

명세서

발명의 명칭: 비천연 5'비번역 영역 및 그의 용도

기술분야

- [1] 비천연 5'비번역 영역 및 그의 용도에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 메신저 RNA는 플라스미드 DNA의 대안으로 암 면역 요법 및 줄기 세포 기반 생물 의학 연구 분야에서 유전자 전달 분자로 자주 사용된다. 유전자 산물의 직접적인 공급원으로서 mRNA는 특히 비분열 세포에서 DNA 전달에 대한 상당한 장벽을 나타내는 핵 진입에 대한 요구 사항의 부재를 포함하여 몇 가지 장점을 가지고 있다. 또한 비정상적인 전사 및 삽입 돌연변이 유발로 인한 발암 유전자의 발현을 회피함으로써, mRNA가 숙주 계놈에 통합될 가능성은 거의 없다.
- [3] 주어진 유전자에 대해, 5'UTR 및 3'UTR을 포함하는 번역되지 않은 유전자 영역(UTR)은 발현 조절에 관여하는 영역이다. 5'UTR은 mRNA로 전사되지만 단백질로 번역되지 않는 모든 단백질 코딩 서열의 5'말단에 위치한 DNA의 조절 영역이다. 5'UTR은 다양한 조절 요소, 예를 들어 5'캡 구조, G-사중체 구조(G4), 스텝-루프 구조 및 내부 리보솜 진입 부위(IRES)를 포함할 수 있으며, 이는 번역 개시 제어에 중요한 역할을 한다. 단백질 코딩 서열의 하류에 위치한 3'UTR은 전사체 절단, 안정성 및 폴리아데닐화, 번역 및 mRNA 국소화를 비롯한 많은 조절 과정에 관여하는 것으로 알려져 있다. 3'UTR은 많은 조절 단백질 및 작은 비암호화 RNA(예, microRNA)의 결합 부위 역할을 한다.
- [4] 현재의 mRNA 치료법은 일반적으로 종종 조직 특이적이지 않거나 낮은 수준의 단백질 발현을 제공하는 천연 또는 표준 UTR 서열에 의존한다. 치료 mRNA를 안정화하고 단백질 합성을 증가시킬 수 있는 새로운 5'UTR 및 그의 조합에 대한 필요성이 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [5] 일 양상은 비천연 5'비번역 영역(untranslated region, 5'UTR)을 포함하는 mRNA를 제공한다.
- [6] 다른 양상은 상기 mRNA를 코딩하는 DNA를 제공한다.
- [7] 다른 양상은 상기 DNA를 주형으로 하여 mRNA를 전사하는 단계를 포함하는, mRNA를 얻는 방법을 제공한다.
- [8] 다른 양상은 상기 mRNA를 번역하는 단계를 포함하는, 폴리펩티드를 얻는 방법을 제공한다.
- [9] 다른 양상은 상기 mRNA를 포함하는 조성물을 제공한다.
- [10] 다른 양상은 상기 mRNA를 숙주세포에 도입하는 단계를 포함하는 상기 mRNA를 이용하는 방법을 제공한다.

과제 해결 수단

- [11] 본 명세서에 있어서, "5'비번역 영역(untranslated region, 5'UTR)"은 폴리펩티드를 코딩하지 않는 개시 코돈 즉, 리보솜에 의해 번역되는 mRNA 전사체의 첫번째 코돈으로부터 직접적으로 상류(즉, 5')인 mRNA의 영역을 나타낸다.
- [12] 본 명세서에 있어서, "3'비번역 영역(untranslated region, 3'UTR)"은 폴리펩티드를 코딩하지 않는 중단 코돈(stop codon) 즉, 번역 종결(termination)을 신호하는 mRNA 전사체의 코돈으로부터 직접적으로 하류(즉, 3')인 mRNA의 영역을 나타낸다.
- [13] 본 명세서에 있어서, "오픈 리딩 프레임(open reading frame, ORF)" 또는 "폴리펩티드를 코딩하는 서열(sequence encoding a polypeptide)"은 개시 코돈 예를 들면, 메티오닌 코돈(ATG)으로 시작하고 중단 코돈 예를 들면, TAA, TAG 또는 TGA로 끝나고 폴리펩티드를 코딩하는 DNA의 연속 영역을 나타낸다.
- [14] 본 명세서에 있어서, "폴리아데닐레이트 서열(polyadenylate sequence)", "폴리A", 또는 "폴리A 테일(polyA tail)"은 복수의 연속적 아데닌 뉴클레오티드를 포함하는 3'UTR로부터 하류 예를 들면, 직접적으로 하류(즉, 3')에 있는 mRNA의 영역을 나타낸다. 상기 폴리A 테일은 1,000개, 500개, 400, 또는 300개 이하의 아데닌 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 예를 들면, 상기 폴리A 테일은 10 내지 300개 아데닌 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 예를 들면, 상기 폴리A 테일은 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 또는 300 아데닌 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 상기 폴리A 테일은 예를 들면, 50 내지 250개 아데닌 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 세포 또는 개체와 같은 생체 내에서 상기 폴리A 테일은 효소, 예를 들면, 세포질에 있는 효소의 공격으로부터 mRNA를 보호하고 전사 종결, 핵으로부터 mRNA의 배출(export), 및 번역을 돕는 역할을 할 수 있다. 3'폴리A 테일은 아데닌 뉴클레오티드의 영역(stretch)으로서, 일반적으로 mRNA 가공 과정 동안 전사된 mRNA 또는 미성숙 mRNA에 첨가된다.
- [15] 본 명세서에 있어서, 용어 "작동적으로 연결된(operatively linked)"은 하나의 기능이 다른 것에 의하여 영향을 받도록 단일 핵산 단편 상에서 뉴클레오티드 서열들이 연결된 것을 나타낸다. 예를 들면, 프로모터는 코딩 서열의 발현에 영향을 미칠 수 있는 경우(즉, 코딩 서열이 상기 프로모터의 전사적 조절하에 있는 경우) 코딩 서열(예를 들면, ORF)에 작동가능하게 연결되어 있는 것이다. 코딩 서열은 센스 또는 안티센스 방향으로 조절 서열에 작동가능하게 연결되어 있을 수 있다. 본 명세서에서 달리 언급이 없으면, 청구된 mRNA 또는 DNA에 포함된 각 핵산 서열은 작동적으로 연결된 것을 나타낸다.
- [16] 본 명세서에 있어서, 뉴클레오티드 서열의 위치와 관련하여 달리 언급이 없으면, 5' 말단으로부터 3' 말단의 방향으로 연결되거나 위치하는 것을 나타낸다.

