(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0042754
(43) 공개일자 2023년03월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/00 (2006.01) *A61K 38/00* (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) *C12N 15/62* (2006.01)
C12N 15/88 (2017.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/00 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-7008126
(22) 출원일자(국제) 2021년08월06일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2023년03월07일
(86) 국제출원번호 PCT/US2021/045012
(87) 국제공개번호 WO 2022/032140
국제공개일자 2022년02월10일
(30) 우선권주장
63/062,844 2020년08월07일 미국(US)
63/160,215 2021년03월12일 미국(US)

(71) 출원인
아미쿠스 세라퓨틱스, 인코포레이티드
미국 08512 뉴저지주 크랜버리 세다 브룩 드라이브 1
(72) 발명자
바우만, 조셉
미국 19104, 펜실베니아주, 필라델피아, 3675 마켓 스트리트, 아미쿠스 테라퓨틱스, 인코포레이티드
우, 시아오양
미국 19104, 펜실베니아주, 필라델피아, 3675 마켓 스트리트, 아미쿠스 테라퓨틱스, 인코포레이티드
머캐너니, 요리아
미국 19104, 펜실베니아주, 필라델피아, 3675 마켓 스트리트, 아미쿠스 테라퓨틱스, 인코포레이티드
(74) 대리인
최은선

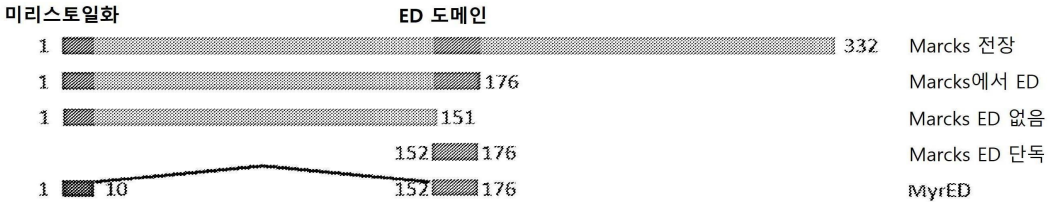
전체 청구항 수 : 총 94 항

(54) 발명의 명칭 **소포 표적화 단백질 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 개시내용은 펩티드 서열이 유전자 치료를 통해 생성된 단백질을 엑소좀으로 표적화하는 유전 장애를 치료하기 위한 신규 방법을 제공한다. 이러한 단백질이 로딩된 엑소좀은 형질도입되지 않은 세포에 들어가 병리를 교정할 수 있다. 또한, 유전자 치료 조성물, 단백질 대체 요법 조성물, 약제학적 조성물, 치료 방법, 유전자 치료 조성물 및 재조합 단백질의 용도도 또한 개시되어 있다. 이 방법은 또한 시험관 내 재조합 단백질 수율을 개선하는 데 사용될 수 있다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61K 48/00 (2013.01)
C12N 15/62 (2013.01)
C12N 15/88 (2013.01)
C07K 2319/02 (2013.01)
C07K 2319/033 (2013.01)
C07K 2319/055 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

이펙터 도메인(ED) 도메인에 연결된 신호 도메인을 포함하는 막 연관-ED 단백질로서,

a. 상기 신호 도메인은 상기 이펙터 도메인에 직접 연결되거나; 또는

b. 상기 신호 도메인은 적어도 제1 링커 펩티드에 의해 상기 이펙터 도메인에 연결되고, 여기서 제1 링커 펩티드는 서열번호 143, 서열번호 144, 서열번호 145, 서열번호 146, 서열번호 147, 서열번호 148, 서열번호 149, 서열번호 150, 서열번호 151, 서열번호 152 또는 서열번호 153과 적어도 70%의 서열 유사성을 포함하는 아미노산 서열을 갖는, 막 연관-ED 단백질.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 신호 도메인은 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 10, 서열번호 11, 서열번호 12, 서열번호 155, 서열번호 156, 서열번호 157, 서열번호 158, 서열번호 159 또는 서열번호 165와 적어도 70%의 서열 유사성을 포함하는 아미노산 서열을 갖고, 단 막 연관-ED 단백질의 생성된 아미노산 서열은 서열번호 38이 아닌, 막 연관-ED 단백질.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 신호 도메인은 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 10, 서열번호 11, 서열번호 12, 서열번호 155, 서열번호 156, 서열번호 157, 서열번호 158, 서열번호 159 또는 서열번호 165와 적어도 90%의 서열 유사성을 포함하는 아미노산 서열을 갖고, 단 막 연관-ED 단백질의 생성된 아미노산 서열은 서열번호 38이 아닌, 막 연관-ED 단백질.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 신호 도메인은 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 10, 서열번호 11, 서열번호 12, 서열번호 155, 서열번호 156, 서열번호 157, 서열번호 158, 서열번호 159 또는 서열번호 165를 포함하는 아미노산 서열을 갖고, 단 막 연관-ED 단백질의 생성된 아미노산 서열은 서열번호 38이 아닌, 막 연관-ED 단백질.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 ED 도메인은 서열번호 13, 서열번호 14, 서열번호 15, 서열번호 16, 서열번호 17, 서열번호 18, 서열번호 19, 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 22, 서열번호 23, 서열번호 24, 서열번호 25, 서열번호 26, 서열번호 27, 서열번호 28, 서열번호 29 또는 서열번호 30과 적어도 70%의 서열 유사성을 포함하는 아미노산 서열을 갖고, 단 막 연관-ED 단백질의 생성된 아미노산 서열은 서열번호 38이 아닌, 막 연관-ED 단백질.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 ED 도메인은 서열번호 13, 서열번호 14, 서열번호 15, 서열번호 16, 서열번호 17, 서열번호 18, 서열번호 19, 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 22, 서열번호 23, 서열번호 24, 서열번호 25, 서열번호 26, 서열번호 27, 서열번호 28, 서열번호 29 또는 서열번호 30과 적어도 90%의 서열 유사성을 포함하는 아미노산 서열을 갖고, 단 막 연관-ED 단백질의 생성된 아미노산 서열은 서열번호 38이 아닌, 막 연관-ED 단백질.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 ED 도메인은 서열번호 13, 서열번호 14, 서열번호 15, 서열번호 16, 서열번호 17, 서열번호 18, 서열번호 19, 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 22, 서열번호 23, 서열번호 24, 서열번호 25, 서열번호 26, 서열번호 27, 서열번호 28, 서열번호 29 또는 서열번호 30을 포함하는 아미노산 서열을 갖고, 단 막 연관-ED 단백질의 생성된 아미노산 서열은 서열번호 38이 아닌, 막 연관-ED 단백질.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 막 연관-ED 단백질은 서열번호 31, 서열번호 32, 서열번호 33, 서열번호 34, 서열번호 35, 서열번호 36, 서열번호 37, 서열번호 39, 서열번호 40, 서열번호 41, 서열번호 42, 서열번호 43, 서열번호 44, 서열번호 45, 서열번호 46, 서열번호 47, 서열번호 48, 서열번호 49, 서열번호 50, 서열번호 51, 서열번호 52, 서열번호 53, 서열번호 54, 서열번호 55, 서열번호 56, 서열번호 57, 서열번호 58, 서열번호 59, 서열번호 60, 서열번호 61, 서열번호 62, 서열번호 63, 서열번호 64, 서열번호 65, 서열번호 66, 서열번호 67, 서열번호 68, 서열번호 69, 서열번호 70, 서열번호 71, 서열번호 72, 서열번호 73, 서열번호 74, 서열번호 75, 서열번호 76, 서열번호 77, 서열번호 78, 서열번호 79, 서열번호 80, 서열번호 81, 서열번호 82, 서열번호 83, 서열번호 84, 서열번호 85, 서열번호 86, 서열번호 87, 서열번호 88, 서열번호 89, 서열번호 90, 서열번호 91, 서열번호 92, 서열번호 93, 서열번호 94, 서열번호 95, 서열번호 96, 서열번호 97, 서열번호 98, 서열번호 99, 서열번호 100, 서열번호 101, 서열번호 102, 서열번호 103, 서열번호 104, 서열번호 105, 서열번호 106, 서열번호 107, 서열번호 108, 서열번호 109, 서열번호 110, 서열번호 111, 서열번호 112, 서열번호 113, 서열번호 114, 서열번호 115, 서열번호 116, 서열번호 117, 서열번호 118, 서열번호 119, 서열번호 120, 서열번호 121, 서열번호 122, 서열번호 123, 서열번호 124, 서열번호 125, 서열번호 126, 서열번호 127, 서열번호 128, 서열번호 129, 서열번호 130, 서열번호 131, 서열번호 132, 서열번호 133, 서열번호 134, 서열번호 135, 서열번호 136, 서열번호 137, 서열번호 138, 서열번호 139, 서열번호 140, 서열번호 141 또는 서열번호 142와 적어도 70%의 서열 유사성을 포함하는 아미노산 서열을 갖는, 막 연관-ED 단백질.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 막 연관-ED 단백질은 서열번호 31, 서열번호 32, 서열번호 33, 서열번호 34, 서열번호 35, 서열번호 36, 서열번호 37, 서열번호 39, 서열번호 40, 서열번호 41, 서열번호 42, 서열번호 43, 서열번호 44, 서열번호 45, 서열번호 46, 서열번호 47, 서열번호 48, 서열번호 49, 서열번호 50, 서열번호 51, 서열번호 52, 서열번호 53, 서열번호 54, 서열번호 55, 서열번호 56, 서열번호 57, 서열번호 58, 서열번호 59, 서열번호 60, 서열번호 61, 서열번호 62, 서열번호 63, 서열번호 64, 서열번호 65, 서열번호 66, 서열번호 67, 서열번호 68, 서열번호 69, 서열번호 70, 서열번호 71, 서열번호 72, 서열번호 73, 서열번호 74, 서열번호 75, 서열번호 76, 서열번호 77, 서열번호 78, 서열번호 79, 서열번호 80, 서열번호 81, 서열번호 82, 서열번호 83, 서열번호 84, 서열번호 85, 서열번호 86, 서열번호 87, 서열번호 88, 서열번호 89, 서열번호 90, 서열번호 91, 서열번호 92, 서열번호 93, 서열번호 94, 서열번호 95, 서열번호 96, 서열번호 97, 서열번호 98, 서열번호 99, 서열번호 100, 서열번호 101, 서열번호 102, 서열번호 103, 서열번호 104, 서열번호 105, 서열번호 106, 서열번호 107, 서열번호 108, 서열번호 109, 서열번호 110, 서열번호 111, 서열번호 112, 서열번호 113, 서열번호 114, 서열번호 115, 서열번호 116, 서열번호 117, 서열번호 118, 서열번호 119, 서열번호 120, 서열번호 121, 서열번호 122, 서열번호 123, 서열번호 124, 서열번호 125, 서열번호 126, 서열번호 127, 서열번호 128, 서열번호 129, 서열번호 130, 서열번호 131, 서열번호 132, 서열번호 133, 서열번호 134, 서열번호 135, 서열번호 136, 서열번호 137, 서열번호 138, 서열번호 139, 서열번호 140, 서열번호 141 또는 서열번호 142와 적어도 90%의 서열 유사성을 포함하는 아미노산 서열을 갖는, 막 연관-ED 단백질.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 막 연관-ED 단백질은 서열번호 31, 서열번호 32, 서열번호 33, 서열번호 34, 서열번호 35, 서열번호 36, 서열번호 37, 서열번호 39, 서열번호 40, 서열번호 41, 서열번호 42, 서열번호 43, 서열번호 44, 서열번호 45, 서열번호 46, 서열번호 47, 서열번호 48, 서열번호 49, 서열번호 50, 서열번호 51, 서열번호 52, 서열번호 53, 서열번호 54, 서열번호 55, 서열번호 56, 서열번호 57, 서열번호 58, 서열번호 59, 서열번호 60, 서열번호 61, 서열번호 62, 서열번호 63, 서열번호 64, 서열번호 65, 서열번호 66, 서열번호 67, 서열번호 68, 서열번호 69, 서열번호 70, 서열번호 71, 서열번호 72, 서열번호 73, 서열번호 74, 서열번호 75, 서열번호 76, 서열번호 77, 서열번호 78, 서열번호 79, 서열번호 80, 서열번호 81, 서열번호 82, 서열번호 83, 서열번호 84, 서열번호 85, 서열번호 86, 서열번호 87, 서열번호 88, 서열번호 89, 서열번호 90, 서열번호 91, 서열번호 92, 서열번호 93, 서열번호 94, 서열번호 95, 서열번호 96, 서열번호 97, 서열번호 98, 서열번호 99, 서열번호 100, 서열번호 101, 서열번호 102, 서열번호 103, 서열번호 104, 서열번호 105, 서열번호 106, 서열번호 107, 서열번호 108, 서열번호 109, 서열번호 110, 서열번호 111, 서열번호 112, 서열번호 113, 서열번호 114, 서열번호 115, 서열번호 116, 서열번호 117, 서열번호 118, 서열번호 119, 서열번호 120, 서열번호 121, 서열번호 122, 서열번호 123, 서열번호 124, 서열번호 125, 서열번호 126, 서열번호 127, 서열번호 128, 서열번호 129,

서열번호 130, 서열번호 131, 서열번호 132, 서열번호 133, 서열번호 134, 서열번호 135, 서열번호 136, 서열번호 137, 서열번호 138, 서열번호 139, 서열번호 140, 서열번호 141 또는 서열번호 142를 포함하는 아미노산 서열을 갖는, 막 연관-ED 단백질.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 곡률 감지 도메인을 추가로 포함하는, 막 연관-ED 단백질.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 막 연관-ED 단백질의 N-말단은 메티오닌을 갖지 않는, 막 연관-ED 단백질.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 막 연관-ED 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 14

소포 표적화 단백질 및 관심 단백질을 포함하는 융합 단백질로서, 상기 소포 표적화 단백질은 지질 접합 도메인 및 이펙터 도메인(ED)을 포함하고;

(a) 소포 표적화 단백질은 이펙터 도메인(ED)에 직접 연결된 지질 접합 도메인을 포함하거나; 또는

(b) 소포 표적화 단백질은 제2 링커 펩티드에 의해 이펙터 도메인(ED)에 연결된 지질 접합 도메인을 포함하고, 제2 링커 펩티드는 서열번호 143, 서열번호 144, 서열번호 145, 서열번호 146, 서열번호 147, 서열번호 148, 서열번호 149, 서열번호 150, 서열번호 151, 서열번호 152 또는 서열번호 153과 적어도 70%의 서열 유사성을 포함하는 아미노산 서열을 갖는, 융합 단백질.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 소포 표적화 단백질은 서열번호 31, 서열번호 32, 서열번호 33, 서열번호 34, 서열번호 35, 서열번호 36, 서열번호 37, 서열번호 39, 서열번호 40, 서열번호 41, 서열번호 42, 서열번호 43, 서열번호 44, 서열번호 45, 서열번호 46, 서열번호 47, 서열번호 48, 서열번호 49, 서열번호 50, 서열번호 51, 서열번호 52, 서열번호 53, 서열번호 54, 서열번호 55, 서열번호 56, 서열번호 57, 서열번호 58, 서열번호 59, 서열번호 60, 서열번호 61, 서열번호 62, 서열번호 63, 서열번호 64, 서열번호 65, 서열번호 66, 서열번호 67, 서열번호 68, 서열번호 69, 서열번호 70, 서열번호 71, 서열번호 72, 서열번호 73, 서열번호 74, 서열번호 75, 서열번호 76, 서열번호 77, 서열번호 78, 서열번호 79, 서열번호 80, 서열번호 81, 서열번호 82, 서열번호 83, 서열번호 84, 서열번호 85, 서열번호 86, 서열번호 87, 서열번호 88, 서열번호 89, 서열번호 90, 서열번호 91, 서열번호 92, 서열번호 93, 서열번호 94, 서열번호 95, 서열번호 96, 서열번호 97, 서열번호 98, 서열번호 99, 서열번호 100, 서열번호 101, 서열번호 102, 서열번호 103, 서열번호 104, 서열번호 105, 서열번호 106, 서열번호 107, 서열번호 108, 서열번호 109, 서열번호 110, 서열번호 111, 서열번호 112, 서열번호 113, 서열번호 114, 서열번호 115, 서열번호 116, 서열번호 117, 서열번호 118, 서열번호 119, 서열번호 120, 서열번호 121, 서열번호 122, 서열번호 123, 서열번호 124, 서열번호 125, 서열번호 126, 서열번호 127, 서열번호 128, 서열번호 129, 서열번호 130, 서열번호 131, 서열번호 132, 서열번호 133, 서열번호 134, 서열번호 135, 서열번호 136, 서열번호 137, 서열번호 138, 서열번호 139, 서열번호 140, 서열번호 141 또는 서열번호 142와 적어도 70%의 서열 유사성을 포함하는 아미노산 서열을 갖는, 소포 표적화 단백질.

청구항 16

제14항에 있어서, 상기 소포 표적화 단백질은 서열번호 31, 서열번호 32, 서열번호 33, 서열번호 34, 서열번호 35, 서열번호 36, 서열번호 37, 서열번호 39, 서열번호 40, 서열번호 41, 서열번호 42, 서열번호 43, 서열번호 44, 서열번호 45, 서열번호 46, 서열번호 47, 서열번호 48, 서열번호 49, 서열번호 50, 서열번호 51, 서열번호 52, 서열번호 53, 서열번호 54, 서열번호 55, 서열번호 56, 서열번호 57, 서열번호 58, 서열번호 59, 서열번호 60, 서열번호 61, 서열번호 62, 서열번호 63, 서열번호 64, 서열번호 65, 서열번호 66, 서열번호 67, 서열번호 68, 서열번호 69, 서열번호 70, 서열번호 71, 서열번호 72, 서열번호 73, 서열번호 74, 서열번호 75, 서열번호

76, 서열번호 77, 서열번호 78, 서열번호 79, 서열번호 80, 서열번호 81, 서열번호 82, 서열번호 83, 서열번호 84, 서열번호 85, 서열번호 86, 서열번호 87, 서열번호 88, 서열번호 89, 서열번호 90, 서열번호 91, 서열번호 92, 서열번호 93, 서열번호 94, 서열번호 95, 서열번호 96, 서열번호 97, 서열번호 98, 서열번호 99, 서열번호 100, 서열번호 101, 서열번호 102, 서열번호 103, 서열번호 104, 서열번호 105, 서열번호 106, 서열번호 107, 서열번호 108, 서열번호 109, 서열번호 110, 서열번호 111, 서열번호 112, 서열번호 113, 서열번호 114, 서열번호 115, 서열번호 116, 서열번호 117, 서열번호 118, 서열번호 119, 서열번호 120, 서열번호 121, 서열번호 122, 서열번호 123, 서열번호 124, 서열번호 125, 서열번호 126, 서열번호 127, 서열번호 128, 서열번호 129, 서열번호 130, 서열번호 131, 서열번호 132, 서열번호 133, 서열번호 134, 서열번호 135, 서열번호 136, 서열번호 137, 서열번호 138, 서열번호 139, 서열번호 140, 서열번호 141 또는 서열번호 142와 적어도 90%의 서열 유사성을 포함하는 아미노산 서열을 갖는, 소포 표적화 단백질.

청구항 17

제14항에 있어서, 상기 소포 표적화 단백질은 서열번호 31, 서열번호 32, 서열번호 33, 서열번호 34, 서열번호 35, 서열번호 36, 서열번호 37, 서열번호 39, 서열번호 40, 서열번호 41, 서열번호 42, 서열번호 43, 서열번호 44, 서열번호 45, 서열번호 46, 서열번호 47, 서열번호 48, 서열번호 49, 서열번호 50, 서열번호 51, 서열번호 52, 서열번호 53, 서열번호 54, 서열번호 55, 서열번호 56, 서열번호 57, 서열번호 58, 서열번호 59, 서열번호 60, 서열번호 61, 서열번호 62, 서열번호 63, 서열번호 64, 서열번호 65, 서열번호 66, 서열번호 67, 서열번호 68, 서열번호 69, 서열번호 70, 서열번호 71, 서열번호 72, 서열번호 73, 서열번호 74, 서열번호 75, 서열번호 76, 서열번호 77, 서열번호 78, 서열번호 79, 서열번호 80, 서열번호 81, 서열번호 82, 서열번호 83, 서열번호 84, 서열번호 85, 서열번호 86, 서열번호 87, 서열번호 88, 서열번호 89, 서열번호 90, 서열번호 91, 서열번호 92, 서열번호 93, 서열번호 94, 서열번호 95, 서열번호 96, 서열번호 97, 서열번호 98, 서열번호 99, 서열번호 100, 서열번호 101, 서열번호 102, 서열번호 103, 서열번호 104, 서열번호 105, 서열번호 106, 서열번호 107, 서열번호 108, 서열번호 109, 서열번호 110, 서열번호 111, 서열번호 112, 서열번호 113, 서열번호 114, 서열번호 115, 서열번호 116, 서열번호 117, 서열번호 118, 서열번호 119, 서열번호 120, 서열번호 121, 서열번호 122, 서열번호 123, 서열번호 124, 서열번호 125, 서열번호 126, 서열번호 127, 서열번호 128, 서열번호 129, 서열번호 130, 서열번호 131, 서열번호 132, 서열번호 133, 서열번호 134, 서열번호 135, 서열번호 136, 서열번호 137, 서열번호 138, 서열번호 139, 서열번호 140, 서열번호 141 또는 서열번호 142를 포함하는 아미노산 서열을 갖는, 소포 표적화 단백질.

청구항 18

제14항에 있어서, 상기 지질 접합 도메인은 하나 이상의 신호 도메인을 포함하고, 상기 신호 도메인은 미리스토일화 신호 도메인, 팔미토일화 신호 도메인, 프레닐화 신호 도메인, 글리코실포스파티딜인시톨 앵커 단백질 및 BiP 분비 신호 도메인 중 하나 이상을 포함하는, 소포 표적화 단백질.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 지질 접합 도메인은 미리스토일화 신호 도메인인, 소포 표적화 단백질.

청구항 20

제18항 또는 제19항에 있어서, 상기 신호 도메인의 아미노산 서열은 단백질의 MARCKS, MARCKSL1 또는 BASP1 계열의 미리스토일화 신호 도메인과 적어도 70%의 유사성을 갖는, 소포 표적화 단백질.

청구항 21

제18항 또는 제19항에 있어서, 상기 신호 도메인의 아미노산 서열은 단백질의 MARCKS, MARCKSL1 또는 BASP1 계열의 미리스토일화 신호 도메인과 적어도 90%의 유사성을 갖는, 소포 표적화 단백질.

청구항 22

제18항 또는 제19항에 있어서, 상기 신호 도메인의 아미노산 서열은 단백질의 MARCKS, MARCKSL1 또는 BASP1 계열의 미리스토일화 신호 도메인과 100%의 유사성을 갖는, 소포 표적화 단백질.

청구항 23

제19항에 있어서, 상기 신호 도메인은 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 10, 서열번호 11, 서열번호 12, 서열번호 155, 서열번호 156, 서열번호 157, 서열번호 158, 서열번호 159 또는 서열번호 165와 적어도 70%의 서열 유사성을 포함하는 아미노산 서열을 갖고, 단 막 연관-ED 단백질의 생성된 아미노산 서열은 서열번호 38이 아닌, 소포 표적화 단백질.

청구항 24

제19항에 있어서, 상기 신호 도메인은 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 10, 서열번호 11, 서열번호 12, 서열번호 155, 서열번호 156, 서열번호 157, 서열번호 158, 서열번호 159 또는 서열번호 165와 적어도 90%의 서열 유사성을 포함하는 아미노산 서열을 갖고, 단 막 연관-ED 단백질의 생성된 아미노산 서열은 서열번호 38이 아닌, 소포 표적화 단백질.

청구항 25

제20항에 있어서, 상기 신호 도메인은 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 10, 서열번호 11, 서열번호 12, 서열번호 155, 서열번호 156, 서열번호 157, 서열번호 158, 서열번호 159 또는 서열번호 165를 포함하는 아미노산 서열을 갖고, 단 막 연관-ED 단백질의 생성된 아미노산 서열은 서열번호 38이 아닌, 소포 표적화 단백질.

청구항 26

제19항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ED 도메인은 서열번호 13, 서열번호 14, 서열번호 15, 서열번호 16, 서열번호 17, 서열번호 18, 서열번호 19, 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 22, 서열번호 23, 서열번호 24, 서열번호 25, 서열번호 26, 서열번호 27, 서열번호 28, 서열번호 29 또는 서열번호 30과 적어도 70%의 서열 유사성을 포함하는 아미노산 서열을 갖고, 단 막 연관-ED 단백질의 생성된 아미노산 서열은 서열번호 38이 아닌, 소포 표적화 단백질.

청구항 27

제19항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ED 도메인은 서열번호 13, 서열번호 14, 서열번호 15, 서열번호 16, 서열번호 17, 서열번호 18, 서열번호 19, 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 22, 서열번호 23, 서열번호 24, 서열번호 25, 서열번호 26, 서열번호 27, 서열번호 28, 서열번호 29 또는 서열번호 30과 적어도 90%의 서열 유사성을 포함하는 아미노산 서열을 갖고, 단 막 연관-ED 단백질의 생성된 아미노산 서열은 서열번호 38이 아닌, 소포 표적화 단백질.

청구항 28

제19항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ED 도메인은 서열번호 13, 서열번호 14, 서열번호 15, 서열번호 16, 서열번호 17, 서열번호 18, 서열번호 19, 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 22, 서열번호 23, 서열번호 24, 서열번호 25, 서열번호 26, 서열번호 27, 서열번호 28, 서열번호 29 또는 서열번호 30을 포함하는 아미노산 서열을 갖고, 단 막 연관-ED 단백질의 생성된 아미노산 서열은 서열번호 38이 아닌, 소포 표적화 단백질.

청구항 29

제14항에 있어서, 상기 소포 표적화 단백질은 Nef 단백질 또는 이의 변이체를 포함하는, 융합 단백질.

청구항 30

제14항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 소포 표적화 단백질은 엑소좀 및 세포외 소포 중 하나 이상을 표적화하는, 융합 단백질.

청구항 31

제14항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 관심 단백질은 치료 단백질인, 융합 단백질.

청구항 32

제31항에 있어서, 상기 치료 단백질은 리소좀 단백질을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 33

제31항에 있어서, 상기 치료 단백질은 CDKL5, 알파-갈락토시다제, β-갈락토시다제, β-헥소사미니다제, 갈락토실세라미다제, 아릴설파타제, β-글루코세레브로시다제, 글루코세레브로시다제, 리소좀 산 리파제, 리소좀 효소 산 스핑고미엘리나제, 포르밀글리신-생성 효소, 이두로니다제, 아세틸-CoA: 알파-글루코사미나이드 N-아세틸트랜스퍼라제, 글리코사미노글리칸 알파-L-이두로노하이드롤라제, 헤파란 N-설파타제, N-아세틸-α-D-글루코사미니다제(NAGLU), 이두로네이트-2-설파타제, 갈락토사민-6-설페이트 설파타제, N-아세틸갈락토사민-6-설파타제, 글리코사미노글리칸 N-아세틸갈락토사민 4-설파타제, β-글루쿠로니다제, 히알루로니다제, 알파-N-아세틸 뉴라미니다제(시알리다제), 강글리오사이드 시알리다제, 포스포트랜스퍼라제, 알파-글루코시다제, 알파-D-만노시다제, 베타-D-만노시다제, 아스파틸글루코사미니다제, 알파-L-푸코시다제, 바테닌, 팔미토일 단백질 티오에스테라제 및 기타 바텐-관련 단백질 또는 이의 효소 활성 단편을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 34

제31항에 있어서, 상기 바텐-관련 단백질은 세로이드-리포푸신증 뉴런 단백질 1, 세로이드-리포푸신증 뉴런 단백질 2, 세로이드-리포푸신증 뉴런 단백질 3, 세로이드-리포푸신증 뉴런 단백질 4, 세로이드-리포푸신증 뉴런 단백질 5, 세로이드-리포푸신증 뉴런 단백질 6, 세로이드-리포푸신증 뉴런 단백질 7, 세로이드-리포푸신증 뉴런 단백질 8, 세로이드-리포푸신증 뉴런 단백질 19, 세로이드-리포푸신증 뉴런 단백질 10, 세로이드-리포푸신증 뉴런 단백질 11, 세로이드-리포푸신증 뉴런 단백질 12, 세로이드-리포푸신증 뉴런 단백질 13 및 세로이드-리포푸신증 뉴런 단백질 14를 포함하는, 바텐-관련 단백질.

청구항 35

제31항에 있어서, 상기 치료 단백질은 호르몬 및 성장 및 분화 인자를 포함하는, 융합 단백질.

청구항 36

제35항에 있어서, 상기 호르몬 및 성장 및 분화 인자는 인슐린, 글루카곤, 성장 호르몬(GH), 부갑상선 호르몬(PTH), 성장 호르몬 방출 인자(GRF), 여포 자극 호르몬(FSH), 황체형성 호르몬(LH), 인간 융모막 성선자극 호르몬(hCG), 혈관 내피 성장 인자(VEGF), 안지오포이에틴, 안지오스타틴, 과립구 집락 자극 인자(GCSF), 에리스로포이에틴(EPO), 결합 조직 성장 인자(CTGF), 염기성 섬유아세포 성장 인자(bFGF), 산성 섬유아세포 성장 인자(aFGF), 표피 성장 인자(EGF), 혈소판-유래 성장 인자(PDGF), 인슐린 성장 인자 I(IGF-I), 인슐린 성장 인자 II(IGF-II), 형질전환 성장 인자, 헤레글루인 성장 인자, 뉴레귤린 성장 인자, ARIA 성장 인자, neu 분화 인자(NDF), 신경 성장 인자(NGF), 뇌-유래 뉴로트로핀 인자(BDNF), 뉴로트로핀 NT-3, 뉴로트로핀 NT-4/5, 섬모 뉴로트로핀 인자(CNTF), 신경아교세포주 유래 뉴로트로핀 인자(GDNF), 뉴투린, 아그린, 세마포린, 콜랩신, 네트린-1, 네트린-2, 간세포 성장 인자(HGF), 에프린, 노긴, 소닉 헤지호그 또는 티로신 수산화효소를 포함하는, 융합 단백질.

청구항 37

제36항에 있어서, 상기 형질전환 성장 인자는 TGFα, 액티빈, 인히빈, 뼈 형태형성 단백질(BMP-1), 뼈 형태형성 단백질(BMP-2), 뼈 형태형성 단백질(BMP-3), 뼈 형태형성 단백질(BMP-4), 뼈 형태형성 단백질(BMP-5), 뼈 형태형성 단백질(BMP-6), 뼈 형태형성 단백질(BMP-7), 뼈 형태형성 단백질(BMP-8), 뼈 형태형성 단백질(BMP-9), 뼈 형태형성 단백질(BMP-10), 뼈 형태형성 단백질(BMP-11), 뼈 형태형성 단백질(BMP-12), 뼈 형태형성 단백질(BMP-13), 뼈 형태형성 단백질(BMP-14) 또는 뼈 형태형성 단백질(BMP-15)을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 38

제31항에 있어서, 상기 치료 단백질은 면역계 조절 단백질을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 39

제38항에 있어서, 상기 면역계 조절 단백질은 사이토카인 및 림포카인을 포함하고, 사이토카인 및 림포카인은

트롬보포이에틴(TPO), 인터루킨-1(IL-1), 인터루킨-2(IL-2), 인터루킨-3(IL-3), 인터루킨-4(IL-4), 인터루킨-5(IL-5), 인터루킨-6(IL-6), 인터루킨-7(IL-7), 인터루킨-8(IL-8), 인터루킨-9(IL-9), 인터루킨-10(IL-10), 인터루킨-11(IL-11), 인터루킨-12(IL-12), 인터루킨-13(IL-13), 인터루킨-14(IL-14), 인터루킨-15(IL-15), 인터루킨-16(IL-16), 인터루킨-17(IL-17), 인터루킨-18(IL-18), 인터루킨-19(IL-19), 인터루킨-20(IL-20), 인터루킨-21(IL-21), 인터루킨-22(IL-22), 인터루킨-23(IL-23), 인터루킨-24(IL-24), 인터루킨-25(IL-25), 단핵구 화학유인 단백질, 백혈병 억제 인자, 과립구-대식세포 집락 자극 인자, Fas 리간드, 종양 괴사 인자 α, 종양 괴사 인자 β, 인터페론 α, β 및 γ, 줄기 세포 인자 또는 flk-2/flt3 리간드를 포함하는, 융합 단백질.

청구항 40

제31항에 있어서, 상기 치료 단백질은 면역글로불린 IgG, IgM, IgA, IgD 및 IgE, 키메라 면역글로불린, 인간화 항체, 단일 사슬 항체, T 세포 수용체, 키메라 T 세포 수용체, 단일 사슬 T 세포 수용체, 클래스 I MHC 분자, 클래스 II MHC 분자, 조작된 면역글로불린 또는 조작된 MHC 분자를 포함하는, 융합 단백질.

청구항 41

제31항에 있어서, 상기 치료 단백질은 보체 조절 단백질을 포함하고, 보체 조절 단백질은 막 보조인자 단백질(MCP), 붕괴 촉진 인자(DAF), CR1, CF2 또는 CD59를 포함하는, 융합 단백질.

청구항 42

제31항에 있어서, 상기 치료 단백질은 호르몬, 성장 인자, 사이토카인, 림포카인, 조절 단백질 또는 면역계 단백질에 대한 수용체를 포함하는, 융합 단백질.

청구항 43

제31항에 있어서, 상기 치료 단백질은 저밀도 지단백질(LDL) 수용체, 고밀도 지단백질(HDL) 수용체, 초저밀도 지단백질(VLDL) 수용체 또는 스캐빈저 수용체를 포함하는 콜레스테롤 조절 및/또는 지질 조정을 위한 수용체를 포함하는, 융합 단백질.

청구항 44

제31항에 있어서, 상기 치료 단백질은 글루코코르티코이드 수용체 및 에스트로겐 수용체, 비타민 D 수용체 또는 다른 핵 수용체를 포함하는 스테로이드 호르몬 수용체 슈퍼패밀리의 구성원을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 45

제31항에 있어서, 상기 치료 단백질은 jun, fos, max, mad, 혈청 반응 인자(SRF), AP-1, AP2, myb, MyoD 및 미오게닌, ETS-박스 함유 단백질, TFE3, E2F, ATF1, ATF2, ATF3, ATF4, ZF5, NFAT, CREB, HNF-4, C/EBP, SP1, CCAAT-박스 결합 단백질, 인터페론 조절 인자(IRF-1), 빌름스(Wilms) 종양 단백질, ETS-결합 단백질, STAT, GATA-박스 결합 단백질 또는 익상 나선 단백질의 포크헤드 계열을 포함하는 전사 인자를 포함하는, 융합 단백질.

청구항 46

제31항에 있어서, 상기 치료 단백질은 카바모일 합성효소 I, 오르니틴 트랜스카바밀라아제, 아르기노숙시네이트 합성효소, 아르기노숙시네이트 분해효소, 아르기나제, 푸마릴아세트아세테이트 가수분해효소, 페닐알라닌 수산화효소, 알파-1 항트립신, 글루코스-6-포스파타제, 포르포빌리노겐 데아미나제, 시스타티온 베타-합성효소, 분지쇄 케톤산 데카복실라제, 알부민, 이소발레릴-coA 탈수소효소, 프로피오닐 CoA 카복실라제, 메틸 말로닐 CoA 뮤타제, 글루타릴 CoA 탈수소효소, 인슐린, 베타-글루코시다제, 피루베이트 카복실레이트, 간 포스포릴라제, 포스포릴라제 키나제, 글리신 데카복실라제, H-단백질, T-단백질, 낭포성 섬유증 막관통 조절자(CFTR) 서열, 및 디스트로핀 유전자 생성물을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 47

제31항에 있어서, 상기 치료 단백질은 혈우병 B 및 혈우병 A를 포함하는 혈우병의 치료에 사용되는 단백질을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 48

제31항에 있어서, 상기 치료 단백질은 삽입, 결실 또는 아미노산 치환을 함유하는 비-천연 발생 아미노산 서열을 갖는 키메라 또는 하이브리드 폴리펩티드와 같은 비-천연 발생 폴리펩티드를 포함하는, 융합 단백질.

청구항 49

제31항에 있어서, 상기 치료 단백질은 단일 사슬 조작된 면역글로불린, 안티센스 분자 및 촉매성 핵산을 포함하는 비-천연 발생 폴리펩티드를 포함하는, 융합 단백질.

청구항 50

제31항에 있어서, 상기 치료 단백질은 세포 수용체 및 "자기"-지시 항체를 생성하는 세포를 포함하는 자가면역과 연관된 표적에 대한 광범위한 보호 면역 반응을 부여함으로써 자가면역 질병 및 장애를 앓고 있는 개체를 치료하는 데 유용한 단백질을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 51

제50항에 있어서, 상기 세포 수용체는 T 세포 수용체를 포함하는, 융합 단백질.

청구항 52

제50항 또는 제51항에 있어서, 상기 자가면역 질병은 류마티스성 관절염(RA), 다발성 경화증(MS), 쇼그렌 증후군, 유육종증, 인슐린 의존성 진성 당뇨병(IDDM), 자가면역 갑상선염, 반응성 관절염, 강직성 척추염, 경피증, 다발성근염, 피부근염, 건선, 맥관염, 베게너 육아종증, 크론병 및 궤양성 대장염을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 53

제14항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 융합 단백질은 하나 이상의 곡률 감지 도메인을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 54

제14항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서, 제3 링커 펩티드를 추가로 포함하고, 제3 링커 펩티드는

(a) 소포 표적화 단백질과 관심 단백질 사이; 또는

(b) 융합 단백질의 말단 단부 사이

에 위치하는, 융합 단백질.

청구항 55

제54항에 있어서, 상기 제3 링커 펩티드는 스페이서 펩티드, 막관통 도메인 및 소포외 도메인 중 하나 이상을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 56

제54항에 있어서, 상기 제3 링커 펩티드는 친화성 태그, 링커 펩티드, 프로테아제 절단 부위, 분비 신호 펩티드, 세포 표적화 도메인, 리포터, 효소 또는 이들의 조합 중 하나 이상을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 57

제14항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 융합 단백질의 N-말단은 메티오닌을 갖지 않는, 융합 단백질.

청구항 58

제14항 내지 제57항 중 어느 한 항의 융합 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 59

제14항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 융합 단백질이 지질과 접합된, 융합 단백질.

청구항 60

제59항에 있어서, 상기 융합 단백질은 미리스토일화에 의해 접합된, 융합 단백질.

청구항 61

제59항에 있어서, 상기 융합 단백질은 팔미토일화에 의해 접합된, 융합 단백질.

청구항 62

제59항에 있어서, 상기 융합 단백질은 프레닐화에 의해 접합된, 융합 단백질.

청구항 63

제59항에 있어서, 상기 융합 단백질은 글리코실포스파티딜이노시톨 앵커 단백질에 의해 접합된, 융합 단백질.

청구항 64

제14항 내지 제63항 중 어느 한 항에 있어서, 지질 소포로 재구성된 융합 단백질.

청구항 65

융합 단백질을 발현시키는 단계, 엑소좀을 분리하는 단계 및 융합 단백질을 정제하는 단계를 포함하는, 제14항 내지 제63항 중 어느 한 항의 융합 단백질을 제조하는 방법.

청구항 66

제65항에 있어서, 지질 접합을 추가로 포함하는, 융합 단백질의 제조 방법.

청구항 67

제66항에 있어서, 지질 접합은 미리스토일화에 의해 수행되는, 방법.

청구항 68

제66항에 있어서, 지질 접합은 팔미토일화에 의해 수행되는, 방법.

청구항 69

제66항에 있어서, 지질 접합은 프레닐화에 의해 수행되는, 방법.

청구항 70

제66항에 있어서, 지질 접합은 글리코실포스파티딜이노시톨 앵커 단백질에 의해 수행되는, 방법.

청구항 71

제65항 내지 제 70항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 융합 단백질을 지질 소포로 재구성하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 72

제64항 내지 제71항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 융합 단백질은 중간엽 줄기 세포, 다발성 골수종 세포, Expi293F 세포, PC12 세포, COS7 세포, HAP1 세포, 차이니즈 햄스터 난소(CHO) 세포, HeLa 세포, 인간 배아 신장(HEK) 세포, 마우스 1차 근모세포, NIH 3T3 세포, 대장균 세포 또는 이의 변이체에서 발현되는, 방법.

청구항 73

제14항 내지 제64항 중 어느 한 항의 융합 단백질; 및

약제학적으로 허용되는 담체

를 포함하는, 약제학적 제형.

청구항 74

제73항의 약제학적 제형을 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 질병 또는 장애를 치료하는 방법.

청구항 75

제73항의 약제학적 제형을 대상체에게 예방적으로 투여하는 단계를 포함하는, 질병 또는 장애를 예방하는 방법.

청구항 76

제74항 또는 제75항에 있어서, 상기 약제학적 제형은 척수강내, 두개내, 대수조내, 정맥내, 수조내, 뇌실내, 또는 실질내 중 하나 이상을 통해 투여되는, 방법.

청구항 77

제73항 내지 제76항 중 어느 한 항의 약제학적 조성물 및 사용 지침서를 포함하는 키트.

청구항 78

유전자 치료 전달 시스템; 및

소포 표적화 단백질 및 관심 단백질을 포함하는 조작된 단백질을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드

를 포함하는 유전자 치료 조성물.

청구항 79

제78항에 있어서, 상기 조작된 단백질은 제14항 내지 제57항 중 어느 한 항의 융합 단백질을 포함하는, 유전자 치료 조성물.

청구항 80

제78항 또는 제79항에 있어서, 상기 유전자 치료 전달 시스템은 군집된 규칙적으로 간격을 둔 짧은 회문 반복부(CRISPR) 연관 단백질 9(CRISPR-Cas-9), 전사 활성제-유사 이펙터 뉴클레아제(TALEN) 또는 ZNF(아연 핑거 단백질) 중 하나 이상을 포함하는, 유전자 치료 조성물.

청구항 81

제78항 또는 제79항에 있어서, 상기 유전자 치료 전달 시스템은 벡터, 리포솜, 지질-핵산 나노입자, 엑소좀 및 유전자 편집 시스템 중 하나 이상을 포함하는, 유전자 치료 조성물.

청구항 82

제78항 또는 제79항에 있어서, 상기 유전자 치료 전달 시스템은 바이러스 벡터를 포함하는, 유전자 치료 조성물.

청구항 83

제82항에 있어서, 상기 바이러스 벡터는 아데노바이러스 벡터, 아데노-연관 바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 폭스바이러스 벡터 또는 단순 헤르페스 바이러스 벡터 중 하나 이상을 포함하는, 유전자 치료 조성물.

청구항 84

제82항 또는 제83항에 있어서, 상기 바이러스 벡터는 조작된 단백질을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동가능하게 연결된 바이러스 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 유전자 치료 조성물.

청구항 85

제82항 내지 제84항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 바이러스 벡터는 적어도 하나의 역위 말단 반복부(ITR)를 포함하는, 유전자 치료 조성물.

청구항 86

제82항 내지 제85항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 바이러스 벡터는 SV40 인트론, 폴리아데닐화 신호 또는 안정화 요소 중 하나 이상을 포함하는, 유전자 치료 조성물.

청구항 87

제78항 내지 제86항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유전자 치료 전달 시스템은 프로모터를 포함하는, 유전자 치료 조성물.

청구항 88

제78항 내지 제87항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유전자 치료 전달 시스템은 리더 신호 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 유전자 치료 조성물.

청구항 89

약제학적으로 허용되는 담체 및 제78항 내지 제88항 중 어느 한 항의 유전자 치료 조성물을 포함하는, 유전자 치료 조성물 제형.

청구항 90

제89항의 유전자 치료 조성물 제형을 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 질병 또는 장애를 치료하는 방법.

청구항 91

제89항의 유전자 치료 조성물 제형을 대상체에게 예방적으로 투여하는 단계를 포함하는, 질병 또는 장애를 예방하는 방법.

청구항 92

제90항 또는 제91항에 있어서, 상기 유전자 치료 조성물은 척수강내, 정맥내, 수조내, 뇌실내 또는 실질내 중 하나 이상을 통해 투여되는, 방법.

청구항 93

제90항 또는 제91항에 있어서, 상기 유전자 치료 조성물은 경구, 비경구, 설하, 경피, 직장, 경점막, 국소, 흡입, 협측 투여, 흉막내, 정맥내, 동맥내, 복강내, 피하, 근육내, 비강내, 림프관내, 안구주위, 척수강내 및 관절내 또는 이들의 조합으로 투여되는, 방법.

청구항 94

제78항 내지 제93항 중 어느 한 항의 유전자 치료 조성물 및 사용 지침서를 포함하는 키트.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 개시내용은 일반적으로 유전자 치료 및 유전 장애 치료에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 핵산은 비-기능성 유전자의 교체 및 질병-유발 돌연변이의 중화를 위한 유전자 치료에서 일상적으로 사용되며, 간섭(RNAi) 이펙터 분자를 포함하는 RNA 및 DNA의 형태일 수 있다. 이러한 유용성에도 불구하고, 네이키드 DNA 및 RNA는 신속한 제거, 뉴클레아제, 장기-특이적 분포 부족 및 낮은 세포 흡수 효능으로 인해 생체 내 전달이

어려운 것으로 알려져 있으며; 따라서 특수화된 유전자 전달 비히클이 일반적으로 전달에 사용된다. 바이러스 벡터 및 양이온성 리포솜도 또한 전달 비히클로 개발되었다.

[0003] 이러한 기존 기술에도 불구하고, 대부분의 바이러스 벡터에 대한 면역 인식 및 렌티바이러스와 같은 바이러스에 대한 돌연변이 유발 통합; 및 염증성 독성 및 리포솜에 대한 신속한 제거를 포함하여, 유전자 치료를 제한하는 중요한 제한 사항이 남아 있다. 선천적 면역 체계에 의한 인식은 급성 염증 반응을 일으키며, 이는 기회 감염의 부당한 위험에 환자를 잠재적으로 노출시키는 현재 전략의 흡수 및 재투여 문제를 극복하기 위해 면역억제 전략의 사용을 필요로 할 수 있다. 전달 비히클에 대해 생성된 항체는 또한 후속 투여에서 전이유전자 발현을 극적으로 감소시킨다.

[0004] 특히, 아데노-연관 바이러스(AAV) 벡터는 유전자 치료을 위한 전이유전자 전달에 사용되어 온 한 가지 유형이다. AAV는 파보바이러스과, 파보바이러스 아과, 디펜도바이러스 속, 아데노-연관 바이러스 종의 헬퍼-의존성 바이러스이다. 복제를 위해서는 헬퍼 바이러스가 필요하므로, 아데노바이러스와 같은 헬퍼 바이러스에 의한 감염이라는 맥락에서 자연 감염이 일어난다. AAV 벡터는 주로 유전 질병 치료에 사용되는 확장가능하고 효율적인 비-세포변성 유전자 전달 비히클이다. 여러 AAV-기반 유전자 전달 생성물이 현재 여러 적응증에 대한 임상 시험 중이며, 경우에 따라 임상 개발이 레베르 선천 흑암시(Leber's congenital amaurosis) 치료를 위한 새로운 유전자 치료제인 보레티진 네파르보벡(voretigene neparvovec)(Luxturna)의 미국 FDA 승인을 포함하는 후기-상 및 라이센싱에 접근하고 있다. 다양한 장애의 치료를 위한 AAV 기반 유전자 치료 접근법의 가능성에도 불구하고, 아데노-연관 바이러스 또는 AAV 벡터에 노출된 후 면역 반응이 발생하며, 이러한 보호 반응은 AAV 벡터의 치료 효능을 제한할 수 있다. 체액 반응(항-AAV 중화 항체 또는 NAb)은 종종 바이러스 중화를 일으켜 표적 세포의 바이러스 형질도입을 상당히 감소시켜 전달되는 치료용 폴리펩티드의 양을 제한한다. 항-AAV 중화 항체는 AAV 벡터를 효율적으로 중화할 수 있으며; 이는 인간(Manno C. S., et al., Nat Med. 2006; 12:342-347), 마우스(Scallan C. D., et al., Blood. 2006; 107:1810-1817), 및 비-인간 영장류(Jiang H., et al., Blood. 2006; 108:3321-3328)에서 보고되었다. 인간은 또한 자연적으로 야생형 AAV에 노출되어 모든 AAV 혈청형과 교차 반응하는 항체를 개발한다.

[0005] 항체 반응 이외에도, AAV 벡터에 노출된 개체는 AAV 벡터 캡시드에 대해 특이적으로 지시되는 세포독성 T 세포(CTL) 반응을 발달시킬 수 있다(Li H., et al., Nature. 475, 217-221 (2011); Arruda V. R., et al., Blood. 115, 4678-4688 (2010); Chen Y.H., et al., Nat. Med. 15, 1215-1218 (2009); Boutin S., et al., Hum. Gene. Ther. 21, 704-712 (2010); Calcedo R., et al., J. Infect. Dis. 199, 381-390 (2009)). 이러한 CTL 반응은 결과적으로 제한된 치료 효능으로 AAV 벡터 형질도입 세포의 제거를 담당한다. CTL 반응은 벡터 용량-의존적 방식으로 촉발되어(Li H., et al., Nature. 475, 217-221 (2011); Chen Y. H., et al., Nat. Med. 15, 1215-1218 (2009); Calcedo R., et al., J. Infect. Dis. 199, 381-390 (2009)), 따라서 낮은 벡터 용량에서 높은 수준의 형질도입 효율을 달성하는 것의 중요성을 강조하고 있다.

[0006] 면역 반응 관련 문제를 해결하는 현재의 방법은 개체를 사전 선별하고 바이러스 캡시드에 대한 중화 항체 역가가 높은 개체를 배제하는 것을 포함한다. 투여에 필요한 바이러스 부하를 낮추면 캡시드에 대한 면역 반응의 기회가 줄어든다.

[0007] 유전자 치료과 연관된 또 다른 난제는 표적 조직의 불완전한 교정이다. 100% 바이러스 형질도입(질병에 걸린 관심 세포당 적어도 하나의 벡터 카피)은 현재 방법으로는 가능하지 않다. 일반적으로 비-분비 단백질을 코딩하는 유전자로 형질도입할 때, AAV-전달 유전자를 수용하고 안정적으로 발현할 수 있는 소수의 세포에서만 질병이 개선된다. 이로 인해 모자이크 패턴의 단지 일부만 교정된다. 이상적으로는 병에 걸린 전체 조직이 전이유전자 생성물의 혜택을 받을 수 있다.

[0008] 현재, 형질도입을 최대화하기 위한 유일한 옵션 중 하나는 바이러스 벡터가 세포에 들어갈 가능성을 최대화하기 위해 바이러스 투여량을 증가시키는 것이다. 이는 더 높은 용량이 심각한 유해 사례을 포함하여 더 많은 유해사례로 이어지기 때문에 문제가 된다.

[0009] 형질도입 효율을 개선하기 위한 또 다른 옵션은 보다 직접적인 투여 경로를 선택하는 것이다. 중추신경계(CNS) 질병의 경우, 유전자 치료 벡터를 뇌척수액(CSF)에 주입하거나 척수강내(IT), 두개내(IC) 또는 대수조내(ICM) 경로와 같은 다양한 경로를 통해 뇌에 직접 주입한다. 이들 투여 경로는 정맥내(IV) 전달과 대조된다. 정맥내 전달은 CSF로 전달하는 것보다 더 일상적이고 안전하며 전문 의료진이 수행할 필요가 없다. 그러나 AAV를 포함한 바이러스 벡터는 혈액 뇌 장벽(BBB)을 쉽게 통과하지 못하고 대신 간 및 기타 비-CNS 조직으로 더 쉽게 형질도입된다.

