



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0081487
(43) 공개일자 2020년07월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/073 (2010.01) A61K 35/28 (2015.01)
A61K 35/50 (2015.01) A61P 3/00 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01) C07K 14/705 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C12N 5/0605 (2013.01)
A61K 35/28 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-7016874
(22) 출원일자(국제) 2018년11월13일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2020년06월11일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2018/081122
(87) 국제공개번호 WO 2019/092287
국제공개일자 2019년05월16일
(30) 우선권주장
1718681.8 2017년11월13일 영국(GB)

(71) 출원인
에복스 테라퓨틱스 리미티드
영국 옥스포드 오엑스4 4에이취지 로버트 로빈슨
에비뉴 2층 이스트 빌딩 메다워 센터 옥스포드 사
이언스 파크

(72) 발명자
해안 저스틴
영국 옥스포드 오엑스2 7에스에스 알드리치 로드
17
룬틴 피
영국 옥스포드 오엑스3 0이알 윌리엄 스트리트 4
피르겐 안드레
스웨덴 14162 후딘게 도마르베겐 18

(74) 대리인
장훈

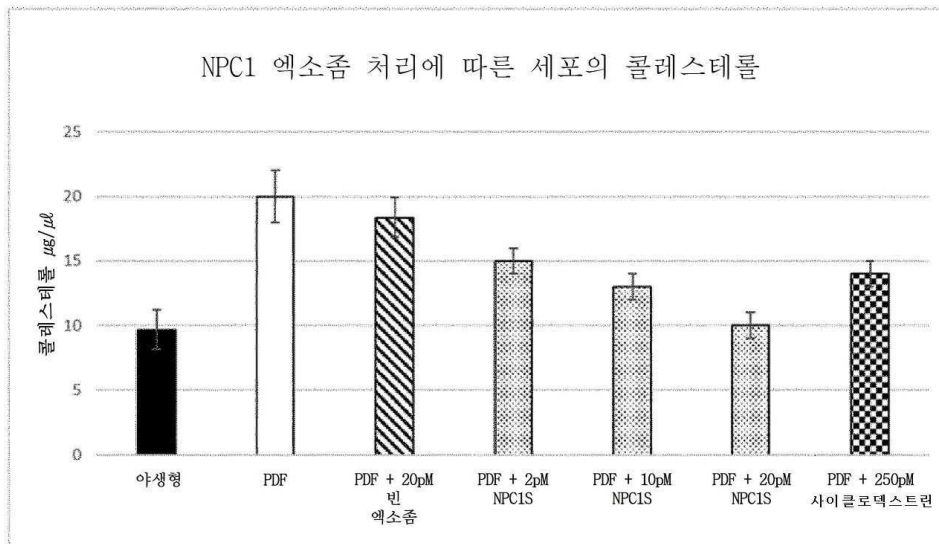
전체 청구항 수 : 총 27 항

(54) 발명의 명칭 **단백질 조작된 세포의 소포**

(57) 요약

본 발명은 리소솜 저장 장애(LSD)에 대한 신규 치료적 접근법으로서의 세포의 소포(EV)에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 적재가 어려운 LSD-관련 단백질의 적재를 개선하고 이에 따른 EV를 관심 조직 및 기관에 표적화하기 위한 다양한 단백질 조작 전략의 사용에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 35/50 (2013.01)

A61P 3/00 (2018.01)

C07K 14/47 (2013.01)

C07K 14/70596 (2013.01)

C12N 2509/10 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

중간엽 줄기세포(mesenchymal stromal cell: MSC), 양막 상피(amnion epithelial: AE) 세포 또는 태반-유래 세포로부터 획득 가능한 세포의 세포외소포(extracellular vesicle: EV)로서,

적어도 하나의 리소솜 단백질을 포함하는 복수의 폴리펩타이드 작제물을 포함하는, EV.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 폴리펩타이드 작제물은 적어도 하나의 EV 풍부화 폴리펩타이드를 더 포함하는, EV.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 리소솜 단백질은 알파-D-만노시다제, N-아스파틸-베타-글루코사미니다제, 리소솜산 리파제, 시스티노신, 리소솜 연합 막단백질-2, 알파-갈락토시다제 A, 산 세라미다제, 알파-푸코시다제, 카텡신 A, 산 베타-글루코시다제, 베타-갈락토시다제, 베타-헥소사미니다제 A, 베타-헥소사미니다제 B, GlcNAc-1 - 인산전이효소, 베타-갈락토실세라미다제, 리소솜산 리파제, 아릴설파타제 A, 알파-L-이두로니다제, 이두로네이트-2-설파타제, 과란 설파미다제, 아세틸 알파-글루코사미니다제, 아세틸 CoA: 알파-글루코사미니드-N-아세틸전이효소, N-아세틸 글루코사민-6-설파타제, N-아세틸 갈라토사민-6-설파타제, 히알루로니다제, 아세틸 갈라토사민-4-설파타제, 베타-글루쿠로니다제, 알파-N-아세틸 뉴라미니다제, N-아세틸글루코사민-1-인산전이효소, 뮤코리핀-1, 포틸글리신-생성 효소, 팔미토일-단백질 티오에스터라제-1, 트리펩티딜 펩티다제 I, 시스테인 스트링 단백질, CLN3p, CLN5p, CLN6p, CLN7p, CLN8p, 산 스펅고마이엘리나제, NPC 1, NPC 2, 산 알파-글루코시다제, 카텡신 K, 시알린, 알파-N-아세틸갈라토사미니다제, GM2 활성화제, 리소솜 산 리파제, 및 이들의 유도체, 부분, 도메인 및/임의의 조합을 포함하는 군으로부터 선택되는, EV.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 EV 풍부화 폴리펩타이드는 CD9, CD53, CD63, CD81, CD54, CD50, FLOT1, FLOT2, CD49d, CD71, CD133, CD138, CD235a, ALIX, 신테닌(서열번호 1), 신테닌의 N 말단 부분(서열번호 2), 신테닌-2, Lamp2b, TSPAN8, TSPAN14, CD37, CD82, CD151, CD231, CD102, NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3, NOTCH4, DLL1, DLL4, JAG1, JAG2, CD49d/ITGA4, ITGB5, ITGB6, ITGB7, CD11a, CD11b, CD11c, CD18/ITGB2, CD41, CD49b, CD49c, CD49e, CD51, CD61, CD104, Fc 수용체, 인터루킨 수용체, 면역글로불린, CD2, CD3 엡실론, CD3 제타, CD13, CD18, CD19, CD30, CD34, CD36, CD40, CD40L, CD44, CD45, CD45RA, CD47, CD86, CD110, CD111, CD115, CD117, CD125, CD135, CD184, CD200, CD279, CD273, CD274, CD362, COL6A1, AGRN, EGFR, GAPDH, GLUR2, GLUR3, HLA-DM, HSPG2, Hsp70, L1CAM, LAMB1, LAMC1, LFA-1, LGALS3BP, Mac-1 알파, Mac-1 베타, MFGE8, SLIT2, STX3, TCRA, TCRB, TCRD, TCRG, VTI1A, VTI1B, 이들의 임의의 유도체 및/또는 도메인, 이들의 임의의 유도체 및/또는 도메인, 및 이들의 임의의 조합을 포함하는 군으로부터 선택되는, EV.

청구항 5

제2항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 EV 풍부화 폴리펩타이드는 신테닌, 신테닌의 N 말단 부분, 또는 CD63인, EV.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 리소솜 단백질은 리소솜 막 단백질인, EV.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 EV는 다음의 폴리펩타이드:

CD63, CD81, CD44, SSEA4, CD133, CD24, 및 열충격 70 kDa 단백질 8

중 하나 또는 둘 이상에 대해 양성인, EV.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 EV는 적어도 하나의 열충격 단백질을 더 포함하는, EV.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 적어도 하나의 열충격 단백질은 열충격 70 kDa 단백질 8인, EV.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 조직 표적화 펩타이드 및/또는 폴리펩타이드를 더 포함하는, EV.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 조직 표적화 펩타이드 및/또는 폴리펩타이드는 상기 폴리펩타이드 작제물에 포함되고/되거나 별개의 폴리펩타이드 작제물로서 존재하는, EV.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 리소솜 단백질을 포함하는 상기 폴리펩타이드 작제물은 실질적으로 정확하게 폴딩되는, EV.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 단일 EV는,

- (i) 적어도 10 카피의 상기 폴리펩타이드 작제물;
- (ii) 적어도 50 카피의 상기 폴리펩타이드 작제물; 및/또는
- (iii) 적어도 100 카피의 상기 폴리펩타이드 작제물을 포함하는, EV.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 EV를 생산하기 위한 방법으로서,

- (i) EV-생산 MSC, AE 또는 태반-유래 세포에 적어도 하나의 리소솜 단백질을 포함하는 폴리펩타이드 작제물을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 작제물을 도입하는 단계, 및 (ii) 상기 EV-생산 세포로부터 적어도 하나의 리소솜 단백질을 포함하는 복수의 폴리펩타이드 작제물을 포함하는 EV를 수득하는 단계를 포함하는, EV를 생산하기 위한 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 적어도 하나의 리소솜 단백질을 포함하는 복수의 폴리펩타이드 작제물을 포함하는 EV는,

- (i) 적어도 10 카피의 리소솜 단백질;
- (ii) 적어도 50 카피의 리소솜 단백질; 및/또는
- (iii) 적어도 100 카피의 리소솜 단백질을 포함하는, EV를 생산하기 위한 방법.

청구항 16

제14항 또는 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 리소솜 단백질을 포함하는 폴리펩타이드 작제물은 적어도 하나의 EV 풍부화 폴리펩타이드를 더 포함하는, EV를 생산하기 위한 방법.

청구항 17

EV-생산 MSC, AE 또는 태반-유래 세포로서,

적어도 하나의 리소솜 단백질을 포함하는 적어도 하나의 폴리펩타이드 작제물, 적어도 하나의 리소솜 단백질을 암호화하는 적어도 하나의 폴리뉴클레오타이드 작제물, 및/또는 적어도 하나의 리소솜 단백질을 암호화하는 폴

리뉴클레오타이드 작제물을 포함하는 적어도 하나의 벡터를 포함하는, EV-생산 MSC, AE 또는 태반-유래 세포.

청구항 18

제17항에 있어서, 적어도 하나의 리소솜 단백질을 포함하는 폴리펩타이드 작제물을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 작제물, 및/또는 이러한 작제물을 포함하는 벡터가 상기 EV-생산 세포에 안정하게 삽입되는, EV-생산 MSC, AE 또는 태반-유래 세포.

청구항 19

제17항 또는 제18항에 있어서, 상기 적어도 하나의 리소솜 단백질을 포함하는 폴리펩타이드 작제물은 또한 적어도 하나의 EV 풍부화 폴리펩타이드를 포함하는, EV-생산 MSC, AE 또는 태반-유래 세포.

청구항 20

제17항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포에 의해 생산된

(i) 적어도 50%;

(ii) 적어도 70%; 및/또는

(iii) 적어도 90%

의 EV가 상기 적어도 하나의 리소솜 단백질을 포함하는 폴리펩타이드 작제물을 포함하는, EV-생산 MSC, AE 또는 태반-유래 세포.

청구항 21

제17항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포에 의해 생산된 EV가,

(i) 적어도 10 카피의 상기 리소솜 단백질;

(ii) 적어도 50 카피의 상기 리소솜 단백질; 및/또는

(iii) 적어도 100 카피의 상기 리소솜 단백질을 포함하는 상기 폴리펩타이드 작제물을 포함하는, EV-생산 MSC, AE 또는 태반-유래 세포.

청구항 22

제17항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포가 불멸화인, EV-생산 MSC, AE 또는 태반-유래 세포.

청구항 23

제17항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포 및 상기 세포에 의해 생산된 EV는 다음의 천연 단백질:

CD63, CD81, CD44, CD49e, CD105, SSEA4, CD133, CD24, 및/또는 열충격 70 kDa 단백질 8

중 하나 또는 둘 이상을 포함하는, EV-생산 MSC, AE 또는 태반-유래 세포.

청구항 24

제17항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포 및 상기 세포에 의해 생산된 EV가 다음의 천연 단백질:

CD63, CD81 및 열충격 70 kDa 단백질 8

을 포함하는, EV-생산 MSC, AE 또는 태반-유래 세포.

