



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0029756

(43) 공개일자 2015년03월18일

- | | |
|--|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>C12N 15/867</i> (2006.01) <i>C12N 5/0735</i> (2010.01)
 <i>C12N 5/074</i> (2010.01) <i>C12N 5/0789</i> (2010.01)
 <i>C12N 5/10</i> (2006.01) <i>A61K 48/00</i> (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2015-7004059(분할)</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2012년06월08일
 심사청구일자 없음</p> <p>(62) 원출원 특허 10-2014-7000344
 원출원일자(국제) 2012년06월08일
 심사청구일자 2014년11월11일</p> <p>(85) 번역문제출일자 2015년02월13일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2012/041693</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2012/170911
 국제공개일자 2012년12월13일</p> <p>(30) 우선권주장
 61/495,857 2011년06월10일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
 블루버드 바이오, 인코포레이티드.
 미국, 매사추세츠 02139, 캄브리지, 840 메모리얼 드라이브)</p> <p>(72) 발명자
 디나로, 마리아, 조안
 미국, 매사추세츠 01945, 마블헤드, 39 피크윅 로드
 화이너, 미첼, 하워드
 미국, 캘리포니아 94062, 우드사이드, 21 오크 헤이븐 웨이
 버리스, 가보
 미국, 매사추세츠 02155, 메드퍼드, 44 미스틱 리버 로드</p> <p>(74) 대리인
 손민</p> |
|--|--|

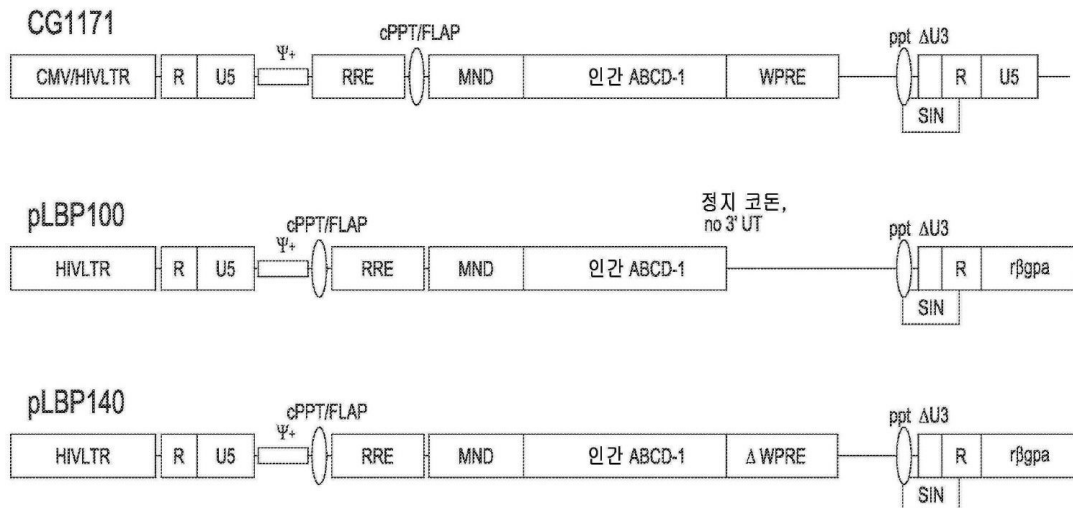
전체 청구항 수 : 총 41 항

(54) 발명의 명칭 부신백질이영양증 및 부신척수신경병증을 위한 유전자 요법 벡터

(57) 요약

본 발명은 레트로바이러스 벡터를 포함하는 조성물, 형질도입된 세포, 및 유전자 요법을 위해서 이들을 사용하는 방법을 제공한다. 특히, 본 발명은 부신백질이영양증 및/또는 부신척수신경병증을 갖는 대상체에게 유전자 요법을 제공하기 위한 렌티바이러스 벡터 및 이들 벡터로 형질도입된 세포에 관한 것이다.

대표도



특허청구의 범위

청구항 1

- (a) 좌측 (5') 레트로바이러스 LTR;
 - (b) 중앙 폴리퓨린 트랙트(tract)/DNA 플랩 (cPPT/FLAP);
 - (c) 레트로바이러스 익스포트(export) 요소;
 - (e) ATP-결합 카세트, 서브-패밀리 D, 구성원 1 (ABCD1) 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드에 작동적으로 연결된, 소교세포 내에서 활성인 프로모터; 및
 - (f) 우측 (3') 레트로바이러스 LTR을 포함하며;
- 우드척 (woodchuck) 전사-후 조절 요소 (WPRE)를 포함하지 않는 벡터.

청구항 2

제1항에 있어서, 렌티바이러스 벡터인 벡터.

청구항 3

제2항에 있어서, 렌티바이러스가 HIV인 벡터.

청구항 4

제2항에 있어서, 렌티바이러스가 HIV-1인 벡터.

청구항 5

제1항에 있어서, 5' LTR의 프로모터가 이중 프로모터로 대체된 벡터.

청구항 6

제5항에 있어서, 이중 프로모터가 사이토메갈로바이러스 (CMV) 프로모터, 라우스 육종 바이러스 (RSV) 프로모터, 또는 시미안 바이러스 40 (SV40) 프로모터인 벡터.

청구항 7

제5항에 있어서, 이중 프로모터가 CMV 프로모터인 벡터.

청구항 8

제1항에 있어서, 5' LTR 또는 3' LTR이 렌티바이러스 LTR인 벡터.

청구항 9

제1항에 있어서, 5' LTR 및 3' LTR이 렌티바이러스 LTR인 벡터.

청구항 10

제8항 또는 제9항에 있어서, 렌티바이러스가 HIV-1인 벡터.

청구항 11

제10항에 있어서, 3' LTR이 하나 이상의 변형을 포함하는 벡터.

청구항 12

제10항에 있어서, 3' LTR이 하나 이상의 결실을 포함하는 벡터.

청구항 13

제10항에 있어서, 3' LTR이 자기-불활성화 (SIN) LTR인 벡터.

청구항 14

제1항에 있어서, 레트로바이러스 익스포트 요소가 rev 반응 요소 (RRE)인 벡터.

청구항 15

제1항에 있어서, cPPT/FLAP가 HIV-1로부터 유래되는 벡터.

청구항 16

제1항에 있어서, 프로모터가 골수증식성 육종 바이러스 인핸서, 결실된 네거티브 제어 지역, d1587rev 프라이머-결합 부위 치환된 (MND) 프로모터 또는 그의 전사적으로 활성인 단편을 포함하는 벡터.

청구항 17

제1항에 있어서, ABCD1 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드가 cDNA인 벡터.

청구항 18

제17항에 있어서, cDNA가 최적화된 코작 서열을 포함하는 벡터.

청구항 19

제18항에 있어서, 최적 코작 서열이 (GCC)RCCATGG이며, 여기에서 R은 퓨린 (A 또는 G)인 벡터.

청구항 20

제1항에 있어서, 폴리뉴클레오타이드가 인간 ABCD1 폴리펩타이드를 인코딩하는 벡터.

청구항 21

- (a) 좌측 (5') LTR;
 - (b) cPPT/FLAP;
 - (c) RRE;
 - (d) 인간 ABCD1 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드에 작동적으로 연결된 MND 프로모터;
 - (e) 우측 (3') LTR; 및
 - (f) 폴리아데닐화 서열을 포함하며;
- 우드척 전사-후 조절 요소 (WPRE)를 포함하지 않는 렌티바이러스 벡터.

청구항 22

제21항에 있어서, 프사이 (Ψ) 패키징 신호를 포함하는 렌티바이러스 벡터.

청구항 23

제21항에 있어서, 폴리아데닐화 서열이 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 또는 시그날 토끼 β -글로빈 폴리아데닐화 서열인 렌티바이러스 벡터.

청구항 24

제21항에 있어서, 5' LTR 또는 3' LTR이 HIV-1로부터 유래되는 렌티바이러스 벡터.

청구항 25

제21항에 있어서, 3' LTR 이 SIN LTR인 렌티바이러스 벡터.

청구항 26

- (a) 좌측 (5') HIV-1 LTR;
 - (b) 프사이 (Ψ) 패키징 시그널;
 - (c) cPPT/FLAP;
 - (d) RRE;
 - (e) 인간 ABCD1 폴리펩타이드를 인코딩하는 cDNA에 작동적으로 연결된 MND 프로모터;
 - (f) 우측 (3') 자기-불활성화 (SIN) HIV-1 LTR; 및
 - (g) 토끼 β -글로빈 폴리아데닐화 서열을 포함하며;
- 우드척 전사-후 조절 요소 (WPRE)를 포함하지 않는 렌티바이러스 벡터.

청구항 27

제1항 내지 제26항 중의 어느 한 항의 벡터를 포함하는 포유동물 세포.

청구항 28

gag를 인코딩하는 제1 폴리뉴클레오타이드, pol을 인코딩하는 제2 폴리뉴클레오타이드, env를 인코딩하는 제3 폴리뉴클레오타이드, 및 제1항 내지 제26항 중의 어느 한 항의 벡터를 포함하는 패키징 세포.

청구항 29

제1항 내지 제26항 중의 어느 한 항의 벡터를 포함하는 생산자 세포.

청구항 30

제29항의 생산자 세포에 의해서 생산된 벡터 입자.

청구항 31

- (a) 적어도 하나의 LTR;
 - (b) 중앙 폴리퓨린 트랙트/DNA 플랩 (cPPT/FLAP);
 - (c) 레트로바이러스 익스포트 요소; 및
 - (e) ATP-결합 카세트, 서브-패밀리 D, 구성원 1 (ABCD1) 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드에 작동적으로 연결된, 소교세포 내에서 활성인 프로모터를 포함하며;
- 우드척 전사-후 조절 요소 (WPRE)를 포함하지 않는 벡터.

청구항 32

- (a) 적어도 하나의 LTR;
 - (b) cPPT/FLAP;
 - (c) RRE;
 - (d) 인간 ABCD1 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드에 작동적으로 연결된 MND 프로모터; 및
 - (e) 폴리아데닐화 서열을 포함하며;
- 우드척 전사-후 조절 요소 (WPRE)를 포함하지 않는 벡터.

청구항 33

- (a) 적어도 하나의 SIN HIV-1 LTR;
- (b) 프사이 (Ψ) 패키징 시그널;
- (c) cPPT/FLAP;

(d) RRE;

(e) 인간 ABCD1 폴리펩타이드를 인코딩하는 cDNA에 작동적으로 연결된 MND 프로모터; 및

(f) 토끼 β -글로빈 폴리아데닐화 서열을 포함하며;

우드척 전사-후 조절 요소 (WPPE)를 포함하지 않는 벡터.

청구항 34

제31항 내지 제33항 중의 어느 한 항의 벡터에 의해서 형질도입된 숙주 세포.

청구항 35

제34항에 있어서, 세포가 배아 줄기 세포, 체세포 줄기 세포 또는 선조 세포인 형질도입된 숙주 세포.

청구항 36

제35항에 있어서, 세포가 조혈 줄기 세포인 형질도입된 숙주 세포.

청구항 37

유전자 요법에서 제31항 내지 제33항 중의 어느 한 항의 바이러스 벡터의 용도.

청구항 38

제37항에 있어서, 유전자 요법이 부신백질이영양증 또는 부신척수신경병증을 치료 또는 예방하는 것인 용도.

청구항 39

대상체에게 제31항 내지 제33항 중의 어느 한 항의 벡터에 의해서 형질도입된 세포를 투여하는 것을 포함하여, 부신백질이영양증 또는 부신척수신경병증을 치료하는 방법.

청구항 40

제39항에 있어서, 세포가 배아 줄기 세포, 체세포 줄기 세포 또는 선조 세포인 방법.

청구항 41

제39항에 있어서, 세포가 조혈 줄기 세포인 방법.

명세서

기술분야

[0001] 관련된 출원에 대한 교차 참조

[0002] 본 출원은 본 발명에 온전히 참고로 포함된, 2011년 6월 10일에 출원된 미국 가출원 제61/495,857호를 35 U.S.C. § 119(e) 하에 우선권으로 주장한다.

[0003] 서열 목록에 관한 설명

[0004] 본 출원과 관련된 서열 목록은 서류 사본 대신에 텍스트 형식으로 제공되며, 이로써 본 명세서에 참고로 포함된다. 서열 목록을 함유하는 텍스트 파일의 명칭은 BLBD_003_01WO_ST25.txt이다. 텍스트 파일은 8 KB이며, 2012년 6월 8일에 만들어 졌고, 본 명세서의 제출과 동시에 EFS-Web을 통해서 전자 제출된다.

[0005] 본 출원은 일반적으로 유전자 요법 벡터에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 부신백질이영양증 및 부신척수신경병증을 위한 유전자 요법을 제공하는 렌티바이러스 벡터에 관한 것이다.

배경기술

[0006] 소아 대뇌 부신백질이영양증 (childhood cerebral adrenoleukodystrophy; CCALD)은 치료되지 않고, 식물 인간 상태를 초래하며, 진단 후 평균 5년 이내에 궁극적으로 사망하는, 소년 (발현 연령의 평균 연령 7세; 범위 3-15

세)에서의 매우 희귀하며, 때때로 급속 진행성인, x-연관된 유전적 신경 장애이다.

[0007] CCALD는 종종 초기에 애디슨병 (Addison's disease)으로 나타나지만, 진단은 통상적으로 자기공명영상 (MRI) 상에서의 대뇌 수초탈락의 확인 소견과 함께 주의력, 사고력, 집중력 및 그 밖의 다른 대뇌 기능의 "갑작스러운 (sudden)" 감소에 기반하여 이루어진다. 수초탈락 전에, 환자의 뇌의 MRI는 정상이며, 여기에 신경발달적 이상은 없다. 임상 경과를 처음에는 "느릴" 수 있으나, 뇌에서 마이엘린의 광범한 상실에 의해 급속 진행성이며 비가역적으로 될 수 있다. 용어 "느리다 (slow)" 및 "갑작스럽다 (sudden)"는 수초탈락의 지속기간이 명확히 알려져 있지 않지만, 인지 및 운동 기능의 빠른 감소가 미지의 이유로 어떤 시기에라도 나타날 수 있다는 점에서 상대적이다. 실제로, MRI 변화는 증상에 선행하며, 질병의 임상적 징후가 매우 적은 시기에 광범한 수초탈락과 함께 상당히 비정상적일 수 있다. 미국에서 x-연관된 부신백질이영양증 (ALD)의 발생률은 남아 출산의 약 1:21,000로서 약 35%는 발달성 (developing) CCALD이며; 약 35 내지 40 명의 소년이 매년 CCALD로 진단된다. 질병의 원인은 기능부전 또는 부신백질이영양증 단백질 (ALDP) 유전자 생성물의 부재를 유발하는 ATP-결합 카세트, 서브-패밀리 D (ALD), 구성원 1 (ABCD1) 유전자의 돌연변이이다. ALDP는 세포 퍼옥시좀에 국재화하며, 여기에서 이것은 매우 장쇄의 지방산 (VLCFA) (쇄 길이 > 20 탄소)을 세포 구조 및 기능을 유지시키는데 사용되는 더 짧은 지방산으로 분해시키는데 참여한다.

[0008] CCALD의 중추신경계 (CNS) 징후의 병태생리학은 잘 이해되지 않았지만, 수초탈락은 결합적 ALDP가 뇌 소교세포에서 그 과정을 지지하지 않기 때문에 대사될 수 없는 VLCFA의 국소 축적에 기인하여 일어난다. 이 질병의 급속 진행기는 아마도 마이엘린의 손실을 증가시키는 VLCFA에 의한 세포 단백질의 아실화에 의해서 야기되는 염증에 의해서 야기된다. CCALD의 급속 진행기는 수개월 이내에 소년을 정상 기능으로부터 심각한 장애를 가진 상태로 악화시킬 수 있다.

[0009] 유일하게 이용가능한 치료법은 기능적 ALDP를 생산하는 세포를 공급하기 위한 동종이계 조혈 줄기 세포 이식 (HCT)이다. 뇌 소교세포는 골수로부터 유래되기 때문에, 기능적 ALDP를 생산하는 세포를 사용한 완전히 부합된 (matched) 관련 공여자 인간 줄기 세포 이식은 잠재적으로 수초탈락을 개선시키거나 중지시킬 수 있다. 그러나, 동종이계 HCT의 경우에 질병을 안정화시키는데 12 내지 18 개월이 걸리고, 질병은 진행적 성질이 있기 때문에, 이식은 진단이 내려지면 가능한 한 빨리 이루어져야 한다. 이것은 때때로, 관련되거나 무관한 부합된 골수 줄기 세포 공여자를 찾는 데 필요한 소요시간 (lead times)으로 인하여 문제가 있다. 동종이계 줄기 세포의 사용은 또한 이식 실패의 위험 및 급성 및 만성 이식편 대 숙주 질환 (GVHD)의 발생을 나타낸다. 이들 합병증은 사망을 초래할 수 있으며, 무관한 공여자가 동종이계 조혈 줄기 세포의 공급원으로 이용되는 경우에는 발생률이 증가된다.

[0010] ALDP 대체의 또 다른 공급원은 부합되거나, 더욱 전형적으로는, 부분적으로 부합된 제대혈 세포 이식의 사용이다. 제대혈 줄기 세포 (CBSC)의 사용은 이식 실패의 위험 및 연장된 수혈 서포트를 필요로 하는 생착까지의 장시간으로 인하여 문제가 된다. 실제로, 모든 형태의 동종이계 HCT는 이식 관련된 사망률의 10-15% 위험, 및 만성 이식편 대 숙주 질환의 30%까지의 위험을 수반한다.

[0011] 따라서, 본 기술분야에서는 더 안전하고 더 효율적인 부신백질이영양증 치료법에 대한 필요성이 있다. 본 발명은 이들 및 그 밖의 다른 문제에 대한 해결책을 제공한다.

발명의 내용

[0012] 간단한 요약

[0013] 따라서, 본 명세서 전체적으로 다양한 위치에서 문구 "한가지 구체예에서" 또는 "구체예에서"의 출현은 반드시 모두 동일한 구체예를 나타내는 것은 아니다. 더욱이, 특별한 특성, 구조 또는 특징은 하나 이상의 구체예에서 임의의 적합한 방식으로 조합될 수 있다.

[0014] 다양한 구체예에서, 본 발명은 부분적으로, 좌측 (5') 레트로바이러스 LTR; 중앙 폴리퓨린 트랙트 (tract)/DNA 플랩 (flap) (cPPT/FLAP); 레트로바이러스 익스포트 (export) 요소; ATP-결합 카세트, 서브-패밀리 D, 구성원 1 (ABCD1) 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드에 작동적으로 연결된, 소교세포에서 활성인 프로모터; 및 우측 (3') 레트로바이러스 LTR을 포함하며, 우드척 (woodchuck) 전사-후 조절 요소 (WPRE)를 포함하지 않는 벡터를 고려한다.

[0015] 특별한 구체예에서, 벡터는 렌티바이러스 벡터이다.

- [0016] 관련된 구체예에서, 렌티바이러스는 HIV다.
- [0017] 더욱 특별한 구체예에서, 렌티바이러스는 HIV-1이다.
- [0018] 특징의 구체예에서, 5' LTR의 프로모터는 이중 프로모터로 대체된다.
- [0019] 추가의 구체예에서, 이중 프로모터는 사이토메갈로바이러스 (CMV) 프로모터, 라우스 육종 바이러스 (Rous Sarcoma Virus; RSV) 프로모터, 또는 시미안 바이러스 (Simian Virus) 40 (SV40) 프로모터이다.
- [0020] 추가의 특별한 구체예에서, 이중 프로모터는 CMV 프로모터이다.
- [0021] 추가의 구체예에서, 5' LTR 또는 3' LTR은 렌티바이러스 LTR이다.
- [0022] 다른 구체예에서, 5' LTR 및 3' LTR은 렌티바이러스 LTR이다.
- [0023] 특징의 특별한 구체예에서, 렌티바이러스는 HIV-1이다.
- [0024] 특별한 구체예에서, 3' LTR은 하나 이상의 변형을 포함한다.
- [0025] 특징의 특별한 구체예에서, 3' LTR은 하나 이상의 결실을 포함한다.
- [0026] 추가의 구체예에서, 3' LTR은 자가-불활성화 (SIN) LTR이다.
- [0027] 일부의 구체예에서, 레트로바이러스 익스포트 요소는 rev 반응 요소 (RRE)이다.
- [0028] 추가의 구체예에서, cPPT/FLAP는 HIV-1로부터 유래한다.
- [0029] 특징의 구체예에서, 프로모터는 골수증식성 육종 바이러스 인핸서 (enhancer), 결실된 네거티브 제어 지역, dl587rev 프라이머-결합 부위 치환된 (MND) 프로모터 또는 전사적으로 활성인 그의 단편을 포함한다.
- [0030] 특별한 구체예에서, ABCD1 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 cDNA이다.
- [0031] 관련된 구체예에서, cDNA는 최적화된 코작 (Kozak) 서열을 포함한다.
- [0032] 특징의 구체예에서, 최적화된 코작 서열은 (GCC)RCCATGG이며, 여기에서 R은 퓨린 (A 또는 G)이다.
- [0033] 특별한 구체예에서, 폴리뉴클레오타이드는 인간 ABCD1 폴리펩타이드를 인코딩한다.
- [0034] 다양한 구체예에서, 본 발명은 부분적으로 좌측 (5') LTR; cPPT/FLAP; RRE; 인간 ABCD1 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드에 작동적으로 연결된 MND 프로모터; 우측 (3') LTR; 및 폴리아데닐화 서열을 포함하며, 우드척 전사-후 조절 요소 (WPPE)를 포함하지 않는 렌티바이러스 벡터를 고려한다.
- [0035] 특별한 구체예에서, 렌티바이러스 벡터는 프사이 (Psi; Ψ) 패키징 시그널 (packaging signal)을 포함한다.
- [0036] 특징의 구체예에서, 폴리아데닐화 서열은 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 또는 시그널 토끼 β-글로빈 폴리아데닐화 서열이다.
- [0037] 특징의 특별한 구체예에서, 렌티바이러스 벡터는 HIV-1로부터의 5' LTR 또는 3' LTR을 포함한다.
- [0038] 추가의 구체예에서, 3' LTR은 SIN LTR이다.
- [0039] 다양한 구체예에서, 본 발명은 부분적으로, 좌측 (5') HIV-1 LTR; 프사이 (Ψ) 패키징 시그널; cPPT/FLAP; RRE; 인간 ABCD1 폴리펩타이드를 인코딩하는 cDNA에 작동적으로 연결된 MND 프로모터; 우측 (3') 자가-불활성화 (SIN) HIV-1 LTR; 및 토끼 β-글로빈 폴리아데닐화 서열을 포함하며, 우드척 전사-후 조절 요소 (WPPE)를 포함하지 않는 렌티바이러스 벡터를 고려한다.
- [0040] 다양한 구체예에서, 본 발명은 부분적으로, 본 발명에 기술된 선행하는 벡터 중의 어느 하나에 따르는 벡터를 포함하는 포유동물 세포를 고려한다.
- [0041] 특별한 구체예에서, 본 발명은 부분적으로, gag를 인코딩하는 제1 폴리뉴클레오타이드, pol을 인코딩하는 제2 폴리뉴클레오타이드, env를 인코딩하는 제3 폴리뉴클레오타이드, 및 본 발명에 기술된 선행하는 벡터 중의 어느 하나에 따르는 벡터를 포함하는 패키징 세포를 고려한다.
- [0042] 특징의 구체예에서, 본 발명은 부분적으로, 본 발명에 기술된 선행하는 벡터 중의 어느 하나에 따르는 벡터를 포함하는 생산자 세포 (producer cell)를 고려한다.