- [17] 본 명세서에 있어서, 용어 "벡터(vector)" 또는 "핵산 구조체(nucleic acid construct)"는 유전자 또는 ORF 또는 DNA 단편을 세포로 나눌 수 있는 임의의 핵산을 나타낸다. 상기 벡터는 예를 들면, 세포에서 복제될 수 있는 것일 수 있다. 상기 벡터는 바이러스, 박테리오파지, 프로바이러스, 플라스미드, 파아지미드, 트랜스포존, 또는 효모 인공 염색체 (yeast artificial chromosome, YAC), 박테리아 인공 염색체 (bacterial artificial chromosome, BAC), 식물 인공 염색체 (plant artificial chromosome, PLAC) 등과 같은 인공 염색체일 수 있다.
- [18] 제1 양상은 비천연 5'비번역 영역(untranslated region, 5'UTR)을 포함하는 mRNA로서,
- [19] 상기 5'UTR은 2차 구조를 형성하지 않는 것인 mRNA를 제공한다. 본 명세서에 서 용어 "2차 구조"는 염기쌍 간의 결합을 의미한다.
- [20] 상기 비천연 5'UTR을 포함하는 mRNA는 하기 화학식 1의 서열을 갖는 것으로서,
- [21] 화학식 1: AGN_aGCCACC
- [22] 여기서 N은 A, U, G, 또는 C이고 각 N은 같거나 다를 수 있으며, a는 N의 반복 수로서 42, 또는 62인 것일 수 있다.
- [23] 상기 5'UTR를 포함하는 mRNA는 서열번호 1 내지 9 중 어느 하나의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것일 수 있다. 상기 mRNA는 서열번호 1 내지 9 중 어느 하나의 뉴클레오티드 서열로 이루어진 것일 수 있다. 상기 mRNA는 서열번호 1 내지 9 중 어느 하나의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 분리된 핵산 예를 들면, 전사체일 수 있다. 상기 전사체 목적 단백질을 코딩 서열을 포함하는 것일 수 있다.
- [24] 상기 mRNA는 폴리펩티드를 코딩하는 서열을 더 포함하는 것일 수 있다. 상기 폴리펩티드를 코딩하는 서열은 상기 5'UTR의 하류에서 5'UTR과 작동가능하게 연결된 것일 수 있다.
- [25] 상기 폴리펩티드는 항원성 또는 치료적 폴리펩티드일 수 있다. 상기 항원성 폴리펩티드는 바이러스 항원성 폴리펩티드일 수 있다.
- [26] 상기 치료적 폴리펩티드는 질병을 치료하는 활성 예를 들면, 항암 활성을 갖는 임의의 폴리펩티드일 수 있다. 상기 항암 활성을 갖는 폴리펩티드는 종양 억제자(tumor suppressor), 면역 자극 단백질(immune stimulating protein), 방사선 증진 단백질(radiation enhancing protein), 또는 화학요법 증진 단백질(chemotherapy enhancing protein)일 수 있다. 종양 억제자의 일 예는 암세포 자체 세포 주기 조절에 관여하여 항암 활성을 갖는 것일 수 있다. 상기 면역 자극에 관련된 면역 세포는 B 세포, NK 세포, T 세포, 또는 비만 세포(mast cell)를 포함하는 것일 수 있다. 상기 항암 활성을 갖는 폴리펩티드는 숙주 세포 또는 이를 포함하는 개체에서 항원성을 갖지 않는 것일 수 있다. 상기 항암 활성을 갖는 폴리펩티드는 항체, 호르몬, 사이토카인, 효소, 이의 유도체, 또는 이들의 조합일 수 있다. 또한, 상기 항암 활성을 갖는 폴리펩티드는 암 세포의 증식을 억제하는 것일 수 있다. 상기 폴리펩티드는 융합 단백질을 포함하는 제조합된 것일 수 있다.

