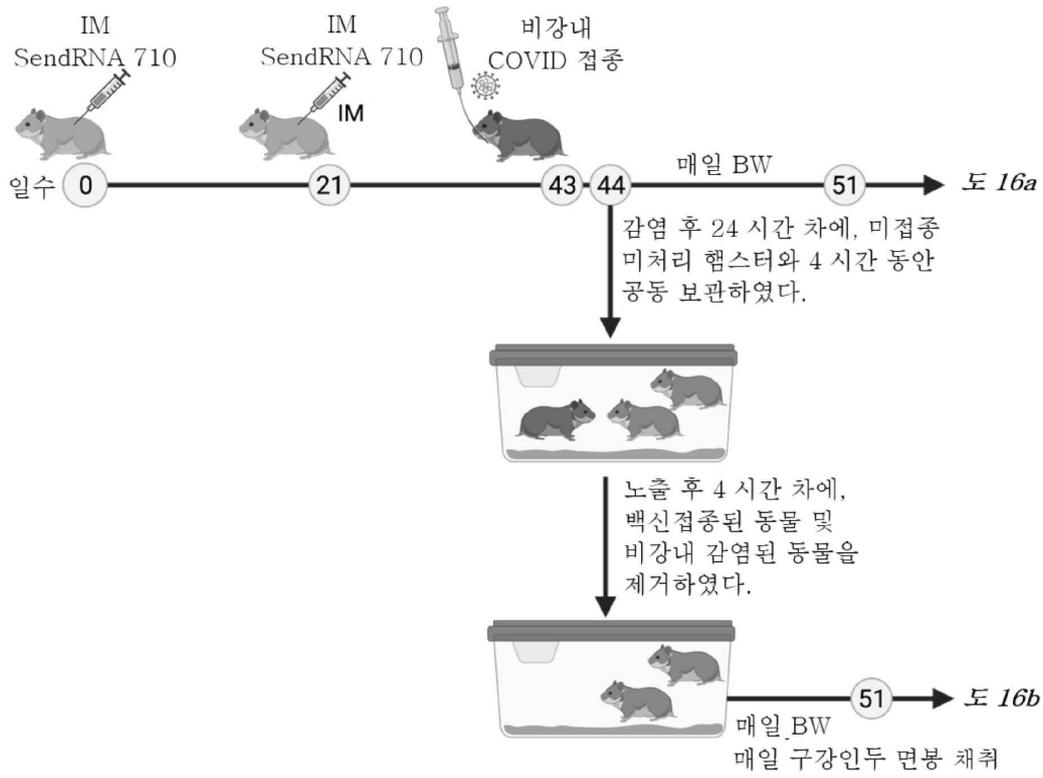
- [0707] 혈청, 비강 세척액, 및 BAL 유체에서 항원 특이적 면역글로불린을 조사하기 위해, S1 단백질 및 수용체 결합 도메인(RBD) 펩티드 코팅된 Maxisorp 플레이트를 사용하였다. 간략하게, Maxisorp 플레이트를 S1 단백질 펩티드 또는 RBD 펩티드로 밤새 코팅하고, 상응하는 HRP-접합된 이차 항체 및 테트라메틸벤지딘 기질을 사용하여 혈청, 비강 세척액, 및 BAL 유체에서 IgA 및 총 IgG를 측정하였다.
- [0708] 결과가 도 15에 도시되어 있다. 도 15에 도시된 바와 같이, 마우스에게 LPMP/SARS-CoV-2 제형을 근육내 경로(0.4mg/kg), 비강내 경로(0.4mg/kg), 및 경구 경로(8mg/kg)를 통해 투여한 후, 마우스에서 SARS-CoV-2의 S 항원에 대한 면역 반응이 있었다.
- [0709] 이들 실시예의 데이터는 림프절에 대한 정확한 생체분포로 프로그래밍되고, 간을 표적화하고, 전신 노출을 최소화하는 백신 제형의 능력을 입증하였다(간을 표적화하는 것으로 알려진 표준 LNP/mRNA 제형 대비).
- [0710] 또한 이들 실시예의 데이터는 LPMP/mRNA 제형 백신의 단일 근육내 투여량이 양호한 벤치마크 수준에서 단일 투여량(2회 투여량 요법을 사용하는 벤치마크 대비)으로 SARS-CoV-2 코로나바이러스(COVID-19)로부터 보호할 수 있고; 약 60% 더 낮은 mRNA 투여량으로 벤치마크보다 약 1,000배 더 높은 항체 역가를 생성할 수 있고; SARS-CoV2(델타 및 오미크론 포함)의 변이체에 대해 광범위하게 중화할 수 있고; SARS-CoV-2 코로나바이러스(COVID-19) 전염의 예방을 위한 전신 면역 및 점막 면역을 생성할 수 있음을 입증하였다. 또한, 실시예는 설계에 의해 개선된 안전성 프로파일(예를 들어, 낮은 반응원성, 낮은 수준의 염증 또는 독성 마커)을 입증하였다.
- [0711] **실시예 8. LPMP/mRNA 제형의 근육내 백신접종을 이용한 햄스터 접종 모델에서 바이러스 전염의 예방**
- [0712] LPMP/SARS-CoV-2 백신 제형을 실시예 2에 따라 제조하였다. 예시된 시험 샘플은 SARS-CoV-2를 갖는 재구성된 레몬(recLemon) LPMP 제형(recLecom LPMP/SARS-CoV-2)이었다.
- [0713] LPMP/mRNA 제형의 햄스터 접종 모델에서 바이러스 전염의 예방에 대한 연구 설계가 반응식 3에 도시되어 있다.
- [0714] LPMP/mRNA 제형의 2회 투여량의 근육내 백신접종을 사용한 햄스터 접종 모델에서 바이러스 전염의 예방에 대한 연구 설계가 반응식 4에 도시되어 있다.
- [0715] 결과가 도 16a 및 도 16b에 도시되어 있다. 체중은 SARS-CoV-2 코로나바이러스(COVID-19) 전염 연구를 위한 햄스터 모델의 특징적인 판독치 중 하나이다. 도 16a에 도시된 바와 같이, 햄스터에서 LPMP/SARS-CoV-2 제형의 투여는 접종 시 SARS-CoV2 감염으로부터 햄스터를 완전히 보호하였다. 도 16b에 도시된 바와 같이, LPMP/SARS-CoV-2 제형으로 백신접종된 SARS-CoV-2 코로나바이러스(COVID-19)로 접종된 햄스터는 미처리 햄스터에게 바이러스를 전달하지 않았다.
- [0716] 이론에 구속되지 않고, LPMP/mRNA 제형을 이용한 햄스터의 근육내 백신접종은 비강 점막에서 항체를 생성하였는데, 이는 바이러스(SARS-CoV-2 코로나바이러스, COVID-19) 전염을 예방하기 위한 전신 면역 및/또는 점막 면역을 초래할 수 있다.