청구항 25

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 복수의 EV, 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 26

제25항에 있어서, 미글루스타트, 아리모클로몰, 헤파린, 트레할로스 및/또는 사이클로덱스트린, 및/또는 이들의

임의의 유도체를 더 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 27

하나 또는 둘 이상의 리소솜 저장 장애를 치료하는데 사용하기 위한, 제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 EV 및/또는 제25항 또는 제26항에 따른 약제학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 리소솜 저장 장애(lysosomal storage disorder: LSD)에 대한 신규 치료적 접근법으로서의 조작된 세포외 소포(extracellular vesicle: EV)에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 적체가 어려운 LSD-관련 단백질의 적체를 개선하고 이에 따른 EV를 관심 조직 및 기관에 표적화하기 위한 다양한 단백질 조작 전략의 사용에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 리소솜 저장 질환은 선천성 대사 이상의 중요한 하위군을 형성한다. LSD는 신생아 5000명당 1명에 영향을 미치는 것으로 추정되지만, 진단이 이루어지지 않거나 진단오류로 인해 수치는 더 클 것으로 생각된다. 모든 LSD는 엔도솜적-자가포식적-리소솜적 체계의 세포소기관 내부에 특정 거대분자 또는 단량체 화합물이 축적되어 발생한다. 기질 축적 오류를 넘어, LSD는 전형적으로 전신적 신경퇴행 사례의 많은 부분을 차지하는 것으로 여겨지는 신경학적 장애 및 병리와 연관이 있다. 지난 20년 동안 특히 효소 대체 요법의 발전의 결과로 LSD에 대한 진전을 보여왔다. 그러나, 현재의 치료법에서 추가적인 발전이 요구되거나, 현재의 치료법이 아직까지 좋지 못하거나, 치료법이 존재하지 않는 몇몇 질환이 존재한다. C형 니만-피크병(Niemann-Pick)은 이런 LSD 중 하나의 예시이며, 단백질 NPC-1의 부재 또는 기능 부전으로 발생한다. 이 NPC-1 단백질은 콜레스테롤 및 당지질과 같은 큰 불수용성 분자의 공동국재화(colocalization) 및 세포내 수송에 관여한다. 결과적으로, 질환 환경 하에서 자유 콜레스테롤 및 글리코스핑고리피드(glycosphingolipid)는 다수의 조직 및 기관에 축적된다. 니만-피크 질환은 광범위한 임상 스펙트럼을 가지며, 간종대(hepatomegaly), 비종대(splenomegaly) 또는 간비종대(hepatosplenomegaly) 징후를 나타낼 수 있다. 전형적인 LSD인 니만-피크병은 점진적인 신경학적 병리를 일으켜 유아기를 넘어 모든 경우에서 조기사망을 일으킨다. 현재 C형 니만-피크병(Niemann Pick type C: NPC)의 치료법은 없고, 현재 치료 요법은 질환 관리를 수반한다.

[0003] 이전의 NPC 치료 전략에는 항-간질성, 항콜린성 또는 항-우울제와 같은 증상을 완화시키는 약물이 포함되었다. 이후 미글루스타트(miglustat) 및 히드록시프로필-베타-사이클로덱스트린(CD)을 포함하여 지질 대사 경로의 상이한 단계를 교정하는 것을 겨냥한 몇몇 후보약물이 임상 환경에서 평가되었거나 현재 평가되고 있다. 미글루스타트는 포도당세라미드 합성효소(glucosylceramide synthase)의 활성을 억제하는 이미노당(imino sugar)으로, 이로 인해 글리코스핑고리피드 생산을 감소시킨다. 본래 미글루스타트는 고세병(Gaucher's disease)의 치료를 위해 개발되었고, 2009년 유럽에서 NPC 환자에 사용하는 것이 승인되었다. CD 또한 현재 척추강 내 또는 정맥 내 투여 경로로 NPC 치료를 위해 임상시험 중이다. CD는 콜레스테롤과 상호작용하고 순환에서 이를 제거하거나 이의 분포를 변화시키는 것으로 여겨진다. 존재하는 모든 NPC 치료법과 관련된 몇몇 시도가 있었고, 가장 중요하게는 이들은 근본적인 질환 병리를 충분히 다루고 있지 않는다.

[0004] 단백질 생물학과 같은 생물약제학(중요하지만 종종 불충분한 종류가 상급된 효소 대체 요법임) 및 RNA 요법은 LSD 치료를 위한 보다 효과적인 대체 수단을 제공할 수 있다. 1990년대 초 ERT의 임상 실습 도입은 특정 LSD(예컨대, 고세병)를 치료하는 방법에 변화를 일으켰지만, ERT는 아직까지 심각한 결점이 있고, 이는 많은 LSD 환자들이 아직까지 충분히 도움을 받지 못한다는 것을 의미한다. 많은 ERT가 표적 세포 내에서의 치료 효과를 수행하지만, 이들 단백질-기초 약제의 내재화는 특히 효율적이지 않다. 게다가 본질적으로 모든 단백질 생물체제의 큰 크기와 전하로 인해, ERT는 혈액-뇌-장벽을 통과하지 않으며, 이에 따라 중추신경계(CNS)로 진입하는데 방해가 되는데, 이것이 신경적 징후가 매우 심각한 몇몇 LSD의 치료를 위한 열쇠가 된다. W02016/044947은 LSD의 치료 방식으로 엑소솜을 활용하는 것을 제시하며, 이러한 응용은 치료적 중재를 위한 다양한 접근법을 논하지만, 설계 전략에는 몇몇 중요한 결점이 있다. 실제로, W02016/044947은 표면상으로는 (i) 리소솜 표적화 서열이 융합된 (ii) 엑소솜 단백질을 포함하는 융합 단백질 작제물을 사용하여 표적 세포의 리소솜을 표적화하기 위해 엑소솜을 변형하는 것을 기술하지만, 실제 치료적 mRNA 및/또는 단백질-기반 체제의 적체 및 생물활성적 전달에 관련하여 눈에 띄는 내용이 전혀 없다. 엑소솜이 다양한 형태의 생물분자를 운반하기 위한 우수한 운반

체인 것에 의심의 여지가 없지만, 치료적 단백질 및/또는 mRNA의 생체 내 전달을 위한 실제적인 효용성은 사소한 것이 아니며 소포 기술에 대한 많은 고민이 필요하다.

발명의 내용

- [0005] 따라서 본 발명의 목적은 LSD를 위한 단백질 치료제의 전달을 위해 EV 엔지니어링에 관련된 상기 확인된 문제점을 극복하는 것이다. 본 발명은 LSD를 위한 EV-기반 치료제의 몇몇 주요 양상, 즉, EV에 복잡한 단백질 약물의 포장 및 적재; EV 자체의 약물동태학적 특성의 최적화; EV의 재생 효과 활용; 및 생체 내 표적 세포로의 약물 (본 발명의 경우 리소솜 단백질, 예컨대, 수송체 및 효소)의 생물활성적 전달에 관한 것이다.
- [0006] 본 발명은 LSD 치료에 필요한 복잡하고 주로 크기가 매우 큰 리소솜 단백질을 생물활성적 상태 및 형태로 포장하고 적재하기 위한 신규 EV 공학 기술을 이용하여 이를 달성한다. 또한, 본 발명은 적합한 약물동태학적 특성과 재생 특성 사이의 최적 균형을 제공하는 특수한 분자적 특성을 갖는 EV를 세포 근원으로부터 선택하고 프로파일링하는 것뿐만 아니라, 다양한 LSD에 치료적 활성을 갖는 추가 단백질 및 핵산 성분을 포함하는 EV를 제공하는 것을 포함한다. 본 발명의 발명자는 (i) 기대하지 않았던 특정 세포 근원이 정확하게 폴딩되어 활성화된 리소솜 단백질을 생산하는데 우수하다는 것, (ii) 이러한 리소솜 단백질을 EV 내부로 운반하는 능력이 세포 형태에 높은 의존성이 있고 치료용 리소솜 단백질 및 엑소솜 단백질 사이의 융합 단백질 작제물을 이용하여 이를 개선할 수 있다는 것, (iii) 특정 EV 단백질 성분이 운반 단백질 및 EV 그 자체 생물학적 활성의 열쇠라는 것, 및 (iv) 본 발명의 EV-생산 세포 근원으로부터 수득된 EV가 정확한 세포 내부 구역으로 생물활성적으로 전달할 수 있다는 것을 깨달았다. 대조적으로, 선행기술, 예를 들어 W02016/044947는 리소솜 단백질의 생물활성적 전달을 위한 최적 세포 근원의 선택에 대해 전혀 고려하지 않고, 또한 치료용 리소솜 단백질 그 자체에 EV 풍부화 폴리펩타이드를 융합하는 것의 중요성을 인지하지 못하고 있다. W02016/044947은 실제로 융합 단백질 기술을 이용하는 것을 제안하지만, 표적 세포의 리소솜 구획을 표적화하기 위한 것에 불과하다. W02016/044947의 융합은 표적 세포의 리소솜과 같은 엑소솜의 표적화를 위해 제공되는 짧은 펩타이드 서열을 기초로 하는 것이지만, 이 융합 단백질은 실제 치료용 리소솜 단백질 그 자체를 EV에 생물활성적으로 적재하는 것을 가능하게 하지 않는다. 따라서, 선행기술은 (1) 옳은 세포 내부 위치에 표적화하기 위한 의미로서 세포 근원을 선택하는 것의 중요성, (2) 임의의 주어진 세포 근원으로 조작될 경우 리소솜 단백질이 정확하게 폴딩되지 않고 및/또는 생물활성을 나타내지 않는다는 사실, 및 (3) EV 내에서 그리고 중요하게는 표적 세포 내에서 임의의 효소적 및/또는 운반체 활성을 달성하기 위해 치료용 리소솜 단백질을 EV 내부에 적재하는 것에는 종종 EV 풍부화 폴리펩타이드/도메인으로 융합하는 것이 필요하다는 사실을 명확하게 인지하지 못한다.
- [0007] 따라서 첫째 양상에서, 본 발명은 중간엽 줄기세포(mesenchymal stromal cell: MSC), 양막 상피(amnion epithelial: AE) 세포 또는 태반 유래(placenta-derived: P) 세포로부터 획득 가능한 EV에 관한 것이고, 여기서 상기 EV는 적어도 하나의 리소솜 단백질을 포함하는 다수의 폴리펩타이드 작제물을 포함한다. 본 발명에서 상기 각 AE-EV, MSC-EV 및 P-EV는 EV 내부로의 포장 및 적재를 최적화하기 위해, 목적하는 조직 및/또는 세포 형태에 EV를 표적화하기 위해, 및/또는 상이한 LSD를 치료하기 위해 이들의 표적 구획, 즉, 표적 세포의 전형적인 리소솜 구획으로 EV의 트래피킹(trafficking)을 강화하기 위해 다양한 폴리펩타이드 작제물을 포함하도록 조작될 수 있다.
- [0008] 본 발명에 따른 일부 주요 EV 강화 전략은 신테닌(syntenin), 신테닌의 N-말단 부분과 같은 EV 단백질 및 EV 단백질의 일부분, 또는, 매우 놀랍게도 치료용 리소솜 단백질을 위한 융합 파트너로 CD63을 이용하는 것을 포함한다. 유리한 실시형태에서, 본 발명은 NPC1 단백질, 시스티노신(cystinosin), CLN 단백질 및/또는 LAMP2 단백질과 같은 전달이 매우 어려운 리소솜 막관통 단백질(transmembrane protein)을 EV 전달하는 것을 제공한다.
- [0009] 추가 양상에서, 본 발명은 적어도 하나의 리소솜 단백질 및 적어도 하나의 EV 풍부화 폴리펩타이드를 포함하는 폴리펩타이드 작제물, 및 추가적인 양상에서 이러한 폴리펩타이드 작제물을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 작제물에 관한 것이다.
- [0010] 보다 구체적으로 본 발명의 상기 폴리펩타이드 작제물의 리소솜 단백질은 NPC1, LAMP2, 시알린(sialin), CIC5, CLN3, 시스티노신, 또는 GM2-활성제 단백질(GM2-activator protein) 중 하나 또는 그 이상일 수 있다. 상기 폴리펩타이드 작제물의 적어도 하나의 EV 풍부화 폴리펩타이드는 신테닌, 신테닌의 N-말단 부분, 및/또는 CD63일 수 있다. 또한, 본 발명의 상기 폴리펩타이드는 적어도 하나의 표적화 펩타이드 및/또는 폴리펩타이드를 더 포함할 수 있다.
- [0011] 본 발명은 또한 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 작제물을 포함하는 벡터에 관한 것으로 상기 벡터는 플라스미드,

미니-서클, 및/또는 실질적으로 원형화된 폴리뉴클레오타이드의 임의의 다른 형태; 아데노바이러스, 아데노-관련 바이러스, 렌티바이러스, 및/또는 캡시드-프리 바이러스; 선형 DNA 및/또는 RNA 폴리뉴클레오타이드; 메신저 RNA(mRNA); 및/또는 변형된 mRNA이다.

[0012] 본 발명은 또한 다른 양상에서, 이러한 폴리펩타이드 및/또는 폴리뉴클레오타이드 작제물을 포함하는 세포에 관한 것이다. 이러한 세포는 바람직하게는 MSC, AE 및/또는 태반-유래 세포이고, 이들 세포는 바람직하게는 복수의 상기 폴리펩타이드 작제물이 내생적으로 적재된 EV의 일관성 및 재생산성을 위해 이러한 폴리뉴클레오타이드 작제물로 안정적으로 형질감염 및/또는 형질도입된다.

