



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년02월06일

(11) 등록번호 10-2764120

(24) 등록일자 2025년02월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 39/215 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01) C07K 14/005 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01) C12N 15/86 (2006.01)

C12N 5/071 (2010.01)

(52) CPC특허분류

A61K 39/215 (2013.01)

A61P 31/14 (2018.01)

(21) 출원번호 10-2022-7026458

(22) 출원일자(국제) 2020년12월30일

심사청구일자 2023년12월20일

(85) 번역문제출일자 2022년07월29일

(65) 공개번호 10-2022-0129567

(43) 공개일자 2022년09월23일

(86) 국제출원번호 PCT/US2020/067506

(87) 국제공개번호 WO 2021/138447

국제공개일자 2021년07월08일

(30) 우선권주장

62/955,801 2019년12월31일 미국(US)

62/992,700 2020년03월20일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

KR1020040104936 A

(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 12 항

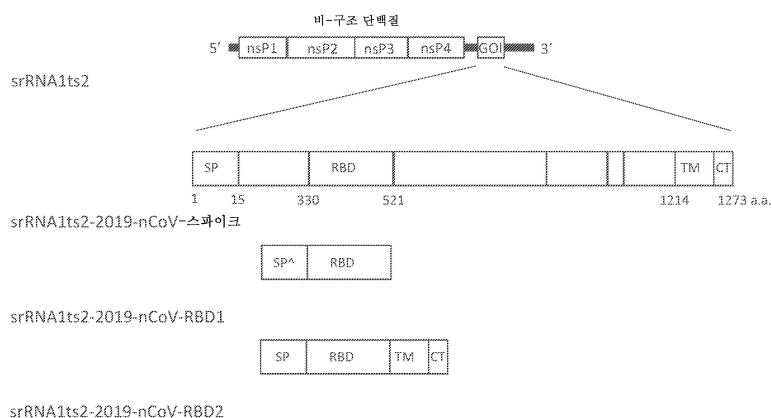
심사관 : 조경주

(54) 발명의 명칭 **핵산 및 단백질의 세포 및 조직으로의 온도-기반 일시적 전달**

(57) 요약

본 개시내용은, 예를 들어 1개 이상의 세포를 온도-감수성 작용제와 접촉시키고, 세포에서 온도-감수성 작용제의 활성을 유도하기 위한 허용 온도에서 세포를 일시적으로 인큐베이션함으로써, 1개 이상의 세포에서 온도-감수성 작용제를 일시적으로 활성화시키는 방법에 관한 것이다. 추가적으로, 본 개시내용은 대상체 내의 1개 이상의 세포 (뒷면에 계속)

대표도



포를 온도-감수성 작용제와 접촉시킨 다음, 대상체의 심부 체온을, 세포에서 온도-감수성 작용제의 활성을 유도하기 위한 허용 온도로 저하시키는 방법에 관한 것이다. 본 개시내용은 또한 대상체 내의 1개 이상의 세포를 온도-감수성 작용제와 접촉시켜, 대상체의 표면 체온을, 세포에서 온도-감수성 작용제의 활성을 유도하기 위한 허용 온도로 유지하는 방법에 관한 것이다. 온도-감수성 치료제를 사용하여 대상체를 치료하는 방법이 추가로 개시된다.

(52) CPC특허분류

C07K 14/005 (2013.01)
C12N 15/1131 (2013.01)
C12N 15/86 (2013.01)
C12N 5/0602 (2013.01)
A61K 2039/5158 (2025.01)
A61K 2039/5256 (2013.01)
A61K 2039/53 (2013.01)
A61K 2039/572 (2013.01)
A61K 2039/575 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

US20060024788 A1*
 US20060073594 A1*
 US20100203027 A1*
 US20160215270 A1
 W02018170347 A1*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

명세서

청구범위

청구항 1

바이러스 구조 단백질 코딩 영역이 결여된 알파바이러스 레플리콘을 포함하는 온도-감수성 자기-복제 RNA이고, 비구조 단백질 2 (nsP2)의 베타 시트 5와 베타 시트 6 사이에 4 내지 6개의 추가의 아미노산을 포함하는 nsP2의 발현을 유발하는 12-18개 뉴클레오타이드의 삽입을 갖는 비구조 단백질 코딩 영역을 포함하는 온도-감수성 작용제 (ts-작용제).

청구항 2

제1항에 있어서, 추가의 아미노산이 서열식별번호: 38 (GCGRT), 서열식별번호: 39 (TGAAA) 및 서열식별번호: 40 (LRPHP)으로 이루어진 군으로부터 선택된 1개의 서열을 포함하는 것인 온도-감수성 작용제.

청구항 3

제1항에 있어서, 추가의 아미노산이 서열식별번호: 39 (TGAAA)의 서열을 포함하는 것인 온도-감수성 작용제.

청구항 4

제1항에 있어서, nsP2의 아미노산 서열이 서열식별번호: 29-36으로 이루어진 군으로부터 선택된 1개의 서열을 포함하는 것인 온도-감수성 작용제.

청구항 5

제1항에 있어서, 병원체의 항원을 코딩하고, 허용 온도에서는 항원을 발현할 수 있지만 비-허용 온도에서는 그렇지 않은 온도-감수성 작용제.

청구항 6

제5항에 있어서, 항원이 바이러스 항원이고, 바이러스 항원은 알파바이러스 항원이 아닌 것인 온도-감수성 작용제.

청구항 7

제1항에 있어서, 알파바이러스가 베네수엘라 말 뇌염 바이러스, 신드비스 바이러스 및 썸리키 포레스트 바이러스로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 온도-감수성 작용제.

청구항 8

제1항에 있어서, 알파바이러스가 베네수엘라 말 뇌염 바이러스인 온도-감수성 작용제.

청구항 9

제1항에 있어서, 제약 작용제를 코딩하고, 허용 온도에서는 제약 작용제를 발현할 수 있지만 비-허용 온도에서는 그렇지 않은 온도-감수성 작용제.

청구항 10

제9항에 있어서, 허용 온도가 31℃ 내지 35℃이고, 비-허용 온도가 37℃ ± 0.5℃인 온도-감수성 작용제.

청구항 11

제9항에 있어서, 제약 작용제가 단백질을 포함하는 것인 온도-감수성 작용제.

청구항 12

제9항에 있어서, 제약 작용제가 비-코딩 RNA, siRNA, shRNA 및 엔도뉴클레아제 편집 시스템으로 이루어진 군으

로부터 선택된 것인 온도-감수성 작용제.

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

청구항 98

삭제

청구항 99

삭제

청구항 100

삭제

청구항 101

삭제

청구항 102

삭제

청구항 103

삭제

청구항 104

삭제

청구항 105

삭제

청구항 106

삭제

청구항 107

삭제

청구항 108

삭제

청구항 109

삭제

청구항 110

삭제

청구항 111

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호-참조

[0002] 본 출원은 2020년 3월 20일에 출원된 미국 가출원 번호 62/992,700 및 2019년 12월 31일에 출원된 미국 가출원 번호 62/955,801을 우선권 주장하며, 이들의 개시내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0003] ASCII 텍스트 파일로서의 서열의 제출

[0004] 하기 ASCII 텍스트 파일의 제출 내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다: 서열 목록의 컴퓨터 판독가능 형태 (CRF) (파일명: 699442001240SEQLIST.TXT, 기록된 날짜: 2020년 12월 27일, 크기: 25 KB).

[0005] 분야

[0006] 본 개시내용은, 예를 들어 1개 이상의 세포를 온도-감수성 작용제 (ts-작용제)와 접촉시키고, 세포에서 ts-작용제의 활성을 유도하기 위한 허용 온도에서 세포를 일시적으로 인큐베이션함으로써, 1개 이상의 세포에서 ts-작용제를 일시적으로 활성화시키는 방법에 관한 것이다. 생체의 치료 전략의 경우, 1개 이상의 세포를 허용 온도에서 생체의 치료 ts-작용제로 처리하고, 후속적으로 세포를 비-허용 온도 (예를 들어, 대상체의 정상 심부 체온)에서 대상체로 전달한다. 생체내 치료 전략의 경우, 치료 ts-작용제를 허용 온도에서 유지되는 대상체로 전달하여, 대상체의 심부 체온이 정상으로 복귀할 때 또는 대상체의 표면 체온이 상승할 때 (예를 들어, 비-허용 온도) ts-작용제가 영구적으로 턴 오프되기 전에 제한적 시간 동안 치료 ts-작용제가 생체내에서 기능하도록 한다. 대안적으로, 치료 ts-작용제를 대상체로 전달하고, 후속적으로 대상체의 심부 체온을, 대상체의 세포에서 치료 ts-작용제의 활성을 유도하기 위한 허용 온도로 저하시킴으로써 ts-작용제를 일시적으로 활성화시킨다.

배경 기술

[0007] 치료 유전자 생성물의 인간 세포, 조직 및 기관으로의 전달은 큰 과제를 제기한다. 환자에서 유전자의 결함을 보충하기 위해 유전자의 연속 발현을 요구하는 전통적인 유전자 요법의 경우, 이는 바이러스 벡터, 예컨대 레트로바이러스, 아데노바이러스 또는 아데노-연관 바이러스를 사용함으로써 달성되었다. 그러나, 동등하게 중요한 전략 유전자 요법은 유전자의 일시적 단기간 발현을 수반한다. 이러한 적용의 경우, 유전자의 지속적인 발현이 요구되지 않고, 이는 실제로 세포에 유해할 수 있다.

[0008] 예를 들어, CAS9는 DNA를 절단하는 박테리아 효소이다. 이는 유전자 요법을 위해 고려된 CRISPR/CAS9-기반 유전자 편집 복합체의 중요한 성분이다. 가이드 RNA 및 CAS9 둘 다는 단일 센다이 바이러스 벡터 상의 유전자에 의해 코딩될 수 있다 (Park et al., 2016). 유전자-편집 시스템을 치료적으로 사용하기 위해, CRISPR-CAS9를 함유하는 벡터는 인간 세포 또는 인간 신체 내로 도입되어야 한다. 그러나, CAS9의 연속 발현은 DNA 파괴 및 돌연변이의 도입을 야기할 수 있다. 따라서, CAS9가 1주 이상보다는 짧은 기간 동안, 예를 들어 대략 수시간 또는 수일 동안 발현되는 것이 바람직하다.

[0009] 유전자의 단기간 발현을 위한 또 다른 적용은 세포 재프로그래밍을 위한 것이다. 최근, 전사 인자의 세트의 이소성 발현이 세포를 치료상 유용한 세포 유형으로 전환시킬 수 있는 것으로 밝혀졌다. 예를 들어, 3개의 전사 인자의 세트는 췌장관 세포를 인슐린-분비 췌장 베타-세포로 전환시킬 수 있다 (Zhou et al., 2008). 전사 인자의 또 다른 세트는 섬유모세포를 심근세포로 전환시킬 수 있다 (Ieda et al., 2010). 이들 전사 인자를 인간 신체 내로 생체내 전달하는 것은 재생 의학의 한 유형으로서 사용될 수 있는 것으로 생각된다. 그러나, 이들 강력한 세포 정체-변화 전사 인자는 일시적으로만 발현되는 것이 바람직한데, 이는 이들 강력한 전사 인자의 연

속 발현이 해를 야기할 수 있기 때문이다.

[0010] 상기 예가 강조하는 바와 같이, 유전자의 연속 발현을 유도하는 바이러스 벡터를 사용하는 전통적인 유전자 요법은 바람직하지 않을 수 있다. 유전자 생성물의 시간-제한적 발현을 위해, 합성 또는 시험관내-전사된 mRNA의 세포 내로의 전달이 사용되기 시작하였다 (Warren et al., 2010). 그러나, 이들 방법론에는 여러 문제가 있다. 예를 들어, 세포, 조직 및 기관으로 전달되는 mRNA의 양은 제한되고, 따라서 단백질 생성물의 양은 생체내에서 생물학적으로 의미있는 효과에 충분하지 않을 수 있다.

[0011] 또한, 통상적으로 최대 12시간까지만 지속되는 RNA의 빠른 턴-오버로 인해 (Warren et al., 2010; Goparaju et al., 2017), 합성 RNA는 세포 내로 다수회 형질감염되어야 한다. 인간 만능 줄기 세포, 예컨대 배아 줄기 세포 및 유도된 만능 줄기 (iPS) 세포의 강제 분화를 위해, 수일의 과정에 걸쳐 1일 2회 형질감염이 요구된다 (Akiyama et al., 2016; Goparaju et al. 2017). 인간 섬유모세포로부터 iPS 세포를 생성하기 위해, 합성 RNA의 각테일의 매일 형질감염이 2주 초과 동안 계속되어야 한다 (Warren et al., 2010). 이는 번거로울 뿐만 아니라 비효율적이다.

[0012] iPS 세포의 생성을 위해, 이러한 문제는 단지 1회의 전달 후에 장기간 발현을 가능하게 하는 자기-복제 RNA를 사용함으로써 해결되었다 (Yoshioka et al., 2013). 자기-복제 RNA는 바이러스 입자 형성에 요구되는 구조 단백질을 코딩하는 DNA를 제거함으로써 (Petrakova et al., 2005), 알파바이러스 (Jose et al., 2009), 예컨대 베네수엘라 말 뇌염 바이러스 (VEEV), 신드비스 바이러스 (SINV) 및 썸리키 포레스트 바이러스 (SFV)로부터 통상적으로 생산되는 단일-가닥 RNA이다. 자기-복제 RNA는 비구조 단백질 (nsP)을 코딩하며, 이는 RNA-의존성 RNA 폴리머라제로서 기능하여 자기-복제 RNA 자체를 복제하고 번역을 위한 전사체를 생산한다. 자기-복제 RNA는 또한 관심 단백질을 코딩하는 관심 유전자 (GOI) 및 다른 유전자 요소를 포함할 수 있다. RNA의 그의 양성 피드백 생산으로 인해, 자기-복제 RNA는 GOI를 높은 수준으로 발현할 수 있다. 자기-복제 RNA는 네이키드 RNA (즉, 합성 RNA)로서, 또는 소실된 바이러스 구조 단백질을 패키징 헬퍼 세포에 의해 보충함으로써 생성될 수 있는 바이러스 입자로서 포유동물 세포로 전달될 수 있다.

[0013] 자기-복제 RNA 벡터의 이점은 GOI의 발현 수준의 증진을 가져오는 그의 자기-복제 특색이다. 그러나, RNA/단백질을 포유동물 세포로 전달하기 위한 자기-복제 RNA 벡터의 단점 중 하나는 그의 지속적인 발현이다. 통상적으로, RNA-의존성 RNA 폴리머라제 및 GOI의 양성 피드백 생산이 계속되며, 이는 네이키드 RNA 형태의 자기-복제 RNA로 형질감염되거나 또는 바이러스 형태의 자기-복제 RNA로 감염된 세포의 사멸을 유발할 수 있다.

[0014] 따라서, 유전자 요법 분야에서 필요한 것은 관심 단백질, 예컨대 치료제 또는 외래 항원 (예를 들어, 병원체의 항원)을 코딩하는 GOI의 일시적 발현을 위한 도구이다. 특히, RNA 벡터 및 자기-복제 RNA의 전사 및 번역의 제어가 요망된다.

발명의 내용

[0015] 관심 유전자 (GOI)의 시간-제한적 발현을 가질 필요성에 기초하여, 핵산 또는 단백질을 시험관내 또는 생체내에서 특이적 세포로 전달하거나 또는 특이적 세포에서 발현시킬 수 있고, 핵산/단백질의 양이 생물학적으로 의미 있는 효과를 갖기에 충분하며, 일시적 발현이 생물학적으로 의미 있는 효과를 달성한 후에 영구적으로 턴 오프될 수 있는 일시적 유전자 생성물 전달 시스템이 요구된다. 이들 및 다른 필요를 충족시키기 위해, 본 개시내용은 대상체 (생체내) 또는 배양물 중 세포 (생체외)에서 온도-감수성 작용제 (ts-작용제), 예컨대 치료 ts-작용제의 활성을 일시적으로 유도하는 방법에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 치료 ts-작용제는 경도 치료 저온요법과 조합되어 사용된다. 다른 실시양태에서, 치료 ts-작용제는 경도 치료 고온요법 또는 국부 열 적용과 조합되어 사용된다. 일부 실시양태에서, ts-작용제는 ts-RNA 분자 또는 ts-단백질 분자이다. 일부 실시양태에서, ts-작용제는 온도-감수성 바이러스 벡터 또는 자기-복제 RNA에 삽입된 이중 핵산에 의해 코딩된다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 비제한적으로 센다이 바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 아데노 바이러스 벡터, 아데노-연관 바이러스 벡터 및 알파 바이러스 벡터로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 자기-복제 RNA는 바이러스 구조 단백질 코딩 영역이 결여된 알파바이러스 레플리콘을 포함한다. 일부 실시양태에서, 알파바이러스는 비제한적으로 베네수엘라 말 뇌염 바이러스, 신드비스 바이러스 및 썸리키 포레스트 바이러스로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 관심 유전자 생성물은 ZSCAN4가 아니다.

[0016] 본 개시내용의 상기 및 다른 목적 및 특색은 첨부된 도면을 참조하여 진행되는 하기 상세한 설명으로부터 보다 분명해질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0017]

도 1a - 1d는 베네수엘라 말 뇌염 바이러스 (VEEV) 게놈의 구조 및 돌연변이된 영역의 위치를 도시한다. 도 1a는 야생형 VEEV 게놈 (TC-83 균주: 완전 게놈 11,446 bp 선형 RNA: NCBI 수탁번호: L01443.1 GI: 323714)의 개략적 표현을 보여준다. 비구조 단백질 (nsP1, nsP2, nsP3, nsP4)의 유전자는 RNA-의존성 RNA 폴리머라제를 코딩하고, 구조 단백질의 유전자는 바이러스 외피 단백질 (C, E1, E2)을 코딩한다. 5'-UTR (5'-비번역 영역) 및 3'-UTR (3'-비번역 영역). 볼드 박스로서 제시된 nsP2 단백질의 유전자를 돌연변이시켜 온도 감수성을 생성하였다. 도 1b는 돌연변이 1 (온도-감수성 돌연변이체 1: ts1)을 갖는 nsP2의 개략적 표현을 보여준다. 5개의 아미노산을 아미노산 439와 440 사이에 삽입하였다. 도 1c는 돌연변이 2 (ts2)를 갖는 nsP2의 개략적 표현을 보여준다. 5개의 아미노산을 아미노산 586과 587 사이에 삽입하였다. 도 1d는 돌연변이 3 (ts3)을 갖는 nsP2의 개략적 표현을 보여준다. 5개의 아미노산을 아미노산 594와 595 사이에 삽입하였다.

도 2a - 2c는 ts1, ts2 및 ts3에서 돌연변이된 영역에 상응하는 VEEV nsP2의 부분 서열을 도시한다. 도 2a는 야생형 서열과 비교하여 돌연변이체 1 (ts1)이 15개 뉴클레오타이드 삽입을 포함하여 5개 아미노산 삽입이 생성된 것을 보여준다. 도 2b는 야생형 서열과 비교하여 돌연변이체 2 (ts2)가 15개 뉴클레오타이드 삽입을 포함하여 5개 아미노산 삽입이 생성된 것을 보여준다. 도 2c는 야생형 서열과 비교하여 돌연변이체 3 (ts3)이 15개 뉴클레오타이드 삽입을 포함하여 5개 아미노산 삽입이 생성된 것을 보여준다.

도 3은 각각 서열식별번호: 19 및 서열식별번호: 20으로서 제시된 야생형 (TC-83 균주) 및 돌연변이체 4 (ts4)의 VEEV nsP1에 대한 부분 뉴클레오타이드 서열을 도시한다. 5'-UTR 및 51-nt CSE (보존된 서열 요소)는 볼드체로 제시된다. ts4에서의 돌연변이된 뉴클레오타이드는 밑줄표시된다.

도 4a 및 4b는 30°C, 32°C 및 37°C에서 srRNA1ts2 및 srRNA1ts3의 온도-감수성을 시험한 것을 도시한다. 야생형 자기-복제 RNA (srRNA) 벡터 (srRNA1wt-GFP) 및 돌연변이체 srRNA 벡터 (srRNA1ts2-GFP, srRNA1ts3-GFP)를 생성하였다. 시험관내 전사에 의해 생산된 RNA를 인간 유도된 만능 줄기 세포 (ADSC-iPSC 세포주) 내로 형질감염시켰다. 세포를 각각 30°C, 32°C 및 37°C에서 유지된 CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다. 각각 20시간 및 48시간에 세포의 사진을 얻었다. 상부 패널은 위상-대조 영상을 보여주고, 하부 패널은 녹색 형광 단백질 (GFP)의 발현을 검출하는 형광 영상을 보여준다. 도 4a는 세포를 srRNA1wt-GFP, srRNA1ts2-GFP 및 srRNA1ts3-GFP RNA로 형질감염시킨 결과를 보여준다. 도 4b는 세포를 GFP 코딩 합성 mRNA (synRNA-GFP)로 형질감염시킨 결과를 보여준다.

도 5는 32°C에서 srRNA1ts1 및 srRNA1ts2의 온도-감수성을 시험한 것을 도시한다. 야생형 자기-복제 RNA (srRNA) 벡터 (srRNA1wt-GFP) 및 돌연변이체 srRNA 벡터 (srRNA1ts2-GFP 및 srRNA1ts1-GFP)를 생성하였다. 시험관내 전사에 의해 생산된 RNA를 인간 유도된 만능 줄기 세포 (ADSC-iPSC 세포주) 내로 형질감염시켰다. 세포를 32°C에서 유지된 CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다. 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 240, 288시간에 세포의 사진을 얻었다. srRNA1ts1-GFP의 경우, 24시간 및 168시간의 사진만을 찍었다. 상부 패널은 위상-대조 영상을 보여주고, 하부 패널은 GFP의 발현을 검출하는 형광 영상을 보여준다.

도 6은 32°C, 33°C, 37°C에서 srRNA1ts2 및 srRNA1ts4의 온도-감수성을 시험한 것을 도시한다. 돌연변이체 자기-복제 RNA (srRNA) 벡터 (srRNA1ts2-GFP 및 srRNA1ts4-GFP)를 생성하였다. 시험관내 전사에 의해 생산된 RNA를 인간 유도된 만능 줄기 세포 (ADSC-iPSC 세포주) 내로 형질감염시켰다. 세포를 각각 32°C, 33°C, 37°C에서 유지된 CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다. 20, 48, 96시간에 세포의 사진을 얻었다. 상부 패널은 위상-대조 영상을 보여주고, 하부 패널은 GFP의 발현을 검출하는 형광 영상을 보여준다.

도 7은 32°C에서 유지된 돌연변이체 srRNA1ts2-GFP의 온도-감수성을 시험한 것을 도시한다. 돌연변이체 벡터 (srRNA1ts2-GFP)의 시험관내 전사에 의해 생산된 RNA를 인간 유도된 만능 줄기 세포 (ADSC-iPSC 세포주) 내로 형질감염시켰다. 세포를 32°C에서 유지된 CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다. srRNA1ts2-GFP 벡터는 "IRES" 서열 뒤에 삽입된 퓨로마이신 N-아세틸트랜스퍼라제 (pac) 선택 유전자를 함유하고, 따라서 형질감염된 세포는 퓨로마이신을 사용하여 선택될 수 있다. 1 µg/ml의 퓨로마이신의 부재 (상부 패널) 또는 존재 (하부 패널) 하에 실험을 수행하였다. 24, 48, 96, 144, 168, 192시간에 세포의 사진을 얻었다. 상부 패널은 위상-대조 영상을 보여주고, 하부 패널은 GFP의 발현을 검출하는 형광 영상을 보여준다.

도 8은 24시간에 32°C에서 37°C로의 온도 전환을 사용하여 돌연변이체 srRNA1ts2-GFP의 온도-감수성을 시험한 것을 도시한다. 돌연변이체 벡터 (srRNA1ts2-GFP)의 시험관내 전사에 의해 생산된 RNA를 인간 유도된 만능 줄

기 세포 (ADSC-iPSC 세포주) 내로 형질감염시켰다. 세포를 32℃에서 유지된 CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다. 24시간에, 세포를 37℃에서 유지된 CO₂ 인큐베이터로 옮겼다. srRNA1ts2-GFP 벡터는 "IRES" 서열 뒤에 삽입된 퓨로마이신 N-아세틸트랜스퍼라제 (pac) 선택 유전자를 함유하고, 따라서 형질감염된 세포는 퓨로마이신을 사용하여 선택될 수 있다. 1 µg/ml의 퓨로마이신의 부재 (상부 패널) 또는 존재 (하부 패널) 하에 실험을 수행하였다. 24, 48, 96, 144, 168, 192시간에 세포의 사진을 얻었다. 상부 패널은 위상-대조 영상을 보여주고, 하부 패널은 GFP의 발현을 검출하는 형광 영상을 보여준다.

도 9는 48시간에 32℃에서 37℃로의 온도 전환을 사용하여 돌연변이체 srRNA1ts2-GFP의 온도-감수성을 시험한 것을 도시한다. 돌연변이체 벡터 (srRNA1ts2-GFP)의 시험관내 전사에 의해 생산된 RNA를 인간 유도된 만능 줄기 세포 (ADSC-iPSC 세포주) 내로 형질감염시켰다. 세포를 32℃에서 유지된 CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다. 48시간에, 세포를 37℃에서 유지된 CO₂ 인큐베이터로 옮겼다. srRNA1ts2-GFP 벡터는 "IRES" 서열 뒤에 삽입된 퓨로마이신 N-아세틸트랜스퍼라제 (pac) 선택 유전자를 함유하고, 따라서 형질감염된 세포는 퓨로마이신을 사용하여 선택될 수 있다. 1 µg/ml의 퓨로마이신의 부재 (상부 패널) 또는 존재 (하부 패널) 하에 실험을 수행하였다. 24, 48, 96, 144, 168, 192시간에 세포의 사진을 얻었다. 상부 패널은 위상-대조 영상을 보여주고, 하부 패널은 GFP의 발현을 검출하는 형광 영상을 보여준다.

도 10은 72시간에 32℃에서 37℃로의 온도 전환을 사용하여 돌연변이체 srRNA1ts2-GFP의 온도-감수성을 시험한 것을 도시한다. 돌연변이체 벡터 (srRNA1ts2-GFP)의 시험관내 전사에 의해 생산된 RNA를 인간 유도된 만능 줄기 세포 (ADSC-iPSC 세포주) 내로 형질감염시켰다. 세포를 32℃에서 유지된 CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다. 72시간에, 세포를 37℃에서 유지된 CO₂ 인큐베이터로 옮겼다. srRNA1ts2-GFP 벡터는 "IRES" 서열 뒤에 삽입된 퓨로마이신 N-아세틸트랜스퍼라제 (pac) 선택 유전자를 함유하고, 따라서 형질감염된 세포는 퓨로마이신을 사용하여 선택될 수 있다. 1 µg/ml의 퓨로마이신의 부재 (상부 패널) 또는 존재 (하부 패널) 하에 실험을 수행하였다. 24, 48, 96, 144, 168, 192시간에 세포의 사진을 얻었다. 상부 패널은 위상-대조 영상을 보여주고, 하부 패널은 GFP의 발현을 검출하는 형광 영상을 보여준다.

도 11a - 11d는 섬유모세포에서 돌연변이체 srRNA1ts2-GFP의 온도-감수성을 시험한 것을 도시한다. 돌연변이체 벡터 (srRNA1ts2-GFP)의 시험관내 전사에 의해 생산된 RNA를 인간 신생아 피부 섬유모세포 (HDFn 세포주) 내로 형질감염시켰다. 세포를 32℃에서 유지된 CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다. 24, 48 및 96시간에 세포의 사진을 얻었다. 상부 패널은 위상-대조 영상을 보여주고, 하부 패널은 GFP의 발현을 검출하는 형광 영상을 보여준다.

도 11a 및 11b는 제트메신저(JetMessenger) (폴리플러스(Polyplus))를 사용하여 수행된 형질감염을 도시한다. 세포를 표준 배지 단독 (도 11a) 또는 200 ng/ml의 B18R이 보충된 표준 배지 (도 11b)에서 배양하였다. 도 11c 및 11d는 메신저맥스(MessengerMax) (써모피셔(ThermoFisher))를 사용하여 수행된 형질감염을 도시한다. 세포를 표준 배지 단독 (도 11c) 또는 200 ng/ml의 B18R이 보충된 표준 배지 (도 11d)에서 배양하였다.

도 12는 다양한 알파바이러스 패밀리의 구성원의 nsP2 돌연변이체 2 (ts2)에 상응하는 아미노산 서열의 정렬을 도시한다. 좌측 패널은 서열식별번호: 21-28로서 제시된 야생형 서열의 정렬 (문헌 [Russo et al., 2006]의 도 1로부터 부분적으로 재현됨)을 도시하고, 한편 우측 패널은 nsP2의 2차 구조에서 "β5"와 "β6" (제5와 제6 "β" 가닥) 사이에 5개 아미노산의 삽입을 포함하는 서열식별번호: 29-36으로서 제시된 돌연변이체 서열의 정렬을 도시한다. VEEV (베네수엘라 말 뇌염 바이러스), 아우라 (아우라 바이러스), WEEV (서부 말 뇌염 바이러스), BFV (바마 포레스트 바이러스), ONNV (오니옹-니옹 바이러스), RRV (로스 리버 바이러스), SFV (샘리키 포레스트 바이러스) 및 SINV (신드비스 바이러스).

도 13은 온도-감수성 작용제 (ts-작용제)를 사용한 세포의 전형적 생체의 처리를 보여주는 개략적 다이어그램을 도시한다. ts-작용제, 예컨대 srRNA 또는 센다이 바이러스 벡터는 허용 온도 (예를 들어, 33℃)에서 기능적이지만, 비-허용 온도 (예를 들어, 37℃)에서는 비-기능적이다. ts-작용제로 처리된 표적 세포를 허용 온도에서 특정 지속기간 (예를 들어, 3일) 동안 배양한 다음, 비-허용 온도에서 특정 지속기간 (예를 들어, 10일) 동안 계속 배양한다. 관심 유전자 (GOI)의 RNA (또는 RNA로부터 번역된 단백질)의 예상 수준은 허용 온도에서 증가하고, 높은 수준에 도달한다. 비-허용 온도로 전환한 후, RNA (또는 단백질)의 예상 수준은 전사 및 번역이 중지됨에 따라 점차 감소한다.

도 14는 예시적인 생체의 치료 절차를 보여주는 개략적 다이어그램을 도시한다. 온도-감수성 작용제 (ts-작용제), 예컨대 srRNA 또는 센다이 바이러스 벡터는 허용 온도 (예를 들어, 33℃)에서 기능적이지만, 비-허용 온도

(예를 들어, 37℃)에서는 비-기능적이다. 표적 세포를 환자의 신체로부터 취하고 (자가이식편), 허용 온도, 예를 들어 33℃에서 특정 지속기간, 예를 들어 24시간 동안 생체외에서 ts-작용제와 함께 인큐베이션한다. 이어서, ts-작용제를 갖는 표적 세포를 환자에 이식한다. 37℃의 비-허용 온도에서, ts-작용제는 환자의 신체 내부에서 기능하지 않는다.

도 15는 또 다른 예시적인 생체외 치료 절차를 보여주는 개략적 다이어그램을 도시한다. 온도-감수성 작용제 (ts-작용제), 예컨대 srRNA 또는 센다이 바이러스 벡터는 허용 온도 (예를 들어, 33℃)에서 기능적이지만, 비-허용 온도 (예를 들어, 37℃)에서는 비-기능적이다. 표적 세포를 공여자의 신체로부터 취하고 (동종이식편), 허용 온도, 예를 들어 33℃에서 특정 지속기간, 예를 들어 24시간 동안 생체외에서 ts-작용제와 함께 인큐베이션한다. 이어서, ts-작용제를 갖는 표적 세포를 환자에 이식한다. 37℃의 비-허용 온도에서, ts-작용제는 환자의 신체 내부에서 기능하지 않는다.

도 16은 예시적인 반 생체내 치료 절차를 보여주는 개략적 다이어그램을 도시한다. 온도-감수성 작용제 (ts-작용제), 예컨대 srRNA 또는 센다이 바이러스 벡터는 허용 온도 (예를 들어, 33℃)에서 기능적이지만, 비-허용 온도 (예를 들어, 37℃)에서는 비-기능적이다. 환자는 치료 저온요법에 대한 절차를 받고, 환자의 심부 체온은 정상 체온 (예를 들어, 37℃)보다 더 낮은 감소된 온도 (예를 들어, 33℃)에서 유지된다. 표적 세포 (자가 또는 동종)를 생체외에서 ts-작용제로 처리하고, 즉시 환자의 순환계 내로 주입하거나 또는 환자의 기관 내로 주사한다. 환자가 감소된 온도 (예를 들어, 33℃)에서 일부 시간 (예를 들어, 24시간) 동안 유지되는 동안, ts-작용제는 기능적이다. 후속적으로, 환자의 심부 체온은 정상 온도 (37℃)로 복귀되고, 이때 ts-작용제는 더 이상 기능적이지 않다.

도 17은 예시적인 생체내 치료 절차를 보여주는 개략적 다이어그램을 도시한다. 온도-감수성 작용제 (ts-작용제), 예컨대 srRNA 또는 센다이 바이러스 벡터는 허용 온도 (예를 들어, 33℃)에서 기능적이지만, 비-허용 온도 (예를 들어, 37℃)에서는 비-기능적이다. 환자는 치료 저온요법에 대한 절차를 받고, 환자의 심부 체온은 정상 체온 (예를 들어, 37℃)보다 더 낮은 감소된 온도 (예를 들어, 33℃)에서 유지된다. ts-작용제는 전신으로 또는 특이적 기관, 조직 또는 세포 유형으로 직접 전달된다. 환자가 감소된 온도 (예를 들어, 33℃)에서 일부 시간 (예를 들어, 24시간) 동안 유지되는 동안, ts-작용제는 기능적이다. 후속적으로, 환자의 심부 체온은 정상 온도 (37℃)로 복귀되고, 이때 ts-작용제는 더 이상 기능적이지 않다.

도 18은 인간 ES/iPS 세포의 뉴런으로의 분화를 도시한다. 전형적 실험 절차의 개략적 표현이 제시된다. 인간 ES/iPS 세포를 제-1일에 세포 배양 접시 상에 플레이팅하였다. 제0일에, 세포를 srRNA1ts2-NGN3으로 형질감염시켰다. 세포를 33℃에서 72시간 동안 배양하였다. 제3일에, 세포를 새로운 배양 접시 상에 재-플레이팅한 다음, 세포 배양물을 37℃로 옮겼다. 푸로마이신을 제3일에 24시간 동안 배지에 첨가하였다. 제0일 (형질감염 전), 제1일, 제2일, 제3일 (계대배양 전), 제4일 (배지 교체 전), 제5일 및 제6일에 위상 대조 현미경 영상을 찍었다. 제6일 사진의 확대 영상이 또한 제시된다. 세포를 제9일에 고정시키고, 성숙 뉴런에 특이적인 항-TUBB3 (베타3-튜불린) (적색 신호)에 의한 면역염색에 사용하였다 (10x 및 20x 대물 렌즈).

도 19는 인간 ES/iPS 세포의 혈관 내피 세포로의 분화를 도시한다. 전형적 실험 절차의 개략적 표현이 제시된다. 인간 ES/iPS 세포를 제-1일에 세포 배양 접시 상에 플레이팅하였다. 제0일에, 세포를 srRNA1ts2-ETV2로 형질감염시켰다. 세포를 33℃에서 72시간 동안 배양하였다. 제3일에, 세포 배양물을 37℃로 옮겼다. 푸로마이신을 제3일에 48시간 동안 배지에 첨가하였다. (하부 패널) 제1일, 제2일, 제3일, 제4일, 제5일, 제6일, 제7일 및 제8일에 위상 대조 현미경 영상을 찍었다. 세포를 제8일에 고정시키고, 항-CD31에 의한 면역염색에 사용하였다 (10x 및 20x 대물 렌즈).

도 20은 예시적인 생체내 치료 절차를 보여주는 개략적 다이어그램을 도시한다. 온도-감수성 작용제 (ts-작용제), 예컨대 srRNA 또는 센다이 바이러스 벡터는 허용 온도 (예를 들어, 31-34℃)에서 기능적이지만, 비-허용 온도 (예를 들어, >37℃)에서는 비-기능적이다. 환자 신체 표면에서의 또는 그 바로 아래의 온도 (표면 체온)는 약 31-34℃이며, 환자의 심부 체온인 약 37℃보다 더 낮다. ts-작용제는 환자에게 피내, 피하 또는 근육내 투여에 의해 직접 전달되며, 여기서 이는 환자의 표면 체온에서 기능적이다. 추가의 행위는 요구되지 않는다. 대안적으로, ts-작용제의 기능이 더 이상 필요하지 않은 경우에, ts-작용제는 환자의 표면 체온을 일시적으로 증가시킴으로써 비-기능적이 될 수 있다.

도 21은 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스-2 (SARS-CoV-2, 또한 2019-nCoV로도 공지됨)의 스파이크 단백질 (또는 그의 부분)을 코딩하는 예시적인 srRNA1ts2 벡터를 보여주는 개략적 다이어그램을 도시한다. SARS-CoV-2는 코로나바이러스 질환 2019 (COVID-2019)의 병원체이다. srRNA1ts2 벡터의 비-구조 단백질 (nsP1-

nsP4)은 RNA 게놈의 복제 및 전사에 요구되고, 반면 관심 유전자 (GOI)는 스파이크 단백질 또는 그의 단편을 코딩한다. "srRNA1ts2-2019-nCoV-스파이크"는 2019-nCoV의 전장 스파이크 단백질 (서열식별번호: 41)을 코딩한다. "srRNA1ts2-2019-nCoV-RBD1"은 CD5의 신호 펩티드 (잔기 1-24) 및 2019-nCoV의 스파이크 단백질의 RBD를 포함하는 융합 단백질 (서열식별번호: 42)을 코딩한다. "srRNA1ts2-2019-nCoV-RBD2"는 2019-nCoV의 스파이크 단백질의 신호 펩티드, RBD, 막횡단 도메인 및 세포질 꼬리를 포함하는 융합 단백질 (서열식별번호: 43)을 코딩한다. 2019-nCoV의 RBD의 아미노산 서열은 서열식별번호: 44로서 제시된다. 약어: SP (신호 펩티드); RBD (수용체 결합 도메인); TM (막횡단 도메인); 및 CT (세포질 꼬리).

도 22는 예시적인 생체내 치료 절차를 보여주는 개략적 다이어그램을 도시한다. 온도-감수성 작용제 (ts-작용제), 예컨대 srRNA 또는 센다이 바이러스 벡터는 허용 온도 (예를 들어, 31-35°C)에서 기능적이지만, 비-허용 온도 (예를 들어, >37°C)에서는 비-기능적이다. 환자 신체의 기도의 온도 (기도 온도)는 비강 및 상부 기관의 경우 약 32°C이고 구역기관지까지의 경우 35°C이며 (McFadden et al., 1985), 약 37°C인 환자의 심부 체온보다 더 낮다. ts-작용제는 환자에게 비강 투여 (예를 들어, 취입, 흡입 또는 점적주입)에 의해 직접 전달되며, 여기서 이는 환자의 기도 온도에서 기능적이다. 추가의 행위는 요구되지 않는다. ts-작용제의 기능이 더 이상 필요하지 않은 경우에, ts-작용제는 환자의 기도 온도를 일시적으로 증가시킴으로써 비-기능적이 될 수 있다.

도 23은 이계교배 마우스의 뒷다리에 관심 유전자 (루시페라제)를 코딩하는 RNA를 피내 투여한 결과로서 생체내 관심 유전자의 발현을 도시한다.

도 24a - 24b는 SARS-CoV-2의 수용체 결합 도메인 (RBD)을 코딩하는 온도-감수성 srRNA1ts2 RNA (srRNA1ts2-2019-CoV-RBD1) 또는 위약 (완충제만)의 피내 주사에 의해 면역화된 마우스로부터 수득된 비장세포 샘플에서의 시토키인-분비 세포의 빈도를 보여준다. 도 24a는 인터페론-감마 (INF- γ) 스파트-형성 세포 (SFC)의 빈도를 보여주고, 도 24b는 ELISpot 검정에 의해 결정 시 SARS-CoV-2 항원의 존재 및 부재 하에 배양된 면역화된 마우스로부터의 비장세포에서의 인터류킨-4 (IL-4) SFC의 빈도를 제시한다. 흑색 막대 (자극)는 SARS-CoV-2 RBD를 커버하는 53개 펩티드 (11개 아미노산 중첩을 갖는 15량체)의 풀에 의해 24시간 동안 자극된 비장세포를 나타낸다. 회색 막대 (대조군)는 자극이 없는 비장세포를 나타낸다. 삼중 샘플의 평균 및 표준 편차 (오차 막대)가 제시된다.

도 25a - 25c는 SARS-CoV-2의 수용체 결합 도메인 (RBD)을 코딩하는 온도-감수성 srRNA1ts2 RNA (srRNA1ts2-2019-CoV-RBD1) 또는 위약 (완충제만)의 피내 주사에 의해 면역화된 마우스의 SARS-CoV-2 항원-반응성 혈청 이뮤노글로불린 G (IgG)의 수준을 보여준다. 간략하게, 제0일 및 제14일에, 마우스는 RNase 억제제 (흑색 삼각형)의 존재 및 부재 하에 위약 또는 srRNA1ts2-2019-CoV-RBD1을 받았다. 제49일에, 모든 마우스는 재조합 RBD 단백질 (개방 삼각형)을 받았다. 별표 (*)는 3보다 더 높은 IgG 수준 (OD450)을 나타낸다. 도 25a는 2회 용량의 위약 (완충제만)을 받은 마우스의 결과를 보여준다. 도 25b는 2회 용량의 srRNA1ts2-2019-CoV-RBD1 RNA를 받은 마우스의 결과를 보여준다. 도 25c는 2회 용량의 srRNA1ts2-2019-CoV-RBD1 RNA를 RNase 억제제와 조합하여 받은 마우스의 결과를 보여준다. 별표 (*)는 3보다 더 높은 IgG 수준 (OD450)을 나타낸다. 모든 군에서 N = 10.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

개관

본 출원인은 세포가 온도-감수성 치료제의 활성을 유도하기 위한 허용 온도에서 배양될 수 있다는 것 및 활성이 세포에서 치료 효과를 유도할 수 있다는 것을 입증하였다. 더욱이, 온도-감수성 치료제의 활성은 후속적으로 세포를 비-허용 온도에서 인큐베이션함으로써 감소되거나 억제될 수 있다. 본 출원인은 또한 최초로 생체내 온도-감수성 작용제 (ts-작용제)의 사용 방법을 제공하였다. 시험관내 사용된 동일한 유형의 ts-작용제가 생체내 사용될 수 있다. 예를 들어, 대상체의 심부에 ts-작용제를 투여한 후에, 대상체의 심부 체온을 ts-작용제의 활성을 유도하기 위한 허용 온도로 저하시킬 수 있다. 대안적으로, 대상체의 표면 (표피, 진피, 피하 또는 골격근)에 ts-작용제를 투여한 후에, 대상체의 표면 체온을 ts-작용제의 활성을 유도하기 위한 허용 온도에서 유지한다. 대상체의 표면 체온은 자연적으로 또는 인공적으로 유지될 수 있다. 이들 방법은 치료제, 예컨대 핵산 및 폴리펩티드를 전달하고 일시적으로 활성화시키는 새로운 방법을 제공한다. 특히, 본 개시내용은 핵산 및 단백질의 세포로의 온도-감수성 전달을 위한 도구를 제공하며, 단 핵산 및 단백질은 ZSCAN4 핵산 및 단백질이 아니다.

