



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0128519
(43) 공개일자 2020년11월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/86 (2006.01) A61K 38/36 (2006.01)
A61P 7/00 (2006.01) C07K 14/705 (2006.01)
C07K 14/755 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/86 (2013.01)
A61K 38/36 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-7022774
(22) 출원일자(국제) 2019년01월11일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2020년08월06일
(86) 국제출원번호 PCT/US2019/013361
(87) 국제공개번호 WO 2019/140311
국제공개일자 2019년07월18일
(30) 우선권주장
62/616,167 2018년01월11일 미국(US)
62/768,779 2018년11월16일 미국(US)

(71) 출원인
카멜리온 바이오사이언시즈, 인크.
미국 94710 캘리포니아주 버클리 스위트 에이 밴
크로프트 웨이 626
(72) 발명자
원슬로우, 제닌
미국 94710 캘리포니아주 버클리 스위트 에이 밴
크로프트 웨이 626
(74) 대리인
양영준, 이상남

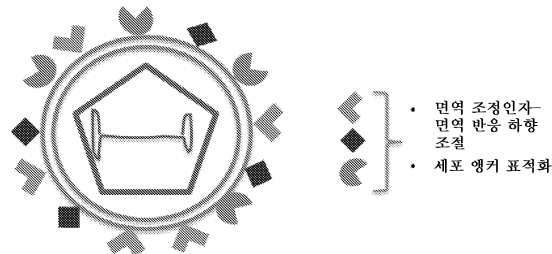
전체 청구항 수 : 총 75 항

(54) 발명의 명칭 면역 회피 백터 및 유전자 요법을 위한 용도

(57) 요약

외피로 둘러싸인 바이러스 입자를 포함하는 외피보유 바이러스 백터로서, 여기서 바이러스 입자는 이중 트랜스진
을 포함하고, 외피는 지질 이중층 및 하나 이상의 면역억제 분자를 포함하는 것인 외피보유 바이러스 백터, 및
그의 제조 방법 및 사용 방법이 제공된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 7/00 (2018.01)

C07K 14/70521 (2013.01)

C07K 14/70532 (2013.01)

C07K 14/755 (2013.01)

C12N 2750/14143 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

외피로 둘러싸인 바이러스 입자를 포함하는 외피보유 바이러스 벡터로서, 여기서 바이러스 입자는 이중 트랜스 진을 포함하고, 외피는 지질 이중층 및 하나 이상의 면역억제 분자를 포함하는 것인 외피보유 바이러스 벡터.

청구항 2

제1항에 있어서, 외피보유 바이러스가 지질 이중층에 면역억제 분자를 갖지 않는 동일한 유형의 벡터와 비교하여 감소된 면역원성을 갖는 것인 외피보유 바이러스 벡터.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 하나 이상의 면역억제 분자가 하나 이상의 면역 체크포인트 단백질을 포함하는 것인 외피보유 바이러스 벡터.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 면역억제 분자가 CTLA4, B7-1, B7-2, PD-1, PD-L1, PD-L2, CD28, VISTA, TIM-3, GAL9, TIGIT, CD155, LAG3, VISTA, BTLA 또는 HVEM 중 하나 이상을 포함하는 것인 외피보유 바이러스 벡터.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 외피가 2종 이상, 3종 이상, 또는 4종 이상의 상이한 면역억제 분자를 포함하거나; 또는 2종 이상, 3종 이상, 또는 4종 이상의 상이한 체크포인트 단백질을 포함하는 것인 외피보유 바이러스 벡터.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 외피가 CTLA4 및 PD-L1; CTLA 및 PD-L2; CTLA-4 및 VISTA; PD-L1 및 PD-L2; PD-L1 및 VISTA; PD-L2 및 VISTA; CTLA4 및 PD-L1 및 PD-L2; CTLA4 및 PD-L1 및 VISTA; CTLA4 및 PD-L2 및 VISTA; PD-L1 및 PD-L2 및 VISTA; 또는 CTLA4 및 PD-L1 및 PD-L1 및 VISTA를 포함하는 것인 외피보유 바이러스 벡터.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 면역억제 분자 중 하나 이상이 막횡단 도메인을 포함하는 것인 외피보유 바이러스 벡터.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 외피가 표적화 분자를 추가로 포함하는 것인 외피보유 바이러스 벡터.

청구항 9

제8항에 있어서, 표적화 분자가 외피보유 벡터에 세포- 또는 조직-특이성을 부여하는 것인 외피보유 바이러스 벡터.

청구항 10

제9항에 있어서, 표적화 분자가 항체인 외피보유 바이러스 벡터.

청구항 11

제8항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 표적화 분자가 막횡단 도메인을 포함하는 것인 외피보유 바이러스 벡터.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 외피가 하나 이상의 면역억제 분자를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는 세포로부터의 세포막의 일부를 포함하는 것인 외피보유 바이러스 벡터.

청구항 13

제12항에 있어서, 바이러스 입자가 바이러스 캡시드 및 바이러스 게놈을 포함하고, 바이러스 게놈이 이중 트랜스진을 포함하는 것인 외피보유 바이러스 벡터.

청구항 14

제13항에 있어서, 이중 트랜스진이 폴리펩티드를 코딩하는 것인 외피보유 바이러스 벡터.

청구항 15

제14항에 있어서, 이중 트랜스진이 치료 폴리펩티드 또는 수용체 폴리펩티드를 코딩하는 것인 외피보유 바이러스 벡터.

청구항 16

제13항에 있어서, 이중 트랜스진이 인자 VIII, 인자 IX, 미오투블라린, 생존 운동 뉴런 단백질 (SMN), 레티노이드 이소머로히드롤라제 (RPE65), NADH-유비퀴논 옥시도리덕타제 체 4, 맥락막결손증 단백질 (CHM), 헌팅틴, 알파-갈락토시다제 A, 산 베타-글루코시다제, 알파-글루코시다제, 오르니틴 트랜스카르바밀라제, 아르기노숙시네이트 신테타제, β -글로빈, γ -글로빈, 페닐알라닌 히드록실라제, 또는 부신백질이영양증 단백질 (ALD)을 코딩하는 것인 외피보유 바이러스 벡터.

청구항 17

제13항에 있어서, 이중 트랜스진이 치료 핵산을 코딩하는 것인 외피보유 바이러스 벡터.

청구항 18

제17항에 있어서, 치료 핵산이 siRNA, miRNA, shRNA, 안티센스 RNA, RNAzyme, 또는 DNAzyme인 외피보유 바이러스 벡터.

청구항 19

제13항에 있어서, 이중 트랜스진이 하나 이상의 유전자 편집 산물을 코딩하는 것인 외피보유 바이러스 벡터.

청구항 20

제19항에 있어서, 하나 이상의 유전자 편집 산물이 RNA-가이드된 뉴클레아제, 가이드 핵산, 및/또는 도너 핵산인 외피보유 바이러스 벡터.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 바이러스 입자가 아데노-연관 바이러스 벡터 (AAV)를 포함하는 것인 외피보유 바이러스 벡터.

청구항 22

제21항에 있어서, AAV 벡터가 인간 AAV 혈청형 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11 또는 AAV12로부터의 캡시드를 포함하는 것인 외피보유 바이러스 벡터.

청구항 23

제21항 또는 제22항에 있어서, AAV가 역위 말단 반복 (ITR) 서열을 포함하는 AAV 바이러스 게놈을 포함하며, 여

기서 AAV 캡시드 및 AAV ITR은 동일한 AAV 혈청형으로부터의 것 또는 상이한 AAV 혈청형으로부터의 것인 외피보유 바이러스 벡터.

청구항 24

제1항 및 제21항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 외피보유 바이러스 벡터가 인간 인자 IX를 코딩하는 이중 트랜스진을 포함하는 외피보유 AAV이고, 외피가 CTLA-4 및 PD-L1을 함유하도록 조작된 엑소솜인 외피보유 바이러스 벡터.

청구항 25

제1항 및 제21항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 외피가 CTLA-4 및 PD-L1을 과다발현하도록 조작된 생산자 세포로부터의 엑소솜인 외피보유 바이러스 벡터.

청구항 26

제1항 및 제21항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 외피보유 바이러스 벡터가 인간 인자 VIII을 코딩하는 이중 트랜스진을 포함하는 외피보유 AAV이고, 외피가 CTLA-4 및 PD-L1을 함유하도록 조작된 엑소솜인 외피보유 바이러스 벡터.

청구항 27

제26항에 있어서, 외피가 CTLA-4 및 PD-L1을 과다발현하도록 조작된 생산자 세포로부터의 엑소솜인 외피보유 바이러스 벡터.

청구항 28

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 바이러스 입자가 렌티바이러스 벡터를 포함하는 것인 외피보유 바이러스 벡터.

청구항 29

제28항에 있어서, 렌티바이러스 벡터가 인간 면역결핍 바이러스, 원숭이 면역결핍 바이러스 또는 고양이 면역결핍 바이러스인 외피보유 바이러스 벡터.

청구항 30

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체에게 단일 용량으로서 투여되었을 때 벡터가, 대상체에게 투여 후 3-주에, 동일한 양으로 및 동일한 조건 하에 동일한 유형의 비-외피보유 바이러스 벡터의 투여에 의해 생산된 트랜스진 발현과 비교하여 약 50% 이상만큼 증가된 트랜스진 발현 수준을 제공하는 것인 외피보유 바이러스 벡터.

청구항 31

제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 벡터가, 대상체에게 단일 용량으로서 투여 후 3-주에, 동일한 조건 하에 면역억제 분자 없이 동일한 양으로 동일한 유형의 외피보유 바이러스 벡터의 투여에 의해 생산된 트랜스진 발현과 비교하여 약 20% 이상만큼 증가된 트랜스진 발현 수준을 제공하는 것인 외피보유 바이러스 벡터.

청구항 32

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항의 외피보유 바이러스 벡터 및 하나 이상의 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 조성물.

청구항 33

트랜스진을 세포 또는 대상체에게 전달하는 방법으로서, 세포 또는 대상체에게 제1항 내지 제31항 중 어느 한 항의 외피보유 바이러스 벡터 또는 제32항의 조성물을 투여하는 것을 포함하는 방법.

청구항 34

제33항에 있어서, 대상체가 트랜스진의 전달 및 발현에 의해 치료될 수 있는 질환 또는 병태를 앓는 것인 방법.

청구항 35

대상체에서 질환 또는 장애를 치료하는 방법으로서, 대상체에게 제1항 내지 제31항 중 어느 한 항의 외피보유 바이러스 벡터 또는 제32항의 조성물을 투여하는 것을 포함하는 방법.

청구항 36

제33항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 인간인 방법.

청구항 37

제34항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 질환 또는 장애가 단일유전자성 질환인 방법.

청구항 38

제34항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 질환 또는 장애가 근세관성 근병증, 척수성 근위축증, 레베르 선 천성 흑암시, A형 혈우병, B형 혈우병, 맥락막결손증, 헌팅톤병, 배튼병, 레베르 유전성 시신경병증, 오르니틴 트랜스카르바밀라제 (OTC) 결핍증, 폼페병, 파브리병, 시트룰린혈증 1형, 페닐케톤뇨증 (PKU), 부신백질이영양증, 겸상 세포 질환, 니만-픽병, 또는 베타 지중해빈혈인 방법.

청구항 39

제34항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 질환 또는 장애가 A형 혈우병 또는 B형 혈우병인 방법.

청구항 40

제34항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 B형 혈우병을 앓고, 외피보유 바이러스 벡터가 인자 IX를 코딩하는 이중 트랜스진을 포함하는 AAV를 포함하고, 외피가 CTLA-4 및 PD-L1을 함유하도록 조작된 엑소솜인 방법.

청구항 41

제34항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 A형 혈우병을 앓고, 외피보유 바이러스 벡터가 인간 인자 VIII을 코딩하는 이중 트랜스진을 포함하는 외피보유 AAV를 포함하고, 외피가 CTLA-4 및 PD-L1을 함유하도록 조작된 엑소솜인 방법.

청구항 42

제40항 또는 제41항에 있어서, 외피가 CTLA-4 및 PD-L1을 과다발현하도록 조작된 생산자 세포로부터의 엑소솜인 방법.

청구항 43

제33항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 방법이 각 용량 사이의 1일 이상의 간격으로 대상체에게 외피보유 바이러스 벡터의 2회 이상의 용량을 투여하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 44

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항의 외피보유 바이러스 벡터를 생산하는 방법으로서,

- a) 외피보유 바이러스 입자를 생성하는 조건 하에 시험관내에서 바이러스 생산자 세포를 배양하며, 여기서 바이러스 생산자 세포는 하나 이상의 막-결합된 면역억제 분자를 코딩하는 핵산을 포함하는 것인 단계, 및
- b) 외피보유 바이러스 벡터를 수집하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 45

제44항에 있어서, 바이러스 생산자 세포가 막-결합된 면역억제 분자를 코딩하는 외인성 핵산을 포함하는 것인

방법.

청구항 46

제44항 또는 제45항에 있어서, 바이러스 생산자 세포가 막-결합된 면역억제 분자를 코딩하는 이중성 핵산을 포함하는 것인 방법.

청구항 47

제44항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 막-결합된 면역억제 분자가 CTLA4, B7-1, B7-2, PD-1, PD-L1, PD-L2, CD28, VISTA, TIM-3, GAL9, TIGIT, CD155, LAG3, VISTA, BTLA 또는 HVEM 중 하나 이상을 포함하는 것인 방법.

청구항 48

제44항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 막-결합된 면역억제 분자가 CTLA4 및 PD-L1, CTLA 및 PD-L2, CTLA-4 및 VISTA, PD-L1 및 PD-L2, PD-L1 및 VISTA, PD-L2 및 VISTA, CTLA4 및 PD-L1 및 PD-L2, CTLA4 및 PD-L1 및 VISTA, CTLA4 및 PD-L2 및 VISTA, PD-L1 및 PD-L2 및 VISTA, 또는 CTLA4 및 PD-L1 및 PD-L1 및 VISTA를 포함하는 것인 방법.

청구항 49

제44항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 바이러스 생산자 세포가 CTLA-4 및 PD-L1을 코딩하는 이중성 핵산을 포함하는 것인 방법.

청구항 50

제44항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 막-결합된 면역억제 분자를 코딩하는 핵산이 일시적으로 바이러스 생산자 세포에 도입되는 것인 방법.

청구항 51

제44항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 막-결합된 면역억제 분자를 코딩하는 핵산이 안정적으로 바이러스 생산자 세포에서 유지되는 것인 방법.

청구항 52

제51항에 있어서, 하나 이상의 막-결합된 면역억제 분자를 코딩하는 핵산이 바이러스 생산자 세포의 게놈 내로 통합되는 것인 방법.

청구항 53

제44항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, 바이러스 생산자 세포가 하나 이상의 표적화 분자를 코딩하는 핵산을 포함하는 것인 방법.

청구항 54

제44항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서, 외피보유 바이러스 벡터가 외피보유 AAV 벡터인 방법.

청구항 55

제54항에 있어서, 바이러스 생산자 세포가

c) AAV rep 및 cap 유전자를 코딩하는 핵산,

d) 트랜스진 및 적어도 하나의 ITR을 포함하는 AAV 바이러스 게놈을 코딩하는 핵산, 및

e) AAV 헬퍼 기능

을 포함하는 것인 방법.

청구항 56

제55항에 있어서, AAV rep 및 cap 유전자 및/또는 AAV 바이러스 게놈을 코딩하는 핵산이 일시적으로 생산자 세포주에 도입되는 것인 방법.

청구항 57

제55항에 있어서, AAV rep 및 cap 유전자 및/또는 AAV 바이러스 게놈을 코딩하는 핵산이 안정적으로 생산자 세포주에서 유지되는 것인 방법.

청구항 58

제57항에 있어서, AAV rep 및 cap 유전자 및/또는 AAV 바이러스 게놈을 코딩하는 핵산이 안정적으로 생산자 세포주의 게놈 내로 통합되는 것인 방법.

청구항 59

제44항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 AAV 헬퍼 기능이 플라스미드, 아데노바이러스, 안정적으로 세포 게놈 내로 통합된 핵산, 또는 단순 헤르페스 바이러스 (HSV) 중 하나 이상에 의해 제공되는 것인 방법.

청구항 60

제44항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서, AAV 헬퍼 기능이 아데노바이러스 E1A 기능, 아데노바이러스 E1B 기능, 아데노바이러스 E2A 기능, 아데노바이러스 E4 기능 및 아데노바이러스 VA 기능 중 하나 이상을 포함하는 것인 방법.

청구항 61

제44항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서, AAV 헬퍼 기능이 HSV UL5 기능, HSV UL8 기능, HSV UL52 기능, 및 HSV UL29 기능 중 하나 이상을 포함하는 것인 방법.

청구항 62

제44항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서, 외피보유 바이러스 벡터가 렌티바이러스 벡터인 방법.

청구항 63

제62항에 있어서, 렌티바이러스 벡터가 인간 면역결핍 바이러스, 원숭이 면역결핍 바이러스 또는 고양이 면역결핍 바이러스인 방법.

청구항 64

제62항 또는 제63항에 있어서, 바이러스 생산자 세포가

f) 렌티바이러스 gag 유전자를 코딩하는 핵산,

g) 렌티바이러스 pol 유전자를 코딩하는 핵산,

h) 트랜스진, 5' 긴 말단 반복부 (LTR) 및 3' LTR을 포함하는 렌티바이러스 전달 벡터를 코딩하며, 여기서 3' LTR의 U3 영역 모두 또는 그의 일부는 이중성 조절 요소, 프라이머 결합 부위, GAG 유전자 모두 또는 그의 일부, 중심 폴리푸린 트랙, GAG 서열 내 합성 정지 코돈, rev 반응성 요소, 및 env 스플라이스 엑셉터에 의해 대체되는 것인 핵산

을 포함하는 것인 방법.

청구항 65

제44항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, 외피보유 벡터가 추가로 정제되는 것인 방법.

청구항 66

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항의 외피보유 바이러스 벡터 또는 제32항의 조성물을 포함하는 키트.

청구항 67

제66항에 있어서, 사용 설명서를 추가로 포함하는 키트.

청구항 68

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체에게 핵산을 전달하는데 사용하기 위한 외피보유 바이러스 벡터 또는 조성물.

청구항 69

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체에서 질환 또는 장애를 치료하는데 사용하기 위한 외피보유 바이러스 벡터 또는 조성물.

청구항 70

제68항 또는 제69항에 있어서, 제33항 내지 제43항 중 어느 한 항에 따라 대상체에게 핵산을 전달하는데 사용하기 위한 외피보유 바이러스 벡터 또는 조성물.

청구항 71

핵산의 전달을 필요로 하는 개체에게 핵산을 전달하기 위한 의약의 제조에서의 제1항 내지 제31항 중 어느 한 항의 외피보유 바이러스 벡터 또는 제32항의 조성물의 용도.

청구항 72

질환 또는 장애를 앓는 개체를 치료하기 위한 의약의 제조에서의 제1항 내지 제31항 중 어느 한 항의 외피보유 바이러스 벡터 또는 제32항의 조성물의 용도.

청구항 73

제72항에 있어서, 질환 또는 장애가 근세관성 근병증, 척수성 근위축증, 레베르 선천성 흑암시, A형 혈우병, B형 혈우병, 맥락막결손증, 헌팅톤병, 배튼병, 레베르 유전성 시신경병증, 오르니틴 트랜스카르바밀라제 (OTC) 결핍증, 폼페병, 파브리병, 시트룰린혈증 1형, 페닐케톤뇨증 (PKU), 부신백질이영양증, 겸상 세포 질환, 니만-픽병, 또는 베타 지중해빈혈인 용도.

청구항 74

제73항에 있어서, 질환 또는 장애가 A형 혈우병 또는 B형 혈우병인 용도.

청구항 75

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항의 외피보유 바이러스 벡터 또는 제32항의 조성물을 포함하는 제조 물품.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

관련 출원에 대한 상호 참조

[0002]

본 출원은 2018년 1월 11일에 출원된 미국 가출원 번호 62/616,167, 및 2018년 11월 16일에 출원된 미국 가출원 번호 62/768,779의 우선권 이익을 주장하며, 상기 가출원들의 전체 개시내용이 본원에 참조로 포함된다.

[0003]

ASCII 텍스트 파일의 서열 목록 제출

[0004]

하기 ASCII 텍스트 파일로 제공된 제출물의 내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다: 서열 목록의 컴퓨터 판독가능 형태 (CRF) (파일명: 774392000140SeqList.txt, 작성일: 2019년 1월 11일, 크기: 29 KB).

[0005]

본 발명의 분야

[0006]

본 개시내용은 일반적으로, 감소된 면역원성을 갖는 유전자 요법용 개선된 벡터에 관한 것이다.

배경 기술

- [0007] AAV 유전자 요법 임상 시험은 AAV가 척수성 근위축증 (SMA) (Meliani *et al.* (2017) *Blood Advances*, 1(23): 2019-31), B형 혈우병 (Nathwani *et al.* (2011) *N Engl J Med*, 365: 2357-65), 및 RPE65 유전자에서의 돌연변이에 의해 유발된 유전성 망막 질환 (Simonelli *et al.* (2010) *Molecular Therapy*, 18(3): 643-650)을 포함한 여러 단일유전자성 질환에 대한 질환 표현형을 역전시키는데 안전하게 사용될 수 있는 것으로 제시한 바 있다. 유망한 인간 임상 시험 데이터 이외에도, 예를 들어, 근세관성 근병증 (Childers *et al.* (2014) *Sci Transl Med*, 6: 220ra10)과 같이, AAV 유전자 요법을 이용하는 유망한 임상전 데이터의 추가 예가 또한 존재한다. 긍정적인 임상 및 임상전 데이터에도 불구하고, 재조합 AAV 및/또는 새로 발견된 치료 단백질에 대하여 생성된 면역 반응은 여전히, 단일유전자성 장애를 치료하기 위한 AAV 유전자 요법을 더욱 광범위하게 사용하지 못하게 막는 장벽이 되고 있다 (Mingozzi *et al.* (2013) *Blood*, 122(1): 23-36; Chermule *et al.* (1999) *Gene Therapy*; 6, 1574-1583; Masat *et al.* (2013) *Discov Med*, 15(85): 379-389).
- [0008] AAV 기반 유전자 요법이 치유력이 있을 수 있다는 것이 명백해졌지만, 단일 치료의 수명을 둘러싸고 의문이 제기되고 있다. 치료 단백질의 AAV 매개 전달은 최대 3년 동안 기능한다는 증거가 존재하지만 (Nathwani *et al.* (2014) *N Engl J Med*, 371: 1994-2004), 일생 동안 트랜스진 발현이 진행된다고 입증된 바도 있으며, 일부 경우에는 그러한 가능성은 없다. AAV 기반 벡터는 세포 염색체 내로 통합되지 않는 이중 가닥 DNA 루프 구조인 에피솜 요소로서 존속한다. 이러한 이유에서, AAV 계놈은 세포 분열 시, 복제 및 분열하지 않고, 세포 분열에 의해 희석될 수 있다. 연장된 트랜스진 발현을 확실하게 하기 위해, AAV 유전자 요법 연구원들은 천천히 분열하거나, 전혀 분열하지 않는 세포 유형; 예를 들어, 근육, 간, 또는 뉴런 세포를 표적화하였다. 그러므로, AAV 전달된 치료 유전자가 환자 일생 동안 발현되는지 여부는 알려져 있지 않다. 이는 실제로 예컨대, 척수성 근위축증과 같이, 어린 아동이 걸리는 생명을 위협하는 질환에서 특히 그러한데, 그 이유는 아동이 성장함에 따라 어린 아동의 근육 세포가 성인 근육 세포보다 더 많은 세포 분열을 거치게 되기 때문이다. 임상 데이터를 통해, 치료 유전자의 AAV 전달이 정의된 SMA 질환 중점을 개선시킬 수 있다고 제안되고 있지만, 발현 수준이 아동의 일생 동안 유지될 가능성은 없다. 실제로, 심지어는 천천히 분열하거나, 또는 분열하지 않는 세포를 위한 AAV 유전자 요법을 받고 있는 성인도 형질도입된 세포 내에서 AAV 계놈의 희석에 기인하여 환자의 일생 동안에 걸쳐 치료 단백질 수준 감소를 경험하게 될 가능성을 갖고 있다. 그러므로, 추가 용량의 AAV 유전자 요법 제품을 전달할 수 있는 것이 유익할 것이다.
- [0009] AAV 유전자 요법에 대한 숙주 면역 반응은 여전히 AAV 유전자 요법이 더욱 광범위하게 사용될 수 있기 전에 극복되어야 할 장애물로 남아있다. AAV는 자연적으로 발생된 바이러스이기 때문에, 환자 집단 중 일부는 상이한 AAV 혈청형에 대한 기존 항체를 갖고 있다. 예를 들어, 가장 일반적인 혈청형인 AAV2에 대한 기존 항체는 집단 중 최대 60%에서 발견될 수 있다 (Chiermule *et al.* (1999) *Gene Therapy*; 6, 1574-1583). 다른 AAV 혈청형은 덜 일반적이기는 하지만, 모든 조직 유형을 표적화하는데 사용될 수 없고; 예를 들어, AAV5는 우선적으로 간을 감염시키고, AAV8은 우선적으로 근육 세포를 표적화한다 (Asokan *et al.* (2012) *Molecular Therapy*, 20 (4) 699-708). AAV에 대한 기존 항체를 회피하면서, 선택적으로 특정 조직으로 표적화될 수 있는 차세대 AAV 벡터가 잠재적 환자 집단을 증가시키고, 단일 생산 플랫폼의 사용으로 다중 질환 표적을 위한 벡터를 처리할 수 있도록 할 것이다.
- [0010] AAV 유전자 요법에 대한 숙주 면역 반응은 캡시드 특이적 적응 면역 반응에 기인하여 제2 용량의 제품의 투여를 방해한다. 추가로, 치료 단백질의 신규 발현에 대한 T 세포 반응은 AAV 유전자 요법 제품의 효능을 감소시킬 수 있다 (Mingozzi *et al.* (2013) *Blood*, 122(1): 23-36).
- [0011] 숙주 면역 반응이 AAV 요법에 미치는 효과를 감소시키기 위한 노력이 계속되어 왔다. 예를 들어, 외피보유 AAV ("엑소-AAV"로도 공지)는 비-외피보유 AAV보다 더 효과적인 것으로 제시된 바 있는데, 이는 생체내 및 시험관내에서 벡터를 제거할 수 있는 항-AAV 항체의 능력으로부터 벡터를 어느 정도 차폐시키는 것에 기인하는 것으로 간주된다 (Gyorgy *et al.* (2014) *Biomaterials*, 35(26): 7598-7609; Hudry *et al.* (2016) *Gene Ther*, Apr, 23(4): 380-92; US 2013/020559). 또한, CTLA-4-Ig와 함께 PD-L1 또는 PD-L2를 코딩하는 AAV의 공동-투여가 트랜스진 발현을 연장시키고, 그 결과로 트랜스진 반응성 T 세포는 감소된다는 증거도 일부 존재한다 (Adriouch *et al.* (2011) *Front Microbiol*, 2:199). 본 발명은 투약 시 면역 반응 및 제한을 감소시키고, 치료 유전자의 반복 투약을 촉진시키는 이펙터 벡터를 생성하기 위해 체크포인트 면역 조정 분자와 함께 조합된 외피보유 AAV 기술을 이용한다.
- [0012] 숙주 면역 반응의 효과는 최소화하면서, 트랜스진 전달 및 발현을 개선시키는 새 바이러스 벡터 및 방법이 여전

히 요구되고 있다.

[0013] 특허 출원 및 공개문헌을 포함한, 본원에 인용된 모든 참고문헌은 그 전문이 참조로 포함된다.

발명의 내용

[0014] 본원에서는 외피로 둘러싸인 벡터 입자를 포함하는 외피보유 바이러스 벡터로서, 여기서 벡터 입자는 트랜스진을 포함하고, 외피는 하나 이상의 면역억제 분자를 포함하는 것인 외피보유 바이러스 벡터가 제공된다. 외피보유 바이러스 벡터 및 하나 이상의 제약상 허용되는 담체 또는 부형제를 포함하는 제약 조성물이 또한 제공된다.

[0015] 외피보유 바이러스 벡터에게 투여하는 것을 포함하는, 트랜스진을 세포 또는 대상체에게 전달하는 방법 뿐만 아니라, 외피보유 바이러스 벡터를 대상체에게 투여함으로써 대상체에서 질환 또는 장애를 치료하는 방법이 또한 제공된다.

[0016] 외피보유 바이러스 벡터를 생산하는 방법으로서, (a) 외피보유 바이러스 입자를 생성하는 조건 하에 (즉, 시험관내에서) 바이러스 생산자 세포를 배양하며, 여기서 바이러스 생산자 세포는 하나 이상의 막 결합된 면역억제 분자를 코딩하는 핵산을 포함하는 것인 단계, 및 (b) 외피보유 바이러스 벡터를 수집하는 단계를 포함하는 방법이 추가로 제공된다.

[0017] 일부 측면에서, 본 발명은 외피보유 바이러스 벡터를 포함하는 조성물로서, 여기서 외피보유 바이러스 벡터는 외피로 둘러싸인 벡터 입자를 포함하고, 여기서 외피는 면역 이펙터 기능을 제공하는 하나 이상의 분자를 포함하는 것인 조성물을 제공한다. 일부 실시양태에서, 면역 이펙터 기능은 면역 이펙터 분자가 없는 벡터와 비교하여 외피보유 벡터의 면역원성을 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 면역 이펙터 기능은 면역 억제제를 자극한다. 다른 실시양태에서, 면역 이펙터 기능은 면역 자극 분자를 억제한다. 일부 실시양태에서, 외피는 면역 억제제를 자극하는 분자, 및 면역 자극 분자를 억제하는 분자를 포함한다. 일부 실시양태에서, 면역 이펙터 기능을 제공하는 하나 이상의 분자는 CTLA4, B7-1, B7-2, PD-1, PD-L1, PD-L2, CD28, 또는 VISTA 중 하나 이상을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 외피는 CTLA4 및 PD-L1, CTLA 및 PD-L2 CTLA-4 및 VISTA, PD-L1 및 PD-L2, PD-L1 및 VISTA, PD-L2 및 VISTA, CTLA4 및 PD-L1 및 PD-L2, CTLA4 및 PD-L1 및 VISTA, CTLA4 및 PD-L2 및 VISTA, PD-L1 및 PD-L2 및 VISTA, 또는 CTLA4 및 PD-L1 및 PD-L1 및 VISTA를 포함한다. 일부 실시양태에서, 면역 이펙터 기능을 제공하는 하나 이상의 분자는 막횡단 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 외피는 벡터를 하나 이상의 세포 유형으로 표적화하는 표적화 분자를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 표적화 분자는 외피보유 벡터에 조직 특이성을 부여한다. 일부 실시양태에서, 표적화 분자는 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체는 항체 8D7이다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 표적화 분자는 막횡단 도메인을 포함한다.

