



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0039428
(43) 공개일자 2021년04월09일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 48/00 (2006.01) A61K 38/37 (2006.01)
A61P 7/02 (2006.01) C07K 14/755 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 48/005 (2013.01)
A61K 38/37 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2021-7006266
- (22) 출원일자(국제) 2019년08월02일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2021년03월02일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2019/044946
- (87) 국제공개번호 WO 2020/028830
국제공개일자 2020년02월06일
- (30) 우선권주장
62/714,553 2018년08월03일 미국(US)
(뒷면에 계속)

- (71) 출원인
상가모 테라퓨틱스, 인코포레이티드
미국 캘리포니아 94005 브리즈번 마리나 불러바드 7000
- (72) 발명자
코너, 에드워드 알.
미국 94804 캘리포니아주 리치몬드 스위트 에이100 커널 불러바드 501 포인트 리치몬드 테크 센터 2 상가모 테라퓨틱스, 인코포레이티드 내
라일리, 브리짓 이.
미국 94804 캘리포니아주 리치몬드 스위트 에이100 커널 불러바드 501 포인트 리치몬드 테크 센터 2 상가모 테라퓨틱스, 인코포레이티드 내
루이, 디디에
미국 94804 캘리포니아주 리치몬드 스위트 에이100 커널 불러바드 501 포인트 리치몬드 테크 센터 2
- (74) 대리인
양영준, 김영

전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 인자 VIII의 발현에 의한 개선된 임상 파라미터

(57) 요약

본원에 기재되는 것은 간-특이적 트랜스진 발현에 사용되는 구축물이다.

대표도

인자 VIII 대체 사용 감소

용량 코호트 (용량 vg/kg)	대상체	추적 (주수)	투약 전 인자 VIII 주입	치료 후 ≥3주에서의 인자 VIII 주입의 횟수
1 (9e11)	1	93	주당 2회	115
1 (9e11)	2	83	주당 2회	26
2 (2e12)	3	73	주당 2회	13
2 (2e12)	4	66	주당 3회	9
3 (1e13)	5	50	2일마다	11
3 (1e13)	6	40	2일마다	0
4 (3e13)	7	14	4일마다	0
4 (3e13)	8	18	2일마다	0
4 (3e13)	9	5	3일마다	1*
4 (3e13)	10	5	3일마다	-

(52) CPC특허분류

A61P 7/02 (2018.01)
C07K 14/755 (2013.01)
C12N 2750/14143 (2013.01)

(30) 우선권주장

62/826,887 2019년03월29일 미국(US)
62/869,445 2019년07월01일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

인간 대상체에서 인자 VIII (FVIII) 단백질을 증가시키는 방법으로서, FVIII 단백질을 코딩하는 아데노바이러스-연관 바이러스 (AAV) 벡터 5×10^{12} 내지 5×10^{13} vg/kg의 1회 이상의 용량을 인간 대상체에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 AAV 벡터의 투여는 순환 FVIII 활성의 수준에서의 임상적으로 유의한 증가를 초래하는 것인 방법.

청구항 2

인간 대상체에서 인자 VIII (FVIII) 단백질을 증가시키는 방법으로서, FVIII 단백질을 코딩하는 아데노바이러스-연관 바이러스 (AAV) 벡터 5×10^{12} 내지 5×10^{13} vg/kg의 1회 이상의 용량을 인간 대상체에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 AAV 벡터의 투여는 인간 대상체가 받는 FVIII 치료의 횟수의 감소를 초래하는 것인 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 투여가 투여 후 3-12개월 사이에 인간 대상체에서의 자발적 출혈 에피소드의 1회 또는 0회 발생을 초래하는 것인 방법.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 1×10^{13} vg/kg 내지 3×10^{13} vg/kg의 1회 이상의 용량을 투여하는 것을 포함하는 방법.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 2×10^{13} vg/kg 내지 4×10^{13} vg/kg의 1회 이상의 용량을 투여하는 것을 포함하는 방법.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, 3×10^{13} vg/kg의 1회 이상의 용량을 투여하는 것을 포함하는 방법.

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서, FVIII이 서열식별번호: 1의 아미노산 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, AAV 벡터가 AAV6 혈청형을 갖는 것인 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, AAV 벡터가 간-특이적 인핸서 및 프로모터에 작동가능하게 연결된 FVIII 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 카세트를 포함하는 것인 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 간-특이적 인핸서가 서열식별번호: 2의 뉴클레오티드 서열을 포함하고/거나, 프로모터가 서열식별번호: 3의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 11

제8항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, AAV 벡터가 발현 카세트에 플랭킹하는 AAV2 5' 역위 말단 반복 (ITR) 서열 및 AAV2 3' ITR 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 12

제8항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, AAV2 5' ITR이 서열식별번호: 12의 뉴클레오티드 서열을 포함하고/거나, AAV2 3' ITR이 서열식별번호: 13의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 13

제8항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 발현 카세트의 서열이 서열식별번호: 5의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 대상체가 혈우병을 갖는 것인 방법.

청구항 15

제2항에 있어서, 인간 대상체가 투여 후 3-12개월 동안 어떠한 FVIII 치료도 받지 않는 것인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 특허 출원에 대한 상호-참조

[0002] 본 출원은 2018년 8월 3일에 출원된 미국 특허 가출원 번호 62/714,553; 2019년 3월 29일에 출원된 미국 특허 가출원 번호 62/826,887; 및 2019년 7월 1일에 출원된 미국 특허 가출원 번호 62/869,445 각각에 대한 우선권의 이익을 주장하며, 이들 각각은 그 전문이 참조로 포함된다.

[0003] 서열 목록

[0004] 본 출원은 서열 목록을 포함하며, 이는 ASCII 포맷으로 전자 제출되었으며, 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. 2019년 8월 1일에 생성된 상기 ASCII 카피의 명칭은 1147465_SL.txt이며, 그 크기가 28,207 바이트이다.

배경 기술

[0005] 유전자 요법은 1종 이상의 불활성화된 유전자를 갖도록 및/또는 해당 세포가 이전에는 그 세포에서 생산되지 않던 산물을 발현하게 하도록 세포를 유전적으로 조작하는데 사용될 수 있다 (예를 들어, 트랜스진 삽입을 통해 및/또는 내인성 서열의 보정을 통해). 트랜스진 삽입의 사용의 예는 1종 이상의 신규한 치료용 단백질을 코딩하는 1종 이상 유전자의 삽입, 세포 또는 개체에 결핍되어 있는 단백질을 코딩하는 코딩 서열의 삽입, 돌연변이된 유전자 서열을 포함하는 세포에의 야생형 유전자의 삽입, 및/또는 구조 핵산 예컨대 마이크로RNA 또는 siRNA를 코딩하는 서열의 삽입을 포함한다. 내인성 유전자 서열 '보정'의 유용한 적용의 예는 질환-연관 유전자 돌연변이의 변경, 스플라이스 부위를 코딩하는 서열의 변경, 조절 서열의 변경, 및/또는 단백질의 구조적 특징을 코딩하는 서열의 표적화된 변경을 포함한다.

[0006] 간 유전자 전달은 혈우병 및 리소솜 저장 장애를 포함한 다양한 장애의 치료 및/또는 예방을 위하여 대상체에게 트랜스진을 전달하는 효과적인 수단을 제공한다. 예를 들어, 미국 특허 번호 9,150,847 및 미국 공개 번호 20130177983 및 20140017212를 참조한다. 간-유도 유전자 요법에 특이적인 벡터가 또한 기재되어 있다. 예를 들어 WO 2014064277; WO 2009130208; EP 2451474B1, 문헌 [Chuah *et al.*, (2014) *Molecular Therapy*, 22, 1605-1613]; 및 [Nair *et al.* (2014) *Blood* 123:3195-3199]을 참조한다. 이들 벡터는 야생형 마우스 미세 바이러스 (MVM) 인트론 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Haut and Pintel (1998) *J. Virol.* 72: 1834-1843]; [Haut and Pintel (1998) *Virol.* 258:84-94]을 참조한다.

[0007] A형 혈우병 및 B형 혈우병과 같은 혈우병은 관절 및 연부 조직으로의 출혈, 및 외상을 겪고 있거나 수술을 받고 있는 임의의 부위에의 과도한 출혈을 특징으로 하는 혈액-응고 시스템의 유전적 장애이다. A형 혈우병은 임상적으로는 B형 혈우병과 구분가능하지 않지만, 인자 VIII (FVIII 또는 F8)이 A형 혈우병에서는 부족하거나 없는 반면, B형 혈우병에서는 인자 IX (FIX 또는 F.IX)가 환자에서 부족하거나 없다. F8 유전자는 그의 불활성인 형태로 폰 빌레브란트 인자와 함께 순환하는 혈장 당단백질을 코딩한다. 표면 손상 시, 고유한 응고 캐스케이드가 개시됨으로써, FVIII이 복합체로부터 방출되어 활성화된다. 활성화된 형태는 인자 IX와 함께 작용하여 인자

X이 활성화된 Xa가 되도록 활성화함으로써, 궁극적으로 피브리노겐의 피브린으로의 변화 및 응고 유도로 이어진다. 문헌 [Levinson *et al.* (1990) *Genomics* 7(1): 1-11]을 참조한다. A형 혈우병 환자의 40-50%가 F8 인트론 22 (IVS22로도 알려져 있음)를 수반하는 염색체 역위를 갖는다. 상기 역위는 F8 유전자 인트론 22 내의 9.6 kb 서열과 F8 유전자와 약 300 kb인 원거리에 위치하는 2개의 밀접하게 관련된 역위 배향 서열 중 하나 사이의 염색체-내 재조합 사례에 의해 야기되어, 엑손 23 내지 26에 대한 엑손 1 내지 22의 역위를 초래한다. 문헌 [Textbook of Hemophilia. Lee *et al.* (eds) 2005, Blackwell Publishing]을 참조한다. 다른 A형 혈우병 환자는 활성화 부위 돌연변이, 넌센스 돌연변이 및 미스센스 돌연변이를 포함한 F8의 결함을 가지고 있다.

[0008] 임상적으로, A형 혈우병 환자는 환자가 얼마나 자주 출혈 에피소드를 나타내는지, 및 이들 에피소드가 얼마나 오래 지속되는지에 따라 평가 및 계층화된다. 이러한 특징 둘 다는 환자 혈액에서의 FVIII 단백질의 양에 따라 직접적으로 달라진다. 중증의 혈우병을 갖는 환자는 통상적으로 정상적인 FVIII 혈중 수준의 1% 미만만을 가지며, 손상 후 출혈 및 종종 그의 관절로의 자발적인 출혈을 겪는다. 중등도의 환자는 정상적인 FVIII 수준의 1-5%를 갖는 반면, 경증의 환자는 정상 FVIII의 6% 이상을 가지며, 심각한 손상, 외상 또는 수술 후에만 출혈 에피소드를 나타낸다 (문헌 [Kulkarni *et al.* (2009) *Haemophilia* 15 : 1281-90]). A형 혈우병을 갖는 환자는 인간 혈장으로부터 유래하거나 재조합적으로 생산되는 것 중 어느 하나인 대체 FVIII 단백질 (종종 "인자"로 지칭됨)을 사용하여 치료되며, 이 경우 치료 빈도는 출혈 패턴 및 혈우병의 중증도를 기준으로 한다. 중증 A형 혈우병이 있는 환자는 출혈이 발생하는 것을 예방하기 위하여 규칙적으로 예방적 치료를 받는 반면, 덜 중증인 환자는 손상 후 필요에 따라서만 치료를 받을 수 있다.

[0009] 기능성 FVIII 또는 F.IX 단백질을 코딩하는 플라스미드 및 다른 벡터 (예를 들어, AAV)의 도입을 수반하는 A형 또는 B형 혈우병을 갖는 환자를 위한 유전자 요법이 기재되어 있다 (예를 들어, 미국 특허 번호 6,936,243; 7,238,346 및 6,200,560; 문헌 [Shi *et al.* (2007) *J Thromb Haemost.* (2): 352-61]; [Lee *et al.* (2004) *Pharm. Res.* 7: 1229-1232]; [Graham *et al.* (2008) *Genet Vaccines Ther.* 3:6-9]; [Manno *et al.* (2003) *Blood* 101(8): 2963-72]; [Manno *et al.* (2006) *Nature Medicine* 12(3): 342-7]; [Nathwani *et al.* (2011) *Mol Ther* 19(5): 876-85]; [Nathwani *et al.* (2011) *N Engl J Med.* 365(25): 2357-65] 및 [McIntosh *et al.* (2013) *Blood* 121 (17): 3335-44] 참조).

발명의 내용

[0010] 인자 VIII을 발현하는 AAV 벡터, 및 혈우병의 치료 방법 뿐만 아니라 다른 측면이 개시된다. 일부 실시양태에서는, 인간에게 인자 VIII (FVIII) 단백질을 제공하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 방법은 본원에 기재된 바와 같은 아데노바이러스-연관 바이러스 (AAV) 벡터 6×10^{11} 내지 1×10^{13} 또는 3×10^{13} , 1×10^{13} 내지 1×10^{14} , 또는 1×10^{13} 내지 5×10^{13} , 또는 2×10^{13} 내지 4×10^{13} vg/kg의 1회 이상의 용량을 인간에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 AAV 벡터의 투여는 인간에서의 인자 VIII 단백질의 생산을 초래한다. 일부 실시양태에서, 용량은 9×10^{11} vg/kg, 2×10^{12} vg/kg, 1×10^{13} vg/kg, 2×10^{13} vg/kg, 3×10^{13} vg/kg 또는 4×10^{13} vg/kg이다. 일부 실시양태에서, AAV 벡터는 서열식별번호(SEQ ID NO): 1을 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동가능하게 연결된 간-특이적 인핸서 및 프로모터를 포함하는 발현 카세트에 플랭킹하는 AAV2 역위 말단 반복 서열을 포함하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 AAV6 혈청형을 갖는다.

[0011] 일부 실시양태에서, 방법은 투여 전 및 후에 인간의 혈액에서 FVIII 단백질을 측정하는 것을 추가로 포함한다.

[0012] 일부 실시양태에서, 예를 들어, 1×10^{13} vg/kg 내지 3×10^{13} 또는 1×10^{13} 내지 1×10^{14} , 또는 1×10^{13} 내지 5×10^{13} , 또는 2×10^{13} 내지 4×10^{13} vg/kg 범위의 용량의 AAV 벡터의 투여는 투여 전에 환자에서 평가된 환자 순환 FVIII 활성에 대비하여 5% 내지 150%, 또는 그 초과 범위의 FVIII 활성에서의 임상적으로 유의한 증가를 초래한다. 일부 실시양태에서, 예를 들어, 3×10^{13} vg/kg의 용량에서의 AAV 벡터의 투여는 20% 내지 150%, 또는 그 초과 범위의 FVIII 활성에서의 임상적으로 유의한 증가를 초래한다. 일부 실시양태에서, 투여는 투여 후 3-12개월 (또는, 예를 들어, 3-6개월, 3개월 - 1, 2, 5 또는 10년, 또는 그 초과) 사이에 인간 대상체에서의 자발적 출혈 에피소드의 1회 또는 0회 발생을 초래한다.

[0013] 일부 실시양태에서, 본원에서 제공되는 것은 인간 대상체에서 인자 VIII (FVIII) 단백질을 증가시키는 방법으로서, FVIII 단백질 (임의적으로 서열식별번호: 1의 아미노산 서열을 포함함)을 코딩하는 아데노바이러스-연관 바이러스 (AAV) 벡터 2×10^{12} vg/kg 내지 3×10^{13} 또는 1×10^{13} 내지 1×10^{14} , 또는 1×10^{13} 내지 5×10^{13} , 또는 2×10^{13} 내

지 4×10^{13} vg/kg의 1회 이상의 용량을 인간 대상체에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 AAV 벡터의 투여는, 예를 들어, 5% 내지 150%만큼; 또는 50% 내지 150%만큼의 순환 FVIII 활성의 수준의 임상적으로 유의한 증가를 초래하는 것인 방법이다. 일부 실시양태에서, 환자에게 투여되는 인자 VIII의 1회 이상의 용량은 1×10^{13} vg/kg 내지 3×10^{13} vg/kg의 범위이다. 일부 실시양태에서, AAV 벡터는 AAV6 혈청형을 갖는다. 일부 실시양태에서, AAV 벡터는 간-특이적 인핸서 및 프로모터에 작동가능하게 연결된 FVIII 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 카세트를 포함한다. 일부 실시양태에서, 간-특이적 인핸서는 Serpin 1 인핸서이고/거나, 프로모터는 트랜스티레틴 최소 프로모터이다. 일부 실시양태에서, 간-특이적 인핸서는 서열식별번호: 2의 뉴클레오티드 서열을 포함하고/거나, 프로모터는 서열식별번호: 3의 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, AAV 벡터는 발현 카세트에 플랭킹하는 AAV2 5' 역위 말단 반복 (ITR) 서열 및 AAV2 3' ITR 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, AAV2 5' ITR은 서열식별번호: 12의 뉴클레오티드 서열을 포함하고/거나, AAV2 3' ITR은 서열식별번호: 13의 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 발현 카세트의 서열은 서열식별번호: 5의 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 인간 대상체는 혈우병을 갖는다.

[0014] 일부 실시양태에서, 본원에서 제공되는 것은 인간 대상체에서 인자 VIII (FVIII) 단백질을 증가시키는 방법으로, FVIII 단백질 (임의적으로 서열식별번호: 1의 아미노산 서열을 포함함)을 코딩하는 아데노바이러스-연관 바이러스 (AAV) 벡터 2×10^{12} vg/kg 내지 3×10^{13} 또는 1×10^{13} 내지 1×10^{14} , 또는 1×10^{13} 내지 5×10^{13} , 또는 2×10^{13} 내지 4×10^{13} vg/kg의 1회 이상의 용량을 인간 대상체에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 AAV 벡터의 투여는 인간 대상체가 받는 FVIII 치료의 횟수의 감소를 초래하는 것인 방법이다. 일부 실시양태에서, 인간 대상체는 투여 후 3-12개월 (또는, 예를 들어, 3-6개월, 3개월 - 1, 2, 5 또는 10년, 또는 그 초과) 동안 어떠한 FVIII 치료도 받지 않는다. 일부 실시양태에서, 환자에게 투여되는 인자 VIII의 1회 이상의 용량은 1×10^{13} vg/kg 내지 3×10^{13} vg/kg의 범위이다. 일부 실시양태에서, AAV 벡터는 AAV6 혈청형을 갖는다. 일부 실시양태에서, AAV 벡터는 간-특이적 인핸서 및 프로모터에 작동가능하게 연결된 FVIII 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 카세트를 포함한다. 일부 실시양태에서, 간-특이적 인핸서는 Serpin 1 인핸서이고/거나, 프로모터는 트랜스티레틴 최소 프로모터이다. 일부 실시양태에서, 간-특이적 인핸서는 서열식별번호: 2의 뉴클레오티드 서열을 포함하고/거나, 프로모터는 서열식별번호: 3의 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, AAV 벡터는 발현 카세트에 플랭킹하는 AAV2 5' 역위 말단 반복 (ITR) 서열 및 AAV2 3' ITR 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, AAV2 5' ITR은 서열식별번호: 12의 뉴클레오티드 서열을 포함하고/거나, AAV2 3' ITR은 서열식별번호: 13의 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 발현 카세트의 서열은 서열식별번호: 5의 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 인간 대상체는 혈우병을 갖는다.

[0015] 일부 실시양태에서, 예를 들어, 2×10^{12} vg/kg 내지 3×10^{13} 또는 1×10^{13} 내지 1×10^{14} , 또는 1×10^{13} 내지 5×10^{13} , 또는 2×10^{13} 내지 4×10^{13} vg/kg 범위의 용량의 AAV 벡터의 투여는 FVIII 치료의 사용에서의 감소, 예를 들어, 환자가 주당 또는 개월당 받는 FVIII 주사의 횟수에서의 감소를 초래한다. 일부 실시양태에서, FVIII의 사용은 적어도 20%만큼 감소된다. 다른 실시양태에서, FVIII의 사용은 적어도 50%만큼 감소된다. 일부 실시양태에서, FVIII의 사용은 90% 이상만큼 감소된다.

[0016] 일부 실시양태에서, 투여 전에, 인간은 정상적인 인간 순환 FVIII 활성의 1% 미만을 가지며, 투여 후 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48 또는 52주 이내에 인간은 정상적인 인간 순환 FVIII 활성의 적어도 1%를 갖는다.

[0017] 일부 실시양태에서, 투여 전에, 인간은 정상적인 인간 순환 FVIII 활성의 5% 미만을 가지며, 투여 후 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48 또는 52주 이내에 인간은 정상적인 인간 순환 FVIII 활성의 적어도 5%를 갖는다.

[0018] 일부 실시양태에서, 인간은 투여 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48 또는 52주 이내에, 정상 상위 한계 (ULN)의 1.5배 이하인 알라닌 아미노트랜스퍼라제 (ALT), 아스파르테이트 아미노트랜스퍼라제 (AST), 빌리루빈, 알칼리성 포스파타제 또는 알부민 중 적어도 1종을 나타낸다.

[0019] 일부 실시양태에서, 인간은 투여 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48 또는 52주 후에 검출가능 수준의 FVIII 억제인자를 갖지 않는다.

- [0020] 일부 실시양태에서, AAV 벡터가 투여될 대상체는 예방적 스테로이드 치료를 받는다.
- [0021] 일부 실시양태에서, 방법은 투여 전, 및 투여 후 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48 또는 52주 이내에 폰 빌레브란트 인자 (vWF), 가용성 표피 성장 인자 수용체 (sEGFR), 갈락틴-3-결합 단백질 (GAL3BP), C-반응성 단백질 (CRP), IL-6, 순환 알파 태아단백질 중 적어도 1종의 수준을 측정하는 것을 추가로 포함한다.
- [0022] 일부 실시양태에서, 투여 후 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48 또는 52주 이내의 폰 빌레브란트 인자 (vWF), 가용성 표피 성장 인자 수용체 (sEGFR), 갈락틴-3-결합 단백질 (GAL3BP), C-반응성 단백질 (CRP), IL-6, 순환 알파 태아단백질의 수준은 투여 2주 전 이내 수준의 1.5배 이하이다.
- [0023] 일부 실시양태에서, 인간은 투여 후 더 적은 출혈 에피소드를 나타낸다. 일부 실시양태에서, 인간은 투여 후, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100% 더 적은 출혈 에피소드를 나타낸다.
- [0024] 일부 실시양태에서, 인간은 대체 인자 VIII 단백질을 사용한 치료에 대하여 감소된 필요성을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 인간은 투여 후, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100% 더 적은 대체 인자 VIII 단백질을 사용한 치료를 필요로 한다.
- [0025] 일부 실시양태에서, 인간은 혈우병을 갖는다.
- [0026] 일부 실시양태에서, 뉴클레오티드 서열은 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서, AAV2 역위 말단 반복 서열은 서열식별번호: 12 및 서열식별번호: 13이다.

