



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0034719
(43) 공개일자 2022년03월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 48/00 (2006.01) *A61K 38/44* (2006.01)
A61P 25/14 (2006.01) *A61P 25/16* (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)
 (52) CPC특허분류
A61K 48/005 (2013.01)
A61K 38/44 (2013.01)
 (21) 출원번호 10-2021-7032582
 (22) 출원일자(국제) 2020년03월10일
 심사청구일자 없음
 (85) 번역문제출일자 2021년10월08일
 (86) 국제출원번호 PCT/IB2020/052073
 (87) 국제공개번호 WO 2020/183374
 국제공개일자 2020년09월17일
 (30) 우선권주장
 62/816,170 2019년03월10일 미국(US)
 62/871,007 2019년07월05일 미국(US)

(71) 출원인
시오 진 테라피스 인코포레이티드
 미국 뉴욕 뉴욕 일레븐 타임스 스퀘어 33플로어
 (우: 10036)
옥스포드 바이오메디카(유케이) 리미티드
 영국, 오엑스4 6엘티 옥스포드셔 옥스포드, 트랜스포트 웨이, 윈드러쉬 코트
 (72) 발명자
코코란, 가빈
 미국 10036 뉴욕 뉴욕 타임스 스퀘어 11 33 플로어
스톤, 미첼
 미국 27703 노스 캐롤라이나 더럼 슬라터 로드
 1009 스위트 380
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
특허법인 남앤남

전체 청구항 수 : 총 28 항

(54) 발명의 명칭 **파킨슨병을 치료하기 위한 유전자 요법 조성물 및 방법**

(57) 요약

(i) 티로신 하이드록실라제(TH)를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열, (ii) GTP-사이클로하이드롤라제 I(CH1)을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열, (iii) 방향족 아미노산 도파 데카르복실라제(AADC)를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열, 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는 핵산 작제물을 포함하는 유효량의 바이러스 벡터를 대상체에 투여하는 것을 포함하는, 신경퇴행성 질병 또는 내인성 도파민 수준이 대상체에서 감소되는 질병을 앓고 있는 대상체에서 운동 기능을 개선시키고 운동이상증을 감소시키는 방법.

(52) CPC특허분류

A61P 25/14 (2018.01)

A61P 25/16 (2018.01)

C12N 15/86 (2013.01)

C12Y 114/16002 (2013.01)

C12Y 305/04016 (2013.01)

C12Y 401/01028 (2013.01)

C07K 2319/00 (2013.01)

C12N 2740/15043 (2013.01)

C12N 2810/6081 (2013.01)

(72) 발명자

미트로파노스, 키리아코스

영국 오엑스4 6엘티 옥스퍼드 트랜스포트 웨이 윈
드러쉬 코트 옥스퍼드 바이오메디카 (내)

스튜어트, 한나

영국 오엑스4 6엘티 옥스퍼드 트랜스포트 웨이 윈
드러쉬 코트 옥스퍼드 바이오메디카 (내)

명세서

청구범위

청구항 1

(i) 티로신 하이드록실라제(TH)를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열, (ii) GTP-사이클로하이드롤라제 I(CH1)을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열, (iii) 방향족 아미노산 도파 데카르복실라제(AADC)를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열, 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는 핵산 작제물을 포함하는 유효량의 바이러스 벡터를 대상체에 투여하는 것을 포함하는, 신경퇴행성 질병 또는 내인성 도파민 수준이 대상체에서 감소되는 질병을 앓고 있는 대상체에서 운동 기능을 개선시키고 운동이상증을 감소시키는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 신경퇴행성 질병 또는 내인성 도파민 수준이 감소되는 질병이 파킨슨병인 방법.

청구항 3

(a) (i) 티로신 하이드록실라제(TH)를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열, (ii) GTP-사이클로하이드롤라제 I(CH1)을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열, (iii) 방향족 아미노산 도파 데카르복실라제(AADC)를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열, 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는 핵산 작제물을 포함하는 바이러스 벡터; 및 (b) 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 치료적 유효량의 조성물을 대상체에 투여하는 것을 포함하는, 파킨슨병을 앓고 있는 대상체에서 운동 기능을 치료하거나 개선시키고, 운동이상증을 감소시키는 방법.

청구항 4

제2항 또는 제3항에 있어서, 대상체가 L-DOPA 또는 LED 요법을 받고 있는 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체의 L-DOPA 또는 LED 요법 용량이 투여 전 대상체의 L-DOPA 또는 LED 요법 용량에 비해 핵산 작제물의 투여 후 3개월 내에 감소되는 방법.

청구항 6

제4항 또는 제5항에 있어서, 평균 L-DOPA 또는 LED 요법 용량이 투여 3개월 후 기준선으로부터 적어도 10%, 적어도 12%, 적어도 14%, 적어도 15%, 적어도 16%, 적어도 17%, 적어도 18% 또는 적어도 19%만큼 감소되는 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 바이러스 벡터가 1×10^6 TU/대상체 내지 5×10^8 TU/대상체의 표적 용량으로 투여되는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 표적 용량이 약 4×10^6 TU/대상체 내지 8×10^6 TU/대상체; 8×10^6 TU/대상체 내지 4×10^7 TU/대상체; 또는 1×10^7 TU/대상체 내지 5×10^8 TU/대상체인 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 투여가 1회 투여인 방법.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 투여가 뇌로의 투여인 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 투여가 주입에 의한 조가비핵으로의 투여인 방법.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, (i) 티로신 하이드록실라제(TH)를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열, (ii) GTP-사이클로하이드롤라제 I(CH1)을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열 및 (iii) 방향족 아미노산 도파 데카르복실라제(AADC)를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하며, 상기 TH를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열이 이들이 융합 단백질 TH-CH1을 인코딩하도록 CH1을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 연결되는 방법.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산 작제물이,

TH_L-CH1_L-IRES-AADC;

AADC_L-TH_L-CH1;

TH_L-CH1_L-AADC;

또는 TH_L-CH1_L-AADC를 포함하고;

여기서, L이 링커 인코딩 서열이고, IRES가 내부 리보솜 진입 부위이고, P가 프로모터인, 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 핵산 작제물이 TH_L-CH1_L-IRES-AADC를 포함하는 방법.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산 작제물이 (i) 티로신 하이드록실라제(TH)를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열, (ii) GTP-사이클로하이드롤라제 I(CH1)을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열 및 (iii) 방향족 아미노산 도파 데카르복실라제(AADC)를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하며, 상기 TH를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열이 이들이 융합 단백질 TH-CH1을 인코딩하도록 CH1을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 연결되고, 상기 작제물이 TH-L-CH1-IRES-AADC 또는 TH-L-CH1-P-AADC를 포함하고, 여기서 L이 링커 인코딩 서열이고, IRES가 내부 리보솜 진입 부위이고, P가 프로모터인 방법.

청구항 16

제13항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 링커(L)가 코돈 최적화되지 않은 방법.

청구항 17

제13항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 링커(L)가 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:3로 제시된 서열을 포함하는 방법.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산 작제물이 항시성 프로모터, 조직-특이적 프로모터 또는 이들의 조합으로부터 선택되는 프로모터(P)를 추가로 포함하는 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 프로모터가 CMV 프로모터, 포스포글리세레이트 키나제 프로모터 또는 티미딘 키나제 프로모터인 방법.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 바이러스 벡터가 렌티바이러스 벡터 또는 아데노-관련 바이러스 벡터인 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 바이러스 벡터가 렌티바이러스 벡터인 방법.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 바이러스 벡터가 바이러스 입자인 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, 바이러스 입자가 EIAV 벡터 입자이고, VSV-G로 슈도타이핑되는 방법.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 바이러스 벡터가 약학적으로 허용되는 부형제 및/또는 희석제를 포함하는 약학적 조성물로 제형화되는 방법.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체의 운동 기능이 기준선과 비교하여 투여 3개월 후 UPDRS-III (운동) OFF 스코어에서 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35% 또는 적어도 40% 증가로 제시된 바와 같이 개선되는 방법.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, (a) 기준선과 비교하여 투여 3개월 후 성가신 운동이상증을 갖는 하우스러 다이어리(Hauser diary) ON 시간에서의 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80% 또는 적어도 85% 감소; (b) 기준선과 비교하여 투여 3개월 후 UPDRS-IV 스코어에서의 적어도 50% 감소, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70% 또는 적어도 74% 감소, 및 (c) 기준선과 비교하여 투여 3개월 후 러시 이상운동증(Rush Dyskinesia)에서의 적어도 10%, 적어도 12%, 적어도 15%, 적어도 18% 개선 중 하나 이상에 의해 제시된 바와 같이 대상체에서 운동이상증이 감소되는 방법.

청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법이 진전, 운동완만증, 경직된 근육, 손상된 자세 및/또는 균형, 자동 움직임의 상실, 말하기 어려움, 미세 운동 기술의 어려움, 또는 이들의 임의의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 대상체에서의 하나 이상의 증상을 추가로 개선시키는 방법.

청구항 28

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 투여 후 3개월 이내에, 대상체가 투여 전 대상체의 기준선에 비해 투여 후 개선된 운동 기능, 감소된 운동이상증 및 감소된 L-DOPA 또는 LED 요법 용량을 갖는 방법.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 관련 출원의 교차 참조
- [0002] 본 출원은 각각의 전체내용이 참조로서 본원에 포함되는 2019년 3월 10일에 출원된 미국 가특허 출원 번호 62/816,170호; 및 2019년 7월 5일에 출원된 미국 가특허 출원 번호 62/871,007호의 이익을 주장한다.
- [0003] EFS-WEB을 통해 전자적으로 제공된 서열 목록에 대한 참조
- [0004] 본 출원에 제공된 전자적으로 제출된 서열 목록(명칭: 4226_038PC02_seqListing_ST25.txt, 크기: 4,044 바이트; 및 생성일: 2020년 3월 10일)의 내용은 전체내용이 참조로서 본원에 포함된다.
- [0005] 분야
- [0006] 본 발명의 개시는 파킨슨병의 치료를 위해 바이러스 벡터 입자를 사용하여 전달되는 도파민 합성 경로와 관련된 효소 활성을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 요법 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0007] 파킨슨병(PD)은 흑색질에서 도파민성 뉴런의 손실을 특징으로 하는 중추신경계(CNS)의 신경퇴행성 장애이다. 이는 궁극적으로 선조체의 도파민 고갈로 이어져 심각한 운동 결핍을 유발한다. 대부분의 환자에 대한 PD의 원인은 공지되어 있지 않으며, 이는 '산발성' 또는 '특발성' PD로 지칭된다. 전 세계적으로 630만 명의 사람들이 PD를 갖는 것으로 추정되며, 대부분의 사람들이 60세 후에 증상이 발달할 것이지만, 대략 10명 중 1명이 50세 이전에 진단된다(유럽 파킨슨병 협회 웹사이트: www.epda.eu.com/en/pd-info/에서 이용 가능함). 여성보다 남성이 약간 더 많이 영향을 받는다.

[0008] PD의 질병 진행을 막는 치료적 치료 또는 요법은 없다. 현재 치료 옵션은 약리학적 및 외과적 접근법을 포함한다. 질병의 초기 단계는 L-DOPA(도파민에 대한 전구체) 요법, 도파민 효능제 및 말초에서 L-DOPA 또는 도파민의 분해를 막는 것을 목표로 하는 효소 억제제와 같은 경구 도파민성 치료에 의해 효과적으로 관리될 수 있다. 대략 5년의 경구 도파민성 치료 후, 환자의 50%는 특히 장기간 및 박동성 사용 후에 운동이상증과 같은 운동 문제를 발생시킨다. 예를 들어, 질병이 진행됨에 따라, L-DOPA 요법은 운동 결핍의 치료에 덜 효과적이게 되며, 심각한 부작용을 갖는 더 많은 용량이 사용되는 것을 필요로 한다.

[0009] 경구 약물이 중기 내지 후기 단계 PD에서 실패하기 시작하면 표준 치료가 없다. 이 단계에서는 심부 뇌 자극(DBS), Duodopa®(조합된 레보도파/카르비도파) 및 아포모르핀(도파민 효능제) 펌프를 포함하여 운동 기능을 제어하고 저운동 에피소드를 감소시키는 보다 침습적인 외과적 요법이 도입된다.

발명의 내용

도면의 간단한 설명

[0010] 도 1은 티로신을 레보도파(L-dopa)로 전환시키는 효소 티로신 하이드록실라제(TH) 및 사이클로하이드롤라제 1(CH1); 및 L-dopa를 도파민으로 전환시키는 방향족 L-아미노산 데카르복실라제(AADC)를 포함하는 개략적 내인성 도파민 합성을 제시한다.

도 2a-2b는 각각 (A) Lenti-PD 및 (B) ProSavin®에 대한 유전자 작제물을 제시한다. 2개의 구조 사이의 차이는 Lenti-PD에서 CH1이 발현을 향상시키기 위해 프로모터에 더 가깝게 이동되고, Lenti-PD에서 TH 및 CH1은 공동-국소화를 보장하기 위해 가요성 링커에 의해 결합된다는 것을 포함한다.

도 3은 ProSavin® 및 Lenti-PD를 사용한 일차 인간 뉴런에서 도파민 및 L-dopa의 시험관 내 생성을 제시한다.

도 4a-4b는 (A) 파트 A: 용량 상승 및 (B) 파트 B: 확장 코호트 대 모방 수술 절차를 포함하는 2상 임상 연구 계획을 제시한다.

도 5는 UPDRS 파트 III (운동) OFF 스코어를 통해 반영된 PD 환자 진행을 제시한다. 코호트 1 대상체는 58 및 60의 기준선 스코어를 갖는다.

도 6은 Lenti-PD의 저 용량 코호트뿐만 아니라 이전 임상 시험으로부터의 ProSavin® 및 모의 대조군의 저 용량, 중간 용량 및 고 용량 코호트에 대해 3개월에서 UPDRS 파트 III OFF 스코어에서의 기준선으로부터의 변화를 제시한다.

도 7a-7b는 Lenti-PD의 저 용량 코호트뿐만 아니라 ProSavin®의 모든 코호트에 대해 3개월에서 (A) 일상 생활 활동 및 (B) 치료 합병증의 하위척도에 걸친 기준선으로부터의 UPDRS OFF 변화를 제시한다.

도 8은 하우저 환자 다이어리(Hauser Patient Diaries) 및 레보도파 등가 용량(LED)을 제시한다. 연구 방문 직전 2일에 걸쳐 하우저 환자 다이어리를 수집하였다. 환자는 각각의 24시간의 기간 동안 30분마다 다이어리를 완성하는 것이 요구되었다.

도 9a-9d. 도 9a는 Lenti-PD의 저 용량 코호트뿐만 아니라 이전 임상 시험으로부터의 ProSavin® 및 모의 대조군의 저 용량, 중간 용량 및 고 용량 코호트에 대해 3개월 및 6개월에서 UPDRS 파트 III OFF 스코어에서의 기준선으로부터의 변화를 제시한다. 도 9b 및 9c는 Lenti-PD의 저 용량 코호트뿐만 아니라 ProSavin®의 모든 코호트에 대해 3개월 및 6개월에서 (B) 일상 생활 활동 및 (C) 치료 합병증의 하위척도에 걸친 기준선으로부터의 UPDRS OFF 변화를 제시한다. 도 9d는 ProSavin®과 비교한 PDQ-39 요약 지수의 결과를 제시한다. PDQ-39는 파킨슨병 특이적 건강 관련 특질을 평가하는 설문지이다. 환자는 6개월에서 UPDRS II 일상 생활 활동 "OFF" 스코어에서 기준선으로부터 19.5 포인트, UPDRS IV 치료 합병증 "OFF" 스코어에서 기준선으로부터 3 포인트, 및 PDQ-39 요약 지수 스코어에서 기준선으로부터 32.1 포인트의 평균 개선을 경험하였다.

도 10a-10b는 백터 투여 후 PD의 MPTP 마카크(macaque) 모델에서 이동된 총 거리(TDM)의 변화 퍼센트의 정량화 및 임상 등급 스코어를 제시한다. 백분율은 각각의 시점에서 획득된 마지막 3개의 TDM 값으로부터 계산하였다. 데이터는 기준선(MPTP 후) 또는 MPTP 후 값(3 및 6개월 데이터)에 비한 것이다. 데이터는 평균 ± s.e.m.을 나타낸다; $p \leq 0.002^{***}$

본 발명의 양태의 개요

본 발명의 개시의 특정 양태는 (i) 티로신 하이드록실라제(TH)를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열, (ii) GTP-사이클로하이드롤라제 I(CH1)을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열, (iii) 방향족 아미노산 도파 데카르복실라제(AADC)를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열, 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는 핵산 작제물을 포함하는 유효량의 바이러스 백터를 대상체에 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 신경퇴행성 질병 또는 내인성 도파민 수준이 감소되는 질병을 앓고 있는 대상체에서 운동 기능을 개선시키고 운동이상증을 감소시키는 방법에 관한 것이다. 일부 구현예에서, 신경퇴행성 질병 또는 내인성 도파민 수준이 감소되는 질병은 파킨슨병이다.

일부 양태에서, 본 발명의 개시는 (a) (i) 티로신 하이드록실라제(TH)를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열, (ii) GTP-사이클로하이드롤라제 I(CH1)을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열, (iii) 방향족 아미노산 도파 데카르복실라제(AADC)를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열, 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는 핵산 작제물을 포함하는 바이러스 백터; 및 (b) 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 치료적 유효량의 조성물을 대상체에 투여하는 것을 포함하는, 파킨슨병을 앓고 있는 대상체에서 운동 기능을 치료하거나 개선시키고, 운동이상증을 감소시키는 방법에 관한 것이다.

일부 구현예에서, 대상체는 L-DOPA 또는 레보도파 등가 용량(LED) 요법을 받고 있다. 일부 구현예에서, 대상체의 일일 L-DOPA 또는 LED 요법 용량은 투여 전 대상체의 L-DOPA 또는 LED 요법 용량에 비해 핵산 작제물의 투여 후 3개월 내에 감소된다. 일부 구현예에서, 평균 일일 L-DOPA 또는 LED 요법 용량은 투여 3개월 후 기준선으로부터 적어도 10%, 적어도 12%, 적어도 14%, 적어도 15%, 적어도 16%, 적어도 17%, 적어도 18%, 적어도 19%, 또는 적어도 20%만큼 감소된다.

일부 구현예에서, 바이러스 백터는 1×10^6 TU/대상체 내지 5×10^8 TU/대상체의 표적 용량으로 투여된다. 일부 구현예에서, 표적 용량은 약 4×10^6 TU/대상체 내지 8×10^6 TU/대상체; 8×10^6 TU/대상체 내지 4×10^7 TU/대상체; 또는 1×10^7 TU/대상체 내지 5×10^8 TU/대상체이다.

일부 구현예에서, 투여는 1회 투여이다. 일부 구현예에서, 투여는 너로의 투여이다. 일부 구현예에서, 투여는 주입에 의한 조가비핵으로의 투여이다.