[0013] 추가 양상에서, 본 발명은 또한 본 발명에 따른 복수의 EV, 및/또는 본 발명의 폴리펩타이드 작제물 및/또는 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 작제물, 및/또는 본 발명에 따른 임의의 형태의 벡터를 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체를 더 포함할 수 있다. 상기 EV 및/또는 이러한 약제학적 조성물은 특히 LSD의 치료에 적합하지만 리소솜 기능, 형태, 등의 문제를 갖는 다양한 질환, 예를 들어 파킨슨 질환, 알츠하이머 질환, 등의 질환의 치료에도 유용할 수 있다.

[0014] 또 다른 양상에서, 본 발명은 포유동물의 리소솜 및/또는 임의의 다른 세포 구획의 리소솜 폴리펩타이드의 양을 증가시키는 방법뿐만 아니라, 치료가 필요한 대상의 LSD를 치료하기 위한 다양한 발명적 방법에 관한 것이다. 이러한 방법은 최적의 방식으로 환자에 EV를 선택, 프로파일링, 투여 및 부여하는 것을 포함한다.

[0015] 바람직한 실시형태에서, 포유동물의 리소솜 및/또는 임의의 다른 세포 구획의 리소솜 폴리펩타이드의 양을 증가시키는 방법은 포유동물에 본 발명에 따른 EV, 본 발명에 따른 적어도 하나의 폴리펩타이드 작제물, 본 발명에 따른 적어도 하나의 폴리뉴클레오타이드, 및/또는 본 발명에 따른 적어도 하나의 벡터를 함유하는 조성물을 투여하는 것을 포함한다.

[0016] 요약하자면, 본 발명은 LSD를 치료하는데 필요한 복잡하고 종종 매우 크기가 큰 리소솜 단백질을 생물활성적인 상태 및 형태로 포장 및 적재하기 위한 그리고 적절한 운반-안정성 및 전달 능력을 갖는 최적 재생 세포 근원을 선택하기 위한 고도로 창의적인 EV 조작 기술을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1. NPC1 양막-유래 EV는 세포에 많은 양의 생물활성 NPC1 단백질을 전달하여 표적 세포 내 콜레스테롤 수준을 유의적으로 낮춘다.

도 2. 와튼 젤리(Wharton's jelly) MSC-유래 EV(WJ-MS-C-EV, 와튼 젤리로부터 얻을 수 있음)는 리소솜 단백질 시스티노신 및 EV 풍부화 단백질 CD63을 포함하는 폴리펩타이드 작제물을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 작제물로 유전적으로 조작되었고, 시험관 내 유력한 시스테인 운반 효과를 나타낸다.

도 3. CD44, SSEA4, CD133, CD24에 양성이고 복수의 NPC1-신테닌 폴리펩타이드 작제물을 포함하도록 조작된 AE-EV를 니만-피크 질환의 이종 녹아웃 마우스 모델의 생체 내에서 평가하였다. 조작된 AE-EV는 간과 CNS 병리 상에서 모두 유의적인 치료 효과를 나타내었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 생물활성적 EV 개체군의 선택적인 설계 및 프로파일링을 접목한 창의적인 EV 조작 기술을 사용하는 것에 의해, 본 발명은 LSD를 위한 EV-기반 치료제의 몇몇 주요 양상을 개시한다.

[0019] 편의성과 명확성을 위해, 본 명세서에서 사용된 특정 용어를 모아 아래에 설명한다. 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 용어 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 기술자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 같은 의미를 갖는다.

[0020] 본 발명의 특징, 양상, 실시형태, 또는 대안이 마쿠쉬 형태로 기재된 경우, 당업자에게 본 발명은 마쿠쉬 그룹의 임의의 개별 구성원 또는 구원성의 하위그룹의 용어로 기재된 것으로 인식될 것이다. 당업자에게 또한 본 발명은 마쿠쉬 그룹의 개별 구성원 또는 구성원의 하위그룹의 임의의 조합의 용어로 기재된 것으로 인식될 것이다. 또한, 본 발명의 양상 및/또는 실시형태 중 하나와 연결되어 기술된 실시형태 및 특징은 또한 본 발명의 다른 양상 및/또는 실시형태 모두에 준용된다. 예를 들어, 본 명세서에서 리소솜 단백질을 포함하는 EV로 연결되어 기술된 리소솜 단백질은 본 명세서의 모든 다른 양상, 교시 및 실시형태, 예를 들어 이러한 리소솜 단백질을 포함하는 EV를 생산하기 위한 방법에 관한 양상 및/또는 실시형태 또는 본 명세서의 폴리펩타이드 및/또는 폴리뉴클레오타이드 작제물에 관한 양상과 함께 개시되고, 관련되고, 호환되는 것으로 이해되어야 한다. 또한,

본 명세서에서 확인된 모든 폴리펩타이드 및 단백질은 폴리펩타이드를 융합하는 통상적인 전략을 사용하여 폴리펩타이드 작제물 내에 자유롭게 결합될 수 있다. 비제한적인 예시로, 본 명세서에 기술된 모든 리소솜 단백질은 하나 또는 그 이상의 EV 풍부화 폴리펩타이드와 임의의 조합으로 자유롭게 결합될 수 있다. 또한, 본 명세서의 임의의 및 모든 리소솜 단백질은 하나 이상의 리소솜 단백질을 포함하는 폴리펩타이드, 및/또는 이에 상응하는 폴리뉴클레오타이드, 작제물을 생성하기 위해 임의의 다른 리소솜 단백질과 결합될 수 있다. 또한, 임의의 및 모든 특징(예를 들어 마쿠쉬 그룹의 임의의 및 모든 구성원)은 임의의 및 모든 다른 특징(예를 들어 다른 마쿠쉬 그룹의 임의의 및 모든 구성원)과 자유롭게 결합될 수 있다. 또한, 본 명세서의 교시가 단수형의 EV 및/또는 별개의 자연적 나노입자-유사 소포로서의 EV와 관련될 때, 모든 이러한 교시는 다수의 EV 및 집단의 EV에 동등하게 관련되고 적용될 수 있는 것으로 이해되어야 한다. 일반적인 말로, 본 발명에 따른 리소솜 단백질, EV 풍부화 폴리펩타이드, 표적화 펩타이드 및/또는 폴리펩타이드, EV-생산 세포 근원, 및 모든 다른 양상, 실시형태, 및 대안은 본 발명의 범위 및 요지를 벗어나지 않으면서 임의의 및 모든 가능한 조합으로 자유롭게 결합될 수 있다. 또한, 본 발명의 임의의 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드 또는 임의의 폴리펩타이드 서열 또는 폴리뉴클레오타이드 서열(각각 아미노산 서열 또는 염기 서열)은 임의의 주어진 분자가 이와 관련된 원하는 기술적 효과를 수행하기 위한 능력을 보유하는 한 본래의 폴리펩타이드, 폴리뉴클레오타이드 및 서열로부터 상당히 벗어난 것일 수 있다. 가능한 높은 서열 동일성이 바람직하지만(예를 들어 60%, 70%, 80%, 또는 예컨대, 90% 또는 그 이상), 그들의 생물학적 특성을 유지하는 한 본 명세서의 폴리펩타이드 및/또는 폴리뉴클레오타이드 서열은 천연 서열과 비교하여 50%(예를 들어 BLAST 또는 ClustalW를 사용하여 계산)까지 벗어난 것일 수 있다. 예컨대, 적어도 하나의 리소솜 단백질과 적어도 하나의 EV 풍부화 폴리펩타이드의 조합(융합)은 자연히 각각 폴리펩타이드의 특정 단편이 대체 및/또는 변형될 수 있고, 그리고/또는 서열이 다른 아미노산 연속의 삽입에 의해 끊길 수 있고, 천연 서열의 변형이 주요 특성(예컨대, 리소솜 단백질의 천연 효과, EV 트래피킹 및 풍부화, 표적화 특성, 등)이 보존되는 한도 내에서 고려될 수 있다는 것을 의미한다. 따라서 유사한 추론이 자연적으로 이러한 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열에 적용된다. 펩타이드, 폴리펩타이드 및 단백질과 관련하여 본 명세서에 언급된 모든 수탁번호(accession number) 및 서열번호는 단지 예시일 뿐이고, 정보만을 위한 것일 뿐이며, 모든 펩타이드, 폴리펩타이드 및 단백질은 당업자가 이해할 수 있는 바와 같은 일반적인 의미가 부여되어야 할 것이다. 따라서, 전술한 바와 같이, 당업자는 본 발명이 본 명세서에 적용된 특정 서열번호 및/또는 수탁번호뿐만 아니라, 이의 변이체 및 유도체도 포함한다는 것을 이해할 것이다. 본 명세서에 적용된 모든 수탁번호는 2017년 11월 10일 버전의 데이터베이스에 따른 UniProtKB 수탁번호이고, 본 명세서에 언급된 모든 단백질, 폴리펩타이드, 펩타이드, 뉴클레오타이드 및 폴리뉴클레오타이드는 당업자에게 이해되는 통상적인 의미에 따라 해석되어야 한다.

[0021]

용어 "세포외 소포" 또는 "EV" 또는 "엑소솜"은 본 명세서에서 상호교환적으로 사용되며, 임의의 형태로 세포로부터 획득 가능한 임의의 형태의 소포, 예를 들어 미세소포(microvesicle)(예컨대, 세포의 원형질막으로부터 떨어진 임의의 소포), 엑소솜(예컨대, 엔도-리소솜 경로로 파생된 임의의 소포), 자멸사체(apoptotic body)(예컨대, 자멸사 세포로부터 획득 가능한), 미세입자(예컨대, 혈소판으로부터 파생될 수 있음), 엑토솜(ectosome)(예컨대, 혈청 내 호중구 및 단핵구로부터 파생될 수 있음), 프로스타토솜(prostatosome)(예컨대, 전립선암 세포로부터 얻을 수 있음), 또는 카디오솜(cardiosome)(예컨대, 심장세포로부터 파생될 수 있음), 등에 관한 것으로 이해되어야 한다. 엑소솜 및 미세소포는 특히 바람직하게는 EV를 나타낸다. EV의 크기는 상당히 다양할 수 있지만 전형적으로 나노-크기 유체역학적 반경, 즉, 1000nm 미만의 반경을 갖는다. 분명히, EV는 생체 내, 생체 외, 및 시험관 내 임의의 세포 형태로부터 파생될 수 있다. 그러나, 본 발명은 양막 상피(AE) 세포, 중간엽 줄기세포(MSC), 및 태반-유래 세포로부터 얻어지는 EV에 주로 중점을 둔다. 또한, 용어 "EV" 및/또는 "엑소솜" 및/또는 "미세소포"는 세포 외 소포 모방체, 예를 들어 막 분출(membrane extrusion), 음파처리(sonication), 또는 다른 기술, 등을 통해 얻어지는 세포막-기반 소포에 관련된 것으로 이해되어야 한다. EV의 의료적 및 과학적 사용과 응용을 기술할 때, 본 발명은 일반적으로 복수의 EV, 즉, 수천, 수백만, 수십억, 심지어는 수조의 EV를 포함하는 EV 개체군에 관한 것임이 당업자에 명백할 것이다. 아래의 실험 부분에서 볼 수 있듯이, EV는 단위 부피당(예를 들어 mL당) 10^5 , 10^8 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} , 10^{14} , 10^{15} , 10^{18} , 10^{25} , 10^{30} 개의 EV(종종 "입자"로 지칭됨), 또는 임의의 다른 더 큰 수치, 더 작은 수치 또는 사이의 수치와 같은 농도를 나타낼 수 있다. 같은 맥락에서, 예컨대, 특정 리소솜 단백질을 포함하는 EV에 관련될 수 있는 용어 "개체군"은 이러한 개체군을 구성하는 복수의 개체를 포함하는 것으로 이해될 것이다. 다시 말해, 다수로 표현될 때 개별 EV는 EV 개체군을 구성한다. 따라서, 자연히, 본 발명은 개별 EV 및 EV를 포함하는 개체군 모두에 관한 것임이 당업자에게 자명할 것이다. 생체 내에 적용할 경우 EV의 투여량은 치료할 질환, 투여 경로, 관심있는 리소솜 단백질의 활성 및 효과, EV 상에 노출된 표적 모이어티, 약제학적 제형, 등을 고려하여 상당히 달라질 수 있다.