- [0043] 추가의 구체예에서, 본 발명은 부분적으로, 생산자 세포에 의해서 생산된 벡터 입자를 고려한다.
- [0044] 다양한 특별한 구체예에서, 본 발명은 부분적으로, 적어도 하나의 LTR; 중앙 폴리퓨린 트랙트/DNA 플랩 (cPPT/FLAP); 레트로바이러스 익스포트 요소; 및 ATP-결합 카세트, 서브-패밀리 D, 구성원 1 (ABCD1) 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드에 작동적으로 연결된, 소교세포에서 활성인 프로모터를 포함하며, 우드척 전사-후 조절 요소 (WPRE)를 포함하지 않는 벡터를 고려한다.
- [0045] 다양한 특정의 구체예에서, 본 발명은 부분적으로, 적어도 하나의 LTR; cPPT/FLAP; RRE; 인간 ABCD1 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드에 작동적으로 연결된 MND 프로모터; 및 폴리아데닐화 서열을 포함하며, 우드척 전사-후 조절 요소 (WPRE)를 포함하지 않는 벡터를 고려한다.
- [0046] 다양한 추가의 구체예에서, 본 발명은 부분적으로, 적어도 하나의 SIN HIV-1 LTR; 프사이 (Ψ) 패키징 시그널; cPPT/FLAP; RRE; 인간 ABCD1 폴리펩타이드를 인코딩하는 cDNA에 작동적으로 연결된 MND 프로모터; 및 토끼 β -글로빈 폴리아데닐화 서열을 포함하며, 우드척 전사-후 조절 요소 (WPRE)를 포함하지 않는 벡터를 고려한다.
- [0047] 다양한 구체예에서, 본 발명은 부분적으로, 상기 벡터로 형질도입된 숙주 세포를 고려한다. 특별한 구체예에서, 숙주 세포는 배아 줄기 세포, 체세포 줄기 세포 (somatic stem cell), 또는 선조 세포 (progenitor cell)이다.
- [0048] 특정의 구체예에서, 세포는 조혈 줄기 세포이다.
- [0049] 특별한 구체예에서, 본 발명은 부분적으로, 유전자 요법에서의 본 발명의 바이러스 벡터의 용도를 더 고려한다.
- [0050] 바람직한 구체예에서, 유전자 요법은 부신백질이영양증 또는 부신척수신경병증을 치료하거나 예방한다.
- [0051] 다양한 다른 구체예에서, 본 발명은 부분적으로, 대상체에게 본 발명의 벡터로 형질도입된 세포를 투여하는 것을 포함하여 부신백질이영양증 또는 부신척수신경병증을 치료하는 방법을 고려한다.
- [0052] 특별한 구체예에서, 세포는 배아 줄기 세포, 체세포 줄기 세포, 또는 선조 세포이다.
- [0053] 특정의 구체예에서, 세포는 조혈 줄기 세포이다.
- [0054] **서열 식별자의 간단한 설명**
- [0055] 서열번호 1은 인간 ABCD1을 인코딩하는 cDNA 서열이다.
- [0056] 서열번호 2는 인간 ABCD1을 인코딩하는 cDNA 서열이다.
- [0057] 서열번호 3은 MND 프로모터 폴리뉴클레오타이드 서열이다.

도면의 간단한 설명

- [0058] 도 1은 전임상 및 임상 연구에서 사용된 MND-ALD 벡터 구조물의 도식적 지도를 나타낸다. 모든 벡터는 고-수준 발현을 위해 MND 프로모터의 제어 하에서 인간 ABCD-1 cDNA를 갖는다. pLBP100 및 pLBP140에 대한 안전성 변형은 다음을 포함한다: gag 코딩 지역 내의 2개의 정지 코돈, 우측 HIV LTR의 U3 내의 400bp 결실, 및 토끼 β -글로빈 폴리A (r β gppA) 시그널. HIV LTR, 인간 면역결핍 유형-1 바이러스 긴 말단 반복부위; Ψ +, 패키징 시그널; cPPT/플랩, 중앙 폴리퓨린 트랙트; RRE, Rev-반응성 요소; ppt, 폴리퓨린 트랙트. pLBP140은 돌연변이 (mut6)되었지만 기능적인 우드척 간염 바이러스 전사-후 조절 요소 (Δ WPRE)의 도입에 의해서 pLBP100 벡터와 상이하다.
- 도 2는 실험에서의 pLBP100 및 pLBP140 렌티바이러스 벡터 벡터에 의한 형질도입 및 단기간 액체 및 메틸셀룰로즈 배양을 나타낸다.
- 도 3은 pLBP100 및 pLBP140 렌티바이러스 벡터 벡터에 의한 형질도입에 이은 단기간 액체 및 메틸셀룰로즈 배양 또는 지지 MS5 기질 (supporting MS5 stroma) 상에서의 장기간 배양을 나타낸다.
- 도 4는 정상 인간 CD34+ 세포의 형질도입 후의 골수양 (CFU-GM; 도 4A) 및 적혈구양 (BFU-E; 도 4B) 선조 세포의 수를 나타낸다. 형질도입은 4개의 별개의 실험을 포함하여 pLBP100 (p100) 또는 pLBP140 (p140)을 사용하여 수행되었다.

도 5는 LTC-IC의 빈도를 나타낸다. 제한 희석 및 5-주일 기질 공동-배양 후에 메틸셀룰로즈 배양으로 옮겨서 L-Calc™ 프로그램을 사용하여 이차 CFC를 계산하고, 95% 신뢰 구간을 갖는 빈도를 추정한다.

도 6은 단기간 선조 세포에서 벡터 통합의 효율을 나타낸다. (A) 액체 배양에서 7, 14, 28, 31 및 35일째에 세포 상의 벡터 카피수 (Vector copy number; VCN). (B) 풀링 14일째 (pooled day 14) CFC 배양물로부터의 평균 VCN. (C) 벡터 포지티브 골수양 콜로니 퍼센트. 분석된 포지티브 및 총 콜로니 수를 나타낸다.

도 7은 단기간 대 장기간 (LTC-IC) 선조 세포에서 벡터 통합의 효율을 나타낸다. (A) 풀링 14일째 CFC 배양물로부터의 평균 VCN. (B) 벡터 포지티브 골수양 콜로니 퍼센트. 분석된 포지티브 및 총 콜로니 수를 나타낸다.

도 8은 유동 세포분석에 의한 형질도입된 세포에서의 ALD 단백질 (ALDP) 발현을 나타낸다. (A1 및 A2) 다양한 실험으로부터의 모의 (mock), pLBP100 및 pLBP140 형질도입된 세포에 대한 PE 형광을 나타낸 히스토그램 (histogram). (B) 7일째 (expts. 072010 및 091410), 14일째 (expt. 081010) 및 28일째 (expt. 080610)제의 ALDP 포지티브 세포 퍼센트. (C) ALDP+ 세포 사이에서 ALDP 발현의 상대적 수준을 나타내는 모의 대조군에 대비한 비로서 MFI.

도 9는 MND-ALD 벡터 구조물의 도식적 지도를 나타낸다. 벡터는 고-수준 발현을 위해 MND 프로모터의 제어 하에서 인간 ABCD-1 cDNA를 갖는다. HIV LTR, 인간 면역결핍 유형-1 바이러스 긴 말단 반복부위; Ψ+, 패키징 시그널; cPPT/플랩, 중앙 폴리퓨린 트랙트; RRE, Rev-반응성 요소; ppt, 폴리퓨린 트랙트. 벡터는 WPRE 서열을 함유하지 않는다.

도 10은 다양한 MOI에서 p100 및 p140으로 형질도입된 4496 세포에서 모의 대 VCN에 대한 VLCFA 보정의 비를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

A. 개요

본 발명은 일반적으로, 부신백질이영양증 및 부신척수신경병증을 위한 더 안전하고 더 효율적인 바이러스 벡터 및 형질도입 세포 치료법에 관한 것이다. 임의의 특정한 이론에 의해서 구속받기를 원하지는 않지만, 본 발명자들은, ALD가 있는 소년의 조혈 줄기 세포가 다른 식으로는 정상이며, 소교세포가 골수 기원이기 때문에, 대상체의 조혈 줄기 세포에서 정상 ABCD1 cDNA로의 결합적 ABCD1 유전자의 보충이 뇌 소교세포에서 ALDP 수준의 정상화를 유도할 수 있을 것으로 생각한다. 따라서, 정상 ABCD1 cDNA를 본 발명의 벡터를 사용하여 자가유래 CD34+ 조혈 줄기 세포 내로 생체의 유전자 전이시키고, 이어서 골수 제거 후에 이식함으로써 CNS 기능의 안정화 및 ALD의 치사 효과와 연관된 혈장 VLCFA 수준의 강화(drop)를 야기시킬 수 있다.

따라서, 본 발명의 조성물 및 방법은 급성 및 만성 GvHD의 조혈 생착 실패 및 제거의 상당히 감소된 위험으로 빠른 치료를 허용할 것이기 때문에, ALD가 있는 소년의 치료에 있어서의 상당한 의학적 진보를 나타낼 수 있었다. 빠른 CNS 악화의 가능성이 있고, HCT에 의해서 나타나는 질병 안정화 전에 12-18 개월을 기다려야 하기 때문에 이 집단에서 매우 중요한 것이다.

본 발명의 실행은 반대로 구체적으로 나타내지 않는 한, 본 분야에서의 기술 내의 분자 생물학 및 재조합 DNA 기술의 통상적인 방법을 사용할 것이며, 이들의 대부분은 설명을 목적으로 이하에 기술된다. 이러한 기술은 문헌에 충분히 설명된다 [참조: 예를 들어, Sambrook, *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd Edition, 1989); Maniatis *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1982); *DNA Cloning: A Practical Approach*, vol. I & II (D. Glover, ed.); *Oligonucleotide Synthesis* (N. Gait, ed., 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (B. Hames & S. Higgins, eds., 1985); *Transcription and Translation* (B. Hames & S. Higgins, eds., 1984); *Animal Cell Culture* (R. Freshney, ed., 1986); *A Practical Guide to Molecular Cloning* (B. Perbal, ed., 1984)].

본 명세서에 인용된 모든 간행물, 특허 및 특허출원은 이에 의해서 온전히 참고로 포함된다.

B. 정의

다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상적으로 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본 발명의 목적에 따라, 다음의 용어들은 이하에 정의된다.

- [0066] 본 명세서에서 사용된 것으로서, 용어 "레트로바이러스"는 그의 게놈 RNA를 선형 이중-스트랜드 DNA 카피로 역전사시키고, 이어서 그의 게놈 DNA를 숙주 게놈 내에 공유적으로 통합시키는 RNA 바이러스를 나타낸다. 레트로바이러스는 짧은 다이머화 지역을 갖는 단일-스트랜드 RNA 게놈의 2개의 카피를 갖는 다수의 비-20면체 외피 바이러스로 구성되는 레트로비리다에 (*Retroviridae*) 과에 속한다. 레트로바이러스는 유전자 송달을 위한 통상적인 도구이다 (Miller, 2000, *Nature*. 357: 455-460). 일단 바이러스가 숙주 게놈 내에 통합되면, 이것은 "프로바이러스 (provirus)"라 칭한다. 프로바이러스는 RNA 폴리머라제 II에 대한 주형으로 작용하며, 새로운 바이러스 입자를 생산하는데 필요한 구조 단백질 및 효소를 인코딩하는 RNA 분자의 발현을 지시한다.
- [0067] 예시적인 레트로바이러스에는 몰로니 뮤린 (Moloney murine) 백혈병 바이러스 (M-MuLV), 몰로니 뮤린 육종 바이러스 (MoMSV), 하베이 (Harvey) 뮤린 육종 바이러스 (HaMuSV), 뮤린 유방 종양 바이러스 (MuMTV), 지본 에이프 (gibbon ape) 백혈병 바이러스 (GaLV), 고양이 백혈병 바이러스 (FLV), 스푸마바이러스 (spumavirus), 프렌드 (Friend) 뮤린 백혈병 바이러스, 뮤린 줄기 세포 바이러스 (MSCV) 및 라우스 (Rous) 육종 바이러스 (RSV) 및 렌티바이러스 벡터가 포함되나, 이들로 제한되지는 않는다.
- [0068] 본 명세서에서 사용된 것으로서, 용어 "렌티바이러스"는 복잡한 레트로바이러스의 그룹 (또는 속)이다. 예시적인 레트로바이러스에는 HIV (인간 면역결핍 바이러스; HIV 유형 1, 및 HIV 유형 2 포함); 비스나-매디 (visna-maedi) 바이러스 (VMV); 염소 관절염-뇌염 바이러스 (CAEV); 말 전염성 빈혈 바이러스 (EIAV); 고양이 면역결핍 바이러스 (FIV); 소 면역결핍 바이러스 (BIV); 및 시미안 (simian) 면역결핍 바이러스 (SIV)가 포함되나, 이들로 제한되지는 않는다. 한가지 구체예에서, HIV 기본 벡터 골격 (즉, HIV 시스-작용 서열 요소)이 바람직하다.
- [0069] 레트로바이러스 벡터, 및 더욱 특히 렌티바이러스 벡터가 본 발명의 실시에서 사용될 수 있다. 따라서, 본 명세서에서 사용된 것으로서 용어 "레트로바이러스" 또는 "레트로바이러스 벡터"는 각각 "렌티바이러스" 및 "렌티바이러스 벡터"를 포함하는 것을 의미한다.
- [0070] 용어 "벡터"는 본 명세서에서 또 다른 핵산 분자를 전이시키거나 수송할 수 있는 핵산 분자를 나타내기 위해서 사용된다. 전이된 핵산은 일반적으로 벡터 핵산 분자에 결합되는데, 예를 들어, 벡터 핵산 분자 내에 삽입된다. 벡터는 세포에서의 자율적 복제를 지시하는 서열을 포함할 수 있거나, 숙주 세포 DNA 내로의 통합을 허용하는데 충분한 서열을 포함할 수 있다. 유용한 벡터에는 예를 들어, 플라스미드 (예를 들어, DNA 플라스미드 또는 RNA 플라스미드), 코스미드, 박테리아 인공 염색체, 및 바이러스 벡터가 포함된다. 유용한 바이러스 벡터에는 예를 들어, 복제 결합 레트로바이러스 및 렌티바이러스가 포함된다.
- [0071] 본 기술분야에서 숙련된 전문가에 명백할 것인 바와 같이, 용어 "바이러스 벡터"는 전형적으로 핵산 분자의 전이 또는 세포의 게놈 내로의 통합을 용이하게 하는 바이러스-유래된 핵산 요소를 포함하는 핵산 분자 (예를 들어, 전이 플라스미드), 또는 핵산 전이를 매개하는 바이러스 입자를 나타내기 위해서 광범하게 사용된다. 바이러스 입자는 전형적으로 핵산(들) 이외에도 다양한 바이러스 성분, 및 때때로는 또한 숙주 세포 성분들을 포함할 것이다.
- [0072] 용어 바이러스 벡터는 핵산을 세포 내로 전이시킬 수 있는 바이러스 또는 바이러스 입자, 또는 전이된 핵산 그 자체를 나타낼 수 있다. 바이러스 벡터 및 전이 플라스미드는 주로 바이러스로부터 유래된 구조적 및/또는 기능적 유전자 요소를 함유한다. 용어 "레트로바이러스 벡터"는 주로 레트로바이러스 벡터로부터 유래된 구조적 및 기능적 유전자 요소를 함유하는 바이러스 벡터 또는 플라스미드를 나타낸다. 용어 "렌티바이러스 벡터"는 주로 렌티바이러스로부터 유래된 LTR을 포함한 구조적 및 기능적 유전자 요소를 함유하는 바이러스 벡터 또는 플라스미드를 나타낸다. 용어 "하이브리드"는 레트로바이러스, 예를 들어, 렌티바이러스 서열 및 비-렌티바이러스 바이러스 서열 둘 다를 함유하는 벡터, LTR 또는 그 밖의 다른 핵산을 나타낸다. 한가지 구체예에서, 하이브리드 벡터는 역전사, 복제, 통합 및/또는 패키징을 위한 레트로바이러스, 예를 들어, 렌티바이러스 서열, 및 알파바이러스 서브게놈 프로모터 서열, 비-구조적 단백질, 및/또는 폴리머라제 인식 부위를 포함하는 벡터 또는 전이 플라스미드를 나타낸다.
- [0073] 특별한 구체예에서, 용어 "렌티바이러스 벡터", "렌티바이러스 발현 벡터"는 렌티바이러스 전이 플라스미드 및/또는 감염성 렌티바이러스 입자를 나타내기 위해서 사용될 수 있다. 본 명세서에서 클로닝 부위, 프로모터, 조절 요소, 이중 핵산 등과 같은 요소들을 언급하는 경우에, 이들 요소의 서열은 본 발명의 렌티바이러스 입자에서 RNA 형태로 존재하며, 본 발명의 DNA 플라스미드 내에 DNA 형태로 존재하는 것으로 이해되어야 한다.
- [0074] 프로바이러스의 각각의 말단에는 "긴 말단 반복부위 (long terminal repeat)" 또는 "LTR"로 불리는 구조가 존재한다. 용어 "긴 말단 복제부위 (LTR)"는 그들의 천연 서열 환경에서 직접적인 반복부위이며, U3, R 및 U5 지역

을 함유하는 레트로바이러스 DNA의 말단에 위치하는 염기쌍의 영역을 나타낸다. LTR은 일반적으로 레트로바이러스 유전자의 발현 (예를 들어, 촉진, 개시 및 유전자 전사물의 폴리아데닐화) 및 바이러스 복제에 기본적인 기능을 제공한다. LTR은 전사 조절 요소, 폴리아데닐화 시그널 및 바이러스 게놈의 복제 및 통합에 필요한 서열을 포함한 다수의 조절 시그널을 함유한다. 바이러스 LTR은 U3, R 및 U5로 불리는 3개의 지역으로 구분된다. U3 지역은 인핸서 및 프로모터 요소를 함유한다. U5 지역은 프라이머 결합 부위와 R 지역 사이의 서열이며, 폴리아데닐화 서열을 함유한다. R (반복부위) 지역은 U3 및 U5 지역의 측면에 있다. U3, R 및 U5 지역으로 구성된 LTR은 바이러스 게놈의 5' 및 3' 말단 둘 다에서 나타난다. 5' LTR에 인접한 것은 게놈의 역전사 (tRNA 프라이머 결합 부위)를 위해서, 및 바이러스 RNA의 입자 내로의 효율적인 패키징 (프사이 부위)을 위해서 필요한 서열이다.

[0075] 본 명세서에서 사용된 것으로서, 용어 "패키징 시그널" 또는 "패키징 서열"은 바이러스 RNA를 바이러스 캡시드 또는 입자 내로 삽입하는데 필요한 것으로 레트로바이러스 게놈 내에 위치한 서열을 나타낸다 (참조: 예를 들어, Clever *et al.*, 1995. *J. of Virology*, Vol. 69, No. 4; pp. 2101-2109). 몇 가지의 레트로바이러스 벡터는 바이러스 게놈의 캡시드화 (encapsidation)에 필요한 최소 패키징 시그널 (또한 프사이 [Ψ] 서열로도 불린다)을 사용한다. 따라서, 본 명세서에서 사용된 것으로서 용어 "패키징 서열", "패키징 시그널", "프사이" 및 기호 "Ψ"는 바이러스 입자 형성 중에 레트로바이러스 RNA 스트랜드의 캡시드화에 필요한 비-코딩 서열과 관련하여 사용된다.

[0076] 다양한 구체예에서, 벡터는 변형된 5' LTR 및/또는 3' LTR을 포함한다. 3' LTR의 변형은 종종, 바이러스를 복제-결합성이 되도록 함으로서 렌티바이러스 또는 레트로바이러스 시스템의 안전성을 개선시키기 위해서 만들어진 다. 본 명세서에 사용된 것으로서, 용어 "복제-결합"은 감염성 비리온이 생산되지 않도록 완전하고 효과적인 복제를 할 수 없는 바이러스를 나타낸다 (예를 들어, 복제-결합성 렌티바이러스 자손). 용어 "복제-적격 (replication-competent)"은 바이러스의 바이러스 복제가 감염성 비리온 (예를 들어, 복제-적격성 렌티바이러스 자손) 생산할 수 있도록 복제할 수 있는 야생형 바이러스 또는 돌연변이체 바이러스를 나타낸다.

[0077] "자가-불활성화" (SIN) 벡터는 U3 지역으로 알려진 우측 (3') LTR 인핸서-프로모터 지역이 바이러스 복제의 일차 라운드 이외의 바이러스 전사가 방지되도록 변형된 (예를 들어, 결실 또는 치환에 의해서) 복제-결합 벡터, 예를 들어, 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 벡터를 나타낸다. 이것은 우측 (3') LTR U3 지역이 바이러스 복제 중에 좌측 (5') LTR U3 지역에 대한 주형으로 사용되고, 이에 따라서 바이러스 복제물은 U3 인핸서-프로모터가 없이 만들어질 수 없기 때문이다. 본 발명의 추가의 구체예에서, 3' LTR은 U5 지역이 예를 들어, 이상적인 폴리(A) 서열로 대체되도록 변형된다. 3' LTR, 5' LTR, 또는 3' 및 5' LTR 둘 다에 대한 변형과 같은 LTR에 대한 변형도 본 발명에 포함되는 것에 주목하여야 한다.

[0078] 추가의 안전성 증진은 5' LTR의 U3 지역을 바이러스 입자의 생산 중에 바이러스 게놈의 전사를 구동시키는 이중 프로모터로 대체시킴으로써 제공된다. 사용될 수 있는 이중 프로모터의 예로는 예를 들어, 바이러스성 시미안 바이러스 40 (SV40) (예를 들어, 초기 또는 후기), 사이토메갈로바이러스 (CMV) (예를 들어, 급초기), 모로니 뮤린 백혈병 바이러스 (MoMLV), 라우스 육종 바이러스 (RSV), 및 단순 포진 바이러스 (HSV) (티미딘 키나제) 프로모터가 포함된다. 전형적인 프로모터는 Tat-독립적 방식으로 높은 수준의 전사를 구동시킬 수 있다. 이러한 대체는 복제-적격성 라만 스펙트럼을 생성시키는 재조합의 가능성을 감소시키는데, 이는 바이러스 생산 시스템 내에 적격성 U3 서열이 없기 때문이다.

[0079] 일부의 구체예에서, 바이러스 벡터는 TAR 요소를 포함한다. 용어 "TAR"은 렌티바이러스 (예를 들어, HIV) LTR의 R 지역 내에 위치한 "트랜스-활성화 반응" 유전자 요소를 나타낸다. 이 요소는 렌티바이러스 트랜스-활성화 (tat) 유전자 요소와 상호작용하여 바이러스 복제를 증진시킨다. 그러나, 이 요소는 5' LTR의 U3 지역이 이중 프로모터에 의해서 대체된 구체예에서는 필요하지 않다.

[0080] "R 지역"은 캡핑 (capping) 그룹의 출발점 (즉, 전사의 출발점)에서 시작하여 폴리 A 트랙트의 출발점 직전에서 끝나는 레트로바이러스 LTR 내의 지역을 나타낸다. R 지역은 또한, U3 및 U5 지역의 측면에 있는 것으로 정의된다. R 지역은 역전사 중에 게놈의 한 말단으로부터 다른 말단으로 발생기 DNA의 전이를 허용하는데 역할을 한다.

[0081] 본 명세서에서 사용된 것으로서, 용어 "FLAP 요소"는 그의 서열이 레트로바이러스, 예를 들어, HIV-1 또는 HIV-2의 중앙 폴리퓨린 트랙트 및 중앙 종료 서열 (cPPT 및 CTS)을 포함하는 핵산을 나타낸다. 적합한 FLAP 요소는 미국 특허 제6,682,907호, 및 문헌 (Zennou, *et al.*, 2000, *Cell*, 101:173)에 기술되어 있다. HIV-1 역전사 중에 중앙 폴리퓨린 트랙트 (cPPT)에서의 플러스-스트랜드 DNA의 중앙 개시 및 중앙 종료 서열 (CTS)에서의 중앙 종료는 3-스트랜드 DNA 구조인 HIV-1 중앙 DNA 플랩의 형성을 유도한다. 어떤 이론에 의해서 구속되기를 원하지

는 않지만, DNA 플랩은 렌티바이러스 게놈 핵 임포트 (nuclear import)의 시스-활성 결정인자로 작용할 수 있고 /있거나 바이러스의 역가를 증가시킬 수 있다. 특별한 구체예에서, 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 벡터 골격은 벡터 내의 관심이 있는 이중 유전자의 상류 또는 하류에 하나 이상의 FLAP 요소를 포함한다. 예를 들어, 특별한 구체예에서 전이 플라스미드는 FLAP 요소를 포함한다. 한가지 구체예에서, 본 발명의 벡터는 HIV-1로부터 분리된 FLAP 요소를 포함한다.

[0082] 한가지 구체예에서, 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 전이 벡터는 하나 이상의 익스포트 요소를 포함한다. 용어 "익스포트 요소"는 핵으로부터 세포의 세포질로 RNA 전사물의 수송을 조절하는 시스-작용성 전사-후 조절 요소를 나타낸다. RNA 익스포트 요소의 예로는 인간 면역결핍 바이러스 (HIV) rev 반응 요소 (RRE) (참조: 예를 들어, Cullen *et al.*, 1991, *J. Virol.* 65: 1053; 및 Cullen *et al.*, 1991, *Cell* 58: 423), 및 간염 B 바이러스 전사-후 조절 요소 (HPRE)가 포함되나, 이들로 제한되지는 않는다. 일반적으로, RNA 익스포트 요소는 유전자의 3' UTR 내에 배치되며, 하나 또는 다수의 카피로 삽입될 수 있다.