만 일 소 3

군 5A/5B/5C

[0717]

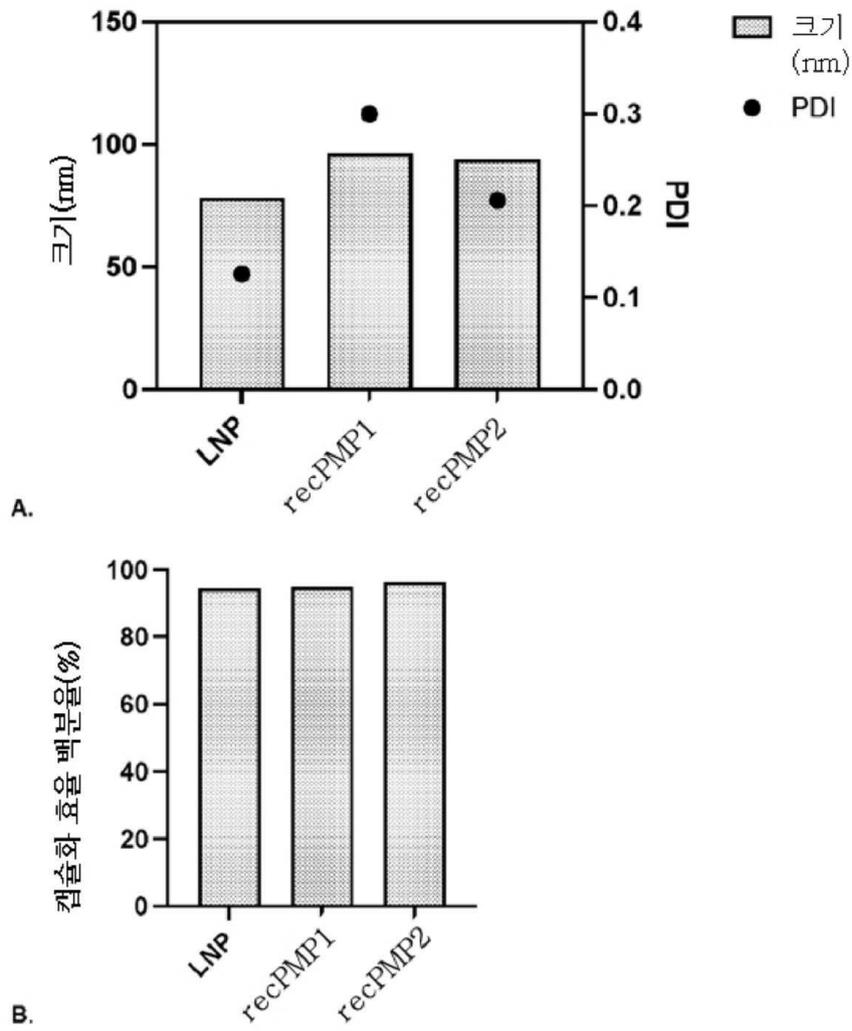


반응식 4

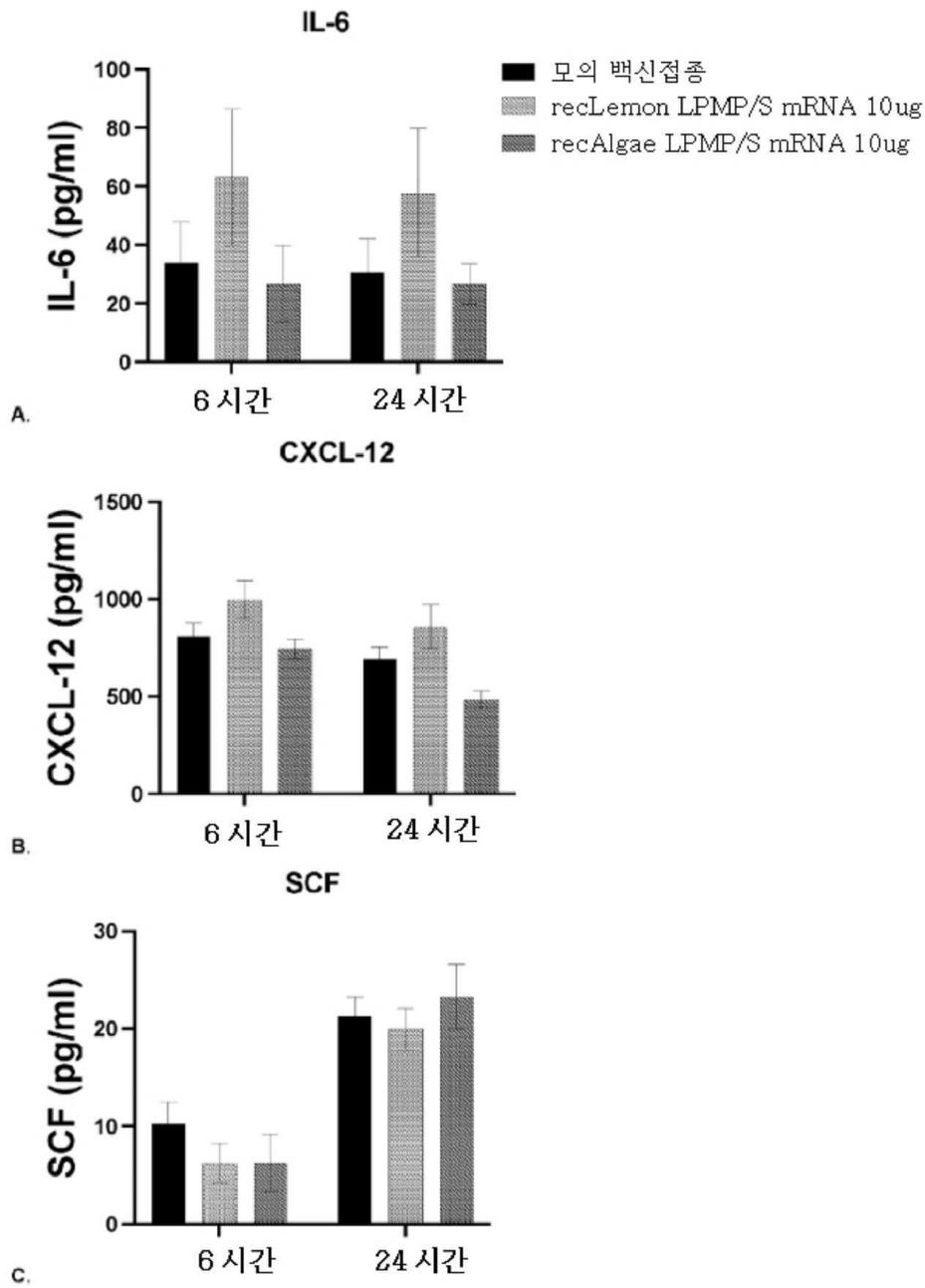
[0718]