[0022] 용어 "EV 풍부화 폴리펩타이드", "EV 단백질", "EV 폴리펩타이드", "엑소솜 폴리펩타이드" 및 "엑소솜 단백질"은 본 명세서에서 상호교환적으로 사용되며 폴리펩타이드 작제물(전형적으로 EV 풍부화 단백질에 더하여, 리소솜 단백질을 포함함)를 적합한 소포 구조, 즉, 적합한 EV로 운반하기 위해 이용할 수 있는 임의의 폴리펩타이드에 관한 것으로 이해되어야 한다. 보다 구체적으로, 이들 용어는 융합 단백질 작제물을 EV와 같은 소포 구조로 운반, 트래핑 또는 왕복수송시킬 수 있는 임의의 폴리펩타이드를 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 이러한 엑소솜 폴리펩타이드의 예시는 예를 들어 CD9, CD53, CD63, CD81, CD54, CD50, FLOT1, FLOT2, CD49d, CD71[트랜스페린(transferrin) 수용체로도 알려져 있음] 및 이의 엔도솜 분류 도메인(endosomal sorting domain), 즉, 트랜스페린 수용체 엔도솜 분류 도메인(비-제한적 예시로 서열번호 3에 예시됨), CD133, CD138[신데칸-1(syndecan-1)], CD235a, ALIX, 신데칸(비-제한적 예시로 서열번호 1에 예시됨)(신데칸-1으로도 알려져 있음), 신데칸의 N-말단 부분(비-제한적 예시로 서열번호 2에 예시됨) Lamp2b, 신데칸-2, 신데칸-3, 신데칸-4, TSPAN8, TSPAN14, CD37, CD82, CD151, CD231, CD102, NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3, NOTCH4, DLL1, DLL4, JAG1, JAG2, CD49d/ITGA4, ITGB5, ITGB6, ITGB7, CD11a, CD11b, CD11c, CD18/ITGB2, CD41, CD49b, CD49c, CD49e, CD51, CD61, CD104, Fc 수용체, 인터루킨(interleukin) 수용체, 면역글로불린(immunoglobulin), MHC-I 또는 MHC-II 구성요소, CD2, CD3 엡실론, CD3 제타, CD13, CD18, CD19, CD30, TSG101, CD34, CD36, CD40, CD40L, CD44, CD45, CD45RA, CD47, CD86, CD110, CD111, CD115, CD117, CD125, CD135, CD184, CD200, CD279, CD273, CD274, CD362, COL6A1, AGRN, EGFR, GAPDH, GLUR2, GLUR3, ARRC1, HLA-DM, HSPG2, L1CAM, LAMB1, LAMC1, LFA-1, LGALS3BP, Mac-1 알파, Mac-1 베타, MFGE8, SLIT2, STX3, TCRA, TCRB, TCRD, TCRG, VTI1A, VTI1B, 다른 엑소솜 폴리펩타이드, 및 이들의 임의의 조합이지만, 폴리펩타이드 작제물을 EV로 운반할 수 있는 다른 수많은 폴리펩타이드가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 전형적으로, 본 발명의 많은 실시형태에서, 적어도 하나의 EV 풍부화 폴리펩타이드가 리소솜 단백질을 포함하는 폴리펩타이드 작제물에 포함되며, 이 융합 폴리펩타이드 작제물은 유리하게 링커(linker), 막관통 도메인(transmembrane domain), 사이토솔 도메인(cytosolic domain), 다중화 도메인(multimerization domain), 방출 도메인(release domain), 등을 포함하는 다양한 다른 구성요소 또한 포함할 수 있다.

[0023] 용어 "근원 세포" 또는 "EV 근원 세포" 또는 "모세포" 또는 "세포 근원" 또는 "EV-생산 세포" 또는 임의의 다른 유사한 용어는 적합한 조건, 예를 들어 현탁배양, 부착배양 또는 임의의 다른 타입의 배양 시스템, 및/또는 생체 내, 생체 외 및/또는 시험관 내에서 EV를 생산할 수 있는 임의의 세포형에 관한 것으로 이해되어야 한다. 본 발명에 따른 근원 세포는 예컨대, EV의 후속 번역 및 생체 내 생산을 위해 폴리뉴클레오타이드 작제물을 대상에 전달하는 것을 통해, 생체 내에서, 예컨대, 간에서 엑소솜을 생산할 수 있는 세포 또한 포함할 수 있다. 본 발명에 따른 가장 유리한 근원 세포는 MSC, AE 세포, 및/또는 태반-유래 세포이고, 이들 모두 포유동물, 가장 바람직하게는 인간 기원의 세포이다. 이 MSC는 예를 들어 골수, 지방조직, 와튼 젤리, 출산전후 조직(perinatal tissue)(예컨대, 양막, 양막적 막, 양수, 장막(chorion), 태반, 탯줄, 와튼 젤리), 치아삭, 제대혈, 피부조직, 등으로부터 얻을 수 있다. 일반적으로, EV는 본질적으로 임의의 세포 근원, 1차 세포 근원 또는 불멸화 세포주로부터 유래될 수 있다. 이 EV 근원 세포는 유도만능 줄기세포(induced pluripotent stem cell: iPSC) 및 임의의 방법으로 파생된 다른 줄기세포를 포함하는 임의의 배아, 태아, 및 성체 줄기 세포 타입뿐만 아니라, 임의의 성체 세포 근원일 수 있다. 이 근원 세포는 치료할 환자에 대해 본질적으로 동종이계, 자가, 또는 심지어 이종의 것, 즉, 환자 자신, 또는 비관련 또는 관련, 일치 또는 불일치 공여자로부터 유래된 세포일 수 있다. 특정 상황에서, 동종이계 세포는 특정 적응증을 겪는 환자의 자가 세포로부터 얻을 수 없는 면역-조절 효과를 제공할 수 있어 의학의 관점에서 바람직할 수 있다.

[0024] 첫째 양상에서, 본 발명은 소위 MSC-EV, AE-EV, 및 P-EV로 불리는 MSC, AE 세포 또는 태반-유래 세포로부터 획득 가능한 EV에 관한 것이다. 본 발명에 따른 이 EV는 또한 다양한 다른 LSD에 대한 치료적 활성을 강화하기 위해 적어도 하나의 리소솜 단백질을 포함하는 상당한 다수의 폴리펩타이드 작제물을 포함하도록 내생적으로 조작된다. 용어 "내생적으로 조작"은 치료적 리소솜 단백질을 암호화하고 세포 시스템을 통해 EV 내부로 통합되는 폴리뉴클레오타이드 작제물을 포함하도록 EV-생산 AE, MSC, 및/또는 태반-유래 세포를 유전적으로 조작하는 것을 의미한다. EV-생산 세포 근원의 선택은 치료적 리소솜 단백질을 EV에 개체군-전체, 고-효율로 적재하는 것을 달성하기 위한 열쇠이다. 그에 반해, 선행기술, 예를 들어 WO2016/044947는 단지 전기천공법을 통한 외인적 적재를 통해 GAA 효소를 적재한 엑소솜(수지상세포 유래)에 관한 것이다. 단백질을 외인적으로 적재하는 것은 (i) 낮은 효율, (2) 전체 EV 개체군에 걸친 불균등한 분포, 및 (3) 단백질 미스폴딩 위험 증가를 포함하는 몇몇 불리함이 있고, 특히 치료적 리소솜 단백질은 구조적 변화에 매우 민감하다.

[0025] MSC-EV, AE-EV, 및 P-EV의 선택은 이들 세포 근원으로부터의 EV가 정확하게 폴딩된 많은 카피수의 리소솜 단백

질, 즉, 치료적 활성 보유하거나, 효소 활성 또는 수송체 활성 또는 치료적 리소솜 단백질의 역할을 수행할 수 있는 임의의 다른 활성을 갖는 리소솜 단백질을 운반할 수 있다는 예상하지 못한 발견을 기반으로 한다. 또한, 본 발명자는 상기 세포 근원(AE, MSC, 및 태반-유래 세포)이 표적 세포의 정확한 작용 위치에 리소솜 단백질을 활성적으로 전달하는 조작된 EV를 생산한다는 것을 예상치 못하게 알게 되었다. 이론에 구속되지 않고, 이러한 특성은 높은 함량의 열충격 단백질, 특히 열충격 70kda 단백질 8(HSPA8 유전자에 의해 암호화되는 Hsp70-8로도 알려져 있음)이 이들 세포 근원 및 상기 세포가 나타내는 단백질체 지문으로부터의 EV, 특히 엑소솜에서 발견된 결과인 것으로 추정된다.

[0026] AE-EV, MSC-EV 및 P-EV에 포함되는 폴리펩타이드 작제물은 유리한 실시형태에서 리소솜 단백질을 EV로 내재화하기 위해 적어도 하나의 EV 풍부화 폴리펩타이드를 더 포함하도록 조작될 수 있다. 이러한 EV 풍부화 폴리펩타이드는 본질적으로 임의의 EV 폴리펩타이드, 예를 들어 다음의 EV 풍부화 폴리펩타이드 군으로부터 선택될 수 있다: CD9, CD53, CD63, CD81, CD54, CD50, FLOT1, FLOT2, CD49d, CD71, CD133, CD138, CD235a, ALIX, 신테닌-1, 신테닌-2, Lamp2b, TSPAN8, TSPAN14, CD37, CD82, CD151, CD231, CD102, NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3, NOTCH4, DLL1, DLL4, JAG1, JAG2, CD49d/ITGA4, ITGB5, ITGB6, ITGB7, CD11a, CD11b, CD11c, CD18/ITGB2, CD41, CD49b, CD49c, CD49e, CD51, CD61, CD104, Fc 수용체, 인터루킨 수용체, 면역글로불린, CD2, CD3 엽실론, CD3 제타, CD13, CD18, CD19, CD30, CD34, CD36, CD40, CD40L, CD44, CD45, CD45RA, CD47, CD86, CD110, CD111, CD115, CD117, CD125, CD135, CD184, CD200, CD279, CD273, CD274, CD362, COL6A1, ARRDC1, AGRN, EGFR, GAPDH, GLUR2, GLUR3, HLA-DM, HSPG2, Hsp70, L1CAM, LAMB1, LAMC1, LFA-1, LGALS3BP, Mac-1 알파, Mac-1 베타, MFGE8, SLIT2, STX3, TCRA, TCRB, TCRD, TCRG, VTI1A, VTI1B, 임의의 유도체 및/또는 이들의 도메인, 및 이들의 임의의 조합.

[0027] 본 발명자는 가장 유리한 EV 풍부화 폴리펩타이드가 신테닌, 신테닌의 다양한 N 말단 부분, 및 CD63임을 깨달았다. CD63은 EV 막에 있는 테트라스판닌(tetraspanin)인 반면, 신테닌은 용해성이고, 내강성 EV 단백질이기 때문에 이는 매우 놀라운 것이다. 다양한 타입(막관통, 용해성, 등)의 리소솜 단백질을 EV로 포장하는 상황에서 이런 두 가지의 다른 종류의 EV 단백질이 이러한 충분한 효과를 갖는다는 사실은 매우 뜻밖의 발견이며, EV-생산 세포 근원으로 AE, MSC, 및 태반-유래 세포를 적절히 선택하는 것과 연관이 있는 것으로 보인다. 신테닌의 N 말단 부분 및 신테닌 자체는 융합 폴리펩타이드 작제물로 삽입되는 위치에 거의 상관없이 예외적으로 많은 수의 리소솜 단백질을 EV로 운반할 수 있기 때문에 특히 유리한 EV 풍부화 폴리펩타이드이다. 이는 또한 막-연합, 막관통 및 용해성 리소솜 단백질을 생물활성을 유지하면서 EV로 운반할 수 있다.

[0028] 본 발명의 다른 실시형태에서, 리소솜 단백질은 알파-D-만노시다제, N-아스파틸-베타-글루코사미니다제, 리소솜 산 리파제(lysosomal acid lipase), 시스티노신(cystinosin), 리소솜 연합 막단백질-2(lysosomal associated membrane protein-2: LAMP2), 알파-갈락토시다제 A, 산 세라미다제(acid ceramidase), 알파-푸코시다제, 카텡신 A, 산 베타-글루코시다제(acid beta-glucosidase), 베타-갈락토시다제, 베타-헥소사미니다제(beta-hexosaminidase) A, 베타-헥소사미니다제 B, GlcNAc-1-인산전이효소, 베타-갈락토실세라미다제, 리소솜산 리파제, 아릴설파타제(arylsulfatase) A, 알파-L-이두로니다제, 이두로네이트-2-설파타제(iduronate-2-sulphatase), 파라 설파미다제(paran sulphamidase), 아세틸 알파-글루코사미니다제, 아세틸 CoA: 알파-글루코사미니드-N-아세틸전이효소, N-아세틸 글루코사민-6-설파타제, N-아세틸 갈락토사민-6-설파타제, 히알루로니다제, 아세틸 갈락토사민-4-설파타제, 베타-글루쿠로니다제, 알파-N-아세틸 뉴라미니다제, N-아세틸글루코사민-1-인산전이효소, 뮤코리핀-1(mucolipin-1), 포밀글리신-생성 효소(formylglycine-generating enzyme), 팔미토일-단백질 티오에스터라제-1, 트리펩티딜 펩티다제 I, 시스테인 스트링 단백질(cysteine string protein), CLN3p, CLN5p, CLN6p, CLN7p, CLN8p, 산 스팅고마이엘리나제(acid sphingomyelinase), NPC 1, NPC 2, 산 알파-글루코시다제(acid alpha-glucosidase), 카텡신 K, 시알린(sialin), 알파-N-아세틸갈락토사미니다제, GM2 활성화제, 리소솜 산 리파제, 및 이들의 유도체, 부분, 도메인 및/임의의 조합을 포함하는 군으로부터 선택된다.