[0083] 특별한 구체예에서, 바이러스 벡터 내의 이중 서열의 발현은 벡터 내에 전사-후 조절 요소, 및 효율적인 폴리아데닐화 부위 및 임의로, 전사 종결 시그널을 혼입시킴으로써 증가된다. 다양한 전사-후 조절 요소, 예를 들어, 우드척 전사-후 조절 요소 간염 바이러스 전사-후 조절 요소 (WPRES; Zufferey *et al.*, 1999, *J. Virol.*, 73:2886); 간염 B 바이러스 내의 전사-후 조절 요소 (HPRE) (Huang *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 5:3864) 등 (Liu *et al.*, 1995, *Genes Dev.*, 9:1766)은 단백질에서 이중 핵산의 발현을 증가시킬 수 있다. 전사-후 조절 요소는 일반적으로 이중 핵산 서열의 3' 말단에 위치한다. 이 배열은 그의 5' 부분이 이중 핵산 코딩 서열을 포함하고, 그의 3' 부분은 전사-후 조절 요소 서열을 포함하는 mRNA 전사물의 합성을 제공한다. 바람직한 구체예에서, 본 발명의 벡터는 WPRES 또는 HPRES와 같은 전사-후 조절 요소를 결여하거나 포함하지 않는데, 이는 일부의 경우에 이들 요소가 세포 변형의 위험을 증가시키고/시키거나 mRNA 전사물의 양 또는 mRNA의 안정성을 실질적으로 또는 상당히 증가시키지 않기 때문이다. 따라서, 일부의 구체예에서, 본 발명의 벡터는 추가된 안전성 수단으로서 WPRES 또는 HPRES를 결여하거나 포함하지 않는다.

[0084] 이중 핵산 전사물의 효율적인 종결 및 폴리아데닐화를 지시하는 요소는 이중 유전자 발현을 증가시킨다. 전사 종결 시그널은 일반적으로 폴리아데닐화 시그널의 하류에서 발견된다. 본 명세서에서 사용된 것으로서, 용어 "폴리아 부위" 또는 "폴리아 서열"은 RNA 폴리머라제 II에 의한 발생기 RNA 전사의 종결 및 폴리아데닐화 둘 다를 지시하는 DNA 서열을 나타낸다. 제조합체 전사물의 효율적인 폴리아데닐화가 바람직한데, 이는 폴리 A 테일 (tail)을 결여하는 전사물은 불안정하고, 빠르게 분해되기 때문이다. 본 발명의 벡터에서 사용될 수 있는 폴리A 시그널의 예시적인 예로는 이상적인 폴리A 서열 (예를 들어, AATAAA, ATTAAA AGTAAA), 소 성장 호르몬 폴리A 서열 (BGHpA), 토끼 β -글로빈 폴리A 서열 (r β gpA), 또는 본 기술분야에서 공지된 또 다른 적합한 이중 또는 내인성 폴리A 서열이 포함된다.

[0085] 특정한 구체예에서, 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 벡터는 절연인자 (insulator) 요소를 더 포함한다. 절연인자 요소는 게놈 DNA 내에 존재하는 시스-작용성 요소에 의해서 매개될 수 있고, 전이된 서열의 탈조절된 발현을 유도할 수 있는 통합 부작용으로부터 렌티바이러스-발현된 서열, 예를 들어, 치료학적 폴리펩타이드를 보호하는데 기여할 수 있다 (즉, 위치 효과 (position effect); 참조: 예를 들어, Burgess-Beusse *et al.*, 2002, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 99:16433; 및 Zhan *et al.*, 2001, *Hum. Genet.*, 109:471). 일부의 구체예에서, 전이 벡터는 하나 또는 두 개의 LTR 모두 내에, 또는 세포 게놈 내에 통합하는 벡터의 부분 내의 다른 곳에 절연인자 요소를 포함한다. 본 발명에서 사용하기에 적합한 절연인자에는 닭 β -글로빈 절연인자 (참조: Chung *et al.*, 1993, *Cell* 74:505; Chung *et al.*, 1997, *PNAS* 94:575; 및 Bell *et al.*, 1999, *Cell* 98:387; 본 발명에 참고로 포함됨)가 포함되나, 이들로 제한되지는 않는다. 절연인자 요소의 예로는 닭 HS4와 같은 β -글로빈 좌 (locus)로부터의 절연인자가 포함되나, 이들로 제한되지는 않는다.

[0086] 본 발명의 특정한 특정한 구체예에 따르면, 바이러스 벡터 골격 서열의 대부분 또는 모두는 렌티바이러스, 예를 들어, HIV-1로부터 유래된다. 그러나, 렌티바이러스 서열의 다수의 상이한 공급원이 사용될 수 있고, 렌티바이러스 서열 중의 특정한 것에서의 다수의 치환 및 변경은 본 발명에 기술된 기능을 수행하는 전이 벡터의 능력을 손상시키지 없이 수용될 수 있는 것으로 이해되어야 한다. 또한, 다양한 렌티바이러스 벡터가 본 기술분야에서 공지되어 있다 (참조: Naldini *et al.*, (1996a, 1996b, 및 1998); Zufferey *et al.*, (1997); Dull *et al.*, 1998, 미국 특허 제6,013,516호; 및 5,994,136호; 이들 중 임의의 것은 본 발명의 바이러스 벡터 또는 전이 플라스미드를 생산하도록 조정될 수 있다).

[0087] 본 명세서에서 사용된 것으로서, 용어 "폴리뉴클레오타이드" 또는 "핵산"은 메신저 RNA (mRNA), RNA, 게놈 RNA

(gRNA), 플러스 스트랜드 RNA (RNA(+)), 마이너스 스트랜드 RNA (RNA(-)), 게놈 DNA (gDNA), 상보적 DNA (cDNA) 또는 DNA를 나타낸다. 폴리뉴클레오타이드는 단일 및 이중 스트랜드 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 바람직하게는, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 전형적으로 변이체가 기준 서열의 적어도 하나의 생물학적 활성을 유지하는 경우에, 본 발명에 기술된 기준 서열 (참조: 예를 들어, 서열 목록) 중 임의의 것에 대해서 적어도 약 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 폴리뉴클레오타이드 또는 변이체를 포함한다. 다양한 예시적 구체예에서, 본 발명은 부분적으로, 바이러스 벡터 및 전이 플라스미드 폴리뉴클레오타이드 서열 및 이들을 포함하는 조성물을 고려한다. 특별한 구체예에서, 본 발명은 치료학적 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다.

[0088] 본 명세서에서 사용된 것으로서, 용어 "폴리뉴클레오타이드 변이체" 및 "변이체" 등은 기준 폴리뉴클레오타이드 서열 또는 이하에 정의된 엄격한 조건 (stringent condition) 하에서 기준 서열과 하이브리드화하는 폴리뉴클레오타이드와의 상당한 서열 동일성을 나타내는 폴리뉴클레오타이드를 나타낸다. 이들 용어는 하나 이상의 뉴클레오타이드가 첨가 또는 결실되거나, 기준 폴리뉴클레오타이드와 비교하여 상이한 뉴클레오타이드로 대체된 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 이에 관해서, 돌연변이, 첨가, 결실 및 치환을 포함한 특성의 변경은 기준 폴리뉴클레오타이드에 대해서 만들어져서 변경된 폴리뉴클레오타이드가 기준 폴리뉴클레오타이드의 생물학적 기능 또는 활성을 보유할 수 있음은 본 기술분야에서 잘 이해된다.

[0089] 본 명세서에서 사용된 것으로서, 용어 "분리된"은 물질이 그의 천연 상태에서 통상적으로 동반하는 성분들을 실질적으로 또는 본질적으로 함유하지 않는 물질을 의미한다. 예를 들어, 본 명세서에서 사용된 것으로서 "분리된 폴리뉴클레오타이드"는 천연적으로-존재하는 상태에서 그의 측면에 있는 서열로부터 정제된 폴리뉴클레오타이드, 예를 들어, 단편에 정상적으로 인접한 서열로부터 분리된 DNA 단편을 나타낸다.

[0090] 폴리뉴클레오타이드의 배향을 기술하는 용어에는 다음이 포함된다: 5' (통상적으로, 유리 포스페이트 기를 갖는 폴리뉴클레오타이드의 말단) 및 3' (통상적으로 유리 하이드록실 (OH) 기를 갖는 폴리뉴클레오타이드의 말단). 폴리뉴클레오타이드 서열은 5'에서 3' 배향 또는 3'에서 5' 배향으로 주석을 달 수 있다.

[0091] 용어 "상보적" 및 "상보성"은 염기-짝짓기 규칙 (base-pairing rule)에 의해 관련된 폴리뉴클레오타이드 (즉, 뉴클레오타이드의 서열)를 나타낸다. 예를 들어, DNA 서열 5' AGTCATG 3'의 상보적 스트랜드는 3' TCAGTAC 5'이다. 후자의 서열은 종종 좌측에 5' 말단 및 우측에 3' 말단을 갖는 역보체 5' CATGACT 3'로 쓰여진다. 그의 역보체에 해당하는 서열은 회문 서열 (palindromic sequence)인 것으로 언급된다. 상보성은 핵산의 염기의 단지 일부분이 염기 짝짓기 규칙에 따라 부합되는 것으로 "부분적"일 수 있다. 또는, 핵산들 사이에는 "완전한" 또는 "충" 상보성이 있을 수 있다.

[0092] 본 명세서에서 사용된 것으로서, 용어 "핵산 카세트"는 RNA, 및 이어서 단백질을 발현할 수 있는 벡터 내의 유전자 서열을 나타낸다. 핵산 카세트는 관심이 있는 유전자를 함유한다. 핵산 카세트는 카세트 내의 핵산이 RNA로 전사되고, 필요한 경우에 단백질을 또는 폴리펩타이드로 해독되고, 형질전환된 세포에서의 활성에 필요한 적절한 해독-후 변형을 겪고, 적절한 세포내 구획에 대한 표적화 또는 세포외 구획 내로의 분비에 의해 생물학적 활성에 적절한 구획으로 전좌할 수 있도록 벡터 내에 위치적으로 및 연속적으로 배향된다. 바람직하게는, 카세트는 벡터 내로의 준비된 삽입을 위해서 조정된 그의 3' 및 5' 말단을 가지며, 예를 들어, 이것은 각각의 말단에 제한 엔도뉴클레아제 부위를 갖는다. 본 발명의 바람직한 구체예에서, 핵산 카세트는 부신백질이영양증 또는 부신척수신경병증을 치료하기 위해서 사용된 치료학적 유전자의 서열을 함유한다. 카세트를 제거하여, 단일 유닛으로서 플라스미드 또는 바이러스 벡터 내에 삽입할 수 있다.

[0093] 폴리뉴클레오타이드는 관심이 있는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 본 명세서에서 사용된 것으로서, 용어 "관심이 있는 폴리뉴클레오타이드"는 발현되기를 바라는 발현 벡터 내에 삽입된 폴리뉴클레오타이드, 예를 들어, 폴리펩타이드 (즉, 관심이 있는 폴리펩타이드)를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 나타낸다. 특성의 구체예에서, 관심이 있는 폴리뉴클레오타이드는 "치료학적 폴리펩타이드"로 지칭될 수 있는, 질병 또는 장애의 치료 또는 예방에 치료학적 효과를 제공하는 폴리펩타이드, 예를 들어, ATP-결합 카세트, 서브-패밀리 D (ALD), 구성원 1 (ABCD1) 유전자를 인코딩한다. 관심이 있는 폴리뉴클레오타이드, 및 그로부터 인코딩된 폴리펩타이드에는 야생형 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드뿐만 아니라 그의 기능적 변이체 및 단편이 포함된다. 특별한 구체예에서, 기능적 변이체는 상응하는 야생형 기준 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드 서열에 대해서 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 99% 동일성을 갖는다. 특성의 구체예에서, 기능적 변이체 또는 단편은 상응하는 야생형 폴리펩타이드의 생물학적 활성의 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 또는 적어도 90%를 갖는다. 본 발명에서 사용하기에 적합한 대표적인 폴리뉴클레오타이드 서열에는 서열번호 1-

2에 제시된 인간 ACBD1 cDNA가 포함되나, 이들로 제한되지는 않는다.

- [0094] 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 그 자체의 코딩 서열의 길이와는 무관하게, 그들의 전체 길이가 상당히 달라질 수 있도록 본 명세서의 다른 곳에 기술된 바와 같이, 또는 본 기술분야에서 공지된 바와 같이 프로모터 및/또는 인핸서, 비해독된 지역 (UTR), 코작 서열, 폴리아데닐화 시그널, 추가의 제한 효소 부위, 다중 클로닝 부위, 내부 리보솜 유입 부위 (IRES), 재조합효소 (recombinase) 인식 부위 (예를 들어, LoxP, FRT, 및 Att 부위), 종결 코돈, 전사 종결 시그널, 및 자가-분해성 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드, 에피토프 태그와 같은 다른 DNA 서열과 조합될 수 있다. 따라서, 거의 모든 길이의 폴리뉴클레오타이드 단편이 사용될 수 있으며, 총 길이는 바람직하게는 제조 및 의도된 재조합 DNA 프로토콜에서의 사용의 용이성에 의해서 제한되는 것으로 생각된다.
- [0095] 본 명세서에서 사용된 것으로서 용어 "프로모터"는 RNA 폴리머라제가 결합하는 폴리뉴클레오타이드 (DNA 또는 RNA)의 인식 부위를 나타낸다. 용어 "인핸서"는 증진된 전사를 제공할 수 있는 서열을 함유하고, 일부의 경우에 또 다른 조절 서열에 관한 그들의 배향과는 독립적으로 작용할 수 있는 DNA의 분절을 나타낸다. 인핸서는 프로모터 및/또는 다른 인핸서 요소와 협동적으로 또는 부가적으로 작용할 수 있다. 용어 "프로모터/인핸서"는 프로모터 및 인핸서 기능 둘 다를 제공할 수 있는 서열을 함유하는 DNA의 분절을 나타낸다. 한가지 구체예에서, 본 발명의 벡터는 골수증식성 육종 바이러스 인핸서, 결실된 네거티브 제어 지역, dl587rev 프라이머-결합 부위 치환된 (MND) 프로모터를 포함한다 (Challita *et al.*, *J Virol.* 69(2):748-55 (1995); 서열번호 3).
- [0096] 특별한 구체예에서, 본 발명의 벡터는 프로모터 및/또는 인핸서와 같은 외인성, 내인성 또는 이중 조절 서열을 포함한다. "내인성" 조절 서열은 게놈 내에서 소정의 유전자와 자연적으로 결합된 것이다. "외인성" 조절 서열은 유전자의 전사가 결합된 인터류킨/프로모터에 의해서 지시되도록 유전자 조작 (즉, 분자 생물학 기술)의 방법에 의해서 유전자에 병렬로 배치된 것이다. "이중" 조절 서열은 유전적으로 조작된 세포와 상이한 종으로부터 유래하는 외인성 서열이다.
- [0097] 용어 "작동적으로 연결된"은 기술된 성분이 이들이 그들의 의도된 방식으로 기능하도록 허용하는 관계로 존재하는 병렬관계를 나타낸다. 한가지 구체예에서, 상기의 용어는 핵산 발현 조절 서열 (예를 들어, 프로모터 및/또는 인핸서)과 제2 폴리뉴클레오타이드 서열, 예를 들어, 관심이 있는 폴리뉴클레오타이드 사이의 기능적 연계성을 나타내며, 여기에서 발현 조절 서열은 제2 서열에 상응하는 핵산의 전사를 지시한다.
- [0098] 본 명세서에서 사용된 것으로서, 용어 "구성적 프로모터"는 작동적으로 연결된 서열의 전사를 계속해서 또는 연속적으로 허용하는 프로모터를 나타낸다. 구성적 프로모터는 광범한 종류의 세포 및 조직 유형에서 발현을 허용하는 "편재성 프로모터 (ubiquitous promoter)", 또는 제한된 종류의 세포 및 조직 유형에서의 발현을 허용하는 "조직-특이적 프로모터"일 수 있다. 예시적인 편재성 프로모터에는 사이토메갈로바이러스 (CMV) 급초기 프로모터, 바이러스성 시미안 바이러스 40 (SV40) (예를 들어, 초기 또는 후기), 모로니 뮌린 백혈병 바이러스 (MoMLV) LTR 프로모터, 라우스 육종 바이러스 (RSV) LTR, 단순 포진 바이러스 (HSV) (티미딘 키나제) 프로모터, 백시니아 바이러스로부터의 H5, P7.5, 및 P11 프로모터, 신장 인자 (elongation factor) 1-알파 (EF1a) 프로모터, 초기 성장 반응 1 (EGR1), 페리틴 H (FerH), 페리틴 L (FerL), 글리세르알데히드 3-포스페이트 탈하이드로게나제 (GAPDH), 진행성 해독 개시 인자 4A1 (EIF4A1), 열 쇼크 70kDa 단백질 5 (HSPA5), 열 쇼크 단백질 90kDa 베타, 구성원 1 (HSP90B1), 열 쇼크 단백질 70kDa (HSP70), β -키네신 (β -KIN), 인간 ROSA 26 좌 (Irions *et al.*, *Nature Biotechnology* 25, 1477-1482 (2007)), 유비퀴틴 C 프로모터 (UBC), 포스포글리세레이트 키나제-1 (PGK) 프로모터, 사이토메갈로바이러스 인핸서/닭 β -액틴 (CAG) 프로모터, 및 β -액틴 프로모터가 포함되나, 이들로 제한되지는 않는다.
- [0099] 특별한 구체예에서는, 조직-특이적 프로모터를 사용하여 바람직한 폴리뉴클레오타이드 서열의 세포 유형 특이적, 계통 특이적, 또는 조직-특이적 발현을 달성하는 (예를 들어, 단지 세포 유형 또는 조직의 서브세트에서, 또는 발육의 특정 단계 중에 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산을 발현시키는) 것이 바람직할 수 있다. 조직 특이적 프로모터의 예시적 예로는 B29 프로모터 (B 세포 발현), 런트 (runt) 전사 인자 (CBFa2) 프로모터 (줄기 세포 특이적 발현), CD14 프로모터 (단핵구 세포 발현), CD43 프로모터 (백혈구 및 혈소판 발현), CD45 프로모터 (조혈 세포 발현), CD68 프로모터 (대식세포 발현), CYP450 3A4 프로모터 (간세포 발현), 데스민 프로모터 (근육 발현), 엘라스타제 1 프로모터 (췌장 선포 세포 (acinar cell) 발현), 엔도글린 프로모터 (내피 세포 발현), 섬유아세포 특이적 단백질 1 (FSP1) 프로모터 (섬유아세포 세포 발현), 피브로넥틴 프로모터 (섬유아세포 세포 발현), *fms*-관련 티로신 키나제 1 (FLT1) 프로모터 (내피 세포 발현), 신경교 섬유질 산성 단백질 (GFAP) 프로모터 (성상세포 발현), 인슐린 프로모터 (췌장 베타 세포 발현), 인테그린, 알파 2b (ITGA2B) 프로모터 (거

핵구), 세포내 부착 분자 2 (ICAM-2) 프로모터 (내피 세포), 인터페론 베타 (IFN- β) 프로모터 (조혈 세포), 케라틴 5 프로모터 (각질세포 발현), 미오글로빈 (MB) 프로모터 (근육 발현), 근원성 분화 1 (MYOD1) 프로모터 (근육 발현), 네프린 프로모터 (족세포 (podocyte) 발현), 뼈 감마-카복시글루타메이트 단백질 2 (OG-2) 프로모터 (골아세포 발현), 3-옥소산 CoA 트랜스퍼라제 2B (Oxct2B) 프로모터 (단배체성-정자세포 발현), 계면활성제 단백질 B (SP-B) 프로모터 (폐 발현), 시냅신 프로모터 (뉴론 발현), 위스코트-앨드리치 (Wiskott-Aldrich) 증후군 단백질 (WASP) 프로모터 (조혈 세포 발현)가 포함되나, 이들로 제한되지는 않는다.

[0100] 한가지 구체예에서, 본 발명의 벡터는 소교세포에서 바람직한 폴리펩타이드, 예를 들어, ABCD1를 발현하는 조직 특이적 프로모터 및/또는 인핸서, 예를 들어, MND 프로모터 (서열번호 3)를 포함한다.

[0101] 본 명세서에서 사용된 것으로서, "조건적 발현 (conditional expression)"은 유도성 발현; 억제성 발현; 특별한 생리학적, 생물학적 또는 질병 상태를 갖는 세포 또는 조직에서의 발현 등을 포함하는 (단, 이들로 제한되지는 않는다) 모든 유형의 조건적 발현을 나타낼 수 있다. 이 정의는 세포 유형 또는 조직-특이적 발현을 배제하도록 의도된 것은 아니다. 본 발명의 특정한 구체예는 관심이 있는 폴리뉴클레오타이드의 조건적 발현을 제공하며, 예를 들어, 발현은 세포, 조직, 유기체 등을 폴리뉴클레오타이드가 발현되도록 야기하거나, 관심이 있는 폴리뉴클레오타이드에 의해서 인코딩된 폴리뉴클레오타이드의 발현에서의 증가 또는 감소를 야기하는 처리 또는 조건에 적용함으로써 조절된다.

[0102] 유도성 프로모터/인핸서의 예시적 예로는 글루코코르티코이드 또는 에스트로겐 수용체를 인코딩하는 유전자에 대한 프로모터와 같은 스테로이드-유도성 프로모터 (상응하는 호르몬으로 처리함으로써 유도가능함), 메탈로티오닌 프로모터 (다양한 중금속으로 처리함으로써 유도가능함), MX-1 프로모터 (인터페론에 의해서 유도가능함), "진스위치" 미페프리스톤-조절가능한 시스템 ("GeneSwitch" mifepristone-regulatable system) (Sirin *et al.*, 2003, *Gene*, 323:67), 쿠메이트 유도성 유전자 스위치 (WO 2002/088346), 테트라사이클린-의존성 조절 시스템 등이 포함되나, 이들로 제한되지는 않는다.

[0103] 조건적 발현은 또한, 부위-특이적 DNA 재조합효소를 사용함으로써 달성될 수 있다. 본 발명의 특정한 구체예에 따르면, 벡터는 부위-특이적 재조합효소에 의해서 매개된 재조합을 위한 적어도 하나의 (전형적으로는 두 개) 부위(들)를 포함한다. 본 명세서에서 사용된 것으로서, 용어 "재조합효소" 또는 "부위-특이적 재조합효소"는 야생형 단백질 (참조: Landy, *Current Opinion in Biotechnology* 3:699-707 (1993)), 또는 그의 돌연변이체, 유도체 (예를 들어, 재조합 단백질 서열 또는 그의 단편을 함유하는 융합 단백질), 단편 및 변이체일 수 있는, 하나 이상의 재조합 부위 (예를 들어, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 12, 15, 20, 30, 50개 등)를 수반하는 재조합 반응에 연루된 절단성 또는 통합성 단백질, 효소, 보조-인자 (co-factors) 또는 연관된 단백질을 포함한다. 본 발명의 특별한 구체예에서 사용하기에 적합한 재조합효소의 예시적 예로는 Cre, Int, IHF, Xis, FLP, Fis, Hin, Gin, Φ C31, Cin, Tn3 리졸라제 (resolvase), TndX, XerC, XerD, TnpX, Hjc, Gin, SpCCE1, 및 ParA가 포함되나, 이들로 제한되지는 않는다.

[0104] 벡터는 광범한 종류의 부위-특이적 재조합효소 중 임의의 것에 대한 하나 이상의 재조합 부위를 포함할 수 있다. 벡터, 예를 들어, 레트로바이러스 벡터 또는 렌티바이러스 벡터의 통합에 필요한 임의의 부위(들) 이외에도 부위-특이적 재조합효소에 대한 표적 부위가 있는 것으로 이해되어야 한다. 본 명세서에서 사용된 것으로서, 용어 "재조합 서열", "재조합 부위" 또는 "부위-특이적 재조합 부위"는 재조합효소가 인식하고 결합하는 특별한 핵산 서열을 나타낸다.

[0105] 예를 들어, Cre 재조합효소에 대한 하나의 재조합 부위는 8개의 염기쌍 코어 서열의 측면에 있는 두 개의 13개 염기쌍 반전 반복부위 (재조합효소 결합 부위로 작용함)를 포함하는 34개 염기쌍 서열인 loxP이다 (참조: 문헌 (Sauer, B., *Current Opinion in Biotechnology* 5:521-527 (1994))의 도 1). 그 밖의 다른 예시적 loxP 부위에는 lox511 (Hoess *et al.*, 1996; Bethke and Sauer, 1997), lox5171 (Lee and Saito, 1998), lox2272 (Lee and Saito, 1998), m2 (Langer *et al.*, 2002), lox71 (Albert *et al.*, 1995), 및 lox66 (Albert *et al.*, 1995)이 포함되나, 이들로 제한되지는 않는다.

