



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0007615
(43) 공개일자 2025년01월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/755 (2006.01) A61K 38/37 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) A61P 7/04 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/755 (2013.01)
A61K 38/37 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-7039728
(22) 출원일자(국제) 2023년04월18일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년11월28일
(86) 국제출원번호 PCT/RU2023/050094
(87) 국제공개번호 WO 2023/211316
국제공개일자 2023년11월02일
(30) 우선권주장
2022111734 2022년04월28일 러시아(RU)

(71) 출원인
조인트 스타크 컴퍼니 "바이오케드"
러시아 198515 상트페테르부르크 포메슈 89 에스
티알. 1 디. 38 유엘. 스비야지 브이엔. 테르.
취. 포셀록 스텔레나
(72) 발명자
슈게바 타티아나 에브게니예브나
러시아 119021 모스크바 케이브이. 5 디. 10 프룬
첸스카야 냐.
블라소바 엘레나 베니아미노브나
러시아 186791 취. 소르타발라 레스프. 카렐리아
케이브이.3 디.1 유엘. 퀴비셰바
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
유미특허법인

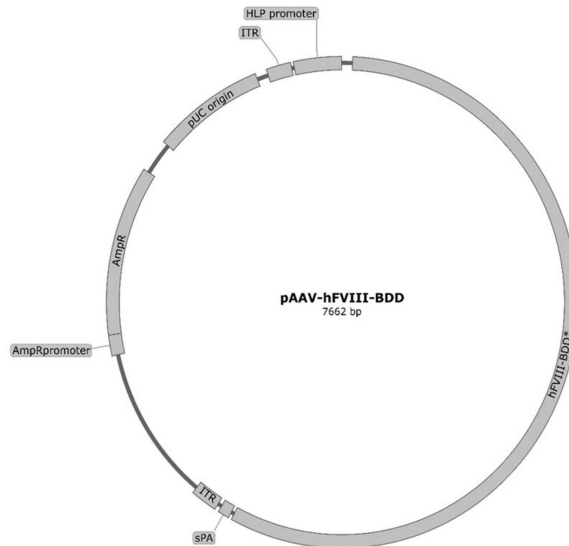
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 FVIII-BDD를 인코딩하는 코돈 최적화된 핵산

(57) 요약

본 출원은 유전학, 유전자 요법 및 분자 생물학 분야에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 FVIII-BDD (B-domain deleted coagulation factor VIII) 단백질을 인코딩하는 코돈 최적화된 핵산, 이를 기반으로 하는 발현 카세트 및 벡터, FVIII-BDD 을 생산하는 숙주 세포, 및 상기 벡터의 다양한 용도에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 48/0008 (2013.01)
A61K 48/0066 (2013.01)
A61P 7/04 (2018.01)
C12N 15/86 (2013.01)
C07K 2319/02 (2013.01)
C12N 2750/14143 (2013.01)
C12N 2800/22 (2013.01)
C12N 2830/50 (2013.01)

(72) 발명자

포미나 아나스타샤 블라디미로브나

러시아 432042 쥐. 울리야노프스크 케이브이. 32 디.12 유엘. 스탄코스트로이틀리

페레펠키나 마리아 파블로브나

러시아 198328 상트페테르부르크 케이브이. 67 코 프. 1 디. 16 유엘. 마살라 자카로바

스트렐코바 안나 니콜라예브나

러시아 612261 쥐. 야란스크 키로브스카야 오비엘. 케이브이 64 디. 65에이 유엘. 라구눔스카야

게르쇼비치 파벨 미하일로비치

러시아 198328 상트페테르부르크 케이브이. 627 디. 45 페테르고프스코에 쇼세

야코프레브 파벨 안드리비치

러시아 196135 상트페테르부르크 케이브이. 17 케 이오알피. 3 디.28 피알-케이티. 유리야 가가리나

모로조프 드미트리 발렌티노비치

러시아 190000 상트페테르부르크 케이브이. 3 디. 20 유엘. 포치탐트스카야 아드미랄테이스키 알-엔

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 또는 서열번호 5의 군에서 선택되는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 서열번호 11의 아미노산 서열을 갖는 FVIII-BDD (B-domain deleted coagulation factor VIII) 단백질을 인코딩하는 단리된 코돈 최적화된 핵산.

청구항 2

제1항에 따른 핵산을 포함하는 발현 카세트.

청구항 3

제2항에 있어서,

5'-말단에서 3'-말단 방향으로 하기 요소를 포함하는, 발현 카세트:

좌측 (제1의) 역위 말단 반복부 (inverted terminal repeat: ITR);

프로모터;

신호 펩타이드를 인코딩하는 핵산;

제1항에 따른 핵산;

폴리아데닐화 신호;

우측 (제2의) ITR.

청구항 4

제1항에 따른 핵산 또는 제2항 또는 제3항에 따른 발현 카세트를 포함하는, 발현 벡터.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 발현 벡터가 재조합 아데노-부속 바이러스 (adeno-associated virus serotype: AAV)인, 발현 벡터.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 AAV가 하기 AAV 혈청형을 포함하는 군에서 선택되는 것인, 발현 벡터: AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13, AAV14, AAV15, AAV16, rAAV.rh8, rAAV.rh10, rAAV.rh20, rAAV.rh39, rAAV.Rh74, rAAV.RHM4-1, AAV.hu37, rAAV.Anc80, rAAV.Anc80L65, rAAV.7m8, rAAV.PHP.B, rAAV2.5, rAAV2tYF, rAAV3B, rAAV.LK03, AAV.HSC1, AAV.HSC2, AAV.HSC3, AAV.HSC4, AAV.HSC5, AAV.HSC6, AAV.HSC7, AAV.HSC8, AAV.HSC9, AAV.HSC10, AAV.HSC11, AAV.HSC12, AAV.HSC13, AAV.HSC14, AAV.HSC15 또는 AAV.HSC16.

청구항 7

제1항에 따른 핵산을 포함하는, FVIII-BDD 단백질을 제조하기 위한 또는 제4항 내지 제6항에 따른 발현 벡터를 제조하기 위한 숙주 세포.

청구항 8

하나 이상의 약제학적으로 허용되는 부형제와 조합하여 제4항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 발현 벡터 또는

제2항 또는 제3항에 따른 카세트를 포함하는, FVIII-BDD 유전자를 표적 세포에 전달하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 9

FVIII-BDD 유전자를 표적 세포에 전달하기 위한, 제4항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 발현 벡터 또는 제2항 또는 제3항에 따른 카세트의 용도.

청구항 10

A형 혈우병을 앓고 있고/있거나 FVIII 유전자의 기능적 카피를 갖지 않는 대상체에게 FVIII-BDD 단백질을 제공하기 위한, 제4항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 발현 벡터 또는 제2항 또는 제3항에 따른 카세트 또는 제8항에 따른 조성물의 용도.

청구항 11

치료학적 유효량의 제4항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 발현 벡터 또는 제8항에 따른 조성물을 이를 필요로 하는 대상체의 세포 내로 투여하는 단계를 포함하는, A형 혈우병을 앓고 있는 대상체에게 FVIII-BDD 단백질을 제공하는 방법.

청구항 12

제4항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 발현 벡터 또는 제8항에 따른 조성물을 대상체의 세포 내로 투여하는 단계를 포함하는, A형 혈우병을 앓고 있는 대상체의 표적 세포에 FVIII-BDD 유전자를 전달하는 방법.

청구항 13

A형 혈우병을 앓고 있는 대상체에서 A형 혈우병을 치료하기 위한, 제4항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 발현 벡터 또는 제8항에 따른 조성물의 용도.

청구항 14

치료학적 유효량의 제4항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 발현 벡터 또는 제8항에 따른 조성물을 혈우병을 앓고 있는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 A형 혈우병을 치료하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 출원은 유전학, 유전자 요법 및 분자 생물학 분야에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 FVIII-BDD (B-domain deleted coagulation factor VIII) 단백질을 인코딩하는 코돈 최적화된 핵산, 이를 기반으로 하는 발현 카세트 및 벡터, FVIII-BDD 을 생산하는 숙주 세포, 및 상기 벡터의 다양한 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 혈우병은 2차 지혈에 관여하는 단백질 중 하나의 결핍을 유발하는 X-연관 열성 유전 장애이다. A형 혈우병, 즉 고전적 혈우병은 가장 흔한 혈우병 변종으로, 신생아 남아 5000명 중 1명에게 발생하며 (WFH 의 2019년 연례 세계 조사 보고서, <https://www.wfh.org/en/our-work-research-data/annual-global-survey>), 응고 인자 VIII 단백질 결핍으로 인해 발생한다. 러시아 혈우병 협회에 따르면 러시아에는 A형 혈우병 환자가 6,500명 이상이다 (WFH 의 2019년 연례 세계 조사 보고서).

[0003] 응고 인자 VIII(FVIII)은 주로 정맥동 간 내피세포에서 혈액으로 분비되는 280kDa의 단백질이다 (Fahs SA, Hille MT, Shi Q, Weiler H, Montgomery RR. A conditional knockout mouse model reveals endothelial cells as the principal and possibly exclusive source of plasma factor VIII/ Blood. 2014 Jun 12;123(24):3706-13. doi: 10.1182/blood-2014-02-555151. Epub 2014 Apr 4. PMID: 24705491 and Everett LA, Cleuren AC, Khoriaty RN, Ginsburg D. Murine coagulation factor VIII is synthesized in endothelial cells/ Blood. 2014 Jun 12;123(24):3697-705. doi: 10.1182/blood-2014-02-554501. Epub 2014 Apr 9. PMID: 24719406). 활성화된 FVIII은 비-공유적 금속-의존적 상호작용을 통해 상호 결합된 중쇄(A1, A2, B 도메인)와 경쇄(A3, C1, C3 도메인)로 구성된 이종이합체로 유기체 내에서 순환한다. FVIII 가공의 결과, 단백질의 활성화된 형태에는

A1-A3, C1, C2 도메인만 존재한다. 이는 B-도메인이 결손된 재조합 FVIII(FVIII-BDD)의 생산에 기여하는데, FVIII-BDD는 전장 FVIII보다 활성 면에서 열등하지 않다 (Pittman DD, Alderman EM, Tomkinson KN, Wang JH, Giles AR, Kaufman RJ. Biochemical, immunological, and *in vivo* functional characterization of B-domain-deleted factor VIII/ Blood. 1993 Jun 1;81(11):2925-35. PMID: 8499631). 혈액 응고 과정의 다른 단백질들이 주로 프로테아제에 속하는 것과는 달리, FVIII는 당단백질이다. 그러나 이는 활성화된 응고 인자 X(FXa)의 생성에 필요한 테나제 복합체(tenase complex) 형성에 중요한 역할을 하는데, FXa는 최종 공통 응고 경로의 첫 번째 구성원으로, 궁극적으로 가교 결합된 피브린 형성을 초래한다.

[0004] 중증 A형 혈우병의 절반 이상은 FVIII 유전자의 인트론 1이나 인트론 22의 역위로 인해 발생한다 (Habart D, Kalabova D, Novotny M, Vorlova Z. Thirty-four novel mutations detected in factor VIII gene by multiplex CSGE: modeling of 13 novel amino acid substitutions/ J Thromb Haemost. 2003 Apr;1(4):773-81. doi: 10.1046/j.1538-7836.2003.00149.x. PMID: 1287141). 그의 경우에서, FVIII 서열의 이상은 안티센스 돌연변이, 판독 프레임 이동, 스플라이스 부위 돌연변이, 결손 및 삽입을 포함한 다양한 돌연변이와 관련이 있다.