도면의 간단한 설명

- [0027] 도 1은 실시예 1에 기재된 바와 같은 발색원성 검정을 사용한 실시예 6의 FVIII 활성 데이터를 제시한다.
- 도 2는 실시예 1에 기재된 바와 같은 발색원성 검정을 사용한 실시예 6의 FVIII 활성 데이터를 제시한다.
- 도 3은 실시예 1에 기재된 바와 같은 1-스테이지 응고 검정을 사용한 실시예 6의 FVIII 활성 데이터를 제시한다.
- 도 4는 벡터를 사용한 치료-후 시간 경과에 따른 10명의 환자에서의 실시예 1에 기재된 바와 같은 1-스테이지 응고 검정을 기준으로 한 FVIII 활성을 제시한다.
- 도 5는 벡터를 사용한 치료-후 시간 경과에 따른 10명의 환자에서의 실시예 1에 기재된 바와 같은 발색원성 검정을 기준으로 한 FVIII 활성을 제시한다.
- 도 6은 표시된 투약량에서의 벡터 투여 후 적어도 3주에 환자의 자발적 출혈 에피소드에 대한 데이터를 제시한다.
- 도 7은 벡터 주사 3주 이상 후의 환자의 FVIII 사용을 제시한다.
- 도 8은 중증 유해 사례 (SAE) 요약을 제공한다.
- 도 9는 치료-관련 유해 사례 (AE) 요약을 제공한다.
- 도 10은 결과의 요약을 제공한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0028] 도입
- [0029] 본 발명자들은 인자 VIII (FVIII)을 발현하는 특정 AAV 벡터가 혈우병을 갖는 인간을 포함한 인간에서 증가된 FVIII 활성을 생성하는데 효과적이라는 것을 발견하였다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 AAV 벡터의 투여는 정상적인 FVIII 활성의 1% 미만으로부터 정상적인 FVIII 활성의 적어도 1%, 일부 실시양태에서는 적어도 2, 3, 4 또는 5%만큼의 순환 FVIII 활성의 상승을 초래한다는 것이 발견되었다. 게다가, 일부 실시양태에서, 인간에서의 순환 FVIII 활성은 간 기능 또는 본원에 기재된 바와 같은 다른 바이오마커에 대한 부정적인 효과가 적거나 없이 증가된다. 1×10^{13} vg/kg 이상의 벡터 투여 농도에서, 투여 후 3주 (또는 3주 초과)에서의 출혈 에피소드의 비율은 대부분의 환자에서 0으로 떨어짐으로써, 1×10^{13} vg/kg 이상 (예를 들어

1×10^{13} vg/kg 내지 1×10^{14} vg/kg, 예를 들어 $2-4 \times 10^{13}$ vg/kg)의 농도가 고도로 효과적인 치료를 초래한다는 것을 표시하였다. 이에 따라, 일부 실시양태에서, 이러한 농도로 벡터를 받는 환자는 추가적인 FVIII 주입을 필요로 하지 않거나, 또는 적어도 벡터 투여 후 3, 6, 9 또는 12개월 이내에는 그를 필요로 하지 않는다.

[0030] FVIII을 코딩하는 아데노-연관 바이러스 (AAV) 벡터가 제공된다. 예시적인 AAV 벡터는 AAV6 혈청형의 것이며, FVIII을 코딩하는 인트론 및 폴리뉴클레오티드에 작동가능하게 연결된 간-특이적 인핸서 및 프로모터를 포함하는 발현 카세트에 플랭킹하는 역위 반복 (ITR) 서열을 포함한다. 예시적인 FVIII은 서열식별번호: 1이다. 일부 실시양태에서, ITR 서열은 AAV2 ITR이며, 이에 따라 벡터는 "AAV2/6" 벡터로 지칭될 수 있다. AAV 혈청의 계통 서열 및 계통 유사성의 논의에 대해서는, 예를 들어 진뱅크(GenBank) 수탁 번호 AF028704.1; 진뱅크 수탁 번호 J01901.1; 문헌 [Chiorini *et al.*, *J. Vir.* 71: 6823-33(1997)]; [Srivastava *et al.*, *J. Vir.* 45:555-64 (1983)]; [Chiorini *et al.*, *J. Vir.* 73: 1309-1319 (1999)]; [Rutledge *et al.*, *J. Vir.* 72:309-319 (1998)]; 및 [Wu *et al.*, *J. Vir.* 74: 8635-47 (2000)]을 참조한다. 예시적인 AAV2 ITR 서열은 하기이다:

AAV2 5' ITR:

CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCGGGCAAAGCCCGGGCGTTCGGGCG
ACCTTTGGTGCCTCGCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCC
AACTCCATCACTAGGGGTTTCCT (서열식별번호: 12).

AAV2 3' ITR:

AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCAC
TGAGGCCGCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG
(서열식별번호: 13).

[0031]

[0032] 예시적인 간-특이적 인핸서는 예를 들어 야생형 또는 돌연변이된 Serpin1 인핸서를 포함하며, 예시적인 프로모터는 트랜스티레틴 최소 (TTR_m) 프로모터이다. 이에 따라, 일부 실시양태에서, AAV 벡터는 FVIII (예를 들어, 서열식별번호: 1)을 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동가능하게 연결된 TTR_m 프로모터에 연결된 야생형이거나 돌연변이된 Serpin1 인핸서에 플랭킹하는 AAV2 ITR 서열을 포함하는 AAV2/6 벡터이다. 예시적인 벡터 서열은 예를 들어 WO 2017/074526에 기재되어 있다.

[0033] 서열식별번호: 1은 신호 펩티드를 포함하는 인간 FVIII 아미노산 서열을 나타낸다:

MQIELSTCFFLCLRFCFSATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPFRVPKSFP
 FNTSVVYKKTLFVEFTDHLFNIAPRPPWMGLLGPTIQAEVYDVTVVITLKNMASHPV
 SLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASD
 PLCLTYSYLSHVLDLVKDLNSGLIGALLVCREGLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKS
 WHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMG
 TTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLMDLGQFLFCHISSHQHDGM
 EAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDNNSPSFIQIRSVAK
 KHPKTTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAY
 TDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRL
 PKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYSSFVNMERDLASGLIG
 PLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVLFSVFDENRSWYL TENIQRFLPNPAGVQLEDPE
 FQASNIMHSINGYVFDLSQLSVCLHEVAYWYILSIGAQDFLSVFFSGYTFKHKMYV
 EDTLTLFPFSGETVFMSENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYE
 DSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFQNPVLRHQRREITRTLQSDQEEIDYDDTISVEMK
 KEDFDIYDEDENQSPRSFQKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLNRNAQSGSVPQF
 KKVVFQEFQDGSFTQPLYRGELNEHLGGLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSS
 LISYEEDQRQGAEPKRFVKNPNETKYFWKVQHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDL
 EKDVHSLIGLPLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCR
 APCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPLGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIH
 FSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTL
 FLVYSNKCQTPLGMAAGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFS
 WIKVDLLAPMIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFF
 GNVDSGSIKHNFNPPIARYIRLHPHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAIS
 DAQITASSYFTNMFAWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVT
 GVTQGVKSLTSMYVKEFLISSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSL
 DPPLLTRYLRHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY.

[0034]

[0035] 서열식별번호: 1의 신호 펩티드 부분은 MQIELSTCFFLCLRFCFS (서열식별번호: 14)로서, 이는 단백질이 분비될 때 절단 제거된다.

[0036] 예를 들어, 예시적인 SERPIN1 인헨서는 하기이다:

GGGGGAGGCTGCTGGTGAATATTAACCAAGATCACCCAGTTACCGGAGGAGCAAACAGGGA
 CTAAGTTCACACGCGTGGTACC (서열식별번호: 2).

[0037]

[0038] 예시적인 TTRm 프로모터는 하기이다:

GTCTGTCTGCACATTTTCGTAGAGCGAGTGTCCGATACTCTAATCTCCCTAGGCAAGGTTCA
 TATTTGTGTAGGTTACTTATTCTCCTTTTGTGACTAAGTCAATAATCAGAATCAGCAGGTT
 TGGAGTCAGCTTGGCAGGGATCAGCAGCCTGGGTTGGAAGGAGGGGTATAAAAGCCCCCTC
 ACCAGGAGAAGCCGTCACACAGATCCACAAGCTCCTG (서열식별번호: 3).

[0039]

[0040] 예시적인 FVIII 코딩 서열은 하기이다:

ATGCAGATCGAGCTCTCCACCTGCTTCTTTCTGTGCCTGTTGAGATTCTGCTTCAGCGCCAC
 CAGGAGATACTACCTGGGGGCTGTGGAGCTGAGCTGGGACTACATGCAGTCTGACCTGGGGG
 AGTGCCTGTGGATGCCAGGTTCCCCCAGAGTGCCCAAGAGCTTCCCCTTCAACACCTCT
 GTGGTGTACAAGAAGACCCTGTTTTGTGGAGTTCACTGACCACCTGTTCAACATTGCCAAGCC
 CAGGCCCCCTGGATGGGCTGCTGGGCCCCACCATCCAGGCTGAGGTGTATGACACTGTGG
 TGATCACCTGAAGAACATGGCCAGCCACCCTGTGAGCCTGCATGCTGTGGGGGTGAGCTAC
 TGGAAGGCCTCTGAGGGGGCTGAGTATGATGACCAGACCAGCCAGAGGGAGAAGGAGGATGA
 CAAGGTGTTCCCTGGGGGAGCCACACCTATGTGTGGCAGGTGCTGAAGGAGAATGGCCCCA
 TGGCTCTGACCCCTGTGCCTGACCTACAGCTACCTGAGCCATGTGGACCTGGTGAAGGAC
 CTGAACTCTGGCCTGATTGGGGCCCTGCTGGTGTGCAGGGAGGGCAGCCTGGCCAAGGAGAA
 GACCCAGACCCTGCACAAGTTTATCCTGCTGTTTGTGTGTTTGTATGAGGGCAAGAGCTGGC
 ACTCTGAAACCAAGAACAGCCTGATGCAGGACAGGGATGCTGCCTCTGCCAGGGCCTGGCCC
 AAGATGCACACTGTGAATGGCTATGTGAACAGGAGCCTGCCTGGCCTGATTGGCTGCCACAG
 GAAGTCTGTGTACTGGCATGTGATTGGCATGGGCACCACCCTGAGGTGCACAGCATCTTCC
 TGGAGGGCCACACCTTCTGGTCAGGAACCACAGGCAGGCCAGCCTGGAGATCAGCCCCATC
 ACCTTCTGACTGCCAGACCCTGCTGATGGACCTGGGCCAGTTCTGCTGTTCTGCCACAT
 CAGCAGCCACCAGCATGATGGCATGGAGGCCTATGTGAAGGTGGACAGCTGCCCTGAGGAGC
 CCCAGCTGAGGATGAAGAACAATGAGGAGGCTGAGGACTATGATGATGACCTGACTGACTCT
 GAGATGGATGTGGTGAAGTTTGTATGATGACAACAGCCCCAGCTTCATCCAGATCAGGTCTGT
 GGCCAAGAAGCACCCCAAGACCTGGGTGCACTACATTGCTGCTGAGGAGGAGGACTGGGACT
 ATGCCCCCTGGTGTGGCCCTGATGACAGGAGCTACAAGAGCCAGTACCTGAACAATGGC
 CCCCAGAGGATTGGCAGGAAGTACAAGAAGGTCAGGTTTATGGCCTTACTGATGAAACCTT
 CAAGACCAGGGAGGCCATCCAGCATGAGTCTGGCATCCTGGGCCCCCTGCTGTATGGGGAGG
 TGGGGGACACCCTGCTGATCATCTTCAAGAACCAGGCCAGCAGGCCCTACAACATCTACCCC
 CATGGCATCACTGATGTGAGGCCCCGTACAGCAGGAGGCTGCCAAGGGGGTGAAGCACCT
 GAAGGACTTCCCCATCCTGCCTGGGGAGATCTTCAAGTACAAGTGGACTGTGACTGTGGAGG
 ATGGCCCCACCAAGTCTGACCCAGGTGCCTGACCAGATACTACAGCAGCTTTGTGAACATG
 GAGAGGGACCTGGCCTCTGGCCTGATTGGCCCCCTGCTGATCTGCTACAAGGAGTCTGTGGA
 CCAGAGGGGCAACCAGATCATGTCTGACAAGAGGAATGTGATCCTGTTCTCTGTGTTTGTATG
 AGAACAGGAGCTGGTACCTGACTGAGAACATCCAGAGGTTCTGCCAACCCCTGCTGGGGTG

[0041]

CAGCTGGAGGACCCCTGAGTTCAGGCCAGCAACATCATGCACAGCATCAATGGCTATGTGTT
 TGACAGCCTGCAGCTGTCTGTGTGCCTGCATGAGGTGGCCTACTGGTACATCCTGAGCATTG
 GGGCCAGACTGACTTCCTGTCTGTGTTCTTCTCTGGCTACACCTTCAAGCACAAAGATGGTG
 TATGAGGACACCCTGACCCGTGCCCTTCTCTGGGGAGACTGTGTTTCATGAGCATGGAGAA
 CCCTGGCCTGTGGATTCTGGGCTGCCACAACCTCTGACTTCAGGAACAGGGGCATGACTGCC
 TGCTGAAAGTCTCCAGCTGTGACAAGAACACTGGGGACTACTATGAGGACAGCTATGAGGAC
 ATCTCTGCCTACCTGCTGAGCAAGAACAATGCCATTGAGCCCAGGAGCTTCAGCCAGAATCC
 ACCCGTCTTAAGCGCCATCAGCGCGAGATCACCAGGACCACCTGCAGTCTGACCAGGAGG
 AGATTGACTATGATGACACCATCTCTGTGGAGATGAAGAAGGAGGACTTTGACATCTACGAC
 GAGGACGAGAACCAGAGCCCCAGGAGCTTCCAGAAGAAGACCAGGCACTACTTCATTGCTGC
 TGTGGAGAGGCTGTGGGACTATGGCATGAGCAGCAGCCCCATGTGCTGAGGAACAGGGCCC
 AGTCTGGCTGTGCCCCAGTTCAAGAAGGTGGTGTCCAGGAGTTCACTGATGGCAGCTTC
 ACCCAGCCCCGTACAGAGGGGAGCTGAATGAGCACCTGGGCCCTGCTGGGCCCTACATCAG
 GGCTGAGGTGGAGGACAACATCATGGTGACCTTCAGGAACCAGGCCAGCAGGCCCTACAGCT
 TCTGAGCAGCCTGATCAGCTATGAGGAGGACCAGAGGCAGGGGGCTGAGCCCAGGAAGAAC
 TTTGTGAAGCCCAATGAAACCAAGACCTACTTCTGGAAGGTGCAGCACCATGGCCCCAC
 CAAGGATGAGTTTACTGCAAGGCCTGGGCCCTACTTCTCTGATGTGGACCTGGAGAAGGATG
 TGCCTCTGGCCTGATTGGCCCCCTGTGGTGTGCCACACCAACCCCTGAACCTGCCCAT
 GGCAGGCAGGTGACTGTGCAGGAGTTTGCCTGTCTTCCACCATCTTTGATGAAACCAAGAG
 CTGGTACTTCACTGAGAACATGGAGAGGAACGCAGGGCCCCCTGCAACATCCAGATGGAGG
 ACCCCACCTTCAAGGAGAACTACAGGTTCCATGCCATCAATGGCTACATCATGGACACCCTG
 CCTGGCCTGGTGTATGGCCCAGGACCAGAGGATCAGGTGGTACCTGCTGAGCATGGGCAGCAA
 TGAGAACATCCACAGCATCCACTTCTCTGGCCATGTGTTCACTGTGAGGAAGAAGGAGGAGT
 ACAAGATGGCCCTGTACAACCTGTACCCTGGGGTGTGTTGAGACTGTGGAGATGCTGCCAGC
 AAGGCTGGCATCTGGAGGGTGGAGTGCCTGATTGGGGAGCACCTGCATGCTGGCATGAGCAC
 CCTGTTCCCTGGTGTACAGCAACAAGTGCCAGACCCCCCTGGGCATGGCCTCTGGCCACATCA
 GGGACTTCCAGATCACTGCCTCTGGCCAGTATGGCCAGTGGGCCCCCAAGCTGGCCAGGCTG
 CACTACTCTGGCAGCATCAATGCCTGGAGCACCAAGGAGCCCTTCAGCTGGATCAAGGTGGA
 CCTGCTGGCCCCCATGATCATCCATGGCATCAAGACCCAGGGGGCCAGGCAGAAGTTCAGCA
 GCCTGTACATCAGCCAGTTTCATCATCATGTACAGCCTGGATGGCAAGAAGTGGCAGACCTAC
 AGGGGCAACAGCACTGGCACCCCTGATGGTGTCTTTGGCAATGTGGACAGCTCTGGCATCAA
 GCACAACATCTTCAACCCCCCATCATTGCCAGATACATCAGGCTGCACCCACCCTACTACA
 GCATCAGGAGCACCCCTGAGGATGGAGCTGATGGGCTGTGACCTGAACAGCTGCAGCATGCC
 CTGGGCATGGAGAGCAAGGCCATCTCTGATGCCAGATCACTGCCAGCAGCTACTTCACCAA
 CATGTTTGGCACCTGGAGCCCCAGCAAGGCCAGGCTGCATCTGCAGGGCAGGAGCAATGCCT
 GGAGGCCCCAGGTCAACAACCCCAAGGAGTGGCTGCAGGTGGACTTCCAGAAGACCATGAAG
 GTGACTGGGGTGACCACCCAGGGGTGAAGAGCCTGCTGACCAGCATGTATGTGAAGGAGTT
 CCTGATCAGCAGCAGCCAGGATGGCCACCAGTGGACCCTGTTCTTCCAGAATGGCAAGGTGA
 AGGTGTTCCAGGGCAACCAGGACAGCTTACCCTGTGGTGAACAGCCTGGACCCCCCTG
 CTGACCAGATACCTGAGGATTACCCCCAGAGCTGGGTGCACCAGATTGCCCTGAGGATGGA
 GGTGCTGGGCTGTGAGGCCAGGACCTGTACTGA (서열식별번호: 4).

[0042]

[0043] 역위 말단 반복 서열에 의해 플랭킹되는 발현 카세트의 예시적인 서열은 하기이다:

GCGGCCTAAGCTTGAACCATTTGCCACCTTCAGGGGGAGGCTGCTGGTGA - 50
 ATATTAACCAAGATCACCCAGTTACCGGAGGAGCAAACAGGGACTAAGT - 100
 TCACACGCGTGGTACCGTCTGTCTGCACATTTCTGATAGAGCGAGTGTCCG - 150
 ATACTCTAATCTCCCTAGGCAAGGTTTCATATTTGTGTAGGTTACTTATTC - 200
 TCCTTTTGTGACTAAGTCAATAATCAGAATCAGCAGGTTTGGAGTCAGC - 250
 TTGGCAGGGATCAGCAGCCTGGGTTGGAAGGAGGGGGTATAAAAAGCCCT - 300
 TCACCAGGAGAAGCCGTCACACAGATCCACAAGCTCCTGAAGAGGTAAGG - 350
 GTTTAAGTTATCGTTAGTTCGTGCACCATTAATGTTTAATTACCTGGAGC - 400
 ACCTGCCTGAAATCATTTTTTTTTTTCAGGTTGGCTAGTATGCAGATCGAGC - 450
 TCTCCACCTGCTTCTTTCTGTGCCTGTTGAGATTCTGCTTCAGCGCCACC - 500
 AGGAGATACTACCTGGGGGCTGTGGAGCTGAGCTGGGACTACATGCAGTC - 550
 TGACCTGGGGAGCTGCCGTGTGGATGCCAGGTTCCCCCCAGAGTGCCCA - 600
 AGAGCTTCCCCTTCAACACCTCTGTGGTGTACAAGAAGACCCTGTTTGTG - 650
 GAGTTCACTGACCACCTGTTCAACATTGCCAAGCCCAGGCCCCCTGGAT - 700
 GGGCCTGCTGGGCCCCACCATCCAGGCTGAGGTGTATGACACTGTGGTGA - 750
 TCACCCCTGAAGAACATGGCCAGCCACCCCTGTGAGCCTGCATGCTGTGGGG - 800
 GTGAGCTACTGGAAGGCCCTGTGAGGGGGCTGAGTATGATGACCAGACCAG - 850
 CCAGAGGGAGAAGGAGGATGACAAGGTGTTCCCTGGGGGCAGCCACACCT - 900
 ATGTGTGGCAGGTGCTGAAGGAGAATGGCCCCATGGCCTCTGACCCCTG - 950
 TGCCTGACCTACAGTACCCTGAGCCATGTGGACCTGGTGAAGGACCTGAA - 1000
 CTCTGGCCTGATTGGGGCCCTGTGGTGTGCAGGGAGGGCAGCCTGGCCA - 1050
 AGGAGAAGACCCAGACCCCTGCACAAGTTTCATCCTGCTGTTTGTGTGTTT - 1100
 GATGAGGGCAAGAGCTGGCACTCTGAAACCAAGAACAGCCTGATGCAGGA - 1150
 CAGGGATGCTGCCTCTGCCAGGGCCTGGCCCAAGATGCACACTGTGAATG - 1200
 GCTATGTGAACAGGAGCCTGCCTGGCCTGATTGGCTGCCACAGGAAGTCT - 1250
 GTGTACTGGCATGTGATTGGCATGGGCACCACCCCTGAGGTGCACAGCAT - 1300
 CTTCCCTGGAGGGCCACACCTTCCCTGGTCAGGAACCACAGGCAGGCCAGCC - 1350
 TGGAGATCAGCCCCATCACCTTCCCTGACTGCCCAGACCCTGCTGATGGAC - 1400
 CTGGGCCAGTTCCCTGCTGTTCTGCCACATCAGCAGCCACCAGCATGATGG - 1450
 CATGGAGGCTATGTGAAGGTGGACAGCTGCCCTGAGGAGCCCCAGCTGA - 1500
 GGATGAAGAACAATGAGGAGGCTGAGGACTATGATGATGACCTGACTGAC - 1550
 TCTGAGATGGATGTGGTGGGTTTGGATGATGACAACAGCCCCAGCTTCAT - 1600
 CCAGATCAGTCTGTGGCCAAGAAGCACCCCAAGACCTGGGTGCACTACA - 1650
 TTGCTGCTGAGGAGGAGGACTGGGACTATGCCCCCTGGTGTGCTGGCCCC - 1700
 GATGACAGGAGCTACAAGAGCCAGTACCTGAACAATGGCCCCCAGAGGAT - 1750
 TGGCAGGAAGTACAAGAAGGTCAGGTTTCATGGCCTACACTGATGAAACCT - 1800
 TCAAGACCAGGGAGGCCATCCAGCATGAGTCTGGCATCCTGGGCCCCCTG - 1850
 CTGTATGGGGAGGTGGGGGACACCCTGCTGATCATCTTCAAGAACCAGGC - 1900
 CAGCAGGCCCTACAACATCTACCCCATGGCATCACTGATGTGAGGCCCC - 1950
 TGTACAGCAGGAGGCTGCCAAGGGGGTGAAGCACCTGAAGGACTTCCCC - 2000
 ATCCTGCCCTGGGGAGATCTTCAAGTACAAGTGGACTGTGACTGTGGAGGA - 2050
 TGGCCCCACCAAGTCTGACCCAGGTGCCCTGACCAGATACTACAGCAGCT - 2100
 TTGTGAACATGGAGAGGGACCTGGCCTCTGGCCTGATTGGCCCCCTGCTG - 2150
 ATCTGCTACAAGGAGTCTGTGGACCAGAGGGGCAACCAGATCATGTCTGA - 2200
 CAAGAGGAATGTGATCCTGTTCTCTGTGTTTGGATGAGAACAGGAGCTGGT - 2250
 ACCTGACTGAGAACATCCAGAGGTTCCGCCCAACCCTGCTGGGGTGCAG - 2300
 CTGGAGGACCCCTGAGTTCCAGGCCAGCAACATCATGCACAGCATCAATGG - 2350
 CTATGTGTTTGCAGCCTGCAGCTGTCTGTGTGCCTGCATGAGGTGGCCT - 2400
 ACTGGTACATCCTGAGCATTTGGGGCCAGACTGACTTCCCTGTCTGTGTTT - 2450