일부 구현예에서, 핵산 작제물은 (i) 티로신 하이드록실라제(TH)를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열, (ii) GTP-사이클로하이드롤라제 I(CH1)을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열 및 (iii) 방향족 아미노산 도파 데카르복실라제(AADC)를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하며, TH를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 이들이 융합 단백질 TH-CH1을 인코딩하도록 CH1을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 연결된다.

일부 구현예에서, 핵산 작제물은 하기를 포함한다:

TH-L-CH1-IRES-AADC;

AADC-L-TH-L-CH1;

TH-L-CH1-L-AADC;

또는 TH-L-CH1-L-AADC;

여기서, L은 링커 인코딩 서열이고, IRES는 내부 리보솜 진입 부위이고, P는 프로모터이다.

일부 구현예에서, 핵산 작제물은 TH-L-CH1-IRES-AADC를 포함한다.

일부 구현예에서, 핵산 작제물은 (i) 티로신 하이드록실라제(TH)를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열, (ii) GTP-사이클로하이드롤라제 I(CH1)을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열 및 (iii) 방향족 아미노산 도파 데카르복실라제(AADC)를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하며, 여기서 TH를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 이들이 융합 단백질 TH-CH1을 인코딩하도록 CH1을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 연결되고, 작제물은 TH-L-CH1-IRES-AADC

또는 TH-L-CH1-P-AADC를 포함하고, L은 링커 인코딩 서열이고, IRES는 내부 리보솜 진입 부위이고, P는 프로모터이다.

일부 구현예에서, 링커(L)는 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:3로 제시된 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 작제물은 항시성 프로모터, 조직 특이적 프로모터 또는 이들의 조합으로부터 선택된 프로모터(P)를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 프로모터는 CMV 프로모터, 포스포글리세레이트 키나제 프로모터 또는 티미딘 키나제 프로모터이다.

일부 구현예에서, 바이러스 벡터는 렌티바이러스 벡터 또는 아데노-관련 바이러스 벡터이다. 일부 구현예에서, 바이러스 벡터는 렌티바이러스 벡터이다. 일부 구현예에서, 바이러스 벡터는 바이러스 입자이다. 일부 구현예에서, 바이러스 입자는 EIAV 벡터 입자이고, 이는 VSV-G로 슈도타이핑된다.

일부 구현예에서, 바이러스 벡터는 약학적으로 허용되는 부형제 및/또는 희석제를 포함하는 약학적 조성물로 제형화된다.

일부 구현예에서, 대상체의 운동 기능은 기준선과 비교하여 투여 3개월 후 UPDRS-III(운동) OFF 스코어에서 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45% 또는 적어도 50% 증가에 의해 제시된 바와 같이 개선된다.

일부 구현예에서, 대상체에서의 운동이상증은 다음 중 하나 이상에 의해 제시된 바와 같이 대상체에서 감소된다: (a) 기준선과 비교하여 투여 3개월 후 성가신 운동이상증을 갖는 하우스 다이어리(Hauser diary) ON 시간에서의 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85% 또는 적어도 90% 감소; (b) 기준선과 비교하여 투여 3개월 후 UPDRS-IV 스코어에서의 적어도 50% 감소, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 74% 또는 적어도 75% 감소, 및 (c) 기준선과 비교하여 투여 3개월 후 러시 이상운동증(Rush Dyskinesia) 스코어에서의 적어도 10%, 적어도 12%, 적어도 15%, 적어도 18%, 적어도 20% 또는 적어도 25% 개선.

일부 구현예에서, 상기 방법은 진전, 운동완만증, 경직된 근육, 손상된 자세 및/또는 균형, 자동 움직임의 상실, 말하기 어려움, 미세 운동 기술의 어려움, 또는 이들의 임의의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 대상체에서의 하나 이상의 증상을 추가로 개선시킨다.

일부 구현예에서, 투여 후 3개월 이내에, 대상체는 투여 전 대상체의 기준선에 비해 투여 후 개선된 운동 기능, 감소된 운동이상증 및 감소된 L-DOPA 또는 LED 요법 용량을 갖는다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0011] 정의
- [0012] 하기 정의 및 방법은 본 발명을 더 잘 정의하고, 본 발명의 실시에서 당업자를 안내하기 위해 제공된다. 본원 및 첨부된 청구항에서 사용되는 바와 같은 단수 형태는 문맥이 명백히 달리 지시하지 않는 한 복수의 지시대상을 포함하는 것이 인지되어야 한다. 따라서, 예를 들어, "효소"에 대한 언급은 복수의 효소를 포함한다.
- [0013] 본원에서 사용되는 바와 같이, 일부 구현예에서, 용어 "벡터"는 한 세포에서 또 다른 세포로 핵산(예를 들어, DNA) 세그먼트(들)를 전달하는 핵산 분자와 관련하여 사용된다. 용어 "비히클" 또는 "전달 벡터"는 때때로 "벡터"와 상호 교환적으로 사용된다. 임의의 형태의 비히클 또는 벡터가 이러한 정의 내에 포함되도록 의도된다. 예를 들어, 벡터(예를 들어, 바이러스 벡터)는 바이러스 입자, 플라스미드, 전위유전단위 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0014] 제1 핵산 서열은 제1 핵산 서열이 제2 핵산 서열과 기능적 관계에 놓인 경우 제2 핵산 서열과 "작동 가능하게 연결"된다. 예를 들어, 프로모터가 코딩 서열의 전사 또는 발현에 영향을 미치는 경우 프로모터는 코딩 서열에 작동 가능하게 연결된다. 일반적으로, 작동 가능하게 연결된 DNA 서열은 연속적이며, 필요한 경우, 동일한 오픈 리딩 프레임에서 2개의 단백질 코딩 영역을 연결한다.
- [0015] 용어 "돌연변이체"는 야생형 서열로부터의 하나 이상의 아미노산 변화를 포함하는 효소를 포함한다. 예를 들어, 돌연변이체는 하나 이상의 아미노산 첨가, 결실 또는 치환을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 돌연변이체는 인위적으로 생성될 수 있다(예를 들어, 부위 특이적 돌연변이유발에 의함).
- [0016] 여기서, 용어 "동족체"는 도파민 합성 효소와 특정 상동성을 갖는 단백질을 의미한다. 여기서, 용어 "상동성"은

"동일성"과 같을 수 있다.

- [0017] 용어 "대상체"는 "환자"와 상호교환적으로 사용될 수 있다. 본 발명의 개시의 대상체는 인간 및 동물(예를 들어, 돼지, 소, 개, 말, 당나귀, 마우스, 햄스터, 원숭이) 대상체를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0018] 핵산 작제물
- [0019] 본 발명의 개시의 특정 양태는 각각이 효소를 인코딩하는 1, 2 또는 3개의 관심 뉴클레오티드 서열(NOI)을 포함하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물에 관한 것이다. 핵산 작제물은, 예를 들어, 합성 RNA/DNA 서열, 재조합 RNA/DNA 서열(즉, 재조합 DNA 기술을 사용하여 제조됨), cDNA 서열 또는 부분적 유전체 DNA 서열 및 이들의 조합과 같은 DNA 또는 RNA 서열일 수 있다. 본 발명의 개시는 또한 본 발명의 개시의 핵산 작제물을 포함하는 플라스미드와 같은 벡터를 포함한다.
- [0020] 일부 구현예에서, 핵산 작제물의 NOI는 도파민 합성에 관여하는 효소를 인코딩한다. 티로신을 레보도파(L-dopa)로 전환시키는 효소 티로신 하이드록실라제(TH) 및 사이클로하이드롤라제 1(CH1); 및 L-dopa를 도파민으로 전환시키는 방향족 L-아미노산 데카르복실라제(AADC)를 포함하는 내인성 도파민 합성을 제시하는 개략도가 도 1에 제시되어 있다. 일부 구현예에서, NOI는 티로신 하이드록실라제(TH), GTP-사이클로하이드롤라제 I(CH1), 방향족 아미노산 도파 데카르복실라제(AADC), 또는 이들의 기능적 단편을 인코딩한다. 일부 구현예에서, 핵산 작제물은 티로신 하이드록실라제(TH), GTP-사이클로하이드롤라제 I(CH1), 방향족 아미노산 도파 데카르복실라제(AADC), 또는 이들의 임의의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 효소를 인코딩하는 핵산을 포함한다. 3개 모두의 전장 효소의 서열이 이용 가능하다: 각각 등록 번호 X05290, U19523 및 M76180.
- [0021] 일부 구현예에서, NOI는 도파민 합성 효소의 전부 또는 일부를 인코딩할 수 있다. 예를 들어, NOI는 효소 활성을 유지하는 트렁케이션된 버전의 단백질을 인코딩할 수 있다. 전장 TH는 촉매 도메인, 사랑체화 도메인 및 N-말단 조절 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 개시의 작제물의 TH-인코딩 NOI는 촉매 및 사랑체화 도메인을 함유하지만 기능적 N-말단 조절 도메인이 결여된 트렁케이션된 TH를 인코딩한다. 일부 구현예에서, 트렁케이션된 TH는 전장 효소의 활성을 제한할 수 있는 도파민에 의한 피드백 억제를 피한다.
- [0022] 일부 구현예에서, NOI는 도파민 합성 효소의 돌연변이체, 동족체 또는 변이체를 인코딩할 수 있다.
- [0023] 일부 구현예에서, 상동성 서열은 아미노산 또는 뉴클레오티드 수준에서 야생형 또는 참조 서열과 적어도 75%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일할 수 있다. 일부 구현예에서, 동족체는 야생형 또는 참조 서열과 동일한 활성 부위 등을 포함하거나 인코딩할 것이다. 동일성 비교는, 예를 들어, BLAST 소프트웨어를 사용하여 수행될 수 있다.
- [0024] 일부 구현예에서, NOI 중 하나 이상이 코돈 최적화된다. 일부 구현예에서, NOI 중 하나 이상이 코돈 최적화되지 않는다.
- [0025] 링커
- [0026] 본 발명의 개시의 특정 양태는 도파민 합성 효소를 인코딩하는 3개의 NOI를 포함하는 본 발명의 개시의 핵산 작제물을 포함하는, 예를 들어, 본 발명의 개시의 렌티바이러스 벡터 유전체를 포함하는 바이러스 벡터에 관한 것이다. 일부 구현예에서, 적어도 2개의 NOI는 링커-인코딩 서열(L)에 의해 연결되어, 유전체가 효소 아미노산 서열을 포함하는 융합 단백질을 인코딩한다.
- [0027] 일부 구현예에서, 적합한 링커는 글리신-세린 반복과 같은 아미노산 반복을 포함할 수 있다. 링커의 목적은 효소의 정확한 형성 및/또는 기능을 허용하는 것이다. 이는 상기 목적을 달성하기에 충분히 유연하고 충분히 길어야 한다. NOI는 상이한 효소를 인코딩할 수 있으므로, 링커는 둘 모두의 효소의 기능을 허용한다. 가요성 링커의 코딩 서열은 이것이 번역 일시 중지를 촉진하고, 따라서 NOI의 단백질 생성물의 독립적인 폴딩을 촉진하도록 선택될 수 있다.
- [0028] 일부 구현예에서, 적합한 링커는 하기에 개시된 링커를 포함하지만, 본 발명의 개시는 이들 특정 링커로 제한되지 않는다.
- [0029] 1. 문헌[Somia et al., 1993 PNAS 90, 7889]에 기재된 바와 같은 (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₃ (SEQ ID NO:2).
- [0030] 2. (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₅ (SEQ ID NO: 4).
- [0031] 3. 효소의 HSF-1으로부터의 (Asn-Phe-Ile-Arg-Gly-Arg-Glu-Asp-Leu-Leu-Glu-Lys-Ile-Ile-Arg-Gln-Lys-Gl- y-

Ser-Ser-Asn) (SEQ ID NO:5), 문헌[Wiederrecht et al., 1988 Cell 54, 841] 참조.

- [0032] 4. POU-특이적 OCT-1으로부터의 (Asn-Leu-Ser-Ser-Asp-Ser-Ser-Leu-Ser-Ser-Pro-Ser-Ala-Leu-Asn-Ser-Pro-Gly-Ile-Glu-Gly-Leu-Ser) (SEQ ID NO:6), 문헌[Dekker et al., 1993 Nature 362, 852 및 Sturm et al., 1988 Genes and Dev. 2, 1582] 참조.
- [0033] 5. RGD-함유 라미닌(Laminin) 펩티드로부터의 (Gln-Gly-Ala-Thr-Phe-Ala-Leu-Arg-Gly-Asp-Asn-Pro-GlnGly) (SEQ ID NO: 7), 문헌[Aumailly et al., 1990 FEES Lett.262, 82] 참조.
- [0034] 6. LDV-함유 링커로부터의 (Ser-Gly-Gly-Gly-Glu-Ile-Leu-Asp-Val-Pro-Ser-Thr-Gly-GlySer-Ser-Pro-Gly) (SEQ ID NO: 8), 문헌[Wickham et al., Gene Therapy 1995 2, 750] 참조.
- [0035] 일부 구현예에서, 다음의 GS15 가요성 링커가 사용될 수 있다: (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₃. (SEQ ID NO: 2). GS5, GS15 및 GS30 링커가 또한 적합할 수 있다.
- [0036] 일부 구현예에서, 핵산 작제물은 2개의 링커를 포함하며, 예를 들어, 3개 모두의 효소가 하나의 융합 단백질로서 발현되도록 연결되고, 2개의 동일하지 않은 링커-인코딩 서열이 선택될 수 있고, 대안적으로 링커 서열이 동일할 수 있다. 링커 서열은 아미노산 수준에서 동일할 수 있지만, 이들의 인코딩 핵산 서열은 유전 코드의 축퇴성으로 인해 상이할 수 있다.
- [0037] 일부 구현예에서, TH 및 CH1 유전자 사이의 변형된 GS15 링커-인코딩 서열(GS15mod)이 사용된다. 일부 구현예에서, 본 발명의 개시의 뉴클레오티드 서열에 사용되는 링커-인코딩 서열은 인간 사용에 코돈 최적화되지 않은 GS5, GS15 및 GS30을 인코딩하는 것과 같은 링커-인코딩 서열의 변형된 형태일 수 있다.
- [0038] 일부 구현예에서, 링커-인코딩 서열은 다음 서열을 포함할 수 있다: GGAGGTGGCGGGTCCGGGGCGGGGTAGCGGTGGCGGGGCTCC (SEQ ID No. 1).
- [0039] 일부 구현예에서, 뉴클레오티드 서열은 SEQ ID NO. 2로 제시된 아미노산 서열을 갖는 링커를 인코딩할 수 있고, 뉴클레오티드 서열은 SEQ ID NO. 3에 제시된 서열을 포함할 수 있다. (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₃ (SEQ ID No. 2); GGGGAGCGGTAGCGGGCGAGGGGCTCCGGCGGAGCGGGGAGC (SEQ ID No. 3).
- [0040] 일부 구현예에서, 작제물은 SEQ ID No. 1로 제시된 서열을 포함할 수 있다.
- [0041] IRES
- [0042] mRNA에서 오픈 리딩 프레임 사이에 위치하는 경우, IRES는 IRES 요소에서 리보솜의 진입을 촉진하고 이어서 번역의 다운스트림 개시를 촉진함으로써 다운스트림 오픈 리딩 프레임의 번역을 허용한다. 레트로바이러스 벡터에서 IRES 요소의 사용이 조사되었다(예를 들어, WO 93/0314호 참조). 렌티바이러스 벡터에서 사용하기에 적합한 IRES 서열은 WO 02/29065호에 기재되어 있다. 일부 구현예에서, 본 발명의 개시의 핵산 작제물은 IRES를 포함한다. 일부 구현예에서, 핵산 작제물은 TH_L-CH1-IRES-AADC를 포함한다.
- [0043] 프로모터
- [0044] 일부 구현예에서, IRES는, 예를 들어, AADC 유전자의 발현을 제어하기 위해 프로모터로 대체될 수 있다. AADC 발현이 IRES의 제어 하에 있는 구성에서, AADC 수준은 도파민 생성을 제한할 수 있다.
- [0045] NOI의 발현은 제어 서열, 예를 들어, 프로모터/인핸서 및 다른 발현 조절 신호를 사용하여 제어될 수 있다. 원핵생물 프로모터 및 진핵생물 세포에서 기능하는 프로모터가 사용될 수 있다. 조직 특이적 또는 자극 특이적 프로모터가 사용될 수 있다. 2개 이상의 상이한 프로모터로부터의 서열 요소를 포함하는 키메라 프로모터가 또한 사용될 수 있다.
- [0046] 일부 구현예에서, 적합한 촉진 서열은 폴리오마 바이러스, 아데노바이러스, 조류폭스 바이러스, 소 유두종 바이러스, 조류 육종 바이러스, 사이토메갈로바이러스(CMV), 레트로바이러스 및 원숭이 바이러스 40(SV40)과 같은 바이러스의 유전체, 또는 액틴 프로모터 또는 리보솜 단백질 프로모터와 같은 포유동물 세포 프로모터로부터 유래된 프로모터를 포함하는 강한 프로모터이다. 인핸서 서열을 벡터에 삽입함으로써 유전자의 전사가 추가로 증가될 수 있다. 인핸서는 상대적으로 배향 및 위치 독립적이나; 진핵생물 세포 바이러스로부터의 인핸서, 예를 들어, 복제 기점의 후기 측(bp 100-270)에 있는 SV40 인핸서 및 CMV 초기 프로모터 인핸서를 사용할 수 있다. 인핸서는 프로모터의 5' 또는 3' 위치에서 벡터에 스플라이싱될 수 있지만, 바람직하게는 프로모터로부터 5' 부

위에 위치한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 개시의 핵산 작제물은 CMV 프로모터를 포함한다.