[0106] FLP 재조합효소에 대한 적합한 인식 부위에는 FRT (McLeod, *et al.*, 1996), F₁, F₂, F₃ (Schlake and Bode, 1994), F₄, F₅ (Schlake and Bode, 1994), FRT(LE) (Senecoff *et al.*, 1988), FRT(RE) (Senecoff *et al.*, 1988)가 포함되나, 이들로 제한되지는 않는다.

[0107] 인식 서열의 다른 예는 재조합효소 효소 λ 인테그라제 (Integrase), 예를 들어, ϕ C31에 의해서 인식되는 attB, attP, attL, 및 attR 서열이다. ϕ C31 SSR은 단지 이형 부위 (heterotypic site) attB (길이 34 bp) 및

attP (길이 39 bp) 사이에서만 재조합을 매개한다 (Groth *et al.*, 2000). 각각 박테리아 및 파지 게놈 상의 파지 인테그라제에 대한 부착 부위에 대한 명칭인 attB 및 attP는 둘 다 ϕ C31 호모다이어머에 의해서 결합될 것 같은 불완전한 반전 반복부위를 함유한다 (Groth *et al.*, 2000). 생성물 부위 (product site)인 attL 및 attR은 추가의 ϕ C31-매개된 재조합에 대해서 효과적으로 불활성이어서 (Belteki *et al.*, 2003), 반응을 비가역적으로 만든다. 삽입을 촉진시키는 경우에, attB-보유 DNA는 게놈 attB 부위 내로의 attP 부위 삽입보다 더 쉽게 게놈 attP 부위 내로 삽입하는 것으로 발견되었다 (Thyagarajan *et al.*, 2001; Belteki *et al.*, 2003). 따라서, 대표적인 전략은 attP-보유 "도킹 부위 (docking site)"를 규정된 좌 내로 상동성 재조합시킨 다음에 삽입을 위한 attB-보유 인커밍 (incoming) 서열과 짝을 이루는 것으로 결정된다.

[0108] 본 명세서에서 사용된 것으로서, 용어 "내부 리보솜 유입 부위" 또는 "IRES"는 시트론 (단백질 코딩 지역)의 ATG와 같은 개시 코돈으로의 직접적인 내부 리보솜 유입을 촉진시킴으로써 유전자의 캡 (cap)-독립적 해독을 유도하는 요소를 나타낸다 (참조: 예를 들어, Jackson *et al.*, 1990. *Trends Biochem Sci* 15(12):477-83) 및 Jackson and Kaminski. 1995. *RNA* 1(10):985-1000). 특별한 구체예에서, 본 발명에 의해서 고려되는 벡터는 하나 이상의 폴리펩타이드를 인코딩하는 하나 이상의 관심이 있는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 다수의 폴리펩타이드 각각의 효율적인 해독을 달성하기 위해서, 폴리뉴클레오타이드 서열은 하나 이상의 IRES 서열 또는 자가-분해성 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열에 의해서 분리될 수 있다.

[0109] 본 명세서에서 사용된 것으로서, 용어 "코작 서열"은 리보솜의 작은 서브유닛에 대한 mRNA의 초기 결합을 크게 촉진시키고, 해독을 증가시키는 짧은 뉴클레오타이드 서열을 나타낸다. 공통 코작 서열은 (GCC)RCCATGG이며, 여기에서 R은 퓨린 (A 또는 G)이다 (Kozak, 1986. *Cell*. 44(2):283-92, 및 Kozak, 1987. *Nucleic Acids Res.* 15(20):8125-48). 특별한 구체예에서, 본 발명에 의해서 고려되는 벡터는 공통 코작 서열을 가지며, 바람직한 폴리펩타이드, 예를 들어, ABCD1을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다.

[0110] 특별한 구체예에서, 벡터는 발현될 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드의 폴리아데닐화 서열 3'를 포함한다. 폴리아데닐화 서열은 코딩 서열의 3' 말단에 폴리A 테일을 첨가함으로써 mRNA 안정성을 촉진시킬 수 있으며, 따라서 증가된 해독 효율에 기여할 수 있다. 인식된 폴리아데닐화 부위에는 이상적인 폴리A 서열 (예를 들어, AATAAA, ATTAAA AGTAAA), 소 성장 호르몬 폴리A 서열 (BGHpA), 토끼 β -글로빈 폴리A 서열 (r β gpA), 또는 본 기술분야에서 공지된 또 다른 적합한 이중 또는 내인성 폴리A 서열이 포함된다.

[0111] 특정의 구체예에서, 벡터는 선택가능한 마커로 또한 불리는 선택 유전자를 포함한다. 전형적인 선택 유전자는 (a) 항생제 또는 다른 독소, 예를 들어, 앰피실린, 네오마이신, 하이그로마이신, 메토타렉세이트, 제오신 (Zeocin), 블라스토시딘 (Blastocidin), 또는 테트라사이클린에 대한 저항성을 부여하거나, (b) 영양요구성 결핍을 보완하거나, (c) 복잡한 배지로부터 이용할 수 있는 중요한 영양소를 공급하는 단백질을 인코딩하며, 예를 들어, 바실루스에 대한 D-알라닌 라세미아제를 인코딩하는 유전자이다. 임의의 수의 선택 시스템이 형질전환된 세포주를 회수하기 위해서 사용될 수 있다. 이들에는 각각 tk- 또는 ap^rt-세포에서 이용될 수 있는 단순포진 바이러스 티미딘 키나제 (Wigler *et al.*, 1977. *Cell* 11:223-232) 및 아데닌 포스포리보실트랜스퍼라제 (Lowy *et al.*, 1990. *Cell* 22:817-823) 유전자가 포함되나, 이들로 제한되지는 않는다.

[0112] "숙주 세포"는 본 발명의 재조합 벡터 또는 폴리뉴클레오타이드에 의해 생체내 또는 시험관내에서 형질감염되거나 감염된 세포를 포함한다. 숙주 세포는 패키징 세포, 생산자 세포, 및 바이러스 벡터로 감염된 세포를 포함할 수 있다. 특별한 구체예에서, 본 발명의 바이러스 벡터로 감염된 숙주 세포는 치료가 필요한 대상체에게 투여된다.

[0113] 대규모 바이러스 입자 생산은 종종 합리적인 바이러스 역가를 달성하기 위해서 필요하다. 바이러스 입자는 전이 벡터를 바이러스 구조 및/또는 액세서리 (accessory) 유전자, 예를 들어, gag, pol, env, tat, rev, vif, vpr, vpu, vpx, 또는 nef 유전자 또는 그 밖의 다른 레트로바이러스 유전자를 포함하는 패키징 세포주 내로 형질감염 시킴으로써 생산된다.

[0114] 본 명세서에서 사용된 것으로서, 용어 "패키징 벡터"는 패키징 시그널이 결여되고, 1, 2, 3, 4 개 이상의 바이러스 구조 및/또는 액세서리 유전자를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현 벡터 또는 바이러스 벡터를 나타낸다. 전형적으로, 패키징 벡터는 패키징 세포 내에 포함되며, 형질감염, 형질도입 또는 감염을 통해서 세포 내로 도입된다. 형질감염, 형질도입 또는 감염의 방법은 본 기술분야에서 숙련된 전문가에게 잘 알려져 있다. 본 발명의 레트로바이러스/렌티바이러스 벡터는 형질감염, 형질도입 또는 감염에 의해 패키징 세포주 내로 도입되어 생산자 세포 또는 세포주를 생성시킬 수 있다. 본 발명의 패키징 벡터는 예를 들어, 칼슘 포스페이트 형질감염, 리포펙션 (lipofection) 또는 전기천공을 포함한 표준 방법에 의해서 인간 세포 또는 세포주 내로

도입될 수 있다. 일부의 구체예에서, 패키징 벡터는 네오마이신, 하이그로마이신, 퓨로마이신, 블라스토시딘, 제오신, 티미딘 키나제, DHFR, Gln 신테타제 또는 ADA와 같은 우성 선택가능한 마커 (dominant selectable marker)와 함께 세포 내로 도입되며, 이어서 적절한 약물의 존재 하에서의 선택 및 클론의 분리가 이어진다. 선택가능한 마커 유전자는 패키징 벡터에 의해서, 예를 들어, IRES 또는 자체 분해성 바이러스 썩타이드에 의해서 인코딩하는 유전자에 물리적으로 결합될 수 있다.

[0115] 바이러스 외피 단백질 (env)은 세포주로부터 생성된 재조합 레트로바이러스에 의해서 궁극적으로 감염 및 형질 전환될 수 있는 숙주 세포의 범위를 결정한다. HIV-1, HIV-2, SIV, FIV 및 EIV와 같은 렌티바이러스의 경우에, env 단백질은 gp41 및 gp120을 포함한다. 바람직하게는, 본 발명의 패키징 세포에 의해서 발현된 바이러스 env 단백질은 전술한 바와 같이 바이러스 gag 및 pol 유전자로부터 별개의 벡터 상에서 인코딩된다.

[0116] 본 발명에서 사용될 수 있는 레트로바이러스-유래된 env 유전자의 예시적인 예로는 MLV 외피, 10A1 외피, BAEV, FeLV-B, RD114, SSAV, 에볼라 (Ebola), 센다이 (Sendai), FPV (조류 독감 (Fowl plague) virus), 및 인플루엔자 바이러스 외피가 포함되나, 이들로 제한되지는 않는다. 유사하게, RNA 바이러스 (예를 들어, 피코르나비리다에 (Picornaviridae), 칼시비리다에 (Calciviridae), 아스트로비리다에 (Astroviridae), 토가비리다에 (Togaviridae), 플라비비리다에 (Flaviviridae), 코로나비리다에 (Coronaviridae), 파라믹소비리다에 (Paramyxoviridae), 라브도비리다에 (Rhabdoviridae), 필로비리다에 (Filoviridae), 오르토믹소비리다에 (Orthomyxoviridae), 분야비리다에 (Bunyaviridae), 아레나비리다에 (Arenaviridae), 레오비리다에 (Reoviridae), 버나비리다에 (Birnaviridae), 레트로비리다에 (Retroviridae)의 RNA 바이러스 패밀리로 부터 뿐만 아니라 DNA 바이러스 (헤파드나비리다에 (Hepadnaviridae), 서코비리다에 (Circoviridae), 파르보비리다에 (Parvoviridae), 파포바비리다에 (Papovaviridae), 아데노비리다에 (Adenoviridae), 헤르페스비리다에 (Herpesviridae), 폭시이리다에 (Poxviridae), 및 이리도비리다에 (Iridoviridae)의 패밀리로 부터의 외피를 인코딩하는 유전자가 이용될 수 있다. 대표적인 예로는 FeLV, VEE, HFVW, WDSV, SFV, 래비스 (Rabies), ALV, BIV, BLV, EBV, CAEV, SNV, ChTLV, STLV, MPMV, SMRV, RAV, FuSV, MH2, AEV, AMV, CT10, EIAV가 포함된다.

[0117] 다른 구체예에서, 본 발명의 바이러스를 슈도타이핑 (pseudotyping)하기 위한 외피 단백질에는 다음의 바이러스들이 포함되나, 이들 중의 어느 것으로 제한되지는 않는다: H1N1, H1N2, H3N2 및 H5N1 (조류 독감)과 같은 인플루엔자 A, 인플루엔자 B, 인플루엔자 C 바이러스, A형 간염 바이러스, B형 간염 바이러스, C형 간염 바이러스, D형 간염 바이러스, E형 간염 바이러스, 로타바이러스, 노르윅 (Norwalk) 바이러스 그룹의 임의의 바이러스, 장의 아데노바이러스 (adenoviruses), 파르보바이러스 (parvovirus), 뎅기열 (Dengue fever) 바이러스, 원숭이 두창 (Monkey pox), 모노네가비랄레스 (Mononegavirales), 광견병 바이러스, 라고스 배트 (Lagos bat) 바이러스, 모콜라 (Mokola) 바이러스, 두벤하제 (Duvénhage) 바이러스, 유로피안 배트 (European bat) 바이러스 1 및 2 및 오스트랄리안 배트 (Australian bat) 바이러스와 같은 리사바이러스 (Lyssavirus), 에페메로바이러스 (Ephemerovirus), 베시쿨로바이러스 (Vesiculovirus), 수포성 구내염 (Vesicular Stomatitis) 바이러스 (VSV), 단순 포진 바이러스 유형 1 및 2, 수두 대상포진 (varicella zoster), 사이토메갈로바이러스, 엡스타인-바르 (Epstein-Bar) 바이러스 (EBV), 인간 헤르페스바이러스 (HHV), 인간 헤르페스바이러스 유형 6 및 8, 인간 면역 결핍 바이러스 (HIV), 파필로마 바이러스 (papilloma virus), 뮤린 감마헤르페스바이러스와 같은 헤르페스바이러스, 아레나바이러스 (Arenaviruses), 예를 들어, 아르헨티나 출혈열 (Argentine hemorrhagic fever) 바이러스, 볼리비아 출혈열 바이러스, 사비아 (Sabia)-연관된 출혈열 바이러스, 베네주엘라 출혈열 바이러스, 라사열 (Lassa fever) 바이러스, 마쿠포 (Machupo) 바이러스, 림프구성 맥락수막염 (Lymphocytic choriomeningitis) 바이러스 (LCMV), 분야비리다에, 예를 들어, 크림미안-콩고 (Crimean-Congo) 출혈열 바이러스, 한타바이러스 (Hantavirus), 신장 증후군을 야기하는 바이러스에 의한 출혈열, 리프트 밸리열 (Rift Valley fever) 바이러스, 에볼라 출혈열 및 마르버그 (Marburg) 출혈열을 포함하는 필로비리다에 (필로바이러스), 케이사누르 산림병 (Kaysanur Forest disease) 바이러스를 포함하는 플라비비리다에, 옴스크 (Omsk) 출혈열 바이러스, 진드기-매개 뇌염을 야기하는 바이러스 및 파라믹소비리다에, 예를 들어, 헨드라 (Hendra) 바이러스 및 니파 (Nipah) 바이러스, 바리올라 메이저 (variola major) 및 바리올라 마이너 (variola minor) (천연두), 알파바이러스, 예를 들어, 베네주엘라 말 뇌염 바이러스, 동부형 말 뇌염 (eastern equine encephalitis) 바이러스, 서부형 (western) 말 뇌염 바이러스, SARS-연관된 코로나바이러스 (SARS-CoV), 웨스트 나일 (West Nile) 바이러스, 임의의 뇌염-야기 바이러스.

[0118] 한가지 구체예에서, 본 발명은 VSV-G 당단백질로 슈도타입화된 재조합 레트로바이러스, 예를 들어, 렌티바이러스를 생산하는 패키징 세포를 제공한다.

- [0119] 본 명세서에서 사용된 것으로서, 용어 "슈도타입" 또는 "슈도타이핑"은 그의 바이러스 외피 단백질이 바람직한 특징을 갖는 다른 바이러스의 것으로 치환된 바이러스를 나타낸다. 예를 들어, HIV 외피 단백질 (env 유전자에 의해서 인코딩됨)은 통상적으로 바이러스를 CD4+ 세포에 대해서 표적화하기 때문에, HIV는 HIV가 더 넓은 범위의 세포를 감염시키도록 소포성 구내염 바이러스 G-단백질 (VSV-G) 외피 단백질로 슈도타입화될 수 있다. 본 발명의 바람직한 구체예에서, 렌티바이러스 외피 단백질은 VSV-G에 의해서 슈도타입화된다. 한가지 구체예에서, 본 발명은 VSV-G 외피 당단백질로 슈도타입화된 재조합 레트로바이러스, 예를 들어, 렌티바이러스를 생산하는 패키징 세포를 제공한다.
- [0120] 본 명세서에서 사용된 것으로서, 용어 "패키징 세포주"는 패키징 시그널을 함유하지 않지만, 바이러스 입자의 정확한 패키징에 필요한 바이러스 구조 단백질 및 복제 효소 (예를 들어, gag, pol 및 env)를 안정적으로 또는 일시적으로 발현하는 세포주에 관하여 사용된다. 임의의 적합한 세포주가 본 발명의 패키징 세포를 제조하기 위해서 사용될 수 있다. 일반적으로, 세포는 포유동물 세포이다. 특별한 구체예에서, 패키징 세포주를 생산하기 위해서 사용된 세포는 인간 세포이다. 사용될 수 있는 적합한 세포주에는 예를 들어, CHO 세포, BHK 세포, MDCK 세포, C3H 10T1/2 세포, FLY 세포, Psi-2 세포, BOSC 23 세포, PA317 세포, WEHI 세포, COS 세포, BSC 1 세포, BSC 40 세포, BMT 10 세포, VERO 세포, W138 세포, MRC5 세포, A549 세포, HT1080 세포, 293 세포, 293T 세포, B-50 세포, 3T3 세포, NIH3T3 세포, HepG2 세포, Saos-2 세포, Huh7 세포, HeLa 세포, W163 세포, 211 세포, 및 211A 세포가 포함된다. 바람직한 구체예에서, 패키징 세포는 293 세포, 293T 세포, 또는 A549 세포이다. 또 다른 바람직한 구체예에서, 세포는 A549 세포이다.
- [0121] 본 명세서에서 사용된 것으로서, 용어 "생산자 세포주"는 패키징 세포주 및 패키징 시그널을 포함하는 전이 벡터를 포함하는, 재조합 레트로바이러스 입자를 생산할 수 있는 세포주를 나타낸다. 감염성 바이러스 입자 및 바이러스 저장 용액의 생산은 통상적인 기술을 사용하여 수행될 수 있다. 바이러스 저장 용액을 제조하는 방법은 본 기술분야에서 공지되어 있으며, 예를 들어, 문헌 (Y. Soneoka *et al.* (1995) *Nucl. Acids Res.* 23:628-633, 및 N. R. Landau *et al.* (1992) *J. Virol.* 66:5110-5113)에 예시되어 있다. 감염성 바이러스 입자는 통상적인 기술을 사용하여 패키징 세포로부터 수거될 수 있다. 예를 들어, 감염성 입자는 본 기술분야에서 공지된 바와 같이 세포 용해, 또는 세포 배양물의 상등액의 수거에 의해서 수거될 수 있다. 임의로, 수거된 바이러스 입자는 필요에 따라 정제될 수 있다. 적합한 정제 기술은 본 기술분야에서 숙련된 전문가에게 잘 알려져 있다.
- [0122] 형질감염에 의해서가 아닌 바이러스 감염에 의해서 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 벡터를 사용한 유전자(들) 또는 다른 폴리뉴클레오타이드 서열의 송달은 "형질도입"이라 칭한다. 한가지 구체예에서, 레트로바이러스 벡터는 감염 및 프로바이러스 통합을 통해서 세포 내에 형질도입된다. 특정의 구체예에서, 세포가 바이러스 또는 레트로바이러스 벡터를 사용한 감염에 의해서 세포에 송달된 유전자 또는 다른 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함한다면, 세포는 "형질도입"된 것이다. 특별한 구체예에서, 형질도입된 세포는 그의 세포 계능 내에 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 벡터에 의해서 송달된 유전자 또는 다른 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함한다.
- [0123] 특별한 구체예에서, 치료학적 폴리펩타이드, 예를 들어, ABCD1 폴리펩타이드를 발현하는 본 발명의 바이러스 벡터에 의해서 형질도입된 숙주 세포는 질병, 장애 또는 상태, 예를 들어, 부신백질이영양증 또는 부신척수신경병증을 치료 및/또는 예방하기 위해서 대상체에게 투여된다. 본 발명의 특정의 구체예에 따라 이용될 수 있는 유전자 요법에서의 바이러스 벡터의 사용에 관한 다른 방법은 예를 들어, 문헌 (Kay, M. A. (1997) *Chest* 111(6 Supp.):138S-142S; Ferry, N. and Heard, J. M. (1998) *Hum. Gene Ther.* 9:1975-81; Shiratory, Y. *et al.* (1999) *Liver* 19:265-74; Oka, K. *et al.* (2000) *Curr. Opin. Lipidol.* 11:179-86; Thule, P. M. and Liu, J. M. (2000) *Gene Ther.* 7:1744-52; Yang, N. S. (1992) *Crit. Rev. Biotechnol.* 12:335-56; Alt, M. (1995) *J. Hepatol.* 23:746-58; Brody, S. L. and Crystal, R. G. (1994) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 716:90-101; Strayer, D. S. (1999) *Expert Opin. Investig. Drugs* 8:2159-2172; Smith-Arica, J. R. and Bartlett, J. S. (2001) *Curr. Cardiol. Rep.* 3:43-49; 및 Lee, H. C. *et al.* (2000) *Nature* 408:483-8)에서 확인될 수 있다.
- [0124] 본 명세서에서 사용된 것으로서, 문맥이 명백하게 다른 식으로 나타내지 않는 한, "치료", 및 "치료된", "치료하는" 등과 같은 유사한 단어는 바람직하게는 임상적 결과를 포함하는 유익하거나 바람직한 결과를 수득하기 위한 접근방법을 나타낸다. 치료는 임의로, 질병 또는 상태의 증상의 감소 또는 개선, 또는 질병 또는 상태의 진행의 지연을 포함할 수 있다.
- [0125] 본 명세서에서 사용된 것으로서, 문맥이 명백하게 다른 식으로 나타내지 않는 한, "예방한다", 및 "예방된", "

예방하는" 등과 같은 유사한 단어는 질병 또는 상태의 출현 또는 재발의 가능성을 방지, 억제 또는 감소시키는 접근방법을 나타낸다. 또한, 이것은 질병 또는 상태의 발현 또는 재발을 지연시키거나, 질병 또는 상태의 증상의 출현 또는 재발을 지연시키는 것을 나타낸다. 본 명세서에서 사용된 것으로서, "예방" 및 유사한 단어들은 또한 질병 또는 상태의 발현 또는 재발 전에 질병 또는 상태의 강도, 영향, 증상 및/또는 부담을 감소시키는 것을 포함한다.

[0126] 본 명세서에서 사용된 것으로서, 형질도입된 숙주 세포 또는 물질의 "유효량" 또는 "치료학적 유효량"은 임상적 결과를 포함하는 유익한 결과와 같은 바람직한 생물학적 효과를 제공하는데 충분한 양이다.

[0127] 본 명세서에서 사용된 것으로서, "약제학적으로 허용되는 담체"는 모든 용매, 분산 매질, 코팅, 향균 및 항진균제, 등장화제 및 흡수 지연제, 및 약제학적으로 허용되는 세포 배양 배지를 포함하는 생리학적으로 허용되는 그 밖의 것을 포함한다. 한가지 구체예에서, 담체는 비경구 투여에 적합하다. 담체는 혈관내 (예를 들어, 정맥내 또는 동맥내), 복강내 또는 근육내 투여에 적합할 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체에는 멸균 수성 용액 또는 분산액, 및 멸균 주사용 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 멸균 분말이 포함된다. 약제학적으로 활성인 물질을 위한 이러한 매질 및 작용제의 사용은 본 기술분야에서 잘 알려져 있다. 임의의 통상적인 매질 또는 작용제가 형질도입된 세포와 양립하지 않는 경우를 제외하고는, 본 발명의 약제학적 조성물에서의 그의 사용이 고려된다.

[0128] 관사 "하나" ("a", "an") 및 "상기" ("the")는 그 관사의 하나 이상 (즉, 적어도 하나)의 문법적 대상체를 나타내기 위해서 사용된다. 예를 들어, 하나의 "요소"는 하나의 요소 또는 하나 이상의 요소를 의미한다.

[0129] 대체용어 (예를 들어, "또는")의 사용은 대체 대상 중의 하나, 둘 다 또는 이들의 모든 조합을 의미하는 것으로 이해되어야 한다. 본 명세서에서 사용된 것으로서, 용어 "포함한다 (include)" 및 "포함한다 (comprise)"는 동의어로 사용된다.

[0130] 본 명세서에서 사용된 것으로서, 용어 "약" 또는 "대략"은 기준 양, 수준, 값, 수, 빈도, 백분율, 치수 (dimension), 크기, 양, 중량 또는 길이의 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% 또는 1%만큼까지 변화하는 양, 수준, 값, 수, 빈도, 백분율, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이를 나타낸다. 한가지 구체예에서, 용어 "약" 또는 "대략"은 기준 양, 수준, 값, 수, 빈도, 백분율, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이의 대략 $\pm 15\%$, $\pm 10\%$, $\pm 9\%$, $\pm 8\%$, $\pm 7\%$, $\pm 6\%$, $\pm 5\%$, $\pm 4\%$, $\pm 3\%$, $\pm 2\%$, 또는 $\pm 1\%$ 인 양, 수준, 값, 수, 빈도, 백분율, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이의 범위를 나타낸다.