[0029] 본 발명에 따른 특히 바람직한 실시형태에서, 리소솜 단백질은 리소솜 막 단백질, 바람직하게는 NPC1이다. NPC1은 조작될 수 있고, 천연상태로 AE-EV, MSC-EV 및/또는 P-EV 내로 적재될 수 있으나, NPC1 단백질 및 신테닌, 신테닌의 N 말단, 및/또는 CD63 중 하나 또는 둘 이상을 포함하는 융합 폴리펩타이드 작제물의 사용을 통해서도 EV로 적재될 수 있다. 본 발명의 다른 바람직한 실시형태는 리소솜 단백질 LAMP2[예컨대, 다논 질환(Danon's disease)의 치료를 위해], 시알린[예컨대, 살라 질환(Salla disease)], 유아 유리 시알산 저장 질환(infantile free sialic acid storage disease)의 치료를 위해], CIC5[X-링크 과칼슘뇨성 신장결석증(X-linked hypercalciuric nephrolithiasis)], CLN3[바텐병(Batten disease)], 또는 시스티노신(시스틴증), 및/또는 GM2-활성화 단백질[GM2 강글리오사이드축적증(gangliosidosis)] 중 하나 또는 둘 이상을 포함하는 폴리펩타이드 작

제물을 포함하는 EV를 포함한다.

- [0030] 추가 실시형태에서, 본 발명에 따른 EV는 재생 및 면역-조절 효과뿐만 아니라 LSD 치료를 위한 적절한 약물동태학적 프로파일과 관련되는 것으로 보이는 다양한 단백질 마커에 대해 양성적으로 선택된다. 가장 생물활성적인 EV는 다음 폴리펩타이드 중 하나(종종 적어도 셋)에 양성적이다: CD63, CD81, CD44, SSEA4, CD133, CD24.
- [0031] 또다른 실시형태에서, 본 발명자는 본 발명의 EV 근원으로부터의 EV가 유전자 조작없이도 다양한 LSD에 본연의 효과를 갖는다는 것을 깨달았다. 이는 EV 내에 상이한 Hsp 단백질 패밀리 유래 다양한 열충격 단백질(Hsps), 예를 들어 Hsp90, Hsp70 - 이 패밀리 중 가장 중요한 단백질은 열충격 70kDa 단백질 8(HSPA8 유전자에 의해 암호화되고 Hsp70-8로도 알려져 있음)이다 - 및/또는 Hsp40이 존재한 결과로 추정된다. 하지만, 다른 세포 근원으로부터의 EV에서는 유사한 치료 효과가 관찰되지 않았기 때문에, 비변형 AE-EV, MSC-EV, 및 P-EV의 고유 활성화에 중요한 다른 요인이 있는 것으로 보인다.
- [0032] 열충격 단백질은 올바른 구조로 단백질을 폴딩하는 것을 돕는 샤페론(chaperone)으로 작용하는 것으로 알려져 있다. 본 발명자는 리소솜 단백질을 내생적으로 생산하고 EV에 적재하기 위해 변형할 때, 내생적으로 생산된 리소솜 단백질이 올바르게 폴딩되도록 하여 높은 생물활성을 나타내도록 하는 열충격 단백질을 높은 수준으로 포함하는 EV를 생산하는 특정 세포형을 처음으로 기술하였다. 이러한 전략의 두 번째 이점은 본래 열충격 단백질 - EV-생산 세포 자체에 의해 생성되어 번역 후 변형을 갖고 EV 보호 환경 내에서 표적 세포로 운반되는 - 이 풍부한 EV로 리소솜 저장 장애 환자를 치료하는 것이 환자의 세포에 이미 존재하는 임의의 돌연변이 리소솜 단백질의 폴딩 또한 개선하는 것으로 생각된다는 것이다. 이는 이들 세포 근원으로부터의 비-조작 EV에 나타나는 고유의 이점을 설명할 수 있다.
- [0033] 선행기술, 예를 들어 W02016/044947과 달리, EV-생산 세포 근원의 선택은 정확하게 폴딩된 치료적 리소솜 단백질을 EV에 개체군-전체, 고-효율로 적재하는 것을 달성하기 위한 열쇠이다. W02016/044947과는 대조적으로, 본 발명자는 치료적 리소솜 단백질을 EV에 내생적으로 적재하는 것이 정확하게 폴딩되고 기능적인 치료적 리소솜 단백질(리소솜 효소 및 리소솜 수송체 모두)을 생물활성적으로 전달하는 것을 달성하기 위한 우수한 접근법이라는 것을 깨달았다. W02016/044947은 샤페론 형성 이후에 인위적으로, 외생적으로 엑소솜에 첨가된 샤페론(열충격 단백질과 같은)이 치료를 촉진할 것이라고 말하지만, 열충격 단백질의 도움으로 정확한 폴딩을 유지하면서 올바른 세포 내 구획에 배치되는 정확하게 폴딩된 단백질을 갖는 EV의 생산에서 천연의 열충격 단백질 및 다른 천연의 EV 구성요소의 역할에 대한 이해가 없다는 것이 W02016/044947의 외생적 적재 접근법으로부터 명백하다.
- [0034] 따라서, 바람직한 실시형태에서, 본 발명의 EV-생산 세포 및 이 세포에 의해 생산된 EV는 모두 치료적 리소솜 단백질뿐만 아니라 적어도 하나의 열충격 단백질, 바람직하게는 열충격 단백질 70kDa 단백질 8을 포함하는 폴리펩타이드 작제물을 포함한다. W02016/044947과 달리 열충격 단백질이 EV-생산 세포에 본래 존재한다는 사실은 이 내생적 열충격 단백질이 그들의 생성 시점부터 EV에 존재한다는 것을 의미하고, 그러므로 복잡하고 민감한 치료적 리소솜 단백질이 처음부터, 즉, EV에 혼합되기 이전부터 정확하게 폴딩된다는 것, 그리고 이들이 세포에 의해 EV가 생성되는 동안, 심지어는 세포로부터 EV가 분비된 이후뿐만 아니라, 정제 과정에서조차 정확한 폴딩 구조를 유지한다는 것을 보장하며, 이는 제품의 저장수명 연장을 기대하게 한다.
- [0035] 또한, 열충격 단백질 자체가 내인성이고 따라서 EV-생산 세포에 의해 올바르게 번역 후 변형된다는 사실은 보다 나은 샤페론 활성화, 그리고 이에 따라 아마도 리소솜 단백질의 보다 나은 치료적 활성을 제공할 것이다. 종합하면, 본 발명의 세포가 선택된 생산 세포형에 내생적으로 존재하는 열충격 단백질과 조합하여 내생적으로 생산된 리소솜 단백질을 사용한다는 사실은 외인적으로 적재된 리소솜 단백질에 비교하여 유의적으로 보다 나은 폴딩, 및 이에 따라 보다 안정하고, 오래 존재하고, 생물활성적으로 리소솜 단백질을 EV에 적재하는 결과를 초래한다. 또한, 내생적으로 적재되고 내생적으로 샤페론 작용된 리소솜 단백질은 치료 단백질의 생물활성을 다시 연장하는 표적 세포에 전달될 때 올바른 폴딩 구조를 유지한다.
- [0036] 따라서, 본 발명에서 정확한 세포 내 구획으로 전달하는데 기여하는 EV 단백질체 지문, 정확하게 폴딩된 치료적 리소솜 단백질, 및 높은 수의 리소솜 단백질이 개체군-전체에 존재하는 것의 조합은 높은 잠재력, 개선된 고유의 면역-조절 효과, 및 제품의 낮은 가격과 함께 치료적 단백질의 세포 내 전달을 강화하는 측면에서 광범위한 영향을 갖는 유일한 접근법을 제시한다.
- [0037] 따라서, 하나의 유리한 실시형태에서, 본 발명은 AE, MSC 및/또는 P-유래 EV의 개체군을 포함하는 조성물에 관한 것으로, 여기서 적어도 50%, 60%, 또는 70%의 EV가 치료적 리소솜 단백질 양성이고, 보다 바람직하게는 적어도 75%의 EV가 치료적 리소솜 단백질 양성이고, 보다 바람직하게는 적어도 90%의 EV가 치료적 리소솜 단백질 양

성이고, 그리고/또는 보다 바람직하게는 적어도 95%의 EV가 치료적 리소솜 단백질 양성이다. 중요하게는, 단백질이 정확한 폴딩을 유지하도록 돕는 열충격 단백질을 포함하는 EV 내에 내인적으로 적재한 결과에 따라, 본 발명의 치료적 리소솜 단백질은 정확하게 폴딩된다.

- [0038] 본 발명에 따른 LSD 치료를 위한 매우 유력한 EV의 비-제한적 예시는 다음을 포함한다:
- [0039] - 치료적 리소솜 단백질뿐만 아니라 열충격 단백질 70kDa 단백질 8과 같은 적어도 하나의 천연 열충격 단백질을 포함하는 폴리펩타이드 작제물의 복수의 복제물을 포함하는 MSC-EV 또는 AE-EV.
- [0040] - 리소솜 단백질-신테닌, 리소솜 단백질-신테닌의 N 말단 부분, 또는 리소솜 단백질-CD63을 포함하는 폴리펩타이드 작제물을 포함하는 AE-EV. 특히 바람직한 예시는 NPC1-신테닌, NPC1-신테닌 N 말단 부분, 또는 NPC1-CD63을 포함하는 폴리펩타이드 작제물을 포함하는 AE-EV.
- [0041] - NPC1-신테닌, NPC1-신테닌 N 말단 부분, 또는 NPC1-CD63을 포함하는 폴리펩타이드 작제물을 포함하고, CD63, CD81, CD44, SSEA4, CD133, CD24 중 적어도 하나에 양성인 AE-EV. 다른 LSD 치료제를 개발할 때에는 자연히 다른 리소솜 단백질이 상기 NPC1 단백질을 대신할 것이다.
- [0042] - 위에 따른 폴리펩타이드 작제물을 포함하고, 적어도 하나의 Hsp, 바람직하게는 Hsp40, Hsp70(바람직하게는 Hsp70-8), 및/또는 Hsp90 또는 이들의 유도체 또는 도메인 중 하나 또는 둘 이상을 더 포함하는 AE-EV.
- [0043] - 복수의 임의의 리소솜 단백질, 바람직하게는 AMP2, 시알린, CIC5, CLN3, 시스티노신, GM2-활성화 단백질, 또는 NPC1와 같은 막관통 리소솜 단백질을 포함하는 폴리펩타이드 작제물을 포함하도록 조작된 AE-EV 및/또는 MSC-EV.
- [0044] - 천연 AE-EV 및 MSC(예컨대, 양막 조직, 태반 조직, 와튼 젤리, 골수, 또는 지방 조직으로부터 얻을 수 있음) 또한 비변형 형태로, 특히 이들이 적어도 하나의 Hsp를 포함하는 경우 치료적으로 이용될 수 있다.
- [0045] 중요하게는, EV-생산 AE, MSC, 및 태반-유래 세포를 최적화하기 위한 본 발명의 조작 전략은 리소솜 단백질(들)을 AE-EV, MSC-EV 및 P-EV에 매우 효율적으로 적재할 수 있게 한다. 전형적으로, 본 발명에 따른 각각 및 모든 EV는 적어도 5 내지 10 카피의 폴리펩타이드 작제물(및 따라서 리소솜 단백질)를 포함하지만, 많은 경우 10 카피 이상, 예를 들어 20 내지 30 카피 정도, 또는 30 내지 50 카피 정도, 또는 50 카피 이상, 예를 들어 75 또는 100 카피 정도의 리소솜 단백질을 포함한다. 분명히, 이것은 치료 효과를 위해 매우 중요하며, 최적의 조작 전략, 세포 근원, 및 EV 프로파일의 의도적인 선택뿐만 아니라, 이러한 EV를 생산 및 수득하기 위한 독창적인 방법 없이는 달성할 수 없을 것이다.
- [0046] 추가 실시형태에서, EV는 기관, 조직 또는 세포 표적화 펩타이드 및/또는 폴리펩타이드를 더 포함할 수 있다. EV를 뇌 및 CNS로 운반하는데 유력한 것으로 입증된 표적화 펩타이드의 예시는 광견병 바이러스 당단백질(rabies virus glycoprotein: RVG) 펩타이드이지만, 다른 펩타이드 및 폴리펩타이드 또한 본 발명의 범위에 있다. 중요하게는, 조직 표적화 펩타이드 및/또는 폴리펩타이드는 리소솜 폴리펩타이드(및 선택적으로 EV 풍부화 폴리펩타이드)를 포함하는 폴리펩타이드 작제물에 포함될 수 있고, 그리고/또는 EV 내에 별개의 폴리펩타이드 작제물로 존재할 수 있다. 이 표적화 펩타이드 및/또는 폴리펩타이드가 별개의 폴리펩타이드 작제물의 부분인 경우, 바람직하게는 EV 내 효과적인 적재를 위해 엑소솜 단백질에 융합된다.
- [0047] 추가 양상에서, 본 발명은 적어도 하나의 리소솜 단백질 및 적어도 하나의 EV 풍부화 폴리펩타이드를 포함하는 폴리펩타이드 작제물에 관한 것이다. 위에서 언급했듯이, 이러한 폴리펩타이드 작제물은 임의의 EV 단백질(즉, EV 풍부화 폴리펩타이드)를 포함할 수 있지만, CD63 및 신테닌 및 신테닌의 일부분과 같은 특정 EV 풍부화 폴리펩타이드가 매우 바람직하다. 또한, 위에서 언급했듯이, 추가 요소, 예를 들어 (i) 표적화 펩타이드 및/또는 폴리펩타이드, (ii) 폴드-온 도메인(fold-on domain) 또는 루신 지퍼 도메인(leucine zipper domain)과 같은 다중화 도메인, (iii) 링커 및 절단 또는 방출 도메인, 등이 본 발명에 따른 폴리펩타이드 작제물에 포함될 수 있다. 유리한 실시형태에서, 이 폴리펩타이드 작제물은 NPC1, LAMP2, 시알린, CIC5, CLN3, 시스티노신, 또는 GM2-활성화 단백질 중 하나 이상과 같은 리소솜 단백질을 포함한다.
- [0048] 또 다른 양상에서, 본 발명은 본 발명에 따른 폴리펩타이드 작제물을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 작제물에 관한 것이다. 이러한 폴리뉴클레오타이드 작제물은 다양한 벡터를 사용하여 생체 내, 생체 외, 및/또는 시험관 내에서 자연적으로 발현될 수 있다. 이 본 발명에 따른 폴리뉴클레오타이드 작제물을 포함하는 적합한 벡터는 또 다른 양상에서: 플라스미드; 미니-서클; 실질적으로 원형화된 폴리뉴클레오타이드의 임의의 형태; 아데노바이러스, 아데노-관련 바이러스, 렌티바이러스, 및/또는 캡시드-프리 바이러스와 같은 바이러스; 선형 DNA 및/또