따라서, 본 개시내용은 일반적으로 시험관내에서 온도-감수성 작용제 (예를 들어, 온도-감수성 치료제)의 활성

을 일시적으로 유도하는 방법에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 온도-감수성 치료제를 포함하는 1개 이상의 세포는 온도-감수성 치료제의 활성을 유도하기 위한 허용 온도에서 배양된다. 세포는 상기 허용 온도에서, 세포에서 온도-감수성 치료제가 치료 효과를 유도하기에 충분한 기간 동안 배양된다. 이어서, 세포는 비-허용 온도로 복귀되며, 여기서 비-허용 온도는 온도-감수성 치료제의 활성을 감소시키거나 억제한다. 또 다른 실시양태에서, 1개 이상의 세포는 온도-감수성 치료제를 아직 포함하지 않고, 온도-감수성 치료제와 처음 접촉된다. 일부 실시양태에서, 1개 이상의 세포에서 치료 효과를 유도한 후에, 세포가 그를 필요로 하는 대상체에게 투여된다. 일부 실시양태에서, 1개 이상의 세포가 치료를 필요로 하는 대상체로부터 단리되고, 온도-감수성 치료제로 처리된 후에, 세포가 상기 대상체로 복귀된다.

[0021] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 생체내에서 온도-감수성 작용제 (예를 들어, 온도-감수성 치료제)의 활성을 일시적으로 유도하는 방법에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 대상체 내의 1개 이상의 세포는 온도-감수성 치료제를 포함하고, 대상체의 체온은 세포에서 온도-감수성 치료제가 치료 효과를 유도하기에 충분한 기간 동안 허용 온도로 저하되고, 이어서 대상체의 체온은 정상 체온으로 복귀된다. 또 다른 실시양태에서, 온도-감수성 치료제는 대상체의 체온이 허용 온도로 저하되기 전에 또는 저하된 후에 대상체에게 투여된다.

[0022] 본 개시내용의 다른 측면은 질환 또는 상태를 앓고 있는 대상체에서 골수 세포를 동원하는 단계, 동원된 골수 세포를 대상체로부터 단리하는 단계, 단리된 골수 세포를 약 $33^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 의 온도에서 배양하는 단계, 상기 세포를 온도-감수성 바이러스 벡터, 예컨대 센다이 바이러스 벡터 또는 온도-감수성 자기-복제 RNA (srRNA)와 접촉시키며, 여기서 바이러스 벡터 또는 srRNA는 이중 핵산 분자를 포함하는 것인 단계, 접촉된 세포를 약 $33^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 에서 충분한 기간 동안 유지하며, 여기서 바이러스 벡터 또는 srRNA는 $33^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 에서 복제될 수 있고, 바이러스 벡터 또는 srRNA의 복제는 이중 핵산 분자의 증가된 발현을 유도하는 것인 단계, 및 접촉된 세포를 대상체 내로 생착시켜 질환 또는 상태를 치료하는 단계를 포함하는 방법에 의해 질환 또는 상태를 치료하는 것에 관한 것이다. 대안적으로, 동원된 골수 세포를 대상체로부터 단리한 후에, 단리된 골수 세포를 온도-감수성 바이러스 벡터, 예컨대 센다이 바이러스 벡터 또는 온도-감수성 srRNA와 접촉시킨 후, 세포를 약 $33^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 의 온도에서 배양한다.

[0023] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 질환 또는 상태의 치료를 필요로 하는 대상체에게 온도-감수성 바이러스 벡터, 예컨대 센다이 바이러스 벡터 또는 온도-감수성 자기-복제 RNA (srRNA)를 투여하며, 여기서 바이러스 벡터 또는 srRNA는 이중 핵산을 포함하는 것인 단계, 대상체의 심부 체온을 약 $33^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 로 저하시키는 단계, 대상체의 심부 체온을 약 $33^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 에서 충분한 기간 동안 유지하며, 여기서 바이러스 벡터 또는 srRNA는 $33^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 에서 복제될 수 있고, 바이러스 벡터 또는 srRNA의 복제는 이중 핵산 분자의 증가된 발현을 유도하는 것인 단계, 및 대상체의 심부 체온이 정상으로 복귀되도록 하는 단계에 의해 질환 또는 상태를 치료하는 것에 관한 것이다. 대안적으로, 대상체의 심부 체온을 약 $33^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 로 저하시키는 것은 온도-감수성 바이러스 벡터, 예컨대 센다이 바이러스 벡터 또는 온도-감수성 srRNA를 투여하기 전에 수행된다.

[0024] 대상체에게 ts-작용제 또는 ts-작용제를 포함하는 세포를 투여함으로써 질환 또는 상태를 치료하는 방법에 대한 언급 및 청구범위는 마찬가지로 그의 일반적 및 구체적 형태에 있어서 하기에 관한 것이다:

[0025] a) 질환 또는 상태의 치료를 위한 의약의 제조를 위한 ts-작용제 또는 ts-작용제를 포함하는 세포의 용도; 및

[0026] b) 질환 또는 상태의 치료를 위한 ts-작용제 또는 ts-작용제를 포함하는 세포를 포함하는 제약 조성물.

[0027] 선행 단락의 방법의 일부 실시양태에서, 이중 핵산은 관심 유전자 (GOI)를 포함하거나 또는 관심 단백질을 코딩한다. 바람직한 실시양태에서, 관심 단백질은 치료제이다. 일부 실시양태에서, GOI는 GOI의 우성-음성 형태 또는 인공 단백질 (예를 들어, 상이한 단백질 도메인을 융합시킴으로써 제조된 하이브리드 단백질)을 코딩하는 인공 유전자이다. 일부 실시양태에서, 이중 핵산은 비-코딩 RNA, siRNA 또는 shRNA를 포함한다. 다른 실시양태에서, 이중 핵산은 엔도뉴클레아제 편집 시스템을 포함한다. 일부 실시양태에서, 엔도뉴클레아제 편집 시스템은 비제한적으로 ZFN 시스템, TALEN 시스템 및 CRISPR/CAS9 시스템으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 관심 단백질은 비제한적으로 인간 뉴로게닌-3 (NGN3), 인간 ETS 전위 변이체 2 (ETV2), 뇌-유래 신경영양 인자 (BDNF) 및 신경 성장 인자 (NGF)로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 관심 단백질은 에리트르포이에틴 (EPO) 또는 과립구 콜로니 자극 인자 (G-CSF)이다. 다른 실시양태에서, 관심 단백질은 효소 대체 요법을 위한 효소, 예컨대 아데노신 데아미나제 (ADA)이다. 일부 실시양태에서, 관심 단백질은 감염성 질환에 대한 백신접종의 목적을 위한 병원성 유기체, 예컨대 바이러스, 원충 또는 박테리아에 의해 코딩되는 항원이다.

[0028] 정의

- [0029] 본원 및 첨부된 청구범위에 사용된 단수 형태는 달리 나타내지 않는 한 복수 형태를 포함한다. 예를 들어, "폴리뉴클레오티드"는 1개 이상의 폴리뉴클레오티드를 포함한다.
- [0030] 본원에 사용된 어구 "포함하는"은 개방형이며, 이는 이러한 실시양태가 추가의 요소를 포함할 수 있다는 것을 나타낸다. 대조적으로, 어구 "로 이루어진"은 폐쇄형이며, 이는 이러한 실시양태가 추가의 요소 (미량의 불순물 제외)를 포함하지 않는다는 것을 나타낸다. 어구 "본질적으로 이루어진"은 부분적으로 폐쇄형이며, 이는 이러한 실시양태가 이러한 실시양태의 기본 특징을 실질적으로 변화시키지 않는 요소를 추가로 포함할 수 있다는 것을 나타낸다. "포함하는"으로서 본원에 기재된 측면 및 실시양태는 "이루어진" 및 "본질적으로 이루어진" 실시양태를 포함하는 것으로 이해된다.
- [0031] 온도 이외의 값과 관련하여 본원에 사용된 용어 "약"은 달리 나타내지 않는 한 그 값의 90% 내지 110%를 포괄한다 (예를 들어, 약 30분은 27분 내지 33분을 지칭함). 섭씨 온도와 관련하여 사용하는 경우 약은 달리 나타내지 않는 한 그 값의 -1°C 내지 $+1^{\circ}\text{C}$ 를 포괄한다 (예를 들어, 약 37°C 는 36°C 내지 38°C 를 지칭함). 대조적으로, 다른 것 없이 플러스 또는 마이너스의 사용은 나타낸 범위를 서술한다 (예를 들어, $33^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 는 32.5°C 내지 33.5°C 를 지칭함).
- [0032] 본원에 사용된 바와 같이, 수치 범위는 그 범위를 규정한 수를 포함한다 (예를 들어, 12-18개 뉴클레오티드는 12, 13, 14, 15, 16, 17 및 18개 뉴클레오티드를 포괄함).
- [0033] 본원에 사용된 용어 "단리된" 및 "정제된"은 대상 (예를 들어, 세포)이 그의 환경 (예를 들어, 세포 배양물, 생물학적 샘플 등)으로부터 제거된 (예를 들어, 분리된) 것을 지칭한다. "단리된" 대상은 이들과 회합된 다른 성분이 적어도 50% 없고, 바람직하게는 75% 없고, 보다 바람직하게는 적어도 90% 없고, 가장 바람직하게는 적어도 95% (예를 들어, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%) 없다.
- [0034] 용어 "개체" 및 "대상체"는 포유동물을 지칭한다. "포유동물"은 인간, 비-인간 영장류 (예를 들어, 원숭이), 농장 동물, 스포츠 동물, 설치류 (예를 들어, 마우스 및 래트) 및 애완동물 (예를 들어, 개 및 고양이)을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0035] 제약 조성물과 관련하여 본원에 사용된 용어 "용량"은 어느 한 시점에 대상체에 의해 취해지는 (그에게 투여되거나 또는 그가 받는) 조성물의 측정된 부분을 지칭한다.
- [0036] 용어 질환 또는 상태를 "치료하는"은 질환의 징후 또는 증상을 완화시키기 위한 노력으로 개체 (인간 또는 다른 포유동물)에게 1종 이상의 제약 조성물을 투여하는 것을 포함할 수 있는 프로토콜을 실행하는 것을 지칭한다. 따라서, "치료하는" 또는 "치료"는 징후 또는 증상의 완전한 완화를 요구하지 않고, 치유를 요구하지 않으며, 구체적으로 개체에 대해 완화적 효과만을 갖는 프로토콜을 포함한다. 본원에 사용되고 관련 기술분야에서 널리 이해되는 바와 같이, "치료"는 임상 결과를 포함한 유익하거나 목적하는 결과를 수득하기 위한 접근법이다. 유익하거나 목적하는 임상 결과는 1종 이상의 증상의 완화 또는 호전, 질환 정도의 감소, 질환의 안정화된 (즉, 악화되지 않는) 상태, 질환 확산의 예방, 질환 진행의 지연 또는 둔화, 질환 상태의 호전 또는 완화 및 관해 (부분적이든 전체적이든)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0037] 면역 반응을 "자극하는 것"은 신생 면역 반응을 도출하는 것 (예를 들어, 초기 백신접종 요법의 결과로서) 또는 기존 면역 반응을 증진시키는 것 (예를 들어, 부스터 백신접종 요법의 결과로서)으로부터 발생할 수 있는, 면역 반응을 증가시키는 것을 의미한다. 일부 실시양태에서, 면역 반응을 자극하는 것은 CD4^{+} T 헬퍼 세포 증식을 자극하는 것; 시토카인 생산을 자극하는 것; B 림프구 증식을 자극하는 것; 항체 생산을 자극하는 것; CD8^{+} 세포독성 T 세포 증식을 자극하는 것; 및 감염된 세포의 세포용해를 자극하는 것으로 이루어진 군 중 하나 이상을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 일부 바람직한 실시양태에서, 면역 반응을 자극하는 것은 대상체에서 항원-특이적 항체 반응을 증가시키는 것을 포함한다. 바람직하게는, 항원-특이적 항체 반응을 증가시키는 것은 항원-특이적 항체의 농도를 투여전 수준보다 적어도 2, 3 또는 4배 더 높게 증가시키는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항원-특이적 항체 반응을 증가시키는 것은 항원-특이적 항체의 농도를 최소 수준 초과로, 바람직하게는 혈청방어 수준 초과로 증가시키는 것을 포함한다.
- [0038] 온도-감수성 작용제
- [0039] 본 개시내용의 특정 측면은 1개 이상의 세포에서 온도-감수성 작용제 (예를 들어, 온도-감수성 치료제)의 활성을 일시적으로 유도하는 것에 관한 것이다. 온도-감수성 작용제의 활성은 작용제의 임의의 목적하는 활성화, 복제 또는 증가된 발현을 지칭한다. 본원에 사용된 용어 "온도-감수성 작용제"는 상이한 온도에서 상이한 수준

의 기능성을 갖는 임의의 핵산 또는 폴리펩티드를 지칭한다. 예시적인 온도-감수성 작용제는 비제한적으로 온도-감수성 바이러스 벡터, 온도-감수성 자기-복제 RNA 및 온도-감수성 폴리펩티드를 포함한다.

[0040] 본원에 사용된 용어 "허용 온도"는 본 개시내용의 온도-감수성 작용제의 활성이 유도되는 임의의 온도를 지칭한다. 전형적으로, 허용 온도는 대상체의 정상 체온이 아니다. 인간 대상체의 정상 체온은 약 $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 이다. 온도-감수성 작용제에 따라, 허용 온도는 대상체의 정상 체온보다 더 높거나 더 낮은 온도일 수 있다. 일부 측면에서, 온도-감수성 작용제에 대한 허용 온도는 30°C 내지 36°C 의 범위이다. 일부 실시양태에서, 허용 온도는 약 31°C 내지 약 35°C 또는 32°C 내지 34°C ($33^{\circ}\text{C} \pm 1.0^{\circ}\text{C}$)이다. 일부 바람직한 실시양태에서, 허용 온도는 $33^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 이다. 이에 따라, 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 온도-감수성 자기-복제 RNA에 대한 비-허용 온도는 36°C 초과이다. 일부 바람직한 실시양태에서, 비-허용 온도는 $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 이다.

[0041] 일부 실시양태에서, 허용 온도에서 유도된 온도-감수성 작용제의 활성은 비-허용 온도에서 감소되거나 억제된다. 본원에 사용된 용어 "비-허용 온도"는 본 개시내용의 온도-감수성 작용제의 활성이 유도되지 않는 임의의 온도를 지칭한다. 온도-감수성 작용제는 온도-감수성 작용제의 활성이 최적 허용 온도에서의 활성 수준보다 적어도 95% 더 적거나, 적어도 90% 더 적거나, 적어도 85% 더 적거나, 적어도 80% 더 적거나, 적어도 75% 더 적거나 또는 적어도 50% 더 적은 경우에는 유도되지 않는다. 전형적으로, 비-허용 온도는 대상체의 정상 체온이다. 온도-감수성 작용제에 따라, 비-허용 온도는 또한 대상체의 정상 체온보다 더 높거나 더 낮은 온도일 수 있다.

[0042] 온도-감수성 바이러스 벡터

[0043] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 온도-감수성 치료제는 온도-감수성 바이러스 벡터를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 허용 온도에서 유도된 온도-감수성 바이러스 벡터의 활성은 벡터의 복제를 포함할 수 있다. 본원에 사용된 용어 "온도-감수성 바이러스 벡터"는 상이한 온도에서 상이한 수준의 기능성을 갖는 임의의 바이러스 벡터를 지칭한다. 예시적인 온도-감수성 바이러스 벡터는 비제한적으로 센다이 바이러스 벡터, 아데노 연관 바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터 또는 알파바이러스 벡터를 포함한다. 예시적인 온도-감수성 알파바이러스 벡터는 비제한적으로 베네수엘라 말 뇌염 바이러스 벡터, 신드비스 바이러스 벡터 및 샘키키 포레스트 바이러스 벡터를 포함한다.

[0044] 본 개시내용의 일부 실시양태에서, 온도-감수성 바이러스 벡터는 이중 핵산 (예를 들어, 바이러스 벡터와 관련된 외래 핵산)을 포함한다. 핵산은 유전자 요소를 포함할 수 있다. 본원에 사용된 용어 "유전자 요소"는 관심 RNA 또는 폴리펩티드를 코딩하는 임의의 핵산을 지칭한다. 예시적인 유전자 요소는 비제한적으로 관심 유전자 (GOI), 관심 유전자의 우성-음성 형태, 인공 단백질, 예컨대 상이한 단백질 도메인을 융합시킴으로써 제조된 하이브리드 단백질을 코딩하는 인공 유전자, 비-코딩 RNA, siRNA, shRNA 및 엔도뉴클레아제 편집 시스템을 포함한다. 일부 실시양태에서, 엔도뉴클레아제 편집 시스템은 ZFN 시스템, TALEN 시스템 및 CRISPR/CAS9 시스템으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, GOI는 비제한적으로 인간 뉴로게닌-3 (NGN3), 인간 ETS 전위 변이체 2 (ETV2), 뇌-유래 신경영양 인자 (BDNF) 및 신경 성장 인자 (NGF)로부터 선택된 단백질을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 관심 단백질은 에리트로포이에틴 (EPO) 또는 과립구 콜로니 자극 인자 (G-CSF)이다. 다른 실시양태에서, 관심 단백질은 효소 대체 요법을 위한 효소, 예컨대 아데노신 데아미나제 (ADA)이다. 일부 실시양태에서, 관심 단백질은 감염성 질환에 대한 백신접종의 목적을 위한 병원성 유기체, 예컨대 바이러스, 원충 또는 박테리아에 의해 코딩되는 항원이다.

[0045] 본 개시내용의 온도-감수성 바이러스 벡터에 대한 허용 온도는 전형적으로 30°C 내지 36°C 또는 38°C 내지 50°C 의 범위이다. 일부 실시양태에서, 허용 온도는 약 31°C 내지 약 35°C 또는 32°C 내지 34°C ($33^{\circ}\text{C} \pm 1.0^{\circ}\text{C}$)이다. 일부 바람직한 실시양태에서, 허용 온도는 $33^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 이다. 이에 따라, 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 온도-감수성 바이러스 벡터에 대한 비-허용 온도는 36°C 초과 및 38°C 미만이다. 일부 바람직한 실시양태에서, 비-허용 온도는 $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 이다.

[0046] 본원에 개시된 바와 같이, 세포는 허용 온도에서 온도-감수성 작용제가 효과를 유도하기에 충분한 기간 동안 유지될 수 있다. 일부 실시양태에서, 온도-감수성 바이러스 벡터는 유전자 요소를 포함하고, 효과는 유전자 요소의 증가된 발현을 포함하며, 여기서 유전자 요소의 발현은 세포에서 생물학적 효과를 생성하는 RNA 또는 폴리펩티드의 생산을 유발한다. 일부 바람직한 실시양태에서, 효과는 치료 효과이다.

[0047] 온도-감수성 자기-복제 RNA

[0048] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 온도-감수성 치료제는 온도-감수성 자기-복제 RNA를 포함할 수 있다. 본원

에 사용된 용어 "온도-감수성 자기-복제 RNA"는 상이한 온도에서 상이한 수준의 기능성을 갖는 임의의 자기-복제 RNA를 지칭한다.

- [0049] 일부 실시양태에서, 온도-감수성 자기-복제 RNA는 바이러스 입자 형성에 요구되는 구조 단백질을 코딩하는 DNA를 제거함으로써 (Petrakova et al., 2005), 알파바이러스, 에컨대 베네수엘라 말 너염 바이러스 (VEEV), 신드비스 바이러스 (SINV) 및 샘키 포레스트 바이러스 (SFV)로부터 통상적으로 제조되는 단일-가닥 RNA인 자기-복제 RNA를 조작함으로써 생성된다. 일부 실시양태에서, 자기-복제 RNA는 비구조 단백질 (nsP)을 코딩하며, 이는 RNA-의존성 RNA 폴리머라제로서 기능하여 자기-복제 RNA 자체를 복제하고 번역을 위한 전사체를 생산한다. 일부 실시양태에서, 자기-복제 RNA는 또한 관심 단백질을 코딩하는 관심 유전자 (GOI) 및 다른 유전자 요소를 포함할 수 있다. 이론에 얽매이는 것을 원하지는 않지만, 일부 실시양태에서, RNA의 그의 양성 피드백 생산으로 인해, 자기-복제 RNA는 GOI를 높은 수준으로 발현할 수 있다. 일부 실시양태에서, 온도-감수성 자기-복제 RNA는 nsP를 코딩하는 유전자를 돌연변이시킴으로써 생성될 수 있다.
- [0050] 일부 실시양태에서, 온도-감수성 자기-복제 RNA는 네이키드 RNA (즉, 합성 RNA)로서 포유동물 세포로 전달될 수 있다. 일부 실시양태에서, 온도-감수성 자기-복제 RNA는 나노입자에 의해 캡슐화된 네이키드 RNA (즉, 합성 RNA)로서 포유동물 세포로 전달될 수 있다. 일부 실시양태에서, 나노입자는 특이적 세포 유형, 조직, 기관, 암, 종양 또는 비정상적 세포를 표적화하도록 조작된다. 일부 실시양태에서, 온도-감수성 자기-복제 RNA는 소실된 바이러스 구조 단백질을 패키징 헬퍼 세포에 의해 보충함으로써 생성될 수 있는 바이러스 입자로서 포유동물 세포로 전달될 수 있다. 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 특이적 세포 유형, 조직, 기관, 암, 종양 또는 비정상 세포를 표적화하도록 조작된다.
- [0051] 온도-감수성 작용제가 온도-감수성 자기-복제 RNA인 경우에, 허용 온도에서 유도된 온도-감수성 자기-복제 RNA의 활성화는 RNA의 복제를 포함할 수 있다.
- [0052] 일부 측면에서, 본 개시내용의 온도-감수성 자기-복제 RNA에 대한 허용 온도는 전형적으로 30℃ 내지 36℃의 범위이다. 일부 실시양태에서, 허용 온도는 약 31℃ 내지 약 35℃ 또는 32℃ 내지 34℃ (33℃ ± 1.0℃)이다. 일부 바람직한 실시양태에서, 허용 온도는 33℃ ± 0.5℃이다. 이에 따라, 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 온도-감수성 자기-복제 RNA에 대한 비-허용 온도는 36℃ 초과이다. 일부 바람직한 실시양태에서, 비-허용 온도는 37℃ ± 0.5℃이다.
- [0053] 다른 측면에서, 본 개시내용의 온도-감수성 자기-복제 RNA에 대한 허용 온도는 전형적으로 38℃ 내지 50℃의 범위이다. 이에 따라, 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 온도-감수성 자기-복제 RNA에 대한 비-허용 온도는 36℃ 초과 및 38℃ 미만이다. 일부 바람직한 실시양태에서, 비-허용 온도는 37℃ ± 0.5℃이다.
- [0054] 온도-감수성 폴리펩티드
- [0055] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 온도-감수성 치료제는 온도-감수성 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 본원에 사용된 용어 "온도-감수성 폴리펩티드"는 상이한 온도에서 상이한 수준의 기능성을 갖는 임의의 온도-감수성 폴리펩티드를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 온도-감수성 폴리펩티드는 온도-감수성 항체일 수 있다. 다른 실시양태에서, 온도-감수성 폴리펩티드는 전사 인자, 성장 인자, 세포 표면 마커, 세포 융합 단백질, 후성적 변형제, 효소 및 구조 단백질로부터 선택되거나 이에 제한되지는 않는다.
- [0056] 온도-감수성 작용제가 온도-감수성 폴리펩티드인 경우에, 허용 온도에서 유도된 온도-감수성 단백질의 활성화는 단백질의 입체형태적 변화 (예를 들어, 구조 또는 형상에 대한 변화)를 포함할 수 있다.
- [0057] 본 개시내용의 온도-감수성 폴리펩티드에 대한 허용 온도는 전형적으로 30℃ 내지 36℃ 또는 38℃ 내지 50℃의 범위이다. 일부 실시양태에서, 허용 온도는 약 31℃ 내지 약 35℃ 또는 32℃ 내지 34℃ (33℃ ± 1.0℃)이다. 일부 바람직한 실시양태에서, 허용 온도는 33℃ ± 0.5℃이다. 이에 따라, 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 온도-감수성 자기-복제 폴리펩티드에 대한 비-허용 온도는 36℃ 초과 및 38℃ 미만이다. 일부 바람직한 실시양태에서, 비-허용 온도는 37℃ ± 0.5℃이다.
- [0058] 본 개시내용의 다양한 측면은 실질적으로 정제된 폴리펩티드에 관한 것이다. 실질적으로 정제된 폴리펩티드는 다른 폴리펩티드, 지질, 탄수화물 또는 자연적으로 회합된 다른 물질이 실질적으로 없는 폴리펩티드를 지칭할 수 있다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 다른 폴리펩티드, 지질, 탄수화물 또는 자연적으로 회합된 다른 물질이 적어도 50%, 예를 들어 적어도 80% 없다. 또 다른 실시양태에서, 폴리펩티드는 다른 폴리펩티드, 지질, 탄수화물 또는 자연적으로 회합된 다른 물질이 적어도 90% 없다. 또 다른 실시양태에서, 폴리펩티드는 다른 폴리

펩티드, 지질, 탄수화물 또는 자연적으로 회합된 다른 물질이 적어도 95% 없다.

[0059] 핵산 및 폴리펩티드

[0060] 본 개시내용의 특정 측면은 1개 이상의 세포에서 온도-감수성 치료제의 활성을 일시적으로 유도하는 것에 관한 것이며, 여기서 활성은 핵산 분자의 증가된 발현을 유도한다. 일부 실시양태에서, 핵산은 폴리뉴클레오티드이다. 폴리뉴클레오티드는 임의의 길이의 핵산 서열 (예컨대 선형 서열)을 지칭할 수 있다. 따라서, 폴리뉴클레오티드는 올리고뉴클레오티드 및 또한 염색체에서 발견된 유전자 서열을 포함한다. 올리고뉴클레오티드는 천연 포스포디에스테르 결합에 의해 연결된 복수의 연결된 뉴클레오티드이다. 올리고뉴클레오티드는 6 내지 300개 뉴클레오티드 길이의 폴리뉴클레오티드이다. 올리고뉴클레오티드 유사체는 올리고뉴클레오티드와 유사하게 기능하지만 비-자연 발생 부분을 갖는 모이어티를 지칭한다. 예를 들어, 올리고뉴클레오티드 유사체는 비-자연 발생 부분, 예컨대 변경된 당 모이어티 또는 당간 연결, 예컨대 포스포로티오에이트 올리고데옥시뉴클레오티드를 함유할 수 있다. 자연 발생 폴리뉴클레오티드의 기능적 유사체는 RNA 또는 DNA에 결합할 수 있고, 펩티드 핵산 (PNA) 분자를 포함한다.

[0061] 특정 실시양태에서, 핵산 분자 또는 폴리뉴클레오티드는 유전자 요소를 코딩한다. 이들 폴리뉴클레오티드는 관심 유전자를 코딩하는 DNA, cDNA 및 RNA 서열, 예컨대 mRNA 서열을 포함한다. 코딩 서열은 유전자 요소의 전사를 지시하는 이중 프로모터에 작동가능하게 연결될 수 있다. 프로모터는 핵산의 전사를 지시하는 핵산 제어 서열을 지칭할 수 있다. 프로모터는 전사 개시 부위 근처에 필요한 핵산 서열을 포함한다. 프로모터는 또한 임의로 원위 인핸서 또는 리프레서 요소를 포함한다. 구성적 프로모터는 연속적으로 활성이고 외부 신호 또는 분자에 의한 조절에 적용되지 않는 프로모터이다. 대조적으로, 유도성 프로모터의 활성은 외부 신호 또는 분자 (예를 들어, 전사 인자)에 의해 조절된다. 제1 핵산 서열이 제2 핵산 서열과 기능적 관계로 위치하는 경우에 제1 핵산 서열은 제2 핵산 서열에 작동가능하게 연결된다. 예를 들어, 프로모터가 코딩 서열의 전사 또는 발현에 영향을 미치는 경우에 프로모터는 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 일반적으로, 작동가능하게 연결된 핵산 서열은 인접하고, 2개의 단백질 코딩 영역을 연결하기 위해 필요한 경우에, 동일한 리딩 프레임 내에 있다. 이중 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드는 상이한 공급원 또는 종으로부터 유래된 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드를 지칭한다. 프로모터는 전사 개시 부위 근처에 필요한 핵산 서열, 예컨대 폴리머라제 II 유형 프로모터의 경우에 TATA 요소를 포함한다. 프로모터는 또한 전사 개시 부위로부터 많게는 수천 염기쌍 멀리 위치할 수 있는 원위 인핸서 또는 리프레서 요소를 임의로 포함한다. 한 예에서, 프로모터는 구성적 프로모터, 예컨대 CAG-프로모터 (Niwa et al., Gene 108(2):193-9, 1991) 또는 포스포글리세레이트 키나제 (PGK)-프로모터이다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 유도성 프로모터, 예컨대 테트라시클린-유도성 프로모터이다 (Masui et al., Nucleic Acids Res. 33:e43, 2005). 유전자 요소의 발현을 구동하는데 사용될 수 있는 다른 예시적인 프로모터는 lac 시스템, trp 시스템, tac 시스템, trc 시스템, 파지 람다의 주요 오퍼레이터 및 프로모터 영역, fd 코트 단백질의 제어 영역, SV40의 초기 및 후기 프로모터, 폴리오마, 아데노바이러스, 레트로바이러스, 바칼로바이러스 및 원숭이 바이러스로부터 유래된 프로모터, 3-포스포글리세레이트 키나제에 대한 프로모터, 효모 산 포스파타제의 프로모터 및 효모 알파-메이팅 인자의 프로모터를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 본 개시내용의 유전자 요소는 구성적 프로모터, 유도성 프로모터 또는 본원에 기재된 임의의 다른 적합한 프로모터 또는 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 용이하게 인식될 다른 적합한 프로모터의 제어 하에 있을 수 있다.

[0062] 일부 실시양태에서, 온도-감수성 작용제의 활성을 유도하는 것은 핵산 또는 폴리펩티드의 증가된 발현을 유도하며, 이는, 예를 들어 작용제와 접촉되지 않은 인간 세포에서의 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 발현에 비해 적어도 1.5배, 적어도 1.6배, 적어도 1.7배, 적어도 1.8배, 적어도 1.9배, 적어도 2.0배, 적어도 2.1배, 적어도 2.1배, 적어도 2.2배, 적어도 2.3배, 적어도 2.4배, 적어도 2.5배, 적어도 2.6배, 적어도 2.7배, 적어도 2.8배, 적어도 2.9배, 적어도 3.0배, 적어도 3.5배, 적어도 4.0배, 적어도 4.5배, 적어도 5.0배, 적어도 5.5배, 적어도 6.0배, 적어도 6.5배, 적어도 7.0배, 적어도 7.5배, 적어도 8.0배, 적어도 8.5배, 적어도 9.0배, 적어도 9.5배, 적어도 10배, 적어도 50배, 적어도 100배, 적어도 200배, 적어도 300배, 적어도 400배, 적어도 500배, 적어도 600배, 적어도 700배, 적어도 800배, 적어도 900배, 적어도 1,000배, 적어도 2,000배, 적어도 3,000배, 적어도 4,000배, 적어도 5,000배, 적어도 6,000배, 적어도 7,000배, 적어도 8,000배, 적어도 9,000배, 적어도 10,000배, 적어도 25,000배, 적어도 50,000배, 적어도 75,000배, 적어도 100,000배, 적어도 125,000배, 적어도 150,000배, 적어도 175,000배, 적어도 200,000배, 적어도 225,000배, 적어도 250,000배, 적어도 275,000배, 적어도 300,000배, 적어도 325,000배, 적어도 350,000배, 적어도 375,000배, 적어도 400,000배, 적어도 425,000배, 적어도 450,000배, 적어도 475,000배, 적어도 500,000배, 적어도 750,000배 또는 적어도 1,000,000배만큼 증가된 발현을 포함할 수 있다.

- [0063] 본 개시내용의 다양한 측면은 단리된 물질, 예컨대 단리된 핵산 또는 합성 mRNA 분자에 관한 것이다. 단리된 핵산은 다른 핵산 서열로부터 및 핵산이 자연 발생한 유기체의 세포로부터, 즉 다른 염색체 및 염색체의 DNA 및 RNA로부터 실질적으로 분리되거나 정제되었다. 따라서, 용어 "단리된"은 표준 핵산 정제 방법에 의해 정제된 핵산을 포괄한다. 상기 용어는 또한 숙주 세포에서의 재조합 발현에 의해 제조된 핵산뿐만 아니라 화학적으로 합성된 핵산을 포괄한다. 유사하게, 단리된 폴리펩티드는 단백질이 자연 발생한 유기체의 세포의 다른 폴리펩티드로부터 실질적으로 분리되거나 정제되었고, 숙주 세포에서의 재조합 발현에 의해 제조된 폴리펩티드뿐만 아니라 화학적으로 합성된 폴리펩티드를 포괄한다. 유사하게, 단리된 세포는 다른 세포 유형으로부터 실질적으로 분리되었다.
- [0064] 온도-감수성 작용제를 세포 내로 도입하는 방법
- [0065] 일부 실시양태에서, 1개 이상의 세포는 온도-감수성 작용제와 접촉된다. 접촉은 고체 및 액체 형태 둘 다를 포함한 직접적 물리적 회합으로의 배치를 지칭할 수 있다. "접촉"은 "노출"과 상호교환가능하게 사용될 수 있다. 일부 경우에, "접촉"은 핵산 분자를 세포 내로 형질감염시키는 것과 같은 형질감염을 포함한다. 일부 경우에, "접촉"은 온도-감수성 작용제를 1개 이상의 세포 내로 도입하는 것을 포함한다.
- [0066] 일부 실시양태에서, 온도-감수성 작용제는 폴리뉴클레오티드 (예를 들어, 자기-복제 RNA)이고, 폴리뉴클레오티드는 세포 내로 도입된다. 핵산 분자 또는 단백질을 세포 내로 도입하는 것은 핵산 분자 또는 단백질을 세포 내로 전달하는 임의의 수단을 포괄한다. 예를 들어, 핵산 분자는 세포 내로 형질감염, 형질도입 또는 전기천공될 수 있다. 일부 실시양태에서, 온도-감수성 작용제는 폴리펩티드 (예를 들어, 온도-감수성 폴리펩티드)이고, 폴리펩티드는 세포 내로 도입된다. 폴리펩티드의 세포 내로의 전달은, 예를 들어 단백질을 세포-침투 펩티드, 예컨대 단백질 전달 도메인을 갖는 펩티드 (예를 들어, HIV-1 Tat) 또는 폴리-아르기닌 펩티드 태그에 융합시킴으로써 달성될 수 있다 (Fuchs and Raines, Protein Science 14:1538-1544, 2005). 단백질 전달 도메인은 전형적인 세포내이입과는 독립적인 메카니즘에 의해 보다 큰 분자 (단백질, 핵산 분자 등)의 세포 내로의 진입을 용이하게 하는 작은 양이온성 펩티드를 지칭할 수 있다. 폴리-아르기닌 펩티드 태그는 보다 큰 분자 (예컨대, 단백질 및 핵산 분자)의 세포 내로의 전달을 용이하게 하는 아르기닌 잔기를 포함하는 짧은 펩티드 (일반적으로 7 내지 11개 잔기)를 지칭할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Fuchs and Raines, Protein Science 14:1538-1544, 2005] 참조).
- [0067] 온도-감수성 작용제를 사용한 핵산의 세포 내로의 도입은 온도-감수성 바이러스 벡터 (예컨대 통합 또는 비-통합 바이러스 벡터) 또는 온도-감수성 플라스미드 벡터를 사용하는 것을 수반할 수 있다. 각각의 이들 방법은 관련 기술분야에 기재되었고, 따라서 관련 기술분야의 통상의 기술자의 능력 내에 있다. 핵산을 인간 세포로 도입하는데 사용될 수 있는 각각의 방법의 간단한 개요가 본원에 제공된다. 벡터는 숙주 세포 내로 도입됨으로써 형질전환된 숙주 세포를 생성하는 핵산 분자를 지칭할 수 있다. 벡터는 숙주 세포에서 복제되도록 하는 핵산 서열, 예컨대 복제 기점 (DNA 합성 개시에 참여하는 DNA 서열)을 포함할 수 있다. 예를 들어, 발현 벡터는 삽입된 유전자 또는 유전자들의 전사 및 번역을 가능하게 하는데 필요한 조절 서열을 함유한다. 벡터는 또한 관련 기술분야에 공지된 1종 이상의 선택 마커 유전자 및 다른 유전자 요소를 포함할 수 있다. 벡터는, 예를 들어 바이러스 벡터 및 플라스미드 벡터를 포함할 수 있다.
- [0068] 허용 온도
- [0069] 허용 온도에서 1개 이상의 세포의 인큐베이션
- [0070] 본 개시내용의 특정 측면은 온도-감수성 작용제의 활성을 유도하기 위한 허용 온도에서 1개 이상의 세포를 인큐베이션함으로써 세포에서 온도-감수성 작용제의 활성을 일시적으로 유도하는 것에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 허용 온도는 표준 세포 배양 온도보다 더 높거나 더 낮을 수 있다. 예를 들어, 인간 및 설치류 세포는 전형적으로 약 37℃의 온도에서 배양된다. 따라서, 일부 실시양태에서, 허용 온도는 약 36.5℃보다 더 낮을 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 세포는 36℃, 35.5℃, 35℃, 34.5℃, 34℃, 33.5℃, 33℃, 32.5℃, 32℃, 31.5℃, 31℃, 30.5℃ 또는 30℃의 허용 온도에서 배양된다. 일부 바람직한 실시양태에서, 허용 온도는 30℃ 내지 36℃ 또는 31℃ 내지 35℃ 또는 32℃ 내지 34℃ 또는 32.5℃ 내지 33.5℃이다. 일부 실시양태에서, 허용 온도는 (하한치) 30℃, 31℃, 32℃, 33℃, 34℃ 또는 35℃ 이상이고, (상한치) 36℃, 35℃, 34℃, 33℃, 32℃ 또는 31℃ 이하이다.
- [0071] 다른 실시양태에서, 허용 온도는 약 37.5℃보다 더 높을 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 세포는 38℃, 38.5℃, 39℃, 39.5℃, 40℃, 40.5℃, 41℃, 41.5℃, 42℃, 42.5℃, 43℃, 43.5℃, 44℃, 44.5℃, 45℃,

45.5℃, 46℃, 46.5℃, 47℃, 47.5℃, 48℃, 48.5℃, 49℃, 49.5℃ 또는 50℃의 허용 온도에서 배양된다.

[0072] 일부 실시양태에서, 허용 온도에서 인큐베이션한 후에, 1개 이상의 세포는 온도-감수성 작용제의 활성이 감소되거나 억제되는 비-허용 온도에서 배양된다. 예를 들어, 온도-감수성 바이러스 벡터의 복제가 억제될 수 있고, 온도-감수성 자기-복제 RNA의 복제가 억제될 수 있으며, 온도-감수성 폴리펩티드에 대한 입체형태적 변화가 억제될 수 있다. 이러한 온도 이동은 온도-감수성 작용제의 활성이 일시적으로 유도된 다음 억제되도록 한다. 다른 실시양태에서, 1개 이상의 세포는 허용 온도에서 배양된 후에 대상체에게 투여된다. 1개 이상의 세포는 허용 온도에서 배양물로부터 직접 대상체에게 투여될 수 있거나 또는 먼저 배양물에서 허용 온도로부터 비-허용 온도로 옮겨진 후, 대상체에게 투여될 수 있다. 특정 실시양태에서, 온도-감수성 작용제는 후속적으로 분해된다. 예를 들어, 비-통합 온도-감수성 바이러스 벡터, RNA 및 폴리펩티드가 분해될 것이다.

[0073] 대상체의 심부 체온을 허용 온도로 저하시키는 것

[0074] 본 개시내용의 특정 측면은 대상체의 심부 체온을 온도-감수성 작용제의 활성을 유도하기 위한 허용 온도로 저하시킴으로써 대상체의 세포에서 온도-감수성 치료제의 활성을 일시적으로 유도하는 것에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 대상체의 심부 체온은 표적-온도 관리 (TTM) 절차를 사용하여 저해된다. TTM 절차는 일정 지속 기간 동안 대상체에서 특정 체온을 달성하고 유지하도록 설계된다. 이러한 절차는 다양한 급성 건강 문제, 예컨대 심장 발작 및 졸중으로 인한 부정적 영향을 감소시키기 위해 이전에 치료적으로 사용되었다. 이들 절차를 사용하는 장비 및 일반적 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있고, 본원에 기재된 방법에 사용될 수 있다. 절차는 카테터 냉각, 블랭킷 냉각 및 신체 주위의 얼음 적용을 포함한 다수의 방법을 사용하여 수행될 수 있다.

