



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0151726
(43) 공개일자 2024년10월18일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/86 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)
A61P 7/06 (2006.01) C07K 14/47 (2006.01)
C12N 5/0789 (2010.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 15/86 (2013.01)
A61K 48/005 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2024-7018425(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2017년09월08일
심사청구일자 없음
- (62) 원출원 특허 10-2019-7009772
원출원일자(국제) 2017년09월08일
심사청구일자 2020년08월24일
- (85) 번역문제출일자 2024년05월31일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2017/050837
- (87) 국제공개번호 WO 2018/049273
국제공개일자 2018년03월15일
- (30) 우선권주장
62/385,185 2016년09월08일 미국(US)
62/412,028 2016년10월24일 미국(US)

- (71) 출원인
센트로 데 인베스티가씨오네스 에너제티카스 메디
오암비엔탈레스 와이 테크놀로지카스, 오.에이.,
엠.피.
스페인, 28040 마드리드, 40, 아브다. 드 라 콤플
루텐제
폰다시안 인스티튜토 데 인베스티카시온 사나타리
아 폰다시안 시메네스 디아즈
스페인, 28040 마드리드, 2, 아브다. 데 로스 레
에스 카톨리코스
(뒷면에 계속)
- (72) 발명자
부에렌 후안 에이.
미국, 뉴욕 10019, 뉴욕, 스위트 에이, 250 더블
유 55 스트리트, 알티더블유 인베스트먼츠, 엘엘
씨 내
리오 파울라
미국, 뉴욕 10019, 뉴욕, 스위트 에이, 250 더블
유 55 스트리트, 알티더블유 인베스트먼츠, 엘엘
씨 내
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인한얼

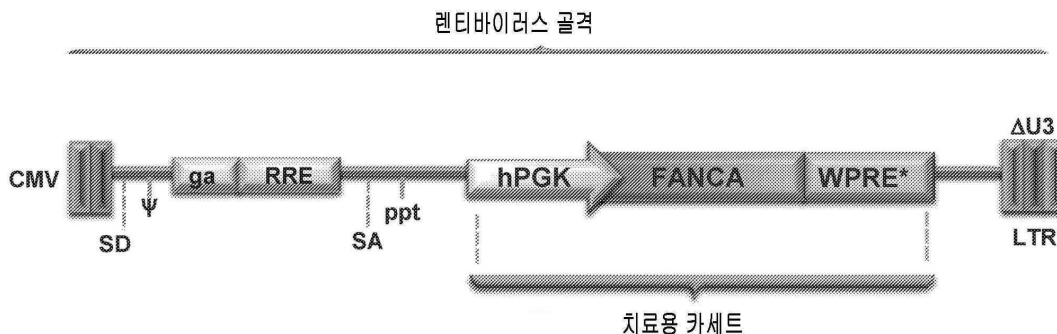
전체 청구항 수 : 총 27 항

(54) 발명의 명칭 판코니 빈혈 환자를 위한 유전자 치료

(57) 요약

본 발명은 FANCA 유전자 산물이 감소되거나 없는 세포에서 FANCA 발현을 구제하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 특히, 판코니 빈혈의 유전자 치료를 위한 방법 및 조성물이 개시된다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61P 7/06 (2018.01)
C07K 14/47 (2013.01)
C12N 5/0647 (2013.01)
C12N 2510/00 (2013.01)
C12N 2740/15041 (2013.01)
C12N 2830/48 (2013.01)
C12N 2830/50 (2013.01)

(71) 출원인

**콘소르시오 센트로 데 인베스티카시온 바이오메디카
엔 레드**

스페인 28029 마드리드 칼레 몬포르테 데 레모스
누메로 5

**퐁다시온 파라 라 인베스티게시온 바이오메디카 델
호스피탈 인판틸 유니베르시타리오 니노 지저스**

스페인, 28009 마드리드, 아브다 메넨데즈 펠라요
65

(72) 발명자

나바로 수산나

미국, 뉴욕 10019, 뉴욕, 스위트 에이, 250 더블유
55 스트리트, 알티더블유 인베스트먼츠, 엘엘씨 내

세빌라 줄리안

미국, 뉴욕 10019, 뉴욕, 스위트 에이, 250 더블유
55 스트리트, 알티더블유 인베스트먼츠, 엘엘씨 내

세고비아 호세 카를로스

미국, 뉴욕 10019, 뉴욕, 스위트 에이, 250 더블유
55 스트리트, 알티더블유 인베스트먼츠, 엘엘씨 내

곤잘레스 아프리카

미국, 뉴욕 10019, 뉴욕, 스위트 에이, 250 더블유
55 스트리트, 알티더블유 인베스트먼츠, 엘엘씨 내

카사도 호세 안토니오

미국, 뉴욕 10019, 뉴욕, 스위트 에이, 250 더블유
55 스트리트, 알티더블유 인베스트먼츠, 엘엘씨 내

구네세아 기예르모

미국, 뉴욕 10019, 뉴욕, 스위트 에이, 250 더블유
55 스트리트, 알티더블유 인베스트먼츠, 엘엘씨 내

명세서

청구범위

청구항 1

5'에서 3' 순서로 하기를 포함하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 발현 카세트:

- (a) 인간 포스포글리세레이트 키나제(PGK) 프로모터 서열 또는 이의 기능적 상동체 또는 변형체;
- (b) 인간 FANCA 폴리펩티드 또는 이의 기능적 단편 또는 변형체를 암호화하는 서열;
- (c) 우드처크 간염 바이러스 조절 요소(WPRE) RNA 배출 신호 서열(RNA export signal sequence) 또는 이의 기능적 변형체 또는 단편,

상기 인간 FANCA 폴리펩티드 또는 이의 기능적 단편 또는 변형체를 암호화하는 서열은 PGK 프로모터 서열에 작동가능하게 연결됨.

청구항 2

제1항에 있어서, FANCA 폴리펩티드 또는 이의 기능적 단편 또는 변형체가 서열번호: 25에 개시된 서열을 포함하는 것인, 발현 카세트.

청구항 3

제1항에 있어서, FANCA 폴리펩티드 또는 이의 기능적 단편 또는 변형체를 암호화하는 서열이 서열번호: 8에 개시된 서열을 포함하는 것인, 발현 카세트.

청구항 4

제1항에 있어서, PGK 프로모터가 서열번호: 7의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것인, 발현 카세트.

청구항 5

제1항에 있어서, WPRE 요소가 서열번호: 23의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것인, 발현 카세트.

청구항 6

제1항에 있어서, 카세트가 서열번호: 24의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것인, 발현 카세트.

청구항 7

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 인핸서 서열을 추가로 포함하는, 발현 카세트.

청구항 8

제1항에 있어서,

- (d) 폴리퓨린 트랙(PPT) 또는 폴리아데닐화(polyA) 신호 서열을 추가로 포함하는, 발현 카세트.

청구항 9

제1항에 있어서,

- (e) 패키징 신호 서열;
- (f) 절두된 Gag 서열;
- (g) Rev 반응 요소(RRE);
- (h) 중앙 폴리퓨린 트랙(cPPT);
- (i) 중앙 종결 서열(CTS); 및

(j) 선택적으로 원숭이 바이러스 40에서 유래한, 상류 서열 요소(USE) (SV40-USE).

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 발현 카세트를 포함하는 재조합 유전자 전달 벡터(recombinant gene delivery vector).

청구항 11

제10항에 있어서, 재조합 유전자 전달 벡터가 바이러스 또는 바이러스 벡터인 것인, 재조합 유전자 전달 벡터.

청구항 12

제11항에 있어서, 바이러스 또는 바이러스 벡터가 렌티바이러스(LV)인 것인, 재조합 유전자 전달 벡터.

청구항 13

제1항의 발현 카세트 또는 제11항 또는 제12항의 재조합 유전자 전달 벡터를 포함하는 세포.

청구항 14

제13항에 있어서, 세포가 조혈 줄기세포(hematopoietic stem cell)인 것인, 세포.

청구항 15

제13항에 있어서, 세포가 $CD34^{+}$ 인 것인, 세포.

청구항 16

약학적으로 허용가능한 부형제 및 제10항 내지 제12항 중 어느 한 항의 재조합 유전자 전달 벡터를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 17

약학적으로 허용가능한 부형제 및 제13항 내지 제15항 중 어느 한 항의 세포를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 18

이를 필요로 하는 대상에서 판코니 빈혈(Fanconi anemia)을 치료하는 방법으로서, 제17항 또는 제17항의 약제학적 조성물을 대상에게 제공하는 것을 포함하는 방법.

청구항 19

이를 필요로 하는 대상에서 판코니 빈혈을 치료하는 방법으로서, 발현 카세트를 포함하는 $CD34^{+}$ 세포를 대상에게 제공하는 것을 포함하고, 발현 카세트가 5'에서 3' 순서로:

(a) 인간 포스포글리세레이트 키나제(PGK) 프로모터 서열 또는 이의 기능적 상동체 또는 변형체;

(b) 인간 FANCA 폴리펩티드 또는 이의 기능적 단편 또는 변형체를 암호화하는 서열;

(c) 우드치크 간염 바이러스 조절 요소(WPRE) RNA 배출 신호 서열 또는 이의 기능적 변형체 또는 단편을 포함하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하고,

상기 인간 FANCA 폴리펩티드 또는 이의 기능적 단편 또는 변형체를 암호화하는 서열은 PGK 프로모터 서열에 작동가능하게 연결되는 것인, 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, $CD34^{+}$ 세포가 대상으로부터 수득된 것인, 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, $CD34^{+}$ 세포가 (i) G-CSF 또는 필그라스티(Filgrastim); 및 (ii) 플레릭사포르(Plerixafor)의 조합으로 대상을 처리한 후 상기 대상으로부터 수득된 것인, 방법.

[청구항 21]

제20항에 있어서, $CD34^{+}$ 세포는 발현 카세트를 포함하는 재조합 유전자 전달 벡터로 형질도입된 것인, 방법.

청구항 22

제21항에 있어서, $CD34^{+}$ 세포가 재조합 유전자 전달 벡터와 $CD34^{+}$ 세포를 약 24시간 동안 접촉시켜 형질도입된 것인, 방법.

청구항 23

하기 단계를 포함하는, 이를 필요로 하는 대상에서 판코니 빈혈을 치료하는 방법:

(a) 대상에게 (i) G-CSF 또는 필그라스티; 및 (ii) 플레릭사포르의 조합을 제공하여 대상 내에서 $CD34^{+}$ 세포를 동원하는 단계;

(b) 상기 대상으로부터 $CD34^{+}$ 세포를 포함하는 생물학적 샘플을 수득하는 단계로서, 상기 생물학적 샘플이 선택적으로 말초 혈액 또는 골수인 단계;

(c) 생물학적 샘플로부터 $CD34^{+}$ 세포로 농화된 세포 집단을 준비하는 단계;

(d) $CD34^{+}$ 세포로 농화된 세포 집단을 5'에서 3' 순서로:

(i) 프로모터 서열 또는 이의 기능적 상동체 또는 변형체; 및

(ii) 인간 FANCA 폴리펩티드 또는 이의 기능적 단편 또는 변형체를 암호화하는 서열을 포함하는, 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 발현 카세트를 포함하는 재조합 유전자 전달 벡터로 형질도입하는 단계로서,

상기 인간 FANCA 폴리펩티드 또는 이의 기능적 단편 또는 변형체를 암호화하는 서열이 PGK 프로모터 서열에 작동가능하게 연결되고, 형질도입이 $CD34^{+}$ 세포로 농화된 세포 집단을 렌티바이러스 벡터와 약 24시간 동안 접촉시키는 것을 포함하는 단계; 및

(e) 단계 (d)에서 발생하는 렌티바이러스로 형질도입된 세포 집단을 대상에게 공급하는 단계.

청구항 24

제23항에 있어서, 세포 집단의 준비가 적혈구의 고갈을 포함하는 것인, 방법.

청구항 25

제23항에 있어서, 세포 집단의 준비가 양성 선별(positive selection), 음성 선별(negative selection) 또는 이들의 조합에 의해 $CD34^{+}$ 세포로 농화하는 것을 포함하는 것인, 방법.

청구항 26

제23항에 있어서, 방법이 대상에게서 판코니 빈혈의 혈액학적 징후의 발병을 억제하고, 이의 진행을 중단시키고/시키거나, 이의 진행을 역전시키는 것인, 방법.

청구항 27

제26항에 있어서, 판코니 빈혈의 혈액학적 징후가 BMF, 혈소판감소증, 백혈구감소증, 범혈구감소증, 호중구감소증 및 빈혈 중 하나 이상으로부터 선택되는 것인, 방법.

발명의 설명

기술 분야

관련 출원

본 출원은 2016년 9월 8일자로 출원된 미국 가출원 제 62/385185 호 및 2016년 10월 24일자로 출원된 미국 가출원 제 62/412.028 호의 우선권을 주장하며, 그 내용은 전체가 본원에 참고로 포함된다.

발명의 분야

본 발명은 일반적으로 하나 이상의 *FANCA* 암호화 단백질로부터의 단백질 활성이 감소되거나 없는 세포 내로의 유전자 전달에 관한 것이다.

서열에 관한 서술

이 출원과 관련된 서열 목록은 종이 사본 대신에 텍스트 형식으로 제공되며 본 명세서에서 참고로서 포함된다. 서열을 포함하는 텍스트 파일의 명칭은 ROPA_002_01WO_ST25.txt이다. 텍스트 파일은 46KB이며, 2017년 9월 8일에 작성되었고, EFS-WEB를 통해 전자 파일로 제출된다.

배경 기술

판코니 빈혈(FA)은 상염색체 열성 질병으로(X 연관된 보체군 FA-B는 예외), 환자의 중간 생존기간은 24년이다(Butturini A, *et al.* (1994) Blood 84: 1650-1655; Kutler DI, *et al.* (2003) Blood 101: 1249-1256). 출생시, 이들 환자의 혈액 수치는 일반적으로 정상이다. 대적혈구증(Macrocytosis)은 종종 이 환자들에게서 감지되는 첫 번째 혈액학적 이상이다. 이것은 보통 혈소판감소증(thrombocytopenia), 빈혈(anemia) 및 범혈구감소증(pancytopenia)으로 진행된다. 골수부전(Bone marrow failure, BMF)은 대체로 5~10년 후 이 환자들에게서 관찰되는데, 혈액학적 질병 개시의 평균 나이는 7세이다. 약 80%의 FA 환자는 생애 첫 10년 내에 BMF의 징후가 발병할 것이다. 지금까지의 역학 연구(epidemiological studies)에 따르면, 만약 악성 증상이 무형성증 전에 나타나지 않는다면, 사실상 모든 FA 환자들은 40세 전에 BMF가 발병할 것이며(Butturini A, *et al.* (1994) Blood 84:1650-1655; Kutler DI, *et al.* (2003) Blood 101: 1249-1256), 이것이 이들 환자들에서 사망률의 주된 원인이다.

FA의 복잡한 임상적 특징 때문에, 이 환자들의 관리는 주로 다음의 증후군들을 개선하는데 초점이 맞추어져 있다: 골수부전(BMF), 골수성 백혈병(myeloid leukemia), 및 고형 종양(solid tumors).

현재의 치료방법은 플루옥시메스테론(flucxymesterone), 옥시메스테론(oxymetholone) 또는 스타노졸롤(stanozolol)로 구성된 것들과 같은 안드로젠(androgens)을 포함한다. Dufour와 그의 동료들의 최신 검토에 따르면(Dufour, C. and Svahn, J. (2008). *Bone Marrow Transplant* 41 Suppl 2: S90-95), 이 치료가 이 질병의 매우 진행된 단계에 시작되지 않는 한 FA 환자들은 안드로젠에 약간의 반응을 보일 수 있다. 약 75%의 환자가 안드로젠에 반응한다. 2 mg/kg/일의 프레드니솔론(prednisolone)과의 조합은 간 독성의 위험을 감소시킨다. 일반적으로 적합한 골수 기증자의 부재 하에서, 안드로젠은 약간의 조혈기능이 남아있는 경우에는 대안적인 치료 방법으로 고려될 수 있으나, 확실한 장기 치료법은 아니다.

Tischkowitz *et al.*은 초기 단계의 FA 환자들은 안드로젠에 반응할 수 있지만 대다수의 FA 환자들은 장기적으로 이 치료법에 불응한다고 지적했다(Tischkowitz, M. and Dokal, I. (2004). *Br J Haematol* 126: 176-191).

FA 치료에 있어 조혈 성장 인자(hematopoietic growth factor)에 대한 구체적인 징후는 없다. 그러나 두 가지 약학적 그룹의 약물이 FA의 구체적 증상(빈혈 및 호중구감소증)에 징후를 갖는 것이 확인되었다: 1) 에리쓰로포이에틴(erythropoietin) 및 2) 과립구-콜로니 자극인자(granulocyte-colony stimulating factors, G-CSFs). 몇몇 에리쓰로포이에틴(예를 들어, Aranesp, Nespo, Exjade)은 빈혈 치료용으로 허가받았으며, G-CSFs(예를 들어, G-CSF의 유사체, 예컨대 필그라스티움(filgrastim), 바이오가스트린(biogastin), 뉴라스타(neulasta))는 호중구감소증 치료용으로 허가받았다. 비록 제한된 숫자의 FA 환자들에게 에리쓰로포이에틴 및 과립구-콜로니 자극인자와 같은 조혈성장인자를 테스트했지만, 그 반응은 부분적이고 일시적이었다(Dufour *et al.*, 2008). 현재 이 치료법들은 장기적으로 좋은 선택에 해당하지 않는다. 호중구감소증 환자의 단기 치료의 경우 G-CSFs가 급성 감염에 대해 사용되어 주변의 호중구(peripheral neutrophils)의 숫자를 증가시켜, 항생제의 효과를 증진시킨다. 그러나 이러한 약물 치료는 FA 환자들의 확실한 관리와는 거리가 있다.

현재 이 질병의 혈액학적 증상의 유일한 치료적 처치는 동종이계 조혈세포의 이식에 기반한다. HLA가 동일한 형

제 기증자(HLA-identical sibling donors)로부터의 이식편을 이식한 FA 환자의 결과는 일반적으로 만족스럽지만 FA 환자의 약 20%만이 HLA가 동일한 형제를 가질 것이다. 형제 기증자가 없는 상당한 비율의 FA 환자들은 다른 대체 기증자로부터 이식을 받을 수 있지만, 이러한 이식은 더 높은 이환율(morbidity) 및 사망률(mortality)과 연관되어 있다. 나머지 FA 환자들의 경우에는 현재 대안적인 치료방법이 없다.

[0013] 따라서 FA의 효과적인 치료 요법에 대한 중요한 요구가 여전히 존재한다. 본 발명은 이러한 요구 및 그 이상을 다룬다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 본 발명의 구현에는 향상된 FANCA 발현을 위한 폴리뉴클레오티드 카세트를 포함한다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드 카세트는 전사 시 mRNA의 안정성을 증가시키기 위해 코돈 최적화(codon-optimized)된 인간 FANCA cDNA를 암호화하는 서열을 포함한다.

[0015] 하나의 구현예에서, 본 발명은 5'에서 3' 순서로: (a) 인간 포스포글리세레이트 키나제(PGK) 프로모터 서열 또는 이의 기능적 상동체 또는 변형체; (b) 인간 FANCA 폴리펩티드 또는 이의 기능적 단편 또는 변형체를 암호화하는 서열; (c) 우드치크 간염 바이러스 조절 요소(WPRE) RNA 배출 신호 서열(RNA export signal sequence) 또는 이의 기능적 변형체 또는 단편을 포함하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현 카세트를 포함하고, 여기서 상기 인간 FANCA 폴리펩티드 또는 이의 기능적 단편 또는 변형체를 암호화하는 서열은 PGK 프로모터 서열에 작동가능하게 연결된다. 특정 구현예에서, FANCA 폴리펩티드 또는 이의 기능적 단편 또는 변형체는 서열번호: 25에 개시된 서열; FANCA 폴리펩티드 또는 이의 기능적 단편 또는 변형체를 암호화하는 서열은 서열번호: 8에 개시된 서열을 포함하고; PGK 프로모터는 서열번호: 7의 뉴클레오티드 서열을 포함하고/하거나; WPRE 요소는 서열번호: 23의 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 특정 구현예에서, 카세트는 서열번호: 24의 뉴클레오티드 서열의 영역을 포함한다. 특정 구현예에서, 카세트는 하나 이상의 인헨서 서열, 폴리퓨린 트랙(PPT) 또는 폴리아데닐화(polyA) 신호 서열, 패키징 신호 서열, 절두된 Gag 서열, Rev 반응 요소(RRE); 중앙 폴리퓨린 트랙(cPPT), 중앙 종결 서열(CTS) 및/또는, 선택적으로 원숭이 바이러스 40에서 유래한, 상류 서열 요소(USE) (SV40-USE)를 추가로 포함한다.

[0016] 하나의 구현예에서, 본 발명은 하기: a) 프로모터 서열; b) 폴리펩티드를 암호화하는 서열; 및 c) 리보핵산(RNA) 배출 신호를 포함하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현 카세트를 제공하고, 여기서 상기 프로모터 서열은 FANCA 폴리펩티드(서열번호: 25)를 암호화하는 서열에 작동가능하게 연결되고, 선택적으로 a)-c)는 발현 카세트에서 5'에서 3' 순서로 존재한다. 특정 구현예에서, 프로모터는 포스포글리세레이트 키나제(PGK) 프로모터이다. 특정 구현예에서, 폴리펩티드를 암호화하는 서열은 코돈-최적화된다. 일부의 구현예에서, 폴리펩티드를 암호화하는 서열은 적어도 85%가 서열번호: 8과 동일한 인간 FANCA cDNA의 코돈-최적화된 버전이다. 구체적인 구현예에서, RNA 배출 신호는 우드치크 간염 바이러스의 돌연변이된 전사 후 조절 요소(wPRE)이다.

[0017] 특정 구현예에서, 돌연변이된 wPRE는 서열번호: 23에 적어도 80% 동일성을 갖는 서열을 포함하는 키메라 wPRE이다. 일부의 구현예에서, 발현 카세트는 하나 이상의 인헨서 서열을 추가로 포함한다. 일부의 구현예에서, 발현 카세트는 폴리퓨린 트랙(PPT) 또는 폴리아데닐화(polyA) 신호 서열을 추가로 포함한다. 일부의 구현예에서, 발현 카세트는 하나 이상의 하기의 서열을 추가로 포함한다: i) 패키징 신호 서열; ii) 절두된 Gag 서열; iii) Rev 반응 요소(RRE); iv) 중앙 폴리퓨린 트랙(cPPT); v) 중앙 종결 서열(CTS); 및 vi) 선택적으로 원숭이 바이러스 40에서 유래한, 상류 서열 요소(USE) (SV40-USE). 일부의 구현예에서, 발현 카세트는 추가로 5' 및 3' 긴 말단 반복(LTR) 서열을 포함한다.

[0018] 관련된 구현예에서, 본 발명은 본원에 개시된 발현 카세트를 포함하는 재조합 유전자 전달 벡터를 제공한다. 특정 구현예에서 재조합 유전자 전달 벡터는 바이러스 또는 바이러스 벡터(viral vector)이다. 특정 구현예에서, 바이러스 또는 바이러스 벡터는 렌티바이러스(LV)이다.

[0019] 다른 관련된 구현예에서, 본 발명은 본원에 개시된 발현 카세트 또는 유전자 전달 벡터를 포함하는 세포를 제공한다. 일부의 구현예에서, 세포는 혈구세포이다. 일부의 구현예에서, 세포는 적혈구세포이다. 일부의 구현예에서, 세포는 골수세포, 예를 들어, 계통 고갈된 골수세포이다. 구체적인 구현예에서, 세포는 조혈 줄기세포 또는 CD34⁺ 세포이다. 일부의 구현예에서 세포는 조혈 줄기세포이다. 일부의 구현예에서, 세포는 CD34⁺ 조혈 줄기세포이다. 일부의 구현예에서, 세포는 수임된(committed) 조혈 적혈구 전구 세포이다.

- [0020] 관련된 구현예에서, 본 발명은 약학적으로 허용가능한 부형제 및 본원에 개시된 재조합 유전자 전달 벡터 또는 세포를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 발명의 특정 측면에서, 본 발명의 폴리뉴클레오티드 카세트 및 약제학적 부형제를 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다. 다른 구현예에서, 약제학적 조성물은 본 발명의 유전자 전달 벡터 및 약제학적 부형제를 포함한다.
- [0021] 방법 및 조성물은 동물 및 특히 인간에서 질병, 장애, 기능장애 집중되고 표적화된 유전자 치료에 유용한 약제의 제조에 사용되기 위한 이 유전적 발현 카세트들을 포함하는 유전자 치료 벡터 조성물, 예를 들어, 바이러스 벡터의 사용을 위해 제공된다.
- [0022] 다른 구현예에서, 본 발명은 대상에게 본원에 개시된 발현 카세트, 유전자 전달 벡터, 또는 약제학적 조성물을 제공하는 것을 포함하는, 이를 필요로 하는 대상의 질병 또는 장애를 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다.
- [0023] 다른 구현예에서, 본 발명은 대상에게 본원에 개시된 약제학적 조성물을 제공하는 것을 포함하는, 이를 필요로 하는 대상에서 판코니 빈혈을 치료하는 방법을 포함한다.
- [0024] 관련된 구현예에서, 본 발명은 대상에게 발현 카세트를 포함하는 $CD34^{+}$ 세포를 제공하는 것을 포함하는, 이를 필요로 하는 대상에서 판코니 빈혈을 치료하는 방법을 포함하고, 상기 발현 카세트는 5'에서 3' 순서: (a) 인간 포스포글리세레이트 키나제(PGK) 프로모터 서열 또는 이의 기능적 상동체 또는 변형체; (b) 인간 FANCA 폴리펩티드 또는 이의 기능적 단편 또는 변형체를 암호화하는 서열; (c) 우드치크 간염 바이러스 조절 요소(WPRE) RNA 배출 신호 서열(RNA export signal sequence) 또는 이의 기능적 변형체 또는 단편을 포함하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하고, 상기 인간 FANCA 폴리펩티드 또는 이의 기능적 단편 또는 변형체를 암호화하는 서열은 PGK 프로모터 서열에 작동가능하게 연결된다. 특정 구현예에서, $CD34^{+}$ 세포는 대상으로부터 획득되었다. 구체적인 구현예에서, $CD34^{+}$ 세포는 (i) G-CSF 또는 필그라스티움(filgrastim); 및 (ii) 플렉사포르의 조합으로 대상을 처리한 후 상기 대상으로부터 획득되었다. 구체적인 구현예에서, $CD34^{+}$ 세포는 발현 카세트를 포함하는 재조합 유전자 전달 벡터로 형질도입되었다. 하나의 구현예에서, $CD34^{+}$ 세포는 $CD34^{+}$ 세포와 재조합 유전자 전달 벡터를 약 24 시간 동안 접촉시켜 형질도입되었다.
- [0025] 다른 구현예에서, 본 발명은 하기 단계를 포함하는, 이를 필요로 하는 대상에서 판코니 빈혈을 치료하는 방법을 제공한다: (a) 대상에게 (i) G-CSF 또는 필그라스티움; 및 (ii) 플렉사포르의 조합을 제공하여 대상 내에서 $CD34^{+}$ 세포를 동원하는 단계; (b) 상기 대상으로부터 $CD34^{+}$ 세포를 포함하는 생물학적 샘플을 획득하는 단계로서, 상기 생물학적 샘플이 선택적으로 말초 혈액 또는 골수인 단계; (c) 생물학적 샘플로부터 $CD34^{+}$ 세포로 농화된(enriched) 세포 집단을 준비하는 단계; (d) $CD34^{+}$ 세포로 농화된 세포 집단을 5'에서 3' 순서로: (i) 프로모터 서열 또는 이의 기능적 상동체 또는 변형체; 및 (ii) 인간 FANCA 폴리펩티드 또는 이의 기능적 단편 또는 변형체를 암호화하는 서열을 포함하는, 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현 카세트를 포함하는 재조합 유전자 전달 벡터로 형질도입하는 단계로서, 상기 인간 FANCA 폴리펩티드 또는 이의 기능적 단편 또는 변형체를 암호화하는 서열이 PGK 프로모터 서열에 작동가능하게 연결되고, 형질도입이 $CD34^{+}$ 세포로 농화된 세포 집단을 렌티바이러스 벡터와 약 24시간 동안 접촉시키는 것을 포함하는 단계; 및 (e) 단계 (d)로부터 획득된 렌티바이러스로 형질도입된 세포 집단을 대상에게 공급하는 단계. 특정 구현예에서, 세포 집단의 준비는 적혈구의 고갈 및/또는 양성 선택(positive selection), 음성 선택(negative selection) 또는 이들의 조합에 의한 $CD34^{+}$ 세포의 농화를 포함한다. 구체적인 구현예에서, 방법은 대상에게서 판코니 빈혈의 혈액학적 징후의 발병을 억제하고, 이의 진행을 중단시키고/시키거나, 이의 진행을 역전시킨다. 구체적인 구현예에서, 판코니 빈혈의 혈액학적 징후는 BMF, 혈소판감소증, 백혈구감소증, 범혈구감소증, 호중구감소증 및 빈혈 중 하나 이상으로부터 선택된다.
- [0026] 본 발명의 다른 특징 및 이점은 다음의 상세한 설명 및 청구범위로부터 명백해질 것이다.

과제의 해결 수단

- [0027] 본 발명은 일반적으로 분자 생물학 및 바이러스학 분야에 관한 것이며, 특히 선택된 치료적 컨스트럭트(예를 들어, 펩티드, 폴리펩티드, 리보자임, 및 촉매 RNA 분자를 포함)를 암호화하는 핵산 분절을 척추 동물의 선택된 세포 및 조직에 전달하는 것에 유용한 유전자 발현 카세트 및 이를 포함한 벡터에 관한 것이다. 특히, 이 유전적 컨스트럭트는 포유류, 특히 FANCA 유전자 산물 조절장애에 관련된 인간의 질병, 장애, 및 기능장애의 치료를 위한 유전자 치료에 유용하다.
- [0028] 특정 구현예에서, 본 발명은 판코니 빈혈(PA) 환자의 유전자 치료를 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 특히,

FANCA 유전자 발현을 구제하기 위한 조성물 및 방법이 제공된다. 본원에 개시된 특정 방법은 FA, 특히 FA-A를 갖는 대상의 조혈 전구세포에 인간 FANCA를 전달하기 위한 렌티바이러스 벡터의 용도에 관한 것이다.

[0029]

정의

[0030]

달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용되는 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기술된 것과 유사하거나 동등한 방법 및 재료가 본 발명의 실시예에 사용될 수 있지만, 적합한 방법 및 재료가 하기에 기술된다. 본원에 언급된 모든 간행물, 특허 출원, 특허 및 기타 참고문헌은 그 전체가 참고문헌으로 포함된다. 상충하는 경우, 정의를 포함하여 본 명세서가 우선할 것이다. 또한, 본원에 기술된 재료, 방법 및 실시예는 단지 예시적인 것이며 제한하려는 의도는 아니다.

[0031]

본원에 사용된 "벡터"는 폴리뉴클레오티드를 포함하거나 이와 연합하여 세포에 폴리뉴클레오티드의 전달을 매개하는데 사용될 수 있는 거대분자 또는 거대분자의 연합을 지칭한다. 예시적인 벡터는, 예를 들어, 플라스미드, 바이러스 벡터(예를 들어, 렌티바이러스 벡터와 같은 레트로바이러스 벡터), 리포좀 및 기타 유전자 전달 비히클을 포함한다.

[0032]

용어 "LV"는 렌티바이러스에 대한 약어이며, 바이러스 자체 또는 이의 유도체를 지칭하는데 사용될 수 있다. 이 용어는 달리 요구되는 경우를 제외하고는, 모든 아형 및 자연 발생형과 재조합형 모두를 포함한다.

[0033]

본원에 사용된 바와 같이, 용어 "유전자" 또는 "암호화 서열"은 유전자 산물을 암호화하는 시험관 내 또는 생체 내 뉴클레오티드 서열을 지칭한다. 일부 경우, 유전자는 암호화 서열 즉 유전자 산물을 암호화하는 서열로 구성되거나 본질적으로 구성된다. 다른 경우에, 유전자는 추가적인, 비-암호화 서열을 포함한다. 예를 들어, 유전자는 암호화 영역 전 및 후 영역, 예를 들어, 5' 비번역(5' UTR) 또는 "리더" 서열 및 3' UTR 또는 "트레일러(trailer)" 서열 뿐만 아니라 개재 서열(인트론)을 개별적인 암호화 분절(엑손) 사이에 포함하거나 하지 않을 수 있다.

[0034]

본원에 사용된 바와 같이, "치료 유전자"는 발현될 때, 그것이 존재하는 세포 또는 조직에, 또는 유전자가 발현되는 포유류에 유익한 효과를 부여하는 유전자를 지칭한다. 유익한 효과의 예시는 상태 또는 질병의 신호 또는 증상의 개선, 상태 또는 질병의 예방 또는 억제, 또는 원하는 특성의 부여를 포함한다. 치료 유전자는 세포 또는 포유류의 유전적 결함을 교정하는 유전자를 포함한다.

[0035]

본원에 사용된 바와 같이, 전이유전자는 벡터에 의해 세포에 전달되는 유전자이다.

[0036]

본원에 사용된 바와 같이, 용어 "유전자 산물"은 폴리펩티드, 펩티드, 단백질, 또는 소형 간섭 RNA(siRNA) miRNA 또는 작은 헤어핀 RNA(shRNA)를 포함하는 간섭 RNA와 같은 폴리뉴클레오티드 서열의 원하는 발현 산물을 지칭한다.

[0037]

본원에 사용된 바와 같이, 용어 "폴리펩티드", "펩티드" 및 "단백질"은 임의의 길이의 아미노산의 중합체를 지칭한다. 상기 용어는 또한, 예를 들어, 이황화 결합 형성, 당화, 지질화, 인산화 또는 표지 성분과의 접합에 의해 변형된 아미노산 중합체를 포함한다.

[0038]

"포함하는"은 인용된 요소가, 예를 들어, 조성물, 방법, 키트 등에 요구되지만, 청구항의 범위 내에서 다른 요소가, 예를 들어, 조성물, 방법, 키트 등을 형성하도록 포함될 수 있음을 의미한다. 예를 들어, 프로모터에 작동가능하게 연결된 치료적 폴리펩티드를 암호화하는 유전자를 "포함하는" 발현 카세트는 유전자 및 프로모터 이외의 다른 요소, 예를 들어, 폴리-아데닐화 서열, 인핸서 요소, 다른 유전자, 링커 도메인 등을 포함할 수 있는 발현카세트이다.

[0039]

"본질적으로 구성된"은, 예를 들어, 조성물, 방법, 키트 등, 기본 및 신규한 특성에 실질적으로 영향을 주지 않는 특정 재료 또는 단계에 기술된, 예를 들어, 조성물, 방법, 키트 등의 범위에 대한 제한을 의미한다. 예를 들어, 프로모터 및 폴리아데닐화 서열에 작동가능하게 연결된 치료적 폴리펩티드를 암호화하는 유전자를 "본질적으로 포함하는" 발현 카세트는, 이들 유전자의 전사 또는 번역에 실질적으로 영향을 미치지 않는 한, 추가 서열, 예를 들어, 링커 서열을 포함할 수 있다. 또 다른 예로서, 인용된 서열로 "본질적으로 구성된" 변형체 또는 변이체, 폴리펩티드 단편은 그것이 유래한 전장의 순수한(naive) 폴리펩티드에 근거한 서열의 경계에서 약 10개 아미노산 잔기가 많거나 적은 또는, 예를 들어, 인용된 경계 아미노산 잔기보다 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 더 많은 아미노산 서열을 갖는다.

- [0040] "구성된"은 청구범위에 명시되지 않은 임의의 요소, 단계 또는 성분의 조성물, 방법 또는 키트의 배제를 의미한다. 예를 들어, 프로모터에 작동가능하게 연결된 치료적 폴리펩티드를 암호하는 유전자 및 전사-후 조절 요소로 "구성된" 발현 카세트는, 프로모터, 치료적 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열 및 전사-후 조절 요소로만 구성된다. 다른 예로서, 인용된 서열로 "구성된" 폴리펩티드는 인용된 서열만을 포함한다.
- [0041] 본원에 사용된 바와 같은 "발현 벡터"는 관심 유전자 산물을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터, 예를 들어, 플라스미드, 미니-서클, 바이러스 벡터, 리포솜 및 상기 논의된 바와 같이 또는 당해 분야에 공지된 바와 같은 것 등을 포함하고, 의도된 표적 세포에서 유전자 산물의 발현에 영향을 주는데 사용된다. 발현 벡터는 또한 표적에서 유전자 산물의 발현을 촉진하기 위해 암호화 영역에 작동가능하게 연결된 조절 요소를 포함한다. 예를 들어, 프로모터, 인핸서, UTR, miRNA 표적화 서열 등의 조절 요소와 이들이 발현을 위해 작동가능하게 연결되는 유전자 또는 유전자들의 조합이 종종 "발현 카세트"라고 언급된다. 많은 그러한 조절 요소는 당업계에 공지되어 있고 이용가능하거나 또는 당업계에서 이용가능한 구성 요소로부터 용이하게 구성될 수 있다.
- [0042] 본원에서 사용된 바와 같은 "프로모터"는 RNA 중합효소의 결합을 지시하고 이에 의해 RNA 합성을 촉진하는 DNA 서열, 즉, 전사를 지시하기에 충분한 최소한의 서열을 포함한다. 프로모터 및 상응하는 단백질 또는 폴리펩티드 발현은 편재적(ubiquitous)일 수 있으며, 이는 광범위한 세포, 조직 및 종 또는 세포-유형 특이적, 조직-특이적 또는 종 특이적으로 강력하게 활성임을 의미한다. 프로모터는 지속적으로 활성임을 의미하는 "구성적", 또는 생물적 또는 비생물적 요인의 존재 또는 부재에 의해 프로모터가 활성화되거나 비활성화될 수 있음을 의미하는 "유도성"일 수 있다. 또한, 프로모터 서열과 인접하거나 인접하지 않을 수 있는 인핸서 서열이 본 발명의 핵산 컨스트럭트 또는 벡터에 포함된다. 인핸서 서열은 프로모터-의존성 유전자 발현에 영향을 미치고, 본래 유전자의 5' 또는 3' 부위에 위치할 수 있다.
- [0043] 본원에 사용된 바와 같은 "인핸서"는 인접 유전자의 전사를 자극하거나 억제하는 시스-작용 요소를 포함한다. 전사를 억제하는 인핸서는 또한 "사일런서(silencer)"라고 불린다. 인핸서는 암호화 서열 및 전사 영역의 하류 위치로부터도 수 킬로베이스 쌍(kb) 까지의 거리에 걸쳐, 양쪽 방향으로 기능적으로 작용할 수 있다(즉, 암호화 서열과 연합될 수 있음).
- [0044] 본원에서 사용된 바와 같은 "종결 신호 서열"은 RNA 중합효소가 전사를 종결하게 하는 임의의 유전적 요소, 예를 들어, 폴리아데닐화 신호 서열을 포함한다.
- [0045] 본원에 사용된 바와 같이, "작동적으로 연결된" 또는 "작동가능하게 연결된"이란 용어는 유전 요소, 예를 들어, 프로모터, 인핸서, 종결 신호 서열, 폴리아데닐화 서열 등의 병렬을 지칭하며, 상기 요소는 이들이 예상되는 방식으로 작동하도록 허용하는 관계에 있다. 예를 들어, 프로모터가 암호화 서열의 전사 개시를 돕는 경우, 프로모터는 암호화 영역에 작동적으로 연결된다. 이러한 기능적 관계가 유지되는 한, 프로모터와 암호화 영역 사이에 개재하는 잔기가 있을 수 있다.
- [0046] 본원에 사용된 바와 같이, "이종"이라는 용어는 그것이 비교되는 개체의 나머지와 유전형적으로 별개인 개체로부터 유도되는 것을 의미한다. 예를 들어, 유전 공학 기술에 의해 다른 종에서 유래된 플라스미드 또는 벡터 내로 도입된 폴리뉴클레오티드는 이종 폴리뉴클레오티드이다. 다른 예로서, 본래의 암호화 서열로부터 제거되고 그와 자연적으로 연결되어 발견되지 않는 암호화 서열에 작동적으로 연결된 프로모터는 이종 프로모터이다. 따라서, 예를 들어, 이종 유전자 산물을 암호화하는 이종 핵산을 포함하는 LV 벡터는 자연 발생적인 야생형 LV에 일반적으로 포함되지 않는 핵산을 포함하는 LV 벡터이며, 암호화된 이종 유전자 산물은 자연 발생적인, 야생형 LV에 의해 일반적으로 암호화되지 않는 유전자 산물이다.
- [0047] 뉴클레오티드 분자 또는 유전자 산물과 관련하여 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "내인성"은 숙주 바이러스 또는 세포에서 자연적으로 발생하거나 혹은 연관되는, 핵산 서열, 예를 들어, 유전자 또는 유전 요소, 또는 RNA, 단백질과 같은 유전자 산물을 지칭한다.
- [0048] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "본래의"는 야생형 바이러스 또는 세포에 존재하는 뉴클레오티드 서열, 예를 들어, 유전자, 또는 RNA, 단백질과 같은 유전자 산물을 지칭한다.
- [0049] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "변형체"는 참고 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열, 예를 들어, 본래의 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열의 변이체, 즉 참고 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열과 100% 미만의 서열 동일성을 갖는 변이체를 지칭한다. 달리 말하면, 변형체는 참고 폴리뉴클레오티드 서열, 예를 들어, 본래의 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열에 대해 적어도 하나의 아미노산 차이(예를 들어, 아미노산 치환, 아미노산 삽입, 아미노산 결실)를 포함한다. 예를 들어, 변형체는 전체 길이의 본래의 폴리뉴클레오티드

서열과 70% 이상, 예를 들어, 75% 또는 80% 이상, 예를 들어, 85%, 90%, 또는 95% 이상, 예를 들어, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 폴리뉴클레오티드일 수 있다. 또 다른 예로서, 변형체는 전체 길이의 본래의 폴리펩티드 서열과 70% 이상, 예를 들어, 75% 또는 80% 이상, 예를 들어, 85%, 90% 또는 95% 이상, 예를 들어, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드일 수 있다. 변형체는 또한 참고의 변형체 단편, 예를 들어, 참고의 단편과 70% 이상의 서열 동일성을 공유하는 본래의 서열, 예를 들어, 본래의 서열과 75% 또는 80% 이상, 예컨대 85%, 90% 또는 95% 이상, 예를 들어, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 변형체 단편을 포함한다.

[0050] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "생물학적 활성" 및 "생물학적으로 활성의"는 세포 내 특정 생물학적 요소에 기인하는 활성을 지칭한다. 예를 들어, "면역 글로불린", "항체" 또는 이의 단편 또는 변형체의 "생물학적 활성"은 항원 결정기와 결합하고 그로 인해 면역 기능을 촉진시키는 능력을 지칭한다. 또 다른 예로서, 폴리펩티드 또는 이의 기능적 단편 또는 변형체의 생물학적 활성은, 예를 들어, 결합, 효소 활성 등의 본래의 기능을 수행하는 폴리펩티드 또는 이의 기능적 단편 또는 변형체의 능력을 지칭한다. 세 번째 예로, 예를 들어, 프로모터, 인핸서, 코자크 서열 등과 같은 유전자 조절 요소의 생물학적 활성은 조절 요소 또는 이의 기능적 단편 또는 변형체가 그에 각각 작동가능하게 연결된 유전자의 발현을 조절, 즉 그의 번역을 촉진, 증진 또는 활성화시키는 능력을 지칭한다.

