(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0074703
(43) 공개일자 2023년05월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/86 (2006.01) *A61K 48/00* (2006.01)
B01D 15/18 (2006.01) *B01D 15/36* (2006.01)
B01D 15/38 (2006.01) *C07K 14/755* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/86 (2013.01)
A61K 48/0091 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-7002618
(22) 출원일자(국제) 2021년06월24일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2023년01월20일
(86) 국제출원번호 PCT/US2021/038871
(87) 국제공개번호 WO 2021/262963
국제공개일자 2021년12월30일
(30) 우선권주장
63/043,697 2020년06월24일 미국(US)
63/062,120 2020년08월06일 미국(US)

(71) 출원인
바이오버라티브 테라퓨틱스 인크.
미국 매사추세츠 (우편번호 02451) 월섬 2엔디 에비뉴 225
폰다지오네 텔레톤
이탈리아 로마 16비-00185 비아 바레세
오스페달레 산 라파엘 에스.알.엘.
이탈리아, 밀라노 I-20132, 60, 비아 올게티나
(72) 발명자
이스마일, 에이만
미국 08807 뉴저지 브리지워터 코포레이트 드라이브 55 메일-코드: 55에이-525 사노피 유.에스. 내
리우, 통야오
미국 08807 매사추세츠 브리지워터 코포레이트 드라이브 55 메일-코드: 55에이-525 사노피 유. 에스. 내
마야니, 무케쉬
미국 08807 뉴저지 브리지워터 코포레이트 드라이브 55 메일-코드: 55에이-525 사노피 유.에스. 내
(74) 대리인
양영준, 장덕순

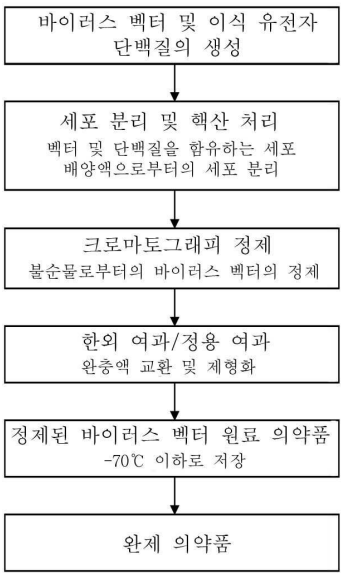
전체 청구항 수 : 총 74 항

(54) 발명의 명칭 **유리 인자 VIII을 상기 단백질이 발현되도록 변형된 렌티바이러스 벡터의 제제로부터 제거하는 방법**

(57) 요 약

본원에서는 바이러스 벡터의 생성 공정 및 숙주 세포로부터 바이러스 벡터를 정제하는 방법이 제공된다.

대 표 도 - 도1a



(52) CPC특허분류
B01D 15/1864 (2013.01)
B01D 15/363 (2013.01)
B01D 15/3804 (2013.01)
C07K 14/755 (2013.01)
C12N 2740/16043 (2013.01)
C12N 2740/16051 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

숙주 세포로부터 바이러스 벡터를 정제하는 방법으로서,

(i) 상기 바이러스 벡터 및 이식 유전자 단백질 오염물질을 포함하는 조성물을 상기 이식 유전자 단백질 오염물질과 선택적으로 결합할 수 있는 제1 크로마토그래피 매트릭스와 접촉시키는 단계; 및

(ii) 상기 크로마토그래피 매트릭스의 통과액 중의 상기 바이러스 벡터를 회수하여,

상기 바이러스 벡터를 상기 이식 유전자 단백질 오염물질로부터 분리하는 단계를 포함하는, 숙주 세포로부터 바이러스 벡터를 정제하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

(iii) 상기 바이러스 벡터 및 상기 이식 유전자 단백질 오염물질을 포함하는 상기 조성물을 상기 바이러스 벡터와 선택적으로 결합할 수 있는 제2 크로마토그래피 매트릭스와 접촉시키는 단계; 및

(iv) 상기 제2 크로마토그래피 매트릭스로부터 상기 바이러스 벡터를 용출하는 단계를 추가로 포함하며,

이때 단계 (iii) 및 단계 (iv)를 단계 (i) 이전에 수행하는 것인 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

(iii) 단계 (ii)로부터 회수된 상기 바이러스 벡터를 상기 바이러스 벡터와 선택적으로 결합할 수 있는 제2 크로마토그래피 매트릭스와 접촉시키는 단계; 및

(iv) 상기 제2 크로마토그래피 매트릭스로부터 상기 바이러스 벡터를 용출하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (i) 및 단계 (ii)는 수회 반복되는 것인 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (i)은 상기 이식 유전자 단백질 오염물질을 안정화시키는 약제의 존재 하에 수행되는 것인 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 약제는 $CaCl_2$인 것인 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

(v) 상기 바이러스 벡터 및 상기 이식 유전자 단백질 오염물질을 포함하는 상기 조성물의 염의 농도를 표적 염 농도로 조절하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 단계 (v)는 단계 (i) 이전에 수행되는 것인 방법.

청구항 9

제7항 또는 제8항에 있어서, 단계 (iii) 및 단계 (iv)가 단계 (i) 이전에 수행되면, 단계 (v)는 단계 (iv)와 단계 (i) 사이에 수행되는 것인 방법.

청구항 10

제7항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 염은 NaCl인 것인 방법.

청구항 11

제7항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표적 염 농도는 약 0.2 M 내지 약 0.6 M인 것인 방법.

청구항 12

제7항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표적 염 농도는 약 0.4 M인 것인 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 표적 염 농도는 약 200 mM NaCl 내지 약 600 mM NaCl인 것인 방법.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (i)은 약 pH 7.0 내지 약 pH 7.5에서 트리스-HCl 완충액 또는 인산 완충액을 포함하는 로딩 완충액 중에서 상기 바이러스 벡터 및 상기 이식 유전자 단백질 오염물질을 포함하는 상기 조성물을 상기 제1 크로마토그래피 매트릭스에 로딩함으로써 수행되는 것인 방법.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (iv)는 약 pH 7.0 내지 약 pH 7.5에서 트리스-HCl 완충액 또는 인산 완충액을 포함하는 용출 완충액을 이용하여 상기 제2 크로마토그래피 매트릭스로부터 상기 바이러스 벡터를 용출함으로써 수행되는 것인 방법.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서,

(vi) 상기 이식 유전자 단백질 오염물질로부터 분리된 상기 바이러스 벡터를 하나 이상의 약학적 부형제와 조합하여 상기 바이러스 벡터를 포함하는 약학 조성물을 생성하는 단계를 추가로 포함하며, 이때 상기 약학 조성물에는 실질적으로 상기 이식 유전자 단백질 오염물질이 없는 것인 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 단계 (vi)은 제형 완충액을 이용하여 상기 이식 유전자 단백질 오염물질로부터 분리된 상기 바이러스 벡터를 한외 여과/정용 여과(UF/DF)함으로써 수행되는 것인 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 UF/DF 단계는 접선 흐름 여과(TFF)를 포함하는 것인 방법.

청구항 19

제17항에 있어서, 상기 제형 완충액은 NaCl 및 수크로오스를 포함하는 인산 완충액 또는 히스티딘 완충액인 것인 방법.

청구항 20

제16항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 약학 조성물은 상기 제1 크로마토그래피 매트릭스가 아닌 상기 제2 크로마토그래피 매트릭스를 이용하여 정제된 참조 바이러스 벡터 조성물에 존재하는 20% 미만의 상기 이식 유전자 단백질 오염물질을 함유하는 것인 방법.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 바이러스 벡터는 외피형 바이러스 벡터인 것인 방법.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 외피형 바이러스 벡터는 렌티바이러스 벡터인 것인 방법.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 바이러스 벡터는 상기 이식 유전자 단백질 오염물질을 암호화하는 것인 방법.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이식 유전자 단백질 오염물질은 전달 플라스미드로부터의 발현에 의해 상기 숙주 세포에서 생성되는 것인 방법.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 크로마토그래피 매트릭스는 친화도 크로마토그래피 칼럼, 양이온 교환(CEX) 크로마토그래피 칼럼, 다중 모드 크로마토그래피(MMC) 칼럼 및 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC) 칼럼으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 크로마토그래피 매트릭스는 상기 이식 유전자 단백질 오염물질에 특이적으로 결합하는 친화도 리간드를 포함하는 친화도 크로마토그래피 칼럼인 것인 방법.

청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 크로마토그래피 매트릭스는 음이온 교환(AEX) 크로마토그래피 매트릭스인 것인 방법.

청구항 28

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 크로마토그래피 매트릭스는 음이온 교환(AEX) 막인 것인 방법.

청구항 29

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이식 유전자 단백질은 응고 인자인 것인 방법.

청구항 30

제29항에 있어서, 상기 응고 인자는 FVIII 또는 FVIIIXTEN인 것인 방법.

청구항 31

제30항에 있어서, 상기 친화도 크로마토그래피 매트릭스는 VIIISelect인 것인 방법.

청구항 32

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 숙주 세포는 포유동물 세포 또는 곤충 세포인 것인 방법.

청구항 33

제32항에 있어서, 상기 포유동물 세포는 CHO 세포, HEK293 세포 또는 HeLa 세포인 것인 방법.

청구항 34

제1항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 바이러스 벡터 및 상기 이식 유전자 단백질 오염물질을 포함

하는 상기 조성물은 상기 숙주 세포를 배양하고 상기 숙주 세포로부터 상기 세포 배양 상층액을 분리 및 정화시킴으로써 생성되는 세포 배양 상층액인 것인 방법.

청구항 35

제34항에 있어서, 상기 세포 배양 상층액에 뉴클레아제 처리가 가해지는 것인 방법.

청구항 36

숙주 세포로부터 FVIII 이식 유전자를 포함하는 렌티바이러스 벡터(LVV)를 정제하는 방법으로서,

(i) 상기 렌티바이러스 벡터 및 FVIII 이식 유전자 단백질 오염물질을 포함하는 조성물을 FVIII 이식 유전자 단백질 오염물질과 선택적으로 결합할 수 있는 제1 크로마토그래피 매트릭스와 접촉시키는 단계; 및

(ii) 상기 크로마토그래피 매트릭스의 통과액 중의 상기 렌티바이러스 벡터를 회수하여,

상기 FVIII 단백질 오염물질로부터 상기 렌티바이러스 벡터를 분리하는 단계를 포함하는, 숙주 세포로부터 렌티바이러스 벡터(LVV)를 정제하는 방법.

청구항 37

제36항에 있어서,

(iii) 상기 렌티바이러스 벡터 및 상기 FVIII 이식 유전자 단백질 오염물질을 포함하는 상기 조성물을 상기 렌티바이러스 벡터와 선택적으로 결합할 수 있는 제2 크로마토그래피 매트릭스와 접촉시키는 단계; 및

(iv) 상기 제2 크로마토그래피 매트릭스로부터 상기 렌티바이러스 벡터를 용출하는 단계를 추가로 포함하며,

이때 단계 (iii) 및 단계 (iv)를 단계 (i) 이전에 수행하여 숙주 세포 오염물질로부터 상기 렌티바이러스 벡터를 분리하는 것인 방법.

청구항 38

제37항에 있어서,

(iii) 단계 (ii)로부터 회수된 상기 렌티바이러스 벡터를 상기 렌티바이러스 벡터와 선택적으로 결합할 수 있는 제2 크로마토그래피 매트릭스와 접촉시키는 단계; 및

(iv) 상기 제2 크로마토그래피 매트릭스로부터 상기 렌티바이러스 벡터를 용출하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 39

제36항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (i) 및 단계 (ii)는 수회 반복되는 것인 방법.

청구항 40

제36항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (i)은 상기 이식 유전자 단백질 오염물질을 안정화시키는 약제의 존재 하에 수행되는 것인 방법.

청구항 41

제40항에 있어서, 상기 약제는 $CaCl_2$인 것인 방법.

청구항 42

제36항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서,

(v) 상기 렌티바이러스 벡터 및 FVIII 이식 유전자 단백질 오염물질을 포함하는 상기 조성물의 염의 농도를 표적 염 농도로 조절하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 43

제42항에 있어서, 단계 (v)는 단계 (i) 이전에 수행되는 것인 방법.

청구항 44

제42항 또는 제43항에 있어서, 단계 (iii) 및 단계 (iv)가 단계 (i) 이전에 수행되면, 단계 (v)는 단계 (iv)와 단계 (i) 사이에 수행되는 것인 방법.

청구항 45

제42항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 염은 NaCl인 것인 방법.

청구항 46

제42항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표적 염 농도는 약 0.2 M 내지 약 0.6 M인 것인 방법.

청구항 47

제42항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표적 염 농도는 약 0.4 M인 것인 방법.

청구항 48

제36항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서,

(vi) 상기 이식 유전자 단백질 오염물질로부터 분리된 상기 렌티바이러스 벡터를 하나 이상의 약학적 부형제와 조합하여 상기 렌티바이러스 벡터를 포함하는 약학 조성물을 제조하는 단계를 추가로 포함하며, 이때 상기 약학 조성물에는 실질적으로 상기 FVIII 이식 유전자 단백질 오염물질이 없는 것인 방법.

청구항 49

제48항에 있어서, 단계 (vi)은 제형 완충액을 이용하여 상기 이식 유전자 단백질 오염물질로부터 분리된 상기 렌티바이러스 벡터를 한외 여과/정용 여과(UF/DF)함으로써 수행되는 것인 방법.

청구항 50

제49항에 있어서, 상기 제형 완충액은 NaCl 및 수크로오스를 포함하는 인산 완충액 또는 히스티딘 완충액인 것인 방법.

청구항 51

제49항에 있어서, 상기 UF/DF 단계는 접선 흐름 여과(TFF)를 포함하는 것인 방법.

청구항 52

제36항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 약학 조성물은 상기 제1 크로마토그래피 매트릭스가 아닌 상기 제2 크로마토그래피 매트릭스를 이용하여 정제된 참조 바이러스 벡터 조성물에 존재하는 20% 미만의 상기 FVIII 이식 유전자 단백질 오염물질을 함유하는 것인 방법.

청구항 53

제36항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 크로마토그래피 매트릭스는 친화도 크로마토그래피 칼럼, 양이온 교환(CEX) 크로마토그래피 칼럼, 다중 모드 크로마토그래피(MMC) 칼럼 및 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC) 칼럼으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 54

제36항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 크로마토그래피 매트릭스는 상기 재조합 FVIII 단백질에 특이적으로 결합하는 친화도 리간드를 포함하는 친화도 크로마토그래피 칼럼인 것인 방법.

청구항 55

제54항에 있어서, 상기 친화도 리간드는 VIIISelect인 것인 방법.

청구항 56

제36항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 FVIII 이식 유전자 단백질 오염물질은 B 도메인-결실 FVIII 단백질인 것인 방법.

청구항 57

제36항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 FVIII 이식 유전자 단백질 오염물질은 서열 번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 인간 FVIII 단백질인 것인 방법.

청구항 58

제36항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 FVIII 이식 유전자 단백질 오염물질은 FVIIIXTEN 분자인 것인 방법.

청구항 59

제58항에 있어서, 상기 FVIIIXTEN 분자는 서열 번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 60

제36항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 크로마토그래피 매트릭스는 음이온 교환(AEX) 크로마토그래피 매트릭스인 것인 방법.

청구항 61

제36항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 크로마토그래피 매트릭스는 음이온 교환(AEX) 막인 것인 방법.

청구항 62

제36항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 숙주 세포는 포유동물 세포 또는 곤충 세포인 것인 방법.

청구항 63

제62항에 있어서, 상기 포유동물 세포는 CHO 세포, HEK293 세포 또는 HeLa 세포인 것인 방법.

청구항 64

제36항 내지 제63항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 바이러스 벡터 및 상기 FVIII 이식 유전자 단백질 오염물질을 포함하는 상기 조성물은 상기 숙주 세포를 배양하고 상기 숙주 세포로부터 상기 세포 배양 상층액을 분리 및 정화시킴으로써 생성되는 세포 배양 상층액인 것인 방법.

청구항 65

제64항에 있어서, 상기 세포 배양 상층액에 뉴클레아제 처리가 가해지는 것인 방법.

청구항 66

제1항 내지 제65항 중 어느 한 항의 방법에 따라 생성되는 바이러스 벡터를 포함하는 조성물.

청구항 67

제66항에 있어서, 상기 조성물은 상기 바이러스 벡터 및 하나 이상의 약학적 부형제를 포함하는 약학 조성물이고, 상기 조성물에는 실질적으로 이식 유전자 단백질 오염물질이 없는 것인 조성물.

청구항 68

제66항 또는 제67항에 있어서, 상기 이식 유전자 단백질은 응고 인자인 것인 조성물.

청구항 69

제68항에 있어서, 상기 응고 인자는 FVIII, FVIIIXTEN 또는 FIX인 것인 조성물.

청구항 70

제68항에 있어서, 상기 응고 인자는 B 도메인-결실 FVIII 단백질인 것인 조성물.

청구항 71

제68항에 있어서, 상기 응고 인자는 서열 번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 인간 FVIII 단백질인 것인 조성물.

청구항 72

제68항에 있어서, 상기 응고 인자는 FVIII-XTEN 분자인 것인 조성물.

청구항 73

제72항에 있어서, 상기 FVIII-XTEN 분자는 서열 번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 것인 조성물.

청구항 74

제66항 내지 제73항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 상기 제1 크로마토그래피 매트릭스가 아닌 상기 제2 크로마토그래피 매트릭스를 이용하여 정제된 참조 바이러스 벡터 조성물에 존재하는 20% 미만의 상기 이식 유전자 단백질을 함유하는 것인 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련 출원**

[0002] 본 출원은 2020년 6월 24일자로 출원된 미국 가출원 제63/043/697호 및 2020년 8월 6일자로 출원된 미국 가출원 제63/062,120호에 대한 우선권의 이익을 주장한다. 상술한 가출원의 전문은 본원에서 그 전체가 참고로 포함된다.

배 경 기 술

[0003] 렌티바이러스 벡터(LV) 및 기타 바이러스 벡터는 유전자 요법을 위한 매력적인 수단이다(문헌[Thomas *et al.*, 2003]). LV는 간세포, 신경세포 및 조혈 줄기 세포와 같은 비분열 세포를 포함하는 광범위한 조직을 형질도입할 수 있다. 게다가, LV는 표적 세포 게놈 내에 통합할 수 있고, 장기간 이식 유전자 발현을 제공할 수 있다.

[0004] 유전자 요법을 위한 바이러스 벡터에 대한 계속 증가하는 요구를 고려하여, 개선된 정제 방법이 매우 요구될 것이다. 본원에서는 개체에 대한 전신 투여에 적합한 바이러스 벡터 조성물을 생성하기 위한 개선된 방법이 본 발명자들에 의해 개시되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 개시내용은 유전자 요법의 적용을 위한 외피형 바이러스 벡터의 정제에 관한 것이다. 본 개시내용은 적어도 부분적으로는 바람직하지 않은 이식 유전자 단백질 오염물질이 통상적인 정제 공정 동안에 바이러스 벡터와 동시 정제할 수 있다는 발견에 기초한 것이다. 특정 실시형태에서, 이식 유전자 단백질 오염물질은 생물 생성 공정 동안에 생성된 프로모터-매개 전사 생성물(예를 들어, 바이러스 벡터가 암호화하는 이식 유전자 단백질 오염물질)로 인한 이식 유전자 활성의 부산물 또는 분비 단백질이다. 예를 들어, 렌티바이러스 벡터의 패키징은 숙주 세포 내로의 2개 이상의 플라스미드의 형질감염을 필요로 한다. 일부 실시형태에서, 플라스미드는 (1) 외피 단백질(예를 들어, VSV-G)을 암호화하는 외피 플라스미드; (2) 관심 이식 유전자를 암호화하는 전달 플라스미드; 및 (3) 하나 이상의 패키징 플라스미드(예를 들어, gag 및 pol을 암호화하는 플라스미드 및 rev를 암호화하는 플라스미드, 또는 gag, pol 및 rev를 암호화하는 플라스미드)를 포함한다. 특정 실시형태에서, 이식 유전자 단백질 오염물질은 전달 플라스미드의 프로모터-매개 전사 생성물이다. 특정 실시형태에서, 전달 플라스

미드의 프로모터-매개 전사 생성물은 숙주 세포(예를 들어, 숙주 패키징 세포)에 의해 생성된다. 특정 실시형태에서, 이식 유전자 단백질 오염물질은 바이러스 벡터 생성물 샘플 내에 존재하고, 검출 가능한 양으로 존재할 수 있다.

[0006] 바이러스 벡터 완제 의약품(drug product) 내의 이식 유전자 단백질 오염물질의 존재는 치료적 처치를 위해 사용되는 경우에 하나 이상의 부작용을 초래할 수 있다. 이는, 바이러스 벡터 완제 의약품이 전신 투여되는 유전자 요법 접근법에서 특히 중요하다. 바이러스 벡터의 전신 투여는 전형적으로 환자 내부에서의 세포의 효율적인 형질도입을 달성하기 위해 높은 바이러스 벡터 용량을 요구한다. 이식 유전자 단백질 오염물질이 충분히 감소 및/또는 제거되지 않는 경우, 오염 단백질은 환자에 동시 투여될 수 있으며, 신체의 형질도입된 세포 내에서의 동일한 단백질의 바이러스 벡터-매개 생성에 악영향을 미칠 수 있다. 따라서, 본 발명은, 바이러스 벡터 원료 의약품(drug substance)에는 실질적으로 이식 유전자 단백질 오염물질이 없도록 이들 이식 유전자 단백질 오염물질을 제거하기 위한 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0007] 하나의 양태에서, 본 발명은 숙주 세포로부터 바이러스 벡터를 정제하는 방법을 제공하며, 이때 이 방법은 (i) 바이러스 벡터 및 이식 유전자 단백질 오염물질을 포함하는 조성물을 이식 유전자 단백질 오염물질과 선택적으로 결합할 수 있는 제1 크로마토그래피 매트릭스와 접촉시키는 단계; 및 (ii) 크로마토그래피 매트릭스의 통과액 중의 바이러스 벡터를 회수하여 이식 유전자 단백질 오염물질로부터 바이러스 벡터를 분리하는 단계를 포함한다.

[0008] 특정 예시적인 실시형태에서, 이 방법은 (iii) 바이러스 벡터 및 이식 유전자 단백질 오염물질을 포함하는 조성물을 바이러스 벡터와 선택적으로 결합할 수 있는 제2 크로마토그래피 매트릭스와 접촉시키는 단계; 및 (iv) 제2 크로마토그래피 매트릭스로부터 바이러스 벡터를 용출하는 단계를 추가로 포함하며, 이때 단계 (iii) 및 단계 (iv)를 단계 (i) 이전에 수행한다.

[0009] 특정 예시적인 실시형태에서, 이 방법은 (iii) 단계 (ii)로부터 회수된 바이러스 벡터를 바이러스 벡터와 선택적으로 결합할 수 있는 제2 크로마토그래피 매트릭스와 접촉시키는 단계; 및 (iv) 제2 크로마토그래피 매트릭스로부터 바이러스 벡터를 용출하는 단계를 추가로 포함한다.

[0010] 특정 예시적인 실시형태에서, 단계 (i) 및 단계 (ii)는 수회 반복된다.

[0011] 특정 예시적인 실시형태에서, 단계 (i)은 이식 유전자 단백질 오염물질을 안정화시키는 약제의 존재 하에 수행된다. 특정 예시적인 실시형태에서, 약제는 $CaCl_2$이다.

[0012] 특정 예시적인 실시형태에서, 이 방법은 (v) 렌티바이러스 벡터 및 FVIII 이식 유전자 단백질 오염물질을 포함하는 조성물의 염의 농도를 표적 염 농도로 조절하는 단계를 추가로 포함한다.

[0013] 특정 예시적인 실시형태에서, 단계 (v)는 단계 (i) 이전에 수행된다.

[0014] 특정 예시적인 실시형태에서, 단계 (iii) 및 단계 (iv)가 단계 (i) 이전에 수행되면, 단계 (v)는 단계 (iv)와 단계 (i) 사이에 수행된다.

[0015] 특정 예시적인 실시형태에서, 염은 NaCl이다.

[0016] 특정 예시적인 실시형태에서, 표적 염 농도는 약 0.2 M 내지 약 0.6 M이다. 특정 예시적인 실시형태에서, 표적 염 농도는 약 0.4 M이다. 특정 예시적인 실시형태에서, 표적 염 농도는 약 200 mM NaCl 내지 약 600 mM NaCl이다.

[0017] 특정 예시적인 실시형태에서, 단계 (i)은 약 pH 7.0 내지 약 pH 7.5에서 트리스-HCl 완충액을 포함하는 로딩 완충액 중에서 바이러스 벡터 및 이식 유전자 단백질 오염물질을 포함하는 조성물을 제1 크로마토그래피 매트릭스에 로딩함으로써 수행된다. 특정 실시형태에서, 로딩 완충액은 약 200 mM 내지 약 600 mM NaCl 및 선택적으로 약 2 mM $MgCl_2$를 추가로 포함한다.

[0018] 기타 예시적인 실시형태에서, 단계 (i)은 약 pH 7.0 내지 약 pH 7.5에서 인산 완충액을 포함하는 로딩 완충액 중에서 바이러스 벡터 및 이식 유전자 단백질 오염물질을 포함하는 조성물을 제1 크로마토그래피 매트릭스에 로딩함으로써 수행된다. 특정 실시형태에서, 로딩 완충액은 약 200 mM 내지 약 600 mM NaCl 및 선택적으로 약 2

mM $MgCl_2$를 추가로 포함한다.

[0019] 특정 예시적인 실시형태에서, 단계 (iv)는 약 pH 7.0 내지 약 pH 7.5에서 트리스-HCl 완충액을 포함하는 용출 완충액을 이용하여 제2 크로마토그래피 매트릭스로부터 바이러스 벡터를 용출함으로써 수행된다. 특정 실시형태에서, 용출 완충액은 약 200 mM 내지 약 600 mM NaCl 및 선택적으로 약 2 mM $MgCl_2$를 추가로 포함한다.

[0020] 기타 예시적인 실시형태에서, 단계 (iv)는 약 pH 7.0 내지 약 pH 7.5에서 인산 완충액을 포함하는 용출 완충액을 이용하여 제2 크로마토그래피 매트릭스로부터 바이러스 벡터를 용출함으로써 수행된다. 특정 실시형태에서, 용출 완충액은 약 200 mM 내지 약 600 mM NaCl 및 선택적으로 약 2 mM $MgCl_2$를 추가로 포함한다.

[0021] 특정 예시적인 실시형태에서, 이 방법은 (vi) 이식 유전자 단백질 오염물질로부터 분리된 바이러스 벡터를 하나 이상의 약학적 부형제와 조합하여 바이러스 벡터를 포함하는 약학 조성물을 생성하는 단계를 추가로 포함하며, 이때 약학 조성물에는 실질적으로 이식 유전자 단백질 오염물질이 없다.

[0022] 특정 예시적인 실시형태에서, 단계 (vi)은 제형 완충액을 이용하여 이식 유전자 단백질 오염물질로부터 분리된 바이러스 벡터를 한외 여과/정용 여과(UF/DF)함으로써 수행된다. 특정 예시적인 실시형태에서, UF/DF 단계는 접선 흐름 여과(TFF)를 포함한다.

[0023] 특정 예시적인 실시형태에서, 제형 완충액은 NaCl 및 수크로오스를 포함하는 인산 완충액 또는 히스티딘 완충액이다.

[0024] 특정 예시적인 실시형태에서, 약학 조성물은 제1 크로마토그래피 매트릭스가 아닌 제2 크로마토그래피 매트릭스를 이용하여 정제된 참조 바이러스 벡터 조성물에 존재하는 20% 미만의 이식 유전자 단백질 오염물질을 함유한다.

[0025] 특정 예시적인 실시형태에서, 바이러스 벡터는 외피형 바이러스 벡터이다. 특정 예시적인 실시형태에서, 외피형 바이러스 벡터는 렌티바이러스 벡터이다.

[0026] 특정 예시적인 실시형태에서, 바이러스 벡터는 이식 유전자 단백질 오염물질을 암호화한다. 특정 예시적인 실시형태에서, 이식 유전자 단백질 오염물질은 전달 플라스미드로부터의 발현에 의해 숙주 세포에서 생성된다.

[0027] 특정 예시적인 실시형태에서, 제1 크로마토그래피 매트릭스는 친화도 크로마토그래피 칼럼, 양이온 교환(CEX) 크로마토그래피 칼럼, 다중 모드 크로마토그래피(MMC) 칼럼 및 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC) 칼럼으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0028] 특정 예시적인 실시형태에서, 제1 크로마토그래피 매트릭스는 이식 유전자 단백질 오염물질에 특이적으로 결합하는 친화도 리간드를 포함하는 친화도 크로마토그래피 칼럼이다.

[0029] 특정 예시적인 실시형태에서, 제2 크로마토그래피 매트릭스는 음이온 교환(AEX) 크로마토그래피 매트릭스이다. 특정 예시적인 실시형태에서, 제2 크로마토그래피 매트릭스는 음이온 교환(AEX) 막이다.

[0030] 특정 예시적인 실시형태에서, 이식 유전자 단백질은 응고 인자이다. 특정 예시적인 실시형태에서, 응고 인자는 FVIII 또는 FVIIIXTEN이다.

[0031] 특정 예시적인 실시형태에서, 제1 크로마토그래피 매트릭스는 VIIISelect 친화도 크로마토그래피 매트릭스이다.

[0032] 특정 예시적인 실시형태에서, 숙주 세포는 포유동물 세포 또는 곤충 세포이다. 특정 예시적인 실시형태에서, 포유동물 세포는 CHO 세포, HEK293 세포 또는 HeLa 세포이다.

[0033] 특정 예시적인 실시형태에서, 바이러스 벡터 및 이식 유전자 단백질 오염물질을 포함하는 조성물은 숙주 세포를 배양하고 숙주 세포로부터 세포 배양 상층액을 분리 및 정화시킴으로써 생성되는 세포 배양 상층액이다.

[0034] 특정 예시적인 실시형태에서, 세포 배양 상층액에 뉴클레아제 처리가 가해진다.

[0035] 다른 양태에서, 본 발명은 숙주 세포로부터 FVIII 이식 유전자를 포함하는 렌티바이러스 벡터(LVV)를 정제하는 방법을 제공하며, 이때 이 방법은 (i) 렌티바이러스 벡터 및 FVIII 이식 유전자 단백질 오염물질을 포함하는 조성물을 FVIII 이식 유전자 단백질 오염물질과 선택적으로 결합할 수 있는 제1 크로마토그래피 매트릭스를 접촉시키는 단계; 및 (ii) 크로마토그래피 매트릭스의 통과액 중의 렌티바이러스 벡터를 회수하여 FVIII 단백질 오염물질로부터 렌티바이러스 벡터를 분리하는 단계를 포함한다.

[0036] 특정 예시적인 실시형태에서, 이 방법은 (iii) 렌티바이러스 벡터 및 FVIII 이식 유전자 단백질 오염물질을 포함하는 조성물을 렌티바이러스 벡터와 선택적으로 결합할 수 있는 제2 크로마토그래피 매트릭스와 접촉시키는 단계; 및 (iv) 제2 크로마토그래피 매트릭스로부터 렌티바이러스 벡터를 용출하는 단계를 추가로 포함하며, 이때 단계 (iii) 및 단계 (iv)를 단계 (i) 이전에 수행하여 숙주 세포 오염물질로부터 렌티바이러스 벡터를 분리한다.

[0037] 특정 예시적인 실시형태에서, 이 방법은 (iii) 단계 (ii)로부터 회수된 렌티바이러스 벡터를 렌티바이러스 벡터와 선택적으로 결합할 수 있는 제2 크로마토그래피 매트릭스와 접촉시키는 단계; 및 (iv) 제2 크로마토그래피 매트릭스로부터 렌티바이러스 벡터를 용출하는 단계를 추가로 포함한다.

[0038] 특정 예시적인 실시형태에서, 단계 (i) 및 단계 (ii)는 수회 반복된다.

[0039] 특정 예시적인 실시형태에서, 단계 (i)은 이식 유전자 단백질 오염물질을 안정화시키는 약제의 존재 하에 수행된다. 특정 예시적인 실시형태에서, 약제는 $CaCl_2$이다.

[0040] 특정 예시적인 실시형태에서, 이 방법은 (v) 렌티바이러스 벡터 및 FVIII 이식 유전자 단백질 오염물질을 포함하는 조성물의 염의 농도를 표적 염 농도로 조절하는 단계를 추가로 포함한다.

[0041] 특정 예시적인 실시형태에서, 단계 (v)는 단계 (i) 이전에 수행된다.

[0042] 특정 예시적인 실시형태에서, 단계 (iii) 및 단계 (iv)가 단계 (i) 이전에 수행되면, 단계 (v)는 단계 (iv)와 단계 (i) 사이에 수행된다.

[0043] 특정 예시적인 실시형태에서, 염은 NaCl이다.

[0044] 특정 예시적인 실시형태에서, 표적 염 농도는 약 0.2 M 내지 약 0.6 M이다. 특정 예시적인 실시형태에서, 표적 염 농도는 약 0.4 M이다. 특정 예시적인 실시형태에서, 표적 염 농도는 약 200 mM NaCl 내지 약 600 mM NaCl이다.

[0045] 특정 예시적인 실시형태에서, 단계 (i)은 약 pH 7.0 내지 약 pH 7.5에서 트리스-HCl 완충액을 포함하는 로딩 완충액 중에서 렌티바이러스 벡터 및 FVIII 이식 유전자 단백질 오염물질을 포함하는 조성물을 제1 크로마토그래피 매트릭스에 로딩함으로써 수행된다. 특정 실시형태에서, 로딩 완충액은 약 200 mM 내지 약 600 mM NaCl 및 선택적으로 약 2 mM $MgCl_2$를 추가로 포함한다.

[0046] 기타 예시적인 실시형태에서, 단계 (i)는 약 pH 7.0 내지 약 pH 7.5에서 인산 완충액을 포함하는 로딩 완충액 중에서 렌티바이러스 벡터 및 FVIII 이식 유전자 단백질 오염물질을 포함하는 조성물을 제1 크로마토그래피 매트릭스에 로딩함으로써 수행된다. 특정 실시형태에서, 로딩 완충액은 약 200 mM 내지 약 600 mM NaCl 및 선택적으로 약 2 mM $MgCl_2$를 추가로 포함한다.

[0047] 특정 예시적인 실시형태에서, 단계 (iv)는 약 pH 7.0 내지 약 pH 7.5에서 트리스-HCl 완충액을 포함하는 용출 완충액을 이용하여 제2 크로마토그래피 매트릭스로부터 렌티바이러스 벡터를 용출함으로써 수행된다. 특정 실시형태에서, 용출 완충액은 약 200 mM 내지 약 600 mM NaCl 및 선택적으로 약 2 mM $MgCl_2$를 추가로 포함한다.

[0048] 기타 예시적인 실시형태에서, 단계 (iv)는 약 pH 7.0 내지 약 pH 7.5에서 인산 완충액을 포함하는 용출 완충액을 이용하여 제2 크로마토그래피 매트릭스로부터 렌티바이러스 벡터를 용출함으로써 수행된다. 특정 실시형태에서, 용출 완충액은 약 200 mM 내지 약 600 mM NaCl 및 선택적으로 약 2 mM $MgCl_2$를 추가로 포함한다.

[0049] 특정 예시적인 실시형태에서, 이 방법은 (vi) 이식 유전자 단백질 오염물질로부터 분리된 렌티바이러스 벡터를 하나 이상의 약학적 부형제와 조합하여 렌티바이러스 벡터를 포함하는 약학 조성물을 제조하는 단계를 추가로 포함하며, 이때 약학 조성물에는 실질적으로 FVIII 이식 유전자 단백질 오염물질이 없다.

[0050] 특정 예시적인 실시형태에서, 단계 (vi)은 제형 완충액을 이용하여 이식 유전자 단백질 오염물질로부터 분리된 렌티바이러스 벡터를 한외 여과/정용 여과(UF/DF)함으로써 수행된다. 특정 예시적인 실시형태에서, 제형 완충액은 NaCl 및 수크로오스를 포함하는 인산 완충액 또는 히스티딘 완충액이다. 특정 예시적인 실시형태에서, UF/DF 단계는 접선 흐름 여과(TFF)를 포함한다.

[0051] 특정 예시적인 실시형태에서, 약학 조성물은 제1 크로마토그래피 매트릭스가 아닌 제2 크로마토그래피 매트릭스를 이용하여 정제된 참조 바이러스 벡터 조성물에 존재하는 20% 미만의 FVIII 이식 유전자 단백질 오염물질을

함유한다.

[0052] 특정 예시적인 실시형태에서, 제1 크로마토그래피 매트릭스는 친화도 크로마토그래피 칼럼, 양이온 교환(CEX) 크로마토그래피 칼럼, 다중 모드 크로마토그래피(MMC) 칼럼 및 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC) 칼럼으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0053] 특정 예시적인 실시형태에서, 제1 크로마토그래피 매트릭스는 재조합 FVIII 단백질에 특이적으로 결합하는 친화도 리간드를 포함하는 친화도 크로마토그래피 칼럼이다. 특정 예시적인 실시형태에서, 친화도 리간드는 VIIISelect이다.

