



등록특허 10-2775926



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년03월04일
(11) 등록번호 10-2775926
(24) 등록일자 2025년02월27일

- (51) 국제특허분류 (Int. Cl.)
C12N 15/86 (2006.01) *C07K 14/005* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 15/86 (2013.01)
C07K 14/005 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-7033628
- (22) 출원일자(국제) 2017년04월20일
심사청구일자 2020년04월17일
- (85) 번역문제출일자 2018년11월20일
- (65) 공개번호 10-2019-0046713
- (43) 공개일자 2019년05월07일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2017/059435
- (87) 국제공개번호 WO 2017/182585
국제공개일자 2017년10월26일
- (30) 우선권주장
16305468.7 2016년04월21일
유럽특허청(EPO)(EP)

(56) 선행기술조사문헌

KR1020140053906 A

US20070031455 A1*

PLoS Pathog. 2016 Jun; 12(6): e1005641.

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

전체 청구항 수 : 총 31 항

심사관 : 손영희

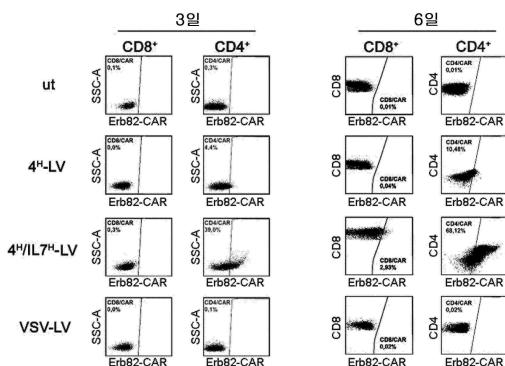
(54) 발명의 명칭 별개의 세포 아형 활성의 선택적 조정 방법

(57) 요약

본 발명은 세포 표적화 도메인에 융합되고 기능성 도메인에 융합된 파라미소바이러스과의 바이러스로부터 유래된 조작된 엔벨로프 당단백질을 포함하는 위형화된 레트로파이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 벡터에 관한 것이다.

본 발명은 또한 세포의 특정한 서브셋, 특히 특정한 면역 세포의 활성을 선택적으로 조정하기 위한 상기 위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 벡터의 용도에 관한 것이다. 이들 위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 벡터는 유전자 요법, 면역 요법 및/또는 백신접종에 특히 유용하다.

대 표 도



(52) CPC특허분류

C07K 2319/03 (2013.01)
C07K 2319/74 (2013.01)
C12N 2740/16043 (2013.01)
C12N 2740/16045 (2013.01)
C12N 2760/18222 (2013.01)
C12N 2760/18422 (2013.01)

(73) 특허권자

위니베르시테 끌로드 베르나르 리옹 I

프랑스 빌뢰르반 애프-69100, 불바르 뒤 11 노바브
르 1918 43

**인스티튜트 내셔널 드 라 쌈테 에 드 라 리세르체
메디칼르 (인제름)**

프랑스 파리 세덱스 13 애프-75654 101 뒤 드 톨비
악

(72) 발명자

꼬제 프랑수아-루아고

프랑스 69004 리옹 께 조세빈 질레 1

벤더 루벤

독일 60327 프랑크푸르트 프랑켄알레 64-65

부흐홀츠 크리슈티안

독일 60594 프랑크푸르트 슈슈트라쎄 10

저우 치

영국 에스지5 1엘에프 허트포드셔 히친 밴크로프트
64 오저 코트 22

명세서

청구범위

청구항 1

(i) SEQ ID NO: 9 의 아미노산 2-34 가 결여되고(GcΔ34), SEQ ID NO: 9 와 비교하여 적어도 2개 또는 3개의 점 돌연변이를 포함하는 니파 바이러스의 절단된 엔벨로프 (envelope) 당단백질 G 로서, 상기 점 돌연변이는 E501A, W504A, Q530A 및 E533A로 이루어진 군에서 선택되는 절단된 엔벨로프 당단백질 G 및 (ii) 조혈 세포, 기질 세포, 간 세포, 근육 세포, 또는 신경계의 세포로부터 선택된 표적 세포에 결합하는 적어도 하나의 세포 표적화 도메인을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 세포 표적화 도메인은 DARPin, ScFv, 표적화 웨티드 및 그들 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 융합 단백질.

청구항 3

(i) SEQ ID NO: 9 의 아미노산 2-34 가 결여되고(GcΔ34), SEQ ID NO: 9 와 비교하여 적어도 2개 또는 3개의 점 돌연변이를 포함하는 니파 바이러스의 절단된 엔벨로프 (envelope) 당단백질 G 로서, 상기 점 돌연변이는 E501A, W504A, Q530A 및 E533A로 이루어진 군에서 선택되는 절단된 엔벨로프 당단백질 G 및 (ii) DARPin, 표적화 웨티드 또는 이의 조합에서 선택되는, 표적 세포에 결합하는 적어도 하나의 세포 표적화 도메인을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 4

(i) SEQ ID NO: 9 의 서열과 비교하여 E501A, W504A, Q530A 및 E533A 점 돌연변이를 포함하고, SEQ ID NO: 9 의 아미노산 2-34 가 결여된 니파 바이러스의 절단된 엔벨로프 (envelope) 당단백질 G (GcΔ34) 및 (ii) 표적 세포에 결합하는 적어도 하나의 세포 표적화 도메인을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 5

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, 절단된 엔벨로프 당단백질 G 는 SEQ ID NO: 9 의 서열과 비교하여 E501A, W504A, Q530A 및 E533A 점 돌연변이를 포함하는 융합 단백질.

청구항 6

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서, 표적 세포는, 조혈 세포, T 세포, B 세포, 단핵구, Th1 세포, Th2 세포, Treg 세포, 비만 세포, 수지상 세포, 자연 살해 세포, 자연 살해 T 세포, 마크로파지, 조혈 줄기 세포, 전구체 T 세포, 전구체 B 세포, 적혈모세포, 혈소판, 또는 호중구에서 선택되는 융합 단백질.

청구항 7

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 세포 표적화 도메인은 CD3, CD8, CD4, CD11b, CD62L, CD56, CCR5 또는 CXCR4 에 특이적인 융합 단백질.

청구항 8

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 세포 표적화 도메인은 항-CD8 scFv 를 포함하고, 항-CD8 scFv 표적화 도메인은 SEQ ID NO:4 의 서열에 제시된 scFv 의 가변 중 (VH) 및 가변 경 (VL) 쇄를 포함하는 융합 단백질.

청구항 9

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 세포 표적화 도메인은 항-CD8 scFv 를 포함하고, 항-CD8 scFv 표적화 도메인은 SEQ ID NO:4 의 서열에 제시된 scFv 를 포함하는 융합 단백질.

청구항 10

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항의 융합 단백질을 포함하는 위형화된 (pseudotyped) 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 벡터.

청구항 11

하기를 포함하는 위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 벡터로서:

- a) (i) SEQ ID NO: 9 의 아미노산 2-34 가 결여되고(GcΔ34), SEQ ID NO: 9 와 비교하여 적어도 2개 또는 3개의 점 돌연변이를 포함하는 니파 바이러스의 절단된 엔벨로프 당단백질 G 로서, 상기 점 돌연변이는 E501A, W504A, Q530A 및 E533A로 이루어진 군에서 선택되는 절단된 엔벨로프 당단백질 G 및 (ii) 적어도 하나의 세포 표적화 도메인을 포함하는 적어도 하나의 세포 표적화 융합 단백질, 및
- b) SEQ ID NO: 11 의 아미노산 525-546 이 결여된 니파 바이러스의 절단된 엔벨로프 당단백질 F (FcΔ22).

청구항 12

제 11 항에 있어서, 치료적 단백질, 아폽토시스 단백질, 키메라 항원 수용체, 세포 표면 수용체, 항체 단편, shRNA, 항원, 사이토카인, 마이크로RNA, CRISPR (Clustered, Regularly Interspaced, Short Palindromic Repeat)/CAS 엘리먼트(들), 징크 평거 뉴클레아제, 또는 S/MAR (Scaffold/Matrix Attachment Region) 애피솔, 리간드, 또는 수용체를 코딩하는 대상 유전자를 포함하는 위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 벡터.

청구항 13

제 11 항에 있어서, 키메라 항원 수용체를 코딩하는 유전자를 포함하는 위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 벡터.

청구항 14

- a) (i) SEQ ID NO: 9 의 아미노산 2-34 가 결여되고(GcΔ34), SEQ ID NO: 9 와 비교하여 적어도 2개 또는 3개의 점 돌연변이를 포함하는 니파 바이러스의 절단된 엔벨로프 당단백질 G 로서, 상기 점 돌연변이는 E501A, W504A, Q530A 및 E533A로 이루어진 군에서 선택되는 절단된 엔벨로프 당단백질 G 및 (ii) 적어도 하나의 세포 표적화 도메인을 포함하는 적어도 하나의 세포 표적화 융합 단백질,
- b) SEQ ID NO: 11 의 아미노산 525-546 이 결여된 니파 바이러스의 절단된 엔벨로프 당단백질 F (FcΔ22), 및
- c) 키메라 항원 수용체를 코딩하는 유전자

를 포함하는, 위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 벡터.

청구항 15

제 11 항 또는 제 14 항에 있어서, 절단된 엔벨로프 당단백질 G 는 상기 엔벨로프 당단백질 G 의 적어도 하나의 천연 수용체에 적어도 부분적으로 결합할 수 없는 위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 벡터.

청구항 16

제 11 항 또는 제 14 항에 있어서, 절단된 엔벨로프 당단백질 G 는 SEQ ID NO: 9 의 서열과 비교하여 E501A, W504A, Q530A 및 E533A 점 돌연변이를 포함하는 위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 벡터.

청구항 17

제 13 항 또는 제 14 항에 있어서, 인코딩된 키메라 항원 수용체는 CD19 에 특이적인 위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 벡터.

청구항 18

제 11 항 또는 제 14 항에 있어서, 상기 세포 표적화 도메인은 DARPin, ScFv, 표적화 펩티드 및 그들 조합으로

이루어진 군에서 선택되는 위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 벡터.

청구항 19

제 11 항 또는 제 14 항에 있어서, 적어도 하나의 세포 표적화 도메인은 조혈 세포, 기질 세포, 간 세포, 근육 세포, 또는 신경계의 세포로부터 선택된 표적 세포에 결합하는 위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 벡터.

청구항 20

제 11 항 또는 제 14 항에 있어서, 적어도 하나의 세포 표적화 도메인은 CD3, CD8, CD4, 암 세포 마커, CD11b, CD19, CD62L, CD56, Glut-1 (포도당 수송체), CD22, CD20, CCR5 또는 CXCR4에 특이적인 위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 벡터.

청구항 21

제 11 항 또는 제 14 항에 있어서, 적어도 하나의 세포 표적화 도메인은 항-CD8 scFv를 포함하고, 항-CD8 scFv 표적화 도메인은 SEQ ID NO:4의 서열에 제시된 scFv의 가변 중 (VH) 및 가변 경 (VL) 쇄를 포함하는 위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 벡터.

청구항 22

제 11 항 또는 제 14 항에 있어서, 적어도 하나의 세포 표적화 도메인은 항-CD8 scFv를 포함하고, 항-CD8 scFv 표적화 도메인은 SEQ ID NO:4의 서열에 제시된 scFv를 포함하는 위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 벡터.

청구항 23

제 12 항에 있어서, 표적 세포의 활성을 선택적으로 조정하고 임의로 상기 표적 세포를 선택적으로 형질도입시키기 위한 위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 벡터.

청구항 24

제 11 항 또는 제 14 항에 있어서, 표적 세포의 활성을 선택적으로 조정하고 임의로 상기 표적 세포를 선택적으로 형질도입시키기 위한 위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 벡터.

청구항 25

제 11 항 또는 제 14 항에 있어서, 표적 세포의 활성을 선택적으로 조정하고 임의로 상기 표적 세포를 선택적으로 형질도입시키는데 사용되기 위한 약제의 제조에서 사용되는 위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 벡터.

청구항 26

표적 세포의 활성을 선택적으로 조정하거나 표적 세포를 선택적으로 형질도입시키기 위한 시험관내 또는 생체외 방법으로서, 상기 방법은 제 11 항 또는 제 14 항에 따른 위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 벡터를 상기 표적 세포를 포함하는 세포와 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.

청구항 27

제 11 항 또는 제 14 항에 있어서, 약제로서 사용하기 위한 위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 벡터.

청구항 28

제 27 항에 있어서, 면역 요법, 유전자 요법 및 백신접종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상에서 사용하기 위한 위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 벡터.

청구항 29

제 27 항에 있어서, 면역 질환, 암, 유전자 질환, 알레르기성 질환, 염증성 질환, 감염성 질환, 대사성 질환, 신경학적 질환, 근육 질환 및 그들 조합의 예방 또는 치료에서 사용하기 위한 위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 백터.

청구항 30

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항의 세포 표적화 융합 단백질을 코딩하는 핵산.

청구항 31

제 11 항에 따른 위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 백터의 제조 방법으로서, 상기 방법은:

(i) 세포 표적화 융합 단백질을 코딩하는 적어도 하나의 핵산으로서, 상기 세포 표적화 융합 단백질은 (i) SEQ ID NO: 9 의 아미노산 2-34 가 결여되고(GcΔ34), SEQ ID NO: 9 와 비교하여 적어도 2개 또는 3개의 점 돌연변 이를 포함하는 니파 바이러스의 절단된 엔벨로프 당단백질 G 로서, 상기 점 돌연변이는 E501A, W504A, Q530A 및 E533A로 이루어진 군에서 선택되는 절단된 엔벨로프 당단백질 G 및 (ii) 적어도 하나의 세포 표적화 도메인을 포함하는 핵산,

(ii) SEQ ID NO: 11 의 아미노산 525-546 이 결여된 니파 바이러스의 절단된 엔벨로프 당단백질 F (FcΔ22) 를 코딩하는 적어도 하나의 핵산, 및

(iii) 상기 레트로바이러스 유래 코어 단백질을 코딩하는 핵산을 포함하는 적어도 하나의 백터
로 패키징 세포주를 공동형질감염시키는 단계를 포함하는

제조 방법.

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 세포의 별개 아형의 활성을 선택적으로 조정하기 위한 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 면역계의 세포는 많은 유형의 병상에 관여된다. 그러므로 그들 활성의 증강 또는 감소는 많은 치료적 전략의 주목을 받고 있다. 매우 뚜렷하게 다른 기능을 갖는 많은 유형의 면역 세포가 일정 세포 표면 단백질의 발현에 의해 구별될 수 있다. 별개의 세포 유형만을, 특히 생체내에서, 선택적으로 활성화 또는 탈활성화시킬 수 있는 이용가능한 기술이 아직까지는 존재하지 않는다.

[0003] 바람직한 면역 반응의 발생을 유도하거나 또는 촉진하기 위해 사이토카인의 사용은 암에 대한 면역 요법에서 매력적인 접근법이다. 사이토카인은 전형적으로 다른 면역 요법을 보조하기 위한 비특이적 보조 물질로서 사용되거나 또는 화학요법에 추가적으로 투여된다. 그러나 지금까지, 사이토카인-기반 치료는 미해결된 전신 독성 때문에 좀처럼 사용되지 않았다. 게다가, 사이토카인은 일반적으로 전신으로 적용되고, 그리하여 관련 사이토카인 수용체를 발현하는 모든 세포 유형을 공격하였다. 그러므로 질환 관련 부위에서 미세 조율된 조정이 가능하지 않았다.

[0004] 이러한 단점을 극복하기 위해서, 사이토카인은 항종양 항체에 융합될 수 있거나 또는 항종양 항체를 갖는 마이크로- 또는 나노-입자에 연결되어, 사이토카인을 종양으로 표적화시키고 전신 부작용을 감소시킨다. 그러나, 이들 융합 단백질 또는 사이토카인-항체 적재된 입자는 덜 안정하고 생체내에서 빠르게 제거되어, 질환 부위에서 비교적 낮은 사이토카인 농도를 초래한다. 또한, 사이토카인-항체 적재된 입자에 의한 사이토카인의 방출은 pH 의존적이다. 게다가, 비선택적으로 이들 이전 접근법에 의해 종양에 전달된 사이토카인 (예컨대 IL-2)은 면역 효과성 및 억제성 세포 둘 모두를 포함하여, 복잡한 종양 미세환경에서 다양한 유형의 상이한 면역 세포를 자극하고, 따라서 암 치료에서 그들 적용이 제한적이다.

[0005] 유전자 요법과 관련하여, 중요한 표적 세포 예컨대 휴지기 인간 T 세포, B 세포 및 HSC (조혈 줄기 세포)는 렌티바이러스 벡터의 형질도입에 내성이다. 통상의 VSV-LV에 의해 매개되는 형질도입은 T 세포가 활성화될 때 예만 일어난다. 지금까지 수행된 유전자 요법 실험에서, T 세포는 일반적으로 T 세포에서 표현형 및 기능적 변화를 유도하고 결국 생체내에서 감소된 T 세포 지속성 및 항종양 효과를 초래하게 되는 동족 항원 수용체를 통해서 활성화되었다.

[0006] 휴지기 T 세포에서 유전자 전달을 촉진하기 위해서, 몇몇 키메라 렌티바이러스 벡터가 생성되었다. 예를 들어, Verhoeven 등 (*Blood*, 2003, vol. 101, n° 6)은 2가지 유형의 엔벨로프 (envelope) 당단백질, 즉 키메라 MLV (*Murine Leukemia Virus*) 엔벨로프 당단백질 (gp)이 N-말단에서 IL-7 및 VSV-G (*Vesicular Stomatitis Virus glycoprotein*)에 융합된 것으로 위형화된 (pseudotyped) HIV-유래 벡터를 개시한다. 이들 IL-7 벡터 입자는 휴지기 T 세포를 효율적으로 형질도입시킬 수 있고 T 세포 활성화를 유도시킬 수 있지만 동일하게 CD4+ 및 CD8+ T 세포에 형질도입된다. 따라서, 그들은 상이한 T 세포 서브셋을 구별할 수 없다. 게다가, 비표적화된 엔벨로프 gp, 예컨대 VSV-G gp가 필요하다는 사실은 아마도 원치 않는 조혈 또는 내피 세포의 형질도입을 가능하게 할 것이다. 한가지 예외는 홍역 바이러스 (MeV) 당단백질로 위형화된 렌티바이러스 (MV-LV)이다. MV-LV는 G0/G1a 세포 주기 상태를 변화시키지 않고 휴지기 T 림프구의 형질도입을 매개할 수 있다. Zhou 등 (*J Immunol*, 2015, vol. 195, n° 5)은 또한 CD4-표적화 LV가 신선하게 단리된 휴지기 T 세포에 형질도입될 수 있지만, 높은 입자 용량에서 매우 낮은 효율 (10% 미만)이라는 것을 개시한다.

[0007] 마지막으로, 양자 T 세포 용법을 위해 덜 분화된 종양 특이적 T 세포를 생성시키는 현행 전략은 T 세포 자극 및 배양 프로토콜의 최적화에 의존적이다. 예를 들어, 더 많은 T_{SCM} 세포 (*Stem memory T cell*) 또는 T_{CM} 세포 (*Central memory T cell*)를 생산하기 위해서, IL-15 및 IL-7 또는 IL-21 및 IL-7의 조합이 T 세포 자극 및 확장에 사용된다. 이러한 배양 시스템은 매우 비싼데 정기적인 사이토카인 재보충 (2일 마다)이 요구되기 때문이다. 그 이후에, 바람직한 세포 유형을 수득하기 위해 몇몇 세포 분류 단계가 일반적으로 실행된다.

[0008] 그러므로 여전히 면역 세포의 별개 아형의 활성화를 선택적이고 효율적으로 조정하기 위한 방법을 제공하는 것이 요구된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0009]

발명의 상세한 설명

[0010]

본 발명자는 파라믹소바이러스과 바이러스의 당단백질에 그 각각이 융합되는 세포-특이적 표적화 도메인 (예를 들어 CD4+ T 세포 또는 CD8+ T 세포에 특이적) 및 기능성 도메인, 예를 들어 사이토카인 둘 모두를 보유하는 위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 벡터 (예를 들어, 렌티바이러스-유사 입자 (VLP) 또는 렌티바이러스 벡터 (LV))를 사용하여 면역 세포의 별개 아형의 활성을 선택적으로 조정하는 것이 가능하다는 것을 놀랍게도 발견하였다. 상기 레트로바이러스 벡터는 또한 표적화 세포로 패키징된 유전자를 선택적이고 효율적으로 전달한다.

[0011]

사실상, 위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 벡터 상에서 세포-특이적 표적화 도메인과 기능성 도메인을 조합하는 것이 세포-특이적 표적화 도메인만을 포함하는 상응하는 입자 또는 벡터와 비교하여 표적화된 면역 세포의 아형의 선택적 활성을 상당히 개선시킨다는 것을 예상치 않게 발견하였다.

[0012]

예를 들어, 발명자는 자극성 사이토카인-표시 T 세포 표적화 입자가, 혼합된 세포 유형의 배양 및 생체내 인간 혈액계 마우스 모델에서 표적화된 T 세포 서브셋을 선택적으로 활성화시키고 또한 임의의 자극성 배양 조건에 대한 필요없이, 표적화된 T 세포 아형으로 패키징된 유전자를 전달한다는 것을 보여주었다. MeV (홍역 바이러스) 당단백질 ($4^H/IL7^H$ -VLP)을 기반으로 하는 IL-7 (인터루킨-7)-표시 CD4-표적화 입자는 실제로 배양된 초대 CD4+ 세포의 생존을 특이적으로 활성화시키고 촉진시키는 한편, NiV (니파 바이러스 (Nipah virus)) 당단백질 ($8^G/IL7^G$ -VLP)을 기반으로 하는 L7-표시 CD8-표적화 입자는 CD8+ T 세포의 생존을 선택적으로 활성화시키고 촉진한다. 게다가, $4^H/IL7^H$ -LV는 용량-의존적 방식으로, 세포 혼합물 중 CD4+ T 세포로 GFP 이식유전자를 효율적이고 특이적으로 전달한다. 부모 CD4-표적화 LV (IL-7을 동시표시하지 않음)와 비교하여, $4^H/IL7^H$ -LV는 선택적으로 휴지기 CD4+ T 세포로 치료적 ErbB2CAR 이식유전자를 전달하는데 더 효율적이다. CD8+ T 세포의 유사한 독점적 유전자 전달 및 자극이 또한 CD8/IL-7 동시표시 NiV 당단백질 위형화된 렌티바이러스 벡터 ($8^G/IL7^G$ -LV)에서도 관찰되었다. 실제로, $8G/IL7G$ -LV는 선택적 CD8+ T 세포 활성화 및 표적화된 유전자 전달에서 8^G -LV에 비해 더욱 효율적이다 (실시예 참조).

[0013]

본 발명에 따른 레트로바이러스-유사 입자 및 레트로바이러스 벡터에는 예전대 다음과 같은 많은 장점이 존재한다:

[0014]

- 세포 표적 부위에서 높은 국소 농도의 사이토카인을 제공하고, 그리하여 효율을 개선시키고 사이토카인 요법의 심각한 부작용을 예방함,

[0015]

- 가용성 사이토카인과 비교하여 표적 세포의 보다 안정하고 일정한 자극을 제공하고, 그리하여 사이토카인 요법의 효율을 개선시킴,

[0016]

- 단일 입자 또는 레트로바이러스 벡터 상에서 상이한 유형의 사이토카인 및 상이한 유형의 표적화 도메인을 조합할 수 있게 매우 탄력적인 시스템을 제공함,

[0017]

- 시험관내 또는 생체내에서 세포-특이적 유전자 전달과 세포 자극의 커플링을 가능하게 하고, 그 결과로 특별한 휴지기 T 세포 서브셋을 보다 효율적으로 형질도입시키게 됨,

[0018]

- 입자 또는 벡터 표면 상에 표시된 사이토카인과의 상호작용에 기인하여 시험관내 또는 생체내에서 유전자 전달과 T 세포 표현형 유도의 커플링을 가능하게 하고, 형질도입된 세포의 분화는 제어됨,

[0019]

그리고 보다 일반적으로:

[0020]

- 시험관내 또는 생체내에서 특별한 세포 또는 세포의 서브셋으로, 제한없이 유전자, mRNA, shRNA, 마이크로 RNA, 웹티드, 단백질, 단백질 단편 및 그들의 조합을 포함하는 치료적 약물(들) 및/또는 생물학적 물질의 전달을 가능하게 함,

[0021]

- 양자요법을 위한 보다 쉬운 세포 제조 방법 (예를 들어, T 세포 또는 조혈 세포 제조 방법)을 가능하게 함,

[0022]

- 인간에서는 낮은 기준 항체로 인해, 니파 바이러스 유래 당단백질로 위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 벡터 사용시 생체내에서 내성 문제를 예방함.

- [0023] 본 발명은 따라서:
- [0024] a) (i) 파라믹소바이러스과 바이러스의 엔벨로프 당단백질 G 또는 H로부터 유래된 단백질로서 상기 단백질은 바람직하게 상기 엔벨로프 당단백질 G 또는 H의 세포질 영역의 적어도 한 부분이 결여되고 바람직하게 상기 엔벨로프 당단백질 G 또는 H의 적어도 하나의 천연 수용체에 적어도 부분적으로 결합할 수 있는 것인 단백질, 또는 경막 도메인 및 (ii) 적어도 하나의 세포 표적화 도메인을 포함하는 적어도 하나의 세포 표적화 융합 단백질,
- [0025] b) (i) 파라믹소바이러스과 바이러스의 엔벨로프 당단백질 G 또는 H로부터 유래된 단백질로서 상기 단백질은 바람직하게 상기 엔벨로프 당단백질 G 또는 H의 세포질 영역의 적어도 한 부분이 결여되고 바람직하게 상기 엔벨로프 당단백질 G 또는 H의 적어도 하나의 천연 수용체에 적어도 부분적으로 결합할 수 있는 것인 단백질, 또는 경막 도메인 및 (ii) 적어도 하나의 기능성 도메인을 포함하는 적어도 하나의 조정성 (modulating) 융합 단백질, 및
- [0026] c) 파라믹소바이러스과 바이러스의 엔벨로프 당단백질 F로부터 유래되고 바람직하게 상기 엔벨로프 당단백질 F의 세포질 영역의 적어도 한 부분이 결여된 적어도 하나의 당단백질
- [0027] 을 포함하고,
- [0028] 여기서 상기 세포 표적화 융합 단백질 및/또는 상기 조정성 융합 단백질은 파라믹소바이러스과 바이러스의 엔벨로프 당단백질 G 또는 H로부터 유래된 단백질을 포함하는 것인, 위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 벡터에 관한 것이다.
- [0029] 상기 파라믹소바이러스과의 바이러스는 예를 들어 홍역 바이러스 (MeV), 개 디스템퍼 바이러스, 고래목 몰빌리 바이러스, 가성우역 (Peste-des-petits-ruminants) 바이러스, 바다표범 디스템퍼 바이러스, 및 우역 바이러스로 이루어진 군으로부터 선택되는 몰빌리바이러스 (*Morbillivirus*) 속의 바이러스, 또는 예를 들어 니파 바이러스 (NiV), 시더 바이러스 (Cedar virus) 및 헨드라 바이러스 (Hendra virus)로 이루어진 군으로부터 선택되는 헤니파바이러스 (*Henipavirus*) 속의 바이러스일 수 있다.
- [0030] a) 및/또는 b)의 단백질은 바람직하게 상기 엔벨로프 당단백질 G 또는 H의 서열과 비교하여 적어도 2개의 돌연변이를 포함하고, 상기 적어도 2개 돌연변이는 그 결과로 상기 엔벨로프 당단백질 G 또는 H의 적어도 하나의 천연 수용체에 대한 적어도 부분적인 결합 불능을 야기시킨다.
- [0031] 상기 세포 표적화 도메인은 DARPin, scFv, 표적화 펩티드 및 그들 조합으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고/있거나 상기 기능성 도메인은 사이토카인, 성장 인자, 호르몬, 신경전달물질, 아폽토시스 리간드 및 그들 조합으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0032] 표적 세포는 조혈계 (T 세포, B 세포, 단핵구, Th1 세포, Th2 세포, Treg 세포, 비만 세포, 수지상 세포 (DC), 자연 살해 (NK) 세포, 자연 살해 T (NKT) 세포, 마크로파지, 조혈 줄기 세포, 전구체 T 및/또는 B 세포, 적혈모 세포, 혈소판 및/또는 호중구 포함), 스트로마 세포, 내피 세포, 간 세포, 근육 세포, 신경계의 세포, 질환 세포 및 그들 조합의 세포로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [0033] 본 발명은 또한 표적 세포의 활성을 선택적으로 조정하고/하거나 표적 세포를 선택적으로 형질도입시키기 위한 상기 정의된 바와 같은 위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 벡터의 용도에 관한 것이며, 표적 세포는 예를 들어 상기에 정의된 바와 같다.
- [0034] 본 발명은 또한 표적 세포의 활성을 선택적으로 조정하고/하거나 표적 세포를 선택적으로 형질도입시키기 위한 방법에 관한 것이며, 상기 방법은 상기 정의된 바와 같은 위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 벡터를 상기 표적 세포를 포함하는 세포와 접촉시키는 단계를 포함하고, 표적 세포는 예를 들어 상기 정의된 바와 같다.
- [0035] 본 발명은 또한 약제로서, 바람직하게 면역 요법, 유전자 요법 및/또는 백신접종에서, 예를 들어 면역 질환 (예를 들어 자가면역 질환), 암, 유전자 질환, 알레르기 질환, 염증성 질환, 감염성 질환, 대사성 질환, 신경학적 질환 (예를 들어, 신경 이영양증, 파킨슨 질환, 헌팅تون 질환, 알츠하이머 질환), 근육 질환 및 그들 조합의 예방 및/또는 치료에서 사용을 위한 상기 정의된 바와 같은 위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 벡터에 관한 것이다.
- [0036] 본 발명은 또한 세포 표적화 융합 단백질을 코딩하는 서열 및/또는 조정성 융합 단백질을 코딩하는 서열을 포함하는 핵산에 관한 것으로서:

- [0037] - 상기 세포 표적화 융합 단백질은 (i) 파라믹소바이러스과 바이러스의 엔벨로프 당단백질 G 또는 H로부터 유래된 단백질 또는 경막 도메인 및 (ii) 적어도 하나의 세포 표적화 도메인을 포함하고,
- [0038] - 상기 조정성 융합 단백질은 (i) 파라믹소바이러스과 바이러스의 엔벨로프 당단백질 G 또는 H로부터 유래된 단백질 또는 경막 도메인 및 (ii) 적어도 하나의 기능성 도메인을 포함한다.
- [0039] 본 발명은 또한 상기에 정의된 바와 같은 핵산을 포함하는 벡터에 관한 것이다.
- [0040] 본 발명은 또한 상기에 정의된 바와 같은 위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 벡터를 제조하기 위한 방법에 관한 것이고, 상기 방법은:
- [0041] (i) 세포 표적화 융합 단백질을 코딩하는 적어도 하나의 핵산으로서, 상기 세포 표적화 융합 단백질은 (i) 파라믹소바이러스과 바이러스의 엔벨로프 당단백질 G 또는 H로부터 유래된 단백질 또는 경막 도메인 및 (ii) 적어도 하나의 세포 표적화 도메인을 포함하는 것인 핵산,
- [0042] (ii) 조정성 융합 단백질을 코딩하는 적어도 하나의 핵산으로서, 상기 조정성 융합 단백질은 (i) 파라믹소바이러스과 바이러스의 엔벨로프 당단백질 G 또는 H로부터 유래된 단백질 또는 경막 도메인 및 (ii) 적어도 하나의 기능성 도메인을 포함하는 것인 핵산,
- [0043] (iii) 파라믹소바이러스과 바이러스의 엔벨로프 당단백질 F로부터 유래된 당단백질을 코딩하는 적어도 하나의 핵산,
- [0044] (iv) 상기 레트로바이러스 유래의 코어 단백질을 코딩하는 핵산을 포함하는 적어도 하나의 벡터, 및
- [0045] (v) 임의로, 패키징 적격성 레트로바이러스 유래 게놈을 포함하는 적어도 하나의 벡터
- [0046] 로 패키징 세포주를 공동형질감염시키는 단계를 포함하고,
- [0047] 상기 세포 표적화 융합 단백질 및/또는 상기 조정성 융합 단백질은 파라믹소바이러스과 바이러스의 엔벨로프 당단백질 G 또는 H로부터 유래된 단백질을 포함한다.
- [0048] 위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 벡터
- [0049] 본 명세서에서 사용되는 "레트로바이러스-유사 입자"는 레트로바이러스 단백질 Gag, Pol 및 Env (엔벨로프)를 포함하지만, 임의의 레트로바이러스 유래의 유전자 정보는 포함하지 않는 입자를 의미한다.
- [0050] Gag, Pol 및 Env 단백질은 레트로바이러스로부터 유래되고 패키징 세포주에 의해서 트랜스로 제공된다.
- [0051] 본 명세서에서 사용되는 "레트로바이러스 벡터"는 Gag, Pol 및 Env (엔벨로프) 단백질 및 RNA 분자를 포함한다. 상기 RNA 분자는 임의의 gag, env 또는 pol 유전자를 함유하지 않지만, 결과적 입자로 RNA 분자의 효과적인 패키징에 요구되는 psi 엘리먼트 및 LTR을 포함한다. 상기 RNA 분자는 적합한 프로모터의 제어 하에 있는 관심 유전자를 더 포함할 수 있고, 그리하여 숙주 또는 표적 세포의 게놈에 상기 유전자의 통합시 발현된다.
- [0052] 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 벡터는 그의 코어 단백질, 즉 Gag 및 Pol 유전자에 의해 코딩되는 단백질이 레트로바이러스로부터 유래되는, 각각 바이러스-유사 입자 또는 바이러스 벡터이다.
- [0053] 용어 "레트로바이러스"는 본 명세서에서 그 게놈이 RNA 분자로 이루어지고 역전사효소를 포함하는 바이러스를 의미한다.
- [0054] 레트로바이러스는 레트로바이러스과의 구성원이다. 레트로바이러스는 온코바이러스, 렌티바이러스 또는 스푸마바이러스일 수 있다.
- [0055] 온코바이러스는 알파레트로바이러스, 베타레트로바이러스, 델타레트로바이러스, 앱실론레트로바이러스 또는 감마레트로바이러스일 수 있다.
- [0056] 레트로바이러스가 온코바이러스일 때, 상기 레트로바이러스는 MLV (Murine leukemia virus; 쥐과동물 백혈병 바이러스), ASV (Avian sarcoma virus; 조류 육종 바이러스), 고양이 백혈병 바이러스, 소 백혈병 바이러스, RSV (Rous sarcoma virus; 라우스 육종 바이러스), MPMV (Mason-Pfizer monkey virus; 메이슨-파이저 원숭이 바이러스), HTLV I (Human T-cell leukemia virus-I; 인간 T-세포 백혈병 바이러스-I) 또는 HTLV II (Human T-cell leukemia virus-II; 인간 T-세포 백혈병 바이러스-II)일 수 있다.
- [0057] 레트로바이러스가 렌티바이러스일 때, 상기 레트로바이러스는 HIV (Human Immunodeficiency Virus; 인간 면역결

펩 바이러스), 바람직하게 HIV-1 또는 HIV-2, SIV (Simian Immunodeficiency Virus; 원숭이 면역결핍 바이러스), EIAV (Equine Infectious Anemia Virus; 말 감염성 빈혈 바이러스), FIV (Feline Immunodeficiency Virus; 고양이 면역결핍 바이러스) 또는 CAEV (Caprine Arthritis Encephalitis Virus; 염소 관절염 뇌염 바이러스)일 수 있다.

[0058] 레트로바이러스가 스푸마바이러스일 때, 상기 레트로바이러스는 HFV (Human Foamy Virus; 인간 거품형성 바이러스)일 수 있다.

