



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년05월10일
(11) 등록번호 10-2396589
(24) 등록일자 2022년05월06일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/85 (2006.01) A61K 31/7105 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 15/85 (2013.01)
A61K 31/7105 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2021-7018401(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2014년11월12일
심사청구일자 2021년06월30일
- (85) 번역문제출일자 2021년06월15일
- (65) 공개번호 10-2021-0076181
- (43) 공개일자 2021년06월23일
- (62) 원출원 특허 10-2016-7015562
원출원일자(국제) 2014년11월12일
심사청구일자 2019년10월15일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2014/074349
- (87) 국제공개번호 WO 2015/071295
국제공개일자 2015년05월21일
- (30) 우선권주장
13192555.4 2013년11월12일
유럽특허청(EPO)(EP)
- (56) 선행기술조사문헌
국제공개공보 WO 01/55369(2001.8.2.)*
Blood., 94(8):2637-2646(1999.10.15.)*
US 200400043468 A1(2001.8.2.)
EMBO J., 24(10):1831-1841(2005.4.28.)
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
브리제 유니버시티아이트 브루셀
벨기에, 비-1050 플루셀, 블레인란 2
- (72) 발명자
헤어덴, 카를로
벨기에, 비-9200 덴데르몬테, 프린센미어스 29
틸레만스, 크리스티안
벨기에, 비-2610 안트베르펜, 아우더스트라트 37
- (74) 대리인
김순웅

전체 청구항 수 : 총 12 항

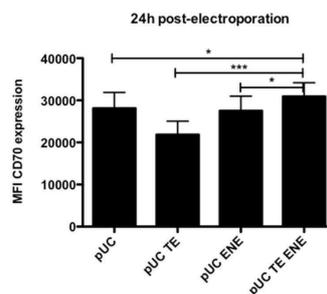
심사관 : 최성호

(54) 발명의 명칭 RNA 전사 벡터 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 개선된 RNA 전사 벡터에 관한 것으로, 생체내(in vivo) 치료적 목적을 위한 mRNA 제조에 매우 적합하다. 벡터에 있어서의 이러한 개선은 번역 인핸서(TE) 및 핵 잔류 서열(NRS)의 존재에 의한 것이며, 특히 후자가 카포시 육종 헤르페스 바이러스(KSHV)의 "발현 및 핵 잔류 구성 요소"(ENE)인 경우에 의한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 39/0011 (2021.08)
A61K 2039/53 (2013.01)
A61K 2039/54 (2013.01)
A61K 2039/55516 (2013.01)
C12N 2320/52 (2013.01)
C12N 2810/10 (2013.01)
C12N 2840/105 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

전사할 수 있는 핵산 서열; 5' 번역 인핸서(TE) 서열; 및 카포시 육종 헤르페스 바이러스(KSHV)의 폴리-아데닐화된 비-번역 RNA(PAN) 영역의 ENE 단편인 3' 핵 잔류 서열(ENE)을 포함하는 RNA 전사 벡터.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 TE 서열은 5' UTR(untranslated region) 내의 TOP (Terminal OligoPyrimidine tract) 영역, IRES (Internal Ribosome Entry Site) 및 상류 ORF's(Open Reading Frame)를 포함하는 그룹으로부터 선택되는 것인, RNA 전사 벡터.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 TE 서열은, 인간 베타 글로빈 5' UTR의 9n 절편에 의해서 나뉘는, 마우스 Gtx 호메오도메인(homeodomain) 단백질의 9 개 뉴클레오티드 절편의 종열 반복(tandem repeat)인 것인,

RNA 전사 벡터.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 TE 서열은, 인간 베타 글로빈(TTCTGACAT)에서 유래한 9n 서열에 의하여 연결되는 Gtx 리더 서열(CCGGCGGGT)에서 유래한 야생형 9n 서열의 10x 종열 반복인 것인,

RNA 전사 벡터.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 ENE 단편은 비대칭적 내부 U-풍부 루프를 갖는, 스템-루프(stem-loop) 구조로 구성된 상기 영역의 79 개 뉴클레오티드 서열인 것인,

RNA 전사 벡터.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 전사할 수 있는 핵산 서열은 CD40L을 암호화하는 mRNA, CD70을 암호화하는 mRNA, caTLR4를 암호화하는 mRNA 및 항원/질환 특이적 mRNA로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인,

RNA 전사 벡터.

청구항 7

다음 단계를 포함하는 시험관내(in vitro) 전사된 RNA의 안정성 및/또는 번역 효율을 증가시키는 방법:

(i) 제1항의 RNA 전사 벡터를 제공하는 단계로서,

상기 전사할 수 있는 핵산 서열은 전사되는 상기 RNA에 대응되는 것인 전사할 수 있는 DNA 서열이고; 및

(ii) 상기 전사할 수 있는 DNA 서열을 시험관내에서 전사하는 단계.

청구항 8

번역할 수 있는 핵산 서열; 5' 번역 인핸서(TE) 서열; 및 카포시 육종 헤르페스 바이러스(KSHV)의 폴리-아데닐화된 비-번역 RNA(PAN) 영역의 ENE 단편인 3' 핵 잔류 서열(ENE)을 포함하는 RNA 분자.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 번역할 수 있는 핵산 서열은 CD40L을 암호화하는 mRNA, CD70을 암호화하는 mRNA, caTLR4를 암호화하는 mRNA 및 항원/질환 특이적 mRNA로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인,

RNA 분자.

청구항 10

제8항 내지 제9항 중 어느 한 항의 RNA 분자를 포함하는 숙주 세포로의 도입을 위한 조성물.

청구항 11

삭제

청구항 12

제8항 내지 제9항 중 어느 한 항의 RNA 분자를 포함하는 암 치료용 약학적 조성물.

청구항 13

제1항의 벡터; 또는 제8항 내지 제9항 중 어느 한 항의 RNA 분자를 포함하는 숙주 세포로의 도입용 키트.

청구항 14

삭제

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 일반적으로는 개선된 RNA 전사 벡터에 관한 것으로, 생체내(in vivo) 치료적 목적을 위한 mRNA 제조에 매우 적합하다. 벡터에 있어서 이러한 개선은 특히 번역 인핸서 및 핵 잔류 구성 요소(nuclear retention

[0001]

element)의 존재에 의한 것이다.

배경 기술

[0003] 우리의 면역 체계가 종양 세포 및 감염원과 건강한 세포를 구별할 수 있더라도, 종종 문제에 대하여 적절하게 인식하고 반응하는 것에 실패한다. 따라서, 의학은 종양 세포 및 감염원의 감시 및 제거에 있어 면역 체계를 돕기 위한 여러 전략의 개발에 초점을 맞추어 왔다. 수지상 세포(DCs)는 면역 반응의 개시에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 항원 제시 세포(APC)이고 면역요법에 있어 DC를 이용하기 위해 많은 노력을 해왔다. 예를 들어 암의 경우에, 종양 무게를 감소시키고 종양 재발을 조절하기 위한 면역학적 기억을 유도할 수 있는 작동 T 세포의 유도에 의해서 종양 특이적 면역 반응을 유도 및 영구화하는 것이 목적이다. 타겟이 될 수 있는 종양관련항원(TAA)이 확인되면, 생체내(*in vivo*)또는 생체외(*ex vivo*)에서, 그들은 적절한 APC, 즉 수지상세포의 운반에 사용될 수 있다.

[0004] 생체내 또는 생체외 면역요법을 위한 DC의 관점에서 상이한 항원 형태 예컨대 펩티드, 단백질, 전체 종양 세포 추출물, 플라스미드 DNA 또는 mRNA가 평가되어 왔다. 이러한 시도 중, 항원을 암호화하는 mRNA가 특히 유력한 것으로 나타나고 있다. 펩티드에 의한 전통적 백신과 비교한 이점은 mRNA가 전체 항원에 대한 유전 정보를 암호화한다는 것이다. HLA에 특이적인 펩티드를 결정할 필요 없이, 전장 항원이 처리되고 모든 가능한 에피토프가 환자의 MHC 분자 내에 제시된다. 이용가능한 펩티드가 그들의 HLA 유형에 매치되지 않기 때문에 모든 환자를 치료할 수 있다. 또한, mRNA는 DNA 또는 바이러스 벡터와 비교해서 게놈의 융합에 대한 위험을 제기하지 않아 바람직한 안정성 프로파일을 부여한다. 그것의 일시적 특징 때문에, mRNA는 짧은 시간 동안 발현할 뿐이고 결과적으로 자연의 산물로 분해된다. 또한, mRNA는 이의 고유한 아주번트(adjutant)로 작용하고, 공동 자극성 신호를 촉진하는데, 이는 mRNA에 기반한 면역요법의 관점에서 유익하다. 외인성 mRNA의 DC로의 전달에 있어 두 가지 경로가 이용된다: 형질감염된 DC의 생체외에서의 후속적 양자 이동 또는 생체내에서의 mRNA의 직접 투여 및 흡수다.

[0005] Diken et al. (2011)에 의해 수행된 연구는 mRNA의 흡수가 거대음세포작용(macropinocytosis), DC 성숙에서 잃게 되는 미성숙 DC의 기능에 의존하기 때문에 성숙 자극(mature stimulus) 및/또는 이의 전달 시간이 신중하게 선택되어야 함을 증명하였다. 결과적으로, 전통적 성숙 자극, 예컨대 리포폴리사카라이드(LPS)와 TAA mRNA의 동시 전달은, 항원 특이적 T세포 반응의 유도를 동시에 결정하는 요인인 항원의 생체이용가능성에 부정적인 영향을 준다(Van Lint 2012; Diken 2011). 생체내에서 DC와 TAA mRNA를 동시에 운반 및 활성화하기 위한 두 개의 상이한 전략이 연구되어 왔다.

[0006] Fotin-Mleczek et al. (2011)에 자유- 및 프로타민-복합 mRNA를 포함하는 2-구성 요소 시스템이 기술되어 있고, 이는 적응 면역을 위한 항원 소스(source)와 함께 병원체 인식 수용체, TLR7의 향상된 유발을 제공한다. 이러한 면역화 전략은 강력한 항-종양 면역 반응의 유도 및 지속적 기억 반응을 야기하고, 이는 기억 T세포가 종양의 재발을 피할 수 있도록 하기 때문에 중요하다.

[0007] 초기에 Bonehill et al., 2008에서는 생체외에서 생성되었으나 생체내에서 직접 투여 및 흡수에 동등하게 적용할 수 있는 활성을 위한, 아주번트 목적을 위해서 mRNA의 특정 조합의 사용을 평가하였다(Bonehill, 2008). 이것은 TAA를 암호화하는 mRNA와 (공동-) 전기천공된 항원성-펩티드가 펄스된 항원 제시 세포(antigenic-peptide pulsed antigen presenting cell) 또는 항원 제시 세포의 T 세포 자극 능력이 그들을 2 또는 그 이상의 면역자극성 인자를 암호화하는 mRNA 또는 DNA 분자의 혼합물을 이용한 전기천공법을 통해서 다른 분자 아주번트와 함께 제공함으로써 매우 향상될 수 있음을 기술하고 있는 특허 출원(WO2009034172)으로 이어졌다. 개념의 증거가 타겟-특이적 펩티드로 펄스되거나 또는 타겟-특이적 항원을 암호화하는 mRNA로 공동-전기천공된 이러한 변형된 항원 제시 세포가 항원-특이적 T 세포를 시험관내 및 백신 접종 이후에 모두 자극할 수 있음을 제공하고 따라서 항-종양, 항-바이러스, 항-박테리아 또는 항-곰팡이 면역요법을 위한 유망한 새로운 시도를 형성하였다. 본 발명에 사용된 면역자극성 인자의 바람직한 조합은 CD40L 및 caTLR4, 또는 CD40L 및 CD70이다. 다른 바람직한 구현예에서, CD40L, CD70 및 caTLR4 면역자극성 분자의 조합이 사용되고, 이하 본원에서 "TriMix"로 지칭한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 5' 번역 인핸서 서열 및 3' 핵 잔류 서열을 포함하는 RNA 전사 벡터에 관한 것이다. 본 발명에 따른 벡터는, 빈 pUC 벡터, 또는 번역 인핸서 또는 핵 잔류 서열을 포함하는 벡터와 비교해서 시험관내 전사된 mRNA

에 의해 암호화되는 단백질의 발현에 있어 예상 외의 개선을 나타낸다. 이러한 개선은 특히 두 구성 요소: 벡터 내 번역 인핸서 및 RNA 안정화 서열의 동시 존재에 기인하며, 이에 따라 얻어진 발현 생성물이 그것에 포함된다. 또한, 마우스 암 모델에서 본 발명의 벡터로부터 얻어진 TriMix mRNA의 생체내 적용은 종양의 느린 성장 및 상기 마우스의 연장된 기대 수명을 야기한다.

과제의 해결 수단

- [0011] 본 발명의 첫 번째 태양은 서열번호 1과 80% 이상의 서열 상동성을 갖는 번역 인핸서(TE) 서열, 전사할 수 있는 핵산 서열 및 서열번호 4로 표시되는 핵 잔류 서열을 포함하는 핵산 벡터를 제공하는 것이다.
- [0012] 특정 구현예에서, 전사할 수 있는 핵산 서열(transcribable nucleic acid sequence)은 CD40L, CD70, caTLR4 또는 항원/질환 특이적 mRNA를 암호화하는 mRNA로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0013] 바람직한 구현예에서, 번역 인핸서(translation enhancer)는 서열번호 1, 2, 또는 3 중 어느 하나, 더욱 구체적으로는 서열번호 1로 표시된다.
- [0014] 추가적인 태양에서, 본 발명은 *시험관내(in vitro)* 전사된 RNA의 안정성 및/또는 번역 효율을 증가시키는 방법으로,
- [0015] (i) 본 발명에 따른 벡터를 제공하는 단계, 여기서 상기 전사할 수 있는 핵산 서열은 전사되는 상기 RNA에 대응되는 것인, 전사할 수 있는 DNA 서열이고;
- [0016] (ii) 전사할 수 있는 DNA 서열을 *시험관내*에서 전사하는 단계;
- [0017] 를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0018] 또 다른 추가적인 태양에서, 본 발명은 서열번호 1과 80% 이상의 서열 상동성을 갖는 번역 인핸서(TE), 전사할 수 있는 핵산 서열, 및 서열번호 4로 표시되는 핵 잔류 서열을 포함하는 RNA 분자를 제공한다.
- [0019] 상기 RNA 분자는 폴리-A 테일(poly-A tail)를 더 포함할 수 있다.
- [0020] 본 발명의 RNA 분자의 문맥에서, 상기 번역할 수 있는 핵산 서열은 CD40L, CD70, caTLR4 또는 항원/질환 특이적 mRNA를 암호화하는 mRNA로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0021] RNA 분자의 바람직한 구현예에서, 번역 인핸서는 서열번호 1, 2 또는 3 중 어느 하나; 더욱 구체적으로는 서열번호 1로 표시된다.
- [0022] 추가적으로 본 발명은 하나 또는 그 이상의 본 발명에 따른 RNA 분자; 더욱 구체적으로 상기 하나 또는 그 이상의 RNA 분자는 CD40L, CD70 및 caTLR4를 암호화하는 mRNA 분자를 표시하는 RNA 분자를 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0023] 본 발명에 따른 조성물은, 항원/질환 특이적 mRNA를 암호화하는 mRNA를 더 포함할 수 있다.
- [0024] 추가적으로 본 발명은 다양한 목적, 예컨대 *생체내* 또는 *시험관내* 숙주 세포 내의 도입; 또는 의약품도를 위한 RNA 분자(들) 및/또는 하나 또는 그 이상의 상기 RNA 분자를 포함하는 조성물(들)의 용도를 제공한다.
- [0025] 또한 본 발명의 태양은 하나 또는 그 이상의 벡터; 하나 또는 그 이상의 RNA 분자; 또는 본 발명에 따른 조성물을 포함하는 키트를 제공한다.
- [0026] 또한 본 발명은 하나 또는 그 이상의 RNA 분자 또는 본 발명에 따른 조성물로 이를 필요로 하는 환자를 치료하는 방법; 여기서 상기 RNA 분자는 동시에 또는 간격을 두고 순차적으로 투여될 수 있는 것인 방법을 제공한다.
- [0027] 본 발명에 따른 RNA 분자 또는 조성물은 임의의 적절한 투여 경로 예컨대 절내(intranodal), 피내, 림프내(intralymphatic) 또는 종양내에 의해서 이를 필요로 하는 환자에 투여될 수 있다. 또한, 예를 들어 암 환자를 치료하는 경우, 본 발명에 따른 RNA 분자 또는 조성물의 투여는 환자의 종양에서 유래한 종양 mRNA를 방출하는 방법, 예컨대 절제 또는 초음파전공법(sonoporation)과 조합하여 사용할 수 있다.
- [0028] **본 발명의 번호화된 서술**
- [0029] 1. 서열번호 1과 80% 이상의 서열 상동성을 갖는 번역 인핸서(TE) 서열, 전사할 수 있는 핵산 서열 및 서열번호 4로 표시되는 핵 잔류 서열을 포함하는, 핵산 벡터.
- [0030] 2. 제1항에 있어서, 상기 전사할 수 있는 핵산 서열은 CD40L, CD70, caTLR4 또는 항원/질환 특이적 mRNA를 암호

화하는 mRNA를 포함하는 군으로부터 선택되는 것인, 핵산 벡터.

- [0031] 3. 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 번역 인헨서는 서열번호 1, 2 또는 3 중 어느 하나; 더욱 구체적으로는 서열번호 1로 표시되는 것인, 핵산 벡터.
- [0032] 4. 시험관내(*in vitro*) 전사된 RNA의 안정성 및/또는 번역 효율을 증가시키는 방법으로,
- [0033] (i) 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 벡터를 제공하는 단계, 여기서 상기 전사할 수 있는 핵산 서열은 전사되는 상기 RNA에 대응되는 것인, 전사할 수 있는 DNA 서열이고;
- [0034] (ii) 상기 전사할 수 있는 DNA 서열을 시험관내에서 전사하는 단계:
- [0035] 를 포함하는, 방법.
- [0036] 5. 서열번호 1과 80% 이상의 서열 상동성을 갖는 번역 인헨서(TE), 전사할 수 있는 핵산 서열, 및 서열번호 4로 표시되는 핵 잔류 서열을 포함하는, RNA 분자.
- [0037] 6. 제5항에 있어서, 폴리-A 테일을 더 포함하는, RNA 분자.
- [0038] 7. 제5항 및 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 전사할 수 있는 핵산 서열은 CD40L, CD70, caTLR4 또는 항원/질환 특이적 mRNA를 암호화하는 mRNA를 포함하는 군으로부터 선택되는 것인, RNA 분자.
- [0039] 8. 제5항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 번역 인헨서는 서열번호 1로 표시되는 것인, RNA 분자.
- [0040] 9. 제5항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 RNA 분자를 하나 또는 그 이상 포함하는, 조성물.
- [0041] 10. 제9항에 있어서, 상기 하나 또는 그 이상의 RNA 분자는 CD40L, CD70 및 caTLR4를 암호화하는 mRNA 분자를 표시하는 것인, 조성물.
- [0042] 11. 제10항에 있어서, 항원/질환 특이적 mRNA를 암호화하는 mRNA를 더 포함하는 것인, 조성물.
- [0043] 12. 제5항 내지 제8항 중 어느 한 항의 RNA 분자 또는 제9항 내지 제11항 중 어느 한 항의 조성물의 숙주 세포로 도입을 위한 용도.
- [0044] 13. 제5항 내지 제8항 중 어느 한 항의 RNA 분자 또는 제9항 내지 제11항 중 어느 한 항의 조성물의 의약품도.
- [0045] 14. 하나 또는 그 이상의 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 조성물; 하나 또는 그 이상의 제5항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 RNA 분자; 또는 제9항 내지 제11항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 포함하는 키트.

도면의 간단한 설명

[0047] 여기서 도면을 구체적으로 참조하여 도시된 특정 사항은 예시적인 방식으로 만 본 발명의 다른 실시예들의 예시적인 논의를 목적으로 강조된다. 그들은 본 발명의 원리 및 개념적 측면을 가장 유용하고 쉽게 기술할 수 있는 것으로 고려되는 것을 제공하기 위해 제시되어있다. 이와 관련하여 본 발명의 기본적인 이해를 위해 필요한 것보다 더 상세하게 본 발명의 구조적 세부 사항을 나타내지 않는다. 도면과 함께 있는 설명은 당업자가 어떻게 본 발명의 여러가지 형태를 실제로 구현할 수 있는지 확실하게 한다.