[0054] 특정 예시적인 실시형태에서, FVIII 이식 유전자 단백질 오염물질은 B 도메인-결실 FVIII 단백질이다. 특정 예시적인 실시형태에서, FVIII 이식 유전자 단백질 오염물질은 서열 번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 인간 FVIII 단백질이다. 특정 예시적인 실시형태에서, FVIII 이식 유전자 단백질 오염물질은 FVIIIXTEN 분자이다. 특정 예시적인 실시형태에서, FVIIIXTEN 분자는 서열 번호 5의 아미노산 서열을 포함한다.

[0055] 특정 예시적인 실시형태에서, 제2 크로마토그래피 매트릭스는 음이온 교환(AEX) 크로마토그래피 매트릭스이다. 특정 예시적인 실시형태에서, 제2 크로마토그래피 매트릭스는 음이온 교환(AEX) 막이다.

[0056] 특정 예시적인 실시형태에서, 숙주 세포는 포유동물 세포 또는 곤충 세포이다. 특정 예시적인 실시형태에서, 포유동물 세포는 CHO 세포, HEK293 세포 또는 HeLa 세포이다.

[0057] 특정 예시적인 실시형태에서, 바이러스 벡터 및 FVIII 이식 유전자 단백질 오염물질을 포함하는 조성물은 숙주 세포를 배양하고 숙주 세포로부터 세포 배양 상층액을 분리 및 정화시킴으로써 생성되는 세포 배양 상층액이다.

[0058] 특정 예시적인 실시형태에서, 세포 배양 상층액에 뉴클레아제 처리가 가해진다.

[0059] 다른 양태에서, 본 발명은 본원에 기술된 방법에 따라 생성된 바이러스 벡터를 포함하는 조성물을 제공한다.

[0060] 특정 예시적인 실시형태에서, 조성물은 바이러스 벡터 및 하나 이상의 약학적 부형제를 포함하는 약학 조성물이며, 이때 조성물에는 실질적으로 이식 유전자 단백질 오염물질이 없다.

[0061] 특정 예시적인 실시형태에서, 이식 유전자 단백질은 응고 인자이다. 특정 예시적인 실시형태에서, 응고 인자는 FVIII, FVIIIXTEN 또는 FIX이다. 특정 예시적인 실시형태에서, 응고 인자는 B 도메인-결실 FVIII 단백질이다. 특정 예시적인 실시형태에서, 응고 인자는 서열 번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 인간 FVIII 단백질이다. 특정 예시적인 실시형태에서, 응고 인자는 FVIII-XTEN 분자이다. 특정 예시적인 실시형태에서, FVIII-XTEN 분자는 서열 번호 5의 아미노산 서열을 포함한다.

[0062] 특정 예시적인 실시형태에서, 조성물은 제1 크로마토그래피 매트릭스가 아닌 제2 크로마토그래피 매트릭스를 이용하여 정제된 참조 바이러스 벡터 조성물에 존재하는 20% 미만의 이식 유전자 단백질을 함유한다. 특정 예시적인 실시형태에서, 조성물은 제1 크로마토그래피 매트릭스가 아닌 제2 크로마토그래피 매트릭스를 이용하여 정제된 참조 바이러스 벡터 조성물의 10% 미만의 총 FVIII 활성 수준을 갖는다. 하나의 예시적인 실시형태에서, 조성물은 약 1 IU 이하의 총 FVIII 활성 수준을 갖는다.

도면의 간단한 설명

[0063] 도 1은 유전자 요법의 적용을 위한 외피형 바이러스 벡터 원료 의약품을 제조하기 위한 통상적인 공정 작업 흐름의 개략도를 보여준다. 도 1a는 공정-관련 및 생성물-관련 불순물로부터 바이러스 벡터를 정제하는 데 주로 관여하는 단일 벡터 포획 정제 크로마토그래피 단계를 수반하는 통상적인 하류 작업 흐름을 보여준다. 도 1b는 적어도 2개의 정제 크로마토그래피 단계(이중 하나는 본 발명의 이식 유전자 단백질 포획 단계임)를 수반하는 본 개시내용의 하나의 실시형태에 따른 개선된 하류 작업 흐름을 보여준다.

도 2는 도 1a에 나타나 있는 바와 같은 통상적인 정제 공정의 각 단계 동안에 렌티바이러스 벡터 1E9 TU 당 FVIIIXTEN 이식 유전자 단백질의 활성을 보여주는 도표이다. 오염 FVIIIXTEN 단백질의 활성은 최종 원료 의약품(DS) 및 완제 의약품(DP)을 비롯하여 생산 공정의 다양한 단계 동안에 일관되게 존재한다.

도 3은 바이러스 벡터에 의해 암호화되는 FVIII 이식 유전자 단백질로부터 렌티바이러스 벡터를 정제하기 위한 VIIISelect 친화도 크로마토그래피의 평가를 보여주는 도표이다. FVIII(실험 1) 또는 FVIIIXTEN(실험 2) 이식 유전자 단백질 중 하나를 이용하여 실험을 실시하였다. 도 3a는 통상적인 1칼럼 공정(예를 들어, 도 1a에 나타낸 바와 같음), 또는 추가적인 이식 유전자 단백질 포획 단계로서 VIIISelect를 포함하는 본 발명의 2칼럼 공정

(예를 들어, 도 1b에 나타낸 바와 같음)에 의한 정제 이후에 생성물 내에 잔류하는 이식 유전자 단백질 활성 수준을 보여주는 도표이다. 도 3b는 1칼럼 공정과 비교할 때 2칼럼 공정에 대한 이식 유전자 단백질 활성화의 감소 비율(%)을 보여주는 도표이다.

도 4는 본 발명의 2칼럼 공정에서 염화칼슘을 이용한 결과를 보여주는 도표이다. $CaCl_2$의 존재("+CaCl2") 또는 부재("-CaCl2") 하에 FVIII 이식 유전자 단백질을 포획하기 위해 VIIISelect 친화도 크로마토그래피를 사용하였다. FVIIIXTEN을 암호화하는 렌티바이러스 벡터(LV-FVIIIXTEN)는 인산 완충액에서 정제되는 반면(실험 3), FVIII을 암호화하는 렌티바이러스 벡터(LV-FVIII)는 히스티딘 완충액에서 정제된다(실험 4).

도 5는 다수의 이식 유전자 단백질 포획 단계를 실시한 이후에 FVIII을 암호화하는 렌티바이러스 벡터 제제(LV-FVIII)에 잔류하는 총 FVIII 활성을 보여주는 도표이다. 바이러스 벡터에 의해 암호화된 이식 유전자 단백질을 포획하기 위해 바이러스 샘플을 VIIISelect 친화도 크로마토그래피 수지를 통해 수회 통과시킴으로써 이를 재생하였다. 각각의 이식 유전자 단백질 포획 단계는 $CaCl_2$의 존재 하에 수행되었다. 바이러스 벡터 LV-FVIII은 히스티딘 완충액에서 정제되었다.

도 6은 본 발명의 하나의 실시형태에 따라 유전자 요법의 적용을 위한 외피형 바이러스 벡터 원료 의약품을 제조하기 위한 하류 공정 작업 흐름의 개략도를 보여준다. 도 6a는 본 개시내용의 하나의 실시형태에 따른 개선된 하류 작업 흐름을 보여주며, 이때 제2 크로마토그래피 정제 단계를 위한 로드 샘플을 조절한다. 도 6b는 본 개시내용의 하나의 실시형태에 따른 개선된 하류 작업 흐름을 보여주며, 이때 제1 크로마토그래피 정제 단계를 위한 로드 샘플을 조절하고, 제2 크로마토그래피 정제 단계를 위한 로드 샘플을 조절한다.

도 7은 본 발명의 하나의 실시형태에 따른 개선된 하류 작업 흐름을 사용하여 정제 효율성에 대한 염의 농도의 영향을 보여주는 도표이다. 도 7a는 샘플을 VIIISelect 친화도 크로마토그래피 수지에 적용하기 이전(흑색 바) 및 이후(회색 바) 총 기능성 벡터 회수의 함수로서 검출된 FVIIIXTEN 활성 수준을 보여주는 도표이며, 이때 로드 샘플은 400 mM NaCl(실험 5) 또는 100 mM NaCl(실험 6)을 포함한다. 도 7b는 샘플을 VIIISelect 친화도 크로마토그래피 수지에 적용하기 이전(흑색 바) 및 이후(회색 바) 총 P24 캡시드 회수의 함수로서 검출된 FVIIIXTEN 활성 수준을 보여주는 도표이며, 이때 로드 샘플은 400 mM NaCl(실험 5) 또는 100 mM NaCl(실험 6)을 포함한다.

도 8은 검출된 총 FVIIIXTEN 활성(흑색 바), 총 기능성 벡터 회수의 함수로서 검출된 FVIIIXTEN 활성(짙은 회색 바) 및 총 P24 캡시드 회수의 함수로서 검출된 FVIIIXTEN 활성(옅은 회색 바)을 보여주는 도표이다.

도 9는 AEX를 이용한 2단계 정제 공정에서의 FVIII-암호화 바이러스 벡터의 정제 동안의 오염 FVIII 이식 유전자 단백질의 제거 이후, 트리스 또는 인산 완충액을 이용한 VIIISelect의 제거에 대한 다양한 염 농도(200 mM, 400 mM 또는 600 mM NaCl)의 영향을 보여주는 도표이다. 총 오염물질 FVIII 이식 유전자 활성(IU)을 AEX 용출 이후 및 VIIISelect 정제 이전에 로딩 샘플(트리스 완충액의 경우 솔리드 흑색 바; 인산 로딩 완충액의 경우 솔리드 회색 바)에서 측정하고, VIIISelect 정제 이후에 통과액 생성물 분획(트리스 완충액의 경우 선형 흑색 바; 인산 완충액의 경우 선형 회색 바)에서 측정하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0064] 본 개시내용은, 바이러스 벡터의 생물 생성 동안에 최종 바이러스 벡터 생성물은 이식 유전자 단백질 오염물질을 함유할 수 있다는 발견에 기초한 것이다. 예를 들어, HEK293T 세포를 이용하여 렌티바이러스 벡터(LV-FVIII 또는 LV-FVIIIXTEN) 생성물을 제조하는 동안, 뜻밖에도 플라스미드(예를 들어, 전달 플라스미드)를 암호화하는 이식 유전자 내의 상류 CMV 프로모터 활성이 오염 FVIII 또는 FVIIIXTEN 단백질의 생산을 초래할 수 있는 이식 유전자 mRNA 생산을 매개할 수 있는 것으로 밝혀졌다. 정제 동안, 이 같은 FVIII 또는 FVIIIXTEN 이식 유전자 단백질 오염물질은 우연히도 벡터 입자와 비특이적 결합을 통해 렌티바이러스 벡터와 동시 정제될 수 있었으며, 결국 우연히도 환자에게 동시 투여될 수 있었다. 이식 유전자 단백질 오염물질을 함유하는 바이러스 벡터 생성물의 투여는 표적 세포(예를 들어, 환자 내부의 표적 세포)를 형질도입시키는 바이러스 벡터의 효능을 간섭할 수 있고/있거나, 동일한 이식 유전자 단백질의 바이러스 벡터-매개 발현을 간섭할 수 있다. 또한, 렌티바이러스 벡터 완제 의약품(LV-FVIII 또는 LV-FVIIIXTEN) 내의 오염 이식 유전자 단백질(예를 들어, FVIII 또는 FVIIIXTEN)의 존재는 잠재적으로 원치 않은 면역 반응을 유발할 수 있으며, 이는 이식 유전자 단백질 오염물질(예를 들어, 항-약물 항체(ADA))에 대항하는 항체 및/또는 LV-형질도입된 세포에 대항하는 잠재적인 세포독성 T 세포 반응의 생성을 초래한다.

[0065] 따라서, 바이러스 벡터 생성물 내의 이식 유전자 단백질 오염물질의 존재에 관한 문제를 회피하기 위해 본 개시 내용은 숙주 세포로부터 바이러스 벡터를 정제하기 위한 방법을 제공하며, 이때 이 방법은 바이러스 벡터가 암호화하는 이식 유전자 단백질 오염물질의 감소 및/또는 제거를 포함한다. 특정 실시형태에서, 본원에서 제공된 방법을 이용한 바이러스 벡터의 정제는 실질적으로 이식 유전자 단백질 오염물질이 없는 바이러스 벡터 생성물을 초래한다.

[0066] 일반적으로, 본원에 기술된 세포 및 조직 배양, 분자 생물학, 생물 물리학, 면역학, 미생물학, 유전학 및 단백질 및 핵산 화학과 관련하여 사용되는 명명법은 당해 기술분야에 잘 알려져 있고 흔히 사용된다. 본원에서 제공된 방법 및 기법은 일반적으로 당해 기술분야에 잘 알려져 있는 통상적인 방법에 따라 수행되며, 달리 언급하지 않는 한 본 명세서 전반에 걸쳐 인용되고 논의된 다양한 일반 참고문헌 및 보다 구체적인 참고문헌에 기술된 바와 같이 수행된다. 효소 반응 및 정제 기법은 당해 기술분야에서 흔히 달성되거나 본원에 기술된 바와 같이 제조사의 설명서에 따라 수행된다. 본원에 기술된 분석 화학, 합성 유기 화학, 및 의료 및 제약 화학과 관련하여 사용되는 명명법, 및 이의 실험 절차 및 기법은 당해 기술분야에 잘 알려져 있고 흔히 사용된다. 화학 합성, 화학적 분석, 제약 제조, 제제화 및 전달 및 환자의 치료를 위해 표준 기법이 사용된다.

[0067] 본원에서 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용된 과학적 및 기술적 용어는 당업자가 흔히 이해하는 의미를 갖는다. 임의의 잠재적인 불확실성이 있으며, 본원에서 제공된 정의가 임의의 사전적 또는 외적 정의보다 우선한다. 문맥상 달리 요구되지 않는 한, 단수 용어는 복수를 포함할 것이며, 복수 용어는 다수를 포함할 것이다. 달리 명시하지 않는 한, "또는"의 사용은 "및/또는"을 의미한다. "포함하는"이란 용어 및 기타 형태(예를 들어, "포함하다" 및 "포함된")의 사용이 제한되는 것은 아니다.

[0068] 본 발명을 보다 용이하게 이해하기 위해, 먼저 특정 용어를 정의한다.

[0069] 본원에서 사용된 바와 같이, 특정 나열된 수치 값을 참고하여 사용되는 경우 "약"이란 용어는 대략적인, 대략, 약 또는 정도를 의미한다. "약"이란 용어가 수치 범위와 함께 사용되는 경우, 이는 기술된 수치 값의 상한 및 하한을 확장함으로써 이 범위를 수식한다. 일반적으로, "약"이란 용어는 수치 값을 표시된 값보다 10%의 변화량 정도 높고 낮게, 표시된 값 이상 또는 이하로 수식하기 위해 본원에서 사용된다. 예를 들어, 본원에서 사용된 바와 같이 "약 100"이란 표현은 90 및 110을 포함하며, 이들 사이의 모든 값(예를 들어, 91, 92, 93, 94 등)을 포함한다. 특정 실시형태에서, "약"이란 용어는 값이 나열된 값으로부터 1% 이하로 변경될 수 있다는 것을 의미한다. 예를 들어, 본원에서 사용된 바와 같이 "약 100"이란 표현은 99 및 101을 포함하며, 이들 사이의 모든 값(예를 들어, 99.1, 99.2, 99.3, 99.4 등)을 포함한다.

[0070] 본원에서 사용된 바와 같이, "벡터"란 용어는 핵산을 숙주 세포 내로 클로닝 및/또는 전달하기 위한 임의의 비히클을 의미한다. 벡터는 다른 핵산 분절이 부착된 분절의 복제를 유발하기 위해 부착될 수 있는 레플리콘일 수 있다. "벡터"란 용어는 시험관 내, 생체 외 또는 생체 내에서 핵산을 세포 내로 도입하기 위한 바이러스 및 비-바이러스성 비히클을 포함한다. 예를 들어, 플라스미드, 개질된 진핵세포 바이러스 또는 개질된 박테리아 바이러스를 비롯한 다수의 벡터가 당해 기술분야에 알려져 있고 사용된다. 적합한 벡터 내로의 폴리뉴클레오타이드의 삽입은 상보적인 점착성 말단을 갖는 선택된 벡터 내로 적절한 폴리뉴클레오타이드 단편을 결찰시킴으로써 달성될 수 있다.

[0071] 본원에서 사용된 바와 같이, "바이러스 벡터"는 핵산을 세포 내로 도입하기 위한 임의의 바이러스 비히클을 지칭한다. 바이러스 벡터는 임의의 방식으로, 예를 들어 시험관 내, 생체 외, 또는 생체 내에서 핵산을 임의의 세포 내로 도입하기 위해 이용될 수 있다. 당업자에게 알려져 있는 바와 같이, 바이러스 벡터는 패키징 세포(예를 들어, 패키징 세포주)에 의해 패키징(생성)된다. 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터를 생성하기 위해 하나 이상의 플라스미드가 패키징 세포 내로 도입된다. 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터를 생성하기 위해 3개 이상의 플라스미드가 패키징 세포 내로 도입된다. 렌티바이러스 벡터의 생성에서, 전형적으로 (1) 관심 이식 유전자를 포함하는 전달 플라스미드; (2) 외피 단백질 암호화 서열(예를 들어, VSV-G)을 포함하는 외피 플라스미드; 및 (3) 하나 이상의 패키징 플라스미드가 패키징 세포 내로 동시 형질감염된다. 렌티바이러스성 패키징 플라스미드는 단일 플라스미드(예를 들어, 2세대 렌티바이러스 벡터 생산의 경우) 상에 또는 별도의 플라스미드(즉, gag 및 pol 유전자를 포함하는 하나의 패키징 플라스미드 및 rev 유전자를 포함하는 다른 패키징 플라스미드; 예를 들어 3세대 렌티바이러스 벡터 생산의 경우) 상에 적어도 gag, pol 및 rev 유전자를 포함한다. 아데노-연관 바이러스(AAV) 벡터의 생산에서, 전형적으로 (1) 관심 이식 유전자를 포함하는 전달 플라스미드; (2) AAV 생활 주기를 위해 요구되는 rep 및 cap 유전자를 포함하는 rep/cap 플라스미드; 및 (3) AAV 복제를 매개하는 유전자를 포함하는 헬퍼 플라스미드가 패키징 세포 내로 동시 형질감염된다. 바이러스 벡터의 생산에 대한 변형은 당해

기술분야에 잘 알려져 있다. 예를 들어, 당업자라면 벡터 중 하나 이상이 단일 벡터 내에 조합될 수 있다는 것을 인식할 것이다.

[0072] 본원에서 사용된 바와 같이, "재조합 렌티바이러스 벡터"란 문구는 패키징 성분의 존재 하에 RNA 게놈(예를 들어, 이종성 RNA 게놈)을 표적 세포를 감염시킬 수 있는 바이러스 입자 내로 패키징하는 것을 허용하기에 충분한 렌티바이러스 유전 정보를 갖는 벡터를 지칭한다. 표적 세포의 감염은 표적 세포 게놈 내로의 역전사 및 통합을 포함할 수 있다. 재조합 렌티바이러스 벡터는 벡터에 의해 표적 세포로 전달되어야 하는 비-바이러스성 암호화 서열을 갖고 있다. 재조합 렌티바이러스 벡터는 최종 표적 세포 내의 감염성 렌티바이러스 입자를 생산하기 위해 독립적인 복제를 할 수 없다. 통상, 재조합 렌티바이러스 벡터에는 기능성 gag-pol 및/또는 env 유전자 및/또는 복제에 필수적인 기타 유전자가 결여되어 있다.

[0073] 본원에서 사용된 바와 같이, "이종성" 또는 "외생성"이란 용어는 주어진 문맥에서, 예를 들어 세포 또는 폴리펩타이드에서 정상적으로 발견되지 않는 이 같은 분자를 지칭한다. 예를 들어, 외생성 또는 이종성 분자는 세포 내로 도입될 수 있으며, 예를 들어 형질감염 또는 기타 형태의 유전 공학에 의해 세포의 조작 이후에만 존재하거나, 이종성 아미노산 서열이 이것이 자연적으로 발견되지 않는 단백질에 존재할 수 있다. 따라서, 이종성 RNA 게놈을 포함하는 재조합 렌티바이러스 벡터는 렌티바이러스에서 자연적으로 발견되지 않는 RNA 게놈을 지칭한다.

[0074] 본원에서 사용된 바와 같이, "이식 유전자 단백질 오염물질"이란 용어는 생체 외에서 숙주 세포 내에서 바이러스 벡터를 생산하는 동안에 숙주 세포에서 생산되는 이식 유전자 단백질을 지칭한다. 특정 실시형태에서, 이식 유전자 단백질은 바이러스 벡터의 이식 유전자에 의해 암호화되지만, 바이러스 벡터 생산 동안에 숙주 세포 내에서 의도치 않게 발현된다. 특정 실시형태에서, 이식 유전자 단백질 생성물은 숙주 세포 내에서의 원치 않은 이식 유전자 활성의 부산물일 수 있다. 기타 실시형태에서, 이식 유전자 단백질은 프로모터-매개 전사로 인해 숙주 세포에 의해 분비될 수 있다. 예시적인 실시형태에서, 이식 유전자 단백질 오염물질은 관심 이식 유전자를 함유하는 전달 플라스미드로부터의 의사 발현(spurious expression)에 의해 숙주 세포에서 생성될 수 있다.

[0075] 본원에서 사용된 바와 같이, "선택적으로 결합할 수 있는"이란 용어는 기타 분자에 대해 특정 분자와 결합(예를 들어 가역적으로 결합)하는 능력(예를 들어, 특정한 분자와 우선적으로 결합하고; 특정한 분자에 대해 보다 높은 친화도를 갖고; 기타 분자보다 높은 정도로 특정한 분자와 결합하거나, 이를 제외하고 결합하는 능력)을 갖는다는 것을 지칭한다. 예를 들어, 바이러스 벡터를 포함하는 조성물이 바이러스 벡터와 선택적으로 결합할 수 있는 크로마토그래피 매트릭스와 접촉되는 경우, 크로마토그래피 매트릭스는 조성물에 존재할 수 있는 기타 분자보다 바이러스 벡터와 결합(이를 보유)할 것이다(예를 들어, 크로마토그래피 매트릭스 실질적으로 조성물에 존재하는 기타 분자와 비교하여 바이러스 벡터에 더 잘 결합함). 이와 같이, 크로마토그래피 매트릭스가 선택적으로 바이러스 벡터와 결합하는 경우, 바이러스 벡터는 크로마토그래피 매트릭스에 의해 보유된다.

[0076] 본원에서 사용된 바와 같이, "치료하다"란 용어는 질병의 하나 이상의 증상의 개선 또는 감소를 지칭한다. 치료는 치유일 수 있지만, 그렇다고 치유일 필요는 없다.

[0077] 본원에서 사용된 바와 같이, "전신 투여하다"란 문구는, 완제 의약품이 개체의 순환계(예를 들어, 혈류) 내로 도입되도록 완제 의약품을 포함하는 약학 조성물을 개체에 처방하거나 제공하는 것을 지칭한다. 특정 실시형태에서, 전신 투여는 바이러스 벡터가 개체의 순환계(예를 들어, 혈류) 내로 도입되도록 바이러스 벡터(예를 들어, 렌티바이러스 벡터)를 포함하는 약학 조성물을 개체에 처방하거나 제공하는 것을 지칭한다. 전신 투여 경로의 예로는, 예를 들어 중심 정맥 접근을 통한 정맥 내, 예를 들어 정맥 내 주사 및 정맥 내 주입, 경구 투여, 근육 내 투여, 피부 내 투여 및 피하 투여를 들 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.

[0078] **A. 바이러스 벡터의 정제**

[0079] 본 개시내용은 이식 유전자 단백질 오염물질을 감소 및/또는 제거하기 위해 바이러스 벡터 생산 공정에 대한 정제 단계(본원에서 "이식 유전자 단백질 포획 단계"로 지칭됨)의 도입에 기초한 것이다. 이식 유전자 단백질 포획 단계의 도입은 바이러스 벡터를 포함하는 조성물로부터의 이식 유전자 단백질 오염물질의 감소 및/또는 제거를 허용하며, 하기 임상적 이익을 제한 없이 제공할 수 있다: (1) 환자의 신체 내부의 세포를 형질도입하기 위해 사용되는 바이러스 벡터 완제 의약품의 효능을 개선시키고; (2) 전신 투여된 유전자 요법 생성물의 약효를 잠재적으로 개선시키고; (3) 투여 직후에 단백질 항원에 대한 잠재적인 면역 반응을 최소화한 결과로서 생체 내 유전자 요법 생성물의 안전성 프로파일을 개선시키고(예를 들어, 항-약물 항체의 잠재적인 개발을 최소화함); (4) 이식 유전자 단백질 생성물의 존재로 인한 임의의 부정적 치료 효과 또는 부작용을 최소화하고; 및 (5) 생

성물 품질을 개선하고 생성물 순도를 증가시킨다. 특정 실시형태에서, 이식 유전자 단백질 오염물질은 전달 플라스미드로부터의 발현에 의해 숙주 세포에서 생성된다.

[0080] 특정 양태에서, 이식 유전자 단백질 포획 단계는 (i) 바이러스 벡터 및 이식 유전자 단백질 오염물질을 포함하는 조성물을 이식 유전자 단백질 오염물질과 선택적으로 결합할 수 있는 제1 크로마토그래피 매트릭스와 접촉시키는 단계; 및 (ii) 크로마토그래피 매트릭스의 통과액 중의 바이러스 벡터를 회수하여 이식 유전자 단백질 오염물질로부터 바이러스 벡터를 분리하는 단계를 포함한다. 당업자에 의해 인식되는 바와 같이, 이식 유전자 포획 단계는 동일하거나 상이한 이식 유전자 포획 단계를 사용하여 1회 또는 수회(2회이상, 3회 이상 등) 수행될 수 있다. 이어서, 얻어진 바이러스 벡터는 임의의 방식으로, 예를 들어 시험관 내, 생체 외, 또는 생체 내에서 핵산을 임의의 세포 내로 도입함으로써 이용될 수 있다. 특정 실시형태에서, 본 개시내용의 바이러스 벡터는 렌티바이러스 벡터이다.

[0081] 당해 기술분야에 알려져 있는 바와 같이, 완제 의약품의 안전성 프로파일은 완제 의약품에 대한 임의의 원치 않은 면역원성의 발생(예를 들어, 완제 의약품에 대한 항-약물 항체의 개발)에 따라 달라질 수 있다. 원치 않은 면역원성의 발생은 완제 의약품의 투여 경로(예를 들어, 피부 내, 피하, 흡입, 근육 내, 정맥 내 경로 등), 투여량 및 투여 빈도에 의해 영향을 받는다. 본원에 기술된 하나 이상의 이식 유전자 포획 단계를 포함하는 바이러스 벡터 정제 방법은 투여 가능한 바이러스 벡터 완제 의약품에 존재할 수 있는 이식 유전자 단백질 오염물질을 감소 및/또는 제거하며, 이와 같이 이식 유전자 단백질 오염물질에 대한 원치 않은 면역원성의 발생을 감소 및/또는 제거한다. 당업자라면 원치 않은 면역원성의 발생의 감소 및/또는 제거가 발생할 수 있지만, 완제 의약품(예를 들어, 바이러스 벡터 완제 의약품)은 임의의 투여량 및 임의의 투여 빈도로 투여된다는 것을 인지할 것이다.

[0082] 특정 실시형태에서, 이식 유전자 단백질 포획 단계(예를 들어, 이식 유전자 불순물 포획 단계)는 하나 이상의 크로마토그래피 분리 기법의 사용을 이용한다. 특정 실시형태에서, 이식 유전자 단백질 포획 단계는 하나 이상의 크로마토그래피 매트리스의 사용을 이용한다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 크로마토그래피 매트리스는 친화도 크로마토그래피, 양이온 교환(CEX) 크로마토그래피, 음이온 교환(AEX) 크로마토그래피, 다중 모드 크로마토그래피(MMC) 및 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC)로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0083] 본원에 기술된 다양한 실시형태에서, 당업자에게 알려져 있는 다양한 완충액 및 용액이 사용된다. 당업자에게 알려져 있는 임의의 적합한 완충액 및 용액이 사용될 수 있다. 예를 들어, 정제 단계는 여러 완충액 및 용액, 예를 들어 위생 용액, 평형화 완충액, 세척 완충액, 용출 완충액, 제거 완충액, 재생 완충액, 희석 완충액 등의 사용을 요구할 수 있다.

[0084] 특정 실시형태에서, 이식 유전자 단백질 포획 단계는 친화도 크로마토그래피를 이용한다. "친화도 크로마토그래피"란 용어는 단백질이 친화도 리간드(예를 들어, 이식 유전자 단백질 오염물질에 특이적으로 결합하는 친화도 리간드)에 가역적이고 특이적으로 결합되는 단백질 분리 기법을 지칭한다. 본원에서 사용된 바와 같이, "특이적으로 결합한다"란 용어는 분자에 고도로 우선하는 분자와의 결합 반응을 매개하는 능력을 지칭한다.

[0085] 친화도 크로마토그래피는 성분을 분리하기 위해 분자들 사이의 특이적 결합 상호작용을 이용한다. 친화도 크로마토그래피에서, 친화도 리간드는, 조성물이 고체 지지체를 통과하는 경우에 수지가 친화도 리간드에 대해 특이적 결합 친화도를 갖는 분자를 수지 보유하고 있도록 고체 지지체, 예를 들어 수지에 고정된다. 특정 실시형태에서, 이식 유전자 단백질 포획 단계는 이식 유전자 단백질 오염물질에 특이적으로 결합하는 친화도 리간드를 포함하는 친화도 크로마토그래피 칼럼을 이용한다. 일부 실시형태에서, 친화도 리간드는 친화도 리간드(예를 들어, 일차 아민, 설프하이드릴, 카르복실산, 알데하이드) 상의 특정 기능성 기와 지지체 상의 반응성 기 사이의 화학적 공유 결합의 형성에 의해 고체 지지 물질에 직접 고정 또는 결합된다. 일부 실시형태에서, 친화도 리간드는, 예를 들어 글루타티온-GST 친화도 상호작용을 통해 글루타티온 지지체에 포획된 글루타티온 S-트랜스퍼라아제(GST)-태깅된 융합 단백질을 통한 간접적인 결합 접근법에 의해 고정된다. 일반적인 부류의 단백질(예를 들어, 항체)에 결합하는 친화도 리간드, 또는 흔히 사용되는 융합 단백질 태그(예를 들어, 히스티딘 태그 또는 His-태그)는 친화도 정제에 사용하기 위한 예비 고정 형태로 용이하게 이용 가능하다. 특정 실시형태에서, 관심 특히 항체 또는 항원과 같은 보다 특화된 친화도 리간드가 고정될 수 있다. 예를 들어, 펩타이드 항원이 지지체에 고정될 수 있으며, 펩타이드를 인식하는 항체를 정제하기 위해 사용될 수 있다. 따라서, 특정 실시형태에서 본 개시내용은 숙주 세포로부터 바이러스 벡터를 정제하는 방법을 제공하며, 이때 이 방법은, 바이러스 벡터 및 이식 유전자 단백질 오염물질을 포함하는 조성물에 이식 유전자 단백질 오염물질과 선택적으로 결합할 수 있는 친화도 크로마토그래피 정제를 가하는 단계; 및 친화도 크로마토그래피 정제의 얻어진 통과액 중의 바이러스 벡

터를 회수하여 이식 유전자 단백질 오염물질로부터 바이러스 벡터를 분리하는 단계를 포함한다. 특정 실시형태에서, 숙주 세포로부터 바이러스 벡터를 정제하는 방법은 (i) 바이러스 벡터 및 이식 유전자 단백질 오염물질을 포함하는 조성물을 이식 유전자 단백질 오염물질과 선택적으로 결합할 수 있는 친화도 크로마토그래피 매트릭스를 접촉시키는 단계; 및 (ii) 친화도 크로마토그래피 매트릭스의 통과액 중의 바이러스 벡터를 회수하여 이식 유전자 단백질 오염물질로부터 바이러스 벡터를 분리하는 단계를 포함한다.

[0086] 바이러스 벡터 생성물 내의 특정 이식 유전자 단백질 오염물질(예를 들어, FVIII 단백질)의 존재를 감소 및/또는 제거할 목적으로, 특정 실시형태에서 친화도 리간드는 크로마토그래피 고체상 물질에 공유 결합되며, 용액이 크로마토그래피 고체상 물질과 접촉함에 따라 용액 중의 오염 단백질(예를 들어, FVIII 단백질)에 접근 가능하다. 이식 유전자 단백질 오염물질(예를 들어, FVIII 단백질)은 크로마토그래피 단계 동안에 친화도 리간드에 대한 이의 특이적 결합 친화도를 통해 보유되는 반면, 혼합물(예를 들어, 바이러스 벡터) 내의 기타 용질 및/또는 단백질은 리간드에 인식 가능하거나 특이적으로 결합하지 않는다. 고정된 리간드에 대한 이식 유전자 단백질 오염물질의 결합은 목적하는 바이러스 벡터가 크로마토그래피 매질을 통과하도록 하는 반면, 오염 단백질은 고체상 물질 상의 고정된 리간드에 특이적으로 결합한 채로 남아 있다. 임의의 성분은 이의 개별 특이적 결합 파트너를 감소 및/또는 제거할 목적으로 리간드로서 사용될 수 있다. 특정 실시형태에서, 친화도 리간드는 이식 유전자에 대한 특이적 결합 친화도를 갖는 항체, 항체 단편, 항체 변이체, 펩타이드 모방체 또는 펩타이드, 예를 들어 FVIII에 대한 결합 친화도를 갖는 항체, 항체 단편, 항체 변이체, 펩타이드 모방체 또는 펩타이드이다. 예시적인 실시형태에서, FVIII 단백질에 대한 리간드는 GE Healthcare/Cytiva사의 VIIISelect™이다.

[0087] 특정 실시형태에서, 친화도 정제는 다양한 완충액 및 용액을 이용한다. 당업자에게 알려져 있는 임의의 완충액 및 용액이 사용될 수 있다. 예를 들어, 적합한 위생 완충액은 0.5 M NaOH를 포함할 수 있고; 적합한 평형화 완충액은 20 mM 트리스 또는 20 mM 인산염, 0 mM 내지 2 mM $MgCl_2$, 10 mM 내지 30 mM $CaCl_2$, 10 mM 내지 70 mM NaCl을 포함할 수 있고, 7.2의 pH를 가질 수 있으며; 적합한 제거 또는 세정 완충액은 0.5 M NaOH, 인산을 함유하는 용액, 벤질 알코올 또는 아세트산을 포함할 수 있고; 적합한 재생 완충액은 20 mM 트리스, 2 mM $MgCl_2$, 150 mM NaCl을 포함할 수 있고, 7.2의 pH를 가질 수 있다.

[0088] 일부 실시형태에서, 이식 유전자 단백질 포획 단계는 바이러스 벡터 및 이식 유전자 단백질 오염물질을 포함하는 조성물에 크로마토그래피 기질(예를 들어, 매트릭스, 수지, 칼럼) 내에 이식 유전자 단백질 오염물질을 보유할 수 있는 이온 교환 크로마토그래피 정제를 가하는 단계를 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같이, "이온 교환 크로마토그래피"란 용어는 이온 가능한 분자의 총 표면 전하에 기초한 이 같은 이온 가능한 분자의 분리를 지칭한다. 특정 실시형태에서, 이온 교환 크로마토그래피는 양이온 교환 수지를 이용한다. "양이온 교환 수지", "양이온 교환 흡착제" 또는 "양이온 교환 매트릭스"는 음으로 하전되어 있으며, 따라서 고체상 상부를 지나가거나 이를 통과하는 수용액에서의 양이온과의 교환을 위한 유리 양이온을 갖는 고체상을 지칭한다. 양이온 교환 수지를 형성하기 위해 고체상에 부착되어 있는 음으로 하전된 리간드는, 예를 들어 카르복실레이트 또는 설포네이트일 수 있다. 상업적으로 구입 가능한 양이온 교환 수지는 카르복시-메틸-셀룰로오스, 아가로오스 상에 고정된 설포프로필(SP)(예를 들어, GE Healthcare Life Sciences사의 SP SEPHAROSE-XL, SP-SEPHAROSE-Fast Flow, SP SEPHAROSE-High Performance, CM SEPHAROSE-Fast Flow, CM SEPHAROSE.High Performance, CAPTO-S 및 CAPTO-SP ImpRes, 또는 EMD Millipore사의 FRACTOGEL EMD SE HiCap, FRACTOGEL EMD SO3-, FRACTOGEL EMD COO-, ESHMUNO S 및 ESHMUNO. CPX, 또는 Bio-Rad사의 UNOSPHERE-S 및 NUVIA-S)을 포함한다.