[0075] 대상체의 심부 체온을 허용 온도로 저하시킨 후에, 대상체의 심부 체온은 온도-감수성 작용제의 활성을 유도하기에 충분한 시간 동안 허용 온도에서 유지된다. 후속적으로 대상체의 심부 체온은 온도-감수성 작용제의 활성이 감소되거나 억제되는 비-허용 온도인 정상 심부 체온으로 복귀된다. 특정 실시양태에서, 온도-감수성 작용제는 후속적으로 분해된다. 예를 들어, 비-통합 온도-감수성 바이러스 벡터, RNA 및 폴리펩티드는 비-허용 온도에서 분해될 것이다. 본원에 사용된 용어 "체온"은 문맥이 달리 명확하게 나타내지 않는 한 "심부 체온"을 지칭한다.

[0076] 대상체의 표면 체온을 허용 온도에서 유지하는 것

[0077] 본 개시내용의 특정 측면은 대상체의 신체 영역에서의 자연 온도 차이를 이용하는 것에 관한 것이다. 예를 들어, 인간 대상체의 신체 표면에서의 또는 그 근처에서의 온도 (표면 체온)는 약 31-34℃이며, 이는 약 37℃인 인간 대상체의 심부 체온보다 더 낮다. 본원에 사용된 대상체의 신체 "표면"은 표피, 진피, 피하 또는 근육 중 하나 이상을 지칭한다. 대상체의 신체 "피부"는 표피 및 진피 중 하나 또는 둘 다를 지칭한다. 따라서, 대상체의 신체 표피, 진피 또는 피하에 대한 적합한 투여 경로는 피내 및 피하 투여를 포함한다. 대상체의 신체 표면 근처의 근육에 대한 적합한 투여 경로는 근육내 투여이다.

[0078] 예를 들어, ts-작용제는 대상체의 피부의 특정 영역으로 (백신접종의 경우) 또는 대상체의 피부의 보다 넓은 영역으로 (피부 질환 치료의 경우) 직접 전달된다. 피부 온도 (약 31-34℃)는 ts-작용제가 기능하도록 하는, ts-작용제에 대한 허용 온도이다. GOI의 장기간 발현을 위해 추가의 행위가 요구되지 않는다. ts-작용제의 기능의 종결이 필요하거나 바람직한 경우에, 열의 국부 적용 (예를 들어, 열 패치 또는 가열 블랭킷)에 의해 또는 경도 치료 고온요법 (예를 들어, 따뜻한 욕조 또는 뜨거운 사우나)에 의해 치료되는 피부의 온도를 증가시키고 비-허용 온도 (>37℃)에서 일시적으로 유지한다. 이 치료 절차는, 심부 체온이 비-허용 온도 (약 37℃)이기 때문에, ts-작용제가 신체의 의도된 영역에서만 기능한다는 점에서 안전하다. 일부 실시양태에서, 대상체의 표면 체온이 정상보다 더 높으면, 표면 체온은 ts-작용제의 허용 온도에 매칭되도록 저해된다.

[0079] 대상체의 상기도 온도를 허용 온도에서 유지하는 것

[0080] 인간 대상체의 표면 체온과 같이, 인간 대상체의 상기도 및 상부 기관의 온도는 ts-작용제가 기능하도록 하는, ts-작용제에 대한 허용 온도이다. 즉, 인간 대상체의 비강 및 상부 기관의 온도는 약 32℃이고, 인간 대상체의 구역기관까지의 온도는 약 35℃이다 (McFadden et al., 1985). 이와 같이, 인간 환자의 상기도 (비강, 인두 및/또는 후두) 및/또는 상부 기관의 세포에 비강내로 투여된 ts-작용제는 인간 환자의 심부 체온을 저하시키지 않으면서 기능적이다. 비강내 투여는 취입, 흡입 또는 점적주입에 의해 수행될 수 있다.

[0081] 비-허용 온도

[0082] 1개 이상의 세포를 비-허용 온도에서 인큐베이션하는 것

- [0083] 세포의 시험관내 배양은 통상적으로 세포가 유래된 대상체의 정상 체온에서 수행된다. 예를 들어, 포유동물 세포, 예컨대 인간 세포 및 마우스 세포는 통상적으로 약 37℃에서 배양된다. 본 개시내용의 특정 측면은 대상체의 정상 체온에서 기능하지 않는 (예를 들어, 유전자를 복제하거나 발현하지 않는) 온도-감수성 작용제에 관한 것이다. 따라서, 대상체의 정상 체온은 온도-감수성 작용제에 대한 비-허용 온도이다. 일부 바람직한 실시양태에서, 비-허용 온도는 37℃ ± 0.5℃이다.
- [0084] 대상체의 정상 심부 체온
- [0085] 일부 실시양태에서, 온도-감수성 작용제, 온도-감수성 작용제와 접촉된 세포 또는 온도-감수성 작용제를 보유하는 세포는 정상 체온에서 유지되는 대상체 신체 내로 도입된다. 본 개시내용의 특정 측면은 유기체의 이러한 정상 체온 (비-허용 온도)에서 기능하지 않는, 예를 들어 유전자를 복제하거나 발현하지 않는 온도-감수성 작용제에 관한 것이다. 이러한 특색은 대상체의 생애 동안 온도-감수성 작용제의 바람직하지 않은 작용 또는 재활성화를 방지하는 안전 메커니즘을 제공한다.
- [0086] 인간 세포
- [0087] 본 개시내용의 특정 측면은 비제한적으로 인간 성체 세포를 포함한 1개 이상의 인간 세포에서 온도-감수성 치료제의 활성을 일시적으로 유도하는 것에 관한 것이다. 특정 실시양태에서, 1개 이상의 인간 세포는 치료제를 사용한 치료를 필요로 하는 대상체 내의 세포이다.
- [0088] 다양한 인간 세포가 본원에 기재된 방법에서 사용된다. 본원에 개시된 용어 "인간 세포(들)"는 배아 발생 동안 및 그 후에 인간 신체 전반에 걸쳐 발견되는 임의의 세포(들), 예컨대 인간 배아 세포, 줄기 세포, 만능 세포, 분화 세포, 성숙 세포, 체세포 및 성체 세포를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 인간 세포는 인간 성체 세포이다. 본원에 개시된 용어 "인간 성체 세포(들)"는 배아 발생 후 인간 신체 전반에 걸쳐 발견되는 임의의 세포(들) (즉, 비-배아 세포)를 지칭한다. 본 개시내용의 인간 세포는 비제한적으로 정자 세포, 난모세포, 수정된 난모세포 (즉, 접합자), 배아 세포, 성숙 세포, 분화 세포, 체세포, 전구 세포, 배아 줄기 (ES) 세포, 유도된 만능 줄기 (iPS) 세포, 성체 줄기 세포, 체세포 줄기 세포 및 조직 줄기 세포를 포함한다. 체세포 줄기 세포 또는 조직 줄기 세포로도 공지된 성체 줄기 세포는 배아 발생 후 신체 전반에 걸쳐 발견되는 미분화 세포를 지칭할 수 있으며, 이는 세포 분열에 의해 증식하여 죽어가는 세포를 보충하고 손상된 조직을 재생시킨다. 전구 세포는 특정 유형의 세포 또는 세포 계통으로 분화되는 협능 또는 단능 세포를 지칭할 수 있다. 전구 세포는 줄기 세포와 유사하지만, 보다 분화되고, 제한적 자기-재생을 나타낸다. 예시적인 성체 줄기 세포, 조직 줄기 세포 및/또는 전구 세포는 비제한적으로 조혈 줄기 세포, 중간엽 줄기 세포, 지방 줄기 세포, 뉴런 줄기 세포, 장 줄기 세포, 피부 줄기 세포 및 배세포 (예컨대, 정자 세포 및 난모세포)를 포함할 수 있다.
- [0089] 인간 세포는 또한 비제한적으로 체세포, 성숙 세포 및 분화 세포를 포함할 수 있다. 체세포는 비제한적으로 배세포, 조직 줄기 세포, 전구 세포, 유도된 만능 줄기 (iPS) 세포 및 분화 세포를 포함한 신체의 임의의 세포를 지칭할 수 있다. 예시적인 체세포, 성숙 세포 및/또는 분화 세포는 비제한적으로 표피 세포, 섬유모세포, 림프구, 간세포, 상피 세포, 근세포, 연골세포, 골세포, 지방세포, 심근세포, 췌장 β 세포, 각질세포, 적혈구, 말초 혈액 세포, 골수 세포, 신경세포, 성상세포 및 배세포를 포함할 수 있다. 배세포는 성적으로 번식하는 유기체의 생식자 (즉, 난자 및 정자)를 생성하는 세포를 지칭할 수 있다. 특정 실시양태에서, 배세포는 비제한적으로 난모세포 및 정자 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 체세포, 성숙 세포 및/또는 분화 세포는 또한 비제한적으로 착상전 배아를 포함한다.
- [0090] 인간 세포는 또한 비제한적으로 체대혈, 조혈 줄기 세포, CD34+ 세포, 중간엽 줄기 세포, 혈관 내피 줄기 세포, 조직 줄기 세포, 과립구, 림프구, T-세포, B-세포, 단핵구, 대식세포, 수지상 세포, 적혈구, 망상적혈구 및 거핵구로부터 유래된 세포를 포함할 수 있다. 인간 세포는 또한 비제한적으로 인간 기원의 비정상적 세포, 예컨대 암 세포, 종양 세포, 악성 세포, 양성 세포, 과형성 세포, 저형성 세포 및 비정형 세포를 포함할 수 있다. 인간 세포는 또한 비제한적으로 이배체 세포, 반수체 세포, 사배체 세포, 다배수체 세포, 핵형 이상을 갖는 세포, 염색체 이상을 갖는 세포, 돌연변이된 유전자를 갖는 세포, 비정상적 텔로미어 길이를 갖는 세포, 짧은 텔로미어를 갖는 세포 및 긴 텔로미어를 갖는 세포를 포함할 수 있다. 인간 세포는 또한 비제한적으로 후성적 이상을 갖는 세포, 예컨대 저메틸화 게놈 영역을 갖는 세포, 과메틸화 게놈 영역을 갖는 세포, 비정상적 히스톤 변형, 예컨대 아세틸화 및 메틸화를 갖는 세포를 포함할 수 있다.
- [0091] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 대상체는 비-인간 동물이다. 비-인간 동물은 인간 이외의 모든 동물을 지칭

할 수 있다. 비-인간 동물은 비-인간 영장류, 농장 동물, 예컨대 돼지, 소 및 가금류, 스포츠 동물 또는 애완 동물, 예컨대 개, 고양이, 말, 햄스터, 설치류, 예컨대 마우스, 또는 동물원 동물, 예컨대 사자, 호랑이 또는 곰을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 한 실시양태에서, 비-인간 동물은 마우스이다.

[0092] 온도-감수성 작용제의 치료 용도

[0093] 본 개시내용의 온도-감수성 작용제는 비제한적으로 경구 투여, 설하 투여, 협측 투여, 국소 투여, 직장 투여, 흡입을 통한 투여, 경피 투여, 피하 주사, 정맥내 (IV) 주사, 동맥내 주사, 근육내 주사, 심장내 주사, 골내 주사, 피내 주사, 복강내 주사, 경점막 투여, 질 투여, 유리체내 투여, 관절내 투여, 관절주위 투여, 국부 투여, 표피 투여 또는 그의 임의의 조합을 포함한 관련 기술분야에 공지된 임의의 적합한 방법에 의해 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 조성물은 피하 주사 및/또는 정맥내 주사에 의해 투여된다. 일부 실시양태에서, 조성물은 대상체의 비장 내로의 주사에 의해 투여된다.

[0094] 일부 측면에서, 본 개시내용의 방법은 치료 유효량의 온도-감수성 작용제의 사용을 수반한다. 작용제의 치료 유효량은 의도된 목적을 달성하기에 충분한 치료제의 양을 지칭할 수 있다. 예를 들어, 질환 또는 상태를 치료하기 위한 인간 세포에서의 온도-감수성 작용제의 치료 유효량은 질환 또는 상태 또는 질환 또는 상태의 1종 이상의 증상을 감소시키기에 충분한 양이다. 치료 유효량은 일부 예에서 질환 또는 상태 또는 질환 또는 상태의 증상을 100% 치료하지는 않을 수 있다. 그러나, 질환 또는 상태의 임의의 공지된 특색 또는 증상의 감소, 예컨대 적어도 25%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%의 감소는 치료적일 수 있다.

[0095] 주어진 치료제의 치료 유효량은 작용제의 성질, 투여 경로, 치료제를 받는 대상체의 크기 및/또는 연령 및 투여 목적과 같은 인자에 따라 달라질 것이다. 각각의 개별 경우에서의 치료 유효량은 관련 기술분야에 확립된 방법에 따라 통상의 기술자에 의해 과도한 실험 없이 실험적으로 결정될 수 있다.

[0096] 대상체는 인간 및 비-인간 포유동물을 포함하는 카테고리인 살아있는 다세포 척추동물 유기체를 지칭할 수 있다. 일부 실시양태에서, 대상체는 인간이다. 본원에 제공된 방법을 사용하여 치료될 수 있는 대상체는 포유동물 대상체, 예컨대 수의학적 또는 인간 대상체를 포함할 수 있다. 대상체는 수정란, 접합자, 착상전 배아, 배아, 태아, 신생아, 영유아, 소아 및/또는 성인을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 치료될 대상체는 요법, 특히 본 개시내용의 온도-감수성 작용제의 투여를 포함하는 요법으로부터 이익을 얻을 대상체를 선택하는 것과 같이 선택된다.

[0097] 본 개시내용의 제약 조성물은 ts-작용제, 예컨대 치료 ts-작용제 및 1종 이상의 추가의 화합물을 포함한다. 본원에 사용된 용어 "제약상 허용되는 담체" 및 "제약상 허용되는 비히클"은 1종 이상의 추가의 화합물(들) (즉, ts-작용제 이외의 화합물)을 지칭한다. 본 개시내용에서 사용하기에 적합한 제약상 허용되는 담체는 통상적이다. 특히, 온도-감수성 작용제를 포함하는 조성물의 제약 전달에 적합한 조성물 및 제제는 이전에 기재된 바와 같다 (예를 들어, 문헌 [Gennaro, A.R. (editor) Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA, 18th edition (1990); 및 Felton, L.A. (editor) Remington Essentials of Pharmaceutics, Pharmaceutical Press, London, United Kingdom, 1st edition, (2013)] 참조).

[0098] 일반적으로, 담체의 성질은 사용될 특정한 투여 방식에 좌우될 것이다. 예를 들어, 비경구 제제는 통상적으로 제약상 및 생리학상 허용되는 유체, 예컨대 물, 생리 염수, 평형 염 용액, 수성 텍스트로스, 글리세롤 등을 비히클로서 포함하는 주사가능한 유체를 포함한다. 고체 조성물 (예를 들어, 분말, 환제, 정제 또는 캡슐 형태)의 경우, 통상적인 비-독성 고체 담체는, 예를 들어 제약 등급의 만니톨, 락토스, 전분 또는 스테아르산마그네슘을 포함할 수 있다. 생물학적으로 중성인 담체에 추가로, 투여될 제약 조성물은 소량의 비-독성 보조 물질, 예컨대 습윤제 또는 유화제, 보존제 및 pH 완충제 등, 예를 들어 아세트산나트륨 또는 소르비탄 모노라우레이트를 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 제약 조성물은 ts-작용제, 예컨대 치료 ts-작용제 및 ts-작용제의 세포 내로의 혼입을 용이하게 하는 1종 이상의 추가의 화합물을 포함한다. RNA-기반 ts-작용제의 경우에, ts-작용제는 나노입자에 캡슐화된다. 일부 경우에, 나노입자는 지질-기반이다 (예를 들어, 리포솜타민).

[0099] 환자 치료에 가장 적절한 치료 용량 및 요법은 치료될 질환 또는 상태 및 환자의 체중 및 다른 파라미터에 따라 달라질 것이다. 유효 투여량 및 치료 프로토콜은 통상적인 수단에 의해 결정될 수 있으며, 실험실 동물에서 저용량으로 출발한 다음, 효과를 모니터링하면서 투여량을 증가시키고, 투여 요법을 체계적으로 변화시킨다. 주어진 대상체에 대한 최적 투여량을 결정하는 경우에 임상가가 수많은 인자를 고려할 수 있다. 인자는 환자의

크기, 환자의 연령, 환자의 일반적 상태, 치료될 특정한 질환, 질환의 중증도, 환자에서의 다른 약물의 존재 등을 포함한다. 시험 투여량은 동물 연구 및 임상 문헌의 결과를 고려한 후에 선택될 것이다.

[0100] 골수 세포의 동원

[0101] 일부 실시양태에서, 방법은 골수 세포 (비제한적으로 CD34+ 세포, 조혈 줄기 세포, 중간엽 줄기 세포, 내피 줄기 세포를 포함함)를 대상체의 비장 및 말초 혈액으로 동원하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 치료 유효량의 본 개시내용의 온도-감수성 작용제 (예를 들어, 온도-감수성 치료제)를, 온도-감수성 작용제가 핵산을 비장 내의 1개 이상의 골수 세포 (비제한적으로 CD34+ 세포, 조혈 줄기 세포, 중간엽 줄기 세포, 내피 줄기 세포를 포함함)로 전달하기에 적합한 조건 하에 투여하는 것을 포함한다.

[0102] 본원에 개시된 방법의 일부 실시양태에서, 골수 세포 (비제한적으로 CD34+ 세포, 조혈 줄기 세포, 중간엽 줄기 세포, 내피 줄기 세포를 포함함)를 비장 및 말초 혈액으로 동원하는 것은 대상체에게 치료 유효량의 시토카인 및/또는 화학요법제를 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 골수 세포 (비제한적으로 CD34+ 세포, 조혈 줄기 세포, 중간엽 줄기 세포, 내피 줄기 세포를 포함함)를 비장 및 말초 혈액으로 동원하는 것은 대상체에게 치료 유효량의 시토카인을 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 골수 세포 (비제한적으로 CD34+ 세포, 조혈 줄기 세포, 중간엽 줄기 세포, 내피 줄기 세포를 포함함)를 비장 및 말초 혈액으로 동원하는 것은 대상체에게 치료 유효량의 화학요법제를 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 골수 세포 (비제한적으로 CD34+ 세포, 조혈 줄기 세포, 중간엽 줄기 세포, 내피 줄기 세포를 포함함)를 비장 및 말초 혈액으로 동원하는 것은 대상체에게 치료 유효량의 시토카인 및 화학요법제를 투여하는 것을 포함한다. 시토카인 및/또는 화학요법제는 비제한적으로 경구 투여, 설하 투여, 협측 투여, 국소 투여, 직장 투여, 흡입을 통한 투여, 경피 투여, 피하 주사, 정맥내 (IV) 주사, 동맥내 주사, 근육내 주사, 심장내 주사, 골내 주사, 피내 주사, 복강내 주사, 경점막 투여, 질 투여, 유리체내 투여, 관절내 투여, 관절주위 투여, 국부 투여, 표피 투여 또는 그의 임의의 조합을 포함한 관련 기술분야에 공지된 임의의 적합한 방법에 의해 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 시토카인 및/또는 케모카인은 피하 주사 및/또는 정맥내 주사에 의해 투여된다.

[0103] 일부 실시양태에서, 대상체의 골수 세포 (비제한적으로 CD34+ 세포, 조혈 줄기 세포, 중간엽 줄기 세포, 내피 줄기 세포를 포함함)는 조성물 (예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 임의의 나노입자 조성물)의 투여 적어도 4 주 전, 적어도 3주 전, 적어도 2주 전, 적어도 1주 전, 적어도 6일 전, 적어도 5일 전, 적어도 4일 전, 적어도 3일 전, 적어도 2일 전, 적어도 1일 전, 1일 미만 전, 적어도 18시간 전, 적어도 16시간 전, 적어도 12시간 전, 적어도 8시간 전, 적어도 6시간 전 또는 적어도 1시간 전에 동원된다. 일부 실시양태에서, 대상체의 골수 세포 (비제한적으로 CD34+ 세포, 조혈 줄기 세포, 중간엽 줄기 세포, 내피 줄기 세포를 포함함)는 조성물의 투여 전 연속 7일, 연속 5일, 연속 4일, 연속 3일, 연속 2일 동안 또는 1일 동안 동원된다. 일부 실시양태에서, 대상체의 골수 세포 (비제한적으로 CD34+ 세포, 조혈 줄기 세포, 중간엽 줄기 세포, 내피 줄기 세포를 포함함)는 조성물의 투여와 공동으로 동원된다.

[0104] 관련 기술분야에 공지된 골수 세포 (비제한적으로 CD34+ 세포, 조혈 줄기 세포, 중간엽 줄기 세포, 내피 줄기 세포를 포함함)를 동원할 수 있는 임의의 시토카인, 예컨대 비제한적으로 과립구-콜로니 자극 인자 (G-CSF), 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자 (GM-CSF), 에리트로포이에틴 (EPO), 트롬보포이에틴 (TPO), 줄기 세포 인자 (SCF), 부갑상선 호르몬 (PTH) 및 그의 임의의 조합이 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 시토카인은 G-CSF이다.

[0105] 일부 실시양태에서, G-CSF는 약 0.1 µg/kg 내지 약 100 µg/kg 또는 약 1.0 µg/kg 내지 약 10 µg/kg의 농도로 대상체에게 투여된다. 일부 실시양태에서, G-CSF는 약 2.5 µg/kg의 농도로 대상체에게 투여된다. 일부 실시양태에서, G-CSF는 약 10 µg/kg의 농도로 대상체에게 투여된다.

[0106] 관련 기술분야에 공지된 골수 세포 (비제한적으로 CD34+ 세포, 조혈 줄기 세포, 중간엽 줄기 세포, 내피 줄기 세포를 포함함)를 동원할 수 있는 임의의 화학요법제, 예컨대 비제한적으로 플레릭사포르, 시클로포스파미드 (CY), 파클리탁셀, 에토포시드, POL6326, BKT-140, TG-0054, NOX-A12, SEW2871, BIO 5192, 보르테조미드, SB-251353, FG-4497 및 그의 임의의 조합이 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 화학요법제는 플레릭사포르이다.

[0107] 일부 실시양태에서, 플레릭사פור는 약 1 µg/kg 내지 약 1000 µg/kg 또는 약 75 µg/kg 내지 약 500 µg/kg의 농도로 대상체에게 투여된다. 일부 실시양태에서, 플레릭사פור는 약 150 µg/kg의 농도로 대상체에게 투여된다. 일부 실시양태에서, 플레릭사פור는 약 240 µg/kg의 농도로 대상체에게 투여된다.

[0108] 일부 실시양태에서, 골수 세포 (비제한적으로 CD34+ 세포, 조혈 줄기 세포, 중간엽 줄기 세포, 내피 줄기 세포

를 포함함)를 비장 및 말초 혈액으로 동원하는 것은 치료 유효량의 G-CSF 및 치료 유효량의 플레릭사포르를 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, G-CSF 및 플레릭사פור는 대상체에게 공투여된다. 일부 실시양태에서, G-CSF 및 플레릭사פור는 1일, 2일, 3일, 4일 또는 그 초과 동안 대상체에게 공투여된다. 일부 실시양태에서, G-CSF는 플레릭사포르 전에 대상체에게 투여된다. 일부 실시양태에서, G-CSF는 플레릭사포르 1일, 2일, 3일, 4일 또는 그 초과 전에 대상체에게 투여된다. 일부 실시양태에서, G-CSF는 플레릭사포르 1일, 2일, 3일, 4일 또는 그 초과 전에 대상체에게 투여되고, 이어서 G-CSF 및 플레릭사פור는 1일, 2일, 3일, 4일 또는 그 초과 동안 대상체에게 공투여된다. 일부 실시양태에서, 플레릭사פור는 G-CSF 전에 대상체에게 투여된다. 일부 실시양태에서, 플레릭사פור는 G-CSF 1일, 2일, 3일, 4일 또는 그 초과 전에 대상체에게 투여된다. 일부 실시양태에서, 플레릭사פור는 G-CSF 1일, 2일, 3일, 4일 또는 그 초과 전에 대상체에게 투여되고, 이어서 G-CSF 및 플레릭사פור는 1일, 2일, 3일, 4일 또는 그 초과 동안 대상체에게 공투여된다.

[0109] 일부 실시양태에서, 1개 이상의 인간 세포는 핵산을 1개 이상의 인간 세포로 전달하는 온도-감수성 작용제 (예를 들어, 온도-감수성 치료제)와 접촉된다. 일부 실시양태에서, 핵산은 관심 유전자를 포함하거나 또는 관심 단백질을 코딩한다.

[0110] 일부 측면에서, 본 개시내용의 방법은 시험관내 또는 생체내에서 핵산을 대상체의 세포로 전달하는 치료량의 온도-감수성 작용제 (예를 들어, 온도-감수성 치료제)의 사용을 수반한다. 작용제의 치료 유효량은 의도된 목적을 달성하기에 충분한 치료제의 양을 지칭할 수 있다. 예를 들어, 질환 또는 상태를 치료하기 위해 핵산을 인간 세포로 전달하는 온도-감수성 작용제 (예를 들어, 온도-감수성 치료제)의 치료 유효량은 질환 또는 상태 또는 질환 또는 상태의 1종 이상의 증상을 감소시키기에 충분한 양이다. 치료 유효량은 일부 예에서 질환 또는 상태 또는 질환 또는 상태의 증상을 100% 치료하지는 않을 수 있다. 그러나, 질환 또는 상태의 임의의 공지된 특색 또는 증상의 감소, 예컨대 적어도 25%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90% 또는 적어도 95%의 감소는 치료적일 수 있다.

[0111] 또 다른 예에서, 대상체에서 골수 세포 (비제한적으로 CD34+ 세포, 조혈 줄기 세포, 중간엽 줄기 세포, 내피 줄기 세포를 포함함)를 동원할 수 있는 시토카인 및/또는 케모카인의 치료 유효량은 골수로부터 말초 혈액 내로의 1개 이상의 골수 세포 (비제한적으로 CD34+ 세포, 조혈 줄기 세포, 중간엽 줄기 세포, 내피 줄기 세포를 포함함)의 동원을 유도하기에 충분한 양이다.

[0112] 주어진 온도-감수성 작용제 (예를 들어, 온도-감수성 치료제)의 치료 유효량은 작용제의 성질, 투여 경로, 치료제를 받는 대상체의 크기 및/또는 연령 및 투여 목적과 같은 인자에 따라 달라질 것이다. 각각의 개별 경우에 있어서의 치료 유효량은 관련 기술분야에 확립된 방법에 따라 통상의 기술자에 의해 과도한 실험 없이 실험적으로 결정될 수 있다.

[0113] 대상체는 인간 및 비-인간 포유동물을 포함하는 카테고리인 살아있는 다세포 척추동물 유기체를 지칭할 수 있다. 일부 실시양태에서, 대상체는 인간이다. 본원에 제공된 방법을 사용하여 치료될 수 있는 대상체는 포유동물 대상체, 예컨대 수의학적 또는 인간 대상체를 포함할 수 있다. 대상체는 태아, 신생아, 영유아, 소아 및/또는 성인을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 치료될 대상체는 요법으로부터 이익을 얻을 대상체를 선택하는 것과 같이 선택된다.

[0114] 질환 및 장애의 치료

[0115] 온도-감수성 작용제 (예를 들어, 온도-감수성 치료제)의 투여로부터 이익을 얻을 수 있는 장애 또는 질환의 예는 유전자 돌연변이(들), 비정상적 텔로미어 길이 또는 비정상적 후성적 변형(들)과 연관된 장애 또는 질환을 포함한다. 온도-감수성 작용제 (예를 들어, 온도-감수성 치료제)의 투여로부터 이익을 얻을 수 있는 장애 또는 질환의 추가의 예는 암, 자가면역 질환 및 세포 재생이 유익한 질환, 예컨대 신경계 손상 또는 신경변성 장애, 뿐만 아니라 실명 및 난청을 포함한다.

[0116] 암은 비정상적 또는 비제어된 세포 성장을 특징으로 하는 악성 종양을 포함한다. 암은 빈번하게 유전자 돌연변이 및 이상 텔로미어 조절과 연관된다. ts-작용제를 사용한 치료로부터 이익을 얻을 수 있는 예시적인 암은 심장암 (예를 들어, 육종 (혈관육종, 섬유육종, 횡문근육종, 지방육종), 점액종, 횡문근종, 섬유종, 지방종 및 기형종), 폐암 (예를 들어, 기관지원성 암종 (편평 세포 암종, 미분화 소세포 암종, 미분화 대세포 암종, 선암종), 폐포 (세기관지) 암종, 기관지 선종, 육종, 림프종, 연골성 파종, 중피종); 위장관암 (예를 들어, 식도암 (편평 세포 암종, 선암종, 평활근육종, 림프종), 위암 (암종, 림프종, 평활근육종), 췌장암 (관 선암종, 인슐린종, 글루카곤종, 가스트린종, 카르시노이드 종양, vip종), 소장암 (선암종, 림프종, 카르시노이드 종양, 카

포시 육종, 평활근종, 혈관종, 지방종, 신경섬유종, 섬유종), 대장암 (선암종, 관상 선종, 용모성 선종, 과오종, 평활근종), 비뇨생식관암 (예를 들어, 신장암 (선암종, 윌름스 종양, 신모세포종, 림프종, 백혈병), 방광암 및 요도암 (편평 세포 암종, 이행 세포 암종, 선암종), 전립선암 (선암종, 육종), 고환암 (정상피종, 기형종, 배아성 암종, 기형암종, 용모막암종, 육종, 간질 세포 암종, 섬유종, 섬유선종, 선종성 종양, 지방종), 간암 (예를 들어, 간세포암 (간세포성 암종), 담관암종, 간모세포종, 혈관육종, 간세포성 선종, 혈관종), 골암 (예를 들어, 골원성 육종 (골육종), 섬유육종, 악성 섬유성 조직구종, 연골육종, 유잉 육종, 악성 림프종 (세망 세포 육종), 다발성 골수종, 악성 거대 세포 종양, 척삭종, 골연골종 (골연골성 외골종), 양성 연골종, 연골모 세포종, 연골점액섬유종, 유골 골종 및 거대 세포 종양), 신경계암 (예를 들어, 두개골암 (골종, 혈관종, 육아종, 황색종, 변형성 골염), 수막암 (수막종, 수막육종, 신경교종증), 뇌암 (성상세포종, 수모세포종, 신경교종, 상의세포종, 배세포종, 송과체종, 다형성 교모세포종, 피지교종, 슈반세포종, 망막모세포종, 선천성 종양), 척수암 (신경섬유종, 수막종, 신경교종, 육종), 부인과암 (예를 들어, 자궁암 (자궁내막 암종), 자궁경부암 (자궁경부 암종, 전-종양 자궁경부 이형성증), 난소암 (난소 암종, 장액성 낭선암종, 점액성 낭선암종, 자궁내막양 종양, 브레너 종양, 투명 세포 암종, 미분류 암종, 과립-난포막 세포 종양, 세르톨리-라이디히 세포 종양, 미분화배세포종, 악성 기형종), 외음부암 (편평 세포 암종, 상피내 암종, 선암종, 섬유육종, 흑색종), 질암 (투명 세포 암종, 편평 세포 암종, 포도상 육종, 배아성 횡문근육종, 난관 (암종)), 혈액암 (예를 들어, 혈액암 (골수성 백혈병 (급성 및 만성), 급성 림프모구성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 골수증식성 질환, 다발성 골수종, 골수이형성 증후군), 호지킨병, 비-호지킨 림프종 (악성 림프종)), 피부암 (예를 들어, 악성 흑색종, 기저 세포 암종, 편평 세포 암종, 카포시 육종, 모반, 이형성 모반, 지방종, 혈관종, 피부섬유종, 켈로이드, 건선) 및 부신암 (예를 들어, 신경모세포종)을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0117] 자가면역 질환은 이상 면역 반응, 예컨대 자기-항원 또는 대상체 자신의 세포 또는 조직에 특이적인 항체 또는 세포독성 T 세포의 생산으로부터 발생한다. 일부 경우에, 자가면역 질환은 특정 기관으로 제한되거나 (예를 들어, 갑상선염에서) 또는 상이한 장소에서의 특정한 조직을 수반할 수 있다 (예를 들어, 궤양성 결장). ts-작용제를 사용한 치료로부터 이익을 얻을 수 있는 예시적인 자가면역 질환은 류마티스 관절염, 소아 소수관절염, 콜라겐-유발 관절염, 아주반트-유발 관절염, 쇼그렌 증후군, 다발성 경화증, 실험적 자가면역 뇌척수염, 염증성 장 질환 (예를 들어, 크론병, 궤양성 결장염), 자가면역 위 위축, 심상성 천포창, 건선, 백반증, 제1형 당뇨병, 비-비만 당뇨병, 중증 근무력증, 그레이브스병, 하시모토 갑상선염, 경화성 담관염, 경화성 타액선염, 전신 홍반성 루푸스, 자가면역 혈소판감소증 자반증, 궤양성 결장 증후군, 애디슨병, 전신 경화증, 다발근염, 피부근염, 자가면역 용혈성 빈혈 및 악성 빈혈을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0118] 일부 실시양태에서, 대상체는 신경계 손상을 앓았거나 또는 신경변성 장애를 앓고 있는 대상체이다. 신경계 손상은 손상된 환자의 운동 및/또는 기억에 유해한 영향을 미치는 신경계 (예컨대 뇌 또는 척수 또는 특정한 뉴런)에 대한 외상을 지칭할 수 있다. 예를 들어, 이러한 환자는 구음장애 (운동 언어 장애), 반부전마비 또는 편마비를 앓고 있을 수 있다. 신경계 손상은 손상된 환자의 운동 및/또는 기억에 불리한 영향을 미치는 신경계 (예컨대 뇌 또는 척수 또는 특정한 뉴런)에 대한 외상으로부터 발생할 수 있다. 이러한 외상은 감염원 (예를 들어, 박테리아 또는 바이러스), 독소, 낙상 또는 다른 유형의 사고로 인한 손상 또는 유전 장애에 의해 또는 다른 미지의 이유로 야기될 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, 온도-감수성인 본 개시내용의 온도-감수성 작용제 (예를 들어, 온도-감수성 치료제)는 신경계 손상을 앓았던 환자의 신경계 내의 조직 줄기 세포를 조정함으로써 대상체에서 신경계 손상을 치료하는데 사용될 수 있으며, 여기서 신경계 내의 조직 줄기 세포를 조정하는 것은 뉴런 및 신경교 세포를 생성하여 신경계 내의 결함을 복구한다. 일부 실시양태에서, 다양한 신경영양 인자, 예컨대 뇌-유래 신경영양 인자 (BDNF), 신경 성장 인자 (NGF), 뉴로트로핀-3, 뉴로트로핀-4, 섬모 신경영양 인자, 신경교 세포주-유래 신경영양 인자 (GDNF)를 코딩하는 온도-감수성 작용제가 이러한 환자를 치료하는데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 환자는 신경계 손상, 예컨대 사고 또는 졸중으로 인한 뇌 또는 척수 손상을 앓았을 수 있다.

[0119] 신경변성 질환은 뇌 및/또는 척수의 세포가 상실된 상태이다. 신경변성 질환은 뉴런 또는 그의 미엘린 수초의 악화로부터 발생하여 시간이 지남에 따라 기능장애 및 장애로 이어진다. 발생하는 상태는 운동 문제 (예컨대 운동실조) 및 기억 문제 (예컨대 치매)를 야기할 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 온도-감수성 작용제 (예를 들어, 온도-감수성 치료제)는 신경변성 질환을 앓고 있는 환자의 신경계 내의 조직 줄기 세포를 조정함으로써 대상체에서 신경변성 질환을 치료하는데 사용될 수 있으며, 여기서 신경계 내의 조직 줄기 세포를 조정하는 것은 뉴런 및 신경교 세포를 생성하여 신경계 내의 결함을 복구한다. 일부 실시양태에서, 작용제는 대상체의 신경계를 조정하고, 질환의 변성 상태를 되돌린다. 예시적인 신경변성 질환은 부신백질이영양증 (ALD), 알콜중독, 알렉산더병, 알파병, 알츠하이머병, 근위축성 측삭 경화증 (루게릭병), 모세혈관확장성 운

동실조, 배튼병 (스필라이어-보그트-쇼그렌-배튼병으로도 공지됨), 소 해면상 뇌병증 (BSE), 카나반병, 뇌성 마비, 코케인 증후군, 피질기저 변성, 크로이츠펔트-야콥병, 가족성 치명적 불면증, 전두측두엽 변성, 헌팅톤병, HIV-연관 치매, 케네디병, 크라베병, 루이 소체 치매, 신경보렐리아증, 마차도-요셉병 (제3형 척수소뇌성 운동 실조), 다계통 위축, 다발성 경화증, 기면증, 니만 픽병, 파킨슨병, 펠리제우스-메르츠바허병, 픽병, 원발성 측삭 경화증, 프리온 질환, 진행성 핵상 마비, 레프슈병, 샌드호프병, 쉴더병, 악성 빈혈에 속발성인 척수의 아급성 연합 변성, 스피라이어-보그트-쇼그렌-배튼병 (배튼병으로도 공지됨), 척수소뇌성 운동실조, 척수성 근육 위축, 스틸-리차드슨-올스제위스키병, 척수로, 독성 뇌병증을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0120] 따라서, 온도-감수성 작용제 (예를 들어, 온도-감수성 치료제)는 특정한 장애와 연관된 증상을 감소시키거나 호전시키기 위해 대상체에게 투여된다. 암의 치료를 위한 치료 중점은 종양의 크기 또는 부피의 감소, 종양으로의 혈관신생의 감소 또는 종양의 전이의 감소를 포함할 수 있다. 종양이 제거된 경우, 또 다른 치료 중점은 제거된 조직 또는 기관의 재생일 수 있다. 암 치료의 유효성은 관련 기술분야의 방법, 예를 들어 종양의 영상화 또는 종양 마커 또는 암 존재의 다른 지표의 검출을 사용하여 측정될 수 있다. 자가면역 질환의 치료에 대한 치료 중점은 자가면역 반응의 감소를 포함할 수 있다. 자가면역 질환 치료의 유효성은 관련 기술분야의 방법, 예를 들어 자가면역 항체의 측정을 사용하여 측정될 수 있으며, 여기서 치료된 대상체에서의 이러한 항체의 감소는 요법이 성공적이라는 것을 나타낸다. 신경변성 장애의 치료에 대한 치료 중점은 신경변성-관련 결핍의 감소, 예를 들어 운동, 기억 또는 행동 결핍의 증가를 포함할 수 있다. 신경변성 장애 치료의 유효성은 관련 기술분야의 방법을 사용하여, 예를 들어 인지 장애를 측정함으로써 측정될 수 있으며, 여기서 치료된 대상체에서의 이러한 장애의 감소는 요법이 성공적이라는 것을 나타낸다. 신경계 손상의 치료에 대한 치료 중점은 손상-관련 결핍의 감소, 예를 들어 운동, 기억 또는 행동 결핍의 증가를 포함할 수 있다. 신경계 손상 치료의 유효성은 관련 기술분야의 방법을 사용하여, 예를 들어 이동성 및 유연성을 측정함으로써 측정될 수 있으며, 여기서 치료된 대상체에서의 이러한 증가는 요법이 성공적이라는 것을 나타낸다. 치료는 100% 유효성일 필요는 없다. 예를 들어 인간 세포에서 작용제를 사용한 치료의 부재에 비해 적어도 약 10%, 약 15%, 약 25%, 약 40%, 약 50% 또는 그 초과와 질환 (또는 그의 증상)의 감소는 효과적인 것으로 간주된다.

[0121] 본 개시내용의 온도-감수성 작용제 (예를 들어, 온도-감수성 치료제)는 또한 아테롬성동맥경화증 및/또는 관상동맥 심장 질환의 치료를 필요로 하는 대상체에서 아테롬성동맥경화증 및/또는 관상동맥 심장 질환을 치료하는데 사용될 수 있으며, 이는 예를 들어 대상체의 혈류에 본 개시내용의 온도-감수성 작용제 (예를 들어, 온도-감수성 치료제)를 투여하여 상기 작용제가 혈관 내피 세포에 도입/접촉되고 혈관 내피 세포의 질을 증가시킴으로써 대상체에서 아테롬성동맥경화증 및/또는 관상동맥 심장 질환을 치료한다.

[0122] 본 개시내용의 온도-감수성 작용제 (예를 들어, 온도-감수성 치료제)는 또한 1개 이상의 인간 세포 및/또는 그를 필요로 하는 대상체에서 1종 이상의 유전자독성 작용제에 대한 저항성을 제공하는데 사용될 수 있다.

[0123] 온도-감수성 작용제 (예를 들어, 온도-감수성 치료제)의 투여로부터 이익을 얻을 수 있는 장애 또는 질환의 예는 유전자 돌연변이(들), 비정상적 텔로미어 길이 또는 비정상적 후성적 변형(들)과 연관된 장애 또는 질환을 포함한다. 온도-감수성 작용제 (예를 들어, 온도-감수성 치료제)의 투여로부터 이익을 얻을 수 있는 장애 또는 질환의 추가의 예는 암, 자가면역 질환 및 세포 재생이 유익한 질환, 예컨대 신경계 손상 또는 신경변성 장애, 뿐만 아니라 실명 및 난청을 포함한다.

[0124] 달리 설명되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 과학 용어는 본 개시내용이 속하는 기술분야의 통상의 기술자에 의해 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 단수 용어는 문맥이 달리 명확하게 나타내지 않는 한 복수 지시대상을 포함한다. 유사하게, 단어 "또는"은 문맥이 달리 명확하게 나타내지 않는 한 "및"을 포함하는 것으로 의도된다. 따라서, "A 또는 B를 포함하는"은 A 또는 B 또는 A 및 B를 포함하는 것을 의미한다. 추가로, 핵산 또는 폴리펩티드에 대해 주어진 모든 염기 크기 또는 아미노산 크기 및 모든 분자량 또는 분자 질량 값은 근사치이고, 설명을 위해 제공되는 것으로 이해될 것이다. 본원에 기재된 것과 유사하거나 동등한 방법 및 물질이 본 개시내용의 실시 또는 시험에 사용될 수 있지만, 적합한 방법 및 물질은 하기 기재된다. 본원에 언급된 모든 간행물, 특허 출원, 특허 및 다른 참고문헌은 그 전문이 참조로 포함된다. 상충되는 경우에, 용어의 설명을 포함한 본 명세서가 우선할 것이다.