- [0047] 프로모터는 적합한 숙주에서 발현을 보장하거나 증가시키는 특징을 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 특징은 보존된 영역, 예를 들어, 프리브나우 박스(Pribnow Box) 또는 TATA 박스일 수 있다. 프로모터는 뉴클레오티드 서열의 발현 수준에 영향을 미치는(예를 들어, 유지시키고, 향상시키고, 감소시키는) 다른 서열을 함유할 수도 있다. 적합한 다른 서열은 Sh1-인트론 또는 ADH 인트론을 포함한다. 다른 서열은 온도, 화학적, 빛 또는 스트레스 유도성 요소와 같은 유도성 요소를 포함한다. 또한, 전사 또는 번역을 향상시키기 위한 적합한 요소가 존재할 수 있다.
- [0048] 일부 구현예에서, 프로모터는, 예를 들어, 항시성이거나 조직 특이적일 수 있다.
- [0049] 항시성 프로모터
- [0050] 일부 예에서, 적합한 항시성 프로모터는 CMV 프로모터, RSV 프로모터, 포스포글리세레이트 키나제(PGK) 및 티미딘 키나제(TK) 프로모터를 포함한다.
- [0051] 조직 특이적 프로모터
- [0052] 일부 예에서, 적합한 조직 특이적 프로모터는 시냅신 1, 에놀라제, α-칼슘/칼모둘린-의존성 단백질 키나제 II 및 GFAP를 포함한다.
- [0053] 융합체
- [0054] 특정 구현예에서, 바이러스 벡터, 예를 들어, 렌티바이러스 벡터는 TH, CHI 및/또는 AADC를 인코딩하는 NOI를 포함하는 본 발명의 개시의 핵산 작제물을 포함한다. 3개 중 2개 또는 3개 모두의 효소는, 예를 들어, 가요성 링커를 사용하여 융합될 수 있다. 2개의 효소가 융합되는 경우, 제3 효소를 인코딩하는 NOI는, 예를 들어, IRES에 의해 융합 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동 가능하게 연결될 수 있다. IRES는 융합 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 5' 또는 3'에 위치할 수 있다. 대안적으로, 제3 효소를 인코딩하는 NOI는 프로모터에 작동 가능하게 연결될 수 있다.
- [0055] 일부 구현예에서,
- [0056] CH1에 연결된 TH를 그 순서로 갖는(즉, TH-CH1 융합 단백질을 형성하기 위함) 작제물은 높은 절대 수준의 카테콜아민 생성을 제공하고;
- [0057] 어느 순서로든 연결된 AADC 및 TH를 갖는(즉, AADC-TH 또는 TH-AADC 융합 단백질을 형성하기 위함) 작제물은 L-DOPA의 도파민으로의 매우 효율적인 전환을 제공한다.
- [0058] 일부 구현예에서, 본 발명의 개시의 핵산 작제물은 CT가 아닌 TC 순서로 TH 및 CH1의 융합체를 인코딩할 수 있다.
- [0059] 일부 구현예에서, 핵산 작제물은 다음으로부터 선택될 수 있다:
- [0060] TH_L-CH1_L-IRES-AADC;
- [0061] AADC_L-TH_L-CH1;
- [0062] TH_L-CH1_L-AADC;
- [0063] TH_L-CH1_P-AADC;
- [0064] TH_L-AADC_L-IRES-CH1;
- [0065] AADC_L-TH_L-IRES-CH1; 및
- [0066] TH_L-AADC_L-CH1; 여기서,
- [0067] L은 링커-인코딩 서열이고,
- [0068] IRES는 내부 리보솜 진입 부위이고,
- [0069] P는 프로모터이다.

- [0070] 상기 언급된 바와 같이, 야생형 TH는 촉매 도메인, 사랑체화 도메인 및 N-말단 조절 도메인을 포함한다.
- [0071] 일부 구현예에서, TH-인코딩 NOI는 촉매 및 사랑체화 도메인을 함유하지만, 기능성 N-말단 조절 도메인이 결여된 트렁케이셔널 TH를 인코딩할 수 있다.
- [0072] 일부 구현예에서, TH의 트렁케이셔널 버전은 GS15 링커를 통해 CH1에 융합된다.
- [0073] 바이러스 벡터
- [0074] 일부 구현예에서, 본 발명의 개시는 본 발명의 개시에 따른 뉴클레오티드 작제물 서열을 포함하는 렌티바이러스 벡터 유전체 또는 아데노-관련 바이러스 벡터 유전체와 같은 바이러스 벡터 유전체의 사용에 관한 것이다. 본 발명의 개시는 또한 상기 유전체를 포함하는 바이러스 벡터 생성 시스템 및 벡터 입자를 제공한다.
- [0075] 일부 구현예에서, 본 발명의 개시의 바이러스 벡터는 임의의 적합한 바이러스로부터 유래되거나 유래될 수 있다. 일부 구현예에서, 재조합 바이러스 입자는 표적 세포를 관상 뉴클레오티드 서열(NOI)로 형질도입시킬 수 있다.
- [0076] 레트로바이러스 입자의 경우, 일단 세포 내에서 벡터 입자로부터의 RNA 유전체는 DNA로 역전사되고, 표적 세포의 유전체로 통합된다.
- [0077] 렌티바이러스 벡터
- [0078] 렌티바이러스는 더 큰 그룹의 레트로바이러스의 일부이다. 렌티바이러스의 상세한 목록은 문헌[Coffin et al. (1997) "Retroviruses" Cold Spring Harbor Laboratory Press Eds: J M Coffin, S M Hughes, H E Varmus pp 758-763]에서 발견될 수 있다. 요컨대, 렌티바이러스는 영장류 및 비-영장류 그룹으로 나뉠 수 있다. 영장류 렌티바이러스의 예는 후천성 면역결핍 증후군(AIDS)의 병원체인 인간 면역결핍 바이러스(HIV), 및 원숭이 면역결핍 바이러스(SIV)를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 비-영장류 렌티바이러스 그룹은 프로토타입 "슬로우 바이러스" 비스나/매디 바이러스(VMV), 뿐만 아니라 관련 염소 관절염-뇌염 바이러스(CAEV), 말 감염성 빈혈 바이러스(EIAV), 고양이 면역결핍 바이러스(FIV) 및 소 면역결핍 바이러스(BIV)를 포함한다.
- [0079] 렌티바이러스는 렌티바이러스가 분열 및 비-분열 세포 둘 모두를 감염시키는 능력을 갖는다는 점에서 레트로바이러스 패밀리의 다른 구성원과 상이하다(Lewis et al (1992) EMBO J 11(8):3053-3058) 및 Lewis and Emerman (1994) J Virol 68 (1):510-516). 대조적으로, 다른 레트로바이러스, 예를 들어, MLV는 분열하지 않는 세포 또는 천천히 분열하는 세포, 예를 들어, 근육, 눈, 뇌, 폐 및 간 조직을 구성하는 세포를 감염시킬 수 없다.
- [0080] 말 감염성 빈혈 바이러스(EIAV)는 레트로바이러스 패밀리의 렌티바이러스 속의 구성원이다. 야생형 EIAV 바이러스는 핵단백질 코어를 함유하는 구형 외피보유 비리온으로 패키징된 이량체 RNA 유전체(단일 가닥, 양성 극성)를 갖는다. 야생형 EIAV 유전체의 복제는 역전사 및 숙주 세포 유전체로의 통합을 통해 발생한다. 유전체는 구조 단백질 gag, pol 및 env를 인코딩하는 3개의 유전자, 및 통합된 바이러스 유전체의 각각의 말단에서 긴 말단 반복(LTR)을 함유한다. 모든 레트로바이러스에 공통인 gag, pol 및 env 서열 외에, EIAV 유전체는 여러 개의 짧은 오픈 리딩 프레임(ORF)을 함유한다. 이들 짧은 ORF는 다중 스플라이싱된 mRNA로부터 번역된다. ORF S1은 전사 트랜스활성화제(transactivator) tat을 인코딩한다. ORF S2는 기능이 공지되지 않은 단백질을 인코딩하고, ORF S3는 rev 단백질을 인코딩하는 것으로 보인다. gag, pol 및 env의 효율적인 발현을 위해서는 rev가 필요한 것으로 생각된다. Rev는 env 유전자 내의 EIAV에 위치한 rev-반응성 요소(RRE)로 공지된 RNA 서열과 상호작용함으로써 전사 후 작용한다.
- [0081] EIAV의 야생형 유전체는 또한 R 서열(유전체의 각각의 말단의 짧은 반복); U5 서열(R 서열 바로 뒤의 고유한 서열 요소); U3 서열(구조 단백질의 다운스트림에 위치한 독특한 서열 요소); 통합된 프로바이러스의 전사 개시를 제어하는 프로모터 요소; 패키징 서열(본원에서 패키징 부위 또는 패키징 신호로 상호 교환적으로 지칭됨); 및 5'-스플라이스 공여체 부위를 포함하는 여러 시스-작용 서열을 함유한다.
- [0082] 본원에서 사용되는 렌티바이러스 벡터는 렌티바이러스로부터 유래 가능한 적어도 하나의 구성요소 부분을 포함하는 벡터, 예를 들어, 전달 벡터일 수 있다. 바람직하게는, 상기 구성요소 부분은 벡터가 세포를 감염시키거나, 유전자를 발현하거나, 복제되는 생물학적 메커니즘에 관여한다.
- [0083] 레트로바이러스 및 렌티바이러스 유전체의 기본 구조는 5' LTR 및 3' LTR과 같은 많은 공통 특징을 공유하며, 그 사이 또는 그 안에 유전체가 패키징되는 것을 가능케 하는 패키징 신호, 프라이머 결합 부위, 숙주 세포 유전체로의 통합을 가능케 하는 부착 부위 및 패키징 구성요소를 인코딩하는 gag, pol 및 env 유전자가 위치되며,

이들은 바이러스 입자의 조립에 필요한 폴리펩티드이다. 렌티바이러스는 감염된 표적 세포의 핵으로부터 세포질로 통합된 프로바이러스의 RNA 전사물의 효율적인 외수송을 가능케 하는 HIV 내의 rev 및 RRE 서열과 같은 추가 특징을 갖는다.

- [0084] 프로바이러스에서, 바이러스 유전자는 양 말단에서 긴 말단 반복(LTR)으로 언급되는 영역에 축적되어 있다. LTR은 인핸서-프로모터 서열 및 아데닐중합체형성 신호로서 작용하여 바이러스 유전자의 발현을 제어함으로써 전사를 담당한다.
- [0085] LTR 자체는 U3, R 및 U5로 언급되는 3개의 요소로 나뉘어질 수 있는 동일한 서열이다. U3은 RNA의 3' 말단에 독특한 서열로부터 유래된다. R은 RNA의 양 말단에 반복된 서열로부터 유래되며, U5는 RNA의 5' 말단에 독특한 서열로부터 유래된다. 3개의 요소의 크기는 상이한 바이러스간에 상당히 다를 수 있다.
- [0086] 복제 결함이 있는 렌티바이러스 벡터 유전체에서, gag, pol 및 env는 부재하거나, 기능적이지 않을 수 있다.
- [0087] 본 발명의 개시의 전형적인 렌티바이러스 벡터에서, 복제에 필수적인 하나 이상의 단백질 코딩 영역의 적어도 일부가 바이러스로부터 제거될 수 있다. 이는 바이러스 벡터를 복제 결함성으로 만든다. 바이러스 유전체의 일부는 또한 표적 비-분열 숙주 세포를 형질도입하고/하거나 이의 유전체를 숙주 유전체로 통합할 수 있는 NOI를 포함하는 벡터를 생성시키기 위해 NOI로 대체될 수 있다.
- [0088] 일 구현예에서, 렌티바이러스 벡터는 전체내용이 참조로서 본원에 포함되는 WO 2007/071994호에 개시된 것과 같은 비-통합 벡터이다.
- [0089] 일부 구현예에서, 벡터는 바이러스 RNA가 없거나 결여된 서열을 전달하는 능력을 갖는다. 추가 구현예에서, 전달될 RNA에 위치한 이중성 결합 도메인(gag에 이중성) 및 gag 또는 pol 상의 동족 결합 도메인은 전달될 RNA의 패키징을 보장하기 위해 사용될 수 있다. 이들 벡터 둘 모두는 WO 2007/072056호에 기재되어 있다.
- [0090] 렌티바이러스 벡터는 "비-영장류" 벡터일 수 있고, 즉, 주로 영장류, 특히 인간을 감염시키지 않는 바이러스로부터 유래될 수 있다.
- [0091] 일부 구현예에서, 바이러스 벡터는 EIAV로부터 유래될 수 있다. gag, pol 및 env 유전자 외에, EIAV는 tat, rev 및 S2의 3개의 다른 유전자를 인코딩한다. Tat는 바이러스 LTR의 전사 활성제로 작용하고(Derse and Newbold (1993) Virology 194(2):530-536 및 Maury et al (1994) Virology 200(2):632-642), Rev는 rev-반응 요소(RRE)를 통해 바이러스 유전자의 발현을 조절하고 조정한다(Martarano et al. (1994) J Virol 68(5):3102-3111). 이들 2개의 단백질의 작용 메커니즘은 영장류 바이러스의 유사한 메커니즘과 대체로 유사한 것으로 생각된다(Martarano et al. (1994) J Virol 68(5):3102-3111). S2의 기능은 공지되어 있지 않다. 또한, 막형단 단백질의 시작에서 env 코딩 서열에 스플라이싱된 tat의 첫 번째 엑손에 의해 인코딩되는 EIAV 단백질 Ttm이 확인되었다(Beisel et al. (1993) J Virol 67(2):832-842).
- [0092] 용어 "재조합 렌티바이러스 벡터"는 패키징 구성요소의 존재하에서 RNA 유전체가 표적 세포를 감염시킬 수 있는 바이러스 입자로 패키징되도록 하는 충분한 렌티바이러스 유전 정보를 갖는 벡터를 지칭한다. 표적 세포의 감염은 역전사 및 표적 세포 유전체로의 통합을 포함할 수 있다. 재조합 렌티바이러스 벡터는 벡터에 의해 표적 세포로 전달될 비-바이러스 코딩 서열을 갖는다. 재조합 렌티바이러스 벡터는 최종 표적 세포 내에서 감염성 렌티바이러스 입자를 생성하도록 하는 독립적인 복제가 불가능하다. 일반적으로, 재조합 렌티바이러스 벡터는 기능성 gag-pol 및/또는 env 유전자 및/또는 복제에 필수적인 다른 유전자가 결여되어 있다. 본 발명의 개시의 벡터는 스플릿-인트론 벡터로 구성될 수 있다. 스플릿 인트론 벡터는 PCT 특허 출원 WO 99/15683호에 기재되어 있다.
- [0093] 일부 구현예에서, 본 발명의 개시의 재조합 렌티바이러스 벡터는 최소 바이러스 유전체를 가질 수 있다.
- [0094] 본원에서 사용되는 용어 "최소 바이러스 유전체"는 관심 뉴클레오티드 서열로 표적 숙주 세포를 감염시키고, 형질도입시키고, 관심 뉴클레오티드 서열을 표적 숙주 세포에 전달하는 데 필요한 기능을 제공하기 위해 비-필수 요소를 제거하고 필수 요소를 보유하도록 바이러스 벡터가 조작되었음을 의미한다. 이러한 전략의 추가 세부사항은 WO 98/17815호에서 발견될 수 있다.
- [0095] 본 발명의 개시의 일부 양태에서, 벡터는 자가-불활성화 벡터이다. 일부 양태에서, 자가-불활성화 레트로바이러스 벡터는 3' LTR의 U3 영역에서 전사 인핸서 또는 인핸서 및 프로모터를 결실시킴으로써 작제되었다. 한 라운드의 벡터 역전사 및 통합 후, 이들 변화는 5' 및 3' LTR 둘 모두에 카피되어 전사적으로 불활성인 프로바이러스를 생성한다(Yu et al (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. 83:3194-3198; Dougherty and Temin et al (1987)

Proc. Natl. Acad. Sci. 84:1197-1201; Hawley (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. 84:2406-2410 및 Yee et al (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. 91:9564-9568). 그러나, 상기 벡터에서 LTR 내부의 임의의 프로모터(들)은 여전히 전사적으로 활성일 것이다. 이러한 전략은 내부적으로 배치된 유전자로부터의 전사에 대한 바이러스 LTR에서 인핸서 및 프로모터의 효과를 제거하기 위해 사용되었다. 상기 효과는 증가된 전사(Jolly et al (1983) Nucleic Acids Res. 11:1855-1872) 또는 전사 억제(Emerman and Temin (1984) Cell 39:449-467)를 포함한다. 이러한 전략은 또한 3' LTR에서 유전체 DNA로의 다운스트림 전사를 제거하는 데 사용될 수 있다(Herman and Coffin (1987) Science 236:845-848). 이는 내인성 종양유전자의 외래성 활성화를 방지하는 것이 매우 중요한 인간 유전자 요법에서 특히 우려된다.

[0096] 그러나, 숙주 세포/패키징 세포 내에서 바이러스 유전체를 생성하는 데 사용되는 플라스미드 벡터는 또한 숙주 세포/패키징 세포에서 유전체의 전사를 지시하기 위해 렌티바이러스 유전체에 작동 가능하게 연결된 전사 조절 제어 서열을 포함할 것이다. 이들 조절 서열은 전사된 렌티바이러스 서열, 즉, 5' U3 영역과 관련된 천연 서열일 수 있거나, 이들은 또 다른 바이러스 프로모터, 예를 들어, CMV 프로모터와 같은 이종성 프로모터일 수 있다. 일부 렌티바이러스 유전체는 효율적인 바이러스 생성을 위해 추가 서열을 필요로 한다. 예를 들어, HIV의 경우, rev 및 RRE 서열이 바람직하게는 포함된다. 그러나, rev 및 RRE에 대한 요구사항은 gag-pol의 코돈 최적화(WO 01/79518호에 기재된 바와 같음) 및/또는 LTR의 다운스트림 및 내부 프로모터의 업스트림에서의 오픈 리딩 프레임의 포함(WO 03/064665호에 기재된 바와 같음)에 의해 감소되거나 제거될 수 있으며, 예를 들어, neo가 본원에 개시된 특정 작제물에서 사용되었지만, 당업자는 임의의 적합한 오픈 리딩 프레임을 사용할 수 있다. rev/RRE 시스템과 동일한 기능을 수행하는 대안적 서열이 또한 공지되어 있다. 예를 들어, rev/RRE 시스템의 기능적 유사체는 Mason Pfizer 원숭이 바이러스에서 발견된다. 이러한 요소는 구성성 트랜스포트 요소(constitutive transport element; CTE)로 공지되어 있으며, 유전체에서 RRE-유형 서열을 포함하며, 이는 감염된 세포의 인자와 상호작용하는 것으로 생각된다. 세포 인자는 rev 유사체로 생각될 수 있다. 따라서, CTE는 rev/RRE 시스템의 대안으로 사용될 수 있다. 공지되거나 이용 가능하게 되는 임의의 다른 기능적 등가물이 본 발명의 개시와 관련될 수 있다. 예를 들어, HTLV-1의 Rex 단백질이 HIV-1의 Rev 단백질을 기능적으로 대체할 수 있다는 것이 또한 공지되어 있다. Rev 및 Rex는 IRE-BP와 유사한 효과를 갖는 것으로도 공지되어 있다.

[0097] 본 발명의 개시에 따른 렌티바이러스 벡터는 바람직하게는 도파민 합성 경로에 관여하는 3개의 효소를 인코딩하는 말 감염성 빈혈 바이러스(EIAV)로부터 유래된 자가 불활성 최소 렌티바이러스 벡터를 포함할 수 있다. 상기 벡터에 의해 인코딩되는 단백질은 인간 티로신 하이드록실라제 유전자(TH의 피드백 조절에 관여하는 N-말단의 160개의 아미노산이 결여됨), 인간 방향족 L-아미노산 데카르복실라제(AADC), 및 인간 GTP-사이클로하이드롤라제 1(GTP-CH1) 유전자의 트렁케이션된 형태를 포함할 수 있다. 벡터는 (1) 본원에 기재된 바와 같은 벡터 유전체, (2) 합성 EIAV gag/pol 발현 벡터(pESGPK, WO 01/79518호 및 WO 05/29065호) 및 (3) VSV-G 외피 발현 벡터(pHGK)를 인코딩하는 3개의 플라스미드를 이용한 세포(예를 들어, HEK293T 세포)의 일시적 형질감염에 의해 생성될 수 있다.