[0051] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "투여하는" 또는 "도입하는"은 세포, 대상의 세포 및/또는 기관 또는 대상에 대한 재조합 단백질 발현용 벡터의 전달을 지칭한다. 이러한 투여 또는 도입은 생체 내, 시험관 내 또는 생체 외에서 발생할 수 있다. 유전자 산물의 발현을 위한 벡터는 전형적으로 물리적 수단(예를 들어, 칼슘 포스페이트 형질감염, 전기천공법, 미세주입 또는 리포펙션)에 의해 이중 DNA를 세포에 삽입하는 것을 의미하는 형질감염; 전형적으로 감염성 체제, 즉 바이러스에 의한 도입을 의미하는 감염; 또는 전형적으로 바이러스에 의한 세포의 안정한 감염 또는 바이러스 체제(예를 들어, 박테리오파지)에 의한 하나의 미생물로부터 다른 미생물의 유전 물질의 전달을 의미하는 형질도입에 의해 세포 내로 도입될 수 있다.

[0052] "형질전환"은 종양유전자를 발현하고 따라서 종양 세포와 같은 연속적인 성장 모드로 전환된 이중 DNA 또는 세포를 포함하는 박테리아를 지칭하는데 통상적으로 사용된다. 세포를 "형질전환시키는"에 사용되는 벡터는 플라스미드, 바이러스 또는 다른 비히클일 수 있다.

[0053] 전형적으로, 세포는 이중 DNA(즉, 벡터)의 세포 내로의 투여, 도입 또는 삽입에 사용되는 수단에 따라 "형질도입된", "감염된", "형질감염된" 또는 "형질전환된" 것으로 지칭된다. "형질도입된", "형질감염된" 및 "형질전환된"이라는 용어는 이중 DNA의 도입 방법에 관계없이 본원에서 상호교환적으로 사용될 수 있다.

[0054] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "숙주 세포"는 벡터로 형질도입, 감염, 형질감염 또는 형질전환된 세포를 지칭한다. 벡터는 플라스미드, 바이러스 입자, 파지 등일 수 있다. 온도, pH 등과 같은 배양 조건은 발현을 위해 선택된 숙주 세포와 함께 이전에 사용된 것들이며, 당업자에게 자명할 것이다. 용어 "숙주 세포"가 원래의 형질도입, 감염, 형질감염 또는 형질전환된 세포 및 이의 자손을 의미하는 것으로 이해될 것이다.

[0055] "치료", "치료하는" 등의 용어는 일반적으로 바람직한 약리학적 및/또는 생리학적 효과를 얻는 것을 의미하는 것으로 본원에서 사용된다. 그 효과는 질병 또는 이의 증상을 완전히 또는 부분적으로 예방, 예를 들어, 대상에서 질병 또는 이의 증상이 발생할 가능성을 감소시키는 측면에서 예방적이고/이거나 질병 및/또는 질병에 기인하는 부작용에 대해 부분적 또는 완전한 치유 측면에서 치료적일 수 있다. 본원에서 사용되는 "치료"는 포유류에서 질병의 치료를 포함하며, 다음을 포함한다: (a) 질병에 걸리기 쉽지만 아직 이를 갖는 것으로 진단되지 않은 대상에서 질병이 발생하는 것을 예방함; (b) 질병의 억제, 즉 그의 발병을 억제함; 또는 (c) 질병의 완화, 즉 질병의 퇴행을 야기함. 치료제는 질병 또는 상해의 발병 전, 발병 중 또는 발병 후에 투여될 수 있다. 치료가 환자의 바람직하지 않은 임상 증상을 안정화시키거나 감소시키는 경우, 진행중인 질병의 치료는 특히 중요하다. 이러한 치료는 바람직하게는 이환된 조직에서 기능의 완전한 손실 이전에 수행된다. 대상 치료는 바람직하게는 질병의 증상 단계 도중에, 그리고 일부 경우에는 질병의 증상 단계 이후에 투여될 것이다.

[0056] "개체", "숙주", "대상" 및 "환자"라는 용어는 본원에서 상호교환적으로 사용되며, 인간과 원숭이; 포유류 스포츠 동물(예를 들어, 말); 포유류 농장 동물(예를 들어, 양, 염소 등); 포유류 애완동물(개, 고양이 등); 및 설치류(예를 들어, 마우스, 쥐 등)를 포함하는 인간 및 비인간 영장류를 포함하지만, 이에 한정되지 않는, 포유류를 지칭한다. 본원에서 사용되는 용어는 단지 특정 구현예를 설명하기 위한 것이며, 본 발명을 제한하고자 하는 것은 아니다. 본원에서 사용된 바와 같이, 단수 형태 "하나", "한" 및 "그"는 문맥상 다르게 지시하지 않는 한 복수 형태를 포함하는 것으로 의도된다. 또한, 용어 "포함하는", "포함한다", "가지는", "가지다", "함께" 또는 이의 변형은 상세한 설명 및/또는 청구범위에서 사용되는 한, 그러한 용어는 용어 "포함하는"이라는 용어와 유

사한 방식으로 포괄적인 것으로 의도된다.

- [0057] 용어 "약" 또는 "대략"은 당업자에 의해 결정된 바와 같은 특정 값에 대한 수용가능한 오차 범위 내를 의미하며, 이는 값이 어떻게 측정되거나 결정되는지, 즉, 측정 시스템의 한계에 부분적으로 의존할 것이다. 예를 들어, "약"은 당업계의 관행에 따라 1 이내 또는 1 초과와 표준 편차를 의미할 수 있다. 대안적으로, "약"은 주어진 값의 20% 이하, 바람직하게는 10% 이하, 보다 바람직하게는 5% 이하, 더욱 바람직하게는 1% 이하의 범위를 의미할 수 있다. 대안적으로, 특히 생물학적 시스템 또는 공정과 관련하여, 이 용어는 값의 10배 이내, 바람직하게는 5배 이내, 보다 바람직하게는 2배 이내를 의미할 수 있다. 특정 값이 명세서 및 청구범위에 기재된 경우, 달리 언급되지 않는 한, 용어 "약"은 상기 특정 값에 대한 허용가능한 오차 범위 내를 의미한다.
- [0058] 본 발명의 실시는 달리 명시되지 않는 한, 세포 생물학, 분자 생물학 (재조합 기술 포함), 미생물학, 생화학 및 면역학의 통상적인 기술을 사용하며, 이들은 당업자의 범위 내에 있다. 이러한 기술은 예컨대, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", second edition (Sambrook *et al.*, 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (M. J. Gait, ed., 1984); "Animal Cell Culture" (R. I. Freshney, ed., 1987); "Methods in Enzymology" (Academic Press, Inc.); "Handbook of Experimental Immunology" (D. M. Weir & C. C. Blackwell, eds.); "Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells" (J. M. Miller & M. P. Calos, eds., 1987); "Current Protocols in Molecular Biology" (F. M. Ausubel *et al.*, eds., 1987); "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis *et al.*, eds., 1994); and "Current Protocols in Immunology" (J. E. Coligan *et al.*, eds., 1991)와 같은 문헌에 상세히 설명되어 있고, 이들 각각은 본원에 참고로서 명시적으로 포함된다.
- [0059] 본 발명의 여러 측면이 설명을 위한 예시적인 응용을 참고하여 아래에서 설명된다. 다수의 특정 세부사항, 관계 및 방법이 본 발명의 완전한 이해를 제공하기 위해 개시되는 것으로 이해되어야 한다. 그러나, 관련 분야의 당업자는 본 발명이 하나 이상의 특정한 세부 사항 없이 또는 다른 방법으로 실시될 수 있다는 것을 쉽게 인식할 수 있다. 본 발명은 몇몇 행위가 상이한 순서로 및/또는 다른 행위 또는 사건과 동시에 발생할 수 있으므로, 행위 또는 사건의 설명된 순서에 의해 제한되지 않는다. 또한, 본 발명에 따른 방법을 구현하기 위해 모든 설명된 행위 또는 사건이 요구되는 것은 아니다.
- [0060] 달리 지시되지 않는 한, 본원에서 사용되는 모든 용어는 당업자가 이해하는 것과 동일한 의미를 가지며, 본 발명의 실시는 미생물학 및 재조합 DNA 기술의 통상적인 기술을 사용할 것이며, 이들은 당업자의 지식 범위 내에 있다.
- [0061] 특정 구현예에서, 본 발명은 세포에서 유전자의 발현을 위한 폴리뉴클레오티드, 폴리뉴클레오티드 카세트 및 발현 벡터를 개시한다. 또한, 예를 들어, 개체에서, 예를 들어, 장애의 치료 또는 예방을 위해 세포에서 유전자의 발현을 촉진시키는데 임의의 조성물을 사용하기 위한 약제학적 조성물 및 방법이 제공된다. 본 발명의 이들 및 다른 목적, 이점 및 특징은 하기에서 보다 상세히 기술되는 조성물 및 방법의 세부사항을 이해함으로써 당업자에게 명백해질 것이다.
- [0062] 특정 구현예에서, 방법 및 조성물은, 예를 들어, 동물 및 특히 인간에서 질병, 장애, 기능장애의 집중되고 표적화 된 유전자 치료에 유용한 약제의 제조에 사용하기 위해 이 유전적 발현 카세트들을 포함하는 유전자 치료 벡터 조성물, 예컨대 바이러스 벡터의 제조를 위해 제공된다.
- [0063] 일부의 구현예에서, 본 발명은 *FANCA* cDNA의 발현을 일으키는 hPGK 전핵 프로모터를 포함하는 LV 벡터에 기반한 판코니 빈혈에 대한 유전자 치료를 제공한다. 이 치료용 벡터는 인간 조혈 줄기세포(HSCs)를 형질도입하는데 사용될 수 있으며, 이 인간 조혈 줄기세포는 판코니 빈혈을 갖는 인간에게 추후 이식될 수 있다.
- [0064] 특정 구현예에서, 본 발명은 판코니 빈혈의 유전적 교정을 위한 FNACA LV 벡터를 제공한다. 종합적으로, 결과는 임상적 응용을 위해 고안된 LV를 이용한 FA에 대한 유전자 치료의 실행가능성을 제시한다.
- [0065] 개시된 조성물은 다양한 인간 질병의 예방 및 치료를 포함하는, 다양한 조사, 진단 및 치료 요법에서 이용될 수 있다. 본 발명의 다양한 조성물 및 방법을 하기에 기술한다.
- [0066] 특정 조성물 및 방법이 본원에 예시되지만, 다수의 대안적인 임의의 조성물 및 방법이 본 발명을 실시하는데 사용하기에 적용가능하고 적절한 것으로 이해된다. 또한, 본 발명의 발현 컨스트럭트 및 방법의 평가는 당업계의 표준 절차를 사용하여 수행할 수 있음을 이해할 것이다.
- [0067] **판코니 빈혈**
- [0068] 판코니 빈혈(Fanconi anemia: FA)은 주로 골수 부전(BMF) 및 암 소인을 특징으로 하는 희귀한 유전되는 염색체

불안정성 증후군이다(Butturini A *et al.* Blood. 1994; 84: 1650-1655; Kutler DI *et al.* Blood. 2003; 101: 1249-1256.). FA의 유병율은 백만명 당 1-5명이며, 이형접합체 운반 빈도는 300분의 1로 추정된다(Tamary H *et al.* Eur J Haematol. 2004; 72: 330-335).

[0069] FA는 유전적 및 표현형적으로 둘 다 이종이다. 지금까지, 상응하는 13개의 판코니 빈혈 보체군 유전자(Fanconia Anemia Complementation group (FANC) genes)에서의 돌연변이와 연관된 13개의 보체군이 보고되었다(FA-A, B, C, D1, D2, E, F, G, I, J, L, M 및 N): *FANCA*, *FANCB*, *FANCC*, *FANCD1/BRCA2*, *FANCD2*, *FANCE*, *FANCF*, *FANCG/XRCC9*, *FANCI*, *BRIP1/FANCI*, *FANCL*, *FANCM/Hef* 및 *FANCN/PALB2*(Wang W. Nat Rev Genet. 2007; 8: 735-748). FA-B 환자의 경우(*FANCB*가 X 염색체 상에 존재함),를 제외하고 FA는 상염색체 열성이다.

[0070] FA 유전자에 의해 암호화되는 단백질은 FA/BRCA 경로로서 알려진 생화학적 경로에 참여한다(Wang N. Rev Genet. 2007; 8: 735-748 참조). 13 개의 FA 단백질이 FA 경로에서 동정되었으며, 이들 각각은 지금까지 이 경로에서 특정된 3개의 FA 단백질 복합체 중 하나에 참여한다. 상류 복합체인, FA 코어 복합체는 8개의 FA 단백질(*FANCA*, *FANCB*, *FANCC*, *FANCE*, *FANCF*, *FANCG*, *FANCL*, *FANCM*)과 2개의 FA 관련 단백질(*FAAP24* 및 *FAAP100*)에 의해 통합된다. 두 번째 복합체는 FA-ID 복합체에서 함께 작동하는, *FANCD2* 및 *FANCI*에 의해 형성된다. FA 코어 복합체의 E3 리가아제 활성(*FANCL*)으로 인해, *FANCD2*와 *FANCI*는 모노-유비퀴틴화(mono-ubiquitinated)된 후 염색질 상에 로딩되어 DNA 손상 또는 복제 중단에 대한 반응으로 큰 핵 병소를 형성할 수 있다. 마지막으로, 모노-유비퀴틴화된 *FANCD2/FANCI*는 *FANCI/BRIP1*, *FANCN/PALB2* 및 *FANCD1/BRCA2*와 같은 하류 FA 단백질과 상호작용하며, 이는 *BRCA1* 및 *RAD51*과 같은 상동성 지시 복구(homology directed repair, HDR)에 참여하는 단백질과 안정한 복합체를 형성한다.

[0071] FA-A는 FA 보체군에 상응하는 FA 환자의 약 50% 내지 80%를 갖는 가장 빈번한 FA 보체군이다(Casado JA *et al.*, J Med Genet., 2007; 44: 241-249; Levitus M *et al.* Blood, 2004, 103: 2498-2503, Taniguchi T, D' andrea AD. Blood, 2006, 107: 4223-4233). *FANCA*의 결핍된 또는 무(null) 발현의 결과로, FA 코어 복합체는 형성될 수 없다. 이는 ID 복합체의 활성화를 방해하고, 따라서 이들 단백질이 염색질로 이동하여, 결과적으로 FA 세포의 특징적인 표현형을 초래한다.

[0072] D' Andrea 등에 의해 검토된 바와 같이(Blood, 1997, 90: 1725-1736), FA 세포는 주로 세포 생존, DNA 복구 및 게놈 안정성의 결함과 관련된 상이한 세포 표현형을 특징으로 한다.

[0073] FA는 주로 선천성 기형, 골수 부전의 발병 및 급성 골수성 백혈병 및 특정 고형 종양 발병의 높은 위험성을 특징으로 한다. 평균적으로 FA 환자의 70 %는 선천적 결함이 있다. 골격 이상(방사선, 엉덩이, 척추 측만증, 늑골) 및 정상적인 피부 과색소침착, 카페오레 반점은 FA 환자의 60-70%에서 나타난다. 대부분의 환자는 작은 신장을 가지고, 약 1/3이 소안구증(microphtalmia)과 신장 이상을 앓고 있다. FA 환자의 약 30%에서 아무런 명백한 선천성 이상도 관찰되지 않았다(Tischkowitz M, Dokal I. Br J Haematol., 2004; 126:176-191).

[0074] FA 환자의 가장 중요한 임상 특징은 혈액학적이다. 골수 부전(BMF)은 이 질병의 주요 특징이다. 일반적으로 5-10세 사이에 나타난다. 15세의 환자 중 80%는 BMF가 발병하며 40세가 되면 BMF의 통계적 위험이 90%를 넘는다(Butturini *et al.*, 1994, Kutler *et al.*, 2003). 혈소판감소증이나 백혈구감소증이 전형적으로 빈혈에 선행한다. 범혈구감소증은 일반적으로 시간이 지남에 따라 악화된다. 호중구감소증은 감염 위험 증가와 관련이 있다.

[0075] FA 환자는 또한 암, 주로 급성 골수성 백혈병(AML) 및 골수이형성 증후군(MDS)이 발병하는 경향이 있다. FA와 관련된 종양의 대부분은 13세 이후에 발생하며 평균 연령은 23세이다. AML의 상대 위험도는 785배 증가하는데, AML이 발병한 FA 환자의 중간 연령은 14세이며, 40세까지 혈액학적 악성 종양의 누적 발생률은 30-55%이다(Kutler *et al.*, 2003; Rosenberg PS *et al.* Blood, 2003; 101: 822-826). 또한 나이가 많은 FA 환자일수록 또한 고형 종양, 주로 편평상피세포암(SCC)이 발병할 위험이 높다. 이들 환자에서 고형 종양이 발병하는 중간 연령은 26세이며, 40세까지 고형 종양의 누적 발생률은 30%이다(Kutler *et al.*, 2003, Rosenberg *et al.*, 2003).

[0076] FA의 복잡한 임상 양상으로 인해, 이들 환자의 관리는 주로 골수 부전(BMF), 골수성 백혈병 및 고형 종양의 증상을 감소시키는데 초점을 둔다. FA 환자에 대한 현재 치료법의 각각의 한계점은 희귀 질환에 대한 CIEMAT/CIBER(Bueren, J. (2010). Center for Biomedical Network Research on Rare Diseases Ref EU/3/10/822)에 의해 후원되는, *FANCA* 유전자를 운반하는 렌티바이러스 벡터에 대한 희귀 의약품 문서에 보고되어 있다.

[0077] 특정 구현예에서, 방법 및 조성물은, 예를 들어, 동물 및 특히 인간에서 질병, 장애, 기능장애의 집중되고 표적화된 유전자 치료에 유용한 약제의 제조에 사용하기 위해 이 유전적 발현 카세트들을 포함하는 유전자 치료 벡

터 조성물, 예컨대 바이러스 벡터의 제조를 위해 제공된다.

- [0078] 일부의 구현예에서, 본 발명은 *FANCA* cDNA의 발현을 일으키는 hPGK 진핵 프로모터를 포함하는 LV 벡터에 기반한 판코니 빈혈 유전자 치료를 제공한다. 이 치료용 벡터는 인간 조혈 줄기세포(HSCs)를 형질도입하는데 쓰일 수 있으며, 이 인간 조혈 줄기세포는 판코니 빈혈을 갖는 인간에게 추후 이식될 수 있다.
- [0079] 특정 구현예에서, 본 발명은 판코니 빈혈의 유전적 교정을 위한 FNACA LV 벡터를 제공한다. 종합적으로, 결과는 임상적 응용을 위해 고안된 LV를 이용한 FA에 대한 유전자 치료의 실행가능성을 제시한다.
- [0080] 본원은 유전자 발현 카세트 (예를 들어, 치료용 카세트), 유전자 발현 카세트를 포함하는 유전자 전달 카세트 (예를 들어, 통합 카세트), 유전자 전달 카세트를 포함하는 플라스미드, 및 유전자 전달 카세트를 포함하는 유전자 전달 벡터를 포함한다. 유전자 발현 카세트, 유전자 전달 카세트, 플라스미드 및 유전자 전달 벡터는 프로모터 서열에 작동가능하게 연결된 치료 유전자 산물을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함한다. 특정 구현예에서, 폴리뉴클레오티드 서열은 DNA 또는 RNA이다. 특정 구현예에서, 유전자 발현 카세트는 폴리뉴클레오티드이며, 유전자 전달 카세트는 폴리뉴클레오티드이고, 벡터는 바이러스, 예를 들어, 렌티바이러스이다.
- [0081] 특정 구현예에서, 치료 유전자 산물은 *FANCA* 단백질 또는 이의 기능적 단편 또는 변형체, 선택적으로 야생형 인간 *FANCA* 단백질이다.
- [0082] 구체적 구현예에서, 유전자 발현 카세트는 프로모터 영역, 암호화 서열, 그리고 전사-후 조절 요소를 포함한다. 특정 구현예에서, 프로모터 영역은 프로모터 서열 또는 이의 기능적 단편을 포함한다. 하나의 구현예에서, 프로모터는 인간 PGK 프로모터이다. 일부의 구현예에서, 발현 카세트는 또한 RNA 배출 신호를 포함한다. RNA 배출 신호는 wPRE 서열을 포함할 수 있다. 일부의 구현예에서, 임의의 잔여 오픈 리딩 프레임이 결여된 돌연변이 wPRE 서열(Schambach, Bohne et al. 2006)가 치료 유전자의 발현 수준 및 안정성을 향상시키기 위하여 포함된다.
- [0083] 본 발명의 일부 구현예는 *FANCA* 유전자 산물의 향상된 발현을 위한 유전자 발현 카세트를 포함한다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드 카세트는 전사 시 mRNA 안정성을 증가시키기 위해 야생형 *FANCA* cDNA 암호화 서열, 또는 인간 *FANCA* cDNA의 코돈-최적화 버전을 포함한다. 최적화의 경우, 전사 침묵을 방지하기 위해 GeneArt® 소프트웨어를 사용하여 GC 함량을 높이고 숨겨진(cryptic) 스플라이스 부위를 제거할 수 있고, 따라서 전이유전자 발현을 증가시킬 수 있다. 대안적으로, 당업계에 공지된 임의의 최적화 방법이 사용될 수 있다.
- [0084] 본 발명의 일부 측면에서, 본 발명의 유전자 전달 벡터 및 억제학적 부형제를 포함하는 억제학적 조성물이 제공된다. 일부 구현예에서, 억제학적 조성물은 본 발명의 유전자 전달 벡터 및 억제학적 부형제를 포함한다.
- [0085] 본 발명의 일부 측면에서, 포유류 세포에서 전이유전자를 발현시키기 위한 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 하나 이상의 포유류 세포를 본 발명의 폴리뉴클레오티드 카세트 또는 본 발명의 유전자 전달 벡터의 유효량과 접촉시키는 것을 포함하며, 여기서 전이유전자는 하나 이상의 포유류 세포에서 검출가능한 수준으로 발현된다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 하나 이상의 포유류 세포를 본 발명의 폴리뉴클레오티드 카세트 또는 본 발명의 유전자 전달 벡터의 유효량과 접촉시키는 것을 포함하며, 여기서 전이유전자는 하나 이상의 포유류 세포에서 치료적 수준으로 발현된다. 일부 구현예에서, 이 방법은 시험관 내이다. 다른 구현예에서, 상기 방법은 생체 내이다.
- [0086] 본 발명의 일부 측면에서, 질병 또는 장애에 대한 치료 또는 예방을 필요로 하는 포유류에서 질병 또는 장애의 치료 또는 예방을 위한 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 포유류에게 본 발명의 억제학적 조성물의 유효량을 투여하는 것을 포함하며, 여기서 암호화 서열은 치료 유전자 산물을 암호화한다.
- [0087] **조성물**
- [0088] 본원의 일부 측면에서, 조성물은 진핵 세포에서 *FANCA* 전이유전자의 발현을 위하여 제공된다. 특정 구현예에서, 진핵 세포는 포유류 세포이다. 하나의 구현예에서, 포유류 세포는 조혈 줄기세포이다(HSC). 하나의 구현예에서, 포유류 세포는 조혈 전구세포이다. 하나의 구현예에서, 포유류 세포는 CD34+이다. 하나의 구현예에서, 포유류 세포는 인간 세포이다. 구체적 구현예에서, 상기 세포는 본원에 개시된 유전자 전달로 형질도입된 후 CD34 + 세포로 치료되는 FA로 진단된 대상으로부터 유래된 인간 CD34 + 세포이고, 개시된 유전자 발현 카세트를 포함한다.
- [0089] 하나의 특정 구현예에서, 본 발명은 치료용 *FANCA* 단백질 또는 이의 기능적 단편 또는 변형체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 발현 카세트를 포함하는 렌티바이러스 벡터를 포함한다. 본원에서 사용

된 바와 같이, 참고 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드의 기능적 변형체는 참고 서열과 비교하여 하나 이상의 아미노산 또는 핵산 결실, 첨가 또는 치환을 포함하며, 참고 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드의 기능적 활성을 적어도 50%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 99% 이상을 보유한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 기능적 단편은 참고 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드의 단편이며, 참고 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드의 기능적 활성의 50% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 또는 99% 이상을 보유한다.

[0090] 하나의 구현예에서, 렌티바이러스 벡터의 골격은 의약 산물인 "Wiscott Aldrich 증후군 단백질을 보유한 렌티바이러스 벡터(WASP-LV)" (Ref141/2000)에 상응하는 것과 동일하지만, FA 치료의 경우, 프로모터는 유전자 요법에서 이미 사용된 다른 프로모터와 비교하여 안정한 생체 내 활성 및 개선된 안전성 특성을 특징으로 한 인간 포스포글리세레이트 키나제(hPGK) 프로모터이다(Modlich U, Navarro S, Zychlinski D *et al.* Insertional Transformation of Hematopoietic Cells by Self-Inactivating Lentiviral And Gammaretroviral Vectors. Mol Ther. 2009; 17: 1919-1928; Montini E, Cesana D, Schmidt M *et al.* Hematopoietic Stem Cell Gene Transfer in a Tumor prone Mouse Model Uncovers Low Genotoxicity Of Lentiviral Vector Integration. Nat Biotechnol. 2006; 24:687-696.).

[0091] 본 개시의 일부 구현예에서, 조성물은 폴리뉴클레오티드 카세트를 포함한다. "폴리뉴클레오티드 카세트"는 전형적으로 서로에게 작동가능하게 연결된, 2개 이상의 기능적 폴리뉴클레오티드 서열, 예를 들어, 조절 요소, 번역 개시 서열, 암호화 서열, 종결 서열 등을 포함하는 폴리뉴클레오티드 서열을 의미한다. 마찬가지로, "포유류 세포에서 전이유전자의 발현을 위한 폴리뉴클레오티드 카세트"는 세포에서 전이유전자의 발현을 촉진하는, 2개 이상의 기능적 폴리뉴클레오티드 서열, 예를 들어, 프로모터, 인핸서, 5'UTR, 번역 개시 서열, 암호화 서열, 종결 서열 등의 조합을 의미한다. 유전자 발현 카세트 및 유전자 전달 카세트는 폴리뉴클레오티드 카세트의 예이다.

[0092] 일부의 구현예에서, 본 개시의 폴리뉴클레오티드 카세트는 포유류 세포에서 전이유전자의 향상된 발현을 제공한다. 본 발명의 실시예에 의해 입증된 바와 같이, 본 발명자들은 포유류 세포에서 전이유전자의 향상된 발현을 개별적 및 상승적으로 제공하는 다수의 폴리뉴클레오티드 요소, 즉 당업계에서 공지된 것들에 비해 개선된 요소를 발견하였다. 특정 구현예에서, 본 개시의 폴리뉴클레오티드 카세트 내의 2개 이상의 기능적 폴리뉴클레오티드 서열의 배열이 포유류 세포에서 전이유전자의 향상된 발현을 위해 제공한다. "향상된"은, 본 개시의 폴리뉴클레오티드 카세트를 운반하는 세포에서 전이유전자의 발현이, 예컨대 당업계에 공지된 바와 같이, 비교 가능한 조절 요소에 작동가능하게 연결된 전이유전자를 운반하는 세포에 비해 증가되고, 증강되거나 더 강하다는 것을 의미한다. 다시 말해, 본 개시의 폴리뉴클레오티드 카세트로부터의 전이유전자의 발현은 본 개시의 하나 이상의 최적화된 요소를 포함하지 않는 폴리뉴클레오티드 카세트, 예컨대, 참고 대조군으로부터의 발현과 비교하여 증가되고, 증강되거나 더 강해진다. 특정 구현예에서, 향상된 발현은 하나 이상의 원하는 세포 유형에 특이적이거나 이에 한정된다.

[0093] 예를 들어, 예컨대, 당업계에 공지된 것과 같은 상이한 프로모터에 작동가능하게 연결된 전이유전자를 운반하는 세포에서보다, 본원에 개시된 프로모터를 포함하는 폴리뉴클레오티드 카세트를 포함하는 세포에서 전이유전자의 발현이 향상되거나, 증강되고, 더 강할 수 있다. 또 다른 예로서, 상이한 인핸서에 작동가능하게 연결된 전이유전자를 운반하는 세포에서보다 본원에 개시된 인핸서 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 카세트를 포함하는 세포에서 전이유전자의 발현이 향상되거나, 또는 증가하고, 증강되거나 또는 더 강할 수 있다.

[0094] 이론에 의해 구속됨이 없이, 세포에서의 전이유전자의 발현 향상은 세포에서의 유전자 산물의 더 신속한 형성 또는 세포에서의 더 안정적인 유전자 산물에 기인하는 것으로 생각된다. 따라서, 본 개시 내용의 폴리뉴클레오티드 카세트에 의한 전이유전자의 향상된 발현은 다수의 방식으로 관찰될 수 있다. 예를 들어, 당업계에 공지된 것들과 같은 비교 가능한 조절 요소에 전이유전자가 작동가능하게 연결되었을 때 검출될 수 있는 발현보다 더 빨리, 예를 들어, 2일 빨리, 7일 빨리, 2주 빨리, 3주 빨리, 4주 빨리, 8주 빨리, 12주 이상 빨리, 폴리뉴클레오티드 카세트가 세포에 접촉한 후에 전이유전자의 발현을 검출함으로써 향상된 발현이 관찰될 수 있다. 향상된 발현은 또한 세포 당 유전자 산물의 양이 증가하는 것으로 관찰될 수 있다. 예를 들어, 포유류 세포 당 유전자 산물의 양에서, 2배 이상의 증가, 예를 들어, 3배 이상의 증가, 4배 이상의 증가, 5배 이상의 증가 또는 10배 이상의 증가가 있을 수 있다. 향상된 발현은 또한 폴리뉴클레오티드 카세트에 의해 운반된 전이유전자를 검출가능한 수준으로 발현하는 포유류 세포의 수의 증가로서 관찰될 수 있다. 예를 들어, 전이유전자를 검출가능한 수준으로 발현하는 포유류 세포의 수에서 2배 이상의 증가, 예를 들어, 3배 이상의 증가, 4배 이상의 증가, 5배 이상의 증가 또는 10배 이상의 증가가 있을 수 있다.

[0095] 또 다른 예로서, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 통상적인 폴리뉴클레오티드 카세트와 비교하여 보다 많은 비율

의 세포에서 전이유전자를 검출가능한 수준으로 촉진할 수 있는데; 예를 들어, 통상의 카세트가 특정 영역에서 예를 들어, 5% 미만의 세포에서 검출가능한 수준의 전이유전자 발현을 촉진시킬 수 있는 경우, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 그 영역에 있는 세포의 5% 이상에서 검출가능한 수준의 발현을 촉진하고; 예를 들어, 10% 이상, 15% 이상, 20% 이상, 25% 이상, 30% 이상, 35% 이상, 40% 이상 또는 45% 이상, 어떤 경우에는 50% 이상, 55% 이상; 60% 이상, 65% 이상, 70% 이상 또는 75% 이상, 예를 들어, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상 또는 95% 이상의 접촉된 세포가 검출가능한 수준의 유전자 산물을 발현할 것이다. 향상된 발현은 또한 세포의 생존능력 및/또는 기능의 변화로서 관찰될 수 있다.

[0096] 본 발명의 폴리뉴클레오티드 카세트는 전형적으로 프로모터 영역을 포함한다. 프로모터 영역이 진핵 세포에서 암호화 서열의 발현을 촉진하는 한, 임의의 적합한 프로모터 영역 또는 그 안의 프로모터 서열이 본 발명의 폴리뉴클레오티드 카세트에서 사용될 수 있다. 특정 구현예에서, 프로모터 영역은 포유류 세포에서 암호화 서열의 발현을 촉진한다. 일부 예에서, 프로모터는 편재성(ubiquitous) 프로모터이고, 즉 광범위한 범위의 세포, 조직 및 종에서 활성인 프로모터이다. 다른 경우, 프로모터는 인간 PGK 프로모터이다.

[0097] 프로모터 및 인핸서 요소는 조직 특이적 또는 단계-특이적일 수 있다. 예를 들어, 조직-특이적 프로모터 또는 인핸서는 하나 이상의 특정 세포 유형에서 발현 (또는 보다 높은 수준의 발현)을 우선적으로 유도한다. 세포 유형의 예로는 조혈 줄기세포, 장기 조혈 줄기세포, 단기 조혈 줄기세포, 다분화 전구 세포, 조혈 CD34+ 세포 및 CD34+ 집단 내 임의의 클러스터 분화 부분집단이 포함되나 이에 한정되지 않는다. 단계-특이적 프로모터 또는 인핸서는 세포주기 또는 발달의 하나 이상의 특정 단계 동안 발현(또는 보다 높은 발현 수준)을 우선적으로 유도한다. 이들은 베타-글로빈 유전자와 제어 영역, 스펙트린 프로모터 및 적혈구 특이적 프로모터를 포함하지만 이에 한정되지는 않는다.

[0098] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 하나 이상의 인핸서를 포함한다. 인핸서는 전사를 향상시키는 것으로 당 업계에 공지된 핵산 요소이며, 이들이 조절하는 유전자와 관련하여 어디에나, 예를 들어, 상류, 하류, 인트론 내, 등에 위치할 수 있다. 프로모터와의 조합으로 사용될 때 유전자의 발현을 향상시키는 한, 임의의 인핸서 요소가 본 발명의 폴리뉴클레오티드 카세트 및 유전자 치료 벡터에 사용될 수 있다.

[0099] 세포에서 발현되는 암호화 서열은 임의의 폴리뉴클레오티드 서열, 예를 들어, 유전자 혹은 유전자 산물을 암호화하는 cDNA, 예를 들어, 폴리펩티드 또는 RNA-기반 치료제(siRNA, 안티센스, 리보자임, shRNA 등)일 수 있다. 암호화 서열은 그에 작동가능하게 연결된 프로모터 서열과 이종일 수 있고, 즉, 자연적으로 작동가능하게 연관되지 않는다. 대안적으로, 암호화 서열은 그에 작동가능하게 연결된 프로모터 서열에 내인성일 수 있으며, 즉 그 프로모터와 자연적으로 연관된다. 유전자 산물은 포유류 세포에서 내재적으로 작용할 수 있거나, 또는 외인성으로 작용할 수 있으며, 예를 들어, 분비될 수 있다. 예를 들어, 전이유전자가 치료 유전자인 경우, 암호화 서열은 질병 또는 장애를 치료하기 위한 치료제로서 사용될 수 있는 원하는 유전자 산물 또는 이의 기능적 단편 또는 변형체를 암호화하는 임의의 유전자일 수 있다. 다양한 바람직한 구현예에서, 전이유전자는 인간 FANCA, 즉 서열번호: 25를 암호화한다.

[0100] 본 발명의 하나의 구현예에서, 전이유전자 암호화 서열은 드물게 나타나는 코돈을 보다 빈번하게 나타나는 코돈으로 대체함으로써 발현을 향상시키도록 변형되거나 "코돈 최적화"된다. 암호화 서열은 번역을 위한 아미노산을 암호화하는 mRNA 서열의 일부이다. 번역하는 동안, 61개의 트리뉴클레오티드 코돈 각각은 20개의 아미노산 중 하나로 번역되어 유전적 암호에서 축퇴 또는 중복을 일으킨다. 그러나 다른 세포 유형과 다른 동물 종은 서로 다른 빈도로 동일한 아미노산을 암호화하는 tRNA(각각은 안티코돈을 함유함)를 사용한다. 유전자 서열이 상응하는 tRNA에 의해 드물게 나타나는 코돈을 포함할 때, 리보솜 번역 기구는 느려질 수 있으며, 이는 효율적인 번역을 지연시킨다. 암호화 서열이 동일한 단백질 서열을 암호화하도록 변경되지만, 고도로 나타나고/나거나, 고도로 발현된 인간 단백질에 의해 이용되는 코돈을 이용하는 경우, 특정 종에 대한 "코돈 최적화"를 통해 발현이 개선될 수 있다(Cid-Arregui et al., 2003, J. Virol., 77: 4928). 본 발명의 하나의 측면에서, 전이유전자의 암호화 서열은 포유류 또는 영장류에서 드물게 발현되는 코돈을 영장류에서 빈번하게 발현되는 코돈으로 대체하도록 변형된다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 전이유전자에 의해 암호화된 암호화 서열은 상기 또는 본원에 개시된 서열에 의해 암호화되는 폴리펩티드와 적어도 85%의 서열 동일성, 예를 들어, 적어도 90%의 서열 동일성, 예를 들어, 적어도 95%의 서열 동일성, 적어도 98%의 동일성, 적어도 99%의 동일성을 갖는 폴리펩티드를 암호화한다. 상기 암호화 서열의 적어도 하나의 코돈은 상기 또는 본원에 개시된 서열의 상응하는 코돈보다 인간에서 더 높은 tRNA 빈도를 갖는다.

[0101] 본 발명의 추가의 구현예에서, 전이유전자 암호화 서열은 목적하는 전이유전자를 암호화하지 않는 오픈 리딩 프

레임(ORF)의 종결 또는 제거에 의해 발현을 향상시키도록 변형된다. 오픈 리딩 프레임(ORF)은 개시 코돈의 다음에 오고 정지 코돈을 함유하지 않는 핵산 서열이다. ORF는 정방향 또는 역방향일 수 있으며 관심 유전자와 비교하여 "프레임 내(in frame)" 또는 "프레임 외(out frame)"일 수 있다. 이러한 오픈 리딩 프레임은 관심 유전자와 함께 발현 카세트에서 발현될 가능성을 가지며, 바람직하지 않은 역효과를 초래할 수 있다. 본 발명의 한 측면에서, 전이유전자의 암호화 서열은 코돈 사용법(codon usage)을 추가로 변경시킴으로써 오픈 리딩 프레임을 제거하도록 변형되었다. 이는 아미노산 서열을 보존하고 관심 유전자에서 고도로 이용된 코돈을 유지(즉, <20% 빈도의 코돈을 회피함) 하면서, 역방향 또는 프레임 외 ORF에서 개시 코돈(ATG)을 제거하고 정지 코돈(TAG, TAA 또는 TGA)을 도입함으로써 이루어졌다. 본 발명에서, 전이유전자 암호화 서열은 코돈 최적화 및 비-전이유전자 ORF의 제거 중 하나에 의해 또는 두 가지 기술 모두를 이용하여 최적화될 수 있다. 당업자에게 명백한 바와 같이, 코돈 최적화 동안 도입된 ORF를 제거하기 위해 코돈 최적화 후 비-전이유전자 ORF를 제거하거나 최소화하는 것이 바람직하다.