[0131] 본 명세서 전체에 걸쳐서, 문맥이 다른 식으로 요구하지 않는 한, 단어 "포함한다 (comprise)", "포함한다 (comprises)" 및 "포함하는 (comprising)"은 언급된 단계 또는 요소 또는 단계 또는 요소의 그룹을 포함하지만, 어떤 다른 단계 또는 요소 또는 단계 또는 요소의 그룹을 배제하지는 않는 것을 의미하는 것으로 이해될 것이다. "~로 구성되는"은 문구 "~로 구성되는"에 이어지는 것은 무엇이든지 포함하며, 이들로 제한되는 것을 의미한다. 따라서, 문구 "~로 구성되는"은 열거된 요소가 필요하거나 필수적인 것이며, 존재할 수 있는 다른 요소가 없음을 나타낸다. "본질적으로 ~로 구성되는"은 문구 다음에 열거된 임의의 요소를 포함하며, 열거된 요소에 대한 설명에 명시된 활성 또는 작용을 저해하지 않거나 명시된 활성 또는 작용에 기여하는 다른 요소들로 제한되는 것을 의미한다. 따라서, 문구 "본질적으로 ~로 구성되는"은 열거된 요소가 필요하거나 필수적이지만, 임의적이며, 열거된 요소의 활성 또는 작용에 영향을 미치지 아니지에 따라 존재할 수 있거나 존재하지 않을 수 있는 다른 요소가 없음을 나타낸다.

[0132] 본 명세서 전체적으로 "하나의 구체예" 또는 "구체예"에 대한 언급은 구체예와 관련하여 기술된 특별한 양상, 구조 또는 특징이 본 발명의 한가지 구체예에 포함되는 것을 의미한다. 따라서, 본 명세서 전체적으로 다양한 위치에서 문구 "한가지 구체예에서," 또는 "구체예에서"의 출현은 반드시 모두가 동일한 구체예를 언급하는 것은 아니다. 더욱이, 특별한 특색, 구조 또는 특징은 하나 이상의 구체예에서 모든 적합한 방식으로 조합될 수 있다.

[0133] 이하의 설명에서는, 특정한 구체적인 상세한 내용이 본 발명의 다양한 구체예의 완전한 이해를 제공하기 위해서 제시된다. 그러나, 본 기술분야에서 숙련된 전문가가 본 발명이 이들 상세한 내용 없이도 실행될 수 있다는 것을 이해할 것이다. 또한, 본 명세서에 기술된 구조 및 치환체의 다양한 조합으로부터 유도된 개개의 벡터 또는 벡터의 그룹은 마치 각각의 벡터 또는 벡터의 그룹이 개별적으로 제시된 것처럼 동일한 정도로 본 출원에 기술된 것으로 이해되어야 한다. 따라서, 특별한 벡터 구조 또는 특별한 치환체의 선택은 본 발명의 범주 내에 포함

된다.

C. 바이러스 벡터

레트로바이러스 및 렌티바이러스 벡터를 시험하여 관심이 있는 유전자의 광범한 표적 세포의 계층 내로의 안전한 도입을 위한 적합한 송달 비히클인 것으로 확인하였다. 다수의 벡터 디자인은 FLAP, RRE, 및 HPRE 또는 WPRE 서열을 포함시킴으로써 최대 형질도입 효율 및 이식유전자 발현에 대해서 최적화되었다. 특히, 본 기술분야에서 통상적으로 숙련된 전문가들은 종종 전사후 조절 서열을 포함시켜 이식유전자 발현을 증가시킨다. 놀랍게도, 본 발명자들은 WPRE 서열의 포함은 발현을 상당히 증가시키지 않은 것을 발견하였다.

이러한 배열은 그의 5' 부분이 이중 핵산 코딩 서열을 포함하고, 그의 3' 부분이 전사-후 조절 요소 서열을 포함하는 mRNA 전사물의 합성을 제공한다. 바람직한 구체예에서, 본 발명의 벡터는 WPRE 또는 HPRE와 같은 전사-후 조절 요소를 결여하거나 포함하지 않는데, 이는 일부의 경우에 이들 요소는 세포 변형의 위험을 증가시키고/시킴거나 mRNA 전사물의 양 또는 mRNA 안정성을 실질적으로 또는 상당히 증가시키지 않기 때문이다. 따라서, 일부의 구체예에서 본 발명의 벡터는 부가된 안전성 수단으로서 WPRE 또는 HPRE를 결여하거나 포함하지 않는다.

본 발명은 추가로, 본 발명의 방법을 실행하기 위해서 사용될 수 있는 전이 벡터를 제공한다.

숙련된 전문가는 이러한 전이 벡터가 다양한 종류의 바이러스 벡터를 사용하여 생산될 수 있음을 인식할 것이며, 특별한 구체예에서 전이 벡터는 레트로바이러스 벡터 또는 렌티바이러스 벡터인데, 이는 부분적으로 렌티바이러스 벡터가 시험관내 및 생체내 모두에서 이식유전자의 비-분할성 세포 내로의 효율적인 송달, 통합 및 장기간 발현을 제공할 수 있기 때문이다. 다양한 렌티바이러스 벡터는 본 기술분야에서 공지되어 있다 (참조: Naldini *et al.*, (1996a, 1996b, 및 1998); Zufferey *et al.*, (1997); Dull *et al.*, 1998, 미국 특허 제 6,013,516; 및 5,994,136호; 이들 중의 어떤 것이라도 본 발명의 전이 벡터를 생산하도록 개조될 수 있다). 일반적으로, 이들 벡터는 플라스미드-기반 또는 바이러스-기반이며, 치료학적 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산을 숙주 세포 내로 전이시키는데 필수적인 서열을 운반하도록 배열된다.

렌티바이러스 계층 및 프로바이러스 DNA는 레트로바이러스에서 발견되는 3 개의 유전자, 즉 2개의 긴 말단 반복 부위(LTR) 서열이 측면에 있는 gag, pol 및 env를 포함한다. gag 유전자는 내부 구조 (매트릭스, 캡시드 및 뉴클레오펙시드) 단백질을 인코딩하며; pol 유전자는 RNA-지시된 DNA 폴리머라제 (역전사효소), 프로테아제 및 인테그라제를 인코딩하고; env 유전자는 바이러스 외피 당단백질을 인코딩한다. 5' 및 3' LTR은 각각 비리온 RNAs의 전사 및 폴리아데닐화를 촉진시키는 작용을 한다. 렌티바이러스는 vif, vpr, tat, rev, vpu, nef 및 vpx를 포함하는 추가의 유전자를 갖는다. 5' LTR에 인접하여 계층의 역전사 (tRNA 프라이머 결합 부위) 및 바이러스 RNA의 입자 내로의 효율적인 캡시드화 (Psi 부위)에 필요한 서열이 존재한다.

추가적 구체예에서, 렌티바이러스 벡터는 HIV 벡터이다. 따라서, 벡터는 인간 면역결핍-1 (HIV-1), 인간 면역결핍-2 (HIV-2), 시미안 면역결핍 바이러스 (SIV), 고양이 면역결핍 바이러스 (FIV), 소 면역결핍 바이러스 (BIV), 켈브라나병 (Jembrana Disease) 바이러스 (JDV), 말 전염성 빈혈 바이러스 (EIAV), 염소 관절염 뇌염 바이러스 (CAEV) 등으로부터 유래될 수 있다. HIV 기본 벡터 골격 (즉, HIV 시스-작용 서열 요소 및 HIV gag, pol 및 rev 유전자)은 일반적으로, HIV-기본 구조물이 인간 세포의 형질도입 시에 가장 효율적이라는 점에서 본 발명의 대부분의 관점과 관련하여 바람직하다.

다양한 구체예에서, 본 발명의 벡터는 부신백질이영양증 및/또는 부신축수신경병증에 대한 치료법을 제공하는 폴리펩타이드를 인코딩하는 유전자에 작동적으로 연결된 소교세포 내의 프로모터를 포함한다. 벡터는 하나 이상의 LTR을 가질 수 있으며, 여기에서 어느 하나의 LTR은 하나 이상의 뉴클레오타이드 치환, 첨가 또는 결실과 같은 하나 이상의 변형을 포함한다. 본 발명의 벡터가 WPRE 또는 HPRE를 포함하지 않는 것을 제외하고는, 벡터는 추가로, 형질도입 효율 (예를 들어, cPPT/FLAP), 바이러스 패키징 (예를 들어, Psi (Ψ) 패키징 시그널, RRE)을 증가시키는 하나 이상의 액세서리 요소, 및/또는 치료학적 유전자 발현 (예를 들어, 폴리(A) 서열)을 증가시키는 다른 요소를 더 포함할 수 있다.

특별한 구체예에서, 본 발명의 전이 벡터는 좌측 (5') 레트로바이러스 LTR; 중앙 폴리퓨린 트랙트/DNA 플랩 (cPPT/FLAP); 레트로바이러스 익스포트 요소; ATP-결합 카세트, 서브-패밀리 D, 구성원 1 (ABCD1) 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드에 작동적으로 연결된, 소교세포에서 활성인 프로모터; 및 우측 (3') 레트로바이러스 LTR을 포함하며; 여기에서 벡터는 우드척 전사-후 조절 요소 (WPRE)를 포함하지 않는다.

특별한 구체예에서, 본 발명의 전이 벡터는 좌측 (5') 레트로바이러스 LTR; 레트로바이러스 익스포트 요소; ATP-결합 카세트, 서브-패밀리 D, 구성원 1 (ABCD1) 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드에 작동적

로 연결된, 소교세포에서 활성인 프로모터; 우측 (3') 레트로바이러스 LTR; 및 폴리 (A) 서열을 포함하며, 여기에서 벡터는 우드척 전사-후 조절 요소 (WPRE)를 포함하지 않는다. 또 다른 특별한 구체예에서, 본 발명은 좌측 (5') LTR; cPPT/FLAP; RRE; 인간 ABCD1 폴리펩타이드 (예를 들어, 서열번호 1-2)를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드에 작동적으로 연결된 MND 프로모터; 우측 (3') LTR; 및 폴리아데닐화 서열을 포함하며, 우드척 전사-후 조절 요소 (WPRE)를 포함하지 않는 렌티바이러스 벡터를 제공한다.

[0144] 특정의 구체예에서, 본 발명은 좌측 (5') HIV-1 LTR; 프사이 (Ψ) 패키징 시그널; cPPT/FLAP; RRE; 인간 ABCD1 폴리펩타이드를 인코딩하는 cDNA에 작동적으로 연결된 MND 프로모터; 우측 (3') 자가-불활성화 (SIN) HIV-1 LTR; 및 토끼 β -글로빈 폴리아데닐화 서열을 포함하며, 우드척 전사-후 조절 요소 (WPRE)를 포함하지 않는 렌티바이러스 벡터를 제공한다.

[0145] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 적어도 하나의 LTR; 중앙 폴리퓨린 트랙트/DNA 플랩 (cPPT/FLAP); 레트로바이러스 익스포트 요소; 및 ATP-결합 카세트, 서브-패밀리 D, 구성원 1 (ABCD1) 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드에 작동적으로 연결된, 소교세포에서 활성인 프로모터를 포함하며; 우드척 전사-후 조절 요소 (WPRE)를 포함하지 않는 벡터를 제공한다.

[0146] 특별한 구체예에서, 본 발명은 적어도 하나의 LTR; cPPT/FLAP; RRE; 인간 ABCD1 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드에 작동적으로 연결된 MND 프로모터; 및 폴리아데닐화 서열을 포함하며; 우드척 전사-후 조절 요소 (WPRE)를 포함하지 않는 벡터를 제공한다.

[0147] 특정의 구체예에서, 본 발명은 적어도 하나의 SIN HIV-1 LTR; 프사이 (Ψ) 패키징 시그널; cPPT/FLAP; RRE; 인간 ABCD1 폴리펩타이드를 인코딩하는 cDNA에 작동적으로 연결된 MND 프로모터; 및 토끼 β -글로빈 폴리아데닐화 서열을 포함하며, 우드척 전사-후 조절 요소 (WPRE)를 포함하지 않는 벡터를 제공한다.

[0148] 숙련된 전문가가 치료학적 이식유전자가 WPRE 또는 HPRE 요소를 결여하는 레트로바이러스 벡터 내의 소교세포에서 발현되도록 다수의 다른 상이한 구체예가 본 발명의 기존의 구체예로부터 형성될 수 있음을 인식할 것이다.

[0149] D. 조성물 및 제형

[0150] 본 발명은 추가로, 본 발명에 기술된 방법에 따라 생산된 형질도입된 세포 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 포함한다. 한가지 구체예에서, 담체는 비경구 투여에 적합하다. 담체는 정맥내, 복강내 또는 근육내 투여에 적합할 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체에는 멸균 수성 용액 또는 분산액 및 멸균 주사용 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 멸균 분말이 포함된다. 약제학적 활성 물질을 위한 이러한 매질 및 작용제의 사용은 본 기술분야에서 잘 알려져 있다.

[0151] 본 발명의 조성물은 단독으로 또는 하나 이상의 다른 치료 양식과 조합하여 세포 또는 동물에게 투여하기 위한 약제학적으로 허용되거나 생리학적으로 허용되는 용액 중에서 제형화된, 본 발명에 기술된 바와 같은 하나 이상의 폴리펩타이드, 폴리뉴클레오타이드, 동일한 형질도입 세포를 포함하는 벡터 등을 포함할 수 있다. 또한, 필요한 경우에, 본 발명의 조성물은 예를 들어, 다른 단백질, 폴리펩타이드, 소분자 또는 다양한 약제학적 활성 작용제와 같은 다른 작용제와 함께 투여될 수 있는 것으로 이해될 것이다. 조성물 내에 또한 포함될 수 있는 다른 성분은 대해 실질적으로 제한은 없으며, 단 추가의 작용제는 의도된 유전자 요법을 전달하는 조성물의 능력에 악영향을 미치지 않아야 한다.

[0152] 본 발명의 약제학적 조성물에서, 약제학적으로 허용되는 부형제 및 담체 용액의 제형은, 예를 들어, 경구, 비경구, 정맥내, 비내, 및 근육내 투여를 포함하는 다양한 치료 레지멘 및 제형에서 본 발명에 기술된 특별한 조성물을 사용하기 위한 적합한 투약 및 치료 레지멘의 개발과 마찬가지로 본 기술분야에서 숙련된 전문가에게 잘 알려져 있다.

[0153] 특정의 구체예에서, 본 발명에 기술된 조성물은 예를 들어, 미국 특허 제5,543,158호; 미국 특허 제5,641,515호 및 미국 특허 제5,399,363호 (이들은 각각 본 발명에 구체적으로 온전히 참고로 포함된다)에 기술된 바와 같이 비경구적으로, 정맥내로, 근육내로, 또는 복강내로도 송달하는데 바람직하다. 유리 염기 또는 약물학적으로 허용된 염으로서의 활성 화합물의 용액은 하이드록시프로필셀룰로오스와 같은 계면활성제와 적합하게 혼합된 물 중에서 제조될 수 있다. 분산액은 또한, 글리세롤, 액체 폴리에틸렌 글리콜 및 이들의 혼합물 중에서, 및 오일 중에서 제조될 수 있다. 저장 및 사용의 통상적인 조건 하에서, 이들 제제는 미생물의 성장을 방지하기 위한 보존제를 함유한다.

[0154] 주사용으로 사용하기에 적합한 약제학적 형태에는 멸균 수성 용액 또는 분산액, 및 멸균 주사용 용액 또는 분산

액의 즉석 제조를 위한 멸균 분말이 포함된다 (미국 특허 제5,466,468호; 이것은 본 발명에 구체적으로 온전히 참고로 포함된다). 모든 경우에, 형태는 멸균되어야 하며, 용이한 시린지 충전가능성이 존재할 정도로 유체여야 한다. 이것은 제조 및 저장의 조건 하에서 안정하여야 하며, 박테리아 및 진균과 같은 미생물의 오염 작용에 대해서 보존되어야 한다. 담체는 예를 들어, 물, 에탄올, 폴리에틸렌 (예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 이들의 적합한 혼합물, 및/또는 식물유를 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 적절한 유동성은 예를 들어, 레시틴과 같은 코팅을 사용하거나, 분산액의 경우에는 필요한 입자 크기를 유지시키거나, 계면활성제를 사용함으로써 유지될 수 있다. 미생물의 작용의 방지는 다양한 항균 및 항진균제, 예를 들어, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르빈산, 티메로살 등에 의해서 용이하게 될 수 있다. 대부분의 경우에, 등장화제, 예를 들어, 당류 또는 나트륨 클로라이드를 포함시키는 것이 바람직할 것이다. 주사용 조성물의 장기적인 흡수는 조성물에서 흡수를 지연시키는 작용제, 예를 들어, 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴을 사용함으로써 유도될 수 있다.

[0155] 수용액으로 비경구 투여하기 위해서, 예를 들어, 용액은 필요한 경우에 적합하게 완충되어야 하며, 액체 희석제는 우선 충분한 식염수 또는 글루코스로 등장성이 되도록 한다. 이들 특별한 수용액은 특히 정맥내, 근육내, 피하 및 복강내 투여에 적합하다. 이와 관련하여, 이용될 수 있는 멸균 수성 매질은 본 발명을 고려하여 본 기술 분야에서 숙련된 전문가에게 공지될 것이다. 예를 들어, 1 투약량을 1 ml의 등장성 NaCl 용액에 용해시키고, 1000 ml의 대량피하주사 (hypodermoclysis) 유체에 첨가하거나, 제안된 주입 부위에 주사할 수 있다 (참조: 예를 들어, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Edition, Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins, 2000). 투약량에서의 약간의 변이가 치료될 대상체의 상태에 따라 필연적으로 발생할 것이다. 투여에 책임이 있는 사람은, 임의의 경우에, 개개 대상체에게 적절한 용량을 결정할 것이다. 더욱이, 인간 투여의 경우에 제제는 FDA Office of Biologics standards에 의해서 요구되는 것으로서 멸균성, 발열성 및 일반적인 안전성 및 순도 기준을 충족하여야 한다.

[0156] 멸균 주사용 용액은 필요한 양의 활성 화합물을 필요한 것으로서 상기 열거된 다양한 다른 성분들과 함께 적절한 용매에 혼합시키고, 이어서 여과 멸균함으로써 제조될 수 있다. 일반적으로, 분산액은 다양한 멸균된 활성 성분을 기본 분산액 매질 및 상기 열거된 것들로부터 필요한 다른 성분들을 함유하는 멸균 비히클 내에 혼합시킴으로써 제조된다. 멸균 주사용 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우에, 바람직한 제조 방법은 그의 이전의 멸균-여과된 용액으로부터의 활성 성분과 임의의 추가적인 바람직한 성분의 분말을 더해 수득하는 진공-건조 및 동결-건조 기술이다.

[0157] 본 발명에 기술된 조성물은 중성 또는 염 형태로 제형화될 수 있다. 약제학적으로 허용되는 염은 예를 들어, 염산 또는 인산과 같은 무기산, 또는 아세트산, 옥살산, 타르타르산, 만델산 등과 같은 유기산에 의해서 형성되는 산부가염 (단백질이 유리 아미노 기에 의해서 형성됨)을 포함한다. 유리 카복실 기에 의해서 형성된 염은 또한, 예를 들어, 나트륨, 칼륨, 암모늄, 칼슘 또는 페릭 하이드록사이드와 같은 무기 염기, 및 이소프로필아민, 트리메틸아민, 히스티딘, 프로카인 등과 같은 유기 염기로부터 유도될 수 있다. 제형화 시, 용액은 투약 제형과 양립가능한 방식으로, 치료학적으로 효과적인 양으로 투여될 것이다. 제제는 주사용 용액, 약물-방출 캡셀제 등과 같은 다양한 투약형으로 쉽게 투여된다.

[0158] 본 명세서에서 사용된 것으로서, 용어 "담체"는 모든 용매, 분산 매질, 비히클, 코팅, 희석제, 항균 및 항진균제, 등장화제 및 흡수 지연제, 완충제, 담체 용액, 현탁액, 콜로이드 등을 포함한다. 약제학적 활성 성분을 위한 이러한 매질 및 작용제의 사용은 본 기술분야에서 잘 알려져 있다. 임의의 통상적인 매질 또는 작용제가 활성 성분과 양립가능한 경우를 제외하고는, 치료학적 조성물에서의 그의 사용이 고려된다. 추가의 활성 성분은 또한 조성물 내에 혼합될 수도 있다.

[0159] 문구 "약제학적으로 허용되는"은 인간에게 투여하면 알레르기 또는 유사한 부반응을 야기하지 않는 분자 본체 및 조성물을 나타낸다. 활성 성분으로서 단백질질을 함유하는 수성 조성물의 제조는 본 기술분야에서 잘 이해되고 있다. 전형적으로, 이러한 조성물은 액체 용액 또는 현탁액으로서 주사용으로 제조되며; 주사하기 전에 액체 중에서 용액 또는 현탁액용으로 적합한 고체 형태로 제조될 수도 있다. 제제는 또한 유화될 수도 있다.

[0160] 특정의 구체예에서, 조성물은 비내 스프레이, 흡입 및/또는 다른 에어로졸 송달 비히클에 의해서 송달될 수도 있다. 유전자, 폴리뉴클레오타이드, 및 펩타이드 조성물을 비내 에어로졸 스프레이를 통해서 폐에 직접 송달하는 방법은 예를 들어, 미국 특허 제5,756,353호 및 미국 특허 제5,804,212호 (이들은 각각 본 발명에 구체적으로 온전히 참고로 포함된다)에 기술되어 있다. 마찬가지로, 비내 미립자 수지 (Takenaga *et al.*, 1998) 및 라이소포스파티딜-글리세롤 화합물 (미국 특허 제5,725,871호; 본 발명에 구체적으로 온전히 참고로 포함된다)을 사

용한 약물의 송달도 또한 약제학적 기술분야에서 잘 알려져 있다. 마찬가지로, 폴리테트라플루오로에틸렌 지지 매트릭스 형태의 경점막 약물 송달은 미국 특허 제5,780,045호 (본 발명에 구체적으로 온전히 참고로 포함된다)에 기술되어 있다.

[0161] 특정의 구체예에서, 송달은 본 발명의 조성물의 적합한 숙주 세포 내로의 도입을 위해서 리포솜, 나노캡셀, 미립자, 미립구, 지질 입자, 소포체 (vesicles), 임의로 CPP 폴리펩타이드와의 혼합 등을 사용함으로써 일어날 수 있다. 특히, 본 발명의 조성물은 송달을 위해서 지질 입자, 리포솜, 소포체, 나노구 (nanosphere), 나노입자 등에 캡셀화시켜 제형화될 수 있다. 제형 및 이러한 송달 비하클의 사용은 공지되어 있는 통상의 기술을 사용하여 수행될 수 있다. 본 발명의 제형 및 조성물은 단독으로, 또는 하나 이상의 다른 치료 양식과 함께 세포 또는 동물에게 투여하기 위하여 약제학적으로 허용되거나 생리학적으로 허용되는 용액 (예를 들어, 배양 배지) 중에서 제형화된, 본 발명에 기술된 바와 같은 다수의 폴리펩타이드, 폴리뉴클레오타이드 및 소분자의 조합으로 이루어진 하나 이상의 억제제 및/또는 활성화제를 포함할 수 있다. 또한, 필요한 경우에, 본 발명의 조성물은 역시 예를 들어, 세포, 다른 단백질 또는 폴리펩타이드 또는 다양한 약제학적 활성 작용제와 같은 다른 작용제와 함께 투여될 수 있는 것으로 이해될 수 있다.

[0162] 특별한 구체예에서, 본 발명에 따르는 제제 또는 조성물은 본 발명에 기술된 바와 같은 다수의 폴리펩타이드, 폴리뉴클레오타이드, 및 소분자의 조합과 접촉된 세포를 포함한다.

[0163] 특정의 관점에서, 본 발명은 레트로바이러스 (예를 들어, 렌티바이러스) 벡터를 포함하는 (단, 이들로 제한되지는 않는다) 바이러스 벡터 시스템의 송달 (즉, 바이러스-매개된 형질도입)에 적합한 제제 또는 조성물을 제공한다.

[0164] 생체의 송달을 위한 예시적인 제제는 또한, 칼슘 포스페이트, 전기천공, 열 쇼크 및 다양한 리포솜 제제 (즉, 지질-매개된 형질감염)와 같은 본 기술분야에서 공지된 다양한 형질감염제의 사용을 포함할 수 있다. 이하에 더 상세하게 기술된 바와 같은 리포솜은 수성 유체의 일부분을 포획하는 지질 이중층이다. DNA는 자발적으로 양이온성 리포솜의 외부 표면에 회합하고 (그의 전하에 의해서), 이들 리포솜은 세포막과 상호작용할 것이다.