도 1: pUC-벡터, pUC-TE 벡터, pUC-ENE 벡터 또는 pUC TE ENE-벡터에 의해서 암호화되는 TriMix mRNA로 전기천공한 iDC. 양성 DC 집단의 MFI(평균 형광 강도) 값을 나타낸다. 데이터를 평균 ± SEM으로 표시하였다. (짝비교 *t* 검정, * *P* < 0,05). N pUC = 6; N pUC-TE = 15; N pUC-ENE = 15; N pUC TE ENE = 19

도 2: WT1 mRNA로 전기천공한 DC 내에서 WT1 발현. iDC를 다른 벡터에 의해서 암호화되는 WT1 mRNA로 전기천공하고 전기천공 후 4시간, 24시간, 및 48시간 후에 세포내 염색에 의해서 그들의 WT1 발현을 분석하였다. 다른 WT1을 암호화하는 벡터로 한 iDC의 전기천공 후의 MFI 값의 비교를 나타내었다. 데이터를 평균 ± SEM으로 표시하였다. (짝비교 *t* 검정, * *P* < 0.05; ***P* < 0.01; *** *P* < 0.001). N = 6

도 3: DC의 eGFP 발현의 동역학. iDC를 eGFP 및 pUC-벡터 또는 pUC TE ENE-벡터에 의해서 암호화되는 TriMix mRNA로 공동 전기천공하였다. eGFP 발현을 전기천공 후 여러 시점에서 분석하였다. eGFP 양성 DC 집단의 MFI 값을 분석하였다. 데이터를 평균 ± SEM으로 표시하였다. (짝비교 *t* 검정, * *P* < 0.05; ***P* < 0.01; *** *P* < 0.001). N = 9

도 4: 미성숙 및 성숙 DC의 표현형. 표시된 분자의 MFI 값을 iDC의 전기천공 24시간 후에 조사하였다. 데이터를 평균 ± SEM으로 표시하였다. (짝비교 *t* 검정, * *P* < 0.05; ***P* < 0.01; *** *P* < 0.001). CD40 N = 9; CD70 N = 19;

CD80 N = 12; CD 83 N = 12; CCR7 N = 12.

도 5: P815를 이용한 2면 종양 모델: 대조군으로서 tNGFR를 이용하건 pUC TE ENE TriMix를 이용한 종양의 단일 치료. 전신성 항-종양 면역 반응을 측정하기 위해서 반대쪽의 치료하지 않은 종양을 사용하였다. 군 당 각각의 마우스(n=6)에 대해 종양 성장을 나타내었고 후에 평균 종양 부피의 개관을 나타내었다. 생존을 Kaplan-Meier 도표로 시각화하였다. 로그 순위 검정에 의해서 생존에서의 차이를 분석하였다.

도 6: P815를 이용한 2면 종양 모델: 대조군으로서 tNGFR 또는 0.8 부피의 하트만 용액을 이용한 하나의 종양의 단일 치료. 전신성 항-종양 면역 반응을 측정하기 위해서 반대쪽 치료하지 않은 종양을 사용하였다. 군 당 각각의 마우스(n=6)에 대해 종양 성장을 나타내었고 후에 평균 종양 부피의 개관을 나타내었다. 생존을 Kaplan-Meier 도표로 시각화하였다. 로그 순위 검정에 의해서 생존에서의 차이를 분석하였다.

도 7: 가장 중요한 구성 요소를 갖는 pUC TE ENE-벡터.

도 8: EMBL의 Clustal 2.1에 의해서 생성된 3 가변적 TE 서열(서열번호 1, 2 및 3)의 서열 비교를 나타낸다.

도 9: (A) WT1 mRNA를 이용한 DC 내에서의 WT1 발현. iDC를 다른 벡터에 의해서 암호화되는 10 µg WT1 mRNA로 전기천공하고 전기천공 4시간, 24시간, 및 48시간 후에 세포내 염색에 의해서 그들의 WT1 발현을 분석하였다. 다른 WT1을 암호화하는 벡터를 이용한 iDC의 전기천공 후에 MFI 값의 비교를 나타내었다. N=3 **(B)** eGFP mRNA로 전기천공한 DC 내에서 eGFP의 발현. iDC를 다른 벡터에 의해서 암호화되는 10 µg eGFP로 전기천공하고 전기천공 4시간, 24시간, 및 48시간 후에 세포내 염색에 의해서 그들의 eGFP 발현을 분석하였다. 다른 WT1을 암호화하는 벡터로 한 iDC의 전기천공 후에 MFI 값의 비교를 나타내었다. N=3

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0048] 본 발명의 첫 번째 태양은 번역 인핸서(TE) 및 핵 잔류 서열을 포함하는 핵산 벡터를 제공하는 것이다. 더욱 구체적으로, 상기 핵산 벡터는 서열번호 1과 80% 이상의 서열 상동성을 갖는 번역 인핸서(TE) 서열, 전사할 수 있는 핵산 서열 및 서열번호 4로 표시되는 핵 잔류 서열을 포함한다.

[0049] 용어 "벡터"는 이것의 가장 일반적인 의미로 본원에서 사용되는 핵산에 대한 임의의 매개체 비히클, 예컨대 상기 핵산을 원핵 및/또는 진핵 숙주 세포로 도입할 수 있게 하는 것이며, 계놈 내에 적절하게 융합되도록 하는 비히클을 포함한다. 이러한 벡터는 바람직하게 세포 내에서 복제 및/또는 발현된다. 벡터는 플라스미드, 파지미드 또는 바이러스 계놈을 포함한다. 본원에서 사용되는 용어 "플라스미드"는 일반적으로 염색체 DNA와 독립적으로 복제할 수 있는 염색체 외부의 유전적 물질, 보통 이중 원형 DNA(circular DNA) 듀플렉스의 구조(construct)에 관한 것이다.

[0050] 본 발명에 따르면, 핵산 분자 또는 핵산 서열은 바람직하게는 데옥시리보핵산(DNA) 또는 리보핵산(RNA)인 핵산을 지칭한다. 본 발명에 따르면, 핵산은 지노믹 DNA(genomic DNA), cDNA, mRNA, 재조합으로 제조된 분자 및 화학적으로 합성된 분자를 포함한다. 본 발명에 따르면, 핵산은 단일 가닥 또는 이중 가닥 및 선형 또는 공유적으로 폐쇄된 원형 분자 형태일 수 있다. 또한 용어 "핵산"은 뉴클레오티드 염기, 당 또는 인산에 있어서 핵산의 화학적 유도체, 및 비-천연 뉴클레오티드 및 뉴클레오티드 유사체(analog)를 포함하는 핵산을 포함한다.

[0051] 본 발명에 기술된 바에 따르면 핵산은 바람직하게는 분리되어있다. 본 발명에 따르면 용어 "분리된 핵산"은 1/ 시험관내, 예컨대 중합효소 연쇄 반응(PCR)에 의해 증폭 2/ 클로닝에 의해 재조합적으로 생산; 3/ 예컨대 절단 및 겔-전기영동 분획(gel-electrophoretic fractionation)에 의한 정제, 또는 4/ 예컨대 화학적 합성에 의해 합성된 핵산을 의미한다. 분리된 핵산은 재조합 DNA 기술에 의해서 조작이 가능한 핵산이다.

[0052] 5' 번역 인핸서(5' Translation enhancer: TE)

[0053] 번역의 전사 후 조절은 번역 개시 단계에서 주로 조절된다. 개시 인자 복합체는 5' CAP 구조에 결합하고 리보솜 소단위를 모집한다. 이후 이러한 복합체는 mRNA를 따라서 적절한 환경에 있는 AUG 코돈을 만날 때 까지 스캐닝을 시작한다. 이러한 과정의 효율은 mRNA의 5' 및 3' UTR(UnTranslated Regions)내 다수의 구조적 특징에 의해서 조절될 수 있다. 이러한 특징은 5' UTR 내의 TOP(Terminal OligoPyrimidine tract) 영역, IRES(Internal Ribosome Entry Site) 및 상류 ORF's(Open Reading Frame)를 포함한다. 3' UTR CITE(Cap Independent Translation Enhancer) 모티프는 기술되어 있다. 폴리-A 테일의 길이 또한 번역 개시에 있어서 중요한 역할을 함이 밝혀졌다, 왜냐하면 PABP(Poly-A Binding Protein)이 폴리-A 테일 및 CAP 위치 상의 eIF4 복합체 모두에 결합하는 것이 필요하기 때문이다.

- [0054] IRES는 5'CAP 구조의 상호작용과 독립적으로 리보솜을 모집할 수 있는 모티프이다. 첫 번째 IRES 구성 요소는 피코르나바이러스(예컨대 EMCV, 뇌심근염바이러스)에서 기술되었다. 감염 동안 CAP 의존적 번역은 중단되고, 바이러스 단백질의 CAP 독립적 번역이 우세하게 일어난다. 몇몇의 진핵 IRES 서열은 최근 몇 년 동안 기술되어 왔다. 스트레스 환경에서 CAP 의존적 번역은 하향 조절되는 반면, 일부 필수적 유전자의 CAP 독립적 번역은 유지될 수 있다. 더욱 구체적으로, 예컨대 톨 유사 수용체 4 상의 LPS의 접합(ligation)에 의해서 활성화되는 수지상 세포는 또한 CAP 의존적 번역을 중단시키는 반면, 일부 유전자의 CAP 독립적 번역은 세포를 아포토시스로부터 보호한다.
- [0055] Hu Et al.에서는 마우스 Gtx 호메오도메인(homeodomain) 단백질을 암호화하는 mRNA의 5' 리더(leader) 내 서열이 연구되었다. 그들은 서열이 18S 리보솜 RNA 내의 서열에 상보적인 것으로 기술하였다. 그들은 이러한 모티프가 번역의 효율에 큰 영향을 준다는 것을 발견하였다(Hu et al., 1999).
- [0056] 이후, 이러한 모티프가 IRES의 역할을 함이 밝혀졌고 더 짧은 이러한 5'리더의 비중첩 부분(nonoverlapping segment)이 디시스트로닉(dicistronic) mRNA 내의 두 번째 시스트론(cistron)의 번역을 향상시킬 수 있음이 밝혀졌다. 이러한 부분 중 하나는 9 뉴클레오티드 길이를 가지며 이러한 IRES 모듈의 다수 카피(copy)가 함께 연결되는 경우, IRES의 활성은 매우 향상된다. 인간 베타 글로빈 5' UTR의 9n 절편에 의해서 나뉘는, 동일한 9n 부분의 중열 반복(tandem repeat)은, ORF의 전방에서, mRNA의 5'-말단에 위치하는 경우 모노시스트로닉 mRNA 내에서 전사 인핸서(TE)로 작용을 하는 것으로 나타났다.
- [0057] 따라서, 본 발명의 문맥 내에서, mRNA에 대한 번역 인핸서 역할을 하는 임의의 서열이 사용될 수 있고, 예를 들어 이러한 구성 요소는 본원 발명의 상기에 기술되어 있다. 특히, 번역 인핸서는 번역을 촉진하는 전사된 RNA 내의 서열이다. 하나의 가능한 작용 양식은 mRNA의 5' 말단과 리보솜의 결합을 통하여 촉진하는 것이다.
- [0058] 특정 실시예에서, 본 발명에 따른 벡터는, Gtx 리더 서열: CCGGCGGGT에서 유래한 야생형 9n 서열의 10x 중열 반복을 포함하는 RNA를 생산할 수 있다. 이러한 모티프는 인간 베타 글로빈: TTCTGACAT에서 유래한 9n 서열에 의하여 연결된다. 이러한 DNA 절편은 플라스미드 내에서 박테리오파지 프로모터 서열 및 ORF(개방 해독 서열) 사이에 클로닝될 수 있다.
- [0059] 특정 구현예에서, 본 발명에 따른 번역 인핸서는 서열번호 1과 80% 이상의 서열 상동성을 갖는다. 도 8에서 확인되는 바와 같이, 서열번호 2 및 3은 서열번호 1과 비교해서 80% 이상의 서열 상동성을 갖고, 따라서 본 발명과 관련하여 바람직하게 사용될 수 있다. 더욱 바람직하게, 본 발명에 따른 번역 인핸서는 서열번호 1과 85%, 86%, 87%, 88% 또는 89% 이상의 서열 상동성을 갖는다. 도 8에서 확인되는 바와 같이, 서열번호 2 및 3은 서열번호 1과 비교해서 85% 이상의 서열 상동성을 갖는다. 더욱 바람직하게, 본 발명에 따른 번역 인핸서는 서열번호 1과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상 또는 100%의 서열 상동성을 갖는다. 도 8에서 확인되는 바와 같이, 서열번호 3은 서열번호 1과 비교해서 90% 이상의 서열 상동성을 갖는다. 더욱 바람직하게, 번역 인핸서는 서열번호 1, 2 또는 3 중 어느 하나; 가장 바람직하게는 서열번호 1로 표시된다.
- [0060] **핵 잔류 서열(nuclear retention sequence)**
- [0061] 전사 후 유전적 조절 과정의 중요성은 최근 점점 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 과정 중, 상당한 주목을 받기 시작한 것은 mRNA 안정성의 조절이다. mRNA 분해가 유전자 발현에 중요한 영향을 주며 mRNA 붕괴 비율이 환경 및 발달 신호에 대한 반응으로 조절될 수 있다는 것이 점점 밝혀짐에 따라, 많은 연구 노력이 이러한 과정을 이해하는 것에 초점이 맞추어지고 있다. 지난 20년 동안 얻어진 뚜렷한 진전과 연구는 mRNA 분해의 많은 일반적인 특징들을 밝혀냈다.
- [0062] 세포 및 바이러스 mRNA는 모두 활발한 RNA 붕괴 경로를 겪게 된다. 바이러스는 그들의 mRNA를 숙주의 탈아데닐화 메커니즘으로부터 보호하기 위한 다른 방법들을 발달시켜 왔다. 카포시 육종 헤르페스 바이러스(KSHV)의 폴리-아데닐화된 비-번역된 RNA(PAN)는 감염된 세포의 핵 내에서 매우 풍부하다. 이러한 RNA는 탈아데닐화 및 분해에 저항성을 갖는다. PAN의 축적은 ENE(Expression and Nuclear retention Element)로 불리는, 3' 영역 내의 79 뉴클레오티드 RNA 구성 요소의 활성에 의존한다. ENE에 관한 첫 번째 문헌인 2005년에 출판된 Conrad et al.에 카포시 육종 바이러스 RNA 구성 요소가 핵에서 인트론이 없는 전사체(transcript)의 존재를 증가시키는 것이 기술되어있다(Conrad, 2005). ENE 절편은 폴리-A 테일과 상호작용하는 특이적 U-풍부 헤어핀 구조를 포함한다. 이처럼, 핵 내에서 RNA를 잔류시키는 결과를 야기하는 이차 구조가 얻어졌으며, 따라서 이는 핵 잔류 구성 요소(Nuclear Retention Element)로 불린다. 두 번째 효과는, U-풍부 헤어핀 구조와 mRNA의 폴리-A 꼬리의 상호작용이 숙주에 의한 분해로부터의 '보호(shielding)' 효과를 야기하는 것이고, 이는 면역요법 목적을 위한

mRNA의 생산에서 특히 관심 있는 특징이다.

- [0063] 폴리아데닐화된 핵(PAN) RNA(T1.1 또는 nut-1 RNA)로도 알려짐)는 중앙형성 감마헤르페스바이러스, 카포시 육종 헤르페스 바이러스(KSHV)에 의해서 생성된 IncRNA이다(Sun et al., 1996). PAN RNA는 용균 감염 동안 비정상적으로 높은 수준(~500,000 카피/세포)으로 축적되고 후기의 바이러스 단백질 및 감염성 바이러스의 생산에 필요하다(Sun et al., 1996). 발현 및 PAN RNA의 폴리아데닐화 위치의 ~120 nt 상류에 위치한, ENE(nuclear retention element)는 핵 내에서 이러한 많은 축적에 필수적이다(Conrad 및 Steitz, 2005). ENE는 탈아데닐화의 차단에 의해서 PAN RNA의 빠른 붕괴를 저해한다(Conrad et al., 2006). PAN RNA는 단백질을 발현시키지 못한다. 핵 잔류는 RNA가 세포질 내에서 번역 기구로부터 떨어지도록 유지하는 반면, 폴리-A 테일의 보호는 효율적인 번역에 필수적인 PABP(polyA binding protein)에 대한 결합을 저해한다. 따라서, 형질감염에서 이러한 서열의 이용은 명백하지 않다.
- [0064] KSHV ENE는, ENE의 기능적 중심(core)을 구성하는 인접 염기 쌍과 접합한, 비대칭적 내부 U-풍부 루프를 갖는, 스템-루프(stem-loop) 구조를 포함하는 79 nt 길이의 RNA 구성 요소이다. 올리고(A) 9에 결합한 ENE 중심의 결정 구조는 U-풍부 루프 및 올리고(A)9 사이에 형성된 5개의 보존된 U-A-U 염기 트리플렛(triplet)임이 밝혀졌고(Mitton-Fry et al., 2010), 이는 하부 스템의 3 개의 G-C 염기 쌍과 A-마이너(minor) 상호작용에 의해서 확장된다. 유전적 및 생화학적 분석은 생체내에서 PAN RNA의 폴리(A) 테일과 ENE 사이의 유사한 상호작용을 밝혔다(Mitton-Fry et al., 2010).
- [0065] 따라서, 본 발명에 문맥에서, mRNA에 대한 핵 잔류 구성 요소 역할을 하는 임의의 서열이 사용될 수 있고, 예컨대 이들은 본원에서 상기 기술된 구성 요소들이다. 특히, 핵 잔류 구성 요소는 mRNA를 세포질 붕괴로부터 보호할 수 있는 능력을 갖는 *cis* 작용 서열(*cis* acting sequence)이다.
- [0066] 특정 구현예에서, 핵 잔류 구성 요소는 또한 RNA 안정화 서열(RNA stabilizing sequence)의 역할을 한다.
- [0067] 특정 실시예에서, 핵 잔류 구성 요소는 발현 및 KSHV의 Nuclear retention Element이다. PAN(Poly Adenylated Non translated) RNA에서 분리된 79bp 서열은 RNA 생성 플라스미드 내의 A124 구간으로부터 상류에 위치한다. ENE는 폴리A 테일과 결합하는 U 풍부 루프를 형성하고 이것을 분해로부터 보호한다.
- [0068] 특정 구현예에서, 본 발명에 따른 핵 잔류 구성 요소는 서열번호 4로 표시된다.
- [0069] **본 발명의 벡터 내 추가적인 구성 요소**
- [0070] 추가적인 구현예에서, 본 발명의 핵산 벡터는, 박테리오파지 프로모터, 전사할 수 있는 핵산 서열 및 폴리-A 테일로 구성된 군으로부터 선택되는 추가적인 구성 요소를 더 포함할 수 있다.
- [0071] 메신저 RNA 또는 리보핵산(mRNA)는 4 뉴클레오티드(아데노신, 구아노신, 시티딘 및 우리딘 모노포스페이트)의 단일-사슬 폴리머로 구성된다. 5'-말단 변형 또는 5'CAP은 번역 개시 복합체에 의한 mRNA의 인식, 리보솜에 대한 mRNA의 적절한 부착, 또한 5' 엑소뉴클레아제(exonuclease)로부터의 보호에 필요하다. 이러한 변형은 첫 번째로 전사된 뉴클레오티드에 첨가되는 7-메틸구아노신 뉴클레오티드로 구성된다. 암호화 영역은 개시 코돈(일반적으로 AUG)에서 시작되고 종결 코돈(일반적으로 UAA, UAG 또는 UGA)에서 종결된다. 개시 코돈 전 및 종결 코돈 후, 성숙 mRNA는 5' UTR(untranslated region) 및 3UTR을 포함한다. 이러한 영역은 mRNA 안정성 또는 비안정성 및 번역 효율에 기여한다.
- [0072] 번역할 수 있는 핵산 서열, 구체적으로 펩티드 또는 단백질을 암호화하기 위한 핵산, 및 발현 조절 서열은, 그들이 전사할 수 있는 그리고 구체적으로 암호화하는 핵산이 발현 조절 서열의 조절 하에 있거나 이의 영향 하에 있는 방식으로 서로 공유적으로 연결되는 경우, 서로 "기능적으로"연결된다.
- [0073] 본원에 명시된 핵산, 구체적으로 전사할 수 있는 핵산 그리고 암호화 핵산은, 임의의 발현 조절 서열, 구체적으로는 프로모터와 조합될 수 있고, 이는 상기 핵산에 대해 상동(homologous) 또는 이종(heterologous)이며, 용어 "상동"은 핵산이 발현 조절 서열에 자연히 기능적으로 연결된 핵산이라는 점을 지칭하고, 용어 "이종"은 핵산이 발현 조절 서열에 자연히 기능적으로 연결되지 않은 점을 지칭한다.
- [0074] 용어 "발현 조절 서열(expression control sequence)"은 본 발명에 따른 프로모터, 리보솜-결합 서열 및 다른 조절 구성 요소를 포함하고, 이는 유전자의 전사 또는 유래된 RNA의 번역을 조절한다. 본 발명의 특정 구현예에서, 발현 조절 서열은 조절될 수 있다. 발현 조절 서열의 정확한 구조는 종 또는 세포 유형에 매우 의존적이지만 보통 각각 전사 및 번역의 개시에 각각 연관된 5'-비전사 및 5' 및 3'비번역 서열, 예컨대 TATA 박스, 캐핑(capping) 서열, CAAT 서열 등을 포함한다. 더욱 구체적으로, 5' 비전사된 발현 조절 서열은 기능적으로

연결된 유전자의 전사 조절을 위한 프로모터 서열을 포함하는 프로모터 영역을 포함한다. 발현 조절 서열은 또한 인핸서 서열 또는 상류 활성화 서열(upstream activator sequence)을 포함한다.