[0098] 패키징 서열

[0099] "패키징 서열" 또는 "psi"로 상호교환적으로 지칭되는 용어 "패키징 신호"는 바이러스 입자 형성 동안 렌티바이러스 RNA 가닥의 캡슐화에 필요한 비-코딩 시스-작용 서열과 관련하여 사용된다. HIV-1에서, 이러한 서열은 주요 스플라이스 공여체 부위(SD)의 업스트림에서 적어도 gag 시작 코돈으로 연장되는 유전자좌에 매핑되었다.

[0100] 본원에서 사용되는 용어 "연장된 패키징 신호" 또는 "연장된 패키징 서열"은 gag 유전자로 추가로 연장된 psi 서열 주위의 서열의 사용을 지칭한다. 이들 추가 패키징 서열의 포함은 벡터 RNA의 바이러스 입자로의 삽입 효율을 증가시킬 수 있다.

[0101] 슈도타이핑(Pseudotyping)

[0102] 일부 구현예에서, 본 발명의 개시의 렌티바이러스 벡터는 슈도타이핑된다. 이와 관련하여, 슈도타이핑은 하나 이상의 장점을 부여할 수 있다. 예를 들어, 렌티바이러스 벡터의 경우, HIV 기반 벡터의 env 유전자 생성물은 이들 벡터를 CD4로 언급되는 단백질을 발현하는 세포만을 감염시키는 것으로 제한할 것이다. 그러나, 이들 벡터의 env 유전자가 다른 바이러스의 env 서열로 대체된 경우, 이들은 더 넓은 감염 스펙트럼을 가질 수 있다(Verma and Somia (1997) Nature 389(6648):239-242). 예를 들어, 밀러 등(Miller et al.)은 양쪽성 레트로바이러스 4070A로부터의 외피를 갖는 MoMLV 벡터를 슈도타이핑하였다(Mol. Cell. Biol. 5:431-437). 다른 이들은 VSV로부터의 당단백질을 사용하여 HIV 기반 렌티바이러스 벡터를 슈도타이핑하였다(Verma and Somia (1997) Nature 389(6648):239-242).

- [0103] 일부 구현예에서, Env 단백질은 돌연변이체 또는 조작된 Env 단백질과 같은 변형된 Env 단백질이다. 표적화 능력을 도입하거나 독성을 감소시키거나 또 다른 목적을 위해 변형이 이루어지거나 선택될 수 있다(Marin et al (1996) J Virol 70(5):2957-2962; Nilson et al (1996) Gene Ther 3(4):280-286; 및 Fielding et al (1998) Blood 91(5):1802-1809 및 여기에 인용된 참고문헌).
- [0104] 일부 구현예에서, 벡터는, 예를 들어, 광견병 G 단백질 또는 VSV-G 단백질의 적어도 일부를 인코딩하는 유전자로 슈도타이핑될 수 있다.
- [0105] VSV-G
- [0106] 일부 구현예에서, 소수포 구내염 바이러스(VSV)인 랍도바이러스의 외피 당단백질(G)은 렌티바이러스를 포함하는 특정 레트로바이러스를 슈도타이핑할 수 있는 것으로 밝혀진 외피 단백질이다.
- [0107] 임의의 레트로바이러스 외피 단백질의 부재하에서 MoMLV-기반 레트로바이러스 벡터를 슈도타이핑하는 이의 능력은 문헌[Emi et al. (1991) J. Virol. 65:1202-1207]에 의해 처음 제시되었다. WO 94/29444호에는 레트로바이러스 벡터가 VSV-G로 성공적으로 슈도타이핑될 수 있음이 교시되어 있다. 이들 슈도타이핑된 VSV-G 벡터는 광범위한 포유동물 세포를 형질도입시키는 데 사용될 수 있다. 보다 최근에, 문헌[Abe et al. (1998) J. Virol 72(8): 6356-6361]에는 비-감염성 레트로바이러스 입자가 VSV-G의 첨가에 의해 감염성이 될 수 있음이 교시되어 있다.
- [0108] 문헌[Burns et al (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:8033-8037]에서는 레트로바이러스 MLV를 VSV-G로 성공적으로 슈도타이핑하였고, 이는 이의 고유 형태의 MLV와 비교하여 변경된 숙주 범위를 갖는 벡터를 발생시켰다. VSV-G 슈도타이핑된 벡터는 포유동물 세포뿐만 아니라 어류, 파충류 및 곤충으로부터 유래된 세포주도 감염시키는 것으로 나타났다(Burns et al (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:8033-8037). 이들은 또한 다양한 세포주에 대해 전통적인 양쪽성 외피보다 더 효율적인 것으로 나타났다(Yee et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:9564-9568 및 Emi et al. (1991) J. Virol. 65:1202-1207). VSV-G 단백질은 또한 세포질 꼬리가 레트로바이러스 코어와 상호작용할 수 있기 때문에 특정 렌티바이러스 및 레트로바이러스를 슈도타이핑하는 데 사용될 수 있다.
- [0109] VSV-G 단백질과 같은 비-렌티바이러스 슈도타이핑 외피의 제공은 벡터 입자가 감염성의 손실 없이 고 역가로 농축될 수 있다는 이점을 제공한다(Akkina et al (1996) J. Virol. 70:2581-2585). 렌티바이러스 및 레트로바이러스 외피 단백질은 아마도 2개의 비-공유적으로 연결된 서브유닛으로 구성되기 때문에 초원심분리 동안 분명히 전단력을 견딜 수 없다. 서브유닛 사이의 상호작용은 원심분리에 의해 붕괴될 수 있다. 이에 비해, VSV 당단백질은 단일 단위로 구성된다. 따라서, VSV-G 단백질 슈도타이핑은 잠재적 이점을 제공할 수 있다.
- [0110] WO 00/52188호에는 막-관련 바이러스 외피 단백질로서 소포성 구내염 바이러스-G 단백질(VSV-G)을 갖는 안전한 생산자 세포주로부터의 슈도타이핑된 레트로바이러스 및 렌티바이러스 벡터의 생성이 기재되어 있으며, 이는 VSV-G 단백질에 대한 유전자 서열을 제공한다.
- [0111] 로스 리버 바이러스
- [0112] 로스 리버 바이러스 외피는 비-영장류 렌티바이러스 벡터(FIV)를 슈도타이핑하는 데 사용되었으며, 전신 투여 후에 주로 간을 형질도입하였다(Kang et al (2002) J Virol 76(18):9378-9388.). 효율성은 VSV-G 슈도타이핑된 벡터로 획득된 것보다 20배 더 큰 것으로 보고되었고, 간독성을 시사하는 간 효소의 혈청 수준에 의해 측정된 바와 같은 더 적은 세포독성을 유발하였다.
- [0113] 로스 리버 바이러스(RRV)는 호주의 열대 및 온대 지역에서 풍토성 및 전염성 있는 모기에 의해 전파되는 알파바이러스이다. 온대 해안 지역의 정상 인구에서 항체 비율은 낮은 경향이 있지만(6% 내지 15%), 머레이 밸리 리버 시스템(Murray Valley River system)의 평원에서 혈청유병률은 27 내지 37%에 이른다. 1979년부터 1980년까지 로스 리버 바이러스는 태평양 제도에서 전염병이 되었다. 상기 질병은 인간 사이에 전염되지 않고 결코 치명적이지 않으며, 첫 번째 증상은 약 절반의 환자에서 피로 및 무기력을 동반한 관절통이다(Fields Virology Fifth Edition (2007) Eds. Knipe and Howley. Lippincott Williams and Wilkins).
- [0114] 배칼로바이러스 GP64
- [0115] 배칼로바이러스 GP64 단백질은 임상 및 상업적 적용에 필요한 고-역가 바이러스의 대규모 생산에 사용되는 바이러스 벡터에 대해 VSV-G에 대한 매력적인 대안인 것으로 나타났다(Kumar M, Bradow B P, Zimmerberg J (2003) Hum. Gene Ther. 14(1):67-77). VSV-G-슈도타이핑된 벡터와 비교하여, GP64-슈도타이핑된 벡터는 유사한 넓은

향성 및 유사한 고유 역가를 갖는다. GP64 발현은 세포를 사멸시키지 않으므로, 항시성으로 GP64를 발현하는 293T-기반 세포주가 생성될 수 있다.

- [0116] 광견병 G
- [0117] 본 발명의 개시에서, 백터는 광견병 G 단백질 또는 이의 돌연변이체, 변이체, 동족체 또는 단편의 적어도 일부로 슈도타이핑될 수 있다.
- [0118] 광견병 G 단백질뿐만 아니라 이의 돌연변이체에 대한 교시는 WO 99/61639호뿐만 아니라 문헌[Rose et al (1982) J. Virol. 43:361-364, Hanham et al (1993) J. Virol. 67:530-542; Tuffereau et al (1998) J. Virol. 72:1085-1091, Kucera et al (1985) J. Virol. 55:158-162; Dietzschold et al (1983) PNAS 80:70-74; Seif et al (1985) J. Virol. 53:926-934; Coulon et al (1998) J. Virol. 72:273-278; Tuffereau et al (1998) J. Virol. 72:1085-10910; Burger et al (1991) J. Gen. Virol. 72:359-367; Gaudin et al (1995) J. Virol. 69:5528-5534; Benmansour et al (1991) J. Virol. 65:4198-4203; Luo et al (1998) Microbiol. Immunol. 42:187-193, Coll (1997) Arch. Virol. 142:2089-2097; Luo et al (1997) Virus Res. 51:35-41; Luo et al (1998) Microbiol. Immunol. 42:187-193; Coll (1995) Arch. Virol. 140:827-851; Tuchiya et al (1992) Virus Res. 25:1-13; Morimoto et al (1992) Virology 189:203-216; Gaudin et al (1992) Virology 187:627-632; Whitt et al (1991) Virology 185:681-688; Dietzschold et al (1978) J. Gen. Virol. 40:131-139; Dietzschold et al (1978) Dev. Biol. Stand. 40:45-55; Dietzschold et al (1977) J. Virol. 23:286-293 및 Otvos et al (1994) Biochim. Biophys. Acta 1224:68-76]에서 발견될 수 있다. 광견병 G 단백질은 또한 EP 0445625호에 기재되어 있다.
- [0119] 대안적 외피
- [0120] 슈도타입 렌티바이러스 백터에 사용될 수 있는 다른 외피는 모콜라(Mokola), 에볼라(Ebola), 4070A 및 LCMV(림프구성 맥락수막염 바이러스)를 포함한다.
- [0121] 아데노-관련 바이러스 백터
- [0122] 아데노-관련 바이러스(AAV) 백터는 제한된 패키징 능력을 가지므로 효율적으로 전달될 수 있는 유전자의 수에 부정적인 영향을 미치는 것이 당 분야에 공지되어 있다. 그러나, 이러한 제한은 AAV 혈청형에 의존한다는 것이 이제 공지되어 있다. 예를 들어, AAV5 및 AAV7 혈청형의 캡시드는 최대 8 kb의 유전체를 패키징할 수 있다. 이러한 작업은 미국 특허 번호 7,943,374호에 기재되었다. 또한, US 2009/0214478호에는 최대 9 kb의 패키징 용량을 갖는 AAV2/5 재조합 백터가 기재되어 있다.
- [0123] AAV 백터의 특징은 일반적으로 당업자에게 공지되어 있다. 예를 들어, AAV 백터는 넓은 숙주 범위를 가지며 비교적 낮은 면역원성을 갖는 분열 및 비-분열 세포 둘 모두를 형질도입시킨다. 또한, 모든 AAV 바이러스 유전자를 제 자리에서 시스-작용 AAV 요소인 역 말단 반복(ITR), DNA 패키징 신호, 및 복제 기점만을 남겨두는 유전자 카세트에 대체하는 방법이 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌[Musatov et al., J. Virol., December 2002, 76(24)]을 참조한다. AAV는 AAV 유전자 생성물, Rep 및 Cap, 및 기타 보조 단백질이 트랜스로 제공되는 경우에 생산자 세포에 패키징될 수 있다. AAV 패키징 시스템이 기재되었다. 예를 들어, 미국 특허 번호 5,139,941호를 참조한다. 비-AAV 보조 기능은 아데노바이러스, 단순 헤르페스 바이러스 및 백시니아 바이러스와 같은 공지된 헬퍼 바이러스 중 임의의 것에 의해 제공될 수 있다. 상기 AAV 패키징 시스템은, 예를 들어, 미국 특허 번호 4,797,368호; 미국 특허 번호 5,139,941호; 미국 특허 번호 5,866,552호; 미국 특허 번호 6,001,650호; 미국 특허 번호 6,723,551호에 기재되었다.
- [0124] 코돈 최적화
- [0125] 일부 구현예에서, 본 발명의 개시에 사용되는 폴리뉴클레오티드(핵산 작제물, NOI 및/또는 백터 구성요소의 전부 또는 일부를 포함함)는 코돈 최적화될 수 있다. 코돈 최적화는 이전에 WO 99/41397호 및 WO 01/79518호에 기재되었다. 다양한 세포는 이들의 특정 코돈의 사용에 있어서 상이하다. 이러한 코돈 편향은 세포 유형에서의 특정 tRNA의 상대적 과다에서의 편향에 해당한다. 해당 tRNA의 상대적 과다와 일치하게 맞춤화되도록 서열 내의 코돈을 변경시킴으로써, 발현을 증가시키는 것이 가능하다. 같은 이유로, 해당 rRNA가 특정 세포 유형에서 드문 것으로 공지된 코돈을 일부러 선택함으로써 발현을 감소시키는 것이 가능하다. 따라서, 추가적인 번역 정도 제어 가능하다.
- [0126] HIV 및 다른 렌티바이러스를 포함하는 많은 바이러스는 많은 수의 희귀 코돈을 사용하고, 이들을 일반적으로 사

용되는 포유동물 코돈에 상응하도록 변경함으로써 관심 유전자, 예를 들어, 포유동물 생산자 세포에서 NOI 또는 패키징 구성요소의 증가된 발현이 달성될 수 있다. 포유동물 세포뿐만 아니라 다양한 다른 유기체에 대한 코돈 사용 표는 당 분야에 공지되어 있다.

- [0127] 바이러스 벡터 구성요소의 코돈 최적화는 다수의 다른 이점을 갖는다. 이들의 서열의 변경으로 인해, 생산자 세포/패키징 세포에서 바이러스 입자의 조립에 필요한 바이러스 입자의 패키징 구성요소를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 이들로부터 제거된 RNA 불안정성 서열(INS)을 갖는다. 동시에, 패키징 구성요소에 대한 아미노산 서열 코딩 서열은 서열에 의해 인코딩되는 바이러스 구성요소가 동일하게 유지되거나, 패키징 구성요소의 기능이 손상되지 않도록 적어도 충분히 유사하도록 유지된다. 렌티바이러스 벡터에서 코돈 최적화는 또한 외수송을 위한 Rev/RRE 요구사항을 극복하여 최적화된 서열 Rev를 독립적으로 만든다. 코돈 최적화는 또한 벡터 시스템 내의 상이한 작제물 사이(예를 들어, gag-pol 및 env 오픈 리딩 프레임에서 중복 영역 사이)의 상동성 재조합을 감소시킨다. 일부 구현예에서, 코돈 최적화의 전반적인 효과는 바이러스 역가의 현저한 증가 및 개선된 안정성이다.
- [0128] 일부 구현예에서, INS와 관련된 코돈만이 코돈 최적화된다. 그러나, 일부 구현예에서, 서열은, 예를 들어, gag-pol의 프레임시프트 부위를 포함하는 서열을 일부 제외하고 전체적으로 코돈 최적화된다(하기 참조).
- [0129] gag-pol 유전자는 gag-pol 단백질을 인코딩하는 2개의 중복 리딩 프레임을 포함한다. 둘 모두의 단백질의 발현은 번역 동안 프레임시프트에 의존한다. 이러한 프레임시프트는 번역 동안 리보솜 "미끄러짐(slippage)"의 결과로 발생한다. 이러한 미끄러짐은 RNA 이차 구조로 인한 리보솜-정지에 의해 적어도 부분적으로 유발되는 것으로 생각된다. 상기 이차 구조는 gag-pol 유전자에서 프레임시프트 부위의 다운스트림에 존재한다. HIV의 경우, 중복 영역은 gag의 시작(여기서 뉴클레오타이드 1은 gag ATG의 A임)의 다운스트림 뉴클레오타이드 1222에서 gag의 말단(nt 1503)까지 연장된다. 결과적으로, 프레임시프트 부위 및 2개의 리딩 프레임의 중복 영역에 걸친 281 bp 단편은 바람직하게는 코돈 최적화되지 않는다. 상기 단편을 보유하는 것은 gag-pol 단백질의 보다 효율적인 발현을 가능하게 할 것이다.
- [0130] EIAV의 경우, 중복의 시작은 nt 1262(여기서 뉴클레오타이드 1은 gag ATG의 A임)로 간주되었다. 중복의 끝은 1461 bp이다. 프레임시프트 부위 및 gag-pol 중복이 보존되도록 보장하기 위해, 야생형 서열은 nt 1156에서 1465까지 유지되었다.
- [0131] 예를 들어, 편리한 제한 부위를 수용하기 위해 최적 코돈 사용으로부터의 유도가 이루어질 수 있고, 보존적 아미노산 변화가 gag-pol 단백질에 도입될 수 있다.
- [0132] 일 구현예에서, 코돈 최적화는 약하게 발현된 포유동물 유전자에 기초한다. 각각의 코돈의 세 번째, 때때로 두 번째 및 세 번째 염기가 변경될 수 있다.
- [0133] 유전 코드의 축퇴성 특성으로 인해, 숙련된 작업자에 의해 다수의 gag-pol 서열이 달성될 수 있음이 인지될 것이다. 또한, 코돈 최적화된 gag-pol 서열을 생성하기 위한 시작점으로 사용될 수 있는 많은 레트로바이러스 변이체가 기재되어 있다. 렌티바이러스 유전체는 매우 다양할 수 있다. 예를 들어, 여전히 기능하는 HIV-1의 많은 준-종이 있다. EIAV의 경우도 마찬가지이다. 이들 변형은 형질도입 과정의 특정 부분을 향상시키기 위해 사용될 수 있다. HIV-1 변형의 예는 Los Alamos National Security에서 운영하는 HIV 데이터베이스에서 발견될 수 있다. EIAV 클론의 세부사항은 미국 국립생물공학정보센터(National Center for Biotechnology Information; NCBI) 데이터베이스에서 발견될 수 있다.
- [0134] 코돈 최적화된 gag-pol 서열에 대한 전략은 임의의 레트로바이러스와 관련하여 사용될 수 있다. 이는 EIAV, FIV, BIV, CAEV, VMR, SIV, HIV-1 및 HIV-2를 포함하는 모든 렌티바이러스에 적용된다. 또한, 이러한 방법은 HTLV-1, HTLV-2, HFV, HSRV 및 인간 내인성 레트로바이러스(HERV), MLV 및 다른 레트로바이러스로부터의 유전자의 발현을 증가시키는 데 사용될 수 있다.
- [0135] 코돈 최적화는 gag-pol 발현 Rev를 독립적으로 만들 수 있다. 그러나, 렌티바이러스 벡터에서 항-rev 또는 RRE 인자의 사용을 가능하게 하기 위해, 바이러스 벡터 생성 시스템을 완전히 Rev/RRE 독립적으로 만드는 것이 필요하다. 따라서, 유전체가 또한 변형될 필요가 있다. 이는 벡터 유전체 구성요소를 최적화함으로써 달성된다. 유리하게는, 이들 변형은 또한 생산자 및 형질도입된 세포 둘 모두에서 모든 추가 단백질이 없는 보다 안전한 시스템의 생성으로 이어진다.
- [0136] 활성

