



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년02월13일
(11) 등록번호 10-2766526
(24) 등록일자 2025년02월06일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/86 (2006.01) A61K 38/37 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) C07K 14/755 (2006.01)
C12N 7/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 15/86 (2013.01)
A61K 38/37 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-7014472
- (22) 출원일자(국제) 2016년07월13일
심사청구일자 2021년07월13일
- (85) 번역문제출일자 2018년05월23일
- (65) 공개번호 10-2018-0069054
- (43) 공개일자 2018년06월22일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2016/042099
- (87) 국제공개번호 WO 2017/074526
국제공개일자 2017년05월04일
- (30) 우선권주장
62/247,469 2015년10월28일 미국(US)
(뒷면에 계속)
- (56) 선행기술조사문헌
WO2014064277 A1
US20150071883 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
상가모 테라퓨틱스, 인코포레이티드
미국 캘리포니아주 94804 리치먼드 스위트 에이
100 501 카날 불러바드
- (72) 발명자
라일리, 브리짓 이.
미국 94804 캘리포니아주 리치먼드 스위트
에이100 커널 불러바드 501 포인트 리치먼드 테크
센터 상가모 테라퓨틱스, 인코포레이티드 내
이, 게리, 케이.
미국 94804 캘리포니아주 리치먼드 스위트
에이100 커널 불러바드 501 포인트 리치먼드 테크
센터 상가모 테라퓨틱스, 인코포레이티드 내
- (74) 대리인
양영준, 김영

전체 청구항 수 : 총 42 항

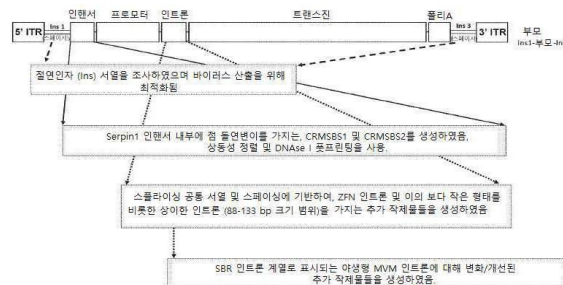
심사관 : 전명숙

(54) 발명의 명칭 간-특이적 작제물인, 인자 VIII 발현 카세트 및 이의 사용 방법

(57) 요약

본 출원은 유전자 치료 분야, 특히, 유익한 (치료적) 단백질의 발현을 위해 간에 트랜스진(transgene)-인코딩 작제물을 표적화 전달하는 것에 관한 것이다. 특히, 본 출원은 혈우병, 가령, 혈우병 A의 치료에 관한 것이다. 본 발명은 간 세포에서 트랜스진을 발현시키기 위한 조성물 및 방법들을 설명한다. 트랜스진은 염색체-외부에서 (에피솜적으로) 발현될 수 있거나 간 세포의 유전체 내부에 통합될 수 있다. 일부 구체예들에서, 트랜스진은 응고 연쇄반응에 관여하는 단백질을 인코딩한다. 바람직한 구체예들에서, 트랜스진은 FVIII 폴리펩티드를 인코딩한다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 48/00 (2024.01)
A61K 48/0058 (2013.01)
C07K 14/755 (2013.01)
C12N 7/00 (2013.01)
C12N 2750/14143 (2013.01)
C12N 2750/14145 (2013.01)
C12N 2750/14171 (2013.01)
C12N 2830/008 (2013.01)

(30) 우선권주장

62/307,897	2016년03월14일	미국(US)
62/315,438	2016년03월30일	미국(US)
62/326,229	2016년04월22일	미국(US)
62/355,106	2016년06월27일	미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

서열 번호:34를 포함하는 폴리뉴클레오티드 발현 작제물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 폴리뉴클레오티드 발현 작제물은 5' 반전 말단 반복부 (ITR) 및 3' ITR에 의해 연결됨을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드 발현 작제물.

청구항 3

청구항 1의 폴리뉴클레오티드 발현 작제물을 포함하는 벡터.

청구항 4

청구항 3에 있어서, 벡터는 바이러스 또는 비-바이러스 벡터임을 특징으로 하는 벡터.

청구항 5

청구항 4에 있어서, 벡터는 폴리뉴클레오티드 발현 작제물을 포함하는 아데노-연관 바이러스 (AAV) 벡터이고, 여기서 폴리뉴클레오티드 발현 작제물은 5' 및 3' AAV 반전 말단 반복 서열 (ITR)에 의해 연결됨을 특징으로 하는 벡터.

청구항 6

청구항 5에 있어서, ITR은 AAV2 ITR임을 특징으로 하는 벡터.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 벡터는 AAV 혈청형 6 (AAV6) 캡시드를 추가로 포함함을 특징으로 하는 벡터.

청구항 8

혈우병의 치료를 필요로 하는 대상체에서 혈우병을 치료하기 위한, 청구항 7의 벡터 및 제약학적으로 허용가능한 운반체를 포함하는 제약 조성물.

청구항 9

청구항 7의 벡터를 포함하는 키트.

청구항 10

서열 번호:37을 포함하는 폴리뉴클레오티드 발현 작제물.

청구항 11

청구항 10에 있어서, 폴리뉴클레오티드 발현 작제물은 5' ITR 및 3' ITR에 의해 연결됨을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드 발현 작제물.

청구항 12

청구항 10의 폴리뉴클레오티드 발현 작제물을 포함하는 벡터.

청구항 13

청구항 12에 있어서, 벡터는 바이러스 또는 비-바이러스 벡터임을 특징으로 하는 벡터.

청구항 14

청구항 13에 있어서, 벡터는 폴리뉴클레오티드 발현 작제물을 포함하는 아데노-연관 바이러스 (AAV) 벡터이고, 여기서 폴리뉴클레오티드 발현 작제물은 5' 및 3' ITR에 의해 연결됨을 특징으로 하는 벡터.

청구항 15

청구항 14에 있어서, ITR은 AAV2 ITR임을 특징으로 하는 벡터.

청구항 16

청구항 15에 있어서, 벡터는 AAV 혈청형 6 (AAV6) 캡시드를 추가로 포함함을 특징으로 하는 벡터.

청구항 17

혈우병의 치료를 필요로 하는 대상체에서 혈우병을 치료하기 위한, 청구항 16의 벡터 및 제약학적으로 허용가능한 운반체를 포함하는 제약 조성물.

청구항 18

청구항 16의 벡터를 포함하는 키트.

청구항 19

서열 번호:28에 따른 절연인자 서열, 서열 번호:30에 따른 절연인자 서열, 인핸서 서열, 프로모터 서열, 및 트랜스진을 포함하는 폴리뉴클레오티드 발현 작제물이며, 여기서 절연인자 서열은 인핸서 서열, 프로모터 서열, 및 트랜스진을 연결시키는 것인 폴리뉴클레오티드 발현 작제물.

청구항 20

청구항 19에 있어서, 인트론 서열을 추가로 포함하며, 인핸서 서열은 야생형 또는 돌연변이된 세르핀 1 인핸서를 포함하고; 프로모터 서열은 야생형 또는 돌연변이된 트랜스타이레틴 (TTR) 프로모터를 포함하고; 인트론 서열은 야생형 또는 돌연변이된 마우스 미닛 바이러스 (MVM) 인트론 서열을 포함함을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드 발현 작제물.

청구항 21

청구항 20에 있어서, 인핸서 서열이 서열 번호:1 내지 13 중 어느 하나의 1, 5, 14, 32 및/또는 39 위치에서 돌연변이를 갖는 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드 발현 작제물.

청구항 22

청구항 20에 있어서, 인트론 서열이 서열 번호:15, 16 및 17, 및 서열 번호:37의 뉴클레오티드 340 내지 432로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드 발현 작제물.

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

청구항 19에 있어서, 폴리 아데닐화 신호를 추가로 포함함을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드 발현 작제물.

청구항 26

청구항 19에 있어서, 트랜스진은 혈우병 또는 리소좀 축적 질병에 없거나 결핍된 단백질을 인코딩함을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드 발현 작제물.

청구항 27

청구항 26에 있어서, 혈우병이 혈우병 A인 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드 발현 작제물.

청구항 28

청구항 27에 있어서, 트랜스진이 대체 인자 VIII를 인코딩함을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드 발현 작제물.

청구항 29

청구항 28에 있어서, 트랜스진이 B-도메인 결실된 사람 인자 VIII을 인코딩함을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드 발현 작제물.

청구항 30

청구항 26에 있어서, 트랜스진은 하나 이상의 뉴클레아제를 추가로 인코딩함을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드 발현 작제물.

청구항 31

청구항 19에 있어서,
 서열 번호:28을 포함하는 제1 절연인자 서열,
 서열 번호:36을 포함하는 인핸서 서열,
 TTR 최소 프로모터 서열,
 서열 번호:37의 뉴클레오티드 340 내지 432를 포함하는 인트론 서열,
 대체 인자 VIII을 인코딩하는 트랜스진,
 폴리 아데닐화 신호 서열, 및
 서열 번호:30을 포함하는 제2 절연인자 서열
 을 5'에서 3'으로 포함하는 폴리뉴클레오티드 발현 작제물.

청구항 32

청구항 19의 폴리뉴클레오티드 발현 작제물을 포함하는 AAV 벡터로서, 폴리뉴클레오티드 발현 작제물은 AAV 벡터의 5'과 3' 반전 말단 반복부들 (ITR) 사이에 존재하는 AAV 벡터.

청구항 33

청구항 32에 있어서, ITR은 AAV2 ITR임을 특징으로 하는 AAV 벡터.

청구항 34

청구항 32에 있어서, 벡터는 AAV6 캡시드를 포함함을 특징으로 하는 벡터.

청구항 35

혈우병의 치료를 필요로 하는 대상체에서 혈우병을 치료하기 위한, 청구항 32의 AAV 벡터 및 제약학적으로 허용 가능한 운반체를 포함하는 제약 조성물.

청구항 36

청구항 19의 폴리뉴클레오티드 발현 작제물을 포함하는 키트.

청구항 37

인자 VIII이 결핍된 대상체에 대체 인자 VIII을 인코딩하는 트랜스진을 공급하기 위한, 청구항 1, 2, 10, 11, 19 내지 22, 및 25 내지 31 중 어느 한 항의 폴리뉴클레오티드 발현 작제물, 또는 청구항 3 내지 7, 12 내지

16, 및 32 내지 34 중 어느 한 항의 벡터를 포함하는 제약 조성물로서, 여기서 상기 대상체에서 인자 VIII이 생성되는, 제약 조성물.

청구항 38

청구항 37에 있어서, 대상체가 혈우병 A를 갖는 것을 특징으로 하는 제약 조성물.

청구항 39

청구항 37에 있어서, 트랜스진은 간 세포의 유전체 내부에 통합됨을 특징으로 하는 제약 조성물.

청구항 40

청구항 37에 있어서, 하나 이상의 뉴클레아제들이 대상체에 추가로 투여되며, 여기서 뉴클레아제는 내인성 알부민 유전자를 절단시키고, 트랜스진은 내인성 알부민 유전자 내부에 통합됨을 특징으로 하는 제약 조성물.

청구항 41

인자 VIII이 결핍된 대상체에서 대체 인자 VIII에 대한 내성을 유도하기 위한, 청구항 1, 2, 10, 11, 19 내지 22, 및 25 내지 31 중 어느 한 항의 폴리뉴클레오티드 발현 작제물, 또는 청구항 3 내지 7, 12 내지 16, 및 32 내지 34 중 어느 한 항의 벡터를 포함하는 제약 조성물이며, 여기서 대상체는 하나 이상의 스테로이드 및/또는 B-세포 억제제들로 처리되어, 대상체에서 대체 인자 VIII에 대한 내성이 되도록 하는, 제약 조성물.

청구항 42

청구항 41에서, 대상체가 혈우병 A를 갖는 것을 특징으로 하는 제약 조성물.

청구항 43

혈우병 A를 갖는 대상체에 대체 인자 VIII을 공급하기 위한, AAV 벡터를 포함하는 제약 조성물이며, 여기서 AAV 벡터는 5'과 3' 반전 말단 반복부 (ITR) 사이에 존재하는 폴리뉴클레오티드 발현 작제물을 포함하고, 여기서 ITR은 AAV2 ITR이고, 폴리뉴클레오티드 발현 작제물은 서열 번호:37의 서열을 포함하고, AAV 벡터는 AAV6 캡시드를 추가로 포함하는, 제약 조성물.

청구항 44

청구항 43에서, AAV 벡터가 대상체의 말초 정맥을 통해 정맥내 투여되는 것을 특징으로 하는 제약 조성물.

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참고

[0002] 본 출원은 2015년 10월 28일 출원된 미국 가특허출원 제 62/247,469; 2016년 3월 14일 출원된 미국 가특허출원 제 62/307,897; 2016년 4월 22일 출원된 미국 가특허출원 제 62/326,229; 2016년 3월 30일 출원된 미국 가특허출원 제 62/315,438; 그리고 2016년 6월 27일 출원된 미국 가특허출원 제 62/355,106의 이익을 주장하며, 이들의 내용은 본 출원에 모두 참고로 포함된다.

배경 기술

[0003] 기술 분야

[0004] 본 출원은 유전자 치료 분야, 특히, 유익한 (치료적) 단백질의 발현을 위해 간에 트랜스진(transgene)-인코딩 작제물을 표적화 전달하는 것에 관한 것이다. 특히, 본 출원은 혈우병, 가령, 혈우병 A의 치료에 관한 것이다.

[0005] 배경

[0006] 유전자 치료는 하나 이상의 불활성화 유전자들을 가지는 세포를 유전적으로 조작하기 위해 및/또는 세포가 세포에서 이전에 생성되지 않는 산물을 세포가 발현시키도록 하기 위해 (예컨대, 트랜스진 삽입에 의해 및/또는 내인성 서열의 교정에 의해) 사용될 수 있다. 트랜스진 삽입의 사용예들에는 하나 이상의 새로운 치료 단백질을 인코딩하는 하나 이상의 유전자들의 삽입, 세포에 또는 개체에 없는 단백질을 인코딩하는 코딩 서열의 삽입, 돌연변이된 유전자 서열을 내포하는 세포에서 야생형 유전자의 삽입, 및/또는 구조 핵산, 가령, 마이크로RNA 또는 siRNA를 인코딩하는 서열의 삽입이 포함된다. 내인성 유전자 서열의 "교정"에 관한 유용한 응용예들에는 질병-연관 유전자 돌연변이의 변형, 스플라이스 부위들을 인코딩하는 서열의 변형, 조절 서열들의 변형 및/또는 단백질의 구조적 특성을 인코딩하는 서열의 표적화된 변형이 포함된다.

[0007] 간 유전자 전달은, 혈우병 및 리소좀 축적 질환을 비롯한 다양한 질환의 치료 및/또는 예방을 위해 대상체에 트랜스진을 전달하는 효과적인 수단을 제공한다. 예컨대, 미국 특허 9,150,847 및 미국 공개특허출원 20130177983 및 20140017212를 참고하라. 간-지향된 유전자 치료에 특이적인 벡터들 또한 기재된 바 있다. 예컨대, WO 2014064277; WO 2009130208; EP 2451474B1, Chuah 외, (2014) *Molecular Therapy*, 22, 1605-1613; 및 Nair 외 (2014) *Blood* 123:3195-3199를 참고하라. 이들 벡터들은 야생형 마우스 미닛 바이러스 (mouse minute virus, MVM) 인트론 서열을 포함할 수 있다. 예컨대, Haut 및 Pintel (1998) *J. Virol.* 72:1834-1843; Haut 및 Pintel (1998) *Virol.* 258:84-94을 참고하라.

[0008] 전체 포유동물에서, 면역 시스템의 세포 구성원들의 활성화 또는 억제를 조절할 수 있는 복잡한 메커니즘이 존재한다. 예를 들면, 수지상 세포들 (DC)은 면역 활성화 대 면역 내성 사이의 균형에 있어서 중심적인 역할을 하여왔다. 이들은 면역 시스템에서 가장 강력한 항원 제시 세포이며 구체적으로는 항원을 포획하여 미감작 (naïve) T 세포들에 제시한다. 미성숙 DC는 특이적 수용체들, 가령, 톨-유사 수용체들을 통해 가능한 항원들과 상호작용하며, 이러한 수용체들에서 항원은 미세세포흡수작용(micropinocytosis)에 의해 세포 내부로 들어가게 된다. 이후 항원은 더 작은 펩티드들로 부서지고 이러한 펩티드들은 주조직 적합 복합체에 의해 T 세포들에 제시된다. 또한, 성숙 DC는 염증 매개자들, 가령, IL-1 β , IL-12, IL-6 및 TNF를 분비하며, 이는 추가로 T 세포들을 활성화시키는 기능을 한다. 다른 한편에서, DC는 또한 중추 및 말초 내성을 유지시키기 위해 신체를 일부

항원들에 대해 용인시키는 역할을 한다. 면역관용성 DC (tolDC)는 세포 표면들에서 적은 양의 공동-자극 신호들을 가지며 상기 기재된 염증 매개자들의 발현을 감소시킨다. 그러나 이들 tolDC는 IL-10과 같은 항-염증 사이토키ンを 많은 양 발현시키며 이들 세포들이 미감작 T 세포들과 상호작용 할 때, T 세포들은 무반응(anegetic)/조절 T 세포들이 되도록 유도된다 (CD8+ Tregs). 사실, 이러한 과정은 이러한 미성숙/면역관용성 DC로 T 세포들을 반복하여 자극시 향상됨이 밝혀졌다. 다른 유형의 Tregs를 유도하기 위하여 tolDC와 협력하여 작동하는 몇 가지 인자들 또한 확인된 바 있다. 예를 들면, tolDC 및 HGF, VIP 펩티드, TSLP 또는 비타민 D3와 공동-노출된 미감작 T 세포들은 CD4+CD25+Foxp3+ Tregs의 유도를 유도하고, TGF-β 또는 IL-10과의 공동-노출은 Tr1 T regs를 유도하며 코르티코스테로이드, 라파마이신, 레티노산과의 공동-노출은 CD4+/CD8+ Tregs을 유도할 수 있다 (Raker 외 (2015) *Front Immunol* 6:art 569 및 Osorio 외 (2015) *Front Immunol* 6: art 535).

[0009] 혈우병, 가령, 혈우병 A 및 혈우병 B는, 관절 및 연 조직 내부로의 출혈, 및 외상을 입은 또는 수술되는 임의의 부위로의 과다 출혈로 특징지어지는 혈액-응고 시스템에 관한 유전 질환이다. 혈우병 A는 혈우병 B와 임상적으로 구별되지 않으나, 혈우병 A에서는 인자 VIII (FVIII 또는 F8)가 결핍이거나 없는 반면, 혈우병 B 환자들에서는 인자 IX (FIX 또는 F.IX)가 결핍이거나 없다. F8 유전자는 불활성화 형태의 본 빌레브란트 인자 (von Willebrand's factor)와 함께 순환하는 혈장 당단백질을 인코딩한다. 표면 손상시, 내인성 응고 연쇄반응이 시작되고 FVIII가 복합체로부터 방출되어 활성화된다. 활성화된 형태는 인자 IX와 함께 작용하여 인자 X를 활성화시켜 활성화된 Xa가 되며, 결국 피브리노겐이 피브린으로 변하여 혈전 유도를 초래한다. Levinson 외 (1990) *Genomics* 7(1):111을 참고하라. 혈우병 A 환자들의 40-50%는 F8 인트론 22 관여 염색체 역전 (IVS22로도 공지됨)을 가진다. 역전은 F8 유전자의 인트론 22 내부의 9.6 kb 서열과 F8 유전자에 대해 약 300 kb 원위에 위치한 2개의 밀접하게 관련된 역방향 서열들 중 하나 사이의 염색체-내 재조합 발생에 의해 유발되며, 이는 엑손 23 내지 26에 대한 엑손 1 내지 22의 역전을 가져온다. Textbook of Hemophilia, Lee 외 (eds) 2005, Blackwell Publishing을 참고하라. 다른 혈우병 A 환자들은 F8에 활성 부위 돌연변이, 및 넌센스 및 미스센스 돌연변이를 비롯한 결함들을 가진다.

[0010] 임상적으로, 혈우병 A 환자들은 환자가 얼마나 자주 출혈이 일어나는지 그리고 이러한 출혈이 얼마나 지속되는지에 따라 평가되고 계층화된다. 이러한 특성들 둘 모두는 환자들의 혈액 내 FVIII 단백질의 양에 직접적으로 의존한다. 중증 혈우병 환자들은 전형적으로 정상 혈액 수준의 1%미만의 FVIII를 가지며, 부상 후 출혈 그리고 종종 환자 관절 내부로의 자연 출혈을 경험한다. 중등도의 환자들은 정상 FVIII 수준의 1-5%를 가지고 경도의 환자들은 정상 FVIII의 6% 이상을 가지며 심각한 부상, 외상 또는 수술 후에만 출혈이 발생한다 (Kulkarni 외 (2009) *Haemophilia* 15:1281-90). 혈우병 A 환자들은 사람 혈장으로부터 유래하거나 재조합하여 생성된 FVIII 단백질 대체로 치료되는데, 여기서 치료 빈도는 출혈 양상 및 혈우병의 중증도에 기초하여 정한다. 중증 혈우병 A 환자들은 출혈이 발생하는 것을 방지하기 위해 정기적으로 예방적 치료를 받는 반면, 중증이 덜한 환자들은 부상 후 필요에 따라 치료를 받을 수 있다.

[0011] 기능적 FVIII 또는 F.IX 단백질을 인코딩하는 플라스미드 및 다른 벡터들 (예컨대, AAV)의 도입을 포함하는 혈우병 A 또는 B 환자들에 대한 유전자 치료가 기술된 바 있다. (예컨대, 미국 특허 6,936,243; 7,238,346 및 6,200,560; Shi 외 (2007) *J Thromb Haemost.* (2):352-61; Lee 외 (2004) *Pharm. Res.* 7:1229-1232; Graham 외 (2008) *Genet Vaccines Ther.* 3:6-9; Manno 외 (2003) *Blood* 101(8): 2963-72; Manno 외 (2006) *Nature Medicine* 12(3): 342-7; Nathwani 외 (2011) *Mol Ther* 19(5): 876-85; Nathwani 외 (2011); *N Engl J Med.* 365(25): 2357-65 및 McIntosh 외 (2013) *Blood* 121(17):3335-44를 참고하라). 그러나, 이러한 프로토콜들에서, 억제성 항-인자 VIII 또는 IX (항-FVIII 또는 항-F.IX) 항체들, 및 전달 비히클에 대항하는 항체들의 형성은 혈우병에 대한 FVIII 및 F.IX 대체에 기반한 치료에 있어 주된 합병증으로 남아있다. 예컨대, Scott & Lozier (2012) *Br J Haematol.* 156(3):295-302를 참고하라.

[0012] 그러나, 간 세포에서 하나 이상의 트랜스진 (혈우병에 없는 하나 이상의 단백질을 인코딩하는 트랜스진들을 포함)의 높은 수준의 발현을 유도하는 간-특이적 폴리뉴클레오티드 (발현 작제물 및 전사 모듈)에 대한 필요성이 여전히 존재한다.

발명의 내용

[0013] 요약

[0014] 본 발명은 간 세포에서 트랜스진을 발현시키기 위한 조성물 및 방법들을 설명한다. 트랜스진은 염색체-외부에서 (에피솜적으로) 발현될 수 있거나 간 세포의 유전체 내부에 (예컨대, 뉴클레아제-매개된 표적화 통합을 통해, 예를 들면 알부민 유전자좌위 내부로) 통합될 수 있다. 일부 구체예들에서, 트랜스진은 응고 연쇄반응

에 관여하는 단백질을 인코딩한다. 바람직한 구체예들에서, 트랜스진은 FVIII 폴리펩티드를 인코딩한다. 본 출원에 기재된 조성물 및 방법들은 *시험관내* 및 *생체내* 모두에서, *생체내*에서 임상적으로 관련된 (치료적) 효과들을 보이기에 충분한 수준을 포함하여, 높은 수준의 단백질 생성을 가져온다.

[0015] 한 양상에서, 본 출원은 절연인자 서열을 포함하는 최소한 하나의 스페이서 서열, 간-특이적 인헨서 서열 (*예컨대*, 야생형 또는 돌연변이된 세르핀 1 (Serp1) 인헨서 서열), 프로모터 서열 (*예컨대*, 야생형 또는 돌연변이된 트랜스타이레틴 (TTR) 프로모터) 및 트랜스진 (*예컨대*, 뉴클레아제 및/또는 치료 단백질, 가령, 혈우병 또는 리소좀 축적 질병에 없는 및/또는 결핍된 단백질)을 포함하는 폴리뉴클레오티드 발현 작제물을 기재한다. 특정 구체예들에서, 폴리뉴클레오티드 발현 작제물은 인트론 서열 (*예컨대*, 야생형 또는 돌연변이된 마우스 미닛 바이러스 (MVM) 인트론 서열)을 추가로 포함한다. 특정 구체예들에서, 폴리뉴클레오티드 발현 카세트는 간-특이적 인헨서 서열, 프로모터 서열, 인트론 서열 및 트랜스진 그리고 선택적으로, 폴리아데닐화 신호를 연결시키는 두 개의 스페이서 서열들을 포함한다. 임의의 야생형 또는 돌연변이된 절연인자 서열을 비롯한 (그러나 이에 제한되는 것은 아님) 임의의 절연인자 서열(들)이 사용될 수 있다 (*예컨대*, 서열 번호:28, 29, 30 및/또는 38 중 하나 이상의 임의의 조합). 특정 구체예들에서, 폴리뉴클레오티드 발현 작제물은 CRMSBS1 (서열 번호:37) 또는 CRMSBS2 (서열 번호:34)로 지정되는 폴리뉴클레오티드를 포함한다.

[0016] 또 다른 양상에서, 본 출원은 간-특이적 인헨서 서열 (*예컨대*, 야생형 또는 돌연변이된 세르핀 1 인헨서 서열), 프로모터 서열 (*예컨대*, 야생형 또는 돌연변이된 트랜스타이레틴 (TTR) 프로모터), 서열 번호:15, 16 또는 17 중 어느 하나로 나타내어지는 인트론 서열 및 트랜스진 (*예컨대*, 뉴클레아제 및/또는 치료 단백질, 가령, 혈우병 또는 리소좀 축적 질병에 없는 및/또는 결핍된 단백질)을 포함하는 폴리뉴클레오티드 발현 작제물을 기재한다. 특정 구체예들에서, 폴리뉴클레오티드 발현 카세트는 절연인자 서열 및/또는 폴리아데닐화 신호를 포함하는 최소한 하나의 스페이서 서열을 추가로 포함한다.

[0017] 또한 또 다른 양상에서, 본 출원은 서열 번호: 1-13 중 어느 하나의 위치 1, 5, 14, 32 및/또는 39에 돌연변이를 가지는 간-특이적 인헨서 서열 (*예컨대*, 서열 번호:35 또는 36으로 나타냄), 프로모터 서열 (*예컨대*, 야생형 또는 돌연변이된 트랜스타이레틴 (TTR) 프로모터), 및 트랜스진 (*예컨대*, 뉴클레아제 및/또는 치료 단백질, 가령, 혈우병 또는 리소좀 축적 질병에 없는 및/또는 결핍된 단백질)을 포함하는 폴리뉴클레오티드 발현 작제물을 기재한다. 특정 구체예들에서, 폴리뉴클레오티드 발현 작제물은 인트론 서열 (*예컨대*, 야생형 또는 돌연변이된 마우스 미닛 바이러스 (MVM) 인트론 서열) 및/또는 절연인자 서열 및/또는 폴리아데닐화 신호를 포함하는 최소한 하나의 스페이서 서열을 추가로 포함한다.

[0018] 다른 양상들에서, 본 출원에 기재된 임의의 폴리뉴클레오티드 발현 작제물을 포함하는 AAV 벡터가 제공된다 (*예컨대*, 여기서 폴리뉴클레오티드 발현 작제물은 AAV 벡터의 5'과 3' 반전 말단 반복부들 (ITRs) 사이에 존재한다).

[0019] 또한 다른 양상들에서, 본 출원은 본 출원에 기재된 하나 이상의 AAV 벡터들 및/또는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드 발현 작제물을 포함하는 제약학적 조성물을 제공한다.

[0020] 또한 필요로 하는 대상체에게 단백질을 제공하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 대상체의 간에 본 출원에 기재된 폴리뉴클레오티드 발현 작제물, AAV 벡터 또는 제약학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 트랜스진은 단백질을 인코딩하고 단백질이 상기 대상체에서 생성된다. 특정 구체예들에서, 트랜스진은 대상체에서 간 세포의 유전체에 통합된다. 선택적으로, 상기 방법은 하나 이상의 뉴클레아제들을 대상체에 투여하는 단계를 추가로 포함하며, 여기서 뉴클레아제는 내인성 알부민 유전자를 절단시키고 트랜스진은 내인성 알부민 유전자 내부에 통합된다. (*예컨대*, 단백질을 생성하는) 트랜스진을 포함하도록 하는 세포의 유전자 변형 방법 또한 제공되며, 이러한 트랜스진을 세포 내부에 도입시키는 (예피솜적으로 또는 뉴클레아제-매개된 표적화 통합을 포함한 통합) 방법을 포함한다. 또한 포유동물에서 치료 단백질에 대한 내성을 유도하는 방법들이 제공되는데, 이 방법은 본 출원에 기재된 바와 같이 세포 (*예컨대*, 본 출원에 기재된 바와 같이 단백질을 생성하도록 변형된 세포)를 유전자 변형하는 단계 및 하나 이상의 스테로이드 및/또는 B-세포 억제제들을 처리하여 포유동물이 상기 치료 단백질에 대해 내성을 가지도록 하는 단계를 포함한다.

[0021] 한 양상에서, 본 출원은 인헨서 서열 (*예컨대*, 야생형 또는 돌연변이된 세르핀1 인헨서), 프로모터 서열 (*예컨대*, 트랜스타이레틴 최소 프로모터 (TTRm) 프로모터), 및 트랜스진 그리고, 선택적으로, 폴리아데닐화 서열 (*예컨대*, 합성 폴리아데닐화 서열 (SPA) 및/또는 신호 펩티드 (SP)를 포함하는 폴리뉴클레오티드 발현 작제물을 기재한다. 특정 구체예들에서, 발현 작제물은 인트론 서열 (*예컨대*, 야생형 MVM 또는 돌연변이된 MVM 서열 및/또는 키메라 인트론)을 추가로 포함한다. 특정 구체예들에서, 발현 작제물은 5' 에서 3' 방향으로, 인헨서 서열,

프로모터 서열, 인트론 서열, 트랜스진 (선택적으로 신호 펩티드를 포함), 및 폴리아데닐화 신호를 포함한다.

[0022] 상기 발현 카세트는 플라스미드 벡터들, 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터들 및 아데노 연관 벡터 (AAV)를 비롯한 (그러나 이에 제한되는 것은 아님) 임의의 바이러스 또는 비-바이러스 벡터에 포함될 수 있다. 한 바람직한 구체예에서, 발현 작제물은 AAV 작제물 상에 운반되며 본 출원에 기재된 바와 같은 발현 작제물을 연결시키는 5' 및 3' ITRs를 추가로 포함한다. 선택적으로, 절연인자 (스페이서) 분자들은 또한 하나 이상의 발현 작제물 성분들 사이에, 예를 들면, 5' ITR과 인핸서 사이 및/또는 폴리아데닐화 신호와 3' ITR 사이에 포함된다. 일부 구체예들에서, 절연인자 (스페이서) 영역은 표적화 통합을 용이하게 하기 위하여 상동성 암 (homology arm)들을 포함한다. 특정 구체예들에서, 상기 작제물은 도 1, 2, 4, 6, 7, 10, 19, 20 또는 25 중 어느 하나에 도시된 작제물이다. 두 개의 예시 작제물을 서열 번호:34 및 서열 번호:37로 나타낸다. 개개의 성분들 (프로모터, 절연인자(들), 인핸서, 트랜스진)은 본 출원에 기재된 다른 성분들과 임의의 조합으로 조합될 수 있음이 자명할 것이다.

[0023] 본 출원에 기재된 임의의 폴리뉴클레오티드에서, 인핸서는 세르핀-1 인핸서로부터 유도될 수 있다. 특정 구체예들에서, 인핸서는 야생형 서열이다. 다른 구체예들에서, 인핸서는 야생형과 비교하여 하나 이상의 변형들, 예를 들면, 도 5에 도시된 하나 이상의 뉴클레오티드 변형들을 내포하는 세르핀1 인핸서, 서열 번호:1-13 중 어느 하나에 나타낸 서열의 잔기 1, 5, 14, 32 및/또는 39 중 하나 이상에서의 뉴클레오티드 변형들을 포함한다. 특정 구체예들에서, 세르핀1 인핸서는 서열 번호:1-13 중 어느 하나의 위치 1, 5, 14 및 32에서의 변형들을 포함하는 반면, 다른 구체예들에서, 세르핀1 인핸서는 서열 번호:1-13 중 어느 하나의 위치 1, 14, 32 및 39에서의 변형들을 포함한다. 예시 인핸서 서열들을 서열 번호:35 및 36에 나타낸다. 일부 구체예들에서, 본 출원에 기재된 폴리뉴클레오티드는 1, 2, 3, 4, 5 또는 그 이상의 인핸서 요소들을 포함한다. 특정 구체예들에서, 1, 2, 3, 4, 5 또는 그 이상의 인핸서 요소들은 동일하지만, 다른 구체예들에서, 하나 이상의 유형의 인핸서 요소가 사용된다.

[0024] 본 출원에 기재된 임의의 폴리뉴클레오티드는 선택적으로 인트론 서열을 추가로 포함할 수 있다. 특정 구체예들에서, 발현 작제물은 예를 들면, 도 6 및 7의 맨 아래 패널에 도시된 바와 같은 키메라 인트론 서열을 포함한다. T-키메라 인트론은 pCI-neo (GenBank U47120)에 있는 키메라 인트론의 절두된 버전이다. pCI-neo에 있는 키메라 인트론은 사람 β-글로빈 유전자로부터의 5' 스플라이스 공여체 부위, 그리고 면역글로불린 유전자 중쇄 가변 영역의 3' 수용체 부위 및 분기점이다. T-키메라 인트론은 5' 스플라이스 공여체와 분기점 사이에 45 bp 결실을 내포한다. 또한 다른 구체예들에서, 발현 작제물은 돌연변이된 MVM 인트론 서열 (예컨대, 도 12, 13 및 14에 도시된 돌연변이들 중 하나 이상) (서열 번호:15-17)을 포함한다. 택일적으로, 본 출원에 기재된 발현 작제물은 예를 들면, 도 6, 7, 19 및 20의 중간 패널에 도시된 작제물에 도시된 바와 같이, 인트론 서열이 없을 수 있다.

[0025] 본 발명의 발현 작제물은 또한 AAV ITRs와 발현 카세트 사이에 최적화된 절연인자 서열들을 포함할 수 있다. 특정 구체예들에서, 발현 작제물은 절연인자 (스페이서) 영역 (예컨대 Ins1 및 Ins3, 각각 서열 번호 15 또는 28 그리고 서열 번호: 17 또는 30), 및 Ins2 (서열 번호:16 또는 29)을 포함한다. 특정 구체예들에서, 발현 작제물은 Ins4 (서열 번호:38)를 포함한다. 임의의 절연인자 서열들이 5' 또는 3' 위치에서 사용될 수 있으며, 절연인자 서열들의 임의의 조합이 발현 작제물 내에서 사용될 수 있다. 5' 위치에 Ins1 그리고 3' 위치에 Ins3의 조합이 특히 바람직하다.

[0026] 본 출원에 기재된 발현 작제물은 또한 하나 이상의 트랜스진들을 포함하여 발현한다. 본 출원에 기재된 폴리뉴클레오티드를 사용하여 리소좀 축적 질환 (예컨대, 고세병, 파브리병, 헌터병, 혈러병, 니만-피크병, 페닐케톤뇨증 (PKU) 등), 대사 질환, 및/또는 혈액 질환, 가령, 혈우병 및 헤모글로빈혈증 등을 비롯한 임의의 유전질환에서 없거나 결핍된 단백질의 기능적 형태를 인코딩하는 트랜스진들을 비롯하여 (그러나 이에 제한되는 것은 아님) 임의의 트랜스진(들)이 발현될 수 있다. 예컨대, 미국 공개특허출원 20140017212 및 20140093913; 미국 특허 9,255,250 및 9,175,280을 참고하라. 본 출원에 기재된 바와 같이 발현될 수 있는 단백질의 비-제한적 예들에는 피브리노겐, 프로트롬빈, 조직 인자, 인자 V, 인자 VII, 인자 VIIII, 인자 IX, 인자 X, 인자 XI, 인자 XII (하계만 인자), 인자 XIII (피브린-안정화 인자), 본 빌레브란트 인자, 프리칼리크레인, 고분자량 키니노겐 (피츠제랄드 인자), 피브로넥틴, 안티트롬빈 III, 헤파린 보조인자 II, 단백질 C, 단백질 S, 단백질 Z, 단백질 Z-관련 프로테아제 억제제, 플라스미노겐, 알파 2-항플라스민, 조직 플라스미노겐 활성화제, 우로키나아제, 플라스미노겐 활성화제 억제제-1, 플라스미노겐 활성화제 억제제-2, 글루코세레브로시다아제 (GBA), α-갈락토시다아제 A (GLA), 이두로네이트 설파타아제 (IDS), 이두로니다제 (IDUA), 산성 스펅고미엘리나제 (SMPD1), MMAA, MMAB, MMACHC, MMADHC (C2orf25), MTRR, LMBRD1, MTR, 프로피온일-CoA 카복실라제 (PCC) (PCCA 및/또는 PCCB 소단

위), 글루코스-6-포스페이트 운반자 (G6PT) 단백질 또는 글루코스-6-포스파타제 (G6Pase), LDL 수용체 (LDLR), ApoB, LDLRAP-1, PCSK9, 미토콘드리아 단백질, 가령, NAGS (N-아세틸글루타메이트 합성효소), CPS1 (카르바모일 포스페이트 합성효소 I), 및 OTC (오르니틴 트랜스카르바밀라제), ASS (아르기니노숙시닉 에시드 합성효소), ASL (아르기니노숙시나제 산 분해효소) 및/또는 ARG1 (아르기나제), 및/또는 용질 운반체군 25 (SLC25A13, 아스파르테이트/글루타메이트 운반체) 단백질, UGT1A1 또는 UDP 글루쿠론실트랜스퍼라제 폴리펩티드 A1, 푸마로아세틸아세테이트 하이드로라이아제 (FAH), 알라닌-글라이옥실레이트 아미노트랜스퍼라제 (AGXT) 단백질, 글라이옥실레이트 환원효소/하이드록시파이루베이트 환원효소 (GRHPR) 단백질, 트랜스타이레틴 유전자 (TTR) 단백질, ATP7B 단백질, 페닐알라닌 하이드록실라제 (PAH) 단백질, 지질단백질 분해효소 (LPL) 단백질, 유전자 조작된 뉴클레아제, 유전자 조작된 전사 인자 및/또는 유전자 조작된 단일 사슬 가변 단편 항체 (디아바디, 카멜리드, 등)가 포함된다. 한 바람직한 구체예에서, 트랜스진은 FVIII 폴리펩티드를 인코딩한다. 일부 구체예들에서, FVIII 폴리펩티드는 B 도메인의 결실을 포함한다.