[0059] 예를 들어, 레트로바이러스 백터는 렌티바이러스 백터, 알파 레트로바이러스 백터, 젖과동물 레트로바이러스 백터 또는 FIV 백터일 수 있다.

[0060] 이러한 레트로바이러스의 계놈은 유전자 데이타베이스에서 쉽게 입수할 수 있다.

[0061] 바람직한 구체예에서, 상기 레트로바이러스는 렌티바이러스, 보다 바람직하게 HIV, 예컨대 HIV-1 또는 HIV-2이다.

[0062] 따라서 본 발명은 바람직하게 렌티바이러스 유사 입자 (LVP) 또는 렌티바이러스 백터 (LV), 바람직하게 HIV-유래 LVP 또는 LV에 관한 것이다.

[0063] 본 명세서에서 표현 "위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 백터"에서 용어 "위형화된 (pseudotyped)"은 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 백터가 상기 레트로바이러스 이외의 적어도 다른 바이러스로부터 유래되고/되거나 조작된 엔벨로프 당단백질, 예를 들어 키메라 및/또는 돌연변이된 엔벨로프 당단백질인 엔벨로프 당단백질을 보유하는 것을 의미한다.

[0064] 본 발명에 따른 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 백터는 예를 들어 파라믹소바이러스과의 바이러스, 바람직하게 하기에 상세하게 기술하는 바와 같은 몰빌리바이러스 속 바이러스로부터 유래되거나 또는 헤니파바이러스 속 바이러스 당단백질로부터 유래된 조작된 당단백질에 의해 위형화된다.

파라믹소바이러스과의 엔벨로프 당단백질

[0066] 본 발명에 따라서 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 백터를 위형화시키는데 사용되는 변형된 엔벨로프 당단백질은 파라믹소바이러스과 바이러스의 엔벨로프 당단백질로부터 유래된다.

[0067] 파라믹소바이러스과 바이러스는 바람직하게 몰빌리바이러스 속 또는 헤니파바이러스 속의 바이러스이다.

[0068] 몰빌리바이러스 속 및 헤니파바이러스 속의 바이러스는 표적 세포로 진입을 위해서 다음의 2개 유형의 당단백질을 사용한다: 부착 단백질 (헤니파바이러스 속 바이러스의 당단백질 G 또는 몰빌리바이러스 속 바이러스의 당단백질 H라고 함) 및 당단백질 F (또한 융합 단백질 또는 단백질 F라고 함). 단백질 F는 숙주 세포의 세포막과 바이러스 막의 융합을 매개한다. 당단백질 G/H는 표적 막 상의 수용체를 인식하고 이의 막융합 기능에서 F 단백질을 지원한다. 당단백질 G/H 및 당단백질 F 둘 모두는 본 발명에 따라서 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 백터를 위형화시키기 위해 변형된 형태로 사용된다.

[0069] 몰빌리바이러스 속의 바이러스는 예를 들어 홍역 바이러스, 개 디스템퍼 바이러스, 고래목 몰빌리바이러스, 가성우역 바이러스, 바다표범 디스템퍼 바이러스 및 우역 바이러스로 이루어진 군에서 선택된다.

[0070] 몰빌리바이러스 속의 바람직한 바이러스는 홍역 바이러스 (MeV)이다.

[0071] 헤니파바이러스 속의 바이러스는 예를 들어 니파 바이러스, 시더 바이러스 및 핸드라 바이러스로 이루어진 군에서 선택된다.

[0072] 헤니파바이러스 속의 바람직한 바이러스는 니파 바이러스 (NiV)이다.

[0073] 바람직한 구체예에서, 변형된 엔벨로프의 당단백질은 홍역 바이러스의 엔벨로프 당단백질 H 및 당단백질 F 또는 니파 바이러스의 엔벨로프 당단백질 G 및 당단백질 F로부터 유래된다.

[0074] 니파 바이러스 엔벨로프 당단백질 G의 서열의 예는 SEQ ID NO: 9의 서열이다.

[0075] 니파 바이러스 엔벨로프 당단백질 F의 서열의 예는 SEQ ID NO: 11의 서열이다.

[0076] 홍역 바이러스 엔벨로프 당단백질 H (당단백질 H라고 함)의 서열의 예는 SEQ ID NO: 10의 서열이다.

[0077] 홍역 바이러스 엔벨로프 당단백질 F의 서열의 예는 SEQ ID NO: 12의 서열이다.

[0078] 엔벨로프 당단백질 G/H로부터 유래된 단백질

[0079] 본 발명에 따른 위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 벡터는 적어도 하나의 세포 표적화 융합 단백질 및 적어도 하나의 조정성 융합 단백질을 포함한다. 세포 표적화 융합 단백질 및/또는 조정성 융합 단백질은 파라믹소바이러스와 바이러스의 엔벨로프 당단백질 G 또는 H로부터 유래되는 제1 단백질을 포함한다.

[0080] 엔벨로프 당단백질 G 또는 H는 "파라믹소바이러스과의 엔벨로프 당단백질" 부문에서 상기에 정의된 바와 같다.

[0081] 파라믹소바이러스과의 바이러스는 "위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 벡터" 부문에서 상기에 정의된 바와 같다.

[0082] "엔벨로프 당단백질 G 또는 H로부터 유래된 단백질"이란 표현은, 본 명세서에서 단백질이 엔벨로프 당단백질 G 또는 H의 서열과 비교하여 적어도 하나의 변형을 포함하는 것을 의미한다.

[0083] 바람직한 엔벨로프 당단백질 G는 니파 바이러스 엔벨로프 당단백질 G이고, 또한 NiV 엔벨로프 당단백질 G, NiV G 당단백질, 또는 NiV-G라고도 한다.

[0084] 바람직한 엔벨로프 당단백질 H는 홍역 바이러스 엔벨로프 당단백질 H이고, 또한 MeV 당단백질 H, MeV 헤마글루티닌, 또는 MV-H라고도 한다.

[0085] 엔벨로프 당단백질 G 또는 H는 야생형 또는 백신 균주 바이러스 엔벨로프 당단백질 또는 이의 변이체이고, 단, 상기 변이체는 표적 막 상의 수용체를 인식하고 이의 막 융합 기능에서 F 단백질을 지원하는 상기 야생형 또는 백신 균주 당단백질의 능력을 보유한다.

[0086] NiV 엔벨로프 당단백질 G에 대한 기준 서열은 SEQ ID NO: 9의 서열이다.

[0087] NiV 엔벨로프 당단백질 G는 SEQ ID NO: 9와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%가 동일한 서열의 것일 수 있다. 예를 들어, NiV 엔벨로프 당단백질은 SEQ ID NO: 9의 서열일 수 있다.

[0088] MeV 헤마글루티닌에 대한 기준 서열은 SEQ ID NO: 10의 서열이다.

[0089] MeV 헤마글루티닌은 SEQ ID NO: 10과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%가 동일한 서열의 것일 수 있다. 예를 들어, MeV 헤마글루티닌은 SEQ ID NO: 10의 서열의 것일 수 있다.

[0090] 바람직한 구체예에서, 엔벨로프 당단백질 G로부터 유래된 단백질은 상기 엔벨로프 당단백질 G의 세포질 영역의 적어도 한 부분이 결여된다.

[0091] 상기 엔벨로프 당단백질 G의 세포질 영역의 적어도 한 부분이 결여된 단백질은 또한 이의 세포질 영역이 절단된 단백질이라고 한다.

[0092] 표현 "세포질 영역의 x 아미노산이 결여된 단백질", "이의 세포질 영역 내 x 아미노산이 절단된 단백질" 및 "단백질 Δcx"는 본 명세서에서 동의어이고 상호교환적으로 사용될 수 있다.

[0093] 이의 세포질 영역이 절단된 엔벨로프 당단백질 G의 사용은 레트로바이러스-유사 입자 및 레트로바이러스 벡터로 이의 도입을 상당히 개선시키고, 그리하여 높은 역가 및 생산 수율로 위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 벡터를 생성시킬 수 있게 한다.

[0094] 엔벨로프 당단백질 G의 세포질 영역은 N-말단에 위치된다.

[0095] 따라서, 비절단된 당단백질 G와 관련하여 당단백질 Δcx의 절단된 부분의 위치를 확인할 때, 엔벨로프 당단백질 G의 N-말단의 제2 아미노산 잔기에서 세기 시작하며, 즉 제1 메티오닌 잔기는 생략하고 시작한다.

[0096] 예로서, SEQ ID NO: Z 서열의 당단백질 G의 세포질 영역 중 X 아미노산이 결여된 단백질은 SEQ ID NO: Z 서열의 아미노산 2 내지 1+X가 결여된다는 점에서 상기 당단백질 G와 상이하다.

[0097] 엔벨로프 당단백질 G 서열에서 세포질 영역의 국재화는 당업자가 쉽게 결정할 수 있다.

[0098] MeV H 당단백질의 세포질 영역은 예를 들어 SEQ ID NO: 10의 서열의 아미노산 1 내지 34로 이루어진다.

[0099] NiV G 당단백질의 세포질 영역은 예를 들어 SEQ ID NO: 9의 서열의 아미노산 1 내지 45로 이루어진다.

[0100] 예를 들어, 엔벨로프 당단백질 G 또는 H로부터 유래된 단백질은 세포질 영역 중 적어도 10개 아미노산, 적어도

15개 아미노산, 적어도 18개 아미노산, 적어도 20개 아미노산이 결여될 수 있다.

[0101] 예를 들어, 홍역 바이러스 엔벨로프 당단백질 H로부터 유래된 단백질은 세포질 영역 중 적어도 10개 아미노산, 적어도 15개 아미노산, 적어도 18개 아미노산, 적어도 20개 아미노산, 적어도 24개 아미노산이 결여될 수 있다.

바람직한 구체예에서, 홍역 바이러스 엔벨로프 당단백질 H로부터 유래된 단백질은 15개, 18개, 20개 또는 24개 아미노산이 결여된다.

[0102] 예를 들어, 니파 바이러스 엔벨로프 당단백질 G로부터 유래된 단백질은 세포질 영역 중 적어도 10개 아미노산, 적어도 15개 아미노산, 적어도 18개 아미노산, 적어도 20개 아미노산, 적어도 25개 아미노산 또는 적어도 30개 아미노산이 결여될 수 있다. 바람직한 구체예에서, 니파 바이러스 엔벨로프 당단백질 G로부터 유래된 단백질은 34개 아미노산이 결여된다.

[0103] 바람직한 구체예에서, 엔벨로프 당단백질 G 또는 H로부터 유래된 단백질은 엔벨로프 당단백질 G 또는 H의 적어도 하나의 천연 수용체에 적어도 부분적으로 결합할 수 없다.

[0104] 상기 엔벨로프 당단백질 G 또는 H의 적어도 하나의 천연 수용체에 대한 적어도 부분적인 결합 불능은 상기 엔벨로프 당단백질 G 또는 H의 서열에 도입되는 적어도 하나의 돌연변이에 의해 수득될 수 있다.

[0105] 예를 들어, 엔벨로프 당단백질 G 또는 H로부터 유래된 단백질은 상기 엔벨로프 당단백질의 서열과 비교하여 적어도 하나의 점 돌연변이, 바람직하게 적어도 2개 점 돌연변이를 포함할 수 있다.

[0106] 점 돌연변이는 아미노산 결실, 첨가 또는 치환일 수 있다.

[0107] 바람직한 구체예에서, 점 돌연변이는 치환이다.

[0108] 바람직한 구체예에서, 엔벨로프 당단백질 G 또는 H로부터 유래된 단백질은 상기 엔벨로프 당단백질 G 또는 H의 적어도 하나의 천연 수용체에 결합할 수 없고, 즉 완전하게 결합할 수 없다.

[0109] 이의 천연 수용체에 대한 엔벨로프 당단백질 G 또는 H로부터 유래된 단백질의 결합 불능은 세포 표적화 효율을 크게 증가시킨다.

[0110] 엔벨로프 당단백질 G의 적어도 하나의 천연 수용체에 결합하는 능력의 평가는 당업자에게 잘 알려진 임의 방법으로 평가할 수 있다.

[0111] 천연 NiV 수용체는 에프린-B2 및 에프린-B3 NiV 수용체이다.

[0112] 따라서 NiV 엔벨로프 당단백질 G로부터 유래된 단백질은 바람직하게 에프린-B2 수용체 및/또는 에프린-B3 NiV 수용체, 바람직하게 에프린-B2 수용체 및 에프린-B3 NiV 수용체 둘 모두에 적어도 부분적으로 결합할 수 없다.

[0113] 예를 들어, 엔벨로프 당단백질 NiV-G는 SEQ ID NO: 9의 서열과 비교하여 적어도 2개 또는 적어도 3개의 점 돌연변이를 포함할 수 있고, 상기 점 돌연변이는 E501A, W504A, Q530A 및 E533A로 이루어진 군에서 선택된다.

[0114] 바람직한 구체예에서, 당단백질 NiV-G는 점 돌연변이 E501A, W504A, Q530A 및 E533A를 포함하거나 또는 그로 이루어지고, 따라서 에프린-B2 수용체 및 에프린-B3 NiV 수용체에 대한 결합 불능을 야기시킨다.

[0115] 천연 MeV 수용체는 SLAM, 넥틴-4 및 CD46이다.

[0116] 따라서, MeV 엔벨로프 당단백질 H로부터 유래된 단백질은 바람직하게 SLAM, 넥틴-4 및/또는 CD46, 바람직하게 적어도 SLAM 및 CD46 둘 모두에 적어도 부분적으로 결합할 수 없다.

[0117] 예를 들어, 엔벨로프 당단백질 MV-H는 SEQ ID NO: 10의 서열과 비교하여 적어도 2개 또는 적어도 3개 점 돌연변이를 포함할 수 있고, 상기 점 돌연변이는 Y481A, R533A, S548L 및 F549S로 이루어진 군에서 선택된다.

[0118] 바람직한 일 구체예에서, 엔벨로프 당단백질 MV-H는 점 돌연변이 Y481A, R533A, S548L 및 F549S를 포함하거나 또는 그로 이루어지고, 따라서 SLAM 및 CD46에 대한 결합 불능을 야기한다.

[0119] 따라서, 엔벨로프 당단백질 G 또는 H로부터 유래된 단백질은 바람직하게 상기 엔벨로프 당단백질 G 또는 H의 세포질 영역의 적어도 한 부분이 결여되고/되거나 상기 엔벨로프 당단백질 G 또는 H의 적어도 하나의 천연 수용체에 적어도 부분적으로 결합할 수 없다.

[0120] 더 바람직한 구체예에서, 엔벨로프 당단백질 G 또는 H로부터 유래된 단백질은 둘 모두가 상기 엔벨로프 당단백질 G 또는 H의 세포질 영역의 적어도 한 부분이 결여되고 상기 엔벨로프 당단백질 G 또는 H의 적어도 하나의 천

연 수용체에 적어도 부분적으로 결합할 수 없다.

[0121] "기준 서열"과 적어도 x%가 동일한 서열"이란, 본 명세서에서 서열이 기준 서열의 각 100개 아미노산 당 최대 100-x 아미노산 변경만큼 기준 서열과 상이하거나 또는 기준 서열과 동일하다는 것을 의도한다.

[0122] 정렬 및 동일성 백분율의 결정은 수동으로 또는 자동으로 예를 들어 문헌 [Needleman and Wunsch (1970) J. Mol Biol. 48:443-453]에 기술된 니들만 및 분치 알고리즘을 기반으로 니들 프로그램을 사용하여 수행할 수 있고, 예를 들어 다음의 폴리펩티드 서열 비교를 위한 매개변수: 비교 매트릭스: BLOSUM62, 캡 오픈 패널티: 10 및 캡 확장 패널티: 0.5, 엔드 캡 패널티: 거짓, 엔드 캡 오픈 패널티 = 10, 엔드 캡 확장 패널티 = 0.5; 및 다음의 폴리뉴클레오티드 서열 비교를 위한 매개변수를 사용하였다: 비교 매트릭스: DNAFULL; 캡 오픈 패널티 = 10, 캡 확장 패널티 = 0.5, 엔드 캡 패널티: 거짓, 엔드 캡 오픈 패널티 = 10, 엔드 캡 확장 패널티 = 0.5.

[0123] 본 명세서에서 정의된 바와 같이 기준 서열과 "적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%가 동일한" 아미노산 서열은 돌연변이, 예컨대 기준 서열과 비교하여 결실, 삽입 및/또는 치환을 포함할 수 있다.

[0124] 치환의 경우, 치환은 바람직하게 하기 표 1에 표시된 바와 같이 보존성 치환에 상응한다. 바람직한 구체예에서, 기준 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%가 동일한 서열은 오직 보존성 치환만이 기준 서열과 상이하다.

[0125] [표 1]

보존성 치환	아미노산 유형
Ala, Val, Leu, Ile, Met, Pro, Phe, Trp	지방족 소수성 측쇄를 갖는 아미노산
Ser, Tyr, Asn, Gln, Cys	비하전 극성 측쇄를 갖는 아미노산
Asp, Glu	산성 측쇄를 갖는 아미노산
Lys, Arg, His	염기성 측쇄를 갖는 아미노산
Gly	중성 측쇄

[0126]

[0127] 다른 바람직한 구체예에서, 기준 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%가 동일한 아미노산 서열은 기준 서열의 천연 발생 대립유전자 변이체에 상응한다.

[0128] 엔벨로프 당단백질 F로부터 유래된 당단백질

[0129] 본 발명에 따른 위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 벡터는 또한 파라믹소바이러스과 바이러스의 엔벨로프 당단백질 F로부터 유래된 적어도 하나의 당단백질을 포함하고, 상기 당단백질은 바람직하게 상기 엔벨로프 당단백질 F의 세포질 영역의 적어도 한 부분이 결여된다.

[0130] 엔벨로프 당단백질 F는 "파라믹소바이러스과의 엔벨로프 당단백질" 부문에서 상기에 정의된 바와 같다.

[0131] 파라믹소바이러스과 바이러스는 "위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 벡터" 부문에서 상기에 정의된 바와 같다.

[0132] "엔벨로프 당단백질 F로부터 유도된 단백질"이란 표현은, 본 명세서에서 단백질이 엔벨로프 당단백질 F의 서열과 비교하여 적어도 하나의 변형을 포함한다는 것을 의미한다.

[0133] 바람직한 엔벨로프 당단백질 F는 니파 바이러스 엔벨로프 당단백질 F이고, 또한 NiV 엔벨로프 당단백질 F, NiV F 당단백질, 또는 NiV-F라고도 한다.

[0134] 다른 바람직한 엔벨로프 당단백질 F는 홍역 바이러스 엔벨로프 당단백질 F이고, 또한 MeV 당단백질 F 또는 MeV-F라고도 한다.

[0135] 엔벨로프 당단백질 F는 야생형 바이러스 또는 백신 균주 엔벨로프 당단백질 또는 이의 변이체이고, 단, 상기 변이체는 표적화 또는 숙주 세포의 세포막과 바이러스막의 융합을 매개하는 야생형 또는 백신 균주 당단백질 F의 능력을 보유한다.

[0136] NiV 엔벨로프 당단백질 F에 대한 기준 서열은 서열 번호 11의 서열이다. NiV 엔벨로프 당단백질 F는 SEQ ID NO: 11과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%가 동일한 서열의 것일 수 있다. 예를 들어,

NiV 엔벨로프 당단백질 F는 SEQ ID NO: 11의 서열일 수 있다.

[0137] MeV 엔벨로프 당단백질 F에 대한 기준 서열은 SEQ ID NO: 12의 서열일 수 있다.

[0138] MeV 엔벨로프 당단백질 F는 SEQ ID NO: 12와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%가 동일한 서열의 것일 수 있다. 예를 들어, MeV 엔벨로프 당단백질 F는 SEQ ID NO: 12의 서열의 것일 수 있다.

[0139] 바람직한 구체예에서, 엔벨로프 당단백질 F로부터 유래된 단백질은 상기 엔벨로프 당단백질 F의 세포질 영역의 적어도 한 부분이 결여된다.

[0140] 상기 엔벨로프 당단백질 F의 세포질 영역의 적어도 한 부분이 결여된 단백질은 또한 이의 세포질 영역이 절단된 단백질이라고도 한다.

[0141] 표현 "세포질 영역의 x 아미노산이 결여된 단백질", "이의 세포질 영역의 x 아미노산이 절단된 단백질" 및 "단백질 Δcx "는 본 명세서에서 동의어이고 상호교환적으로 사용될 수 있다.

[0142] 이의 세포질 영역에서 절단된 엔벨로프 당단백질 F의 사용은 레트로바이러스-유사 입자 및 레트로바이러스 벡터로의 이의 도입을 상당히 개선시키고, 그리하여 더 높은 역가 및 생산 수율로 위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 벡터를 생성시킬 수 있게 한다.

[0143] 엔벨로프 당단백질 F의 세포질 영역은 C-말단에 위치된다.

[0144] 따라서, 비절단된 당단백질 G를 기준으로 당단백질 Δcx 의 절단된 부분의 위치를 확인할 때, 당단백질 F의 C-말단으로부터 세기 시작한다.

[0145] 예로서, n 아미노산으로 이루어진 SEQ ID NO: Z의 서열의 당단백질 F와 비교하여 이의 세포질 영역에서 X 아미노산이 결여된 당단백질은 SEQ ID NO: Z의 서열의 아미노산 $n-x+1$ 내지 n이 결여된다는 점에서 상기 당단백질 F와 상이하다.

[0146] 엔벨로프 당단백질 F 서열에서 세포질 영역의 국재화는 당업자가 쉽게 결정할 수 있다.

[0147] MeV 당단백질 F의 세포질 영역은 예를 들어 SEQ ID NO: 12의 서열의 아미노산 518 내지 550 (33개 아미노산)으로 이루어진다.

[0148] NiV 당단백질 F의 세포질 영역은 예를 들어 SEQ ID NO: 11의 서열의 아미노산 519 내지 546 (28개 아미노산)으로 이루어진다.

[0149] 예를 들어, 엔벨로프 당단백질 F로부터 유래된 단백질은 세포질 영역에서 적어도 10개 아미노산, 적어도 15개 아미노산, 적어도 20개 아미노산, 적어도 25개 또는 적어도 30개 아미노산이 결여될 수 있다.

[0150] 예를 들어, 홍역 바이러스 엔벨로프 당단백질 F로부터 유래된 단백질은 상기 홍역 바이러스 엔벨로프 당단백질 F와 비교하여 세포질 영역에서 30개 아미노산이 결여될 수 있다. 예를 들어, 홍역 바이러스 엔벨로프 당단백질 F로부터 유래되고 세포질 영역에 30개 아미노산이 결여된 상기 단백질은 SEQ ID NO: 15의 서열을 포함하거나 또는 그로 이루어진다.

[0151] 예를 들어, 니파 바이러스 엔벨로프 당단백질 F로부터 유래된 단백질은 상기 니파 바이러스 엔벨로프 당단백질 F와 비교하여 세포질 영역에서 22개 아미노산이 결여될 수 있다. 예를 들어, 니파 바이러스 엔벨로프 당단백질 F로부터 유래되고 세포질 영역에 22개 아미노산이 결여된 상기 단백질은 SEQ ID NO: 16의 서열을 포함하거나 또는 그로 이루어진다.

표적 세포

[0153] 표적 세포는 그 활성이 조정되고/되거나 적어도 하나의 관심 유전자가 형질도입되는 관심 세포이다.

[0154] 표적 세포는 특별한 세포 표면 수용체를 그들 표면에서 발현하고, 그리하여 이를 세포를 특이적으로 표적화할 수 있게 하고, 상기 세포 표면 수용체를 발현하지 않는 세포는 표적화하지 않는다.

[0155] 표현 "표적 세포" 및 "세포의 표적 서브셋"은 본 명세서에서 동의어이고 상호교환적으로 사용될 수 있다.

[0156] 표적 세포는 조혈 세포, 스트로마 세포, 내피 세포, 간 세포, 근육 세포 (예를 들어, 심장 세포), 신경계의 세포 및/또는 질환 세포로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

[0157] 신경계의 세포는 예를 들어 뉴런 및/또는 신경교세포이다.

- [0158] "조혈 세포"란 본 명세서에서 조혈계의 세포를 의미한다.
- [0159] 바람직한 표적 세포는 조혈 세포이다.
- [0160] 조혈 세포는 T 세포, B 세포, 단핵구, Th1 세포, Th2 세포, Treg 세포, 비만 세포, 수지상 세포 (DC), 자연 살해 (NK) 세포, 자연 살해 T (NKT) 세포, 마크로파지, 조혈 줄기 세포, 전구체 T 및/또는 B 세포, 적혈모세포, 혈소판, 호중구 및 그들 조합으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [0161] 가장 바람직한 표적 조혈 세포는 T 세포, 보다 바람직하게 CD8+ T 세포 또는 CD4+ T 세포이다.
- [0162] 질환 세포는 종양 세포, 종양 줄기 세포, 특별한 기능성 유전자가 결여되고/되거나, 특별한 유전자가 과발현되고/되거나 특별한 유전자의 절단 형태 또는 돌연변이 형태를 발현하는 세포, 감염된 세포 및/또는 기능적으로 손상된 세포일 수 있다.
- [0163] 세포-특이적 표적화 도메인
- [0164] 세포-특이적 표적화 도메인 ("세포 표적화 도메인"이라고도 함)은 표적 세포에 의해 선택적으로 발현되는 표면 수용체와 본 발명에 따른 위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 백터의 특이적 결합을 가능하게 한다.
- [0165] 표적 세포는 동일한 명칭의 부문에서 상기에 정의된 바와 같을 수 있다.
- [0166] 표적화 융합 단백질의 세포 표적화 도메인은 바람직하게 DARPin, scFv, 표적화 웹티드 및 그들 조합으로 이루어진 군에서 선택된다.
- [0167] 용어 "DARPin"은 디자인된 안키틴 반복 단백질 (designed ankytin repeat protein)을 의미한다.
- [0168] 용어 scFv는 항체의 단쇄 가변 단편을 의미한다.
- [0169] 예를 들어, 세포 표적화 도메인은 CD3, CD8, CD4, 암 세포 마커, CD11b, CD19, CD62L, CD56, Glut-1 (포도당 수송체), CD19, CD22, CD20, CCR5 또는 CXCR4에 특이적이다.
- [0170] 바람직한 세포 표적화 도메인은 CD4에 특이적인 DARPin 또는 CD8에 특이적인 scFv이다.
- [0171] 기능성 도메인
- [0172] 기능성 도메인은 표적 세포의 활성을 조정할 수 있게 한다.
- [0173] "표적 세포의 활성을 조정하는"이란, 본 명세서에서 표현형 변화 (예를 들어 성숙화 및/또는 분화)를 활성화하거나 또는 억제하거나, 유도하고/하거나, 증식을 유도하고/하거나 상기 표적 세포의 아폽토시스를 유도하는 것을 의미한다. 표적 세포의 활성을 조정하는 것은 예를 들어 면역성의 증강 또는 억제, 세포 유형-특이적 면역 반응(들)의 촉진을 포함한다.
- [0174] 조정성 융합 단백질의 기능성 도메인은 바람직하게 수용체 리간드이다.
- [0175] "수용체 리간드"란, 바람직하게 세포에 의해서 정상적으로 방출되고, 그들 세포 표면에서 동족 수용체를 발현하는 세포의 생리학적 상태를 변경하는 분자, 바람직하게 단백질을 의미한다. 수용체 리간드는 예를 들어 사이토카인, 성장 인자, 호르몬, 신경매개인자, 아폽토시스 리간드, 케모카인, 포도당 수송체 및 그들 조합으로 이루어진 군에서 선택된다.
- [0176] 예를 들어, 사이토카인은 인터루킨 (IL), TNF (*Tumor Necrosis Factor*) 또는 인터페론으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [0177] 인터루킨은 예를 들어 IL-2, IL-3, IL-6, IL-7, IL15, IL21, IL-17 또는 IL-12일 수 있다.
- [0178] 예를 들어, 아폽토시스 리간드는 FAS 리간드, CD40 리간드 또는 TNF알파일 수 있다.
- [0179] 예를 들어, 케모카인은 CXCL4, CCL5 또는 CXCL10일 수 있다.
- [0180] 예를 들어, 성장 인자는 GM-SCF (*Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*; 과립구-마크로파지 콜로니-자극 인자), 줄기 세포 인자 (SCF), 트롬보포이어틴 (TPO) 또는 Flt-3 리간드일 수 있다.
- [0181] 예를 들어, 호르몬은 인슐린, 성장 호르몬 또는 호르몬 웹티드, 예를 들어 바소프레신일 수 있다. 예를 들어, 신경매개인자는 예를 들어 인슐린, 글루카곤, 칼시토닌, 뉴로텐신 또는 브라디키닌 중에서 선택되는 신경펩

티드일 수 있다.

[0182] 바람직한 기능성 도메인은 사이토카인, 바람직하게 인터루킨, 보다 바람직하게 IL-7이다.

세포 표적화 및 조정성 융합 단백질

[0184] 본 발명에 따른 레트로바이러스-유사 입자 및 레트로바이러스 벡터는 2개 유형의 융합 단백질: 하나의 세포 표적화 융합 단백질 및 하나의 조정성 융합 단백질을 포함한다.

[0185] 세포 표적화 융합 단백질은 (i) 파라믹소바이러스과 바이러스의 엔벨로프 당단백질 G 또는 H로부터 유래된 단백질 또는 경막 도메인 및 (ii) 적어도 하나의 세포 표적화 도메인을 포함한다.

[0186] 조정성 융합 단백질은 (i) 파라믹소바이러스과 바이러스의 엔벨로프 당단백질 G 또는 H로부터 유래된 단백질 또는 경막 도메인 및 (ii) 적어도 하나의 기능성 도메인을 포함한다.

[0187] 세포 표적화 융합 단백질 및 조정성 융합 단백질은 2종의 상이한 유형의 융합 단백질이므로, 세포 표적화 도메인 및 기능성 도메인이 상이하다는 것은 당업자가 분명하게 이해하게 될 것이다.

[0188] 경막 도메인은 천연 발생이거나 또는 비천연 발생인 경막 도메인일 수 있다.

[0189] 경막 도메인은 수용체의 경막 도메인, 경막 단백질, 바람직하게 바이러스 경막 단백질, 경막 단백질의 단편, 경막 펩티드 또는 이의 변이체, 예컨대 수용체의 유전자 변형된 경막 도메인, 유전자 변형된 경막 단백질, 경막 단백질의 유전자 변형된 단편 또는 유전자 변형된 경막 펩티드일 수 있다.

[0190] 경막 도메인의 예는 혈소판-유래된 성장 인자 수용체 (PDGFR)의 경막 도메인 (TMD), CD34의 경막 도메인 또는 VSVG 당단백질 경막 도메인이다.

[0191] 파라믹소바이러스과 바이러스의 엔벨로프 당단백질 G 또는 H로부터 유래된 단백질의 C-말단은 바람직하게 직접적으로 또는 간접적으로 (예를 들어, 링커를 통해서), 세포 표적화 또는 기능성 도메인의 N-말단에 융합된다.

[0192] 경막 도메인의 C-말단은 바람직하게 직접적으로 또는 간접적으로 (예를 들어, 링커를 통해서), 세포 표적화 또는 기능성 도메인의 N-말단에 융합된다.

[0193] 파라믹소바이러스과 바이러스의 엔벨로프 당단백질 G 또는 H로부터 유래된 단백질, 엔벨로프 당단백질 F로부터 유래된 당단백질, 세포 표적화 도메인 및 기능성 도메인은 상기에 정의된 바와 같다.

[0194] 위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 벡터에 둘 모두가 존재할 때, 세포 표적화 융합 단백질 중 파라믹소바이러스과 바이러스의 엔벨로프 당단백질 G 또는 H로부터 유래된 단백질 및 조정성 융합 단백질 중의 것들은 파라믹소바이러스과의 동일한 바이러스로부터 유래될 수 있거나 또는 파라믹소바이러스과의 상이한 바이러스로부터 유래될 수 있다.

[0195] 세포 표적화 융합 단백질 및 조정성 융합 단백질 중 파라믹소바이러스과 바이러스의 엔벨로프 당단백질 G 또는 H로부터 유래된 단백질이 파라믹소바이러스과의 상이한 바이러스로부터 유래되는 경우에, 그들은 바람직하게 동일한 바이러스 속의 바이러스, 보다 바람직하게 동일한 종의 바이러스로부터 유래된다.

[0196] 세포 표적화 융합 단백질 중 파라믹소바이러스과 바이러스의 엔벨로프 당단백질 G 또는 H로부터 유래된 단백질 및 조정성 융합 단백질 중의 것들은 바람직하게 동일하다. 바람직한 구체예에서, 세포 표적화 융합 단백질은 이와 같이 기능성 도메인 및 가능하게, 존재하는 경우, 적어도 하나의 링커 및/또는 적어도 하나의 태그 대신에 이의 표적화 도메인이 조정성 융합 단백질과 상이하다.

[0197] 융합 단백질의 2개 단백질은 서로 링커를 통해서 연결될 수 있다. 당업자에게 잘 알려진 임의의 적합한 링커가 사용될 수 있다.

[0198] 예를 들어, 링커는 $(G_4S)_3$, G_4S , 인자 Xa 절단 부위 또는 나선형 링커 (예를 들어 HL3, HL7...)일 수 있다.

[0199] 융합 단백질은 예를 들어 그들 정제 및/또는 검출을 용이하게 하기 위해서, 태그화될 수 있다.

[0200] 존재하는 경우, 태그는 바람직하게 융합 단백질의 C-말단에 위치하며, 즉 세포 표적화 도메인 및/또는 기능성 도메인의 N-말단에 융합된다. 당업자에게 잘 알려진 임의의 적합한 태그가 사용될 수 있다.

[0201] 예를 들어, 태그는 His-태그, RGS-His 태그, 예컨대 RGSHis, HA 태그 또는 c-myc 태그일 수 있다.

[0202] 특이적 위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 벡터

[0203] 본 발명은 특허:

[0204] a) (i) 파라믹소바이러스과 바이러스의 엔벨로프 당단백질 G 또는 H로부터 유래된 단백질 또는 경막 도메인 및 (ii) 적어도 하나의 세포 표적화 도메인을 포함하는 적어도 하나의 세포 표적화 융합 단백질,

[0205] b) (i) 파라믹소바이러스과 바이러스의 엔벨로프 당단백질 G 또는 H로부터 유래된 단백질 또는 경막 도메인 및 (ii) 적어도 하나의 기능성 도메인을 포함하는 적어도 하나의 조정성 융합 단백질, 및

[0206] c) 파라믹소바이러스과 바이러스의 엔벨로프 당단백질 F로부터 유래된 적어도 하나의 당단백질

[0207] 을 포함하는 위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 벡터에 관한 것이고,

[0208] 여기서 상기 세포 표적화 융합 단백질 및/또는 상기 조정성 융합 단백질은 파라믹소바이러스과 바이러스의 엔벨로프 당단백질 G 또는 H로부터 유래된 단백질을 포함한다.

[0209] 따라서 위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 벡터는 파라믹소바이러스과 바이러스의 엔벨로프 당단백질 G 또는 H로부터 유래된 단백질을 포함하는 적어도 하나의 융합 단백질을 포함하고, 상기 융합 단백질은 세포 표적화 융합 단백질 또는 조정성 융합 단백질이다. 일 구체예에서, 위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 벡터는 각각 파라믹소바이러스과 바이러스의 엔벨로프 당단백질 G 또는 H로부터 유래된 단백질을 포함하는 2종의 융합 단백질을 포함하고, 여기서 하나의 융합 단백질은 세포 표적화 융합 단백질이고 두번째 융합 단백질은 조정성 융합 단백질이다.