[0165] 특정의 관점에서, 본 발명은 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 담체 (첨가제) 및/또는 희석제 (예를 들어, 약제학적으로 허용되는 세포 배양 배지)와 함께 제형화된, 본 발명에 기술된 바와 같은 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드의 치료학적 유효량을 포함하는 약제학적으로 허용되는 조성물을 제공한다.

[0166] 본 발명의 특별한 구체예는 약제학적 기술분야에서 잘 알려져 있으며, 예를 들어, 문헌 (Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Edition, Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins, 2000)에 기술된 것과 같은 다른 제제를 포함할 수 있다.

[0167] E. 유전자 치료 방법

[0168] 레트로바이러스 벡터는 부신백질이영양증 및 부신척수신경병증 유전자 요법의 개선된 방법을 제공한다. 본 명세서에서 사용된 것으로서, 용어 "유전자 요법"은 유전자를 세포의 게놈 내로 도입시키는 것을 나타낸다. 다양한 구체예에서, 본 발명의 바이러스 벡터는 부신백질이영양증 또는 부신척수신경병증으로 진단되거나, 이들을 앓는 것으로 의심되는 대상체에게 치유적, 예방적 또는 개선적 이득을 제공하는 폴리펩타이드를 인코딩하는 치료학적 이식유전자를 발현하는 프로모터를 포함한다. 바이러스는 생체내, 생체외 또는 시험관내에서 세포를 감염 및 형질도입시킬 수 있다. 생체외 및 시험관내 구체예에서, 형질도입된 세포는 그 후에 치료가 필요한 대상체에게 투여될 수 있다. 본 발명은 본 발명의 벡터 시스템, 바이러스 입자, 및 형질도입된 세포를 대상체에서 부신백질이영양증 또는 부신척수신경병증을 치료, 예방 및/또는 개선시키기 위해서 사용할 수 있는 것으로 생각한다.

[0169] 다양한 구체예에서, 레트로바이러스 벡터는 생체내에서 유전자 요법이 필요한 대상체의 세포, 조직 또는 기관에 직접 주사함으로써 투여된다. 다양한 다른 구체예에서, 세포는 시험관내 또는 생체외에서 본 발명의 벡터로 형질도입된다. 그 후, 형질도입된 세포는 부신백질이영양증 또는 부신척수신경병증을 갖는 대상체에게 투여된다.

[0170] 본 발명의 유전자 치료 방법에서 형질도입 및 투여하기에 적합한 세포에는 줄기 세포, 선조 세포, 및 분화된 세포가 포함되나, 이들로 제한되지는 않는다. 특정의 구체예에서, 형질도입된 세포는 골수 줄기 세포, 제대 줄기 세포, 또는 간엽 줄기 세포이다.

[0171] 다양한 구체예에서, 줄기 세포의 사용이 바람직한데, 이는 이들이 생체내에서 특별한 생물학적 위치에 투여하면 적절한 세포 유형으로 분화하는 능력을 갖기 때문이다. 용어 "줄기 세포"는 (1) 장기간 자가-재생 (self-renewal), 또는 원래의 세포의 적어도 하나의 동일한 카피를 생성시키는 능력, (2) 단일 세포 수준에서 다수의,

및 일부의 경우에는 단지 하나의, 특수화된 세포 유형으로의 분화, 및 (3)조직의 생체내 기능적 재생이 가능한 미분화된 세포인 세포를 나타낸다. 줄기 세포는 그들의 발육 잠재력에 따라 전능성 (totipotent), 다능성 (pluripotent), 다분화성 (multipotent) 및 올리고 (oligo)/단분화성 (unipotent)으로 하위 분류된다. "자가-재생"은 변화되지 않은 딸 세포를 생산하고, 특수화된 세포 유형 (효력)을 생성시키는 독특한 능력을 갖는 세포를 의미한다. 자가-재생은 두 가지 방법으로 달성될 수 있다. 비대칭 세포 분열은 부모 세포와 동일한 하나의 딸 세포 및 부모 세포와 상이하며, 선조 또는 분화된 세포인 하나의 딸 세포를 생산한다. 비대칭 세포 분열은 세포의 수를 증가시키지 않는다. 대칭 세포 분열은 두 개의 동일한 딸 세포를 생산한다. 세포의 "증식" 또는 "팽창"은 대칭적으로 분열하는 세포를 나타낸다.

[0172] 본 명세서에서 사용된 것으로서, 용어 "다능성"은 신체 또는 체세포 (즉, 적절한 배아)의 모든 계통을 형성하는 세포의 능력을 의미한다. 예를 들어, 배아 줄기 세포는 3개의 배엽인 외배엽, 중배엽 및 내배엽 각각으로부터의 세포를 형성할 수 있는 다능성 줄기 세포 유형이다. 본 명세서에서 사용된 것으로서, 용어 "다분화성"은 하나의 계통의 다수의 세포 유형을 형성시키는 성체 줄기 세포의 능력을 나타낸다. 예를 들어, 조혈 줄기 세포는 혈액 세포 계통의 모든 세포, 예를 들어, 림프구 및 골수양 세포를 형성시킬 수 있다.

[0173] 본 명세서에서 사용된 것으로서, 용어 "선조" 또는 "선조 세포"는 자가-재생하고, 더 성숙한 세포로 분화하는 능력을 갖는 세포를 나타낸다. 다수의 선조 세포는 단일 계통을 따라서 분화하지만, 매우 광범한 증식능을 가질 수 있다.

[0174] 조혈 줄기 세포 (HSC)는 유기체의 수명에 걸쳐서 성숙한 혈액 세포의 전체 레퍼토리를 생성시킬 수 있는 수입된 (committed) 조혈 선조 세포 (HPC)를 야기한다. 용어 "조혈 줄기 세포" 또는 "HSC"는 골수양 (예를 들어, 단핵구 및 대식세포, 호중구, 호염기구, 호산구, 적혈구, 거핵구/혈소판, 수지상 세포) 및 림프구 계통 (예를 들어, T-세포, B-세포, NK-세포), 및 본 기술분야에서 공지된 그 밖의 다른 세포를 포함하는 유기체의 모든 혈액 세포 유형을 생성시키는 다분화성 줄기 세포를 나타낸다 (참조: Fei, R., *et al.*, 미국 특허 제5,635,387호; McGlave, *et al.*, 미국 특허 제5,460,964호; Simmons, P., *et al.*, 미국 특허 제5,677,136호; Tsukamoto, *et al.*, 미국 특허 제5,750,397호; Schwartz, *et al.*, 미국 특허 제5,759,793호; DiGuisto, *et al.*, 미국 특허 제5,681,599호; Tsukamoto, *et al.*, 미국 특허 제5,716,827호). 치사적으로 방사선 조사된 동물 또는 인간에게 이식되는 경우에, 조혈 줄기 및 선조 세포는 적혈구, 호중구-대식세포, 거핵구 및 림프구 조혈 세포 풀 (pool)을 재집단화할 수 있다.

[0175] 바람직한 구체예에서, 형질도입된 세포는 골수, 제대혈, 또는 말초 순환으로부터 분리된 조혈 줄기 및/또는 선조 세포이다. 특히 바람직한 구체예에서, 형질도입된 세포는 골수, 제대혈 또는 말초 순환으로부터 분리된 조혈 줄기 세포이다.

[0176] 본 발명의 세포는 자가유래/자가발생성 ("자가") 또는 비-자가유래성 ("비-자기", 예를 들어, 동종이계 (allogeneic), 동계발생성 (syngeneic), 또는 이종발생성 (xenogeneic))일 수 있다. 본 명세서에서 사용된 것으로서, "자가유래"는 동일한 대상체로부터의 세포를 나타낸다. 본 명세서에서 사용된 것으로서, "동종이계"는 비교하는 세포와 유전적으로 상이한 동일한 종의 세포를 나타낸다. 본 명세서에서 사용된 것으로서 "동계발생성"은 비교하는 세포와 유전적으로 동일한 상이한 대상체의 세포를 나타낸다. 본 명세서에서 사용된 것으로서, "이종발생성"은 비교하는 세포와 상이한 종의 세포를 나타낸다. 바람직한 구체예에서, 본 발명의 세포는 동종이계이다.

[0177] 본 명세서에서 사용된 것으로서, "대상체"는 본 명세서의 다른 곳에 기술된 유전자 요법 벡터, 세포-기본 치료제 및 방법에 의해서 치료될 수 있는 부신백질이영양증 또는 부신척수신경병증의 증상을 나타내는 모든 동물을 포함한다. 적합한 대상체 (예를 들어, 환자)에는 실험실 동물 (예를 들어, 마우스, 랫트, 토끼, 또는 기니아 피그), 농장 동물, 및 가축 또는 애완동물 (예를 들어, 고양이 또는 개)이 포함된다. 비-인간 영장류 및, 바람직하게는, 인간 환자가 포함된다. 전형적인 대상체에는 유전자 요법에 의해서 변조될 수 있는 하나 이상의 생리학적 활성의 비정상적인 양 ("정상" 또는 "건강한" 대상체보다 더 낮거나 높은 양)을 나타내는 동물을 포함한다.

[0178] 본 명세서에서 사용된 것으로서, "치료" 또는 "치료하는"은 질병 또는 병리학적 상태의 증상 또는 병리학에 대한 모든 유익하거나 바람직한 효과를 포함하며, 치료될 질병 또는 상태의 하나 이상의 측정 가능한 마커의 최소의 감소라도 포함할 수 있다. 치료는 임의로, 질병 또는 상태의 증상의 감소 또는 개선, 또는 질병 또는 상태의 진행의 지연을 포함할 수 있다. "치료"는 질병 또는 상태, 또는 그의 연관된 증상을 반드시 완전히 근절하거나 치유하는 것을 나타내지는 않는다.

- [0179] 본 명세서에서 사용된 것으로서, "예방하다", 및 "예방된", "예방하는" 등의 유사한 단어들은 질병 또는 상태의 출현 또는 재발의 가능성을 방지, 억제 또는 감소시키는 접근방법을 나타낸다. 또한, 이것은 질병 또는 상태의 발현 또는 재발을 지연시키거나, 질병 또는 상태의 증상의 출현 또는 재발을 지연시키는 것을 나타낸다. 본 명세서에서 사용된 것으로서, "예방" 및 유사한 단어들은 또한 질병 또는 상태의 발현 또는 재발 전에 질병 또는 상태의 강도, 영향, 증상 및/또는 부담을 감소시키는 것을 포함한다.
- [0180] 본 명세서에서 사용된 것으로서, 용어 "양"은 임상적 결과를 포함하는 유익하거나 바람직한 예방적 또는 치료학적 결과를 달성하기 위한 바이러스 또는 형질도입된 치료학적 세포의 "효과적인 양" 또는 "유효량"을 나타낸다.
- [0181] "예방적 유효량"은 바람직한 예방적 결과를 달성하는데 효과적인 형질도입된 치료학적 세포의 양을 나타낸다. 필수적이지 않지만, 전형적으로 예방적 용량은 질병의 초기 단계에서, 또는 그 이전에 대상체에서 사용되기 때문에, 예방적 유효량은 치료학적 유효량보다 적다.
- [0182] 바이러스 또는 형질도입된 치료학적 세포의 "치료학적 유효량"은 개체의 질병 상태, 연령, 성별 및 체중, 및 개체에게서 바람직한 반응을 유발하는 줄기 및 선조 세포의 능력과 같은 인자들에 따라 달라질 수 있다. 치료학적 유효량은 또한, 바이러스 또는 형질도입된 치료학적 세포의 모든 독성 또는 유해한 효과가 치료학적으로 유익한 효과보다 중요하지 않은 것이다. 용어 "치료학적 유효량"은 대상체 (예를 들어, 환자)를 "치료"하는데 효과적인 양을 포함한다.
- [0183] 한가지 바람직한 구체예에서, 본 발명은 뇌 소교세포로 발육할 가능성을 갖는 형질도입된 세포를 제공한다. 특별한 구체예에서, 조혈 줄기 세포는 본 발명의 벡터에 의해서 형질도입되고, 부신백질이영양증 또는 부신척수신경병증에 대한 치료가 필요한 개체에게 투여된다. 조혈 줄기 세포는 뇌 소교세포의 기원이며, 따라서 바람직하다.
- [0184] 형질도입된 세포는 골수 절제 치료법을 수행하거나 수행하지 않은 개체에서 골수 이식의 일부분으로 투여될 수 있다. 한가지 구체예에서, 본 발명의 형질도입된 세포는 화학적절제 (chemoablative) 또는 방사성절제 (radioablative) 골수 치료법을 수행한 개체에 대한 골수 이식으로 투여된다. 바람직한 구체예에서, 대상체는 젊은 남성이다.
- [0185] 한가지 구체예에서, 형질도입된 세포의 용량은 대상체에게 정맥내로 송달된다. 바람직한 구체예에서, 형질도입된 조혈 줄기 세포는 대상체에게 정맥내로 투여된다.
- [0186] 특별한 구체예에서, 환자는 한번의 단일 정맥내 용량으로 약 1×10^5 세포/kg, 약 5×10^5 세포/kg, 약 1×10^6 세포/kg, 약 2×10^6 세포/kg, 약 3×10^6 세포/kg, 약 4×10^6 세포/kg, 약 5×10^6 세포/kg, 약 6×10^6 세포/kg, 약 7×10^6 세포/kg, 약 8×10^6 세포/kg, 약 9×10^6 세포/kg, 약 1×10^7 세포/kg, 약 5×10^7 세포/kg, 약 1×10^8 세포/kg, 또는 그 이상의 형질도입된 조혈 줄기 세포의 용량을 제공받는다. 특정한 구체예에서, 환자는 약 1×10^5 세포/kg 내지 약 1×10^8 세포/kg, 약 1×10^6 세포/kg 내지 약 1×10^8 세포/kg, 약 1×10^6 세포/kg 내지 약 9×10^6 세포/kg, 약 2×10^6 세포/kg 내지 약 8×10^6 세포/kg, 약 2×10^6 세포/kg 내지 약 8×10^6 세포/kg, 약 2×10^6 세포/kg 내지 약 5×10^6 세포/kg, 약 3×10^6 세포/kg 내지 약 5×10^6 세포/kg, 약 3×10^6 세포/kg 내지 약 4×10^8 세포/kg, 또는 세포/kg로 나타난 이들 사이의 모든 용량의 형질도입된 조혈 줄기 세포의 양을 제공받는다.
- [0187] 형질도입된 세포는 본 기술분야에서의 기존의 방법을 사용한 팽창을 위해 사이토킨으로 자극시킬 수 있다. 다양한 구체예에서, 대상체에게는 치료를 유지시키거나 증가시킬 필요에 따라 수일, 수개월 또는 수년에 걸쳐서 1, 2, 3, 4, 5, 또는 그 이상의 용량으로 투여된다.
- [0188] 특별한 구체예에서, 조혈 줄기 세포는 대상체에서 부신백질이영양증 및/또는 부신척수신경병증을 치료, 예방 또는 개선하기 위해서 사용될 수 있는 폴리펩타이드, 예를 들어, ABCD1를 인코딩하는 유전자에 작동적으로 연결된, 소교세포에서 활성인 프로모터, 예를 들어, MND 프로모터를 포함하는 본 발명의 벡터로 형질도입된다.
- [0189] 본 발명은 이제 이하의 실시예에 의해 더 상세히 기술될 것이다. 그러나, 본 발명은 다수의 상이한 형태로 구체화될 수 있으며, 여기에 제시된 구체예로 제한되는 것으로 해석되지는 않아야 하며; 오히려, 이들 구체예는 본 설명이 철저하고 완전하며, 본 기술분야에서 숙련된 전문가에게 본 발명의 범위를 충분히 전달할 수 있도록 제

공된다.

실시예

실시예 1

WPRe가 있거나 없는 ABCD1 렌티바이러스 벡터를 사용한 정상 인간 조혈 줄기 세포에 대한 유전자 형질도입의 비교

실험 개요:

인간 ABCD1을 인코딩하는 cDNA에 작동적으로 연결된 MND 프로모터, 및 WPRE 요소를 포함하는 렌티바이러스 벡터 (참조: 도 1; CG1711 MND-ALD)는 상업적 개발에 이용할 수 없다. 그 결과로, 본 출원인은 미래의 임상 실험으로 진행할 적절한 렌티바이러스 벡터를 확인하기 위한 벡터 개발 프로그램을 착수하였다. 상업적으로 허용되는 벡터는 벡터 개발 프로그램의 결과로 만들어졌으며, MND 프로모터에 작동적으로 연결된 ABCD-1 유전자를 변화시키지 않았다. 놀랍게도, 벡터로부터 WPRE의 제거는 인간 조혈 세포에서 형질도입 효율 및 이식유전자 발현을 변화시키지 않았다. 조혈 세포에 대한 실험의 다음의 시리즈가 WPRE의 존재에 관해서 상이한 두 개의 MND-ALD 벡터인 pLBP100 (참조: 도 1 및 서열번호 1; WPRE 제거됨) 및 pLBP140 (참조: 도 1; 기능적 WPRE를 가짐)을 비교하는 단기 및 장기 선조 세포 시험을 사용하여 수행되었다.

렌티바이러스 벡터 구조물

모든 렌티바이러스 벡터는 MND 프로모터의 제어 하에 정상적인 인간 ATP-결합 카세트, 서브-패밀리 D (ALD), 구성원 1 (ABCD1) cDNA를 함유하였다. 도 1 및 표 1은 CG1711, pLBP100 및 pLBP140 MND-ALD 벡터 내의 다양한 성분 및 그들의 위치를 요약한 것이다.

[표 1] 벡터 요약

	pLBP100	pLBP140	
HIV 공급원	HIV1 (NL4-3) 수탁번호 #m19921	HIV1 (NL4-3) 수탁번호 #m19921	
5'LTR:			
하이브리드/WT	WT	WT	
R	+	+	
U5	+	+	
Gag 서열:			
ORF 붕괴됨	2 개의 정지 코돈	2 개의 정지 코돈	
길이	Nsi I 부위까지, 120 bp. 더 길다	Nsi I 부위까지, 120 bp. 더 길다	
RRE 및 cPPT 및 S/A	cPPT/CTS	cPPT/CTS	벡터의 이 영역은 상이한 그룹에 의해 서 독특하게 디자인 된다.
	RRE (500bp)	RRE (500bp)	
프로모터	MND	MND	
ABCD-1 서열	Nt. 346-2638	Nt. 346-2638	수탁번호 NM 000033
5'UT	+	+	
3'UT	-	+	
WPRE	무	유 (돌연변이됨)	
SIN 3'LTR	+	+	동일한 결실
폴리 A	U5의 대신에 합성 토끼 β-글로빈 폴리 A (r β gpA)	U5의 대신에 합성 토끼 β-글로빈 폴리 A (r β gpA)	합성 r β gpA는 LTR 뉴클레오타이드 서 열의 대부분을 제거 함으로써 또 다른 정도의 자기-활성화 를 부가한다

형질도입

렌티바이러스 pLBP100 및 pLBP140 상등액은 5-플라스미드 (pLBP100 또는 pLBP140 벡터, HPV 275 - gag-pol, Ψ N 15 - VSV-G env, p633 - rev, HPV601 - tat)로의 293T 세포의 칼슘 포스페이트 형질감염에 의해서 생산되었다. 농축된 pLBP100을 초원심분리 후에 수득하고, SCGM (CellGenix Inc., Germany GMBH) 배지에 재현탁시키고, 단일-사용 저온바이알 (cryovials) 내에서 < -70°C에서 냉동보존하였다. 감염 역가는 형질도입된 3T3 세포의 유

동 세포분석으로부터 결정하였다.

[0201] 인간 조혈 줄기 세포의 형질도입을 위한 pLBP100 및 pLBP140 렌티바이러스 벡터는 비교는 표 2에 요약된 4 개의 별도의 실험들로 수행되었다. 수행된 실험에 대한 절차 및 분석은 각각 도 2 및 3에 설명된다.

[0202] [표 2] 실험 요약

Expt.	CD34+ 세포 공급원	MND-ALD 벡터	LV Lot No.	역가 (TU/ml)	MOI	RN	배양 시험
072010 (BBB6)	Lonza: 신선한 BM Lonza: Lot # 0F3668C	pLBP100	100701	1.3×10^8	12	-	액체 및 CFC
		pLBP140	100717	1.9×10^7	8.6	-	
081010 (BBB8)	AllCells: 신선한 mPB Lot# A2186	pLBP100	100701	1.3×10^8	25	-	액체 및 CFC
		pLBP140	100724	1.0×10^8	25	-	
091410 (BBB9)	AllCells: 동결된 mPB Lot# A2186	pLBP100	100820	1.2×10^8	25	-	액체 및 CFC
		pLBP140	100730	1.3×10^8	25	-	
080610	Lonza: 신선한 BM Lonza: Lot # 0F3739B	pLBP100	100701	1.3×10^8	25	+	액체, CFC 및 LTC-IC
		pLBP140	100724	1.0×10^8	25	+	

[0203]

[0204] 신선한 인간 골수 (BM) CD34⁺ 세포 (Lonza, Walkersville, MD) 또는 신선하거나 냉동보존된 인간 G-CSF 동원된 말초혈액 (mPB) CD34⁺ 세포 (AllCells, LLC, Emeryville, CA)를 세척하고, 인간 재조합 IL-3 (60 ng/ml), Flt-3L (100 ng/ml), TPO (100 ng/ml) 및 SCF (100 ng/ml) (Peprotech)가 보충된 SCGM 내에서 1×10^6 세포/ml의 세포 농도로 18 시간 동안 배양하였다.

[0205] 그 후, 세포를 분리하여 세척하고, 바이러스와 함께 첨가된 동일한 농도의 사이토킨 및 8 µg/ml 프로타민이 보충된, 8.6 내지 25의 MOIs ($1.7-5.0 \times 10^7$ TU/ml 최종 역가)에서의 SCGM (모의 대조군 또는 pLBP100 또는 pLBP140) 상등액 내에서 2×10^6 세포/ml의 농도로 하여 편평-바닥 96-웰 플레이트 내에서 단일 (expt. 080610) 또는 삼중 (expts. 072010, 081010 및 091410) 200 µl 용적으로 재현탁시켰다. Expt. 080610에서, 형질도입은 20 µg/ml 레트로벡틴 (Takara Bio Inc, Shiga, Japan)으로 전-코팅된 96-웰 플레이트 내에서 4°C로 밤새 배양함으로써 수행되었다.

[0206] 단기간 선조 세포 시험

[0207] 바이러스를 첨가한 후 24 시간째에, 세포를 세척하고, (1) 동일한 농도의 사이토킨이 보충된 SCGM 배지에 재현탁시키고, 21일에 걸쳐서 더 배양하거나, (2) 콜로니 형성 세포 (CFC)를 위해 메토컬트 (MethoCult) H4434 배지 (Stem Cell Technologies) 내에서 1-배양하였다.

[0208] 총 골수양 (CFU-GM) 및 적혈구양 (BFU-E) 콜로니를 14일째에 계수하고, 세포를 PBS에 현탁시키고, 세척하고, 게놈 DNA를 DNEASy 키트 (QIAGEN) ($1-2 \times 10^6$ 생존 세포)로 제조하였다.

[0209] 장기배양 개시 세포 (LTC-IC) 시험

[0210] 8개의 96-웰 플레이트를 10% 소 태아 혈청 보충된 알파 배지 (Alpha medium) 내에서 마우스 골수 기질 세포주 MS-5로 접종하고, 이들이 거의 합류 상태가 되면 감마-조사하였다 (30 Gy).

[0211] 조사한 후 2일째에, 전-확립된 MS-5 기질층을 희석당 16-웰로 하여 다양한 희석도 (16 웰에서 웰당 2000 세포, 16 웰에서 웰당 1000 세포, 16 웰에서 웰당 500 세포, 16 웰에서 웰당 250 세포, 16 웰에서 웰당 125 세포, 16 웰에서 웰당 62 세포, 16 웰에서 웰당 31 세포, 16 웰에서 웰당 16 세포, 16 웰에서 웰당 8 세포)로 200 µl의 스템스판 (StemSpan) SFEM (무-혈청 배지, Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada) 중의 인간 CD34+ 시험 세포로 접종하였다. 추가의 100,000 CD34+ 세포를 5 주일 동안 MS-5 피더 (feeder) 세포 상에서 대량으로 배양하였다. 각 주일 마다, 100 µl의 배지를 100 µl의 신선한 스템스판 SFEM으로 대체하였다. 5 주일 후에, 배양액을 수확한 다음에, 전체 내용물을 콜로니의 14-일 성장을 위해서 메토컬트 (Methocult™) GF+ H4434 (12 웰 플레이트의 웰당 500 µl의 메틸 셀룰로즈)에 접종하였다. 그 후, 개별적인 콜로니를 뽑아 내고, 추출 후에 계

DNA의 존재를 증명하는 포지티브 대조군을 갖도록 하기 위해서 벡터 내의 gag 서열을 향한 프라이머 및 게놈 서열 (Epo 유전자)을 향한 프라이머를 사용하여 후속 PCR 분석을 위해서 추출하였다 (SOP # GTX/RE/PBM/M-023 및 LTGC/RE/PBM/M-07). LTC-IC의 빈도 및 95% 신뢰 구간은 L-calc 소프트웨어, 버전 1.1 (Stem Cell Technologies)을 사용하여 계산하였다.