[0005] A형 혈우병에서 출혈 경향은 정의된 FVIII 활성과 상관관계가 있으며 경증(0.05-0.40 IU/ml), 중등도(0.01 - 0.05 IU/ml) 또는 중증(<0.01 IU/ml)으로 분류된다. 경증 혈우병 환자는 일반적으로 의학적 개입이나 부상과 관련하여 비정상적인 출혈을 경험한다. 반면, 중등도 혈우병 환자는 상대적으로 사소한 부상에도 장기간 출혈 반응을 보이며, 중증 혈우병 환자는 자연적으로 출혈하는 경우가 많다. 중증 A형 혈우병은 자발적 혈관관절증, 연부조직 혈종, 복막후 출혈, 뇌내 출혈, 및 수술 후 지연 출혈 등의 증상이 나타난다. 시간이 지남에 따라 재발성 혈관관절증과 연부조직 혈종으로 인한 합병증으로 인해 중증 관절병, 관절 수축, 가성종양이 발생하여 만성 질환으로 이어질 수 있다. 경증, 중등도 및 중증 A형 혈우병 변이를 앓는 환자의 비율은 정확히 알려져 있지 않지만, 최근 역학 연구에 따르면 A형 혈우병 환자의 약 60%가 중증 변이를 앓고 있는 것으로 보고되었다 (WFH의 2019년 연례 세계 조사 보고서).

[0006] 현재까지는 재조합 FVIII 주사 형태의 평생 대체 요법이 A형 혈우병 환자의 표준 치료이다 (WFH의 2019년 연례 세계 조사 보고서). 혈우병 치료에 성공을 거두었음에도 불구하고 이러한 접근 방식에는 심각한 문제점이 있다. A형 혈우병에 대한 예방적 대체 요법은 질병의 중증 변이를 앓는 환자의 평생 동안 3일마다 재조합 FVIII를 정맥 주사하는 것을 포함한다. 이러한 치료 방법은 비용이 많이 들고, 주로 혈관관절증과 관련된 합병증이 없다고 보장할 수 없다. 일부 경우에는 환자에게 저해성 항체가 생기기도 한다. A형 혈우병의 저해성 변이는 일반적으로 중증 질환을 앓는 환자에게서 더 흔하게 관찰되므로 이 질환의 치료 및 예방을 위해서는 대체 접근법이 요구된다 (Eckhardt CL, van der Bom JG, van der Naald M, Peters M, Kamphuisen PW, Fijnvandraat K. Surgery and inhibitor development in haemophilia A: a systematic review/ J Thromb Haemost. 2011 Oct; 9(10):1948-58. doi: 10.1111/j.1538-7836.2011.04467.x. PMID: 21838755).

[0007] FVIII 유전자를 인코딩하는 아데노-부속 바이러스(AAV) 기반 바이러스 (발현) 벡터를 통한 A형 혈우병의 유전자 요법은 일련의 전임상 및 임상 연구에서 우수한 결과를 보여주었다 (Bunting S, Zhang L, Xie L, Bullens S, Mahimkar R, Fong S, Sandza K, Harmon D, Yates B, Handyside B, Sihn CR, Galicia N, Tsuruda L, O'Neill CA, Bagri A, Colosi P, Long S, Vehar G, Carter B. Gene Therapy with BMN 270 Results in Therapeutic Levels of FVIII in Mice and Primates and Normalization of Bleeding in Hemophilic Mice/ Mol Ther. 2018 Feb 7;26(2):496-509. doi: 10.1016/j.ymthe.2017.12.009. Epub 2017 Dec 14. PMID: 29292164 and Peyvandi F, Garagiola I. Clinical advances in gene therapy updates on clinical trials of gene therapy in haemophilia/ Haemophilia. 2019 Sep;25(5):738-746. doi: 10.1111/hae.13816. Epub 2019 Jul 8. PMID: 31282050). 혈우병 치료에 대한 전통적인 접근 방식과는 달리, AAV를 이용한 유전자 요법은 환자에게 치료제를 단 한 번 투여한 후에도 수년간 외부 FVIII의 발현 수준을 충분한 수준으로 유지할 수 있다 (Long BR, Veron P, Kuranda K, Hardet R, Mitchell N, Hayes GM, Wong WY, Lau K, Li M, Hock MB, Zoog SJ, Vettermann C, Mingozzi F, Schweighardt B. Early Phase Clinical Immunogenicity of Valoctocogene Roxaparvovec, an AAV5-Mediated Gene Therapy for Haemophilia A/ Mol Ther. 2021 Feb 3;29(2):597-610. doi: 10.1016/j.ymthe.2020.12.008. Epub 2020 Dec 10. PMID: 33309883).

[0008] 현재까지 전 세계적으로 A형 혈우병 치료를 위한 유전자 치료제가 승인된 바 없다.

[0009] 따라서 A형 혈우병 치료를 위한 유전자 치료제와, A형 혈우병 치료를 위한 유전자 치료제의 효능을 개선하는 해결책을 개발할 필요가 있다.

발명의 내용

- [0010] 효과적인 유전자 요법 개발 분야에서 연구의 시급한 목적 중 하나는 벡터에서 목적 유전자의 코돈을 최적화하여 목적 단백질의 최대 생산 수준을 달성하는 것이며, 이를 통해 더 낮은 용량의 벡터를 사용하여 상당한 효과를 얻을 수 있다.
- [0011] 놀랍게도, 본 발명의 발명자들은 서열번호 11의 아미노산 서열을 갖는 FVIII-BDD (B-domain deleted coagulation factor VIII) 단백질을 인코딩하고 서열번호 2 (변이체 FVIII-BDDco-v1), 서열번호 3 (변이체 FVIII-BDDco-v2), 서열번호 4 (변이체 FVIII-BDDco-v3) 또는 서열번호 5 (변이체 FVIII-BDDco-v4)의 군에서 선택되는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 코돈 최적화된 핵산이, 놀랍게도 응고 인자 VIII-BDD 를 인코딩하는 야생형 유전자(FVIII-BDD-wt)와 비교하여 FVIII-BDD 유전자 발현 수준을 증가시키고, 응고 인자 VIII-BDD 단백질 생산 수준을 증가시키고, 응고 인자 VIII-BDD 단백질 활성 수준을 수배로 증가시킨다는 것을 발견하였다. 본 발명에 따른 서열번호 2 (변이체 FVIII-BDDco-v1), 서열번호 3 (변이체 FVIII-BDDco-v2), 서열번호 4 (변이체 FVIII-BDDco-v3) 또는 서열번호 5 (변이체 FVIII-BDDco-v4)의 군에서 선택된 뉴클레오타이드 서열을 갖는 코돈 최적화된 핵산의 이들 변이체들은 발현 카세트 및 이를 기반으로 하는 벡터에 포함된다.
- [0012] 정의 및 일반적인 방법
- [0013] 본 출원에 달리 정의되지 않는다면, 본 발명과 관련하여 사용되는 모든 기술 용어 및 과학 용어는 당해 분야의 통상의 기술자들이 통상적으로 이해하는 바와 동일한 의미를 가질 것이다.
- [0014] 또한, 문맥상 달리 요구되지 않는 한, 단수 용어는 복수 용어를 포함하고, 복수 용어는 단수 용어를 포함한다. 전형적으로, 본 출원에 기재된 세포 배양, 분자 생물학, 면역학, 미생물학, 유전학, 분석 화학, 유기 합성 화학, 의학 및 약제학적 화학 뿐만 아니라 본 출원에 기재된 단백질과 핵산의 하이브리드화 및 화학의 현재 분류 및 방법은 당해 분야의 통상의 기술자들에 의해 잘 공지되어 있으며 당해 분야에 널리 사용된다. 효소 반응 및 정제 방법은 당해 분야에서 일반적인 바와 같거나 본 출원에 기재된 바와 같이 제조업체의 지침에 따라 수행된다.
- [0015] 용어 "자연 발생(naturally occurring)", "천연 (native)" 또는 "야생형(wild-type)"은 인공적으로 생산된 것과는 구별되는 자연에서 발견될 수 있는 물체를 기술하는 데 사용된다. 예를 들어, 자연에서 공급원으로부터 분리될 수 있고 실험실에서 사람에게 의해 의도적으로 변형되지 않은 유기체 (바이러스 포함)에 존재하는 단백질 또는 뉴클레오타이드 서열은 자연 발생적이다.
- [0016] 문맥상 달리 지시되지 않는다면, 이하의 본 설명 및 청구범위에 사용되는 "포함하다 (include)" 및 "포함하다 (comprise)"라는 단어, 또는 "포함한다 (includes)", "포함하는 (including)", "포함한다 (comprises)" 또는 "포함하는 (comprising)"과 같은 변형태는, 명시된 정수 또는 정수 그룹의 포함을 의미하지만 임의의 다른 정수 또는 정수 그룹의 배제를 의미하지 않는 것으로 이해될 것이다.
- [0017] 단백질 (펩타이드)
- [0018] 본 설명에 사용되는 용어 "펩타이드", "폴리펩타이드" 및 "단백질" 는 상호 교환적으로 사용되며, 펩타이드 결합에 의해 공유적으로 연결된 아미노산 잔기로 이루어진 화합물을 지칭한다. 폴리펩타이드는 천연 펩타이드, 재조합 펩타이드, 합성 펩타이드 또는 이들의 조합을 포함한다.
- [0019] 핵산 분자
- [0020] 본 설명에 상호 교환적으로 사용되는 "핵산", "핵 서열", "핵산 서열", "폴리뉴클레오타이드", "올리고뉴클레오타이드", "폴리뉴클레오타이드 서열" 및 "뉴클레오타이드 서열"이라는 용어는, 비천연 뉴클레오타이드를 함유하거나 함유하지 않고 이중 가닥 DNA 또는 RNA, 단일 가닥 DNA 또는 RNA, 또는 상기 DNA의 전사 산물인 핵산의 단편 또는 영역을 결정하는 변형 또는 비변형된 뉴클레오타이드의 정확한 서열을 의미한다.
- [0021] 본 설명에 사용되는 폴리뉴클레오타이드는, 비제한적인 예로서, 재조합 수단, 즉, 통상적인 클로닝 기술과 PCR 을 이용하는 재조합 라이브러리 또는 세포 계능으로부터의 핵산 서열의 클로닝 등을 비제한적인 예로서 비롯하여 당해 분야에서 이용 가능한 임의의 수단 및 합성 수단에 의해 취득되는 모든 핵산 서열을 포함한다.
- [0022] 본 발명은 천연 염색체 환경, 즉, 천연 상태의 뉴클레오타이드 서열에 관한 것이 아니라는 점도 또한 여기에 포함되어야 한다. 본 발명의 서열은 단리 및/또는 정제되었는데, 즉, 예를 들어, 카피에 의해 직접적으로 또는 간접적으로 샘플링되었으며, 이의 환경이 적어도 부분적으로 변형된 것이다. 따라서, 재조합 유전학에 의해, 예를

들어, 숙주 세포의 수단에 의해 수득되거나 화학적 합성에 의해 수득된 단리된 핵산도 또한 본 발명에 언급되어야 한다.

[0023] 달리 명시되지 않는다면, 용어 뉴클레오타이드 서열은 이의 상보체를 포함한다. 따라서, 특정 서열을 갖는 핵산은 이의 상보적 서열을 갖는 이의 상보적 가닥을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

[0024] 벡터

[0025] 본 출원에 사용되는 용어 "벡터"는 연결된 또 다른 핵산을 운반할 수 있는 핵산 분자를 의미한다. 또한, 본 출원의 "벡터"라는 용어는 핵산을 운반할 수 있는 재조합 바이러스 입자를 지칭한다.

[0026] 본 설명에 사용되는 용어 "발현"은 프로모터에 의해 구동되는 특정 뉴클레오타이드 서열의 전사 및/또는 번역으로서 정의된다.

[0027] 용도

[0028] "유전자 요법"은 질환, 전형적으로는 유전병을 치료하기 위해 대상체의 세포 및/또는 조직 내로 유전자를 삽입하는 것이며, 여기서, 결함 돌연변이 대립 유전자는 기능성 대립 유전자로 대체된다.

[0029] "치료하다", "치료하는" 및 "요법"은 생물학적 장애 및/또는 이에 수반되는 증상 중 적어도 하나를 완화하거나 제거하는 방법을 지칭한다.

[0030] 용어 "대상체", "환자", "개체" 등은 본 설명에서 상호 교환적으로 사용되며, 본 설명에 기재된 방법을 잘 받아들이는 임의의 동물을 지칭한다. 비제한적인 특정 실시 형태에서, 상기 대상체, 환자 또는 개체는 사람이다. 상기 대상체는 임의의 연령의 남성 또는 여성일 수 있다.