[0044]

TTCTCTGGCTACACCTTCAAGCACAAAGATGGTGTATGAGGACACCCTGAC - 2500
 CCTGTTCCCTTCTCTGGGGAGACTGTGTTTCATGAGCATGGAGAACCCTG - 2550
 GCCTGTGGATTCTGGGCTGCCACAACCTCTGACTTCAGGAACAGGGGCATG - 2600
 ACTGCCCTGTGAAAGTCTCCAGCTGTGACAAGAACACTGGGGACTACTA - 2650
 TGAGGACAGCTATGAGGACATCTCTGCCTACCTGCTGAGCAAGAACAATG - 2700
 CCATTGAGCCCAGGAGCTTCAGCCAGAATCCACCCGTCCTTAAGCGCCAT - 2750
 CAGCGCGAGATCACCAGGACCACCCTGCAGTCTGACCAGGAGGAGATTGA - 2800
 CTATGATGACACCATCTCTGTGGAGATGAAGAAGGAGGACTTTGACATCT - 2850
 ACGACGAGGACGAGAACCAGAGCCCCAGGAGCTTCCAGAAGAGACCAGG - 2900
 CACTACTTCATTGCTGCTGTGGAGAGGCTGTGGGACTATGGCATGAGCAG - 2950
 CAGCCCCCATGTGCTGAGGAACAGGGCCCAGTCTGGCTCTGTGCCCCAGT - 3000
 TCAAGAAGGTGGTGTCCAGGAGTTCACTGATGGCAGCTTCACCCAGCCC - 3050
 CTGTACAGAGGGGAGCTGAATGAGCACCTGGGCTGCTGGGCCCCCTACAT - 3100
 CAGGGCTGAGGTGGAGGACAACATCATGGTGACCTTCAGGAACCAGGCCA - 3150
 GCAGGCCCTACAGCTTCTACAGCAGCCTGATCAGTATGAGGAGGACCAG - 3200
 AGGCAGGGGGCTGAGCCCAGGAAGAACTTTGTGAAGCCCAATGAAACCAA - 3250
 GACCTACTTCTGGAAGGTGCAGCACCACATGGCCCCACCAAGGATGAGT - 3300
 TTGACTGCAAGGCCTGGGCTACTTCTCTGATGTGGACCTGGAGAAGGAT - 3350
 GTGCACTCTGGCCTGATTGGCCCCCTGCTGGTGTGCCACACCAACACCT - 3400
 GAACCTGGCCATGGCAGGCAAGTGTGTCAGGAGTTTGCCTGTTCT - 3450
 TCACCATCTTTGATGAAACCAAGAGCTGGTACTTCACTGAGAACATGGAG - 3500
 AGGAACCTGCAGGGCCCCCTGCAACATCCAGATGGAGGACCCACCTTCAA - 3550
 GGAGAACTACAGGTTCCATGCCATCAATGGCTACATCATGGACACCCTGC - 3600
 CTGGCCTGGTGTGATGGCCCAGGACCAGAGGATCAGGTGGTACCTGCTGAGC - 3650
 ATGGGCAGCAATGAGAACATCCACAGCATCCACTTCTCTGGCCATGTGTT - 3700
 CACTGTGAGGAAGAAGGAGGAGTACAAGATGGCCCTGTACACCTGTACC - 3750
 CTGGGGTGTTTGAGACTGTGGAGATGCTGCCAGCAAGGCTGGCATCTGG - 3800
 AAGGTGGAGTGCCTGATTGGGGAGCACCTGCATGCTGGCATGAGCACCCCT - 3850
 GTTCCTGGTGTACAGCAACAAGTGCCAGACCCCCCTGGGCATGGCCTCTG - 3900
 GCCACATCAGGGACTTCCAGATCACTGCCCTCTGGCCAGTATGGCCAGTGG - 3950
 GCCCCAAGCTGGCCAGGCTGCACTACTCTGGCAGCATCAATGCCTGGAG - 4000
 CACCAAGGAGCCCTTCAGCTGGATCAAGGTGGACCTGCTGGCCCCCATGA - 4050
 TCATCCATGGCATCAAGACCCAGGGGGCCAGGCAGAAAGTTCAGCAGCCTG - 4100
 TACATCAGCCAGTTTCATCATCATGTACAGCCTGGATGGCAAGAAGTGGCA - 4150
 GACCTACAGGGCAACAGCACTGGCACCCCTGATGGTGTCTTTGGCAATG - 4200
 TGGACAGCTCTGGCATCAAGCACAACATCTTCAACCCCCCATCATTGCC - 4250
 AGATACATCAGGCTGCACCCACCCACTACAGCATCAGGAGCACCCCTGAG - 4300
 GATGGAGCTGATGGGCTGTGACCTGAACAGCTGCAGCATGCCCTGGGCA - 4350
 TGGAGAGCAAGGCCATCTCTGATGCCAGATCACTGCCAGCAGCTACTTC - 4400
 ACCAACATGTTTGCCACCTGGAGCCCCAGCAAGGCCAGGCTGCATCTGCA - 4450
 GGGCAGGAGCAATGCCTGGAGGCCCCAGGTCAACAACCCCAAGGAGTGGC - 4500
 TGCAGGTGGACTTCCAGAAGACCATGAAGGTGACTGGGGTGACCACCCAG - 4550
 GGGGTGAAGAGCCTGCTGACCAGCATGTATGTGAAGGAGTTCTGATCAG - 4600
 CAGCAGCCAGGATGGCCACCAGTGGACCCGTCTTCCAGAATGGCAAGG - 4650
 TGAAGGTGTCCAGGGCAACCAGGACAGCTTCAACCCCTGTGGTGAACAGC - 4700
 CTGGACCCCCCTGCTGACCAGATACCTGAGGATTCACCCCCAGAGCTG - 4750
 GGTGCACCAGATTGCCCTGAGGATGGAGGTGCTGGGCTGTGAGGCCCAGG - 4800
 ACCTGTACTGAGGATCCAATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGT - 4850
 GTTGGTTTTTTGTGTGTTTTCTGTAACGATCGGGCTCGAGCCG

(서열식별번호: 5).

[0045]

[0046]

PCT 공개 번호 WO 2017/074526에 기재된 바와 같이, 서열식별번호: 5는 (5'에서 3'로) 인슐레이터 (스페이서) 서열 Ins1 (서열식별번호: 5의 nt 14-32), Serpin1 인핸서 CRMSBS2 (서열식별번호: 5의 nt 33-104), 트랜스스티레틴 최소 프로모터 TTRm (서열식별번호: 5의 nt 117-339), SBR 인트론3 (서열식별번호: 5의 nt 340-432), FVIII 코딩 서열 hF8 BDD (서열식별번호: 5의 438-4811), SPA51 합성 폴리A 서열 (서열식별번호: 5의 nt 4818-4868), 및 인슐레이터 서열 Ins3 (서열식별번호: 5의 nt 4869-4885)을 포함한다.

[0047]

제조함 AAV 벡터의 구축에 대해서는 미국 특허 번호 5,173,414; 문헌 [Tratschin *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 5:3251-3260 (1985)]; [Tratschin, *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 4:2072-2081 (1984)]; [Hermonat & Muzyczka, *PNAS* 81:6466-6470 (1984)]; 및 [Samulski *et al.*, *J. Virol.* 63:03822-3828 (1989)]을 포함한 수많은 공개물에 기재되어 있다. 형질도입되는 세포의 계능으로의 통합으로 인한 효율적인 유전자 전달 및 안정한 트랜스진 전달이 이와 같은 벡터 시스템의 특징이다. 예를 들어, 문헌 [Wagner *et al.*, *Lancet* 351:9117 1702-3 (1998)], [Kearns *et al.*, *Gene Ther.* 9:748-55 (1996)]을 참조한다.

[0048]

투여될 AAV 벡터의 유효량은 환자마다 달라질 수 있다. 일부 실시양태에서, 유효량은 조성물 (AAV 벡터)을 투

여하는 의사에 의해 결정된다. 치료용 폴리펩티드의 혈청, 혈장 또는 다른 조직 수준의 분석, 그리고 투여 전 최초 수준과의 비교는 투여되는 양이 너무 낮은지, 올바른 범위 이내인지, 또는 너무 높은지를 결정할 수 있다. 최초 및 후속 투여를 위한 적합한 레지멘이 또한 가변적이지만, 최초 투여, 필요에 따라 임의적으로 이어지는 후속 투여로 전형화되어 있다. 후속 투여는 매일 내지 매년 내지 수년마다까지 범위의 가변적인 간격으로 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서는, 전달 벡터의 면역억제에 의한 형질도입의 억제 또는 차단을 방지하기 위하여 적절한 면역억제 기술이 권장될 수도 있다. 예를 들어, 문헌 [Vilquin *et al.*, (1995) *Human Gene Ther.*, 6:1391-1401]을 참조한다.

[0049] 투여는 임의의 수단에 의할 수 있다. 생체내 및 생체외 방법 둘 다가 고려된다. 일부 실시양태에서는, 정맥내 주사 (예를 들어, 간문맥을 통하여, 제한되는 것은 아님)가 투여 방법이다. 일부 실시양태에서, 투여는 표준 정맥내 투여를 통한다. 다른 생체내 투여 양식은, 예를 들어, 간엽 또는 담도에의 직접 주사 및 간 동맥을 통하는 것을 포함한 간에서 원거리인 정맥내 주사, 간 실질에의 직접 주사, 간 동맥을 통한 주사, 및/또는 담관 가지를 통한 역행 주사를 포함한다. 생체외 투여 양식은 절제된 간세포 또는 간의 다른 세포의 시험관내 형질도입 후 이어지는 형질도입된 절제된 간세포의 다시 인간 환자의 문맥 혈관구조, 간 실질 또는 담관 가지로의 주입을 포함하며, 예를 들어, 문헌 [Grossman *et al.*, (1994) *Nature Genetics*, 6:335-341]을 참조한다.

[0050] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 AAV 벡터의 예시적인 정맥내 용량은 6×10^{11} 내지 1×10^{13} 또는 3×10^{13} 또는 1×10^{13} 내지 1×10^{14} , 또는 1×10^{13} 내지 5×10^{13} , 또는 2×10^{13} 내지 4×10^{13} vg/kg, 예를 들어, 1×10^{12} 또는 2×10^{12} 내지 3×10^{13} 바이러스 게놈/인간 수용자 킬로그램 (vg/kg)일 수 있다. 일부 실시양태에서, 투약량은 1×10^{11} 내지 1×10^{12} vg/kg이다. 일부 실시양태에서, 투약량은 1×10^{12} 내지 1×10^{13} vg/kg 또는 3×10^{13} 이다. 일부 실시양태에서, 투약량은 2×10^{12} 내지 3×10^{13} 이다. 일부 실시양태에서, 투약량은 5×10^{12} 내지 5×10^{13} vg/kg이다. 상기에서 언급된 바와 같이, 일부 실시양태에서, AAV 벡터는 단일 용량으로서 수용자에게 공급된다. 일부 실시양태에서, 투약량은 6×10^{11} , 9×10^{11} , 1.2×10^{12} , 2×10^{12} , 4×10^{12} , 6×10^{12} , 1×10^{13} , 3×10^{13} , 4×10^{13} 또는 5×10^{13} vg/kg이다. 일부 실시양태에서, 환자는 단일 용량의 AAV 벡터를 받는다.

[0051] 제약상-허용되는 담체가 투여되는 제제의 일부로서 포함될 수 있다. 제약상 허용되는 담체는 부분적으로 투여되는 특정한 조성물, 뿐만 아니라 조성물을 투여하는데 사용되는 특정한 방법에 의해서 결정된다. 이에 따라, 하기 기재된 바와 같이, 이용가능한 제약 조성물에는 매우 다양한 적합한 제형이 존재한다 (예를 들어, 문헌 [Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 17th ed., 1989] 참조).

[0052] 생체외 및 생체내 투여 둘 다를 위한 제형은 액체 또는 에멀전화된 액체 중 현탁액 (예를 들어, 유전적으로 변형된 세포, 리포솜 또는 나노입자의 것)을 포함할 수 있다. 활성 성분은 제약상 허용되며 활성 성분과 상용성인 부형제와 혼합될 수 있다. 적합한 부형제는, 예를 들어, 물, 염수, 텍스트로스, 글리세롤, 에탄올 등 및 이들의 조합을 포함한다. 또한, 조성물은 부차량의 보조 물질, 예컨대, 습윤제 또는 에멀전화제, pH 완충제, 안정화제, 또는 제약 조성물의 효과성을 강화하는 다른 시약을 함유할 수 있다.

[0053] 기재되는 AAV 벡터를 받는 대상체는 임의의 인간일 수 있다. 예시적인 수용자는 예를 들어 혈우병 (예를 들어 A형 혈우병)이 있는 개체를 포함한다. 일부 실시양태에서, A형 혈우병으로 고통받는 대상체에서의 A형 혈우병의 치료와 관련한 치료 유효량, 또는 출혈 에피소드 동안 출혈 시간을 감소시키는 방법에서 사용하기 위한 치료 유효량은 하기 효과 중 1종 이상을 유발할 수 있는 양을 지칭한다: (1) 예를 들어 타박상, 관절 통증 또는 부기, 장기간의 두통, 구토 또는 피로를 포함한 A형 혈우병 생리학적 증상 중 1종 이상의 어느 정도까지의 감소, 억제 또는 예방, (2) 혈액을 응고시키는 능력의 향상, (3) 출혈 에피소드 동안의 전체적인 출혈 시간의 감소, (4) 투여가 대상체 혈장에서의 기능성 FVIII 단백질의 농도 또는 활성의 측정가능한 증가를 초래함, 및/또는 (5) 장애와 연관되어 있는 1종 이상의 증상의 어느 정도까지의 경감.

[0054] 일부 실시양태에서는, 본원에 기재된 바와 같은 AAV 벡터의 투여로부터, 정상적인 개체에서 발견되는 인자 농도의 1%를 초과하는 FVIII 혈중 농도가 초래됨으로써, 중증의 질환 표현형이 중증도의 것으로 변화된다. 중증 표현형은 관절 손상 및 생명을 위협하는 출혈을 특징으로 한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 AAV 벡터의 투여는 정상의 적어도 5%인 FVIII 혈중 농도를 초래한다. 일부 실시양태에서는, 중증도의 질환 표현형을 경증의 것으로 전환시키기 위하여, 정상의 5%를 초과하는 FVIII 혈중 농도를 필요로 한다. 예를 들어 활성화된 부분적 트롬보플라스틴 시간 (aPTT) 1-스테이지 응고 검정 (예를 들어, 문헌 [Butenas, *et al.*, *Thromb Res.* (2010 Aug); 126(2): 119-123] 참조)에서, 정상적인 인간의 FVIII 수준은 약 1.14 ± 0.48 nM 혈

장이다. 따라서, 치료 효과는 대상체/인간에서의 FVIII의 총량이 정상적인 대상체/인간에 존재하는 FVIII의 1%, 예를 들어, 1.14 + 0.48 nM의 1%를 초과하도록 하는 FVIII의 발현에 의해 달성될 수 있다.

[0055] 일부 실시양태에서, 투여 전에, 인간은 정상적인 인간 순환 FVIII 활성의 1%, 2%, 3%, 4% 또는 5% 미만을 가지며, 투여 후 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48 또는 52주 이내에 인간은 정상적인 인간 순환 FVIII 활성의 각각 적어도 1%, 2%, 3%, 4% 또는 5%를 갖는다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 AAV 벡터의 투여는 투여 전 (예를 들어, 투여 14일 전 이내)에 대상체의 혈장에 존재하는 기능성 FVIII 단백질 활성의 양과 비교하였을 때, 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 IU/dl, 또는 그 초과인 인간 수용자 혈장에서의 기능성 FVIII 단백질 활성의 증가를 초래한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 AAV 벡터의 투여는 대상체 혈장에서의 적어도 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 IU/dl, 또는 그 초과인 순환 FVIII 활성의 발현을 초래한다. 이와 관련하여, FVIII 활성에 관한 "IU" 또는 "국제 단위"라는 용어는 통상적으로 이해되는 용어로서, FVIII 활성 1 IU는 정상적인 인간 혈장 1 ml 중 FVIII의 양과 동가이다. 일부 실시양태에서, 정상적인 인간 FVIII 활성은 0.500-1.500 IU/ml 혈장이다. 세계 보건 기구는 하기와 같이 혈우병의 중증도 수준을 기재하고 있다:

수준	정상적인 혈중 인자 활성에 대한 백분율	전혈 밀리리터 (ml) 당 국제 단위 (IU)의 수
정상 범위	50%-150%	0.50-1.5 IU
경증 혈우병	5%-40%	0.05-0.40 IU
중등도 혈우병	1%-5%	0.01-0.05 IU
중증 혈우병	1% 미만	0.01 IU 미만

[0056]

[0057] 혈장에서의 FVIII 활성은, 예를 들어, 활성화된 부분적 트롬보플라스틴 시간 (APPT) 방법 (예를 들어, 문헌 [Miletich JP: Activated partial thromboplastin time. In Williams Hematology. Fifth edition. Edited by E Beutler, MA Lichtman, BA Collier, TJ Kipps. New York, McGraw-Hill, 1995, pp L85-86], [Greaves and Preston, Approach to the bleeding patient. In Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice. Fourth edition. Edited by RW Colman, J Hirsh, VJ Marder, et al. Philadelphia, JB Lippincott Co, 2001, pp 1197-1234] 및 [Olson et al., Arch. Pathol. Lab. Med. 122:782-798 (1998)] 참조) 또는 발색 원성 FXa 검정 (문헌 [Harris et al., Thromb. Res. 128(6): 125-129 (2011)])을 포함한 수많은 널리 공지되어 있으며 인정되어 있는 검정에 의해 정량적으로 결정될 수 있다.

[0058] 다른 실시양태에서, 대상체에서의 출혈 시간은 예를 들어 아이비(Ivy) 방법 (예를 들어, 문헌 [Ivy et al., Surg. Gynec. Obstet. 60:781 (1935)] 및 [Ivy et al., J. Lab. Clin. Med. 26: 1812 (1941)] 참조) 또는 듀크(Duke) 방법 (예를 들어, 문헌 [Duke et al., JAMA 55: 1185 (1910)] 참조)을 포함한 널리 공지되어 있으며 인정되어 있는 기술에 의해 측정될 수 있다. 대상체에서의 "출혈 에피소드"는 외부적으로 또는 내부적으로 중 어느 하나로의 대상체에서의 출혈을 초래하는 손상을 지칭하는 것이며, 일반적으로 손상으로부터 혈병의 형성까지의 시간 기간을 포함한다. 일부 실시양태에서, 출혈 에피소드의 빈도는 본원에 기재되는 AAV 벡터의 투여 후 대상체에서 감소된다. 일부 실시양태에서, 출혈 에피소드의 빈도는 투여 후 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100% 감소된다.

[0059] 일부 실시양태에서는, 투여 전, 후, 또는 전 및 후에 인간 혈액 중 FVIII 단백질의 농도가 측정된다. FVIII 혈중 농도를 측정하기 위한 직접적이거나 간접적인 검정이 사용될 수 있다. 예시적인 간접적 방법은 예를 들어 문헌 [Over, J. (1986) Scand. J. Haematol. 33 (Suool. 41), 13-24]; [Kemball-Cook, G., et al. (1993) Brit. J. Haematol. 84, 273-278]에 기재되어 있는 것들을 포함한다. 직접적인 검출 방법은, 예를 들어, 미국 특허 번호 8715951에 기재되어 있는 것들을 포함한다. 일부 실시양태에서는, 투여 후의 효과를 가장 잘 결정하기 위하여, AAV 벡터의 최초 투여 2주 전 이내에 FVIII 혈중 농도가 결정된다.

[0060] 일부 실시양태에서, 본원에 기재되는 AAV 벡터의 투여 및 그를 사용한 치료는 대상체에 의한 대체 인자 VIII 단백질을 사용한 치료에 대한 필요성의 감소를 야기하게 된다. 이는 본원에 기재되는 AAV 벡터의 투여 전의 치료에 대한 필요성의 빈도를 적시한 다음, 투여 후의 치료에 대한 필요성의 빈도를 적시하는 것에 의해 측정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 치료에 대한 필요성의 감소는 투여 후 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100% 감소된다.

[0061] 일부 실시양태에서, 본원에 기재되는 AAV 벡터의 투여 및 그를 사용한 치료는 간의 손상을 적게 야기하거나 야

기하지 않는다. 간 상태는 예를 들어 개체의 혈액에서 1종 이상의 마커를 측정하는 것에 의해 측정될 수 있다. 간 건강을 표시하는 예시적인 마커는 알라닌 아미노트랜스퍼라제 (ALT) 또는 아스파르테이트 아미노트랜스퍼라제 (AST), 빌리루빈, 알칼리성 포스파타제 및 알부민을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 인간은 투여 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48 또는 52주 이내에, 정상 상위 한계 (ULN)의 1.0, 1.2, 1.5, 1.7 또는 2.0배 이하인 알라닌 아미노트랜스퍼라제 (ALT), 아스파르테이트 아미노트랜스퍼라제 (AST), 빌리루빈, 알칼리성 포스파타제 또는 알부민 중 적어도 1종을 나타낸다. ULN은 일반적으로 집단에서 결정될 수 있다. 예를 들어, ALT에 대하여 논의하고 있는 문헌 [Neuschwander-Tetri, B., *et al.*, *Arch Intern Med.* 2004 Mar 24; 168(6): 663-666]을 참조한다. 일부 실시양태에서, ALT의 ULN은 44 U/L이다. 일부 실시양태에서, AST의 ULN은 39 U/L이다. 일부 실시양태에서, 빌리루빈의 ULN은 총 빌리루빈에 대하여 0.1-1.0 mg/dl, 직접된 빌리루빈에 대하여 0.2-0.7 mg/dl, 그리고 비직접된 빌리루빈에 대하여 0.1-0.4 mg/dl이다. 예를 들어, 문헌 [Lisa B, VanWagner (2015). *Journal of American Medical Association (JAMA)* 313 (5): 516-517]을 참조한다. 일부 실시양태에서, 알칼리성 포스파타제의 ULN은 129 또는 133 U/L이다. 예를 들어, 문헌 [Gowda, *et al.*, *Pan Afr Med J.* (2009) 3:17]을 참조한다. 일부 실시양태에서, 알부민의 정상 범위는 35-55 g/리터이다 (문헌 [Burtis and Ashwood (1999) *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*, 3rd edition. Saunders Editor]).