- [0102] 일부의 구현예에서, 폴리뉴클레오티드 카세트는 하기를 포함한다:
- [0103] (i) 포스포글리세레이트 키나제(PGK) 프로모터 서열 또는 이의 기능적 변형체 또는 단편;
- [0104] (ii) 인간 FANCA 단백질 또는 이의 기능적 단편 또는 변형체를 암호화하는 서열; 및
- [0105] (iii) 우드처크 간염 바이러스(WPRE) 서열의 전사 후 조절 요소.
- [0106] 일부의 구현예에서, 폴리뉴클레오티드 카세트는 하기를 포함한다:
- [0107] (i) 인간 포스포글리세레이트 키나제(PGK) 프로모터 서열;
- [0108] (ii) 인간 FANCA 단백질을 암호화하는 서열; 및
- [0109] (iii) 돌연변이 WPRE 서열.
- [0110] 일부의 구현예에서, 폴리뉴클레오티드 카세트는 하기를 포함한다:
- [0111] a) 5' LTR, 선택적으로 변형된 5' LTR;
- [0112] b) cPPT 서열;
- [0113] c) PGK 프로모터 서열, 선택적으로 인간 PGK 프로모터 서열;
- [0114] d) 인간 FANCA 단백질을 암호화하는 서열, 선택적으로 cDNA 서열 또는 코돈 최적화된 서열;
- [0115] e) 돌연변이 wPRE 서열; 및
- [0116] f) 3' LTR, 선택적으로 변형된 3' LTR.
- [0117] 하나의 구현예에서, 변형된 WPRE는 WPRE*로 언급된다. WPRE*은 오픈 리딩 프레임이 결여된 변형된 WPRE이다(예를 들어, Schambach et al, 2006 Gene Ther. 13: 641-645 참고).
- [0118] 특정 구현예에서, 유전자 전달 카세트는 하나 이상의 추가적인 요소, 예를 들어, 다음으로부터 선택된 하나 이상의 요소를 포함한다: 5' LTR, 3' LTR, cPPT, CTS, RRE, 인핸서 서열, 및 패키징 서열.
- [0119] RRE 서열은 유전자 전달의 효율을 증가시킨다. 본원에 기술된 임의의 발현 카세트 및 유전자 전달 벡터의 구체적 구현예에서, RRE 서열은 하기 서열 중 임의의 서열, 또는 하기 서열의 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95% 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하거나 이로 이루어진다:
- [0120] (AGGAGCTTTGTTTCCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCGCAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGCAGCAGCAGACAATTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTGCACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAATCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGTCCT (서열번호: 1); 또는
- [0121] 서열번호: 24의 뉴클레오티드 2649-2882를 포함하거나 또는 이로 이루어진 서열.
- [0122] 레트로바이러스 리더 영역은 레트로바이러스 게놈을 바이러스 캡시드 내로 패키징하는데 관여하는 패키징 신호(Ψ)를 포함한다. LV 벡터는 이 영역에서 약 300 bp의 Gag 유전자를 필요로 하는 것으로 생각되었다. 현재 이 Gag 서열은 단지 40 bp로 감소되었다(도 65). 본원에 기술된 임의의 발현 카세트 및 유전자 전달 벡터의 구체적 구현예에서, Ψ 서열은 HIV-1 Ψ 서열이거나 Ψ 서열은 다음 서열 중 임의의 서열, 또는 다음 서열의 80% 이상, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99 %의 동일성을 갖는 서열을 포함하거나 이로

이루어진다:

- [0123] CTCTCTCGACGCAGGACTCGGCTTGCTGAAGCGCGCACGGCAAGAGGCGAGGGGCGGCGACTGGTGAGTACGCCAAAAATTTTACTAGCGGAGGCTAGAAG GAGAGAGATGGGTGCGAGAGCGTC (서열번호: 2); 또는
- [0124] 서열번호: 24의 2031-2156 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하거나 이로 이루어진 서열.
- [0125] 본원에 기술된 임의의 발현 카세트 및 유전자 전달 벡터의 구체적 구현예에서, 절두된 HIV-1 5' LTR은 하기 서열 중 임의의 서열, 또는 하기 서열의 적어도 80%, 적어도 85% 이상, 적어도 90% 이상, 적어도 95% 이상, 적어도 98 %, 또는 적어도 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하거나 이로 이루어진다:
- [0126] GGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTTCAAGTA GTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGAAAAATCTCTAGCA (서열번호: 3); 또는
- [0127] 서열번호: 24의 1586-9495 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하거나 이로 이루어진 서열.
- [0128] 본원에 기술된 임의의 발현 카세트 및 유전자 전달 벡터의 구체적 구현예에서, HIV-1 자가-불활성화 3' LTR 서열은 하기 서열 중 임의의 서열, 또는 하기 서열의 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하거나 이로 이루어진다:
- [0129] TGAAGGGCTAATCACTCCCAACGAAGACAAGATCTGCTTTTTGCTTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAAC TAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGAC CCTTTAGTCAGTGTGAAAAATCTCTAGCA (서열번호: 4); 또는
- [0130] 서열번호: 24의 9262-9495 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하거나 이로 이루어진 서열.
- [0131] 본원에 기술된 임의의 발현 카세트 및 유전자 전달 벡터의 구체적 구현예에서, 인간 사이토메갈로바이러스(CMV) 직전 초기 프로모터는 하기 서열 중 임의의 서열, 이들의 기능적 단편, 또는 하기 서열의 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99 %의 동일성을 갖는 서열을 포함하거나 이로 이루어진다:
- [0132] GTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTACTCACGGGGATTTCAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGG CACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCCATTGACGCAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCT (서열번호: 5); 또는
- [0133] 서열번호: 24의 1586-1789 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하거나 이로 이루어진 서열.
- [0134] 역전사 효소의 분리에 관여하는 CTS와 함께 사전-통합(pre-integration) 복합체의 핵 전좌를 촉진시키는, cPPT는 바이러스 역가를 개선시키는 것으로 밝혀졌다(Zennou, et al. 2000; Follenzi et al. 2000). 본원에 기술된 임의의 발현 카세트 및 유전자 전달 벡터의 구체적 구현예에서, HIV-1의 중앙 폴리퓨린 트랙 및 중앙 종결 서열(cPPT/CTS)은 하기 서열 중 임의의 서열, 이들의 기능적 단편, 또는 하기 서열의 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99 %의 동일성을 갖는 서열을 포함하거나 이로 이루어진다:
- [0135] TTTTAAAGAAAAGGGGGATTGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACAACTAAAGAATTACAAAAACAATTAC AAAAAATCAAAATTTT (서열번호: 6);
- [0136] TTTAAAGAAAAGGGGGATTGGGGGT (서열번호: 12); 또는
- [0137] 서열번호: 24의 3378-3495 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하거나 이로 이루어진 서열.
- [0138] 본원에 기술된 임의의 발현 카세트 및 유전자 전달 벡터의 구체적 구현예에서, 인간 포스포글리세레이트 키나제 1(PGK) 프로모터는 하기 서열 중 임의의 서열, 이들의 기능적 단편, 또는 하기 서열의 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하거나 이로 이루어진다:
- [0139] GGGGTGGGGTTGCGCCTTTTCCAAGGCAGCCCTGGGTTTGCAGGGACGCGGCTGCTCTGGGCGTGGTTCCGGGAAACGCAGCGGCGCCGACCTGGGTC TCGCACATTCTTACGTCGCTTCGACAGCGTACCCGGATCTTCGCCGTACCTTGTGGGCCCCCGGCGACGCTTCTGCTCCGCCCTAAGTCGGAAGG TTCCTTGGGTTTCGCGCGTGCAGGACGTGACAAACGGAAGCCGCACGTCTCACTAGTACCCTCGCAGACGACAGCGCCAGGGAGCAATGGCAGCGCGCG ACCGCGATGGGCTGTGGCAATAGCGGCTGCTCAGCAGGCGCGCCAGAGCAGCGCGCGGAAGGGCGGTGCGGGAGGCGGGGTGTGGGCGGTAGTGTG GGCCCTGTTCTGCCCGCGCGGTGTTCGCATTCTGCAAGCCTCCGAGCGCACGTGCGCAGTCCCTCGTTGACCGAATCACCGACCTCTCTCCCA G (서열번호: 7); 또는

- [0140] 서열번호: 24의 3541-4051 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하거나 이로 이루어진 서열.
- [0141] 대부분의 FA 환자는 FA-A 보체군에 속하기 때문에(Casado et al., 2007, Levitus et al., 2004, Taniguchi et al., 2006), 구체적인 구현예에서, 암호화 된 치료 유전자 산물은 FANCA를 포함하지만, 본 발명은 다른 보체군의 FA 단백질이 또한 전달될 수 있고, 따라서, 예를 들어, FANCA 대신에 본원에 개시된 발현 카세트에서 암호화될 수 있음을 고려한다.
- [0142] 본원에 기술된 임의의 발현 카세트 및 유전자 전달 벡터의 구체적인 구현예에서, FANCA를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열은 하기 서열 중 임의의 서열, 이들의 기능적 단편, 또는 하기 서열의 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하거나 이로 이루어지는 인간 *FANCA* cDNA 서열이다:
- [0143] ATGTCCGACTCGTGGGTCCCGAACTCCGCCTCGGGCCAGGACCCAGGGGGCCCGGAGGGCCTGGGCCGAGCTGCTGGCGGAAGGGTCAAGAGGGAAAAA
TATAATCCTGAAAGGGCACAGAAATTAAGGAATCAGCTGTGCGCTCTCTGCGAAGCCATCAGGACCTGAATGCCCTTTTGTCTGAGGTAGAAGGTCCACTG
TGTAATAAATTTGTCTCTCAGCAAAGTGATTGACTGTGACAGTTCTGAGGCCATATGCTAATCATTCTAGTTCATTTATAGGCTCTGCTTTCAGGATCAAGCC
TCAAGGCTGGGGGTTCCTGTTTCTCTCAGCCGGGATGGTTGCCTCTAGCGTGGGACAGATCTGCACGGCTCCAGCGGAGACCAGTACCCTGTGTCTG
CTGACTGTGGAGCAGAGAAAGAAGCTGTCTCCCTGTTAGAGTTTGCTCAGTATTTATTGGCACACAGTATGTTCTCCCGTCTTCTCTGTCAAGAATTA
TGGAATAACAGAGTTCTTTGTGTCTGAAGCGGTGTGGCATCTTCACGTACAAGGCATTGTGAGCCTGCAAGAGCTGCTGGAAGCCATCCCGACATGCAT
GCTGTGGGATCGTGGCTCTTCAGGAATCTGTGTGCCTTTGTGAACAGATGGAAGCATCCTGCCAGCATGCTGACGTCGCCAGGGCCATGCTTTCTGATTTT
GTTCAATGTTTGTGTTGAGGGGATTTCAAGAACTCAGATCTGAGAAGAACTGTGGAGCCTGAAAAATGCCGAGGTACGGTTGATGTAAGTGCAGAGA
ATGCTGATTTTGCACCTTGACGCTTTGGCTGCTGGAGTACAGGAGGAGTCTCCACTCACAAGATCGTGAGGTGCTGGTTCCGAGTGTTCAGTGGACACAG
CTTGGCAGTGAATTTCCACAGATCCTCTGAAGAGGTTCTTCAGTCATACCTGACTCAGATACTCACTCACAGCCCTGTGCTGAAAGCATCTGATGTCTGT
CAGATGCAGAGAGTGGAGCTTTGCGCGGACACACCTCTGCTCACCTCACTGTACCGCAGGCTCTTTGTGATGTGAGTGCAGAGGAGTTGGTTGGCCAT
TTGCAAGAAGTTCTGAAACGCAGGAGGTTCACTGGCAGAGAGTGTCTCCTTTGTGTCTGCCCTGGTTGTCTGCTTTCCAGAAGCGCAGCAGCTGCTTGAA
GACTGGGTGGCGCGTTTGTATGGCCAGGCATTCAGAGCTGCCAGCTGGACAGCATGGTCACTGCGTTCTGGTTGTGCGCCAGGCAGCACTGGAGGGCCCC
TCTGCGTTCTCTGTCATATGCAGACTGGTTCAAGGCTCCTTTGGGAGCACACAGGCTACCATGGCTGCAGCAAGAAGGCCCTGGTCTTCTGTTTACGTTT
TTGTCAAGAACTCGTGCTTTTGAAGTCTCCCCGTACCTGCAAGTGCACATTTCCACCCACCCCTGGTTCACAGCAAGTACCGCTCCCTCTCACAGACTAC
ATCTCATTGGCCAAGACACGGCTGGCCGACCTCAAGGTTTCTATAGAAAACATGGGACTCTACGAGGATTGTATCAGCTGGGGACATTACTGAGCCCCAC
AGCCAAGCTCTTCAGGATGTTGAAAAGGCCATCATGGTGTGTTGAGCATACGGGAACATCCAGTCACCGTCATGGAGGCCAGCATATTCAGGAGGCCCTTAC
TACGTGTCCCACTTCTCCCCCGCTGCTCACACCTCGAGTGTCCCCAAAGTCCCTGACTCCCGTGTGGCGTTATAGAGTCTCTGAAGAGAGCAGATAAA
ATCCCCCATCTCTGTACTCCACCTACTGCCAGGCTGCTCTGTGCTGAAGAGAAGCCAGAAGATGCAGCCCTGGGAGTGAGGGCAGAACCCTCTGCT
GAGGAGCCCCCTGGACAGCTCACAGCTGCACTGGGAGAGCTGAGAGCCTCCATGACAGACCCAGCCAGCGTGATGTTATATCGGCACAGGTGGCAGTGATT
TCTGAAAGACTGAGGGCTGTCTGGGCCACAATGAGGATGACAGCAGCGTTGAGATATCAAGATTTCAGCTCAGCATCAACACGCCGAGACTGGAGCCACGG
GAACACATTGCTGTGGACCTCTGCTGACGCTTTCTGTGCAAGCTGATGGCTGCCTCCAGTGTGCTCCCCCGAGAGGCGAGGTCCTGGGCTGCCCTC
TTCGTGAGGACCATGTGTGGACGTGTCTCCCTGCAGTGTCTACCGGCTCTGCCAGCTGTCCGTCACCGAGGCCGAGCCTGAGTGCCCCACATGTGTCTG
GGGTTGGCTGCCCTGGCCGTGCACCTGGGTGAGTCCAGGCTGCGCTCCAGAGGTGGATGTGGTCTCTCTGCACCTGGTGTGGCTTCTGTCCCTGCG
CTCTTTGACAGCCTCTGACCTGTAGGACGAGGGATTCTTGTCTTCTGCTGAAATTTGTACAGCAGCAATTTCTTACTCTCTGTCAAGTTTCTTCC
CAGTCACGAGATACTTTGTGCACTGTTATCTCCAGGCCTTATTAAGTTTTCAGTTCCTCATGTTTCAGATTGTTCTCAGAGGCCGACAGCCTCTTCT
GAGGAGGACGTAGCCAGCCTTCTCTGGAGACCTTGCACCTTCTTCTGCACTGGCAGAGAGTGCCCTCTCTCTGACACACAGAACCTTCCGAGAG
GTGTTGAAAGAGGAAGATGTTCACTTAACCTACCAAGACTGTTACACCTGGAGCTGGAATTAACCTGAAGCTGATGCTCTTTCAGATACTGAACGGCAG
GACTTCCACCACTGGGCGATCCATGACACTTTCTCCCTGAGTCTCGGCTTCAGGGGGCTGTGACGGAGACCTGCAGGCTGCGTGTACCATTTCTGTCAAC
GCACTGATGGATTTCCACCAAGCTCAAGGAGTTATGACCACTCAGAAAATCTGATTTGGTCTTTGGTGGCCGCACAGGAAATGAGGATATTATTCCAGA
TTGCAGGAGATGGTAGCTGACCTGGAGCTGCAGCAAGACCTCATAGTGCTCTCGGCCACACCCCTTCCAGGAGCACTTCTCTTTGAGATTTTCCGCAGA
CGGCTCCAGGCTCTGACAAGCGGGTGGAGCGTGGCTGCCAGCCTTCAGAGACAGAGGGAGCTGCTAATGTACAAACGGATCCTCTCCGCTGCTTCTGTCT
GTCCTCTGCGGCAGCAGCTTCCAGGCAGAACAGCCATCACTGCCAGATGCGAGCAGTCTTCCACTTGGTCAACTCTGAGATGAGAACTTCTGTCCCAC
GGAGGTGCCCTGACACAGACATCACTGCCACTTCTTCAGGGGCTCTGAAACGCTGTCTGCGGAGCAGAGACCCCTCCCTGATGGTGCAGTTCATACTG
GCCAAGTGCCAGACGAAATGCCCTTAATTTGACCTCTGCTCTGGTGTGGTGGCCGAGCCTGGAGCCTGTGCTGCTCTGCCGGTGGAGGAGACTGCCAG
AGCCCCGTGCCCCGGAACTGCAGAAGCTACAAGAAGGCCGGCAGTTTGCCAGCGATTCTCTCTCCCTGAGGCTGCTTCCAGCACCCAAACCCGGACTGG
CTCTCAGTGTCTGCACTGCACTTTGCGATTCAACAAGTCAAGGAAGAAAACATCAGGAAGCAGCTAAAGAAGCTGGACTGCGAGAGAGAGGAGCTATTGGTT
TTCCTTTTCTTCTCTCCTTGATGGGCTGTGTGCTCACATCTGACCTCAAATAGCACACAGACCTGCCAAAGGCTTTCACGTTTGTGACGAATCCTC
GAGTGTTTAGAGAAGAGGAAGATATCTGGTGGCACTCTTTCAGTTGACAGAGAGTACCTCAGGCTGGGGCGGCTCTCTCCGTGTGGCCCCGGATCAG
CACACCAGGCTGTGCTTTCGCTTTTACAGTCTTCTCTCTCTTCCATGAAGACGCGGCCATCAGGAAGAGGCCTTCTGTCATGTTGCTGTGGACATG

TACTTGAAGCTGGTCCAGCTCTTCGTGGCTGGGGATACAAGCACAGTTTCACCTCCAGCTGGCAGGAGCCTGGAGCTCAAGGGTCAGGGCAACCCCGTGGAACTGATAACAAAAGCTCGTCTTTTCTGCTGCAGTTAATACCTCGGTGCCGAAAAAGAGCTTCTCACACGTGGCAGAGCTGCTGGCTGATCGTGGGGACTGCGACCCAGAGGTGAGCGCCGCCCTCCAGAGCAGACAGCAGGCTGCCCTGACGCTGACCTGTCCCAGGAGCCTCATCTCTTCTGA (서열번호: 8).

- [0144] 본 발명은 본원에 기술된 발현 카세트 또는 전달 카세트를 포함하는 플라스미드를 포함한다. 구체적인 구현예에서, 플라스미드는 pCCL-PGK-FANCA-WPRE*이다(도 41; 서열번호: 24).
- [0145] 특정 구현예에서, 본 발명은 본원에 기술된 플라스미드를 포함하는 세포, 예를 들어, 패키징 세포 또는 패키징 세포주, 예를 들어, 293 세포를 포함한다. 구체적인 구현예에서, 세포는 도 38-41에 묘사된 플라스미드를 포함한다.
- [0146] 특정 구현예에서, 본원에 개시된 전달 카세트 또는 플라스미드는 하나 이상의 추가적인 요소, 예를 들어, CMV 프로모터 및/또는 인핸서, SV40 polyA 서열, 복제 원점, 예를 들어, SV40 ori 서열, 또는 본원에 개시된 임의의 서열을 포함한다.
- [0147] 본원에 기술된 임의의 전달 카세트, 플라스미드 또는 벡터의 구체적인 구현예에서, 인간 CMV 인핸서는 하기 서열 중 임의의 서열, 이들의 기능적 단편, 또는 하기 서열의 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하거나 이로 이루어진다:
- [0148] GACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATG (서열번호: 9).
- [0149] 본원에 기술된 임의의 전달 카세트, 플라스미드 또는 벡터의 구체적인 구현예에서, 원숭이 바이러스 40(SV40) 폴리(A) 신호는 하기 서열 중 임의의 서열, 이들의 기능적 단편, 또는 하기 서열의 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99 %의 동일성을 갖는 서열을 포함하거나 이로 이루어진다:
- [0150] AACTTGTTTATTGACGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTA (서열번호: 10).
- [0151] 본원에 기술된 임의의 전달 카세트, 플라스미드 또는 벡터의 구체적인 구현예에서, SV40 복제 원점은 하기 서열 중 임의의 서열, 이들의 기능적 단편, 또는 하기 서열의 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하거나 이로 이루어진다:
- [0152] ATCCCGCCCTAACTCCGCCAGTTCGCCCATTTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTATGCAGAGGCCGAGGCCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGCTTTTTTGGAGGCC (서열번호: 11).
- [0153] 본원에 기술된 임의의 전달 카세트, 플라스미드 또는 벡터의 일부의 구현예에서, 본원에 개시된 임의의 발현 카세트 또는 유전자 전달 벡터에 존재하는 dNEF 신호는 하기 서열 중 임의의 서열, 이들의 기능적 단편, 또는 하기 서열의 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하거나 이로 이루어진다:
- [0154] GAATTCGAGCTCGGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAAGAAAAGGGGGGAC (서열번호: 13).
- [0155] 본원에 기술된 임의의 전달 카세트, 플라스미드 또는 벡터의 구체적인 구현예에서, 본원에 개시된 임의의 발현 카세트 또는 유전자 전달 벡터에 존재하는 KanR 서열은 하기 서열을 포함하거나 이로 이루어진다:
- [0156] ATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCGGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTCCGGCTGTACAGCGCAGGGCGTCCGGTTCTTTTGTCAAGACCGACCTGTCGGTGCCCTGAATGAAGTGAAGACGAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCGACGACGGCGTTCCTTGCGCGGCTGTGCTCGACGTGTCTACTGAAGCGGGAAGGACTGGTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGCGAGGATCTCTGTCTATCTACCTTGCTCTGCGGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCATTTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCAGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGGCCAGCCGAAGTGTTCGCCAGGCTCAAGCGGTCTATGCCGACGCGAGGATCTCGTCGTGACCCACGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTTCATCGACTGTGGCGCTCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCAATGGGCTGACCGCTTCCTTGCTTTACGGTATCGCCGCGCCGATTCGACGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTCTTCTGA (서열번호: 14)
- [0157] 본원에 기술된 임의의 전달 카세트, 플라스미드 또는 벡터의 일부의 구현예에서, 본원에 개시된 임의의 발현 카세트 또는 유전자 전달 벡터에 존재하는 rrnG종결자(*E. coli* 리보솜 RNA rrnG 오페론의 전사 종결자(Albrechtsen

et al., 1991) 는 하기 서열을 포함하거나 이로 이루어진다:

- [0158] GCATTGGCGCAGAAAAAATGCCTGATGCGACGCTGCGCGTCTTATACTCCACATATGCCAGATTCAGCAACGGATACGGCTTCCCCAACTTGCCCACTTC CATACGTGTCTCTTACCAGAAATTTATCCTTAA (서열번호: 15).
- [0159] 본원에 기술된 임의의 전달 카세트, 플라스미드 또는 벡터의 일부의 구현예에서, 본원에 개시된 임의의 발현 카세트 또는 유전자 전달 벡터에 존재하는 원점(고-카피-수의 ColE1/pMB1/pBR322/pUC 복제 원점)은 하기 서열 중 임의의 서열, 이들의 기능적 단편, 또는 하기 서열의 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하거나 이로 이루어진다:
- [0160] TTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTT TCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAACTACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACC GCCTAC ATACCTCGCTCTGCTAATCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCA GCGGTGCGGGTGAACGGGGGTTGCTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCAC GCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTATCTTTA TAGTCTGTGCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTGTGTATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGAAA (서열번호: 16).
- [0161] 본원에 기술된 임의의 전달 카세트, 플라스미드 또는 벡터의 일부의 구현예에서, 본원에 개시된 임의의 발현 카세트 또는 유전자 전달 벡터에 존재하는 CAP 결합 부위는 하기 서열 중 임의의 서열, 이들의 기능적 단편, 또는 하기 서열의 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하거나 이로 이루어진다:
- [0162] TAATGTGAGTTAGCTCACTCAT (서열번호: 17).
- [0163] 본원에 기술된 임의의 전달 카세트, 플라스미드 또는 벡터의 일부의 구현예에서, 본원에 개시된 임의의 발현 카세트 또는 유전자 전달 벡터에 존재하는 *E.coli lac* 프로모터는 하기 서열 중 임의의 서열, 이들의 기능적 단편, 또는 하기 서열의 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하거나 이로 이루어진다:
- [0164] TTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTG (서열번호: 18).
- [0165] 본원에 기술된 임의의 전달 카세트, 플라스미드 또는 벡터의 일부의 구현예에서, 본원에 개시된 임의의 발현 카세트 또는 유전자 전달 벡터에 존재하는 lac 작동자(operator)는 하기 서열 중 임의의 서열, 이들의 기능적 단편, 또는 하기 서열의 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하거나 이로 이루어진다:
- [0166] TTGTGAGCGGATAACAA (서열번호: 19).
- [0167] 본원에 기술된 임의의 전달 카세트, 플라스미드 또는 벡터의 일부의 구현예에서, 본원에 개시된 임의의 발현 카세트 또는 유전자 전달 벡터에 존재하는 T3 프로모터(박테리오파지 T3 RNA중합효소의 프로모터)는 하기 서열 중 임의의 서열, 이들의 기능적 단편, 또는 하기 서열의 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하거나 이로 이루어진다:
- [0168] AATTAACCTCACTAAAGG (서열번호: 20).
- [0169] 본원에 기술된 임의의 전달 카세트, 플라스미드 또는 벡터의 일부의 구현예에서, 본원에 개시된 임의의 발현 카세트 또는 유전자 전달 벡터에 존재하는 T7 프로모터(박테리오파지 T7 RNA중합효소의 프로모터)는 하기 서열 중 임의의 서열, 이들의 기능적 단편, 또는 하기 서열의 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하거나 이로 이루어진다:
- [0170] CCTATAGTGAGTCGTATTA (서열번호: 21).
- [0171] 본원에 기술된 임의의 전달 카세트, 플라스미드 또는 벡터의 일부의 구현예에서, 본원에 개시된 임의의 발현 카세트 또는 유전자 전달 벡터에 존재하는 f1 원점(박테리오파지 f1의 복제 원점)은 하기 서열 중 임의의 서열, 이들의 기능적 단편, 또는 하기 서열의 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하거나 이로 이루어진다:
- [0172] ACGCGCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGGGGGGTGTGGTGTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCGCTCCTTTTCGCTTTCT TCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTTCGCCGGCTTTCCCGCTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCA

AAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGAAGCTCT
TGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTATAAGGGATTTTGCCGATTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTT
AACAAAAATTTAACGCGAATT (서열번호: 22).

[0173] 본원에 논의된 바와 같이, 본 발명의 폴리뉴클레오티드 카세트는 RNA 배출 신호를 포함할 수 있다. 예시적인 RNA 배출 서열은 wPRE를 포함하지만 이에 한정되지 않는다. wPRE는 프로모터 및 벡터-비의존적 방식으로 전이유전자에서 RNA 안정성을 증가시킴으로써, 표적 세포에서 전이유전자 발현을 현저히 증가시킨다(Zuffrey et al, 1999). 그러나 이는 간암에 관여하는 WHV X 유전자에서 유래된 절두된 60-아미노산 단백질을 발현할 수 있다(Kingsman et al, 2005). 따라서 대부분의 전-임상 프로토콜 및 임상 시험에는 wPRE 요소의 돌연변이 버전이 포함된다(Zanta-Boussif et al, 2009). 다른 한편, SIN-LV 벡터에서 2개의 SV40-USE 요소의 사용은 전사 관독을 억제하는데 wPRE 서열보다 더 효율적인 것으로 나타났다(Schambach et al, 2007). 보다 정확하게는, 본원에 개시된 wPRE는 Axel Schambach에 의해 수행된 변형된 WPRE로부터의 589개 뉴클레오티드 (뉴클레오티드 1-589) (WO 2008136670 A2, [5]) 및 이전 wPRE로부터의 88개 (뉴클레오티드 590-677)를 운반하는 키메라 wPRE이다(Zuffrey et al, 1999). 본원에 개시된 데이터는 이 키메라 wPRE가 이전 wPRE보다 잘 작동함을 나타낸다. 키메라 wPRE 서열은 하기 서열, 이들의 기능적 단편, 또는 하기 서열의 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함한다:

[0174] CGAGCATCTTACCGCCATTTATCCCATATTTGTTCTGTTTTCTTGATTTGGGTATACATTTAAATGTTAATAAAACAAAATGGTGGGGCAATCATTACAT
TTTTAGGGATATGAATTACTAGTTCAGGTGATTGCCACAAGACAACATGTTAAGAAACTTTCCCGTTATTACGCTCTGTTCTGTTAATCAACCTCT
GGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGATATTCTTAACATATGTTGCTCCTTTACGCTGTGTGGATATGCTGCTTTAATGCCTCTGTATCATGCTATTGC
TTCCCGTACGGCTTTCGTTTTCTCTCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCCGTCACAGTGGCGTGGTGTGCTC
TGTGTTGCTGACGCAACCCCACTGGCTGGGGCATGCCACCACCTGTCAACTCCTTTCTGGGACTTTCGCTTTCCCTCCCGATGCCACGGCAGAACT
CATCGCCGCTGCCTTGGCCGCTGTGGACAGGGGCTAGGTTGCTGGGCACTGATAATCCGTGGTGTGTCGGGGAAGGGCTGTGCCGGCTCTGCGGCC
TCTTCGCGCTCTTCGCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCTCCCGCCTG (서열번호: 23).

[0175] 구체적 구현예에서, 돌연변이된 wPRE 서열은 서열번호: 24의 뉴클레오티드 8502-9178에 상응하거나 서열번호: 24의 이 영역과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99 %의 동일성을 갖는 WPRE*를 포함하거나 이로 이루어진다.

[0176] 본 명세서에 개시되거나 당업계에 공지된 바와 같은 요소들의 다른 조합은 당업자에 의해 용이하게 이해될 것이다.

[0177] 또한, 당업자에게 인식되는 바와 같이, 폴리뉴클레오티드 카세트는, 이로 제한되는 것은 아니지만, 클로닝을 용이하게 하기 위한 제한효소 부위 및 특정 유전자 발현 벡터에 대한 조절 요소를 포함하고, 다른 요소들을 선택적으로 포함할 수 있다.

[0178] 본 발명의 일부 측면에서, 본 폴리뉴클레오티드 카세트는, 예를 들어, 유전자가 세포 생존능력 및/또는 기능에 미치는 영향을 결정하고, 세포 장애를 치료하는 것 등을 위해, 세포에 유전자를 전달하는데 사용된다. 다양한 구현예에서, 형질도입에 의한 세포로의 바이러스 벡터의 전달은 생체 외, 생체 외 또는 시험관 내에서 발생할 수 있다. 따라서, 본 발명의 일부 측면에서, 포유류 세포에서 전이유전자의 발현을 제공하는 조성물은 유전자 전달 벡터이며, 상기 유전자 전달 벡터는 본 발명의 폴리뉴클레오티드 카세트, 예를 들어, 유전자 전달 카세트를 포함한다.

[0179] 포유류 세포에 폴리뉴클레오티드 서열을 전달하는 용도를 발견하는 임의의 편리한 유전자 전달 벡터가 본 발명의 유전자 전달 벡터에 의해 포함된다. 예를 들어, 벡터는 단일 또는 이중 가닥 핵산, 예를 들어, 단일 가닥 또는 이중 가닥 DNA를 포함할 수 있다. 예를 들어, 유전자 전달 벡터는 DNA, 예를 들어, 플라스미드, 미니서클 등과 같은 네이키드 DNA일 수 있다. 벡터는 변형된 형태의 RNA를 포함하는 단일-가닥 또는 이중-가닥 RNA를 포함할 수 있다. 다른 예에서, 유전자 전달 벡터는 RNA, 예를 들어, mRNA 또는 변형된 mRNA일 수 있다.

[0180] 또 다른 예로서, 유전자 전달 벡터는 바이러스로부터 유래된 바이러스 벡터, 예를 들어, 아데노바이러스, 아데노-관련 바이러스, 렌티바이러스(LV), 헤르페스 바이러스, 알파바이러스 또는 레트로바이러스, 예를 들어, Moloney 쥐 백혈병 바이러스(M-MuLV), Moloney 쥐 육종 바이러스(MoMSV), Harvey 쥐 육종 바이러스(HaMuSV), 쥐 유방 종양 바이러스(MuMTV), 긴팔 원숭이 백혈병 바이러스(GaLV), 고양이 백혈병 바이러스(FLV), Friend 쥐 백혈병 바이러스, 쥐 줄기 세포 바이러스(MSCV) 또는 악성 육종 바이러스(RSV)일 수 있다. LV의 사용을 포함하는 구현예가 하기에서 보다 상세하게 기술될 것이지만, 당업자는 당분야의 유사한 지식 및 기술이 비-LV 유전자

치료 벡터에도 전달 수 있음을 인식할 것이다.

- [0181] 일부 구현예에서, 유전자 전달 벡터는 자가-제한적 LV이다. 본원에 기술된 임의의 발현 카세트 및 유전자 전달 벡터의 특정 구현예에서, 전달 카세트는 하기 서열, 또는 서열번호: 24와 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하거나 이로 이루어진 본 발명의 pCCL-SIN-cPPT/CTS-hPGK-hFANCA-WPRE (도 41)이다. 서열번호: 24는 도 41의 pCCL-PGK-FANCA-WPRE* 플라스미드에 상응한다.
- [0182] 하나의 구현예에서, FANCA 유전자는 렌티바이러스 벡터(LV)를 통해 전달된다. 본원에 기술된 FANCA LV는 자가-불활성화 렌티바이러스 벡터(LV)를 이용한다. 하나의 구현예에서, FANCA LV는 인간 포스포글리세레이트(PGK) 유전자의 프로모터를 포함한다. 이 벡터의 안전성 특성은 강력한 바이러스 프로모터를 보유한 임상에서 이미 사용된 감마-레트로바이러스 벡터와 비교하여 현저하게 개선되었다.
- [0183] 특정 구현예에서, 렌티바이러스 벡터는 서열번호: 24에 개시된 서열을 포함하는, 도 1에 나타낸 유전자 전달 카세트를 포함하는 PGK-FANCA.WPRE*LV이다. PGK-FANCA-WPRE*LV 유전자 발현 카세트 부분은 인간 PGK 프로모터, FANCA cDNA 암호화 서열, 및 WPRE*를 포함하고; 서열번호: 24의 뉴클레오타이드 3541 내지 9178에 상응한다. PGK-FANCA-WPRE*LV 전달 카세트 부분은 도 41에 도시된 서열의 약 5' LTR (U5) 내지 약 3' LTR (U5)을 포함한다. 서열번호: 24에 관하여, 서열번호: 24의 뉴클레오타이드 1586-1789는 인간 CMV 즉시 초기 프로모터를 포함한다. 서열번호: 24의 뉴클레오타이드 2031-2156은 HIV1 psi 패키징 시그널을 포함한다. 서열번호: 24의 뉴클레오타이드 2649-2882는 HIV1 RRE 요소를 포함한다. 서열번호: 24의 뉴클레오타이드 3378-3495는 HIV cPPT/CTS 요소를 포함한다. 서열번호: 24의 뉴클레오타이드 3541-4051은 hPGK 프로모터를 포함한다. 서열번호: 24의 뉴클레오타이드 4078-8445는 인간 FANCA-A cDNA를 포함한다. 서열번호: 24의 뉴클레오타이드 8502-9178은 돌연변이된 WPRE 요소를 포함한다. 서열번호: 24의 뉴클레오타이드 9262-9495는 HIV 델타 U 3' LTR을 포함한다.
- [0184] 또 다른 구현예에서, 렌티바이러스 벡터는 하기 요소를 함유한다:
- [0185] (i) 초기 pCCLsin-cppt-hPGK-eGFP-WPRE에서 유래된 렌티바이러스 벡터의 골격(Dull et al., 1998; J.Virol 72 (11), 9873-9880). pCCL 골격은 이형 CMV-HIV 5' LTR을 이용하여 생산자 세포에서 높은 수준의 바이러스 RNA 전사를 얻는다. 이러한 이종의 LTR은 컨스트럭트가 rHIV 입자의 생산을 위해 HIV Tat 단백질을 사용할 필요성에 독립적이게 만들며, 따라서 안전하다. 3' LTR의 U3 영역은 문헌 (Zufferey et al J Virol, 1998)에 기재된 바와 같이 벡터에 자가-불활성화 성질을 부여하는 400 bp 결실을 함유한다;
- [0186] (ii) 인간 PGK 프로모터의 조절 하에 FANCA 단백질 (1455AA)을 암호화하는 인간 FANCA 유전자의 cDNA (4368bp GenBank 수탁 번호: X_99226 또는 본원에 개시된 바와 같다). 프로모터는 이미 유전자 치료에서 이전에 사용된 다른 프로모터와 비교하여, 안정한 생체 내 활성 및 개선된 안정성 특성을 특징으로 한다; 및
- [0187] (iii) X 단백질을 암호화하는 서열의 3' 영역 및 Schambach 등에 기술된 임의의 ORF 잔여 잔기(Gene therapy, 2006; 13, 641-645)가 결실된 우드처크 간염 바이러스의 전사-후 조절 요소(WPRE)의 돌연변이된 버전 또는 WPRE*.
- [0188] 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 카세트를 캡슐화하는 유전자 치료 벡터는 표준 방법론을 사용하여 제조될 수 있다. 예를 들어, LV 비리온의 경우, 본 발명에 따른 LV 발현 벡터를 생산자 세포 내로 도입한 다음 LV 헬퍼 컨스트럭트를 도입할 수 있으며, 여기서 상기 헬퍼 컨스트럭트는 생산자 세포에서 발현될 수 있고 LV 벡터에 존재하지 않는 LV 헬퍼 기능을 보완하는 LV 암호화 영역을 포함한다. 이어서, 헬퍼 바이러스 및/또는 추가 벡터가 생산자 세포 내로 도입되고, 이 헬퍼 바이러스 및/또는 추가 벡터는 효과적인 LV 바이러스 생산을 지원할 수 있는 부속 기능을 제공한다. 생산자 세포는 그 후에 LV를 생산하기 위해 배양된다. 이 단계는 표준 방법론을 사용하여 수행된다. 구체적 구현예에서, 유전자 전달 벡터를 생산하기 위해 도 38-41에 묘사된 플라스미드가 사용된다.
- [0189] 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 카세트의 전달을 위해 바이러스 입자를 생산하기 위한 임의의 적합한 방법이 사용될 수 있으며, 하기에 기재된 예가 포함되나 이에 한정되지는 않는다. 포유류 세포를 효과적으로 형질도입시키기 위한 바이러스 입자의 농도는 포유류 세포를 시험관 내 또는 생체 내에서 접촉시키기 위해 준비될 수 있다. 예를 들어, 바이러스 입자는 mL 당 10^8 개 이상의 벡터 계능, 예를 들어, mL 당 5×10^8 개의 벡터 계능; mL 당 10^9 개의 벡터 계능; mL 당 5×10^9 개의 벡터 계능, mL 당 10^{10} 개의 벡터 계능, mL 당 5×10^{10} 개의 벡터 계능; mL 당 10^{11} 개의 벡터 계능; mL 당 5×10^{11} 개의 벡터 계능; mL 당 10^{12} 개의 벡터 계능; mL 당 5×10^{12} 개의 벡터 계능; mL 당 10^{13} 개의 벡터 계능; mL 당 1.5×10^{13} 개의 벡터 계능; mL 당 3×10^{13} 개의 벡터 계능; mL 당 5×10^{13} 개의

백터 계능; mL 당 7.5×10^{13} 개의 백터 계능; mL 당 9×10^{13} 개의 백터 계능; mL 당 1×10^{14} 개의 백터 계능, mL 당 5×10^{14} 개의 백터 계능 이상, 일반적으로 mL 당 1×10^{15} 개의 백터 계능 이하의 농도로 제제화될 수 있다.

[0190] 본 발명의 LV 조성물을 준비함에 있어서, 예를 들어, 포유류 세포 (예를 들어, 293 세포), 곤충 세포 (예를 들어, SF9 세포), 미생물 및 효모를 포함하는, LV 비리온을 생산하기 위한 임의의 숙주 세포가 사용될 수 있다. 숙주 세포는 LV 백터 계능이 안정하게 유지 및 포장되는 숙주 세포 또는 생산자 세포에서 LV rep 및 cap 유전자가 안정하게 유지되는 패키징 세포가 될 수 있다. 예시적인 패키징 및 생산자 세포는 SF-9, 293, A549 또는 HeLa 세포로부터 유도된다. LV 백터는 당업계에 공지된 표준 기술을 사용하여 정제 및 제제화된다.

[0191] 특정 구현예에서, 본 발명은 본원에 개시된 유전자 발현 카세트, 유전자 전달 카세트 또는 유전자 전달 백터를 포함하는 세포를 포함한다. 관련된 구현예에서, 세포는 본원에 개시된 발현 카세트를 포함하는 유전자 전달 백터로 형질도입되거나, 세포 계능내로 통합된 본원에 개시된 발현 카세트를 갖는다.

[0192] 특정 구현예에서, 세포는 바이러스 유전자 전달 백터를 생산하는데 사용되는 세포, 예를 들어, 패키징 세포이다.

[0193] 다른 구현예에서, 세포는 발현 카세트에 의해 암호화된 유전자 산물을 대상에게 제공하기 위해 대상에게 전달되는 세포이다. 따라서, 특정 구현예에서 세포는 치료될 대상에게 자가유래(autoalogous)이거나 치료될 대상으로부터 획득되었다. 다른 구현예에서, 세포는 치료될 대상에게 동종이체이거나 또는 치료될 대상 외의 공여자로부터 획득되었다. 구체적 구현예에서, 세포는 포유류 세포, 예를 들어, 인간 세포이다. 특정 구현예에서 세포는 혈구, 적혈구, 조혈 전구세포, 골수 세포, 예를 들어, 계통이 고갈된 골수 세포, 조혈 줄기세포 (예를 들어, CD34 +) 또는 수입된(committed) 적혈구 전구 세포이다. 구체적 구현예에서, 이 세포는 본원에 개시된 유전자 전달 백터에 의해 형질도입된 후 세포로 치료될 대상으로부터 획득된 CD34+ 세포이다. 구체적 구현예에서, 세포는 FA로 진단받은 대상에게서 얻은 CD34+ FA 세포이다.

[0194] 본 발명은 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드 카세트, 유전자 전달 백터 또는 세포 및 약학적으로 허용가능한 담체, 희석제 또는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물을 포함한다. 대상 폴리뉴클레오티드 카세트, 유전자 전달 백터 또는 세포는 일반적으로 안전하고 독성이 없고 바람직한 제형을 제조하는데 유용한 약학적으로 허용가능한 담체, 희석제 및 시약과 조합될 수 있으며, 영양류에 대한 사용에 적합한 부형제를 포함한다. 이러한 부형제는 고체, 액체, 반고체 또는 에어로졸 조성물의 경우 기체일 수 있다. 이러한 부형제, 담체 또는 희석제의 예는 물, 식염수, 링거액, 덱스트로스(dextrose) 용액 및 5% 인간 혈청 알부민을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 보충 활성 화합물 또한 제제에 혼입될 수 있다. 제제에 사용되는 용액 또는 현탁액은 주사용수, 식염수, 고정유, 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycols), 글리세린(glycerine), 프로필렌글리콜(propylene glycol) 또는 다른 합성 용매와 같은 멸균 희석제; 향균 화합물, 예컨대 벤질알콜(benzyl alcohol) 또는 메틸파라벤(methyl parabens); 아스코르브산(ascorbic acid) 또는 아황산수소나트륨(sodium bisulfite)과 같은 항산화제; 에틸렌 디아민 테트라 아세트산(ethylenediaminetetraacetic acid) (EDTA)과 같은 킬레이트화 화합물; 아세트이트, 시트레이트, 또는 포스페이트와 같은 완충제; 응집을 방지하기 위해 트윈(Tween) 20과 같은 세제; 및 염화나트륨 또는 덱스트로스과 같은 장력 조절용 화합물을 포함한다. pH는 염산 또는 수산화 나트륨과 같은 산 또는 염기로 조절될 수 있다. 구체적 구현예에서 약제학적 조성물은 무균이다.

[0195] 본 발명에 사용하기에 적합한 약제학적 조성물은 추가로 멸균 수용액 또는 분산액 및 멸균 주사 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 멸균 분말을 포함한다.

[0196] 멸균 용액은 요구되는 양의 활성 화합물을 적절한 용매에 상기 열거된 성분 중 하나 또는 조합과 함께, 필요에 따라 혼입한 다음 여과 멸균함으로써 제조할 수 있다. 일반적으로, 분산액은 활성 화합물을 염기성 분산 매질 및 상기 열거된 것들로부터 필요한 다른 성분을 함유하는 무균 비히클에 혼입시킴으로써 제조된다. 멸균 주사 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우, 제조 방법은 활성 성분의 분말과 이의 이전에 멸균 여과된 용액으로부터 임의의 추가의 바람직한 성분을 생성하는 진공 건조 및 동결-건조이다.

[0197] 하나의 구현예에서, 조성물은 임플란트 및 마이크로캡슐화된 전달 시스템을 포함하는 제어된 방출 제제와 같이, 신체로부터의 신속한 제거로부터 유전자 카세트 또는 발현 백터를 보호할 담체로 제조된다. 에틸렌비닐아세테이트(ethylene vinyl acetate), 폴리안하이드라이드(polyanhydrides), 폴리글리콜산(polyglycolic acid), 콜라겐(collagen), 폴리ortho에스테르(polyorthoesters) 및 폴리락트산(polylactic acid)과 같은 생분해성, 생체 적합성 중합체가 사용될 수 있다. 이러한 제제의 제조 방법은 당업자에게 명백할 것이다. 이 물질은 또한 상업적

으로 수득할 수 있다.