[0031] "치료학적 유효량" 또는 "유효량"은 치료되는 질환의 증상 중 하나 이상을 어느 정도까지 완화시킬 투여되는 치료제의 양을 지칭한다.

[0032] **발명의 상세한 설명**

[0033] 핵산

[0034] 하나의 양태에서, 본 발명은 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 또는 서열번호 5의 군에서 선택되는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 서열번호 11의 아미노산 서열을 갖는 FVIII-BDD (B-domain deleted coagulation factor VIII) 단백질을 인코딩하는 단리된 코돈 최적화된 핵산에 관한 것이다.

[0035] "단리된" 핵산 분자란 하나 이상의 핵산 분자-불순물로부터 식별 및 분리된 핵산 분자를 말한다. 단리된 핵산 분자는 자연 환경에서 발견되는 형태 또는 세트와는 다른 것이다. 따라서, 단리된 핵산 분자는 자연 상태에서 세포에 존재하는 핵산 분자와는 다르다.

[0036] 유전 암호의 특성 중 하나는 축퇴성, 즉, 동일한 아미노산을 인코딩하는 상이한 코돈 (트리뉴클레오타이드)의 능력이다. 동일한 아미노산으로 번역되는 이러한 코돈은 동의 코돈으로 지칭된다. 천연 서열에서, 동의 코돈 중 하나가 진화 과정에서 무작위로 선택되지만, 동의 코돈의 사용 빈도는 상이하다: 각각의 아미노산은 더 선호하거나 덜 선호하는 동의 코돈을 갖는다. 코돈 최적화는 단백질 분자의 생산을 증폭시키기 위해 널리 사용되는 기술이며, 단백질 서열 내의 각각의 아미노산에 대한 적합한 동의 코돈 중 하나의 합리적인 매핑을 제공한다. 코돈 최적화의 공통 원칙 중 하나는 가장 빈번한 코돈의 사용을 포함하는 반면, 조화 (코돈 사용 빈도 분포의 재현)와 같은 다른 접근법은 나중에 도입되었지만 항상 생산성을 높이는 것이 아니다. 코돈 빈도에 추가하여, 서열 GC 함량 (서열의 전체 길이에 대한 구아닌과 사이토신의 비율)은 생산 효율에 영향을 미칠 수 있으며, 특히, 높은 GC 함량은 포유 동물 세포의 mRNA 수준 증가와 연관되는 것으로 나타났다 (Grzegorz Kudla ET AL., High Guanine and Cytosine Content Increases mRNA Levels in Mammalian Cells, June 2006, Volume 4, Issue 6, e180, pp. 933-942). mRNA의 안정적인 2차 구조 요소, 즉, 낮은 자유 폴딩 에너지를 갖는 것들이 효율성을 감소시킬 수 있다는 점도 또한 주목할 가치가 있다.

[0037] 목적 유전자 서열의 코돈 최적화의 상이한 변이체들은 (야생형 유전자와 비교하여) 다음과 같은 결과를 가질 수 있다:

[0038] a) 목적 유전자의 발현 수준이 약간 증가할 것이다;

[0039] b) 목적 유전자의 발현 수준이 유의적으로 증가할 것이다;

- [0040] c) 목적 유전자의 발현 수준이 거의 동일한 수준으로 유지될 것이다;
- [0041] d) 목적 유전자의 발현 수준이 낮아질 것이다.
- [0042] 본 발명에 따른 상기 코돈 최적화된 핵산은 서열번호 1의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 야생형 핵산을 코돈 최적화함으로써 제조되었다.
- [0043] 서열번호 1의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 FIX-BDD 단백질을 인코딩하는 야생형 핵산의 코돈 최적화의 결과, 다수의 코돈 최적화된 핵산들이 제조되었으며, 이들의 단백질 생산 수준을 대조군인 FVIII-BDD-wt와 비교하여 테스트하였다 (서열번호 1을 갖는 야생형 핵산).
- [0044] 모든 코돈 최적화된 핵산은 야생형 핵산과 비교하여 FVIII-BDD 단백질 생산 수준을 증가시켰다; 또한, 일부 코돈 최적화된 핵산은 야생형 핵산과 비교하여 FVIII-BDD 단백질 생산 수준을 약간 증가시켰다. 결과적으로, 본 발명에 따른 서열번호 2 (변이체 FVIII-BDDco-v1), 서열번호 3 (변이체 FVIII-BDDco-v2), 서열번호 4 (변이체 FVIII-BDDco-v3) 또는 서열번호 5 (변이체 FVIII-BDDco-v4)의 군에서 선택되는 코돈 최적화된 핵산은, 놀랍게도 야생형 유전자(FVIII-BDD-wt)와 비교하여 FVIII-BDD 유전자 발현 수준을 증가시키고, 응고 인자 VIII-BDD 단백질 생산 수준을 증가시키고, 응고 인자 VIII-BDD 단백질 활성 수준을 수배로 증가시켰다.
- [0045] 발현 카세트 및 발현 벡터
- [0046] 하나의 양태에서, 본 발명은 FVIII-BDD 단백질을 인코딩하는 상기 코돈 최적화된 핵산 중 어느 하나를 포함하는 발현 카세트에 관한 것이다.
- [0047] 본 출원에 사용되는 용어 "발현하는 카세트" 또는 "발현 카세트"는 특히 적절한 환경에서 상기 발현 카세트에 포함되는 목적 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드의 발현을 촉발할 수 있는 DNA 단편을 지칭한다. 숙주 세포 내로 도입될 때, 발현 카세트는 특히 목적 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 RNA로 전사시킨 다음 전형적으로 추가로 가공하고 결국 목적 폴리펩타이드로 번역하는 세포 메커니즘에 관여할 수 있다. 상기 발현 카세트는 발현 벡터에 함유될 수 있다.
- [0048] 본 발명의 발현 카세트는 프로모터를 요소로 포함한다. 본 출원에 사용되는 "프로모터"라는 용어는 특히 프로모터가 작동 가능하게 연결된 폴리뉴클레오타이드의 전사를 촉진하는 DNA 요소를 지칭한다. 상기 프로모터는 프로모터/인핸서 요소의 일부를 추가로 형성할 수 있다. "프로모터"와 "인핸서" 요소 사이의 물리적 경계가 항상 명확하지는 않지만, 용어 "프로모터"는 전형적으로 RNA 폴리머라아제 및/또는 임의의 관련 인자가 결합하고 전사가 개시되는 핵산 분자 상의 부위를 지칭한다. 인핸서는 시간적으로 뿐만 아니라 공간적으로도 프로모터 활성을 강화한다. 다수의 프로모터는 광범위한 세포 유형에서 전사적으로 활성인 것으로 당해 분야에 공지되어 있다. 프로모터는 2개의 클래스, 즉, 항시적으로 기능하는 프로모터와 유도 또는 탈억제에 의해 조절되는 프로모터로 나누어질 수 있다. 상기 두 클래스 모두는 단백질 발현에 적합하다. 진핵 세포, 특히, 포유 동물 세포에서 고수준의 폴리펩타이드 생산에 사용되는 프로모터는 강력해야 하며 바람직하게는 광범위한 세포 유형에서 활성이어야 한다. 다수의 세포 유형에서 발현을 구동시킬 수 있는 강력한 항시성 프로모터는 당해 분야에 잘 공지되어 있으므로, 본 출원에서 이를 상세히 기재할 필요는 없다.
- [0049] 본 발명의 일 구현예에 따르면, HLP 프로모터가 본 발명의 발현 카세트에 사용된다.
- [0050] 일부 구현예에서, 발현 카세트는 5'-말단에서 3'-말단 방향으로 하기 요소를 포함한다:
- [0051] 좌측 (제1의) 역위 말단 반복부 (inverted terminal repeat: ITR);
- [0052] 프로모터;
- [0053] 신호 펩타이드를 인코딩하는 핵산;
- [0054] FVIII-BDD 단백질을 인코딩하는 전술한 코돈 최적화된 핵산 중 어느 하나;
- [0055] 폴리아데닐화 신호;
- [0056] 우측 (제2의) ITR.
- [0057] 상기 발현 카세트의 구조적 요소들은 서로 작동 가능하게 연결된다.
- [0058] 본 출원에 사용되는 용어 "작동 가능하게 연결된"은 기능적 관계에서 폴리뉴클레오타이드 (또는 폴리펩타이드) 요소의 연결을 지칭한다. 핵산은 또 다른 핵산 서열과 기능적 관계 조건에 존재할 때 "작동 가능하게 연결된

다". 예를 들어, 전사 조절 서열은, 상기 코딩 서열의 전사에 영향을 미치는 경우, 코딩 서열에 작동 가능하게 연결된 것이다. 용어 "작동 가능하게 연결된"은 연결되는 DNA 서열이 전형적으로 인접하고, 2개의 단백질 코딩 영역을 연결하는 것이 필요한 경우, 또한 인접하고, 리딩 프레임에 존재함을 의미한다.

- [0059] 일부 구현예에서, 발현 카세트는 서열번호 13의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 좌측 (제1의) ITR 을 포함한다.
- [0060] 일부 구현예에서, 발현 카세트는 서열번호 14의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 HLP 프로모터를 포함한다.
- [0061] 일부 구현예에서, 발현 카세트는 서열번호 15의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 폴리아데닐화 신호를 포함한다.
- [0062] 일부 구현예에서, 발현 카세트는 서열번호 16의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 우측 (제2의) ITR 을 포함한다.
- [0063] 일부 구현예에서, 신호 펩타이드를 인코딩하는 핵산은 서열번호 17, 서열번호 18, 서열번호 19, 서열번호 20 또는 서열번호 21의 군에서 선택되는 뉴클레오타이드 서열을 갖는다.
- [0064] 일부 구현예에서, 신호 펩타이드를 갖는 FVIII-BDD 단백질(FVIII-BDDco-v1 변이체)을 인코딩하는 코돈 최적화된 핵산은 서열번호 7의 뉴클레오타이드 서열을 갖는다.
- [0065] 일부 구현예에서, 신호 펩타이드를 갖는 FVIII-BDD 단백질(FVIII-BDDco-v2 변이체)을 인코딩하는 코돈 최적화된 핵산은 서열번호 8의 뉴클레오타이드 서열을 갖는다.
- [0066] 일부 구현예에서, 신호 펩타이드를 갖는 FVIII-BDD 단백질(FVIII-BDDco-v3 변이체)을 인코딩하는 코돈 최적화된 핵산은 서열번호 9의 뉴클레오타이드 서열을 갖는다.
- [0067] 일부 구현예에서, 신호 펩타이드를 갖는 FVIII-BDD 단백질(FVIII-BDDco-v4 변이체)을 인코딩하는 코돈 최적화된 핵산은 서열번호 10의 뉴클레오타이드 서열을 갖는다.
- [0068] 일부 구현예에서, 발현 카세트는 5'-말단에서 3'-말단 방향으로 하기 요소를 포함한다:
- [0069] 서열번호 13의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 좌측 (제1의) 역위 말단 반복부 (inverted terminal repeat: ITR);
- [0070] 서열번호 14의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 프로모터;
- [0071] 서열번호 17, 서열번호 18, 서열번호 19, 서열번호 20 또는 서열번호 21의 군에서 선택되는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 신호 펩타이드를 인코딩하는 핵산;
- [0072] FVIII-BDD 단백질을 인코딩하는 전술한 코돈 최적화된 핵산 중 어느 하나;
- [0073] 서열번호 15의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 폴리아데닐화 신호;
- [0074] 서열번호 16의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 우측 (제2의) ITR.
- [0075] 일부 구현예에서, 발현 카세트는 5'-말단에서 3'-말단 방향으로 하기 요소를 포함한다:
- [0076] 서열번호 13의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 좌측 (제1의) 역위 말단 반복부 (inverted terminal repeat: ITR);
- [0077] 서열번호 14의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 프로모터;
- [0078] 신호 펩타이드를 갖는 FVIII-BDD 단백질을 인코딩하는 코돈 최적화된 핵산으로서, 상기 코돈 최적화된 핵산이 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9, 또는 서열번호 10의 군에서 선택되는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 것인, 핵산;
- [0079] 서열번호 15의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 폴리아데닐화 신호;
- [0080] 서열번호 16의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 우측 (제2의) ITR.
- [0081] 하나의 양태에서, 본 발명은 FVIII-BDD 단백질을 인코딩하는 상기 코돈 최적화된 핵산 중 어느 하나, 또는 상기 발현 카세트 중 어느 하나를 포함하는, 발현 벡터에 관한 것이다.
- [0082] 본 발명의 일부 구현예에서, 벡터는 플라스미드, 즉 추가 DNA 세그먼트가 삽입될 수 있는 원형의 이중 가닥 DNA 조각이다.
- [0083] 본 발명의 일부 구현예에서, 벡터는 추가적인 DNA 세그먼트가 바이러스 게놈에 삽입될 수 있는 바이러스 (발현) 벡터이다.
- [0084] 본 발명의 일부 구현예에서, 벡터 (예를 들어, 박테리아 복제 원점 부위를 갖는 박테리아 벡터와 에피솜 벡터)

는 도입되는 숙주 세포 내에서 자율 복제 가능하다. 본 발명의 추가적인 구현예에서, 벡터 (예를 들어, 비-에피솜 벡터)는 숙주 세포 내로 도입될 때 숙주 세포의 게놈 내로 통합되어 숙주 유전자와 함께 복제될 수 있다. 또한, 특정 벡터는 작동 가능하게 연결된 유전자의 발현을 지시할 수 있다. 이러한 벡터는 본원에서 "재조합 발현 벡터" (또는 간단히 "발현 벡터")로 지칭된다.