[0210] 일 구체예에서, 위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 벡터는:

[0211] a) (i) 파라믹소바이러스과 바이러스의 엔벨로프 당단백질 G 또는 H로부터 유래된 단백질 및 (ii) 적어도 하나의 세포 표적화 도메인을 포함하는 적어도 하나의 세포 표적화 융합 단백질,

[0212] b) (i) 경막 도메인 및 (ii) 적어도 하나의 기능성 도메인을 포함하는 적어도 하나의 조정성 융합 단백질, 및

[0213] c) 파라믹소바이러스과 바이러스의 엔벨로프 당단백질 F로부터 유래된 적어도 하나의 당단백질

[0214] 을 포함한다.

[0215] 일 구체예에서, 위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 벡터는:

[0216] a) (i) 경막 도메인 및 (ii) 적어도 하나의 세포 표적화 도메인을 포함하는 적어도 하나의 세포 표적화 융합 단백질,

[0217] b) (i) 파라믹소바이러스과 바이러스의 엔벨로프 당단백질 G 또는 H로부터 유래된 단백질 및 (ii) 적어도 하나의 기능성 도메인을 포함하는 적어도 하나의 조정성 융합 단백질, 및

[0218] c) 파라믹소바이러스과 바이러스의 엔벨로프 당단백질 F로부터 유래된 적어도 하나의 당단백질

[0219] 을 포함한다.

[0220] 일 구체예에서, 위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 벡터는:

[0221] a) (i) 파라믹소바이러스과 바이러스의 엔벨로프 당단백질 G 또는 H로부터 유래된 단백질 및 (ii) 적어도 하나의 세포 표적화 도메인을 포함하는 적어도 하나의 세포 표적화 융합 단백질,

[0222] b) (i) 파라믹소바이러스과 바이러스의 엔벨로프 당단백질 G 또는 H로부터 유래된 단백질 및 (ii) 적어도 하나의 기능성 도메인을 포함하는 적어도 하나의 조정성 융합 단백질, 및

[0223] c) 파라믹소바이러스과 바이러스의 엔벨로프 당단백질 F로부터 유래된 적어도 하나의 당단백질

[0224] 을 포함한다.

[0225] 세포 표적화 융합 단백질 중 파라믹소바이러스과 바이러스의 엔벨로프 당단백질 G로부터 유래된 단백질, 조정성 융합 단백질 중의 것들 및 엔벨로프 당단백질 F로부터 유래된 당단백질은 파라믹소바이러스과의 동일한 바이러스 또는 파라믹소바이러스과의 상이한 바이러스로부터 유래될 수 있다.

[0226] 세포 표적화 융합 단백질 중 파라믹소바이러스과 바이러스의 엔벨로프 당단백질 G로부터 유래된 단백질, 조정성 융합 단백질 중의 것들 및/또는 엔벨로프 당단백질 F로부터 유래된 당단백질이 파라믹소바이러스과의 상이한 바

이러스로부터 유래된 경우에, 그들은 바람직하게 동일한 속의 바이러스, 보다 바람직하게 동일한 종의 바이러스로부터 유래된다.

- [0227] 일 구체예에서, 세포 표적화 융합 단백질 중 파라믹소바이러스과 바이러스의 엔벨로프 당단백질 G로부터 유래된 단백질, 조정성 융합 단백질 중의 것들 및 엔벨로프 당단백질 F로부터 유래된 당단백질은 파라믹소바이러스과의 동일한 바이러스로부터 유래된다.
- [0228] 다른 구체예에서, 세포 표적화 융합 단백질 중 파라믹소바이러스과 바이러스의 엔벨로프 당단백질 G로부터 유래된 단백질 및 파라믹소바이러스과 바이러스의 엔벨로프 당단백질 F로부터 유래된 당단백질은 파라믹소바이러스과의 동일한 바이러스로부터 유래되는 한편, 조정성 융합 단백질은 (i) 경막 도메인, 예를 들어 혈소판-유래된 성장 인자 수용체 (PDGFR)의 경막 도메인 (TMD), 및 (ii) 적어도 하나의 기능성 도메인을 포함한다.
- [0229] 다른 구체예에서, 조정성 융합 단백질 중 파라믹소바이러스과 바이러스의 엔벨로프 당단백질 G로부터 유래된 단백질 및 파라믹소바이러스과 바이러스의 엔벨로프 당단백질 F로부터 유래된 당단백질은 파라믹소바이러스과의 동일한 바이러스로부터 유래되는 반면, 세포 표적화 융합 단백질은 (i) 경막 도메인, 예를 들어 혈소판-유래된 성장 인자 수용체 (PDGFR)의 경막 도메인 (TMD), 및 (ii) 적어도 하나의 세포 표적화 도메인을 포함한다.
- [0230] 위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 백터의 상이한 구성성분, 특히 세포 표적화 융합 단백질, 조정성 융합 단백질, 파라믹소바이러스과 바이러스의 엔벨로프 당단백질 F로부터 유래된 당단백질 및 경막 도메인은 상기에 정의된 바와 같다.
- [0231] 바람직한 위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 백터는:
- [0232] a) (i) 파라믹소바이러스과 바이러스의 엔벨로프 당단백질 G로부터 유래된 단백질로서 상기 단백질은 상기 엔벨로프 당단백질 G의 세포질 영역의 적어도 한 부분이 결여되고 상기 엔벨로프 당단백질 G의 적어도 하나의 천연 수용체에 적어도 부분적으로 결합할 수 없는 것인 단백질 또는 경막 도메인 및 (ii) 적어도 하나의 세포 표적화 도메인을 포함하는 적어도 하나의 세포 표적화 융합 단백질,
- [0233] b) (i) 파라믹소바이러스과의 바이러스의 엔벨로프 당단백질 G로부터 유래되는 단백질로서 상기 단백질은 상기 엔벨로프 당단백질 G의 세포질 영역의 적어도 한 부분이 결여되고 상기 엔벨로프 당단백질 G의 적어도 하나의 천연 수용체에 적어도 부분적으로 결합할 수 없는 것인 단백질 또는 경막 도메인 및 (ii) 적어도 하나의 기능성 도메인을 포함하는 적어도 하나의 조정성 융합 단백질, 및
- [0234] c) 파라믹소바이러스과 바이러스의 엔벨로프 당단백질 F로부터 유래되고 상기 엔벨로프 당단백질 F의 세포질 영역의 적어도 한 부분이 결여된 적어도 하나의 당단백질
- [0235] 을 포함하고,
- [0236] 여기서 상기 세포 표적화 융합 단백질 및/또는 상기 조정성 융합 단백질은 파라믹소바이러스과 바이러스의 엔벨로프 당단백질 G 또는 H로부터 유래된 단백질을 포함한다.
- [0237] 위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 백터의 예는 하기 표 2에 제공된다.

[0238]

[표 2]

명칭	세포 표적화 융합 단백질		조정성 융합 단백질		엔벨로프 당단백질 F 유래의 당단백질
	엔벨로프 당단백질 G 또는 H 유래의 단백질	세포 표적화 도메인	엔벨로프 당단백질 G 또는 H 유래의 단백질	기능성 도메인	
MeV 4 ^H /IL7 ^H	- HcΔ15, HcΔ18 또는 HcΔ20 - 4 돌연변이 Y481A, R533A, S548L, F549S	인간 CD4 에 특이적인 DARpin	- HΔ15, HΔ18 또는 HΔ20 - 4 돌연변이 Y481A, R533A, S548L, F549S	IL-7	FΔ30
	예를 들어 HcΔ15 및 His 태그를 포함하는 SEQ ID NO: 2		예를 들어 HcΔ15 및 His 태그를 포함하는 SEQ ID NO: 14	예를 들어 SEQ ID NO: 15	
NiV 8 ^G /IL7 ^G	- GcΔ34 - 4 돌연변이: E501A, W504A, Q530A, E533A	인간 CD8 에 특이적인 scFv	- GcΔ34 - 4 돌연변이: E501A, W504A, Q530A, E533A	IL-7	FΔ22
	예를 들어 His 태그 및 링커 (G ₄ S) ₃ 를 포함하는 SEQ ID NO: 4		예를 들어 His 태그를 포함하는 SEQ ID NO: 6	예를 들어 SEQ ID NO: 16	

[0239]

[0240]

바람직한 구체예에서, 위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 벡터는 하기 본 명세서에서 "위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 벡터의 제조를 위한 방법" 부분에서 하기에 설명되는 제조 방법에 의해 수득되거나 또는 수득될 수 있다.

[0241]

핵산 및 벡터

[0242]

본 발명은 또한 본 발명에 따른 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 벡터를 위형화시키는데 사용되는 세포 표적화 융합 단백질 및/또는 조정성 융합 단백질을 코딩하는 핵산에 관한 것이다.

[0243]

따라서 본 발명은 특히 세포 표적화 융합 단백질을 코딩하는 서열 및/또는 조정성 융합 단백질을 코딩하는 서열을 포함하는 핵산에 관한 것이고, 여기서:

[0244]

- 상기 세포 표적화 융합 단백질은 (i) 파라믹소바이러스과 바이러스의 엔벨로프 당단백질 G로부터 유래되는 단백질로서 상기 단백질은 바람직하게 상기 엔벨로프 당단백질 G의 세포질 영역의 적어도 한 부분이 결여되고 바람직하게 상기 엔벨로프 당단백질 G의 적어도 하나의 천연 수용체에 적어도 부분적으로 결합할 수 없는 것인 단백질 또는 경막 도메인 및 (ii) 적어도 하나의 세포 표적화 도메인을 포함하고,

[0245]

- 상기 조정성 융합 단백질은 (i) 파라믹소바이러스과 바이러스의 엔벨로프 당단백질 G로부터 유래된 단백질로

서 상기 단백질은 바람직하게 상기 엔벨로프 당단백질 G의 세포질 영역의 적어도 한 부분이 결여되고 바람직하게 상기 엔벨로프 당단백질 G의 적어도 하나의 천연 수용체에 적어도 부분적으로 결합할 수 없는 것인 단백질 또는 경막 도메인 및 (ii) 적어도 하나의 기능성 도메인을 포함한다.

[0246] 핵산이 세포 표적화 융합 단백질을 코딩하는 서열 및 조정성 융합 단백질을 코딩하는 서열을 포함하는 경우에, 상기 세포 표적화 융합 단백질 및/또는 상기 조정성 융합 단백질은 파라믹소바이러스과 바이러스의 엔벨로프 당단백질 G 또는 H로부터 유래된 단백질을 포함한다.

[0247] 핵산은 바람직하게:

[0248] (i) 파라믹소바이러스과 바이러스의 엔벨로프 당단백질로부터 유래된 단백질을 코딩하는 서열로서, 상기 단백질은 바람직하게 상기 엔벨로프 당단백질 G의 세포질 영역의 적어도 한 부분이 결여되고 바람직하게 상기 엔벨로프 당단백질 G의 적어도 하나의 천연 수용체에 적어도 부분적으로 결합할 수 없는 것인 서열,

[0249] (ii) 하나의 세포 표적화 도메인 또는 하나의 기능성 도메인을 코딩하는 서열, 및

[0250] (iii) 임의로, 서열 (i) 및 (ii) 사이의 링커 서열,

[0251] (iv) 임의로, 바람직하게 서열 (ii)의 3' 말단에서 태그를 코딩하는 서열

[0252] 을 포함하거나 또는 그로 이루어지고,

[0253] 여기서 서열 (i) 및 (ii)는 인프레임으로 융합된다.

[0254] 링커 서열은 상기에 정의된 바와 같은 링커를 코딩하고, 예를 들어 $(G_4S)_3$ 을 코딩한다.

[0255] 서열 (i)은 핵산의 3'에 위치된 서열 (ii)와 비교하여 핵산의 5'에 위치된다.

[0256] 일 구체예에서, 핵산은 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7 및 SEQ ID NO: 13으로 이루어진 군에서 선택되는 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%가 동일한 서열을 포함하거나 또는 그로 이루어지고/지거나 SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8 및 SEQ ID NO: 14의 서열로 이루어진 군에서 선택되는 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%가 동일한 서열을 코딩하는 서열을 포함하거나 또는 그로 이루어진다.

[0257] 바람직한 구체예에서, 핵산은 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7 및 SEQ ID NO: 13으로 이루어진 군에서 선택되는 서열을 포함하거나 또는 그로 이루어지고/지거나 SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8 및 SEQ ID NO: 14의 서열로 이루어진 군에서 선택되는 서열을 코딩하는 서열을 포함하거나 또는 그로 이루어진다.

[0258] 서열 동일성 백분율의 정의는 상기에 제공되어 있다.

[0259] 기준 서열과 "적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%가 동일한" 핵산 서열은 기준 서열과 비교하여 돌연변이, 예컨대 결실, 삽입 및/또는 치환을 포함할 수 있다.

[0260] 치환의 경우에, 치환은 바람직하게 기준 서열과 비교하여, 예를 들어 상기 표 1에 표시된 바와 같이, 번역된 아미노산 서열에 보존성 치환을 야기하는 치환 또는 침묵 치환에 해당된다.

[0261] 바람직한 구체예에서, 기준 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%가 동일한 핵산 서열은 오직 보존성 아미노산 치환을 야기하는 치환(들) 및/또는 침묵 치환(들)만이 기준 서열과 상이하다.

[0262] 본 발명은 또한 파라믹소바이러스과 바이러스의 엔벨로프 당단백질 F로부터 유래되고 바람직하게 상기 엔벨로프 당단백질 F의 세포질 영역의 적어도 한 부분이 결여된 당단백질을 코딩하는 핵산에 관한 것이다.

[0263] 파라믹소바이러스과 바이러스의 엔벨로프 당단백질 F로부터 유래된 당단백질은 상기에 정의된 바와 같다.

[0264] 핵산은 바람직하게 단리된 핵산이다.

[0265] "핵산"이란 표현은, 본 명세서에서 단일 가닥 형태이거나 또는 이중 가닥 형태인, 리보뉴클레오시드 ("RNA 분자"라고도 함), 데옥시리보뉴클레오시드 ("DNA 분자"라고도 함)의 포스페이트 에스테르 중합체 형태 또는 이의 포스포에스테르 유사체, 예컨대 포스포로티오에이트 및 티오에스테르를 의미한다.

[0266] 생물학적 성분 (예컨대 핵산, 벡터 또는 단백질)과 관련된 용어 "단리된"은 성분이 천연적으로 존재하는 유기체 그 자체 또는 유기체의 세포 내 다른 생물학적 성분, 예컨대 다른 염색체 및 염색체외 DNA 및 RNA, 단백질,

세포 및 세포내 기관으로부터 실질적으로 분리되거나 또는 정제된 생물학적 성분을 의미한다. "단리된 핵산" 또는 "단리된 벡터"는 표준 정제 방법으로 정제된 핵산 분자를 포함한다. 이들 용어는 또한 증폭 및/ 또는 클로닝으로 제조된 핵산 및 벡터를 비롯하여 화학적으로 합성된 핵산 및 벡터를 포함한다.

- [0267] 본 발명에 따른 핵산은 바람직하게 벡터에 클로닝된다.
- [0268] 그러므로 용어 "벡터"는 "레트로바이러스 벡터"와는 다른 의미를 갖는다.
- [0269] 용어 "벡터"란, 본 명세서에서 핵산 벡터를 의미한다.
- [0270] 벡터는 일반적으로 복제 기원, 다중클로닝 부위 및 선별 마커를 포함한다.
- [0271] 벡터는 바람직하게 발현 카세트를 포함하고, 즉 본 발명에 따른 핵산은 이의 발현을 가능하게 하는 적어도 하나의 발현 신호의 제어 하에 위치된다.
- [0272] 발현 신호는 특히 프로모터, 종결인자, 인핸서 및 그들 조합 중에서 선택된다.
- [0273] 적합한 프로모터, 종결인자 및 인핸서는 당업자에게 잘 알려져 있다.
- [0274] 벡터의 예는 예를 들어 플라스미드이다.
- [0275] "플라스미드"란, 본 명세서에서 이중 가닥 원형 DNA를 의미한다. 플라스미드는 상기 플라스미드를 포함하는 세포를 선별할 수 있는 마커 유전자, 세포가 플라스미드를 복제할 수 있게 하는 복제 기원 및/또는 본 발명에 따른 핵산의 삽입을 가능하게 하는 다중 클로닝 부위를 포함할 수 있다.
- [0276] 따라서 본 발명은 또한 상기에 정의된 바와 같은 핵산을 포함하는 벡터에 관한 것이다.
- [0277] 벡터는 바람직하게 단리된 벡터이다.
- [0278] 벡터는:
- [0279] - (i) a) 파라믹소바이러스과 바이러스의 엔벨로프 당단백질 G 또는 H로부터 유래된 단백질로서 상기 단백질은 바람직하게 상기 엔벨로프 당단백질 G 또는 H의 세포질 영역의 적어도 한 부분이 결여되고 바람직하게 상기 엔벨로프 당단백질 G 또는 H의 적어도 하나의 친연 수용체에 적어도 부분적으로 결합할 수 있는 것인 단백질 또는 b) 경막 도메인을 코딩하는 서열,
- [0280] (ii) 하나의 세포 표적화 도메인을 코딩하는 서열,
- [0281] (iii) 임의로, 서열 (i) 및 (ii) 사이의 링커 서열,
- [0282] (iv) 임의로 바람직하게 서열 (i)의 3' 말단에서 태그를 코딩하는 서열
- [0283] 을 포함하거나 또는 그로 이루어지는 제1 핵산 서열로서, 서열 (i) 및 (ii)은 인프레임으로 융합된 것인 제1 핵산 서열,
- [0284] - (i) a) 파라믹소바이러스과 바이러스의 엔벨로프 당단백질 G 또는 H로부터 유래된 단백질로서 상기 단백질은 바람직하게 상기 엔벨로프 당단백질 G 또는 H의 세포질 영역의 적어도 한 부분이 결여되고 바람직하게 상기 엔벨로프 당단백질 G 또는 H의 적어도 하나의 친연 수용체에 적어도 부분적으로 결합할 수 있는 것인 단백질 또는 b) 경막 도메인을 코딩하는 서열,
- [0285] (ii) 하나의 기능성 도메인을 코딩하는 서열,
- [0286] (iii) 임의로, 서열 (i) 및 (ii) 사이의 링커 서열,
- [0287] (iv) 임의로, 바람직하게 서열 (ii)의 3' 말단에서 태그를 코딩하는 서열
- [0288] 을 포함하거나 또는 그로 이루어지는 제2 핵산로서, 서열 (i) 및 (ii)는 인프레임으로 융합된 것인 제2 핵산
- [0289] 을 포함할 수 있거나 또는 그로 이루어질 수 있고,
- [0290] 여기서 제1 핵산 및/또는 제2 핵산은 파라믹소바이러스과 바이러스의 엔벨로프 당단백질 G 또는 H로부터 유래된 단백질을 코딩하는 서열을 포함한다.
- [0291] 따라서 상기 제1 핵산은 세포 표적화 융합 단백질을 코딩하고 상기 제2 핵산은 조정성 융합 단백질을 코딩한다.
- [0292] 관심 유전자

- [0293] 위형화된 레트로바이러스 벡터가 사용되는 경우에, 적어도 하나의 관심 유전자가 상기 레트로바이러스 벡터의 레트로바이러스-유래된 게놈에 존재할 수 있다.
- [0294] 관심 유전자는 치료적 단백질, 아폽토시스 단백질, 키메라 항원 수용체, 세포 표면 수용체, 항체 단편, shRNA, 항원, 사이토카인, 마이크로RNA, CRISPR (*clustered, regularly interspaced, short palindromic repeat*)/CAS 엘리먼트(들) (특히 특이적 유전자 파괴 또는 교정을 위한, 예를 들어 CAS9 및/또는 가이드 RNA), 다른 뉴클레아제 시스템, 예컨대 징크 평거 뉴클레아제, S/MAR (Scaffold/Matrix Attachment Region) - 에피솜, 리간드 및/또는 수용체를 코딩할 수 있다.
- [0295] S/MAR-에피솜은 레트로바이러스 벡터에 의해서 세포 핵에 삽입되고 그리하여 숙주 세포 DNA와 복제된다.
- [0296] 관심 유전자의 예는 글로빈 유전자, 조혈 성장 인자 유전자 (예를 들어 에리쓰로포이어틴 (EPO) 유전자), 인터루킨 유전자 (특히 인터루킨-1, 인터루킨-2, 인터루킨-3, 인터루킨-6 또는 인터루킨-12 유전자), 콜로니-자극 인자 유전자 (예컨대 과립구 콜로니-자극 인자 유전자, 과립구/마크로파지 콜로니-자극 인자 유전자 또는 줄기-세포 콜로니-자극 인자 유전자), 혈소판-특이적 인테그린 α IIb β 유전자, 다제 내성 유전자, 만성 육아종증 (CGD)을 갖는 환자에서 결합된 gp91 또는 gp 47 유전자, 병원체 (예컨대 인간 면역결핍 바이러스) 감염에 내성인 세포를 야기시키는 항바이러스 유전자, 혈우병에서 돌연변이된 혈액 응고 인자 VIII 또는 IX를 코딩하는 유전자, T 세포-매개된 면역 반응에 관여되는 리간드를 코딩하는 유전자, 예컨대 T 세포 항원 수용체, 키메라 항원 수용체 (CAR), B 세포 항원 수용체 (HIV, C형 간염, B형 간염 및/또는 다른 감염성 질환에 대한 중화 항체, 면역글로불린), 인터루킨 수용체 공통 γ 사슬 유전자, TNF 유전자, 감마 인터페론 유전자, CTLA4 유전자, 종양 세포에서 발현되는 유전자 예컨대 Melana, MAGE 유전자 (예컨대 MAGE-1, MAGE-3), P198 유전자, P1A 유전자, gp100 유전자를 포함한다.
- [0297] 위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 벡터의 제조를 위한 방법
- [0298] 본 발명은 또한 상기 정의된 바와 같은 위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 벡터를 제조하기 위한 방법에 관한 것으로서, 상기 방법은:
- [0299] (i) 세포 표적화 융합 단백질을 코딩하는 적어도 하나의 핵산,
- [0300] (ii) 조정성 융합 단백질을 코딩하는 적어도 하나의 핵산,
- [0301] (iii) 파라믹소바이러스과 바이러스의 엔벨로프 당단백질 F로부터 유래되고 바람직하게 상기 엔벨로프 당단백질 F의 세포질 영역의 적어도 한 부분이 결여된 당단백질을 코딩하는 적어도 하나의 핵산,
- [0302] (iv) 상기 레트로바이러스 유래의 코어 단백질을 코딩하는 핵산을 포함하는 적어도 하나의 벡터, 및
- [0303] (v) 임의로, 패키징 적격성 레트로바이러스 유래된 게놈을 포함하는 적어도 하나의 벡터
- [0304]로 패키징 세포주를 공동 형질감염시키고,
- [0305] 그리하여 공동 형질감염된 세포를 수득하는 단계를 포함한다.
- [0306] 상기 세포 표적화 융합 단백질 및/또는 상기 조정성 융합 단백질은 파라믹소바이러스과 바이러스의 엔벨로프 당단백질 G 또는 H로부터 유래된 단백질을 포함한다.
- [0307] 패키징 적격성 레트로바이러스 유래된 게놈을 포함하는 적어도 하나의 벡터는 레트로바이러스 벡터를 생산하는데만 요구된다.
- [0308] 당업자에게 잘 알려진 임의의 적합한 패키징 세포주가 사용될 수 있다.
- [0309] "패키징 세포주"란, 본 명세서에서 본 발명의 위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 벡터의 상이한 성분을 발현할 수 있는 세포주를 의미한다.
- [0310] 본 발명의 위형화 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 벡터의 상이한 성분을 코딩하는 핵산 및 벡터는 예를 들어 젖과동물 백혈병 기반 벡터의 경우에, 패키징 세포주의 게놈에 통합시킬 수 있다.
- [0311] 패키징 세포주는 바람직하게 렌티바이러스 Gag 및 Pol 유전자의 발현과 상용성일 수 있다.
- [0312] 예를 들어, 패키징 세포주는 293T 세포, 곤충 세포, TE 671 세포 및 HT1080 세포로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

- [0313] 용어 "형질감염"은 숙주 세포가 상기 핵산(들) 또는 벡터(들)에 의해 코딩되는 단백질(들)을 발현하게 되도록 세포로 적어도 하나의 외래 핵산 또는 벡터 (예를 들어 DNA, cDNA 또는 RNA)를 도입하는 것을 의미한다. 외래 핵산(들) 또는 벡터(들)는 세포의 유전자 기구에 의해 사용되는 조절 또는 제어 서열, 예컨대 출발, 중지, 프로모터, 신호, 분비 또는 다른 서열을 포함할 수 있다.
- [0314] 캡시드화에 필요한 psi 서열을 포함하는 벡터는 psi-양성 벡터라고 불리는 한편, 상기 psi 서열을 포함하지 않는 벡터는 psi-음성 벡터라고 불린다.
- [0315] 패키징 적격성 레트로바이러스 유래된 계놈을 포함하는 유일한 벡터는 psi-양성 벡터이다. 공동 형질감염을 위해 사용되는 다른 핵산 및 벡터는 psi-음성이다.
- [0316] 세포 표적화 융합 단백질을 코딩하는 핵산, 조정성 융합 단백질을 코딩하는 핵산 및 파라미소바이러스과 바이러스의 엔벨로프 당단백질 F로부터 유래된 당단백질을 코딩하는 핵산은 상기에 정의된 바와 같다. 그들은 2종 또는 3종의 개별 벡터의 형태로 제공될 수 있다: 예를 들어, 2개의 개별 벡터로서, 예컨대 제1 벡터는 세포 표적화 융합 단백질을 코딩하는 핵산 및 조정성 융합 단백질을 코딩하는 핵산을 포함하거나 또는 그로 이루어지고, 제2 벡터는 파라미소바이러스과 바이러스의 엔벨로프 당단백질 F로부터 유래된 당단백질을 코딩하는 핵산을 포함하거나 또는 그로 이루어진 것이거나; 또는 3개의 개별 벡터로서, 제1 벡터는 세포 표적화 융합 단백질을 코딩하는 핵산을 포함하거나 또는 그로 이루어지고, 제2 벡터는 조정성 융합 단백질을 코딩하는 핵산을 포함하거나 또는 그로 이루어지고, 제3 벡터는 파라미소바이러스과 바이러스의 엔벨로프 당단백질 F로부터 유래된 당단백질을 코딩하는 핵산을 포함하거나 또는 그로 이루어진다. 대안적으로, 세포 표적화 융합 단백질을 코딩하는 핵산, 조정성 융합 단백질을 코딩하는 핵산 및 파라미소바이러스과 바이러스의 엔벨로프 당단백질 F로부터 유래된 당단백질을 코딩하는 핵산은 이들 3종의 핵산을 포함하거나 또는 그로 이루어진 단일 벡터로 제공될 수 있다.
- [0317] 상기 레트로바이러스 유래의 코어 단백질을 코딩하는 핵산을 포함하는 벡터가 또한 사용된다.
- [0318] "레트로바이러스 유래의 코어 단백질"이란, 본 명세서에서 gag 및 pol 유전자에 의해 코딩되는 단백질을 의미한다. gag 유전자는 코어를 포함하는 구조 단백질로 레트로바이러스 프로테아제에 의해서 더욱 프로세싱되는 폴리단백질을 코딩한다. pol 유전자는 특히 레트로바이러스 프로테아제, 역전사효소 및 인테그라제를 코딩한다.
- [0319] 따라서 레트로바이러스 유래의 코어 단백질을 코딩하는 핵산은 상기 레트로바이러스의 gag 유전자 및 pol 유전자를 포함한다.
- [0320] 레트로바이러스 유래의 적어도 하나의 코어 단백질은 예를 들어 야생형 레트로바이러스 유래의 상응하는 코어 단백질과 비교하여 변형될 수 있다.
- [0321] 일 구체예에서, 레트로바이러스 유래의 적어도 하나의 코어 단백질은 적어도 하나의 아미노산 돌연변이, 예컨대 아미노산 결실, 삽입 또는 치환에 의해 변형된다.
- [0322] 바람직한 구체예에서, 상기 적어도 하나의 변형된 코어 단백질은 결합적 인테그라제이다. 결합적 인테그라제의 예는 D116A 돌연변이를 보유한다.
- [0323] 코어 단백질을 코딩하는 핵산은 따라서 pol 유전자에 적어도 하나의 돌연변이 및/또는 gag 유전자에 적어도 하나의 돌연변이를 포함할 수 있다. 상기 적어도 하나의 돌연변이는 뉴클레오티드 결실, 삽입 또는 치환일 수 있다.
- [0324] 바람직한 일 구체예에서, 코어 단백질을 코딩하는 핵산은 pol 유전자에 적어도 하나의 돌연변이를 포함하며, 그에 따라서 결합적 인테그라제를 코딩한다.
- [0325] 결합적 인테그라제를 포함하는 레트로바이러스 벡터는 통합-결합적 레트로바이러스 벡터라고 한다. 이러한 벡터는 관심 유전자를 코딩하는 캡슐화된 RNA 분자를 일시적으로 전달할 수 있게 한다.
- [0326] 바람직한 통합-결합적 레트로바이러스 벡터는 IDLV (통합-결합적 렌티바이러스 벡터)이다.
- [0327] gag 및 pol 유전자의 기원은 이의 명칭을 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 벡터에게 제공한다. 예를 들어, 표현 "HIV-1-유래된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 벡터"는 일반적으로 gag 및 pol 유전자가 HIV-1의 것이거나 또는 HIV-1 유래의 변형된 gag 및 pol 유전자라는 것을 의미한다.

- [0328] 패키징 적격성 레트로바이러스 유래 게놈을 포함하는 벡터는 또한 공동 형질감염, 특히 레트로바이러스 벡터의 생산을 위해 사용될 수 있다.
- [0329] "패키징 적격성 레트로바이러스 유래 게놈을 포함하는 벡터"란, 본 명세서에서 "시스-작용성" 서열이라고 알려진 레트로바이러스 핵산 서열을 포함하는 벡터를 의미한다. 이들은 전사 및 통합의 제어를 위한 긴 말단 반복부 (Long Terminal Repeat) (LTR) 또는 예를 들어 U3 영역의 적어도 한 부분이 결여된 변형물 (LTR), 캡시드화에 필요한 psi 서열 및 레트로바이러스 게놈의 역전사에 필요한 프라이머 결합 부위 (PBS) 및 폴리푸린 트랙 (PPT) 서열을 포함한다.
- [0330] U3 영역의 적어도 한 부분이 결여된 LTR을 포함하는 벡터를 사용하여 생성된 레트로바이러스 벡터는 예를 들어 자가-불활성화 (SIN-LTR) 벡터이다.
- [0331] 일 구체예에서, 패키징 적격성 레트로바이러스-유래된 게놈을 포함하는 상기 벡터는 CRISPR/CAS 엘리먼트(들) 및/또는 S/MAR-에피솜을 포함하는 관심 유전자(들)를 더 포함한다.
- [0332] CRISPR/CAS 시스템을 사용하는 경우에, 패키징 적격성 레트로바이러스-유래된 게놈을 포함하는 벡터는 전형적으로 엔도뉴클레아제 CAS (예를 들어 CAS9)를 코딩하는 유전자, 표적화하려는 관심 유전자에 특이적인 가이드 RNA (gRNA)에 상응하는 DNA 서열 및 임의로 유전자 교정을 위한 서열을 포함한다.
- [0333] 상기 레트로바이러스-유래된 게놈은 바람직하게 임의의 트랜스-보완성 기능의 부재 하에서 복제-결합적이다. 복제-적격성 게놈은 gag, pol 및 env 레트로바이러스 유전자를 더 포함하게 된다. 복제-결합적 게놈에서, 바이러스 유전자 gag, pol 및 env는 결실된다. 본 발명의 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 벡터의 조립은 gag 및 pol을 코딩하지만, "시스" 서열은 결합적인 다른 벡터 (예컨대 (iv)의 벡터), 및 위형화된 엔벨로프 당단백질을 코딩하는 적어도 다른 벡터 또는 핵산 (예컨대 (i), (ii) 및 (iii)의 핵산 또는 상기 핵산을 포함하는 벡터(들))을 트랜스로 제공하여 획득된다. 그들 발현은 완전한 바이러스 입자의 형성 및 바이러스 게놈의 복제에 필요한 유전자를 배제하면서, 관심 유전자의 캡시드화를 가능하게 한다.
- [0334] 상기에 정의된 바와 같은 위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 벡터를 제조하기 위한 방법은:
- [0335] b) 상기 핵산(들) 및 벡터(들)에 의해 코딩되는 단백질의 발현을 가능하게 하는데 충분한 시간 동안 공동 형질 감염된 세포를 배양하는 단계; 및
- [0336] c) 코딩된 단백질이 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 벡터를 형성할 수 있게 하는 단계
- [0337] 를 더 포함할 수 있다.
- [0338] 특이적 세포 또는 세포 아형의 활성 조정 및/또는 형질도입
- [0339] 본 발명의 다른 목적은 표적 세포의 활성을 선택적으로 조정하고, 임의로 표적 세포를 선택적으로 형질도입시키기 위한 상기에 정의된 바와 같은 위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 벡터의 용도, 바람직하게 시험관내 또는 생체외 용도이다.
- [0340] 본 발명의 여전히 다른 목적은 표적 세포의 활성을 선택적으로 조정하고, 임의로 표적 세포를 선택적으로 형질도입시키기 위한 방법, 바람직하게 시험관내 또는 생체외 방법이고, 여기서 상기 방법은 상기에 정의된 바와 같은 위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 벡터를 상기 표적 세포를 포함하는 세포와 접촉시키는 단계를 포함한다.
- [0341] "표적 세포의 활성을 선택적으로 조정하는"이란 표현에서 용어 "선택적으로"는 본질적으로 오직 상기 표적 세포만이 위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 벡터에 의해 조정되는 그들 활성을 갖는다는 것을 의미한다. 예를 들어, 그 활성이 조정되는 세포는 10% 미만, 예를 들어 5% 미만 또는 1% 미만의 비표적화 세포를 포함한다.
- [0342] "표적 세포를 선택적으로 형질도입시키는"이란 표현에서 용어 "선택적으로"는 본 명세서에서 본질적으로 오직 표적 세포만을 형질도입시킨다는 것을 의미한다. 예를 들어, 형질도입된 세포는 10% 미만, 예를 들어 5% 미만 또는 1% 미만으로 비표적화 세포가 형질도입된 것을 포함한다.
- [0343] "표적 세포의 활성을 조정하는"이란 표현은 "기능성 도메인" 부문에서 상기에 정의된 바와 같다.
- [0344] 본 명세서에서 사용되는 용어 "전달하는" 또는 "형질도입시키는"은 표적 세포와의 결합시, 표적 세포의 막 또는

세포질로 생물학적 물질을 전달하는 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 벡터의 능력에 관한 것이다. 전달 이후에, 생물학적 물질은 세포의 다른 구획(들)으로 전위될 수 있다.

[0345] 본 명세서에서 사용되는 표현 "생물학적 물질"은 세포의 구조 및/또는 기능을 변경시키기 쉬운 하나 이상의 화합물에 관한 것이다. 본 발명의 맥락에서, 생물학적 물질은 상기에 설명한 바와 같이, 레트로바이러스 벡터의 게놈 내에 포함될 수 있는, 관심 유전자를 포함하는 하나 이상의 핵산인 것이 바람직하다.

[0346] 세포의 형질도입을 수행하기 위한 조건은 당업자에게 잘 알려져 있고 전형적으로 바람직하게 예를 들어 레트로넥틴으로 코팅된 플라스크, 플레이트 또는 디쉬에서 배양되고, 임의로 사이토카인 각테일로 사전 자극시킨, 형질도입시키려는 세포를 위형화된 레트로바이러스 벡터와, 바람직하게 0.5 내지 100의 MOI (Multiplicity of Infection)로 인큐베이션시키는 단계를 포함한다.

[0347] 표적 세포는 특히 동일 명칭의 부문에서 상기에 정의된 바와 같다.

[0348] 위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 벡터는 배양 배지에서 표적 세포를 포함하는 세포와 접촉될 수 있다.

[0349] 당업자는 소정 세포에 적절한 배지 배양을 알고 있다.