는 RNA 폴리뉴클레오타이드; 메신저 RNA(mRNA); 및/또는 변형된 mRNA를 포함한다.

- [0049] 추가 양상에서, 본 발명은 본 명세서에 기술된 하나 또는 그 이상의 폴리펩타이드 작제물, 폴리뉴클레오타이드 작제물, 또는 벡터를 포함하는 세포에 관한 것이다. 당연히, 본 발명에 따른 EV-생산 세포는 바람직하게는 중간엽 줄기세포(MSC), 양막 상피 세포(AE) 및/또는 태반-유래 세포이지만, 임의의 다른 세포 또한 사용될 수 있다. EV-생산 세포는 시험관 내, 예컨대, 세포배양물 내, 또는 임의의 생체 외 또는 생체 내 시스템 내에 존재할 수 있다. 본 발명에 따른 세포는 EV의 지속적인 생산을 위해 선택적으로 불멸될 수 있다.
- [0050] 본 발명의 바람직한 실시형태에서, EV-생산 MSC, AE 또는 태반-유래 세포는 적어도 하나의 치료적 리소솜 단백질을 포함하는 적어도 하나의 폴리펩타이드 작제물, 이 폴리펩타이드 작제물을 암호화하는 적어도 하나의 폴리뉴클레오타이드 작제물 및/또는 본 발명에 따른 적어도 하나의 벡터를 포함한다. 본 발명의 세포는 이 폴리뉴클레오타이드 작제물(플라스미드, mRNA, 선형 DNA 분자, 바이러스 또는 바이러스 게놈, 등과 같은 벡터의 형태로 존재할 수 있음)를 포함하도록 전형적으로 조작되며, 이 폴리뉴클레오타이드 작제물은 세포 시스템에 의해 해당 폴리펩타이드 작제물로 발현되고 이에 따라 이 세포에 의해 생산된 EV, 일반적인 엑소솜 및/또는 미세소포에 통합된다. 따라서, 이 세포는 일반적으로 초기에 폴리뉴클레오타이드 작제물(또는 이 작제물을 포함하는 벡터)를 포함하고, 폴리펩타이드 작제물의 발현 및 번역이 완료될 때 이 세포는 이 폴리뉴클레오타이드 및 해당 폴리펩타이드 작제물을 모두 포함할 것이며, 이 폴리펩타이드 작제물은 일반적으로 EV-매개 엑소시토시스(exocytosis)에 의해 세포 외부로 분비되고, 여기서 각각 및 모든 EV는 복수 카피의 이 폴리펩타이드 작제물을 포함한다.
- [0051] 이 폴리펩타이드 작제물은 적어도 하나의 치료적 리소솜 단백질을 포함하고, 선택적으로 적어도 하나의 EV 풍부화 폴리펩타이드, 예를 들어 CD63, 신테닌, 신테칸, Alix, 또는 임의의 다른 EV 풍부화 폴리펩타이드와 함께 하나의 폴리펩타이드 작제물에 결합된 치료적 리소솜 단백질을 포함하고, 이 EV 풍부화 폴리펩타이드는 폴리뉴클레오타이드 및 폴리펩타이드 수준에서 치료적 리소솜 단백질에 작동 가능하게 연결될 수 있다.
- [0052] 본 발명의 EV-생산 MSC, AE 또는 태반-유래 세포는 바람직하게는 다음을 포함할 수 있다: (a) EV-생산 세포에 안정적으로 삽입되는 적어도 하나의 리소솜 단백질을 포함하는 폴리펩타이드 작제물을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 작제물; 및/또는 (b) 적어도 하나의 리소솜 단백질을 포함하는 폴리펩타이드 작제물, 위에서 언급하였듯이, 적어도 하나의 EV 풍부화 폴리펩타이드를 선택적으로 더 포함할 수 있다. 안정하게(유전적으로) 조작된 EV-생산 세포 근원을 창조하는 것이 재생할 수 있는 치료적 효과를 갖고 화학합성, 공장생산 및 품질관리(CMC)의 관점에서 재생할 수 있는 동일성을 갖는 EV의 안정화 및 고-효율 생산을 위한 열쇠이다. 안정한 세포는 일반적으로 예를 들어 hTERT 불멸화, 바이러스 불멸화, 및/또는 조건적 불멸화 전략을 사용하여 불멸화된다. 스케일로 EV 생산을 가능하게 하기 위해, EV-생산 세포가 특정 개체군 배가(population doubling: PDL)의 수치, 바람직하게는 적어도 20 PDL, 보다 바람직하게는 적어도 50 PDL, 보다 바람직하게는 적어도 70 PDL, 보다 바람직하게는 적어도 100 또는 적어도 200 PDL 이상의 폴리뉴클레오타이드 작제물(바람직하게는 적절한 벡터 내에서)를 안정적으로 포함하는 것이 바람직하다.
- [0053] 본 발명의 바람직한 양상에서, EV-생산 MSC, AE 또는 태반-유래 세포에 의해 생산된 적어도 50% 또는 60%, 바람직하게는 적어도 70% 또는 80%, 보다 바람직하게는 90% 또는 95% 또는 그 이상의 EV는 적어도 하나의 리소솜 단백질을 포함하는 폴리펩타이드 작제물을 포함한다.
- [0054] 본 발명의 다른 바람직한 양상에서, 이 EV-생산 MSC, AE 또는 태반-유래 세포에 의해 생산된 EV는 적어도 10, 20, 30 또는 40 카피, 바람직하게는 적어도 50 카피의 리소솜 단백질, 보다 바람직하게는 이 리소솜 단백질을 포함하는 적어도 70, 80 또는 100 카피의 폴리펩타이드 작제물을 포함한다. EV 내 치료적 리소솜 단백질의 높은 카피수 및 치료적 리소솜 단백질이 개체군-전체에 걸쳐 존재하는 것은 본 발명의 세포 근원의 혁신적인 선택으로부터 야기되지만, 필요할 때 EV 풍부화 폴리펩타이드의 잠재적인 포섭에 의해서뿐만 아니라, 지속적인 EV 생산을 위해 안정적으로 조작된 세포의 창조에 의해서도 야기된다.
- [0055] 다른 양상에서, EV-생산 MSC, AE 또는 태반-유래 세포는 바람직하게는 다음의 천연 단백질 중 하나 또는 둘 이상을 포함한다: CD63, CD81, CD44, CD49e, CD105, SSEA4, CD133, CD24, 및/또는 열충격 70kDa 단백질 8. 보다 바람직하게는, EV-생산 MSC, AE 또는 태반-유래 세포는 다음의 천연 단백질을 포함한다: CD63, CD81, 및 열충격 70kDa 단백질 8. 세포 및 이에 상응하는 EV 내 이들 세 가지 천연 단백질들의 조합[및 보다 일반적으로 Hsp70-8과 조합된 테트라스판닌(tetraspanins)]은 고-수율 EV 생산, 정확한 폴딩 및 오랜 기간동안의 치료적 리소솜 단백질의 활성뿐만 아니라, 표적 세포 내 높은 구획으로 효율적이고 생물활성적으로 전달하는 것과 밀접하게 연관된다.

[0056] 세포 및 이에 상응하는 EV 내에 열충격 단백질, 예를 들어 열충격 70kDa 단백질 8과 같은 Hsp70 패밀리의 열충격 단백질이 계속해서 존재하는 것은 모든 치료적 리소솜 단백질의 폴딩 및 활성을 위해 중요하지만, 특히 NPC1, 시스티노신, 시알린, LAMP1, LAMP2, LAMP2A, PPT1, TPP1, CLN3, CLN6, CLN8, MFSD8, 글루코실세라미다제, LIMP2, Lgp85, 플로틸린-1(Flotillin-1), ATP6V1B1, ATP13A2, CLCN7, OSTM1, HGNSAT, LMBRD1, TRPML1, TRPML3, DIRC2, SPPL2A, DIRC2, DNAJC5, 및/또는 CLN5, 등과 같은 막관통 리소솜 단백질을 위해 중요하다. 이론에 구애받지 않고, 리소솜 막관통 단백질의 번역 상에서 세포 및 이 세포의 EV 내 천연 열충격 단백질(Hsp70-8와 같은)의 존재는 단백질의 정확한 폴딩을 생성하고 계속해서 유지하기 위한 열쇠라고 추측된다. 열충격 단백질 또는 소분자 샤페론과 같은 다른 샤페론의 지속적인 외인적 추가는 치료적 리소솜 막관통 단백질의 활성에 상당히 부정적인 영향을 미치는 이미 잘못 폴딩된 단백질을 구제할 수는 없을 것이다. 따라서 본 발명에서 세포 및 이 세포에 의해 생산된 상응하는 EV 내 천연 열충격 단백질을 높은 수준으로 갖는 EV-생산 세포의 선택.

[0057] 추가 양상에서, 본 발명은 또한 본 명세서에 기술된 복수의 EV, 적어도 하나의 폴리펩타이드 작제물, 적어도 하나의 폴리뉴클레오타이드, 및/또는 적어도 하나의 벡터, 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다. 중요하게는, 본 명세서의 생물학적 요소 모두 유리하게는 단독 또는 임의의 조합으로 약제학적 조성물에 포함될 수 있다. 일반적으로는, 본 발명의 약제학적 조성물은 EV 개체군 및 적합한 약제학적 담체, 첨가제 및/또는 부형제를 포함한다.

[0058] 다른 실시형태에서, 이 약제학적 조성물은 유리하게는 미글루스타트(miglustat), 아리모클로몰(arimoclomol), 헤파린, 트레할로스 및/또는 사이클로텍스트린, 및/또는 이들의 임의의 유도체와 같은 약제학적 물질을 더 포함할 수 있다. EV가 기능적 리소솜 단백질을 전달하고 이러한 약제학적 물질에 의해 효과가 강화되기 때문에 이들의 조합형은 높은 상승적 치료 효과를 초래할 수 있다. 흥미롭게도, 본 발명자는 또한 미글루스타트, 아리모클로몰, 및 사이클로텍스트린이 EV-생산 세포의 배양에 첨가되어 EV에 이 물질을 내인적으로 적재하고 치료 효과를 강화시키는 결과를 초래할 수 있음을 깨달았다. 이것은 약물을 EV에 적재하기 위한 매우 용이한 방법이고 본질적으로 EV-생산 AE, MSC, 또는 태반-유래 세포를 적합한 농도의 약물 존재 내에서 배양하는 것을 포함한다. 자연히, 본 발명의 약제학적 조성물은 특히 리소솜 저장 장애를 치료하기 위해 적합하지만 리소솜과 연관된 다른 질환 또한 본 명세서의 발명을 사용하여 치료될 수 있다. 이러한 질환은 파킨슨병, GBA를 갖는 파킨슨병, 알츠하이머병, 크론병, 등을 포함한다.