[0062] 일부 실시양태에서, 본원에 기재되는 AAV 벡터의 투여 및 그를 사용한 치료는, 예를 들어, 투여 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48 또는 52주 후의 임의의 하나 이상 시점에 검출가능한 수준의 FVIII 억제인자를 초래하지 않는다. FVIII 억제인자는 니즈메겐-베테스다(Nijmegen-Bethesda) 검정 (문헌 [Duncan, *et al.*, *Methods Mol Biol.* 2013;992:321-33] 및 [Miller CH, *et al. Am J Hematol.* 90:871-876 (2015)]에 의해 검출된다. 이와 같은 검정의 검출 한계는 0.6 BU이다. 0.6 BU 미만의 어떠한 결과도 검출불가능한 것으로 간주된다.

[0063] 일부 실시양태에서, 본원에 기재되는 AAV 벡터의 투여 및 그를 사용한 치료는 특정 바이오마커의 발현에 유의하게 영향을 주지 않으며, 이상적으로는 바이오마커에 대한 개선된 결과를 초래한다. 예시적인 바이오마커는, 예를 들어, 폰 빌레브란트 인자 (vWF), 가용성 표피 성장 인자 수용체 (sEGFR), 갈락틴-3-결합 단백질 (GAL3BP), C-반응성 단백질 (CRP), IL-6, 순환 알파 태아단백질을 포함한다. 일부 실시양태에서는, 상기 열거된 바이오마커 중 1종 이상이 투여 전 또는 후, 또는 둘 다에 개체의 혈액에서 측정된다. 일부 실시양태에서, 투여 후 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48 또는 52주 이내에 검정될 때, 상기 바이오마커 중 1종 이상의 혈중 수준은 투여 2주 전 이내 수준의 1.0, 1.2, 1.5, 1.7 또는 2.0배 이하이다.

[0064] **일반사항**

[0065] 본원에서 개시되는 방법의 실시, 뿐만 아니라 조성물의 제조 및 사용은 달리 표시되지 않는 한 분자 생물학, 생화학, 염색질 구조 및 분석, 컴퓨터 화학, 세포 배양, 재조합 DNA, 및 관련 기술분야의 기술에 속하는 것으로 되어 있는 관련 분야의 통상적인 기술을 사용한다. 이들 기술에 대해서는 문헌에 충분히 설명되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Sambrook *et al.* MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 and Third edition, 2001]; [Ausubel *et al.*, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York, 1987] 및 주기적인 업데이트물; [METHODS IN ENZYMOLOGY, Academic Press, San Diego] 시리즈; [Wolffe, CHROMATIN STRUCTURE AND FUNCTION, Third edition, Academic Press, San Diego, 1998]; [METHODS IN ENZYMOLOGY, Vol. 304, "Chromatin" (P.M. Wassarman and A. P. Wolffe, eds.), Academic Press, San Diego, 1999]; 및 [METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Vol. 119, "Chromatin Protocols" (P.B. Becker, ed.) Humana Press, Totowa, 1999]을 참조한다.

[0066] **정의**

[0067] "핵산", "폴리뉴클레오티드" 및 "올리고뉴클레오티드"라는 용어는 호환가능하게 사용되어, 선형 또는 원형 입체 구조이고 단일- 또는 이중-가닥 형태 중 어느 하나인 데옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드 중합체를 지칭한다. 본 개시내용의 목적상, 이들 용어가 중합체의 길이와 관련한 제한으로 해석되어서는 안된다. 상기 용어들은 천연 뉴클레오티드의 공지된 유사체, 뿐만 아니라 염기, 당 및/또는 포스페이트 잔기 (예를 들어, 포스포로티오에이트 백본)에서 변형된 뉴클레오티드를 포괄할 수 있다. 일반적으로, 특정한 뉴클레오티드의 유사체는 동일한 염기-쌍형성 특이성을 갖는데; 다시 말하자면 A의 유사체는 T와 염기-쌍을 이루게 된다.

[0068] "폴리펩티드", "펩티드" 및 "단백질"이라는 용어는 호환가능하게 사용되어, 아미노산 잔기의 중합체를 지칭한다. 상기 용어는 하나 이상의 아미노산이 상응하는 자연-발생 아미노산의 화학적 유사체 또는 변형된 유

도체인 아미노산 중합체에도 적용된다.

- [0069] 본원에 기재되는 방법 중 어느 것에서, 외인성 뉴클레오티드 서열 ("발현 구축물" 또는 "발현 카세트" 또는 "벡터")은 해당 영역의 게놈 서열과 상동성이나 동일하지는 않아서 해당 영역에 비-동일 서열을 삽입하기 위한 상동성 재조합을 자극하는 서열을 포함할 수 있다. 이에 따라, 특정 실시양태에서, 해당 영역의 서열과 상동성인 발현 카세트 서열의 일부는 대체되는 게놈 서열에 대하여 약 80 내지 99% (또는 그 사이의 임의의 정수)의 서열 동일성을 나타낸다. 다른 실시양태에서는, 예를 들어 100개를 초과하는 연속 염기 쌍인 발현 카세트와 게놈 서열의 상동성 영역 사이에 1개의 뉴클레오티드만이 상이한 경우로서, 발현 카세트와 게놈 서열 사이의 상동성이 99%를 초과한다. 특정 경우에서, 발현 카세트의 비-상동성인 부분은 새로운 서열이 해당 영역에 도입되도록 하는, 해당 영역에는 존재하지 않는 서열을 포함할 수 있다. 이러한 경우에서, 비-상동성 서열은 일반적으로 해당 영역의 서열과 상동성이거나 동일한 50-1,000개의 염기 쌍 (또는 그 사이의 임의의 정수 값) 또는 1,000개를 초과하는 임의의 수의 염기 쌍 서열에 의해 플랭킹된다.
- [0070] "서열"이라는 용어는 DNA 또는 RNA일 수 있으며; 선형, 원형 또는 분지형일 수 있고, 단일-가닥 또는 이중-가닥 중 어느 하나일 수 있는 임의의 길이의 뉴클레오티드 서열을 지칭한다. "트랜스진"이라는 용어는 게놈에 삽입되는 뉴클레오티드 서열을 지칭한다. 트랜스진은 예를 들어 길이 2 내지 100,000,000개 뉴클레오티드 (또는 그 사이 또는 그 위의 임의의 정수 값), 바람직하게는 길이 약 100 내지 100,000개 뉴클레오티드 (또는 그 사이의 임의의 정수), 더욱 바람직하게는 길이 약 2000 내지 20,000개 뉴클레오티드 (또는 그 사이의 임의의 값), 더욱 더 바람직하게는 약 5 내지 15 kb (또는 그 사이의 임의의 값)인 임의의 길이의 것일 수 있다.
- [0071] "염색체"는 세포 게놈의 전부 또는 일부를 포함하는 염색질 복합체이다. 세포의 게놈은 종종 세포의 게놈을 포함하는 모든 염색체의 모음인 그의 핵형에 의해 특성화된다. 세포의 게놈은 하나 이상의 염색체를 포함할 수 있다.
- [0072] "에피솜"은 세포의 염색체 핵형의 일부가 아닌, 복제성의 핵산, 핵산단백질 복합체 또는 핵산을 포함하는 다른 구조이다. 에피솜의 예는 플라스미드 및 특정 바이러스 게놈을 포함한다. 본원에 기재되는 간 특이적 구축물은 에피솜형으로 유지될 수 있거나, 또는 대안적으로는 세포에 안정하게 통합될 수 있다.
- [0073] "외인성" 분자는 정상적으로는 세포에 존재하지 않지만 1종 이상의 유전적, 생화학적 또는 다른 방법에 의해 세포에 도입될 수 있는 분자이다. "세포 내에서의 정상적인 존재"는 세포의 특정한 발생 스테이지 및 환경 조건과 관련하여 결정된다. 따라서, 예를 들어 근육의 배아 발생 동안에만 존재하는 분자는 성체 근육 세포와 관련하여서는 외인성 분자이다. 유사하게는, 열 충격에 의해 유도되는 분자는 비-열-충격 세포와 관련하여서는 외인성 분자이다. 외인성 분자는 예를 들어 기능불량성 내인성 분자의 기능성 버전 또는 정상-기능성 내인성 분자의 기능불량성 버전을 포함할 수 있다.
- [0074] 외인성 분자는 특히 조합 화학 과정에 의해 생성되는 것과 같은 소형 분자, 또는 거대분자 예컨대 단백질, 핵산, 탄수화물, 지질, 당단백질, 지질단백질, 다당류, 상기 분자의 임의의 변형된 유도체, 또는 상기 분자 중 1종 이상을 포함하는 임의의 복합체일 수 있다. 핵산은 DNA 및 RNA를 포함하며, 단일- 또는 이중-가닥일 수 있고; 선형, 분지형 또는 원형일 수 있으며; 임의의 길이의 것일 수 있다. 핵산은 듀플렉스를 형성할 수 있는 것들, 뿐만 아니라 트리플렉스-형성 핵산을 포함한다. 예를 들어, 미국 특허 번호 5,176,996 및 5,422,251를 참조한다. 단백질은 DNA-결합 단백질, 전사 인자, 염색질 재형성 인자, 메틸화된 DNA 결합 단백질, 폴리머라제, 메틸라제, 데메틸라제, 아세틸라제, 데아세틸라제, 키나제, 포스파타제, 리가제, 데유비퀴티나제, 인테그라제, 리콤비나제, 리가제, 토포이소머라제, 기라제 및 헬리카제를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0075] 외인성 분자는 내인성 분자와 동일한 유형의 분자, 예컨대 외인성 단백질 또는 핵산일 수 있다. 예를 들어, 외인성 핵산은 세포로 도입되는 감염성 바이러스 게놈, 플라스미드 또는 에피솜, 또는 정상적으로는 세포에 존재하지 않는 염색체를 포함할 수 있다. 세포에의 외인성 분자의 도입을 위한 방법은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있으며, 지질-매개 전달 (즉 중성 및 양이온성 지질을 포함하는 리포솜), 전기천공, 직접 주사, 세포 융합, 입자 충격, 칼슘 포스페이트 공동-침전, DEAE-텍스트란-매개 전달 및 바이러스 벡터-매개 전달을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 외인성 분자는 내인성 분자와 동일한 유형이나 그 세포가 유래하는 것과는 다른 종으로부터 유래하는 분자일 수도 있다. 예를 들어, 인간 핵산 서열이 원래는 마우스 또는 햄스터로부터 유래하는 세포주로 도입될 수 있다. 식물 세포로의 외인성 분자의 도입을 위한 방법은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있으며, 원형질체 형질전환, 탄화 규소 (예를 들어, 휘스커스(WHISKERS)TM), 아그로박테리움(*Agrobacterium*)-매개 형질전환, 지질-매개 전달 (즉 중성 및 양이온성 지질을 포함하는 리포솜), 전기천공, 직접 주사, 세포 융합, 입자 충격 (예를 들어, "유전자 총" 사용), 칼슘 포스페이트 공동-침전, DEAE-

텍스트란-매개 전달 및 바이러스 벡터-매개 전달을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

- [0076] 반면, "내인성" 분자는 특정한 환경 조건 하에 특정한 발생 스테이지에서 특정한 세포에 정상적으로 존재하는 것이다. 예를 들어, 내인성 핵산은 염색체, 미토콘드리아, 염록체 또는 다른 소기관의 게놈, 또는 자연-발생 에피솜 핵산을 포함할 수 있다. 추가적인 내인성 분자는 단백질, 예를 들어 전사 인자 및 효소를 포함할 수 있다.
- [0077] 본원에서 사용될 때, "외인성 핵산의 산물"이라는 용어는 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드 산물 둘 다, 예를 들어, 전사 산물 (폴리뉴클레오티드 예컨대 RNA) 및 번역 산물 (폴리펩티드)을 포함한다.
- [0078] 본 개시내용의 목적상, "유전자"는 유전자 산물 (이하 참조)을 코딩하는 DNA 영역, 뿐만 아니라 해당 조절 서열이 코딩 및/또는 전사 서열에 인접하는지 여부에 관계없이 유전자 산물의 생산을 조절하는 모든 DNA 영역을 포함한다. 따라서, 유전자는 프로모터 서열, 종결인자, 번역 조절 서열 예컨대 리보솜 결합 부위 및 내부 리보솜 진입 부위, 인핸서, 사일런서, 인슐레이터, 경계 요소, 복제 기원, 매트릭스 부착 부위 및 로커스 제어 영역을 포함하나, 반드시 이에 제한되지는 않는다.
- [0079] "유전자 발현"은 유전자에 함유되어 있는 정보의 유전자 산물로의 전환을 지칭한다. 유전자 산물은 유전자의 직접적인 전사 산물 (예를 들어, mRNA, tRNA, rRNA, 안티센스 RNA, 리보자임, 구조 RNA 또는 임의의 다른 유형의 RNA), 또는 mRNA의 번역에 의해 생산되는 단백질일 수 있다. 유전자 산물은 또한 캡핑, 폴리아데닐화, 메틸화 및 편집과 같은 과정에 의해 변형된 RNA, 및 예를 들어 메틸화, 아세틸화, 인산화, 유비퀴틴화, ADP-리보실화, 미리스틸화 및 글리코실화에 의해 변형된 단백질을 또한 포함한다.
- [0080] 유전자 발현의 "조정"은 유전자 활성의 변화를 지칭한다. 발현의 조정은 유전자 활성화 및 유전자 억제를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 게놈 편집 (예를 들어, 절단, 변경, 불활성화, 무작위 돌연변이)이 발현을 조정하는데 사용될 수 있다. 유전자 불활성화는 본원에 기재된 바와 같은 ZFP, TALE 또는 크리스퍼 (CRISPR)/Cas 시스템을 포함하지 않는 세포와 비교하였을 때의 소정의 유전자 발현 감소를 지칭한다. 따라서, 유전자 불활성화는 부분적이거나 완전할 수 있다.
- [0081] "진핵" 세포는 줄기 세포 (만능성 및 다능성)를 포함한 진균 세포 (예컨대 효모), 식물 세포, 동물 세포, 포유 동물 세포 및 인간 세포 (예를 들어, T-세포)를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0082] "작동적 연결" 및 "작동적으로 연결된" (또는 "작동가능하게 연결된")이라는 용어는 구성요소가 정상적으로 기능하는 것, 및 구성요소 중 적어도 하나가 다른 구성요소 중 적어도 하나에 대하여 발휘되는 기능을 매개할 수 있는 가능성을 허용하는 것 둘 다하도록 구성요소가 배열되는 2개 이상 구성요소 (예컨대 서열 요소)의 병치와 관련하여 호환가능하게 사용된다. 예시하자면, 전사 조절 서열이 1종 이상 전사 조절 인자의 존재 또는 부재에 반응하여 코딩 서열의 전사 수준을 제어하는 경우, 프로모터와 같은 전사 조절 서열은 코딩 서열에 작동적으로 연결되는 것이다. 전사 조절 서열은 일반적으로 코딩 서열과 인 시스로 작동적으로 연결되나, 직접적으로 거기에 인접할 필요는 없다. 예를 들어, 인핸서는 코딩 서열에 작동적으로 연결되는 전사 조절 서열이지만, 그들이 연속되지는 않는다.
- [0083] 단백질, 폴리펩티드 또는 핵산의 "기능성 단편"은 그의 서열이 전장 단백질, 폴리펩티드 또는 핵산과 동일하지는 않지만, 아직 전장 단백질, 폴리펩티드 또는 핵산과 동일한 기능을 유지하는 단백질, 폴리펩티드 또는 핵산이다. 기능성 단편은 상응하는 원래 분자보다 더 많거나, 더 적거나, 또는 그와 동일한 수의 잔기를 보유할 수 있고/거나, 하나 이상의 아미노산 또는 뉴클레오티드 치환을 포함할 수 있다. 핵산의 기능 (예를 들어, 코딩 기능, 또 다른 핵산에 혼성화되는 능력)을 결정하기 위한 방법에 대해서는 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 유사하게는, 단백질 기능을 결정하기 위한 방법은 널리 공지되어 있다. 예를 들어, B-도메인 결실 인간 인자 VIII은 전장 인자 VIII 단백질의 기능성 단편이다.
- [0084] 폴리뉴클레오티드 "벡터" 또는 "구축물"은 유전자 서열을 표적 세포로 전달할 수 있다. 통상적으로, "벡터 구축물", "발현 벡터", "발현 구축물", "발현 카세트" 및 "유전자 전달 벡터"는 해당 유전자의 발현을 유도할 수 있으며, 유전자 서열을 표적 세포에 전달할 수 있는 임의의 핵산 구축물을 의미한다. 따라서, 상기 용어는 클로닝 및 발현 비히클, 뿐만 아니라 통합 벡터를 포함한다.
- [0085] "대상체" 및 "환자"라는 용어는 호환가능하게 사용되며, 인간 환자 및 비-인간 영장류와 같은 포유동물, 뿐만 아니라 토끼, 개, 고양이, 래트, 마우스 및 다른 동물과 같은 실험 동물을 지칭한다. 따라서, 본원에서 사용될 때의 "대상체" 또는 "환자"라는 용어는 본 발명의 발현 카세트가 투여될 수 있는 임의의 포유동물 환자 또는 대

상체를 의미한다. 본 발명의 대상체는 장애가 있는 것들을 포함한다.

- [0086] 본원에서 사용될 때의 "치료하는" 및 "치료"라는 용어는 증상의 중증도 및/또는 빈도의 감소, 증상 및/또는 근본적인 원인의 제거, 증상의 발생 및/또는 그의 근본 원인의 예방, 및 손상의 개선 또는 치유를 지칭한다. 암 및 이식편 대 숙주 질환이 본원에 기재되는 조성물 및 방법을 사용하여 치료될 수 있는 병태의 비-제한적인 예이다. 이에 따라, "치료하는" 및 "치료"는 하기를 포함한다:
- [0087] (i) 특히 해당 포유동물이 병태의 소인이 있으나 아직 그것이 있는 것으로 진단되지 않는 경우에, 포유동물에서 질환 또는 병태가 발생하는 것을 예방하는 것;
- [0088] (ii) 질환 또는 병태를 억제하는 것, 즉 그의 발달을 정지시키는 것;
- [0089] (iii) 질환 또는 병태를 경감하는 것, 즉 질환 또는 병태의 퇴행을 야기하는 것; 및/또는
- [0090] (iv) 질환 또는 병태에 기인하는 증상을 경감하거나 제거하는 것, 즉 근본적인 질환 또는 병태의 해소를 동반하여, 또는 그것 없이 통증을 경감하는 것.
- [0091] 본원에서 사용될 때, "질환" 및 "병태"라는 용어는 호환가능하게 사용될 수 있거나, 또는 특정한 병 또는 병태는 병인이 알려져 있지 않으며 (그에 따라 병인학이 아직 도출되어 있지 않음), 그에 따라 그것이 아직 질환으로 인지되지 않고 대신 단지 바람직하지 않은 병태 또는 증후군으로 인지되며, 임상적에 의해 다소 특이적인 일련의 증상들이 확인되어 있을 수 있다는 점에서 서로 다를 수 있다.
- [0092] "제약 조성물"은 본 발명의 화합물과 포유동물, 예컨대 인간에의 생물학적으로 활성인 화합물의 전달용으로 관련된 기술분야에서 일반적으로 허용되는 매질의 제제를 지칭한다. 그와 같은 매질은 그를 위한 모든 제약상 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제를 포함한다.
- [0093] "유효량" 또는 치료 유효량은 포유동물, 바람직하게는 인간에게 투여되었을 때 포유동물, 바람직하게는 인간에서 치료를 수행하기에 충분한 본 발명의 화합물의 양을 지칭한다. "치료 유효량"을 구성하는 본 발명의 화합물의 양은 화합물, 병태 및 그의 중증도, 투여 방식, 그리고 치료될 포유동물의 연령에 따라 달라지게 되나, 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 그 자신의 지식 및 본 개시내용에 유념하여 일상적으로 결정될 수 있다.
- [0094] **간-특이적 발현 구축물**
- [0095] 또한 본원에 기재되는 것은 대상체에의 발현 카세트(들)의 하기 생체내 투여 (예를 들어, 간 전달)를 포함하여, 간 세포에서 트랜스진의 발현을 유도하는데 사용하기 위한 발현 카세트 (구축물)이다. 상기 발현 구축물은 에피솜형으로 유지되면서 염색체외로의 트랜스진의 발현을 추진할 수 있거나, 또는 대안적으로는 발현 구축물이 예를 들어 뉴클레아제-매개 표적화 통합에 의해 간 세포의 게놈에 통합될 수 있다.
- [0096] 폴리뉴클레오티드 발현 구축물은 인헨서 서열, 프로모터 서열 및 하나 이상의 트랜스진을 포함한다. 임의적으로 포함되는 것은 하기 중 1종 이상이다: 인트론성 서열, 폴리아데닐화 서열 및/또는 신호 펩티드. 어떠한 인헨서 서열도 본원에 기재되는 발현 구축물에 사용될 수 있다. 특정 실시양태에서, 인헨서는 야생형이거나 변형된 Serpin1 인헨서 (문헌 [Chuah *et al.*, (2014) *Molecular Therapy*, 22, 1605-1613]; [Nair *et al.*, (2014) *Blood*, 123, 3195-3199])이다.
- [0097] 알고 있을 바와 같이, 어떠한 트랜스진도 본원에 기재되는 구축물에 사용될 수 있다. 게다가, 본원에 기재되는 구축물의 개별 구성요소 (프로모터, 인헨서, 인슐레이터, 트랜스진 등)는 어떠한 조합으로도 혼합 및 매칭될 수 있다.
- [0098] 본원에 기재되는 구축물은 임의의 바이러스 또는 비-바이러스 벡터 내에 포함될 수 있다. 구축물은 에피솜형으로 유지될 수 있거나, 또는 (예를 들어, 뉴클레아제-매개 표적화 통합을 통하여) 세포의 게놈으로 통합될 수 있다.
- [0099] 비-바이러스 벡터는 DNA 또는 RNA 플라스미드, DNA MC, 네이키드 핵산, 그리고 리포솜, 나노입자 또는 폴록사머와 같은 전달 비히클과 복합체화된 핵산을 포함한다. 본원에 기재되는 발현 카세트를 운반하는데 사용될 수 있는 바이러스 벡터는 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스 벡터, 박시니아 및 헤르페스 심플렉스 바이러스 벡터를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 숙주 게놈에의 통합은 레트로바이러스, 렌티바이러스 및 아데노-연관 바이러스 유전자 전달 방법을 사용하여 가능하며, 본원에 기재된 바와 같이, 뉴클레아제-매개 통합에 의해 촉진될 수 있다.