- [0198] 투여의 용이성 및 투여량의 균일성을 위해 투여 단위 형태로 경구, 인구 또는 비경구 조성물을 제제화하는 것이 특히 유리하다. 본원에 사용된 투여 단위 형태는 치료될 대상을 위한 단일 투여량으로 적합한 물리적으로 분리된 단위를 의미하고; 각 단위는 필요한 약학적 담체와 관련하여 원하는 치료 효과를 나타내도록 계산된 기결정된 양의 활성 화합물을 함유한다. 본 발명의 투여 단위 형태에 대한 자세한 설명은 활성 화합물의 고유한 특성 및 달성될 특정 치료 효과와, 개인의 치료를 위해 그러한 활성 화합물을 배합하는 분야의 내재적인 한계에 의해 결정되고 좌우된다.
- [0199] 약제학적 조성물은 투여 지침과 함께 용기, 팩 또는 디스펜서, 예를 들어, 주사기, 예를 들어, 미리 채워진 주사기에 포함될 수 있다.
- [0200] 본 발명의 약제학적 조성물은 인간을 포함하는 동물에게 투여시 (직접적으로 또는 간접적으로) 생물학적 활성 대사산물 혹은 이들의 잔여물을 제공할 수 있는, 임의의 약학적으로 허용되는 염, 에스테르, 또는 이러한 에스테르의 염, 또는 임의의 다른 화합물을 포함한다.
- [0201] 용어 "약학적으로 허용되는 염"은 본 발명의 화합물의 생리학적 및 약학적으로 허용되는 염, 즉 모 화합물의 바람직한 생물학적 활성을 유지하고 이에 바람직하지 않은 독성 효과를 부여하지 않는 염을 지칭한다. 다양한 약학적으로 허용되는 염은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어, 문헌 ["Remington's Pharmaceutical Sciences", 17th edition, Alfonso R. Gennaro (Ed.), Mark Publishing Company, Easton, PA, USA, 1985 (및 이들의 최신 판), "Encyclopaedia of Pharmaceutical Technology", 3rd edition, James Swarbrick (Ed.), Informa Healthcare USA (Inc.), NY, USA, 2007, 및 J. Pharm. Sci. 66: 2 (1977)]에 서술되어 있다. 또한, 적합한 염에 대한 검토를 위해 문헌 [Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use by Stahl and Wermuth (Wiley-VCH, 2002)]을 참고한다.
- [0202] 약학적으로 허용되는 염기 부가염은 금속 또는 아민, 예컨대 알칼리 및 알칼리 토금속 또는 유기 아민으로 형성된다. 양이온으로 사용되는 금속은 나트륨, 칼륨, 마그네슘, 칼슘 등을 포함한다. 아민은 N-N'-디벤질에틸렌디아민, 클로로프로카인, 콜린, 디에탄올아민, 디시클로헥실아민, 에틸렌디아민, N-메틸글루카민 및 프로카인을 포함한다(Berge et al., "Pharmaceutical Salts", J. Pharma Sci., 1977, 66, 119). 상기 산성 화합물의 염기 부가염은 통상적인 방식으로 염을 생성하기 위해 유리 산 형태를 충분한 양의 원하는 염기와 접촉시켜 제조된다. 유리 산 형태는 염 형태를 산과 접촉시키고 통상적인 방식으로 유리 산을 분리시킴으로써 재생될 수 있다. 유리 산 형태는 극성 용매에서의 용해도와 같은 특정 물리적 성질에서 이들 각각의 염 형태와 상이하지만, 다르게는 본 발명의 목적을 위한 이들 각각의 유리 산과 등가이다.
- [0203] 본 발명의 폴리뉴클레오티드 카세트, 유전자 전달 벡터, 예를 들어, 재조합 바이러스(비리온) 또는 세포(예를 들어, 본원에 개시된 유전자 전달 벡터로 형질도입된 세포)는 포유류 환자, 특히 영장류, 더욱 구체적으로는 인간에 투여하기 위한 약제학적 조성물 내로 혼입될 수 있다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드 카세트, 유전자 전달 벡터, 예를 들어, 비리온 또는 세포는 바람직하게는 3 내지 8, 보다 바람직하게는 6 내지 8 범위의 pH에서 비독성, 불활성, 약학적으로 허용되는 수성 담체 중에 제제화될 수 있다. 이러한 멸균 조성물은 재구성시 허용 가능한 pH를 갖는 수용 완충액에 용해된 치료용 분자를 암호화하는 핵산을 포함하는 벡터 또는 비리온을 포함할 것이다.
- [0204] 일부의 구현예에서, 본원에서 제공되는 약제학적 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체 및/또는 부형제, 예를 들어, 식염수, 인산염 완충된 염수, 인산염 및 아미노산, 중합체, 폴리올, 당, 완충제, 방부제 및 기타 단백질과 혼합된 본원에 개시된 세포, 벡터 또는 비리온의 치료적 유효량을 포함한다. 예시적인 아미노산, 중합체 및 당 등은 옥틸페녹시 폴리에톡시 에탄올 화합물(octylphenoxy polyethoxy ethanol compounds), 폴리에틸렌글리콜 모노스테아레이트 화합물(polyethylene glycol monostearate compounds), 폴리옥시에틸렌 소르비탄 지방산 에스테르(polyoxyethylene sorbitan fatty acid esters), 수크로스(sucrose), 프룩토스(fructose), 덱스트로스(dextrose), 말토스(maltose), 글루코스(glucose), 만니톨(mannitol), 덱스트란(dextran), 소르비톨(sorbitol), 이노시톨(inositol), 갈락티톨(galactitol), 자일리톨(xylitol), 락토스(lactose), 트레할로오스(trehalose), 소 또는 인간 혈청 알부민, 시트레이트, 아세테이트, 링거 및 행크 용액(Ringer's and Hank's solutions), 시스테인, 아르기닌, 카르니틴, 알라닌, 글리신, 라이신, 발린, 류신, 폴리비닐피롤리돈(polyvinylpyrrolidone), 폴리에틸렌 및 글리콜이다. 바람직하게는, 이 제형은 4℃에서 적어도 6개월 동안 안정하다.

- [0205] 일부 구현예에서, 본원에서 제공되는 약제학적 조성물은 인산염 완충 식염수소(PBS) 또는 인산 나트륨/황산나트륨, 트리스 완충제, 글리신 완충제, 멸균수 및 문헌 [Good et al. (1966) Biochemistry 5: 467]에 기술된 것과 같은 당업자에게 공지된 다른 완충제와 같은 완충제를 포함한다. 아데노바이러스 벡터 전달 시스템에 종양 억제 유전자를 포함하는 약제학적 조성물이 포함된 완충제의 pH는 6.5 내지 7.75, 바람직하게는 7 내지 7.5, 가장 바람직하게는 7.2 내지 7.4일 수 있다.
- [0206] 특정 구현예에서, 바이러스 벡터는 1×10^8 벡터 게놈 이상, 예를 들어, 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} 또는 1×10^{13} 벡터 게놈 이상을, 제한 없이, 포함하는 임의의 적합한 단위 투여량으로 제제화될 수 있으며, 어떤 경우에는 1×10^{14} 벡터 게놈이지만, 보통 4×10^{15} 벡터 게놈보다 많지 않다. 일부 경우에, 단위 투여량은 최대 약 5×10^{15} 벡터 게놈, 예를 들어, 1×10^{14} 벡터 게놈 이하, 예를 들어, 1×10^{13} , 1×10^{12} , 1×10^{11} , 1×10^{10} 또는 1×10^9 벡터 게놈 이하, 특정 경우에 1×10^8 벡터 게놈 이하, 전형적으로 1×10^8 벡터 게놈보다 작지 않다. 특정 경우, 단위 투여량은 1×10^{10} 내지 1×10^{11} 벡터 게놈이다. 경우에 따라 단위 투여량은 1×10^{10} 에서 3×10^{12} 벡터 게놈이다. 일부 경우에, 단위 투여량은 1×10^9 에서 3×10^{13} 벡터 게놈이다. 일부 경우에, 단위 투여량은 1×10^8 내지 3×10^{14} 벡터 게놈이다. 하나의 구현예에서, 범위는 약 5×10^{10} 내지 약 1×10^{11} 벡터 게놈이다. 일부 구현예에서, 범위는 약 1×10^9 에서 약 1×10^{10} 벡터 게놈이다.
- [0207] 일부 경우에, 약제학적 조성물의 단위 투여량은 감염 다중도(MOI)를 사용하여 측정될 수 있다. MOI는 핵산이 전달될 수 있는 세포에 대한 벡터 또는 바이러스 게놈의 비율 또는 배수를 의미한다. 일부 경우에, MOI는 1×10^6 일 수 있다. 일부 경우에, MOI는 1×10^5 - 1×10^7 일 수 있다. 일부 경우에, MOI는 1×10^4 - 1×10^8 일 수 있다. 일부 경우에, 본원의 재조합 바이러스는 적어도 약 1×10^1 , 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} , 1×10^{13} , 1×10^{14} , 1×10^{15} , 1×10^{16} , 1×10^{17} 및 1×10^{18} MOI이다. 일부 경우에, 본원의 재조합 바이러스는 1×10^8 내지 3×10^{14} MOI이다. 일부 경우에, 본원의 재조합 바이러스는 약 1×10^1 , 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} , 1×10^{13} , 1×10^{14} , 1×10^{15} , 1×10^{16} , 1×10^{17} 및 1×10^{18} MOI이다. 일부 구현예에서, 범위는 약 20 내지 약 400 MOI이다.
- [0208] 일부 측면에서, 약제학적 조성물의 양은 약 1×10^8 내지 약 1×10^{15} 재조합 바이러스, 약 1×10^9 내지 약 1×10^{14} 재조합 바이러스, 약 1×10^{10} 내지 약 1×10^{13} 재조합 바이러스, 또는 약 1×10^{11} 내지 약 3×10^{12} 재조합 바이러스이다.
- [0209] **방법**
- [0210] 하기에 보다 상세히 논의되는 바와 같이, 본원에서 "대상 조성물"로 총칭되는, 본 발명의 폴리뉴클레오티드 카세트 및 유전자 전달 벡터는 동물, 예를 들어, 포유류 또는 인간의 세포에서, 전이유전자, 예를 들어, FANCA를 발현하는데 사용된다. 예를 들어, 대상 조성물은, 예를 들어, 유전자가 세포 생존능력 및/또는 기능에 미치는 영향을 결정하기 위한 연구에 사용될 수 있다. 또 다른 예로서, 대상 조성물은 예를 들어, FA와 같은 장애를 치료하기 위해 의학에 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명의 몇몇 측면에서, 세포에서 유전자의 발현을 위한 방법이 제공되며, 이 방법은 세포를 본 발명의 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부의 구현예에서, 접촉은 시험관 내에서 일어난다. 일부의 구현예에서, 접촉은 생체 내에서 일어나고, 즉, 대상 조성물이 대상에게 투여된다.
- [0211] 포유류 세포가 대상 폴리뉴클레오티드 카세트 또는 대상 폴리뉴클레오티드 카세트를 포함하는 유전자 전달 벡터와 시험관 내 또는 생체 내에서 접촉되는 경우, 세포는 임의의 포유류 종, 예를 들어, 설치류 (예를 들어, 마우스, 쥐, 게르빌루스(gerbils), 다람쥐), 토끼, 고양이, 개, 염소, 양, 돼지, 말, 소, 영장류, 인간에서 얻어질 수 있다. 세포는 확립된 세포주 유래일 수 있거나, 1차 세포일 수 있는데, 여기서 "1차 세포", "1차 세포주" 및 "1차 배양물"은 대상으로부터 유래되었고, 배양물의 제한된 수의 계대 배양 즉 분할을 위해 시험관 내 성장된 세포 및 세포 배양물을 지칭하기 위해 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 예를 들어, 1차 배양은, 위기 단계를 통과하기에 충분하지는 않지만, 0번, 1번, 2번, 4번, 5번, 10번 또는 15 번 계대 배양되었을 수 있는 배양이다. 전형적으로, 본 발명의 1차 세포주는 생체 내에서 10회 미만 계대로 유지된다.
- [0212] 본 발명의 구현예는 바이러스 전달 벡터, 예를 들어, 인간 FANCA 유전자를 함유하는 LV 벡터로 형질도입된 포유류 세포 (예를 들어, CD34+ 세포)를 포함한다. 또한, 본 발명은 포유류 세포, 예를 들어, 인간 조혈 줄기세포

또는 본원에 개시된 다른 세포를 형질도입시키는 방법을 포함하고, 상기 방법은 세포를 유전자 전달 벡터, 예를 들어, 본원에 개시된 LV 벡터 또는 본원에 개시된 발현 카세트를 포함하는 벡터와 접촉시키는 것을 포함한다. 특정 구현예에서, 세포는 이전에 치료할 대상 또는 다른 기증자로부터 수득된 것이다. 구체적 구현예에서, 대상은 판코니 빈혈로 진단 받았고, 세포는 FANCA 암호화 영역 또는 cDNA를 암호화하는 발현 카세트를 포함하는 LV로 형질도입되었다. 개시된 방법, 예를 들어, FANCA cDNA 서열을 사용하여 FANCA 유전자 산물을 대상에게 전달하기 위해 사용되는 방법이 또한 판코니 빈혈을 치료하는데 사용될 수 있음이 이해된다. 구체적 구현예에서, 형질도입된 세포는 FA를 가진 대상에게서 수득된 세포 집단으로, 일단 그들이 형질도입되면 세포로 치료된다. 세포는 골수 또는 혈액에서 수득될 수 있다. 특정 구현예에서, FA를 가진 대상은 줄기 세포를 동원하기 위한 약제로 처리된 후, 혈액이 대상에서 추출되고, 적혈구가 제거되고, CD34+ 세포가 선택된다. 선택 후에, 세포가 형질도입된다. 구체적 구현예에서, 형질전환된 세포는 사용하기 전에 저장되거나 동결되는 반면, 특정 구현예에서, 세포는 이들이 형질도입된 후 즉시 또는 이후 빠르게, 예를 들어, 1시간, 2시간 또는 4시간 이내에 대상에게 제공된다.

[0213] 특정 구현예에서, 본원에 개시된 유전자 전달 벡터로 세포를 형질도입 하는 경우, 세포는 약 30분, 약 1시간, 약 1.5시간, 약 2시간, 약 2.5시간, 약 3시간, 약 3.5시간, 약 4시간, 약 5시간, 약 6시간, 약 7시간, 약 8시간, 약 12시간, 약 16시간, 약 18시간, 약 20시간, 약 24시간, 약 36시간, 약 48시간, 약 60시간 동안 유전자 전달 벡터와 접촉한다. 일부의 구현예에서, 세포는 60시간 미만, 48시간 미만, 36시간 미만 또는 24시간 미만 동안 형질도입된다.

[0214] 대상 폴리뉴클레오타이드 카세트 또는 대상 폴리뉴클레오타이드 카세트를 포함하는 유전자 전달 벡터는 대상 세포에 1회 이상, 예를 들어, 1회, 2회, 3회 또는 3 초과로 제공될 수 있고, 세포는 각각의 접촉 이벤트 후 일정 시간 동안, 예컨대 16-24시간 동안, 약물(들)과 함께 인큐베이션 되고, 그 후에 배지를 새로운 배지로 교체하고 세포를 더 배양한다. 세포 접촉은 모든 배양 배지 및 세포의 생존을 촉진하는 모든 배양 조건에서 발생할 수 있다. 배양물에는 세포가 반응하는 성장 인자가 포함될 수 있다. 본원에서 정의된 성장 인자는 막형단 수용체에 대한 특이적 효과를 통해, 배양 중이거나 손상되지 않은 조직에서, 세포의 생존, 성장 및/또는 분화를 촉진할 수 있는 분자이다. 성장 인자는 폴리펩티드 및 비-폴리펩티드 인자를 포함한다.

[0215] 전형적으로, 대상 폴리뉴클레오타이드 카세트를 포함하는 대상 유전자 전달 벡터 또는 형질도입된 세포의 유효량은 세포에서 전이유전자의 발현을 생성하도록 제공된다. 본원의 다른 곳에서 논의된 바와 같이, 유효량은, 예를 들어, 형질전환 유전자 산물의 존재 또는 수준의 검출, 세포의 생존능력 또는 기능에 대한 효과의 검출 등에 의해 경험적으로 용이하게 결정될 수 있다. 전형적으로, 대상 폴리뉴클레오타이드 카세트 또는 대상 폴리뉴클레오타이드 카세트를 포함하는 유전자 전달 벡터의 유효량은 당해 분야에 공지된 것과 동일한 양의 폴리뉴클레오타이드 카세트보다 세포 내에서 전이유전자의 발현을 더욱 촉진할 것이다. 전형적으로, 발현은 기준 또는 대조군의 폴리뉴클레오타이드 카세트로부터의 발현에 비해 2배 이상, 예를 들어, 3배, 4배 또는 5배 이상, 일부 경우에 10배, 20배 또는 50배 이상, 예를 들어, 100배 증강될 것이다.

[0216] 예를 들어, 세포가 대상 폴리뉴클레오타이드 카세트 또는 대상 폴리뉴클레오타이드 카세트를 포함하는 유전자 전달 벡터와 생체 내에서 접촉되는 경우, 대상은 임의의 포유류, 예를 들어, 설치류 (예를 들어, 마우스, 쥐, 게르빌루스), 토끼, 고양이, 개, 염소, 양, 돼지, 말, 소, 또는 영장류일 수 있다. 추가의 바람직한 구현예에서, 영장류는 인간이다. 추가의 구현예에서, 세포는 CD34+ 세포이다.

[0217] 본 발명의 방법 및 조성물은, 예를 들어, 판코니 빈혈의 치료에 사용된다.

[0218] 일부의 구현예에서, 본 방법은 치료적 이익, 예를 들어, 장애의 발병 예방, 장애의 진행 중단, 장애의 진행 역전 등을 초래한다. 예를 들어, 하나의 구현예에서, 장애는 BMF다. 하나의 구현예에서, 장애는 혈소판감소증이다. 또 다른 구현예에서, 장애는 백혈구감소증이다. 하나의 구현예에서, 장애는 범혈구감소증이다. 하나의 구현예에서, 장애는 호중구감소증이다. 또 다른 구현예에서, 장애는 빈혈이다. 일부의 구현예에서, 본 방법은 치료적 이익이 달성되었음을 검출하는 단계를 포함한다. 당업자는 치료 효능의 그러한 측정이 변형되는 특정 질환에 적용가능할 것이며, 치료 효능을 측정하기 위해 사용하는데 적절한 검출 방법을 인식할 것이다.

[0219] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 치료를 필요로 하는 대상에서 질환을 치료하는 방법을 포함하는데, 이 방법은 치료 유전자 산물을 발현하는 유전자 전달 벡터, 예를 들어, 바이러스 벡터로 형질도입된 유효량의 세포를 대상에게 제공하는 것을 포함한다. 구체적 구현예에서, 세포는 대상에게 자가이다. 특정 구현예에서, 세포는 적혈구 세포, 예를 들면, 조혈 줄기세포 또는 수입된 적혈구 전구 세포이다. 일부 구현예에서 세포는 골수 세포, 예를 들어, 계통이 고갈된 골수 세포이다. 구체적 구현예에서, 이 방법은 FA를 치료하는데 사용되며, 바이러스 벡터

는 FANCA 유전자 cDNA 또는 암호화 서열에 작동가능하게 연결된 인간 PGK 프로모터 및 본원에 개시된 돌연변이된 wPRE를 포함하는 본원에 개시된 발현 컨스트럭트를 포함하는 LV이다. 구체적 구현예에서, 세포는 예를 들어, 정맥 내 주사를 통해 비경구적으로 대상에게 제공된다.

[0220] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 이를 필요로 하는 대상에서 FA를 치료하는 방법을 포함하며, 이 방법은 FANCA cDNA를 세포에서 발현하는 LV 벡터로 형질도입된 자가 CD34+ 줄기세포의 유효량을 대상에게 제공하는 것을 포함하며, 여기서 LV 벡터는 FANCA cDNA 또는 암호화 서열에 작동가능하게 연결된 인간 PGK 프로모터 및 본원에 개시된 돌연변이된 wPRE 서열을 포함한다. 구체적 구현예에서, 세포는 조혈 줄기세포 또는 조혈 적혈구 전구 세포, 예를 들어, 골수 세포이다. 구체적 구현예에서, 세포는 예를 들어, 정맥 내 주사를 통해 비경구적으로 대상에게 제공된다.

[0221] 대상 전이유전자를 이용한 전이유전자의 발현은 건고할 것으로 기대된다. 따라서, 일부 경우에, 예를 들어, 유전자 산물의 수준을 측정하거나, 치료 효능을 측정하는 등에 의해 검출된 전이유전자의 발현은 투여 후 2개월 이하, 예를 들어, 투여 후 4, 3 또는 2주 이하, 예를 들어, 대상 조성물의 투여 후 1주에 관찰될 수 있다. 전이유전자의 발현은 또한 시간이 지남에 따라 지속될 것으로 예상된다. 따라서, 일부 경우에, 예를 들어, 유전자 산물의 수준을 측정하거나, 치료 효능을 측정하는 등에 의해 검출된 전이유전자의 발현은 대상 조성물의 투여 후 2개월 이상, 예를 들어, 4, 6, 8 또는 10개월 이상, 일부 경우에, 1년 이상, 예를 들어, 2년, 3년, 4년 또는 5년, 특정 경우에는, 5년 이상에서 관찰될 수 있다.

[0222] 특정 구현예에서, 이 방법은 세포 또는 대상에서 전이유전자의 발현을 검출하는 단계를 포함하며, 발현은 본 발명의 하나 이상의 개선된 요소를 포함하지 않는 폴리뉴클레오티드 카세트로부터의 발현에 비하여 향상된다. 전형적으로, 발현은 기준, 즉, 예를 들어, 당업계에서 공지된 바와 같은, 대조 폴리뉴클레오티드 카세트로부터의 발현에 비해, 예를 들어, 조기 검출, 높은 수준의 유전자 산물, 세포에 대한 더 강력한 기능적 영향 등에 의해 입증되는 바와 같이, 2배 이상, 예를 들어, 3배, 4배 또는 5배 이상, 일부 경우에는 10배, 20배 또는 50배 이상, 예를 들어, 100배 증강될 것이다.

[0223] 전형적으로, 대상 조성물이 본 발명의 대상 폴리뉴클레오티드 카세트를 포함하는 LV인 경우, 변화를 달성하기 위한 유효량은 약 1×10^8 벡터 게놈 이상, 일부 경우에는 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} , 또는 1×10^{13} 벡터 게놈 이상, 특정 경우에는 1×10^{14} 벡터 게놈 이상일 것이며, 보통 1×10^{15} 벡터 게놈 이상은 아니다. 일부의 경우, 전달되는 벡터 게놈의 양은 최대 약 1×10^{15} 벡터 게놈, 예를 들어, 1×10^{14} 벡터 게놈 이하, 예를 들어, 1×10^{13} , 1×10^{12} , 1×10^{11} , 1×10^{10} 또는 1×10^9 벡터 게놈 이하, 특정 경우에 1×10^8 벡터 게놈, 및 전형적으로 1×10^8 벡터 게놈보다 적지 않다. 일부 경우에, 전달되는 벡터 게놈의 양은 1×10^{10} 에서 1×10^{11} 벡터 게놈이다. 일부 경우에, 전달되는 벡터 게놈의 양은 1×10^{10} 에서 3×10^{12} 벡터 게놈이다. 일부 경우에, 전달되는 벡터 게놈의 양은 1×10^9 에서 3×10^{13} 벡터 게놈이다. 일부 경우에, 전달되는 벡터 게놈의 양은 1×10^8 에서 3×10^{14} 벡터 게놈이다.

[0224] 일부 경우에, 투여될 약제학적 조성물의 양은 감염 다중도(MOI)를 사용하여 측정될 수 있다. 일부 경우에, MOI는 핵이 있는 세포에 전달될 수 있는 벡터 또는 바이러스 게놈의 비율 또는 배수를 지칭할 수 있다. 일부 경우에, MOI는 1×10^6 일 수 있다. 일부 경우에, MOI는 1×10^5 - 1×10^7 일 수 있다. 일부 경우에, MOI는 1×10^4 - 1×10^8 일 수 있다. 일부 경우에, 본 발명의 재조합 바이러스는 적어도 약 1×10^1 , 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} , 1×10^{13} , 1×10^{14} , 1×10^{15} , 1×10^{16} , 1×10^{17} 및 1×10^{18} MOI이다. 일부 경우에, 본 발명의 재조합 바이러스는 최대 1×10^1 , 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} , 1×10^{13} , 1×10^{14} , 1×10^{15} , 1×10^{16} , 1×10^{17} 및 1×10^{18} MOI이다.

[0225] 일부 측면에서, 약제학적 조성물의 양은 약 1×10^8 내지 약 1×10^{15} 입자의 재조합 바이러스, 약 1×10^9 내지 약 1×10^{14} 입자의 재조합 바이러스, 약 1×10^{10} 내지 약 1×10^{13} 입자의 재조합 바이러스, 또는 약 1×10^{11} 내지 약 3×10^{12} 입자의 재조합 바이러스를 포함할 수 있다.

[0226] 원하는 효과를 부여하거나 질병을 치료하기 위해 세포의 적절한 형질도입을 제공하는데 적합한 임의의 총 바이러스 입자 수를 포유류에게 투여할 수 있다. 다양한 바람직한 구현예에서, 적어도 10^8 ; 5×10^8 ; 10^9 ; 5×10^9 , 10^{10} ,

5×10^{10} ; 10^{11} ; 5×10^{11} ; 10^{12} ; 5×10^{12} ; 10^{13} ; 1.5×10^{13} ; 3×10^{13} ; 5×10^{13} ; 7.5×10^{13} ; 9×10^{13} , 1×10^{14} 바이러스 입자, 또는 5×10^{14} 바이러스 입자 이상, 그러나 일반적으로 1×10^{15} 바이러스 입자 이하가 주사된다. 포유류 또는 영장류의 눈에 임의의 적절한 수의 벡터의 수가 투여될 수 있다. 하나의 구현예에서, 방법은 단일 투여를 포함하고; 다른 구현예에서, 다수의 투여가 주치의에 의해 적절한 것으로 간주되는 바와 같이 시간의 경과에 따라 이루어진다. 일부의 구현예에서, 단일 투여(24시간 형질도입)시 적어도 5×10^5 세포/ml의 2×10^8 VG/ml 이상이 높은 형질도입 효능을 얻기 위해 필요하다. 개별 투여량은 전형적으로 대상에 대한 측정가능한 효과를 발생시키는데 필요한 양보다 적지 않으며, 대상 조성물 또는 그의 부산물의 흡수, 분포, 대사 및 배설("ADME")에 대한 약물 동력학 및 약리학, 및 따라서 대상 내에서의 조성물의 성향에 기초하여 결정될 수 있다. 이는 투여 경로 뿐만 아니라 투여량에 대한 고려를 포함한다. 유효량의 용량 및/또는 용량 요법은 전임상 시험, 안전성 및 단계적 확대 및 투여량 범위 시험, 개별적인 임상-환자 관계, 뿐만 아니라 본원에 기술되고 실시예에서 묘사한 바와 같은 시험관 내 및 생체 내 분석으로부터 경험적으로 용이하게 결정될 수 있다.

[0227] 일부 구현예에서, 환자가 주입에 의해 투여받은 세포의 용량은 형질도입 과정으로부터 수득된다. 다양한 바람직한 구현예에서, 환자 체중의 적어도 1×10^1 , 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 이상의 CD34+ 세포/KG가 환자에게 주입된다. 일부 구현예에서, 환자 체중의 1×10^6 및 4×10^6 CD34+ 세포/KG 사이가 환자에게 주입된다. 다른 구현예에서, 환자 체중의 3×10^5 및 4×10^6 CD34+ 세포/Kg가 환자에게 주입된다. 일부의 구현예에서, 세포는 단일 용량으로 환자에게 주입될 것이다. 다른 구현예에서, 세포는 다회 용량으로 환자에게 주입될 것이다. 형질도입 과정이 완료된 후에 형질도입된 세포가 즉시 주입될 수 있다.

[0228] 일단 통합되면, 치료 단백질(예를 들어, 인간 FANCA 단백질)이 세포에 의해 발현된다. 형질도입된 FA 세포는 유전적으로 교정되어 FANCD2 및 FANCI의 모노-유비퀴틴화에 의해 FA 경로를 활성화시킬 수 있다. 이 단백질들은 DNA 손상 영역으로 이동하고, 다른 DNA 복구 단백질과 협력하여, 건강한 세포에서 일어나는 것처럼 이들 세포에서 DNA의 복구를 촉진한다.

[0229] 실시예에서 보다 상세히 기술된 바와 같이, 인간 FA 환자로 부터의 BM 샘플을 사용한 전임상 시험관 내 데이터는 이미 이들 세포의 표현형을 교정하기 위한 FANCA LV의 효능을 보여주었다.

[0230] 따라서, 본 발명은 FA의 혈액학적 징후의 치료 방법을 제공한다. 하나의 구현예에서, FA의 혈액학적 징후는 BMF, 혈소판감소증, 백혈구감소증, 범혈구감소증, 호중구감소증 및 빈혈 중 하나 이상으로부터 선택된다. 특정 구현예에서, 혈액학적 징후는 대부분의 FA 환자에서 소아 연령에서 나타나는 골수 부전(BMF)이다. 하나의 구현예에서, 혈액학적 징후는 혈소판감소증이다. 또 다른 구현예에서, 혈액학적 징후는 백혈구감소증이다. 하나의 구현예에서, 혈액학적 증상은 범혈구감소증이다. 하나의 구현예에서, 혈액학적 증상은 호중구감소증이다. 또 다른 구현예에서, 혈액학적 징후는 빈혈이다. 하나의 구현예에서, 혈액학적 증상은 BMF, 혈소판감소증, 백혈구감소증, 범혈구감소증, 호중구감소증 및 빈혈 중 두 가지 이상의 조합이다.

[0231] FANCA LV는 질병의 보다 진보된 단계에서 생성될 수 있는 고행 종양을 직접 치료하지 않는다. 그럼에도 불구하고, 조혈 유전자 치료로 치료받는 FA 환자의 혈액학적 상태의 개선은 고행 종양의 발병에 대한 면역 감시를 향상시킬 수 있다. 따라서 FA 환자를 FANCA LV로 처리한 결과로서 간접적인 항종양 효과가 또한 발생할 수 있다.

[0232] FA에서 성공적인 유전자 치료를 달성하기 위해, 충분한 수의 조혈 줄기세포(HSC)를 대상으로부터 수집하는 것이 유익하다.

[0233] 하나의 구현예에서, HSC는 골수 샘플로부터 수득되거나 또는 수집된다. 하나의 구현예에서, 골수 샘플은 적혈구가 고갈되어 있다. 일부의 구현예에서, 골수 샘플은 CD16+ 백혈구가 고갈되어 있다. 일부의 구현예에서, 고갈 기법 후 잔존하는 세포를 세척한다. 또 다른 구현예에서, 비-특이적 IgG를 세척된 세포에 첨가한다. 일부의 구현예에서, 비-특이적 IgG는 플레보감마(flebogamma)이다. 이어서, CD34+ 세포가 세척된 세포로부터 선별될 수 있다. 하나의 구현예에서, CD34+ 세포는 골수 샘플에서 선택될 수 있다. CD34+ 세포의 선별 방법은 양성 선별, 음성선별 또는 이들의 조합일 수 있다.

[0234] 또 다른 구현예에서, HSC는 말초 혈액로부터 수득된다. 하나의 구현예에서, 말초 혈액 샘플은 적혈구가 고갈되어 있다. 일부의 구현예에서, 혈액 샘플은 CD16+ 백혈구가 고갈되어 있다. 일부의 구현예에서, 고갈 기법 후 잔존하는 혈액 세포를 세척한다. 또 다른 구현예에서, 비-특이적 IgG를 세척된 세포에 첨가한다. 일부의 구현예에서, 비-특이적 IgG는 플레보감마이다. 이어서, CD34+ 세포가 세척된 세포로부터 선별될 수 있다. 하나의 구현예

에서, CD34⁺ 세포는 말초 혈액 샘플에서 선택될 수 있다. CD34⁺ 세포의 선별 방법은 양성 선별, 음성선별 또는 이들의 조합일 수 있다.

[0235] 본 발명의 일부의 구현예에서, HSC는 동원된(mobilization) 후 대상에서 수득될 수 있다. 동원은 골수에서 혈액으로의 줄기 세포의 이동을 야기하고 약물 또는 화합물로 대상을 처리함으로써 달성될 수 있다. 줄기 세포는 수집되고 저장될 수 있다. 일부의 구현예에서, 동원은 대상을 G-CSF (filgrastim)로 처리함으로써 달성된다. 다른 구현예에서, 동원은 대상을 플레릭사포르로 처리함으로써 달성된다. 또 다른 구현예에서, 동원은 대상을 필그라스티움 및 플레릭사포르의 조합으로 처리함으로써 달성된다(도 11 및 도 14).

[0236] 하나의 구현예에서, 환자 체중 1킬로그램 당 적어도 1 내지 4×10^6 교정된 CD34⁺ 세포 (예를 들어, FANCA 형질도입된 HSC)가 비-조건화된 FA 환자에서 조혈기능을 복구하기 위해 투여된다. 일부의 구현예에서, 형질도입된 세포는 형질도입 직후에 환자에게 주입되거나 투여된다(도 11). 다른 구현예에서, 형질도입된 세포는 환자에게 주입 또는 투여하기 전에 동결된다(도 11).

[0237] 이들 세포의 자가 이식(조혈 유전자 치료) 후 FA 환자로부터 HSC의 유전적 교정은 FA 환자, 특히 HLA가 동일한 형제가 없는 환자에게 좋은 대안이다. 하나의 구현예에서, 조혈 유전자 치료는 HLA가 동일한 형제가 없는 환자에게 바람직한 치료 요법이다. 또 다른 구현예에서, 조혈 유전자 치료는 HLA- 동일한 형제를 갖는 환자에게 바람직한 치료 요법이다.

[0238] 본원에 언급된 모든 간행물은 그와 관련하여 간행물이 인용된 방법 및/또는 재료를 개시하고 기술하기 위해 본원에 참고문헌으로 포함된다. 본원의 개시가 모순이 존재하는 범위까지 포함된 간행물의 임의의 개시를 대체하는 것으로 이해된다.

[0239] 청구항이 임의의 선택적인 요소를 배제하도록 작성 될 수 있음을 또한 주목해야한다. 따라서, 이 진술은 청구항 요소의 인용 또는 "부정적인" 제한의 사용과 관련하여 "단독으로", "오직" 등과 같은 배타적인 용어의 사용을 위한 선행 기준으로서의 제공되는 것으로 의도된다.

[0240] 본원에서 논의된 간행물은 본 출원의 출원일 이전에 그들의 개시에 대해서만 제공된다. 또한, 제공되는 간행물의 날짜는 실제 공개 날짜와 다를 수 있으며, 이는 독자적으로 확인할 필요가 있을 수 있다.

[0241] FA-A가 FA 환자에서 가장 빈번한 보체군이기 때문에(Casado et al., 2007, Taniguchi et al., 2006), 실시예는 FANCA 유전자 및/또는 EGFP 마커 유전자를 발현하는 벡터에 집중하지만; 다른 FANCA 유전자가 다른 보체군을 처리하는데 유사하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0242] 도 1은 예시적인 컨스트럭트, PGK-FANCA.WPRE*LV의 모식도이다.

도 2A는 상이한 내부 프로모터들의 조절 하에서 FANCA를 발현하는 LV의 개략적인 표시를 도시한다. 도 2B는 패널 A에 나타난 벡터로 형질도입된 FA-A 세포에서, 유전자 치료를 받은 FA-A 쥐의 조혈 전구세포의 MMC-과민성이 교정된 것을 보여주는 FANCA의 웨스턴 블롯 분석을 도시한다. FA-A 골수(BM) 세포는 PGK_FANCA-WPRE* 또는 대조군 SF1-EGFP LVs로 형질도입되었으며 방사선 조사된 FA-A 쥐에게 이식되었다. 이식 후 7개월 쯤에 BM 샘플을 채취하였으며 증가하는 농도의 마이토마이신C(MMC)의 존재 하에서 메틸셀룰로스 중에 배양하였다.

도 3은 상이한 내부 프로모터들의 조절 하에서 FANCA를 발현하는 렌티바이러스 벡터의 기능적 분석을 보여주는 데이터를 나타낸다. 도 3A는 LVs로 형질도입된 FA-A 림프모구 세포주(LCL)의 MMC 민감성의 역전을 도시한다. 3가지 다른 실험의 평균값이 도시되었다. 도 3B는 벡터로 형질도입되고 마이토마이신C(MMC)에 노출된 FA-A LCLs의 핵 FANCD2 병소의 회복된 형성을 도시한다.

도 4는 PGK-FANCA.Wpre* LV를 이용한 FA 유전자 치료의 생체 내 유효성 및 안정성을 보여주는 데이터를 나타낸다. 도 4A는 상기 컨스트럭트를 도시한다. 도 4B는 FA-A 쥐로부터의 골수(BM) 세포를 FANCA LV로 형질도입한 후 방사선 조사된 FA-A 수용자 쥐에게 이식하는 방법을 묘사한다. 도 4C는 이식된 FA-A 쥐 유래의 BM 샘플이 MMC의 부재 또는 존재 하에서 메틸셀룰로스에서 배양되었음을 도시한다.

도 5는 이전에 PGK 프로모터의 조절 하에 있는 치료적 FANCA 유전자를 운반하는 렌티바이러스 벡터로 형질도입된 동계의 골수 세포를 이식받은 FANCA^{-/-} 쥐에서의 프로바이러스 카피 수를 도시한다. PB=말초 혈액; BM=골수.

도 6은 의약품으로 유전자 치료를 받은 FA-A 쥐의 조혈 전구세포의 MMC-과민성이 교정된 것을 보여주는 데이터를

나타낸다. FA-A 골수(BM) 세포는 PGK_FANCA-WPRE* 또는 SF1-EGFP LVs로 형질도입되었으며 방사선 조사된 FA-A 쥐에게 이식되었다. 이식-후 7개월 후에 BM 샘플을 채취하였으며 증가하는 농도의 MMC의 존재 하에서 메틸셀룰로로스 중에 배양하였다.

도 7은 3 명의 판코니 빈혈 환자들로부터의 동결보존된 골수 전구세포에서 형질도입 효율이 증가한 것을 묘사한다. 샘플은 2시간의 정적인 프리로딩(preloading) 이후의 단일 형질도입 사이클(16 시간)을 포함하는 표준 형질도입 (흰색 막대; 1xS) 또는 렌티바이러스 벡터를 이용한 3 회의 형질도입 사이클(2시간+2시간+12시간)로 이루어진 향상된 형질도입 (회색 막대; 3xD)에 적응하였다.

도 8은 PGK 프로모터의 조절 하에서 FANCA를 발현하는 렌티바이러스 벡터의 기능적 특성에 대한 WPRE 서열의 관련성을 도시한다. 도 8A: PGK-FANCA 및 PGK-FANCA-WPRE LVs로 형질도입된 FA-A LCLs의 (MMC) 민감성의 역전. 3 가지 다른 실험의 평균값이 도시되었다. 도 8B: SFFV-FANCA LV 및 PGK-FANCA LVs ("실험 1") 및 PGK-FANCA 및 PGK-FANCA-WPRE LVs ("실험 2")로 형질도입된 FA-A 조혈 전구세포(콜로니 형성 세포, CFCs)의 MMC 민감성의 역전. 흰색 막대=MMC 없음; 회색 막대=10 nM MMC. MMC=마이토마이신 C

도 9는 판코니 빈혈 환자의 골수에서 얻은 조혈 전구세포를 EGFP-LVs로 형질도입하기 위한 GALV-TR 및 VSV-G 슈도타입화 렌티바이러스 벡터의 유효성을 도시한다.

도 10은 hPGK 프로모터를 포함한 렌티바이러스의 시험관 내 형질전환 능력을 보여준다. 도 10A: 벡터의 묘사. 도 10B: 카피 수에 따른 재-도말 빈도로 측정된 형질전환 능력.

도 11은 FA-A 환자의 예시적인 조혈 줄기세포 (HSC) 수집 및 유전자 치료 시험의 묘사이다.

도 12는 실시예에서 묘사된 연구에 모집된 환자들의 혈액학적 매개변수를 도시한다. 도 12A는 헤모글로빈에 대한 결과를 도시한다. 도 12B는 호중구에 대한 결과를 도시한다. 도 12C는 혈소판에 대한 결과를 도시한다. 도 12D는 CD34+ 세포에 대한 결과를 도시한다.

도 13은 판코니 빈혈 환자에서 플렉사포르(Plerixafor) (MOZOBIL) 및 필그라스티(Filgrastim) (G-CSF로도 알려져 있음) (NEUPOGENE) 처리 후 CD34+ 세포의 동원 및 수집의 안전성 및 유효성 평가를 위한 Fancostem 프로토콜 2단계 연구를 설명한다. 환자의 수는 10명이다.

도 14는 FA-A 환자에서 G-CSF/플렉사포르-매개 CD34+의 동원을 도시한다.

도 15는 FA-A 환자에서 G-CSF/플렉사포르-매개 CFCs의 동원을 도시한다.

도 16은 G-CSF/플렉사포르로 매개된 FA-A 환자에서 수집된 CD34+ 세포에 관한 요약이다. 도 16A는 FANCOSTEM에서의 CD34+ 수집을 도시하며 도 16B는 선행 연구들과의 비교를 도시한다.

도 17은 골수(BM)내 예측된 CD34+ 세포와 동원된 말초 혈액(mPB)내 실제 수를 비교하여 보여주는 차트이다.

도 18은 동원된 말초 혈액(mPB) FA-A CD34+ 세포의 수집과 정제에 관한 차트이다.

도 19는 건강한 공여자(HD) 및 FA 환자의 동원된 말초 혈액(mPB) CD34+ 세포에서 면역선택(immunoselection) 전 및 후의 CD34 발현을 도시한다.

도 20은 환자 FA 02005가 FANCOSTEM 및 FANCOLEN 연구 둘 다의 기준에 적합함을 도시한다. 도 20A는 세포 수를 나타내고; 도 20B는 조혈 줄기세포(HSC) 함량 대 나이를 도시한다.

도 21 (A-E)는 유전자 치료 전에 환자 FA-02005의 FA 진단을 보여주는 테스트 결과를 나타낸다.

도 22는 FA-A 환자 02005를 위한 세포 제조 과정의 후속 매개변수를 도시한다.

도 23은 환자 FA-02005에서 유전자 치료 전, 유전자 치료 2주, 4주, 6주, 2달, 3달, 4달, 그리고 5달 후의 벡터 카피 수를 묘사하는 그래프이다.

도 24는 유전자 치료 이후의 헤모글로빈 양으로 측정되는 바와 같이 유전자 치료 전후의 제 1 비-조건화 FA-A 환자(FA-02005)의 추적 검사를 나타낸다.

도 25는 유전자 치료 이후의 호중구 양으로 측정되는 바와 같이 유전자 치료 전후의 제 1 비-조건화 FA-A 환자(FA-02005)의 추적 검사를 나타낸다.

도 26은 유전자 치료 이후의 혈소판 양으로 측정되는 바와 같이 유전자 치료 전후의 제 1 비-조건화 FA-A 환자

(FA-02005)의 추적 검사를 나타낸다.

도 27은 환자 FA-A 02002의 혈액학적 진화에 관한 차트이다.

도 28은 모자이크 현상 부재; 동형접합 *FANCA* c.239 C>T p.Gln99*MMC 과민성; *FANCA*에 의한 보강에 의한 FA 02002의 진단을 나타낸다.

도 29는 환자 FA-A 02002에서의 세포 제조 과정을 도시한다.

도 30은 환자 FA 02002에서 LV-형질도입을 위해 필요한 다른 단계 도중에 건강한 공여자 (HD) 및 FA 동원된 말초 혈액 (mPB)에서의 CD34 발현에 관한 분석을 나타낸다.

도 31은 환자 FA 02002에서 유전자 치료 전 및 후의 백터 카피 수를 묘사하는 그래프이다.

도 32는 헤모글로빈 양에 의해 측정된 바와 같이 동결보존된 세포가 주입된 환자 FA-A 02002의 추적검사의 후속 데이터를 나타낸다.

도 33은 호중구 양에 의해 측정된 바와 같이 동결보존된 세포가 주입된 환자 FA-A 02002의 추적검사의 후속 데이터를 나타낸다.

도 34는 혈소판 양에 의해 측정된 바와 같이 동결보존된 세포가 주입된 환자 FA-A 02002의 추적검사의 후속 데이터를 나타낸다.