- [27] 상기 폴리펩티드는 p53 단백질일 수 있다.
- [28] 상기 폴리펩티드를 코딩하는 서열은 코돈 최적화된 것일 수 있다. 상기 코돈 최적화는 상기 mRNA 분자가 도입되는 숙주세포에 따라 달라질 수 있다. 또한, 상기 폴리펩티드를 코딩하는 서열은 축퇴서열(degenerate sequence)을 포함하는 것일 수 있다.
- [29] 상기 mRNA는 발현 조절 서열을 더 포함하는 것일 수 있다. 상기 발현 조절 서열은 번역 조절 또는 mRNA의 안정성에 관여하는 것일 수 있다. 상기 발현 조절 서열은 코작 서열, 3'UTR 또는 폴리A 서열일 수 있다.
- [30] 상기 5'UTR, 폴리펩티드를 코딩하는 서열, 및 발현 조절 서열은 인 비트로 또는 인 비보에서 전사된 것으로서, 공통의 전사체일 수 있다.
- [31] 상기 3'UTR은 상기 폴리펩티드를 코딩하는 서열의 하류에서 이와 작동가능하게 연결되어 있는 것일 수 있다.
- [32] 상기 3'UTR은 임의의 유전자로부터 유래된 것일 수 있다. 상기 3'UTR은 상기 5'UTR과 조합되었을 때 RNA의 발현 효율을 상승적으로 증가시키는 것일 수 있다.
- [33] 상기 폴리A 서열은 상기 3'UTR의 하류에서 이와 작동가능하게 연결된 것일 수 있다.
- [34] 상기 5'UTR은, 천연형 5'UTR이 사용된 경우에 비하여, 번역 효율, 상기 RNA의 안정성, 또는 그 조합을 증가시키는 활성을 갖는 것일 수 있다.
- [35] 일부 구체예에 있어서, 상기 mRNA는 캡0, 캡1, 또는 캡2와 같은 "5' 캡"을 포함한다. 용어 "5'캡(5'cap)"은 mRNA 분자의 5'말단에서 발견되는 캡 구조를 나타낸다. 상기 5'캡은 일반적으로 mRNA의 5'에서 3'으로의 사슬(5'-to-3' chain)의 첫번째 뉴클레오티드의 5' 위치에 5'-트리포스페이트를 통하여 연결된 7-메틸구아닌 리보뉴클레오티드이다. 캡0에서, mRNA의 첫번째 및 두번째 캡-근위 뉴클레오티드(cap-proximal nucleotide)의 리보스는 모두 2'-히드록실을 포함한다. 캡1에서, mRNA의 첫번째 및 두번째 캡-근위 뉴클레오티드의 리보스는 각각 2'-메톡시 및 2'-히드록실을 포함한다. 캡2에서, mRNA의 첫번째 및 두번째 캡-근위 뉴클레오티드의 리보스는 모두 2'-메톡시를 포함한다. 상기 7-메틸구아닌 리보뉴클레오티드는 더 변형된 것일 수 있다. 예를 들면, 변형된 7-메틸구아닌 리보뉴클레오티드는 7-메틸구아닌 3'-메톡시(7mG(3'OMe)) 또는 2'-히드록실 및 3'-히드록실이 독립적으로 설포닐-함유 기 예를 들면, 메실기, 에실기, 트리플릴기, 트레실기, 토실기, 브로실기, 노실기, 및 단실기로 이루어지는 군으로부터 선택되는 설포닐-함유 기로 치환될 수 있다. 설포닐-함유 기로 치환된 변형된 7-메틸구아닌 리보뉴클레오티드는 예를 들면, 7-메틸구아닌 3'-메실(7mG(3'OMs))일 수 있다. 사람 mRNA와 같은 포유동물 mRNA를 포함한, 대부분의 내재적 고등 진핵 mRNA는 캡1 또는 캡2를 포함한다. 캡0, 및 캡1 및 캡2와 상이한 다른 캡 구조는 사람과 같은 포유동물에서 면역원성일 수 있다.

- [36] 상기 캡은 전사와 함께(co-transcriptionally) 도입될 수 있다. 예를 들면, 5' 캡 또는 5' 캡 아날로그는 DNA 주형을 5' 캡 또는 5' 캡 아날로그의 존재하에서 인 비트로 전사에서, 상기 5' 캡 또는 5' 캡 아날로그가 개시에서 전사체에 도입될 수 있다. 또한, 상기 캡은 전사 후(post-transcriptionally)에 RNA에 도입될 수 있다. 5' 캡 또는 5' 캡 아날로그를 전사 후(post-transcriptionally) 캡핑 효소, 예를 들면, 백시니아 바이러스의 캡핑 효소에 의하여 RNA에 도입될 수 있다. 상기 5' 말단 캡 구조가 형성된 5' 말단 서열은 예를 들면, 7mG(5')ppp(5')ApG, m7G(3'OMe)(5')ppp(5')ApG, m7G(3'OMe)(5')ppp(5')(2'OMeA)pG, m7G(3'OMs)(5')ppp(5')(2'OMeA)pG, 또는 m7G(5')ppp(5')(2'OMeA)pG를 포함할 수 있다.
- [37] 일 구체예에서, 상기 mRNA는 변형된 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 일 구체예에서, 상기 mRNA는 하나 이상의 U가 N1-메틸-슈도우리딘으로 치환된 것일 수 있다. 상기 mRNA에서, 5' 캡이 형성된 5' 말단의 서열은 m7(3'OMeG)(5')ppp(5')(2'OMeA)pG, 또는 m7(3'OMsG)(5')ppp(5')(2'OMeA)pG의 캡 구조를 갖는 것일 수 있다. 상기 mRNA에서, 모든 U는 N1-메틸-슈도우리딘으로 치환되어 있을 수 있다. 상기 mRNA는, 모든 U는 N1-메틸-슈도우리딘으로 치환되어 있고, 5' 캡이 형성된 5' 말단 서열은 m7(3'OMeG)(5')ppp(5')(2'OMeA)pG 또는 m7(3'OMsG)(5')ppp(5')(2'OMeA)pG의 캡 구조를 갖는 것일 수 있다.
- [38] 상기 mRNA는 서열번호 1 내지 9 중 어느 하나의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것이고, 상기 서열의 U 중 하나 이상이 N1-메틸-슈도우리딘으로 치환된 것일 수 있다. 상기 mRNA는 그 서열의 모든 U가 N1-메틸-슈도우리딘으로 치환된 것일 수 있다.
- [39] 제2 양상은 폴리펩티드를 코딩하는 서열을 포함하는 상기 mRNA를 번역하는 단계를 포함하는, 폴리펩티드를 얻는 방법을 제공한다.
- [40] 제3 양상은 활성 성분으로서 상기 mRNA를 포함하는 조성물을 제공한다. 상기 조성물은 mRNA 또는 이에 의하여 발현되는 산물을 개체에 전달하기 위한 것일 수 있다.
- [41] 제4 양상은 활성 성분으로서 상기 mRNA를 포함하는 mRNA 또는 이에 의하여 발현되는 산물을 포함하는 치료적 반응 또는 폴리펩티드에 대한 면역 반응을 유도하기 위한 조성물을 제공한다.
- [42] 제3 양상 및 제4 양상에서, 상기 조성물은 면역원성 또는 질병을 치료하기 위한 것일 수 있다. 상기 질병은 선택된 폴리펩티드에 따라 달라질 수 있다. 상기 질병은 예를 들면, 바이러스 또는 외래 세포에 의한 감염증, 암, 대사성질환, 염증, 위장관 질환, 내분비 질환, 패혈증, 또는 자가 면역 질환일 수 있다. 상기 질병에 있어서 상기 외래 세포는 원핵 또는 진핵 세포일 수 있다. 상기 외래 세포는 박테리아일 수 있다.
- [43] 상기 mRNA는 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것일 수 있다. 상기 폴리펩티드는 항원성 또는 치료적 폴리펩티드일 수 있다. 상기 항원

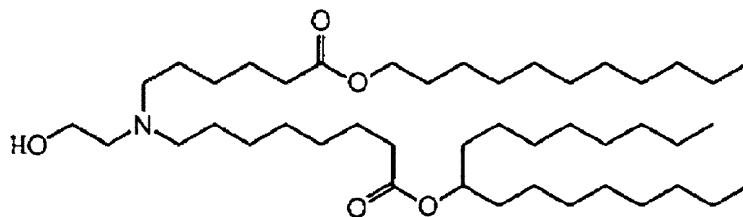
성 폴리펩티드는 바이러스 항원성 폴리펩티드일 수 있다. 상기 폴리펩티드에 대하여는 제1 양상에서 설명한 바와 같다.