- [0137] 본 발명의 개시의 특정 양태에서, 본 발명의 개시의 융합 작제물은 기능성 도파민성 합성 효소를 생성하고, WO 02/29065호에 기재된 IRES 서열에 의해 분리된 도파민 합성 효소를 인코딩하는 3개 모두의 유전자를 갖는 작제물을 사용하여 획득된 수준과 비교하는 경우 도파민 생성의 증가를 유발할 수 있다.
- [0138] 일부 구현예에서, 본 발명의 개시의 벡터는 WO 2001/04433호에 기재된 벡터인 pONYK1의 것보다 세포 내로 발현되는 경우에 증가된 L-DOPA 및/또는 도파민 생성을 유발할 수 있다.
- [0139] 본 발명의 개시의 벡터는 도파민 및/또는 L-DOPA 생성의 적어도 2, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 80, 90, 100, 120, 130, 140, 150, 160, 200, 500, 1000배 증가를 제공할 수 있다.
- [0140] 본 발명의 개시의 벡터는, 예를 들어, HEK293T 세포 또는 PC-12 세포에서 발현되는 경우 pONYK1과 비교하는 경우 증가된 L-DOPA 및/또는 도파민 생성을 유발할 수 있다.
- [0141] 도파민 또는 L-DOPA 생성은 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)와 같은 당 분야에 공지된 다수의 방법 중 임의의 방법에 의해 측정될 수 있다.
- [0142] 이론으로 제한하고자 하는 것은 아니지만, 본 발명자는 L-DOPA 및/또는 도파민 합성이 융합 단백질에 의해 증가되는 것을 제안하는데, 이는 인코딩된 단백질이 함께 물리적으로 가까워서 서로 간의 상호작용을 촉진하기 때문이다. 이는 각각의 효소의 물리적 근접성이 하나의 효소에서 다른 효소로의 효율적인 대사산물 흐름을 촉진하여 최대 L-DOPA 또는 도파민 생성을 가능하게 할 수 있기 때문에 도파민 생합성 경로의 효소에 특이 유리하다.
- [0143] 일부 구현예에서, 본 발명의 개시의 융합 작제물은 기준선에 비해, 그리고 일부 구현예에서 ProSavin®과 같은 다른 작제물에 비해 개선된 L-DOPA 생성 및 개선된 도파민 생성을 제공한다.
- [0144] 약학적 조성물 및 투여
- [0145] 본 발명의 개시의 핵산 작제물을 포함하는 바이러스 벡터, 예를 들어, 렌티바이러스 벡터(예를 들어, Lenti-PD)는 약학적 조성물의 형태로 제공될 수 있다. 약학적 조성물은 유전자 요법에 의해 개체를 치료하기 위해 사용될 수 있으며, 여기서 조성물은 본 발명의 개시의 작제물을 포함하는 치료적 유효량의 바이러스 벡터, 예를 들어, 렌티바이러스 벡터(예를 들어, Lenti-PD)를 포함한다.
- [0146] 일부 구현예에서, 바이러스 제조물은 초원심분리에 의해 농축될 수 있다. 일부 구현예에서, 렌티바이러스 벡터는 전체내용이 참조로서 본원에 포함되는 WO 2009/153563호에 개시된 임의의 방법에 따라 처리될 수 있다.
- [0147] 바이러스 벡터의 치료적 유효량은 바이러스 벡터가 임상적으로 관련된 효과를 제공하도록 본 발명의 개시의 핵산 작제물을 표적 세포 집단 또는 표적 조직에 전달하기에 충분한 양이다. 유효량은 대상체의 종, 연령, 체중, 건강 및 표적화될 조직과 같은 요인에 좌우될 수 있으며, 따라서 동물 및 조직에 따라 달라질 수 있다. 약학적 조성물은 인간 대상체를 치료하는 데 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 대상체는 신경퇴행성 질병 또는 대상체에서 도파민 수준이 감소되는 질병을 앓고 있다. 일부 구현예에서, 인간은 파킨슨병, 예를 들어, 양측성 특발성 파킨슨병을 앓고 있다.
- [0148] 일부 구현예에서, 약학적 조성물은 본 발명의 개시의 바이러스 벡터, 예를 들어, 렌티바이러스 입자를 포함한다. 일부 구현예에서, 바이러스 벡터 용량은 적어도 10^6 개의 형질도입 단위(TU), 예를 들어, 1×10^6 TU 내지 5×10^8 TU를 포함할 수 있다. TU는, 예를 들어, 통합(DNA) 역가 검정을 사용하여 통합 사건의 수에 기초하여 계산될 수 있다. 벡터 역가는 표준 HEK293T 세포주에서 적정된 벡터 강도에 대해 mL 당 TU(TU/mL)로 표현될 수 있거나, 대상체에 전달된 표적 용량(TU/대상체)(예를 들어, 벡터의 표적 강도에 대해 계산됨)으로 표현될 수 있다.
- [0149] 일부 구현예에서, 표적 용량은 2×10^6 TU/대상체 내지 2×10^8 TU/대상체; 3×10^6 TU/대상체 내지 2×10^8 TU/대상체; 4×10^6 TU/대상체 내지 2×10^8 TU/대상체, 5×10^6 TU/대상체 내지 2×10^8 TU/대상체, 6×10^6 TU/대상체 내지 2×10^8 TU/대상체, 7×10^6 TU/대상체 내지 2×10^8 TU/대상체, 8×10^6 TU/대상체 내지 2×10^8 TU/대상체, 또는 9×10^6 TU/대상체 내지 2×10^8 TU/대상체를 포함한다.
- [0150] 일부 구현예에서, 표적 용량은 1×10^7 TU/대상체 내지 1×10^8 TU/대상체; 2×10^7 TU/대상체 내지 1×10^8 TU/대상체; 3×10^7 TU/대상체 내지 1×10^8 TU/대상체; 4×10^7 TU/대상체 내지 1×10^8 TU/대상체, 5×10^7 TU/대

상체 내지 1×10^8 TU/대상체, 6×10^7 TU/대상체 내지 1×10^8 TU/대상체, 7×10^7 TU/대상체 내지 1×10^8 TU/대상체, 8×10^7 TU/대상체 내지 1×10^8 TU/대상체, 또는 9×10^7 TU/대상체 내지 1×10^8 TU/대상체를 포함한다.

[0151] 일부 구현예에서, 총 표적 용량은 1×10^7 TU/대상체 내지 2×10^7 TU/대상체, 2×10^7 TU/대상체 내지 3×10^7 TU/대상체, 3×10^7 TU/대상체 내지 4×10^7 TU/대상체, 4×10^7 TU/대상체 내지 5×10^7 TU/대상체, 5×10^7 TU/대상체 내지 6×10^7 TU/대상체, 6×10^7 TU/대상체 내지 7×10^7 TU/대상체, 7×10^7 TU/대상체 내지 8×10^7 TU/대상체, 8×10^7 TU/대상체 내지 9×10^7 TU/대상체, 또는 9×10^7 TU/대상체 내지 1×10^8 TU/대상체를 포함한다.

[0152] 일부 구현예에서, 표적 용량은 약 1×10^6 TU/대상체 내지 5×10^8 TU/대상체, 4×10^6 TU/대상체 내지 8×10^6 TU/대상체; 8×10^6 TU/대상체 내지 4×10^7 TU/대상체; 또는 1×10^7 TU/대상체 내지 5×10^8 TU/대상체이다. 일부 구현예에서, 표적 용량은 약 1.5×10^7 TU/mL 내지 5×10^7 TU/mL이다.

[0153] 일부 구현예에서, 표적 용량은 약 2×10^6 TU/대상체, 약 1.4×10^7 TU/대상체, 약 1.5×10^7 TU/대상체, 약 1.6×10^7 TU/대상체, 약 1.7×10^7 TU/대상체, 약 1.8×10^7 TU/대상체, 약 1.9×10^7 TU/대상체, 약 2×10^7 TU/대상체, 약 2.1×10^7 TU/대상체, 약 2.2×10^7 TU/대상체, 약 2.3×10^7 TU/대상체, 약 2.4×10^7 TU/대상체, 또는 약 2.5×10^7 TU/대상체이다.

[0154] 일부 구현예에서, 표적 벡터 용량 강도는 5×10^6 TU/mL 내지 5×10^8 TU/mL, 5×10^6 TU/mL 내지 5×10^7 TU/mL, 1×10^7 TU/mL 내지 5×10^7 TU/mL, 1.5×10^7 TU/mL 내지 5×10^7 TU/mL, 또는 5×10^7 TU/mL 내지 5×10^8 TU/mL를 포함한다.

[0155] 일부 구현예에서, 총 표적 벡터 용량은 조가비핵에 직접 제어된 속도(예를 들어, 약 2-4 μ L/분)로 다수의 작은 부피(예를 들어, 50-200 μ L)로 대상체에 투여된다.

[0156] 조성물은 선택적으로 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다. 약학적 담체, 부형제 또는 희석제의 선택은 의도된 투여 경로 및 표준 약학적 실시와 관련하여 선택될 수 있다. 약학적 조성물은 담체로서(또는 이에 추가하여) 부형제 또는 희석제, 임의의 적합한 결합제(들), 유효제(들), 현탁제(들), 코팅제(들), 가용화제(들), 및 표적 부위의 바이러스 진입을 돕거나 증가시킬 수 있는 다른 담체 제제를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 본 발명의 개시의 약학적 조성물은 긴장성 제제, 동결보존 보조제, pH 완충제, pH 조정제, 또는 이들의 임의의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 부형제를 포함한다. 일부 구현예에서, 긴장성 제제는 염화나트륨을 포함한다. 일부 구현예에서, 동결보존 보조제는 만니톨 및/또는 수크로스 포함한다. 일부 구현예에서, pH 완충제는 트로메타민(TRIS)을 포함한다. 일부 구현예에서, pH 조정제는 염산(HCl)을 포함한다. 일부 구현예에서, 희석제는 물이다.

[0157] 투여

[0158] 일부 구현예에서, 본 발명의 개시의 작제물을 포함하는 바이러스 벡터(예를 들어, Lenti-PD)는, 예를 들어, 꼬리 조가비핵으로의 주사에 의해 뇌에 투여된다. 일부 구현예에서, 바이러스 벡터는 감각운동 조가비핵에 주사에 의해 투여된다. 일부 구현예에서, 벡터는, 예를 들어, 전체내용이 참조로서 본원에 포함되는 미국 특허 번호 9,339,512호에 개시된 임의의 방법에 따라 뇌에 지속적으로 주입된다.

[0159] 일부 구현예에서, 바이러스 벡터는 비-도파민성 뉴런에서 인코딩된 단백질의 발현을 허용하는 PD 대상체의 감각운동 조가비핵으로의 국소 양측 정위 주입에 의해 투여된다. 일부 구현예에서, 투여는 제어된 속도(약 2-4 μ L/분, 예를 들어, 3 μ L/분)로 다수의 작은 부피(예를 들어, 50-200 μ L))로 제1 반구에서 1-6개, 예를 들어, 3개의 관 및 제2 반구에서 1-6개, 예를 들어, 3개의 관을 통해 직접 조가비핵으로 이루어진다.

[0160] 바이러스 벡터는 반구 당 1, 2, 3, 4, 5, 6개 또는 그 이상의 관을 통해 투여될 수 있다.

[0161] 일부 구현예에서, 바이러스 벡터는 렌티바이러스 벡터에 대해 이전에 기재된 투여 시스템(전체내용이 참조로서

본원에 포함되는 문헌[Jarraya et al (2009) Sci Transl Med 14: 1(2) 2-4])으로 투여될 수 있다. 예를 들어, 바이러스 벡터 조성물은 관의 바닥에 분취액(2-4 μL)을 투여하고, 바늘을 약간 빼 후, 제2 분취액(2-4 μL)을 투여하고, 바늘을 조금 더 빼고(두 번째), 이후 제3 분취액(2-4 μL)을 투여함으로써 불연속적 또는 "점상" 방식으로 투여될 수 있으며, 따라서 분취액은 총 약 10 μL를 전달하는 각각의 바늘 관을 따라 3개 지점에 배치되었다.

- [0162] 사용 방법
- [0163] 본 발명의 개시의 특정 양태는 파킨슨병을 앓고 있는 대상체에 (a) 운동 기능을 개선시키고/시키거나, (b) 운동 이상증을 감소시키고/시키거나, (c) 대상체의 L-DOPA 또는 LED의 1일 용량에서의 감소를 허용하는 것 중 하나 이상을 제공하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 본원에 개시된 핵산 작제물을 포함하는 바이러스 벡터(예를 들어, Lenti-PD)를 이를 필요로 하는 대상체에 투여하는 것을 포함한다.
- [0164] 본 발명의 개시의 특정 양태는 본원에 개시된 작제물을 포함하는 바이러스 벡터를 투여하는 것을 포함하는 운동 이상증을 앓고 있는 대상체에서 운동 기능을 개선시키고/시키거나 운동이상증을 감소시키는 방법에 관한 것이다.
- [0165] PD의 약리학적 치료에 영향을 미치는 주요 문제 중 하나는 L-dopa 요법을 개시할 시기를 결정하는 것이다. L-dopa를 사용한 장기 치료는 불쾌한 운동 부작용과 관련이 있는 것으로 공지되어 있지만 초기 투여는 가장 큰 임상적 이점을 부여하는 것으로 나타났다. 결과적으로, 많은 의사들은 초기 요법으로 L-dopa의 수행을 지연하는 것을 선호한다. 그러나, L-dopa는 부작용으로 운동이상증을 유도한다.
- [0166] 일부 구현예에서, 대상체는 신경퇴행성 질병 또는 대상체에서 내인성 도파민 수준이 감소되는 질병을 앓고 있다. 일부 구현예에서, 대상체는 파킨슨병을 갖는다. 일부 구현예에서, 대상체는 L-DOPA(레보도파(levodopa)로도 공지됨) 요법을 받고 있다. 일부 구현예에서, 대상체는 레보도파 등가 용량(LED) 요법을 받고 있다. 일부 구현예에서, 대상체는 또한 카르비도파(carbidopa)가 투여된다.
- [0167] 일부 구현예에서, L-Dopa 또는 LED 요법을 받고 있는 환자에 투여되는 경우, 본원에 개시된 핵산 작제물을 포함하는 바이러스 벡터(예를 들어, Lenti-PD)는 증상의 점감(tapering)을 개선시키고 L-dopa 또는 LED 요법의 투여와 관련된 운동이상증을 감소시키면서 L-dopa의 1일 투여량을 감소시킨다. 조합된 치료는 파킨슨병 환자의 운동 기능의 개선을 발생시키고, 또한 약리학적 요법에 의해 유도된 운동 변동을 개선시킨다. 상기 조합은 특히 운동 이상증, "온-오프(on-off)" 및 마모(wearing-off) 현상을 감소시킨다. 일부 구현예에서, 운동이상증의 감소는 "OFF" 및 "ON" 상태에서 러시 운동이상증 평가 척도(RDRS)를 사용하여 기준선으로부터의 평가 척도에 기초하여 결정되었다.
- [0168] 일부 구현예에서, 운동이상증은 다음 중 하나 이상에 의해 제시된 바와 같이 대상체에서 감소된다: (a) 기준선과 비교하여 투여 3개월 후 성가신 운동이상증을 갖는 하우저 다이어리(Hauser diary) ON 시간에서의 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85% 또는 적어도 90% 감소; (b) 기준선과 비교하여 투여 3개월 후 UPDRS-IV 스코어에서의 적어도 50% 감소, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 74% 또는 적어도 75% 감소, 및 (c) 기준선과 비교하여 투여 3개월 후 러시 이상운동증(Rush Dyskinesia)에서의 적어도 10%, 적어도 12%, 적어도 15%, 적어도 18%, 적어도 20% 또는 적어도 25% 개선.
- [0169] 일부 구현예에서, 운동 기능에 대한 임상 표준화된 측정, 예를 들어, UPDRS-III (운동) OFF 스코어는 본 발명의 개시의 핵산 작제물을 포함하는 바이러스 벡터(예를 들어, Lenti-PD)의 투여 후에 개선된다. 일부 구현예에서, 운동 기능은 기준선과 비교하여 투여 3개월 후 평균 UPDRS-III(운동) OFF 스코어에서 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 42%, 적어도 45% 또는 적어도 50% 증가에 의해 제시된 바와 같이 개선된다. 일부 구현예에서, 운동 기능은 기준선과 비교하여 투여 3개월 후 평균 UPDRS-III (운동) OFF 스코어에서 적어도 12, 적어도 15, 적어도 20, 적어도 22, 적어도 25, 적어도 30 또는 적어도 35 포인트 증가로 제시된 바와 같이 개선된다.
- [0170] 일부 구현예에서, 투여 약 3개월 후, 대상체의 평균 UPDRS OFF 총 스코어는 기준선으로부터 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 55% 또는 적어도 60%만큼 개선된다. 일부 구현예에서, 대상체의 기준선 UPDRS 파트 III (운동) OFF 스코어는 30-60이다.
- [0171] 일부 구현예에서, UPDRS-II(일상 생활 활동) OFF 스코어는 본 발명의 개시의 핵산 작제물을 포함하는 바이러스 벡터(예를 들어, Lenti-PD)의 투여 후에 개선된다. 일부 구현예에서, UPDRS-II OFF 스코어는 기준선과 비교하여 투여 3개월 후 평균 UPDRS-II OFF 스코어에서 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 42%,

적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75% 또는 적어도 80% 증가로 제시된 바와 같이 개선된다. 일부 구현예에서, 운동 기능은 기준선과 비교하여 투여 3개월 후 평균 UPDRS-II OFF 스코어에서 적어도 12, 적어도 15, 적어도 20, 적어도 22, 적어도 25, 적어도 30 또는 적어도 35 포인트 증가로 제시된 바와 같이 개선된다.

[0172] 일부 구현예에서, UPDRS-IV(치료 합병증) OFF 스코어는 본 발명의 개시의 핵산 작제물을 포함하는 바이러스 벡터(예를 들어, Lenti-PD)의 투여 후에 개선된다. 일부 구현예에서, UPDRS-IV OFF 스코어는 기준선과 비교하여 투여 3개월 후 평균 UPDRS-IV OFF 스코어에서 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 42%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75% 또는 적어도 80% 증가로 제시된 바와 같이 개선된다. 일부 구현예에서, 운동 기능은 기준선과 비교하여 투여 3개월 후 평균 UPDRS-II OFF 스코어에서 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10 또는 적어도 12 포인트 증가로 제시된 바와 같이 개선된다.