[0089] 일부 실시형태에서, 이식 유전자 단백질 포획 단계는 바이러스 벡터 및 이식 유전자 단백질 오염물질을 포함하는 조성물에 크로마토그래피 기질(예를 들어, 매트릭스, 수지, 칼럼) 내에 이식 유전자 단백질 오염물질을 보유할 수 있는 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC) 정제를 가하는 단계를 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같이, "소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC)"란 용어는 정지상(예를 들어, 수지)과의 소수성 상호작용에 기초한 성분의 분리를 지칭한다. HIC에서의 용출 순서는 성분을 이들의 상대적 소수성에 기초하여 순위 결정할 수 있도록 한다. HIC의 이점은, 예를 들어 비변성 조건의 사용을 포함하며, 이는 유기 용매 또는 고온의 사용을 요구하지 않으며, 바이러스 정제 공정에서 사용되는 경우에 바이러스 구조를 보존하는 생리적 pH에서 분리를 수행한다. 일부 실시형태에서, 이식 유전자 단백질 포획 단계는 소수성 상호작용 크로마토그래피를 이용한다. 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC)는 이들의 표면 소수성에서의 차이에 기초하여 생체 분자를 분리하기 위한 기법이다. HIC 크로마토그래피 매질은 직쇄 탄화수소(예를 들어, 프로필(C3), 부틸(C4), 헥실(C6) 또는 옥틸(C8)) 또는 방향족(예를 들어, 페닐)과 같은 소수성 리간드를 함유한다. 순수에서, 소수성 효과는 리간드와 단백질 사이 또는 단백질 자체의 기능성 상호작용을 위해 너무 약하다. 그러나, 이액염(lyotropic salt)은 소수성 상호작용을 향

상시키고, 염의 첨가는 HIC 매질에 대한 단백질의 포획을 조장한다. 이러한 이유로, HIC 수지는 통상 높은 염 농도 하에 로딩되고, 보다 낮은 염 농도에서 용출된다. 당업자라면 황산암모늄[$(NH_4)_2SO_4$]이 호프마이스터(Hofmeister) 계열에서의 암모늄 및 황산 이온 둘 모두의 높은 이액 순위 및 염의 높은 용해성으로 인해 HIC 크로마토그래피를 통해 단백질의 포획을 제어하기 위해 가장 흔히 사용되는 염이라는 것을 인지할 것이다. 당업자라면 염(예를 들어, 황산암모늄)의 농도가 이식 유전자 단백질 오염물질의 결합을 위한 최적 농도를 달성하도록 조작될 수 있다는 것을 인지할 수 있다. 게다가 공용매는 소수성 상호작용에 또한 영향을 미칠 수 있다. 예를 들어, 에틸렌 또는 프로필렌 글리콜은 단백질과 고정된 리간드 사이의 상호작용을 감소시킬 수 있으며, 따라서 용출 프로파일을 개선시키는 데 유용할 수 있다. 적합한 소수성 수지의 예로는 Capto Adhere, Tosoh Butyl 650M, Tosoh SuperButyl 650C, Tosoh Phenyl 650C 및 EMD Fractogel® Phenyl(Tosoh Bioscience LLC, PA)을 들 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.

[0090] 일부 실시형태에서, 이식 유전자 단백질 포획 단계는 바이러스 벡터 및 이식 유전자 단백질 오염물질을 포함하는 조성물에 크로마토그래피 기질(예를 들어, 매트릭스, 수지, 칼럼) 내에 이식 유전자 단백질 오염물질을 보유할 수 있는 다중 모드 크로마토그래피 정제를 가하는 단계를 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같이, "혼합 모드 크로마토그래피" 또는 "다중 모드 크로마토그래피"란 용어는 혼합물 내에서의 성분의 분리를 달성하기 위해 2개 이상의 기작의 조합을 이용하는 크로마토그래피를 지칭한다. 일부 실시형태에서, 이식 유전자 단백질 포획 단계는 바이러스 벡터로부터 생성물-관련 불순물(예를 들어, 이식 유전자 단백질 오염물질)을 분리하기 위해 다중 모드 또는 혼합 모드 크로마토그래피(MMC)를 이용한다. 일부 실시형태에서, MMC는 바이러스와 불순물 사이의 적어도 크기 차이, 및/또는 불순물과 하나 이상의 크로마토그래피 리간드 사이에서 발생하는 화학적 상호작용에 기초하여 작동한다. 물리적 및 화학적 MMC를 비롯한 다양한 유형의 MMC가 당업자에게 알려져 있다. 화학적 MMC는 이온 교환 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 역상 액체 크로마토그래피 및 친수성 상호작용 액체 크로마토그래피의 원리들 사이의 조합을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 추가의 예로는 수소 결합, pi-pi 결합 및 금속 친화도의 조합을 활용하는 수지를 들 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 다중 모드 크로마토그래피의 일례는 특정 크기, 예를 들어 700 킬로달톤(kDA)의 크기 하에 분자를 트래핑하는 소수성 특성 및 양전하 특성 둘 모두를 갖도록 설계된 옥틸아민 리간드를 포함하는 Capto® Core 700 크로마토그래피 수지(GE Healthcare Bio-Sciences)의 사용을 활용한다. 이 같은 크로마토그래피 수지에서, 비드 외면은 불활성이며, 목적하는 바이러스 벡터는 수지를 통과하고 불순물을 그 내부에 보유되는 크기 배제에 의한 바이러스 벡터의 정제를 허용한다.

[0091] 바이러스 벡터 정제에 관련된 단계는 효율을 개선시키는, 당업자에게 알려져 있는 특정 약제의 존재 하에 수행될 수 있다. 예를 들어, 특정 실시형태에서 이식 유전자 단백질 포획 단계는 이식 유전자 단백질 오염물질을 안정화시키는 약제의 존재 하에 수행된다. 특정 실시형태에서, 이식 유전자 단백질 포획 단계는 이식 유전자 단백질 오염물질을 안정화시키는 약제의 존재 하에 수행되며, 이때 약제는 $CaCl_2$이다.

[0092] 본원에 기술된 바와 같은 이식 유전자 단백질 포획 단계는 당업자에게 알려져 있는 바이러스 벡터 생산 공정 내에 혼입될 수 있다. 도 1a는 상류 단계(세포 은행 바이알의 해동; 세포 성장 및 계대배양; 바이러스 벡터를 생성하기 위한 숙주 세포의 형질감염 및/또는 유도)와 그 이후의 일련의 하류 단계(세포 제거(정화) 및 뉴클레아제 처리를 포함하는 바이러스 벡터의 수확; 기타 생성물- 및 공정-관련 불순물로부터 벡터를 분리하기 위한 적어도 하나의 정제 단계(본원에서 "바이러스 벡터 포획 단계"로 지칭됨); 및 원료 의약품의 최종 제형화를 위한 한외 여과/정용 여과 단계)를 포함하는 전형적인 바이러스 벡터 제작 공정을 보여주는 일반적인 흐름도이다. 일반적으로, 이식 유전자 포획 단계는 하류 공정에서의 정화 단계와 최종 단계 사이의 임의의 시점에 바이러스 벡터 생산 공정에 혼입될 수 있다.

[0093] 바이러스 벡터 생산을 위한 상류 가공 단계는 일반적으로 세포 증식, 벡터 생산 세포의 형질감염 또는 감염 및 바이러스 벡터 생산 단계를 포함한다. 일반적으로, 벡터 생산 세포의 형질감염 또는 감염은 포유동물 또는 곤충 세포에서의 일시적인 형질감염 또는 안정한 생산자 세포주의 사용에 의해 달성된다. 세포는 성분들을 암호화하는 바이러스 벡터로 형질감염되고, 배양되어 바이러스 개수 및/또는 바이러스 역가를 증가시킨다. 형질감염 방법 및 세포 배양 방법은 당업자에게 알려져 있으며, 적어도 세포에 필수 영양분, 예를 들어 적합한 배양 배지를 제공하는 단계를 포함한다. 세포를 배양하기 위한 방법은, 예를 들어 표면에 부착한 성장, 현탁액 중의 성장 또는 이들의 조합을 포함한다. 배양은 적합한 용기, 예를 들어 배양 접시, 배양 플라스크 또는 회전병(roller bottle) 내에서 수행될 수 있다. 대규모 배양은 종종 당업자가 입수 가능한 다양한 시스템(예를 들어, 배치, 유가식, 연속 시스템, 중공 섬유 등을 포함함)을 사용한 생물 반응기를 사용하여 수행된다.

[0094] 상류 가공 단계 이후, 정화, 뉴클레아제 처리, 바이러스 벡터 포획 및 멸균 여과의 하류 가공 단계를 포함하는 하류 가공 단계는 전형적으로 도 1a에 나타나 있는 바와 같다. 하류 가공의 목표는 상류 가공 동안에 생성된 다양한 불순물로부터 바이러스 벡터를 분리하고 벡터를 제형화 및 환자에 대한 투여에 적절한 상태로 수득하는 것이다. 당업자라면 가장 효율적인 바이러스 벡터 제작 공정을 수득하기 위해 상술한 단계의 최적 순서(대부분의 바이러스 벡터를 수득하기 위한 공정에서의 단계의 최적 순서)를 결정할 수 있다.

[0095] 정화 단계는 초기 조질 현탁액으로부터의 대형 잔해 및 거대분자 복합체의 제거를 포함한다. 특정 실시형태에서, 정화는 바이러스 벡터 수율을 개선하기 위해 세포 용균을 포함한다. 용균을 촉진하기 위해 미세유동화기의 사용 및 열충격 처리와 같은 물리적 방법을 비롯한 다양한 방법이 세포를 용균하려고 하는 당업자에게 알려져 있다. 용균은 종종 세정제를 사용하여 달성된다. 세정제는 비이온 형태(예를 들어, 트리톤 X-100, 트리톤 X-114, 트위 20, 트위 80, NP-40, 옥틸 글루코시드 및 옥틸 티오글루코시드), 음이온 형태(예를 들어, SDS) 및 양쪽성 이온 형태(예를 들어, CHAPS 및 CHAPSO)로 구입 가능하다. 일부 실시형태에서, 정화는 세포 잔해 및 기타 불순물을 제거하기 위한 여과 단계에 의해 수행된다. 적합한 필터로는 셀룰로오스 필터, 예를 들어, 무기 필터 보조제와 결합된 셀룰로오스 섬유(예를 들어, 흡드 실리카, 펄라이트, 규조토), 유기 수지와 결합된 셀룰로오스 섬유 또는 이들의 임의의 조합, 및 중합체성 필터(예를 들어, 나일론, 폴리에테르설폰 또는 폴리프로필렌을 포함하는 필터)를 포함하는 필터를 들 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 당업자에게 알려져 있는 임의의 정화 접근법이 본 발명의 바이러스 벡터 생산 공정에 적합할 수 있다. 적합한 정화 접근법으로는 원심분리, 미세 여과, 전량 여과(dead-end filtration), 심층 여과(depth filtration), 막 여과 또는 이들의 조합을 들 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 따라서, 정화는, 예를 들어 기공 크기를 0.2 ㎛까지 감소하여 필터 조합이 사용을 포함할 수 있다.

[0096] 숙주 세포(예를 들어, 바이러스 벡터 생성 세포)의 배양, 및 그 이후의 후속적인 용균 및 정화 단계에 의해 바이러스 벡터 및 이식 유전자 단백질 오염물질을 포함하는 조성물이 얻어진다. 특정 실시형태에서, 바이러스 벡터 및 이식 유전자 단백질 오염물질을 포함하는 조성물은 숙주 세포를 배양하고, 숙주 세포로부터 세포 배양 상층액을 분리 및 정화시킴으로써 생성되는 세포 배양 상층액이다. 숙주 세포는 당업자에게 알려져 있는 바이러스 벡터 생산에 적합한 임의의 숙주 세포일 수 있다. 특정 실시형태에서, 숙주 세포는 CHO 세포, HEK293 세포(예를 들어, HEK293T 세포), HeLa 세포 및 곤충 세포로 이루어진 군으로부터 선택된다. 특정 실시형태에서, 숙주 세포는 HEK293 세포이다. 특정 실시형태에서, 숙주 세포는 HEK293T 세포이다.

[0097] 세포 용균 단계 동안 및/또는 이후, 핵산(예를 들어, 숙주 세포 핵산, RNA 및/또는 DNA 오염물질)을 분해하고 임의의 거대분자 복합체를 붕괴시키기 위해 뉴클레아제 처리 단계를 수행할 수 있다. 뉴클레아제 처리 단계는 정화 동안 및/또는 이후에 수행될 수 있다. 본 발명의 바이러스 벡터 생산 공정에 사용하기에 적합한 뉴클레아제는 벤조나아제, 데나라아제(Denarase), 및 당업자에게 알려져 있는 임의의 기타 DNase 및/또는 RNase를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 실시형태에서, 뉴클레아제 처리 대신에 또는 이 외에도, 핵산 불순물의 선택적인 침전은, 예를 들어 폴리에틸렌 이민(PEI), 테트라데실트리메틸-암모늄 클로라이드(TTA), 도미펜 브로마이드(DB), 세틸피리디늄 클로라이드(CPC), 벤제토늄 클로라이드(BTC) 및 세틸 트리메틸벤제토늄 브로마이드(CTAB)를 포함하지만 이에 제한되지 않는 적합한 침전제를 이용한 침전에 의해 수행될 수 있다.

[0098] 특정 실시형태에서, 세포 분리 및 뉴클레아제 처리는 약 7의 pH를 갖는 인산염 또는 트리스 완충액을 사용하여 실시된다.

[0099] 세포 제거 및 뉴클레아제 처리 이후, 하나 이상의 바이러스 벡터 포획 단계는 다양한 숙주 세포 오염물질로부터 바이러스 벡터를 정제하기 위해 이용될 수 있다. 본 발명의 이식 유전자 단백질 포획 단계가 바이러스 벡터 및 이식 유전자 단백질 오염물질을 포함하는 조성물에 크로마토그래피 기질 내의 이식 유전자 단백질 오염물질과 선택적으로 결합할 수 있는 크로마토그래피 정제를 가하는 단계를 포함하는 반면, 바이러스 벡터 포획 단계는 크로마토그래피 기질(예를 들어, 매트릭스, 수지, 칼럼) 내의 바이러스 벡터와 선택적으로 결합할 수 있는 크로마토그래피 기질을 이용한다. 특정 실시형태에서, 바이러스 벡터 포획 단계는 (i) 바이러스 벡터(및 하나 또는 대부분의 숙주 세포 오염물질)를 포함하는 조성물을 바이러스 벡터와 선택적으로 결합할 수 있는 크로마토그래피 매트릭스와 접촉시키는 단계, 및 (ii) 크로마토그래피 매트릭스로부터 바이러스 벡터를 용출하여 숙주 세포 오염물질로부터 바이러스 벡터를 분리하는 단계를 포함한다.

[0100] 바이러스 벡터 포획을 위해 다양한 크로마토그래피 정제 기법 중 하나 이상이 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터 포획 단계의 크로마토그래피는 음이온 교환 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC), 역상 크로마토그래피(RPC) 및 고정된 금속 이온 친화도 크로마토그래피

(IMAC)로 이루어진 군으로부터 선택된다. 특정 실시형태에서, 이온 교환 크로마토그래피는 음이온 교환 수지를 이용한다. "음이온 교환 수지", "음이온 교환 흡착제" 또는 "음이온 교환 매트릭스"란 용어는 본원에서 양으로 하전되어 있는 고체상, 예를 들어 4차 아미노기와 같은 하나 이상의 양으로 하전된 리간드가 부착되어 있는 고체상을 지칭하기 위해 사용된다. 음이온 교환 크로마토그래피 수지는 순 표면 음전하를 갖는 분자에 대한 친화도를 가지며, 조성물로부터 음으로 하전된 분자를 분리하는 데 유용하다. 상업적으로 구입 가능한 음이온 교환 수지로는 GE Healthcare Life Sciences사의 DEAE SEPHAROSETM Fast Flow, Q SEPHAROSETM Fast Flow, Q SEPHAROSETM High Performance, Q SEPHAROSETM XL, CAPTOTM DEAE, CAPTOTM Q 및 CAPTOTM Q ImpRes, 또는 EMD Millipore사의 FRACTOGELTM EMD TMAE HiCap, FRACTOGELTM EMD DEAE 및 ESHMUNOTM Q, 또는 Bio-Rad사의 UNOSPHERETM Q 및 NUVIATM Q를 들 수 있다.

[0101] 특정 실시형태에서, 이온 교환 크로마토그래피는 막 교환의 사용을 포함한다. 막 교환 크로마토그래피는 막 흡수제를 사용하는 일종의 이온 교환 크로마토그래피이며, 이에 대해 편평 시트, 중공 섬유 및 방사 흐름을 비롯한 다양한 유형이 존재한다. 일부 실시형태에서, 막 교환 칼럼에는 바이러스 벡터와 결합할 수 있는 흡착성 모이어티를 함유하는 내부 기공을 포함하는 미세 다공성 막이 채워져 있다. 흡착성 막은 이들을 정제 목적으로 적합하도록 하는 다양한 형상 및 화학 특정으로 이 구입 가능하다.

[0102] 당업자에게 알려져 있는 다양한 완충액 및 용액은 바이러스 벡터 포획용으로 사용될 수 있다. 예를 들어, 적합한 위생 용액은 0.5 M NaOH를 포함할 수 있고; 적합한 평형화 완충액은 20 mM 트리스, 2 mM $MgCl_2$, 150 mM NaCl을 포함할 수 있고, 7.2의 pH를 가질 수 있고; 적합한 세척 완충액은 20 mM 트리스, 2 mM $MgCl_2$, 400 mM NaCl을 포함할 수 있고, 7.2의 pH를 가질 수 있고; 적합한 용출 완충액은 20 mM 트리스, 2 mM $MgCl_2$, 1,200 mM NaCl을 포함할 수 있고, 7.2의 pH를 가질 수 있고; 적합한 제거 완충액은 20 mM 트리스, 2 mM $MgCl_2$, 2,000 mM NaCl을 포함할 수 있고, 7.2의 pH를 가질 수 있고; 적합한 재생 완충액은 20 mM 트리스, 2 mM $MgCl_2$, 150 mM NaCl을 포함할 수 있고, 7.2의 pH를 가질 수 있다.

[0103] 특정 실시형태에서, 도 1b에 나타나 있는 바와 같이, 바이러스 벡터 포획 단계는 이식 유전자 단백질 정제 단계 이전에 수행될 수 있다. 예를 들어, 특정 양태에서 본 개시내용은 숙주 세포로부터 바이러스 벡터를 정제하는 방법을 제공하며, 이때 이 방법은 (i) 바이러스 벡터 및 이식 유전자 단백질 오염물질을 포함하는 조성물을 이식 유전자 단백질 오염물질과 선택적으로 결합할 수 있는 제1 크로마토그래피 매트릭스와 접촉시키는 단계; (ii) 크로마토그래피 매트릭스의 통과액 중의 바이러스 벡터를 회수하여 이식 유전자 단백질 오염물질로부터 바이러스 벡터를 분리하는 단계; (iii) 단계 (ii)로부터 회수된 바이러스 벡터를 바이러스 벡터와 선택적으로 결합할 수 있는 제2 크로마토그래피 매트릭스와 접촉시키는 단계; 및 (iv) 제2 크로마토그래피 매트릭스로부터 바이러스 벡터를 용출하여 숙주 세포 오염물질로부터 바이러스 벡터를 분리하는 단계를 포함한다.

[0104] 기타 실시형태에서, 바이러스 벡터 포획 단계는 이식 유전자 단백질 포획 단계 이후에 수행될 수 있다. 따라서, 특정 실시형태에서 본 개시내용은 숙주 세포로부터 바이러스 벡터를 정제하는 방법을 제공하며, 이때 이 방법은 (i) 바이러스 벡터 및 이식 유전자 단백질 오염물질을 포함하는 조성물을 바이러스 벡터와 선택적으로 결합할 수 있는 크로마토그래피 매트릭스와 접촉시키는 단계; (ii) 제2 크로마토그래피 매트릭스로부터 바이러스 벡터(및 임의의 나머지 이식 유전자 단백질 오염물질)를 용출하는 단계; (iii) 단계 (ii)의 용출액을 이식 유전자 단백질 오염물질과 선택적으로 결합할 수 있는 제1 크로마토그래피 매트릭스와 접촉시키는 단계; 및 (iv) 크로마토그래피 매트릭스의 통과액 중의 바이러스 벡터를 회수하여 이식 유전자 단백질 오염물질로부터 바이러스 벡터를 분리하는 단계를 포함한다.

[0105] 특정 실시형태에서, 이식 유전자 단백질 포획 단계 및/또는 바이러스 벡터 포획 단계를 수행한 후, 바이러스 벡터를 추가로 농축하기 위해 바이러스 벡터 조성물에는 하나 이상의 한외 여과 단계를 가할 수 있다. 한외 여과 단계는 완충액 교환용으로 사용되는 경우에 정용 여과로서 종종 지칭된다. 특정 실시형태에서, 한외 여과/정용 여과 단계는 벡터를 농축하는 단계 및/또는 완충액을 교환하는 단계를 포함한다. 임의의 여과 공정, 예를 들어 직접 흐름 여과, 접선 흐름 여과는 본원에 기술된 바이러스 벡터 생산 공정의 한외 여과/정용 여과 단계에 적합하다. 일반적으로, 희석제를 조성물로부터 제거하도록 필터를 통해 희석제를 강제로 통과시킴으로써 여과 공정에 의해 벡터가 농축되지만, 벡터는 필터를 통과할 수 없어서, 농축된 벡터 조성물이 얻어진다. 특정 실시형태에서, 접선 흐름 여과(TFF)는 한외 여과/정용 여과 단계에서 이용된다. TFF 시스템은 3개의 독특한 공정 스트림으로 구성되어 있다: 공급물 용액, 투과액 및 농축액(예를 들어, 바이러스 벡터를 함유하는 농축액). 당업자라면 벡터를 농축하고/하거나 완충액을 교환할 목적으로 TFF 적용에 사용하기 위한 최적의 막 및 장치를 선택하기

위해 유체 특징, 샘플 부피 및 가공 시간과 관련된 인자를 용이하게 고려할 것이다. 예를 들어, 보유되어야 하는 바이러스 벡터의 분자량보다 3배 내지 6배 작은 분자량 컷오프를 갖는 막이 전형적으로 여과 시스템에 사용하기 위해 선택된다. 막은 편평 시트 또는 중공 섬유일 수 있다.

[0106] 바이러스 벡터 포획 단계에 이어서 이식 유전자 단백질 포획 단계가 이루어지는 특정 실시형태에서, 바이러스 벡터 포획 단계로부터의 용출액은 한외 여과/정용 여과(UF/DF)에 의해 농축 및 추가로 여과된다. 이식 유전자 단백질 포획 단계에 이어서 바이러스 벡터 포획 단계가 이루어지는 기타 실시형태에서, 이식 유전자 단백질 포획 단계로부터의 용출액은 UF/DF에 의해 농축 및 추가로 여과된다. 특정 실시형태에서, 용출액은 여기에 UF/DF를 가하기 전에 먼저 희석될 수 있다. 특정 실시형태에서, 제1 정제 단계의 용출액의 희석은 희석 완충액, 예를 들어 20 mM 트리스 또는 20 mM 인산염, 2 mM $MgCl_2$, 30 mM 내지 120 mM $CaCl_2$를 포함하고 6.5 내지 7.5의 pH를 갖는 희석 완충액의 사용을 포함한다. 특정 실시형태에서, 희석 완충액은 희석 이전에 냉각된다(15℃ 미만의 온도를 가짐). 특정 실시형태에서, 희석 후 전도율은 20 mS/cm 내지 40 mS/cm이다.

[0107] 본원에 기술된 다양한 실시형태에서, 본 발명의 이식 유전자 단백질 포획 단계를 실시하기 위해 샘플을 로딩하기 전, 로드 샘플을 적합한 로딩 조건으로 조절될 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, "로드 샘플"이란 용어는 하류 크로마토그래피 매트릭스에 인가되는 샘플을 지칭한다. 예를 들어, 음이온 교환 크로마토그래피 로드 샘플은 하류 음이온 교환 크로마토그래피 매트릭스에 인가되는 샘플을 지칭한다. 다른 예로서, 친화도 크로마토그래피 로드 샘플은 하류 친화도 크로마토그래피 매트릭스에 인가되는 샘플을 지칭한다

[0108] 예시적인 실시형태에서, 도 6a에 나타나 있는 바와 같이, 바이러스 벡터 생산을 위한 하류 가공 단계가 바이러스 벡터 포획 단계 이후에 이식 유전자 단백질 포획 단계를 포함하면, 바이러스 벡터 포획 단계(제1 크로마토그래피 정제 단계)의 용출액(바이러스 벡터 포획 단계의 용출액은 본원에서 이식 유전자 단백질 포획 단계를 위한 로드 샘플로도 지칭됨)은 이식 유전자 단백질 포획 크로마토그래피 매트릭스에 인가되기 전에 적합한 로딩 조건으로 조절된다. 이 같은 실시형태에서, 이식 유전자 단백질 포획 단계를 위한 로드 샘플(즉, 바이러스 벡터 포획 단계의 용출액)은 약 300 mM 내지 약 1,500 mM의 염(예를 들어, NaCl 또는 KCl) 농도를 갖는 용출 완충액을 사용하여 바이러스 벡터 포획 크로마토그래피 매트릭스(예를 들어, 음이온 교환 매질)로부터 결합된 벡터를 용출함으로써 수득된다. 이어서, 이식 유전자 단백질 포획 단계를 위한 로드 샘플은 본원에 기술된 바와 같은 적합한 로딩 조건으로 조절된다.

[0109] 다른 실시형태에서, 도 6b에 나타나 있는 바와 같이, 바이러스 벡터 생산을 위한 하류 가공 단계가 이식 유전자 단백질 포획 단계 이후에 바이러스 벡터 포획 단계를 포함하면, 이식 유전자 단백질 포획 단계를 위한 로드 샘플은 이식 유전자 단백질 포획 크로마토그래피 매트릭스에 인가되기 전에 적합한 로딩 조건으로 조절된다. 이식 유전자 단백질 포획 단계로부터의 통과액(정제된 바이러스 벡터를 함유하는 통과액)을 수집한 후, 통과액 샘플을 후속적인 바이러스 벡터 포획 크로마토그래피 매트릭스에 인가하기에 적합한 로딩 조건으로 조절할 수 있다. 특정 실시형태에서, 이식 유전자 단백질 포획 단계의 통과액 샘플(예를 들어, 바이러스 벡터 포획 단계를 위한 로드 샘플)은 20 mS/cm 미만의 표적 샘플 전도율을 달성하기 위해 표적 염 농도로 조절된다.

[0110] 이와 같이, 특정 실시형태에서 본 개시내용에 기술된 바이러스 벡터 생산을 위한 하류 가공 단계는 바이러스 벡터 및 이식 유전자 단백질 오염물질을 포함하는 조성물의 염의 농도를 표적 염 농도로 조절하는 단계를 포함한다.

[0111] 특정 실시형태에서, 이식 유전자 단백질 포획 단계를 위한 로드 샘플을 조절하는 단계는 염의 농도를 표적 염 농도로 조절하는 단계를 포함한다. 이식 유전자 단백질 포획 단계를 위한 로드 샘플의 조절은 NaCl, KCl, $CaCl_2$ 및 $MgCl_2$를 포함하지만 이에 제한되지 않는 염 및 이온 성분의 농도를 조절하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 이식 유전자 단백질 포획 단계를 위한 로드 샘플을 조절하는 단계는 로드 샘플 내의 염의 농도를 표적 염 농도까지 감소시키기 위해 로드 샘플을 1:0, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10 정도 등으로 희석하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 이식 유전자 단백질 포획 단계를 위한 로드 샘플을 조절하는 단계는 로드 샘플 내의 염의 농도를 표적 염 농도까지 증가시키기 위해 (예를 들어, 저장 염의 볼루스 첨가를 통한) 염의 첨가를 포함한다. 당업자라면 이식 유전자 단백질 포획 크로마토그래피 매트릭스에 인가하기에 적합한 표적 염 농도를 달성하기 위해 요구되는 희석량, 또는 로드 샘플에 첨가될 필요가 있는 염의 양을 용이하게 결정할 수 있을 것이다. 이식 유전자 단백질 포획 단계를 위해 조절된 로드 샘플은 약 200 mM(0.2 M) 내지 약 600 mM(0.6 M)의 표적 염 농도를 가질 수 있다. 예를 들어, 특정 실시형태에서 표적 염 농도는 약 200 mM, 약 250 mM, 약 300 mM, 약 350 mM, 약 400 mM, 약 450 mM, 약 500 mM, 약 550 mM, 약 600 mM이다. 특정 예

시적인 실시형태에서, 표적 염 농도는 약 400 mM이다. 일부 실시형태에서, 이식 유전자 단백질 포획 단계를 위한 로드 샘플 내의 염은 NaCl 또는 KCl이다. 이와 같이, 일부 실시형태에서 이식 유전자 단백질 포획 단계를 위해 조절된 로드 샘플은 약 200 mM NaCl 내지 약 600 mM NaCl의 표적 염 농도를 가질 수 있다. 특정 예시적인 실시형태에서, 이식 유전자 단백질 포획 단계를 위해 조절된 로드 샘플은 약 400 mM의 표적 NaCl 농도를 갖는다. 기타 실시형태에서, 이식 유전자 단백질 포획 단계를 위해 조절된 로드 샘플은 약 200 mM KCl 내지 약 600 mM KCl의 표적 염 농도를 가질 수 있다. 특정 예시적인 실시형태에서, 이식 유전자 단백질 포획 단계를 위해 조절된 로드 샘플은 약 400 mM의 표적 KCl 농도를 갖는다. 임의의 이론과 결부되지 않지만, 본 발명의 이식 유전자 단백질 포획 단계를 위한 로드 샘플의 염 농도의 조절은, 임의의 결합된 오염 이식 유전자 단백질로부터 바이러스 벡터가 분리되는 최적의 염 농도를 제공함으로써 이식 유전자 단백질 포획 단계의 효율을 개선시킬 수 있다.

[0112] 기타 이온 성분 및/또는 부형제를 조절하기 위한 이식 유전자 단백질 포획 단계를 위한 로드 샘플에 대한 첨가 또는 이의 희석은 본 발명의 이식 유전자 단백질 포획 단계에서 오염 이식 유전자 단백질의 최적의 제거를 용이하게 하기 위해 수행될 수 있다.

[0113] 완충액 시스템, 예를 들어 트리스, 인산염, 비스-트리스, 또는 본 발명의 이식 유전자 단백질 포획 단계에 적합한 당해 기술분야에 알려져 있는 기타 완충액 시스템이 사용될 수 있다. 이 같은 완충액 시스템은 부형제, 예를 들어 당(예를 들어, 수크로오스), 폴록사머, 폴리소르베이트, 및 당해 기술분야에 알려져 있는 기타 적합한 부형제를 함유할 수 있다. 특정 실시형태에서, 완충액 시스템은 또한 $MgCl_2$, $CaCl_2$와 같은 하나 이상의 이온 성분, 또는 본 발명의 이식 유전자 단백질 포획 단계에서 이식 유전자 단백질 포획 및 제거 효율을 향상시키기 위해 당해 기술분야에 알려져 있는 기타 성분을 함유한다. 특정 예시적인 실시형태에서, $MgCl_2$ 및 $CaCl_2$와 같은 이온 성분은 0 mM 내지 약 20 mM의 표적 농도로 조절될 수 있다. 특정 예시적인 실시형태에서, 본 발명의 이식 유전자 단백질 포획 단계를 위해 조절된 적합한 로드 샘플은 약 200 mM 내지 약 600 mM NaCl 또는 KCl, 약 0 mM 내지 약 20 mM $MgCl_2$ 또는 $CaCl_2$를 포함할 수 있으며, 부형제, 예를 들어 당(예를 들어, 수크로오스), 폴록사머, 폴리소르베이트, 및/또는 당해 기술분야에 적합한 것으로 알려져 있는 임의의 기타 부형제를 함유할 수 있거나, 함유하지 않을 수 있다.

[0114] 본 발명의 이식 유전자 단백질 포획 단계를 위해 조절된 로드 샘플은 가공 필요에 따라 일시적 보류를 위해 보다 낮은 온도에서 저장될 수 있다. 특정 실시형태에서, 조절된 로드 샘플은 이식 유전자 단백질 포획 크로마토그래피 매트릭스에 직접 인가된다. 본 발명의 이식 유전자 단백질 포획 단계를 실시하기에 적합한 조건(예를 들어, 약 4℃ 내지 약 25℃의 온도)은 당업자에게 알려져 있으며, 이식 유전자 단백질 포획 크로마토그래피 매트릭스의 제조사에 의해 제공될 수 있다. 조절된 샘플은 약 4분 내지 약 12분 범위의 잔류 시간 값에서 이식 유전자 단백질 포획 크로마토그래피 매트릭스(예를 들어, 이식 유전자 단백질 포획 크로마토그래피 칼럼) 내에 로딩되어, 이식 유전자 단백질 포획 크로마토그래피 매트릭스 내에 이식 유전자 단백질 오염물질이 잔류하도록 충분한 경과 시간을 허용한다. 결합하지 않은 바이러스 벡터 입자는 매트릭스를 통해 유동하며, 그 결과 정제된 바이러스 벡터 생성물이 얻어진다. 크로마토그래피 매트릭스(예를 들어, 채워진 칼럼의 빈 공간)으로부터 임의의 잔류 바이러스 벡터 입자를 회수하기 위해, 소량의 평형화 완충액을 크로마토그래피 매트릭스에 적용하고, 목적하는 수준의 바이러스 벡터 입자가 수득될 때까지 통과액을 수집한다.

[0115] 본원에 기술된 바이러스 생산 공정에서의 이러한 단계에서, 바이러스 벡터 조성물(즉, 바이러스 벡터 용출액)을 하나 이상의 약학적 부형제와 조합하여 약학 조성물을 제조하고, 이어서 이 조성물에 필터 살균을 선택적으로 가하여 조성물을 임상용으로 적합하도록 한다. 다양한 필터 살균 공정 및 살균용 필터는 당업자에게 알려져 있다. 따라서, 본원에 기술된 바이러스 벡터 생산 공정은 이식 유전자 단백질 오염물질(예를 들어, 바이러스 벡터 용출액)로부터 분리된 바이러스 벡터를 하나 이상의 약학적 부형제와 조합하여 바이러스 벡터를 포함하는 약학 조성물을 제조하는 단계를 포함한다. 특정 실시형태에서, 이식 유전자 단백질 오염물질(예를 들어, 바이러스 벡터 용출액)로부터 분리된 바이러스 벡터를 하나 이상의 약학적 부형제와 조합하는 단계는 제형 완충액을 이용하여 이식 유전자 단백질 오염물질(예를 들어, 바이러스 벡터 용출액)로부터 분리된 바이러스 벡터를 UF/DF함으로써 달성된다.

[0116] 특정 실시형태에서, 본원에 기술된 바이러스 벡터 생산 공정에 의해 바이러스 벡터를 포함하는 조성물이 얻어지며, 이때 조성물에는 실질적으로 이식 유전자 단백질 오염물질이 없다. 본원에서 사용된 바와 같이, "실질적으로 이식 유전자 단백질 오염물질이 없는"이란 용어는, 본 발명의 이식 유전자 단백질 포획 단계 없이 정제된 참조 바이러스 벡터 조성물(예를 들어, 이식 유전자 단백질 포획 단계가 아닌 바이러스 벡터 포획 단계를 이용하는 통상적인 정제 공정에 따라 정제된 바이러스 벡터 조성물)에 존재하는 이식 유전자 단백질 오염물질을 약

50% 미만의 양으로 포함하는 조성물을 지칭한다. 예를 들어, 조성물이 참조 바이러스 벡터 조성물에 존재하는 이식 유전자 단백질 오염물질을 약 45% 미만, 약 40% 미만, 약 35% 미만, 약 30% 미만, 약 25% 미만, 약 20% 미만, 약 15% 미만, 약 10% 미만 또는 약 5% 미만의 양으로 포함하는 경우에 조성물에는 실질적으로 이식 유전자 단백질 오염물질이 없다. 특정 실시형태에서, 조성물은 참조 바이러스 벡터 조성물에 존재하는 이식 유전자 단백질 오염물질을 20% 미만으로 함유한다.