[0085] 발현 벡터는 플라스미드, 레트로바이러스, 아데노바이러스, 아데노-부속 바이러스 (AAV), 식물 바이러스, 예를 들어, 콜리플라워 모자이크 바이러스, 담배 모자이크 바이러스, 코스미드, YAC, EBV 등을 포함한다. DNA 분자는 벡터 내의 전사 및 번역 제어 서열이 DNA의 전사 및 번역을 조절하는 의도된 기능을 제공하도록 벡터에 삽입될 수 있다. 발현 벡터 및 발현 제어 서열은 사용된 발현 숙주 세포와 상용 가능하도록 선택될 수 있다. DNA 분자는 표준 방법 (예를 들어, 상보적 제한 부위의 연결, 또는 제한 부위가 존재하지 않는 경우, 평활 말단 연결)에 의해 발현 벡터 내로 도입될 수 있다.

[0086] 일부 구현예에서, 발현 벡터는 재조합 아데노-부속 바이러스(AAV)이다.

[0087] 일부 구현예에서, AAV는 하기 AAV 혈청형을 포함하는 군에서 선택된다: AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13, AAV14, AAV15, AAV16, rAAV.rh8, rAAV.rh10, rAAV.rh20, rAAV.rh39, rAAV.Rh74, rAAV.RHM4-1, AAV.hu37, rAAV.Anc80, rAAV.Anc80L65, rAAV.7m8, rAAV.PHP.B, rAAV2.5, rAAV2tYF, rAAV3B, rAAV.LK03, AAV.HSC1, AAV.HSC2, AAV.HSC3, AAV.HSC4, AAV.HSC5, AAV.HSC6, AAV.HSC7, AAV.HSC8, AAV.HSC9, AAV.HSC10, AAV.HSC11, AAV.HSC12, AAV.HSC13, AAV.HSC14, AAV.HSC15 또는 AAV.HSC16.

[0088] 본원의 일부 구현예에서, 벡터 또는 카세트는 발현 제어 서열을 포함할 수 있다. 본 설명에 사용되는 용어 "발현 제어 서열"은 삽입된 코딩 서열의 발현 및 가공을 수행하는데 필요한 폴리뉴클레오타이드 서열을 지칭한다. 발현 제어 서열의 선택을 비롯한 발현 벡터 또는 카세트의 설계가, 형질 전환하고자 하는 숙주 세포의 선택, 단백질의 필요한 발현 수준 등과 같은 요인에 좌우될 수 있다는 것은 당해 분야의 통상의 기술자들에 의해 이해될 것이다. 발현 제어 서열은 적절한 전사 개시, 종결, 프로모터 및 인핸서 서열; 스플라이싱 및 폴리아데닐화 신호와 같은 효율적인 RNA 가공 신호; 세포질 mRNA를 안정화시키는 서열; 번역 효율을 증진시키는 서열 (즉, Kozak 공통 서열); 단백질 안정성을 증진시키는 서열; 및 원하는 경우, 단백질 분비를 증진시키는 서열을 포함한다. 이러한 제어 서열의 성질은 숙주 유기체에 따라 상이하며; 원핵 생물에서, 이러한 제어 서열은 일반적으로 리보솜 결합 부위의 프로모터 및 전사 종결 서열을 포함하며; 진핵 생물에서, 이러한 제어 서열은 전형적으로 프로모터 및 전사 종결 서열을 포함한다. 포유 동물의 발현 숙주 세포에 대한 바람직한 제어 서열은 포유 동물 세포에서 고수준의 단백질 발현을 보장하는 바이러스 요소, 예를 들어, 레트로바이러스 LTR, 사이토메갈로바이러스 (CMV) (예를 들어, CMV 프로모터/인핸서), 시미안 바이러스 40 (SV40)(예를 들어, SV40 프로모터/인핸서), 아데노바이러스 (예를 들어, 주요 후기 프로모터 아데노바이러스 (AdMLP)), 폴리오마바이러스 및 강력한 포유 동물 프로모터, 예를 들어, TTR 프로모터, 천연 면역글로불린 프로모터, 액틴 프로모터, 및 HLP (hybrid liver-specific promoter)로부터 유래된 프로모터 및/또는 인핸서를 포함한다. 발현 제어 서열은 적어도 발현 및 가공에 필수적인 존재인 모든 구성 요소를 포함한다.

[0089] 상기 유전자 및 발현 제어 서열에 추가하여, 본 발명의 재조합 발현 벡터는 숙주 세포에서 벡터의 복제를 조절하는 서열 (예를 들어, 복제 원점) 및 선택 마커 유전자와 같은 추가의 서열을 가질 수 있다. 선택 마커 유전자는 벡터 또는 카세트가 도입된 숙주 세포의 선택을 용이하게 한다

[0090] 본 발명의 하나의 실시 형태에서, 발현 벡터는 하나 이상의 목적 폴리뉴클레오타이드 서열, 목적 유전자, 또는 파보바이러스 서열 또는 역위 말단 반복부 (ITR) 서열에 의해 플랭킹되는 전이유전자를 포함하는 벡터에 관한 것이다.

[0091] 본 발명의 카세트 및 벡터는 아데노-부속 바이러스의 비구조 단백질 (Rep) 및 구조 단백질 (Cap)을 인코딩하는 유전자의 뉴클레오타이드 서열을 포함하지 않는다.

[0092] 숙주 세포

[0093] 하나의 양태에서, 본 발명은 FVIII-BDD 단백질을 생산하기 위한 또는 상기 발현 벡터 중 어느 하나를 생산하기 위한 숙주 세포에 관한 것으로, 상기 숙주 세포는 FVIII-BDD 단백질을 인코딩하는 상기 코돈 최적화된 핵산 중 어느 하나를 포함한다.

[0094] 본원에서 사용되는 용어 "숙주 세포"는 본 발명에 따른 재조합 발현 벡터 또는 카세트가 도입된 세포를 지칭한다. 본 발명은 숙주 세포에 관한 것으로, 상기 숙주 세포는 예를 들어 본 발명에 따른 전술한 벡터를 포함할 수 있다. "숙주 세포"는 특정한 대상 세포만을 지칭하는 것이 아니라 그러한 세포의 자손도 지칭한다는 것을 이해

해야 한다. 돌연변이 또는 환경적 영향으로 인해 후속 세대에서 변형이 발생할 수 있으므로, 이러한 자손은 실제로 부모 세포와 동일하지 않을 수도 있다; 그러나 이러한 세포는 여전히 본원에서 사용되는 용어 "숙주 세포"의 범위에 포함된다.

- [0095] 본 발명에 따른 발현 벡터 또는 카세트는 포유류 세포, 식물 세포, 박테리아 또는 효모 숙주 세포의 형질감염에 사용될 수 있다. 형질감염은 폴리뉴클레오타이드를 숙주 세포에 도입하는 모든 공지된 기술을 통해 수행될 수 있다. 이중 폴리뉴클레오타이드를 포유류 세포에 도입하는 방법은 당 기술 분야에서 잘 알려져 있으며, 텍스트란-매개 형질감염, 양이온성 중합체-핵산 복합체 형질감염, 인산칼슘 침전, 폴리브렌-매개 형질감염, 원형질체 융합, 리포솜 내 폴리뉴클레오타이드 캡슐화, 및 DNA를 핵 내로 직접 미세 주입하는 방법이 포함된다. 또한, 핵산 분자는 바이러스 (발현) 벡터를 통해 포유류 세포로 도입될 수도 있다.
- [0096] 형질전환을 위한 숙주로 사용되는 포유류 세포주는 당 기술 분야에 공지되어 있으며, 이용가능한 다수의 불멸화 세포주가 포함된다. 이들은 예를 들어, 중국 햄스터 난소(CHO) 세포, NS0 세포, SP2 세포, HEK-293T 세포, FreeStyle 293 세포 (Invitrogen), NIH-3T3 세포, HeLa 세포, 베이비 햄스터 신장(BHK) 세포, 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포(COS), 인간 간세포 암종 세포(예를 들어, Hep G2), A549 세포, SK-HEP1, HUH7, Hep-RG 및 기타 다수의 세포주가 포함된다. 세포주는 어떤 세포주가 높은 발현 수준을 가지고 있고 생성되는 단백질의 필요한 특성을 제공하는지 판단함으로써 선택된다. 사용될 수 있는 다른 세포주로는 Sf9나 Sf21 세포와 같은 곤충 세포주가 사용될 수 있다. 본 발명의 재조합 발현 벡터가 포유류 숙주 세포에 도입되면, 숙주 세포에서 융합 단백질을 발현시키기 위해 충분한 시간 동안 숙주 세포를 배양함으로써, 또는 더 바람직하게는 숙주 세포가 배양되는 배양 배지에 융합 단백질을 분비함으로써 FVIII-BDD 단백질이 생산된다. 융합 단백질은 표준 단백질 정제 기술을 사용하여 배양 배지에서 분리할 수 있다. 식물 숙주 세포로는 예를 들어 니코티아나(Nicotiana), 아라비도시스(Arabidopsis), 개구리밥(duckweed), 옥수수, 밀, 감자 등이 포함된다. 박테리아 숙주 세포에는 대장균과 스트렙토마이세스 종이 포함된다. 효모 숙주 세포로는 스킴조사카로미세스 폼베(Schizosaccharomyces pombe), 사카로미세스 세레비시아에(Saccharomyces cerevisiae), 및 피치아 파스토리스(Pichia pastoris)가 포함된다.
- [0097] 상기 숙주 세포는 인간 배아를 이용하여 만들어진 숙주세포를 의미하지 않는다.
- [0098] 상기 숙주 세포는 인간 생식세포의 유전적 무결성을 변형하여 생성된 숙주 세포를 의미하지 않는다.
- [0099] *약제학적 조성물*
- [0100] 하나의 양태에서, 본 발명은 전술한 발현 벡터 또는 카세트 중 어느 하나를 포함하는, FVIII-BDD 유전자를 표적 세포에 전달하기 위한 약제학적 조성물에 관한 것이다.
- [0101] 일부 구현예에서, FVIII-BDD 유전자를 표적 세포에 전달하기 위한 약제학적 조성물은 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 부형제와 조합하여 전술한 발현 벡터 또는 카세트 중 어느 하나를 포함한다.
- [0102] 상기 조성물 중의 활성 물질은 유효량, 예를 들어, 생물학적 유효량으로 존재한다.
- [0103] "약제학적 조성물"은 본 발명에 따른 전술한 발현 벡터 중 어느 하나와, 약제학적으로 허용되고 약리학적으로 상용 가능한 부형제, 충전제, 용매, 희석제, 담체, 보조제, 분산제, 또는 전달제로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 구성 요소를 포함하는 조성물을 의미한다.
- [0104] 본 발명의 약제학적 조성물 및 이의 제조 방법은 의심할 바 없이 당해 분야의 통상의 기술자들에게 자명할 것이다. 약제학적 조성물은 바람직하게는 의약품 제조 및 품질관리 기준 (Good Manufacturing Practice: GMP) 요구 사항을 준수하여 제조되어야 한다.
- [0105] 약제학적 조성물의 일부 구현예에서, 이는 완충제 조성물, 등장화제 (tonicity agent)(삼투용질 또는 삼투압제), 안정화제 및/또는 가용화제를 포함할 수 있다.
- [0106] "약제학적으로 허용되는"은 생물학적 또는 기타 부정적인 부작용을 갖지 않는 물질을 의미하며, 예를 들어, 상기 물질은 임의의 바람직하지 않은 생물학적 효과를 일으키지 않고 대상체에게 투여될 수 있다. 따라서, 이러한 약제학적 조성물은, 예를 들어, 본 발명의 전술한 발현 벡터 중 하나를 대상에게 직접 생체 내(in vivo) 투여 또는 세포의 생체 외(ex vivo) 형질감염에 사용될 수 있다.
- [0107] 용어 "부형제"는 본 출원에서 본 발명의 상기 성분 이외의 임의의 성분을 기재하기 위해 사용된다. 이는 의약품에 필요한 물리 화학적 특성을 부여하기 위해 의약품 생산/제조에 사용되는 무기 또는 유기 성질의 물질이다.
- [0108] 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 안정한 조성물이다.