[0018] 상기 측면 및 실시양태의 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 바이러스 입자를 포함한다. 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 바이러스 캡시드 및 바이러스 게놈을 포함한다. 일부 실시양태에서, 바이러스 게놈은 하나 이상의 이중 트랜스진을 포함한다. 일부 실시양태에서, 이중 트랜스진은 폴리펩티드를 코딩한다. 일부 실시양태에서, 이중 트랜스진은 치료 폴리펩티드 또는 수용체 폴리펩티드를 코딩한다. 일부 실시양태에서, 치료 폴리펩티드는 인자 VIII, 인자 IX, 미오투볼라린, SMN, RPE65, NADH-유비퀴논 옥시도리덕타제 쉐 4, CHM, 헌팅틴, 알파-갈락토시다제 A, 산 베타-글루코시다제, 알파-글루코시다제, 오르니틴 트랜스카르바말라제, 아르기노숙시네이트 신테타제, β -글로빈, γ -글로빈, 페닐알라닌 히드록실라제, 또는 ALD이다. 일부 실시양태에서, 이중 트랜스진은 치료 핵산을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 치료 핵산은 siRNA, miRNA, shRNA, 안티센스 RNA, RNAzyme, 또는 DNAzyme이다. 일부 실시양태에서, 이중 트랜스진은 하나 이상의 유전자 편집 유전자 산물을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 유전자 편집 유전자 산물은 CAS 뉴클레아제 및/또는 하나 이상의 가이드 서열 및/또는 하나 이상의 도너 서열이다.

[0019] 상기 측면 및 실시양태의 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 아데노-연관 바이러스 (AAV) 벡터 또는 렌티바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 아데노-연관 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, AAV 벡터는 인간 AAV 혈청형 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11 또는 AAV12로부터의 캡시드를 포함한다. 일부 실시양태에서, AAV 벡터는 인간 AAV 혈청형 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, r AAV10으로부터의 역위 말단 반복 (ITR) 서열을 포함하는 AAV 바이러스 게놈을 포함한다. 일부 실시양태에서, AAV 캡시드 및 AAV ITR은 동일한 혈청형으로부터의 것 또는 상이한 혈청형으로부터의 것이다.

[0020] 상기 측면 및 실시양태의 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 렌티바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 렌

티바이러스 벡터는 인간 면역결핍 바이러스, 원숭이 면역결핍 바이러스 또는 고양이 면역결핍 바이러스로부터 유래된 것이다. 일부 실시양태에서, 렌티바이러스 벡터는 비-복제성이다. 일부 실시양태에서, 렌티바이러스 벡터는 비-통합성이다.

[0021] 일부 실시양태에서, 본 발명은 상기 기재된 조성물 중 임의의 것 및 하나 이상의 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 제약 조성물을 제공한다.

[0022] 일부 측면에서, 본 발명은 트랜스진을 개체에게 전달하는 방법으로서, 개체에게 외피보유 바이러스 벡터를 포함하는 조성물을 투여하는 것을 포함하며, 여기서 외피보유 바이러스 벡터는 외피로 둘러싸인 벡터 입자를 포함하고, 여기서 외피는 면역 이펙터 기능을 제공하는 하나 이상의 분자를 포함하고, 여기서 바이러스 입자는 트랜스진을 포함하는 바이러스 게놈을 포함하는 것인 방법을 제공한다. 일부 측면에서, 본 발명은 질환 또는 장애를 앓는 개체를 치료하는 방법으로서, 질환 또는 장애의 치료를 필요로 하는 개체에게 외피보유 바이러스 벡터를 포함하는 조성물을 투여하는 것을 포함하며, 여기서 외피보유 바이러스 벡터는 외피로 둘러싸인 벡터 입자를 포함하고, 여기서 외피는 면역 이펙터 기능을 제공하는 하나 이상의 분자를 포함하고, 여기서 바이러스 입자는 치료 트랜스진을 포함하는 바이러스 게놈을 포함하는 것인 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 면역 이펙터 기능은 면역 이펙터 분자를 포함하지 않는 벡터와 비교하여 외피보유 벡터의 면역원성을 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 면역 이펙터 기능은 면역 억제제를 자극한다. 다른 실시양태에서, 면역 이펙터 기능은 면역 자극 분자를 억제한다. 일부 실시양태에서, 외피는 면역 억제제를 자극하는 분자, 및 면역 자극 분자를 억제하는 분자를 포함한다. 일부 실시양태에서, 면역 이펙터 기능을 제공하는 하나 이상의 분자는 CTLA4, B7-1, B7-2, PD-1, PD-L1, PD-L2, CD28, 또는 VISTA 중 하나 이상을 포함한다. 일부 실시양태에서, 외피는 CTLA4 및 PD-L1 또는 CTLA 및 PD-L2를 포함한다. 일부 실시양태에서, 면역 이펙터 기능을 제공하는 하나 이상의 분자는 막횡단 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 외피는 벡터를 하나 이상의 세포 유형으로 표적화하는 표적화 분자를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 표적화 분자는 외피보유 벡터에 조직 특이성을 부여한다. 일부 실시양태에서, 표적화 분자는 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체는 항체 8D7이다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 표적화 분자는 막횡단 도메인을 포함한다.

[0023] 상기 방법의 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 바이러스 입자를 포함한다. 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 바이러스 캡시드 및 바이러스 게놈을 포함한다. 일부 실시양태에서, 바이러스 게놈은 하나 이상의 이중 트랜스진을 포함한다. 일부 실시양태에서, 이중 트랜스진은 폴리펩티드를 코딩한다. 일부 실시양태에서, 이중 트랜스진은 치료 폴리펩티드 또는 수용체 폴리펩티드를 코딩한다. 일부 실시양태에서, 치료 폴리펩티드는 인자 VIII, 인자 IX, 미오투블라틴, SMN, RPE65, NADH-유비퀴논 옥시도리덕타제 체 4, CHM, 헌팅틴, 알파-갈락토시다제 A, 산 베타-글루코시다제, 알파-글루코시다제, 오르니틴 트랜스카르바밀라제, 아르기노숙시네이트 신테타제, β -글로빈, γ -글로빈, 페닐알라닌 히드록실라제, 또는 ALD이다. 일부 실시양태에서, 이중 트랜스진은 치료 핵산을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 치료 핵산은 siRNA, miRNA, shRNA, 안티센스 RNA, RNAzyme, 또는 DNAzyme이다. 일부 실시양태에서, 이중 트랜스진은 하나 이상의 유전자 편집 유전자 산물을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 유전자 편집 유전자 산물은 CAS 뉴클레아제 및/또는 하나 이상의 가이드 서열 및/또는 하나 이상의 도너 서열이다.

[0024] 상기 방법의 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 아데노-연관 바이러스 (AAV) 벡터 또는 렌티바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 아데노-연관 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, AAV 벡터는 인간 AAV 혈청형 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11 또는 AAV12로부터의 캡시드를 포함한다. 일부 실시양태에서, AAV 벡터는 인간 AAV 혈청형 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, r AAV10으로부터의 역위 말단 반복 (ITR) 서열을 포함하는 AAV 바이러스 게놈을 포함한다. 일부 실시양태에서, AAV 캡시드 및 AAV ITR은 동일한 혈청형으로부터의 것 또는 상이한 혈청형으로부터의 것이다.

[0025] 상기 방법의 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 렌티바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 렌티바이러스 벡터는 인간 면역결핍 바이러스, 원숭이 면역결핍 바이러스 또는 고양이 면역결핍 바이러스로부터 유래된 것이다. 일부 실시양태에서, 렌티바이러스 벡터는 비-복제성이다. 일부 실시양태에서, 렌티바이러스 벡터는 비-통합성이다.

[0026] 상기 방법의 일부 실시양태에서, 조성물은 외피보유 바이러스 벡터 및 하나 이상의 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 제약 조성물이다.

[0027] 상기 방법의 일부 실시양태에서, 개체는 인간이다. 일부 실시양태에서, 질환 또는 장애는 단일유전자성 질환이

다. 일부 실시양태에서, 질환 또는 장애는 근세관성 근병증, 척수성 근위축증, 레베르 선천성 흑암시, A형 혈우병, B형 혈우병, 맥락막결손증, 헌팅톤병, 배튼병, 레베르 유전성 시신경병증, 오르니틴 트랜스카르바밀라제 (OTC) 결핍증, 폼페병, 파브리병, 시트룰린혈증 1형, 페닐케톤뇨증 (PKU), 부신백질이영양증, 겸상 세포 질환, 또는 베타 지중해빈혈이다.

[0028] 일부 측면에서, 본 발명은 감소된 면역원성을 갖는 외피보유 바이러스 벡터를 생산하는 방법으로서, a) 외피보유 바이러스 입자를 생성하는 조건 하에 바이러스 생산자 세포를 배양하며, 여기서 바이러스 생산자 세포는 외피보유 벡터의 면역원성을 감소시키는 하나 이상의 막 결합된 면역 이펙터 기능을 코딩하는 핵산을 포함하는 것인 단계, 및 b) 외피보유 바이러스 벡터를 수집하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 면역 이펙터 기능은 외피보유 벡터의 면역원성을 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 면역 이펙터 기능은 면역 억제제를 자극한다. 일부 실시양태에서, 면역 이펙터 기능은 면역 자극 분자를 억제한다. 일부 실시양태에서, 바이러스 생산자 세포는 면역 억제제를 자극하는 분자 및 면역 자극 분자를 억제하는 분자를 코딩하는 핵산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 면역 이펙터 기능을 제공하는 하나 이상의 분자는 CTLA4, B7-1, B7-2, PD-1, PD-L1, PD-L2, CD28, 또는 VISTA 중 하나 이상을 포함한다. 일부 실시양태에서, 바이러스 생산자 세포는 CTLA4 및 PD-L1 또는 CTLA 및 PD-L2를 코딩하는 핵산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 면역 이펙터 기능을 제공하는 하나 이상의 분자는 막횡단 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 면역 이펙터 기능을 제공하는 하나 이상의 분자를 코딩하는 핵산은 일시적으로 바이러스 생산자 세포에 도입된다. 일부 실시양태에서, 면역 이펙터 기능을 제공하는 하나 이상의 분자를 코딩하는 핵산은 안정적으로 바이러스 생산자 세포에서 유지된다. 일부 실시양태에서, 면역 이펙터 기능을 제공하는 하나 이상의 분자를 코딩하는 핵산은 바이러스 생산자 세포의 게놈 내로 통합된다.

[0029] 상기 방법의 일부 실시양태에서, 바이러스 생산자 세포는 벡터를 하나 이상의 세포 유형으로 표적화하는 하나 이상의 표적화 분자를 코딩하는 핵산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 표적화 분자는 외피보유 벡터에 조직 특이성을 부여한다. 일부 실시양태에서, 표적화 분자는 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체는 항체 8D7이다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 표적화 분자는 막횡단 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 표적화 분자를 코딩하는 핵산은 일시적으로 바이러스 생산자 세포에 도입된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 표적화 분자를 코딩하는 핵산은 안정적으로 바이러스 생산자 세포에서 유지된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 분자 표적화 분자를 코딩하는 핵산은 바이러스 생산자 세포의 게놈 내로 통합된다.

[0030] 상기 방법의 일부 실시양태에서, 외피보유 바이러스 벡터는 외피보유 AAV 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 생산자 세포는 a) AAV rep 및 cap 유전자를 코딩하는 핵산, b) 트랜스진 및 적어도 하나의 ITR을 포함하는 AAV 바이러스 게놈을 코딩하는 핵산, 및 c) AAV 헬퍼 기능을 포함한다. 일부 실시양태에서, AAV rep 및 cap 유전자 및/또는 AAV 바이러스 게놈을 코딩하는 핵산은 일시적으로 바이러스 생산자 세포주에 도입된다. 일부 실시양태에서, AAV rep 및 cap 유전자 및/또는 AAV 바이러스 게놈을 코딩하는 핵산은 안정적으로 바이러스 생산자 세포주에서 유지된다. 일부 실시양태에서, AAV rep 및 cap 유전자 및/또는 AAV 바이러스 게놈을 코딩하는 핵산은 안정적으로 바이러스 생산자 세포주의 게놈 내로 통합된다. 일부 실시양태에서, rAAV 게놈은 2개의 AAV ITR을 포함한다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 AAV 헬퍼 기능은 플라스미드, 아데노바이러스, 안정적으로 세포 게놈 내로 통합된 핵산, 또는 단순 헤르페스 바이러스 (HSV) 중 하나 이상에 의해 제공된다. 일부 실시양태에서, AAV 헬퍼 기능은 아데노바이러스 E1A 기능, 아데노바이러스 E1B 기능, 아데노바이러스 E2A 기능, 아데노바이러스 E4 기능 및 아데노바이러스 VA 기능 중 하나 이상을 포함한다. 일부 실시양태에서, AAV 헬퍼 기능은 HSV UL5 기능, HSV UL8 기능, HSV UL52 기능, 및 HSV UL29 기능 중 하나 이상을 포함한다.

[0031] 상기 방법의 일부 실시양태에서, 외피보유 바이러스 벡터는 렌티바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 렌티바이러스 벡터는 인간 면역결핍 바이러스, 원숭이 면역결핍 바이러스 또는 고양이 면역결핍 바이러스이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 생산자 세포는 a) 렌티바이러스 gag 유전자를 코딩하는 핵산, b) 렌티바이러스 pol 유전자를 코딩하는 핵산, c) 트랜스진, 5' 긴 말단 반복부 (LTR) 및 3' LTR을 포함하는 렌티바이러스 전달 벡터를 코딩하며, 여기서 3' LTR의 U3 영역 모두 또는 그의 일부는 이중성 조절 요소, 프라이머 결합 부위, GAG 유전자 모두 또는 그의 일부, 중심 폴리퓨린 트랙, GAG 서열 내 합성 정지 코돈, rev 반응성 요소, 및 env 스플라이스 역셉터에 의해 대체되는 것인 핵산을 포함한다.

[0032] 상기 방법의 일부 실시양태에서, 외피보유 벡터는 추가로 정제된 것이다.

[0033] 일부 측면에서, 본 발명은 본원에 기재된 조성물 중 임의의 것을 포함하는 키트를 제공한다. 일부 실시양태에서, 키트는 사용 설명서를 추가로 포함한다.

[0034] 일부 측면에서, 본 발명은 본원에 기재된 방법 중 임의의 것에 따라 핵산의 전달을 필요로 하는 개체에게 핵산을 전달하는데 사용하기 위한 조성물을 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 방법 중 임의의 것에 따라 질환 또는 장애의 치료를 필요로 하는 개체에게 질환 또는 장애를 치료하는데 사용하기 위한 조성물을 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 발명은 핵산의 전달을 필요로 하는 개체에게 핵산을 전달하기 위한 의약의 제조에서의 본원에 기재된 바와 같은 조성물의 용도를 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 발명은 질환 또는 장애를 앓는 개체를 치료하기 위한 의약의 제조에서의 본원에 기재된 바와 같은 조성물의 용도를 제공한다. 일부 실시양태에서, 질환 또는 장애는 근세관성 근병증, 척수성 근위축증, 레베르 선천성 흑암시, A형 혈우병, B형 혈우병, 맥락막결손증, 헌팅톤병, 배튼병, 레베르 유전성 시신경병증, 오르니틴 트랜스카르바밀라제 (OTC) 결핍증, 폼페병, 파브리병, 시트룰린혈증 1형, 페닐케톤뇨증 (PKU), 부신백질이영양증, 겸상 세포 질환, 또는 베타 지중해빈혈이다.

[0035] 일부 측면에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 조성물을 포함하는 제조 물품을 제공한다.

[0036] 하기의 본 발명의 상세한 설명에 기재되는 바와 같이 추가 조성물 및 방법이 제공된다.

도면의 간단한 설명

[0037] 도 1은 이펙터 벡터의 예시적인 개략도를 제시한다. 특정한 예에서, AAV 벡터는 외피보유 바이러스 입자의 표면 상에 면역 이펙터 기능 뿐만 아니라, 세포 표적화 기능을 제공하도록 조작된 세포막에 외피를 보유한다.

도 2는 예시적인 이펙터 분자를 제시한다.

도 3은 이베이더(EVADER) 벡터의 외피 상의 마우스 PDL1 (좌측 패널) 및 마우스 CTLA4의 존재를 제시한다. FACS 히스토그램은 항-마우스 PDL1 또는 항-마우스 CTLA-4 항체로 염색된 외피보유 AAV 및 이베이더 벡터를 제시한다. 정제된 벡터의 더 높은 수준의 PDL-1 또는 CTLA-4 염색을 제시하기 위해 이펙터 벡터 히스토그램 상에 외피보유 AAV 히스토그램이 중첩되어 있다. 이펙터 벡터는 PDL-1 및 CTLA-4 둘 다를 외피보유 AAV 벡터보다 더 높은 수준으로 갖는다. 이베이더는 이펙터 벡터이다.

도 4는 최초 주사 후 제3주 및 제6주에 마우스에서의 인간 FIX 수준을 제시하는 그래프를 나타낸 것이다. 제3주 암컷 마우스의 경우: *p=0.036; **p=0.002; ****p<0.0001. 제3주 수컷 마우스의 경우: ****p<0.0001. 제6주 암컷 마우스의 경우: std vs. 이베이더 p=0.0002; 엑소 vs. 이베이더 p=0.0006. 이베이더는 mEV-AAV-hFIX이다. 엑소는 외피보유 AAV이다.

도 5는 제3주 및 제6주에 마우스로부터의 혈청 중 항-AAV8 IgG 항체의 역가를 나타낸 그래프를 제시한다.

도 6은 제3주 및 제6주에 AAV8에 대한 중화 항체의 역가를 나타낸 그래프를 제시한다.

도 7은 제3주 및 제6주에 수컷 또는 암컷 마우스의 간으로부터의 벡터 게놈 카피수 (VGCN)를 도시한 그래프를 제시한다.

도 8은 제3주 및 제6주에 조합된 수컷 및 암컷 마우스의 간으로부터의 벡터 게놈 카피수 (VGCN)를 도시한 그래프를 제시한다.

도 9는 제6주에 조합된 수컷 및 암컷 마우스의 간으로부터의 벡터 게놈 카피수 (VGCN)를 도시하고, 통계 분석도 포함하고 있는 그래프를 제시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0038] 본원에서는 외피로 부분적으로 또는 완전히 둘러싸인 바이러스 입자를 포함하는 외피보유 바이러스 벡터로서, 여기서 외피는 지질 이중층 및 하나 이상의 면역 억제 분자, 예컨대 체크포인트 면역 하향-조절인자를 포함하는 것인 외피보유 바이러스 벡터가 제공된다. 일부 실시양태에서, 외피보유 바이러스 (예를 들어, AAV 또는 렌티 바이러스)는 바이러스 생산자 세포막으로부터의 "출아"에 의해 생산된다. 그러므로, 외피는 생산자 세포막의 일부를 포함하기 때문에, 생산자 세포막에 포매된 면역 조정 분자는 외피보유 바이러스로 전달된다. 하기 섹션에서 상세하게 기재되는 바와 같이, 외피보유 바이러스 벡터는 핵산 (트랜스진)을 세포 또는 대상체에게 전달하는데 유용하고, 숙주에서 생성된 면역 반응에 내성을 띠는 것으로 간주된다. 외피보유 바이러스 벡터 및 그의 사용 및 생산 방법이 하기 섹션에서 상세하게 기재된다.

[0039] I. 일반 기술

[0040] 본원에 기재되거나, 또는 참조된 기술 및 방법은 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 일반적으로 충분히 이해되고 있고, 예컨대, 예를 들어, 문헌 [*Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Sambrook *et al.*, 4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2012)]; [*Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel, *et al.* eds., 2003)]; 시리즈 [*Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.)]; [*PCR 2: A Practical Approach* (M.J. MacPherson, B.D. Hames and G.R. Taylor eds., 1995)]; [*Antibodies, A Laboratory Manual* (Harlow and Lane, eds., 1988)]; [*Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications* (R.I. Freshney, 6th ed., J. Wiley and Sons, 2010)]; [*Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait, ed., 1984)]; [*Methods in Molecular Biology*, Humana Press]; [*Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J.E. Cellis, ed., Academic Press, 1998)]; [*Introduction to Cell and Tissue Culture* (J.P. Mather and P.E. Roberts, Plenum Press, 1998)]; [*Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (A. Doyle, J.B. Griffiths, and D.G. Newell, eds., J. Wiley and Sons, 1993-8)]; [*Handbook of Experimental Immunology* (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds., 1996)]; [*Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J.M. Miller and M.P. Calos, eds., 1987)]; [*PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis *et al.*, eds., 1994)]; [*Current Protocols in Immunology* (J.E. Coligan *et al.*, eds., 1991)]; [*Short Protocols in Molecular Biology* (Ausubel *et al.*, eds., J. Wiley and Sons, 2002)]; [*Immunobiology* (C.A. Janeway *et al.*, 2004)]; [*Antibodies* (P. Finch, 1997)]; [*Antibodies: A Practical Approach* (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989)]; [*Monoclonal Antibodies: A Practical Approach* (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000)]; [*Using Antibodies: A Laboratory Manual* (E. Harlow and D. Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999)]; [*The Antibodies* (M. Zanetti and J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995)]; 및 [*Cancer: Principles and Practice of Oncology* (V.T. DeVita *et al.*, eds., J.B. Lippincott Company, 2011)]에 기재된, 널리 사용되는 방법과 같이, 통상의 방법을 이용하여 보편적으로 이용된다.

[0041] II. 정의

[0042] 본 명세서를 해석하기 위한 목적으로, 달리 언급되지 않는 한, 하기 정의가 적용될 것이다. 적절할 경우에는 언제든지, 단수 형태로 사용되는 용어는 또한 복수 형태의 것도 포함할 것이며, 그 반대의 경우로도 적용될 것이다. 하기 기재되는 임의의 정의가 본원에 참조로 포함된 임의의 문헌상의 내용과 상충할 경우, 기재된 정의에 의해 조정되어야 한다.

[0043] 본원에서 사용되는 바, 단수 형태는 달리 명시되지 않는 한, 복수의 지시대상을 포함한다.

[0044] 후속하여 하나 이상의 항목 목록이 기재되는 "적어도 하나의"라는 용어의 사용은 본원에서 달리 명시되지 않는 한, 또는 문맥상 명백히 모순되지 않는 한, (예를 들어, "적어도 하나의 A 및 B") 열거된 항목으로부터 선택되는 하나의 항목 (A 또는 B), 또는 열거된 항목 중 둘 이상의 임의의 조합 (A 및 B)을 의미하는 것으로 해석되어야 한다.

[0045] 본원에 기재된 본 개시내용의 측면 및 실시양태는 상기 측면 및 실시양태를 "포함하는", 그로 "이루어진", 및 그로 "본질적으로 이루어진" 것을 포함한다는 것을 이해한다.

[0046] 본원에 기재된 모든 조성물, 및 본원에 기재된 조성물을 사용하는 모든 방법의 경우, 조성물은 열거된 성분 또는 단계를 포함할 수 있거나, 또는 열거된 성분 또는 단계로 "본질적으로 이루어질 수 있거나" 또는 "이루어질 수 있다". 조성물이 열거된 성분으로 "본질적으로 이루어진" 것으로 기재된 경우, 조성물은 열거된 성분을 함유하고, 개시된 방법에는 실질적으로 영향을 주지 않는 다른 성분도 함유할 수 있지만, 상기 명확하게 열거된 것 이외의 다른 것으로서, 개시된 방법에 실질적으로 영향을 미치는 임의의 다른 성분은 함유하지 않거나; 또는 조성물이, 열거된 것 이외의 다른 것으로서, 개시된 방법에 실질적으로 영향을 미치는 추가 성분을 함유한다면, 조성물은 추가 성분을 개시된 방법에 실질적으로 영향을 미칠 정도로 충분한 농도 또는 양으로 함유하지 않는다. 방법이 열거된 단계로 "본질적으로 이루어진" 것으로 기재된 경우, 방법은 열거된 단계를 함유하고, 개시된 방법에는 실질적으로 영향을 주지 않는 다른 단계도 함유할 수 있지만, 상기 명확하게 열거된 단계 이외의 다른 것으로서, 개시된 방법에 실질적으로 영향을 미치는 임의의 다른 단계는 함유하지 않는다. 비제한적인 구체적인 예로서, 조성물이 한 성분으로 "본질적으로 이루어진" 것으로 기재된 경우, 조성물은 임의의 양의 제약 상 허용되는 담체, 비히클, 또는 희석제, 및 개시된 조성물 또는 방법의 특성에는 실질적으로 영향을 주지 않는 상기과 같은 다른 성분을 추가로 함유할 수 있다.

- [0047] 본원에서 사용되는 바, "약"이라는 용어는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 쉽게 알려져 있는 바와 같이, 각 값에 대한 일반적인 오차 범위를 지칭한다. 본원에서, 값 또는 파라미터를 "약"으로 언급하는 것은 상기 값 또는 파라미터 그 자체에 대한 실시양태를 포함한다 (그리고 그를 기재한다).
- [0048] 본원에서 사용되는 바, "폴리뉴클레오티드" 또는 "핵산"이라는 용어는 본원에서 임의의 길이의 뉴클레오티드의 중합체 형태, 리보뉴클레오티드, 데옥시리보뉴클레오티드 또는 조합을 지칭한다. 따라서, 상기 용어는 단일, 이중 또는 다중 가닥 DNA 또는 RNA, 게놈 DNA, cDNA, DNA-RNA 하이브리드, 또는 퓨린 및 피리미딘 염기, 또는 다른 천연, 화학적으로 또는 생화학적으로 변형된, 비-천연, 또는 유도체화된 뉴클레오티드 염기를 포함하는 중합체를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 폴리뉴클레오티드의 백본은 당 및 포스페이트 기(이는 전형적으로 RNA 또는 DNA에서 발견될 수 있음), 또는 변형된 또는 치환된 당 또는 포스페이트 기를 포함할 수 있다. 대안적으로, 폴리뉴클레오티드의 백본은 합성 서브유닛 예컨대 포스포라미데이트의 중합체를 포함할 수 있고, 따라서, 올리고데옥시뉴클레오시드 포스포라미데이트 (P-NH₂) 또는 혼합 포스포라미데이트-포스포디에스테르 올리고머가 될 수 있다. 추가로, 이중 가닥 폴리뉴클레오티드는 상보성 가닥을 합성하고, 적절한 조건 하에 가닥을 어닐링하거나, 또는 적절한 프라이머와 함께 DNA 폴리머라제를 이용하여 새로 상보성 가닥을 합성함으로써 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 산물의 화학적 합성으로 수득될 수 있다.
- [0049] 용어 "폴리펩티드" 및 "단백질"은 상호교환적으로 사용되며, 아미노산 잔기의 중합체를 지칭하고, 어느 특정한 최소 또는 최대 길이로 제한되지 않는다. 상기 아미노산 잔기의 중합체는 천연 또는 비-천연 아미노산 잔기를 함유할 수 있고, 펩티드, 올리고펩티드, 아미노산 잔기의 이량체, 삼량체, 및 다량체를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 전장 단백질 및 그의 단편 둘 다가 본 정의에 의해 포괄된다. 본 용어는 또한 폴리펩티드의 발현 후 변형, 예를 들어, 글리코실화, 시알릴화, 아세틸화, 인산화 등을 포함한다. 추가로, 본 발명의 목적을 위해, "폴리펩티드"는 단백질이 원하는 활성을 유지하는 한, 천연 서열에 대하여 변형, 예컨대 결실, 부가, 및 치환 (일반적으로, 실제로 보존적 치환)을 포함하는 단백질을 지칭한다. 이러한 변형은 부위 지정 돌연변이 유발을 통해 이루어지는 것과 같이 의도적인 것일 수 있거나, 단백질을 생산하는 숙주의 돌연변이 또는 PCR 증폭 동안의 오류를 통해 이루어지는 것과 같이, 우발적인 것이 될 수 있다.
- [0050] "바이러스 벡터"는 적어도 하나 또는 둘의 반복 서열 (예를 들어, AAV의 경우에 역위 말단 반복 서열 (ITR) 또는 렌티바이러스의 경우에 긴 말단 반복부 (LTR))에 의해 플랜킹된 하나 이상의 이중성 서열 (즉, 바이러스 기원이 아닌 핵산 서열)을 포함하는 폴리뉴클레오티드 벡터를 지칭한다. 이중성 핵산은 대개는 적어도 하나 또는 둘의 반복 서열 (예를 들어, AAV의 경우에 역위 말단 반복 서열 (ITR) 또는 렌티바이러스의 경우에 긴 말단 반복부 (LTR))에 의해 플랜킹된, "카세트"로 전달되는 "페이로드"로서 지칭될 수 있다. 숙주 세포가 필수 기능을 제공한다면, 상기 바이러스 벡터는 숙주 세포에 존재할 때, 복제되고, 감염성 바이러스 입자 내로 패키징될 수 있다. 바이러스 벡터가 더 큰 폴리뉴클레오티드로 도입되는 경우 (예를 들어, 염색체에서 또는 또 다른 벡터에서, 예컨대 클로닝 또는 형질감염을 위해 사용되는 플라스미드), 이때, 바이러스 벡터는 바이러스 복제 및 패키징 기능의 존재 하에서 복제 및 캡시드화에 의해 "구체"될 수 있는 "프로-벡터"로서 지칭될 수 있다. 바이러스 벡터는 바이러스 캡시드 내로 패키징되어 "바이러스 입자"를 생성할 수 있다. 일부 측면에서, 바이러스 입자는 바이러스 게놈 및 이중성 핵산 페이로드와 함께 바이러스 캡시드를 지칭한다.
- [0051] "이중성"이란, 비교 대상이 되거나, 또는 그 내부로의 도입 또는 혼입 대상이 되는 엔티티의 남은 부분의 것과 유전자형이 상이한 엔티티로부터 유래된 것일 수 있다는 것을 의미한다. 예를 들어, 유전자 조작 기술에 의해 상이한 세포 유형 내로 도입되는 폴리뉴클레오티드가 이중성 폴리뉴클레오티드이다 (그리고 발현되었을 때, 이중성 폴리펩티드를 코딩할 수 있다). 유사하게, 바이러스 벡터 내로 도입되는 세포 서열 (예를 들어, 유전자 또는 그의 일부)은 벡터와 관련하여 이중성 뉴클레오티드 서열이다. 이중성 핵산은 비교 대상이 되거나, 또는 그 내부로의 도입 또는 혼입 대상이 되는 엔티티의 남은 부분의 것과 유전자형이 상이한 엔티티로부터 유래된 핵산을 지칭할 수 있다. 이중성은 또한 그 내부로의 도입 대상이 되는 종에 대해 비-천연적인 다른 생물학적 성분 (예를 들어, 단백질)을 지칭하는 데에도 사용될 수 있다. 예를 들어, 세포에서 이중성 핵산으로부터 발현되는 단백질은 세포와 관련하여 이중성 단백질이 될 것이다. 유전자 조작 기술에 의해 세포 또는 유기체 내로 도입된 핵산은 그가 세포 또는 유기체와 이중성인지 또는 동종성인지 여부와 상관 없이, 세포 또는 유기체에 대해서는 "외인성"인 것으로 간주될 수 있다. 따라서, 예를 들어, 벡터는 인간 세포 내로 인간 유전자의 추가 카피를 도입하는데 사용될 수 있다. 세포에 도입된 유전자는 비록 그가 동종성 (천연) 핵산 서열을 함유할 수 있지만, 세포에 대해서는 외인성 유전자가 될 것이다.
- [0052] "단리된" 분자 (예를 들어, 핵산 또는 단백질) 또는 세포란, 그가 그의 천연 환경의 성분으로부터 확인 및 분리

및/또는 회수되었다는 것을 의미한다.