- [0075] 특정 구현예에서, 본 발명에 따라 핵산은 핵산의 관점에서 상동 또는 이종일 수 있는 발현 조절 서열에 기능적으로 연결된다.
- [0076] 용어 "프로모터(promoter)" 또는 "프로모터 영역(promoter region)"은 유전자의 암호화 서열의 상류(5') DNA 서열을 지칭하고, 이는 RNA 폴리머라제를 위한 인식 및 결합 부위를 제공함으로써 상기 암호화 서열의 발현을 조절한다. 프로모터 영역은 추가적으로 상기 유전자의 전사 조절과 연관된 추가적인 인자에 대한 인식 또는 결합 부위를 더 포함할 수 있다. 프로모터는 원핵 또는 진핵 유전자의 전사를 조절할 수 있다. 프로모터는 "유도성(inducible)"일 수 있고 유도 인자(inducer)에 반응하여 전사를 시작할 수 있고, 또는 전사가 유도 인자에 의해서 조절되지 않는 경우 "구조성(constitutive)"일 수 있다. 유도성 프로모터는 유도 인자가 존재하지 않는 경우, 매우 작은 범위로 발현되거나 전혀 발현되지 않을 수 있다. 유도 인자의 존재 하에, 유전자는 "켜짐(switched on)"이거나 전사의 수준이 증가된다. 이는 보통 특이적 전사 인자의 결합에 의해서 매개된다.
- [0077] 특정 구현예에서, 전사할 수 있는 핵산 서열은 CD40L(NM_000074), CD70(NM_001251), caTLR4(LAMP1(lysosome associated membrane protein)의 신호 펩티드가 앞에 있는, 유전자의 막통과 및 세포질 영역만을 포함하는, 절단된 형태의 인간 TLR4 유전자) 또는 항원/질환 특이적 mRNA를 암호화하는 mRNA로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0078] 본 발명에 따른 박테리오파지 프로모터는, RNA 전사를 위한 임의의 적절한 프로모터일 수 있고 바람직하게는 T7 프로모터, SP6 프로모터 및 T3 프로모터로 구성된 군으로부터 선택되고; 더욱 구체적으로는 T7 프로모터이다.
- [0079] 본 발명의 문맥에서 사용되는 폴리-A 테일은, 바람직하게는 약 100-150 아데노신, 더욱 구체적으로는 120-125 아데노신, 바람직하게는 약 124 아데노신으로 구성된다.
- [0080] 용어 "폴리아데닐 카세트(polyadenyl cassette)" 또는 "폴리-A 서열(poly-A sequence)"은 전형적으로 RNA 분자의 3' 말단에 위치한 아데닐 잔기의 서열을 지칭한다. 본 발명은 암호화 가닥에 대해 상보적인 가닥 내의 반복된 티미딜 잔기에 기반한 DNA 주형 방법에 의해서 RNA 전사 동안 부착되는 서열을 제공하는 반면, 상기 서열은 보통 DNA에서 암호화되지 않고 핵 내에서 전사 이후에 주형-비의존적 RNA 폴리머라제에 의해서 RNA의 자유 3' 말단에 부착된다. 본 발명에 따르면, 이러한 유형의 폴리(A) 서열은 20 이상, 바람직하게 40 이상, 바람직하게 80 이상, 바람직하게 100 이상 및 바람직하게 500까지, 바람직하게 400까지, 바람직하게 300까지, 바람직하게 200까지, 및 특히 150 까지의 연속 A 뉴클레오티드, 및 특히 약 120 연속 A 뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열을 의미하는 것으로 이해되고, 여기서 용어 "뉴클레오티드"는 아데닐 잔기를 지칭한다.
- [0081] 추가적으로 본 발명은 본 발명에 따른 핵산 벡터의 전사에 의해 얻을 수 있는 RNA 분자를 제공한다.
- [0082] 추가적인 태양에서, 본 발명은 시험관내(in vitro) 전사된 RNA의 안정성 및/또는 번역 효율을 증가시키는 방법으로,
- [0083] (i) 본 발명에 따른 벡터를 제공하는 단계, 여기서 상기 전사할 수 있는 핵산 서열은 전사되는 상기 RNA에 대응되는 것인, 전사할 수 있는 DNA 서열이고;
- [0084] (ii) 전사할 수 있는 DNA 서열을 시험관내에서 전사하는 단계;
- [0085] 를 포함하는 방법;
- [0086] 및 상기 방법에 의해서 얻을 수 있는 RNA 분자를 제공한다.
- [0087] 본 발명에 따르면, 용어 "전사(transcription)"는 "시험관내 전사(in vitro transcription)"를 포함하고 여기서 용어 "시험관내 전사"는 RNA, 특히 mRNA가 세포 없는 방식으로 시험관내에서 합성되는 방법에 관한 것이다. 바람직하게 전사체의 제조는 일반적으로 전사 벡터로 지칭되고 용어 "벡터"로 본원에 따라 포함되는 클로닝 벡터를 활용한다.
- [0088] 용어 "핵산 서열로부터 전사되는 핵산 서열"은 완전한 RNA 분자의 일부로서 적절한 경우의 RNA를 지칭하고, 이것은 후자인 핵산 서열의 전사 생성물이다.
- [0089] 용어 "일반적인 전사체를 만들기 위해 전사될 수 있는 핵산"은 상기 핵산이 적절한 선형화 예컨대 상기 핵산, 특히 폐쇄된 원형 핵산 분자를 포함하는 핵산 분자의 제한 효소 절단과 같은 선형화 후에 적절한 경우, 사이에

위치하는 서열에 의해서 적절하게 분리되는 경우에, 상기 핵산이 전사가 서로 공유적으로 연결된 상기 핵산의 전사체를 포함하는 RNA 분자를 야기하는 프로모터의 조절 하에 있는 방식으로 서로 기능적으로 연결된 것을 의미한다.

- [0090] 본 발명에 따르면, 용어 "발현(expression)"은 이의 가장 일반적인 의미로 사용되는 RNA 및/또는 단백질의 생성을 포함한다. 또한 핵산의 부분적 발현을 포함한다. 또한, 발현은 일시적이거나 안정적인 수 있다. RNA의 관점에서, 용어 "발현" 또는 "번역"은 특히 펩티드 또는 단백질의 생성을 지칭한다.
- [0091] 용어 "핵산 서열의 번역 효율 및/또는 안정성을 증가시키기 위해 활성인 핵산 서열"은 일반적인 전사체에서 첫 번째 핵산이 변형될 수 있고, 두 번째 핵산을 가지며, 상기 번역 효율 및/또는 안정성과 같은 방식으로 상기 첫 번째 핵산이 없는 상기 두 번째 핵산의 번역 효율 및/또는 안정성과 비교해서 상기 두 번째 핵산의 번역 효율 및/또는 안정성이 증가되는 것을 의미한다.
- [0092] 특정 구현예에서, 본 발명은 번역 인핸서(TE) 및 핵 잔류 구성 요소(ENE)를 포함하는 RNA 분자; 또는 하나 또는 그 이상의 상기 RNA 분자를 포함하는 조성물을 제공한다. 더욱 구체적으로, 본 발명은 서열번호 1과 80% 이상의 서열 상동성을 갖는 번역 인핸서(TE), 전사할 수 있는 핵산 서열, 및 서열번호 4로 표시되는 핵 잔류 서열을 포함하는 RNA 분자; 또는 상기 RNA 분자를 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0093] 상기 RNA 분자는 번역할 수 있는 핵산 서열, 및 폴리-A 테일을 포함하는 군으로부터 선택되는 하나 또는 그 이상의 구성 요소를 더 포함할 수 있고; 여기서 상기 번역할 수 있는 핵산 서열은 CD40L, CD70, caTLR4 또는 항원/질환 특이적 mRNA를 암호화하는 mRNA를 포함하는 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0094] 본 발명의 문맥에서, TE 구성 요소는 바람직하게 전사될 수 있는/번역될 수 있는 RNA 분자의 5' 말단에 위치하고 핵 잔류 서열(ENE)은 바람직하게 3' 말단에 위치한다.
- [0095] 본 발명에 따르면 "핵산의 3' 말단"은 자유 히드록시기를 갖는 말단을 지칭한다. 본 발명에 따르면 "핵산의 5' 말단"은 자유 인산기를 갖는 말단을 지칭한다.
- [0096] 본 발명의 문맥에서 "mRNA"는 "메신저 RNA(messenger RNA)"를 의미하고 주형으로 DNA를 사용하여 생산된 전사체 및 그 자체로 펩티드 또는 단백질을 암호화하는 전사체를 지칭한다. mRNA는 전형적으로 5' 비번역 영역, 단백질-암호화 영역 및 3' 비번역 영역을 포함한다. mRNA는 세포 내에서 제한된 반감기를 갖는다. 본 발명에 따르면, mRNA는 *시험관내* 전사에 의해서 DNA 주형으로부터 제조될 수 있다. 이는 본 발명에 따른 변형에 더하여 안정화 변형 및 캐핑(capping)에 의해서 추가적으로 변형될 수 있다.
- [0097] 특정 구현예에서, 본 발명에 따른 조성물은 CD40L, CD70 및 caTLR4를 암호화하는 mRNA 단독 또는 이들과 항원/질환 특이적 mRNA를 암호화하는 mRNA와의 조합을 포함한다.
- [0098] 본 발명에 따른 항원/질환 특이적 mRNA는 중앙 항원, 항원에서 유래한 병원체, 알레르겐(allergen)을 포함하는 비-제한적인 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0099] 추가적으로 본 발명은 RNA 분자(들) 및/또는 하나 또는 그 이상의 상기 RNA 분자를 포함하는 조성물(들)의 다수의 목적, 예컨대 숙주 세포에 *생체내* 또는 *시험관내* 도입; 또는 의약에 사용을 위한 용도를 제공한다.
- [0100] 또한 본 발명의 태양은 하나 또는 그 이상의 벡터; 하나 또는 그 이상의 RNA 분자 또는 본 발명에 따른 조성물을 포함하는 키트를 제공한다.
- [0101] 또한 본 발명은 본 발명에 따른 하나 또는 그 이상의 RNA 분자 또는 조성물을 이용한 이를 필요로 하는 환자의 치료 방법을 제공한다; 여기서, 상기 RNA 분자는 동시에 또는 간격을 두고 순차적으로 투여될 수 있다.
- [0102] 본 발명은 환자에게 투여되는 핵산, 구체적으로 RNA를 제공한다. 핵산은 생체외(ex vivo) 방법, 즉 환자로부터 세포를 제거하고, 상기 세포를 유전적으로 변형시키는 것(예컨대 형질감염에 의함) 및 변형된 세포를 환자에게 다시 도입함으로써 투여될 수 있다. 형질감염 및 형질도입 방법은 당업자에게 공지되어 있다. 또한 본 발명은 생체내 투여되는 핵산을 제공한다.
- [0103] 본 발명에 따르면, 용어 "형질감염(transfection)"은 하나 또는 그 이상의 핵산을 유기체 또는 숙주 세포로 도입하는 것을 지칭한다. 본 발명에 따라 핵산을 세포내로 *시험관내* 또는 *생체내* 도입하기 위해서 다양한 방법이 사용될 수 있다. 이러한 방법은 핵산-CaPO4 침전물의 형질감염, DEAE에 결합한 핵산의 형질감염, 관심 있는 핵산을 운반하는 바이러스로 감염하는 형질감염, 리포솜 매개된 형질감염 등을 포함한다. 특정 구현예에서, 특정 세포로 핵산을 직접 전달하는 것이 바람직하다. 이러한 구현예에서, 핵산을 세포로 투여하기 위해 사용되는 담

체(carrier) (예컨대 레트로바이러스 또는 리포솜)는 타겟 분자와 결합될 수 있다. 예를 들어, 분자 예컨대 타겟 세포 상의 표면 막 단백질에 특이적인 항체, 또는 타겟 세포 상의 수용체에 대한 리간드가 핵산 담체 내에 포함되거나 결합될 수 있다. 리포솜에 의한 핵산의 투여가 요구되는 경우, 엔도시토시스(endocytosis)와 연관된 표면 막에 결합한 단백질이 타겟화 및/또는 흡수를 가능하게 하기 위하여 리포솜 제제에 포함될 수 있다. 이러한 단백질은 특정 세포 유형에 특이적인 캡시드 단백질 또는 이의 절편, 내재화된 단백질에 대한 항체, 세포내 부위를 타겟하는 단백질 등을 포함한다.

- [0104] 본 발명에 따른 RNA 분자 또는 조성물은 임의의 적절한 투여 경로 예컨대 절내, 피내, 림프내 및 종양내 투여 경로에 의해서 이를 필요로 하는 환자에 투여될 수 있다. 또한, 예를 들어 암 환자를 치료할 경우, 본 발명에 따른 RNA 분자 또는 조성물의 투여는, 환자의 종양에서 유래한 종양 mRNA를 방출하는 방법, 예컨대 절제 또는 초음파천공법(sonoporation)과 조합하여 사용할 수 있다.
- [0105] 본 발명에 따르면, 표준 방법이 제조된 핵산의 제조, 세포 배양, 특정한 전기천공 및 리포펙션(lipofection)에 사용될 수 있다. 효소적 반응은 제조업자의 지시 또는 공지된 방법 자체에 따라 수행될 수 있다.
- [0106] 본 발명에 따르면, "핵산 서열로부터 유래한 핵산 서열"은, 그것이 유래한 핵산과 비교해서, 단일 또는 다수 뉴클레오티드 치환, 결실 및/또는 첨가를 포함하는 핵산을 지칭하고 바람직하게 이것은 이것이 유래한 핵산에 대해 상보적이다, 즉 상기 핵산 및 상기 핵산의 뉴클레오티드 서열 사이에 상당히 직접적 또는 상보적인 방식에 부합하여 특정한 정도의 상동성(homology)이 존재한다.
- [0107] 본 발명에 따르면, 핵산으로부터 유래한 핵산은 그것이 유래된 핵산의 기능적 특성을 갖는다. 이러한 기능적 특성은, 특히, RNA로 전사될 수 있는 핵산(전사될 수 있는 핵산 서열)에 대한 기능적 연결에서, 완전한 RNA 분자 내의 이러한 핵산으로부터 생성된 RNA의 안정성 및/또는 번역 효율을 증가시키는 능력을 포함한다.
- [0108] 두 서열이 서로 혼성화될 수 있고 안정한 듀플렉스(duplex)를 형성할 수 있는 경우 핵산은 또 다른 핵산에 대하여 "상보적(complementary)"이고, 상기 혼성화는 바람직하게 폴리뉴클레오티드 사이에 특이적 혼성화를 허용하는 조건(엄격한 조건) 하에서 수행된다. 엄격한 조건은 예를 들어 Molecular Cloning: A laboratory manual, J Sambrook et al.에 기술되어 있다.
- [0109] 본 발명에 따르면, 상보적인 핵산은, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 및 바람직하게는 95% 이상, 98% 이상 또는 99% 이상 동일한 뉴클레오티드를 갖는다.
- [0110] 본 발명에 따르면, 첫 번째 폴리뉴클레오티드 영역의 5' 말단이 두 번째 폴리뉴클레오티드 영역의 3' 말단에 가장 가까운 첫 번째 뉴클레오티드 영역의 일부인 경우 첫 번째 폴리뉴클레오티드 영역은 두 번째 폴리뉴클레오티드 영역의 하류에 위치하는 것으로 고려된다.
- [0111] 3' 비번역 영역은 전형적으로 번역 생성물에 대한 종결 코돈에서부터 보통 전사 과정 후에 부착되는 폴리-A 서열까지의 범위이다. 포유 동물 mRNA의 3'비번역 영역은 전형적으로 AAUAAA 핵사뉴클레오티드 서열로 알려진 상동 영역을 갖는다. 이 서열은 폴리-A 부착 신호인 것으로 추정되고 폴리-A 부착 부위의 10 내지 30 염기의 상류에 자주 위치한다.
- [0112] 3' 비번역 영역은, 엑소리보뉴클레아제에 대한 장벽으로서 역할을 하거나 RNA 안정성을 증가시키는 것으로 알려진 단백질(예컨대 RNA-결합 단백질)과 상호작용하는, 스템-루프 구조를 연도록 접힐 수 있는 하나 또는 그 이상의 역반복(inverted repeat)을 포함할 수 있다.
- [0113] 본 발명에 따르면, 5' 및/또는 3' 비번역 영역은, 이러한 영역이 상기 전사할 수 있는 핵산으로부터 전사되는 RNA의 안정성 및/또는 번역 효율이 증가하는 방식으로 핵산과 연관되도록 하기 위해서 전사할 수 있는, 특히 암호화하는 핵산에 기능적으로 연결될 수 있다.
- [0114] 본 발명에 따르면, 용어 "유전자(gene)"는 하나 또는 그 이상의 세포 생성물의 생성 및/또는 하나 또는 그 이상의 세포 생성물의 달성 및/또는 하나 또는 그 이상의 세포간 또는 세포내 기능의 달성에 책임이 있는 특정 핵산 서열을 지칭한다. 더욱 구체적으로, 상기 용어는, 특정 단백질 또는 기능적 또는 구조적 RNA 분자를 암호화하는 핵산을 포함하는, DNA 부분에 관한 것이다.
- [0115] 본 발명에 따르면, 용어 "숙주 세포(host cell)"는 외인성 핵산으로 형질전환 또는 형질감염될 수 있는 임의의 세포를 지칭한다. 본 발명에 따르면 용어 "숙주 세포"는 원핵 세포(예컨대 E.coli) 또는 진핵 세포(예컨대 효모 세포 및 곤충 세포)를 포함한다. 포유류 세포 예컨대 인간, 마우스, 햄스터, 돼지, 염소, 및 영장류에서 유래한 세포가 특히 바람직하다. 세포는 다수의 조직 유형으로부터 유래될 수 있고 단일 세포(primary cell) 및 세포주

를 포함한다. 특정 실시예는 케라티노사이트(keratinocyte), 말초 혈액 백혈구(peripheral blood leukocytes), 골수 줄기 세포(bone marrow stem cells) 및 배아 줄기 세포(embryonic stem cells)를 포함한다. 다른 구현예에서, 숙주 세포는 항원-제시 세포, 특히 수지상세포, 단핵구 또는 마크로파지이다. 핵산은 숙주 세포에 단일 또는 몇몇의 카피로 존재할 수 있고, 일 구현예에서는 숙주 세포 내에서 발현된다.

[0116] 본 발명에 따르면, 핵산에 의해서 암호화되는 펩티드 또는 단백질은 세포질 내, 핵 내, 막 내, 세포소기관 내 또는 분비된 형태 내에 위치하는 펩티드 또는 단백질일 수 있다. 그들은 구조 단백질(structural proteins), 조절 단백질(regulatory proteins), 호르몬, 신경전달물질(neurotransmitters), 성장-조절 인자(growth-regulating factors), 분화 인자(differentiation factors), 유전자 발현 조절 인자(gene expression regulating factors), DNA에 결합된 단백질(DNA-associated proteins), 효소, 혈청 단백질, 수용체, 의약품(medicaments), 면역조절자(immunomodulators), 종양 유전자(oncogenes), 독소(toxins), 종양 항원(tumor antigens) 또는 항원을 포함한다. 상기 펩타이드 또는 단백질은 그들의 생물학적 활성을 향상, 저해, 조절 또는 제거하기 위한 자연적으로 발생한 서열 또는 돌연변이 서열을 가질 수 있다.