[0010] 유전자 전달 기술이 개선되었지만, 형질도입되지 않을 수 있는 일부 세포(예를 들어, 근육 위성 세포/줄기 세포)를 비롯한 문제가 남아 있다(Arnett et al 2014 Mol Therapy - Methods & Clin Dev 1:14038). 또한 효과적인 형질도입은 일부 상황에서 질병, 예를 들어 근육 변성 및 섬유증에 의해 부정적인 영향을 받을 수 있다. 그러나 비만, 심장병 및 정신 질병을 포함하여 유전적 요소를 가지고 있는 것으로 밝혀진 질병의 수가 증가함에 따라, 위험이 더 감소되고 장기적인 지속가능성이 달성되는 경우에는, 선제적 유전적 해결책을 위한 감수성 유전자의 변형에 대한 엄청난 잠재력이 있다. 따라서 치명적인 질병을 넘어 유전자 치료의 사용을 확대하기 위해서는, 우수한 전달 효율을 유지하면서 면역 인식과 염증을 피할 수 있는 기술 개발이 절실하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

과제의 해결 수단

[0011] 본 개시내용의 한 양태는 하나 이상의 신호 도메인 및 이펙터 도메인(ED)을 포함하는 막 연관-ED 단백질에 관한 것이다. 일부 구현예에서, 신호 도메인은 이펙터 도메인에 직접 연결된다. 일부 구현예에서, 신호 도메인은 적어도 제1 링커 펩티드에 의해 이펙터 도메인에 연결된다. 일부 구현예에서, 신호 도메인은 미리스토일화 신호 도메인이다.

[0012] 막 연관-ED 단백질의 하나 이상의 구현예에서, 신호 도메인 아미노산 서열은 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 10, 서열번호 11, 서열번호 12, 서열번호 155, 서열번호 156, 서열번호 157, 서열번호 158, 서열번호 159 또는 서열번호 165와 적어도 70%의 서열 유사성을 포함한다. 하나 이상의 구현예에서, 막 연관-ED 단백질의 생성된 아미노산 서열은 서열번호 38이 아니다.

[0013] 막 연관-ED 단백질의 하나 이상의 구현예에서, 신호 도메인 아미노산 서열은 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 10, 서열번호 11, 서열번호 12, 서열번호 155, 서열번호 156, 서열번호 157, 서열번호 158, 서열번호 159 또는 서열번호 165와 적어도 90%의 서열 유사성을 포함한다. 하나 이상의 구현예에서, 막 연관-ED 단백질의 생성된 아미노산 서열은 서열번호 38이 아니다.

[0014] 막 연관-ED 단백질의 하나 이상의 구현예에서, 신호 도메인 아미노산 서열은 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 10, 서열번호 11, 서열번호 12, 서열번호 155, 서열번호 156, 서열번호 157, 서열번호 158, 서열번호 159 또는 서열번호 165를 포함한다. 하나 이상의 구현예에서, 막 연관-ED 단백질의 생성된 아미노산 서열은 서열번호 38이 아니다.

[0015] 막 연관-ED 단백질의 하나 이상의 구현예에서, ED 도메인 아미노산 서열은 서열번호 13, 서열번호 14, 서열번호 15, 서열번호 16, 서열번호 17, 서열번호 18, 서열번호 19, 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 22, 서열번호 23, 서열번호 24, 서열번호 25, 서열번호 26, 서열번호 27, 서열번호 28, 서열번호 29, 또는 서열번호 30과 적어도 70%의 서열 유사성을 포함한다. 하나 이상의 구현예에서, 막 연관-ED 단백질의 생성된 아미노산 서열은 서열번호 38이 아니다.

[0016] 막 연관-ED 단백질의 하나 이상의 구현예에서, ED 도메인 아미노산 서열은 서열번호 13, 서열번호 14, 서열번호 15, 서열번호 16, 서열번호 17, 서열번호 18, 서열번호 19, 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 22, 서열번호 23, 서열번호 24, 서열번호 25, 서열번호 26, 서열번호 27, 서열번호 28, 서열번호 29, 또는 서열번호 30과 적어도 90%의 서열 유사성을 포함한다. 하나 이상의 구현예에서, 막 연관-ED 단백질의 생성된 아미노산 서열은 서열번호 38이 아니다.

[0017] 막 연관-ED 단백질의 하나 이상의 구현예에서, ED 도메인 아미노산 서열은 서열번호 13, 서열번호 14, 서열번호 15, 서열번호 16, 서열번호 17, 서열번호 18, 서열번호 19, 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 22, 서열번호 23, 서열번호 24, 서열번호 25, 서열번호 26, 서열번호 27, 서열번호 28, 서열번호 29, 또는 서열번호 30을 포함한다. 하나 이상의 구현예에서, 막 연관-ED 단백질의 생성된 아미노산 서열은 서열번호 38이 아니다.

[0018] 하나 이상의 구현예에서, 제1 링커 펩티드는 서열번호 143, 서열번호 144, 서열번호 145, 서열번호 146, 서열번호 147, 서열번호 148, 서열번호 149, 서열번호 150, 서열번호 151, 서열번호 152 또는 서열번호 153과 적어도

70%의 서열 유사성을 포함하는 아미노 서열을 갖는다.

[0019] 하나 이상의 구현예에서, 제1 링커 펩티드는 서열번호 143, 서열번호 144, 서열번호 145, 서열번호 146, 서열번호 147, 서열번호 148, 서열번호 149, 서열번호 150, 서열번호 151, 서열번호 152 또는 서열번호 153과 적어도 90%의 서열 유사성을 포함하는 아미노 서열을 갖는다.

[0020] 하나 이상의 구현예에서, 제1 링커 펩티드는 서열번호 143, 서열번호 144, 서열번호 145, 서열번호 146, 서열번호 147, 서열번호 148, 서열번호 149, 서열번호 150, 서열번호 151, 서열번호 152 또는 서열번호 153을 포함하는 아미노 서열을 갖는다.

[0021] 막 연관-ED 단백질의 하나 이상의 구현예에서, 막 연관-ED 아미노산 서열은 서열번호 31, 서열번호 32, 서열번호 33, 서열번호 34, 서열번호 35, 서열번호 36, 서열번호 37, 서열번호 38, 서열번호 39, 서열번호 40, 서열번호 41, 서열번호 42, 서열번호 43, 서열번호 44, 서열번호 45, 서열번호 46, 서열번호 47, 서열번호 48, 서열번호 49, 서열번호 50, 서열번호 51, 서열번호 52, 서열번호 53, 서열번호 54, 서열번호 55, 서열번호 56, 서열번호 57, 서열번호 58, 서열번호 59, 서열번호 60, 서열번호 61, 서열번호 62, 서열번호 63, 서열번호 64, 서열번호 65, 서열번호 66, 서열번호 67, 서열번호 68, 서열번호 69, 서열번호 70, 서열번호 71, 서열번호 72, 서열번호 73, 서열번호 74, 서열번호 75, 서열번호 76, 서열번호 77, 서열번호 78, 서열번호 79, 서열번호 80, 서열번호 81, 서열번호 82, 서열번호 83, 서열번호 84, 서열번호 85, 서열번호 86, 서열번호 87, 서열번호 88, 서열번호 89, 서열번호 90, 서열번호 91, 서열번호 92, 서열번호 93, 서열번호 94, 서열번호 95, 서열번호 96, 서열번호 97, 서열번호 98, 서열번호 99, 서열번호 100, 서열번호 101, 서열번호 102, 서열번호 103, 서열번호 104, 서열번호 105, 서열번호 106, 서열번호 107, 서열번호 108, 서열번호 109, 서열번호 110, 서열번호 111, 서열번호 112, 서열번호 113, 서열번호 114, 서열번호 115, 서열번호 116, 서열번호 117, 서열번호 118, 서열번호 119, 서열번호 120, 서열번호 121, 서열번호 122, 서열번호 123, 서열번호 124, 서열번호 125, 서열번호 126, 서열번호 127, 서열번호 128, 서열번호 129, 서열번호 130, 서열번호 131, 서열번호 132, 서열번호 133, 서열번호 134, 서열번호 135, 서열번호 136, 서열번호 137, 서열번호 138, 서열번호 139, 서열번호 140, 서열번호 141 또는 서열번호 142와 적어도 70%의 서열 유사성을 포함한다. 하나 이상의 구현예에서, 막 연관-ED 아미노산 서열은 서열번호 38이 아니다.

[0022] 막 연관-ED 단백질의 하나 이상의 구현예에서, 막 연관-ED 아미노산 서열은 서열번호 31, 서열번호 32, 서열번호 33, 서열번호 34, 서열번호 35, 서열번호 36, 서열번호 37, 서열번호 38, 서열번호 39, 서열번호 40, 서열번호 41, 서열번호 42, 서열번호 43, 서열번호 44, 서열번호 45, 서열번호 46, 서열번호 47, 서열번호 48, 서열번호 49, 서열번호 50, 서열번호 51, 서열번호 52, 서열번호 53, 서열번호 54, 서열번호 55, 서열번호 56, 서열번호 57, 서열번호 58, 서열번호 59, 서열번호 60, 서열번호 61, 서열번호 62, 서열번호 63, 서열번호 64, 서열번호 65, 서열번호 66, 서열번호 67, 서열번호 68, 서열번호 69, 서열번호 70, 서열번호 71, 서열번호 72, 서열번호 73, 서열번호 74, 서열번호 75, 서열번호 76, 서열번호 77, 서열번호 78, 서열번호 79, 서열번호 80, 서열번호 81, 서열번호 82, 서열번호 83, 서열번호 84, 서열번호 85, 서열번호 86, 서열번호 87, 서열번호 88, 서열번호 89, 서열번호 90, 서열번호 91, 서열번호 92, 서열번호 93, 서열번호 94, 서열번호 95, 서열번호 96, 서열번호 97, 서열번호 98, 서열번호 99, 서열번호 100, 서열번호 101, 서열번호 102, 서열번호 103, 서열번호 104, 서열번호 105, 서열번호 106, 서열번호 107, 서열번호 108, 서열번호 109, 서열번호 110, 서열번호 111, 서열번호 112, 서열번호 113, 서열번호 114, 서열번호 115, 서열번호 116, 서열번호 117, 서열번호 118, 서열번호 119, 서열번호 120, 서열번호 121, 서열번호 122, 서열번호 123, 서열번호 124, 서열번호 125, 서열번호 126, 서열번호 127, 서열번호 128, 서열번호 129, 서열번호 130, 서열번호 131, 서열번호 132, 서열번호 133, 서열번호 134, 서열번호 135, 서열번호 136, 서열번호 137, 서열번호 138, 서열번호 139, 서열번호 140, 서열번호 141 또는 서열번호 142와 적어도 90%의 서열 유사성을 포함한다. 하나 이상의 구현예에서, 막 연관-ED 아미노산 서열은 서열번호 38이 아니다.

[0023] 막 연관-ED 단백질의 하나 이상의 구현예에서, 막 연관-ED 아미노산 서열은 서열번호 31, 서열번호 32, 서열번호 33, 서열번호 34, 서열번호 35, 서열번호 36, 서열번호 37, 서열번호 38, 서열번호 39, 서열번호 40, 서열번호 41, 서열번호 42, 서열번호 43, 서열번호 44, 서열번호 45, 서열번호 46, 서열번호 47, 서열번호 48, 서열번호 49, 서열번호 50, 서열번호 51, 서열번호 52, 서열번호 53, 서열번호 54, 서열번호 55, 서열번호 56, 서열번호 57, 서열번호 58, 서열번호 59, 서열번호 60, 서열번호 61, 서열번호 62, 서열번호 63, 서열번호 64, 서열번호 65, 서열번호 66, 서열번호 67, 서열번호 68, 서열번호 69, 서열번호 70, 서열번호 71, 서열번호 72, 서열번호 73, 서열번호 74, 서열번호 75, 서열번호 76, 서열번호 77, 서열번호 78, 서열번호 79, 서열번호 80, 서열번호 81, 서열번호 82, 서열번호 83, 서열번호 84, 서열번호 85, 서열번호 86, 서열번호 87, 서열번호 88, 서열번

호 89, 서열번호 90, 서열번호 91, 서열번호 92, 서열번호 93, 서열번호 94, 서열번호 95, 서열번호 96, 서열번호 97, 서열번호 98, 서열번호 99, 서열번호 100, 서열번호 101, 서열번호 102, 서열번호 103, 서열번호 104, 서열번호 105, 서열번호 106, 서열번호 107, 서열번호 108, 서열번호 109, 서열번호 110, 서열번호 111, 서열번호 112, 서열번호 113, 서열번호 114, 서열번호 115, 서열번호 116, 서열번호 117, 서열번호 118, 서열번호 119, 서열번호 120, 서열번호 121, 서열번호 122, 서열번호 123, 서열번호 124, 서열번호 125, 서열번호 126, 서열번호 127, 서열번호 128, 서열번호 129, 서열번호 130, 서열번호 131, 서열번호 132, 서열번호 133, 서열번호 134, 서열번호 135, 서열번호 136, 서열번호 137, 서열번호 138, 서열번호 139, 서열번호 140, 서열번호 141 또는 서열번호 142를 포함한다. 하나 이상의 구현예에서, 막 연관-ED 아미노산 서열은 서열번호 38이 아니다.

[0024] 하나 이상의 구현예에서, 막 연관-ED 단백질은 곡률 감지 도메인을 추가로 포함한다. 하나 이상의 구현예에서, 곡률 감지 도메인은 막 연관-ED 단백질의 C-말단 또는 N-말단에 있다. 하나 이상의 구현예에서, 곡률 감지 도메인은 신호 도메인과 ED 도메인 사이의 링커 펩티드이다.

[0025] 하나 이상의 구현예에서, 막 연관-ED 단백질의 N-말단은 메티오닌을 갖지 않는다.

[0026] 본 개시내용의 또 다른 양태는 막 연관-ED 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다.

[0027] 본 개시내용의 또 다른 양태는 소포 표적화 단백질 및 관심 단백질을 포함하는 융합 단백질에 관한 것이다. 하나 이상의 구현예에서, 소포 표적화 단백질은 신호 도메인 및 이펙터 도메인(ED)을 포함한다. 일부 구현예에서, 신호 도메인은 지질 접합 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 소포 표적화 단백질은 이펙터 도메인(ED)에 직접 연결된 지질 접합 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 소포 표적화 단백질은 적어도 제2 링커 펩티드에 의해 이펙터 도메인(ED)에 연결된 지질 접합 도메인을 포함한다. 하나 이상의 구현예에서, 제2 링커 펩티드는 서열번호 143, 서열번호 144, 서열번호 145, 서열번호 146, 서열번호 147, 서열번호 148, 서열번호 149, 서열번호 150, 서열번호 151, 서열번호 152 또는 서열번호 153을 포함하는 아마노산 서열을 갖는다.

[0028] 융합 단백질의 하나 이상의 구현예에서, 소포 표적화 단백질 아미노산 서열은 서열번호 31, 서열번호 32, 서열번호 33, 서열번호 34, 서열번호 35, 서열번호 36, 서열번호 37, 서열번호 38, 서열번호 39, 서열번호 40, 서열번호 41, 서열번호 42, 서열번호 43, 서열번호 44, 서열번호 45, 서열번호 46, 서열번호 47, 서열번호 48, 서열번호 49, 서열번호 50, 서열번호 51, 서열번호 52, 서열번호 53, 서열번호 54, 서열번호 55, 서열번호 56, 서열번호 57, 서열번호 58, 서열번호 59, 서열번호 60, 서열번호 61, 서열번호 62, 서열번호 63, 서열번호 64, 서열번호 65, 서열번호 66, 서열번호 67, 서열번호 68, 서열번호 69, 서열번호 70, 서열번호 71, 서열번호 72, 서열번호 73, 서열번호 74, 서열번호 75, 서열번호 76, 서열번호 77, 서열번호 78, 서열번호 79, 서열번호 80, 서열번호 81, 서열번호 82, 서열번호 83, 서열번호 84, 서열번호 85, 서열번호 86, 서열번호 87, 서열번호 88, 서열번호 89, 서열번호 90, 서열번호 91, 서열번호 92, 서열번호 93, 서열번호 94, 서열번호 95, 서열번호 96, 서열번호 97, 서열번호 98, 서열번호 99, 서열번호 100, 서열번호 101, 서열번호 102, 서열번호 103, 서열번호 104, 서열번호 105, 서열번호 106, 서열번호 107, 서열번호 108, 서열번호 109, 서열번호 110, 서열번호 111, 서열번호 112, 서열번호 113, 서열번호 114, 서열번호 115, 서열번호 116, 서열번호 117, 서열번호 118, 서열번호 119, 서열번호 120, 서열번호 121, 서열번호 122, 서열번호 123, 서열번호 124, 서열번호 125, 서열번호 126, 서열번호 127, 서열번호 128, 서열번호 129, 서열번호 130, 서열번호 131, 서열번호 132, 서열번호 133, 서열번호 134, 서열번호 135, 서열번호 136, 서열번호 137, 서열번호 138, 서열번호 139, 서열번호 140, 서열번호 141 또는 서열번호 142와 적어도 70%의 서열 유사성을 포함한다. 하나 이상의 구현예에서, 소포 표적화 단백질 아미노산 서열은 서열번호 38이 아니다.

[0029] 융합 단백질의 하나 이상의 구현예에서, 소포 표적화 단백질 아미노산 서열은 서열번호 31, 서열번호 32, 서열번호 33, 서열번호 34, 서열번호 35, 서열번호 36, 서열번호 37, 서열번호 38, 서열번호 39, 서열번호 40, 서열번호 41, 서열번호 42, 서열번호 43, 서열번호 44, 서열번호 45, 서열번호 46, 서열번호 47, 서열번호 48, 서열번호 49, 서열번호 50, 서열번호 51, 서열번호 52, 서열번호 53, 서열번호 54, 서열번호 55, 서열번호 56, 서열번호 57, 서열번호 58, 서열번호 59, 서열번호 60, 서열번호 61, 서열번호 62, 서열번호 63, 서열번호 64, 서열번호 65, 서열번호 66, 서열번호 67, 서열번호 68, 서열번호 69, 서열번호 70, 서열번호 71, 서열번호 72, 서열번호 73, 서열번호 74, 서열번호 75, 서열번호 76, 서열번호 77, 서열번호 78, 서열번호 79, 서열번호 80, 서열번호 81, 서열번호 82, 서열번호 83, 서열번호 84, 서열번호 85, 서열번호 86, 서열번호 87, 서열번호 88, 서열번호 89, 서열번호 90, 서열번호 91, 서열번호 92, 서열번호 93, 서열번호 94, 서열번호 95, 서열번호 96, 서열

번호 97, 서열번호 98, 서열번호 99, 서열번호 100, 서열번호 101, 서열번호 102, 서열번호 103, 서열번호 104, 서열번호 105, 서열번호 106, 서열번호 107, 서열번호 108, 서열번호 109, 서열번호 110, 서열번호 111, 서열번호 112, 서열번호 113, 서열번호 114, 서열번호 115, 서열번호 116, 서열번호 117, 서열번호 118, 서열번호 119, 서열번호 120, 서열번호 121, 서열번호 122, 서열번호 123, 서열번호 124, 서열번호 125, 서열번호 126, 서열번호 127, 서열번호 128, 서열번호 129, 서열번호 130, 서열번호 131, 서열번호 132, 서열번호 133, 서열번호 134, 서열번호 135, 서열번호 136, 서열번호 137, 서열번호 138, 서열번호 139, 서열번호 140, 서열번호 141 또는 서열번호 142와 적어도 90%의 서열 유사성를 포함한다. 하나 이상의 구현예에서, 소포 표적화 단백질 아미노산 서열은 서열번호 38이 아니다.

[0030] 융합 단백질의 하나 이상의 구현예에서, 소포 표적화 단백질 아미노산 서열은 서열번호 31, 서열번호 32, 서열번호 33, 서열번호 34, 서열번호 35, 서열번호 36, 서열번호 37, 서열번호 38, 서열번호 39, 서열번호 40, 서열번호 41, 서열번호 42, 서열번호 43, 서열번호 44, 서열번호 45, 서열번호 46, 서열번호 47, 서열번호 48, 서열번호 49, 서열번호 50, 서열번호 51, 서열번호 52, 서열번호 53, 서열번호 54, 서열번호 55, 서열번호 56, 서열번호 57, 서열번호 58, 서열번호 59, 서열번호 60, 서열번호 61, 서열번호 62, 서열번호 63, 서열번호 64, 서열번호 65, 서열번호 66, 서열번호 67, 서열번호 68, 서열번호 69, 서열번호 70, 서열번호 71, 서열번호 72, 서열번호 73, 서열번호 74, 서열번호 75, 서열번호 76, 서열번호 77, 서열번호 78, 서열번호 79, 서열번호 80, 서열번호 81, 서열번호 82, 서열번호 83, 서열번호 84, 서열번호 85, 서열번호 86, 서열번호 87, 서열번호 88, 서열번호 89, 서열번호 90, 서열번호 91, 서열번호 92, 서열번호 93, 서열번호 94, 서열번호 95, 서열번호 96, 서열번호 97, 서열번호 98, 서열번호 99, 서열번호 100, 서열번호 101, 서열번호 102, 서열번호 103, 서열번호 104, 서열번호 105, 서열번호 106, 서열번호 107, 서열번호 108, 서열번호 109, 서열번호 110, 서열번호 111, 서열번호 112, 서열번호 113, 서열번호 114, 서열번호 115, 서열번호 116, 서열번호 117, 서열번호 118, 서열번호 119, 서열번호 120, 서열번호 121, 서열번호 122, 서열번호 123, 서열번호 124, 서열번호 125, 서열번호 126, 서열번호 127, 서열번호 128, 서열번호 129, 서열번호 130, 서열번호 131, 서열번호 132, 서열번호 133, 서열번호 134, 서열번호 135, 서열번호 136, 서열번호 137, 서열번호 138, 서열번호 139, 서열번호 140, 서열번호 141 또는 서열번호 142를 포함한다. 하나 이상의 구현예에서, 소포 표적화 단백질 아미노산 서열은 서열번호 38이 아니다.

[0031] 융합 단백질의 하나 이상의 구현예에서, 신호 도메인은 지질 접합 도메인, 예를 들어 미리스토일화 신호 도메인, ESCRT 결합 모티프, MIT 모티프, 팔미토일화 신호 도메인, 프레닐화 신호 도메인, 리소좀 신호 도메인, 글리코실포스파티딜린시톤 앵커 단백질 및 면역글로불린 중쇄 결합 단백질(BiP) 분비 신호 도메인 중 하나 이상을 포함한다. 하나 이상의 구현예에서, 지질 접합 도메인은 미리스토일화 신호 도메인이다.

[0032] 융합 단백질의 하나 이상의 구현예에서, 신호 도메인의 아미노산 서열은 단백질의 MARCKS, MARCKSL1, SNX1 또는 BASP1 계열 중 하나 이상의 미리스토일화 신호 도메인과 적어도 70%의 유사성을 갖는다. 융합 단백질의 하나 이상의 구현예에서, 신호 도메인의 아미노산 서열은 단백질의 MARCKS, MARCKSL1 또는 BASP1 계열의 미리스토일화 신호 도메인과 적어도 90%의 유사성을 갖는다. 융합 단백질의 하나 이상의 구현예에서, 신호 도메인의 아미노산 서열은 단백질의 MARCKS, MARCKSL1 또는 BASP1 계열의 미리스토일화 신호 도메인과 100%의 유사성을 갖는다.

[0033] 융합 단백질의 하나 이상의 구현예에서, 막 연관-ED 단백질의 신호 도메인의 아미노산 서열은 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 10, 서열번호 11, 서열번호 12, 서열번호 155, 서열번호 156, 서열번호 157, 서열번호 158, 서열번호 159 또는 서열번호 165와 적어도 70%의 서열 유사성을 포함한다.

[0034] 융합 단백질의 하나 이상의 구현예에서, 소포 표적화 단백질의 신호 도메인의 아미노산 서열은 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 10, 서열번호 11, 서열번호 12, 서열번호 155, 서열번호 156, 서열번호 157, 서열번호 158, 서열번호 159 또는 서열번호 165와 적어도 90%의 서열 유사성을 포함한다.

[0035] 융합 단백질의 하나 이상의 구현예에서, 소포 표적화 단백질의 신호 도메인의 아미노산 서열은 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 10, 서열번호 11, 서열번호 12, 서열번호 155, 서열번호 156, 서열번호 157, 서열번호 158, 서열번호 159 또는 서열번호 165를 포함한다.

[0036] 융합 단백질의 하나 이상의 구현예에서, 소포 표적화 단백질의 ED 도메인의 아미노산 서열은 서열번호 13, 서열번호 14, 서열번호 15, 서열번호 16, 서열번호 17, 서열번호 18, 서열번호 19, 서열번호 20, 서열번호 21, 서열

번호 22, 서열번호 23, 서열번호 24, 서열번호 25, 서열번호 26, 서열번호 27, 서열번호 28, 서열번호 29, 또는 서열번호 30과 적어도 70%의 서열 유사성을 포함한다.

[0037] 융합 단백질의 하나 이상의 구현예에서, 소포 표적화 단백질의 ED 도메인의 아미노산 서열은 서열번호 13, 서열번호 14, 서열번호 15, 서열번호 16, 서열번호 17, 서열번호 18, 서열번호 19, 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 22, 서열번호 23, 서열번호 24, 서열번호 25, 서열번호 26, 서열번호 27, 서열번호 28, 서열번호 29, 또는 서열번호 30과 적어도 90%의 서열 유사성을 포함한다.

[0038] 융합 단백질의 하나 이상의 구현예에서, 소포 표적화 단백질의 ED 도메인의 아미노산 서열은 서열번호 13, 서열번호 14, 서열번호 15, 서열번호 16, 서열번호 17, 서열번호 18, 서열번호 19, 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 22, 서열번호 23, 서열번호 24, 서열번호 25, 서열번호 26, 서열번호 27, 서열번호 28, 서열번호 29, 또는 서열번호 30을 포함한다.

[0039] 융합 단백질의 하나 이상의 구현예에서, 소포 표적화 단백질은 Nef 단백질 또는 이의 변이체를 포함한다.

[0040] 융합 단백질의 하나 이상의 구현예에서, 관심 단백질은 치료 단백질이다.

[0041] 융합 단백질의 하나 이상의 구현예에서, 치료 단백질은 리소좀 단백질을 포함한다.

[0042] 융합 단백질의 하나 이상의 구현예에서, 치료 단백질은 CDKL5, 알파-갈락토시다제, β-갈락토시다제, β-헥소사미니다제, 갈락토실세라미다제, 아릴설파타제, β-글루코세레브로시다제, 글루코세레브로시다제, 리소좀 산 리파제, 리소좀 효소 산 스핑고미엘리나제, 포르밀글리신-생성 효소, 이두로니다제, 아세틸-CoA:알파-글루코사미나이드 N-아세틸트랜스퍼라제, 글리코사미노글리칸 알파-L-이두로노하이드롤라제, 헤파란 N-설파타제, N-아세틸-α-D-글루코사미니다제(NAGLU), 이두로네이트-2-설파타제, 갈락토사민-6-설페이트 설파타제, N-아세틸갈락토사민-6-설파타제, 글리코사미노글리칸 N-아세틸갈락토사민 4-설파타제, β-글루쿠로니다제, 히알루로니다제, 알파-N-아세틸 뉴라미니다제(시알리다제), 강글리오사이드 시알리다제, 포스포트랜스퍼라제, 알파-글루코시다제, 알파-D-만노시다제, 베타-D-만노시다제, 아스파르틸글리코사미니다제, 알파-L-푸코시다제, 바테닌, 팔미토일 단백질 티오에스테라제 및 기타 바텐-관련 단백질 또는 이의 효소 활성 단편을 포함한다.

[0043] 융합 단백질의 하나 이상의 구현예에서, 치료 단백질의 바텐-관련 단백질은 세로이드-리포푸신증 뉴런 단백질 1, 세로이드-리포푸신증 뉴런 단백질 2, 세로이드-리포푸신증 뉴런 단백질 3, 세로이드-리포푸신증 뉴런 단백질 4, 세로이드-리포푸신증 뉴런 단백질 5, 세로이드-리포푸신증 뉴런 단백질 6, 세로이드-리포푸신증 뉴런 단백질 7, 세로이드-리포푸신증 뉴런 단백질 8, 세로이드-리포푸신증 뉴런 단백질 19, 세로이드-리포푸신증 뉴런 단백질 10, 세로이드-리포푸신증 뉴런 단백질 11, 세로이드-리포푸신증 뉴런 단백질 12, 세로이드-리포푸신증 뉴런 단백질 13 및 세로이드-리포푸신증 뉴런 단백질 14를 포함한다.

[0044] 융합 단백질의 하나 이상의 구현예에서, 치료 단백질은 하나 이상의 호르몬 및/또는 성장 및/또는 분화 인자를 포함한다.

[0045] 융합 단백질의 하나 이상의 구현예에서, 치료 단백질의 호르몬 및/또는 성장 및/또는 분화 인자는 인슐린, 글루카곤, 성장 호르몬(GH), 부갑상선 호르몬(PTH), 성장 호르몬 방출 인자(GRF), 여포 자극 호르몬(FSH), 황체형성 호르몬(LH), 인간 융모막 성선자극 호르몬(hCG), 혈관 내피 성장 인자(VEGF), 안지오포이에틴, 안지오스타틴, 과립구 집락 자극 인자(GCSF), 에리스로포이에틴(EPO), 결합 조직 성장 인자(CTGF), 염기성 섬유아세포 성장 인자(bFGF), 산성 섬유아세포 성장 인자(aFGF), 표피 성장 인자(EGF), 혈소판-유래 성장 인자(PDGF), 인슐린 성장 인자 I(IGF-I), 인슐린 성장 인자 II(IGF-II), 형질전환 성장 인자, 헤레글루인 성장 인자, 뉴레큘린 성장 인자, ARIA 성장 인자, neu 분화 인자(NDF), 신경 성장 인자(NGF), 뇌-유래 뉴로트로핀 인자(BDNF), 뉴로트로핀 NT-3, 뉴로트로핀 NT-4/5, 섬모 뉴로트로핀 인자(CNTF), 신경아교세포주 유래 뉴로트로핀 인자(GDNF), 뉴투린, 아그린, 세마포린, 콜랩신, 네트린-1, 네트린-2, 간세포 성장 인자(HGF), 에프린, 노긴, 소닉 헤지호그 또는 티로신 수산화효소 중 하나 이상을 포함한다.

[0046] 융합 단백질의 하나 이상의 구현예에서, 치료 단백질의 호르몬의 형질전환 성장 인자 및/또는 성장 및/또는 분화 인자는 TGFα, 액티빈, 인히빈, 뼈 형태형성 단백질(BMP-1), 뼈 형태형성 단백질(BMP-2), 뼈 형태형성 단백질(BMP-3), 뼈 형태형성 단백질(BMP-4), 뼈 형태형성 단백질(BMP-5), 뼈 형태형성 단백질(BMP-6), 뼈 형태형성 단백질(BMP-7), 뼈 형태형성 단백질(BMP-8), 뼈 형태형성 단백질(BMP-9), 뼈 형태형성 단백질(BMP-10), 뼈 형태형성 단백질(BMP-11), 뼈 형태형성 단백질(BMP-12), 뼈 형태형성 단백질(BMP-13), 뼈 형태형성 단백질(BMP-14) 또는 뼈 형태형성 단백질(BMP-15)을 포함한다.

[0047] 융합 단백질의 하나 이상의 구현예에서, 치료 단백질은 하나 이상의 면역계 조절 단백질을 포함한다.

[0048] 융합 단백질의 하나 이상의 구현예에서, 치료 단백질의 면역계 조절 단백질은 사이토카인 및 림포카인을 포함하고, 사이토카인 및 림포카인은 트롬보포이에틴(TPO), 인터루킨-1(IL-1), 인터루킨-2(IL-2), 인터루킨-3(IL-3), 인터루킨-4(IL-4), 인터루킨-5(IL-5), 인터루킨-6(IL-6), 인터루킨-7(IL-7), 인터루킨-8(IL-8), 인터루킨-9(IL-9), 인터루킨-10(IL-10), 인터루킨-11(IL-11), 인터루킨-12(IL-12), 인터루킨-13(IL-13), 인터루킨-14(IL-14), 인터루킨-15(IL-15), 인터루킨-16(IL-16), 인터루킨-17(IL-17), 인터루킨-18(IL-18), 인터루킨-19(IL-19), 인터루킨-20(IL-20), 인터루킨-21(IL-21), 인터루킨-22(IL-22), 인터루킨-23(IL-23), 인터루킨-24(IL-24), 인터루킨-25(IL-25), 단핵구 화학유인 단백질, 백혈병 억제 인자, 과립구-대식세포 집락 자극 인자, Fas 리간드, 종양 괴사 인자 α, 종양 괴사 인자 β, 인터페론 α, β 및 ɣ, 줄기 세포 인자 또는 flk-2/flt3 리간드를 포함한다.

[0049] 융합 단백질의 하나 이상의 구현예에서, 치료 단백질은 하나 이상의 면역글로불린 IgG, IgM, IgA, IgD 및 IgE, 키메라 면역글로불린, 인간화 항체, 단일 사슬 항체, T 세포 수용체, 키메라 T 세포 수용체, 단일 사슬 T 세포 수용체, 클래스 I MHC 분자, 클래스 II MHC 분자, 조작된 면역글로불린 또는 조작된 MHC 분자를 포함한다.

[0050] 융합 단백질의 하나 이상의 구현예에서, 치료 단백질은 하나 이상의 보체 조절 단백질을 포함하고, 여기서 보체 조절 단백질은 막 보조인자 단백질(MCP), 붕괴 촉진 인자(DAF), CR1, CF2 또는 CD59를 포함한다.

[0051] 융합 단백질의 하나 이상의 구현예에서, 치료 단백질은 호르몬, 성장 인자, 사이토카인, 림포카인, 조절 단백질 또는 면역계 단백질에 대한 하나 이상의 수용체를 포함한다.

[0052] 융합 단백질의 하나 이상의 구현예에서, 치료 단백질은 저밀도 지단백질(LDL) 수용체, 고밀도 지단백질(HDL) 수용체, 초저밀도 지단백질(VLDL) 수용체 또는 스캐빈저 수용체를 포함하는 콜레스테롤 조절 및/또는 지질 조정을 위한 하나 이상의 수용체를 포함한다.

[0053] 융합 단백질의 하나 이상의 구현예에서, 치료 단백질은 글루코코르티코이드 수용체 및 에스트로겐 수용체, 비타민 D 수용체 또는 다른 핵 수용체를 포함하는 스테로이드 호르몬 수용체 수퍼패밀리의 하나 이상의 구성원을 포함한다.

[0054] 융합 단백질의 하나 이상의 구현예에서, 치료 단백질은 jun, fos, max, mad, 혈청 반응 인자(SRF), AP-1, AP2, myb, MyoD 및 미오게닌, ETS-박스 함유 단백질, TFE3, E2F, ATF1, ATF2, ATF3, ATF4, ZF5, NFAT, CREB, HNF-4, C/EBP, SP1, CCAAT-박스 결합 단백질, 인터페론 조절 인자(IRF-1), 빌름스(Wilms) 종양 단백질, ETS-결합 단백질, STAT, GATA-박스 결합 단백질 또는 익상 나선 단백질의 포크헤드 계열을 포함하는 하나 이상의 전사 인자를 포함한다.

[0055] 융합 단백질의 하나 이상의 구현예에서, 치료 단백질은 카바모일 합성효소 I, 오르니틴 트랜스카바밀라아제, 아르기노숙시네이트 합성효소, 아르기노숙시네이트 분해효소, 아르기나제, 푸마릴아세트아세테이트 가수분해효소, 페닐알라닌 수산화효소, 알파-1 항트립신, 글루코스-6-포스파타제, 포르포빌리노겐 데아미나제, 시스타티온 베타-합성효소, 분지쇄 케톤산 데카복실라제, 알부민, 이소발레릴-coA 탈수소효소, 프로피오닐 CoA 카복실라제, 메틸 말로닐 CoA 뮤타제, 글루타릴 CoA 탈수소효소, 인슐린, 베타-글루코시다제, 피루베이트 카복실레이트, 간 포스포릴라제, 포스포릴라제 키나제, 글리신 데카복실라제, H-단백질, T-단백질, 낭포성 섬유증 막관통 조절인자(CFTR) 서열, 및 디스트로핀 유전자 생성물 중 하나 이상을 포함한다.

[0056] 융합 단백질의 하나 이상의 구현예에서, 치료 단백질은 혈우병 B 및 혈우병 A를 포함하는 혈우병의 치료에 사용되는 하나 이상의 단백질을 포함한다.

[0057] 융합 단백질의 하나 이상의 구현예에서, 치료 단백질은 삽입, 결실 또는 아미노산 치환을 함유하는 비-천연 발생 아미노산 서열을 갖는 키메라 또는 하이브리드 폴리펩티드와 같은 하나 이상의 비-천연 발생 폴리펩티드를 포함한다.

[0058] 융합 단백질의 하나 이상의 구현예에서, 치료 단백질은 단일-사슬 조작된 면역글로불린, 안티센스 분자 및 촉매 핵산을 포함하는 비-천연 발생 폴리펩티드를 포함한다.

[0059] 융합 단백질의 하나 이상의 구현예에서, 치료 단백질은 세포 수용체 및 "자기"-지시 항체를 생성하는 세포를 포함하는 자가면역과 연관된 표적에 대한 광범위한 보호 면역 반응을 부여함으로써 자가면역 질병 및 장애를 앓고 있는 개체를 치료하는 데 유용한 하나 이상의 단백질을 포함한다.

[0060] 융합 단백질의 하나 이상의 구현예에서, 치료 단백질의 세포 수용체는 T 세포 수용체를 포함한다.

[0061] 융합 단백질의 하나 이상의 구현예에서, 자가면역 질병은 류마티스성 관절염(RA), 다발성 경화증(MS), 쇼그렌 증후군, 유육종증, 인슐린 의존성 진성 당뇨병(IDDM), 자가면역 갑상선염, 반응성 관절염, 강직성 척추염, 경피증, 다발성근염, 피부근염, 건선, 맥관염, 베게너 육아종증, 크론병 및 궤양성 대장염을 포함한다.

[0062] 하나 이상의 구현예에서, 소포 표적화 단백질은 엑소좀 또는 세포외 소포 중 하나 이상을 표적화한다.

[0063] 하나 이상의 구현예에서, 융합 단백질은 친화성 태그, 링커 펩티드, 프로테아제 절단 부위, 분비 신호 펩티드, 세포 표적화 도메인, 리포터, 효소 또는 이들의 조합 중 하나 이상을 포함한다.

[0064] 하나 이상의 구현예에서, 융합 단백질은 하나 이상의 곡률 감지 도메인을 포함한다.

[0065] 하나 이상의 구현예에서, 융합 단백질은 제3 링커 펩티드를 추가로 포함하고, 여기서 제3 링커 펩티드는 소포 표적화 단백질과 관심 단백질 또는 융합 단백질의 말단 단부 사이에 위치한다. 일부 구현예에서, 제3 링커 펩티드는 스페이서 펩티드, 막관통 도메인 및 소포외 도메인 중 하나 이상을 포함한다.

[0066] 하나 이상의 구현예에서, 융합 단백질의 N-말단은 메티오닌을 갖지 않는다.

[0067] 본 개시내용의 또 다른 양태는 본원에 기재된 바와 같은 융합 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0068] 융합 단백질의 하나 이상의 구현예에서, 융합 단백질은 하나 이상의 지질과 접합된다. 융합 단백질의 하나 이상의 구현예에서, 융합 단백질은 미리스토일화에 의해 접합된다. 융합 단백질의 일부 구현예에서, 융합 단백질은 팔미토일화에 의해 접합된다. 융합 단백질의 하나 이상의 구현예에서, 융합 단백질은 프레닐화에 의해 접합된다. 융합 단백질의 일부 구현예에서, 융합 단백질은 글리코실포스파티딜이노시톨 앵커 단백질에 의해 접합된다.

[0069] 본 개시내용의 또 다른 양태는 융합 단백질을 지질 소포로 재구성하는 것에 관한 것이다.

[0070] 본 개시내용의 또 다른 양태는 융합 단백질을 발현시키는 단계, 엑소좀을 분리하는 단계 및 융합 단백질을 정제하는 단계를 포함하는 융합 단백질의 제조 방법에 관한 것이다.

[0071] 하나 이상의 구현예에서, 융합 단백질을 생산하는 방법은 지질 접합을 추가로 포함한다. 융합 단백질을 생산하는 방법의 일부 구현예에서, 지질 접합은 미리스토일화에 의해 수행된다. 융합 단백질을 생산하는 방법의 하나 이상의 구현예에서, 지질 접합은 팔미토일화에 의해 수행된다. 융합 단백질을 생산하는 방법의 일부 구현예에서, 지질 접합은 프레닐화에 의해 수행된다. 융합 단백질을 생산하는 방법의 하나 이상의 구현예에서, 지질 접합은 글리코실포스파티딜이노시톨 앵커 단백질에 의해 수행된다.

[0072] 융합 단백질을 생산하는 방법의 하나 이상의 구현예에서, 상기 방법은 융합 단백질을 지질 소포로 재구성하는 것을 추가로 포함한다.

[0073] 융합 단백질을 생산하는 방법의 하나 이상의 구현예에서, 융합 단백질은 중간엽 줄기 세포, 다발성 골수종 세포, Expi293F 세포, PC12 세포, COS7 세포, HAP1 세포, 차이니즈 햄스터 난소(CHO), HeLa 세포, 인간 배아 신장(HEK) 세포, 마우스 1차 근육모세포, NIH 3T3 세포, 대장균 세포 또는 이의 변이체에서 발현된다.

[0074] 본 개시내용의 또 다른 양태는 융합 단백질 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 제형에 관한 것이다.

[0075] 본 개시내용의 또 다른 양태는 약제학적 제형을 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하여, 질병 또는 장애의 치료 방법에 관한 것이다. 질병 또는 장애를 치료하는 방법의 하나 이상의 구현예에서, 약제학적 제형은 경막내, 두개내, 대수조내, 정맥내, 수조내, 뇌실내 또는 실질내 중 하나 이상을 통해 투여된다.

[0076] 본 개시내용의 또 다른 양태는 유전자 치료 전달 시스템 및 조작된 단백질을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 유전자 치료 조성물에 관한 것이다. 조작된 단백질은 소포 표적화 단백질 및 관심 단백질을 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된 단백질은 융합 단백질이다.

[0077] 유전자 치료 조성물의 하나 이상의 구현예에서, 유전자 치료 전달 시스템은 군집된 규칙적으로 간격을 둔 짧은 회문 반복부(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat; CRISPR) 연관 단백질 9(CRISPR-Cas-9), 전사 활성제-유사 이펙터 뉴클레아제(TALEN) 또는 ZNF(아연 핑거 단백질)중 하나 이상을 포함한다.

[0078] 유전자 치료 조성물의 하나 이상의 구현예에서, 유전자 치료 전달 시스템은 벡터, 리포솜, 지질-핵산 나노입자, 엑소좀 및 유전자 편집 시스템 중 하나 이상을 포함한다.

[0079] 유전자 치료 조성물의 하나 이상의 구현예에서, 유전자 치료 전달 시스템은 바이러스 벡터를 포함한다.

[0080] 유전자 치료 조성물의 하나 이상의 구현예에서, 바이러스 벡터는 아데노바이러스 벡터, 아데노-연관 바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 폭스바이러스 벡터 또는 단순 헤르페스 바이러스 벡터 중 하나 이상을 포함한다.

[0081] 유전자 치료 조성물의 하나 이상의 구현예에서, 바이러스 벡터는 조작된 단백질을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동가능하게 연결된 바이러스 폴리뉴클레오티드를 포함한다.

[0082] 유전자 치료 조성물의 하나 이상의 구현예에서, 바이러스 벡터는 적어도 하나의 역위 말단 반복부(ITR)를 포함한다.

[0083] 유전자 치료 조성물의 하나 이상의 구현예에서, 바이러스 벡터는 SV40 인트론, 폴리아데닐화 신호 또는 안정화 요소 중 하나 이상을 포함한다.

[0084] 유전자 치료 조성물의 하나 이상의 구현예에서, 유전자 치료 전달 시스템은 프로모터를 포함한다.

[0085] 유전자 치료 조성물의 하나 이상의 구현예에서, 유전자 치료 전달 시스템은 리더 신호 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다.

[0086] 본 개시내용의 또 다른 양태는 약제학적으로 허용되는 담체 및 유전자 치료 조성물을 포함하는 유전자 치료 조성물 제형에 관한 것이다.

[0087] 본 개시내용의 또 다른 양태는 유전자 치료 조성물 제형을 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는 질병 또는 장애의 치료 방법에 관한 것이다.

[0088] 본 개시내용의 또 다른 양태는 유전자 치료 조성물 제형을 대상체에게 예방적으로 투여하는 것을 포함하는 질병 또는 장애를 예방하는 방법에 관한 것이다.

[0089] 질병 또는 장애를 치료하는 방법의 하나 이상의 구현예에서, 유전자 치료 조성물은 척수강내, 정맥내, 수조내, 뇌실내 또는 실질내 중 하나 이상을 통해 투여된다.

[0090] 하나 이상의 구현예에서, 유전자 치료 조성물은 경구, 비경구, 설하, 경피, 직장, 경점막, 국소, 흡입, 협측 투여, 흉막내, 정맥내, 동맥내, 복강내, 피하, 근육내, 비강내, 경막내, 및 관절내 또는 이들의 조합으로 투여된다.

도면의 간단한 설명

[0091] **도 1. MARCKS 절단 및 MyrED 개략도.**

도 2. 엑소좀을 표적으로 하는 절단된 MARCKS 변이체 및 MyrEd. COS-7 세포를 절단된 MARCKS 변이체 또는 형광 단백질 mCherry에 융합된 MyrED 중 하나를 인코딩하는 플라스미드로 형질주입하였다. 형질주입된 세포를 mCherry(왼쪽) 및 엑소좀 단백질 CD63(오른쪽)에 대한 항-CD63 항체를 사용하여 면역-가시화하였다.

도 3. MARCKS 변이체 또는 MyrED를 사용한 교차-교정. Cos-7 세포를 mMARCKS-에서 ED, Myr-mMARCKS-ED 또는 BiPa에 융합된 mCherry 형광 단백질을 인코딩하는 플라스미드로 형질주입하였다. 형질주입된 Cos-7 세포(흰색)를 비-형질주입된 세포(검정색)와 공동 배양하였다.

도 4. DIV15 1차 피질 뉴런 세포에서의 교차-교정. Cos-7 세포를 mMARCKS-에서 ED, Myr-mMARCKS-ED 또는 BiPa에 융합된 mCherry 형광 단백질을 인코딩하는 플라스미드로 형질주입하였다. 형질주입된 세포(흰색)를 비-형질주입된 DIV15 1차 피질 뉴런 세포(검정색)와 공동 배양하였다.

도 5. MyrED 변이체의 서열 정렬. 본 개시내용을 위해 개발된 다양한 MyrED 서열의 정렬. 미리스토일화 신호 영역, SNX1 및 MARCKS 또는 MLP ED 도메인은 음영 처리된다.

도 6. 48시간 내에 엑소좀을 표적화하는 MyrED 변이체. Expi293F 세포를 mCherry와 융합된 MyrGag단독, MyrED6, MyrED7, MyrED8, MyrED9 또는 Δ45-MARCKS-ED를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드로 형질주입하였다. 도 6a는 24시간 및 48시간 후 조절 배지에서 상대 형광을 나타낸다. 도 6b는 정제된 엑소좀에서 상대적인 형광을

나타낸다. 도 6c는 mCherry에 대한 1차 항체로 정제된 엑소좀의 웨스턴 블롯 분석을 나타낸다.

도 7. 96시간 내에 엑소좀을 표적화하는 MyrED 변이체. Expi293F 세포를 mCherry에 융합된 MyrED6, MyrED7, MyrED8, MyrED10, MyrED11, MyrED12, MyrED13, MyrED14, MyrED15, MyrED16, MyrED17, MyrED18, MyrED19, MyrED20, MyrED21, MyrED22, MyrED23, MyrED24, MyrED25 또는 MyrED26을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드로 형질주입하였다. 도 7a는 48시간 및 96시간 후 조절 배지에서 상대 형광을 나타낸다. 도 7b는 정제된 엑소좀에서 상대적인 형광을 나타낸다. 도 7c는 Cos-7 세포에서 CD63 단백질을 갖는 mCherry 단백질에 융합된 MyrED13 또는 MyrED17의 공동-국소화를 나타낸다.

도 8. GAA 및 CDKL5에 대한 MyrED의 적용. MyrED13-GAA-HPC4 단백질을 인코딩하는 구성물을 사용하여 Cos7 세포를 형질주입시켰다. 도 8a는 MyrED13-GAA-HPC4 단백질과 CD63 단백질의 공동-국소화가 Cos-7임을 나타낸다. MyrED13, MyrED14 및 MyrED17과 융합된 GAA 단백질을 인코딩하는 구성물을 사용하여 세포를 형질주입시켰다. 도 8b는 엑소좀을 표적으로 하는 융합 단백질인 MyrED13-GAA, MyrED14-GAA 및 MyrED17-GAA의 웨스턴 블롯 분석을 나타낸다. 유사하게, MyrED13, MyrED14 및 MyrED17과 융합된 CDKL5 단백질을 인코딩하는 구성물을 사용하여 세포를 형질주입시켰다. 도 8c는 엑소좀을 표적화하는 융합 단백질인 MyrED13-CDKL5, MyrED14-CDKL5 및 MyrED17-CDKL5의 웨스턴 블롯 분석을 나타낸다.

도 9. 간에서의 mCherry 및 GFP 존재의 웨스턴 블롯 분석. 간에서 mCherry, GFP 및 GAPDH의 수준을 웨스턴 블롯 분석을 사용하여 분석하였다.

도 10. MyrED27 형질도입된 배아 뇌 세포의 형광 이미지 분석. MyrED27로 형질도입된 배아의 뇌 절편을 형광 이미지화하여 형질도입 효율을 결정했다. GFP는 형질주입된 세포에서만 발현된다. 유사하게 교차-교정된 세포은 mCherry만 발현한다. 따라서, 도 10a는 GFP 형질주입된 세포를 나타내고, 도 10b는 mCherry 교차-교정된 세포를 나타내고, 도 10c는 이들의 병합 이미지를 나타낸다.

도 11. MyrED77 형질도입된 배아 뇌 세포의 형광 이미지 분석. MyrED77로 형질도입된 배아의 뇌 절편을 형광 이미지화하여 형질도입 효율을 결정했다. GFP는 형질주입된 세포에서만 발현된다. 유사하게 교차-교정된 세포는 mCherry만 발현한다. 따라서, 도 11a는 GFP 형질주입된 세포를 나타내고, 도 11b는 mCherry 교차-보정된 세포를 나타내고, 도 11c는 이들의 병합 이미지를 나타낸다.