[0053] "조작된" 또는 "유전적으로 조작된" 및 유사 용어는 (예를 들어, 실험실 기술을 이용하여) 인공적으로 유전적으로 변형된 생물학적 물질, 또는 상기 유전자 변형으로부터의 결과를 지칭하는 것으로 사용된다.

[0054] 본원에서 사용되는 바, "치료"는 유익한 또는 원하는 임상 결과를 위한 접근법이다. 본 발명의 목적을 위해, 유익한 또는 원하는 임상 결과는 그의 검출가능 여부와 상관없이, 증상 경감, 질환 정도 감소, 질환 상태 안정화 (예를 들어, 악화되지 않음), 질환 확산 (예를 들어, 전이) 예방, 질환 진행 지연 또는 저속화, 질환 상태 호전 또는 완화, 및 관해 (부분적 관해든 또는 완전 관해든 상관 없음)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. "치료"는 또한 치료를 받지 않았을 때 예상되는 생존 기간과 비교하여 생존 기간을 연장시키는 것을 의미할 수 있다.

[0055] 본원에서 사용되는 바, "예방적 치료"라는 용어는 개체가 장애를 앓는 것으로 공지 또는 의심되거나, 또는 장애를 앓을 위험이 있는 것으로 공지 또는 의심되지만, 질환의 어떤 증상도 보이지 않거나, 또는 최소의 증상을 보이는 경우의 치료를 지칭한다. 예방적 치료를 받는 개체는 증상 발병 이전에 치료될 수 있다.

[0056] "유효량"은 임상 결과 (예를 들어, 증상 오전, 임상 종점 달성 등)를 포함한, 유익한 또는 원하는 임상 결과를 얻는데 충분한 양이다. 유효량은 1회 이상의 투여로 투여될 수 있다. 질환 상태에 있어서, 유효량은 질환을 호전시키거나, 안정화시키거나, 또는 그의 발생을 지연시키는데 충분한 양이다.

[0057] 본원에 기재된 구조적 및 기능적 특징들 중 임의의 것을 위해, 이러한 특징들을 측정하는 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있다.

[0058] III. 벡터

[0059] 본원에서는 외피로 부분적으로 또는 완전히 둘러싸인 바이러스 입자를 포함하는 외피보유 바이러스 벡터로서, 여기서 외피는 지질 이중층 및 하나 이상의 면역 억제 분자를 포함하는 것인 외피보유 바이러스 벡터가 제공된다. 이 벡터 벡터의 개략도는 도 1에 제시되어 있다. 일부 실시양태에서, 본원에서 제공되는 외피보유 바이러스 벡터는 외피를 보유하지 않거나, 또는 외피에 면역억제 분자를 포함하도록 조작되지 않은 외피를 갖는 동일한 외피보유 벡터보다 더 효과적으로 및/또는 더 효율적으로 핵산 트랜스진 페이로드를 전달할 수 있다.

[0060] 일부 실시양태에서, 외피보유 바이러스 입자는 천연 바이러스 입자와 비교하여 바이러스 입자에의 면역이 감소되도록 조작된다. 일부 실시양태에서, 외피보유 바이러스 입자는 트랜스진 산물을 코딩하는 천연 바이러스 입자를 포함하는 벡터와 비교하여 바이러스 트랜스진 산물에의 면역이 감소되도록 조작된다. 일부 실시양태에서, 외피보유 바이러스 입자는 예컨대, 아데노-연관 바이러스 (AAV) 입자 및 아데노바이러스 입자와 같이, 그의 전형적인 천연 상태에서는 외피를 보유하지 않는 것이다. 다른 실시양태에서, 천연 바이러스 입자는 예를 들어, 레트로바이러스 및 헤르페스 바이러스와 같이 외피보유하는 것이고, 여기서 외피는 바이러스 입자 및/또는 바이러스 트랜스진 산물에 대한 면역을 조정하도록 조작된다.

[0061] 예를 들어, 일부 실시양태에서, 본원에서 제공되는 바와 같이, 외피에 면역억제 분자를 포함하는 외피보유 바이러스 벡터 (예를 들어, 외피보유 AAV)는 대상체에게 단일 용량 (예를 들어, 2×10^{11} 내지 2×10^{12} vg/kg)으로서 투여 후 3-주에, 동일한 조건 하에 (예를 들어, 동일한 트랜스진, 동일한 대상체, 동일한 투여 용량 및 투여 경로 등, 단, 유일한 차이는 벡터임) 동일한 유형의 비-외피보유 바이러스 벡터의 투여에 의해 생산되는 것과 비교하여 약 50% 이상 (약 75% 이상, 약 100% 이상, 약 125% 이상, 약 150% 이상, 약 175% 이상, 또는 심지어 약 200% 이상)만큼 증가된 트랜스진 발현 수준을 제공한다.

[0062] 또한, 일부 실시양태에서, 본원에서 제공되는 바와 같이, 외피에 면역억제 분자를 포함하는 외피보유 바이러스 벡터 (예를 들어, 외피보유 AAV)는 대상체에게 단일 용량 (예를 들어, 2×10^{11} 내지 2×10^{12} vg/kg)으로서 투여 후 3-주에, 동일한 조건 하에 (예를 들어, 동일한 트랜스진, 동일한 대상체, 동일한 투여 용량 및 투여 경로 등, 단, 유일한 차이는 벡터임) 면역억제 분자가 없는 동일한 유형의 외피보유 바이러스 벡터의 투여에 의해 생산되는 것 (예외적으로 숙주 세포가 면역억제 분자를 발현하도록 조작되지 않은 것인, 동일한 유형의 생산자 세포로부터 생산되는 것)과 비교하여 약 20% 이상 (약 50% 이상, 약 75% 이상, 약 100% 이상, 약 125% 이상, 약 150% 이상, 약 175% 이상, 또는 심지어 약 200% 이상)만큼 증가된 트랜스진 발현 수준을 제공한다.

[0063] 본원에 제공된 면역억제 분자를 포함하는 외피보유 벡터는 가용성 면역억제 분자 (예를 들어, CTLA4/Ig, 아바타셉트)의 투여로부터 초래되는 전체적인 면역억제를 최소화시킨다는 것이 추가로 간주된다. 일부 실시양태에서,

본원에 제공된 바와 같은, 외피에 면역억제 분자를 포함하는 외피보유 바이러스 벡터 (예를 들어, 외피보유 AAV)는 투여 후 2 내지 3주 이내에, 투여된 벡터로부터 유도되는 것보다 순환 총 항-IgG 항체의 증가, 또는 항원 특이적 항체의 증가, 또는 항원에 의해 자극받은 활성화된 CD4+ 또는 CD8+ T 세포로 측정되는 바, 대상체, 특히, 인간에게 유효량으로 투여 시, 예를 들어, 2×10^{11} vg/kg의 용량, 또는 5×10^{11} vg/kg의 용량은 10 mg/kg CTLA4/Ig (또는 일부 실시양태에서, 2 mg/kg CTLA4/Ig)의 단일 투여에 의해 유발되는 것보다 더 적은 전 체적인 면역억제를 유발한다.

[0064] 임의의 특정한 이론, 또는 작용 기전으로 제한하고자 하지 않으면서, 본원에 제공된 외피보유 바이러스 벡터는 숙주-면역 반응을 억제하고/거나, 벡터를 숙주에서 생성되는 면역 반응으로부터 차폐시킴으로써 벡터 또는 바이러스 트랜스진 산물에 대한 숙주-면역 반응의 효과를 회피하는 것으로 간주된다. 예를 들어, 본 발명의 벡터는 숙주에 의해 생산되는 벡터-중화 항체의 개수를 감소시킬 수 있거나, 또는 바이러스를 중화시키는데 있어서 상기 항체의 효과를 감소시킬 수 있다. 유사하게, 본 발명의 벡터는 바이러스 트랜스진 산물에 대한 숙주-생산된 항체의 개수를 감소시킬 수 있거나, 또는 트랜스진 산물의 발현을 억제하는데 있어서 상기 항체의 효과를 감소시킬 수 있다. 또한, 본 발명의 벡터는 전형적으로 종래 유전자 요법 벡터와 연관된 염증을 감소시킬 수 있고, 그 결과로, 트랜스진 발현은 증가될 수 있다.

[0065] 따라서, 일부 실시양태에서, 외피보유 바이러스 벡터는 천연 또는 비-외피보유 바이러스 입자와 비교하여, 또는 동일한 유형이지만, 단, 외피에 면역억제 분자를 포함하도록 조작되지 않은 외피를 갖는 외피보유 바이러스 입자와 비교하여 숙주에서 감소된 면역원성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 외피보유 바이러스 벡터는 천연 또는 비-외피보유 바이러스 입자, 또는 단, 외피에 면역억제 분자를 포함하도록 조작되지 않은 외피를 갖는 외피보유 바이러스 입자를 포함하는 동일한 유형의 벡터와 비교하여, 바이러스 트랜스진 산물에 대한 숙주 면역을 감소시킨다.

[0066] (A) 바이러스 벡터

[0067] 외피보유 바이러스를 제공하기 위해, 지질 이중층과 회합될 수 있는 임의의 바이러스 벡터가 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 외피보유 바이러스 입자는, 전형적으로는 그의 천연 상태에서는 외피를 보유하지 않는 유형, 예컨대 아데노-연관 바이러스 (AAV) 입자 및 아데노바이러스 입자이다. 다른 실시양태에서, 천연 바이러스 입자는 전형적으로 외피보유하는 유형의 것, 예컨대, 레트로바이러스 및 헤르페스 바이러스이다.

[0068] 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 AAV 바이러스 입자를 포함한다. AAV는 전형적으로는 외피보유 바이러스로서 사용되지 않는 파르보바이러스 과의 구성원이다. 트랜스진을 전달하는데 적합한 임의의 AAV 벡터가 사용될 수 있다. AAV 입자는 임의의 혈청형으로부터의 AAV 캡시드 단백질 및 AAV 바이러스 게놈을 포함할 수 있다. AAV 혈청형은 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11 또는 AAV12를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, AAV 바이러스 입자는 동일한 혈청형으로부터의 AAV 바이러스 캡시드 및 AAV 바이러스 게놈을 포함한다. 다른 실시양태에서, AAV 바이러스 게놈 및 AAV 캡시드는 상이한 혈청형의 것이다. 예를 들어, AAV 바이러스 캡시드는 AAV6 바이러스 캡시드일 수 있고, AAV 바이러스 게놈은 AAV2 바이러스 게놈일 수 있다. 일부 실시양태에서, AAV는 자기 상보성 AAV (scAAV)이다. 일부 실시양태에서, 벡터는 AAV8 또는 AAV2/8 벡터, 특히 scAAV8 또는 scAAV2/8)이다.

[0069] 일부 실시양태에서, 외피보유 바이러스 벡터는 렌티바이러스 입자를 포함한다. 트랜스진 전달에 적합한 임의의 렌티바이러스가 사용될 수 있으며, 인간 면역결핍 바이러스, 원숭이 면역결핍 바이러스 및 고양이 면역결핍 바이러스를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 전형적으로, 렌티바이러스 벡터는 비-복제성이다. 렌티바이러스 벡터는 통합성 또는 비-통합성 렌티바이러스 벡터일 수 있다. 일부 실시양태에서, 렌티바이러스 게놈에는 *vif*, *vpr*, *vpu*, *tat*, *rev*, *nef* 유전자가 결여되어 있다. 일부 실시양태에서, 렌티바이러스 게놈은 이중 트랜스진, 5' 긴 말단 반복부 (LTR) 및 3' LTR을 포함하며, 여기서 3' LTR의 U3 영역 모두 또는 그의 일부는 제거되거나, 또는 이중성 조절 요소에 의해 대체된다.

[0070] 바이러스 입자, 구체적으로, 바이러스 게놈은 전달하고자 하는 이중성 핵산 (예를 들어, 트랜스진) "페이로드"를 포함하게 되거나, 또는 비어있는 벡터일 수 있다. 전달하고자 하는 핵산의 특정한 성질은 원하는 최종 용도에 의존하고, 본 발명의 외피보유 벡터는 임의의 특정한 용도 또는 페이로드로 제한되지 않는다. 일부 실시양태에서, 페이로드 핵산은 생물학적 단백질, 예를 들어, 인자 VIII (예를 들어, 인간 F8 (유니프루트 KB(UniProtKB) - Q2VF45), B-도메인 결실 (BDD) 인간 인자 VIII 유전자의 SQ-FVIII 변이체 (Lind *et al.*, 1995 *Eur J Biochem.* Aug 15;232(1):19-27)) 또는 공지되어 있는 다른 변이체), 인자 IX (예를 들어, 인간 인자 IX 유니프루트KB - P00740; 또는 인간 인자 IX (R338L) "파두아(Padua)" (문헌 [Monahan *et al.*, 2015 *Hum Gene*

Ther., 26(2): 69-81], 또는 공지되어 있는 다른 변이체), 미오투불라린, SMN, RPE65, NADH-유비퀴논 옥시도리덕타제 쇠 4, CHM, 헌팅틴, 알파-갈락토시다제 A, 산 베타-글루코시다제, 알파-글루코시다제, 오르니틴 트랜스 카르바밀라제, 아르기노숙시네이트 신테타제, β -글로빈, γ -글로빈, 페닐알라닌 히드록실라제, 또는 ALD를 발현할 것이다. 일부 실시양태에서, 페이로드 핵산 서열은 서열식별번호(SEQ ID NO): 1의 인간 인자 VIII 아미노산 서열을 코딩하거나, 또는 서열식별번호: 1의 아미노산 서열로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 페이로드 핵산 서열은 서열식별번호: 1의 아미노산 서열과 약 80%, 85%, 90%, 또는 99%의 동일성 중 임의의 값을 초과하는 정도의 동일성을 갖는 인간 인자 VIII 아미노산 서열을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 페이로드 핵산 서열은 서열식별번호: 2의 아미노산 서열과 약 80%, 85%, 90%, 또는 99%의 동일성 중 임의의 값을 초과하는 정도의 동일성을 갖는 인간 인자 IX 아미노산 서열을 코딩한다. 다른 실시양태에서, 페이로드 핵산은 수용체 분자, 예를 들어, 녹색 형광 단백질, 적색 형광 단백질, 황색 형광 단백질, 루시페라제, 알칼리성 포스파타제, 또는 베타-갈락토시다제를 코딩한다. 또 다른 실시양태에서, 페이로드 핵산은 치료 핵산, 예컨대 siRNA, miRNA, shRNA, 안티센스 RNA, RNAzyme, 또는 DNAzyme을 코딩한다. 또 다른 실시양태에서, 페이로드 핵산은 하나 이상의 유전자 편집 유전자 산물, 예컨대 RNA-가이드된 엔도뉴클레아제 (예를 들어, Cas9, CPF1 등), RNA-가이드된 엔도뉴클레아제에 대한 가이드 핵산, 도너 핵산, 또는 그의 일부 조합을 코딩한다.

[0071] 이중성 핵산은 적합한 프로모터의 제어 하에 있을 수 있고, 상기 프로모터는 조직 특이적 프로모터일 수 있다. 예를 들어, 벡터를 간으로 전달하고자 하는 경우, 간-특이적 프로모터 (예를 들어, 간-특이적 인간 $\alpha 1$ -항트립신 (hAAT) 프로모터)이다. 주어진 적용에 적절할 수 있다면, 다른 조절 요소 또한 포함될 수 있다.

[0072] (B) 면역억제 분자를 포함하는 조작된 외피

[0073] 본원에 제공된 바이러스 벡터의 외피는 부분적으로 또는 완전히 바이러스 입자를 둘러싸는 지질 이중층을 포함한다. 자연적으로 발생된 또는 합성 (인공) 지질 이중층을 포함한, 임의의 지질 이중층이 사용될 수 있다. 합성 지질 이중층은 예를 들어, 리포솜을 포함한다. 자연적으로 발생된 지질 이중층은 엑소솜, 미세소포체 (예를 들어, 쉼딩 소포체 또는 엑토솜) 등을 포함한, 관련 기술분야에 공지된, 다양한 유형의 세포외 소포체 (EV) 중 임의의 것을 포함한다. 예를 들어, 벡터의 외피의 지질 이중층은 생산자 세포, 특히, 동일한 유형의 비-조작된 생산자 세포와 비교하여 하나 이상의 면역억제 분자를 과다발현하도록 조작된 생산자 세포로부터 "출아된" 세포막의 일부에 의해 제공될 수 있다. 상기 지질 이중층은 쉼딩의 유래 기점이 되는 세포막의 일부를 포함한다. 일부 실시양태에서, 지질 이중층은 엑소솜 회합 단백질 (Alix, Tsg101, 및 Rab 단백질); 테트라스파닌 (CD9, CD63, CD81, CD82, CD53, 및 CD37); 리피드 래프트 회합 단백질 (글리코실포스파티딜이노시톨 및 플로틸린), 및/또는 콜레스테롤, 스핑고미엘린 및/또는 글리세로포스포리피드를 포함하는 지질을 포함한다. 일부 실시양태에서, 지질 이중층은 엑소솜 지질 이중층 (예를 들어, 지질 이중층이 엑소솜임), 특히, 본원에 기재된 바와 같이 하나 이상의 면역억제 분자를 과다발현하도록 조작된 생산자 세포의 엑소솜 지질 이중층 (즉, 다르게는 생산자 세포로부터 유래되거나 또는 생산된 다른 것으로부터 쉼딩된 것)이다.

[0074] 임의의 세포 유형이 EV를 제공할 수 있지만, 종양 세포의 불멸화의 원인이 되고, 발암성일 수 있거나, 또는 다르게는 대상체에게 유해할 수 있는 작용물질 (예를 들어, 유전적 요소)에 의해 오염이 일어날 수 있는 잠재성에 기인하여, 때로는, 본 발명과 관련하여 생산자 세포로서 종양 세포의 사용을 피하는 것이 이롭다. 따라서, 일부 실시양태에서, 지질 이중층은 비-종양 EV 지질 이중층, 예컨대 비-종양 엑소솜 지질 이중층이다 (예를 들어, 지질 이중층은 비-종양 EV, 예컨대 비-종양 엑소솜으로부터의 것이며, 이는 EV 또는 엑소솜이 종양 세포 기원은 가지지 않는다는 것을 의미함). 다른 실시양태에서, 지질 이중층은 293 세포 (예를 들어, HEK293 또는 HEK293T)로부터의 EV 지질 이중층 (예를 들어, 엑소솜 지질 이중층 또는 엑소솜), 특히, 본원에 기재된 바와 같이 하나 이상의 면역억제 분자를 과다발현하도록 조작된 비-종양 생산자 세포, 예컨대 293 세포의 EV 지질 이중층 (예를 들어, 엑소솜 지질 이중층 또는 엑소솜) (즉, 다르게는 생산자 세포로부터 유래되거나 또는 생산된 다른 것으로부터 쉼딩된 것)이다.

[0075] 외피는 또한 면역억제 분자를 포함한다. 면역억제 분자는 임의 방식으로 외피의 지질 이중층과 회합될 수 있다. 일부 실시양태에서, 면역억제 분자는 지질 이중층 내에 또는 그 위에 포매되어 있다. 예를 들어, 면역억제 분자는 천연적으로 또는 합성적으로, 지질 이중층 내로 통합되는 막횡단 도메인을 포함할 수 있다. PDGR 막횡단 도메인을 포함한, 막횡단 도메인은 관련 기술분야에 공지되어 있다. (예를 들어, 융합 단백질을 생성함으로써) 막횡단 도메인을 도입시키는 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있다.

[0076] 면역억제 분자는 외피를 보유하지 않거나, 또는 면역억제 분자를 함유하도록 조작되지 않은 외피를 갖는 동일한

백터와 비교하여 본 발명의 외피보유 백터에 대한 숙주 면역 반응을 감소시키는 임의의 분자일 수 있다. 면역 억제 분자는 예컨대, 면역 억제제를 자극하거나, 또는 상향조절함으로써, 또는 면역 자극 분자 및/또는 활성인자를 억제하거나, 또는 하향-조절함으로써, 또는 다르게는 면역억제 분자를 포함하지 않는 외피보유 백터와 비교하여 외피보유 바이러스 백터의 면역원성을 감소시킴으로써, 임의의 기전에 의한 숙주의 면역 기능을 하향-조절하는 분자 (예를 들어, 단백질)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 면역억제 분자는 면역 체크포인트 수용체 및 리간드를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 면역억제 분자의 비제한적인 예는, 예를 들어, CTLA-4 및 그의 리간드 (예를 들어, B7-1 및 B7-2), PD-1 및 그의 리간드 (예를 들어, PDL-1 및 PDL-2), VISTA, TIM-3 및 그의 리간드 (예를 들어, GAL9), TIGIT 및 그의 리간드 (예를 들어, CD155), LAG3, VISTA, 및 BTLA 및 그의 리간드 (예를 들어, HVEM)를 포함한다. 상기 체크포인트 분자 중 임의의 것의 활성 단편 및 유도체; 상기 체크포인트 분자 중 임의의 것의 효능제, 예컨대 상기 체크포인트 분자 중 임의의 것에 대한 효능작용 항체; 면역 자극성 수용체 (공동-자극성 수용체) 또는 그의 리간드를 차단하는 항체, 예컨대 항-CD28 항체; 또는 면역 체크포인트 분자의 면역 기능을 모방하는 펩티드가 또한 포함된다. 원하는 면역억제 분자가 천연적으로 막횡단 도메인을 포함하지 않는 정도로, 면역억제 분자는 도 2에 도시되어 있는 바와 같이, 세포외 도메인, 막횡단 도메인, 및 임의적으로, 전장의 세포내 도메인, 또는 키메라 분자 발현 및 그의 리간드 또는 수용체에의 결합을 유지시키는 데 필요할 수 있는 임의의 최소 세포간 도메인을 포함하는 키메라 분자를 생성함으로써 지질 이중층 내에 포매 되도록 조작될 수 있다. 이펙터 분자의 막횡단 도메인 및 세포간 도메인은 이뮤노글로불린 Fc 수용체 도메인 (또는 그의 막횡단 영역), 또는 발현 및 리간드 결합 활성을 유지시키는데 필요한 임의의 다른 기능성 도메인을 포함할 수 있다.

[0077]

외피는 임의의 하나 이상의 상이한 유형의 면역억제 분자를 포함할 수 있지만; 일부 실시양태에서, 외피는 2종 이상의 상이한 면역억제 분자 (예를 들어, 3종 이상의 상이한 면역억제 분자, 4종 이상의 상이한 면역억제 분자, 또는 심지어 5종 이상의 상이한 면역억제 분자)의 조합을 포함한다. 따라서, 예를 들어, 일부 실시양태에서, 외피는 2종 이상의 상이한 면역 체크포인트 분자 (예를 들어, 3종 이상의 상이한 면역 체크포인트 분자, 4종 이상의 상이한 면역 체크포인트 분자, 또는 심지어 5종 이상의 상이한 면역 체크포인트 분자), 임의적으로, CTLA-4 및 그의 리간드 (예를 들어, B7-1 및 B7-2), PD-1 및 그의 리간드 (예를 들어, PDL-1 및 PDL-2), VISTA, TIM-3 및 그의 리간드 (예를 들어, GAL9), TIGIT 및 그의 리간드 (예를 들어, CD155), LAG3, VISTA, 및 BTLA 및 그의 리간드 (예를 들어, HVEM); 상기 체크포인트 분자 중 임의의 것의 활성 단편 및 유도체; 상기 체크포인트 분자 중 임의의 것의 효능제, 예컨대 상기 체크포인트 분자 중 임의의 것에 대한 효능작용 항체; 면역 자극성 수용체 (공동-자극성 수용체) 또는 그의 리간드를 차단하는 항체, 예컨대 항-CD28 항체; 또는 면역 체크포인트 분자의 면역 기능을 모방하는 펩티드로부터 선택되는, 임의적으로 2종 이상의 (예를 들어, 3종 이상, 4종 이상, 또는 심지어 5종 이상의) 분자의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서 외피는 CTLA-4 및 PD-L1 및 PD-L2 및 VISTA, 또는 이들의 임의 조합, 또는 다른 면역 억제 분자를 단독으로 또는 최대 4종의 상이한 분자의 조합으로 포함한다. 일부 실시양태에서, 외피는 CTLA-4 및 PD-L1, CTLA-4 및 PD-L2, CTLA-4 및 PD-1, CTLA-4 및 VISTA, CTLA-4 및 항-CD28, PD-1 및 VISTA, B7-1 및 PD-L1, B7-1 및 PD-L2, B7-1 및 PD-1, B7-1 및 VISTA, B7-1 및 항-CD28, B7-2 및 PD-L1, B7-2 및 PD-L2, B7-2 및 PD-1, B7-2 및 VISTA, B7-2 및 항-CD28, PD-1 및 VISTA, PD-1 및 항-CD-28, VISTA 및 항-CD28, PD-L1 및 VISTA, PD-L1 및 항-CD-28, PD-L2 및 VISTA, PD-L2 및 항-CD-28, 또는 VISTA 및 항-CD28을 포함한다. 일부 실시양태에서, 외피는 CTLA4 및 PD-L1, CTLA 및 PD-L2 CTLA-4 및 VISTA, PD-L1 및 PD-L2, PD-L1 및 VISTA, PD-L2 및 VISTA, CTLA4 및 PD-L1 및 PD-L2, CTLA4 및 PD-L1 및 VISTA, CTLA4 및 PD-L2 및 VISTA, PD-L1 및 PD-L2 및 VISTA, 또는 CTLA4 및 PD-L1 및 PD-L1 및 VISTA를 포함한다. 일부 실시양태에서, 면역억제 분자는 막횡단 도메인을 포함하거나, 또는 그를 포함하도록 조작된다. 백터에서 사용되는 면역억제 분자는 백터가 투여되는 포유동물 종의 것이어야 한다. 따라서, 인간용인 경우, 면역억제 분자의 인간 오르토로그가 사용되어야 하고, 이 단백질은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 특정한 실시양태에서, 외피에 포함되는 면역억제 분자는 CTLA-4 및 PD-L1을 포함하거나, 본질적으로 그로 이루어지거나, 또는 그로 이루어진다. 인간 CTLA-4는 예를 들어, NCBI 참조 서열: NP_005205.2에 의해 확인되는 단백질에 의해 제공되고; PD-L1은 NCBI 참조 서열: NP_054862.1에 의해 확인되는 단백질에 의해 제공된다. 일부 실시양태에서, 면역억제 분자는 서열식별번호: 3의 아미노산 서열을 포함하는 CTLA-4 분자 (또는 그로부터 유래된 것)이다. 일부 실시양태에서, 면역억제 분자는 서열식별번호: 3의 아미노산 서열과 약 80%, 85%, 90%, 또는 99%의 동일성 중 임의의 값을 초과하는 정도의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 CTLA-4 분자 (또는 그로부터 유래된 것)이다. 일부 실시양태에서, 면역억제 분자는 서열식별번호: 4의 아미노산 서열을 포함하는 PDL-1 분자 (또는 그로부터 유래된 것)이다. 일부 실시양태에서, 면역억제 분자는 서열식별번호: 4의 아미노산 서열과 약 80%, 85%, 90%, 또는 99%의 동일성 중 임의의 값을 초과하는 정도의 동일성을 갖는 아미노산 서열을

포함하는 PDL-1 분자 (또는 그로부터 유래된 것)이다.

[0078] 외피는 임의의 적합한 양 또는 농도로 면역억제 분자를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 외피는, 면역억제 분자를 함유하도록 조작되지 않은 동일한 외피보유 벡터와 비교하여 트랜스진의 전달 및 발현을 개선시키는데 충분한 양으로 면역억제 분자를 포함한다. 외피보유 벡터를 생산하는 방법과 관련하여 더 상세하게 설명되는 바와 같이, 외피에 충분한 농도의 면역억제 분자를 포함하는 외피보유 벡터는 천연 숙주 세포와 비교하여 면역억제 분자를 과다발현하도록 숙주 (생산자) 세포를 조작함으로써 제공될 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 벡터의 외피는 면역억제 분자 중 하나 이상을 (또는 그들 모두를) 면역억제 분자를 과다발현하도록 조작되지 않은 동일한 숙주 세포로부터 생산되는 동일한 외피보유 벡터보다 더 많은 양으로 포함한다. 일부 실시양태에서, 예를 들어, 본원에 제공된 벡터의 외피는 면역억제 분자 중 하나 이상을 (또는 그들 모두를) 면역억제 분자를 과다발현하도록 조작되지 않은 동일한 숙주 세포로부터 생산되는 동일한 외피보유 벡터보다 약 2x 이상만큼, 약 3x 이상만큼, 약 5x 이상만큼, 약 10x 이상만큼, 약 20x 이상만큼, 약 50x 이상만큼, 또는 심지어 약 100x 이상만큼 (예를 들어, 약 1000x 이상만큼) 더 많은 양으로 포함한다. 일부 실시양태에서, 숙주 세포는 면역억제 분자 중 하나 이상을 (또는 그들 모두를) 면역억제 분자를 과다발현하도록 조작되지 않은 동일한 숙주 세포보다 약 2x 이상, 약 3x 이상, 약 5x 이상, 약 10x 이상, 약 20x 이상, 약 50x 이상, 또는 심지어 약 100x 이상 (예를 들어, 약 1000x 이상)만큼 과다발현하도록 조작된다. 상기 설명된 바와 같이, 일부 실시양태에서, 숙주 세포는 면역억제 분자를 과다발현하도록 조작된 비-종양 숙주 세포이고, 외피는 비-종양 EV 지질 이중층, 예컨대, 면역억제 분자를 과다발현하도록 조작된 비-종양 세포로부터의 비-종양 엑소솜 지질 이중층을 포함한다. 특정한 실시양태에서, 지질 이중층은 면역억제 분자를 과다발현하도록 조작된 293 세포(예를 들어, HEK293 또는 그의 임의의 변종, 예컨대, HEK293E, HEK293F, HEK293T 등)로부터의 EV 지질 이중층 (예를 들어, 엑소솜 지질 이중층 또는 엑소솜)이다. (예를 들어, 벡터 외피에서) 벡터 표면 상의 면역억제 분자의 양은 관련 기술분야에 공지된 다양한 기술 중 임의의 것을 사용하여 측정될 수 있다. 예를 들어, ELISA를 사용하여 벡터 표면 상의 상기 분자의 양을 측정하고, 상이한 벡터 상의 상기 분자의 상대적인 양을 결정할 수 있다.