[0350] 따라서 위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 벡터는 정의된 세포 기능을 변경시키기 위해 시험관내 또는 생체내에서 사용될 수 있고, 그리하여 기초 연구에 새로운 도구를 제공한다.

약학 조성물

[0352] 본 발명은 또한 상기에 정의된 바와 같은 적어도 하나의 위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 벡터를 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다.

[0353] 약학 조성물에 사용하려는 위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 벡터의 양은 예를 들어, 면역원성, 투여를 의도하는 대상체의 상태 (예를 들어, 체중, 연령, 성별, 건강, 존재시 공존 치료, 및 치료 빈도), 투여 방식, 제제의 유형 및/또는 표적 세포의 수에 따라 좌우된다.

[0354] 약학 조성물은 바람직하게 적어도 하나의 위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 벡터 및 적어도 하나의 약학적으로 허용가능한 담체를 포함한다.

[0355] 본 명세서에서 사용되는 용어 "약학적으로 허용가능한 담체"는 활성 성분의 생물학적 활성의 유효성을 방해하지 않고 바람직하게 투여되는 숙주에게 유독하지 않은 임의의 담체를 포괄하는 의미이다.

[0356] 본 발명의 약학 조성물에 사용할 수 있는 약학적으로 허용가능한 담체는 당업자에게 잘 알려져 있다. 예를 들어, 그들은 이온 교환제, 알루미나, 알루미늄 스테아레이트, 레시틴, 자기 유화 약물 전달 시스템 (SEDDS), 예컨대 d-α-토코페롤 폴리에틸렌글리콜 1000 숙시네이트, 약학적 투약 형태에 사용되는 계면활성제 예컨대 Tween 또는 다른 유사한 중합성 전달 매트릭스, 혈청 단백질, 예컨대 인간 혈청 알부민, 완충제 물질 예컨대 포스페이트, 글리신, 솔브산, 포타슘 슬레이트, 포화된 식물성 지방산의 부분 글리세리드 혼합물, 물, 염 또는 전해질, 예컨대 프로타민 슬레이트, 디소듐 히드로겐 포스페이트, 포타슘 히드로겐 포스페이트, 소듐 클로라이드, 징크 염, 콜로이드 실리카, 마그네슘 트리실리케이트, 폴리비닐 파롤리돈, 셀룰로스-기반 물질, 폴리에틸렌 글리콜, 소듐 카복시메틸셀룰로스, 폴리아크릴레이트, 왁스, 폴리에틸렌-폴리옥시프로필렌-블록 중합체, 폴리에틸렌 글리콜 및 양모지 (wool fat)를 포함한다. 시클로덱스트린 예컨대 α-, β-, 및 γ-시클로덱스트린, 또는 2- 및 3-히드록시프로필-β-시클로덱스트린을 포함하는, 화학적으로 변형된 유도체 예컨대 히드록시알킬시클로덱스트린, 또는 다른 가용화된 유도체가 또한 본 발명에 따른 조성물의 전달을 강화시키는데 유리하게 사용될 수 있다.

[0357] 약학 조성물은 10^6 IU 내지 10^{12} IU의 위형화된 레트로바이러스 벡터, 바람직하게 10^7 IU 내지 10^9 IU, 보다 바람직하게 10^7 IU 내지 10^8 IU의 위형화된 레트로바이러스 벡터를 포함할 수 있다.

[0358] 본 명세서에서 용어 "IU" 또는 "감염 단위"는 세포주에 대한 적정으로 결정되고 IU/mL로 표시되는 감염성 벡터 입자의 분량을 의미한다.

[0359] 투여는 본 발명에 따른 약학 조성물의 단일 용량 또는 여러 용량으로 성취될 수 있고, 상기 여러 용량은 동일한 시간에 또는 개별적으로 시간 경과에 따라 주사된다.

- [0360] 일 구체예에서, 약학 조성물은 정확한 투약을 용이하게 하기 위해서 단위 투약 형태로 존재한다. 용어 "단위 투약 형태"는 각각의 단위가 적합한 약학 부형제와 함께 바람직한 치료적 효과를 생성시키도록 계산된 활성 재료의 사전 결정된 분량을 함유하는, 인간 대상체 및 다른 포유동물을 위한 일원화된 투약량으로서 적합한 물리적으로 구별되는 단위를 의미한다. 전형적인 단위 투약 형태는 액상 조성물의 사전충전, 사전 측정 앰플 또는 시린지를 포함한다. 이러한 조성물에서, 위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 벡터는 일반적으로 소수 성분이고, 나머지는 다양한 비히클 또는 담체 및 바람직한 투약 형태를 형성하는데 도움이 되는 프로세싱 보조제이다.
- [0361] 본 발명은 상기에 정의된 바와 같은 위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 벡터를 포함하는 약학 조성물 및 투여 방식에 관한 지시서를 포함하는 키트를 더 제공한다. 이들 지시서는 예를 들어 의학적 정후, 투여 경로, 투약량 및/또는 치료되는 환자군을 표시할 수 있다.
- [0362] 치료 대상체
- [0363] 치료하려는 대상체는 포유동물, 예를 들어 인간 또는 인간 이외의 포유동물일 수 있다.
- [0364] 인간은 또한 "개체" 또는 "환자"라고도 한다.
- [0365] 상기 인간은 임의 연령일 수 있는데, 예를 들어, 영아, 유아, 청소년, 성인, 노인일 수 있고, 임의 성별일 수 있다.
- [0366] 인간 이외의 포유동물은 바람직하게 설치류 (예를 들어, 마우스, 래트 또는 토끼), 고양잇과 (예를 들어, 고양이), 갯과 (예를 들어, 개) 또는 영장류 (예를 들어, 침팬지)이다.
- [0367] 치료하려는 대상체는 바람직하게 인간이다.
- [0368] 질환의 예방 및/또는 치료
- [0369] 본 발명은 특별한 세포 또는 세포 서브셋의 활성을 선택적으로 조정하고, 임의로 상기 특별한 세포 또는 세포 서브셋을 선택적으로 형질도입시킴으로써 예방 및/또는 치유할 수 있는 질환의 예방 및/또는 치료에 특히 유용하다.
- [0370] 상기 질환은 바람직하게 특별한 세포 또는 세포 서브셋을 포함한다.
- [0371] 따라서 치료하려는 대상체는 특별한 세포 또는 세포 서브셋의 활성을 선택적으로 조정하고, 임의로 상기 특별한 세포 또는 세포 서브셋을 선택적으로 형질도입시킴으로써 예방 및/또는 치유할 수 있는 질환을 앓고 있을 수 있거나 또는 앓을 가능성이 있을 수 있다.
- [0372] 상기 질환은 면역 질환 (예를 들어 자가면역 질환), 암, 유전자 질환, 알레르기 질환, 염증성 질환, 감염성 질환 (특히 박테리아 및/또는 바이러스 감염), 대사성 질환, 신경퇴행성 질환 (예를 들어 신경 이영양증, 파킨슨 질환, 헌팅تون 질환, 알츠하이머 질환), 근육 질환 및 그들 조합으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0373] 본 명세서에서 사용되는 표현 "자가면역 질환"은 신체 내에 정상적으로 존재하는 물질 및/또는 조직에 대해 과활성된 면역 반응으로 인한 질환을 의미한다. 따라서, 이러한 과활성된 면역 반응에 관여되는 면역 세포를 특이적으로 표적화함으로써, 본 발명의 위형화된 레트로바이러스-유사 입자 및 레트로바이러스 벡터는 자가면역 질환의 예방 및/또는 치료에 유용한 도구이다.
- [0374] 자가면역 질환은 특히 급성 파종성 뇌척수염, 급성 출혈성 백질뇌염, 애디슨병, 무감마글로불린혈증, 원형탈모증, 근위축성 측색 경화증, 강직성 척추염, 항인지질 증후군, 항합성효소 증후군, 아토피성 알레르기, 자가면역성 재생불량성 빈혈증, 자가면역성 심근병증, 자가면역성 장병증, 자가면역성 용혈성 빈혈증, 자가면역성 간염, 자가면역성 내이 질환, 자가면역성 림프세포증식성 증후군, 자가면역성 말초 신경병증, 자가면역성 췌장염, 자가면역성 다선 증후군, 자가면역성 프로케스테론 피부염, 자가면역성 혈소판감소성 자반병, 자가면역성 두드러기, 자가면역성 포도막염, 발로병, 발로 동심성 경화증, 베체트 증후군, 버거씨 병, 비커스태프 뇌염, 블라우 증후군, 수포성 유천포창, 캐슬맨병, 셀리악병, 만성 염증성 탈수초성 다발성신경병증, 만성 재발성 다병소 골수염, 척-스트라우스 증후군, 반흔성 유천포창, 코간 증후군, 한랭응집증, 보체 성분 2 결핍증, 두개동맥염, CREST 증후군, 크론병, 쿠싱 증후군, 피부 백혈구파괴성 혈관염, 디고스병, 엘컴병, 헤르페스모양 피부염, 피부 근염, 제I형 진성 당뇨병, 미만성 피부 전신 경화증, 드레슬러 증후군, 원관형 홍반성 루푸스, 습진, 부착부염-관절염, 호산구성 근막염, 호산구성 위장염, 후천성 표피 수포증, 결절성 홍반증, 본태성 혼합 한랭글로불린혈증, 에반스 증후군, 진행성 골화성 섬유이형성증, 섬유성 폐포염, 위염, 위장 유천포창, 거대 세포 동맥염,

사구체신염, 굿파스처 증후군, 그레이브스병, 길랑-바레 증후군 (GBS), 하시모토 뇌염, 하시모토 갑상선염, 용혈성 빈혈증, 헤노호-쉔라인 자반증, 임신성 포진증, 저감마글로불린혈증, 특발성 염증성 탈수초성 질환, 특발성 폐섬유증, 특발성 혈소판감소성 자반병, IgA 신장병증, 봉입체 근염, 염증성 탈수초성 다발성신경병증, 간질성 방광염, 소아 특발성 관절염, 소아 류마티스성 관절염, 가와사키병, 람베르트-이튼 근무력 증후군, 백혈구파괴성 혈관염, 편평 태선, 경화성 태선, 선형 IgA 질환 (LAD), 루게릭병, 루포이드 간염, 홍반성 루푸스, 마지드 증후군, 메니에르병, 현미경적 다발성혈관염, 밀러-피셔 증후군, 혼합 결합 조직병, 반상경피증, 무카-하베르만 병, 다발성 경화증, 중증 근무력증, 근염, 시속신경수염, 신경근긴장증, 안구 반흔성 유천포창, 안구간대경련-근간대경련 증후군, 오드 갑상선염, 재발성 류마티즘, 방종양성 소뇌 변성, 발작성 야간 혈색소뇨증 (PNH), 패리 롬버그 증후군, 파르소니지-터너 증후군, 평면부염, 수포창, 심상성 천포창, 악성 빈혈, 정맥주위 뇌척수염, POEMS 증후군, 결절성 다발성동맥염, 류마티스성 다발성근통, 다발성근염, 원발성 담즙성 간경변, 원발성 경화성 담관염, 진행성 염증성 신경병증, 건선, 건선성 관절염, 괴저성 농피증, 진성 적혈구계 무형성증, 라스무센 뇌염, 레이노 현상, 재발성 다발연골염, 라이터 증후군, 하지 불안 증후군, 후복막 섬유증, 류마티스성 관절염, 류마티스성 열, 사르코이드증, 슈미트 증후군, 슈니츨러 증후군, 공막염, 경피증, 쇠그렌 증후군, 척추관절병증, 스틸병, 강직 인간 증후군, 아급성 박테리아성 심내막염, 스삭 증후군, 스위트 증후군, 시덴합 무도병, 교감성 안염, 타카야수 동맥염, 측두 동맥염, 틀로사-힌트 증후군, 횡단성 척수염, 궤양성 대장염, 미분화성 결합 조직 질환, 미분화성 척추관절병증, 혈관염, 백반증 및 베게너 육아종증을 포함한다.

[0375] 본 명세서에서 사용되는 용어 "암"은 임의 유형의 암, 예컨대 교아세포종, 신경아세포종, B 세포 림프종, T 세포 림프종, 유방암, 간세포 암종, 백혈병을 포함한 조혈 세포로부터 발생된 암, 특히 B-CLL (B-cell Chronic lymphocytic leukaemia; B-세포 만성 림프성 백혈병), CML (Chronic Myelogenous Leukemia; 만성 골수성 백혈병) 또는 T 세포 기반 백혈병 예컨대 ATL (acute T cell leukemia; 급성 T 세포 백혈병), ALL (Acute Lymphoblastic Leukemia; 급성 림프아구성 백혈병), AML (Acute Myeloid Leukemia; 급성 골수성 백혈병) 및/또는 흑색종을 포함한다.

치료적 적용

[0377] 본 발명은 또한 약제로서, 바람직하게 면역 요법, 유전자 요법 및/또는 백신접종에서 사용을 위한 상기에 정의된 바와 같은 위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 백터에 관한 것이다.

[0378] 유전자 요법은 예를 들어 세포에서 관심 유전자를 전달하고/하거나 내생성 부위에서 관심 유전자(들)를 교정하여 수득할 수 있는, 약제로서 유전자(들)을 사용하는 요법이다. 유전자 요법에서, 관심 유전자(들)를 포함하는 핵산이 환자의 세포로 전달되고, 관심 유전자(들)에 의해 코딩되는 단백질(들)의 발현 및/또는 관심 유전자(들)의 교정으로 질환이 예방 및/또는 치료될 수 있다.

[0379] 상기 관심 유전자(들)는 본 발명에 따른 레트로바이러스 백터에 포함되는 RNA 분자에 존재할 수 있다.

[0380] 유전자(들)의 교정은 CRISPR/CAS 시스템에 의해 수행될 수 있다.

[0381] 면역요법이라고도 하는 면역 요법은 질환을 예방하고/하거나 치료하기 위해서 면역계의 활성 조정 (예를 들어, 자극 또는 억제)을 기반으로 하는 요법이다.

[0382] 본 발명의 맥락에서, 면역요법은 본 발명에 따른 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 백터를 사용하여, 오직 특별한 표적화된 면역 세포의 활성을 조정하고, 임의로 상기 표적 면역 세포를 선택적으로 형질도입시키는 것으로 이루어진다. 예를 들어, 레트로바이러스 백터는 B 세포를 활성화시키고, 예컨대 그들을 형질 세포로 분화시키고, 임의로 그들을 감염성 작용제 (예를 들어, HIV, HCV 또는 HBC)에 대한 이소성 항체를 코딩하는 핵산으로 형질도입시키는데 사용될 수 있다.

[0383] 면역 요법은 또한 T 세포 요법을 포함한다. T 세포 요법에서, T 세포는 그들 기능을 조정하는 것 이외에도, 유전자 전달, 예를 들어 T 세포 수용체 (CAR) 유전자 전달을 더 혜용할 수도 있다.

[0384] 양자 T 세포 요법은 T 세포가 그를 필요로 하는 대상체에게 주입되는 요법이다. 본 발명의 맥락에서, 상기 T 세포의 활성은 본 발명에 따른 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 백터를 사용함으로써, 주입 이전에 조정될 수 있다.

[0385] 본 발명의 맥락에서, 백신접종은 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 백터의 표면에 표적화되는 특이적 바이러스 에피토프를 표시하고 동시에 항원 제시 세포 (예를 들어 마크로파지)를 활성화시키고 이후에 에피토프를 면역계 (T 및 B 세포)에 제시하게 되는 것으로 이루어진다.

- [0386] 본 발명은 또한 약제로서 사용을 위한 상기에 정의된 바와 같은 위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 백터에 관한 것으로서, 상기 위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 백터는 표적 세포의 활성을 선택적으로 조정하고 임의로 표적 세포를 선택적으로 형질도입시킨다.
- [0387] 본 발명은 특히 "질환의 예방 및/또는 치료" 부문에서 상기에 정의된 바와 같이 질환의 예방 및/또는 치료에서, 상기에 정의된 바와 같이 사용을 위한 위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 백터에 관한 것이다.
- [0388] 상기 질환은 예를 들어 면역 질환 (예를 들어 자가면역 질환), 암, 유전자 질환, 알레르기 질환, 염증성 질환, 감염성 질환 (특히 박테리아 및/또는 바이러스 감염), 대사성 질환, 신경학적 질환 (예컨대 신경 이영양증, 알츠하이머 질환, 파킨슨 질환, 헌팅تون 질환), 근육 질환 및 그들 조합이다.
- [0389] 일 구체예에서, 위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 백터는 단백질 또는 유전자 전달을 위해서, 예를 들어 DC 세포 특이적 리간드 (예컨대 CD11b) 및 GM-SCF (*Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*)를 백터의 표면 상에 동시표시함으로써, DC (*Dendritic Cell*) 백신을 개선시키는데 사용된다.
- [0390] 유리한 구체예에서, T 세포 활성화는 T 세포 특이적 유전자 전달과 커플링되고, 이것은 휴지기 T 세포에서, 예를 들어 T 세포-기반 유전자 요법에서, 유전자 전달 효율을 상당히 증강시켰다. T 세포 서브셋에 효율적으로 생체내 유전자를 전달하는 것은 유전자 및 세포 요법 분야의 혁명인데, 이것이 임상 적용에 고비용을 유발하는 생체외 배양 및 형질도입 과정을 생략할 수 있게 하기 때문이다. 게다가, 세포를 생체내 그들 정상 미세 환경에 남겨두는 것은 그들 표현형을 보존할 수 있게 하고 환자에서 장기간 지속될 수 있게 한다 (예를 들어, 종양 특이적 CD8 세포독성 세포).
- [0391] 다른 구체예에서, 본 발명은 휴지기 B 림프구로, 예를 들어 B 세포-기반 유전자 요법에서, 예컨대 B 세포가 관용원성 세포로서 작용할 수 있기 때문에 면역계에 의해 관용되는 재조합 단백질의 B 세포 분비를 가능하게 하거나 또는 B 세포가 감염성 작용제(들)에 대한 중화 항체를 생산할 수 있게 하는 면역요법에서, 선택적 유전자 전달을 증강시키는데 사용될 수 있다.
- [0392] 게다가, 위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 백터의 표면 상에 하나 이상의 사이토카인의 제시는 생체 내에서 장기간 동안 지속될 수 있는, TSCM 또는 TCM과 같은 표현형으로 분화되는 T 세포 서브셋을 유도시킬 수 있다.
- [0393] 다른 구체예에서, 본 발명은 암 요법을 위해, (자가) 항암 자연 살해 세포의 생체내 확장에 사용될 수 있다.
- [0394] 일 구체예에서, 위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 백터는 아폽토시스 리간드 및 종양 또는 면역 세포 특이적 표적화 도메인을 동시표시함으로써 한정된 세포 서브셋의 아폽토시스를 유도하는데 사용된다.
- [0395] 위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 백터는 약학 조성물의 형태로 제공될 수 있다.
- [0396] 약학 조성물은 바람직하게 동일 명칭의 부문에서 상기에 정의된 바와 같다.
- [0397] 본 발명은 또한 바람직하게 면역 요법, 유전자 요법 및/또는 백신접종의 구성에서, 상기에 정의된 바와 같은 위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 백터의 치료적 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 치료를 필요로 하는 대상체를 치료하기 위한 방법에 관한 것이다.
- [0398] 본 발명은 또한 상기 정의된 바와 같은 위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 백터의 치료적 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 치료를 필요로 하는 대상체를 치료하기 위한 방법에 관한 것이고, 여기서 상기 위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 백터는 표적 세포의 활성을 선택적으로 조정하고 임의로 표적 세포를 선택적으로 형질도입시킨다.
- [0399] 본 발명은 또한 질환을 예방 및/또는 치료하기 위한 방법에 관한 것으로서, 예방 및/또는 치료를 필요로 하는 대상체에게 상기에 정의된 바와 같은 위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 백터의 치료적 유효량을 투여하는 단계를 포함하고, 여기서 상기 질환은 바람직하게 상기에 정의된 바와 같다.
- [0400] 당업자에게 공지된 임의의 적합한 투여 방법이 사용될 수 있다. 특히, 본 발명에 따른 위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 백터는 경구 경로, 비경구 경로 (바람직하게 정맥내 주사에 의해), 수질 경로, 특히 대퇴골내 (예컨대 골수강내) 또는 상완골 수질 경로 주사 및/또는 국소 종양내 주사에 의해 투여될

수 있다.

- [0401] 비경구 경로가 선택된 경우에, 위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 백터는 주사용 용액 또는 혼탁액의 형태, 예를 들어 앰풀 또는 플라스크에 조건화된 형태로 존재할 수 있다.
- [0402] 위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 백터는 바람직하게 치료적 유효량으로 사용되거나 또는 투여된다.
- [0403] "치료적 유효량"은 치료되는 대상체에게 치료적 효과를 부여하는 위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 백터의 분량을 의미한다. 치료적 효과는 객관적 (즉, 일부 검사 또는 마커로 측정가능)이거나 또는 주관적 (즉, 대상체가 효과의 징후 또는 느낌을 제공함)일 수 있다. 당업자에게 공지된 바와 같이, 유효 용량은 투여 경로, 대상체의 크기 및/또는 체중을 비롯하여 다른 작용제와 공동용법의 가능성에 따라서 다양할 것이다.
- [0404] 본 명세서에서 사용되는 용어 "포함하는"은 용어 "이루어지는"을 포함한다.
- [0405] 본 발명을 하기의 실시예 및 도면의 관점에서 더욱 예시할 것이다.
- [0406] 저널 논문 또는 요약문, 공개 또는 미공개 특허 출원, 특허 공보 또는 임의의 다른 참조 문헌을 포함하여, 본 명세서에서 인용되는 모든 참조 문헌은 인용된 참조 문헌에 제시된 모든 데이터, 표, 도면 및 텍스트를 포함해 본 명세서에서 전체로 참조하여 편입된다.

서열의 간단한 설명

- [0408] SEQ ID NO: 1은 인간 CD4에 특이적인 DARPin (Designed Ankyrin Repeat Protein)-29.2에 융합된 절단되고 돌연변이 (Y481A, R533A, S548L, F549S)된 MV H 단백질 (HcDelta18)을 코딩하는 핵산 서열에 해당된다.
- [0409] SEQ ID NO: 2는 SEQ ID NO: 1의 서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열에 해당된다.
- [0410] SEQ ID NO: 3은 추가적인 (G₄S)₃ 링커로 연결된 인간 CD8에 대해 유도된 단쇄 항체 (scFvC8-Vh1)에 융합된 절단되고 돌연변이 (E501A, W504, Q530A, E533A)된 NiV G 단백질 (GcΔ34)을 코딩하는 핵산 서열에 해당된다.
- [0411] SEQ ID NO: 4는 SEQ ID NO: 3의 서열에 의해 코딩된 아미노산 서열에 해당된다.
- [0412] SEQ ID NO: 5는 IL-7에 융합된 절단되고 돌연변이 (E501A, W504, Q530A, E533A)된 NiV G 단백질 (GcΔ34)을 코딩하는 핵산 서열에 해당된다.
- [0413] SEQ ID NO: 6은 SEQ ID NO: 5의 서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열에 해당된다.
- [0414] SEQ ID NO: 7은 인간 EpCAM에 대해 유도된 DARPin (designed ankyrin repeat protein)에 융합된 절단되고 돌연변이 (E501A, W504, Q530A, E533A)된 NiV G 단백질 (GcΔ34)을 코딩하는 핵산에 해당된다.
- [0415] SEQ ID NO: 8은 SEQ ID NO: 7의 서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열에 해당된다.
- [0416] SEQ ID NO: 9는 니파 바이러스 엔벨로프 당단백질 G의 전체 길이 아미노산 서열에 해당된다.
- [0417] SEQ ID NO: 10은 홍역 바이러스 엔벨로프 당단백질 H의 전체 길이 아미노산 서열에 해당된다.
- [0418] SEQ ID NO: 11은 니파 바이러스 엔벨로프 당단백질 F의 전체 길이 아미노산 서열에 해당된다.
- [0419] SEQ ID NO: 12는 홍역 바이러스 엔벨로프 당단백질 F의 전체 길이 아미노산 서열에 해당된다.
- [0420] SEQ ID NO: 13은 IL-7에 융합된 절단되고 돌연변이된 MeV H 단백질 (HcΔ15)을 코딩하는 핵산 서열에 해당된다.
- [0421] SEQ ID NO: 14는 SEQ ID NO: 13의 서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열에 해당된다.
- [0422] SEQ ID NO: 15는 세포질 꼬리부에서 30개 아미노산이 절단된 홍역 바이러스 F 단백질 (FcΔ30)의 아미노산 서열에 해당된다.
- [0423] SEQ ID NO: 16은 세포질 꼬리부에서 22개 아미노산이 절단된 니파 바이러스 F 단백질 (FcΔ22)의 아미노산 서열에 해당된다.

도면의 간단한 설명

- [0425] 도 1: 4^H/IL7^H-LV에 의한 휴지기 CD4⁺ T 세포로의 효율적이고 안정한 ErbB2-CAR 유전자 전달. 4^H/IL7^H-LV가

휴지기 T 세포로 치료적 유전자 (ErbB2 특이적 CAR, ErbB2-CAR)를 효율적으로 전달할 수 있는지를 평가하기 위해서, 신선하게 단리된 CD3⁺ T 세포를 4^H-LV 또는 4^H/IL7^H-LV로 형질도입시켰다. VSV-LV로 형질도입시킨 세포 또는 미형질도입된 채로 남겨둔 세포 (ut)를 음성 대조군으로서 사용하였다. 3일 후에, 형질도입된 세포의 절반을 FACS를 통해 분석하여 CD4- 또는 CD8- 게이팅된 세포에서 ErbB2-CAR⁺ 세포의 백분율을 결정하였다. 안정한 ErbB2-CAR 발현을 확증하기 위해서, 형질도입된 세포의 나머지 절반을 세척 단계 이후에, 추가 3일 동안 항-CD3/항-CD28/IL-2 자극의 존재 하에서 더욱 배양하였다. 다음으로, CD4⁺/ErbB2⁺ 세포 및 CD8⁺/ErbB2⁺ 세포의 백분율을 FACS를 통해 결정하였다.

[0426]

도 2: 천연 수용체 인식을 제거하기 위한 NiV 엔벨로프 당단백질 G의 돌연변이. 에프린-B2 (A) 및 B3 (B)과 NiV-G 돌연변이체의 결합을 도시한다. 293T 세포를 모의군, GcΔ34^{His}를 코딩하는 플라스미드 또는 상이한 GcΔ34^{EpCAM} 돌연변이체: 미돌연변이된 (GcΔ34^{EpCAM}), E533A (GcΔ34^{EpCAM} mut 1), Q530A+E533A (GcΔ34^{EpCAM} mut 2.1), E501A+W504A (GcΔ34^{EpCAM} mut 2.2) 또는 E501A+W504A+Q530A+E533A (GcΔ34^{EpCAM} mut 4)를 코딩하는 플라스미드로 형질감염시켰고 1 μg/mL 재조합 Fc-에프린B2 또는 B3과 인큐베이션시켰다. 상이한 돌연변이체에 의한 수용체의 결합량은 MFI 값으로 표시하였다. 통계학은 미돌연변이된 GΔ34-DARPin-Ac1과 관련이 있었다 (n=3; 평균 ± 표준 편차 (SD)를 도시한다; 단측 t 검정에 의해 *, P<0,1 **, P<0,01; ***, P<0,001).

[0427]

도 3: 4^H/IL7^H-VLP에 의한 CD4⁺ T 세포의 선택적 활성화. 신선하게 단리된 CD3⁺ T 세포를 미형질도입된 채로 두거나 (ut) 또는 CD4-DARPin-Hmut (4^H-VLP), CD4-DARPin/IL7-Hmut (4^H/IL7^H-VLP) 또는 IL7-Hnse (Hnse/IL7^H-VLP)로 위형화시킨 VLP의 상이한 유형으로 형질도입시켰다. 3일 후에 세포를 CD8, CD4, 및 CD71 항체로 염색시켰다. CD4- 또는 CD8- 게이팅된 T 세포에서 CD71 발현을 도시한다.

[0428]

도 4: 표적화된-VLP 상에서 기능적으로 표시된 IL7은 T 세포 생존을 촉진시킨다. CD4-표적화 MV-H (4^H-VLP), CD8-표적화 MV-H (8^H-VLP), IL7-표시 CD4-표적화 MV-H (4^H/IL7^H-VLP), 또는 IL7-표시 CD8-표적화 MV-H (8^H/IL7^H-VLP)로 위형화시킨 바이러스-유사 입자 (VLP)와 6일 동안 인큐베이션시킨 성인 휴지기 CD3⁺ T 세포의 전면/측면 산란 프로파일. 배지 단독 (미형질도입, ut)에서 또는 15 ng/mL의 IL7 존재 하에서 배양된 세포를 대조군으로서 사용하였다. 생존 세포의 백분율은 각각 도트 블롯으로 표시한다.

[0429]

도 5: CD4-표적화 LV 상에서 기능적으로 표시된 IL7은 T 세포 생존을 촉진한다. VSVG (VSV-LV), MV-Hmut (Hnse-LV), CD4-표적화 MV-H (4^H-LV) 또는 IL7-표시 CD4-표적화 MV-H (4^H/IL7^H-LV)로 위형화시킨 렌티바이러스 벡터 (LV)와 6일 동안 인큐베이션시킨 성인 휴지기 CD3⁺ T 세포의 전면/측면 산란 프로파일. 배지 단독 (미형질도입, ut)에서 또는 15 ng/mL의 IL7의 존재 하에서 배양된 세포를 대조군으로서 사용하였다. 생존 세포의 백분율은 각각 도트 블롯으로 표시한다.

[0430]

도 6: 4^H/IL7^H-LV에 의한 CD4⁺ T 세포의 선택적 활성화. 신선하게 단리된 CD3⁺ T 세포를 형질도입시키지 않은 채로 (ut) 또는 CD4-DARPin-Hmut (4^{HΔ18}-LV), Hnse (Hnse-LV) 또는 VSVG (VSVG-LV)로 위형화시킨 LV의 상이한 유형으로 형질도입시켰다. 여기서 IL7은 20개 아미노산 C-절단형 (HΔ20) 또는 15개 아미노산 C-절단형 (HΔ15)인, Hmut의 2개의 상이한 형태 상에 표시시켰다. 따라서, 2개 유형의 4^H/IL7^H-LV를 제조하였고 휴지기 T 세포에 형질도입시켰다. 3일 후에, 세포를 CD3, CD8, CD69 및 CD71 항체로 염색하였다. CD8⁺ 및 CD8⁻ (CD4⁺) 세포에서 활성화 마커 CD69 및 CD71 발현을 도시한다.

[0431]

도 7: 위형화된 렌티바이러스 벡터 (LV)의 개략적 대표도. 4^H-LV는 MeV 당단백질 위형을 기반으로 하는 CD4-표적화 LV이다. 4^H/IL7^H-LV는 MV 당단백질 위형을 기반으로 하는 IL7-표시 CD4-표적화 LV이다. 엔벨로프 당단백질 H (MV-H)는 예를 들어 15개, 18개 또는 20개 아미노산 만큼 이의 세포질 꼬리부에서 절단되고 4개 점 돌연변이 (Y481A, R533A, S548L 및 F549S) 중 적어도 2개가 SLAM 및 CD46의 이의 천연 수용체 인식을 가리도록 도입되어, 그리하여 엔벨로프 당단백질 Hmut가 생성된다. 이후에, 표적화 도메인 (예를 들어 CD4-DARPin) 및/또는 사이토카인 (예를 들어 IL7)이 링커와 함께 또는 링커 없이, 돌연변이체 H (Hmut)에 융합된다.

MV 엔벨로프 당단백질 F는 30개 아미노산만큼 이의 세포질 꼬리부에서 절단된다 (MV-F_{Δ30}).

[0432] 도 8: 위형화된 바이러스-유사 입자 (VLP)의 개략적 대표도. 8^G-VLP는 NiV 당단백질 위형을 기반으로 하는 CD8-표적화 VLP이다. 8^G/IL7^G-VLP는 NiV 당단백질 위형을 기반으로 하는 IL7-표시 CD8-표적화 VLP이다. NiV-G 엔벨로프 당단백질은 이의 세포질 꼬리부에서 34개 아미노산만큼 절단되었고 (Δ34), 4개 점 돌연변이 (E501A, W504A, Q530A, 및 E533A)가 에프린-B2/B3의 이의 천연 수용체 인식을 가리도록 도입되어, 그리하여 엔벨로프 당단백질 NiV-G_{Δ34}가 생성된다. 이후에, 표적화 도메인 (CD8-scFv) 및/또는 사이토카인 (IL7)이 링커와 함께 또는 링커없이 돌연변이체 G 단백질 (NiV-G_{Δ34})에 융합된다. NiV 엔벨로프 당단백질 F는 이의 세포질 꼬리부에서 22개 아미노산만큼 절단된다 (NiV-F_{Δ22}).

[0433] 도 9: 4^H/IL7^H-LV에 의한 휴지기 CD4⁺ T 세포의 효율적이고 선택적인 형질도입. 신선하게 단리된 CD3⁺ T 세포를 미형질도입된 채로 두거나 (ut) 또는 CD4-DARPin-Hmut (4^{HΔ18}-LV), Hnse (Hnse-LV) 또는 VSVG (VSVG-LV)로 위형화된 LV의 상이한 유형으로 형질도입시켰다. 여기서 IL7은 20개 아미노산 C-절단형 (HΔ20) 또는 15개 아미노산 C-절단형 (HΔ15)인, Hmut의 2개의 상이한 형태 상에서 표시되었다. 따라서, 2개 유형의 4^H/IL7^H-LV (4^{HΔ18}/IL7^{HΔ15}-LV 및 4^{HΔ18}/IL7^{HΔ20}-LV)를 제조하였고 휴지기 T 세포에 형질도입시켰다. 3일 이후에 세포를 CD3, CD8 및 CD4 항체로 염색하였다. CD4- 또는 CD8- 게이팅된 T 세포에서 GFP 발현을 도시한다.

[0434] 도 10: NiV 당단백질 위형화된 LV의 중화. CHO-EpCAM 또는 CHO-에프린-B2 세포를, 2시간 동안 37°C에서 풀링된 인간 혈청 (IVIG)의 연속 희석물과 인큐베이션시킨 후 0.4의 MOI로 NiVmutEpCAM-LV (원형), MVEpCAM-LV (사각형), NiVwt-LV (삼각형) 또는 VSVG-LV (다이아몬드형)로 형질도입시켰다. 72시간 이후에, GFP+ 세포를 유세포측정을 통해 결정하였고 미처리 대조군 대비 GFP+ 세포의 수를 도시한다 (n=3).

[0435] 도 11: 8^G/IL7^G-LV에 의한 CD8⁺ T 세포의 선택적 활성화. 신선하게 단리된 CD3⁺ T 세포는 미형질도입시킨 채로 두거나 (ut) 또는 CD8-scFv-Gmut (8^G-LV) 또는 CD8-scFv-Gmut/IL7-Gmut (8^G/IL7^G-LV)로 위형화시킨 LV의 상이한 유형으로 형질도입시켰다. 3일 이후에 세포를 CD3, CD8 및 CD71 항체로 염색시켰다. CD4- 또는 CD8- 게이팅된 T 세포에서 CD71 발현을 도시한다.

[0436] 도 12: 8^G/IL7^G-LV에 의한 휴지기 CD8⁺ T 세포의 효율적이고 선택적인 형질도입. 신선하게 단리된 CD3⁺ T 세포는 미형질도입된 채로 두거나 (ut) 또는 CD8-scFv-Gmut (8^G-LV) 또는 CD8-scFv-Gmut/IL7-Gmut (8^G/IL7^G-LV)로 위형화된 LV의 상이한 유형으로 형질도입시켰다. 3일 이후에 세포를 CD3, CD8 및 CD4 항체로 염색하였다. CD4- 또는 CD8- 게이팅된 T 세포에서 GFP 발현을 도시한다.