- [44] 또한 상기 mRNA는 siRNA 또는 miRNA와 같은 다른 유전자의 발현을 조절하여, 항암 활성을 갖는 것일 수 있다.
- [45] 상기 조성물은 상기 mRNA의 "효과적인 양(effective amount)"으로 세포, 조직 또는 개체와 접촉될 수 있다.
- [46] 상기 효과적인 양은 표적 조직, 표적 세포, 투여 수단, mRNA의 물리적 특성(예를 들면, 크기 및 변형된 뉴클레오타이드의 함량 정도) 및 조성물의 다른 성분에 근거하여 정할 수 있다. 일반적으로, 효과적인 양의 상기 조성물은 세포에서 항원 생산의 함수로서 유도된(induced) 또는 부스트된(boosted) 면역 반응을 야기시킬 수 있다.
- [47] 상기 조성물은 근육내, 피하, 피내, 비강 또는 폐로 투여될 수 있다.
- [48] 상기 조성물은 하나 이상의 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 포함할 수 있다. 상기 조성물 중 mRNA는 상기 담체 또는 부형제와 제형화되거나 복합체화되어 있을 수 있다. 상기 담체 또는 부형제는 당업계에 알려진 것일 수 있다.
- [49] 상기 조성물에 포함되는 활성 성분, 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제, 및/또는 다른 부가적 성분의 상대적 양은 치료될 개체의 아이덴티티(identity), 크기 및/또는 조건 및 투여되는 경로에 따라 달라질 수 있다. 예를 들면, 상기 조성물은 0.1% 내지 100%, 예를 들면, 0.5% 내지 50%, 1.0% 내지 30%, 5.0% 내지 80%, 또는 80%(w/w) 이상의 활성 성분을 포함할 수 있다.
- [50] 상기 조성물은 나노입자로서 제형화된 것일 수 있다. 상기 나노입자는 mRNA와 같은 폴리뉴클레오타이드를 세포에 전달하기 위한 것으로서 알려진 것일 수 있다. 예를 들면, 상기 나노입자는 RNA 백신에 사용되는 알려진 나노입자일 수 있다. 상기 나노입자는 지질 나노입자(lipid nanoparticle, LNP)일 수 있다. 상기 조성물은 지질 나노입자(lipid nanoparticle, LNP)로서 제형화된 것 또는 LNP에 결합되어 있는 것일 수 있다. 상기 결합은 LNP 내 또는 표면에 결합하는 것을 포함한다. 예를 들면, 상기 조성물은 지질 폴리양이온(lipid polycation) 복합체 내에 제형화된 것 또는 지질 폴리양이온 복합체에 결합되어 있는 것일 수 있다. 상기 지질 폴리양이온(lipid polycation) 복합체는 양이온성 지질 나노입자(cationic lipid nanoparticle)라고도 한다. 상기 폴리양이온은 MC3, 지질 319(Lipid 319), C12-200, 5A2-SC8, 306Oi10, 모더나 지질 5(Moderna Lipid 5), Acuitas A9, SM-102, ALC-0315, Arcturus 지질 2,2(8,8) 4C CH₃, Genevant CL1, 폴리라이신, 폴리오르니틴, 및/또는 폴리아르기닌과 같은 양이온성 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 또한, 상기 조성물은 1,2 디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린(DSPC), 디팔미토일 포스파티딜콜린(DPPC), 콜레스테롤과 같은 스테롤 또는 디올레오일 포스파티딜에탄올아민(DOPE)과 같은 비양이온성 지질을 포함하는 지질 나노입자에 제형화되거나 결합되어 있을 수 있다. 또한, 상기 조성물은 1,2-디미리스토일-rac-

글리세로-3-메톡시폴리에틸렌글리콜-2000(PEG2000-DMG), 2-[(폴리에틸렌글리콜)-2000]-N,N-디테트라데실아세트아미드(ALC-0159), 폴리에틸렌글리콜디메타크릴레이트(PEG-DMA)와 같은 PEG-지질을 포함하는 지질 나노입자에 제형화 제형화되거나 결합되어 있을 수 있다.

- [51] 지질 나노입자 제형은 양이온성 지질, 인지질, 콜레스테롤과 같은 스테롤, PEG-지질, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 지질 나노입자 제형은 예를 들면 양이온성 지질, 인지질, 콜레스테롤과 같은 스테롤, 및 PEG-지질을 포함할 수 있다. 또한, 지질 나노입자는 PEG-변형된 지질, 비양이온성 지질, 스테롤, 및 이온화 가능한 지질, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 상기 지질 나노입자는 0.5 내지 15 mol% PEG-변형된 지질, 5 내지 25 mol% 비양이온성 지질, 25 내지 55 mol% 스테롤, 및 20 내지 60 mol% 이온화 가능한 지질을 포함할 수 있다. 상기 PEG-변형된 지질은 1,2 디미리스토일-sn-글리세롤 메톡시폴리에틸렌글리콜(PEG2000-DMG)이고, 비양이온성 지질은 1,2 디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린(DSPC)이고, 스테롤은 콜레스테롤이고, 상기 이온화가능한 양이온성 지질은 하기 구조의 화합물1일 수 있다.