도 35는 확인된 조건으로 FA-A 환자에서 얻은 신선한 동원된 말초 혈액(mPB) CD34+ 세포의 형질도입을 도시한다. 도 35A는 프로토콜을 나타낸다. 도 35B는 환자 02002에서 얻은 결과 그래프를 도시한다. 도 35C는 환자 02003에서 얻은 결과 그래프를 도시한다. 도 35D는 환자 02004에서 얻은 결과 그래프를 도시한다.

도 36은 NSG 쥐에서 교정된 FA-A mPB CD34+ 세포의 생착에 관한 데이터를 도시한다. 도 36A는 프로토콜을 나타낸다. 도 36B는 환자 02002의 결과를 도시한다. 패널 C는 환자 02003의 결과를 도시한다. 도 36D는 환자 02004의 결과를 도시한다. mPB=동원된 말초 혈액.

도 37은 NOD skid 감마(NSG) 쥐에서 환자 02002에서 얻은 교정된 FA HPCs의 생체 내 선택을 묘사한다. 도 37A는 프로토콜을 도시한다. 도 37B는 CFCs 사전-이식에 관한 그래프이다. 도 37C는 이식 30일 후 hCFCs의 그래프이다.

도 38은 CMV 프로모터의 조절 하에 있는 VSV 외피 G 당단백질을 암호화하는 5.7kb 플라스미드의 지도이고, 선별 목적을 위해 카나마이신 저항성 유전자를 운반한다.

도 39는 CMV 프로모터의 조절 하에 있는 HIV-1 *rev* 유전자를 암호화하는 3.5kb 플라스미드의 지도이고, 선별 목적을 위해 카나마이신 저항성 유전자를 운반한다.

도 40은 CMV 프로모터의 조절 하에 있는 HIV-1 구조 및 효소 단백질을 암호화하는 HIV-1 *gag* 및 *pol* 유전자를 포함하는 8.8kb 플라스미드의 지도이다. 이는 인간 베타 글로빈 (HBB2)의 인트론 2, HIV-1 Rev 반응 요소 (RRE) 및 카나마이신 저항성 유전자를 포함한다.

도 41은 11621개 염기 쌍의 pCCL-SIN-cPPT/CTS-hPGK-hFANCA-WPRE 전달 카세트의 지도이다.

도 42는 FA 조혈 줄기세포 (HSC)에서 FANCA-LV 삽입 부위의 LAM-PCR 분석을 나타낸다.

도 43은 FANCA-LV 처리된 세포를 추적한 LAM-PCR 결과를 묘사한다. 도 43A는 프로토콜을 묘사하며 도 43B는 데이터에 관한 차트이다.

도 44는 LV-교정된 HSC로 이식된 Fanca-/- 수용자들의 클론 다양성을 도시한다. 도 44A는 프로토콜을 도시하며 도 44B는 데이터에 관한 그래프를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0243] 실시예 1: FANCA 렌티바이러스 벡터

[0244] RV에 비해 더 안전한 LV의 통합 양상으로 인해(Gonzalez-Murillo *et al.*, 2008; Modlich *et al.*, 2009; Montini *et al.*, 2006; Mitchell RS, Beitzel BF, Schroder AR *et al.* Plos Biol. 2004;2:E234; Montini E *et al.* J Clin Invest. 2009; 119: 964-975; Schroder AR *et al.* Cell. 2002; 110: 521-529), LV를 FA 세포의 표현형을 교정하기 위한 치료용 벡터로 개발하는 것이 목표였다(Gonzalez-Murillo *et al.*, 2009). 더 나아가, 최

근 연구에서 강한 내부 프로모터를 포함한 LV가 근처의 유전자를 트랜스-활성화시킬 수 있음이 확인되었기 때문에(Modlich *et al.*, 2009), LV는 치료전 효능과 근처의 유전자를 트랜스-활성화시키는 위험 간의 절충안으로서 임상에서의 사용이 고려되었다. 따라서, 치료 유전자의 발현을 유도하는 인핸서/프로모터에 의한 유전자 트랜스-활성화의 위험을 제한하기 위해, 치료적일 수 있는, FANCA 발현의 임계 수준을 정의하는 것이 목적이었다. FANCA LV의 효능을 먼저 시험관 내 FA-A LCLs에서, 그 이후 FA-A 환자의 1차 BM 샘플에서, 마지막으로 FA-A 마우스 모델의 생체 내에서 확인하였다.

[0245] 이러한 목적을 위하여, 상이한 프로모터: vav, PGK, CMV 및 SFFV 프로모터의 조절하에 FANCA를 발현하는 LV를 제작하였다. 도 1은 의료용 산물의 개략도이다. 도 2A는 다른 내부 프로모터의 조절 하에 있는 FANCA를 발현하는 LV의 개략적인 모식도를 도시한다. 또한 본 발명자들은 FANCA의 발현 수준과 LV의 치료 효능 모두에서 전사-후 WPRE 요소의 영향을 조사했다. 처음에는 모든 LV가 키메라 GALV-TR 외피로 패키징되었다. $1-2 \times 10^6$ tu/ml의 역가가 통상적으로 얻어졌으며, 1-2 tu/세포의 추정 MOI로 형질도입이 수행되었다. 도 2B는 형질도입된 FA-A 쥐의 세포에서 FANCA의 웨스턴 블롯 분석을 도시한다.

[0246] 각 벡터에 의해 부여된 FANCA mRNA의 수준을 결정하기 위해, 형질도입된 FA-A 림프구 세포주(LCL)를 30 nM의 MMC로 5일 동안 선별하였다. 선별 과정 후, 형질도입된 FA-A LCL은 세포 당 각각의 LV를 0.81 내지 3.04 카피로 함유하였다 (표 1). 건강한 공여자(HD)의 EGFP-LVs와 LCLs로 형질도입된 선별되지 않은 FA-A LCL을 대조군으로 사용하였다.

[0247] LV 카피 수 당 상대적인 FANCA mRNA 수준뿐 만 아니라 총 FANCA mRNA 수준을 상이한 LV로 형질도입된 LCL에서 결정하였다 (표 1). HD LCL에서 관찰된 FANCA mRNA 수준과 비교하여, vav-FANCA 및 PGK-FANCA LV로 형질도입된 FA-A 세포에서 유사한 수준의 FANCA mRNA/카피가 관찰되었다. CMV-FANCA 및 보다 유의미하게 SFFV-FANCA LV는 초-생리학적인 수준의 FANCA mRNA/카피를 부여했다 (각각 3.6배, 5.6배). WPRE 또는 돌연변이된 WPRE* 서열을 포함하는 PGK-FANCA LV(Schambach *et al.*, 2006)는 WPRE 부재의 PGK-LV와 비교하여 FANCA mRNA 수준을 2.3-2.6배 증가시켰다. 다른 연구들과 일치하고(Schambach *et al.*, 2006; Zanta-Boussif MA, Charrier S, Brice-Ouzet A *et al.*. Validation of a Mutated Pre Sequence Allowing High and Sustained Transgene Expression While Abrogating WHV-X Protein Synthesis: Application to the Gene Therapy of WAS. *Gene Ther.* 2009;16:605-619; Zufferey R, Donello JE, Trono D, Hope TJ. Woodchuck Hepatitis Virus Posttranscriptional Regulatory Element Enhances Expression of Transgenes Delivered by Retroviral Vectors. *J Virol.* 1999; 73: 2886-2892), WPRE 또는 WPRE* 서열의 삽입은 PGK-FANCA LV로 형질도입된 세포에서 FANCA mRNA 수준을 상당히 증가시켰다. 야생형 WPRE 요소는 종양발생(tumorigenic) 효과를 매개할 수 있는 C형 간염 바이러스 X 단백질의 절두된 버전을 암호화하기 때문에(Bouchard MJ, Schneider RJ. The Enigmatic X Gene Of Hepatitis B Virus. *J Virol.* 2004; 78: 12725-12734.2004; Kingsman SM, Mitrophanous K, Olsen JC. Potential Oncogene Activity of the Woodchuck Hepatitis Post-Transcriptional Regulatory Element (WPRE). *Gene Ther.* 2005; 12: 3-4), 임의의 잔여 오픈 리딩 프레임이 없는 돌연변이된 WPRE*서열을 가진 LV(Schambach *et al.*, 2006)는 임상적으로 사용하기에 더 적합한 것으로 여겨진다.

표 1. FANCA-발현 렌티바이러스 벡터로 형질감염된 FA-A LCLS에서의 FANCA 발현 수준.

세포 공여자	렌티바이러스 벡터	FANCA 카피/세포	mRNA		단백질	
			총 FANCA	FANCA/ 카피	총 FANCA	FANCA/ 카피
HD	-	2*	1	0.5	1	0.5
FA-A	SFFV-I-EGFP	0	0.27 ± 0.03	-	-	-
FA-A	VAV-FANCA-WPRE	1.1 ± 0.33	0.51 ± 0.01	0.57 ± 0.20	0.75	0.59
FA-A	PGK-FANCA	3.04 ± 1.36	1.92 ± 1.32	0.54 ± 0.19	1.3 ± 0	0.53 ± 0.24
FA-A	PGK-FANCA-WPRE	3.01 ± 0.30	3.91 ± 2.19	1.24 ± 0.60	1.74 ± 0.26	0.57 ± 0.03
FA-A	PGK-FANCA-WPRE *	1.52 ± 0.05	2.20 ± 0.70	1.43 ± 0.41	1.7	0.54
FA-A	CMV-FANCA-I-EGFP	1.4 ± 0.28	2.42 ± 0.06	1.8 ± 0.41	0.96	0.58
FA-A	SFFV-FANCA-I-EGFP	0.81 ± 0.18	2.13 ± 0.26	2.78 ± 0.36	1.6	1.7

FANCA 사본 당 FANCA mRNA와 FANCA 단백질의 수준을 추정하기 위해, 건강한 공여자 LCL에서 게놈 FANCA 2 카피가 고려되었다.

FANCA mRNA 발현의 차이가 단백질 수준에서 확인되었는지를 시험하기 위해, 웨스턴 블롯 분석 (도 2B)을 표 1에 제시된 샘플을 사용하여 수행하였다. FANCA mRNA 결정으로 수행되었기 때문에, FANCA 단백질 값은 단백질 로딩뿐만 아니라 각각의 형질도입된 FA-LCL에서 결정된 프로바이러스 카피 수와 관련이 있었다. HD-LCL에서 결정된 FANCA 수준/사본과 비교하여 SFFV-FANCA LV를 제외하고 모든 시험된 FANCA-LV에 의해 본질적으로 정상 수준의 FANCA/카피가 부여되었다. 이 경우 상대적인 FANCA 수준/사본은 HD-LCL에서 결정된 수준보다 3.4배 더 높았다. 항-FANCD2로 제-염색된 웨스턴 블롯에 따르면 대조군 벡터로 형질감염된 FA-A LCL은 FANCD2를 모노-유비퀴틴화할 수 없었으나, FANCA-LVs의 어느 한 유형으로 형질도입된 FA-A LCLs는 비-유비퀴틴화 뿐만 아니라 모노-유비퀴틴화 형태의 FANCD2를 둘 다 발현했으며, 이는 이러한 세포에서 기능성 FA 경로와 일치한다.

FA-A LCL에서 상이한 LV에 의해 부여된 FANCA 발현 수준을 건강한 공여자 (HD) LCL (FANCA의 2 카피 수)에서 관찰된 것과 비교했을 때, 본 발명자들은 SFFV-LVs의 경우를 제외하고, 세포 당 2개의 LV 카피의 삽입이 치료용 단백질의 생리학적 수준을 초래할 수 있다는 결론을 내렸고, 이는 FANCA의 초-생리학적 수준을 부여할 것이다. 이 카피 수를 달성하는 것은, FA 환자의 BM에 존재하는 전구세포 수가 적기 때문에 적어도 50%의 형질도입 효율이 요구되는 이들 환자의 임상 시험 요건에 부합할 수 있다(Gonzalez-Murillo *et al.*, 2009, Jacome *et al.*, 2006, Kelly *et al.*, 2007; Larghero J, Marolleau JP, Soulier J *et al.* Hematopoietic Progenitor Cell Harvest and Functionality in Fanconi Anemia Patients. Blood. 2002; 100: 3051).

상이한 FANCA-발현 LV의 치료 효능의 가능한 차이를 분석하기 위해, FA-A 림프구 세포주(LCL)의 MMC-과민성을 교정하기 위한 각각의 벡터의 효율을 측정하였다. 이 목적을 위해, FA-A LCL은 상이한 LV (도 3A)로 형질도입된 다음 증가하는 농도의 MMC에 노출되었다. 그 후, 형질도입된 세포의 생존력을 측정하였다. 도 3A에 도시된 바와 같이, 시험된 모든 FANCA-LV는 FA-A LCL의 과민성을 복구시키는데 동일하게 효율적이었다. 유사하게, 모든 벡터는 어느 하나의 FANCA-LV로 형질도입된 FA-A 세포에서의 기능적 FA 경로와 일치하게, MMC-처리된 세포에서 핵 FANCD2 병소의 생성을 촉진하였다 (도 3B).

실시예 2: 마우스 모델 연구

유전적으로 교정되거나 되지 않은, FA 환자의 BM 샘플의 재증식(repopulating) 특성을 평가하기 위해, 몇몇 그룹은 FA 환자의 BM 세포를 면역-결핍 마우스에 이식하였다. 그럼에도 불구하고, 어떤 경우에도 유의미한 생착이 보고되지 않았는데, 이는 아마도 이들 환자의 BM에 존재하는 조혈 전구세포 및 HSC의 수가 감소했기 때문인 것으로 보인다.

의약품의 생체 내 효과를 평가하기 위하여, Fanca 유전자에 결실을 함유하는 FA-A의 마우스 모델을 사용하였다. FA 환자와는 달리, 이 동물들은 명백한 혈액학적 결함이 발병하지 않는다. 그럼에도 불구하고, 그들의 BM 전구세포는 FA 환자와와 같이, MMC에 매우 민감하다(Rio *et al.*, 2002). 따라서, FANCA LV (도 4A)가 생체 내에서

FA-A 마우스로부터의 HSC의 표현형을 안정적으로 교정하였는지를 결정하기 위해, FA-A 마우스로부터의 BM 세포를 FANCA LV로 형질전환시킨 다음, 조사된 FA-A 수용자에게 이식 하였다 (도 4B). 유전학적으로-교정된 세포의 이식 후에 조혈 전구세포의 표현형이 교정되었는지 여부를 평가하기 위해, 이식된 FA-A 마우스로부터의 BM 샘플을 MMC의 부재 및 존재 하에서 메틸셀룰로오스 중에 배양하였다 (도 4C). 치료 카세트의 통합을 확인하는 추가 데이터가 도 42-44에 제시되어 있다. 선형 증폭 매개(Linear Amplification Mediated (LAM)) PCR은 상이한 통합 벡터의 게놈 내로의 통합 부위를 검색하는 방법이다. 벡터의 알려진 서열로부터 시작하여 알려지지 않은 인접 게놈을 통해 연장되는 PCR 산물을 생성하고 염기 서열을 결정하여 벡터 통합의 게놈 내의 위치를 확인한다. 도 42는 FA 조혈 줄기세포(HSC) 내 FANCA-LV 삽입 부위의 LAM-PCR 분석을 나타낸다. 도 43은 FANCA-LV 처리된 세포를 추적하기 위한 LAM-PCR 결과를 묘사한다. 도 44는 LV-교정된 HSC로 이식된 Fanca-/- 수여자들의 클론 다양성을 도시한다.

[0257] 이식-후 1개월 후에, 정상적인 혈액학적 수치가 이들 동물에서 관찰되어, LV는 명백한 독성을 나타내지 않았다. 이 시점에서, 세포 당 프로바이러스 FANCA 카피 수는 0.5에서 10 카피/세포 사이에서 다양했다 (이식-후 3개월과 6개월에서 비슷한 결과가 관찰되었다) (도 5). 유전자-교정된 세포의 이식 후 조혈 전구세포의 표현형이 교정되었는지 여부를 평가하기 위해, 이식된 FA-A 마우스의 BM 샘플을 MMC 부재 및 존재 하에서 메틸셀룰로오스 중에 배양하였다.

[0258] 도 6에 나타난 바와 같이, SF1-EGFP LV 대조군과 비교하여 FANCA LV로 유전자 치료를 실시한 FA 마우스의 조혈 전구세포에서 MMC-과민성의 유의미한 교정이 관찰되었다. FA-A 골수(BM) 세포를 PGK_FANCA-WPRE* 또는 대조군 SF1-EGFP LV로 형질도입하고 방사선 조사된 FA-A 마우스에 이식하였다. 이식-후 7 개월째에 BM 샘플을 채취하고 농도를 점점 증가시킨 마이토마이신C(MMC)의 존재 하에서 메틸셀룰로스 중에 배양하였다.

[0259] 따라서, 이들 데이터는 FANCA LV가 생체 내 이식 후에 FA-A 마우스로부터 조혈 전구세포의 표현형을 복귀시킬 수 있음을 나타낸다. 안전성 측면에서, 이전에 FANCA LV로 형질도입된 BM 세포를 이식한 30마리의 생쥐 중 어느 하나도 골수 증식성 장애 또는 백혈병의 증상이 나타나지 않았다 (이식-후 1 년까지의 데이터).

[0260] 실시예 3: 렌티바이러스 벡터를 이용한 FA 환자로부터 얻은 신선한 조혈 전구세포의 효율적인 형질도입

[0261] 동결보존된 FA 조혈 줄기세포 (HSC)의 형질도입이 신선한 이식편의 형질도입과 비교하여 덜 효과적이었던 것으로 나타났기 때문에(Jacome et al., 2009), 동결보존된 FA BM 샘플의 형질도입의 효율을 최적화하기 위한 노력에 착수했다. 도 7에 나타난 바와 같이, 3회의 형질도입 사이클의 수행은 단일 형질도입 사이클 후에 얻어진 값과 비교하여 FA CFCs의 형질도입 효율을 상당히 증가시켰다(각각 $45.7 \pm 4.2 \%$ 대 $13.5 \pm 5.1 \%$). 2시간의 정적인 프리로딩(preloading) 이후의 단일 형질도입 사이클(16 시간)을 포함하는 표준 형질도입 (흰색 막대; 1xS) 또는 렌티바이러스 벡터를 이용한 3 회의 형질도입 사이클(2시간+2시간+12시간)로 이루어진 향상된 형질도입 (회색 막대; 3xD)에 적응하였다.

[0262] 실시예 4: PGK-FANCA-WPRE* 렌티바이러스 벡터는 FA-A 환자의 골수 전구세포의 표현형을 효율적으로 교정함

[0263] FANCA가 PGK 프로모터에 의해 유도되는 LV의 효능으로 인해, 그리고 안정성(Follenzi A et al. Nat Genet.2000; 25: 217-222) 및 PGK 프로모터를 운반하는 LV의 낮은 유전독성 특성(Modlich et al., 2009, Montini et al., 2006, Montini et al., 2009)을 나타내는 이전의 연구를 토대로, 추가 실험은 LCLs 및 또한 FA-A 환자의 골수 세포에서 어떤 WPRE 요소도 없거나 또는 WPRE 또는 WPRE* 서열을 포함하지 않는 PGK-FANCA LVs를 사용하여 수행되었다. 도 8A에 나타난 바와 같이, 이들 3가지 벡터 모두 MMC에 대한 FA-A LCL의 과민성에서 동일한 복귀를 부여하였다.

[0264] FA-A 환자로부터의 조혈 전구세포의 표현형을 교정하기 위한 SFFV-FANCA 및 PGK-FANCA LV의 효능을 비교하기 위해, FA-A 환자로부터의 적혈구-고갈된 BM 샘플을 최근에 기술된 바와 같이 형질도입시켰다(Jacome et al. 2009). 적혈구가 고갈된 BM 세포는 최근에 기술된 바와 같이 LV 상등액이 프리로딩된 플레이트에서 16시간 동안 형질도입되었다(Gonzalez-Murillo et al., 2009). 14일 후, 10 nM MMC가 부재 및 존재하에서 성장한 콜로니의 수를 기록하여 약물내 내성이 생긴 전구세포의 비율을 결정하였다.

[0265] 도 8B에 도시된 바와 같이, 샘플을 EGFP-LV로 형질도입하는 경우, MMC의 존재 하에서는 거의 콜로니가 생성되지 않았다. 이 관찰과는 대조적으로, FA-A BM 세포의 SFFV-FANCA 및 PGK-FANCA LVs로의 형질도입은 MMC가 없는 배양에서 기록된 콜로니의 26 및 38%의 성장을 허용했다. WPRE 및 WPRE* 서열을 포함하는 PGK-FANCA LV의 효능을 WPRE가 없는 PGK-FANCA LV와 비교하였다. 도 8B에 도시된 바와 같이, 3개의 LV는 모두 MMC에 대해 유사하고 높은 수준의 보호를 매개하였다. 비록 전사 후 조절 요소 WPRE*(Schambach et al., 2006)의 삽입이 PGK-FANCA LV

의 효능을 향상시키는데 필수적인 것은 아니지만, 이 요소는 환자의 이소성 FANCA의 장기적인 치료 수준을 유지하기 위한 여분의 요소를 제공할 것이다.

- [0266] 종합하여 볼 때, 이들 연구에서 얻어진 데이터는 PGK-FANCA-WPRE * LV가 FA-A 환자의 조혈적 표현형을 교정하기에 충분한 수준의 FANCA 발현을 제공함을 강력하게 시사한다. 이러한 결과는, PGK-LVs의 안정성(Follenzi *et al.*, 2000) 및 안전성 특성(Modlich *et al.*, 2009, Montini *et al.*, 2006, Montini *et al.*, 2009), 돌연변이된 WPRE* 전사-후 요소의 효능(Schambach *et al.*, 2006)을 보여주는 이전의 관찰과 함께, PGK-FANCA-WPRE* LV가 FA-A 환자의 유전자 치료를 위한 효율적이고 안전한 벡터를 구성할 수 있다는 가설을 강화시킨다.
- [0267] 실시예 5: FA 환자에서 조혈 전구세포를 형질도입하기 위한 GALV-TR 및 VSV-G 패키징된 렌티바이러스 벡터의 효능 분석
- [0268] LV가 GALV-TR 및 VSV-G 외피 모두에 의해 슈도타입화(pseudotyped) 될 수 있기 때문에, FA 환자의 비선택된 골수 세포를 EIFFP-LV가 2개의 외피로 슈도타입된 최적 조건 하에서 형질전환시키는 새로운 실험이 수행되었다.
- [0269] GALV-TR 슈도타입된 LV의 경우, 비-집중 LV (추정 역가: 2×10^5 IU/mL; 추정 MOI: 2IU/세포)를 이용한 2회의 형질도입 사이클을 수행하였다.
- [0270] VSV-G 슈도타입된 LV의 경우, 농축되고 정제된 LV (추정 역가: 10^8 IU/mL; 추정 MOI: 50IU/세포)를 이용한 1회의 형질도입 사이클.
- [0271] 도 9에 나타난 바와 같이, 두 조건 모두에서 FA 환자로부터의 조혈 전구세포의 유사한 형질도입이 얻어졌으며, 이는 제조상의 타협이 패키징을 위한 최상의 외피를 결정할 수 있음을 나타낸다.
- [0272] 실시예 6: 안정성 연구
- [0273] 도 10A에 나타난 렌티바이러스 벡터의 형질전환 능력을 카피 수에 대한 재도말(replating) 빈도로 측정하였다. 도 10B에 나타난 바와 같이, PGK-FANCA-WPRE* LV (PGK 유래 렌티바이러스 벡터)에 상응하는 렌티바이러스 골격의 형질전환 능력은, 이미 X1-SCID 및 CGD 임상 시험에 사용되는 벡터인, 바이러스 프로모터를 보유하는 벡터의 형질전환 능력에 비해 현저히 낮다.
- [0274] PGK-FANCA-WPRE* LV로 형질도입된 BM 세포를 이식한 쥐에 대한 생체 내 연구와 관련하여, 30 마리의 쥐가 이식되었으며, 지금까지 (이식 후 1년까지) 이식된 동물 중 어느 것도 골수중식성 장애 또는 백혈병의 증상을 나타내지 않았다.
- [0275] 실시예 7: 약학적 산물
- [0276] FANCA 렌티바이러스 벡터는 인간 PGC 프로모터의 조절 하에 인간 FANCA cDNA를 암호화하고 X 단백질 ORF가 결핍된 돌연변이된 WPRE에 의해 전사-후 수준에서 조절되는 제3 세대 자가-불활성화 rHIV1 유래 벡터이다 (도 1, 도 41 및 서열번호: 24). 이러한 FANCA 렌티바이러스 벡터는 FA 유전자 치료에서 이전에 사용된 감마-레트로바이러스 벡터에 비해 몇 가지 이점, 특히 짧은 사전-활성화 프로토콜에도 불구하고 세포를 형질도입하는 능력을 제공하는데, 이는 조혈 줄기세포의 다-계통 잠재력을 보존하는데 유리하다.
- [0277] 치료용 렌티바이러스 벡터를 생성하기 위해, 벡터 패키징을 위해 필요한 모든 헬퍼 단백질을 제공하는 (도 38-40 참조), 3개의 추가 플라스미드로 형질감염된 293T 세포는 PGK-FANCA -WPRE* 의약품을 포함할 것이다 (도 41).
- [0278] PGK-FANCA-WPRE* LV 치료용 카세트는 인간 PGC 프로모터, FANCA cDNA의 암호화 서열 및 WPRE* 인핸서를 포함하고 서열번호: 24의 뉴클레오타이드 3541 내지 9178을 포함한다. 인간 CMV 즉시 초기 프로모터, HIV 패키징 서열, ga 및 RRE 요소, 치료용 카세트, 및 HIV 자가-비활성화 3' LTR을 포함하고, 상기 치료용 카세트가 인간 PGC프로모터, FANCA cDNA 암호화 서열 및 WPRE* 인핸서를 포함하는 전달카세트 영역은 서열번호: 24의 뉴클레오타이드 1586-9495에 의해 암호화된다.
- [0279] 서열번호: 24의 뉴클레오타이드 1586-1789는 인간 CMV 즉시 초기 프로모터를 포함한다. 서열번호: 24의 뉴클레오타이드 2031-2156은 HIV1 psi 패키징 신호를 포함한다. 서열번호: 24의 뉴클레오타이드 2649-2882는 HIV1 RRE 요소를 포함한다. 서열번호: 24의 뉴클레오타이드 3378-3495는 HIV cPPT/CTS 요소를 포함한다. 서열번호: 24의 뉴클레오타이드 3541-4051은 hPGK 프로모터를 포함한다. 서열번호: 24의 뉴클레오타이드 4078-8445는 인간 FANCA-A cDNA를 포함한다. 서열번호: 24의 뉴클레오타이드 8502-9178은 돌연변이된 WPRE 요소를 포함한다. 서열번호: 24의 뉴

클레오티드 9262-9495는 HIV 델타 U 3' LTR을 포함한다.

[0280] 실시예 8: FANCOSTEM 임상 연구

[0281] 미국에서는 FA-A 및 FA-C 환자에서 두 가지 유전자 치료 시험이 수행되었으나 임상적으로 효과가 없었다(Liu, J. M., et al. (1999). Engraftment of hematopoietic progenitor cells transduced with the Fanconi anaemia group C gene (FANCC). *Hum. Gene Ther.* 10: 2337-2346; Kelly, P. F., et al. (2007). Stem cell collection and gene transfer in fanconi anaemia. *Mol Ther* 15: 211-219). 다양한 최적화를 통해 전술한 시험의 효능이 크게 향상될 수 있다. 향후 임상 사용을 위해 충분한 수의 CD34+ 세포를 수집하고 정제하는 과정(FANCOSTEM)의 타당성을 결정하고, 이와 병행하여 보체군 A의 FA를 가진 환자(FA-A)에서 유전자 치료의 안전성과 효능을 평가(FANCOLEN)하기 위해 2건의 임상 시험을 동시에 수행하였다. **도 11** 참조.

[0282] FANCOSTEM의 주요 포함 기준은 AF의 진단을 받았고, 디에폭시부탄 또는 마이토마이신 C를 이용한 염색체 불안정성 테스트, 연령이 1세 초과인 환자였고, 다음 매개변수들 중 적어도 하나는 다음 보다 높아야 한다: 1) 헤모글로빈: 8.0 g/dL, 2) 호중구: 750/mm³, 3) 혈소판: 30,000/mm³. 10명의 환자가 모집되었고, 9명이 선별되었으며 2명이 실패(모자이크 환자)했다. **도 12**는 모집한 환자의 혈액학적 지표를 보여준다. 7명의 환자가 G-CSF와 플레릭사포르로 처리되었다. 동원 요법은 G-CSF (뉴포젠(neupogen); 12 µg/Kg/12 시간) 및 플레릭사포르(모조빌(mozobil); 240 µg/kg 체중/일)의 투여를 이용했다. 동원된 말초 혈액(mPB) CD34+ 세포를 단기간의 생체 외 형질도입 프로토콜 (**도 13**)을 사용하여 PGK-FANCA-WPRE* LV로 GMP 조건 하에서 형질도입시켰다. 15세와 16세인 2명의 환자는 말초 혈액에서 CD34+ 세포의 수준이 역치 수준에 도달하지 못했지만 3-5세 사이의 5명의 환자에서 성분채집술(apheresis)을 시행할 수 있었다. 이 환자들에서 CD34+ 세포/kg의 중간값은 6.6x10⁶ (범위: 1.6x10⁶에서 7.6x10⁶)였다. CD34+ 세포 선별 후, CD34+ 세포/kg은 2.0x10⁶ (범위: 8.5x10⁵ 및 5.1x10⁶)였다. 동원 요법과 관련된 심각한 부작용은 치료받은 환자에서 2.5년까지 검출되지 않았다.

[0283] **도 14**는 FA-A환자에서 G-CSF/플레릭사포르-매개 CD34+의 동원을 도시하며 **도 15**는 FA-A환자에서 G-CSF/플레릭사포르-매개 콜로니 형성 세포(CFC)의 동원을 도시한다. **도 16A**는 FANCOSTEM에서의 CD34+ 세포 수집을 도시하며 **도 16B**는 선행 연구들과의 비교를 도시한다.

[0284] **도 17**은 골수(BM)에서 예측된 CD34+ 세포 수 대 실제로 동원된 말초 혈액(mPB)내 실제 수를 비교하여 도시한다. **도 18**은 G-CSF/플레릭사포르로 동원된 FA-A 환자에서 CD34⁺ 세포 수집물에 관한 요약이다. 선별 후의 CD34+ 수는 0일째 BM에서의 CD34⁺ 세포/µl와 상관관계가 있다(데이터는 도시되지 않음).

[0285] **도 19**는 건강한 기증자(HD) 및 FA 환자로부터의 mPB CD34+ 세포의 면역선택 전 및 후의 CD34 발현을 도시한다.

[0286] 이들 데이터로부터, 다른 임상 연구와 비교하여, 지금까지 필그라스티프(G-CSF)과 플레릭사포르로 처리된 환자에서의 CD34+ 세포의 수집에서 명백한 개선이 관찰되었으며, 병의 초기 단계의 FA 환자만이 임상적으로 관련된 수의 HSC의 수집에 적합한 것으로 결론지었다.

[0287] 실시예 9: FANCOLEN 임상 연구

[0288] 두번째 병행 임상 시험(FANCOLEN)은 FA 보체군A (FA-A) 환자에서 유전자 치료의 안전성 및 효능을 평가하는 것을 목적으로 하였다(FANCOLEN). 유전자 교정된 자가 HSC를 주입하여 FA 환자의 조혈을 회복시키기 위해, 최적화된 벡터와 형질도입 프로토콜을 개발하였다. 특히, 이는 판코니 빈혈 아형 A 환자의 FANCA 유전자 (희귀 의약품(Orphan drug))를 운반하는 렌티바이러스 벡터로 형질도입된 자가 CD34+ 세포 주입의 안전성과 효능을 평가하기 위한 I/II기 임상 시험이었다.

[0289] 주요 포함 기준은 FA-A로 진단된, 연령> 1세의 환자였고, 다음 매개변수 중 적어도 하나는 역치 이하이어야 한다: 1) 헤모글로빈: 8.0 g/dL; 2) 호중구: 1,000/mm³; 3) 혈소판: 50,000/mm³.

[0290] 보다 구체적인 대상 포함 기준은 다음을 포함한다: 1) 보체군 FA-A의 환자; 2) 다음 매개변수 중 하나 이상이 표시된 값 미만이어야 함: 헤모글로빈: 8.0 g/dL; 호중구: 750/mm³; 혈소판: 30,000/mm³; 3) 최소 연령: 1세; 4) 최대 연령: 21 세; 5) 란스키 색인(Lasnky index)> 60% 6) 경미한 장기 기능장애; 7) 현행법에 따라 정보에 근거한 동의 제공; 8) 세포 수: 적어도 3x10⁵ 정제된 CD34+ 세포/환자 체중 kg; 9) 가임기 여성들은 기준선 방문 시에 소변 임신 검사가 음성이어야 하고, 시험에 참여하는 동안 효과적인 피임법의 사용을 수용해야 함.

[0291] 대상 제외 기준은 다음을 포함한다: 1) HLA-동일 가족 공여자를 갖는 환자; 2) 골수이형성 증후군 또는 백혈병

의 징후, 또는 골수 흡인 분석에서 이러한 상태를 예측하는 세포 유전학적 이상. 이 평가는 환자가 임상 시험에 진입하기 2개월 전에 유효한 연구를 통해 이루어져야 함; 3) 환자가 개선된 혈액학으로 체세포 모자이크현상 (mosaicism)의 징후를 가지고 있다는 증거; 4) 조사자의 의견으로, 피험자가 연구에 참가하기에 적합하지 않다고 간주되는, 수반되는 질병이나 상태; 5) 국가 암 협회(National Cancer Institute, NCI)의 기준에 따라 ≥ 2 등급인 기존의 감각 장애 또는 운동 장애; 6) 임신 또는 모유수유 여성.

[0292] 투여 경로: 환자는 정맥 내 주입에 의해 치료용 벡터로 형질도입된 세포를 투여 받았다.

[0293] 세포의 투여량: 수혈에 의해 투여된 환자의 세포량은 3×10^5 내지 4×10^6 의 정제된 CD34⁺ 세포/환자 체중 kg의 형질전환으로부터 수득된 것이었다.

[0294] 특히 이 임상 시험이 비-조건화 환자에게 많은 환자에게 주입될 것을 고려하면 3×10^5 CD34⁺ 세포/Kg 미만은 형질도입된 세포로부터 환자 이식편을 생산할 가능성이 매우 낮다. Williams 박사(Kelly et al., 2007)에 의해 수행된 판코니 빈혈 환자의 유전자 치료 시험에서 2명의 환자 (FAAGT1001 및 1003)에 주입된 세포의 수는 각각 환자 체중 kg 당 4.5×10^5 및 3.25×10^5 의 유핵 세포였다. 두 환자 모두에서, Hb와 혈소판 수가 일시적으로 개선되었지만, 전이유전자의 관련 존재를 입증할 수는 없었다. 세포가 감마-레트로바이러스 벡터로 4일 동안 형질도입되었던 Williams 박사의 시험과는 달리, 이 임상 시험에서 세포는 보다 효과적인 렌티바이러스 벡터로 형질도입되었고, 형질도입은 최대 48시간 동안, 즉 이전 프로토콜에서 사용된 4일보다 더 짧게 수행될 것이다. 이를 감안할 때, 본 발명자들은 환자 체중 kg 당 3×10^5 의 정제된 CD34⁺ 세포를 이 시험의 합리적인 하한선으로 간주했다.

[0295] 세포의 수가 더 많을수록 이식 가능성을 증가시키기 때문에, 4×10^6 정제된 CD34⁺ 세포/kg의 상한선은 주입되는 세포의 수를 제한할 필요성에 기초하지 않는다. 오히려 환자의 체중 kg 당 4×10^6 정제된 CD34⁺ 세포의 제한은 골수에서 CD34⁺ 세포 수가 감소하는 것을 특징으로 하는 판코니 빈혈 환자에게서 이 수치를 초과하는 세포를 동원하고 수집하는 어려움에서 비롯된다(Jacome et al., 2009).

[0296] 투여 요법 : 치료용 벡터로 형질도입된 세포를 환자에게 단일 용량으로 주입하였다. 이것은 두 가지 주된 이유 때문이었다: 1) 지금까지 수행된 모든 조혈 유전자 치료 시험이 형질도입된 세포의 단일 주입을 사용하여 수행되었다(Naldini, 2011). 이 사전 경험에 따라, 본 발명자들은 이 매개변수를 변경하려고 하지 않았다. 2) 모든 형질도입된 세포의 단일 주입은 분획된 동일한 투여량의 주입과 비교하여 더 큰 이식편이 존재할 가능성을 증가시킬 것이다.

[0297] 모집 기간: 환자는 3년의 기간에 걸쳐 모집된다. 아형 FA-A를 가진 환자가 FA 환자 집단에서 가장 빈번하기 때문에 (FA를 가진 스페인 환자의 약 80%가 이 보체군에 해당한다(Casado et al. (2007))), 설계된 치료용 벡터는 *FANCA* 유전자를 운반한다. 그러므로, FA 환자 중 아형 FA-A에 속하는 환자만이 이 연구에 참여할 수 있다. 소아 또는 성인의 이 보체군에 속한 모든 환자는, 이들이 정의된 포함 기준 및 제외 기준을 충족하는 경우, 이 연구에 포함되었다.

[0298] 임상 시험에서 평가될 1 차 및, 만약에 있다면 2 차 변수에 대한 구체적인 설명은 다음을 포함한다: 1) 주요 변수: A) 판코니 빈혈 아형 A 환자에서 치료용 렌티바이러스 벡터로 형질도입된 자가 CD34⁺ 세포의 주입과 관련된 독성의 결정 B) 판코니 빈혈 아형 A를 가진 환자에서 치료용 렌티바이러스 벡터로 형질도입된 자가 CD34⁺ 세포의 주입과 관련된 이식의 정도를 결정. 2) 2 차적 변수: 판코니 빈혈 아형 A를 가진 환자에서 치료용 렌티바이러스 벡터로 형질도입된 자가 CD34⁺ 세포의 주입과 관련된 임상 반응의 결정.

[0299] 판코니 빈혈 아형 A (FA-A)를 가진 환자로부터의 골수 유래 및/또는 말초 혈액 내 동원된 CD34⁺ 세포(신선한 및/또는 동결보존된)를 *FANCA* 유전자 (회귀 의약품)를 운반하는 렌티바이러스 벡터로 생체 외에서 형질도입시켰다 (도 11). 세포 형질도입 후, 환자들은 조혈을 회복시키기 위해 유전적으로 교정된 이들 줄기 세포를 주입 받았다.

[0300] 평가: 치료를 개시하기 전에, 사전에 정보에 입각한 동의를 얻어 환자를 평가 하였다. 표준 신체 검사 (체중과 신장 포함), 말초 혈액 세포 수, 기본적인 생화학, 및 골수 흡인을 통해 유전적으로 교정된 세포가 주입되기 1개월 전에 평가를 실시하였다.

[0301] 유전적으로 교정된 CD34⁺ 세포의 형질도입 및 주입: 정제된 CD34⁺ 세포 집단을 치료용 렌티바이러스 벡터로 생체

외에서 형질도입하였다. 세포 형질도입 후, 제품 품질 관리 평가를 수행하고, 부분 표본을 추후 연구를 위해 동결보존하고, 제품은 환자에게 주입하기 위해 준비되었다.

[0302] 허용가능한 수의 형질전환된 세포 (적어도 시험관 내에서 7일 배양 후 적어도 0.3 카피의 벡터/세포가 검출된 부분 표본에서, 적어도 1백만 개의 주입된 세포/체중 kg)으로 주입된 2명의 환자라고 한다면, 최소한 0.1 카피 벡터/세포는 주입 6개월 후에 골수 또는 말초 혈액에서 관찰되지 않으며, 이후의 환자는 세포 주입 전에 조건화 (conditioning)과정을 거치게 될 것이다.

[0303] 임의의 종류의 조건화에 적절한 환자의 경우, 형질도입된 세포의 조건화 및 가능한 이식 실패와 관련된 골수의 잠재적 무형성을 구제하는 적합한 방법이 있어야 한다. 구제 방법은 일배수동종인(haploidentical) 공여자로부터의 제대혈 또는 조혈 세포의 단위를 포함한다. 세포는 정맥 내로 주입될 것이다.

[0304] 형질도입 과정으로부터 수득된, 주입에 의해 환자에게 투여된 세포의 투여량은 환자 체중의 3×10^5 내지 4×10^6 CD34+ 세포/Kg 사이이다.

[0305] 세포는 단일 용량으로 환자에게 주입된다.

[0306] 형질도입된 세포는 형질도입 과정이 완료되고 즉시 주입되었다.

[0307] 주입된 제품은 CIEMAT의 CLINISTEM GMP 레보러토리에 의한 주입용 멸균 백에 패키징된 CD34+ 세포의 현탁액으로 구성된다.

[0308] 모집 기간: 첫 번째 환자의 주입 이후 3년.

[0309] 추적 관찰 기간: 형질도입된 세포 주입으로부터 2년. 그러나 환자는 임상 시험 밖에서 10년간 모니터링된다.

[0310] 형질도입된 세포 이식편의 모니터링은 말초 혈액 및 골수 샘플에서 수행 될 것이다.

[0311] 주입 후 처음 72시간: 이 기간 동안, 생체 신호를 매 8시간마다 기록하였고, 매 24시간마다 중요한 장기 기능 (전해질 검사, 혈액학, 신장 및 간 기능)을 모니터링 하였다.

[0312] 이후 다음의 점검을 표 2 에 나타난 바와 같이 수행하였다.

[0313] 표 2.

	말초 혈액											
	주:				개월:							
혈액학적 모니터링	2	4	6	-	2	4	6	9	12	15	18	21 24
치료용 벡터의 카피	2	4	6	-	2	4	6	9	12	15	18	21 24
	골수											
	주:				개월:							
세포학	4	-			6			12				24
치료용 벡터의 카피	4	-			6			12				24

[0314]

[0315] FA로 진단되고 보체군FA-A에 속하는 환자가 본 연구에 포함될 것이다. 세포 표현형 교정이 FANCA 유전자를 보유한 벡터로 형질도입에 의해 입증되었거나 이 유전자에서 이중-대립형질(bi-allelic) 병원성 돌연변이가 입증된 경우, 환자가 고려되었다.

[0316] 환자 FA 02005는 도 20에 요약된 바와 같이 FANCOSTEM 및 FANCOLEN에 대한 기준에 부합한다. 도 21은 유전자 치료 전에 환자 FA-02005의 FA 진단을 나타내는 시험을 도시하고, 도 22는 FA-02005 환자에 대한 세포 제조 과정의 후속 조치를 나타낸다. 도 23은 유전자 치료 전 및 유전자 치료 후 2주, 4주, 6주, 2개월, 3개월, 4개월 및 5개월째의 환자 FA02005 벡터 카피 수를 나타낸다. 유전자 치료 전후의 첫 번째 비-조건화 FA-A 환자의 추적

관찰에서, 환자 FA02005 (4세)를 헤모글로빈 (도 24), 호중구 (도 25) 및 혈소판 (도 26)에 대해 표시한다.