[0117] 용어 "펩티드(peptide)"는 펩티드 결합을 통해서 서로 연결된 2 또는 그 이상, 바람직하게는 3 또는 그 이상, 바람직하게는 4 또는 그 이상, 바람직하게는 6 또는 그 이상, 바람직하게는 8 또는 그 이상, 바람직하게는 10 또는 그 이상, 바람직하게는 13 또는 그 이상, 바람직하게는 16 또는 그 이상, 바람직하게는 100 또는 바람직하게는 150의 연속된 아미노산을 포함하는 물질을 지칭한다. 용어 "단백질(protein)"은 큰 펩티드, 바람직하게는 151 아미노산 이상을 갖는 펩티드를 지칭하지만, 용어 "펩티드" 및 "단백질"은 본원에서 보통 동의어로 사용된다. 본 발명에 따르면 용어 "펩티드" 및 "단백질"은 아미노산 성분 뿐만 아니라 비-아미노산 성분 예컨대 당 및 인산 구조를 포함하는 물질이고, 또한 에스터 결합, 티오에스터 결합 또는 다이설파이드 결합을 포함하는 물질을 포함한다.

[0118] "레포터(reporter)"는, 레포터 유전자에 의해서 암호화되고 레포터 분석법에서 측정되는, 전형적으로는 펩티드 또는 단백질인, 분자에 관한 것이다. 관습적인 시스템은 보통 효소적 레포터를 사용하고 상기 레포터의 활성을 측정한다.

[0119] 본 발명에 따르면, 그들이 직접적으로 서로 인접하는 경우, 두 구성 요소, 예컨대 뉴클레오티드 또는 아미노산은 임의의 중단 없이 연속된다.

[0120] "제한 엔도뉴클레아제(restriction endonucleases)" 또는 "제한 효소(restriction enzymes)"는 특정 염기 서열 내에서 DNA 분자의 두 가닥에 있는 인산디에스터(phosphodiester) 결합을 절단하는 효소의 분류를 지칭한다. 그들은 이중 가닥 DNA 분자 상의 인식 서열로 지칭되는 특정 결합 부위를 인식한다. 상기 인산디에스터 결합이 상기 효소에 의해서 절단되는 DNA 내의 부위가 절단 부위로 지칭된다. IIS 효소의 경우에, 절단 부위는 DNA 결합 부위를 형성하는 정해진 거리에 위치한다.

[0121] **적용 영역**

[0122] 본 발명의 적용 영역은 백신 접종, 즉 접종을 위한 변형된 mRNA의 사용 또는 접종 시약으로서 변형된 mRNA를 포함하는 약학적 조성물의 사용, 또는 접종 목적을 위한 약학적 조성물의 제조에서 변형된 mRNA의 사용이다. 백신 접종은 항원을 유기체 또는 개체, 특히 유기체 또는 개체의 세포로 도입하는 것에 기초한다. 본 발명의 문맥에서, 항원을 암호화하는 유전 정보가 항원을 암호화하는 변형된 mRNA 및/또는 상이한 TriMix mRNA 가닥의 형태로 유기체 또는 개체에 도입된다. 약학적 조성물에 포함된 변형된 '항원' mRNA는 항원으로 번역된다, 즉 변형된 mRNA에 의해서 암호화되는 폴리펩티드 또는 항원 펩티드가 발현되고 폴리펩티드 또는 항원 펩티드에 직접적으로 대항하는 면역 반응이 자극된다. 병원성 유기체, 예컨대 바이러스, 박테리아, 또는 원생동물에 대한 백신 접종을 위해서, 이러한 유기체의 표면 항원이 유도된 면역 반응에 대한 항원으로 사용될 수 있다. 본 발명의 문맥에서, 이러한 표면 항원을 암호화하는 변형된 mRNA를 포함하는 약학적 조성물이 백신으로 사용될 수 있다. 유전적 백신(genetic vaccine)이 암을 치료하기 위해 사용되는 적용에서, 면역 반응은 종양 항원(들), 특히 암 세포 상에서 독점적으로 발현되는 단백질을 암호화하는 변형된 mRNA의 발생에 의해서 종양 항원에 직접적으로 대항한다. 종양 항원을 암호화하는 이러한 변형된 mRNA는 단독으로 또는 본 발명에 따른 약학적 조성물의 성분으로 사용될 수 있고 여기서 변형된 mRNA 또는 이의 조성물 중 하나의 투여가 유기체 내에서 암 항원(들)의 발현을 야기한다. 따라서 이러한 백신에 대한 면역 반응은 접종 개체에 면역화한 암 항원과 연관된 암에 대한 보호적 면역 정도를 부여한다. 대안적으로, 이러한 방법은 암호화된 항원을 발현하는 임의의 암 세포를 공격하기 위해 암 환자의 면역 반응을 자극하도록 환자의 암 세포에 발현되는 종양 항원(들)을 암호화하는 변형된 mRNA를 암 환자에 백신 접종하는데 사용할 수 있다.

[0123] 예를 들어 본 발명의 약학적 조성물이 사용되는 유전자 치료 적용에 있어서, 그 안에 변형된 mRNA는 치료될 환자에서 형성되지 않거나 단지 충분하지 않게 또는 결핍되어 형성되는 하나 이상의 생물학적 활성 펩티드 또는 폴리펩티드를 암호화한다. 하나 이상의 생물학적으로 활성인 펩티드 또는 폴리펩티드를 암호화하는 변형된 mRNA 또는 이의 조성물의 이런 환자에 대한 투여는, 따라서, 환자에서 하나 이상의 생물학적으로 활성인 펩티드 또는 폴리펩티드의 발현 및/또는 활성을 적어도 부분적으로 회복시키고 그렇게 함으로써 환자의 유전적 결함을 보완한다. 살아있는 동물에 정상인 기능적 유전자의 직접적인 도입은 결함이 있는 유전 정보를 교정하기 위한 방법으로서 연구되어 왔다. 이러한 연구에서, 핵산 서열은 살아있는 동물의 세포 내로 직접 도입된다. 따라서, 본 발명의 변형된 mRNA에 의해서 암호화되는 폴리펩티드의 예는, 이에 제한되는 것은 아니나, 디스트로핀, 낭포성 섬유증에서 결함 변형된 염소 채널, 대사 장애 예컨대 페닐케톤뇨증(phenylketonuria), 갈락토오스혈증(galactosaemia), 호모시스틴뇨증(homocystinuria), 아데노신 데아미나아제 결손증(adenosine deaminase deficiency) 등에서 부족 또는 결핍된 효소; 및 신경전달물질 예컨대 도파민, 노르에피네프린 및 GABA, 특히 티로신 가수분해효소 및 DOPA 탈탄산 효소(decarboxylase), 및 알파-1-안티트립신 등의 합성에 관여하는 효소를 포함한다. 본 발명의 약학적 조성물은 또한 그 안에 포함된 이러한 생물학적으로 활성인 단백질 또는 펩티드를 암호화하는 변형된 mRNA의 세포 표면 수용체 및/또는 세포 표면 수용체의 결함 파트너의 발현에 영향을 주는데 사용될 수 있다. 세포 외부적 방식인 이러한 단백질 또는 세포 표면 수용체에 결합한 단백질의 예는, 예를 들어 조직 플라스미노겐 활성화제(TPA), 성장 호르몬, 인슐린, 인터페론, 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자(GM-CSF) 및 에리스로포이에틴(EPO) 등을 포함한다.

[0124] 적절한 성장 인자의 선택에 의해서, 본 발명의 약학적 조성물은 예를 들어 조직 재형성 또는 줄기 세포와 상호 작용을 위해 사용될 수 있다. 이러한 방식으로 예를 들어 조직 퇴행에 의해서 특징지어지는 질환, 이 중에서 신경 퇴행성 질환 예컨대 알츠하이머 병, 파킨슨 병 등 및 다른 퇴행성 병태, 예컨대 관절증이 치료될 수 있다. 이러한 유형에서 변형된 mRNA, 특히 본 발명의 조성물에 포함된 변형된 mRNA는, 바람직하게는 제한 없이, TGF-베타 패밀리를 구성요소, 신경성장 인자(neurotropic factor) 예컨대 NGF, 신경영양인자(neurotrophin) 등을 암호화한다.

[0125] **치료 방법**

[0126] 따라서 추가적으로 본 발명은 암, 알러지 및 감염성 질환 예컨대 박테리아, 바이러스 또는 곰팡이 감염 예컨대 HIV 감염 또는 간염을 포함하는 비제한적인 군으로부터 선택되는 하나 이상의 질환 또는 질병의 예방 및/또는 치료 방법을 제공한다.

[0127] 본 명세서에서 사용되는 용어 "암(cancer)" 및/또는 "종양(tumor)"을 예시로 한 암 또는 종양의 유형으로 제한하려는 의도가 없다. 따라서 용어는 모든 증식하는 질병 예컨대 신생물(neoplasma), 형성이상(dysplasia), 전암 병변(premalignant lesion) 또는 전암성병변(precancerous lesions), 비정상 세포 성장(abnormal cell growths), 양성 종양(benign tumors), 악성 종양(malignant tumors), 암 또는 전이(metastasis)를 포함하고, 여기서 암은 백혈병, 비소세포폐암, 소세포폐암, CNS 암, 흑색종, 난소암, 신장암, 전립선암, 유방암, 신경교종(glioma), 대장암, 방광암, 육종, 췌장암, 직장암, 두경부암, 간암, 골암, 골수암, 위암, 십이지장암, 식도암, 갑상선암, 혈액암, 및 림프종:으로 구성되는 군으로부터 선택된다. 암 특이적 항원은 예컨대 MelanA/MART1, 암 생식 계열 항원, gp100, 티로시나제, CEA, PSA, Her-1/neu, 서바이빈(survivin), 텔로머라제일 수 있다.

[0128] 본 명세서에서 사용되는 용어 "감염성 질환" 또는 "감염"을 본원에 예시로 한 감염의 유형으로 제한하려는 의도가 없다. 따라서 용어는 백신 접종이 개체에 유익한 모든 감염성 인자를 포함한다. 비제한적인 예시는 하기의 바이러스에 의해 야기된 감염 또는 질병이다: 후천성면역결핍증(Acquired Immunodeficiency Syndrome) - 아데노바이러스과 감염(Adenoviridae Infections) - 알파바이러스 감염(Alphavirus Infections) - 아르보바이러스 감염(Arbovirus Infections) - 벨 마비(Bell Palsy) - 보르나병(Borna Disease) - 부니아바이러스과 감염(Bunyaviridae Infections) - 칼리시비리과 감염(Caliciviridae Infections) - 수두(Chickenpox) - 보통 감기(Common Cold) - 콘딜로마 아쿠미나타(Condyloma Acuminata) - 코로나바이러스과 감염(Coronaviridae Infections) - 콕사키바이러스 감염(Coxsackievirus Infections) - 사이토메갈로바이러스 감염(Cytomegalovirus Infections) - 뎅기열(Dengue) - DNA 바이러스 감염(DNA Virus Infections) - 전염성 농창(Contagious Ecthyma) - 뇌염(Encephalitis) - 뇌염, 아르보바이러스 - 뇌염, 단순 헤르페스(Herpes Simplex) - 엡스타인-바 바이러스 감염(Epstein-Barr Virus Infections) - 홍반 감염(Erythema Infectiosum) - 돌발성 발진(Exanthema Subitum) - 피로 증후군, 만성(Fatigue Syndrome, Chronic) - 한타바이러스 감염(Hantavirus Infections) - 출혈열, 바이러스성(Hemorrhagic Fevers, Viral) - 간염, 바이러스성, 인간(Hepatitis, Viral, Human) - 입술 헤르페스(Herpes Labialis) - 단순 헤르페스(Herpes Simplex) - 대상포진(Herpes Zoster) - 이

대상포진(Herpes Zoster Oticus) - 헤르페스바이러스과 감염(Herpesviridae Infections) - HIV 감염(HIV Infections) - 감염성 단핵구증(Infectious Mononucleosis) - 조류 인플루엔자(Influenza in Birds) - 인플루엔자, 인간 - 라사열(Lassa Fever) - 홍역(Measles) - 수막염, 바이러스성(Meningitis, Viral) - 전염성 연속증(Molluscum Contagiosum) - 원두(Monkeypox) - 볼거리(Mumps) - 척수염(Myelitis) - 유두종바이러스 감염(Papillomavirus Infections) - 파라믹소바이러스과 감염(Paramyxoviridae Infections) - 과파타치열(Phlebotomus Fever) - 급성 회백수염(Poliomyelitis) - 폴리오마바이러스 감염(Polyomavirus Infections) - 급성 회백수염 후 증후군(Postpoliomyelitis Syndrome) - 광견병(Rabies) - RS 바이러스 감염(Respiratory Syncytial Virus Infections) - 리프트밸리열(Rift Valley Fever) - RNA 바이러스 감염(RNA Virus Infections) - 풍진(Rubella) - 중증급성호흡기증후군(Severe Acute Respiratory Syndrome) - 지연성 바이러스성 질환(Slow Virus Diseases) - 천연두(Smallpox) - 아급성 경화성 범뇌염(Subacute Sclerosing Panencephalitis) - 진드기 질환(Tick-Borne Diseases) - 종양 바이러스 감염(Tumor Virus Infections) - 혹(Warts) - 서부 나일강 열(West Nile Fever) - 바이러스성 질환(Virus Diseases) - 황열병(Yellow Fever) - 인축공통전염병(Zoonoses) 등. 바이러스 특이적 항원은 HIV-gag, -tat, -rev 또는 -nef, 또는 C형 간염 항원일 수 있다.

[0129]

추가적으로 비제한적인 예시는 하기의 박테리아- 또는 곰팡이에서 야기된 감염 또는 질병이다: 농양(Abscess) - 방성균증(Actinomycosis) - 아나플라즈마증(Anaplasmosis) - 탄저병(Anthrax) - 반응성 관절염(Arthritis, Reactive) - 아스페르길루스증(Aspergillosis) - 균혈증(Bacteremia) - 박테리아성 감염 및 진균증 - 바르토넬라 감염(Bartonella Infections) - 보툴리눔 식중독(Botulism) - 뇌농양(Brain Abscess) - 브루셀라병(Brucellosis) - 부르크홀데리아 감염(Burkholderia Infections) - 캄필로박터 감염(Campylobacter Infections) - 칸디다증(Candidiasis) - 외음부질 칸디다증(Candidiasis, Vulvovaginal) - 고양이 찰과상 감염증(Cat-Scratch Disease) - 봉와직염(Cellulitis) - 중추신경계 감염(Central Nervous System Infections) - 연성 하감(Chancroid) - 클라미디아 감염(Chlamydia Infections) - 클라미디아세아에 감염(Chlamydiaceae Infections) - 콜레라(Cholera) - 클로스트리듐 감염(Clostridium Infections) - 콕시디오미테스 진균증(Coccidioidomycosis) - 각막 궤양(Corneal Ulcer) - 교차 감염(Cross Infection) - 효모균증(Cryptococcosis) - 피부진균증(Dermatomycoses) - 디프테리아(Diphtheria) - 엘리히증(Ehrlichiosis) - 고름가슴증(Empyema, Pleural) - 세균성 심내막염(Endocarditis, Bacterial) - 내안구염(Endophthalmitis) - 전장염(Enterocolitis), 가막성(Pseudomembranous) - 단독(Erysipelas) - 대장균 감염(Escherichia coli Infections) - 괴사성 근막염(Fasciitis, Necrotizing) - 푸르니에 괴저(Fournier Gangrene) - 질종증(Furunculosis) - 푸소박테륨 감염(Fusobacterium Infections) - 가스 괴저(Gas Gangrene) - 임질(Gonorrhea) - 그람-음성 세균 감염(Gram-Negative Bacterial Infections) - 그람-양성 세균 감염(Gram-Positive Bacterial Infections) - 서혜부 육아종(Granuloma Inguinale) - 화농성한선염(Hidradenitis Suppurativa) - 히스토플라스마증(Histoplasmosis) - 다래끼(Hordeolum) - 농가진(Impetigo) - 클렙시엘라감염증(Klebsiella Infections) - 레기오넬라증 (Legionellosis) - 나병(Leprosy) - 렙토스피라병(Leptospirosis) - 리스테리아 감염(Listeria Infections) - 루드비히의 협심증(Ludwig's Angina) - 폐 농양 - 라임 병 - 서혜 림프 육아종(Lymphogranuloma Venereum) - 마두라진균증(Maduremycosis) - 멜리오이도시스 (Melioidosis) - 박테리아성 수막염(Meningitis, Bacterial) - 진균 감염(Mycobacterium Infections) - 마이코 플라즈마 감염 - 진균증(Mycoses) - 노카르디아 감염(Nocardia Infections) - 손발톱 진균증(Onychomycosis) - 골수염 - 손톱 주위염(Paronychia) - 골반 염증성 질환(Pelvic Inflammatory Disease) - 전염병(Plague) - 폐렴 구균 감염(Pneumococcal Infections) - 슈도모나스 감염 - 앵무새병(Psittacosis) - 산욕기 감염(Puerperal Infection) - Q열(Q Fever) - 서교열(Rat-Bite Fever) - 회귀열(Relapsing Fever) - 호흡기 감염 - 인후 농양(Retropharyngeal Abscess) - 류마티스성 열(Rheumatic Fever) - 비경화증(Rhinoscleroma) - 리케차 감염(Rickettsia Infections) - 로키산 홍반열(Rocky Mountain Spotted Fever) - 살모넬라 감염(Salmonella Infections) - 성홍열(Scarlet Fever) - 털진드기병(Scrub Typhus) - 패혈증(Sepsis) - 박테리아성 성병(Sexually Transmitted Diseases, Bacterial) - 박테리아성 성병(Sexually Transmitted Diseases, Bacterial) - 패혈증성 쇼크(Shock, Septic) - 박테리아성 피부 질환(Skin Diseases, Bacterial) - 감염성 피부 질환(Skin Diseases, Infectious) - 포도상구균 감염(Staphylococcal Infections) - 연쇄상 구균 감염(Streptococcal Infections) - 매독(Syphilis) - 선천성매독(Syphilis, Congenital) - 파상풍(Tetanus) - 진드기 질환(Tick-Borne Diseases) - 백선(Tinea) - 진풍(Tinea Versicolor) - 트라코마(Trachoma) - 결핵(Tuberculosis) - 척추결핵(Tuberculosis, Spinal) - 야토병(Tularemia) - 장티푸스(Typhoid Fever) - 유행성 이에 의한 발진티푸스(Typhus, Epidemic Louse-Borne) - 요로감염증(Urinary Tract Infections) - 위플병(Whipple Disease) - 백일해(Whooping Cough) - 비브리오 감염(Vibrio Infections) - 매종(Yaws) - 예르시니아 감염(Yersinia

Infections) - 인축공통전염병(Zoonoses) - 접합균증(Zygomycosis) - 등.