[0212] 벡터 카피 수 (VCN) 결정

[0213] 세포당 평균 VCN은 희석 및 PBS 중에서의 세척 후에, 액체 배양물 또는 메틸셀룰로즈 배양액 중의 플링된 콜로니 세포로부터의 DNA 제제에 대한 정량적 (실시간) PCR (QPCR)로부터 결정되었다. QPCR은 ABI 시약 및 96 웰-플레이트와 함께 ABI 프리즘 (Prism) 7000 서열 검출 시스템 상에서 수행되었다.

[0214] 벡터를 정량하기 위해서 사용된 인간 gag 프로브 및 프라이머:

[0215] GAG-F (정방향 프라이머) 5' ggagctagaacgattcgagttta 3'

[0216] GAG-R (역방향 프라이머) 5' ggttgtagctgtcccagttattgtc 3'

[0217] GAG-P (프로브, 안티센스) 5'-(FAM)-acagccttctgatgtctctctaaaggccagg-(TAMRA)-3'

[0218] 표준화를 위해서 게놈 DNA를 정량하기 위해 사용된 인간 베타 액틴 프로브 및 프라이머:

[0219] 프로브: 5' VIC-cctggcctcgctgtccaccttcca-TAMRA

[0220] 정방향 - 5' tccgtgtggatcgcggtctcca 3'

[0221] 역방향 - 5' ctgcttgctgatccacatctg 3'

[0222] 용출된 게놈 DNA (약 50-100 ng)의 1/100th을 Absolute Quantification 프로그램 및 디폴트 열사이클링 (default thermal cycling) 프로그램에 의해서 25 μ l의 반응액 중의 1x 태크맨 유니버설 마스터 믹스 (TaqMan[®] Universal Master Mix), 0.72 μ M의 각각의 프라이머 및 0.35 μ M의 프로브를 사용하여 시험하였다.

[0223] 유동 세포분석에 의한 이식유전자 발현

[0224] ABCD1 (ALDP) 단백질의 발현을 마우스 항-인간 ALDP (ABCD1) 모노클로날 항체 (클론 1D6, Lot# LV1383343, Chemicon)를 사용하여 고정되고 투과화된 세포 (Fix & Perm Reagents A and B, cat. Nos. GAS001 & GAS002, Invitrogen) 상에서 수행하고, 이어서 PE-컨주게이트된 랫트 항-마우스 IgG1 mAb (클론 A85-1, BD Pharmingen)로 염색하였다. 마우스 IgG1 모노클로날 항체 클론 MOPC-21 (BioLegend)이 이소타입 대조군으로 사용되었다.

[0225] 통계학적 분석

[0226] 각각의 실험에서 그룹 값의 비교는 투-테일드 비-파라메터 맨-위트니 U-시험 (two-tailed non-parametric Mann-Whitney U-test) (GraphPad Prism v. 3.0)을 사용하여 분석되었으며, 여기에서 샘플 크기는 충분하였다 ($n \geq 3$). 그룹들 간의 유의성은 0.05 이하의 p 값으로 결정되었다.

[0227] **결과:**

[0228] 선조 세포 빈도에 대한 효과

[0229] 기능적 골수양 (CFU-GM) 및 적혈구양 (BFU-E) 선조 세포의 수율은 도 4에서 모두 4 개의 실험에 대해 비교하였으며, 실험의 제1 세트 (실험 072010, 081010 및 091410)에서 삼중 형질도입에 대한 pLBP100 또는 pLBP140 상등액 첨가의 상당한 효과는 나타나지 않았다. 단일 형질도입을 위한 메틸셀룰로즈 배양물의 6개의 세트를 비교한 실험의 제2 세트 (실험 080610)의 경우에는, 골수양 선조 세포에 있어서의 상당한 증가가 pLBP100의 첨가에 의해서 관찰된 반면에, 적혈구양 콜로니의 수율에 있어서의 상당한 감소가 pLBP100으로 처리한 후에 나타났으며, pLBP140 형질도입 후에 더 감소하였다.

[0230] 더 원시적인 LTC-IC의 빈도는 두 개의 렌티바이러스 벡터로 형질도입시킨 후에 평균적으로 더 낮았지만 (도 5), 95% 신뢰 구간은 중복되었기 때문에 이들 차이는 유의적이지 않았다 ($p > 0.05$).

[0231] 벡터 PCR에 의한 형질도입 효율

[0232] 35일에 걸쳐서 액체 배양액 중에서 유지된 세포로부터 분리된 게놈 DNA의 실시간 PCR 분석은 실험의 제2 세트에서 pLBP140과 비교하여 pLBP100에 대해서 모든 시점에서 더 큰 추정 벡터 카피 수 (VCN)를 나타내었다 (도 6A).

- [0233] 이것은 또한, 메틸 셀룰로즈 배양액 중에서 성장하는 폴딩된 CFCs에 대한 더 큰 평균 VCN 및 동일한 실험으로부터의 벡터 포지티브 골수양 콜로니 퍼센트로 반영되었다 (도 6B 및 C). 그러나, 실험의 제1 세트의 삼중 실험들 간의 비교는 폴딩된 콜로니의 VCN에 있어서, 또는 벡터에 대해서 포지티브인 시험한 콜로니 퍼센트에 있어서의 상당한 차이를 나타내었다.
- [0234] 도 7은 평균 VCN 및 벡터 포지티브 골수양 콜로니 퍼센트가 다시 더 큰 VCN (1.1 대 0.4 카피) 및 포지티브 콜로니의 비율 (51% 대 35%)을 갖는 pLBP100 형질도입된 세포를 갖는 벡터 그룹 둘 다에 대해 5-주일 LTC-IC 이후에 감소하였음을 나타낸다.
- [0235] 유동 세포분석에 의한 ALDP 이식유전자 발현
- [0236] 항-ALDP 항체로 세포내 염색된 세포의 형광 프로파일의 예는 도 8A1 및 A2의 히스토그램 나타내며, 이들로부터 포지티브 퍼센트 (각각의 모의 대조군의 0.5% 이상에서 결정됨) 및 평균 형광 강도 (median fluorescence intensities; MFI)의 비를 결정하였으며, 도 8B 및 C에 나타내었다. 이식유전자 발현의 수준은 실험들 사이에서 변화하였으며, 여기에서 expts. 072010 및 080610에서는 pLBP140 그룹에 비해 pLBP100에 대해서 발현 세포의 더 큰 평균 퍼센트가 나타났다. 그러나, expt. 091410에서는 반대가 나타났으며, expt. 081010에서는 동등한 수준으로 나타났다. 삼중 실험들 사이에서의 통계학적 비교는 ALDP⁺ 세포 퍼센트 또는 MFI에서 유의적인 차이는 나타나지 않았다 ($p > 0.05$).
- [0237] **결론:**
- [0238] 전임상 pLBP100 렌티바이러스 벡터의 2 개의 제제 및 WPRE 함유 pLBP140 벡터의 3 개의 제제를 사용하고, 골수 또는 GCSF-동원된 말초혈액으로부터 유래하는 정상 인간 CD34⁺ 세포의 형질도입을 수반하는 4 개의 별개의 실험 간의 비교를 수행하였다. 실험 080610에서의 골수양 선조 세포의 증가 및 적혈구양 선조 세포의 감소를 제외하고는, 초기 선조 세포 또는 더 원시적인 LTC-IC에 대한 상등액의 유의적인 독성은 없었다. 여기에서는 평균 VCN 또는 벡터 함유 골수양 콜로니 또는 LTC-IC의 비율에 따라 pLBP140에 대해서 더 낮은 형질도입 효율의 경향이 있었지만, 이것은 충분한 샘플 크기 ($n=3$)의 이들 실험에 대해서 통계학적으로 유의적이지 않았다. 두 개의 벡터에 의해서 제공된 이식유전자 발현의 수준은 pLBP100으로부터의 ALDP⁺ 세포의 더 높은 퍼센트를 나타내는 두 개의 실험 및 pLBP140에 비해 더 낮은 퍼센트를 나타내는 하나의 실험에 의한 혼합된 결과를 제공하였다. 이들 차이는 통계학적으로 유의적이지 않았다.
- [0239] 종합적으로, MND-ALD 벡터에 WPRE를 첨가하는 것은 이점이 없는 것으로 보인다. 따라서, 본 발명의 벡터는 WPRE 함유 벡터와 비교하여 증가된 안전성 및 동등한 탁월한 효능을 제공한다. 더욱이, 결과는 본 발명의 벡터가 추가의 개발 및 임상 적용에 꽤 적합한 것을 나타낸다.
- [0240] **실시예 2**
- [0241] ALD-결함 원발성 인간 섬유아세포에서 ALD 단백질 결핍의 기능적 보정의 평가
- [0242] 실험 개요
- [0243] 매우 장쇄의 지방산 (VLCFA), 특히 C26 쇠의 축적은 종종 ALD의 생화학적 "홀마크 (hallmark)"로 불린다 (Hubbard, *Mol Genet. Metab.* 97:212-220 (2009)). ABCD1 cDNA를 함유하는 레트로바이러스 벡터에 의한 결함 세포의 형질도입은 기능적 ALD 단백질 (ALDP) 수준을 회복시키며, VLCFA의 감소된 수준을 제공한다. 이것은 ALD 환자로부터의 원발성 섬유아세포주를 포함하는 다양한 세포 집단에서 나타났다.
- [0244] Kennedy Krieger Institute (Baltimore, MD)에서 개발된 C26:0 라이소 (lyso)-PC 시험 (LPC 시험)은 액체 크로마토그래피 및 탠덤 질량 분광광도법에 의해서 VLCFA를 측정한다. 이 방법은 신생아 혈액 스폿(spot)을 위해서 개발되었으며, 또한 혈장 및 배양된 피부 섬유아세포 상에서 입증되었다. 본 실시예에서, C26:0 라이소-PC 시험은 ALD 환자 섬유아세포에서 생화학적 결핍의 기능적 보정을 입증하기 위해서 사용되었다. 본 실험의 목적은 벡터-변형된 ALD-결함 섬유아세포에서 VLCFA 수준을 감소시키는데 있어서의 벡터 pLBP100 (p100) 및 pLBP140 (p140)의 효능을 비교하기 위한 것이었다.
- [0245] 세포주
- [0246] 원발성 인간 섬유아세포 GM04496 및 AG01440은 Coriell Cell Repository (Camden, NJ, USA)로부터 수득하였다.

GM04496 세포는 ABCD1 유전자의 미지의 돌연변이를 갖는 ALD-네거티브 환자로부터 분리된 비-변형된 인간 섬유아세포이다. AG01440 세포는 정상적인 인간 섬유아세포이다. 세포를 가슴 인큐베이터 내에서 37°C, 5% CO₂ 하에, 15% FBS (HyClone FBS, GIBCO Life Technologies)를 첨가한 DMEM (GIBCO Life Technologies, Carlsbad, CA) 중에서 성장시켰다.

[0247] TF-1 세포 (ATCC® 번호 CRL-2003™)는 골수 적백혈병으로부터 유래된 인간 림프아구 세포주이다. 세포는 10% FBS가 첨가된 RPMI-1640 (GIBCO Life Technologies) 중에서 성장시켰다.

[0248] 렌티바이러스 벡터를 생산하기 위해서 사용된 293T 세포 (Stanford University)는 10% FBS가 첨가된 DMEM 중에서 성장시켰다.

[0249] 라이소-PC 시험을 위한 형질도입 프로토콜 및 플레이팅

[0250] 합류-하 (sub-confluent) 세포를 배지 + 8 µg/ml 폴리브렌 (헥사디메트린 브로마이드, Sigma, St Louis MO) 중에서 바이러스 상등액으로 14-16 시간 동안 형질도입시켰다. 신선한 배지를 다음 날 대체하였다. 빠르게는 형질도입-후 3일째에 대부분의 세포를 12-웰 플레이트 내에 삼중으로 플레이팅하였다 (지질 추출물에 대해서 2 개의 복제물 및 단백질 분석을 위한 하나) (Falcon # 35-3043). 동등한 수의 정상-대조군 세포 (293T, AG01440 또는 TF-1)를 또한 플레이팅하거나 펠릿화하였다. 세포 단일층을 1X HBSS 완충액 (GIBCO Life Technologies)으로 2 회 세척하고, 동일계(in situ) -20°C에서 동결시켰다. 동결 방법은 우선 Kennedy Krieger에서 시험하였으며, 신선한 세포 단일층의 수확물과 동등한 것으로 측정되었다. 나머지 세포는 배양물 내에서 유지시켰다.

[0251] **게놈 DNA 분리 및 벡터 카피수 (VCN) 측정**

[0252] LPC 시험을 위한 플레이팅 후에 남은 세포는 DNA 분리 및 VCN 분석을 위해서 형질도입 후 적어도 9일까지 게놈 DNA 수확을 위한 배양물 중에 유지시켰다. 액체 및 단백질 추출은 Kennedy Krieger Institute에서 완료하였다.

[0253] **결과:**

[0254] 4496 세포 및 다양한 정상 및 네거티브 대조군의 라이소-PC 분석

[0255] 4496 세포 및 정상-섬유아세포로서 1440 세포를 분석을 위해서 플레이팅하였다. ALDP는 TF-1 세포 및 293 세포에서 면역염색 및 유동 세포분석에 의해서 검출가능하였다. 따라서, 이들 세포는 또한 C26:0 LPC의 기준선 수준에 대한 대체 포지티브 (즉, 정상 ALDP-표현형) 대조군으로서 시험하였다. 샘플은 4 개의 독립적인 분석으로 시험하였다.

[0256] C26:0LPC의 기준선 수준은 정상 표현형을 갖는 세포에서 3-50 pmol/mg 단백질의 범위였으며, 4496 세포는 각각의 분석에서 상승된 수준을 가졌다. 종합적으로는, 여기에서 4496과 비교하여 정상 세포에서 C26:0LPC의 수준에 있어서 적어도 5-배 차이 (0.2 이하의 비)가 있었다. 이 비는 환자 혈액 스포트에 대해서 보고된 결과와 유사하였다.

[0257] p100 및 p140으로 형질도입된 4496 세포의 비교

[0258] 4496 세포를 p100 및 p140으로 형질도입시켰다. 세포를 본 명세서에 기술된 바와 같이 VLCFA 및 VCN에 대해서 분석하였다. 라이소PC 시험 결과는 표 3에 나타내었다. 이중 웰을 평균화하고, 모의 형질도입된 세포에 대해서 표준화하였다. 모의 대 VCN에 대한 VLCFA 보정의 비는 도 10에 나타내었다. VCN은 ≤ 1 카피로 감소하였기 때문에, 세포 집단은 비형질도입된 세포와 세포당 1 또는 2 벡터-카피를 갖는 세포의 혼합물인 것으로 예상된다; 따라서, VLCFA는 감소하는 것으로 예상된다 (도 10).

[0259] [표 3] 렌티-D p100 및 LVVp140으로 형질도입된 4496 세포에서의 C26:0LPC 결과

	MOI	총 pmoles C26:0LPC/mg 단백질 (반복체 웰)		반복체 웰의 평균	모의 txd에 대한 비
모의 txd 4496		50.53	58.94	54.73	1.00
렌티-D p100	3	8.82	8.47	8.65	0.16
	1	11.05	12.57	11.81	0.21
	0.3	20.59	25.57	23.08	0.42
p140	3	15.55	10.81	13.18	0.24
	1	10.35	15.37	12.86	0.23
	0.3	22.74	33.34	28.04	0.51
정상 293T		6.98	6.75	6.87	0.12

[0260]

[0261] 0.2의 비는 모의-txd 4496 세포와 비교하여 정상 표현형을 갖는 세포의 수준으로서 확립되었다. 4496 세포에서의 VLCFA 축적은 $VCN \geq \sim 1.5$ 인 경우에 두 가지 벡터 모두에 대해 정상 세포의 수준으로 보정된다. 보정에서 감소의 경향은 VCN 1.0-0.6에서 두 가지 벡터 모두에 대해서 존재한다.

[0262]

결론:

[0263]

Kennedy Krieger Institute (Hubbard 2009)에서 수행된 C26:0 라이소-PC 시험은 액체 크로마토그래피 및 탄젠트 질량 분광광도법에 의해서 VLCFA를 측정하고, C26의 축적의 ALD-환자 세포주 GM04496 세포에서의 생화학적 결합을 확인하였다. p100 및 p140으로 형질도입시킨 후에, 세포는 유동 세포분석 (데이터는 제시되지 않음)에 의해서 입증되는 바와 같이 ALDP 발현에 대해서 포지티브였으며, 평균 $VCN \geq 1.5$ 인 세포는 VLCFA 축적의 정상 표현형을 갖는 세포의 수준으로의 완전한 보정을 나타내었다. 동등한 결과는 p100 및 p140으로 형질도입시킨 세포를 비교한 경우에 획득되었으며, 이것은 WPRE 서열을 결여하는 p100의 유효성을 시사한다.

[0264]

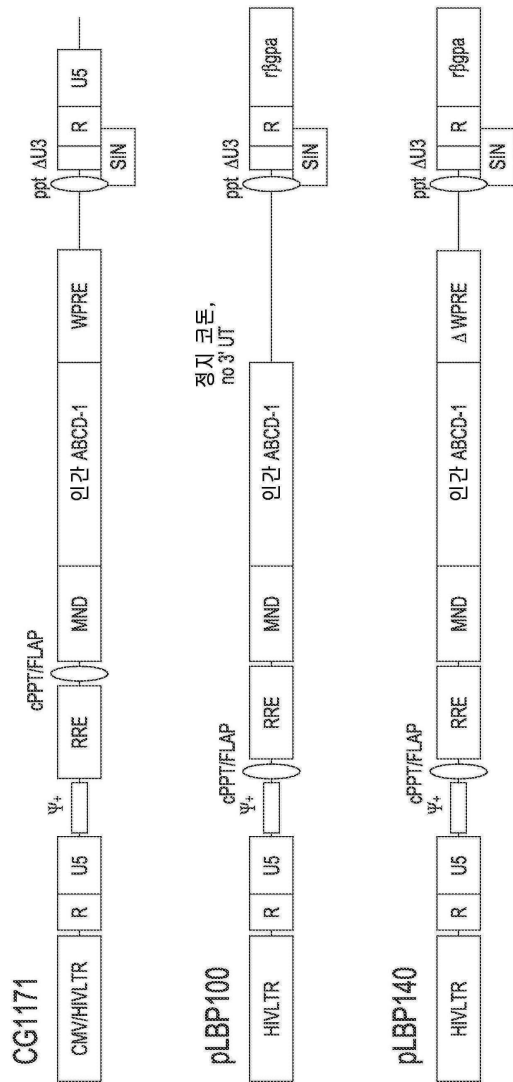
상술한 다양한 구체예를 조합하여 추가의 구체예를 제공할 수 있다. 본 명세서에서 인용되고/되거나 출원 데이터 시트 (Application Data Sheet)에 열거된 모든 미국 특허, 미국 특허출원 공개, 미국 특허출원, 해외 특허, 해외 특허출원 및 비-특허 문헌은 본 발명에 온전히 참고로 포함된다. 구체예의 관점은 필요에 따라 다양한 특허, 출원 및 공개의 개념을 이용하여 추가의 구체예를 제공하도록 변형될 수 있다.

[0265]

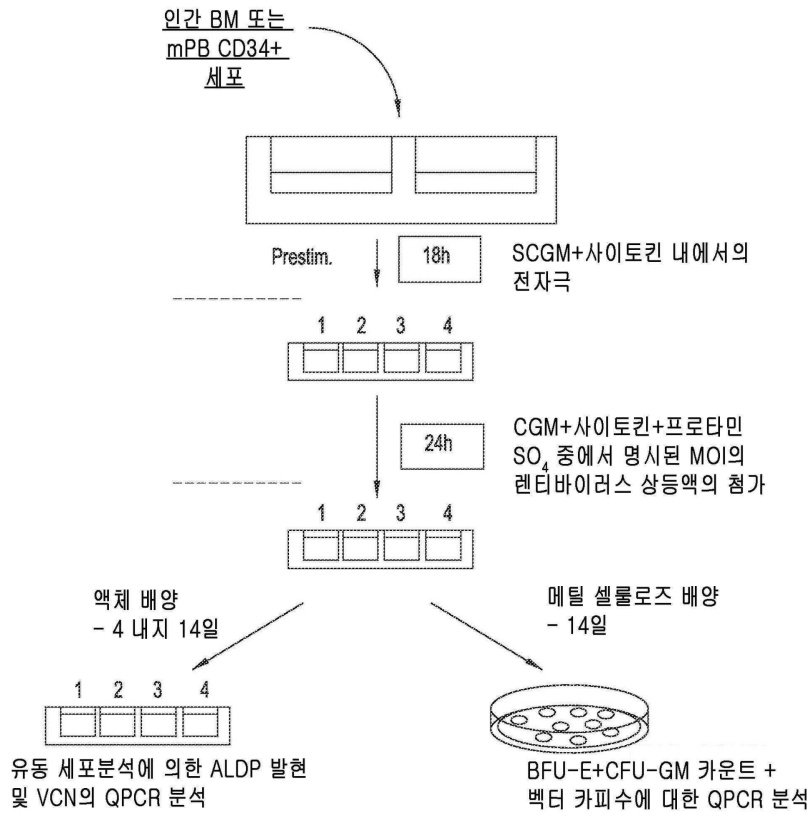
구체예에 대한 이들 및 그 밖의 다른 변화는 상술한 설명에 비추어서 이루어질 수 있다. 일반적으로, 이하의 특허청구범위에서 사용된 용어들은 특허청구범위를 명세서 및 특허청구범위에 기술된 특성의 구체예로 제한하는 것으로 이해되지는 않아야 하지만, 이러한 특허청구할 자격이 있는 등가물의 전체 범위와 함께 모든 가능한 구체예를 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 따라서, 특허청구범위는 기재 내용에 의해서 제한되지 않는다.