[0125] 예시적인 실시양태

[0126] 1. i) 온도-감수성 작용제를 포함하는 1개 이상의 세포를, 온도-감수성 활성을 유도하는 허용 온도에서, 1개 이상의 세포에서 온도-감수성 활성이 효과를 생성하기에 충분한 기간 동안 인큐베이션하는 단계; 및

- [0127] ii) 1개 이상의 세포를 비-허용 온도에서 인큐베이션하며, 여기서 비-허용 온도는 온도-감수성 작용제의 온도-감수성 활성을 감소시키는 것인 단계
- [0128] 를 포함하며, 여기서 온도-감수성 작용제는 치료제를 포함하고, 효과는 치료 효과를 포함하는 것인,
- [0129] 온도-감수성 작용제의 온도-감수성 활성을 일시적으로 유도하는 방법.
- [0130] 2. 실시양태 1에 있어서, 단계 i) 전에, 1개 이상의 세포를 온도-감수성 작용제와 접촉시키는 것을 추가로 포함하는 방법.
- [0131] 3. 실시양태 2에 있어서, 1개 이상의 세포가 온도-감수성 작용제와 접촉될 때 허용 온도에 있는 것인 방법.
- [0132] 4. 실시양태 1-3 중 어느 하나에 있어서, 치료 효과를 필요로 하는 대상체에게 1개 이상의 세포를 투여하는 것을 추가로 포함하는 방법.
- [0133] 5. 실시양태 1-3 중 어느 하나에 있어서, 1개 이상의 세포를 비-허용 온도에서 인큐베이션하는 것이 치료 효과를 필요로 하는 대상체에게 1개 이상의 세포를 투여하는 것을 포함하며, 여기서 대상체의 체온은 비-허용 온도인 방법.
- [0134] 6. 실시양태 4 또는 5에 있어서, 대상체에게 1개 이상의 세포를 투여하기 전에, 1개 이상의 세포가 비-허용 온도에서 추가로 인큐베이션되는 것인 방법.
- [0135] 7. 실시양태 1-6 중 어느 하나에 있어서, 1개 이상의 세포가 배아 줄기 세포 또는 유도된 만능 줄기 세포인 방법.
- [0136] 8. 실시양태 7에 있어서, 치료 효과가 상기 세포의 목적하는 세포 유형으로의 분화를 포함하는 것인 방법.
- [0137] 9. 실시양태 8에 있어서, 목적하는 세포 유형이 뉴런, 신경교 세포 및 내피 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.
- [0138] 10. 실시양태 2-9 중 어느 하나에 있어서, 1개 이상의 세포를 온도-감수성 작용제와 접촉시키기 전에, 1개 이상의 세포가 대상체로부터 단리된 것인 방법.
- [0139] 11. 대상체에서 온도-감수성 작용제의 온도-감수성 활성을 일시적으로 유도하는 방법이며, 여기서 대상체의 1개 이상의 세포는 온도-감수성 작용제를 포함하고, 여기서 온도-감수성 작용제의 온도-감수성 활성은 허용 온도에서 유도되고, 여기서 허용 온도는 대상체의 체온보다 더 낮으며,
- [0140] i) 대상체의 체온을 허용 온도로 저하시키는 단계;
- [0141] ii) 대상체에서 온도-감수성 활성이 효과를 유도하기에 충분한 기간 동안 상기 저하된 체온을 유지하는 단계; 및
- [0142] iii) 대상체의 체온을 정상 체온으로 다시 증가시키는 단계
- [0143] 를 포함하는, 대상체에서 온도-감수성 작용제의 온도-감수성 활성을 일시적으로 유도하는 방법.
- [0144] 12. 대상체에서 온도-감수성 작용제의 온도-감수성 활성을 일시적으로 유도하는 방법이며, 여기서 온도-감수성 작용제의 온도-감수성 활성은 허용 온도에서 유도되고, 여기서 허용 온도는 대상체의 체온보다 더 낮으며,
- [0145] i) 대상체의 체온을 허용 온도로 저하시키는 단계;
- [0146] ii) 대상체의 1개 이상의 세포에 온도-감수성 작용제를 투여하는 단계;
- [0147] iii) 대상체에서 온도-감수성 활성이 효과를 유도하기에 충분한 기간 동안 상기 저하된 체온을 유지하는 단계; 및
- [0148] iv) 대상체의 체온을 정상 체온으로 다시 증가시키는 단계
- [0149] 를 포함하며, 여기서 단계 (i)은 단계 (ii) 전에, 그 후에 또는 그와 동시에 수행되는 것인,
- [0150] 대상체에서 온도-감수성 작용제의 온도-감수성 활성을 일시적으로 유도하는 방법.
- [0151] 13. 실시양태 12에 있어서, 온도-감수성 작용제가 전신으로 투여되는 것인 방법.
- [0152] 14. 실시양태 13에 있어서, 온도-감수성 작용제가 정맥내로 투여되는 것인 방법.

- [0153] 15. 실시양태 12에 있어서, 온도-감수성 작용제가 대상체의 특이적 조직 또는 기관에 투여되는 것인 방법.
- [0154] 16. 실시양태 15에 있어서, 온도-감수성 작용제가 경막외 주사에 의해 뇌 및 척수에 투여되는 것인 방법.
- [0155] 17. 실시양태 15에 있어서, 온도-감수성 작용제가 경피 주사에 의해 표적 기관 내로 투여되는 것인 방법.
- [0156] 18. 실시양태 15에 있어서, 온도-감수성 작용제가 주사 바늘 카테터를 사용한 내시경술에 의해 표적 기관 내로 투여되는 것인 방법.
- [0157] 19. 실시양태 15에 있어서, 온도-감수성 작용제가 혈관카테터에 의해 표적 기관 내로 투여되는 것인 방법.
- [0158] 20. 실시양태 17-19 중 어느 하나에 있어서, 표적 기관이 간, 신장, 골격근, 심장 근육, 췌장, 비장, 심장, 뇌, 척수, 피부, 눈, 폐, 장, 흉선, 골수, 골 및 연골로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.
- [0159] 21. 실시양태 12에 있어서, 온도-감수성 작용제가 흡입에 의해 투여되는 것인 방법.
- [0160] 22. 실시양태 11-21 중 어느 하나에 있어서, 대상체의 체온을 변경시키는 단계가 표적 온도 관리 (TTM) 절차를 사용하는 것을 포함하며, 여기서 TTM 절차는 대상체에 대한 냉각 카테터, 냉각 블랭킷 및 얼음으로 이루어진 군 중 하나의 적용을 포함하는 것인 방법.
- [0161] 23. 실시양태 11-22 중 어느 하나에 있어서, 대상체가 포유동물 대상체이고, 임의로 여기서 대상체는 인간인 방법.
- [0162] 24. 실시양태 11-23 중 어느 하나에 있어서, 온도-감수성 작용제가 치료제를 포함하고, 효과가 치료 효과를 포함하는 것인 방법.
- [0163] 25. 실시양태 24 또는 실시양태 1-10 중 어느 하나에 있어서, 치료제가 온도-감수성 바이러스 벡터의 이중 핵산의 코딩 영역에 의해 코딩되는 것인 방법.
- [0164] 26. 실시양태 25에 있어서, 상기 온도-감수성 바이러스 벡터가 센다이 바이러스, 아데노 바이러스, 아데노-연관 바이러스, 레트로바이러스 및 알파바이러스로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.
- [0165] 27. 실시양태 26에 있어서, 상기 온도-감수성 바이러스 벡터가 알파바이러스인 방법.
- [0166] 28. 실시양태 27에 있어서, 상기 알파바이러스가 베네수엘라 말 뇌염 바이러스, 신드비스 바이러스 및 쉼리키 포레스트 바이러스로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.
- [0167] 29. 실시양태 26에 있어서, 온도-감수성 바이러스 벡터가 센다이 바이러스인 방법.
- [0168] 30. 실시양태 25-29 중 어느 하나에 있어서, 치료제가 비-코딩 RNA, siRNA, shRNA 및 엔도뉴클레아제 편집 시스템으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.
- [0169] 31. 실시양태 25-29 중 어느 하나에 있어서, 치료제가 단백질인 방법.
- [0170] 32. 실시양태 31에 있어서, 단백질이 전사 인자이고, 임의로 여기서 전사 인자는 인간 뉴로게닌-3 (NGN3) 및 인간 ETS 전위 변이체 2 (ETV2)로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.
- [0171] 33. 실시양태 31에 있어서, 단백질이 성장 인자이고, 임의로 여기서 성장 인자는 뇌-유래 신경영양 인자 (BDNF) 및 신경 성장 인자 (NGF)로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.
- [0172] 34. 실시양태 25-33 중 어느 하나에 있어서, 온도 감수성 활성이 온도-감수성 바이러스 벡터의 복제 및 전사를 포함하는 것인 방법.
- [0173] 35. 실시양태 24 또는 실시양태 1-10 중 어느 하나에 있어서, 치료제가 온도-감수성 자기-복제 RNA의 코딩 영역에 의해 코딩되는 것인 방법.
- [0174] 36. 실시양태 35에 있어서, 상기 자기-복제 RNA가 바이러스 구조 단백질 코딩 영역이 결여된 알파바이러스 레플리콘을 포함하는 것인 방법.
- [0175] 37. 실시양태 36에 있어서, 상기 알파바이러스가 베네수엘라 말 뇌염 바이러스, 신드비스 바이러스 및 쉼리키 포레스트 바이러스로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.
- [0176] 38. 실시양태 35-37 중 어느 하나에 있어서, 치료제가 비-코딩 RNA, siRNA, shRNA 및 엔도뉴클레아제 편집 시스템으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

- [0177] 39. 실시양태 35-37 중 어느 하나에 있어서, 치료제가 단백질인 방법.
- [0178] 40. 실시양태 39에 있어서, 단백질이 전사 인자이고, 임의로 여기서 전사 인자는 인간 뉴로게닌-3 (NGN3) 및 인간 ETS 전위 변이체 2 (ETV2)로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.
- [0179] 41. 실시양태 39에 있어서, 단백질이 성장 인자이고, 임의로 여기서 성장 인자는 뇌-유래 신경영양 인자 (BDNF) 및 신경 성장 인자 (NGF)로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.
- [0180] 42. 실시양태 35-41 중 어느 하나에 있어서, 온도-감수성 활성이 온도-감수성 자기-복제 RNA의 복제 및 전사 중 하나 또는 둘 다를 포함하는 것인 방법.
- [0181] 43. 실시양태 25-42 중 어느 하나에 있어서, 코딩 영역이 프로모터에 작동가능하게 연결된 것인 방법.
- [0182] 44. 실시양태 1-10 중 어느 하나에 있어서, 온도-감수성 활성이 치료 효과를 생성하기에 충분한 기간이 약 12 시간 내지 약 12주의 범위이고, 임의로 여기서 기간은 1 내지 7일인 방법.
- [0183] 45. 실시양태 11-43 중 어느 하나에 있어서, 대상체에서 효과를 유도하기에 충분한 기간이 약 12시간 내지 약 7일이고, 임의로 여기서 기간은 약 12시간 내지 약 72시간인 방법.
- [0184] 46. 실시양태 1-45 중 어느 하나에 있어서, 허용 온도가 30℃ 내지 36℃ 또는 38℃ 내지 50℃의 범위인 방법.
- [0185] 47. 실시양태 46에 있어서, 허용 온도가 33℃ ± 0.5℃인 방법.
- [0186] 48. 실시양태 46 또는 실시양태 47에 있어서, 비-허용 온도가 37℃ ± 0.5℃인 방법.
- [0187] 49. 실시양태 1-48 중 어느 하나에 있어서, 1개 이상의 세포가 인간 세포인 방법.
- [0188] 50. 실시양태 49에 있어서, 1개 이상의 인간 세포가 성체 줄기 세포, 조직 줄기 세포, 전구 세포, 배아 줄기 세포 또는 유도된 만능 줄기 세포인 방법.
- [0189] 51. 실시양태 50에 있어서, 1개 이상의 인간 세포가 조혈 줄기 세포, 중간엽 줄기 세포, 지방 줄기 세포, 뉴런 줄기 세포 및 생식 줄기 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.
- [0190] 52. 실시양태 49에 있어서, 1개 이상의 인간 세포가 체세포, 성숙 세포 또는 분화 세포인 방법.
- [0191] 53. 실시양태 52에 있어서, 1개 이상의 인간 세포가 표피 세포, 섬유모세포, 림프구, 간세포, 상피 세포, 근세포, 연골세포, 골세포, 지방세포, 심근세포, 위장 세포, 위장 β 세포, 각질세포, 적혈구, 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC), 뉴런, 신경교 세포, 신경세포, 정상세포, 배세포, 정자 세포 및 난모세포로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.
- [0192] 54. 실시양태 49에 있어서, 1개 이상의 인간 세포가 인간 골수 세포인 방법.
- [0193] 55. 실시양태 54에 있어서, 인간 골수 세포가 조혈 줄기 세포, 중간엽 줄기 세포 및 내피 줄기 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.
- [0194] 56. 실시양태 55에 있어서, 조혈 줄기 세포가 CD34+인 방법.
- [0195] 57. 실시양태 25-56 중 어느 하나에 있어서, 온도-감수성 바이러스 벡터 또는 온도-감수성 자기-복제 RNA가 12-18개 뉴클레오타이드의 삽입을 갖는 비구조 단백질 코딩 영역을 포함하며, 여기서 삽입은 비구조 단백질 2 (nsP2 = 헬리카제 프로테이나제)의 베타 시트 5와 베타 시트 6 사이에 4 내지 6개의 추가의 아미노산을 포함하는 nsP2의 발현을 유발하고, 임의로 여기서 추가의 아미노산은 바이러스 벡터 또는 자기-복제 RNA의 온도-감수성을 생성하는 것인 방법.
- [0196] 58. 실시양태 57에 있어서, 추가의 아미노산이 서열식별번호: 38 (GCGRT), 서열식별번호: 39 (TGAAA) 및 서열식별번호: 40 (LRPHP)으로 이루어진 군으로부터 선택된 1개의 서열을 포함하는 것인 방법.
- [0197] 59. 실시양태 57에 있어서, 추가의 아미노산이 서열식별번호: 39 (TGAAA)의 서열을 포함하는 것인 방법.
- [0198] 60. 실시양태 59에 있어서, nsP2의 아미노산 서열이 서열식별번호: 29-36으로 이루어진 군으로부터 선택된 1개의 서열을 포함하는 것인 방법.
- [0199] 61. 12-18개 뉴클레오타이드의 삽입을 갖는 비구조 단백질 코딩 영역을 포함하는 온도-감수성 바이러스 벡터 또는 온도-감수성 자기-복제 RNA인 온도-감수성 작용제이며, 여기서 삽입은 비구조 단백질 2 (nsP2 = 헬리카제 프

로테이나제)의 베타 시트 5와 베타 시트 6 사이에 4 내지 6개의 추가의 아미노산을 포함하는 nsP2의 발현을 유발하고, 임의로 여기서 추가의 아미노산은 바이러스 벡터 또는 자기-복제 RNA의 온도-감수성을 생성하는 것인 온도-감수성 작용제.

- [0200] 62. 실시양태 61에 있어서, 추가의 아미노산이 서열식별번호: 38 (GCGRT), 서열식별번호: 39 (TGAAA) 및 서열식별번호: 40 (LRPHP)으로 이루어진 군으로부터 선택된 1개의 서열을 포함하는 것인 온도-감수성 작용제.
- [0201] 63. 실시양태 61에 있어서, 추가의 아미노산이 서열식별번호: 39 (TGAAA)의 서열을 포함하는 것인 온도-감수성 작용제.
- [0202] 64. 실시양태 63에 있어서, NsP2의 아미노산 서열이 서열식별번호: 29-36으로 이루어진 군으로부터 선택된 1개의 서열을 포함하는 것인 온도-감수성 작용제.
- [0203] 65. 실시양태 61-64 중 어느 하나에 있어서, 온도-감수성 알파바이러스 벡터인 온도-감수성 작용제.
- [0204] 66. 실시양태 61-64 중 어느 하나에 있어서, 바이러스 구조 단백질 코딩 영역이 결여된 알파바이러스 레플리콘을 포함하는 온도-감수성 자기-복제 RNA인 온도-감수성 작용제.
- [0205] 67. 실시양태 65 또는 실시양태 66에 있어서, 알파바이러스가 베네수엘라 말 뇌염 바이러스, 신드비스 바이러스 및 쉐리키 포레스트 바이러스로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 온도-감수성 작용제.
- [0206] 68. 실시양태 65 또는 실시양태 66에 있어서, 알파바이러스가 베네수엘라 말 뇌염 바이러스인 온도-감수성 작용제.
- [0207] 69. 대상체에서 온도-감수성 작용제 (ts-작용제)의 온도-감수성 활성을 일시적으로 유도하는 방법이며, 여기서 대상체의 신체 표면에 또는 그 근처에 있는 1개 이상의 세포는 ts-작용제를 포함하고, 여기서 ts-작용제의 온도-감수성 활성은 허용 온도에서 유도되고, 여기서 허용 온도는 대상체의 표면 체온이며,
- [0208] i) 대상체에서 온도-감수성 활성이 효과를 유도하기에 충분한 기간 동안 대상체의 표면 체온을 허용 온도에서 유지하는 단계; 및
- [0209] ii) 대상체에서 온도-감수성 활성이 중지되기에 충분한 기간 동안 대상체의 표면 체온을 비-허용 온도로 증가시키는 단계
- [0210] 를 포함하는, 대상체에서 ts-작용제의 온도-감수성 활성을 일시적으로 유도하는 방법.
- [0211] 70. 대상체에서 온도-감수성 작용제 (ts-작용제)의 온도-감수성 활성을 일시적으로 유도하는 방법이며, 여기서 ts-작용제의 온도-감수성 활성은 허용 온도에서 유도되고, 여기서 허용 온도는 대상체의 표면 체온이며,
- [0212] i) 대상체의 신체의 표면에 또는 그 근처에 있는 1개 이상의 세포에 ts-작용제를 투여하는 단계; 및
- [0213] ii) 대상체에서 온도-감수성 활성이 효과를 유도하기에 충분한 기간 동안 대상체의 표면 체온을 허용 온도에서 유지하는 단계
- [0214] 를 포함하는, 대상체에서 ts-작용제의 온도-감수성 활성을 일시적으로 유도하는 방법.
- [0215] 71. 실시양태 70에 있어서, iii) 대상체에서 온도-감수성 활성이 중지되기에 충분한 기간 동안 대상체의 표면 체온을 비-허용 온도로 증가시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [0216] 72. 실시양태 70 또는 실시양태 71에 있어서, 온도-감수성 작용제가 피내로 또는 피하로 투여되는 것인 방법.
- [0217] 73. 실시양태 70 또는 실시양태 71에 있어서, 온도-감수성 작용제가 근육내로 투여되는 것인 방법.
- [0218] 74. 실시양태 69-73 중 어느 하나에 있어서, 비-허용 온도가 36℃ 초과이고, 허용 온도가 36℃ 미만이며, 임의로 여기서 허용 온도는 약 31℃ 내지 약 34℃ 또는 약 33℃ $\pm$ 0.5℃이고, 비-허용 온도는 37℃ $\pm$ 0.5℃인 방법.
- [0219] 75. 실시양태 69-74 중 어느 하나에 있어서, 제약 작용제가 ts-작용제의 코딩 영역에 의해 코딩되거나, 또는 ts-작용제가 제약 작용제를 포함하고 효과가 제약 효과를 포함하거나, 임의로 여기서 제약 작용제는 치료제이고 제약 효과는 치료 효과이거나, 또는 여기서 제약 작용제는 예방제이고 제약 효과는 예방 효과인 방법.
- [0220] 76. 실시양태 69-75 중 어느 하나에 있어서, ts-작용제가 온도-감수성 바이러스 벡터이고, 온도-감수성 활성이 온도-감수성 바이러스 벡터의 복제 및 전사를 포함하는 것인 방법.

- [0221] 77. 실시양태 76에 있어서, 온도-감수성 바이러스 벡터가 센다이 바이러스, 아데노 바이러스, 아데노-연관 바이러스, 레트로바이러스 및 알파바이러스로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.
- [0222] 78. 실시양태 76에 있어서, 온도-감수성 바이러스 벡터가 알파바이러스이고, 임의로 여기서 알파바이러스는 베네수엘라 말 뇌염 바이러스, 신드비스 바이러스 및 쉘리키 포레스트 바이러스로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.
- [0223] 79. 실시양태 76에 있어서, 온도-감수성 바이러스 벡터가 센다이 바이러스인 방법.
- [0224] 80. 실시양태 69-75 중 어느 하나에 있어서, ts-작용제가 온도-감수성 자기-복제 RNA이고, 온도-감수성 활성이 온도-감수성 자기-복제 RNA의 복제 및 전사 중 하나 또는 둘 다를 포함하는 것인 방법.
- [0225] 81. 실시양태 80에 있어서, 자기-복제 RNA가 알파바이러스 바이러스 구조 단백질 코딩 영역이 결여된 알파바이러스 레플리콘을 포함하는 것인 방법.
- [0226] 82. 실시양태 81에 있어서, 알파바이러스가 베네수엘라 말 뇌염 바이러스, 신드비스 바이러스 및 쉘리키 포레스트 바이러스로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.
- [0227] 83. 실시양태 81에 있어서, 알파바이러스가 베네수엘라 말 뇌염 바이러스인 방법.
- [0228] 84. 실시양태 69-83 중 어느 하나에 있어서, 제약 작용제가 비-코딩 RNA, siRNA, shRNA 및 엔도뉴클레아제 편집 시스템으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.
- [0229] 85. 실시양태 69-83 중 어느 하나에 있어서, 제약 작용제가 단백질을 포함하는 것인 방법.
- [0230] 86. 실시양태 85에 있어서, 단백질이 병원체의 항원을 포함하는 것인 방법.
- [0231] 87. 실시양태 86에 있어서, 병원체가 바이러스, 박테리아, 원충 및 진균 중 하나 이상을 포함하는 것인 방법.
- [0232] 88. 실시양태 86 또는 실시양태 87에 있어서, 항원이 병원체의 표면 단백질 또는 그의 단편을 포함하는 것인 방법.
- [0233] 89. 실시양태 69-88 중 어느 하나에 있어서, 온도-감수성 활성이 효과를 생성하기에 충분한 기간이 약 12시간 내지 약 12주의 범위이고, 임의로 여기서 기간은 1 내지 7일인 방법.
- [0234] 90. 실시양태 69-88 중 어느 하나에 있어서, 대상체에서 효과를 유도하기에 충분한 기간이 약 12시간 내지 약 7일이고, 임의로 여기서 기간은 약 12시간 내지 약 72시간인 방법.
- [0235] 91. 부형제 및 온도-감수성 작용제 (ts-작용제)를 포함하는, 대상체에서 병원체에 대한 면역 반응을 자극하기 위한 면역원성 조성물이며, 여기서 ts-작용제는 병원체의 항원을 코딩하는 온도-감수성 바이러스 벡터 또는 온도-감수성 자기-복제 RNA이고, 여기서 ts-작용제는 허용 온도에서는 항원을 발현할 수 있지만 비-허용 온도에서는 그렇지 않은 것인, 대상체에서 병원체에 대한 면역 반응을 자극하기 위한 면역원성 조성물.
- [0236] 92. 실시양태 91에 있어서, 병원체가 바이러스, 박테리아, 원충 및 진균 중 하나 이상을 포함하는 것인 조성물.
- [0237] 93. 실시양태 91 또는 실시양태 92에 있어서, 항원이 병원체의 표면 단백질 또는 그의 단편을 포함하는 것인 조성물.
- [0238] 94. 실시양태 93에 있어서, 병원체가 바이러스이고, 바이러스가 바이러스 벡터와 상이한 것인 조성물.
- [0239] 95. 실시양태 94에 있어서, 바이러스가 코로나바이러스이고, 항원이 코로나바이러스의 스파이크 단백질 또는 그의 단편을 포함하는 것인 조성물.
- [0240] 96. 실시양태 95에 있어서, 코로나바이러스가 2019-nCoV이고, 항원이 2019-nCoV의 수용체-결합 도메인 (RBD)을 포함하는 것인 조성물.
- [0241] 97. 실시양태 96에 있어서, RBD의 아미노산 서열이 서열식별번호: 44 또는 서열식별번호: 44에 대해 적어도 75%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인 조성물.
- [0242] 98. 실시양태 95에 있어서, 코로나바이러스가 2019-nCoV이고, 항원이 서열식별번호: 41의 잔기 16-1213의 아미노산 서열 또는 서열식별번호: 41에 대해 적어도 75%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 스파이크 단백질의 세포외 영역을 포함하는 것인 조성물.

- [0243] 99. 실시양태 91-98 중 어느 하나에 있어서, 비-허용 온도가 36℃ 초과이고, 허용 온도가 36℃ 미만이며, 임의로 여기서 허용 온도는 약 31℃ 내지 약 34℃ 또는 약 33℃ $\pm$ 0.5℃이고, 비-허용 온도는 37℃ $\pm$ 0.5℃인 조성물.
- [0244] 100. 실시양태 91-99 중 어느 하나에 있어서, ts-작용제가 온도-감수성 자기-복제 RNA인 조성물.
- [0245] 101. 실시양태 100에 있어서, 자기-복제 RNA가 바이러스 구조 단백질 코딩 영역이 결여된 알파바이러스 레플리콘을 포함하는 것인 조성물.
- [0246] 102. 실시양태 101에 있어서, 알파바이러스가 베네수엘라 말 뇌염 바이러스, 신드비스 바이러스 및 쉼리키 포레스트 바이러스로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 조성물.
- [0247] 103. 실시양태 101에 있어서, 알파바이러스가 베네수엘라 말 뇌염 바이러스인 조성물.
- [0248] 104. 실시양태 91-99 중 어느 하나에 있어서, ts-작용제가 온도-감수성 바이러스 벡터인 조성물.
- [0249] 105. 실시양태 104에 있어서, 바이러스 벡터가 센다이 바이러스, 아데노 바이러스, 아데노-연관 바이러스, 레트로바이러스 및 알파바이러스로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 조성물.
- [0250] 106. 실시양태 105에 있어서, 알파바이러스가 베네수엘라 말 뇌염 바이러스, 신드비스 바이러스 및 쉼리키 포레스트 바이러스로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 조성물.
- [0251] 107. 실시양태 105에 있어서, 바이러스 벡터가 센다이 바이러스인 조성물.
- [0252] 108. 실시양태 69-107 중 어느 하나에 있어서, 대상체가 포유동물 대상체이고, 임의로 여기서 대상체는 인간인 방법 또는 조성물.
- [0253] 109. 실시양태 91-108 중 어느 하나에 있어서, 병원체가 포유동물 병원체이고, 임의로 여기서 병원체는 인간 병원체인 조성물.
- [0254] 110. 포유동물 대상체에게 실시양태 109의 면역원성 조성물을 투여하여 포유동물 대상체에서 항원에 대한 면역 반응을 자극하는 것을 포함하며, 임의로 여기서 포유동물 대상체는 인간 대상체인, 포유동물 대상체에서 병원체에 대한 면역 반응을 자극하는 방법.
- [0255] 111. 실시양태 110에 있어서, 면역원성 조성물이
- [0256] i) 피내로 또는 피하로; 또는
- [0257] ii) 근육내로
- [0258] 투여되는 것인 방법.
- [0259] 112. 실시양태 110에 있어서, 면역원성 조성물이 비강내로 투여되는 것인 방법.
- [0260] 실시예
- [0261] 약어: 아우라 (아우라 바이러스); BFV (바마 포레스트 바이러스); GFP (녹색 형광 단백질); GOI (관심 유전자); IRES (내부 리보솜 진입 부위); LUC (루시페라제); OD (광학 밀도); ONNV (오니옹-니옹 바이러스); RBD (수용체 결합 도메인); RRV (로스 리버 바이러스); SeV (센다이 바이러스); SeVts (온도-감수성 센다이 바이러스); SFV (쉼리키 포레스트 바이러스); shRNA (짧은 헤어핀 RNA); SINV (신드비스 바이러스); srRNA (자기-복제 RNA); ts (온도-감수성); ts-작용제 (온도-감수성-작용제); VEEV (베네수엘라 말 뇌염 바이러스); 및 WEEV (서부 말 뇌염 바이러스).
- [0262] 하기 실시예는 특정의 특정한 특색 및/또는 실시양태를 예시하기 위해 제공된다. 실시예는 청구된 바와 같은 개시내용을 제한하는 것으로 의도되지 않는다.
- [0263] 실시예 1: 온도-감수성 작용제
- [0264] 본 실시예는 정상 체온보다 더 낮거나 더 높은 온도에서 기능하지만, 정상 체온에서는 기능하지 않거나 감소된 기능성을 나타내는 온도-감수성 작용제 (ts-작용제)를 기재한다. ts-작용제는 생체외, 반 생체내 및 생체내 요법에서 사용하기에 적합하다. 온도-감수성 바이러스 벡터 및 자기-복제 RNA는 관심 유전자 (GOI), 짧은 헤어핀 RNA (shRNA), 긴 비-코딩 RNA 및/또는 다른 유전자 요소(들)를 발현하도록 조작된다. 예를 들어, 온도-감수성 돌연변이를 갖는 단백질은 더 낮은 온도 (예를 들어, 30℃)에서 기능적이지만, 정상 체온 (예를 들어, 37℃)에

서는 기능적이지 않다. 달리 명시되지 않는 한, 정상 체온은 $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 의 정상 인간 체온이다.

[0265] 실시예 2: 온도-감수성 센다이 바이러스 벡터 (SeVts)

[0266] 본 실시예는 온도-특이적 유전자 발현에 사용될 수 있는 온도-감수성 센다이 바이러스 벡터 (SeVts)를 기재한다. 센다이 바이러스 벡터는 파라믹소바이러스 서브패밀리의 단일-가닥 RNA 바이러스인 센다이 바이러스에 기반한다. SeV18/TS15 Δ F는 32-35 $^{\circ}\text{C}$ 에서 유지될 때 바이러스 복제 및 유전자 발현을 가능하게 하는 온도-감수성 센다이 바이러스 벡터이다. 그러나, 바이러스 복제는 37 $^{\circ}\text{C}$ 이상의 비-허용 온도에서는 중지된다 (Ban et al., PNAS 2011).

[0267] 실시예 3: 온도-감수성 자기-복제 RNA (srRNA)

[0268] 본 실시예는 베네수엘라 말 뇌염 바이러스 (VEEV) 벡터에 코딩된 nsP2 단백질 내의 돌연변이가 온도 감수성을 나타낸다는 발견을 기재한다. 온도-감수성 시스템은 30 $^{\circ}\text{C}$ -33 $^{\circ}\text{C}$ 에서는 관심 유전자 (GOI)의 발현을 허용하지만, 37 $^{\circ}\text{C}$ 이상에서는 그렇지 않다. srRNA 벡터는 GOI를 코딩하는 합성 RNA보다 더 높은 GOI 발현을 허용한다. 온도가 37 $^{\circ}\text{C}$ (예를 들어, 비-허용 온도)로 이동될 때, GOI의 발현이 턴 오프된다. 하기 기재된 특이적 온도-감수성 돌연변이 (돌연변이 2)는 알파바이러스 중에서 잘 보존된 영역에 있다. 센다이 바이러스 벡터 (SeVts)와 비교하여, srRNAs는 비-바이러스 RNA 발현 시스템에 이용될 수 있기 때문에, srRNAs가 일부 적용에 더 매력적일 수 있다.

[0269] 물질 및 방법

[0270] 세포 배양

[0271] 인간 지방 줄기 세포-유래 iPS 세포주 (ADSC-iPS 세포)를 시스템 바이오사이언시스(System Biosciences) (캘리포니아주 팔로 알토)로부터 구입하였다. 세포를 표준 hPSC 배양 방법에 따라 미분화 인간 만능 줄기 세포 (hPSC)로서 상용적으로 유지하였다. 간략하게, 세포를 100 ng/ml FGF2가 보충된 스템피트 베이직02 (아지노모토(Ajinomoto), 일본)에서 배양하였다. 추가로, 세포를 라미닌-511 기질 (i매트릭스-511, 니피(Nippi), 일본)로 코팅된 세포 배양 접시 상에서 배양하였다.

[0272] VEEV 벡터

[0273] 공개적으로 이용가능한 서열 정보를 기초로 합성된 DNA 단편을 사용하여 VEEV 벡터 플라스미드를 조립하였다 (T7-VEE-IRES-퓨로, 본원 이하에서 "srRNA1wt"). 문헌 [Yoshioka et al., 2013]에 따라, VEEV 벡터 백본은 원래 문헌 [Petrakova et al., 2005]에서와 같이 유래되었다. 삽입 돌연변이유발 및 대규모 병렬 서열분석 (Beitzel et al., 2010)에 의해 확인된 7480개의 후보 서열을 사용하여 잠재적 온도-감수성 돌연변이체를 유도하였다. 본래의 대규모 스크린을 VEEV 게놈 내의 15 bp의 트랜스포존-매개 삽입에 의해 수행하였다 (도 1a). 후속적으로, 30 $^{\circ}\text{C}$ 또는 40 $^{\circ}\text{C}$ 에서 증식할 수 있는 다수의 15-bp-삽입 VEEV 돌연변이체를 분리하였다. 이들 데이터가 추가 연구를 위한 초기 돌연변이체를 제공하였지만, 이들 서열이 온도 감수성, 예컨대 32 $^{\circ}\text{C}$ 또는 33 $^{\circ}\text{C}$ 에서의 허용성 및 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서의 비-허용성을 나타내는지 여부는 공지되지 않았다. 3개의 돌연변이체 서열 - 돌연변이체 1 (ts1, 도 1b), 돌연변이체 2 (ts2, 도 1c) 및 돌연변이체 3 (ts3, 도 1d)을 총 7480개의 후보 돌연변이체 서열 (문헌 [Beitzel et al., 2010]으로부터의 데이터 세트 S1)로부터 선택하였다. 이들 돌연변이체 DNA 단편 (도 2)을 합성하고, VEEV 벡터 내로 클로닝하고, srRNA1ts1 (돌연변이체1), srRNA1ts2 (돌연변이체 2), srRNA1ts3 (돌연변이체 3)으로 명명하였다. 바이러스 서열의 5'-영역 (5'-UTR 및 51-nt 보존된 서열 요소 (CSE)를 포함하는 것으로 공지된 RNA-의존성 RNA 폴리머라제의 N-말단 단백질 서열의 일부)을 포함하는 돌연변이체 4를 설계하였다. 이러한 경우에, 뉴클레오타이드는 아미노산 서열은 유지하면서 덜 열-안정한 변이체 (예를 들어, G→A)로 체계적으로 변화되었다 (도 3). srRNA1ts2 내의 이러한 영역의 서열을 대체하여 srRNA1ts4를 생성하였다 (즉, 돌연변이체 4 및 돌연변이체 2 둘 다를 함유함). 이들 벡터로부터 문헌 [Yoshioka et al., 2013]에 따라 합성 RNA를 생산하였다.

[0274] 결과

[0275] 30 $^{\circ}\text{C}$, 32 $^{\circ}\text{C}$ 및 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서의 srRNA1ts2-GFP 및 srRNA1ts3-GFP의 온도-감수성의 평가

[0276] ADSC-iPSC 세포를 24-웰 플레이트 상에 80,000개 세포/웰의 밀도로 플레이팅하였다. 24시간 후에, 세포를 srRNA1wt-GFP, srRNA1ts2-GFP 또는 srRNA1ts3-GFP로 형질감염시켰다. 형질감염을 위해, 24-웰 플레이트의 각각의 웰을 1 μl 의 제트메신저 (폴리플러스) 형질감염 시약과 혼합된 0.5 μg 합성 RNA (srRNA)로 50 μl 의 최종 부피로 처리하였다. 형질감염 복합체를 세포에 첨가한 후에, 450 μl 의 배양 배지를 첨가하였다. 세포를

30℃, 32℃ 또는 37℃에서 인큐베이션하였다. 형질감염 6시간 후에, 배지를 교체하여 형질감염 복합체를 제거하였다. 20시간 및 48시간에 위상-대조 및 형광 영상을 찍었다. 도 4a는 야생형 (srRNA1wt-GFP)이 37℃에서 GFP를 강하게 발현하였지만, 30℃ 및 32℃ 둘 다에서는 GFP를 단지 약하게 발현하였다는 것을 보여준다. 대조적으로, 돌연변이체 2 (srRNA1ts2-GFP)는 30℃ 및 32℃에서 GFP를 발현하였지만, 37℃에서는 그렇지 않았다. 돌연변이체 3 (srRNA1ts3-GFP)은 30℃ 및 32℃에서 GFP를 발현하였을 뿐만 아니라, 37℃에서도 GFP를 발현하였다. 이들 결과에 기초하여, 돌연변이체 2를 추가 개발을 위해 선택하였다. 예상된 바와 같이, srRNA는 GFP를 코딩하는 합성 mRNA의 단일 형질감염에 의해 달성된 GFP 발현 수준과 비교하여 훨씬 더 높은 GFP 발현을 보였다 (도 4b).

[0277] 32℃에서의 srRNA1ts1-GFP 및 srRNA1ts2-GFP의 온도-감수성 평가

[0278] ADSC-iPSC 세포를 24-웰 플레이트 상에 50,000개 세포/웰의 밀도로 플레이팅하였다. 24시간 후에, 세포를 srRNA1wt-GFP, srRNA1ts2-GFP 또는 srRNA1ts1-GFP로 형질감염시켰다. 형질감염을 위해, 24-웰 플레이트의 각각의 웰을 1 µl의 제트메신저 (폴리플러스) 형질감염 시약과 혼합된 0.5 µg 합성 RNA (srRNA)로 50 µl의 최종 부피로 처리하였다. 형질감염 복합체를 세포에 첨가한 후에, 450 µl의 배양 배지를 첨가하였다. 세포를 32℃에서 인큐베이션하였다. 형질감염 6시간 후에, 배지를 교체하여 형질감염 복합체를 제거하였다. 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 240 및 288시간에 위상-대조 및 형광 영상을 찍었다.

[0279] 도 5는 결과를 보여준다. 야생형 (srRNA1wt-GFP)으로부터의 GFP 발현은 24시간에 시작하였고, 관찰 기간의 종료 (288시간)까지 계속되었지만, 시간 경과에 걸쳐 매우 약하였다. 대조적으로, 돌연변이체 2 (srRNA1ts2-GFP)로부터의 GFP 발현은 시간 경과에 걸쳐 매우 강하였다. 돌연변이체 1 (srRNA1ts1-GFP)은 GFP를 전혀 발현하지 않았다 (24시간 및 168시간에서의 관찰에 기초함). 이들 결과에 기초하여, 돌연변이체 2를 추가 개발을 위해 선택하였다.

[0280] 32℃, 33℃ 및 37℃에서의 srRNA1ts2-GFP 및 srRNA1ts4-GFP의 온도-감수성의 평가

[0281] ADSC-iPSC 세포를 24-웰 플레이트 상에 50,000개 세포/웰의 밀도로 플레이팅하였다. 24시간 후에, 세포를 srRNA1ts2-GFP 또는 srRNA1ts4-GFP로 형질감염시켰다. 형질감염을 위해, 24-웰 플레이트의 각각의 웰을 1 µl의 제트메신저 (폴리플러스) 형질감염 시약과 혼합된 0.5 µg 합성 RNA (srRNA)로 50 µl의 최종 부피로 처리하였다. 형질감염 복합체를 세포에 첨가한 후에, 450 µl의 배양 배지를 첨가하였다. 세포를 32℃, 33℃ 또는 37℃에서 인큐베이션하였다. 형질감염 6시간 후에, 배지를 교체하여 형질감염 복합체를 제거하였다. 20, 48 및 96시간에 위상-대조 및 형광 영상을 찍었다.

[0282] 도 6은 결과를 보여준다. 32℃ 및 33℃에서, 돌연변이체 2 (srRNA1ts2-GFP)로부터의 GFP 발현은 이르게는 20시간에 시작하였지만, 48시간에 유의하게 증가하였고, 96시간에 추가로 증가하였다. GFP의 발현은 32℃에서보다 33℃에서 더 강하였다. 상기 실험과 일치하게, GFP는 37℃에서 전혀 발현되지 않았다. srRNA1ts4-GFP (돌연변이체 2 및 돌연변이체 4 둘 다를 함유함)는 srRNA1ts2-GFP와 유사한 온도 프로파일을 보였지만, GFP 발현은 전반적으로 훨씬 더 약하였다. 이들 결과에 기초하여, 돌연변이체 2를 추가 개발을 위해 선택하였다.

[0283] 32℃에서의 srRNA1ts2-GFP의 온도-감수성의 평가

[0284] ADSC-iPSC 세포를 24-웰 플레이트 상에 80,000개 세포/웰의 밀도로 플레이팅하였다. 24시간 후에, 세포를 srRNA1ts2-GFP로 형질감염시켰다. 형질감염을 위해, 24-웰 플레이트의 각각의 웰을 1 µl의 제트메신저 (폴리플러스) 형질감염 시약과 혼합된 0.5 µg 합성 RNA (srRNA)로 50 µl의 최종 부피로 처리하였다. 형질감염 복합체를 세포에 첨가한 후에, 450 µl의 배양 배지를 첨가하였다. 세포를 32℃에서 인큐베이션하였다. 형질감염 6시간 후에, 배지를 교체하여 형질감염 복합체를 제거하였다. 배지를 매일 교체하였다. srRNA1ts2-GFP 벡터는 "IRES" 서열 뒤에 삽입된 퓨로마이신 N-아세틸트랜스퍼라제 (pac) 선택 유전자를 함유하고, 따라서 퓨로마이신을 사용하여 선택될 수 있다. 1 µg/ml의 퓨로마이신의 부재 (상부 패널) 또는 존재 (하부 패널) 하에 실험을 수행하였다. 퓨로마이신 선택을 사용하는 세포에 대해, 퓨로마이신을 48시간 및 72시간에 첨가하였다. 24, 48, 72, 96, 144, 168, 192시간에 위상-대조 및 형광 영상을 찍었다.

[0285] 도 7은 결과를 보여준다. 32℃에서, srRNA1ts2-GFP로부터의 GFP 발현은 이르게는 24시간에 시작하였지만, 48시간에 유의하게 증가하였고, 72시간 및 96시간에 피크에 도달하였다. GFP의 발현은 관찰 기간의 종료 (192시간)까지 계속되었다. GFP의 발현 패턴은 퓨로마이신의 첨가에 의해 변경되는 것으로 보이지 않았다.