[0173] 일부 구현예에서, 본 발명의 개시의 바이러스 벡터는 신경학적 질환을 치료하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 벡터는 파킨슨병(PD)과 같은 신경퇴행성 질병의 치료 및/또는 예방에 유용할 수 있다. 질병은 대상체에서 L-DOPA 및/또는 도파민의 생성에 의해 치료될 수 있다. 질병은 파킨슨병, 예를 들어, 양측 특발성 파킨슨병일 수 있다. 일부 구현예에서, 치료는 PD의 말기 단계, 예를 들어, 경구 L-DOPA 치료에 불응성이 된 환자를 위한 것이다.

[0174] 본원에 기재된 특정 작제물은 L-DOPA의 생성을 증가시키고/시키거나, 도파민의 생성을 증가시킨다. L-DOPA의 증가된 생성은 잔류 AADC 효소 활성을 유지하고 따라서 L-DOPA를 도파민으로 적어도 부분적으로 전환시킬 수 있는 환자에서 유용할 수 있다. 이들 환자는 통상적인 L-DOPA 치료에 민감할 수 있다. 예를 들어, TH_L-CH1_{IRES}-AADC 작제물은 높은 수준의 도파민 및 L-DOPA 둘 모두를 생성한 반면, TH_L-AADC_{IRES}-CH1 및 AADC_L-TH_L-CH1은 L-DOPA에 비해 더 높은 수준의 도파민을 생성하였다.

[0175] 도파민의 증가된 생성은 L-DOPA를 처리하기에 충분한 내인성 AADC 활성이 부족하여 통상적인 L-DOPA 치료에 덜 민감한 후기 환자에 유용할 수 있다.

[0176] 일부 구현예에서, 대상체는 L-DOPA 또는 LED 요법(LED = L-DOPA 등가 용량의 약물)을 받고 있다. 일부 구현예에서, 대상체는 L-DOPA 또는 LED 요법을 받고 있다. 일부 구현예에서, 대상체의 L-DOPA 또는 LED 요법 용량은 핵산 작제물의 투여 전에 대상체의 L-DOPA 또는 LED 요법 용량에 비해 본 발명의 개시의 핵산 작제물을 포함하는 바이러스 벡터의 투여 후에 감소된다. 일부 구현예에서, 평균 일일 L-DOPA 또는 LED 요법 용량은 본 발명의 개시의 핵산 작제물을 포함하는 바이러스 벡터의 투여 3개월 후 기준선으로부터 적어도 10%, 적어도 12%, 적어도 14%, 적어도 15%, 적어도 16%, 적어도 17%, 적어도 18%, 적어도 19%, 적어도 20% 또는 적어도 25%만큼 감소된다.

[0177] 일부 구현예에서, 본 발명의 개시의 방법은 파킨슨병의 하나 이상의 증상을 개선시킨다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 증상은 진전, 운동완만증, 경직된 근육, 손상된 자세 및/또는 균형, 자동 움직임의 상실, 말하기 어려움 및 미세 운동 기술의 어려움으로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 증상은 일반적으로 사지, 종종 손 또는 손가락에서 시작되는 진전 또는 떨림을 포함한다. 일부 구현예에서, 증상은 운동완만증(느려진 움직임)을 포함한다. 시간이 지남에 따라, 파킨슨병은 대상체의 움직임을 늦추어 간단한 작업을 어렵고 시간 소모적으로 만들 수 있다. 일부 구현예에서, 증상은 경직된 근육, 예를 들어, 대상체 신체의 임의의 부분에서의 근육 경직을 포함한다. 경직된 근육은 고통스럽고 운동 범위를 제한할 수 있다. 일부 구현예에서, 증상은 손상된 자세 및/또는 균형을 포함한다. 일부 구현예에서, 증상은 말하기 어려움을 포함한다. 일부 구현예에서, 증상은, 예를 들어, 쓰기와 같은 미세 운동 기술의 어려움을 포함한다.

[0178] 본 발명의 개시는 이제 실시예에 의해 추가로 설명될 것이며, 이는 본 발명의 개시를 수행하는 데 있어서 당업자를 돕기 위해 제공하는 것을 의미하고, 본 발명의 범위를 어떠한 방식으로든 제한하고자 하는 것이 아니다.

[0179] 실시예

[0180] 실시예 1

[0181] "Lenti-PD"는 비-병원성 야생형 말 감염성 빈혈 바이러스(EIAV)에 기초한 비-복제 비-영장류 재조합 렌티바이러스 벡터(LV)이다. 야생형 EIAV 유전체는 6개의 별개의 유전 단위를 갖지만, 이들 EIAV 서열의 대부분(약 90%)은 원래 바이러스 유전체의 10% 미만을 함유하고, 임의의 천연 바이러스 프로모터 또는 인핸서를 함유하지 않고,

EIAV 유전체 또는 패키징 시스템에서 보조 단백질에 대한 코딩 영역이 없는 복제 결합 최소 벡터 시스템을 생성하기 위해 제거되었다. Lenti-PD는 인간 티로신 하이드록실라제(TH), 인간 GTP-사이클로하이드롤라제 1(CH1) 및 인간 방향족 L-아미노산 데카르복실라제(AADC)의 트렁케이션된 형태를 인코딩하는 도파민 효소 융합 플라스미드를 함유한다. Lenti-PD 작제물은 도 2a에 제시되어 있다.

- [0182] ProSavin®은 말 감염성 빈혈 바이러스(EIAV) 기반 LV이다. ProSavin®은 또한 이러한 작제물에서 2개의 내부 리보솜 진입 부위(IRES)에 의해 작동 가능하게 연결된 코딩 서열 TH, AADC 및 CH1을 포함하는 트리시스트로닉 작제물을 함유한다. ProSavin®에 대한 작제물은 도 2b에 제시되어 있다.
- [0183] ProSavin®과 Lenti-PD 구조 사이의 차이는 Lenti-PD에서 CH1이 발현을 향상시키기 위해 프로모터에 더 가깝게 이동되고, Lenti-PD에서 TH 및 CH1은 공동-국소화를 보장하기 위해 가요성 링커에 의해 결합된다는 것을 포함한다.
- [0184] 플라스미드를 제조하기 위해, 보다 최근에 pONY8.9.4TY(KanR 유전자를 함유함)로 기재된 최소 pONYK1 유전체 플라스미드(Jarraya et al., 2009 Science Translational Medicine 1, 2ra4)가 사용되었다. 이러한 플라스미드는 pONY8.0T를 기반으로 하였으며, 이는 문헌[Azzouz M et al (Azzouz et al., 2002 J Neurosci 22, 10302-10312)]에 의해 보다 상세히 기재되어 있다. 간단히 말해서, pONYK1은 내부 CMV 프로모터인 Neo, 트렁케이션된 코돈 최적화된 인간 티로신 하이드록실라제(TH), EMCV 내부 리보솜 진입 부위(IRES), 코돈 최적화된 인간 방향족 아미노산 도파 데카르복실라제(AADC), 폴리오바이러스 IRES, GTP-사이클로하이드롤라제 I(GTP-CH1) 및 우드 칩 간염 바이러스 전사 후 조절 요소(WPRE)를 (이 순서로) 함유하는 카세트가 삽입된 EIAV SIN 벡터 유전체이다. 2개의 융합된 유전자(TH 및 CH1) 및 1개의 PV IRES 요소를 함유하는 Lenti-PD 융합 플라스미드를 합성된 DNA(GeneArt, Germany)의 영역을 트리시스트로닉 카세트에 삽입하고, 제1 유전자의 EMCV IRES 영역 및 정지 코돈을 GS15 링커로 대체하여 생성하였다. GS15 링커는 4X 글리신 아미노산에 이어 3중으로 반복된 1X 세린 아미노산을 코딩하며, 이는 15개의 아미노산의 링커를 생성한다. 이러한 GS15 링커에 대한 DNA 서열은 다음과 같다:
- [0185] GGGGAGGCGGTAGCGGCGGAGGGGCTCCGCGGAGGCGGGAGC(SEQ ID NO: 3).
- [0186] VSV-G 외피 및 EIAV 합성 Gag/Po1 플라스미드를 HEK293T 세포에서 바이러스 벡터 생성에 사용하였다. 형질도입 단위/ml(TU/ml)의 벡터 역가를 통합(DNA) 역가 검정에 의해 추정하였다.
- [0187] Lenti-PD는 ProSavin®과 비교하여 시험관 내에서 일차 인간 뉴런에서 도파민 및 L-dopa의 생성이 큰 증가를 달성하였다(도 3).
- [0188] 실시예 2
- [0189] 2상 파킨슨병 연구(저용량 - 코호트 1)
- [0190] Lenti-PD의 2상 연구(SUNRISE-PD, NCT03720418)를 양측 특발성 파킨슨병(PD)을 갖는 대상체(48-70세)에서 개시하였다. 진단은 영국 파킨슨병 학회(Parkinson's Disease Society; PDS) 뇌 은행(Brain Bank) 기준을 사용하여 수행하였으나, 하나 초과와 병에 영향을 받은 친척이 있는 대상체를 구체적으로 배제하지 않았다. 임상 시험 연구 계획의 파트 A는 도 4a에 제시된 바와 같은 용량 상승 부분이다. 임상 시험 연구의 파트 B는 도 4b에 제시된 바와 같이 확장 코호트 대 모방 수술 절차 부분이다.
- [0191] Lenti-PD는 단일 렌티바이러스 벡터를 통해 인간 티로신 하이드록실라제(TH), 인간 GTP-사이클로하이드롤라제 1(CH1) 및 인간 방향족 L-아미노산 데카르복실라제(AADC)의 트렁케이션된 형태의 3개의 효소를 인코딩하는 유전자를 전달하여 도파민 합성에 필요한 효소의 세트를 인코딩한다.
- [0192] 진행 중인 2상 연구의 용량 상승 부분의 용량 수준 1 코호트에서 2명의 대상체에 4.2×10^6 TU Lenti-PD를 투여하여 Lenti-PD의 가장 낮은 계획 용량을 시험하였다. 이러한 "저 용량" 코호트(용량 수준 1)로부터의 3개월 데이터를 수집하였다. 상기 코호트는 저 용량으로 Lenti-PD를 1회 투여한 진행성 파킨슨병을 갖는 2명의 대상체를 포함하였다.
- [0193] Lenti-PD를 만니톨(1.0% w/v), 트로메타민(TRIS)(20mM), 수크로스(1.0%), 염화나트륨(100 mM), 염산(pH 7.3 까지) 및 주사용수를 갖는 선조제 주입을 위한 액체 생성물로 제형화하였다.
- [0194] Lenti-PD를 비-도파민성 뉴런에서 인코딩된 단백질의 발현을 허용하는 PD 대상체의 감각운동 조가비핵으로의 국소 양측 정위 주입에 의해 대상체에 전달하였다. Lenti-PD는 제어된 속도(약 3 μ L/분)로 소량(100 μ L)의 부피

로 제1 반구의 3개의 관 및 제2 반구의 3개의 관을 통해 조가비핵에 직접 투여된다.

- [0195] 통합형 파킨슨병 평가 척도(Unified Parkinson's Disease Rating Scale; UPDRS) 스코어는 0 내지 199 범위이며 낮은 스코어가 개선을 나타내는 의사 평가 척도이다. UPDRS 파트 III (운동) OFF 스코어는 파킨슨병에서 운동 기능의 객관적이고 잘 검증된 척도이다. OFF 스코어는 대상체가 경구 레보도파 요법에서 약효세척되는 동안 평가되었다. 레보도파 "오프(off)" 상태에 있는 동안 대상체를 평가함으로써, UPDRS OFF 스코어는 배경 의학적 치료의 잠재적인 혼란 효과 없이 요법의 이점을 포착하도록 설계되었다. UPDRS 파트 III (운동) OFF 스코어를 통해 반영된 진행은 도 5에 제시된다. 용량 수준 1 대상체는 30-60의 기준선 UPDRS 파트 III (운동) OFF 스코어를 가졌다.
- [0196] 대상체는 "OFF"/"ON" 임상 및 PET 평가를 위해 PD 약물 투여를 철회하였다. 마지막 L-DOPA 용량은 "OFF" 평가 전 적어도 12시간이어야 한다. "ON" 평가를 위해, 대상체에게 효과적인 "ON" 반응을 달성하기에 충분한 L-DOPA의 공격 용량이 제공되었으며, 이는 일반적으로 이들의 일반적인 아침 용량의 100% 내지 150%일 것이다. "ON" 평가는 대상체 및 검사자가 판단한 대로 양호한 "ON" 응답에 도달하면 기록하였다. 시기는 투여 후 적어도 1시간이었다. L-DOPA 요법에 대한 대상체의 요구사항이 연구 동안 감소한 경우, 조사자는 이에 따라 L-DOPA 공격 용량을 조정하였다.
- [0197] 3개월에, 용량 수준 1 코호트의 대상체는 Lenti-PD를 투여받은 후 54.5 포인트의 평균 UPDRS OFF 총 스코어 개선을 경험하였으며, 이는 기준선으로부터의 55% 개선을 나타낸다.
- [0198] 다수의 UPDRS 하위척도에 걸쳐 일관된 개선이 또한 관찰되었다. 대상체는 도 6에 제시된 바와 같이 운동 검사 하위척도(UPDRS 파트 III OFF)에서 기준선으로부터 25 포인트의 개선, 도 7a에 제시된 바와 같이 일상 생활 활동 하위척도(UPDRS 파트 II OFF)에 대한 기준선으로부터 22 포인트의 개선, 및 도 7b에 제시된 바와 같이 치료 합병증 하위척도(UPDRS 파트 IV OFF)에 대한 기준선으로부터 7 포인트의 개선을 경험하였다.
- [0199] 6개월에, 대상체는 도 9a에 제시된 바와 같이 운동 검사 하위척도(UPDRS 파트 III OFF)에서 기준선으로부터 17 포인트의 개선, 도 9b에 제시된 바와 같이 일상 생활 활동 하위척도(UPDRS 파트 II OFF)에 대한 기준선으로부터 19.5 포인트의 개선, 및 도 9c에 제시된 바와 같이 치료 합병증 하위척도(UPDRS 파트 IV OFF)에 대한 기준선으로부터 3 포인트의 개선을 경험하였다. 또한, PDQ-39 조사를 기준선에서 3개월 및 6개월까지의 변화를 평가하기 위해 수행하였다. PDQ-39는 파킨슨병 특이적 건강 관련 특질을 평가하는 설문지이다. 대상체는 도 9d에 제시된 바와 같이 ProSavin®과 비교하여 32.1 포인트의 6개월 평균 개선을 경험한다. 이는 3개월 시점에서 측정된 바와 같은 기준선으로부터의 대략 37% 개선의 위인 대략 65%의 기준선으로부터의 평균 총 스코어 개선을 나타낸다. 이들 데이터는 헤드-투-헤드(head-to-head) 임상 시험이 아니라 교차 시험 비교를 기반으로 한다.
- [0200] Lenti-PD 및 ProSavin® 둘 모두는 도파민 생합성 경로에서 동일한 3개의 효소를 인코딩한다. ProSavin®을 사용한 별도의 완료된 I/II 상 연구는 오픈 라벨 용량 상승 연구(PS1/001/07, EudraCT 2007-001109-26)였으며, 상기 연구로부터의 대상체는 치료 후 최대 10년 동안 ProSavin®의 안전성 및 내약성을 모니터링하도록 설계된 연구에 대한 장기 추적(PS1/001/09, EudraCT 2009-017253-35)에 등록하도록 권유되었다.
- [0201] 최저 용량 코호트(4.2×10^6 TU의 총 용량)에서 Lenti-PD로 치료된 둘 모두의 대상체는 이전에 시험된 ProSavin®의 임의의 용량 코호트에서 관찰된 평균 개선보다 UPDRS 파트 III OFF 스코어에서 더 큰 개별적 개선을 나타내었다. 종합하면, 이들 결과는 이전에 시험된 ProSavin®의 최고 용량(1.0×10^8 TU의 총 용량)과 비교하여 3개월에 Lenti-PD에 대한 더 큰 효능을 시사한다. 이러한 연구로부터의 Lenti-PD 및 이전 임상 시험으로부터의 ProSavin®에 대한 UPDRS 척도에 대한 결과의 상세한 요약은 하기 표 1에 제시된다.

[0202] 표 1

척도	3개월에서의 Lenti-PD 코호트 1 (저 용량: 4.2x10 ⁶ TU) (N=2)	3개월에서의 ProSavin® 코호트 3 (고 용량: 1.0x10 ⁸ TU) (N=6)
UPDRS 총 OFF 스코어. 0 내지 199의 범위		
기준선	99.0	79.3
3개월	44.5	61.3
<i>기준선으로부터의 개선</i>	54.5	18.0
UPDRS 파트 I OFF 스코어 (정신활동, 거동 및 기분). 0 내지 16의 범위		
기준선	1.0	2.5
3개월	0.5	0.8
<i>기준선으로부터의 개선</i>	0.5	1.7
UPDRS 파트 II OFF 스코어 (일상 생활 활동). 0 내지 52의 범위		
기준선	29.5	21.7
3개월	7.5	19.3
<i>기준선으로부터의 개선</i>	22.0	2.3
UPDRS 파트 III OFF 스코어 (운동). 0 내지 108의 범위		
기준선	59.0	44.8
3개월	34.0	34.0
<i>기준선으로부터의 개선</i>	25.0	10.8
UPDRS 파트 IV OFF 스코어(치료 합병증). 0 내지 23의 범위		
기준선	9.5	10.3
3개월	2.5	7.2
<i>기준선으로부터의 개선</i>	7.0	3.2

[0203]

[0204]

대상체는 레보도파를 포함하여 이들의 PD 약물을 관리하기 위해 이들의 표준 임상 치료를 계속하였다. 3개월에, 평균 레보도파 등가 용량(LED)은 용량 수준 1에서 대상체에 대해 208 mg까지 감소하였다. 이는 기준선으로부터 평균 19%의 감소를 나타낸다.

[0205]

용량 수준 1의 대상체는 또한 대상체가 경구 레보도파를 복용하는 동안 일상 생활 활동 동안 기능적 장애의 객관적인 평가인 러시 운동이상증 평가 척도 ON 스코어에 의해 측정된 바와 같이 운동이상증의 18% 개선을 경험하였다. 다른 치료 합병증 중에서 장애 및 운동이상증의 기간을 포착하는 UPDRS 파트 IV 스코어는 또한 표 1에 제시된 바와 같이 개선되었다. 또한, 결과는 Lenti-PD의 최저 시험 용량이 이전에 시험된 ProSavin®의 최고 용량보다 실질적으로 더 큰 생물학적 활성을 갖는 것을 뒷받침한다.

[0206]

주관적 주제 다이어리(하우저 환자 다이어리)는 용량 수준 1로부터의 대상체에서 수집되었다. 대상체가 기록한 다이어리 항목에는 변동성이 있었지만, 둘 모두의 대상체는 기준선으로부터 3.5 시간(57%)의 평균 감소와 함께 운동이상증이 있는 다이어리 ON 시간에서 개선을 나타내었다. 일관된 이익이 또한 기준선으로부터 1.3시간의 평균 감소(87%)와 함께 성가신 운동이상증을 갖는 다이어리 ON 시간에서 관찰되었다. 주관적 주제 다이어리 및 레보도파 등가 용량(LED)에 대한 결과는 도 8에 요약되어 있다.