도면

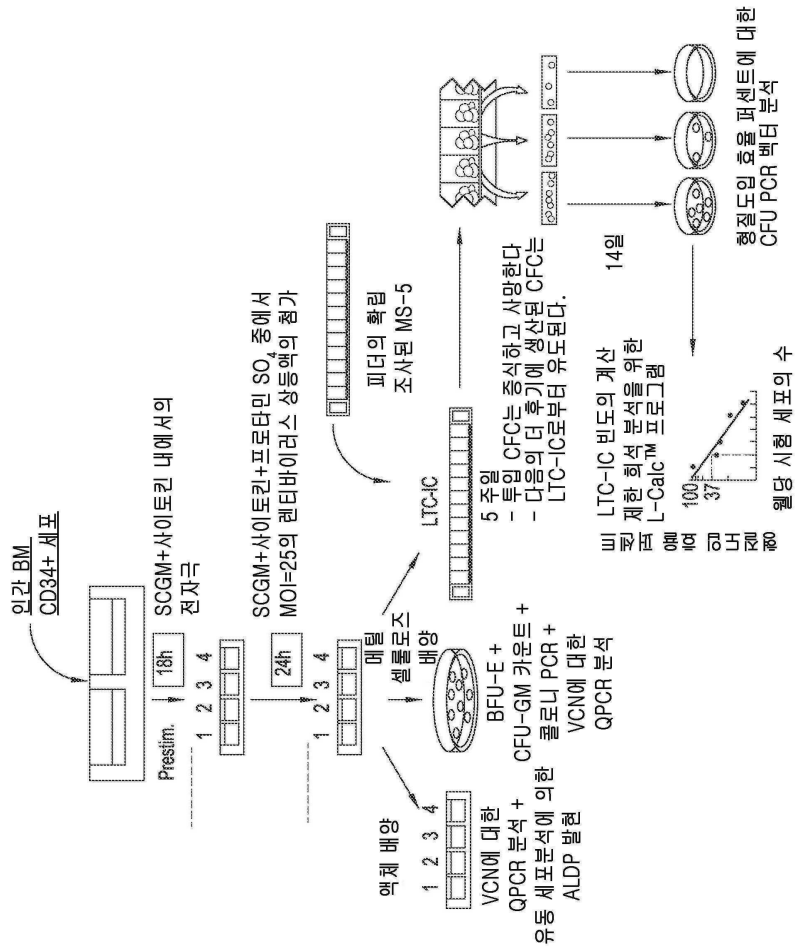
도면1



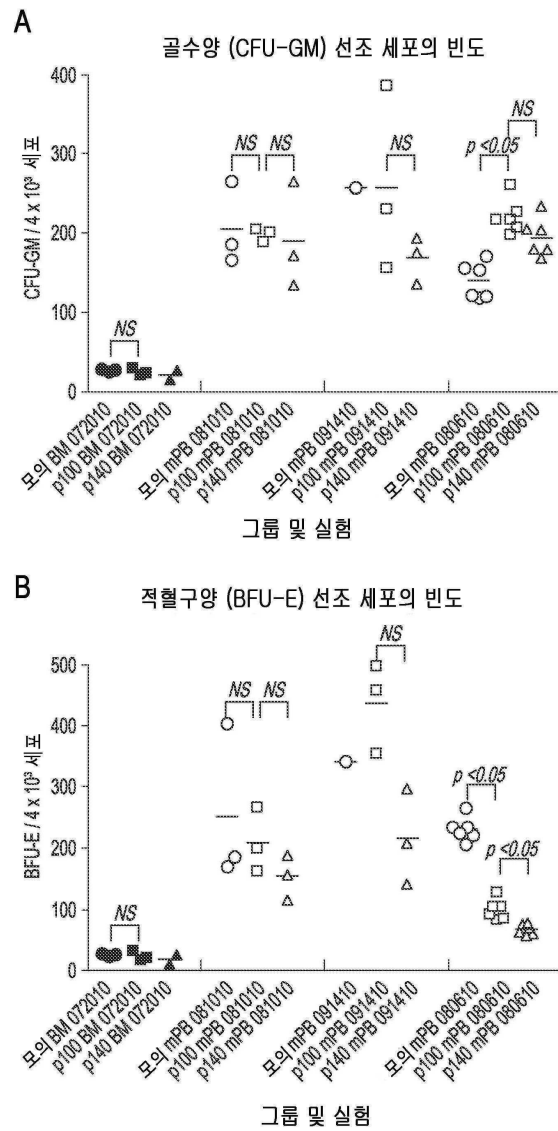
도면2



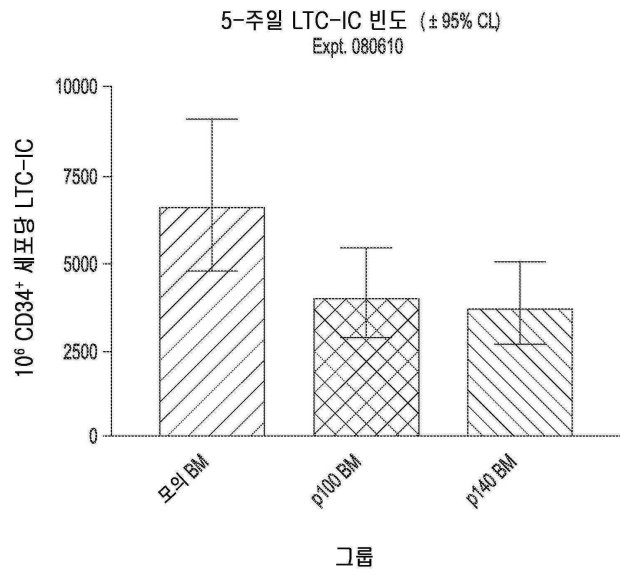
도면3



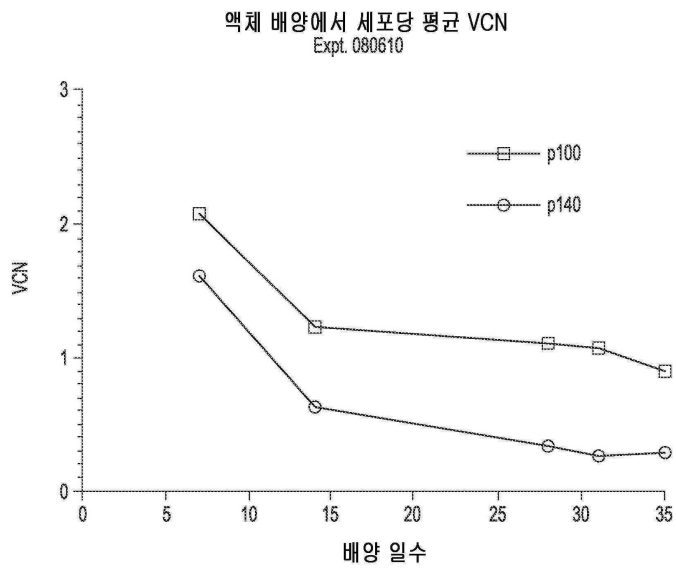
도면4



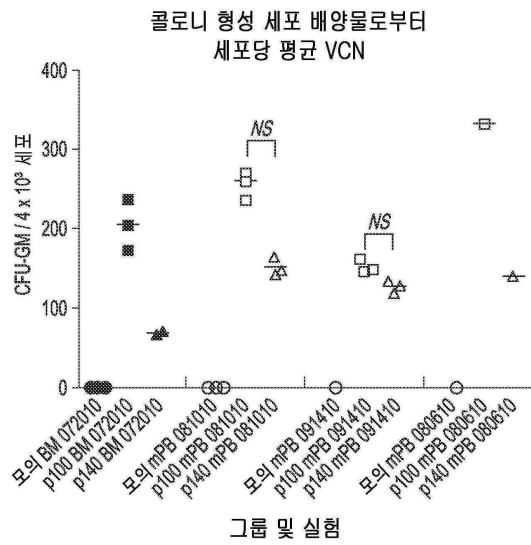
도면5



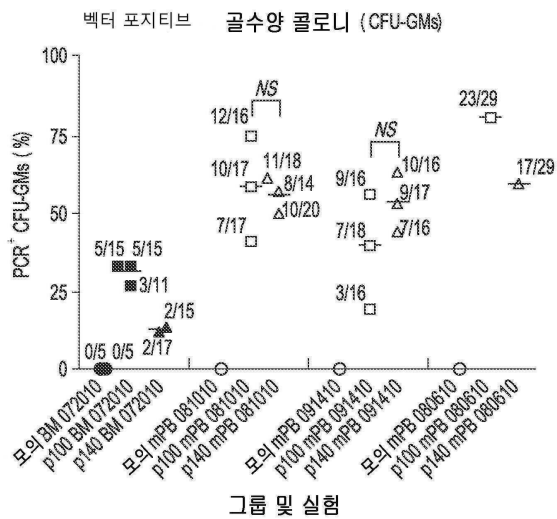
도면6a



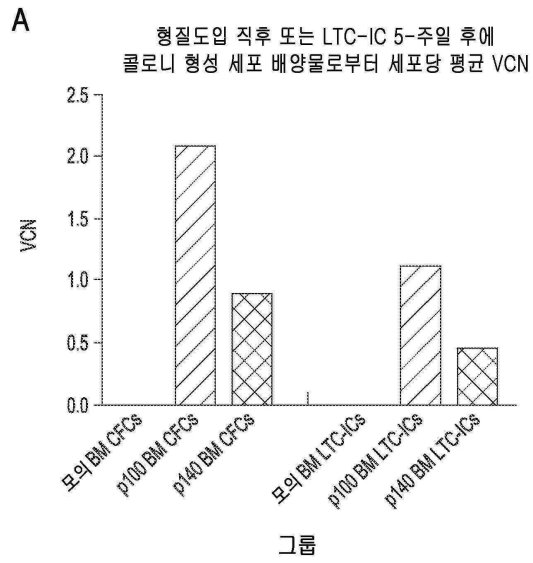
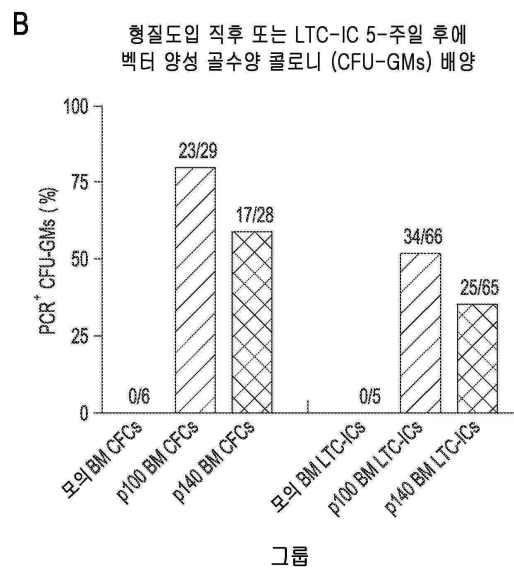
도면6b



도면6c

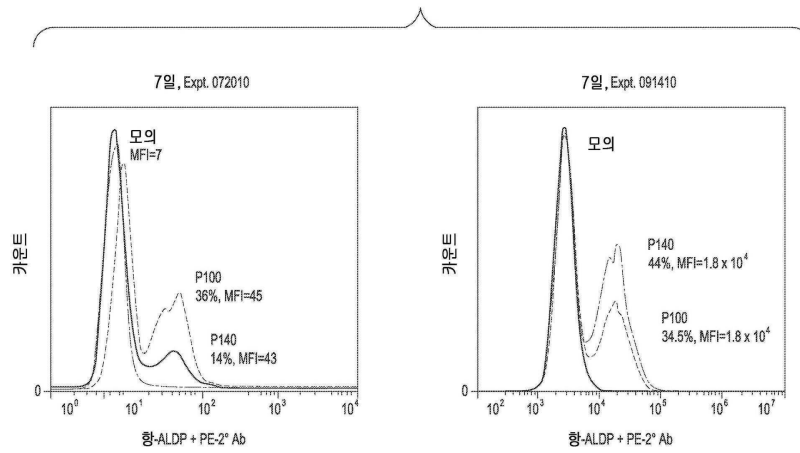


도면7

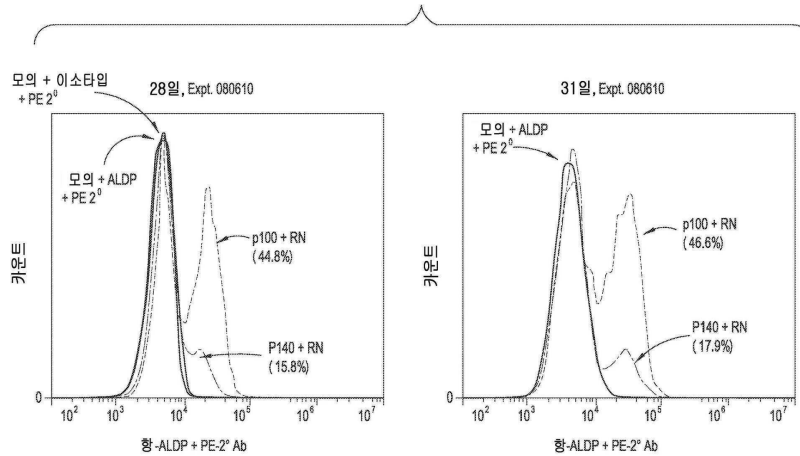


도면8a

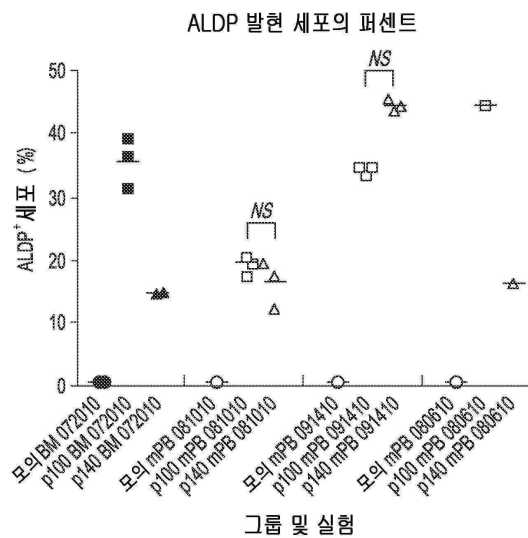
A1



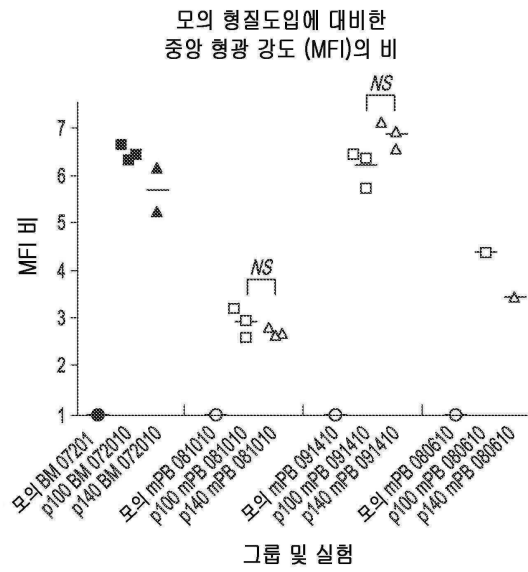
A2



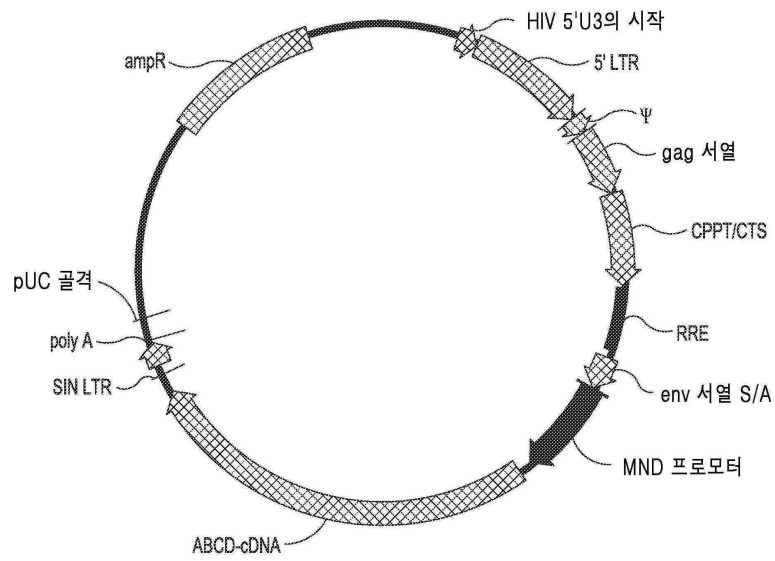
도면8b



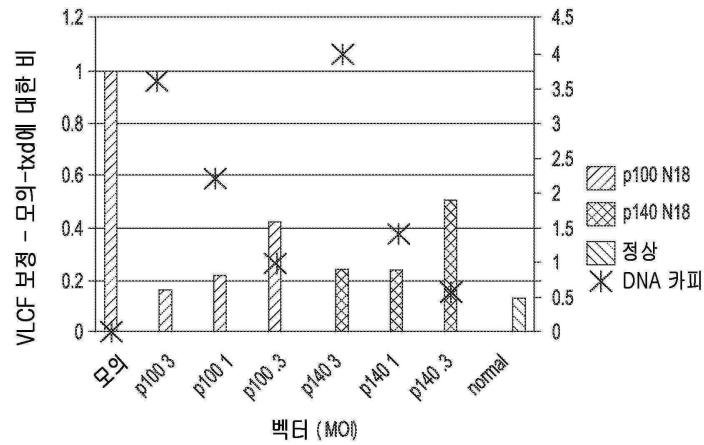
도면8c



도면9



도면10



서열 목록

<110> bluebird bio, Inc.

<120> GENE THERAPY VECTORS FOR ADRENOLEUKODYSTROPHY AND ADRENOMYELONEUROPATHY

<130> IPA131306-US-D1

<150> US 61/495,857

<151> 2011-06-10

<160> 3

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 2297

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

ccagccccag tcctacgcg gcagccagcc caggtgacat gccggtgctc tccaggcccc 60
ggccctggcg ggggaacacg ctgaagcgca cggccgtgct cctggccctc gcggcctatg 120
gagccccaaa agtctacccc ttggtgcgcc agtgcctggc cccggccagg ggtcttcagg 180

cgcccgccgg ggagcccacg caggaggcct ccggggtcgc ggccggccaaa gctggcatga 240
accgggtatt cctgcagcgg ctctgtggc tcctgcggct gctgttcccc cgggtcctgt 300
gccgggagac ggggctgctg gccctgcaact cggccgcctt ggtgagccgc accttctgt 360
cgggtgatgt ggcccgcctg gacggaagge tggcccgtg catcgtccgc aaggaccgcg 420
gggcttttgg ctggcagctg ctgcagtggc tcctcatcgc cctccctgct accttcgtca 480

```

acagtgccat ccgttacctg gagggccaac tggccctgtc gttccgcagc cgtctggtgg 540
 cccacgccta ccgcctctac ttctcccagc agacctacta ccgggtcagc aacatggacg 600
 ggcggtctcg caaccctgac cagtctctga cggaggacgt ggtggccttt gcggcctctg 660

tgccccacct ctactccaac ctgaccaagc cactcctgga cgtggctgtg acttcctaca 720
 ccttgcttcg ggcgggccgc tcccgtggag ccggcacagc ctggccctcg gccatcgccg 780
 gcctcgtggt gttcttcacg gccaacgtgc tgcgggcctt ctgcccgaag ttcggggagc 840
 tgggtggcaga ggaggcgcgg cggaaggggg agctgcgcta catgcactcg cgtgtggtgg 900
 ccaactcgga ggagatgcc ttctatgggg gccatgaggt ggagctggcc ctgctacagc 960
 gctcctacca ggacctggcc tcgcagatca acctcatcct tctggaacgc ctgtggtatg 1020
 ttatgctgga gcagttcttc atgaagtatg tgtggagcgc ctggggcctg ctcatggtgg 1080
 ctgtcccat catcactgcc actggctact cagagtcaga tgcagaggcc gtgaagaagg 1140

cagccttgga aaagaaggag gaggagctgg tgagcgagcg cacagaagcc ttcactattg 1200
 cccgaacct cctgacagcg gctgcagatg ccattgagcg gatcatgtcg tcgtacaagg 1260
 aggtgacgga gctggctggc tacacagccc gggtgcacga gatgttcag gtatttgaag 1320
 atgttcagcg ctgtcacttc aagaggccca gggagctaga ggacgctcag gcggggtctg 1380
 ggaccatagg ccggtctggt gtccgtgtgg agggccccct gaagatccga ggccaggtgg 1440
 tggatgtgga acaggggatc atctgcgaga acatcccat cgtcacgccc tcaggagagg 1500
 tgggtggtggc cagcctcaac atcagggtgg aggaaggcat gcattgtctc atcacaggcc 1560
 ccaatggctg cggcaagagc tcctgttcc ggatcctggg tgggctctgg cccacgtacg 1620

gtggtgtgct ctacaagccc ccaccccagc gcattgttcta catccgcagc aggcctaca 1680
 tgtctgtggg ctccctgcgt gaccaggtga tctacccgga ctcagtggag gacatgcaa 1740
 ggaagggcta ctggagcag gacctggaag ccattcctgga cgtcgtgcac ctgcaccaca 1800
 tcctgcagcg ggagggaggt tgggaggcta tgtgtgactg gaaggacgtc ctgtcgggtg 1860
 gcgagaagca gagaatcggc atggcccga tgttctacca caggccaag tacgccctcc 1920
 tggatgaatg caccagcgc gtagcatcg acgtggaagg caagatcttc caggcgcca 1980
 aggacgccc cattgccctg ctctccatca cccaccggcc ctccctgtgg aaataccaca 2040
 cacacttgct acagttcgt ggggaggcgc gctggaagt cgagaagctg gactcagctg 2100

ccgcctgag cctgacggag gagaagcagc ggctggagca gcagctggcg ggcatccca 2160
 agatgcagcg gcgcctccag gagctctgcc agatcctggg cgaggccgtg gcccagcgc 2220
 atgtgccggc acctagccc caaggccctg gtggcctcca gggtcctcc acctgactcg 2280
 agggggggcc cggtacc 2297

<210> 2

<211> 2238

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

```

atgccgtgc tctccaggcc ccggccctgg cgggggaaca cgctgaagcg cacggccgtg 60
ctcctggccc tcgcgcccta tggagcccac aaagtctacc ccttggtgcg ccagtgcctg 120
gccccggcca ggggtcttca ggcgcccgcc ggggagccca cgcaggaggc ctccggggtc 180

gcggcggcca aagctggcat gaaccgggta ttctgcagc ggctcctgtg gctcctgcgg 240
ctgctgttcc cccgggtcct gtgcgggag acggggctgc tggccctgca ctccggccgc 300
ttggtgagcc gcaccttctc gtcggtgat gtggccgcc tggacggaag gctggccgcg 360
tgcacgtcc gcaaggaccc gcgggctttt ggctggcagc tgctgcagtg gctcctcatc 420
gccctccctg ctaccttctg caacagtcc atccgttacc tggagggcca actggccctg 480
tcgttccgca gccgtctggt ggcccacgcc taccgcctct acttctccca gcagacctac 540
taccgggtca gcaacatgga cgggcggctt cgcaacctg accagtctct gacggaggac 600
gtggtggcct ttgcggctc tgtggccac ctctactcca acctgaccaa gccactcctg 660

gacgtggctg tgacttctca caccctgctt cgggcggccc gctcccgtgg agccggcaca 720
gcctggccct cggccatcgc cggcctcgtg gtgttctca cggccaactg gctgcgggcc 780
ttctcggcca agttcgggga gctggtggca gaggaggcgc ggcggaaggg ggagctgcgc 840
tacatgcact cgcgtgtggt ggccaactcg gaggagatcg ccttctatgg gggccatgag 900
gtggagctgg ccttctaca gcctcctac caggacctgg cctcgcatg caacctcatc 960
cttctggaac gccgtggta tgttatgctg gagcagttcc tcatgaagta tgtgtggagc 1020
gcctcgggcc tgctcatggt ggctgtcccc atcatcactg cactggcta ctcagagtca 1080
gatgcagagg ccgtgaagaa ggcagccttg gaaaagaagg aggaggagct ggtgagcgag 1140

cgcacagaag ccttactat tccccgaac ctctgacag cggtgcaga tgccattgag 1200
cggatcatgt cgtcgtacaa ggaggtgacg gagctggctg gctacacagc ccgggtgcac 1260
gagatgttcc aggtatttga agatgttcag cgtgtcact tcaagaggcc caggagagcta 1320
gaggacgctc aggcggggtc tgggaccata ggccggctctg gtgtccgtgt ggagggcccc 1380
ctgaagatcc gaggccaggt ggtggatgtg gaacaggga tcatctgca gaacatcccc 1440
atcgtcacgc cctcaggaga ggtggtggtg gccagcctca acatcagggt ggaggaaggc 1500
atgcactcgc tcatcacagg cccaatggc tgcggcaaga gctccctgtt ccggtacctg 1560

```

ggtgggctct gggccacgta cggtggtgtg ctctacaagc cccacccca gcgcatgttc 1620

tacatcccg agaggcccta catgtctgtg ggctccctgc gtgaccaggt gatctaccg 1680

gactcagtg aggcacatgca aaggaaggc tactcggagc aggcactgga agccatcctg 1740

gacgtcgtg acctgcacca catcctgcag cgggaggag gttgggaggc tatgtgtgac 1800

tggaaggacg tcctgtcggg tggcgagaag cagagaatcg gcatggcccg catgtttctac 1860

cacaggccca agtacgcct cctggatgaa tgcaccagcg cgtgagcat cgacgtggaa 1920

ggcaagatct tccaggcggc caaggacg cgcatgtccc tgctctccat caccaccgg 1980

ccctccctgt ggaaatacca cacacacttg ctacagttcg atgggaggc cggctggaag 2040

ttcgagaagc tggactcagc tgcccgctg agcctgacgg aggagaagca gcggctggag 2100

cagcagctgg cgggcattcc caagatgcag cggcgccctcc aggagctctg ccagatcctg 2160

ggcgaggccg tggccccagc gcatgtgccg gcacctagcc cgcaaggccc tgggtggcctc 2220

cagggtgcct ccacctga 2238

<210> 3

<211> 399

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> a MND promoter sequence

<400> 3

tttatattagt ctccagaaaa aggggggaat gaaagacccc acctgtaggt ttggcaagct 60

aggatcaagg ttaggaacag agagacagca gaatatgggc caaacaggat atctgttgta 120

agcagttcct gccccggctc agggccaaga acagttggaa cagcagaata tgggccaac 180

aggatatctg tggtaagcag ttctgcccc ggctcagggc caagaacaga tggccccag 240

atgcgggtccc gccctcagca gtttctagag aaccatcaga tgtttccagg gtgccccag 300

gacctgaaat gacctgtgc cttatttgaa ctaaccaatc agttcgttc tcgtttctgt 360

tcgcgcgtt ctgtccccg agctcaataa aagagccca 399