도 12. MyrED81 형질도입된 배아 뇌 세포의 형광 이미지 분석. MyrED81로 형질도입된 배아의 뇌 절편을 형광 이미지화하여 형질도입 효율을 결정했다. GFP는 형질주입된 세포에서만 발현된다. 유사하게 교차-교정된 세포는 mCherry만 발현한다. 따라서, 도 12a는 GFP 형질주입된 세포를 나타내고, 도 12b는 mCherry 교차-교정된 세포를 나타내고, 도 12c는 이들의 병합 이미지를 나타낸다.

도 13. MyrED88 형질도입된 배아 뇌 세포의 형광 이미지 분석. MyrED88로 형질도입된 배아의 뇌 절편을 형광 이미지화하여 형질도입 효율을 결정했다. GFP는 형질주입된 세포에서만 발현된다. 유사하게 교차-교정된 세포는 mCherry만 발현한다. 따라서, 도 13a는 GFP 형질주입된 세포를 나타내고, 도 13b는 mCherry 교차-교정된 세포를 나타내고, 도 13c는 이들의 병합 이미지를 나타낸다.

도 14. 비교 형질도입 효율 분석. 융합 단백질인 MyrED27, MyrED77, MyrED81 및 MyrED88로 형질도입된 배아의 뇌 절편을 형광 이미지화하고 양성 대조군 BiP-mCherry와 비교하여 상대적 형질도입 효율을 결정했다. GFP는 형질주입된 세포에서만 발현된다. 유사하게 교차-교정된 세포는 mCherry만 발현한다. 따라서, 도 14a, 14d, 14g, 14j 및 14m은 GFP 형질주입된 세포를 나타내고, 도 14b, 14e, 14h, 14k 및 14n은 mCherry 교차-교정된 세포를 나타내고, 도 14c, 14f, 14i, 14l 및 14o는 이들의 병합 이미지를 나타낸다.

도 15. MyrED53-67을 이용한 CDKL5 표적화. 도 15a는 MyrED27 및 MyrED54-67의 구성 요소에 대한 비교를 나타낸다. 도 15b는 다양한 엑소좀 표적 변이체에서 CDKL5 발현(약 115 kDa)을 나타내는 웨스턴 블롯이다.

도 16. MyrED59-65로 표적화하는 TPP1. 도 16은 다양한 엑소좀 표적 변이체에서 TPP1 발현(약 75 kDa) 및 CD81 발현(테트라스파닌 마커)을 나타내는 웨스턴 블롯이다.

도 17. C-말단 엑소좀 표적화 태그의 테스팅. 도 17a는 MyrED81-94의 구성 요소에 대한 비교를 나타낸다. 도 17b는 다양한 엑소좀 표적 변이체에 대한 부피로 정규화된 BiP-mCherry-MyrED 엑소좀을 나타낸다.

도 18. C-말단 엑소좀 표적화 태그의 테스팅. 도 18은 다양한 C 말단 태그된 엑소좀 표적 변이체에서 mCherry 형광 스크린을 나타낸다.

도 19. MyrED를 사용한 GAA 표적화. 도 19는 C-말단 태그된 엑소좀 표적 변이체에서 GAA(약 105 kDa) 및 CD9(약 20 kDa) 테트라스파닌 마커 발현을 나타내는 웨스턴 블롯이다.

도 20. MyrED를 사용한 NAGLU 표적화. 도 20은 C-말단 태그된 엑소좀 표적 변이체에서 NAGLU(약 85 kDa) 및 CD9(약 20 kDa) 테트라스파닌 마커 발현을 나타내는 웨스턴 블롯이다. COV2 NAGLU(T343P/A181L)를 음성 대조군으로 간주하였다.

도 21. MyrED를 사용한 TTP1 표적화. 도 21은 C-말단 태그된 엑소좀 표적 변이체에서 TPP1(HPC4 Ab- 약 65 kDa) 및 CD9(약 20 kDa) 테트라스파닌 마커 발현을 나타내는 웨스턴 블롯이다. BiP1 태그된 TPP1 구성물을 음성 대조군으로 간주하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0092] 본 개시내용의 몇몇 예시적인 구현예를 설명하기 전에, 본 개시내용은 다음의 설명에서 제시되는 구성 또는 과정 단계의 세부사항으로 제한되지 않는다는 것을 이해해야 한다. 본 개시내용은 다른 구현예가 가능하고 다양한 방식으로 실행되거나 수행될 수 있다.

[0093] 본 개시내용의 다양한 구현예는 소포, 예컨대 엑소좀을 통해 세포에 치료 분자를 전달하는 것에 관한 것이다.

[0094] 본원에 기재된 바와 같이, 엑소좀 또는 다른 세포외 소포는 유전자 전달을 위해 사용될 수 있다. 엑소좀은 다포체와 원형질막의 융합 후 세포외 환경으로 방출되는 세포내 기원의 작은 막-결합 소포(30 내지 100 nm)이다. 환자는 효소 대체 요법에 의해 전달된 단백질에 대해 면역 반응을 일으켜 요법의 효능에 잠재적으로 영향을 미칠 수 있는 것으로 알려져 있다(Harmatz, Clin Ther, 2015). 신체에 외래인 높은 수준의 분비 단백질이 혈류로 전달되면, 종종 단백질에 대한 중화 항체가 발생한다. 이것은 생존률 및 임상 결과의 불량률을 초래하는 정도로, 잔류 효소 발현이 없는 환자(교차-반응성 면역 물질(CRIM) - 음성 환자)에서 특히 그러하다(Kishnani et al., Mol Genet Metab. , 2010). 아마도 이것은 유전자 치료로 전달된 단백질의 경우에도 마찬가지이다. 엑소좀은 단백질 페이로드를 운반하는 "트로이 목마" 역할을 한다. 단백질은 소포 안에 숨겨져 있어 면역 세포 및 항체와 상호 작용할 수 없다. 엑소좀은 체내 세포에 의해 이미 자연적으로 분비되기 때문에 면역 반응을 유도할 가능성이 낮다. 단백질을 엑소좀에 표적화함으로써 단백질이 면역 반응을 유도할 가능성이 낮아져 치료 효과가 향상된다.

[0095] B 세포, T 세포 및 수지상 세포(DC)를 포함하는 많은 면역 세포에 대한 엑소좀 생산이 기재되었다. B 림프구 및 성숙한 DC로부터 유래된 엑소좀은 MHC-II, MHC-I, CD86 및 ICAM-1을 발현하고 실험 모델 및 임상 시험에서 특정 항종양 T 세포독성 반응 및 항종양 면역을 유도하는 데 사용되었다. 엑소좀-매개 유전자 전달의 가능성은 뮤린 mRNA 및 miRNA를 인간 비만 세포로 전달하는 것으로 나타났으며 신경아교종-유래 엑소좀은 외인성 DNA 플라스미드에 의해 생성된 mRNA를 이종 세포로 전달하는 것으로 입증되었지만, 외인성 DNA, siRNA 및 기타 변형된 올리고뉴클레오티드의 로딩 및 전달은 아직 입증되지 않았다.

[0096] 추가로, 약물 제품을 엑소좀으로 시험관내 패킹하는 현재의 접근법은 엑소좀 제조의 고비용 및 약물 혼입의 상대적으로 낮은 효율을 포함하여 매우 도전적이다. 엑소좀은 본질적으로 이질적이며 그 내용물에 대한 현재 지식이 부족하고; 따라서 특히 엑소좀이 불멸화 세포로부터 시험관내에서 제조될 때 안전성 문제가 제기된다. 개별 조직이 동일한 조직에서 유래된 엑소좀만 내재화할 수 있다는 증거가 있으므로, 시험관내에서 제조된 엑소좀은 모든 조직/기관을 효율적으로 표적화하지 않을 수 있다.

[0097] 다양한 구현예에서, 본원에 개시된 방법 및/또는 조성물은 소포, 예컨대 엑소좀을 통한 치료 화물의 전달을 개선한다.

[0098] **정의**

[0099] 본원에서 사용되는 용어 "포함하다", "비롯하다", "갖는", "가지다", "할 수 있다", "함유하다" 및 이들의 변형어는 추가적인 작용이나 구조의 가능성을 배제하지 않는 개방형 전환 문구, 용어 또는 단어를 의미한다. 단수형태("a", "an" 및 "the")는 문맥에서 달리 명시하지 않는 한 복수 참조를 포함한다. 본 개시내용은 또한 명시적으로 제시되었는지 여부에 상관없이 본원에 제시된 구현예 또는 요소를 "포함하는", 요소로 "구성된" 및 "본질적으로 구성된" 다른 구현예를 고려한다.

[0100] 용어 "코딩 서열" 또는 "인코딩 핵산"은 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산(RNA 또는 DNA 분자)을 지칭한다. 코딩 서열은 핵산이 투여되는 개체 또는 포유동물의 세포에서 발현을 지시할 수 있는 프로모

터 및 폴리아데닐화 신호를 포함하는 조절 요소에 작동가능하게 연결된 개시 및 종결 신호를 추가로 포함할 수 있다.

[0101] 용어 "보체" 또는 "상보적인"은 뉴클레오티드 또는 핵산 분자의 뉴클레오티드 유사체 사이의 왓슨-크릭(예를 들어, A-T/U 및 C-G) 또는 후그스틴 염기 쌍을 지칭한다.

[0102] 용어 "~에 직접 연결된"은 2개의 펩티드가 2개의 펩티드 사이에 아미노산 없이 아미드 결합을 통해 연결된 상태를 지칭한다.

[0103] 용어 "발현가능한 형태"는 개체의 세포에 존재할 때 코딩 서열이 발현되도록 표적 단백질을 인코딩하는 코딩 서열에 작동가능하게 연결된 필수 조절 요소를 함유하는 유전자 구성물을 지칭한다.

[0104] 용어 "단편"은 포유동물에서 실질적인 수준의 기능을 유지하는 폴리펩티드를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열 또는 이의 일부를 지칭한다. 단편은 아래 제시된 단백질 단편을 인코딩하는 다양한 뉴클레오티드 서열 중 적어도 하나로부터 선택되는 DNA 단편일 수 있다.

[0105] 용어 "유전적 구성물"은 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 DNA 또는 RNA 분자를 지칭한다. 코딩 서열은 핵산 분자가 투여되는 개체의 세포에서 발현을 지시할 수 있는 프로모터 및 폴리아데닐화 신호를 포함하는 조절 요소에 작동가능하게 연결된 개시 및 종료 신호를 포함한다. 본원에서 사용되는 용어 "발현가능한 형태"는 개체의 세포에 존재할 때 코딩 서열이 발현되도록 단백질을 인코딩하는 코딩 서열에 작동가능하게 연결된 필수 조절 요소를 함유하는 유전자 구성물을 지칭한다.

[0106] 2개 이상의 핵산 또는 폴리펩티드 서열과 관련하여 본원에서 사용되는 용어 "동일한" 또는 "동일성"은 서열이 특정 영역에 걸쳐서 동일한 잔기의 특정 백분율을 갖는다는 것을 의미한다. 백분율은 두 서열을 최적으로 정렬하고, 지정된 영역에 걸쳐서 두 서열을 비교하고, 두 서열에서 동일한 잔기가 발생하는 위치의 수를 결정하여 일치하는 위치의 수를 산출하고, 일치하는 위치의 수를 지정된 영역의 총 위치 수로 나누고, 결과에 100을 곱하여 서열 유사성의 백분율을 산출한다. 두 서열의 길이가 다르거나 정렬이 하나 이상의 엇갈린 끝을 생성하고 지정된 비교 영역이 단일 서열만 포함하는 경우, 단일 서열의 잔기는 계산의 분자가 아닌 분모에 포함된다. DNA와 RNA를 비교할 때 티민(T)과 우라실(U)은 동등한 것으로 간주될 수 있다. 동일성은 수동으로 수행되거나 BLAST 또는 BLAST 2.0과 같은 컴퓨터 서열 알고리즘을 사용하여 수행될 수 있다.

[0107] 용어 "유전자 치료 전달 시스템"은 관심 유전자가 표적 세포에서 발현되거나 과발현되도록 관심 외인성 유전자를 표적 세포에 전달하기 위해 사용될 수 있는 임의의 시스템을 지칭한다. 하나 이상의 구현예에서, 표적 세포는 생체내 환자 세포이다. 하나 이상의 구현예에서, 표적 세포는 체외 세포이고 그 다음 세포는 환자에게 투여된다.

[0108] 용어 "숙주 세포"는 세포에 의한 물질 생산, 예를 들어 세포에 의한 유전자, DNA 또는 RNA 서열, 단백질 또는 효소의 발현을 위해 임의의 방식으로 선택, 변형, 형질전환, 성장 또는 사용 또는 조작되는 임의의 유기체의 임의의 세포를 의미한다.

[0109] 용어 "미니유전자"는 전이유전자, 프로모터/인핸서 및 5' 및 3' AAV ITR의 조합을 지칭하며 본원에서 용이한 참조를 위해 "미니유전자"로 지칭된다. 본 개시내용의 교시와 함께, 이러한 미니유전자의 설계는 통상적인 기법에 의지하여 이루어질 수 있다.

[0110] 용어 "핵산" 또는 "올리고뉴클레오티드" 또는 "폴리뉴클레오티드"는 함께 공유 결합된 적어도 2개의 뉴클레오티드를 지칭한다. 단일 가닥의 묘사는 또한 상보적 가닥의 서열을 정의한다. 따라서, 핵산은 또한 도시된 단일 가닥의 상보적 가닥을 포함한다. 핵산의 많은 변이체는 주어진 핵산과 동일한 목적을 위해 사용될 수 있다. 따라서, 핵산은 또한 실질적으로 동일한 핵산 및 이의 보체를 포함한다. 단일 가닥은 엄격한 혼성화 조건 하에서 표적 서열에 혼성화할 수 있는 프로브를 제공한다. 따라서, 핵산은 또한 엄격한 혼성화 조건 하에서 혼성화하는 프로브를 포함한다.

[0111] 용어 "작동가능하게 연결된"은 공간적으로 연결된 프로모터의 제어 하에 있는 유전자의 발현을 지칭한다. 프로모터는 제어 하에 있는 유전자의 5'(상류) 또는 3'(하류)에 위치할 수 있다. 프로모터와 유전자 사이의 거리는 해당 프로모터와 프로모터가 유래된 유전자에서 조절하는 유전자 사이의 거리와 대략 동일할 수 있다. 당업계에 공지된 바와 같이, 이 거리의 변화는 프로모터 기능의 손실 없이 수용될 수 있다.

[0112] 용어 "환자"는 진단, 치료 또는 요법이 요구되는 임의의 포유동물 대상체, 특히 인간을 지칭한다. 치료 목적의 포유동물 대상체는 인간, 가축 및 농장 동물, 실험실, 동물원, 스포츠 또는 애완 동물, 예컨대 개, 말, 고양이,

소, 양, 염소, 돼지, 마우스, 랫트, 토끼, 기니피그, 원숭이 등을 포함하여 포유 동물로 분류된 임의의 동물을 지칭한다. 포유동물 대상체는 장애가 있는 태아, 신생아, 어린이, 청소년 또는 성인일 수 있다. 하나 이상의 구현예에서, 포유동물 대상체는 인간이다.

[0113] 용어 "펩티드", "단백질" 또는 "폴리펩티드"는 아미노산의 연결된 서열을 지칭하고 천연, 합성, 또는 변형 또는 천연과 합성의 조합일 수 있다.

[0114] 용어 "약제학적으로 허용되는"은 생리학적으로 허용가능하고 인간에게 투여될 때 통상적으로 원치 않는 반응을 일으키지 않는 분자 실체 및 조성물을 지칭한다. 바람직하게는, 본원에서 사용되는 용어 "약제학적으로 허용되는"은 연방 또는 주 정부의 규제 기관에 의해 승인되거나 미국 약전 또는 동물, 더 구체적으로 인간에서 사용하기 위해 기타 일반적으로 인정되는 약전에 등재된 것을 의미한다. 용어 "담체"는 화합물과 함께 투여되는 희석제, 보조제, 부형제 또는 비히클을 지칭한다. 이러한 약제학적 담체는 물 및 오일과 같은 멸균 액체일 수 있다. 물 또는 수용액 식염수와 수성 덱스트로스 및 글리세롤 용액은 바람직하게는 특히 주사용 용액을 위한 담체로서 사용된다. 적합한 약제학적 담체는 문헌["Remington's Pharmaceutical Sciences" by E.W. Martin, 18th Edition], 또는 다른 판에 기재되어 있다.

[0115] 용어 "프로모터"는 효소 RNA 중합효소가 결합하여 DNA의 RNA로의 전사를 개시하는 DNA 상의 부위를 지칭한다. 프로모터는 세포에서 핵산의 발현을 부여, 활성화 또는 향상시킬 수 있는 합성 또는 자연-유래 분자일 수 있다. 프로모터는 핵산의 발현을 추가로 향상시키고/시키거나 공간적 발현 및/또는 시간적 발현을 변경하기 위해 하나 이상의 특정 전사 조절 서열을 포함할 수 있다. 프로모터는 또한 원위의 인핸서 또는 억제자 요소를 포함할 수 있으며, 이는 전사 시작 부위로부터 수천 개의 염기쌍만큼 떨어져서 위치할 수 있다. 프로모터는 바이러스, 박테리아, 진균, 식물, 곤충 및 동물을 포함하는 공급원에서 유래할 수 있다. 프로모터는 발현이 일어나는 세포, 조직 또는 기관에 대해, 또는 발현이 일어나는 발달 단계에 대해, 또는 생리학적 스트레스, 병원체, 금속 이온 또는 유도제와 같은 외부 자극에 대한 반응으로 유전자 성분의 발현을 구성적으로 또는 차등적으로 조절할 수 있다. 프로모터의 대표적인 예는 박테리오파지 T7 프로모터, 박테리오파지 T3 프로모터, SP6 프로모터, lac 오퍼레이터-프로모터, tac 프로모터, SV40 후기 프로모터, SV40 초기 프로모터, RSV-LTR 프로모터, CMV IE 프로모터, SV40 초기 프로모터 또는 SV40 후기 프로모터 및 CMV IE 프로모터를 포함한다.

[0116] 용어 "단백질 대체 요법"은 외인성, 정제된 단백질을 이러한 단백질이 결핍된 개체에게 도입하는 것을 지칭하고자 한다. 투여된 단백질은 천연 공급원 또는 재조합 발현에 의해 얻을 수 있다. 이 용어는 또한 정제된 단백질의 투여를 필요로 하거나 그로부터 이익을 얻는 개체에서 정제된 단백질을 도입하는 것을 지칭한다. 적어도 하나의 구현예에서, 이러한 개체는 단백질 결핍증을 앓고 있다. 도입된 단백질은 시험관내에서 생산된 정제된 재조합 단백질이거나, 예를 들어 태반 또는 동물의 우유와 같은 분리된 조직 또는 체액으로부터, 또는 식물로부터 정제된 단백질일 수 있다.

[0117] 용어 "대상체"는 본원에 기재된 조성물을 투여받을 수 있는 포유동물을 지칭한다. 포유동물은, 예를 들어 인간, 침팬지, 개, 고양이, 말, 소, 마우스 또는 래트일 수 있다. 하나 이상의 구현예에서, 대상체는 인간이다.

[0118] 용어 "실질적인 상동성" 또는 "실질적인 유사성"은 핵산 또는 이의 단편을 지칭하는 경우, 다른 핵산(또는 이의 상보적 가닥)과의 적절한 뉴클레오티드 삽입 또는 결실과 최적으로 정렬될 때, 정렬된 서열의 적어도 약 95 내지 99%에서 뉴클레오티드 서열 유사성이 있음을 나타낸다. 바람직하게는, 상동성은 전장 서열, 또는 이의 오픈 리딩 프레임, 또는 길이가 적어도 15개 뉴클레오티드인 또 다른 적합한 단편에 걸쳐 있다. 적합한 단편의 예는 본원에 기재되어 있다.

[0119] 핵산 서열과 관련하여 용어 "서열 유사성", "서열 동일성", "퍼센트 서열 동일성" 또는 "백분율 동일"은 최대 일치를 위해 정렬될 때 동일한 2개의 서열 내의 잔기를 지칭한다. 유사하게, "퍼센트 서열 동일성"은 단백질 또는 이의 단편의 전체 길이에 걸쳐 아미노산 서열에 대해 쉽게 결정될 수 있다.

[0120] 용어 "혈청형"은 다른 AAV 혈청형과 혈청학적으로 구별되는 캡시드를 갖는 AAV에 대한 구별이다. 혈청학적 특이성은 다른 AAV와 비교하여 AAV에 대한 항체 사이의 교차 반응성의 결여에 기초하여 결정된다.

[0121] 교차-반응성은 통상적으로 중화 항체 분석에서 측정된다. 이 검정을 위해 토끼 또는 아데노-연관 바이러스를 사용하는 다른 적합한 동물 모델에서 특정 AAV에 대해 폴리클로날 혈청을 생성한다. 그 다음 이 검정에서 특정 AAV에 대해 생성된 혈청은 동일한(동종) 또는 이종 AAV를 중화하는 능력에 대해 테스트된다. 50% 중화를 달성하는 희석은 중화 항체 역가로 간주된다. 2개의 AAV에 대해 상동 역가로 나눈 이종 역가의 몫이 역의 방식으로 16보다 낮으면, 이들 2개의 벡터는 동일한 혈청형으로 간주된다. 역으로, 동종 역가에 대한 이종 역가의 비율이

역의 방식으로 16 이상인 경우 두 AAV는 별개의 혈청형으로 간주된다.

[0122] 본원에 정의된 바와 같이, 혈청형 9를 형성하기 위해, 선택된 AAV 캡시드에 대해 생성된 항체는 AAV 1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7 또는 AAV8 중 어느 것과도 교차 반응성이 없어야 한다. 한 구현예에서, AAV 캡시드는 인간 AAV 혈청형 9로서 본원에서 확인된 신규 혈청형이다.

[0123] 용어 "치료 단백질"은 유전적 장애를 갖는 환자에서 유전적 장애와 연관된 결함 또는 결핍 단백질을 대체할 수 있는 단백질을 지칭한다.

[0124] 본원에 사용된 치료 단백질은 인슐린, 글루카곤, 성장 호르몬(GH), 부갑상선 호르몬(PTH), 성장 호르몬 방출 인자(GRF), 여포 자극 호르몬(FSH), 황체형성 호르몬(LH), 인간 융모막 성선자극 호르몬(hCG), 혈관 내피 성장 인자(VEGF), 안지오포이에틴, 안지오스타틴, 과립구 집락 자극 인자(GCSF), 에리스로포이에틴(EPO), 결합 조직 성장 인자(CTGF), 염기성 섬유아세포 성장 인자(bFGF), 산성 섬유아세포 성장 인자(aFGF), 표피 성장 인자(EGF), 혈소판-유래 성장 인자(PDGF), 인슐린 성장 인자 I 및 II(IGF-I 및 IGF-II), TGFα, 액티빈, 인히빈 또는 뼈 형태형성 단백질(BMP)인 BMP 1 내지 15 중 임의의 것을 포함하는 형질전환 성장 인자 슈퍼패밀리 중 임의의 하나, 성장 인자의 헤레글루인/뉴레귤린/ARIA/neu 분화 인자(NDF) 계열 중 임의의 하나, 신경 성장 인자(NGF), 뇌-유래 뉴로트로핀 인자(BDNF), 뉴로트로핀 NT-3 및 NT-4/5, 섬모 뉴로트로핀 인자(CNTF), 신경아교세포주 유래 뉴로트로핀 인자(GDNF), 뉴투린, 아그린, 세마포린/콜랩신 계열 중 임의의 하나, 네트린-1 및 네트린-2, 간세포 성장 인자(HGF), 에프린, 노긴, 소닉 헤지호그 및 티로신 수산화효소를 제한 없이 포함하는 호르몬 및/또는 성장 및/또는 분화 인자를 포함할 수 있다.

[0125] 본원에 사용된 치료 단백질은 또한 사이토카인 및 림포카인, 예컨대 트롬보포이에틴(TPO), 인터루킨(IL) IL-1 내지 IL-25(예를 들어, IL-2, IL-4, IL-12 및 IL-18), 단핵구 화학유인 단백질, 백혈병 억제 인자, 과립구-대식세포 집락 자극 인자, Fas 리간드, 종양 괴사 인자 α 및 β, 인터페론 α, β 및 γ, 줄기 세포 인자, flk-2/flt3 리간드를 제한 없이 포함하는 면역계를 조절하는 단백질을 포함할 수 있다. 본원에 사용된 치료 단백질은 또한 면역글로불린 IgG, IgM, IgA, IgD 및 IgE, 키메라 면역글로불린, 인간화 항체, 단일 사슬 항체, T 세포 수용체, 키메라 T 세포 수용체, 단일 사슬 T 세포 수용체, 클래스 I 및 클래스 II MHC 분자, 뿐만 아니라 조작된 면역글로불린 및 MHC 분자를 제한 없이 포함한다. 또한, 본원에서 사용되는 치료 단백질은 막 보조인자 단백질(MCP), 붕괴 촉진 인자(DAF), CR1, CF2 및 CD59와 같은 보체 조절 단백질을 포함한다.

[0126] 본원에서 사용되는 치료 단백질은 또한 호르몬, 성장 인자, 사이토카인, 림포카인, 조절 단백질 및 면역계 단백질에 대한 수용체 중 임의의 하나를 포함할 수 있다. 본 개시내용은 저밀도 지단백질(LDL) 수용체, 고밀도 지단백질(HDL) 수용체, 초저밀도 지단백질(VLDL) 수용체 및 스캐빈저 수용체를 포함하는 콜레스테롤 조절 및/또는 지질 조정을 위한 수용체를 포함한다. 본 개시내용은 또한 글루코코르티코이드 수용체 및 에스트로겐 수용체, 비타민 D 수용체 및 다른 핵 수용체를 포함하는 스테로이드 호르몬 수용체 슈퍼패밀리의 구성원과 같은 유전자 생성물을 포함한다. 또한, 치료 단백질은 jun, fos, max, mad, 혈청 반응 인자(SRF), AP-1, AP2, myb, MyoD 및 미오게닌, ETS-박스 함유 단백질, TFE3, E2F, ATF1, ATF2, ATF3, ATF4, ZF5, NFAT, CREB, HNF-4, C/EBP, SP1, CCAAT-박스 결합 단백질, 인터페론 조절 인자(IRF-1), 빌름스(Wilms) 종양 단백질, ETS-결합 단백질, STAT, GATA-박스 결합 단백질, 예를 들어 GATA-3 및 익상 나선 단백질의 포크헤드 계열과 같은 전사 인자를 포함한다.

[0127] 치료 단백질은 또한 카바모일 합성효소 I, 오르니틴 트랜스카바밀라아제, 아르기노숙시네이트 합성효소, 아르기노숙시네이트 분해효소, 아르기나제, 푸마릴아세트아세테이트 가수분해효소, 페닐알라닌 수산화효소, 알파-1 안티트립신, 글루코스-6-포스파타제, 포르포빌리노겐 데아미나제, 시스타티온 베타-합성효소, 분지쇄 케토산 데카복실라제, 알부민, 이소발레릴-coA 탈수소효소, 프로피오닐 CoA 카복실라제, 메틸 말로닐 CoA 뮤타제, 글루타릴 CoA 탈수소효소, 인슐린, 베타-글루코시다제, 피루베이트 카복실레이트, 간 포스포릴라제, 포스포릴라제 키나제, 글리신 데카복실라제, H-단백질, T-단백질, 낭포성 섬유증 막관통 조절인자(CFTR) 서열, 및 디스트로핀 유전자 생성물을 또한 포함할 수 있다. 치료 단백질은 또한 효소 대체 요법에 유용할 수 있는 효소를 포함할 수 있으며, 이는 효소의 결핍 활성으로 인한 다양한 병태에서 유용하다. 비제한적인 예시적인 효소는 CDKL5, 알파-갈락토시다제, β-갈락토시다제, β-헥소사미니다제, 갈락토실세라미다제, 아릴설파타제, β-글루코세레브로시다제, 글루코세레브로시다제, 리소좀 산 리파제, 리소좀 효소 산 스핑고미엘리나제, 포르밀글리신-생성 효소, 이두로니다제, 아세틸-CoA: 알파-글루코사미나이드 N-아세틸트랜스퍼라제, 글리코사미노글리칸 알파-L-이두로노하이드롤라제, 헤파란 N-설파타제, N-아세틸-α-D-글루코사미니다제(NAGLU), 이두로네이트-2-설파타제, 갈락토사민-6-설페이트 설파타제, N-아세틸갈락토사민-6-설파타제, 글리코사미노글리칸 N-아세틸갈락토사민 4-설파타제, β-글루쿠로니다제, 히알루로니다제, 알파-N-아세틸 뉴라미니다제(시알리다제), 강글리오사이드

시알리다제, 포스포트랜스퍼라제, 알파-글루코시다제, 알파-D-만노시다제, 베타-D-만노시다제, 아스파틸글루코사미니다제, 알파-L-푸코시다제, 바테닌, 팔미토일 단백질 티오에스테라제 및 기타 바텐-관련 단백질 또는 이의 효소 활성 단편을 포함한다. 하나 이상의 구현예에서, 바텐-관련 단백질은 세로이드-리포푸신증 뉴런 단백질 1, 세로이드-리포푸신증 뉴런 단백질 2, 세로이드-리포푸신증 뉴런 단백질 3, 세로이드-리포푸신증 뉴런 단백질 4, 세로이드-리포푸신증 뉴런 단백질 5, 세로이드-리포푸신증 뉴런 단백질 6, 세로이드-리포푸신증 뉴런 단백질 7, 세로이드-리포푸신증 뉴런 단백질 8, 세로이드-리포푸신증 뉴런 단백질 19, 세로이드-리포푸신증 뉴런 단백질 10, 세로이드-리포푸신증 뉴런 단백질 11, 세로이드-리포푸신증 뉴런 단백질 12, 세로이드-리포푸신증 뉴런 단백질 13 및 세로이드-리포푸신증 뉴런 단백질 14를 포함한다.

[0128] 치료 단백질은 또한 혈우병 B(인자 IX를 포함함) 및 혈우병 A(인자 VIII 및 이종이량체의 경쇄 및 중쇄, 및 B-결실된 도메인와 같은 이의 변이체를 포함함; 미국 특허 6,200,560 및 미국 특허. 6,221,349)를 포함하는 혈우병 치료에 사용되는 단백질을 포함할 수 있다.

[0129] 치료 단백질은 또한 삽입, 결실 또는 아미노산 치환을 함유하는 비-천연 발생 아미노산 서열을 갖는 키메라 또는 하이브리드 폴리펩티드와 같은 비-천연 발생 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 예를 들어, 단일-사슬 조작 면역글로불린은 특정 면역저하 환자에서 유용할 수 있다. 다른 유형의 비-천연 발생 유전자 서열에는 안티센스 분자 및 표적의 과발현을 감소시키는 데 사용될 수 있는 리보자임과 같은 촉매 핵산이 포함된다.

[0130] 유전자 발현의 감소 및/또는 조절은 암 및 건선과 같이 과증식 세포를 특징으로 하는 과증식 병태의 치료에 특히 바람직하다. 치료 단백질은 또한 표적 항원 및 표적 폴리펩티드와 같은 종양유전자 생성물을 포함하며, 여기서 표적 폴리펩티드는 정상 세포와 비교하여 과증식성 세포에서 배타적으로 또는 더 높은 수준으로 생산되는 단백질을 포함하고, 표적 항원은 myb, myc, fyn 및 전위 유전자 bcr/abl, ras, src, P53, neu, trk 및 EGRF와 같은 종양유전자에 의해 인코딩된 단백질을 포함한다. 표적 항원으로서의 종양유전자 생성물, 항암 치료 및 보호요법을 위한 표적 폴리펩티드 이외에, 치료 단백질은 또한 B 세포 림프종에 의해 생성된 항체의 가변 영역 및 T 세포 림프종의 T 세포 수용체의 가변 영역을 포함하는데, 이는 또한 일부 구현예에서, 자가 면역 질병의 표적 항원으로도 사용된다. 모노클로날 항체 17-1A에 의해 인식되는 폴리펩티드 및 엽산 결합 폴리펩티드를 포함하는 종양 세포에서 더 높은 수준으로 발견되는 폴리펩티드와 같은 다른 종양-연관 폴리펩티드가 표적 폴리펩티드로 사용될 수 있다.

[0131] 다른 적합한 치료용 단백질은 세포 수용체 및 "자기"-지시 항체를 생성하는 세포를 포함하는 자가면역과 연관된 표적에 대해 광범위한 보호 면역 반응을 부여함으로써 자가면역 질병 및 장애를 앓고 있는 개체를 치료하는 데 유용할 수 있는 것을 포함한다. T 세포 매개 자가면역 질병은 류마티스성 관절염(RA), 다발성 경화증(MS), 쇼그렌 증후군, 유육종증, 인슐린 의존성 진성 당뇨병(IDDM), 자가면역 갑상선염, 반응성 관절염, 강직성 척추염, 경피증, 다발성근염, 피부근염, 건선, 혈관염, 베게너 육아종증, 크론병 및 궤양성 대장염을 포함한다. 이들 각각의 질병은 내인성 항원에 결합하고 자가면역 질병과 연관된 염증 캐스케이드를 개시하는 T 세포 수용체(TCR)를 특징으로 한다.

[0132] 용어 "치료하는"은 장애의 적어도 하나의 양태 또는 마커를 억제, 약화, 감소, 예방 또는 변경하는 것을 포함하는 치료 효과를 얻기 위한 목적으로 통계적으로 유의한 방식 또는 임상적으로 유의한 방식으로 작용제를 투여하거나 절차를 수행하는 것을 말한다. 용어 "치료하다"는 근본적인 상태에 대한 치유를 나타내거나 암시하지 않으며 오히려 다음을 포함한다: (a) 장애에 소인이 있을 수 있지만 아직 장애(예를 들어, 원발성 장애와 관련되거나 이에 의해 유발될 수 있는 장애를 포함함)가 있는 것으로 진단되지 않은 환자에서 장애 또는 장애의 증상이 발생하는 것을 방지; (b) 장애 억제, 즉 장애 발생 정지; (c) 장애 완화, 즉 장애 퇴행 유발; 및 (d) 장애의 적어도 하나의 증상 개선. 치료는 경감; 완화; 증상의 감소 또는 장애 상태를 환자가 더 견딜 수 있게 만드는 것; 퇴화 또는 쇠퇴 속도의 둔화; 또는 퇴행의 최종 지점을 덜 쇠약하게 만드는 것과 같은 임의의 객관적 또는 주관적 매개변수를 포함하여 장애의 치료 또는 개선 또는 예방의 임의의 성공 지표를 지칭할 수 있다. 증상의 치료 또는 개선은, 의사의 검사 결과를 포함하여, 하나 이상의 객관적 또는 주관적 매개변수를 기반으로 한다. 따라서, "치료하는"이라는 용어는 장애와 연관된 증상 또는 병태의 발생을 예방 또는 지연, 완화 또는 정지 또는 억제하기 위해 본 개시내용의 화합물 또는 작용제를 투여하는 것을 포함한다.

[0133] 용어 "벡터"는 치료 유전자를 세포에 전달하는 유전자 치료 전달 비히클 또는 담체를 지칭한다. 벡터는 유전자 치료에 사용하기에 적합한 임의의 벡터, 예를 들어 핵산 중합체(폴리펩티드 또는 이의 변이체를 인코딩함)를 환자의 표적 세포로 치료학적으로 전달하기에 적합한 임의의 벡터이다. 일부 구현예에서, 유전자 치료 벡터는 융합 단백질이 세포로부터 발현되고 분비되는 세포에 융합 단백질을 인코딩하는 핵산을 전달한다. 벡터는 임의의

유형일 수 있으며, 예를 들어 플라스미드 벡터 또는 미니서클 DNA일 수 있다. 통상적으로 벡터는 바이러스 벡터이다. 예를 들어, 바이러스 벡터는 아데노-연관 바이러스(AAV), 레트로바이러스, 렌티바이러스, 단순 헤르페스 바이러스 또는 아데노바이러스로부터 유래될 수 있다. 바이러스 벡터는 또한 프로모터(예를 들어, 하이브리드 CBA 프로모터(CBh) 및 인간 시냅신 1 프로모터(hSyn1)), 폴리아데닐화 신호(예를 들어, 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 신호(bGHpolyA)), 안정화 요소(예를 들어, 우드척 간염 바이러스(WHP) 전사 후 조절 요소(WPRE)) 및/또는 SV40 인트론과 같은 발현 증가 및/또는 벡터 안정화를 위한 추가 요소를 또한 포함할 수 있다. 하나 이상의 구현예에서, 벡터는 게놈의 원하는 부위에서 상동성 재조합을 촉진하는 영역이 측접하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있으며, 따라서 원하는 단백질의 발현을 제공할 수 있다(문헌[Koller and Smithies, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:8932-8935; Zijlstra et al., 1989, Nature 342:435-438]; Zarling외 다수의 미국 특허 6,244,113; 및 Pati외 다수의 미국 특허 6,200,812 참조).

[0134] **AAV 벡터**

[0135] 전이유전자를 전달하기 위한 AAV 벡터

[0136] 다양한 구현예에서, 유전자 치료 조성물 및/또는 방법은 AAV 벡터를 이용한다. 대안적으로, 본원에 기재된 바와 같은 다른 바이러스 벡터 또는 유전자 치료 전달 시스템이 사용될 수 있다.

[0137] 다수의 클레이드 중 하나로부터의 AAV 벡터는 형질도입을 위해 생체내 전이유전자를 전달하기 위해 이용될 수 있고, 다수의 예가 본원에 전체 내용이 참조로포함되는 미국 특허 7,198,951(James Wilson 특허)에 상세히 제공되어 있다. 이들 AAV 벡터의 게놈 및 본원에 기재된 제조 공정, 및 당업계에서 이용가능한 것을 사용하여, 본원에 제공된 전이유전자 중 하나 이상의 전달을 위한 벡터로서 재조합 AAV(rAAV)를 생성할 수 있다.

[0138] I. 클레이드

[0139] 클레이드는 적어도 75%(적어도 1000회 반복)의 부트스트랩 값 및 AAV vp1 아미노산 서열의 정렬에 기반한 0.05 이하의 포아송(Poisson) 교정 거리 측정치에 의해 이웃-결합 알고리즘(Neighbor-Joining algorithm)을 사용하여 결정된 바와 같이 서로 계통발생학적으로 관련된 AAV의 군이다.

[0140] 이웃-결합 알고리즘은 문헌에 광범위하게 기재되어 있다(예를 들어, 문헌[M. Nei and S. Kumar, Molecular Evolution and Phylogenetics (Oxford University Press, New York (2000)] 참조). 이 알고리즘을 구현하는 데 사용할 수 있는 컴퓨터 프로그램이 있다. 예를 들어, MEGA v2.1 프로그램은 수정된 네이-고조보리(Nei-Gojobori) 방법을 구현한다. 이들 기법 및 컴퓨터 프로그램, 및 AAV vp1 캡시드 단백질의 서열을 사용하여, 당업자는 선택된 AAV가 본원에서 확인된 클레이드 중 하나에 함유되는지, 또 다른 클레이드에 포함되는지 또는 이러한 클레이드 외부에 있는지를 쉽게 결정할 수 있다.

[0141] 본원에 정의된 클레이드는 주로 자연 발생 AAV vp1 캡시드에 기반하지만, 클레이드는 자연 발생 AAV에 제한되지 않는다. 클레이드는 재조합, 변형 또는 변경, 키메라, 하이브리드, 합성, 인공 등의 AAV을 포함하지만 이에 제한되지 않는 비-천연 발생 AAV를 포함할 수 있으며, 클레이드는는 이웃-결합 알고리즘(적어도 75%(적어도 1000회 반복)) 및 AAV vp1 아미노산 서열의 정렬을 기준으로 0.05 이하의 포아송 교정 거리 측정을 사용하여 결정된 바와 같이 계통발생학적으로 관련되어 있다.

[0142] 본원에 기술된 클레이드는 클레이드 A(AAV1 및 AAV6으로 표시), 클레이드 B(AAV2로 표시) 및 클레이드 C(AAV2-AAV3 하이브리드로 표시), 클레이드 D(AAV7로 표시), 클레이드 E(AAV8로 표시) 및 Clade F(인간 AAV9로 표시)를 포함한다.

[0143] 클레이드 B(AAV2) 및 클레이드 C(AAV2-AAV3 하이브리드)는 인간에서 발견되는 것 중 가장 풍부하다(AAV2의 경우 12명의 개체로부터의 22개의 분리체 및 클레이드 C의 경우 8명의 개체로부터의 17개의 분리체).

[0144] 클레이드 A(AAV1 및 AAV6으로 표시)

[0145] AAV 벡터는 AAV1 및 AAV6을 포함하는 클레이드 A의 것들을 포함할 수 있다. 예를 들어, 국제 공개 WO 00/28061(2000년 5월 18일); 문헌[Rutledge et al, J Virol, 72(1):309-319 (January 1998)]을 참조한다. 또한, 이 클레이드는 미국 특허 7,198,951에 AAV를 포함한다.

[0146] 클레이드 B(AAV2 클레이드)

[0147] 하나 이상의 구현예에서, AAV 벡터는 AAV2 및 미국 특허 7,198,951에 기재된 것을 포함하여 클레이드 B의 것들을 포함한다. 일 구현예에서, 이 클레이드의 구성원 중 하나 이상은 AAV2 캡시드의 vp1, vp2 또는 vp3의 전체

길이에 걸쳐 적어도 85% 동일성, 적어도 90% 동일성, 적어도 95% 동일성 또는 적어도 97% 동일성의 아미노산 동일성을 갖는 캡시드를 갖는다.

[0148] 클레이드 C(AAV2-AAV3 하이브리드 클레이드)

[0149] 하나 이상의 구현예에서, AAV 벡터는 이전에 공개된 AAV2 및 AAV3의 하이브리드인 AAV를 포함하는 것을 특징으로 하는 클레이드 C의 것 및 미국 특허 7,198,951에 기재된 것을 포함한다. 한 구현예에서, 이 클레이드의 구성원 중 하나 이상은 hu.4 및/또는 hu.2 캡시드의 vp1, vp2 또는 vp3의 전체 길이에 걸쳐 적어도 85% 동일성, 적어도 90% 동일성, 적어도 95% 동일성 또는 적어도 97% 동일성의 아미노산 동일성을 갖는 캡시드를 갖는다.

[0150] 클레이드 D(AAV7 클레이드)

[0151] 하나 이상의 구현예에서, AAV 벡터는 미국 특허 7,198,951에 기재된 것인 AAV7을 포함하는 클레이드 D의 것을 포함한다. 한 구현예에서, 이 클레이드의 구성원 중 하나 이상은 AAV7 캡시드의 vp1, vp2 또는 vp3의 전체 길이에 걸쳐 적어도 85% 동일성, 적어도 90% 동일성, 적어도 95% 동일성 또는 적어도 97% 동일성의 아미노산 동일성을 갖는 캡시드를 갖는다.

[0152] 클레이드 E(AAV8 클레이드)

[0153] 하나 이상의 구현예에서, AAV 벡터는 AAV8 및 미국 특허 7,198,951에 기재된 것을 포함하는 클레이드 E의 것을 포함한다. 한 구현예에서, 이 클레이드의 구성원 중 하나 이상은 AAV8 캡시드의 vp1, vp2 또는 vp3의 전체 길이에 걸쳐 적어도 85% 동일성, 적어도 90% 동일성, 적어도 95% 동일성 또는 적어도 97% 동일성의 아미노산 동일성을 갖는 캡시드를 갖는다. 하나 이상의 구현예에서, AAV 벡터는 미국 공개 특허 출원 US 2003/0138772 A1(2003년 7월 24일)에 기재된 클레이드 E의 것을 포함한다.

[0154] 클레이드 F (AAV 9 클레이드)

[0155] 하나 이상의 구현예에서, AAV 벡터는 AAV9 및 미국 특허 7,198,951에 기재된 것을 포함하는 클레이드 F의 것을 포함한다. 한 구현예에서, 이 클레이드의 구성원 중 하나 이상은 AAV9 캡시드의 vp1, vp2 또는 vp3의 전체 길이에 걸쳐 적어도 85% 동일성, 적어도 90% 동일성, 적어도 95% 동일성 또는 적어도 97% 동일성의 아미노산 동일성을 갖는 캡시드를 갖는다.

[0156] AAV 클레이드는 바이러스 벡터를 생성하고 표적 분자를 생성하기 위한 관련 AAV의 준비된 컬렉션을 제공하는 것을 포함하여 다양한 목적에 유용하다. 이들 클레이드는 또한 당업자에게 쉽게 자명할 다양한 목적을 위한 도구로서 사용될 수 있다.

[0157] **전이유전자**

[0158] 전이유전자는 관심 폴리펩티드, 단백질 또는 기타 생성물을 인코딩하는 전이유전자를 측접하는 벡터 서열에 대해 이종인 핵산 서열이다. 핵산 코딩 서열은 숙주 세포에서의 전이유전자 전사, 번역 및/또는 발현을 허용하는 방식으로 조절 성분에 작동가능하게 연결될 수 있다.

[0159] 전이유전자은 정상 유전자가 정상 수준 미만으로 발현되는 결함 또는 기능적 유전자 생성물이 발현되지 않는 결함을 포함할 수 있는 유전자 결함을 수정하거나 개선하기 위해 사용될 수 있다. 대안적으로, 전이유전자는 세포 유형 또는 숙주에서 선천적으로 발현되지 않는 생성물을 세포에 제공할 수 있다. 바람직한 유형의 전이유전자 서열은 숙주 세포에서 발현되는 치료 단백질 또는 폴리펩티드를 인코딩한다. 하나 이상의 구현예에서, 다수의 전이유전자가 사용된다. 특정 상황에서, 단백질의 각 서브유닛을 인코딩하거나 상이한 펩티드 또는 단백질을 인코딩하기 위해 상이한 전이유전자가 사용될 수 있다. 이는 면역글로불린, 혈소판-유래 성장 인자 또는 디스트로핀 단백질과 같이 단백질 서브유닛을 인코딩하는 DNA의 크기가 클 때 바람직하다. 세포가 다중 서브유닛 단백질을 생산하기 위해서는, 각각의 상이한 서브유닛을 함유하는 재조합 바이러스로 세포를 감염시킨다. 대안적으로, 단백질의 상이한 서브유닛은 동일한 전이유전자에 의해 인코딩될 수 있다. 이 경우, 단일 전이유전자는 내부 라이보자임 진입 부위(IRES)에 의해 분리된 각 서브유닛에 대한 DNA와 함께 각 서브유닛을 인코딩하는 DNA를 포함한다. 이는 각각의 서브유닛을 인코딩하는 DNA의 크기가 작을 때, 예를 들어 서브유닛을 인코딩하는 DNA와 IRES의 총 크기가 5 킬로베이스 미만일 때 바람직하다. IRES에 대한 대안으로서, DNA는 2A 펩티드를 인코딩하는 서열에 의해 분리될 수 있으며, 이는 번역 후 이벤트에서 자가 절단된다. 예를 들어, 문헌[M. L. Donnelly, et al, J. Gen. Virol., 78(Pt 1):13-21 (January 1997); Furler, S., et al, Gene Ther., 8(11):864-873 (June 2001); Klump H., et al., Gene Ther., 8(10):811-817 (May 2001)]을 참조한다. 이 2A 펩티드는 IRES보다 훨씬 작기 때문에 공간이 제한 요인일 때 사용하기에 매우 적합하다. 더 자주, 전이유전자가 크거나 다중-서브유닛으

로 구성되거나 두 개의 전이유전자가 함께 전달되는 경우이다. 일부 구현예에서, 원하는 전이유전자(들) 또는 서브유닛을 운반하는 rAAV는 이들이 단일 벡터 게놈을 형성하기 위해 생체 내에서 연쇄체화(concatamerize)되도록 공동 투여될 수 있다. 이러한 구현예에서, 제1 AAV는 단일 전이유전자를 발현하는 발현 카세트를 운반할 수 있고, 제2 AAV는 숙주 세포에서 공동-발현을 위해 상이한 전이유전자를 발현하는 발현 카세트를 운반할 수 있다. 그러나, 선택된 전이유전자은 임의의 생물학적 활성 생성물 또는 다른 생성물, 예를 들어 연구에 바람직한 생성물을 인코딩할 수 있다.

[0160] **치료적 전이유전자**

[0161] 전이유전자에 의해 코딩되는 유용한 치료 생성물은 인슐린, 글루카곤, 성장 호르몬(GH), 부갑상선 호르몬(PTH), 성장 호르몬 방출 인자(GRF), 여포 자극 호르몬(FSH), 황체형성 호르몬(LH), 인간 융모막 성선자극 호르몬(hCG), 혈관 내피 성장 인자(VEGF), 안지오포이에틴, 안지오스타틴, 과립구 집락 자극 인자(GCSF), 에리스로포이에틴(EPO), 결합 조직 성장 인자(CTGF), 염기성 섬유아세포 성장 인자(bFGF), 산성 섬유아세포 성장 인자(aFGF), 표피 성장 인자(EGF), 혈소판-유래 성장 인자(PDGF), 인슐린 성장 인자 I 및 II(IGF-I 및 IGF-II), TGFα, 액티빈, 인히빈 또는 뼈 형태형성 단백질(BMP)인 BMP 1 내지 15 중 임의의 것을 포함하는 형질전환 성장 인자 슈퍼패밀리 중 임의의 하나, 성장 인자의 헤레글루인/뉴레뮬린/ARIA/neu 분화 인자(NDF) 계열 중 임의의 하나, 신경 성장 인자(NGF), 뇌-유래 뉴로트로핀 인자(BDNF), 뉴로트로핀 NT-3 및 NT-4/5, 섬모 뉴로트로핀 인자(CNTF), 신경아교세포주 유래 뉴로트로핀 인자(GDNF), 뉴투린, 아그린, 세마포린/콜랩신 계열 중 임의의 하나, 네트린-1 및 네트린-2, 간세포 성장 인자(HGF), 에프린, 노긴, 소닉 헤지호그 및 티로신 수산화효소를 제한 없이 포함하는 호르몬 및/또는 성장 및/또는 분화 인자를 포함한다.

[0162] 다른 유용한 전이유전자 생성물은 사이토카인 및 림포카인, 예를 들어 트롬보포이에틴(TPO), 인터루킨(IL) IL-1 내지 IL-25(예를 들어, IL-2, IL -4, IL-12 및 IL-18을 포함함), 단핵구 화학유인 단백질, 백혈병 억제 인자, 과립구-대식세포 집락 자극 인자, Fas 리간드, 종양 괴사 인자 α 및 β, 인터페론 α, β 및 γ, 줄기 세포 인자, flk -2/flt3 리간드를 제한 없이 포함하는 면역계를 조절하는 단백질을 포함한다. 면역계에 의해 생성된 유전자 생성물도 또한 본 발명에 유용하다. 상기 유전자 생성물은 면역글로불린 IgG, IgM, IgA, IgD 및 IgE, 키메라 면역글로불린, 인간화 항체, 단일 사슬 항체, T 세포 수용체, 키메라 T 세포 수용체, 단일 사슬 T 세포 수용체, 클래스 I 및 클래스 II MHC 분자, 뿐만 아니라 조작된 면역글로불린 및 MHC 분자를 제한 없이 포함한다. 유용한 유전자 생성물은 또한 보체 조절 단백질, 막 보조인자 단백질(MCP), 붕괴 촉진 인자(DAF), CR1, CF2 및 CD59와 같은 보체 조절 단백질을 포함한다.