- [0109] 활성제가 저장 온도, 예를 들어, 2-8℃에서 명시된 저장 기간 동안 물리적 안정성 및/또는 화학적 안정성 및/또는 생물학적 활성을 유지하는 경우, 약제학적 조성물은 "안정하다". 바람직하게는, 상기 활성제는 생물학적 활성 뿐만 아니라 물리적 및 화학적 안정성 모두를 유지한다. 가속 또는 자연 노화 조건에서의 안정성 테스트 결과에 근거하여, 저장 기간이 조정된다.
- [0110] 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 정맥 주사용 용액이다.
- [0111] 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 정맥 주사용 용액을 제조하기 위한 농축물이다.
- [0112] 용도
- [0113] 하나의 양태에서, 본 발명은 FVIII-BDD 유전자를 표적 세포에 전달하기 위한, 전술한 발현 카세트 또는 벡터 또는 전술한 조성물 중 어느 하나의 용도에 관한 것이다.
- [0114] 하나의 양태에서, 본 발명은 A형 혈우병을 앓고 있고/있거나 FVIII 유전자의 기능적 카피를 갖지 않는 대상체에게 FVIII-BDD 단백질을 제공하기 위한, 전술한 발현 카세트 또는 벡터 또는 전술한 조성물 중 어느 하나의 용도에 관한 것이다.
- [0115] FVIII 유전자의 기능적 카피의 결핍은, 유전자 기능의 상실 또는 결함을 초래하는, 게놈 내 FVIII 유전자의 모든 카피에서의 불활성화 돌연변이 또는 결실을 지칭한다.
- [0116] 하나의 양태에서, 본 발명은 전술한 발현 벡터 또는 전술한 조성물 중 어느 하나의 치료학적 유효량을 이를 필요로 하는 대상체의 세포 내로 투여하는 단계를 포함하는, A형 혈우병을 앓고 있는 대상체에게 FVIII-BDD 단백질을 제공하는 방법에 관한 것이다.
- [0117] 하나의 양태에서, 본 발명은 전술한 발현 벡터 또는 전술한 조성물 중 어느 하나를 대상체의 세포 내로 투여하는 단계를 포함하는, A형 혈우병을 앓고 있는 대상체의 표적 세포에 FVIII-BDD 유전자를 전달하는 방법에 관한 것이다.
- [0118] FVIII-BDD 유전자를 표적 세포에 전달할 필요가 있는 대상체 또는 FVIII-BDD 단백질을 제공받을 필요가 있는 대상체란, A형 혈우병을 앓고 있는 대상체, 응고 인자 FVIII 결핍을 갖는 대상체, 또는 FVIII 유전자 기능의 상실 또는 결함을 초래하는 FIX 유전자 내의 불활성화 돌연변이 또는 결실을 갖는 대상체를 말한다.
- [0119] 하나의 양태에서, 본 발명은 A형 혈우병을 앓고 있는 대상체에서 A형 혈우병을 치료하기 위한, 전술한 발현 벡터 또는 전술한 조성물의 용도에 관한 것이다.
- [0120] 하나의 양태에서, 본 발명은 전술한 발현 벡터 또는 전술한 조성물 중 어느 하나의 치료학적 유효량을 A형 혈우병을 앓고 있는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 A형 혈우병을 치료하는 방법에 관한 것이다.
- [0121] 일부 구현예에서, A형 혈우병은 중증 A형 혈우병 (인자 VIII 활성도가 <1%) 또는 중등도 A형 혈우병 (인자 VIII 활성도가 1-5%)이다.
- [0122] 예시적인 투여 방식은 국소 적용, 비강내, 흡입, 경점막, 경피, 장관 (예를 들어, 경구, 직장), 비경구 (예를 들어, 정맥내, 피하, 진피내, 근육내) 투여 뿐만 아니라 직접적인 조직 또는 장기 주사를 포함한다.
- [0123] 본 발명의 일부 구현예에서, 상기 발현 벡터 또는 상기 조성물 중 어느 하나는 대상체에게 정맥 주입으로 투여된다.
- [0124] 상기 발현 벡터 중 어느 하나는 유효량으로 생물체 내에 투여된다. 상기 발현 벡터 중 어느 하나는 바람직하게는 생물학적 유효량으로 생물체 내에 투여된다. 발현 벡터의 "생물학적 유효량"은 세포에서 핵산 서열의 세포형질도입 및 발현을 유발하기에 충분한 양이다. 상기 발현 벡터가 생체 내에서(in vivo) 세포에 투여되는 경우, 발현 벡터의 "생물학적 유효량"은 표적 세포의 형질도입과 표적 세포에서 핵산 서열의 발현을 유발하기에 충분한 양이다.
- [0125] 본 발명에 따른 상기 발현 벡터 중 어느 하나의 투여량은 특정 벡터의 투여 방식에 따라 달라질 것이며, 이는 일상적인 방식으로 결정될 수 있다.
- [0126] 본 발명에 따른 전술한 발현 카세트 또는 벡터 중 어느 하나를 투여하기 위한 세포는 모든 유형의 세포일 수 있으며, 상피 세포(예를 들어, 피부 세포, 호흡기 세포, 및 장 상피세포), 간 세포, 근육 세포, 췌장 세포(췌도 세포 포함), 간 세포, 비장 세포, 섬유아세포, 내피 세포 등을 포함하되 이에 제한되지 않는다.

- [0127] 본 발명에 따른 전술한 발현 카세트 또는 벡터 중 어느 하나는 인간 생식세포의 유전적 무결성을 변형하는 데 사용되지 않는다.
- [0128] 용도의 일부 구체예에서, 본 발명에 따른 전술한 발현 벡터 중 어느 하나 및 이를 기반으로 한 산물은 단일 요법으로 사용된다.
- [0129] 용도의 일부 구체예에서, 본 발명에 따른 전술한 발현 벡터 중 어느 하나 및 이를 기반으로 한 산물은 응고 인자 농축액, 데스모프레신 및/또는 섬유소 용해 억제제를 이용한 대체 요법과 조합되어 사용된다.
- [0130] 용도의 일부 구체예에서, 본 발명에 따른 전술한 발현 벡터 중 어느 하나 및 이를 기반으로 한 산물은 단일클론 항체(예를 들어, 에미시주맙)와 조합되어 사용된다.
- [0131] 용도의 일부 구체예에서, 본 발명에 따른 전술한 발현 벡터 중 어느 하나 및 이를 기반으로 한 치료제는 RNA 간섭 치료제(예를 들어, 피투시란)와 조합되어 사용된다.
- [0132] 용도의 일부 구체예에서, 본 발명에 따른 전술한 발현 벡터 중 어느 하나 및 이를 기반으로 한 산물은 대상체에 한 번만 투여된다.
- [0133] 용도의 일부 구체예에서, 본 발명에 따른 전술한 발현 벡터 중 어느 하나 및 이를 기반으로 한 산물은 대상체에 반복적으로 투여된다.

도면의 간단한 설명

[0134] **도 1**은 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4 또는 서열번호 5에서 선택된 인간 응고 인자 FVIII(FVIII) 유전자 서열을 포함하는 플라스미드 pAAV-hFVIII-BDD의 개략도이다. 플라스미드 서열은 또한 다음의 요소들을 포함한다:

AmpR은 암피실린에 대한 내성을 제공하는 베타-락타마아제 유전자이고;

pUC 원점은 박테리아의 pUC 복제 원점이고;

ITR은 역위 말단 반복부이고;

HLP 프로모터는 합성 조직-특이적 프로모터이고;

sPA는 mRNA 안정성을 증가시키기 위한 합성 폴리아데닐화 신호 서열이다.

도 2는 FVIII-BDD 단백질을 인코딩하는 야생형 핵산과 비교하여, FVIII-BDD (B-domain deleted coagulation factor VIII) 단백질을 인코딩하는 코돈 최적화된 핵산으로 형질감염시킨 후, 배양액으로의 FVIII-BDD 단백질 생산 수준이 증가한 것을 보여주는 그래프이다.

하기로 세포 형질감염시킨 후의 FVIII-BDD 단백질 수준:

- 1- 서열번호 1의 뉴클레오타이드 서열을 갖는, FVIII-BDD 단백질을 인코딩하는 야생형 핵산으로 형질감염시킴.
- 2- 서열번호 2의 뉴클레오타이드 서열을 갖는, FVIII-BDD 단백질을 인코딩하는 코돈-최적화된 핵산으로 형질감염시킴.
- 3- 서열번호 3의 뉴클레오타이드 서열을 갖는, FVIII-BDD 단백질을 인코딩하는 코돈-최적화된 핵산으로 형질감염시킴.
- 4- 서열번호 4의 뉴클레오타이드 서열을 갖는, FVIII-BDD 단백질을 인코딩하는 코돈-최적화된 핵산으로 형질감염시킴.
- 5- 서열번호 5의 뉴클레오타이드 서열을 갖는, FVIII-BDD 단백질을 인코딩하는 코돈-최적화된 핵산으로 형질감염시킴.

도 3은 FVIII-BDD 단백질을 인코딩하는 야생형 핵산과 비교하여, FVIII-BDD 단백질(B-domain deleted coagulation factor VIII)을 인코딩하는 코돈 최적화된 핵산으로 형질감염시킨 후, 배양액에서 FVIII-BDD 단백질 활성 수준이 증가한 것을 보여주는 그래프이다.

하기로 세포 형질감염시킨 후의 FVIII-BDD 활성 수준:

- 1- 서열번호 1의 뉴클레오타이드 서열을 갖는, FVIII-BDD 단백질을 인코딩하는 야생형 핵산으로 형질감염시킴.
- 2- 서열번호 2의 뉴클레오타이드 서열을 갖는, FVIII-BDD 단백질을 인코딩하는 코돈-최적화된 핵산으로 형질감염시킴.
- 3- 서열번호 3의 뉴클레오타이드 서열을 갖는, FVIII-BDD 단백질을 인코딩하는 코돈-최적화된 핵산으로 형질감염시킴.
- 4- 서열번호 4의 뉴클레오타이드 서열을 갖는, FVIII-BDD 단백질을 인코딩하는 코돈-최적화된 핵산으로 형질감염시킴.
- 5- 서열번호 5의 뉴클레오타이드 서열을 갖는, FVIII-BDD 단백질을 인코딩하는 코돈-최적화된 핵산으로 형질감염시킴.