도면

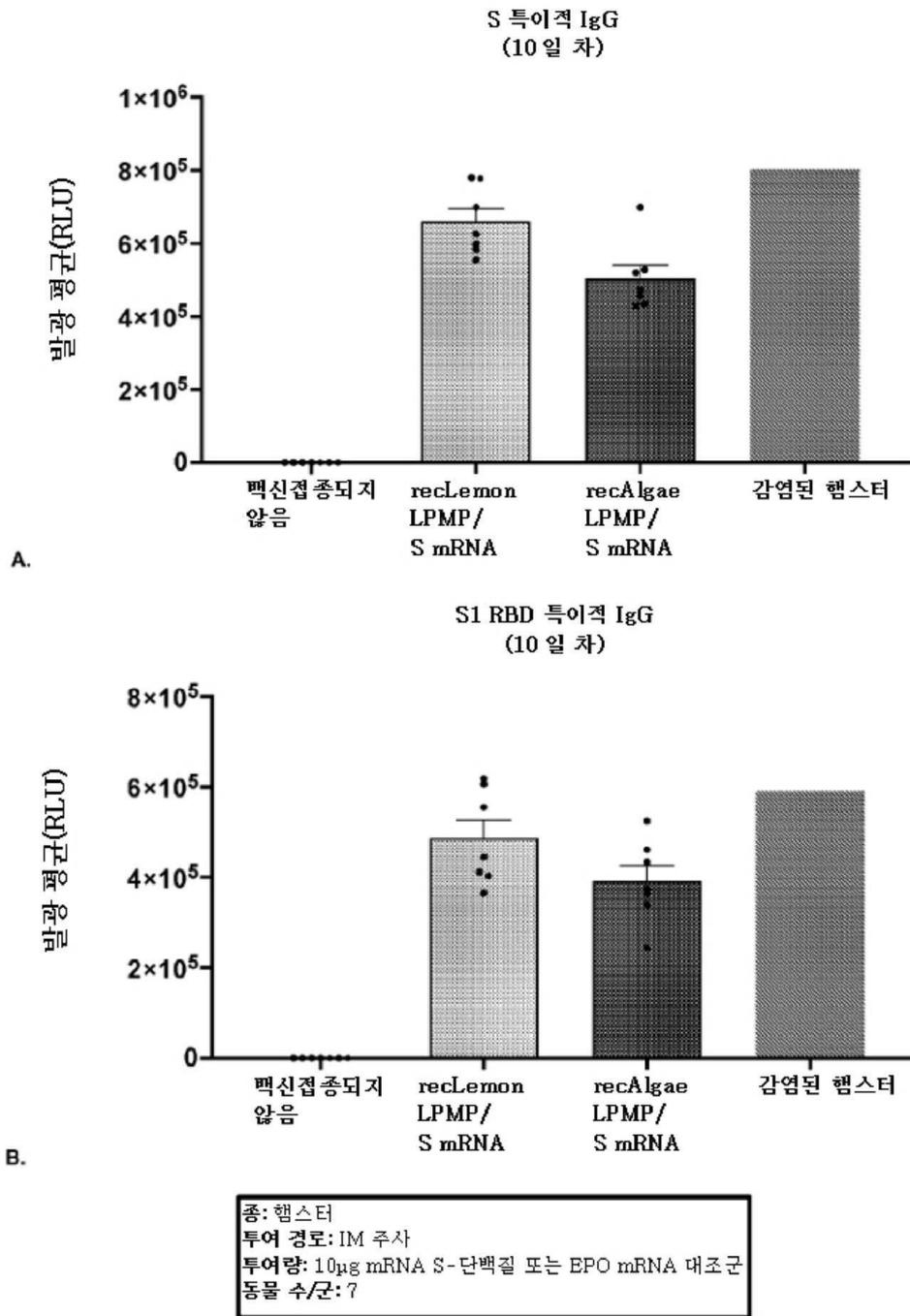
도면1



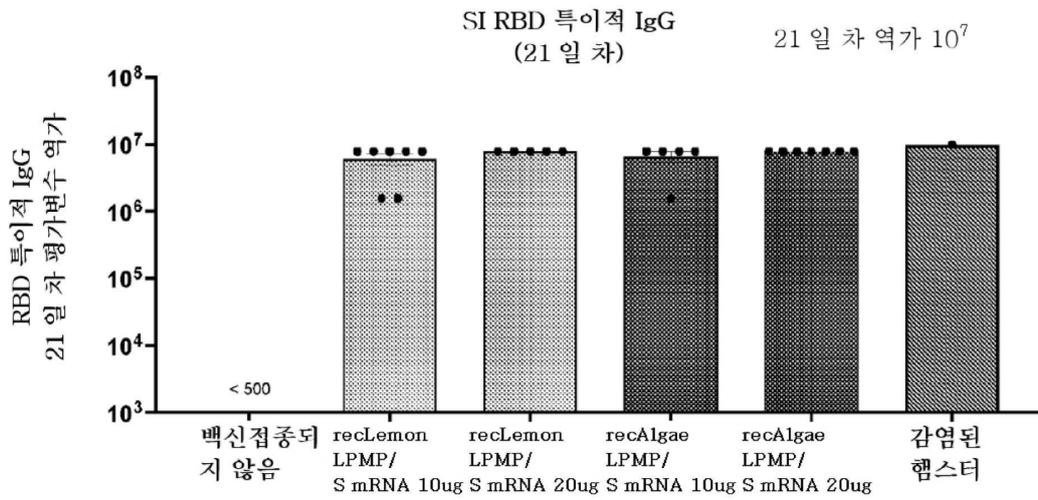
도면2



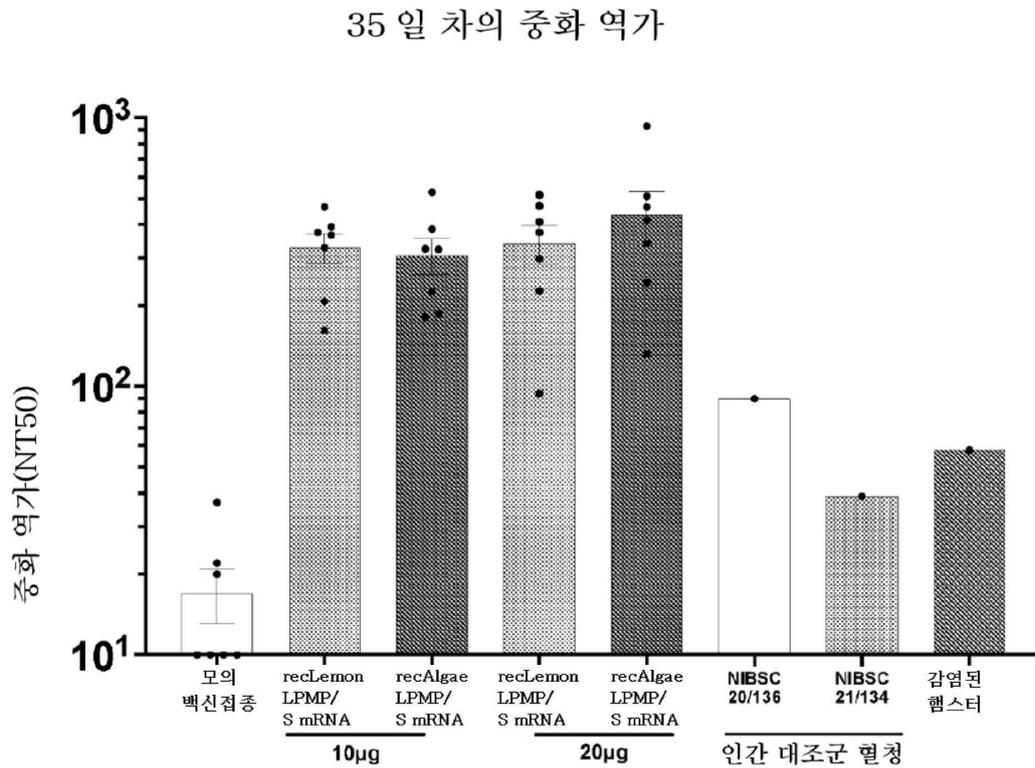