[0317] 환자 FA02002의 경우, 혈액학적 진화가 도 27에 제시되고, 진단은 도 28에 나타나며, 세포 제조 과정의 후속조치는 도 29에 나타난다. 도 30은 건강한 공여자 및 FA mPB에서 환자 FA-02002에 대한 LV-형질도입에 필요한 다른 단계 동안 CD34 발현의 분석을 도시한다. 도 31은 유전자 치료 전 및 유전자 치료 후 2주, 4주, 6주째의 환자 FA02002에서 백터 카피 수를 도시한다. 환자 FA02002 (동결보존된 세포가 주입됨)의 추적 관찰은 헤모글로빈 (도 32), 호중구 (도 33) 및 혈소판 (도 34)에 대해 표시된다.

[0318] 이들 2명의 환자에 대한 데이터는 환자에게 상당한 수의 유전자-교정된 동원된 말초 혈액 (mPB) CD34+ 세포가 주입되었다는 결론을 뒷받침한다. 치료된 2명의 환자 중 어느 환자에서도 심각한 부작용이 관찰되지 않았다. GT를 투여한 지 15일 내지 5개월 후에 치료된 환자에서 약 1-5 카피/1000개의 말초 혈액 세포의 유전자 마킹 수준이 검출되었고 시간이 지나면서 완만하게 증가했다. 이 바이러스 카피 수는 이전 시험에서 GT-후 3주 후에 검출된 최고값 (3 카피/10⁵ 세포; Kelly et al. 2007)에 비해 약 100 배 더 높았다.

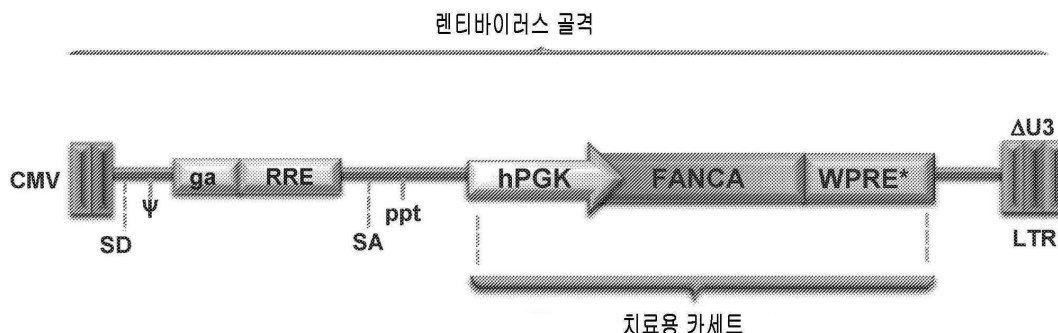
[0319] 실시예 6: FA-A 환자로부터 얻은 신선한 mPB CD34⁺ 세포의 형질도입

[0320] G-CSF/플렉사포르 처방으로 치료된 환자로부터의 동원된 말초 혈액(mPB) CD34+ 샘플의 작은 부분 표본의 치료용 백터를 이용한 단기간의 형질도입은 17 내지 45%의 형질도입 효율을 나타냈다(도 35). 이 샘플의 작은 부분 표본을 1.5Gy로 처리된 NSG 마우스에 이식하였다. 이식된 샘플의 대부분을 NSG 마우스 (BM 세포의 1-10%는 hCD45+/mCD45-였음) 내로 생착시켰다(도 36). 더욱이, 교정된 CD34+FA-A 세포의 명백한 선별 이점이 이식된 쥐에서 관찰되었다(도 37).

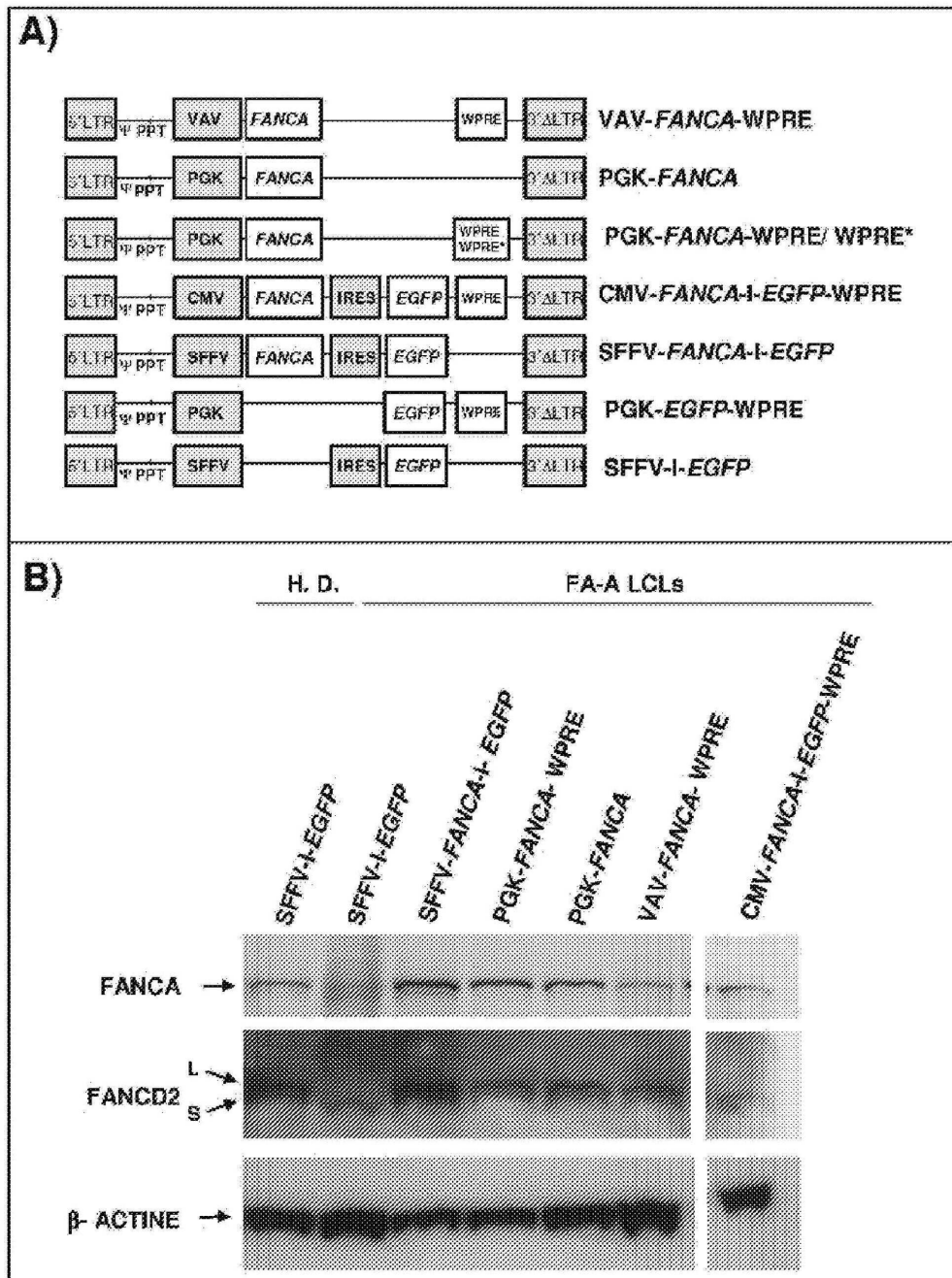
[0321] 이러한 결과는 형질도입된 FA-A mPB CD34+ 세포가 NSG 쥐에 이식되고 NSG 수용자 쥐에서 교정된 인간 FA-A 재증식 세포의 생체 내 증식 이점이 있음을 보여준다.

도면

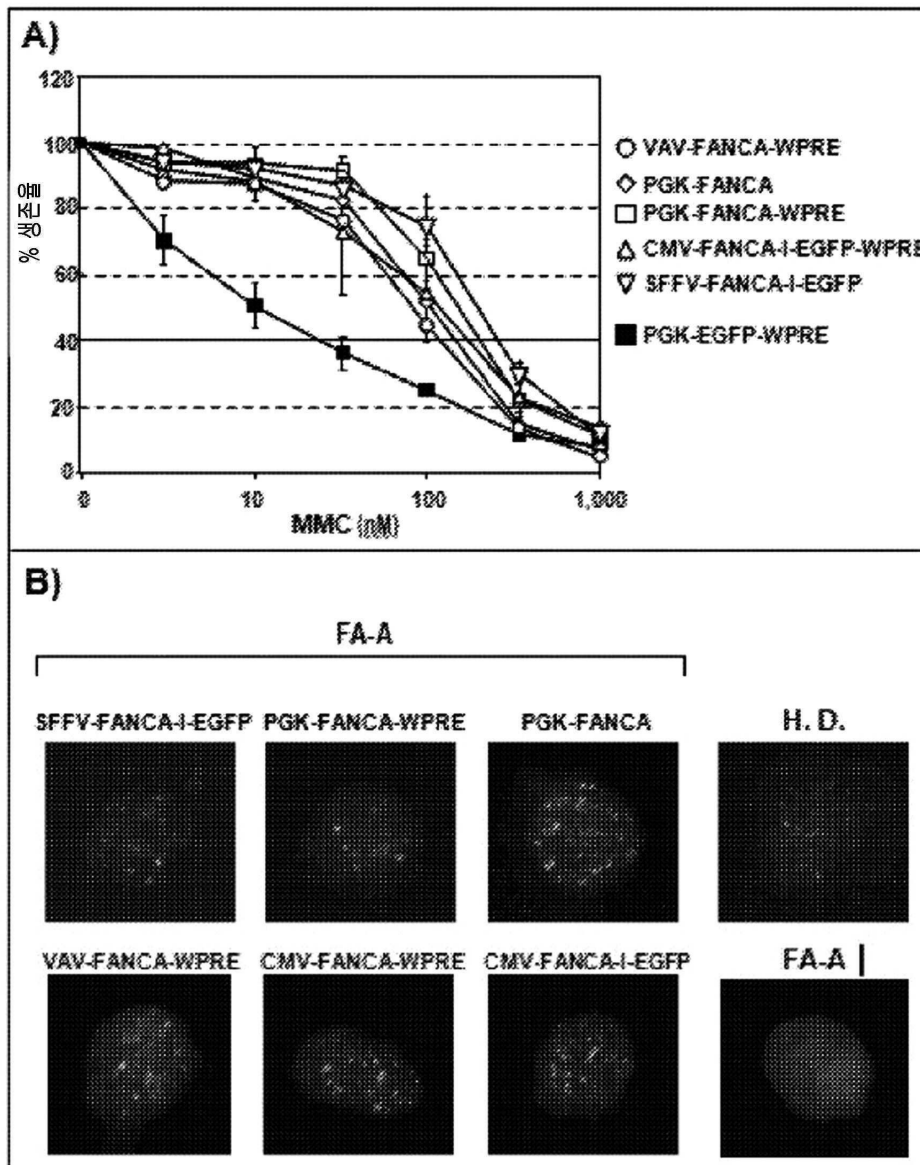
도면1



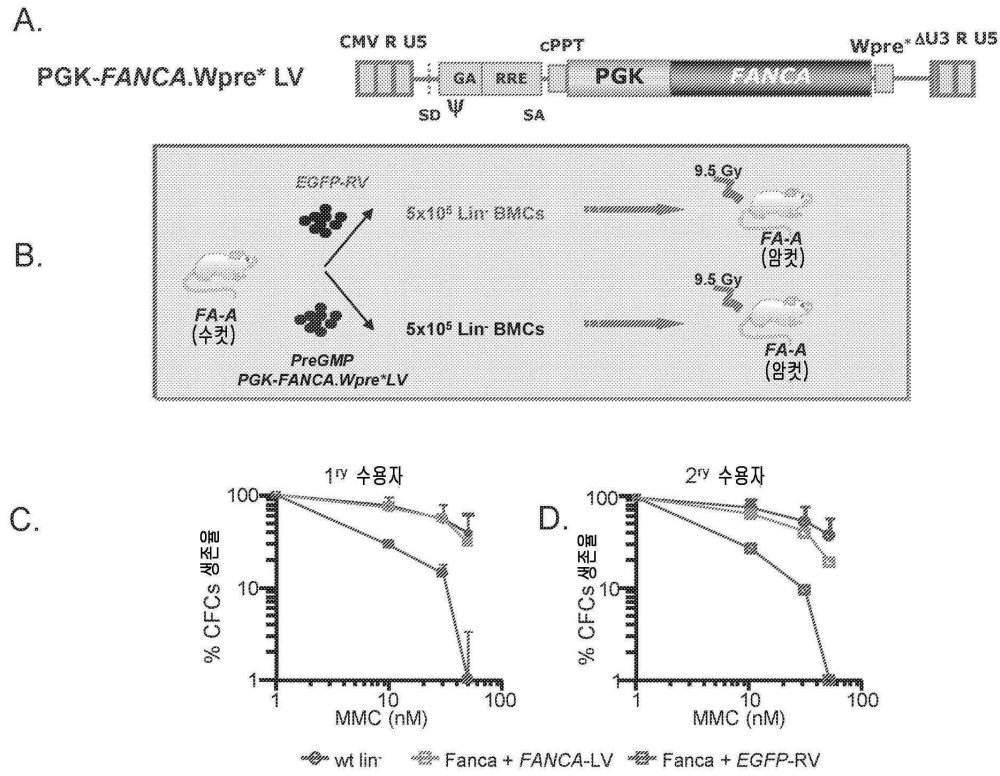
도면2



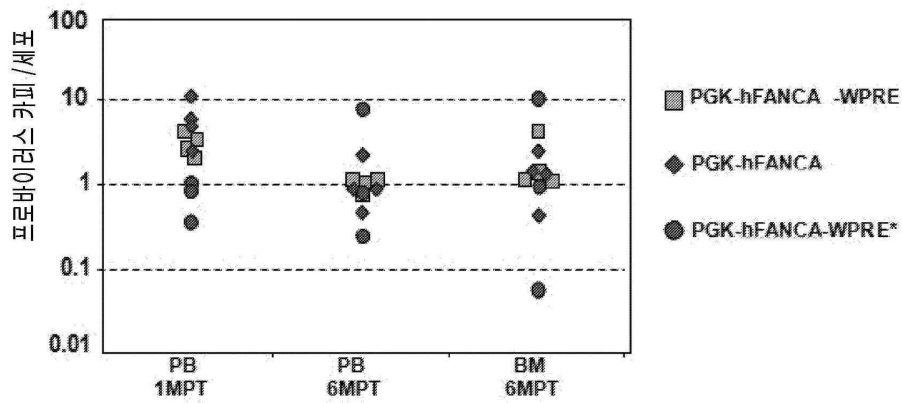
도면3



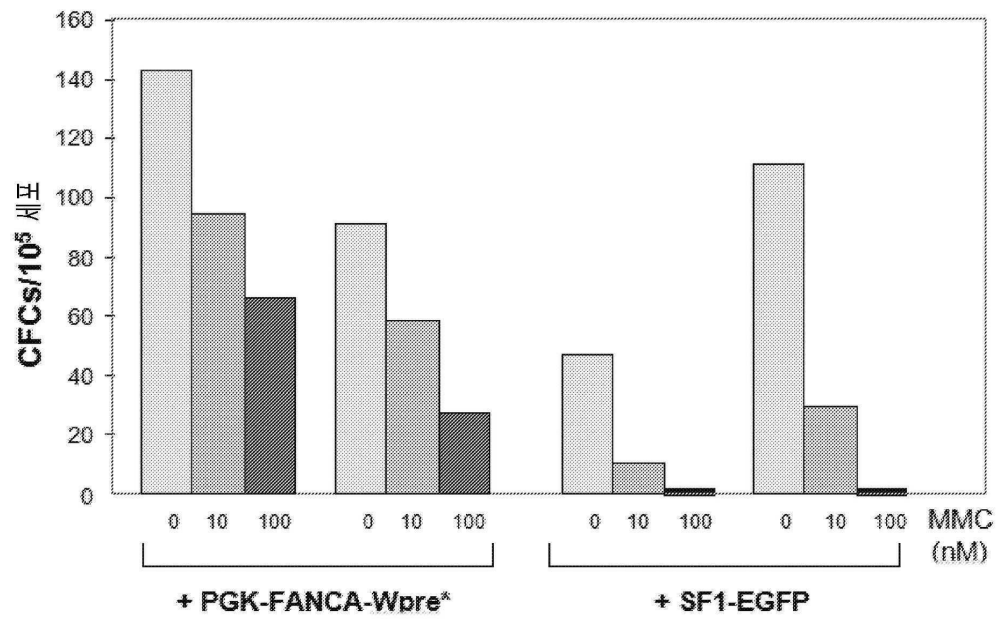
도면4



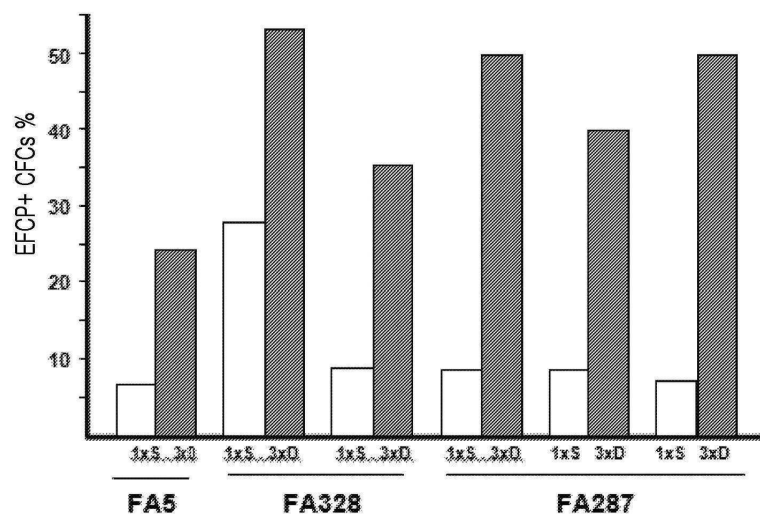
도면5



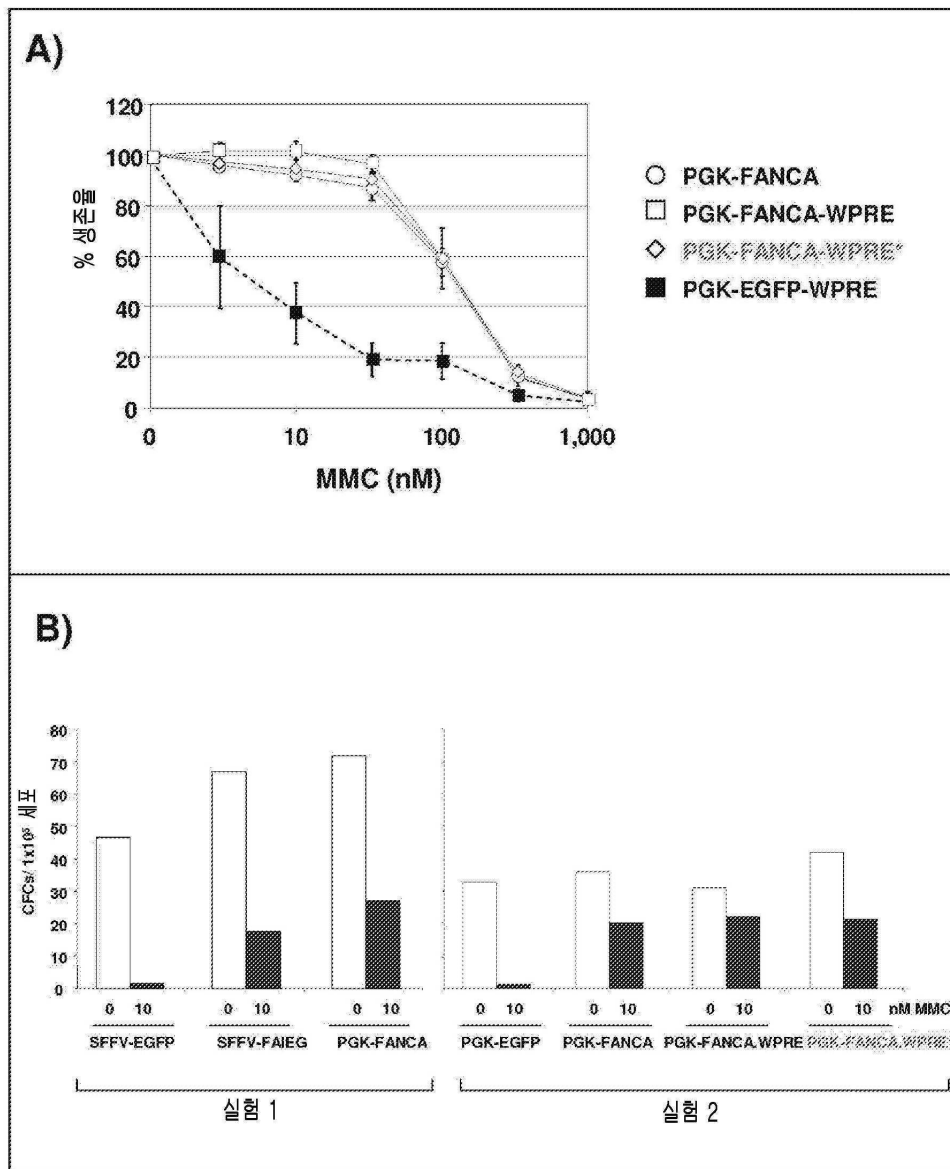
도면6



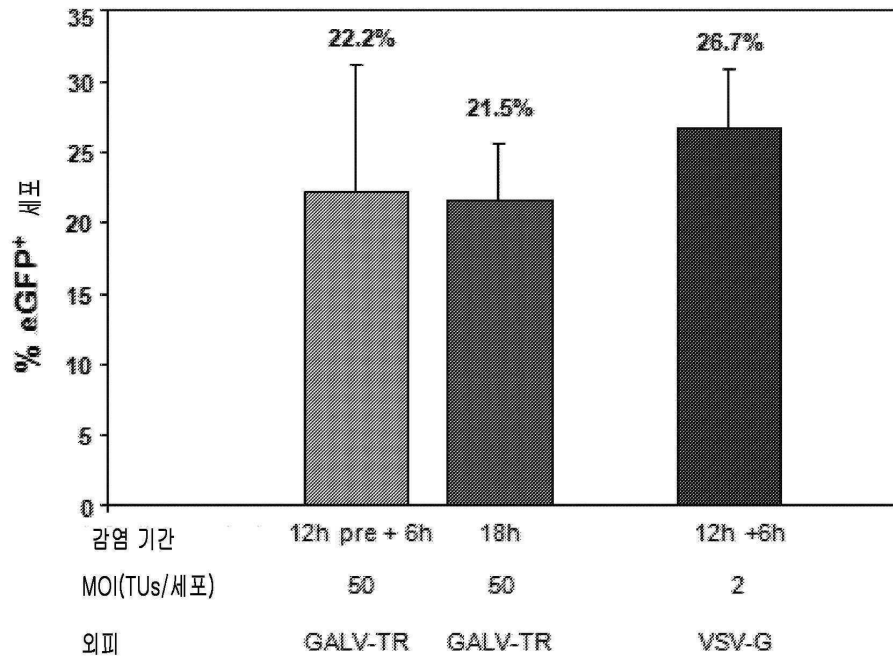
도면7



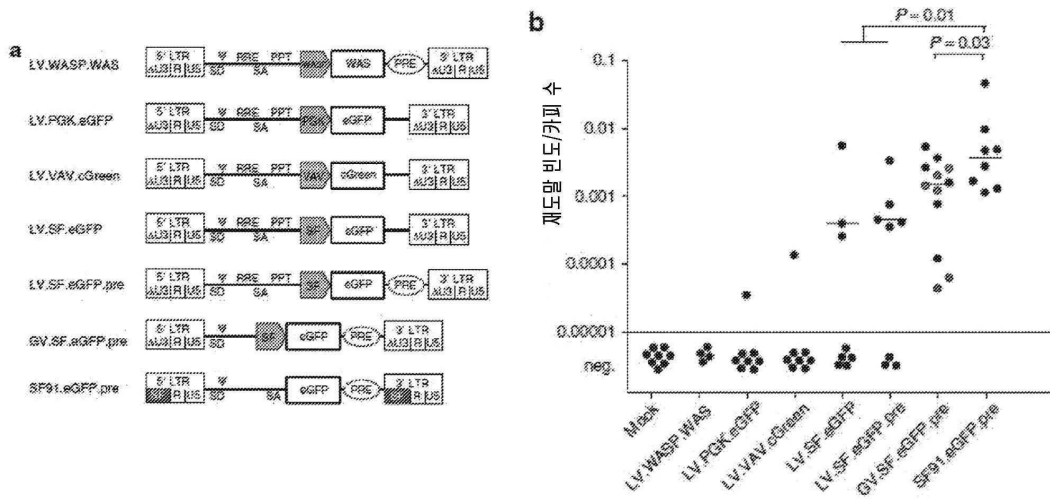
도면8



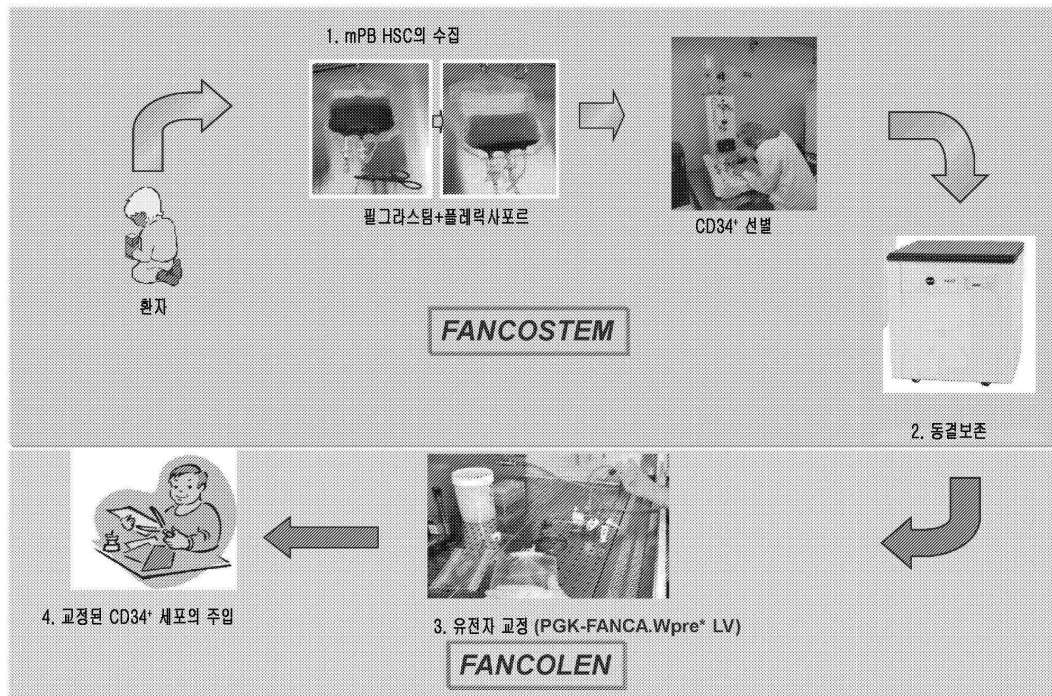
도면9



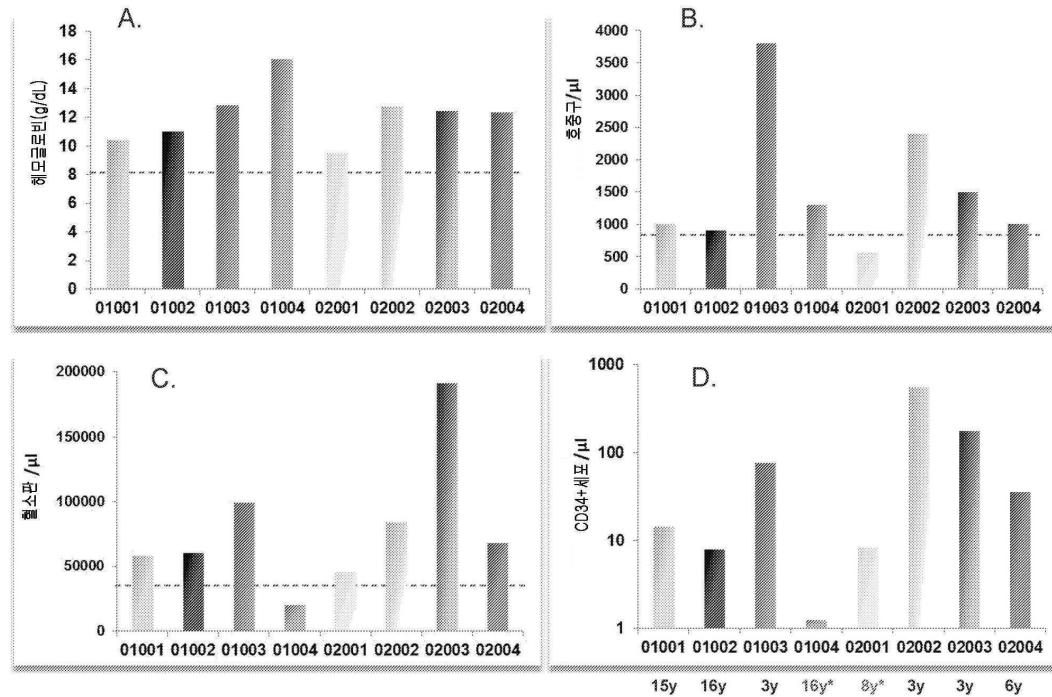
도면10



도면11



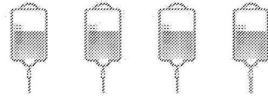
도면12



도면13

목표: 4×10^6 CD34⁺세포/Kg(5년으로 예상됨)

성분채집술:



모조빌: (240 µg/kg/day):



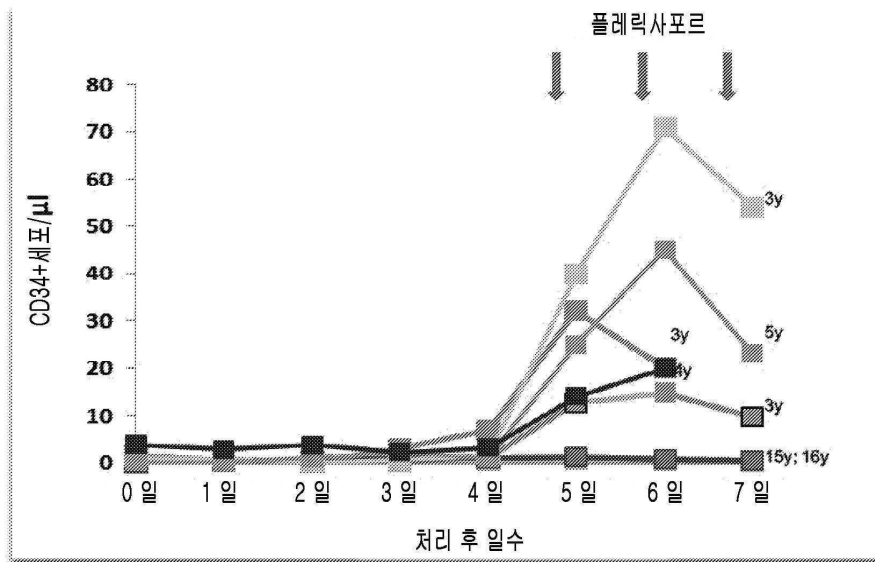
뉴포젠: (12 mg/Kg/12h):



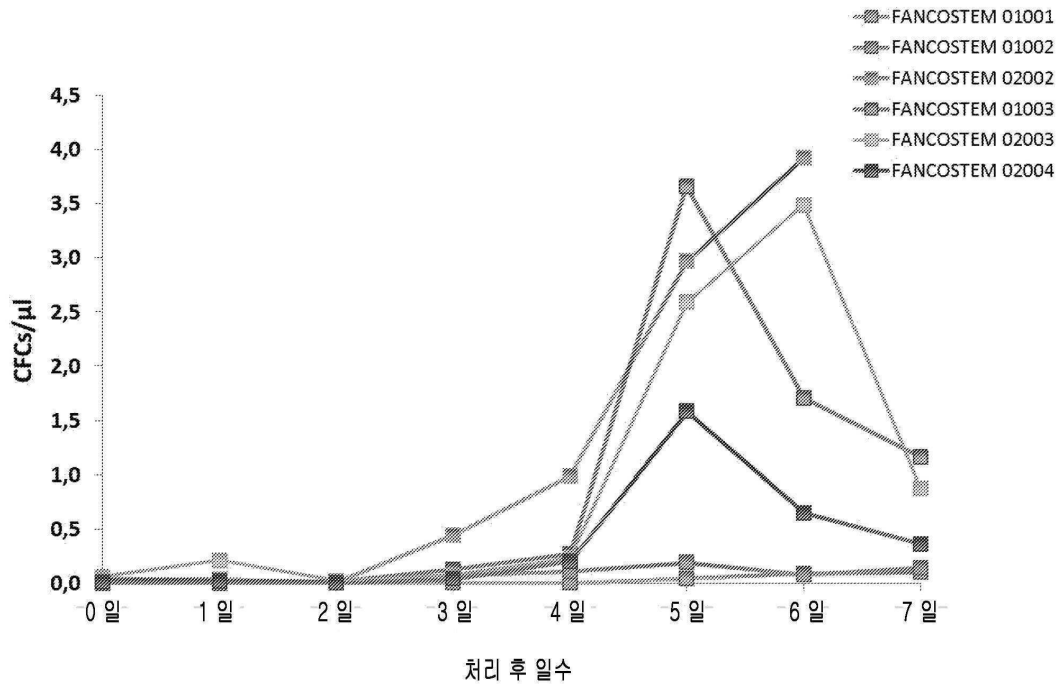
일:

1 2 3 4 5 6 7 8

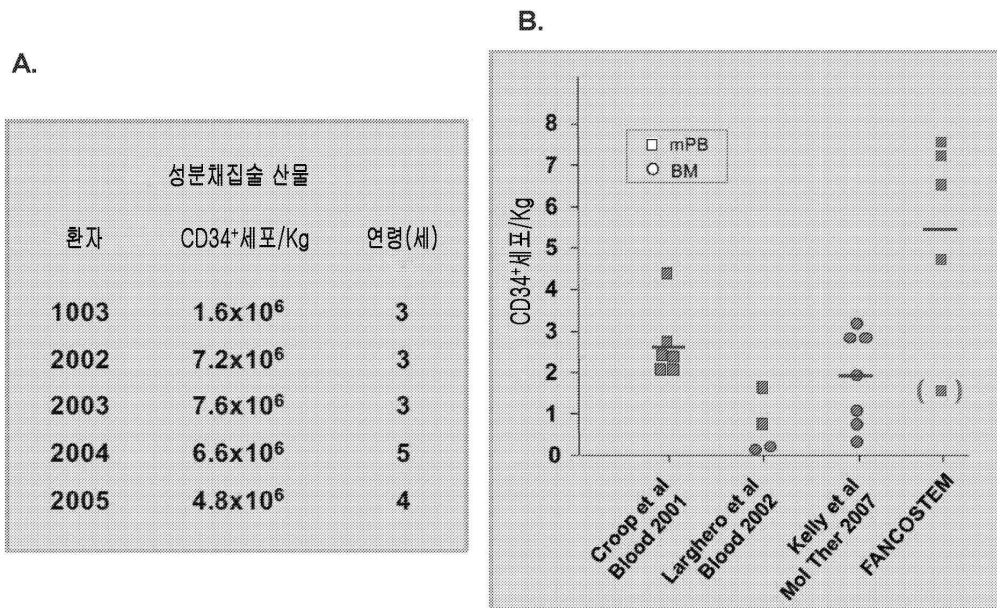
도면14



도면15



도면16



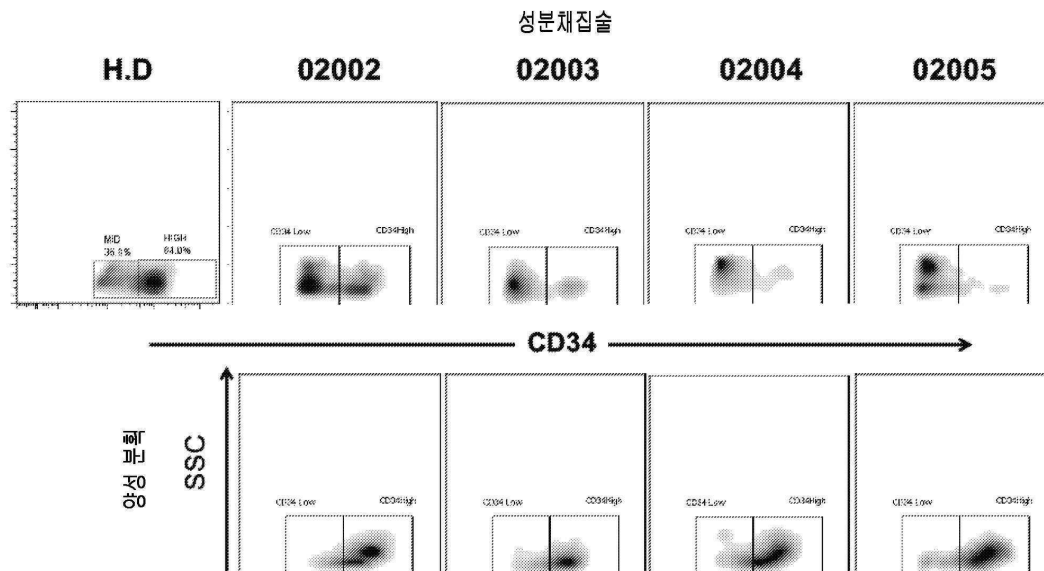
도면17

환자	BM			mPB	
	CD34/mcL (x10E6)	CD34/Kg (x10E6)	교정된 CD34/Kg (x10E6)	CD34/Kg (x10E6)	배수 증가 vs BM
01003	75	1.5	0.84	1.6	1.9
02002	546	10.9	6.1	7.2	1.2
02003	175	3.5	2.0	7.6	3.9
02004	35	0.7	0.39	6.6	16.6
02005	276	5.5	3.9	4.8	1.5

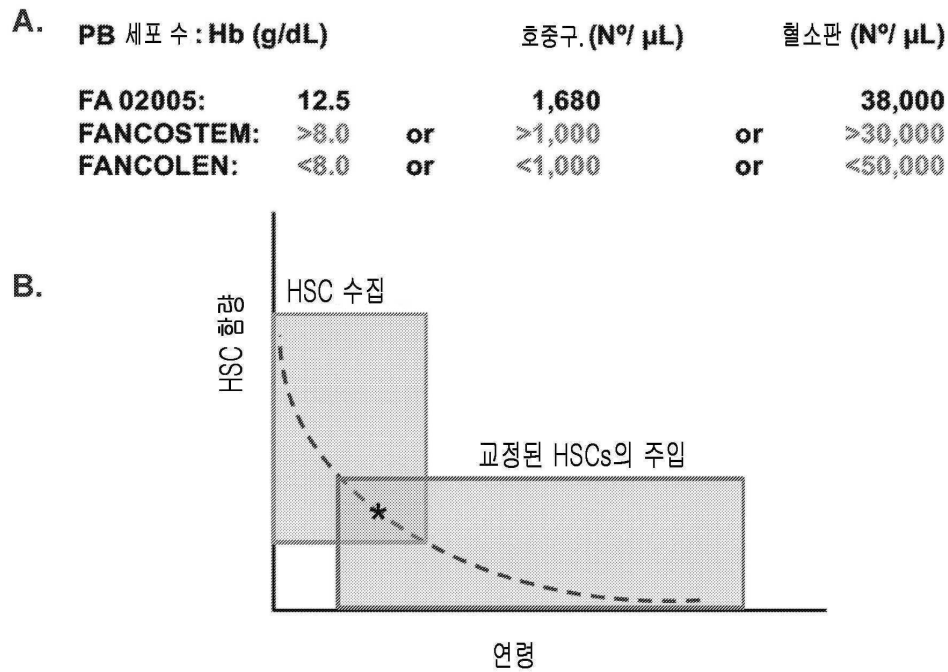
도면18

환자	성분채집술		양성 분획		
	CD34 ⁺ /Kg	% CD34 ⁺	CD34 ⁺ /Kg	% CD34 ⁺	회수율
1003	1.6x10 ⁶	0.05	8.6x10 ⁵	17.40	53.20
2002	7.2x10 ⁶	0.16	5.1x10 ⁶	79.96	70.94
2003	7.6x10 ⁶	0.17	2.9x10 ⁶	29.33	47.85
2004	6.6x10 ⁶	0.15	2.0x10 ⁶	25.55	26.63

도면19

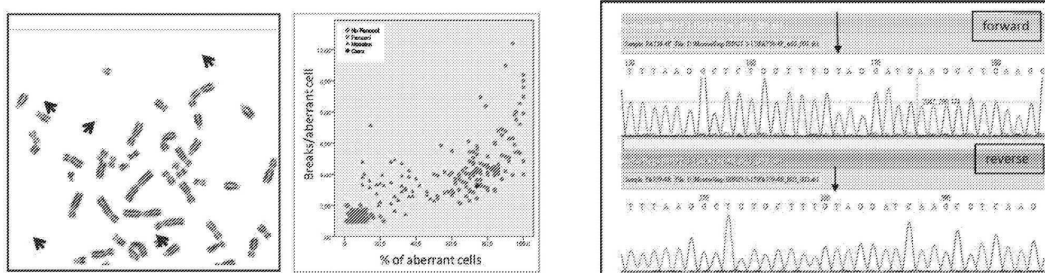


도면20

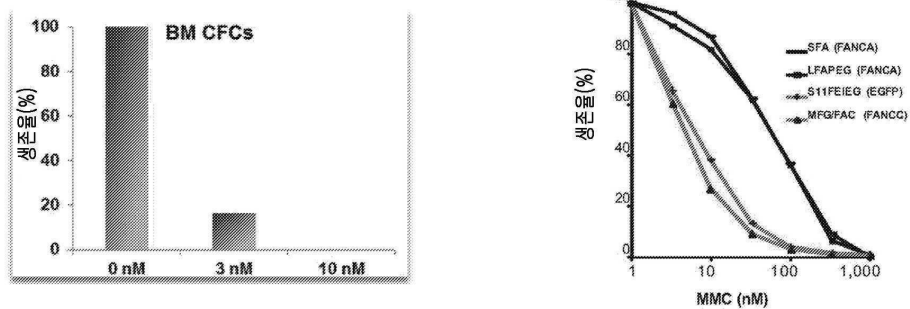


도면21

모자이크 현상 부재; 동형접합 FANCA c.239 C>T p.Gln99*



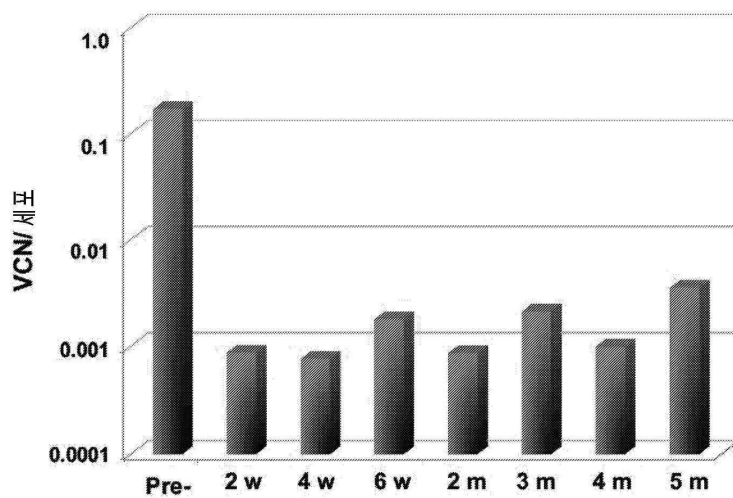
MMC 과민성, FANCA에 의해 보완됨



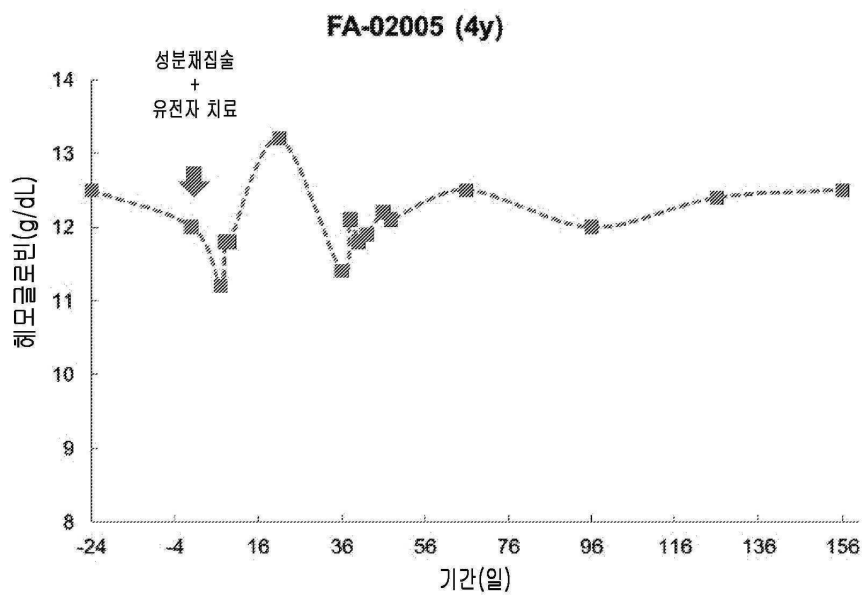
도면22

02005	총 CD34 ⁺ 세포	CD34 ⁺ /Kg	% CD34 ⁺	생존 능력	총 CFCs	CFCs/Kg
형질도입 전	1.86x10 ⁷	1.02 x10 ⁶	59.0%	100 %	2.9 x10 ⁵	1.7x10 ⁴
형질도입 후	2.3x10 ⁷	1.33 x10 ⁶	80.5%	97.4 %	2.7 x10 ⁵	1.5x10 ⁴
수율	125.2%				110.6%	