도 4는 FVIII-BDD 단백질을 인코딩하는 야생형 핵산을 포함하는 AAV 발현 벡터와 비교하여, FVIII-BDD 단백질 (B-domain deleted coagulation factor VIII)을 인코딩하는 코돈 최적화된 핵산을 포함하는 AAV 발현 벡터 형태의 핵산을 시험관 내(in vitro) 전달한 경우 FVIII-BDD 단백질 생산 수준이 증가한 것을 보여주는 그래프이다.

하기 세포 형질도입 후의 FVIII-BDD 단백질 수준:

- 1- AAV를 함유하지 않는 대조군 용액(음성 대조군).
- 2- 서열번호 2의 뉴클레오타이드 서열을 갖는, FVIII-BDD 단백질을 인코딩하는 코돈-최적화된 핵산을 포함하는 AAV 혈청형 6 발현 벡터.
- 3- 서열번호 5의 뉴클레오타이드 서열을 갖는, FVIII-BDD 단백질을 인코딩하는 코돈-최적화된 핵산을 포함하는 AAV 혈청형 6 발현 벡터.
- 4- 서열번호 2의 뉴클레오타이드 서열을 갖는, FVIII-BDD 단백질을 인코딩하는 코돈-최적화된 핵산을 포함하는 AAV 혈청형 5 발현 벡터.

도 5는 FVIII-BDD 단백질을 인코딩하는 야생형 핵산을 포함하는 AAV 발현 벡터와 비교하여, FVIII-BDD 단백질 (B-domain deleted coagulation factor VIII)을 인코딩하는 코돈 최적화된 핵산을 포함하는 AAV 발현 벡터 형태의 핵산을 시험관 내(in vitro) 전달한 경우 FVIII-BDD 단백질 활성 수준이 증가한 것을 보여주는 그래프이다.

하기 세포 형질도입 후의 FVIII-BDD 활성 수준:

- 1- AAV를 함유하지 않는 대조군 용액(음성 대조군).
- 2- 서열번호 2의 뉴클레오타이드 서열을 갖는, FVIII-BDD 단백질을 인코딩하는 코돈-최적화된 핵산을 포함하는 AAV 혈청형 6 발현 벡터.
- 3- 서열번호 5의 뉴클레오타이드 서열을 갖는, FVIII-BDD 단백질을 인코딩하는 코돈-최적화된 핵산을 포함하는 AAV 혈청형 6 발현 벡터.
- 4- 서열번호 2의 뉴클레오타이드 서열을 갖는, FVIII-BDD 단백질을 인코딩하는 코돈-최적화된 핵산을 포함하는 AAV 혈청형 5 발현 벡터.

도 6은 FVIII-BDD 단백질을 인코딩하는 코돈 최적화된 핵산을 AAV 발현 벡터 형태로 B6.129S-F8tm1Smoc (HemA) 마우스에 생체 내(in vivo) 전달하는 경우 FVIII-BDD 단백질 수준이 증가한 것을 보여주는 그래프이다.

하기 주사 후 동물의 혈장에서 FVIII-BDD 단백질 수준:

- 1- AAV를 함유하지 않는 대조군 용액(음성 대조군).
- 2- 서열번호 2의 뉴클레오타이드 서열을 갖는, FVIII-BDD 단백질을 인코딩하는 코돈-최적화된 핵산을 포함하는 AAV 혈청형 5 발현 벡터.
- 3- 서열번호 2의 뉴클레오타이드 서열을 갖는, FVIII-BDD 단백질을 인코딩하는 코돈-최적화된 핵산을 포함하는 AAV 혈청형 6 발현 벡터.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0135] **실시예**
- [0136] 하기 실시예는 본 발명의 보다 나은 이해를 위해 제공된다. 이러한 실시예는 예시의 목적일 뿐이지, 어떠한 식으로든 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 이해해서는 안된다.
- [0137] 본 명세서에 인용된 모든 간행물, 특허 및 특허 출원은 본 출원에 참조로 포함된다. 전술한 발명이 명확성 또는 이해의 목적으로 예시와 예로써 어느 정도 상세히 기재되었지만, 특정 변경 및 변형이 첨부된 실시 형태의 사상 또는 범위를 벗어나지 않고 이에 대해 이루어질 수 있다는 것은 본 발명의 교시 내용에 비추어 당해 분야의 통상의 기술자들에게 쉽게 자명할 것이다.
- [0138] **재료 및 일반적인 방법**
- [0139] **제조합 DNA 기술**
- [0140] 문헌 [Sambrook, J. et al, Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989]에 기재된 바와 같이 표준 방법을 사용하여 DNA를 조작하였다. 분자 생물학적 시약을 제조업체의 프로토콜에 따라 사용하였다. 간단히 말하면, 플라스미드가 세포 집단에서 손실되지 않도록, 선택적 항생제 압력 하에 성장한 이. 콜라이 (*E. coli*) 세포에서 추가의 조작을 위해 플라스미드 DNA를 생산하였다. 본 발명자들은 상업용 키트를 사용하여 세포로부터 플라스미드 DNA를 단리하고, 농도를 측정하고, 이를 제한 엔도뉴클레아제 처리 또는 PCR 증폭에 의해 클로닝에 사용하였다. 리가아제를 사용하여 DNA 단편을 서로 연결하고, 클론 선택 및 추가의 생산을 위해 세균 세포 내로 형질 전환시켰다. 생성된 모든 유전자 작제물을 제한 패턴과 완전한 Sanger 서열 분석에 의해 확인하였다.
- [0141] **유전자 합성**
- [0142] 화학적 합성에 의해 제조된 올리고뉴클레오타이드로부터 목적하는 유전자 분절을 제조하였다. 서로의 위에 있는 올리고뉴클레오타이드를 재생시킨 후 경계 프라이머로부터 PCR 증폭을 수행하여, 고유한 제한 부위에 의해 플랭킹된 300 내지 1000 bp 길이의 유전자 분절을 수집하였다. 결과적으로, 목적하는 것을 포함하는 단편 혼합물을 생성하였다. 단편을 제한 부위에서 중간 벡터 내로 클로닝한 후, 서브클로닝된 단편의 DNA 서열을 DNA 서열 분석에 의해 확인하였다.
- [0143] **DNA 서열 결정**
- [0144] DNA 서열을 Sanger 서열 분석에 의해 결정하였다. 서열 생성, 맵핑, 분석, 주석 및 예시를 위해, DNA 및 단백질 서열을 분석하고, 서열 데이터를 SnapGene Viewer 4.2 이상에서 처리하였다.
- [0145] **세포 배양물의 배양**
- [0146] 실험에서는 다음의 세포주를 사용하였다: HEK293 (인간 배아 신장 클론 293), SK-HEP1 (인간 선암종 내피세포주) 및 HUH7 (인간 간세포 암종 세포주). AAV를 생산하는 데 사용된 현탁된 HEK293 세포를 FBS 및 항생제 무함유 완전 배양 배지에서 37°C 및 5% CO₂의 표준 조건 하에 배양하였다. AAV 산물의 효능을 테스트하는 데 사용된 부착성 SK-HEP1 세포를 10% FBS, 항생제/항진균제로 보충된 완전 EMEM 배지에서 37°C 및 5% CO₂의 표준 조건 하에 배양하였다. AAV 산물의 효능을 테스트하는 데 사용된 부착성 HUH7 세포를 10% FBS, 항생제/항진균제로 보충된 완전 DMEM 배지에서 37°C 및 5% CO₂의 표준 조건 하에 배양하였다. 세포를 80~90% 합류에 도달하면 계대 배양하였다. TrypLE Select 효소 (10x)를 사용하여 세포 단층을 분리하였다. 트리판 블루 염색 및 자동 Countess II 계수기를 사용하는 일회용 세포 계수 챔버를 사용하여 세포 생존율을 평가하였다.
- [0147] **세포 배양물의 형질감염**
- [0148] FVIII-BDD 단백질을 인코딩하는 새로운 코돈 최적화된 핵산의 기능을 평가하기 위해, 다양한 hFVIII-BDD 전이유전자의 변이체를 발현하기 위한 발현 카세트를 포함하는 플라스미드를 형질감염에 사용하였다. SK-HEP1 세포를 12웰 플레이트의 웰에 10000세포/cm²의 밀도로 미리 시딩하였다. 하루 후, 동일한 카피 수를 가진 플라스미드를 리포펙타민 3000를 사용하여 복합체로 도입하였다. 형질감염 후 7일째, 배양액 내 FVIII-BDD 단백질의 수준과 활성을 ELISA와 발색 분석법을 통해 확인하였다. 배양액에서 FVIII-BDD 단백질의 수준과 활성을 평가하는 연구를 6개의 독립적인 실험으로 수행하였다. 손상되지 않은 SK-HEP1 세포를 음성 대조군으로 사용하였다.

[0149] **AAV 기반의 발현 벡터의 조립 및 정제**

[0150] FVIII-BDD 유전자의 변이체를 포함하는 AAV 발현 벡터를 조립하기 위해 다음과 같은 3개의 플라스미드로 형질감염된 HEK293 생산 세포를 사용하였다:

- [0151] 1) hFVIII-BDD 전이유전자의 다양한 변이체를 발현하기 위한 AAV 발현 카세트를 포함하는 플라스미드 (도 1);
 - [0152] 2) AAV6 또는 AAV5 혈청형 Cap 유전자와 AAV2 혈청형 Rep 유전자를 발현하기 위한 플라스미드. 각 유전자는 대체 판독 프레임을 사용하여 여러 가지 단백질 산물을 인코딩한다;
 - [0153] 3) AAV 캡시드의 조립 및 패키징에 필요한 아데노바이러스 Ad5 유전자를 발현하기 위한 플라스미드.
- [0154] 72시간 후, 세포를 용해시키고, 벡터를 여과, 크로마토그래피, 초원심분리 방법을 사용하여 정제 및 농축하였다. 바이러스 벡터의 역가는 재조합 바이러스 계능 영역에 특이적인 프라이머와 샘플을 이용한 정량적 PCR을 통해 결정하였으며, 1ml당 바이러스 계능의 카피 수로 표현하였다.

[0155] **세포 배양물의 형질도입**

[0156] HUH7 세포를 12웰 플레이트의 웰에 10000세포/cm²의 밀도로 미리 시딩하였다. 세포가 접착 기질에 부착된 후, AAV 체제를 MOI 500000 vg/cell로 도입하였다. 형질도입 후 7일째, 배양액 내 FVIII-BDD 단백질의 수준과 활성을 ELISA와 발색 분석법을 통해 확인하였다. 배양액에서 FVIII 단백질의 수준과 활성을 평가하는 연구를 6개의 독립적인 실험으로 수행하였다. 손상되지 않은 세포를 음성 대조군으로 사용하였다.

[0157] **ELISA 에 의한 응고 인자 VIII-BDD 단백질의 양 결정**

[0158] 표적 후보물질을 이용한 세포 형질감염 후 배양액 중 응고 인자 VIII-BDD 단백질의 수준을, 비경쟁 고체상 효소면역 검정 (ELISA)의 샌드위치 방법에 의해 평가하였다. 간단히 말하면, 희석 완충액에 희석된 배양액 샘플을 응고 인자 VIII-BDD 에 특이적인 1차 항체로 감작화된 96-웰 플레이트 웰 내로 도입하였다. 동일한 플레이트를 검량선, 대조군을 플롯팅하기 위한 표준물로 로딩하였다. 플레이트를 37°C에서 1 시간 동안 인큐베이션하였다. 비오틴화 항체, 스트렙타아비딘 퍼옥시다아제 접합체 용액 및 TMB를 도입하기 전에 플레이트 웰을 세척 완충액으로 세척하였다. 인자 VIII-BDD 에 특이적인 비오틴화 검출 항체를 함유하는 용액을 도입하고, 플레이트를 37°C에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 그 다음, 생성된 복합체에 스트렙타아비딘 퍼옥시다아제 접합체 용액을 첨가하고, 플레이트를 37°C에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 효소 반응을 시각화하기 위해 TMB 용액을 도입하였다. 일단 필요한 정도의 염색 강도에 도달하면, 모든 웰에 정지 용액을 첨가하여 반응을 정지시켰다. 그 다음, 플레이트 웰 중 용액의 광학 밀도를 측정하였다. 샘플의 예비 희석을 고려한 검량선에 의해 테스트 샘플 중 응고 인자 VIII-BDD 의 농도를 결정하였다.