- [0130] 본원에 사용된 바와 같이 그리고 달리 명시되지 않으면, 용어 "용매 화합물(solvate)"은 본 발명의 RNA 분자(들)와 적절한 무기 용매(예컨대 수화물) 또는 유기 용매, 예컨대 이에 제한되는 것은 아니나 주사용수, 하트만액(hartmann's solution), PBS, 0.9% NaCl, 무혈청 배양 배지에 의해서 형성될 수 있는 임의의 조합을 포함한다.
- [0131] 일반적으로, 약학적 용도를 위해서, 본 발명의 RNA 분자(들)은 본 발명의 하나 이상의 RNA 분자 및 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 담체, 희석제 또는 부형제 및/또는 아주벤트, 및 선택적으로 하나 또는 그 이상의 약학적으로 활성인 생성물을 더 포함하는 약학적 제제 또는 약학적 조성물로 제형화될 수 있다.
- [0132] 비제한적인 예시의 의미에 의해서, 이러한 제형은 경구 투여용, 비경구 투여용(예컨대 림프내, 종양내, 정맥내, 근육내 또는 피하 주사 또는 정맥내 주입에 의함), 국부 투여용(각막을 포함), 흡입, 피부 패치, 이식(implant), 좌약 등에 의한 투여용에 적절한 형태일 수 있다. 이러한 적절한 투여 형태는 - 투여 방식에 의존하여 고체, 반-고체 또는 액체일 수 있다 - 또한 방법 및 이의 제조에 사용하기 위한 담체, 희석제 및 부형제는, 당업자에게 명백할 것이다; 참고 문헌은 예를 들어 US-A-6,372,778, US-A-6,369,086, US-A-6,369,087 및 US-A-6,372,733, 또한 표준 핸드북 예컨대 Remington' Pharmaceutical Sciences의 가장 최신 판이다.
- [0133] 일부의 바람직한, 그러나 비제한적인 이러한 제제의 예시는 약의 일회분 용량으로서의 투여 및/또는 지속적 투여를 위한 정제, 알약, 산제, 마름포플 캔디(lozenges), 봉지(sachets), 카시에(cachets), 엘릭서제(elixirs), 현탁액, 에멀전, 용액, 시럽, 에어로졸, 연고, 크림, 로션, 연질 및 경질 젤라틴 캡슐, 좌약, 점안액, 멸균 주입용 용액 및 멸균 포장된 산제(보통 사용 전 녹인다)를 포함하고, 그 자체로 이러한 제형에 적합한, 담체, 부형제, 및 희석제, 예컨대 락토오스, 텍스트로스, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 전분, 아라비아 고무, 인산칼슘, 알긴산염, 트라가칸트(tragacanth), 젤라틴, 규산칼슘, 마이크로결정 셀룰로오스, 폴리비닐피롤리돈, 폴리 에틸렌 글리콜, 셀룰로오스, (멸균)수, 메틸셀룰로오스, 메틸- 및 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아린산 마그네슘, 식용유, 식물성 오일 및 미네랄 오일 또는 이의 적절한 혼합물과 함께 제형화할 수 있다. 제형은 선택적으로 다른 약학적으로 활성인 물질(본 발명의 생성물과 시너지 효과를 유도할 수 있거나 유도하지 않을 수 있다) 및 약학적 제형에 보통 사용되는 다른 물질, 예컨대 운환제, 습윤제, 유화제 및 서스펜션화제, 분산제, 붕괴제, 증량제, 필러, 보존제, 감미제, 방향제, 유량 조절기, 방출제 등을 포함한다. 또한 조성물은 예를 들어 리포솜 또는 천연 겔 또는 합성 폴리머에 기반한 친수성 폴리머 매트릭스를 사용하여 여기에 포함된 활성 생성물(들)의 빠른, 지속된 또는 지연된 방출을 제공하기 위해서 제형화될 수 있다. 본 발명에 따른 약학적 조성물의 생성물의 용해도 및/또는 안정성을 향상시키기 위해서, α -, β - 또는 γ -시클로덱스트린 또는 이의 유도체를 이용하는 것이 유익하다.
- [0134] 더욱 구체적으로, 조성물은 본 발명의 생성물의 고체 분산 및 하나 또는 그 이상의 약학적으로 허용가능한 수용성 폴리머로 구성된 입자의 치료적 유효량을 포함하는 약학적 제형으로 제형화될 수 있다.
- [0135] 용어 "고체 분산(solid dispersion)"은 2 이상의 구성 요소를 포함하는 고체 상태(액체 또는 가스 상태와는 대조적임) 내의 시스템을 정의하고, 여기서 하나의 구성 요소는 다른 구성 요소 또는 구성 요소 전체에 거의 고르게 분산된 상태이다. 상기 구성 요소의 분산이 전체에 걸쳐 화학적 및 물리적으로 균일 또는 균질이거나 열역학에 정의된 바에 따라 하나의 상으로 구성되는 시스템인 경우, 이러한 고체 분산은 "고체 용액(solid solution)"으로 지칭된다. 고체 용액의 구성요소는 그들이 투여되는 유기체에 대해 보통 용이한 생체 이용가능성이 있기 때문에, 고체 용액은 바람직한 물리적 시스템이다.
- [0136] 추가적으로 생성물을 1000nm 이하의 효과적인 평균 입자 크기를 유지하기에 충분한 양으로 이의 표면에 흡수된 표면 변형제(modifier)를 갖는 나노입자의 형태로 제형화하는 것이 용이할 수 있다. 적절한 표면 변형제는 바람직하게 공지된 유기 및 무기 약학적 부형제로부터 선택될 수 있다. 이러한 부형제는 다양한 폴리머, 저분자량의 올리고머, 천연물 및 계면활성제를 포함한다. 바람직하게 표면 변형제는 비이온성 및 이온성 계면활성제를 포함한다.
- [0137] 본 발명에 따른 생성물을 제형화하는 또 다른 흥미로운 방식은 생성물이 친수성 폴리머에 포함되고 이러한 혼합물을 다수의 작은 비드를 덮는 코팅 필름으로 적용하고, 따라서 좋은 생체이용가능성을 갖는 조성물을 생산하는 약학적 조성물을 포함하고, 이는 제조하기가 용이할 수 있고 경구 투여용 약학적 용량 형태를 제조하기에 적합하다. 비드에서 코어로 사용하기 적합한 원료는 다양하며, 상기 원료는 약학적으로 허용 가능하다. 이러한 원료의 예는 폴리머, 무기 물질, 유기 물질, 및 단당류 및 이의 유도체이다.

- [0138] 제제는 그 자체로 공지된 방식으로 제조될 수 있고, 보통 본 발명에 따른 하나 이상의 생성물과 하나 또는 그 이상의 약학적으로 허용가능한 담체의 혼합, 및 무균 상태 하에 필요한 경우, 다른 약학적 활성 생성물과의 조합을 포함한다. 참고 문헌은 예를 들어 US-A-6,372,778, US-A-6,369,086, US-A-6,369,087 및 US-A-6,372,733 및 추가적으로 상기 언급된 공지 기술, 및 표준 핸드북 예컨대 Remington' Pharmaceutical Sciences의 가장 최신판이다.
- [0139] 본 발명의 약학적 제제는 바람직하게 단위 용량 형태이며, 적절하게 포장될 수 있고 예를 들어 박스, 블리스터, 바이알, 병, 봉지, 앰플 또는 임의의 다른 적절한 단일-용량 또는 멀티-용량 지지체(holder) 또는 용기(적절하게 표시될 수 있다) 내에 포장될 수 있고; 선택적으로 제품 정보 및/또는 사용을 위한 지침을 포함하는 하나 또는 그 이상의 전단(leaflet)과 함께 포장될 수 있다. 일반적으로, 이러한 단위 용량은 0.1 내지 1000 mg을 포함한다.
- [0140] 생성물은 주요하게는 사용된 특정 제제 및 치료 또는 예방될 병태에 의존하여, 림프내, 중앙내, 경구, 직장, 안구, 경피, 피하, 정맥내, 근육내 또는 비강내 투여를 포함하는 다양한 경로에 의해서 투여될 수 있다. 본 발명의 하나 이상의 생성물은 일반적으로 "유효량(effective amount)"으로 투여될 수 있고, 이는 적절한 투여에서, 투여되는 개인에 있어 필요한 약학적 또는 예방적 효과를 성취하기에 충분한, 임의의 양의 생성물을 의미한다. 보통, 예방 또는 치료될 병태 및 투여의 경로에 의존하여, 이러한 유효량은 보통 하루 당 환자의 체중 kg당 0.01 내지 1000 mg이며, 단일 일일 용량으로, 하나 또는 그 이상으로 분리된 일일 용량으로, 또는 필수적으로 지속적으로, 예컨대 점적 주입의 사용으로 투여될 수 있다. 투여되는 양(들), 투여 경로 및 추가적인 치료 요법은 치료중인 임상상에 의해서, 나이, 성 및 환자의 일반적 병태 및 특징 및 치료될 질환/증상의 정도와 같은 요인에 의존하여 결정될 수 있다. 참고 문헌은 예를 들어 US-A-6,372,778, US-A-6,369,086, US-A-6,369,087 및 US-A-6,372,733 및 추가적으로 상기 언급된 공지 기술, 및 표준 핸드북 예컨대 Remington' Pharmaceutical Sciences의 가장 최신판이다.
- [0141] 본 발명의 방법에 따라, 상기 약학적 조성물은 치료 과정 동안 다른 시간에 분리하여 또는 분리되거나 단일 조합 형태로 동시에 투여될 수 있다. 따라서 본 발명은 이러한 동시 또는 교대 치료의 요법을 포함하는 것으로서 이해되고 용어 "투여"는 이에 따라 이해된다.
- [0142] 경구 투여 형태를 위해서, 본 발명의 조성물은 적절한 첨가제, 예컨대 부형제, 안정화제, 또는 비활성 희석제와 혼합될 수 있고, 관습적인 방법의 방식에 의해서 적절한 투여 형태, 예컨대 정제, 코팅 정제, 경질 캡슐, 수성, 알코올성, 또는 유성 용액으로 제공된다. 적절한 비활성 담체의 예는 아라비아 고무, 마그네시아, 탄산마그네슘, 인산포타슘, 락토오스, 글루코오스, 또는 전분, 특히 옥수수 전분이다. 이러한 경우에, 제제는 건조 또는 습성 과립으로서 전달될 수 있다. 적절한 유성 부형제 또는 용매는 식물성 또는 동물성 오일, 예컨대 해바라기씨 오일 또는 대구 간유이다. 수성 또는 알코올성 용매를 위한 적절한 용매는 물, 에탄올, 당액, 또는 이의 혼합물이다. 또한 폴리에틸렌 글리콜 및 폴리프로필렌 글리콜은 다른 투여 형태를 위한 추가적 보조제로서 유용하다. 즉시 방출 정제로서, 이러한 조성물은 당업계에 공지된 마이크로결정 셀룰로오스, 인산 이칼슘, 전분, 스테아린산마그네슘 및 락토오스 및/또는 다른 부형제, 결합제, 증량제, 붕괴제, 희석제 및 윤활제를 포함할 수 있다.
- [0143] 비강 에어로졸 또는 흡입에 의한 투여의 경우에, 이러한 조성물은 약학적 제형의 업계에 공지된 기술에 따라서 제조될 수 있고, 당업계에 공지된 벤질 알코올 또는 다른 적절한 보존제, 생체이용성을 향상시키기 위한 흡수 촉진제, 플루오르화 탄소, 및/또는 다른 용해제 또는 분산제를 사용하여 식염수 내에 용액으로서 제조될 수 있다. 에어로졸 또는 스프레이의 형태로 투여하기 위한 적절한 약학적 제형은, 예를 들어, 약학적으로 허용 가능한 용액, 예컨대 에탄올 또는 물, 또는 이러한 용매의 혼합물 내 본 발명의 생성물 또는 그들의 생리학적으로 허용가능한 염의 용액, 현탁액 또는 에멀전이다. 또한 필요한 경우, 제형은 추가적으로 다른 약학적 보조제 예컨대 계면활성제, 유화제 및 안정제 및 추진제를 포함할 수 있다.
- [0144] 피하 투여를 위해서, 본 발명에 따른 생성물은, 필요한 경우 관습적 물질 예컨대 가용화제, 유화제 또는 추가적 보조제와 함께 용액, 현탁액, 또는 에멀전에 포함된다. 또한 본 발명의 생성물은 동결건조될 수 있고 얻어진 리오필리제이트(lyophilizate)는 예를 들어, 주사 또는 주입 제제의 생산에 사용될 수 있다. 적절한 용매는, 예컨대, 물, 생리 식염수 용액 또한 당액 예컨대 글루코오스 또는 만니톨 용액, 또는 대안적으로 언급된 다양한 용매의 혼합물이다. 주사용 용액 또는 현탁액은 공지 기술에 따라 적절한 비독성, 비경구적으로-허용가능한 희석제 또는 용매, 예컨대 만니톨, 물, 링거액 또는 등장성 염화나트륨 용액, 또는 적절한 분산제 또는 습윤제 및 서스펜션화제, 예컨대 합성 모노- 또는 디글리세라이드, 및 올레산을 포함하는 지방산을 포함하는 멸균,

온화한, 고정된 오일을 사용해서 제형화할 수 있다.

[0145] 좌약의 형태로 직장으로 투여하는 경우, 이러한 제형은 본 발명에 따른 생성물과 약물을 방출하기 위해서 일반적인 온도에서는 고체이나 직장 내에서는 액화 및/또는 용해되는, 적절한 비자극성 부형제, 예컨대 코코아 버터, 합성 글리세라이드 에스터 또는 폴리에틸렌 글리콜과 혼합함으로써 제조될 수 있다.

[0146] 바람직한 구현예에서, 본 발명의 생성물 및 조성물은 국소적으로, 예컨대 국부 또는 흡수 및 비흡수 용도로 사용된다.

[0147] 수의학 분야에서 동물 내 질환의 예방 및/또는 치료를 포함할 뿐만 아니라 경제적으로 중요한 동물 예컨대 소, 돼지, 양, 닭, 어류 등에 대해 동물의 성장 및/또는 체중 및/또는 동물로부터 얻는 고기 또는 다른 생성물의 양 및/또는 질을 포함하는 본원의 목적에 대해 상기 조성물은 유용하다. 따라서, 추가적인 측면에서, 본 발명은 하나 이상의 본 발명의 생성물 및 하나 이상의 적합한 담체(즉 수의학적 용도로 적합한 담체)를 포함하는 수의학 적 용도를 위한 조성물에 관한 것이다. 또한 본 발명은 이러한 조성물의 제조에서 본 발명의 생성물의 용도에 관한 것이다.

[0148] **실시예**

[0149] **일반적 재료 및 방법**

[0150] *시험관내 실험: DC에서 유래한 단핵구의 생성*

[0151] 말초 혈액 단핵구 세포(PBMC)를 DC 전구체의 소스로 사용하였고 백혈구 성분채집술 생성물로부터 분리하였다. 인공의 점착성 분획(plastic adherent fraction)으로부터 하기와 같이 임상적인 수준의 DC를 시험관내에서 생성 하였다. 0일차에, PBMC를 2% 자가유래 혈장(AP)이 보충된 조혈성 세포 배양을 위해 적절한 배지에 10×10^6 세포 /mL로 플레이팅하였다. 상기 세포를 37°C에서 2시간 동안 두어 단핵구가 인공 점착되도록 하였다. 비부착 세포를 세척에 의해서 제거하고, 부착 세포를 Cell Factory에서 1% AP, 1,000 U/mL GM-CSF 및 500 U/mL IL-4로 보충된 배지내에서 배양하였다. 2일 및 4일차에, 0일차 양의 사이토카인을 포함하는 배지를 DC 배양물에 첨가하였다. DC 배양 6일차에, 세포를 수확하고 저온 보존하였다.

[0152] *시험관내 실험: DC의 전기천공법(electroporation)*

[0153] 6일차에, $4-8 \times 10^6$ DC를 기재한 바와 같이 mRNA로 전기천공하였다. 전기천공 전에, DC를 2회 세척하는데, 첫 번째에는 보충물 없이 PBS로 세척하고 두 번째에는 페놀 레드 없이 감소된 혈청 배지로 세척하였다. 두 번째 세척 단계 후에, mRNA를 포함하는 감소 혈청 배지의 최종 부피가 200 μ l가 되도록 DC를 재현탁하였다. 4-mm 겹 전기 천공 큐벳에서 전기천공을 수행하였다. 하기의 조건으로 지수 붕괴 펄스를 사용하였다: 전압, 300V, 정전 용량, 150 μ F, 및 저항, $\infty \Omega$, 펄스 시간은 \approx 11 ms인 결과를 얻었다. 전기천공 직후, DC를 1% huAB 혈청 및 PS/GLU 로 보충된 배지에 희석하고 37°C에서 가습화된 5% CO₂ 분위기에서 배양하였다. 전기천공 후에는 추가적인 사이토카인을 DC에 첨가하지 않았다.

[0154] *생체내 실험: 마우스*

[0155] 암컷, 6 내지 12주령 DBA/2 마우스.

[0156] *생체내 실험: 마우스 세포주*

[0157] 비만세포종 세포주 P815를 C. Uyttenhove (Universite Catholique de Louvain, Louvain-La-Neuve, Belgium)로부터 얻었다.

[0158] *생체내 실험: 종양 세포 접종 및 mRNA의 인시추(in situ) 전달*

[0159] 감지되는 종양 성장을 촉진하기 위해서, 실험에 제시된 바와 같이 마우스 양쪽 옆구리에 5×10^5 P815 종양 세포를 피하 주입하였다. mRNA의 종양내 전달을 위해서, 마우스를 이소플루레인(Abbott)으로 마취시켰다. 종양의 최종 부피가 약 100 mm³에 도달하였을 때, 주입된 종양 당 최종 부피 50 μ l의 0.8 하트만 용액 내 10 μ g의 각각의 TriMix mRNA 성분을 포함하는 혼합물과 함께 종양을 주입하였다. 다른 군 사이에 동일한 양의 mRNA를 사용하였다. pGEM 벡터로부터 생성된 tNGFR을 암호화하는 mRNA를 대조군으로 사용하였다.

[0160] **실시예 1**

[0161] 구체적 재료 및 방법

[0162] iDC 생성 및 전기천공을 상기의 일반적인 방법 및 재료 부분에 기술한 바와 같이 수행하였다. DC의 성숙을 위해서 iDC를 5 µg의 TriMix의 각각 성분으로 전기천공하였다. 모든 유세포 염색을 PBS/BSA/아자이드 내에서 수행하였다. CD70의 발현을 분석하기 위해서, 항 CD70-플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC)를 사용하였다. 데이터 획득은 FACSFortessa flow cytometer (BD)로 수행하여 얻었고 FACS Diva 소프트웨어를 사용하여 분석하였다.

[0163] 결과:

[0164] 전기천공 24시간 후, DC를 그들의 CD70 표면 발현에 대해 염색하였다. 결과는 TriMix로 한 iDC의 전기천공 후 - CD70 발현 감소 - 평균 형광 강도(MFI) - 가 pUC-벡터(pUC TE EME 플라스미드의 기초), pUC TE-벡터 및 pUC-ENE-벡터와 비교하여, 조절 구성 요소(TE + ENE)를 모두 포함하는 pUC TE ENE 플라스미드(서열번호 5)에 의해서 암호화되는 TriMix로 전기천공한 후 유의적으로 증가함을 확인하였다. pUC TE ENE 플라스미드에 의해서 암호화되는 TriMix로 전기천공한 후의 CD70 발현은 유의적으로 높았던 반면, pUS TE 및 pUC ENE의 사용은 pUC가 없는 이러한 구성 요소와 비교하여 모두 감소되거나 최대 동일한 수준의 CD70 발현을 야기했다(도 1). 따라서, pUC TE ENE 플라스미드에 의해서 암호화되는 TriMix로 전기천공한 후 벡터 내에 구성 요소(TE 및 ENE) 모두의 존재는 CD70 발현의 관점에서 예상치 못한 시너지 효과를 나타냄을 확인하였다.

[0165] 실시예 2

[0166] 구체적 재료&방법:

[0167] iDC 생성 및 전기천공 조건을 상기 일반적 재료 및 방법 부분에 기술한 바와 같이 수행하였다. iDC를 항원을 로딩하는 것을 가능하게 하는 mRNA 를 암호화하는 20 µg WT1으로 전기천공하였다. 세포내 WT1 발현을 분석하기 위해서, 세포를 고정하고 투과성 있게 만들었고, 항-WT1 모노클로날 항체(클론 6F-H2; Dako Cytomation, Carpinteria, CA)로 세포내 염색하였다. IgG 이소타입에 매치되는 PE-표시된 항-마우스 항체(Becton&Dickinson, Erembodegem, Belgium)를 이차 Ab로 사용하였다. 비활성 이소타입에 매치되는 항체(eBioscience, Vienna, Austria)를 대조군으로 사용하였다. 데이터 획득은 FACSFortessa flow cytometer (BD)로 수행하여 얻었고 FACS Diva 소프트웨어를 사용하여 분석하였다.

[0168] 결과:

[0170] *결과는 pUC TE ENE-벡터에 의해서 암호화되는 WT1로 한 iDC의 전기천공 후, 다른 WT1 mRNA를 암호화하는 벡터와 비교하는 경우 더 많이 유지되는 WT1 발현을 나타내었다(도 2). 이러한 데이터는 5' TE 및 3' ENE 부분 모두의 상이한 방식의 작용을 증명한다. pUC-TE 벡터로부터 유래한 mRNA의 발현이 4시간 이후에 높은 반면, 이는 빠르게 감소하였다. RNA를 포함하는 ENE로부터의 번역은 전체 기간에서 모든 다른것들보다 더 낮았다. pUC TE-ENE-벡터는 TE의 높은 번역가능성을 갖고 ENE 서열이 오래 지속되는 효과를 갖는다. WT1의 발현 수준은 다른 벡터에 비해서 유의적으로 낮은 비율로 감소한다.

[0171] 실시예 3

[0172] 구체적 재료&방법:

[0173] iDC 생성 및 전기천공 조건을 상기 일반적 재료 및 방법 부분에 기술한 바와 같이 수행하였다. DC의 항원 로딩 및 성숙을 가능하게 하기 위해서 iDC를 5 µg mRNA를 암호화하는 eGFP와 TriMix(5 µg의 각각 성분)로 공동-전기천공하였다. eGFP 발현을 여러 시점에 유세포 분석에 의해서 측정하였다.