[0117] 이식 유전자 단백질 오염물질의 양을 검정하는 다양한 방법이 당업자에게 알려져 있으며, 적합하다. 특정 실시형태에서, 특정 활성(예를 들어, 효소 활성)을 갖는 이식 유전자 단백질 오염물질에 있어서, 본 발명의 조성물 내의 이식 유전자 단백질 오염물질의 활성을 검정할 수 있으며, 참조 바이러스 벡터 조성물 내의 이식 유전자 단백질 오염물질의 활성과 비교할 수 있다. 예를 들어, FVIII 이식 유전자 활성(mU/㎖) 수준은 당업자에게 알려져 있는 다양한 발색 검정에 의해 검정될 수 있다. 특정 실시형태에서, 본 발명의 정제된 FVIII 바이러스 벡터 조성물은 50,000 mU/㎖ 미만의 FVIII 활성(예를 들어, 40,000 mU/㎖, 30,000 mU/㎖, 20,000 mU/㎖, 10,000 mU/㎖ 또는 500 mU/㎖ 미만의 FVIII 활성)을 포함한다. 특정 예시적인 실시형태에서, 본 발명의 정제된 FVIII 바이러스 벡터 조성물은 약 1 IU 이하의 총 FVIII 활성을 포함한다.

[0118] 특정 실시형태에서, 이식 유전자 단백질 오염물질의 양은 실제 오염물질 단백질의 존재를 정량화하기 위해 당해 기술분야에 알려져 있는 다양한 기법을 통해 검출될 수 있다. 특정 실시형태에서, 본 발명의 조성물 내의 이식 유전자 단백질 오염물질의 존재를 검정할 수 있고, 참조 바이러스 벡터 조성물 내의 이식 유전자 단백질 오염물질의 존재와 비교할 수 있다. 예를 들어, 이식 유전자 단백질 오염물질의 존재를 검출하기 위해 효소 결합 면역 흡착 검정(ELISA)을 수행할 수 있다. 적합할 수 있는 기타 예로는 분광 분석 방법(예를 들어, 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC), 및 액체 크로마토그래피-질량 분광 분석법(LC/MS) 등) 및 항체 기반 단백질 검출 방법(예를 들어, 단백질 면역 침전, 면역 전기영동 등)을 들 수 있다.

[0119] **B. 바이러스 벡터**

[0120] 본원에서 제공된 방법 및 공정은 임의의 바이러스 벡터의 생산 및 정제에 적합하다. 특정 실시형태에서, 바이러스 벡터는 외피형 바이러스 벡터이다. 당해 기술분야에 알려져 있는 바와 같이, 외피형 바이러스 벡터는 외피형 DNA 바이러스 벡터, 예를 들어 헤르페스바이러스 및 수두 바이러스, 및 외피형 RNA 바이러스 벡터, 예를 들어 알파바이러스 및 파라믹소바이러스를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 외피형 바이러스 벡터는 또한 레트로바이러스, 예를 들어 온코레트로바이러스, 렌티바이러스 및 스푸마바이러스를 포함한다. 특정 실시형태에서, 외피형 바이러스 벡터는 렌티바이러스 벡터이다. 렌티바이러스 벡터는 보다 큰 그룹의 레트로바이러스 벡터의 일부이다(문헌[Coffin *et al.* (1997) "Retroviruses" Cold Spring Harbor Laboratory Press Eds: J M Coffin, S M Hughes, H E Varmus pp 758-763]). 영장류 렌티바이러스의 예로는 인간 면역 결핍 바이러스(HIV) 및 원숭이 면역 결핍 바이러스(SIV)를 들 수 있다. 렌티바이러스 부류는 렌티바이러스가 분열 세포 및 비분열 세포 둘 모두를 감염시키는 능력을 갖고 있다는 점에서 레트로바이러스와는 다르다(문헌[Lewis *et al.* (1992)]; 문헌[Lewis and Emerman (1994)]).

[0121] 본원에서 사용된 바와 같이, "렌티바이러스 벡터"란 용어는 렌티바이러스에서 유래 가능한 적어도 하나의 성분 일부를 포함하는 벡터를 지칭한다. 일부 실시형태에서, 성분 일부는 벡터가 복제되거나, 세포를 감염시키거나, 유전자를 발현하는 생물학적 기작에 관련이 있다. 일부 실시형태에서, 복제에 필수적인 재조합 렌티바이러스 벡터의 하나 이상의 단백질 암호화 영역의 적어도 일부가 바이러스로부터 제거될 수 있다. 따라서, 일부 실시형태에서 재조합 렌티바이러스 벡터는 복제 결함을 갖는다. 바이러스 게놈의 일부가 또한 이식 유전자로 교체될 수 있어서, 벡터는 표적 비분열 숙주 세포를 형질도입하고/하거나 이의 게놈을 숙주 게놈에 통합할 수 있게 한다.

[0122] 특정 실시형태에서, 재조합 외피형 바이러스(예를 들어, 재조합 렌티바이러스)는 재조합 렌티바이러스 벡터의 굴성(tropism)을 변경 또는 개질하기 위해 위형화(pseudotyping)된다. 위형화는 하나 이상의 이점을 부여할 수 있다. 예를 들어, HIV 기반 벡터의 env 유전자 생성물은 이들 벡터를 CD4로 지칭되는 단백질을 발현하는 세포만을 감염시키는 것으로 제한할 수 있다. 일부 실시형태에서, 이들 벡터 내의 env 유전자가 기타 RNA 바이러스에서 유래한 env 서열로 치환되면, 이는 보다 넓은 감염 스펙트럼을 부여할 수 있다(문헌[Verma and Somia (1997)]). 랍도바이러스(rhabdovirus)인 베시쿠랄 스토마티스 바이러스(*Vesicular stomatitis* virus; VSV)의 외피 당단백질(G)은 특정 레트로바이러스를 위형화할 수 있는 것으로 나타나 있는 외피 단백질이다. 위형화된 VSV-G 벡터는 광범위한 포유동물 세포를 형질도입시키기 위해 사용될 수 있다. VSV-G 단백질과 같은 비-렌티바이러스 위형화 외피의 혼입은 벡터 입자가 감염성 손실 없이 높은 역가까지 농축될 수 있다는 이점을 제공한다(문헌[Akkina *et al.* (1996) J. Virol. 70:2581-5])

[0123] 렌티바이러스는 소 렌티바이러스 그룹, 말 렌티바이러스 그룹, 고양이 렌티바이러스 그룹, 양 렌티바이러스 그룹, 염소 렌티바이러스 그룹 및 영장류 렌티바이러스 그룹의 멤버를 포함한다. 유전자 요법을 위한 렌티바이러스 벡터의 개발은 문헌[Klimatcheva *et al.* (1999) Frontiers in Bioscience 4: 481-496]에 검토되어 있다. 유전자 요법에 적합한 렌티바이러스 벡터의 설계 및 용도는, 예를 들어 미국 특허 제6,207,455호 및 제6,615,782호에 기술되어 있다. 렌티바이러스의 예로는 HIV-1, HIV-2, HIV-1/HIV-2 위형, HIV-1/SIV, FIV, 염소 관절염 뇌염 바이러스(CAEV), 말 감염성 빈혈 바이러스 및 소 면역 결핍 바이러스를 들 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.

[0124] 일부 실시형태에서, 렌티바이러스 벡터는 "3세대" 렌티바이러스 벡터이다. 본원에서 사용된 바와 같이, "3세대" 렌티바이러스 벡터란 용어는 2세대 벡터 시스템의 특징을 갖고, 기능성 tat 유전자가 추가로 결여되어 있는 렌티바이러스 패키징 시스템(예를 들어, tat 유전자가 결실 또는 불활성화되어 있는 시스템)을 지칭한다. 전형적으로, rev를 암호화하는 유전자는 별도의 발현 구조체 상에 제공된다. 예를 들어, 문헌[Dull *et al.* (1998) J. Virol. 72: 8463-8471]을 참고한다. 본원에서 사용된 바와 같이, "2세대" 렌티바이러스 벡터 시스템은 기능성 부속 유전자가 결여되어 있는 렌티바이러스 패키징 시스템(예를 들어, 부속 유전자 vif, vpr, vpu 및 nef가 결실 또는 불활성화되어 있는 시스템)을 지칭한다. 예를 들어, 문헌[Zufferey *et al.* (1997) Nat. Biotechnol. 15: 871-875]을 참고한다. 본원에서 사용된 바와 같이, "패키징 시스템"은 재조합 바이러스의 패키징에 관련이 있는 바이러스 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는 한 세트의 바이러스 구조체를 지칭한다. 전형적으로, 패키징 시스템의 구조체는 궁극적으로 패키징 세포 내로 혼입될 것이다.

[0125] 특정 실시형태에서, 렌티바이러스 벡터는 비분열 세포를 감염시킬 수 있는 재조합 렌티바이러스의 벡터이다. 특정 실시형태에서, 렌티바이러스 벡터는 간 세포(예를 들어, 간세포)를 감염시킬 수 있는 재조합 렌티바이러스의 벡터이다. 렌티바이러스 게놈 및 프로바이러스 DNA는 전형적으로 레트로바이러스에서 발견되는 3개의 유전자, 즉 gag, pol 및 env를 가지며, 이들은 2개의 긴 말단 반복(LTR) 서열 측면에 있다. gag 유전자는 내부 구조(매트릭스, 캡시드 및 뉴클레오캡시드) 단백질을 암호화하고; pol 유전자는 RNA-유도 DNA 폴리메라아제(역전사 효소), 프로테아제 및 인테그라아제를 암호화하고; env 유전자는 바이러스 외피 당단백질을 암호화한다. 5' 및 3' LTR은 비리온 RNA의 전사 및 폴리아데닐화를 촉진하는 역할을 한다. LTR은 바이러스 복제에 필요한 모든 기타 시스-작용성 서열을 함유한다. 렌티바이러스는 (HIV-1, HIV-2 및/또는 SIV 내에) vif, vpr, tat, rev, vpu, nef 및 vpx를 포함한 추가적인 유전자를 갖는다. 게놈의 역전사(tRNA 프라이머 결합 부위) 및 입자 내로의 바이러스 RNA의 효율적인 내부화(encapsidation)(Psi 부위)를 위한 서열이 5' LTR에 인접해 있다.

[0126] 일부 실시형태에서, 비분열 세포를 감염시킬 수 있는 재조합 렌티바이러스를 생성하는 방법은 적합한 숙주 세포를 rev 및 tat뿐만 아니라 패키징 기능, 즉 gag, pol 및 env를 보유하는 2개 이상의 벡터로 형질감염시키는 단계를 포함한다. 따라서, 예를 들어 제1 벡터는 바이러스 gag 및 바이러스 pol을 암호화하는 핵산을 제공할 수 있고, 다른 벡터는 바이러스 env를 암호화하는 핵산을 제공하여 패키징 세포를 생성할 수 있다. 본원에서 전달 벡터로서 확인된 이종성 유전자를 이러한 패키징 세포 내로 제공하는 벡터를 도입하면 관심 외래 유전자를 보유하는 감염성 바이러스 입자를 방출하는 생산자 세포가 수득된다.

[0127] 벡터 및 외래 유전자의 상술한 구성에 따르면, 제2 벡터는 바이러스 외피(env) 유전자를 암호화하는 핵산을 제공할 수 있다. env 유전자는 레트로바이러스를 포함하는 거의 모든 적합한 바이러스로부터 유래할 수 있다. 일부 실시형태에서, env 단백질은 인간 및 기타 종의 세포의 형질도입을 허용하는 양치환성(amphotropic) 외피 단백질이다.

[0128] 레트로바이러스-유래 env 유전자의 예로는 몰로니(Moloney) 쥐 백혈병 바이러스(MoMuLV 또는 MMLV), 하베이(Harvey) 쥐 육종 바이러스(HaMuSV 또는 HSV), 쥐 유방 종양 바이러스(MuMTV 또는 MMTV), 긴팔원숭이 백혈병 바이러스(GaLV 또는 GALV), 인간 면역 결핍 바이러스(HIV) 및 라우스 육종 바이러스(RSV)를 들 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 간염 바이러스 및 인플루엔자의 단백질인 베시쿠랄 스토마티스 바이러스(VSV) 단백질 G(VSV-G)와 같은 기타 env 유전자가 또한 사용될 수 있다.

[0129] 특정 실시형태에서, 본 개시내용의 렌티바이러스 벡터는 gag 단백질, Rev-반응 요소, 중심 폴리푸린관(cPPT) 또는 이의 임의의 조합을 암호화하는 하나 이상의 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0130] 일부 실시형태에서, 렌티바이러스 벡터는 렌티바이러스 벡터 또는 암호화된 FVIII 폴리펩타이드의 표적화 및/또는 활성을 개선시키는 이의 표면 하나 이상의 폴리펩타이드 상에서 발현한다. 하나 이상의 폴리펩타이드는 렌티바이러스 벡터에 의해 암호화될 수 있거나, 숙주 세포로부터 렌티바이러스 벡터의 발아(budding) 동안에 혼입될 수 있다. 렌티바이러스 생산 동안, 바이러스 입자는 생산 숙주 세포로부터 발아한다. 발아 과정 동안, 바이러스

입자는 숙주 세포의 지질막에서 유래하는 지질 피막을 차지한다. 그 결과, 바이러스 입자의 지질 피막은 이전에는 숙주 세포의 표면 상에 존재한 막 결합형 폴리펩타이드를 포함할 수 있다.

[0131] 일부 실시형태에서, 렌티바이러스 벡터는 인간 개체에 대한 투여 이후 렌티바이러스 벡터에 대한 면역 반응을 저해하는 하나 이상의 폴리펩타이드를 이의 표면 상에 발현한다. 일부 실시형태에서, 렌티바이러스 벡터의 표면은 하나 이상의 CD47 분자를 포함한다. CD47은 인간 세포 상에 편재하여 발현되는 "자신의 마커" 단백질이다. CD47의 표면 발현은 CD47과 대식세포-발현 SIRPα의 상호작용을 통해 내생성 세포의 대식세포-유도 식세포작용을 저해한다. 높은 수준의 CD47을 발현하는 세포는 생체 내에서 인간 대식세포에 의해 표적화되고 파괴될 가능성이 낮다.

[0132] 일부 실시형태에서, 렌티바이러스 벡터는 이의 표면 상에 고농도의 CD47 폴리펩타이드 분자를 포함한다. 일부 실시형태에서, 렌티바이러스 벡터는 CD47의 높은 발현 수준을 갖는 세포주에서 생성된다. 특정 실시형태에서, 렌티바이러스 벡터는 $CD47^{고발현}$ 세포에서 생성되며, 이때 세포는 세포막 상에서의 CD47의 발현이 높다. 특정한 실시형태에서, 렌티바이러스 벡터는 $CD47^{고발현}$ HEK 293T 세포에서 생성되며, 이때 HEK 293T는 세포막 상에서의 CD47의 발현이 높다. 일부 실시형태에서, HEK 293T 세포는 변형되지 않은 HEK 293T 세포에 대비하여 증가된 CD47 발현을 갖도록 변형된다. 특정 실시형태에서, CD47은 인간 CD47이다.

[0133] 일부 실시형태에서, 렌티바이러스 벡터는 주요 조직 적합성 복합체 I형(MHC-I)의 표현 발현이 거의 없다. 표면 발현된 MHC-I는 세포 내로부터의 "비자아" 단백질의 펩타이드 단편, 예를 들어 감염을 나타내는 단백질 단편을 디스플레이하여, 세포에 대한 면역 반응을 용이하게 한다. 일부 실시형태에서, 렌티바이러스 벡터는 $MHC\text{-}I^{저발현}$ 세포에서 생성되며, 이때 세포는 세포막 상에서의 MHC-I 발현이 감소된다. 일부 실시형태에서, 렌티바이러스 벡터는 $MHC\text{-}I^{-}$(또는 "$MHC\text{-}I^{부재}$", "$MHC\text{-}1^{음성}$" 또는 "MHC-음성") 세포에서 생성되며, 이때 세포에는 MHC-I 발현이 결여되어 있다.

[0134] 특정한 실시형태에서, 렌티바이러스 벡터는 고농도의 CD47 폴리펩타이드를 포함하고 MHC-I 폴리펩타이드가 결여되어 있는 지질 피막을 포함한다. 특정 실시형태에서, 렌티바이러스 벡터는 $CD47^{고발현}$/$MHC\text{-}I^{저발현}$ 세포주, 예를 들어 $CD47^{고발현}$/$MHC\text{-}I^{저발현}$ HEK 293T 세포주에서 생성된다. 일부 실시형태에서, 렌티바이러스 벡터는 $CD47^{고발현}$/$MHC\text{-}I^{부재}$ 세포주, 예를 들어 $CD47^{고발현}$/$MHC\text{-}I^{부재}$ HEK 293T 세포주에서 생성된다.

[0135] 렌티바이러스 벡터의 예는 미국 특허 제9,050,269호 및 국제 공개공보 제WO09931251호, 제WO09712622호, 제WO09817815호, 제WO09817816호 및 제WO09818934호에 기재되어 있으며, 이는 본원에서 그 전체가 참고로 포함된다.

[0136] 발현 제어 요소

[0137] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 핵산 분자 또는 벡터는 적어도 하나의 발현 제어 서열을 추가로 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같은 발현 제어 서열은 이것이 작동 가능하게 연결된 암호화 핵산의 효율적인 전사 및 번역을 용이하게 하는 임의의 조절 뉴클레오타이드 서열, 예를 들어 프로모터 서열 또는 프로모터-인핸서 조합이다. 예를 들어, 본 개시내용의 단리된 핵산 분자는 적어도 하나의 전사 제어 서열에 작동 가능하게 연결될 수 있다.

[0138] 유전자 발현 제어 서열은, 예를 들어 구성성 또는 유도성 프로모터와 같은 포유동물 또는 바이러스 프로모터일 수 있다. 구성성 포유동물 프로모터는 하기 유전자, 즉 히포크산틴 포스포리보실 트랜스퍼라아제(HPRT), 아데노신 데아미나아제, 피루브산 키나아제를 위한 프로모터, 베타-액틴 프로모터 및 기타 구성성 프로모터를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 진핵 세포에서 구성적으로 기능을 하는 예시적인 바이러스 프로모터는, 예를 들어 사이토메갈로바이러스(CMV), 원숭이 바이러스(예를 들어, SV40), 유두종 바이러스, 아데노바이러스, 인간 면역결핍 바이러스(HIV), 라우스 육종 바이러스, 사이토메갈로바이러스, 몰로니 백혈병 바이러스의 긴 말단 반복부(LTR) 및 기타 레트로바이러스에서 유래한 프로모터, 및 단순 헤르페스 바이러스의 티미딘 키나아제 프로모터를 포함한다.

[0139] 기타 구성성 프로모터는 당업자에게 알려져 있다. 본 개시내용의 유전자 발현 서열로서 유용한 프로모터는 또한 유도성 프로모터를 포함한다. 유도성 프로모터는 유도제의 존재 하에 발현된다. 예를 들어, 메탈로티오네인 프로모터는 특정 금속 이온의 존재 하에 전사 및 번역을 촉진하도록 유도된다. 기타 유도성 프로모터는 당업자에게 알려져 있다.

[0140] 하나의 실시형태에서, 본 개시내용은 조직-특이적 프로모터 및/또는 인핸서의 제어 하의 이식 유전자의 발현을 포함한다. 다른 실시형태에서, 프로모터 또는 기타 발현 제어 서열은 선택적으로 간 세포의 이식 유전자의 발현을 향상시킨다. 간-특이적 프로모터의 예로는 마우스 티레틴(thyretin) 프로모터(mTTR), 내생성 인간 인자 VIII(F8) 프로모터, 내생성 인간 인자 IX(F9) 프로모터, 인간 알파-1-항트립신 프로모터(hAAT), 인간 알부민 최소 프로모터 및 마우스 알부민 프로모터를 들 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 특정한 실시형태에서, 프로모터는 mTTR 프로모터를 포함한다. mTTR 프로모터는 문헌[R. H. Costa *et al.*, 1986, Mol. Cell. Biol. 6: 4697]에 기술되어 있다. F8 프로모터는 문헌[Figueiredo and Brownlee, 1995, J. Biol. Chem. 270: 11828-11838]에 기술되어 있다. 특정 실시형태에서, 프로모터는 전문이 본원에서 참고로 포함된 미국 특허 공개공보 제US2019/0048362호에 기술된 바와 같은 mTTR 프로모터(예를 들어, mTTR202 프로모터, mTTR202opt 프로모터, mTTR482 프로모터) 중 임의의 것을 포함한다.

[0141] 발현 수준은 하나 이상의 인핸서를 사용하여 치료적 약효를 달성하기 위해 추가로 향상될 수 있다. 하나 이상의 인핸서는 단독으로 제공될 수 있거나, 하나 이상의 프로모터 요소와 함께 제공될 수 있다. 전형적으로, 발현 제어 서열은 복수의 인핸서 요소 및 조직-특이적 프로모터를 포함한다. 하나의 실시형태에서, 인핸서는 하나 이상의 복제수의 α-1-마이크로글로불린/비쿠닌(bikunin) 인핸서를 포함한다(문헌[Rouet *et al.*, 1992, *J. Biol. Chem.* 267: 20765-20773]; 문헌[Rouet *et al.*, 1995, *Nucleic Acids Res.* 23: 395-404]; 문헌[Rouet *et al.*, 1998, *Biochem. J.* 334: 577-584]; 문헌[Ill *et al.*, 1997, *Blood Coagulation Fibrinolysis* 8: S23-S30]). 다른 실시형태에서, 인핸서는 Enh1(HNF1, (센스)-HNF3, (센스)-HNF4, (안티센스)-HNF1, (안티센스)-HNF6, (센스)-EBP, (안티센스)-HNF4(안티센스)를 포함함)와 함께 간-특이적 전사 인자 결합 부위, 예를 들어 EBP, DBP, HNF1, HNF3, HNF4, HNF6에서 유래한다.

[0142] 특정한 실시예에서, 본 개시내용에 유용한 프로모터는 ET 프로모터로서, 유전자은행 제AY661265호로도 알려져 있다. 또한, 문헌[Vigna *et al.*, *Molecular Therapy 11(5)*: 763 (2005)]을 참고한다. 기타 적합한 벡터 및 유전자 조절 요소의 예는 전문이 본원에서 참고로 포함된 WO 02/092134, EP1395293 또는 미국 특허 제6,808,905호, 제7,745,179호 또는 제7,179,903호에 기술되어 있다.

[0143] 일반적으로, 발현 제어 서열은 필요한 경우 전사 및 번역의 개시와 각각 관련이 있는 5' 비-전사 및 5' 비-번역 서열, 예를 들어 TATA 박스, 캐핑 서열, CAAT 서열 등을 포함해야 한다. 특히, 이 같은 5' 비-전사 서열은 작동 가능하게 결합된 암호화 핵산의 전사 제어를 위한 프로모터 서열을 포함하는 프로모터 영역을 포함할 것이다. 유전자 발현 서열은 필요한 경우 인핸서 서열 또는 상류 활성자 서열을 선택적으로 포함한다.

[0144] 특정 실시형태에서, 예를 들어 렌티바이러스 벡터 내의 이식 유전자에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 miRNA 표적 서열을 렌티바이러스 벡터 내에 포함시키는 것이 유용할 것이다. 렌티바이러스 벡터에 포함된 1개 초과 복제수의 miRNA 표적 서열은 시스템의 효과를 증가시킬 수 있다.

[0145] 상이한 miRNA 표적 서열이 또한 포함된다. 예를 들어, 1개 초과의 이식 유전자를 발현하는 렌티바이러스 벡터는 이식 유전자를 동일하거나 상이한 1개 초과의 miRNA 표적 서열의 제어 하에 둘 수 있다. miRNA 표적 서열은 나란히 존재할 수 있지만, 기타 배열이 또한 포함된다. miRNA 표적 서열을 함유하는 이식 유전자 발현 카세트는 또한 안티센스 배향으로 렌티바이러스 벡터 내에 삽입될 수 있다. 안티센스 배향은 달리 생산자 세포에 독이 될 수 있는 유전자 생성물의 발현을 피하기 위한 바이러스 입자의 생산에 유용할 수 있다.

[0146] 기타 실시형태에서, 렌티바이러스 벡터는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개 또는 8개 복제수의 동일하거나 상이한 miRNA 표적 서열을 포함한다. 특정 실시형태에서, 렌티바이러스 벡터는 임의의 miRNA 표적 서열을 포함하지 않는다. miRNA 표적 서열(그리고, 얼마나 많이)을 포함하는지에 대한 선택은 의도된 조직 표적, 요구되는 발현 수준 등과 같은 알려진 파라미터에 의해 유도될 것이다.

[0147] 하나의 실시형태에서, 표적 서열은 골수 수임 전구세포(myeloid committed progenitor)에서 가장 효율적으로 발현을 차단하고 보다 원시적인 HSPC에서 적어도 부분적으로 발현을 차단하는 것으로 보고된 바 있는 miR-223 표적이다. miR-223 표적은 과립구, 단핵구, 대식세포, 골수 수지상 세포를 비롯한 분화된 골수 세포에서의 발현을 차단할 수 있다. miR-223 표적은 또한 림프 또는 적혈구 계통에서의 강력한 이식 유전자 발현에 따라 유전자 요법의 적용에 적합할 수 있다. miR-223 표적은 또한 인간 HSC에서 매우 효율적으로 발현을 차단할 수 있다.

[0148] 다른 실시형태에서, 표적 서열은 miR-142 표적(tccataaagtaggaaacactaca(서열 번호 7))이다. 하나의 실시형태에서, 렌티바이러스 벡터는 4개 복제수의 miR-142 표적 서열을 포함한다. 특정 실시형태에서, miR-142(142T)와 같은 조혈-특이적 microRNA의 상보적인 서열은 렌티바이러스 벡터의 3' 비번역 영역 내로 혼입되어, 이식 유전

자-암호화 전사체를 miRNA-매개 하향 조절에 민감하게 만든다. 이러한 방법에 의해, 이식 유전자 발현은 조혈 계통의 항원 제시 세포(APC)에서 방지될 수 있지만, 비-조혈 세포에서는 유지될 수 있다(문헌[Brown *et al.*, Nat Med 2006]). 이러한 전략은 이식 유전자 발현에 대해 엄격한 전사 후 제어를 할 수 있으며, 따라서 이식 유전자의 안정한 전달 및 장기간 발현을 가능케 한다. 일부 실시형태에서, miR-142 조절은 형질도입된 세포의 면역-매개 소거(clearance)를 방지하고/하거나, 항원-특이적 조절 T 세포(T reg)를 유도하고 이식 유전자-암호화된 항원에 대한 강력한 면역 내성을 매개한다.

[0149] 일부 실시형태에서, 표적 서열은 miR181 표적이다. 문헌[Chen C-Z and Lodish H, Seminars in Immunology (2005) 17(2): 155-165]에는 마우스 골수 내의 B 세포에서 특이적으로 발현되는 miRNA(문헌[Chen and Lodish, 2005])인 miR-181이 개시되어 있다. 또한, 여기에는 일부 인간 miRNA가 백혈병과 관계가 있다는 것이 개시되어 있다.

[0150] 표적 서열은 miRNA에 완전히 또는 부분적으로 상보적일 수 있다. "완전히 상보적인"이란 용어는 표적 서열이 이를 인식하는 miRNA의 서열에 대해 100% 상보적인 핵산 서열을 갖는다는 것을 의미한다. "부분적으로 상보적인"이란 용어는 표적 서열이 이를 인식하는 miRNA의 서열에 대해 부분적으로만 상보적이어서, 부분적으로 상보적인 서열이 miRNA에 의해 여전히 인식된다는 것을 의미한다. 즉, 본 개시내용의 문맥에서 부분적으로 상보적인 표적 서열은 상응하는 miRNA를 인식하고 이 miRNA를 발현하는 세포에서 이식 유전자 발현의 방지 또는 감소에 영향을 미치는 데 효과적이다. miRNA 표적 서열의 예는 전문이 본원에서 참고로 포함된 WO2007/000668, WO2004/094642, WO2010/055413 또는 WO2010/125471에 기술되어 있다.

[0151] 일부 실시형태에서, 적합한 3세대 렌티바이러스 벡터는 자기-불활성화 렌티바이러스 벡터이다. 일부 실시형태에서, 렌티바이러스 벡터는 VSV.G 위형 렌티바이러스 벡터이다. 일부 실시형태에서, 렌티바이러스 벡터는 이식 유전자 발현을 위한 간세포-특이적 프로모터를 포함한다. 일부 실시형태에서, 간세포-특이적 프로모터는 향상된 트랜스티레틴 프로모터이다. 일부 실시형태에서, 렌티바이러스 벡터는 이식 유전자 생성물에 대한 면역 반응을 감소시키기 위해 miR-142에 대한 하나 이상의 표적 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, miR-142에 대한 하나 이상의 표적 서열을 본 개시내용의 렌티바이러스 벡터 내에 혼입하면 목적하는 이식 유전자 발현 프로파일이 얻어진다. 예를 들어, miR-142에 대한 하나 이상의 표적 서열의 혼입은 혈관 내 및 혈관 외 조혈 계통에서의 이식 유전자 발현을 억제할 수 있는 반면, 비-조혈 세포에서는 이식 유전자 발현이 유지된다.

[0152] **C. 바이러스 벡터 이식 유전자**

[0153] 본원에 기술된 방법에 적합한 바이러스 벡터는 질환 또는 질병을 앓고 있는 개체에서 이를 치료하기 위한 이식 유전자 단백질, 예를 들어, 치료용 단백질을 암호화하는 이식 유전자 발현 카세트를 포함한다. 바이러스 벡터를 생체 내에서 개체에게 투여하는 경우, 바이러스 벡터는 이식 유전자의 단백질 생성물이 필요한 경우에 개체에서 발현되도록 개체의 세포에 이식 유전자 발현 카세트를 형질도입한다. 그러나, 이식 유전자가 바이러스 벡터 생산 공정 동안에 생체 외에서 발현되면 이식 유전자 단백질은 바이러스와 공-정제할 수 있는 오염물질로 간주된다. 따라서, 본 발명의 방법은 이식 유전자 단백질 오염물질을 제거하기 위해 사용될 수 있다.

[0154] 이식 유전자 단백질 오염물질은 임의의 관심 이식 유전자에 상응할 수 있다. 특정 실시형태에서, 이식 유전자는 응고 인자, 성장 인자, 항체 또는 대사 효소로부터 선택되는 단백질을 암호화할 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, "응고 인자"란 용어는 개체에서 출혈 에피소드를 예방하거나 이의 기간을 감소시키는, 자연적으로 발생하거나 재조합적으로 생성된 분자 또는 이의 유사체를 지칭한다. 즉, 이는 전-응고 활성을 갖는 분자를 의미하며, 즉 이들 분자는 불용성 피브린의 메시로의 피브리노겐의 전환에 관여하여 혈액이 응집 또는 응고하도록 한다. 본원에서 사용된 바와 같이, "응고 인자"는 활성화된 응고 인자, 이의 효소원 또는 활성화 가능한 응고 인자를 포함한다. "활성화 가능한 응고 인자"는 활성 형태로 전환될 수 있는 불활성 형태(예를 들어, 이의 효소원 형태)의 응고 인자이다. "응고 인자"란 용어는 인자 I(FI), 인자 II(FII), 인자 V(FV), FVII, FVIII, FIX, 인자 X(FX), 인자 XI(FXI), 인자 XII(FXII), 인자 XIII(FXIII), 폰빌레브란트 인자(Von Willebrand factor; VWF), 프리칼리크레인(prekallikrein), 고분자량 키니노겐, 피브로넥틴, 항트롬빈 III, 헤파린 보조인자 II, 단백질 C, 단백질 S, 단백질 Z, 단백질 Z-관련 프로테아제 저해제(ZPI), 플라스미노겐, 알파 2-항플라스민, 조직 플라스미노겐 활성자(tPA), 우로키나제, 플라스미노겐 활성자 저해제-1(PAI-1), 플라스미노겐 활성자 저해제-2(PAI2), 이의 효소원, 이의 활성화 형태 또는 이의 임의의 조합을 들 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 특정 실시형태에서, 응고 인자는 FVIII 또는 이의 변이체 또는 단편을 포함한다. 기타 실시형태에서, 응고 인자는 VIIIXTEN 또는 이의 변이체 또는 단편을 포함한다. 특정 실시형태에서, 응고 인자는 FIX 또는 이의 변이체 또는 단편을 포함한다.

[0155] 일부 실시형태에서, 이식 유전자는 이종성 아미노산 서열을 암호화한다. 이종성 아미노산 서열은 FVIII 아미노산 서열 또는 FIX 아미노산 서열의 N-말단 또는 C-말단에 연결될 수 있거나, FVIII 아미노산 서열 또는 FIX 아미노산 서열 내의 2개의 아미노산 사이에 삽입될 수 있다. 일부 실시형태에서, 이종성 아미노산 서열은 전문이 본원에서 참고로 포함된 국제 공개공보 제WO 2013/123457 A1호 및 제WO 2015/106052 A1호 또는 미국 공개공보 제2015/0158929 A1호에 개시된 임의의 부위에서 FVIII 폴리펩타이드 내에 삽입될 수 있다.

[0156] 일부 실시형태에서, 이종성 아미노산 서열은 FVIII 또는 이의 단편의 B 도메인 내에 삽입된다. 일부 실시형태에서, 이종성 아미노산 서열은 성숙한 인간 FVIII(서열 번호 4)의 745번 아미노산에 상응하는 아미노산의 바로 하류에 있는 FVIII 내에 삽입된다. 하나의 특정한 실시형태에서, FVIII은 성숙한 인간 FVIII에 상응하는 746번 내지 1,646번 아미노산의 결실을 포함하고, 이종성 아미노산 서열은 성숙한 인간 FVIII에 상응하는 745번 아미노산 바로 하류에 삽입된다.

[0157] 일부 실시형태에서, 이종성 모이어티는 하나 이상의 XTEN 서열, 이의 단편, 변이체 또는 유도체를 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같이, "XTEN 서열"은, 주로 작은 친수성 아미노산으로 구성된, 비-자연적으로 발생하고 실질적으로 비-반복적인 서열을 갖는 연장된 길이의 폴리펩타이드를 지칭하며, 이때 서열은 생리적 조건 하에서는 낮은 정도의 구조를 갖거나, 2차 또는 3차 구조를 갖지 않는다. 이종성 모이어티로서, XTEN은 반감기 연장 모이어티로서 작용할 수 있다. 또한, XTEN은 향상된 약동학적 파라미터 및 용해성 특징을 포함하지만 이에 제한되지 않는 바람직한 특성을 제공할 수 있다.

[0158] 일부 실시형태에서, 본 개시내용에 유용한 XTEN 서열은 약 20개, 30개, 40개, 50개, 60개, 70개, 80개, 90개, 100개, 150개, 200개, 250개, 300개, 350개, 400개, 450개, 500개, 550개, 600개, 650개, 700개, 750개, 800개, 850개, 900개, 950개, 1,000개, 1,200개, 1,400개, 1,600개, 1,800개 또는 2,000개 초과의 아미노산 잔기를 갖는 펩타이드 또는 폴리펩타이드이다. 특정 실시형태에서, XTEN은 약 20개 초과 내지 약 3,000개의 아미노산 잔기, 30개 초과 내지 약 2,500개의 잔기, 40개 초과 내지 약 2,000개의 잔기, 50개 초과 내지 약 1,500개의 잔기, 60개 초과 내지 약 1,000개의 잔기, 70개 초과 내지 약 900개의 잔기, 80개 초과 내지 약 800개의 잔기, 90개 초과 내지 약 700개의 잔기, 100개 초과 내지 약 600개의 잔기, 110개 초과 내지 약 500개의 잔기, 또는 120개 초과 내지 약 400개의 잔기를 갖는 펩타이드 또는 폴리펩타이드이다. 하나의 특정한 실시형태에서, XTEN은 42개보다 긴 아미노산 길이 및 144개보다 짧은 아미노산 길이를 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0159] 본 개시내용의 XTEN 서열은 5개 내지 14개(예를 들어, 9개 내지 14개)의 아미노산 잔기의 하나 이상의 서열 모티프를 포함할 수 있거나, 이 서열 모티프와 적어도 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있으며, 이때 모티프는 글리신(G), 알라닌(A), 세린(S), 트레오닌(T), 글루타메이트(E) 및 프롤린(P)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 4개 내지 6개 유형의 아미노산(예를 들어, 5개의 아미노산)을 포함하거나, 이들로 이루어지거나 본질적으로 이들로 이루어져 있다. 본 개시내용의 키메라 단백질 내의 이종성 모이어티로서 사용될 수 있는 XTEN 서열의 예는, 예를 들어 이의 전문이 본원에서 참고로 포함된 미국 특허 공개공보 제2010/0239554 A1호, 제2010/0323956 A1호, 제2011/0046060 A1호, 제2011/0046061 A1호, 제2011/0077199 A1호 또는 제2011/0172146 A1호, 또는 국제 특허 공개공보 제WO 2010/091122 A1호, 제WO 2010/144502 A2호, 제WO 2010/144508 A1호, 제WO 2011/028228 A1호, 제WO 2011/028229 A1호 또는 제WO 2011/028344 A2호에 기재되어 있다.

[0160] 특정 실시형태에서, 이식 유전자는 표 1에 나타나 있는 바와 같은 FVIII 암호화 서열을 포함한다. 특정 실시형태에서, 이식 유전자에 의해 암호화된 이식 유전자 단백질은 표 1에 나타나 있는 바와 같은 아미노산 서열을 포함한다.