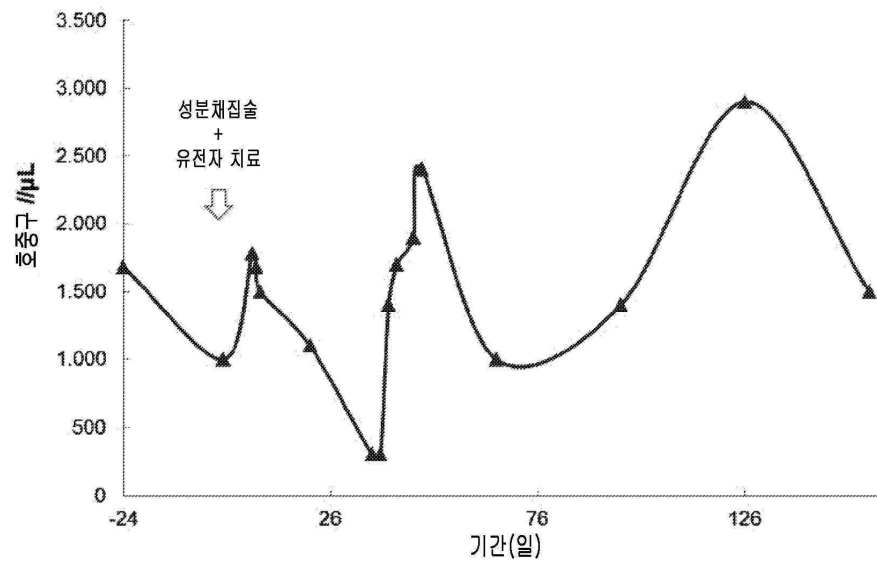
도면23



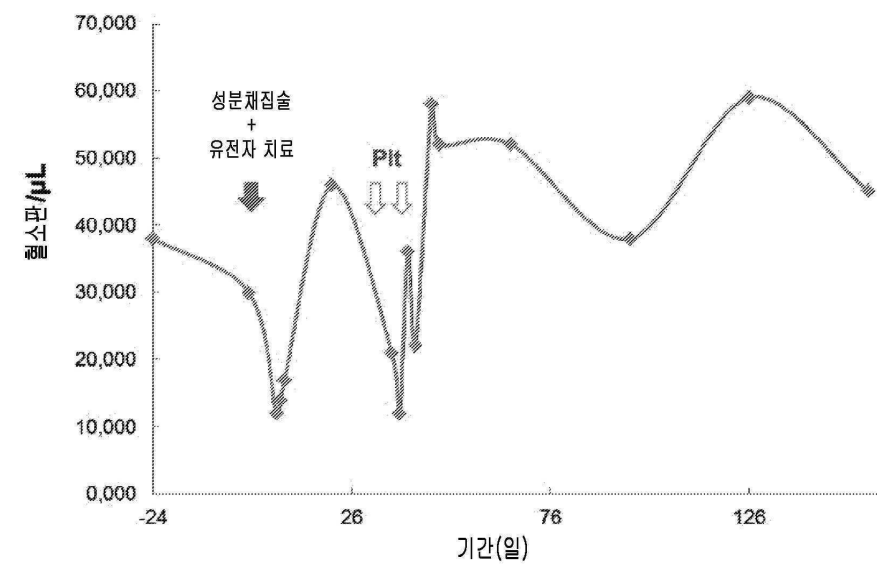
도면24



도면25



도면26



도면27

12/5/2014

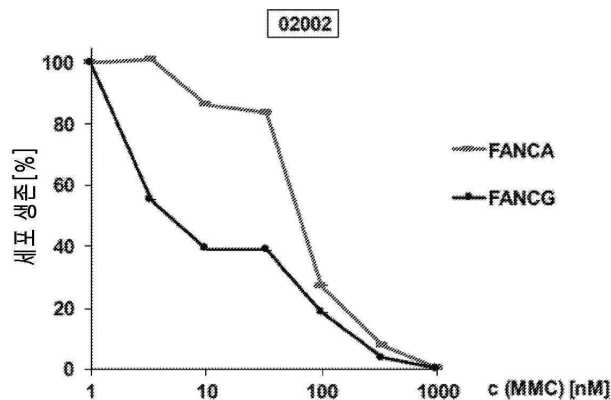
PB 세포 수 : Hb (g/dL)		호중구. (N ^o / μ L)		혈소판 : (N ^o / μ L)	
FA 02002:	12.7		2,400		84,000
FANCOSTEM:	>8.0	or	>1,000	or	>30,000
FANCOLEN:	<8.0	or	<1,000	or	<50,000

20/1/2016

PB 세포 수 : Hb (g/dL)		호중구. (N ^o / μ L)		혈소판 : (N ^o / μ L)	
FA 02002:	10.5		1,600		29,000
FANCOLEN:	<8.0	or	<1,000	or	<50,000

도면28

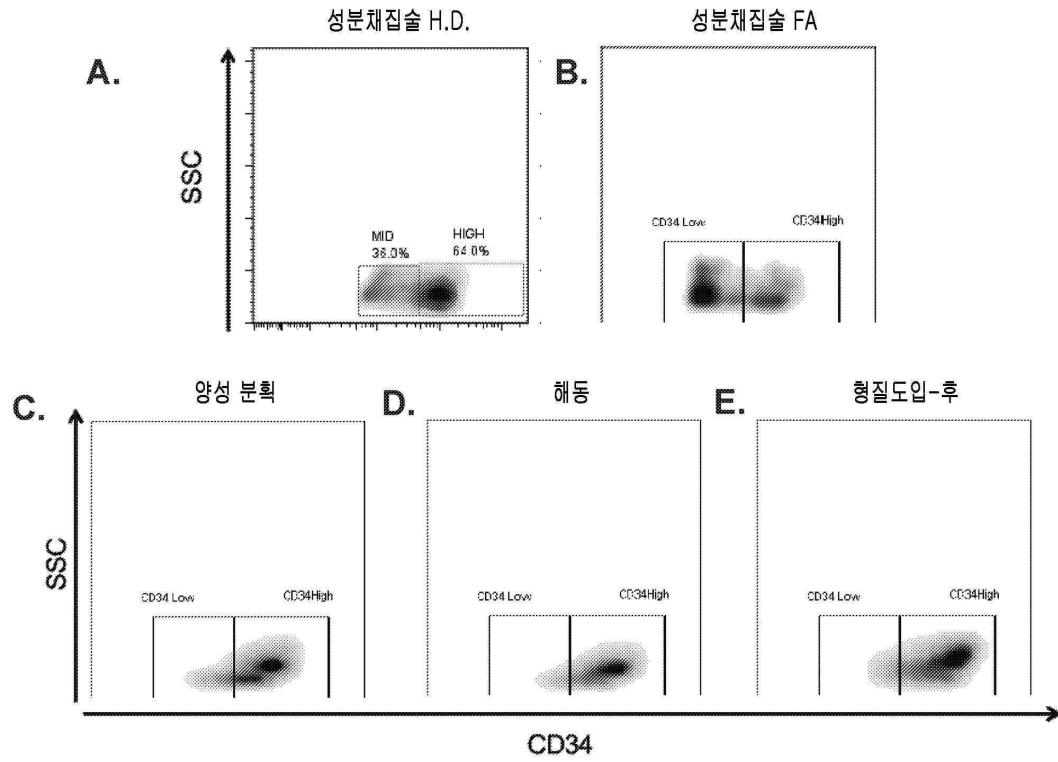
모자이크 현상 부재; 동형접합 *FANCA* c.239 C>T p.Gln99*
MMC 과민성, *FANCA*에 의해 보완됨



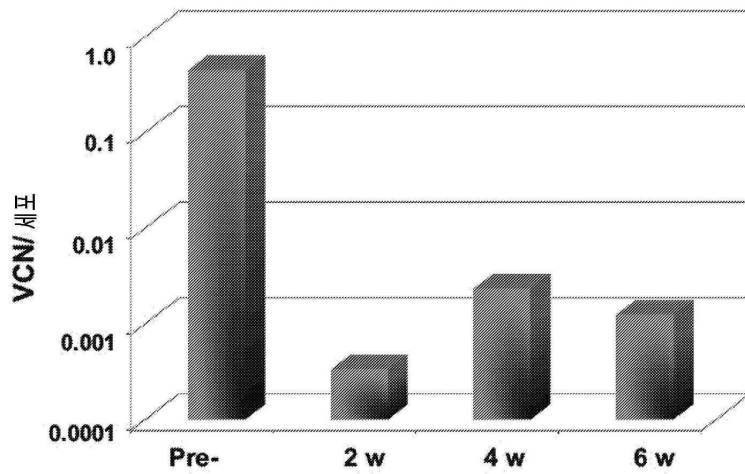
도면29

02002	총 CD34 ⁺ 세포	CD34 ⁺ /Kg	% CD34 ⁺	생존 능력	총 CFCs	CFCs/Kg
형질도입 전	1.81x10 ⁷	8.5x10 ⁵	87.6%	92.7%	8.8 x10 ⁵	4.1x10 ⁴
형질도입 후	1.17x10 ⁷	5.5x10 ⁵	90.6%	84.04 %	6.75 x10 ⁵	3.8x10 ⁴
수율	64.24%				76.7%	

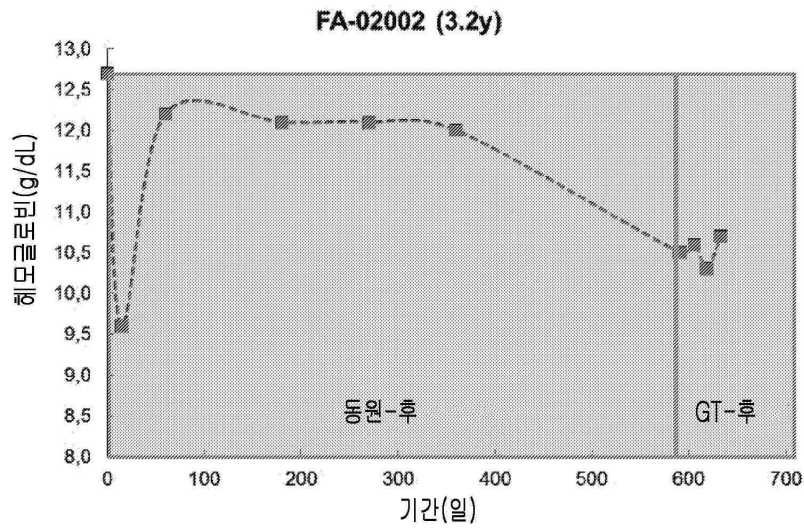
도면30



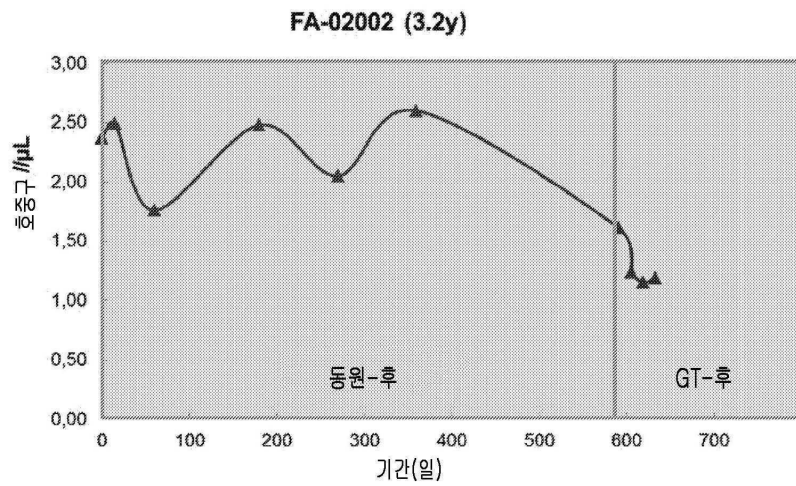
도면31



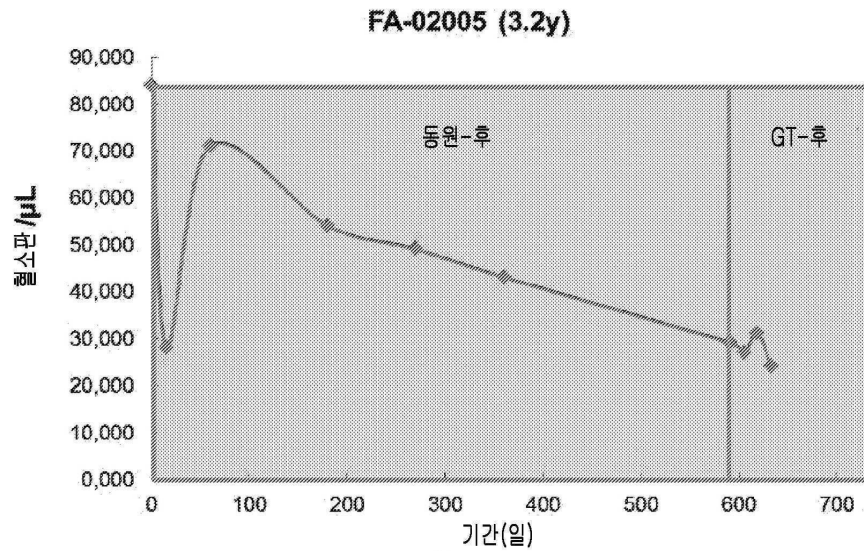
도면32



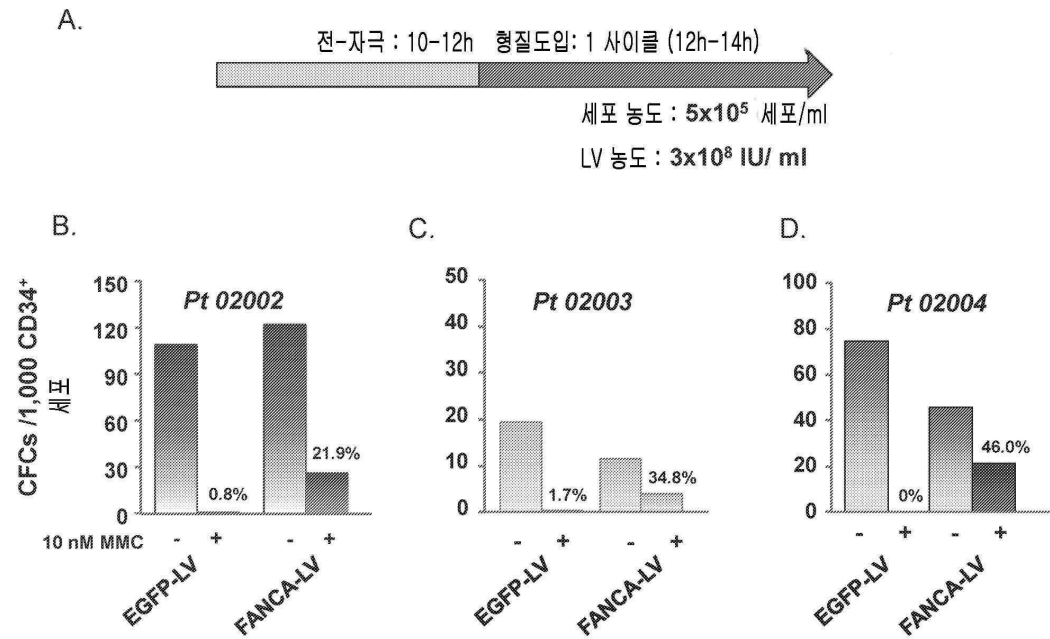
도면33



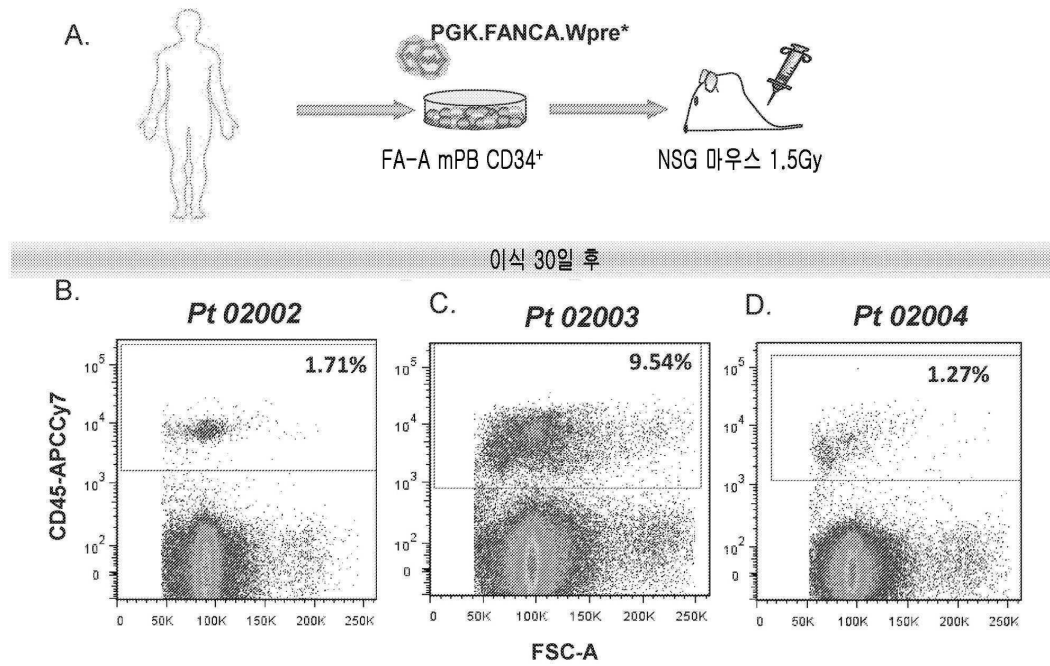
도면34



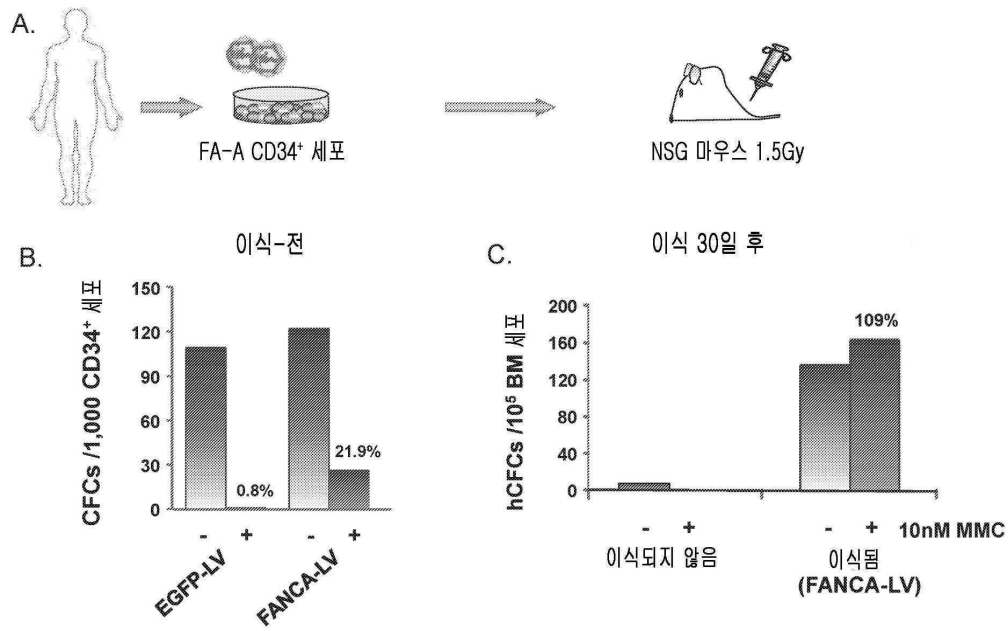
도면35



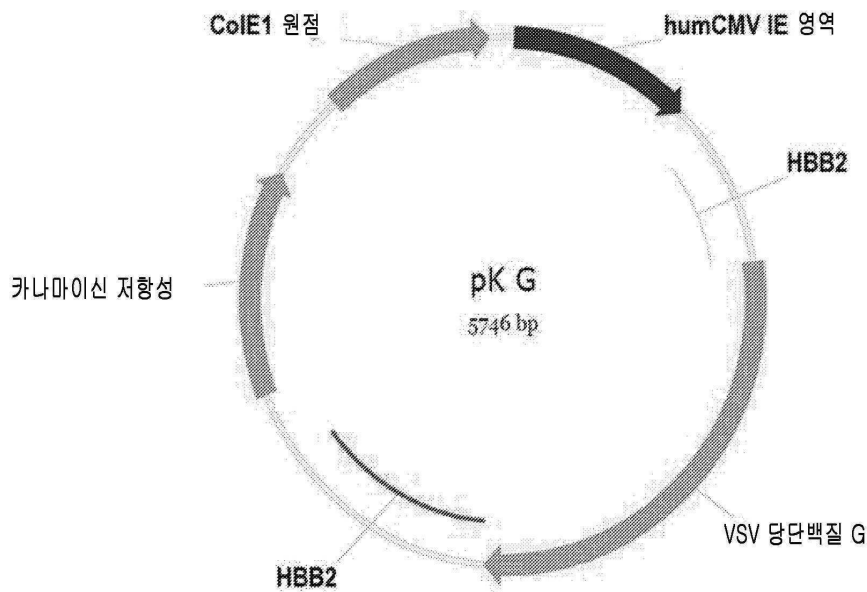
도면36



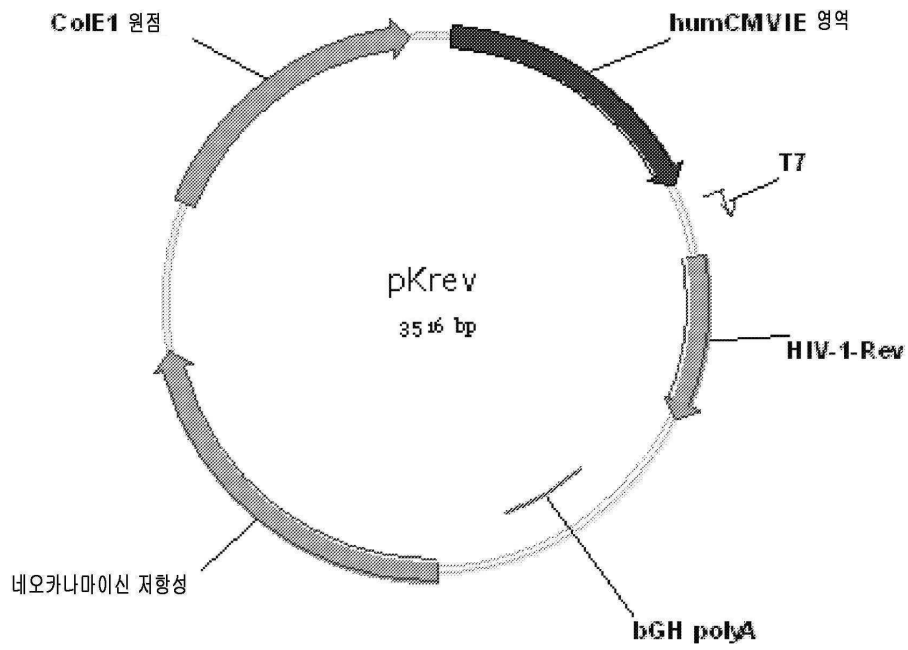
도면37



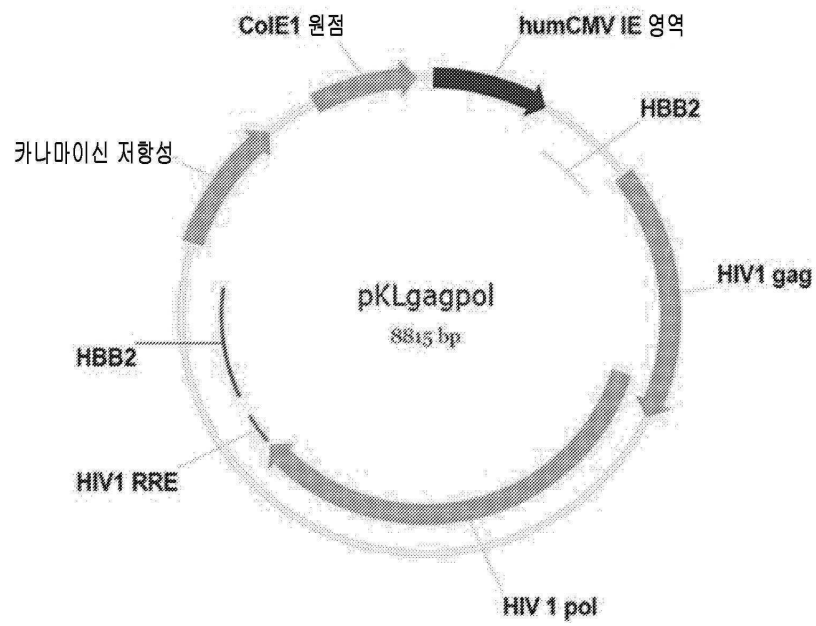
도면38



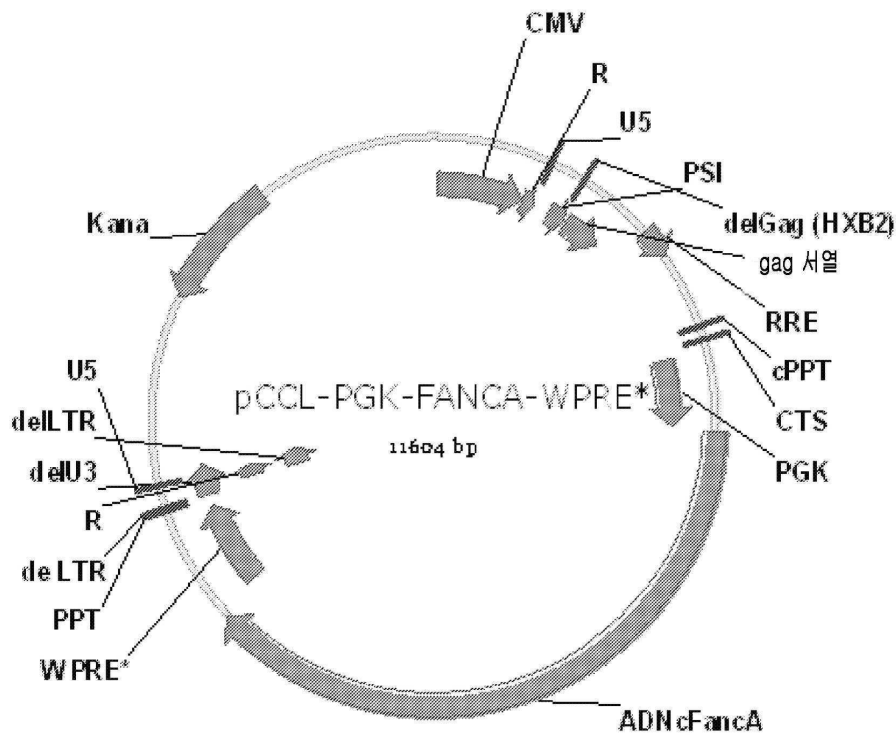
도면39



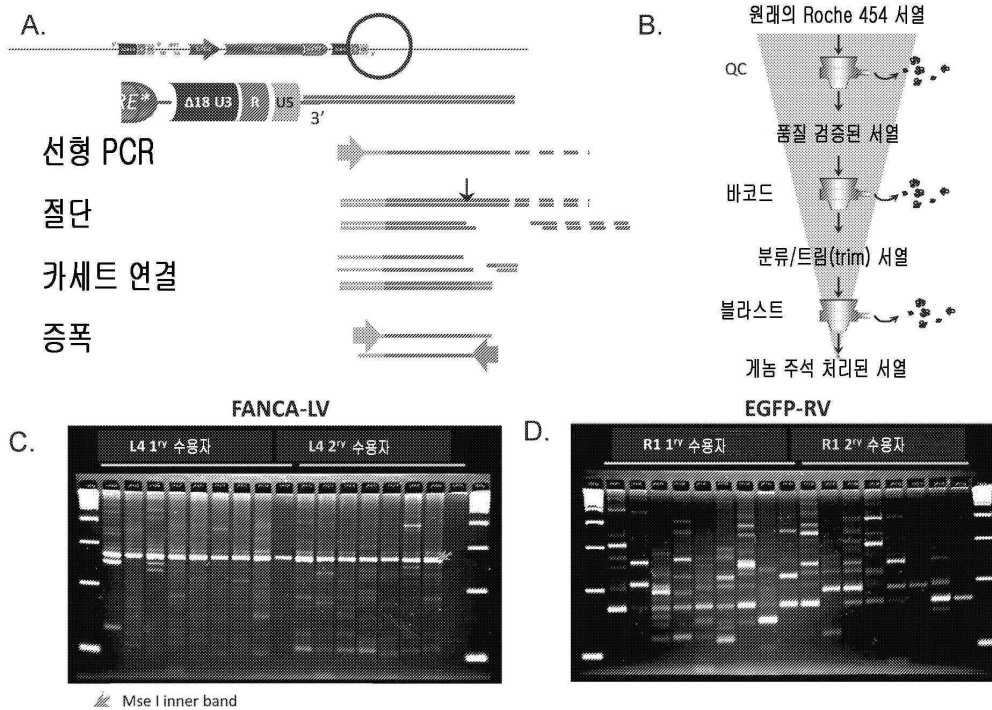
도면40



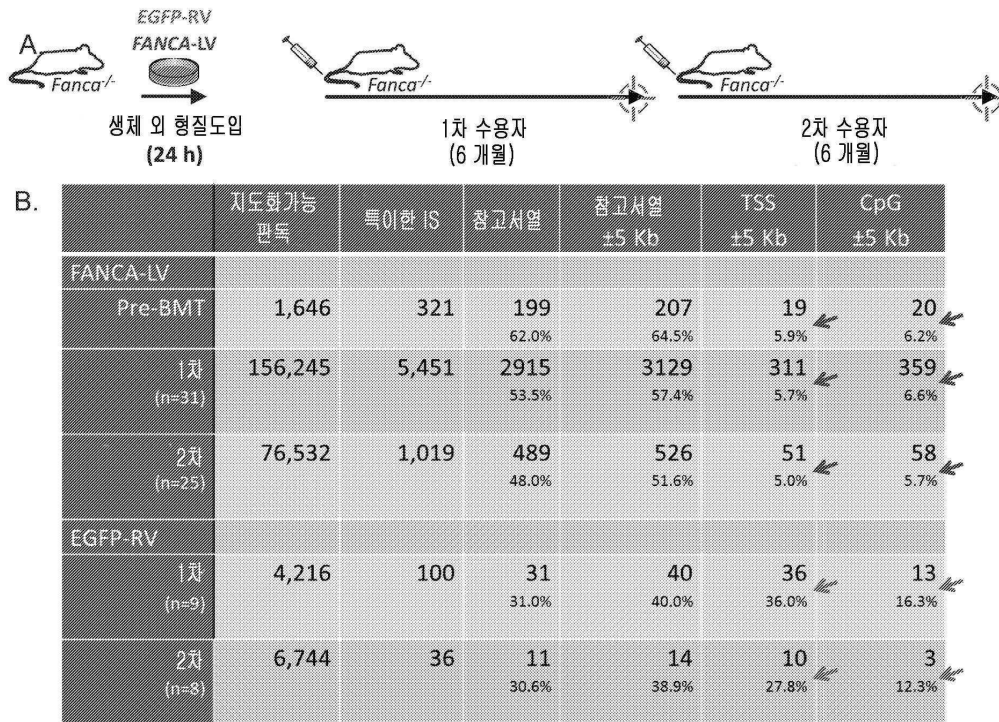
도면41



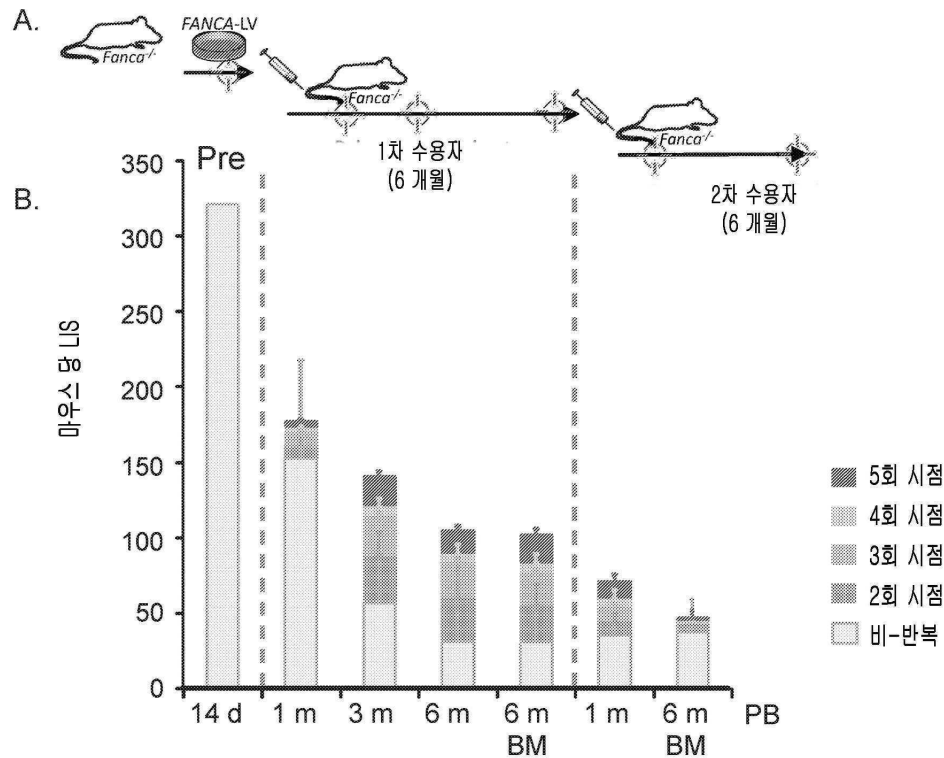
도면42



도면43



도면44



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Centro de Investigaciones Energeticas Medioambientales y

Tecnologicas
Fundacion Instituto de Investigacion Sanitaria Fundacion
Jimenez Diaz
Centro de Investigacion Biomedica en Red
Fundacion para la investigacion biomedica Hospital Infantil
Universitario Nino Jesus
Bueren, Juan A.
Rio, Paula
Navarro, Susana
Sevilla, Julian
Segovia, Jose Carlos
Ganzalez, Africa
Casado, Jose Antonio

Guenechea, Guillermo

<120> GENE THERAPY FOR PATIENTS WITH FANCONI ANEMIA

<130> IPA190346-US-D1-1

<160> 25

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 234

<212> DNA

<213> Human immunodeficiency virus 1 (HIV-1)

<400> 1

aggagctttg ttccttgggt tcttgggagc agcaggaagc actatgggcg cagcgtcaat	60
gacgctgacg gtacaggcca gacaattatt gtctggtata gtgcagcagc agaacaattt	120
gctgagggct attgaggcgc aacagcatct gttgcaactc acagtctggg gcatcaagca	180
gtccaggca agaatcctgg ctgtggaaag atacctaaag gatcaacagc tcct	234

<210> 2

<211> 126

<212> DNA

<213> Human immunodeficiency virus 1 (HIV-1)

<400> 2

ctctctcgac gcaggactcg gcttgctgaa gcgcgcacgg caagaggcga ggggcggcga 60

ctggtgagta cgccaaaaat ttgactagc ggaggctaga aggagagaga tgggtgcgag 120

agcgtc 126

<210> 3

<211> 181

<212> DNA

<213> Human immunodeficiency virus 1 (HIV-1)

<400> 3

gggtctctct ggtagacca gatctgagcc tgggagctct ctggctaact agggaacca 60

ctgcttaagc ctcaataaag cttgccttga gtgcttcaag tagtgtgtgc ccgtctgttg 120

tgtgactctg gtaactagag atccctcaga cccctttagt cagtgtggaa aatctctagc 180

a 181

<210> 4

<211> 234

<212> DNA

<213> Human immunodeficiency virus 1 (HIV-1)

<400> 4

tggaagggtc aattcactcc caacgaagac aagatctgct ttttgcttgt actgggtctc 60

tctgggtaga ccagatctga gcctgggagc tctctggcta actaggaac cactgctta 120

agcctcaata aagcttgctt tgagtgtctc aagtagtgtg tgcccgtctg ttgtgtgact 180

ctggtaacta gagatccctc agaccctttt agtcagtgtg gaaaatctct agca 234

<210> 5

<211> 204

<212> DNA

<213> Human herpesvirus-5

<400> 5

gtgatgcggt tttggcagta catcaatggg cgtggatagc ggtttgactc acggggattt 60

ccaagtctcc accccattga cgtcaatggg agtttgtttt ggcacaaaa tcaacgggac 120

tttccaaaat gtcgtaacaa ctccgcccc a ttgacgcaa tgggcggtag gcgtgtacgg 180

tgggaggtct atataagcag agct 204

<210> 6

<211> 118

<212> DNA

<213> Human immunodeficiency virus 1 (HIV-1)