[0286] 24시간 후에 32℃에서 37℃로 전환된 srRNA1ts2-GFP의 온도-감수성의 평가

- [0287] ADSC-iPSC 세포를 24-웰 플레이트 상에 80,000개 세포/웰의 밀도로 플레이팅하였다. 24시간 후에, 세포를 srRNA1ts2-GFP로 형질감염시켰다. 형질감염을 위해, 24-웰 플레이트의 각각의 웰을 1 μ l의 제트메신저 (폴리 플러스) 형질감염 시약과 혼합된 0.5 μ g 합성 RNA (srRNA)로 50 μ l의 최종 부피로 처리하였다. 형질감염 복합체를 세포에 첨가한 후에, 450 μ l의 배양 배지를 첨가하였다. 세포를 32°C에서 인큐베이션하였다. 형질감염 6시간 후에, 배지를 교체하여 형질감염 복합체를 제거하였다. 배지를 매일 교체하였다. srRNA1ts2-GFP 벡터는 "IRES" 서열 뒤에 삽입된 푸로마이신 N-아세틸트랜스퍼라제 (pac) 선택 유전자를 함유하고, 따라서 푸로마이신을 사용하여 선택될 수 있다. 1 μ g/ml의 푸로마이신의 부재 (상부 패널) 또는 존재 (하부 패널) 하에 실험을 수행하였다. 푸로마이신 선택을 사용하는 세포에 대해, 푸로마이신을 48시간 및 72시간에 첨가하였다. 온도 이동의 효과를 시험하기 위해, 세포 배양물을 24시간 (형질감염 24시간 후)에 37°C에서 유지된 CO₂ 인큐베이터로 옮겼다. 24, 48, 72, 96, 144, 168, 192시간에 위상-대조 및 형광 영상을 찍었다.
- [0288] 도 8은 결과를 보여준다. 32°C에서, srRNA1ts2-GFP로부터의 GFP 발현은 이르게는 24시간에 시작하였지만, 24시간에 37°C로 온도를 전환시킨 후에도 계속 증가하였다. GFP의 발현은 48시간에 피크에 도달한 다음, 감소하기 시작하였다. 96시간까지 GFP 발현은 매우 약해졌고, 144시간까지 GFP 발현은 더 이상 검출될 수 없었다. 후속적으로, 192시간에서의 관찰 기간의 종료까지 GFP 발현은 없었다. 따라서, 온도가 33°C (허용 온도)에서 37°C (비-허용 온도)로 이동될 때, GOI의 발현 (본원에서 GFP에 의해 나타내어짐)은 급속히 턴 오프되었다. GFP의 발현 패턴은 푸로마이신의 첨가에 의해 변경되는 것으로 보이지 않았다.
- [0289] 48시간 후에 32°C에서 37°C로 전환된 srRNA1ts2-GFP의 온도-감수성의 평가
- [0290] ADSC-iPSC 세포를 24-웰 플레이트 상에 80,000개 세포/웰의 밀도로 플레이팅하였다. 24시간 후에, 세포를 srRNA1ts2-GFP로 형질감염시켰다. 형질감염을 위해, 24-웰 플레이트의 각각의 웰을 1 μ l의 제트메신저 (폴리 플러스) 형질감염 시약과 혼합된 0.5 μ g 합성 RNA (srRNA)로 50 μ l의 최종 부피로 처리하였다. 형질감염 복합체를 세포에 첨가한 후에, 450 μ l의 배양 배지를 첨가하였다. 세포를 32°C에서 인큐베이션하였다. 형질감염 6시간 후에, 배지를 교체하여 형질감염 복합체를 제거하였다. 배지를 매일 교체하였다. srRNA1ts2-GFP 벡터는 "IRES" 서열 뒤에 삽입된 푸로마이신 N-아세틸트랜스퍼라제 (pac) 선택 유전자를 함유하고, 따라서 푸로마이신을 사용하여 선택될 수 있다. 1 μ g/ml의 푸로마이신의 부재 (상부 패널) 또는 존재 (하부 패널) 하에 실험을 수행하였다. 푸로마이신 선택을 사용하는 세포에 대해, 푸로마이신을 48시간 및 72시간에 첨가하였다. 온도 이동의 효과를 시험하기 위해, 세포 배양물을 48시간 (형질감염 48시간 후)에 37°C에서 유지된 CO₂ 인큐베이터로 옮겼다. 24, 48, 72, 96, 144, 168, 192시간에 위상-대조 및 형광 영상을 찍었다.
- [0291] 도 9는 결과를 보여준다. 32°C에서, srRNA1ts2-GFP로부터의 GFP 발현은 이르게는 24시간에 시작하였고, 48시간에 추가로 증가하였다. GFP의 발현은 48시간에 37°C로 온도를 전환시킨 후에도 96시간까지 계속되었다. 그러나, GFP 발현은 72시간부터 감소하기 시작하였고, 96시간까지 GFP 발현은 매우 약해졌다. 144시간까지 GFP 발현은 거의 검출되지 않았고, 192시간까지 완전히 턴 오프되었다. 따라서, 온도가 33°C (허용 온도)에서 37°C (비-허용 온도)로 이동될 때, GOI의 발현 (본원에서 GFP에 의해 나타내어짐)은 급속히 턴 오프되었다. GFP의 발현 패턴은 푸로마이신의 첨가에 의해 변경되는 것으로 보이지 않았다.
- [0292] 72시간 후에 32°C에서 37°C로 전환된 srRNA1ts2-GFP의 온도-감수성의 평가
- [0293] ADSC-iPSC 세포를 24-웰 플레이트 상에 80,000개 세포/웰의 밀도로 플레이팅하였다. 24시간 후에, 세포를 srRNA1ts2-GFP로 형질감염시켰다. 형질감염을 위해, 24-웰 플레이트의 각각의 웰을 1 μ l의 제트메신저 (폴리 플러스) 형질감염 시약과 혼합된 0.5 μ g 합성 RNA (srRNA)로 50 μ l의 최종 부피로 처리하였다. 형질감염 복합체를 세포에 첨가한 후에, 450 μ l의 배양 배지를 첨가하였다. 세포를 32°C에서 인큐베이션하였다. 형질감염 6시간 후에, 배지를 교체하여 형질감염 복합체를 제거하였다. 배지를 매일 교체하였다. srRNA1ts2-GFP 벡터는 "IRES" 서열 뒤에 삽입된 푸로마이신 N-아세틸트랜스퍼라제 (pac) 선택 유전자를 함유하고, 따라서 푸로마이신을 사용하여 선택될 수 있다. 1 μ g/ml의 푸로마이신의 부재 (상부 패널) 또는 존재 (하부 패널) 하에 실험을 수행하였다. 푸로마이신 선택을 사용하는 세포에 대해, 푸로마이신을 48시간 및 72시간에 첨가하였다. 온도 이동의 효과를 시험하기 위해, 세포 배양물을 72시간 (형질감염 72시간 후)에 37°C에서 유지된 CO₂ 인큐베이터로 옮겼다. 24, 48, 72, 96, 144, 168, 192시간에 위상-대조 및 형광 영상을 찍었다.
- [0294] 도 10은 결과를 보여준다. 32°C에서, srRNA1ts2-GFP로부터의 GFP 발현은 이르게는 24시간에 시작하였고, 48시간에 추가로 증가하였다. GFP의 발현은 48시간에 37°C로 온도를 전환시킨 후에도 96시간까지 계속되었다. 그러나, GFP 발현은 72시간부터 감소하기 시작하였고, 144시간까지 GFP 발현은 매우 약해졌다. 168시간까지 GFP

발현은 거의 검출되지 않았고, 192시간까지 완전히 턴 오프되었다. 따라서, 온도가 33℃ (허용 온도)에서 37℃ (비-허용 온도)로 이동될 때, GOI의 발현 (본원에서 GFP에 의해 나타내어짐)은 급속히 턴 오프되었다. GFP의 발현 패턴은 퓨로마이신의 첨가에 의해 변경되는 것으로 보이지 않았다.

[0295] 섬유모세포에서의 srRNA1ts2-GFP의 온도-감수성의 평가

[0296] 인간 신생아 피부 섬유모세포 (계대 20의 HDFn)를 24-웰 플레이트 상에 10,000개 세포/웰의 밀도로 플레이팅하였다. 24시간 후에, 세포를 srRNA1wt-GFP로 형질감염시켰다. srRNA1wt-GFP (0.5 µg 합성 RNA)의 형질감염을 제트메신저 (폴리플러스) 형질감염 시약 또는 리포펙타민 메신저맥스 (써모-피셔)를 사용하여 수행하였다. 세포를 37℃에서 인큐베이션하였다. 인터페론 반응을 억제하는 것으로 공지된 B18R의 효과를 알아보기 위해, 200 ng/ml B18R의 부재 (상부 패널) 또는 존재 (하부 패널) 하에 형질감염 및 세포 배양을 수행하였다. 배지를 매일 교체하였다. 0, 24, 48 및 96시간에 위상-대조 및 형광 영상을 찍었다.

[0297] 도 11은 결과를 보여준다. B18R의 부재 하에, GFP의 발현은 거의 검출되지 않았다. 대조적으로, B18R의 존재 하에서는, srRNA1wt-GFP로부터의 GFP 발현이 이르게는 24시간에 시작되었고, 48시간 및 72시간까지 계속되었다. GFP의 발현은 GFP+ 세포에서 강했지만, GFP+ 세포의 빈도는 높지 않았다. 이는 인간 1차 섬유모세포에 대한 srRNA1wt-GFP의 낮은 형질감염 효율로 인한 것일 가능성이 가장 컸다.

[0298] 돌연변이체 2 (ts2)에 상응하는 알파바이러스 패밀리의 아미노산 서열의 정렬

[0299] 도 12에 제시된 바와 같이, 알파바이러스의 nsP2 단백질의 구조는, 심지어 아미노산 수준에서도, 패밀리 구성원들 사이에서 잘 보존된다. 3D 구조적 모델 (Russo et al., 2006)에 기초하여, 5개의 아미노산인 서열식별번호: 39 (TGAAA)가 돌연변이체 2 내에 삽입된 단백질 영역은 2개의 베타-시트 구조 사이의 전환점이며, 이는 또한 알파바이러스 패밀리 구성원들 사이에서 잘 보존된다. 따라서, 돌연변이체 2의 온도-감수성은 아우라 (아우라 바이러스), WEEV (서부 말 뇌염 바이러스), BFV (바마 포레스트 바이러스), ONNV (오니옹-니옹 바이러스), RRV (로스 리버 바이러스), SFV (셈리키 포레스트 바이러스) 및 SINV (신드비스 바이러스)를 포함한 다른 알파바이러스 패밀리 구성원으로 전달가능할 가능성이 높다. 온도-감수성을 부여하기 위한 다양한 알파바이러스의 nsP2에의 삽입에 적합한 위치가 표 3-1에 열거되어 있다.

[0300] 표 3-1. 알파바이러스 nsP2 서열 및 삽입 부위

알파바이러스	NCBI 수탁 번호	삽입 위치 (:) 아미노산 위치
베네수엘라 말 뇌염 바이러스	NP_740697	586:587
아우라 바이러스	NP_819011	596:597
서부 말 뇌염 바이러스	CAA52868	683:684
바마 포레스트 바이러스	NP_818996	588:589
오니옹-니옹 바이러스	AAC97204	1123:1124
로스 리버 바이러스	NP_740679	587:588
셈리키 포레스트 바이러스	NP_463457	1125:1126
신드비스 바이러스	AF492770_1	1137:1138

[0301]

[0302] 실시예 4: 온도-감수성 항체

[0303] 본 실시예는 온도-감수성 항체를 기재한다. 허용 온도 (예를 들어, 32℃)에서 기능하고 비-허용 온도 (예를 들어, 37℃)에서는 기능하지 않거나 감소된 기능을 나타내는 항체는 아미노산 서열의 삽입 또는 치환에 의해 조작된다. 온도-감수성 항체는 문헌 [Kamihara and Iijima, 2000; Merutka and Stellwagen, 1990]에 기재된 바와 같이 온도-감수성 헬릭스-코일 전이 펩티드 (-Glu-Ala-Ala-Ala-Lys-, 서열식별번호: 37로서 제시됨)를 코딩하는 링커 올리고뉴클레오타이드를 삽입함으로써 생산될 수 있다. 이러한 방식으로, 허용 온도 (예를 들어, 32℃)에서 기능하지만 비-허용 온도 (예를 들어, 37℃)에서는 기능하지 않는 조작된 항체가 생산될 수 있다. 대안적으로, 저온 환경에서 자연적으로 살아있는 동물 (예를 들어, 대서양 연어 및 새우)의 항체 DNA 서열이 사용될 수 있으며, 이는 이들 항체가 허용 온도에서 (저온에서) 최적으로 기능하지만 비-허용 온도 (예를 들어, 37℃)에서는 감소된 기능성을 나타내기 때문이다.

[0304] 실시예 5: 온도-감수성 단백질

[0305] 본 실시예는 온도-감수성 단백질을 기재한다. 이러한 단백질은 허용 온도 (예를 들어, 32℃)에서 기능하고 비-허용 온도 (예를 들어, 37℃)에서는 기능하지 않거나 낮은 기능을 나타낸다. 온도-감수성 단백질은 아미노산

서열을 치환함으로써 조작된다. 대안적으로, 저온 환경에서 자연적으로 살아있는 동물 (예를 들어, 대서양 연어 및 새우)로부터 수득된 온도-감수성 단백질이 사용될 수 있으며, 이는 이들 단백질이 허용 온도에서 (저온에서) 최적으로 기능하지만 비-허용 온도 (예를 들어, 37℃)에서는 감소된 기능성을 나타내기 때문이다 (예를 들어, 새우 알칼리성 포스파타제).

[0306] 실시예 6: 온도-감수성 RNA

[0307] 본 실시예는 온도-감수성 RNA 분자를 기재한다. RNA 분자는 mRNA, mRNA의 전구체, 비-코딩 RNA, siRNA 및 shRNA를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 온도-감수성 RNA는 허용 온도 (예를 들어, 32℃)에서 기능하고 비-허용 온도 (예를 들어, 37℃)에서는 기능하지 않거나 낮은 기능을 나타낸다. 온도-감수성 RNA는 RNA의 기능적 특성이 유지되는 것을 보장하면서 RNA 분자의 뉴클레오티드를 덜 열-안정한 변이체 (예를 들어, G→A)로 체계적으로 변화시킴으로써 조작된다. 추가로, 온도 이동에 의해 유도되는 뉴클레오티드 쌍의 열안정성의 차이는 RNA의 2차 구조를 변화시킨다.

[0308] 실시예 7: 온도-감수성 작용제를 사용한 세포의 생체외 처리

[0309] 본 실시예는 생체외에서 RNA 또는 단백질을 세포로 일시적으로 전달하는 방법을 입증한다 (도 13). 온도-감수성 치료제는 본원에 개시된 임의의 온도-감수성 치료제일 수 있다. srRNA 또는 센다이 바이러스 벡터와 같은 ts-작용제는 허용 온도 (예를 들어, 33℃)에서 기능적이지만, 비-허용 온도 (예를 들어, 37℃)에서는 비-기능적이다. ts-작용제로 처리된 표적 세포를 허용 온도에서 특정 지속기간 (예를 들어, 3일) 동안 생체외 배양한 다음, 비-허용 온도에서 특정 지속기간 (예를 들어, 10일) 동안 배양한다. GOI의 RNA (또는 RNA로부터 번역된 단백질)의 수준은 허용 온도에서 증가하고, 높은 수준에 도달한다. 비-허용 온도로 전환한 후, RNA의 예상 수준은 점차 감소하고, 후속적으로 비-발현 수준에 도달한다 (도 13).

[0310] 실시예 8: 온도-감수성 작용제의 생체외 치료 용도

[0311] 본 실시예는 생체외에서 RNA 또는 단백질을 세포로 일시적으로 전달하는 방법을 입증한다 (도 14 및 도 15). srRNA 또는 센다이 바이러스 벡터와 같은 ts-작용제는 허용 온도 (예를 들어, 33℃)에서 기능적이지만, 비-허용 온도 (예를 들어, 37℃: 인간 체온)에서는 비-기능적이다. 전형적으로, 표적 세포는 환자로부터 채취되지만 (자가 세포 이식; 도 14), 공여자로부터 단리된 표적 세포를 사용하는 것이 또한 가능하다 (동종 세포 이식; 도 15). 예를 들어, 표적 세포는 항체-접합된 자기 비드를 사용하여 단리될 수 있다. 표적 세포를 허용 온도, 예를 들어 33℃에서 특정 지속기간, 예를 들어 24시간 동안 생체외에서 ts-작용제와 함께 인큐베이션한다. GOI의 RNA (또는 RNA로부터 번역된 단백질)의 수준은 허용 온도에서 증가하고, 높은 수준에 도달한다. 치료 효과가 유도된 후에, 세포를 환자에게 다시 이식하여 환자를 치료한다. 온도-감수성 치료제의 활성은 대상체의 정상 체온에서는 유도되지 않는다 (즉, 정상 체온은 비-허용 온도임). 온도-감수성 치료제의 분해는 치료 효과가 유도된 후에 시작되고, 결국 온도-감수성 치료제는 완전히 분해된다. 체온은 환자의 생애 동안 37℃ 이상으로 유지되고, 따라서 ts-작용제는 재활성화되지 않으며, 표적 세포 이외의 세포는 ts-작용제로 처리되지 않을 것이다.

[0312] 동원된 인간 말초 혈액 세포

[0313] 환자 또는 공여자의 골수 또는 말초 혈액으로부터 단리된 인간 혈액 세포를 생체외에서 허용 온도에서 ts-작용제로 처리한다. G-CSF 또는 다른 동원 작용제의 주사 후에, 분리반출술 기계 (예를 들어, COBE 스펙트라)에 의해 말초 혈액으로부터 인간 백혈구를 수집한다. 골수로부터의 동원 후에 수집된 백혈구는 과립구, 단핵구, 림프구, 수지상 세포, 중간엽 줄기 세포 (MSC), 혈관 내피 세포 (VEC) 및 CD34+ 조혈/전구 세포를 함유한다. 이들 세포를 ts-작용제로 처리하는 것은 생체외에서, 이상적으로는 기능적 폐쇄 시스템, 예컨대 밀테니(Milteny i)의 클리니맥스 프로디지(CliniMacs Prodigy)를 사용하여, 기능적 온도 (예를 들어, 33℃)에서 특정 지속기간 (수시간 내지 수주) 동안 수행한다. 후속적으로, 처리된 세포를 비-허용 온도 (37℃)에서 환자 내로 주입한다. ts-작용제, ts-작용제를 함유하는 세포 또는 ts-작용제의 생성물은 환자의 신체에서 기능하지 않는다.

[0314] 인간 CD34+ 조혈 줄기/전구 세포

[0315] 동원된 인간 말초 혈액 세포 또는 골수 세포로부터 항체 (CD34에 대한 항체)-접합된 자기 비드에 의해 인간 CD34+ 조혈 줄기/전구 세포를 단리하고, 표적 세포로서 사용하여, 생체외에서 허용 온도에서 ts-작용제로 처리한다. ts-작용제로 처리한 후, 인간 CD34+ 세포를 환자의 신체 내로 주입하고, 환자의 골수에 생착시킨다. 이들 세포는 결국 환자의 신체에서 모든 혈액 세포를 생산할 것이고, 따라서 다양한 질환에 적합한 표적이다.

- [0316] 조직 줄기 세포를 포함한 임의의 인간 세포
- [0317] 환자 또는 공여자로부터 분리되고 표적 세포로서 사용된 임의의 인간 세포를 생체외에서 허용 온도에서 ts-작용제로 처리한다. 이러한 세포는 피부 섬유모세포, 여포 세포, 골격근 세포, 간세포 및 신경 조직을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 이러한 세포는 또한 다양한 조직 줄기 세포, 예컨대 중간엽 줄기 세포, 신경 줄기 세포, 근육 줄기 세포, 피부 줄기 세포 및 장 줄기 세포를 포함한다.
- [0318] 실시예 9: 온도-감수성 작용제의 반 생체내 치료 용도
- [0319] 본 실시예는 RNA 또는 단백질을 세포로 일시적으로 전달하기 위한 반 생체내 방법을 기재한다 (도 16). 온도-감수성 치료제는 본원에 개시된 임의의 온도-감수성 치료제일 수 있다. ts-작용제는 허용 온도 (예를 들어, 33℃)에서 기능적이지만, 비-허용 온도 (예를 들어, 37℃)에서는 비-기능적이다.
- [0320] 환자는 치료 저온요법에 대한 절차를 받는다: 환자의 심부 체온은 정상 체온보다 더 낮은 온도 (예를 들어, 33℃)에서 유지된다. 표적 세포 (임의의 세포 - 자가 또는 동종)를 생체외에서 ts-작용제에 의해 처리하고, 즉시 환자의 순환계 내로 주입하거나 또는 환자의 기관 내로 주사한다.
- [0321] 환자가 표적 온도, 예를 들어 33℃에서 일부 시간, 예를 들어 24시간 동안 유지되는 동안, ts-작용제는 그의 예상 기능을 나타낸다. GOI의 RNA (또는 RNA로부터 번역된 단백질)의 수준은 허용 온도에서 증가하고, 높은 수준에 도달한다. 후속적으로, 환자의 체온은 37℃의 정상 온도로 복귀된다. ts-작용제는 환자의 신체 내부 37℃의 비-허용 조건에서는 더 이상 기능하지 않는다. 체온은 환자의 생애 동안 37℃ 이상으로 유지되고, 따라서 ts-작용제는 재활성화되지 않으며, 표적 세포 이외의 세포는 ts-작용제로 처리되지 않을 것이다. 특히, 이러한 치료 절차는 상기 기재된 것을 포함한 임의의 세포 유형에 적용될 수 있다.
- [0322] 실시예 10: 온도-감수성 작용제의 생체내 치료 용도
- [0323] 본 실시예는 온도-감수성 바이러스 벡터가 대상체에게 투여되고, 경도 저체온이 대상체에서 유도될 때 상기 벡터가 일시적으로 활성화되는 방법을 입증한다 (도 17). 온도-감수성 치료제는 본원에 개시된 임의의 온도-감수성 치료제일 수 있다. 온도-감수성 치료제는 허용 온도 (예를 들어, 33℃)에서 기능적이지만, 비-허용 온도 (예를 들어, 37℃: 인간 체온)에서는 비-기능적이다.
- [0324] 대상체의 체온은 표적-온도 관리 (TTM) 절차를 사용하여 저하되며, 이 절차는 심장 및 뇌 외상을 갖는 환자를 위한 클리닉에서 사용되었다 (Callaway et al., 2015). TTM 절차는 일정 지속기간 동안 대상체에서 특정 체온을 달성하고 유지하도록 설계된다. 이러한 절차는 다양한 급성 건강 문제, 예컨대 심장 발작 및 졸중으로 인한 부정적 영향을 감소시키기 위해 이전에 치료적으로 사용되었다. TTM 절차를 사용하는 장비 및 일반적 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있고, 본원에 기재된 방법과 함께 사용될 수 있다. TTM 절차는 카테터 냉각, 블랭킷 냉각 및 신체 주위의 얼음 적용을 포함한 다수의 방법을 사용하여 수행될 수 있다. 이러한 목적을 위해 다양한 기기가 사용되었다. 예를 들어, 아크틱선(ArcticSun)TM은 환자의 체온을 32℃-38.5℃로 감소시키거나 증가시키는데 사용될 수 있는 기기이다 (Pittl et al., 2013). 절차는 안전하게 수행될 수 있고, 이러한 기기에 의해 야기되는 주요 유해 효과는 없는 것으로 보고되었다.
- [0325] 환자는 TTM 절차를 사용하여 저체온 조건 하에 놓이고, 표적 체온은 온도-감수성 치료제의 활성을 유도하기에 충분한 것이다. 온도-감수성 치료제는 전신 경로를 통해 (예를 들어, 정맥내로) 또는 기관/조직 내로의 직접 주사를 통해 (예를 들어, 카테터 또는 경피 바늘 주사를 통해) 환자에게 직접 전달된다 (도 17).
- [0326] 환자의 체온은 허용 온도에서 온도-감수성 치료제의 목적하는 활성을 유도하기에 충분한 시간 동안 유지된다. 온도-감수성 작용제의 목적하는 활성은 온도-감수성 치료제를 함유하거나 이에 노출된 세포에서 치료 효과를 유도한다.
- [0327] 목적하는 치료 효과가 달성된 후에, 환자의 체온은 이어서 정상 체온 (즉, 비-허용 온도)으로 복귀되어 온도-감수성 치료제의 활성이 중지되도록 한다. 이 후 온도-감수성 치료제의 분해가 이어진다.
- [0328] 순환을 통한 전신 전달
- [0329] 환자는 저체온 조건 (예를 들어, 33℃) 하에 놓인다. 환자의 심부 체온이 표적 온도에서 안정하게 유지되면, ts-작용제가 정맥내로 환자에게 직접 전달된다. ts-작용제는 이러한 전신 경로를 통해 많은 기관 및 조직으로 전달된다. 환자의 심부 체온은 기능적 온도에서 목적하는 지속기간 (예를 들어, 24시간) 동안 유지된다. 환자의 체온이 작용제에 대한 허용 온도 (예를 들어, 33℃)에서 유지되는 동안, 작용제가 기능한다. 환자의 체온이

작용제의 비-허용 온도인 37℃ 정상으로 복귀되는 경우에, 작용제는 작용을 정지한다.

- [0330] ts-작용제는 네이키드 RNA (즉, 합성 RNA)일 수 있다. 순환을 통한 전신 전달은 네이키드 RNA를 표적 기관 특이성의 존재 또는 부재 하에 많은 기관으로 전달한다. 대안적으로, ts-작용제는 나노입자에 의해 캡슐화된 RNA (즉, 합성 RNA)이며, 이는 특이적 세포 유형, 조직, 기관, 암, 종양 또는 비정상적 세포를 표적화하도록 조작된다. 따라서, 순환을 통한 전신 전달은 나노입자-캡슐화된 RNA를 특이적 세포 유형, 조직, 기관, 암, 종양 또는 비정상적 세포로 전달한다. 대안적으로, ts-작용제는 바이러스 입자 내로 패키징된 RNA이다. 외피 유형 및 다른 특색에 따라, 바이러스 입자는 특이적 세포 유형, 조직, 기관, 암, 종양 또는 비정상적 세포를 표적화한다. 따라서, 순환을 통한 전신 전달은 바이러스 입자 내로 패키징된 RNA를 특이적 세포 유형, 조직, 기관, 암, 종양 또는 비정상적 세포로 전달한다. 대안적으로, ts-작용제는 온도-감수성 바이러스 벡터이다. 외피 유형 및 다른 특색에 따라, 바이러스 입자는 특이적 세포 유형, 조직, 기관, 암, 종양 또는 비정상적 세포를 표적화한다. 따라서, 순환을 통한 전신 전달은 온도-감수성 바이러스 벡터를 특이적 세포 유형, 조직, 기관, 암, 종양 또는 비정상적 세포로 전달한다.
- [0331] 뇌척수액을 통한 뇌 및 척수로의 표적화 전달
- [0332] 환자는 저체온 조건 (예를 들어, 33℃) 하에 놓인다. 환자의 심부 체온이 표적 온도에서 안정하게 유지되면, ts-작용제가 경막외 주사에 의해 환자의 뇌척수액으로 직접 전달된다. ts-작용제는 뇌 및 척수로 전달된다. 환자의 심부 체온은 허용 온도에서 목적하는 지속기간 (예를 들어, 24시간) 동안 계속 유지된다. 환자의 체온이 작용제에 대한 허용 온도 (예를 들어, 33℃)에서 유지되는 동안, 작용제가 기능한다. 환자의 체온이 작용제의 비-허용 온도인 37℃ 정상으로 복귀되는 경우에, 작용제는 작용을 정지한다.
- [0333] 경피 주사를 통한 간, 신장, 골격근, 심장 근육, 췌장, 골수 및 다른 기관으로의 표적화 전달
- [0334] 환자는 저체온 조건 (예를 들어, 33℃) 하에 놓인다. 환자의 심부 체온이 표적 온도에서 안정하게 유지되면, ts-작용제가 초음파 또는 CT의 시각적 안내 하에 매우 가는 바늘을 사용하여 피부를 통해 (경피로) 기관, 예컨대 간, 신장, 골격근, 심장 근육, 췌장 또는 다른 기관 내로 주사된다. 환자의 심부 체온은 허용 온도에서 목적하는 지속기간 (예를 들어, 24시간) 동안 유지된다. 환자의 체온이 작용제에 대한 허용 온도 (예를 들어, 33℃)에서 유지되는 동안, 작용제가 기능한다. 환자의 체온이 작용제의 비-허용 온도인 37℃ 정상으로 복귀되는 경우에, 작용제는 작용을 정지한다.
- [0335] 주사 바늘 카테터를 사용한 내시경술을 통한 간, 신장, 골격근, 심장 근육, 췌장, 골수 및 다른 기관으로의 표적화 전달
- [0336] 환자는 저체온 조건 (예를 들어, 33℃) 하에 놓인다. 환자의 심부 체온이 표적 온도에서 안정하게 유지되면, ts-작용제가 내시경 주사 바늘 카테터를 통해 특이적 기관 및 조직으로 직접 전달된다. 환자의 심부 체온은 허용 온도에서 목적하는 지속기간 (예를 들어, 24시간) 동안 유지된다. 환자의 체온이 작용제에 대한 허용 온도 (예를 들어, 33℃)에서 유지되는 동안, 작용제가 기능한다. 환자의 체온이 작용제의 비-허용 온도인 37℃ 정상으로 복귀되는 경우에, 작용제는 작용을 정지한다.
- [0337] 혈관카테터를 통한 간, 신장, 골격근, 심장 근육, 췌장, 골수 및 다른 기관으로의 표적화 전달
- [0338] 환자는 저체온 조건 (예를 들어, 33℃) 하에 놓인다. 환자의 심부 체온이 표적 온도에서 안정하게 유지되면, ts-작용제가 혈관카테터를 통해 특이적 기관 및 조직으로 직접 전달된다. 환자의 심부 체온은 허용 온도에서 목적하는 지속기간 (예를 들어, 24시간) 동안 유지된다. 환자의 체온이 작용제에 대한 허용 온도 (예를 들어, 33℃)에서 유지되는 동안, 작용제가 기능한다. 환자의 체온이 작용제의 비-기능적 온도인 37℃ 정상 온도로 복귀되는 경우에, 작용제는 작용을 정지한다.
- [0339] 흡입을 통한 폐 및 다른 기관으로의 표적화 전달
- [0340] 환자는 저체온 조건 (예를 들어, 33℃) 하에 놓인다. 환자의 심부 체온이 표적 온도에서 안정하게 유지되면, ts-작용제가 흡입에 의해 환자에게 직접 전달된다. ts-작용제는 폐를 통한 흡입을 통해 폐 및 다른 기관으로 전달된다. 환자의 심부 체온은 허용 온도에서 목적하는 지속기간 (예를 들어, 24시간) 동안 유지된다. 환자의 체온이 작용제에 대한 허용 온도 (예를 들어, 33℃)에서 유지되는 동안, 작용제가 기능한다. 환자의 체온이 작용제의 비-허용 온도인 37℃ 정상으로 복귀되는 경우에, 작용제는 작용을 정지한다.
- [0341] 비장으로 동원된 골수 세포로의 표적화 전달

- [0342] 환자는 대상체의 비장으로 골수 세포 (비제한적으로 CD34+ 세포, 조혈 줄기 세포, 중간엽 줄기 세포 및 내피 줄기 세포를 포함함)를 동원하기 위해 G-CSF, 플레릭사포르 또는 다른 시토카인의 주사를 받을 것이다. 환자는 저체온 조건 (예를 들어, 33℃) 하에 놓인다. 환자의 심부 체온이 표적 온도에서 안정하게 유지되면, ts-작용제가 상기 기재된 방법을 통해 비장으로 전달된다. 후속적으로, ts-작용제는 비장으로 동원된 골수 세포로 전달된다. 환자의 심부 체온은 허용 온도에서 목적하는 지속기간 (예를 들어, 24시간) 동안 유지된다. 환자의 체온이 작용제에 대한 허용 온도 (예를 들어, 33℃)에서 유지되는 동안, 작용제가 기능한다. 환자의 체온이 작용제에 대한 비-허용 온도인 37℃ 정상 온도로 복귀되는 경우에, 작용제는 작용을 정지한다. 예를 들어, 방법은 치료 유효량의 온도-감수성 작용제 (예를 들어, 온도-감수성 치료제)를 비장 내의 1개 이상의 골수 세포 (비제한적으로 CD34+ 세포, 조혈 줄기 세포, 중간엽 줄기 세포, 내피 줄기 세포를 포함함)에 투여하는 것을 포함할 수 있다.
- [0343] 실시예 11: 온도-감수성 작용제로서의 자기-복제 RNA에 의한 인간 ES 및 iPS 세포의 목적하는 세포 유형으로의 분화
- [0344] 본 실시예는 인간 전사 인자를 발현하는 온도-감수성 자기-복제 RNA가 hPSC를 다양한 분화 세포로 분화시킬 수 있다는 발견을 기재한다. 본 실시예에 제시된 발견은 "ts-작용제를 사용한 세포의 생체의 처리"에 적용될 수 있다. 이러한 방법에 의해 생성된 분화 세포는 환자-유래 iPS 세포의 사용에 의한 인간 질환의 시험관내 모델링 및 약물 스크리닝과 같은 많은 유용한 적용을 갖는다. 본 실시예에 제시된 발견은 "ts-작용제의 생체의 치료 용도"에 적용될 수 있다. 이러한 방법에서 생성된 분화 세포는 환자에 이식되어 결합성 기관 및 조직을 복구할 수 있다. 예를 들어, 이러한 방법에 의해 생체의 생성된 뉴런 (보다 구체적으로 도파민성 뉴런)은 환자의 흑색질 (뇌의 일부)에 이식되어 파킨슨병을 치료한다. 본 실시예에 제시된 발견은 "ts-작용제의 반 생체내 치료 용도"에 적용될 수 있다. 뉴런을 유도하는 ts-작용제로 처리된 세포는 치료 저온요법을 받는 환자 내로 이식되어 환자의 신체에서 ts-유도된 세포 분화가 발생하도록 한다. 분화 세포가 나타나면, 환자의 체온을 비-허용 온도 (즉, 37℃)로 복귀시킴으로써 ts-작용제를 턴 오프한다. 본 실시예에 제시된 발견은 "ts-작용제의 생체내 치료 용도"에 적용될 수 있다. 예를 들어, 전사 인자의 세트를 발현하는 ts-작용제는 (허용 온도에서) 치료 저온요법을 받는 당뇨병 환자의 체장 내로 직접 주사되어 생체내에서 환자의 체장관 세포가 인슐린-분비 베타-세포로 전환되도록 한다. 목적하는 세포가 나타나면, 환자의 체온을 비-허용 온도 (즉, 37℃)로 복귀시킴으로써 ts-작용제를 턴 오프한다.
- [0345] 물질 및 방법
- [0346] 세포 배양
- [0347] 인간 지방 줄기 세포-유래 iPS 세포주 (ADSC-iPS 세포)를 시스템 바이오사이언시스 (캘리포니아주 팔로 알토)로부터 구입하였다. 세포를 표준 hPSC 배양 방법에 따라 미분화 만능 세포로서 상용적으로 유지하였다. 간략하게, 세포를 100 ng/ml FGF2가 보충된 스템피트 베이직02 (아지노모토, 일본)에서 배양하였다. 추가로, 세포를 라미닌-511 기질 (i매트릭스-511, 니피, 일본)로 코팅된 세포 배양 접시 상에서 배양하였다.
- [0348] 온도-감수성 자기-복제 RNA (srRNA1ts2)
- [0349] 관심 유전자 (GOI)의 오픈 리딩 프레임에 srRNA1ts2 벡터 내로 클로닝하여 GOI의 발현이 온도 감수성 방식으로 제어되도록 하였다. 합성 RNA를 문헌 [Yoshioka et al., 2013]에 따라 벡터로부터 시험관내 전사에 의해 생산하고, 이를 형질감염에 사용하였다. 하기 GOI를 srRNA1ts2 벡터 내로 클로닝하였다:
- [0350] srRNA1ts2-NGN3: 인간 뉴로게닌 3 (NGN3) [NCBI 진ID(GeneID): 50674]; 및
- [0351] srRNA1ts2-ETV2: 인간 ETS 변이체 2 (ETV2) [NCBI 진ID: 2116].
- [0352] 결과
- [0353] 뉴런의 생성
- [0354] ADSC-iPSC 세포를 24-웰 플레이트 상에 1.2×10^5 개 세포/웰의 밀도로 플레이팅하였다. 세포를 플레이팅하기 전에, 세포를 Rock 억제제로 1시간 동안 전처리하였다. 플레이팅 24시간 후에, 세포를 srRNA1ts2-NGN3으로 형질감염시켰다. 형질감염을 위해, 24-웰 플레이트의 각각의 웰을 1 μ l의 체트메신저 (폴리플러스) 형질감염 시약과 혼합된 0.5 μ g 합성 RNA (srRNA)로 50 μ l의 최종 부피로 처리하였다. 형질감염 복합체를 세포에 첨가한 후에, 450 μ l의 배양 배지를 첨가하였다. 세포를 33℃에서 72시간 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 세포를 계대배양하고, 오르니틴/라미닌-코팅된 유리 커버슬립 상에서 배양하였다. 이어서, 세포를 37℃에서 배양하였

다. 배지를 매일 교체하였다. srRNA1ts2-NGN3 벡터는 "IRES" 서열 뒤에 삽입된 퓨로마이신 N-아세틸트랜스퍼라제 (pac) 선택 유전자를 함유하고, 따라서 퓨로마이신을 사용하여 선택될 수 있다. 계대배양 후에, 세포를 1 µg/ml의 퓨로마이신의 존재 하에 24시간 동안 배양하였다. 제0일, 제1일, 제2일, 제3일, 제4일, 제5일 및 제6일에 위상-대조 영상을 찍었다 (도 18). 형성된 신경돌기를 보다 명확하게 보여주기 위해, 제6일 영상의 확대 사진이 또한 제시된다. 제9일에, 세포를 고정시키고, 튜블린 베타 III (TUBB3) - 신경 마커에 대한 항체로 염색하였다. 2가지 상이한 배율 (10x, 40x)의 형광 현미경검사 영상이 제시된다 (도 18). 결과는 srRNA1ts2-NGN3이 인간 iPS 세포를 뉴런으로 신속하게 및 효율적으로 분화시킬 수 있다는 것을 보여준다.

[0355] 혈관 내피 세포의 생성

[0356] ADSC-iPSC 세포를 24-웰 플레이트 상에 1.2×10^5 개 세포/웰의 밀도로 플레이팅하였다. 세포를 플레이팅하기 전에, 세포를 Rock 억제제로 1시간 동안 전처리하였다. 플레이팅 24시간 후에, 세포를 srRNA1ts2-ETV2로 형질감염시켰다. 형질감염을 위해, 24-웰 플레이트의 각각의 웰을 1 µl의 제트메신저 (폴리플러스) 형질감염 시약과 혼합된 0.5 µg 합성 RNA (srRNA)로 50 µl의 최종 부피로 처리하였다. 형질감염 복합체를 세포에 첨가한 후에, 450 µl의 배양 배지를 첨가하였다. 세포를 32°C에서 3일 동안 인큐베이션한 다음, 37°C에서 추가 5일 (총 8일) 동안 추가로 배양하였다. 배지를 매일 교체하였다. srRNA1ts2-ETV2 벡터는 "IRES" 서열 뒤에 삽입된 퓨로마이신 N-아세틸트랜스퍼라제 (pac) 선택 유전자를 함유하고, 따라서 퓨로마이신을 사용하여 선택될 수 있다. 33°C에서 37°C로의 온도 전환 시점에 1 µg/ml의 퓨로마이신을 배양물에 첨가하였다. 다음 날, 배지를 1 µg/ml의 퓨로마이신을 함유하는 배지로 대체하였다. 따라서, 세포를 1 µg/ml의 퓨로마이신의 존재 하에 2일 동안 배양하였다. 제1일, 제2일, 제3일, 제4일, 제5일, 제6일, 제7일 및 제8일에 위상-대조 영상을 찍었다 (도 19). 제8일에, 세포를 고정시키고, CD31 (혈관 내피 세포에 대한 마커)에 대한 항체로 염색하였다. 2가지 상이한 배율 (10x, 20x)의 형광 현미경검사 영상이 제시된다 (도 19). 결과는 srRNA1ts2-ETV2가 인간 iPS 세포를 혈관 내피 세포로 신속하게 및 효율적으로 분화시킬 수 있다는 것을 보여준다.

[0357] 실시예 12: 게놈 편집

[0358] 게놈 편집은 뉴클레오타이드 서열을 대체, 결실 또는 부가함으로써 유기체의 게놈을 변경시키는 유전자 조작 방법이다. 게놈 편집은 유전자 요법을 위해 게놈 돌연변이를 교정하는데 사용될 수 있는 것으로 제안되었다. 제1 단계로서, 게놈 DNA는 DNA 뉴클레아제, 예컨대 아연 핑거 뉴클레아제 (ZFN), 전사 활성화인자-유사 이펙터-기반 뉴클레아제 (TALEN) 또는 클러스터링된 규칙적 간격의 짧은 회문식 반복부 (CRISPR)-CAS9 시스템에 의해 특정 위치에서 절단되어야 한다. 이들 효소에 의해 도입된 이중-가닥 DNA 파괴는 세포에 매우 유해하기 때문에, 이들 뉴클레아제의 도입은 주의깊게 제어되어야 한다. 이들 뉴클레아제의 표적화 발현은 시기 및 지속기간의 정밀 제어를 요구한다. 가이드 RNA 및 CAS9 둘 다는 단일 센다이 바이러스 벡터 상에서 코딩될 수 있으며, 이 벡터는 인간 세포의 게놈 편집을 위해 이들 성분을 높은 효율로 전달하는 것을 가능하게 하는 것으로 보고되었다 (Park et al., Molecular Therapy 2016). 그러나, CAS9의 연속 발현은 인간 세포에서 제어불가능한 DNA 파괴 및 돌연변이의 도입을 야기할 수 있다. 따라서, 유전자 편집 시스템을 치료적으로 사용하기 위해, CAS9가 수일이 아니라 대략 수시간인 짧은 시간 동안 발현되도록 하는 것이 바람직하다. 이를 위해, 온도-감수성 작용제가 이들 성분, 특히 뉴클레아제의 전달 비히클로서 사용될 수 있다.