[0163] 또 다른 유용한 유전자 생성물은 호르몬, 성장 인자, 사이토카인, 림포카인, 조절 단백질 및 면역계 단백질에 대한 수용체 중 어느 하나를 포함한다. 본 발명은 저밀도 지단백질(LDL) 수용체, 고밀도 지단백질(HDL) 수용체, 초저밀도 지단백질(VLDL) 수용체 및 스캐빈저 수용체를 포함하는 콜레스테롤 조절 및/또는 지질 조정을 위한 수용체를 포함한다. 본 발명은 또한 글루코코르티코이드 수용체 및 에스트로겐 수용체, 비타민 D 수용체 및 기타 핵 수용체를 포함하는 스테로이드 호르몬 수용체 슈퍼패밀리의 구성원과 같은 유전자 생성물을 포함한다. 또한 유용한 유전자 생성물은 jun, fos, max, mad, 혈청 반응 인자(SRF), AP-1, AP2, myb, MyoD 및 미오게닌, ETS-박스 함유 단백질, TFE3, E2F, ATF1, ATF2, ATF3, ATF4, ZF5, NFAT, CREB, HNF-4, C/EBP, SP1, CCAAT-박스 결합 단백질, 인터페론 조절 인자(IRF-1), 빌름스 종양 단백질, ETS-결합 단백질, STAT, GATA-박스 결합 단백질, 예를 들어 GATA-3 및 익상 나선 단백질의 포크헤드 계열과 같은 전사 인자를 포함한다.

[0164] 다른 유용한 유전자 생성물은 카바모일 합성효소 I, 오르니틴 트랜스카바밀라제, 아르기노숙시네이트 합성효소, 아르기노숙시네이트 분해효소, 아르기나제, 푸마릴아세트아세테이트 가수분해효소, 페닐알라닌 수산화효소, 알파-1 항트립신, 글루코스-6-포스파타제, 포르포빌리노겐 데아미나제, 시스타티온 베타-합성효소, 분지쇄 케토산 데카복실라제, 알부민, 이소발레릴-coA 탈수소효소, 프로피오닐 CoA 카복실라제, 메틸 말로닐 CoA 뮤타제, 글루타릴 CoA 탈수소효소, 인슐린, 베타-글루코시다제, 피루베이트 카복실레이트, 간 포스포릴라제, 포스포릴라제 키나제, 글리신 데카복실라제, H-단백질, T-단백질, 낭포성 섬유증 막관통 조절인자(CFTR) 서열, 및 디스트로핀 유전자 생성물을 포함한다. 또 다른 유용한 유전자 생성물은 효소 대체 요법에 유용할 수 있는 것과 같은 효소를 포함하며, 이는 효소의 결핍 활성으로 인한 다양한 병태에서 유용하다. 예를 들어, 만노스-6-포스페이트를 함유하는 효소는 리소좀 저장 질병에 대한 요법에 이용될 수 있다(예를 들어, 적합한 유전자는 β-글루쿠로니다제(GUSB)를 인코딩하는 것을 포함함).

[0165] 또 다른 유용한 유전자 생성물은 혈우병 B(인자 IX를 포함함) 및 혈우병 A(인자 VIII 및 이종이량체의 경쇄 및 중쇄, 및 B-결실된 도메인와 같은 이의 변이체를 포함함; 미국 특허 6,200,560 및 미국 특허. 6,221,349)를 포

함하는 혈우병 치료에 사용되는 것을 포함한다. 인자 VIII 유전자는 2351개의 아미노산을 코딩하고 단백질은 아미노에서 말단 카복시 말단까지 A1-A2-B-A3-C1-C2로 지정된 6개의 도메인을 갖는다(Wood et al, Nature, 312:330 (1984); Vehar et al., Nature 312:337 (1984); 및 Toole et al, Nature, 342:337 (1984)). 인간 인자 VIII은 세포 내에서 처리되어 A1, A2 및 B 도메인을 포함하는 중쇄와 A3, C1 및 C2 도메인을 포함하는 경쇄를 주로 포함하는 이종이량체를 산출한다. 단일 사슬 폴리펩티드 및 이종이량체는 둘 다 A2 및 B 도메인 사이의 트롬빈 절단에 의해 활성화될 때까지 비활성 전구체로서 혈장에서 순환하며, 이는 B 도메인을 방출하고 A1과 A2 도메인으로 구성된 중쇄를 생성한다. B 도메인은 단백질의 활성화된 응고촉진제 형태에서 결실된다. 또한 천연 단백질에서 B 도메인에 측접하는 두 개의 폴리펩티드 사슬("a" 및 "b")은 2가 칼슘 양이온에 결합된다.

[0166] 일부 구현예에서, 미니유전자는 인간 성장 호르몬(hGH) 폴리아데닐화 서열뿐만 아니라 10개의 아미노산 신호 서열을 인코딩하는 인자 VIII 중쇄의 처음 57개 염기쌍을 포함한다. 대안적인 구현예에서, 미니유전자는 A1 및 A2 도메인, B 도메인의 N-말단으로부터의 5개 아미노산 및/또는 B 도메인의 C-말단의 85개 아미노산 뿐만 아니라 A3, C1 및 C2 도메인을 추가로 포함할 수 있다. 또 다른 구현예에서, 인자 VIII 중쇄 및 경쇄를 인코딩하는 핵산은 B 도메인의 14개 아미노산을 코딩하는 42개의 핵산에 의해 분리된 단일 미니유전자로 제공된다(미국 특허 6,200,560).

[0167] 본원에서 사용되는 바와 같이, AAV 벡터의 치료적 유효량은 대상체의 혈액이 응고되는 데 걸리는 시간을 감소시키기에 충분한 양의 인자 VIII를 생성하는 AAV 벡터의 양이다. 일반적으로, 인자 VIII의 정상 수준의 1% 미만을 갖는 중증 혈우병 환자는 비혈우병 대상체의 약 10분과 비교하여 60분 초과의 전혈 응고 시간을 갖는다.

[0168] 본 발명은 임의의 특정 인자 VIII 서열에 제한되지 않는다. 인자 VIII의 많은 천연 및 재조합 형태가 분리 및 생성되었다. 인자 VII의 자연 발생 및 재조합 형태의 예는 미국 특허 5,563,045, 미국 특허 5,451,521, 미국 특허 5,422,260, 미국 특허 5,004,803, 미국 특허 4,757,006, 미국 특허 5,661,008, 미국 특허 5,789,203, 미국 특허 5,681,746, 미국 특허 5,595,886, 미국 특허 5,045,455, 미국 특허 5,668,108, 미국 특허 5,633,150, 미국 특허 5,693,499, 미국 특허 5,587,310, 미국 특허 5,171,844, 미국 특허 5,149,637, 미국 특허 5,112,950, 미국 특허 4,886,876; 국제 특허 공개 WO 94/11503, WO 87/07144, WO 92/16557, WO 91/09122, WO 97/03195, WO 96/21035, 및 WO 91/07490; 유럽 특허 출원 EP 0 672 138, EP 0 270 618, EP 0 182 448, EP 0 162 067, EP 0 786 474, EP 0 533 862, EP 0 506 757, EP 0 874 057, EP 0 795 021, EP 0 670 332, EP 0 500 734, EP 0 232 112, 및 EP 0 160 457; 문헌[Sanberg et al., XXth Int. Congress of the World Fed. Of Hemophilia (1992), 및 Lind et al., Eur. J Biochem., 232:19 (1995)]을 포함하여, 특허 및 과학 문헌에서 찾을 수 있다.

[0169] 상기 기재된 인자 VIII을 코딩하는 핵산 서열은 재조합 방법을 사용하거나 이를 포함하는 것으로 알려진 벡터로부터 서열을 유도함으로써 수득될 수 있다. 또한, 원하는 서열은 폐놀 추출 및 cDNA 또는 게놈 DNA의 PCR과 같은 표준 기법을 사용하여 이를 포함하는 세포 및 조직으로부터 직접 분리될 수 있다(예를 들어, 문헌[Sambrook et al] 참조). 뉴클레오티드 서열은 또한 클로닝이 아닌 합성으로 생성될 수 있다. 완전한 서열은 표준 방법에 의해 제조된 중첩 올리고뉴클레오티드로부터 조립될 수 있고 완전한 코딩 서열로 조립될 수 있다(예를 들어, 문헌[Edge, Nature 292:757 (1981); Nambari et al, Science, 223:1299 (1984); 및 Jay et al, J. Biol. Chem. 259:6311 (1984)] 참조).

[0170] 또한, 본 발명은 인간 인자 VIII에 제한되지 않는다. 실제로, 본 발명은 반려 동물(예를 들어, 개, 고양이 및 말), 가축(예를 들어, 소, 염소 및 양), 실험실 동물, 해양 포유류, 대형 고양이 등을 포함하지만 이로 제한되지 않는 인간 이외의 동물로부터의 인자 VIII를 포함하고자 한다.

[0171] AAV 벡터는 그 자체로 생물학적 활성이 아니지만 대상체에 투여될 때 혈액 응고 시간을 개선하거나 회복시키는 인자 VIII의 단편을 코딩하는 핵산을 함유할 수 있다. 예를 들어, 위에서 논의한 바와 같이, 인자 VIII 단백질은 2개의 폴리펩티드 사슬, 즉 처리 동안 절단되는 B-도메인에 의해 분리된 중쇄 및 경쇄를 포함한다. 본 발명에 의해 입증된 바와 같이, 인자 VIII 중쇄 및 경쇄를 갖는 수용자 세포를 공동-형질도입하는 것은 생물학적 활성 인자 VIII의 발현을 유도한다. 대부분의 혈우병 환자는 사슬 중 하나(예를 들어, 중쇄 또는 경쇄)에만 돌연변이 또는 결실이 있기 때문에, 다른 사슬을 공급하기 위해 환자에게 결함이 있는 사슬만 투여하는 것이 가능할 수 있다.

[0172] 다른 유용한 유전자 생성물은 삽입, 결실 또는 아미노산 치환을 함유하는 비-천연 발생 아미노산 서열을 갖는 키메라 또는 하이브리드 폴리펩티드와 같은 비-천연 발생 폴리펩티드를 포함한다. 예를 들어, 단일 사슬 조작 면역글로불린은 특정 면역저하 환자에게 유용할 수 있다. 다른 유형의 비-천연 발생 유전자 서열은 안티센스 분자 및 표적의 과발현을 감소시키는 데 사용될 수 있는 리보자임과 같은 촉매 핵산을 포함한다.

[0173] 유전자 발현의 감소 및/또는 조절은 암 및 건선과 같이 과증식 세포를 특징으로 하는 과증식 병태의 치료에 특히 바람직하다. 표적 폴리펩티드는 정상 세포와 비교하여 과증식성 세포에서 배타적으로 또는 더 높은 수준으로 생산되는 폴리펩티드를 포함한다. 표적 항원은 myb, myc, fyn과 같은 종양유전자 및 전좌 유전자 bcr/abl, ras, src, P53, neu, trk 및 EGRF에 의해 인코딩되는 폴리펩티드를 포함한다. 표적 항원으로서 종양유전자 생성물 이외에, 항암 치료 및 보호 요법을 위한 표적 폴리펩티드는 B 세포 림프종에 의해 생성된 항체의 가변 영역 및 T 세포 림프종의 T 세포 수용체의 가변 영역을 포함하며, 이는 일부 구현예에서 자가면역 질병에 대한 표적 항원으로 사용된다. 모노클로날 항체 17-1A에 의해 인식되는 폴리펩티드 및 엽산 결합 폴리펩티드를 포함하는 종양 세포에서 더 높은 수준으로 발견되는 폴리펩티드와 같은 다른 종양-연관 폴리펩티드가 표적 폴리펩티드로 사용될 수 있다.

[0174] 다른 적합한 치료용 폴리펩티드 및 단백질은 세포 수용체 및 "자기"-지시 항체를 생성하는 세포를 포함하는 자가면역과 연관된 표적에 대해 광범위한 보호 면역 반응을 부여함으로써 자가면역 질병 및 장애를 앓고 있는 개체를 치료하는 데 유용할 수 있는 것들을 포함한다. T 세포 매개 자가면역 질병은 류마티스성 관절염(RA), 다발성 경화증(MS), 쇼그렌 증후군, 유육종증, 인슐린 의존성 진성 당뇨병(IDDM), 자가면역 갑상선염, 반응성 관절염, 강직성 척추염, 경피증, 다발성근염, 피부근염, 건선, 혈관염, 베게너 육아종증, 크론병 및 궤양성 대장염을 포함한다. 이들 각각의 질병은 내인성 항원에 결합하고 자가면역 질병과 연관된 염증 캐스케이드를 개시하는 T 세포 수용체(TCR)를 특징으로 한다.

[0175] **엑소좀 및 소포 표적 단백질**

[0176] 소포는 엑소솜과 세포외 소포로 구성된다. 엑소좀은 30 내지 130 nm의 작은 막-결합 소포로, 세포질에서 세포내 다중-소포체(MVB)로 또는 원형질막에서 세포외 공간으로 직접 발아한다. MVB는 세포내이입 경로의 일부이며 원형질막과 융합된 후 엑소좀 화물을 세포외 공간으로 방출할 수 있다.

[0177] 다수의 단백질이 엑소좀과 연관되는 것으로 알려져 있으며; 즉, 이들은 엑소좀이 형성될 때 엑소좀에 통합된다. 본 발명에 따라 사용하기에 바람직한 단백질은 막관통 단백질 또는 막 연관 단백질인 것들이다. 예에는 Lamp-1, Lamp-2, CD13, CD86, 플로틸린, 신탁신-3, CD2, CD36, CD40, CD40L, CD41a, CD44, CD45, ICAM-1, 인테그린 알파4, LiCAM, LFA-1, Mac-1 알파 및 베타, Vti-1A 및 B, CD3 입실론 및 제타, CD9, CD18, CD37, CD53, CD63, CD81, CD82, CXCR4, FcR, GluR2/3, HLA-DM(MHC II), 면역글로불린, MHC-I 또는 MHC-II 성분, TCR 베타 및 테트라스파닌을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 특히 바람직한 구현예에서, 막관통 단백질은 Lamp-1, Lamp-2, CD13, CD86, 플로틸린, 신탁신-3으로부터 선택된다.

[0178] **Nef 단백질 및 변이체**

[0179] Nef는 HIV 및 SIV와 같은 영장류 렌티바이러스에 의해 발현되는 단백질이다. Nef는 엑소좀과 연관하여 분비되는 것으로 알려져 있으며 HIV-감염 세포의 표면에도 존재하는 것으로 나타났다.

[0180] Nef 단백질은 전이유전자에 융합될 수 있다. 일부 구현예에서, Nef 단백질은 이의 단편이며, 이는 아미노산 1 내지 70, 1 내지 75, 1 내지 80, 1 내지 85, 1 내지 90, 1 내지 95, 1 내지 100, 1 내지 105, 1 내지 110, 1 내지 115, 1 내지 120, 1 내지 125, 1 내지 130, 1 내지 135, 1 내지 140, 1 내지 145, 1 내지 150, 1 내지 155, 1 내지 160, 1 내지 165, 1 내지 170, 1 내지 175, 1 내지 180, 1 내지 185, 1 내지 190, 1 내지 195, 1 내지 200, 또는 1 내지 205의 단편일 수 있다. 바람직하게는 단편은 1 내지 70 aa이다. Nef 단백질은 G3C, V153L, E177G 또는 이들의 조합을 포함하는 돌연변이 버전일 수 있으며, 바람직하게는 Nef^{mut}로 지칭되는 3개의 점 돌연변이를 모두 포함한다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 Nef 단백질 또는 이의 변이체를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0181] **막 연관-ED 단백질 및 변이체**

[0182] 본 개시내용의 한 양태는 막 연관-ED 단백질 및 이의 변이체를 기재한다. 일부 구현예에서, 막 연관-ED 단백질은 신호 도메인, 곡률 감지 도메인 및 이펙터 도메인(ED 도메인) 중 하나 이상을 포함한다.

[0183] MARCKS(미리스토일화된 알라닌-풍부 C 키나제 기질) 단백질 계열은 엑소좀과 연관되는 것으로 알려져 있다. 따라서, 일부 구현예에서, MARCKS 단백질은 신호 도메인, 곡률 감지 도메인 및 이펙터 도메인(ED 도메인) 중 하나 이상을 포함하고, 여기서 신호 도메인은 미리스토일화 신호 도메인을 포함한다.

[0184] MARCKS-유사 단백질 1 또는 MARCKSL1(미리스토일화 알라닌-풍부 C 키나제 기질) 단백질 계열은 대식세포와 연관되는 것으로 알려져 있다. MARCKS 단백질과 유사하게, 일부 구현예에서 MARCKSL1은 또한 신호 도메인, 곡률 감

지 도메인 및 이펙터 도메인(ED 도메인) 중 하나 이상을 포함하며, 여기서 신호 도메인은 미리스토일화 신호 도메인을 포함한다.

[0185] 단백질의 BASP1 계열은 또한 엑소좀과 연관되는 것으로 알려져 있다. BASP1 단백질은 주로 뉴런 조직에서 발견된다. MARCKS 단백질과 유사하게, 일부 구현예에서 BASP1 단백질은 또한 신호 도메인, 곡률 감지 도메인 및 이펙터 도메인(ED 도메인) 중 하나 이상을 포함하며, 여기서 신호 도메인은 미리스토일화 신호 도메인을 포함한다.

[0186] 하나 이상의 구현예는 막 연관-ED 단백질을 포함하며, 여기서 막 연관-ED 단백질은 신호 도메인 및 ED 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 신호 도메인은 막 연관-ED 단백질의 N-말단에 있다. 일부 구현예에서, 신호 도메인은 ED 도메인에 직접 연결된다. 일부 구현예에서, 신호 도메인은 제1 링커 펩티드에 의해 ED 도메인에 연결된다. 제1 링커 펩티드는 서열번호 143, 서열번호 144, 서열번호 145, 서열번호 146, 서열번호 147, 서열번호 148, 서열번호 149, 서열번호 150, 서열번호 151, 서열번호 152 또는 서열번호 153에 따른 아미노 서열을 갖는다.

[0187] 본 개시내용은 MARCKS, MARCKSL1 및 BASP1 단백질의 변이체를 제공한다. 따라서, 하나 이상의 구현예에서, 막 연관-ED 단백질은 MyrED 단백질을 포함하고, 여기서 MyrED 단백질은 미리스토일화 신호 도메인 및 ED 도메인을 포함한다.

[0188] 일부 구현예에서, 막 연관-ED 단백질은 BiPED 단백질을 포함하고, BiPED 단백질은 BiP 분비 신호 도메인 및 ED 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, BiP 분비 신호 도메인은 서열번호 155, 서열번호 156, 서열번호 157, 서열번호 158, 서열번호 159 또는 서열번호 165와 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90% 또는 적어도 95%의 아미노산 서열 유사성을 포함한다.

[0189] 신호 도메인은 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 10, 서열번호 11, 서열번호 12, 서열번호 155, 서열번호 156, 서열번호 157, 서열번호 158, 서열번호 159 또는 서열번호 165의 아미노산 서열 중 어느 하나와 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90% 또는 적어도 95%의 서열 유사성을 포함한다. 본 개시내용은 또한 생성된 폴리펩티드가 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 10, 서열번호 11, 서열번호 12, 서열번호 155, 서열번호 156, 서열번호 157, 서열번호 158, 서열번호 159 또는 서열번호 165와 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90% 또는 적어도 95%의 서열 유사성을 갖도록 하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 대안적으로, 신호 도메인은 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 10, 서열번호 11, 서열번호 12, 서열번호 155, 서열번호 156, 서열번호 157, 서열번호 158, 서열번호 159 또는 서열번호 165의 아미노산 서열 중 어느 하나를 포함할 수 있다. 본 개시내용은 또한 생성된 폴리펩티드 서열이 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 10, 서열번호 11, 서열번호 12, 서열번호 155, 서열번호 156, 서열번호 157, 서열번호 158, 서열번호 159 또는 서열번호 165 중 어느 하나가 되도록 하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 일부 구현예에서, 신호 도메인은 미리스토일화 신호 도메인을 포함한다.

[0190] 일부 구현예에서, 신호 도메인은 천연 글리코실화된 단백질 리더 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 천연 글리코실화된 단백질 리더 서열은 네프릴리신, 바순, 인간 B형 간염 바이러스 preS, 오리 B형 간염 바이러스 preS, 라사 엔벨로프, 마추포 엔벨로프 또는 이들의 조합으로부터 유래된다.

[0191] 파네실화는 미리스토일화와 유사한 막 결합 강도를 갖는 C-말단 지질화의 한 유형이다. Marcks ED 도메인을 연상시키는 파네실화 시스테인 근처에 라이신이 풍부한 영역이 있는 KRAS4b의 1차 서열은 MARCKS 단백질과 유사한 방식으로 기능한다. KRAS4b는 칼슘 의존적 방식으로 칼모듈린과 상호작용하여 칼모듈린이 막에 결합하는 것을 차단한다. 따라서, 일부 구현예에서, 신호 도메인은 KRAS4b 또는 이의 변이체를 포함한다. 일부 구현예에서, KRAS4b 또는 이의 변이체는 KRAS4b와 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90% 또는 적어도 95%의 서열 유사성의 서열을 포함한다. 하나 이상의 구현예에서, KRAS4b 서열은 CVIM(서열번호 165)을 포함한다. KRAS4b와 Marcks의 최소화된-ED 도메인을 병합하는 일련의 서열(MYRED88-93)을 제조하고 테스트했다(서열번호 118 내지 123 및 140 내지 142).

[0192] 글리피화(Glypiation)는 강력한 막 앵커인 글리코실포스파티딜이노시톨(GPI)을 단백질에 첨가하는 것이다. 따라

서, 일부 구현예에서, 신호 도메인은 GPI 앵커링 신호 펩티드를 포함한다. 일부 구현예에서, GPI 앵커링 신호 펩티드는 COBL9_ARATH로부터의 GPI 앵커링 신호를 포함한다. COBL9_ARATH는 애기장대(Aradopsis thaliana)로부터의 COBRA-유사 단백질 9이며 미세섬유 및 셀룰로오스 결정화도의 배향에 역할을 하는 것으로 나타났다.

[0193] ED 도메인은 서열번호 13, 서열번호 14, 서열번호 15, 서열번호 16, 서열번호 17, 서열번호 18, 서열번호 19, 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 22, 서열번호 23, 서열번호 24, 서열번호 25, 서열번호 26, 서열번호 27, 서열번호 28, 서열번호 29, 또는 서열번호 30과 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90% 또는 적어도 95%의 서열 유사성을 포함할 수 있다. 본 개시내용은 또한 생성된 폴리펩티드가 서열번호 13, 서열번호 14, 서열번호 15, 서열번호 16, 서열번호 17, 서열번호 18, 서열번호 19, 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 22, 서열번호 23, 서열번호 24, 서열번호 25, 서열번호 26, 서열번호 27, 서열번호 28, 서열번호 29, 또는 서열번호 30과 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90% 또는 적어도 95%의 서열 유사성을 갖도록 하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

[0194] 대안적으로, ED 도메인은 서열번호 13, 서열번호 14, 서열번호 15, 서열번호 16, 서열번호 17, 서열번호 18, 서열번호 19, 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 22, 서열번호 23, 서열번호 24, 서열번호 25, 서열번호 26, 서열번호 27, 서열번호 28, 서열번호 29, 또는 서열번호 30의 아미노산 서열 중 어느 하나를 포함한다. 본 개시내용은 또한 생성된 폴리펩티드 서열이 서열번호 13, 서열번호 14, 서열번호 15, 서열번호 16, 서열번호 17, 서열번호 18, 서열번호 19, 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 22, 서열번호 23, 서열번호 24, 서열번호 25, 서열번호 26, 서열번호 27, 서열번호 28, 서열번호 29, 또는 서열번호 30 중 어느 하나가 되도록 하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

[0195] 막 연관-ED 단백질은 서열번호 31, 서열번호 32, 서열번호 33, 서열번호 34, 서열번호 35, 서열번호 36, 서열번호 37, 서열번호 38, 서열번호 39, 서열번호 40, 서열번호 41, 서열번호 42, 서열번호 43, 서열번호 44, 서열번호 45, 서열번호 46, 서열번호 47, 서열번호 48, 서열번호 49, 서열번호 50, 서열번호 51, 서열번호 52, 서열번호 53, 서열번호 54, 서열번호 55, 서열번호 56, 서열번호 57, 서열번호 58, 서열번호 59, 서열번호 60, 서열번호 61, 서열번호 62, 서열번호 63, 서열번호 64, 서열번호 65, 서열번호 66, 서열번호 67, 서열번호 68, 서열번호 69, 서열번호 70, 서열번호 71, 서열번호 72, 서열번호 73, 서열번호 74, 서열번호 75, 서열번호 76, 서열번호 77, 서열번호 78, 서열번호 79, 서열번호 80, 서열번호 81, 서열번호 82, 서열번호 83, 서열번호 84, 서열번호 85, 서열번호 86, 서열번호 87, 서열번호 88, 서열번호 89, 서열번호 90, 서열번호 91, 서열번호 92, 서열번호 93, 서열번호 94, 서열번호 95, 서열번호 96, 서열번호 97, 서열번호 98, 서열번호 99, 서열번호 100, 서열번호 101, 서열번호 102, 서열번호 103, 서열번호 104, 서열번호 105, 서열번호 106, 서열번호 107, 서열번호 108, 서열번호 109, 서열번호 110, 서열번호 111, 서열번호 112, 서열번호 113, 서열번호 114, 서열번호 115, 서열번호 116, 서열번호 117, 서열번호 118, 서열번호 119, 서열번호 120, 서열번호 121, 서열번호 122, 서열번호 123, 서열번호 124, 서열번호 125, 서열번호 126, 서열번호 127, 서열번호 128, 서열번호 129, 서열번호 130, 서열번호 131, 서열번호 132, 서열번호 133, 서열번호 134, 서열번호 135, 서열번호 136, 서열번호 137, 서열번호 138, 서열번호 139, 서열번호 140, 서열번호 141 또는 서열번호 142와 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90% 또는 적어도 95%의 서열 유사성을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다. 대안적으로,본 개시내용은 서열번호 31, 서열번호 32, 서열번호 33, 서열번호 34, 서열번호 35, 서열번호 36, 서열번호 37, 서열번호 38, 서열번호 39, 서열번호 40, 서열번호 41, 서열번호 42, 서열번호 43, 서열번호 44, 서열번호 45, 서열번호 46, 서열번호 47, 서열번호 48, 서열번호 49, 서열번호 50, 서열번호 51, 서열번호 52, 서열번호 53, 서열번호 54, 서열번호 55, 서열번호 56, 서열번호 57, 서열번호 58, 서열번호 59, 서열번호 60, 서열번호 61, 서열번호 62, 서열번호 63, 서열번호 64, 서열번호 65, 서열번호 66, 서열번호 67, 서열번호 68, 서열번호 69, 서열번호 70, 서열번호 71, 서열번호 72, 서열번호 73, 서열번호 74, 서열번호 75, 서열번호 76, 서열번호 77, 서열번호 78, 서열번호 79, 서열번호 80, 서열번호 81, 서열번호 82, 서열번호 83, 서열번호 84, 서열번호 85, 서열번호 86, 서열번호 87, 서열번호 88, 서열번호 89, 서열번호 90, 서열번호 91, 서열번호 92, 서열번호 93, 서열번호 94, 서열번호 95, 서열번호 96, 서열번호 97, 서열번호 98, 서열번호 99, 서열번호 100, 서열번호 101, 서열번호 102, 서열번호 103, 서열번호 104, 서열번호 105, 서열번호 106, 서열번호 107, 서열번호 108, 서열번호 109, 서열번호 110, 서열번호 111, 서열번호 112, 서열번호 113, 서열번호 114, 서열번호 115, 서열번호 116, 서열번호 117, 서열번호 118, 서열번호 119, 서열번호 120, 서열번호 121, 서열번호 122, 서열번호 123, 서열번호 124, 서열번호 125, 서열번호 126, 서열번호 127, 서열번호 128, 서열번호 129, 서열번호 130, 서열번호 131, 서열번호 132, 서열번호 133, 서열번호 134, 서열번호 135, 서열번호 136, 서열번호 137, 서열번호 138, 서열번호 139, 서열번호 140, 서열번호 141

또는 서열번호 142를 포함하는 막 연관-ED 아미노산 서열을 제공한다. 하나 이상의 구현예에서, 막 연관-ED 단백질의 아미노산 서열은 서열번호 38이 아니다.

[0196] 본 개시내용은 또한 생성된 폴리펩티드가 서열번호 31, 서열번호 32, 서열번호 33, 서열번호 34, 서열번호 35, 서열번호 36, 서열번호 37, 서열번호 38, 서열번호 39, 서열번호 40, 서열번호 41, 서열번호 42, 서열번호 43, 서열번호 44, 서열번호 45, 서열번호 46, 서열번호 47, 서열번호 48, 서열번호 49, 서열번호 50, 서열번호 51, 서열번호 52, 서열번호 53, 서열번호 54, 서열번호 55, 서열번호 56, 서열번호 57, 서열번호 58, 서열번호 59, 서열번호 60, 서열번호 61, 서열번호 62, 서열번호 63, 서열번호 64, 서열번호 65, 서열번호 66, 서열번호 67, 서열번호 68, 서열번호 69, 서열번호 70, 서열번호 71, 서열번호 72, 서열번호 73, 서열번호 74, 서열번호 75, 서열번호 76, 서열번호 77, 서열번호 78, 서열번호 79, 서열번호 80, 서열번호 81, 서열번호 82, 서열번호 83, 서열번호 84, 서열번호 85, 서열번호 86, 서열번호 87, 서열번호 88, 서열번호 89, 서열번호 90, 서열번호 91, 서열번호 92, 서열번호 93, 서열번호 94, 서열번호 95, 서열번호 96, 서열번호 97, 서열번호 98, 서열번호 99, 서열번호 100, 서열번호 101, 서열번호 102, 서열번호 103, 서열번호 104, 서열번호 105, 서열번호 106, 서열번호 107, 서열번호 108, 서열번호 109, 서열번호 110, 서열번호 111, 서열번호 112, 서열번호 113, 서열번호 114, 서열번호 115, 서열번호 116, 서열번호 117, 서열번호 118, 서열번호 119, 서열번호 120, 서열번호 121, 서열번호 122, 서열번호 123, 서열번호 124, 서열번호 125, 서열번호 126, 서열번호 127, 서열번호 128, 서열번호 129, 서열번호 130, 서열번호 131, 서열번호 132, 서열번호 133, 서열번호 134, 서열번호 135, 서열번호 136, 서열번호 137, 서열번호 138, 서열번호 139, 서열번호 140, 서열번호 141 또는 서열번호 142와 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90% 또는 적어도 95%의 서열 유사성을 갖도록 하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 대안적으로, 본 개시내용은 서열번호 31, 서열번호 32, 서열번호 33, 서열번호 34, 서열번호 35, 서열번호 36, 서열번호 37, 서열번호 38, 서열번호 39, 서열번호 40, 서열번호 41, 서열번호 42, 서열번호 43, 서열번호 44, 서열번호 45, 서열번호 46, 서열번호 47, 서열번호 48, 서열번호 49, 서열번호 50, 서열번호 51, 서열번호 52, 서열번호 53, 서열번호 54, 서열번호 55, 서열번호 56, 서열번호 57, 서열번호 58, 서열번호 59, 서열번호 60, 서열번호 61, 서열번호 62, 서열번호 63, 서열번호 64, 서열번호 65, 서열번호 66, 서열번호 67, 서열번호 68, 서열번호 69, 서열번호 70, 서열번호 71, 서열번호 72, 서열번호 73, 서열번호 74, 서열번호 75, 서열번호 76, 서열번호 77, 서열번호 78, 서열번호 79, 서열번호 80, 서열번호 81, 서열번호 82, 서열번호 83, 서열번호 84, 서열번호 85, 서열번호 86, 서열번호 87, 서열번호 88, 서열번호 89, 서열번호 90, 서열번호 91, 서열번호 92, 서열번호 93, 서열번호 94, 서열번호 95, 서열번호 96, 서열번호 97, 서열번호 98, 서열번호 99, 서열번호 100, 서열번호 101, 서열번호 102, 서열번호 103, 서열번호 104, 서열번호 105, 서열번호 106, 서열번호 107, 서열번호 108, 서열번호 109, 서열번호 110, 서열번호 111, 서열번호 112, 서열번호 113, 서열번호 114, 서열번호 115, 서열번호 116, 서열번호 117, 서열번호 118, 서열번호 119, 서열번호 120, 서열번호 121, 서열번호 122, 서열번호 123, 서열번호 124, 서열번호 125, 서열번호 126, 서열번호 127, 서열번호 128, 서열번호 129, 서열번호 130, 서열번호 131, 서열번호 132, 서열번호 133, 서열번호 134, 서열번호 135, 서열번호 136, 서열번호 137, 서열번호 138, 서열번호 139, 서열번호 140, 서열번호 141 또는 서열번호 142를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 하나 이상의 구현예에서, 뉴클레오티드 서열은 서열번호 38의 막 연관-ED를 인코딩하지 않는다.

[0197] **융합 단백질**

[0198] 본 개시내용의 한 양태는 소포 표적화 단백질 및 관심 단백질을 포함하는 융합 단백질을 포함한다. 하나 이상의 구현예에서, 소포 표적화 단백질은 엑소좀 및 세포외 소포 중 하나 이상을 표적화한다.

[0199] 다양한 구현예에서, 융합 단백질의 소포 표적화 단백질은 지질 접합 도메인 및 이펙터 도메인(ED)을 포함한다. 일부 구현예에서, 지질 접합 도메인은 이펙터 도메인(ED)에 직접 연결된다. 일부 구현예에서, 지질 접합 도메인은 제2 링커 펩티드에 의해 이펙터 도메인(ED)에 연결된다. 하나 이상의 구현예에서, 제2 링커 펩티드는 서열번호 143, 서열번호 144, 서열번호 145, 서열번호 146, 서열번호 147, 서열번호 148, 서열번호 149, 서열번호 150, 서열번호 151, 서열번호 152 또는 서열번호 153을 포함하는 아미노산 서열을 갖는다.

[0200] 융합 단백질의 하나 이상의 구현예에서, 소포 표적화 단백질은 막 연관-ED 단백질을 포함한다. 일부 구현예에서, 막 연관-ED 단백질은 신호 도메인 및 ED 도메인을 포함한다. 하나 이상의 구현예에서, 관심 단백질은 막 연관-ED 단백질의 C- 또는 N-말단에 존재한다. 하나 이상의 구현예에서, 관심 단백질은 신호 도메인의 C-말단에 있다. 하나 이상의 구현예에서, 관심 단백질은 ED 도메인의 C- 또는 N-말단에 존재한다. 일부 구현예에서, 막 연관-ED 단백질은 MyrED 단백질을 포함한다. 하나 이상의 구현예에서 MyrED 단백질은 미리스토일화 신호

도메인 및 ED 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 막 연관-ED 단백질은 BiPED 단백질을 포함한다. 하나 이상의 구현예에서 BiPED 단백질은 BiP 분비 신호 도메인 및 ED 도메인을 포함한다.

[0201] 융합 단백질의 하나 이상의 구현예에서, 신호 도메인은 지질 접합 도메인, 예를 들어 미리스토일화 신호 도메인, 팔미토일화 신호 도메인, 프레닐화 신호 도메인, 글리코실포스파티딜이노시톨 앵커 단백질 및 BiP 분비 신호 도메인 중 하나 이상을 포함한다. 일부 구현예에서, 지질 접합 도메인은 미리스토일화 신호 도메인이다.

[0202] 융합 단백질의 하나 이상의 구현예에서, 신호 도메인은 MARCKS, MARCKSL1 또는 BASP1 단백질 계열의 미리스토일화 신호 도메인과 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 100% 서열 유사성을 갖는다. 융합 단백질의 하나 이상의 구현예에서, 신호 도메인을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드는 생성된 폴리펩티드가 MARCKS, MARCKSL1 또는 BASP1 계열 단백질의 미리스토일화 신호 도메인에 대해 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 100% 서열 유사성을 갖도록 하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0203] 일부 구현예에서, 신호 도메인은 KRAS4b와 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 100% 서열 유사성을 갖는다. 융합 단백질의 하나 이상의 구현예에서, 신호 도메인을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드는 생성된 폴리펩티드가 KRAS4b와 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 100% 서열 유사성을 갖도록 하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 하나 이상의 구현예에서, 신호 도메인은 서열 CVIM(서열번호 165)을 포함한다.

[0204] 일부 구현예에서, 신호 도메인은 GPI 앵커링 신호 펩티드에 대해 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 100% 서열 유사성을 갖는다. 융합 단백질의 하나 이상의 구현예에서, 신호 도메인을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드는 생성된 폴리펩티드가 GPI 앵커링 신호 펩티드에 대해 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 100% 서열 유사성을 갖도록 하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0205] 융합 단백질의 하나 이상의 구현예에서, 신호 도메인은 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 10, 서열번호 11, 서열번호 12, 서열번호 155, 서열번호 156, 서열번호 157, 서열번호 158, 서열번호 159 또는 서열번호 165의 아미노산 서열 중 어느 하나와 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90% 또는 적어도 95%의 서열 유사성을 포함한다. 융합 단백질의 하나 이상의 구현예에서, 신호 도메인을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드는 생성된 폴리펩티드가 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 10, 서열번호 11, 서열번호 12, 서열번호 155, 서열번호 156, 서열번호 157, 서열번호 158, 서열번호 159 또는 서열번호 165와 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90% 또는 적어도 95%의 서열 유사성을 갖도록 하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0206] 융합 단백질의 하나 이상의 구현예에서, 신호 도메인은 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 10, 서열번호 11, 서열번호 12, 서열번호 155, 서열번호 156, 서열번호 157, 서열번호 158, 서열번호 159 또는 서열번호 165의 아미노산 서열 중 어느 하나를 포함한다. 융합 단백질의 하나 이상의 구현예에서, 신호 도메인을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드는 생성된 폴리펩티드 서열이 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 10, 서열번호 11, 서열번호 12, 서열번호 155, 서열번호 156, 서열번호 157, 서열번호 158, 서열번호 159 또는 서열번호 165 중 어느 하나가 되도록 하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0207] 융합 단백질의 하나 이상의 구현예에서, ED 도메인은 서열번호 13, 서열번호 14, 서열번호 15, 서열번호 16, 서열번호 17, 서열번호 18, 서열번호 19, 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 22, 서열번호 23, 서열번호 24, 서열번호 25, 서열번호 26, 서열번호 27, 서열번호 28, 서열번호 29, 또는 서열번호 30과 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90% 또는 적어도 95%의 서열 유사성을 포함한다. 융합 단백질의 하나 이상의 구현예에서, ED 도메인을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드는 생성된 폴리펩티드가 서열번호 13, 서열번호 14, 서열번호 15, 서열번호 16, 서열번호 17, 서열번호 18, 서열번호 19, 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 22, 서열번호 23, 서열번호 24, 서열번호 25, 서열번호 26, 서열번호 27, 서열번호 28, 서열번호 29, 또는 서열번호 30과 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90% 또는 적어도 95%의 서열 유사성을 갖도록 하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0208] 융합 단백질의 하나 이상의 구현예에서, ED 도메인은 서열번호 13, 서열번호 14, 서열번호 15, 서열번호 16, 서열번호 17, 서열번호 18, 서열번호 19, 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 22, 서열번호 23, 서열번호 24, 서열번호 25, 서열번호 26, 서열번호 27, 서열번호 28, 서열번호 29, 또는 서열번호 30의 아미노산 서열 중 어느 하나를 포함한다. 융합 단백질의 하나 이상의 구현예에서, ED 도메인을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드는 생성된 폴리펩티드 서열이 서열번호 13, 서열번호 14, 서열번호 15, 서열번호 16, 서열번호 17, 서열번호 18, 서열번호 19, 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 22, 서열번호 23, 서열번호 24, 서열번호 25, 서열번호 26, 서열번호 27 , 서열번호 28, 서열번호 29, 또는 서열번호 30 중 어느 하나가 되도록 하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0209] 융합 단백질의 하나 이상의 구현예에서, 막 연관-ED 단백질 아미노산 서열은 서열번호 31, 서열번호 32, 서열번호 33, 서열번호 34, 서열번호 35, 서열번호 36, 서열번호 37, 서열번호 38, 서열번호 39, 서열번호 40, 서열번호 41, 서열번호 42, 서열번호 43, 서열번호 44, 서열번호 45, 서열번호 46, 서열번호 47, 서열번호 48, 서열번호 49, 서열번호 50, 서열번호 51, 서열번호 52, 서열번호 53, 서열번호 54, 서열번호 55, 서열번호 56, 서열번호 57, 서열번호 58, 서열번호 59, 서열번호 60, 서열번호 61, 서열번호 62, 서열번호 63, 서열번호 64, 서열번호 65, 서열번호 66, 서열번호 67, 서열번호 68, 서열번호 69, 서열번호 70, 서열번호 71, 서열번호 72, 서열번호 73, 서열번호 74, 서열번호 75, 서열번호 76, 서열번호 77, 서열번호 78, 서열번호 79, 서열번호 80, 서열번호 81, 서열번호 82, 서열번호 83, 서열번호 84, 서열번호 85, 서열번호 86, 서열번호 87, 서열번호 88, 서열번호 89, 서열번호 90, 서열번호 91, 서열번호 92, 서열번호 93, 서열번호 94, 서열번호 95, 서열번호 96, 서열번호 97, 서열번호 98, 서열번호 99, 서열번호 100, 서열번호 101, 서열번호 102, 서열번호 103, 서열번호 104, 서열번호 105, 서열번호 106, 서열번호 107, 서열번호 108, 서열번호 109, 서열번호 110, 서열번호 111, 서열번호 112, 서열번호 113, 서열번호 114, 서열번호 115, 서열번호 116, 서열번호 117, 서열번호 118, 서열번호 119, 서열번호 120, 서열번호 121, 서열번호 122, 서열번호 123, 서열번호 124, 서열번호 125, 서열번호 126, 서열번호 127, 서열번호 128, 서열번호 129, 서열번호 130, 서열번호 131, 서열번호 132, 서열번호 133, 서열번호 134, 서열번호 135, 서열번호 136, 서열번호 137, 서열번호 138, 서열번호 139, 서열번호 140, 서열번호 141 또는 서열번호 142와 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90% 또는 적어도 95%의 서열 유사성을 포함한다. 융합 단백질의 하나 이상의 구현예에서, 막 연관-ED 단백질을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드는 생성된 폴리펩티드가 서열번호 31, 서열번호 32, 서열번호 33, 서열번호 34, 서열번호 35, 서열번호 36, 서열번호 37, 서열번호 38, 서열번호 39, 서열번호 40, 서열번호 41, 서열번호 42, 서열번호 43, 서열번호 44, 서열번호 45, 서열번호 46, 서열번호 47, 서열번호 48, 서열번호 49, 서열번호 50, 서열번호 51, 서열번호 52, 서열번호 53, 서열번호 54, 서열번호 55, 서열번호 56, 서열번호 57, 서열번호 58, 서열번호 59, 서열번호 60, 서열번호 61, 서열번호 62, 서열번호 63, 서열번호 64, 서열번호 65, 서열번호 66, 서열번호 67, 서열번호 68, 서열번호 69, 서열번호 70, 서열번호 71, 서열번호 72, 서열번호 73, 서열번호 74, 서열번호 75, 서열번호 76, 서열번호 77, 서열번호 78, 서열번호 79, 서열번호 80, 서열번호 81, 서열번호 82, 서열번호 83, 서열번호 84, 서열번호 85, 서열번호 86, 서열번호 87, 서열번호 88, 서열번호 89, 서열번호 90, 서열번호 91, 서열번호 92, 서열번호 93, 서열번호 94, 서열번호 95, 서열번호 96, 서열번호 97, 서열번호 98, 서열번호 99, 서열번호 100, 서열번호 101, 서열번호 102, 서열번호 103, 서열번호 104, 서열번호 105, 서열번호 106, 서열번호 107, 서열번호 108, 서열번호 109, 서열번호 110, 서열번호 111, 서열번호 112, 서열번호 113, 서열번호 114, 서열번호 115, 서열번호 116, 서열번호 117, 서열번호 118, 서열번호 119, 서열번호 120, 서열번호 121, 서열번호 122, 서열번호 123, 서열번호 124, 서열번호 125, 서열번호 126, 서열번호 127, 서열번호 128, 서열번호 129, 서열번호 130, 서열번호 131, 서열번호 132, 서열번호 133, 서열번호 134, 서열번호 135, 서열번호 136, 서열번호 137, 서열번호 138, 서열번호 139, 서열번호 140, 서열번호 141 또는 서열번호 142와 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90% 또는 적어도 95%의 서열 유사성을 갖도록 하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0210] 융합 단백질의 하나 이상의 구현예에서, 막 연관-ED 단백질 아미노산 서열은 서열번호 31, 서열번호 32, 서열번호 33, 서열번호 34, 서열번호 35, 서열번호 36, 서열번호 37, 서열번호 38, 서열번호 39, 서열번호 40, 서열번호 41, 서열번호 42, 서열번호 43, 서열번호 44, 서열번호 45, 서열번호 46, 서열번호 47, 서열번호 48, 서열번호 49, 서열번호 50, 서열번호 51, 서열번호 52, 서열번호 53, 서열번호 54, 서열번호 55, 서열번호 56, 서열번호 57, 서열번호 58, 서열번호 59, 서열번호 60, 서열번호 61, 서열번호 62, 서열번호 63, 서열번호 64, 서열번호 65, 서열번호 66, 서열번호 67, 서열번호 68, 서열번호 69, 서열번호 70, 서열번호 71, 서열번호 72, 서열번호 73, 서열번호 74, 서열번호 75, 서열번호 76, 서열번호 77, 서열번호 78, 서열번호 79, 서열번호 80, 서열번호 81, 서열번호 82, 서열번호 83, 서열번호 84, 서열번호 85, 서열번호 86, 서열번호 87, 서열번호 88, 서열번호 89, 서열번호 90, 서열번호 91, 서열번호 92, 서열번호 93, 서열번호 94, 서열번호 95, 서열번호 96, 서열번

호 97, 서열번호 98, 서열번호 99, 서열번호 100, 서열번호 101, 서열번호 102, 서열번호 103, 서열번호 104, 서열번호 105, 서열번호 106, 서열번호 107, 서열번호 108, 서열번호 109, 서열번호 110, 서열번호 111, 서열번호 112, 서열번호 113, 서열번호 114, 서열번호 115, 서열번호 116, 서열번호 117, 서열번호 118, 서열번호 119, 서열번호 120, 서열번호 121, 서열번호 122, 서열번호 123, 서열번호 124, 서열번호 125, 서열번호 126, 서열번호 127, 서열번호 128, 서열번호 129, 서열번호 130, 서열번호 131, 서열번호 132, 서열번호 133, 서열번호 134, 서열번호 135, 서열번호 136, 서열번호 137, 서열번호 138, 서열번호 139, 서열번호 140, 서열번호 141 또는 서열번호 142를 포함한다. 융합 단백질의 하나 이상의 구현예에서, 막 연관-ED 단백질을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드는 생성된 폴리펩티드가 서열번호 31, 서열번호 32, 서열번호 33, 서열번호 34, 서열번호 35, 서열번호 36, 서열번호 37, 서열번호 38, 서열번호 39, 서열번호 40, 서열번호 41, 서열번호 42, 서열번호 43, 서열번호 44, 서열번호 45, 서열번호 46, 서열번호 47, 서열번호 48, 서열번호 49, 서열번호 50, 서열번호 51, 서열번호 52, 서열번호 53, 서열번호 54, 서열번호 55, 서열번호 56, 서열번호 57, 서열번호 58, 서열번호 59, 서열번호 60, 서열번호 61, 서열번호 62, 서열번호 63, 서열번호 64, 서열번호 65, 서열번호 66, 서열번호 67, 서열번호 68, 서열번호 69, 서열번호 70, 서열번호 71, 서열번호 72, 서열번호 73, 서열번호 74, 서열번호 75, 서열번호 76, 서열번호 77, 서열번호 78, 서열번호 79, 서열번호 80, 서열번호 81, 서열번호 82, 서열번호 83, 서열번호 84, 서열번호 85, 서열번호 86, 서열번호 87, 서열번호 88, 서열번호 89, 서열번호 90, 서열번호 91, 서열번호 92, 서열번호 93, 서열번호 94, 서열번호 95, 서열번호 96, 서열번호 97, 서열번호 98, 서열번호 99, 서열번호 100, 서열번호 101, 서열번호 102, 서열번호 103, 서열번호 104, 서열번호 105, 서열번호 106, 서열번호 107, 서열번호 108, 서열번호 109, 서열번호 110, 서열번호 111, 서열번호 112, 서열번호 113, 서열번호 114, 서열번호 115, 서열번호 116, 서열번호 117, 서열번호 118, 서열번호 119, 서열번호 120, 서열번호 121, 서열번호 122, 서열번호 123, 서열번호 124, 서열번호 125, 서열번호 126, 서열번호 127, 서열번호 128, 서열번호 129, 서열번호 130, 서열번호 131, 서열번호 132, 서열번호 133, 서열번호 134, 서열번호 135, 서열번호 136, 서열번호 137, 서열번호 138, 서열번호 139, 서열번호 140, 서열번호 141 또는 서열번호 142 중 어느 하나가 되도록 하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0211] 융합 단백질의 하나 이상의 구현예에서, 소포 표적화 단백질은 Nef 단백질을 포함하고, 여기서 소포는 엑소좀 또는 세포외 소포이다. 하나 이상의 구현예에서, 관심 단백질은 Nef 단백질의 C 또는 N-말단에 존재한다. Nef 단백질은 전이유전자에 융합될 수 있다. 하나 이상의 구현예에서 Nef 단백질은 이의 단편이며, 이는 아미노산 1 내지 70, 1 내지 75, 1 내지 80, 1 내지 85, 1 내지 90, 1 내지 95, 1 내지 100, 1 내지 105, 1 내지 110, 1 내지 115, 1 내지 120, 1 내지 125, 1 내지 130, 1 내지 135, 1 내지 140, 1 내지 145, 1 내지 150, 1 내지 155, 1 내지 160, 1 내지 165, 1 내지 170, 1 내지 175, 1 내지 180, 1 내지 185, 1 내지 190, 1 내지 195, 1 내지 200, 또는 1 내지 205의 단편일 수 있다. 바람직하게는 단편은 1 내지 70 aa이다. Nef 단백질은 G3C, V153L, E177G 또는 이들의 조합을 포함하는 돌연변이 버전일 수 있으며, 바람직하게는 Nef^{mut}로 지칭되는 3개의 점 돌연변이를 모두 포함한다.

[0212] 융합 단백질의 하나 이상의 구현예에서, 관심 단백질은 치료 단백질을 포함한다.