[0027] 일부 구체예들에서, 하나 이상의 트랜스진들은 유전자 조작된 뉴클레아제들 (예컨대 ZFN, TALEN, TtAgo 및 CRISPR/Cas 시스템)을 인코딩하는 서열들을 포함한다. 다른 구체예들에서, 트랜스진들은 유전자 조작된 전사 인자들 (예컨대 ZFP-TFs, TALE-TFs, CRISPR/Cas-TF 시스템)을 인코딩하는 서열들을 포함한다. 트랜스진들은 또한 관심 표적에 특이적인 단일 사슬 항체를 인코딩하는 서열들을 포함할 수 있다. 또한, 트랜스진은 구조적 RNA (예컨대 RNAi, shRNA, miRNA)를 인코딩하는 서열들을 포함할 수 있다.

[0028] 특정 양상들에서, 본 출원에 기재된 폴리뉴클레오티드는 세포 내부로 도입되어, 트랜스진의 발현을 추진하는 동안 에피솜에서 유지된다. 다른 양상들에서, 발현 작제물들은 무작위로 도입되는 세포의 유전체 내부로 통합된다. 추가 양상들에서, 트랜스진 발현을 유도하는 발현 작제물들은 뉴클레아제-매개된 표적화 통합에 의해 유전체 내부에 통합된다.

[0029] 추가 양상들에서, 본 출원은 간 세포에서 하나 이상의 트랜스진들을 발현시키는 방법을 기재하며, 이 방법은 본 출원에 기재된 하나 이상의 발현 작제물을 세포 내부에 도입시켜, 세포에서 트랜스진을 발현시키는 단계를 포함한다. 특정 구체예들에서, 발현 작제물은 바이러스 또는 비-바이러스 벡터, 바람직하게는 AAV 벡터 (예를 들면 AAV2 또는 AAV2/6)상에 운반된다.

[0030] 또 다른 양상에서, 본 출원은 살아있는 동물에서 하나 이상의 트랜스진들을 발현시키는 방법을 제공하며, 이 방법은 본 출원에 기재된 하나 이상의 발현 카세트를 살아있는 동물에 투여하는 단계를 포함한다. 특정 구체예들에서, 발현 카세트는 살아있는 동물의 간에 투여된다. 특정 구체예들에서, 발현 작제물은 바이러스 또는 비-바이러스 벡터, 바람직하게는 AAV 벡터 (예를 들면 AAV2, AAV2/6 또는 AAV2/8) 상에 운반된다.

[0031] 일부 구체예들에서, 본 출원은 하나 이상의 트랜스진들로부터 치료적 관련 수준의 하나 이상의 치료 단백질을 발현시키는 방법 및 조성물을 제공한다. 특정 구체예들에서, 대체 단백질을 인코딩하는 트랜스진 작제물의 발현은 생성되는 단백질 정상 수준의 1%이며, 반면 다른 구체예들에서, 단백질 정상 수준의 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 50%, 80%, 100%, 150%, 200%, 또는 그 이상이 생성된다. 일부 바람직한 구체예들에서, 트랜스진은 FVIII 단백질을 인코딩하며 치료적 관련 양의 단백질이 생성된다. 일부 구체예들에서, 본 발명의 방법들 및 조성물들을 사용한 결과, 사람 환자는 혈액 중에 임상 증상들의 감소를 가져오는 증가된 양의 치료 단백질을 가진다. 특정 양상들에서, 사람 환자에서 본 출원에 기재된 방법 및 조성물들에 의한 치료 단백질의 생성은 치료받지 않았던 환자에 비해 또는 치료 전 환자에 비해 부상 후 응고 시간을 감소시킨다. 일부 양상들에서, 본 발명의 방법 및 조성물로 치료받은 사람 환자는 치료받지 않았던 환자 보다 또는 치료 전 환자에 비해 감소된 양의 대체 요법을 필요로 한다.

[0032] 일부 구체예들에서, 본 출원에 기재된 본 발명의 방법 및 조성물은 포유동물에서 치료 단백질에 대한 내성을 유도하여, 트랜스진에 의해 인코딩되는 치료 단백질의 수준을 항-치료 단백질 항체들의 일시적 상승 후 치료적 관련 수준으로 유지시키기 위해 사용될 수 있다. 그러므로, 본 출원은 대상체에서 치료 단백질에 대한 내성 유도 방법을 제공하며, 이 방법은 본 출원에 기재된 방법을 사용하여 (예컨대, 그리하여 세포가 치료 단백질을 생성하도록) 대상체에서 세포를 유전자 변형시키는 단계, 선택적으로 대상체를 또 다른 조성물 (예컨대, 스테로이드 및/또는 B-세포 억제제들)로 처리하여 동물이 치료 단백질에 대해 내성을 가지도록 하는 단계를 포함한다. 일부 구체예들에서, 수용자 세포들 내부로의 치료 단백질의 삽입 (통합)은 면역-억제성 스테로이드 또는 B-세포 억제제를 이용한 치료와 동시에 이루어지는 반면, 다른 예들에서, 면역조절 물질들은 전혀 동물에 투여되지 않는다. 일부 예들에서, 항-치료 단백질 항체들이 생성되는 경우에만 면역조절제가 투여된다. 다른 예들에서, 면역조절제는 일정 시기 후 중단된다.

- [0033] 또 다른 양상에서, 본 출원에 기재된 세포, 발현 작제물 및/또는 선택적 뉴클레아제 중 하나 이상을 포함하는 제약학적 조성물이 제공된다.
- [0034] 특정 양상들에서, 본 출원은 간-특이적 발현 카세트의 표적화 통합을 위한 방법 및 시스템들을 기재한다. 이러한 방법 및 시스템들은 본 출원에 기재된 하나 이상의 발현 카세트를 투여하는 단계 및 표적 유전자에 특이적인 하나 이상의 뉴클레아제들을 세포에 투여하는 단계를 포함한다. 표적 유전자의 뉴클레아제-매개된 절단 후, 발현 카세트는 상동성-의존성 또는 상동성-독립성 메커니즘들에 의해 유전자 내부에 통합된다. 특정 구체예들에서, 표적 유전자는 내인성 알부민 유전자이다.
- [0035] 본 발명의 발현 작제물의 뉴클레아제-매개된 표적화 통합을 위하여, 하나 이상의 징크 핑거 뉴클레아제 (ZFNs), TALEN, CRISPR/Cas 뉴클레아제 및/또는 TtAgo 뉴클레아제를 비롯한 (그러나 이에 제한되는 것은 아님) 임의의 뉴클레아제가 사용될 수 있으며, 그리하여 발현 작제물은 뉴클레아제(들)에 의해 절단되는 영역 (유전자) 내부로 통합된다. 특정 구체예들에서, 한 쌍 이상의 뉴클레아제들이 사용된다. 뉴클레아제들은 mRNA 형태로 도입될 수 있거나 비-바이러스 또는 바이러스 벡터들을 사용하여 세포에 투여될 수 있다. 일부 양상들에서, 뉴클레아제 폴리뉴클레오티드는 렌티바이러스에 의해 또는 비-통합 렌티바이러스에 의해 전달될 수 있다. 다른 양상들에서, 발현 카세트는 AAV 및/또는 DNA 올리고에 의해 전달될 수 있다.
- [0036] 또 다른 양상에서, 본 출원은, 예를 들면, 대상체에 없거나 결핍된 단백질(들)을 공급함으로써 질병을 치료하기 위해 질병 (예컨대, 대사 질병, 리소좀 축적 질병 (LSD), 헤모글로빈혈증 및/또는 혈우병)을 가진 포유동물에, 또는 영장류, 가령, 사람 영장류, 가령, 사람 환자에 없거나 결핍된 하나 이상의 기능성 단백질을 제공하는 방법을 제공한다. 또 다른 양상에서, 본 출원은 단백질이 없거나, 결핍되거나, 이상 발현된 질환을 치료하기 위해 기능성 단백질을 제공하는 방법을 제공한다. 추가 구체예들에서, 상기 방법은 질환을 예방 또는 치료함에 유용한 치료 단백질을 인코딩하는 발현 카세트를 투여하는 단계를 포함한다. 한 추가 양상에서, 본 출원은 치료 단백질이 단일 사슬 항체인, 질환 치료를 위한 치료 단백질의 제공 방법들을 기재한다. 특정 구체예들에서, 상기 방법들은 필요로 하는 대상체의 간에 본 출원에 기재된 발현 카세트 (예컨대, AAV 벡터)를 투여하는 단계를 포함한다. 다른 구체예들에서, 상기 방법은 변형된 세포 (대상체에서 이상 발현되는 단백질의 기능성 형태를 기재된 발현 카세트로부터 발현시키는)를 대상체에 투여하는 단계를 포함한다. 그러므로, 단리된 세포가 대상체 내부에 도입될 수 있거나 (생체의 세포 요법) 또는 세포가 대상체의 일부인 경우 세포가 변형될 수 있다 (생체내).
- [0037] 기재된 임의의 조성물 및 방법들에서, 발현 카세트 및/또는 뉴클레아제들은, AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV8, AAV9 및 AAVrh10을 비롯한 (그러나 이에 제한되는 것은 아님) AAV 벡터 또는 슈도형 (pseudotyped) AAV, 가령, AAV2/8, AAV8.2, AAV2/5 및 AAV2/6 등 상에 운반될 수 있다. 특정 구체예들에서, 폴리뉴클레오티드 (발현 작제물 및/또는 뉴클레아제)는 동일한 AAV 벡터 유형을 사용하여 전달된다. 다른 구체예들에서, 폴리뉴클레오티드는 상이한 AAV 벡터 유형들을 사용하여 전달된다. 폴리뉴클레오티드는 하나 이상의 벡터들을 사용하여 전달될 수 있다. 특정 구체예들에서, 폴리뉴클레오티드는 정맥내 (예컨대, 간문맥 내) 투여에 의해 무손상 동물의 간 내부로 전달된다. 다른 구체예들에서, 폴리뉴클레오티드는 정맥내 투여에 의해 말초 정맥에 전달된다.
- [0038] 본 출원에 기재된 임의의 조성물 및 방법들에서, 트랜스진에 의해 인코딩되는 단백질은 F8 단백질, 예를 들면, B-도메인 결실된 인자 VIII (BDD-F8)을 포함할 수 있다. 다른 구체예들에서, 트랜스진에 의해 인코딩되는 단백질은 인자 IX 단백질을 포함한다. 다른 구체예들에서, 트랜스진에 의해 인코딩되는 단백질은 인자 VII 단백질을 포함한다. 다른 구체예들에서, 트랜스진에 의해 인코딩되는 단백질은 인자 X 단백질을 포함한다. 일부 구체예들에서, 트랜스진에 의해 인코딩되는 단백질은 글루코세레브로시다아제를 포함한다. 다른 구체예들에서, 트랜스진에 의해 인코딩되는 단백질은 α 갈락토시다아제를 포함한다. 추가 구체예들에서, 트랜스진에 의해 인코딩되는 단백질은 이두로네이트-2-설파타제를 포함한다. 일부 구체예들에서, 트랜스진에 의해 인코딩되는 단백질은 알파-L 이두로니다제를 포함한다. 추가 구체예들에서, 트랜스진에 의해 인코딩되는 단백질은 스프링고미엘린 포스포다이에스테라제를 포함한다. 일부 구체예들에서, 트랜스진은 단일 사슬 항체를 인코딩한다. 다른 구체예들에서, 트랜스진은 구조적 RNA를 인코딩한다. 본 출원에 기재된 임의의 조성물 또는 방법들에서, 트랜스진은 또한 전사 조절인자를 포함하지만, 다른 조성물 또는 방법들에서는 포함하지 않으며 전사는 내인성 조절인자에 의해 조절된다. 또 다른 양상에서, 본 발명의 방법들은 필요로 하는 대상체에서 치료적 처치를 위한 조성물을 포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 조성물은 피난항 (safe harbor) 특이적 뉴클레아제, 및 인자 VII, F8, F.IX, 인자 X, GBA, GLA, IDS, IDUA, 단일 사슬 항체 및/또는 SMPD1 단백질을 인코딩하는 트랜스진 또는 이의 기능적 단편 및/또는 이의 절두를 포함하는 유전자 조작된 줄기 세포들을 포함한다. 다른 구체예들에서,

상기 조성물은, 변형되어 있는 그리고 인자 VII, F8, F.IX, 인자 X, GBA, GLA, IDS, IDUA, 단일 사슬 항체 및/또는 SMPD1 단백질을 인코딩하는 트랜스진 또는 이의 기능적 단편 및/또는 절두를 발현시키는 유전자 조작된 줄기 세포들을 포함한다.

[0039] 본 출원에 기재된 방법들은 시험관내, 생체의 또는 생체내에서 실시될 수 있다. 특정 구체예들에서, 조성물은 살아있는, 무손상 포유동물 내에 도입된다. 포유동물은 전달 시에 임의의 발달 단계, 예컨대, 배아, 태아, 신생아, 유아, 청소년 또는 성체(adult) 일 수 있다. 추가적으로, 표적화된 세포는 건강하거나 질병에 걸릴 수 있다. 특정 구체예들에서, 하나 이상의 조성물은 정맥내 (예컨대, 간문맥내, 예를 들면, 꼬리 혈관 주사에 의해 간으로), 동맥내, 복강내, 근육내, 간 유조직 내 (예컨대, 주사에 의해), 간 동맥 내 (예컨대, 주사에 의해), 및/또는 담도계를 통해 (예컨대, 주사에 의해) 전달된다.

[0040] 조성물을 특정 유형의 세포, 예컨대, 혈소판, 섬유아세포, 간세포 등에 표적화하기 위하여, 하나 이상의 투여되는 조성물은 세포의 표면 수용체에 특이적으로 결합하는 호밍제 (homing agent)와 결합될 수 있다. 예를 들면, 벡터는 특정한 간 시스템 세포들이 그 수용체들을 가지는 리간드 (예컨대, 갈락토스)에 접합(conjugate) 될 수 있다. 접합은 공유성, 예컨대, 가교제, 가령, 글루타르알데하이드이거나, 또는 비공유성, 예컨대, 비오틴닐화된 벡터에 대한 아비딘화된 리간드의 결합일 수 있다. 공유 접합의 또 다른 형태는 벡터 스톱을 준비하기 위하여 사용되는 AAV 헬퍼 플라스미드를 유전자조작함으로써 제공되며, 그 결과 하나 이상의 인코딩된 외피 단백질은 천연 AAV 외피 단백질과 펩티드 또는 단백질 리간드의 하이브리드가 되고, 리간드가 바이러스 입자의 표면에 노출된다.

[0041] 본 출원에 기재된 하나 이상의 발현 작제물, AAV 벡터들, 세포 및/또는 제약학적 조성물을 포함하는 키트 또한 제공된다. 이러한 키트는 뉴클레아제를 인코딩하는 핵산들, (예컨대 ZFNs, TALENs 또는 Cas 및 변형된 Cas 단백질, 및 가이드 RNAs를 인코딩하는 RNA 분자들), 또는 뉴클레아제 단백질의 분취시료, 세포들, 본 발명의 방법들을 실시하기 위한 지시사항들, 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0042] 이러한 그리고 다른 양상들은 전반적인 본 출원의 내용에 비추어 숙련된 기술자들에게 용이하게 명확해질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0043] 도면의 간단한 설명

도 1은 트랜스진 카세트 요소들, 그리고 개선된 인헨서 및 인트론을 확인하기 위해 거치는 단계들을 보여주는 도식이다.

도 2는 절연인자 1-3 ("Ins1-3")을 보유한 부모 TTRm 프로모터 및 HLP 작제물을 도시하는 도식이다. SerpE는 간-특이적 세르핀 조절 요소인 SERPINA1 유전자로부터 얻은 세르핀 인헨서를 지칭한다. TTRm은 트랜스타이레틴 최소 프로모터를 지칭한다. HLP는 하이브리드 간 특이적 프로모터 (McIntosh 외, *ibid*)를 지칭한다. hFVIII은 B-도메인 결실된 사람 인자 VIII 트랜스진을 지칭한다. SP는 신호 펩티드를 지칭한다. ITR은 반전 말단 반복부를 지칭한다. SPA는 합성 폴리 아데닐화 서열을 지칭한다.

도 3 은 상이한 절연인자 서열들 또는 프로모터 영역을 포함하는 상이한 AAV 작제물의 수율을 도시하는 그래프이다. 부모 TTRm 프로모터 또는 HLP 작제물과 관련하여 Ins1-Ins2에 비해 Ins1-Ins3의 개선된 수율이 도면에 나타나있다. 바이러스는 HEK293 세포들에서 생성되었으며, 수율은 두 곳의 세포 공장들 (2 CF)로부터 얻은 것이다. SerpE는 간-특이적 세르핀 조절 요소인 SERPINA1 유전자로부터 얻은 세르핀 인헨서를 지칭한다. TTRm은 트랜스타이레틴 최소 프로모터를 지칭한다. HLP는 하이브리드 간 특이적 프로모터 (McIntosh 외, *ibid*)를 지칭한다. hFVIII은 B-도메인 결실된 사람 인자 VIII 트랜스진을 지칭한다. SP는 신호 펩티드를 지칭한다. ITR은 반전 말단 반복부를 지칭한다. SPA는 합성 폴리 아데닐화 서열을 지칭한다.

도 4는 부모, 그리고 CRMSBS1 및 CRMSBS2를 지향하는, 새로운 인헨서들을 가지는 작제물을 도시하는 도식이며, 각각은 B-도메인 결실된 사람 인자 VIII (인자 VIII-BDD) 트랜스진을 운반한다. SerpE는 간-특이적 세르핀 조절 요소인 SERPINA1 유전자로부터 얻은 세르핀 인헨서를 지칭한다. TTRm은 트랜스타이레틴 최소 프로모터를 지칭한다. "SBS"는 Sangamo Biosciences사 내부 참고번호를 지칭한다. "hFVIII"는 사람 인자 VIII BDD 트랜스진을 지칭한다. "SP"는 신호 펩티드를 지칭한다. ITR은 반전 말단 반복부를 지칭한다. SPA는 합성 폴리 아데닐화 서열을 지칭한다. "Ins1" 및 "Ins3"은 상기 도 2에 기재한 바와 같다.

도 5 (서열 번호:1 내지 13)는 여러 종의 SERPINA1 유전자의 ENCODE 정렬을 사용하여, 여러 종들의 SERPINA1

유전자 정렬을 보여준다. 동일한 잔기들은 나타내지 않는다 ("."로 표기됨). 1 내지 5로 표기된 박스표시된 영역은 상기 서열에 대한 변형 부위들이다. 또한 HepG2 세포들에서 DNase I 민감성 영역을 중간 패널에 검은색 막대로 나타낸다. CRMSBS1은 박스표시된 위치 1, 2, 3, 및 4에서의 변화를 포함하고 CRMSBS2는 박스표시된 위치 1, 3, 4, 및 5에서의 변화를 포함한다. "CRM"은 cis-조절 모듈을 지칭한다. "SBS1/2"은 작제물 1 및 2에 대한 Sangamo Biosciences사의 내부 참고번호를 지칭한다. 밝은 회색의 박스표시 영역은 생략되었던 SERPINA1 유전자의 서열이다.

도 6은 MVM 인트론이 없는 CRMSBS1 (CRMSBS1 인트론 없음) 또는 절두된 키메라 인트론 (CRMSBS1 T-키메라 인트론)로부터 유도된 2개의 작제물 CRMSBS1을 도시하는 도식이며, 각각의 작제물은 인자 VIII BDD 트랜스진을 포함한다. "CRM"은 cis-조절 요소를 지칭한다. "SBS"는 Sangamo Biosciences사 내부 참고번호를 지칭한다. "hFVIII"는 사람 인자 VIII-BDD를 지칭한다. "SP"는 신호 펩티드를 지칭한다. ITR은 반전 말단 반복부를 지칭한다. SPA는 합성 폴리 아데닐화 서열을 지칭한다. "Ins1" 및 "Ins3"은 상기 도 2에 기재한 바와 같다.

도 7은 MVM 인트론이 없는 CRMSBS2 (CRMSBS2 인트론 없음) 또는 절두된 키메라 인트론 (CRMSBS2 T-키메라 인트론)로부터 유도된 2개의 작제물인 CRMSBS2를 도시하는 도식이며, 각각의 작제물은 인자 VIII BDD 트랜스진을 포함한다. "CRM"은 cis-조절 요소를 지칭한다. "SBS"는 Sangamo Biosciences사 내부 참고번호를 지칭한다. "hFVIII"는 사람 인자 VIII BDD를 지칭한다. "SP"는 신호 펩티드를 지칭한다. ITR은 반전 말단 반복부를 지칭한다. SPA는 합성 폴리 아데닐화 서열을 지칭한다. "Ins1" 및 "Ins3"은 상기 도 2에 기재한 바와 같다.

도 8A 및 8B는 지정된 작제물을 마우스에 투여 후 사람 분비된 인자 VIII BDD의 *생체내* 생성을 보여주는 그래프이다. C57BL/6 마우스들은 6E+12 vg/kg의 AAV2/6 hFVIII-BDD 작제물로 형질도입되었다. 도 8A는 투여 후 7일차의 hFVIII-BDD 분비 수준을 보여주며 도 8B는 28-일의 연구 기간에 걸친 hFVIII-BDD 분비 수준을 보여준다. 각 그래프의 왼쪽 y-축은 ng/mL를 보여주고 오른쪽 y-축은 정상 백분율을 보여주는데, 여기서, 1U = 100% 정상 = 200 ng/mL이다. *** 은 p > .001를 나타내고, *는 p > .05를 나타낸다. 그룹 내 각 개별적인 모양은 하나의 동물로부터 얻은 결과들을 나타낸다.

도 9A 및 9B는 도 7에 기재된 벡터들의 투여 후 F8-BDD cDNA의 간 특이적 발현을 도시한다. 도 9A는 지정된 조직들 (뇌, 심장, 신장, 폐, 간, 비장, 고환)로부터 분석된 사람 인자 VIII-BDD (hFVIII) mRNA 수준을 보여준다. 도시된 바와 같이, hFVIII-BDD mRNA는 간에서만 검출되었으며 부모 F8-BDD cDNA 작제물 (열린 기호) 또는 CRMSBS2 인트론 없음 (채운 기호)으로부터의 다른 조직들에는 없었다. 도 9B는 도 9A에 도시된 동일한 조직들로부터의 벡터 유전체 (VG) 생물분포를 보여준다. 혈청형 AAV2/6은 주로 간을 형질도입시킨다.

도 10은 작제물 CRMSBS2, 및 추가 작제물 (CRMSBS2 SBR 인트론 1, 2 또는 3으로 지칭)을 도시하는 도식이다. 모든 작제물은 사람 인자 VIII BDD 트랜스진을 포함한다. "CRM"은 cis-조절 요소를 지칭한다. "SBS"는 "SBS"는 Sangamo Biosciences사 내부 참고번호를 지칭한다. "hFVIII"는 사람 인자 VIII-BDD 트랜스진을 지칭한다. "SP"는 신호 펩티드를 지칭한다. ITR은 반전 말단 반복부를 지칭한다. SPA는 합성 폴리 아데닐화 서열을 지칭한다. "MVM"은 MVM 인트론 서열을 지칭한다.

도 11은 부분 서열 (서열 번호:14) 및 공여체와 수용체의 위치를 포함하는, 야생형의 마우스 미닛 바이러스 ("WT MVM") 인트론을 도시하는 도식이다. "D1" 및 "D2"는 각각 공여체 1 및 2를 지칭한다. "A1" 및 "A2"는 각각 수용체 1 및 2를 지칭한다. "IES"는 인트론 인헨서 서열을 지칭한다. Haut 및 Pintel (1998) *J. Virology* 72:1834-1843 그리고 Haut 및 Pintel (1998) *Virology J.*, 258:84-94 또한 참고하라.

도 12 (서열 번호:15)는 본 출원에 기재된 작제물에서 사용된 SBR 인트론 1에서 야생형 MVM 인트론에 이루어진 변화들에 관한 개요를 보여준다. 변화들은 회색박스로 기재되며 다음을 포함한다: 가능한 분기점 수용체 1 (PBPA1)에 대한 마이너 돌연변이; 돌연변이된 수용체 부위 1 폴리-피리미딘 트랙, A1PPT (-); 돌연변이된 수용체 부위 1, A1(-); 개선된 가능한 분기점 수용체 부위 2, PBPA2(+); 더 많은 티미딘 (T)의 부가에 의한 강화된 수용체 부위 2 폴리-피리미딘 트랙, A2PPT(+, 8T); 개선된 수용체 부위 2, A2(+).

도 13 (서열 번호:16)은 본 출원에 기재된 작제물에서 사용된 SBR 인트론 2에서 야생형 MVM 인트론에 이루어진 변화들에 관한 개요를 보여준다. 변화들은 회색박스로 기재되며 다음을 포함한다: 가능한 분기점 수용체 1 (PBPA1)에 대한 마이너 돌연변이; 돌연변이된 수용체 부위 1 폴리-피리미딘 트랙, A1PPT (-); 돌연변이된 수용체 부위 1, A1(-); 더 많은 티미딘 (T)의 부가에 의한 강화된 수용체 부위 2 폴리-피리미딘 트랙, A2PPT(+, 8T); 개선된 수용체 부위 2, A2(+).

도 14 (서열 번호:17)는 본 출원에 기재된 작제물에서 사용된 SBR 인트론 3에서 야생형 MVM 인트론에 이루어진

변화들에 관한 개요를 보여준다. 변화들은 회색박스로 기재되며 다음을 포함한다: G-풍부 인트론 인헨서 서열의 돌연변이, IES ko; 가능한 분기점 수용체 1 (PBPA1)에 대한 마이너 돌연변이; 돌연변이된 수용체 부위 1 폴리-피리미딘 트랙, A1PPT (-); 돌연변이된 수용체 부위 1, A1(-); 더 많은 티미딘 (T)의 부가에 의한 강화된 수용체 부위 2 폴리-피리미딘 트랙, A2PPT(+, 9T); 개선된 수용체 부위 2, A2(+).

도 15A 및 15B는 새로운 인트론 서열들을 가지는 마우스에서 B-도메인 결실된 사람 인자 VIII의 생체내 분비 생성을 도시한다. 도 15는 마우스로부터 얻은, B-도메인 결실된 사람 인자 VIII (hFVIII)의 분비 수준을 도시하는 그래프이며, ng/mL (왼쪽-y-축) 또는 정상 백분율 (오른쪽 y-축)로 나타내고 1U = 100% 정상 = 200 ng/mL이다. C57BL/6 마우스들은 x-축에 표시된 바와 같이 6E+12 vg/kg의 AAV2/6 hFVIII 작제물로 형질도입되었다. 도 15A는 7일차의 hFVIII 분비 수준을 보여준다. 도 15B는 28-일의 연구 기간에 걸친 hFVIII 분비 피크 수준을 보여준다. 숫자는 해당 그룹에 대한 평균 hFVIII 정상 백분율 수준을 표시한다.

도 16A 및 16B는 FVIII-BDD cDNA의 발현이 간-특이적임을 보여준다. 도 16A는 도 15에 나타낸 연구에서 조직들 (뇌, 심장, 신장, 폐, 간, 비장, 고환)으로부터 분석되었던 사람 인자 VIII (hFVIII)을 인코딩하는 mRNA 수치들을 보여주는 그래프이다. hFVIII mRNA는 간에서만 검출되었으며 부모 F8 cDNA 작제물 (열린 기호) 또는 CRMSBS2 SBR 인트론 3 (채운 기호)로부터의 다른 조직들에는 없었다. 도 16B는 도 16A에서 분석된 동일한 조직들로부터의 벡터 유전체 (VG) 생물분포를 보여준다. 혈청형 AAV2/6은 이전에 공개되었던 바와 같이 주로 간을 형질도입시킨다.

도 17A 및 17B는 혈우병 A 마우스의 혈장에서 효소적 활성인 사람 인자 VIII-BDD의 초생리적 (supraphysiological) 수준을 도시한다. 도 17은 혈우병 A R593C 마우스로부터 얻은 B-도메인 결실된 사람 인자 VIII (hFVIII)의 효소적 활성 분비 수준을 정상 백분율로 나타내어 도시하는 그래프이며, 1U = 100% 정상이다. 혈우병 A 녹아웃 마우스 R593C는 x-축에 표시된 바와 같이 ~7E+12 vg/kg의 AAV2/6 hFVIII-BDD 작제물로 형질도입되었다. 도 17A는 14일차의 hFVIII 분비 활성 수준을 보여준다. 도 17B는 42일차의 hFVIII 분비 활성 수준을 보여준다. 숫자는 해당 그룹에 대한 평균 hFVIII 정상 백분율 수준을 표시한다.

도 18은 F8 CRMSBS2 SBR 인트론 3 cDNA로 처리된 혈우병 A R593C 마우스에서 출혈 시간을 보여주는 그래프이다. 결과는 꼬리 혈관 횡절단 후 혈우병 마우스에서 지혈에 도달하는 시간의 양에 있어서 유의한 감소 ($p < 0.0001$)를 입증한다.

도 19는 CRMSBS1, 그리고 MVM 인트론이 없거나, 키메라 인트론을 가진 새로운 예시 작제물을 B-도메인 결실된 인자 VIII 트랜스진 및 Ins1-Ins3과 함께 도시하는 도식이다. CRM은 cis-조절 요소를 지칭한다. SBS는 Sangamo Biosciences를 지칭한다. hFVIII은 사람 인자 VIII을 지칭한다. SP는 신호 펩티드를 지칭한다. ITR은 반전 말단 반복부를 지칭한다. SPA는 합성 폴리 아데닐화 서열을 지칭한다. "Ins1" 및 "Ins3"은 상기 도 2에 기재한 바와 같다.

도 20은 CRMSBS2, 그리고 MVM 인트론이 없거나, 키메라 인트론, 또는 SBR 인트론 3을 가지는 새로운 예시 작제물을, B-도메인 결실된 인자 VIII 트랜스진 및 Ins1-Ins3과 함께 도시하는 도식이다. CRM은 cis-조절 요소를 지칭한다. SBS는 Sangamo Biosciences를 지칭한다. hFVIII은 사람 인자 VIII을 지칭한다. SP는 신호 펩티드를 지칭한다. ITR은 반전 말단 반복부를 지칭한다. SPA는 합성 폴리 아데닐화 서열을 지칭한다. "Ins1" 및 "Ins3"은 상기 도 2에 기재한 바와 같다.

도 21은 HepG2 세포들에서 시험관내 AAV F8 cDNA 발현에 의한 hFVIII 수준 및 활성의 평가를 도시하는 그래프이다. 24-웰 디쉬에서 AAV2/6 F8 cDNA (CRMSBS2 SBR 인트론 3)를 1E+05개 세포들 당 4.8E+06, 2.4E+06, 1.2E+6 및 0.6E+06 바이러스 유전체 용량으로 HepG2 세포들에 부가하였다 (시간 t0 일차로 표시). AAV2/6 바이러스 부가 후 7일차 (t7)에 상청액을 hFVIII 분비 수준에 관해 ELISA로 (가장 왼쪽 막대), 그리고 활성에 관하여 APTT 응고 분석으로 (가장 오른쪽 막대) 그리고 색소형성능 (chromogenic assay) 분석 (중앙 막대)하여 분석하였다. 결과는 hFVIII 분비 수준과 활성 간의 우수한 상관관계를 입증하였다 (왼쪽 축에 U/mL, 그리고 오른쪽 y 축에 정상 백분율로 기록, 1U/mL = 100 정상 백분율). n = 6의 생물학적 반복에 대한 데이터를 도시한다. 오차 막대는 평균의 표준 오차를 나타낸다.

도 22는 CRMSBS1 또는 CRMSBS2 인트론 계열에 관한 내용에서 개선된 생성 수율을 도시하는 그래프이다. 바이러스는 HEK293 세포들에서 생성되었으며, 수율은 두 곳의 세포 공장들 (2 CF)로부터 얻은 것이다. CRM은 cis-조절 요소를 지칭한다. SBS는 Sangamo Biosciences를 지칭한다. hFVIII은 사람 인자 VIII을 지칭한다. SP는 신호 펩티드를 지칭한다. ITR은 반전 말단 반복부를 지칭한다. SPA는 합성 폴리 아데닐화 서열을 지칭한다. Ins1 및

Ins3은 각각 절연인자 1, 및 절연인자 3을 지칭한다.

도 23은 도시된 바와 같은 복수의 AAV 혈청형들을 사용하여 야생형 마우스에서 hFVIII-BD 생성 수준을 도시하는 그래프이다. 수컷 C57BL/6 마우스에게 AAV2/5 및 AAV2/9 작제물을 6E+10 vg/마우스 (~2E+12 vg/kg), 또는 AAV2/6 및 AAV2/8 작제물을 6E+10 vg/마우스 (~2E+12 vg/kg) 및 1.8E+11 vg/마우스 (~7E+12 vg/kg)로 정맥내 주사하였다. 이 도면은 저 용량의 AAV2/6 및 AAV 2/5 중 일부를 제외한 모든 샘플들의 혈장에서 초생리적 hFVIII-BDD가 검출되었음을 입증한다.

도 24 는 트랜스진이 HEK293 생성 (HEK)에 의해 또는 Sf9 세포들 (Sf9)에서의 바콜로바이러스 생성에 의해 정제된 AAV2/6에 의해 전달될 때 야생형 마우스에서 hFVIII-BDD 트랜스진의 상대적 발현을 도시하는 그래프이다. 트랜스진은 부모 cDNA (도 4)를 사용하였다. 수컷 C57BL/6 마우스에게 부모 F8 부모 cDNA를 HEK293 세포들 또는 Sf9/rBV (재조합 바콜로바이러스)로부터 생성된 1.8E+11 vg/마우스 (~7E+12 vg/kg)의 AAV2/6 F8 부모 cDNA로 IV 주사 (꼬리 혈관)를 통해 투여하였다. HEK293 세포들로부터 얻은 F8 부모 cDNA 처리는 정상 사람 FVIII 혈장 수준의 142.1% ± 8.3 % SEM (n=8) (hFVIII ELISA로 측정)의 평균 피크 값에 도달하게 하였다. 마우스에게 F8 부모 cDNA (Sf9/rBV) 투여 후 132.8% ± 18.6 % SEM (n = 5)의 유사 수준 (hFVIII ELISA로 측정)에 도달되었다.

도 25A 및 25B는 마우스에서 CRBSBS2 SBR 인트론 3 (Ins1-Ins3) cDNA 트랜스진 공여체의 발현 수준을 보여준다. 도 25A는 도 10에도 도시된 공여체의 도식이다. 도 25B는 혈장내 검출가능한 hFVIII-BDD의 양을 ng/mL 및 정상 백분율 모두로 표현하여 보여준다 (정상 사람 혈장에서). 수컷 C57BL/6 마우스에게 1.8E+11 vg/마우스 (~7E+12 vg/kg)의 AAV2/6 CRMSBS2 SBR 인트론 3 cDNA (n=8)를 정맥내 주사하였다. hFVIII ELISA로 측정된 C57BL/6 마우스의 혈장 내 hFVIII-BDD의 평균 피크 수준을 나타낸다.

도 26A 및 26B는 103일차시의 모든 면역억제 제거 연구를 포함하여, 다양한 비-사람 영장류 (NHP) 연구에서 사람 FVIII-BDD에 관한 투약 계획을 보여준다. 도 26A는 리툭산 (Rituxan) 및 솔루-메드롤 (솔루-메드롤) 투약의 개요를 보여준다. 리툭산 (10 mg/kg; IV) 투약은 테스트 제품 투여 이전이었던 반면, 메틸프레드니솔론 (솔루-메드롤) (10 mg/kg; IM)은 103일차까지 매일 투약하였다. 도 26B는 테스트 물 부가 전 및 후의 실험들에 관한 투약 계획들을 보여주며 또한 리툭산과 솔루-메드롤 투약 시기도 보여준다. 그룹 1-5은 테스트 제품 주사 전 면역억제 요법을 따랐던 반면, 그룹 6-8은 테스트 제품 주사 후 면역억제 요법을 따랐다. 이 연구 기간은 56일 이었다.

도 27은 AAV2/6 hF8 cDNA로 처리된 NHP에서 hFVIII 활성화 수준 사이의 상관관계를 보여주는 그래프이다. 시노물구스 원숭이들에게 제제 완충액 또는 6E+12 vg/kg의 AAV2/6 hF8 cDNA (부모 벡터)를 투여하였다. 도 27은 각각의 동물들을 제제 대조 그룹 (그룹 1, 동물 ID 1101-1102), 및 6E+12 vg/kg 투여 그룹 (그룹 3, 동물 ID 3101-3103)에 관하여 보여준다. 테스트 제품 부가 후 14일차에, hFVIII의 순환 수준 및 활성을 ELISA 또는 APTT 응고 활성으로 분석하였다. 시노물구스 원숭이 FVIII의 정상 수준은 ~1U/mL (~100% 정상)이고 제제 대조 그룹에 대한 응고 활성 데이터에 반영되는데, 이는 응고 활성 분석은 사람 FVIII에 대해 특이적이지 않기 때문이다. ELISA는 시노물구스 원숭이 FVIII에 비해 사람 FVIII에 특이적이므로, 예상한 바와 같이, 제제 대조 그룹에서 ELISA로 측정된 바와 같이 hFVIII 수준은 없다. 그룹 3 동물들에서 순환 hFVIII의 8U/mL 이상 (800% 정상)의 초생리적 수준 및 활성이 존재한다.

도 28A 및 28B는 AAV hF8 cDNA로 처리된 NHP에서 간 효소 프로파일을 보여주는 그래프이다. 시노물구스 원숭이들에게 제제 완충액 또는 6E+12 vg/kg의 AAV2/6 hF8 cDNA (부모 벡터)를 투여하였다. 제제 대조 그룹 (그룹 1, 동물 ID 1101), 및 6E+12 vg/kg 투여 그룹 (그룹 3, 동물 ID 3102)에 관한 동물들에서 간 상태의 지표로서 대표적인 간 효소 프로파일들을 보여준다. 알라닌 아미노트랜스퍼라제 (ALT) 및 아스파르테이트 아미노트랜스퍼라제 (AST)를 보여준다. ALT에 있어서 여전히 시노물구스 원숭이의 정상 범위에 있는 허용가능한 상한 기준치는 126 U/L이고 AST에 있어서는 120U/L이다. 제제 대조 그룹과 6E+12 vg/kg AAV hF8 cDNA (부모 벡터) 그룹 모두에 있어서 ALT/AST 수준은 별표로 표시한 바와 같이 간 생검 후 상승되었다 (간 생검은 41일차에 하였다). 그렇지 않으면 AAV hF8 cDNA는 연구 전반에 걸쳐 (247일) 내성이 좋았다.

도 29A 내지 29D는 B-도메인 결실된 인자 VIII (F8) (FVIII-BDD) 단백질을 운반하는 AAV 공여체를 사용한 NHP 연구에 있어서 사람 FVIII 혈장 수준을 요약하여 도시하는 그래프이다. 도 29A는 그룹 2 동물 (AAV2/6, 2E+12 vg/kg)에 관한 결과를 보여주며; 도 29B는 그룹 3 동물 (AAV2/6, 6E+12 vg/kg)에 관한 결과를 보여주며; 도 29C는 그룹 4 동물 (AAV2/8, 6E+12 vg/kg)에 관한 결과를 보여주며; 그리고 도 29D는 그룹 5 동물 (AAV2/8, 6E+12 vg/kg)에 관한 결과를 보여준다. 1U/mL의 사람 인자 VIII은 생리학적 정상으로 고려되고, 그리하여 생리

학적 정상 순환 사람 인자 VIII의 100%와 동일하다.