[0359] 먼저, 보고된 CRISPR/CAS9 시스템 (Park et al., 2016)에 사용된 센다이 바이러스 벡터를 온도-감수성 센다이 바이러스 벡터 (SeVts-CAS9-가이드RNA)로 대체한다. 한 실시양태에서, SeVts는 SeV18/TS15ΔF이다 (Ban et al., PNAS 2011). 인간 1차 섬유모세포를 33°C에서 MOI 25로 온도-감수성 센다이 바이러스 벡터로 감염시키고, CO₂ 인큐베이터 내 33°C에서 24-48시간 동안 유지한다. 후속적으로, 세포 배양물의 온도를 나머지 세포 배양물에 대해 37°C로 이동시킨다. 바이러스 복제 및 증가된 CAS9 발현은 세포 배양물이 33°C에서 유지되는 경우에만 발생하고, 따라서 CAS9 뉴클레아제에 대한 세포 노출은 이러한 짧은 시간으로 제한된다. 세포가 37°C에서 배양되는 동안, 온도-감수성 센다이 바이러스 벡터는 결국 세포로부터 소실되고, 따라서 시험관내 및 생체내 CAS9 발현의 재활성화에 대한 우려는 없을 것이다. 유사하게, 온도-감수성 자기-복제 RNA, 예컨대 srRNA1ts2 (srRNA1ts2-CAS9-가이드RNA)가 SeVts-CAS9-가이드RNA 대신에 사용될 수 있다.

[0360] 실시예 13: CAR T 세포 요법

[0361] CAR T 세포 요법은 키메라 항원 수용체 (CAR)를 코딩하는 벡터를 환자 자신의 T 세포 내로 전달하고 세포독성 T 세포에서 CAR을 안정적으로 발현하는 것을 이용한다 (Maus and June 2016). CAR T 세포 요법은 환자 내의 악성 세포를 공격하도록 환자 자신의 T 세포를 재프로그래밍하는 것을 목표로 한다. 예를 들어, CD19를 표적화하는 CAR T 세포는 B-세포 악성종양에 성공적으로 적용되었다. 그러나, CD19는 정상 B 세포에서도 발현되고, 따라서

CAR의 연속 발현은 부작용을 일으킬 수 있어 바람직하지 않다. 따라서, 최근의 임상 시험은 CAR을 코딩하는 합성 mRNA를 환자 자신의 T 세포 내로 전달하여 CAR의 발현이 일시적하도록 한다 (ClinicalTrials.gov 식별자: NCT02624258). 그러나, 짧은 턴오버 시간 (<12시간) 및 합성 mRNA에 의한 비교적 낮은 단백질 발현 수준은 CAR의 충분한 발현 수준을 달성하는데 문제를 제시한다. 이러한 문제를 해결하기 위해, ts-작용제가 CAR의 T 세포로의 전달 비히클로서 사용된다.

[0362] CAR을 T 세포로 전달하기 위한 온도-감수성 작용제의 생체의 치료 용도

[0363] 분리반출술 기계 (COBE 스펙트라) 및 자기 비드-기반 풍부화 방법 (밀테니의 클리니맥스 프로디지)을 사용하여 말초 혈액으로부터 T 세포를 수집한다. 이어서, T 세포를 srRNA1ts2-CAR로 형질감염시키고, 허용 온도 (33°C)에서 24시간 (또는 그 초과) 동안 생체의 배양한다. 이상적으로, 이러한 절차는 기능적으로 폐쇄된 시스템, 예컨대 밀테니의 클리니맥스 프로디지에서 수행한다. 후속적으로, 처리된 세포를 환자 내로 다시 주입한다. 비-허용 온도 (37°C)의 환자 신체에서, srRNA1ts2-CAR은 CAR 생산을 정지시키지만, CAR의 예상 기능을 발휘하기 위해 충분한 양의 CAR이 T 세포의 표면 상에 이미 존재한다. 대안적으로, CAR을 코딩하는 온도-감수성 센다이 바이러스 벡터 (SeVts-CAR)가 srRNA1ts2-CAR 대신에 사용된다. 예를 들어, SeVts는 SeV18/TS15ΔF일 수 있다 (Ban et al., PNAS 2011).

[0364] CAR을 T 세포로 전달하기 위한 온도-감수성 작용제의 반 생체내 치료 용도

[0365] srRNA1ts2-CAR로 처리된 T 세포를 치료 저온요법에 의해 허용 온도 (예를 들어, 33°C)에서 유지된 환자 내로 즉시 주입한다. 허용 온도를 유지하는 동안, srRNA1ts2-CAR은 기능적이다. 그러나, 환자의 온도를 정상 온도 (37°C)로 전환시키는 경우에, srRNA1ts2-CAR은 CAR의 생산을 정지시킨다. 대안적으로, CAR을 코딩하는 온도-감수성 센다이 바이러스 벡터 (SeVts-CAR)가 사용될 수 있다. 예를 들어, SeVts는 SeV18/TS15ΔF일 수 있다 (Ban et al., PNAS 2011).

[0366] CAR을 T 세포로 전달하기 위한 온도-감수성 작용제의 생체내 치료 용도

[0367] srRNA1ts2-CAR은 허용 온도 (33°C)에서 유지된 환자의 신체로의 생체내 전달을 통해 T 세포에 직접 표적화된다. 허용 온도에서 유지되는 동안, srRNA1ts2-CAR은 기능적이다. 그러나, 환자의 온도를 정상 온도 (37°C)로 전환시키는 경우에, srRNA1ts2-CAR은 CAR의 생산을 정지시킨다. 대안적으로, CAR을 코딩하는 온도-감수성 센다이 바이러스 벡터 (SeVts-CAR)가 사용될 수 있다. 예를 들어, SeVts는 SeV18/TS15ΔF일 수 있다 (Ban et al., PNAS 2011).

[0368] 실시예 14: PD1 및 CTLA4의 우성-음성 돌연변이체

[0369] 프로그램화된 사멸-1 (PD1) 및 세포독성 T-림프구 항원-4 (CTLA4)는 면역 체크포인트로서 기능하는 것으로 공지되어 있다. PD1 및 CTLA4에 대한 항체 (예를 들어, 니볼루맙 및 펠름롤리주맙)의 전신 전달은 암 요법에 사용되었다. 그러나, 이들 요법을 받는 환자의 최대 20%는 자가면역과 같은 유해 사건을 경험하였다 (Roberts et al., 2017). 면역 체크포인트는 면역 기능의 활성화를 제한하여 자가면역을 방지하는 기능을 자연적으로 하기 때문에, 항체의 투여에 의해 이들 분자의 기능을 전신적으로 차단하는 것은 암뿐만 아니라 환자 자신의 정상 세포에 대한 면역을 활성화시키는 것으로 간주된다. 이러한 문제를 해결하기 위해, PD1 및 CTLA4의 우성 음성 돌연변이체를 T 세포에서 특이적으로 발현시켜 T 세포에서만 PD1 및 CTLA4의 기능을 차단한다 (Shin et al., 2016). PD1의 경우, 세포의 도메인 및 막횡단 도메인을 함유하지만 세포질 도메인이 결여된 돌연변이체가 우성 음성 돌연변이체 (PD1 디코이 또는 PD1Δ)로서 기능하는 것으로 밝혀졌다 (Shin et al., 2016). 마우스 연구에서 레트로바이러스 벡터가 단리된 T 세포에 PD1 디코이를 전달하는데 사용되었지만, 면역 체크포인트를 장기간 차단하는 것의 잠재적인 유해 효과를 고려하면, 숙주 게놈 내로의 레트로바이러스 벡터의 통합 및 PD1 디코이의 지속적인 발현은 인간에게 바람직하지 않다. 이상적으로, T 세포 (또는 다른 면역 세포)에서의 PD1 디코이의 발현은 그의 유익한 기능을 발휘한 후에 영구적으로 턴 오프되어야 한다. 이를 위해, ts-작용제가 PD1 및 CTLA4의 우성-음성 돌연변이체의 전달 비히클로서 사용된다.

[0370] 우성-음성 PD1 돌연변이체를 전달하기 위한 온도-감수성 작용제의 생체의 치료 용도

[0371] 분리반출술 기계 (COBE 스펙트라) 및 자기 비드-기반 풍부화 방법 (밀테니의 클리니맥스 프로디지)을 사용하여 말초 혈액으로부터 표적 세포 (예를 들어, T 세포)를 수집한다. 이어서, 표적 세포를 srRNA1ts2-PD1Δ로 형질감염시키고, 허용 온도 (예를 들어, 33°C)에서 목적하는 양의 시간 (예를 들어, 24시간 또는 1주) 동안 배양한다. 후속적으로, 처리된 세포를 환자 내로 주입한다. 비-허용 온도 (37°C)의 환자 신체에서, srRNA1ts2-PD1Δ는 결국 PD1Δ 생산을 정지시킬 것이다. 그러나, PD1Δ 단백질이 표적 세포에 존재하는 한, PD1 기능은 차단된

다. 대안적으로, PD1Δ를 코딩하는 온도-감수성 센다이 바이러스 벡터가 srRNA1ts2-PD1Δ 대신에 사용될 수 있다. 예를 들어, SeVts는 SeV18/TS15ΔF일 수 있다 (Ban et al., PNAS 2011).

[0372] 양성-음성 PD1 돌연변이체를 전달하기 위한 온도-감수성 작용제의 반 생체내 치료 용도

[0373] srRNA1ts2-PD1Δ로 처리된 T 세포를 치료 저온요법에 의해 허용 온도 (예를 들어, 33℃)에서 유지된 환자 내로 즉시 주입한다. 허용 온도에서 유지되는 동안, srRNA1ts2-PD1Δ는 기능적이다. 그러나, 환자의 온도를 정상 온도 (37℃)로 전환시키는 경우에, srRNA1ts2-PD1Δ는 PD1Δ의 생산을 정지시킨다. 대안적으로, PD1Δ를 코딩하는 온도-감수성 센다이 바이러스 벡터가 srRNA1ts2-PD1Δ 대신에 사용될 수 있다. 예를 들어, SeVts는 SeV18/TS15ΔF일 수 있다 (Ban et al., PNAS 2011).

[0374] 양성-음성 PD1 돌연변이체를 전달하기 위한 온도-감수성 작용제의 생체내 치료 용도

[0375] srRNA1ts2-PD1Δ는 허용 온도 (33℃)에서 유지된 환자의 신체 내로의 생체내 전달을 통해 T 세포에 직접적으로 표적화된다. 허용 온도를 유지하는 동안, srRNA1ts2-PD1Δ는 기능적이다. 그러나, 환자의 온도를 정상 온도 (37℃)로 전환시키는 경우에, srRNA1ts2-PD1Δ는 PD1Δ의 생산을 정지시킨다. 대안적으로, PD1Δ를 코딩하는 온도-감수성 센다이 바이러스 벡터가 srRNA1ts2-PD1Δ 대신에 사용될 수 있다. 예를 들어, SeVts는 SeV18/TS15ΔF일 수 있다 (Ban et al., PNAS 2011).

[0376] 실시예 15: CAR T 세포와 PD1 및 CTLA4의 양성-음성 돌연변이체의 조합 요법

[0377] PD1-차단 항체의 전신 투여는 CAR T 세포에 의한 종양의 근절을 증진시킨다 (John et al., 2013). ts-작용제, 특히 srRNA1ts2는 큰 카고 용량을 갖고 동일한 벡터에 다수의 유전자를 수용할 수 있기 때문에, srRNA1ts2는 동일한 T 세포에 대한 PD1-차단 기능 및 CAR 둘 다를 위한 전달 비히클을 제공한다.

[0378] CAR 및 양성-음성 PD1을 T 세포로 전달하기 위한 온도-감수성 작용제의 생체외 치료 용도

[0379] PD1Δ 및 CAR의 코딩 영역을 이들 사이의 P2A 펩티드 (자기-절단 펩티드) 삽입물과 융합시킨다. 이러한 융합 단백질-코딩 서열을 이제 GOI로서 srRNA1ts2 벡터에 삽입한다. srRNA1ts2-PD1Δ-CAR 벡터로부터 합성 RNA (srRNA1ts2-PD1Δ-CAR)를 생성한다. 분리반출술 기계 (COBE 스펙트라) 및 자기 비드-기반 풍부화 방법 (밀테니의 클리니맥스 프로디지)을 사용하여 말초 혈액으로부터 T 세포를 수집한다. 이어서, T 세포를 srRNA1ts2-PD1Δ-CAR로 형질감염시키고, 허용 온도 (33℃)에서 24시간 (또는 그 초과) 동안 배양한다. 후속적으로, 처리된 세포를 환자 내로 다시 주입한다. 비-허용 온도 (37℃)의 환자 신체에서, srRNA1ts2-PD1Δ-CAR은 PD1Δ 및 CAR의 생산을 정지시킨다. 그러나, 충분한 양의 PD1Δ 및 CAR이 T 세포의 표면 상에 이미 존재한다. 대안적으로, PD1Δ-CAR을 코딩하는 온도-감수성 센다이 바이러스 벡터가 srRNA1ts2-PD1Δ-CAR 대신에 사용될 수 있다. 예를 들어, SeVts는 SeV18/TS15ΔF일 수 있다 (Ban et al., PNAS 2011).

[0380] CAR 및 양성-음성 PD1을 T 세포로 전달하기 위한 온도-감수성 작용제의 반 생체내 치료 용도

[0381] srRNA1ts2-PD1Δ-CAR로 처리된 T 세포를 치료 저온요법에 의해 허용 온도 (예를 들어, 33℃)에서 유지된 환자 내로 즉시 주입한다. 허용 온도에서 유지되는 동안, srRNA1ts2-PD1Δ-CAR은 기능적이다. 그러나, 환자의 온도를 정상 온도 (37℃)로 전환시키는 경우에, srRNA1ts2-PD1Δ-CAR은 CAR 및 PD1Δ의 생산을 정지시킨다. 대안적으로, PD1Δ-CAR을 코딩하는 온도-감수성 센다이 바이러스 벡터가 srRNA1ts2-PD1Δ-CAR 대신에 사용될 수 있다. 예를 들어, SeVts는 SeV18/TS15ΔF일 수 있다 (Ban et al., PNAS 2011).

[0382] CAR 및 양성-음성 PD1을 T 세포로 전달하기 위한 온도-감수성 작용제의 생체내 치료 용도

[0383] srRNA1ts2-PD1Δ-CAR은 허용 온도 (33℃)에서 유지된 환자의 신체 내로의 생체내 전달을 통해 T 세포에 직접 표적화된다. 허용 온도에서 유지되는 동안, srRNA1ts2-PD1Δ-CAR은 기능적이다. 그러나, 환자의 온도를 정상 온도 (37℃)로 전환시키는 경우에, srRNA1ts2-PD1Δ-CAR은 CAR 및 PD1Δ의 생산을 정지시킨다. 대안적으로, PD1Δ-CAR을 코딩하는 온도-감수성 센다이 바이러스 벡터가 srRNA1ts2-PD1Δ-CAR 대신에 사용될 수 있다. 예를 들어, SeVts는 SeV18/TS15ΔF일 수 있다 (Ban et al., PNAS 2011).

[0384] 실시예 16: 리보핵단백질

[0385] 리보핵단백질은 RNA와 복합체를 형성함으로써 기능한다. 리보핵단백질의 치료적 적용은, 동일한 벡터로부터 단백질 및 RNA 둘 다를 발현시키는 것이 어렵기 때문에, 난제이다. 예를 들어, 텔로머라제의 주요 성분은 인간 텔로머라제 리버스 트랜스크립타제 (TERT) 및 텔로머라제 RNA (TERC)이다. 텔로미어의 비정상적 단축은 질환을 야기한다. 따라서, 텔로미어를 연장시키기 위한 텔로머라제 (TERT+TERC)의 전달은 바람직한 치료적 개입이다.

그러나, 텔로머라제의 지속적인 존재는 종양 형성과 같은 유해 사건을 야기할 수 있다. 따라서, TERT 및 TERC 둘 다의 시간-제한적 전달을 갖는 것이 바람직하다. 이를 위해, ts-작용제가 TERT 및 TERC의 전달 비히클로서 사용될 수 있다.

- [0386] TERT 및 TERC를 전달하기 위한 온도-감수성 작용제의 생체의 치료 용도
- [0387] 단백질 TERT를 온도-감수성 방식으로 발현하도록 srRNA1ts2 벡터를 구축한다. 벡터는 또한 자기-절단 리보자임 (예를 들어, 해머헤드 리보자임)에 의해 샌드위치된 RNA 성분인 TERC를 함유한다. 생성된 벡터를 사용하여 합성 RNA (srRNA1ts2-TERT-TERC)를 생성한다. 표적 세포 (예를 들어, 조혈 줄기 세포)를 srRNA1ts2-TERT-TERC로 형질감염시킨다. 허용 온도 (예를 들어, 33℃)에서, srRNA1ts2-TERT-TERC는 복제되고 TERT (단백질)를 생산한다. 동시에, 일부 RNA 분자 (srRNA1ts2-TERT-TERC)는 리보자임에 의해 자기-절단되고, TERC (RNA)가 된다. 이어서, TERT 및 TERC는 텔로머라제 복합체를 형성하고, 텔로미어를 연장시킨다. 이어서, 표적 세포 (예를 들어, 조혈 줄기 세포)를 환자의 순환계 내로 주입한다. 비-허용 온도인 37℃에서, srRNA1ts2-TERT-TERC는 작용을 정지한다. 대안적으로, TERT-TERC를 코딩하는 온도-감수성 센다이 바이러스 벡터가 srRNA1ts2-TERT-TERC 대신에 사용될 수 있다. 예를 들어, SeVts는 SeV18/TS15ΔF일 수 있다 (Ban et al., PNAS 2011).
- [0388] TERT 및 TERC를 전달하기 위한 온도-감수성 작용제의 반 생체내 치료 용도
- [0389] srRNA1ts2-TERT-TERC로 처리된 표적 세포를 치료 저온요법에 의해 허용 온도 (예를 들어, 33℃)에서 유지된 환자에게 즉시 이식한다. 허용 온도에서 유지되는 동안, srRNA1ts2-TERT-TERC는 기능적이다. 그러나, 환자의 온도를 정상 온도 (37℃)로 전환시키는 경우에, srRNA1ts2-TERT-TERC는 TERT 및 TERC의 생산을 정지시킨다. 대안적으로, TERT-TERC를 코딩하는 온도-감수성 센다이 바이러스 벡터가 srRNA1ts2-TERT-TERC 대신에 사용될 수 있다. 예를 들어, SeVts는 SeV18/TS15ΔF일 수 있다 (Ban et al., PNAS 2011).
- [0390] TERT 및 TERC를 전달하기 위한 온도-감수성 작용제의 생체내 치료 용도
- [0391] srRNA1ts2-TERT-TERC는 허용 온도 (33℃)에서 유지된 환자의 신체 내로의 생체내 전달을 통해 세포에 직접 표적화된다. 허용 온도에서 유지되는 동안, srRNA1ts2-TERT-TERC는 기능적이다. 그러나, 환자의 온도를 정상 온도 (37℃)로 전환시키는 경우에, srRNA1ts2-TERT-TERC는 TERT 및 TERC의 생산을 정지시킨다. 대안적으로, TERT-TERC를 코딩하는 온도-감수성 센다이 바이러스 벡터가 srRNA1ts2-TERT-TERC 대신에 사용될 수 있다. 예를 들어, SeVts는 SeV18/TS15ΔF일 수 있다 (Ban et al., PNAS 2011).
- [0392] 실시예 17: 유전자 녹다운 또는 침묵
- [0393] 마이크로RNA, siRNA 및 shRNA를 포함한 RNAi는 치료 목적을 위해 특이적 유전자의 기능을 녹다운시키기 위한 매력적인 선택이 되었다 (Kaczmarek et al., 2017). 그러나, RNAi 기술의 결점은 그의 작용이 매우 단시간이어서 다량의 siRNA의 반복 투여가 요구된다는 것이다. 다른 한편으로, 플라스미드 및 바이러스가 PolIII 프로모터로부터 shRNA의 강한 발현을 제공할 수 있지만, 발현을 정지시키는 것이 요구되는 경우 정지시키기가 어렵다. 추가로, DNA-기반 shRNA 발현 시스템은 유기체의 게놈 내로 통합되어 돌연변이를 야기할 수 있다. 이러한 의미에서, 온도-감수성 srRNA 또는 센다이 바이러스 벡터는 이들이 RNAi의 풋프린트 없이 (유기체의 게놈 내로의 통합 없이) 제어가능하고 장기적인 발현을 제공하기 때문에 이상적인 해결책을 제공할 수 있다.
- [0394] shRNA. shRNA는 문헌 [Park et al., 2016]에 제시된 자기-절단 리보자임이 플랭킹된 가이드 RNA와 유사한 방식으로, 자기-절단 리보자임이 플랭킹된 GOI로서 srRNA1ts2 또는 SeVts에 혼입된다. srRNA1ts2-shRNA는 표적 세포로 전달되며, 여기서 표적 유전자는 표적 세포가 허용 온도에서 유지되는 경우에 침묵된다. 그러나, 온도가 비-허용 온도로 이동되는 경우에, shRNA의 생산은 정지되고, 표적 유전자는 침묵되지 않는다. 대안적으로, shRNA를 코딩하는 온도-감수성 센다이 바이러스 벡터가 srRNA1ts2-shRNA 대신에 사용될 수 있다. 예를 들어, SeVts는 SeV18/TS15ΔF일 수 있다 (Ban et al., PNAS 2011).
- [0395] dsRNA. 긴 이중-가닥 RNA (dsRNA)의 발현 유닛은 표적 RNA (즉, 녹다운될 것)의 긴 센스-가닥 및 그의 안티센스-가닥을 짧은 링커 RNA 서열에 의해 연결함으로써 제조된다. 이러한 dsRNA의 발현 유닛은 자기-절단 리보자임이 플랭킹된 가이드 RNA (Park et al., 2016 및 Shinagawa T1, Ishii S. 2003)와 유사한 방식으로, 자기-절단 리보자임이 플랭킹된 GOI로서 srRNA1ts2 벡터에 삽입된다. dsRNA로부터 siRNA의 형성을 용이하게 하기 위해, srRNA1ts2 벡터는 또한 인간 DICER1 (NCBI 참조 서열: NG_016311.1)을 발현한다. srRNA1ts2-dsRNA 또는 srRNA1ts2-DICER1-dsRNA는 표적 세포로 전달되며, 여기서 표적 유전자는 표적 세포가 허용 온도에서 유지되는 경우에 침묵된다. 그러나, 온도가 비-허용 온도로 이동되는 경우에, dsRNA (및 존재하는 경우 DICER1)의 생산은 정지되고, 표적 유전자는 침묵되지 않는다. 대안적으로, dsRNA 또는 dsRNA-DICER1을 코딩하는 온도-감수성

센다이 바이러스 벡터가 srRNA1ts2-dsRNA 또는 srRNA1ts2-dsRNA-DICER1 대신에 사용될 수 있다. 예를 들어, SeVts는 SeV18/TS15 Δ F일 수 있다 (Ban et al., PNAS 2011).

[0396] asRNA. 표적 RNA의 안티센스-가닥 (asRNA) (즉, 녹다운될 것)은 문헌 [Park et al., 2016 및 Shinagawa T1, Ishii S. 2003]에 제시된 자기-절단 리보자임이 플랭킹된 가이드 RNA와 유사한 방식으로, 자기-절단 리보자임이 플랭킹된 GOI로서 srRNA1ts2 벡터에 삽입된다. dsRNA로부터 siRNA의 형성을 용이하게 하기 위해, srRNA1ts2 벡터는 또한 인간 DICER1 (NCBI 참조 서열: NG_016311.1)을 발현한다. srRNA1ts2-asRNA 또는 srRNA1ts2-DICER1-asRNA는 표적 세포로 전달되며, 여기서 표적 유전자는 표적 세포가 허용 온도에서 유지되는 경우에 침묵된다. 그러나, 온도가 비-허용 온도로 이동되는 경우에, sRNA (및 존재하는 경우 DICER1)의 생산은 정지되고, 표적 유전자는 침묵되지 않는다. 대안적으로, asRNA 또는 asRNA-DICER1을 코딩하는 온도-감수성 센다이 바이러스 벡터가 srRNA1ts2-asRNA 또는 srRNA1ts2-asRNA-DICER1 대신에 사용될 수 있다. 예를 들어, SeVts는 SeV18/TS15 Δ F일 수 있다 (Ban et al., PNAS 2011).

[0397] 상기 상술된 유전자 녹다운 또는 유전자 침묵 방법은 "ts-작용제를 사용한 세포의 생체외 처리", "ts-작용제의 생체외 치료 용도", "ts-작용제의 반 생체내 치료 용도" 또는 "ts-작용제의 생체내 치료 용도" 중 임의의 것에 적용된다.

[0398] 실시예 18: 세포 융합 요법

[0399] 재생 의학 분야에서의 전략 중 하나는 인간 만능 줄기 세포, 예컨대 배아 줄기 (ES) 세포 및 유도된 만능 줄기 (iPS) 세포를 목적하는 세포 유형, 예컨대 뉴런 및 근육으로 분화시킨 다음, 이들 분화 세포를 환자 내로 이식하는 것이다. 종종, 환자 자신의 세포로부터 제조된 iPS 세포, 예컨대 혈액 세포 또는 섬유모세포를 사용하는 것이 바람직하다. 예를 들어, 근육 이영양증을 갖는 환자를 치료하기 위해, ES 세포 또는 iPS 세포로부터 생체외 분화된 골격근 세포를 환자의 골격근에 이식할 수 있다. 기술적 과제 중 하나는 외인성 근육 세포의 적절한 생착 및 환자의 결합성 근육 기능의 대체 또는 보충을 보장하는 것이다. 이러한 문제를 해결하기 위해, 융합생성 단백질을 코딩하는 RNA를 외인성 근육 세포 내로 전달할 수 있으며, 이는 외인성 근육 세포와 환자 자신의 근육 세포 사이의 세포-대-세포 융합을 용이하게 한다.

[0400] 융합생성 단백질을 전달하기 위한 온도-감수성 작용제의 반 생체내 치료 용도

[0401] 융합생성 단백질, 예컨대 센다이 바이러스 F 및 HN 단백질을 발현하도록 srRNA1ts2 벡터를 구축한다. F 및 HN을 P2A 자기-절단 펩티드를 통해 단일 단백질로 융합시킨다. srRNA1ts2-F-HN 벡터를 사용하여 합성 RNA (srRNA1ts2-F-HN)를 생성한다. 세포 표면 상의 F 및 HN 단백질의 존재가 세포 융합을 유도할 수 있다는 것은 잘 확립되어 있다 (Rawling et al., 2008). 대안적으로, 세포-대-세포 융합을 단독으로 유도할 수 있는 인간 호흡기 세포융합 바이러스 F 단백질 (Rawling et al., 2008)을 srRNA 벡터 내로 클로닝하여 합성 RNA (srRNA1ts2-RSVF)를 생성한다. 융합생성 단백질의 또 다른 예는 미오메이커 (Mymk) 및 미오믹서 (Mymx) (또한 미오머저로도 공지됨)이다 (Bi et al., 2017). 미오메이커 및 미오믹서를 P2A 자기-절단 펩티드를 통해 단일 단백질로 융합시킨다. srRNA1ts2-Mymk-Mymx 벡터를 사용하여 합성 RNA (srRNA1ts2-Mymk-Mymx)를 생성한다. 미오메이커 및 미오믹서 둘 다 존재는 근육뿐만 아니라 섬유모세포에서도 세포-대-세포 융합을 유도한다 (Bi et al., 2017). 인간 iPS 세포를 상기 기재된 방법을 사용하여 골격근으로 분화시킨다. 이어서, 골격근을 srRNA1ts2-HN-F 또는 srRNA1ts2-RSVF 또는 srRNA1ts2-Mymk-Mymx로 형질감염시킨 직후에, 이를 치료 저온요법에 대한 절차에 의해 체온이 이미 33 $^{\circ}$ C로 저하된 환자의 골격근 내로 주사한다 (도 15). 환자가 표적 온도 (33 $^{\circ}$ C)에서 24시간 동안 유지되는 동안, 융합생성 단백질이 이식된 골격근 세포에서 발현되고, 이어서 환자 자신의 결합성 골격근 세포에 융합된다. 후속적으로, 환자의 체온은 37 $^{\circ}$ C의 정상 온도로 복귀된다. ts-작용제 및 융합생성 단백질은 환자의 신체 내부 37 $^{\circ}$ C의 이러한 비-기능적 조건에서는 더 이상 기능하지 않는다.

[0402] ts-작용제의 이러한 반 생체내 용도로 치료될 수 있는 조직은 골격근에 제한되지는 않는다. 심근세포 및 간세포는 통상적으로 다배수성이고, 따라서 심장 조직 및 간이 이러한 요법에 적합한 표적이다. 심근세포 및 간세포는 인간 ES/iPS 세포로부터 용이하게 생성될 수 있는 조직이다. 추가로, ts-작용제의 반 생체내 용도는 신경계 질환, 예컨대 척수 손상 및 신경변성 질환, 예컨대 파킨슨병을 치료하는데 사용될 수 있다. 대안적으로, 온도-감수성 센다이 바이러스 벡터가 srRNA1ts 대신에 사용될 수 있다. 예를 들어, SeVts는 SeV18/TS15 Δ F일 수 있다 (Ban et al., PNAS 2011).

[0403] 상기 상술된 유전자 녹다운 또는 유전자 침묵 방법은 "ts-작용제를 사용한 세포의 생체외 처리", "ts-작용제의 생체외 치료 용도", "ts-작용제의 반 생체내 치료 용도" 또는 "ts-작용제의 생체내 치료 용도" 중 임의의 것에

적용될 수 있다.

[0404] 실시예 19: 백신

[0405] 온도-감수성 작용제 (ts-작용제), 예컨대 srRNA 또는 센다이 바이러스 백신은 허용 온도 (예를 들어, 약 31-34℃)에서 기능적이지만, 비-허용 온도 (예를 들어, $\geq 37^{\circ}\text{C}$)에서는 비-기능적이다. 인간 대상체의 심부 체온은 약 37℃이지만, 인간 대상체의 표면 체온은 약 31-34℃이다. 따라서, 인간 환자의 신체의 표면에 또는 그 근처에 있는 세포에 (예를 들어, 피내로, 피하로 또는 근육내로) 투여된 ts-작용제는 인간 환자의 심부 체온을 저하시키지 않으면서 기능적이다 (도 20). 추가의 행위는 요구되지 않는다.

[0406] 유사하게, 인간 대상체의 비강 및 상부 기관의 온도는 약 32℃이고, 인간 대상체의 구역기관지까지의 온도는 약 35℃이다 (McFadden et al., 1985). 이와 같이, 인간 환자의 상기도 (비강, 인두 및/또는 후두) 및/또는 상부 기관의 세포에 비강내로 투여된 ts-작용제는 인간 환자의 심부 체온을 저하시키지 않으면서 기능적이다 (도 22). 비강내 투여는 취입, 흡입 또는 점적주입에 의해 수행될 수 있다. 추가의 행위는 요구되지 않는다.

[0407] 대안적으로, 인간 환자의 신체 표면에 또는 그 근처에 있는 세포에 (예를 들어, 피내로, 피하로 또는 근육내로) 투여된 ts-작용제는 후속적으로 인간 환자의 표면 체온을 상승시킴으로써, 예를 들어 열 패치 또는 가열 패드를 환자 피부의 치료 영역에 적용하거나, 따뜻한 욕조에 담그거나 또는 뜨거운 사우나에 앉힘으로써 비-기능적이 될 수 있다. 이러한 치료 절차는 ts-작용제가 의도된 영역에서만 기능적이고 환자 신체의 다른 영역에서는 비-기능적이라는 점에서 매우 안전하다. 유사하게, 인간 환자의 상기도 (비강, 인두 및/또는 후두) 및/또는 상부 기관의 세포에 비강내로 투여된 ts-작용제는 인간 환자를 비-허용 온도 (예를 들어, $\geq 37^{\circ}\text{C}$)를 갖는 환경에 배치함으로써 비-기능적이 될 수 있다.

[0408] srRNA1ts2를 백신으로서 사용하는 면역원성 조성물 및 백신은 모든 유형의 병원체에 대한 면역 반응을 유도하는 데 적합하다. 예를 들어, 병원체의 항원의 코딩 영역이 공지되어 있으면, 재조합 srRNA1ts2 백신을 비교적 신속하게 구축할 수 있다. 추가적으로, srRNA1ts2 백신의 RNA는 동물 또는 인간 기원의 물질을 사용하지 않고 시험관내에서 전사시킬 수 있다. 이러한 방식으로, srRNA1ts2 백신을 사용하는 백신은 현행 우수 제조 관리기준을 사용하는 생산에 용이하게 적합화된다. 대안적으로, 병원체의 항원을 코딩하는 온도-감수성 센다이 바이러스 백신이 사용될 수 있다 (예를 들어, SeV18/TS15ΔF).

[0409] srRNA1ts2의 구축은 상기 실시예 3에 기재되어 있다. 간략하게, srRNA1ts2는 베네수엘라 말 뇌염 바이러스 (VEEV) 구조 단백질 코딩 영역이 결여된 VEEV 레플리콘을 포함한다. VEEV 레플리콘은 15-18개 뉴클레오타이드의 삽입을 갖는 VEEV 비구조 단백질 코딩 영역을 포함하며, 상기 삽입은 비구조 단백질 2 (nsP2 = 헬리카제 프로테이나제)의 베타 시트 5와 베타 시트 6 사이에 5 또는 6개의 추가의 아미노산 (서열식별번호: 39 = TGAAA)을 포함하는 nsP2의 발현을 유발한다. 추가의 아미노산은 자기-복제 RNA의 온도-감수성을 생성한다.

[0410] 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스-2 (SARS-CoV-2, 또한 2019-nCoV로도 공지됨)의 스파이크 단백질 (또는 그의 부분)을 코딩하는 예시적인 srRNA1ts2 백신의 게놈이 도 21에 제시된다. 관련 코로나바이러스의 스파이크 단백질 및 스파이크 단백질의 수용체-결합 도메인 (RBD)은 백신 및 약물 개발을 위한 표적으로서 이전에 확인되었다 (Du et al., Nat Rev Microbiol, 7:226-236, 2009). 2019-nCoV의 RNA 게놈의 서열은 NCBI 수탁 번호: NC_045512에 제시된다. 3종의 별개의 온도-감수성 srRNA1ts2 백신을 구축하였다. srRNA1ts2-2019-nCoV-스파이크는 전장 스파이크 단백질을 코딩한다. srRNA1ts2-2019-nCoV-RBD1은 스파이크 단백질의 RBD에 융합된 CD5 신호 펩티드를 코딩한다. srRNA1ts2-2019-nCoV-RBD2는 RBD에 융합된 스파이크 단백질의 신호 펩티드, 막횡단 도메인 및 스파이크 단백질의 세포질 꼬리를 코딩한다. 스파이크 단백질 또는 그의 단편의 발현은 VEEV 레플리콘의 26S 프로모터에 의해 구동된다.

[0411] 전체 RNA를 T7 RNA 폴리머라제를 사용하여 시험관내에서 전사시킨다. 이어서, RNA를 대상체의 피부 조직의 세포 내로 형질감염시킨다. 형질감염에 적합한 방법은 네이키드 RNA의 패치 전기천공에 의한 것이다. 대안적으로, 미세바늘을 사용하여 RNA를 피내로 형질감염시킨다. 예를 들어, 히알루론산 또는 키토산-히알루론산 복합체로 제조된 용해성 미세바늘을 사용하여 RNA를 피내로 형질감염시킨다. 일부 실시양태에서, 정기적 망투 절차가 사용될 수 있다. 대안적으로, 피내 주사를 용이하게 하도록 설계된 특수 주사 장치가 사용될 수 있다.

[0412] srRNA1ts2-2019-nCoV-스파이크의 스파이크 단백질의 아미노산 서열은 서열식별번호: 41로서 제시된다:

MFVFLVLLPLVSSQCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFS
 NVTWFHAIHVSGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSKTQSLIIV
 NNATNVVIKVCEQFCNDPFLGVYYHKNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLLMDLE
 GKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPOGFSALEPLVDLPIGINITRFQT
 LLALHRSYLTSGDSSSGWTAGAAAYVGYLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCALDPLSETK
 CTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRRKRISN
 CVADYSVLVNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIAD
 YNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGNNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIQAGSTPC
 NGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVN
 FNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQOQGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVSVITP
 GTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEHVNNYSY
 ECDIPIGAGICASYQTQTSNPRRARSVASQSIIAYTMSLGAENSVAYSNNIAIPTNFTI
 SVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTECNNLLQYGSFCTQLNRALTGIAVEQDKNTQE
 VFAQVQKIYKTPPIKDFGGNFNSQILPDPSKPSKRSFIEDLLFNKVTLDAGFIKQYGD
 LGDIAARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDEMIAQYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAM
 QMAYRFNGIGVTVNVLNENQKLIANQFNSAIGKIQDSLSTASALGKLQDVVNQNAQALN
 TLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRDKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRA
 SANLAATKMSSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSFPQSAPHGVVFLHVTYVPAQEKNFTTAPA
 ICHDGAHFHPREGVFSVNGTHWFVTQRNFYEPQIITTDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDP
 LQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVLGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDL
 QELGKYEQYIKWPWYIWLGFIAGLIAIVMVTIMLCCMTSCCSCCLKGCCSCGSCCKFDEDD
 SEPVLKGVKLHYT

[0413]

[0414] 신호 펩티드는 잔기 1-15에 이르고, 세포외 영역은 잔기 16-1213에 이르고, 막횡단 도메인은 잔기 1214-1236에 이르고, 세포질 도메인은 잔기 1237-1273에 이른다.

[0415] srRNA1ts2-2019-nCoV-RBD1의 스파이크 단백질 단편의 아미노산 서열은 서열식별번호: 42로서 제시된다:

MPMGSLQPLATLYLLGMLVASCLGPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRRKRISNVCADY
 SVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKL
 PDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGNNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIQAGSTPCNGVEG
 FNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAP

[0416]

[0417] CD5 신호 펩티드는 잔기 1-24에 이르고, RBD는 잔기 25-192에 이른다.

[0418] srRNA1ts2-2019-nCoV-RBD2의 스파이크 단백질 단편의 아미노산 서열은 서열식별번호: 43으로서 제시된다:

MFVFLVLLPLVSSQCPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRRKRISNVCADYSVLVNSASF
 STFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVI
 AWNSNNLDSKVGNNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQS
 YGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPWYIWLGFIAGLIAIVMVTIMLCCMTSCCSCCLKG
 CCSCGSCCKFDEDDSEPVLKGVKLHYT

[0419]

[0420] 신호 펩티드는 잔기 1-15에 이르고, RBD는 잔기 16-207에 이르고, 막횡단 도메인은 잔기 208-230에 이르고, 세포질 도메인은 잔기 231-267에 이른다.

[0421] RBD의 아미노산 서열은 서열식별번호: 44로서 제시된다:

```
PNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNKRKISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSP TKLND
LCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNY
NYLYRLFRKSNLKPFFERDISTEIYQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYPYR
VVVLSFELLHAP
```

[0422]

[0423] 실시예 20: 온도 감수성-srRNA의 주사 후 GOI의 생체내 발현

[0424] 실시예 19에 기재되고 도 20에 제시된 바와 같이, 허용 온도 (예를 들어, 약 31-34℃)에서 기능적이지만 비-허용 온도 (예를 들어, 37℃)에서는 비-기능적인 온도-감수성 작용제 (ts-작용제), 예컨대 srRNA 또는 센다이 바이러스 벡터를 관심 유전자 (GOI)의 제어된 발현을 위해 인간 신체 (예를 들어, 피부)의 표면으로 전달할 수 있다. 따라서, GOI를 코딩하는 ts-작용제는 ts-작용제가 전달되는 국부 영역 (허용 온도)으로 GOI의 발현이 제한된다는 점에서 고유한 안전성 특색을 갖는다. 즉, 자연적으로 허용 온도 초과 또는 미만의 온도를 갖는 대상체의 신체 영역에서는 ts-작용제에 의한 GOI의 의도하지 않은 발현이 발생하지 않는다. 본 실시예는 이러한 안전성 특색이 모델 포유동물 대상체, 즉 마우스에서 생체내 작용한다는 것을 입증한다. 마우스의 피부 온도는 인간의 것과 유사하고 (Mortola 2013), 따라서 마우스로의 ts-작용제의 피내 전달은 인간으로의 ts-작용제의 피내 전달을 모방할 것으로 예상된다.

[0425] RNA를 락테이트화 링거 용액 중에서 지질 나노입자 또는 임의의 다른 형질감염 시약 없이 네이키드 RNA로서 제제화하였다. 루시페라제 (LUC)를 코딩하는 RNA (5 µg)를 CD-1 이계교배 마우스의 우측 뒷다리 상의 단일 부위 내로 피내로 주사하였다. 루시페라제 활성을 가시화하고, 생물발광 영상화 시스템인 AMI HTX (스펙트럴 인스트루먼트 이미징(Spectral Instruments Imaging), 아리조나주 투손)를 사용하여 정량화하였다.

[0426] 도 23은 트리링크(TriLink) (캘리포니아주 샌디에고)로부터의 대조군 synRNA-LUC; 또는 온도-감수성 srRNA (srRNA1ts2-LUC)의 수용자에서 제0일 (주사일)부터 제26일까지의 생체내 루시페라제 활성의 시간-경과를 보여준다. 루시페라제 영상화는 루시페라제를 코딩하는 네이키드 RNA의 피내 주사가 생체내에서 루시페라제의 발현을 유발하였음을 보여주었다. 놀랍게도, srRNA1ts2-LUC에 의해 구동된 루시페라제의 생체내 발현은 그의 자기-복제 특색으로 인해 거의 1개월 동안 계속되었다. 대조적으로, synRNA-LUC에 의해 구동된 루시페라제의 생체내 발현은 1주에 걸쳐 단지 약간 동안만 지속되었다. 추가로, srRNA1ts2-LUC의 수용자에서의 루시페라제의 발현 수준은 그의 자기-복제 특색으로 인해 synRNA-LUC의 수용자에서의 루시페라제의 발현 수준보다 10배 내지 100배 더 높았다. 중요하게, 루시페라제 발현은 수용자의 피부의 비주사 영역에서 또는 수용자의 내부 기관 내에서는 관찰되지 않았다. 이러한 관찰은 온도-감수성 srRNA1ts2-LUC가 복제되지 않았고, 비-허용 조건 하에 루시페라제를 발현하였다는 것을 나타낸다.