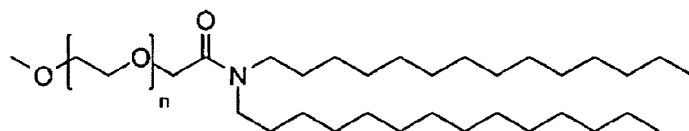
[52]



[53] (화합물 1)

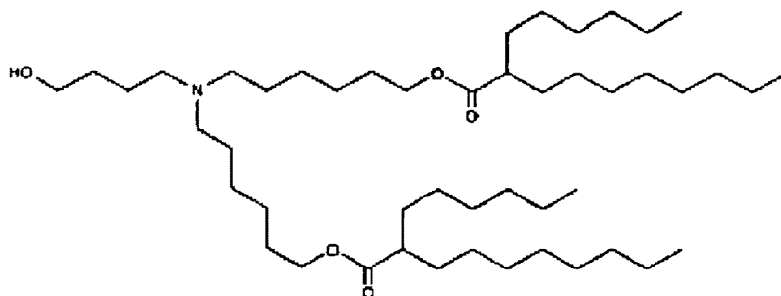
- [54] 상기 PEG-변형된 지질은 하기 구조의 화합물2(ALC-0159)이고, 비양이온성 지질은 1,2 디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린(DSPC)이고, 스테롤은 콜레스테롤이고, 상기 이온화가능한 양이온성 지질은 하기 구조의 화합물3(ALC-0315)일 수 있다.

[55]



[56] (화합물 2)

[57]



- [58] (화합물 3)
- [59] 제5 양상은 상기 mRNA를 숙주세포에 도입하는 단계를 포함하는 mRNA를 이용하는 방법을 제공한다.
- [60] 상기 방법에 있어서, 상기 숙주세포는 개체 유래의 임의의 세포일 수 있다. 상기 개체는 사람을 포함한 포유동물일 수 있다. 상기 세포는 예를 들면, 줄기세포, 생식세포 또는 체세포일 수 있다. 상기 방법에 있어서, 상기 숙주세포는 수지상 세포를 포함한 항원제공 세포, 모노사이트 또는 마크로파지인 것일 수 있다.
- [61] 상기 방법은 상기 mRNA를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 것일 수 있다. 상기 투여는 비경구 또는 경구 투여일 수 있다. 상기 투여는 근육내, 피하, 피내, 비강 또는 폐내 투여일 수 있다. 상기 개체는 사람을 포함한 포유동물일 수 있다.
- [62] 상기 방법은 개체를 폴리펩티드에 대하여 면역화하는 것 또는 치료적 폴리펩티드에 의한 치료적 반응을 유도하는 것일 수 있다. 또한, 상기 방법은 개체에서 질병을 치료하는 것일 수 있다.
- [63] 제6 양상은 상기 mRNA를 코딩하는 DNA를 제공한다.
- [64] 상기 DNA는 전사가 가능한 뉴클레오타이드 서열을 도입하기 위한 서열을 더 포함하는 것일 수 있다. 상기 전사가 가능한 뉴클레오타이드 서열을 도입하기 위한 서열은 상기 3'UTR을 코딩하는 뉴클레오타이드의 상류에서 3'UTR과 작동가능하게 연결된 것일 수 있다. 상기 전사가 가능한 뉴클레오타이드 서열을 도입하기 위한 서열은 클로닝 자리인 것일 수 있다. 상기 클로닝 자리는 다중 클로닝 자리일 수 있다. 클로닝 자리는 제한 효소의 인지 부위, 절단 부위 또는 그 조합을 포함할 수 있다.
- [65] 상기 DNA는 프로모터 서열을 더 포함하는 것일 수 있다. 상기 프로모터는 상기 5'UTR의 상류에서 그에 작동가능하게 연결된 것일 수 있다.
- [66] 상기 5'UTR을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열, 폴리펩티드를 코딩하는 서열 또는 전사가 가능한 뉴클레오타이드 서열을 도입하기 위한 서열, 및 3'UTR은 인 비트로 또는 인 비보에서 전사되는 경우 공통의 전사체를 형성하도록 연결된 것일 수 있다.
- [67] 상기 DNA는 벡터일 수 있다. 상기 벡터는 목적 단백질 또는 mRNA를 발현하기 위한 발현 벡터 또는 전사 벡터일 수 있다.
- [68] 제7 양상은 상기 DNA를 주형으로 하여 mRNA를 전사하는 단계를 포함하는, mRNA를 얻는 방법을 제공한다. 상기 전사는 인 비트로, 엑스 비보 또는 인 비보 전사를 포함할 수 있다. 상기 인 비보 전사는 개체 내 전사를 포함할 수 있다.
- [69] 용어 "인 비트로 전사" 또는 "RNA 인 비트로 전사"는 무세포 시스템 즉, 인 비트로에서 mRNA를 포함한 RNA가 합성되는 과정을 나타낸다. 플라스미드 DNA 벡터를 포함한 클로닝 벡터 DNA가 RNA 전사체의 생성을 위한 주형으로서 적용될 수 있다. 이들 클로닝 벡터는 일반적으로 전사 벡터(transcription vector)라고도 한다. RNA는 적절한 DNA 주형의 DNA 의존성 인 비트로 전사에 의하여 얻어질 수 있다. 상기 DNA 주형은 선형화된 플라스미드 DNA 주형일 수 있다. RNA 인 비트로 전사를 제어하는 프로모터는 DNA 의존성 RNA 폴리머라제를 위한 임의의 프

로모터일 수 있다. 상기 DNA 의존성 RNA 폴리머라제는 T7 RNA 폴리머라제, T3 RNA 폴리머라제, SP6 RNA 폴리머라제, 또는 그 조합일 수 있다. RNA 인 비트로 전사를 위한 DNA 주형은 핵산을 클로닝하고, 이를 RNA 인 비트로 전사를 위한 벡터에 도입하여 얻어질 수 있다. 상기 DNA는 인 비트로 전사되는 각 RNA에 대응하는 cDNA를 포함할 수 있다. 상기 RNA 인 비트로 전사를 위한 벡터는 원형 플라스미드 DNA일 수 있다. 상기 cDNA는 mRNA의 역전사 또는 화학 합성에 의하여 얻어질 수 있다.