도 30은 비-사람 영장류들 (NHP)에서 지정된 작제물 (AAV6 또는 AAV8 벡터들)로 처리 후의 연구에 관하여, 사람 FVIII 항원의 피크 수준을 도시하는 그래프이다. 2E+12 vg/kg (n =3)의 용량 수준에서, 사람에서 111.0%, 493.9% 및 840.0% 정상 hFVIII 혈장 수준의 피크 값 (hFVIII ELISA로 측정시 전체 평균 481.6%)에 도달되었다. 6E+12 vg/kg (n =3)을 나타내는 고 용량에서, 450.0%, 625.6% 및 886.7% [전체 평균 654.1%]의 hFVIII 혈장 수준의 피크 값들에 도달되었다. AAV8에 관한 전체 평균값은 147.1%였다.

도 31A 내지 31C는 저 용량 (2E+12 vg/kg, 그룹 2)의 AAV2/6-FVIII-BDD cDNA를 투여한 개개의 시노물구스 원숭이들 (n=3; 동물 2101, 2102 및 2103)로부터 투약 후 168일의 시기에 걸쳐 얻은 결과를 도시하는 그래프이다. 3개 그래프 모두에서, ELISA로 측정된 혈장 내 FVIII-BDD의 농도를 검은색으로 나타낸다. 추가적으로, 혈장에서 중화 항-FVIII 항체의 농도는 (Bethesda 단위로 표시) 회색으로 나타낸다. 수평 점선은 Bethesda 단위 절사점을 나타내는데, 이 값들 미만은 항-FVIII 중화 항체들에 대해 양성으로 고려되지 않을 것이다. 솔루션-메드물은 수직 파선으로 표시된 바와 같이 103일차에 중단되었다. 각각의 그래프는 하나의 원숭이에 대한 결과를 보여준다: 도 31A는 동물 2101을 보여주고; 도 31B는 동물 2102를 보여주며; 도 31C는 동물 2103을 보여준다.

도 32A 내지 32C는 고 용량 (6E+12 vg/kg, 그룹 3)의 AAV2/6-FVIII-BDD cDNA를 투여한 개개의 시노물구스 원숭이들 (n=3, 동물 3101, 3102 및 3103)로부터 투약 후 168일의 시기에 걸쳐 얻은 결과를 도시하는 그래프이다. 3개 그래프 모두에서, ELISA로 측정된 혈장 내 FVIII-BDD의 농도를 검은색으로 나타낸다. 추가적으로, 혈장에서 중화 항-FVIII 항체의 농도는 (Bethesda 단위로 표시) 회색으로 나타낸다. 수평 점선은 Bethesda 단위 절사점을 나타내는데, 이 값들 미만은 항-FVIII 중화 항체들에 대해 양성으로 고려되지 않을 것이다. 솔루션-메드물은 수직 파선으로 표시된 바와 같이 103일차에 중단되었다. 각각의 그래프는 하나의 원숭이에 대한 결과를 보여준다: 도 32A는 동물 3101을 보여주고; 도 32B는 동물 3102를 보여주며; 도 32C는 동물 3103을 보여준다.

도 33A 내지 33D는 고 용량 (6E+12 vg/kg, 그룹 4)의 AAV2/8-FVIII-BDD cDNA를 투여한 개개의 시노물구스 원숭이들 (n=3, 동물 4101, 4102, 및 4103)로부터 투약 후 168일의 시기에 걸쳐 얻은 결과를 도시하는 그래프이다. 그래프 33A- 33C에서, ELISA로 측정된 혈장 내 FVIII-BDD의 농도를 검은색으로 나타낸다. 추가적으로, 혈장에서 중화 항-FVIII 항체의 농도는 (Bethesda 단위로 표시) 회색으로 나타낸다. 도 33D는 동물 4103에 대한 그래프에서 낮은 수치들을 "확대한"(blow up) 것이다 (도 33A-33C에서 y 축은 0-5 U/mL의 FVIII 항원으로 진행하고 도 33D는 0-1 U/mL의 FVIII 항원으로 진행함을 주목하라). 수평 점선은 Bethesda 단위 절사점을 나타내는데, 이 값들 미만은 항-FVIII 중화 항체들에 대해 양성으로 고려되지 않을 것이다. 솔루션-메드물은 수직 파선으로 표시된 바와 같이 103일차에 중단되었다. 각각의 그래프는 하나의 원숭이에 대한 결과를 보여준다: 도 33A는 동물 4101을 보여주고; 도 33B는 동물 4102를 보여주며; 도 33C 및 33D는 동물 4103을 보여준다.

도 34A 내지 34E는 고 용량 (6E+12 vg/kg, 그룹 5)의 AAV2/8-FVIII-BDD cDNA를 투여한 개개의 시노물구스 원숭이들 (n=3)로부터 168일의 시기에 걸쳐 얻은 결과를 도시하는 그래프이다. 도 34A- 34C에서, ELISA로 측정된 혈장 내 FVIII-BDD의 농도를 검은색으로 나타낸다. 추가적으로, 혈장에서 중화 항-FVIII 항체의 농도는 (Bethesda 단위로 표시) 회색으로 나타낸다. 도 34D 및 34E는 그래프에서 낮은 수치들을 "확대한"(blow up) 것이다 (도 34A-C에서 y 축은 0-5 U/mL의 FVIII 항원으로 진행하고 34D 및 34E의 y 축은 0-1 U/mL의 FVIII 항원으로 진행함을 주목하라). 수평 점선은 Bethesda 단위 절사점을 나타내는데, 이 값들 미만은 항-FVIII 중화 항체들에 대해 양성으로 고려되지 않을 것이다. 솔루션-메드물은 수직 파선으로 표시된 바와 같이 103일차에 중단되었다. 각 그래프는 하나의 원숭이 (동물 5101: 도 34A, 5102: 도 34B 및 5103: 도 34C)에 대한 결과를 보여준다.

도 35A 및 35F는 유전자변이 hFVIII를 발현시키는 동물에서 치료 hFVIII 생물체제를 이용한 감염(challenge)을 도시하는 그래프이다. 그룹 1, 3, 4 및 5 (동물 ID 1101, 3101, 3103, 4103, 5101, 5102)의 시노물구스 원숭이들에게 hFVIII 생물체제 Xyntha®를 감염시켰으며, 이러한 감염은, 25 U/kg의 Xyntha®를 도 35A 내지 35F에 역삼각형으로 나타낸 바와 같이 매주 4회 주입하여 이루어졌다. Xyntha® 감염은 198, 205, 212, 219일차에 대응하였다 (0일차에 AAV hF8 cDNA 테스트 제품 부가 후). hFVIII의 짧은 반감기 및 매주 혈장 수집으로 인해 hFVIII 생물체제 Xyntha®로 인한 hFVIII 수준의 증가는 없었다. 그러나 대조군 체제 그룹 1 (AAV hF8 cDNA를 투여받지 않았던 동물 ID 1101 참고, 도 35A)에서 Xyntha® 감염 (Bethesda 단위로 측정됨, BU) 후 억제성 항체들의 증가가 존재하였다. 도 35A에 도시된 바와 같이, BU는 그래프의 회색 영역으로 나타낸 바와 같이 Xyntha® 감염 후 ~ 0.9 BU/mL에 도달하였다. 동물 ID 3103은 수 주 동안 3U/mL 이상의 높은 BU 수준을 가졌으며, 추가적인 hFVIII 생물체제 감염 (수직 파선으로 나타냄)은 추가의 검출가능한 억제성 항체들 (BU)을 유도하지 않

았다 (도 35B). AAV hF8 cDNA를 투여받았으며 hFVIII 수준을 지속했던 모든 그룹들에서, 억제성 항체들에서, BU의 증가는 없었다 (회색 화살표도 나타냄, 도 35C 내지 F). 도 35C는 동물 ID 3101에 대한 hFVIII 수준이 19주 동안 정상 hFVIII의 ~150%로 지속되었음을 보여주는 반면, 도 35D는 동물 ID 4103에 대한 hFVIII 수준이 19주 동안 정상 hFVIII의 ~10%로 지속되었음을 보여준다. 도 35E는 동물 ID 5101에 대한 hFVIII 수준이 19주 동안 정상 hFVIII의 ~15%로 지속되었음을 보여주는 반면, 도 35F에서, 동물 ID 5102에 대한 hFVIII 수준은 19주 동안 정상 hFVIII의 ~35%로 지속되었음을 보여준다. 수평 점선은 Bethesda 단위 절사점을 나타내는데, 이 값들 미만은 항-FVIII 중화 항체들에 대해 양성으로 고려되지 않을 것이다. 수직 점선은 도 35B, 35E 및 35F에서 테스트 제품 투약 후 103일차시 솔루션-메드롤의 제거를 나타낸다.

도 36A 및 36B는 HepG2 세포들에서 내인성 알부민 유전자좌위로부터의 hVIII-BDD의 *시험관내* 발현을 도시한다. 도 36A는 알부민-표적화된 ZFN (SBS#47171/47898, AAV2/6-ZFN) 및 hFVIII-BDD cDNA AAV2/6-FVIII-BDD (CRMSBS2 인트론 없음)의 HepG2 세포들에 대한 투여 후 시간 경과에 따라 (t = 일) HepG2 세포 상청액에서 검출되는 hFVIII-BDD를 보여주는 그래프이며, AAV2/6-FVIII-BDD는 3.0E+04, 6.0E+04 및 1.2E+05로 투여되었고 이와 함께 AAV2/6-ZFN은 3.0E+05로 투여되었다. 도 36B는 hFVIII cDNA 단독을 보여주는 그래프이다 (ZFN 없음). n = 3의 생물학적 반복에 대한 데이터를 도시한다. 오차 막대는 반복에 대한 평균의 표준 오차를 나타낸다. 점선은 hFVIII ELISA의 검출 한계이다.

도 37은 내인성 알부민 유전자좌위에서 hFVIII-BDD 트랜스진 표적화 통합의 *시험관내* 검출을 보여주는 그래프이다. 표적화 통합은 알부민 삽입 부위를 포함하는 정량적 PCR에 의해 검출되었다. 5' PCR 프라이머는 내인성 사람 알부민 유전자좌위 내에 위치되었으며, PCR 프로브는 hFVIII-BDD 카세트의 ITR 내부에 그리고 3' 프라이머는 hFVIII-BDD 트랜스진 내부에 위치한다. 표시된 숫자들은 하우스-키퍼 유전자 GAPDH에 대해 정규화된다.

도 38은 도 26B의 일정에 따라 비-사람 영장류들 (NHP)에서의 처리 후 사람 FVIII 항원 피크 수준을 도시하는 그래프이다. 그룹 1-5는 테스트 제품 주사 전 면역억제 (IS) 요법을 따랐다. 6E+11 vg/kg의 용량 수준에서 (n = 3, 그룹 3), 피크 값들의 전체 평균은 사람에서 정상 hFVIII 혈장 수준의 5.7% (hFVIII ELISA로 측정)에 도달하였다. 2E+12 vg/kg를 나타내는 고 용량에서 (n = 3, 그룹 4), 피크 값들의 전체 평균은 hFVIII 혈장 수준의 56.4%에 도달되었으며 6E+12 vg/kg (n = 3, 그룹 5)에서 피크 값들의 전체 평균은 hFVIII 혈장 수준의 229.0 % (hFVIII ELISA로 측정)에 도달되었다. 회색으로 음영처리된 것은 IS 테스트 후 제품 요법을 따르는 그룹 7과 8이다. 2E+12 vg/kg의 용량 수준 (n = 3, 그룹 7)에서 피크 값들의 전체 평균은 87.9%였으며, 6E+12 vg/kg (n=3, 그룹 8)에서는, 101.7%였다. 그룹 1과 6은 제제 대조 그룹들 이었으며, 제제로 표시된다.

도 39는 도 38에 나타낸 2E+11 vg/kg 코호트에서의 대상체들을, 검출가능한 순환하는 사람 FVIII 항원 수준을 생성하는 동일한 혈청형을 사용하여 재투약 후 그 결과들을 보여주는 그래프이다. 처음 2E+11 vg/kg 투약을 나타내는 그룹 2 (n = 3)는, 연구 56일차에 9E+11 vg/kg (n = 3)으로 재투약되었다 (도 26B). 재투약 후 7일차에서 순환하는 사람 FVIII 항원 수준을 도시하며, 반-열린 원으로 표시된다 (7일차에 9E+11 vg/kg의 새로운 용량). 모든 나머지 데이터는 도 38에 나타냈던 것과 동일하다 (연구 56일차에서와 같은 피크 수준).

도 40A 및 40B는 내인성 알부민 유전자좌위로부터의 hVIII의 *시험관내* 생성 및 검출을 보여주는 그래프이다. 도 40A는 알부민-표적화된 ZFN (SBS#42906/43043) 및 hFVIII cDNA (CRMSBS2 SBR 인트론 3)의 HepG2 세포들에 대한 투여 후 HepG2 세포 상청액에서 검출된 hFVIII의 총 수준을 보여준다 (19일차에 분석됨). 이 실시예에서, ZFN 3.0E+05와 함께 3.0E+04, 6.0E+04 및 1.2E+05로부터 증가하는 용량의 hFVIII cDNA가 사용되었다. 또한 세포들에 부가되는 총 바이러스를 조절하기 위한 GFP를 갖는 hFVIII cDNA (ZFN 없음), 그리고 hFVIII cDNA 단독 (ZFN 없음)이 도시되어 있으며, 두 가지 후자 모두는 분비되는 hFVIII가 거의 내지 전혀 검출되지 않음을 입증한다. 이는 검출가능한 분비되는 hFVIII가 충분한 양으로 축적되기 전에 에피솜 hFVIII가 분해됨으로 인한 것이다. n = 2의 생물학적 반복에 대한 데이터를 도시한다. 오차 막대는 기술적 및 생물학적 반복에 대한 평균의 표준 오차를 나타낸다. 점선은 hFVIII ELISA의 검출 한계이다. 도 40B는 NHEJ에 의한 내인성 알부민-hFVIII 표적 통합의 수준을 정량적 PCR을 사용하여 보여준다. 5' 프라이머는 내인성 사람 알부민 유전자좌위 내에 위치되며, 프로브는 hFVIII 카세트의 ITR 내에 그리고 3' 프라이머는 hFVIII 내에 위치된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0044] 상세한 설명

[0045] 본 출원은 특히, 간 세포에서의, 트랜스진 발현을 위한 발현 카세트를 개시한다. 이 작제물은 임의의 트랜스진 (들)을 간 세포들에, *생체내* 또는 *시험관내* 전달하기 위하여 사용될 수 있으며 하나 이상의 트랜스진 공급에 의

해 개선될 수 있는 임의의 질병 또는 질환의 치료 및/또는 예방을 위해 사용될 수 있다. 현재 사용되는 간-표적화된 작제물들과 달리, 본 출원에 기재된 작제물은 변형된 인헨서 및/또는 인트론 서열들을 포함하며, 또한, MVM 인트론을 사용하지 않고도 높은 수준으로 트랜스진을 발현시킨다. 이들 작제물들은 또한 작아서, AAV와 같은 소형 벡터 시스템에 의해 전달되는 트랜스진들을 성공적으로 사용할 수 있게 한다.

[0046] 본 출원에 기재된 작제물은 비-사람 영장류의 간에서 hFVIII BDD를 발현시키기 위하여 사용될 수 있다. AAV hF8 cDNA 발현 카세트의 초기 용량에 따라, hFVIII의 순환 혈장 수준은 정상 순환 hFVIII의 800%를 상회하였다. 이러한 초기 고 용량 투여 후, 많은 동물들은 안정적으로 8주 이상 동안 정상 수준의 10-150%를 발현시켰다. 또한, 동물들 중 일부는 hFVIII 단백질 (Xyntha®) 주사로 감염시 항-hFVIII 항체 반응을 증가시키지 않았으며, 이는 이들 동물들에서 hFVIII 단백질에 대한 내성이 실험 과정 전반에 걸쳐 발달됨을 시사하는 것이다.

[0047] 일반

[0048] 본 출원에 개시된 방법의 실시, 뿐만 아니라 조성물의 제조 및 사용은, 달리 명시되지 않는 한, 분자 생물학, 생화학, 염색질 구조 및 분석, 전산 화학, 세포 배양, 재조합 DNA 및 관련 분야에서 해당 기술 분야의 숙련된 기술자의 지식 범위에 속하는 통상의 기술을 사용한다. 이러한 기술들은 문헌에 상세히 설명되어 있다. 예를 들면, Sambrook 외 MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 및 Third edition, 2001; Ausubel 외, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York, 1987 및 주기적 업데이트물; 총서 METHODS IN ENZYMOLOGY, Academic Press, San Diego; Wolffe, CHROMATIN STRUCTURE AND FUNCTION, Third edition, Academic Press, San Diego, 1998; METHODS IN ENZYMOLOGY, Vol. 304, "Chromatin" (P.M. Wassarman and A. P. Wolffe, eds.), Academic Press, San Diego, 1999; 및 METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Vol. 119, "Chromatin Protocols" (P.B. Becker, ed.) Humana Press, Totowa, 1999를 참고하라.

[0049] 정의

[0050] 용어 "핵산," "폴리뉴클레오티드," 및 "올리고뉴클레오티드"는 호환적으로 사용되며 선형 또는 원형의, 그리고 단일- 또는 이중-가닥 형태의 데옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드 폴리머를 지칭한다. 본 출원의 목적에서, 이들 용어들은 폴리머의 길이에 대한 제한으로 해석되어서는 안된다. 이 용어들은 자연 뉴클레오티드, 뿐만 아니라 염기, 당 및/또는 포스페이트 모이어티 (예컨대, 포스포로티오에이트 골격)에서 변형되어 있는 뉴클레오티드의 공지된 유사체를 포함할 수 있다. 일반적으로, 특정 뉴클레오티드의 유사체는 동일한 염기-쌍 특이성을 가진다; 즉, A의 유사체는 T와 염기-쌍을 이루게 될 것이다.

[0051] 용어 "폴리펩티드," "펩티드" 및 "단백질"은 호환적으로 사용되어, 아미노산 잔기들의 폴리머를 지칭한다. 이 용어는 또한 하나 이상의 아미노산들이 화학적 유사체인 또는 상응하는 자연-발생 아미노산의 변형된 유도체인 아미노산 폴리머에도 적용된다.

[0052] "재조합"은 두 개의 폴리뉴클레오티드 사이의 유전적 정보의 교환 과정을 지칭하며, 비-상동 말단 결합 (NHEJ) 및 상동성 재조합에 의한 포획을 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다. 본 출원의 목적에 있어서, "상동성 재조합 (HR)"은, 예를 들면, 상동성-지향된 복구 메커니즘들을 통해 세포내 이중-가닥 절단을 복구하는 동안 발생하는 특수한 교환형태를 지칭한다.

[0053] 본 출원의 특정 방법들에서, 본 출원에 기재된 하나 이상의 표적화된 뉴클레아제는 표적 서열 (예컨대, 세포 염색질) 내 예정된 부위 (예컨대, 알부민 유전자)에서 이중-가닥 절단 (DSB)을 생성한다. DSB는 본 출원에 기재된 작제물의 통합을 매개한다. 선택적으로, 작제물은 절단 영역 내 뉴클레오티드 서열에 상동성을 가진다. 발현 작제물은 물리적으로 통합될 수 있거나 또는, 택일적으로, 상동성 재조합을 통한 절단 복구를 위한 주형으로 발현 카세트가 사용되어, 발현 카세트에서와 같은 뉴클레오티드 서열의 전부 또는 일부를 세포 염색질로 도입시킨다. 그러므로, 세포 염색질 내 첫번째 서열은 변화될 수 있으며, 특정 구체예들에서는, 하나의 발현 카세트에 존재하는 서열로 변환될 수 있다. 그러므로, 용어 "대체하다" 또는 "대체"의 사용은 하나의 뉴클레오티드 서열의 다른 서열로의 대체를 의미할 수 있으며 (즉, 정보가 있는 센스 내 서열의 대체), 반드시 하나의 폴리뉴클레오티드의 또 다른 뉴클레오티드에 의한 물리적 또는 화학적 대체를 필요로 하는 것은 아니다.

[0054] 본 출원에 기재된 임의의 방법들에서, 외인성 뉴클레오티드 서열 ("발현 작제물" 또는 "발현 카세트" 또는 "벡터")은 관심 영역내 유전체 서열들에 상동성이지만, 동일하지는 않은 서열들을 내포함으로써, 상동성 재조합을 자극하여 관심 영역내 비-동일성 서열을 삽입할 수 다. 그러므로, 특정 구체예들에서, 관심 영역내 서열들에 상동성인 발현 카세트 서열의 부분들은 대체되는 유전체 서열에 약 80 내지 99% (또는 이들 사이의 임의의

정수) 서열 동일성을 나타낸다. 다른 구체예들에서, 예를 들면, 발현 카세트의 상동성 영역과 100개가 넘는 연속 염기쌍의 유전체 서열들 간에 1개의 뉴클레오티드 만이 상이한 경우 발현 카세트와 유전체 서열 사이의 상동성은 99% 보다 높다. 특정 경우에서, 발현 카세트의 비-상동성 부분은 관심 영역내 존재하지 않는 서열들을 내포할 수 있어서, 새로운 서열이 관심 영역 내에 도입된다. 이러한 경우들에서, 비-상동성 서열은 일반적으로 관심 영역 내 서열들에 상동성이거나 동일한 50-1,000개 염기쌍들 (또는 이들 사이의 임의의 정수값) 또는 1,000개 초과 임의의 수의 염기쌍들의 서열에 의해 연결된다.

[0055] 용어 "서열"은 DNA 또는 RNA일 수 있고; 선형, 원형 또는 분지형일 수 있으며 단일-가닥 또는 이중-가닥일 수 있는 임의의 길이의 뉴클레오티드 서열을 지칭한다. 용어 "트랜스진"은 유전체 내에 삽입되는 뉴클레오티드 서열을 지칭한다. 트랜스진은 임의의 길이, 예를 들면, 2 내지 100,000,000개 뉴클레오티드 길이 (또는 그 사이 또는 그 이상의 임의의 정수 값), 바람직하게는 약 100 내지 100,000개 뉴클레오티드 길이 (또는 그 사이의 임의의 정수), 더욱 바람직하게는 약 2000 내지 20,000개 뉴클레오티드 길이 (또는 그 사이의 임의의 값) 그리고 더더욱 바람직하게는, 약 5 내지 15 kb (또는 그 사이의 임의의 값)일 수 있다.

[0056] "염색체"는 세포의 유전체 전부 또는 일부를 포함하는 염색질 복합체이다. 세포의 유전체는 종종 그 핵형에 의해 특성화되는데, 핵형은 세포의 유전체를 포함하는 염색체 모두의 집합이다. 세포의 유전체는 하나 이상의 염색체들을 포함할 수 있다.

[0057] "에피솜"은 세포의 염색체 핵형의 일부가 아닌 핵산을 포함하는 반복 핵산, 뉴클레오단백질 복합체 또는 그 외 다른 구조이다. 에피솜들의 예에는 플라스미드 및 특정 바이러스 유전체들이 포함된다. 본 출원에 기재된 간 특이적 작제물은 에피솜형으로 유지될 수 있거나, 또는 택일적으로, 세포 내부에 안정하게 통합될 수 있다.

[0058] "외인성" 분자는 세포에서 정상적으로 존재하지 않으나, 하나 또는 그 이상의 유전적, 생화학적 또는 다른 방법들에 의해 세포 내부로 도입될 수 있는 분자이다. "세포에서 정상적 존재"는 세포의 특정 발생 단계 및 환경 조건들과 관련하여 결정된다. 그러므로, 예를 들면, 근육 세포들의 배아 발생기 동안에만 존재하는 분자는 성체 근육 세포와 관련하여 외인성 분자이다. 유사하게, 열 충격에 의해 유도된 분자는 비-열-충격 세포와 관련하여 외인성 분자이다. 외인성 분자는, 예를 들면, 기능부전 내인성 분자의 기능적 형태(version) 또는 정상적으로-기능하는 내인성 분자의 기능부전 형태를 포함할 수 있다.

[0059] 외인성 분자는, 여러가지 중에서도, 소분자, 가령, 조합적 화학 과정에 의해 생성되는 소분자, 또는 대분자, 가령, 단백질, 핵산, 탄수화물, 지질, 당단백질, 지질단백질, 다당류, 상기 분자들의 임의의 변형된 유도체, 또는 하나 또는 그 이상의 상기 분자들을 포함하는 임의의 복합체일 수 있다. 핵산은 DNA 및 RNA를 포함하고, 단일-또는 이중-가닥일 수 있고; 선형, 분지형, 또는 원형일 수 있으며; 임의의 길이일 수 있다. 핵산은 이중가닥을 형성할 수 있는 핵산들, 뿐만 아니라 삼중가닥-형성 핵산들을 포함한다. 예를 들면, 미국 특허 제 5,176,996 및 5,422,251호를 참고하라. 단백질은, DNA-결합 단백질, 전사 인자, 염색질 재형성 인자, 메틸화된 DNA 결합 단백질, 중합효소, 메틸라아제, 디메틸라아제, 아세틸라아제, 디아세틸라아제, 키나아제, 포스포타아제, 결찰효소(ligases), 디유비퀴티나아제 (deubiquitinases), 인테그라아제, 재조합효소, 결찰효소, 토포이소머라제, 자이라제(gyrases) 및 헬리카제를 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0060] 외인성 분자는 내인성 분자와 동일한 유형의 분자, 예컨대, 외인성 단백질 또는 핵산일 수 있다. 예를 들면, 외인성 핵산은 감염성 바이러스 유전체, 세포 내로 도입된 플라스미드 또는 에피솜, 또는 세포내 정상적으로 존재하지 않는 염색체를 포함할 수 있다. 외인성 분자들의 세포내 도입방법들은 해당 분야의 숙련된 기술자들에게 공지이며, 지질-매개 전달 (즉, 리포솜, 중성 및 양이온성 지질 포함), 전기천공, 직접 주입, 세포 융합, 입자 충격, 칼슘 포스페이트 공동-침전, DEAE-텍스트란-매개 전달 및 바이러스 벡터-매개 전달을 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다. 외인성 분자는 또한 내인성 분자와 동일한 유형의 분자이지만 해당 세포가 유래한 것이 아닌 상이한 종들로부터 유래한 것일 수 있다. 예를 들면, 사람 핵산 서열은 본래 마우스 또는 햄스터로부터 유래한 세포주로 도입될 수 있다. 외인성 분자들의 이식 세포내 도입방법들은 해당 분야의 숙련된 기술자들에게 공지이며, 프로토플라스트 형질전환, 실리콘 카바이드 (예컨대, WHISKERS™), *아그로박테리움*-매개 형질전환, 지질-매개 전달 (즉, 리포솜, 중성 및 양이온성 지질 포함), 전기천공, 직접 주입, 세포 융합, 입자 충격 (예컨대, "유전자 총" 사용), 칼슘 포스페이트 공동-침전, DEAE-텍스트란-매개 전달 및 바이러스 벡터-매개 전달을 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0061] 대조적으로, "내인성" 분자는 특정 환경 조건들하에서 특정 발생 단계에 있는 특정 세포에 정상적으로 존재하는 분자이다. 예를 들면, 내인성 핵산은 염색체, 미토콘드리아, 클로로플라스트 또는 다른 소기관의 유전체, 또는 자연-발생 에피솜 핵산을 포함할 수 있다. 추가적인 내인성 분자들은 단백질, 예를 들면, 전사 인자 및 효소들

을 포함할 수 있다.

- [0062] 본 출원에서 사용되는, 용어 "외인성 핵산의 생성물"은 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드 생성물 모두, 예를 들면, 전사 생성물 (폴리뉴클레오티드, 가령, RNA) 및 번역 생성물 (폴리펩티드)을 포함한다.
- [0063] "융합" 분자는 둘 또는 그 이상의 아단위 분자들이 연결, 바람직하게는 공유적으로 연결되어 있는 분자이다. 아단위 분자들은 동일한 화학적 유형의 분자일 수 있거나, 상이한 화학적 유형들의 분자들일 수 있다. 융합 분자들의 예들에는, 융합 단백질 (예를 들면, 단백질 DNA-결합 도메인과 절단 도메인 사이의 융합), 절단 도메인과 작동적으로 연관된 폴리뉴클레오티드 DNA-결합 도메인 사이의 융합 (예컨대, sgRNA), 및 융합 핵산 (예를 들면, 융합 단백질을 인코딩하는 핵산)이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0064] 세포에서 융합 단백질의 발현은 융합 단백질의 세포로의 전달로부터, 또는, 폴리뉴클레오티드가 전사되고, 전사체가 번역되어, 융합 단백질을 생성하는, 융합 단백질을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드의 세포로의 전달에 의해 이루어질 수 있다. 트랜스-스플라이싱, 폴리펩티드 절단 및 폴리펩티드 결합 또한 세포에서의 단백질 발현에 관여할 수 있다. 세포로의 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드 전달 방법들은 본 출원의 다른 부분에서 제시된다.
- [0065] 본 출원의 목적에 있어서 "유전자"는, 유전자 생성물을 인코딩하는 DNA 영역 (하기 참조), 뿐만 아니라 조절 서열들이 코딩 및/또는 전사된 서열들에 인접하였든 아니든간에 유전자 생성물의 생성을 조절하는 DNA 영역들을 포함한다. 따라서, 유전자는 프로모터 서열, 터미네이터, 번역 조절 서열, 가령, 리보솜 결합 부위 및 내부 리보솜 진입 부위, 인핸서, 슬라이서, 절연체, 경계 요소, 복제 원점, 기질 부착 부위 및 좌위 제어 영역을 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0066] "유전자 발현"은 유전자에 내포된 정보의, 유전자 생성물로의 전환을 의미한다. 유전자 생성물은 유전자의 직접적인 전사 생성물 (예컨대, mRNA, tRNA, rRNA, 안티센스 RNA, 리보자임, 구조 RNA 또는 임의의 유형의 RNA) 또는 mRNA의 번역에 의해 생성된 단백질이 될 수 있다. 유전자 생성물들은 또한 과정들, 가령, 캡핑(capping), 폴리아데닐화, 메틸화, 및 교정에 의해 변형된 RNA, 및 예를 들면, 메틸화, 아세틸화, 인산화, 유비퀴틴화, ADP-리보실화, 미리스틸화, 및 글리코실화에 의해 변형된 단백질을 포함한다.
- [0067] 유전자 발현의 "조절"은 유전자의 활성 변화를 의미한다. 발현의 조절은 유전자 활성화 및 유전자 억제를 포함할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 발현을 조절하기 위해 유전체 교정 (예컨대, 절단, 변경, 불활성화, 무작위 돌연변이)이 사용될 수 있다. 유전자 불활성화는 본 출원에 기재된 ZFP, TALE 또는 CRISPR/Cas 시스템을 포함하지 않는 세포에 비해 유전자 발현에 있어 임의의 감소를 지칭한다. 그러므로 유전자 불활성화는 부분적이거나 전부일 수 있다.
- [0068] "관심 영역"은 임의의 세포 염색질 영역, 가령, 예를 들면, 유전자 내부 또는 유전자에 인접한 유전자 또는 비-코딩 서열이며, 이 영역에서 외인성 분자를 결합시키는 것이 바람직하다. 결합은 표적화된 DNA 절단 및/또는 표적화된 재조합을 위한 것일 수 있다. 관심 영역은 예를 들면, 염색체, 에피솜, 소기관 유전체 (예컨대, 미토콘드리아, 클로로플라스트), 또는 감염성 바이러스 유전체에 존재할 수 있다. 관심 영역은 유전자의 코딩 영역 내부, 전사되는 비-코딩 영역 내부, 가령, 예를 들면, 리더 서열, 트레이러 서열 또는 인트론, 또는 비-전사 영역 내부, 코딩 영역의 상류 또는 하류에 존재할 수 있다. 관심 영역은 하나의 뉴클레오티드 쌍 길이 만큼 작거나 최대 2,000개 뉴클레오티드 쌍 길이, 또는 임의의 정수 값의 뉴클레오티드 쌍일 수 있다.
- [0069] "진핵" 세포들은 줄기 세포들 (만능성 및 다능성)을 비롯하여, 진균 세포 (가령, 효모), 식물 세포, 동물 세포, 포유동물 세포 및 사람 세포 (예컨대, T-세포)를 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0070] 용어 "작동적 연결" 및 "작동적으로 연결된" (또는 "작동가능하게 연결된")은 병치된 둘 또는 그 이상의 성분들 (가령, 서열 요소들)과 관련하여 호환적으로 사용되는데, 여기서 이러한 성분들은 두 가지 성분들이 정상적으로 기능하고 이들 성분들 중 최소한 하나가 다른 성분들 중 최소한 하나에 대해 발휘되는 기능을 매개할 수 있도록 배열된다. 예로서, 전사 조절 서열, 가령, 프로모터는, 전사 조절 서열이 하나 또는 그 이상의 전사 조절 인자들의 존재 또는 부재에 대해 반응하여 코딩 서열의 전사 수준을 제어하는 경우 코딩 서열에 작동적으로 연결된 것이다. 전사 조절 서열은 일반적으로 코딩 서열과 시스(cis)로 작동적으로 연결되지만, 코딩서열에 직접적으로 인접할 필요는 없다. 예를 들면, 인핸서는 코딩 서열에 작동적으로 연결된 전사 조절 서열이지만, 이들은 인접해 있지는 않다.
- [0071] 단백질, 폴리펩티드 또는 핵산의 "기능적 단편"은, 그 서열이 전장 단백질, 폴리펩티드 또는 핵산과 동일하지 않으나, 전장 단백질, 폴리펩티드 또는 핵산과 동일한 기능을 유지하는 단백질, 폴리펩티드 또는 핵산이다. 기

능적 단편은 상응하는 본래의 분자와 동일한, 더 많은 또는 더 적은 수의 잔기를 보유할 수 있으며, 및/또는 하나 또는 그 이상의 아미노산 또는 뉴클레오티드 치환들을 내포할 수 있다. 핵산의 기능 (예컨대, 코딩 기능, 또다른 핵산에 혼성화하는 능력)을 결정하는 방법은 해당 분야에 널리 공지되어 있다. 유사하게, 단백질 기능의 결정 방법들이 널리 공지되어 있다. 예를 들면, B-도메인 결실된 사람 인자 VIII은 전장 인자 VIII 단백질의 기능적 단편이다.

[0072] 폴리뉴클레오티드 "백터" 또는 "작제물"은 표적 세포들에 유전자 서열들을 전달할 수 있다. 전형적으로, "백터 작제물," "발현 백터," "발현 작제물," "발현 카세트," 및 "유전자 전달 백터"는 관심 유전자의 발현을 유도할 수 있고 유전자 서열들을 표적 세포들로 전달할 수 있는 임의의 핵산 작제물을 의미한다. 그러므로 이 용어는 클로닝, 및 발현 운반체, 뿐만 아니라 통합 백터를 포함한다.

[0073] 용어 "대상체" 및 "환자"는 호환적으로 사용되며 포유동물, 가령, 사람 환자들 및 비-사람 영장류, 뿐만 아니라 실험 동물들, 가령, 토끼, 개, 고양이, 래트, 마우스, 및 다른 동물들을 지칭한다. 따라서, 본 출원에서 사용되는 용어 "대상체" 또는 "환자"는 본 발명의 발현 카세트가 투여될 수 있는 임의의 포유동물 환자 또는 대상체를 의미한다. 본 발명의 대상체들은 질환이 있는 대상체들을 포함한다.

[0074] **간-특이적 발현 작제물**

[0075] 본 출원은 대상체에 발현 카세트(들) 투여 후 (예컨대, 간 전달) 간 세포에서 *생체내*를 포함하여 트랜스진의 발현을 유도함에 사용하기 위한 발현 카세트 (작제물)을 기재한다. 발현 작제물은 에피솜상태로 유지되어 트랜스진의 염색체외적 발현을 유도할 수 있거나, 또는, 택일적으로, 발현 작제물은 간 세포, 예를 들면, 뉴클레아제-매개된 표적화 통합에 의해 간 세포의 유전체 내부에 통합될 수 있다.

[0076] 폴리뉴클레오티드 발현 작제물은 인헨서 서열, 프로모터 서열, 및 하나 이상의 트랜스진들을 포함한다. 선택적으로 다음 중 하나 이상이 포함된다: 인트론 서열, 폴리아데닐화 서열 및/또는 신호 펩티드. 본 출원에 기재된 발현 작제물에서 임의의 인헨서 서열이 사용될 수 있다. 특정 구체예들에서, 인헨서는 야생형 또는 변형된 세르핀1 인헨서이다 (Chuah 외, (2014) *Molecular Therapy*, 22, 1605-1613.; Nair 외, (2014) *Blood*, 123, 3195-3199)

[0077] 바람직한 구체예들에서, 세르핀1 인헨서는 야생형과 비교하여 하나 이상의 돌연변이 (예컨대, 점 돌연변이)를 포함하는데, 예를 들면, 세르핀1 인헨서는 도 5에 도시된 하나 이상의 뉴클레오티드 변형들, 즉, 서열 번호:1-13 중 어느 하나에 나타낸 서열의 잔기들 1, 5, 14, 32 및/또는 39 중 하나 이상에서의 뉴클레오티드 변형들을 내포한다. 특정 구체예들에서, 세르핀1 인헨서는 서열 번호:1-13 중 어느 하나의 위치 1, 5, 14 및 32에서의 변형들을 포함(CRMSBS1로 표시된 작제물)하는 반면, 다른 구체예들에서, 세르핀1 인헨서는 서열 번호:1-13 중 어느 하나의 위치 1, 14, 32 및 39에서의 변형들을 포함(CRMSBS2로 표시된 작제물)한다. 예시 인헨서 서열들을 하기에 나타낸다:

[0078] CRMSBS1 (서열 번호:35): 5'GGGGGAGGCTGCTGGTGAATATTAACCAAGATCAGCCCAGTTACCGGAGGAGCAAACAGGGGCTAAGTTCAC

[0079] CRMSBS2 (서열 번호:36): 5'

[0080] GGGGGAGGCTGCTGGTGAATATTAACCAAGATCACCCAGTTACCGGAGGAGCAAACAGGGGACTAAGTTCAC

[0081] 유사하게, 임의의 프로모터 서열이 본 발명의 발현 카세트에서 사용될 수 있다. 특정 구체예들에서, 프로모터는 항시발현(constitutive) 프로모터이다. 다른 구체예들에서, 프로모터는 유도성 또는 조직 특이적 프로모터이다. 일부 구체예들에서, 프로모터는 간-특이적 프로모터이다. 특정 구체예들에서, 프로모터는 트랜스타이레틴 최소 프로모터 (TTRm) 프로모터이다. 다른 구체예들에서, 프로모터는 알파-1 항-트립신 (hAAT) 프로모터이다.