[0159] **ELISA에 의한 응고 인자 VIII-BDD 단백질의 활성화 측정**

[0160] 세포를 표적 후보물질로 형질감염시킨 후 배양액 내 응고 인자 VIII 단백질의 활성을 발색 검정법을 통해 평가하였다. 이 검정법은, 칼슘 이온, 인지질 및 인자 IXa가 존재할 때 인자 X가 활성화된 형태 Xa로 변환되고, 인자 VIII이 반응에서 보조 인자로 작용하며, 인자 X 활성화 속도가 인자 VIII 수준과 선형적으로 연관되어 있다는 사실에 기초한 것이다. 간략히 설명하면, 희석 완충액에 희석한 배양액 샘플, 검량선을 플롯팅하기 위한 표준물질 및 대조군을 96웰 플레이트의 웰에 도입하였다. 플레이트를 37°C의 온도에서 3분 동안 배양하였다. 인자 IXa, 인자 X, 트롬빈, CaCl₂ 및 인지질을 포함하는 인자 시약 용액을 플레이트의 모든 웰에 주입하였다. 플레이트를 37°C의 온도에서 4분 동안 배양하였다. 발색 기질 S-2765+I-2581 용액을 플레이트의 모든 웰에 주입하였다. 플레이트를 37°C의 온도에서 7분 동안 배양하였다. 필요한 염색 강도에 도달하면, 반응을 멈추기 위해 모든 웰에 20% 아세트산 용액을 첨가하였다. 그런 다음 플레이트 웰에 있는 용액의 광학 밀도를 측정하였다. 테스트 샘플 내 응고 인자 VIII의 활성은 샘플의 예비 희석을 고려한 검량선을 통해 결정하였다.

[0161] **실험실 동물에 대한 생체내(in vivo) 연구**

[0162] 실험을 C57BL/6 마우스 (6~8 주령 수컷)에서 수행하였다. 산물을 단일 정맥내 주사에 의해 동물의 꼬리 정맥 내로 투여하였다. AAV를 함유하지 않는 완충 용액을 음성 대조군 동물 내로 투여하였다. 산물의 투여 전 주사 당일 및 그 다음 발현 벡터의 도입 후 35 및 56 일차에 혈장 샘플링을 수행하였다.

[0163] **통계 분석**

[0164] 결과는 평균값 ± 표준 편차(SD)를 나타내며, Dunnett의 다중 쌍 비교에 따른 일원 분산 분석(ANOVA)을 사용하

여 실험 결과를 비교한 결과, 통계적으로 유의미한 것으로 판명되었다.

[0165] **실시예 1: 개발된 코돈 최적화 알고리즘을 이용한 hFVIII-BDD 유전자 서열의 변형**

[0166] 개발된 유전적 컨스트럭트는 인간-B 도메인이 결손된 응고 인자 VIII 유전자(FVIII-BDD)를 포함하는 발현 카세트를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열이다.

[0167] 결과적으로 생성된 발현 카세트는 재조합 AAV 게놈에서 유전자 발현과 조립에 필요한 모든 요소를 포함한다 (도 1):

[0168] 1) 발현 벡터에 캡슐화된 서열의 말단에 있는 ITR;

[0169] 2) 표적 유전자를 발현하기 위한 요소(프로모터, 전이유전자, 폴리아데닐화 부위);

[0170] 3) 박테리아 세포에서 플라스미드 DNA를 생산하기 위한 박테리아 복제 기원 및 항생제 내성 유전자.

[0171] 야생형 핵산으로서 인간 B-도메인이 결손된 응고 인자 VIII 단백질을 인코딩하는 핵산을 사용했으며, 이는 서열 번호 1의 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 제시된 핵산은 발현 카세트 내에서 대조군으로 사용된다.

[0172] 또한, 발현 효율을 높이기 위해, B-도메인이 결손된 응고 인자 VIII 유전자의 자연-발생 뉴클레오타이드 서열을 코돈 최적화 알고리즘을 사용하여 변형하였다.

[0173] 서열번호 1의 서열에 상응하는 핵산의 코돈 최적화를 통해 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4 또는 서열번호 5의 다수의 코돈 최적화된 핵산이 생성되었으며, 이들을 이용해 응고 인자 VIII-BDD 단백질 발현 및 활성 수준을, 발현 카세트 내에서 대조군(서열번호 1의 핵산)과 비교하여 테스트하였다 (도 1).

[0174] **실시예 2. B-도메인이 결손된 FVIII 유전자 서열의 코돈 최적화 변이체의 시험관 내(in vitro) 기능 테스트**

[0175] 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4 또는 서열번호 5에서 선택된, FVIII-BDD 단백질을 인코딩하는 생성된 코돈 최적화된 핵산을, 좌측(제1의) ITR (inverted terminal repeats), 조직-특이적 프로모터, 전이유전자, 폴리아데닐화 신호, 우측(제2의) ITR로 구성된 발현 카세트의 일부로서 SK-HEP1 세포에 시험관 내 형질감염시켜 확인하였으며, 이때 상기 전이유전자는 서열번호 2 내지 5의 서열 중 하나이다. 대조군으로서, 전이유전자는 인간 B-도메인이 결손된 FVIII 단백질을 인코딩하는 최적화되지 않은 핵산을 사용하였고, 상기 최적화되지 않은 핵산은 서열번호 1의 서열에 상응한다.

[0176] FVIII-BDD 단백질을 인코딩하는 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4 또는 서열번호 5에서 선택된 모든 핵산의 사용은, 서열번호 1의 최적화되지 않은 핵산의 사용에 비해 FVIII-BDD 단백질의 생성(도 2) 및 활성(도 3) 수준을 증가시켰다.

[0177] 또한, B-도메인이 결손된 응고 인자 VIII 단백질(서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4 또는 서열번호 5)을 인코딩하는 생성된 코돈 최적화된 핵산은 서열번호 1의 최적화되지 않은 핵산을 사용하는 경우에 비해 숙주 세포에서 FVIII-BDD 단백질의 시험관 내 발현을 증가시킬 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 코돈 최적화된 핵산은 A형 혈우병 치료를 위한 재조합 FVIII-BDD 단백질을 생산할 수 있는 높은 잠재력을 가지고 있다.

[0178] **실시예 3. FVIII-BDD 유전자 서열의 코돈 최적화된 변이체를 포함하는 발현 벡터의 생성 및 시험관 내(in vitro) 기능 테스트**

[0179] 개발된 코돈 최적화된 핵산을 발현 벡터를 사용하여 시험관 내 전달하는 효율성을 증명하기 위해, 표적 유전자 컨스트럭트를 인코딩하는 플라스미드와 나머지 필수 플라스미드를 함께 사용하여, 서열번호 2의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 아데노-부속 바이러스 혈청형 5를 기반으로 하는 발현 벡터 (이하, AAV5-FVIII-BDDco-v1 라고 함), 서열번호 2의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 아데노-부속 바이러스 혈청형 6을 기반으로 하는 발현 벡터 (이하, AAV6-FVIII-BDDco-v1 라고 함), 또는 서열번호 5의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 아데노-부속 바이러스 혈청형 6을 기반으로 하는 발현 벡터 (이하, AAV6-FVIII-BDDco-v1라고 함)를 생성하였다. 시험관 내 및 생체 내 연구에 사용된 정제된 AAV5-FVIII-BDDco-v1, AAV6-FVIII-BDDco-v1 및 AAV6-FVIII-BDDco-v4 산물은 안전하고 AAV 특성을 변화시키지 않는 표준 완충액 및 부형제를 사용하여 제조하였다.

[0180] AAV5-FVIII-BDDco-v1, AAV6-FVIII-BDDco-v1 및 AAV6-FVIII-BDDco-v4 산물은 부착성 HUH7 세포주를 사용하여 시험관 내에서 테스트하였다 (도 4 및 5). 세포주의 세포들을 12웰 플레이트의 웰에 10,000세포/cm²의 밀도로 플레이트링하였다. 세포가 접착 기질에 부착된 후, AAV 제제를 500,000 vg/세포의 MOI로 도입하였다. 형질도입 후 7일째, 배양액 내 FVIII-BDD 단백질의 수준과 활성을 ELISA로 확인하였다. 모든 샘플은 3회 반복하였다. 손상되

지 않은 세포를 음성 대조군으로 사용하였다.

[0181] 응고 인자 VIII-BDD 유전자의 코돈 최적화된 변이체를 함유하는 생성된 AAV5-FVIII-BDDco-v1, AAV6-FVIII-BDDco-v1 및 AAV6-FVIII-BDDco-v4 발현 벡터는, 응고 인자 VIII-BDD 단백질의 ELISA에 의한 배양액 분석(도 4) 및 활성 분석(도 5)을 통해 확인된 바와 같이, 응고 인자 VIII-BDD 전이유전자를 HUH7 세포에 효과적으로 전달하고 표적 단백질을 생산할 수 있는 것으로 나타났다. AAV 혈청형 5 발현 벡터를 사용하여 서열번호 2를 전달한 경우 배양액에서 FVIII-BDD 단백질의 생성량이 129 ng/ml이고 활성도는 97% 이었다. AAV 혈청형 6 발현 벡터를 사용하여 서열번호 2를 전달한 경우 배양액에서 FVIII-BDD 단백질의 생성량이 104 ng/ml이고 활성도는 91%이었다. AAV 혈청형 6 발현 벡터를 사용하여 서열번호 5를 전달한 경우 배양액에서 FVIII-BDD 단백질의 생성량이 61 ng/ml 이고 활성도는 68%이었다.

[0182] **실시예 4. AAV5-FVIII-BDDco-v1 및 AAV6-FVIII-BDDco-v1 산물의 생체 내(in vivo) 기능 테스트**

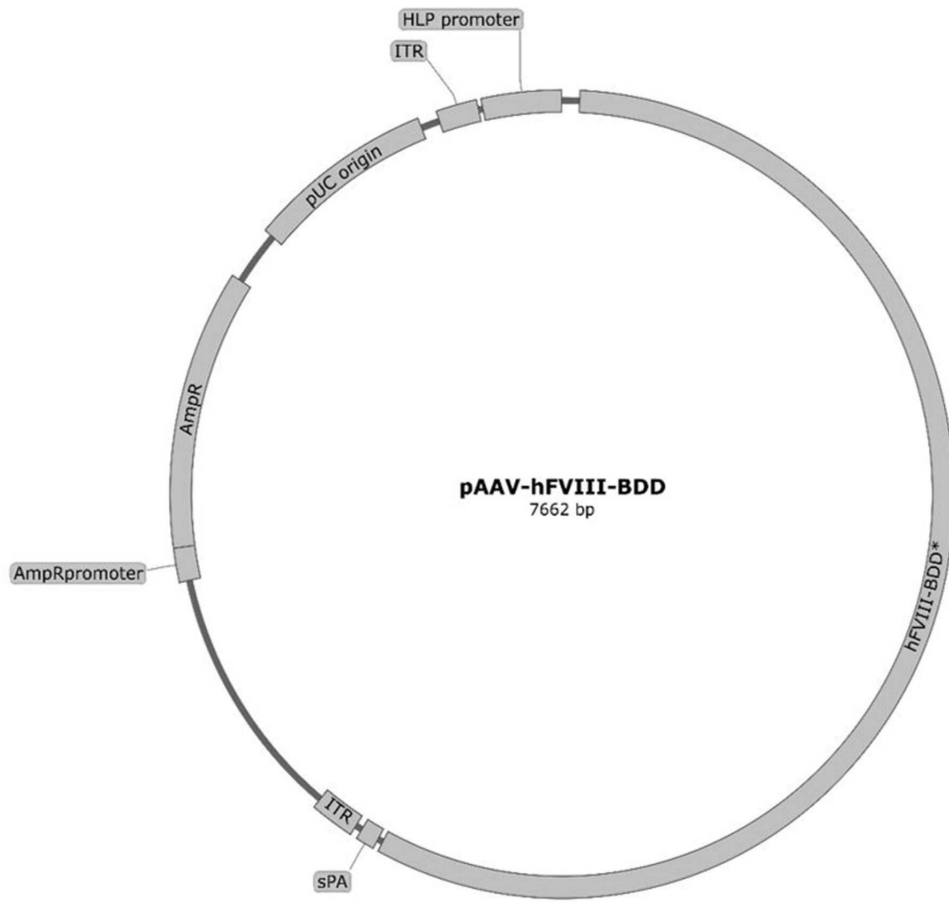
[0183] 개발된 코돈 최적화된 핵산을 발현 벡터에 넣어 생체 내 전달하는 효율성을 보여주기 위해, 선별된 산물인 AAV5-FVIII-BDDco-v1과 AAV6-FVIII-BDDco-v1을 실험실 C57BL/6 마우스에 투여하였다. 본 연구에 사용된 AAV 산물의 용량은 6×10^{13} vg/마우스였다. 산물들은 동물의 꼬리 정맥을 통한 단일 정맥 유체 역학적 투여 방식으로 투여하였다. 혈장 샘플링은 산물 투여 전 주사 당일(0일차)과, 산물 투여 후 35일차와 56일차에 실시하였다. 혈장 샘플에서 응고 인자 VIII-BDD 단백질의 수준은 전술한 바와 같은 ELISA로 결정하였다.