[0059] 본 발명에 따른 EV 사용 치료에 특히 관심있는 LSD는 다음의 비-제한적인 리스트의 질환을 포함한다: 알파-만노스축적증(Alpha-mannosidosis), 베타-만노스축적증, 아스파틸글루코사민뇨(Aspartylglucosaminuria), 콜레스테릴 에스터 저장 질환(Cholesteryl Ester Storage Disease), 시스틴증(Cystinosis), 다논병(Danon Disease), 파브리병(Farber Disease), 푸코스축적증(Fucosidosis), 갈락토시알리도시스(Galactosialidosis), 1형 고세병(Gaucher Disease Type I), 2형 고세병, 3형 고세병, 1형 GM1 강글리오사이드축적증(GM1 Gangliosidosis Type I), 2형 GM1 강글리오사이드축적증, 3형 GM1 강글리오사이드축적증, GM2-샌드호프병(GM2 - Sandhoff disease), GM2-테이-삭스병(GM2 - Tay-Sachs disease), GM2-강글리오사이드축적증, AB 변형, 뮤코리피드증(Mucopolipidosis) II, 크라베병(Krabbe Disease), 리소솜산 리파제 결핍(Lysosomal acid lipase deficiency), 이염성 백질디스트로피(Metachromatic Leukodystrophy), MPS I-후틀러증후군(MPS I - Hurler Syndrome), MPS I-샤이증후군(MPS I - Scheie Syndrome), MPS I 후틀러-샤이증후군(MPS I - Hurler-Scheie Syndrome), MPS II - 헌터증후군, MPS MA-A형 산필리포증후군(MPS IIIA - Sanfilippo Syndrome Type A), MPS NIB-B형 산필리포증후군, MPS NIB-C형 산필리포증후군, MPS NIB-D형 산필리포증후군, MPS IV-A형 모르키오(MPS IV -Morquio Type A), MPS IV - B형 모르키오, MPS IX-히알루로니다제 결핍(MPS IX - Hyaluronidase Deficiency), MPS VI-마로토-라미(MPS VI - Maroteaux-Lamy), MPS VII-슬라이증후군(MPS VII - Sly Syndrome), 뮤코리피드증 I-시알산증(Mucopolipidosis I - Sialidosis), 뮤코리피드증 NIC, 4형 뮤코리피드증, 다발성 설페타제 결핍(Multiple Sulfatase Deficiency), 신경 세로이드 리포푸신증(Neural Ceroid Lipofuscinosis) T1, 신경 세로이드 리포푸신증 T2, 신경 세로이드 리포푸신증 T3, 신경 세로이드 리포푸신증 T4, 신경 세로이드 리포푸신증 T5, 신경 세로이드 리포푸신증 T6, 신경 세로이드 리포푸신증 T7, 신경 세로이드 리포푸신증 T8, 신경 세로이드 리포푸신증 T9, 신경 세로이드 리포푸신증 T10, A형 니만-피크병(Niemann-Pick Disease Type A), B형 니만-피크병, C형 니만-피크병, 폼페병(Pompe Disease), 피크노디스토시스(Pycnodysostosis), 살라병(Salla Disease), 셴들러병(Schindler Disease) 및 월만병(Wolman Disease).

[0060] 추가 양상에서, 본 발명은 다음 중 하나 또는 둘 이상을 포함하는 조성물을 포유동물에 투여하는 것을 포함하는 포유동물의 리소솜 및/또는 임의의 다른 세포 구획에 리소솜 단백질의 양을 증가시키는 방법에 관한 것이다:

(i) EV, (ii) 적어도 하나의 폴리펩타이드 작제물, (iii) 적어도 하나의 폴리뉴클레오타이드 작제물, 및/또는 (iv) 적어도 하나의 벡터. 또한, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 치료가 필요한 대상의 LSD를 치료하는 방법에 관한 것이다: (i) 본 발명에 따른 EV 개체군을 포함하는 약제학적 조성물을 제공하는 단계 및 (ii) 체중 kg 당 적어도 10⁶개의 EV의 투여량으로 환자에 투여하는 단계. 중요하게는, 위에서 언급하였듯이, 이 치료적 개입은 폴리펩타이드 작제물, 폴리뉴클레오타이드 작제물, 및/또는 이런 폴리뉴클레오타이드 작제물을 포함하는 벡터를 환자에 투여하는 것을 대안적으로 포함할 수 있다. 이는 다양한 전달 벡터, 예컨대, 지질 나노입자 또는 중합체 또는 펩타이드-기반 전달 벡터를 사용하여 수행될 수 있다. 이 조성물, EV, 폴리뉴클레오타이드 및/또는 폴리펩타이드 작제물은 다양한 투여 경로, 예를 들어 피하 투여, 혈관내 및/또는 정맥내 투여, 경구(per os) 투여, 복강내 투여, 척추강내 투여, 뇌실내(intracerebroventricular) 투여 등을 통해 대상에 투여될 수 있다.

[0061] 실험 및 실시예

[0062] 재료 및 방법

[0063] 작제물 설계 및 클로닝: 적어도 하나의 리소솜 단백질 및 선택적으로 다른 폴리펩타이드 도메인(EV 풍부화 폴리펩타이드)을 포함하는 다양한 폴리펩타이드 작제물을 설계하고, 벡터에 클론화하고 몇몇 상이한 EV-생산 세포 근원, 특히 AE 세포, MSC 및 태반-유래 세포에서 생산하였다. ORF는 합성하고 포유동물 발현 벡터 pSF-CAG-Amp에 클론화하여 전형적으로 만들었다. 간단히 설명하면, 제조자의 지시(NEB)에 따라 합성된 DNA 및 벡터 플라스미드를 NotI 및 SalI 효소로 소화시켰다. 제한효소처리 및 정제된 DNA 단편들을 T4 리가제를 사용하여 제조자의 지시(NEB)에 따라 결합하였다. 압피실린-보충된 플레이트에서 박테리아 형질전환을 통해 성공적으로 결합된 경우를 선별하였다. 형질감염 플라스미드는 'maxi-prep'을 사용하여 제조자의 지시에 따라 준비하였다.

[0064] • 세포 배양 및 형질감염

[0065] 실험 설계 및 분석에 따라, 특정 경우에, 통상적인 2D 세포 배양에서 비-바이러스적 순간적 형질감염 및 엑소솜 생산을 수행하였고, 다른 경우에 안정한 세포주를 제작하기 위해 바이러스-매개 형질도입을 적용하였으며, 상이한 타입의 바이오리액터에서 배양하였다. 또한, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 작제물 및/또는 이 폴리뉴클레오타이드 작제물이 포함된 적합한 벡터의 비-바이러스적 형질감염을 사용하여 안정하게 조작된 EV-생산 세포를 생산하였다. 간단 명료함을 위해, 본 명세서에서는 몇 가지의 실시예만을 언급한다.

[0066] 리소솜 단백질 및 EV 폴리펩타이드의 다양한 조합을 위한 안정한 세포주의 바이러스적 형질도입 및 바이러스적 제작의 경우, BM-MS, WJ-MS, 양막 상피 세포, 양막 중간엽 줄기세포, 또는 태반-유래 세포와 같은 세포 근원을 렌티바이러스(LV)를 사용하는 전형적인 방법으로 바이러스-형질도입하였다. 전형적으로, 2 μ l의 LV 및 선택적으로 폴리브렌(Polybrene)[또는 브로민화 헥사다이메트린(hexadimethrine bromide), 웰 상 최종농도 8 μ g/ml]을 세포 배양에 첨가하고, 형질도입 24시간 후 형질도입된 세포의 배지를 신선한 완전 배지로 교체한다. 형질도입 72시간 후에, 퓨로마이신(puromycin) 선별(4 내지 6 μ g/ml)을 일반적으로 7일 동안 수행하고 관심 단백질, 대표적으로 리소솜 단백질 및 선택적으로 EV 풍부화 폴리펩타이드와 같은 다른 폴리펩타이드를 포함하는 폴리펩타이드 작제물의 안정한 발현을 분석한다. 안정적으로 변형된 MSC(예를 들어 골수, 와튼 젤리, 지방 조직, 양막 조직, 양수, 등으로부터의), AE 세포 또는 태반-유래 세포를 예를 들어 화학-기반 형질감염 및/또는 물리적 형질감염 방법을 적용하는 비-바이러스적 방법을 사용하여 제작하였다. 화학적 형질감염 방법은 양이온 지질 및/또는 리포솜(종종 리포펙션(lipofection)이라고도 함), 양이온 중합체, 덴드리머(dendrimer), 인산칼슘, 다이에틸아미노에틸텍스트란 및/또는 이들의 조합과 같은 예컨대, 지질-기반 제제를 사용하여 폴리뉴클레오타이드 및/또는 이 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터를 도입하는 것을 포함하였다. 물리적 방법은 전기천공법(electroporation), 세포 스퀴징(cell squeezing), 미량주사법(microinjection) 등 뿐만 아니라, 당업자에 알려진 안정한 세포주를 창조하기 위한 다양한 다른 물리적 방법을 포함하였다. 안정한 세포주를 창조하기 위한 물리적 및 화학적 방법은 예를 들어 전기천공법과 함께 리포펙션 또는 양이온 중합체를 조합하는 것, 또는 당업자에 알려진 안정한 세포를 창조하기 위한 임의의 다른 조합으로 조합될 수 있다.

[0067] 안정한 세포를 2D 배양 또는 바이오리액터, 대표적으로 할로우-파이버 바이오리액터(hollow-fibre bioreactor) 및/또는 스티어-탱크 바이오리액터(stir-tank bioreactor) 및/또는 웨이브백(Wave bag)과 같은 셰이킹 바이오리액터(shaking bioreactor)에서 배양하였고, 이후 엑소솜 준비를 위해 조건배지를 수확하였다. 세포가 부유된 상태로 배양되었을 때(예컨대, 양막-유래 세포), 다양한 제조 및 정제 단계를 수행하였다. 표준 작업흐름은 상등액의 전-청소, 여과-기반 농축, 단백질 오염물의 크로마토그래피-기반 제거, 및 시험관 내 및/또는 생체 내 분석을 위해 적합한 완충제로 얻어진 엑소솜 조성물의 선택적인 제형화의 단계를 포함한다.

[0068] • 분석

[0069] 웨스턴블롯은 EV 내 폴리펩타이드 작제물 풍부화를 평가하기 위한 매우 편리한 분석방법이다. 간단히 설명하면, 제조자의 지시(Invitrogen, Novex PAGE 4-12% 겔)에 따라 SDS-PAGE를 수행하였고, 여기서 1×10^{10} 엑소좀 및 20 μ g 세포 용해물을 각 웰에 로딩하였다. 제조자의 지시(Immobilon, Invitrogen)에 따라 SDS-PAGE 겔에서 단백질을 PVDF 막으로 이동시켰다. 막을 Odyssey 블로킹 완충액(Licor)으로 블로킹하고 공급자의 지시(1차 항체 - Abeam, 2차 항체 - Licor)에 따라 리소솜 단백질 및/또는 엑소좀 단백질에 대한 항체로 탐침조사하였다. 680 및 800nm 파장에서 분자탐침을 가시화하였다. EV의 크기를 결정하기 위해, 분석 소프트웨어가 갖추어진 NanoSight 장치를 사용하여 나노입자 추적 분석(NTA)을 수행하였다. 모든 기록을 위해, 모든 획득-후 설정으로 13 또는 15의 카메라 레벨 및 자동 기능을 사용하였다. EV의 세포 내 위치 및 방출을 이해하기 위해, 그리고 정량 및 분석을 위해 종종 전자현미경법 및 현광현미경법을 사용하였다.

[0070] EV를 다양한 방법, 대표적으로 TFF와 같은 여과 및 LC, 특히 비드-용출 LC 및 이온-교환 크로마토그래피의 조합을 사용하여 분리 및 정제하였다. 대표적으로, EV-함유 배양액을 수집하고, 300g에서 5분 동안 저속 회전을 적용한 다음, 크기가 큰 입자 및 세포 파편을 제거하기 위해 10분 동안 2000g 회전을 적용하였다. 대안적으로, 상등액, 특히 이 경우 부유세포의 전-청소를 위해 다양한 필터를 사용하였다. 이후 상등액을 0.22 μ m 시린지 필터로 여과하고 상이한 정제 단계를 적용하였다. 부피가 클 경우 희석여과(diafiltrate)하고 100 kDa 컷오프 필터를 사용한 Vivaflow 50R tangential flow(TFF) 장치(Sartorius) 또는 100 또는 300 kDa 컷오프 할로우 파이버 필터를 사용한 KR2i TFF 시스템(SpectrumLabs)을 사용하여 대략 20ml로 농축하였다. 이어서 전농축된 배양액을 AKTAprime plus 또는 AKTA Pure 25 크로마토그래피 시스템(GE Healthcare Life Sciences)에 연결된 비드-용출 칼럼(HiScreen 또는 HiTrap Capto Core 700 칼럼, GE Healthcare Life Sciences)에 로딩하였다. 이 절차에서 칼럼 평형, 시료 로딩 및 칼럼 청소를 위한 흐름률 설정은 제조자의 지시에 따라 선택하였다. 시료를 UV 흡광도 크로마토그램에 따라 수집하고 Amicon Ultra-15 10 kDa 분자량 컷-오프 회전-필터(Millipore)를 사용하여 최종 부피 100 μ l로 농축하고 추가 분석 때까지 -80 $^{\circ}$ C로 보관하였다. 단백질 및 RNA 용출 프로파일을 평가하기 위해, 배양액을 농축하고, 100 kDa 및 300 kDa 할로우 파이버 필터를 사용한 KR2i TFF 시스템으로 희석여과하고, Tricorn 10/300 Sepharose 4 Fast Flow(S4FF) 칼럼(GE Healthcare Life Sciences) 상에서 시료를 분석하였다.