[0079] 본원에 제공된 외피보유 바이러스 벡터는 임의의 적합한 입자 크기를 가질 수 있다. 전형적으로, 외피보유 바이러스 입자의 크기는 제조사의 프로토콜에 따라 NANOSIGHT™ NS300 (말번 인스트루먼트(Malvern Instruments: 영국 말번))를 이용하여 측정한 바, 약 30-600 nm, 예컨대 약 50-300 nm 범위가 될 것이며, 여기서 평균 입자 크기는 약 75-150 nm, 예컨대 약 80-120 nm (예를 들어, 약 90-115 nm) 범위가 될 것이다. 외피보유 바이러스 벡터는 각각 단일 외피 내에 단일 캡시드 또는 다중 캡시드를 포함할 수 있다.

[0080] (C) 외부 외피 모이어티

[0081] 본원에 제공된 외피보유 바이러스 벡터는 상이한 기능을 제공하기 위하여 원하는 바에 따라 외피에 추가의 모이어티를 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 외피는 벡터를 원하는 세포 또는 조직 유형으로 표적화하는 막 표면 단백질, 예를 들어, 원하는 세포 유형 상의 리간드 또는 수용체에 특이적으로 결합하는 분자를 함유하도록 조작될 수 있다. 일부 바이러스 벡터, 예컨대 AAV에서, 벡터의 세포 또는 조직 특이성은 적어도 부분적으로, 바이러스의 혈청형에 의해 결정될 수 있다. 본원에 제공된 벡터를 원하는 세포 유형 상의 리간드 또는 수용체에 결합하는 외피-결합된 표적화 모이어티 (예를 들어, 표적화 단백질)를 함유하도록 조작함으로써, 벡터는 AAV 혈청형 특이성에만 단독으로 의존하는 것과 비교하여, 더욱 정확하게 표적화할 수 있을 뿐만 아니라, 선택이 더욱 광범위한 세포 유형의 표적화를 위한 옵션도 가능하게 한다. 예를 들어, 인간 인자 IX 단백질을 사용하여 B형 혈우병을 치료하기 위해, 벡터의 외피는 특이적으로 또는 우선적으로 간 세포 상에서 발현된 표면 단백질 (예를 들어, 아시알로당단백질 수용체 1(ASGR1)에 특이적으로 결합하는 막-결합된 항원 결합 도메인 (예를 들어, 클론 8D7의 도메인, BD 바이오사이언시스(BD Biosciences))과 같은 단백질)에 특이적으로 또는 우선적으로 결합하는 모이어티를 포함하도록 조작될 수 있다. 벡터가 원하는 목적지에 의존하여 상이한 세포 또는 조직 유형을 표적화하는 다른 표적화 분자가 사용될 수 있다. 비제한적인 예는 간, 근육, 심장, 뇌 (예를 들어, 뉴런, 신경교 세포, 성상세포 등), 신장, 폐, 위, 장, 골수, 혈액 세포 (예를 들어, 백혈구, 림프구, 적혈구), 난소, 자궁, 고환, 또는 임의 유형의 줄기 세포 중 하나 이상을 포함한다. 벡터를 생산하는 방법과 관련하여 더 상세하게 설명되는 바와 같이, 상기 벡터 외피는 막 결합된 표적화 모이어티를 고수준으로 발현하도록 숙주 세포 (생산자 세포)를 조작함으로써 제공될 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, 본 발명은 면역억제 분자 및 표적화 분자를 포함하는 외피를 포함하는 바이러스 벡터를 제공한다.

[0082] 외피보유 바이러스 벡터는 벡터의 효과 또는 효능을 개선시키거나, 또는 생산을 개선시키는 추가 요소를 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 생산자 세포에서 테트라스파닌 CD9의 외인성 발현은 벡터 성능을 저하시키지 않으면서, 벡터 생산을 개선시킬 수 있다 (Shiller *et al.*, *Mol Ther Methods Clin Dev*, (2018) 9:278-287). 따라

서, 벡터는 외피에 CD9를 포함할 수 있다. 그러나, 일부 실시양태에서, 외피보유 바이러스 벡터는 핵산을 대상 체에게 전달하는데 있어서 벡터의 효능 또는 효과를 유의적으로 손상시키거나, 벡터를 (예를 들어, FDA 규제 하에서) 인간용으로는 부적합한 것으로 만들거나, 또는 벡터 생산을 실질적으로 손상시키는 요소는 실질적으로 함유하지 않거나, 또는 완전히 함유하지 않는다.

[0083] IV. 적용 및 사용 방법

[0084] 본원에 제공된 외피보유 바이러스 벡터는 핵산 (트랜스진)의 세포 또는 대상체에게로의 전달 및 발현에 유용하다. 따라서, 본 발명은 세포 또는 대상체에게 외피보유 바이러스 벡터를 투여함으로써 세포 또는 대상체에게 핵산 (트랜스진)을 전달하는 방법을 제공한다.

[0085] 일부 실시양태에서, 외피에 면역억제 분자를 포함하는 외피보유 바이러스 벡터는, 동일한 유형의 비-외피보유 바이러스 벡터, 또는 면역억제 분자를 포함하도록 조작된 외피를 보유하지 않는, 동일한 유형의 외피보유 바이러스 벡터보다 더 효과적으로 또는 효율적으로 세포 또는 대상체에게 핵산 (트랜스진)을 전달할 수 있다. 일부 실시양태에서, 더 효과적 또는 효율적인 전달의 결과로, 세포 또는 대상체에서 표적 세포당 바이러스 게놈 카피는 더 높고/거나, (적용되는 바에 따라) 트랜스진 산물의 발현은 더 높다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 바와 같은, 외피에 면역억제 분자를 포함하는 외피보유 바이러스 벡터 (예를 들어, 외피보유 AAV)는 대상체에게 투여 후 3-주에, 동일한 조건 하에 (예를 들어, 동일한 트랜스진, 동일한 대상체, 동일한 투여 용량 및 투여 경로 등, 단, 유일한 차이는 벡터임) 동일한 유형의 비-외피보유 바이러스 벡터의 투여에 의해 생산되는 것과 비교하여 약 50% 이상 (약 75% 이상, 약 100% 이상, 약 125% 이상, 약 150% 이상, 약 175% 이상, 또는 심지어 약 200% 이상)만큼 증가된 트랜스진 발현 수준을 제공한다. 또한, 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 바와 같은, 외피에 면역억제 분자를 포함하는 외피보유 바이러스 벡터 (예를 들어, 외피보유 AAV)는 대상체에게 투여 후 3-주에, 동일한 조건 하에 (예를 들어, 동일한 트랜스진, 동일한 대상체, 동일한 투여 용량 및 투여 경로 등, 단, 유일한 차이는 벡터임) 면역억제 분자가 없는 동일한 유형의 외피보유 바이러스 벡터의 투여에 의해 생산되는 것 (예외적으로 숙주 세포가 면역억제 분자를 발현하도록 조작되지 않은 것인, 동일한 유형의 생산자 세포로부터 생산되는 것)과 비교하여 약 20% 이상 (약 50% 이상, 약 75% 이상, 약 100% 이상, 약 125% 이상, 약 150% 이상, 약 175% 이상, 또는 심지어 약 200% 이상)만큼 증가된 트랜스진 발현 수준을 제공한다.

[0086] 추가적으로, 또는 대안적으로, 면역억제 분자를 포함하는 외피보유 바이러스 벡터의 일부 실시양태는 벡터 또는 트랜스진 산물에 대한 숙주 면역 반응, 또는 숙주 면역 반응이 트랜스진 전달 및/또는 발현에 미치는 영향을 감소시키는 것으로 간주된다. 따라서, 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 외피보유 바이러스 벡터를 통해 벡터를 반복 투약할 수 있고/거나, 소정의 바이러스 유형 (예를 들어, 특정한 혈청형의 AAV)에 대하여 기존 면역을 갖고 있는 대상체에게 투약할 수 있다. 따라서, 한 측면에서, 본 방법은 앞서 이전에 (천연 바이러스에의 자연적 노출에 의해, 또는 이전의 바이러스 벡터 투여에 의해) 외피보유 바이러스 벡터에 함유되어 있는 동일한 유형의 바이러스에 노출된 바 있는 대상체에게, 또는 다르게는 바이러스에 대한 기존 면역을 갖고 있는 대상체 (예를 들어, 바이러스에 대한 기존 항체를 갖고 있는 환자)에게 외피보유 바이러스 벡터를 투여하는 단계를 포함한다. 따라서, 본 방법은, 적합한 시간 간격에 의해 분리된 외피보유 바이러스 벡터의 용량을 2회 이상 별개로 투여하는 것 (예를 들어, 적어도 1일, 적어도 1주, 적어도 2주, 적어도 3주, 적어도 4주 또는 1개월, 적어도 2개월, 적어도 3개월, 적어도 6개월, 또는 심지어 적어도 1년 이상의 간격에 의해 분리된 외피보유 바이러스 벡터의 용량을 2회 이상 투여하는 것)을 포함하는 반복 투약 스케줄로 대상체에게 외피보유 바이러스 벡터를 투여하는 단계를 포함할 수 있다.

[0087] 비록 벡터가 면역억제 분자를 포함하지만, 소정의 용량의 벡터 중의 면역억제 분자의 총량은 전형적으로 가용성 면역억제제체로서 투여될 때 사용되는 면역억제 분자의 용량보다는 적은 양이 될 것이다. 따라서, 예를 들어, CTLA4/Ig는 면역억제제체로서 10 mg/kg의 용량으로 사용될 수 있다. 그러나, 일부 실시양태에서, 벡터의 단일 용량 (예를 들어, 2×10^{11} vg/kg 또는 심지어 5×10^{11} vg/kg)은 훨씬 더 적은 양의 면역억제제 (예를 들어, 막-결합된 CTLA4), 예컨대, 약 5 mg/kg 미만, 약 2 mg/kg 미만, 약 1 mg/kg 미만, 또는 심지어 약 0.5 mg/kg 미만 (예를 들어, 약 0.1 mg/kg 미만)으로 갖게 될 것이다. 따라서, 일부 실시양태에서, 본원에 제공된, 면역억제 분자를 포함하는 외피보유 벡터는 가용성 면역억제제 (예를 들어, CTLA4/Ig, 아바타셉트)의 투여로부터 초래되는 전체적인 면역억제를 최소화시킨다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된, 외피에 면역억제 분자를 포함하는 외피보유 바이러스 벡터 (예를 들어, 외피보유 AAV)는 투여 후 2-3주 이내에, 투여된 벡터로부터 유도되는 것보다 순환 총 항-IgG 항체의 증가, 또는 항원 특이적 항체의 증가, 또는 항원에 의해 자극받은 활성화된 CD4+ 또는 CD8+ T 세포로 측정되는 바, 대상체, 특히, 인간에게 유효량으로 투여 시, 예를 들어, 2×10^{11} vg/kg의

용량 또는 5×10^{11} vg/kg의 용량은 10 mg/kg CTLA4/Ig (또는 일부 실시양태에서, 2 mg/kg CTLA4/Ig)의 단일 투여에 의해 유발되는 것보다 더 적은 전체적인 면역억제를 유발한다.

[0088] 외피보유 바이러스 벡터는 임의의 궁극적인 최종의 목적을 위해 핵산 (트랜스진)을 세포 또는 대상체에게 전달하기 위해 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 최종의 목적은 연구 목적으로, 또는 단백질의 생산을 위해 또는 다른 생물-생산 프로세스를 위해 시험관내에서 트랜스진을 세포에서 발현하는 것일 수 있다. 다른 실시양태에서, 외피보유 바이러스 벡터는 개체에서 질환 또는 장애를 치료하는데 사용된다. 질환 또는 장애는 핵산 또는 트랜스진의 전달 및 (적용가능할 경우) 발현에 의한 치료에 감수성인 임의의 질환 또는 장애일 수 있다. 일부 실시양태에서, 질환 또는 장애는 단일유전자성 질환이다. 일부 실시양태에서, 질환 또는 장애는 리소솜 축적병이다. 일부 실시양태에서, 질환 또는 장애는 글리코젠 축적병이다. 일부 실시양태에서, 질환 또는 장애는 헤모글로빈 장애이다. 일부 실시양태에서, 질환 또는 장애는 근골격 장애이다. 일부 실시양태에서, 질환 또는 장애는 CNS 질환 또는 장애이다. 일부 실시양태에서, 질환 또는 장애는 심장병 또는 뇌졸중을 포함한, 심혈관 장애이다. 일부 실시양태에서, 질환은 암이다.

[0089] 질환의 더욱 구체적인 예시적 예이되, 비-제한적인 것으로 근세관성 근병증, 척수성 근위축증, 레베르 선천성 흑암시, A형 혈우병 및 B형 혈우병, 니만 픽병 (예를 들어, 니만 픽병 A형, 니만 픽병 B형, 니만 픽병 C형), 맥락막결손증, 헌팅턴병, 배튼병, 레베르 유전성 시신경병증, 오르니틴 트랜스카르바밀라제 (OTC) 결핍증, 글리코젠 축적병, 폼페병, 윌슨병, 시트룰린혈증 1형, PKU (페닐케톤뇨증), 부신백질이영양증, 겸상 세포 질환을 포함한, 헤모글로빈 장애, 베타 지중해 빈혈, 중추 신경계 장애, 및 근골격 장애를 포함한다. 따라서, 본 방법의 일부 실시양태에서, 외피보유 바이러스 벡터는 상기 질환 또는 장애를 앓거나, 또는 질환 또는 장애가 발생할 위험이 있는 (예를 들어, 질환 또는 장애에 대한 돌연변이를 보유하거나, 또는 질환 또는 장애의 가족력이 있는) 대상체에게 투여된다. 추가로, 외피보유 바이러스 벡터가 질환 또는 장애를 치료하는데 사용될 때, 이는, 그가 발현이 대상체의 질환을 치료하는 것인 페이로드 핵산을 포함한다. 비제한적인 예로서, 핵산은 하기: 인자 VIII, 인자 IX, 미오투블라린, SMN, RPE65, NADH-유비퀴논 옥시도리덕타제 쇠 4, CHM, 헌팅턴, 알파-갈락토시다제 A, 산 베타-글루코시다제, 알파-글루코시다제, 오르니틴 트랜스카르바밀라제, 아르기노숙시네이트 신테타제, β -글로빈, γ -글로빈, 페닐알라닌 히드록실라제, 또는 ALD 중 하나 이상을 코딩할 수 있다.

[0090] 본 방법은 또한 질환 치료를 위해 또는 임의의 다른 목적으로 치료 핵산을 세포 또는 대상체에 전달하는데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 치료 핵산은 siRNA, miRNA, shRNA, 안티센스 RNA, RNAzyme, 또는 DNAzyme이다.

[0091] 시험관내 또는 생체내에서 세포에 하나 이상의 유전자 편집 유전자 산물을 코딩하는 핵산을 전달하기 위해 외피보유 바이러스 벡터를 사용하는 방법 또한 제공한다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 유전자 편집 유전자 산물은 RNA-가이드된 엔도뉴클레아제 (예를 들어, Cas9 또는 Cpf1), RNA-가이드된 엔도뉴클레아제에 대한 하나 이상의 가이드 서열, 및/또는 하나 이상의 도너 서열이다.

[0092] 상기 방법 중 임의의 것에서, 세포는 임의 유형의 세포, 특히, 포유동물 세포, 또는 인간 세포일 수 있다. 대상체는 임의의 대상체, 예컨대 인간, 비-인간 영장류, 또는 설치류 (예를 들어, 마우스, 래트, 기니아 피그, 햄스터), 토끼, 개, 고양이, 말, 소, 돼지, 양, 개구리, 또는 조류를 포함한, 다른 포유동물일 수 있다.

[0093] 상기 치료 방법 중 임의의 것에서, 치료 유효량의 외피보유 바이러스 벡터는 대상체에게 임의의 적합한 투여 경로에 의해 투여된다. 유효 용량 및 투여 경로는 적응증에 의존할 것이며, 의사에 의해 결정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 외피보유 바이러스 벡터는 전신으로; 예를 들어, 정맥내로, 동맥내로, 복강내로, 피하로, 경구적으로, 또는 흡입에 의해 전달된다. 다른 실시양태에서, 외피보유 바이러스 벡터는 조직 (예를 들어, 기관, 중앙 등)에 직접 전달되거나, 또는 CNS에 (예를 들어, 경막내로, 척수에, 뇌 특정 부분에, 예컨대 뇌실, 시상하부, 뇌하수체, 대뇌, 소뇌 등에) 투여된다.

[0094] 외피보유 바이러스 벡터는 외피보유 바이러스 벡터 및 적절한 담체, 예컨대, 제약상 허용되는 담체, 예컨대, 염수를 포함하는 조성물의 일부로서 사용될 수 있다. 바이러스 벡터 조성물의 제제화를 위해 적합한 담체, 제제화 완충제, 및 다른 부형제는 관련 기술분야에 공지되어 있고, 본 발명에서 제공되는 조성물에 적용가능하다.

[0095] 특정한 실시양태에서, B형 혈우병을 치료하는 방법으로서, B형 혈우병의 치료를 필요로 하는 대상체에게 본원에 제공된 외피보유 바이러스 벡터를 투여하는 것을 포함하며, 여기서 이중 트랜스진은 인간 인자 IX (FIX) 단백질 (예를 들어, 인간 인자 IX 유니프루트KB - P00740; 인간 인자 IX (R338L) "파두아" (문헌 [Monahan *et al.*, (2015) *Hum Gene Ther.*, 26(2):69-81], 또는 공지되어 있는 다른 변이체)을 코딩하고, 여기서 바이러스 벡터의

외피는 CTLA-4 및 PD-L1을 포함하는 조작된 지질 이중층인 방법을 제공한다. 더욱 특정한 실시양태에서, 바이러스 벡터는 AAV (예를 들어, AAV8 또는 AAV2/8, 또는 scAAV8 또는 scAAV2/8)이고, 임의적으로, 여기서 외피는 CTLA-4 및 PD-L1을 함유하도록 조작된 엑소솜 (예를 들어, CTLA-4 및 PD-L1을 과다발현하도록 조작된 생산자 세포 (예를 들어, HEK293 세포)로부터의 엑소솜)에 의해 제공된다. 일부 실시양태에서, 인간 인자 IX는 서열식별번호: 1의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 인간 인자 IX는 서열식별번호: 2의 아미노산 서열과 약 80%, 85%, 90%, 또는 99%의 동일성 중 임의의 값을 초과하는 정도의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, CTLA-4는 서열식별번호: 3의 아미노산 서열을 포함하는 CTLA를 포함하거나, 또는 그로부터 유래된 것이다. 일부 실시양태에서, CTLA-4는 서열식별번호: 3의 아미노산 서열과 약 80%, 85%, 90%, 또는 99%의 동일성 중 임의의 값을 초과하는 정도의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PDL-1은 서열식별번호: 4의 아미노산 서열을 포함하는 PDL-1을 포함하거나, 또는 그로부터 유래된 것이다. 일부 실시양태에서, PDL-1은 서열식별번호: 4의 아미노산 서열과 약 80%, 85%, 90%, 또는 99%의 동일성 중 임의의 값을 초과하는 정도의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 외피보유 바이러스 벡터는 간으로 전달되고, 이중 트랜스진은 간-특이적 프로모터를 포함한다. 일부 실시양태에서, 벡터는 정맥내로, 임의적으로, 간 동맥에 투여된다. 일부 실시양태에서, 벡터는 2×10^{11} 내지 2×10^{12} 벡터 게놈 (vg)/kg (대상체의 체중) (예를 들어, 2×10^{11} 내지 8×10^{11} 또는 3×10^{11} 내지 6×10^{11} 벡터 게놈 (vg)/kg (대상체의 체중))의 용량으로 투여될 것이다. 일부 실시양태에서, 본 방법은 용량 사이의 적어도 1일 (적어도 1일, 적어도 1주, 적어도 2주, 적어도 3주, 적어도 4주 또는 1개월, 적어도 2개월, 적어도 3개월, 적어도 6개월, 또는 심지어 적어도 1년 이상)의 간격으로 2회 이상의 용량 (예를 들어, 3회 이상의 용량, 4회 이상의 용량, 또는 5회 이상의 용량)을 투여하는 것을 포함한다.

[0096]

또 다른 특정한 실시양태에서, A형 혈우병을 치료하는 방법으로서, A형 혈우병의 치료를 필요로 하는 대상체에 게 본원에 제공된 외피보유 바이러스 벡터를 투여하는 것을 포함하며, 여기서 이중 트랜스진은 인간 인자 VIII (예를 들어, 인간 F8 (유니프루트KB - Q2VF45), B-도메인 결실 (BDD) 인간 F8 유전자의 SQ-FVIII 변이체 (문헌 [Lind *et al.*, (1995) *Eur J Biochem.* Aug 15;232(1):19-27], 또는 공지되어 있는 다른 변이체)을 코딩하고, 여기서 바이러스 벡터의 외피는 CTLA-4 및 PD-L1을 포함하는 조작된 지질 이중층인 방법을 제공한다. 더욱 특정한 실시양태에서, 바이러스 벡터는 AAV (예를 들어, AAV8 또는 scAAV8, 또는 scAAV8 또는 scAAV2/8)이고, 임의적으로, 여기서 외피는 CTLA-4 및 PD-L1을 과다발현하도록 조작된 숙주 세포 (예를 들어, HEK293 세포)로부터 생산된 엑소솜에 의해 제공된다. 일부 실시양태에서, 인간 인자 VIII는 서열식별번호: 1의 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 서열식별번호: 1의 아미노산 서열로부터 유래된 것이다. 일부 실시양태에서, 인간 인자 VIII는 서열식별번호: 1의 아미노산 서열과 약 80%, 85%, 90%, 또는 99%의 동일성 중 임의의 값을 초과하는 정도의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, CTLA-4는 서열식별번호: 3의 아미노산 서열을 포함하는 CTLA를 포함하거나, 또는 그로부터 유래된 것이다. 일부 실시양태에서, CTLA-4는 서열식별번호: 3의 아미노산 서열과 약 80%, 85%, 90%, 또는 99%의 동일성 중 임의의 값을 초과하는 정도의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PDL-1은 서열식별번호: 4의 아미노산 서열을 포함하는 PDL-1을 포함하거나, 또는 그로부터 유래된 것이다. 일부 실시양태에서, PDL-1은 서열식별번호: 4의 아미노산 서열과 약 80%, 85%, 90%, 또는 99%의 동일성 중 임의의 값을 초과하는 정도의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 외피보유 바이러스 벡터는 간으로 전달되고, 이중 트랜스진은 간-특이적 프로모터를 포함한다. 일부 실시양태에서, 벡터는 정맥내로, 임의적으로, 간 동맥에 투여된다. 일부 실시양태에서, 벡터는 2×10^{11} 내지 2×10^{12} 벡터 게놈 (vg)/kg (대상체의 체중) (예를 들어, 2×10^{11} 내지 8×10^{11} 또는 3×10^{11} 내지 6×10^{11} 벡터 게놈 (vg)/kg (대상체의 체중))의 용량으로 투여될 것이다. 일부 실시양태에서, 본 방법은 용량 사이의 적어도 1일 (적어도 1일, 적어도 1주, 적어도 2주, 적어도 3주, 적어도 4주 또는 1개월, 적어도 2개월, 적어도 3개월, 적어도 6개월, 또는 심지어 적어도 1년 이상)의 간격으로 2회 이상의 용량 (예를 들어, 3회 이상의 용량, 4회 이상의 용량, 또는 5회 이상의 용량)을 투여하는 것을 포함한다.

[0097]

VI. 제조

[0098]

본원에 제공된 외피보유 바이러스 벡터는 임의의 적합한 방법에 의해 생산될 수 있다. 비제한적인 예는 US 2013/020559에 의해 제공되며, 이는 본원에 참조로 포함된다.

[0099]

한 가지 특별히 이로운 방법은 벡터의 외피에 포함시키고자 하는 면역억제 분자를 과다발현하도록 조작된 생산자 세포주로부터 외피보유 벡터를 생산하는 것을 포함한다. 따라서, 본원에서는 (a) 외피보유 바이러스 입자를

생성하는 조건 하에 바이러스 생산자 세포를 배양하며, 여기서 바이러스 생산자 세포는 하나 이상의 막-결합된 면역억제 분자를 코딩하는 핵산을 포함하는 것인 단계, 및 (b) 외피보유 바이러스 벡터를 수집하는 단계에 의해, 본원에 기재된 바와 같이, 면역억제 분자를 포함하는 외피를 갖는 외피보유 바이러스 벡터를 생산하는 방법이 제공된다.

[0100] (A) 생산자 세포 조작

[0101] 바이러스 벡터에서 사용되는 종래의 바이러스 생산에 적합한 임의의 생산자 세포를 사용하여 본 발명의 외피보유 바이러스 벡터를 생산할 수 있다. 적합한 생산자 세포는 293 세포 (예를 들어, HEK293, HEK293E, HEK293F, HEK293T 등) 및 HeLa 세포를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 생산자 세포는 임의의 적합한 방법에 의해 원하는 면역억제 분자를 발현하도록 조작될 수 있다. 본 발명의 일부 실시양태에서, 면역억제 분자는 생산자 세포 내로의, 면역억제 분자를 코딩하는 외인성 핵산 (예를 들어, 플라스미드 또는 다른 벡터)의 안정적인, 또는 일시적이 형질감염에 의해 발현된다. 상기 외인성 핵산의 발현에 의해, 생산자 세포는 면역억제 분자를 코딩하는 외인성 핵산으로 형질감염되지 않은 동일한 생산자 세포와 비교하여 면역억제 분자를 과다발현하고, 결국, 생산자 세포로부터 출아된 외피보유 바이러스는 면역억제 분자를 과다발현하도록 조작되지 않은 동일한 생산자 세포로부터 출아된 외피보유 바이러스와 비교하여 증가된 양의 면역억제 분자를 갖는다. 일부 실시양태에서, 숙주 세포는 면역억제 분자를 과다발현하도록 조작되지 않은 동일한 숙주 세포보다 약 2x 이상, 약 3x 이상, 약 5x 이상, 약 10x 이상, 약 20x 이상, 약 50x 이상, 또는 심지어 약 100x 이상만큼 면역억제 분자를 과다발현하도록 조작된다.

[0102] 면역억제 분자의 발현은 프로모터, 예컨대 구성적 프로모터 (예를 들어, CMV 프로모터)에 의해 구동될 수 있다. 일부 실시양태에서, 이펙터 분자를 코딩하는 유전자 다음으로 이펙터 분자 코딩 영역의 하류 방향으로 폴리아데닐화 신호 (예를 들어, 헤모글로빈 폴리아데닐화 신호)가 이어진다. 일부 실시양태에서, 인트론은 프로모터의 하류 방향으로 삽입되어 있다. 예를 들어, 프로모터의 하류 방향에 위치하는 헤모글로빈 유래 인공 인트론은 이펙터 분자 생산을 증가시키는데 사용될 수 있다. 일시적 형질감염 방법은 인산칼슘 형질감염을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 단일 또는 조합 면역 조정인자를 발현하는 안정적인 세포주를 생산하는 방법은 레트로 바이러스 유전자 전달, 또는 연쇄체 형질감염에 이은 선별을 포함하나 이에 제한되지는 않는다 (Throm *et al.* (2009) *Blood*, 113(21): 5104-5110). 생산자 세포는 외피보유 벡터에서 요구될 수 있는 바, 상기 방식으로 개별 면역억제 분자를 발현하도록, 또는 면역억제 분자의 상이한 조합을 발현하도록 조작된다. 생산자 세포는 또한 생산성을 증가시키도록, 관련 기술분야에 공지된 다른 방식으로 조작될 수 있다. 예를 들어, 생산자 세포는 벡터 생산을 개선시키기 위해 테트라스파닌 CD9를 과다발현하도록 조작될 수 있다 (Shiller *et al.*, (2018) *Mol Ther Methods Clin Dev*, 9:278-287).

[0103] (B) 외피보유 바이러스 벡터의 생산

[0104] 본원에 기재된 외피보유 벡터는 조작된 생산자 세포로부터 임의의 적합한 기술에 의해 생산될 수 있다. 사용되는 특정한 기술은 외피보유 바이러스 벡터에서 사용되는 바이러스 유형에 의존하게 될 것이다. 예를 들어, 외피보유 AAV 벡터는 바이러스 생산 유전자 (예를 들어, Rep/Cap 및 헬퍼 유전자)를 코딩하는 플라스미드 또는 다른 발현 벡터 및 AAV ITR 및 페이로드 핵산을 포함하는 플라스미드 또는 다른 구축물을 공동으로 형질감염시킴으로써 생산될 수 있다. 형질감염은 임의의 방식으로, 예컨대 인산칼슘 형질감염, 폴리에틸렌이민 (PEI) 형질감염을 사용하여, 또는 HSV 기반 생산 시스템을 사용하여 달성될 수 있다 (Booth *et al.* (2004) *Gene Ther*, 11(10):829-837). AAV의 경우, 바이러스 유전자는 AAV2 ITR에 의해 플랭킹된, AAV2, 5, 6, 8, 또는 9 구조 유전자 Rep 및 Cap, 및 필요한 헬퍼 바이러스 유전자를 포함할 수 있지만, 이에 제한되지는 않는다 (Ayuso *et al.* (2014) *Hum Gene Ther*, 25:977-987). 생산은 임의의 적합한 방식으로, 예컨대 혈청 존재 또는 부재 하에서 부작성 또는 현탁 제조 시스템을 사용함으로써 수행될 수 있다 (문헌 [Ayuso *et al.* (2014) *Hum Gene Ther*, 25:977-987]; [Xiao *et al.* (1998), *J Virol*, 72(3): 2224-2232]; [Ryu *et al.* (2013) *Mol Ther*, Volume 21.B], 상기 방법들은 임의적으로 하기 변형을 포함할 수 있으며: 염화세슘 또는 이오딧산놀 구배 정제 이전에, 정화된 수거된 상청액을 친화성 정제 칼럼 상에서 사용하여 외피보유 바이러스를 강화시킬 수 있음). 외피보유 바이러스 벡터가 본원에 기재된 바와 같이 표적화 모이어티를 포함할 때, 표적화 모이어티는 단리/정제를 지원하는 친화성 리간드로서 사용될 수 있다. 외피보유 AAV 벡터를 생산하는 다른 방법도 공지되어 있고, 이는, 다른 유형의 외피보유 바이러스 (예를 들어, 외피보유 렌티바이러스)를 생산하는 방법과 같이, 생산자 세포가 원하는 면역억제 분자를 과다발현하도록 조작된다면, 사용될 수 있다. 렌티바이러스 기반 벡터의 경우, 필요한 바이러스 유전자는 유사한 정제 방법을 이용하여 다중 플라스미드를 공동으로 형질감염시킴으로써 공급된다.