[0427] 실시예 21: 온도-감수성 srRNA 백신에 의해 도출된 세포성 면역

[0428] 본 실시예에서, SARS CoV-2의 스파이크 단백질의 수용체 결합 도메인 (RBD)을 발현하는 온도-감수성 srRNA의 피내 투여에 의해 도출된 시토킨-분비 비장세포를 측정하였다. RNA를 락테이트화 링거 용액 중에서 임의의 지질 나노입자 또는 임의의 다른 형질감염 시약 없이 네이키드 RNA로서 제제화하였다. 세포성 면역을 평가하기 위해, 단일 용량의 위약 (완충제만) 또는 5 µg, 25 µg 또는 100 µg의 srRNA1ts2-2019-CoV-RBD1 RNA (실시예 19에 기재됨)를 받은 CD-1 이계교배 마우스로부터 수득된 비장세포에 대해 시토킨 분비 세포의 수를 정량화하는 효소-연결 면역흡착 (ELISpot) 검정을 수행하였다. 주사 12일 후에 단리된 비장세포를 SARS-CoV-2 RBD (펩믹스(PepMix) SARS-CoV-2 [S-RBD], JPT 펩티드 테크놀로지스 게엠베하(JPT Peptide Technologies GmbH), 독일 베를린)를 커버하는 53개 펩티드 (11개 아미노산 중첩을 갖는 15량체)의 풀로 24시간 동안 자극하였다.

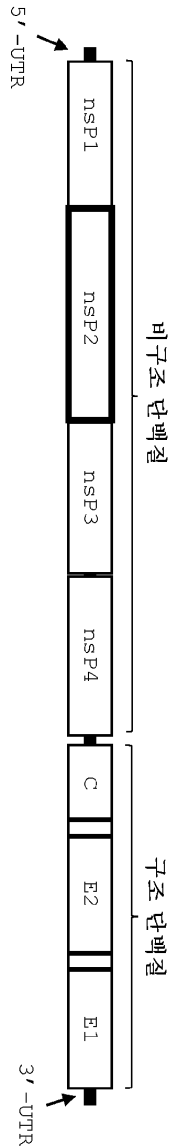
[0429] 도 24a에 제시된 바와 같이, 피내 주사에 의해 투여된 srRNA1ts2-2019-nCoV-RBD1은 SARS-CoV-2 RBD에 대한 세포성 면역을 용량-의존성 방식으로 유도하였다. 유형 1 CD4+ T 헬퍼 세포 (Th1 세포) 및 CD8+ 세포독성 T 세포의 특징인 IFN-γ-분비 세포 (도 24a)는 온도-감수성 SARS-CoV-2 RBD srRNA 백신에 의해 우선적으로 확장되었다. 대조적으로, 유형 2 CD4+ T 헬퍼 세포 (Th2 세포)의 특징인 IL4-분비 세포 (도 24b)는 온도-감수성 SARS-CoV-2 RBD srRNA 백신에 의해 확장되지 않았다. 결론적으로, 결과는 srRNA1ts2-2019-nCoV-RBD1의 피내 투여가, 바이러스 병원체에 대해 지시된 백신의 바람직한 특색인, SARS-CoV-2 RBD에 대한 Th1 우성 (Th1>Th2) 세포성 면역 반응을 도출하였다는 것을 보여주었다.

[0430] 실시예 22: 온도-감수성 srRNA 백신에 의해 도출된 체액성 면역

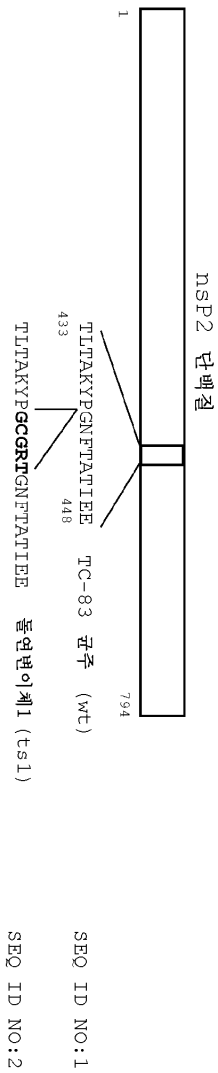
- [0431] 본 실시예에서, SARS CoV-2의 스파이크 단백질의 수용체 결합 도메인 (RBD)을 발현하는 온도-감수성 srRNA의 피내 투여에 의해 도출된 항체를 측정하였다. RNA를 락테이트화 링거 용액 중에서 임의의 지질 나노입자 또는 임의의 다른 형질감염 시약 없이 네이키드 RNA로서 제제화하였다. CD-1 이계교배 마우스의 군 (N = 10)은 제0일 및 제14일에 피내 주사에 의해 다음 3종의 제제 중 하나를 받았다 (흑색 삼각형): 위약 (완충제만) (도 25a), 5 μ g의 온도-감수성 srRNA1ts2-2019-CoV-RBD1 RNA (도 25b) 또는 5 μ g의 온도-감수성 srRNA1ts2-2019-CoV-RBD1 RNA와 RNase 억제제 (3 유닛의 RNasin Plus) (프로메가(Promega), 위스콘신주 매디슨)와의 조합 (도 25c). 모든 마우스는 제49일에 피내 주사에 의해 재조합 RBD 단백질 (Ala319-Phe541, C-말단 6-His 태그를 가짐, 수탁 # YP_009724390.1: 알앤디 시스템즈(R&D Systems), 미네소타주 미네아폴리스)을 받았다 (개방 삼각형). 체액성 면역을 평가하기 위해, 제-3일, 제14일, 제28일, 제46일, 제56일 및 제63일에 주사받은 마우스로부터 수득한 혈청에 대해 재조합 RBD 단백질에 특이적인 이뮤노글로불린 G (IgG)의 양 (OD450에서의 측정치에 의해 나타냄)을 정량화하는 효소-연결 면역흡착 검정 (ELISA)을 수행하였다. 혈청 중 IgG의 양은 OD450으로 제시된다.
- [0432] 도 25a-25c에 도시된 바와 같이, 단지 프라임 및 제1 부스터 후에는 어떠한 군에서도 RBD-특이적 IgG의 증가가 관찰되지 않았다. 그러나, 마우스가 재조합 RBD 단백질을 포함하는 제2 부스터를 받았을 때, srRNA1ts2-2019-CoV-RBD1을 포함하는 프라임 및 제1 부스터를 받은 군은 RBD-특이적 IgG의 증가로 신속하게 반응한 반면 (도 25b-c), 위약군은 RBD-특이적 IgG의 인지가능한 증가를 보여주지 않았다 (도 25a). 재조합 RBD 단백질의 주사 시 RBD-특이적 IgG의 급속한 증가는 srRNA1ts2-2019-CoV-RBD1을 포함하는 프라임 및 제1 부스터를 받은 마우스가 면역 기억을 유지하였고 재조합 RBD에 대한 2차 체액성 반응을 보였다는 것을 나타낸다.

도면

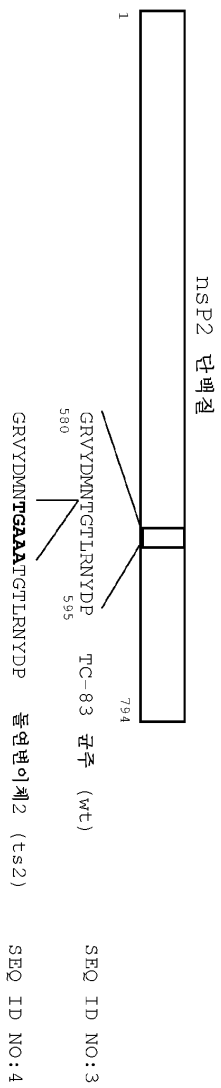
도면1a



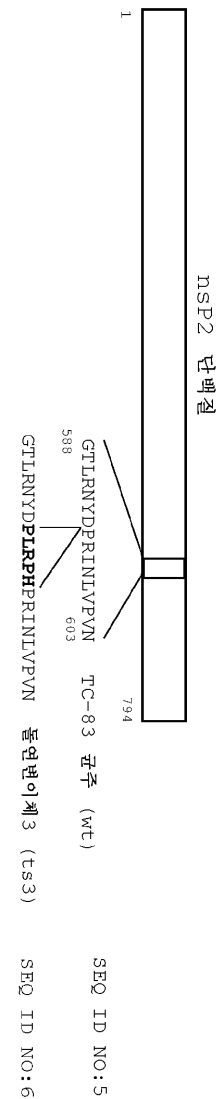
도면1b



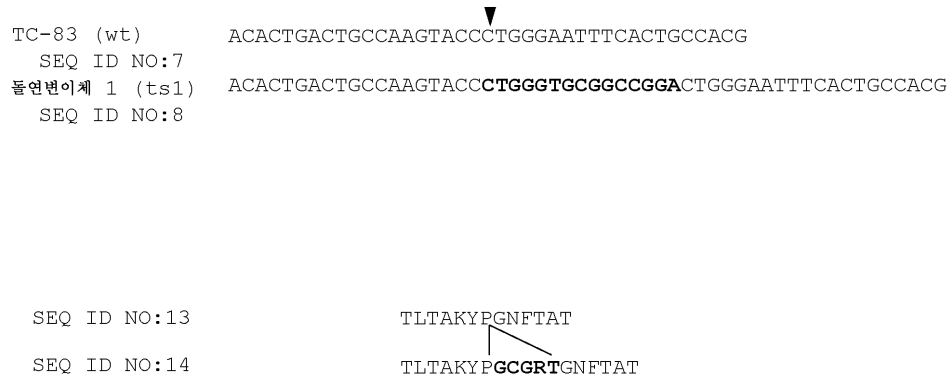
도면 1c



도면1d



도면2a



도면2b

TC-83 (wt) GGAAGAGTCTATGACATGAACACTGGTACACTGCGCAAT
 SEQ ID NO:9
 돌연변이체 2 (ts2) GGAAGAGTCTATGACATGAAC**ACTGGTGCCGCCGCA**ACTGGTACACTGCGCAAT
 SEQ ID NO:10

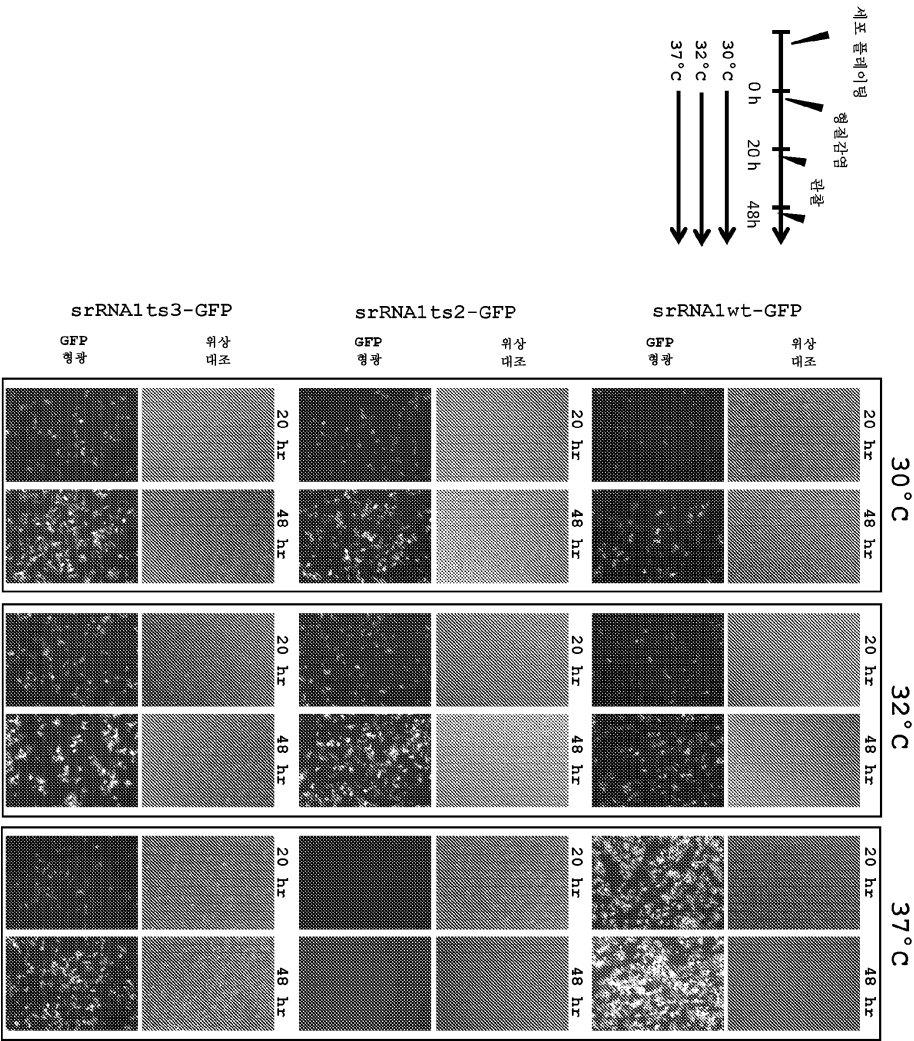
SEQ ID NO:15 GRVYDMNTGTLRN
 SEQ ID NO:16 GRVYDMN**TGAAA**TGTLRN

도면2c

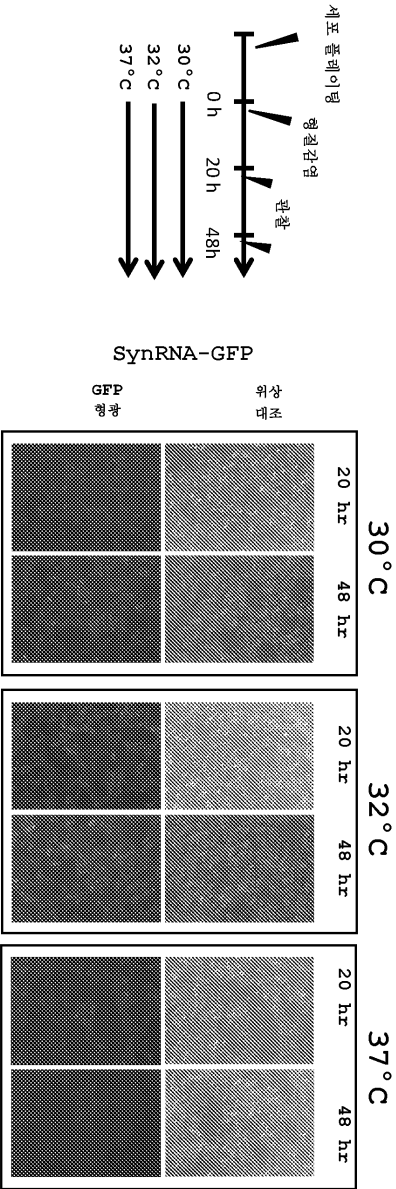
TC-83 (wt) GGTACACTGCGCAATTATGATCCGCGCATAAACCTAGTA
 SEQ ID NO:11
 돌연변이체 3 (ts3) GGTACACTGCGCAATTATG**ATCCGCTGCGGCCCC**ATCCGCGCATAAACCTAGTA
 SEQ ID NO:12

SEQ ID NO:17 GTLRNYDPRINLV
 SEQ ID NO:18 GTLRNYDPL**LRPH**PRINLV

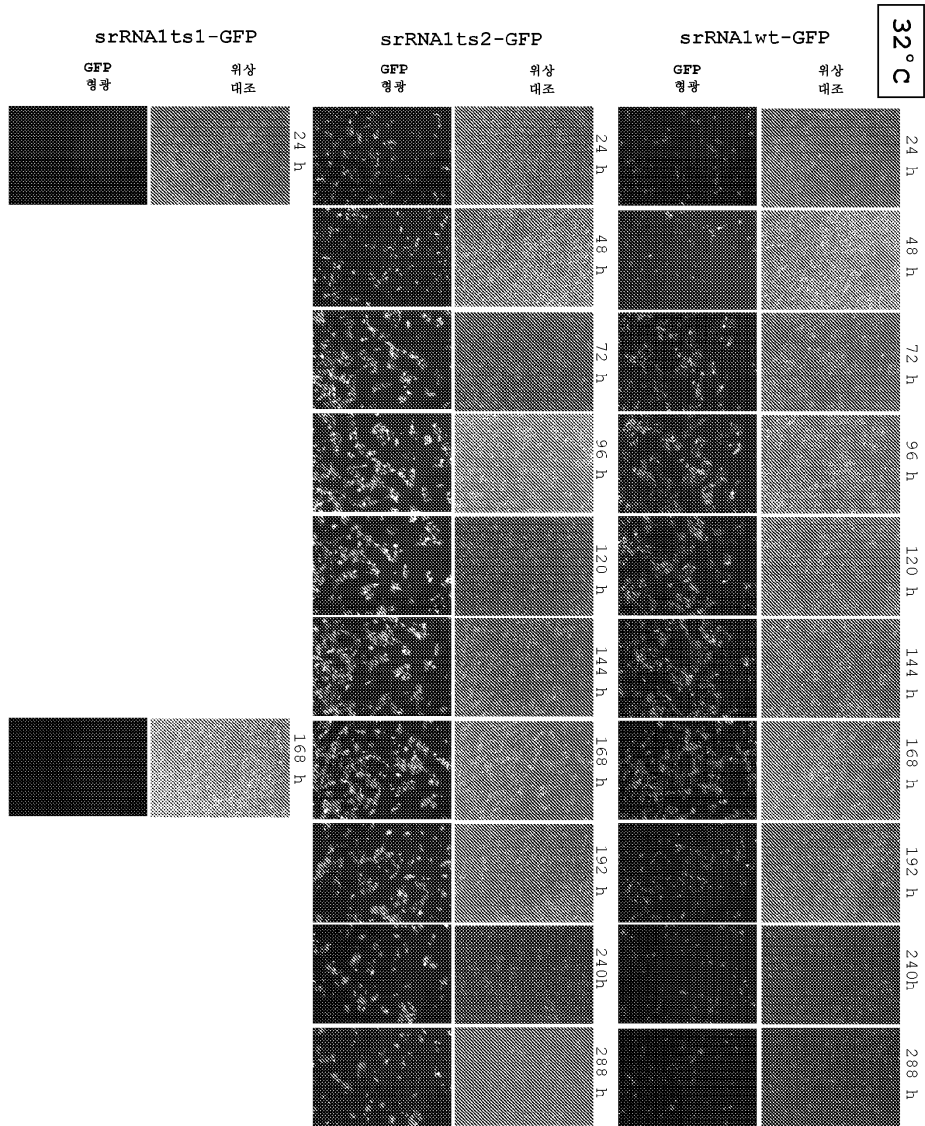
도면4a



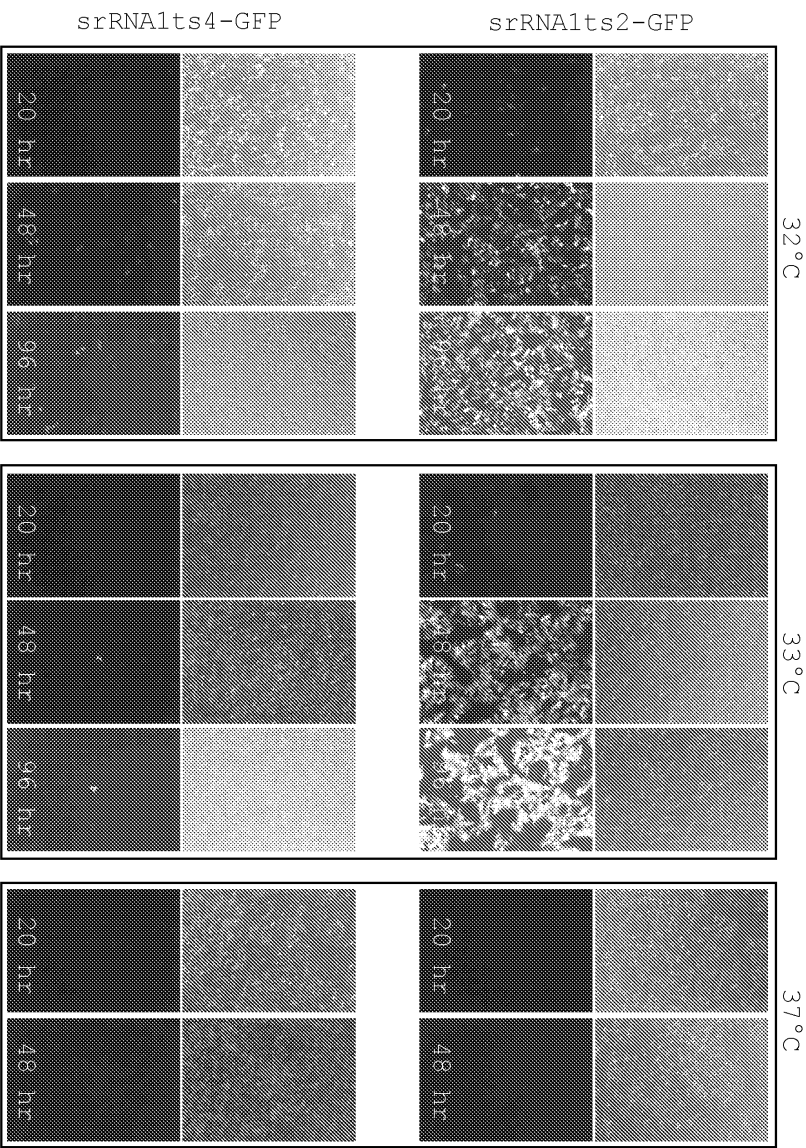
도면4b



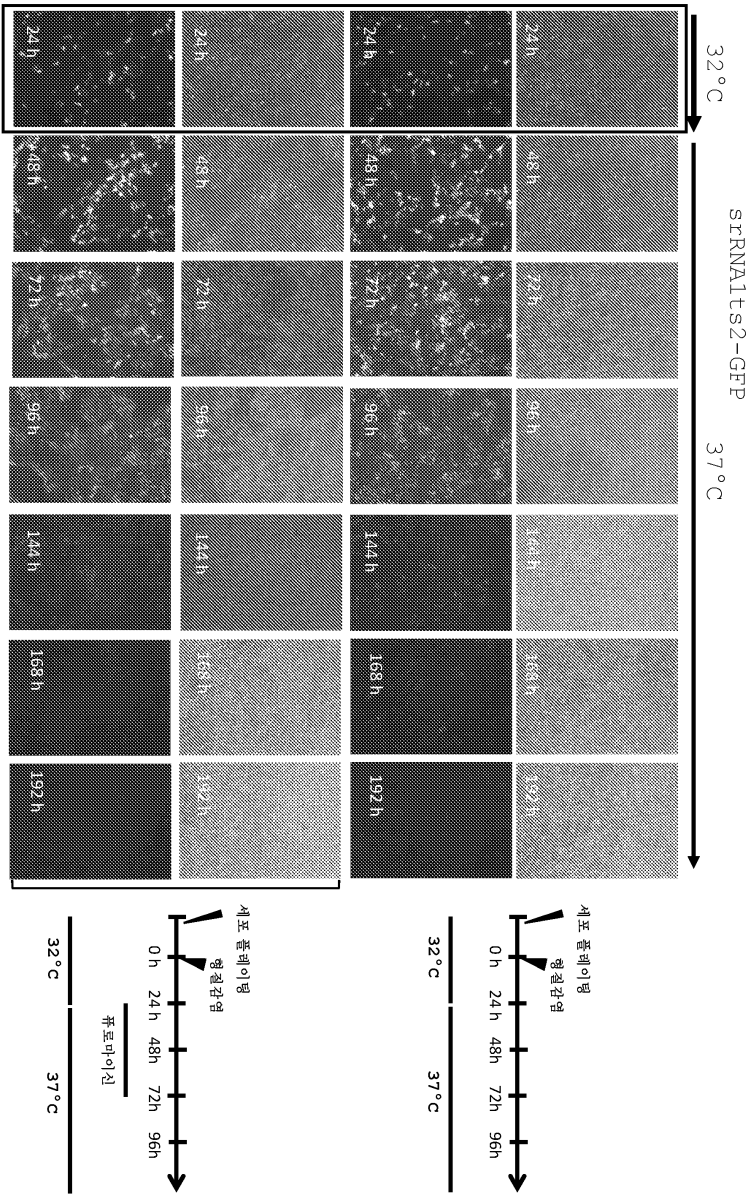
도면5



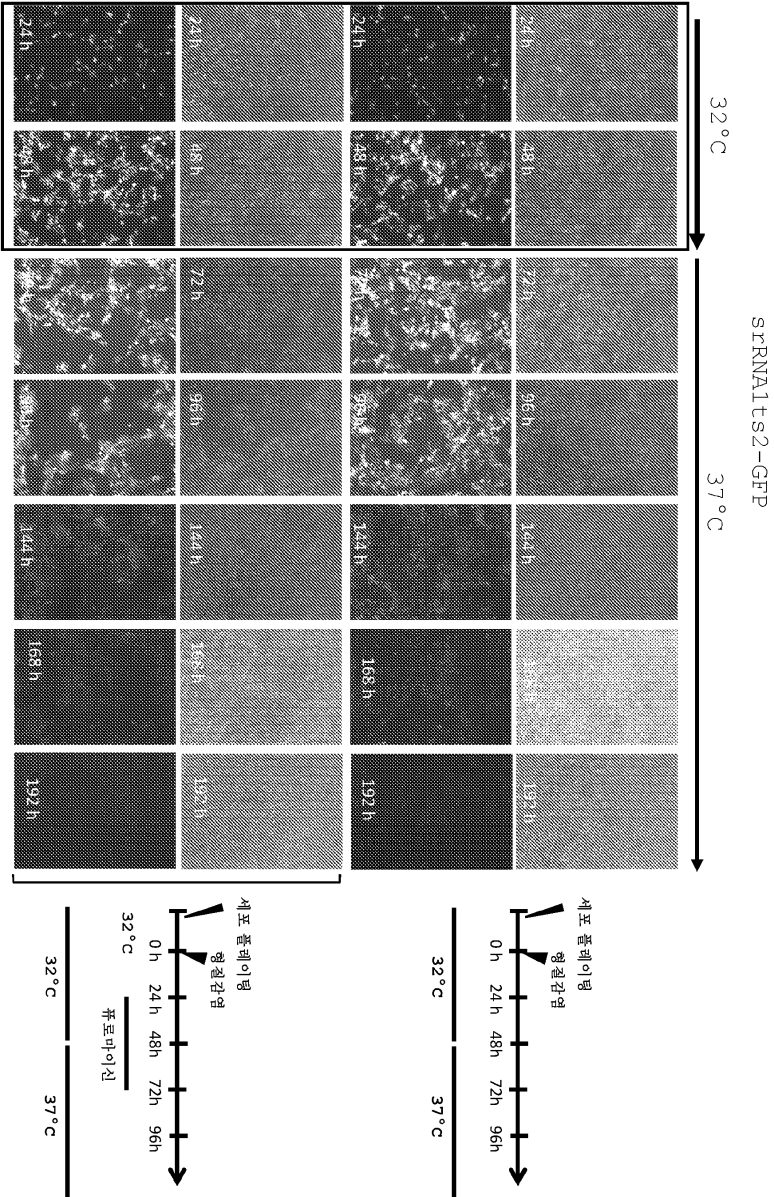
도면6



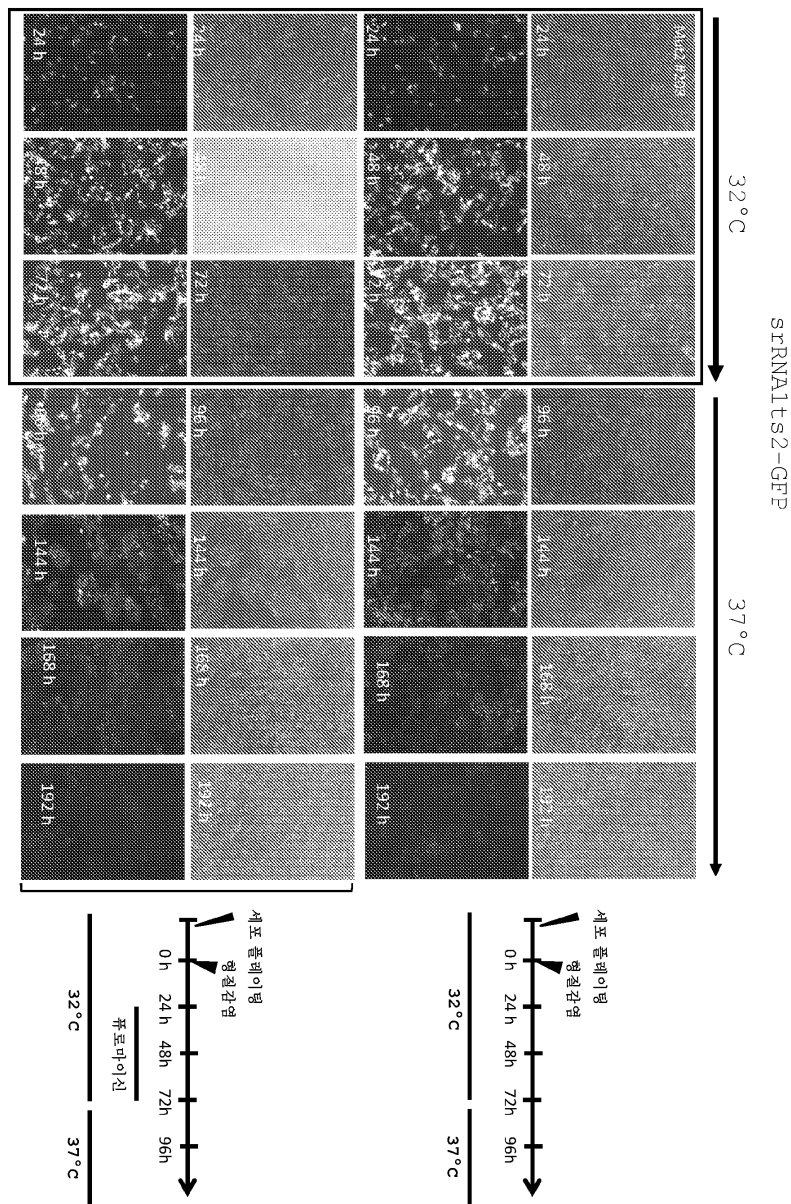
도면8



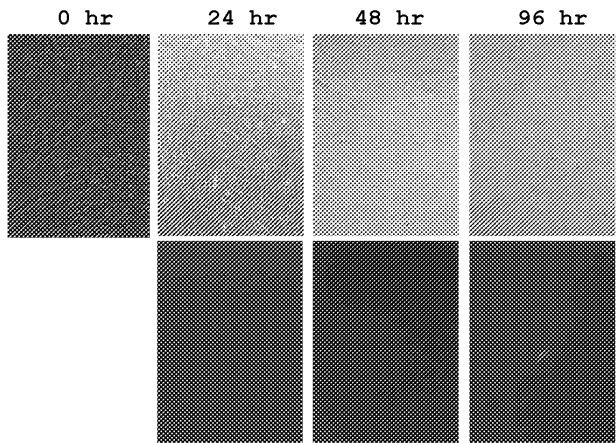
도면9



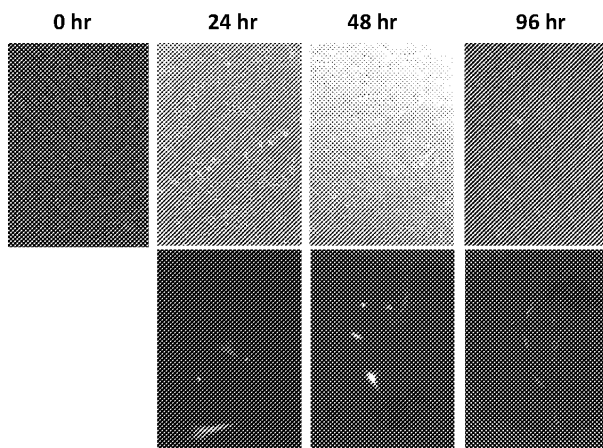
도면10



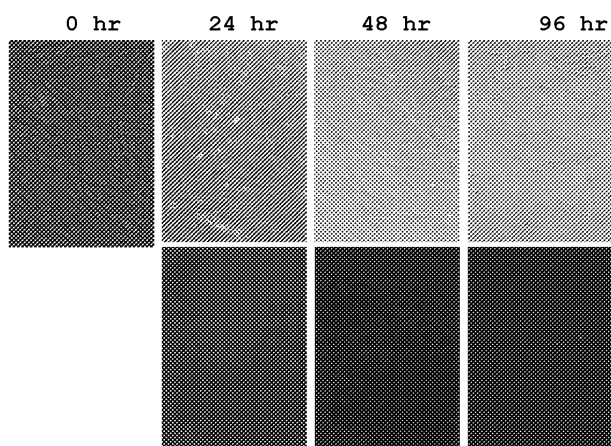
도면11a



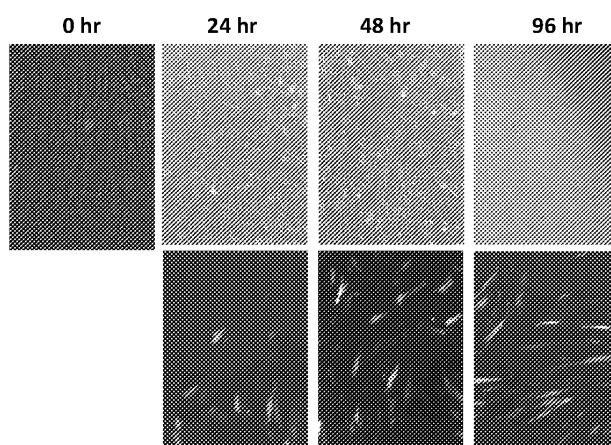
도면11b



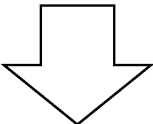
도면11c



도면11d

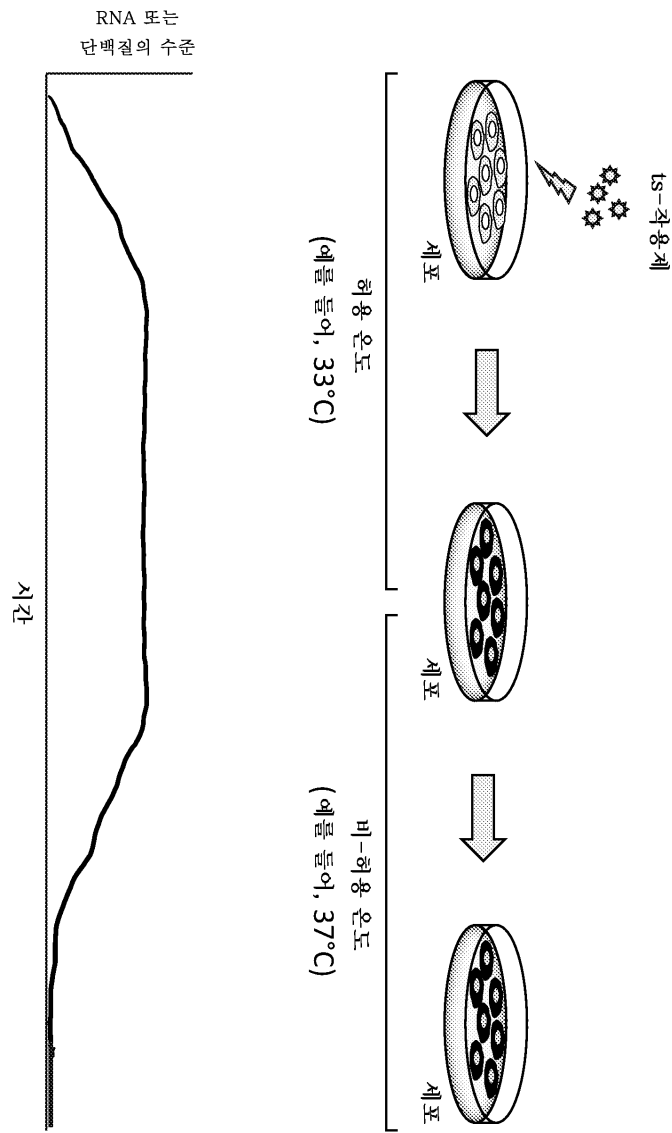


SEQ ID		SEQ ID	
NO:		NO:	
580			
β5			
▼			
β6			
592			
VEEV	GRVYDMNTGTLRN 21	GRVYDMNTGAAA	TGTLRN 29
Aura	GDQILPIYGRVSV 22	GDQILPITGAAA	YGRVSV 30
WEEV	GRVADIRNNTIKD 23	GRVADIRTTGAAA	NNNTIKD 31
BfV	GMQIVVTTEMRIQR 24	GMQIVVTTGAAA	EMRIQR 32
ONNV	NKQICITTRKVD 25	NKQICITTTGAAA	TRKVD 33
RRV	GLQVNVPEKRVQP 26	GLQVNVPTGAAA	ERKRVQP 34
SfV	GKQAVIAERKIQP 27	GKQAVIATGAAA	ERKIQP 35
SINV	GTQLDLQTGRTRV 28	GTQLDLQTGAAA	TGRTRV 36
* * * *			