- [0100] 특정 실시양태에서, 구축물은 아데노-연관 바이러스 ("AAV") 벡터, 또는 에피솜형으로 유지되거나 (예를 들어, 뉴클레아제-매개 표적화 통합을 통하여) 간 세포의 게놈에 통합될 수 있는 벡터 시스템에 포함된다. 제조합 AAV 벡터의 구축에 대해서는 미국 특허 번호 5,173,414; 문헌 [Tratschin *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 5:3251-3260 (1985)]; [Tratschin, *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 4:2072-2081 (1984)]; [Hermonat & Muzyczka, *PNAS* 81:6466-6470 (1984)]; 및 [Samulski *et al.*, *J. Virol.* 63:03822-3828 (1989)]을 포함한 수많은 공개물에 기재되어 있다.
- [0101] 이에 따라, 특정 실시양태에서, 발현 구축물은 AAV 구축물 상에서 운반되며, 본원에 기재된 바와 같은 발현 구축물 요소 (예를 들어, 인핸서, 프로모터, 임의적 인트론, 트랜스진 등)에 플랭킹하는 5' 및 3' ITR을 추가로 포함한다. 임의적으로, 스페이서 분자도 1종 이상의 발현 구축물 구성요소 사이, 예를 들어 5' ITR과 인핸서 사이 및/또는 폴리아데닐화 신호와 3' ITR 사이에 포함된다. 스페이서는 안전-안착 로커스 (예를 들어, 알부민)로의 재조합을 촉진하는 상동성 아암으로 기능할 수 있다.
- [0102] 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 AAV 벡터는 어떠한 AAV로부터도 유래할 수 있다. 특정 실시양태에서, AAV 벡터는 결손형의 비병원성인 과보바이러스 아데노-연관 유형 2 바이러스로부터 유래한다. 모든 그와 같은 벡터는 트랜스진 발현 카세트에 플랭킹하는 AAV 145 bp 역위 말단 반복체만을 유지하는 플라스미드로부터 유래한다. 효율적인 유전자 전달, 및 형질도입되는 세포 게놈으로의 통합으로 인한 안정한 트랜스진 전달이 이와 같은 벡터 시스템의 핵심 특징이다 (문헌 [Wagner *et al.*, *Lancet* 351:9117 1702-3 (1998)], [Kearns *et al.*, *Gene Ther.* 9:748-55 (1996)]). AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9 및 AAVrh.10을 포함한 다른 AAV 혈청형 및 임의의 신규 AAV 혈청형이 본 발명에 따라 사용될 수도 있다. 일부 실시양태에서는, 바이러스 핵산의 LTR 서열의 바이러스 기원이 캡시드 서열의 바이러스 기원에 대하여 이종유래인 키메라 AAV가 사용된다. 비-제한적인 예는 AAV2로부터 유래하는 LTR, 및 AAV5, AAV6, AAV8 또는 AAV9 (즉 각각 AAV2/5, AAV2/6, AAV2/8 및 AAV2/9)로부터 유래하는 캡시드를 갖는 키메라 바이러스를 포함한다.
- [0103] 패키징 세포가 숙주 세포를 감염시킬 수 있는 바이러스 입자를 형성하는데 사용된다. 그와 같은 세포는 AAV와 아데노바이러스를 패키징하는데 사용될 수 있는 HEK293 및 Sf9 세포, 그리고 레트로바이러스를 패키징하는 ψ 2 세포 또는 PA317 세포를 포함한다. 유전자 요법에 사용되는 바이러스 벡터는 보통 바이러스 입자에 핵산 벡터를 패키징하는 제조자 세포주에 의해 생성된다. 벡터는 통상적으로 패키징 및 이후의 숙주에의 통합 (해당될 경우)에 필요한 최소한의 바이러스 서열을 포함하며, 바른 바이러스 서열은 발현될 단백질을 코딩하는 발현 카세트에 의해 대체된다. 누락 바이러스 기능은 세포주를 패키징하는 것에 의해 인 트랜스로 공급된다. 예를 들어, 유전자 요법에 사용되는 AAV 벡터는 통상적으로 패키징 및 숙주 게놈에의 통합에 필요한 AAV 게놈 유래의 역위 말단 반복 (ITR) 서열만을 보유한다. 바이러스 DNA는 다른 AAV 유전자, 즉 *rep* 및 *cap*을 코딩하나 ITR 서열은 결핍되어 있는 헬퍼 플라스미드를 함유하는 세포주에서 패키징된다. 세포주는 또한 헬퍼로서의 아데노바이러스에 의해 감염되어 있다. 헬퍼 바이러스는 AAV 벡터의 복제, 및 헬퍼 플라스미드로부터의 AAV 유전자의 발현을 촉진한다. 헬퍼 플라스미드는 ITR 서열의 결핍으로 인하여 상당량으로는 패키징되지 않는다. 아데노바이러스에 의한 오염은, 예를 들어, AAV에 비해 아데노바이러스가 더 민감인 열 처리에 의해 감소될 수 있다. 일부 실시양태에서, AAV는 바칼로바이러스 발현 시스템을 사용하여 생산된다.
- [0104] 많은 유전자 요법 적용분야에서, 유전자 요법 벡터는 특정한 조직 유형에 대하여 고도의 특이성 정도로 전달되는 것이 바람직하다. 따라서, 바이러스 벡터는 바이러스 외부 표면상 바이러스 코트 단백질과의 융합 단백질로서 리간드를 발현하는 것에 의해 주어진 세포 유형에 대하여 특이성을 갖도록 변형될 수 있다. 리간드는 해당 세포 유형에 존재하는 것으로 공지되어 있는 수용체에 대하여 친화성을 갖도록 선택된다. 예를 들어, 문헌 [Han *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:9747-9751 (1995)]은 gp70에 융합된 인간 헤레굴린을 발현하고 재조합 바이러스는 인간 표피 성장 인자 수용체를 발현하는 특정 인간 유방암 세포를 감염시키도록 몰로니 뮤린 백혈병 바이러스가 변형될 수 있다고 보고하였다. 이와 같은 원리는 표적 세포가 수용체를 발현하며 바이러스가 세포-표면 수용체의 리간드를 포함하는 융합 단백질을 발현하는 다른 바이러스-표적 세포 쌍으로 확장될 수 있다. 예를 들어, 필라멘트형 파지는 사실상 모든 선택된 세포 수용체에 대하여 특이적 결합 친화성을 갖는 항체 단편 (예를 들어, FAB 또는 Fv)을 나타내도록 조작될 수 있다. 상기한 설명이 주로 바이러스 벡터에 적용되기는 하지만, 동일한 원리가 비바이러스 벡터에도 적용될 수 있다. 그와 같은 벡터는 특이적 표적 세포에 의한 흡수를 선호하는 특이적 흡수 서열을 포함하도록 조작될 수 있다.
- [0105] 본원에 기재되는 폴리뉴클레오티드는 1종 이상의 비-자연 염기 및/또는 백본을 포함할 수 있다. 구체적으로, 본원에 기재된 바와 같은 발현 카세트는 해당 영역의 전사 정지 상태를 달성하기 위하여 메틸화된 시토신을 포

함할 수 있다.

- [0106] 게다가, 본원에 기재된 바와 같은 발현 구축물은 추가적인 전사 또는 번역 조절 또는 다른 서열, 예를 들어 코작(Kozak) 서열, 추가 프로모터, 인핸서, 인슐레이터, 내부 리보솜 진입 부위, 2A 캡티드를 코딩하는 서열, 퓨린 절단 부위 및/또는 폴리아데닐화 신호도 포함할 수 있다. 또한, 키메라 유전자 (예를 들어, 리포터 발현 카세트)를 생성하기 위하여, 해당 유전자의 제어 요소는 리포터 유전자에 작동가능하게 연결될 수 있다.
- [0107] 전달
- [0108] 본원에 기재되는 구축물은 임의의 적합한 수단에 의해 임의의 세포 유형, 바람직하게는 간으로 (간 전달) 생체 내 또는 생체의 전달될 수 있다. 유사하게는, 표적화된 통합을 위하여 뉴클레아제와의 조합으로 사용되는 경우, 비-바이러스 벡터(들), 바이러스 벡터(들), 및/또는, 예를 들어, mRNA로서의 RNA 형태를 사용하여 폴리뉴클레오티드 및/또는 단백질 형태로 뉴클레아제가 전달될 수 있다.
- [0109] 통상적인 바이러스 및 비-바이러스 기반 유전자 전달 방법이 세포 (예를 들어, 포유동물 세포) 및 표적 조직에 조작된 유전자 조정인자를 코딩하는 핵산을 도입하는데 사용될 수 있다. 그와 같은 방법은 또한 시험관 내에서 세포에 해당 억제인자 (또는 그의 구성요소)를 코딩하는 핵산을 투여하는데 사용될 수 있다. 특정 실시양태에서, 억제인자를 코딩하는 핵산은 생체내 또는 생체의 유전자 요법 용도로 투여된다. 비-바이러스 벡터 전달 시스템은 DNA 플라스미드, 네이키드 핵산, 및 리포솜 또는 폴록사머와 같은 전달 비히클과 복합체화된 핵산을 포함한다. 바이러스 벡터 전달 시스템은 세포에의 전달 후 에피솜형이거나 통합 게놈형 중 어느 하나인 DNA 및 RNA 바이러스를 포함한다. 유전자 요법 절차의 고찰을 위해서는, 문헌 [Anderson, *Science* 256:808-813 (1992)]; [Nabel & Felgner, *TIBTECH* 11:211-217 (1993)]; [Mitani & Caskey, *TIBTECH* 11:162-166 (1993)]; [Dillon, *TIBTECH* 11:167-175 (1993)]; [Miller, *Nature* 357:455-460 (1992)]; [Van Brunt, *Biotechnology* 6(10):1149-1154 (1988)]; [Vigne, *Restorative Neurology and Neuroscience* 8:35-36 (1995)]; [Kremer & Perricaudet, *British Medical Bulletin* 51(1):31-44 (1995)]; [Haddada *et al.*, in *Current Topics in Microbiology and Immunology* Doerfler and Boehm (eds.) (1995)]; 및 [Yu *et al.*, *Gene Therapy* 1:13-26 (1994)]을 참조한다.
- [0110] 비제한적으로 플라스미드 벡터, 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 폭스바이러스 벡터; 헤르페스바이러스 벡터 및 아데노-연관 바이러스 벡터 등을 포함한 어떠한 벡터 시스템도 사용될 수 있다. 그 전문이 본원에 참조로 포함된 미국 특허 번호 8,586,526; 6,534,261; 6,607,882; 6,824,978; 6,933,113; 6,979,539; 7,013,219; 및 7,163,824를 또한 참조한다.
- [0111] 핵산의 비-바이러스 전달 방법은 전기천공, 리포펙션, 미세주사, 바이오리스트릭, 비로솜, 리포솜, 면역리포솜, 다른 나노입자, 폴리양이온 또는 지질:핵산 접합체, 네이키드 DNA, 인공 비리온, 및 DNA의 작용제-강화 흡수를 포함한다. 예를 들어 소니트론(Sonitron) 2000 시스템 (리치-마르(Rich-Mar))을 사용한 초음파천공이 또한 핵산의 전달에 사용될 수 있다. 추가적인 예시적인 핵산 전달 시스템은 아막사바이오시스템즈(AmaxaBiosystems) (독일 쾰른 소재), 맥스사이트, 인크.(Maxcyte, Inc.) (메릴랜드주 로크빌 소재), BTX 몰레큘라 딜리버리 시스템즈(Molecular Delivery Systems) (매사추세츠주 홀리스톤 소재) 및 코페르니쿠스 테라퓨틱스 인크.(Copernicus Therapeutics Inc.)에 의해 제공되는 것들을 포함한다 (예를 들어, US6008336 참조).
- [0112] 일부 실시양태에서, 발현 구축물은 AAV 벡터이다. 임의적인 뉴클레아제는 mRNA 형태로, 또는 1종 이상의 바이러스 벡터 (AAV, Ad 등)를 사용하여 투여될 수 있다. 투여는 원하는 표적 세포로 폴리뉴클레오티드가 전달되는 임의의 수단에 의할 수 있다. 생체내 및 생체의 방법 둘 다 고려된다. 간문맥으로의 정맥내 주사가 가능한 투여 방법이다. 다른 생체내 투여 양식은, 예를 들어, 간엽 또는 담도에의 직접 주사 및 간 동맥을 통하는 것을 포함한 간에서 원거리인 정맥내 주사, 간 실질에의 직접 주사, 간 동맥을 통한 주사, 및/또는 담관 가지를 통한 역행 주사를 포함한다. 생체의 투여 양식은 절제된 간세포 또는 간의 다른 세포의 시험관내 형질도입 후 이어지는 형질도입된 절제된 간세포의 다시 인간 환자의 문맥 혈관구조, 간 실질 또는 담관 가지로의 주입이 포함하며, 예를 들어, 문헌 [Grossman *et al.*, (1994) *Nature Genetics*, 6:335-341]을 참조한다.
- [0113] 1종 초과 폴리뉴클레오티드 (예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 구축물과 폴리뉴클레오티드 형태의 뉴클레아제)의 전달을 수반하는 시스템에서는, 1종 이상의 동일하고/거나 서로 다른 벡터를 사용하여 2종 이상의 폴리뉴클레오티드(들)가 전달된다. 예를 들어, 폴리뉴클레오티드 형태의 뉴클레아제는 mRNA 형태로 전달될 수 있으며, 본원에 기재된 바와 같은 간-특이적 구축물은 바이러스 벡터 (예를 들어, AAV), 미니서클 DNA, 플라스미드 DNA, 선형 DNA, 리포솜, 나노입자 등과 같은 다른 양식을 통하여 전달될 수 있다.

- [0114] 추가적인 예시적인 핵산 전달 시스템은 아막사 바이오시스템즈 (독일 쾰른 소재), 맥스사이트, 인크. (메릴랜드 주 로크빌 소재), BTX 몰레큘라 딜리버리 시스템즈 (매사추세츠주 홀리스톤 소재) 및 코페르니쿠스 테라퓨틱스 인크.에 의해 제공되는 것들을 포함한다 (예를 들어, US6008336 참조). 리포펙션에 대해서는 예를 들어 미국 특허 번호 5,049,386; 4,946,787; 및 4,897,355에 기재되어 있으며, 리포펙션 시약이 시중에서 판매되고 있다 (예를 들어, 프랜스펙탐(Transfectam)[®] 및 리포펙틴(Lipofectin)[®] 및 리포펙타민(Lipofectamine)[®] RNAiMAX). 폴리뉴클레오티드의 효율적인 수용체-인식 리포펙션에 적합한 양이온성 및 중성 지질은 펠그너(Felgner)의 WO 91/17424, WO 91/16024의 것들을 포함한다. 전달은 세포 (생체의 투여) 또는 표적 조직 (생체내 투여)으로의 것일 수 있다.
- [0115] 면역지질 복합체와 같은 표적화된 리포솜을 포함한 지질:핵산 복합체의 제조에 대해서는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Crystal, Science 270:404-410 (1995)]; [Blaese et al., Cancer Gene Ther. 2:291-297 (1995)]; [Behr et al., Bioconjugate Chem. 5:382-389 (1994)]; [Remy et al., Bioconjugate Chem. 5:647-654 (1994)]; [Gao et al., Gene Therapy 2:710-722 (1995)]; [Ahmad et al., Cancer Res. 52:4817-4820 (1992)]; 미국 특허 번호 4,186,183, 4,217,344, 4,235,871, 4,261,975, 4,485,054, 4,501,728, 4,774,085, 4,837,028 및 4,946,787 참조).
- [0116] 추가적인 전달 방법은 엔진아이씨(EnGeneIC) 전달 비히클 (EDV)에의 전달될 핵산의 패키징의 사용을 포함한다. 이러한 EDV는 항체의 하나의 아암은 표적 조직에 대하여 특이성을 가지며 다른 것은 EDV에 대하여 특이성을 갖는 이중특이적 항체를 사용하여 표적 조직으로 특이적으로 전달된다. 항체는 EDV를 표적 세포 표면으로 가져오며, 이후 세포내입에 의해 EDV가 세포로 운반된다. 일단 세포 내에서는, 내용물이 방출된다 (문헌 [MacDiarmid et al. (2009) Nature Biotechnology 27(7):643] 참조).
- [0117] 일시적인 발현이 요구되는 적용분야에서는, 아데노바이러스 기반 시스템이 사용될 수 있다. 아데노바이러스 기반 벡터는 많은 세포 유형에서 매우 높은 형질도입 효율을 가질 수 있으며, 세포 분할을 필요로 하지 않는다. 그와 같은 벡터를 사용하면, 고역가 및 고수준의 발현이 수득된다. 이와 같은 벡터는 상대적으로 단순한 시스템에서 대량으로 생산될 수 있다. 아데노-연관 바이러스 ("AAV") 벡터가 또한, 예를 들어, 핵산 및 펩티드의 시험관내 생산에서, 그리고 생체내 및 생체의 유전자 요법 절차를 위하여 표적 핵산을 세포에 형질도입하는데 사용된다 (예를 들어, 문헌 [West et al., Virology 160:38-47 (1987)]; 미국 특허 번호 4,797,368; WO 93/24641; 문헌 [Kotin, Human Gene Therapy 5:793-801 (1994)]; [Muzyczka, J. Clin. Invest. 94:1351 (1994)] 참조). 재조합 AAV 벡터의 구축에 대해서는 미국 특허 번호 5,173,414; 문헌 [Tratschin et al., Mol. Cell. Biol. 5:3251-3260 (1985)]; [Tratschin, et al., Mol. Cell. Biol. 4:2072-2081 (1984)]; [Hermonat & Muzyczka, PNAS 81:6466-6470 (1984)]; 및 [Samulski et al., J. Virol. 63:03822-3828 (1989)] 을 포함한 수많은 공개물에 기재되어 있다.
- [0118] 재조합 아데노-연관 바이러스 벡터 (rAAV)는 결손형의 비병원성인 파보바이러스 아데노-연관 유형 2 바이러스를 기반으로 하는 유망한 대안적인 유전자 전달 시스템이다. 모든 벡터는 트랜스진 발현 카세트에 플랭킹하는 AAV 145 bp 역위 말단 반복체만을 유지하는 플라스미드로부터 유래한다. 효율적인 유전자 전달, 및 형질도입되는 세포 계능으로의 통합으로 인한 안정한 트랜스진 전달이 이와 같은 벡터 시스템의 핵심 특징이다 (문헌 [Wagner et al., Lancet 351:9117 1702-3 (1998)], [Kearns et al., Gene Ther. 9:748-55 (1996)]). AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV8AAV 8.2, AAV9 및 AAV rh10을 포함한 다른 AAV 혈청형, 그리고 AAV2/8, AAV2/9, AAV2/5 및 AAV2/6와 같은 슈도유형 AAV가 본 발명에 따라 사용될 수도 있다. 혈-뇌 장벽을 건널 수 있는 신규 AAV 혈청형이 본 발명에 따라 사용될 수도 있다 (예를 들어, US20150079038 참조). 일부 실시양태에서는, AAV6가 사용된다.
- [0119] 패키징 세포가 숙주 세포를 감염시킬 수 있는 바이러스 입자를 형성하는데 사용된다. 그와 같은 세포는 아데노 바이러스를 패키징하는 293 세포, 및 레트로바이러스를 패키징하는 ψ 2 세포 또는 PA317 세포를 포함한다. 유전자 요법에 사용되는 바이러스 벡터는 보통 바이러스 입자에 핵산 벡터를 패키징하는 제조자 세포주에 의해 생성된다. 벡터는 통상적으로 패키징 및 이후의 숙주에의 통합 (해당될 경우)에 필요한 최소한의 바이러스 서열을 포함하며, 바른 바이러스 서열은 발현될 단백질을 코딩하는 발현 카세트에 의해 대체된다. 누락 바이러스 기능은 세포주를 패키징하는 것에 의해 인 트랜스로 공급된다. 예를 들어, 유전자 요법에 사용되는 AAV 벡터는 통상적으로 패키징 및 숙주 계능에의 통합에 필요한 AAV 계능 유래의 역위 말단 반복 (ITR) 서열만을 보유한다. 바이러스 DNA는 다른 AAV 유전자, 즉 rep 및 cap을 코딩하나 ITR 서열은 결핍되어 있는 헬퍼 플라스미드를 함유하는 세포주에서 패키징된다. 세포주는 또한 헬퍼로서의 아데노바이러스에 의해 감염되어 있다. 헬퍼 바이러스

스는 AAV 벡터의 복제, 및 헬퍼 플라스미드로부터의 AAV 유전자의 발현을 촉진한다. 헬퍼 플라스미드는 ITR 서열의 결핍으로 인하여 상당량으로는 패키징되지 않는다. 아데노바이러스에 의한 오염은, 예를 들어, AAV에 비해 아데노바이러스가 더 민감성인 열 처리에 의해 감소될 수 있다.

[0120] 293 또는 바칼로바이러스 시스템으로부터의 AAV 입자의 정제는 통상적으로 바이러스를 생산하는 세포의 성장 후 이어지는 세포 상청액으로부터의 바이러스 입자의 수집, 또는 세포를 용해시키고 조 용해물로부터 바이러스를 수집하는 것을 수반한다. 다음에, AAV는 이온 교환 크로마토그래피 (예를 들어, 미국 특허 번호 7,419,817 및 6,989,264 참조), 이온 교환 크로마토그래피 및 CsCl 밀도 원심분리 (예를 들어, PCT 공개 W02011094198A10), 면역친화성 크로마토그래피 (예를 들어, W02016128408) 또는 AVB 세파로스(Sepharose) (예를 들어, GE 헬스케어 라이프 사이언스즈(Healthcare Life Sciences))를 사용한 정제를 포함하여, 관련 기술분야에 공지되어 있는 방법에 의해 정제된다.