[0437] 도 13: 8^G/IL7^G-LV에 의한 휴지기 CD8⁺ T 세포로의 효율적인 CAR19 유전자 전달. 신선하게 단리된 CD3⁺ T 세포는 미형질도입된 채로 두거나 (ut) 또는 CD8-scFv-Gmut (8^G-LV), CD8-scFv-Gmut/IL7-Gmut (8^G/IL7^G-LV) 또는 VSVG (VSVG-LV)로 위형화시킨 LV의 상이한 유형으로 형질도입시켰다. CD19-특이적 CAR (CAR19)을 코딩하는 치료적 유전자는 LV를 통해서 전달하였다. 형질도입 이후 3일에 CAR19 발현을 항-cmyc 항체로 검출하였다. CD4⁺ 또는 CD8⁺ T 세포 중에서 CAR19 발현 세포의 백분율을 도시한다.

[0438] 도 14: 4^H/IL7^H-LV는 인간화된 마우스에서 CD4+ T 세포의 표적화된 생체내 활성화를 가능하게 한다.

[0439] NOD/SCID gc/- 마우스에게 제대혈 T 세포를 주사하였고 이식시 2개월 (20% T 세포 재구성)에, 100 마이크로리터의 4^H/IL7^H-LV (1E6 IU) 또는 4^H/IL7^H-LV를 IV로 주사하였다. 벡터의 주사 후 2주에, 마우스를 희생시켰고 비장세포를 CD71 + CD4+ T 세포 (활성화 마커)의 %에 대해 평가하였다.

[0440] 실시예

[0441] 재료 및 방법

[0442] 구성체의 생성

[0443] 절단형 및 돌연변이형 MV HcΔ18mut 단백질, 및 H 및 His-태그화된 DARPin Ac1 사이의 (G₄S)₃ 링커 (L3)를 코딩

하는 플라스미드 pH3-Ac1은 pQE30ss_Ac1_corr로부터 EpCAM 특이적 DARPin Ac1 (Stefan et al. 2011)의 PCR 증폭된 코딩 서열을 Sfi1/NotI를 통해서 플라스미드 pH3-HRS3opt2#2 (Friedel et al. 2015)의 골격에 삽입시켜 생성시켰다.

[0444] 니파 바이러스 G 단백질 변이체를 코딩하는 모든 플라스미드는 플라스미드 pCAGGS-NiV-codonop-Gn으로부터 유래되었다. Ac1 표적화 도메인에 대한 코딩 서열은 각 단편의 PCR 증폭에 의해서 G 단백질 리딩 프레임의 C-말단에 융합시켰고 결찰에 사용되는 공통 AgeI 제한효소 부위를 동시에 도입시켜 플라스미드 pCAGGS-NiV-G-DARPin-Ac1을 생성시켰다. 모든 다른 표적화 도메인은 AgeI/NotI를 통해서 교환시켰다. G 단백질 세포질 꼬리부의 절단은 G 단백질 리딩 프레임의 PCR 증폭에 의해서 도입시켰고 PCR 단편을 pCAGGS-NiV-G-DARPin-Ac1에 삽입시켜서 플라스미드 pCAGGS-NiV-Gc Δ33-DARPin-Ac1 및 pCAGGS-NiV-Gc Δ34-DARPin-Ac1을 생성시켰다. His-태그화된 G 및 Gc Δ34 단백질은 pCAGGS-NiV-codonop-Gn으로부터 PCR 증폭에 의해 생성시켰다. 단편은 PacI/NotI 제한효소를 통해서 pCAGGS-NiV-G-DARPin-Ac1의 플라스미드 골격으로 클로닝시켜서 각각 pCAGGS-NiV-G-His 및 pCAGGS-NiV-Gc Δ34-His를 생성시켰다. 천연 수용체 인식을 방해하는 돌연변이는 부위-지정 돌연변이유발법을 통해서 NiV-Gc Δ34-DARPin-Ac1 단백질 코딩 서열에 도입시켰다. 각각의 돌연변이는 돌연변이 부위에서 상동성 영역과 지정된 돌연변이를 보유하는 2개 단편의 증폭을 통해서 생성시켰다. 이를 단편은 측접된 프라이머 쌍을 통해서 융합시키고 증폭되었다. 최종 단편은 pCAGGS-NiV-Gc Δ34-DARPin-Ac1로 RsrII/AgeI를 통해서 클로닝되어, pCAGGS-NiV-Gc Δ34EpCAMmut가 생성되었다.

[0445] NiV-F 변이체의 생성을 위해서, Fc Δ22 및 Fc Δ25에 대한 코딩 서열을 pCAGGS-NiV-F로부터 증폭시켰고 PacI/SacI 제한효소를 통해서 pCAGGS-NiV-codonop-Gn의 플라스미드 골격으로 클로닝하여 플라스미드 pCAGGS-NiV-Fc Δ22 및 pCAGGS-NiV-Fc Δ25를 생성시켰다. 벡터 입자의 웨스턴 블로트 분석에 사용되는 AU1 태그화된 NiV-F 변이체는 pCAGGS-NiV-F로부터 NiV-F 변이체를 증폭시키고 AU1 태그를 N-말단에 동시에 첨가하여 생성시켰다. 최종 PCR 단편은 PacI/SacI 제한효소 분해를 통해서 pCAGGS-NiV-codonop-Gn의 골격에 클로닝되어, 플라스미드 pCAGGS-AU1-NiV-F, pCAGGS-AU1-NiV-Fc Δ22, 및 pCAGGS-AU1-NiV-Fc Δ25를 생성시켰다.

벡터 제조

[0447] 벡터 입자는 폴리에틸렌이민 (PEI)을 사용하여 HEK-293T 세포의 일시적 형질감염에 의해 생성되었다. 형질감염 이전 24시간에, 2.5×10^7 세포를 T175 플라스크에 과종하였다. 형질감염 당일에, 세포 배양 배지를 15% FCS 및 3 mM L-글루타민이 보충된 10 mL DMEM으로 교체하였다. DNA 믹스는 첨가제 없는 2.3 mL의 DMEM과 35 μg의 총 DNA를 혼합하여 제조하였다.

[0448] 예를 들어, G 대 F 비율의 최적화 이후에, Gc Δ34DARPin/scFv 변이체를 코딩하는 0.9 μg의 플라스미드를 F 변이체를 코딩하는 4.49 μg의 플라스미드와 혼합하였다. 14.4 μg의 HIV-1 패키징 플라스미드 pCMVΔR8.9 및 15.1 μg의 전달-LV 플라스미드를 사용하였다. 형질감염 시약 믹스는 첨가제가 없는 2.2 mL의 DMEM과 H20 중 140 μl의 18 mM PEI 용액을 혼합하여 제조하였다. 이 용액을 DNA 믹스와 혼합하였고, 와류시켰으며 20분 동안 실온에서 인큐베이션시키고 HEK-293T 세포를 첨가하여 총 10% FCS, 2 mM L-글루타민이 첨가된 DMEM을 생성시켰다. 24시간 이후에, 배지는 나머지 PEI/DNA 복합체를 제거하기 위해서 10% FCS, 2 mM L-글루타민이 보충된 DMEM으로 교환하였다. 형질감염 이후 2일에, 렌티바이러스 벡터를 함유하는 세포 상청액을 0.45 μm 필터를 통해 여과시켰다. 필요하면, 벡터 입자는 20% 수크로스 쿠션 상에서 24시간 동안 450 x g에서 원심 분리에 의해 정제하였다. 펠렛은 포스페이트-완충된 염수 (PBS)에 재현탁시켰다. 형질도입을 위해서, 8×10^3 의 CHO-EpCAM 및 SK-OV-3 세포 또는 2×10^4 Molt4.8 및 Raji 세포를 96웰 플레이트의 단일 웰에 과종하였고 다음날 형질도입시켰다. 필요한 경우에, 세포의 배지는 상이한 농도의 바필로마이신 A1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Dallas, USA)을 함유하는 배지로 교체하였고 벡터를 첨가하기 전에 세포를 37°C에서 30분 동안 프리-인큐베이션시켰다. 적정을 위해서, 벡터 입자의 적어도 4회 연속 희석물을 사용하였다. 72시간 이후에, 녹색 형광발광 단백질 (GFP)-양성 세포의 백분율을 유세포측정법으로 결정하였다. 형질도입 유닛/mL (t.u./mL)은 희석 배율 및 GFP-양성 세포수 사이에 선형 상관을 보이는 희석물을 선택하여 계산하였다 (형질도입된 세포의 수/벡터의 부피 (μl)/0.001).

[0449] 본 발명에 따른 위형화된 레트로바이러스-유사 입자 또는 레트로바이러스 벡터에 대한 개략적인 설명은 도 7 및 8에 도시하였다.

실시예 1: CD4+ T 세포의 선택적 활성화

[0451] $CD8^+$ 랩프구가 아닌 $CD4^+$ 를 활성화시키기 위해서, $4^H/IL7^H$ -VLP (SEQ ID NO: 2, 14 및 15의 서열의 단백질을 포함)를 생성시키도록 융합 단백질 (F)와 함께 MV H 단백질 상에서 활성화 도메인으로서 IL-7 및 표적화 리간드로서 CD4-특이적 DARPin을 표시하는 VLP를 생성시켰다. 입자를 생성시키기 위해서, 형질감염 프로토콜을 확립 시켰다. 간략하게, 0.45 μ g의 pCG-Hmut-CD4-DARPin (Zhou et al., J Immunol, 2015), 0.45 μ g의 pCG-H Δ 15-IL7 (Els Verhoeven가 제공), 4.7 μ g의 pCG-Fc Δ 30 (Funke et al., Molecular therapy, 2008), 14.4 μ g의 HIV-1 패키징 플라스미드 pCMV Δ R8.9 (Funke et al., Molecular therapy, 2008), 및 15.1 μ g의 pCG-1을 하나의 T175 플라스크 중 HEK293T 세포의 형질감염에 사용하였다. 수확 후, 벡터 입자를 초원심분리를 통해서 더욱 농축시켰다. $\sim 10^7$ tu/mL의 역가가 LV에 대해 수득되었고 ~ 1.5 ug p24/mL의 역가가 VLP에 대해 수득되었다.

[0452] $4^H/IL7^H$ -VLP의 기능은 신선하게 단리된 휴지기 T 세포 상에서 입증하였다. 간략하게, $CD3^+$ T 세포는 성인 말초 혈액으로부터 범 (Pan) T 세포 단리 키트 (Miltenyi Biotech)를 사용하여 음성 선별을 통해서 단리하였다. 후속하여, 세포는 임의의 자극 부재 하에서 $4^H/IL7^H$ -VLP와 인큐베이션시켰다. 3일 후에, CD71 활성화 마커에 대한 FACS 분석으로 확증한 바와 같이, 세포 배양물 중 $CD4^-$ T 세포가 아닌 $CD4^+$ T 세포가 활성화되었다 (도 3). IL-7을 표시하는 비표적화 입자는 $CD4^+$ T 세포 및 $CD4^-$ T 세포 둘 모두를 활성화시켰다. IL-7은 T 세포 생존 사이토카인으로서 알려져 있다. 그러므로, 모든 IL7-표시 VLP는 초대 T 세포의 사멸의 예방에서 재조합 인간 IL-7만큼 효과적이었고, 한편 배양물 중 위치된 대부분의 휴지기 T 세포는 통상의 IL7-결핍 VLP 입자의 존재 하에서 6일 이후에 사멸된 것이 입증되었다 (도 4).

[0453] T 세포 생존을 촉진하고 $CD4^+$ T 세포를 선택적으로 활성화시키는 능력은 또한 IL7-표시 CD4-표적화 LV ($4^H/IL7^H$ -LV)에 의해 획득되었다. 바이러스 입자는, pCG-1이 GFP를 코딩하는 전달 플라스미드에 의해 대체된 것을 제외하고는, 상기 기술된 대로 제조되었다. 또한, 시스템의 탄력성 및 입자의 기능이 Hmut의 다른 형태를 사용하여 증강될 수 있는지 여부를 시험하기 위해서, Hmut-IL7을 코딩하는 2종의 상이한 플라스미드를 벡터 제조에 사용하였다. pCG-H Δ 15-IL7은 Hmut-IL7의 15개 aa 세포질 절단형 ($4^H/IL7^H\Delta^{15}$ -LV 제조용)이고 pCG-H Δ 20-IL7은 Hmut-IL7의 20 aa 세포질 절단형 ($4^H/IL7^H\Delta^{20}$ -LV 제조용)이다. 특별한 지시없이, IL7-표시 VLP 및 LV는 pCG-H Δ 15-IL7로 제조하였다. $4^H/IL7^H$ -VLP에 의해서 획득된 것과 유사하게, 신선하게 단리된 인간 $CD3^+$ T 세포를 6일 동안 자극 부재 하에서 표시된 LV와 인큐베이션시켰을 때, $4^H/IL7^H$ -LV는 부모 4^H -LV 및 비표적화 Hnse-LV와 비교하여 T 세포 생존을 상당히 촉진시켰다 (도 5). 예상한 바와 같이, 생존 세포의 최고 백분율은 rhIL-7 처리된 양성 대조군에서 관찰되었고 최소 생존 세포는 VSV-LV 형질도입 또는 미형질도입 (ut) 군에서 관찰되었다 (도 5). 게다가, $4^H/IL7^H$ -LV는 혼합된 세포 배양물 중 이의 표적 세포 개체군을 선택적으로 자극하는데 있어서 $4^H/IL7^H$ -VLP 만큼 강력하였다. 도 6에 도시된 바와 같이, $4^H/IL7^H$ -LV는 활성화 마커 CD69 및 CD71 발현 $CD4^+$ 세포를 선택적으로 상향조절시켰지만 $CD4^-$ 세포는 그렇지 않았다. $CD4^+$ T 세포 자극에서 $4^H/IL7^H\Delta^{15}$ -LV 및 $4^H/IL7^H\Delta^{20}$ -LV 사이에 차이는 없었다. 그러므로, 기능성 IL7-표시 표적화 LV가 성공적으로 생성되었다.

실시예 2: 휴지기 T 세포로 종양-특이적 키메라 항원 수용체의 전달

[0455] IL7-표시 벡터가 휴지기 T 세포 활성화를 촉발시켰으므로, 이를 세포가 렌티바이러스 형질도입을 허용할 것으로 예상된다. 이것을 증명하기 위해서, GFP 이식유전자를 전달하는 2가지 형태의 $4^H/IL7^H$ -LV를 생성시켰다. 도 9에 도시된 바와 같이, $4^H/IL7^H\Delta^{15}$ -LV 및 $4^H/IL7^H\Delta^{20}$ -LV 둘 모두는 세포 혼합물에서 휴지기 $CD4^+$ T 세포를 효율적이고 선택적으로 형질도입시킬 수 있다.

[0456] 키메라 항원 수용체 (CAR)은 암 요법을 위한 강력한 도구이다. 지금까지, T 세포 서브셋은 CAR의 유전자 전달을 위해서 정제되어야 하고 활성화되어야만했다. 여기서, CAR가 휴지기 $CD4^+$ 세포에 선택적으로 전달될 수 있다는 것을 입증한다. 입자는 pCG-1이 CAR 코딩 전달 플라스미드로 대체된 것을 제외하고는 실시예 1에 기술된 대로 생성시켰다. 휴지기 T 세포가 ErbB2-특이적 키메라 항원 수용체 (ErbB2-CAR)를 전달하는 $4^H/IL7^H$ -LV로 형질도입되었을 때, ErbB2-CAR 발현은 오직 $CD4^+$ T 세포 개체군에서만 관찰되었다. IL7-결핍

CD4-표적화 LV (4^H -LV)와 비교하여, $4^H/IL7^H$ -LV는 $CD4^+$ T 세포에 대한 선택성을 유지하면서 CAR 유전자를 전달하는데 보다 효율적이었다 (도 1).

[0457] **실시예 3: MV 당단백질은 휴지기 인간 $CD8^+$ T 세포를 선택적으로 활성화시키고 형질도입시키도록 NiV의 것으로 치환될 수 있다**

VLP 또는 LV를 NiV 당단백질을 사용해 효율적으로 위형화시키기 위해서, NiV-G는 이의 세포질 꼬리부에서 34개 아미노산 만큼 절단시켰고 (GcΔ34) NiV-F는 이의 세포질 꼬리부에서 22개 아미노산 만큼 절단시켰다 (FΔ22).

다음으로, 에프린-B2/B3에 대한 GcΔ34의 천연 수용체 인식은 4개 점 돌연변이 (E501A, W504A, Q530A, E533A)를 GcΔ34에 도입시켜 파괴시켰다. 이렇게 조작된 G 단백질로 위형화된 LV는 천연 에프린-B2 및 에프린-B3 NiV 수용체와의 결합을 완전하게 상실하였고 (도 2) 이들 수용체를 발현하는 세포로 전입하지 않았다.

[0459] 계다가, NiV-위형화된 LV는 높은 생산 수율 및 정맥내 면역글로불린에 대한 내성과 같은 일부 매력적인 특성을 갖는다. NiV에 대한 백신접종이 없고 소수의 접단 발병은 말레이시아, 방글라데시 및 인도에서 소수 사례에 국한되므로 (SEARO | WHO 동남 아시아 지역), 인간에서 존재하는 중화 항체가 없어야 한다. 이것을 입증하기 위해서, 최대 범위의 인간 혈청 도너를 포괄하는 정맥내 면역글로불린 (IVIG; Inratect®)을 표적 세포의 형질도입 이전에 상승 농도의 NiVwt-LV, NiVm^{EpCAM}-LV, MV^{EpCAM}-LV 및 VSV-LV와 인큐베이션시켰다. 다음으로 GFP 발현은 형질도입 후 3일에 유세포측정을 통해 결정하였다. 예상한 바와 같이, VSVG-LV 및 NiVwt-LV에 의해 매개되는 형질도입은 IVIG의 처리에 의해서 영향받지 않았다. 다른 한편으로, MV^{EpCAM}-LV는 100 μ g/mL의 IVIG에 의한 완전한 중화로 형질도입 속도의 용량-의존적 감소를 보였다. 대조적으로, NiVm^{EpCAM}-LV는 사용된 모든 농도에서 IVIG에 대해 내성이었고 따라서 상응하는 MV-기반 백터에 비해서 인간 면역글로불린에 대해 적어도 10000배 덜 감수성이어야만 한다 (도 10). 이들 결과는 NiV 당단백질을 기반으로 하는 수용체-표적화 백터가 인간에게 주사될 때 중화되지 않을 것임을 보여준다.

[0460] 그러므로, NiV-G의 상기 특성에 기인하여, NiV-위형은 사이토카인-표시 $CD8^+$ -표적화 입자를 생성시키는데 더욱 사용되었다. 여기서 OKT8로부터 유래된 CD8 특이적 scFv는 엔벨로프 플라스미드 pCG-Gmut-CD8scFv를 생성시키도록 NiV-GΔ34mut4 상에 표시되었고 인간 IL7은 NiV-GΔ34mut4 상에 표시되어 엔벨로프 플라스미드 pCG-Gmut-IL7이 생성되었다. $8^G/IL7^G$ -LV를 제조하기 위해서, 0.45 μ g의 pCG-Gmut-CD8scFv, 0.45 μ g의 pCG-Gmut-IL7, 4.7 μ g의 pCG-FcΔ22, 14.4 μ g의 HIV-1 패키징 플라스미드 pCMVΔR8.9, 및 15.1 μ g의 전달-LV 플라스미드를 하나의 T175 플라스크 중 HEK293T 세포의 형질감염에 사용하였다. $\sim 10^7$ tu/mL의 역가가 LV에 대해 수득되었고 ~ 1.5 ug p24/mL의 역가가 VLP에 대해 수득되었다.

[0461] $4^H/IL7^H$ -LV에 의해 수득된 것과 유사하게, $8^G/IL7^G$ -LV (SEQ ID NO: 4, 6 및 16의 서열의 단백질을 포함)는 말초 혈액 혼합물 중 $CD8^+$ T 세포를 선택적으로 자극할 수 있었고 형질도입시킬 수 있었다. 도 11에 도시된 바와 같이, 신선하게 단리된 인간 $CD3^+$ T 세포를 3일 동안 $8^G/IL7^G$ -LV와 인큐베이션시켰을 때, 배양물 중 $CD8^+$ T 세포 서브셋은 CD71 발현을 상향조절시켰을 뿐만 아니라 또한 오직 이 세포 개체군만이 리포터 이식유전자 GFP (도 12) 또는 치료적 이식유전자 CAR19 (도 13)를 효율적으로 발현시켰다. 또한, 부모 IL7-결핍 CD8-표적화 LV (8^G -LV)와 비교하여, $8^G/IL7^G$ -LV는 $CD8^+$ T 세포의 형질도입에 대한 특이성을 약화시키지 않고 표적 세포를 활성화시키고 이식유전자를 전달하는데 보다 효율적이었다.

[0462] **실시예 4: CD8-표적화 NiV-G 대 IL7-표시 NiV-G의 최적 비율의 식별**

[0463] 표적외 효과를 최대로 감소시키면서, 더 많은 표적 세포를 명중시키고, 역가를 개선시키고 개별 세포 개체군의 선택적 활성화 및 형질도입을 위한 입자의 특이성을 증강시키기 위해서, 형질도입 프로토콜을 백터 제조에 대해 더욱 최적화시키고 패키징 세포에 유지된 NiV-G^{표적화 도메인} (또는 MV-H^{표적화 도메인}) 및 NiV-G^{기능성 도메인} (MV-H^{기능성 도메인}) 코딩 플라스미드의 양을 신중하게 결정하였다.

[0464] 실시예 3에 기술된 바와 같이, G^8/G^{IL7} -LV의 제조를 위해서, 4.7 μ g의 pCG-FcΔ22, 14.4 μ g의 HIV-1 패키징 플라스미드 pCMVΔR8.9, 및 15.1 μ g의 pSEW와 함께 총 0.9 μ g의 양의 pCG-Gmut 플라스미드를 하나의 T175 플라스크 중 HEK293T 세포의 형질도입에 사용하였다. 한편, pCG-Gmut-CD8scFv 및 pCG-Gmut-IL7 플라스미드는

20:1, 10:1, 5:1, 1:1, 또는 1:5의 상이한 비율로 혼합하였다. $8^G/IL7^G$ -LV를 함유하는 개별 세포 상청액을 CD8⁺ Molt 또는 A301 세포의 형질도입에 사용하였고, 형질도입 후 48시간에, GFP⁺ 세포의 백분율을 FACS로 측정하여 역가를 계산하였다. 또한, $8^G/IL7^G$ -LV를 신선하게 단리된 CD3⁺ T 세포의 형질도입에 사용하였고 이후에 CD8⁺ 및 CD8⁻ 세포에서 CD71 및 GFP 발현을 결정한다. 최고 비율은 표적 개체군에서 최고 역가, CD71 및 GFP의 최고 발현을 제공하고 비표적 개체군에서 최저 발현을 제공하는 것으로서 확인된다.

[0465]

실시예 5: IL7-표시 표적화된 VLP 및 LV에 의한 형질도입된 휴지기 T 세포의 특징규명

[0466]

T 세포 구획은 고도로 불균질성이고 T 세포 서브셋은 표현형적으로 그리고 기능적으로 구별된다. 암에 대한 T 세포 요법에 관한 한, 일반적으로 덜 분화된 세포가 생체내에서 보다 양호한 항종양 효과와 상관된다. 그러므로, 본 발명에 따른 백터 입자에 의해 활성화되거나 또는 변형되는 T 세포 서브셋을 동정하는 것이 중요하다. $8^G/IL7^G$ -LV-CAR을 예를 들어, 형질도입된 휴지기 T 세포의 표현형은 형질도입된 사전-자극된 T 세포 (CD3/CD28 자극의 가장 광범위하게 사용되는 프로토콜)와 비교하여 특징규명되어야 한다. 간략하게, 휴지기 또는 사전자극된 CD3⁺ T 세포의 형질도입 이후 3일에, CD11a, CD11b, CD25, CD27, CD28, CD45RA, CD45RO, CD62L, CD69, CD71, CD95, CD127 및 CCR7을 포함하는 다수 T 세포 마커의 발현이 모니터링된다. 이를 분자는 그들이 과거에 CD45RA⁺CD45RO⁻CD62L^{high}CD95⁻CD27^{high}CCR7^{high} 나이브 (T_N), CD45RA⁺CD45RO⁻CD62L^{high}CD95⁺CD27^{high}CCR7^{high} 줄기 세포 기억 (T_{SCM}), CD45RA⁻CD45RO^{high}CD62L⁺CD95⁺CD27⁺ 중심 기억 (T_{CM}), CD45RA^{+/+}CD45RO^{high}CD62L⁻CD95⁺CD27^{-/+}CCR7⁻ 이펙터 기억 (T_{EM}), 및 CD45RA^{-/+}CD45RO⁺CD62L⁻CD95^{high}CD27⁻CD28⁻CCR7⁻ 이펙터 (T_E) T 세포를 분화시키기 위해 사용되었기 때문에 선택된다. CAR⁺ T 세포의 표현형은 유세포측정법으로 분석된다.

[0467]

또한, 사전 분류된 CD4⁺ T 세포 서브셋 (T_{SCM} , T_{CM} , T_{EM} , 및 T_E)은 예를 들어 통상의 TCR 자극보다 T 세포 활성화에 대한 본 발명의 장점을 입증하기 위해서 $4^H/IL7^H$ -VLP와 인큐베이션된다. 간략하게, $4^H/IL7^H$ -VLP와의 인큐베이션 또는 CD3/28 항체에 의한 자극 이후 3일에, 상기 표시된 T 세포 서브셋은 표현형 왜곡 및 활성화 수준에 대해 분석된다. IL7-표시 T 세포 표적화 백터 입자는 덜 분화된 T 세포를 활성화시키고 형질도입시킬 것으로 예상된다.

[0468]

실시예 6: 생체외 생성된 CART 세포의 기능을 강화하고 CART 세포 생성 절차를 단순화시킨다

[0469]

양자 T 세포 면역요법은 다양한 질환 유형의 치료를 위해 클리닉에서 효과적인 용법인 것으로 입증되었다. 그러나, 이의 광범위한 적용은 몇몇 쟁점들에 의해 제한되었다. 한편으로, CAR1-조작되거나 또는 TCR-조작된 T 세포의 생산은 시험관내 자극, 장기간 확장, 및 세포 단리 및 정제로 인해 매우 값비싸고 노동집약적이다. 다른 한편으로, 시험관내에서 확장시킨 이펙터 T 세포는 종종 생체내에서 불충분하게 지속되고, 지속적인 항종양 효과를 나타내는데 실패하였다. 본 발명은 단일 단계로 세포 자극 및 유전자 전달을 조합하고 휴지기 T 세포 형질도입을 가능하게 하여 이를 도전에 대한 잠재적인 해결법을 제공한다. 본 발명을 사용하여, T 세포 제조 과정이 상당히 단순화될 수 있고 그리하여 T 세포 제조 비용을 절감할 수 있다.

게다가, 통상적으로 제조되는 세포와 비교하여, 본 발명으로 제조된 CAR/TCR-조작된 T 세포는 실시예 5에서 입증된 바와 같이 덜 분화된 세포를 효율적으로 조작하는 잠재력으로 인해, 생체내에서 보다 강력할 수 있다.

[0470]

이들 특성을 입증하기 위해서, 신선하게 단리된 인간 PBMC 또는 CD8⁺ T 세포를 예를 들어 $8^G/IL7^G$ -LV-CAR 또는 VSV-LV-CAR을 대조군으로서 형질도입시킨다. 한편, 통상의 CAR T 세포는 가장 광범위하게 사용되는 프로토콜에 따라서 동시에 제조된다. 간략하게, 동일한 도너로부터 단리된 인간 PBMC 또는 CD8⁺ T 세포는 CD3/CD28 항체 및 IL2로 모의실험된다. 다음으로 세포를 $8^G/IL7^G$ -LV-CAR 또는 VSV-LV-CAR가 형질도입된 후 IL2의 존재 하에서 10일 동안 확장시킨다. 휴지기 T 세포의 백터 형질도입 후 2 내지 3일 또는 자극된 T 세포의 형질도입 후 12일에, 이를 세포를 표적 종양 세포와 시험관내에서 공동 배양하거나 또는 종양 보유 인간화 마우스에 주입시킨다. 이후에, 시험관내 종양 세포 용해 및 생체내 종양 차도, 동물 생존, 종양-반응성 T 세포 지속성 및 증식성을 평가한다.

[0471] 실시예 7: 생체내 유사 조건 하에 IL7-표시 표적화 입자에 의한 선택적 활성화 및 형질도입

다음 단계에서, 생체내 상황에서 별개 세포를 표적화하고 기능적으로 변형시키기 위해 바이러스 입자를 사용하는 것의 실현가능성을 조사한다. 따라서, 바이러스 입자로 신선한 인간 말초 혈액의 형질도입을 예를 들어 G^8/G^{IL7} -LV를 사용해 수행한다. 이것은 생체내에서 바이러스 입자가 마주하게 되는 장애물인, 활성 인간 보체 시스템의 존재 하에 $CD8^+$ T 세포 개체군에서 표적화 활성화 및 유전자 전달의 평가를 가능하게 한다.

간략하게, 신선한 말초 혈액을 $8^G/IL7^G$ -LV-GFP 또는 다른 대조군 벡터 (VSV-LV, $8^H/IL7^H$ -LV, 8^G -LV, 또는 VSV/ $IL7^G$ -LV)와 6시간 내지 8시간 동안 인큐베이션시킨다. 이후에, 전체 PBMC를 혈액으로부터 단리하고 임의의 자극성 시약 첨가가 없는 T 세포 배양 배지에서 더욱 배양한다. 3 내지 4일 이후에, 배양물 중 $CD8^+$ 및 $CD8^-$ 세포를 CD71 및 GFP 발현에 대해 평가한다. 안정한 유전자 전달을 확증하기 위해서, 세포의 작은 분획을 CD3/CD28 항체 및 IL2가 보충된 배양 배지로 추가 3일 동안 전달하고 이후에 GFP^+ 세포의 백분율을 분석한다.

[0474] 실시예 8: IL7-표시 표적화 입자는 인간화 마우스 모델에서 휴지기 T 세포를 선택적으로 활성화시키고 형질도입 시킨다

본 발명에 따른 입자가 세포 유형 특이적 활성화 또는 변형이 가능하도록 생체내에서 국소적으로 또는 전신으로 적용될 수 있다는 것을 입증하기 위해서, 그들을 건강한 도너 유래의 인간 $CD34^+$ 조혈 줄기 세포 (HSC)가 이식된 마우스에 적용한다. 이러한 마우스 모델에서, 다계통 인간 조혈 세포를 생성시킬 수 있고 이를 세포는 마우스 숙주에 의해 내성이다.

여기서, 인간 $CD8^+$ T 세포 활성화 및 변형에 대한 G^8/G^{IL7} -위형화된 입자의 적용을 예를 든다. 간략하게, 인간 면역 시스템이 대략 10%의 인간 $CD3^+$ T 세포를 검출함으로써 성공적으로 확립되었음을 확증한 후, G^8/G^{IL7} -위형화된 입자를 정맥내 주사 (iv)를 통해서 전신으로 또는 비장내 또는 흉선내 주사를 통해 국소적으로 적용한다. G^8/G^{IL7} -VLP를 주사하여 생체내에서 인간 $CD8^+$ T 세포의 선택적 활성화의 실현가능성을 평가한다.

이러한 실험 상황에서, 활성화 수준/지속기간 및 $CD8^+$ T 세포 증식은 VLP 주사 이후 상이한 시점에 분석된다. G^8/G^{IL7} -LV-GFP는 생체내 유전자 전달의 기능을 평가하기 위해 주사된다. 이러한 실험 상황에서, GFP 발현, 형질도입된 세포의 표현형, 및 그들 증식성 및 지속성은 LV 주사 이후에 상이한 시점에서 분석된다. G^8/G^{IL7} -LV-CAR은 CAR T 세포의 생체내 생성 및 치료적 유전자 전달의 실현가능성을 평가하기 위해 주사된다. 이러한 실험 상황에서, CAR 발현, 형질도입된 세포의 표현형, 표적 종양 세포/항원의 존재/부재 하에서 형질도입된 세포의 증식성 및 지속성, 국소/전신 종양의 제거는 LV 주사 이후에 상이한 시점에 분석된다.

[0477] 실시예 9: 레서스 마카크 (Rhesus Macaque) $CD4^+$ T 세포의 선택적 활성화

인간 이외 영장류 (NHP)의 T 세포는 인간 T 세포와 표현형적으로 유사하여, 인간 면역성 및 면역요법을 위한 최고의 동물 모델이 된다. T 세포 요법에 관한 한, NHP 모델은 잠재적인 약제의 효과, 투약량, 적용 경로, 및 안전성을 예측하는데 보다 신뢰할만하다. 그러므로, NHP의 개별 세포 유형의 기능적 변화를 특이적으로 변형시키거나 또는 유도하기 위한 도구가 매우 바람직하다.

여기서, $4^H/IL7^H$ -SIV 벡터 및 레서스 마카크에 대한 이의 적용을 예로서 상세하게 기술한다. 먼저, 레서스 마카크 $CD4$ -특이적 DARPin57.2 ($CD4^{D57.2}$)는 Hmut 단백질 ($H-CD4^{D57.2}$) 상에 표시되는 표적화 도메인으로서 사용되고 레서스 마카크 반응성 IL7은 Hmut ($H-rmIL7$) 상에 표시되는 기능성 도메인으로서 사용된다. 다음으로, 예를 들어 실시예 4에서 결정된 비율을 갖는 상기 2종의 H 단백질을, 원숭이 면역결핍 바이러스 mac 251 (SIVmac251)-유도된 LV를 위형화시키는데 사용한다. $CD4^+$ 원숭이 세포의 형질도입 및 P27 ELISA/Nano-sight에 의한 벡터 수율 및 역가를 결정한 후, 신선하게 단리된 원숭이 $CD3^+$ T 세포는 GFP 또는 CAR을 전달하는 $4^H/IL7^H$ -SIV로 형질도입시킨다. 다음으로, $CD4^+$ 대 $CD4^-$ T 세포에서 활성화 마커 및 이식유전자 발현을 상기에 기술된 바와 같이 결정하였다. 다음으로, 생체내 적용 확률을 NHP 모델에서 평가한다. 이러한 목적

을 위해서, 백터의 단일 용량을 각각의 참여 동물 (예를 들어, 레서스 마카크)의 양쪽 겨드랑이 림프절에 서서히 주사한다. 주사 후 1주에, 혈액 샘플을 채혈하고 주사된 양쪽 림프절 중 하나를 외과적으로 제거하고 단일 세포 혼탁물로 해리시킨다. 상세한 분석을 수행하여 생체내 형질도입된 T 세포의 표현형, 특이적 활성화, 이식유전자 발현 수준 및/또는 기능 (치료적 이식유전자 전달의 경우)을 분석한다. 게다가, 두번째 림프절에 제2 용량의 동일 백터가 투여되며 참여 동물은 생체내 형질도입된 T 세포의 증식성, 지속성 및/또는 기능 (치료적 이식유전자 전달의 경우)을 평가하기 위해 6개월 동안 모니터링된다.

[0480] 실시예 10: 면역적격성 마우스 모델에서 항원-특이적 T 세포를 선택적으로 활성화하고 확장시킨다

전신 독성을 피하면서 질환 부위에서 작용하는 사이토카인을 표적화하는 잠재성은 면역적격성 마우스 흑색종 종양 모델에서 충분히 평가할 수 있다. IL12 표시 마우스 CD8-표적화 VLP ($m8^G/mIL12^G$ -VLP)가 예로서 선택된다. 이전 실험들은 IL12 적용이 전달된 종양-반응성 T 세포 내성 및 항종양 효능을 증강시킬 수 있지만, 전신에 매우 유독하다는 것을 보여주었다. 이러한 단점을 극복하기 위해서, 본 실험에서, $m8^G/mIL12^G$ -VLP를 사용하여 종양 부위에서 발생되는 IL12의 기능을 제어한다. 야생형 C57/B16 마우스에 B16/OVA 흑색종 세포를 이식시키고, 종양의 확립 이후에, 마우스는 방사선으로 처리하고 C57/B16 OT-I 유전자이식 마우스로부터 단리된 T 세포를 전달받는다. OT-I T 세포 이식 후, 마우스를 $m8^G/mIL12^G$ -VLP, 또는 마우스 IL12, 또는 대조군으로서 PBS를 i.v. 주사하여 처리한다. 종양 부피, OT-I T 세포의 생체내 지속성 및 기능, 및 마우스 생존을 분석한다.