[0213] 하나 이상의 구현예에서, 치료 단백질은 인슐린, 글루카곤, 성장 호르몬(GH), 부갑상선 호르몬(PTH), 성장 호르몬 방출 인자(GRF), 여포 자극 호르몬(FSH), 황체형성 호르몬(LH), 인간 융모막 성선자극 호르몬(hCG), 혈관 내피 성장 인자(VEGF), 안지오포이에틴, 안지오스타틴, 과립구 집락 자극 인자(GCSF), 에리스로포이에틴(EPO), 결합 조직 성장 인자(CTGF), 염기성 섬유아세포 성장 인자(bFGF), 산성 섬유아세포 성장 인자(aFGF), 표피 성장 인자(EGF), 혈소판-유래 성장 인자(PDGF), 인슐린 성장 인자 I 및 II(IGF-I 및 IGF-II), TGFα, 액티빈, 인히빈 또는 뼈 형태형성 단백질(BMP)인 BMP 1 내지 15 중 임의의 것을 포함하는 형질전환 성장 인자 슈퍼패밀리 중 임의의 하나, 성장 인자의 헤레글루인/뉴레귤린/ARIA/neu 분화 인자(NDF) 계열 중 임의의 하나, 신경 성장 인자(NGF), 뇌-유래 뉴로트로핀 인자(BDNF), 뉴로트로핀 NT-3 및 NT-4/5, 섬모 뉴로트로핀 인자(CNTF), 신경아교세포주 유래 뉴로트로핀 인자(GDNF), 뉴투린, 아그린, 세마포린/콜랩신 계열 중 임의의 하나, 네트린-1 및 네트린-2, 간세포 성장 인자(HGF), 에프린, 노긴, 소닉 헤지호그 및 티로신 수산화효소와 같은 호르몬 및/또는 성장 및/또는 분화 인자를 포함한다.

[0214] 하나 이상의 구현예에서, 치료 단백질은 면역계 조절 단백질을 포함하고, 조절 단백질은 사이토카인 및 림포카인, 예를 들어 트롬보포이에틴(TPO), 인터루킨(IL) IL-1 내지 IL-25(예를 들어, IL-2, IL-4, IL-12 및 IL-18을 포함함), 단핵구 화학유인 단백질, 백혈병 억제 인자, 과립구-대식세포 집락 자극 인자, Fas 리간드, 종양 괴사 인자 α 및 β, 인터페론 α, β 및 γ, 줄기 세포 인자, flk -2/flt3 리간드를 포함한다.

[0215] 하나 이상의 구현예에서, 치료 단백질은 면역글로불린 IgG, IgM, IgA, IgD 및 IgE, 키메라 면역글로불린, 인간화 항체, 단일 사슬 항체, T 세포 수용체, 키메라 T 세포 수용체, 단일 사슬 T 세포 수용체, 클래스 I 및 클래스 II MHC 분자 뿐만 아니라 조작된 면역글로불린 및 MHC 분자를 포함한다.

[0216] 하나 이상의 구현예에서, 치료 단백질은 보체 조절 단백질을 포함하고, 보체 조절 단백질은 막 보조인자 단백질(MCP), 붕괴 촉진 인자(DAF), CR1, CF2 및 CD59를 포함한다.

[0217] 하나 이상의 구현예에서, 치료 단백질은 호르몬, 성장 인자, 사이토카인, 림포카인, 조절 단백질 및 면역계 단백질에 대한 수용체를 포함한다.

[0218] 하나 이상의 구현예에서, 치료 단백질은 저밀도 지단백질(LDL) 수용체, 고밀도 지단백질(HDL) 수용체, 초저밀도 지단백질(VLDL) 수용체 및 스캐빈저 수용체를 포함하는 콜레스테롤 조절 및/또는 지질 조정으 위한 수용체를 포함한다.

[0219] 하나 이상의 구현예에서, 치료 단백질은 글루코코르티코이드 수용체 및 에스트로겐 수용체, 비타민 D 수용체 및 기타 핵 수용체를 포함하는 스테로이드 호르몬 수용체 슈퍼패밀리의 구성원을 포함한다.

[0220] 하나 이상의 구현예에서, 치료 단백질은 jun, fos, max, mad, 혈청 반응 인자(SRF), AP-1, AP2, myb, MyoD 및 미오게닌, ETS-박스 함유 단백질, TFE3, E2F, ATF1, ATF2, ATF3, ATF4, ZF5, NFAT, CREB, HNF-4, C/EBP, SP1, CCAAT-박스 결합 단백질, 인터페론 조절 인자(IRF-1), 빌름스(Wilms) 종양 단백질, ETS-결합 단백질, STAT, GATA-박스 결합 단백질, 및 익상 나선 단백질의 포크헤드 계열과 같은 전사 인자를 포함한다.

[0221] 하나 이상의 구현예에서, 치료 단백질은 카바모일 합성효소 I, 오르니틴 트랜스카바밀라제, 아르기노숙시네이트 합성효소, 아르기노숙시네이트 분해효소, 아르기나제, 푸마릴아세트아세테이트 가수분해효소, 페닐알라닌 수산화효소, 알파-1 항트립신, 글루코스-6-포스파타제, 포르포빌리노겐 데아미나제, 시스타티온 베타-합성효소, 분지쇄 케토산 데카복실라제, 알부민, 이소발레릴-coA 탈수소효소, 프로피오닐 CoA 카복실라제, 메틸 말로닐 CoA 뮤타제, 글루타릴 CoA 탈수소효소, 인슐린, 베타-글루코시다제, 피루베이트 카복실레이트, 간 포스포릴라제, 포스포릴라제 키나제, 글리신 데카복실라제, H-단백질, T-단백질, 낭포성 섬유증 막관통 조절인자(CFTR) 서열, 및 디스트로핀 유전자 생성물을 포함한다.

[0222] 하나 이상의 구현예에서, 치료 단백질은 CDKL5, 알파-갈락토시다제, β-갈락토시다제, β-헥소사미니다제, 갈락토실세라미다제, 아릴설파타제, β-글루코세레브로시다제, 글루코세레브로시다제, 리소좀 산 리파제, 리소좀 효소 산 스핑고미엘리나제, 포르밀글리신-생성 효소, 이두로니다제, 아세틸-CoA: 알파-글루코사미나이드 N-아세틸트랜스퍼라제, 글리코사미노글리칸 알파-L-이두로노하이드롤라제, 헤파란 N-설파타제, N-아세틸-α-D-글루코사미니다제(NAGLU), 이두로네이트-2-설파타제, 갈락토사민-6-설페이트 설파타제, N-아세틸갈락토사민-6-설파타아제, 글리코사미노글리칸 N-아세틸갈락토사민 4-설파타제, β-글루쿠로니다제, 히알루로니다제, 알파-N-아세틸뉴라미니다제(시알리다제), 강글리오사이드 시알리다제, 포스포트랜스퍼라제, 알파-글루코시다제, 알파-D-만노시다제, 베타-D-만노시다제, 아스파틸글루코사미니다제, 알파-L-푸코시다제, 바테닌, 팔미토일 단백질 티오에스테라제 및 기타 바텐-관련 단백질 또는 이의 효소 활성 단편을 포함한다. 하나 이상의 구현예에서, 바텐-관련 단백질은 세로이드-리포푸신증 뉴런 단백질 1, 세로이드-리포푸신증 뉴런 단백질 2, 세로이드-리포푸신증 뉴런 단백질 3, 세로이드-리포푸신증 뉴런 단백질 4, 세로이드-리포푸신증 뉴런 단백질 5, 세로이드-리포푸신증 뉴런 단백질 6, 세로이드-리포푸신증 뉴런 단백질 7, 세로이드-리포푸신증 뉴런 단백질 8, 세로이드-리포푸신증 뉴런 단백질 19, 세로이드-리포푸신증 뉴런 단백질 10, 세로이드-리포푸신증 뉴런 단백질 11, 세로이드-리포푸신증 뉴런 단백질 12, 세로이드-리포푸신증 뉴런 단백질 13 및 세로이드-리포푸신증 뉴런 단백질 14를 포함한다.

[0223] 하나 이상의 구현예에서, 치료 단백질은 혈우병 B 및 혈우병 A를 포함하는 혈우병 치료에 사용되는 단백질을 포함할 수 있다.

[0224] 하나 이상의 구현예에서, 치료 단백질은 삽입, 결실 또는 아미노산 치환을 함유하는 비-천연 발생 아미노산 서열을 갖는 키메라 또는 하이브리드 폴리펩티드와 같은 비-천연 발생 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 하나 이상의 구현예에서, 비-천연 발생 폴리펩티드는 단일 사슬 조작된 면역글로불린, 안티센스 분자 및 촉매 핵산을 포함한다.

[0225] 하나 이상의 구현예에서, 치료 단백질은 표적 항원 및 표적 폴리펩티드를 포함하는 종양유전자 생성물을 포함하며, 여기서 표적 폴리펩티드는 정상 세포와 비교하여 과증식성 세포에서 배타적으로 또는 더 높은 수준으로 생산되는 단백질을 포함하고, 표적 항원은 myb, myc, fyn 및 전위 유전자 bcr/abl, ras, src, P53, neu, trk 및

EGRF를 포함하는 종양유전자에 의해 인코딩된 단백질을 포함한다. 하나 이상의 구현예에서, 치료 단백질은 B 세포 림프종에 의해 생성된 항체의 가변 영역 및 T 세포 림프종의 T 세포 수용체의 가변 영역을 포함한다. 하나 이상의 구현예에서, 치료 단백질은 다른 종양-연관 폴리펩티드를 포함하고, 폴리펩티드는 모노클로날 항체 17-1A에 의해 인식되는 폴리펩티드 및 엽산 결합 폴리펩티드를 포함하는 종양 세포에서 더 높은 수준으로 발견된다.

[0226] 하나 이상의 구현예에서, 치료 단백질은 세포 수용체 및 "자기"-지시 항체를 생성하는 세포를 포함하는 자가면역과 연관된 표적에 대해 광범위한 보호 면역 반응을 부여함으로써 자가면역 질병 및 장애를 앓고 있는 개체를 치료하는 데 유용한 단백질을 포함한다. 하나 이상의 구현예에서, 자가면역 연관 세포는 T 세포이다. 하나 이상의 구현예에서, 자가면역 질병은 류마티스성 관절염(RA), 다발성 경화증(MS), 쇼그렌 증후군, 유육종증, 인슐린 의존성 진성 당뇨병(IDDM), 자가면역 갑상선염, 반응성 관절염, 강직성 척추염, 경피증, 다발성근염, 피부근염, 건선, 혈관염, 베게너 육아종증, 크론병 및 궤양성 대장염을 포함한다.

[0227] 하나 이상의 구현예에서, 융합 단백질은 제3 링커 펩티드를 포함하고, 여기서 제3 링커 펩티드는 소포 표적화 단백질과 관심 단백질 사이에 위치한다. 일부 구현예에서, 제3 링커 펩티드는 융합 단백질의 말단에 위치한다.

[0228] 일부 구현예에서, 제3 링커 펩티드는 스페이서 펩티드, 막관통 도메인 및 소포외 도메인 중 하나 이상을 포함한다. 일부 구현예에서, 제3 링커 펩티드는 친화성 태그, 연결 펩티드, 프로테아제 절단 부위, 분비 신호 펩티드, 세포 표적화 도메인, 리포터, 효소 또는 이들의 조합 중 하나 이상을 포함한다. 일부 구현예에서, 친화성 태그는 mCherry, TwinStrep, 폴리히스티딘, HA, FLAG, GST 및 GFP 중 하나 이상일 수 있다.

[0229] 하나 이상의 구현예에서, 융합 단백질은 하나 초과의 이펙터 도메인(ED)을 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 초과의 이펙터 도메인(ED)은 제1 이펙터 도메인(ED) 및 제2 이펙터 도메인(ED)을 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 이펙터 도메인(ED)은 제2 이펙터 도메인(ED)에 직접 연결된다. 일부 구현예에서, 제1 이펙터 도메인(ED)은 링커 펩티드를 통해 제2 이펙터 도메인(ED)에 연결된다.

[0230] 일부 구현예에서, 단백질분해 절단 부위는 융합 단백질 합성 또는 정제와 함께 친화성 태그를 포함하는 소포 표적 단백질 및/또는 다른 펩티드 기능성 도메인으로부터 관심 단백질의 방출을 촉진하기 위해 융합 단백질로 조작될 수 있다. 예시적인 프로테아제 절단 부위는 트롬빈, 푸린, 인자 Xa, 메탈로프로테아제, 엔테로키나제 및 카텝신에 민감한 절단 부위를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, 절단 부위는 라이소절단 부위를 포함한다. 라이소절단 부위는 알려지지 않은 리소좀 프로테아제에 민감하다.

[0231] 세포 표적화 도메인은 세포-유형 특이적 또는 세포 분화-특이적 표적화를 부여하는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 세포 표적화 도메인은 융합 단백질에 통합될 수 있거나 공동-발현된 막-결합 엑소좀 마커 단백질에 융합될 수 있다. 바람직하게는 세포 표적화 도메인은 막 결합 단백질의 세포외 도메인에 융합된다. 세포 표적화 도메인은 항체 또는 항체 유도체, 펩티드 리간드, 수용체 리간드, 수용체 단편, 호르몬 등을 포함할 수 있다. 예시적인 막-결합 엑소좀 마커 단백질은 특히 CD9, CD63, CD81, CD82 및 CD151, 및 다양한 GPI(글리세롤-포스파티딜 이노시톨)-앵커된 단백질 등과 같은 테트라스파닌을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0232] 예시적인 항체 또는 항체 유래 세포 표적화 도메인은 IgG, 항체 가변 영역; 분리된 CDR 영역; 항원 결합 부위를 형성하기 위해 두 도메인 사이의 회합을 가능하게 하는 펩티드 링커에 의해 연결된 VH 및 VL 도메인을 포함하는 단일 사슬 Fv 분자(scFv); 이중특이성 scFv 이량체; VH 또는 VL 도메인으로 구성된, CH3 도메인, 단일 사슬 디아바디 단편, dAb 단편에 결합된 scFv를 포함하는 미니바디; VL, VH, CL 및 CH1 도메인으로 구성된 Fab 단편; 항체 힌지 영역으로부터의 하나 이상의 시스테인을 포함하는 중쇄 CH1 도메인의 카복실 말단에 몇 개의 잔기의 첨가에 의해 Fab 단편과 상이한 Fab' 단편; 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)가 유리 티올 기를 보유하는 Fab' 단편인 Fab'-SH 단편; F(ab')2, 2개의 연결된 Fab 단편을 포함하는 2가 단편; VH 및 CH1 도메인으로 구성된 Fd 단편; 이의 유도체, 및 항원-결합 기능을 보유하는 임의의 다른 항체 단편(들)으로 구성된 군의 임의의 구성원을 포함할 수 있다. Fv, scFv 또는 디아바디 분자는 VH 및 VL 도메인을 연결하는 이황화 가교의 혼입에 의해 안정화될 수 있다. 항체-유래 표적화제를 사용하는 경우, 그 안의 세포 표적화 도메인 및/또는 Fc 영역의 일부 또는 전부는 당업자에게 잘 알려진 방법론을 사용하여 "인간화"될 수 있다.

[0233] 본 발명의 융합 단백질의 기능적 도메인은 스페이서에 의해 서로 분리되어 서로에 대한 각 펩티드 부분의 독립적인 폴딩을 용이하게 하고 융합 단백질의 개별 펩티드 부분이 서로 간섭하지 않도록 한다. 스페이서는 임의의 아미노산 또는 이들의 혼합물을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 선택된 스페이서는 단백질의 유연성을 증가시키고 확장된 형태의 채택을 용이하게 할 것이다. 바람직한 펩티드 스페이서는 프롤린, 라이신, 글리신, 알라닌 및

세린, 또는 이들의 조합을 포함한다. 한 구현예에서, 링커는 글리신 풍부 링커이다.

[0234] 스페이서 서열은 통상적으로 길이가 1 내지 10개의 아미노산, 통상적으로 길이가 1 내지 8개의 아미노산, 예컨대 길이가 2, 3 또는 4개의 아미노산이다. 스페이서에 혼입시키기에 적합한 아미노산은 알라닌, 아르기닌, 세린 또는 글리신이다. 적합한 스페이서는 Ala-Arg 및 Ser-Gly-Gly를 포함한다. 본 발명의 실시에서, 표적화 모이어티는 rAAV-전이유전자로 형질도입된 세포 내에서 표적화 모이어티 및 엑소좀 막관통 단백질을 포함하는 융합 단백질의 발현에 의해 엑소좀 내로 도입되어 생체 내에서 엑소좀을 생산한다. 세포에서 이 융합 단백질의 발현은 융합 단백질이 세포에서 생산될 때 엑소솜으로 혼입되도록 한다. 특정 구현예에서, 스페이서는 4개의 아미노산 펩티드이다.

[0235] 일부 구현예에서, 융합 단백질은 하나 이상의 곡률 감지 도메인을 포함할 수 있다. 하나 이상의 구현예에서, 곡률 감지 도메인은 SNX-1 곡률 감지 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, SNX-1 곡률 감지 도메인은 서열번호 154에 따른 서열을 포함한다.

[0236] 하나 이상의 구현예에서, 융합 단백질의 N-말단은 메티오닌을 갖지 않는다.

[0237] 본 개시내용은 또한 융합 단백질을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 제공한다.

[0238] 당업자는 아미노산 서열을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 쉽게 유도할 수 있다. 또한, 폴리뉴클레오티드 서열은 상업적으로 입수가능한 생성물을 사용하여 표적 세포에서의 발현을 위해 코돈 최적화될 수 있다. 본 발명은 융합 단백질을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함한다. 융합 단백질을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 발현 제어 서열, 예를 들어 분비 신호 펩티드 유전자인 유전자의 발현을 지시하는 프로모터에 작동가능하게 연결될 수 있다.

[0239] 하나 이상의 구현예에서, 융합 단백질은 지질과 접합된다. 일부 구현예에서, 융합 단백질은 미리스토일화, 팔미토일화, 프레닐화 또는 글리코실포스파티딜이노시톨 앵커 단백질에 의해 접합된다.

[0240] 일부 구현예에서, 융합 단백질은 추가로 지질 소포로 재구성된다.

[0241] **융합 단백질 발현**

[0242] 하나 이상의 구현예에서, 융합 단백질을 생산하는 방법은 숙주 세포를 형질주입시키고, 숙주 세포가 일시적으로 융합 단백질을 발현하게 하고, 엑소좀을 분리하고, 이로부터 융합 단백질을 정제하는 것을 포함한다. 하나 이상의 구현예에서, 정제된 융합 단백질은 엑소좀에 로딩된다. 하나 이상의 구현예에서, 엑소좀은 외인성으로 생성된다. 하나 이상의 구현예에서, 융합 단백질은 숙주 세포에서 발현된다. 하나 이상의 구현예에서, 숙주 세포는 Expi293F 세포, PC12 세포, HAP1 세포, 차이니즈 햄스터 난소(CHO) 세포, HeLa 세포, 인간 배아 신장(HEK) 세포, 마우스 1차 근육모세포, NIH 3T3 세포, 또는 대장균 세포 중 어느 하나를 포함한다. 하나 이상의 구현예에서, 융합 단백질을 발현하기 위해 무세포 발현 합성이 사용된다.

[0243] 하나 이상의 구현예에서, 융합 단백질 발현 세포는 엑소좀의 생산을 증가시키도록 유도된다. 일부 구현예에서, 융합 단백질 발현 세포는 N-메틸도파민 및/또는 노르에피네프린으로 유도된다. 일부 구현예에서, 융합 단백질 발현 세포는 세포독성제로 유도된다. 일부 구현예에서, 세포독성제는 멜팔란을 포함한다.

[0244] 하나 이상의 구현예에서, 숙주 세포는 적합한 벡터를 사용하여 형질주입되며, 여기서 벡터는 바이러스(예를 들어, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스(AAV), 백시니아, 헤르페스바이러스, 배큘로바이러스 및 레트로바이러스, 파보바이러스, 렌티바이러스) 박테리오파지, 코스미드, 플라스미드, 진균 벡터, 네이키드 DNA, DNA 지질 복합체, 및 다양한 진핵 및 원핵 숙주에서의 발현에 대해 기재된 당업계에서 통상적으로 사용되는 기타 재조합 비히클을 포함하고, 유전자 치료 뿐만 아니라 단순한 단백질 발현에 사용될 수 있다.

[0245] **조절 요소**

[0246] 전이유전자 이외에, 미니유전자는 또한 플라스미드 벡터로 형질주입되거나 본 발명에 의해 생산된 바이러스로 감염된 세포에서 이의 전사, 번역 및/또는 발현을 허용하는 방식으로 전이유전자에 작동가능하게 연결된 통상적인 제어 요소를 포함할 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "작동가능하게 연결된" 서열은 관심 유전자와 인접하는 발현 제어 서열 및 관심 유전자를 제어하기 위해 트랜스로 또는 일정 거리에서 작용하는 발현 제어 서열 모두를 포함한다.

[0247] 발현 제어 서열은 적절한 전사 개시, 종결, 프로모터 및 인핸서 서열; 스플라이싱 및 폴리아데닐화(폴리A) 신호와 같은 효율적인 RNA 처리 신호; 세포질 mRNA를 안정화시키는 서열; 번역 효율성을 향상시키는 서열(즉, Kozak

컨센서스 서열); 단백질 안정성을 향상시키는 서열; 및 원하는 경우 인코딩된 생성물의 분비를 향상시키는 서열을 포함한다. 천연, 구성적, 유도성 및/또는 조직-특이적 프로모터를 포함하는 다수의 발현 제어 서열이 당업계에 공지되어 있고 이용될 수 있다.

[0248] 구성적 프로모터의 예는 레트로바이러스성 라우스 육종 바이러스(RSV) LTR 프로모터(선택적으로 RSV 인핸서 포함), 거대세포바이러스(CMV) 프로모터(선택적으로로 CMV 인핸서 포함)(예를 들어, 문헌[Boshart et al, Cell, 41:521-530 (1985)] 참조), SV40 프로모터, 디하이드로폴레이트 환원효소 프로모터, 13-액틴 프로모터, 포스포글리세롤 키나제(PGK) 프로모터 및 EF1 프로모터(Invitrogen)를 제한 없이 포함한다. 유도성 프로모터는 유전자 발현의 조절을 허용하고 외인성으로 공급된 화합물, 온도와 같은 환경적 요인 또는 특정 생리학적 상태, 예를 들어 급성 상, 세포의 특정 분화 상태 또는 복제 세포에서만의 존재에 의해 조절될 수 있다. 유도성 프로모터 및 유도성 시스템은 Invitrogen, Clontech 및 Ariad를 제한 없이 포함하는 다양한 상업적 공급원에서 구할 수 있다. 많은 다른 시스템이 기재되었고 당업자에 의해 쉽게 선택될 수 있다. 외인성 공급 화합물에 의해 조절되는 유도성 프로모터의 예로는 아연-유도성 양 메탈로티오닌(MT) 프로모터, 덱사메타손(Dex)-유도성 마우스 유선종양 바이러스(MMTV) 프로모터, T7 중합효소 프로모터 시스템(국제 특허 공개 WO 98/10088); 엑디손 곤충 프로모터(No et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:3346-3351(1996)), 테트라사이클린-억제 시스템(Gossen et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5547-5551(1992)), 테트라사이클린-유도 시스템(Gossen et al, Science, 268:1766-1769(1995), Harvey et al, Curr. Opin. Chem. Biol., 2:512-518(1998)), RU486-유도 시스템(Wang et al, Nat. Biotech., 15:239-243(1997) 및 Wang et al, Gene Ther., 4:432-441(1997)) 및 라파마이신-유도 시스템(Magari et al, J. Clin. Invest., 100:2865-2872(1997))을 포함한다. 이와 관련하여 유용할 수 있는 다른 유형의 유도성 프로모터는 특정 생리학적 상태, 예를 들어 온도, 급성 상, 세포의 특정 분화 상태 또는 복제 세포 단독에서 조절되는 것들이다.

[0249] 또 다른 구현예에서, 전이유전자에 대한 천연 프로모터가 사용될 것이다. 천연 프로모터는 전이유전자의 발현이 천연 발현을 모방하는 것이 요구될 때 바람직할 수 있다. 천연 프로모터는 전이유전자의 발현이 일시적으로 또는 발달적으로, 또는 조직-특이적 방식으로, 또는 특정 전사 자극에 대한 반응으로 조절되어야 할 때 사용될 수 있다. 추가 구현예에서, 인핸서 요소, 폴리아데닐화 부위 또는 코작(Kozak) 컨센서스 서열과 같은 다른 천연 발현 제어 요소가 또한 천연 발현을 모방하는데 사용될 수 있다.

[0250] 전이유전자의 또 다른 구현예는 조직-특이적 프로모터에 작동가능하게 연결된 유전자를 포함한다. 예를 들어, 골격근에서의 발현을 원하는 경우, 근육에서 활성화된 프로모터를 사용해야 한다. 여기에는 골격 β-액틴, 미오신 경쇄 2A, 디스트로핀, 근육 크레아틴 키나제를 인코딩하는 유전자의 프로모터와 천연-발생 프로모터보다 활성이 더 높은 합성 근육 프로모터가 포함된다(문헌[Li et al., Nat. Biotech., 17 :241-245(1999)] 참조). 조직-특이적 프로모터의 예는 특히 간(알부민, Miyatake et al., J. Virol., 71:5124-32(1997)); B형 간염 바이러스 코어 프로모터(Sandig et al., Gene Ther., 3:1002-9(1996)); 알파-페토단백질(AFP)(Arbuthnot et al., Hum. Gene Ther., 7:1503-14(1996)), 뼈 오스테오칼신(Stein et al., Mol. Biol. Rep., 24:185-96(1997)); 뼈 시알로프로테인(Chen et al., J. Bone Miner. Res., 11:654-64(1996)), 림프구(CD2, Hansal et al., J. Immunol., 161:1063-8(1998); 면역글로불린 중쇄; T 세포 수용체 사슬), 뉴런-특이적 에놀라제(NSE) 프로모터와 같은 뉴런(Andersen et al., Cell. Mol. Neurobiol., 13:503-15(1993)), 뉴런필라멘트 경쇄 유전자(Piccioli et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:5611-5(1991)), 뉴런-특이적 vgf 유전자(Piccioli et al., Neuron, 15:373-84 (1995))에 대해 알려져 있다.

[0251] 선택적으로, 치료적으로 유용한 전이유전자를 운반하는 플라스미드는 또한 선택가능한 마커를 포함할 수 있거나 리포터 유전자는 특히 제네티신, 하이그로마이신 또는 퓨리마이신 내성을 인코딩하는 서열을 포함할 수 있다. 이러한 선택가능한 리포터 또는 마커 유전자(바람직하게는 본 발명의 방법에 의해 구제될 바이러스 게놈 외부에 위치)는 암피실린 내성과 같은 박테리아 세포에서 플라스미드의 존재를 알리는 데 사용될 수 있다. 플라스미드의 다른 성분은 복제 기점을 포함할 수 있다. 이들 및 다른 프로모터 및 벡터 요소의 선택은 통상적이며, 그러한 많은 서열이 이용가능하다(예를 들어, 문헌[Sambrook et al], 및 거기에 인용된 참고문헌 참조).

[0252] **패키징 숙주 세포로의 미니유전자 전달**

[0253] 미니유전자는 숙주 세포에 전달되는 임의의 적합한 벡터, 예를 들어 플라스미드 상에서 운반될 수 있다. 본 발명에 유용한 플라스미드는 복제 및 선택적으로 원핵 세포, 포유동물 세포 또는 둘 모두에서의 통합에 적합하도록 조작될 수 있다. 이들 플라스미드(또는 5' AAV ITR-이종 분자-3' AAV ITR을 운반하는 다른 벡터)는 진핵생물 및/또는 원핵생물에서 미니유전자의 복제를 허용하는 서열 및 이들 시스템에 대한 선택 마커를 함유한다. 선택

가능한 마커 또는 리포터 유전자는 특히 제네티신, 하이그로마이신 또는 퓨리마이신 내성을 인코딩하는 서열을 포함할 수 있다. 플라스미드는 또한 암피실린 내성과 같은 박테리아 세포에서 벡터의 존재를 알리는 데 사용할 수 있는 특정 선택가능한 리포터 또는 마커 유전자를 함유할 수 있다. 플라스미드의 다른 성분은 복제 기점 및 엡스타인 바(Epstein Barr) 바이러스 핵 항원을 사용하는 앰플리콘 시스템과 같은 앰플리콘을 포함할 수 있다. 이 앰플리콘 시스템 또는 기타 유사한 앰플리콘 성분은 세포에서 높은 카피 에피솜 복제를 허용한다. 바람직하게는, 미니유전자를 운반하는 분자는 일시적으로 존재할 수 있는 세포 내로 형질주입된다. 대안적으로, 미니유전자(5' AAV ITR-이종 분자-3' ITR을 운반함)는 염색체로 또는 에피좀으로서 숙주 세포의 게놈에 안정적으로 통합될 수 있다. 특정 구현예에서, 미니유전자는 선택적으로 머리-머리, 머리-꼬리 또는 꼬리-꼬리 연쇄동일서열로 다수의 카피로 존재할 수 있다. 적합한 형질주입 기법은 공지되어 있고 미니유전자를 숙주 세포로 전달하기 위해 쉽게 이용될 수 있다.

[0254] 일반적으로, 형질주입에 의해 미니유전자를 포함하는 벡터를 전달하는 경우, 벡터는 약 5 μg 내지 약 100 μg DNA, 약 10 μg 내지 약 50 μg DNA로부터, 약 1×10^{4}개 세포 내지 10^{13}개 세포 또는 약 1×10^{5}개 세포까지의 양으로 전달된다. 그러나, 숙주 세포에 대한 벡터 DNA의 상대적인 양은 선택된 벡터, 전달 방법 및 선택된 숙주 세포와 같은 요소를 고려하여 조정될 수 있다.

[0255] A. Rep 및 Cap 서열

[0256] 미니유전자 이외에, 패키징 숙주 세포는 숙주 세포에서 신규 AAV 캡시드 단백질(또는 이의 단편을 포함하는 캡시드 단백질)의 발현을 유도하는 서열 및 미니유전자에서 발견되는 AAV ITR의 공급원 또는 교차-보체 공급원과 동일한 공급원의 rep 서열을 함유한다. AAV cap 및 rep 서열은 상기 기재된 바와 같이 AAV 공급원으로부터 독립적으로 수득될 수 있고 상기 기재된 바와 같이 당업자에게 공지된 임의의 방식으로 숙주 세포 내로 도입될 수 있다. 또한, AAV 벡터를 슈도 타이핑할 때(예를 들어, AAV9/HU.14 캡시드), 각각의 필수 rep 단백질을 인코딩하는 서열은 다른 AAV 공급원(예를 들어, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8)에 의해 공급될 수 있다. 예를 들어, rep78/68 서열은 AAV2에서 유래할 수 있는 반면, rep52/40 서열은 AAV8에서 유래할 수 있다.

[0257] 하나의 구현예에서, 숙주 세포는 상기 기재된 것과 같은 적합한 프로모터의 제어 하에 캡시드 단백질을 안정적으로 함유한다. 가장 바람직하게는, 이 구현예에서, 캡시드 단백질은 유도성 프로모터의 제어 하에 발현된다. 또 다른 구현예에서, 캡시드 단백질은 트랜스로 숙주 세포에 공급된다. 트랜스로 숙주 세포에 전달될 때, 캡시드 단백질은 숙주 세포에서 선택된 캡시드 단백질의 발현을 지시하는 데에 필요한 서열을 함유하는 플라스미드를 통해 전달될 수 있다. 가장 바람직하게는, 트랜스로 숙주 세포에 전달될 때, 캡시드 단백질을 운반하는 플라스미드는 또한 rAAV 패키징에 필요한 다른 서열, 예를 들어 rep 서열을 운반한다.

[0258] 또 다른 구현예에서, 숙주 세포는 상기 기재된 것과 같은 적합한 프로모터의 제어 하에 rep 서열을 안정적으로 함유한다. 가장 바람직하게는, 이 구현예에서, 필수 rep 단백질은 유도성 프로모터의 제어 하에 발현된다. 또 다른 구현예에서, rep 단백질은 트랜스로 숙주 세포에 공급된다. 숙주 세포에 트랜스로 전달될 때, rep 단백질은 숙주 세포에서 선택된 rep 단백질 발현의 발현을 지시하는 데에 필요한 서열을 함유하는 플라스미드를 통해 전달될 수 있다. 가장 바람직하게는, 트랜스로 숙주 세포에 전달될 때, 캡시드 단백질을 운반하는 플라스미드는 또한 rAAV 패키징에 필요한 다른 서열, 예를 들어 rep 및 cap 서열을 운반한다.

[0259] 따라서, 한 구현예에서, rep 및 cap 서열은 단일 핵산 분자 상에서 숙주 세포로 형질주입될 수 있고 에피솜으로서 세포에 안정적으로 존재할 수 있다. 또 다른 구현예에서, rep 및 cap 서열은 세포의 염색체에 안정적으로 통합된다. 또 다른 구현예는 숙주 세포에서 일시적으로 발현되는 rep 및 cap 서열을 갖는다. 예를 들어, 이러한 형질주입에 유용한 핵산 분자는 5'에서 3'으로 프로모터, 프로모터와 rep 유전자 서열의 시작 부위 사이에 개재된 선택적인 스페이서, AAV rep 유전자 서열 및 AAV cap 유전자 서열을 포함한다.

[0260] 선택적으로, rep 및/또는 cap 서열은 숙주 세포에 도입될 다른 DNA 서열을 함유하는 벡터 상에 공급될 수 있다. 예를 들어, 벡터는 미니유전자를 포함하는 rAAV 구성물을 포함할 수 있다. 벡터는 헬퍼 기능을 인코딩하는 유전자, 예를 들어 아데노바이러스 단백질 E1, E2a 및 E4 ORF6, 및 VAI RNA에 대한 유전자 중 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0261] 바람직하게는, 이 구성물에 사용되는 프로모터는 당업자에게 공지되거나 상기 논의된 바와 같은 임의의 구성적, 유도성 또는 천연 프로모터일 수 있다. 한 구현예에서, AAV P5 프로모터 서열이 사용된다. 임의의 이들 서열을 제공하기 위한 AAV의 선택은 본 발명을 제한하지 않는다.

[0262] 또 다른 바람직한 구현예에서, rep에 대한 프로모터는 전이유전자 조절 요소와 관련하여 상기 논의된 바와 같은

유도성 프로모터이다. rep 발현을 위한 하나의 바람직한 프로모터는 T7 프로모터이다. T7 프로모터 및 cap 유전자에 의해 조절되는 rep 유전자를 포함하는 벡터는 T7 중합효소를 구성적으로 또는 유도적으로 발현하는 세포로 형질주입되거나 형질전환된다. 1998년 3월 12일 공개된 국제 특허 공개 WO 98/10088을 참조한다.

[0263] 스페이서는 벡터 설계에서 선택적인 요소이다. 스페이서는 프로모터와 rep 유전자 ATG 시작 부위 사이에 삽입된 DNA 서열이다. 스페이서는 임의의 원하는 설계를 가질 수 있으며; 즉, 뉴클레오티드의 무작위 서열일 수도 있고, 또는 대안적으로 마커 유전자와 같은 유전자 생성물을 인코딩할 수도 있다. 스페이서는 통상적으로 시작/중지 및 폴리A 부위를 혼입하는 유전자를 포함할 수 있다. 스페이서는 원핵생물 또는 진핵생물로부터의 비-코딩 DNA 서열, 반복적 비-코딩 서열, 전사 제어가 없는 코딩 서열 또는 전사 제어가 있는 코딩 서열일 수 있다. 스페이서 서열의 2가지 예시적인 공급원은 파지 래더 서열 또는 효모 래더 서열이며, 이는 예를 들어 특히 Gibco 또는 Invitrogen으로부터 시판된다. 스페이서는 rep78 및 rep68 유전자 생성물의 발현을 감소시키기에 충분한 임의의 크기일 수 있으며, 정상 수준으로 발현된 rep52, rep40 및 cap 유전자 생성물을 남긴다. 따라서 스페이서의 길이는 약 10 bp 내지 약 10.0 kbp 범위, 바람직하게는 약 100 bp 내지 약 8.0 kbp 범위일 수 있다. 재조합의 가능성을 줄이기 위해, 스페이서는 바람직하게는 길이가 2 kbp 미만이지만; 그러나, 본 발명은 그렇게 제한되지 않는다.

[0264] rep 및 cap을 제공하는 분자(들)가 숙주 세포에 일시적으로(즉, 형질주입을 통해) 존재할 수 있지만, rep 및 cap 단백질 중 하나 또는 둘 모두 및 이들의 발현을 제어하는 프로모터(들)가, 예를 들어, 에피솜으로서 또는 숙주 세포의 염색체로의 통합에 의해 숙주 세포에서 안정적으로 발현되는 것이 바람직하다. 본 발명의 구현예를 구축하기 위해 사용되는 방법은 상기 참고 문헌에 기재된 것과 같은 종래의 유전 공학 또는 재조합 공학 기법이다. 본 명세서는 특정 구성물의 예시적인 예를 제공하지만, 본원에 제공된 정보를 사용하여 당업자는 스페이서, P5 프로모터 및 적어도 하나의 번역 시작 및 정지 신호, 및 폴리아데닐화 부위의 선택적인 첨가를 포함하는 다른 요소의 선택을 사용하여 다른 적합한 구성물을 선택하고 설계할 수 있다.

[0265] 본 발명의 또 다른 구현예에서, rep 또는 cap 단백질은 숙주 세포에 의해 안정적으로 제공될 수 있다.

[0266] **헬퍼 기능**

[0267] 패키징 숙주 세포는 또한 본 발명의 rAAV를 패키징하기 위해 헬퍼 기능을 필요로 한다. 선택적으로 이러한 기능은 헤르페스바이러스에 의해 공급될 수 있다. 가장 바람직하게는, 필요한 헬퍼 기능은 각각 상기 기재된 것과 같은 인간 또는 비-인간 영장류 아데노바이러스 공급원으로부터 제공되고/되거나 아메리칸 타입 컬처 컬렉션(American Type Culture Collection(ATCC); 미국 버지니아주 매너서스 소재)를 포함하는 다양한 공급원으로부터 입수가능하다. 하나의 현재 바람직한 구현예에서, 숙주 세포는 E1a 유전자 생성물, E1b 유전자 생성물, E2a 유전자 생성물 및/또는 E4 ORF6 유전자 생성물을 제공 및/또는 함유한다. 숙주 세포는 VAI RNA와 같은 다른 아데노바이러스 유전자를 포함할 수 있지만, 이러한 유전자는 필요하지 않다. 바람직한 구현예에서, 다른 아데노바이러스 유전자 또는 유전자 기능은 숙주 세포에 존재하지 않는다.

[0268] "E1a 유전자 생성물을 발현하는 아데노바이러스 DNA"는 E1a 또는 임의의 기능성 E1a 부분을 인코딩하는 임의의 아데노바이러스 서열을 의미한다. E2a 유전자 생성물을 발현하는 아데노바이러스 DNA 및 E4 ORF6 유전자 생성물을 발현하는 아데노바이러스 DNA는 유사하게 정의된다. 또한 아데노바이러스 유전자 또는 이의 기능적 부분의 임의의 대립유전자 또는 다른 변형이 포함된다. 이러한 변형은 어떤 방식으로든 아데노바이러스 기능을 향상시키기 위한 기존의 유전 공학 또는 돌연변이 유발 기법에 의지하여 의도적으로 도입될 수 있을 뿐만 아니라 자연적으로 발생하는 이의 대립유전자 변이체일 수 있다. 이러한 아데노바이러스 유전자 기능을 달성하기 위해 DNA를 조작하는 이러한 변형 및 방법은 당업자에게 공지되어 있다.

[0269] 아데노바이러스 E1a, E1b, E2a, 및/또는 E4ORF6 유전자 생성물 뿐만 아니라 임의의 다른 원하는 헬퍼 기능은 세포에서 이들의 발현을 허용하는 임의의 수단을 사용하여 제공될 수 있다. 이러한 생성물을 인코딩하는 각 서열은 별도의 벡터에 있을 수도 있고 하나 이상의 유전자가 동일한 벡터에 있을 수도 있다. 벡터는 플라스미드, 코스미드 및 바이러스를 포함하여 당업계에 공지되거나 상기 개시된 임의의 벡터일 수 있다. 벡터의 숙주 세포로의 도입은 특히 형질주입, 감염, 전기천공, 리포솜 전달, 막 융합 기법, 고속 DNA-코팅된 펠릿, 바이러스 감염 및 원형질체 융합을 포함하는 당업계에 공지된 또는 상기 개시된 임의의 수단에 의해 달성될 수 있다. 하나 이상의 아데노바이러스 유전자는 숙주 세포의 게놈에 안정적으로 통합되거나, 에피좀으로 안정적으로 발현되거나, 일시적으로 발현될 수 있다. 유전자 생성물은 모두 에피솜에서 일시적으로 발현되거나 안정적으로 통합될 수 있거나, 유전자 생성물 중 일부는 안정적으로 발현되는 반면 나머지는 일시적으로 발현될 수 있다. 또한, 각각의 아데노바이러스 유전자에 대한 프로모터는 구성적 프로모터, 유도성 프로모터 또는 천연 아데노바이러스 프로모

터로부터 독립적으로 선택될 수 있다. 프로모터는 유기체 또는 세포의 특정 생리학적 상태에 의해(즉, 분화 상태에 의해 또는 복제 또는 정지 세포에서) 또는 외인성으로 추가된 인자에 의해 조절될 수 있다.

[0270] **숙주 세포 및 패키징 세포주**

[0271] 숙주 세포 자체는 원핵(예를 들어, 박테리아) 세포를 포함하는 임의의 생물학적 유기체, 및 곤충 세포, 효모 세포 및 포유동물 세포를 포함하는 진핵 세포로부터 선택될 수 있다. 특히 바람직한 숙주 세포는 A549, WEHI, 3T3, 10T1/2, BHK, MDCK, COS 1, COS 7, BSC 1, BSC 40, BMT 10, VERO, WI38, HeLa, 293 세포(기능성 아데노바이러스 E1을 발현함), Saos, C2C12, L 세포, HT1080, HepG2 및 인간, 원숭이, 마우스, 래트, 토끼 및 햄스터를 포함하는 포유동물로부터 유래된 1차 섬유아세포, 간세포 및 근육아세포 세포를 제한 없이 포함하는 임의의 포유동물 종 중에서 선택된다. 세포를 제공하는 포유동물 종의 선택은 본 발명의 제한이 아니며; 포유동물 세포의 유형, 즉 섬유아세포, 간세포, 종양 세포 등도 마찬가지로 본 발명의 제한이 아니다. 사용되는 세포에 대한 요구 사항은 E1, E2a 및/또는 E4 ORF6 이외의 임의의 아데노바이러스 유전자를 운반하지 않는 것이고; rAAV 생산 중 오염 바이러스의 동종 재조합을 초래할 수 있는 임의의 다른 바이러스 유전자를 포함하지 않는 것이고; DNA의 감염 또는 형질주입 및 형질주입된 DNA의 발현이 가능해야 한다. 바람직한 구현예에서, 숙주 세포는 세포에서 안정적으로 형질주입된 rep 및 cap을 갖는 세포이다.

[0272] 본 발명에 유용한 하나의 숙주 세포는 rep 및 cap을 인코딩하는 서열로 안정적으로 형질전환된 숙주 세포이며, 아데노바이러스 E1, E2a 및 E4ORF6 DNA 및 상기 기재된 바와 같은 미니유전자를 운반하는 구성물로 형질주입된다. B-50(국제 특허 출원 공개 WO 99/15685) 또는 미국 특허 5,658,785에 기재된 것과 같은 안정적인 rep 및/또는 cap 발현 세포주도 또한 유사하게 사용될 수 있다. 또 다른 바람직한 숙주 세포는 E4 ORF6을 발현하기에 충분한 최소한의 아데노바이러스 DNA를 함유한다. 또 다른 세포주는 본 발명의 신규한 AAV9 cap 서열을 사용하여 구축될 수 있다.

[0273] rAAV를 생산하기 위한 하나의 플랫폼은 HEK293 세포를 2개 또는 3개의 플라스미드로 형질주입시키는 것을 포함하는데; 하나는 관심 유전자를 인코딩하고, 하나는 AAV rep/cap 유전자를 운반하고, 다른 하나는 아데노 또는 헤르페스 바이러스에 의해 제공되는 헬퍼 유전자를 함유한다. 롤러 버틀(roller bottles) 또는 세포 스택(cell stacks)에 부착된 세포을 사용하여 많은 견고한 생산 수준을 달성했다. 또한 현탁액-적응된 HEK293 세포에서 높은 생산 수준을 달성할 수 있다. 생산은 기재된 것에 제한되지 않고, 당업계에 공지된 개선된 생산 기술을 통합할 수 있다.

[0274] 패키징 숙주 세포로의 분자(플라스미드 또는 바이러스로서)의 도입은 또한 당업자에게 공지되고 명세서 전반에 걸쳐 논의된 바와 같은 기법을 사용하여 달성될 수 있다. 바람직한 구현예에서, 표준 형질주입 기법, 예를 들어 CaPO4 형질주입 또는 전기천공법, 및/또는 하이브리드 아데노바이러스/AAV 벡터에 의한 인간 배아 신장 세포주 HEK 293(트랜스-작용 E1 단백질을 제공하는 기능성 아데노바이러스 E1 유전자을 함유하는 인간 신장 세포주)과 같은 세포주로의 감염이 사용된다.

[0275] 당업자는 AAV 서열이 시험관내, 생체외 또는 생체내 유전자 전달을 위해 쉽게 적응될 수 있음을 쉽게 이해할 것이다. 유사하게, 당업자는 다양한 rAAV 및 비-rAAV 벡터 시스템에서 사용하기 위해 AAV 게놈의 다른 단편을 쉽게 선택할 수 있다. 그러한 벡터 시스템은 특히, 예를 들어 렌티바이러스, 레트로바이러스, 폭스바이러스, 백시니아 바이러스 및 아데노바이러스 시스템을 포함할 수 있다. 이들 벡터 시스템의 선택은 본 발명의 제한이 아니다.

[0276] **소포 지시 단백질의 정제**

[0277] 발현 및 분비 후, 융합 단백질을 함유하는 엑소좀 및 세포외 소포는 표준 기법을 사용하여 주변 세포 배양 배지로부터 분리 및 정제될 수 있다. 일부 구현예에서, 엑소좀 및 세포외 소포는 침전 및 세척에 의해 정제될 수 있다. 일부 구현예에서, 정제된 엑소좀 및 세포외 소포는 추가로 용해되어 내부로부터 융합 단백질을 정제할 수 있다.

[0278] **정제된 융합 단백질의 변형**

[0279] 하나 이상의 구현예에서, 정제된 융합 단백질은 지질 접합된다. 하나 이상의 구현예에서, 지질 접합 과정은 미리스토일화를 포함한다. 하나 이상의 구현예에서, 지질 접합 과정은 팔미토일화를 포함한다. 하나 이상의 구현예에서, 지질 접합 과정은 프레닐화를 포함한다. 하나 이상의 구현예에서, 지질 접합 과정은 글리코실포스파티딜이노시톨 앵커 단백질을 포함한다.

[0280] 하나 이상의 구현예에서, 융합 단백질 또는 지질 접합 융합 단백질은 지질 소포로 재구성된다. 일부 구현예에서, 지질 소포는 엑소좀 또는 합성 소포이다.

[0281] **융합 단백질의 교차-교정 효율 결정**

[0282] 하나의 세포에서 생성된 단백질 또는 유전자 생성물이 형질도입되지 않은 세포에 들어가 영향을 미칠 수 있는 메커니즘(교차-교정이라고 함)을 설계하는 것은 안전성과 효능을 개선하기 위한 실행가능한 전략이다. 특히, 교차-교정은 형질도입되지 않은 세포에 치료용 거대분자를 전달함으로써 치료 효과를 극대화한다. 이런 식으로 전체 조직에 잠재적인 영향을 미치기 위해 소수의 세포만 형질도입하면 된다. 바이러스 벡터 투여량을 줄일 수 있으므로 유해 사례 위험이 감소하고 용량당 비용이 절감된다.

[0283] 하나 이상의 구현예에서, 융합 단백질에 대한 교차-교정 효율이 측정되며, 여기서 형광 단백질 태그를 갖는 융합 단백질을 인코딩하는 벡터로 형질주입된 세포는 형질주입되지 않은 세포와 공동-배양되고 형광 현미경 하에서 가시화된다. 일부 구현예에서, 세포는 COS-7이다. 일부 구현예에서, 형광 단백질 태그는 mCherry 태그이다. 일부 구현예에서, 융합 단백질의 치료 단백질은 CDKL5를 포함한다. 일부 구현예에서, 융합 단백질의 치료 단백질은 알파-갈락토시다제 A를 포함한다.

[0284] 하나 이상의 구현예에서, 융합 단백질에 대한 교차-교정 효율은 생체내에서 측정된다. 일부 구현예에서, 융합 단백질은 MyrED27(서열번호 57), MyrED77(서열번호 107), MyrED81(서열번호 111) 또는 MyrED88(서열번호 118)을 포함한다. 일부 구현예에서, 생체내 연구는 마우스 배아를 사용하는 것을 포함한다. 따라서, 일부 구현예에서, 자궁 내부의 배아 뇌에 플라스미드를 직접 주입하고/하거나 플라스미드가 뇌 세포에 들어갈 수 있도록 전기천공한다. 일부 구현예에서, 상대적 형질도입 효율을 결정하기 위해 양성 대조군이 사용된다. 일부 구현예에서, 양성 대조군 구성물은 BiP-mCherry-IRES-GFP를 포함한다. 일부 구현예에서, 플라스미드는 형질주입된 세포가 GFP 및 mCherry를 발현하는 반면, 교차-교정된 세포는 mCherry만을 함유하도록 한다. 교차-교정된 세포는 mCherry를 발현하지 않으며, 형질전환된 세포에서 이미 번역된 단백질을 받는다. 일부 구현예에서, 배아는 4일 후 E18.5에서 수확된다. 일부 구현예에서, 배아 뇌 섹션은 GFP 및 mCherry의 존재에 대해 형광 이미지화되고 양성 대조군과 비교된다.

[0285] **막 연관-ED 변이체를 함유하는 융합 단백질의 상대적인 발현 결정**

[0286] 일부 구현예에서, 엑소솜에서 막 연관-ED 변이체를 함유하는 융합 단백질의 상대적인 발현은 웨스턴 블롯 분석에 의해 결정될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포는 COS-7 또는 Expi293일 수 있다. 하나 이상의 구현예에서, 형광 단백질 태그는 mCherry 태그일 수 있다.

[0287] **환자에게 융합 단백질 전달**

[0288] 본 발명의 또 다른 양태는 융합 단백질 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 제형에 관한 것이다.

[0289] 본 발명의 또 다른 양태는 약제학적 제형을 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는 질병 또는 장애의 치료 방법에 관한 것이다. 일부 구현예에서, 질병 또는 장애는 CDKL5-매개 신경학적 장애를 포함하고 치료 단백질은 CDKL5를 포함한다. 일부 구현예에서, 질병 또는 장애는 파브리병을 포함하고 치료 단백질은 알파-갈락토시다제 A를 포함한다. 일부 구현예에서, 질병 또는 장애는 폼페병을 포함하고 치료 단백질은 알파-글루코시다제를 포함한다.

[0290] 하나 이상의 구현예에서, 약제학적 조성물은 질병 또는 장애를 예방하기 위한 예방제로서 투여된다.