[0121] 많은 유전자 요법 적용분야에서, 유전자 요법 벡터는 특정한 조직 유형에 대하여 고도의 특이성 정도로 전달되는 것이 바람직하다. 따라서, 바이러스 벡터는 바이러스 외부 표면상 바이러스 코트 단백질과의 융합 단백질로서 리간드를 발현하는 것에 의해 주어진 세포 유형에 대하여 특이성을 갖도록 변형될 수 있다. 리간드는 해당 세포 유형에 존재하는 것으로 공지되어 있는 수용체에 대하여 친화성을 갖도록 선택된다. 예를 들어, 문헌 [Han et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:9747-9751 (1995)]은 gp70에 융합된 인간 헤레굴린을 발현하고 재조합 바이러스는 인간 표피 성장 인자 수용체를 발현하는 특정 인간 유방암 세포를 감염시키도록 몰로니 마우스 백혈병 바이러스가 변형될 수 있다고 보고하였다. 이와 같은 원리는 표적 세포가 수용체를 발현하며 바이러스가 세포-표면 수용체의 리간드를 포함하는 융합 단백질을 발현하는 다른 바이러스-표적 세포 쌍으로 확장될 수 있다. 예를 들어, 필라멘트형 과지는 사실상 모든 선택된 세포 수용체에 대하여 특이적 결합 친화성을 갖는 항체 단편 (예를 들어, FAB 또는 Fv)을 나타내도록 조작될 수 있다. 상기한 설명이 주로 바이러스 벡터에 적용되기는 하지만, 동일한 원리가 비바이러스 벡터에도 적용될 수 있다. 그와 같은 벡터는 특이적 표적 세포에 의한 흡수를 선호하는 특이적 흡수 서열을 포함하도록 조작될 수 있다.

[0122] 하기 기재된 바와 같이, 유전자 요법 벡터는 통상적으로 전신성 투여 (예를 들어, 정맥내, 복막내, 근육내, 인피하, 또는 뇌의 직접 주사를 포함한 두개내 주입) 또는 국소 적용에 의한 개별 환자에의 투여에 의해 생체내로 전달될 수 있다.

[0123] 제약상 허용되는 담체는 부분적으로 투여되는 특정한 조성물, 뿐만 아니라 조성물을 투여하는데 사용되는 특정한 방법에 의해서 결정된다. 이에 따라, 하기 기재된 바와 같이, 이용가능한 제약 조성물에는 매우 다양한 적합한 제형이 존재한다 (예를 들어, 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., 1989] 참조).

[0124] 투여될 발현 카세트 (및 임의적인 뉴클레아제(들) 및/또는 변형된 세포)의 유효량은 환자마다 달라지게 된다. 따라서, 유효량은 조성물 (예를 들어, 세포)을 투여하는 의사에 의해 가장 많이 결정되며, 적절한 투약량은 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 치료용 폴리펩티드의 혈청, 혈장 또는 다른 조직 수준의 분석, 그리고 투여 전 최초 수준과의 비교는 투여되는 양이 너무 낮은지, 올바른 범위 이내인지 또는 너무 높은지를 결정할 수 있다. 최초 및 후속 투여를 위한 적합한 레지멘이 또한 가변적이지만, 최초 투여, 필요에 따라 이어지는 후속 투여로 전형화되어 있다. 후속 투여는 매일 내지 매년 내지 수년마다까지 범위의 가변적인 간격으로 투여될 수 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자라면, 전달 벡터의 면역억제에 의한 형질도입의 억제 또는 차단을 방지하기 위하여 적절한 면역억제 기술이 권장될 수 있다는 것을 알고 있을 것이며, 예를 들어, 문헌 [Vilquin et al., (1995) Human Gene Ther., 6:1391-1401]을 참조한다.

[0125] 생체의 및 생체내 투여 둘 다를 위한 제형은 액체 또는 에멀전화된 액체 중 현탁액 (예를 들어, 유전적으로 변형된 세포, 리포솜 또는 나노입자의 것)을 포함한다. 활성 성분은 종종 제약상 허용되며 활성 성분과 상용성인 부형제와 혼합된다. 적합한 부형제는, 예를 들어, 물, 염수, 텍스트로스, 글리세롤, 에탄올 등 및 이들의 조합을 포함한다. 또한, 조성물은 부차량의 보조 물질, 예컨대, 습윤제 또는 에멀전화제, pH 완충제, 안정화제, 또는 제약 조성물의 효과성을 강화하는 다른 시약을 함유할 수 있다.

[0126] **적용분야**

[0127] 본원에서 개시되는 방법 및 조성물은 질환에서는 결핍되어 있거나 또는 부족하거나, 아니면 질환을 치료하거나 예방하는 산물을 발현하는 트랜스진의 제공에 의해 임의의 질환에 대한 요법을 제공하기 위한 것이다.

[0128] **실시예**

- [0129] **실시예 1: 임상 방법**
- [0130] **정량적 PCR**
- [0131] **qRT-PCR (인간 인자 VIII mRNA 수준용):** 올프렙(A11Prep) DNA/RNA 키트를 사용하여 제조자의 지침에 따라 혈장으로부터 RNA/DNA를 분리한다 (퀴아젠(Qiagen), 캘리포니아주 칼스배드 소재). 다음에, 추출된 RNA를 사용하고, 콰티텍트(Quantitect) cDNA 합성 키트 (퀴아젠, 캘리포니아주 칼스배드 소재)를 사용하여 cDNA를 제조한다. 다음에, 바이오래드(Biorad) CFX 96 상에서 쏘어드밴스드(SsoAdvanced) 범용 프로브 슈퍼믹스 (바이오래드(Biorad), 캘리포니아주 허큘리스 소재)를 사용하고, IDT (아이오와주 코랄빌 소재)의 표지된 프라이머/프로브 검정을 사용하여 정량적 PCR을 수행한다. 인간 인자 VIII mRNA의 특이적 검출에 있어서, 프라이머/프로브 검정은 관습이다: 정방향 프라이머 (GGAGATGAAGAAGGAGGACTTTG) (서열식별번호: 6), 프로브 (ACATCTACGACGAGGACGAGAACCA) (서열식별번호: 7) 및 역방향 프라이머 (TCCACAGCAGCAATGAAGTAG) (서열식별번호: 8). 각 샘플에 대하여 GAPDH에 대한 표준화를 동반하여 정량적 qRT-PCR (절대적인 것은 아님)을 사용하고, 1.0으로 설정된 하나의 샘플에 대비하여 최종 데이터 분석을 기록한다. 주형 대조군 및 리버스 트랜스크립타제 대조군을 모든 샘플과 함께 전개하지는 않으므로, 검출가능 신호를 생성하지 않는다.
- [0132] **qPCR (백터 계승, VG, 분석용):** 올프렙 DNA/RNA 키트를 사용하여 제조자의 지침에 따라 혈장으로부터 RNA/DNA를 분리한다 (퀴아젠, 캘리포니아주 칼스배드 소재). 추출된 DNA를 사용하여 AB 7300 실-시간 PCR 시스템(어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystems), 캘리포니아주 포스터 시티 소재) 상에서 타크만(TaqMan) 속성 범용 PCR 마스터 믹스인 노 앰프에레이즈(No AmpErase) UNG (어플라이드 바이오시스템즈, 캘리포니아주 포스터 시티 소재)를 사용한 정량적 PCR을 수행한다. 인간 인자 VIII의 특이적 검출에 있어서, 프라이머/프로브 검정은 관습이다: 정방향 프라이머 (CCTGGGCCAGTTCCTGCT) (서열식별번호: 9), 프로브 (TTCTGCCACATCAGCACCACCA) (서열식별번호: 10) 및 역방향 프라이머 (GGCTCCATGCCATCATG) (서열식별번호: 11). 주형 대조군을 모든 샘플과 함께 전개하지는 않으므로, 검출가능 신호를 생성하지 않는다. 기지의 양의 정제되고 선형화된 인간 인자 VIII 플라스미드의 7종의 연속 4-배 희석물로부터 qPCR DNA 표준 곡선을 생성한다.
- [0133] **인간 FVIII 총 항원 면역검정.** 상가모 테라퓨틱스, 인크.(Sangamo Therapeutics, Inc.)에서 개발된 hFVIII-BDD 면역검정을 사용하여, 시트레이트화된 인간 혈장에서의 인간 인자 VIII B-도메인 결실 (hFVIII-BDD) 총 항원을 측정한다. 크신타(Xyntha)® (인간 재조합 BDD-FVIII) 참조 물질이 보정제로서 사용될 것이다. 크신타(Xyntha)®는 hFVIII-BDD 항원을 나타내기 위한 QC로도 사용될 것이다. 상기 검정은 단일클론 항체 (mAb)를 포착 항체로, 그리고 바이오티닐화된 mAb를 검출 항체로 사용하는 샌드위치 ELISA로서, 이들 둘 다 FVIII의 A2 도메인을 에피토프로서 갖는다. 포착 mAb (GMA-8023; 그린 마운틴 안티바디스(Green Mountain Antibodies))를 사용한 코팅, 블로킹 및 세척 후, 5인 최소 필요 희석물 (MRD)의 혈장 샘플, 보정 및 품질 제어 샘플을 검정 플레이트에서 인큐베이션한 후, 이어서 세척한다. 바이오티닐화된 mAb (GMA-8024; 그린 마운틴 안티바디스)를 인큐베이션하면서 플레이트에 적용하고, 이어서 세척한 후, 스트렙타비딘-양고추냉이 퍼옥시다제 (SA-HRP) 접합체 시약을 첨가한다. SA-HRP 인큐베이션 및 세척 후, 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘 (TMB)기질 용액을 10분 동안 첨가하고, 이후 산성 중지 용액을 첨가하여 450 nm에서의 검출 전에 반응을 급랭시킨다. 포착된 hFVIII-BDD 항원을 0.020 IU/mL 내지 0.500 IU/mL 범위에 걸친 log-log 선형 피팅을 사용하여 회귀되는 선형 표준 곡선에 대비하여 정량한다. 보정제는 혼합수집된 선천적 FVIII-결핍 혈장 (조지 킹 바이오-메디칼(George King Bio-Medical) 등) 중에서 제조된 10.0 IU/mL의 크신타® 작용 용액을 사용하여 제조될 것이다.
- [0134] 검정 희석제 중에 적용가능한 수준으로 희석된 검정 보정제를 사용하여, 9-포인트 보정 곡선 (0.010 IU/mL 및 0.000 IU/mL에서 앵커 포인트를 갖는 0.500 IU/mL 내지 0.020 IU/mL의 정량 범위)을 준비한다. 보정은 x-축 상의 IU/mL로 측정된 총 hFVIII-BDD 항원 함량 및 y-축 상의 광학 밀도 (OD, 450 nm에서 측정됨)를 사용하는 log-log 선형 피팅을 사용하여, 이중으로 단일 곡선으로서 수행한다. 최종 2개 표준 수준이 허용 기준 없이 0.010 IU/mL 및 0.000 IU/mL에서 준비되는 앵커 포인트가 될 것이다. 샘플 및 QC를 이중으로 검정하고, 보정 곡선에 대비하여 역-계산함으로써, 총 hFVIII-BDD 항원 (IU/mL로 기록되는 농도)을 결정한다.
- [0135] **발색원성 인간 인자 VIII 활성 검정.** 디아파르마(Diapharma)의 크로모제닉 코아마틱(Chromogenic Coamatic) 인간 인자 VIII 검정 (오하이오주 웨스트 체스터 소재)을 사용하여, 인간 인자 VIII 표준 이외에는 제조자의 프로토콜에 따라, 혈장에서의 분비된 인간 인자 VIII의 활성을 결정한다. 상기 ELISA 검정에 사용되는 인간 인자 VIII 표준은 US 바이올로지칼스(US Biologicals) (매사추세츠주 살렘 소재)의 재조합 정제 인간 인자 VIII (#F0016-06)이다.
- [0136] **응고 활성 검정.** 디아그노스티카 스타고(Diagnostica Stago) (매사추세츠주 보스턴 소재)의 활성화된 부분적 트

롬보플라시틴 시간 (aPTT) 검정을 사용하여, 인간 인자 VIII 표준 및 인간 인자 VIII-결핍 혈장 이외에는 제조자의 프로토콜에 따라, 혈장에서의 분비된 인간 인자 VIII의 활성을 결정한다. 인간 인자 VIII 표준은 ELISA 검정에서 사용되는 것과 동일하다 (매사추세츠주 살렘 소재 US 바이올로지칼스의 재조합 정제 인간 인자 VIII인 #F0016-06). 응고 검정에 사용되는 결핍 FVIII 시약은 헤마톨로지 테크놀로지스, 인크.(Haematologic Technologies, Inc.) (버몬트주 에섹스 정선 소재)의 FVIII 활성 <1%인 FVIII-CD (냉동된 결핍 FVIII)이다.

[0137] **실시예 2: SB-525의 제조**

[0138] USP 등급 시약을 사용하여, CaCl₂, MgCl₂, 35 mM NaCl을 함유하는 포스페이트 완충 염수 (PBS) (즉 0.90 mM CaCl₂, 0.49 mM MgCl₂, 2.68 mM KCl, 1.47 mM KH₂PO₄, 172 mM NaCl, 8.10 mM Na₂HPO₄)로 구성되는 최종 산물 제제 기제 완충제인 SBR-0099를 제조하였다. CaCl₂, MgCl₂, 35 mM NaCl, 1% 수크로스, 0.05% 콜리포르 (Kolliphor) (폴록사머) P 188을 함유하는 PBS로 구성되는 최종 제제 완충제 중 1.0x10¹³ vg/mL의 목표 농도로 SB-525 벌크를 조정하였다.

[0139] SB-525 백터는 AAV6 캡시드를 포함하며 5' 및 3'에 각각 AAV2 ITR 서열식별번호: 12 및 13에 의해 플랭킹되는 서열식별번호: 5를 포함하는 AAV 백터이다.

[0140] 용량 수준 (vg/kg) 급하기 대상체 체중 (kg) 및 이후의 바이러스 계승 수준 (vg/mL)으로 나누기에 의해 산물 성분 부피를 계산하는 것에 의해, SB-525 산물을 준비하였다. 표준 염수 (NS)의 부피는 SB-525 산물이 1:1 비가 되도록 계산하였다. 총 부피는 NS의 부피 플러스 SB-525 산물의 부피를 서로 더하는 것에 의해 계산하였다. 대상체에서의 SB-525 산물의 예시적인 용량은 하기 표 I에 제시되어 있다:

[0141] **표 I: 예시적인 SB-525 용량**

용량 수준	총 SB-525 AAV 용량 (vg/kg)
1	6.00 x 10 ¹¹
2	9.00 x 10 ¹¹
3	1.20 x 10 ¹²
4	2.00 x 10 ¹²
5	4.00 x 10 ¹²
6	6.00 x 10 ¹²
7	1.00 x 10 ¹³

[0142]

[0143] **실시예 3: 주입 프로토콜**

[0144] 총 부피는 대상체의 용량 수준 할당 및 체중에 따라 4 mL 내지 200 mL일 것으로 예상되었다. 총 부피가 50 mL 미만이었다면 경우에는, 주사기를 통하여 주입 산물을 투여한 반면, 부피가 50 mL를 초과하였던 경우, 주입 백을 통하여 주입 산물을 투여하였다. 양쪽 주입 속도는 일정 속도 주입 펌프를 사용하여 100 mL/시간이었다.

[0145] **실시예 4: 연구 목적 및 임상 종료점**

[0146] 포함 및 배제 기준: 연구에 있어서, 포함 기준에는 대상체가 적어도 150 노출일 동안 FVIII 농축물 또는 냉동침전물에 치료되거나 노출된 적이 있는 남성이면서 ≥18세 연령일 것이 포함되었다. 또한, 대상체는 선행 12개월 동안 ≥ 12회의 출혈 에피소드를 보였을 필요가 있었다. 배제 기준에는 대상체가 AAV6 캡시드에 대한 중화 항체, FVIII 억제인자 또는 그의 이력, FVIII에 대한 과민성, A형 혈우병에 대한 소정 출혈 장애의 증거, 간 염종의 마커, 그리고 전신성 (IV 또는 경구) 면역조정제의 사용이 있는 것이 포함되었다.

[0147] 연구 목적: 본 연구의 일차적인 목적은 안전성을 평가하는 것이었다. 이와 같은 일차적인 목적은 SB-525의 안전성 및 내약성을 조사하고, SB-525를 사용한 투약 후의 FVIII 활성의 시간-경과 프로파일을 평가하는 것이었다. 이차적인 종료점에는 FVIII 대체 요법 ("인자")의 기준선 사용 및 출혈 에피소드 빈도 및 중증도의 변화 관찰, 투약 후 A형 혈우병에 대한 임상적 영향의 평가, 및 또한 FVIII에 대한 면역 반응, 및 AAV2/6 백터의 백터 배출을 평가하는 것이 포함되었다. 예비적인 목적에는 ELISA 및 FVIII 활성 검정에 의한 FVIII 수준

사이의 일치를 평가하는 것, 및 SB-525에 대한 임의의 면역 반응을 평가하는 것이 포함되었다.

- [0148] 이와 같은 연구에는 대략 20명의 대상체가 등록될 수 있다. 용량 선택, 및 각 용량 수준에서 연구되는 대상체의 수는 이전에 투약된 대상체에서 관찰된 안전성 및 누적 약동학 반응 (순환 FVIII 수준의 동역학)을 기준으로 하게 된다.
- [0149] 안전하고 내약성인 치료 범위를 확인하기 위해서는, 대략 7종의 용량 수준을 연구할 필요가 있을 수 있다. 잠재적인 용량 수준은 6×10^{11} , 9×10^{11} , 1.2×10^{12} , 2×10^{12} , 4×10^{12} , 6×10^{12} 및 1×10^{13} vg/kg이다. 개시 용량 수준 (9×10^{11} vg/kg)은 NHP 연구에서의 정상의 12%인 FVIII 활성과 연관되어 있다.
- [0150] **실시예 5: 예비 결과**
- [0151] 예비로 5명의 환자를 치료하였다. SB-525는 일반적으로 치료-관련 중증 유해 사례가 없고 점감 스테로이드 사용이 없어서 내약성이 우수한 것으로 발견되었다. 제3 코호트 (용량 수준 3)에서 치료된 1명의 환자는 자발적 출혈 및 인자 사용의 상당한 감소 또는 제거가 예측될 수 있는 치료적으로 유의한 수준의 인자 VIII 발현을 달성하였다. 제2 코호트 (용량 수준 2)에서는, 치료 후 감소된 인자 사용이 관찰되었다.
- [0152] **실시예 6: • SB-525 유전자 요법을 사용하여 치료된 8명의 환자가 FVIII 활성의 용량-의존성 증가를 나타내었으며, 3×10^{13} vg/kg 용량을 사용하여 치료된 2명의 환자가 정상적인 FVIII 수준에 도달하였음**
- [0153] 상 1/2 알타(Alta) 연구는 중증의 A형 혈우병을 갖는 20명 이하의 성인 환자에서의 SB-525의 안전성 및 내약성을 평가하도록 설계된 오픈-라벨형의 용량-가변식 임상 시험이다. 데이터는 SB-525가 일반적으로 내약성이 우수하였다는 것을 표시하였으며, 4개 투약량 코호트에 걸친 인자 VIII (FVIII) 수준의 용량-의존성 증가를 입증하였다.
- [0154] SB-525 유전자 요법으로 치료된 A형 혈우병을 갖는 첫 번째 8명의 환자로부터의 데이터는 고무적이며, 용량-의존성 관계, 지속적 인자 수준의 증거, 그리고 각 환자 내 및 각 코호트 내 둘 다에서의 낮은 가변성을 입증한다.
- [0155] 상 1/2 데이터는 4종의 상승 투약량 코호트 (코호트당 2명의 환자로 9×10^{11} vg/kg, 2×10^{12} vg/kg, 1×10^{13} vg/kg 및 3×10^{13} vg/kg)에 걸쳐 치료된 8명의 환자를 포괄한다. 환자는 더 높은 투약량 코호트에서의 FVIII 활성의 임상적으로 유의한 증가, 및 3×10^{13} vg/kg 투약량 코호트에서의 정상적인 FVIII 수준 (정상 범위: 50-150%)를 달성하는 FVIII 수준의 용량-의존성 증가를 나타내었다. 인자 VIII 대체 요법 사용의 용량-의존성 감소가 또한 관찰되었으며, 더 높은 용량 코호트에서 상당한 감소가 관찰되었다. SB-525는 일반적으로 내약성이 우수하였으며, 1명의 환자 (3×10^{13} vg/kg의 용량으로 치료됨)는 저혈압 및 열이라는 치료-관련 중증 유해 사례를 보고하였으며, 백터 주입 후 발생하여, 백터 주입 완료 24시간 이내에 치료로 해결되었다.
- [0156] 연구중인 환자는 예방적 스테로이드로 치료하지 않았다. 처음 3개 코호트에서는, 치료-관련 중증 유해 사례 및 7일을 초과하는 코르티코스테로이드 치료를 필요로 하는 ALT 상승이 관찰되지 않았다. 4번째 코호트의 환자 1명은 4주차에 점감 추이의 경구 스테로이드를 필요로 하는 ALT 상승 ($>1.5 \times \text{ULN}$)을 겪었다. 상기 환자는 스테로이드 요법 개시 후 7주차에는 어떠한 인자 VIII 활성의 연관 손실 또는 ALT 상승도 나타내지 않았다. 상기 환자는 치료-관련 주입 반응을 겪었으나, 프로토콜-명기 일정에 따라 다음날 방출되었다.
- [0157] 하기 표 II는 투약량 9×10^{11} , 2×10^{12} , 1×10^{13} 및 3×10^{13} vg/Kg인 AAV 백터의 투여의 결과를 예시하는 데이터를 제공한다. 도 1-3은 투여-후 획득된 FVIII 활성 데이터를 제공한다.
- [0158] 표 II. AAV 투약량의 투여 결과. "추적"은 FVIII 활성 수준 (칼럼 2) 및 FVIII 치료의 빈도 (칼럼 5)가 측정된 투여 후 시간 기간을 지칭함.

SB-525의 용량 (vg/kg)	FVIII 활성 수준 (1-스테이지 응고 검정)	추적	SB-525 주사 전 FVIII 치료의 횟수	SB-525 주사 후 FVIII 치료의 횟수
9 x 10 ¹¹	<1%<	52주	2-3/주	예방적, 12주차
9 x 10 ¹¹	<1%<	52주	2/주	예방적, 13주차
2 x 10 ¹²	<1%<	52주	2-3/개월	12개월에 9회
2 x 10 ¹²	2-3%	48주	3/주	12개월에 7회
1 x 10 ¹³	13-20%	40주	3/주	36주에 7회
1 x 10 ¹³	5-10%	28주	1/3주	16주에 0회
3 x 10 ¹³	115-172%	12주	2/주	12주에 0회
3 x 10 ¹³	23-41%	6주	3-4/주	처음 3주에 예방적

[0159]

[0160] 실시예 7: • SB-525 유전자 요법을 사용하여 치료된 10명의 환자가 FVIII 활성의 용량-의존성 증가를 나타내었으며, 3x10¹³ vg/kg 용량을 사용하여 치료된 4명의 환자가 정상적인 FVIII 수준도에 도달하였음

[0161] 실시예 6에서 기재된 8명의 환자를 추가 시간 동안 추적하였으며, 3x10¹³ vg/kg 용량에서 추가 2명의 환자 (환자 9 및 10)를 시험에 추가하였다. 도 4 및 5는 벡터를 사용한 치료 후 시간 경과에 따른 전체 10명의 환자에서의 FVIII 활성을 도시한다.