- [70] 상기 전사 벡터는 프로모터, 5'UTR을 코딩하는 뉴클레오티드 서열, 폴리펩티드를 코딩하는 서열, 예를 들면 오픈 리딩 프레임(open reading frame, ORF), 3'UTR을 코딩하는 뉴클레오티드 서열, 및 폴리A를 포함할 수 있다. 상기 5'UTR은 서열 번호 1 내지 9의 뉴클레오티드 서열 중 하나 이상을 포함하는 것일 수 있다. 상기 3'UTR은 임의의 알려진 3'UTR을 포함하는 것일 수 있다. 상기 전사 벡터는 또한 복제 원점 예를 들면, 대장균 복제 원점 ColE1 ori, 선택마커 유전자, 또는 그 조합을 포함할 수 있다. 상기 프로모터는 T7 프로모터일 수 있다. 상기 선택마커는 항생제, 예를 들면, 카나마이신 저항성 효소일 수 있다.
- [71] 상기 인 비트로 전사는 상기 전사 벡터를 숙주세포, 예를 들면, 대장균에 도입하여 형질전환된 숙주세포를 얻고, 얻어진 숙주세포를 배양하여 mRNA의 주형이 되는 플라스미드 DNA를 포함하고 있는 숙주세포를 증식시키는 단계를 포함할 수 있다. 상기 인 비트로 전사는 증식된 숙주세포, 예를 들면 대장균으로부터 상기 플라스미드 DNA를 분리하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 플라스미드 DNA를 분리하는 단계는 배양물 중 세포층을 분리하고 세포로부터 플라스미드 DNA를 분리하는 것을 포함할 수 있다. 세포층 분리는 원심분리, 분리, 침전, 또는 그 조합에 의하여 이루어질 수 있다. 세포로부터 플라스미드 DNA 분리는 알려진 방법, 예를 들면 알칼리 추출법, 친화성 크로마토그래피, HPLC, 전기영동, 또는 그 조합에 의하여 이루어질 수 있다.
- [72] 상기 RNA를 얻는 방법은 상기 DNA를 포함하는 세포를 배양하여 상기 DNA의 RNA 전사체를 생산하는 단계를 포함하는 것일 수 있다.

발명의 효과

- [73] 일 양상에 따른 mRNA는 상대적으로 안정하고 생산 수율이 높아 mRNA를 효율적으로 전사 및 번역하는데 사용될 수 있다.
- [74] 다른 양상에 따른 폴리펩티드를 얻는 방법에 의하면, 폴리펩티드를 효율적으로 얻을 수 있다.
- [75] 다른 양상에 따른 상기 mRNA를 포함하는 조성물은 mRNA 또는 이에 의하여 발현되는 산물을 개체에 전달하는데 사용될 수 있다.
- [76] 다른 양상에 따른 치료적 반응 또는 폴리펩티드에 대한 면역 반응을 유도하기 위한 조성물은 개체에서 치료적 반응 또는 폴리펩티드에 대한 면역 반응을 유도하는데 사용될 수 있다.

- [77] 다른 양상에 따른 DNA는 mRNA를 얻는데 사용될 수 있다.
- [78] 다른 양상에 따른 RNA를 얻는 방법에 의하면, RNA를 효율적으로 얻을 수 있다.
- 발명의 실시를 위한 최선의 형태**
- [79] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [80] 실시예 1: 유전자의 수율을 증가시키는 구조 미형성 5'UTR 비천연 서열
- [81] 유전자의 수율을 증가시키는 5'UTR을 선별하였다. 5'UTR은 자연계에 존재하지 않는 비천연 서열로서 천연 서열에 비하여 유전자의 수율을 증가시키는 활성을 갖는다.
- [82] 먼저, 길이가 50 bp 또는 70 bp이고 평균 자유 에너지 (Mean free energy)가 0인 무작위 비천연 서열을 선별하고, 이 중 염기 사이에 2차 구조를 형성하지 않는 서열을 다시 선별하였다.
- [83] 선별된 mRNA 서열은 5' 말단을 보호하기 위한 캡핑 최적화를 목적으로 'AG'로 시작하고, 안정적인 유전자 발현을 위한 코작(kozak) 서열인 'GCCACC'로 끝나도록 설계되었다.
- [84] 서열의 선별은 서열의 수율을 증가시키는 활성이 우수한 서열을 1차 선별하였고, 그 서열을 기반으로 일부 염기서열을 치환하여 유전자의 수율을 증가시키는 활성을 개선할 수 있도록 하여, 최종 9개의 비천연 서열을 선별하였다(표 1).
- [85] [표1]

서열 번호	5'UTR 서열
1	AGCCGUCUCCAUCGUUACAGUCACCGUUUUCGCAUUCUGUC UAGCCACC
2	AGAAUCCAGUCAACGCAUAUCCACGUAUACCCGAACACAUCA CAGCCACC
3	AGCCCCCAACACUGACUUAUUCGCUUUAAGUUCCUCCAAAC GAGCCACC
4	AGAGCAGAACGCGUAACCACACCAUCGCAACAUCCCACUUGA UAGCCACC
5	AGACCAGACACCUAACAGACUAGACAUUUUACCGAAAUCCGC AUUAACCAUUCUAACUCGUAUAGCCACC
6	AGAUCACUAACACCAUAUAACGCUAUCUCCUCCUUCUCCGA CAUCCAGUACUCAUCCACAAGCCACC

7	AGUACCCACUCCAGAUAAACUGACAACCAUACGCGAACAACG ACGAAUCGUAUCACACGCAGAAGCCACC
8	AGCGAGAUAAACUUACAAGGAGAGAGAAGACGAGGAGAGAU AAUUAGAGAGAAAACGAGUAAGAGCCACC
9	AGUAAACUAACCACUCCAUCACGUAUAUAUCCUCUUUCACA CCUUCCAUCUCGAACUAACCGCCACC