도면3



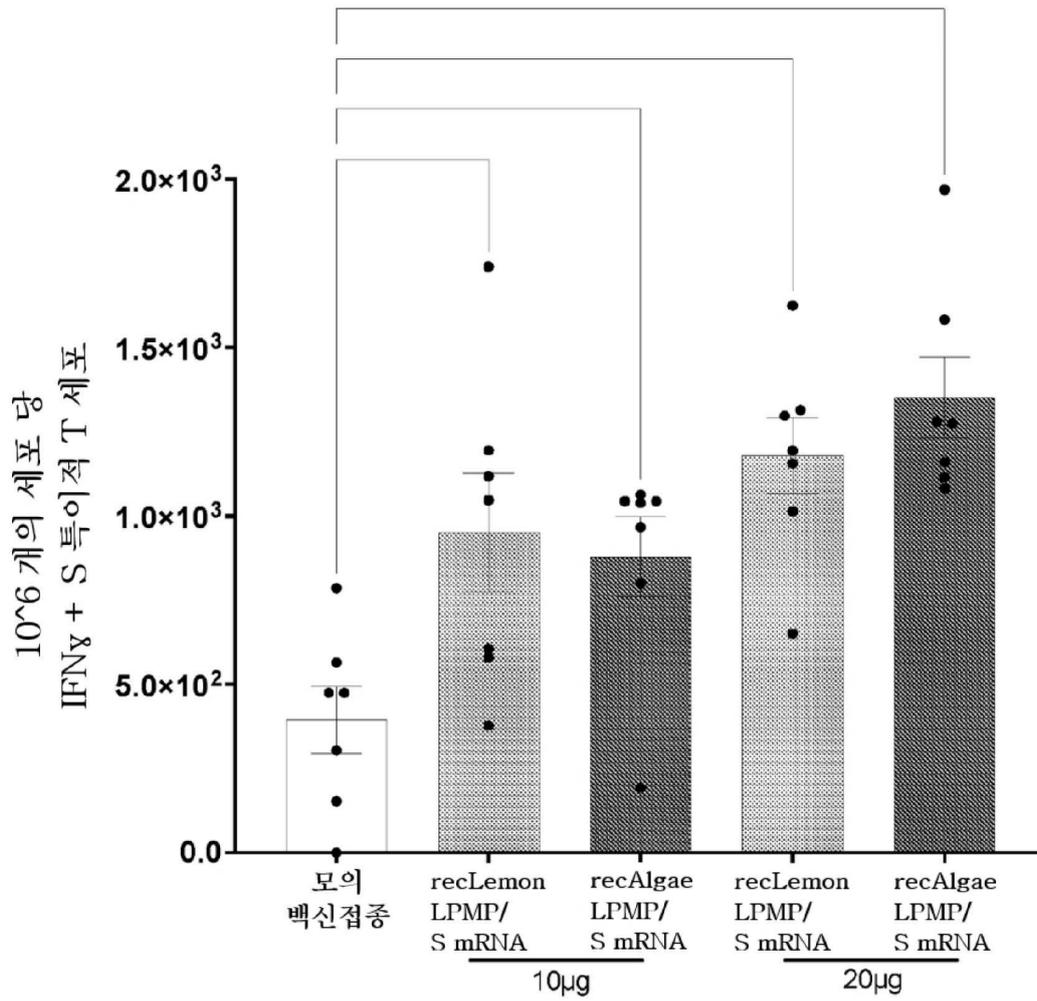
도면4



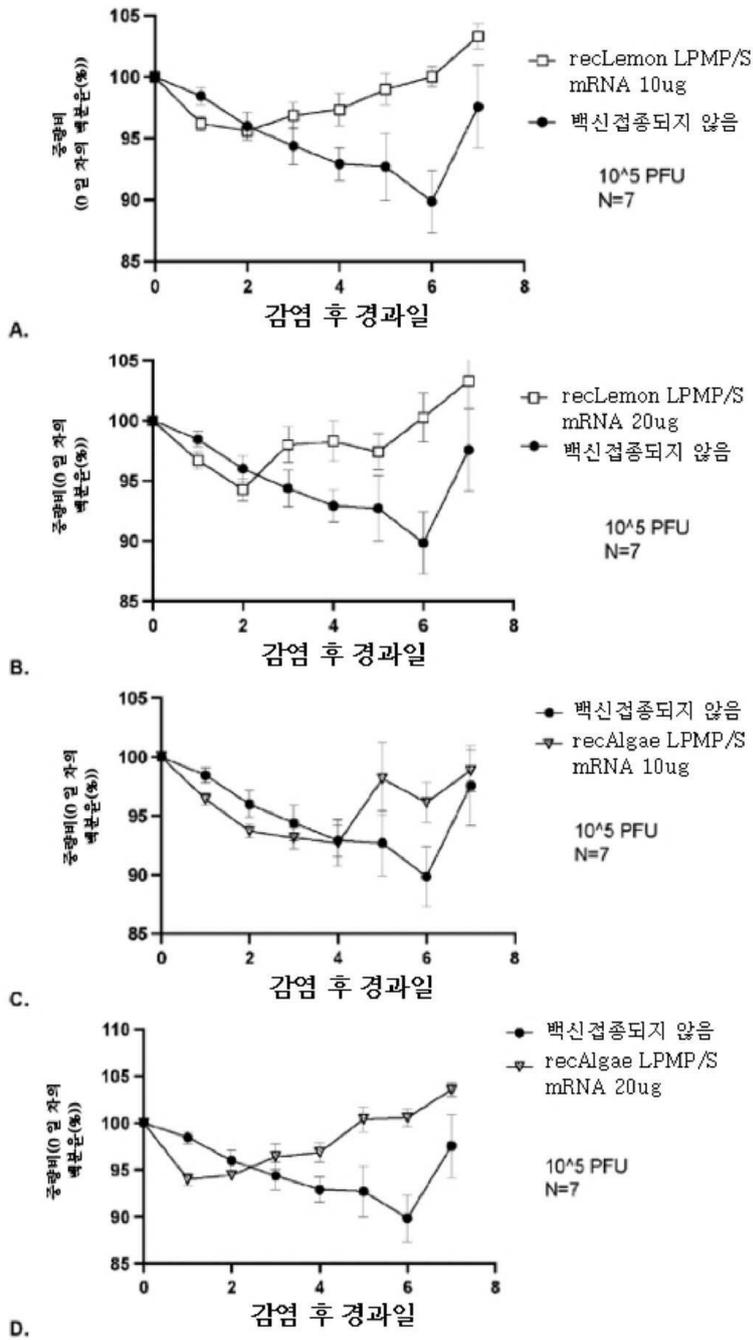
도면5



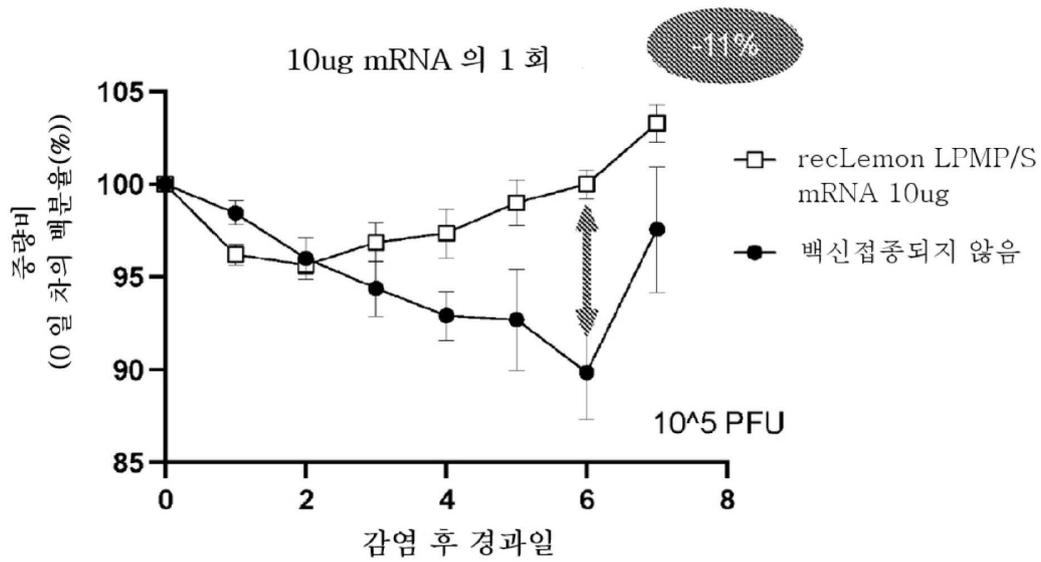