[0082] 본 출원에 기재된 임의의 폴리뉴클레오티드는 선택적으로 인트론 서열을 추가로 포함할 수 있다. 특정 구체예들에서, 발현 작제물은, 예를 들면, 도 6, 7, 19 및 20의 맨 아래 패널에 도시된 바와 같은, 절두된 키메라 인트론 (T-키메라 인트론) 서열을 포함한다. T-키메라 인트론은 pCI-neo (GenBank U47120)에 있는 키메라 인트론의 절두된 버전이다. pCI-neo에 있는 키메라 인트론은 사람 β-글로빈 유전자로부터의 5' 스플라이스 공여체 부위, 그리고 면역글로불린 유전자 중쇄 가변 영역의 3' 수용체 부위 및 분기점이다. T-키메라 인트론은 5' 스플라이스 공여체와 분기점 사이에 45 bp 결실을 내포한다. 또한 다른 구체예들에서, 발현 작제물은 돌연변이된 MVM 인트론 서열 (예컨대, 도 12, 13 및 14에 도시된 돌연변이들 중 하나 이상) (서열 번호:15-17)을 포함한다.

[0083] 택일적으로, 본 출원에 기재된 발현 작제물은 예를 들면, 도 6, 7, 19 및 20의 중간 패널에 도시된 작제물에 도

시된 바와 같이, 인트론 서열이 없을 수 있다. 인자 VIII 트랜스진을 포함하는 것으로 주석이 달린 예시적 작 제물을 하기에 나타내며, F8 트랜스진은 임의의 트랜스진으로 대체될 수 있고 프로모터 및 절연인자 서열들은 본 출원에 기재된 바와 같이 추가로 변형될 수 있음이 명백할 것이다:

[0084] hF8 cDNA, 인트론 없음 (프로모터 모듈, 폴리 A 및 Ins를 포함하는 완전 서열, CRMSBS2 인트론 없음) (서열 번 호:34):

명칭: CRMSBS2 인트론 없음	
모듈	잔기들
Ins 1	14 - 32
CRMSBS2	33 - 104
TTRm	117 - 339
hF8 BDD	345 - 4718
SPA51	4725 - 4775
Ins 3	4776 - 4792

[0085]

```

|          |          |          |          |
| GCGGCCAAGCTTGGAAACCAATTGCCACCTTCAGGGGGAGGCTGCTGGTGA - 50
| ATATTAAACCAAGATCACCCACAGTTACCGGAGGAGCAAACAGGGACTAAGT - 100
| TCACACCGCTGGTACCCTTCGGTCTGCCACATTTGGTAGAGCGAGTGTTCGG - 150
| ATACTCTAATTCCTTAGGCAAGGTTCAATATTGCTTAGGTTACTTTATTC - 200
| TCTTTTGTTCACCAAGTCAATAATCAGAAATCAGCAGGTTTGGATTGAGG - 250
| TTGGCAGGGATCAGGAGCTTGGGTTGGTAGGAGGGGGTATAAAGCTCTT - 300
| TCACCAAGGAGAAGCCCTCACACAGATCACAAAGCTCTTCTAGTATGCAG - 350
| ATCGAGCTCTCCACCTGCTTCTTTCTGTGCCTGTGTGAGATTCTGCTTCAG - 400
| CGCCACCAGGAGATACTACTCTGGGGGCTGTGGAGCTGAGCTGGGACTACA - 450
| TGCAGTCTGACCTGGGGAGCTGCCTGTGGATGCCAGGTTCCCCCCCAGA - 500
| GTGCCCAAGAGCTTCCCCTTCAACACCTCTGTGGTGTACAAGAAGACCCT - 550
| GTTTGTGGAGTTCACTGACCACCTGTTCAACATTGCCAAGCCCAGGCCCC - 600
| CCTGGATGGGCCTGCTGGGCCCCACCATCCAGGCTGAGGTGTATGCACT - 650
| GTGGTGATCACCTGAAGAACAATGGCCAGCCACCCCTGTGAGCCTGCAATGC - 700
| TGTGGGGGTGAGCTACTGGAAGGCCCTGTGAGGGGCTGAGTATGATGACC - 750
| AGACCAGCCAGAGGGAGAAGGAGGATGACAAGGTGTTCCCTGGGGGCAGC - 800
| CACACCTATGTGTGGCAGGTGCTGAAGGAGAATGGCCCCATGGCCTCTGA - 850
| CCCCCTGTGCCTGACCTACAGCTACCTGAGCCATGTGGACCTGGTGAAGG - 900
| ACCTGAACTCTGGCCTGATTTGGGGCCCTGCTGGTGTGCAGGGAGGGCAGC - 950
| CTGGCCAAGGAGAAGACCAGCCCTGCACAAGTTCATCCTGCTGTTTGC - 1000
| TGTGTTTGTATGAGGGCAAGAGCTGGCACTCTGAAACCAAGAACAGCCTGA - 1050
| TGCAGGACAGGGATGCTGCCTCTGCCAGGGCCTGGCCCAAGATGCACACT - 1100
| GTGAATGGCTATGTGAACAGGAGCCTGCCTGGCCTGATTTGGCTGCCACAG - 1150
| GAAGTCTGTGTAAGTGGCATGTGATTTGGCATGGCCACCACCCTGAGGTGC - 1200
| ACAGCATCTTCTGGAGGGCCACACCTTCCCTGGTCAGGAACCCAGGGCAG - 1250
| GCCAGCCTGGAGATCAGCCCATCACCTTCCCTGACTGCCAGACCCTGCT - 1300
| GATGGACCTGGGCCAGTTTCTGCTGTCTGCCACATCAGCAGCCACCAGC - 1350
| ATGATGGCATGGAGCCATATGTGAAGGTGGACAGCTGCCCTGAGGAGGCC - 1400
| CAGCTGAGGATGAAGAACAATGAGGAGGCTGAGGACTATGATGATGACCT - 1450
| GACTGACTCTGAGATGGATGTGGTGGGTTTGTATGATGACAACAGCCCCA - 1500
| GCTTCATCCAGATCAGGTTCTGTGGCCAAGAAGCACCCEAAGACCTGGGTG - 1550
| CACTACATTTGCTGCTGAGGAGGAGGACTGGGACTATGCCCCCTGGTGTCT - 1600
| GGCCCTGATGACAGGAGCTACAAGAGCCAGTACCTGAACAATGGCCCCC - 1650
| AGAGGATTTGGCAGGAAGTACAAGAAGGTCAGGTTTATGGCTTACACTGAT - 1700
| GAAACCTTCAAGACCAGGAGGCCATCCAGCATGAGTCTGGCATCCTGGG - 1750
| CCCCCTGCTGTATGGGGAGGTGGGGACACCCTGCTGATCATCTTCAAGA - 1800
| ACCAGGCCAGCAGGCCCTACAACATCTACCCCATGGCATCACTGATGTG - 1850
| AGGCCCTGTACAGCAGGAGGCTGCCAAGGGGTGAAGCACCTGAAGGA - 1900
| CTTCCCCATCCTGCTGGGGAGATCTTCAAGTACAAGTGGACTGTGACTG - 1950
| TGGAGGATGGCCCCACCAAGTCTGACCCAGGTTGCTGACCAGATACCTAC - 2000
| AGCAGCTTTGTGAACATGGAGAGGGACCTGGCCTCTGGCCTGATTTGGCC - 2050

```

```

1          10          20          30          40          50
|          |          |          |          |
| CCTGCTGATCTGCTACAAGGAGTCTGTGGACCAGAGGGGCAACCAGATCA - 2100
| TGTCTGACAAGGGAATGTGATCCTGTTCTCTGTGTTTGTATGAGAACAGG - 2150
| AGCTGGTACC'TGACT'GAGAACA'TCCAGAGG'TTCCCTGCCCAACCCTGCT'GG - 2200
| GGTGCAGCTGGAGGACCCTGAGTTCCAGGCCAGCAACATCATGCACAGCA - 2250
| TCAATGGCTATGTGTTTACAGCCTGCAGCTGTCTGTGTGCTGCCTGCATGAG - 2300
| GTGGCCTACTGGTACATCCTGAGCATTTGGGGCCAGACTGACTTCTCTGTC - 2350

```

[0086]

TGTGTTCTTCTCTGGTACACCTTCAAGCACAAGATGGTGTATGAGGACA - 2400
 CCTGACCCCTGTTGCCCTTCTCTGGGGAGACTGTGTTCAAGGATGGAG - 2450
 AACCCCTGGCCGTGGATTCTGGGCTGCCACAACCTTGACTTCAGGAACAG - 2500
 GGGCATGACTGCCCTGCTGAAAGTCTCCAGCTGTGACAAGAACAACCTGGGG - 2550
 ACTACTATGAGGACAGCTATGAGGACATCTCTGCCACCTGCTGAGCAAG - 2600
 AACCAATGCCATTGAGCCCAAGGAGCTTCAGCCAGAATCCACCCGTCCTTAA - 2650
 GGCCATCAGCGCGAGATCACCAGGACCACCTGCAGTCTGACCAGGAGG - 2700
 AGATTGACTATGATGACACCATCTCTGTGGAGATGAAGAAGGAGGACTTT - 2750
 GACATCTACGACGAGGACGAGAACCAGAGCCCAAGGAGCTTCCAGAAGAA - 2800
 GACCAGGCACACTTTCATGCTGCTGTGGAGAGGCTGTGGGACTATGGCA - 2850
 TGAGCAGCAGCCCCATGTGCTGAGGAACAGGGCCCAAGTCTGGCTCTGTG - 2900
 CCCCAGTTCAAGAAGGTGGTGTCCAGGAGTTCACGTGATGGCAGCTTCAC - 2950
 CCAGCCCTGTACAGAGGGGAGCTGAATGAGCACCTGGGCTGCTGGGCC - 3000
 CCTACATCAGGGCTGAGGTGGAGGACAAACATCATGGTGACCTTCAGGAAC - 3050
 CAGGCCAGCAGGCCCTACAGCTTCTACAGCAGCTGATCAGCTATGAGGA - 3100
 GGACCAAGGAGGAGGGGCTGAGCCCAAGGAAGAACTTTGTGAAGCCCAATG - 3150
 AAACCAAGACCTACTTCTGGAAGGTGCAGCACACATGGCCCCCACCAG - 3200
 GATGATTTGACTGCAAGGCCCTGGGCTACTTCTCTGATGTGGACCTGGA - 3250
 GAAGGATGTGCACTTGGCTGATTTGGCCCTGCTGGTGTGCCACCCA - 3300
 ACACCTGAAACCTGCCATGGCAGGCAGGTGACTGTGCAGGATTTGCC - 3350
 CTGTTCTTACCATCTTTGATGAAACCAAGAGCTGGTACTTCACTGAGAA - 3400
 CATGGAGAGGAAGTGCAGGGCCCTGCAACATCCAGATGGAGGACCCCA - 3450
 CCTTCAAGGAGAAGTACAGGTTCATGCCATCAATGGCTACATCATGGAC - 3500
 ACCCTGCCCTGGCTGGTGTGGCCAGGACCAGGATCAGGTGGTACCT - 3550
 GCTGAGCATGGGCAGCAATGAGAACAATCCACAGCATCCACTTCTCTGGCC - 3600
 ATGTGTTTCACTGTGAGGAAGAAGGAGGAGTACAAGATGGCCCTGTACAA - 3650
 CTGTACCTGGGGTGTGAGACTGTGGAGATGCTGCCAGCAAGGCTGG - 3700
 CATCTGGAGGTTGGAGTGCCTGATTTGGGAGCACCTGCATGCTGGCATGA - 3750
 GCACCTGTTCCTGGTGTACAGCAACAAGTCCAGACCCCTGGGCATG - 3800
 GCCTCTGGCCACATCAGGGACTTCCAGATCACTGCCTCTGGCCAGTATGG - 3850
 CCAGTGGGCCCAAGCTGGCCAGGCTGCACACTCTTGGCAGCATCAATG - 3900
 CCTGGAGCACCAGGAGCCCTTCAAGTGGATCAAGGTGGACCTGCTGGCC - 3950
 CCCATGATCATCCATGGCATCAAGACCCAGGGGGCCAGGCAGAAGTTCA - 4000
 CAGCCTGTACATCAGCCAGTTCATCATCATGTACAGCCTGGATGGCAAGA - 4050
 AGTGGCAGACCTACAGGGGCAACAGCACTGGCACCTGATGGTGTCTTT - 4100
 GGCAATGTGGCAGCTCTGGCATCAAGCACAACATCTTCAACCCCCCAT - 4150
 CATTTGCCAGATACATCAGGCTGCACCCACCCACTACAGCATCAGGAGCA - 4200
 CCTGAGGATGGAGCTGATGGGCTGTGACCTGAACAGCTGCAGCATGCC - 4250
 CTGGGCATGGAGAGCAAGGCCATCTCTGATGCCAGATCACTGCCAGCAG - 4300
 TACTTTCAACCAACATGTTTGGCCACCTGGAGCCCAAGGCCAGGCTGC - 4350
 ATCTGCAGGGCAGGAGCAATGCCCTGGAGGCCCAAGTCAACAACCCCAAG - 4400
 GAGTGGCTGCAGGTGGACTTCCAGAAGACCATGAAGGTGACTGGGGTGAC - 4450
 CACCCAGGGGTGAAGAGCCTGCTGACCAGCATGTATGTGAAGGAGTTCC - 4500
 TGATCAGCAGCAGCCAGGATGGCCACCAGTGGACCTGTTCTTCCAGAAT - 4550
 GGCAAGGTGAAGGTGTTCCAGGGCAACAGGACAGCTTACCCCTGTGGT - 4600
 GAACAGCCTGGACCCCTGCTGACCAGATACCTGAGGATTCACCCCT - 4650
 AGAGCTGGGTGCACCAGATGTCCTGAGGATGGAGGTGCTGGGCTGTGAG - 4700
 GCCCAGGACCTGTACTGAGGATCC**AATAAAATATCTTTATTTTCATTACA** - 4750

1 10 20 30 40 50
 | | | | | |
TCCTGTGTTGGTTTT**TTTGTGTTTTCCTGTACGATCGGG**CTCGAGCG - 4800

[0087]

[0088]

5'

[0089]

인자 VIII 트랜스진을 포함하는 것으로 주석이 달린 또 다른 예시적 작제물을 하기에 나타내며, 이 또한 F8 트랜스진은 임의의 트랜스진으로 대체될 수 있고 프로모터 및 절연인자 서열들은 본 출원에 기재된 바와 같이 추가로 변형될 수 있음이 명백할 것이다:

[0090]

인트론을 포함하는 hF8 cDNA (프로모터 모듈, 폴리 A 및 Ins를 포함하는 완전 서열, CRMSBS2 SBR 인트론 3) (서열 번호:37):

명칭: CRMSBS2 SBR 인트론 3	
모듈	잔기들
Ins 1	14 - 32
CRMSBS2_	33 - 104
TTRm	117 - 339
SBR 인트론 3	340 - 432
hF8 BDD	438 - 4811
SPA51	4818 - 4868
Ins 3	4869 - 4885

[0091]

```

1       10       20       30       40       50
|       |       |       |       |       |
GCGGCCTAAGCTTGGAAACCATGGCCACCTTCAGGGGGAGGCTGCTGGTGA - 50
ATATTAACCAAGATCACCCAGTTACCGGAGGAGCAAACAGGGACTAAGT - 100
TCACACGCGTGGTACCCTCTGCTGCACATTCGTAGAGGGAGCTTCC - 150
TACTCTAATCTTCCCTAGCCCAAGGTTCAATTTGTTAGGTTACTTATT - 200
TCCTTTCTGACTAAGTCAATAAATCAGAAATCAGCAGCTTTGGAGTCAG - 250
TTGGCAGGATCAGCAGCTTGGTTGGAAAGGAGGGCTTAAAGAGGCTCC - 300
TCACACGAGAAAGCTTCACACAGATCCCAAACTCTGAAAGAGGTAAGG - 350
GTTTAAGTTATCGTTAGTTGTCGACCATTAATGTTTAATTACCTGGAGC - 400
ACCTGCCTGAAATCATTTTTTTTCAGGTTGGCTAGTATGCAGATCGAGC - 450
TCTCCACCTGCTTCTTTCTGTGCTGTTGAGATTCTGCTTCAGCGCCACC - 500
AGGAGATACTACCTGGGGCTGTGGAGCTGAGCTGGGACTACATGCAGTC - 550
TGACCTGGGGAGCTGCCTGTGGATGCCAGGTTCCCCCCAGAGTGCCCA - 600
AGAGCTTCCCCTTCAACACCTCTGTGGTGTACAAGAAGACCTGTTTGTG - 650
GAGTTCACCTGACCACCTGTCAACATTGCCAAGCCAGGCCCCCTGGAT - 700
GGGCTGCTGGGCCCCACCATCCAGGCTGAGGTGTATGACACTGTGGTGA - 750
TCACCTGAAGAACATGGCCAGCCACCTGTGAGCCTGCATGCTGTGGGG - 800
GTGAGCTACTGGAAGGCTCTGAGGGGGCTGAGTATGATGACCAGACCAG - 850
CCAGAGGGAGAAGGAGGATGACAAGGTGTTCCCTGGGGGAGCCACACCT - 900
ATGTGTGGCAGGTGCTGAAGGAGAATGGCCCATGGCCTCTGACCCCTG - 950
TGCTTACCTACAGCTACCTGAGCCATGTGGACCTGGTGAAGGACCTGAA - 1000
CTCTGGCCTGATTTGGGGCCCTGCTGGTGTGCAGGGAGGGCAGCCTGGCCA - 1050
AGGAGAAGACCCAGACCTGCACAAGTTCATCCTGCTGTTTGTGTGTTT - 1100
GATGAGGGCAAGAGCTGGCCTCTGAAACCAAGAAGACCTGATGCAGGA - 1150
CAGGGATGCTGCCTCTGCCAGGGCTGGCCCAAGATGCACACTGTGAATG - 1200
GCTATGTGAACAGGAGCCTGCCTGGCCTGATTTGGCTGCCACAGGAAGTCT - 1250
GTGTACTGGCATGTGATTTGGCATGGGCACCACCCCTGAGGTGCACAGCAT - 1300
CTTCTGGAGGGCCACACCTTCTGGTTCAGGAACCACAGGCAGGCCAGCC - 1350
TGGAGATCAGCCCATCACCTTCTTACTGCCAGACCTGCTGATGGAC - 1400
CTGGCCAGTTCTGCTGTTCTGCCACATCAGCAGCCACCAGCATGATGG - 1450
CATGGAGGCCTATGTGAAGGTGGACAGCTGCCCTGAGGAGCCCCAGCTGA - 1500
GGATGAAGAACAATGAGGAGGCTGAGGACTATGATGATGACCTGACTGAC - 1550
TCTGAGATGGATGTGGTGAAGTTTGTATGATGACAACAGCCCCAGCTTCAT - 1600
CCAGATCAGGTCTGTGGCCAAGAAGCACCCCAAGACTGGGTGCACTACA - 1650
TTGCTGCTGAGGAGGAGGACTGGGACTATGCCCCCTGGTGTGGCCCT - 1700

```

[0092]

GATGACAGGAGCTACAAGAGCCAGTACCTGAACAATGGCCCCAGAGGAT - 1750
 TGGCAGGAAGTACAAGAAGGTGAGGTTTCATGGCCACACTGATGAAACCT - 1800
 TCAAGACCAGGGAGGCCATCCAGCATGAGTCTGGCATCCGGGCCCCCTG - 1850
 CTGTATGGGGAGGTGGGGACACCCCTGCTGATCACTTCAAGAACCAGGC - 1900
 CAGCAGGCCCTACAACATCTACCCCATGGCATCACTGATGTGAGGCCCC - 1950

1 10 20 30 40 50
 | | | | |
 TGTACAGCAGGAGGCTGCCCAAGGGGGTGAAGCACCTGAAGGACTTCCCC - 2000
 ATCCTGCTGGGGAGATCTTCAAGTACAAGTGGACTGTGACTGTGGAGGA - 2050
 TGGCCCCACCAAGTCTGACCCAGGTGCTGACCAGATACTACAGCAGCT - 2100
 TTGTGAACATGGAGAGGGACCTGGCCCTGGCCCTGATTGGCCCCCTGCTG - 2150
 ATCTGTACAAGGAGTCTGTGGACCAGAGGGGCAACCAGATCATGTCTGA - 2200
 CAAGAGGAATGTGATCCTGTTCTCTGTGTTTGTATGAGAACCAGGAGCTGGT - 2250
 ACCTGACTGAGAACATCCAGAGGTTCCCTGCCCAACCCCTGCTGGGGTGCAG - 2300
 CTGGAGGACCCCTGAGTTCAGGCCAGCAACATCATGCACAGCATCAATGG - 2350
 CTATGTGTTTGCACGCTGCAGCTGTCTGTGTGCCCTGCATGAGGTGGCCT - 2400
 ACTGGTACATCCTGAGCATGGGGCCAGACTGACTTCTCTGTCTGTGTTC - 2450
 TTCTCTGGCTACACCTTCAAGCACAAAGATGGTGTATGAGGACACCCCTGAC - 2500
 CCTGTTCCCTTCTCTGGGGAGACTGTGTTCATGAGCATGGAGAACCCTG - 2550
 GCCTGTGGATCTGGGCTGCCACAACCTGACTTCAAGAACAGGGGCATG - 2600
 ACTGCCCTGCTGAAAGTCTCCAGCTGTGACAAGAACAAGTGGGGACTACTA - 2650
 TGAGGACAGCTATGAGGACATCTCTGCCCTACCTGCTGAGCAAGAACAATG - 2700
 CCATTGAGCCAGGAGCTTCAGCCAGAATCCACCCGTCCTTAAGGCCAT - 2750
 CAGCGCGAGATCACCAGGACCACCCCTGCAGTCTGACCAGGAGGAGATTGA - 2800
 CTATGATGACACCACTCTCTGTGGAGATGAGAAGAGGAGGACTTTGACATCT - 2850
 ACGACGAGGACGAAACCAGGCCAGGAGCTTCCAGAAGAAGACCAGG - 2900
 CACTACTTCATGCTGCTGTGGAGAGGCTGTGGGACTATGGCATGAGCAG - 2950
 CAGCCCCATGTGCTGAGGAACAGGGCCAGTCTGGCTCTGTGCCCCAGT - 3000
 TCAAGAAGGTGGTGTTCAGGAGTTCACTGATGGCAGCTTCACCCAGCCC - 3050
 CTGTACAGAGGGGAGCTGAATGAGCACCTGGCCCTGCTGGGCCCTACAT - 3100
 CAGGGCTGAGTGGAGGACAACATCATGGTGCCTTCAGGAACCAGGCCA - 3150
 GCAGGCCCTACAGCTTCTACAGCAGCCTGATCAGCTATGAGGAGGACCAG - 3200
 AGGCAGGGGGCTGAGCCCAGGAAGAATTTGTGAAGCCCAATGAAACCAA - 3250
 GACCTACTTCTGGAAGGTGCAGCACCCATGGCCCCACCAAGGATGAGT - 3300
 TTGACTGCAAGGCCGTGGCCCTACTTCTCTGATGTGGACCTGGAGAAGGAT - 3350
 GTGCACCTTGGCCCTGATTGGCCCCCTGCTGGTGTGCCACACCAACACCT - 3400
 GAACCCTGCCCATGGCAGGAGGTGACTGTGCAGGAGTTTGCCTGTCTCT - 3450
 TCACCATCTTTGATGAAACCAAGAGCTGGTACTTCACTGAGAACATGGAG - 3500
 AGGAACCTGCAGGGGCCCTTGAACATCCAGATGGAGGACCCCACTTCAA - 3550
 GGAGAACTACAGGTTCCATGCCATCAATGGCTACATCATGGACACCCCTGC - 3600
 CTGGCCCTGGTGTGGCCCAAGGACCCAGAGGATCAGGTGGTACCTGCTGAGC - 3650
 ATGGGCAGCAATGAGAACATCCACAGCATCCACTTCTCTGGCCATGTGTT - 3700
 CACTGTGAGGAAGAAGGAGGAGTACAAGATGGCCCTGTACAACCTGTACC - 3750
 CTGGGGTGTGTGAGACTGTGGAGATGCTGCCAGCAAGGCTGGCATCTGG - 3800
 AGGGTGGAGTGCCTGATTGGGGAGCCTGCATGCTGGCATGAGCACCCCT - 3850
 GTTCTTGGTGTACAGCAACAAGTGCAGACCCCTTGGGCATGGCCCTG - 3900
 GCCACATCAGGGACTTCCAGATCACTGCCTCTGGCCAGTATGGCCAGTGG - 3950
 GCCCCCAAGCTGGCCAGGCTGCACTACTCTGGCAGCATCAATGCTGGAG - 4000
 CACCAAGGAGCCCTTCAGCTGGATCAAGGTGGACCTGCTGGCCCCATGA - 4050
 TCATCCATGGCATCAAGACCCAGGGGGCCAGGCAGAAGTTCAAGCAGCCTG - 4100
 TACATCAGCCAGTTTATCATCATGTACAGCCTGGATGGCAAGAAGTGGCA - 4150
 GACCTACAGGGGCAACAGCACTGGCACCCCTGATGGTGTCTTTGGCAATG - 4200
 TGACAGCTCTGGCATCAAGCACAAACATTTCAACCCCCCATCATTTGCC - 4250
 AGATACATCAGGCTGCACCCACCCACTACAGCATCAGGAGCACCCCTGAG - 4300
 GATGGAGCTGATGGCTGTGACCTGAACAGTGCAGCATGCCCTGGGCA - 4350
 TGGAGAGCAAGGCCATCTGTGATGCCAGATCACTGCCAGCAGTACTTC - 4400
 ACCAACATGTTTGGCACCTGGAGCCCAAGGAGGAGGCTGCATCTGCA - 4450
 GGGCAGGAGCAATGCTGGAGGCCCAAGGTAACAACCCCAAGGAGTGGC - 4500
 TGCAGTGGACTTCCAGAAGCATGAAGGTGACTGGGGTGGACCCACAG - 4550
 GGGGTGAAGAGCCTGCTGACCAGCATGTATGTGAAGGAGTTCTGTATCAG - 4600

[0093]

CAGCAGCCAGGATGGCCACCAGTGGACCCGTCTTCTCCAGAATGGCAAGG - 4650
 1 10 20 30 40 50
 | | | | |
 TGAAGGTGTTCAGGGCAACCAGGACAGCTTACCCCTGTGGTGAACAGC - 4700
 CTGGACCCCCCTGCTGACCAGATACCTGAGGATTCACCCCCAGAGCTG - 4750
 GGTGCACCATGATGCTTGGAGTGGAGGTGCTGGGCTGTGAGGCCAGG - 4800
 ACCTTACTGAGGATCC**AATAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGT** - 4850
GTTGGTTTTTTGTGTGTTTCCTGTAACGATCGGGCTCGAGCCG

[0094]

[0095]

바람직한 구체예들에서, 본 출원에 기재된 작제물은 도 1, 2, 4, 6, 7, 10, 19, 20, 및 25에 도시된 절연인자 (스페이서) 서열들을 포함한다. 예시 절연인자 서열들은 Ins1: 5' GGAACCATGGCCACCTCA (서열 번호:28); Ins2: 5' CTATCCATGCACTATGCT (서열 번호:29); Ins3: 5' TTCCTGTAACGATCGGG (서열 번호:30) 및 Ins4: 5' TTGAATTCATAACTATCCAA (서열 번호:38)를 포함한다.

[0096]

명백한 바와 같이, 본 출원에 기재된 작제물에서 임의의 트랜스젠이 사용될 수 있다. 더욱이, 본 출원에 기재

된 작제물의 개개의 성분들 (프로모터, 인헨서, 절연인자, 트랜스진 등)은 임의의 조합으로 혼합되어 매치 (match)될 수 있다.

- [0097] 본 출원에 기재된 작제물은 임의의 바이러스 또는 비-바이러스 벡터 내에 내포될 수 있다. 이러한 작제물은 에피솜적으로 유지될 수 있거나 또는 (예컨대, 뉴클레아제-매개된 표적화 통합을 통해) 세포의 유전체 내부에 통합될 수 있다.
- [0098] 비-바이러스 벡터들은 전달 비히클, 가령, 리포솜, 나노입자 또는 폴록사머와 복합된 DNA 또는 RNA 플라스미드, DNA MC, 네이키드 핵산, 및 핵산을 포함한다. 본 출원에 기재된 발현 카세트를 운반함에 사용될 수 있는 바이러스 벡터들에는, 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스 벡터들, 우두증 및 단순 헤르페스 바이러스 벡터들이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다. 숙주 유전체에서의 통합은 레트로바이러스, 렌티바이러스, 및 아데노-연관 바이러스 유전자 전달 방법을 사용하여 가능하며, 본 출원에 기재된 바와 같이 뉴클레아제-매개된 통합에 의해 촉진될 수 있다.
- [0099] 바람직한 특정 구체예들에서, 작제물은, 에피솜적으로 유지되거나 (예컨대, 뉴클레아제-매개된 표적화 통합을 통해) 간 세포의 유전체로 통합될 수 있는 아데노-연관 바이러스 ("AAV") 벡터 또는 벡터 시스템에 포함된다. 재조합 AAV 벡터들의 작제는 미국 특허 5,173,414; Tratschin 외, Mol. Cell. Biol. 5:3251-3260 (1985); Tratschin, 외, Mol. Cell. Biol. 4:2072-2081 (1984); Hermonat & Muzyczka, PNAS 81:6466-6470 (1984); 및 Samulski 외, J. Virol. 63:03822-3828 (1989)을 비롯한 수많은 간행물들에 기재되어 있다.
- [0100] 그러므로, 특정 구체예들에서, 발현 작제물은 AAV 작제물 상에 운반되며 본 출원에 기재된 바와 같은 발현 작제물 요소들 (예컨대, 인헨서, 프로모터, 선택적 인트론, 트랜스진, 등)을 연결시키는 5' 및 3' ITR들을 추가로 포함한다. 선택적으로, 스페이서 분자들은 또한 하나 이상의 발현 작제물 성분들 사이에, 예를 들면, 5' ITR과 인헨서 사이 및/또는 폴리아데닐화 신호와 3' ITR 사이에 포함된다. 스페이서는 상동성 암으로 기능하여 세이프-하버 (safe-harbor) 유전자좌위 (예컨대 알부민)로의 재조합을 용이하게 할 수 있다. 특정 구체예들에서, 상기 작제물은 도 1, 2, 4, 6, 7, 10, 18, 19, 20 또는 25 중 어느 하나에 도시된 작제물이다.
- [0101] 특정 구체예들에서, 본 출원에 기재된 AAV 벡터들은 임의의 AAV로부터 유도될 수 있다. 특정 구체예들에서, AAV 벡터는 결합이고 비병원성인 파르보바이러스 아데노-연관 제2형 바이러스로부터 유도된다. 이러한 모든 벡터들은 트랜스진 발현 카세트에 연결된 AAV 145 bp 반전 말단 반복부만을 보유하는 플라스미드로부터 유도된다. 형질도입된 세포의 유전체 내부로의 통합으로 인한 효율적인 유전자 전달 및 안정한 트랜스진 전달은 이러한 벡터 시스템에 있어 중요한 특징이다. (Wagner 외, Lancet 351:9117 1702-3 (1998), Kearns 외, Gene Ther. 9:748-55 (1996)). AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9 및 AAVrh.10을 비롯한 다른 AAV 혈청형 그리고 새로운 AAV 혈청형 또한 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 일부 구체예들에서, 바이러스 핵산의 LTR 서열들의 바이러스 기원이 캡시드 서열들의 바이러스 기원에 대해 이종인 경우 키메라 AAV가 사용된다. 비-제한적 예들에는, AAV2로부터 유래한 LTR 및 AAV5, AAV6, AAV8 또는 AAV9로부터 유래한 캡시드를 가지는 키메라 바이러스 (즉, 각각 AAV2/5, AAV2/6, AAV2/8 및 AAV2/9)가 포함된다.
- [0102] 레트로바이러스 벡터들은 쥐과 백혈병 바이러스 (MuLV), 긴팔 원숭이 백혈병 바이러스 (GaLV), 유인원 면역결핍 바이러스 (SIV), 사람 면역결핍 바이러스 (HIV), 및 이의 조합에 기초한 벡터들을 포함한다 (, 예컨대, Buchscher 외, J. Virol. 66:2731-2739 (1992); Johann 외, J. Virol. 66:1635-1640 (1992); Sommerfelt 외, Virol. 176:58-59 (1990); Wilson 외, J. Virol. 63:2374-2378 (1989); Miller 외, J. Virol. 65:2220-2224 (1991); PCT/US94/05700를 참고하라).
- [0103] 본 출원에 기재된 작제물은 또한 아데노바이러스 벡터 시스템 내부에 통합될 수 있다. 아데노바이러스 기반 벡터들은 많은 세포 유형들에서 매우 높은 형질도입 효율이 가능하며 세포 분열을 필요로 하지 않는다. 이러한 벡터들을 사용하여, 높은 역가 및 높은 수준의 발현이 수득되어 왔다. 이러한 벡터는 비교적 단순한 시스템에서 많은 양으로 생성될 수 있다.
- [0104] pLASN 및 MFG-S는 임상 실험에서 사용되어 왔던 레트로바이러스 벡터들의 예들이다 (Dunbar 외, Blood 85:3048-305 (1995); Kohn 외, Nat. Med. 1:1017-102 (1995); Malech 외, PNAS 94:22 12133-12138 (1997)). PA317/pLASN은 유전자 치료 시험에서 사용되었던 첫번째 치료적 벡터였다. (Blaese 외, Science 270:475-480 (1995)). MFG-S 패키지 벡터들에서 50% 또는 그 이상의 형질도입 효율이 관찰된 바 있다. (Ellem 외, Immunol Immunother. 44(1):10-20 (1997); Dranoff 외, Hum. Gene Ther. 1:111-2 (1997)).
- [0105] 복제-결합 재조합 아데노바이러스 벡터들 (Ad) 또한 본 출원에 기재된 폴리뉴클레오티드와 함께 사용될 수

있다. 대부분의 아데노바이러스 벡터들은, 트랜스진이 Ad E1a, E1b, 및/또는 E3 유전자들을 대체하고; 후속적으로 복제 결합 벡터가 도중에 (in trans) 결실된 유전자 기능을 제공하는 사람 293 세포들에서 전과되도록 유전자 조작된다. Ad 벡터들은 간, 신장 및 근육에서 발견되는 세포들과 같은, 비분열, 미분화 세포들을 포함하여 생체내 다수 유형의 조직들을 형질도입할 수 있다. 종래의 Ad 벡터들은 큰 운반능(large carrying capacity)을 가진다. 임상 실험에서 Ad 벡터의 사용에는 근육내 주사를 이용한 항암 면역화를 위한 폴리뉴클레오티드 요법에 관계한다 (Sterman 외, Hum. Gene Ther. 7:1083-9 (1998)). 임상 실험에서 유전자 전달을 위한 아데노바이러스 벡터들의 사용에 관한 추가 예들은 Rosenecker 외, Infection 24:1 5-10 (1996); Sterman 외, Hum. Gene Ther. 9:7 1083-1089 (1998); Welsh 외, Hum. Gene Ther. 2:205-18 (1995); Alvarez 외, Hum. Gene Ther. 5:597-613 (1997); Topf 외, Gene Ther. 5:507-513 (1998); Sterman 외, Hum. Gene Ther. 7:1083-1089 (1998)을 포함한다.

[0106] 숙주 세포를 감염시킬 수 있는 바이러스 입자들을 형성하기 위해 패키징 세포들이 사용된다. 이러한 세포들은, AAV 및 아데노바이러스를 패키징하기 위해 사용될 수 있는 HEK293 및 Sf9 세포들, 그리고, 레트로바이러스를 패키징하는 ψ 2 세포들 또는 PA317 세포들을 포함한다. 유전자 치료에서 사용되는 바이러스 벡터들은 통상적으로 핵산 벡터를 바이러스 입자 내부에 패키징하는 생산자 세포주에 의해 생성된다. 이러한 벡터들은 전형적으로 패키징 그리고 후속적으로 숙주로의 통합 (가능한 경우)에 필요한 최소한의 바이러스 서열들을 내포하며, 그 외 바이러스 서열들은 발현될 단백질을 인코딩하는 발현 카세트에 의해 대체된다. 소실된 바이러스 기능은 도중에 패키징 세포주에 의해 공급된다. 예를 들면, 유전자 치료에서 사용되는 AAV 벡터들은 전형적으로 패키징 및 숙주 유전체 내부로의 통합에 필요한, AAV 유전체로부터의 반전 말단 반복부 (ITR) 서열만을 보유한다. 바이러스 DNA는, 다른 AAV 유전자들, 즉, rep 및 cap을 인코딩하지만, ITR 서열들은 없는 헬퍼 플라스미드를 내포하는 세포주에 패키징된다. 이 세포주는 또한 헬퍼로서 아데노바이러스로 감염된다. 헬퍼 바이러스는 AAV 벡터의 복제 및 헬퍼 플라스미드로부터의 AAV 유전자들의 발현을 촉진시킨다. 헬퍼 플라스미드는 ITR 서열의 부재로 인해 상당량으로 패키징되지 않는다. 아데노바이러스로 인한 오염은, 예컨대, AAV보다 아데노바이러스가 더욱 민감성을 보이는 열처리에 의해 감소될 수 있다. 일부 구체예들에서, AAV는 바칼로바이러스 발현 시스템을 사용하여 생성된다.

[0107] 많은 유전자 치료 응용에서, 유전자 치료 벡터는 특정 조직 유형에 대해 높은 정도의 특이성으로 전달되는 것이 바람직하다. 따라서, 바이러스 벡터는 바이러스의 외부 표면 상의 바이러스 외피 단백질과의 융합 단백질로서 리간드를 발현시킴으로써 주어진 세포 유형에 대하여 특이성을 가지도록 변형될 수 있다. 리간드는 관심 세포 유형에 존재하는 것으로 공지된 수용체에 대해 친화성을 가지도록 선택된다. 예를 들면, Han 외, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:9747-9751 (1995)는, 몰로니(Moloney) 쥐과 백혈병 바이러스가 gp70에 융합된 사람 헤레굴린(hereregulin)을 발현하도록 변형될 수 있으며, 이러한 재조합 바이러스는 사람 표피 성장 인자 수용체를 발현하는 특정 사람 유방암 세포들을 감염시키는 것으로 보고하였다. 이러한 원리는 다른 바이러스-표적 세포 쌍에 확장될 수 있는데, 이러한 세포쌍에서 표적 세포는 수용체를 발현시키고 바이러스는 세포-표면 수용체에 대한 리간드를 포함하는 융합 단백질을 발현시킨다. 예를 들면, 섬유상 과지는 거의 모든 선택된 세포 수용체에 대해 특이적 결합 친화성을 가지는 항체 단편들 (예컨대, Fab or Fv)을 나타내도록 유전자 조작될 수 있다. 상기 기재는 주로 바이러스 벡터들에 적용되지만, 비바이러스 벡터들에 동일한 원리들이 적용될 수 있다. 이러한 벡터들은 특이적 표적 세포들에 의한 흡수를 선호하는 특이적 흡수 서열들을 내포하도록 유전자 조작될 수 있다.

[0108] 본 출원에 기재된 폴리뉴클레오티드는 하나 이상의 비-자연 염기 및/또는 골격을 포함할 수 있다. 특히, 본 출원에 기재된 발현 카세트는 관심 영역에서 전사 휴지 상태에 도달하도록 하기 위해 메틸화된 시토신을 포함할 수 있다.