- [0105] 실험을 통해 결정된 기간 경과 후, 벡터를 수거하고, 이어서, 사용되는 정제가 바이러스로부터 외피를 제거하지 않는다면, 관련 기술분야에 공지된 다양한 기술 중 임의의 것을 사용하여 정제한다. 정제 기술은 이온 교환 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피, 및 접선 유동 여과를 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 연속 초원심분리를 포함한 초원심분리는 외피보유 바이러스 벡터를 정제하는데 사용될 수 있다.
- [0106] 다양한 방법을 사용하여 생산자 세포 리터당 생산되는 외피보유 바이러스 벡터의 양을 증가시킬 수 있다. 이러한 방법은 아포토시스를 억제하거나, 또는 생산자 세포로의 세포 분열을 중단시키는 분자를 첨가하는 것을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 생산자 세포막의 지질 조성을 변경시키는 분자 또는 화합물 또한 리터당 벡터 생산을 증가시키는데 사용될 수 있다. 추가로, 막 융합생성 분자를 포함한, 엑소솜 생산을 증가시키는 화합물 또는 분자.
- [0107] 따라서, 일부 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 외피보유 바이러스 벡터를 생산하는 방법으로서, (a) 외피보유 바이러스 입자를 생성하는 조건 하에 바이러스 생산자 세포를 배양하며, 여기서 바이러스 생산자 세포는 하나 이상의 막 결합된 면역억제 분자를 코딩하는 핵산을 포함하는 것인 단계, 및 (b) 외피보유 바이러스 벡터를 수집하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 외피보유 바이러스 벡터는 본 발명의 외피보유 바이러스 벡터와 관련하여 본원에 기재된 특징 및 요소 중 임의의 것을 가질 수 있다. 추가로, 생산자 세포는 이전 섹션에 기재된 특징 및 요소 중 임의의 것을 가질 수 있고, 외피보유 바이러스 벡터를 생산하는 방법은 예를 들어, 하나 이상의 막-결합된 면역억제 분자를 코딩하는 핵산으로 생산자 세포를 형질전환시킴으로써 생산자 세포를 제공하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 숙주 세포는 면역억제 분자를 과다발현하도록 조작되지 않은 동일한 숙주 세포보다 약 2x 이상, 약 3x 이상, 약 5x 이상, 약 10x 이상, 약 20x 이상, 약 50x 이상, 또는 심지어 약 100x 이상만큼 면역억제 분자를 과다발현하도록 조작된다 (예를 들어, 면역억제 분자를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함함). 일부 실시양태에서, 숙주 세포는 비-종양 세포, 예컨대 293 세포(예를 들어, HEK293, HEK293T, HEK293E, HEK293F 등)이다.
- [0108] 외피보유 바이러스 벡터의 수집은 배양된 바이러스 생산자 세포의 배양액으로부터 외피보유 바이러스를 분리하는 것을 포함할 수 있다. 수집은 바이러스로부터 외피를 제거하지 않는 임의의 방법에 의해 수행될 수 있다. 따라서, 예를 들어, 수집은 초원심분리 또는 다른 적합한 방법에 의해 세포 배양물로부터 외피보유 바이러스를 분리하는 것을 포함할 수 있다. 본 방법은 바람직하게는 계면활성제 사용을 회피한다. 추가로, 본 방법은 바람직하게는 외피보유 바이러스의 수집 이전에 생산자 세포의 용해를 최소화하거나, 또는 그를 회피하는데, 그 이유는 생산자 세포의 용해가 비-외피보유 바이러스를 배양물 내로 방출할 수 있기 때문이다.
- [0109] 일부 실시양태에서, 외피보유 바이러스 벡터는 외피보유 AAV 벡터이고, 바이러스 생산자 세포는 (i) AAV rep 및 cap 유전자를 코딩하는 핵산, (ii) 트랜스진 및 적어도 하나의 ITR을 포함하는 AAV 바이러스 게놈을 코딩하는 핵산, 및 (iii) AAV 헬퍼 유전자를 코딩하는 핵산을 포함한다. 일부 실시양태에서, AAV rep 및 cap 유전자 및/또는 AAV 바이러스 게놈을 코딩하는 핵산은 일시적으로 생산자 세포주에 도입된다. 일부 실시양태에서, AAV rep 및 cap 유전자 및/또는 AAV 바이러스 게놈을 코딩하는 핵산은 안정적으로 생산자 세포주에서 유지된다. 일부 실시양태에서, AAV rep 및 cap 유전자 및/또는 AAV 바이러스 게놈을 코딩하는 핵산은 안정적으로 생산자 세포주의 게놈 내로 통합된다. 일부 실시양태에서, AAV 게놈은 2개의 AAV ITR을 포함한다 (예를 들어, 바이러스 게놈은 AAV ITR에 의해 플랜킹된 이중 트랜스진을 포함함). 일부 실시양태에서, 하나 이상의 AAV 헬퍼 기능은 플라스미드, 아데노바이러스, 안정적으로 세포 게놈 내로 통합된 핵산, 또는 단순 헤르페스 바이러스 (HSV) 중 하나 이상에 의해 제공된다. 일부 실시양태에서, AAV 헬퍼 기능은 아데노바이러스 E1A 기능, 아데노바이러스 E1B 기능, 아데노바이러스 E2A 기능, 아데노바이러스 E4 기능 및 아데노바이러스 VA 기능 중 하나 이상을 포함한다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 AAV 헬퍼 기능은 안정적으로 숙주 세포 게놈 내로 통합되고, 다른 AAV 헬퍼 기능은 일시적으로 전달된다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, AAV 외피보유 벡터는 아데노바이러스 E1A 및 E1B 기능을 발현하는 293 세포에서 제조된다. 다른 헬퍼 기능은, 예를 들어, 플라스미드에 의해 또는 복제 결핍 아데노바이러스에 의해 일시적으로 전달된다. 일부 실시양태에서, AAV 헬퍼 기능은 HSV UL5 기능, HSV UL8 기능, HSV UL52 기능, 및 HSV UL29 기능 중 하나 이상을 포함한다.
- [0110] 일부 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 외피보유 렌티바이러스 벡터를 생산하는 방법으로서, (a) 외피보유 바이러스 입자를 생성하는 조건 하에 바이러스 생산자 세포를 배양하며, 여기서 바이러스 생산자 세포는 하나 이상의 막 결합된 면역억제 분자를 코딩하는 핵산을 포함하는 것인 단계, 및 (b) 외피보유 렌티바이러스 벡터를 수집하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 렌티바이러스 벡터는 인간 면역결핍 바이러스, 원숭이 면역결핍 바이러스 또는 고양이 면역결핍 바이러스이다. 일부 실시양태에서, 바이러스

스 생산자 세포는 a) 렌티바이러스 gag 유전자를 코딩하는 핵산, b) 렌티바이러스 pol 유전자를 코딩하는 핵산, c) 트랜스진, 5' 긴 말단 반복부 (LTR) 및 3' LTR을 포함하는 렌티바이러스 전달 벡터를 코딩하며, 여기서 3' LTR의 U3 영역 모두 또는 그의 일부는 이중성 조절 요소에 의해, 또는 (Ryu *et al.* (2013) *Mol Ther* 2013, Volume 21.B.; Meliani *et al.* (2015) *Hum Gene Ther Methods*, 26:45-53)에 기재된 바와 같이 대체되는 것인 핵산을 포함한다.

VI. 키트

본 발명은 또한 본 발명의 방법에 따라 세포 또는 대상체에게 본원에 기재된 외피보유 바이러스 벡터를 투여하기 위한 키트를 제공한다. 키트는 본 발명의 임의의 외피보유 바이러스 벡터를 포함할 수 있다. 예를 들어, 키트는 본원에 기재된 바와 같은 외피보유 AAV 벡터 또는 외피보유 렌티바이러스 벡터를 포함할 수 있다.

일부 실시양태에서, 키트는 이펙터 벡터 전달에 대한 설명서를 추가로 포함한다. 본원에 기재된 키트는 본원에 기재된 임의의 방법을 수행하는 것에 대한 설명서와 함께 다른 완충제, 희석제, 필터, 니들, 시린지, 및 패키지 인서트를 포함한, 상업적 및 사용자 견지에서 바람직할 수 있는 다른 물질을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 패키징 물질 또한 포함될 수 있고, 예를 들어, 바이알 (예컨대 실링된 바이알), 베슬, 앰플, 보틀, 자, 가요성 패키징 (예를 들어, 실링된 마일라(Mylar) 또는 플라스틱 백) 등을 포함한, 관련 기술분야에 공지된 임의의 패키징 물질일 수 있다. 이러한 제조 물품은 추가로 멸균처리 및/또는 실링될 수 있다. 일부 실시양태에서, 키트는 본원에 기재된 방법 및/또는 이펙터 벡터 중 임의의 것을 사용하여 본원에 기재된 질환 장애를 치료하는 것에 대한 설명서를 포함한다. 키트는 포유동물 내로의 주사를 수행하는 것에 대한 설명서와 함께, 개체 내로 주사하기에 적합한 제약상 허용되는 담체, 및 완충제, 희석제, 필터, 니들, 시린지 및 패키지 인서트 중 하나 이상을 포함할 수 있다.

일부 실시양태에서, 키트는 (예를 들어, 문헌 [REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Pub. Co., N.J. 1991)에 기재된 바와 같이) 본원에 기재된 완충제 및/또는 제약상 허용되는 부형제 중 하나 이상을 추가로 함유한다. 일부 실시양태에서, 키트는 하나 이상의 제약상 허용되는 부형제, 담체, 용액 및/또는 본원에 기재된 추가 성분을 포함한다. 본원에 기재된 키트는 1회 단위 투여량으로 또는 다회 투여 형태로 패키징될 수 있다. 키트의 내용물은 일반적으로 멸균 상태로 제제화되고, 동결건조될 수 있거나, 또는 실질적으로 등장성인 용액으로 제공될 수 있다.

예시적인 실시양태

하기 실시양태는 단지 본원에 제공된 조성물 및 방법을 추가로 예시하고자 하는 목적으로 제공되는 것이며, 본 발명을 제한하는 것은 아니다:

실시양태 1. 외피보유 바이러스 벡터를 포함하는 조성물로서, 여기서 외피보유 바이러스 벡터는 외피로 둘러싸인 벡터 입자를 포함하고, 여기서 외피는 면역 이펙터 기능을 제공하는 하나 이상의 분자 (즉, 면역억제 분자)를 포함하는 것인 조성물.

실시양태 2. 실시양태 1에 있어서, 면역 이펙터 기능이 면역 이펙터 분자가 없는 벡터와 비교하여 외피보유 벡터의 면역원성을 감소시키는 것인 조성물.

실시양태 3. 실시양태 1 또는 2에 있어서, 면역 이펙터 기능이 면역 억제제를 자극하는 것인 조성물.

실시양태 4. 실시양태 1 또는 2에 있어서, 면역 이펙터 기능이 면역 자극 분자를 억제하는 것인 조성물.

실시양태 5. 실시양태 1-4 중 어느 한 실시양태에 있어서, 외피가 면역 억제제를 자극하는 분자 및 면역 자극 분자를 억제하는 분자를 포함하는 것인 조성물.

실시양태 6. 실시양태 1-5 중 어느 한 실시양태에 있어서, 면역 이펙터 기능을 제공하는 하나 이상의 분자가 CTLA4, B7-1, B7-2, PD-1, PD-L1, PD-L2, CD28, VISTA TIM-3, GAL9, TIGIT, CD155, LAG3, VISTA, BTLA 또는 HVEM 중 하나 이상을 포함하는 것인 조성물.

실시양태 7. 실시양태 1-6 중 어느 한 실시양태에 있어서, 외피가 CTLA4 및 PD-L1, CTLA 및 PD-L2 CTLA-4 및 VISTA, PD-L1 및 PD-L2, PD-L1 및 VISTA, PD-L2 및 VISTA, CTLA4 및 PD-L1 및 PD-L2, CTLA4 및 PD-L1 및 VISTA, CTLA4 및 PD-L2 및 VISTA, PD-L1 및 PD-L2 및 VISTA, 또는 CTLA4 및 PD-L1 및 PD-L1 및 VISTA를 포함하는 것인 조성물.

실시양태 8. 실시양태 1-7 중 어느 한 실시양태에 있어서, 면역 이펙터 기능을 제공하는 하나 이상의 분자가 막

형단 도메인을 포함하는 것인 조성물.

- [0125] 실시양태 9. 실시양태 1-8 중 어느 한 실시양태에 있어서, 외피가 벡터를 하나 이상의 세포 유형으로 표적화하는 표적화 분자를 추가로 포함하는 것인 조성물.
- [0126] 실시양태 10. 실시양태 9에 있어서, 표적화 분자가 외피보유 벡터에 조직 특이성을 부여하는 것인 조성물.
- [0127] 실시양태 11. 실시양태 10에 있어서, 표적화 분자가 항체인 조성물.
- [0128] 실시양태 12. 실시양태 11에 있어서, 항체가 항체 8D7인 조성물.
- [0129] 실시양태 13. 실시양태 9-12 중 어느 한 실시양태에 있어서, 하나 이상의 표적화 분자가 막형단 도메인을 포함하는 것인 조성물.
- [0130] 실시양태 14. 실시양태 1-13 중 어느 한 실시양태에 있어서, 바이러스 벡터가 바이러스 입자를 포함하는 것인 조성물.
- [0131] 실시양태 15. 실시양태 14에 있어서, 바이러스 입자가 바이러스 캡시드 및 바이러스 게놈, 또는 외피보유 캡시드 및 바이러스 게놈, 예컨대 레트로바이러스를 포함하는 것인 조성물.
- [0132] 실시양태 16. 실시양태 15에 있어서, 바이러스 게놈이 하나 이상의 이중 트랜스진을 포함하는 것인 조성물.
- [0133] 실시양태 17. 실시양태 16에 있어서, 이중 트랜스진이 폴리펩티드를 코딩하는 것인 조성물.
- [0134] 실시양태 18. 실시양태 17에 있어서, 이중 트랜스진이 치료 폴리펩티드 또는 수용체 폴리펩티드를 코딩하는 것인 조성물.
- [0135] 실시양태 19. 실시양태 18에 있어서, 치료 폴리펩티드가 인자 VIII, 인자 IX, 미오튜브라린, SMN, RPE65, NADH-유비퀴논 옥시도리덕타제 쇠 4, CHM, 헌팅틴, 알파-갈락토시다제 A, 산 베타-글루코시다제, 알파-글루코시다제, 오르니틴 트랜스카르바밀라제, 아르기노숙시네이트 신테타제, β -글로빈, γ -글로빈, 페닐알라닌 히드록실라제, 또는 ALD인 조성물.
- [0136] 실시양태 20. 실시양태 16에 있어서, 이중 트랜스진이 치료 핵산을 코딩하는 것인 조성물.
- [0137] 실시양태 21. 실시양태 20에 있어서, 치료 핵산이 siRNA, miRNA, shRNA, 안티센스 RNA, RNAzyme, 또는 DNAzyme인 조성물.
- [0138] 실시양태 22. 실시양태 16에 있어서, 이중 트랜스진이 하나 이상의 유전자 편집 유전자 산물을 코딩하는 것인 조성물.
- [0139] 실시양태 23. 실시양태 22에 있어서, 하나 이상의 유전자 편집 유전자 산물이 CAS 뉴클레아제 및/또는 하나 이상의 가이드 서열 및/또는 하나 이상의 도너 서열인 조성물.
- [0140] 실시양태 24. 실시양태 1-23 중 어느 한 실시양태에 있어서, 바이러스 벡터가 아데노-연관 바이러스 (AAV) 벡터 또는 렌티바이러스 벡터인 조성물.
- [0141] 실시양태 25. 실시양태 1-24 중 어느 한 실시양태에 있어서, 바이러스 벡터가 아데노-연관 바이러스 벡터인 조성물.
- [0142] 실시양태 26. 실시양태 25에 있어서, AAV 벡터가 인간 AAV 혈청형 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11 또는 AAV12로부터의 캡시드를 포함하는 것인 조성물.
- [0143] 실시양태 27. 실시양태 25 또는 26에 있어서, AAV 벡터가 인간 AAV 혈청형 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, r AAV10으로부터의 역위 말단 반복 (ITR) 서열을 포함하는 AAV 바이러스 게놈을 포함하는 것인 조성물.
- [0144] 실시양태 28. 실시양태 27에 있어서, AAV 캡시드 및 AAV ITR이 동일한 혈청형으로부터의 것 또는 상이한 혈청형으로부터의 것인 조성물.
- [0145] 실시양태 29. 실시양태 1-24 중 어느 한 실시양태에 있어서, 바이러스 벡터가 렌티바이러스 벡터인 조성물.
- [0146] 실시양태 30. 실시양태 29에 있어서, 렌티바이러스 벡터가 인간 면역결핍 바이러스, 원숭이 면역결핍 바이러스 또는 고양이 면역결핍 바이러스로부터 유래된 것인 조성물.

- [0147] 실시양태 31. 실시양태 29 또는 30에 있어서, 렌티바이러스 벡터가 비-복제성인 것인 조성물.
- [0148] 실시양태 32. 실시양태 29-30에 있어서, 렌티바이러스 벡터가 비-통합성인 것인 조성물.
- [0149] 실시양태 33. 실시양태 1-32 중 어느 한 실시양태의 조성물 및 하나 이상의 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 제약 조성물.
- [0150] 실시양태 34. 트랜스진을 개체에게 전달하는 방법으로서, 개체에게 외피보유 바이러스 벡터를 포함하는 조성물을 투여하는 것을 포함하며, 여기서 외피보유 바이러스 벡터는 외피로 둘러싸인 벡터 입자를 포함하고, 여기서 외피는 면역 이펙터 기능을 제공하는 하나 이상의 분자를 포함하고, 여기서 바이러스 입자는 트랜스진을 포함하는 바이러스 게놈을 포함하는 것인 방법.
- [0151] 실시양태 35. 질환 또는 장애를 앓는 개체를 치료하는 방법으로서, 질환 또는 장애의 치료를 필요로 하는 개체에게 외피보유 바이러스 벡터를 포함하는 조성물을 투여하는 것을 포함하며, 여기서 외피보유 바이러스 벡터는 외피로 둘러싸인 벡터 입자를 포함하고, 여기서 외피는 면역 이펙터 기능을 제공하는 하나 이상의 분자를 포함하고, 여기서 바이러스 입자는 치료 트랜스진을 포함하는 바이러스 게놈을 포함하는 것인 방법.
- [0152] 실시양태 36. 실시양태 34 또는 35에서, 면역 이펙터 기능이 외피보유 벡터의 면역원성을 감소시키는 것인 방법.
- [0153] 실시양태 37. 실시양태 34-36 중 어느 한 실시양태에 있어서, 면역 이펙터 기능이 면역 억제제를 자극하는 것인 조성물.
- [0154] 실시양태 38. 실시양태 34-36 중 어느 한 실시양태에 있어서, 면역 이펙터 기능이 면역 자극 분자를 억제하는 것인 방법.
- [0155] 실시양태 39. 실시양태 34-38 중 어느 한 실시양태에 있어서, 외피가 면역 억제제를 자극하는 분자 및 면역 자극 분자를 억제하는 분자를 포함하는 것인 방법.
- [0156] 실시양태 40. 실시양태 34-39 중 어느 한 실시양태에 있어서, 면역 이펙터 기능을 제공하는 하나 이상의 분자가 CTLA4, B7-1, B7-2, PD-1, PD-L1, PD-L2, CD28, VISTA, TIM-3, GAL9, TIGIT, CD155, LAG3, VISTA, BTLA 또는 HVEM 중 하나 이상을 포함하는 것인 방법.
- [0157] 실시양태 41. 실시양태 34-40 중 어느 한 실시양태에 있어서, 외피가 CTLA4 및 PD-L1, CTLA 및 PD-L2 CTLA-4 및 VISTA, PD-L1 및 PD-L2, PD-L1 및 VISTA, PD-L2 및 VISTA, CTLA4 및 PD-L1 및 PD-L2, CTLA4 및 PD-L1 및 VISTA, CTLA4 및 PD-L2 및 VISTA, PD-L1 및 PD-L2 및 VISTA, 또는 CTLA4 및 PD-L1 및 PD-L1 및 VISTA를 포함하는 것인 방법.
- [0158] 실시양태 42. 실시양태 34-41 중 어느 한 실시양태에 있어서, 면역 이펙터 기능을 제공하는 하나 이상의 분자가 막횡단 도메인을 포함하는 것인 방법.
- [0159] 실시양태 43. 실시양태 34-42 중 어느 한 실시양태에 있어서, 외피가 벡터를 하나 이상의 세포 유형으로 표적화하는 표적화 분자를 추가로 포함하는 것인 방법.
- [0160] 실시양태 44. 실시양태 43에 있어서, 표적화 분자가 외피보유 벡터에 조직 특이성을 부여하는 것인 방법.
- [0161] 실시양태 45. 실시양태 44에 있어서, 표적화 분자가 항체인 방법.
- [0162] 실시양태 46. 실시양태 45에 있어서, 항체가 항체 8D7인 방법.
- [0163] 실시양태 47. 실시양태 43-46 중 어느 한 실시양태에 있어서, 하나 이상의 표적화 분자가 막횡단 도메인을 포함하는 것인 방법.
- [0164] 실시양태 48. 실시양태 34-47 중 어느 한 실시양태에 있어서, 이중 트랜스진이 폴리펩티드를 코딩하는 것인 방법.
- [0165] 실시양태 49. 실시양태 48에 있어서, 이중 트랜스진이 치료 폴리펩티드 또는 수용체 폴리펩티드를 코딩하는 것인 방법.
- [0166] 실시양태 50. 실시양태 49에 있어서, 치료 폴리펩티드가 인자 VIII, 인자 IX, 인자 VIII, 인자 IX, 미오투블라린, SMN, RPE65, NADH-유비퀴논 옥시도리덕타제 체 4, CHM, 헌팅틴, 알파-갈락토시다제 A, 산 베타-글루코시다제, 알파-글루코시다제, 오르니틴 트랜스카르바밀라제, 아르기노숙시네이트 신테타제, β -글로빈, γ -글로빈,

페닐알라닌 히드록실라제, 또는 ALD인 방법.

- [0167] 실시양태 51. 실시양태 34-47 중 어느 한 실시양태에 있어서, 이중 트랜스진이 치료 핵산을 코딩하는 것인 방법.
- [0168] 실시양태 52. 실시양태 51에 있어서, 치료 핵산이 siRNA, miRNA, shRNA, 안티센스 RNA, RNAzyme, 또는 DNAzyme 인 방법.
- [0169] 실시양태 53. 실시양태 52에 있어서, 이중 트랜스진이 하나 이상의 유전자 편집 유전자 산물을 코딩하는 것인 방법.
- [0170] 실시양태 54. 실시양태 34-53 중 어느 한 실시양태에 있어서, 하나 이상의 유전자 편집 유전자 산물이 CAS 뉴클레아제 및/또는 하나 이상의 가이드 서열 및/또는 하나 이상의 도너 서열인 방법.
- [0171] 실시양태 55. 실시양태 34-54 중 어느 한 실시양태에 있어서, 바이러스 벡터가 아데노-연관 바이러스 (AAV) 벡터 또는 렌티바이러스 벡터인 방법.
- [0172] 실시양태 56. 실시양태 34-55 중 어느 한 실시양태에 있어서, 바이러스 벡터가 아데노-연관 바이러스 벡터인 방법.
- [0173] 실시양태 57. 실시양태 56에 있어서, AAV 벡터가 인간 AAV 혈청형 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11 또는 AAV12로부터의 캡시드를 포함하는 것인 방법.
- [0174] 실시양태 58. 실시양태 56 또는 57에 있어서, AAV 벡터가 인간 AAV 혈청형 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, r AAV10으로부터의 역위 말단 반복 (ITR) 서열을 포함하는 AAV 바이러스 게놈을 포함하는 것인 방법.
- [0175] 실시양태 59. 실시양태 58에 있어서, AAV 캡시드 및 AAV ITR이 동일한 혈청형으로부터의 것 또는 상이한 혈청형으로부터의 것인 방법.
- [0176] 실시양태 60. 실시양태 34-55 중 어느 한 실시양태에 있어서, 바이러스 벡터가 렌티바이러스 벡터인 방법.
- [0177] 실시양태 61. 실시양태 60에 있어서, 렌티바이러스 벡터는 인간 면역결핍 바이러스, 원숭이 면역결핍 바이러스 또는 고양이 면역결핍 바이러스로부터 유래된 것인 방법.
- [0178] 실시양태 62. 실시양태 60 또는 61에 있어서, 렌티바이러스 벡터가 비-복제성인 것인 방법.
- [0179] 실시양태 63. 실시양태 60-52 중 어느 한 실시양태에 있어서, 렌티바이러스 벡터가 비-통합성인 것인 방법.
- [0180] 실시양태 64. 실시양태 34-63 중 어느 한 실시양태에 있어서, 조성물이 외피보유 바이러스 벡터 및 하나 이상의 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 제약 조성물인 방법.
- [0181] 실시양태 65. 실시양태 34-64 중 어느 한 실시양태에 있어서, 개체가 인간인 방법.
- [0182] 실시양태 66. 실시양태 35에 있어서, 질환 또는 장애가 단일유전자성 질환인 방법.
- [0183] 실시양태 67. 실시양태 35에 있어서, 질환 또는 장애가 근세관성 근병증, 척수성 근위축증, 레베르 선천성 흑암시, A형 혈우병, B형 혈우병, 맥락막결손증, 헌팅톤병, 배튼병, 레베르 유전성 시신경병증, 오르니틴 트랜스카르바밀라제 (OTC) 결핍증, 폼페병, 파브리병, 시트룰린혈증 1형, 페닐케톤뇨증 (PKU), 부신백질이영양증, 겸상세포 질환, 또는 베타 지중해빈혈인 방법.
- [0184] 실시양태 68. 감소된 면역원성을 갖는 외피보유 바이러스 벡터를 생산하는 방법으로서, a) 외피보유 바이러스 입자를 생성하는 조건 하에 바이러스 생산자 세포를 배양하며, 여기서 바이러스 생산자 세포는 외피보유 벡터의 면역원성을 감소시키는 하나 이상의 막 결합된 면역 이펙터 기능을 코딩하는 핵산을 포함하는 것인 단계, 및 b) 외피보유 바이러스 벡터를 수집하는 단계를 포함하는 방법.
- [0185] 실시양태 69. 실시양태 68에 있어서, 면역 이펙터 기능이 외피보유 벡터의 면역원성을 감소시키는 것인 방법.
- [0186] 실시양태 70. 실시양태 68 또는 69에 있어서, 면역 이펙터 기능이 면역 억제제를 자극하는 것인 방법.
- [0187] 실시양태 71. 실시양태 68 또는 69에 있어서, 면역 이펙터 기능이면역 자극 분자를 억제하는 것인 방법.
- [0188] 실시양태 72. 실시양태 68-71 중 어느 한 실시양태에 있어서, 바이러스 생산자 세포가 면역 억제제를 자극하는

분자 및 면역 자극 분자를 억제하는 분자를 코딩하는 핵산을 포함하는 것인 방법.