[0291] 하나 이상의 구현예에서, 약제학적 제형은 척수강내, 두개내, 대수조내, 정맥내, 수조내, 뇌실내, 또는 실질내로 투여된다.

[0292] **유전자 치료**

[0293] 본 발명의 또 다른 양태는 유전자 치료에서의 적용이다. 일부 구현예에서, 유전자 치료 조성물은 유전자 치료 전달 시스템 및 조작된 단백질을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된 단백질은 융합 단백질을 포함한다. 일부 구현예에서, 유전자 치료 전달 시스템은 벡터, 리포솜, 지질-핵산 나노입자, 엑소좀 및 유전자 편집 시스템 중 하나 이상일 수 있다. 일부 구현예에서, 유전자 치료 전달 시스템은 군집된 규칙적으로 간격을 둔 짧은 회문 반복부(CRISPR) 연관 단백질 9(CRISPR-Cas-9), 전사 활성제-유사 이펙터 뉴클레아제(TALEN) 또는 ZNF(아연 핑거 단백질) 중 하나 이상을 포함한다. 일부 구현예에서, 유전자 치료 전달 시스템

은 프로모터를 포함한다. 일부 구현예에서, 유전자 치료 전달 시스템은 리더 신호 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다.

[0294] 일부 구현예에서, 유전자 치료 전달 시스템은 바이러스 벡터일 수 있다. 바이러스 벡터는 아데노바이러스 벡터, 아데노-연관 바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 폭스바이러스 벡터 또는 단순 헤르페스 바이러스 벡터 중 하나 이상을 포함한다. 바이러스 벡터는 또한 프로모터(예를 들어, 하이브리드 CBA 프로모터(CBh) 및 인간 시냅신 1 프로모터(hSyn1)), 폴리아데닐화 신호(예를 들어, 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 신호(bGHpolyA)), 안정화 요소(예를 들어, 우드척 간염 바이러스(WHP) 전사 후 조절 요소(WPRE)) 및/또는 SV40 인트론과 같은 또한 발현 증가 및/또는 벡터 안정화를 위한 추가 요소를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 바이러스 벡터는 조작된 단백질을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동가능하게 연결된 바이러스 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 바이러스 벡터는 적어도 하나의 역위 말단 반복부(ITR)를 포함한다.

[0295] 하나 이상의 구현예에서, 유전자 치료 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 약제학적으로 허용되는 담체는 화합물과 함께 투여되는 희석제, 보조제, 부형제 또는 비히클을 포함한다.

[0296] 본 발명의 다양한 양태는 유전자 치료 조성물을 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는 질병 또는 장애의 치료 방법에 관한 것이다. 하나 이상의 구현예에서, 유전자 치료 조성물은 척수강내, 두개내, 대수조내, 정맥내, 수조내, 뇌실내, 또는 실질내로 투여된다.

[0297] 재조합 바이러스 및 이의 용도

[0298] 본원에 기재된 기법을 사용하여, 당업자는 본원에 제공된 AAV의 캡시드를 갖고 원하는 전이유전자를 포함하는 미니유전자를 호스팅하는 rAAV를 생성할 수 있다. 한 구현예에서, 단일 AAV로부터의 전장 캡시드가 이용될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 또 다른 선택된 AAV 또는 동일한 AAV의 이종(즉, 비연속) 부분으로부터의 서열과 프레임 내에서 융합된 신규 AAV 캡시드의 하나 이상의 단편을 함유하는 전장 캡시드가 생성될 수 있다. 대안적으로, 독특한 AAV 서열은 다른 바이러스 또는 비-바이러스 서열을 포함하는 구성물에서 사용될 수 있다.

[0299] 바이러스 전달

[0300] 원하는 전이유전자를 포함하는 미니유전자를 함유하는 rAAV는 다수의 이용가능한 투여 방법 중 하나에 의해 생체내 엑소좀을 생성하기 위해 표적 세포에 직접 투여될 수 있다. 예를 들어, 투여는 경구, 비경구, 설하, 경피, 직장, 경점막, 국소, 흡입, 협측 투여, 흉막내, 정맥내, 동맥내, 복강내, 피하, 근육내, 비강내, 림프관내, 안구주위, 척수강내, 및 관절내 또는 이들의 조합을 포함하는 상이한 수의 투여 경로 중 하나에 의한 것일 수 있다. 수의학적 사용을 위해, rAAV는 통상적인 수의학적 관행에 따라 적합하게 허용되는 제형으로 투여될 수 있다. 수의사는 특정 동물에 가장 적합한 투약 요법과 투여 경로를 쉽게 결정할 수 있다. 바람직하게는, 전이유전자와 함께 미니유전자를 함유하는 rAAV 벡터는 전통적인 주사기, 무바늘 주입 장치에 의해 , "미소발사체 폭격 유전자 총" 또는 전기천공법("EP"), "유체역학 방법" 또는 초음파와 같은 다른 물리적 방법에 의해 투여될 수 있다.

[0301] 일 구현예에서, 본 발명은 전이유전자를 숙주로 AAV-매개 전달하는 방법을 제공한다. 이 방법은 선택된 숙주 세포를 이의 발현을 지시하는 서열 및 AAV9 캡시드 단백질의 제어 하에 선택된 전이유전자를 함유하는 재조합 바이러스 벡터로 형질주입 또는 감염시키는 것을 수반한다.

[0302] 선택적으로, 숙주로부터의 샘플은 선택된 AAV 공급원(예를 들어, 혈청형)에 대한 항체의 존재에 대해 먼저 검정될 수 있다. 중화 항체를 검출하기 위한 다양한 검정 형식은 당업자에게 잘 알려져 있다. 그러한 검정의 선택은 본 발명의 제한이 아니다. 예를 들어, 문헌[Fisher et al, Nature Med , 3(3):306-312 (March 1997) 및 W C Manning et al, Human Gene Therapy, 9:477-485 (March 1, 1998)]을 참조한다. 이 검정의 결과는, 예를 들어 해당 캡시드 공급원에 특이적인 중화 항체의 부재에 의해 특정 공급원의 캡시드 단백질을 함유하는 AAV 벡터가 전달에 바람직한지 결정하는 데 사용될 수 있다.

[0303] 이 방법의 한 양태에서, AAV 캡시드 단백질을 갖는 벡터의 전달은 상이한 AAV 캡시드 단백질을 갖는 벡터를 통한 유전자의 전달에 선행하거나 후속할 수 있다. 따라서, rAAV 벡터를 통한 유전자 전달은 선택된 숙주 세포로의 반복 유전자 전달에 사용될 수 있다. 바람직하게는, 후속 투여된 rAAV 벡터는 제1 rAAV 벡터와 동일한 전이유전자를 갖지만, 후속 투여되는 벡터는 제1 벡터와 상이한 공급원(및 바람직하게는, 상이한 혈청형)의 캡시드 단백질을 함유한다.

[0304] 선택적으로, 다수의 rAAV 벡터는 단일 벡터 게놈을 형성하기 위해 생체내에서 연쇄체화되는 rAAV 벡터의 공동-

투여에 의해 큰 전이유전자 또는 다중 전이유전자를 전달하는 데 사용될 수 있다. 이러한 구현예에서, 제1 AAV는 단일 전이유전자(또는 이의 서브유닛)를 발현하는 발현 카세트를 운반할 수 있고, 제2 AAV는 숙주 세포에서 공동-발현을 위해 제2 전이유전자(또는 상이한 서브유닛)를 발현하는 발현 카세트를 운반할 수 있다. 제1 AAV는 폴리시스트론 구성물의 제1 조각(예를 들어, 프로모터 및 전이유전자 또는 서브유닛)인 발현 카세트를 운반할 수 있고, 제2 AAV는 폴리시스트론 구성물의 제2 조각(예를 들어, 전이유전자 또는 서브유닛 및 폴리A 서열)인 발현 카세트를 운반할 수 있다. 폴리시스트론 구성물의 이 두 조각은 제1 및 제2 AAV에 의해 전달되는 전이유전자를 공동-발현하는 단일 벡터 게놈을 형성하기 위해 생체 내에서 연쇄체화된다. 이러한 구현예에서, 제1 발현 카세트를 운반하는 rAAV 벡터 및 제2 발현 카세트를 운반하는 rAAV 벡터는 단일 약제학적 조성물로 전달될 수 있다. 다른 구현예에서, 2개 이상의 rAAV 벡터는 실질적으로 동시에, 또는 서로 직전 또는 직후에 투여될 수 있는 별개의 약제학적 조성물로서 전달된다.

[0305] 상기 기재된 재조합 벡터는 공개된 방법에 따라 대상체에게 전달될 수 있다. 바람직하게는 생리학적으로 적합한 담체에 현탁된 rAAV는 인간 또는 비인간 포유동물 환자에게 투여될 수 있다. 적합한 담체는 전달 바이러스가 지시하는 적응증을 고려하여 당업자에 의해 용이하게 선택될 수 있다. 예를 들어, 하나의 적합한 담체는 다양한 완충 용액(예를 들어, 인산염 완충 식염수)으로 제형화될 수 있는 식염수를 포함한다. 다른 예시적인 담체는 멸균 염수, 락토스, 수크로스, 인산칼슘, 젤라틴, 덱스트란, 한천, 펙틴, 땅콩유, 참기름 및 물을 포함한다. 담체의 선택은 본 발명의 제한이 아니다.

[0306] 선택적으로, 본 발명의 조성물은 rAAV 및 담체(들) 이외에, 방부제 또는 화학적 안정화제와 같은 다른 통상적인 약제학적 성분을 함유할 수 있다. 적합한 예시적인 방부제는 클로로부탄올, 칼륨 소르베이트, 소르브산, 이산화황, 프로필 갈레이트, 파라벤, 에틸 바닐린, 글리세린, 페놀 및 파라클로로페놀을 포함한다. 적합한 화학적 안정화제는 젤라틴 및 알부민을 포함한다.

[0307] 벡터는 세포를 형질주입시키고 충분한 수준의 유전자 전달 및 발현을 제공하여 과도한 역효과 없이 또는 의학적으로 허용되는 생리학적 효과를 가지는 치료적 이점을 제공하기에 충분한 양으로 투여되며, 이는 의학 분야의 당업자에 의해 결정될 수 있다. 통상적이고 약제학적으로 허용되는 투여 경로는 원하는 기관(예를 들어, 간(선택적으로 간동맥을 통해) 또는 폐)으로의 직접 전달, 경구, 흡입, 비강내, 기관내, 동맥내, 안구내, 정맥내, 근육내, 피하, 피내 및 기타 비경구 투여 경로를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 원하는 경우 투여 경로를 조합할 수 있다.

[0308] 바이러스 벡터의 투여량은 주로 치료될 병태, 환자의 연령, 체중 및 건강과 같은 요인에 따라 달라지므로 환자마다 다를 수 있다. 예를 들어, 바이러스 벡터의 치료학적으로 효과적인 인간 투여량은 일반적으로 약 1×10^{9} 내지 1×10^{16}개 게놈 바이러스 벡터의 농도를 함유하는 용액 약 0.1 mL 내지 약 100 mL 범위이다. 큰 기관(예를 들어, 간, 근육, 심장 및 폐)으로의 전달을 위한 바람직한 인간 투여량은 약 1 내지 100 mL의 부피에서 1 kg당 약 5×10^{10} 내지 5×10^{13}개 AAV 게놈일 수 있다. 눈으로의 전달을 위한 바람직한 투여량은 약 0.1 mL 내지 1 mL의 부피에서 약 5×10^{9} 내지 5×10^{12}개 게놈 카피이다. 투여량은 임의의 부작용에 대한 치료적 이점의 균형을 맞추도록 조정될 것이며 이러한 투여량은 재조합 벡터가 사용되는 치료 적용에 따라 달라질 수 있다. 전이유전자의 발현 수준은 바이러스 벡터, 바람직하게는 미니유전자를 함유하는 AAV 벡터를 초래하는 투여 빈도를 결정하기 위해 모니터링될 수 있다. 선택적으로, 치료 목적을 위해 기재된 것과 유사한 투여 요법이 본 발명의 조성물을 사용하는 면역화에 이용될 수 있다.

[0309] AAV-함유 벡터에 의한 전달을 위한 치료 생성물 및 면역원성 생성물의 예는 아래에 제공된다. 이들 벡터는 본원에 기재된 바와 같이 다양한 치료 또는 백신 요법을 위해 사용될 수 있다. 추가로, 이들 벡터는 원하는 치료 및/또는 백신 요법에서 하나 이상의 다른 벡터 또는 활성 성분과 조합하여 전달될 수 있다.

[0310] 생체내 엑소좀 매개 유전자 전달

[0311] 엑소좀은 B 림프구, T 림프구, 수지상 세포(DC) 및 대부분의 세포와 같은 면역 세포를 포함하는 많은 상이한 유형의 세포에 의해 생산된다. 엑소좀은 또한, 예를 들어 신경아교종 세포, 혈소판, 망상적혈구, 뉴런, 장 상피 세포 및 종양 세포에 의해 생성된다. 이들이 정의하는 이러한 세포 유형 및 조직은 조작된 단백질을 인코딩하는 유전자를 사용하여 엑소좀 생산을 위해 표적이 될 수 있다. 이러한 표적화는 조작된 단백질을 인코딩하는 유전자를 포함하여 제공된 미니유전자를 함유하는 rAAV 구성물로의 형질도입에 의해 달성된다.

[0312] 본 발명의 바람직한 양태에서, DC, 바람직하게는 미성숙 DC로부터 유도된 엑소좀이 표적이 된다. 미성숙 DC에서

생성된 엑소좀은 MHC-II, MHC-I 또는 CD86을 발현하지 않는다. 이와 같이, 이러한 엑소좀은 미경험 T 세포를 상당한 정도로 자극하지 않으며 혼합 림프구 반응에서 반응을 유도할 수 없다. 따라서 미성숙 수지상 세포에서 생성된 엑소좀은 유전자 치료와 같은 유전 물질 전달을 위한 비히클로서 표적으로 삼기에 이상적인 후보이다.

[0313] 엑소좀에 혼입하기 위한 핵산은 단일 또는 이중 가닥일 수 있다. 단일 가닥 핵산은 포스포디에스터, 2'O-메틸, 2' 메톡시-에틸, 포스포르아미데이트, 메틸포스포네이트 및/또는 포스포로티오에이트 백본 화학을 갖는 것들을 포함한다. 통상적으로는, 예를 들어 플라스미드 DNA 및 작은 간섭 RNA(siRNA)를 포함하는 이중-가닥 핵산이 도입된다.

[0314] 엑소좀 표적화(교차-교정을 위함)

[0315] 본 발명은 또한 근육 위성, 줄기 또는 이환된(섬유증 또는 근육 변성) 세포와 같은 일부 세포가 형질도입하기 어렵기 때문에, 교차-교정을 가능하게 하는 원하는 세포 유형 또는 조직에 대한 엑소좀의 표적화에 관한 것이다. 이러한 표적화는 교차-교정을 필요로 하는 세포 유형의 표면 상에 발현된 세포 표면 모이어티에 결합하는 표적화 모이어티를 엑소좀의 표면 상에 발현함으로써 달성된다. 통상적으로, 표적화 모이어티는 엑소좀의 표면 상에 통상적으로 발현되는 막관통 단백질을 갖는 조작된 단백질로서 발현되는 펩티드이다.

[0316] 교차-교정을 위한 표적 세포에 적합한 펩티드는 표적화될 세포의 세포 표면에서 발견되는 수용체 또는 이들의 리간드와 같은 세포 표면 모이어티에 결합하는 것들이다. 적합한 표적화 모이어티의 예는 표적화 모이어티가 엑소좀의 표면에서 발현될 수 있고 막 단백질이 엑소좀으로 삽입되는 것을 방해하지 않는 한, 짧은 펩티드, scFv 및 완전한 단백질이다. 통상적으로, 표적화 펩티드는 막관통 엑소좀 단백질에 대해 이종성이다. 펩티드 표적화 모이어티는 통상적으로 길이가 100개 미만의 아미노산, 예를 들어 길이가 50개 미만의 아미노산, 길이가 30개 미만의 아미노산, 최소 길이가 10, 5 또는 3개의 아미노산일 수 있다.

[0317] 표적 모이어티는, 예를 들어 근육, 뇌, 간, 췌장 및 폐와 같은 특정 조직 유형을 표적으로 하거나 종양과 같은 이환된 조직을 표적으로 삼도록 선택될 수 있다. 본 발명의 특히 바람직한 구현예에서, 엑소좀은 뇌 조직을 표적으로 한다.

[0318] 표적화 모이어티의 특정 예는 골격근을 표적화하기 위한, 파지 디스플레이에 의해 발견된 근육 특이적 펩티드, 아세틸콜린 수용체에 결합하는 광견병 바이러스 당단백질의 29개 아미노산 단편 또는 뉴런을 표적화 하기 위한, 이의 수용체를 표적으로 하는 신경 성장 인자의 단편을 포함하고 세크레틴 수용체에 결합하는 세크레틴 펩티드는 담즙 및 췌장 상피를 표적화하는 데 사용될 수 있다. 대안으로, scFv 항체 단편을 포함한 면역글로불린 및 그 유도체는 또한 암 유전자 치료를 위한 VEGFR과 같은 특정 항원을 표적으로 하는 조작된 단백질로서 발현될 수 있다. 대안으로, 수용체에 대한 천연 리간드는 NGFR에 결합하고 뉴런-특이적 표적화를 부여하는 NGF와 같은 특이성을 부여하기 위해 조작된 단백질로 발현될 수 있다.

[0319] 펩티드 표적화 모이어티는 엑소좀을 엑소좀 막관통 단백질로 조작된 단백질로 발현함으로써 엑소좀의 표면에서 발현된다. 일부 구현예에서, 엑소좀 막관통 단백질은 Lamp-1, Lamp-2, CD13, CD86, 플로틸린, 신탁신-3, CD2, CD36, CD40, CD40L, CD41a, CD44, CD45, ICAM-1, 인테그린 알파4, LiCAM, LFA-1, Mac-1 알파 및 베타, Vti-1A 및 B, CD3 입실론 및 제타, CD9, CD18, CD37, CD53, CD63, CD81, CD82, CXCR4, FcR, G1uR2/3, HLA-DM(MHC II), 면역글로불린, MHC-I 또는 MHC-II 성분, TCR 베타 및 테트라스파닌 중 하나 이상일 수 있다. 본 발명의 특히 바람직한 구현예에서, 막관통 단백질은 Lamp-1, Lamp-2, CD13, CD86, 플로틸린, 신탁신-3으로부터 선택된다.

[0320] **치료 방법**

[0321] 원하는 전이유전자를 포함하는 미니유전자를 함유하는 하나 이상의 rAAV 벡터를 투여함으로써 이를 필요로 하는 대상체에서 질병을 치료, 보호 및/또는 예방하는 방법이 본원에 제공된다. 전이유전자를 대상체에게 투여하면 엑소좀 전달 경로를 통해 대상체에게 유전자 치료를 제공할 수 있다. 이는 유전자 치료의 표적이 되는 세포가 질병에 걸리거나 접근하기 어렵거나(예를 들어, 뇌 세포에 대한 혈액-뇌 장벽), 면역 반응에 매우 민감하기 때문에 형질도입에 어려움이 있을 때, 본원에 기재된 바와 같은 엑소좀을 통한 전달에 특히 유용하다.

[0322] 유전자 치료에 이상적인 유전적 결함에 의해 유발되는 질병의 예는 기타 잠재적 유전자 치료 표적 중에서, 유전성 망막 질병(보레티진 네파르보벡-RPE65를 포함함), X-연관 망막분리증 및 색맹, X-연관 색소성 망막염, 및 연령-관련 황반 변성, 지단백 리파아제(LPL) 결핍(LPL 유전자), 레베르 선천성 흑암시(안과 질병)(RPE-특이적 단백질 RPE65 유전자), 맥락막결핍증(안과 질병)(REP-1 유전자), 색맹(실명)(CNGA3 유전자), 레베르 유전성 시신경병증(안과 질병)(G11778A 미토콘드리아 유전자), X-연관 소아망막분리증(안과 질병) (XLRS 유전자), 혈우병 A(FVIII 유전자), 혈우병 B(FIX 유전자), 알파-항트립신 (AAT) 결핍증(AAT 유전자), 척수성 근위축증(SMN 유전

자), 뒤시엔느 근이영양증(microDMD 유전자), 지대형 근이영양증 유형 2D(알파-사르코글리칸 유전자), 베커 근이영양증 산발성 봉입체 근염(폴리스타틴 유전자), 디스페린 결핍증(디스페린 유전자), 류마티스 관절염(NF-kB 및 IFN-베타 유전자), 이색성 백질이영양증(ARSA 유전자), 알츠하이머병(NGF 유전자), 특발성 파킨슨병(뉴투린 유전자), AADC 결핍에 대한 유전자 효소 대체 요법(GERT)(AADC 유전자), LINCL에 대한 GERT(바텐병의 형태)(TPP1 유전자), MPSIIIA에 대한 GERT(산필리포 A 증후군)(SGSH 유전자), 혈중 암모니아 축적을 교정하기 위한 GERT(OTC 유전자) 및 간염(C형 간염 바이러스)이다.

[0323] **키트**

[0324] 본 개시내용은 약제학적 조성물 및 사용 지침서를 포함하는 키트를 제공한다. 본 개시내용은 또한 유전자 치료 조성물 및 사용 지침서를 포함하는 키트를 제공한다.

[0325] **실시예**

[0326] **실시예-1**

[0327] **[A] 융합 단백질을 엑소좀에 표적화하기 위한 절단된 MARCKS 변이체 설계**

[0328] MARCKS 단백질의 4개의 절단된 변이체, 즉 MARCKS에서 ED, MARCKS ED 없음, MARCKS ED 단독 및 MyrED는 MARCKS 단백질의 어떤 부분이 융합 단백질을 엑소좀에 표적화하는 데 필수적인지를 확인하기 위해 설계되었다. 도 1은 4개의 절단된 MARCKS 단백질 변이체의 개략도를 나타낸다.

[0329] 4개의 절단된 MARCKS 단백질 변이체 각각을 mCherry를 사용하여 플라스미드로 클로닝하였다. Cos-7 세포를 플라스미드로 형질주입시켰다. CD63 단백질은 엑소좀을 표적으로 한다. 도 2는 mCherry(왼쪽) 및 엑소좀 단백질 CD63(오른쪽)에 대해 지시된 항-CD63 항체에 대한 면역-시각화 이미지이다. 도면은 MARCKS에서 ED, MARCKS ED 단독 또는 MyrED에 융합될 때 mCherry 형광 단백질이 엑소좀 단백질 CD63과 공동-국소화됨을 나타낸다.

[0330] **[B] 융합 단백질에 대한 절단된 MARCKS의 교차-교정 능력 결정.**

[0331] 2개의 구성물, 즉 mCherry 태그를 갖는 mMARCKS에서 ED 및 MyrED를 생성하였다. Cos-7 세포를 구성물로 형질주입시켰다. Cos-7 세포를 또한 분비 단백질인 BiPa 및 음성 대조군으로서 mCherry로 형질주입시켰다. 형질주입된 세포를 비-형질주입 Cos-7 세포와 공동-배양하였다. 도 3의 형광 이미지는 두 구성물 모두 이웃한 비형질주입 세포에 들어갈 수 있는 능력을 가짐을 나타낸다.

[0332] mCherry 태그가 있는 mMARCKS에서 ED 및 MyrED의 두 구성물을 사용하여 Cos-7 세포를 형질주입시켰다. 분비성 양성 대조군을 위해, Cos-7 세포를 mCherry로 태그된 BiPa로 형질주입시켰다. 형질주입된 Cos-7 세포를 mCherry 구성물 형질주입된 293T 세포로부터 생성된 조절 배지로 처리된 비-형질주입 DIV15 1차 피질 뉴런 세포와 함께 공동-배양하였다. 도 4는 주변의 비형질주입 뉴런 세포에 들어갈 수 있는 능력을 가진 구조물의 형광 이미지를 나타낸다.

[0333] **실시예-2**

[0334] **[A] 융합 단백질을 엑소좀에 표적화하기 위한 MyrED 변이체 설계.**

[0335] 융합 단백질에 대한 소포 표적화 능력을 개선하기 위해 MyrED 단백질의 34개 변이체를 설계하였다. 도 5는 본 발명을 위해 설계된 다양한 MyrED 서열의 정렬을 나타낸다.

[0336] Expi293F 세포를 mCherry와 융합된 MyrED 단백질 변이체, MyrGag단독, MyrED6(서열번호 36), MyrED7(서열번호 37), MyrED8(서열번호 38), MyrED9(서열번호 39) 및 Δ45-MARCKS-ED를 각각 인코딩하는 폴리뉴클레오티드로 형질주입시켰다. 음성 대조군을 위해, (1) 모의 p-시그널로 형질주입된 Expi293F 세포 및 (2) 비형질주입 Expi293F 세포를 사용하였다. Expi293 발현 배지에서 세포를 성장시켰다. 도 6a에 나타낸 바와 같이 24시간 및 48시간에서 조절 배지의 형광 강도를 측정하였다. mCherry를 함유하는 엑소좀을 48시간 후에 조절 배지로부터 정제하였고 도 6b에 나타낸 바와 같이 상대 형광 강도를 측정하였다. 도 6c는 mCherry가 이 실험을 위해 테스트된 모든 MyrED 변이체에서 엑소좀을 표적으로 한다는 것을 보여주는 웨스턴 블롯 분석을 나타낸다.

[0337] 유사하게, Expi293F 세포를 mCherry와 융합된 각각의 MyrED 단백질 변이체, MyrED6(서열번호 36), MyrED7(서열번호 37), MyrED8(서열번호 38), MyrED10(서열번호 40), MyrED11(서열번호 41), MyrED12(서열번호 42), MyrED13(서열번호 43), MyrED14(서열번호 44), MyrED15(서열번호 45), MyrED16(서열번호 46), MyrED17(서열번호 47), MyrED18(서열번호 48), MyrED19(서열번호 49), MyrED20(서열번호 50), MyrED21(서열번호 51),

MyrED22(서열번호 52), MyrED23(서열번호 53), MyrED24(서열번호 54), MyrED25(서열번호 44) 및 MyrED26(서열번호 56)을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드로 형질주입시켰다. Expi293F 세포를 분비 양성 대조군으로서 BiPa 및 mCherry로 형질주입시켰다. 음성 대조군을 위해, (1) 모의 p-시그널로 형질주입된 Expi293F 세포 및 (2) 비형질주입 Expi293F 세포를 사용하였다. Expi293 발현 배지에서 세포를 성장시켰다. 도 7a에 나타낸 바와 같이 48시간 및 96시간에서 조절 배지의 형광 강도를 측정하였다. mCherry를 포함하는 엑소좀을 Expi293 발현 배지로부터 정제하고 도 7b에 나타낸 바와 같이 상대 형광 강도를 측정하였다. mCherry가 포함된 MyrED13 및 MyrED17을 추가로 사용하여 Cos-7 세포를 형질주입시켰다. 도 7c는 MyrED13 및 MyrED17에 대해 CD63(오른쪽)과 공동-국소화하는 mCherry(왼쪽)를 나타낸다.

[0338] **실시예-3**

[0339] **[A] 엑소좀을 표적으로 하는 α-D-글루코피라노시드 단백질의 결정.**

[0340] 융합 단백질인 MyrED13-GAA-HPC4를 인코딩하는 구성물을 사용하여 Cos-7 세포를 형질주입시켰다. CD63 단백질은 엑소좀을 표적으로 한다. 도 8a는 항-HPC4(오른쪽 위) 및 엑소좀 단백질 CD63에 대한 항-CD63 항체(오른쪽 아래)에 대한 면역-시각화 이미지를 나타낸다. 도면은 융합 단백질과 엑소좀 단백질 CD63의 공동-국소화를 나타낸다.

[0341] MyrED13(서열번호 43), MyrED14(서열번호 44) 및 MyrED17(서열번호 47)과 융합된 GAA 단백질을 인코딩하는 구성물로 세포를 형질주입시켰다. 세포를 분비성 양성 대조군으로서 BiP-GAA로 형질주입시켰다. 음성 대조군의 경우, (1) 모의 p-시그널로 형질주입된 세포 및 (2) 비형질주입 세포를 사용하였다. 세포를 발현 배지에서 성장시켰다. 융합 단백질을 함유하는 엑소좀을 형광 조절 배지로부터 정제하고 이스턴 블롯 분석을 수행하였다. 도 8b는 융합 단백질이 엑소좀을 표적으로 한다는 것을 나타낸다.

[0342] **[B] 엑소좀을 표적으로 하는 CDKL5 단백질의 결정.**

[0343] MyrED13(서열번호 43), MyrED14(서열번호 44) 및 MyrED17(서열번호 47)과 CDKL5 단백질 융합을 인코딩하는 구성물로 세포를 형질주입시켰다. 세포를 분비 양성 대조군으로서 N_Tatk28로 형질주입시켰다. 음성 대조군의 경우, (1) 모의 p-시그널로 형질주입된 세포 및 (2) 비형질주입 세포를 사용하였다. 세포를 발현 배지에서 성장시켰다. 융합 단백질을 함유하는 엑소좀을 형광 조절 배지로부터 정제하고 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다. 도 7c는 융합 단백질이 엑소좀을 표적으로 한다는 것을 나타낸다.

[0344] **실시예-4**

[0345] **[A] 생체내 엑소좀의 형질도입 효율 결정.**

[0346] 융합 단백질을 인코딩하는 형질도입을 위한 구성물을 제조하였으며, 여기서 융합 단백질은 MyrED27-mCherry(서열번호 160), MyrED77-mCherry(서열번호 107로 나타낸 MyrED77), MyrED81-mCherry(서열번호 161) 또는 MyrED88-mCherry(서열번호 162)를 포함하였다. Bip-mCherry를 대조군으로 사용하였다. 또한, 각각의 구성물은 IRES-GFP 마커를 추가로 포함하였다. 마커는 형질도입된 세포를 식별하는 기능을 했다.

[0347] 각각의 구성물을 사용하여 마우스 배아를 형질도입하였다. 구체적으로, 자궁 내부의 배아 뇌에 플라스미드를 직접 주입하고/하거나 플라스미드가 세포에 들어갈 수 있도록 전기천공했다. 그런 다음 배아를 4일 후 E18.5에서 수확하였다.

[0348] 간 추출물을 웨스턴 블롯으로 mCherry 단백질의 존재에 대해 분석하였다. 도 9는 간에서 mCherry 및 GFP 발현의 웨스턴 블롯 분석을 나타낸다. 이 분석은 잠재적인 장거리 교차-교정과 혈액-뇌 장벽으로부터의 탈출을 시사한다.

[0349] 배아 뇌 섹션을 GFP 및 mCherry의 존재에 대해 형광 이미지하였다. 형질주입된 세포만 GFP를 발현한 반면, 교차-교정 세포는 mCherry만 발현했다. 도 10a 내지 10c는 mCherry의 MyrED27 매개 형질도입의 이미지 분석을 나타낸다. 도 10a는 GFP 형질주입된 세포를 나타내고, 도 10b는 mCherry 교차-교정된 세포를 나타내고, 도 10c는 이들의 병합 이미지를 나타낸다. 도 9 및 10a 내지 10c의 결합된 분석은 MyrED27이 교차-교정에 사용될 수 있는 축삭 표적화 및 막 연관된 구성물임을 시사한다. 그러나, 하나 또는 두 개의 배아는 간에서 mCherry의 발현을 나타내었다.

[0350] 도 11a 내지 11c는 mCherry의 MyrED77 매개 형질도입의 이미지 분석을 나타낸다. 도 11a는 GFP 형질주입된 세포를 나타내고, 도 11b는 mCherry 교차-교정된 세포를 나타내고, 도 11c는 이들의 병합 이미지를 나타낸다. 도 9

및 11a 내지 11c의 결합된 분석은 MyrED77이 축삭에 대한 친화도를 가지며 구성물이 교차-교정에 사용될 수 있음을 시사한다.

[0351] 도 12a 내지 12c는 mCherry의 MyrED81 매개 형질도입의 이미지 분석을 나타낸다. 도 12a는 GFP 형질주입된 세포를 나타내고, 도 12b는 mCherry 교차-교정된 세포를 나타내고, 도 12c는 이들의 병합 이미지를 나타낸다. 도 9 및 12a 내지 12c의 결합된 분석은 MyrED81이 더 낮은 발현을 나타냄을 시사한다. 그러나 구성물은 교차-교정에 사용할 수 있다.

[0352] 도 13a 내지 13c는 mCherry의 MyrED88 매개 형질도입의 이미지 분석을 나타낸다. 도 13a는 GFP 형질주입된 세포를 나타내고, 도 13b는 mCherry 교차-교정된 세포를 나타내고, 도 13c는 이들의 병합 이미지를 나타낸다. 도 9 및 13a 내지 13c의 결합된 분석은 MyrED88이 세트에서 이상점임을 시사한다. 구성물은 교차-교정에 사용할 수 있지만 전체 실질에 걸쳐 확산 신호가 있다. 고배율에서는 세포외로 분비될 가능성이 있는 작은 붉은 반점을 보여준다.

[0353] 도 14a 내지 14o는 양성 대조군 BiP-mCherry에 대한 융합 단백질 MyrED27-mCherry, MyrED77-mCherry, MyrED81-mCherry 및 MryED88-mCherry의 비교된 형질도입 효율을 나타낸다. 도 14a, 14d, 14g, 14j 및 14m은 GFP 형질주입된 세포를 나타내고, 도 14b, 14e, 14h, 14k 및 14n은 mCherry 교차-교정된 세포를 나타내고, 도 14c, 14f, 14i, 14l 및 14o는 이들의 병합 이미지를 나타낸다. 이미지 분석은 또한 BiP-mCherry 구성물에서 교차-교정이 분명하지 않음을 시사한다.

[0354] 결론적으로, MyrED27 구성물은 축삭 표적화 및 막 연관 구성물이다. 녹색/노란색 세포보다 더 많은 적색 세포의 존재는 MyrED27 매개 교차-교정을 나타낸다. 웨스턴 블롯 분석에 따르면, 하나 또는 두 개의 배아가 간에서 MyrED27 매개 mCherry 발현을 나타내었다. 예를 들어, 한쪽 뇌 반구가 다른 쪽 반구에 영향을 미치지 않고 형질도입되었다는 점에서, 이 기법의 특이성은 놀라운 것이었다.

[0355] **실시예-5**

[0356] **[A] MyrED를 사용한 CDKL5 표적화**

[0357] MyrED27(서열번호 57) 및 MyrED53-67(서열번호 83 내지 97)과의 CDKL5 단백질 융합을 인코딩하는 구성물로 세포를 형질주입시켰다. Expi293F 세포에서 형질주입 72시간 후 9 μl의 조절 배지(CM)를 수확하고 총 단백질 정량화를 기반으로 정규화된 5 μg의 엑소좀(EXO)을 각각의 레인에 로딩하였다. Qiagen Exoeasy 맥시 키트를 사용하여 5 ml의 조절 배지에서 엑소좀을 강화하였다. 도 15b는 융합 단백질이 엑소좀을 표적으로 한다는 것을 나타내는 웨스턴 블롯이다.

[0358] **실시예-6**

[0359] **[A] MyrED를 사용한 TPP1 표적화**

[0360] MyrED27(서열번호 57), MyrED 59(서열번호 89), MyrED60(서열번호 90), MyrED63(서열번호 93), MyrED64(서열번호 94) 및 MyrED65(서열번호 95)로 융합된 TPP1 단백질을 인코딩하는 구성물로 세포를 형질주입시켰다. Expi293F 세포에서 형질주입 72시간 후 수확한 9 μl의 조절 배지(CM) 및 총 단백질 정량화를 기반으로 정규화된 4.5 μg의 엑소좀(EXO)을 각각의 레인에 로딩하였다. Qiagen Exoeasy 맥시 키트를 사용하여 5 ml의 조절 배지에서 엑소좀을 강화하였다. 도 16은 융합 단백질이 엑소좀에 표적화되었음을 나타내는 웨스턴 블롯이다.

[0361] **실시예-7**

[0362] **[A] C-말단 엑소좀 표적화 태그의 테스트**

[0363] MyrED27(서열번호 57) 및 MyrED81-94(서열번호 111 내지 124)와 융합된 mCherry 단백질을 인코딩하는 구성물로 세포를 형질주입시켰고 이러한 다양한 C 말단 태그된 엑소좀 표적 변이체를 사용하여 mCherry 형광 스크린을 수행했다. Spectramax id5를 사용하여 575Ex/620 Em에서 전체 단백질 정량화를 기반으로 정규화된 15 μg의 엑소좀을 판독했다. Qiagen Exoeasy 맥시 키트를 사용하여 5 ml의 조절 배지에서 엑소좀을 강화하였다. 도 18은 융합 단백질이 엑소좀을 표적으로 한다는 것을 나타낸다.

[0364] **실시예-8**

[0365] **[A] MyrED를 사용한 GAA 표적화**

[0366] 세포를 MyrED81(서열번호 111), MyrED88(서열번호 118), MyrED89(서열번호 119) 및 MyrED93(서열번호 123)과

융합된 GAA 단백질을 인코딩하는 구성물로 형질주입시켰다. BiP 태그된 GAA 구조물을 음성 대조군으로 간주하였다. Expi293F 세포에서 형질주입 72시간 후 수확한 총 세포 용해물(LYS) 5 μg 및 조절 배지(CM) 12 μl를 각각의 레인에 로딩하였다. Miltenyi Biotec 엑소좀 분리 키트 팬, 인간(MACS)을 사용하여 2 ml의 조절 배지에서 엑소좀을 강화하였다. 100 μl의 분리된 엑소좀을 5000 g에서 회전시키고 12 μl의 상청액(EXO S/N) 및 12 ul 펠릿 비드(EXO BEAD)를 각각의 레인에 로딩하였다. 도 19는 이러한 C-말단 태그된 엑소좀 표적 변이체에서 GAA(약 105 kDa) 및 CD9(약 20 kDa) 테트라스파닌 마커 발현을 나타내는 웨스턴 블롯이다.

[0367] **실시예-9**

[0368] **[A] MyrED를 사용한 NAGLU 표적화**

[0369] 세포를 MyrED81(서열번호 111), MyrED88(서열번호 118), MyrED89(서열번호 119) 및 MyrED93(서열번호 123)과 융합된 NAGLU 단백질을 인코딩하는 구성물로 형질주입시켰다. COV2 NAGLU(T343P/A181L)를 음성 대조군으로 간주하였다. Expi293F 세포에서 형질주입 72시간 후 수확한 총 세포 용해물(LYS) 5 μg 및 조절 배지(CM) 12 μl를 각각의 레인에 로딩하였다. Miltenyi Biotec 엑소좀 분리 키트 팬, 인간(MACS)을 사용하여 2 ml의 조절 배지에서 엑소좀을 강화하였다. 100 μl의 분리된 엑소좀을 5000 g에서 회전시키고 12 μl의 상청액(EXO S/N) 및 12 μl 펠릿 비드(EXO BEAD)를 각각의 레인에 로딩하였다. 도 20은 이들 C-말단 태그 엑소좀 표적 변이체에서 NAGLU(약 85 kDa) 및 CD9(약 20 kDa) 테트라스파닌 마커 발현을 나타내는 웨스턴 블롯이다.

[0370] **실시예-10**

[0371] **[A] MyrED를 사용한 TPP1 표적화**

[0372] MyrED81(서열번호 111), MyrED89(서열번호 119) 및 MyrED93(서열번호 123)과 융합된 TPP1 단백질을 인코딩하는 구성물로 세포를 형질주입시켰다. BiP1 태그된 TPP1 구성물을 음성 대조군으로 간주하였다. Expi293F 세포에서 형질주입 72시간 후 수확한 총 세포 용해물(LYS) 5 μg 및 조건 배지(CM) 12 μl를 각각의 레인에 로딩하였다. Miltenyi Biotec 엑소좀 분리 키트 팬, 인간(MACS)을 사용하여 2 ml의 조절 배지에서 엑소좀을 강화하였다. 100 μl의 분리된 엑소좀을 5000 g에서 회전시키고 12 μl의 상청액(EXO S/N) 및 12 μl 펠렛 비드(EXO BEAD)를 각각의 레인에 로딩하였다. 도 20은 이러한 C-말단 태그 엑소좀 표적 변이체에서 TPP1(HPC4 Ab- 약 65 kDa) 및 CD9(약 20 kDa) 테트라스파닌 마커 발현을 나타내는 웨스턴 블롯이다.

[0373] **[서열목록]**

[0374] 서열목록 1

[0375] Met Gly Ala Arg Ala Ser Val Leu Ser Gly Gly

[0376] 서열목록 2

[0377] Met Gly Ala Arg Ala Ser Val Leu Ser Gly

[0378] 서열목록 3

[0379] Met Gly Gly Lys Leu Ser

[0380] 서열목록 4

[0381] Met Gly Ala Arg Ala Ser Gly Gly

[0382]

[0383] 서열목록 5

[0384] Met Gly Ala Arg Ala Ser

[0385]

[0386] 서열목록 6

[0387] Met Gly Ala Arg Ala Ser Val Leu Ser

[0388]

[0389] 서열목록 7

[0390] Met Gly Ser Lys Leu Thr Cys Cys Leu Gly Gly

[0391] 서열목록 8

[0392] Met Gly Asn Ile Leu Thr Cys Cys Ile Asn Ser

[0393] 서열목록 9

[0394] Met Gly Ser Cys Val Ser Arg Asp Leu Phe Thr

[0395] 서열목록 10

[0396] Met Gly Gly Asn His Ser His Lys Pro Pro

[0397] 서열목록 11

[0398] Met Gly Ser Cys Val Ser Arg Asp Leu Phe Thr Ser

[0399]

[0400] 서열목록 12

[0401] Met Gly Ala Arg Ala Ser Gly

[0402]

[0403] 서열목록 13

[0404] Lys Lys Lys Lys Lys Arg Phe Ser Phe Lys Lys Ser Phe Lys Leu Ser

[0405] Gly Phe Ser Phe Lys Lys Asn Lys Lys Ala Ser

[0406]

[0407] 서열목록 14

[0408] Lys Lys Phe Ser Phe Lys Lys Phe Gly

[0409]

[0410] 서열목록 15

[0411] Lys Lys Phe Ser Phe Lys Lys Asn Lys Lys Gly

[0412] 서열목록 16

[0413] Lys Lys Lys Lys Phe Ser Phe Lys Lys Phe Gly

[0414]

[0415] 서열목록 17

[0416] Lys Lys Lys Lys Phe Ala Phe Lys Lys Phe Gly

[0417]

[0418] 서열목록 18

[0419] Lys Lys Phe Ala Phe Lys Lys Phe Gly

[0420]

[0421] 서열목록 19

[0422] Lys Lys Lys Lys Lys Arg Phe Ala Phe Lys Lys Ala Phe Lys Leu Ala

[0423] Gly Phe Ala Phe Lys Lys Asn Lys Lys Ala Gly

[0424]

[0425] 서열목록 20

[0426] Lys Lys Lys Lys Arg Phe Ser Phe Lys Lys Pro Phe Lys Leu Ser Gly

[0427] Leu Ser Phe Lys Arg Asn Arg Lys Ala Ser

[0428] 서열목록 21

[0429] Lys Lys Lys Lys Gly

[0430] 서열목록 22

[0431] Lys Lys Lys Lys Lys Arg Phe Ser Phe Lys Lys Ser Phe Lys Leu Ala

[0432] Gly Phe Ser Phe Lys Lys Asn Lys Lys Ala Ser

[0433] 서열목록 23

[0434] Lys Lys Lys Lys Arg Phe Ser Phe Lys Lys Pro Phe Lys Leu Ser Gly

[0435] Leu Ser Phe Lys Arg Asn Arg Lys Ala Ser Gly

[0436] 서열목록 24

[0437] Lys Lys Lys Lys Lys Phe Ser Phe Lys Lys Ala Ser

[0438]

[0439] 서열목록 25

[0440] Lys Lys Lys Lys Lys Phe Leu Ser Phe Lys Arg Asn Arg Lys Ala Ser

[0441]

[0442] 서열목록 26

[0443] Lys Lys Lys Lys Arg Phe Ser Phe Lys Lys Pro Phe Lys Leu Ser Gly

[0444] Leu Ser Phe Lys Arg Asn Arg Lys Ala Ser Gly Gly Gly Gly Gly

[0445]

[0446] 서열목록 27

[0447] Lys Lys Lys Lys Lys Phe Ser Phe Lys Lys Pro Phe Lys Leu Ser Gly

[0448] Leu Ser Phe Lys Arg Asn Arg Lys Ala Ser

[0449] 서열목록 28

[0450] Lys Lys Lys Lys Lys Arg Phe Ser Phe Lys Lys Pro Phe Lys Leu Ser

[0451] Gly Leu Ser Phe Lys Arg Asn Arg Lys Ala Ser

[0452] 서열목록 29

[0453] Lys Lys Lys Lys Arg Phe Ser Phe Lys Lys Ala Ser

[0454]

[0455] 서열목록 30

[0456] Lys Lys Lys Lys Lys Phe Ser Phe Lys Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly

[0457] Gly Gly Gly Ser Gly Ala Gly Leu

[0458]

[0459] 서열목록 31

[0460] Met Gly Ala Arg Ala Ser Val Leu Ser Gly Lys Lys Phe Ser Phe Lys

[0461] Lys Phe Gly

[0462]

[0463] 서열목록 32

[0464] Met Gly Ala Arg Ala Ser Val Leu Ser Gly Lys Lys Phe Ser Phe Lys

[0465] Lys Asn Lys Lys Gly

[0466]

[0467] 서열목록 33

[0468] Met Gly Ala Arg Ala Ser Val Leu Ser Gly Lys Lys Lys Lys Phe Ser

[0469] Phe Lys Lys Phe Gly

[0470]

[0471] 서열목록 34

[0472] Met Gly Ala Arg Ala Ser Val Leu Ser Gly Lys Lys Lys Lys Phe Ala

[0473] Phe Lys Lys Phe Gly

[0474]

[0475] 서열목록 35

[0476] Met Gly Ala Arg Ala Ser Val Leu Ser Gly Lys Lys Phe Ala Phe Lys

[0477] Lys Phe Gly

[0478]

[0479] 서열목록 36

[0480] Met Gly Ala Arg Ala Ser Val Leu Ser Gly Gly Lys Lys Lys Lys Lys

[0481] Arg Phe Ala Phe Lys Lys Ala Phe Lys Leu Ala Gly Phe Ala Phe Lys

[0482] Lys Asn Lys Lys Ala Gly

[0483]

[0484] 서열목록 37

[0485] Met Gly Ala Arg Ala Ser Val Leu Ser Gly Gly Lys Lys Lys Lys Arg

[0486] Phe Ser Phe Lys Lys Pro Phe Lys Leu Ser Gly Leu Ser Phe Lys Arg

[0487] Asn Arg Lys Ala Ser Gly

[0488]

[0489] 서열목록 38

[0490] Met Gly Gly Lys Leu Ser Lys Lys Lys Lys Gly

[0491]

[0492] 서열목록 39

[0493] Met Gly Ala Arg Ala Ser Val Leu Ser Gly Gly Lys Lys Lys Lys Lys

[0494] Arg Phe Ser Phe Lys Lys Ser Phe Lys Leu Ala Gly Phe Ser Phe Lys

[0495] Lys Asn Lys Lys Ala Ser Gly

[0496] 서열목록 40

[0497] Met Gly Ala Arg Ala Ser Gly Gly Lys Lys Lys Lys Arg Phe Ser Phe

[0498] Lys Lys Pro Phe Lys Leu Ser Gly Leu Ser Phe Lys Arg Asn Arg Lys

[0499] Ala Ser Gly

[0500]

[0501] 서열목록 41

[0502] Met Gly Ala Arg Ala Ser Lys Lys Lys Lys Arg Phe Ser Phe Lys Lys

[0503] Pro Phe Lys Leu Ser Gly Leu Ser Phe Lys Arg Asn Arg Lys Ala Ser

[0504] Gly

[0505]

[0506] 서열목록 42

[0507] Met Gly Ala Arg Ala Ser Val Leu Ser Lys Lys Lys Lys Arg Phe Ser

[0508] Phe Lys Lys Pro Phe Lys Leu Ser Gly Leu Ser Phe Lys Arg Asn Arg

[0509] Lys Ala Ser Gly

[0510]

[0511] 서열목록 43

[0512] Met Gly Ala Arg Ala Ser Val Leu Ser Gly Gly Lys Lys Lys Lys Lys

[0513] Phe Ser Phe Lys Lys Ala Ser Gly

[0514]

[0515] 서열목록 44

[0516] Met Gly Ala Arg Ala Ser Val Leu Ser Gly Gly Lys Lys Lys Lys Lys

[0517] Phe Leu Ser Phe Lys Arg Asn Arg Lys Ala Ser Gly

[0518]

[0519] 서열목록 45

[0520] Met Gly Ser Lys Leu Thr Cys Cys Leu Gly Gly Lys Lys Lys Lys Arg

[0521] Phe Ser Phe Lys Lys Pro Phe Lys Leu Ser Gly Leu Ser Phe Lys Arg

[0522] Asn Arg Lys Ala Ser Gly

[0523]

[0524] 서열목록 46

[0525] Met Gly Asn Ile Leu Thr Cys Cys Ile Asn Ser Gly Lys Lys Lys Lys

[0526] Arg Phe Ser Phe Lys Lys Pro Phe Lys Leu Ser Gly Leu Ser Phe Lys

[0527] Arg Asn Arg Lys Ala Ser Gly

[0528] 서열목록 47

[0529] Met Gly Ser Cys Val Ser Arg Asp Leu Phe Thr Ser Gly Lys Lys Lys

[0530] Lys Arg Phe Ser Phe Lys Lys Pro Phe Lys Leu Ser Gly Leu Ser Phe

[0531] Lys Arg Asn Arg Lys Ala Ser Gly

[0532] 서열목록 48

[0533] Met Gly Gly Asn His Ser His Lys Pro Pro Gly Gly Lys Lys Lys Lys

[0534] Arg Phe Ser Phe Lys Lys Pro Phe Lys Leu Ser Gly Leu Ser Phe Lys

[0535] Arg Asn Arg Lys Ala Ser Gly

[0536]

[0537] 서열목록 49

[0538] Met Gly Ala Arg Ala Ser Val Leu Ser Gly Gly Lys Lys Lys Lys Lys

[0539] Phe Ser Phe Lys Lys Pro Phe Lys Leu Ser Gly Leu Ser Phe Lys Arg

[0540] Asn Arg Lys Ala Ser Gly

[0541]

[0542] 서열목록 50

[0543] Met Gly Ala Arg Ala Ser Val Leu Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

[0544] Gly Gly Ser Lys Lys Lys Lys Lys Arg Phe Ser Phe Lys Lys Pro Phe

[0545] Lys Leu Ser Gly Leu Ser Phe Lys Arg Asn Arg Lys Ala Ser Gly Gly

[0546] Gly Gly Gly

[0547]

[0548] 서열목록 51

[0549] Met Gly Ala Arg Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

[0550] Lys Lys Lys Lys Lys Arg Phe Ser Phe Lys Lys Pro Phe Lys Leu Ser

[0551] Gly Leu Ser Phe Lys Arg Asn Arg Lys Ala Ser Gly Gly Gly Gly Gly

[0552]