표 1

서열

서 열 번호	설명	서열
1	FVIII 암호화 서열(코돈 최적화되지 않음)	ATGCAGATTGAGCTGTCCACTTGTTTCTTCCTGTGCCTCCTGCGCTTCTGTTTCTCCGCCACTCGCCG GTACTACCTTGGAGCCGTGGAGCTTTCATGGGACTACATGCAGAGCGACCTGGGCGAACTCCCCGTGG ATGCCAGATTCCCCCCCCGCGTGCCAAAGTCCTTCCCCTTTAACACCTCCGTGGTGTACAAGAAAACC CTCTTTGTCGAGTTCACTGACCACCTGTTCAACATCGCCAAGCCGCGCCCACCTTGGATGGGCCTCCT GGGACCGACCATTCAAGCTGAAGTGTACGACACCGTGGTGATCACCCTGAAGAACATGGCGTCCCACC CCGTGTCCCTGCATGCGGTCGGAGTGTCCTACTGGAAGGCCTCCGAAGGAGCTGAGTACGACGACCAG ACTAGCCAGCGGGAAAAGGAGGACGATAAAGTGTTCCCGGGCGGCTCGCATACTTACGTGTGGCAAGT CCTGAAGGAAAACGGACCTATGGCATCCGATCCTCTGTGCCTGACTTACTCCTACCTTTCCCATGTGG ACCTCGTGAAGGACCTGAACAGCGGGCTGATTGGTGCACTTCTCGTGTGCCGCGAAGGTTCGCTCGCT AAGGAAAAGACCCAGACCCTCCATAAGTTCATCCTTTTGTTCGCTGTGTTCGATGAAGGAAAGTCATG GCATTCCGAAACTAAGAACTCGCTGATGCAGGACCGGGATGCCGCCTCAGCCCGCGCCTGGCCTAAAA TGCATACAGTCAACGGATACGTGAATCGGTCACTGCCCGGGCTCATCGGTTGTCACAGAAAGTCCGTG TACTGGCACGTCATCGGCATGGGCACTACGCCTGAAGTGCACTCCATCTTCCTGGAAGGGCACACCTT CCTCGTGCGCAACCACCGCCAGGCCTCTCTGGAAATCTCCCCGATTACCTTTCTGACCGCCCAGACTC TGCTCATGGACCTGGGGCAGTTCCTTCTCTTCTGCCACATCTCCAGCCATCAGCACGACGGAATGGAG GCCTACGTGAAGGTGGACTCATGCCCGGAAGAACCTCAGTTGCGGATGAAGAACAACGAGGAGGCCGA GGACTATGACGACGATTTGACTGACTCCGAGATGGACGTCGTGCCGGTTCGATGACGACAACAGCCCCA GCTTCATCCAGATTCGCAGCGTGGCCAAGAAGCACCCCAAAACCTGGGTGCACTACATCGCGGCCGAG GAAGAAGATTGGGACTACGCCCCGTTGGTGCTGGCACCCGATGACCGGTCGTACAAGTCCCAGTATCT GAACAATGGTCCGCAGCGGATTGGCAGAAAGTACAAGAAAGTGCGGTTCATGGCGTACACTGACGAAA CGTTTAAGACCCGGGAGGCCATTCAACATGAGAGCGGCATTCTGGGACCACTGCTGTACGGAGAGGTC GGCGATACCCTGCTCATCATCTTCAAAAACCAGGCCTCCCGGCCTTACAACATCTACCCTCACGGAAT CACCGACGTGCGGCCACTCTACTCGCGGCGCCTGCCGAAGGGCGTCAAGCACCTGAAAGACTTCCCTA TCCTGCCGGGCGAAATCTTCAAGTATAAGTGGACCGTCACCGTGGAGGACGGGCCCACCAAGAGCGAT CCTAGGTGTCTGACTCGGTACTACTCCAGCTTCGTGAACATGGAACGGGACCTGGCATCGGGACTCAT TGGACCGCTGCTGATCTGCTACAAAGAGTCGGTGGATCAACGCGGCAACCAGATCATGTCCGACAAGC GCAACGTGATCCTGTTCTCCGTGTTTGATGAAAACAGATCCTGGTACCTCACTGAAAACATCCAGAGG TTCCTCCCAAACCCCGCAGGAGTGCAACTGGAGGACCCTGAGTTTCAGGCCTCGAATATCATGCACTC GATTAACGGTTACGTGTTCGACTCGCTGCAGCTGAGCGTGTGCCTCCATGAAGTCGCTTACTGGTACA TTCTGTCCATCGGCGCCCAGACTGACTTCCTGAGCGTGTTCTTTTCCGGTTACACCTTTAAGCACAAG ATGGTGTACGAAGATACCCTGACCCTGTTCCCTTTCTCCGGCGAAACGGTGTTCATGTCGATGGAGAA CCCGGGTCTGTGGATTCTGGGATGCCACAACAGCGACTTTCGGAACCGCGGAATGACTGCCCTGCTGA AGGTGTCCTCATGCGACAAGAACACCGGAGACTACTACGAGGACTCCTACGAGGATATCTCAGCCTAC CTCCTGTCCAAGAACAACGCGATCGAGCCGCGCAGCTTCAGCCAGAACCCGCCTGTGCTGAAGAGGCA CCAGCGAGAAATTACCCGGACCACCCTCCAATCGGATCAGGAGGAAATCGACTACGACGACACCATCT CGGTGGAAATGAAGAAGGAAGATTTCGATATCTACGACGAGGACGAAAATCAGTCCCCTCGCTCATTC CAAAAGAAAACTAGACACTACTTTATCGCCGCGGTGGAAAGACTGTGGGACTATGGAATGTCATCCAG CCCTCACGTCCTTCGGAACCGGGCCCAGAGCGGATCGGTGCCTCAGTTCAAGAAAGTGGTGTTCCAGG AGTTCACCGACGGCAGCTTCACCCAGCCGCTGTACCGGGGAGAACTGAACGAACACCTGGGCCTGCTC GGTCCCTACATCCGCGCGGAAGTGGAGGATAACATCATGGTGACCTTCCGTAACCAAGCATCCAGACC TTACTCCTTCTATTCCTCCCTGATCTCATACGAGGAGGACCAGCGCCAAGGCGCCGAGCCCCGCAAGA ACTTCGTCAAGCCCAACGAGACTAAGACCTACTTCTGGAAGGTCCAACACCATATGGCCCCGACCAAG GATGAGTTTGACTGCAAGGCCTGGGCCTACTTCTCCGACGTGGACCTTGAGAAGGATGTCCATTCCGG CCTGATCGGGCCGCTGCTCGTGTGTCACACCAACACCCTGAACCCAGCGCATGGACGCCAGGTCACCG TCCAGGAGTTTGCTCTGTTCTTCACCATTTTTGACGAAACTAAGTCCTGGTACTTCACCGAGAATATG GAGCGAAACTGTAGAGCGCCCTGCAATATCCAGATGGAAGATCCGACTTTCAAGGAGAACTATAGATT CCACGCCATCAACGGGTACATCATGGATACTCTGCCGGGGCTGGTCATGGCCCAGGATCAGAGGATTC

[0161]

[0162]

서열 번호	설명	서열
		GGTGGTACTTGCTGTCAATGGGATCGAACGAAAACATTCACTCCATTCACTTCTCCGGTCACGTGTTC ACTGTGCGCAAGAAGGAGGAGTACAAGATGGCGCTGTACAATCTGTACCCCGGGGTGTTCGAAACTGT GGAGATGCTGCCGTCCAAGGCCGGCATCTGGAGAGTGGAGTGCCTGATCGGAGAGCACCTCCACGCGG GGATGTCCACCCTCTTCCTGGTGTACTCGAATAAGTGCCAGACCCCGCTGGGCATGGCCTCGGGCCAC ATCAGAGACTTCCAGATCACAGCAAGCGGACAATACGGCCAATGGGCGCCGAAGCTGGCCCGCTTGCA CTACTCCGGATCGATCAACGCATGGTCCACCAAGGAACCGTTCTCGTGGATTAAGGTGGACCTCCTGG CCCCTATGATTATCCACGGAATTAAGACCCAGGGCGCCAGGCAGAAGTTCTCCTCCCTGTACATCTCG CAATTCATCATCATGTACAGCCTGGACGGGAAGAAGTGGCAGACTTACAGGGGAAACTCCACCGGCAC CCTGATGGTCTTTTTCGGCAACGTGGATTCCTCCGGCATTAAGCACAACATCTTCAACCCACCGATCA TAGCCAGATATATTAGGCTCCACCCCACTCACTACTCAATCCGCTCAACTCTTCGGATGGAACTCATG GGGTGCGACCTGAACTCCTGCTCCATGCCGTTGGGGATGGAATCAAAGGCTATTAGCGACGCCCAGAT CACCGCGAGCTCCTACTTCACTAACATGTTCGCCACCTGGAGCCCCTCCAAGGCCAGGCTGCACTTGC AGGGACGGTCAAATGCCTGGCGGCCGCAAGTGAACAATCCGAAGGAATGGCTTCAAGTGGATTTCCAA AAGACCATGAAAGTGACCGGAGTCACCACCCAGGGAGTGAAGTCCCTTCTGACCTCGATGTATGTGAA GGAGTTCCTGATTAGCAGCAGCCAGGACGGGCACCAGTGGACCCTGTTCTTCCAAAACGGAAAGGTCA AGGTGTTCCAGGGGAACCAGGACTCGTTCACACCCGTGGTGAACTCCCTGGACCCCCCACTGCTGACG CGGTACTTGAGGATTCATCCTCAGTCCTGGGTCCATCAGATTGCATTGCGAATGGAAGTCCTGGGCTG CGAGGCCCAGGACCTGTAC
2	XTEN(몰드체의 밑줄 친 XTEN)을 포함하는 FVIII 암호화 서열(코돈 최적화되지 않음)	ATGCAGATTGAGCTGTCCACTTGTTTCTTCCTGTGCCTCCTGCGCTTCTGTTTCTCCGCCACTCGCCG GTACTACCTTGGAGCCGTGGAGCTTTCATGGGACTACATGCAGAGCGACCTGGGCGAACTCCCCGTGG ATGCCAGATTCCCCCCCCGCGTGCCAAAGTCCTTCCCCTTTAACACCTCCGTGGTGTACAAGAAAACC CTCTTTGTCGAGTTCACTGACCACCTGTTCAACATCGCCAAGCCGCGCCCACCTTGGATGGGCCTCCT GGGACCGACCATTCAAGCTGAAGTGTACGACACCGTGGTGATCACCCTGAAGAACATGGCGTCCCACC CCGTGTCCCTGCATGCGGTCGGAGTGTCCTACTGGAAGGCCTCCGAAGGAGCTGAGTACGACGACCAG ACTAGCCAGCGGGAAAAGGAGGACGATAAAGTGTTCCCGGGCGGCTCGCATACTTACGTGTGGCAAGT CCTGAAGGAAAACGGACCTATGGCATCCGATCCTCTGTGCCTGACTTACTCCTACCTTTCCCATGTGG ACCTCGTGAAGGACCTGAACAGCGGGCTGATTGGTGCACTTCTCGTGTGCCGCGAAGGTTCGCTCGCT AAGGAAAAGACCCAGACCCTCCATAAGTTCATCCTTTTGTTCGCTGTGTTCGATGAAGGAAAGTCATG GCATTCCGAAACTAAGAACTCGCTGATGCAGGACCGGGATGCCGCCTCAGCCCGCGCCTGGCCTAAAA TGCATACAGTCAACGGATACGTGAATCGGTCACTGCCCGGGCTCATCGGTTGTCACAGAAAGTCCGTG TACTGGCACGTCATCGGCATGGGCACTACGCCTGAAGTGCACTCCATCTTCCTGGAAGGGCACACCTT CCTCGTGCGCAACCACCGCCAGGCCTCTCTGGAAATCTCCCCGATTACCTTTCTGACCGCCCAGACTC TGCTCATGGACCTGGGGCAGTTCCTTCTCTTCTGCCACATCTCCAGCCATCAGCACGACGGAATGGAG GCCTACGTGAAGGTGGACTCATGCCCGGAAGAACCTCAGTTGCGGATGAAGAACAACGAGGAGGCCGA GGACTATGACGACGATTTGACTGACTCCGAGATGGACGTCGTGCGGTTCGATGACGACAACAGCCCCA GCTTCATCCAGATTCGCAGCGTGGCCAAGAAGCACCCCAAAACCTGGGTGCACTACATCGCGGCCGAG GAAGAAGATTGGGACTACGCCCCGTTGGTGCTGGCACCCGATGACCGGTCGTACAAGTCCCAGTATCT GAACAATGGTCCGCAGCGGATTGGCAGAAAGTACAAGAAAGTGCGGTTCATGGCGTACACTGACGAAA CGTTTAAGACCCGGGAGGCCATTCAACATGAGAGCGGCATTCTGGGACCACTGCTGTACGGAGAGGTC GGCGATACCCTGCTCATCATCTTCAAAAACCAGGCCTCCCGGCCTTACAACATCTACCCTCACGGAAT CACCGACGTGCGGCCACTCTACTCGCGGCGCCTGCCGAAGGGCGTCAAGCACCTGAAAGACTTCCCTA TCCTGCCGGGCGAAATCTTCAAGTATAAGTGGACCGTCACCGTGGAGGACGGGCCCACCAAGAGCGAT CCTAGGTGTCTGACTCGGTACTACTCCAGCTTCGTGAACATGGAACGGGACCTGGCATCGGGACTCAT TGGACCGCTGCTGATCTGCTACAAAGAGTCGGTGGATCAACGCGGCAACCAGATCATGTCCGACAAGC GCAACGTGATCCTGTTCTCCGTGTTTGATGAAAACGAGATCCTGGTACCTCACTGAAAACATCCAGAGG TTCCTCCCAAACCCCGCAGGAGTGCAACTGGAGGACCCTGAGTTTCAGGCCTCGAATATCATGCACTC GATTAACGGTTACGTGTTCGACTCGCTGCAGCTGAGCGTGTGCCTCCATGAAGTCGCTTACTGGTACA TTCTGTCCATCGGCGCCAGACTGACTTCCTGAGCGTGTTCTTTTCCGGTTACACCTTTAAGCACAAG ATGGTGTACGAAGATACCCTGACCCTGTTCCCTTTCTCCGGCGAAACGGTGTTCATGTCGATGGAGAA CCCGGGTCTGTGGATTCTGGGATGCCACAACAGCGACTTTCGGAACCGCGGAATGACTGCCCTGCTGA

[0163]

서열 번호	설명	서열
		AGGTGTCCTCATGCGACAAGAACACCGGAGACTACTACGAGGACTCCTACGAGGATATCTCAGCCTAC CTCCTGTCCAAGAACAACGCGATCGAGCCGCGCAGCTTCAGCCAGAAC**ACATCAGAGAGCGCCACCCC** **TGAAAGTGGTCCCGGGAGCGAGCCAGCCACATCTGGGTCGGAAACGCCAGGCACAAGTGAGTCTGCAA** **CTCCCGAGTCCGGACCTGGCTCCGAGCCTGCCACTAGCGGCTCCGAGACTCCGGGAACTTCCGAGAGC** **GCTACACCAGAAAGCGGACCCGGAACCAGTACCGAACCTAGCGAGGGCTCTGCTCCGGGCAGCCCAGC** **CGGCTCTCCTACATCCACGGAGGAGGGCACTTCCGAATCCGCCACCCCGGAGTCAGGGCCAGGATCTG** **AACCCGCTACCTCAGGCAGTGAGACGCCAGGAACGAGCGAGTCCGCTACACCGGAGAGTGGGCCAGGG** **AGCCCTGCTGGATCTCCTACGTCCACTGAGGAAGGGTCACCAGCGGGCTCGCCCACCAGCACTGAAGA** **AGGTGCCTCGAGC**CCGCCTGTGCTGAAGAGGCACCAGCGAGAAATTACCCGGACCACCCTCCAATCGG ATCAGGAGGAAATCGACTACGACGACACCATCTCGGTGGAAATGAAGAAGGAAGATTTCGATATCTAC GACGAGGACGAAAATCAGTCCCCTCGCTCATTCCAAAAGAAAACTAGACACTACTTTATCGCCGCGGT GGAAAGACTGTGGGACTATGGAATGTCATCCAGCCCTCACGTCCTTCGGAACCGGGCCCAGAGCGGAT CGGTGCCTCAGTTCAAGAAAGTGGTGTTCCAGGAGTTCACCGACGGCAGCTTCACCCAGCCGCTGTAC CGGGGAGAACTGAACGAACACCTGGGCCTGCTCGGTCCCTACATCCGCGCGGAAGTGGAGGATAACAT CATGGTGACCTTCCGTAACCAAGCATCCAGACCTTACTCCTTCTATTCCTCCCTGATCTCATACGAGG AGGACCAGCGCCAAGGCGCCGAGCCCCGCAAGAACTTCGTCAAGCCCAACGAGACTAAGACCTACTTC TGGAAGGTCCAACACCATATGGCCCCGACCAAGGATGAGTTTGACTGCAAGGCCTGGGCCTACTTCTC CGACGTGGACCTTGAGAAGGATGTCCATTCCGGCCTGATCGGGCCGCTGCTCGTGTGTCACACCAACA CCCTGAACCCAGCGCATGGACGCCAGGTCACCGTCCAGGAGTTTGCTCTGTTCTTCACCATTTTTGAC GAAACTAAGTCCTGGTACTTCACCGAGAATATGGAGCGAAACTGTAGAGGCCCTGCAATATCCAGAT GGAAGATCCGACTTTCAAGGAGAACTATAGATTCCACGCCATCAACGGGTACATCATGGATACTCTGC CGGGGCTGGTCATGGCCCAGGATCAGAGGATTCGGTGGTACTTGCTGTCAATGGGATCGAACGAAAAC ATTCACTCCATTCACTTCTCCGGTCACGTGTTCACTGTGCGCAAGAAGGAGGAGTACAAGATGGCGCT GTACAATCTGTACCCCGGGGTGTTCGAAACTGTGGAGATGCTGCCGTCCAAGGCCGGCATCTGGAGAG TGGAGTGCCTGATCGGAGAGCACCTCCACGCGGGGATGTCCACCCTCTTCCTGGTGTACTCGAATAAG TGCCAGACCCCGCTGGGCATGGCCTCGGGCCACATCAGAGACTTCCAGATCACAGCAAGCGGACAATA CGGCCAATGGGCGCCGAAGCTGGCCCGCTTGCACTACTCCGGATCGATCAACGCATGGTCCACCAAGG AACCGTTCTCGTGGATTAAGGTGGACCTCCTGGCCCCTATGATTATCCACGGAATTAAGACCCAGGGC GCCAGGCAGAAGTTCTCCTCCCTGTACATCTCGCAATTCATCATCATGTACAGCCTGGACGGGAAGAA GTGGCAGACTTACAGGGGAAACTCCACCGGCACCCTGATGGTCTTTTTCGGCAACGTGGATTCCTCCG GCATTAAGCACAACATCTTCAACCCACCGATCATAGCCAGATATATTAGGCTCCACCCCACTCACTAC TCAATCCGCTCAACTCTTCGGATGGAACTCATGGGGTGCGACCTGAACTCCTGCTCCATGCCGTTGGG GATGGAATCAAAGGCTATTAGCGACGCCCAGATCACCGCGAGCTCCTACTTCACTAACATGTTCGCCA CCTGGAGCCCCTCCAAGGCCAGGCTGCACTTGCAGGGACGGTCAAATGCCTGGCGGCCGCAAGTGAAC AATCCGAAGGAATGGCTTCAAGTGGATTTCCAAAAGACCATGAAAGTGACCGGAGTCACCACCCAGGG AGTGAAGTCCCTTCTGACCTCGATGTATGTGAAGGAGTTCCTGATTAGCAGCAGCCAGGACGGGCACC AGTGGACCCTGTTCTTCCAAAACGGAAAGGTCAAGGTGTTCCAGGGGAACCAGGACTCGTTCACACCC GTGGTGAACTCCCTGGACCCCCCACTGCTGACGCGGTACTTGAGGATTCATCCTCAGTCCTGGGTCCA TCAGATTGCATTGCGAATGGAAGTCCTGGGCTGCGAGGCCCAGGACCTGTAC
3	R338L 돌연변이를 포함하는 FIX 암호화 서열(볼드체의 밑줄 친 **신호 펩타이드**(코돈 최적화되지 않음)	**ATGCAGAGAGTCAACATGATTATGGCTGAGTCACCTGGGCTGATTACTATTTGCCTGCTGGGCTACCT** **GCTGTCCGCCGAGTGTACCGTGTTCCTGGACCATGAGAACGCAAATAAGATCCTGAACAGGCCCAAAA** **GA**TACAATAGTGGGAAGCTGGAGGAATTTGTGCAGGGCAACCTGGAGAGAGAATGCATGGAGGAAAAG TGTAGCTTCGAGGAAGCCCGCGAGGTGTTTGAAAATACAGAGGCGAACCACAGAGTTCTGGAAGCAGTA TGTGGACGGCGATCAGTGCGAGAGCAACCCCTGTCTGAATGGCGGAAGTTGCAAAGACGATATCAACT CATACGAATGCTGGTGTCCTTTCGGGTTTGAAGGCAAAAATTGCGAGCTGGACGTGACATGTAACATT AAGAATGGACGGTGCGAGCAGTTTTGTAAAAACTCTGCCGATAATAAGGTGGTGTGCAGCTGTACTGA AGGATATCGCCTGGCTGAGAACCAGAAGTCCTGCGAACCAGCAGTGCCCTTCCCTTGTGGGAGGGTGA GCGTCTCCCAGACTTCAAAACTGACCAGAGCAGAGACAGTGTTTCCCGACGTGGATTACGTCAACAGC ACTGAGGCCGAAACCATCCTGGACAACATTACTCAGTCTACCCAGAGTTTCAATGACTTTACTCGGGT GGTCGGGGGCGAGGATGCTAAACCAGGCCAGTTCCCCTGGCAGGTGGTCCTGAACGGAAAGGTGGATG

[0164]

서열 번호	설명	서열
		CATTTTGCGGAGGGTCTATCGTGAATGAGAAATGGATTGTCACCGCCGCTCACTGCGTGGAAACCGGA GTCAAGATCACAGTGGTCGCTGGGGAGCACAACATTGAGGAAACAGAACATACTGAGCAGAAGCGGAA TGTGATCCGCATCATTCCTCACCATAACTACAATGCAGCCATCAACAAATACAATCATGACATTGCCC TGCTGGAACTGGATGAGCCTCTGGTGCTGAACAGCTACGTCACTCCAATCTGCATTGCTGACAAAGAG TATACCAATATCTTCCTGAAGTTTGGATCAGGGTACGTGAGCGGCTGGGGAAGAGTCTTCCACAAGGG CAGGAGCGCCCTGGTGCTCCAGTATCTGCGAGTGCCTCTGGTCGATCGAGCTACCTGTCTGCTCTCTA CCAAGTTTACAATCTACAACAACATGTTCTGCGCTGGGTTTCACGAGGGAGGACGAGACTCCTGTCAG GGCGATTCTGGGGGCCCACATGTGACAGAGGTCGAAGGCACCAGCTTCCTGACTGGCATCATTTCCTG GGGAGAGGAATGTGCAATGAAGGAAAATACGGGATCTACACCAAAGTGAGCCGCTATGTGAACTGGA TCAAGGAAAAAACCAAACTGACC
4	성숙한 FVIII 폴리펩타이드	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTDHLFNIAKPRPPW MGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTY VWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDE GKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLE GHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNN EEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYK SQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIY PHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLA SGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASN IMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFM SMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNSRH PSTRQKQFNATTIPENDIEKTDPWFAHRTPMPKIQNVSSSDLLMLLRQSPTPHGLSLSDLQEAKYETF SDDPSPGAIDSNNSLSEMTHFRPQLHHSGDMVFTPESGLQLRLNEKLGTTAATELKKLDFKVSSTSNN LISTIPSDNLAAGTDNTSSLGPPSMPVHYDSQLDTTLFGKSPLTESGGPLSLSEENNDSKLLESGLMNS QESSWGKNVSSTESGRLFKGKRAHGPALLTKDNALFKVSISLLKTNKTSNNSATNRKTHIDGPSLLIE NSPSVWQNILESDTEFKKVTPLIHDRMLMDKNATALRLNHMSNKTTSSKNMEMVQQKKEGPIPPDAQN PDMSFFKMLFLPESARWIQRTHGKNSLNSGQGPSPKQLVSLGPEKSVEGQNFLSEKNKVVVGKGEFTK DVGLKEMVFPSSRNLFLTNLDNLHENNTHNQEKKIQEEIEKKETLIQENVVLPQIHTVTGTKNFMKNL FLLSTRQNVEGSYDGAYAPVLQDFRSLNDSTNRTKKHTAHFSKKGEEENLEGLGNQTKQIVEKYACTT RISPNTSQQNFVTQRSKRALKQFRLPLEETELEKRIIVDDTSTQWSKNMKHLTPSTLTQIDYNEKEKG AITQSPLSDCLTRSHSIPQANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLTRVLFQDNSSHLPAASYRKKDSGVQES SHFLQGAKKNNLSLAILTLEMTGDQREVGSLGTSATNSVTYKKVENTVLPKPDLPKTSGKVELLPKVH IYQKDLFPTETSNGSPGHLDLVEGSLLQGTEGAIKWNEANRPGKVPFLRVATESSAKTPSKLLDPLAW DNHYGTQIPKEEWKSQEKSPEKTAFKKKDTILSLNACESNHAIAAINEGQNKPEIEVTWAKQGRTERL CSQNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAV ERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNI MVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYF WKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFD ETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNEN IHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNK CQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQG ARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHY SIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVN NPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTP VVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY
5	XTEN(볼드체의 밑줄 친 XTEN)을 포함하는 FVIII	MQIELSTCFFLCLLRFCFSATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKT LFVEFTDHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQ TSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLA KEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSV YWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGME

[0165]

서열 번호	설명	서열
	아미노산 서열	AYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAE EEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEV GDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSD PRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQR FLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHK MVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAY LLSKNNAIEPRSFSQNTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPG SPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGASSPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIY DEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLY RGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYF WKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFD ETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNEN IHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNK CQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQG ARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHY SIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVN NPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTP VVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY
6	FIX-R338L 아미노산 서열(볼드체의 밑줄 친 신호 펩타이드)	MQRVNMIMAESPGLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLERECMEEK CSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSCKDDINSYECWCPFGFEGKNCELDVTCNI KNGRCEQFCKNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSKLTRAETVFPDVDYVNS TEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETG VKITVVAGEHNIEETEHTEQKRNVIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIADK EYTNIFLKFGSGYVSGWGRVFHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLLSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSC QGDSGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGIYTKVSRYVNWIKEKTKLT

[0166] **D. 제형의 부형제, 담체 및 기타 구성성분**

[0167] 특정 실시형태에서, 본원에서 제공된 공정 또는 방법에 의해 생성되는 바이러스 벡터 조성물을 하나 이상의 약학적 부형제와 조합하여 바이러스 벡터를 포함하는 약학 조성물을 제조한다.

[0168] 특정 실시형태에서, 약학 조성물은 유효 용량의 바이러스 벡터(예를 들어, 재조합 렌티바이러스 벡터)를 포함한

다. 특정 실시형태에서, 약학 조성물은 유효 용량의 재조합 렌티바이러스 벡터를 포함한다. 특정 실시형태에서, 약학 조성물은 제형 완충액을 포함한다. 특정 실시형태에서, 제형 완충액은 NaCl 및 수크로오스를 포함하는 인산 완충액 또는 히스티딘 완충액이다. 특정 실시형태에서, 약학 조성물은 (a) 유효 용량의 재조합 렌티바이러스 벡터; (b) 트리스-부재 완충액 시스템; (c) 염; (d) 계면 활성제; 및 (e) 탄수화물을 포함하며, 이때 약학 조성물은 인간 개체에 대한 투여에 적합하다. 특정 실시형태에서, 완충액 시스템의 pH는 pH 6.0 내지 pH 8.0이다. 특정 실시형태에서, 완충액 시스템은 인산 완충액 또는 히스티딘 완충액이다. 특정 실시형태에서, 인산 완충액 또는 히스티딘 완충액의 농도는 5 mM 내지 30 mM이다. 특정 실시형태에서, 인산 완충액의 농도는 약 10 내지 약 20 mM, 약 10 내지 약 15 mM, 약 20 내지 약 30 mM, 약 20 내지 약 25mM, 또는 약 15 내지 약 20 mM이다. 특정 실시형태에서, 염은 염화물 염이다. 특정 실시형태에서, 염화물 염의 농도는 80 mM 내지 150 mM이다. 특정 실시형태에서, 염의 농도는 약 100 mM, 약 110 mM, 약 130 mM 또는 약 150 mM이다. 특정 실시형태에서, 계면 활성제는 폴록사머 또는 폴리소르베이트이다. 특정 실시형태에서, 폴록사머 또는 폴리소르베이트의 농도는 0.01% 내지 0.1%이다. 특정 실시형태에서, 탄수화물은 수크로오스이다. 특정 실시형태에서, 탄수화물의 농도는 0.5% 내지 5%이다. 특정 실시형태에서, 염화물 염은 NaCl이다. 특정 실시형태에서, 폴록사머는 폴록사머 101(P101), 폴록사머 105(P105), 폴록사머 108(P108), 폴록사머 122(P122), 폴록사머 123(P123), 폴록사머 124(P124), 폴록사머 181(P181), 폴록사머 182(P182), 폴록사머 183(P183), 폴록사머 184(P184), 폴록사머 185(P185), 폴록사머 188(P188), 폴록사머 212(P212), 폴록사머 215(P215), 폴록사머 217(P217), 폴록사머 231(P231), 폴록사머 234(P234), 폴록사머 235(P235), 폴록사머 237(P237), 폴록사머 238(P238), 폴록사머 282(P282), 폴록사머 284(P284), 폴록사머 288(P288), 폴록사머 331(P331), 폴록사머 333(P333), 폴록사머 334(P334), 폴록사머 335(P335), 폴록사머 338(P338), 폴록사머 401(P401), 폴록사머 402(P402), 폴록사머 403(P403), 폴록사머 407(P407) 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 특정 실시형태에서, 폴리소르베이트는 폴리소르베이트 20, 폴리소르베이트 40, 폴리소르베이트 60, 폴리소르베이트 80 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 특정 실시형태에서, 인산 완충액 또는 히스티딘 완충액의 pH는 pH 6.1, pH 6.3, pH 6.5, pH 6.7, pH 6.9, pH 7.1, pH 7.3, pH 7.5, pH 7.7 또는 pH 7.9이다. 특정 실시형태에서, 인산 완충액 또는 히스티딘 완충액의 농도는 10 mM, 15 mM, 20 mM 또는 25 mM이다. 특정 실시형태에서, 염화물 염은 100 mM, 110 mM, 130 mM 또는 150 mM이다. 특정 실시형태에서, 폴록사머 또는 폴리소르베이트의 농도는 0.03%, 0.05%, 0.07% 또는 0.09%이다. 특정 실시형태에서, 탄수화물의 농도는 1%, 2%, 3% 또는 4%이다. 특정 실시형태에서, 폴록사머는 폴록사머 188(P188)이다. 특정 실시형태에서, 폴록사머는 폴록사머 407(P407)이다.

[0169] 본 개시내용의 바이러스 벡터는 정맥 내, 피하, 근육 내, 또는 임의의 점막 표면을 통해 투여될 수 있으며, 예를 들어 경구, 설하, 설측, 설하, 비강, 직장, 질내 또는 폐 경로를 통해 투여될 수 있다. 바이러스 벡터는 생체 고분자 고체 지지체 내에 이식되거나 이에 연결될 수 있으며, 이는 목적하는 부위에 대한 벡터의 점진적 방출을 가능케 한다.

[0170] 하나의 실시형태에서, 바이러스 벡터를 포함하는 제형화된 원료 의약품의 투여 경로는 비경구 경로이다. 본원에서 사용된 바와 같이, 비경구란 용어는 정맥 내, 동맥 내, 복강 내, 근육 내, 피하, 직장 또는 질내 투여를 포함한다. 정맥 내 비경구 투여 형태가 바람직하다. 이들 모든 투여 형태가 명백히 본 개시내용의 범주 내에 있는 것으로 고려되지만, 투여 형태는 주사용 용액, 특히 정맥 내 또는 동맥 내 주사 또는 적하용 용액일 수 있다. 통상, 주사용으로 적합한 약학 조성물은 완충액(예를 들어, 아세트산, 인산 또는 시트르산 완충액), 계면 활성제(예를 들어, 폴리소르베이트), 선택적으로 안정화제(예를 들어, 인간 알부민) 등을 포함할 수 있다. 그러나, 본원의 교시와 양립 가능한 기타 방법에서 바이러스 벡터는 유해한 세포 개체군의 부위에 직접 전달될 수 있어서, 치료제에 대한 병든 조직의 노출을 증가시킬 수 있다.

[0171] 비경구 투여용 제제는 멸균 수용액 또는 비-수용액, 현탁액 및 유화액을 포함한다. 비-수용성 용매의 예로는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 식물성 오일(예를 들어, 올리브 오일) 및 주사용 유기 에스테르(예를 들어, 에틸 올리에이트)가 있다. 수성 담체는 물, 알코올성 용액/수용액, 유화액 또는 현탁액(식염수 및 완충 매질을 포함함)을 포함한다. 본 개시내용에서, 약학적으로 허용 가능한 담체는 0.01 M 내지 0.1 M 및 바람직하게는 0.05 M 인산 완충액 또는 0.8% 식염수를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 기타 흔한 비경구용 비히클은 인산 나트륨 용액, 링거 덱스트로오스, 덱스트로오스 및 염화나트륨, 젖산 링거액 또는 고정유를 포함한다. 정맥 내 비히클은 유체 및 영양제 보충제, 전해질 보충제, 예를 들어 링거 덱스트로오스에 기반을 둔 보충제 등을 포함한다. 예를 들어, 항미생물제, 산화방지제, 킬레이트제 및 비활성 기체 등과 같은 보존제 및 기타 첨가제가 또한 존재할 수 있다.

[0172] 보다 구체적으로, 주사용으로 적합한 약학 조성물은 멸균 주사 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 멸균 수용

액(수용성인 경우) 또는 분산액 및 멸균 분말을 포함한다. 이 같은 경우, 조성물은 멸균되어야 하며, 주사 용이성이 존재하는 정도로 유체이어야 한다. 이는 제조 및 저장 조건 하에 안정해야 하며, 바람직하게는 박테리아 및 진균과 같은 미생물의 오염 작용으로부터 보존될 것이다. 담체는, 예를 들어 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등) 및 이들의 적합한 혼합물을 포함하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 적절한 유동성은, 예를 들어 레시틴과 같은 코팅의 사용, 분산액의 경우에 요구되는 입자 크기의 유지, 및 계면 활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다.

[0173] 미생물 작용의 방지는 다양한 항균제 및 항진균제, 예를 들어 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 아스코르브산, 티메로살(thimerosal) 등에 의해 달성될 수 있다. 많은 경우, 조성물 내에 등장화제, 예를 들어 당, 폴리알코올(예를 들어, 만니톨, 소르비톨) 또는 염화나트륨을 포함하는 것이 바람직할 것이다. 주사용 조성물의 장기간 흡수는 흡수를 지연시키는 약제, 예를 들어 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴을 조성물에 포함시킴으로써 야기될 수 있다.

[0174] 임의의 경우, 멸균 주사 용액은, 필요한 경우 본원에 나열된 하나의 성분 또는 이들의 조합과 함께 적절한 용매에서 활성 화합물(예를 들어, 폴리펩타이드 단독 또는 기타 활성제와 함께)을 소정의 양으로 혼입한 후, 여과 살균함으로써 제조될 수 있다. 일반적으로, 분산액은, 염기성 분산 매질, 및 상기에 나열된 것으로부터 필요한 기타 성분을 함유하는 멸균 비히클 내로 활성 화합물을 혼입함으로써 제조된다. 멸균 주사 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우, 바람직한 제조 방법은 진공 건조 및 냉동 건조이며, 이 방법에 의해 앞서 멸균 여과된 이의 용액에서 유래한 임의의 추가적인 목적하는 성분뿐만 아니라 유효 성분의 분말이 수득된다. 주사용 제제는 당해 기술분야에 알려져 있는 방법에 따라 가공되고, 앰플, 봉투, 병, 주사기 또는 바이알과 같은 용기 내에 채우고, 무균 조건 하에 밀봉된다. 또한, 제제는 키트의 형태로 포장되고 판매될 수 있다. 이 같은 제품은 바람직하게는 라벨 또는 포장 삽입물(package insert)을 가질 것이며, 이는 관련된 조성물이 응고 질병을 앓고 있거나 이에 대한 소향이 있는 개체를 치료하는 데 유용하다는 것을 보여준다.