- [0189] 실시양태 73. 실시양태 68-72 중 어느 한 실시양태에 있어서, 면역 이펙터 기능을 제공하는 하나 이상의 분자가 CTLA4, B7-1, B7-2, PD-1, PD-L1, PD-L2, CD28, VISTA, TIM-3, GAL9, TIGIT, CD155, LAG3, VISTA, BTLA 또는 HVEM 중 하나 이상을 포함하는 것인 방법.
- [0190] 실시양태 74. 실시양태 68-73 중 어느 한 실시양태에 있어서, 바이러스 생산자 세포가 CTLA4 및 PD-L1, CTLA 및 PD-L2 CTLA-4 및 VISTA, PD-L1 및 PD-L2, PD-L1 및 VISTA, PD-L2 및 VISTA, CTLA4 및 PD-L1 및 PD-L2, CTLA4 및 PD-L1 및 VISTA, CTLA4 및 PD-L2 및 VISTA, PD-L1 및 PD-L2 및 VISTA, 또는 CTLA4 및 PD-L1 및 PD-L1 및 VISTA를 코딩하는 핵산을 포함하는 것인 방법.
- [0191] 실시양태 75. 실시양태 68-74 중 어느 한 실시양태에 있어서, 면역 이펙터 기능을 제공하는 하나 이상의 분자가 막횡단 도메인을 포함하는 것인 방법.
- [0192] 실시양태 76. 실시양태 68-75 중 어느 한 실시양태에 있어서, 면역 이펙터 기능을 제공하는 하나 이상의 분자를 코딩하는 핵산이 일시적으로 바이러스 생산자 세포에 도입되는 것인 방법.
- [0193] 실시양태 77. 실시양태 68-76 중 어느 한 실시양태에 있어서, 면역 이펙터 기능을 제공하는 하나 이상의 분자를 코딩하는 핵산이 안정적으로 바이러스 생산자 세포에서 유지되는 것인 방법.
- [0194] 실시양태 78. 실시양태 77에 있어서, 면역 이펙터 기능을 제공하는 하나 이상의 분자를 코딩하는 핵산이 바이러스 생산자 세포의 게놈 내로 통합되는 것인 방법.
- [0195] 실시양태 79. 실시양태 68-78 중 어느 한 실시양태에 있어서, 바이러스 생산자 세포가 벡터를 하나 이상의 세포 유형으로 표적화하는 하나 이상의 표적화 분자를 코딩하는 핵산을 포함하는 것인 방법.
- [0196] 실시양태 80. 실시양태 79에 있어서, 표적화 분자가 외피보유 벡터에 조직 특이성을 부여하는 것인 방법.
- [0197] 실시양태 81. 실시양태 80에 있어서, 표적화 분자가 항체인 방법.
- [0198] 실시양태 82. 실시양태 71에 있어서, 항체는 항체 8D7인 방법.
- [0199] 실시양태 83. 실시양태 79-82 중 어느 한 실시양태에 있어서, 하나 이상의 표적화 분자가 막횡단 도메인을 포함하는 것인 방법.
- [0200] 실시양태 84. 실시양태 79-83 중 어느 한 실시양태에 있어서, 하나 이상의 표적화 분자를 코딩하는 핵산이 일시적으로 바이러스 생산자 세포에 도입되는 것인 방법.
- [0201] 실시양태 85. 실시양태 79-84 중 어느 한 실시양태에 있어서, 하나 이상의 표적화 분자를 코딩하는 핵산이 안정적으로 바이러스 생산자 세포에서 유지되는 것인 방법.
- [0202] 실시양태 86. 실시양태 85에 있어서, 하나 이상의 분자 표적화 분자를 코딩하는 핵산이 바이러스 생산자 세포의 게놈 내로 통합되는 것인 방법.
- [0203] 실시양태 87. 실시양태 68-86 중 어느 한 실시양태에 있어서, 외피보유 바이러스 벡터가 외피보유 AAV 벡터인 방법.
- [0204] 실시양태 88. 실시양태 87에 있어서, 바이러스 생산자 세포가 a) AAV rep 및 cap 유전자를 코딩하는 핵산, b) 트랜스진 및 적어도 하나의 ITR을 포함하는 AAV 바이러스 게놈을 코딩하는 핵산, 및 c) AAV 헬퍼 기능을 포함하는 것인 방법.
- [0205] 실시양태 89. 실시양태 88에 있어서, AAV rep 및 cap 유전자 및/또는 AAV 바이러스 게놈을 코딩하는 핵산이 일시적으로 생산자 세포주에 도입되는 것인 방법.
- [0206] 실시양태 90. 실시양태 88에 있어서, AAV rep 및 cap 유전자 및/또는 AAV 바이러스 게놈을 코딩하는 핵산이 안정적으로 생산자 세포주에서 유지되는 것인 방법.
- [0207] 실시양태 91. 실시양태 90에 있어서, AAV rep 및 cap 유전자 및/또는 AAV 바이러스 게놈을 코딩하는 핵산이 안정적으로 생산자 세포주의 게놈 내로 통합되는 것인 방법.
- [0208] 실시양태 92. 실시양태 88-91 중 어느 한 실시양태에 있어서, rAAV 게놈이 2개의 AAV ITR을 포함하는 것인 방법.
- [0209] 실시양태 93. 실시양태 88-92 중 어느 한 실시양태에 있어서, 하나 이상의 AAV 헬퍼 기능이 플라스미드, 아데노

바이러스, 안정적으로 세포 계능 내로 통합된 핵산, 또는 단순 헤르페스 바이러스 (HSV) 중 하나 이상에 의해 제공되는 것인 방법.

- [0210] 실시양태 94. 실시양태 88-93 중 어느 한 실시양태에 있어서, AAV 헬퍼 기능이 아데노바이러스 E1A 기능, 아데노바이러스 E1B 기능, 아데노바이러스 E2A 기능, 아데노바이러스 E4 기능 및 아데노바이러스 VA 기능 중 하나 이상을 포함하는 것인 방법.
- [0211] 실시양태 95. 실시양태 88-93 중 어느 한 실시양태에 있어서, AAV 헬퍼 기능이 HSV UL5 기능, HSV UL8 기능, HSV UL52 기능, 및 HSV UL29 기능 중 하나 이상을 포함하는 것인 방법.
- [0212] 실시양태 96. 실시양태 68-86 중 어느 한 실시양태에 있어서, 외피보유 바이러스 벡터가 렌티바이러스 벡터인 방법.
- [0213] 실시양태 97. 실시양태 96에 있어서, 렌티바이러스 벡터가 인간 면역결핍 바이러스, 원숭이 면역결핍 바이러스 또는 고양이 면역결핍 바이러스인 방법.
- [0214] 실시양태 98. 실시양태 96 또는 97에 있어서, 바이러스 생산자 세포가 a) 렌티바이러스 gag 유전자를 코딩하는 핵산, b) 렌티바이러스 pol 유전자를 코딩하는 핵산, c) 트랜스진, 5' 긴 말단 반복부 (LTR) 및 3' LTR을 포함하는 렌티바이러스 전달 벡터를 코딩하며, 여기서 3' LTR의 U3 영역 모두 또는 그의 일부는 이중성 조절 요소에 의해 대체되는 것인 핵산을 포함하는 것인 방법.
- [0215] 실시양태 99. 실시양태 68-98 중 어느 한 실시양태에 있어서, 외피보유 벡터가 추가로 정제되는 것인 방법.
- [0216] 실시양태 100. 실시양태 1-33 중 어느 한 실시양태의 조성물을 포함하는 키트.
- [0217] 실시양태 101. 실시양태 100에 있어서, 사용 설명서를 추가로 포함하는 키트.
- [0218] 실시양태 102. 실시양태 34-67 중 어느 한 실시양태에 따라 핵산의 전달을 필요로 하는 개체에게 핵산을 전달하는데 사용하기 위한 조성물.
- [0219] 실시양태 103. 실시양태 34-67 중 어느 한 실시양태에 따라 질환 또는 장애의 치료를 필요로 하는 개체에서 질환 또는 장애를 치료하는데 사용하기 위한 조성물
- [0220] 실시양태 104. 핵산의 전달을 필요로 하는 개체에게 핵산을 전달하기 위한 의약의 제조에서의 실시양태 1-33 중 어느 한 실시양태에 따른 조성물의 용도
- [0221] 실시양태 105. 질환 또는 장애를 앓는 개체를 치료하기 위한 의약의 제조에서의 실시양태 1-33 중 어느 한 실시양태에 따른 조성물의 용도.
- [0222] 실시양태 106. 실시양태 105에 있어서, 질환 또는 장애가 근세관성 근병증, 척수성 근위축증, 레베르 선천성 흑암시, A형 혈우병, B형 혈우병, 맥락막결손증, 헌팅톤병, 배튼병, 레베르 유전성 시신경병증, 오르니틴 트랜스카르바밀라제 (OTC) 결핍증, 폼페병, 파브리병, 시트룰린혈증 1형, 페닐케톤뇨증 (PKU), 부신백질이영양증, 겸상 세포 질환, 또는 베타 지중해빈혈인 용도.
- [0223] 실시양태 107. 실시양태 1-33 중 어느 한 실시양태에 따른 조성물을 포함하는 제조 물품.
- [0224] 실시양태 108. 외피로 둘러싸인 바이러스 입자를 포함하는 외피보유 바이러스 벡터로서, 여기서 바이러스 입자는 이중 트랜스진을 포함하고, 외피는 지질 이중층 및 하나 이상의 면역억제 분자를 포함하는 것인 외피보유 바이러스 벡터.
- [0225] 실시양태 109. 실시양태 108에 있어서, 외피보유 바이러스가 지질 이중층에 면역억제 분자를 갖지 않는 동일한 유형의 벡터와 비교하여 감소된 면역원성을 갖는 것인 외피보유 바이러스 벡터.
- [0226] 실시양태 110. 실시양태 108 또는 109에 있어서, 하나 이상의 면역억제 분자가 하나 이상의 면역 체크포인트 단백질들을 포함하는 것인 외피보유 바이러스 벡터.
- [0227] 실시양태 111. 실시양태 108-110 중 어느 한 실시양태에 있어서, 하나 이상의 면역억제 분자가 CTLA4, B7-1, B7-2, PD-1, PD-L1, PD-L2, CD28, VISTA, TIM-3, GAL9, TIGIT, CD155, LAG3, VISTA, BTLA 또는 HVEM 중 하나 이상을 포함하는 것인 외피보유 바이러스 벡터.
- [0228] 실시양태 112. 실시양태 108-111 중 어느 한 실시양태에 있어서, 외피가 2종 이상, 3종 이상, 또는 4종 이상의 상이한 면역억제 분자를 포함하거나; 또는 2종 이상, 3종 이상, 또는 4종 이상의 상이한 체크포인트 단백질을

포함하는 것인 외피보유 바이러스 벡터.

- [0229] 실시양태 113. 실시양태 108-112 중 어느 한 실시양태에 있어서, 외피가 CTLA4 및 PD-L1; CTLA 및 PD-L2; CTLA-4 및 VISTA; PD-L1 및 PD-L2; PD-L1 및 VISTA; PD-L2 및 VISTA; CTLA4 및 PD-L1 및 PD-L2; CTLA4 및 PD-L1 및 VISTA; CTLA4 및 PD-L2 및 VISTA; PD-L1 및 PD-L2 및 VISTA; 또는 CTLA4 및 PD-L1 및 PD-L1 및 VISTA를 포함하는 것인 외피보유 바이러스 벡터.
- [0230] 실시양태 114. 실시양태 108-113 중 어느 한 실시양태에 있어서, 면역억제 분자 중 하나 이상이 막횡단 도메인을 포함하는 것인 외피보유 바이러스 벡터.
- [0231] 실시양태 115. 실시양태 108-114 중 어느 한 실시양태에 있어서, 외피가 표적화 분자를 추가로 포함하는 것인 외피보유 바이러스 벡터.
- [0232] 실시양태 116. 실시양태 115에 있어서, 표적화 분자가 외피보유 벡터에 세포- 또는 조직-특이성을 부여하는 것인 외피보유 바이러스 벡터.
- [0233] 실시양태 117. 실시양태 116에 있어서, 표적화 분자가 항체인 외피보유 바이러스 벡터.
- [0234] 실시양태 118. 실시양태 115-117 중 어느 한 실시양태에 있어서, 하나 이상의 표적화 분자가 막횡단 도메인을 포함하는 것인 외피보유 바이러스 벡터.
- [0235] 실시양태 119. 실시양태 108-118 중 어느 한 실시양태에 있어서, 외피가 하나 이상의 면역억제 분자를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는 세포로부터의 세포막의 일부를 포함하는 것인 외피보유 바이러스 벡터.
- [0236] 실시양태 120. 실시양태 119에 있어서, 바이러스 입자가 바이러스 캡시드 및 바이러스 게놈을 포함하고, 바이러스 게놈이 이중 트랜스진을 포함하는 것인 외피보유 바이러스 벡터.
- [0237] 실시양태 121. 실시양태 120에 있어서, 이중 트랜스진이 폴리펩티드를 코딩하는 것인 외피보유 바이러스 벡터.
- [0238] 실시양태 122. 실시양태 121에 있어서, 이중 트랜스진이 치료 폴리펩티드 또는 수용체 폴리펩티드를 코딩하는 것인 외피보유 바이러스 벡터.
- [0239] 실시양태 123. 실시양태 122에 있어서, 이중 트랜스진이 인자 VIII, 인자 IX, 미오투불라린, 생존 운동 뉴런 단백질 (SMN), 레티노이드 이소머로히드롤라제 (RPE65), NADH-유비퀴논 옥시도리덕타제 쇄 4, 맥락막결손증 단백질 (CHM), 헌팅틴, 알파-갈락토시다제 A, 산 베타-글루코시다제, 알파-글루코시다제, 오르니틴 트랜스카르바밀라제, 아르기노숙시네이트 신테타제, β -글로빈, γ -글로빈, 페닐알라닌 히드록실라제, 또는 부신백질이영양증 단백질 (ALD)을 코딩하는 것인 외피보유 바이러스 벡터.
- [0240] 실시양태 124. 실시양태 120에 있어서, 이중 트랜스진이 치료 핵산을 코딩하는 것인 외피보유 바이러스 벡터.
- [0241] 실시양태 125. 실시양태 124에 있어서, 치료 핵산이 siRNA, miRNA, shRNA, 안티센스 RNA, RNAzyme, 또는 DNAzyme인 외피보유 바이러스 벡터.
- [0242] 실시양태 126. 실시양태 120에 있어서, 이중 트랜스진이 하나 이상의 유전자 편집 산물을 코딩하는 것인 외피보유 바이러스 벡터.
- [0243] 실시양태 127. 실시양태 126에 있어서, 하나 이상의 유전자 편집 산물인 RNA-가이드된 뉴클레아제, 가이드 핵산, 및/또는 도너 핵산인 외피보유 바이러스 벡터.
- [0244] 실시양태 128. 실시양태 108-127 중 어느 한 실시양태에 있어서, 바이러스 입자가 아데노-연관 바이러스 벡터 (AAV)를 포함하는 것인 외피보유 바이러스 벡터.
- [0245] 실시양태 129. 실시양태 128에 있어서, AAV 벡터가 인간 AAV 혈청형 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11 또는 AAV12로부터의 캡시드를 포함하는 것인 외피보유 바이러스 벡터.
- [0246] 실시양태 130. 실시양태 128 또는 129에 있어서, AAV가 역위 말단 반복 (ITR) 서열을 포함하는 AAV 바이러스 게놈을 포함하며, 여기서 AAV 캡시드 및 AAV ITR은 동일한 AAV 혈청형으로부터의 것 또는 상이한 AAV 혈청형으로부터의 것인 외피보유 바이러스 벡터.
- [0247] 실시양태 131. 실시양태 108 또는 128-130 중 어느 한 실시양태에 있어서, 외피보유 바이러스 벡터가 인간 인자 IX를 코딩하는 이중 트랜스진을 포함하는 외피보유 AAV이고, 외피가 CTLA-4 및 PD-L1을 함유하도록 조작된 엑소솜인 외피보유 바이러스 벡터.

- [0248] 실시양태 132. 실시양태 108 또는 128-131 중 어느 한 실시양태에 있어서, 외피가 CTLA-4 및 PD-L1을 과다발현하도록 조작된 생산자 세포로부터의 엑소솜인 외피보유 바이러스 벡터.
- [0249] 실시양태 133. 실시양태 108 또는 128-130 중 어느 한 실시양태에서, 외피보유 바이러스 벡터는 인간 인자 VIII을 코딩하는 이중 트랜스진을 포함하는 외피보유 AAV이고, 외피가 CTLA-4 및 PD-L1을 함유하도록 조작된 엑소솜인 외피보유 바이러스 벡터.
- [0250] 실시양태 134. 실시양태 133에 있어서, 외피가 CTLA-4 및 PD-L1을 과다발현하도록 조작된 생산자 세포로부터의 엑소솜인 외피보유 바이러스 벡터.
- [0251] 실시양태 135. 실시양태 108-127 중 어느 한 실시양태에 있어서, 바이러스 입자가 렌티바이러스 벡터를 포함하는 것인 외피보유 바이러스 벡터.
- [0252] 실시양태 136. 실시양태 135에 있어서, 렌티바이러스 벡터가 인간 면역결핍 바이러스, 원숭이 면역결핍 바이러스 또는 고양이 면역결핍 바이러스인 외피보유 바이러스 벡터.
- [0253] 실시양태 137. 실시양태 108-136 중 어느 한 실시양태에 있어서, 대상체에게 단일 용량으로서 투여되었을 때 벡터가, 대상체에게 투여 후 3-주에, 동일한 양으로 및 동일한 조건 하에 동일한 유형의 비-외피보유 바이러스 벡터의 투여에 의해 생산된 트랜스진 발현과 비교하여 약 50% 이상만큼 증가된 트랜스진 발현 수준을 제공하는 것인 외피보유 바이러스 벡터.
- [0254] 실시양태 138. 실시양태 108-137 중 어느 한 실시양태에 있어서, 벡터가, 대상체에게 단일 용량으로서 투여 후 3-주에, 동일한 조건 하에 면역억제 분자 없이 동일한 양으로 동일한 유형의 외피보유 바이러스 벡터의 투여에 의해 생산된 트랜스진 발현과 비교하여 약 20% 이상만큼 증가된 트랜스진 발현 수준을 제공하는 것인 외피보유 바이러스 벡터.
- [0255] 실시양태 139. 실시양태 108-138 중 어느 한 실시양태의 외피보유 바이러스 벡터 및 하나 이상의 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 조성물.
- [0256] 실시양태 140. 트랜스진을 세포 또는 대상체에게 전달하는 방법으로서, 세포 또는 대상체에게 실시양태 108-138 중 어느 한 실시양태의 외피보유 바이러스 벡터 또는 실시양태 139의 조성물을 투여하는 것을 포함하는 방법.
- [0257] 실시양태 141. 실시양태 140에 있어서, 대상체가 트랜스진의 전달 및 발현에 의해 치료될 수 있는 질환 또는 병태를 앓는 것인 방법.
- [0258] 실시양태 142. 대상체에서 질환 또는 장애를 치료하는 방법으로서, 대상체에게 실시양태 108-138 중 어느 한 실시양태의 외피보유 바이러스 벡터 또는 실시양태 139의 조성물을 투여하는 것을 포함하는 방법.
- [0259] 실시양태 143. 실시양태 140-142 중 어느 한 실시양태에 있어서, 대상체가 인간인 방법.
- [0260] 실시양태 144. 실시양태 141-143 중 어느 한 실시양태에 있어서, 질환 또는 장애가 단일유전자성 질환인 방법.
- [0261] 실시양태 145. 실시양태 141-143 중 어느 한 실시양태에 있어서, 질환 또는 장애가 근세관성 근병증, 척수성 근위축증, 레베르 선천성 흑암시, A형 혈우병, B형 혈우병, 맥락막결손증, 헌팅톤병, 배튼병, 레베르 유전성 시신경병증, 오르니틴 트랜스카르바밀라제 (OTC) 결핍증, 폼페병, 파브리병, 시트룰린혈증 1형, 페닐케톤뇨증 (PKU), 부신백질이영양증, 겸상 세포 질환, 니만-픽병, 또는 베타 지중해빈혈인 방법.
- [0262] 실시양태 146. 실시양태 141-143 중 어느 한 실시양태에 있어서, 질환 또는 장애가 A형 혈우병 또는 B형 혈우병인 방법.
- [0263] 실시양태 147. 실시양태 141-143 중 어느 한 실시양태에 있어서, 대상체가 B형 혈우병을 앓고, 외피보유 바이러스 벡터가 인자 IX를 코딩하는 이중 트랜스진을 포함하는 AAV를 포함하고, 외피가 CTLA-4 및 PD-L1을 함유하도록 조작된 엑소솜인 방법.
- [0264] 실시양태 148. 실시양태 141-143 중 어느 한 실시양태에 있어서, 대상체가 A형 혈우병을 앓고, 외피보유 바이러스 벡터가 인간 인자 VIII을 코딩하는 이중 트랜스진을 포함하는 외피보유 AAV를 포함하고, 외피가 CTLA-4 및 PD-L1을 함유하도록 조작된 엑소솜인 방법.
- [0265] 실시양태 149. 실시양태 147 또는 148에 있어서, 외피가 CTLA-4 및 PD-L1을 과다발현하도록 조작된 생산자 세포로부터의 엑소솜인 방법.

- [0266] 실시양태 150. 실시양태 140-149중 어느 한 실시양태에 있어서, 방법이 각 용량 사이의 1일 이상의 간격으로 대상체에게 외피보유 바이러스 벡터의 2회 이상의 용량을 투여하는 것을 포함하는 것인 방법.
- [0267] 실시양태 151. 실시양태 108-138 중 어느 한 실시양태의 외피보유 바이러스 벡터를 생산하는 방법으로서, 외피보유 바이러스 입자를 생성하는 조건 하에 시험관내에서 바이러스 생산자 세포를 배양하며, 여기서 바이러스 생산자 세포는 하나 이상의 막-결합된 면역억제 분자를 코딩하는 핵산을 포함하는 것인 단계, 및 외피보유 바이러스 벡터를 수집하는 단계를 포함하는 방법.
- [0268] 실시양태 152. 실시양태 151에 있어서, 바이러스 생산자 세포가 막-결합된 면역억제 분자를 코딩하는 외인성 핵산을 포함하는 것인 방법.
- [0269] 실시양태 153. 실시양태 151 또는 152에 있어서, 바이러스 생산자 세포가 막-결합된 면역억제 분자를 코딩하는 이중성 핵산을 포함하는 것인 방법.
- [0270] 실시양태 154. 실시양태 151-153 중 어느 한 실시양태에 있어서, 막-결합된 면역억제 분자는 CTLA4, B7-1, B7-2, PD-1, PD-L1, PD-L2, CD28, VISTA, TIM-3, GAL9, TIGIT, CD155, LAG3, VISTA, BTLA 또는 HVEM 중 하나 이상을 포함하는 것인 방법.
- [0271] 실시양태 155. 실시양태 151-153 중 어느 한 실시양태에 있어서, 막-결합된 면역억제 분자는 CTLA4 및 PD-L1, CTLA 및 PD-L2 CTLA-4 및 VISTA, PD-L1 및 PD-L2, PD-L1 및 VISTA, PD-L2 및 VISTA, CTLA4 및 PD-L1 및 PD-L2, CTLA4 및 PD-L1 및 VISTA, CTLA4 및 PD-L2 및 VISTA, PD-L1 및 PD-L2 및 VISTA, 또는 CTLA4 및 PD-L1 및 PD-L1 및 VISTA를 포함하는 것인 방법.
- [0272] 실시양태 156. 실시양태 151-155 중 어느 한 실시양태에 있어서, 바이러스 생산자 세포가 CTLA-4 및 PD-L1을 코딩하는 이중성 핵산을 포함하는 것인 방법.
- [0273] 실시양태 157. 실시양태 151-156 중 어느 한 실시양태에 있어서, 하나 이상의 막-결합된 면역억제 분자를 코딩하는 핵산이 일시적으로 바이러스 생산자 세포에 도입되는 것인 방법.
- [0274] 실시양태 158. 실시양태 151-156 중 어느 한 실시양태에 있어서, 하나 이상의 막-결합된 면역억제 분자를 코딩하는 핵산이 안정적으로 바이러스 생산자 세포에서 유지되는 것인 방법.
- [0275] 실시양태 159. 실시양태 158에 있어서, 하나 이상의 막-결합된 면역억제 분자를 코딩하는 핵산이 바이러스 생산자 세포의 게놈 내로 통합되는 것인 방법.
- [0276] 실시양태 160. 실시양태 151-159 중 어느 한 실시양태에 있어서, 바이러스 생산자 세포가 하나 이상의 표적화 분자를 코딩하는 핵산을 포함하는 것인 방법.
- [0277] 실시양태 161. 실시양태 151-160 중 어느 한 실시양태에 있어서, 외피보유 바이러스 벡터가 외피보유 AAV 벡터인 방법.
- [0278] 실시양태 162. 실시양태 161에 있어서, 바이러스 생산자 세포가 AAV rep 및 cap 유전자를 코딩하는 핵산, 트랜스진 및 적어도 하나의 ITR을 포함하는 AAV 바이러스 게놈을 코딩하는 핵산, 및 AAV 헬퍼 기능을 포함하는 것인 방법.
- [0279] 실시양태 163. 실시양태 162에 있어서, AAV rep 및 cap 유전자 및/또는 AAV 바이러스 게놈을 코딩하는 핵산이 일시적으로 생산자 세포주에 도입되는 것인 방법.
- [0280] 실시양태 164. 실시양태 162에 있어서, AAV rep 및 cap 유전자 및/또는 AAV 바이러스 게놈을 코딩하는 핵산이 안정적으로 생산자 세포주에서 유지되는 것인 방법.
- [0281] 실시양태 165. 실시양태 164에 있어서, AAV rep 및 cap 유전자 및/또는 AAV 바이러스 게놈을 코딩하는 핵산이 안정적으로 생산자 세포주의 게놈 내로 통합되는 것인 방법.
- [0282] 실시양태 166. 실시양태 151-165 중 어느 한 실시양태에 있어서, 하나 이상의 AAV 헬퍼 기능이 플라스미드, 아데노바이러스, 안정적으로 세포 게놈 내로 통합된 핵산, 또는 단순 헤르페스 바이러스 (HSV) 중 하나 이상에 의해 제공되는 것인 방법.
- [0283] 실시양태 167. 실시양태 151-166 중 어느 한 실시양태에 있어서, AAV 헬퍼 기능이 아데노바이러스 E1A 기능, 아데노바이러스 E1B 기능, 아데노바이러스 E2A 기능, 아데노바이러스 E4 기능 및 아데노바이러스 VA 기능 중 하나

이상을 포함하는 것인 방법.

- [0284] 실시양태 168. 실시양태 151-166 중 어느 한 실시양태에 있어서, AAV 헬퍼 기능이 HSV UL5 기능, HSV UL8 기능, HSV UL52 기능, 및 HSV UL29 기능 중 하나 이상을 포함하는 것인 방법.
- [0285] 실시양태 169. 실시양태 151-160 중 어느 한 실시양태에 있어서, 외피보유 바이러스 벡터가 렌티바이러스 벡터인 방법.
- [0286] 실시양태 170. 실시양태 169에 있어서, 렌티바이러스 벡터가 인간 면역결핍 바이러스, 원숭이 면역결핍 바이러스 또는 고양이 면역결핍 바이러스인 방법.
- [0287] 실시양태 171. 실시양태 169 또는 170에 있어서, 바이러스 생산자 세포가 렌티바이러스 gag 유전자를 코딩하는 핵산, 렌티바이러스 pol 유전자를 코딩하는 핵산, 트랜스진, 5' 긴 말단 반복부 (LTR) 및 3' LTR을 포함하는 렌티바이러스 전달 벡터를 코딩하며, 여기서 3' LTR의 U3 영역 모두 또는 그의 일부는 이중성 조절 요소, 프라이머 결합 부위, GAG 유전자 모두 또는 그의 일부, 중심 폴리펩린 트랙, GAG 서열 내 합성 정지 코돈, rev 반응성 요소, 및 env 스플라이스 억셉터에 의해 대체되는 것인 핵산을 포함하는 것인 방법.
- [0288] 실시양태 172. 실시양태 151-171 중 어느 한 실시양태에 있어서, 외피보유 벡터가 추가로 정제되는 것인 방법.
- [0289] 실시양태 173. 실시양태 108-138 중 어느 한 실시양태의 외피보유 바이러스 벡터 또는 실시양태 139의 조성물을 포함하는 키트.
- [0290] 실시양태 174. 실시양태 173에 있어서, 사용 설명서를 추가로 포함하는 키트.
- [0291] 실시양태 175. 실시양태 108-139 중 어느 한 실시양태에 있어서, 대상체에게 핵산을 전달하는데 사용하기 위한 외피보유 바이러스 벡터 또는 조성물.
- [0292] 실시양태 176. 실시양태 108-139 중 어느 한 실시양태에 있어서, 대상체에서 질환 또는 장애를 치료하는데 사용하기 위한 외피보유 바이러스 벡터 또는 조성물.
- [0293] 실시양태 177. 실시양태 175 또는 176에 있어서, 실시양태 140 내지 43 중 어느 한 실시양태에 따라 대상체에게 핵산을 전달하는데 사용하기 위한 외피보유 바이러스 벡터 또는 조성물.
- [0294] 실시양태 178. 핵산의 전달을 필요로 하는 개체에게 핵산을 전달하기 위한 의학의 제조에서의 실시양태 108-138 중 어느 한 실시양태의 외피보유 바이러스 벡터 또는 실시양태 139의 조성물의 용도.
- [0295] 실시양태 179. 질환 또는 장애를 앓는 개체를 치료하기 위한 의학의 제조에서의 실시양태 108-138 중 어느 한 실시양태의 외피보유 바이러스 벡터 또는 실시양태 139의 조성물의 용도.
- [0296] 실시양태 180. 실시양태 179에 있어서, 질환 또는 장애가 근위관성 근병증, 척수성 근위축증, 레베르 선천성 흑암시, A형 혈우병, B형 혈우병, 맥락막결손증, 헌팅톤병, 배튼병, 레베르 유전성 시신경병증, 오르니틴 트랜스 카르바밀라제 (OTC) 결핍증, 폰페병, 파브리병, 시트룰린혈증 1형, 페닐케톤뇨증 (PKU), 부신백질이영양증, 겸상 세포 질환, 니만-픽병, 또는 베타 지중해빈혈인 용도.
- [0297] 실시양태 181. 실시양태 180에 있어서, 질환 또는 장애가 A형 혈우병 또는 B형 혈우병인 용도.
- [0298] 실시양태 182. 실시양태 108-138 중 어느 한 실시양태의 외피보유 바이러스 벡터 또는 실시양태 139의 조성물을 포함하는 제조 물품.
- [0299] **실시예**
- [0300] **실시예 1: 항-AAV 면역 반응 감소 측정**
- [0301] 본 발명을 입증하기 위해 세포에서 연속 실험에 착수한다. AAV 양성 개체로부터 정제된 PBMC를 사용하는 혼합된 림프구 반응 (MLR)은 혈청형이 매칭되는 비-외피보유 벡터와 비교하여 이펙터 벡터가 캡시드 특이적 면역 반응을 얼마나 감소시킬 수 있는지를 측정하고자 하는 것이다. 유사하게, MLR은 비-외피보유 벡터와 비교하여 이펙터 벡터가 치료 단백질에 대한 T 세포 반응을 억제할 수 있는지 여부를 시험하는데 사용된다. 상기 두 번째 MLR은 하기와 같이 수행된다: 항원 제시 세포를 먼저 치료 단백질과 함께 인큐베이션한 후, 이어서, (T 및 B 세포를 함유하는) PBMC를 이펙터 벡터 또는 혈청형이 매칭되는 비-외피보유 벡터의 존재 하에 첨가한다. CD3+, CD4+, CD8+, CD25+ (IL2R), 및 FoxP3+을 포함한, 전체 T 세포를 계수하는 FACS 분석을 이용하여 T 세포 활성화를 측정한다. 항 AAV 캡시드 항체에 대해 양성 반응을 보인 개체로부터의 혈청을 이용하여 중화 항체 검정법을

수행한다. 검정법은 문헌 [Meliani *et al.* (2015) *Hum Gene Ther Methods*, 26:45-53]에 기재된 바와 같이 수행한다.

[0302] 실시예 2: 벡터 생산

[0303] 벡터를 발현하는 AAV 생산 플라스미드로 형질감염된 생산자 세포를 이용하여 AAV를 생산하였다. 외피보유 AAV (들)가 세포막의 일부 (외피)와 함께 배양 배지로 shedding되고, 외피를 제거하지 않는 방법을 통해 배양 배지로부터 수집하였다. 비-외피보유 AAV는 생산자 세포를 용해시켜 비-외피보유 바이러스 입자를 수집하였다.