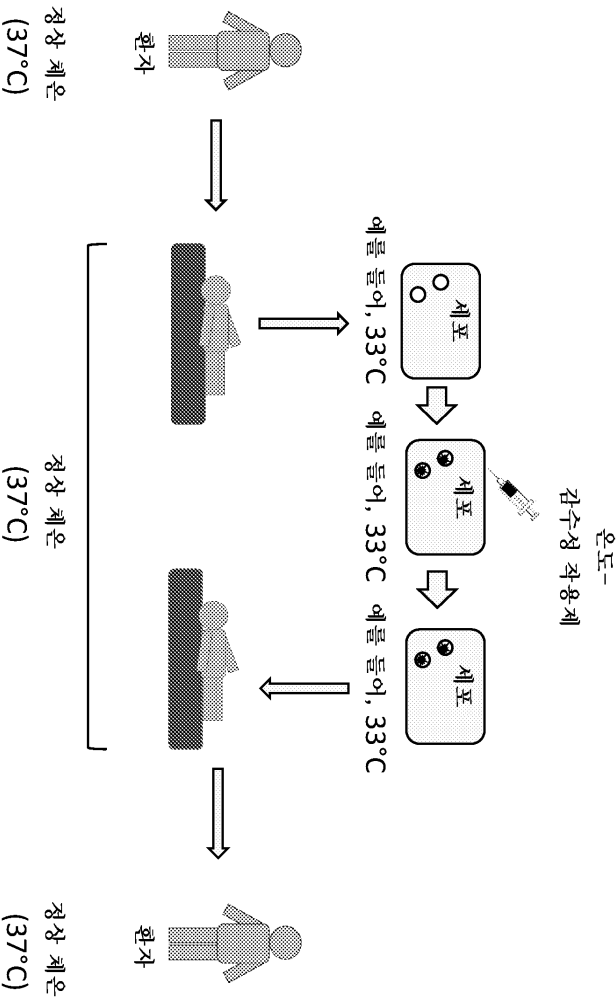


도면12

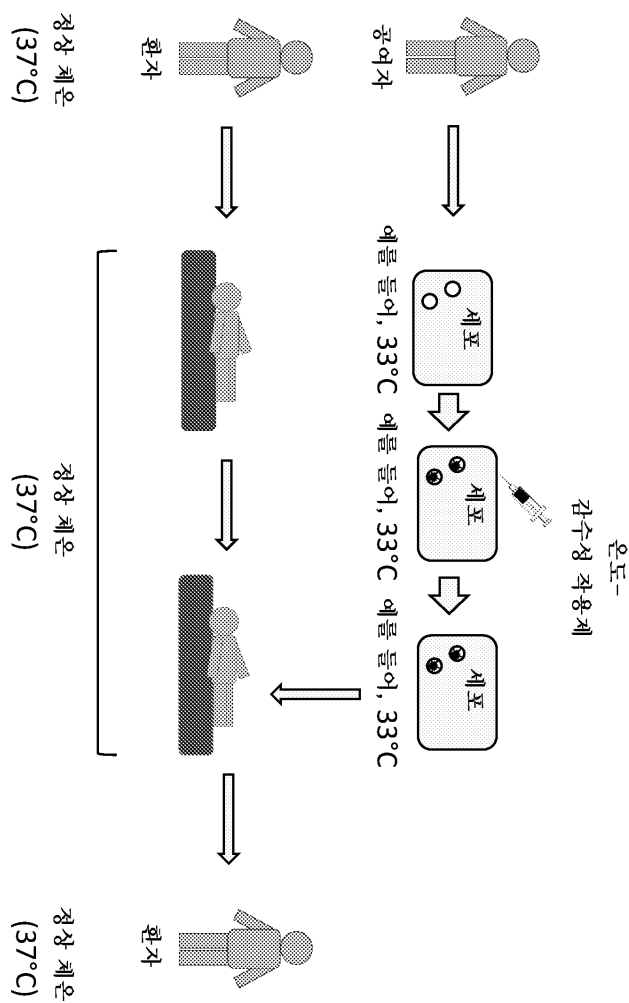
도면13



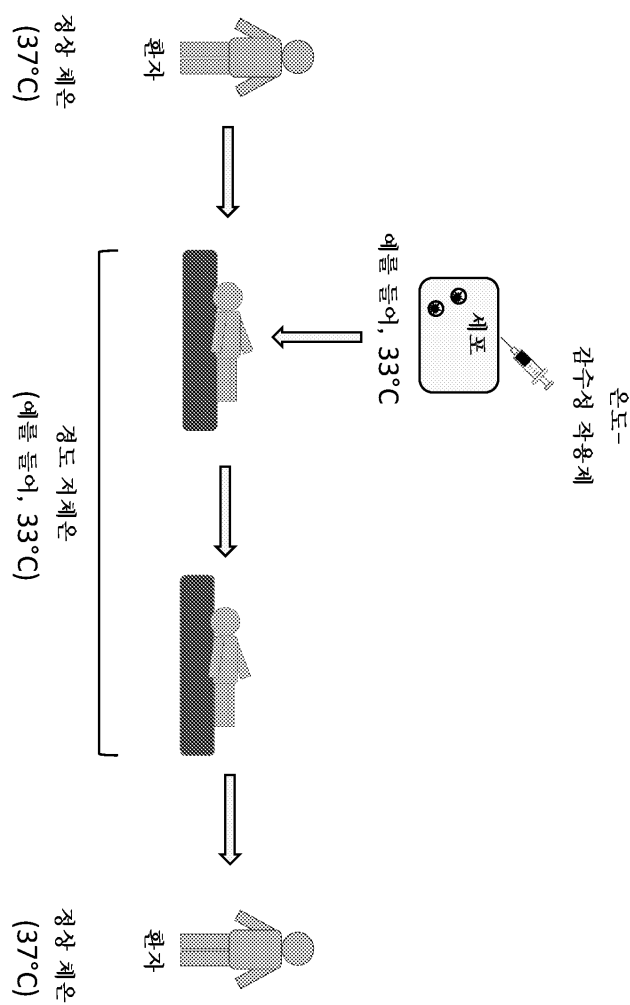
도면14



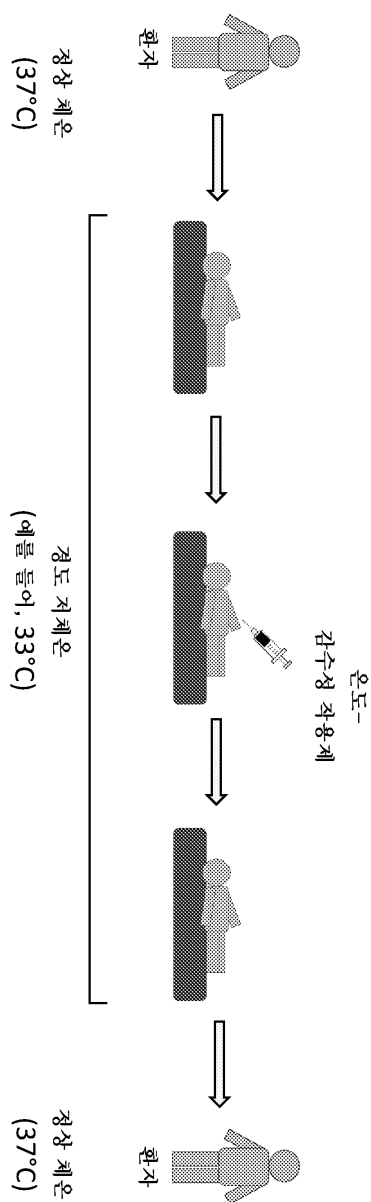
도면15



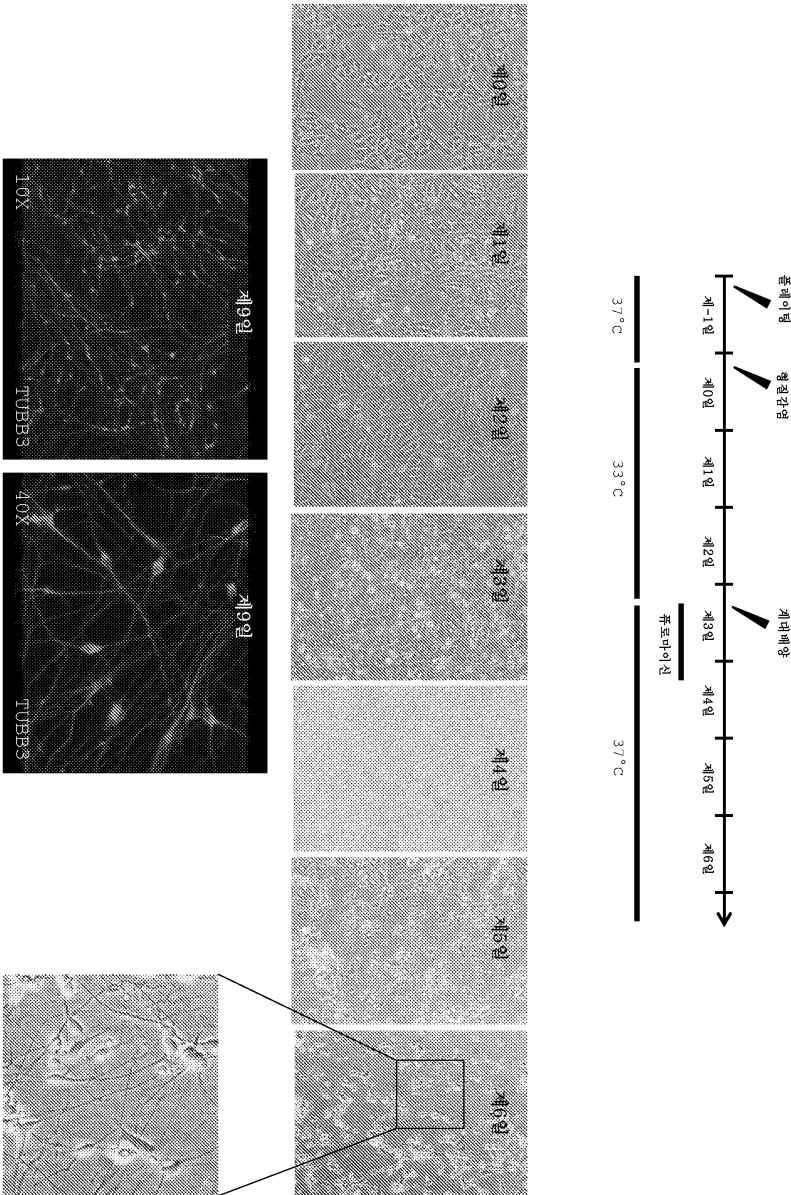
도면16



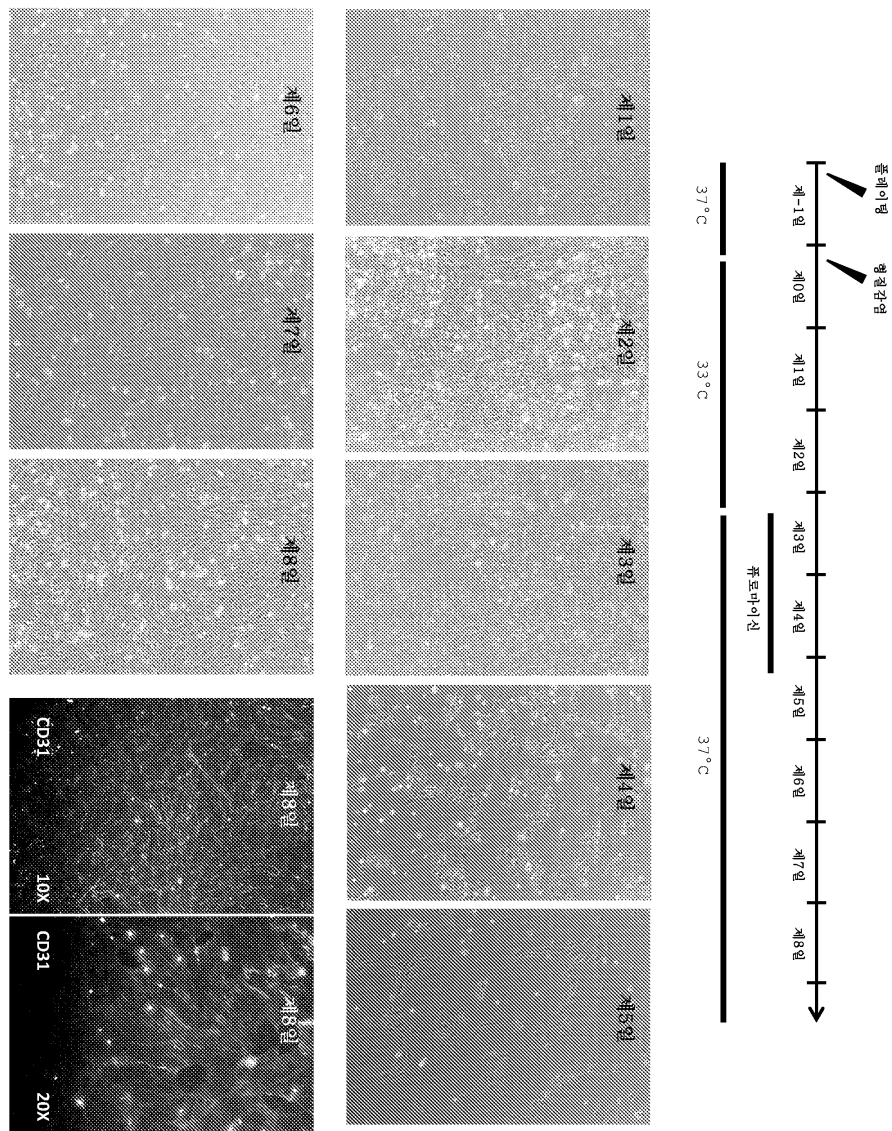
도면17



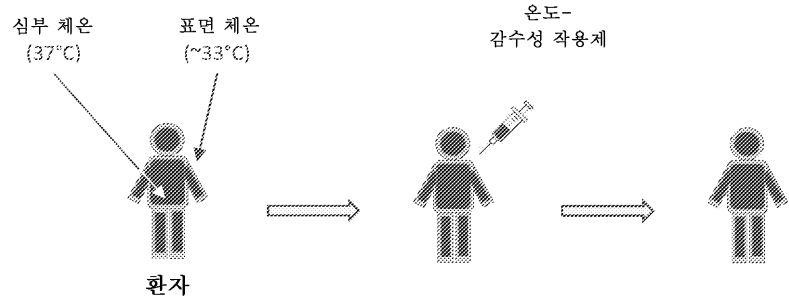
도면18



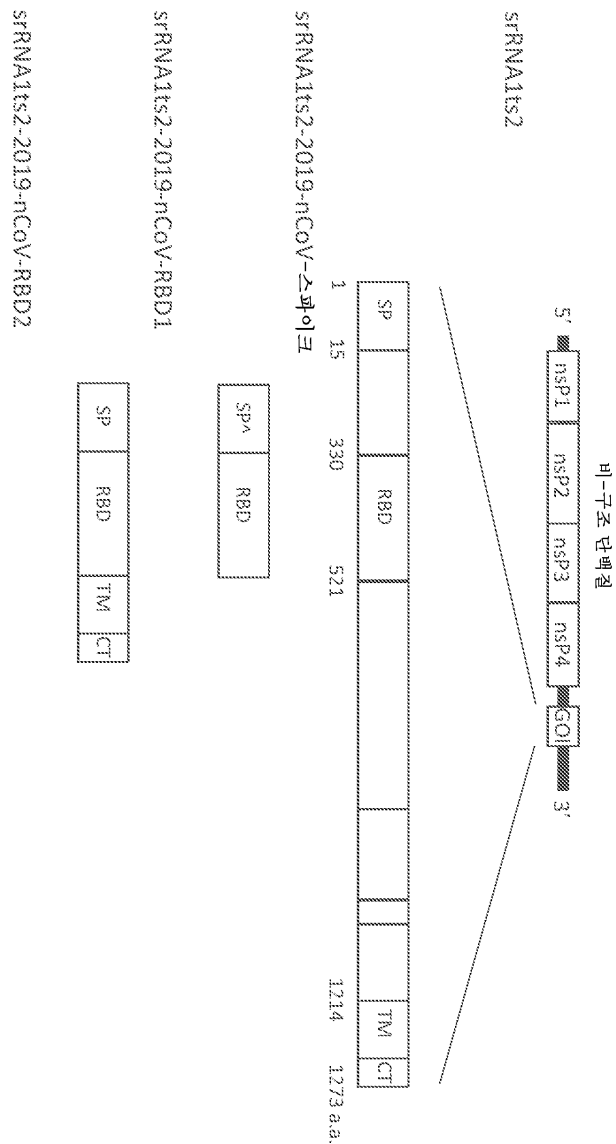
도면19



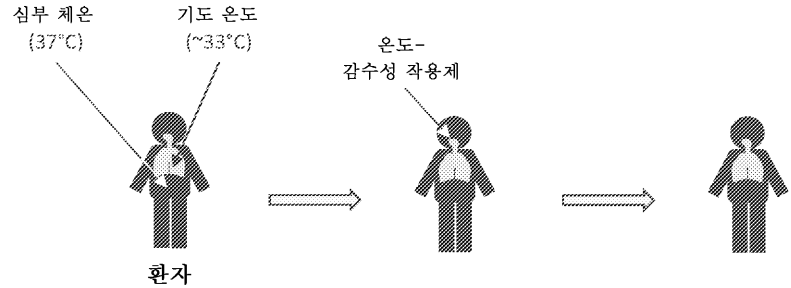
도면20



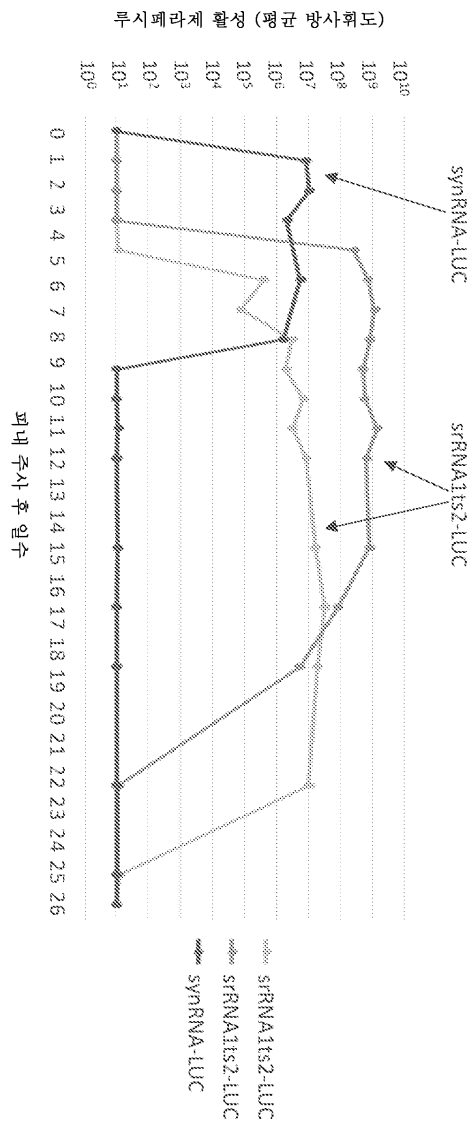
도면21



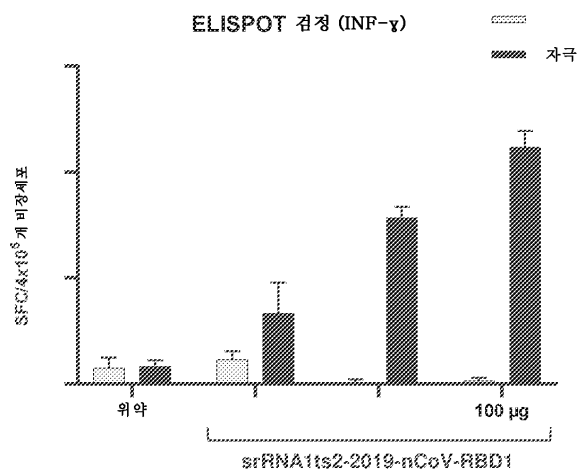
도면22



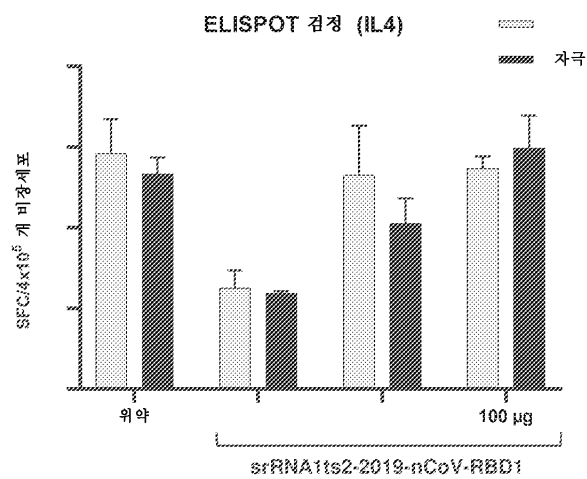
도면23



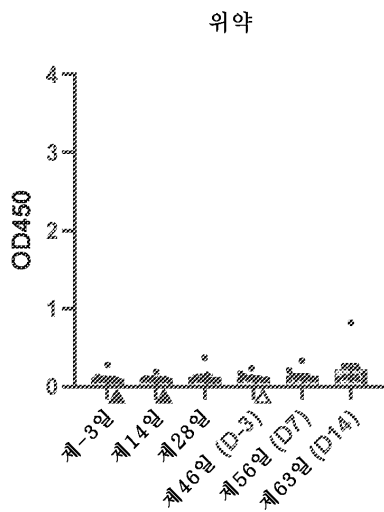
도면24a



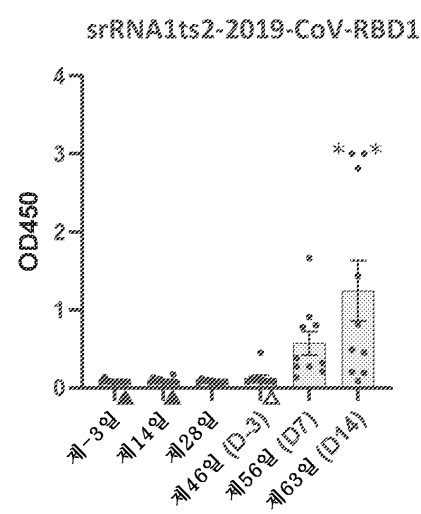
도면24b



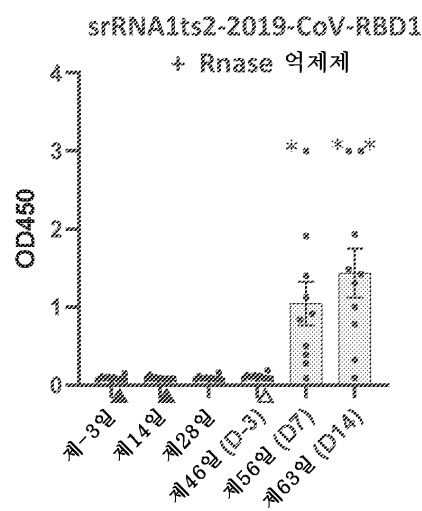
도면25a



도면25b



도면25c



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> Elixirgen Therapeutics, Inc.
- <120> TEMPERATURE-BASED TRANSIENT DELIVERY OF NUCLEIC ACIDS AND PROTEINS TO CELLS AND TISSUES
- <130> 69944-20012.40
- <140> Not Yet Assigned
- <141> Concurrently Herewith
- <150> US 62/992,700
- <151> 2020-03-20
- <150> US 62/955,801
- <151> 2019-12-31
- <160> 44
- <170> FastSEQ for Windows Version 4.0
- <210> 1
- <211> 16
- <212> PRT
- <213> Venezuelan Equine Encephalitis Virus (VEEV)
- <400> 1

Thr Leu Thr Ala Lys Tyr Pro Gly Asn Phe Thr Ala Thr Ile Glu Glu

- 1 5 10 15
- <210> 2
- <211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 2

Thr Leu Thr Ala Lys Tyr Pro Gly Cys Gly Arg Thr Gly Asn Phe Thr

1 5 10 15

Ala Thr Ile Glu Glu

20

<210> 3

<211> 16

<212> PRT

<213> Venezuelan Equine Encephalitis Virus (VEEV)

<400> 3

Gly Arg Val Tyr Asp Met Asn Thr Gly Thr Leu Arg Asn Tyr Asp Pro

1 5 10 15

<210> 4

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 4

Gly Arg Val Tyr Asp Met Asn Thr Gly Ala Ala Ala Thr Gly Thr Leu

1 5 10 15

Arg Asn Tyr Asp Pro

20

<210> 5

<211> 16

<212> PRT

<213> Venezuelan Equine Encephalitis Virus (VEEV)

<400> 5

Gly Thr Leu Arg Asn Tyr Asp Pro Arg Ile Asn Leu Val Pro Val Asn

1 5 10 15

<210> 6

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 6

Gly Thr Leu Arg Asn Tyr Asp Pro Leu Arg Pro His Pro Arg Ile Asn

1 5 10 15

Leu Val Pro Val Asn

20

<210> 7

<211> 39

<212> DNA

<213> Venezuelan Equine Encephalitis Virus (VEEV)

<400> 7

acactgactg ccaagtaccc tgggaatttc actgccacg 39

<210> 8

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 8

acactgactg ccaagtaccc tgggtgcggc cggactggga atttactgc cacg 54

<210> 9

<211> 39

<212> DNA

<213> Venezuelan Equine Encephalitis Virus (VEEV)

<400> 9

ggaagagtct atgacatgaa cactggtaca ctgcgcaat 39

<210> 10

<211> 54

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic Construct
 <400> 10
 ggaagagtct atgacatgaa cactgggtgcc gccgcaactg gtacactgcg caat 54

<210> 11
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Venezuelan Equine Encephalitis Virus (VEEV)
 <400> 11
 ggtacactgc gcaattatga tccgcgcata aacctagta 39

<210> 12
 <211> 54
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic Construct
 <400> 12
 ggtacactgc gcaattatga tccgctgcgg ccccatccgc gcataaacct agta 54

<210> 13
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Venezuelan Equine Encephalitis Virus (VEEV)
 <400> 13
 Thr Leu Thr Ala Lys Tyr Pro Gly Asn Phe Thr Ala Thr
 1 5 10

<210> 14
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic Construct

<400> 14

Thr Leu Thr Ala Lys Tyr Pro Gly Cys Gly Arg Thr Gly Asn Phe Thr

1 5 10 15

Ala Thr

<210> 15

<211> 13

<212> PRT

<213> Venezuelan Equine Encephalitis Virus (VEEV)

<400> 15

Gly Arg Val Tyr Asp Met Asn Thr Gly Thr Leu Arg Asn

1 5 10

<210> 16

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 16

Gly Arg Val Tyr Asp Met Asn Thr Gly Ala Ala Ala Thr Gly Thr Leu

1 5 10 15

Arg Asn

<210> 17

<211> 13

<212> PRT

<213> Venezuelan Equine Encephalitis Virus (VEEV)

<400> 17

Gly Thr Leu Arg Asn Tyr Asp Pro Arg Ile Asn Leu Val

1 5 10

<210> 18

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 18

Gly Thr Leu Arg Asn Tyr Asp Pro Leu Arg Pro His Pro Arg Ile Asn

1 5 10 15

Leu Val

<210> 19

<211> 240

<212> DNA

<213> Venezuelan Equine Encephalitis Virus (VEEV)

<400> 19

ataggcggcg catgagagaa gcccagacca attacctacc caaaatggag aaagttcacg 60
 ttgacatcga ggaagacagc ccattcctca gagctttgca gcggagcttc ccgcagtttg 120
 aggtagaagc caagcaggtc actgataatg accatgctaa tgccagagcg ttttcgcac 180
 ttgcttcaaa actgatcgaa acggaggtgg acccatccga cagcgcctt gacattggaa 240

<210> 20

<211> 240

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 20

atgggcggcg catgagagaa gcccagacca attacctact caaaatggaa aaagttcacg 60
 ttgacatcga agaagacagc ccattcctca gagctttgca gcggagtttt ccgcagtttg 120
 aagtagaagc caagcaggtc actgataatg accatgctaa tgcaagagcg ttttcgcac 180
 ttgcttcaaa actgatcgaa acggaggtgg acccatccga cagcgcctt gacattggaa 240

<210> 21

<211> 13

<212> PRT

<213> Venezuelan Equine Encephalitis Virus (VEEV)

<400> 21

Gly Arg Val Tyr Asp Met Asn Thr Gly Thr Leu Arg Asn

1 5 10

<210> 22

<211> 13

<212> PRT

<213> Aura virus (Aura)

<400> 22

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

1 5 10

<210> 23

<211> 13

<212> PRT

<213> Western equine encephalitis virus (WEEV)

<400> 23

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

1 5 10

<210> 24

<211> 13

<212> PRT

<213> Barmah Forest virus (BFV)

<400> 24

Gly Met Gln Ile Val Val Thr Glu Met Arg Ile Gln Arg

1 5 10

<210> 25

<211> 13

<212> PRT

<213> O'nyong-nyong virus (ONNV)

<400> 25

Asn Lys Gln Ile Cys Ile Thr Thr Arg Lys Val Asp Glu

1 5 10

<210> 26

<211> 13

<212> PRT

<213> Ross River virus (RRV)

<400> 26

Gly Leu Gln Val Asn Val Pro Glu Arg Lys Val Gln Pro

1 5 10

<210> 27

<211> 13

<212> PRT

<213> Semliki Forest virus (SFV)

<400> 27

Gly Lys Gln Ala Val Ile Ala Glu Arg Lys Ile Gln Pro

1 5 10

<210> 28

<211> 13

<212> PRT

<213> Sindbis virus (SINV)

<400> 28

Gly Thr Gln Leu Asp Leu Gln Thr Gly Arg Thr Arg Val

1 5 10

<210> 29

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 29

Gly Arg Val Tyr Asp Met Asn Thr Gly Ala Ala Ala Thr Gly Thr Leu

1 5 10 15

Arg Asn

<210> 30

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 30

Gly Asp Gln Ile Leu Pro Ile Thr Gly Ala Ala Ala Tyr Gly Arg Val

1 5 10 15

Ser Val

<210> 31

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 31

Gly Arg Val Ala Asp Ile Arg Thr Gly Ala Ala Ala Asn Asn Thr Ile

1 5 10 15

Lys Asp

<210> 32

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 32

Gly Met Gln Ile Val Val Thr Thr Gly Ala Ala Ala Glu Met Arg Ile

1 5 10 15

Gln Arg

<210> 33

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 33

Asn Lys Gln Ile Cys Ile Thr Thr Gly Ala Ala Ala Thr Arg Lys Val

1 5 10 15

Asp Glu

<210> 34

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 34

Gly Leu Gln Val Asn Val Pro Thr Gly Ala Ala Ala Glu Arg Lys Val

1 5 10 15

Gln Pro

<210> 35

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 35

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

1 5 10 15

Gln Pro

<210> 36

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 36

Gly Thr Gln Leu Asp Leu Gln Thr Gly Ala Ala Ala Thr Gly Arg Thr

1 5 10 15

Arg Val

<210> 37

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 37

Glu Ala Ala Ala Lys

1 5

<210> 38

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 38

Gly Cys Gly Arg Thr

1 5

<210> 39

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 39

Thr Gly Ala Ala Ala

1 5

<210> 40

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 40

Leu Arg Pro His Pro

1 5

<210> 41

<211> 1273

<212> PRT

<213> SARS-CoV-2

<400> 41

Met Phe Val Phe Leu Val Leu Leu Pro Leu Val Ser Ser Gln Cys Val

1 5 10 15

Asn Leu Thr Thr Arg Thr Gln Leu Pro Pro Ala Tyr Thr Asn Ser Phe

20 25 30

Thr Arg Gly Val Tyr Tyr Pro Asp Lys Val Phe Arg Ser Ser Val Leu

35 40 45

His Ser Thr Gln Asp Leu Phe Leu Pro Phe Phe Ser Asn Val Thr Trp

50 55 60

Phe His Ala Ile His Val Ser Gly Thr Asn Gly Thr Lys Arg Phe Asp

65 70 75 80

Asn Pro Val Leu Pro Phe Asn Asp Gly Val Tyr Phe Ala Ser Thr Glu

85 90 95

Lys Ser Asn Ile Ile Arg Gly Trp Ile Phe Gly Thr Thr Leu Asp Ser

100 105 110

Lys Thr Gln Ser Leu Leu Ile Val Asn Asn Ala Thr Asn Val Val Ile

115 120 125

Lys Val Cys Glu Phe Gln Phe Cys Asn Asp Pro Phe Leu Gly Val Tyr

130 135 140

Tyr His Lys Asn Asn Lys Ser Trp Met Glu Ser Glu Phe Arg Val Tyr

145	150	155	160
Ser Ser Ala Asn Asn Cys Thr Phe Glu Tyr Val Ser Gln Pro Phe Leu			
	165	170	175
Met Asp Leu Glu Gly Lys Gln Gly Asn Phe Lys Asn Leu Arg Glu Phe			
	180	185	190
Val Phe Lys Asn Ile Asp Gly Tyr Phe Lys Ile Tyr Ser Lys His Thr			
	195	200	205
Pro Ile Asn Leu Val Arg Asp Leu Pro Gln Gly Phe Ser Ala Leu Glu			
	210	215	220
Pro Leu Val Asp Leu Pro Ile Gly Ile Asn Ile Thr Arg Phe Gln Thr			
225	230	235	240
Leu Leu Ala Leu His Arg Ser Tyr Leu Thr Pro Gly Asp Ser Ser Ser			
	245	250	255
Gly Trp Thr Ala Gly Ala Ala Ala Tyr Tyr Val Gly Tyr Leu Gln Pro			
	260	265	270
Arg Thr Phe Leu Leu Lys Tyr Asn Glu Asn Gly Thr Ile Thr Asp Ala			
	275	280	285
Val Asp Cys Ala Leu Asp Pro Leu Ser Glu Thr Lys Cys Thr Leu Lys			
	290	295	300
Ser Phe Thr Val Glu Lys Gly Ile Tyr Gln Thr Ser Asn Phe Arg Val			
305	310	315	320
Gln Pro Thr Glu Ser Ile Val Arg Phe Pro Asn Ile Thr Asn Leu Cys			
	325	330	335
Pro Phe Gly Glu Val Phe Asn Ala Thr Arg Phe Ala Ser Val Tyr Ala			
	340	345	350
Trp Asn Arg Lys Arg Ile Ser Asn Cys Val Ala Asp Tyr Ser Val Leu			
	355	360	365
Tyr Asn Ser Ala Ser Phe Ser Thr Phe Lys Cys Tyr Gly Val Ser Pro			
	370	375	380
Thr Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Thr Asn Val Tyr Ala Asp Ser Phe			
385	390	395	400

Val Ile Arg Gly Asp Glu Val Arg Gln Ile Ala Pro Gly Gln Thr Gly
405 410 415

Lys Ile Ala Asp Tyr Asn Tyr Lys Leu Pro Asp Asp Phe Thr Gly Cys
420 425 430

Val Ile Ala Trp Asn Ser Asn Asn Leu Asp Ser Lys Val Gly Gly Asn
435 440 445

Tyr Asn Tyr Leu Tyr Arg Leu Phe Arg Lys Ser Asn Leu Lys Pro Phe
450 455 460

Glu Arg Asp Ile Ser Thr Glu Ile Tyr Gln Ala Gly Ser Thr Pro Cys
465 470 475 480

Asn Gly Val Glu Gly Phe Asn Cys Tyr Phe Pro Leu Gln Ser Tyr Gly
485 490 495

Phe Gln Pro Thr Asn Gly Val Gly Tyr Gln Pro Tyr Arg Val Val Val
500 505 510

Leu Ser Phe Glu Leu Leu His Ala Pro Ala Thr Val Cys Gly Pro Lys
515 520 525

Lys Ser Thr Asn Leu Val Lys Asn Lys Cys Val Asn Phe Asn Phe Asn
530 535 540

Gly Leu Thr Gly Thr Gly Val Leu Thr Glu Ser Asn Lys Lys Phe Leu
545 550 555 560

Pro Phe Gln Gln Phe Gly Arg Asp Ile Ala Asp Thr Thr Asp Ala Val
565 570 575

Arg Asp Pro Gln Thr Leu Glu Ile Leu Asp Ile Thr Pro Cys Ser Phe
580 585 590

Gly Gly Val Ser Val Ile Thr Pro Gly Thr Asn Thr Ser Asn Gln Val
595 600 605

Ala Val Leu Tyr Gln Asp Val Asn Cys Thr Glu Val Pro Val Ala Ile
610 615 620

His Ala Asp Gln Leu Thr Pro Thr Trp Arg Val Tyr Ser Thr Gly Ser
625 630 635 640

Asn Val Phe Gln Thr Arg Ala Gly Cys Leu Ile Gly Ala Glu His Val

645	650	655
Asn Asn Ser Tyr Glu Cys Asp Ile Pro Ile Gly Ala Gly Ile Cys Ala		
660	665	670
Ser Tyr Gln Thr Gln Thr Asn Ser Pro Arg Arg Ala Arg Ser Val Ala		
675	680	685
Ser Gln Ser Ile Ile Ala Tyr Thr Met Ser Leu Gly Ala Glu Asn Ser		
690	695	700
Val Ala Tyr Ser Asn Asn Ser Ile Ala Ile Pro Thr Asn Phe Thr Ile		
705	710	715
Ser Val Thr Thr Glu Ile Leu Pro Val Ser Met Thr Lys Thr Ser Val		
725	730	735
Asp Cys Thr Met Tyr Ile Cys Gly Asp Ser Thr Glu Cys Ser Asn Leu		
740	745	750
Leu Leu Gln Tyr Gly Ser Phe Cys Thr Gln Leu Asn Arg Ala Leu Thr		
755	760	765
Gly Ile Ala Val Glu Gln Asp Lys Asn Thr Gln Glu Val Phe Ala Gln		
770	775	780
Val Lys Gln Ile Tyr Lys Thr Pro Pro Ile Lys Asp Phe Gly Gly Phe		
785	790	795
Asn Phe Ser Gln Ile Leu Pro Asp Pro Ser Lys Pro Ser Lys Arg Ser		
805	810	815
Phe Ile Glu Asp Leu Leu Phe Asn Lys Val Thr Leu Ala Asp Ala Gly		
820	825	830
Phe Ile Lys Gln Tyr Gly Asp Cys Leu Gly Asp Ile Ala Ala Arg Asp		
835	840	845
Leu Ile Cys Ala Gln Lys Phe Asn Gly Leu Thr Val Leu Pro Pro Leu		
850	855	860
Leu Thr Asp Glu Met Ile Ala Gln Tyr Thr Ser Ala Leu Leu Ala Gly		
865	870	875
Thr Ile Thr Ser Gly Trp Thr Phe Gly Ala Gly Ala Ala Leu Gln Ile		
885	890	895

Pro Phe Ala Met Gln Met Ala Tyr Arg Phe Asn Gly Ile Gly Val Thr
900 905 910

Gln Asn Val Leu Tyr Glu Asn Gln Lys Leu Ile Ala Asn Gln Phe Asn
915 920 925

Ser Ala Ile Gly Lys Ile Gln Asp Ser Leu Ser Ser Thr Ala Ser Ala
930 935 940

Leu Gly Lys Leu Gln Asp Val Val Asn Gln Asn Ala Gln Ala Leu Asn
945 950 955 960

Thr Leu Val Lys Gln Leu Ser Ser Asn Phe Gly Ala Ile Ser Ser Val
965 970 975

Leu Asn Asp Ile Leu Ser Arg Leu Asp Lys Val Glu Ala Glu Val Gln
980 985 990

Ile Asp Arg Leu Ile Thr Gly Arg Leu Gln Ser Leu Gln Thr Tyr Val
995 1000 1005

Thr Gln Gln Leu Ile Arg Ala Ala Glu Ile Arg Ala Ser Ala Asn Leu
1010 1015 1020

Ala Ala Thr Lys Met Ser Glu Cys Val Leu Gly Gln Ser Lys Arg Val
1025 1030 1035 1040

Asp Phe Cys Gly Lys Gly Tyr His Leu Met Ser Phe Pro Gln Ser Ala
1045 1050 1055

Pro His Gly Val Val Phe Leu His Val Thr Tyr Val Pro Ala Gln Glu
1060 1065 1070

Lys Asn Phe Thr Thr Ala Pro Ala Ile Cys His Asp Gly Lys Ala His
1075 1080 1085

Phe Pro Arg Glu Gly Val Phe Val Ser Asn Gly Thr His Trp Phe Val
1090 1095 1100

Thr Gln Arg Asn Phe Tyr Glu Pro Gln Ile Ile Thr Thr Asp Asn Thr
1105 1110 1115 1120

Phe Val Ser Gly Asn Cys Asp Val Val Ile Gly Ile Val Asn Asn Thr
1125 1130 1135

Val Tyr Asp Pro Leu Gln Pro Glu Leu Asp Ser Phe Lys Glu Glu Leu

1140 1145 1150
 Asp Lys Tyr Phe Lys Asn His Thr Ser Pro Asp Val Asp Leu Gly Asp
 1155 1160 1165
 Ile Ser Gly Ile Asn Ala Ser Val Val Asn Ile Gln Lys Glu Ile Asp
 1170 1175 1180
 Arg Leu Asn Glu Val Ala Lys Asn Leu Asn Glu Ser Leu Ile Asp Leu
 1185 1190 1195 1200
 Gln Glu Leu Gly Lys Tyr Glu Gln Tyr Ile Lys Trp Pro Trp Tyr Ile
 1205 1210 1215

 Trp Leu Gly Phe Ile Ala Gly Leu Ile Ala Ile Val Met Val Thr Ile
 1220 1225 1230
 Met Leu Cys Cys Met Thr Ser Cys Cys Ser Cys Leu Lys Gly Cys Cys
 1235 1240 1245
 Ser Cys Gly Ser Cys Cys Lys Phe Asp Glu Asp Asp Ser Glu Pro Val
 1250 1255 1260
 Leu Lys Gly Val Lys Leu His Tyr Thr
 1265 1270
 <210> 42
 <211> 216
 <212> PRT
 <213>
 > SARS-CoV-2
 <400> 42
 Met Pro Met Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Thr Leu Tyr Leu Leu Gly
 1 5 10 15
 Met Leu Val Ala Ser Cys Leu Gly Pro Asn Ile Thr Asn Leu Cys Pro
 20 25 30
 Phe Gly Glu Val Phe Asn Ala Thr Arg Phe Ala Ser Val Tyr Ala Trp
 35 40 45
 Asn Arg Lys Arg Ile Ser Asn Cys Val Ala Asp Tyr Ser Val Leu Tyr
 50 55 60

 Asn Ser Ala Ser Phe Ser Thr Phe Lys Cys Tyr Gly Val Ser Pro Thr

65 70 75 80
 Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Thr Asn Val Tyr Ala Asp Ser Phe Val
 85 90 95
 Ile Arg Gly Asp Glu Val Arg Gln Ile Ala Pro Gly Gln Thr Gly Lys
 100 105 110
 Ile Ala Asp Tyr Asn Tyr Lys Leu Pro Asp Asp Phe Thr Gly Cys Val
 115 120 125

 Ile Ala Trp Asn Ser Asn Asn Leu Asp Ser Lys Val Gly Gly Asn Tyr
 130 135 140
 Asn Tyr Leu Tyr Arg Leu Phe Arg Lys Ser Asn Leu Lys Pro Phe Glu
 145 150 155 160
 Arg Asp Ile Ser Thr Glu Ile Tyr Gln Ala Gly Ser Thr Pro Cys Asn
 165 170 175
 Gly Val Glu Gly Phe Asn Cys Tyr Phe Pro Leu Gln Ser Tyr Gly Phe
 180 185 190

 Gln Pro Thr Asn Gly Val Gly Tyr Gln Pro Tyr Arg Val Val Val Leu
 195 200 205
 Ser Phe Glu Leu Leu His Ala Pro
 210 215
 <210> 43
 <211> 267
 <212> PRT
 <213> SARS-CoV-2
 <400> 43
 Met Phe Val Phe Leu Val Leu Leu Pro Leu Val Ser Ser Gln Cys Pro
 1 5 10 15
 Asn Ile Thr Asn Leu Cys Pro Phe Gly Glu Val Phe Asn Ala Thr Arg
 20 25 30

 Phe Ala Ser Val Tyr Ala Trp Asn Arg Lys Arg Ile Ser Asn Cys Val
 35 40 45
 Ala Asp Tyr Ser Val Leu Tyr Asn Ser Ala Ser Phe Ser Thr Phe Lys
 50 55 60

Cys Tyr Gly Val Ser Pro Thr Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Thr Asn
 65 70 75 80
 Val Tyr Ala Asp Ser Phe Val Ile Arg Gly Asp Glu Val Arg Gln Ile
 85 90 95

Ala Pro Gly Gln Thr Gly Lys Ile Ala Asp Tyr Asn Tyr Lys Leu Pro
 100 105 110
 Asp Asp Phe Thr Gly Cys Val Ile Ala Trp Asn Ser Asn Asn Leu Asp
 115 120 125
 Ser Lys Val Gly Gly Asn Tyr Asn Tyr Leu Tyr Arg Leu Phe Arg Lys
 130 135 140
 Ser Asn Leu Lys Pro Phe Glu Arg Asp Ile Ser Thr Glu Ile Tyr Gln
 145 150 155 160

Ala Gly Ser Thr Pro Cys Asn Gly Val Glu Gly Phe Asn Cys Tyr Phe
 165 170 175
 Pro Leu Gln Ser Tyr Gly Phe Gln Pro Thr Asn Gly Val Gly Tyr Gln
 180 185 190
 Pro Tyr Arg Val Val Val Leu Ser Phe Glu Leu Leu His Ala Pro Trp
 195 200 205
 Tyr Ile Trp Leu Gly Phe Ile Ala Gly Leu Ile Ala Ile Val Met Val
 210 215 220

Thr Ile Met Leu Cys Cys Met Thr Ser Cys Cys Ser Cys Leu Lys Gly
 225 230 235 240
 Cys Cys Ser Cys Gly Ser Cys Cys Lys Phe Asp Glu Asp Asp Ser Glu
 245 250 255
 Pro Val Leu Lys Gly Val Lys Leu His Tyr Thr
 260 265

<210> 44

<211> 192

<212> PRT

<213> SARS-CoV-2

<400> 44

Pro Asn Ile Thr Asn Leu Cys Pro Phe Gly Glu Val Phe Asn Ala Thr

1	5	10	15
Arg Phe Ala Ser Val Tyr Ala Trp Asn Arg Lys Arg Ile Ser Asn Cys			
20		25	30
Val Ala Asp Tyr Ser Val Leu Tyr Asn Ser Ala Ser Phe Ser Thr Phe			
35		40	45
Lys Cys Tyr Gly Val Ser Pro Thr Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Thr			
50		55	60
Asn Val Tyr Ala Asp Ser Phe Val Ile Arg Gly Asp Glu Val Arg Gln			
65	70	75	80
Ile Ala Pro Gly Gln Thr Gly Lys Ile Ala Asp Tyr Asn Tyr Lys Leu			
85		90	95
Pro Asp Asp Phe Thr Gly Cys Val Ile Ala Trp Asn Ser Asn Asn Leu			
100		105	110
Asp Ser Lys Val Gly Gly Asn Tyr Asn Tyr Leu Tyr Arg Leu Phe Arg			
115		120	125
Lys Ser Asn Leu Lys Pro Phe Glu Arg Asp Ile Ser Thr Glu Ile Tyr			
130		135	140
Gln Ala Gly Ser Thr Pro Cys Asn Gly Val Glu Gly Phe Asn Cys Tyr			
145	150	155	160
Phe Pro Leu Gln Ser Tyr Gly Phe Gln Pro Thr Asn Gly Val Gly Tyr			
165		170	175
Gln Pro Tyr Arg Val Val Val Leu Ser Phe Glu Leu Leu His Ala Pro			
180		185	190