<400> 6

ttttaaaaga aaagggggga ttggggggta cagtgcaggg gaaagaatag tagacataat 60

agcaacagac atacaaacta aagaattaca aaaacaaatt acaaaaattc aaaatttt 118

<210> 7

<211> 511

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

ggggttgggg ttgcgccttt tccaaggcag ccctgggttt gcgcaggac gcggctgctc 60

tgggcgtggg tccgggaaac gcagcggcgc cgaccctggg tctcgacat tcttcacgtc 120

cgttcgcagc gtcacccgga tcttcgccgc tacccttggt ggccccccgg cgacgttcc 180

tgctccgcc ctaagtcggg aaggttcctt gcggttcgcg gcgtgccgga cgtgacaaac 240

ggaagccgca cgtctcacta gtacctcgc agacggacag cgccaggag caatggcagc 300

gcgccgaccg cgatgggctg tggccaatag cggctgctca gcaggcgcg ccgagagcag 360

cggccgggaa ggggcgggtgc gggaggcggg gtgtggggcg gtagtgtggg ccctgttctt 420

gcccgcgagg tggtccgcat tctgcaagcc tccggagcgc acgtcggcag tcggtccctt 480

cgttgaccga atcacgacc tcttccccca g 511

<210> 8

<211> 4368

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

atgtccgact cgtgggtccc gaactccgc tcgggccagg acccaggggg ccgccggagg 60

gcctgggccc agctgctggc gggaagggtc aagagggaaa aatataatcc tgaaagggca 120

cagaaattaa aggaatcagc tgtgcgcctc ctgcgaagcc atcaggacct gaatgcctt 180

ttgcttgagg tagaaggctc actgtgtaaa aaattgtctc tcagcaaagt gattgactgt 240

gacagtcttg aggcctatgc taatcattct agttcattta taggtctctgc ttgcaggat 300

caagcctcaa ggctgggggt tcccggtggg attctctcag ccgggatggt tgcctctagc 360

gtgggacaga tctgcacggc tccagcggag accagtcacc ctgtgctgct gactgtggag 420

cagagaaaga agctgtcttc cctgttagag ttgtctcagt atttattggc acacagtatg 480

ttctcccgctc tticcttctg tcaagaatta tggaaaatac agagtctttt gttgcttgaa 540

gcggtgtggc atcttcacgt acaaggcatt gtgagcctgc aagagctgct ggaaagccat 600

cccgacatgc atgctgtggg atcgtggctc ttcaggaatc tgtgctgcct ttgtgaacag 660

atggaagcat ccigccagca tgtgacgtc gccagggccca tgctttctga ttttgttcaa 720

atgtttgttt tgaggggatt tcagaaaaac tcagatctga gaagaactgt ggagcctgaa 780

aaaatgccgc aggtcacggt tgatgtactg cagagaatgc tgatttttgc acttgacgct 840

ttggctgctg gactacagga ggagtcctcc actcacaaga tcgtgaggtg ctggttcgga 900

gtgttcagtg gacacacgct tggcagtgtg atttccacag atcctctgaa gaggttcttc 960

agtcataccc tgactcagat actcactcac agccctgtgc tgaaagcatc tgatgctgtt 1020

cagatgcaga gagagtggag ctttgcgcgg acacaccctc tgctcacctc actgtaccgc 1080

aggctctttg tgatgctgag tgcagaggag ttggttggcc atttgcaaga agttctggaa 1140

acgcaggagg ttactggca gagagtgtc tcctttgtgt ctgccctggt tgtctgcttt 1200

ccagaagcgc agcagctgct tgaagactgg gtggcgctt tgatggcca ggcattcgag 1260

agctgccagc tggacagcat ggtcactgcg ttcttggttg tgcgccagc agcactggag 1320

ggccctctg cgttctgtc atatgcagac tggttcaagg cctcctttgg gagcacacga 1380

ggctaccatg gctgcagcaa gaaggccctg gtcttctgt ttacgttctt gtcagaactc 1440

gtgccttttg agtctccccg gtacctgcag gtgcacattc tccaccacc cctggttccc 1500

agcaagtacc gctccctct cactagactac atctcattgg ccaagacag gctggccgac 1560

ctcaaggttt ctatagaaaa catgggactc tacgaggatt tgtcatcagc tggggacatt 1620

actgagcccc acagccaagc tcttcaggat gttgaaaagg ccatcatggt gtttgagcat 1680

acggggaaca tccagtcac cgtcatggag gccagcatat tcaggaggcc ttactacgtg 1740

tcccacttcc tccccgcct gctcacact cgagtgtcc ccaaagtccc tgactcccgt 1800

gtggcgttta tagagtctct gaagagagca gataaaatcc cccatctct gttactccacc 1860

tactgccagg cctgctctgc tgtgaagag aagccagaag atgcagccct gggagtgagg 1920

gcagaaccca actctgctga ggagccctg ggacagctca cagctgcact gggagagctg 1980

agagcctcca tgacagacc cagccagcgt gatgttatat cggcacaggt ggcagtgatt 2040

tctgaaagac tgagggctgt cctgggccac aatgaggatg acagcagctg tgagatatca 2100

aagattcagc tcagcatcaa cagccgaga ctggagccac gggaacacat tgctgtggac 2160

ctcctgctga cgtctttctg tcagaacctg atggctgcct ccagtgtcgc tccccggag 2220

aggcagggtc cctgggctgc cctcttcgtg aggacatgt gtggacgtgt gctccctgca 2280
 gtgctcacc ggctctgcc gctgctccgt caccagggcc cgagcctgag tgccccacat 2340
 gtgctggggt tggtgcctt ggccgtgcac ctgggtgagt ccaggctctg gctcccagag 2400
 gtggatgtgg gtctctctgc acctgggtgt ggccttcttg tccctgcgt ctttgacagc 2460
 ctctgacct gtaggacgag ggattccttg ttcttctgcc tgaaattttg tacagcagca 2520
 atttcttact ctctctgcaa gttttcttcc cagtcacgag ataacttttg cagctgctta 2580
 tctccaggcc ttattaaaaa gtttcagtgc ctcattgtca gattgttctc agaggccga 2640

cagcctcttt ctgaggagga cgtagccagc ctttctgga gacccttgca ctttcttct 2700
 gcagactggc agagagctgc cctctctctc tggacacaca gaaccttccg agagggttg 2760
 aaagaggaag atgttactt aacttacc aa gactgggtac acctggagct ggaaattcaa 2820
 cctgaagctg atgtctttt agatactgaa cggcaggact tccaccagt ggcatccat 2880
 gagcactttc tccctgagtc ctgggttca gggggctgtg acggagacct gcaggctgcg 2940
 tgtaccattc ttgtcaacgc actgatgat ttccacaaa gctcaaggag ttatgaccac 3000
 tcagaaaatt ctgatttggc ctttgggtggc cgcacaggaa atgaggatat tatttccaga 3060

ttgcaggaga tggtagctga cctggagctg cagcaagacc tcatagtgc tctcgccac 3120
 acccttccc aggagcactt cctctttgag attttccga gacggctcca ggctctgaca 3180
 agcgggtgga gcttggtgc cagccttcag agacagaggg agctgctaata gtacaaacgg 3240
 atcctctcc gctgccttc gtctgtctc tgcggcagca gcttccaggc agaacagccc 3300
 atcactgcca gatgcgagca gttcttccac ttggtcaact ctgagatgag aaacttctgc 3360
 tcccacggag gtgcccgtac acaggacatc actgcccact tcttcagggg cctcctgaac 3420
 gcctgtctgc ggagcagaga cccctccctg atggctgact tcatactggc caagtgccag 3480

acgaaatgcc ccttaatttt gacctctgt ctggtgtggt ggccgagcct ggagcctgtg 3540
 ctgctctgcc ggtggaggag acactgccag agcccgtgc cccgggaact gcagaagcta 3600
 caagaaggcc ggcagtttg cagcgatttc ctctccctg aggtgcctc cccagcacc 3660
 aaccggact ggtctctcagc tgctgcaact cactttgcga ttcaacaagt cagggaagaa 3720
 aacatcagga agcagctaaa gaagctggac tgcgagagag aggagctatt ggttttctt 3780
 ttcttcttct cttgatggg cctgtgtctg tcacatctga cctcaaatag caccacagac 3840
 ctgccaagg ctttccagt ttgtgcagca atcctcgagt gtttagagaa gaggaagata 3900

tcctggctgg cactctttca gttgacagag agtgacctca ggctggggcg gctctctc 3960
 cgtgtggccc cggatcagca caccaggctg ctgcctttcg ctttttacag tcttctctc 4020
 tacttccatg aagacgcggc catcaggga gaggccttcc tgcatgttc tgtggacatg 4080

tacttgaagc tgggccagct ctctgtggct ggggatacaa gcacagtttc acctccagct 4140
ggcaggagcc tggagctcaa gggtcagggc aaccccgctg aactgataac aaaagctcgt 4200
ctttttctgc tgcagttaat acctcgggtgc ccgaaaaaga gcttctcaca cgtggcagag 4260
ctgctggctg atcgtgggga ctgcgaccca gaggtgagcg ccgcctcca gagcagacag 4320

caggctgccc ctgacgtga cctgtcccag gagcctcadc tcttctga 4368

<210> 9

<211> 380

<212> DNA

<213> Human herpesvirus-5

<400> 9

gacattgatt attgactagt tattaatagt aatcaattac ggggtcatta gttcatagcc 60
cataatgga gttccgcgtt acataactta cggtaaattg cccgcctggc tgaccgcca 120
acgacccccg cccattgacg tcaataatga cgtatgttcc catagtaacg ccaataggga 180
ctttccattg acgtcaatgg gtggagtatt tacggtaaac tgcccacttg gcagtacac 240
aagtgtatca tatgccaagt acgcccccta ttgacgtcaa tgacggtaaa tggcccgctt 300

ggcattatgc ccagtacatg accttatggg actttcctac ttggcagtag atctacgtat 360

tagtcacgc tattaccatg 380

<210> 10

<211> 122

<212> DNA

<213> Simian virus 40

<400> 10

aacttgttta ttgcagctta taatggttac aaataaagca atagcatcac aaatttcaca 60
aataaagcat ttttttact gcattctagt tgtggtttgt ccaaactcat caatgtatct 120
ta 122

<210> 11

<211> 136

<212> DNA

<213> Simian virus 40

<400> 11

atcccgcccc taactccgcc cagttccgcc cattctccgc cccatggctg actaatTTTT 60
tttatttatg cagaggccga ggccgcctcg gcctctgagc tattccagaa gtagtgagga 120

ggcttttttg gaggcc	136
<210> 12	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Human immunodeficiency virus 1 (HIV-1)	
<400> 12	
tttaaaagaa aaggggggat tggggggt	28
<210> 13	
<211> 83	
<212> DNA	
<213> Human immunodeficiency virus 1 (HIV-1)	
<400> 13	
gaattcgagc tcggtacctt taagaccaat gacttacaag gcagctgtag atcttagcca	60
ctttttaaaa gaaaaggggg gac	83
<210> 14	
<211> 795	
<212> DNA	
<213> Escherichia coli	
<400> 14	
atgattgaac aagatggatt gcacgcaggt tctccggcgg cttgggtgga gaggctattc	60
ggctatgact gggcacaaca gacaatcggc tgctctgatg ccgccgtgtt ccggctgtca	120
gcgcaggggc gtccggttct ttttgtcaag accgacctgt ccggtgccct gaatgaactg	180
caagacgagg cagcgcggct atcgtggctg gcgacgacgg gcgttccttg cgcggctgtg	240
ctcgacgttg tactgaagc gggaaggac tgctgtctat tgggcgaagt gccggggcag	300
gatctcctgt catctacct tgctcctgcc gagaaagtat ccatcatggc tgatgcaatg	360
cggcggctgc atacgcttga tccggctacc tgccattcg accaccaagc gaaacatcgc	420
atcgagcgag cacgtactcg gatggaagcc ggtcttgcg atcaggatga tctggacgaa	480
gagcatcagg ggtcgcgcc agccgaactg ttcgccagge tcaaggcgtc tatgcccgac	540
ggcgaggatc tcgtcgtgac ccacggcgat gcctgcttgc cgaatatcat ggtggaaaat	600
ggccgctttt ctggattcat cgactgtggc cgtctgggtg tggcggaccg ctatcaggac	660
atagcgttgg ctacccgtga tattgctgaa gagcttggcg gcgaatgggc tgaccgcttc	720
cttgtgcttt acggtatcgc cgcgcccgat tcgcagcgca tcgccttcta tcgccttctt	780

gacgagttct tctga 795

<210> 15

<211> 137

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 15

gcattggcgc agaaaaaat gcctgatgcg acgctgcgcg tcttatactc ccacatatgc 60

cagattcagc aacggatagc gcttcccaaa cttgcccaact tccatacgtg tcttccttac 120

cagaaattta tctttaa 137

<210> 16

<211> 589

<212> DNA

<213> unknown

<220><223> ColE1/pMB1/pBR322/pUC origin of replication plasmid sequence

<400> 16

ttgagatcct tttttctgc gcgtaatctg ctgcttgcaa acaaaaaaac caccgctacc 60

agcgggtggtt tgtttgccgg atcaagagct accaactctt tttccgaagg taactggctt 120

cagcagagcg cagataccaa atactgttct tctagtgtag ccgtagttag gccaccactt 180

caagaactct gtagcaccgc ctacatacct cgtctgcta atcctgttac cagtggctgc 240

tgccagtggc gataagtcgt gtcttaccgg gttggactca agacgatagt taccggataa 300

ggcgcagcgg tcgggctgaa cgggggggttc gtgcacacag ccagcttgg agcgaacgac 360

ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga gctatgagaa agcgccacgc ttcccgaagg 420

gagaaaggcg gacaggtatc cggtaaagcg cagggtcgga acaggagagc gcacgaggga 480

gcttccaggg ggaacgcct ggtatcttta tagtctgtc gggtttcgcc acctctgact 540

tgagcgtcga tttttgtgat gtcgtcagg ggggcggagc ctatggaaa 589

<210> 17

<211> 22

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 17

taatgtgagt tagctcactc at 22

<210> 18

<211> 31	
<212> DNA	
<213> Escherichia coli	
<400> 18	
tttacacttt atgcttccgg ctcgatgtt g	31
<210> 19	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Escherichia coli	
<400> 19	
ttgtgagcgg ataacaa	17
<210> 20	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Bacteriophage T3	
<400> 20	
aattaaccct cactaaagg	19
<210> 21	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Bacteriophage T7	
<400> 21	
cctatagtga gtcgtatta	19
<210> 22	
<211> 428	
<212> DNA	
<213> F1 bacteriophage	
<400> 22	
acgcgcctg tagcggcgca ttaagcgcgg cgggtgtggt ggttacgcgc agcgtgaccg	60
ctacacttgc cagcgccta gcgcccgtc ctttcgcttt cttcccttcc ttctcgcca	120
cgttcgccgg ctttccccgt caagctctaa atcgggggct ccccttaggg ttccgattta	180
gtgctttacg gcacctgac cccaaaaaac ttgattaggg tgatggttca cgtagtgggc	240
catcgccctg atagacggtt ttctgccctt tgacgttga gtccacgttc tttaatagtg	300

gactcttggt ccaaactgga acaacactca accctatctc ggtctattct ttigatttat 360
aagggtttt gccgatttcg gcctattggt taaaaaatga gctgatttaa caaaaattta 420
acgcgaat 428

<210> 23

<211> 677

<212> DNA

<213> Woodchuck hepatitis virus

<400> 23

cgagcatctt accgcatctt attcccatat ttgttctggt tttcttgatt tgggtataca 60
tttaaatggt aataaaacaa aatggtgggg caatcattta catttttagg gatatgtaat 120
tactagtcca ggtgtattgc cacaagacaa acatgttaag aaactttccc gttatttacg 180

ctctgttctt gttaatcaac ctctggatta caaaatttgt gaaagattga ctgatattct 240
taactatggt gtccttttta cgctgtgtgg atatgctgct ttaatgcctc tgtatcatgc 300
tattgtcttc cgtacggctt tegttttctc ctcttctgat aaatcctggt tgcgtctctc 360
ttatgaggag ttgtggcccg ttgtccgtca acgtggcgtg gtgtgctctg tgtttgctga 420
cgcaaccccc actggctggg gcattgccac cacctgtcaa ctcttttctg ggactttcgc 480
tttccccctc ccgatcgcca cggcagaact catcgccgcc tgccttgccc gctgctggac 540
aggggctagg ttgtgggca ctgataattc cgtggtgttg tcggggaagg gcctgctgcc 600

ggctctgcgg cctcttccgc gtcttcgcct tcgccctcag acgagtcgga tctccctttg 660
ggccgcctcc ccgcctg 677

<210> 24

<211> 11433

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in lab transfer cassette pCCL-SIN-cPPT/CTS -hPGK-hFANCA-WPRE

<400> 24

catgacaaa atcccttaac gtgagttttc gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa 60
gatcaaagga tcttcttgag atcctttttt tctgcgcgta atctgctgct tgcaaacaaa 120
aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttggtt gccggatcaa gagctaccaa ctctttttcc 180

gaaggtaact ggcttcagca gagcgcagat accaaatact gttcttctag ttagaccgta 240
gttagccac cacttcaaga actctgtagc accgcctaca tacctcgctc tgctaactct 300
gttaccagtg gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttgg actcaagacg 360

atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg ggcticgtgca cacagcccag 420
 cttggagcga acgacctaca ccgaactgag atacctacag cgtgagctat gagaaagcgc 480
 cacgcttccc gaaggagaaa aggcggacag gtatccggtg agcggcaggg tcggaacagg 540
 agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa cgcctggtat ctttatagtc ctgtcgggtt 600

 tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg 660
 gaaaaacgcc agcaacgcgg cttttttacg gttcctggcc ttttctggc cttttgtca 720
 catgttcttt cctgcgttat cccctgattc tgtggataac cgtattaccg cttttgagtg 780
 agctgatacc gctcgccgca gccgaacgac cgagcgcagc gagtcaagtga gcgaggaagc 840
 ggaagagcgc ccaatacgca aaccgcctct ccccgcgctg tggccgattc attaatgcag 900
 ctggcacgac aggtttcccg actggaaagc gggcagtgag cgcaacgcaa ttaatgtgag 960
 ttagctcact cattaggcac ccagggcttt acactttatg cttccggctc gtatgttgtg 1020

 tggaattgtg agcggataac aatttcacac aggaaacagc tatgacatg attacgcaa 1080
 gcgcgcaatt aaccctcact aaagggaaca aaagctggag ctgcaagctt ggccattgca 1140
 tacgttgtat ccatatcata atatgtacat ttatatggc tcatgtccaa cattaccgcc 1200
 atgttgacat tgattattga ctagttatta atagtaatca attacggggt cattagtcca 1260
 tagcccatat atggagtcc gcgttacata acttacggta aatggcccgc ctggctgacc 1320
 gccaacgac ccccgcccat tgacgtcaat aatgacgtat gttcccatag taacccaat 1380
 agggactttc cattgacgtc aatgggtgga gtatttacgg taaactgccc acttggcagt 1440

 acatcaagtg tatcatatgc caagtacgcc cctattgac gtcaatgacg gtaaatggcc 1500
 cgcctggcat taigcccagt acatgacctt atgggacttt cctacttggc agtacatcta 1560
 cgtattagtc atcgctatta ccatggtgat gcggttttgg cagtacatca atgggcgtgg 1620
 atagcggttt gactcacggg gatttccaag tctccacccc attgacgtca atgggagttt 1680
 gttttggcac caaatcaac gggactttcc aaaatgtcgt aacaactccg cccattgac 1740
 gcaaatgggc ggtaggcgtg tacggtggga ggtctatata agcagagctc gtttagtgaa 1800
 ccggggtctc tctggttaga ccagatctga gcctgggagc tctctggcta actagggaa 1860

 ccaactgctta agcctcaata aagcttgcct tgagtgttc aagtagtgtg tgcccgtctg 1920
 ttgtgtgact ctggtaacta gagatccctc agaccctttt agtcagtgtg gaaaatctct 1980
 agcagtggcg cccgaacagg gacttgaaag cgaaaggga accagaggag ctctctcgac 2040
 gcaggactcg gcttgctgaa gcgcgcacgg caagagcgga ggggcggcga ctggtgagta 2100
 cgccaaaaat tttagctagc ggaggctaga aggagagaga tgggtgcgag agcgtcagta 2160
 ttaagcgggg gagaattaga tcgcgatggg aaaaaattcg gttaaggcca gggggaaaga 2220

aaaaatataa attaaaacat atagtatggg caagcagga gctagaacga ttcgcagtta 2280

 atcctggcct gttagaaca tcagaaggct gtagacaaat actgggacag ctacaacat 2340
 cccctcagac aggatcagaa gaacttagat cattatataa tacagtagca accctctatt 2400
 gtgtgcatca aaggatagag ataaaagaca ccaaggaagc tttagacaag atagaggaag 2460
 agcaaaacaa aagtaagacc accgcacagc aagcggccgc tgatcttcag acctggagga 2520
 ggagatatga gggacaattg gagaagtga ttatataaat ataaagtagt aaaaattgaa 2580
 ccattaggag tagcaccac caaggcaaag agaagagtgg tgcagagaga aaaaagagca 2640
 gtgggaatag gagctttgtt ccttgggttc ttgggagcag caggaagcac tatgggcgca 2700

 gcgtcaatga cgctgacggt acaggccaga caattattgt ctggtatagt gcagcagcag 2760
 aacaatttgc tgagggtat tgaggcgcaa cagcatctgt tgcaactcac agtctggggc 2820
 atcaagcagc tccaggcaag aatcttggt gtggaaagat acctaaagga tcaacagctc 2880
 ctggggattt ggggttgctc tggaaaactc atttgacca ctgctgtgcc ttggaatgct 2940
 agttggagta ataatctct ggaacagatt tggaaacaca cgacctggat ggagtgggac 3000
 agagaaatta acaattacac aagcttaata cactccttaa ttgaagaatc gcaaaaccag 3060
 caagaaaaga atgaacaaga attattgaa ttagataaat gggcaagttt gtggaattgg 3120

 tttacataa caaattggct gtggtatata aaattattca taatgatagt aggagcttg 3180
 gtaggttaa gaatagttt tgctgtactt tctatagtga atagagttag gcagggatat 3240
 tcaccattat cgttcagac ccacctcca accccgaggg gaccgcagac gcccgaaagga 3300
 atagaagaag aaggtaggag gagagacaga gacagatcca ttcgattagt gaacggatct 3360
 cgacggtatc ggtaacttt taaaagaaaa ggggggattg ggggggtacag tgcaggggaa 3420
 agaatagtag acataatagc aacagacata caaactaaag aattacaaaa acaaattaca 3480
 aaaattcaaa attttatcga tcacgagact agcctcgaga agcttgatat cgaattccac 3540

 ggggttgggg ttgcgccttt tccaaggcag ccctgggttt gcgcaggac gcggtgctc 3600
 tgggcgtggt tccgggaac gcagcggcgc cgacctggg tctcgacat tcttcacgtc 3660
 cgttcgagc gtcaccgga tcttcgccgc tacccttggt gggccccgg cgacgttcc 3720
 tgctccgcc ctaagtcggg aaggttcctt gcggttcgcg gcgtgccgga cgtgacaaac 3780
 ggaagccgca cgtctacta gtacctcgc agacggacag cgccaggag caatggcagc 3840
 gcgccgaccg cgatgggctg tggccaatag cggtgtctca gcaggcgcg ccgagagcag 3900
 cggccgggaa ggggcggtgc gggaggcggg gtgtggggcg gtagtgtggg ccctgttctt 3960

gccccgcgcg tgttccgcat tctgcaagcc tccggagcgc acgtcggcag tcggctccct 4020
cgttgaccga atcacccgacc tctctcccca gggggatccc ccgggctgca ggaattcatg 4080
tccgactcgt gggccccgaa ctccgcctcg ggccaggacc cagggggccg ccggaggggc 4140
tgggccgagc tgctggcggg aagggtcaag agggaaaaat ataactctga aagggcacag 4200
aaattaaagg aatcagctgt gcgcctcctg cgaagccatc aggacctgaa tgcccttttg 4260
cttgaggtag aaggccact gtgtaaaaaa ttgtctctca gcaaagtgat tgactgtgac 4320
agttctgagg cctatgctaa tcattctagt tcatttatag gctctgcttt gcaggatcaa 4380

gcctcaaggc tgggggttcc cgtgggtatt ctctcagccg ggatggttgc ctctagcgtg 4440
ggacagatct gcacggctcc agcggagacc agtcaccctg tgctgctgac tgtggagcag 4500
agaaagaagc tgccttcctt gttagagttt gctcagtatt tattggcaca cagtatgttc 4560
tcccgtcttt cttctgtca agaattatgg aaaatacaga gttctttgtt gcttgaagcg 4620
gtgtggcatc ttcacgtaca aggcattgtg agcctgcaag agctgctgga aagccatccc 4680
gacatgcatg ctgtgggacg gtggctcttc aggaatctgt gctgcctttg tgaacagatg 4740
gaagcactct gccagcatgc tgacgtcgcc agggccatgc tttctgattt tgttcaaatg 4800

tttgttttga ggggatttca gaaaaactca gatctgagaa gaactgtgga gcctgaaaaa 4860
atgccgcagg tcacggttga tgtactgcag agaatgctga tttttgact tgacgctttg 4920
gctgctggag tacaggagga gtccctccact cacaagatcg tgagggtctg gttcggagtg 4980
ttcagtggac acacgcttgg cagtgttaatt tccacagatc ctctgaagag gttcttcagt 5040
cataccctga ctcagatact cactcacagc cctgtgctga aagcatctga tgctgttcag 5100
atgcagagag agtggagctt tgccgcggaca caccctctgc tcacctact gtaccgcagg 5160
ctctttgtga tgctgagtc agaggagtgt gttggccatt tgcaagaagt tctggaaacg 5220

caggaggttc actggcagag agtgcctctc tttgtgtctg ccctggttgt ctgctttcca 5280
gaagcgcagc agctgcttga agactgggtg gcgcgtttga tggcccaggc attcgagagc 5340
tgccagctgg acagcatggt cactgcgttc ctggttgtgc gccaggcagc actggagggc 5400
ccctctgcgt tectgtcata tgcagactgg ttcaaggcct cctttgggag cacacgaggc 5460
taccatggct gcagcaagaa ggccctggtc ttctgttta cgttcttgtc agaactcgtg 5520
ccttttgagt ctccccgta cctgcaggtg cacattctcc accaccct ggttcccagc 5580
aagtaccgt cctcctcac agactacatc tcattggcca agacacggct ggccgacctc 5640

aaggtttcta tagaaaacat gggactctac gaggatttgt catcagctgg ggacattact 5700
gagccccaca gccaagctct tcaggatgtt gaaaaggcca tcatggtgtt tgagcatacg 5760
gggaacatcc cagtcaccgt catggaggcc agcatattca ggaggcctta ctactgtcc 5820

cacttctcc ccgcccgtct cacacctga gtgctccca aagtcctga ctcccgtgtg 5880
 gcgtttatag agtctctgaa gagagcagat aaaatcccc catctctgta ctccacctac 5940
 tgccaggcct gctctgtctg tgaagagaag ccagaagatg cagccctggg agtgagggca 6000
 gaacccaact ctgctgagga gcccctggga cagctcacag ctgcactggg agagctgaga 6060

gcctccatga cagaccccag ccagcgtgat gttatatcgg cacaggtggc agtgatttct 6120
 gaaagactga gggtgtcct gggccacaat gaggatgaca gcagcgttga gatatcaaag 6180
 attcagctca gcatcaacac gccgagactg gagccacggg aacacattgc tgtggacctc 6240
 ctgctgacgt ctttctgtca gaacctgatg gctgcctcca gtgtcgtcc cccggagagg 6300
 cagggtccct gggtgcctct ctctgtgagg accatgtgtg gacgtgtgct cctgcagtg 6360
 ctccccggc tctgccagct gctccgtcac caggggccga gcctgagtgc cccacatgtg 6420
 ctggggttgg ctgcccctggc cgtgcacctg ggtgagtcca ggtctgcgt cccagaggtg 6480

gatgtgggtc ctctgcacc tgggtctggc ctctctgtcc ctgcgtctt tgacagcctc 6540
 ctgacctgta ggacgagggg ttcttgttc ttctgcctga aattttgtac agcagcaatt 6600
 tcttactctc tctgcaagtt ttcttcccag tcacgagata ctttgtgcag ctgcttatct 6660
 ccaggcctta ttaaaaagtt tcagttctc atgttcagat tgttctcaga ggcccagacg 6720
 cctctttctg aggaggacgt agccagcctt tcttgagac ccttgcacct tcttctgca 6780
 gactggcaga gagctgcct ctctctctgg acacacagaa ccttccgaga ggtgttgaaa 6840
 gaggaagatg ttacttaac ttaccaagac tggttacacc tggagctgga aattcaacct 6900

gaagctgatg ctctttcaga tactgaacgg caggacttcc accagtgggc gatccatgag 6960
 cactttctcc ctgagtcctc ggcttcaggg ggctgtgacg gagacctga ggctgcgtgt 7020
 accattcttg tcaacgcact gatggatttc caccaaagct caaggagtta tgaccactca 7080
 gaaaattctg atttggcttt tgggtggccgc acaggaaatg aggatattat ttccagattg 7140
 caggagatgg tagctgacct ggagctgcag caagacctca tagtgcctct cggccacacc 7200
 ctttcccagg agcatttct ctttgagatt ttccgcagac ggctccagc tctgacaagc 7260
 ggggtggagcg tggctgccag ctttcagaga cagagggagc tgctaattga caaacggatc 7320

ctctccgcc tgccttcgtc tgtcctctgc ggcagcagct tccaggcaga acagcccatc 7380
 actgccagat gcgagcagtt ctccacttg gtcaactctg agatgagaaa ctctgtctcc 7440
 cacggagggtg cctgacaca ggacatcact gccacttct tcaggggcct cctgaacgcc 7500
 tgtctgcgga gcagagaccc ctccctgatg gtcgacttca tactggccaa gtgccagacg 7560
 aaatgccct taattttgac ctctgctctg gtgtgggtggc cgagcctgga gcctgtgctg 7620
 ctctgccggt ggaggagaca ctgccagac ccgctgcccc gggaactgca gaagctacaa 7680

gaaggccggc agtttgccag cgatttcctc tcccctgagg ctgcctcccc agcacccaac	7740
ccggactggc tctcagctgc tgcactgcac tttgcgattc aacaagtcag ggaagaaaac	7800
atcaggaagc agctaaagaa gctggactgc gagagagagg agctattggt tttccttttc	7860
ttctttctct tgatgggcct gctgtcgtca catctgacct caaatagcac cacagacctg	7920
ccaaaggttt tccacgtttg tgcagcaatc ctcgagtgtt tagagaagag gaagatatcc	7980
tggtctggc acctttcagtt gacagagagt gacctcaggc tggggcggct cctcctccgt	8040
gtggccccgg atcagcacac caggctgctg cctttcgttt ttacagttct tctctctac	8100
ttccatgaag acgcggccat cagggaagag gccttcctgc atgttgctgt ggacatgtac	8160
ttgaagctgg tccagctctt cgtggctggg gatacaagca cagtttcacc tccagctggc	8220
aggagcctgg agctcaaggg tcagggaac cccgtggaac tgataacaaa agctcgtctt	8280
tttctgctgc agttaatacc tcgggtcccc aaaaagagct tctcacacgt ggcagagctg	8340
ctggctgac gtggggactg cgaccagag gtgagcgccg cctccagag cagacagcag	8400
gctgccccctg acgtgacct gtcccaggag cctcatctct tctgatgaga attcgatgc	8460
aagcttatcg ataccgtcga atccccggg ctgcaggaat tcgagcatct taccgccatt	8520
tattcccata ttgtttctgt ttttcttgat ttgggtatac atttaaatgt taataaaaca	8580
aaatgggtgg gcaatcatth acatthtttag ggatatgtaa ttactagttc aggtgtattg	8640
ccacaagaca aacatgttaa gaaactttcc cgttatttac gctctgttcc tgtaatacaa	8700
cctctggatt acaaaatttg tgaaagattg actgatattc ttaactatgt tgctcctttt	8760
acgtgtgtg gatatgtgc tttaatgect ctgtatcatg ctattgcttc ccgtacggct	8820
ttcgttttct cctccttgta taaatcctgg ttgctgtctc tttatgagga gttgtggccc	8880
gttgtccgtc aacgtggcgt ggtgtgtctc gtgtttgtcg acgcaacccc cactggtggt	8940
ggcattgcca ccacctgtca actcctttct gggactttcg ctttccccct cccgatcgcc	9000
acggcagaac tcatcgccgc ctgccttgcc cgctgctgga caggggctag gttgctgggc	9060
actgataatt ccgtggtgtt gtcggggaag ggctgtctgc cggctctgcg gcctcttccg	9120
cgtcttcgcc ttcgccccca gacgagtcgg atctcccttt gggccgcctc cccgcctgga	9180
attcgagctc ggtaccttta agaccaatga cttacaaggc agctgtagat cttagccact	9240
ttttaaaaga aaagggggga ctggaagggc taattcactc ccaacgaaga caagatctgc	9300
tttttgcttg tactgggtct ctctggttag accagatctg agcctgggag ctctctggct	9360
aactagggaa cccactgctt aagcctcaat aaagcttgcc ttgagtgtct caagtagtgt	9420

gtgcccgctct gttgtgtgac tctggtaact agagatccct cagacccttt tagtcagtgt	9480
ggaaaatctc tagcagtagt agttcatgtc atcttattat tcaglattta taacttgcaa	9540
agaaatgaat atcagagagt gagaggaact tgtttattgc agcttataat ggttacaaat	9600
aaagcaatag catcacaaat ttacacaaata aagcattttt ttactgcat tctagtgtg	9660
gtttgtccaa actcatcaat gtatcttatt atgtctggct ctagctatcc cgcccctaac	9720
tccgcccatac ccgcccctaa ctccgcccag ttccgcccct tctccgcccc atggctgact	9780
aatttttttt atttatgcag aggccgaggc cgctcggcc tctgagctat tccagaagta	9840
gtgaggaggc ttttttgag gcctaggac gtaccaatt cgccctatag tgagtctat	9900
tacgcgcgt cactggcgt cgttttaca cgtctgact gggaaaacc tggcgtaacc	9960
caacttaac gccttcagc acatccccct ttccgagct ggcgtaatag cgaagaggcc	10020
cgcaccgac gcccttccca acagttgcgc agcctgaatg gcgaatggga cgcgcctgt	10080
agcggcgcat taagcgcgc ggggtgtgtg gttacgcga gcgtgaccgc tacacttgcc	10140
agcgccttag cgcccgctcc ttctgctttc ttcccttct ttctcgccac gttcgccggc	10200
tttcccgctc aagctctaaa tcgggggctc ctttaggggt tccgatttag tgctttacgg	10260
cacctgacc caaaaaact tgattagggt gatggttcac gtagtgggc atcgccctga	10320
tagacggttt ttcccccctt gacgttgag tccacgttct ttaatagtgg actctgttc	10380
caaaactgaa caaacactca ccctatctcg gtctattctt ttgatttata agggattttg	10440
ccgatttcgg cctattggtt aaaaaatgag ctgatttaac aaaaatttaa cgcgaatttt	10500
aacaaaatat taacgcttac aatttaggtg gcacttttcg gggaaatgtg cgcggaacc	10560
ctatttgttt atttttctaa atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga caataaccct	10620
gataaatgct tcaataatag cacctagatc aagagacagg atgaggatcg ttctgcatga	10680
ttgaacaaga tggattgcac gcagttctc cgcccgcttg ggtggagagg ctattcggt	10740
atgactgggc acaacagaca atcggtctgt ctgatgccgc cgtgttccgg ctgtcagcgc	10800
aggggcgccc ggttcttttt gtcaagaccg acctgtccgg tgccctgaat gaactgcaag	10860
acgaggcagc gcggctatcg tggctggcca cgacggcggt tccttgcgca gctgtgctcg	10920
acgttgtcac tgaagcggga agggactggc tgctattggg cgaagtgccg gggcaggatc	10980
tcctgtcatc tcacctgtct cctgccgaga aagtatccat catggctgat gcaatcggc	11040
ggctgcatac gcttgatccg gctacctgcc cattcgacca ccaagcgaat catcgcatcg	11100
agcgagcacg tactcggatg gaagccggtc ttgtcgatca ggatgatctg gacgaagagc	11160
atcaggggct cgcgccagcc gaactgttcg ccaggctcaa ggcgagcatg cccgacggcg	11220
aggatctcgt cgtgacccat ggcgatgcct gcttgccgaa tatcatggtg gaaaatggcc	11280

gcttttctgg attcatcgac tgtggccggc tgggtgtggc ggaccgctat caggacatag 11340
cgttggctac ccgtgatatt gctgaagagc ttggcggcga atgggctgac cgcttcctcg 11400
tgctttacgg tatcgccgct cccgattcgc agc 11433

<210> 25

<211> 1455

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Met Ser Asp Ser Trp Val Pro Asn Ser Ala Ser Gly Gln Asp Pro Gly

1 5 10 15

Gly Arg Arg Arg Ala Trp Ala Glu Leu Leu Ala Gly Arg Val Lys Arg

20 25 30

Glu Lys Tyr Asn Pro Glu Arg Ala Gln Lys Leu Lys Glu Ser Ala Val

35 40 45

Arg Leu Leu Arg Ser His Gln Asp Leu Asn Ala Leu Leu Leu Glu Val

50 55 60

Glu Gly Pro Leu Cys Lys Lys Leu Ser Leu Ser Lys Val Ile Asp Cys

65 70 75 80

Asp Ser Ser Glu Ala Tyr Ala Asn His Ser Ser Ser Phe Ile Gly Ser

85 90 95

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

100 105 110

Ser Ala Gly Met Val Ala Ser Ser Val Gly Gln Ile Cys Thr Ala Pro

115 120 125

Ala Glu Thr Ser His Pro Val Leu Leu Thr Val Glu Gln Arg Lys Lys

130 135 140

Leu Ser Ser Leu Leu Glu Phe Ala Gln Tyr Leu Leu Ala His Ser Met

145 150 155 160

Phe Ser Arg Leu Ser Phe Cys Gln Glu Leu Trp Lys Ile Gln Ser Ser

165 170 175

Leu Leu Leu Glu Ala Val Trp His Leu His Val Gln Gly Ile Val Ser

180 185 190
 Leu Gln Glu Leu Leu Glu Ser His Pro Asp Met His Ala Val Gly Ser
 195 200 205
 Trp Leu Phe Arg Asn Leu Cys Cys Leu Cys Glu Gln Met Glu Ala Ser
 210 215 220
 Cys Gln His Ala Asp Val Ala Arg Ala Met Leu Ser Asp Phe Val Gln
 225 230 235 240
 Met Phe Val Leu Arg Gly Phe Gln Lys Asn Ser Asp Leu Arg Arg Thr
 245 250 255

 Val Glu Pro Glu Lys Met Pro Gln Val Thr Val Asp Val Leu Gln Arg
 260 265 270
 Met Leu Ile Phe Ala Leu Asp Ala Leu Ala Ala Gly Val Gln Glu Glu
 275 280 285
 Ser Ser Thr His Lys Ile Val Arg Cys Trp Phe Gly Val Phe Ser Gly
 290 295 300
 His Thr Leu Gly Ser Val Ile Ser Thr Asp Pro Leu Lys Arg Phe Phe
 305 310 315 320

 Ser His Thr Leu Thr Gln Ile Leu Thr His Ser Pro Val Leu Lys Ala
 325 330 335
 Ser Asp Ala Val Gln Met Gln Arg Glu Trp Ser Phe Ala Arg Thr His
 340 345 350
 Pro Leu Leu Thr Ser Leu Tyr Arg Arg Leu Phe Val Met Leu Ser Ala
 355 360 365
 Glu Glu Leu Val Gly His Leu Gln Glu Val Leu Glu Thr Gln Glu Val
 370 375 380

 His Trp Gln Arg Val Leu Ser Phe Val Ser Ala Leu Val Val Cys Phe
 385 390 395 400
 Pro Glu Ala Gln Gln Leu Leu Glu Asp Trp Val Ala Arg Leu Met Ala
 405 410 415
 Gln Ala Phe Glu Ser Cys Gln Leu Asp Ser Met Val Thr Ala Phe Leu
 420 425 430

Val Val Arg Gln Ala Ala Leu Glu Gly Pro Ser Ala Phe Leu Ser Tyr
435 440 445

Ala Asp Trp Phe Lys Ala Ser Phe Gly Ser Thr Arg Gly Tyr His Gly
450 455 460

Cys Ser Lys Lys Ala Leu Val Phe Leu Phe Thr Phe Leu Ser Glu Leu
465 470 475 480

Val Pro Phe Glu Ser Pro Arg Tyr Leu Gln Val His Ile Leu His Pro
485 490 495

Pro Leu Val Pro Ser Lys Tyr Arg Ser Leu Leu Thr Asp Tyr Ile Ser
500 505 510

Leu Ala Lys Thr Arg Leu Ala Asp Leu Lys Val Ser Ile Glu Asn Met
515 520 525

Gly Leu Tyr Glu Asp Leu Ser Ser Ala Gly Asp Ile Thr Glu Pro His
530 535 540

Ser Gln Ala Leu Gln Asp Val Glu Lys Ala Ile Met Val Phe Glu His
545 550 555 560

Thr Gly Asn Ile Pro Val Thr Val Met Glu Ala Ser Ile Phe Arg Arg
565 570 575

Pro Tyr Tyr Val Ser His Phe Leu Pro Ala Leu Leu Thr Pro Arg Val
580 585 590

Leu Pro Lys Val Pro Asp Ser Arg Val Ala Phe Ile Glu Ser Leu Lys
595 600 605

Arg Ala Asp Lys Ile Pro Pro Ser Leu Tyr Ser Thr Tyr Cys Gln Ala
610 615 620

Cys Ser Ala Ala Glu Glu Lys Pro Glu Asp Ala Ala Leu Gly Val Arg
625 630 635 640

Ala Glu Pro Asn Ser Ala Glu Glu Pro Leu Gly Gln Leu Thr Ala Ala
645 650 655

Leu Gly Glu Leu Arg Ala Ser Met Thr Asp Pro Ser Gln Arg Asp Val
660 665 670

Ile Ser Ala Gln Val Ala Val Ile Ser Glu Arg Leu Arg Ala Val Leu

675 680 685
 Gly His Asn Glu Asp Asp Ser Ser Val Glu Ile Ser Lys Ile Gln Leu
 690 695 700

Ser Ile Asn Thr Pro Arg Leu Glu Pro Arg Glu His Ile Ala Val Asp
 705 710 715 720
 Leu Leu Leu Thr Ser Phe Cys Gln Asn Leu Met Ala Ala Ser Ser Val
 725 730 735
 Ala Pro Pro Glu Arg Gln Gly Pro Trp Ala Ala Leu Phe Val Arg Thr
 740 745 750
 Met Cys Gly Arg Val Leu Pro Ala Val Leu Thr Arg Leu Cys Gln Leu
 755 760 765

Leu Arg His Gln Gly Pro Ser Leu Ser Ala Pro His Val Leu Gly Leu
 770 775 780
 Ala Ala Leu Ala Val His Leu Gly Glu Ser Arg Ser Ala Leu Pro Glu
 785 790 795 800
 Val Asp Val Gly Pro Pro Ala Pro Gly Ala Gly Leu Pro Val Pro Ala
 805 810 815
 Leu Phe Asp Ser Leu Leu Thr Cys Arg Thr Arg Asp Ser Leu Phe Phe
 820 825 830

Cys Leu Lys Phe Cys Thr Ala Ala Ile Ser Tyr Ser Leu Cys Lys Phe
 835 840 845
 Ser Ser Gln Ser Arg Asp Thr Leu Cys Ser Cys Leu Ser Pro Gly Leu
 850 855 860
 Ile Lys Lys Phe Gln Phe Leu Met Phe Arg Leu Phe Ser Glu Ala Arg
 865 870 875 880
 Gln Pro Leu Ser Glu Glu Asp Val Ala Ser Leu Ser Trp Arg Pro Leu
 885 890 895

His Leu Pro Ser Ala Asp Trp Gln Arg Ala Ala Leu Ser Leu Trp Thr
 900 905 910
 His Arg Thr Phe Arg Glu Val Leu Lys Glu Glu Asp Val His Leu Thr
 915 920 925

Tyr Gln Asp Trp Leu His Leu Glu Leu Glu Ile Gln Pro Glu Ala Asp
 930 935 940
 Ala Leu Ser Asp Thr Glu Arg Gln Asp Phe His Gln Trp Ala Ile His
 945 950 955 960

 Glu His Phe Leu Pro Glu Ser Ser Ala Ser Gly Gly Cys Asp Gly Asp
 965 970 975
 Leu Gln Ala Ala Cys Thr Ile Leu Val Asn Ala Leu Met Asp Phe His
 980 985 990
 Gln Ser Ser Arg Ser Tyr Asp His Ser Glu Asn Ser Asp Leu Val Phe
 995 1000 1005
 Gly Gly Arg Thr Gly Asn Glu Asp Ile Ile Ser Arg Leu Gln Glu
 1010 1015 1020

 Met Val Ala Asp Leu Glu Leu Gln Gln Asp Leu Ile Val Pro Leu
 1025 1030 1035
 Gly His Thr Pro Ser Gln Glu His Phe Leu Phe Glu Ile Phe Arg
 1040 1045 1050
 Arg Arg Leu Gln Ala Leu Thr Ser Gly Trp Ser Val Ala Ala Ser
 1055 1060 1065
 Leu Gln Arg Gln Arg Glu Leu Leu Met Tyr Lys Arg Ile Leu Leu
 1070 1075 1080

 Arg Leu Pro Ser Ser Val Leu Cys Gly Ser Ser Phe Gln Ala Glu
 1085 1090 1095
 Gln Pro Ile Thr Ala Arg Cys Glu Gln Phe Phe His Leu Val Asn
 1100 1105 1110
 Ser Glu Met Arg Asn Phe Cys Ser His Gly Gly Ala Leu Thr Gln
 1115 1120 1125
 Asp Ile Thr Ala His Phe Phe Arg Gly Leu Leu Asn Ala Cys Leu
 1130 1135 1140

 Arg Ser Arg Asp Pro Ser Leu Met Val Asp Phe Ile Leu Ala Lys
 1145 1150 1155
 Cys Gln Thr Lys Cys Pro Leu Ile Leu Thr Ser Ala Leu Val Trp

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

Ala Arg	Leu Phe	Leu Leu	Gln	Leu Ile	Pro Arg	Cys	Pro Lys	Lys
1400			1405				1410	
Ser Phe	Ser His	Val Ala	Glu	Leu Leu	Ala Asp	Arg	Gly Asp	Cys
1415			1420				1425	
Asp Pro	Glu Val	Ser Ala	Ala	Leu Gln	Ser Arg	Gln	Gln Ala	Ala
1430			1435				1440	
Pro Asp	Ala Asp	Leu Ser	Gln	Glu Pro	His Leu	Phe		
1445			1450				1455	