[0304] 더욱 상세하게, 표준 (비-외피보유) AAV (본 결과 및 도면에서 "표준" 또는 "std" 벡터로 지칭) 및 외피보유 AAV 벡터 (본 결과 및 도면에서 "엑소" 벡터로 지칭)를 문헌 [Simonelli *et al.* (2010) *Molecular Therapy*, 18(3): 643-650]에 기재된 바와 같이 HEK293T 세포에서 생산하였다. 벡터 유형 둘 다를 위한 AAV 생산 플라스미드는 동일한 것이었다. 벡터 계놈 플라스미드 (pAAV.MCS.cb.Hu FIX)는 문헌 [Nathwani *et al.* (2011) *N Engl J Med*, 365: 2357-65]에 기재된 바와 같은 인간 인자 IX 유전자를 함유하였다. 패키징, 및 헬퍼 플라스미드는 이전에 사용된 것이었다 (id.). 생산 플라스미드를 문헌 [Melaini *et al.* (2017) *Blood Advances*, 1(23): 2019-31]에 기재된 바와 같이, PEI를 이용하여 293T 세포에 형질감염시키고, 문헌 [Nathwani *et al.* (2011) *N Engl J Med*, 365: 2357-65]에 기재된 바와 같이, 정제하였다. 이들 프랩은 293T 생산자 세포의 24 × 150 mm 조직 배양 디쉬로부터 생성되었다.

[0305] 생산자 세포 배양물을 원심분리하고, 상청액으로부터 생산자 세포를 분리하였다. 외피보유 AAV를 2 단계 초원심분리를 사용하여 상청액으로부터 단리 및 정제하고, PBS 중에 재현탁시켜 평균 입자 크기가 약 100 nm인 외피보유 AAV 입자 집단을 수득하였다. 표준 (비-외피보유) AAV는 생산자 세포를 세포 용해 완충제 중에서 용해시킨 후, 표준 이오딧사놀 구매 프로토콜을 이용하여 정제함으로써 상기 세포로부터 수거하였다 (Melaini *et al.* (2017) *Blood Advances*, 1(23): 2019-31). 프로토콜 및 벡터 수율에 관한 추가의 상세한 세부사항은 하기 표 1에 제시되어 있다.

[0306] 표 1. 벡터의 생산

벡터 유형	헬퍼 플라스미드 양 (μg)	형질감염된 생산 플라스미드의 수량 (μg) (혼합 및 12개 플레이트로 분취)				총 DNA (μg) / 150mm 디쉬	VG 역가 (vg/mL)	정제된 벡터의 총 부피 (mL)	총 수율
		AAV2 /8	hFIX	mPDL1	mCTL4				
외피보유 (엑소-AAV8-hFIX)	600	300	300	0	0	100	2.39E+12	0.5	1.20E+12
이베이더 (EV-AAV8-hFIX)	400	100	100	200	200		2.70E+11	0.5	1.35E+11
표준 (AAV8-hFIX)	600	300	300	0	0		1.67E+13	0.5	8.35E+12

[0307]

[0308] CTLA-4 및 PD-L1을 포함하는 외피를 보유하는 외피보유 벡터 (본 결과 및 도면에서 "이베이더" 또는 "이펙터" 벡터로 지칭되거나, 또는 "EF"로 표시)를 2개의 배치에서 외피보유 AAV에 대해 사용된 것과 동일한 방법을 이용하되 단, 생산자 HEK293T 세포를 AAV 생산 플라스미드 이외에도 pCMV.mCTLA-4 및 pCMV.mPDL-1 발현 벡터와 함께 공동으로 형질감염시킴으로써 생산하였다. pCMV.mCTLA-4는 CMV 프로모터에 의해 구동되는 무린 CTLA-4 cDNA 서열을 함유한다 (시노 바이오로지컬(Sino Biological) 카탈로그 번호 MG50503-UT). pCMV.mPDL-1은 CMV 프로모터에 의해 구동되는 무린 PDL-1 cDNA 서열을 함유한다 (시노 바이오로지컬 카탈로그 번호 MG50010-M). 24 × 150 mm 조직 배양 디쉬로 이루어진 총 2개의 프랩을 제조하였다. 프로토콜 및 벡터 수율에 관한 추가의 상세한 세부사항은 표 1에 제시되어 있다.

[0309] 정제된 벡터가 외피를 보유하는지 여부를 확인하기 위해, 항-CD9 항체를 이용하여 웨스턴 블롯을 수행하였다. CD9는 생산된 세포로부터 유래된 외피의 존재를 나타내는 마커로서 사용된다. 외피보유 AAV 및 이베이더 벡터 둘 다가 약 25 kDa의 예측 크기에서 CD9를 함유하였다. 예상대로, 표준 (비-외피보유) AAV8-FIX는 CD9의 부재로 입증되는 바와 같이, 외피 성분을 함유하지 않았다.

[0310] 형광 표지된 항체: 항-무린 CTLA-4 (항-CTLA-4 PECy7, 압캠(Abcam) 카탈로그 번호 ab134090) 및 항-무린 PDL-1 (항-PDL-1- PE-A, 압캠 카탈로그 번호 ab213480)를 사용하는 비드 기반 FACS 분석을 이용하여 이베이더 및 외피

보유 AAV 상의 뮤린 CTLA-4 및 PDL-1의 수준을 정량화하였다. FACS 분석 결과, 도 3에 제시된 바와 같이, 외피 보유 AAV와 비교하여 이베이터 벡터가 표면 상에 CTLA-4 및 PDL-1 (각각 83.6% 및 75.3%) 둘 다를 더 높은 수준을 가진 것으로 나타났으며, 여기서, 각 도면에서 이베이터 히스토그램의 우측으로의 이동은 입자 대부분이 CTLA-4 및 PD-L1에 대하여 각각 양성임을 나타내는 것이다.

[0311] 실시예 3: 마우스에서의 생체내 유전자 전달

[0312] 하기 실시예는 C57Bl/6 마우스에서의 생체내 유전자 전달을 위한, 실시예 2에서 생산된 벡터의 용도를 예시하는 것이다.

[0313] C57Bl/6 마우스 (수컷 7마리 암컷 7마리)에 1×10^9 벡터 게놈을 정맥내로 주사하였다. 투약군으로 1) PBS 단독 (비히클 대조군), 2) AAV8-hFIX, 3) 엑소-AAV8-hFIX, 및 4) EV-AAV8-hFIX를 포함한다.

[0314] 투약 후 제3주에, 마우스를 출혈시키고, (a) 인간 FIX 수준 (비줄라이즈™ 팩터 IX (FIX) 안티겐 키트(VisuLize™ Factor IX (FIX) Antigen Kit), 어피니티 바이올로지컬즈(Affinity Biologicals)), (b) 항-AAV8 IgG를 사용하는 ELISA에 의해 AAV8-결합 항체 (BAb), 및 (c) 중화 항체 검정법을 이용하여 AAV8-중화 항체 (NAb) (Meliani et al. (2015) Hum Gene Ther Methods, 26:45-53)에 대해 분석하였다. 시험관내 중화 검정법을 이용하여 시험 AAV 벡터가 표적 세포를 감염시키지 못하게 막는 항체의 역할을 측정한다. 간략하면, 본 검정법은 연속 희석된 시험 항체와 함께, 수용체 유전자, 예컨대 루시페라제를 함유하는 시험 벡터를 최적화된 감염 다중도 (MOI)로 인큐베이션한 후, 이어서, 벡터가 허용 표적 세포를 감염시킬 수 있게 하는 것을 포함한다. 24시간 경과 후, 감염된 세포로부터의 형광량을 측정하고, 상기 형광량은 중화 항체의 역할을 나타낸다. 샘플의 중화 역가는 루시페라제 발현이 50% 이상 억제된 것으로 측정되는 제1 희석률로서 결정된다.

[0315] 또한, 투약 후 제3주에, 각 군으로부터 수컷 마우스 2마리 및 암컷 마우스 2마리씩 희생시키고, 동물로부터의 간을 qPCR에 의해 세포당 벡터 게놈 카피수 (VGCN)에 대해 분석하였다. 마그나 퓨어 96 DNA(Magna Pure 96 DNA) 및 바이러스 NA 소량 키트 (로슈 디아그노스틱스(Roche Diagnostics: 미국 인디애나주 인디애나폴리스))를 사용하여 제조사의 설명서에 따라 조직 DNA를 전체 기관으로부터 추출하였다. ABI PRISM 7900 HT 서열 검출기 (썬코 피셔 사이언티픽(Thermo Fisher Scientific: 미국 매사추세츠주 월섬))를 이용하여 택맨(TaqMan) 실시간 PCR에 의해 벡터 게놈 카피수를 정량화하였다. 마우스 티탄 유전자를 노멀라이저로서 사용하였다. 정량화에 사용된 프라이머 및 프로브는 하기와 같았다:

[0316] hAAT 프로모터:

[0317] 정방향 5'GGCGGGCGACTCAGATC-3', (서열식별번호: 5)

[0318] 역방향 5'-GGGAGGCTGCTGGTGAATATT-3' (서열식별번호: 6)

[0319] 프로브 FAM 5'-AGCCCTGTTTGTCTCCTCCGATAACTG-3' (서열식별번호: 7).

[0320] 티탄:

[0321] 정방향 5'-AAAACGAGCAGTGACGTGAGC-3', (서열식별번호: 8)

[0322] 역방향 5'-TTCAGTCATGCTGCTAGCGC-3' (서열식별번호: 9)

[0323] 프로브 VIC 5'-TGCACGGAAGCGTCTCGTCTCAGTC-3' (서열식별번호: 10).

[0324] (투약 후 제3주) 남은 동물에 각 투약군에 대해 초기에 투여된 것과 동일한 AAV 벡터를 1×10^{10} vg 투여하였다. 제6주에, 마우스를 다시 출혈시키고, 동일한 프로토콜에 의해 인간 FIX 수준, AAV8-결합 항체 (BAb), 및 AAV8- 중화 항체 (NAb)에 대하여 분석하였다. 이어서, 남은 동물 모두 희생시키고, 동물로부터의 간을 이전 프로토콜을 이용하여 qPCR에 의해 세포당 벡터 게놈에 대해 분석하였다.

[0325] 대조군 동물과 비교하여 혈중 인자 IX (FIX)의 수준 증가는 유전자 전달 및 발현이 성공적이었다는 것을 나타내는 것이고, 여기서 대조군 동물은 벡터 대신 PBS를 받았다. 도 4에 제시된 바와 같이, 혈중 FIX 수준은 표준 외피보유 또는 비-외피보유 바이러스로 처리된 마우스보다 EV-AAV8-hFIX로 처리된 마우스에서 유의적으로 더 높았다. 이는 3-주 및 6-주 시점 둘 다에서 관찰되었다. 수컷 마우스와 암컷 마우스에서의 인자 IX 수준 차이는 암컷 마우스보다 수컷 마우스가 전통적으로 간에서 AAV 벡터로 더 높은 효율로 형질감염되는 것인 잘 확립된 동물 모델 아티팩트에 기인하는 것이다. 이러한 성별에 기반한 형질도입률의 차이는 마우스 모델의 아티팩트이며, 인간에서는 발생하지 않는다. 이러한 데이터를 위해, 오직 수컷 마우스만이 고려된다. PBS를

받은 대조군 마우스로부터의 제3주 내지 제6주 사이의 인자 IX 수준 변동은 검출 한계에 가까운 검정법의 일일 변동성 때문이었다. PBS를 받은 군의 마우스 군 및 표준 AAV를 받은 군의 마우스 둘 다 제3주 약 0.1 μg/mL로 유사한 인자 IX 수준을 나타내었다. 제3주에, EV-AAV8-hFIX 처리된 마우스에서의 수준은 표준 비-외피보유 AAV로 처리된 마우스보다 약 22배 더 높았고, 외피에 면역억제 분자를 포함하지 않는 외피보유 AAV보다 약 5.6배 더 높았다. 유사하게, 제6주에, EV-AAV8-hFIX 처리된 마우스에서의 FIX 수준은 표준 비-외피보유 AAV로 처리된 마우스보다 약 20배 더 높았고, 외피에 면역억제 분자를 포함하지 않는 외피보유 AAV보다 약 5배 더 높았다. 이러한 결과는 외피에 면역억제 분자를 포함하는 이베이더 벡터가 표준 AAV 또는 표준 외피보유 AAV와 비교하여 생체내에서 유의적으로 증진된 인자 IX 유전자 발현을 제공하였다는 것을 입증한다.

[0326] **도 7-9**는 희생된 동물의 간에서의 세포당 바이러스 계놈의 개수를 제시한다. 역시, 6-주 시점에 EV-AAV8-hFIX 처리된 마우스는 다른 처리군과 비교하였을 때, 간 중에 더 많은 개수를 바이러스 계놈을 나타내었고, 이는 표준 AAV와 비교하여 형질도입율이 더 크다는 것을 시사하는 것이다.

[0327] **도 5 및 6**은 처리된 마우스 혈액 중 총 AAV-결합 항체 수준 및 중화 AAV 항체 수준을 제시한다. EV-AAV8-hFIX로 처리된 마우스가 다른 벡터로 처리된 마우스보다 항체 수준이 더 높은 것으로 관찰되었다. 내독소가 항체 생산 및 염증 둘 다의 강력한 자극인자이고, 관찰된 항체 생산 수준 증가를 유발할 수 있는 바, 벡터를 내독소 수준 (진스크립트(Genscript)에 의한 독신센서™ 크로모제닉 LAL 엔도독신 어세이 키트(TOXINSENSOR™ Chromogenic LAL Endotoxin Assay Kit))에 대해 분석하였다. 결과는 표 2에 제시되어 있다. 하기 표 2의 결과로부터, 내독소 양을 표준 AAV8-FIX 마우스가 받은 용량으로 정규화함으로써 마우스에 투여된 내독소의 양을 계산하였다. 투약 1 및 2를 위해 투여된 상대적인 내독소 수준은 유사하였는 바, 이에 **도 4**에는 오직 제1 용량을 위한 상대적인 양만이 제시되어 있다. EV-AAV8-hFIX 벡터로 처리된 마우스는 표준 AAV8-hFIX 벡터와 비교하여 동물당 투약당 ~300배 더 높은 내독소 수준을 받았고, 엑소-AAV8-hFIX로 처리된 마우스는 표준 AAV8-FIX로 처리된 마우스와 비교하여 동물당 용량당 ~50배 더 높은 내독소 수준을 받은 것으로 계산되었다. 따라서, EV-AAV8-hFIX 처리된 마우스에서의 항체 역가가 더 높은 것은 본 실험에서 내독소 수준 증가 때문일 수 있다.

[0328] 표 2

시험	표준 AAV8-FIX	외피보유 AAV8-FIX	이베이더 (제1 용량)	이베이더 (제2 용량)
내독소 (EU/mL)	0.1128	0.9348	0.5840	0.3983
VG 역가 (VG/mL)	1.67E+13	2.39E+12	2.70E+11	N/A

[0329]

[0330] EV-AAV8-hFIX 처리된 마우스에서 BAb 및 NAb 수준 증가에도 불구하고, EV-AAV8-hFIX 벡터는 다른 모든 처리군과 비교하였을 때, 유의적으로 hFIX 트랜스진을 전달하고, FIX 발현을 증가시킬 수 있었다. 이는 EV-AAV8-hFIX 벡터의 외피에 면역억제 분자가 존재하는 것이 트랜스진 발현에 대하여 상당히 긍정적인 영향을 미친다는 것을 제안한다.

[0331] 본원에서 달리 명시되지 않는 한, 본원에서 값을 범위로 언급하는 것은 단지 상기 범위 내에 포함된 각각의 개별 값을 개별적으로 지칭하는 단축 방법의 역할을 하는 것으로 의도되며, 각각의 개별 값은 마치 그가 본원에서 개별적으로 언급된 것과 같이, 본 명세서에 포함된다. 본원에 기재된 모든 방법은 본원에서 달리 명시되지 않는 한, 또는 문맥상 명백히 모순되지 않는 한, 임의의 적합한 순서로 수행될 수 있다. 달리 주장되지 않는 한, 본원에서 사용되는 임의 및 모든 예, 또는 예시적 표현 (예를 들어, "예컨대")의 사용은 단지 개시된 주제를 더욱 잘 이해하기 쉽게 설명하고자 하는 것이며, 본 개시내용의 범주를 제한하는 것은 아니다. 본 명세서에서 어떤 표현도 임의의 비-청구 요소를 본원에 개시된 대상의 실시예 필수적인 것을 나타내는 것으로 해석되지 않아야 한다.

[0332] 최상의 작동 모드를 포함한 실시양태가 본원에 기재되어 있다. 상기 실시양태의 변형은 상기 설명을 읽을 때, 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 자명해질 수 있고, 그러한 변형은 출원인에 의해 고려된다. 따라서, 본 개시내용은 적용가능한 법에 의해 허용되는 바와 같이, 본원에 첨부된 청구범위에서 언급된 주제의 모든 변형 및 등가물을 포함한다. 또한, 그의 모든 가능한 변형에서 상기 기재된 요소의 임의 조합도 본원에서 달리 명시되지 않는 한, 또는 문맥상 명백히 모순되지 않는 한, 본 개시내용에 포함된다.

서열

인간 F8 (유니프록트 KB - Q2VF45), B-도메인-결실 (BDD)의 SQ-FVIII 변이체

10	20	30	40	50
MQIELSTCFF	LCLLRFCFSA	TRRYLGAIVE	LSWDYMQSDL	GELFVDARFP
60	70	80	90	100
PRVPKSFPPN	TSVYKKTLE	VEFTDHLFNI	AKPRPPWMGL	LGPTIQAEVY
110	120	130	140	150
DTVVITLKNM	ASHPVSLHAV	GVSYWKASEG	AEYDDQTSQR	EKEDDKVFPG
160	170	180	190	200
GSHTYVWQVL	KENGPMASDP	LCLTYSYLSH	VDLVKDLNSG	LIGALLVCRE
210	220	230	240	250
GSLAKEKTQT	LHKFILLFAV	FDEGKSWHSE	TKNSLMQDRD	AASARAWPKM
260	270	280	290	300
HTVNGYVNR	LPGLIGCHRK	SVYWHVIGMG	TTPEVHSIFL	EGHTFLVRNH
310	320	330	340	350
RQASLEISPI	TFLTAQTLLM	DLGQFLLFCH	ISSHQHDGME	AYVKVDSCEP
360	370	380	390	400
EPQLRMKNNE	EAEDYDDDLT	DSEMDVVRFD	DDNSPSFIQI	RSVAKKHPEK
410	420	430	440	450
WVHYIAAEEE	DWDYAPLVLA	PDDRSYKSQY	LNNGPQRIGR	KYKKVRFMAY
460	470	480	490	500
TDETFKTREA	IQHESGILGP	LLYGEVGDIT	LIIFKNQASR	PYNIYPHGIT
510	520	530	540	550
DVRPLYSRRL	PKGKHLKDF	PILPGEIFKY	KWTVTVEDGP	TKSDPRCLTR
560	570	580	590	600
YYSSFVNMER	DLASGLIGPL	LICYKESVDQ	RGNQIMSDKR	NVILFSVFDE
610	620	630	640	650
NRSWYLTENI	QRFLEPNAGV	QLEDPEFQAS	NIMHSINGYV	FDSLQLSVCL
660	670	680	690	700
HEVAYWYILS	IGAQTDFLSV	FFSGYTFKHK	MVYEDTLTLF	PFSGETVFMS
710	720	730	740	750
MENPGLWILG	CHNSDFRNRG	MTALLKVSSC	DKNTGDYIED	SYEDISAYLL
760	770	780	790	800
SKNNAIEPRS	FSQNSRHPST	RQKQFNATTI	PENDIEKTD	WFAHRTMPK
810	820	830	840	850
IQNVSSDDL	MLLRQSPTPH	GLSLSDLQEA	KYETFSDDPS	PGAIDSNNSL
860	870	880	890	900
SEMTHFRPQL	HHSQDMVFTP	ESGLQLRLNE	KLGTAAATEL	KKLDFKVSST
910	920	930	940	950
SNNLISTIPS	DNLAAGTDNT	SSLGPPSMPV	HYDSQLDTTL	FGKSSSPLTE
960	970	980	990	1000
SGGPLSLSEE	NNDSKLLESG	LMNSQESSWG	KNVSSSTESGR	LFKKGKRAHGP
1010	1020	1030	1040	1050
ALLTKDNALF	KVSISLLKTN	KTSNNSATNR	KTHIDGPSLL	IENSPSVWQN
1060	1070	1080	1090	1100
ILESDETFKK	VTPLIHDRML	MDKNATALRL	NHMSNKTSS	KNMEMVQQKK
1110	1120	1130	1140	1150
EGPIPPDAQN	PDMSFFKMLF	LPESARWIQR	THGKNSLNSG	QGPSPKQLVS
1160	1170	1180	1190	1200
LGPEKSVGQ	NFLSEKNKV	VGKGEFTKDV	GLKEMVFPSS	RNLFLTNLDN
1210	1220	1230	1240	1250
LHENNTHNQE	KKIQEETIEKK	ETLIQENVVL	PQIHTVTGK	NFMKNLFLLS
1260	1270	1280	1290	1300
TRQNVESGYD	GAYAPVLQDF	RSLNDSTNRT	KKHTAHFSKK	GEEENLEGLG
1310	1320	1330	1340	1350
NQTKQIVEKY	ACTTRISPT	SQQNFVTQRS	KRALQFRLP	LEETELEKRI
1360	1370	1380	1390	1400

[0333]

IVDDTSTQWS KNMKHLTPST LTQIDYNEKE KGAITQSPLS DCLTRSHSIP
1410 1420 1430 1440 1450
QANRSPLPIA KVSSFPSIRP IYLTRVLFQD NSSHLPAASY RKKDSGVQES
1460 1470 1480 1490 1500
SHFLQGAKKN NLSLAILTLE MTGDQREVGS LGTSATNSVT YKKVENTVLP
1510 1520 1530 1540 1550
KPDLPKTSBK VELLPKVHIY QKDLFPTETS NGSPGHLDLV EGSLLQGTEG
1560 1570 1580 1590 1600
AIKWNEANRP GKVPFLRVAT ESSAKTPSKL LDPLAWDNHY GTQIPKEEWK
1610 1620 1630 1640 1650
SQEKSPEKTA FKKKDTILSL NACESNHAIA AINEGQNKPE IEVTWAKQGR
1660 1670 1680 1690 1700
TERLCSQNPV VLKRHQREIT RTTLQSDQEE IDYDDTISVE MKKEDFDIYD
1710 1720 1730 1740 1750
EDENQSPRSF QKTRHYFIA AVERLWDYGM SSSPHVLRNR AQSGSVPQFK
1760 1770 1780 1790 1800
KVVFQEFDTG SFTQPLYRGE LNEHLGGLGP YIRAEVEDNI MVTFRNQASR
1810 1820 1830 1840 1850
PYSFYSSLIS YEEDQRQGA EPRKNFVKPNE TKTYFWKVQH HMAPTKDEFD
1860 1870 1880 1890 1900
CKAWAYFSDV DLEKDVHSGI IGPLLVCNTN TLNPAHGRQV TVQEFALFFT
1910 1920 1930 1940 1950
IFDETKSWYF TENMERNCR APCNIQMEDPT FKENYRFHAI NGYIMDTLPG
1960 1970 1980 1990 2000
LVMAQDQRI WYLLSMGSNE NIHSIHESGH VFTVRKKEEY KMALYNLYPG
2010 2020 2030 2040 2050
VFETVEMLP KAGIWRVECL IGEHLHAGMS TLFLVYSNKC QTPLGMASGH
2060 2070 2080 2090 2100
IRDFQITASG QYQWAPKLA RLHYSGSINA WSTKEPFSWI KVDLLAPMII
2110 2120 2130 2140 2150
HGIKTQGARQ KFSSLYISQF IIMYSLDGKK WQTYRGNSTG TLMVFFGNVD
2160 2170 2180 2190 2200
SSGIKHNIFN PPIIARYIRL HPTHYSIRST LRMELMGCDL NSCSMPLGME
2210 2220 2230 2240 2250
SKAISDAQIT ASSYFTNMFA TWSPSKARLH LQGRSNAWRP QVNNPKEWLQ
2260 2270 2280 2290 2300
VDFQKTMKVT GVTTQGVKSL LTSMYVKEFL ISSSQDGHQW TLFFQNGKVK
2310 2320 2330 2340 2350
VFQGNQDSFT PNVNSLDPPL LTRYLRHPQ SWVHQIALRM EVLGCEAQDL

Y
(SEQ ID NO:1)

인간 인자 IX 유니프록 KB - P00740

10	20	30	40	50
MQRVNMIMAE	SPGLITICLL	GYLLSAECTV	FLDHENANKI	LNRPKRYNSG
60	70	80	90	100
KLEEFVQGNL	ERECMEEKCS	FEEAREVFEN	TERTTEFWKQ	YVDGDQCESN
110	120	130	140	150
PCLNGGSCKD	DINSYECWCP	FGFEGKNCEL	DVTCNIKNGR	CEQFCCKNSAD
160	170	180	190	200
NKVVCSCTEG	YRLAENQKSC	EPAVPFPCGR	VSVSQTSKLT	RAETVFPDVD
210	220	230	240	250
YVNSTEAETI	LDNITQSTQS	FNDFTRVVGG	EDAKPGQFPW	QVVLNGKVDA
260	270	280	290	300
FCGGSIVNEK	WIVTAAHCVE	TGVKITVVAG	EHNIEETEHT	EQKRNVRIRI
310	320	330	340	350
PHHNYNAAIN	KYNHDIALLE	LDEPLVLNSY	VTPICIADEK	YTNIFLKFGS

[0334]

360 370 380 390 400
GYVSGWGRVF HKGRSALVLQ YLRVPLVDRA TCLRSTKFTI YNNMFCAGFH
410 420 430 440 450
EGGRDSCQGD SGGPHVTEVE GTSFLTGIIS WGEECAMKGK YGIYTKVSRV
460
VNWIKEKTKL T
(SEQ ID NO:2)

인간 CTLA-4: NCBI 참조 서열: NP_005205.2

10 20 30 40 50
MACLGFRHK AQLNLATRTW PCTLLFFLLF IPVFCAMHV AQPAVVLASS
60 70 80 90 100
RGIASFVCEY ASPGKATEVR VTVLRQADSQ VTEVCAATYM MGNETLFLDD
110 120 130 140 150
SICTGTSSGN QVNLTIQGLR AMDTGLYICK VELMYPPPPY LGIGNGTQIY
160 170 180 190 200
VIDPEPCPDS DFLLWILAAV SSGLFFYSFL LTAVSLSKML KKRSPLETTGV
210 220
YVKMPTEPE CEKQFQPYFI PIN
(SEQ ID NO:3)

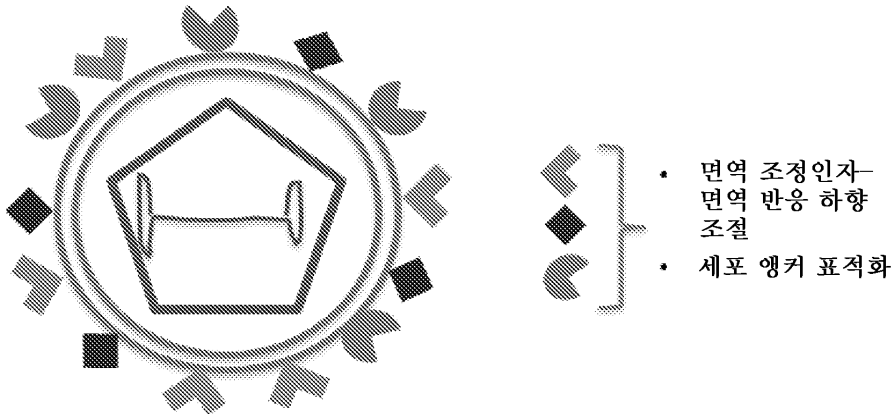
인간 PDL-1: NCBI 참조 서열: NP_054862.1

1 MRIFAVFIFM TYWHLLNAFT VTPKDLVYV EYGSNMTIEC KFPVEKQLDL AALIVYWEME
61 DKNIIQFVHG EEDLKVQHSS YRQRARLLKD QLSLGNAALQ ITDVKLQDAG VYRCMISYGG
121 ADYKRITVKV NPYNKNQR ILVVDPTSE HELTCQAEY PKAEVIWTSS DHQVLSGKTT
181 TTNSKREEKL FNVSTLRIN TTTNEIFYCT FRRLDPEENH TAEVPIPELP LAHPPNERTH
241 LVILGAILLC LGVALTFIFR LRKGRMDVK KCGIQDTNSK KQSDTHLEET
(SEQ ID NO:4)

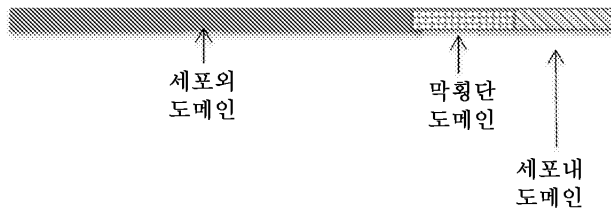
[0335]