[0109] 더욱이, 본 출원에 기재된 발현 작제물은 또한 추가적인 전사 또는 번역 조절 또는 그 외 다른 서열들, 예를 들면, Kozak 서열, 추가적인 프로모터, 인핸서, 절연인자, 내부 리보솜 진입 부위, 2A 펩티드를 인코딩하는 서열들, 퓨린 절단 부위 및/또는 폴리아데닐화 신호를 포함할 수도 있다. 더욱이, 관심 유전자들의 제어 요소들이 리포터 유전자들에 작동가능하게 연결되어 키메라 유전자들을 생성할 수 있다 (예컨대, 리포터 발현 카세트).

[0110] 트랜스진

[0111] 본 출원에 기재된 작제물은 임의의 트랜스진의 간 전달을 위해 사용될 수 있다. 예시적인 트랜스진들 (관심 유전자들 및/또는 외인성 서열들로도 지칭됨)에는, 임의의 폴리펩티드 코딩 서열 (예컨대, cDNA), 프로모터 서열, 인핸서 서열, 에피토프 표지(epitope tags), 마커 유전자들, 절단 효소 인식 부위 및 다양한 유형의 발현 작제물들이 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다. 마커 유전자들에는, 항생제 내성 (예컨대, 암피실린 내성, 네오

마이신 내성, G418 내성, 퓨로마이신 내성)을 매개하는 단백질들을 인코딩하는 서열들, 유색 또는 형광 또는 발광 단백질들 (예컨대, 녹색 형광 단백질, 증강된 녹색 형광 단백질, 적색 형광 단백질, 루시페라제)을 인코딩하는 서열들, 및 증강된 세포 성장 및/또는 유전자 증폭을 매개하는 단백질들 (예컨대, 디하이드로엽산염 환원효소)을 매개하는 단백질들이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다. 에피토프 표지들은, 예를 들면, FLAG, His, myc, Tap, HA 또는 임의의 검출가능한 아미노산 서열의 하나 또는 그 이상의 복제본들을 포함한다.

[0112] 한 바람직한 구체예에서, 트랜스진은, 항체, 항원, 효소, 수용체 (세포 표면 또는 핵), 호르몬, 림포카인, 사이토킨, 리포터 폴리펩티드, 성장 인자, 및 상기 중 어느 하나의 기능적 단편들을 비롯하여 (그러나 이에 제한되는 것은 아님), 세포 내 발현이 필요한 임의의 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 코딩 서열은, 예를 들면, cDNA일 수 있다.

[0113] 특정 구체예들에서, 트랜스진(들)은, 리소좀 축적 질환 (예컨대, 고세병, 파브리병, 헌터병, 헐러병, 니만-피크병, 등), 대사 질환, 및/또는 혈액 질환, 가령, 혈우병 및 헤모글로빈혈증 등을 비롯한 (그러나 이에 제한되는 것은 아님) 임의의 유전 질병에서 없거나 결핍된 단백질의 기능적 형태를 인코딩한다. 예컨대, 미국 공개특허 출원 20140017212 및 20140093913; 미국 특허 9,255,250 및 9,175,280을 참고하라.

[0114] 예를 들면, 트랜스진은 유전 질병을 가지는 대상체에 없거나 기능하지 않는 폴리펩티드를 인코딩하는 서열을 포함할 수 있으며, 이러한 유전 질병에는 다음과 같은 유전 질병들 중 어느 하나가 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다: 연골무형성증, 완전색맹, 산성 말타아제 결핍증, 아데노신 탈아미노효소 결핍증 (OMIM No.102700), 부신백질형성장장애증, 아이카디 증후군, 알파-1 항트립신 결핍증, 알파-지중해빈혈, 안드로겐 무감응 증후군, 에이퍼트 증후군, 부정맥유발성 우심실심근증, 이형성증, 모세혈관확장성 운동실조증후군, 바르트 증후군, 베타-지중해빈혈, 청색 고무 수포 모반 증후군, 카나반 병, 만성 육아종병 (CGD), 고양이울음 증후군, 남성성유증, 더컴 병, 외배열 이형성증, 판코니 빈혈, 진행성 골화성 섬유이형성증, 취약 X 증후군, 갈락토스혈증, 고세병, 전신성 강글리오시드증 (예컨대, GM1), 혈액소증, 베타-글로빈의 6번째 코돈에서 헤모글로빈 C 돌연변이 (HbC), 혈우병, 헌팅턴병, 헐러 증후군, 저인산증, 클라인펠터 증후군, 크라베 병, 랑거-기드온 증후군, 백혈구 부착 결핍증 (LAD, OMIM No. 116920), 백질이영양증, 긴 QT 증후군, 마르팡 증후군, 피비우스 증후군, 점액다당류증 (MPS), 손발톱 무릎뼈 증후군, 신장성 요붕증, 신경섬유종증, 니만-피크병, 골형성부전증, 포르피린증, 프래더-윌리 증후군, 유전조로증, 프로테우스 증후군, 망막모세포종, 레드 증후군, 루빈스타인-테이비 증후군, 산필립 포 증후군, 중증 복합 면역결핍 (SCID), 슈바크만 증후군, 낮적혈구 질병 (낮적혈구 빈혈), 스미스-마제니스 증후군, 스티클러 증후군, 데이-삭스 질병, 저혈소판 요골 무형성 (TAR) 증후군, 트리처 콜린스 증후군, 세염색체증, 결절성 경화증, 터너 증후군, 요소 회로 질환, 본 히펠-윈다우 질병, 바르텐부르크 증후군, 윌리엄스 증후군, 윌슨병, 위스코트-알드리치 증후군, X-연관 림프증식성 증후군 (XLP, OMIM No. 308240), 후천성 면역결핍증, 리소좀 축적 질병 (예컨대, 고세병, GM1, 파브리병 및 데이-삭스 질병), 점액다당류증 (예컨대 헌터병 질병, 헐러병 질병), 헤모글로빈혈증 (예컨대, 낮적혈구 질병, HbC, α -지중해빈혈, β -지중해빈혈) 및 혈우병.

[0115] 본 출원에 기재된 바와 같이 발현될 수 있는 단백질 (절두된 형태와 같은 이의 기능적 단편들 포함)의 비-제한적 예들에는 피브리노겐, 프로트롬빈, 조직 인자, 인자 V, 인자 VII, 인자 VIIII, 인자 IX, 인자 X, 인자 XI, 인자 XII (하계만 인자), 인자 XIII (피브린-안정화 인자), 본 빌레브란트 인자, 프리칼리크레인, 고분자량 키니노겐 (피츠제랄드 인자), 피브로넥틴, 안티트롬빈 III, 헤파린 보조인자 II, 단백질 C, 단백질 S, 단백질 Z, 단백질 Z-관련 프로테아제 억제제, 플라스미노겐, 알파 2-항플라스민, 조직 플라스미노겐 활성화제, 우로키나아제, 플라스미노겐 활성화제 억제제-1, 플라스미노겐 활성화제 억제제-2, 글루코세레브로시다아제 (GBA), α -갈락토시다아제 A (GLA), 이두로네이트 설파타아제 (IDS), 이두로니다제 (IDUA), 산성 스펅고미엘리나제 (SMPD1), MMAA, MMAB, MMACHC, MMADHC (C2orf25), MTRR, LMBRD1, MTR, 프로피온일-CoA 카르복실라제 (PCC) (PCCA 및/또는 PCCB 소단위), 글루코스-6-포스페이트 운반자 (G6PT) 단백질 또는 글루코스-6-포스파타제 (G6Pase), LDL 수용체 (LDLR), ApoB, LDLRAP-1, PCSK9, 미토콘드리아 단백질, 가령, NAGS (N-아세틸글루타메이트 합성효소), CPS1 (카르바모일 포스페이트 합성효소 I), 및 OTC (오르니틴 트랜스카르바밀라제), ASS (아르기니노숙시닉 애시드 합성효소), ASL (아르기니노숙시나제 산 분해효소) 및/또는 ARG1 (아르기나제), 및/또는 용질 운반체군 25 (SLC25A13, 아스파라테이트/글루타메이트 운반체) 단백질, UGT1A1 또는 UDP 글루쿠론실트랜스퍼라제 폴리펩티드 A1, 푸마로아세틸아세테이트 하이드로라이아제 (FAH), 알라닌-글라이옥실레이트 아미노트랜스퍼라제 (AGXT) 단백질, 글라이옥실레이트 환원효소/하이드록시파이루베이트 환원효소 (GRHPR) 단백질, 트랜스타이레틴 유전자 (TTR) 단백질, ATP7B 단백질, 페닐알라닌 하이드록실라제 (PAH) 단백질, 지질단백질 분해효소 (LPL) 단백질, 유전자 조작된 뉴클레아제, 유전자 조작된 전사 인자 및/또는 치료적 단일 사슬 항체가

포함된다.

- [0116] 특정 구체예들에서, 트랜스진은 표적화 통합을 거친 세포들의 선택을 가능하게 하는 마커 유전자 (상기 기재), 및 추가 기능을 인코딩하는 연결된 서열을 포함할 수 있다. 마커 유전자들의 비-제한적 예들에는 GFP, 약물 선택 마커(들) 등이 포함된다.
- [0117] 본 출원에 기재된 작제물은 또한 비-코딩 트랜스진의 전달을 위해 사용될 수 있다. 안티센스 RNA, RNAi, shRNA 및 마이크로 RNA (miRNA)를 인코딩하는 서열들 또한 표적화된 삽입을 위해 사용될 수 있다.
- [0118] 특정 구체예들에서, 트랜스진은 1 kb 이상의 길이, 예를 들면, 2 내지 200 kb, 2 내지 10 kb (또는 그 사이의 임의의 값)의 서열들 (예컨대, 코딩 서열, 트랜스진으로도 지칭됨)을 포함한다. 트랜스진은 또한 하나 이상의 뉴클레아제 표적 부위들을 포함할 수 있다.
- [0119] (예컨대, 뉴클레아제-매개 통합에 의한) 통합시, 트랜스진이 내인성 유전자 내부에 삽입되고, 그 결과 내인성 유전자가 전부, 또는 일부 발현되거나 전혀 발현되지 않을 수 있다.
- [0120] 뉴클레아제
- [0121] 상기 논의한 바와 같이, 발현 카세트는 예피솜적으로 유지될 수 있거나 세포의 유전체 내부에 통합될 수 있다. 통합은 무작위적일 수 있다. 바람직하게는, 트랜스진 작제물(들)의 통합은 하나 이상의 뉴클레아제 (예컨대, 징크 핑거 뉴클레아제 ("ZFNs"), TALEN, TtAgo, CRISPR/Cas 뉴클레아제 시스템, 및 호밍 엔도뉴클레아제)에 의해 표적 유전자를 절단하여 표적화한 다음 이들 작제물을 상동성 지향 복구 (HDR)함으로써 또는 비-상동 말단 결합 (NHEJ)으로 추진되는 과정들 동안 말단 포획함으로써 통합된다. 예컨대, 미국 특허 9,255,250; 9,200,266; 9,045,763; 9,005,973; 9,150,847; 8,956,828; 8,945,868; 8,703,489; 8,586,526; 6,534,261; 6,599,692; 6,503,717; 6,689,558; 7,067,317; 7,262,054; 7,888,121; 7,972,854; 7,914,796; 7,951,925; 8,110,379; 8,409,861; 미국 공개 특허 출원 20030232410; 20050208489; 20050026157; 20050064474; 20060063231; 20080159996; 201000218264; 20120017290; 20110265198; 20130137104; 20130122591; 20130177983; 20130196373 및 20150056705를 참고하며, 이들의 내용은 온전히 참고로 포함된다.
- [0122] 트랜스진 발현 작제물의 표적화된 통합을 위해 임의의 뉴클레아제가 사용될 수 있다.
- [0123] 특정 구체예들에서, 뉴클레아제는, 징크 핑거 DNA-결합 도메인 및 절단 (뉴클레아제) 도메인을 포함하는 징크 핑거 뉴클레아제 (ZFN)를 포함한다. 예컨대, 미국 특허 9,255,250; 9,200,266; 9,045,763; 9,005,973; 9,150,847; 8,956,828; 8,945,868; 8,703,489; 8,586,526; 6,534,261; 6,599,692; 6,503,717; 6,689,558; 7,067,317; 7,262,054; 7,888,121; 7,972,854; 7,914,796; 7,951,925; 8,110,379; 8,409,861를 참고하라.
- [0124] 다른 구체예들에서, 뉴클레아제는, TAL-효과기 DNA 결합 도메인 및 절단 (뉴클레아제) 도메인을 포함하는 TALEN를 포함한다. 예컨대, 미국 특허 8,586,526 및 미국 공개특허출원 20130196373을 참고하라.
- [0125] 또한 추가 구체예들에서, 뉴클레아제는 CRISPR/Cas 뉴클레아제 시스템을 포함하는데, 이 시스템은 표적 부위를 인식하기 위한 하나의 가이드 RNA 및 하나 이상의 절단 도메인들을 포함한다. 예컨대, 미국 공개특허 출원 20150056705를 참고하라. 일부 구체예들에서, CRISPR-Cpf1 시스템이 사용된다 (Fagerlund 외, (2015) *Genom Bio* 16:251 참고). 용어 "CRISPR/Cas" 시스템은 CRISPR/Cas 및 CRISPR/Cfp1 시스템 모두를 지칭하는 것으로 이해된다.
- [0126] 상기 뉴클레아제들의 절단 도메인들은 야생형이거나 돌연변이될 수 있으며, 필수 헤테로다이머를 형성하는 비-자연 발생 (유전자 조작된) 절단 도메인들을 포함한다. 예컨대, 미국 특허 8,623,618; 7,888,121; 7,914,796; 및 8,034,598 그리고 미국 공개특허출원 20110201055를 참고하라.
- [0127] 뉴클레아제(들)은 표적 부위에서 하나 이상의 이중-가닥 및/또는 단일-가닥 절단을 형성할 수 있다. 특정 구체예들에서, 뉴클레아제는 촉매적 불활성 절단 도메인 (예컨대, FokI 및/또는 Cas 단백질)을 포함한다. 예컨대, 미국 특허 9,200,266; 8,703,489 및 Guillingier 외 (2014) *Nature Biotech.* 32(6):577-582를 참고하라. 촉매적 불활성 절단 도메인은, 촉매적 활성 도메인과 조합하여, 니카아제 (nickase)로 작용하여, 단일-가닥 절단을 형성할 수 있다. 그러므로, 특정 영역에서 이중-가닥 절단을 형성하기 위해 두 개의 니카아제가 조합되어 사용될 수 있다. 추가적인 니카아제들 또한, 예를 들면, McCaffery 외 (2016) *Nucleic Acids Res.* 44(2):e11. doi: 10.1093/nar/gkv878. Epub 2015 Oct 19에 공지된 바와 같이 해당 분야에 공지이다.
- [0128] 특정 구체예들에서, 뉴클레아제는 피난항 유전자 (예컨대, CCR5, Rosa, 알부민, AAVS1 등)를 절단한다.

예컨대, 미국 특허 7,888,121; 7,972,854; 7,914,796; 7,951,925; 8,110,379; 8,409,861; 8,586,526; 미국 공개 특허 출원 20030232410; 20050208489; 20050026157; 20060063231; 20080159996; 201000218264; 20120017290; 20110265198; 20130137104; 20130122591; 20130177983 및 20130177960을 참고하라. 바람직한 구체예들에서, 뉴클레아제는 발현 카세트가 간 세포의 내인성 알부민 유전자좌위 내부에 통합되도록 내인성 알부민 유전자를 절단한다. 알부민-특이적 뉴클레아제는 예를 들면, 미국 특허 9,150,847; 및 미국 공개특허출원 20130177983 및 20150056705에 기재되어 있다.

[0129] 전달

[0130] 본 출원에 기재된 작제물 (및/또는 뉴클레아제)은 임의의 적합한 수단들에 의해 임의의 세포 유형 내부로, 바람직하게는 간으로 (간 전달) 생체내 또는 생체의 전달될 수 있다. 유사하게, 표적화 통합을 위해 뉴클레아제와 조합하여 사용될 때, 이들 뉴클레아제는 폴리뉴클레오티드 및/또는 단백질 형태로, 예를 들면, 비-바이러스 벡터(들), 바이러스 벡터(들)을 사용하여 및/또는 RNA 형태로, 예컨대, mRNA로 전달될 수 있다.

[0131] 핵산들의 비-바이러스 전달 방법들에는 전기천공, 리포펙션, 마이크로주사, 유전자총(biolistics), 비로솜, 리포솜, 면역리포솜, 다른 나노입자, 다가양이온 또는 지질: 핵산 접합체, 네이키드 DNA, 인공 비리온, 및 DNA의 제제-증강된 흡수가 포함된다. 핵산의 전달을 위해, 예컨대, Sonitron 2000 시스템 (Rich-Mar)을 사용한 초음파천공 (Sonoporation) 또한 사용될 수 있다. 추가적인 예시적 핵산 전달 시스템들에는, AmaxaBiosystems (Cologne, 독일), Maxcyte, Inc. (Rockville, 메릴랜드), BTX Molecular Delivery Systems (Holliston, MA) 및 Copernicus Therapeutics Inc.에 의해 공급되는 시스템들이 포함된다 (예를 들면 US6008336를 보라).

[0132] 바람직한 구체예들에서, 현 작제물은 AAV 벡터들이다. 선택적 뉴클레아제들이 mRNA 형태로 또는 하나 이상의 바이러스 벡터들 (AAV, Ad, 등)을 사용하여 투여될 수 있다. 투여는 원하는 표적 세포들로 폴리뉴클레오티드를 전달하는 임의의 수단들에 의해 이루어질 수 있다. 생체내 및 생체의 방법들 모두 고려된다. 간 문맥으로의 정맥내 주사는 바람직한 투여 방법이다. 다른 생체내 투여 방식들에는, 예를 들면, 간엽 또는 담관으로 직접 주사 및 간 동맥을 통한 것을 포함하여 간 원위에 정맥내 주사, 간 유조직으로 직접 주사, 간 동맥을 통한 주사, 및/또는 담도계를 통한 역방향 주사가 포함된다. 생체의 투여 방식은, 절제된 간세포 또는 간의 다른 세포들을 시험관내 형질도입 후, 형질도입된, 절제된 간세포를 사람 환자의 문맥 혈관구조, 간 유조직 또는 담도계로 다시 주입하는 것을 포함하며, 예컨대, Grossman 외, (1994) Nature Genetics, 6:335-341를 참고하라.

[0133] 하나 이상의 폴리뉴클레오티드 (예컨대, 본 출원에 기재된 작제물 및 폴리뉴클레오티드 형태의 뉴클레아제)의 전달에 관여하는 시스템에서, 둘 이상의 폴리뉴클레오티드(들)은 하나 이상의 동일한 및/또는 상이한 벡터들을 사용하여 전달된다. 예를 들면, 폴리뉴클레오티드 형태의 뉴클레아제는 mRNA 형태로 전달될 수 있으며 본 출원에 기재된 간-특이적 작제물은 다른 양상, 가령, 바이러스 벡터들 (예컨대, AAV), 미니서클 DNA, 플라스미드 DNA, 선형 DNA, 리포솜, 나노입자 등을 통해 전달될 수 있다.

[0134] 제약학적으로 허용가능한 운반체들은 부분적으로는 투여되는 특정 조성물에 의해, 뿐만 아니라 이러한 조성물을 투여하기 위해 사용되는 특정 방법에 의해 결정된다. 따라서, 하기하는 바와 같이 이용가능한 제약학적 조성물에 관한 널리 다양한 적합한 제제들이 존재한다 (예컨대, Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., 1989를 참고하라).

[0135] 투여되는 발현 카세트 (및 선택적 뉴클레아제(들), 및/또는 변형된 세포들)의 효과량은 환자별로 달라질 것이다. 따라서, 효과량은 조성물 (예컨대, 세포들)을 투여하는 의사에 의해 가장 잘 결정되며 적절한 용량은 해당 기술 분야의 통상의 기술자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 치료적 폴리펩티드의 혈청, 혈장 또는 다른 조직 수준을 분석하고 투여 전 초기 수준과 비교하여 투여되는 양이 너무 낮은지, 올바른 범위 내인지, 또는 너무 높은지 여부를 결정할 수 있다. 초기 및 후속 투여에 적합한 요법들 또한 다양하지만, 초기 투여, 필요에 따라 후속 투여에 의해 전형화된다. 후속 투여는 매일 내지 매년 그리고 수년마다의 범위에서 다양한 간격으로 투여될 수 있다. 해당 분야의 숙련된 기술자는 전달 벡터들의 면역억제에 의해 형질도입이 억제 또는 차단되지 않도록 하기 위해 적절한 면역억제 기술들이 권장될 수 있음을 알고 있을 것이며, 예컨대, Vilquin 외, (1995) Human Gene Ther., 6:1391-1401을 참고한다.

[0136] 생체의 및 생체내 투여 모두를 위한 제형들은, 액체 또는 유탁액 중에서의 (예컨대, 유전적으로 변형된 세포, 리포솜 또는 나노입자의) 현탁액을 포함한다. 활성 성분들은 종종 활성 성분과 제약학적으로 허용가능하며 상용가능한 부형제와 혼합된다. 적합한 부형제에는, 예를 들면, 물, 식염수, 포도당, 글리세롤, 에탄올 등, 그리고 이의 조합이 포함된다. 또한, 상기 조성물은 소량의 보조 물질들, 가령, 습윤 또는 유화제, pH 완충제, 안정화

제 또는 제약학적 조성물의 효능을 증강시키는 다른 시약들을 내포할 수 있다.

[0137] **응용**

[0138] 본 출원에 개시된 방법 및 조성물들은 임의의 질병에 없거나 결핍된 생성물을 발현시키는 또는 그렇지 않으면 해당 질병을 치료 또는 예방하는 트랜스진을 공급함으로써 해당 질병에 대한 치료요법을 제공하기 위한 것이다. 상기 세포는 *생체내* 변형될 수 있거나 *생체외* 변형될 수 있으며 후속하여 대상체에 투여된다. 그리하여, 상기 방법 및 조성물들은 이러한 유전 질병들의 치료 및/또는 예방을 제공한다.

[0139] 하기 실시예들은 선택적으로 사용되는 뉴클레아제가 징크 핑거 뉴클레아제 (ZFN)를 포함하는 본 출원의 예시적 구체예들을 포함한다. 이는 단지 예시를 위한 것이며, 다른 뉴클레아제들, 예를 들면, TALEN, CRISPR/Cas 시스템, 유전자 조작된 DNA-결합 도메인을 가지는 호밍 엔도뉴클레아제 (메가뉴클레아제) 및/또는 유전자 조작된 호밍 엔도뉴클레아제 (메가뉴클레아제) DNA-결합 도메인과 이중 절단 도메인의 자연 발생적 융합 및/또는 메가뉴클레아제와 TALE 단백질의 융합이 사용될 수 있음이 이해될 것이다. 또한, 본 출원에 기재된 발현 작제물은 (AAV가 아닌) 다른 벡터들 상에 운반되어, 결핍된 단백질 생성에 의해 유발되는 질환 치료 및/또는 예방에 있어서 동일한 결과를 생성할 수 있음이 이해될 것이다.

[0140] 실시예

[0141] **실시예 1: 방법들**

[0142] **DNA 작제물**

[0143] 사람 인자 VIII cDNA를 운반하는 예시적 작제물의 개발을 위해 수반되는 전체 구조 및 접근이 도 1에 도시되어 있다. 작제물은 간-특이적 인핸서, 간-특이적 프로모터, 선택적 인트론, 절연인자 서열 및 트랜스진 (*예컨대*, B-도메인 결실된 코돈-최적화된 사람 인자 VIII 트랜스진), 합성 폴리 아데닐화 서열, 스페이서 및 5'/3' 반전 말단 반복부를 포함한다. 모든 작제물은 관계적인 분자 생물학 클로닝 방법을 사용하여 조립되었다.

[0144] 도 1에 도시된 바와 같이, 벡터를 개발하는 동안 여러 단계들이 수반되었다. 우리는 먼저 제작하는 동안 수득되는 바이러스 수율에 대한 작제물 성분들의 효과를 조사하였다. 작제물 내 절연인자 영역의 서열의 영향을 다음과 같은 3개의 상이한 가능한 절연인자 서열들을 사용하여 조사하였다: Ins1: 5' GGAACCATGCCCCTCA (서열 번호:28), Ins2: 5' CTATCCATTGCACTATGCT (서열 번호:29), 및 Ins3: 5' TTCCTGTAACGATCGGG (서열 번호:30). 그 다음 절연인자 영역들이 트랜스진 발현 카세트에 삽입되었으며, 여기서 5' ITR 서열과 인핸서/프로모터 서열의 시작 부분 사이에 사용된 절연인자는 항상 Ins1 이었다. 그러나 작제물의 3' 단부에서는, 다음과 같이, Ins2 또는 Ins3 서열들이 SPA51 합성 폴리 A 서열 (5' AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTGTGTGTT, 서열 번호:31)에 연결되었다: Ins2-SPA51: 5' AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTGTGTGTTCTATCCATTGCACTATGCT, 서열 번호:32, 및 Ins3-SPA51: 5' AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTGTGTGTTTTCCTGTAACGATCGGG, 서열 번호:33. 일부 구체예들에서, Ins4는 SPA51에 연결된다.

[0145] Ins 서열 변이체들은 또한 SerpE-TTRm-MVM 프로모터 영역이 하이브리드 간 프로모터로 대체되어 있는 발현 작제물 (HLP, McIntosh *외*, *ibid*)에서 사용되었다. 이러한 작제물이 도 2에 도시되어 있다. 다음으로 이들 작제물들을 HEK293 세포들을 사용하여 AAV2/6 입자들로 패키징하였으며, 여기서 수율은 2곳의 세포 공장들로부터 얻었다 (Yuan *외*, (2011) *Hum Gene Ther.*, 22, 613-624, 2011). 변형된 절연인자 서열들을 내포하는 작제물에 대한 수율 (벡터 유전체)은 발현 카세트가 5' 및 3' 단부에서 각각 Ins1 및 Ins3 절연인자 영역에 의해 연결되어 있는 부모 프로모터 영역을 포함하는 작제물에서보다 거의 3 로그 더 높은 것으로 나타났다 (도 3). 또한, 이들 절연인자 서열들을 또한 단계 2에서 하기 변형된 CRMSBS1 및 CRMSBS2 작제물 내부에 삽입하고 (도 19 및 20), 바이러스 수율에 대해 테스트하였다 (도 22). 데이터는 새로운 작제물에 대한 바이러스 수율에 있어 부모 작제물에 비해 8-10배의 개선을 보여주었다.

[0146] 단계 2에서, 세르핀 1 인핸서에 점 돌연변이를 도입하여, 첫번째 두 개의 유도체 벡터들 CRMSBS1 및 CRMSBS2를 생성하였다 (도 4). 이들 벡터들은 도 5에 도시된 바와 같이 점 돌연변이가 도입되어 있는 인핸서 서열들에 있어 상이하다. 구체적인 변화들은 다음과 같다: CRMSBS1에서, 도 5에 도시된 바와 같이 1, 2, 3, 및 4로 표시되며 각각 다음과 같이 치환되었다: 1 = G가 A로, 2 = C가 G로, 3 = T가 C로 그리고 4 = G가 A로. 유사하게, CRMSBS2에서, 위치 1, 3, 4 및 5는 다음과 같이 변형되었다: 1 = G가 A로, 3 = T가 C로, 4 = G가 A로 그리고 5 = C가 T로.

[0147] 단계 3에서, 벡터에서 인트론 서열을 조사하기 위해 작제물을 제조하였다. 도 6 및 7에 도시된 바와 같이, CRMSBS2 및 CRMSBS2 벡터들 내 인트론 서열들은 MVM 인트론을 제거하여 변형되었다 ("CRMSBS1 인트론 없음", 도 6, 그리고 "CRMSBS2 인트론 없음", 도 7). 또 다른 변이체에서, T-키메라 인트론 서열을 테스트하였다 ("CRMSBS1 T-키메라 인트론", 도 6, 그리고 "CRMSBS2 T-키메라 인트론", 도 7).

[0148] 단계 4 동안, 스플라이스 공여체 및 수용체 부위들에 겨냥하여 돌연변이를 도입하여 MVM 인트론을 변화시켰다. 이들 벡터들의 맵(map)이 도 10에 도시되어 있으며, 여기서 변형된 인트론들은 SBR 인트론 1-3으로 지칭된다. MVM 인트론은 2개의 가능한 공여체 부위 및 이들 공여체들의 2개의 가능한 수용체 부위들을 가진다 (설명을 위해 도 11을 보라). 도 11에서, 2개의 공여체 부위들을 D1 및 D2로 표시하며, 이들의 상응하는 수용체 부위들을 A1 및 A2로 나타낸다. D1-A1 및 D2-A2의 스플라이스에 의해 만들어지는 스플라이스 접합부는 유전자 위에 점선으로 표시된다. MVM 인트론의 부분 서열을 도 11에서 유전자 아래에 나타내며 (서열 번호:14) 인트론 인핸서 서열 (IES)의 위치 (밑줄)가 A1 및 A2 수용체 부위와 함께 표시되어 있다 (Haut 및 Pintel, (1998) *J Virol*, 72:1834-1843; Haut 및 Pintel, (1998) *Virol J*, 258:84-94). 테스트를 위해 3개의 인트론들을 작제하였으며, 이들을 도 10에 도시하고, SBR 인트론 1-3로 표시한다 (서열 번호:15-17에 나타난 인트론 서열). AAV F8 cDNA에 의해 전달된 발현된 hFVIII의 활성 또한 *시험관내* 평가하였다. 24-웰 디쉬에서 AAV2/6 F8 cDNA (CRMSBS2 SBR 인트론 3)를 1E+05개 세포들 당 4.8E+06, 2.4E+06, 1.2E+06 및 0.6E+06 바이러스 유전체 용량으로 HepG2 세포들에 부가하였다 (시간 t0 일차로 표시). AAV2/6 바이러스 부가 후 7일차 (t7)에 상청액을 hFVIII 분비 수준에 관해 ELISA로, 그리고 활성에 관하여 APTT 응고 분석으로 그리고 색소형성능 분석으로 분석하였다 (방법에 관하여는 하기 참고). 결과들 (도 21)은 분비된 hFVIII 수준과 활성 사이의 우수한 상관관계를 입증하였다. n = 6의 생물학적 반복에 대한 데이터를 도시한다. 오차 막대는 반복에 관한 평균의 표준 오차를 나타낸다.

[0149] 그 다음 이들 작제물들을 하기와 같이 *생체내* 테스트하였다.

[0150] **정량적 PCR**

[0151] **qRT-PCR (사람 인자 VIII mRNA 수준에 대해):** FastPrep 및 Lysing Matrix D (MP Biomedicals, Santa Ana CA)를 사용하여 제조업체의 지시사항에 따라 마우스 조직을 용해시켰다. AllPrep DNA/RNA 키트를 사용하여 제조업체 (Qiagen, Carlsbad CA)의 지시사항에 따라 마우스 조직으로부터 RNA/DNA를 단리하였다. 다음으로 추출된 RNA를 사용하여 Quantitect cDNA 합성 키트 (Qiagen, Carlsbad CA)를 이용해 cDNA를 만들었다. 그 후 IDT (Coralville IA)의 표지된 프라이머 / 프로브 분석법을 사용하는 Biorad CFX 96에서 SsoAdvanced Universal Probes Supermix (Biorad, Hercules CA)를 사용하여 정량적 PCR을 실시하였다. 마우스 GAPDH 분석법은 Mm.PT.39a.1 이었다. 사람 인자 VIII mRNA를 특이적으로 검출하기 위해, 다음의 프라이머/프로브 분석법이 맞춤 설계되었다; 정방향 프라이머 (GGAGATGAAGAAGGAGACTTTG) (서열 번호:18), 프로브 (ACATCTACGACGAGGACGAGAACCA) (서열 번호:19) 및 역방향 프라이머 (TCCACAGCAGCAATGAAGTAG) (서열 번호:20). 각 샘플에 있어 GAPDH에 대해 정규화된 정량적 qRT-PCR (절대적이지 않음)을 사용하였으며, 최종 데이터 분석을 1.0으로 설정된 하나의 마우스 샘플에 대해 상대적으로 기록했다. 모든 샘플들에 대해 어떠한 주형 대조 및 역전사효소 대조도 수행되지 않았으며 검출가능한 신호도 전혀 생성되지 않았다.

[0152] **qPCR (벡터 유전체, VG, 분석에 대해):** FastPrep 및 Lysing Matrix D (MP Biomedicals, Santa Ana CA)를 사용하여 제조업체의 지시사항에 따라 마우스 조직을 용해시켰다. AllPrep DNA/RNA 키트를 사용하여 제조업체 (Qiagen, Carlsbad CA)의 지시사항에 따라 마우스 조직으로부터 RNA/DNA를 단리하였다. 추출된 DNA를 AB 7300 실시간 PCR 시스템 (Applied Biosystems, Foster City, CA)에서 TaqMan Fast Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG (Applied Biosystems, Foster City, CA)을 사용하여 정량적 PCR하기 위해 사용하였다. 사람 인자 VIII를 특이적으로 검출하기 위해 다음과 같은 프라이머/프로브 분석법이 맞춤 설계되었다; 정방향 프라이머 (CCTGGGCCAGTTCTCTGCT) (서열 번호:21), 프로브 (TTCTGCCACATCAGCAGCCACCA) (서열 번호:22) 및 역방향 프라이머 (GGCCTCCATGCCATCATG) (서열 번호:23). 모든 샘플들에 대해 어떠한 주형 대조도 수행되지 않았으며 검출가능한 신호도 전혀 생성되지 않았다. 공지된 양의 정제된, 선형화된 사람 인자 VIII 플라스미드의 7회, 연속 4-배 희석으로부터 qPCR DNA 표준 곡선이 생성되었다.

[0153] **qPCR (HepG2 세포들을 이용한 NHEJ에 의한 표적화 통합에 대해)** QIAamp DNA micro를 사용하여 제조업체 (Qiagen, Carlsbad CA)의 지시사항에 따라 사람 HepG2 세포들로부터 DNA를 단리하였다. 그 후 IDT (Coralville IA)의 표지된 프라이머 / 프로브 분석법을 사용하는 Biorad CFX 96에서 SsoAdvanced Universal Probes Supermix (Biorad, Hercules CA)를 사용하여 정량적 PCR을 실시하였다. 사람 GAPDH 분석법은

Hs.PT.39a.22214836 이었다. 내인성 사람 알부민 유전자좌위에서 NHEJ에 의한 사람 인자 VIII의 표적화 통합을 특이적으로 검출하기 위해 다음과 같은 프라이머/프로브 분석법이 맞춤설계되었다; 정방향 프라이머 (AGTGCAAAGTAACTTAGAGTGACT) (서열 번호:24), 프로브 (CCATCACTAGGGGTTCTGCGGCCT) (서열 번호:25) 및 역방향 프라이머 (CCTGAAGGTGGCAATGGT) (서열 번호:26). 본 연구를 위해 우리는 각 샘플에 있어 GAPDH에 대해 정규화된 정량적 qPCR (절대적이지 않음)을 사용하였으며, 최종 데이터 분석을 1.0으로 설정된 1개의 샘플에 상대적으로 기록하였다. 어떠한 주형 대조, 전사효소 대조 및 ZFN 대조도 수행되지 않았으며 검출가능한 신호도 전혀 생성되지 않았다.

[0154] **qPCR (마우스 조직으로부터의 NHEJ 및 HDR에 의한 표적화 통합에 대해)** FastPrep 및 Lysing Matrix D (MP Biomedicals, Santa Ana CA)를 사용하여 제조업체의 지시사항에 따라 마우스 조직을 용해시켰다. AllPrep DNA/RNA 키트를 사용하여 제조업체 (Qiagen, Carlsbad CA)의 지시사항에 따라 마우스 조직으로부터 RNA/DNA를 분리하였다. 그 후 IDT (Coralville IA)의 표지된 프라이머 / 프로브 분석법을 사용하는 Biorad CFX 96에서 SsoAdvanced Universal Probes Supermix (Biorad, Hercules CA)를 사용하여 정량적 PCR을 실시하였다. 마우스 GAPDH 분석법은 Mm.PT.39a.1 이었다. 내인성 마우스 알부민 유전자좌위에서 NHEJ에 의한 사람 인자 8 cDNA의 표적화 통합을 특이적으로 검출하기 위해 다음과 같은 프라이머/프로브 분석법이 맞춤설계되었다; 정방향 프라이머 (GTGTAGCAGAGAGAACCAT, 서열 번호:39), 프로브 (CCATCACTAGGGGTTCTGCGGCCT, 서열 번호:40) 및 역방향 프라이머 (GTTAATATTCACCAGCAGCCT, 서열 번호:41). 내인성 마우스 알부민 유전자좌위에서 NHEJ에 의한 ZFN의 표적화 통합을 특이적으로 검출하기 위해 다음과 같은 프라이머/프로브 분석법이 맞춤설계되었다; 정방향 프라이머 (AGTGTAGCAGAGAGAACCA, 서열 번호:42), 프로브 (CCATCACTAGGGGTTCTGCGGCCT, 서열 번호:43) 및 역방향 프라이머 (CAGGGTGAGCCAGAAAC, 서열 번호:44). 내인성 마우스 알부민 유전자좌위에서 HDR에 의한 사람 인자 8의 표적화 통합을 특이적으로 검출하기 위해 다음과 같은 프라이머/프로브 분석법이 맞춤설계되었다; 정방향 프라이머 (AACTTTGAGTGTAGCAGAGAGG, 서열 번호:45), 프로브 (TACCGGAGGAGCAAACAGGGACTA, 서열 번호:46) 및 역방향 프라이머 (CTCTACGAAATGTGCAGACAGA, 서열 번호:47). 본 연구를 위해 우리는 정량적 qPCR (절대적이지 않음)을 사용하였으며, 최종 데이터 분석을 1.0으로 설정된 1개의 샘플에 상대적으로 기록하였다. 어떠한 주형 대조, 전사효소 대조 및 ZFN 대조도 수행되지 않았으며 검출가능한 신호도 전혀 생성되지 않았다.

[0155] **Indel (삽입 및 결실)** FastPrep 및 Lysing Matrix D (MP Biomedicals, Santa Ana CA)를 사용하여 제조업체의 지시사항에 따라 마우스 조직을 용해시켰다. AllPrep DNA/RNA 키트를 사용하여 제조업체 (Qiagen, Carlsbad CA)의 지시사항에 따라 마우스 조직으로부터 RNA/DNA를 분리하였다. 추출된 DNA를 PCR 및 딥 시퀀싱 (deep sequencing)에 사용하여 마우스 알부민 유전자좌위에서의 indel을 측정하였다.

[0156] **혈장** - C57BL/6 연구를 위해 모든 마우스로부터 7, 14, 21일차 (비-종료시) 및 28일차에, 또는 표시된 만큼 오래 (종료시) 혈액을 수집하였다. 혈우병 A 마우스 연구를 위해 모든 마우스로부터 8, 14, 21, 28, 35 및 42일차 (비-종료시)에 혈액을 수집하였다. 모든 혈액을 소독 시트레이트를 내포하는 시험관에 수집하였으며 혈장으로 가공되었다. 비-종료시 혈액 수집은 아래턱밑 정맥 또는 후-안와 정맥동 (retro-orbital sinus)을 통해 수집되었다. 희생시 혈액 수집은 심장 천자 또는 대정맥을 통해 수집되었다. 혈장을 분리하여 하기 ELISA 분석법 또는 Chromogenix Coamatic 활성 분석법에서 사용할 때까지 -60 내지 -80°C에서 보관하였다.