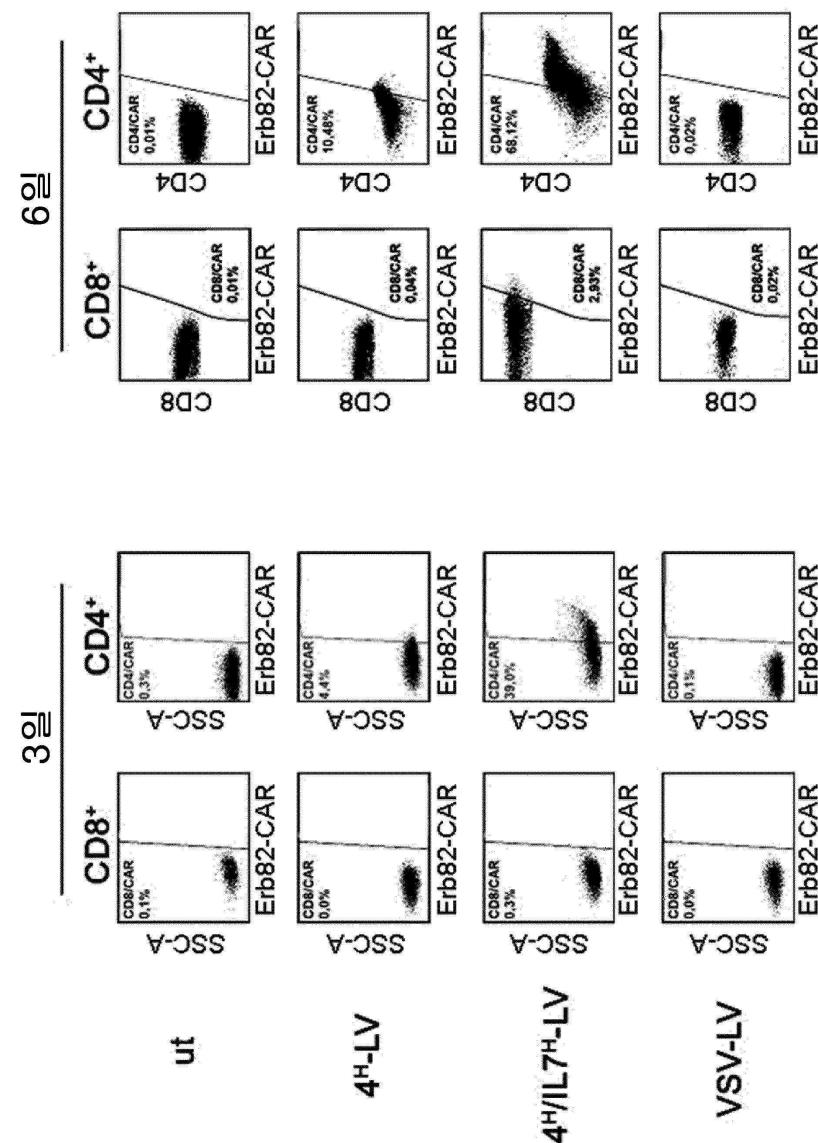
[0482] 실시예 11: 인간 CD4+ T 세포의 생체내 표적화된 활성화.

인간 CD4⁺ T 세포를 활성화시키기 위한 MV-4^H/IL7^H-LV의 생체내 효율을 평가하기 위해서, NOD/SCID gc-/- (NSG) 마우스에 CD3⁺ 제대혈 T 세포를 이식시켰다. 인간 T 세포 재구성은 혈액에서 1주마다 결정하였다. hT 세포의 20%가 검출되었을 때 (% hCD3⁺ 세포/전체 hCD45⁺+mCD45⁺ 세포), 마우스에 1E6 IU MV-4^H/IL7^H-LV 또는 MV-4^H-LV를 IV로 주사하였다. 백터의 주사 후 2주에, 마우스를 희생시켰고 비장세포 및 말초 혈액 단핵 세포를 단리하였다. 주목할만하게, MV-4^H-LV (8% CD4+ CD71+ 세포)와 비교하여 MV-4^H/IL7^H-LV (25% CD4+ CD71+ 세포)의 경우에서 인간 CD4+ T 세포의 CD71 후기 활성화 마커에 의해 밝혀진 보다 강력한 특이적 IL-7 활성화가 확인되었다 (도 14). 게다가, CD8+ T 세포를 나타내는 CD4- T 세포는 양쪽 표적화 백터에 대해서 CD71의 동일한 발현을 보인다. 후자는 IL-7 생존 신호전달이 표적화 CD4+ T 세포만을 활성화시켰고 CD8+ 세포는 그렇지 않았다는 것을 강조한다.

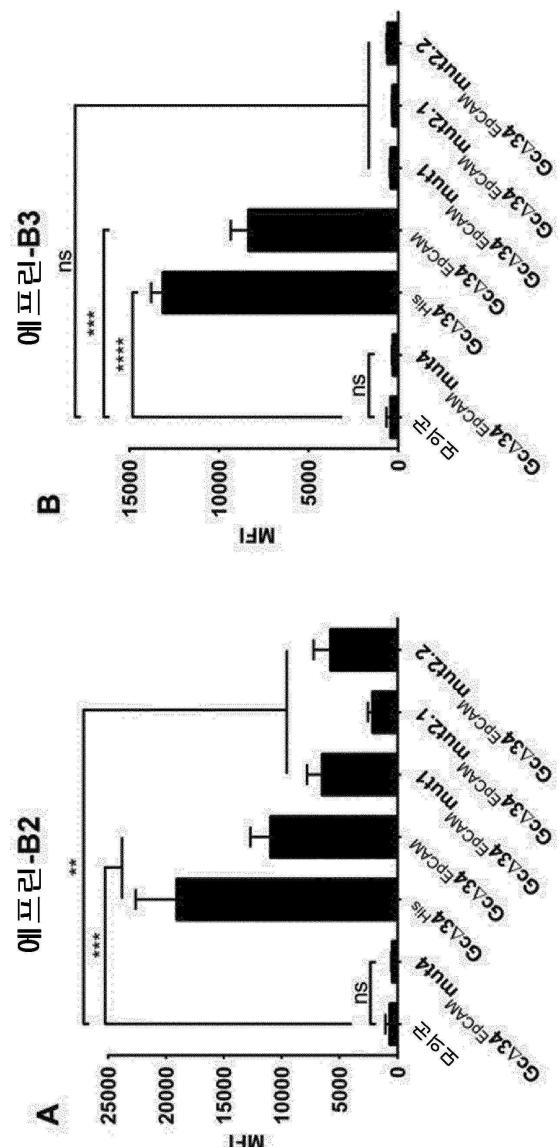
[0484] 결론적으로, MV-4^H/IL7^H-LV에 의해 획득된 표적 세포의 시험관내 특이적 활성화 다음으로, MV-4^H/IL7^H-LV에 의한 CD4+ T 세포의 특이적 활성화가 인간 혈액계 마우스 모델에서 생체내 확증되었다.

도면

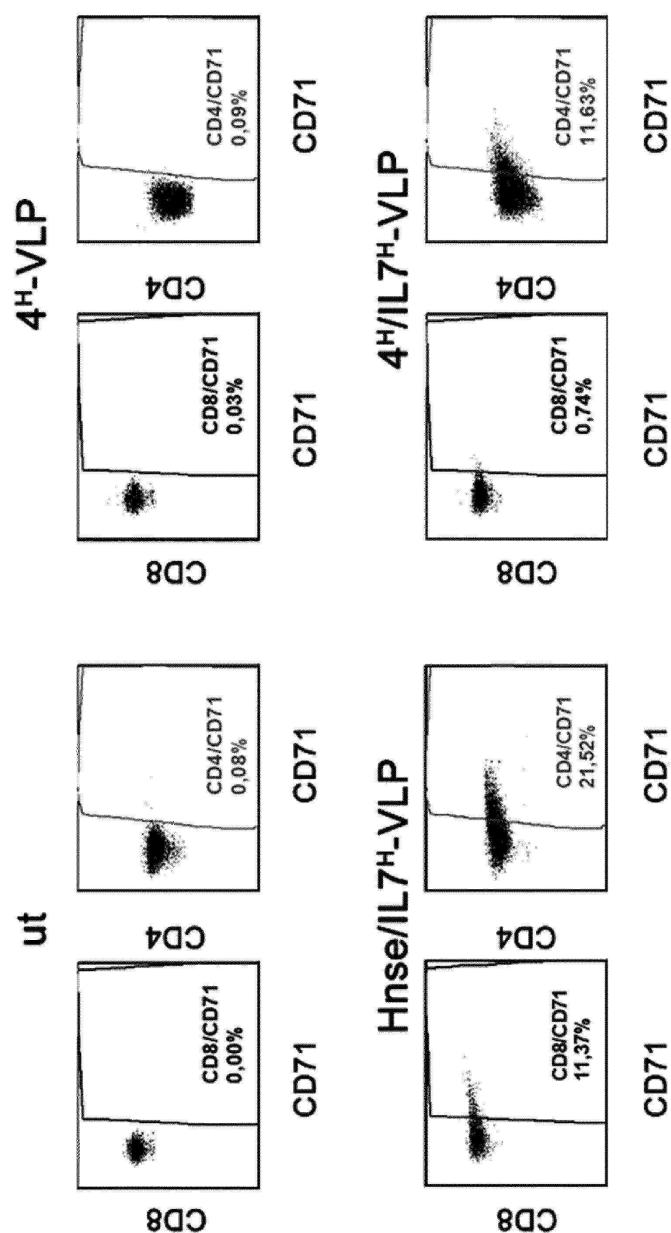
도면 1



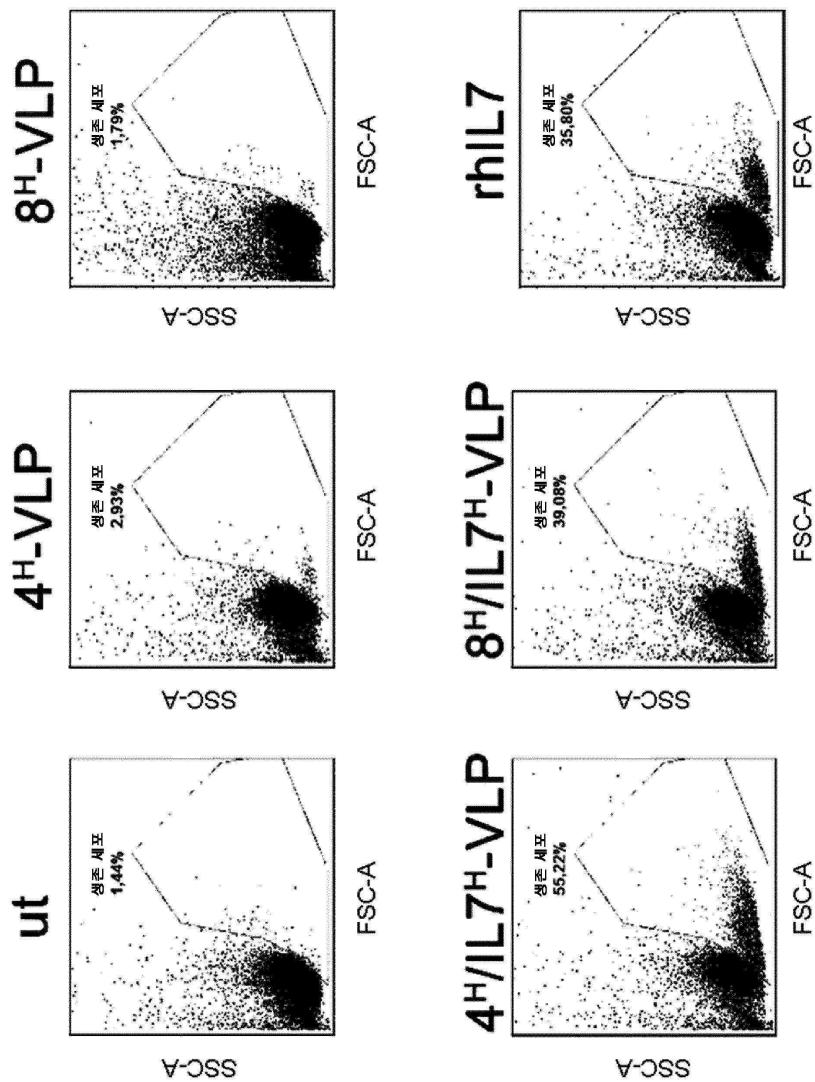
도면2



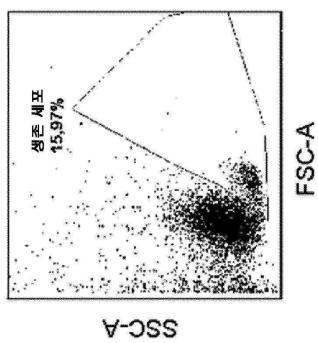
도면3



도면4

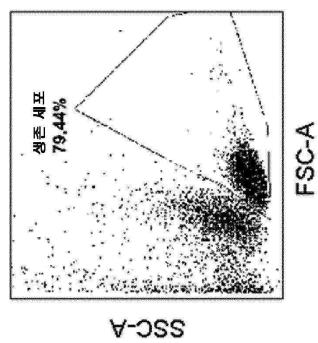


도면5

Hnse-LV

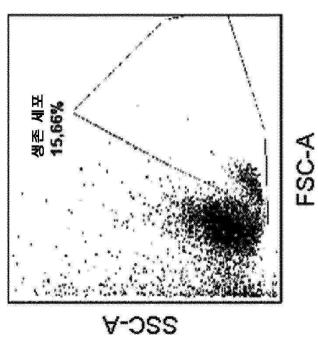
FSC-A

SSC-A

rhIL7

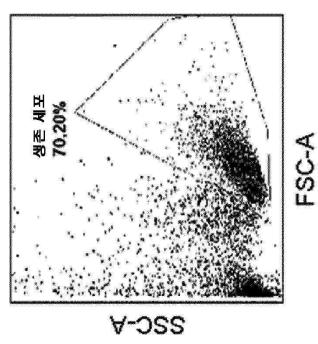
FSC-A

SSC-A

VSV-LV

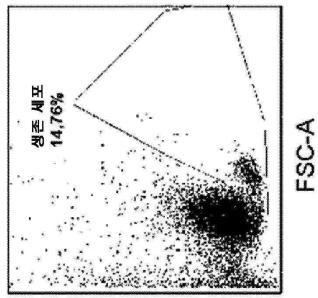
FSC-A

SSC-A

4^H/IL7^H-LV

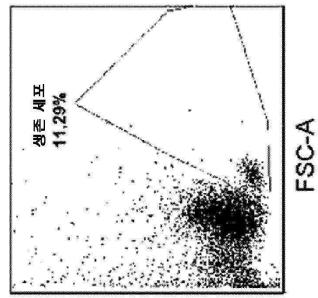
FSC-A

SSC-A

ut

FSC-A

SSC-A

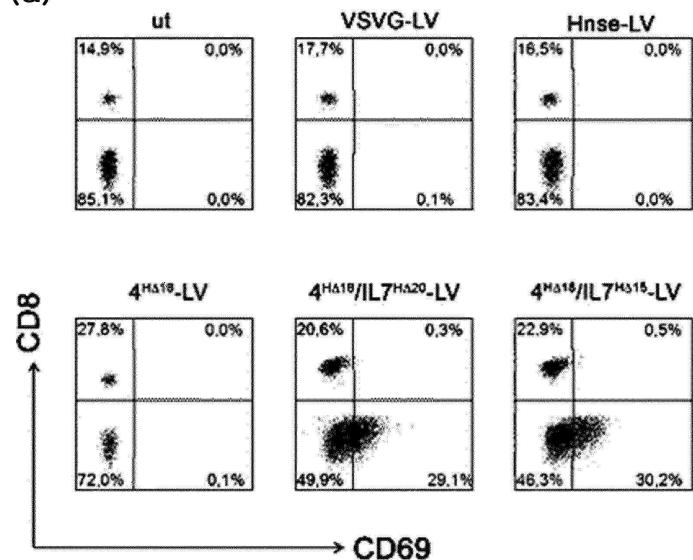
4^H-LV

FSC-A

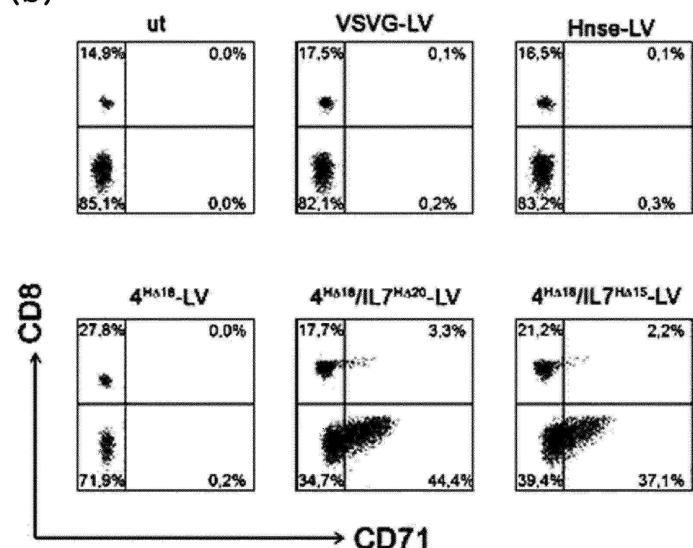
SSC-A

도면6

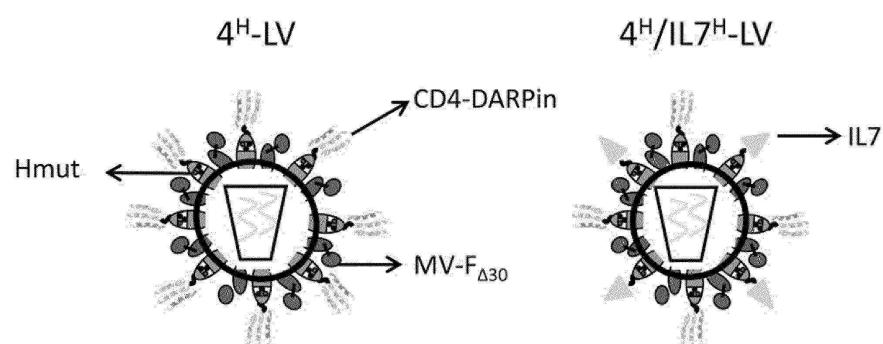
(a)



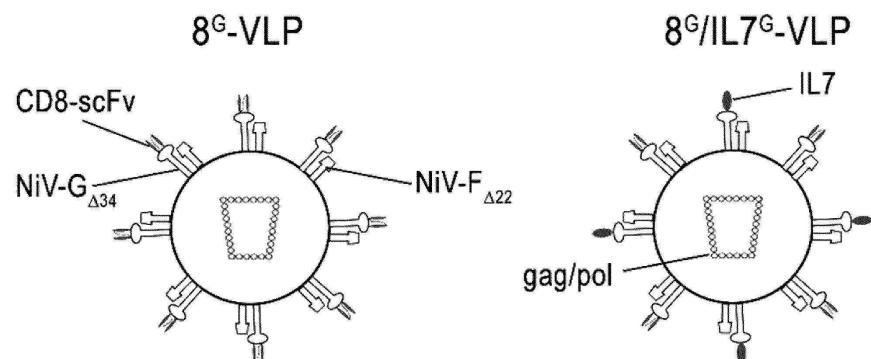
(b)



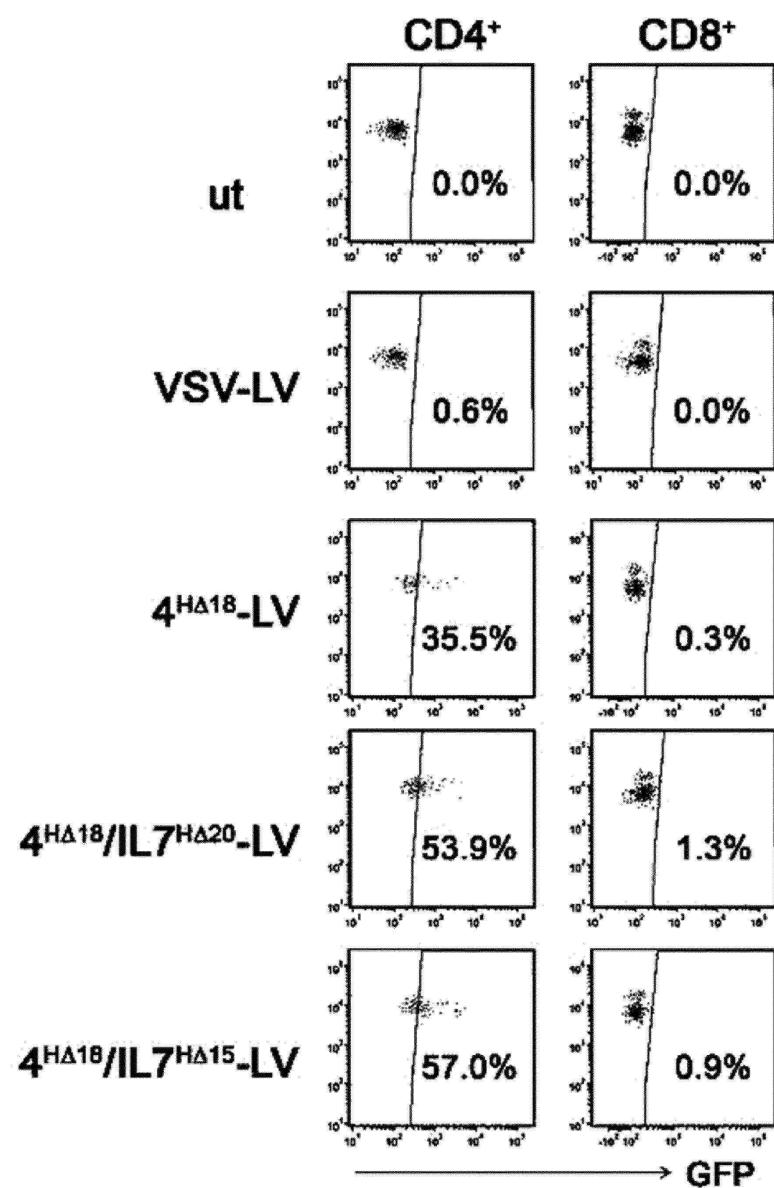
도면7



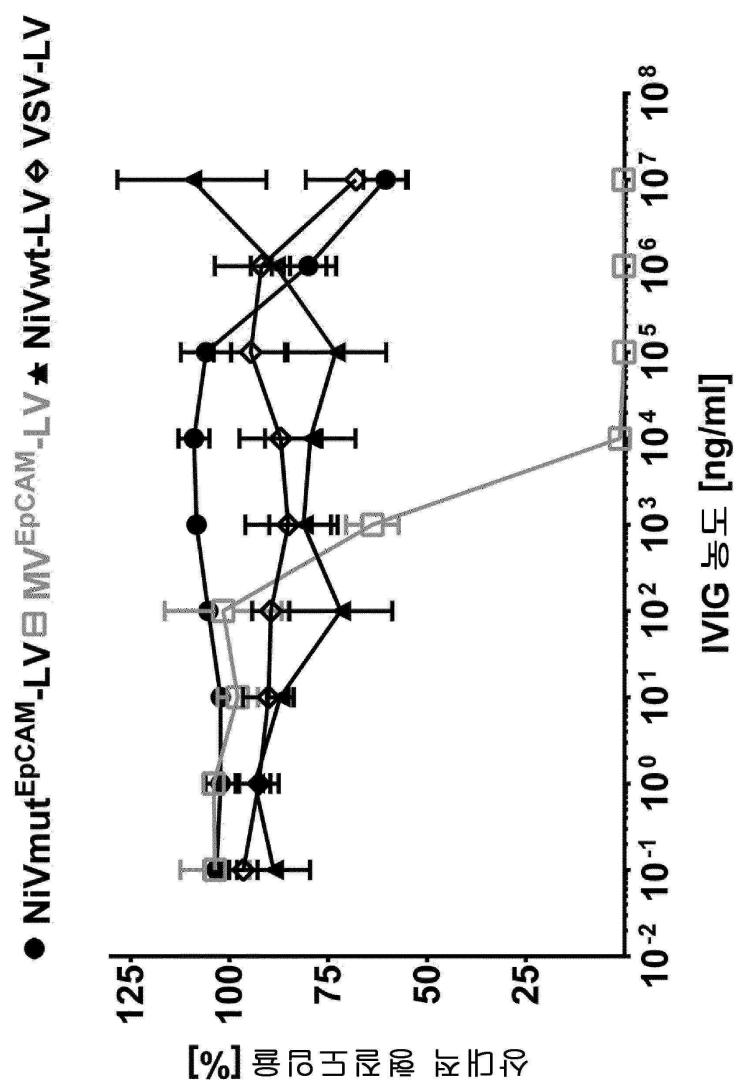
도면8



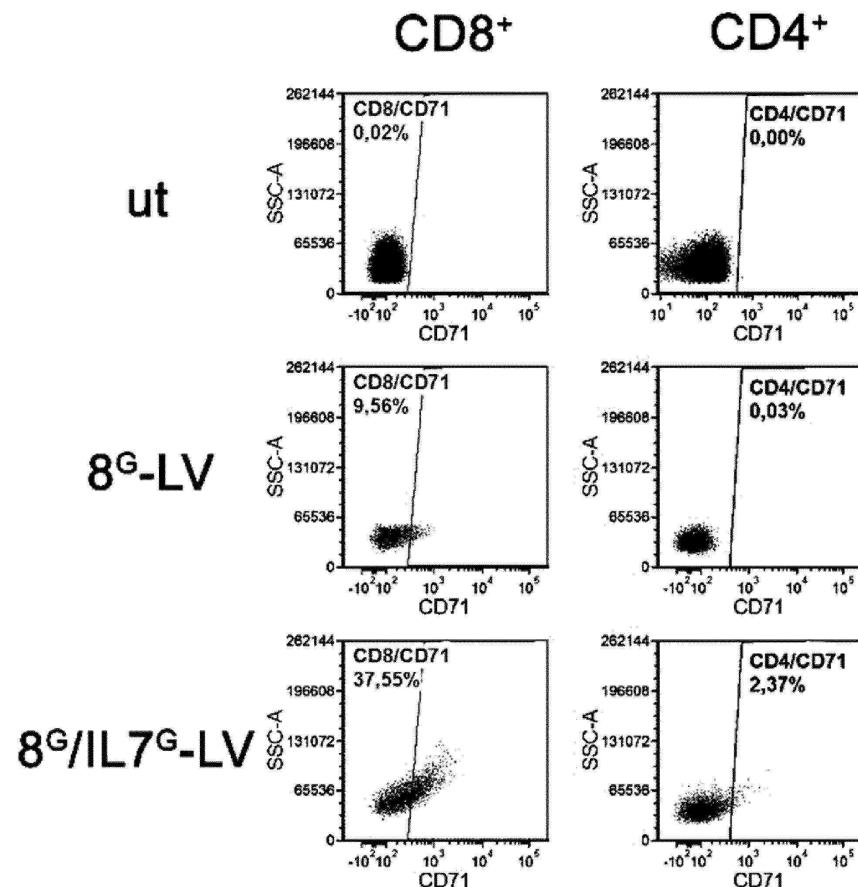
도면9



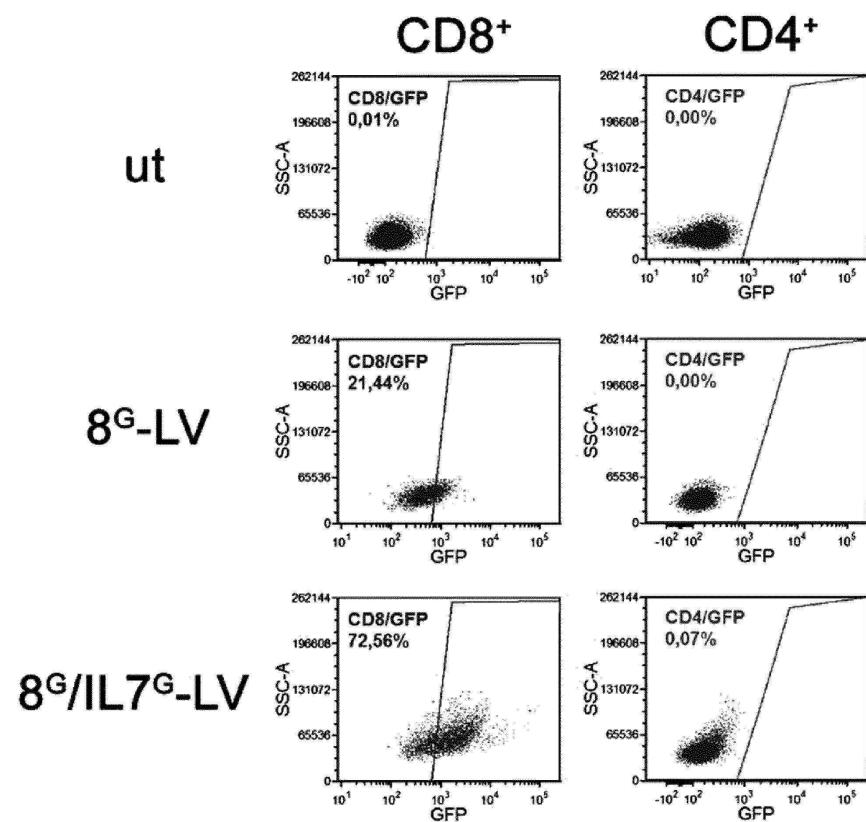
도면 10



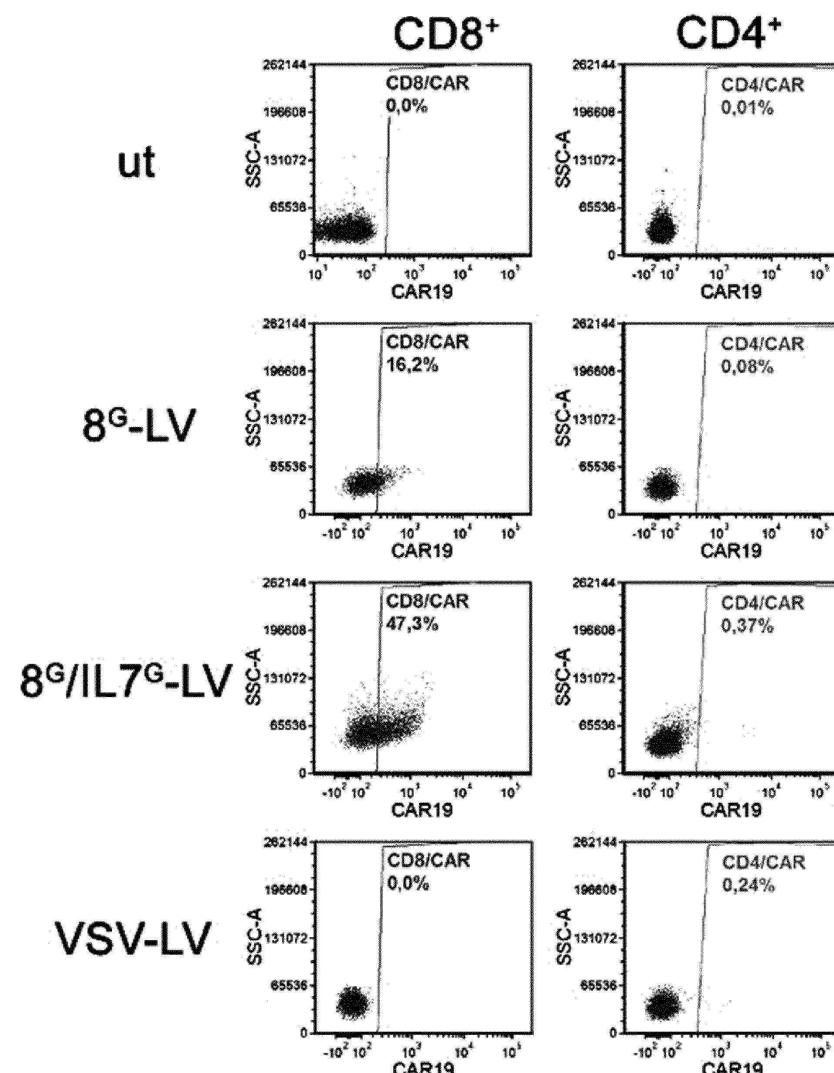
도면11



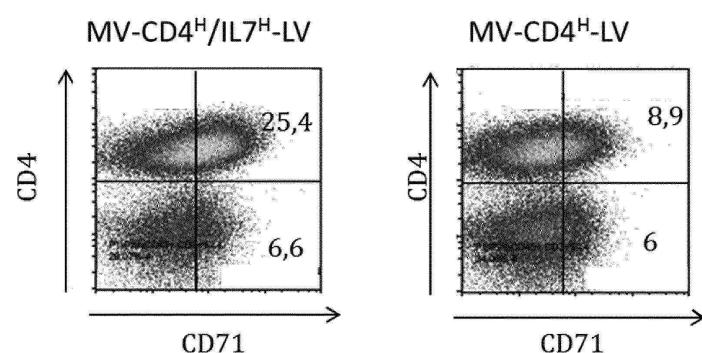
도면12



도면13



도면14



서 열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> ECOLE NORMALE SUPERIEURE DE LYON (ENS LYON)

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)

Université Claude Bernard Lyon 1 (UCBL)

INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE
(INSERM)

<120> METHODS FOR SELECTIVELY MODULATING THE ACTIVITY OF DISTINCT
SUBTYPES OF CELLS

<130> BET 17L1339

<150> EP16305468.7

<151> 2016-04-21

<160> 16

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 2217

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Truncated and mutated (Y481A, R533A, S548L, F549S) MV H protein

(HcDelta18) fused to Designed Ankyrin Repeat Protein

(DARPin)-29.2 specific for human CD4

<220><221> CDS

<222> (1)..(2217)