도면

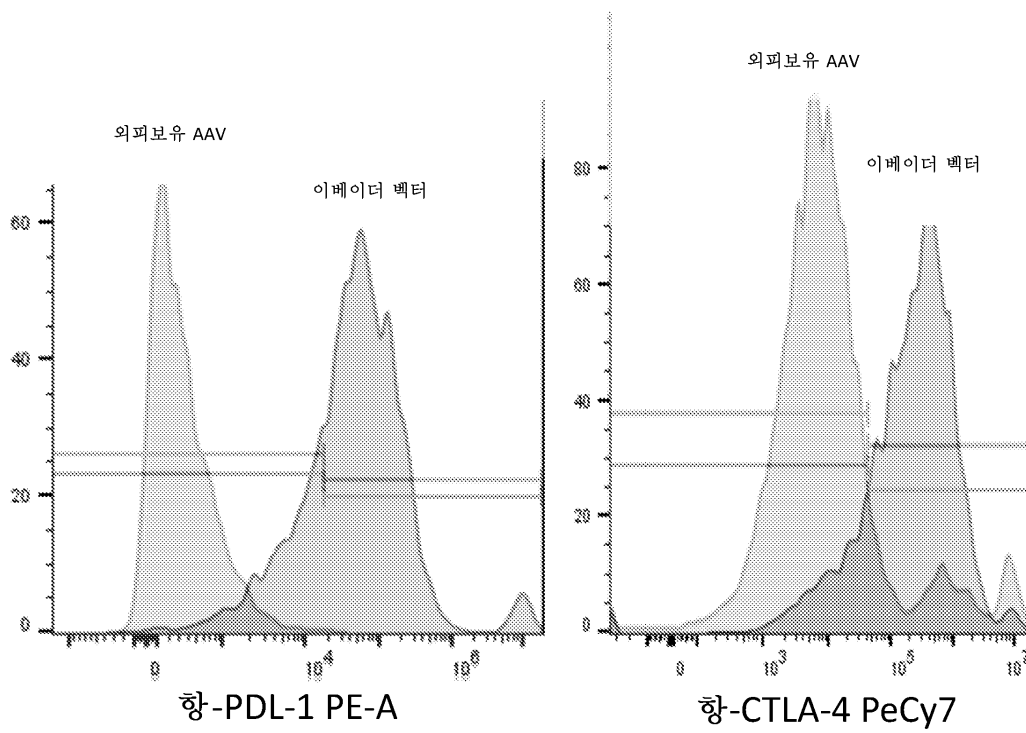
도면1



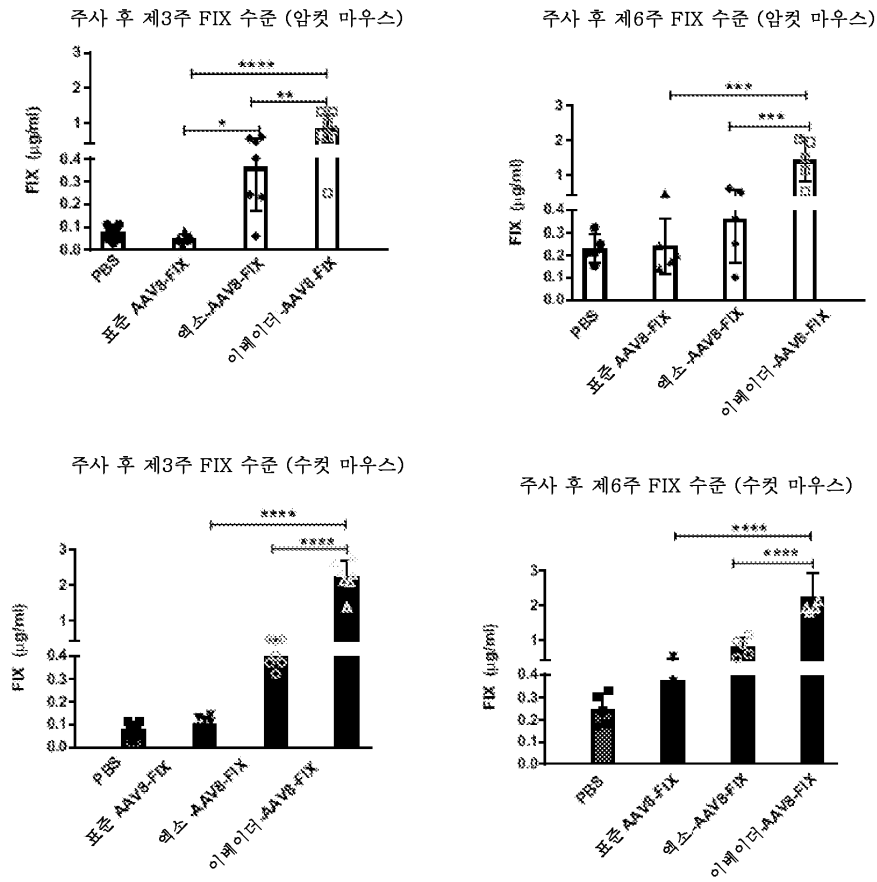
도면2



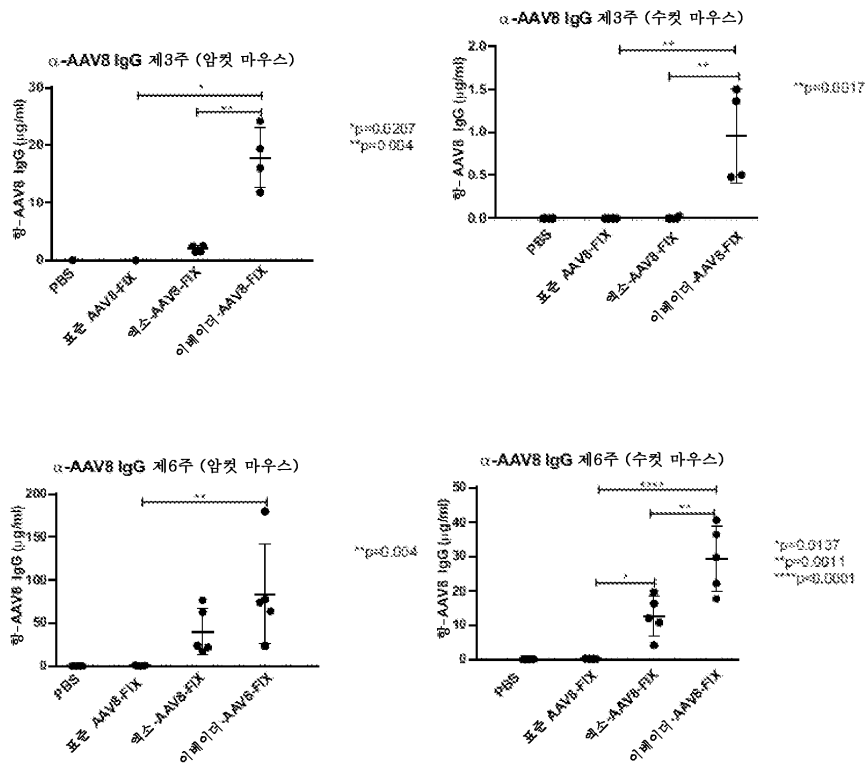
도면3



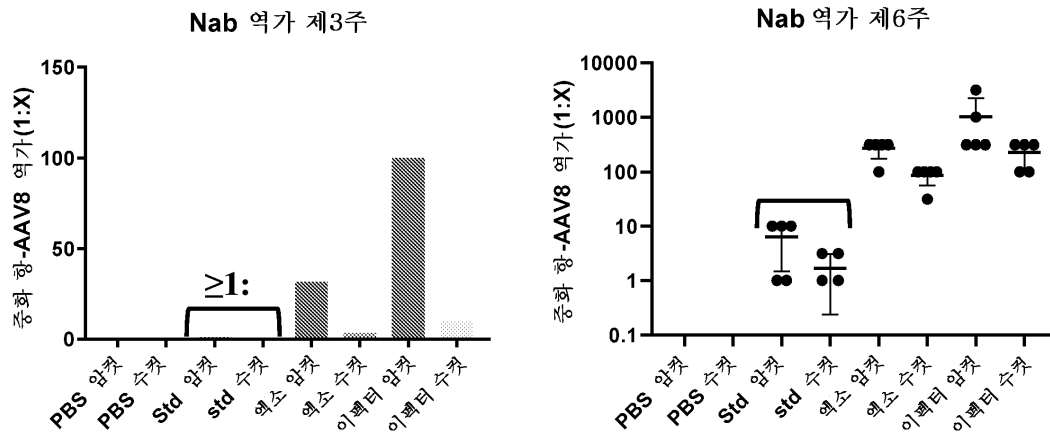
도면4



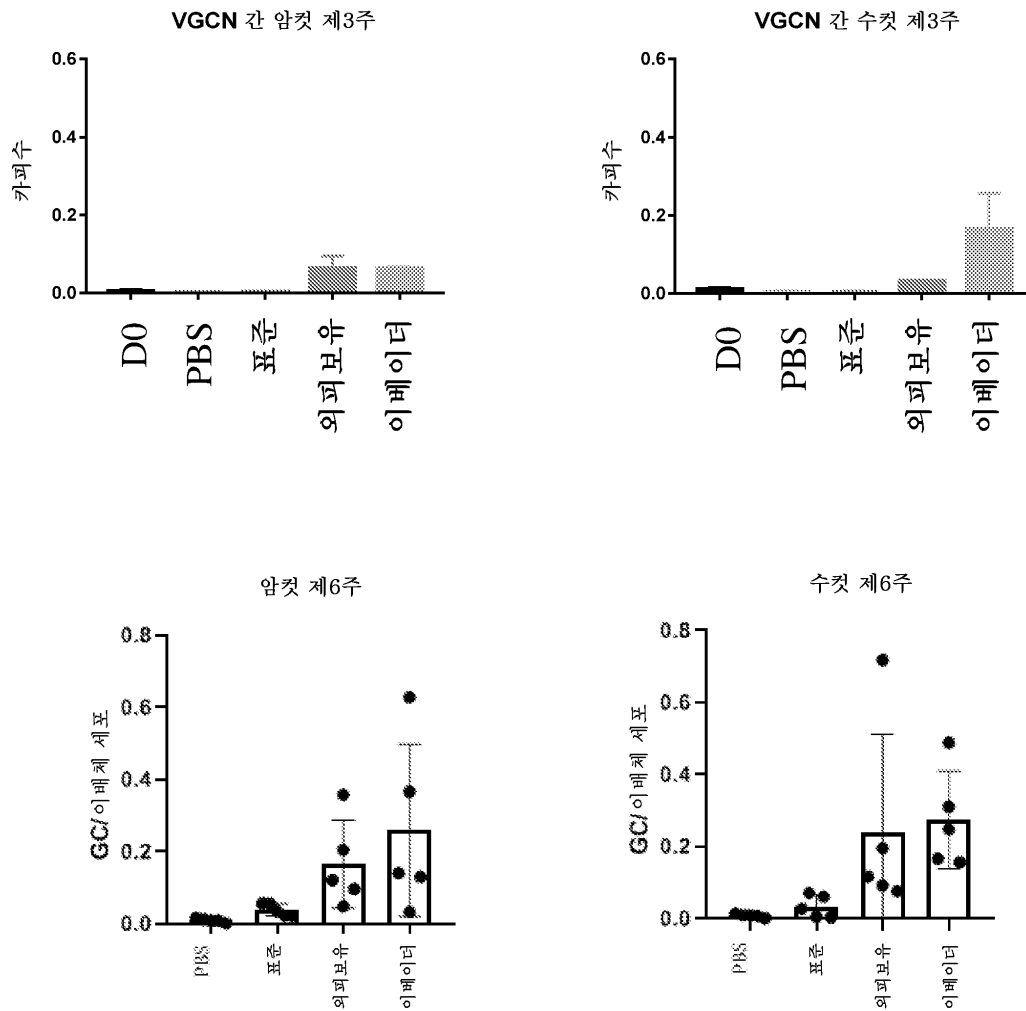
도면5



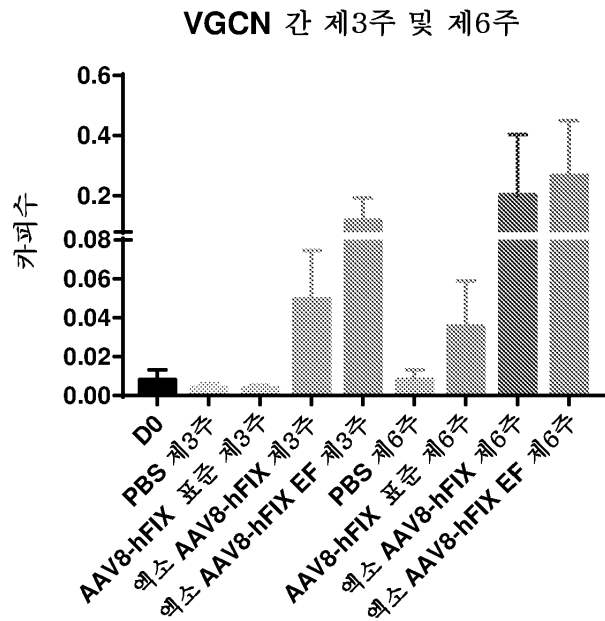
도면6



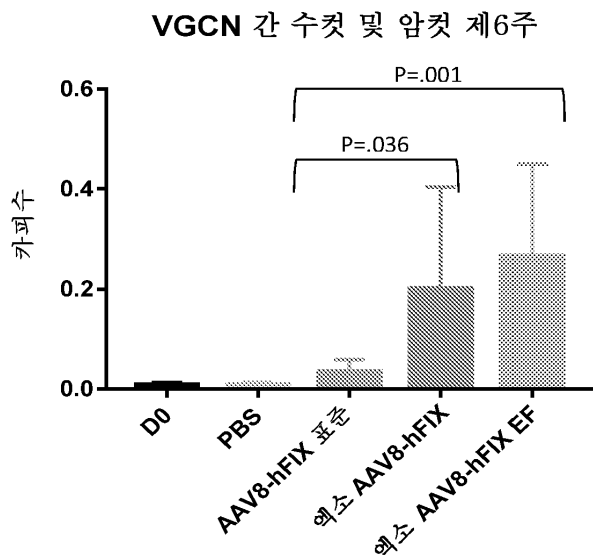
도면7



도면8



도면9



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> WINSLOW, Genine

<120> IMMUNO-EVASIVE VECTORS AND USE FOR GENE

THERAPY

<130> 77439-20001.40

<140> Not Yet Assigned

<141> Concurrently Herewith

<150> US 62/616,167

<151> 2018-01-11

<150> US 62/768,779

<151> 2018-11-16

<160> 10

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 2351

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 1

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

1 5 10 15
Cys Phe Ser Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser

20 25 30
Trp Asp Tyr Met Gln Ser Asp Leu Gly Glu Leu Pro Val Asp Ala Arg

35 40 45
Phe Pro Pro Arg Val Pro Lys Ser Phe Pro Phe Asn Thr Ser Val Val

50 55 60
Tyr Lys Lys Thr Leu Phe Val Glu Phe Thr Asp His Leu Phe Asn Ile

65 70 75 80
Ala Lys Pro Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile Gln

85 90 95
Ala Glu Val Tyr Asp Thr Val Val Ile Thr Leu Lys Asn Met Ala Ser

100 105 110
His Pro Val Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser Tyr Trp Lys Ala Ser

115 120 125
Glu Gly Ala Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu Asp

130 135 140
Asp Lys Val Phe Pro Gly Gly Ser His Thr Tyr Val Trp Gln Val Leu

145 150 155 160
 Lys Glu Asn Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Cys Leu Thr Tyr Ser
 165 170 175
 Tyr Leu Ser His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn Ser Gly Leu Ile
 180 185 190
 Gly Ala Leu Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser Leu Ala Lys Glu Lys Thr

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

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

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

 385 390 395 400

Trp Val His Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro
 405 410 415
 Leu Val Leu Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn
 420 425 430
 Asn Gly Pro Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met
 435 440 445
 Ala Tyr Thr Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu
 450 455 460
 Ser Gly Ile Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu
 465 470 475 480
 Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro
 485 490 495
 His Gly Ile Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys
 500 505 510
 Gly Val Lys His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe
 515 520 525
 Lys Tyr Lys Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp
 530 535 540
 Pro Arg Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg
 545 550 555 560
 Asp Leu Ala Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu
 565 570 575
 Ser Val Asp Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val
 580 585 590
 Ile Leu Phe Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu
 595 600 605
 Asn Ile Gln Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp
 610 615 620
 Pro Glu Phe Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val
 625 630 635 640
 Phe Asp Ser Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp

645 650 655
 Tyr Ile Leu Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe
 660 665 670
 Ser Gly Tyr Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr
 675 680 685
 Leu Phe Pro Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro
 690 695 700
 Gly Leu Trp Ile Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg Gly

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

 770 775 780
 Ile Glu Lys Thr Asp Pro Trp Phe Ala His Arg Thr Pro Met Pro Lys
 785 790 795 800
 Ile Gln Asn Val Ser Ser Ser Asp Leu Leu Met Leu Leu Arg Gln Ser
 805 810 815
 Pro Thr Pro His Gly Leu Ser Leu Ser Asp Leu Gln Glu Ala Lys Tyr
 820 825 830
 Glu Thr Phe Ser Asp Asp Pro Ser Pro Gly Ala Ile Asp Ser Asn Asn

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

Val Ser Ser Thr Ser Asn Asn Leu Ile Ser Thr Ile Pro Ser Asp Asn

900 905 910
 Leu Ala Ala Gly Thr Asp Asn Thr Ser Ser Leu Gly Pro Pro Ser Met
 915 920 925
 Pro Val His Tyr Asp Ser Gln Leu Asp Thr Thr Leu Phe Gly Lys Lys
 930 935 940
 Ser Ser Pro Leu Thr Glu Ser Gly Gly Pro Leu Ser Leu Ser Glu Glu
 945 950 955 960
 Asn Asn Asp Ser Lys Leu Leu Glu Ser Gly Leu Met Asn Ser Gln Glu

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

1025 1030 1035 1040
 Ile Glu Asn Ser Pro Ser Val Trp Gln Asn Ile Leu Glu Ser Asp Thr
 1045 1050 1055
 Glu Phe Lys Lys Val Thr Pro Leu Ile His Asp Arg Met Leu Met Asp
 1060 1065 1070
 Lys Asn Ala Thr Ala Leu Arg Leu Asn His Met Ser Asn Lys Thr Thr
 1075 1080 1085
 Ser Ser Lys Asn Met Glu Met Val Gln Gln Lys Lys Glu Gly Pro Ile

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

1140 1145 1150
 Pro Glu Lys Ser Val Glu Gly Gln Asn Phe Leu Ser Glu Lys Asn Lys

 1155 1160 1165
 Val Val Val Gly Lys Gly Glu Phe Thr Lys Asp Val Gly Leu Lys Glu
 1170 1175 1180
 Met Val Phe Pro Ser Ser Arg Asn Leu Phe Leu Thr Asn Leu Asp Asn
 1185 1190 1195 1200
 Leu His Glu Asn Asn Thr His Asn Gln Glu Lys Lys Ile Gln Glu Glu
 1205 1210 1215
 Ile Glu Lys Lys Glu Thr Leu Ile Gln Glu Asn Val Val Leu Pro Gln

 1220 1225 1230
 Ile His Thr Val Thr Gly Thr Lys Asn Phe Met Lys Asn Leu Phe Leu
 1235 1240 1245
 Leu Ser Thr Arg Gln Asn Val Glu Gly Ser Tyr Asp Gly Ala Tyr Ala
 1250 1255 1260
 Pro Val Leu Gln Asp Phe Arg Ser Leu Asn Asp Ser Thr Asn Arg Thr
 1265 1270 1275 1280
 Lys Lys His Thr Ala His Phe Ser Lys Lys Gly Glu Glu Glu Asn Leu

 1285 1290 1295
 Glu Gly Leu Gly Asn Gln Thr Lys Gln Ile Val Glu Lys Tyr Ala Cys
 1300 1305 1310
 Thr Thr Arg Ile Ser Pro Asn Thr Ser Gln Gln Asn Phe Val Thr Gln
 1315 1320 1325
 Arg Ser Lys Arg Ala Leu Lys Gln Phe Arg Leu Pro Leu Glu Glu Thr
 1330 1335 1340
 Glu Leu Glu Lys Arg Ile Ile Val Asp Asp Thr Ser Thr Gln Trp Ser

 1345 1350 1355 1360
 Lys Asn Met Lys His Leu Thr Pro Ser Thr Leu Thr Gln Ile Asp Tyr
 1365 1370 1375
 Asn Glu Lys Glu Lys Gly Ala Ile Thr Gln Ser Pro Leu Ser Asp Cys
 1380 1385 1390

Leu Thr Arg Ser His Ser Ile Pro Gln Ala Asn Arg Ser Pro Leu Pro
 1395 1400 1405
 Ile Ala Lys Val Ser Ser Phe Pro Ser Ile Arg Pro Ile Tyr Leu Thr
 1410 1415 1420
 Arg Val Leu Phe Gln Asp Asn Ser Ser His Leu Pro Ala Ala Ser Tyr
 1425 1430 1435 1440
 Arg Lys Lys Asp Ser Gly Val Gln Glu Ser Ser His Phe Leu Gln Gly
 1445 1450 1455
 Ala Lys Lys Asn Asn Leu Ser Leu Ala Ile Leu Thr Leu Glu Met Thr
 1460 1465 1470
 Gly Asp Gln Arg Glu Val Gly Ser Leu Gly Thr Ser Ala Thr Asn Ser
 1475 1480 1485
 Val Thr Tyr Lys Lys Val Glu Asn Thr Val Leu Pro Lys Pro Asp Leu
 1490 1495 1500
 Pro Lys Thr Ser Gly Lys Val Glu Leu Leu Pro Lys Val His Ile Tyr
 1505 1510 1515 1520
 Gln Lys Asp Leu Phe Pro Thr Glu Thr Ser Asn Gly Ser Pro Gly His
 1525 1530 1535
 Leu Asp Leu Val Glu Gly Ser Leu Leu Gln Gly Thr Glu Gly Ala Ile
 1540 1545 1550
 Lys Trp Asn Glu Ala Asn Arg Pro Gly Lys Val Pro Phe Leu Arg Val
 1555 1560 1565
 Ala Thr Glu Ser Ser Ala Lys Thr Pro Ser Lys Leu Leu Asp Pro Leu
 1570 1575 1580
 Ala Trp Asp Asn His Tyr Gly Thr Gln Ile Pro Lys Glu Glu Trp Lys
 1585 1590 1595 1600
 Ser Gln Glu Lys Ser Pro Glu Lys Thr Ala Phe Lys Lys Lys Asp Thr
 1605 1610 1615
 Ile Leu Ser Leu Asn Ala Cys Glu Ser Asn His Ala Ile Ala Ala Ile
 1620 1625 1630
 Asn Glu Gly Gln Asn Lys Pro Glu Ile Glu Val Thr Trp Ala Lys Gln

1635 1640 1645
Gly Arg Thr Glu Arg Leu Cys Ser Gln Asn Pro Pro Val Leu Lys Arg

1650 1655 1660
His Gln Arg Glu Ile Thr Arg Thr Thr Leu Gln Ser Asp Gln Glu Glu

1665 1670 1675 1680
Ile Asp Tyr Asp Asp Thr Ile Ser Val Glu Met Lys Lys Glu Asp Phe

1685 1690 1695
Asp Ile Tyr Asp Glu Asp Glu Asn Gln Ser Pro Arg Ser Phe Gln Lys

1700 1705 1710
Lys Thr Arg His Tyr Phe Ile Ala Ala Val Glu Arg Leu Trp Asp Tyr

1715 1720 1725
Gly Met Ser Ser Ser Pro His Val Leu Arg Asn Arg Ala Gln Ser Gly

1730 1735 1740
Ser Val Pro Gln Phe Lys Lys Val Val Phe Gln Glu Phe Thr Asp Gly

1745 1750 1755 1760
Ser Phe Thr Gln Pro Leu Tyr Arg Gly Glu Leu Asn Glu His Leu Gly

1765 1770 1775
Leu Leu Gly Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val Glu Asp Asn Ile Met Val

1780 1785 1790
Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe Tyr Ser Ser Leu

1795 1800 1805
Ile Ser Tyr Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly Ala Glu Pro Arg Lys Asn

1810 1815 1820
Phe Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr Tyr Phe Trp Lys Val Gln His

1825 1830 1835 1840
His Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu Phe Asp Cys Lys Ala Trp Ala Tyr

1845 1850 1855
Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu Lys Asp Val His Ser Gly Leu Ile Gly

1860 1865 1870
Pro Leu Leu Val Cys His Thr Asn Thr Leu Asn Pro Ala His Gly Arg

1875 1880 1885

Gln Val Thr Val Gln Glu Phe Ala Leu Phe Phe Thr Ile Phe Asp Glu
1890 1895 1900
Thr Lys Ser Trp Tyr Phe Thr Glu Asn Met Glu Arg Asn Cys Arg Ala
1905 1910 1915 1920
Pro Cys Asn Ile Gln Met Glu Asp Pro Thr Phe Lys Glu Asn Tyr Arg
1925 1930 1935
Phe His Ala Ile Asn Gly Tyr Ile Met Asp Thr Leu Pro Gly Leu Val
1940 1945 1950
Met Ala Gln Asp Gln Arg Ile Arg Trp Tyr Leu Leu Ser Met Gly Ser
1955 1960 1965
Asn Glu Asn Ile His Ser Ile His Phe Ser Gly His Val Phe Thr Val
1970 1975 1980
Arg Lys Lys Glu Glu Tyr Lys Met Ala Leu Tyr Asn Leu Tyr Pro Gly
1985 1990 1995 2000
Val Phe Glu Thr Val Glu Met Leu Pro Ser Lys Ala Gly Ile Trp Arg
2005 2010 2015
Val Glu Cys Leu Ile Gly Glu His Leu His Ala Gly Met Ser Thr Leu
2020 2025 2030
Phe Leu Val Tyr Ser Asn Lys Cys Gln Thr Pro Leu Gly Met Ala Ser
2035 2040 2045
Gly His Ile Arg Asp Phe Gln Ile Thr Ala Ser Gly Gln Tyr Gly Gln
2050 2055 2060
Trp Ala Pro Lys Leu Ala Arg Leu His Tyr Ser Gly Ser Ile Asn Ala
2065 2070 2075 2080
Trp Ser Thr Lys Glu Pro Phe Ser Trp Ile Lys Val Asp Leu Leu Ala
2085 2090 2095
Pro Met Ile Ile His Gly Ile Lys Thr Gln Gly Ala Arg Gln Lys Phe
2100 2105 2110
Ser Ser Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp Gly
2115 2120 2125
Lys Lys Trp Gln Thr Tyr Arg Gly Asn Ser Thr Gly Thr Leu Met Val

2130 2135 2140
 Phe Phe Gly Asn Val Asp Ser Ser Gly Ile Lys His Asn Ile Phe Asn
 2145 2150 2155 2160
 Pro Pro Ile Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro Thr His Tyr Ser
 2165 2170 2175
 Ile Arg Ser Thr Leu Arg Met Glu Leu Met Gly Cys Asp Leu Asn Ser

 2180 2185 2190
 Cys Ser Met Pro Leu Gly Met Glu Ser Lys Ala Ile Ser Asp Ala Gln
 2195 2200 2205
 Ile Thr Ala Ser Ser Tyr Phe Thr Asn Met Phe Ala Thr Trp Ser Pro
 2210 2215 2220
 Ser Lys Ala Arg Leu His Leu Gln Gly Arg Ser Asn Ala Trp Arg Pro
 2225 2230 2235 2240
 Gln Val Asn Asn Pro Lys Glu Trp Leu Gln Val Asp Phe Gln Lys Thr

 2245 2250 2255
 Met Lys Val Thr Gly Val Thr Thr Gln Gly Val Lys Ser Leu Leu Thr
 2260 2265 2270
 Ser Met Tyr Val Lys Glu Phe Leu Ile Ser Ser Ser Gln Asp Gly His
 2275 2280 2285
 Gln Trp Thr Leu Phe Phe Gln Asn Gly Lys Val Lys Val Phe Gln Gly
 2290 2295 2300
 Asn Gln Asp Ser Phe Thr Pro Val Val Asn Ser Leu Asp Pro Pro Leu

 2305 2310 2315 2320
 Leu Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp Val His Gln Ile
 2325 2330 2335
 Ala Leu Arg Met Glu Val Leu Gly Cys Glu Ala Gln Asp Leu Tyr
 2340 2345 2350

 <210> 2
 <211> 461
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 2

Met Gln Arg Val Asn Met Ile Met Ala Glu Ser Pro Gly Leu Ile Thr
1 5 10 15

Ile Cys Leu Leu Gly Tyr Leu Leu Ser Ala Glu Cys Thr Val Phe Leu
20 25 30

Asp His Glu Asn Ala Asn Lys Ile Leu Asn Arg Pro Lys Arg Tyr Asn
35 40 45

Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg Glu Cys
50 55 60

Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu Asn
65 70 75 80

Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly Asp Gln
85 90 95

Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Asp Ile
100 105 110

Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys
115 120 125

Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu Gln Phe
130 135 140

Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr Glu Gly
145 150 155 160

Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val Pro Phe
165 170 175

Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala
180 185 190

Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu Ala Glu
195 200 205

Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn Asp Phe
210 215 220

Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe Pro Trp
225 230 235 240

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

245 250 255
Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu Thr Gly
260 265 270

Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu Thr Glu
275 280 285

His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His His Asn
290 295 300

Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Glu
305 310 315 320

Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile Cys Ile
325 330 335

Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser Gly Tyr
340 345 350

Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala Leu Val
355 360 365

Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys Leu Arg
370 375 380

Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly Phe His
385 390 395 400

Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val
405 410 415

Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser Trp Gly
420 425 430

Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Ser
435 440 445

Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
450 455 460

<210>

3

<211> 223

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Ala Cys Leu Gly Phe Gln Arg His Lys Ala Gln Leu Asn Leu Ala

1 5 10 15

Thr Arg Thr Trp Pro Cys Thr Leu Leu Phe Phe Leu Leu Phe Ile Pro

20 25 30

Val Phe Cys Lys Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala

35 40 45

Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly

50 55 60

Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln

65 70 75 80

Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr

85 90 95

Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val

100 105 110

Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile

115 120 125

Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly

130 135 140

Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser

145 150 155 160

Asp Phe Leu Leu Trp Ile Leu Ala Ala Val Ser Ser Gly Leu Phe Phe

165 170 175

Tyr Ser Phe Leu Leu Thr Ala Val Ser Leu Ser Lys Met Leu Lys Lys

180 185 190

Arg Ser Pro Leu Thr Thr Gly Val Tyr Val Lys Met Pro Pro Thr Glu

195 200 205

Pro Glu Cys Glu Lys Gln Phe Gln Pro Tyr Phe Ile Pro Ile Asn

210 215 220

<210> 4

<211> 290

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Arg Ile Phe Ala Val Phe Ile Phe Met Thr Tyr Trp His Leu Leu
1 5 10 15

Asn Ala Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr
20 25 30

Gly Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu
35 40 45

Asp Leu Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile
50 55 60

Ile Gln Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser
65 70 75 80

Tyr Arg Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn
85 90 95

Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr
100 105 110

Arg Cys Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val
115 120 125

Lys Val Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val
130 135 140

Asp Pro Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr
145 150 155 160

Pro Lys Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser
165 170 175

Gly Lys Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn
180 185 190

Val Thr Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr
195 200 205

Cys Thr Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu
210 215 220

Val Ile Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg Thr His

225 230 235 240
Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr

 245 250 255
Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Val Lys Lys Cys

 260 265 270

Gly Ile Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp Thr His Leu Glu
275 280 285

Glu Thr

290

<210> 5

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

 $\langle 220 \rangle$

<223> Synthetic Construct

<400> 5

ggcgggcgac tcagatc 17

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

 $\langle 220 \rangle$

<223> Synthetic Construct

<400> 6

gggaggctgc tggatgaat t 21

 $\langle 210$
$$> 7$$

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

 $\langle 220 \rangle$

<223> Synthetic Construct

<400> 7

agccctgtt tgctctccg ataactg 27

<210> 8	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic Construct	
<400> 8	
aaaacgagca gtagcgtgag c	21
<210> 9	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic Construct	
<400> 9	
ttcagtcattg ctgctagcgc	20
<210> 10	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic Construct	
<400> 10	
tgcacggaag cgtctcgtct cagtc	25