[0175] 또한, 예를 들어 코코아 버터 또는 기타 글리세리드와 같은 통상적인 좌제 베이스를 함유하는 약학 조성물은 좌제 또는 정체 관장제로서 직장 투여용으로 제형화될 수 있다.

[0176] 병태의 치료를 위한 본 개시내용의 조성물의 유효 용량은 투여 수단, 표적 부위, 환자의 생리 상태, 환자가 인간인지 동물인지의 여부, 기타 투여된 약제, 및 치료가 예방용인지 치료용인지의 여부를 비롯한 많은 상이한 인자에 따라 달라진다. 통상, 환자는 인간이지만, 유전자 도입 포유동물을 포함하는 비인간 포유동물이 또한 치료될 수 있다. 치료 투여량은 안전성 및 약효를 최적화하기 위해 당업자에게 알려져 있는 통상의 방법을 사용하여 적정될 수 있다.

[0177] 바이러스 벡터를 포함하는 약학 조성물은 단일 용량 또는 다중 용량으로 투여될 수 있으며, 이때 다중 용량은 연속적으로 투여되거나 특정 시간 간격으로 투여될 수 있다. 시험관 내 검정은 최적의 용량 범위 및/또는 투여 일정을 결정하기 위해 이용될 수 있다. 응고 인자 활성을 측정하는 시험관 내 검정은 당해 기술분야에 알려져 있다. 또한, 유효 용량은 동물 모델, 예를 들어 혈우병 개로부터 수득된 용량-반응 곡선으로부터 추론될 수 있다(문헌[Mount *et al.* 2002, Blood 99 (8): 2670]).

[0178] 또한, 상기 범위 내의 용량 중간값은 본 개시내용의 범주 내에 있는 것으로 의도된다. 이 같은 용량을 매일, 격일, 매주, 또는 경험적 분석에 의해 결정된 임의의 기타 일정에 따라 개체에 투여될 수 있다. 예시적인 치료는, 예를 들어 적어도 6개월의 장기간에 걸쳐 다중 투여량의 투여를 수반한다.

[0179] 바이러스 벡터를 포함하는 약학 조성물은 다수의 경우에 투여될 수 있다. 단일 투여량 사이의 간격은 1일, 1주, 1개월 또는 1년일 수 있다. 또한, 간격은 환자에서 변형된 폴리펩타이드 또는 항원의 혈중 수준을 측정함으로써 나타낸 바와 같이 불규칙할 수 있다. 바이러스 벡터의 투여량 및 빈도는 환자에서의 이식 유전자 단백질 생성물의 반감기에 따라 달라질 수 있다.

[0180] 바이러스 벡터를 포함하는 약학 조성물의 투여량 및 투여 빈도는 치료가 예방용인지 치료용인지의 여부에 따라 달라질 수 있다. 예방용 적용에서, 바이러스 벡터를 함유하는 조성물은 환자의 저항력을 향상시키거나 질환의 영향을 최소화시키기 위해 아직 질환 상태에 있지 않은 환자에게 투여된다. 이 같은 양은 "예방적 유효량"으로 정의된다. 비교적 낮은 투여량은 장기간에 걸쳐 비교적 드문 간격으로 투여된다. 일부 환자는 이들의 나머지 삶 동안 치료를 계속 받는다.

[0181] 바이러스 벡터를 포함하는 약학 조성물은 치료(예를 들어, 예방용 또는 치료용)를 필요로 하는 질병 또는 병태를 치료하는 데 효과적인 기타 약제와 조합하여 선택적으로 투여될 수 있다.

[0182] 본원에서 사용된 바와 같이, 보조 요법과 함께 또는 이와 조합하여 바이러스 벡터를 포함하는 약학 조성물의 투여는 요법 또는 개시된 폴리펩타이드의 순차적, 동시적, 동연적(coextensive), 병용, 부수적 또는 공동 투여 또는 적용을 의미한다. 당업자라면 병용 치료 용법의 다양한 성분의 투여 또는 적용이 치료의 전체 효과를 향상시키도록 시간이 정해질 수 있다는 것을 인식할 것이다. 당업자(예를 들어, 의사)라면 선택된 보조 요법 및 본 명세서의 교시에 기초하여 과도한 실험 없이 효과적인 병용 치료 용법을 용이하게 식별할 수 있을 것이다.

[0183] 바이러스 벡터를 포함하는 약학 조성물이 (예를 들어 병용 치료 용법을 제공하기 위해) 하나의 약제 또는 약제들과 함께 또는 이(들)와 조합하여 사용될 수 있다는 것이 추가로 인식될 것이다. 바이러스 벡터를 포함하는 약학 조성물이 조합될 수 있는 예시적인 약제는 치료될 특정 질병에 대한 현재의 치료 기준을 나타내는 약제를 포함한다. 이 같은 약제는 자연에서 화학적 또는 생물학적 약제일 수 있다. "생물학적" 또는 "생물학적 약제"란 용어는 치료제로서 사용하기 위해 의도된, 생물 및/또는 이들의 생성물로부터 만들어진 임의의 약학적 활성제를 지칭한다.

[0184] 바이러스 벡터를 포함하는 약학 조성물과 조합하여 사용될 약제의 양은 개체에 따라 달라질 수 있거나, 당해 기술분야에 알려져 있는 바와 같이 투여될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Bruce A Chabner *et al.*, *Antineoplastic Agents, in* Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics 1233-1287 ((Joel G. Hardman *et al.*, eds., 9th ed. 1996)]을 참고한다. 다른 실시형태에서, 치료 기준을 따르는 이 같은 약제의 양이 투여된다.

[0185] 특정 실시형태에서, 바이러스 벡터를 포함하는 약학 조성물은 면역 억제제, 항알레르기제 또는 항염증제와 함께 투여된다. 이들 약제는 일반적으로 본원에서 치료되는 개체의 면역 시스템을 억제 또는 마스킹(masking)하도록 작용하는 물질을 지칭한다. 이들 약제는 사이토카인 생산을 억제하거나, 자가 항원 발현을 하향 조절 또는 억제하거나, MHC 항원을 마스킹하는 물질을 포함한다. 이 같은 약제의 예로는 2-아미노-6-아릴-5-치환된 피리미딘; 아자티오프린; 사이클로포스파미드; 브로모크립틴; 다나졸; 답손(dapsone); 글루타르알데하이드; MHC 항원 및 MHC 단편에 대한 항-유전자형 항체; 사이클로스포린 A; 스테로이드, 예를 들어 글루코코르티코스테로이드(예를 들어, 프레드니손, 메틸프레드니솔론 및 덱사메사손); 항-인터페론-γ, -β 또는 -α 항체, 항종양 괴사 인자-α 항체, 항종양 괴사 인자-β 항체, 항-인터류킨-2 항체 및 항-IL-2 수용체 항체를 포함하는 사이토카인 또는 사이토카인 수용체 길항제; 항-LFA-1 항체(항-CD11a 및 항-CD18 항체를 포함함); 항-L3T4 항체; 이종성 항-림프구 글로불린; pan-T 항체; LFA-3 결합 도메인을 함유하는 가용성 펩타이드; 스트렙토키나아제; TGF-β; 스트렙토도르나아제(streptodornase); FK506; RS-61443; 데옥시스페르구알린(deoxyspergualin); 및 라파마이신을 들 수 있다. 특정 실시형태에서, 약제는 항히스타민이다. 본원에서 사용된 바와 같이, "항히스타민"은 히스타민의 생리적 효과를 길항하는 약제이다. 항히스타민의 예로는 클로르페니라민, 디펜하이드라민, 프로메타진, 크로몰린 나트륨, 아스테미졸(astemizole), 아자타딘 말리에이트, 브롬페니라민 말리에이트, 카르비녹사민 말리에이트, 세티리진 염산염, 클레마스틴 푸마레이트, 시프로헵타딘 염산염, 덱스브롬페니라민 말리에이트, 덱스클로르페니라민 말리에이트, 디멘하이드리네이트(dimenhydrinate), 디펜하이드라민 염산염, 독실아민 숙시네이트, 펙소펜다딘 염산염, 테르페나딘 염산염, 히드록시진 염산염, 로라타딘(loratidine), 메클리진 염산염, 트리펠렌아민 시트레이트, 트리펠렌아민 염산염 및 트리프롤리딘 염산염이 있다.

[0186] 면역 억제제, 항알레르기제 또는 항염증제는 바이러스 벡터 투여 용법을 포함하는 약학 조성물 내에 혼입될 수 있다. 예를 들어, 면역 억제제 또는 항염증제의 투여는 바이러스 벡터를 포함하는 약학 조성물의 투여 이전에 개시될 수 있고, 그 이후에 1회 이상의 용량으로 계속할 수 있다. 특정 실시형태에서, 면역 억제제 또는 항염증제는 바이러스 벡터를 포함하는 약학 조성물에 대한 예비 투약으로서 투여된다.

[0187] 투여를 용이하게 하고 활성제의 안정성을 촉진하기 위해 바이러스 벡터를 포함하는 약학 조성물을 제형화할 수 있다는 것이 인식될 것이다. 바람직하게는, 본 개시내용에 따른 약학 조성물은 생리 식염수, 무독성 완충액, 보존제 등과 같은 약학적으로 허용 가능한 무독성의 멸균 담체를 포함한다. 물론, 약학적 유효량의 폴리펩타이드를 제공하기 위해 본 개시내용의 약학 조성물을 단일 또는 다수의 용량으로 투여할 수 있다.

[0188] 이제, 본 개시내용이 상세하게 기술되고 있지만, 이를 하기 실시예를 참고하여 보다 명확하게 이해할 것이며, 여기서 이들 실시예는 예시를 목적으로 본원에 포함되고, 본 개시내용을 제한하기 위한 것은 아니다. 본원에 인용된 모든 특허, 공개물 및 논문은 본원에 명확하고 특이적으로 참고로 포함된다.

[0189] **실시예**

[0190] 재료 및 방법:

[0191] 실시예 1 내지 실시예 6에 요약된 바와 같이, 하기에는 본 개시내용의 방법을 실시하기에 적합한 예시적인 시약(표 2) 및 일반적인 방법이 제공된다.

표 2

본원에 기술된 방법에서 사용하기에 적합한 예시적인 시약

[0192]

재료의 설명	판매사	카탈로그 번호
HEK293 세포	사내	N/A
플라스미드(게놈성 FVIIIXTEN, FVIII, FIX; Gagpol; VSV-G; Rev)	사내	N/A
형질감염제:		
PEIpro	Polyplus Transfection	115-400
리포펙타민 2000	Thermo-Fisher Scientific	11668019
리포펙타민 3000	Thermo-Fisher Scientific	L300075
VIIISelect 수지	Cytiva	카탈로그 번호: 17-5450
FreeStyle 293 발현 생산 배지	Thermo-Fisher Scientific	12338-002
250 X 플레스테롤 지질 농축액(CLC)	Thermo Scientific	12351-018
BIOSTAT® STR50 FlexSafe® Bag	Sartorius Stedim	FRS131920 D
벤조나아제® 엔도뉴클레아제	Merck Millipore	1.01697.001
음이온 교환 크로마토그래피 매질(Sartobind® Q)	Sartorius Stedim	96IEXQ42D1GSS
AKTA Avant 150 크로마토그래피	GE Healthcare	
HDC® II 프리필터 부품 번호	Pall Corporation	NP7J100P1G
Supor® EAV 0.2 ㎛ 필터	Pall Corporation	NT7UEAVP1S
중공 섬유 막(500 kDa)	Cytiva	ReadyToProcess™ RTPUFP-500-C-6S
Chromogenix Coatest® SP 인자 VIII 키트	Diapharma	K824086
$CaCl_2$	Millipore-Sigma	449709-10G
인산나트륨	VWR	JT3802-1 및 JT3827-1
트로메탄 또는 트리스	Avantor, Millipore	T6066, T5941
염화나트륨	JT Baker	BAKR3627
Capto MMC	Cytiva	17531710, 17371601
Capto Adhere	Cytiva	17544410, 17371501
CIMmultus 고급 복합 모노리스 칼럼	Bia Separations	411.5114-2, 411.5113-2

[0193] *FVIIIXTEN 또는 FVIII 활성 측정*: 발색 검정 키트 Chromogenix Coatest® SP 인자 VIII(카탈로그 번호: K824086; Diapharma™)은 FVIII 활성의 시험관 내 진단 광도 측정을 위해 사용될 수 있다. 간단하게는, 인자 X는 칼슘 및 인지질의 존재 하에 인자 IXa에 의해 인자 Xa로 활성화된다. 이러한 생성은 FVIII에 의해 크게 자극받는다. 최적량의 Ca^{2+} 및 인지질 및 과량의 인자 IXa 및 인자 X가 사용되어, 인자 X의 활성화율이 FVIII의 양에 의존하게 되었다. 인자 Xa는 발색 기질(Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA) S-2765™을 가수분해하여 발색단 pNA(p-니트로아닐린)를 방출한다. 생성된 인자 Xa 및 그 결과 얻어진 색의 강도는 샘플에서의 FVIII 활성에 비례한다. 이어서, 색은 405 nm에서 광학 측정에 의해 판독될 수 있다.

[0194] *바이러스 벡터의 생성*: 외피형 바이러스 벡터 LV-FVIIIXTEN 또는 LV-FVIII을 인간 배아 신장 293(HEK293) 세포에서 생성하였다. 세포를 배양 배지에 적응시키고, (1) 플라스미드 DNA 및 형질감염제(예를 들어, PEIpro®(카탈로그 번호: 115-400, Polyplus Transfection®), 리포펙타민® 2000(카탈로그 번호: 11668019, Thermo Fisher™), 리포펙타민® 3000(카탈로그 번호: L300075, Thermo Fisher™) 또는 기타 등가의 시약을 사용하여 일시적으로 형질감염시키거나, (2) 안정한 생산자 세포를 진동 플라스크 또는 생물 반응기(1회용 시스템; 용기 내의 흡착 배지가 존재하거나 존재하지 않는 통상적인 교반 탱크)에서 유도하고, 배치, 유가식, 관류 또는 연속 케모스탯 배양액(chemostat culture)에서 운용하여 바이러스 입자를 생성하였다. 벡터 생산 세포를 생산 배지, 예를 들어 FreeStyle™ 293 발현 배지(LV-Max™), 또는 일반적으로 무혈청이고 화학적으로 정의된 등가의 배지에서 배양할 수 있다. 전형적으로, 현탁 배양은 배지의 주입, 교류 접선 흐름(ATF)을 이용한 배지의 교환, 또는 영양제의 순차적 첨가를 이용한 신선한 배지의 첨가를 수반하고, 이를 수행하여 배치 배양 시스템을 넘어서 세포수 및 생성물 역가를 증가시킨다. 생성물 수율, 생성물 순도 및 불순물의 양은 벡터를 생성하는 세포의 능력, 사용된 생산 시스템 또는 이들의 조합에 따라 달라진다. 세포로부터 생성된 바이러스 벡터는 기타 공정- 및 생성물-관련 불순물 및 공정 동안에 생성된 단백질과 함께 배양 상층액에 남아 있다.

[0195] *Cell 분리 및 핵산 치료*: 여과 단계를 이용하여 벡터 생산 세포, 세포 잔해 및 기타 입자성 불순물을 상층액으로부터 분리할 수 있다. 적합한 필터는 2개 이상의 필터를 차례로 포함하는 필터를 포함하고, 재생 셀룰로오스 섬유, 무기 필터 보조제 또는 유기 수지 또는 이들의 임의의 조합과 조합된 셀룰로오스 섬유, 및 중합체성 필터를 이용할 수 있다. 예를 들어, 세포 잔해 및 기타 입자성 불순물의 효과적인 제거를 달성하기 위해 나일론, 폴

리프로필렌(PE), 폴리에테르설폰(PES) 필터를 사용할 수 있으며, 허용 가능한 회수를 초래할 수 있다. 벡터 수율 및 불순물 감소를 개선하기 위해 다단계 공정을 사용할 수 있다. 예시적인 2단계 또는 3단계 공정은 세포, 대형 침전물 및 세포 잔해를 제거하기 위한 조질 필터(들), 및 그 이후 0.65 미크론(㎛), 0.45 ㎛, 0.22 ㎛ 또는 0.2 ㎛의 공칭 기공 크기를 갖는 연마 제2 단계 필터(들)로 이루어질 수 있다. 최적의 조합은 심층 필터 크기 선별, 세포 수용 능력, 및 바이러스 벡터 및 불순물과의 필터 접촉 표면의 상호작용의 함수일 수 있다. 대안적으로, 단계적 작업은 정화를 위해 수행될 수 있으며, 원심분리, 및 그 이후 0.65 ㎛, 0.45 ㎛, 0.22 ㎛ 또는 0.2 ㎛의 공칭 기공 크기를 갖는 연마 단계 필터(들)를 이용하는 단일 단계 작업을 포함할 수 있다. 일반적으로, 정화 접근법은 하기, 즉 전량 여과, 미세 여과, 원심분리 및 심층 여과(이에 제한되지 않음) 중 하나 이상의 조합을 포함하여, 적합한 투명도 또는 혼탁도를 갖고 후속적인 정제 단계에 적합한 입자성 물질이 없는 상층액을 제공한다. 예를 들어, 5 ㎛ 내지 10 ㎛ 및 1.2 ㎛ 내지 2.0 ㎛ 심층 여과, 및 그 이후 0.2 ㎛ 내지 0.65 ㎛의 막 여과를 포함하는 2단계 심층 여과가 조합하여 사용될 수 있다.

[0196] 상층액은 숙주 세포에 의해 생성된 핵산(DNA/RNA) 불순물 또는 일시적 형질감염 공정의 생성물을 함유한다. 이 같은 핵산은, 적합한 뉴클레아제, 예를 들어 벤조나아제® 엔도뉴클레아제(카탈로그 번호: 1.01697.001, Millipore Sigma™), 또는 원치 않은 DNA 및/또는 RNA 또는 오염 DNA 및/또는 RNA를 제거할 목적으로 당해 기술분야에서 흔히 사용되는 임의의 기타 DNase 및/또는 RNase를 사용하여 분해될 수 있다. 이 같은 뉴클레아제는 세포 분리 작업을 수행하기 이전 또는 이후에 상층액을 제조하기 위한 모든 형태의 DNA 및 RNA(단일 가닥, 이중 가닥의 선형 또는 원형)을 공격 및 분해함으로써 기능을 한다. 일부 실시형태에서, 사용된 뉴클레아제의 농도는 1 단위/㎖ 내지 100 단위/㎖ 범위이고, 세포 분리 단위 작업 이전 또는 이후에 첨가되며, 핵산을 허용 가능한 수준까지 소화시키기 위해 20℃ 내지 37℃에서 5분 내지 60분 동안, 또는 잠재적으로 2℃ 내지 8℃에서 하룻밤 동안 상층액 배약액과 함께 인큐베이션한다. 대안적으로, 뉴클레아제의 이 같은 첨가 없이, 뉴클레아제 효소분비에 관여하는 비-벡터 생산 세포를 첨가할 수 있거나, DNA/RNA 불순물의 제거를 위한 적합한 침전제를 사용하여 선택적인 침전을 수행할 수 있다.

[0197] *바이러스 벡터의 정제*: 바이러스 벡터의 정제는 단백질-관련 및 비-단백질-관련 불순물(이식 유전자 발현 카세트 상류의 프로모터(예를 들어, CMV 프로모터)에 의해 매개되는 이식 유전자 단백질 오염물질을 포함함)뿐만 아니라, 바이러스 벡터 생성물을 포함하는 상층액으로부터 기능성 벡터를 분리하는 단계를 수반한다. 도 1a 및 도 1b에 나타나 있는 바와 같이, 상층액은 정제 단계, 예를 들어 잠재적으로는 크로마토그래피, TFF 및 미세 여과 공정의 다수의 단계를 겪는다. 후속적인 정제는 원료 의약품을 구현하기 위해 수행된다.

[0198] 일부 실시형태에서, 2개 이상의 순차적 크로마토그래피 단계는 보다 높은 바이러스 벡터 입자 순도를 달성하고 오염 단백질, 핵산, 내독소 및 기타 생성물-관련 변이체의 제거를 확인하는데 유용할 수 있다. 높은 바이러스 벡터 입자 순도는 질환을 치료하기 위해 인간 개체에서 사용하기 위한 외피형 바이러스 벡터를 제조하기 위한 요건이다. 순차적 크로마토그래피 단계는 다양한 수지를 사용할 수 있으며, 이는 다양한 순서로 순차적으로 수행되며, 기능성 바이러스 벡터를 보다 많이 회수하기 위해 최적화되며, 최종 완제 의약품 내의 불순물을 최소화한다. 예를 들어, 도 1b에 나타나 있는 바와 같이 2개의 순차적 크로마토그래피 단계에 의해 구현된 벡터 입자 정제는 바이러스 벡터 포획 크로마토그래피(제1 크로마토그래피 정제)를 이용한 후, 이식 유전자 불순물 포획 크로마토그래피(제2 크로마토그래피 정제)에 의해 암호화된 이식 유전자 단백질을 이용할 수 있다. 바이러스 벡터 포획 크로마토그래피 단계 및 이식 유전자 불순물 포획 크로마토그래피 단계는 임의의 순서로 수행될 수 있으며, 예를 들어 이식 유전자 불순물 포획 크로마토그래피 단계가 먼저 수행된 후, 바이러스 벡터 포획 크로마토그래피 단계가 수행되는 도 1b에 나타나 있는 순서와 역순으로 수행될 수 있다.

[0199] 특정 실시형태에서, 상층액을 제1 음이온 교환 칼럼에 적용한다. 특정 실시형태에서, 음이온 교환 칼럼은 막과 DEAE 또는 Q 화학의 조합을 포함한다. 본 발명에 사용하기 적합한 다수의 음이온 교환기는 CIM Monolith(Q 또는 DEAE, 강하거나 약한 음이온 교환기; BIA Separations), Sartobind Q(Q 또는 DEAE, 강하거나 약한 음이온 교환기; Sartorius Stedim), TOYOPEARLE 650C(DEAE, UNOSPHERE Q 또는 DEAE, 강하거나 약한 음이온 교환기; BioRad, Hercules); POROS 50(HQ, 강한 음이온 교환기; Life Technologies), POROS 50(XS, 강한 음이온 교환기; Life Technologies), POROS 50(D, 약한 음이온 교환기; Life Technologies), POROS 50(PI, 약한 음이온 교환기; Life Technologies), SEPHAROSE(DEAE, 약한 음이온 교환기; Cytiva); SEPHAROSE(Q, 강한 음이온 교환기; Cytiva) 및 Capto Q(강한 음이온 교환기; Cytiva)를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0200] 음이온 교환 칼럼은 먼저 표준 완충액을 사용하여 제조사의 설명서에 따라 평형화되거나, 당업자에게 잘 알려져 있는 완충액을 사용하여 평형화된다. 이 같은 완충액은 생리적 조건에 가까운 pH 값에서 트리스, 인산염, 히스

티딘, 염 및 기타 부형제를 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, 10 mM 내지 50 mM 트리스-HCl, 2 mM $MgCl_2$, 150 mM NaCl을 포함하는 완충액(pH 7.2), 또는 10 mM 내지 50 mM 인산염, 2 mM $MgCl_2$, 150 mM NaCl을 포함하는 완충액(pH 7.2)을 사용하여 칼럼을 평형화할 수 있다. 이어서, 샘플을 로딩하고, 2개의 용출 완충액, 즉 저염 완충액 하나 및 고염 완충액 하나를 적용하였다. 각각의 저염 및 고염 세척 이후에 분획을 수집하고, 260 nm 및/또는 280 nm에서의 UV 흡광도 모니터링과 같은 표준 기법을 사용하여 분획에서 단백질을 검출한다. 음이온 교환기를 사용하여 보다 고염 용출액으로부터의 단백질 피크는 바이러스 벡터 입자를 함유하며, 이를 저염-함유 또는 염-무함유 용출 완충액을 사용하여 희석하고, 다음 단계를 위해 가공한다. 대안적으로, 다음 작업 단계 이전에 벡터-함유 생성물 분획을 희석하고 2℃ 내지 15℃에서 저장한다. 음이온 교환 칼럼의 사용을 포함하는 바이러스 벡터 포획 크로마토그래피 단계에서 사용하기에 적절한 완충액은 당해 기술분야에 잘 알려져 있으며, 일반적으로 자연에서 양이온 또는 양쪽성 이온 완충액이다. 이 같은 완충액은 하기 완충액 이온, 즉 트리에탄올아민; 트리스; 인산나트륨 또는 인산칼륨; 비스-트리스; 비스-트리스 프로판; N-메틸디에탄올아민을 갖는 완충액을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0201] 특정 실시형태에서, 바이러스 벡터 크로마토그래피 단계의 용출액은 이식 유전자 불순물 포획 크로마토그래피 단계에 의해 추가로 가공될 수 있으며, 이때 바이러스 벡터에 의해 암호화되는 이식 유전자 단백질 오염물질을 포함하는 원치 않은 불순물이 포획된다. 바이러스 벡터를 포함하는 정제된 조성물은 통과액 생성물 내에 수용되며, 이때 바이러스 벡터는 이식 유전자 불순물 포획 크로마토그래피 매트릭스에 대한 특이적 결합 없이 크로마토그래피 장치를 통해 흐른다.

[0202] 이식 유전자 불순물 포획 크로마토그래피 단계는 이식 유전자 단백질 오염물질의 상호작용이 발생하도록 충분한 매트릭스 가교를 갖는 중합체의 사용을 포함하며, 이때 예를 들어 자연에서 친화도, 이온 교환, 다중 모드, 혼합 모드 또는 소수성인 결합기를 포함하는 다수의 결합기 중 임의의 것이 또한 존재한다. 제2 이식 유전자 불순물 포획 크로마토그래피 단계는 바이러스 벡터에 의해 매개되는 이식 유전자 단백질 오염물질을 포함하는 불순물의 포획을 수반하며, 친화도(예를 들어, Cytiva사로부터 구입 가능한 VIIISelect), 이온 교환(예를 들어, 다수의 판매사로부터 구입 가능한 양이온 교환), 다중 모드/혼합 모드(예를 들어, Cytiva사로부터 구입 가능한 Capto MMC) 및 소수성 상호작용(예를 들어, Cytiva사로부터 구입 가능한 Capto Adhere) 크로마토그래피 수지 중 하나 또는 이의 조합을 사용한다.

[0203] 특정 실시형태에서, 칼럼에 대한 적절한 불순물 결합 및 바이러스 벡터 탈결합 조건을 가능케 하기 위해 샘플을 희석한 이후에 이식 유전자 불순물 포획 크로마토그래피 매트릭스 상에 바이러스 벡터 포획 크로마토그래피 단계 이후에 수득된 얻어진 샘플을 로딩한다. 예를 들어, 로딩 샘플은 2 mM $MgCl_2$, 10 mM 내지 120 mM $CaCl_2$와 함께 10 mM 내지 50 mM 트리스-HCl 또는 10 mM 내지 50 mM 인산염을 포함하며(pH 6.5 내지 pH 7.5), 여기서 희석 샘플 전도율은 20 mS/cm 내지 40 mS/cm 범위이다. 이식 유전자 불순물 포획 크로마토그래피 수지는 당업자에게 알려져 있는 평형화 완충액, 예를 들어 0 mM 내지 2 mM $MgCl_2$, 10 mM 내지 30 mM $CaCl_2$, 10 mM 내지 70 mM NaCl을 함유하는, 10 mM 내지 50 mM 트리스 또는 10 mM 내지 50 mM 인산염을 포함하지만 이에 제한되지 않는 완충액(pH 7.2)을 이용하여 평형화된다.

[0204] 실시예 1: 바이러스 벡터에 의해 암호화된 이식 유전자 단백질

[0205] LV-FVIIIXTEN/LV-FVIII은 A형 혈우병을 치료에 사용하기 위한 바이러스 벡터의 투여 후 혈액에서 FVIIIXTEN/FVIII 단백질을 각각 발현하도록 개발된 렌티바이러스 벡터이다. LV-FVIIIXTEN/LV-FVIII 바이러스 벡터 생산 공정 동안에 생물 반응기 세포 배양액, 정화된 상층액, 정제 크로마토그래피 이후의 원료 의약품 및 정제된 완제 의약품에서 각각 FVIIIXTEN/FVIII 활성을 관찰하였다. 도 1a에 나타나 있는 바와 같은 공정에 따라 생물 반응기에서 생성되고 정제된, 정제된 외피형 바이러스 벡터는 완제 의약품 내에 유의한 수준의 단백질 불순물을 함유하는 것으로 밝혀졌다. 임의의 이론과 결부되지 않지만, 단백질 불순물은 FVIIIXTEN/FVIII 발현 카세트 상류의 CMV 프로모터에 의해 매개되는 이식 유전자 단백질의 발현으로 인해 존재할 수 있다. 도 1a에 나타나 있는 바와 작업 흐름과 같은 표준 (즉 통상적인) 하류 공정 작업 흐름을 사용하여 단백질 불순물(예를 들어, 이식 유전자 단백질 오염물질)을 효율적으로 정제할 수 없다. 기능성 바이러스 벡터 1E9 TU 당 이식 유전자 단백질의 활성은 정제 공정의 단계 전반에 걸쳐, 그리고 도 2에 나타나 있는 바와 같이 최종 생성물 샘플 전반에 걸쳐 일정한 것으로 밝혀졌다. 임의의 이론과 결부되지 않지만, 바이러스 벡터 입자를 포획하기 위해 사용된 정제 크로마토그래피 칼럼은 이식 유전자 단백질 오염물질로부터 외피형 바이러스 벡터를 분리하는 데 덜 효과적인 것으로 밝혀졌으며, 이는 이식 유전자 단백질 오염물질이 바이러스 벡터 생성물과 동시 정제되기 때문일 가능성이 있다.

[0206] 실시예 2: 정제 동안의 오염 이식 유전자 단백질 생성물의 감소

[0207] 오염 이식 유전자 단백질 생성물을 감소시키기 위해, 제2 정제 크로마토그래피 수지 또는 매질은 도 1b에 나타나 있는 바와 같이 하류 공정 작업 흐름에서 전체 바이러스 벡터 정제를 개선시키기 위해 바이러스 벡터에 의해 암호화되는 이식 유전자 단백질의 포획에 대해 조사하였다. 도 3a 및 도 3b에서, 제2 정제 크로마토그래피 칼럼을 첨가하여 실험 1 및 실험 2를 수행하였다. 칼럼 XK16/20(GE Healthcare; 카탈로그 번호: 17-5450)에 VIIISelect 수지(카탈로그 번호: 17-5450-01)를 11.5 ㎝의 층 높이까지 23 ㎖의 칼럼 부피(CV)로 충전하였다. 칼럼 및 VIIISelect 수지는 Cytiva사(미국)로부터 구매하였다. 사중 형질감염 공정을 이용하여 출발 물질을 HEK293 세포(사내), FreeStyle 293 발현(카탈로그 번호: 12338-002, Thermo Fisher Scientific) 생산 배지, 플라스미드(사내) 및 PEIpro 형질감염제(카탈로그 번호: 115-400, Polyplus Transfection)를 이용한 1회용 교반 탱크 생물 반응기를 사용하여 현탁 배양액에서 생성하였다.

[0208] 제2 정제 크로마토그래피 수지는 특이적 이식 유전자 단백질 오염물질을 포획하였으며, 바이러스 입자가 칼럼에 특이적으로 결합하지 않은 채로 크로마토그래피 칼럼을 통해 바이러스 벡터를 유동하도록 하였다. 1칼럼 공정은 이식 유전자 단백질 오염물질을 포획하기 위한 제2 크로마토그래피 수지로서 VIIISelect 친화도 수지를 수반하는 2칼럼 공정과 비교되며, 2칼럼 공정에 의해 완제 의약품 내의 FVIIIXTEN 또는 FVIII 단백질 오염물질의 수준 감소를 가능케 하는 것으로 밝혀졌다. 이식 유전자 단백질 오염물질의 수준은 LV-FVIII 샘플 내에서 20 IU/㎖에서 3 IU/㎖로 감소하고(실험 1), LV-FVIIIXTEN 샘플에서는 129 IU/㎖에서 63 IU/㎖로 감소하였다(실험 2)(도 3a). 이는 LV-FVIII 및 LV-FVIIIXTEN 바이러스 벡터 샘플 각각에서 각각 이식 유전자 단백질 오염물질의 수준이 총 약 51% 및 48% 감소한 것과 같다(도 3b). 도 3a 및 도 3b에서, VIIISelect 친화도 수지 내로의 로딩을 위한 LV-FVIII 및 LV-FVIIIXTEN 샘플을 10 mM 인산나트륨, 100 mM NaCl, 3% 수크로오스(w/v) 및 0.05% 폴록사머(w/v)(pH 7.2)에서 제형화하였다.

[0209] 실시예 3: 정제 동안의 오염 이식 유전자 단백질의 향상된 감소

[0210] 2칼럼 정제 작업 흐름에서 이식 유전자 불순물 포획을 개선시키기 위해, $CaCl_2$의 첨가는 바이러스 벡터의 정제에서의 잠재적인 개선에 대해 조사하였다. 10 mM $CaCl_2$를 포획 크로마토그래피 이전에 바이러스 벡터 샘플에 첨가하거나(+CaCl2), 첨가하지 않았으며(-CaCl2), VIIISelect 친화도 크로마토그래피 매질을 이용하여 샘플에 정제 칼럼을 가하기 전에 로드 샘플을 10분 동안 인큐베이션하였다. 제2 크로마토그래피 정제 단계에서, 칼럼 내의 450 ㎕의 VIIISelect 수지를 사용하여 친화도 크로마토그래피를 수행하였다. 칼럼을 FVIII의 경우 히스티딘(실험 3) 또는 분리용 FVIIIXTEN의 경우 인산염(실험 4)을 함유하는 제형 완충액을 이용하여 10배 부피의 수지로 평형화하였다. 실험에서, 바이러스 벡터 샘플을 500 ㎕의 얻어진 샘플을 10 mM $CaCl_2$ 존재(+CaCl2) 하에 혼합하거나, $CaCl_2$ 부재(-CaCl2) 하에 혼합하고, 칼럼에 로딩하였다. 제형 완충액을 로딩하여 10분의 접촉 시간 이후에 통과액 중의 벡터 생성물을 회수하였다.

[0211] 통과액 샘플 내의 잔류 FVIIIXTEN 또는 FVIII 활성을 발색 검정에 의해 측정하였다(상술한 재료 및 방법 참조). 도 4는 히스티딘을 함유하는 제형 완충액에서 통과액 중의 잔류 FVIIIXTEN 또는 FVIII 활성을 보여주며, 여기서 바이러스 벡터 샘플을 인산염을 함유하는 제형 완충액에서 LV-FVIII 또는 통과액과 혼합하였으며, 이때 바이러스 벡터는 LV-FVIIIXTEN이었다.

[0212] 도 4에 나타나 있는 바와 같이, 바-라벨링된 "1칼럼 공정"이 하나의 전용 벡터 정제 크로마토그래피 단계를 수반하는 하류 작업 흐름을 나타내는 반면, 바-라벨링된 "2칼럼 공정"은 2개의 전용 벡터 정제 크로마토그래피 단계를 수반하는 하류 작업 흐름을 나타낸다. 실험 3에서, FVIII 단백질 활성은 +CaCl2 조건 하에 15.1 IU/㎖에서 2.4 IU/㎖로 감소하였으며, -CaCl2 조건 하에 4.8 IU/㎖까지 감소하였다. 실험 4에서, FVIIIXTEN 단백질 활성은 +CaCl2 조건 하에 168.0 IU/㎖에서 13.4 IU/㎖로 감소하였으며, -CaCl2 조건 하에 28.0 IU/㎖까지 감소하였다. 도 4에 나타나 있는 바와 같이, 프리칼럼 샘플 내의 $CaCl_2$의 존재에 의해 바이러스 벡터 정제에서의 개선이 제공된다.

[0213] 실시예 4: 재생 모드를 사용한 오염 이식 유전자 단백질의 향상된 감소

[0214] 이식 유전자 단백질 오염물질의 감소는 재생 모드 기법을 사용하여 추가적인 감소에 대해 조사하였으며, 이때 이식 유전자 단백질 오염물질을 함유하는 샘플은 이식 유전자 불순물 포획 정제 크로마토그래피 칼럼을 여러 번 통과시켰다. 히스티딘 완충액(즉, 로드)에 존재하는 LV-FVIII 바이러스 벡터 및 FVIII 단백질 불순물을 포함하는 로드 샘플을 10 mM $CaCl_2$(+CaCl2)로 스파이킹(spiking)하고, 10분 동안 인큐베이션하고, VIIISelect 친화도

크로마토그래피 칼럼을 통과시켰다. 제조된 로드 샘플을 6분의 잔류 시간(RT)으로 칼럼을 통해 흘러보냈으며, "FT_Pass 1"로 지칭되는 칼럼의 통과액을 수집하고, 불순물 활성 또는 농도에 대해 분석하였다. 이어서, "FT_Pass 1"을 10 mM $CaCl_2$ 농도로 조절하고, 10분 동안 인큐베이션하고, 칼럼을 세정 또는 재생하지 않고 동일한 칼럼에 다시 로딩하였다. 제2 통과의 통과액을 "FT_Pass 2"로 지칭한다. 유사하게, FT_Pass 2 로드 샘플을 이전 통과와 유사한 방식으로 $CaCl_2$ 농도의 조절 및 인큐베이션 시간 이후에 칼럼을 3번째로 통과시켰다. 제3 통과의 통과액을 "FT_Pass 3"으로서 수집하였다. 로드, FT_Pass 1, FT_Pass 2 및 FT_Pass 3 샘플을 사용하여 불순물 활성의 함량을 결정하였다. 도 5에 나타나 있는 바와 같이, 이식 유전자 불순물 포획 크로마토그래피에 의해 정제될 샘플에 존재하는 총 활성량은 98 IU인 것으로 밝혀졌다. 이러한 활성은 수회의 사이클 이후에 52 IU(FT_Pass 1), 42 IU(FT_Pass 2) 및 10 IU(FT_Pass 3)로 감소하였다. 오염 FVIII 단백질의 활성량에서의 전체 감소는 3회 사이클 이후에 90%인 것으로 밝혀졌다.