[0184] 생체 내 연구에 따르면, 서열번호 2의 응고 인자 VIII-BDD 유전자 코돈 최적화된 서열을 포함하는 산물인 AAV5-FVIII-BDDco-v1 및 AAV6-FVIII-BDDco-v1을 모두 사용했을 때, 35일과 56일째에 동물의 혈장에서 인자 VIII-BDD 수준이 현저히 증가하는 것으로 관찰되었다(도 6). 서열번호 2의 응고 인자 VIII-BDD 유전자 코돈 최적화된 서열을 포함하는 산물인 AAV5-FVIII-BDDco-v1은 주사 후 35일과 56일째에 동물의 혈장에서 각각 304 ng/ml와 279 ng/ml의 FVIII-BDD 발현을 나타내었다. 서열번호 2의 응고 인자 VIII-BDD 유전자 코돈 최적화된 서열을 포함하는 산물인 AAV6-FVIII-BDDco-v1은 주사 후 35일과 56일째에 동물의 혈장에서 각각 415 및 459 ng/ml의 FVIII-BDD 발현을 나타내었다.

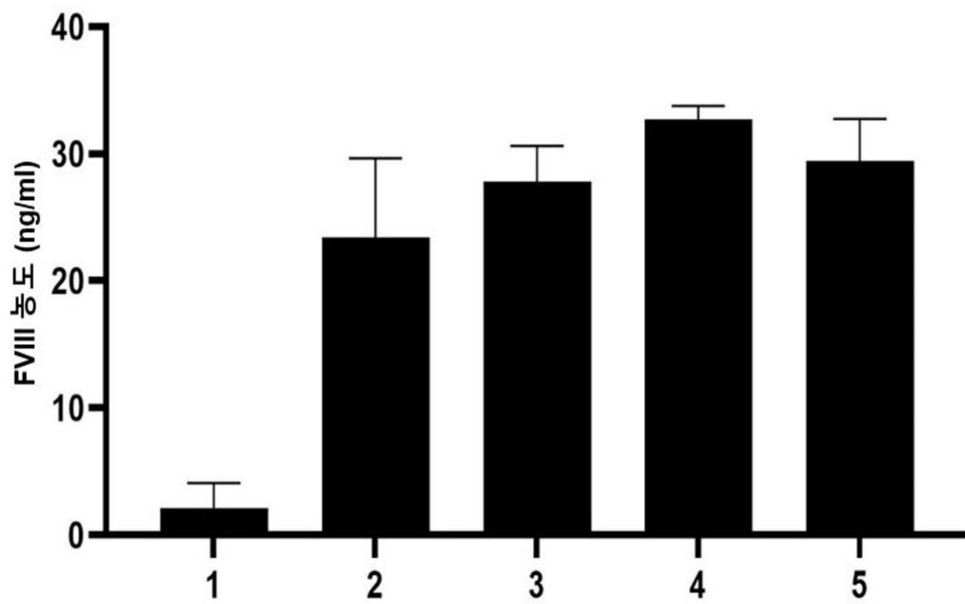
[0185] 따라서, B-도메인이 결손된 응고 인자 VIII 유전자의 코돈 최적화된 버전을 함유하는 개발된 AAV5 및 AAV6 발현 벡터(AAV5-FVIII-BDDco-v1 및 AAV6-FVIII-BDDco-v1)는 생체 내에서 FVIII-BDD 단백질의 발현을 유도할 수 있으며, A형 혈우병의 유전자 치료에 높은 잠재력을 가지고 있다.

도면

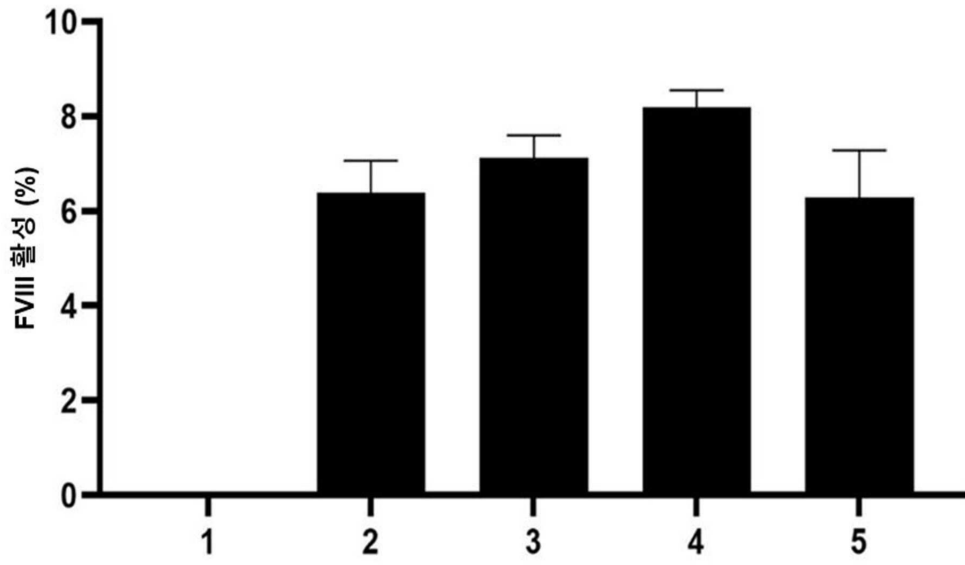
도면1



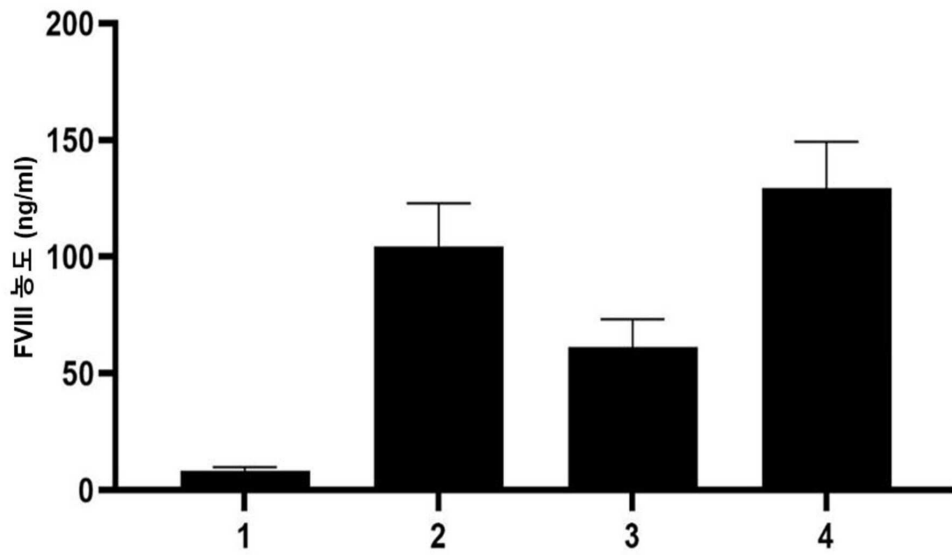
도면2



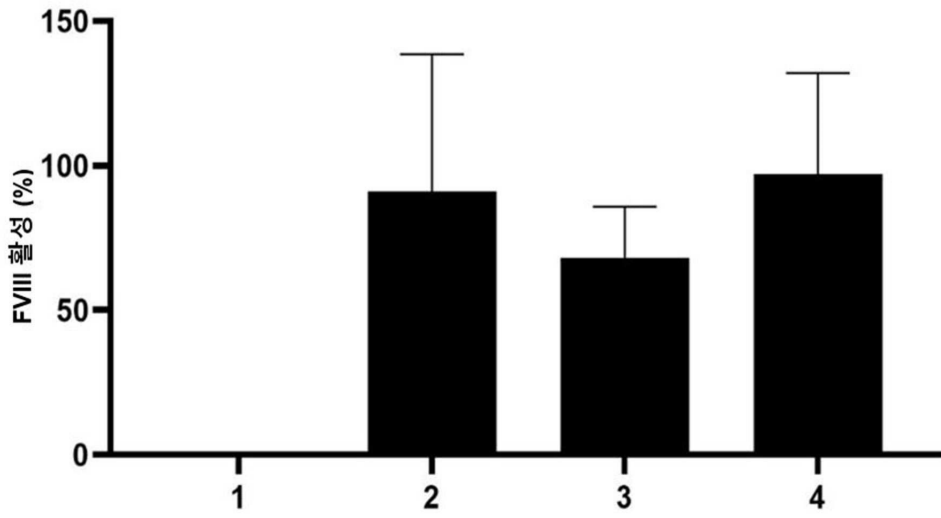
도면3



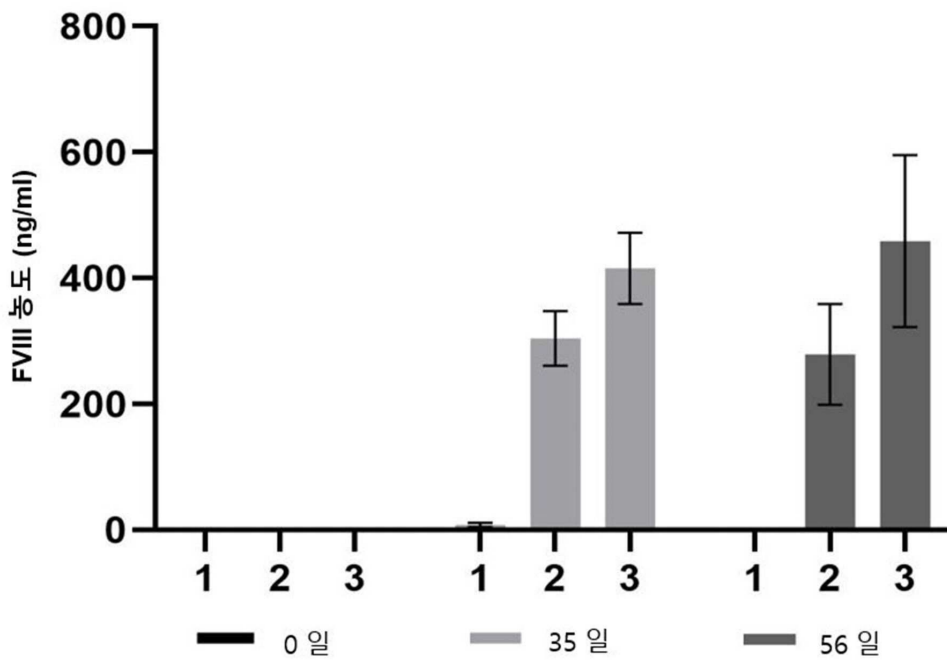
도면4



도면5



도면6



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.