<400> 1

atgggaagta ggatagtcat taacagagaa catcttatga ttgatagacc ttatgtttg	60
ctggctgttc tgggtgtcat gtttctgagc ttgatcggt tgctagccat tgcaggaaatt	120
cgacttcatc gggcagccat ctacaccgca gagatccata aaagcctcag caccaatcta	180
gatgttaacta actcaatcga gcatcaggc aaggacgtgc tgacaccact cttcaaaatc	240

atcgggtgatg aagtgggcct gaggacacct cagagattca ctgacccatgt gaaatttcatc	300
tctgacaaga ttaaatttcct taatccggat agggagtagc acttcagaga tctcacttgg	360
tgtatcaacc cggccagagag aatcaaattt gattatgtatc aatactgtgc agatgtggct	420
gctgaagagc tcatgaatgc attggtaac tcaactctac tggagaccag aacaaccaat	480
cagttccctag ctgtctcaaa gggaaactgc tcagggccca ctacaatcag aggtcaattc	540
tcaaaacatgt cgctgtccct gtttagacttg tatttaggc gaggttacaa tgtgtcatct	600
atagtcacta tgacatccca gggaaatgtat gggggaaacctt acctagtggaa aagcctaat	660

ctgagcagca aaaggtcaga gttgtcacaa ctgagcatgt accgagtggt tgaagtaggt	720
---	-----

gttatcagaa atccgggtt ggggctccg gtgtccata tgacaaacta tctttagcaa	780				
ccagtcgta atgatctcg caactgtatg gtggcttgg gggagctcaa actcgccagcc	840				
ctttgtcag gggaaaggattc tatcacaatt ccctatcagg gatcaggaa aggtgtcagc	900				
ttccagtcg tcaagctagg tgtctggaa tcccaaccg acatgaatc ctgggtcccc	960				
ttatcaacgg atgatccagt gatagacagg ctttacctct catctcacag aggtgttac	1020				
gctgacaacc aagcaaaatg ggctgtcccg acaacacgaa cagatgacaa gttgcgaatg	1080				
gagacatgct tccaacaggc gtgttaagggt aaaatccaag cactctgcga gaatcccgag	1140				
tggcaccat tgaaggataa caggattct tcatacgggg tcttgcgt tgatctgagt	1200				
ctgacagttg agcttaaat caaaatttgt tcgggattcg gccatgtat cacacacggt	1260				
tcagggatgg acctatacaa atccaaccac aacaatgtgt attggctgac tatccgcca	1320				
atgaagaacc tagccttagg tgaatcaac acattggagt ggataccgag attcaagggt	1380				
agtccgcac tttcactgt cccattaag gaagcaggcg gagactgcca tgcccaaca	1440				
tac tacctg cgaggtgga tggatgtc aaactcagtt ccaatctggatttctac	1500				
ggtaaagatc tccaatatgt ttggcaacc tacgataactt ccgcgggtga acatgcgtg	1560				
gtttattacg ttacagccc aagccgccta tcgttact ttatcctt tagttgcct	1620				
ataaaggggg tccccatcga attacaagtg gaatgttca catggacca aaaactctgg	1680				
tgcgtcact tctgtgtct tcggactca gaatctggg gacatatcac tcactctgg	1740				
atggtggca tggagtcag ctgcacagtc acccggaag atggaccaa tgcggccag	1800				
ccggccgacc tggtaagaa actgctggaa gctgctcg tggatcgaa cgacgaagtt	1860				
cgtatctga tggtaacgg tgctgacgtt aacgctactg acactctgg tcgtactccg	1920				
ctacacctgg ctgctcagaa tggtaacctg gaaatcggt aagttctgt gaagcacagt	1980				
gctgacgtta acgttattga agaggttggt atgactccgc tgcacctggc tggatgtct	2040				
ggtaacactgg aaatcggtga agttctgtcg aagaacgggt cttacgttacaa cgctcaggac	2100				
aaatcggtta agaccgctt cgcacatctcc atcgactacg gtaacgagga cctggctgaa	2160				
atcctgcaaa	agcttaatgc	ggccgcaaga	ggttctcatc	accatcacca	tcactaa

<

210> 2

<211> 738

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 2

Met Gly Ser Arg Ile Val Ile Asn Arg Glu His Leu Met Ile Asp Arg

1 5 10 15

Pro Tyr Val Leu Leu Ala Val Leu Phe Val Met Phe Leu Ser Leu Ile

20 25 30

Gly Leu Leu Ala Ile Ala Gly Ile Arg Leu His Arg Ala Ala Ile Tyr

35 40 45

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

50 55 60

Ser Ile Glu His Gln Val Lys Asp Val Leu Thr Pro Leu Phe Lys Ile

65 70 75 80

Ile Gly Asp Glu Val Gly Leu Arg Thr Pro Gln Arg Phe Thr Asp Leu

85 90 95

Val Lys Phe Ile Ser Asp Lys Ile Lys Phe Leu Asn Pro Asp Arg Glu

100 105 110

Tyr Asp Phe Arg Asp Leu Thr Trp Cys Ile Asn Pro Pro Glu Arg Ile

115 120 125

Lys Leu Asp Tyr Asp Gln Tyr Cys Ala Asp Val Ala Ala Glu Glu Leu

130 135 140

Met Asn Ala Leu Val Asn Ser Thr Leu Leu Glu Thr Arg Thr Thr Asn

145 150 155 160

Gln Phe Leu Ala Val Ser Lys Gly Asn Cys Ser Gly Pro Thr Thr Ile

165 170 175

Arg Gly Gln Phe Ser Asn Met Ser Leu Ser Leu Leu Asp Leu Tyr Leu

180 185 190

Gly Arg Gly Tyr Asn Val Ser Ser Ile Val Thr Met Thr Ser Gln Gly

195 200 205

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

210 215 220

Arg Ser Glu Leu Ser Gln Leu Ser Met Tyr Arg Val Phe Glu Val Gly

225 230 235 240

Val Ile Arg Asn Pro Gly Leu Gly Ala Pro Val Phe His Met Thr Asn

245 250 255

Tyr Leu Glu Gln Pro Val Ser Asn Asp Leu Ser Asn Cys Met Val Ala

260 265 270

Leu Gly Glu Leu Lys Leu Ala Ala Leu Cys His Gly Glu Asp Ser Ile

275 280 285

Thr Ile Pro Tyr Gln Gly Ser Gly Lys Val Ser Phe Gln Leu Val

290 295 300

Lys Leu Gly Val Trp Lys Ser Pro Thr Asp Met Gln Ser Trp Val Pro

305 310 315 320

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

325 330 335

Arg Gly Val Ile Ala Asp Asn Gln Ala Lys Trp Ala Val Pro Thr Thr

340 345 350

Arg Thr Asp Asp Lys Leu Arg Met Glu Thr Cys Phe Gln Gln Ala Cys

355 360 365

Lys Gly Lys Ile Gln Ala Leu Cys Glu Asn Pro Glu Trp Ala Pro Leu

370 375 380

Lys Asp Asn Arg Ile Pro Ser Tyr Gly Val Leu Ser Val Asp Leu Ser

385 390 395 400

Leu Thr Val Glu Leu Lys Ile Lys Ile Ala Ser Gly Phe Gly Pro Leu

405 410 415

Ile Thr His Gly Ser Gly Met Asp Leu Tyr Lys Ser Asn His Asn Asn

420 425 430

Val Tyr Trp Leu Thr Ile Pro Pro Met Lys Asn Leu Ala Leu Gly Val

435 440 445

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

450 455 460

Phe Thr Val Pro Ile Lys Glu Ala Gly Gly Asp Cys His Ala Pro Thr

465 470 475 480

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

485	490	495
Val Ile Leu Pro Gly Gln Asp Leu Gln Tyr Val Leu Ala Thr Tyr Asp		
500	505	510
Thr Ser Ala Val Glu His Ala Val Val Tyr Tyr Val Tyr Ser Pro Ser		
515	520	525
Arg Leu Ser Ser Tyr Phe Tyr Pro Phe Arg Leu Pro Ile Lys Gly Val		
530	535	540
Pro Ile Glu Leu Gln Val Glu Cys Phe Thr Trp Asp Gln Lys Leu Trp		
545	550	555
560		
Cys Arg His Phe Cys Val Leu Ala Asp Ser Glu Ser Gly Gly His Ile		
565	570	575
Thr His Ser Gly Met Val Gly Met Gly Val Ser Cys Thr Val Thr Arg		
580	585	590
Glu Asp Gly Thr Asn Ala Ala Gln Pro Ala Asp Leu Gly Lys Lys Leu		
595	600	605
Leu Glu Ala Ala Arg Ala Gly Gln Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu Met		
610	615	620
Ala Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala Thr Asp Thr Leu Gly Arg Thr Pro		
625	630	635
640		
Leu His Leu Ala Ala Gln Asn Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu		
645	650	655
Leu Lys His Ser Ala Asp Val Asn Ala Ile Glu Glu Val Gly Met Thr		
660	665	670
Pro Leu His Leu Ala Val Val Ala Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val		
675	680	685
Leu Leu Lys Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala Gln Asp Lys Phe Gly Lys		
690	695	700
Thr Ala Phe Asp Ile Ser Ile Asp Tyr Gly Asn Glu Asp Leu Ala Glu		
705	710	715
720		
Ile Leu Gln Lys Leu Asn Ala Ala Arg Gly Ser His His His His		
725	730	735

His His

<210> 3

<211> 2529

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Truncated and mutated (E501A, W504A, Q530A, E533A) NiV G protein
(GcDelta34) fused to a single chain antibody directed to human

CD8 (scFvC8-Vh1) linked with an additional (G4S)3 linker

<220><221> CDS

<222> (1)..(2529)

<400> 3

atgaagaaga tcaacgaggg cctgctggac agcaagatcc tgagcgccctt caacaccgtg 60

atcgcctgc tggcagcat cgtgatcatt gtgatgaaca tcatgatcat ccagaactac 120

accagaagca ccgacaacca ggccgtgatc aaggacgctc tccagggat ccagcagcag 180

atcaagggcc tggccgacaa gatcggcacc gagatcgcc ccaaggtgtc cctgatcgac 240

accagcagca ccatcaccat cccgcacaa atcggcctgc tgggtccaa gatcagccag 300

agcaccgcca gcatcaacga gaacgtgaac gagaagtgca agttcacccct gccccccctg 360

aagatccacg agtgcacat cagctgcccc aacccctgc cttccggga gtaccggccc 420

cagacccgagg gctgtgagcaa cctggctggc ctgccccaca acatctgcct gcagaaaaacc 480

agcaaccaga tcctgaagcc caagctcatt tcctacaccc tgccctgggt gggccagagc 540

ggcacctgca tcaccgaccc cctgctggcc atggacgagg gctacttcgc ctacagccac 600

ctggaacgga tcggcagctg cagcaggggc gtgtccaagc agcggatcat cggcgtggc 660

gaggtgctgg accggggcga cgaggtgccc agcctgttca tgaccaacgt gtggaccccc 720

cccaacccca acaccgtgta ccactgcagc gccgtgtaca acaacgagtt ctactacgtg 780

ctgtgcgccc tgagcacccgt gggcgacccc atcctgaaca gcacctactg gtccggcagc 840

ctgatgatga cccggctggc cgtgaagccct aagagcaatg gcccggata caaccagcac 900

cagctggccc tgcggagcat cgagaaggc agatacgaca aagtgtatgcc ctacggcccc 960

agcggcatca agcagggcga cacactgtac ttcccccgg tggcttctt ggtccggacc 1020

gagttcaagt acaacgacag caactgcccc atcaccaagt gccagtacag caagcccgag 1080

aactgcagac tgagcatggg catccggccc aacagccact acatcctgcg gagcggcctg 1140

ctgaagtaca acctgagcga cggcgagaac cccaaagtgc tctttattga gatcagcgac 1200

cagcggctgt ccatcgccag ccccagcaag atctacgaca gcctggcca gcccgtgttc 1260
 taccaggcca gcttcagctg ggacaccatg atcaagttcg ggcacgtgtc gaccgtgaac 1320
 cccctggtgg tgaactggcg gaacaatacc gtgatcagca gaccggcca gagccagtgc 1380
 ccccggttca acacctgccc cgcgcattgc gcggaggcg tgtacaacga cgccttcctg 1440
 atcgaccgga tcaactggat ctctgcccgc gtgttcctgg actccaacgc gaccggcg 1500
 aatcccggtt tcaccgttta aggacaac gagatcctgt accggggcca gctggccagc 1560
 gaggacacca acgcccagaa aaccatcacc aactgcttgc tgctgaagaa caagatctgg 1620

tgcatcagcc tggggagat ctacgatacc ggcgacaacg tgcgttgcgca caagctgttc 1680
 gccgtgaaga tccccgagca gtgcaccgtt ggaggtggct ctgggtggagg aggctctgg 1740
 ggtgggtggat cagcgccca gccggcccaag gtgcagctgg tgcagagcgg agccgaggat 1800
 aagaaacctg gcgcgttgcgtt gaaggtgtcc tgcaaggcca gggcttcaa catcaaggac 1860
 acctacatcc actgggtgcg ccaggctcca ggacaggccc tggatggat gggccggatc 1920
 gaccccgcca acgacaacac cctgtacgcc agcaagttcc agggcagagt gaccatcacc 1980
 gccgacacca gcagcaacac cgcctacatg gaactgagca gcctgagaag cgaggacacc 2040

gccgtgtact actgtggcag aggctacggc tactacgtt tcgaccactg gggccaggc 2100
 accaccgtga cagtgtctag cggcgaggc ggaagtggag gcccggaaag cggaggccgc 2160
 ggtccgaca tctgtatgac ccagagccct agcagctgt ctgcgcgtt gggcgaccgc 2220
 gtgaccatata cctggccgac cagccgtcc atcagccagt acctggctg gtatcaggaa 2280
 aagccggca aggccccaa gctgtatgc tacagccgc gacccctgca gagccggcgt 2340
 ccaagcagat tcagccgcag cggctccggc accgacttca ccctgaccat cagcagctg 2400
 cagcccgagg acttcgcccac ctactactgc cagcagcaca acgagaaccc cctgaccc 2460

ggcaggaa caaagggtgga gatcaagaga gcccggcaaa gaggttctca tcaccatcac 2520
 catactaa

<210> 4

<211> 842

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 4

Met Lys Lys Ile Asn Glu Gly Leu Leu Asp Ser Lys Ile Leu Ser Ala

1	5	10	15
Phe Asn Thr Val Ile Ala Leu Leu Gly Ser Ile Val Ile Ile Val Met			
20	25	30	
Asn Ile Met Ile Ile Gln Asn Tyr Thr Arg Ser Thr Asp Asn Gln Ala			
35	40	45	
Val Ile Lys Asp Ala Leu Gln Gly Ile Gln Gln Gln Ile Lys Gly Leu			
50	55	60	
Ala Asp Lys Ile Gly Thr Glu Ile Gly Pro Lys Val Ser Leu Ile Asp			
65	70	75	80
Thr Ser Ser Thr Ile Thr Ile Pro Ala Asn Ile Gly Leu Leu Gly Ser			
85	90	95	
Lys Ile Ser Gln Ser Thr Ala Ser Ile Asn Glu Asn Val Asn Glu Lys			
100	105	110	
Cys Lys Phe Thr Leu Pro Pro Leu Lys Ile His Glu Cys Asn Ile Ser			
115	120	125	
Cys Pro Asn Pro Leu Pro Phe Arg Glu Tyr Arg Pro Gln Thr Glu Gly			
130	135	140	
Val Ser Asn Leu Val Gly Leu Pro Asn Asn Ile Cys Leu Gln Lys Thr			
145	150	155	160
Ser Asn Gln Ile Leu Lys Pro Lys Leu Ile Ser Tyr Thr Leu Pro Val			
165	170	175	
Val Gly Gln Ser Gly Thr Cys Ile Thr Asp Pro Leu Leu Ala Met Asp			
180	185	190	
Glu Gly Tyr Phe Ala Tyr Ser His Leu Glu Arg Ile Gly Ser Cys Ser			
195	200	205	
Arg Gly Val Ser Lys Gln Arg Ile Ile Gly Val Gly Glu Val Leu Asp			
210	215	220	
Arg Gly Asp Glu Val Pro Ser Leu Phe Met Thr Asn Val Trp Thr Pro			
225	230	235	240
Pro Asn Pro Asn Thr Val Tyr His Cys Ser Ala Val Tyr Asn Asn Glu			
245	250	255	

Phe Tyr Tyr Val Leu Cys Ala Val Ser Thr Val Gly Asp Pro Ile Leu
 260 265 270
 Asn Ser Thr Tyr Trp Ser Gly Ser Leu Met Met Thr Arg Leu Ala Val
 275 280 285
 Lys Pro Lys Ser Asn Gly Gly Tyr Asn Gln His Gln Leu Ala Leu
 290 295 300
 Arg Ser Ile Glu Lys Gly Arg Tyr Asp Lys Val Met Pro Tyr Gly Pro
 305 310 315 320
 Ser Gly Ile Lys Gln Gly Asp Thr Leu Tyr Phe Pro Ala Val Gly Phe
 325 330 335
 Leu Val Arg Thr Glu Phe Lys Tyr Asn Asp Ser Asn Cys Pro Ile Thr
 340 345 350
 Lys Cys Gln Tyr Ser Lys Pro Glu Asn Cys Arg Leu Ser Met Gly Ile
 355 360 365
 Arg Pro Asn Ser His Tyr Ile Leu Arg Ser Gly Leu Leu Lys Tyr Asn
 370 375 380
 Leu Ser Asp Gly Glu Asn Pro Lys Val Val Phe Ile Glu Ile Ser Asp
 385 390 395 400
 Gln Arg Leu Ser Ile Gly Ser Pro Ser Lys Ile Tyr Asp Ser Leu Gly
 405 410 415
 Gln Pro Val Phe Tyr Gln Ala Ser Phe Ser Trp Asp Thr Met Ile Lys
 420 425 430
 Phe Gly Asp Val Leu Thr Val Asn Pro Leu Val Val Asn Trp Arg Asn
 435 440 445
 Asn Thr Val Ile Ser Arg Pro Gly Gln Ser Gln Cys Pro Arg Phe Asn
 450 455 460
 Thr Cys Pro Ala Ile Cys Ala Glu Gly Val Tyr Asn Asp Ala Phe Leu
 465 470 475 480
 Ile Asp Arg Ile Asn Trp Ile Ser Ala Gly Val Phe Leu Asp Ser Asn
 485 490 495
 Ala Thr Ala Ala Asn Pro Val Phe Thr Val Phe Lys Asp Asn Glu Ile

500	505	510
Leu Tyr Arg Ala Gln Leu Ala Ser Glu Asp Thr Asn Ala Gln Lys Thr		
515	520	525
Ile Thr Asn Cys Phe Leu Leu Lys Asn Lys Ile Trp Cys Ile Ser Leu		
530	535	540
Val Glu Ile Tyr Asp Thr Gly Asp Asn Val Ile Arg Pro Lys Leu Phe		
545	550	555
Ala Val Lys Ile Pro Glu Gln Cys Thr Gly Gly Gly Ser Gly Gly		
565	570	575
Gly Gly Ser Gly Gly Ser Ala Ala Gln Pro Ala Gln Val Gln		
580	585	590
Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Asp Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys		
595	600	605
Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His		
610	615	620
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Arg Ile		
625	630	635
Asp Pro Ala Asn Asp Asn Thr Leu Tyr Ala Ser Lys Phe Gln Gly Arg		
645	650	655
Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Met Glu Leu		
660	665	670
Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Arg Gly		
675	680	685
Tyr Gly Tyr Tyr Val Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr		
690	695	700
Val Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly		
705	710	715
Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser		
725	730	735
Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Arg Ser Ile Ser		
740	745	750

Gln Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Glu Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu

755 760 765

Leu Ile Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe

770 775 780

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu

785 790 795 800

Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Asn

805 810 815

Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Ala

820 825 830

Ala Arg Gly Ser His His His His His His

835 840

<210> 5

<211> 2211

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Truncated and mutated (E501A, W504A, Q530A, E533A) NiV G protein

(GcDelta34) fused to IL-7

<220><221> CDS

<222> (1)..(2211)

<400> 5

atgaagaaga tcaacgaggg cctgctggac agcaagatcc tgagcgcctt caacaccgtg 60

atcgccctgc tggcagcat cgtgatcatt gtgatgaaca tcatgatcat ccagaactac 120

accagaagca ccgacaacca ggccgtgatc aaggacgctc tccagggat ccagcagcag 180

atcaagggcc tggccgacaa gatcggcacc gagatcggcc ccaaggtgtc cctgatcgac 240

accagcagca ccatcaccat cccggcaac atcggcctgc tgggtccaa gatcagccag 300

agcacccgcca gcatcaacga gaacgtgaac gagaagtgca agttcacctt gccccccctg 360

aagatccacg agtcaacat cagctgcccc aacccctgc cttccggga gtaccggccc 420

cagaccgagg gcgtgagcaa cctggctggc ctgccaaca acatctgcct gcagaaaacc 480

agcaaccaga tcctgaagcc caagtcatt tcctacaccc tgccctgggt gggccagagc 540

ggcacctgca tcacccgaccc cctgctggcc atggacgagg gctacttcgc ctacagccac 600

ctggaacgga tcggcagctg cagcaggggc gtgtccaagc agcggatcat cggcgtggc 660

gagggtgtgg accggggcga cgaggtgcccg accctgttca tgaccaacgt gtggacccccc	720
cccaacccca acaccgtgttccactgcagc gccgtgtaca acaacgagtt ctactacgt	780
ctgtgcgcgg tgagcaccgt gggcgacccatcctgaaca gcacctactg gtccggcagc	840
ctgtatgtga cccggctggc cgtgaagcct aagagcaatg gcggcgata caaccagcac	900
cagctggccc tgcggagcat cgagaagggc agatacgaca aagtgtatgcc ctacggcccc	960
agcggcatca agcaggcgaa cacactgtac ttcccgccg tggcttcct ggtccggacc	1020
gagttcaagt acaacgacag caactgcccc atcacaagt gccagtacag caagcccgag	1080
aactgcagac tgagcatggg catccggccc aacagccact acatcctgca gaggccctg	1140
ctgaagtaca acctgagcga cggcgagaac cccaaagtgc tcttatttga gatcagcgac	1200
cagcggctgt ccatcggcag cccagcaag atctacgaca gcctggccca gcccgtgttc	1260
taccaggcca gttcagctg ggacaccatg atcaagttcg gcgacgtgct gaccgtgaac	1320
ccccctgggg tgaactggcg gaacaatacc gtgtatcgca gaccggccca gagccagtgc	1380
ccccgggttca acacctgccc cgcgatctgc gcggaggcg tgcataacga cgccttcctg	1440
atcgaccgga tcaactggat ctctggccgc gtgttctgg actccaacgc gaccggccgc	1500
aatcccggtt tcaccgtgtt taaggacaac gagatcctgt accggggccca gtcggccagc	1560
gaggacacca acgcccagaa aaccatcacc aactgtttc tgctgaagaa caagatctgg	1620
tgcatacggcc tggggagat ctacgatacc ggccgacaacg tgcatacggcc caagctgttc	1680
gccgtgaaga tccccgagca gtgcaccggat atggccgatt gtgtatattga aggtaaagat	1740
ggcaaaacaat atgagagtgt tctaatggtc agcatcgatc aattatttggc cagcatgaaa	1800
gaaatttggta gcaattgcct gaataatgaa tttaactttt ttaaaagaca tatctgtat	1860
gctaataagg aaggatgtt ttattccgt gctgctcgca agttgaggca atttctttaaa	1920
atgaatagca ctggtgattt tgatctccac ttattaaaag ttccagaagg cacaacaata	1980
ctgttgaact gcactggcca ggttaaaggaa agaaaaccag ctggccctgg tgaagccaa	2040
ccaacaaaga gtttggaaaga aaataaatct tttaaggaac agaaaaaaact gaatgacttg	2100
tgtttcctaa agagactatt acaagagata aaaacttggt ggaataaaat tttgtatggc	2160
actaaagaac acgcggccgc aagagggtct catcaccatc accatcacta a	
<210> 6	
<211> 736	
<212> PRT	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	

<400> 6

Met Lys Lys Ile Asn Glu Gly Leu Leu Asp Ser Lys Ile Leu Ser Ala
 1 5 10 15
 Phe Asn Thr Val Ile Ala Leu Leu Gly Ser Ile Val Ile Ile Val Met
 20 25 30

Asn Ile Met Ile Ile Gln Asn Tyr Thr Arg Ser Thr Asp Asn Gln Ala
 35 40 45
 Val Ile Lys Asp Ala Leu Gln Gly Ile Gln Gln Gln Ile Lys Gly Leu
 50 55 60
 Ala Asp Lys Ile Gly Thr Glu Ile Gly Pro Lys Val Ser Leu Ile Asp
 65 70 75 80
 Thr Ser Ser Thr Ile Thr Ile Pro Ala Asn Ile Gly Leu Leu Gly Ser
 85 90 95

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

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

Arg Gly Asp Glu Val Pro Ser Leu Phe Met Thr Asn Val Trp Thr Pro
 225 230 235 240

Pro Asn Pro Asn Thr Val Tyr His Cys Ser Ala Val Tyr Asn Asn Glu
 245 250 255

Phe Tyr Tyr Val Leu Cys Ala Val Ser Thr Val Gly Asp Pro Ile Leu
 260 265 270

Asn Ser Thr Tyr Trp Ser Gly Ser Leu Met Met Thr Arg Leu Ala Val
 275 280 285

Lys Pro Lys Ser Asn Gly Gly Tyr Asn Gln His Gln Leu Ala Leu
 290 295 300

Arg Ser Ile Glu Lys Gly Arg Tyr Asp Lys Val Met Pro Tyr Gly Pro
 305 310 315 320

Ser Gly Ile Lys Gln Gly Asp Thr Leu Tyr Phe Pro Ala Val Gly Phe
 325 330 335

Leu Val Arg Thr Glu Phe Lys Tyr Asn Asp Ser Asn Cys Pro Ile Thr
 340 345 350

Lys Cys Gln Tyr Ser Lys Pro Glu Asn Cys Arg Leu Ser Met Gly Ile
 355 360 365

Arg Pro Asn Ser His Tyr Ile Leu Arg Ser Gly Leu Leu Lys Tyr Asn
 370 375 380

Leu Ser Asp Gly Glu Asn Pro Lys Val Val Phe Ile Glu Ile Ser Asp
 385 390 395 400

Gln Arg Leu Ser Ile Gly Ser Pro Ser Lys Ile Tyr Asp Ser Leu Gly
 405 410 415

Gln Pro Val Phe Tyr Gln Ala Ser Phe Ser Trp Asp Thr Met Ile Lys
 420 425 430

Phe Gly Asp Val Leu Thr Val Asn Pro Leu Val Val Asn Trp Arg Asn
 435 440 445

Asn Thr Val Ile Ser Arg Pro Gly Gln Ser Gln Cys Pro Arg Phe Asn
 450 455 460

Thr Cys Pro Ala Ile Cys Ala Glu Gly Val Tyr Asn Asp Ala Phe Leu
 465 470 475 480

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

485	490	495
Ala Thr Ala Ala Asn Pro Val Phe Thr Val Phe Lys Asn Glu Ile		
500	505	510
Leu Tyr Arg Ala Gln Leu Ala Ser Glu Asp Thr Asn Ala Gln Lys Thr		
515	520	525
Ile Thr Asn Cys Phe Leu Leu Lys Asn Lys Ile Trp Cys Ile Ser Leu		
530	535	540
Val Glu Ile Tyr Asp Thr Gly Asp Asn Val Ile Arg Pro Lys Leu Phe		
545	550	555
560		
Ala Val Lys Ile Pro Glu Gln Cys Thr Gly Met Ala Asp Cys Asp Ile		
565	570	575
Glu Gly Lys Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu Met Val Ser Ile		
580	585	590
Asp Gln Leu Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly Ser Asn Cys Leu Asn		
595	600	605
Asn Glu Phe Asn Phe Lys Arg His Ile Cys Asp Ala Asn Lys Glu		
610	615	620
Gly Met Phe Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu Arg Gln Phe Leu Lys		
625	630	635
640		
Met Asn Ser Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu Leu Lys Val Ser Glu		
645	650	655
Gly Thr Thr Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln Val Lys Gly Arg Lys		
660	665	670
Pro Ala Ala Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys Ser Leu Glu Glu Asn		
675	680	685
Lys Ser Leu Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Leu Lys		
690	695	700
Arg Leu Leu Gln Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys Ile Leu Met Gly		
705	710	715
720		
Thr Lys Glu His Ala Ala Ala Arg Gly Ser His His His His His		
725	730	735

<210> 7

<211> 2229

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Truncated and mutated (E501A, W504A, Q530A, E533A) NiV G protein

(GcDelta34) fused to a designed ankaryin repeat protein (DARPin)

directed against human EpCAM

<220><221> CDS

<222> (1)..(2229)

<400> 7

atgaagaaga tcaacgaggg cctgctggac agcaagatcc tgagcgctt caacaccgtg	60
atcgccctgc tggcagcat cgtgatcatt gtgatgaaca tcatgatcat ccagaactac	120
accagaagca ccgacaacca ggccgtgatc aaggacgctc tccagggat ccagcagcag	180

atcaagggcc tggccgacaa gatcggcacc gagatcgccc ccaagggtgc cctgatcgac	240
accaggcagca ccatcaccat ccccgccaaac atcgccctgc tgggtccaa gatcagccag	300
agcacccgcca gcatcaacga gaacgtgaac gagaagtgcg agttcacccct gccccccctg	360
aagatccacg agtcaacat cagctgcccc aacccctgc cttccggga gtaccggccc	420
cagaccgagg gcgtgagcaa cctggctggc ctgccaaca acatctgcct gcagaaaacc	480
agcaaccaga tcctgaagcc caagctcatt tcctacaccc tgccctgtgt gggccagagc	540
ggcacctgca tcacccgaccc cctgctggcc atggacgagg gctacttcgc ctacagccac	600

ctggaacgga tcggcagctg cagcaggggc gtgtccaagc agcggatcat cggcgtggc	660
gaggtgctgg accggggcga cgaggtgccc agcctgttca tgaccaacgt gtggaccccc	720
cccaacccca acaccgtgta ccactgcage gccgtgtaca acaacgagtt ctactacgt	780
ctgtgcgccc tgagcaccgt gggcgacccc atcctgaaca gcacctactg gtccggcagc	840
ctgatgatga cccgctggc cgtgaagct aagagcaatg gcggcgata caaccagcac	900
cagctggccc tgccgagcat cgagaaggc agatacgaca aagtgtatgcc ctacggcccc	960
agcggcatca agcaggcga cacactgtac ttcccgccg tggcttcgt ggtccggacc	1020

gagttcaagt acaacgacag caactgcccc atcaccaagt gccagtacag caagcccgag	1080
aactgcagac tgagcatgg catccggccc aacagccact acatcctgcg gagcggcctg	1140
ctgaagtaca acctgagcga cggcgagaac cccaaagtgc tcttattga gatcagcgcac	1200
cagcggctgt ccatcgccag ccccgacaa atctacgaca gcctggccca gcccgtgttc	1260
taccaggcca gcttcagctg ggacaccatg atcaagttcg gcgacgtgct gaccgtgaac	1320

ccccctggtgg tgaactggcg gaacaatacc gtgatcagca gacccggcca gagccagtgc	1380
cccccggttca acacctgccc cgcgatctgc gcggaggcg tgtacaacga cgcccttcctg	1440

atcgaccgga tcaactggat ctctgccggc gtgtcctgg actccaacgc gaccggcg	1500
aatcccggttgc tcaccgtgtt taaggacaac gagatcctgt accggggcca gctggccagc	1560
gaggacacca acgcccagaa aaccatcacc aactgtttc tgctgaagaa caagatctgg	1620
tgcatacggcc tggggagat ctacgatacc ggcgacaacg tgatcaggcc caagctgttc	1680
gccgtgaaga tccccgagca gtgcaccggt gacctggta agaaactgct ggaagctgct	1740
cgtgctggtc aggacgacga agttcgatc ctgatggcta acggtgctga cgttaacgct	1800
aaggacgagt atggttctac tccgctgcac ctagtgctca ctcttggtca cctggaaatc	1860

gttgaaggttc tgcgtgaagca cgggtgctgac gttaacgctg atgacgctac tggcttact	1920
ccgctgcacc tggctgcttg gaatggtcac ctggagatcg ttgaaggcttct gctgaagttac	1980
gggtgctgacg ttaacgctat ggacttttag ggttggactc cgctgcaccc ggctgctcat	2040
tttggtcacc tggaaatcg tgaagttctg ctgaagtacg gtgctgacgt taacgctcag	2100
gacaaattcg gtaagacccc gttcgaccta gcgatcgaca acggtaacga ggacattgct	2160
gaagtgtgc aaaaagcgcc gaagcttaat gcggccgcaa gaggttctca tcaccatcac	2220
catcaactaa	

<210> 8

<211> 742

<212> PRT

<213>

> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 8

Met Lys Lys Ile Asn Glu Gly Leu Leu Asp Ser Lys Ile Leu Ser Ala

1 5 10 15

Phe Asn Thr Val Ile Ala Leu Leu Gly Ser Ile Val Ile Ile Val Met

20 25 30

Asn Ile Met Ile Ile Gln Asn Tyr Thr Arg Ser Thr Asp Asn Gln Ala

35 40 45

Val Ile Lys Asp Ala Leu Gln Gly Ile Gln Gln Ile Lys Gly Leu

50 55 60

Ala Asp Lys Ile Gly Thr Glu Ile Gly Pro Lys Val Ser Leu Ile Asp

65	70	75	80
Thr Ser Ser Thr Ile Thr Ile Pro Ala Asn Ile Gly Leu Leu Gly Ser			
85	90	95	
Lys Ile Ser Gln Ser Thr Ala Ser Ile Asn Glu Asn Val Asn Glu Lys			
100	105	110	
Cys Lys Phe Thr Leu Pro Pro Leu Lys Ile His Glu Cys Asn Ile Ser			
115	120	125	
Cys Pro Asn Pro Leu Pro Phe Arg Glu Tyr Arg Pro Gln Thr Glu Gly			
130	135	140	
Val Ser Asn Leu Val Gly Leu Pro Asn Asn Ile Cys Leu Gln Lys Thr			
145	150	155	160
Ser Asn Gln Ile Leu Lys Pro Lys Leu Ile Ser Tyr Thr Leu Pro Val			
165	170	175	
Val Gly Gln Ser Gly Thr Cys Ile Thr Asp Pro Leu Leu Ala Met Asp			
180	185	190	
Glu Gly Tyr Phe Ala Tyr Ser His Leu Glu Arg Ile Gly Ser Cys Ser			
195	200	205	
Arg Gly Val Ser Lys Gln Arg Ile Ile Gly Val Gly Glu Val Leu Asp			
210	215	220	
Arg Gly Asp Glu Val Pro Ser Leu Phe Met Thr Asn Val Trp Thr Pro			
225	230	235	240
Pro Asn Pro Asn Thr Val Tyr His Cys Ser Ala Val Tyr Asn Asn Glu			
245	250	255	
Phe Tyr Tyr Val Leu Cys Ala Val Ser Thr Val Gly Asp Pro Ile Leu			
260	265	270	
Asn Ser Thr Tyr Trp Ser Gly Ser Leu Met Met Thr Arg Leu Ala Val			
275	280	285	
Lys Pro Lys Ser Asn Gly Gly Tyr Asn Gln His Gln Leu Ala Leu			
290	295	300	
Arg Ser Ile Glu Lys Gly Arg Tyr Asp Lys Val Met Pro Tyr Gly Pro			
305	310	315	320

Ser Gly Ile Lys Gln Gly Asp Thr Leu Tyr Phe Pro Ala Val Gly Phe
 325 330 335
 Leu Val Arg Thr Glu Phe Lys Tyr Asn Asp Ser Asn Cys Pro Ile Thr
 340 345 350
 Lys Cys Gln Tyr Ser Lys Pro Glu Asn Cys Arg Leu Ser Met Gly Ile
 355 360 365
 Arg Pro Asn Ser His Tyr Ile Leu Arg Ser Gly Leu Leu Lys Tyr Asn
 370 375 380
 Leu Ser Asp Gly Glu Asn Pro Lys Val Val Phe Ile Glu Ile Ser Asp
 385 390 395 400
 Gln Arg Leu Ser Ile Gly Ser Pro Ser Lys Ile Tyr Asp Ser Leu Gly
 405 410 415
 Gln Pro Val Phe Tyr Gln Ala Ser Phe Ser Trp Asp Thr Met Ile Lys
 420 425 430
 Phe Gly Asp Val Leu Thr Val Asn Pro Leu Val Val Asn Trp Arg Asn
 435 440 445
 Asn Thr Val Ile Ser Arg Pro Gly Gln Ser Gln Cys Pro Arg Phe Asn
 450 455 460
 Thr Cys Pro Ala Ile Cys Ala Glu Gly Val Tyr Asn Asp Ala Phe Leu
 465 470 475 480
 Ile Asp Arg Ile Asn Trp Ile Ser Ala Gly Val Phe Leu Asp Ser Asn
 485 490 495
 Ala Thr Ala Ala Asn Pro Val Phe Thr Val Phe Asp Asn Glu Ile
 500 505 510
 Leu Tyr Arg Ala Gln Leu Ala Ser Glu Asp Thr Asn Ala Gln Lys Thr
 515 520 525
 Ile Thr Asn Cys Phe Leu Leu Lys Asn Lys Ile Trp Cys Ile Ser Leu
 530 535 540
 Val Glu Ile Tyr Asp Thr Gly Asp Asn Val Ile Arg Pro Lys Leu Phe
 545 550 555 560
 Ala Val Lys Ile Pro Glu Gln Cys Thr Gly Asp Leu Gly Lys Lys Leu