도면6



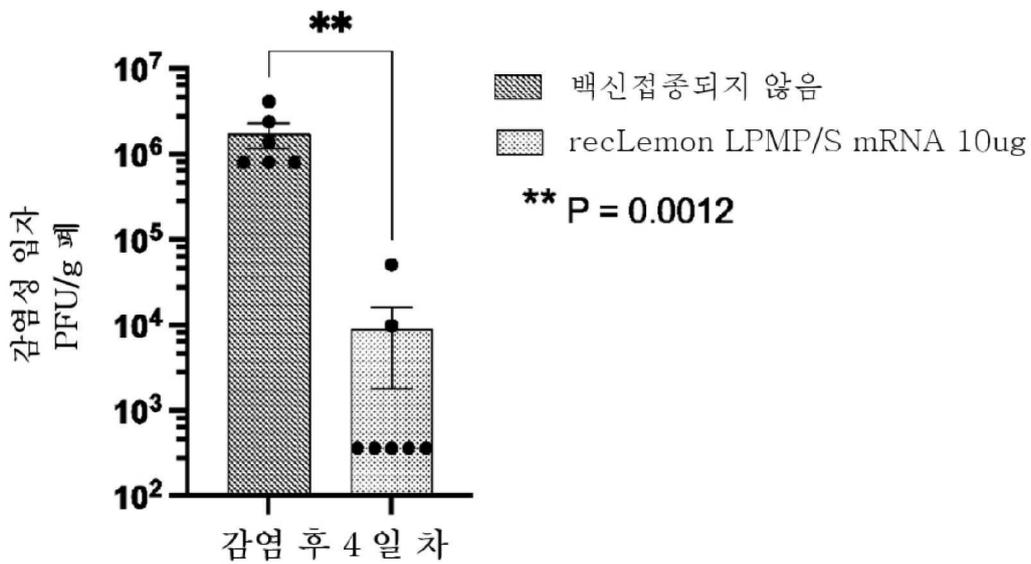
도면7



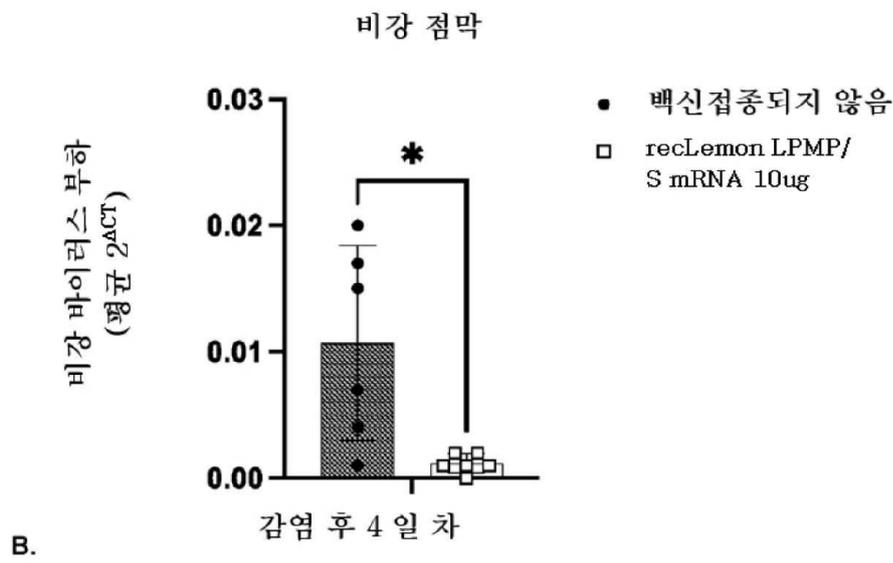
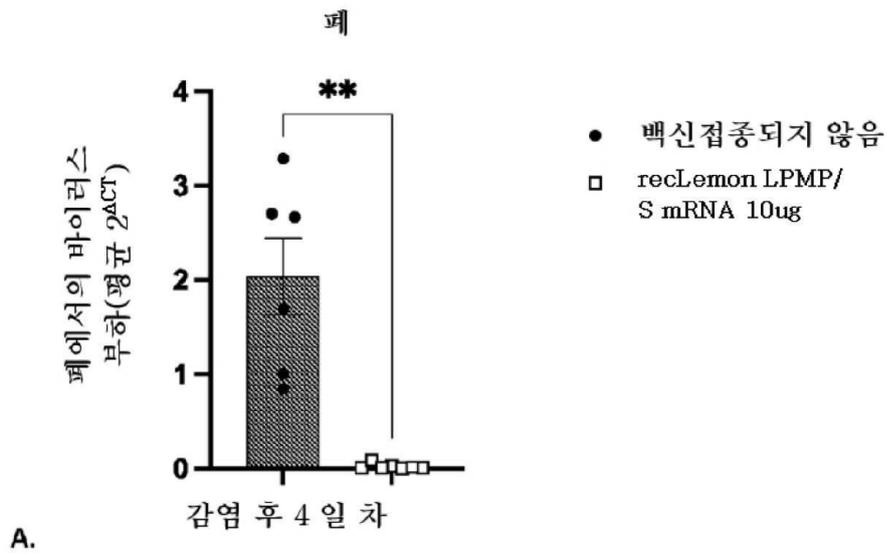
도면8