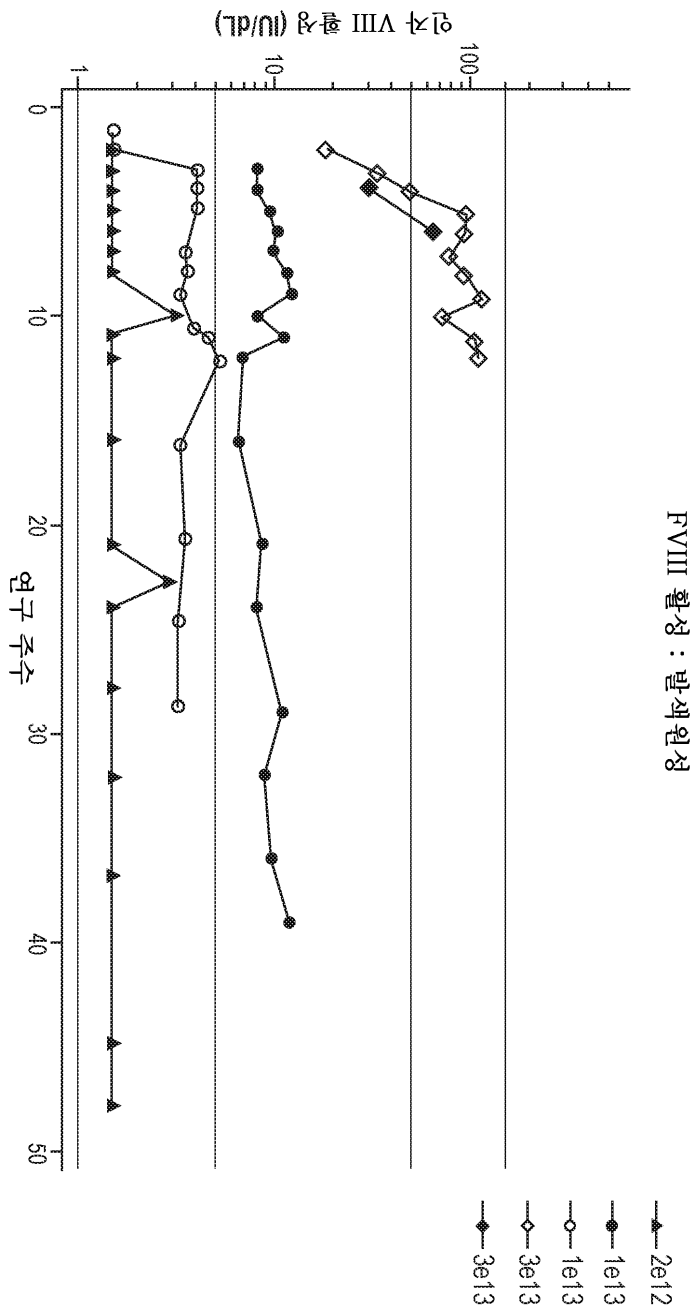
[0162] 용량이 점증하면서, 자발적 출혈 에피소드는 사라지고, 고도 용량 환자 중 누구에서도 출혈 에피소드는 보고되지 않았다. 도 6을 참조한다. 대략 3주의 벡터 주입-후 기간 후에, FVIII 사용은 코호트 3 (1x10¹³ vg/kg)의 환자 1명 및 고도 용량 코호트 (3x10¹³ vg/kg)의 전체 환자에서 0으로 떨어졌다. 환자 9는 3주 2일차에 최종 주입을 받았으나, 이후에는 주입을 받지 않았다. 도 7 (별표는 3주 초과 2일차에 주입이 이루어졌음을 나타냄)을 참조한다.

[0163] 도 8-10은 임상 시험에서의 유해 사례 탐색을 요약하고 있다.

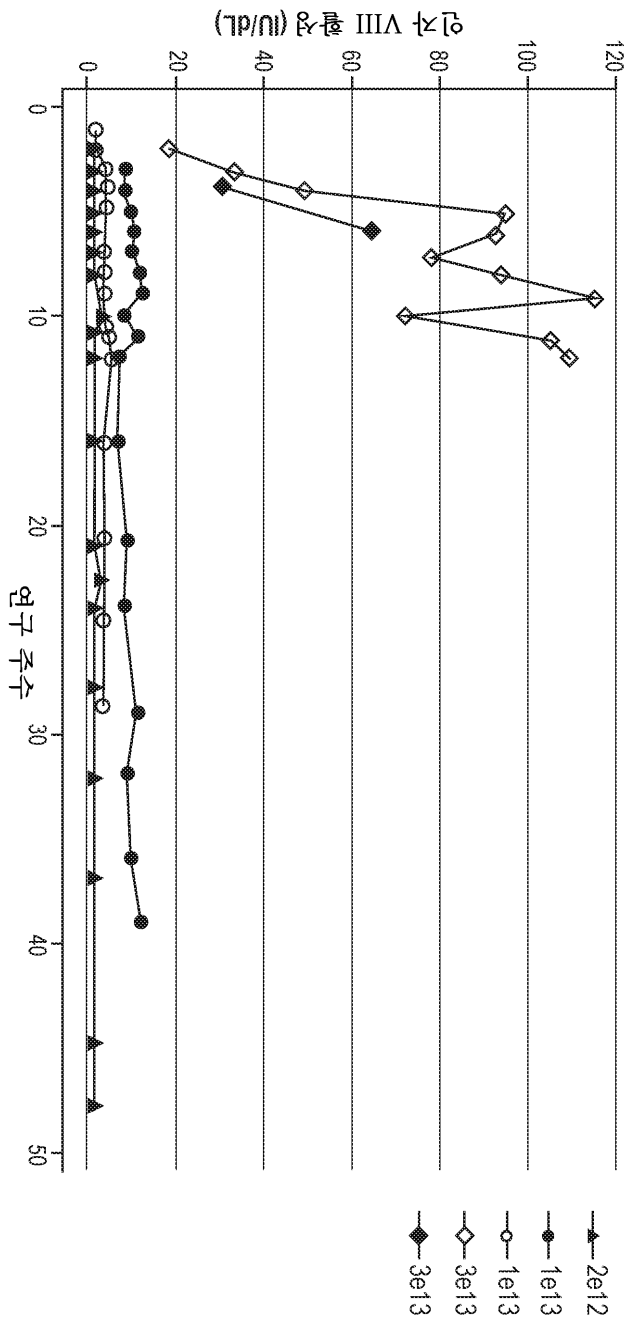
[0164] 본원에서 언급된 모든 특허, 특허 출원 및 공개는 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0165] 이해의 명료성을 목적으로, 예시 및 실시예에 의해 다소 상세하게 본 개시내용이 제공되기는 하였지만, 관련 기술분야의 통상의 기술자에게는, 본 개시내용의 취지 또는 범주에서 벗어나지 않으면서 다양한 변화 및 변형이 실시될 수 있다는 것이 자명할 것이다. 따라서, 상기한 상세한 설명 및 실시예가 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다.

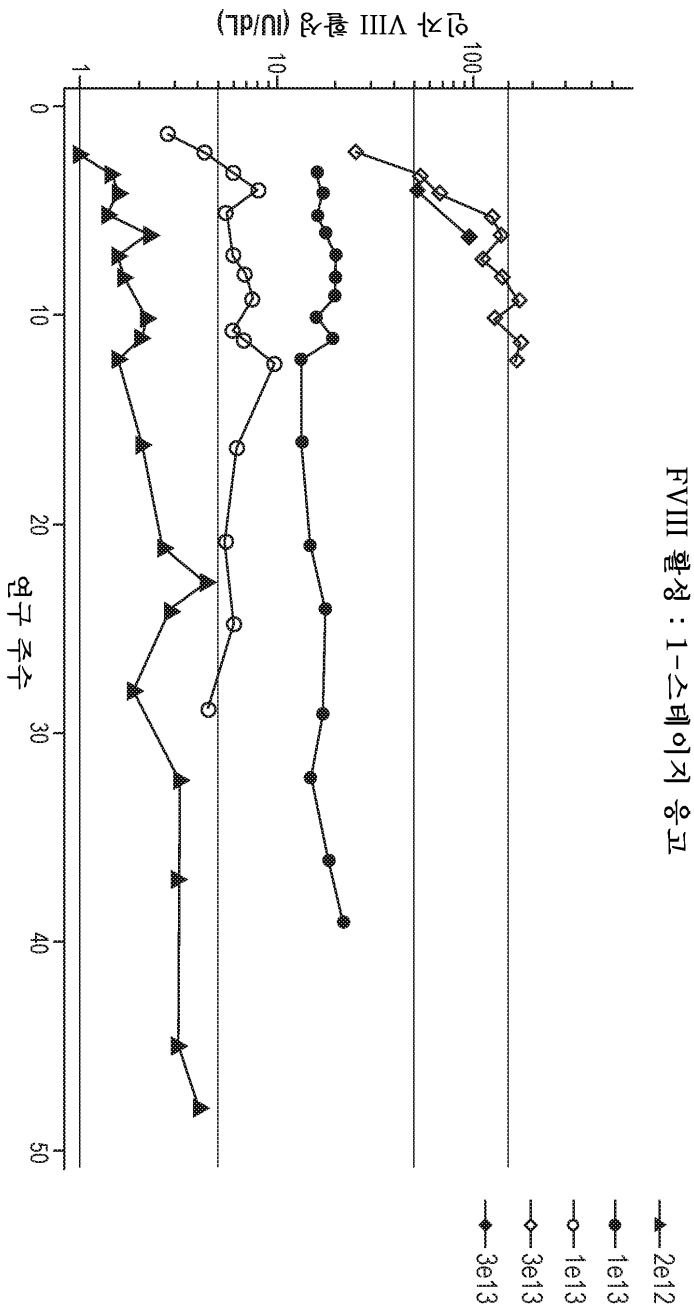
도면
도면1



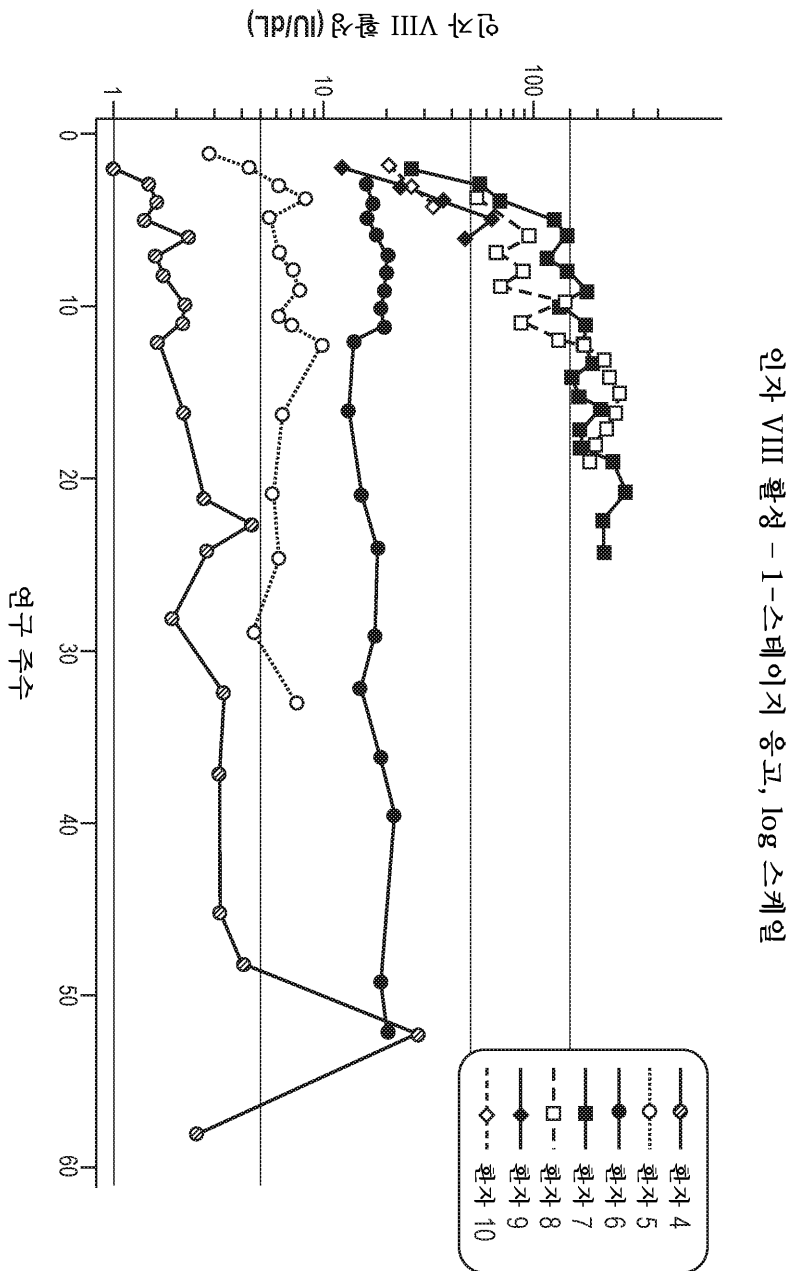
도면2



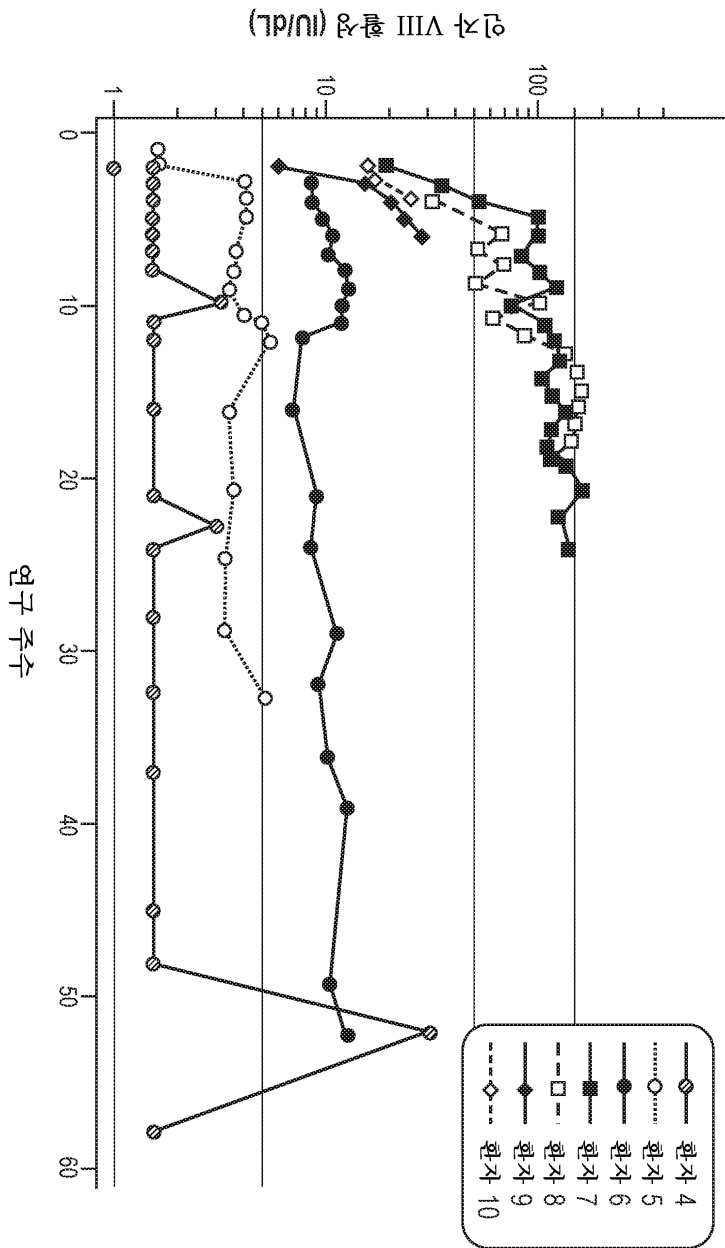
도면3



도면4



도면5



인자 VIII 활성 - 발색원성, log 스케일

자발적 출혈 에피소드

용량 코호트 (용량 vg/kg)	대상체	추적 (주수)	치료 후 ≥3주에서의 출혈 에피소드
1 (9e11)	1	93	7
1 (9e11)	2	83	5
2 (2e12)	3	73	8
2 (2e12)	4	66	5
3 (1e13)	5	50	5
3 (1e13)	6	40	0
4 (3e13)	7	14	0
4 (3e13)	8	18	0
4 (3e13)	9	5	0
4 (3e13)	10	5	-

도면6

인자 VIII 대체 사용 감소

용량 코호트 (용량 vg/kg)	대상체	추적 (주수)	투약 전 인자 VIII 주입	치료 후 ≥3주에 서의 인자 VIII 주입의 횟수
1 (9e11)	1	93	주당 2회	115
1 (9e11)	2	83	주당 2회	26
2 (2e12)	3	73	주당 2회	13
2 (2e12)	4	66	주당 3회	9
3 (1e13)	5	50	2일마다	11
3 (1e13)	6	40	2일마다	0
4 (3e13)	7	14	4일마다	0
4 (3e13)	8	18	2일마다	0
4 (3e13)	9	5	3일마다	1*
4 (3e13)	10	5	3일마다	-

도면7

중증 유해 사례 (SAE) 요약

- 2명의 대상체가 중증 유해 사례 (SAE)를 보고함; 1명의 대상체에서 치료-관련으로 평가됨
- 1명의 대상체에서 저혈압 (등급 3) 및 열 (등급 2)의 SAE, 두통 및 빈맥 증상 동반, SB-52 주입 종료 6시간 후에 발생하여 24시간 이내에 치료에 의해 해결됨
 - 시간적 연관성을 기반으로 하면, 이는 연구 치료와 관련된다는 것으로 평가됨; 대상체의 수분공급 상태가 가능한 기여 인자로 간주됨.
 - 대응하여, 수분공급 수준 유지 및 사례 관리 권장사항에 대한 지침을 현장에 전달하였음
 - 이후 3명의 투약 대상체에서 유사한 고등급 사례는 관찰되지 않았음
- 연구 약물 주입 대략 1년 후 입원을 필요로 하는 연조직염 (등급 3)의 SEA가 발생함
- 대상체의 모스낭 재발 이력을 기반으로 하면, 이는 연구 치료와는 관련되지 않는 것으로 평가됨.

8면

치료-관련 유해 사례 (AE) 요약

MedDRA 선호 용어	코호트 1		코호트 2		코호트 3		코호트 4		전체 (N=10) n(%) [T]
	9e11 vg/kg (N=2) n(%) [T]	2e12 vg/kg (N=2) n(%) [T]	1e13 vg/kg (N=2) n(%) [T]	3e13 vg/kg (N=4) n(%) [T]					
임의의 치료-관련 사례	0 (0.0) [0]	2 (100) [4]	0 (0.0) [0]	3 (75.0) [8]	5 (50.0) [12]				
알라닌 아미노트랜스퍼라제 증가	0 (0.0) [0]	2 (100) [5]	0 (0.0) [0]	1 (25.0) [1]	3 (75.0) [4]				
발열	0 (0.0) [0]	0 (0.0) [0]	0 (0.0) [0]	3 (75.0) [3]*	3 (75.0) [3]				
아스파르테이트 아미노트랜스퍼라제 증가	0 (0.0) [0]	1 (50.0) [1]	0 (0.0) [0]	0 (0.0) [0]	1 (10.0) [1]				
피로	0 (0.0) [0]	0 (0.0) [0]	0 (0.0) [0]	1 (25.0) [1]	1 (10.0) [1]				
저혈압	0 (0.0) [0]	0 (0.0) [0]	0 (0.0) [0]	1 (25.0) [1]**	1 (10.0) [1]				
근육통	0 (0.0) [0]	0 (0.0) [0]	0 (0.0) [0]	1 (25.0) [1]	1 (10.0) [1]				
빈맥	0 (0.0) [0]	0 (0.0) [0]	0 (0.0) [0]	1 (25.0) [1]	1 (10.0) [1]				

N= 각 치료 군 내 대상체의 총 수, n= 각 SOC 내 대상체 수, [T]= 유해 사례의 총 수.
*보고된 등급 2 사례, **보고된 등급 3 사례

결과 요약

- 중증의 A형 혈우병이 있는 10명의 대상체에 9e11 vg/kg 내지 3e13 vg/kg 범위의 용량으로 SB-525를 투여하였으며, 일반적으로 내약성이 우수하였음
- 1명의 대상체가 두통 및 빈맥 증상을 동반하여 지혈암 및 열의 치료-관련 중증 유해 사례를 보고하였으며, 이는 백터 주입 후 발생하여 24시간 이내에 치료에 의해 해결됨
- 처음 3개 코호트에서 7일을 초과하는 트랜스아미니타스는 관찰되지 않았음
- 인자 VIII 활성의 증가가 1e13 및 3e13 vg/kg 용량 들 다에서 대상체에서 관찰되었음
- 프로토콜에 따라 환자를 계속적으로 예방적 관리함
 - 예방적 관리 중단 시, 추가적인 인자 VIII 대체 사용이 필요하지 않았음
- SB-525의 투여 후, 코호트 3 내 환자 1명 및 고용량 코호트 내 모든 환자가 백터 주입 후 출혈 에피소드가 없었음

도면10

서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> SANGAMO THERAPEUTICS, INC.