[0215] 실시예 5: 부형제의 부재 시의 트리스 완충액 시스템을 사용한 정제 동안의 오염 이식 유전자 단백질의 감소

[0216] 벡터의 정제는 개선된 하류 작업 흐름도(예를 들어, 도 1b, 도 6a 및 도 6b에 나타나 있는 바와 같음)에서 제2 크로마토그래피 정제 단계를 사용하여 오염 이식 유전자 단백질의 추가적인 제거에 대해 조사하였다. 개선된 흐름도에서, 벡터 생성물에 오염 이식 유전자 단백질 불순물의 제거를 위해 특별히 설계된 크로마토그래피 매질을 가한다. 본 발명의 개선된 하류 작업 흐름도에서, 오염 이식 유전자 단백질 불순물의 제거 단계는 제2 크로마토그래피 정제 단계(도 6a에 나타나 있는 바와 같음)일 수 있거나, 이는 제1 크로마토그래피 단계(도 6b에 나타나 있는 바와 같음)일 수 있다.

[0217] 도 7은 제2 크로마토그래피 정제의 정제 효율에 대한 로딩 샘플 내의 염의 농도의 영향을 보여주며, 여기서 제2 크로마토그래피 정제는 VIIISelect 수지의 사용을 포함한다. 본 실험에서, 음이온 교환(AEX) 칼럼을 사용한 제1 크로마토그래피 정제를 수행하였으며, 벡터 생성물을 400 mM NaCl을 함유하는 완충액을 사용하여 AEX 칼럼으로부터 용출하였다. 이어서, AEX 용출액(즉, VIIISelect 수지를 포함하는 제2 크로마토그래피 정제를 위한 로드 샘플)을 400 mM NaCl(실험 5) 또는 100 mM NaCl(실험 6)의 염 농도를 갖도록 조절하였다. 실험 5에서, 조절된 로드 샘플은 트리스-HCl 완충액(pH 7.2) 중에 400 mM NaCl, 2.5 mM $CaCl_2$ 및 2.0 mM $MgCl_2$를 함유하고 있었다. 실험 6에서, 로드 샘플은 트리스-HCl 완충액(pH 7.2) 중에 100 mM NaCl, 2.5 mM $CaCl_2$ 및 2.0 mM $MgCl_2$를 함유하고 있었다.

[0218] 도 7a는 VIIISelect 정제 단계 이전(흑색 바; "VIIISelect Load") 및 이후(회색 바; "VIIISelect 생성물")에 검출된, 회수된 총 기능성 렌티바이러스 벡터의 함수로서 FVIIIXTEN의 수준을 보여준다. VIIISelect 로드 샘플의 조절은 상술한 실험 5 및 실험 6에 따라 수행되었다. 도 7a에 나타나 있는 바와 같이, 400 mM NaCl을 함유하는 로드 샘플을 사용하여 VIIISelect 정제 단계를 수행하는 경우(실험 5), VIIISelect 정제 단계에 의해 194.6 IU/1E9 형질도입 단위(TU)에서 15.3 IU/1E9 TU로의 FVIIIXTEN 활성의 감소가 초래되었으며, 이는 FVIIIXTEN 오염 이식 유전자 단백질의 92% 감소를 나타낸다. 이와 비교하여, 100 mM NaCl을 함유하는 로드 샘플을 사용하여 VIIISelect 정제 단계를 수행하는 경우(실험 5), VIIISelect 정제 단계에 의해 127.6 IU/1E9 TU에서 64 IU/1E9 TU로의 FVIIIXTEN 활성의 감소가 초래되었으며, 이는 FVIIIXTEN 오염 이식 유전자 단백질의 50% 감소를 나타낸다. 트리스 완충 로드 샘플을 사용하여 오염 FVIIIXTEN의 제거에서의 2배 가까운 개선은 로드 샘플을 100 mM NaCl(실험 6)과 비교하여 400 mM NaCl(실험 5)로 조절하는 경우에 달성되었다.

[0219] 도 7b는 총 렌티바이러스 입자 개수(IU/1E6 ng P24)의 함수로서 측정된 FVIIIXTEN 수준으로 로드 샘플을 400 mM NaCl(실험 5) 또는 100 mM NaCl(실험 6)로 조절한 결과를 보여준다. 도 7b에 나타나 있는 바와 같이, 400 mM NaCl을 함유하는 로드 샘플을 사용하여 VIIISelect 정제 단계를 수행하는 경우(실험 5), VIIISelect 정제 단계에 의해 167.9 IU/1E6 ng P24에서 16.3 IU/1E6 ng P24로의 FVIIIXTEN 활성의 감소가 초래되었으며, 이는 FVIIIXTEN 오염 이식 유전자 단백질의 90% 감소를 나타낸다. 이와 비교하여, 100 mM NaCl을 함유하는 로드 샘플을 사용하여 VIIISelect 정제 단계를 수행하는 경우(실험 5), VIIISelect 정제 단계에 의해 125.6 IU/1E6 ng P24에서 75.8 IU/1E6 ng P24로의 FVIIIXTEN 활성의 감소가 초래되었으며, 이는 FVIIIXTEN 오염 이식 유전자 단백질의 40% 감소를 나타낸다.

[0220] 실시예 6: 부형제의 존재 시 인산 완충액 시스템을 사용한 정제 동안의 오염 이식 유전자 단백질의 감소

[0221] FVIIIXTEN 오염 이식 유전자 단백질의 감소에 대해 VIIISelect 수지를 사용한 제2 크로마토그래피 정제 단계의 정제 효율을 부형제를 함유하는 인산 완충액 시스템을 사용하여 조사하였다. 본 실험에서, 로드 샘플을 10 mM 인산나트륨, 수크로오스(3%(w/v)) 및 폴록사머(0.05%(w/v))뿐만 아니라 400 mM NaCl 및 1mM $CaCl_2$를 함유하도록

조절하였다. 도 8에 나타나 있는 바와 같이, 검출된 FVIIIXTEN의 총 활성은 정제 전 1768 IU에서 정제 후 423 IU로 감소하였으며, 이는 샘플을 VIIISelect 칼럼에서 10분의 잔류 시간 동안 배양하도록 하는 경우에 1회 통과 시 FVIIIXTEN 오염 이식 유전자 단백질의 76% 감소를 나타낸다. 400 mM NaCl 인산 완충 로드의 기능성 벡터 회수와 관련하여, 검출된 FVIIIXTEN 활성은 정제 전 324 IU/1E9 TU에서 정제 후 86 IU/1E9 TU로 감소하였으며, 이는 불순물 수준에서의 73% 감소를 나타내고; 총 렌티바이러스 입자 개수의 함수로서 검출된 FVIIIXTEN 활성은 정제 전 766 IU/1E6 ng P24에서 정제 후 199 IU/1E6 ng P24로 감소하였으며, 이는 불순물 수준에서의 74% 감소를 나타낸다.

[0222] 100 mM NaCl을 함유하는 동일한 인산 완충 로드 샘플을 사용한 실시예 2의 실험 2(도 3a 및 도 3b 참조)(어떠한 NaCl 농도 조절도 수행하지 않음)에서, 2칼럼 공정에 의해서만 FVIIIXTEN 활성의 51% 감소가 초래되었다. 이와 비교하여, 본 실험에서 인산 완충 로드 샘플을 400 mM NaCl로 조절하면 FVIIIXTEN 활성에서의 70% 초과의 감소가 관찰되었으며, 이는 FVIIIXTEN 오염 이식 유전자 단백질 수준에서 감소에 대한 유의한 향상을 나타낸다.

[0223] **실시예 7: 200 mM 내지 600 mM의 염 농도에서의 트리스 및 인산 완충액을 사용한 정제 동안의 오염 이식 유전자 단백질의 감소**

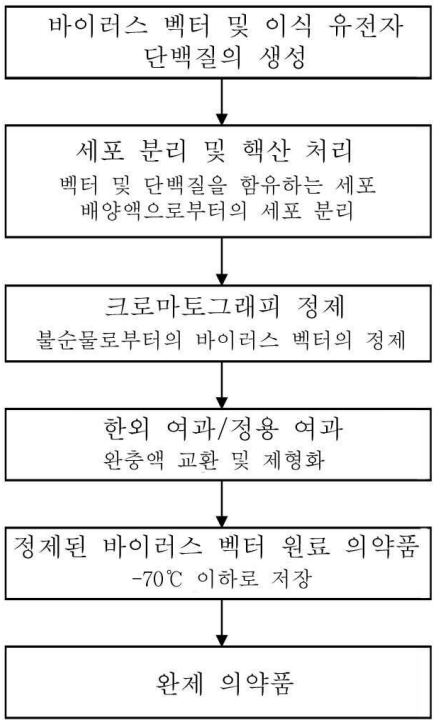
[0224] 개선된 하류 작업 흐름도에서 크로마토그래피 정제 단계(예를 들어, 도 1b, 도 6a 및 도 6b에 나타나 있는 바와 같음)를 이용하여 오염 이식 유전자 단백질을 제거하기 위해 벡터의 정제를 조사하였다. 개선된 흐름도에서, 벡터 생성물에는 다양한 염 농도를 함유하는 트리스 또는 인산 완충액 중 하나에 존재하는 오염 이식 유전자 단백질 불순물을 제거하기 위해 특이적으로 설계된 크로마토그래피 매질이 가해진다. 오염 이식 유전자 단백질 불순물의 제거 단계는 본 발명의 개선된 하류 작업 흐름도에서 제2 크로마토그래피 정제 단계(도 6a에 나타나 있는 바와 같음)일 수 있거나, 이는 제1 크로마토그래피 단계(도 6b 나타나 있는 바와 같음)일 수 있다.

[0225] 도 9는 제2 크로마토그래피 정제 단계의 정제 효율에 대한 로딩 샘플 내의 염의 농도의 영향을 보여주며, 여기서 제2 크로마토그래피 정제 단계는 VIIISelect 수지의 사용을 포함한다. 본 실험에서, 음이온 교환(AEX) 칼럼을 이용한 제1 크로마토그래피 정제 단계를 수행하였으며, 트리스 또는 인산염 중 하나를 포함하고 200 mM 내지 600 mM의 총 염 농도를 포함하는 용출 완충액을 사용하여 AEX 칼럼으로부터 벡터 생성물을 용출하였다. AEX 용출액(즉, VIIISelect 수지를 포함하는 제2 크로마토그래피 정제를 위한 로드 샘플)은 AEX 풀 염 농도가 600 mM 미만이면 조절이 필요하지 않았지만, AEX 풀 염 농도가 600 mM NaCl 초과이면 조절이 필요하였다. 조절된 로드 샘플은 트리스-HCl 완충액(pH 7.2 + 0.3) 중에 200 mM 내지 600 mM 범위의 NaCl, 2.0 mM $MgCl_2$를 함유하거나; 인산 완충액(pH 7.2 + 0.3) 중에 200 mM 내지 600 mM 범위의 NaCl, 2.0 mM $MgCl_2$를 함유하고 있었다. 이어서, 조절된 로드 샘플을 제2 크로마토그래피 수지에 적용하여 단백질 불순물과 결합하고 정제된 벡터 생성물로서 외피형 벡터가 이를 통과하도록 하였다.

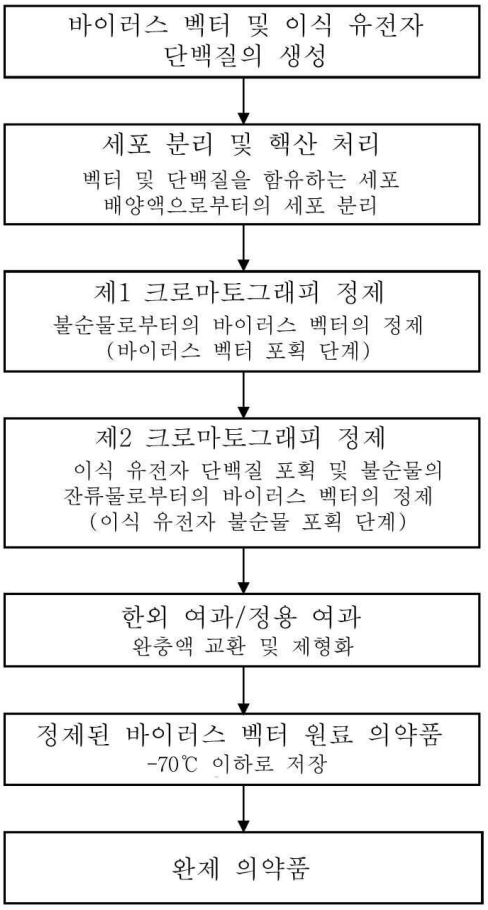
[0226] 도 9에 나타나 있는 바와 같이, FVIII 단백질 활성량은 10 IU 초과의 활성 값에서 1 IU 미만으로 떨어졌으며, 이는 오염 이식 유전자 활성에서의 적어도 10배 감소를 보여주는 반면, 활성 검정의 정량 한계 미만(LoQ 미만)으로 벡터 생성물 샘플에서의 단백질 불순물 활성 값을 감소시킨다. 따라서, 샘플로부터의 이식 유전자 단백질 불순물의 제거는 VIIISelect 크로마토그래피 단계에서 트리스 완충액(솔리드 흑백 바를 선형 흑색 바와 비교함) 또는 인산 완충액(솔리드 회색 바를 선형 회색 바와 비교함)이 로딩 완충액으로서 사용되는지 여부와는 무관하게 90% 초과로 달성되었다. 또한, 오염 이식 유전자 생성물의 제거는 완충종(buffer species) 및 염 농도와 무관하게 일관되게 달성되었다. 따라서, 이들 실험에서는 기능성 외피형 바이러스 벡터의 유의한 손실 없이 이식 유전자 오염물질을 제거하기 위한 개선된 정제 공정의 유효성이 증명되며, 개선된 정제 공정에서의 다양한 완충종 및 염 농도의 일반적인 적합성이 증명된다.

도면

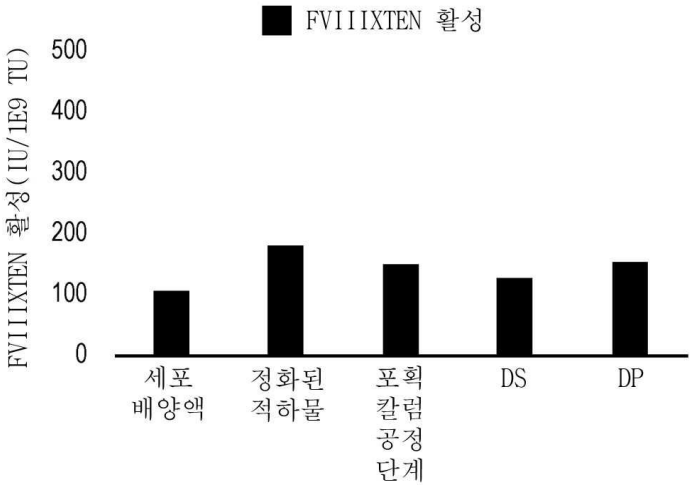
도면1a


바이러스 벡터 및 이식 유전자 단백질의 생성
세포 분리 및 핵산 처리
벡터 및 단백질을 함유하는 세포 배양액으로부터의 세포 분리
크로마토그래피 정제
불순물로부터의 바이러스 벡터의 정제
한외 여과/정용 여과
완충액 교환 및 제형화
정제된 바이러스 벡터 원료 의약품
-70℃ 이하로 저장
완제 의약품

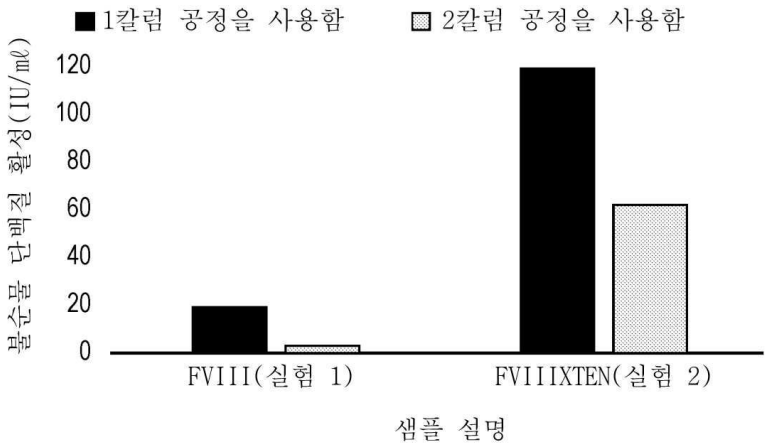
도면1b


바이러스 벡터 및 이식 유전자 단백질의 생성
세포 분리 및 핵산 처리
벡터 및 단백질을 함유하는 세포 배양액으로부터의 세포 분리
제1 크로마토그래피 정제
불순물로부터의 바이러스 벡터의 정제 (바이러스 벡터 포획 단계)
제2 크로마토그래피 정제
이식 유전자 단백질 포획 및 불순물의 잔류물로부터의 바이러스 벡터의 정제 (이식 유전자 불순물 포획 단계)
한외 여과/정용 여과
완충액 교환 및 제형화
정제된 바이러스 벡터 원료 의약품
-70℃ 이하로 저장
완제 의약품

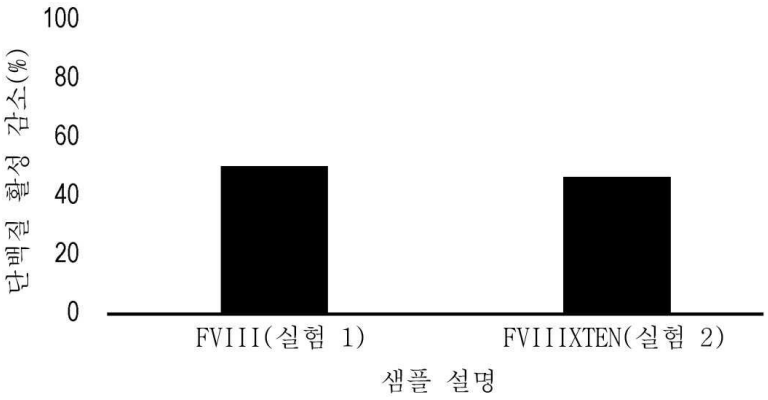
도면2


FVIIIXTEN 활성
FVIIIXTEN 활성(IU/1E9 TU)
500
400
300
200
100
0
세포 배양액
정화된 적하물
포획 칼럼 공정 단계
DS
DP

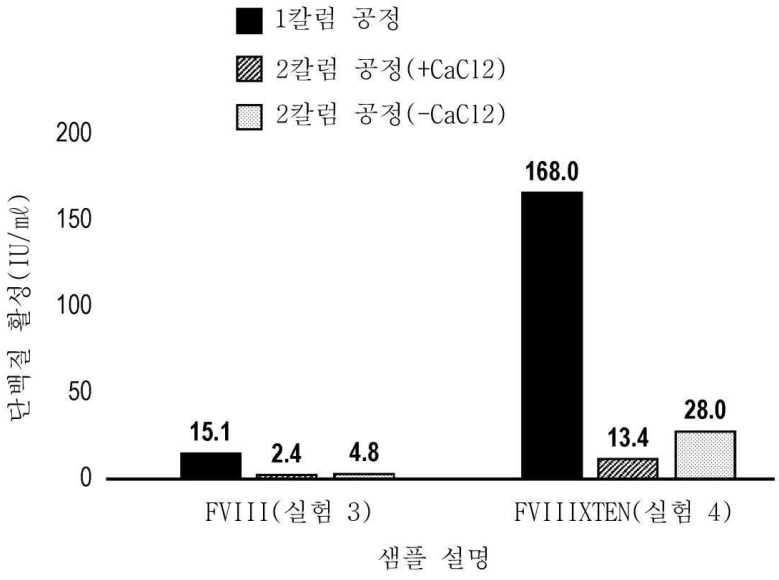
도면3a



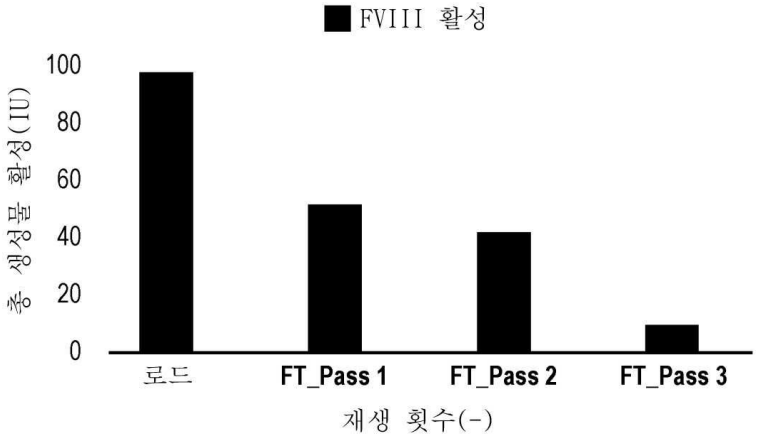
도면3b



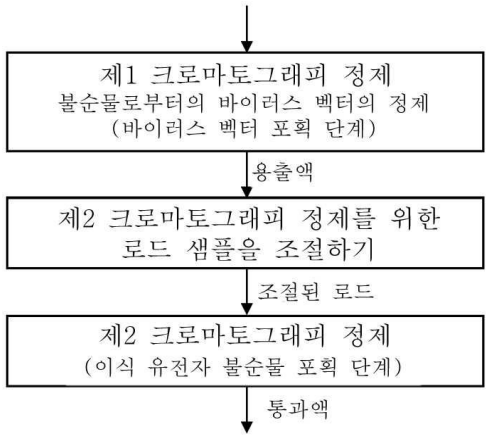
도면4



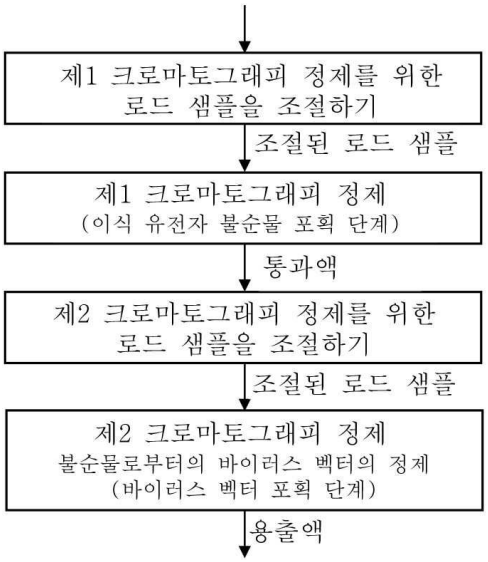
도면5



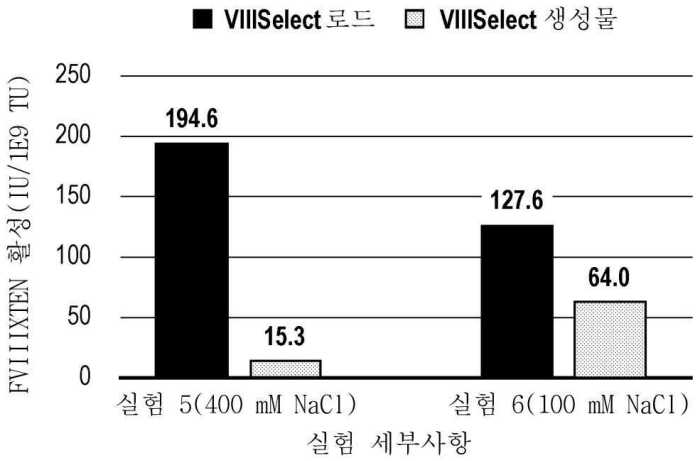
도면6a



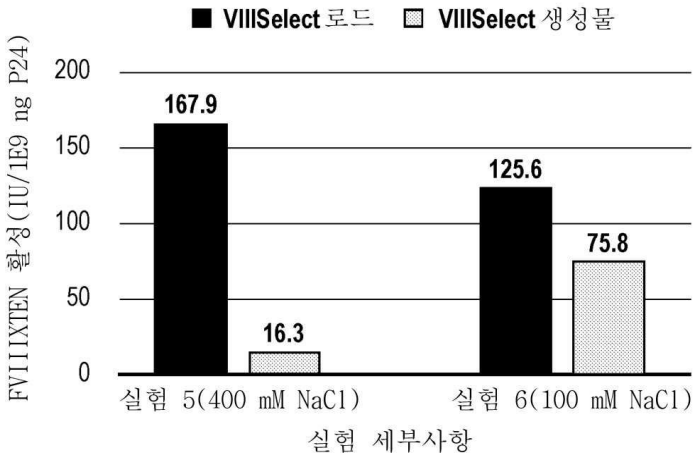
도면6b



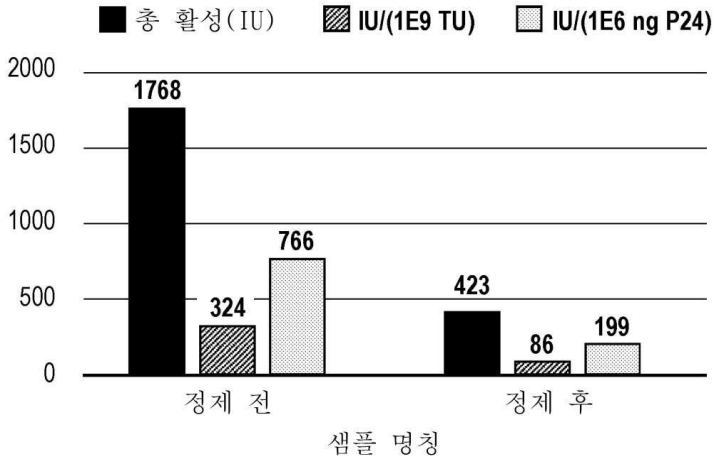
도면7a



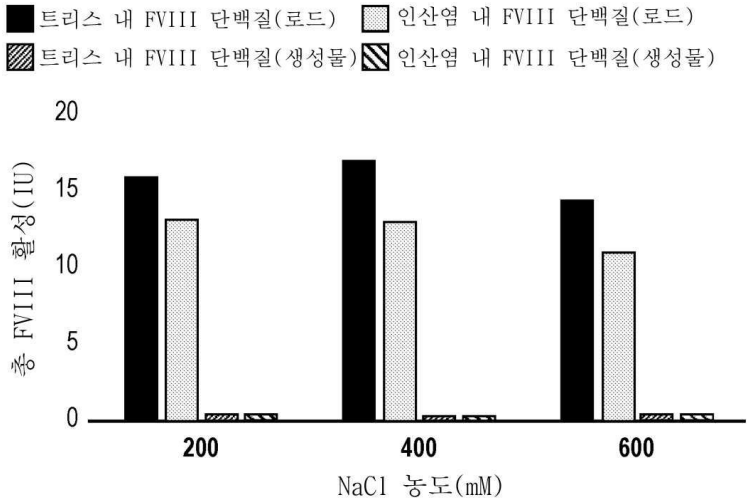
도면7b



도면8



도면9



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> BIOVERATIV THERAPEUTICS INC.

ISMAIL, AYMAN

LIU, TONGYAO

MAYANI, MUKESH

<120> METHODS FOR THE PURIFICATION OF VIRAL VECTORS

<130> 718206: SA9-477PC

<140> PCT/US2021/038871

<141> 2021-06-24

<150> 63/062,120

<151> 2020-08-06

<150> 63/043,697

<151> 2020-06-24

<160> 7

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 4371

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide"