[0071] • 실시예

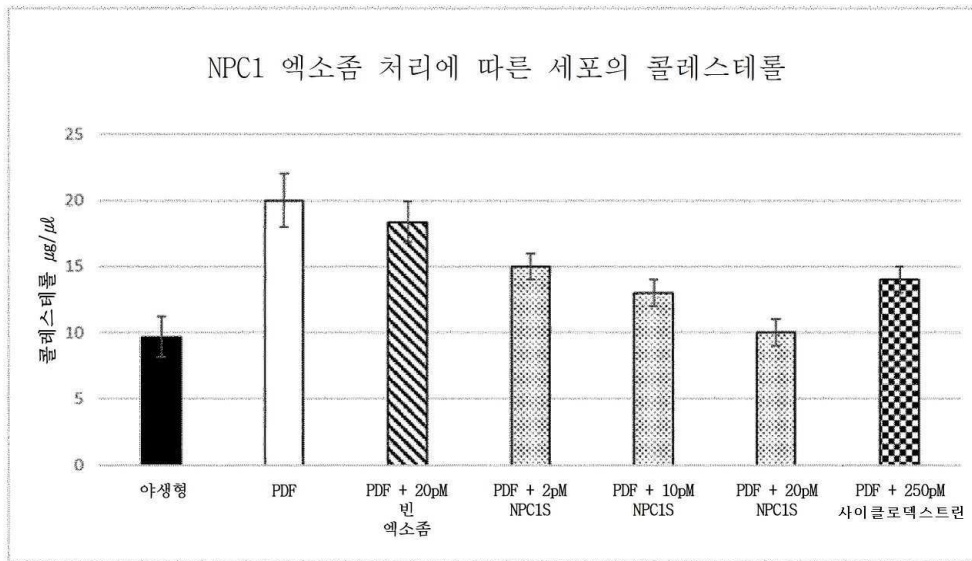
[0072] 실시예 1. 산후 태반에서 얻을 수 있는 양막 상피(AE) 세포를 NPC1 단백질 및 EV 풍부화 단백질 신테닌의 N-말단 부분(NPC1 S)(서열번호 2)을 포함하는 폴리펩타이드 작제물을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 작제물로 유전적으로 조작하였다(렌티바이러스 형질도입을 사용). AE 세포에 의해 생산된 AE-EV를 수확 및 정제하고 환자-유래 섬유아세포(PDF)에 콜레스테롤 운반을 높이는 이들의 능력을 시험관 내에서 평가하였다. 도 1에서 볼 수 있듯이, NPC1 AE-EV는 세포에 다량의 생물활성적 NPC1 단백질을 전달하여 표적 세포의 콜레스테롤 수준을 유의적으로 감소시켰다. 흥미롭게도, AE-EV 및 MSC-EV 만을 사용할 경우(및 다른 세포 근원을 사용하지 않고) 또한 EV 풍부화 폴리펩타이드의 존재없이 NPC1 단백질 그 자체를 발현하는 AE 세포를 유전적으로 조작하는 것에 의해 콜레스테롤 축적의 농도-의존적 감소를 달성하는 것이 가능하였다(데이터를 나타내지 않음). EV-생산 세포 및 이들의 생물활성적 EV는 모두 다양한 열충격 단백질, 중요하게는 Hsp70 패밀리 및 더 특별하게는 Hsp70-8에 양성적이었다.

[0073] 실시예 2. 와튼 젤리 MSC-유래 EV(WJ-MSC-EV, 와튼 젤리로부터 얻을 수 있음)를 리소솜 단백질 시스티노신 및 EV 풍부화 단백질 CD63을 포함하는 폴리펩타이드 작제물을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 작제물로 유전적으로 조작하였다. 시스티노신-함유 WJ-MSC-EV(CYS EV)를 WJ-MSC의 할로우-파이버 바이옱터 세포 배양으로부터 수확하고, 정제하고, 시험관 내 시스티노신 모델에서 시스티노신 축적 감소를 평가하기 위해 환자 유래 피부 섬유아세포(PDSF)에 대해 시험관 내 평가하였다. 도 2와 같이 CD63-시스티노신 폴리펩타이드 작제물을 포함하는 WJ-MSC-EV를 적용할 때 시스티노신이 크게 감소하는 것으로 나타났다. 실시예 1에서와 같이, WJ-MSC 및 WJ-MSC-EV는 Hsp70 단백질, 및 구체적으로 Hsp70-8뿐만 아니라, 테트라스파닌 CD63 및 CD81에 양성적이었다.

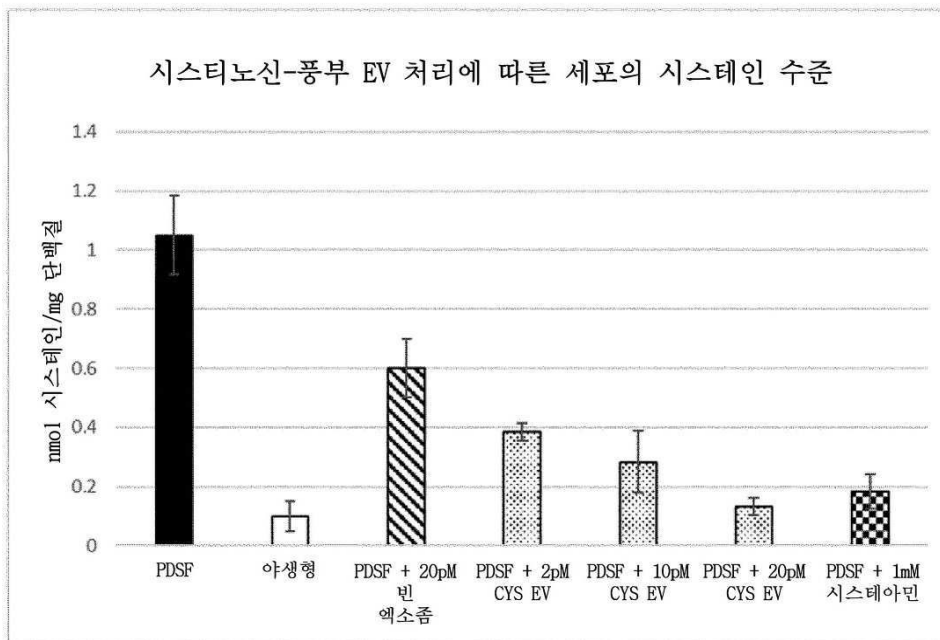
[0074] 실시예 3. CD44, SSEA4, CD133, CD24 및 Hsp70-8에 양성이고 복수의 NPC1-신테닌 폴리펩타이드 작제물을 포함하도록 조작된 AE-EV를 이중 녹아웃 니만-피크병 마우스 모델에서 생체 내 평가하였다. 조작된 AE-EV는 간 및 CNS 병리 모두에서 유의적인 치료적 효과를 나타냈다(도 3). 조작되지 않은 AE-EV 또한 AE-EV 내 높은 함량의 다양한 열충격 단백질에 의해 파생될 수 있는 치료적 잠재력을 나타냈다.

도면

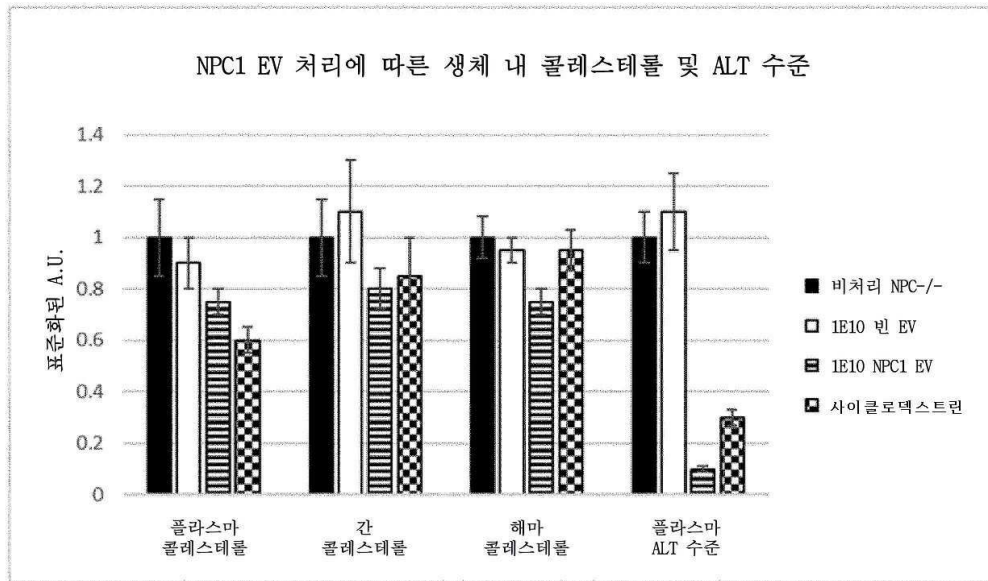
도면1



도면2



도면3



도면4

서열번호 1: 신테닌(인간)

MSLYPSLEDLK VDKVIQAQTA FSANPANPAI LSEASAPIPH DGNLYPRLYP ELSQYMGLSL
 NEEIEIRANVA VVSGAPLQGG LVARPSSINY MVAPVTGNDV GIRRAEIKQG IREVILCKDQ
 DGKIGLRLKS IDNGIFVQLV QANSPASLVG LRFQDQVLQI NGENCAGWSS DKAHKVLKQA
 FGEKITMTIR DRPFERTITM HKDSTGHVGF IFKNGKITSI VKDSSAARNG LLTEHNICEI
 NGQNVIGLKD SQIADILSTS GTVVITIMP AFIFEHIIKR MAPSIMKSLM DHTIPEV

서열번호 2: 신테닌의 N 말단 부분(인간)

RSLYPSLEDLKVDKVIQAQTAFSANPANPAILSEASAPIPHDGNLYPRLYPELSQYMGLSLEGG

서열번호 3: 트랜스페린 수용체 엔도솜 분류 도메인(인간)

MDQARSAFSN LFGGEPLSYT RFSLARQVDG DNSHVEMKLA VDEEENADNN TKANVTKPK

서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Evox Therapeutics Ltd

<120> Protein engineered extracellular vesicles

<130> WO 2019/092287

<150> PCT/EP2018/081122

<151> 2018-11-13

<150> GB1718681.8

<151> 2017-11-13

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 298

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ser Leu Tyr Pro Ser Leu Glu Asp Leu Lys Val Asp Lys Val Ile

1 5 10 15

Gln Ala Gln Thr Ala Phe Ser Ala Asn Pro Ala Asn Pro Ala Ile Leu

20 25 30

Ser Glu Ala Ser Ala Pro Ile Pro His Asp Gly Asn Leu Tyr Pro Arg

35 40 45

Leu Tyr Pro Glu Leu Ser Gln Tyr Met Gly Leu Ser Leu Asn Glu Glu

50 55 60

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

65 70 75 80

Gln Leu Val Ala Arg Pro Ser Ser Ile Asn Tyr Met Val Ala Pro Val

85 90 95

Thr Gly Asn Asp Val Gly Ile Arg Arg Ala Glu Ile Lys Gln Gly Ile

100 105 110

Arg Glu Val Ile Leu Cys Lys Asp Gln Asp Gly Lys Ile Gly Leu Arg

115 120 125

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

130 135 140

Ser Pro Ala Ser Leu Val Gly Leu Arg Phe Gly Asp Gln Val Leu Gln

145 150 155 160

Ile Asn Gly Glu Asn Cys Ala Gly Trp Ser Ser Asp Lys Ala His Lys

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Asp Gln Ala Arg Ser Ala Phe Ser Asn Leu Phe Gly Gly Glu Pro

1 5 10 15

Leu Ser Tyr Thr Arg Phe Ser Leu Ala Arg Gln Val Asp Gly Asp Asn

 20 25 30

Ser His Val Glu Met Lys Leu Ala Val Asp Glu Glu Glu Asn Ala Asp

 35 40 45

Asn Asn Thr Lys Ala Asn Val Thr Lys Pro Lys

 50 55