[0174] 결과:

[0175] 전기천공 후 여러 시점에 eGFP 발현을 추적하였다(도 3). 결과는 양 벡터에서 유래한 eGFP의 발현 수준이 전기천공하고 4시간 후에는 비슷하게 됨을 나타내었다. 그러나 이후 시점에서는, pUC TE ENE에서 유래한 mRNA로부터의 발현이 유의적으로 높다. 이는 형질전환유전자의 더욱 안정하고 지속된 발현을 다시 한번 나타낸다.

[0176] 실시예 4

[0177] 구체적 재료&방법:

[0178] iDC 생성 및 전기천공 조건을 상기 기술한 바와 같이 수행하였다. DC의 성숙을 위해서 iDC를 5 µg의 TriMix의 각각 성분으로 전기천공하였다. 모든 유세포 염색을 PBS/BSA/아자이드 내에서 수행하였다. DC의 세포 표면 상의 표면 분자의 발현을 분석하기 위해서, 하기의 모노클로날 항체를 사용하였다: CD40-APC (Allophycocyanin),

CD70-FITC, CD80-PE, CD83-PE (Phycoerythrin), CD86-PE 및 CCR7-APC. 데이터 획득은 FACSFortessa flow cytometer (BD)로 수행하여 얻었고 FACS Diva 소프트웨어를 사용하여 분석하였다.

[0179]

결과:

[0180]

pUC TE ENE-벡터에 의해서 암호화되는 TriMix mRNA를 이용한 iDC의 전기천공은 DC의 성숙을 유도할 수 있다(도 4).

[0181]

실시예 5: P815를 이용한 2면(two-side) 종양 모델: 1 종양의 단일 치료

[0182]

구체적 재료&방법:

[0183]

종양 성장을 촉진하기 위해서, 마우스의 양쪽 옆구리에 5×10^5 P815 종양 세포를 피하 주입하였다. 종양 모두가 주입 가능한 부피인 약 100mm^3 에 도달하였을 때 치료를 시작하였다. 단지 하나의 종양이 치료된 2면 종양 모델을 사용함으로써, 백신 접종 전략의 전신성 영향을 측정하는 것을 목표로 하였다. 따라서, $0.8 \times$ 하트만 용액 내에 용해된 대조군 mRNA 또는 pUC TE ENE TriMix mRNA($10 \mu\text{g}$ 의 각각의 mRNA 성분)을 좌측 종양에만 주입하였다. 치료된 및 치료되지 않은 군 모두의 반대쪽 종양의 크기를 측정함으로써 그리고 생존을 측정함으로써 전신성 항-종양 면역 반응을 측정하였다.

[0184]

결과:

[0185]

2면 종양 모델의 사용에 의해서, 본 발명자들은 면역화 전략의 전신성 효과를 측정할 수 있었다. pUC TE ENE TriMix mRNA의 단일 종양내 전달은 치료된 그리고 치료되지 않은 반대쪽 종양에서 유의적으로 감소된 종양 크기를 야기했다(도 5). 멀리 떨어져 있는 종양에서 백신 접종의 효과는 단일 종양내 TriMix 주입이 다수의 종양 병변을 치료하는데 사용할 수 있음을 나타낸다.

[0186]

실시예 6: P815를 이용한 2면 종양 모델: 하나의 종양의 단일 치료, 대조군으로서 하트만 용액 및 tNGFR

[0187]

구체적 재료&방법:

[0188]

감지되는 종양 성장을 촉진하기 위해서, 마우스의 양쪽 옆구리에 5×10^5 P815 종양 세포를 피하 주입하였다. 종양 모두가 주입 가능한 부피인 약 100mm^3 에 도달하였을 때 치료를 시작하였다. 단지 하나의 종양이 치료된 2면 종양 모델을 사용함으로써, 백신 접종 전략의 전신성 영향을 측정하는 것을 목표로 하였다. 따라서, 좌측 종양에 비히클(0.8 하트만 용액), $0.8 \times$ 하트만 용액 내에 용해된 대조군 mRNA 또는 pUC TE ENE TriMix mRNA를 주입하였고($10 \mu\text{g}$ 의 각각 mRNA 성분), 모든 것은 $50 \mu\text{l}$ 의 총 부피/주입된 종양이다. 치료된 및 치료되지 않은 군 모두의 반대쪽 종양의 크기를 측정함으로써 그리고 생존을 측정함으로써 전신성 항-종양 면역 반응을 측정하였다.

[0189]

결과:

[0190]

2면 종양 모델의 사용에 의해서, 본 발명자는 면역화 전략의 전신성 효과를 측정하였다. 이 실험은 이전의 관찰을 확실히 하였다, 즉

[0191]

1. pUC TE ENE TriMix mRNA의 단일 종양내 전달은 치료된 및 치료되지 않은 반대쪽 종양의 성장을 유의적으로 감소시킨다.

[0192]

2. pUC TE ENE TriMix mRNA의 단일 종양내 전달은 종양을 갖는 마우스의 생존을 연장시킨다.

[0193]

3. 백신 접종의 효과는 치료된 종양에서 더욱 두드러진다.

[0194]

또한, 비히클로 치료된 종양을 갖는 군을 통해, 본 발명자들은 mRNA 자체의 어주반트 효과를 확인하였다.

[0195]

실시예 7: 다른 TE 서열의 비교

[0196]

구체적 재료&방법:

[0197]

여기에 관련된 구체적 분석 방법과 관련한 세부 사항은 상기 기술된 바와 같이 실시예 2 및 3에서 확인할 수 있다.

[0198]

결과: *WT1* 또는 *eGFP*를 이용한 iDC의 전기천공

- [0199] 서열번호 1, 서열번호 2 또는 서열번호 3으로 표시되는 TE 구성 요소를 포함하는 pUC TE ENE-벡터에 의해서 암호화되는 WT1 (도 9A) 또는 eGFP (도 9B)를 이용한 iDC의 전기천공은 각각 WT1 또는 eGFP 발현의 유의적인 변화를 야기하지 않았다.
- [0200] 이러한 데이터는 서열번호 1과 80% 이상의 서열 상동성을 갖는 서열 예컨대 서열번호 1, 서열번호 2 또는 서열번호 3은 본 발명에 따른 벡터 내에서 번역 인핸서 구성 요소로서 상호교환적으로 사용될 수 있음을 명백하게 나타낸다.
- [0201] **참고 문헌**
- [0202] Bonehill A, Tuyaerts S, Van Nuffel AM, Heirman C, Bos TJ, Fostier K, Neyns B, Thielemans K - *Enhancing the T-cell stimulatory capacity of human dendritic cells by co-electroporation with CD40L, CD70 and constitutively active TLR4 encoding mRNA*. - Mol Ther. 2008 Jun; 16(6):1170-80.
- [0203] Conrad NK, Steitz JA - *A Kaposi's sarcoma virus RNA element that increases the nuclear abundance of intronless transcripts*. - EMBO J. 2005 May 18;24(10):1831-41.
- [0204] Conrad NK, Mili S, Marshall EL, Shu MD, Steitz JA - *Identification of a rapid mammalian deadenylation-dependent decay pathway and its inhibition by a viral RNA element*. Mol Cell. 2006;24:943-953.
- [0205] Diken M, Kreiter S, Selmi A, Britten CM, Huber C, Tureci O, Sahin U - *Selective uptake of naked vaccine RNA by dendritic cells is driven by macropinocytosis and abrogated upon DC maturation*. - Gene Ther. 2011 Jul; 18(7):702-8.
- [0206] Fotin-Mleczek M, Duchardt KM, Lorenz C, Pfeiffer R, Ojkic-Zrna S, Probst J, Kallen KJ - *Messenger RNA-based vaccines with dual activity induce balanced TLR-7 dependent adaptive immune responses and provide antitumor activity*. - J Immunother. 2011 Jan;34(1):1-15.
- [0207] Hu MC, Tranque P, Edelman GM, Mauro VP. - *rRNA-complementarity in the 5' untranslated region of mRNA specifying the Gtx homeodomain protein: evidence that base-pairing to 18S rRNA affects translational efficiency*. - Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Feb 16;96(4):1339-44.
- [0208] Mitton-Fry RM, DeGregorio SJ, Wang J, Steitz TA, Steitz JA, - *Poly(a) tail recognition by a viral RNA element through assembly of a triple helix*. - Science. 2010; 330:1244-1247.
- [0209] Sun R, Lin SF, Gradoville L, Miller G. - *Polyadenylylated nuclear RNA encoded by Kaposi sarcoma-associated herpesvirus*. - Proc Natl Acad Sci USA. 1996;93:11883-11888.
- [0210] Van Lint Sandra, Goyvaerts Cleo, Maenhout Sarah, et al. - *Preclinical Evaluation of TriMix and Antigen mRNA-Based Antitumor Therapy* - Cancer Res 2012;72:1661-1671.
- [0211] **서열 목록**
- [0212] <110> Vrije Universiteit Brussel
- [0214] *<120> RNA TRANSCRIPTION VECTOR AND USES THEREOF
- [0215] <130> ETR-003
- [0216] <150> EP13192555.4
- [0217] <151> 2013-11-12
- [0218] <160> 5
- [0219] <170> BiSSAP 1.2
- [0220] <210> 1
- [0221] <211> 204
- [0222] <212> DNA
- [0223] <213> Artificial Sequence

[0224] <220>

[0225] <221> source

[0226] <222> 1..204

[0227] <223> /organism="Artificial Sequence"

[0228] /note="Translation Enhancer"

[0229] /mol_type="unassigned DNA"

[0230] <400> 1

[0231] ggccgcggcg tttctgacat ccggcgggtt tctgacatcc ggcgggttcc tgacatccgg 60

[0232] cgggtttctg acatccggcg ggtgaattct tctgacatcc ggcgggttcc tgacatccgg 120

[0233] cgggtttctg acatccggcg ggtttctgac atccggcggg tttctgacat ccggcgggtg 180

[0234] actcacaacc aggcctccac aacc 204

[0235] <210> 2

[0236] <211> 238

[0237] <212> DNA

[0238] <213> Artificial Sequence

[0239] <220>

[0240] <221> source

[0241] <222> 1..238

[0242] <223> /organism="Artificial Sequence"

[0243] /note="Translation Enhancer"

[0244] /mol_type="unassigned DNA"

[0245] <400> 2

[0246] aagctttaat acgactcact atagggccgg cgggtttctg acatccggcg ggtttctgac 60

[0247] atccggcggg tttctgacat ccggcgggtt tctgacatcc ggcgggttcc tgacatccgg 120

[0248] cgggtttctg acatccggcg ggtttctgac atccggcggg tttctgacat ccggcgggtt 180

[0249] tctgacatcc ggcgggttcc tgacattcac aaccaggcct ccacaacat ggctcgag 238

[0250] <210> 3

[0251] <211> 238

[0252] <212> DNA

[0253] <213> Artificial Sequence

[0254] <220>

[0255] <221> source

[0256] <222> 1..238

[0257] <223> /organism="Artificial Sequence"

[0258] /note="Translation Enhancer"

[0259] /mol_type="unassigned DNA"

[0260] <400> 3

[0261] aagctttaat acgactcact atagggccgg cgggaattctg acatccggcg gaattctgac 60

[0262] atccggcgga attctgacat ccggcggaat tctgacatcc ggcggaattc tgacatccgg 120

[0263] cgggaattctg acatccggcg gaattctgac atccggcgga attctgacat ccggcggaat 180

[0264] tctgacatcc ggcggaattc tgacattcac aaccaggcct ccacaacat ggctcgag 238

[0265] <210> 4

[0266] <211> 85

[0267] <212> DNA

[0268] <213> Artificial Sequence

[0269] <220>

[0270] <221> source

[0271] <222> 1..85

[0272] <223> /organism="Artificial Sequence"

[0273] /note="Nuclear Retention Element"

[0274] /mol_type="unassigned DNA"

[0275] <400> 4

[0276] tcgagtgttt tgctgggtt tttccttgtt cgcaccggac acctccagt accagacggc 60

[0277] aaggttttta tcccagtga tattg 85

[0278] <210> 5

[0279] <211> 3102

[0280] <212> DNA

[0281] <213> Artificial Sequence

[0282] <220>

[0283] <221> source

[0284] <222> 1..3102

[0285] <223> /organism="Artificial Sequence"

[0286] /note="Empty pUC TE ENE vector"

[0287] /mol_type="unassigned DNA"

[0288] <400> 5

[0289] taatacgact cactataggg ccggcgggtt tctgacatcc ggcgggttcc tgacatccgg 60

[0290] cgggtttctg acatccggcg ggtttctgac atccggcggg tttctgacat ccggcgggtt 120

[0291] tctgacatcc ggcgggttcc tgacatccgg cgggtttctg acatccggcg ggtttctgac 180

[0292] atccggcggg tttctgacat tcacaaccag gcctccacaa ccctcgagtg ttttgctgg 240

[0293] gtttttccct gttcgcaccg gacacctcca gtgaccagac ggcaagggtt ttatcccagt 300

[0294] gtatatgtgc gacaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 360

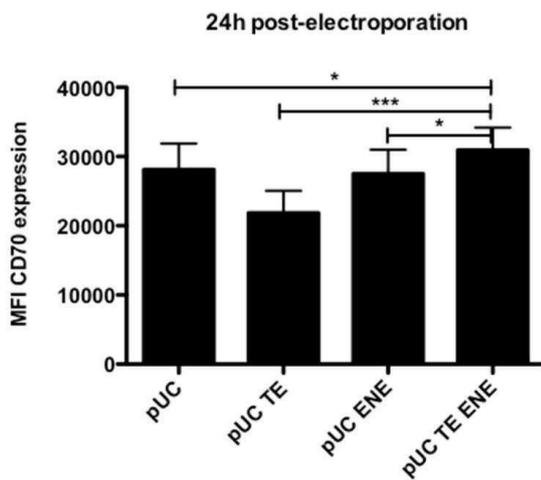
[0295] aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 420

[0296]	aaaaaaaaa aaaaaaagca ggtgtgtctc tctccactg cgaattcact ggccgtcgtt	480
[0297]	ttacaacgtc gtgactggga aaacctggc gttaccaac ttaatcgct tgcagcat	540
[0298]	cccccttctg ccagctggcg taatagcga gaggccgca ccgatcgccc tccccacag	600
[0299]	ttgcgcagcc tgaatggcga atggcgcctg atgcggtatt ttctccttac gcatctgtgc	660
[0300]	ggtatttcac accgcatatg gtgactctc agtacaatct gctctgatgc cgcatagtta	720
[0301]	agccagcccc gacacccgcc aacacccgct gacgcgcct gacgggcttg tctgctccc	780
[0302]	gcatccgctt acagacaagc tgtgaccgtc tccgggagct gcatgtgtca gaggttttca	840
[0303]	ccgtcatcac cgaaacgcgc gagacgaaag ggcctcgtga tacgcctatt tttataggtt	900
[0304]	aatgtcatga taataatggt ttcttagacg tcaggtggca ctttctgggg aatgtgctgc	960
[0305]	ggaacccta ttigtattt tttctaaata cattcaaata tgtatccgct catgagacaa	1020
[0306]	taacctgat aaatgcttca ataatttga aaaaggaaga gtatgagtat tcaacatttc	1080
[0307]	cgtgtcgccc ttattccctt ttttgcggca ttttgccttc ctgtttttgc tcaccagaa	1140
[0308]	acgctggtga aagtaaaaga tgctgaagat cagttaggtg cacgagtggg ttacatcga	1200
[0309]	ctggatctca acagcggtaa gatccttgag agttttcgcc ccgaagaac ttttccaatg	1260
[0310]	atgagcactt ttaaagtctt gctatgtggc gcggtattat cccgtattga cggcgggcaa	1320
[0311]	gagcaactcg gtcgccgat acaactattc cagaatgact tggttgagta ctaccagtc	1380
[0312]	acagaaaagc atcttacgga tggcatgaca gtaagagaat tatgcagtgc tgccataacc	1440
[0313]	atgagtgata aactgcggc caacttactt ctgacaacga tcggaggacc gaaggagcta	1500
[0314]	accgcttttt tgcacaacat gggggatcat gtaactcgcc ttgatcgttg ggaaccggag	1560
[0315]	ctgaatgaag ccatacaaa cgacgagcgt gacaccacga tgccctgtagc aatggcaaca	1620
[0316]	acgttgcgca aactattaac tggcgaacta ctactctag cttcccggca acaattaata	1680
[0317]	gactggatgg aggcggataa agttgcagga ccacttctgc gctcggccct tccggctggc	1740
[0318]	tggtttattg ctgataaatc tggagccggt gagcgtgggt ctgcggtat cattgcagca	1800
[0319]	ctggggccag atggtaagcc ctcccgtatc gtagttatct acacgacggg gagtccagca	1860
[0320]	actatggatg aacgaaatag acagatcgct gagataggtg cctcactgat taagcattgg	1920
[0321]	taactgtcag accaagttaa ctcatatata ctttagattg atttaaaact tcatttttaa	1980
[0322]	tttaaaagga tctagtgaa gatccttttt gataatctca tgacaaaat cccttaacgt	2040
[0323]	gagttttcgt tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat	2100
[0324]	cttttttttc tgcgcgtaat ctgctgcttg caaacaaaa aaccaccgct accagcggtg	2160
[0325]	gtttgtttgc cggatcaaga gctaccaact cttttccga aggtaactgg cttcagcaga	2220
[0326]	gcgcagatac caaactgtt tcttctagt tagccgtagt taggccacca cttcaagaac	2280
[0327]	tctgtagcac cgctacata cctcgtctg ctaatcctgt taccagtggc tgctgccagt	2340
[0328]	ggcgataagt cgtgtcttac cgggttgac tcaagacgat agttaccgga taaggcgcag	2400
[0329]	cggtcgggct gaacgggggg ttctgtcaca cagcccagct tggagcgaac gacctacacc	2460
[0330]	gaactgagat acctacagc tgagctatga gaaagcgcca cgcttcccga agggagaaag	2520
[0331]	gcggacaggt atccgtaag cggcagggct ggaacaggag agcgcacgag ggagcttcca	2580

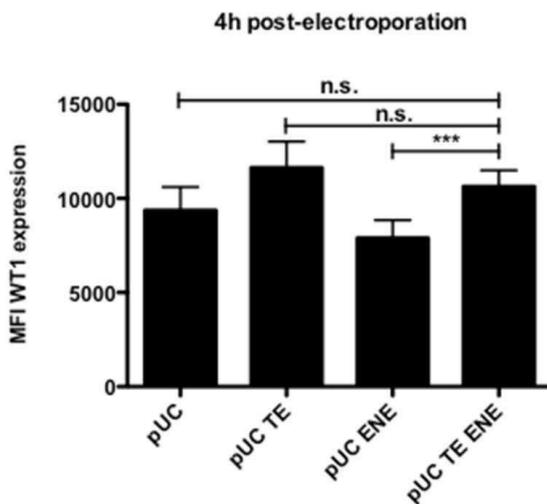
[0332] ggggaaacg cctggtatct ttatagtcct gtcgggtttc gccacctctg acttgagcgt 2640
 [0333] cgatttttgt gatgctcgtc aggggggscgg agcctatgga aaaacgccag caacgcggcc 2700
 [0334] tttttacggt tcttggcctt ttgctggcct tttgctcaca tgttctttcc tgcgttatcc 2760
 [0335] cctgattctg tggataaccg tattaccgcc tttgagtgag ctgataccgc tcgccgcagc 2820
 [0336] cgaacgaccg agcgcagcga gtcagtgagc gaggaagcgg aagagcggcc aatacgcaaa 2880
 [0337] ccgcctctcc ccgcgcgttg gccgattcat taatgcagct ggcaacgacag gtttcccgac 2940
 [0338] tggaaagcgg gcagtgagcg caacgcaatt aatgtgagtt agctcactca ttaggcaccc 3000
 [0339] caggctttac accttatgct tccgctcgt atgttgtgtg gaattgtgag cggataaaaa 3060
 [0340] tttcacacag gaaacagcta tgaccatgat tacgccaagc tt 3102