[0207]

조가비핵 내에서 일정한 도파민성 긴장 수준의 유지는 L-DOPA 및 도파민 효능제 요법의 수준을 감소시키고, 더 긴 "ON" 기간 및 더 짧은 "OFF" 기간으로 지속적인 운동 교정을 제공할 잠재성을 제공한다.

[0208]

이들 결과는 Lenti-PD가 진행성 파킨슨병을 갖는 대상체에서 운동 기능의 개선(예를 들어, 3개월에 달성된 UPDRS-III (운동) OFF 이익의 25 포인트(42%) 증가, 및 6개월에서 달성된 UPDRS-III (운동) OFF 이익의 17 포인트(29%) 증가) 및 운동이상증의 감소(예를 들어, 성가신 운동이상증을 갖는 다이어리 ON 시간에서의 87% 감소; 3개월에서 UPDRS-IV의 74% 감소, 6개월에서 UPDRS-IV의 32% 감소, 및 러시 운동이상증의 18% 개선) 둘 모두를 제공한다.

[0209]

또한, 환자는 하우저 다이어리가 6개월에 수집되었다고 보고하였다. 평균적으로, 환자들은 2.7시간의 운동이상증이 없는 ON 시간의 기준선으로부터의 개선, 운동이상증을 갖는 ON 시간에서의 3.9시간의 개선, 0.3시간의 성가신 운동이상증이 없는 ON 시간의 개선, 1.5시간의 성가신 운동이상증을 갖는 ON 시간의 개선, 및 0.9시간의 OFF 시간에서의 악화를 경험하였다. 6개월에, 평균 레보도파 등가 일일 용량(LED)은 233 mg 감소하였으며, 이는 기준선으로부터 21%의 평균 감소를 나타낸다. 절차 또는 백터 투여와 관련하여 심각한 부작용은 관찰되지 않

았고, Lenti-PD는 일반적으로 내약성이 우수하였다. 대상체의 두 번째 코호트에서 시험될 총 용량은 1.4×10^7 TU이다.

[0210] 실시예 3

[0211] 파킨슨병 연구를 위한 영장류 모델

[0212] PD의 MPTP 마카크 모델에서 Lenti-PD의 효능을 평가하기 위해 영장류 연구를 수행하였다. Lenti-PD의 안전성을 평가하기 위해 영장류에서 별도의 GLP 연구를 수행하였다. 효능 연구는 연구 시작시에 4-5년령의 16마리의 시노몰구스(Cynomologous) 수컷 마카크를 포함하였다. 동물을 5개의 실험 그룹으로 나누었다. 벡터 투여 후 6개월에 모든 치료된 동물은 Lenti-PD 고 용량(HD) 그룹에서 관찰된 가장 높은 회복과 함께 대조군과 비교하여 임상 등급 스코어 및 자발적 운동 활성화에서 유의한 개선을 나타내었다. 이 연구에 사용된 벡터 제조물은 표 2에 제시되어 있으며, 투여량 투여는 표 3에 제시되어 있다. 각각의 연구 그룹에서, 4마리의 동물을 Lenti-PD 전체 용량 또는 1/5 용량, ProSavin®, EIAV-LacZ 또는 EIAV-Null로 처리하였다. EIAV-LacZ 및 EIAV-null 벡터 그룹 둘 모두를 대조군 그룹으로 사용하였다. 각각의 그룹에 사용된 투여량의 요약은 표 3에 상술되어 있다.

[0213] GLP 안전성 연구에서, 3-5년령이고 체중이 2.1-3.6 kg인 6마리의 수컷 및 6마리의 암컷의 건강한 시노몰구스 마카크를 연구에 모집하였다. 동물을 대조군(TSSM 완충제) 그룹과 시험 Lenti-PD 그룹 사이에 균등하게 나누었다. GLP 독성학 연구를 위한 연구 그룹 및 벡터 할당은 표 4에 제시되어 있다.

[0214] 표 2: MPTP 효능 연구를 위한 연구 그룹 및 벡터 할당

EIAV 벡터	DNA 역가 (TU*/ml)	생물학적 역가 (TU/ml)	불임	미코플라스마	내독소
렌티-PD	7.62×10^7	7.57×10^7	통과	통과	통과
렌티-PD	3.67×10^7	4.47×10^7	통과	통과	통과
렌티-PD	1.09×10^7	7.03×10^7	통과	통과	통과
ProSavin®	6.12×10^7	5.80×10^7	통과	통과	통과
EIAV-CMV-Null	1.17×10^8	N/A	통과	통과	통과

* TU - 형질도입 단위; N/A - 해당 없음

[0215]

[0216] 표 3: 실험 그룹 투여 요약

동물 그룹 번호	벡터 연구 그룹	총 벡터 용량/동물
1	ProSavin®	1.22×10^7
2	렌티-PD (FD)	1.52×10^7
		2.18×10^7
3	렌티-PD (LD)	3.04×10^6
	1:5 희석	4.36×10^6
4	EIAV-CMV-LacZ	5.64×10^7
5	EIAV-CMV-Null	2.34×10^7

[0217]

[0218] 표 4. GLP 안전성 연구를 위한 연구 그룹 및 벡터 할당

치료 그룹	그룹 크기	총 벡터 용량/동물
렌티-PD	6 (3 수컷, 3 암컷)	7.0×10^6
TSSM 완충제 (대조군)	6 (3 수컷, 3 암컷)	-

[0219]

[0220] 임상 스코어

[0221] 효능 연구는 유럽(EU Directive 86/609/EEC)에 따라 수행하였다. 동물 고통을 최소화하기 위해 모든 노력을 기

울였으며, 동물 관리는 NHP의 건강관리 및 수용에 능숙한 수의사 및 동물 기술자에 의해 감독되었다. 2.5 ± 0.1세의 평균 연령 및 3.48 ± 0.1kg의 평균 체중을 갖는 16마리의 성체 수컷 시노물구스 원숭이(마카카 파스시쿨라리스(Macaca fascicularis), Sicombrec, Philippines에 의해 공급됨)를 음식 및 물에 자유롭게 접근하도록 하면서 표준 환경 조건(12시간 명암 주기, 온도: 22 ± 1°C 및 습도: 50%) 하에 수용하였다. MPTP 중독 후, 모든 연구 동물은 파킨슨병 증상을 나타내었고, 모든 그룹에서 임상 등급 스코어(CRS)에서 유사한 증가가 관찰되었다 (도 10a 참조).

[0222] 백터 투여 후, EIAV-Null 그룹은 모든 시점에 걸쳐 기준선과 유사한 스코어로 안정적으로 파킨슨병을 유지하였다. 다른 모든 치료 그룹(ProSavin®, Lenti-PD LD, Lenti-PD HD)의 경우, 6개월의 평가 기간에 걸쳐 CRS의 점진적인 개선이 관찰되었다. 3개 그룹 모두는 2 내지 6개월의 모든 시점에서 EIAV-Null 대조군 그룹과 CRS에서 유의한 차이를 나타내었다. 반복 측정 ANOVA 분석은 유의한 그룹 효과(p=0.0001) 및 시간 효과(p<0.0001)를 나타내었다. 피셔(Fisher) LSD 사후 분석은 모든 치료 그룹이 EIAV-Null 백터 대조군 그룹과 유의하게 상이하였다 (ProSavin®, p=0.0005; Lenti-PD HD, p=0.001; Lenti-PD LD, p=0.001).

[0223] 운동 활동

[0224] 운동 활동의 비디오 기반 정량화는 기준선, MPTP 중독 후 및 3 및 6개월에서의 백터 투여 후에 모든 동물에 대해 수행하였다. MPTP 중독 후, 모든 연구 동물은 이동된 총 거리(TDM)에 의해 평가되는 바와 같이 평균 자발 운동 활동에서 적어도 90%± 감소를 나타내었다(도 10b 참조). 백터 투여 후 3 및 6개월에, 3개 모두의 치료 그룹은 MPTP 후 값에 비해 TDM의 증가를 나타내었다. Lenti-PD HD 그룹은 둘 모두의 시점(3개월에 87% +/- 1 및 6개월에 91% +/- 1)에서 TDM의 가장 큰 개선을 나타내었다. MPTP 후 값으로부터의 변화 백분율로서 운동 활동의 차이를 보는 반복 측정 ANOVA는 유의한 그룹 효과(p=0.0003), 시간 효과(p<0.0001) 및 시간 그룹 효과(p<0.0001)를 나타내었다. LSD 사후 분석은 모든 치료 그룹이 EIAV-Null 백터 대조군 그룹과 유의하게 상이함을 나타내었다(ProSavin®, p=0.001; Lenti-PD LD, p=0.002; Lenti-PD HD, p<0.001).

[0225] 생체분포

[0226] GLP 안전성 연구의 각각의 동물로부터, 2 및 4주에 백혈구연층의 샘플을 수집하고 분석하였고, 백터 존재에 대해 qPCR 또는 qRT-PCR 분석에 의해 처리 후 2주에 혈장 샘플을 수집하고 분석하였다. 연구 종료시에 측정된 다양한 조직 및 기관 중량에 대해 전체 육안 및 현미경 검사를 수행하였다. 추가 조직 및 유체 샘플을 또한 뇌 외부의 백터 존재에 대해 수집하였고, Lenti-PD 백터 또는 트랜스진(transgene)의 구성요소에 대한 항체 반응의 웨스턴 블롯 분석을 위한 연구 전체에 걸쳐 주기적인 혈액 샘플링을 수행하였다. 백터 또는 완충액 투여 전 및 후에 획득된 샘플에 대해 완전한 임상 화학 및 소변 분석을 또한 수행하였다. 전신 생체분포 분석은 백터-관련 RNA 및 DNA 서열이 Lenti-PD 처리 동물의 대부분의 생물학적 샘플에서 검출되지 않았음을 나타내었다. 백터 관련 DNA 서열은 검정에 대한 정량화의 하한 미만인 수준의 적은 수의 샘플에서만 검출되었다. 백터 입자(RNA) 전과 또는 혈장에서의 지속성 및 뇌척수액에서의 shedding(shedding)은 없었다. 백터 관련 RNA 또는 DNA 서열의 일관되거나 강력한 존재의 징후는 없었다.

[0227] 독성학

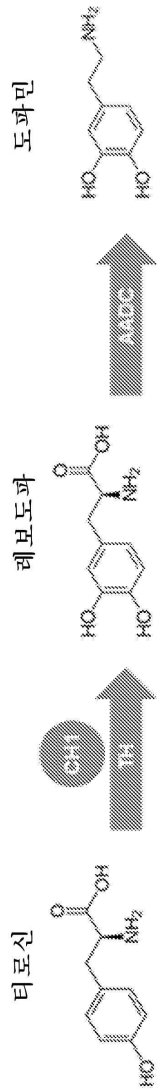
[0228] Lenti-PD에 대한 독성 평가는 사망률, 임상 징후, 체중 및 정성적인 음식 섭취를 기반으로 하였다. 또한, 검안경검사, 심전도법 및 혈압 측정에 의해 인생(in-life) 평가를 수행하였다. 우수 실험실 관리기준(Good Laboratory Practice; GLP) 독성학 연구는 정상적 건강한 시노물구스 마카카에서 Lenti-PD 백터의 양측 선조체 내 전달의 내약성을 조사하였다. 이 연구에 사용된 백터는 우수 의약품 제조관리 기준(Good Manufacturing Practice; GMP) 제조 공정을 사용하여 생산되었다. 26주의 관찰 기간 동안, Lenti-PD는 내약성이 우수하고, 임상 징후 및 비정상적인 관찰이 인지되지 않은 것으로 입증되었다. 신체 검사 및 활동, 운동이상증 등급의 평가, 및 거동 스코어링은 Lenti-PD 관련 효과를 나타내지 않았다. 또한, 체중, 식욕, 검안경검사, 심전도(ECG), 혈압, 임상 병리, 육안 소견 또는 기관 중량에 있어서 치료 관련 변화는 없었다. Lenti-PD의 치료와 관련이 있는 것으로 간주되는 현미경적 발견은 주사 부위에서 착색된 대식세포 침윤이 있거나 없는 최소 내지 경미한 혈관주위 단핵 세포 침윤이었다. 이들은 임의의 전신 관찰과 관련이 없었다.

[0229] 상기 명세서에 언급된 모든 간행물은 참조로서 본원에 포함된다. 본 발명의 개시의 기재된 방법 및 시스템의 다양한 변형 및 변화는 본 발명의 개시의 범위 및 사상으로부터 벗어남이 없이 당업자에게 명백할 것이다. 본 발명의 개시는 특정한 바람직한 구현예와 관련하여 기재되었으나, 청구된 바와 같은 본 발명은 상기 특정 구현예로 부당하게 제한되지 않아야 함이 이해되어야 한다. 또한, 분자생물학, 바이러스학, 신경생물학 또는 관련 분

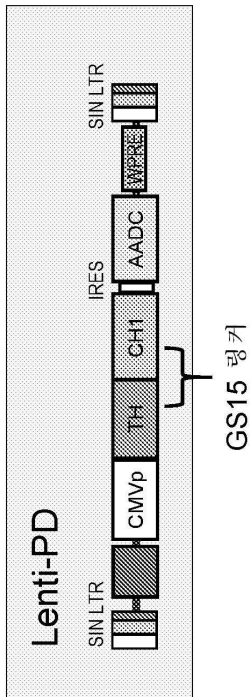
야의 당업자에게 명백한 본 발명을 수행하기 위한 기재된 방식의 다양한 변형은 하기 청구항의 범위 내인 것으로 의도된다.