[0553] 서열목록 52

[0554] Met Gly Ala Arg Ala Ser Val Leu Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

[0555] Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Lys Lys Lys Lys Lys Arg Phe Ser Phe

[0556] Lys Lys Pro Phe Lys Leu Ser Gly Leu Ser Phe Lys Arg Asn Arg Lys

[0557] Ala Ser Gly Gly Gly Gly Gly

[0558] 서열목록 53

[0559] Met Gly Ala Arg Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

[0560] Gly Gly Gly Gly Ser Lys Lys Lys Lys Lys Arg Phe Ser Phe Lys Lys

[0561] Pro Phe Lys Leu Ser Gly Leu Ser Phe Lys Arg Asn Arg Lys Ala Ser

[0562] Gly Gly Gly Gly Gly

[0563]

[0564] 서열목록 54

[0565] Met Gly Ala Arg Ala Ser Val Leu Ser Gly Gly Lys Lys Lys Lys Lys

[0566] Arg Phe Ser Phe Lys Lys Ser Phe Lys Leu Ser Gly Phe Ser Phe Lys

[0567] Lys Asn Lys Lys Ala Ser Gly

[0568]

[0569] 서열목록 55

[0570] Met Gly Ala Arg Ala Ser Val Leu Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ala

[0571] Gly Leu Leu Lys Met Phe Asn Lys Ala Thr Asp Ala Val Ser Lys Met

[0572] Gly Gly Gly Gly Ser Lys Lys Lys Lys Lys Arg Phe Ser Phe Lys Lys

[0573] Ser Phe Lys Leu Ser Gly Phe Ser Phe Lys Lys Asn Lys Lys Ala Ser

[0574] Gly Gly Gly Gly Gly

[0575]

[0576] 서열목록 56

[0577] Met Gly Ala Arg Ala Ser Val Leu Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ala

[0578] Gly Leu Leu Lys Met Phe Asn Lys Ala Thr Asp Ala Val Ser Lys Met

[0579] Gly Gly Gly Gly Ser Gly

[0580]

[0581] 서열목록 57

[0582] Met Gly Ser Cys Val Ser Arg Asp Leu Phe Thr Ser Gly Gly Lys Lys

[0583] Lys Lys Lys Phe Ser Phe Lys Lys Ala Ser Gly

[0584] 서열목록 58

[0585] Met Gly Ala Arg Ala Ser Gly Gly Lys Lys Lys Lys Lys Phe Ser Phe

[0586] Lys Lys Ala Ser Gly

[0587] 서열목록 59

[0588] Met Gly Ala Arg Ala Ser Lys Lys Lys Lys Lys Phe Ser Phe Lys Lys

[0589] Ala Ser Gly

[0590] 서열목록 60

[0591] Met Gly Ala Arg Ala Ser Gly Gly Lys Lys Lys Lys Arg Phe Ser Phe

[0592] Lys Lys Ala Ser Gly

[0593]

[0594] 서열목록 61

[0595] Met Gly Ser Cys Val Ser Arg Asp Leu Phe Thr Ser Gly Gly Ala Ser

[0596] Gly

[0597]

[0598] 서열목록 62

[0599] Met Gly Ala Arg Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

[0600] Gly Gly Gly Gly Ser Gly Lys Lys Lys Lys Lys Phe Ser Phe Lys Lys

[0601] Ala Ser Gly

[0602] 서열목록 63

[0603] Met Gly Ala Arg Ala Ser Gly Lys Lys Lys Lys Lys Phe Ser Phe Lys

[0604] Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ala Gly Leu Leu

[0605] Lys Met Phe Asn Lys Ala Thr Asp Ala Val Ser Lys Met

[0606]

[0607] 서열목록 64

[0608] Met Gly Ala Arg Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Lys Lys Lys Lys

[0609] Lys Phe Ser Phe Lys Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

[0610] Gly Ala Gly Leu Leu Lys Met Phe Asn Lys Ala Thr Asp Ala Val Ser

[0611] Lys Met

[0612] 서열목록 65

[0613] Met Gly Ala Arg Ala Ser Val Leu Ser Gly Gly Lys Lys Lys Lys Lys

[0614] Phe Ser Phe Lys Lys Ala Ser Gly Gly Gly Gly Arg His Arg Gln Pro

[0615] Arg Gly Trp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

[0616] 서열목록 66

[0617] Met Gly Ala Arg Ala Ser Val Leu Ser Gly Gly Lys Lys Lys Lys Lys

[0618] Phe Ser Phe Lys Lys Ala Ser Gly Gly Gly Gly Pro Arg Arg Ala Arg

[0619] Ser Val Lys Ser Gly

[0620] 서열목록 67

[0621] Met Gly Ala Arg Ala Ser Val Leu Ser Gly Gly Lys Lys Lys Lys Lys

[0622] Phe Ser Phe Lys Lys Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Arg Lys Arg

[0623] Glu Val Lys Ser Gly

[0624]

[0625] 서열목록 68

[0626] Met Gly Ala Arg Ala Ser Val Leu Ser Gly Gly Lys Lys Lys Lys Lys

[0627] Phe Ser Phe Lys Lys Ala Ser Gly Gly Gly Lys Ser Arg Arg Glu Val

[0628] Glu Ser Gly

[0629] 서열목록 69

[0630] Met Gly Ala Arg Ala Ser Val Leu Ser Gly Gly Lys Lys Lys Lys Lys

[0631] Phe Ser Phe Lys Lys Ala Ser Gly Gly Gly Lys Lys Arg Lys Lys Arg

[0632] Glu Ser Gly

[0633]

[0634] 서열목록 70

[0635] Met Gly Ala Arg Ala Ser Val Leu Ser Gly Gly Lys Lys Lys Lys Lys

[0636] Phe Ser Phe Lys Lys Ala Ser Gly Gly Gly Arg Ala Arg Arg Glu Ser

[0637] Gly

[0638]

[0639] 서열목록 71

[0640] Met Gly Ala Arg Ala Ser Val Leu Ser Gly Gly Lys Lys Lys Lys Lys

[0641] Phe Ser Phe Lys Lys Arg Ala Arg Arg Glu Ser Gly

[0642] 서열목록 72

[0643] Met Gly Ala Arg Ala Ser Val Leu Ser Gly Gly Lys Lys Lys Lys Lys

[0644] Phe Ser Phe Lys Lys Arg Lys Lys Arg Glu Ser Gly

[0645]

[0646] 서열목록 73

[0647] Met Gly Ser Arg Val Ser Arg Asp Leu Phe Thr Ser Gly Gly Ala Ser

[0648] Gly

[0649]

[0650] 서열목록 74

[0651] Met Gly Ser Ala Val Ser Arg Asp Leu Phe Thr Ser Gly

[0652]

[0653] 서열목록 75

[0654] Met Gly Ser Cys Val Ser Arg Asp Leu Phe Thr Ser Gly Gly Lys Lys

[0655] Lys Lys Lys Phe Ser Phe Lys Lys Ala Ser Gly Gly Gly Gly Arg His

[0656] Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

[0657]

[0658] 서열목록 76

[0659] Met Gly Ser Cys Val Ser Arg Asp Leu Phe Thr Ser Gly Gly Lys Lys

[0660] Lys Lys Lys Phe Ser Phe Lys Lys Ala Ser Gly Gly Gly Gly Pro Arg

[0661] Arg Ala Arg Ser Val Lys Ser Gly

[0662] 서열목록 77

[0663] Met Gly Ser Cys Val Ser Arg Asp Leu Phe Thr Ser Gly Gly Lys Lys

[0664] Lys Lys Lys Phe Ser Phe Lys Lys Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg

[0665] Arg Lys Arg Glu Val Lys Ser Gly

[0666] 서열목록 78

[0667] Met Gly Ser Cys Val Ser Arg Asp Leu Phe Thr Ser Gly Gly Lys Lys

[0668] Lys Lys Lys Phe Ser Phe Lys Lys Ala Ser Gly Gly Gly Lys Ser Arg

[0669] Arg Glu Val Glu Ser Gly

[0670] 서열목록 79

[0671] Met Gly Ser Cys Val Ser Arg Asp Leu Phe Thr Ser Gly Gly Lys Lys

[0672] Lys Lys Lys Phe Ser Phe Lys Lys Ala Ser Gly Gly Gly Lys Lys Arg

[0673] Lys Lys Arg Glu Ser Gly

[0674]

[0675] 서열목록 80

[0676] Met Gly Ser Cys Val Ser Arg Asp Leu Phe Thr Ser Gly Gly Lys Lys

[0677] Lys Lys Lys Phe Ser Phe Lys Lys Ala Ser Gly Gly Gly Arg Ala Arg

[0678] Arg Glu Ser Gly

[0679]

[0680] 서열목록 81

[0681] Met Gly Ser Cys Val Ser Arg Asp Leu Phe Thr Ser Gly Gly Lys Lys

[0682] Lys Lys Lys Phe Ser Phe Lys Lys Arg Ala Arg Arg Glu Ser Gly

[0683] 서열목록 82

[0684] Met Gly Ser Cys Val Ser Arg Asp Leu Phe Thr Ser Gly Gly Lys Lys

[0685] Lys Lys Lys Phe Ser Phe Lys Lys Arg Lys Lys Arg Glu Ser Gly

[0686] 서열목록 83

[0687] Met Gly Ser Cys Val Ser Arg Asp Leu Phe Thr Ser Gly Gly Lys Lys

[0688] Lys Lys Lys Phe Ser Phe Lys Lys Ala Ser Gly Gly Gly Arg Ala Arg

[0689] Arg Glu Ser Gly

[0690] 서열목록 84

[0691] Met Gly Ser Cys Val Ser Arg Asp Leu Phe Thr Ser Gly Gly Lys Lys

[0692] Lys Lys Lys Phe Ser Phe Lys Lys Ala Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly

[0693] Gly Gly Ser Glu Asp Gln Val Asp Pro Arg Leu Ile Asp Gly Lys Gly

[0694] 서열목록 85

[0695] Met Gly Ser Arg Val Ser Arg Asp Leu Phe Thr Ser Gly Gly Lys Lys

[0696] Lys Lys Lys Phe Ser Phe Lys Lys Ala Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly

[0697] Gly Gly Ser Glu Asp Gln Val Asp Pro Arg Leu Ile Asp Gly Lys Gly

[0698] 서열목록 86

[0699] Met Gly Ser Cys Val Ser Arg Asp Leu Phe Thr Ser Gly Gly Lys Arg

[0700] Lys Arg Lys Phe Ser Phe Lys Arg Ala Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly

[0701] Gly Gly Ser Glu Asp Gln Val Asp Pro Arg Leu Ile Asp Gly Lys Gly

[0702]

[0703] 서열목록 87

[0704] Met Gly Gly Leu Phe Ser Arg Trp Arg Thr Ser Gly Gly Lys Lys Lys

[0705] Lys Lys Phe Ser Phe Lys Lys Ala Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

[0706] Gly Ser Glu Asp Gln Val Asp Pro Arg Leu Ile Asp Gly Lys Gly

[0707] 서열목록 88

[0708] Met Gly Gln Asn Leu Ser Thr Ser Asn Pro Leu Gly Gly Lys Lys Lys

[0709] Lys Lys Phe Ser Phe Lys Lys Ala Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

[0710] Gly Ser Glu Asp Gln Val Asp Pro Arg Leu Ile Asp Gly Lys Gly

[0711] 서열목록 89

[0712] Met Lys Leu Ser Leu Val Ala Ala Met Leu Leu Leu Leu Ser Ala Ala

[0713] Arg Ala Gly Gly Lys Lys Lys Lys Lys Phe Ser Phe Lys Lys Ala Ser

[0714] Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Asp Gln Val Asp Pro Arg

[0715] Leu Ile Asp Gly Lys Gly

[0716]

[0717] 서열목록 90

[0718] Met Lys Leu Ser Leu Val Ala Ala Met Leu Leu Leu Leu Ser Ala Ala

[0719] Arg Ala Gly Ser Cys Val Ser Arg Asp Leu Phe Thr Ser Gly Gly Lys

[0720] Lys Lys Lys Lys Phe Ser Phe Lys Lys Ala Ser Gly Gly Gly Ser Gly

[0721] Gly Gly Gly Ser Glu Asp Gln Val Asp Pro Arg Leu Ile Asp Gly Lys

[0722] Gly

[0723]

[0724] 서열목록 91

[0725] Met Gly Leu Gln Ala Cys Leu Leu Gly Leu Phe Ala Leu Ile Leu Ser

[0726] Gly Lys Cys Gly Ser Cys Val Ser Arg Asp Leu Phe Thr Ser Gly Gly

[0727] Lys Lys Lys Lys Lys Phe Ser Phe Lys Lys Ala Ser Gly Gly Gly Ser

[0728] Gly Gly Gly Gly Ser Glu Asp Gln Val Asp Pro Arg Leu Ile Asp Gly

[0729] Lys Gly

[0730]

[0731] 서열목록 92

[0732] Met Gly Val Arg His Pro Leu Cys Ser Arg Arg Leu Leu Ala Val Cys

[0733] Ala Leu Val Ser Leu Ala Thr Ala Ala Leu Leu Gly Gly Lys Lys Lys

[0734] Lys Lys Phe Ser Phe Lys Lys Ala Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

[0735] Gly Ser Glu Asp Gln Val Asp Pro Arg Leu Ile Asp Gly Lys Gly

[0736] 서열목록 93

[0737] Met Gly Lys Ser Glu Ser Gln Met Asp Ile Thr Asp Ile Asn Thr Gly

[0738] Gly Lys Lys Lys Lys Lys Phe Ser Phe Lys Lys Ala Ser Gly Gly Gly

[0739] Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Asp Gln Val Asp Pro Arg Leu Ile Asp

[0740] Gly Lys Gly

[0741]

[0742] 서열목록 94

[0743] Met Gly Asn Glu Ala Ser Leu Glu Gly Gly Ala Gly Glu Gly Pro Leu

[0744] Pro Pro Gly Gly Ser Gly Gly Lys Lys Lys Lys Lys Phe Ser Phe Lys

[0745] Lys Ala Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Asp Gln Val

[0746] Asp Pro Arg Leu Ile Asp Gly Lys Gly

[0747] 서열목록 95

[0748] Met Gly Gln Gln Pro Ala Lys Ser Met Asp Val Arg Arg Ile Glu Gly

[0749] Gly Glu Leu Leu Leu Asn Gln Leu Ala Gly Arg Gly Gly Lys Lys Lys

[0750] Lys Lys Phe Ser Phe Lys Lys Ala Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

[0751] Gly Ser Glu Asp Gln Val Asp Pro Arg Leu Ile Asp Gly Lys Gly

[0752] 서열목록 96

[0753] Met Gly Gln Ile Val Thr Phe Phe Gln Glu Val Pro His Val Ile Glu

[0754] Glu Val Met Asn Ile Val Leu Ile Ala Leu Ser Val Leu Ala Val Leu

[0755] Lys Gly Leu Tyr Asn Phe Ala Thr Cys Gly Leu Val Gly Leu Val Thr

[0756] Phe Leu Leu Leu Cys Gly Arg Ser Cys Thr Gly Gly Lys Lys Lys Lys

[0757] Lys Phe Ser Phe Lys Lys Ala Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

[0758] Ser Glu Asp Gln Val Asp Pro Arg Leu Ile Asp Gly Lys Gly

[0759] 서열목록 97

[0760] Met Gly Gln Leu Ile Ser Phe Phe Gln Glu Ile Pro Val Phe Leu Gln

[0761] Glu Ala Leu Asn Ile Ala Leu Val Ala Val Ser Leu Ile Ala Val Ile

[0762] Lys Gly Ile Ile Asn Leu Tyr Lys Ser Gly Leu Phe Gln Phe Ile Phe

[0763] Phe Leu Leu Leu Ala Gly Arg Ser Cys Ser Gly Gly Lys Lys Lys Lys

[0764] Lys Phe Ser Phe Lys Lys Ala Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

[0765] Ser Glu Asp Gln Val Asp Pro Arg Leu Ile Asp Gly Lys Gly

[0766] 서열목록 98

[0767] Met Gly Ser Cys Val Ser Arg Asp Leu Phe Thr Ser Gly Gly Lys Lys

[0768] Lys Lys Lys Phe Ser Phe Lys Lys Ala Ser Gly Gly Gly Gly Arg Arg

[0769] Ala Arg Ser Val Lys Ser Gly

[0770] 서열목록 99

[0771] Met Gly Ser Cys Val Ser Arg Asp Leu Phe Thr Ser Gly Gly Lys Lys

[0772] Lys Lys Lys Phe Ser Phe Lys Lys Ala Ser Gly Gly Gly Gly Pro Arg

[0773] Arg Ala Arg Ser Val Ser Gly

[0774] 서열목록 100

[0775] Met Gly Ser Cys Val Ser Arg Asp Leu Phe Thr Ser Gly Gly Lys Lys

[0776] Lys Lys Lys Phe Ser Phe Lys Lys Ala Ser Gly Gly Gly Gly Pro Arg

[0777] Arg Ala Arg Ser Val Lys Ser Glu Asp Gln Val Asp Pro Arg Leu Ile

[0778] Asp Gly Lys Gly

[0779] 서열목록 101

[0780] Met Gly Asn Glu Ala Ser Leu Glu Gly Gly Ala Gly Gly Gly Lys Lys

[0781] Lys Lys Lys Phe Ser Phe Lys Lys Ala Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly

[0782] Gly Gly Ser Glu Asp Gln Val Asp Pro Arg Leu Ile Asp Gly Lys Gly

[0783] 서열목록 102

[0784] Met Gly Asn Glu Val Ser Leu Glu Gly Gly Ala Gly Asp Gly Pro Leu

[0785] Pro Pro Gly Gly Ala Gly Pro Gly Pro Gly Pro Gly Pro Gly Ser His

[0786] Pro Gln Leu Pro Ala Ala Lys Lys Arg Lys Ser Leu Ala Ser Arg Lys

[0787] Pro Pro Val Glu Asp Pro Ala Ala Glu Asp Leu Arg Thr Arg

[0788] 서열목록 103

[0789] Met Gly Asn Glu Ala Ser Leu Glu Gly Gly Ala Gly Glu Gly Pro Leu

[0790] Pro Pro Gly Gly Ser Gly Gly Lys Lys Lys Lys Lys Phe Ser Phe Lys

[0791] Lys Ala Ser Gly Gly Gly Gly Pro Arg Arg Ala Arg Ser Val Lys Ser

[0792] Gly Gly Gly Gly Ser Glu Asp Gln Val Asp Pro Arg Leu Ile Asp Gly

[0793] Lys Gly

[0794]

[0795] 서열목록 104

[0796] Met Gly Gln Gln Pro Ala Lys Ser Met Asp Gly Gly Lys Lys Lys Lys

[0797] Lys Phe Ser Phe Lys Lys Ala Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

[0798] Ser Glu Asp Gln Val Asp Pro Arg Leu Ile Asp Gly Lys Gly

[0799] 서열목록 105

[0800] Met Lys Lys Lys Lys Lys Phe Ser Phe Lys Lys Ala Ser Gly Gly Gly

[0801] Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Asp Gln Val Asp Pro Arg Leu Ile Asp

[0802] Gly Lys Gly

[0803] 서열목록 106

[0804] Met Gly Cys Lys Trp Ser Lys Ser Ser Val Ile Gly Trp Pro Ala Val

[0805] Arg Glu Arg Met Arg Arg Ala Glu Pro Ala Ala Asp Gly Val Gly Ala

[0806] Val Ser Arg Asp Leu Glu Lys His Gly Ala Ile Thr Ser Ser Asn Thr

[0807] Ala Ala Asn Asn Ala Ala Cys Ala Trp Leu Glu Ala Gln Glu Glu Glu

[0808] Glu Val Gly Phe Pro Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Asp

[0809] Gln Val Asp Pro Arg Leu Ile Asp Gly Lys Gly

[0810] 서열목록 107

[0811] Met Gly Cys Lys Trp Ser Lys Ser Ser Val Ile Gly Trp Pro Ala Val

[0812] Arg Glu Arg Met Arg Arg Ala Glu Pro Ala Ala Asp Gly Val Gly Ala

[0813] Val Ser Arg Asp Leu Glu Lys His Gly Ala Ile Thr Ser Ser Asn Thr

[0814] Ala Ala Asn Asn Ala Ala Cys Ala Trp Leu Glu Ala Gln Glu Glu Glu

[0815] Glu Val Gly Phe Pro Gly Gly Gly Ser Lys Lys Lys Lys Lys Phe Ser

[0816] Phe Lys Lys Ala Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Asp

[0817] Gln Val Asp Pro Arg Leu Ile Asp Gly Lys Gly

[0818] 서열목록 108

[0819] Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Asp Gln Val Asp Pro Arg Leu Ile

[0820] Asp Gly Lys Ser Gly Gly Gly Lys Lys Lys Lys Lys Phe Ser Phe Lys

[0821] Lys

[0822]

[0823] 서열목록 109

[0824] Met Lys Leu Ser Leu Val Ala Ala Met Leu Leu Leu Leu Ser Ala Ala

[0825] Arg Ala Gly Ala Arg Ala Ser Val Leu Ser Gly Gly Gly Gly Lys Lys

[0826] Lys Lys Lys Phe Ser Phe Lys Lys Ala Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly

[0827] Gly Gly Ser Glu Asp Gln Val Asp Pro Arg Leu Ile Asp Gly Lys Gly

[0828] 서열목록 110

[0829] Met Lys Leu Ser Leu Val Ala Ala Met Leu Leu Leu Leu Ser Ala Ala

[0830] Arg Ala Gly Asn Glu Ala Ser Leu Glu Gly Gly Ala Gly Glu Gly Pro

[0831] Leu Pro Pro Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Lys Lys Lys Lys Lys Phe

[0832] Ser Phe Lys Lys Ala Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu

[0833] Asp Gln Val Asp Pro Arg Leu Ile Asp Gly Lys Gly

[0834] 서열목록 111

[0835] Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Asp Gln Val Asp Pro Arg Leu Ile

[0836] Asp Gly Lys Ser Gly Gly Gly Lys Lys Lys Lys Lys Phe Ser Phe Lys

[0837] Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ala Ile Thr Cys Leu Ser

[0838] Phe Ile Thr Phe Tyr Val Ala Ala Phe Met Val Leu Leu

[0839] 서열목록 112

[0840] Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Asp Gln Val Asp Pro Arg Leu Ile

[0841] Asp Gly Lys Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ala Ile Thr Cys

[0842] Leu Ser Phe Ile Thr Phe Tyr Val Ala Ala Phe Met Val Leu Leu

[0843] 서열목록 113

[0844] Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Asp Gln Val Asp Pro Arg Leu Ile

[0845] Asp Gly Lys Ser Gly Gly Gly Lys Lys Lys Lys Lys Phe Ser Phe Lys

[0846] Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ala Arg Ile Lys Phe Ser

[0847] Thr Gly Ser His Cys His Gly Ser Phe Ser Leu Ile Phe Leu Ser Leu

[0848] Trp Ala Val Ile Phe Val Leu Tyr Gln

[0849] 서열목록 114

[0850] Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Asp Gln Val Asp Pro Arg Leu Ile

[0851] Asp Gly Lys Ser Gly Gly Gly Lys Lys Lys Lys Lys Phe Ser Phe Lys

[0852] Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Lys Leu Leu Asn Ala Thr

[0853] Ala Cys Asp Gly Glu Leu Ser Ser Ser Gly Thr Ser Ser Ser Lys Gly

[0854] Ile Ile Phe Tyr Val Leu Phe Ser Ile Leu Tyr Leu Ile Phe

[0855] 서열목록 115

[0856] Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Asp Gln Val Asp Pro Arg Leu Ile

[0857] Asp Gly Lys Ser Gly Gly Gly Lys Lys Lys Lys Lys Phe Ser Phe Lys

[0858] Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Arg Arg Asn Val Ala Arg

[0859] Tyr Gly Arg Thr Val Val Val Ser Gly Ser His Ala Ala Ala Val Ala

[0860] Pro Gly

[0861]

[0862] 서열목록 116

[0863] Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Asp Gln Val Asp Pro Arg Leu Ile

[0864] Asp Gly Lys Ser Gly Gly Gly Lys Lys Lys Lys Lys Phe Ser Phe Lys

[0865] Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Leu Gly Gln Leu Glu Ala

[0866] Ser Cys Arg Thr Asn Tyr Gly Tyr Ser Ala Ala Pro Ser Leu His Leu

[0867] Pro Pro Gly Ser Leu Leu Ala Ser Leu Val Pro Leu Leu Leu Leu Ser

[0868] Leu Pro

[0869]

[0870] 서열목록 117

[0871] Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Asp Gln Val Asp Pro Arg Leu Ile

[0872] Asp Gly Lys Ser Gly Gly Gly Lys Lys Lys Lys Lys Phe Ser Phe Lys

[0873] Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Arg Thr Asn Tyr Gly Tyr

[0874] Ser Ala Ala Pro Ser Leu His Leu Pro Pro Gly Ser Leu Leu Ala Ser

[0875] Leu Val Pro Leu Leu Leu Leu Ser Leu Pro

[0876] 서열목록 118

[0877] Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Asp Gln Val Asp Pro Arg Leu Ile

[0878] Asp Gly Lys Ser Gly Gly Gly Lys His Lys Glu Lys Met Ser Lys Asp

[0879] Gly Lys Lys Lys Lys Lys Lys Ser Lys Thr Lys Cys Val Ile Met

[0880] 서열목록 119

[0881] Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Asp Gln Val Asp Pro Arg Leu Ile

[0882] Asp Gly Lys Ser Gly Gly Gly Lys His Lys Glu Lys Met Ser Lys Asp

[0883] Gly Lys Lys Lys Lys Lys Phe Ser Phe Lys Lys Ser Lys Thr Lys Cys

[0884] Val Ile Met

[0885] 서열목록 120

[0886] Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Asp Gln Val Asp Pro Arg Leu Ile

[0887] Asp Gly Lys Ser Gly Gly Gly Lys Lys Lys Lys Lys Phe Ser Phe Lys

[0888] Lys Ser Lys Thr Lys Cys Val Ile Met

[0889] 서열목록 121

[0890] Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Asp Gln Val Asp Pro Arg Leu Ile

[0891] Asp Gly Lys Ser Gly Gly Gly Lys Lys Lys Lys Lys Phe Ser Phe Lys

[0892] Lys Cys Val Ile Met

[0893] 서열목록 122

[0894] Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Asp Gln Val Asp Pro Arg Leu Ile

[0895] Asp Gly Lys Ser Gly Gly Gly Lys Lys Lys Lys Lys Phe Ser Phe Lys

[0896] Lys Arg Cys Val Ile Met

[0897] 서열목록 123

[0898] Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Asp Gln Val Asp Pro Arg Leu Ile

[0899] Asp Gly Lys Ser Gly Gly Gly Lys Lys Lys Lys Lys Phe Ser Phe Lys

[0900] Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Cys Val Ile Met

[0901] 서열목록 124

[0902] Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Asp Gln Val Asp Pro Arg Leu Ile

[0903] Asp Gly Lys Ser Gly Gly Gly Lys Lys Lys Lys Lys Phe Ser Phe Lys

[0904] Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Cys Cys Leu Leu

[0905] 서열목록 125

[0906] Met Gly Asn Glu Ala Ser Leu Glu Gly Gly Ala Gly Glu Gly Pro Leu

[0907] Pro Pro Gly Gly Ser Gly Gly Lys Lys Lys Lys Lys Phe Ser Phe Lys

[0908] Lys Ala Ser Gly Gly Gly Lys Ser Arg Arg Glu Val Glu Ser Gly Gly

[0909] Gly Gly Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Gly

[0910] 서열목록 126

[0911] Met Gly Asn Glu Ala Ser Leu Glu Gly Gly Gly Gly Lys Lys Lys Lys

[0912] Lys Phe Ser Phe Lys Lys Ala Ser Gly Gly Gly Lys Ser Arg Arg Glu

[0913] Val Glu Ser Gly Gly Gly Gly Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Gly

[0914] 서열목록 127

[0915] Met Gly Asn Glu Ala Ser Leu Glu Gly Gly Gly Gly Lys Lys Lys Lys

[0916] Lys Phe Ser Phe Lys Lys Ala Ser Gly Gly Gly Gly

[0917] 서열목록 128

[0918] Met Gly Gln Gln Pro Ala Lys Ser Met Asp Val Arg Arg Ile Glu Gly

[0919] Gly Glu Leu Leu Leu Asn Gln Leu Ala Gly Arg Gly Gly Lys Lys Lys

[0920] Lys Lys Phe Ser Phe Lys Lys Ala Ser Gly Gly Gly Lys Ser Arg Arg

[0921] Glu Val Glu Ser Gly Gly Gly Gly Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

[0922] Gly

[0923] 서열목록 129

[0924] Met Gly Gln Gln Pro Ala Lys Ser Met Asp Val Arg Arg Ile Glu Gly

[0925] Gly Gly Lys Lys Lys Lys Lys Phe Ser Phe Lys Lys Ala Ser Gly Gly

[0926] Gly Lys Ser Arg Arg Glu Val Glu Ser Gly Gly Gly Gly Asp Tyr Lys

[0927] Asp Asp Asp Asp Lys Gly

[0928] 서열목록 130

[0929] Met Gly Gln Gln Pro Ala Lys Ser Met Asp Val Arg Arg Ile Glu Gly

[0930] Gly Gly Lys Lys Lys Lys Lys Phe Ser Phe Lys Lys Ala Ser Gly Gly

[0931] Gly Gly

[0932]

[0933] 서열목록 131

[0934] Met Gly Asn Glu Ala Ser Leu Glu Gly Gly Ala Gly Glu Gly Pro Leu

[0935] Pro Pro Gly Gly Ser Gly Gly Lys Lys Lys Lys Lys Phe Ser Phe Lys

[0936] Lys Ala Ser Gly Gly Gly Lys Ser Arg Arg Glu Val Glu Ser Gly Gly

[0937] Gly Gly

[0938]

[0939] 서열목록 132

[0940] Met Gly Ser Cys Val Ser Arg Asp Leu Phe Thr Ser Gly Gly Lys Lys

[0941] Lys Lys Lys Phe Ser Phe Lys Lys Ala Ser Pro Arg Arg Ala Arg Ser

[0942] Val Lys Ser Ser Gly Gly Gly Gly Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

[0943] Gly

[0944]

[0945] 서열목록 133

[0946] Met Gly Ser Cys Val Ser Arg Asp Leu Phe Thr Ser Gly Gly Lys Lys

[0947] Lys Lys Lys Phe Ser Phe Lys Lys Ala Ser Gly Gly Gly Lys Ser Arg

[0948] Arg Glu Val Glu Ser Gly Gly Gly Gly Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp

[0949] Lys Ala

[0950] 서열목록 134

[0951] Met Gly Asn Glu Ala Ser Leu Glu Gly Gly Ala Gly Glu Gly Pro Leu

[0952] Pro Pro Gly Gly Ser Gly Gly Lys Lys Lys Lys Lys Phe Ser Phe Lys

[0953] Lys Ala Ser Gly Gly Gly Gly Pro Arg Arg Ala Arg Ser Val Lys Ser

[0954] Ser Gly Gly Gly Gly Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Ala

[0955] 서열목록 135

[0956] Met Gly Asn Glu Ala Ser Leu Glu Gly Gly Ala Gly Glu Gly Pro Leu

[0957] Pro Pro Gly Gly Ser Gly Gly Lys Lys Lys Lys Lys Phe Ser Phe Lys

[0958] Lys Ala Ser Gly Gly Gly Lys Ser Arg Arg Glu Val Glu Ser Gly Gly

[0959] Gly Gly Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Ala

[0960] 서열목록 136

[0961] Met Gly Asn Glu Ala Ser Leu Glu Gly Gly Ala Gly Glu Gly Pro Leu

[0962] Pro Pro Gly Gly Ser Gly Gly Lys Lys Lys Lys Lys Phe Ser Phe Lys

[0963] Lys Ala Ser Gly Gly Gly Lys Ser Arg Arg Glu Val Glu Ala

[0964] 서열목록 137

[0965] Met Gly Gln Gln Pro Ala Lys Ser Met Asp Val Arg Arg Ile Glu Gly

[0966] Gly Glu Leu Leu Leu Asn Gln Leu Ala Gly Arg Gly Gly Lys Lys Lys

[0967] Lys Lys Phe Ser Phe Lys Lys Ala Ser Gly Gly Gly Lys Ser Arg Arg

[0968] Glu Val Glu Ser Gly Gly Gly Gly Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

[0969] Ala

[0970]

[0971] 서열목록 138

[0972] Met Gly Gln Gln Pro Ala Lys Ser Met Asp Val Arg Arg Ile Glu Gly

[0973] Gly Glu Leu Leu Leu Asn Gln Leu Ala Gly Arg Gly Gly Lys Lys Lys

[0974] Lys Lys Phe Ser Phe Lys Lys Ala Ser Gly Gly Gly Lys Ser Arg Arg

[0975] Glu Val Glu Ala

[0976] 서열목록 139

[0977] Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Arg

[0978] Pro Arg Ala Val Pro Thr Gln Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

[0979] Lys Lys Lys Lys Lys Phe Ser Phe Lys Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly

[0980] Gly Gly Gly Ala Ile Thr Cys Leu Ser Phe Ile Thr Phe Tyr Val Ala

[0981] Ala Phe Met Val Leu Leu

[0982] 서열목록 140

[0983] Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Arg

[0984] Pro Arg Ala Val Pro Thr Gln Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

[0985] Lys His Lys Glu Lys Met Ser Lys Asp Gly Lys Lys Lys Lys Lys Lys

[0986] Ser Lys Thr Lys Cys Val Ile Met

[0987] 서열목록 141

[0988] Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Arg

[0989] Pro Arg Ala Val Pro Thr Gln Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

[0990] Lys His Lys Glu Lys Met Ser Lys Asp Gly Lys Lys Lys Lys Lys Phe

[0991] Ser Phe Lys Lys Ser Lys Thr Lys Cys Val Ile Met

[0992] 서열목록 142

[0993] Ala Gly Gly Gly Gly Ser Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Arg Pro

[0994] Arg Ala Val Pro Thr Gln Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Lys

[0995] Lys Lys Lys Lys Phe Ser Phe Lys Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

[0996] Gly Ser Cys Val Ile Met

[0997]

[0998] 서열목록 143

[0999] Gly

[1000]

[1001] 서열목록 144

[1002] Ser Gly

[1003]

[1004] 서열목록 145

[1005] Gly Gly

[1006]

[1007] 서열목록 146

[1008] Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

[1009]

[1010] 서열목록 147

[1011] Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

[1012]

[1013] 서열목록 148

[1014] Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

[1015]

[1016] 서열목록 149

[1017] Gly Gly Ser Gly Ala Gly Leu Leu Lys Met Phe Asn Lys Ala Thr Asp

[1018] Ala Val Ser Lys Met Gly Gly Gly Gly Ser

[1019]

[1020] 서열목록 150

[1021] Gly Gly Ser Gly Ala Gly Leu Leu Lys Met Phe Asn Lys Ala Thr Asp

[1022] Ala Val Ser Lys Met Gly Gly Gly Gly Ser Gly

[1023] 서열목록 151

[1024] Ser Ser Gly

[1025]

[1026] 서열목록 152

[1027] Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

[1028]

[1029] 서열목록 153

[1030] Gly Gly Ser Gly

[1031]

[1032] 서열목록 154

[1033] Leu Leu Lys Met Phe Asn Lys Ala Thr Asp Ala Val Ser Lys Met

[1034] 서열목록 155

[1035] Met Lys Leu Ser Leu Val Ala Ala Met Leu Leu Leu Leu Ser Ala Ala

[1036] Arg Ala

[1037]

[1038] 서열목록 156

[1039] Met Lys Leu Ser Leu Val Ala Ala Met Leu Leu Leu Leu Ser Leu Val

[1040] Ala Ala Met Leu Leu Leu Leu Ser Ala Ala Arg Ala

[1041] 서열목록 157

[1042] Met Lys Leu Ser Leu Val Ala Ala Met Leu Leu Leu Leu Trp Val Ala

[1043] Leu Leu Leu Leu Ser Ala Ala Arg Ala

[1044] 서열목록 158

[1045] Met Lys Leu Ser Leu Val Ala Ala Met Leu Leu Leu Leu Ser Leu Val

[1046] Ala Leu Leu Leu Leu Ser Ala Ala Arg Ala

[1047] 서열목록 159

[1048] Met Lys Leu Ser Leu Val Ala Ala Met Leu Leu Leu Leu Ala Leu Val

[1049] Ala Leu Leu Leu Leu Ser Ala Ala Arg Ala

[1050] 서열목록 160

[1051] Met Gly Ser Cys Val Ser Arg Asp Leu Phe Thr Ser Gly Gly Lys Lys

[1052] Lys Lys Lys Phe Ser Phe Lys Lys Ala Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ser

[1053] Gly Gly Gly Gly Gly Ser Ala Gly Ser Val Ser Lys Gly Glu Glu Asp

[1054] Asn Met Ala Ile Ile Lys Glu Phe Met Arg Phe Lys Val His Met Glu

[1055] Gly Ser Val Asn Gly His Glu Phe Glu Ile Glu Gly Glu Gly Glu Gly

[1056] Arg Pro Tyr Glu Gly Thr Gln Thr Ala Lys Leu Lys Val Thr Lys Gly

[1057] Gly Pro Leu Pro Phe Ala Trp Asp Ile Leu Ser Pro Gln Phe Met Tyr

[1058] Gly Ser Lys Ala Tyr Val Lys His Pro Ala Asp Ile Pro Asp Tyr Leu

[1059] Lys Leu Ser Phe Pro Glu Gly Phe Lys Trp Glu Arg Val Met Asn Phe

[1060] Glu Asp Gly Gly Val Val Thr Val Thr Gln Asp Ser Ser Leu Gln Asp

[1061] Gly Glu Phe Ile Tyr Lys Val Lys Leu Arg Gly Thr Asn Phe Pro Ser

[1062] Asp Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Met Gly Trp Glu Ala Ser Ser

[1063] Glu Arg Met Tyr Pro Glu Asp Gly Ala Leu Lys Gly Glu Ile Lys Gln

[1064] Arg Leu Lys Leu Lys Asp Gly Gly His Tyr Asp Ala Glu Val Lys Thr

[1065] Thr Tyr Lys Ala Lys Lys Pro Val Gln Leu Pro Gly Ala Tyr Asn Val

[1066] Asn Ile Lys Leu Asp Ile Thr Ser His Asn Glu Asp Tyr Thr Ile Val

[1067] Glu Gln Tyr Glu Arg Ala Glu Gly Arg His Ser Thr Gly Gly Met Asp

[1068] Glu Leu Tyr Lys

[1069] 서열목록 161

[1070] Met Lys Leu Ser Leu Val Ala Ala Met Leu Leu Leu Leu Ser Ala Ala

[1071] Arg Ala Val Ser Lys Gly Glu Glu Asp Asn Met Ala Ile Ile Lys Glu

[1072] Phe Met Arg Phe Lys Val His Met Glu Gly Ser Val Asn Gly His Glu

[1073] Phe Glu Ile Glu Gly Glu Gly Glu Gly Arg Pro Tyr Glu Gly Thr Gln

[1074] Thr Ala Lys Leu Lys Val Thr Lys Gly Gly Pro Leu Pro Phe Ala Trp

[1075] Asp Ile Leu Ser Pro Gln Phe Met Tyr Gly Ser Lys Ala Tyr Val Lys

[1076] His Pro Ala Asp Ile Pro Asp Tyr Leu Lys Leu Ser Phe Pro Glu Gly

[1077] Phe Lys Trp Glu Arg Val Met Asn Phe Glu Asp Gly Gly Val Val Thr

[1078] Val Thr Gln Asp Ser Ser Leu Gln Asp Gly Glu Phe Ile Tyr Lys Val

[1079] Lys Leu Arg Gly Thr Asn Phe Pro Ser Asp Gly Pro Val Met Gln Lys

[1080] Lys Thr Met Gly Trp Glu Ala Ser Ser Glu Arg Met Tyr Pro Glu Asp

[1081] Gly Ala Leu Lys Gly Glu Ile Lys Gln Arg Leu Lys Leu Lys Asp Gly

[1082] Gly His Tyr Asp Ala Glu Val Lys Thr Thr Tyr Lys Ala Lys Lys Pro

[1083] Val Gln Leu Pro Gly Ala Tyr Asn Val Asn Ile Lys Leu Asp Ile Thr

[1084] Ser His Asn Glu Asp Tyr Thr Ile Val Glu Gln Tyr Glu Arg Ala Glu

[1085] Gly Arg His Ser Thr Gly Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Gly Gly Gly

[1086] Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser

[1087] Glu Asp Gln Val Asp Pro Arg Leu Ile Asp Gly Lys Ser Gly Gly Gly

[1088] Lys Lys Lys Lys Lys Phe Ser Phe Lys Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly

[1089] Gly Gly Gly Ala Ile Thr Cys Leu Ser Phe Ile Thr Phe Tyr Val Ala

[1090] Ala Phe Met Val Leu Leu

[1091]

[1092] 서열목록 162

[1093] Met Lys Leu Ser Leu Val Ala Ala Met Leu Leu Leu Leu Ser Ala Ala

[1094] Arg Ala Val Ser Lys Gly Glu Glu Asp Asn Met Ala Ile Ile Lys Glu

[1095] Phe Met Arg Phe Lys Val His Met Glu Gly Ser Val Asn Gly His Glu

[1096] Phe Glu Ile Glu Gly Glu Gly Glu Gly Arg Pro Tyr Glu Gly Thr Gln

[1097] Thr Ala Lys Leu Lys Val Thr Lys Gly Gly Pro Leu Pro Phe Ala Trp

[1098] Asp Ile Leu Ser Pro Gln Phe Met Tyr Gly Ser Lys Ala Tyr Val Lys

[1099] His Pro Ala Asp Ile Pro Asp Tyr Leu Lys Leu Ser Phe Pro Glu Gly

[1100] Phe Lys Trp Glu Arg Val Met Asn Phe Glu Asp Gly Gly Val Val Thr

[1101] Val Thr Gln Asp Ser Ser Leu Gln Asp Gly Glu Phe Ile Tyr Lys Val

[1102] Lys Leu Arg Gly Thr Asn Phe Pro Ser Asp Gly Pro Val Met Gln Lys

[1103] Lys Thr Met Gly Trp Glu Ala Ser Ser Glu Arg Met Tyr Pro Glu Asp

[1104] Gly Ala Leu Lys Gly Glu Ile Lys Gln Arg Leu Lys Leu Lys Asp Gly

[1105] Gly His Tyr Asp Ala Glu Val Lys Thr Thr Tyr Lys Ala Lys Lys Pro

[1106] Val Gln Leu Pro Gly Ala Tyr Asn Val Asn Ile Lys Leu Asp Ile Thr

[1107] Ser His Asn Glu Asp Tyr Thr Ile Val Glu Gln Tyr Glu Arg Ala Glu

[1108] Gly Arg His Ser Thr Gly Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Gly Gly Gly

[1109] Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser

[1110] Glu Asp Gln Val Asp Pro Arg Leu Ile Asp Gly Lys Ser Gly Gly Gly

[1111] Lys His Lys Glu Lys Met Ser Lys Asp Gly Lys Lys Lys Lys Lys Lys

[1112] Ser Lys Thr Lys Cys Val Ile Met

[1113] 서열목록 163

[1114] Met Gly Asn Glu Ala Ser Leu Glu Gly Gly Ala Gly Glu Gly Pro Leu

[1115] Pro Pro Gly Gly Ser Gly Gly Lys Lys Lys Lys Lys Phe Ser Phe Lys

[1116] Lys Ala Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Asp Gln Val

[1117] Asp Pro Arg Leu Ile Asp Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

[1118] Gly Gly Gly Ser Ala Gly Ser Val Ser Lys Gly Glu Glu Asp Asn Met

[1119] Ala Ile Ile Lys Glu Phe Met Arg Phe Lys Val His Met Glu Gly Ser

[1120] Val Asn Gly His Glu Phe Glu Ile Glu Gly Glu Gly Glu Gly Arg Pro

[1121] Tyr Glu Gly Thr Gln Thr Ala Lys Leu Lys Val Thr Lys Gly Gly Pro

[1122] Leu Pro Phe Ala Trp Asp Ile Leu Ser Pro Gln Phe Met Tyr Gly Ser

[1123] Lys Ala Tyr Val Lys His Pro Ala Asp Ile Pro Asp Tyr Leu Lys Leu

[1124] Ser Phe Pro Glu Gly Phe Lys Trp Glu Arg Val Met Asn Phe Glu Asp

[1125] Gly Gly Val Val Thr Val Thr Gln Asp Ser Ser Leu Gln Asp Gly Glu

[1126] Phe Ile Tyr Lys Val Lys Leu Arg Gly Thr Asn Phe Pro Ser Asp Gly

[1127] Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Met Gly Trp Glu Ala Ser Ser Glu Arg

[1128] Met Tyr Pro Glu Asp Gly Ala Leu Lys Gly Glu Ile Lys Gln Arg Leu

[1129] Lys Leu Lys Asp Gly Gly His Tyr Asp Ala Glu Val Lys Thr Thr Tyr

[1130] Lys Ala Lys Lys Pro Val Gln Leu Pro Gly Ala Tyr Asn Val Asn Ile

[1131] Lys Leu Asp Ile Thr Ser His Asn Glu Asp Tyr Thr Ile Val Glu Gln

[1132] Tyr Glu Arg Ala Glu Gly Arg His Ser Thr Gly Gly Met Asp Glu Leu

[1133] Tyr Lys

[1134]

[1135] 서열목록 164

[1136] Met Lys Leu Ser Leu Val Ala Ala Met Leu Leu Leu Leu Ser Ala Ala

[1137] Arg Ala Val Ser Lys Gly Glu Glu Asp Asn Met Ala Ile Ile Lys Glu

[1138] Phe Met Arg Phe Lys Val His Met Glu Gly Ser Val Asn Gly His Glu

[1139] Phe Glu Ile Glu Gly Glu Gly Glu Gly Arg Pro Tyr Glu Gly Thr Gln

[1140] Thr Ala Lys Leu Lys Val Thr Lys Gly Gly Pro Leu Pro Phe Ala Trp

[1141] Asp Ile Leu Ser Pro Gln Phe Met Tyr Gly Ser Lys Ala Tyr Val Lys

[1142] His Pro Ala Asp Ile Pro Asp Tyr Leu Lys Leu Ser Phe Pro Glu Gly

[1143] Phe Lys Trp Glu Arg Val Met Asn Phe Glu Asp Gly Gly Val Val Thr

[1144] Val Thr Gln Asp Ser Ser Leu Gln Asp Gly Glu Phe Ile Tyr Lys Val

[1145] Lys Leu Arg Gly Thr Asn Phe Pro Ser Asp Gly Pro Val Met Gln Lys

[1146] Lys Thr Met Gly Trp Glu Ala Ser Ser Glu Arg Met Tyr Pro Glu Asp

[1147] Gly Ala Leu Lys Gly Glu Ile Lys Gln Arg Leu Lys Leu Lys Asp Gly

[1148] Gly His Tyr Asp Ala Glu Val Lys Thr Thr Tyr Lys Ala Lys Lys Pro

[1149] Val Gln Leu Pro Gly Ala Tyr Asn Val Asn Ile Lys Leu Asp Ile Thr

[1150] Ser His Asn Glu Asp Tyr Thr Ile Val Glu Gln Tyr Glu Arg Ala Glu

[1151] Gly Arg His Ser Thr Gly Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Gly Gly Gly

[1152] Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser

[1153] Glu Asp Gln Val Asp Pro Arg Leu Ile Asp Gly Lys Ser Gly Gly Gly

[1154] Lys His Lys Glu Lys Met Ser Lys Asp Gly Lys Lys Lys Lys Lys Phe

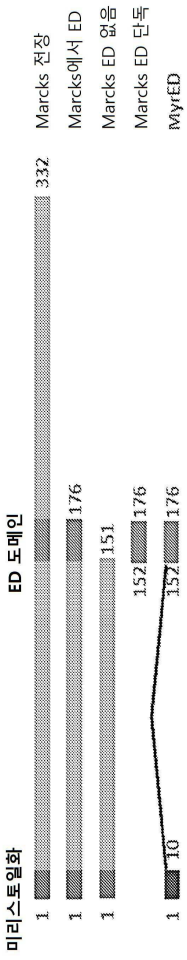
[1155] Ser Phe Lys Lys Ser Lys Thr Lys Cys Val Ile Met

[1156] 서열목록 165

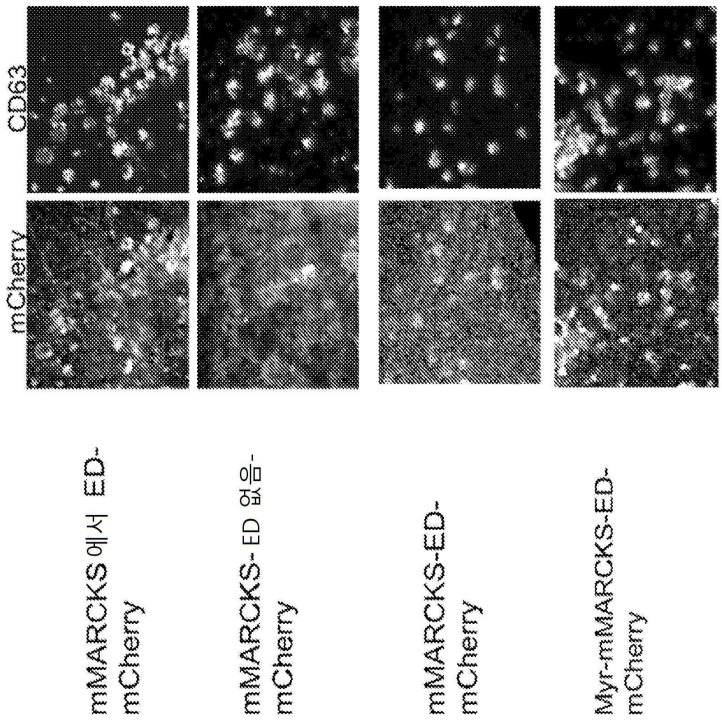
[1157] Cys Val Ile Met

도면

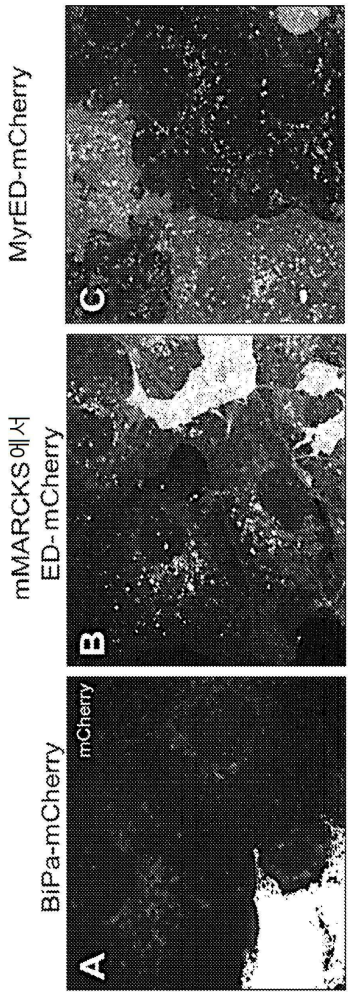
도면1



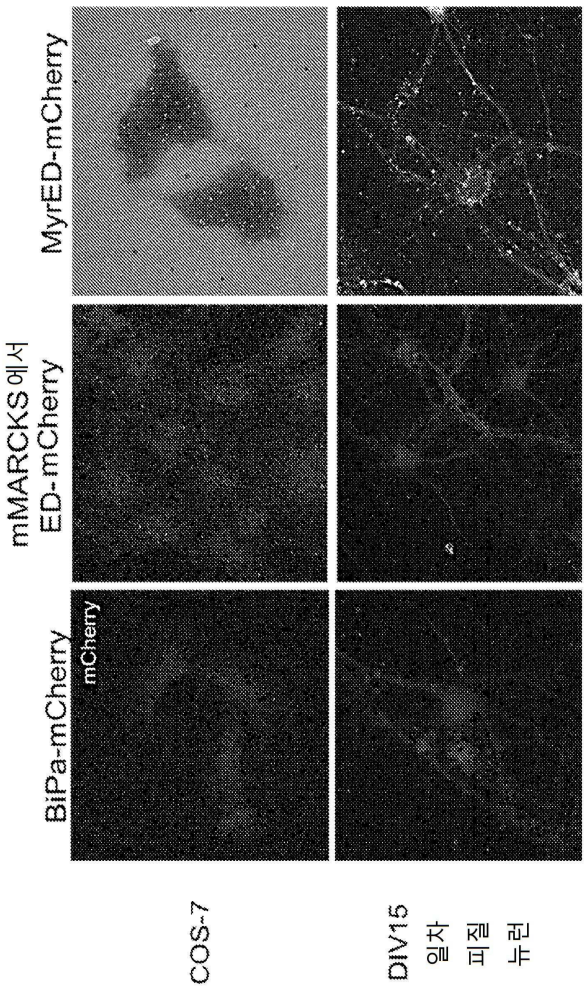
도면2


CD63
mCherry
mMARCKS 에서 ED-mCherry
mMARCKS- ED 없음-mCherry
mMARCKS-ED-mCherry
Myr-mMARCKS-ED-mCherry