[0157] **간** - C57BL/6 연구를 위해, 마우스를 28일차에 희생시키고, 간, 비장, 고환, 뇌, 심장, 폐 및 신장을 수집하여 계량하였다. 간의 왼쪽 외측엽을 분리하고 3 조각으로 나누어 간의 나머지와 별도로 액체 질소에서 급속 냉동 (snap frozen)시켰다. 나머지 간 엽들 그리고 다른 조직들 (전부)을 액체 질소에서 급속 냉동시켰다. 냉동된 표본들을 RNA/DNA 추출을 위해 가공할 까지 -60 내지 -80°C에서 보관하였다.

[0158] **시험관내 연구, HepG2 AAV F8 cDNA/ZFNs.** 사람 HepG2 간 세포들을 제조업체의 지침에 따라 유지시켰다 (ATCC, Manassas VA). 실험일에, HepG2 세포들을 세척하고, 트립신처리하여 계수하였다. 사용된 ZFN는 사람 알부민 인트론 유전자좌위에 대해, 왼쪽 SBS47171 및 오른쪽 SBS47898이었다. hF8 cDNA (CRMSBS2 인트론 없음)와 함께 ZFN은 AAV2/6으로서 전달되었으며 시간 0으로 표시되었다 24-웰 디쉬의 웰 당 1E+05 세포들에 대해, AAV2/6 ZFN은 3.0E+05로, AAV2/6 hFVIII cDNA CRMSBS2 인트론 없음은 3.0E+04, 6.0E+04 및 1.2E+05로 전달되었다. 다음 날 배지를 교환하였다. 상청액 AAV2/6 바이러스 부가 후 t3, t5 및 t7 일의 시점에서 하기 hFVIII ELISA를 사용하여 분비된 hFVIII에 대해 분석하였다.

[0159] **시험관내 연구, HepG2 AAV F8 cDNA.** 사람 HepG2 간 세포들을 제조업체의 지침에 따라 유지시켰다 (ATCC, Manassas VA). 실험일에, HepG2 세포들을 세척하고, 트립신처리하여 계수하였다. AAV2/6 hF8 cDNA (CRMSBS2 SBR 인트론 3)는 24-웰 디쉬에서 1E+05 세포들 당 6.0E+06, 1.2E+06, 2.4E+06 및 4.8E+06의 용량으로 전달되었

다. 배지를 시점 t3 (t = 일)에서 교환하였다. AAV 2/6 바이러스 부가 후 시점 t5 및 t7에서의 상청액을 분비된 hFVIII 수준에 대해 Affinity Biologics사의 hFVIII ELISA를 사용하여, 그리고 hFVIII 활성에 대해 하기 색소형성능 및 응고 분석법으로 분석하였다.

[0160] **사람 인자 VIII ELISA. Affinity Biologics hFVIII ELISA (마우스 및 HepG2 세포들).** 사람 인자 VIII 표준을 제외하고 제조업체의 프로토콜에 따라 Affinity Biologicals (캐나다) ELISA 키트 (FVIII-AG)를 사용하여 분비된 사람 인자 VIII 수준을 결정하였다. ELISA 분석법에서 사용된 사람 인자 VIII은 US Biologicals (Salem, MA)사의 제조함 정제된 사람 인자 VIII (#F0016-06)였다. 요약하면, 마우스 혈장을 플레이트에 추가하고, 실온에서 한시간 반 동안 흔들면서 배양시킨 다음, 키트에 제공된 세척 완충액으로 3회 세척하였다. 키트에 제공된 검출 항체를 추가하고 실온에서 45분 동안 배양시킨 후, 키트에 제공된 세척 완충액으로 3회 세척하였다. 키트에 제공된 TMB 기질을 추가하고 10분 동안 전개시켰다. 반응을 정지 용액으로 중단시키고 플레이트 판독기를 사용하여 450 nm에서의 흡광도를 판독하였다.

[0161] **인-하우스 hFVIII ELISA (시노플구스 원숭이).** NHP 혈장으로 분비된 hFVIII 수준을 맞춤형 ELISA를 사용하여 결정하였다. 폴리스티렌 마이크로플레이트 (Corning, 96-웰 하프-면적 고 결합)를 4 °C에서 하룻밤동안 pH 9.4의 0.2 M 카보네이트 바이카보네이트 완충액 (Thermo Fisher Scientific, Waltham MA) 중의 마우스 단클론 항-hFVIII 항체 (Green Mountain, Burlington, VT)로 코팅하였다. 다음날 플레이트를 1X TBST (Thermo Fisher Scientific, Waltham MA)를 사용하여 4회 세척하였다. 그 후 96-웰 플레이트를 2시간 동안 실온에서 3% BSA/TBS 차단 완충액을 사용하여 차단한 후, 1X TBST로 4회 세척하였다. 혈장을 플레이트에 추가하고 실온에서 2시간 동안 흔들면서 배양시킨 다음, 1X TBST로 4회 세척하였다. 검출 항체인, 비오틴화된 단클론 마우스 항-FVIII 항체 (Green Mountain, Burlington, VT)를 추가하고 실온에서 1시간 동안 배양한 후, 1X TBST로 4회 세척하였다. 스트렙타비딘 HRP (Jackson ImmunoResearch, West Grove PA)를 추가하고 실온에서 1시간 동안 배양한 후 1X TBST로 4회 세척하였다. TMB Ultra (Thermo Fisher Scientific, Waltham MA)를 추가하고 10분 동안 전개시키고, 반응을 정지 용액으로 중단시키고 플레이트 판독기를 사용하여 450 nm에서의 흡광도를 판독하였다. 바탕 흡광도 판독값은 무시할만하였다 (전형적으로 0).

[0162] **색소형성 사람 인자 VIII 활성 분석.** 사람 인자 VIII 표준을 제외하고 제조업체의 프로토콜에 따라 Diapharma Chromogenic Coamatic Factor VIII 분석기 (West Chester, OH)를 사용하여 혈장에서 분비된 사람 인자 VIII의 활성을 결정하였다. ELISA 분석법에서 사용된 사람 인자 VIII은 US Biologicals (Salem, MA)사의 제조함 정제된 사람 인자 VIII (#F0016-06)였다.

[0163] **응고 활성 분석** 사람 인자 VIII 표준 및 사람 인자 VIII-결핍 혈장을 제외하고 제조업체의 프로토콜에 따라 활성화된 부분 트롬보플라스틴 시간 (aPTT) 분석을 사용하여 HepG2 상청액 (또는 시노플구스 원숭이 혈장)에서 분비된 사람 인자 VIII의 활성을 결정하였다. 사람 인자 VIII 표준은 ELISA 분석에서 사용된 것과 동일하였다 (제조함 정제된 사람 인자 VIII, US Biologicals사, Salem, MA의 #F0016-06). 응고 분석에서 사용된 결핍 FVIII 시약은 Haematologic Technologies, Inc 사 (Essex Junction, VT)의 FVIII-CD < 1 % FVIII Activity (냉동시킨 결핍 FVIII)였다. 요약하면, 표준 또는 샘플을 강철볼을 내포하는 큐벳에 추가하였다. 키트에 제공된 FVIII-CD < 1 % FVIII Activity 및 PTT Automate를 추가하고, 37 °C에서 180초 동안 배양시켰다. 강철볼을 큐벳안에서 움직이게 하면서 키트에 제공된 STA CaCl₂ 를 반응에 추가하였다. STA CaCl₂ 를 추가할 때부터 강철볼의 이동이 중단될 때까지 응고 시간을 측정하였다. 이 분석에서 배양 및 시간의 기록은 분석기를 사용하여 수행되었다.

[0164] **실시예 2: 생체내 연구**

[0165] **야생형 마우스:** 8 내지 10주령의 C57BL/6 마우스를 생체내 연구에 사용하였다. 본 연구는 사람 의료 및 동물 사용에 관한 동물 복지 법령을 준수하였다. 투여에 앞서 테스트 제품들 (각제물을 내포하는 AAV 바이러스)을 실온에서 해동시키고, 모든 동물들에게 정맥내 (IV) 주사 200 µL를 한번 투여하였다. 하기 표 1은 도 8에서 생체내 연구되는 각제물 (도 4, 6 및 7에 맵핑됨)테스트에 관한 연구 설계를 보여준다. 표 2는 도 15에 개략적으로 나타낸 상기 각제물의 테스트에 관한 연구 설계를 보여준다. 용량은 마우스 당 1.8E+11 vg이었으며 이는 대략 7E+12 vg/kg 이었다. 모든 동물들에게 후속하여 0일차 및 14일차에 사이클로포스파미드 200 µL를 복강내 주사하였다. 표 1 및 2에 개요된 바와 같이 비-종료시 및 종료시 혈액을 수집하였다.

표 1: 도 4, 6 및 7의 작제물에 관한 연구 설계 (결과는 도 8에)

그룹	테스트 제품 설명	혈청형	면역 억제제	용량	총 부피/마우스 (μL)	N/연속 출혈 시점 (일)			
						7	14	21	28
1	제제	없음	50 mg/kg	없음	200	6	6	6	6
2	부모	AAV2/6	50 mg/kg	1.80E+11	200	6	6	6	6
3	CRMSBS1	AAV2/6	50 mg/kg	1.80E+11	200	6	6	6	6
4	CRMSBS1 인트론 없음	AAV2/6	50 mg/kg	1.80E+11	200	6	6	6	6
5	CRMSBS1 T-키메라 인트론	AAV2/6	50 mg/kg	1.80E+11	200	6	6	6	6
6	CRMSBS2	AAV2/6	50 mg/kg	1.80E+11	200	6	6	6	6
7	CRMSBS2 인트론 없음	AAV2/6	50 mg/kg	1.80E+11	200	6	6	6	6
8	CRMSBS2 T-키메라 인트론	AAV2/6	50 mg/kg	1.80E+11	200	6	6	6	6
									48

[0166]

표 2: 도 15의 작제물에 관한 연구 설계

그룹	테스트 제품 설명	혈청형	면역 억제제	용량	총 부피/마우스 (μL)	N/연속 출혈 시점 (일)			
						7	14	21	28
1	제제	해당없음	50 mg/kg	해당없음	200	4	4	4	4
2	부모	AAV2/6	50 mg/kg	1.80E+11	200	4	4	4	4
3	CRMSBS2	AAV2/6	50 mg/kg	1.80E+11	200	4	4	4	4
4	CRMSBS2 SBR 인트론 1	AAV2/6	50 mg/kg	1.80E+11	200	4	4	4	4
5	CRMSBS2 SBR 인트론 2	AAV2/6	50 mg/kg	1.80E+11	200	4	4	4	4
6	CRMSBS2 SBR 인트론 3	AAV2/6	50 mg/kg	1.80E+11	200	4	4	4	4
									24

[0167]

[0168]

7, 14, 21일차 (비-종료시) 및 28일차 (종료시)에 모든 마우스로부터 혈액을 수집하였다. 모든 혈액을 소듐 시트레이트를 내포하는 시험관에 수집하였으며 혈장으로 가공되었다. 비-종료시 혈액 수집은 아래턱밑 정맥 또는 후-안와 정맥동 (retro-orbital sinus)을 통해 수집되었다. 희생시 혈액 수집은 심장 천자 또는 대정맥을 통해 수집되었다. 혈장을 분리하여 하기 ELISA 분석법에서 사용할 때까지 -60 내지 -80°C에서 보관하였다.

[0169]

모든 동물들을 28일차에 희생시키고, 간, 비장, 고환, 뇌, 심장, 폐 및 신장을 수집하여 계량하였다. 간의 왼쪽 외측엽을 분리하고 3 조각으로 나누어 간의 나머지와 별도로 액체 질소에서 급속 냉동 (snap frozen)시켰다. 나머지 간 엽들 그리고 다른 조직들 (전부)을 액체 질소에서 급속 냉동시켰다. 냉동된 표본들을 RNA/DNA 추출을 위해 가공할 까지 -60 내지 -80°C에서 보관하였다.

[0170]

도 8 및 15에서 보는 바와 같이, 테스트한 모든 작제물들은 투여 후 7일차 (도 8A 및 도 15A) 그리고 28일차 (도 8B 및 도 15B)에 생체내 트랜스진 (B-도메인 결실된 사람 분비 인자 VIII)을 생체내 생성하였다. 더욱이, 도 9 및 16에서 보는 바와 같이, 트랜스진은 오직 간에서만 발현되었으며 다른 조직들에서는 전혀 발현되지 않았고 (도 9A 및 16A) AAV 벡터는 주로 간 세포를 형질도입시킨다 (9B 및 16B에 도시된 벡터 유전체 생물분포 분석). 이러한 데이터세트에서, 표 1에 제시된 연구에서의 조직들 (뇌, 심장, 신장, 폐, 간, 비장, 고환)로부터

얻은 사람 인자 VIII-BDD (hFVIII-BDD) mRNA를 상기 실시예 1에 기재한 바와 같이 qRT-PCR로 분석하였다. 추가적으로, 이러한 동일한 조직들에서의 벡터 유전체 분포를 qPCR로 분석하였으며 (실시예 1 참고) 결과를 도 9B/16B에 나타낸다. 이들 데이터는 AAV2/6 벡터가 주로 간을 형질도입시킴을 입증한다.

[0171] 인트론 변형들의 효능을 조사하기 위하여 설계된 작제물을 표 2에 개요된 연구에서와 같이 *생체내* 테스트 하였으며, 7일차 및 피크 수준에 관한 데이터를 도 15에 나타낸다. 또한 hFVIII-BDD mRNA (도 16A) 그리고 벡터 유전체 분포에 대해서도 분석하였으며 (도 16B) hF8 mRNA 발현은 간 특이적이었으며, AAV2/6은 주로 간을 형질도입시킴을 나타내었다.

[0172] 그러므로, 본 출원에 기재된 작제물은 간 전달 후 양호한 트랜스진 발현을 제공한다.

[0173] *생체내* 관찰된 hFVIII-BDD 수준이 사용되는 AAV의 혈청형에 대해 민감성이었는지를 테스트하기 위한 추가 연구가 실시되었다. 수컷 C57BL/6 마우스에게 6E+10 vg/마우스 (~2E+12 vg/kg) 또는 1.8E+11 vg/마우스 (~7E+12 vg/kg)의 AAV2/5, AAV2/6, AAV2/8 또는 AAV2/9 F8 부모 cDNA를 정맥내 주사하였다. 마우스 간을 형질도입함에 효과적이지 않은 것으로 공지된, 혈청형 AAV2/6로 마우스를 형질도입시키면, 6E+10 vg/마우스 (~2E+12 vg/kg)에서 사람에서의 정상 hFVIII 혈장 수준의 91.9 % +/- 15.5 SEM (n=6)의 평균 피크 값에 도달되었다. 6마리의 독립적 *생체내* 마우스 연구에 있어 ~7E+12 vg/kg로 제시되는 보다 높은 용량에서 of 169.2 % +/- 10.1 SEM (n = 36)의 hFVIII 혈장 평균 피크 값에 도달되었다. 2E+12 vg/kg에서 AAV2/8에 관한 평균 피크 수준은 320 % 였으며 6E+12 vg/kg에서는 323.6 %였다. 2E+12 vg/kg의 AAV2/9에 있어서 평균 피크 수준은 389.6 %였다 (도 23 참고, 이 또한 AAV2/5 및 AAV2/6을 사용한 결과를 보여줌).

[0174] AAV를 생성하기 위해 사용된 제조법이 *생체내* 구현되는 hFVIII-BDD 발현에 영향을 주었는지를 결정하기 위한 연구들 또한 수행되었다. 수컷 C57BL/6 마우스에게 부모 F8 부모 cDNA를 HEK293 세포들 또는 Sf9/rBV (재조합 바칼로바이러스)로부터 생성된 1.8E+11 vg/마우스 (~7E+12 vg/kg)의 AAV2/6 F8 부모 cDNA로 IV 주사 (꼬리 혈관)를 통해 투여하였다. HEK293 세포들로부터 얻은 F8 부모 cDNA 처리는 정상 사람 FVIII 혈장 수준의 142.1% ± 8.3 % SEM (n=8) (hFVIII ELISA로 측정)의 평균 피크 값에 도달하게 하였다. 마우스에게 F8 부모 cDNA (Sf9/rBV) 투여 후 132.8% ± 18.6 % SEM (n = 5)의 유사 수준 (hFVIII ELISA로 측정)에 도달되었다 (도 24).

[0175] F8 CRMSBS2 SBR 인트론 3 cDNA와 비교하기 위해 상기 연구를 반복하였다 (도 10 참고). 수컷 C57BL/6 마우스에게 1.8E+11 vg/마우스 (~6E+12 vg/kg)의 AAV2/6 CRMSBS2 SBR 인트론 3 cDNA (n=8)를 정맥내 주사하였다. hFVIII ELISA로 측정된 C57BL/6 마우스의 혈장 내 hFVIII의 평균 피크 수준을 나타낸다 (도 25).

[0176] **혈우병 A 마우스:** 작제물들을 또한 혈우병 A의 R593A 마우스 모델에서 테스트하였다 (Bri1 외 (2006) *Thromb Haemost* 95(2):341-7; Chavez 외, (2012) *Hum Gen Ther.*, 23(4):390). 이들 마우스는 내인성 쥐과 F8 유전자의 녹아웃을 운반한다. 또한, 이들은 쥐과 알부민 프로모터의 제어하에 돌연변이체 사람 FVIII-R593C 트랜스진을 운반하여, 검출불가능한 양의 돌연변이체 사람 단백질을 발현시키지만, 미량의 돌연변이체 FVIII R593A 단백질 생성으로 인해 사람 FVIII 발현에 대해 내성을 띠는 것으로 생각된다. 최초 균주는 FVB였으나 Jackson Laboratory에서 최소한 5세대 동안 C57BL/6 마우스에 대해 여교잡 (back-cross)되었다. 본 연구는 사람 의료 및 동물 사용에 관한 동물 복지 법령을 준수하였다. 투여에 앞서 테스트 제품들을 실온에서 해동시키고, 모든 동물들에게 정맥내 (IV) 주사 200 µL를 한번 투여하였다. 용량은 마우스 당 1.8E+11 vg이었으며 이는 대략 7E+12 vg/kg 이었다. 연구 설계를 하기 표 3에 나타낸다:

표 3: 혈우병 A 돌연변이체 마우스에서 CRMSBS2 SBR 인트론 3

그룹	테스트 제품 설명	혈청형	면역 억제제	용량	총 부피/ 마우스 (µL)	연속 출혈 시점 (일)						
						8	14	21	28	35	42	희생
1	제제 완충액	해당없음	해당없음	해당없음	200	6	6	6	6	6	6	6
2	CRMSBS2 SBR 인트론 3	AAV2/6	해당없음	1.80E+11	200	6	6	6	6	6	6	6
12												

[0177]

[0178] 본 연구는 3개월 동안 실시되었으며, 3개월 연구의 대표적인 결과들이 나타나있는데, 14일차 및 42일차의 결과들 모두 (도 17)는 FVIII-BDD 트랜스진이 14일차 (도 17A) 및 42일차 (도 17B) 모두에서의 정상 사람 혈장에서 발견되는 FVIII 단백질 수준의 >300% 수준으로 발현되었음을 보여준다.

[0179] 마우스 혈우병 A 모델에서 hFVIII의 기능성 및 치료 효능을 테스트하기 위하여, 꼬리 혈관 횡절단 (TVT) 모델이 사용되었다. 요약하면, 마우스를 먼저 아이소플루란으로 마취시키고, 연구 기간 동안 마취 마스크를 통해 마취를 유지시켰다. 마취 유도 직후, 마우스를 마취 마스크안에 머리가 적절히 위치되도록 하면서 위와 가열 패드 사이에 온도 센서를 보유한 가열 패드 (37 °C로 설정됨) 위에 올려두었다. 측정을 위한 마커 블록을 사용하여, 정확히 2.5 mm 직경에 해당하는 "12시 방향"에서 마커펜으로 꼬리를 표시하고 식염수 수집관 (37 °C 식염수)에 꼬리를 침지시켰다. 출혈 유도 전 총 10분 동안 상기 온도의 식염수에 꼬리를 침지시켰다. 그 후 꼬리를, 대략 절단하기 10초 전에 "15시 방향"을 가리키는 "13"이 표시된 절단 블록에 넣었다 (왼쪽 측부 꼬리 혈관의 횡절단을 용이하게 하기 위해). 정확히 t = 0 분에, 마우스 꼬리의 왼쪽면에서 측면방향으로 1 mm 깊이로 절개하여 꼬리를 절개함으로써, 측면 꼬리 혈관을 횡절단하였다. 즉시 꼬리를 예열된 식염수 수집관에 담갔다. 1차 출혈 사건을 3분 동안 기록하였다. 1차 출혈이 3분 이상인 경우, 동물을 안락사시키고 교체하였다. 부상이 있고 3분 후, 수집관을 새로운 예열된 식염수 수집관으로 교환하였다. 모든 2차 출혈 사건들을 추가 57분 동안 기록하였다. 출혈이 15, 30, 또는 45분에 중단된 경우, 식염수에 적신 거즈 면봉으로 상처를 부드럽게 2번 닦아내어 감염시켰다. 감염 직후, 꼬리를 식염수에 재-침지시켰다. t = 60분에서 여전히 완전 마취되어 있는 상태에 있는 마우스를 안락사시켰다. 1차 및 2차 출혈 시간의 총합으로 출혈 시간을 기록하였다. 1차 및 2차 출혈을 용혈하여 차후 혈액 손실에 관한 헤모글로빈 측정을 위해 보관하였다 (Johansen 외, *Haemophilia*, (2016) doi: 10.1111/hae.12907).

[0180] 결과들은 꼬리 혈관 횡절단 (도 18) 후 혈우병 A R593C 마우스에서 이들 마우스에서의 치료 효능을 나타내는 지혈에 도달하는 시간의 양이 유의하게 감소함 (p<0.0001)을 입증한다.

[0181] 비-사람 영장류: hFVIII-BDD cDNA 작제물을 사용하여 NHP에서 실험을 실시하였으며, AAV2/6 및 AAV2/8 혈청형들을 평가하였다. 하기 표 4 및 도 26B는 투약 그룹들의 식별정보를 보여준다. 설계된 F8 트랜스진 발현 카세트 "cDNA 1" (하기 표 4의 그룹 2-4)와 "cDNA2" (하기 표 4의 그룹 5) 간의 차이점은 "cDNA2" 공여체는 약간 상이한 프로모터 모듈 (하이브리드 간 프로모터, McIntosh 외 (2013) *Blood* 121(17):3335 참고)을 가졌다는 것이지만, F8-BDD 트랜스진 발현 카세트 (코딩 영역 포함)의 나머지는 동일하였다. 이러한 실험들에서, 도 26A에 개요된 투약 요법이 사용되었다 (여기서 리투시맙은 테스트 제품 이전에 투여되었으며 스테로이드는 테스트 제품과 동시에 그리고 그 후 매일 투여되었다).

표 4: FVIII 트랜스진 카세트를 가지는 NHP 그룹

그룹 번호	수컷의 수 ^a	테스트 제품 식별기호	AAV 트랜스진 설명	혈청형	성분 용량 수준 (vg/kg)	총 AAV 벡터 용량 수준 (vg/kg)
1	2	SGMO.01	제제 완충액	해당없음	해당없음	해당없음
2	3	SGMO.02	hF8-BDD cDNA 1	AAV2/6	2E+12	2E+12
3	3	SGMO.03	hF8-BDD cDNA 1	AAV2/6	6E+12	6E+12
4	3	SGMO.04	hF8-BDD cDNA 1	AAV2/8	6E+12	6E+12
5	3	SGMO.05	hF8-BDD cDNA 2	AAV2/8	6E+12	6E+12

[0182] 시노몰구스 원숭이들에게 제제 완충액 또는 6E+12 vg/kg의 AAV2/6 hF8 cDNA (부모)를 투여하였다. 테스트 제품 부가 후 14일차에, hFVIII의 순환 수준 및 활성을 ELISA 또는 응고 활성으로 분석하였다 (도 27 참고). 시노몰구스 원숭이 FVIII의 정상 수준은 ~1U/mL이고 제제 대조 그룹에 대한 응고 활성 데이터에 반영되는데, 이는 응고 활성 분석은 사람 FVIII에 대해 특이적이지 않기 때문이다. ELISA는 시노몰구스 원숭이 FVIII에 비해 사람 FVIII에 특이적이므로, 예상한 바와 같이, 제제 대조 그룹에서 ELISA로 측정된 바와 같이 hFVIII 수준은 없다. 제제 대조 그룹 (그룹 1, 동물 ID 1101-1102), 및 6E+12 vg/kg 투여 그룹 (그룹 3, 동물 ID 3101-3103)에 관한 각각의 동물들이 나타나있다. 그룹 3 동물들에서 순환 hFVIII의 8U/mL 이상의 초생리적 수준 및 활성이 존재한다.

[0184] 처리 후 간 상태에 대한 지표로서, 제제 대조 그룹 (그룹 1, 동물 ID 1101), 및 6E+12 vg/kg 투여 그룹 (그룹 3, 동물 ID 3102)에 대해 간 효소들을 측정하였다. 알라닌 아미노트랜스퍼라제 (ALT) 및 아스파르테이트 아미노트랜스퍼라제 (AST)를 측정하였다. 시노몰구스 원숭이에서 허용가능한 ALT 상한 기준치는 126 U/L이고 AST 상한

기준치는 120U/L이다. 제제 대조 그룹과 6E+12 vg/kg AAV hF8 cDNA (부모) 그룹 모두에 있어서 ALT/AST 수준은 별표로 표시한 바와 같이 간 생검 후 상승되었다 (간 생검은 41일차에 하였다). 그 외에 AAV hF8 cDNA는 전체 연구 기간 (247일)에 걸쳐 내성이 우수하였다 (도 28A 및 28B 참고).

[0185] 데이터가 도 29에 제공되는데, 각 원숭이에 대한 데이터 세트가 그래프 상에 도시되어 있다. 이 데이터는 AAV6 혈청형에 기반한 테스트 제품의 보다 높은 용량은 (도 29A와 도 29B를 비교) 정상 사람 혈장에서 발견되는 수준의 거의 10X 수준의 FVIII-BDD 발현을 제공하였음을 나타낸다. AAV2/8 혈청형의 테스트 제품에 관한 데이터는 FVIII 활성의 증가를 보였으나, AAV2/6에 대해 관찰되었던 것과 동일한 정도는 아니었다.

[0186] 상기 처음 14일 기간에 후속하여, AAV-FVIII-BDD의 단일 용량 투여 후 247일까지 실험을 지속하였다. 스테로이드의 공-투여를 103일차에 중단하였다. 원숭이들의 혈장 내 hFVIII-BDD 수준의 결정은 다음과 같이 맞춤형 ELISA를 사용하여 결정되었다. 96-웰의 하프-면적 HB (고 결합) 폴리스티렌 마이크로플레이트 (Corning사)를 4 °C에서 하룻밤동안 pH 9.4의 0.2 M 카보네이트 바이카보네이트 완충액 (Thermo Fisher Scientific, Waltham MA) 중의 마우스 단클론 항-hFVIII 항체 (Green Mountain, Burlington, VT)로 코팅하였다. 다음날 플레이트를 1X TBST (Thermo Fisher Scientific, Waltham MA)를 사용하여 4회 세척하였다. 그 후 96-웰 플레이트를 2시간 동안 실온에서 3% BSA/TBS 차단 완충액을 사용하여 차단한 후, 1X TBST로 4회 세척하였다. 혈장을 플레이트에 추가하고 실온에서 2시간 동안 흔들면서 배양시킨 다음, 1X TBST로 4회 세척하였다. 검출 항체인, 비오틴화된 단클론 마우스 항-FVIII 항체 (Green Mountain, Burlington, VT)를 추가하고 실온에서 1시간 동안 배양한 후, 1X TBST로 4회 세척하였다. 스트렙타비딘 HRP (Jackson ImmunoResearch, West Grove PA)를 추가하고 실온에서 1시간 동안 배양한 후 1X TBST로 4회 세척하였다. TMB Ultra (Thermo Fisher Scientific, Waltham MA)를 추가하고 10분 동안 전개시키고, 반응을 정지 용액으로 중단시키고 플레이트 판독기를 사용하여 450 nm에서의 흡광도를 판독하였다. 바탕 흡광도 판독값은 무시할만하였다 (전형적으로 0). 억제성 항-FVIII 항체들의 존재를 Bethesda 분석법을 사용하여 결정하였다 (예를 들면, Kasper 외 (1975) *Thromb Diath Haemorrh* 34:869-72 참고). ELISA 분석법을 사용하여, 연구 전반에 걸쳐 사람 FVIII 항원 피크 수준을 평가하였다. 2E+12 vg/kg (n=3)의 용량 수준에서, 사람에서 111.0%, 493.9% 및 840.0% 정상 hFVIII 혈장 수준의 피크 값 (hFVIII ELISA로 측정시 전체 평균 481.6%)에 도달되었다. 6E+12 vg/kg (n=3)을 나타내는 고 용량에서, 450.0%, 625.6% 및 886.7% [전체 평균 654.1%]의 hFVIII 혈장 수준의 피크 값들에 도달되었다 (도 30).

[0187] 표 4에 개요된 연구를 실시하여 FVIII-BDD 및 임의의 억제성 항-FVIII 항체들의 수준을 측정하였다. AAV2/6에 FVIII-BDD cDNA를 포함하는, 2E+12 vg/kg를 투여한 저 투여량의 동물들 (n=3)에 있어서, 양호한 hFVIII 항원 수준 (Ag)의 검출 후, hFVIII-BDD 수준이 감소함과 동시에 베데스다 단위 (BU)가 증가하였다. BU는 시간 경과에 따라 감소하였으며 hFVIII Ag는 증가하였다 (도 31). 이 결과는 면역억제 요법 중단 후, 사람 FVIII 항원의 수준 (ELISA로 측정)이 떨어졌음을 입증하였다.

[0188] AAV2/6에 FVIII-BDD cDNA를 포함하는, 6E+12 vg/kg를 투여한 고 투여량의 동물들 (n=3)에 있어서 유사한 양상이 관찰되었다 (도 32 참고). 그러나 한 마리 동물, 3101에서, 솔루-메드롤 제거 후, FVIII 항원의 검출가능한 그리고 잔류 수준에도 불구하고 (정상 hFVIII 수준의 200%를 나타냄) 항-FVIII 항체들이 검출되지 않았는데, 이는 사람 FVIII 항원에 대한 동물의 내성을 나타내는 것일 수 있다.

[0189] 혈청형 AAV2/8이 고 용량 전달을 위해 사용될 경우, 유사한 결과가 관찰되었으나, 혈장에서 검출가능한 hFVIII 항원의 양은 AAV2/6 벡터를 사용하여 측정된 양에 비해 적었다 (도 33). 유사하게, AAV2/8 벡터에서 상이한 FVIII-BDD cDNA 프로모터 모듈을 테스트하였을 때 (그룹 5, 상기 기재), hFVIII-BDD 혈장 수준은 그룹 4에서 나타난 혈장 수준과 유사하였다 (도 34). 그러나, 상기와 같이, 검출가능한 양의 FVIII-BDD 발현을 유지하였던 두 개체들 (5101 및 5102), 그리고 솔루-메드롤 제거 후 두드러진 항체 반응이 없었던 그룹 4의 한 개체 (4103, 도 33D)가 존재하였는데, 이 또한 실험의 초기 연구일에 양호한 반응 수준을 나타낸 이후 항원에 대한 내성을 암시하는 것이다.

[0190] 도 34D에서 보는 바와 같이, 동물 번호 5101은 메틸프레드니솔론 제거 후에서와 같이 hFVIII-BDD에 대해 내성을 띠는 것으로 보였으며, hFVIII-BDD 수준은 8 주 동안 대략 0.1U/mL로 유지되었다 (정상 hFVIII 수준의 10%를 나타냄). 또한, 도 34E에서 보는 바와 같이, 동물 번호 5102는 메틸프레드니솔론 제거 후에서와 같이 hFVIII-BDD에 대해 내성을 띠는 것으로 보였으며, hFVIII-BDD 수준은 8 주 동안 대략 0.6U/mL로 유지되었다 (정상 hFVIII 수준의 60%를 나타냄). 사람 혈장에서 hFVIII의 정상 수준은 대략 1U/mL 또는 200 ng/mL이며, 심지어 정상 1%-5% (>0.001 U/mL) 발현도 치료 효능을 가질 수 있음에 주목할 필요가 있다 (Llung, RC (1999) *Thromb Haemost* 82(2):525-530).

- [0191] 상이한 면역억제 요법들을 조사한 것을 제외하고 상기와 같은 실험을 NHP에서 또한 수행하였다. 이러한 실험들에서, 도 26B에 나타난 투약 요법을 따랐으며 일부 그룹들 (1-5)은 테스트 제품 투여 전 면역억제 치료제를 투여받았던 반면, 그 외 그룹들 (6-8)은 테스트 제품 투여 후 면역억제제를 투여받았다.
- [0192] 도 38에서 보는 바와 같이, 6E+11 vg/kg의 용량 수준에서 (n = 3, 그룹 3), 피크 값들의 전체 평균은 사람에서 정상 hFVIII 혈장 수준의 5.7% (hFVIII ELISA로 측정)에 도달되었다. 2E+12 vg/kg를 나타내는 고 용량에서 (n = 3, 그룹 4), 피크 값들의 전체 평균은 hFVIII 혈장 수준의 56.5%에 도달되었으며 6E+12 vg/kg (n = 3, 그룹 5)에서 피크 값들의 전체 평균은 hFVIII 혈장 수준의 229.0 % (hFVIII ELISA로 측정)에 도달되었다. 2E+12 vg/kg의 용량 수준 (n = 3, 그룹 7)에서 피크 값들의 전체 평균은 87.9%였으며, 6E+12 vg/kg (n=3, 그룹 8)에서는, 101.7%였다. 그룹 1과 6은 제제 대조 그룹들 이었으며, 제제로 표시된다. 또한, 도 39에서 보는 바와 같이, 동일한 혈청형을 사용한 재-투약은 검출가능한 순환하는 사람 FVIII 항원 수준을 생성하였다. 이들 결과는 면역억제제를 이용한 동물들의 전처리가 최대 치료 단백질 발현에 도움이 될 수 있음을 나타낸다. 추가적으로, 전처리는 첫 투약 동안 중화 항체들이 전혀 발달되지 않았을 경우 재-투약을 가능하게 한다. 도 39는 또한 hFVIII 발현에 관한 처리된 동물들에서의 용량 반응을 투여되는 FVIII-BDD cDNA 범위 변화에 대한 반응으로 보여준다. 혈장 내 FVIII 단백질의 1 내지 5% 존재 조차도 사람에서 유의한 치료 효능을 가지는 것으로 생각되기 때문에, E11 범위 내 임상 용량은 (본 실험에서 정상 수준의 5.7 내지 12.0 퍼센트를 생성) 유의한 치료적 이점을 제공할 수 있다. 그러므로, 상기 데이터는 본 출원에 기재된 작제물이 치료적 수준의 트랜스진을 생체내 생성함을 입증한다.
- [0193] **실시예 3: 뉴클레아제-매개된 표적화 통합**
- [0194] 실시예 1과 2에 기재된 작제물들을 알부민 유전자좌위 내부에 이들 발현 작제물을 표적화 통합시키기 위해 알부민-특이적 뉴클레아제들과 조합하여 사용할 경우의 발현에 관해서도 평가하였다. 특히, 작제물들을 알부민-특이적 징크 핑거 뉴클레아제와 함께 HepG2 세포들에 투여하였다. 예컨대, 미국 특허 9,150,847; 9,255,250 및 미국 공개 특허출원 20130177983; 20150159172; 20150056705 및 20150166618을 참고하라.
- [0195] 사람 HepG2 간 세포들을 제조업체의 지침에 따라 유지시켰다 (ATCC, Manassas VA). 실험일에, HepG2 세포들을 세척하고, 트립신처리하여 계수하였다. 사람 인자 VIII-BDD (hFVIII) cDNA CRMSBS2 인트론 없음과 함께, 사람 알부민 인트론 유전자좌위에 대해 ZFN이 사용되었으며, AAV2/6로서 전달되었고, 시간 0으로 표시되었다. 24-웰 디쉬의 웰 당 1E+05 세포들에 대해, AAV2/6 ZFN은 3.0E+05로, AAV2/6 hFVIII cDNA CRMSBS2 인트론 없음은 3.0E+04, 6.0E+04 및 1.2E+05로 전달되었다. 그리하여 발현 작제물은 3.0E+04로부터, 6.0E+04 및 1.2E+05로 용량을 증가시켜 ZFN 3.0E+05와 함께 투여되었다. 대조 샘플들은 CRMSGS2 SBR 인트론 3 트랜스진 단독 투여 또는 GFP, ZFN 단독 또는 GFP 단독과의 투여를 포함하였다. 다음 날 배지를 교환하였다. 상청액 AAV2/6 바이러스 부가 후 19일차에 하기 hFVIII ELISA를 사용하여 분비된 hFVIII에 대해 분석하였다.
- [0196] 사람 인자 VIII 표준을 제외하고 제조업체의 프로토콜에 따라 Affinity Biologicals (캐나다) ELISA 키트 (FVIII-AG)를 사용하여 분비된 사람 인자 VIII-BDD 수준을 결정하였다. ELISA 분석법에서 사용된 사람 인자 VIII은 US Biologicals (Salem, MA)사의 재조합 정제된 사람 인자 VIII (#F0016-06)이다. 요약하면, HepG2 상청액을 플레이트에 추가하고, 실온에서 한시간 반 동안 흔들면서 배양시킨 다음, 키트에 제공된 세척 완충액으로 3회 세척하였다. 키트에 제공된 검출 항체를 추가하고 실온에서 45분 동안 배양시킨 후, 키트에 제공된 세척 완충액으로 3회 세척하였다. 키트에 제공된 TMB 기질을 추가하고 10분 동안 전개시켰다. 반응을 정지 용액으로 중단시키고 플레이트 판독기를 사용하여 450 nm에서의 흡광도를 판독하였다.
- [0197] 알부민-표적화된 ZFN (SBS#47171/47898, PCT 공개 특허출원 WO 2015/089077 참고) 및 지정된 작제물의 투여 후 시간 경과 (t = 일)에 따라 HepG2 세포 상청액에서 검출되는 총 hFVIII-BDD 단백질 수준을 분석하였다 (도 36). FVIII BDD 발현 작제물 및 ZFN 모두의 존재시, 상청액 내 분비된 FVIII BDD는 처리 후 3일에서는 최고 용량의 FVIII BDD 트랜스진에서 검출되었으며, 그 후 5일차에는 보다 낮은 용량에서 검출가능하였고, 7일차에서는 모든 수준에서 검출가능하였다. ZFN의 부재시, 상청액 내 FVIII BDD는 7일차에서 분석 배경 이상으로는 거의 검출될 수 없었다. n = 3의 생물학적 반복에 대한 데이터를 도시한다. 오차 막대는 기술적 반복에 관한 평균의 표준 오차를 나타낸다. 점선은 hFVIII ELISA의 검출 한계를 나타낸다. 분비된 hFVIII-BDD는 ZFN의 부재시 단지 약하게만 검출되었는데, 이는 검출가능한 분비 hFVIII-BDD가 에피솜으로부터 충분한 양으로 축적되기 전에 에피솜 hFVIII-BDD가 희석 또는 분해되기 쉽기 때문이다.
- [0198] 더욱이, 정량적 PCR (내인성 사람 알부민 유전자좌위 내부에 위치한 5' 프라이머 및 hFVIII-BDD 카세트의 ITR 내부에 위치한 프로브 그리고 hFVIII-BDD 내부의 3' 프라이머를 사용)로 결정되는 바와 같이, 지정된 작제물의

(NHEJ에 의한) 표적화 통합은 알부민-특이적 ZFN의 존재시에만 이루어졌다 (도 37). 그러므로 이들 데이터는 hFVIII-BDD 카세트의 성공적 통합 및 인코딩된 F8 단백질의 발현을 입증한다.