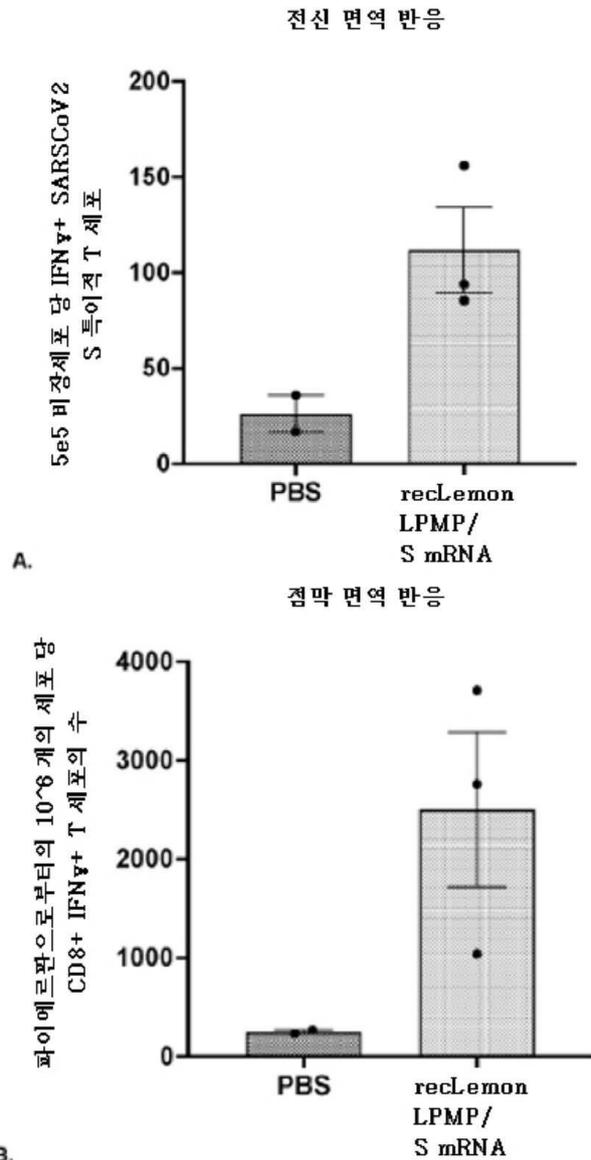
도면9



도면10



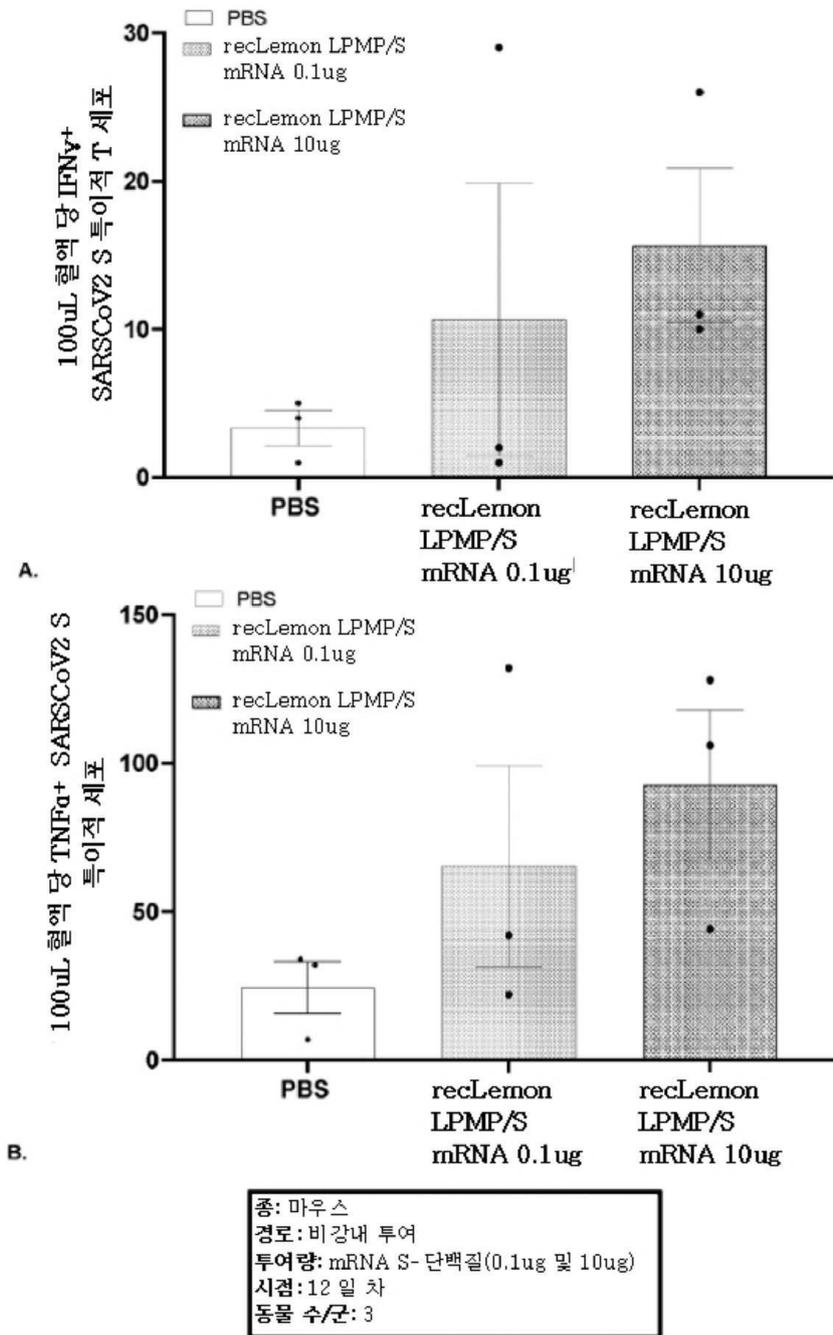
도면11



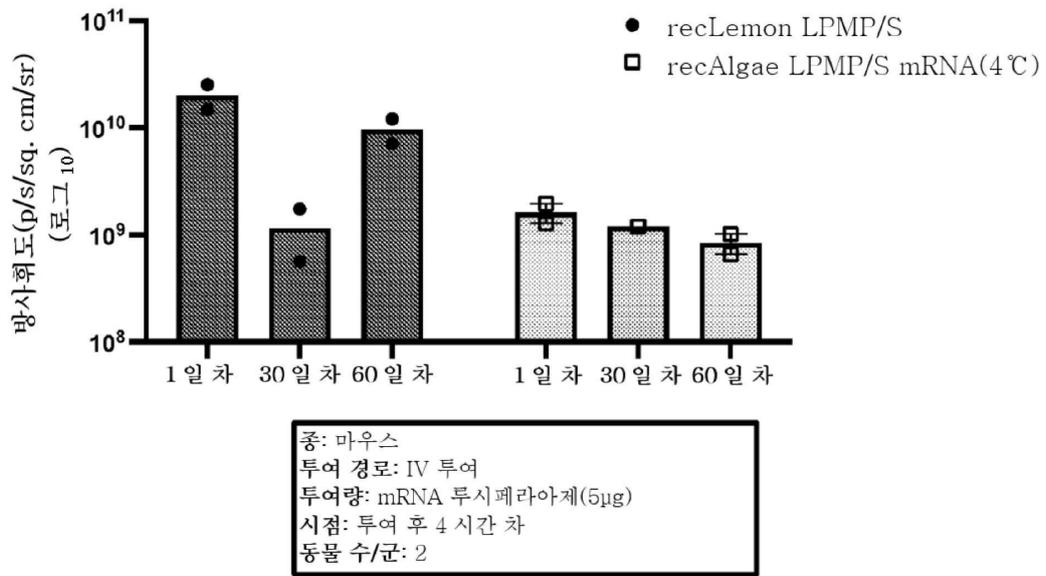
B.