도면

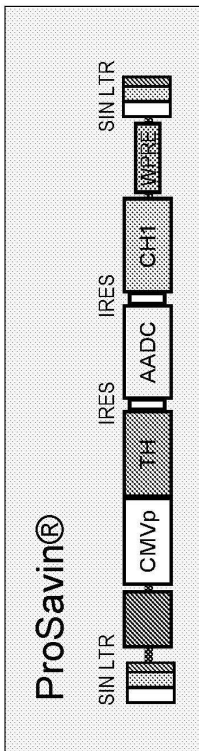
도면1



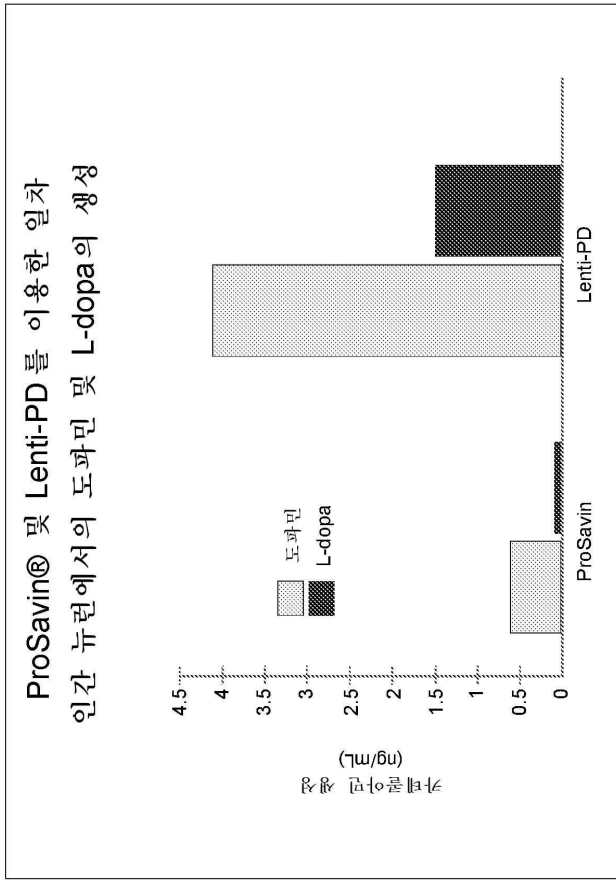
도면2a



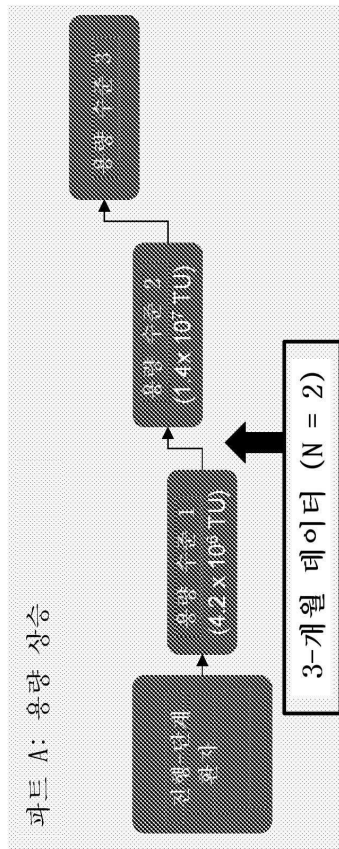
도면2b



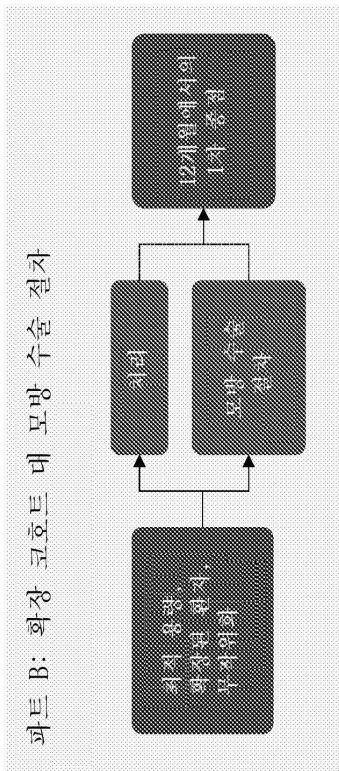
도면3



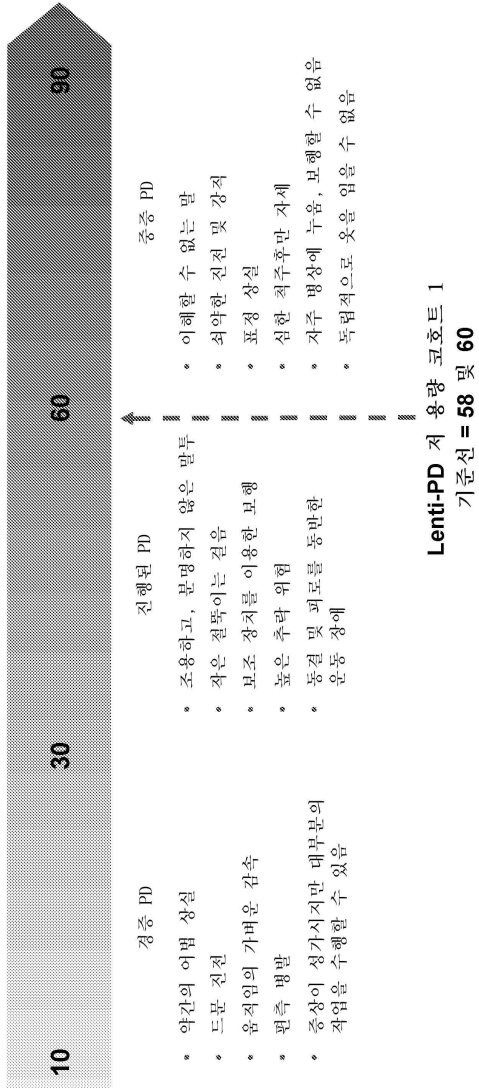
도면4a



도면4b

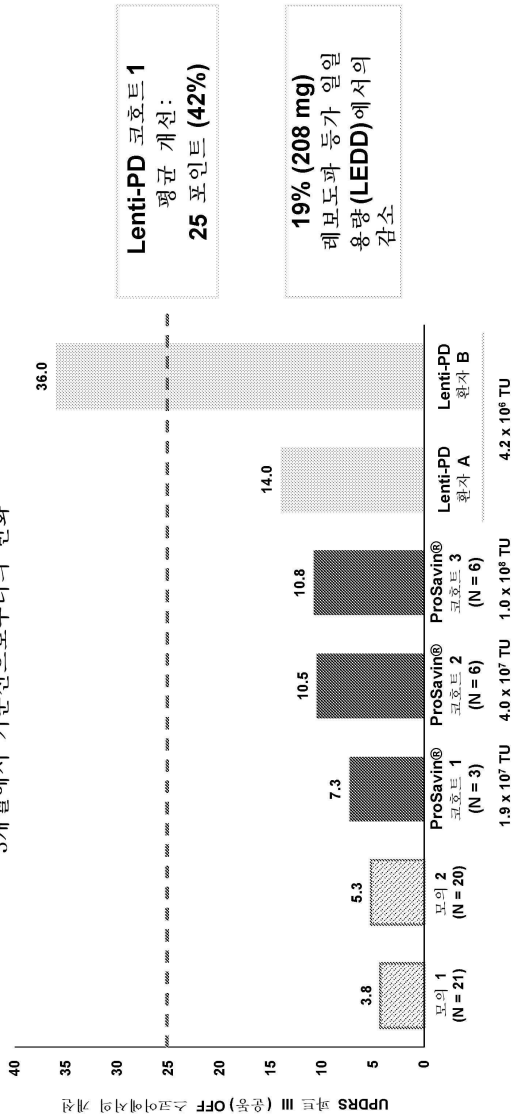


도면5



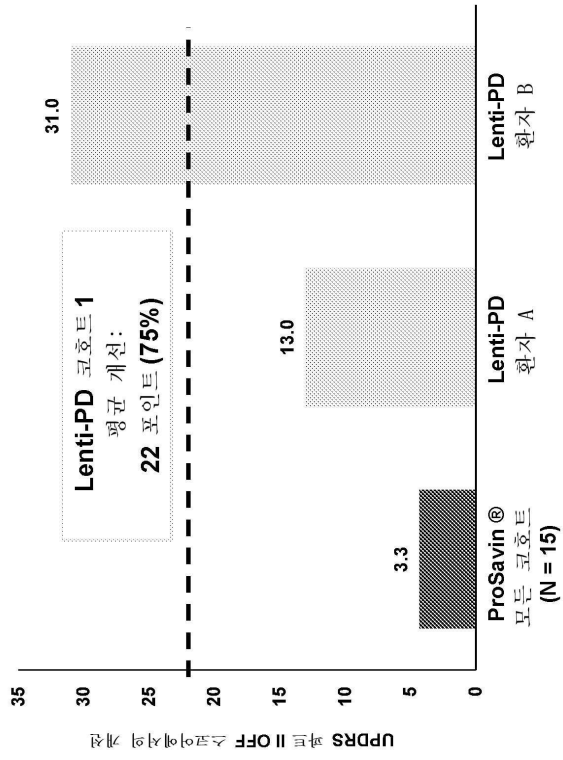
도면6

3개월에서 기준선으로부터의 변화



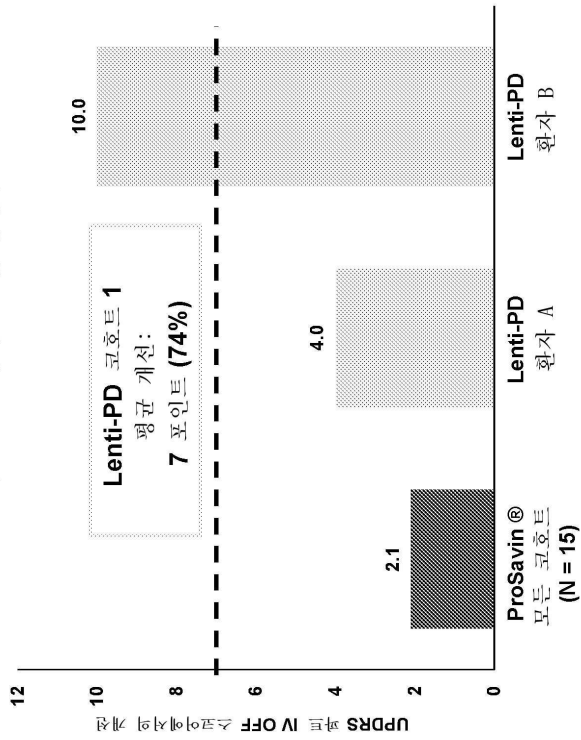
도면7a

파트 II (일상 생활 활동)



도면7b

파트 IV (치료 합병증)



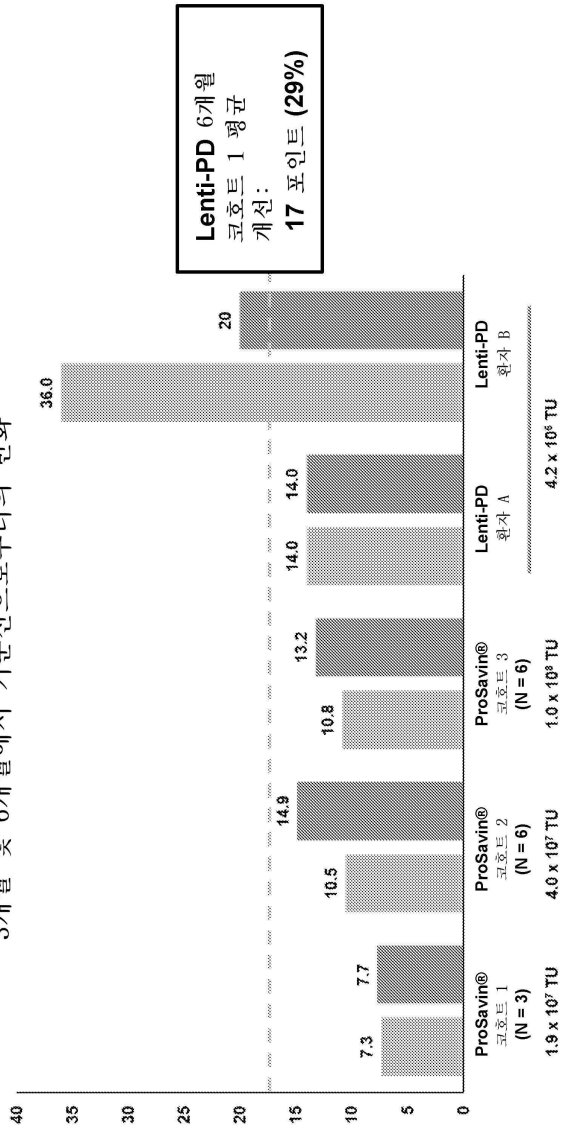
도면8

	기준선 (Min - Max)	3개월 (Min - Max)	기준선으로부터의 개선
운동이상증이 없는 ON 시간	8.0 시간 (6.5 - 9.5)	10.1 시간 (6.1 - 14.1)	2.1 시간
운동이상증이 있는 ON 시간	6.1 시간 (6.0 - 6.2)	2.6 시간 (2.0 - 3.3)	3.5 시간
심각한 운동이상증이 없는 ON 시간	12.5 시간 (11.1 - 14.0)	12.4 시간 (8.8 - 16.0)	-0.1 시간
심각한 운동이상증이 있는 ON 시간	1.5 시간 (1.5 - 1.6)	0.2 시간 (0.0 - 0.5)	1.3 시간
OFF 시간	1.8 시간 (0.5 - 3.1)	3.4 시간 (0.0 - 6.7)	-1.6 시간
레보도파 등가 용량 (LDD)	1116.5 mg (1108 mg - 1125 mg)	908.5 mg (842 mg - 975 mg)	208 mg만큼 감소 (19%)

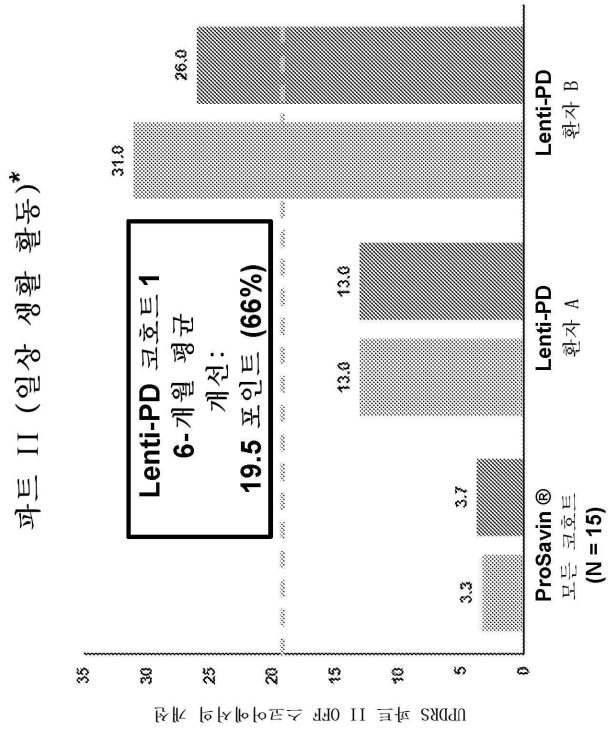
표 1. 임상 시험 결과 요약

도면9a

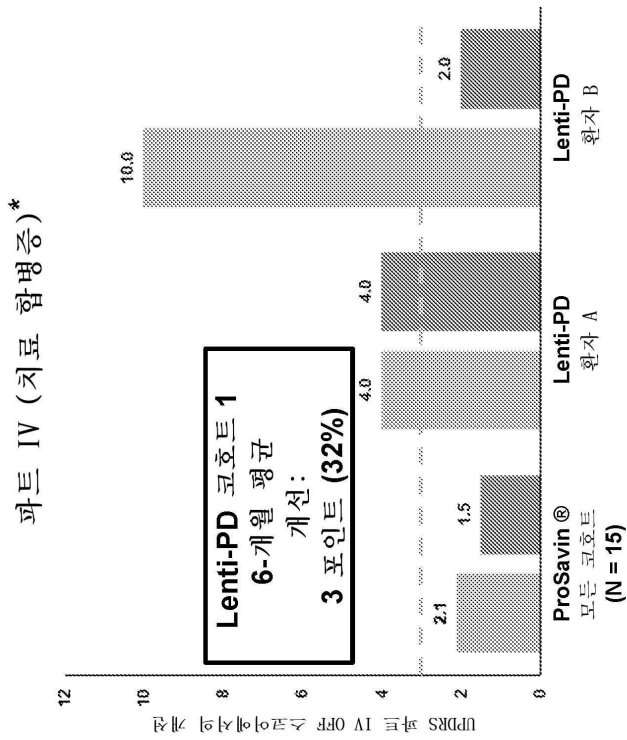
3개월 및 6개월에서 기준선으로부터의 변화 *



도면9b



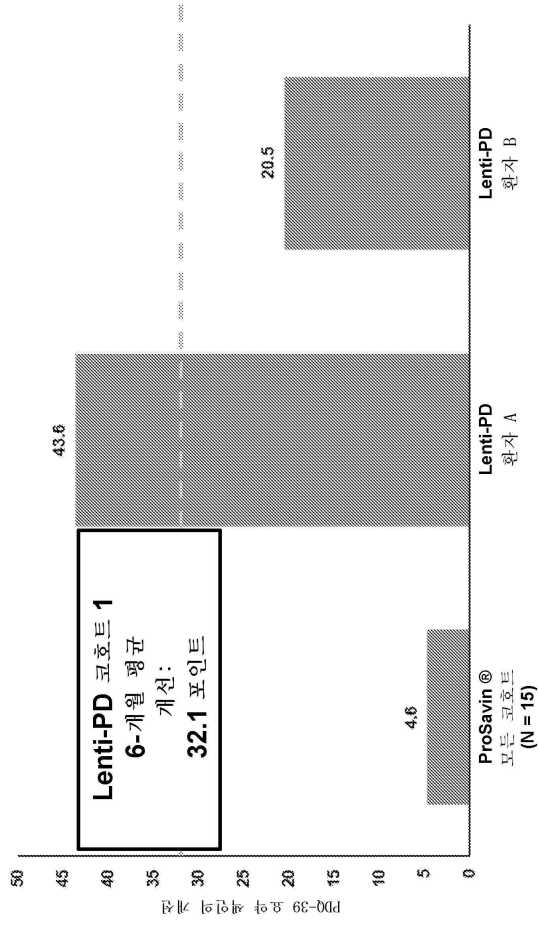
도면9c



*이들 데이터는 헤드-투-헤드 임상 시험이 아니라 교차-시험 비교를 기반으로 한다. 결과로서, 이들 데이터는 직접 비교할 수 없다.

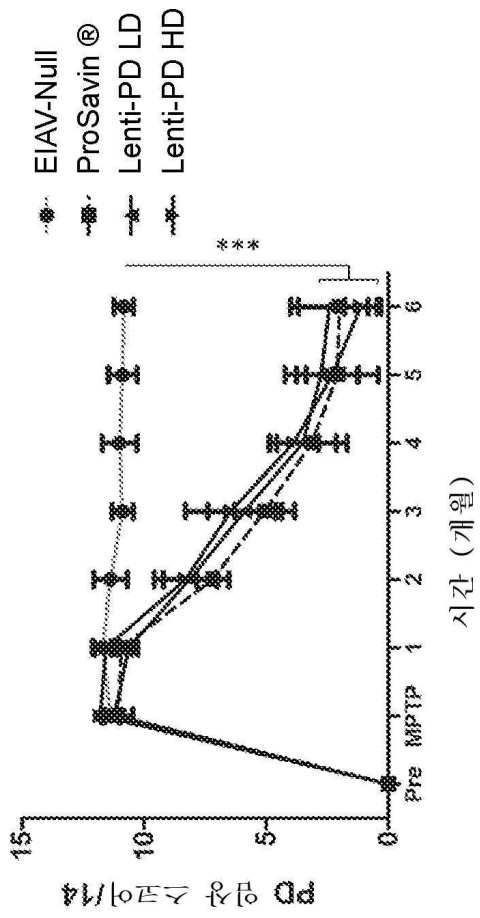
도면9d

PDQ-39 요약 색인: 6개월에서 기준선으로부터의 변화.*

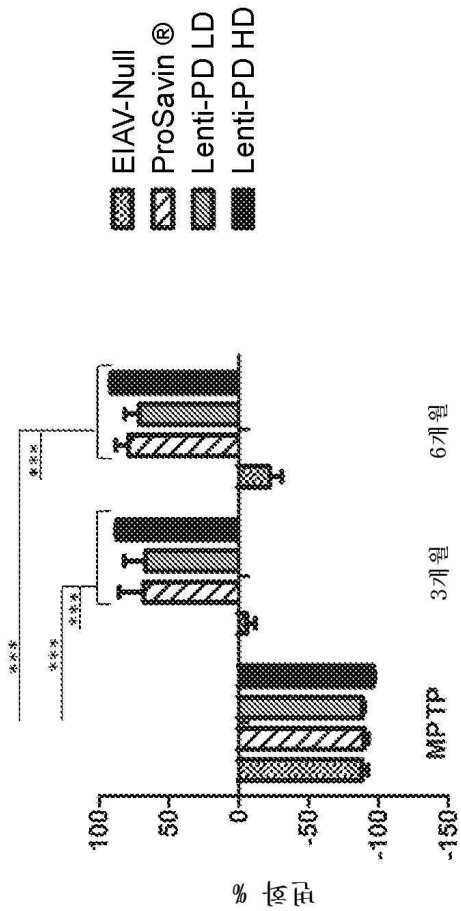


*이들 데이터는 헤드-투-헤드 임상 시험이 아니라 교차-시험 비교를 기반으로 합니다. 결과로서, 이들 데이터는 직접 비교할 수 없습니다.

도면10a



도면10b



서열목록

SEQUENCE LISTING

- <110> AXOVANT SCIENCES GMBH; OXFORD BIOMEDICA LTD.
 CORCORAN, GAVIN
 STONE, MICHELE
 MITROPHANOUS, KYRIACOS
 RALPH, SCOTT
 STEWART, HANNAH
 KINGSMAN, ALAN

- <120> GENE THERAPY COMPOSITIONS AND METHODS FOR TREATING PARKINSON'S DISEASE
- <130> 4226.038PC02/BNC/PMR
- <150> US 62/871,007
- <151> 2019-07-05
- <150> US 62/816,170

<151> 2019-03-10

<160> 10

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic linker-encoding oligonucleotide

<400> 1

ggaggtggcg ggtccggggg cggggtagc ggtggcgggg gctcc 45

<210> 2

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic linker peptide

<400> 2

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 3

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic linker-encoding oligonucleotide

<400> 3

gggggaggcg gtagcggcgg agggggctcc ggcggaggcg ggagc 45

<210> 4

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic linker peptide

<400> 4

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 20 25

<210> 5

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic linker peptide

<400> 5

Asn Phe Ile Arg Gly Arg Glu Asp Leu Leu Glu Lys Ile Ile Arg Gln
1 5 10 15

Lys Gly Ser Ser Asn
 20

<210> 6

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic linker peptide

<400> 6

Asn Leu Ser Ser Asp Ser Ser Leu Ser Ser Pro Ser Ala Leu Asn Ser
1 5 10 15

Pro Gly Ile Glu Gly Leu Ser
 20

<210> 7

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic linker peptide

<400> 7

Gln Gly Ala Thr Phe Ala Leu Arg Gly Asp Asn Pro Gln Gly
1 5 10

<210> 8

<211> 18

<212> PRT

<213

> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic linker peptide

<400> 8

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

1 5 10 15

Pro Gly

<210> 9

<211> 148

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<220><223> Truncated TH linked to AADC via a GS15 linker

<400> 9

ggcgctcct ggaggtgtc caggatgagc tggacaccct tgccatgcg ctgagcgcca 60

tcggcggggg aggcggtagc ggcggagggg gctccggcgg aggcgggagc atggacgcca 120

gtgagttccg aaggcgcggc aaggagat 148

<210> 10

<211> 50

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<220><223> Truncated TH linked to AADC via a GS15 linker

<400> 10

Arg Arg Ser Leu Glu Gly Val Gln Asp Glu Leu Asp Thr Leu Ala His

1 5 10 15

Ala Leu Ser Ala Ile Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

20 25 30

Gly Gly Gly Gly Ser Met Asp Ala Ser Glu Phe Arg Arg Arg Gly Lys

35 40 45

Glu Met

50