도면

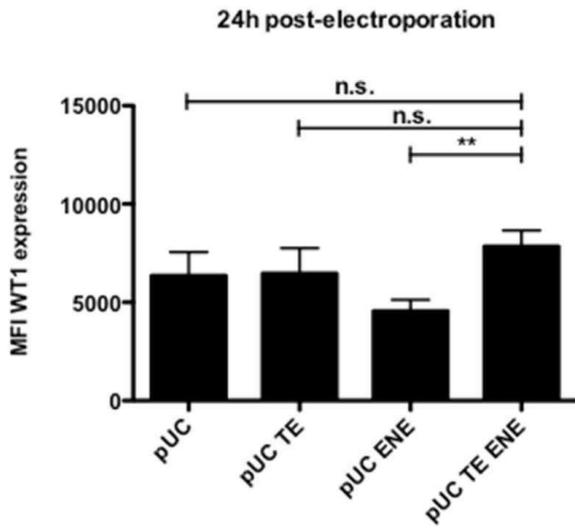
도면1



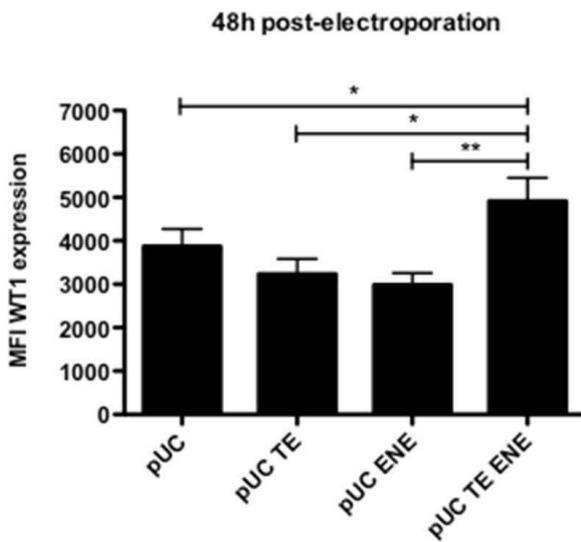
도면2a



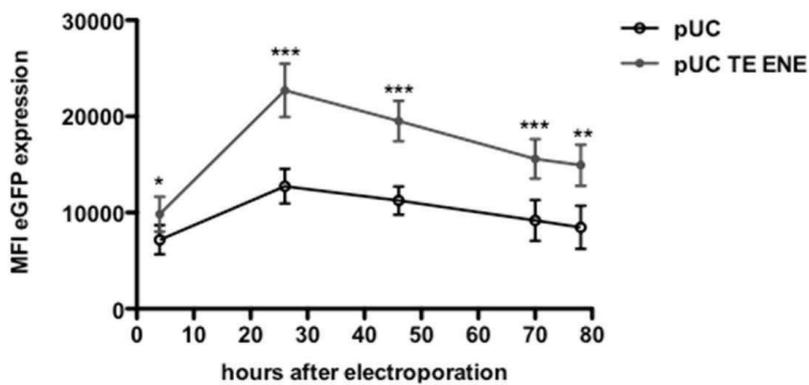
도면2b



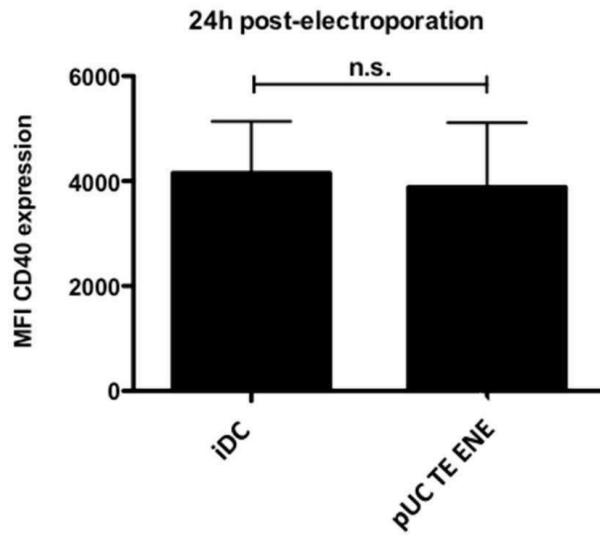
도면2c



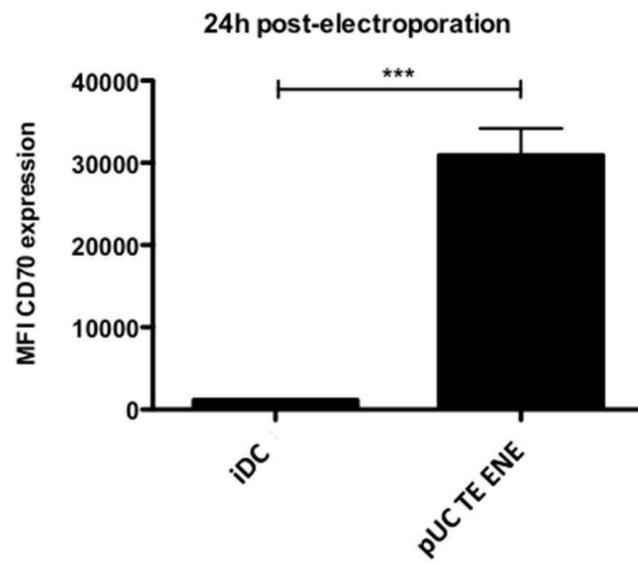
도면3



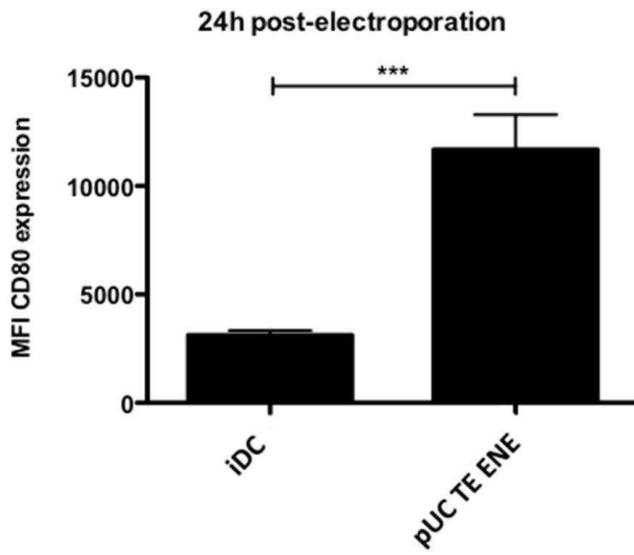
도면4a



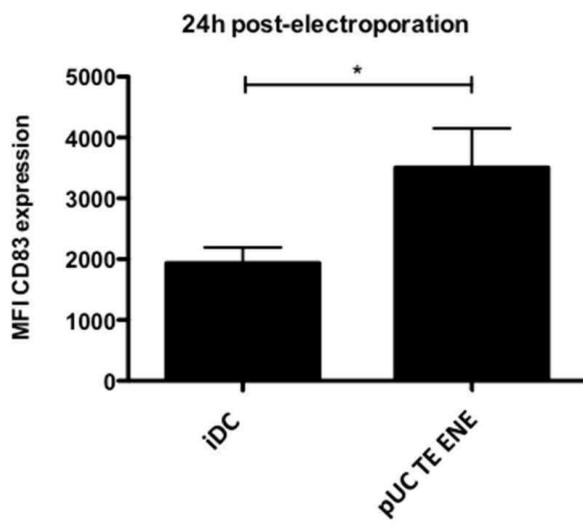
도면4b



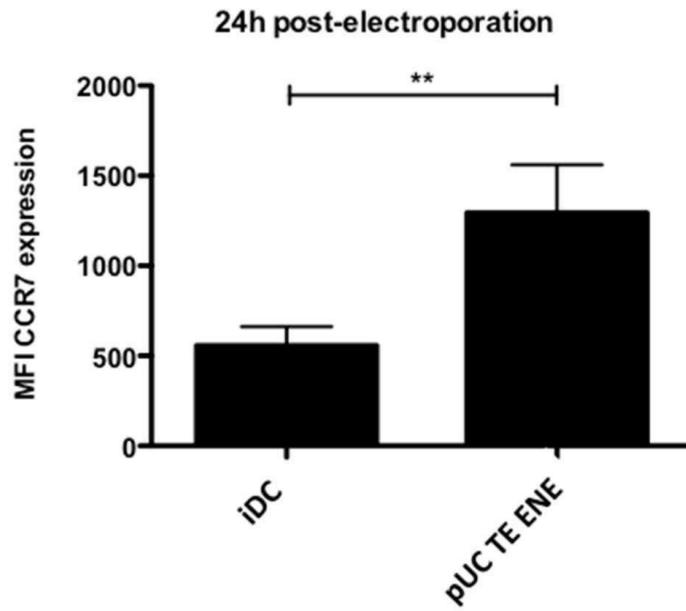
도면4c



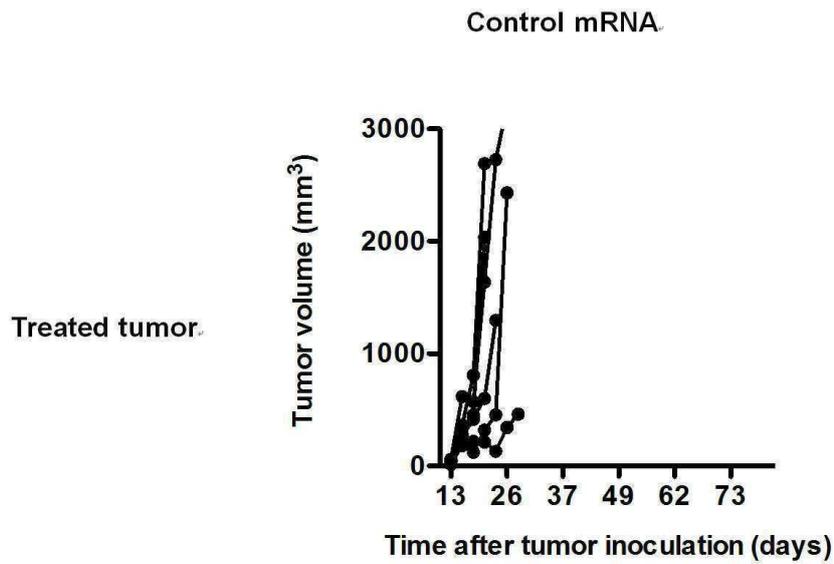
도면4d



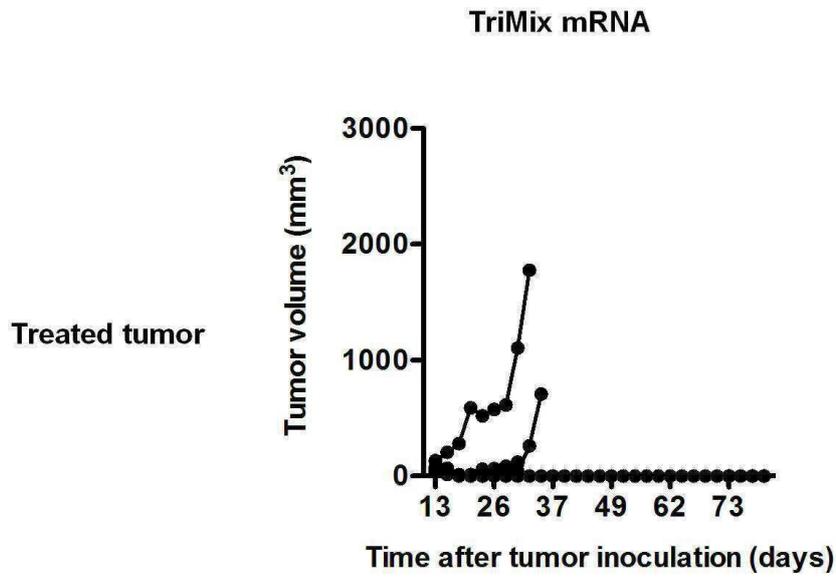
도면4e



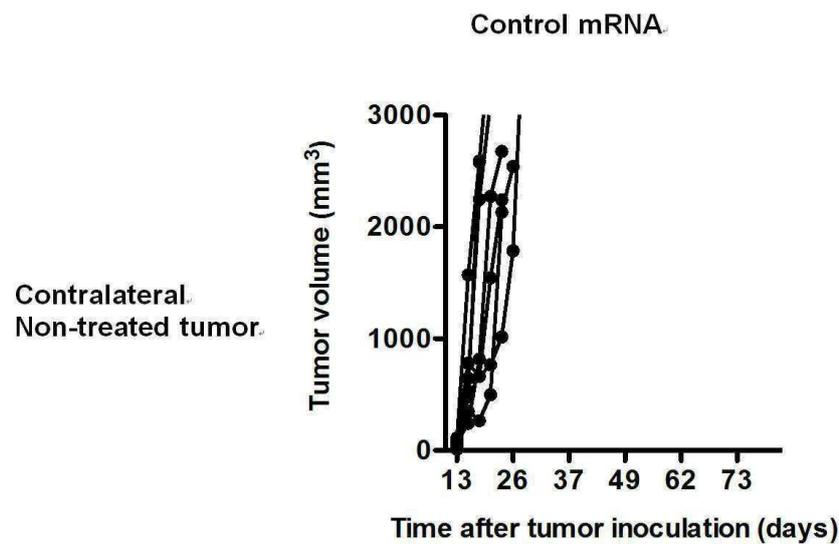
도면5a



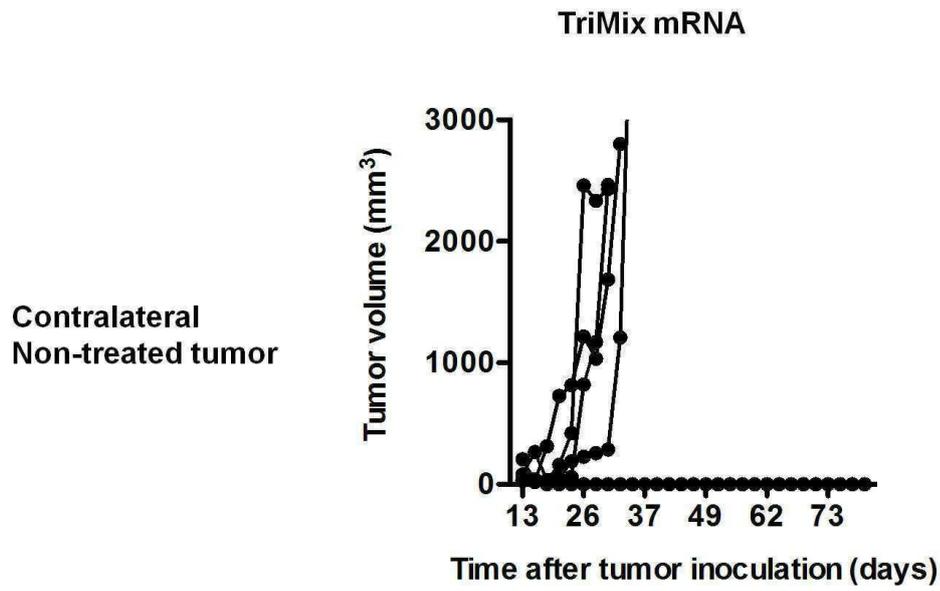
도면5b



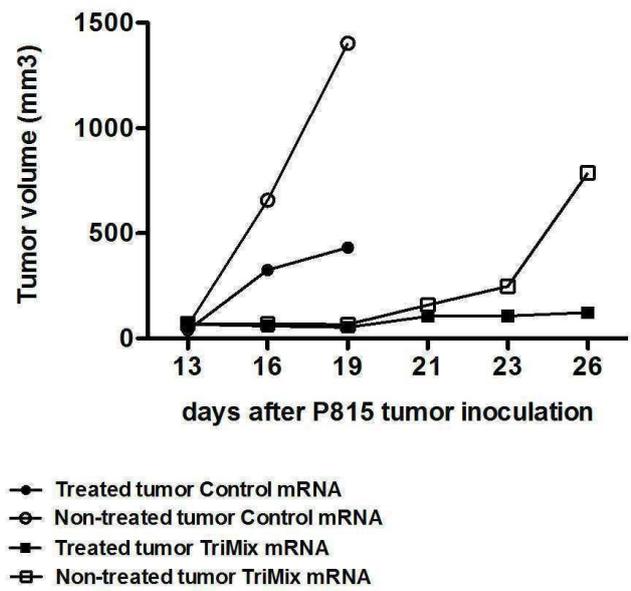
도면5c



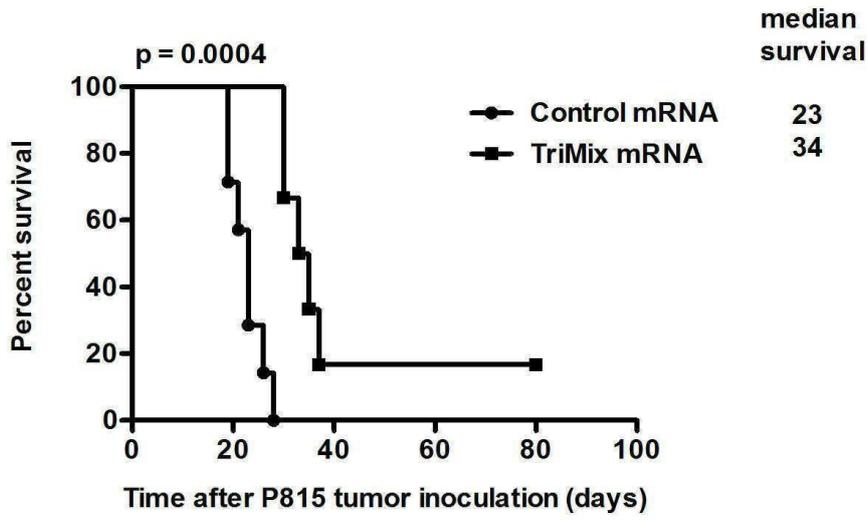
도면5d



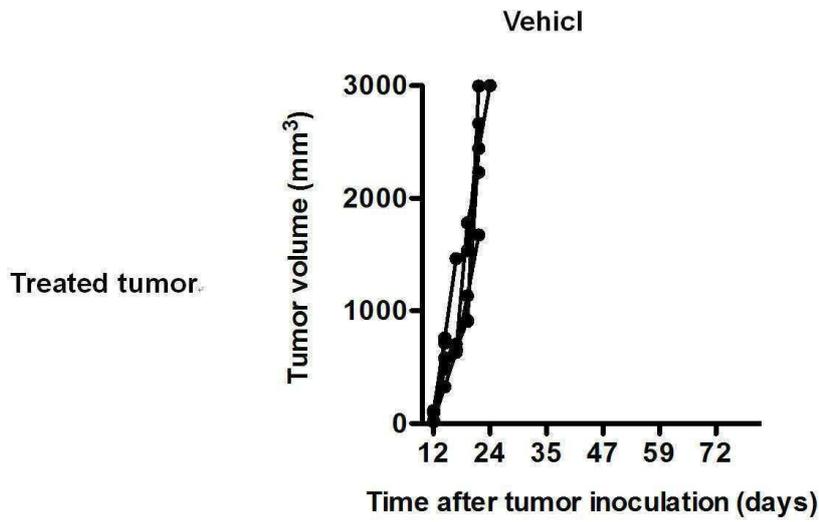
도면5e



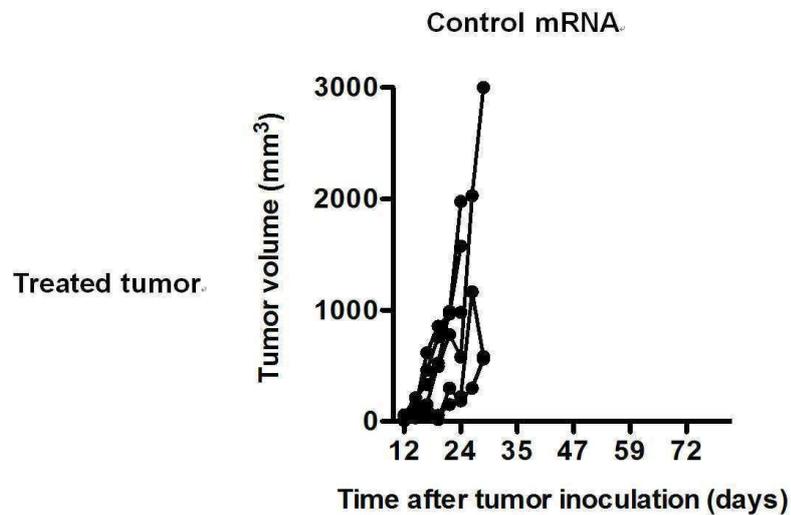
도면5f



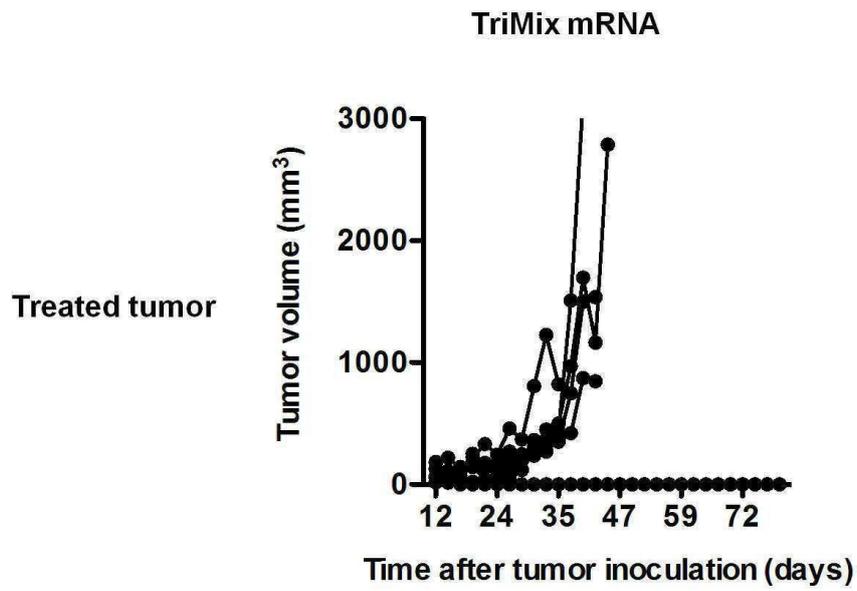
도면6a



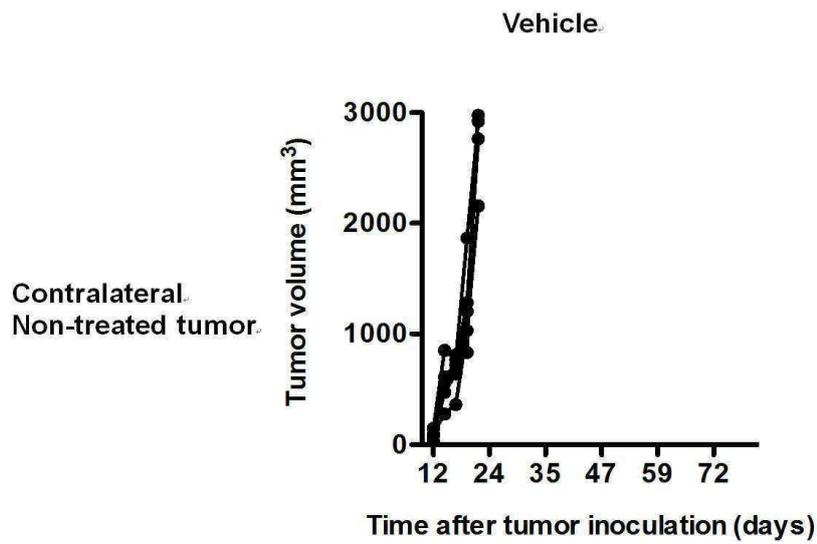
도면6b



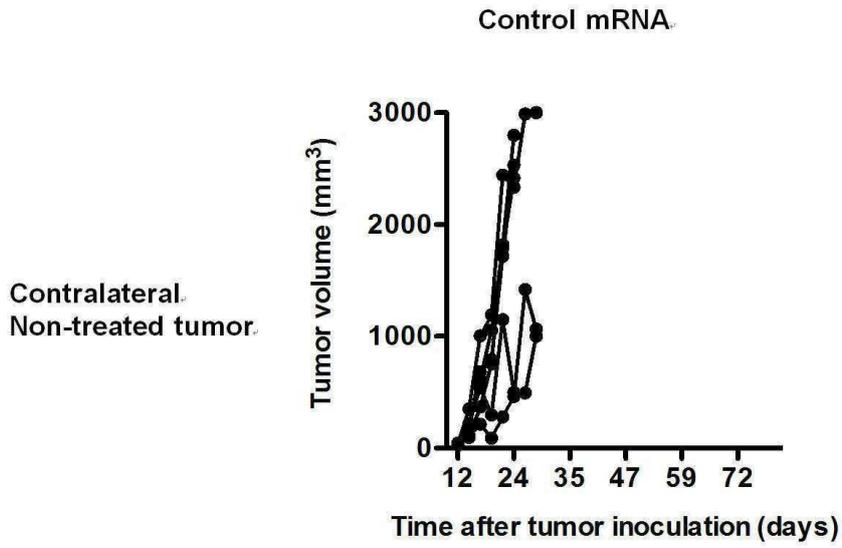
도면6c



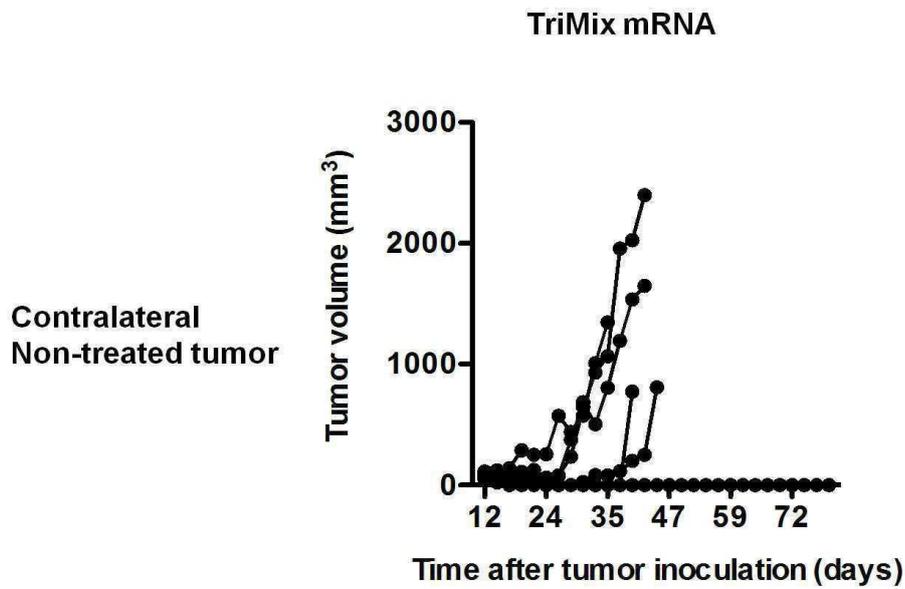
도면6d



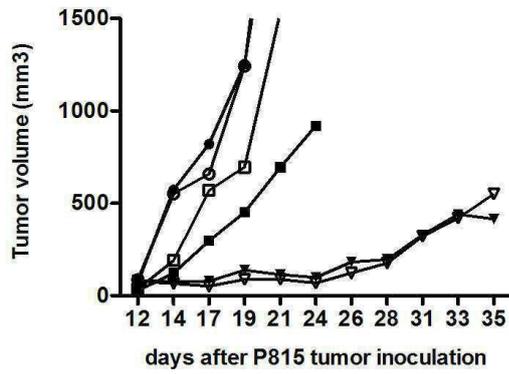
도면6e



도면6f

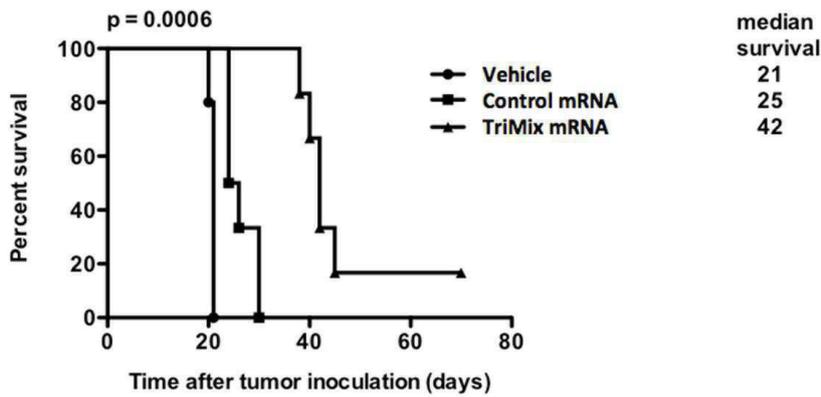


도면6g

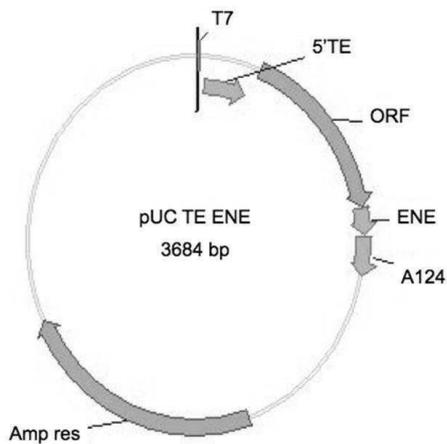


- Treated tumor Vehicle
- Non-treated tumor Vehicle
- Treated tumor Control mRNA
- non-treated tumor Control mRNA
- ▲ Treated tumor TriMix mRNA
- △ Non-treated tumor TriMix mRNA

도면6h



도면7



도면8

SEQ ID N° 1:	100%	89%	92%
SEQ ID N° 2:	89%	100%	99%
SEQ ID N° 3:	92%	99%	100%

```

SEQ ID N°3  AAGCTTTAATACGACTCACTATAGGGCCGGCGGAATTCTGACATCCGGCGGAATTCTGAC
SEQ ID N°1  -----ggCCGGCGGGTTTCTGACATCCGGCGGGTTTCTGAC
SEQ ID N°2  AAGCTTTAATACGACTCACTATAGGGCCGGCGGGTTTCTGACATCCGGCGGGTTTCTGAC
                *****;*****;*****

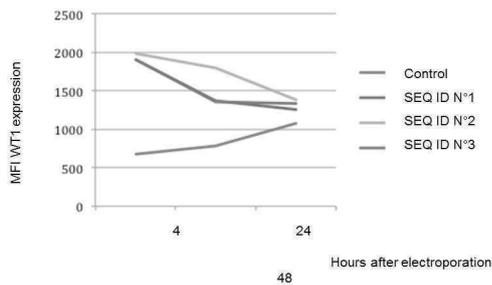
SEQ ID N°3  ATCCGGCGGAATCTGACATCCGGCGGAATCTGACATCCGGCGGAA-----TTCTGAC
SEQ ID N°1  ATCCGGCGGGTTTCTGACATCCGGCGGGTTTCTGACATCCGGCGGGTGAATTCTTCTGAC
SEQ ID N°2  ATCCGGCGGGTTTCTGACATCCGGCGGGTTTCTGACATCCGGCGGGT-----TTCTGAC
                *****;*****;*****;*****

SEQ ID N°3  ATCCGGCGGAATCTGACATCCGGCGGAATCTGACATCCGGCGGAATCTGACATCCGG
SEQ ID N°1  ATCCGGCGGGTTTCTGACATCCGGCGGGTTTCTGACATCCGGCGGGTTTCTGACATCCGG
SEQ ID N°2  ATCCGGCGGGTTTCTGACATCCGGCGGGTTTCTGACATCCGGCGGGTTTCTGACATCCGG
                *****;*****;*****;*****

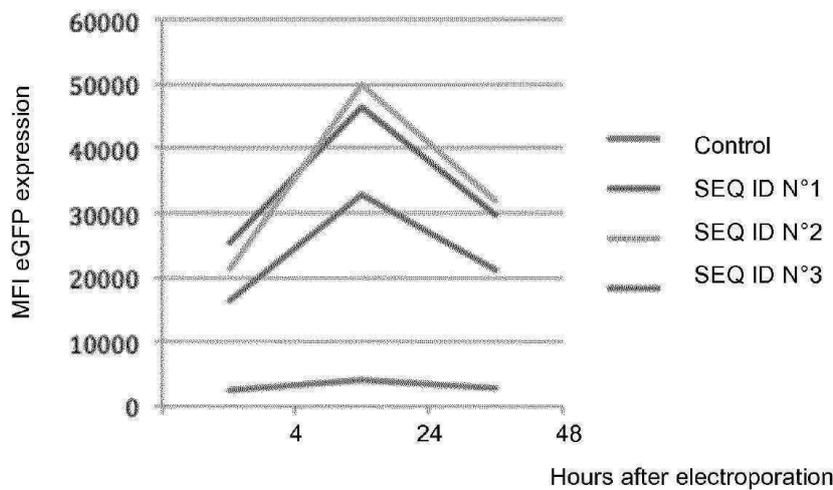
SEQ ID N°3  CGGAATCTGACATCCGGCGGAATCTGACATTCACAACCAGGCCTCCACAACCATGGCT
SEQ ID N°1  CGGGTTTCTGACATCCGGCGGGTAC-----TCACAACCAGGCCTCCACAACC-----
SEQ ID N°2  CGGGTTTCTGACATCCGGCGGGTTTCTGACATTCACAACCAGGCCTCCACAACCATGGCT
                ***;*****;*****;*****

SEQ ID N°3  CGAG
SEQ ID N°1  -----
SEQ ID N°2  CGAG
    
```

도면9a



도면9b



서열목록

- <110> Vrije Universiteit Brussel
- <120> RNA TRANSCRIPTION VECTOR AND USES THEREOF

<130> ETR-003
 <150> EPEP13192555.4
 <151> 2013-11-12
 <160> 5
 <170> BiSSAP 1.2
 <210> 1
 <211> 204
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Translation Enhancer
 <220><221> source
 <222> (1)..(204)
 <223> /organism="Artificial Sequence" /note="Translation Enhancer"
 /mol_type="unassigned DNA"
 <400> 1
 ggccggcggg tttctgacat ccggcgggtt tctgacatcc ggcgggttcc tgacatccgg 60
 cgggtttctg acatccggcg ggtgaattct tctgacatcc ggcgggttcc tgacatccgg 120
 cgggtttctg acatccggcg ggtttctgac atccggcggg tttctgacat ccggcgggtg 180
 actcacaacc aggcctccac aacc 204
 <210> 2
 <211> 238
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Translation Enhancer
 <220><221> source
 <222> (1)..(238)
 <223> /organism="Artificial Sequence" /note="Translation Enhancer"
 /mol_type="unassigned DNA"
 <400> 2
 aagctttaat acgactcact atagggccgg cgggtttctg acatccggcg ggtttctgac 60
 atccggcggg tttctgacat ccggcgggtt tctgacatcc ggcgggttcc tgacatccgg 120
 cgggtttctg acatccggcg ggtttctgac atccggcggg tttctgacat ccggcgggtt 180
 tctgacatcc ggcgggttcc tgacattcac aaccaggcct ccacaacat ggctcgag 238

```

<210> 3
<211> 238
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Translation Enhancer
<220><221> source
<222> (1)..(238)
<223> /organism="Artificial Sequence" /note="Translation Enhancer"

        /mol_type="unassigned DNA"
<400> 3
aagctttaat acgactcact atagggccgg cgggaattctg acatccggcg gaattctgac      60
atccggcgga attctgacat ccggcggaat tctgacatcc ggcggaattc tgacatccgg      120
cggaattctg acatccggcg gaattctgac atccggcgga attctgacat ccggcggaat      180
tctgacatcc ggcggaattc tgacattcac aaccaggcct ccacaacat ggctcgag      238