- [86] 실시예 2: 비천연 5'UTR 서열을 사용한 주형 벡터 제작
- [87] 실시예 1에서 얻어진 서열번호 1 내지 9의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 비천연 5'UTR 뉴클레오티드 서열을 코딩하는 서열 중 하나 이상, 폴리펩티드를 코딩하는 유전자, 및 천연 CYP2E1 3'UTR 뉴클레오티드 서열을 코딩하는 서열을 작동가능하게 연결하여 제조된 벡터를 제조하였다. 상기 폴리펩티드는 서열번호 10의 아미노산 서열의 야생형 p53 단백질이다.
- [88] 구체적으로, 상기 벡터는 프로모터, 5'UTR을 코딩하는 뉴클레오티드 서열, 폴리펩티드를 코딩하는 오픈 리딩 프레임(open reading frame, ORF), 3'UTR을 코딩하는 뉴클레오티드 서열, 및 폴리A가 연결된 것이다.
- [89] 상기 벡터는 또한 대장균 복제 원점 ColE1 ori 및 선택마커 유전자를 포함할 수 있다. 상기 프로모터는 T7 프로모터일 수 있다. 상기 선택마커는 카나마이신 저항성 효소일 수 있다.
- [90] **2-1. p53 mRNA 전사를 위한 주형 벡터의 제작**
- [91] 설계된 비천연 5'UTR 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 중 하나, ORF로서 천연형 p53 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열, 천연 CYP2E1 3'UTR을 코딩하는 뉴클레오티드 서열, 및 폴리A를 포함하는 천연형 p53 mRNA 및/또는 그 단백질 산물 생산용 벡터를 제작하고, 이 벡터를 미생물 세포에 도입하여 얻어진 미생물 세포를 배양하여 클로닝 벡터를 생산하였다. 생산된 벡터를 주형으로 한 인 비트로 전사를 통하여 mRNA를 생산하였다.
- [92] 구체적으로, 먼저 pUC57-Amp^R 벡터(Addgene 사)로부터 항생제 저항 유전자를 카나마이신 저항성 유전자로 치환한 벡터 pUC57-Kan^R을 제작하였다. 제작된 벡터를 제한효소 HindIII 및 EcoRI 처리하여 절단한 후, 절단된 벡터를 합성 제작된 천연형 p53 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드와 리가제를 사용하여 연결하여, 천연형 p53 단백질을 코딩하는 서열을 삽입하였다. 삽입된 천연형 p53 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 5'UTR을 코딩하는 뉴클레오티드 서열과 천연형 p53 단백질을 코딩하는 서열을 포함하고 있고, 천연형 p53 뉴클레오티드 서열의 3'말단에는 제한효소 인식서열이 존재하므로, 이를 절단하여 천연 P450 2E1 3'UTR을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 도입하는데 사용하였다.
- [93] [표2]

서열 번호	천연형 p53 mRNA 전사를 위한 주형 벡터 유전자 서열(DNA)
11	<u>TAATACGACTCACTATA</u>
12	AGTGCTCCCCATCCAACTAACTGTCCCTCTGTCCGAAGTAA ACTGCACTGTCCCAGCACC
13	TCCGCGAATTGAACGAGGCCCTGGAGTTGAAAGACGCTCAAGCC GGAAAGGAACCAGGTGGGTCTAGGGCCCCACTCAAGCCATCTGA AGAGTAAGAAAGGCCAGTCCACTTCCAGGCACAAAAAGTTAAT GTTCAAGACGGAGGGTCCTGACTCTGAC
14	GTGTGTGGAGGACACCCTGAACCCCCCGCTTTCAAACAAGTTTT CAAATTGTTTGAGGTCAGGATTTCTCAAAGTATTCTTTCTTTG CATATGAGTATTTGAAAATAAATATTTTCCCAGAATATAAATAA ATCATCACATGATTATTTTAACTAT
15	AA AA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

[94] 표 2는 제작된 pUC57-Kan^R 벡터에 포함된 프로모터(서열번호 11), 5'UTR을 코딩하는 폴리뉴클레오티드(서열번호 12), 천연형 p53 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드(서열번호 13), 3'UTR을 코딩하는 폴리뉴클레오티드(서열번호 14), 및 폴리A 서열(서열번호 15)을 나타낸 것이다. 표 2에서, 서열번호 11의 밑줄로 표시된 뉴클레오티드는 mRNA의 전사 개시에 관여하는 T7 프로모터 부분을 의미한다. 또한, 서열번호 12의 굵음 표시된 뉴클레오티드는 인간 보조인자3의 천연 5'UTR 서열에서 유래된 5'UTR 서열이다. 또한, 서열번호 13은 5'UTR의 하류 뉴클레오티드의 서열로서 천연 p53 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열이다. 천연 p53 단백질은 서열번호 10의 아미노산 서열을 갖는다. 또한, 서열번호 14는 인간 시토크롬 P450 2E1 유전자의 천연 3'UTR 서열이다.

[95] **2-2. 비천연 5'UTR 서열과 천연형 p53 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열의 연결 및 클로닝**

[96] 상기 제작된 주형 벡터의 5'UTR 서열을 서열번호 1 내지 9 중 하나의 비천연 5'UTR 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열, 또는 서열번호 16의 천연 C3 5'UTR 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열로 치환하기 위해 해당 서열을 포함하는 프라이머 및 상기 천연형 p53 단백질의 XhoI 제한 효소 인식 부위 서열을 포함하는 프라이머를 프라이머 세트와 하고, 상기 주형 벡터를 주형으로 한 PCR 반응을 통해 5'UTR을 코딩하는 뉴클레오티드 서열 함유 DNA 단편을 얻었다.

[97] PCR 반응을 통해 확보된 상기 5'UTR을 코딩하는 뉴클레오티드 서열 함유 DNA 단편 각각과 2-1절에서 제작된 주형 벡터를 제한효소 HindIII와 XhoI으로 처리하

여 절단하고, 이들 절단된 서열을 리가제를 사용하여 연결하였다. 그 결과, 서열 번호_1 내지 9 중 하나의 5'UTR을 코딩하는 뉴클레오티드 서열로 치환된 천연형 p53 단백질을 코딩하는 벡터를 제작하였다.