<120> IMPROVED CLINICAL PARAMETERS BY EXPRESSION OF FACTOR VIII

<130> 1147465

<140><141><150> 62/869,445

<151> 2019-07-01

<150> 62/826,887

<151> 2019-03-29

<150> 62/714,553

<151> 2018-08-03

<160> 14

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1457

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Gln Ile Glu Leu Ser Thr Cys Phe Phe Leu Cys Leu Leu Arg Phe

1 5 10 15

Cys Phe Ser Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser

20 25 30

Trp Asp Tyr Met Gln Ser Asp Leu Gly Glu Leu Pro Val Asp Ala Arg

35 40 45

Phe Pro Pro Arg Val Pro Lys Ser Phe Pro Phe Asn Thr Ser Val Val

50 55 60

Tyr Lys Lys Thr Leu Phe Val Glu Phe Thr Asp His Leu Phe Asn Ile

65 70 75 80

Ala Lys Pro Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile Gln

85 90 95

Ala Glu Val Tyr Asp Thr Val Val Ile Thr Leu Lys Asn Met Ala Ser

100 105 110

His Pro Val Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser Tyr Trp Lys Ala Ser

115 120 125

Glu Gly Ala Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu Asp

130 135 140

Asp Lys Val Phe Pro Gly Gly Ser His Thr Tyr Val Trp Gln Val Leu

145 150 155 160

Lys Glu Asn Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Cys Leu Thr Tyr Ser

165 170 175

Tyr Leu Ser His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn Ser Gly Leu Ile

Asn Gly Pro Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met
 435 440 445
 Ala Tyr Thr Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu
 450 455 460
 Ser Gly Ile Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu

 465 470 475 480
 Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro
 485 490 495
 His Gly Ile Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys
 500 505 510
 Gly Val Lys His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe
 515 520 525
 Lys Tyr Lys Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp

 530 535 540
 Pro Arg Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg
 545 550 555 560
 Asp Leu Ala Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu
 565 570 575
 Ser Val Asp Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val
 580 585 590
 Ile Leu Phe Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu

 595 600 605
 Asn Ile Gln Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp
 610 615 620
 Pro Glu Phe Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val
 625 630 635 640
 Phe Asp Ser Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp
 645 650 655
 Tyr Ile Leu Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe

 660 665 670
 Ser Gly Tyr Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr

Lys Asn Phe Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr Tyr Phe Trp Lys Val
 930 935 940
 Gln His His Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu Phe Asp Cys Lys Ala Trp
 945 950 955 960
 Ala Tyr Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu Lys Asp Val His Ser Gly Leu
 965 970 975
 Ile Gly Pro Leu Leu Val Cys His Thr Asn Thr Leu Asn Pro Ala His
 980 985 990
 Gly Arg Gln Val Thr Val Gln Glu Phe Ala Leu Phe Phe Thr Ile Phe
 995 1000 1005
 Asp Glu Thr Lys Ser Trp Tyr Phe Thr Glu Asn Met Glu Arg Asn
 1010 1015 1020
 Cys Arg Ala Pro Cys Asn Ile Gln Met Glu Asp Pro Thr Phe Lys
 1025 1030 1035
 Glu Asn Tyr Arg Phe His Ala Ile Asn Gly Tyr Ile Met Asp Thr
 1040 1045 1050
 Leu Pro Gly Leu Val Met Ala Gln Asp Gln Arg Ile Arg Trp Tyr
 1055 1060 1065
 Leu Leu Ser Met Gly Ser Asn Glu Asn Ile His Ser Ile His Phe
 1070 1075 1080
 Ser Gly His Val Phe Thr Val Arg Lys Lys Glu Glu Tyr Lys Met
 1085 1090 1095
 Ala Leu Tyr Asn Leu Tyr Pro Gly Val Phe Glu Thr Val Glu Met
 1100 1105 1110
 Leu Pro Ser Lys Ala Gly Ile Trp Arg Val Glu Cys Leu Ile Gly
 1115 1120 1125
 Glu His Leu His Ala Gly Met Ser Thr Leu Phe Leu Val Tyr Ser
 1130 1135 1140
 Asn Lys Cys Gln Thr Pro Leu Gly Met Ala Ser Gly His Ile Arg
 1145 1150 1155
 Asp Phe Gln Ile Thr Ala Ser Gly Gln Tyr Gly Gln Trp Ala Pro

1160	1165	1170
Lys Leu Ala Arg Leu His Tyr Ser Gly Ser Ile Asn Ala Trp Ser		
1175	1180	1185
Thr Lys Glu Pro Phe Ser Trp Ile Lys Val Asp Leu Leu Ala Pro		
1190	1195	1200
Met Ile Ile His Gly Ile Lys Thr Gln Gly Ala Arg Gln Lys Phe		
1205	1210	1215
Ser Ser Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp		
1220	1225	1230
Gly Lys Lys Trp Gln Thr Tyr Arg Gly Asn Ser Thr Gly Thr Leu		
1235	1240	1245
Met Val Phe Phe Gly Asn Val Asp Ser Ser Gly Ile Lys His Asn		
1250	1255	1260
Ile Phe Asn Pro Pro Ile Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro		
1265	1270	1275
Thr His Tyr Ser Ile Arg Ser Thr Leu Arg Met Glu Leu Met Gly		
1280	1285	1290
Cys Asp Leu Asn Ser Cys Ser Met Pro Leu Gly Met Glu Ser Lys		
1295	1300	1305
Ala Ile Ser Asp Ala Gln Ile Thr Ala Ser Ser Tyr Phe Thr Asn		
1310	1315	1320
Met Phe Ala Thr Trp Ser Pro Ser Lys Ala Arg Leu His Leu Gln		
1325	1330	1335
Gly Arg Ser Asn Ala Trp Arg Pro Gln Val Asn Asn Pro Lys Glu		
1340	1345	1350
Trp Leu Gln Val Asp Phe Gln Lys Thr Met Lys Val Thr Gly Val		
1355	1360	1365
Thr Thr Gln Gly Val Lys Ser Leu Leu Thr Ser Met Tyr Val Lys		
1370	1375	1380
Glu Phe Leu Ile Ser Ser Ser Gln Asp Gly His Gln Trp Thr Leu		
1385	1390	1395

Phe Phe Gln Asn Gly Lys Val Lys Val Phe Gln Gly Asn Gln Asp

1400 1405 1410

Ser Phe Thr Pro Val Val Asn Ser Leu Asp Pro Pro Leu Leu Thr

1415 1420 1425

Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp Val His Gln Ile Ala

1430 1435 1440

Leu Arg Met Glu Val Leu Gly Cys Glu Ala Gln Asp Leu Tyr

1445 1450 1455

<210> 2

<211> 84

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown:

SERPIN1 enhancer sequence

<400> 2

gggggaggct gctggtgaat attaaccaag atcacccag ttaccggagg agcaaacagg 60

gactaagttc acacgcgtgg tacc 84

<210> 3

<211> 223

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown:

TTRm promoter sequence

<400> 3

gtctgtctgc acatttcgta gagcgagtgt tccgatactc taatctccct aggcaagtt 60

catatttgtg taggttactt attctccttt tgttgactaa gtcaataatc agaatcagca 120

ggtttggagt cagcttgca gggatcagca gcctgggttg gaaggagggg gtataaaagc 180

cccttcacca ggagaagccg tcacacagat ccacaagctc ctg 223

<210> 4

<211> 4374

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown:

Coding sequence for FVIII

<400> 4

```

atgcagatcg agctctccac ctgcttcttt ctgtgcctgt tgagattctg cttcagcgcc      60
accaggagat actacctggg ggctgtggag ctgagctggg actacatgca gtctgacctg      120
ggggagctgc ctgtggatgc caggttcccc cccagagtgc ccaagagctt ccccttcaac      180
acctctgtgg tgiacaagaa gacctgttt gtggagtca ctgaccacct gttcaacatt      240

gccaagccca ggccccctg gatggcctg ctgggccccca ccatccaggc tgaggtgtat      300
gacactgtgg tgatcacct gaagaacatg gccagccacc ctgtgagcct gcatgctgtg      360
ggggtgagct actggaaggc ctctgagggg gctgagtatg atgaccagac cagccagagg      420
gagaaggagg atgacaaggt gttccctggg ggcagccaca cctatgtgtg gcaggtgctg      480
aaggagaatg gccccatggc ctctgacccc ctgtgcctga cctacagcta cctgagccat      540
gtggacctgg tgaaggacct gaactctggc ctgattgggg ccctgctggt gtcagggag      600
ggcagcctgg ccaaggagaa gaccagacc ctgcacaagt tcatcctgct gtttctgtg      660

tttgatgagg gcaagagctg gcactctgaa accaagaaca gcctgatgca ggacagggat      720
gtgcctctg ccagggcctg gccaagatg cacactgtga atggctatgt gaacaggagc      780
ctgcctggcc tgattggctg ccacaggaag tctgtgtact ggcatgtgat tggcatgggc      840
accaccctg aggtgcacag catcttctg gagggccaca ccttctggt caggaaccac      900
aggcaggcca gcctggagat cagccccatc accttctga ctgccagac cctgctgatg      960
gacctgggcc agttctgct gttctgccac atcagcagcc accagcatga tggcatggag      1020
gcctatgtga aggtggacag ctgccctgag gagccccagc tgaggatgaa gaacaatgag      1080

gaggctgagg actatgatga tgacctgact gactctgaga tggatgtggt gaggtttgat      1140
gatgacaaca gccccagctt catccagatc aggtctgtgg ccaagaagca cccaagacc      1200
tgggtgcact acattgctgc tgaggaggag gactgggact atgccccct ggtgctggcc      1260
cctgatgaca ggagctacaa gagccagtac ctgaacaatg gccccagag gattggcagg      1320
aagtacaaga aggtcaggtt catggcctac actgatgaaa cttcaagac cagggaggcc      1380
atccagcatg agtctggcat cctgggcccc ctgctgtatg gggaggtggg ggacaccctg      1440
ctgatcatct tcaagaacca ggccagcagg ccctacaaca tctaccecca tggcatcact      1500

gatgtgagge cctgtacag caggaggctg cccaaggggg tgaagcacct gaaggacttc      1560
cccatcctgc ctggggagat cttcaagtac aagtggactg tgactgtgga ggatggcccc      1620
accaagtctg accccaggtg cctgaccaga tactacagca gctttgtgaa catggagagg      1680

```

gacctggcct ctggcctgat tggccccctg ctgatctgct acaaggagtc tgtggaccag 1740
aggggcaacc agatcatgtc tgacaagagg aatgtgatcc tgttctctgt gtttgatgag 1800
aacaggagct ggtacctgac tgagaacatc cagaggttcc tgccaacccc tgctgggggtg 1860
cagctggagg acctgagtt ccaggccagc aacatcatgc acagcatcaa tggctatgtg 1920

tttgacagcc tgcagctgtc tgttgccctg catgaggtgg cctactggta catcctgagc 1980
attggggccc agactgactt cctgtctgtg ttcttctctg gctacacctt caagcacaag 2040
atggtgtatg aggacacct gaccctgttc cccttctctg gggagactgt gttcatgagc 2100
atggagaacc ctggcctgtg gattctgggc tgccacaact ctgacttcag gaacaggggc 2160
atgactgccc tgctgaaagt ctccagctgt gacaagaaca ctggggacta ctatgaggac 2220
agctatgagg acatctctgc ctacctgtg agcaagaaca atgccattga gcccaggagc 2280
ttcagccaga atccaccgt ccttaagcgc catcagcgcg agatcaccag gaccacctg 2340

cagtctgacc aggaggagat tgactatgat gacacatct ctgtggagat gaagaaggag 2400
gactttgaca tctacgacga ggacgagaac cagagcccca ggagcttcca gaagaagacc 2460
aggcactact teattgtgc tgtggagagg ctgtgggact atggcatgag cagcagcccc 2520
catgtgctga ggaacagggc ccagctggc tctgtgcccc agttcaagaa ggtgggttcc 2580
caggagttea ctgatggcag cttcaccag ccctgtaca gaggggagct gaatgagcac 2640
ctgggctgc tgggccccta catcagggtc gaggtggagg acaacatcat ggtgaccttc 2700
aggaaccagg ccagcaggcc ctacagcttc tacagcagcc tgatcagcta tgaggaggac 2760

cagaggcagg ggctgagcc caggaagaac ttgtgaagc ccaatgaaac caagacctac 2820
ttctggaagg tgcagacca catggcccc accaaggatg agtttgactg caaggcctgg 2880
gcctacttct ctgatgtgga cctggagaag gatgtgact ctggcctgat tggccccctg 2940
ctggtgtgcc acaccaaac cctgaacct gcccatggca ggcaggtgac tgtgcaggag 3000
tttgccctgt tcttaccat ctttgatgaa accaagagct ggtacttcac tgagaacatg 3060
gagaggaact gcagggcccc ctgcaacatc cagatggagg accccacctt caaggagaac 3120
tacaggttcc atgccatcaa tggctacatc atggacacce tgccctggcct ggtgatgccc 3180

caggaccaga ggatcaggtg gtacctgtg agcatgggca gcaatgagaa catccacagc 3240
atccacttct ctggccatgt gttcactgtg aggaagaagg aggagtacaa gatggccctg 3300
tacaacctgt acctgggggt gtttgagact gtggagatgc tgcccagcaa ggctggcatc 3360
tggaggtgg agtgccctgat tggggagcac ctgcatgctg gcatgagcac cctgttctctg 3420
gtgtacagca acaagtgcc gacccccctg ggcatggcct ctggccacat cagggacttc 3480
cagatcactg cctctggcca gtatggccag tgggccccca agctggccag gctgcactac 3540

tctggcagca tcaatgcctg gagcaccaag gagcccttca gctggatcaa ggtggacctg 3600

ctggccccc tgatcatcca tggcatcaag acccaggggg ccaggcagaa gttcagcagc 3660

ctgtacatca gccagttcat catcatgtac agcctggatg gcaagaagtg gcagacctac 3720

aggggcaaca gcaactggcac cctgatggtg ttctttggca atgtggacag ctctggcatc 3780

aagcacaaca tcttcaacce ccccatcatt gccagatata tcaggctgca ccccaccac 3840

tacagcatca ggagcacctt gaggatggag ctgatgggct gtgacctgaa cagctgcagc 3900

atgcccttgg gcatggagag caaggccatc tctgatgccc agatcactgc cagcagctac 3960

ttaccaaca tgtttgccac ctggagcccc agcaaggcca ggctgcatct gcagggcagg 4020

agcaatgcct ggaggcccca ggtcaacaac cccaaggagt ggctgcaggt ggacttccag 4080

aagaccatga aggtgactgg ggtgaccacc caggggtga agagcctgct gaccagcatg 4140

tatgtgaagg agttcctgat cagcagcagc caggatggcc accagtggac cctgttcttc 4200

cagaatggca aggtgaaggt gttccagggc aaccaggaca gcttcacccc tgtggtgaac 4260

agcctggacc cccccctgct gaccagatac ctgaggattc acccccagag ctgggtgcac 4320

cagattgccc tgaggatgga ggtgctgggc tgtgaggccc aggacctgta ctga 4374

<210> 5

<211> 4894

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown:

Expression cassette sequence

<400> 5

gcggcctaag cttagaacca ttgccacctt cagggggagg ctgctggtga atattaacca 60

agatcacccc agttaccgga ggagcaaaca gggactaagt tcacacgct ggtacctct 120

gtctgcatat tctgtagagc gagtgttccg atactctaat ctccttaggc aaggttcata 180

tttgttagg ttacttatc tcctttgtt gactaagtca ataacagaa tcagcaggtt 240

tggagtgcagc ttggcagga tcagcagcct gggttggaag gaggggtat aaaagcccct 300

tcaccaggag aagccgtcac acagatccac aagctcctga agagtaagg gtttaagtta 360

tcgttagttc gtcaccatt aatgtttaat tacctggagc acctgcctga aatcattttt 420

ttttcaggtt ggctagtatg cagatcgagc tctccacctg cttctttctg tgctgttga 480

gattctgctt cagcgcacc aggagatact acctgggggc tgtggagctg agctgggact 540

acatgcagtc tgacctgggg gagctgcctg tggatgccag gttcccccc agagtgccca 600

agagcttccc cttaacacc tctgtggtgt acaagaagac cctgtttgtg gaggttcactg 660
 accacctgtt caacattgcc aagcccaggc ccccctggat gggcctgctg gcccaccaca 720
 tccaggctga ggtgtatgac actgtggtga tcaccctgaa gaacatggcc agccaccctg 780

 tgagcctgca tgctgtgggg gtgagctact ggaaggcctc tgagggggct gagtatgatg 840
 accagaccag ccagagggag aaggaggatg acaaggtgtt ccctgggggc agccacacct 900
 atgtgtggca ggtgctgaag gagaatggcc ccatggcctc tgacccccctg tgcctgacct 960
 acagctacct gagccatgtg gacctggtga aggacctgaa ctctggcctg attggggccc 1020
 tgctggtgtg cagggagggc agcctggcca aggagaagac ccagaccctg cacaagtcca 1080
 tctctgtgtt tgctgtgttt gatgagggca agagctggca ctctgaaacc aagaacagcc 1140
 tgatgcagga cagggatgct gcctctgcca gggcctggcc caagatgcac actgtgaatg 1200

 gctatgtgaa caggagcctg cctggcctga ttggctgcca caggaagtct gtgtactggc 1260
 atgtgatagg catgggcacc acccctgagg tgcacagcat ctctctggag ggccacacct 1320
 tctgtgtcag gaaccacagg caggccagcc tggagatcag ccccatcacc ttctgtactg 1380
 cccagacct gctgatggac ctgggccagt tctgtgtgtt ctgccacatc agcagccacc 1440
 agcatgatgg catggagccc tatgtgaagg tggacagctg ccctgaggag ccccagctga 1500
 ggatgaagaa caatgaggag gctgaggact atgatgatga cctgactgac tctgagatgg 1560
 atgtggtgag gtttgatgat gacaacagcc ccagcttcat ccagatcagg tctgtggcca 1620

 agaagcacc caagacctgg gtgcaactaca ttgctgtgga ggaggaggac tgggactatg 1680
 cccccctggt gctggcccct gatgacagga gctacaagag ccagtacctg aacaatggcc 1740
 cccagaggat tggcaggaag tacaagaagg tcaggttcat ggcctacact gatgaaacct 1800
 tcaagaccag ggaggccatc cagcatgagt ctggcatcct gggccccctg ctgtatgggg 1860
 aggtggggga caccctgctg atcatcttca agaaccaggc cagcaggccc tacaacatct 1920
 acccccatgg catcactgat gtgaggcccc tgtacagcag gaggctgccc aaggggtga 1980
 agcacctgaa ggacttcccc atcctgcctg gggagatctt caagtacaag tggactgtga 2040

 ctgtggagga tggccccacc aagtctgacc ccaggcct gaccagatac tacagcagct 2100
 ttgtgaacat ggagagggac ctggcctctg gcctgattgg ccccctgctg atctgtctaca 2160
 aggagtctgt ggaccagagg ggcaaccaga tcatgtctga caagaggaat gtgatcctgt 2220
 tctctgtgtt tgatgagaac aggagctggt acctgactga gaacatccag aggttctgc 2280
 ccaaccctgc tggggtgcag ctggaggacc ctgagttcca ggccagcaac atcatgcaca 2340
 gcatcaatgg ctatgtgttt gacagcctgc agctgtctgt gtgcctgcat gaggtggcct 2400

actggtacat cctgagcatt ggggccaga ctgacttctt gtctgtgttc ttctctggct 2460

acaccttcaa gcacaagatg gtgtatgagg acaccctgac cctgttcccc ttctctgggg 2520

agactgtgtt catgagcatg gagaacctg gctgtggat tctgggctgc cacaactctg 2580

acttcaggaa caggggcatg actgcctgc taaaagtctc cagctgtgac aagaacctg 2640

gggactacta ttaggacagc tatgaggaca tctctgccta cctgctgagc aagaacaatg 2700

ccattgagcc caggagcttc agccagaatc caccctctct taagcgccat cagcgcgaga 2760

tcaccaggac cacctgcag tctgaccagg aggagattga ctatgatgac accatctctg 2820

tggagatgaa gaaggaggac tttagacatct acgacgagga cgagaaccag agccccagga 2880

gcttcagaa gaagaccagg cactacttca ttgctgtgtt ggagaggctg tgggactatg 2940

gcatgagcag cagccccat gtgctgagga acagggccca gtctggctct gtgccccagt 3000

tcaagaaggt ggtgttccag gagttcactg atggcagctt caccagccc ctgtacagag 3060

gggagctgaa ttagcacctg ggcctgctgg gccctacat cagggctgag gtggaggaca 3120

acatcatggt gaccttcagg aaccaggcca gcaggcccta cagcttctac agcagcctga 3180

tcagctatga ggaggaccag aggcaggggg ctgagcccag gaagaacttt gtgaagccca 3240

atgaaaccaa gacctacttc tggaaaggtgc agcaccacat ggccccacc aaggatgagt 3300

ttgactgcaa ggcctgggcc tacttctctg atgtggacct ggagaaggat gtgactctg 3360

gcctgattgg cccctgctg gtgtgccaca ccaacacct gaacctgcc catggcaggc 3420

aggtgactgt gcaggagttt gccctgttct tcaccatctt tgatgaaacc aagagctggt 3480

acttcaactga gaacatggag aggaactgca gggccccctg caacatccag atggaggacc 3540

ccaccttcaa ggagaactac aggttccatg ccatcaatgg ctacatcatg gacacctgc 3600

ctggcctggt gatggcccag gaccagagga tcaggtggta cctgctgagc atgggcagca 3660

atgagaacat ccacagcatc cacttctctg gccatgtgtt cactgtgagg aagaaggagg 3720

agtacaagat ggcctgtac aacctgtacc ctgggtgtt tgagactgtg gagatgctgc 3780

ccagcaagge tggcatctgg aggggtggagt gcctgattgg ggagcacctg catgctggca 3840

tgagcacctt gttcctggtg tacagcaaca agtgccagac cccctgggc atggcctctg 3900

gccacatcag ggacttcag atcactgcct ctggccagta tggccagtgg gcccccaagc 3960

tggccagget gcaactctt ggcagcatca atgctggag caccaaggag ccttcagct 4020

ggatcaaggt ggacctgctg gccccatga tcatccatgg catcaagacc cagggggcca 4080

ggcagaagtt cagcagcctg tacatcagcc agttcatcat catgtacagc ctggatggca 4140

agaagtggca gacctacagg ggcaacagca ctggcacct gatggtgttc tttggcaatg 4200
 tggacagctc tggcatcaag cacaacatct tcaaccccc catcattgcc agatacatca 4260
 ggctgcaccc caccactac agcatcagga gcaccctgag gatggagctg atgggctgtg 4320
 acctgaacag ctgcagcatg cccctgggca tggagagcaa ggccatctct gatgcccaga 4380
 tcaactccag cagctacttc accaacaatgt ttgccactg gagccccagc aaggccaggc 4440
 tgcactctga gggcaggagc aatgcctgga ggccccaggt caacaacccc aaggagtggc 4500
 tgcaggtgga cticcagaag accatgaagg tgactggggt gaccaccag ggggtgaaga 4560

gcctgctgac cagcatgtat gtgaaggagt tcctgatcag cagcagccag gatggccacc 4620
 agtggaccct gtcttccag aatggcaagg tgaagggtt ccagggaac caggacagct 4680
 tcaccctgt ggigaacagc ctggacccc cctgctgac cagatactg aggattcacc 4740
 cccagagctg ggtgaccag attgcctga ggatggaggt gctgggctgt gaggcccagg 4800
 acctgtactg aggatccaat aaaatatctt tattttcatt acatctgtgt gttggttttt 4860
 tgtgtgtttt cctgtaacga tcgggctcga gcgc 4894

<210> 6

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 6

ggagatgaag aaggaggact ttg 23

<210> 7

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

probe

<400> 7

acatctacga cgaggacgag aacca 25

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer

<400> 8
 tccacagcag caatgaagta g 21

<210> 9
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer

<400> 9
 cctgggccag ttctgct 18

<210> 10
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 probe

<400> 10
 ttctgccaca tcagcagcca cca 23

<210> 11
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer

<400> 11
 ggctccatg ccatcatg 18

<210> 12
 <211> 130
 <212> DNA
 <213> Adeno-associated virus

<400> 12

ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgtcg ggcgaccttt 60
 ggtcggccgg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggccaa ctccatcact 120
 aggggttctt 130

<210> 13

<211> 108

<212> DNA

<213> Adeno-associated virus

<400> 13

aggaaccctt agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctccactgagg 60
 ccgcccgggc ttgcccggg cggcctcagt gagcgagcga gcgcgcag 108

<210> 14

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Met Gln Ile Glu Leu Ser Thr Cys Phe Phe Leu Cys Leu Leu Arg Phe

1 5 10 15

Cys Phe Ser