<210> 4
<211> 85
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Nuclear Retention Element
<220><221> source
<222> (1)..(85)

<223> /organism="Artificial Sequence" /note="Nuclear Retention Element"
        /mol_type="unassigned DNA"
<400> 4
tcgagtgttt tgctggggtt tttccttgtt cgcaccggac acctccagtg accagacggc      60
aaggttttta tcccagtgta tattg      85

<210> 5
<211> 3102
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Empty pUC TE ENE vector
<220><221> source
<222> (1)..(3102)

```

<223> /organism="Artificial Sequence" /note="Empty pUC TE ENE vector"

/mol_type="unassigned DNA"

<400> 5

taatacgact cactataggg cggcggggtt tctgacatcc ggcgggtttc tgacatccgg	60
cgggtttctg acatccggcg ggtttctgac atccggcggg tttctgacat cggcggggtt	120
tctgacatcc ggcgggtttc tgacatccgg cgggtttctg acatccggcg ggtttctgac	180
atccggcggg tttctgacat tcacaaccag gcctccacaa ccctcgagtg ttttgctgg	240
gtttttcctt gttgcaccg gacacctcca gtgaccagac ggcaaggttt ttatcccagt	300
gtatattgtc gacaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	360
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	420
aaaaaaaaaa aaaaaaaagca ggtgtgtctc tctccacctg cgaattcact ggccgtcgtt	480
ttacaacgtc gtgactggga aaacctggc gttaccaac ttaatcgctt tgcagcacat	540
ccccctttcg ccagctggcg taatagcgaa gaggcccgca ccgatcgccc ttccaacag	600
ttgcgcagcc tgaatggcga atggcgccctg atgcggtatt ttctccttac gcatctgtgc	660
ggtatttcac accgcatatg gtgactctc agtacaatct gctctgatgc cgcatagtta	720
agccagcccc gacaccgcc aacaccgct gacgcgcct gacgggcttg tctgctccc	780
gcatccgctt acagacaagc tgtgaccgtc tccgggagct gcatgtgtca gaggttttca	840
ccgtcatcac cgaaacgcgc gagacgaaag ggcctcgtga tacgcctatt tttataggtt	900
aatgtcatga taataatggt ttcttagacg tcaggtggca cttttcgggg aatgtgcgc	960
ggaacccta ttigtattt tttctaaata cattcaata tgtatccgct catgagacaa	1020
taacctgat aaatgcttca ataatttga aaaaggaaga gtatgagtat tcaacattc	1080
cgtgtcgccc ttattcctt ttttgcggca ttttgcttc ctgtttttgc tcaccagaa	1140
acgctggtga aagtaaaaga tgctgaagat cagtgggtg cacgagtggg ttacatcga	1200
ctggatctca acagcggtaa gatccttgag agttttcgcc ccgaagaacg ttttccaatg	1260
atgagcactt ttaaagttct gctatgtggc gcggtattat cccgtattga cgccgggcaa	1320
gagcaactcg gtcgccgat acaactattc cagaatgact tggttgagta ctcaccagtc	1380
acagaaaagc atcttacgga tggcatgaca gtaagagaat tatgcagtgc tgccataacc	1440
atgagtgata aactgcggc caacttactt ctgacaacga tcggaggacc gaaggagcta	1500
accgcttttt tgcacaacat ggggatcat gtaactcgcc ttgatcgttg ggaaccggag	1560

ctgaatgaag ccatacaaaa cgacgagcgt gacaccacga tgcctgtagc aatggcaaca 1620

 acgttgcgca aactattaac tggcgaacta cttactctag cttcccggca acaattaata 1680
 gactggatgg aggccgataa agttgcagga ccacttctgc gctcggccct tccggetggc 1740
 tggtttattg ctgataaatc tggagccggt gagcgtgggt ctcgcggtat cattgcagca 1800
 ctggggccag atggtaaacc ctcccgtatc gtagttatct acacgacggg gagtcaggca 1860
 actatggatg aacgaaatag acagatcgtc gagatagggt cctcactgat taagcattgg 1920
 taactgtcag accaagttta ctcatatata ctttagattg atttaaaact tcatttttaa 1980
 tttaaaagga tctaggtgaa gatccttttt gataatctca tgacaaaat cccttaacgt 2040

 gagttttcgt tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat 2100
 ccttttttcc tgcgcgtaat ctgctgcttg caaacaacaa aaccaccgct accagcgggtg 2160
 gtttgtttgc cggatcaaga gctaccaact ctttttccga aggttaactgg cttcagcaga 2220
 gcgcagatac caaatactgt tcttctagtg tagccgtagt taggccacca cttcaagaac 2280
 tctgtagcac cgcctacata cctcgtcttg ctaatcctgt taccagtggc tgctgccagt 2340
 ggcgataagt cgtgtcttac cgggttggac tcaagacgat agttaccgga taaggcgcag 2400
 cggtcgggct gaacgggggg ttcgtgcaca cagcccagct tggagcgaac gacctacacc 2460

 gaactgagat acctacagcg tgagctatga gaaagccca cgcttcccga agggagaaaag 2520
 gcggacaggt atccggtaag cggcaggggtc ggaacaggag agcgcacgag ggagcttcca 2580
 gggggaacg cctggatctt ttatagtcct gtcgggtttc gccacctctg acttgagcgt 2640
 cgatttttgt gatgctcgtc agggggggcg agcctatgga aaaacgccag caacgcggcc 2700
 tttttacggt tcttggcctt ttgctggcct ttgctcaca tgttctttcc tgcgttatcc 2760
 cctgattctg tggataaccg tattaccgcc tttagtgag ctgataccgc tcgccgcagc 2820
 cgaacgaccg agcgcagcga gtcagtgagc gaggaagcgg aagagcggcc aatacgcaaa 2880

 ccgcctctcc ccgcgcgttg gccgattcat taatgcagct ggcacgacag gtttcccagc 2940
 tggaaagcgg gcagtgagcg caacgcaatt aatgtgagtt agctcactca ttaggcaccc 3000
 caggctttac actttatgct tccggctcgt atgttggtg gaattgtgag cggataaaaa 3060
 tttcacacag gaaacagcta tgaccatgat tacccaagc tt 3102