종: 마우스
 투여 경로: 경구 투여
 투여량: mRNA S- 단백질(200 μ g)
 시점: 12 일 차
 동물 수/군: 3

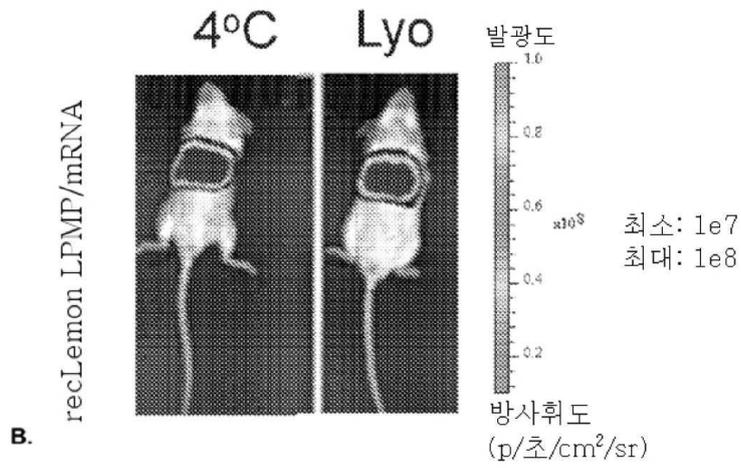
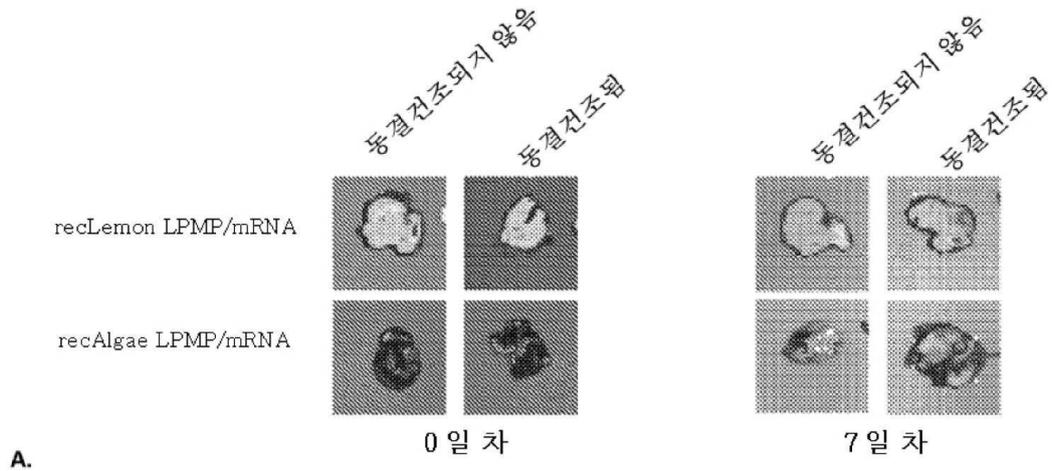
도면12



도면13



도면14

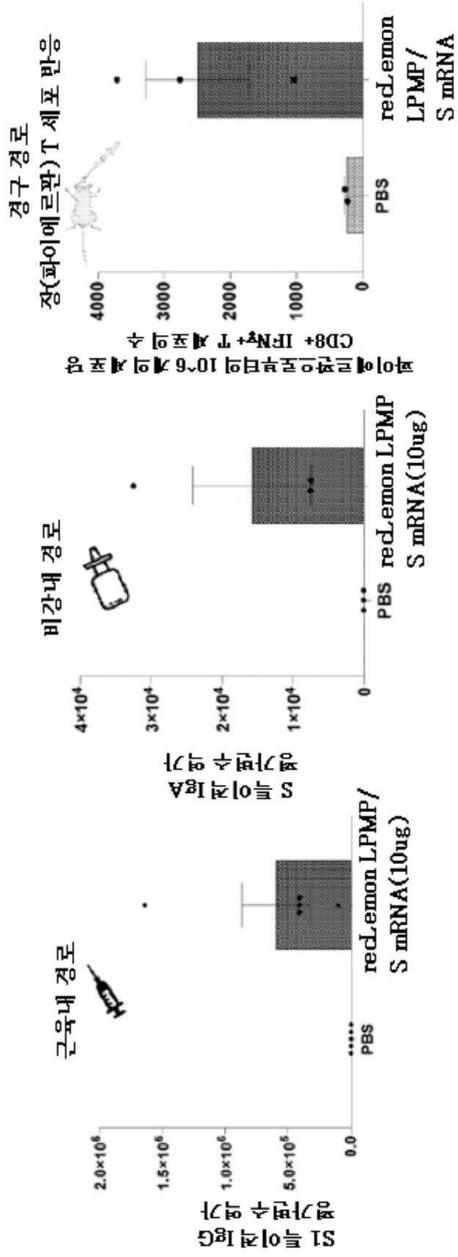


종: 마우스
경로: i.v. 투여
RNA 투여량: 0.2mg/kg
관독: 주사 후 6 시간 차

도면15

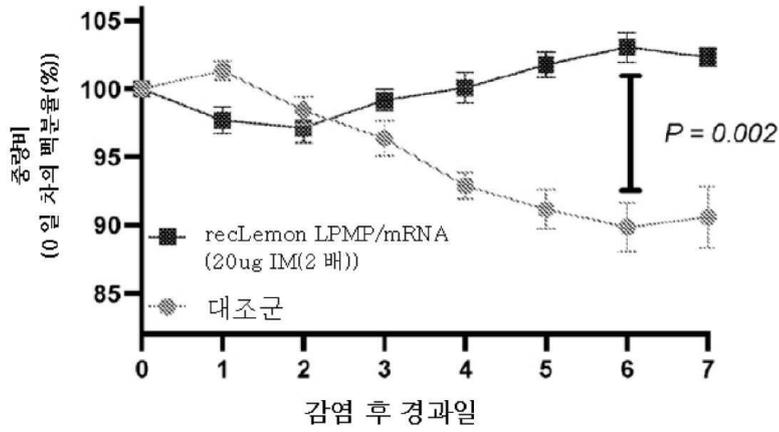
전신 면역:

점막 면역:



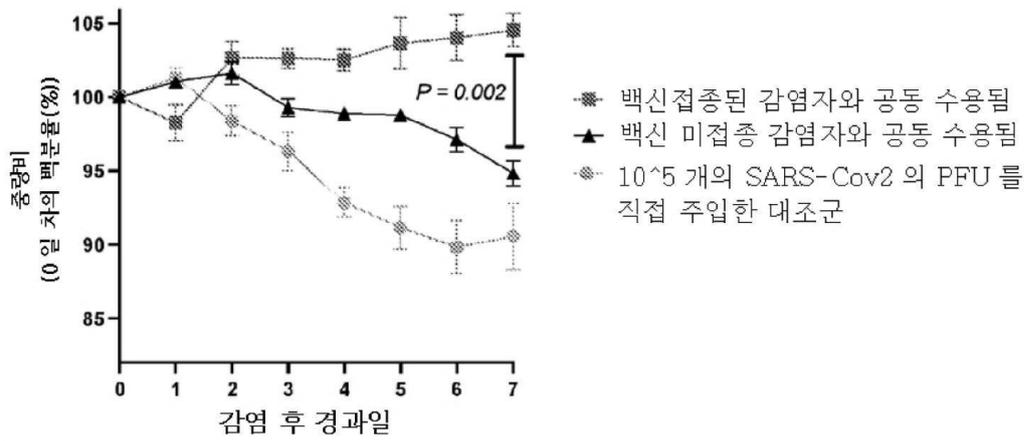
도면16

COVID 접종 후 체중 감소



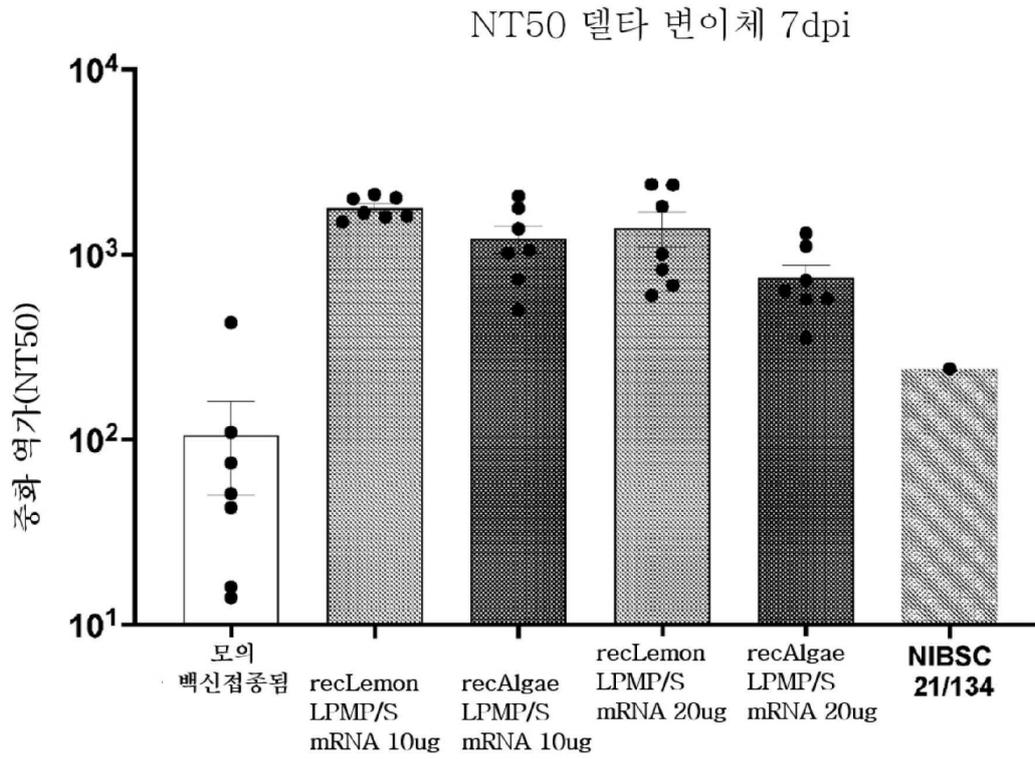
A.

COVID 전염 후 체중 감소

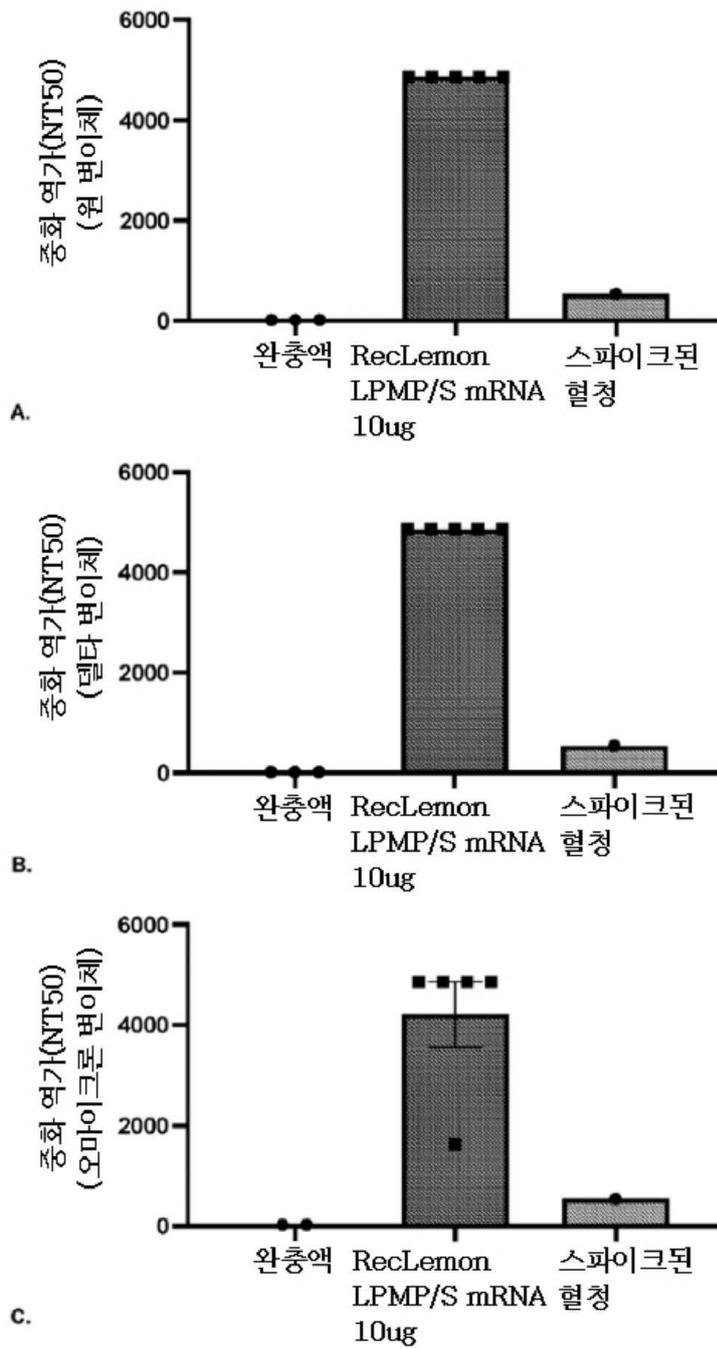


B.

도면17



도면18



도면19