[0199] 이들 실험을 반복하여 또 다른 알부민-특이적 ZFN 세트를 테스트하였다 (SBS#42906/43043, PCT 공개 특허출원 WO 2015/089046 참고). 결과들은 (도 40A 및 40B) 이들 세포들의 상청액에서 FVIII 단백질의 발현 및 트랜스진의 표적화 통합을 보여준다.

[0200] 알부민-특이적 ZFN 및 작제물들은 후속하여 실시예 1과 2에 기재한 바와 같이 본질적으로 동물에 생체내 전달된다. 이 작제물들은 내인성 알부민 유전자좌위 내부에 통합되어 트랜스진을 발현시킨다.

[0201] 생체내 연구를 위한 실험 설계를 아래 표 5에 나타낸다. 요약하면, 생체내 연구를 위해 F1 세대 수컷 C57BL/6 새끼 마우스가 사용되었다 (표 5에 표시된 테스트 제품). 본 연구에서 사용된 ZFN은 SBS#48641 및 SBS#31523이었다 (미국 공개 특허출원 2014-0017212 참고). 본 연구는 사람 의료 및 동물 사용에 관한 동물 복지 법령을 준수하였다. 하기 개요된 바와 같이, 투여에 앞서 테스트 제품들을 실온에서 해동시키고, 모든 동물들에게 100 µL를 한번 피하 주사하였다. ZFN 용량은 마우스 당 1.5E+11 vg이었으며 F8 cDNA 용량은 마우스 당 1.5E+11 vg이었다. 각 7, 14, 21, 및 28일차에 각 그룹 당 2 또는 3 마리 새끼들을 안락사시킨 후 이들로부터 혈액을 수집하였으며 인 하우스 hFVIII ELISA를 사용하여 마우스에 대해 혈장 내 hFVIII의 순환 수준을 분석하기 위하여 혈장으로 가공하였다. 딥 시퀀싱에 의한 유전자 변형 수준의 분석(indels, 삽입 및 결실), RT-PCR에 의한 mRNA 분석, qPCR을 사용한 벡터 유전체 분석 그리고 qPCR을 사용한 표적 통합 분석을 하기 위해 모든 마우스로부터 조직들을 수집하였다.

표 5: 실험 설계

그룹 번호	테스트 제품 설명	테스트 재료	ZFN 용량 (vg/마우스)	F8 cDNA 용량 (vg/마우스)	총 AAV 용량 (vg/마우스)	총 AAV 용량 ^a (vg/kg)	수컷 새끼의 수	용량 부피 (µL) ^b
1	제제 완충액	SGMO.01	0	0	0	0	9	100
2	ZFNs + F8 cDNA	SGMO.02	ZFN 당 1.5 x 10 ¹¹	1.5 x 10 ¹¹	4.5 x 10 ¹¹	3.75 x 10 ¹⁴	12	100
3	F8 cDNA	SGMO.03	0	1.5 x 10 ¹¹	1.5 x 10 ¹¹	1.25 x 10 ¹⁴	12	100

a: 총 AAV 용량은 1.2 g 체중을 사용하여 계산하였다

b: 100 µL 의 일 부피로 한번 투여함.

[0202]

[0203] 혈장에서 검출된 F8 수준과 FVIII-BDD 트랜스진의 표적화 통합 양을 하기 표 6에 제공한다.

표 6: F8 발현 및 트랜스진 통합

일차	샘플 #	그룹 #	설명	동물 #	F8 수준 (ELISA)		Indels %	표적 통합	
					U/mL	ng/mL		평균	SEM
7	1	1	제제	101	0.002	0.4	N.S.	0	
7	2	1	제제	201	0.006	1.2	N.S.	0	
7	3	2	ZFN/F8 cDNA	401	0	0	7.8	1.48	0.00
7	4	2	ZFN/F8 cDNA	501	0.006	1.2	8.4	4.15	1.13
7	5	2	ZFN/F8 cDNA	601	0.082	16.4	12.5	11.38	3.82
7	6	3	F8 cDNA	901	0.022	4.4	N.S.	0	
7	7	3	F8 cDNA	1001	0.012	2.4	N.S.	0	
7	8	3	F8 cDNA	1101	0.006	1.2	N.S.	0	
14	1	1	제제	301	0.006	1.2	N.S.	0	
14	2	1	제제	102	0.006	1.2	N.S.	0	
14	3	2	ZFN/F8 cDNA	701	0.124	24.8	14.4	4.45	1.76
14	4	2	ZFN/F8 cDNA	402	0.037	7.4	16.1	3.02	0.09
14	5	2	ZFN/F8 cDNA	502	0.169	33.8	11.7	2.93	0.71
14	6	3	F8 cDNA	1201	0.002	0.4	N.S.	0	
14	7	3	F8 cDNA	902	0.001	0.2	N.S.	0	
14	8	3	F8 cDNA	1002	0.015	3	N.S.	0	
21	1	1	제제	202	0	0	N.S.	0	
21	2	1	제제	302	0.006	1.2	N.S.	0	
21	3	2	ZFN/F8 cDNA	602	0.082	16.4	15.7	21.11	1.11
21	4	2	ZFN/F8 cDNA	702	*	*	18.6	4.76	1.36
21	5	2	ZFN/F8 cDNA	403	*	*	16.7	5.72	2.36
21	6	3	F8 cDNA	1102	0.012	4.4	N.S.	0	
21	7	3	F8 cDNA	903	0.022	2.4	N.S.	0	
28	1	1	제제	103	0.006	1.2	N.S.	0	
28	4	1	제제	603	0	0	N.S.	0	
28	2	2	ZFN/F8 cDNA	303	0.004	0.8	9.4	1.00	0.68
28	3	2	ZFN/F8 cDNA	503	0.128	25.6	17.3	5.96	1.26
28	5	2	ZFN/F8 cDNA	703	0.001	0.2	15.0	1.93	0.49
28	6	3	F8 cDNA	1003	0.004	0.8	N.S.	0	
28	7	3	F8 cDNA	1103	0.002	0.4	N.S.	0	

*: 사용할 수 없는 데이터

[0204] NS: 배경보다 유의하게 높지 않음

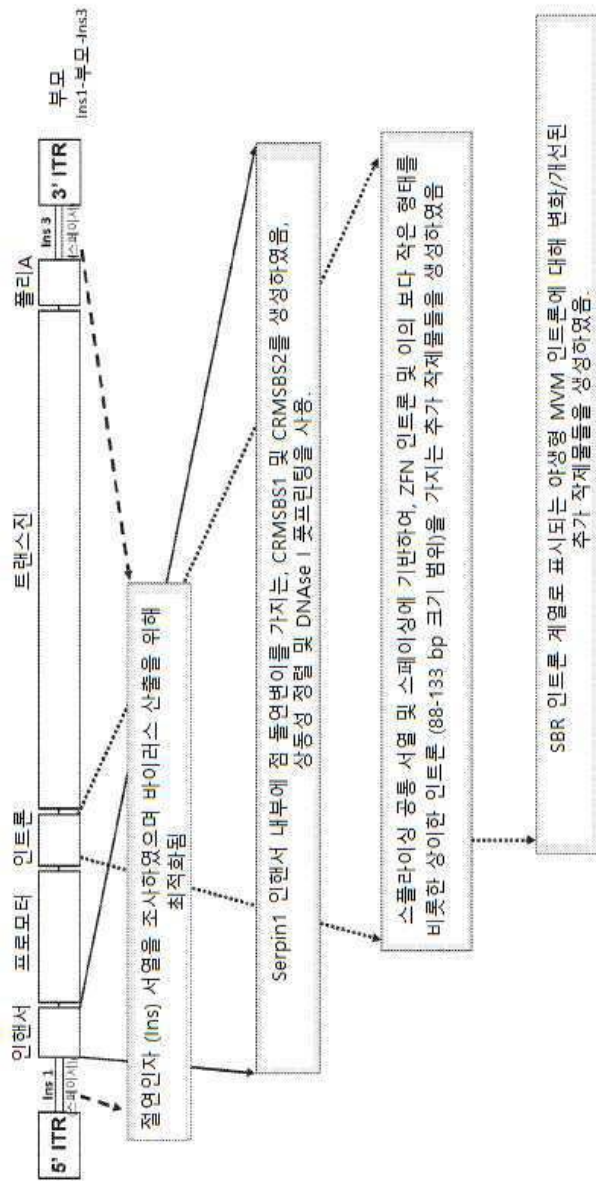
[0205] 그러므로, FVIII은 알부민-특이적 뉴클레아제 및 FVIII-BDD 트랜스진의 투여 후 마우스 새끼들에서 검출가능하였다. 트랜스진의 삽입 또한 ZFN 및 트랜스진 모두를 처리한 마우스들에서 보다 높은 용량으로 검출가능하였다.

[0206] 그러므로 본 출원에 기재된 작제물의 뉴클레아제-매개된 표적화 통합은 간 세포들에서 트랜스진 발현을 제공한다.

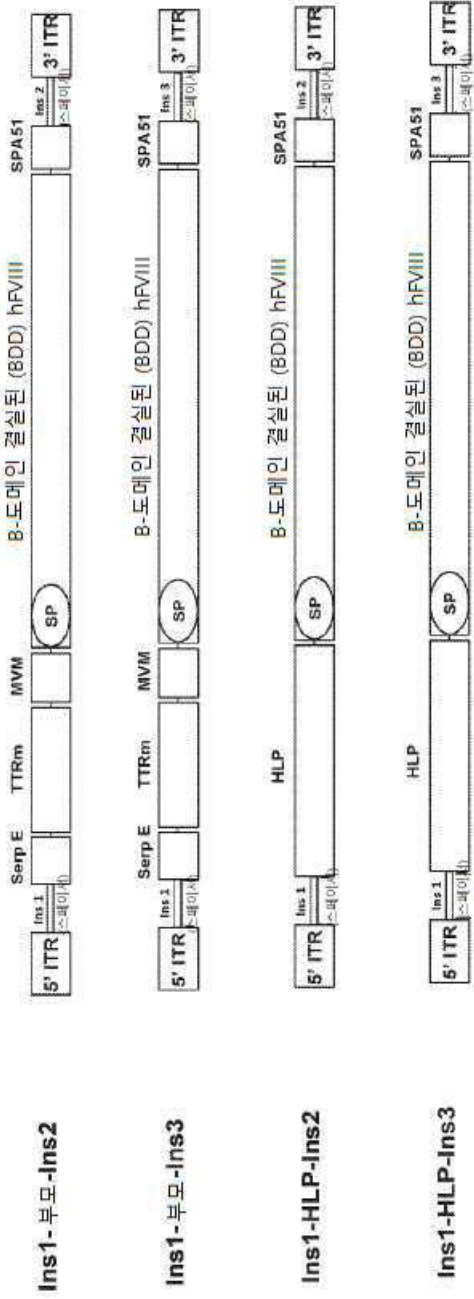
[0207] 본 출원에서 언급된 모든 특허, 특허 출원 및 간행된 참고문헌들은 본 출원에 온전히 참고문헌으로 포함된다. 명확한 이해를 위해 예시 및 예로서 발명을 어느 정도 상세히 설명하였으나, 본 발명의 사상 또는 범위에서 벗어나지 않고 다양한 변형 및 변형들이 이루어질 수 있음이 해당 분야의 숙련된 기술자들에게 명백할 것이다. 따라서, 전술한 설명 및 예들은 본 발명을 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다.

도면

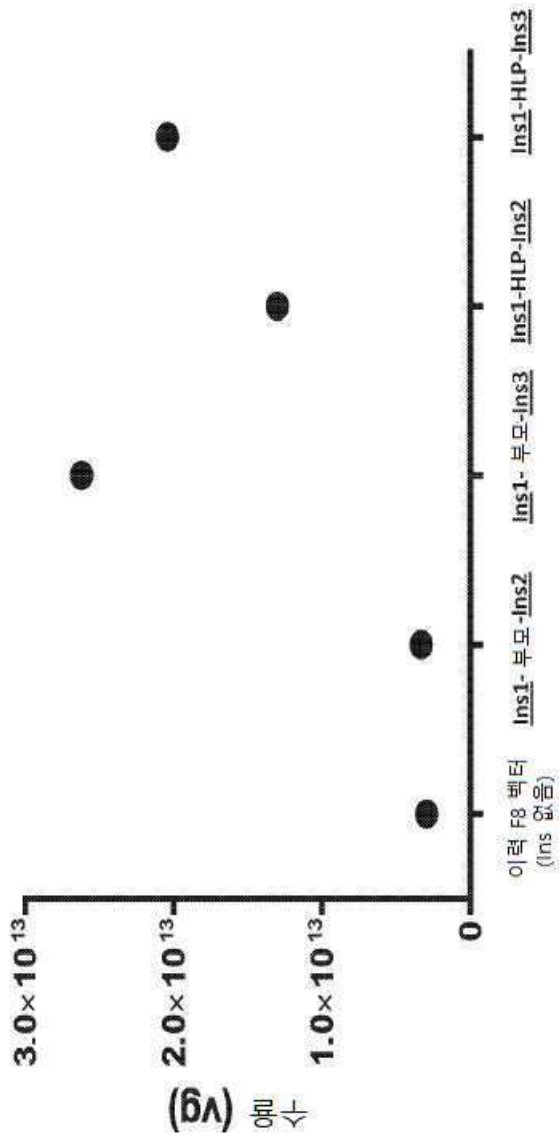
도면1



도면2

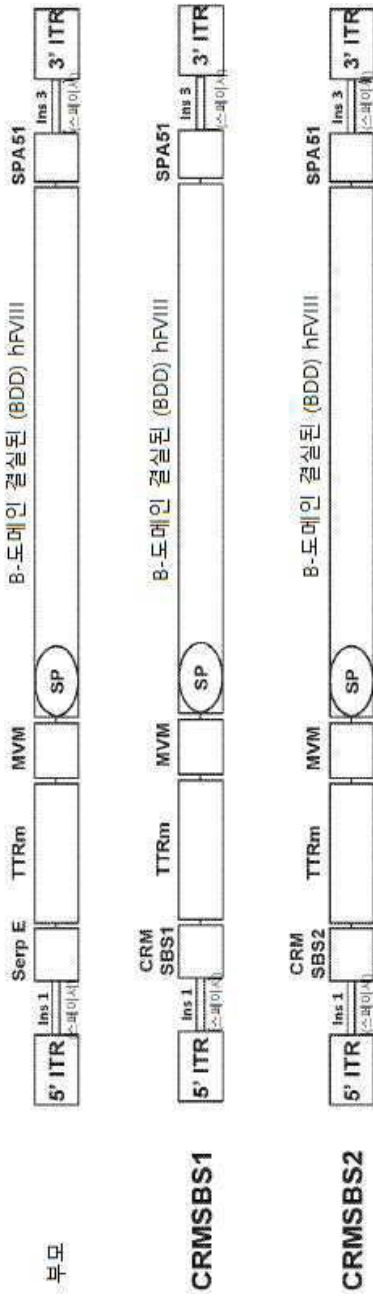


도면3

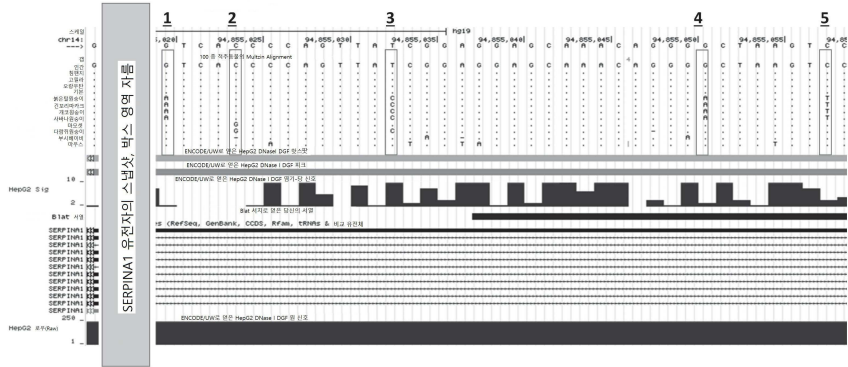


도면4

인핸서 변형



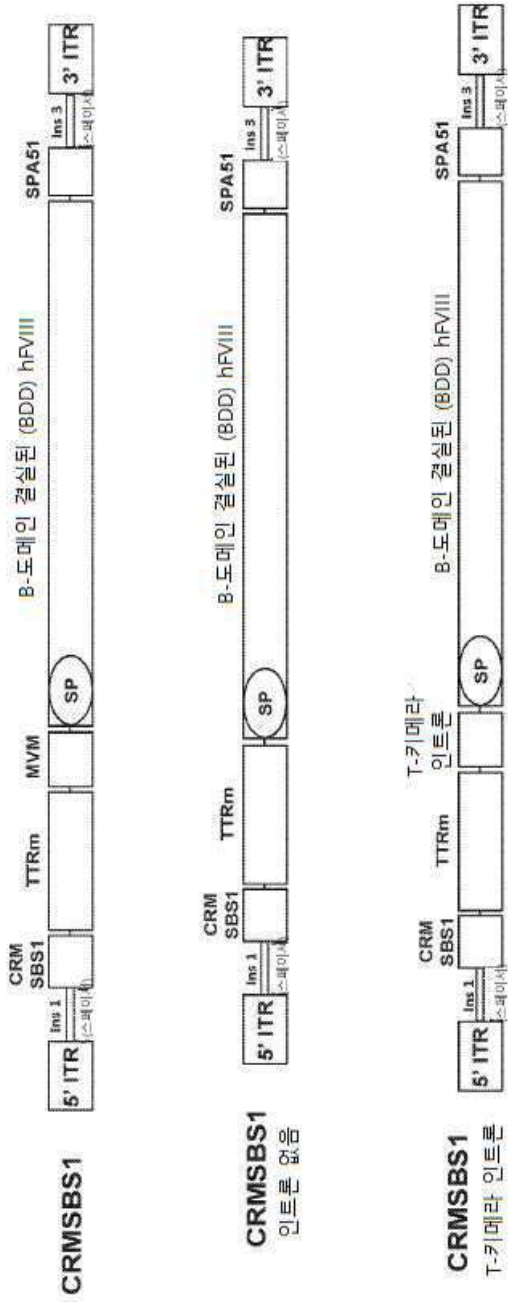
도면5



CRMSBS1 = 1, 2, 3, 4에서 변화
 CRMSBS2 = 1, 3, 4, 5에서 변화

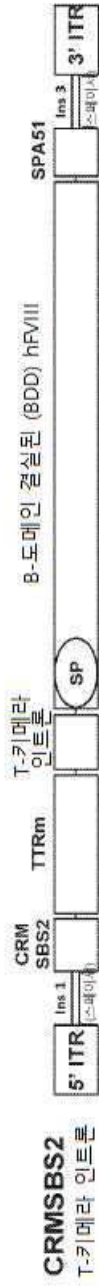
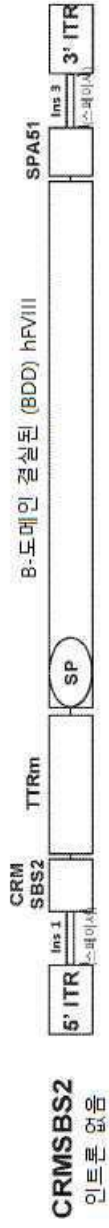
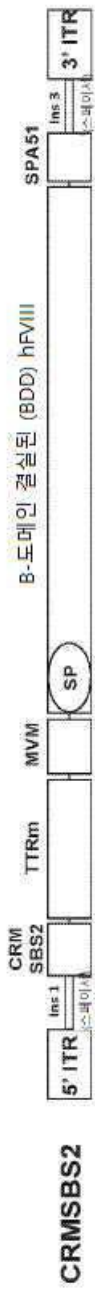
도면6

인트론 변형: CRMSBS1

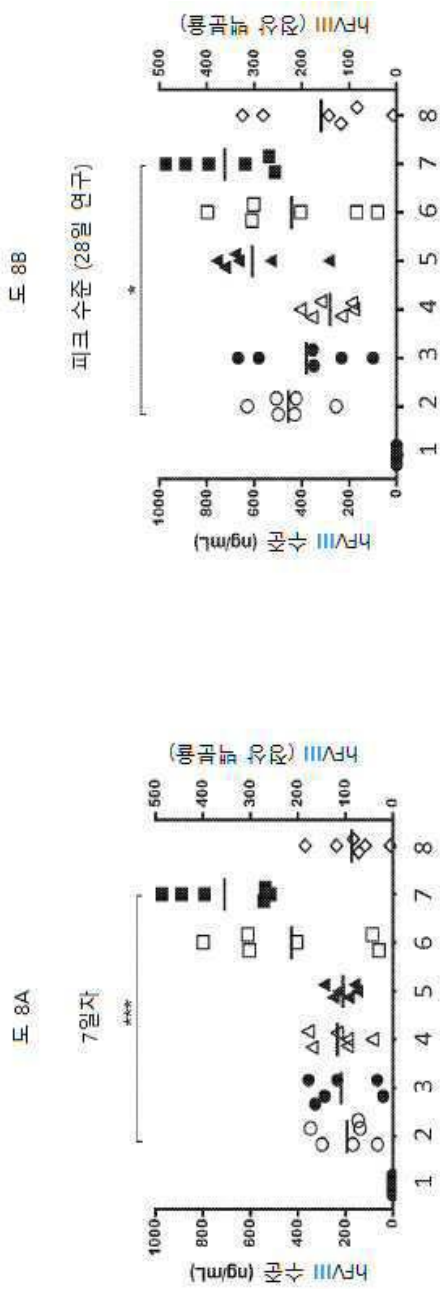


도면7

인트론 변형 : CRMSBS2



도면8

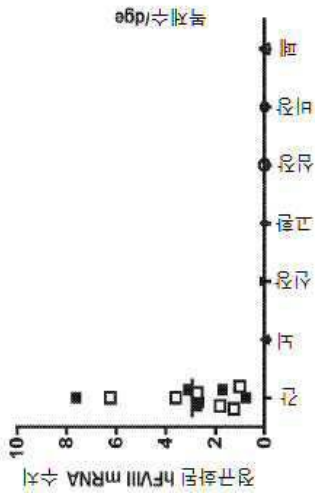


번호	명칭	도시된 도면
1	제제	-
2	부모	도 4
3	CRMSB51	도 4
4	CRMSB51 인터론 없음	도 6
5	CRMSB51 T-키메라 인터론	도 6
6	CRMSB52	도 4
7	CRMSB52 인터론 없음	도 7
8	CRMSB52 T-키메라 인터론	도 7

도면9

도 9A

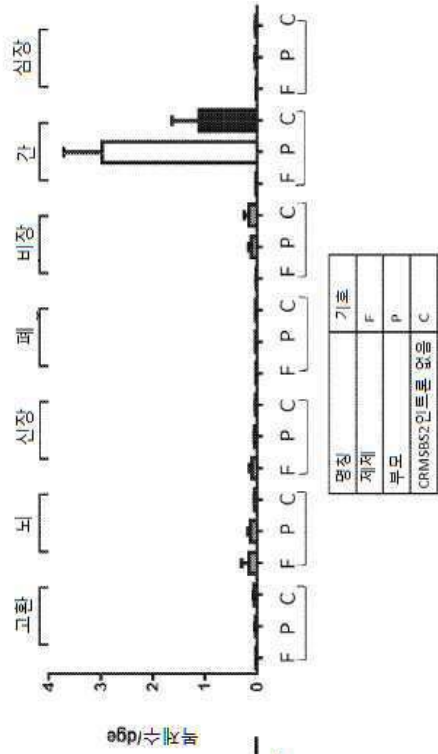
사람 인자 VIII (hFVIII) mRNA



□ 열린기호: 부모
 ■ 채운 기호: CRMSBS2 인트론 없음

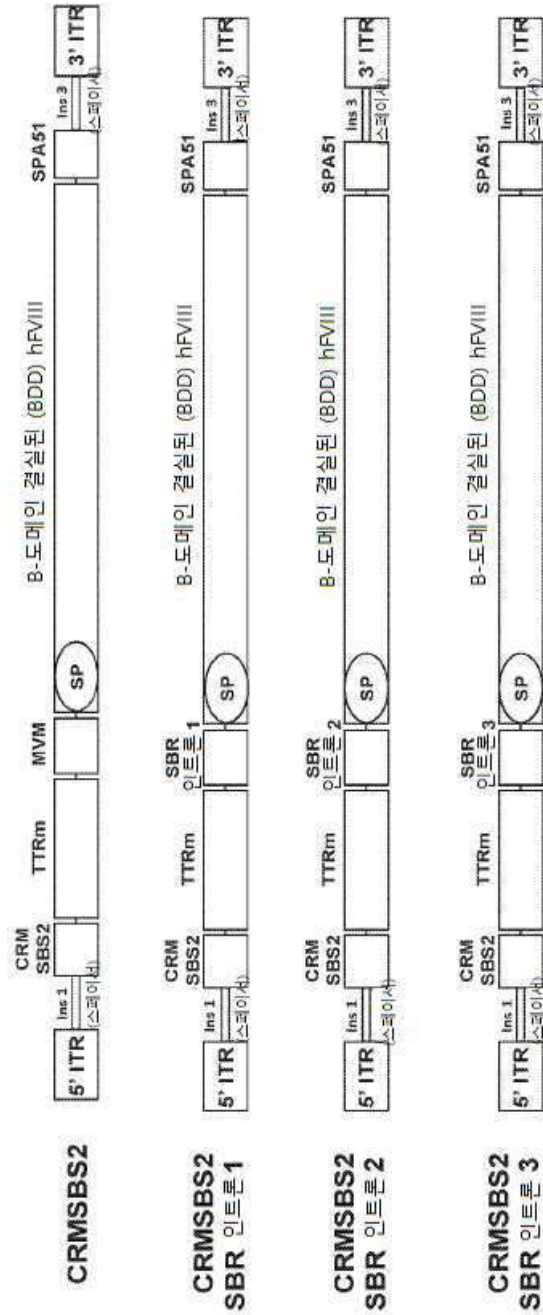
도 9B

백터 유전자 (VGs), AAV2/6 생물분포

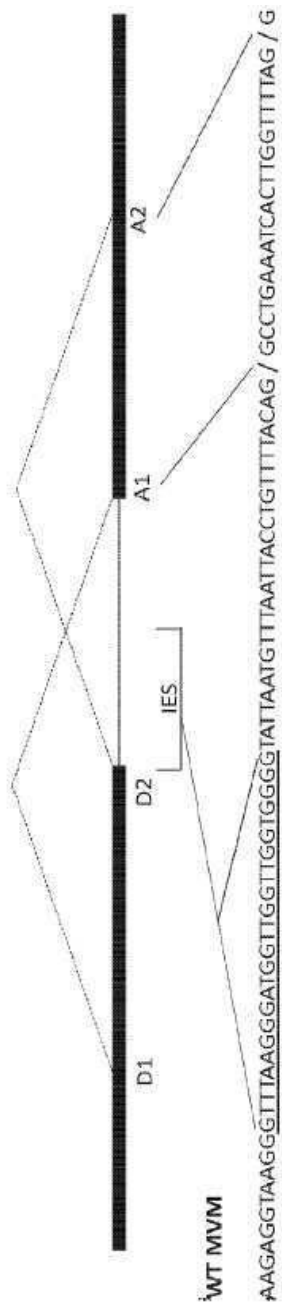


명칭	기호
백터 유전자 <td>F</td>	F
부모 <td>P</td>	P
CRMSBS2 인트론 없음 <td>C</td>	C

도면10

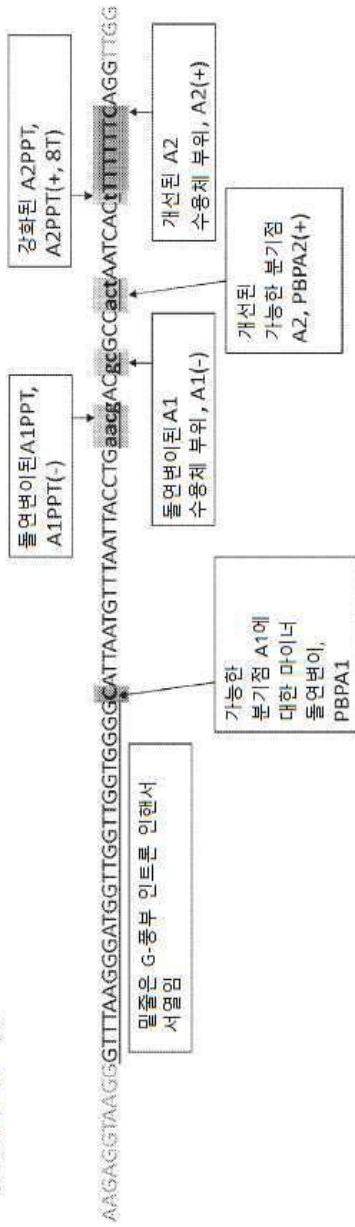


도면11



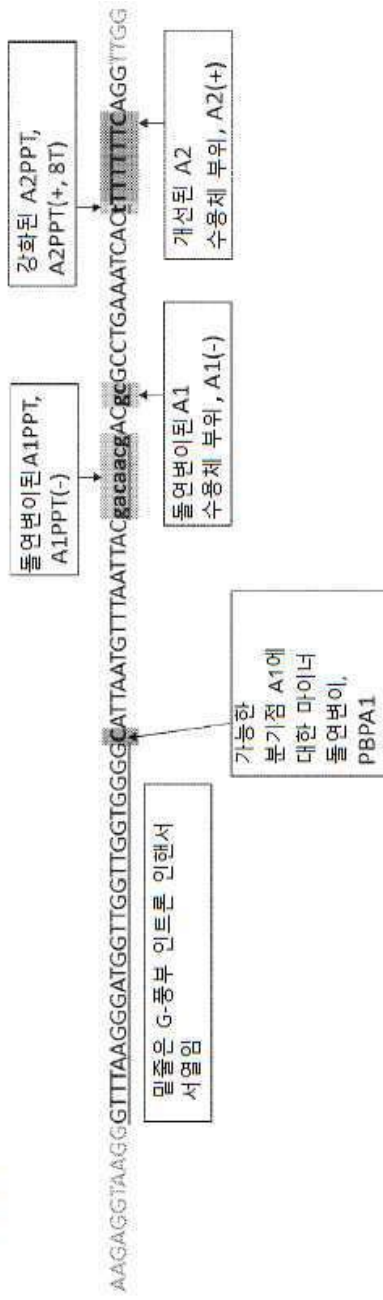
도면12

SBR 인트론 1.



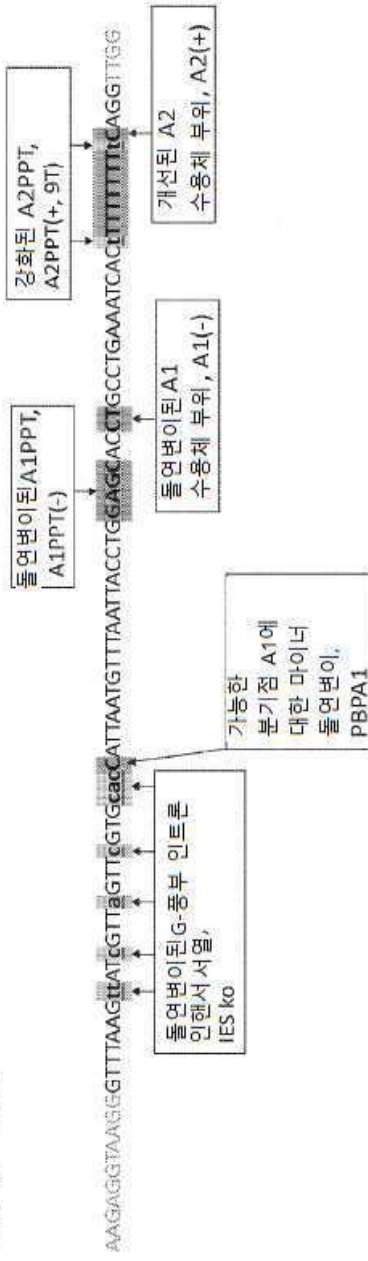
도면13

SBR 인트로 2.

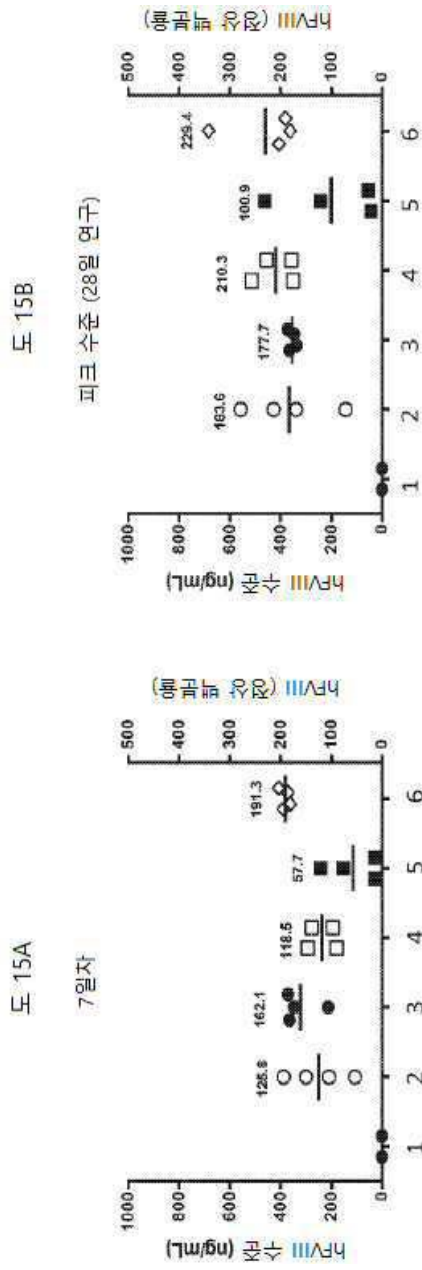


도면14

SBR 인트론 3.