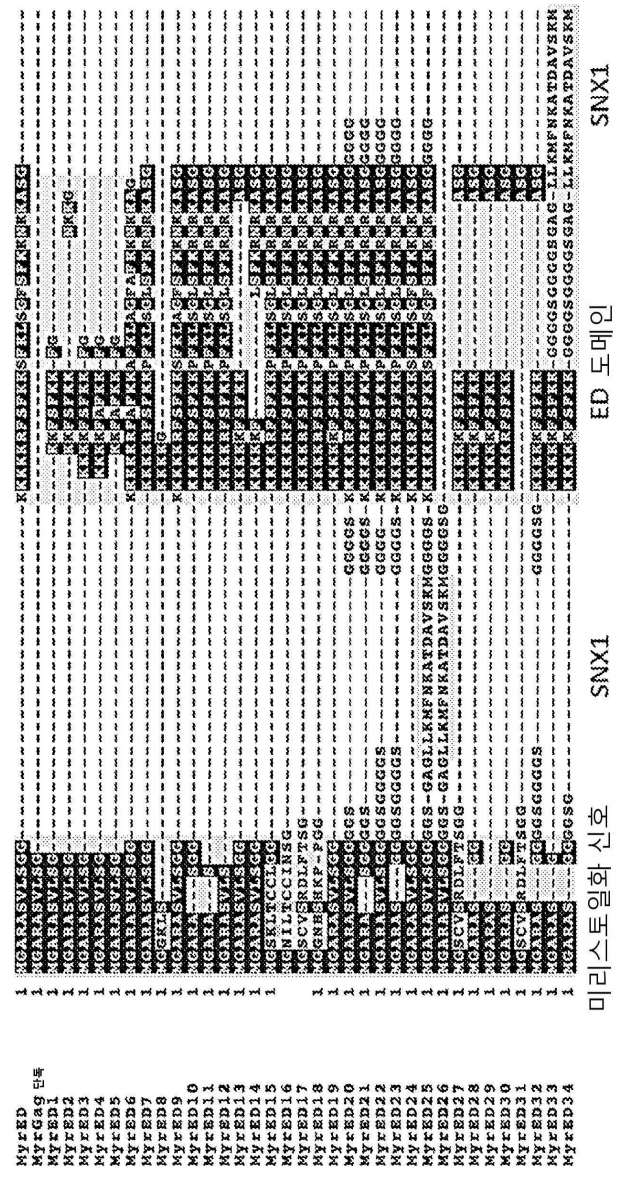
도면3


BiPa-mCherry
mCherry
A
mMARCKS에서
ED-mCherry
B
MyrED-mCherry
C

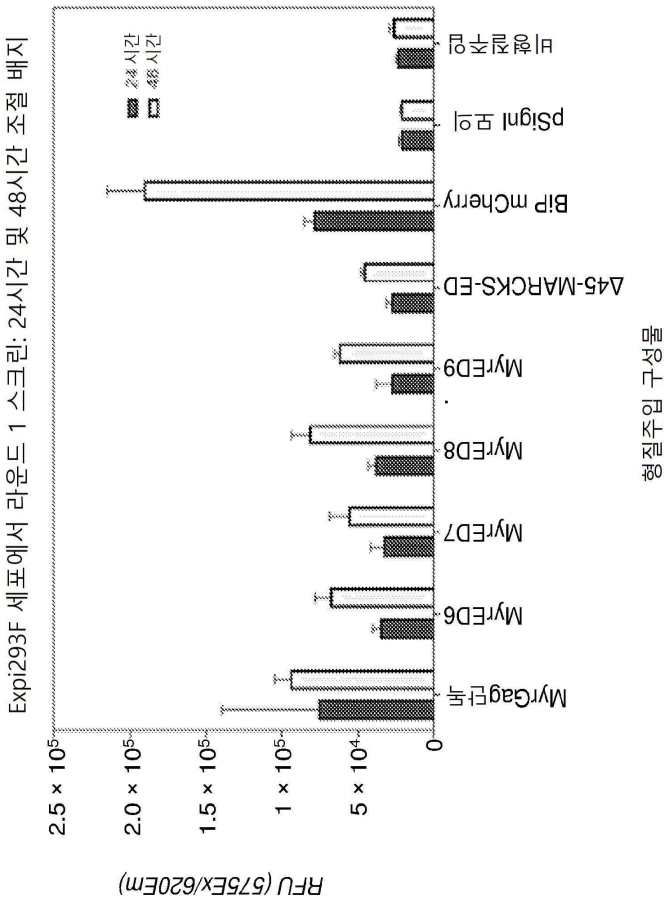
도면4


MyrED-mCherry
mMARCKS에서
ED-mCherry
BiPa-mCherry
mCherry
COS-7
DIV15
일차
피질
뉴런

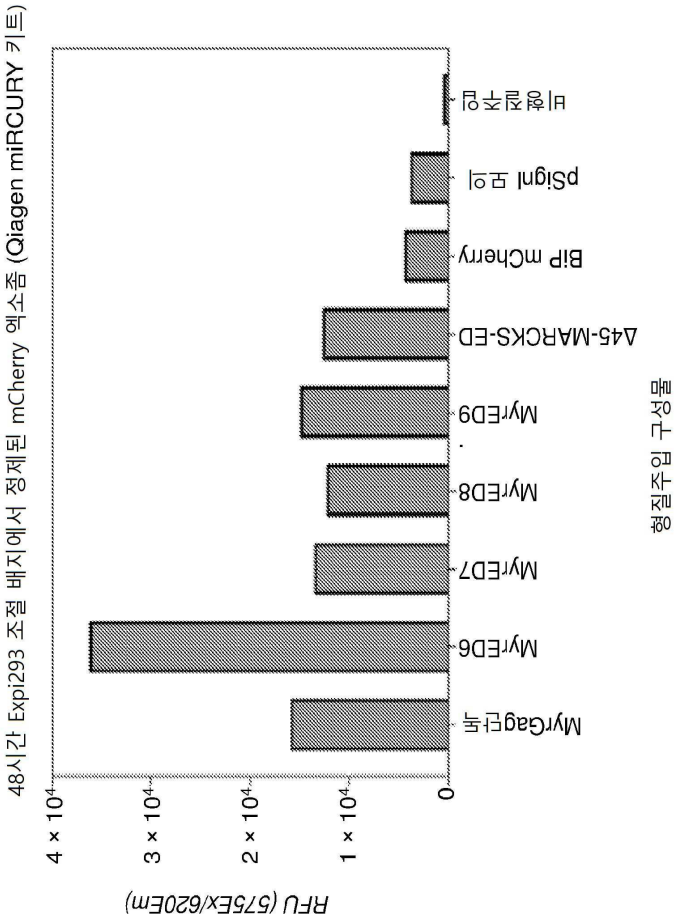
도면5



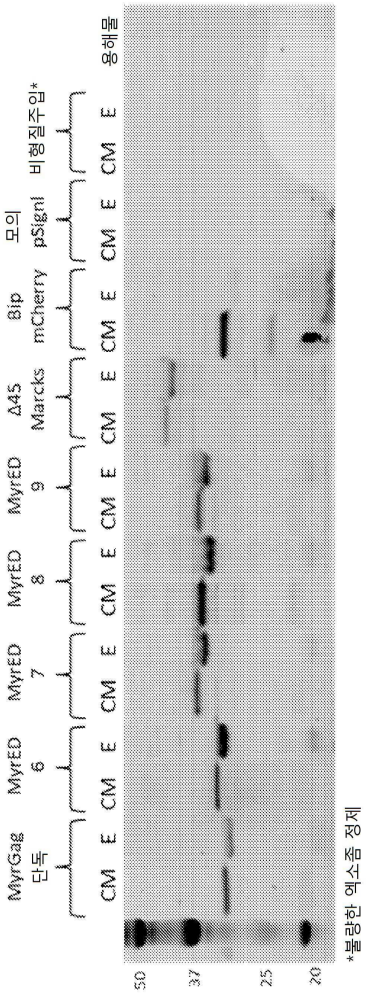
도면6a


Expi293F 세포에서 라운드 1 스크린: 24시간 및 48시간 조절 배지
24 시간
48 시간
RFU (575Ex/620Em)
2.5 × 10^5
2.0 × 10^5
1.5 × 10^5
1 × 10^5
5 × 10^4
0
MyrGag단독
MyrED6
MyrED7
MyrED8
MyrED9
Δ45-MARCKS-ED
BiP mCherry
pSignal 모의
비형질주입
형질주입 구성물

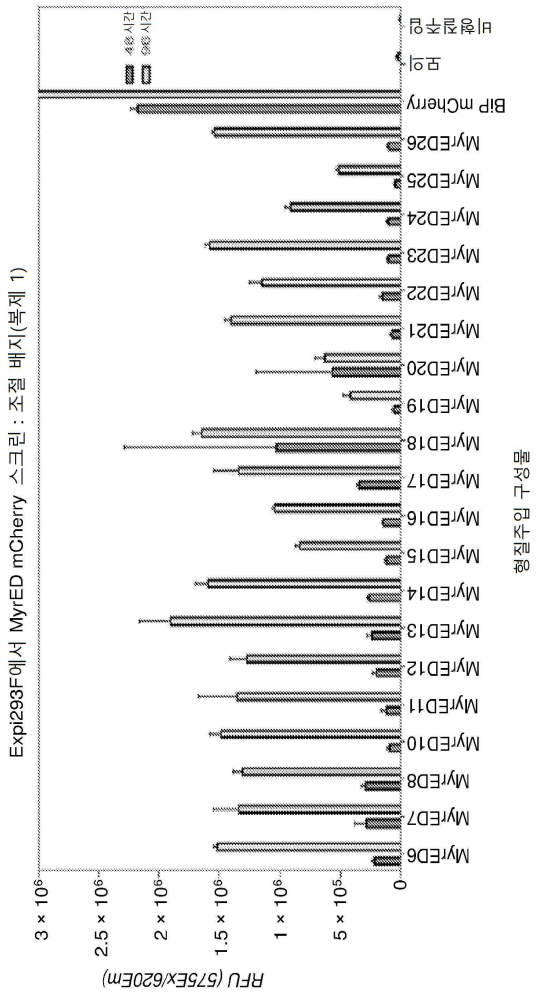
도면6b


48시간 Expi293 조절 배지에서 정제된 mCherry 엑소좀 (Qiagen miRCURY 키트)
RFU (575Ex/620Em)
4 × 10⁴
3 × 10⁴
2 × 10⁴
1 × 10⁴
0
MyrGag단독
MyrED6
MyrED7
MyrED8
MyrED9
Δ45-MARCKS-ED
BIP mCherry
pSigni 모의
비형질주입
형질주입 구성물

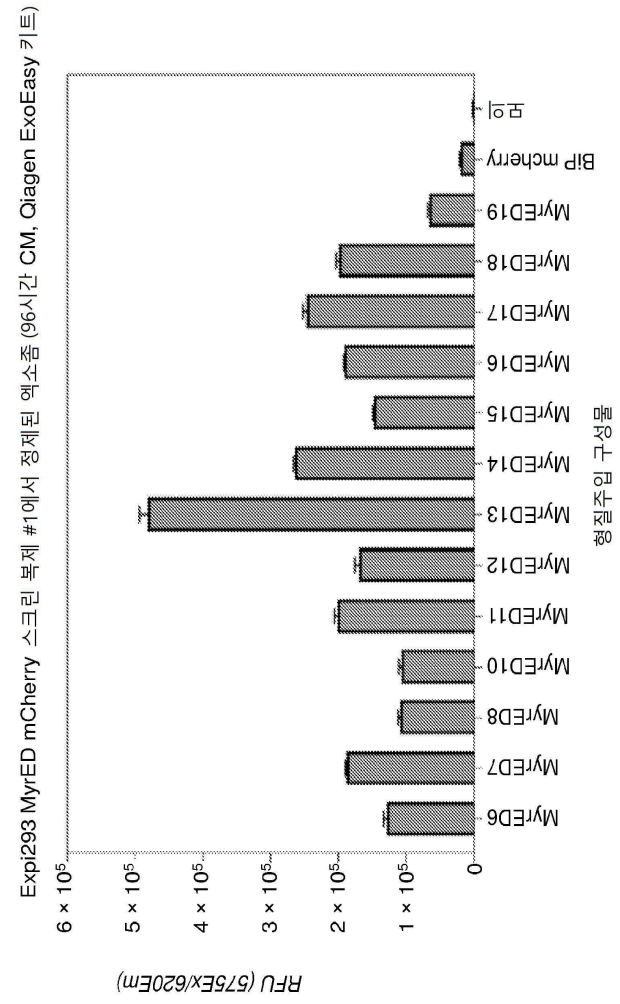
도면6c


MyrGag 단독
MyrED 6
MyrED 7
MyrED 8
MyrED 9
Δ45 Marcks
Bip mCherry
모의 pSignl
비형질주입*
용해물
CM E
50
37
25
20
*불량한 엑소좀 정제

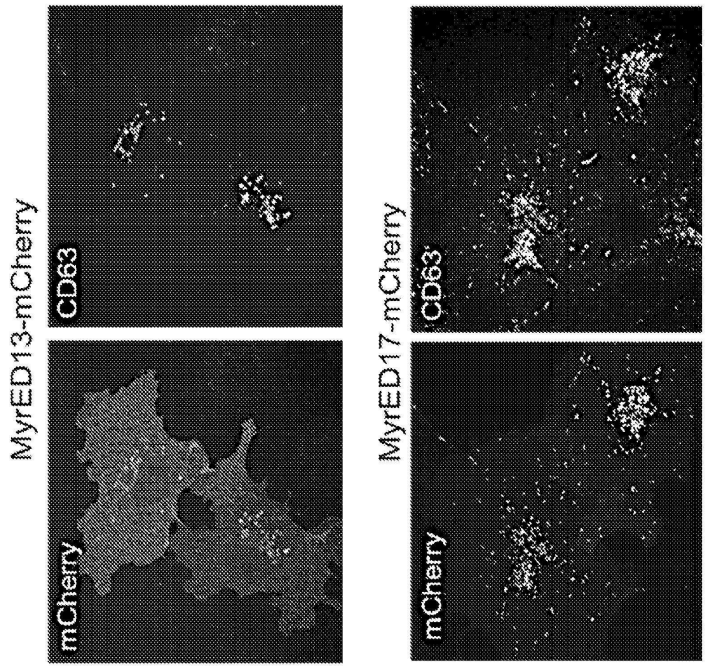
도면7a


Expi293F에서 MyrED mCherry 스크린 : 조절 배지(복제 1)
RFU (575Ex/620Em)
3 × 10⁶
2.5 × 10⁶
2 × 10⁶
1.5 × 10⁶
1 × 10⁶
5 × 10⁵
0
MyrED6
MyrED7
MyrED8
MyrED10
MyrED11
MyrED12
MyrED13
MyrED14
MyrED15
MyrED16
MyrED17
MyrED18
MyrED19
MyrED20
MyrED21
MyrED22
MyrED23
MyrED24
MyrED25
MyrED26
BiP mCherry
모의
비형질주입
48 시간
96 시간
형질주입 구성물

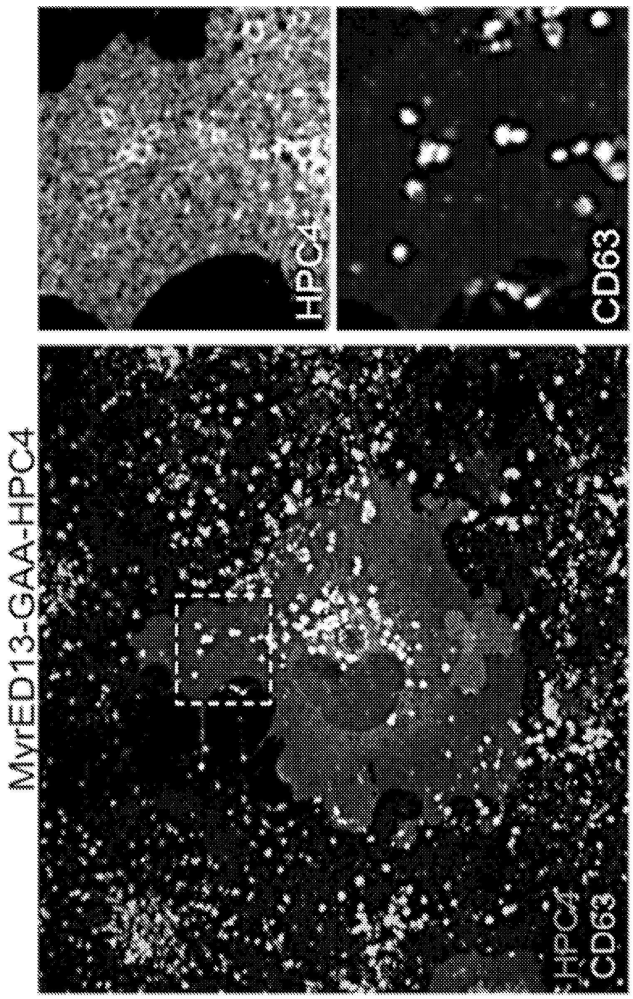
도면7b


Expi293 MyrED mCherry 스크린 복제 #1에서 정제된 엑소좀 (96시간 CM, Qiagen ExoEasy 키트)
RFU (575Ex/620Em)
6 × 10^5
5 × 10^5
4 × 10^5
3 × 10^5
2 × 10^5
1 × 10^5
0
MyrED6
MyrED7
MyrED8
MyrED10
MyrED11
MyrED12
MyrED13
MyrED14
MyrED15
MyrED16
MyrED17
MyrED18
MyrED19
BiP mcherry
없음
형질주입 구성물

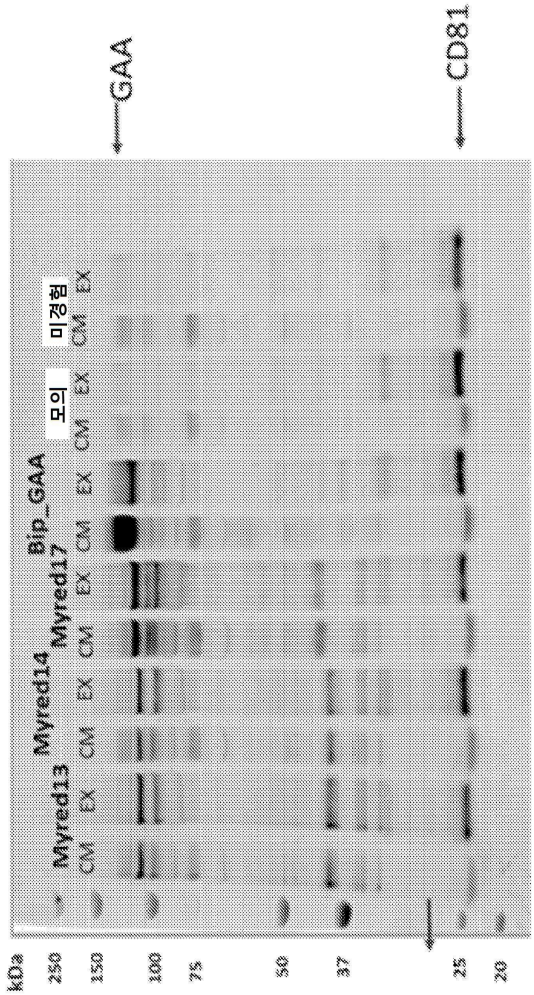
도면7c


MyrED13-mCherry
mCherry
CD63
MyrED17-mCherry
mCherry
CD63

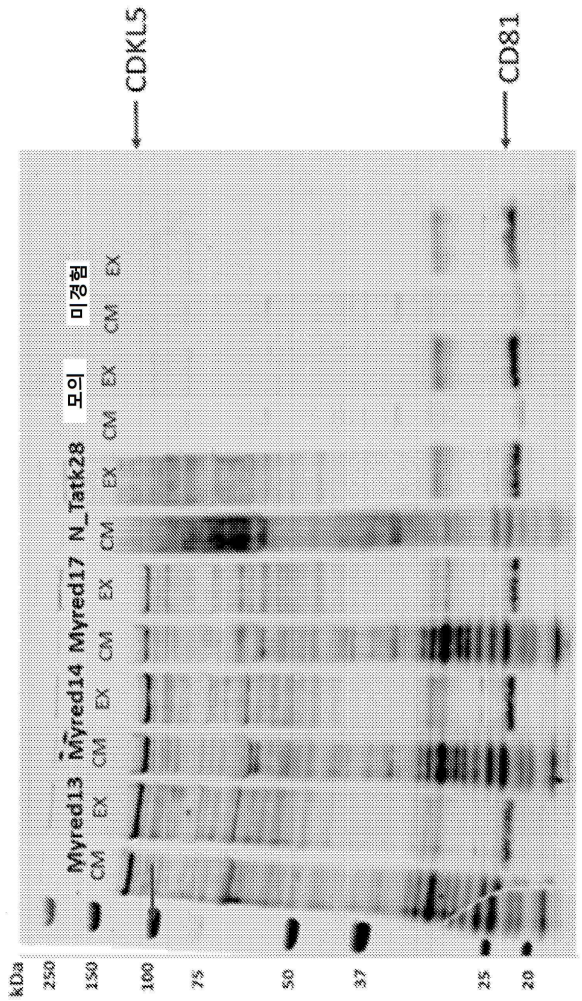
도면8a



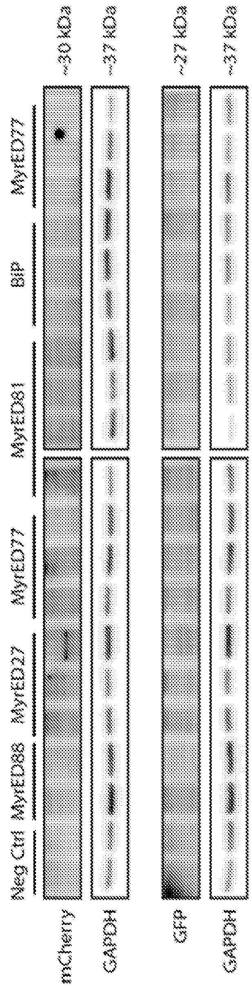
도면8b


GAA
CD81
kDa
250
150
100
75
50
37
25
20
Bip_GAA
Myred13
Myred14
Myred17
CM
EX
모의
미감염

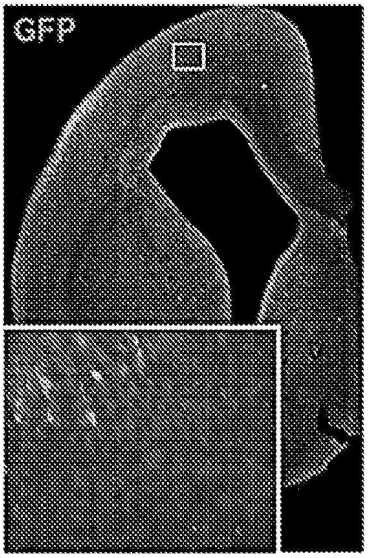
도면8c


CDKL5
CD81
미경험
모의
Myred13
Myred14
Myred17
N_Tatk28
CM
EX
kDa
250
150
100
75
50
37
25
20

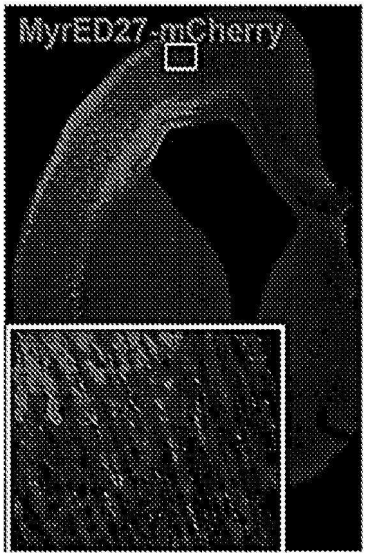
도면9


~30 kDa
~37 kDa
~27 kDa
~37 kDa
Neg Ctrl
MyrED88
MyrED27
MyrED77
MyrED81
BiP
MyrED77
mCherry
GAPDH
GFP
GAPDH

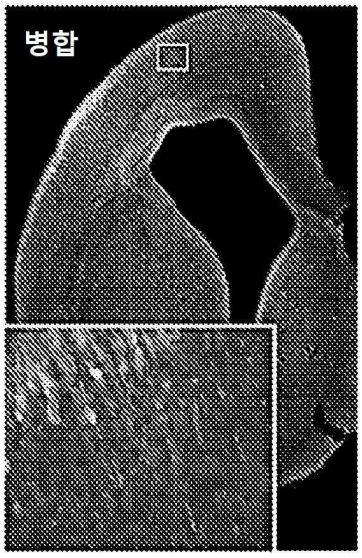
도면10a


GFP

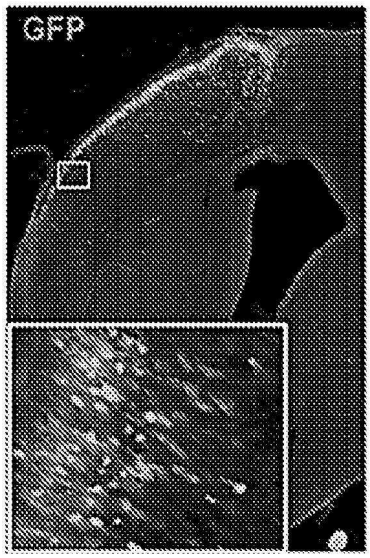
도면10b



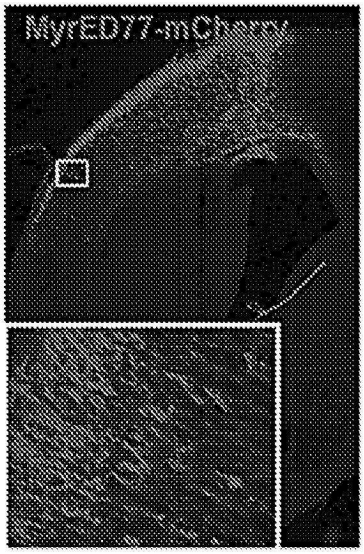
도면10c



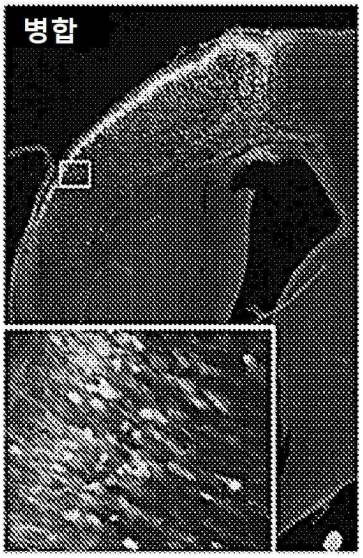
도면11a



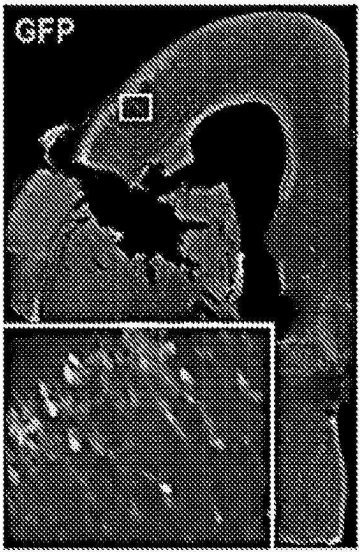
도면11b



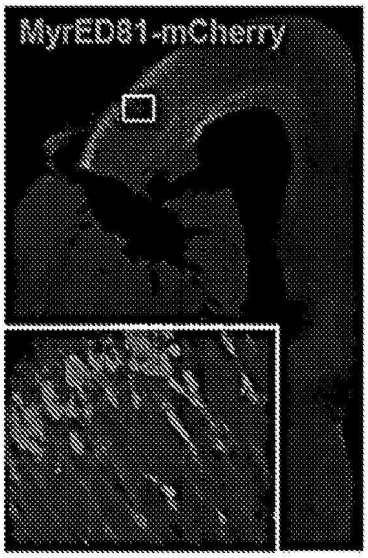
도면11c



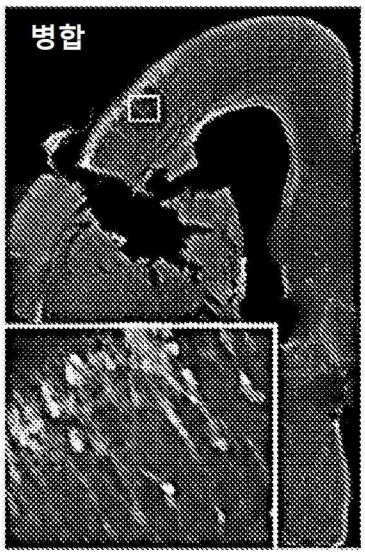
도면12a



도면12b



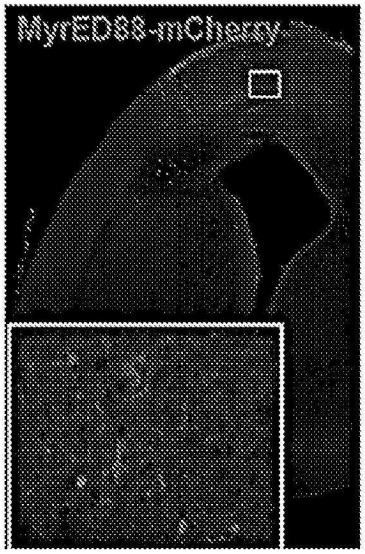
도면12c



도면13a



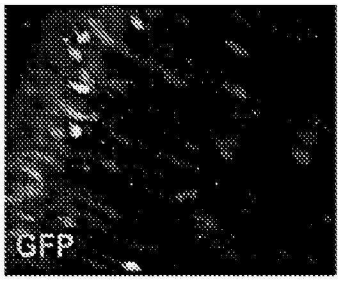
도면13b



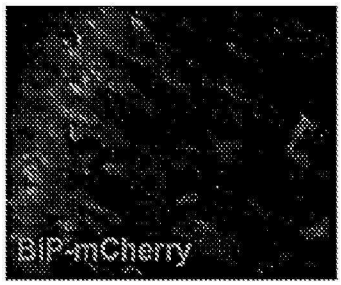
도면13c



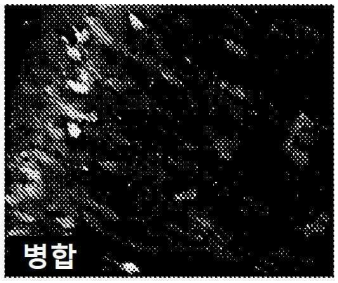
도면14a



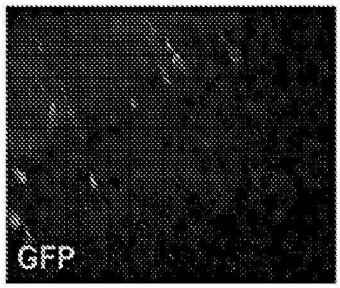
도면14b



도면14c



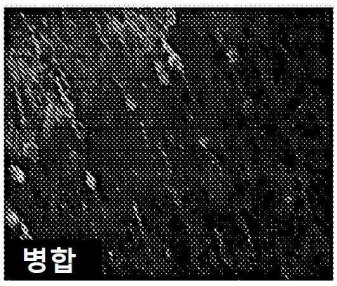
도면14d



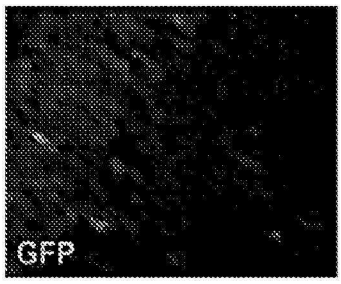
도면14e



도면14f



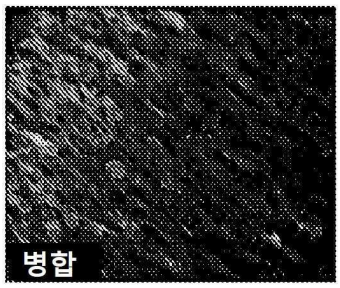
도면14g



도면14h



도면14i



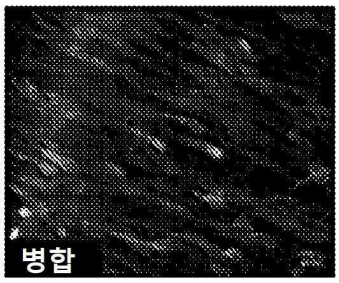
도면14j



도면14k



도면14l



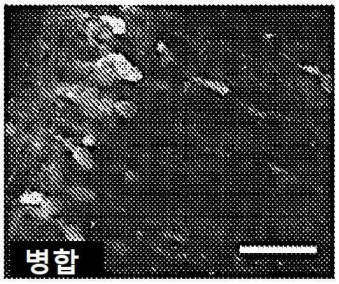
도면14m



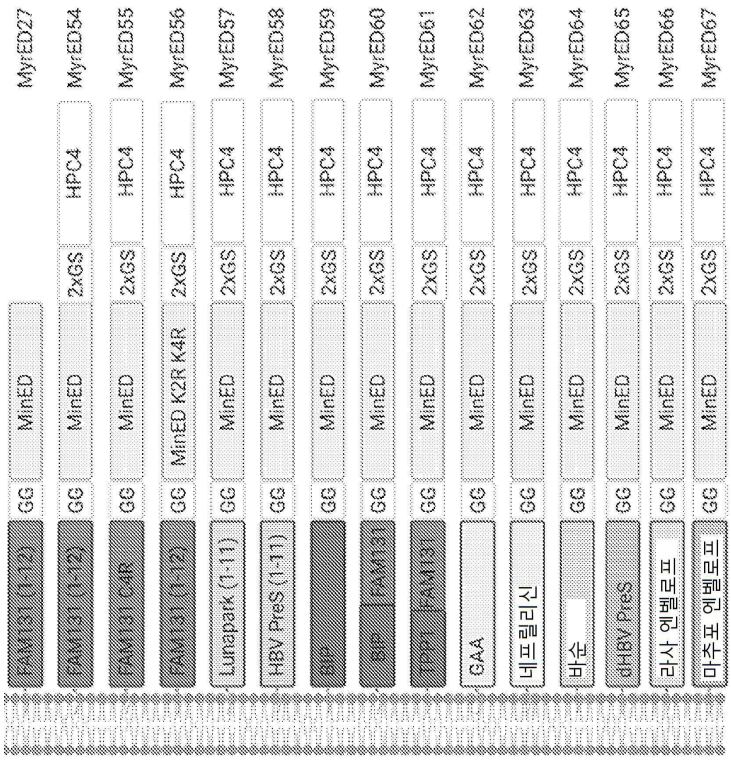
도면14n



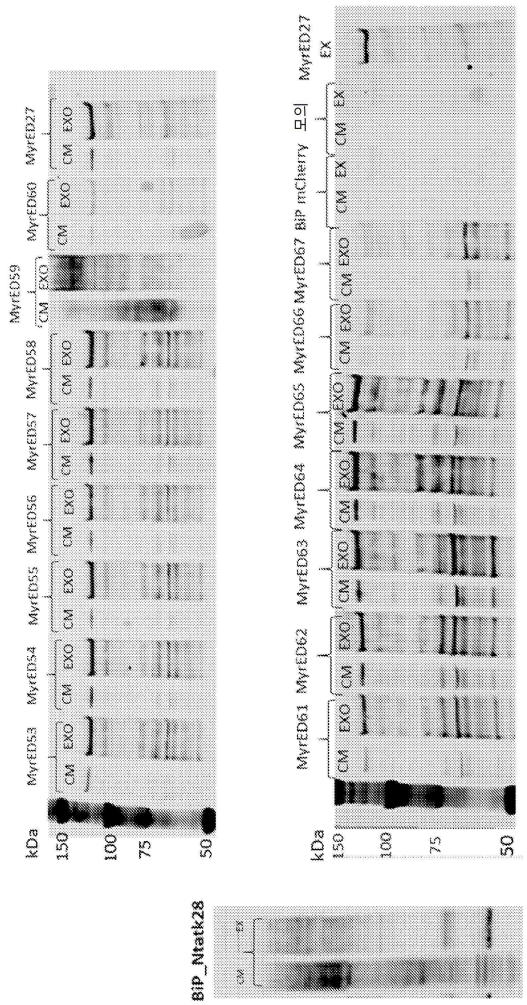
도면14o



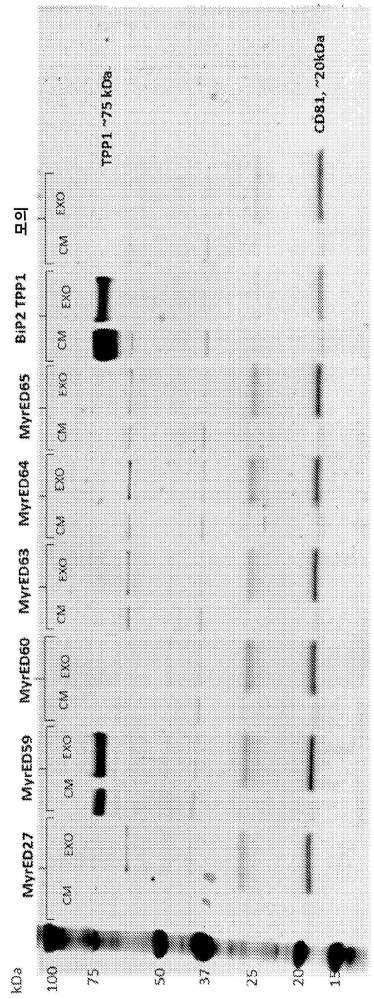
도면15a


MyrED27
MyrED54
MyrED55
MyrED56
MyrED57
MyrED58
MyrED59
MyrED60
MyrED61
MyrED62
MyrED63
MyrED64
MyrED65
MyrED66
MyrED67
MinED
2xGS
HPC4
GG
FAM131 (1-12)
FAM131 (1-12)
FAM131 K4R
FAM131 (1-12)
Lunapark (1-11)
HBV PreS (1-11)
BIP
BIP
FAM131
FAM131
GAA
네프릴리신
바순
dHBV PreS
라사 엔벨로프
마추포 엔벨로프
MinED K2R K4R

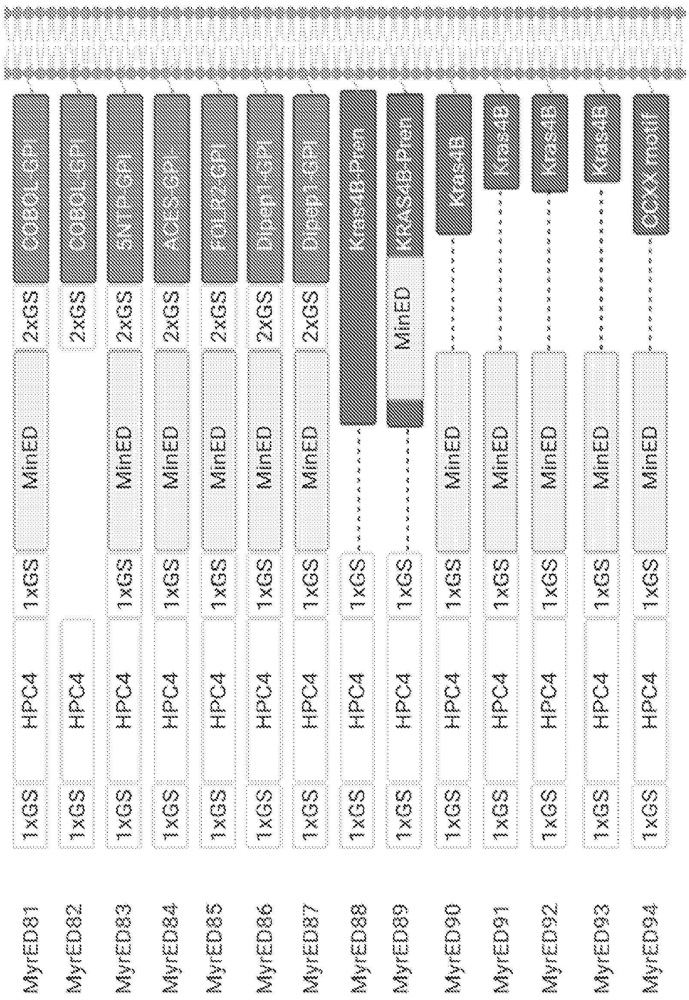
도면15b


kDa
150
100
75
50
MyrED53
MyrED54
MyrED55
MyrED56
MyrED57
MyrED58
MyrED59
MyrED60
MyrED27
CM
EXO
MyrED61
MyrED62
MyrED63
MyrED64
MyrED65
MyrED66
MyrED67
BiP mCherry
모의
EX
MyrED27
EX
BiP_Ntatk28

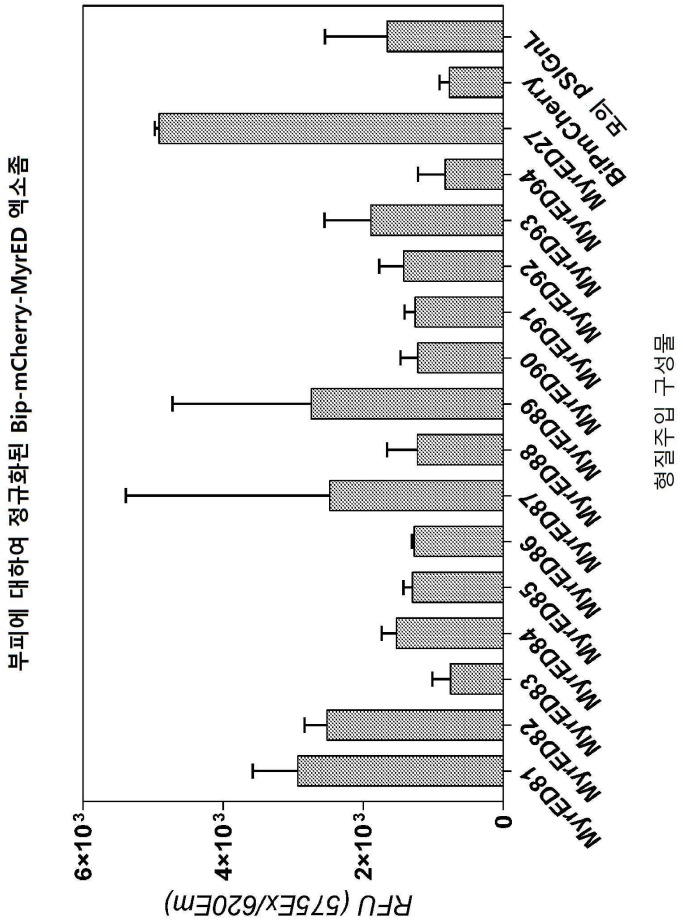
도면16


kDa
100
75
50
37
25
20
15
MyrED27
MyrED59
MyrED60
MyrED63
MyrED64
MyrED65
BiP2 TPP1
모의
CM
EXO
TPP1, ~75 kDa
CD81, ~20kDa

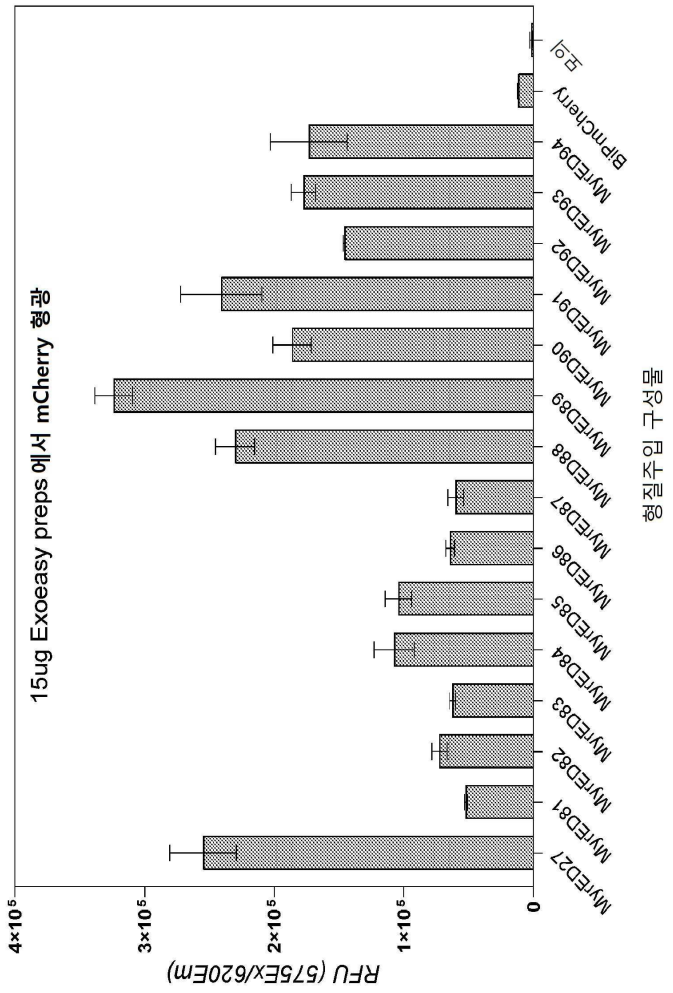
도면17a


MyrED81
MyrED82
MyrED83
MyrED84
MyrED85
MyrED86
MyrED87
MyrED88
MyrED89
MyrED90
MyrED91
MyrED92
MyrED93
MyrED94
1xGS
HPC4
1xGS
MinED
2xGS
Cb5B0L-GPI
Cb5B0L-GPI
3N1P-GPI
ACaS-GPI
FGFR2-GPI
Dpp1-GPI
Dpp1-GPI
Kras4B-Prot
MRASC4B-Prot
Kras4B
Kras4B
Kras4B
Kras4B
6GxX-motif

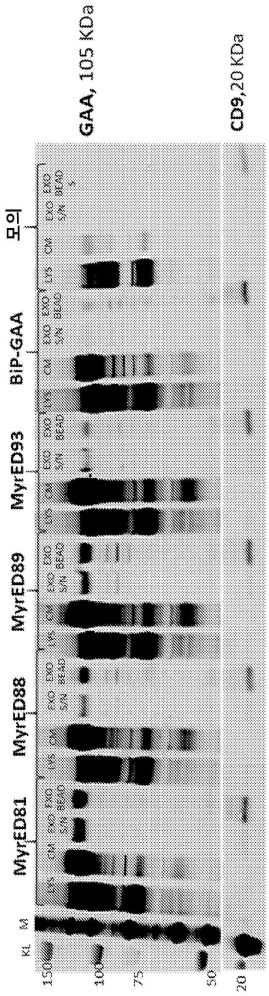
도면17b


부피에 대하여 정규화된 Bip-mCherry-MyrED 엑소좀
RFU (575Ex/620Em)
6×10^3
4×10^3
2×10^3
0
형질주입 구성물
MyrED81
MyrED82
MyrED83
MyrED84
MyrED85
MyrED86
MyrED87
MyrED88
MyrED89
MyrED90
MyrED91
MyrED92
MyrED93
MyrED94
BiPmCherry27
대조 pSIGnL

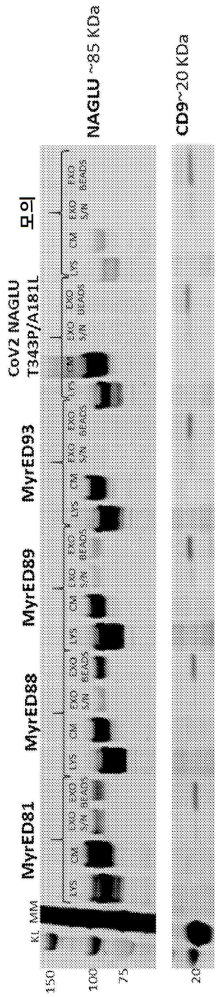
도면18


15ug Exoeasy preps 에서 mCherry 형광
RFU (575Ex/620Em)
4×10⁵
3×10⁵
2×10⁵
1×10⁵
0
형질주입 구성물
MyrED27
MyrED81
MyrED82
MyrED83
MyrED84
MyrED85
MyrED86
MyrED87
MyrED88
MyrED89
MyrED90
MyrED91
MyrED92
MyrED93
MyrED94
BiPmCherry
음성

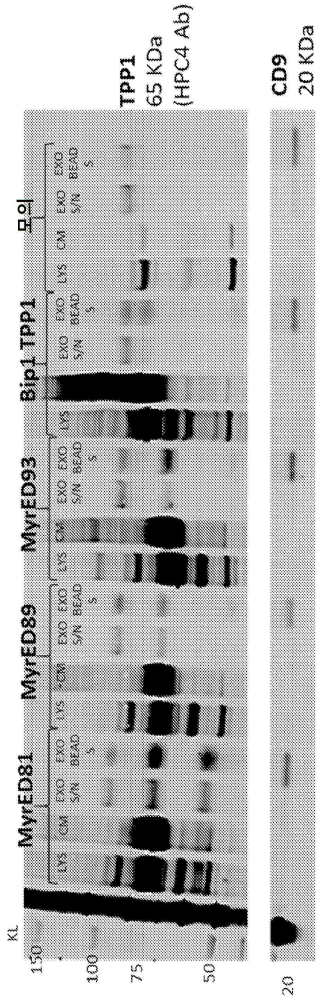
도면19


GAA, 105 KDa
CD9,20 KDa
모의
BiP-GAA
MyrED93
MyrED89
MyrED88
MyrED81
M
KL
150
100
75
50
20

도면20


NAGLU ~85 KDa
CD9~20 KDa
모의
CoV2 NAGLU T343P/A181L
MyrED93
MyrED89
MyrED88
MyrED81
KL MM
150
100
75
20

도면21



서 열 목 록 (첨부)

아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

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