<400> 1

atgcagattg agctgtccac ttgtttcttc ctgtgcctcc tgcgcttctg tttctccgcc 60

actcgccggt actaccttgg agccgtggag ctttcatggg actacatgca gagcgacctg 120

ggcgaactcc ccgtggatgc cagattcccc ccccgcgtgc caaagtcctt ccccctttaac 180

acctccgtgg tgtacaagaa aaccctcttt gtcgagttca ctgaccacct gttcaacatc 240

gccaagccgc gcccaccttg gatgggcctc ctgggaccga ccattcaagc tgaagtgtac 300

gacaccgtgg tgatcaccct gaagaacatg gcgtcccacc ccgtgtccct gcatgcggtc 360

ggagtgtcct actggaaggc ctccgaagga gctgagtacg acgaccagac tagccagcgg 420

gaaaaggagg acgataaagt gttcccgggc ggctcgcata cttacgtgtg gcaagtcctg 480

aaggaaaacg gacctatggc atccgatcct ctgtgcctga cttactccta cctttcccat 540

gtggacctcg tgaaggacct gaacagcggg ctgattggtg cacttctcgt gtgccgcgaa 600

ggttcgctcg ctaaggaaaa gacccagacc ctccataagt tcatcctttt gttcgctgtg 660

ttcgatgaag gaaagtcatg gcattccgaa actaagaact cgctgatgca ggaccgggat 720

gccgcctcag cccgcgcctg gcctaaaatg catacagtca acggatacgt gaatcggtca 780

ctgcccgggc tcatcggttg tcacagaaag tccgtgtact ggcacgtcat cggcatgggc 840

actacgcctg aagtgcactc catcttcctg gaagggcaca ccttcctcgt gcgcaaccac 900

cgccaggcct ctctggaaat ctccccgatt acctttctga ccgcccagac tctgctcatg 960

gacctggggc agttccttct cttctgccac atctccagcc atcagcacga cggaatggag 1020

gcctacgtga aggtggactc atgcccggaa gaacctcagt tgcggatgaa gaacaacgag 1080

gaggccgagg actatgacga cgatttgact gactccgaga tggacgtcgt gcggttcgat 1140

gacgacaaca gccccagctt catccagatt cgcagcgtgg ccaagaagca ccccaaaacc 1200

tgggtgcact acatcgcggc cgaggaagaa gattgggact acgccccgtt ggtgctggca 1260

cccgatgacc ggtcgtacaa gtcccagtat ctgaacaatg gtccgcagcg gattggcaga 1320

aagtacaaga aagtgcggtt catggcgtac actgacgaaa cgtttaagac ccgggaggcc 1380

attcaacatg agagcggcat tctgggacca ctgctgtacg gagaggtcgg cgataccctg 1440

ctcatcatct tcaaaaacca ggcctcccgg ccttacaaca tctaccctca cggaatcacc 1500

gacgtgcggc cactctactc gcggcgcctg ccgaagggcg tcaagcacct gaaagacttc 1560

cctatcctgc cgggcgaaat cttcaagtat aagtggaccg tcaccgtgga ggacgggccc 1620

accaagagcg atcctaggtg tctgactcgg tactactcca gcttcgtgaa catggaacgg 1680

gacctggcat cgggactcat tggaccgctg ctgatctgct acaaagagtc ggtggatcaa 1740

cgcggcaacc agatcatgtc cgacaagcgc aacgtgatcc tgttctccgt gtttgatgaa 1800

aacagatcct ggtacctcac tgaaaacatc cagaggttcc tcccaaaccc cgcaggagtg 1860

caactggagg accctgagtt tcaggcctcg aatatcatgc actcgattaa cggttacgtg 1920

ttcgactcgc tgcagctgag cgtgtgcctc catgaagtcg cttactggta cattctgtcc 1980

atcggcgccc agactgactt cctgagcgtg ttcttttccg gttacacctt taagcacaag 2040

atggtgtacg aagataccct gaccctgttc cctttctccg gcgaaacggt gttcatgtcg 2100

atggagaacc cgggtctgtg gattctggga tgccacaaca gcgactttcg gaaccgcgga 2160

atgactgccc tgctgaaggt gtcctcatgc gacaagaaca ccggagacta ctacgaggac 2220

tcctacgagg atatctcagc ctacctcctg tccaagaaca acgcgatcga gccgcgcagc 2280

ttcagccaga acccgcctgt gctgaagagg caccagcgag aaattacccg gaccaccctc 2340

caatcggatc aggaggaaat cgactacgac gacaccatct cggtggaaat gaagaaggaa 2400

gatttcgata tctacgacga ggacgaaaat cagtcccctc gctcattcca aaagaaaact 2460

agacactact ttatcgccgc ggtggaaaga ctgtgggact atggaatgtc atccagccct 2520

cacgtccttc ggaaccgggc ccagagcgga tcggtgcctc agttcaagaa agtggtgttc 2580

caggagttca ccgacggcag cttcacccag ccgctgtacc ggggagaact gaacgaacac 2640

ctgggcctgc tcggtcccta catccgcgcg gaagtggagg ataacatcat ggtgaccttc 2700

cgtaaccaag catccagacc ttactccttc tattcctccc tgatctcata cgaggaggac 2760

cagcgccaag gcgccgagcc ccgcaagaac ttcgtcaagc ccaacgagac taagacctac 2820

ttctggaagg tccaacacca tatggccccg accaaggatg agtttgactg caaggcctgg 2880

gcctacttct ccgacgtgga ccttgagaag gatgtccatt ccggcctgat cgggccgctg 2940

ctcgtgtgtc acaccaacac cctgaaccca gcgcatggac gccaggtcac cgtccaggag 3000

tttgctctgt tcttcaccat ttttgacgaa actaagtcct ggtacttcac cgagaatatg 3060

gagcgaaact gtagagcgcc ctgcaatatc cagatggaag atccgacttt caaggagaac 3120

tatagattcc acgccatcaa cgggtacatc atggatactc tgccggggct ggtcatggcc 3180

caggatcaga ggattcggtg gtacttgctg tcaatgggat cgaacgaaaa cattcactcc 3240

attcacttct ccggtcacgt gttcactgtg cgcaagaagg aggagtacaa gatggcgctg 3300

tacaatctgt accccggggt gttcgaaact gtggagatgc tgccgtccaa ggccggcatc 3360

tggagagtgg agtgcctgat cggagagcac ctccacgcgg ggatgtccac cctcttcctg 3420

gtgtactcga ataagtgcca gaccccgctg ggcatggcct cgggccacat cagagacttc 3480

cagatcacag caagcggaca atacggccaa tgggcgccga agctggcccg cttgcactac 3540

tccggatcga tcaacgcatg gtccaccaag gaaccgttct cgtggattaa ggtggacctc 3600

ctggccccta tgattatcca cggaattaag acccagggcg ccaggcagaa gttctcctcc 3660

ctgtacatct cgcaattcat catcatgtac agcctggacg ggaagaagtg gcagacttac 3720

aggggaaact ccaccggcac cctgatggtc tttttcggca acgtggattc ctccggcatt 3780

aagcacaaca tcttcaaccc accgatcata gccagatata ttaggctcca ccccactcac 3840

tactcaatcc gctcaactct tcggatggaa ctcatggggt gcgacctgaa ctcctgctcc 3900

atgccgttgg ggatggaatc aaaggctatt agcgacgccc agatcaccgc gagctcctac 3960

ttcactaaca tgttcgccac ctggagcccc tccaaggcca ggctgcactt gcagggacgg 4020

tcaaatgcct ggcggccgca agtgaacaat ccgaaggaat ggcttcaagt ggatttccaa 4080

aagaccatga aagtgaccgg agtcaccacc cagggagtga agtcccttct gacctcgatg 4140

tatgtgaagg agttcctgat tagcagcagc caggacgggc accagtggac cctgttcttc 4200

caaaacggaa aggtcaaggt gttccagggg aaccaggact cgttcacacc cgtggtgaac 4260

tccctggacc ccccactgct gacgcggtac ttgaggattc atcctcagtc ctgggtccat 4320

cagattgcat tgcgaatgga agtcctgggc tgcgaggccc aggacctgta c 4371

<210> 2

<211> 4812

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 2

atgcagattg agctgtccac ttgtttcttc ctgtgcctcc tgcgcttctg tttctccgcc 60

actcgccggt actaccttgg agccgtggag ctttcatggg actacatgca gagcgacctg 120

ggcgaactcc ccgtggatgc cagattcccc ccccgcgtgc caaagtcctt ccccttaac 180

acctccgtgg tgtacaagaa aaccctcttt gtcgagttca ctgaccacct gttcaacatc 240

gccaagccgc gcccaccttg gatgggcctc ctgggaccga ccattcaagc tgaagtgtac 300

gacaccgtgg tgatcaccct gaagaacatg gcgtcccacc ccgtgtccct gcatgcggtc 360

ggagtgtcct actggaaggc ctccgaagga gctgagtacg acgaccagac tagccagcgg 420

gaaaaggagg acgataaagt gttcccgggc ggctcgcata cttacgtgtg gcaagtcctg 480

aaggaaaacg gacctatggc atccgatcct ctgtgcctga cttactccta cctttcccat 540

gtggacctcg tgaaggacct gaacagcggg ctgattggtg cacttctcgt gtgccgcgaa 600

ggttcgctcg ctaaggaaaa gacccagacc ctccataagt tcatcctttt gttcgctgtg 660

ttcgatgaag gaaagtcatg gcattccgaa actaagaact cgctgatgca ggaccgggat 720

gccgcctcag cccgcgcctg gcctaaaatg catacagtca acggatacgt gaatcggtca 780

ctgcccgggc tcatcggttg tcacagaaag tccgtgtact ggcacgtcat cggcatgggc 840

actacgcctg aagtgcactc catcttcctg gaagggcaca ccttcctcgt gcgcaaccac 900

cgccaggcct ctctggaaat ctccccgatt acctttctga ccgcccagac tctgctcatg 960

gacctggggc agttccttct cttctgccac atctccagcc atcagcacga cggaatggag 1020

gcctacgtga aggtggactc atgcccggaa gaacctcagt tgcggatgaa gaacaacgag 1080

gaggccgagg actatgacga cgatttgact gactccgaga tggacgtcgt gcggttcgat 1140

gacgacaaca gccccagctt catccagatt cgcagcgtgg ccaagaagca ccccaaaacc 1200

tgggtgcact acatcgcggc cgaggaagaa gattgggact acgccccgtt ggtgctggca 1260

cccgatgacc ggtcgtacaa gtcccagtat ctgaacaatg gtccgcagcg gattggcaga 1320

aagtacaaga aagtgcggtt catggcgtac actgacgaaa cgtttaagac ccgggaggcc 1380

attcaacatg agagcggcat tctgggacca ctgctgtacg gagaggtcgg cgataccctg 1440

ctcatcatct tcaaaaacca ggcctcccgg ccttacaaca tctaccctca cggaatcacc 1500

gacgtgcggc cactctactc gcggcgcctg ccgaagggcg tcaagcacct gaaagacttc 1560

cctatcctgc cgggcgaaat cttcaagtat aagtggaccg tcaccgtgga ggacgggccc 1620

accaagagcg atcctaggtg tctgactcgg tactactcca gcttcgtgaa catggaacgg 1680

gacctggcat cgggactcat tggaccgctg ctgatctgct acaaagagtc ggtggatcaa 1740

cgcggcaacc agatcatgtc cgacaagcgc aacgtgatcc tgttctccgt gtttgatgaa 1800

aacagatcct ggtacctcac tgaaaacatc cagaggttcc tcccaaaccc cgcaggagtg 1860

caactggagg accctgagtt tcaggcctcg aatatcatgc actcgattaa cggttacgtg 1920

ttcgactcgc tgcagctgag cgtgtgcctc catgaagtcg cttactggta cattctgtcc 1980

atcggcgccc agactgactt cctgagcgtg ttcttttccg gttacacctt taagcacaag 2040

atggtgtacg aagataccct gaccctgttc cctttctccg gcgaaacggt gttcatgtcg 2100

atggagaacc cgggtctgtg gattctggga tgccacaaca gcgactttcg gaaccgcgga 2160

atgactgccc tgctgaaggt gtcctcatgc gacaagaaca ccggagacta ctacgaggac 2220

tcctacgagg atatctcagc ctacctcctg tccaagaaca acgcgatcga gccgcgcagc 2280

ttcagccaga acacatcaga gagcgccacc cctgaaagtg gtcccgggag cgagccagcc 2340

acatctgggt cggaaacgcc aggcacaagt gagtctgcaa ctcccgagtc cggacctggc 2400

tccgagcctg ccactagcgg ctccgagact ccgggaactt ccgagagcgc tacaccagaa 2460

agcggacccg gaaccagtac cgaacctagc gagggctctg ctccgggcag cccagccggc 2520

tctcctacat ccacggagga gggcacttcc gaatccgcca ccccggagtc agggccagga 2580

tctgaacccg ctacctcagg cagtgagacg ccaggaacga gcgagtccgc tacaccggag 2640

agtgggccag ggagccctgc tggatctcct acgtccactg aggaagggtc accagcgggc 2700

tcgcccacca gcactgaaga aggtgcctcg agcccgcctg tgctgaagag gcaccagcga 2760

gaaattaccc ggaccaccct ccaatcggat caggaggaaa tcgactacga cgacaccatc 2820

tcggtggaaa tgaagaagga agatttcgat atctacgacg aggacgaaaa tcagtcccct 2880

cgctcattcc aaaagaaaac tagacactac tttatcgccg cggtggaaag actgtgggac 2940

tatggaatgt catccagccc tcacgtcctt cggaaccggg cccagagcgg atcggtgcct 3000

cagttcaaga aagtggtgtt ccaggagttc accgacggca gcttcaccca gccgctgtac 3060

cggggagaac tgaacgaaca cctgggcctg ctcggtccct acatccgcgc ggaagtggag 3120

gataacatca tggtgacctt ccgtaaccaa gcatccagac cttactcctt ctattcctcc 3180

ctgatctcat acgaggagga ccagcgccaa ggcgccgagc cccgcaagaa cttcgtcaag 3240

cccaacgaga ctaagaccta cttctggaag gtccaacacc atatggcccc gaccaaggat 3300

gagtttgact gcaaggcctg ggcctacttc tccgacgtgg accttgagaa ggatgtccat 3360

tccggcctga tcgggccgct gctcgtgtgt cacaccaaca ccctgaaccc agcgcatgga 3420

cgccaggtca ccgtccagga gtttgctctg ttcttcacca tttttgacga aactaagtcc 3480

tggtacttca ccgagaatat ggagcgaaac tgtagagcgc cctgcaatat ccagatggaa 3540

gatccgactt tcaaggagaa ctatagattc cacgccatca acgggtacat catggatact 3600

ctgccggggc tggtcatggc ccaggatcag aggattcggt ggtacttgct gtcaatggga 3660

tcgaacgaaa acattcactc cattcacttc tccggtcacg tgttcactgt gcgcaagaag 3720

gaggagtaca agatggcgct gtacaatctg taccccgggg tgttcgaaac tgtggagatg 3780

ctgccgtcca aggccggcat ctggagagtg gagtgcctga tcggagagca cctccacgcg 3840

gggatgtcca ccctcttcct ggtgtactcg aataagtgcc agaccccgct gggcatggcc 3900

tcgggccaca tcagagactt ccagatcaca gcaagcggac aatacggcca atgggcgccg 3960

aagctggccc gcttgcacta ctccggatcg atcaacgcat ggtccaccaa ggaaccgttc 4020

tcgtggatta aggtggacct cctggcccct atgattatcc acggaattaa gacccagggc 4080

gccaggcaga agttctcctc cctgtacatc tcgcaattca tcatcatgta cagcctggac 4140

gggaagaagt ggcagactta caggggaaac tccaccggca ccctgatggt ctttttcggc 4200

aacgtggatt cctccggcat taagcacaac atcttcaacc caccgatcat agccagatat 4260

attaggctcc accccactca ctactcaatc cgctcaactc ttcggatgga actcatgggg 4320

tgcgacctga actcctgctc catgccgttg gggatggaat caaaggctat tagcgacgcc 4380
cagatcaccg cgagctccta cttcactaac atgttcgcca cctggagccc ctccaaggcc 4440
aggctgcact tgcagggacg gtcaaatgcc tggcggccgc aagtgaacaa tccgaaggaa 4500
tggcttcaag tggatttcca aaagaccatg aaagtgaccg gagtcaccac ccagggagtg 4560
aagtcccttc tgacctcgat gtatgtgaag gagttcctga ttagcagcag ccaggacggg 4620
caccagtgga ccctgttctt ccaaaacgga aaggtcaagg tgttccaggg gaaccaggac 4680
tcgttcacac ccgtggtgaa ctccctggac cccccactgc tgacgcggta cttgaggatt 4740

catcctcagt cctgggtcca tcagattgca ttgcgaatgg aagtcctggg ctgcgaggcc 4800
caggacctgt ac 4812

<210> 3
<211> 1383
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"
<400> 3

atgcagagag tcaacatgat tatggctgag tcacctgggc tgattactat ttgcctgctg 60
ggctacctgc tgtccgccga gtgtaccgtg ttcctggacc atgagaacgc aaataagatc 120
ctgaacaggc ccaaaagata caatagtggg aagctggagg aatttgtgca gggcaacctg 180

gagagagaat gcatggagga aaagtgtagc ttcgaggaag cccgcgaggt gtttgaaaat 240
acagagcgaa ccacagagtt ctggaagcag tatgtggacg gcgatcagtg cgagagcaac 300
ccctgtctga atggcggaag ttgcaaagac gatatcaact catacgaatg ctggtgtcct 360
ttcgggtttg aaggcaaaaa ttgcgagctg gacgtgacat gtaacattaa gaatggacgg 420
tgcgagcagt tttgtaaaaa ctctgccgat aataaggtgg tgtgcagctg tactgaagga 480
tatcgcctgg ctgagaacca gaagtcctgc gaaccagcag tgcccttccc ttgtgggagg 540
gtgagcgtct cccagacttc aaaactgacc agagcagaga cagtgtttcc cgacgtggat 600

tacgtcaaca gcactgaggc cgaaaccatc ctggacaaca ttactcagtc tacccagagt 660
ttcaatgact ttactcgggt ggtcgggggc gaggatgcta aaccaggcca gttcccctgg 720
caggtggtcc tgaacggaaa ggtggatgca ttttgcggag ggtctatcgt gaatgagaaa 780

tggattgtca ccgccgctca ctgcgtggaa accggagtca agatcacagt ggtcgctggg 840

gagcacaaca ttgaggaaac agaacatact gagcagaagc ggaatgtgat ccgcatcatt 900

cctcaccata actacaatgc agccatcaac aaatacaatc atgacattgc cctgctggaa 960

ctggatgagc ctctggtgct gaacagctac gtcactccaa tctgcattgc tgacaaagag 1020

tataccaata tcttcctgaa gtttggatca gggtacgtga gcggctgggg aagagtcttc 1080

cacaagggca ggagcgccct ggtgctccag tatctgcgag tgcctctggt cgatcgagct 1140

acctgtctgc tctctaccaa gtttacaatc tacaacaaca tgttctgcgc tgggtttcac 1200

gagggaggac gagactcctg tcagggcgat tctgggggcc cacatgtgac agaggtcgaa 1260

ggcaccagct tcctgactgg catcatttcc tggggagagg aatgtgcaat gaagggaaaa 1320

tacgggatct acaccaaagt gagccgctat gtgaactgga tcaaggaaaa aaccaaactg 1380

acc 1383

<210> 4

<211> 2332

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser Trp Asp Tyr

1 5 10 15

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

20 25 30

Arg Val Pro Lys Ser Phe Pro Phe Asn Thr Ser Val Val Tyr Lys Lys

35 40 45

Thr Leu Phe Val Glu Phe Thr Asp His Leu Phe Asn Ile Ala Lys Pro

50 55 60

Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile Gln Ala Glu Val

65 70 75 80

Tyr Asp Thr Val Val Ile Thr Leu Lys Asn Met Ala Ser His Pro Val

85 90 95

Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser Tyr Trp Lys Ala Ser Glu Gly Ala

100 105 110

Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu Asp Asp Lys Val

115 120 125

Phe Pro Gly Gly Ser His Thr Tyr Val Trp Gln Val Leu Lys Glu Asn

130 135 140

Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Cys Leu Thr Tyr Ser Tyr Leu Ser

145 150 155 160

His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn Ser Gly Leu Ile Gly Ala Leu

165 170 175

Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser Leu Ala Lys Glu Lys Thr Gln Thr Leu

180 185 190

His Lys Phe Ile Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu Gly Lys Ser Trp

195 200 205

His Ser Glu Thr Lys Asn Ser Leu Met Gln Asp Arg Asp Ala Ala Ser

210 215 220

Ala Arg Ala Trp Pro Lys Met His Thr Val Asn Gly Tyr Val Asn Arg

225 230 235 240

Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val Tyr Trp His

245 250 255

Val Ile Gly Met Gly Thr Thr Pro Glu Val His Ser Ile Phe Leu Glu

260 265 270

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

275 280 285

Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met Asp Leu Gly

290 295 300

Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His Asp Gly Met

305 310 315 320

Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro Gln Leu Arg

325 330 335

Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp Leu Thr Asp

340 345 350

Ser Glu Met Asp Val Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser Pro Ser Phe

355 360 365

Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr Trp Val His

370 375 380

Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro Leu Val Leu

385 390 395 400

Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn Asn Gly Pro

405 410 415

Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met Ala Tyr Thr

420 425 430

Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu Ser Gly Ile

435 440 445

Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu Leu Ile Ile

450 455 460

Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro His Gly Ile

465 470 475 480

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

485 490 495

His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe Lys Tyr Lys

500 505 510

Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp Pro Arg Cys

515 520 525

Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg Asp Leu Ala

530 535 540

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

545 550 555 560

Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val Ile Leu Phe

565 570 575

Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu Asn Ile Gln

580 585 590

Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp Pro Glu Phe

595 600 605

Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val Phe Asp Ser

610 615 620

Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp Tyr Ile Leu

625 630 635 640

Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe Ser Gly Tyr

645 650 655

Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr Leu Phe Pro

660 665 670

Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro Gly Leu Trp

675 680 685

Ile Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg Gly Met Thr Ala

690 695 700

Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys Asp Lys Asn Thr Gly Asp Tyr Tyr Glu

705 710 715 720

Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Lys Asn Asn Ala

725 730 735

Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser Gln Asn Ser Arg His Pro Ser Thr Arg

740 745 750

Gln Lys Gln Phe Asn Ala Thr Thr Ile Pro Glu Asn Asp Ile Glu Lys

755 760 765

Thr Asp Pro Trp Phe Ala His Arg Thr Pro Met Pro Lys Ile Gln Asn

770 775 780

Val Ser Ser Ser Asp Leu Leu Met Leu Leu Arg Gln Ser Pro Thr Pro

785 790 795 800

His Gly Leu Ser Leu Ser Asp Leu Gln Glu Ala Lys Tyr Glu Thr Phe

805 810 815

Ser Asp Asp Pro Ser Pro Gly Ala Ile Asp Ser Asn Asn Ser Leu Ser

820 825 830

Glu Met Thr His Phe Arg Pro Gln Leu His His Ser Gly Asp Met Val

835 840 845

Phe Thr Pro Glu Ser Gly Leu Gln Leu Arg Leu Asn Glu Lys Leu Gly

850 855 860

Thr Thr Ala Ala Thr Glu Leu Lys Lys Leu Asp Phe Lys Val Ser Ser
865 870 875 880
Thr Ser Asn Asn Leu Ile Ser Thr Ile Pro Ser Asp Asn Leu Ala Ala

885 890 895
Gly Thr Asp Asn Thr Ser Ser Leu Gly Pro Pro Ser Met Pro Val His
900 905 910
Tyr Asp Ser Gln Leu Asp Thr Thr Leu Phe Gly Lys Lys Ser Ser Pro
915 920 925
Leu Thr Glu Ser Gly Gly Pro Leu Ser Leu Ser Glu Glu Asn Asn Asp
930 935 940
Ser Lys Leu Leu Glu Ser Gly Leu Met Asn Ser Gln Glu Ser Ser Trp

945 950 955 960
Gly Lys Asn Val Ser Ser Thr Glu Ser Gly Arg Leu Phe Lys Gly Lys
965 970 975
Arg Ala His Gly Pro Ala Leu Leu Thr Lys Asp Asn Ala Leu Phe Lys
980 985 990
Val Ser Ile Ser Leu Leu Lys Thr Asn Lys Thr Ser Asn Asn Ser Ala
995 1000 1005
Thr Asn Arg Lys Thr His Ile Asp Gly Pro Ser Leu Leu Ile Glu

1010 1015 1020
Asn Ser Pro Ser Val Trp Gln Asn Ile Leu Glu Ser Asp Thr Glu
1025 1030 1035
Phe Lys Lys Val Thr Pro Leu Ile His Asp Arg Met Leu Met Asp
1040 1045 1050
Lys Asn Ala Thr Ala Leu Arg Leu Asn His Met Ser Asn Lys Thr
1055 1060 1065
Thr Ser Ser Lys Asn Met Glu Met Val Gln Gln Lys Lys Glu Gly

1070 1075 1080
Pro Ile Pro Pro Asp Ala Gln Asn Pro Asp Met Ser Phe Phe Lys
1085 1090 1095
Met Leu Phe Leu Pro Glu Ser Ala Arg Trp Ile Gln Arg Thr His

1100 1105 1110

Gly Lys Asn Ser Leu Asn Ser Gly Gln Gly Pro Ser Pro Lys Gln

1115 1120 1125

Leu Val Ser Leu Gly Pro Glu Lys Ser Val Glu Gly Gln Asn Phe

1130 1135 1140

Leu Ser Glu Lys Asn Lys Val Val Val Gly Lys Gly Glu Phe Thr

1145 1150 1155

Lys Asp Val Gly Leu Lys Glu Met Val Phe Pro Ser Ser Arg Asn

1160 1165 1170

Leu Phe Leu Thr Asn Leu Asp Asn Leu His Glu Asn Asn Thr His

1175 1180 1185

Asn Gln Glu Lys Lys Ile Gln Glu Glu Ile Glu Lys Lys Glu Thr

1190 1195 1200

Leu Ile Gln Glu Asn Val Val Leu Pro Gln Ile His Thr Val Thr

1205 1210 1215

Gly Thr Lys Asn Phe Met Lys Asn Leu Phe Leu Leu Ser Thr Arg

1220 1225 1230

Gln Asn Val Glu Gly Ser Tyr Asp Gly Ala Tyr Ala Pro Val Leu

1235 1240 1245

Gln Asp Phe Arg Ser Leu Asn Asp Ser Thr Asn Arg Thr Lys Lys

1250 1255 1260

His Thr Ala His Phe Ser Lys Lys Gly Glu Glu Glu Asn Leu Glu

1265 1270 1275

Gly Leu Gly Asn Gln Thr Lys Gln Ile Val Glu Lys Tyr Ala Cys

1280 1285 1290

Thr Thr Arg Ile Ser Pro Asn Thr Ser Gln Gln Asn Phe Val Thr

1295 1300 1305

Gln Arg Ser Lys Arg Ala Leu Lys Gln Phe Arg Leu Pro Leu Glu

1310 1315 1320

Glu Thr Glu Leu Glu Lys Arg Ile Ile Val Asp Asp Thr Ser Thr

1325 1330 1335

Gln Trp Ser Lys Asn Met Lys His Leu Thr Pro Ser Thr Leu Thr
1340 1345 1350
Gln Ile Asp Tyr Asn Glu Lys Glu Lys Gly Ala Ile Thr Gln Ser
1355 1360 1365
Pro Leu Ser Asp Cys Leu Thr Arg Ser His Ser Ile Pro Gln Ala

1370 1375 1380
Asn Arg Ser Pro Leu Pro Ile Ala Lys Val Ser Ser Phe Pro Ser
1385 1390 1395
Ile Arg Pro Ile Tyr Leu Thr Arg Val Leu Phe Gln Asp Asn Ser
1400 1405 1410
Ser His Leu Pro Ala Ala Ser Tyr Arg Lys Lys Asp Ser Gly Val
1415 1420 1425
Gln Glu Ser Ser His Phe Leu Gln Gly Ala Lys Lys Asn Asn Leu

1430 1435 1440
Ser Leu Ala Ile Leu Thr Leu Glu Met Thr Gly Asp Gln Arg Glu
1445 1450 1455
Val Gly Ser Leu Gly Thr Ser Ala Thr Asn Ser Val Thr Tyr Lys
1460 1465 1470
Lys Val Glu Asn Thr Val Leu Pro Lys Pro Asp Leu Pro Lys Thr
1475 1480 1485
Ser Gly Lys Val Glu Leu Leu Pro Lys Val His Ile Tyr Gln Lys

1490 1495 1500
Asp Leu Phe Pro Thr Glu Thr Ser Asn Gly Ser Pro Gly His Leu
1505 1510 1515
Asp Leu Val Glu Gly Ser Leu Leu Gln Gly Thr Glu Gly Ala Ile
1520 1525 1530
Lys Trp Asn Glu Ala Asn Arg Pro Gly Lys Val Pro Phe Leu Arg
1535 1540 1545
Val Ala Thr Glu Ser Ser Ala Lys Thr Pro Ser Lys Leu Leu Asp

1550 1555 1560
Pro Leu Ala Trp Asp Asn His Tyr Gly Thr Gln Ile Pro Lys Glu

1565 1570 1575

Glu Trp Lys Ser Gln Glu Lys Ser Pro Glu Lys Thr Ala Phe Lys

1580 1585 1590

Lys Lys Asp Thr Ile Leu Ser Leu Asn Ala Cys Glu Ser Asn His

1595 1600 1605

Ala Ile Ala Ala Ile Asn Glu Gly Gln Asn Lys Pro Glu Ile Glu

1610 1615 1620

Val Thr Trp Ala Lys Gln Gly Arg Thr Glu Arg Leu Cys Ser Gln

1625 1630 1635

Asn Pro Pro Val Leu Lys Arg His Gln Arg Glu Ile Thr Arg Thr

1640 1645 1650

Thr Leu Gln Ser Asp Gln Glu Glu Ile Asp Tyr Asp Asp Thr Ile

1655 1660 1665

Ser Val Glu Met Lys Lys Glu Asp Phe Asp Ile Tyr Asp Glu Asp

1670 1675 1680

Glu Asn Gln Ser Pro Arg Ser Phe Gln Lys Lys Thr Arg His Tyr

1685 1690 1695

Phe Ile Ala Ala Val Glu Arg Leu Trp Asp Tyr Gly Met Ser Ser

1700 1705 1710

Ser Pro His Val Leu Arg Asn Arg Ala Gln Ser Gly Ser Val Pro

1715 1720 1725

Gln Phe Lys Lys Val Val Phe Gln Glu Phe Thr Asp Gly Ser Phe

1730 1735 1740

Thr Gln Pro Leu Tyr Arg Gly Glu Leu Asn Glu His Leu Gly Leu

1745 1750 1755

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

1760 1765 1770

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

1775 1780 1785

Leu Ile Ser Tyr Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly Ala Glu Pro Arg

1790 1795 1800

Lys Asn Phe Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr Tyr Phe Trp Lys
1805 1810 1815
Val Gln His His Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu Phe Asp Cys Lys
1820 1825 1830
Ala Trp Ala Tyr Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu Lys Asp Val His
1835 1840 1845
Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Val Cys His Thr Asn Thr Leu

1850 1855 1860
Asn Pro Ala His Gly Arg Gln Val Thr Val Gln Glu Phe Ala Leu
1865 1870 1875
Phe Phe Thr Ile Phe Asp Glu Thr Lys Ser Trp Tyr Phe Thr Glu
1880 1885 1890
Asn Met Glu Arg Asn Cys Arg Ala Pro Cys Asn Ile Gln Met Glu
1895 1900 1905
Asp Pro Thr Phe Lys Glu Asn Tyr Arg Phe His Ala Ile Asn Gly

1910 1915 1920
Tyr Ile Met Asp Thr Leu Pro Gly Leu Val Met Ala Gln Asp Gln
1925 1930 1935
Arg Ile Arg Trp Tyr Leu Leu Ser Met Gly Ser Asn Glu Asn Ile
1940 1945 1950
His Ser Ile His Phe Ser Gly His Val Phe Thr Val Arg Lys Lys
1955 1960 1965
Glu Glu Tyr Lys Met Ala Leu Tyr Asn Leu Tyr Pro Gly Val Phe

1970 1975 1980
Glu Thr Val Glu Met Leu Pro Ser Lys Ala Gly Ile Trp Arg Val
1985 1990 1995
Glu Cys Leu Ile Gly Glu His Leu His Ala Gly Met Ser Thr Leu
2000 2005 2010
Phe Leu Val Tyr Ser Asn Lys Cys Gln Thr Pro Leu Gly Met Ala
2015 2020 2025
Ser Gly His Ile Arg Asp Phe Gln Ile Thr Ala Ser Gly Gln Tyr

2030 2035 2040

Gly Gln Trp Ala Pro Lys Leu Ala Arg Leu His Tyr Ser Gly Ser

2045 2050 2055

Ile Asn Ala Trp Ser Thr Lys Glu Pro Phe Ser Trp Ile Lys Val

2060 2065 2070

Asp Leu Leu Ala Pro Met Ile Ile His Gly Ile Lys Thr Gln Gly

2075 2080 2085

Ala Arg Gln Lys Phe Ser Ser Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile

2090 2095 2100

Met Tyr Ser Leu Asp Gly Lys Lys Trp Gln Thr Tyr Arg Gly Asn

2105 2110 2115

Ser Thr Gly Thr Leu Met Val Phe Phe Gly Asn Val Asp Ser Ser

2120 2125 2130

Gly Ile Lys His Asn Ile Phe Asn Pro Pro Ile Ile Ala Arg Tyr

2135 2140 2145

Ile Arg Leu His Pro Thr His Tyr Ser Ile Arg Ser Thr Leu Arg

2150 2155 2160

Met Glu Leu Met Gly Cys Asp Leu Asn Ser Cys Ser Met Pro Leu

2165 2170 2175

Gly Met Glu Ser Lys Ala Ile Ser Asp Ala Gln Ile Thr Ala Ser

2180 2185 2190

Ser Tyr Phe Thr Asn Met Phe Ala Thr Trp Ser Pro Ser Lys Ala

2195 2200 2205

Arg Leu His Leu Gln Gly Arg Ser Asn Ala Trp Arg Pro Gln Val

2210 2215 2220

Asn Asn Pro Lys Glu Trp Leu Gln Val Asp Phe Gln Lys Thr Met

2225 2230 2235

Lys Val Thr Gly Val Thr Thr Gln Gly Val Lys Ser Leu Leu Thr

2240 2245 2250

Ser Met Tyr Val Lys Glu Phe Leu Ile Ser Ser Ser Gln Asp Gly

2255 2260 2265

His Gln Trp Thr Leu Phe Phe Gln Asn Gly Lys Val Lys Val Phe

2270 2275 2280

Gln Gly Asn Gln Asp Ser Phe Thr Pro Val Val Asn Ser Leu Asp

2285 2290 2295

Pro Pro Leu Leu Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp

2300 2305 2310

Val His Gln Ile Ala Leu Arg Met Glu Val Leu Gly Cys Glu Ala

2315 2320 2325

Gln Asp Leu Tyr

2330

<210> 5

<211>

1604

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 5

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

1 5 10 15

Cys Phe Ser Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser

20 25 30

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

35 40 45

Phe Pro Pro Arg Val Pro Lys Ser Phe Pro Phe Asn Thr Ser Val Val

50 55 60

Tyr Lys Lys Thr Leu Phe Val Glu Phe Thr Asp His Leu Phe Asn Ile

65 70 75 80

Ala Lys Pro Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile Gln

85 90 95

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

100 105 110

His Pro Val Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser Tyr Trp Lys Ala Ser
115 120 125

Glu Gly Ala Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu Asp
130 135 140

Asp Lys Val Phe Pro Gly Gly Ser His Thr Tyr Val Trp Gln Val Leu
145 150 155 160

Lys Glu Asn Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Cys Leu Thr Tyr Ser
165 170 175

Tyr Leu Ser His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn Ser Gly Leu Ile
180 185 190

Gly Ala Leu Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser Leu Ala Lys Glu Lys Thr
195 200 205

Gln Thr Leu His Lys Phe Ile Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu Gly
210 215 220

Lys Ser Trp His Ser Glu Thr Lys Asn Ser Leu Met Gln Asp Arg Asp
225 230 235 240

Ala Ala Ser Ala Arg Ala Trp Pro Lys Met His Thr Val Asn Gly Tyr
245 250 255

Val Asn Arg Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val
260 265 270

Tyr Trp His Val Ile Gly Met Gly Thr Thr Pro Glu Val His Ser Ile
275 280 285

Phe Leu Glu Gly His Thr Phe Leu Val Arg Asn His Arg Gln Ala Ser
290 295 300

Leu Glu Ile Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met
305 310 315 320

Asp Leu Gly Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His
325 330 335

Asp Gly Met Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro
340 345 350

Gln Leu Arg Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp
355 360 365

Leu Thr Asp Ser Glu Met Asp Val Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser
370 375 380
Pro Ser Phe Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr
385 390 395 400
Trp Val His Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro
405 410 415
Leu Val Leu Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn
420 425 430

Asn Gly Pro Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met
435 440 445
Ala Tyr Thr Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu
450 455 460
Ser Gly Ile Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu
465 470 475 480
Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro
485 490 495

His Gly Ile Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys
500 505 510
Gly Val Lys His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe
515 520 525
Lys Tyr Lys Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp
530 535 540
Pro Arg Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg
545 550 555 560

Asp Leu Ala Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu
565 570 575
Ser Val Asp Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val
580 585 590
Ile Leu Phe Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu

595 600 605

Asn Ile Gln Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp

610 615 620

Pro Glu Phe Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val

625 630 635 640

Phe Asp Ser Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp

645 650 655

Tyr Ile Leu Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe

660 665 670

Ser Gly Tyr Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr

675 680 685

Leu Phe Pro Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro

690 695 700

Gly Leu Trp Ile Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg Gly

705 710 715 720

Met Thr Ala Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys Asp Lys Asn Thr Gly Asp

725 730 735

Tyr Tyr Glu Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Lys

740 745 750

Asn Asn Ala Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser Gln Asn Thr Ser Glu Ser

755 760 765

Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser

770 775 780

Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly

785 790 795 800

Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu Ser

805 810 815

Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly

820 825 830

Ser Ala Pro Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly

835 840 845

Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro Ala
850 855 860
Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu
865 870 875 880

Ser Gly Pro Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly
885 890 895
Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Ala Ser Ser Pro
900 905 910
Pro Val Leu Lys Arg His Gln Arg Glu Ile Thr Arg Thr Thr Leu Gln
915 920 925
Ser Asp Gln Glu Glu Ile Asp Tyr Asp Asp Thr Ile Ser Val Glu Met
930 935 940

Lys Lys Glu Asp Phe Asp Ile Tyr Asp Glu Asp Glu Asn Gln Ser Pro
945 950 955 960
Arg Ser Phe Gln Lys Lys Thr Arg His Tyr Phe Ile Ala Ala Val Glu
965 970 975
Arg Leu Trp Asp Tyr Gly Met Ser Ser Ser Pro His Val Leu Arg Asn
980 985 990
Arg Ala Gln Ser Gly Ser Val Pro Gln Phe Lys Lys Val Val Phe Gln
995 1000 1005

Glu Phe Thr Asp Gly Ser Phe Thr Gln Pro Leu Tyr Arg Gly Glu
1010 1015 1020
Leu Asn Glu His Leu Gly Leu Leu Gly Pro Tyr Ile Arg Ala Glu
1025 1030 1035
Val Glu Asp Asn Ile Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg
1040 1045 1050
Pro Tyr Ser Phe Tyr Ser Ser Leu Ile Ser Tyr Glu Glu Asp Gln
1055 1060 1065

Arg Gln Gly Ala Glu Pro Arg Lys Asn Phe Val Lys Pro Asn Glu
1070 1075 1080
Thr Lys Thr Tyr Phe Trp Lys Val Gln His His Met Ala Pro Thr

1085 1090 1095

Lys Asp Glu Phe Asp Cys Lys Ala Trp Ala Tyr Phe Ser Asp Val

1100 1105 1110

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

1115 1120 1125

Val Cys His Thr Asn Thr Leu Asn Pro Ala His Gly Arg Gln Val

1130 1135 1140

Thr Val Gln Glu Phe Ala Leu Phe Phe Thr Ile Phe Asp Glu Thr

1145 1150 1155

Lys Ser Trp Tyr Phe Thr Glu Asn Met Glu Arg Asn Cys Arg Ala

1160 1165 1170

Pro Cys Asn Ile Gln Met Glu Asp Pro Thr Phe Lys Glu Asn Tyr

1175 1180 1185

Arg Phe His Ala Ile Asn Gly Tyr Ile Met Asp Thr Leu Pro Gly

1190 1195 1200

Leu Val Met Ala Gln Asp Gln Arg Ile Arg Trp Tyr Leu Leu Ser

1205 1210 1215

Met Gly Ser Asn Glu Asn Ile His Ser Ile His Phe Ser Gly His

1220 1225 1230

Val Phe Thr Val Arg Lys Lys Glu Glu Tyr Lys Met Ala Leu Tyr

1235 1240 1245

Asn Leu Tyr Pro Gly Val Phe Glu Thr Val Glu Met Leu Pro Ser

1250 1255 1260

Lys Ala Gly Ile Trp Arg Val Glu Cys Leu Ile Gly Glu His Leu

1265 1270 1275

His Ala Gly Met Ser Thr Leu Phe Leu Val Tyr Ser Asn Lys Cys

1280 1285 1290

Gln Thr Pro Leu Gly Met Ala Ser Gly His Ile Arg Asp Phe Gln

1295 1300 1305

Ile Thr Ala Ser Gly Gln Tyr Gly Gln Trp Ala Pro Lys Leu Ala

1310 1315 1320

```
Arg Leu  His Tyr Ser Gly Ser  Ile Asn Ala Trp Ser  Thr Lys Glu
    1325                1330                1335
Pro Phe  Ser Trp Ile Lys Val  Asp Leu Leu Ala Pro  Met Ile Ile
    1340                1345                1350
His Gly  Ile Lys Thr Gln Gly  Ala Arg Gln Lys Phe  Ser Ser Leu
    1355                1360                1365

Tyr Ile  Ser Gln Phe Ile Ile  Met Tyr Ser Leu Asp  Gly Lys Lys
    1370                1375                1380
Trp Gln  Thr Tyr Arg Gly Asn  Ser Thr Gly Thr Leu  Met Val Phe
    1385                1390                1395
Phe Gly  Asn Val Asp Ser Ser  Gly Ile Lys His Asn  Ile Phe Asn
    1400                1405                1410
Pro Pro  Ile Ile Ala Arg Tyr  Ile Arg Leu His Pro  Thr His Tyr
    1415                1420                1425

Ser Ile  Arg Ser Thr Leu Arg  Met Glu Leu Met Gly  Cys Asp Leu
    1430                1435                1440
Asn Ser  Cys Ser Met Pro Leu  Gly Met Glu Ser Lys  Ala Ile Ser
    1445                1450                1455
Asp Ala  Gln Ile Thr Ala Ser  Ser Tyr Phe Thr Asn  Met Phe Ala
    1460                1465                1470
Thr Trp  Ser Pro Ser Lys Ala  Arg Leu His Leu Gln  Gly Arg Ser
    1475                1480                1485

Asn Ala  Trp Arg Pro Gln Val  Asn Asn Pro Lys Glu  Trp Leu Gln
    1490                1495                1500
Val Asp  Phe Gln Lys Thr Met  Lys Val Thr Gly Val  Thr Thr Gln
    1505                1510                1515
Gly Val  Lys Ser Leu Leu Thr  Ser Met Tyr Val Lys  Glu Phe Leu
    1520                1525                1530
Ile Ser  Ser Ser Gln Asp Gly  His Gln Trp Thr Leu  Phe Phe Gln
    1535                1540                1545

Asn Gly  Lys Val Lys Val Phe  Gln Gly Asn Gln Asp  Ser Phe Thr
```

1550 1555 1560

Pro Val Val Asn Ser Leu Asp Pro Pro Leu Leu Thr Arg Tyr Leu

1565 1570 1575

Arg Ile His Pro Gln Ser Trp Val His Gln Ile Ala Leu Arg Met

1580 1585 1590

Glu Val Leu Gly Cys Glu Ala Gln Asp Leu Tyr

1595 1600

<210> 6

<211> 461

<

212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 6

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

1 5 10 15

Ile Cys Leu Leu Gly Tyr Leu Leu Ser Ala Glu Cys Thr Val Phe Leu

20 25 30

Asp His Glu Asn Ala Asn Lys Ile Leu Asn Arg Pro Lys Arg Tyr Asn

35 40 45

Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg Glu Cys

50 55 60

Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu Asn

65 70 75 80

Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly Asp Gln

85 90 95

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

100 105 110

Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys

115 120 125

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

130 135 140

Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr Glu Gly

145 150 155 160

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

165 170 175

Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala

180 185 190

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

195 200 205

Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn Asp Phe

210 215 220

Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe Pro Trp

225 230 235 240

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

245 250 255

Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu Thr Gly

260 265 270

Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu Thr Glu

275 280 285

His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His His Asn

290 295 300

Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Glu

305 310 315 320

Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile Cys Ile

325 330 335

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

340 345 350

Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala Leu Val

355 360 365

Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys Leu Leu

370 375 380

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

Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Ser
435 440 445
Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
450 455 460

<210> 7
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"
<400> 7
tccataaagt aggaaacact aca 23