565	570	575	
Leu Glu Ala Ala Arg Ala Gly Gln Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu Met			
580	585	590	
Ala Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys Asp Glu Tyr Gly Ser Thr Pro			
595	600	605	
Leu His Leu Ala Ala Thr Leu Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu			
610	615	620	
Leu Lys His Gly Ala Asp Val Asn Ala Asp Asp Ala Thr Gly Leu Thr			
625	630	635	640
Pro Leu His Leu Ala Ala Trp Asn Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val			
645	650	655	
Leu Leu Lys Tyr Gly Ala Asp Val Asn Ala Met Asp Phe Glu Gly Trp			
660	665	670	
Thr Pro Leu His Leu Ala Ala His Phe Gly His Leu Glu Ile Val Glu			
675	680	685	
Val Leu Leu Lys Tyr Gly Ala Asp Val Asn Ala Gln Asp Phe Gly			
690	695	700	
Lys Thr Pro Phe Asp Leu Ala Ile Asp Asn Gly Asn Glu Asp Ile Ala			
705	710	715	720
Glu Val Leu Gln Lys Ala Ala Lys Leu Asn Ala Ala Arg Gly Ser			
725	730	735	
His His His His His			
740			
<210> 9			
<211> 602			
<212> PRT			
<213> Nipah virus			
<400> 9			
Met Pro Ala Glu Asn Lys Lys Val Arg Phe Glu Asn Thr Thr Ser Asp			
1	5	10	15
Lys Gly Lys Ile Pro Ser Lys Val Ile Lys Ser Tyr Tyr Gly Thr Met			
20	25	30	

Asp Ile Lys Lys Ile Asn Glu Gly Leu Leu Asp Ser Lys Ile Leu Ser
 35 40 45
 Ala Phe Asn Thr Val Ile Ala Leu Leu Gly Ser Ile Val Ile Ile Val
 50 55 60
 Met Asn Ile Met Ile Ile Gln Asn Tyr Thr Arg Ser Thr Asp Asn Gln

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

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

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

 260 265 270
 Pro Pro Asn Pro Asn Thr Val Tyr His Cys Ser Ala Val Tyr Asn Asn

275	280	285	
Glu Phe Tyr Tyr Val Leu Cys Ala Val Ser Thr Val Gly Asp Pro Ile			
290	295	300	
Leu Asn Ser Thr Tyr Trp Ser Gly Ser Leu Met Met Thr Arg Leu Ala			
305	310	315	320
Val Lys Pro Lys Ser Asn Gly Gly Tyr Asn Gln His Gln Leu Ala			
325	330	335	
Leu Arg Ser Ile Glu Lys Gly Arg Tyr Asp Lys Val Met Pro Tyr Gly			
340	345	350	
Pro Ser Gly Ile Lys Gln Gly Asp Thr Leu Tyr Phe Pro Ala Val Gly			
355	360	365	
Phe Leu Val Arg Thr Glu Phe Lys Tyr Asn Asp Ser Asn Cys Pro Ile			
370	375	380	
Thr Lys Cys Gln Tyr Ser Lys Pro Glu Asn Cys Arg Leu Ser Met Gly			
385	390	395	400
Ile Arg Pro Asn Ser His Tyr Ile Leu Arg Ser Gly Leu Leu Lys Tyr			
405	410	415	
Asn Leu Ser Asp Gly Glu Asn Pro Lys Val Val Phe Ile Glu Ile Ser			
420	425	430	
Asp Gln Arg Leu Ser Ile Gly Ser Pro Ser Lys Ile Tyr Asp Ser Leu			
435	440	445	
Gly Gln Pro Val Phe Tyr Gln Ala Ser Phe Ser Trp Asp Thr Met Ile			
450	455	460	
Lys Phe Gly Asp Val Leu Thr Val Asn Pro Leu Val Val Asn Trp Arg			
465	470	475	480
Asn Asn Thr Val Ile Ser Arg Pro Gly Gln Ser Gln Cys Pro Arg Phe			
485	490	495	
Asn Thr Cys Pro Glu Ile Cys Trp Glu Gly Val Tyr Asn Asp Ala Phe			
500	505	510	
Leu Ile Asp Arg Ile Asn Trp Ile Ser Ala Gly Val Phe Leu Asp Ser			
515	520	525	

Asn Gln Thr Ala Glu Asn Pro Val Phe Thr Val Phe Lys Asn Glu

530 535 540

Ile Leu Tyr Arg Ala Gln Leu Ala Ser Glu Asp Thr Asn Ala Gln Lys

545 550 555 560

Thr Ile Thr Asn Cys Phe Leu Leu Lys Asn Lys Ile Trp Cys Ile Ser

565 570 575

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

580 585 590

Phe Ala Val Lys Ile Pro Glu Gln Cys Thr

595 600

<210> 10

<211> 617

<212> PRT

<213> Measles virus

<400> 10

Met Ser Pro Gln Arg Asp Arg Ile Asn Ala Phe Tyr Lys Asn Pro

1 5 10 15

His Pro Lys Gly Ser Arg Ile Val Ile Asn Arg Glu His Leu Met Ile

20 25 30

Asp Arg Pro Tyr Val Leu Leu Ala Val Leu Phe Val Met Phe Leu Ser

35 40 45

Leu Ile Gly Leu Leu Ala Ile Ala Gly Ile Arg Leu His Arg Ala Ala

50 55 60

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

65 70 75 80

Thr Asn Ser Ile Glu His Gln Val Lys Asp Val Leu Thr Pro Leu Phe

85 90 95

Lys Ile Ile Gly Asp Glu Val Gly Leu Arg Thr Pro Gln Arg Phe Thr

100 105 110

Asp Leu Val Lys Phe Ile Ser Asp Lys Ile Lys Phe Leu Asn Pro Asp

115 120 125

Arg Glu Tyr Asp Phe Arg Asp Leu Thr Trp Cys Ile Asn Pro Pro Glu

130	135	140
Arg Ile Lys Leu Asp Tyr Asp Gln Tyr Cys Ala Asp Val Ala Ala Glu		
145	150	155
Glu Leu Met Asn Ala Leu Val Asn Ser Thr Leu Leu Glu Thr Arg Thr		
165	170	175
Thr Asn Gln Phe Leu Ala Val Ser Lys Gly Asn Cys Ser Gly Pro Thr		
180	185	190
Thr Ile Arg Gly Gln Phe Ser Asn Met Ser Leu Ser Leu Leu Asp Leu		
195	200	205
Tyr Leu Gly Arg Gly Tyr Asn Val Ser Ser Ile Val Thr Met Thr Ser		
210	215	220
Gln Gly Met Tyr Gly Thr Tyr Leu Val Glu Lys Pro Asn Leu Ser		
225	230	235
Ser Lys Arg Ser Glu Leu Ser Gln Leu Ser Met Tyr Arg Val Phe Glu		
245	250	255
Val Gly Val Ile Arg Asn Pro Gly Leu Gly Ala Pro Val Phe His Met		
260	265	270
Thr Asn Tyr Leu Glu Gln Pro Val Ser Asn Asp Leu Ser Asn Cys Met		
275	280	285
Val Ala Leu Gly Glu Leu Lys Leu Ala Ala Leu Cys His Gly Glu Asp		
290	295	300
Ser Ile Thr Ile Pro Tyr Gln Gly Ser Gly Lys Gly Val Ser Phe Gln		
305	310	315
Leu Val Lys Leu Gly Val Trp Lys Ser Pro Thr Asp Met Gln Ser Trp		
325	330	335
Val Pro Leu Ser Thr Asp Asp Pro Val Ile Asp Arg Leu Tyr Leu Ser		
340	345	350
Ser His Arg Gly Val Ile Ala Asp Asn Gln Ala Lys Trp Ala Val Pro		
355	360	365
Thr Thr Arg Thr Asp Asp Lys Leu Arg Met Glu Thr Cys Phe Gln Gln		
370	375	380

Ala Cys Lys Gly Lys Ile Gln Ala Leu Cys Glu Asn Pro Glu Trp Ala
 385 390 395 400
 Pro Leu Lys Asp Asn Arg Ile Pro Ser Tyr Gly Val Leu Ser Val Asp
 405 410 415
 Leu Ser Leu Thr Val Glu Leu Lys Ile Ala Ser Gly Phe Gly
 420 425 430
 Pro Leu Ile Thr His Gly Ser Gly Met Asp Leu Tyr Lys Ser Asn His
 435 440 445
 Asn Asn Val Tyr Trp Leu Thr Ile Pro Pro Met Lys Asn Leu Ala Leu
 450 455 460
 Gly Val Ile Asn Thr Leu Glu Trp Ile Pro Arg Phe Lys Val Ser Pro
 465 470 475 480
 Tyr Leu Phe Thr Val Pro Ile Lys Glu Ala Gly Gly Asp Cys His Ala
 485 490 495
 Pro Thr Tyr Leu Pro Ala Glu Val Asp Gly Asp Val Lys Leu Ser Ser
 500 505 510
 Asn Leu Val Ile Leu Pro Gly Gln Asp Leu Gln Tyr Val Leu Ala Thr
 515 520 525
 Tyr Asp Thr Ser Arg Val Glu His Ala Val Val Tyr Tyr Val Tyr Ser
 530 535 540
 Pro Ser Arg Ser Phe Ser Tyr Phe Tyr Pro Phe Arg Leu Pro Ile Lys
 545 550 555 560
 Gly Val Pro Ile Glu Leu Gln Val Glu Cys Phe Thr Trp Asp Gln Lys
 565 570 575
 Leu Trp Cys Arg His Phe Cys Val Leu Ala Asp Ser Glu Ser Gly Gly
 580 585 590
 His Ile Thr His Ser Gly Met Val Gly Met Gly Val Ser Cys Thr Val
 595 600 605
 Thr Arg Glu Asp Gly Thr Asn Arg Arg
 610 615

<211> 546

<212> PRT

<213> Nipah virus

<400> 11

Met Val Val Ile Leu Asp Lys Arg Cys Tyr Cys Asn Leu Leu Ile Leu

1 5 10 15

Ile Leu Met Ile Ser Glu Cys Ser Val Gly Ile Leu His Tyr Glu Lys

20 25 30

Leu Ser Lys Ile Gly Leu Val Lys Gly Val Thr Arg Lys Tyr Lys Ile

35 40 45

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

50 55 60

Val Ser Asn Met Ser Gln Cys Thr Gly Ser Val Met Glu Asn Tyr Lys

65 70 75 80

Thr Arg Leu Asn Gly Ile Leu Thr Pro Ile Lys Gly Ala Leu Glu Ile

85 90 95

Tyr Lys Asn Asn Thr His Asp Leu Val Gly Asp Val Arg Leu Ala Gly

100 105 110

Val Ile Met Ala Gly Val Ala Ile Gly Ile Ala Thr Ala Ala Gln Ile

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Leu Gln Glu Thr Ala Glu Lys Thr Val Tyr Val Leu Thr Ala Leu Gln

165 170 175

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

180 185 190

Lys Gln Thr Glu Leu Ser Leu Asp Leu Ala Leu Ser Lys Tyr Leu Ser

195 200 205

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

210 215 220

Ser Met Thr Ile Gln Ala Ile Ser Gln Ala Phe Gly Gly Asn Tyr Glu
 225 230 235 240
 Thr Leu Leu Arg Thr Leu Gly Tyr Ala Thr Glu Asp Phe Asp Asp Leu
 245 250 255
 Leu Glu Ser Asp Ser Ile Thr Gly Gln Ile Ile Tyr Val Asp Leu Ser
 260 265 270
 Ser Tyr Tyr Ile Ile Val Arg Val Tyr Phe Pro Ile Leu Thr Glu Ile
 275 280 285
 Gln Gln Ala Tyr Ile Gln Glu Leu Leu Pro Val Ser Phe Asn Asn Asp
 290 295 300
 Asn Ser Glu Trp Ile Ser Ile Val Pro Asn Phe Ile Leu Val Arg Asn
 305 310 315 320
 Thr Leu Ile Ser Asn Ile Glu Ile Gly Phe Cys Leu Ile Thr Lys Arg
 325 330 335
 Ser Val Ile Cys Asn Gln Asp Tyr Ala Thr Pro Met Thr Asn Asn Met
 340 345 350
 Arg Glu Cys Leu Thr Gly Ser Thr Glu Lys Cys Pro Arg Glu Leu Val
 355 360 365
 Val Ser Ser His Val Pro Arg Phe Ala Leu Ser Asn Gly Val Leu Phe
 370 375 380
 Ala Asn Cys Ile Ser Val Thr Cys Gln Cys Gln Thr Thr Gly Arg Ala
 385 390 395 400
 Ile Ser Gln Ser Gly Glu Gln Thr Leu Leu Met Ile Asp Asn Thr Thr
 405 410 415
 Cys Pro Thr Ala Val Leu Gly Asn Val Ile Ile Ser Leu Gly Lys Tyr
 420 425 430
 Leu Gly Ser Val Asn Tyr Asn Ser Glu Gly Ile Ala Ile Gly Pro Pro
 435 440 445
 Val Phe Thr Asp Lys Val Asp Ile Ser Ser Gln Ile Ser Ser Met Asn
 450 455 460
 Gln Ser Leu Gln Gln Ser Lys Asp Tyr Ile Lys Glu Ala Gln Arg Leu

465	470	475	480
Leu Asp Thr Val Asn Pro Ser Leu Ile Ser Met Leu Ser Met Ile Ile			
485	490	495	
Leu Tyr Val Leu Ser Ile Ala Ser Leu Cys Ile Gly Leu Ile Thr Phe			
500	505	510	
Ile Ser Phe Ile Ile Val Glu Lys Lys Arg Asn Thr Tyr Ser Arg Leu			
515	520	525	
Glu Asp Arg Arg Val Arg Pro Thr Ser Ser Gly Asp Leu Tyr Tyr Ile			
530	535	540	
Gly Thr			
545			
<210> 12			
<211> 553			
<212> PRT			
<213> Measles virus			
<400> 12			
Met Ser Ile Met Gly Leu Lys Val Asn Val Ser Ala Ile Phe Met Ala			
1	5	10	15
Val Leu Leu Thr Leu Gln Thr Pro Thr Gly Gln Ile His Trp Gly Asn			
20	25	30	
Leu Ser Lys Ile Gly Val Val Gly Ile Gly Ser Ala Ser Tyr Lys Val			
35	40	45	
Met Thr Arg Ser Ser His Gln Ser Leu Val Ile Lys Leu Met Pro Asn			
50	55	60	
Ile Thr Leu Leu Asn Asn Cys Thr Arg Val Glu Ile Ala Glu Tyr Arg			
65	70	75	80
Arg Leu Leu Arg Thr Val Leu Glu Pro Ile Arg Asp Ala Leu Asn Ala			
85	90	95	
Met Thr Gln Asn Ile Arg Pro Val Gln Ser Val Ala Ser Ser Arg Arg			
100	105	110	
His Lys Arg Phe Ala Gly Val Val Leu Ala Gly Ala Ala Leu Gly Val			
115	120	125	

Ala Thr Ala Ala Gln Ile Thr Ala Gly Ile Ala Leu His Gln Ser Met

130 135 140

Leu Asn Ser Gln Ala Ile Asp Asn Leu Arg Ala Ser Leu Glu Thr Thr

145 150 155 160

Asn Gln Ala Ile Glu Ala Ile Arg Gln Ala Gly Gln Glu Met Ile Leu

165 170 175

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

180 185 190

Met Asn Gln Leu Ser Cys Asp Leu Ile Gly Gln Lys Leu Gly Leu Lys

195 200 205

Leu Leu Arg Tyr Tyr Thr Glu Ile Leu Ser Leu Phe Gly Pro Ser Leu

210 215 220

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

225 230 235 240

Leu Gly Gly Asp Ile Asn Lys Val Leu Glu Lys Leu Gly Tyr Ser Gly

245 250 255

Gly Asp Leu Leu Gly Ile Leu Glu Ser Arg Gly Ile Lys Ala Arg Ile

260 265 270

Thr His Val Asp Thr Glu Ser Tyr Phe Ile Val Leu Ser Ile Ala Tyr

275 280 285

Pro Thr Leu Ser Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Arg Leu Glu Gly

290 295 300

Val Ser Tyr Asn Ile Gly Ser Gln Glu Trp Tyr Thr Thr Val Pro Lys

305 310 315 320

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

325 330 335

Cys Thr Phe Met Pro Glu Gly Thr Val Cys Ser Gln Asn Ala Leu Tyr

340 345 350

Pro Met Ser Pro Leu Leu Gln Glu Cys Leu Arg Gly Ser Thr Lys Ser

355 360 365

Cys Ala Arg Thr Leu Val Ser Gly Ser Phe Gly Asn Arg Phe Ile Leu

370	375	380
Ser Gln Gly Asn Leu Ile Ala Asn Cys Ala Ser Ile Leu Cys Lys Cys		
385	390	395
400		
Tyr Thr Thr Gly Thr Ile Ile Asn Gln Asp Pro Asp Lys Ile Leu Thr		
405	410	415
Tyr Ile Ala Ala Asp His Cys Pro Val Val Glu Val Asn Gly Val Thr		
420	425	430
Ile Gln Val Gly Ser Arg Arg Tyr Pro Asp Ala Val Tyr Leu His Arg		
435	440	445
Ile Asp Leu Gly Pro Pro Ile Ser Leu Glu Arg Leu Asp Val Gly Thr		
450	455	460
Asn Leu Gly Asn Ala Ile Ala Lys Leu Glu Asp Ala Lys Glu Leu Leu		
465	470	475
480		
Glu Ser Ser Asp Gln Ile Leu Arg Ser Met Lys Gly Leu Ser Ser Thr		
485	490	495
Ser Ile Val Tyr Ile Leu Ile Ala Val Cys Leu Gly Gly Leu Ile Gly		
500	505	510
Ile Pro Ala Leu Ile Cys Cys Cys Arg Gly Arg Cys Asn Lys Lys Gly		
515	520	525
Glu Gln Val Gly Met Ser Arg Pro Gly Leu Lys Pro Asp Leu Thr Gly		
530	535	540
Thr Ser Lys Ser Tyr Val Arg Ser Leu		
545	550	
<210> 13		
<211> 2328		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> Truncated and mutated (Y481A, R533A, S548L, F549S) MeV H protein		
(Hcdelta15) fused to IL-17		
<220><221> CDS		
<222> (1)..(2328)		
<400> 13		

atgcatccca aggaaatgt gatagtcatt aacagagaac atcttatgtat tgatagacct	60
tatgtttgc tggctgttct gttgtcatg tttctgagct tgatcgggtt gctagccatt	120
gcaggcatta gacttcatcg ggcagccatc tacaccgcag agatccataa aagcctcagc	180
accaatctag atgtaactaa ctcaatcgag catcaggtaa aggacgtgct gacaccactc	240
ttcaaaaatca tcggtgatga agtggcctg aggacacctc agagattcac tgacctatg	300
aaattcatct ctgacaagat taaattcctt aatccggata gggagttacga cttagagat	360
ctcacttggt gatcaaccc gccagagaga atcaaattgg attatgtca atactgtgca	420
gatgtggctg ctgaagagct catgaatgca ttggtaact caactctact ggagaccaga	480
acaaccaatc agttccttagc tgcgtcaaaag ggaaactgct cagggccac tacaatcaga	540
ggtaattct caaacatgtc gctgtccctg ttagacttgt atttaggtcg aggttacaat	600
gtgtcatcta tagtcaactat gacatcccag ggaatgtatg gggaaactta cctagtgaa	660
aagcctaatac tgacgacaa aaggtcagag ttgtcacaac tgagcatgta ccgagtgtt	720
gaagtaggtg ttatcagaaa tccgggttg ggggtccgg tggccatata gacaaactat	780
ctttagcaac cagtcaatc tgatctcagc aactgtatgg tggcttggg ggagctaaa	840
ctcgccccc ttgtcacgg ggaagattct atcacaattc cctatcaggg atcaggaaa	900
ggtgtcagct tccagctcgt caagcttaggt gtctggaaat ccccaaccga catgcaatcc	960
tgggtccct tatcaacggta tgatccagt atagacaggc ttacatctc atctcacaga	1020
ggtgttatcg ctgacaatca agcaaaatgg gctgtcccgaa caacacgaac agatgacaag	1080
ttgcgaatgg agacatgctt ccaacaggcg tgtaaggta aaatccaagc actctgcag	1140
aatcccgagt gggaccattt gaaggataac aggattcctt catacgggtt cttgtctgtt	1200
gatctgagtc tgacagttga gcttaaaatc aaaattgctt cgggattcgg gccattgtac	1260
acacacgggtt cagggatgga cctataaaaa tccaaaccaca acaatgtgta ttggctgact	1320
atcccgccaa tgaagaacct agccttaggt gtaatcaaca cattggagt gataccgaga	1380
ttcaaggta gtcggcgct cttcaatgtc ccaattaagg aagcaggcgaa agactgcccatt	1440
gcccccaacat acctacactgc ggaggtggat ggtgatgtca aactcagttc caatctgggt	1500
atttacactg gtcaagatct ccaatatgtt ttggcaacct acgataacttc cgccgttga	1560
catgtgtgg ttattacgt ttacagccca agccgctcat ttcttactt ttatcctttt	1620
aggttgccta taaaggggtt ccccatcgaa ttacaagttt aatgcttcac atgggaccaa	1680
aaactctggt gccgtcactt ctgtgtgctt gcggactcag aatctgggtt acatatcact	1740

cactctggga tggagggcat gggagtcatc tgcacagtca cccgggaaga tggaaccaat	1800
atcgaggaa gggcgccca gccggccatg gccgatttg atattgaagg taaagatggc	1860
aaacaatatg agagtgttct aatggtcagc atcgatcaat tattggacag catgaaagaa	1920
attggtagca atigctgaa taatgaattt aactttttt aaagacatat ctgtgtatgt	1980
aataaggaag gtatgtttt attccgtgt gctcgcaagt tgaggcaatt tcttaaaatg	2040
aatagcactg gtgatttgta tctccactt ttaaaatgtt cagaaggcac aacaatactg	2100
ttgaactgca ctggccaggt taaaggaaga aaaccagctg ccctgggtga agcccaacca	2160

acaagagttt tggaaagaaaa taaatctta aaggaacaga aaaaactgaa tgacttgtgt	2220
ttcctaaga gactattaca agagataaaa acttgtgaa ataaaattttt gatggcact	2280
aaagaacacg cggccgcaag aggatcgcat caccatcacc atcactga	

<210> 14

<211> 775

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 14

Met His Pro Lys Gly Ser Arg Ile Val Ile Asn Arg Glu His Leu Met

1 5 10 15

Ile Asp Arg Pro Tyr Val Leu Leu Ala Val Leu Phe Val Met Phe Leu

20 25 30

Ser Leu Ile Gly Leu Leu Ala Ile Ala Gly Ile Arg Leu His Arg Ala

35 40 45

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

50 55 60

Val Thr Asn Ser Ile Glu His Gln Val Lys Asp Val Leu Thr Pro Leu

65 70 75 80

Phe Lys Ile Ile Gly Asp Glu Val Gly Leu Arg Thr Pro Gln Arg Phe

85 90 95

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

100 105 110

Asp Arg Glu Tyr Asp Phe Arg Asp Leu Thr Trp Cys Ile Asn Pro Pro

115	120	125
Glu Arg Ile Lys Leu Asp Tyr Asp Gln Tyr Cys Ala Asp Val Ala Ala		
130	135	140
Glu Glu Leu Met Asn Ala Leu Val Asn Ser Thr Leu Leu Glu Thr Arg		
145	150	155
Thr Thr Asn Gln Phe Leu Ala Val Ser Lys Gly Asn Cys Ser Gly Pro		
165	170	175
Thr Thr Ile Arg Gly Gln Phe Ser Asn Met Ser Leu Ser Leu Leu Asp		
180	185	190
Leu Tyr Leu Gly Arg Gly Tyr Asn Val Ser Ser Ile Val Thr Met Thr		
195	200	205
Ser Gln Gly Met Tyr Gly Thr Tyr Leu Val Glu Lys Pro Asn Leu		
210	215	220
Ser Ser Lys Arg Ser Glu Leu Ser Gln Leu Ser Met Tyr Arg Val Phe		
225	230	235
Glu Val Gly Val Ile Arg Asn Pro Gly Leu Gly Ala Pro Val Phe His		
245	250	255
Met Thr Asn Tyr Leu Glu Gln Pro Val Ser Asn Asp Leu Ser Asn Cys		
260	265	270
Met Val Ala Leu Gly Glu Leu Lys Leu Ala Ala Leu Cys His Gly Glu		
275	280	285
Asp Ser Ile Thr Ile Pro Tyr Gln Gly Ser Gly Lys Gly Val Ser Phe		
290	295	300
Gln Leu Val Lys Leu Gly Val Trp Lys Ser Pro Thr Asp Met Gln Ser		
305	310	315
Trp Val Pro Leu Ser Thr Asp Asp Pro Val Ile Asp Arg Leu Tyr Leu		
325	330	335
Ser Ser His Arg Gly Val Ile Ala Asp Asn Gln Ala Lys Trp Ala Val		
340	345	350
Pro Thr Thr Arg Thr Asp Asp Lys Leu Arg Met Glu Thr Cys Phe Gln		
355	360	365

Gln Ala Cys Lys Gly Lys Ile Gln Ala Leu Cys Glu Asn Pro Glu Trp
 370 375 380
 Ala Pro Leu Lys Asp Asn Arg Ile Pro Ser Tyr Gly Val Leu Ser Val
 385 390 395 400
 Asp Leu Ser Leu Thr Val Glu Leu Lys Ile Lys Ile Ala Ser Gly Phe
 405 410 415
 Gly Pro Leu Ile Thr His Gly Ser Gly Met Asp Leu Tyr Lys Ser Asn
 420 425 430
 His Asn Asn Val Tyr Trp Leu Thr Ile Pro Pro Met Lys Asn Leu Ala
 435 440 445
 Leu Gly Val Ile Asn Thr Leu Glu Trp Ile Pro Arg Phe Lys Val Ser
 450 455 460
 Pro Ala Leu Phe Asn Val Pro Ile Lys Glu Ala Gly Glu Asp Cys His
 465 470 475 480
 Ala Pro Thr Tyr Leu Pro Ala Glu Val Asp Gly Asp Val Lys Leu Ser
 485 490 495
 Ser Asn Leu Val Ile Leu Pro Gly Gln Asp Leu Gln Tyr Val Leu Ala
 500 505 510
 Thr Tyr Asp Thr Ser Ala Val Glu His Ala Val Val Tyr Tyr Val Tyr
 515 520 525
 Ser Pro Ser Arg Ser Phe Ser Tyr Phe Tyr Pro Phe Arg Leu Pro Ile
 530 535 540
 Lys Gly Val Pro Ile Glu Leu Gln Val Glu Cys Phe Thr Trp Asp Gln
 545 550 555 560
 Lys Leu Trp Cys Arg His Phe Cys Val Leu Ala Asp Ser Glu Ser Gly
 565 570 575
 Gly His Ile Thr His Ser Gly Met Glu Gly Met Gly Val Ser Cys Thr
 580 585 590
 Val Thr Arg Glu Asp Gly Thr Asn Ile Glu Gly Arg Ala Ala Gln Pro
 595 600 605
 Ala Met Ala Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys Asp Gly Lys Gln Tyr Glu

610	615	620
Ser Val Leu Met Val Ser Ile Asp Gln Leu Leu Asp Ser Met Lys Glu		
625	630	635
Ile Gly Ser Asn Cys Leu Asn Asn Glu Phe Asn Phe Phe Lys Arg His		
645	650	655
Ile Cys Asp Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe Leu Phe Arg Ala Ala Arg		
660	665	670
Lys Leu Arg Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser Thr Gly Asp Phe Asp Leu		
675	680	685
His Leu Leu Lys Val Ser Glu Gly Thr Thr Ile Leu Leu Asn Cys Thr		
690	695	700
Gly Gln Val Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala Leu Gly Glu Ala Gln Pro		
705	710	715
720		
Thr Lys Ser Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu Lys Glu Gln Lys Lys Leu		
725	730	735
Asn Asp Leu Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu Gln Glu Ile Lys Thr Cys		
740	745	750
Trp Asn Lys Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu His Ala Ala Ala Arg Gly		
755	760	765
Ser His His His His His		
770	775	
<210> 15		
<211> 523		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> Truncated MeV fusion glycoprotein (FcDelta30)		
<400> 15		
Met Ser Ile Met Gly Leu Lys Val Asn Val Ser Ala Ile Phe Met Ala		
1	5	10
Val Leu Leu Thr Leu Gln Thr Pro Thr Gly Gln Ile His Trp Gly Asn		
20	25	30
Leu Ser Lys Ile Gly Val Val Gly Ile Gly Ser Ala Ser Tyr Lys Val		

35 40 45

Met Thr Arg Ser Ser His Gln Ser Leu Val Ile Lys Leu Met Pro Asn

50 55 60

Ile Thr Leu Leu Asn Asn Cys Thr Arg Val Glu Ile Ala Glu Tyr Arg

65 70 75 80

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

85 90 95

Met Thr Gln Asn Ile Arg Pro Val Gln Ser Val Ala Ser Ser Arg Arg

100 105 110

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

115 120 125

Ala Thr Ala Ala Gln Ile Thr Ala Gly Ile Ala Leu His Gln Ser Met

130 135 140

Leu Asn Ser Gln Ala Ile Asp Asn Leu Arg Ala Ser Leu Glu Thr Thr

145 150 155 160

Asn Gln Ala Ile Glu Ala Ile Arg Gln Ala Gly Gln Glu Met Ile Leu

165 170 175

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

180 185 190

Met Asn Gln Leu Ser Cys Asp Leu Ile Gly Gln Lys Leu Gly Leu Lys

195 200 205

Leu Leu Arg Tyr Tyr Thr Glu Ile Leu Ser Leu Phe Gly Pro Ser Leu

210 215 220

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

225 230 235 240

Leu Gly Gly Asp Ile Asn Lys Val Leu Glu Lys Leu Gly Tyr Ser Gly

245 250 255

Gly Asp Leu Leu Gly Ile Leu Glu Ser Arg Gly Ile Lys Ala Arg Ile

260 265 270

Thr His Val Asp Thr Glu Ser Tyr Phe Ile Val Leu Ser Ile Ala Tyr

275 280 285

Pro Thr Leu Ser Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Arg Leu Glu Gly
 290 295 300
 Val Ser Tyr Asn Ile Gly Ser Gln Glu Trp Tyr Thr Thr Val Pro Lys
 305 310 315 320

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

Ser Gln Gly Asn Leu Ile Ala Asn Cys Ala Ser Ile Leu Cys Lys Cys
 385 390 395 400
 Tyr Thr Thr Gly Thr Ile Ile Asn Gln Asp Pro Asp Lys Ile Leu Thr
 405 410 415
 Tyr Ile Ala Ala Asp His Cys Pro Val Val Glu Val Asn Gly Val Thr
 420 425 430
 Ile Gln Val Gly Ser Arg Arg Tyr Pro Asp Ala Val Tyr Leu His Arg
 435 440 445

Ile Asp Leu Gly Pro Pro Ile Ser Leu Glu Arg Leu Asp Val Gly Thr
 450 455 460
 Asn Leu Gly Asn Ala Ile Ala Lys Leu Glu Asp Ala Lys Glu Leu Leu
 465 470 475 480
 Glu Ser Ser Asp Gln Ile Leu Arg Ser Met Lys Gly Leu Ser Ser Thr
 485 490 495
 Ser Ile Val Tyr Ile Leu Ile Ala Val Cys Leu Gly Gly Leu Ile Gly
 500 505 510

Ile Pro Ala Leu Ile Cys Cys Cys Arg Gly Arg

515 520

<210> 16

<211> 524

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Truncated NiV fusion glycoprotein (FcDelta22)

<400> 16

Met Val Val Ile Leu Asp Lys Arg Cys Tyr Cys Asn Leu Leu Ile Leu

1 5 10 15

Ile Leu Met Ile Ser Glu Cys Ser Val Gly Ile Leu His Tyr Glu Lys

20 25 30

Leu Ser Lys Ile Gly Leu Val Lys Gly Val Thr Arg Lys Tyr Lys Ile

35 40 45

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

50 55 60

Val Ser Asn Met Ser Gln Cys Thr Gly Ser Val Met Glu Asn Tyr Lys

65 70 75 80

Thr Arg Leu Asn Gly Ile Leu Thr Pro Ile Lys Gly Ala Leu Glu Ile

85 90 95

Tyr Lys Asn Asn Thr His Asp Leu Val Gly Asp Val Arg Leu Ala Gly

100 105 110

Val Ile Met Ala Gly Val Ala Ile Gly Ile Ala Thr Ala Ala Gln Ile

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Leu Gln Glu Thr Ala Glu Lys Thr Val Tyr Val Leu Thr Ala Leu Gln

165 170 175

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

180 185 190

Lys Gln Thr Glu Leu Ser Leu Asp Leu Ala Leu Ser Lys Tyr Leu Ser

195 200 205

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

210	215	220	
Ser Met Thr Ile Gln Ala Ile Ser Gln Ala Phe Gly Gly Asn Tyr Glu			
225	230	235	240
Thr Leu Leu Arg Thr Leu Gly Tyr Ala Thr Glu Asp Phe Asp Asp Leu			
245	250	255	
Leu Glu Ser Asp Ser Ile Thr Gly Gln Ile Ile Tyr Val Asp Leu Ser			
260	265	270	
Ser Tyr Tyr Ile Ile Val Arg Val Tyr Phe Pro Ile Leu Thr Glu Ile			
275	280	285	
Gln Gln Ala Tyr Ile Gln Glu Leu Leu Pro Val Ser Phe Asn Asn Asp			
290	295	300	
Asn Ser Glu Trp Ile Ser Ile Val Pro Asn Phe Ile Leu Val Arg Asn			
305	310	315	320
Thr Leu Ile Ser Asn Ile Glu Ile Gly Phe Cys Leu Ile Thr Lys Arg			
325	330	335	
Ser Val Ile Cys Asn Gln Asp Tyr Ala Thr Pro Met Thr Asn Asn Met			
340	345	350	
Arg Glu Cys Leu Thr Gly Ser Thr Glu Lys Cys Pro Arg Glu Leu Val			
355	360	365	
Val Ser Ser His Val Pro Arg Phe Ala Leu Ser Asn Gly Val Leu Phe			
370	375	380	
Ala Asn Cys Ile Ser Val Thr Cys Gln Cys Gln Thr Thr Gly Arg Ala			
385	390	395	400
Ile Ser Gln Ser Gly Glu Gln Thr Leu Leu Met Ile Asp Asn Thr Thr			
405	410	415	
Cys Pro Thr Ala Val Leu Gly Asn Val Ile Ile Ser Leu Gly Lys Tyr			
420	425	430	
Leu Gly Ser Val Asn Tyr Asn Ser Glu Gly Ile Ala Ile Gly Pro Pro			
435	440	445	
Val Phe Thr Asp Lys Val Asp Ile Ser Ser Gln Ile Ser Ser Met Asn			
450	455	460	

Gln Ser Leu Gln Gln Ser Lys Asp Tyr Ile Lys Glu Ala Gln Arg Leu
465 470 475 480
Leu Asp Thr Val Asn Pro Ser Leu Ile Ser Met Leu Ser Met Ile Ile

485 490 495
Leu Tyr Val Leu Ser Ile Ala Ser Leu Cys Ile Gly Leu Ile Thr Phe
500 505 510
Ile Ser Phe Ile Ile Val Glu Lys Lys Arg Asn Thr
515 520