- [98] 실시예 4: 비천연 5'UTR 서열을 사용한 유전자 산물의 생산 및 수율
- [99] 실시예 3에서 제작된 비천연 5'UTR 서열-p53 단백질을 코딩하는 서열-3'UTR 서열-폴리A의 구조를 포함하는 벡터를 대장균에 도입하고, 이를 배양하여 mRNA의 주형이 되는 플라스미드 DNA를 포함하고 있는 대장균을 증식시켰다. 증식된 대장균은 고속 원심분리를 통해 배양액과 분리한 후, 알칼리 추출법을 사용하여 세포 유래 주형 DNA를 확보하였다. 확보된 주형 DNA는 폴리A 말단에 위치한 제한효소 인식서열을 이용하여 선형화하였다. 선형화된 세포 유래 주형 DNA를 이용하여 인 비트로 전사를 통해 비천연 5'UTR-p53 단백질을 코딩하는 서열-3'UTR 서열-폴리A의 뉴클레오티드 서열을 갖는 mRNA를 생산하였다. 여기서, 상기 비천연 5'UTR은 서열번호 1 내지 9 중 어느 하나의 서열을 갖고, 3'UTR은 서열번호 14 (천연형 CYP2E1), 폴리A, 및 p53 단백질을 코딩하는 서열에 대하여는 상기한 바와 같다.
- [100] 구체적으로, 선형화된 플라스미드 DNA 10 ng/ μ L, 캡핑 시약(capping reagent) 4 mM, ATP 5 mM, CTP 5 mM, GTP 5 mM, N1-메틸슈도우리딘 5'-트리포스페이트 5 mM, 마그네슘 이온염 20 mM, DTT 10 mM, 무기피로인산 분해효소 (pyrophosphatase, inorganic, PPase) 0.01 U/ μ L, 및 RNA 분해효소 억제제 1 U/ μ L 함유 수성용액에 T7 RNA 중합 효소 5 U/ μ L를 첨가하고, 얻어진 반응 혼합물을 37°C에서 한 시간 이상 배양하여 인 비트로 전사 반응이 진행되도록 하였다. 상기 캡핑 시약은 2023년 10월 10일 공개된 한국공개특허 제10-2023-0141482호에 기재된 실시예 8의 캡 유사체 화합물 m7G(3'OMs)pppA(2'OMe)pG를 사용하였다. 상기 캡핑 시약은 mRNA의 전사와 동시 캡핑(co-transcriptional capping)을 위한 시약으로서, 5'캡 구조는 캡 구조 m7G(3'OMs)pppA(2'OMe)pG를 형성한다. 여기서 m7G는 7-메틸구아노신, A는 아데노신, G는 구아노신, p는 -P(=O)(OH)O-, Ms는 메실, Me는 메틸을 의미한다. 반응물을 DNA 분해 효소로 처리하고 Monarch® RNA Cleanup Kit (New England Biolabs 사)를 사용하여, 물질 1 내지 10(서열번호 17 내지 26)의 mRNA를 얻었다. 이들 mRNA에 포함된 비천연 5'UTR, p53 단백질 서열, 3'UTR의 뉴클레오티드 서열 구성 및 UTR 조합에 따른 상대적 합성 수율은 다음 표 4와 같다. 이들 mRNA는 5' 캡 구조와 폴리 A 서열 구조를 추가로 포함할 수 있다(서열번호 27 내지 36). 상기 상대적 합성 수율은 인 비트로 전사에 따른 mRNA 상대적 합성 수율을 나타내며, 물질 1번의 합성 수득량(100%)을 기준으로 계산하였다.
- [101] 상대적 합성 수율 (%) = (각 물질 합성 수득량 / 물질 1 합성 수득량) $\times$ 100
- [102] [표3]

물질 번호	5'UTR 서열	ORF 서열	3'UTR 서열	수득량(mg/mL)	상대적 합 성 수율 (%)
1	천연형 C3 서열번호 16	천연 형 p53	천연형 CYP2E1	4.75	100.0
2	서열번호 1	천연 형 p53	천연형 CYP2E1	4.94	104.0
3	서열번호 2	천연 형 p53	천연형 CYP2E1	6.99	147.2
4	서열번호 3	천연 형 p53	천연형 CYP2E1	7.30	153.7
5	서열번호 4	천연 형 p53	천연형 CYP2E1	7.34	154.5
6	서열번호 5	천연 형 p53	천연형 CYP2E1	7.02	147.8
7	서열번호 6	천연 형 p53	천연형 CYP2E1	7.38	155.4
8	서열번호 7	천연 형 p53	천연형 CYP2E1	6.64	139.8
9	서열번호 8	천연 형 p53	천연형 CYP2E1	7.83	164.8
10	서열번호 9	천연 형 p53	천연형 CYP2E1	7.28	152.2

[103] 표 3에 나타난 바와 같이, UTR 서열에 따른 구조적 변화로 인해 전사 효율이 달라질 수 있고 이로 인해 p53 mRNA는 비천연 5'UTR에 따라 인 비트로 전사(IVT)를 통한 합성 수율이 향상되는 것을 알 수 있다. 또한, 물질 2 내지 10를 사용한 번역 반응에서 번역 수율이 증가하는 것을 확인하였다.

청구범위

- [청구항 1] 비천연 5'비번역 영역(untranslated region, 5'UTR)을 포함하는 mRNA로서, 상기 5'UTR은 2차 구조를 형성하지 않는 것인 mRNA.
- [청구항 2] 청구항 1에 있어서, 상기 비천연 5'UTR을 포함하는 mRNA는 하기 화학식 1의 서열을 갖는 것으로서,
화학식 1: AGN_aGCCACC
여기서 N은 A, U, G, 또는 C이고 각 N은 같거나 다를 수 있으며, a는 N의 반복 수로서 42, 또는 62인 것인 mRNA.
- [청구항 3] 청구항 1에 있어서, 상기 비천연 5'UTR을 포함하는 mRNA는 서열번호 1 내지 9 중 어느 하나의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인 mRNA.
- [청구항 4] 청구항 1에 있어서, 상기 mRNA는 폴리펩티드를 코딩하는 서열을 더 포함하는 것인 mRNA.
- [청구항 5] 청구항 4에 있어서, 상기 mRNA는 코작 서열, 3'UTR 서열 또는 폴리A 서열을 더 포함하는 것인 mRNA.
- [청구항 6] 청구항 1에 있어서, 캡0, 캡1, 및 캡2로부터 선택되는 5' 캡을 포함하는 것인 mRNA.
- [청구항 7] 청구항 1에 있어서, 상기 mRNA는 하나 이상의 변형된 뉴클레오티드를 포함하는 것인 mRNA.
- [청구항 8] 청구항 1 내지 7 중 어느 한 항의 mRNA를 코딩하는 DNA.
- [청구항 9] 활성 성분으로서 청구항 1 내지 8 중 어느 한 항의 mRNA 또는 DNA를 포함하는 조성물.