도면15

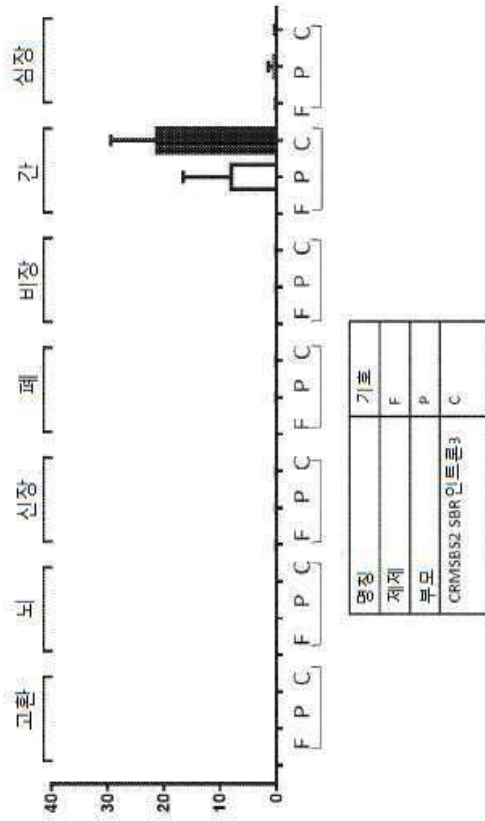


번호	명칭	도시원 도면
1	제제	-
2	복구	도 4
3	CRM/SRS2	도 7
4	CRM/SRS2 SBR 인트론1	도 8
5	CRM/SRS7 SBR 인트론7	도 8
6	CRM/SRS2 SBR 인트론2	도 8

도면16

도 16B

백터 유전체 (VGs), AAV2/6 생물분포



조직	기호
제제	F
부모	P
CRMSBS2 SBR 인트론3	C

도 16A

사람 인자 VIII (hFVIII) mRNA

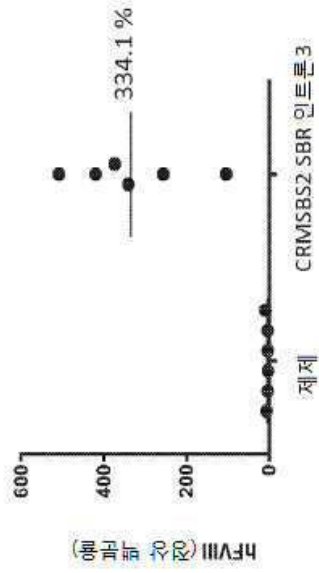


□ 옐린기호: 부모
 ■ 채운 기호: CRMSBS2 SBR 인트론

도면17

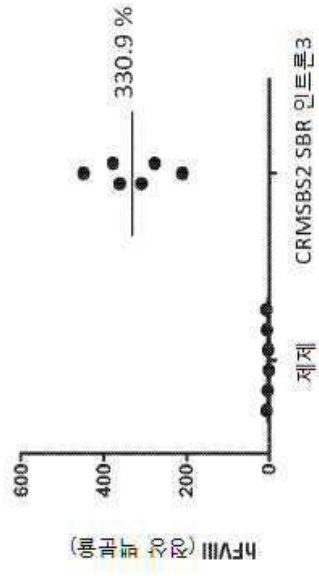
도 17A

14일차



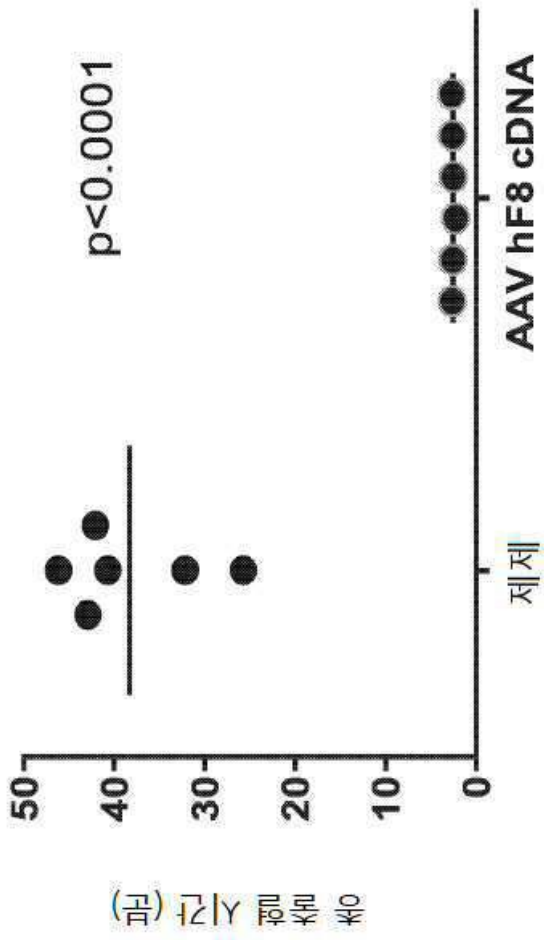
도 17B

42일차

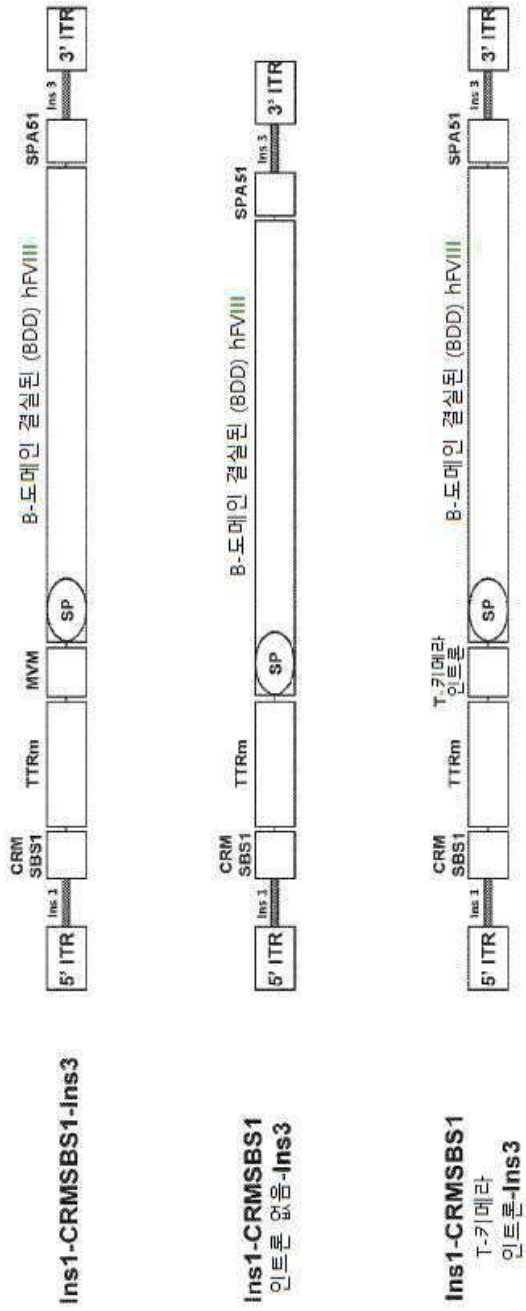


R593A 마우스 모델

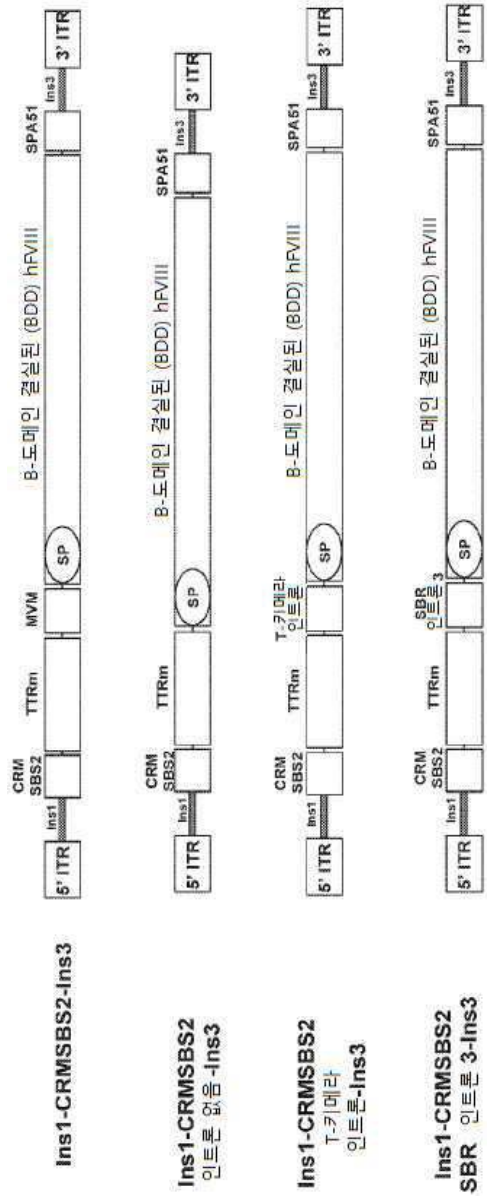
도면18



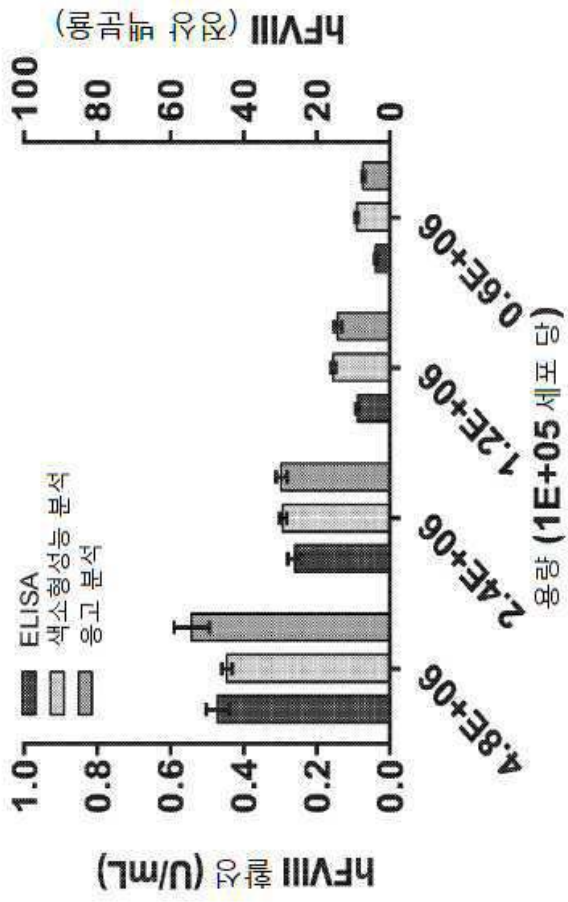
도면19



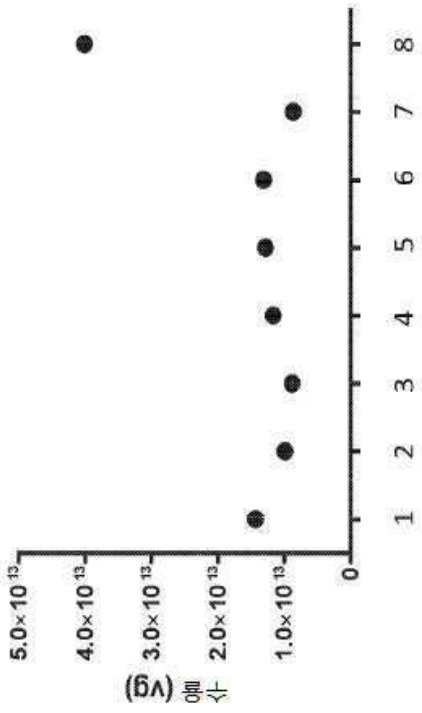
도면20



도면21

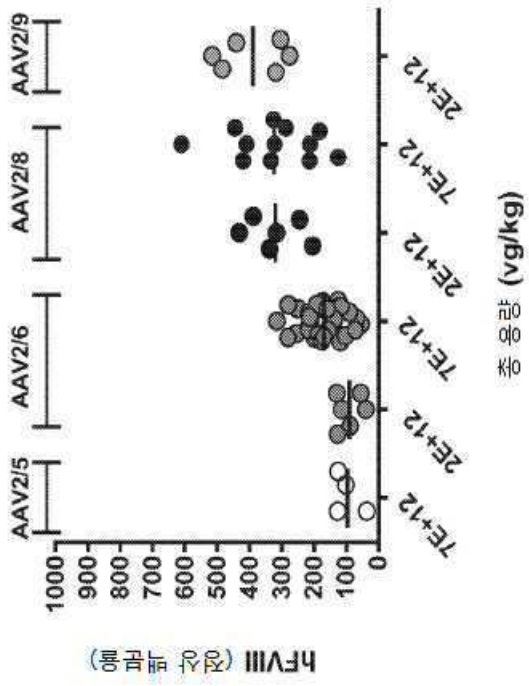


도면22

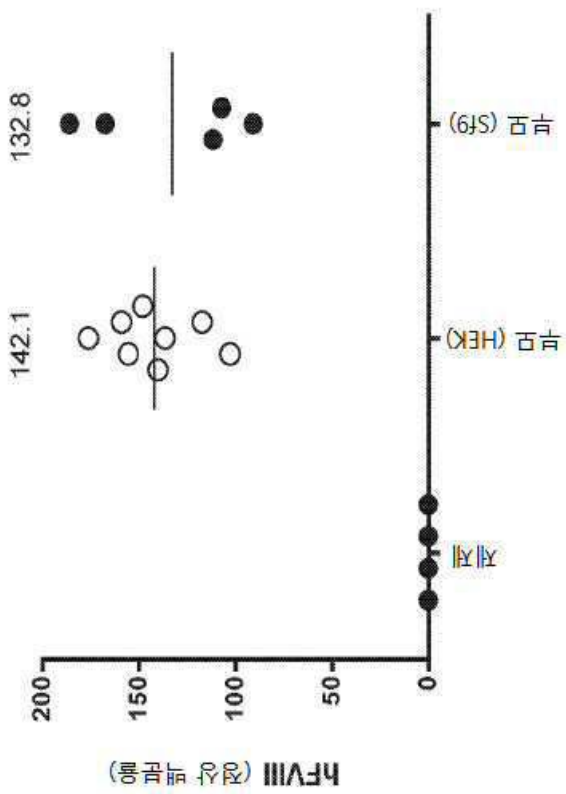


명칭	번호
Ins1-부모-Ins3	1
Ins1-CRMSBS1-Ins3	2
Ins1-CRMSBS1 인트론 없음-Ins3	3
Ins1-CRMSBS1 T-키메라 인트론-Ins3	4
Ins1-CRMSBS2-Ins3	5
Ins1-CRMSBS2 인트론 없음-Ins3	6
Ins1-CRMSBS2 T-키메라 인트론-Ins3	7
Ins1-CRMSBS2 SBR 인트론 3-Ins3	8

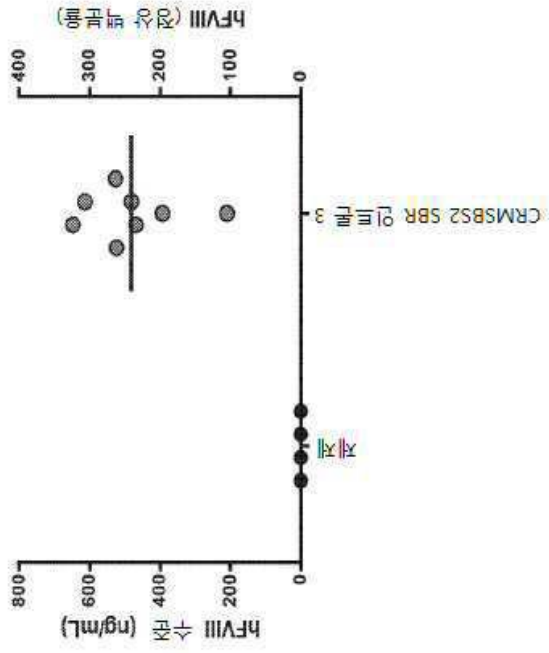
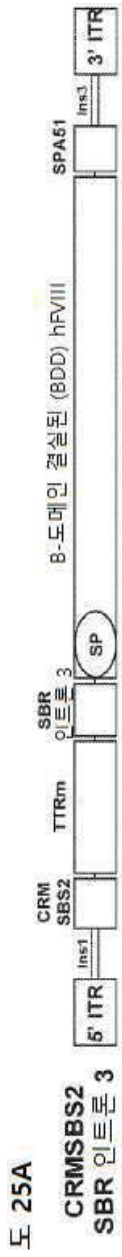
도면23



도면24



도면25



도면26

도 26A



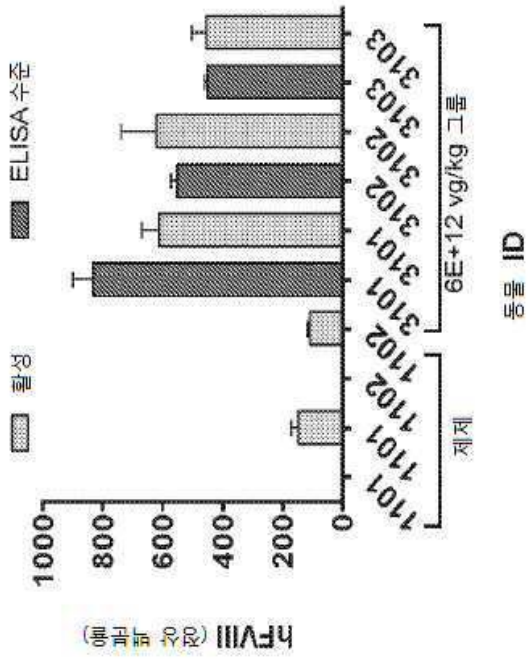
그룹	동물의 수		테스트 제품 식별기호	AAV 트랜스진 설명	혈장량	총 rAAV 용량 (μg/kg)
	수컷	수컷				
면역억제 요법 - 테스트 제품 주사 전						
1	1	3	SGMO.01	체제 완충액	NA	0
2	3	3	SGMO.02	hF8 eDNA 1	AAV2/6	2E+11
3	3	3	SGMO.03	hF8 eDNA 1	AAV2/6	6E+11
4	3	3	SGMO.04	hF8 eDNA 1	AAV2/6	2E+12
5	3	3	SGMO.05	hF8 eDNA 1	AAV2/6	6E+12
면역억제 요법 - 테스트 제품 주사 후						
6	1	3	SGMO.06	hF8 eDNA 1	NA	0
7	3	3	SGMO.07	hF8 eDNA 1	AAV2/6	2E+12
8	3	3	SGMO.08	hF8 eDNA 1	AAV2/6	6E+12

도 26B

그룹	동물의 수		테스트 제품 식별기호	AAV 트랜스진 설명	혈장량	총 rAAV 용량 (μg/kg)
	수컷	수컷				
2	3	3	SGMO.A	56일차에 그룹2 재투약 hF8 eDNA 1	AAV2/6	9E+11

vs. 벡터 유전자

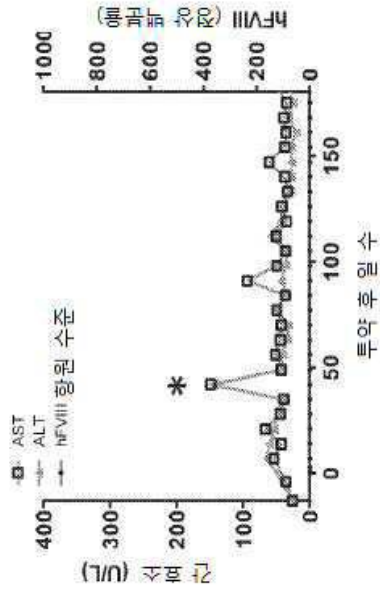
도면27



도면28

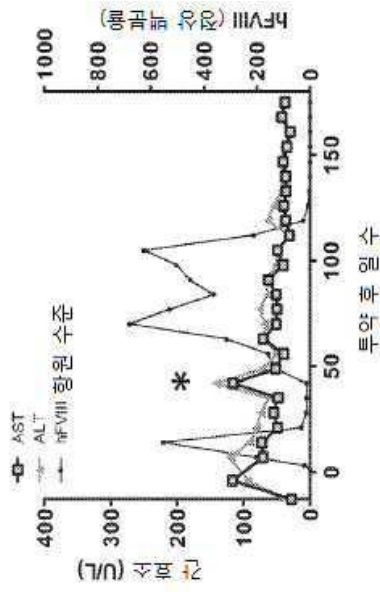
도 28A

제제
대조 그룹
(동물 ID 1101)



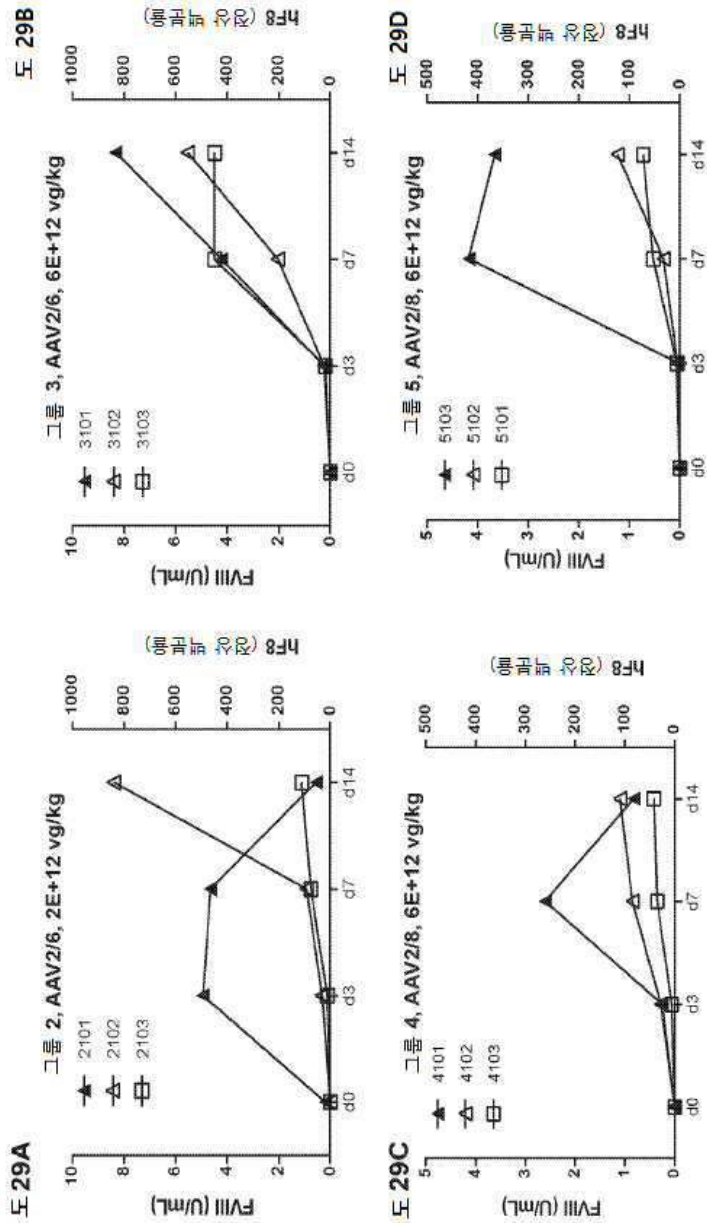
도 28B

그룹 3
6E+12 vg/kg
(동물 ID 3102)

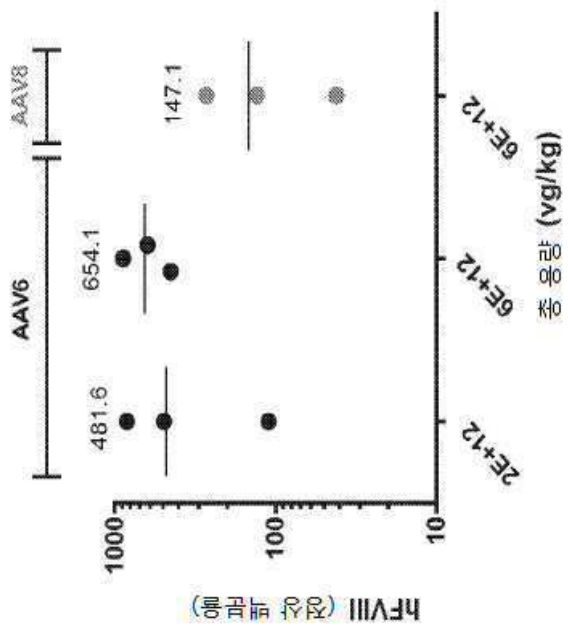


* 상승된 수준이 간 생검 후 관찰되었다 (41일차)

도면29



도면30



도면31

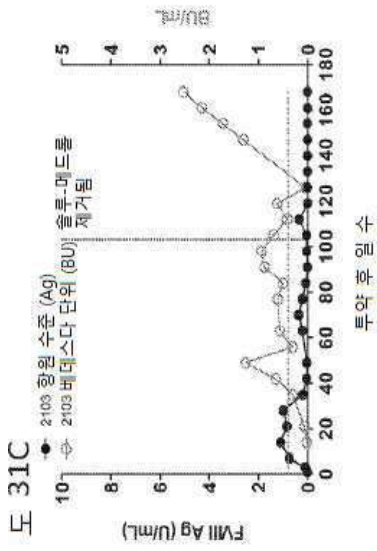
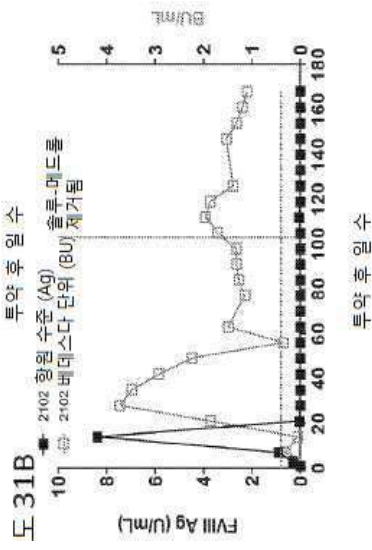
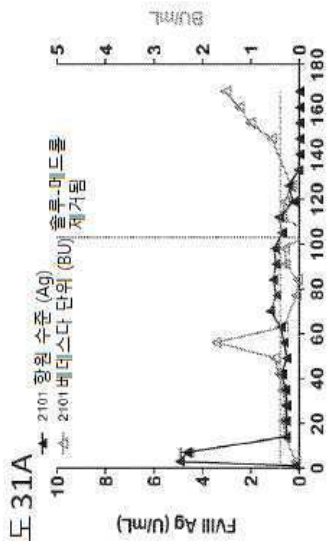


그림 2, AAV2/6, 2E+12 vg/kg



도면32

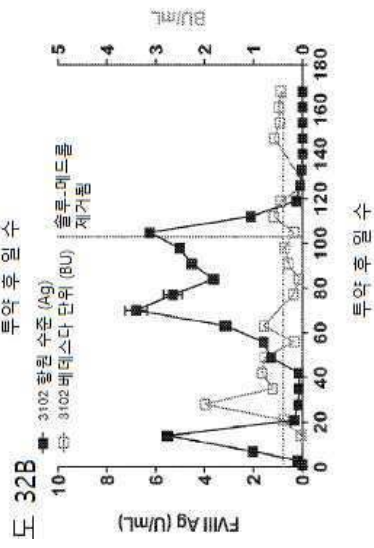
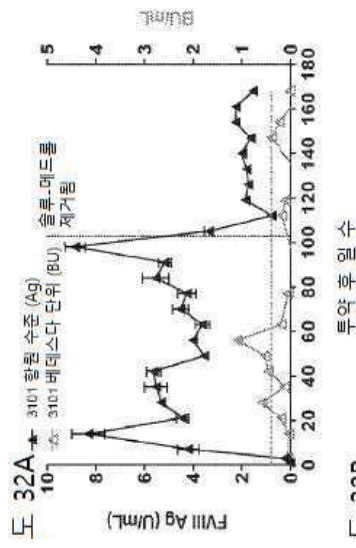
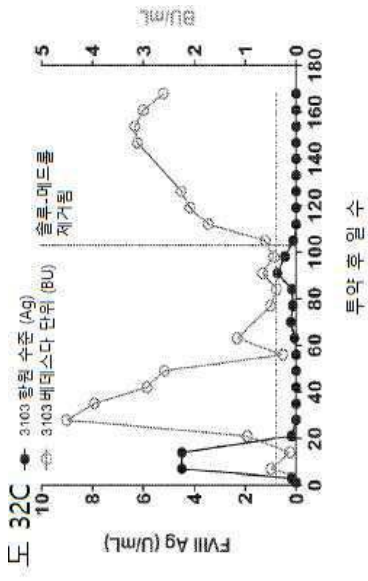
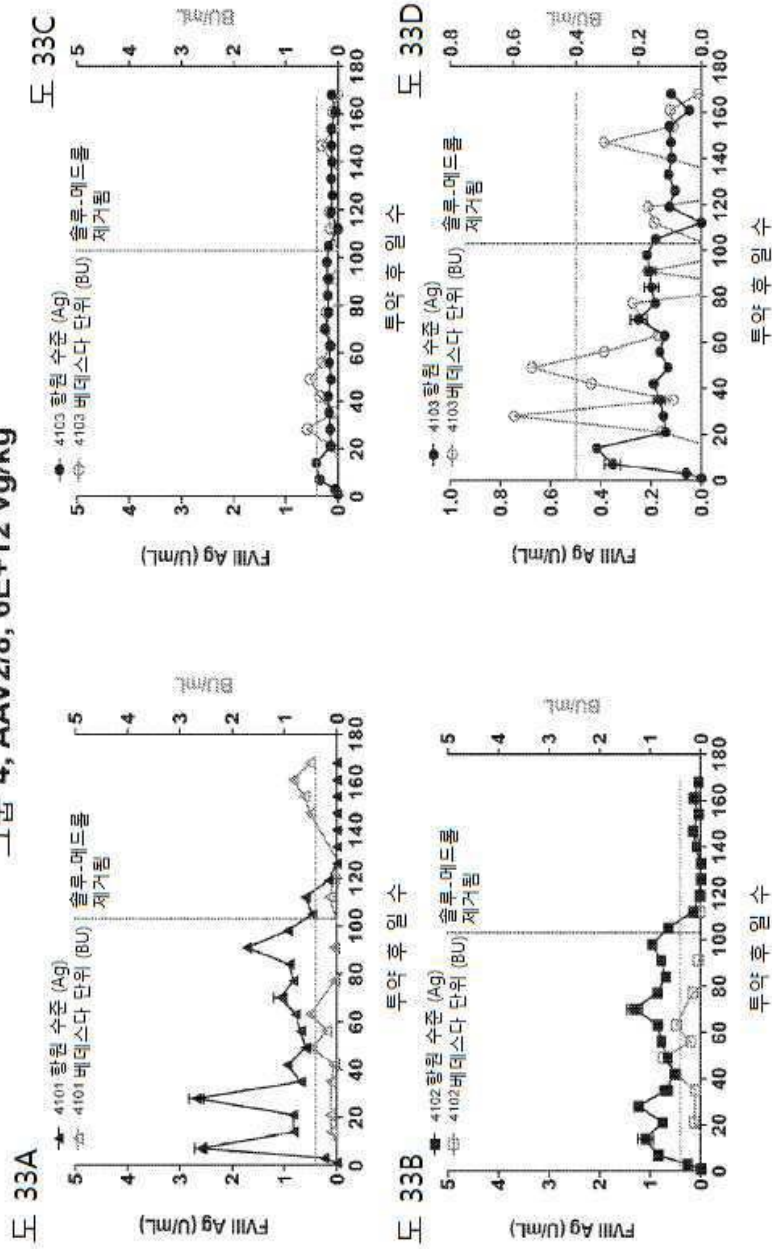


그림 3, AAV2/6, 6E+12 vg/kg

도면33

그림 4, AAV2/8, 6E+12 vg/kg



도면34abc

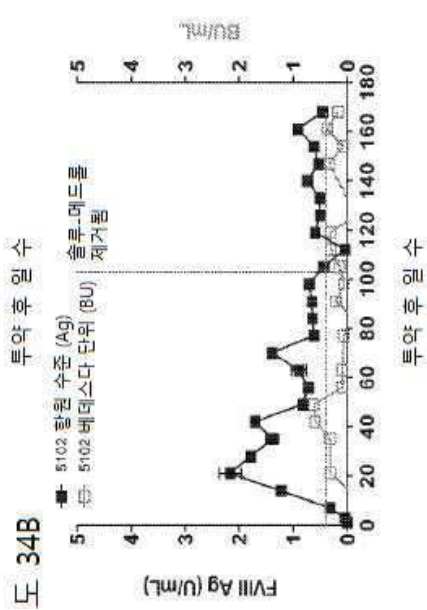
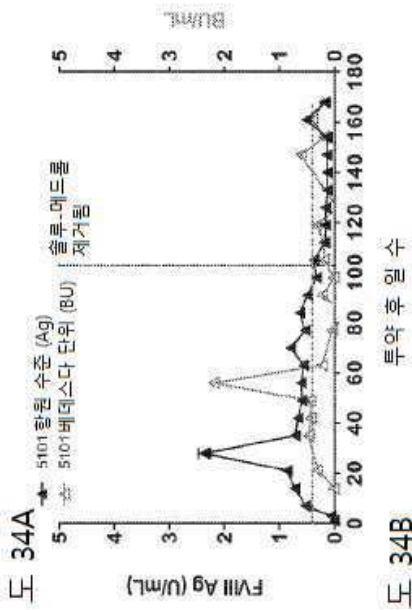
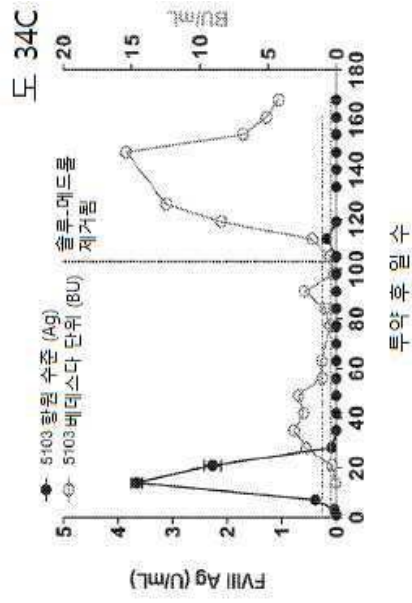


그림 5, AAV2/8, 6E+12 vg/kg

도면34de

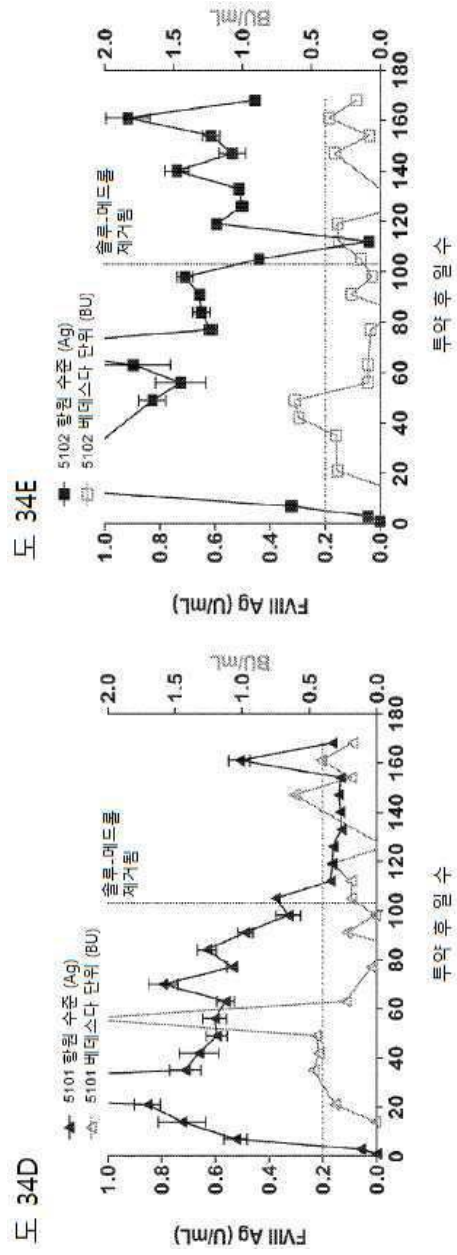
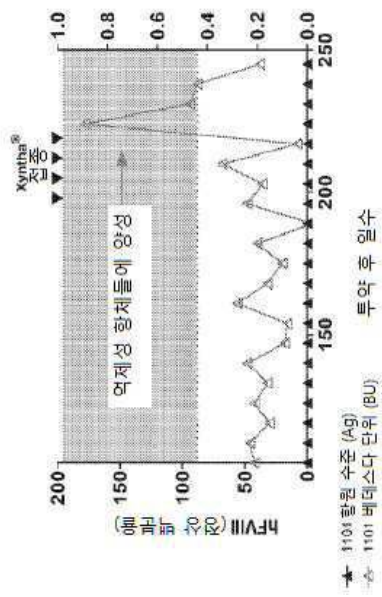


그림 5, AAV2/8, 6E+12 vg/kg

도면35ab

도 35A

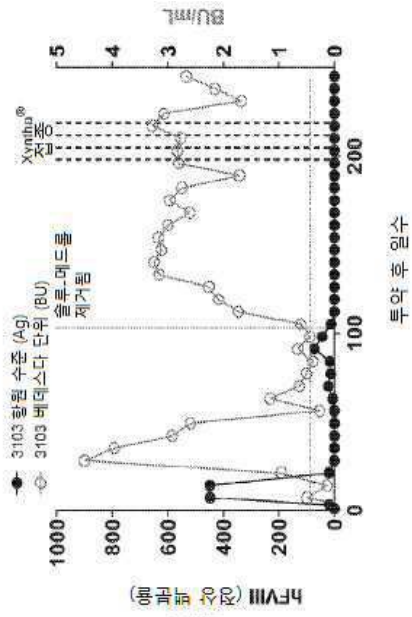
제제 대조 그룹 1



▲ 1104 칼립 수준 (Ag)
△ 1101 베타스타단위 (BU)

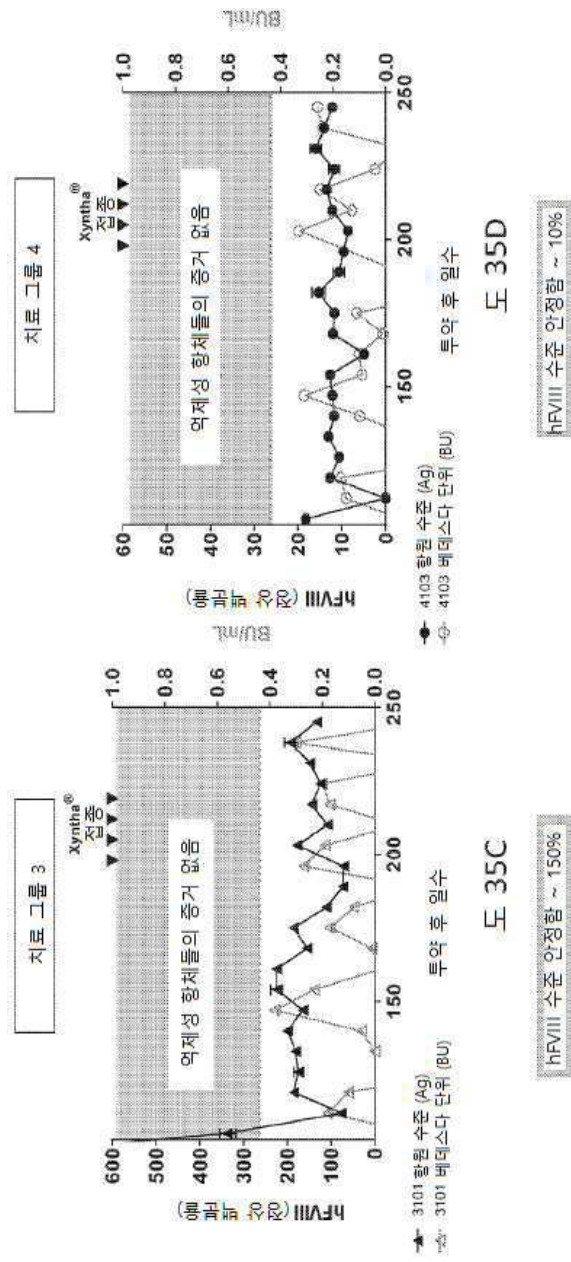
도 35B

치료 그룹 3

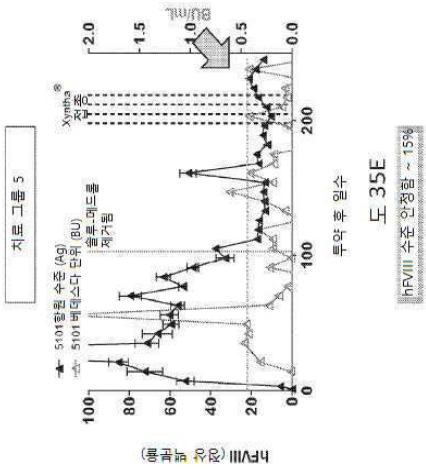
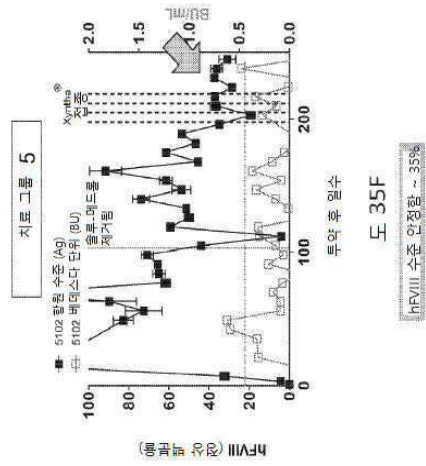


hFVIII 수준은 결코 회복되지 않음
양호한 BU 수준

도면35cd

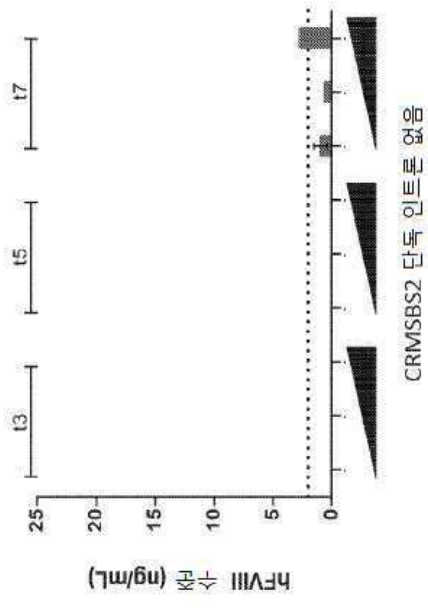


도면35ef

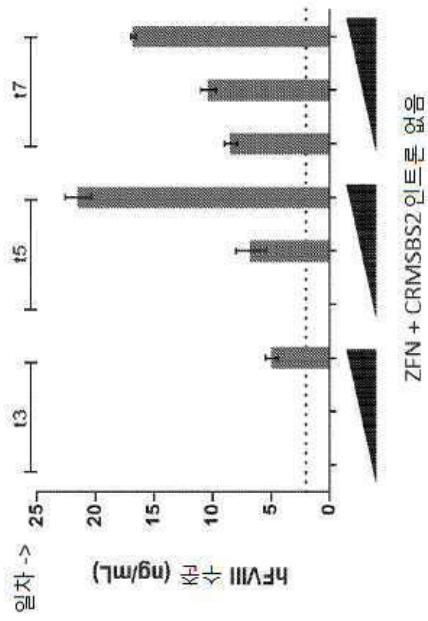


도면36

도 36B



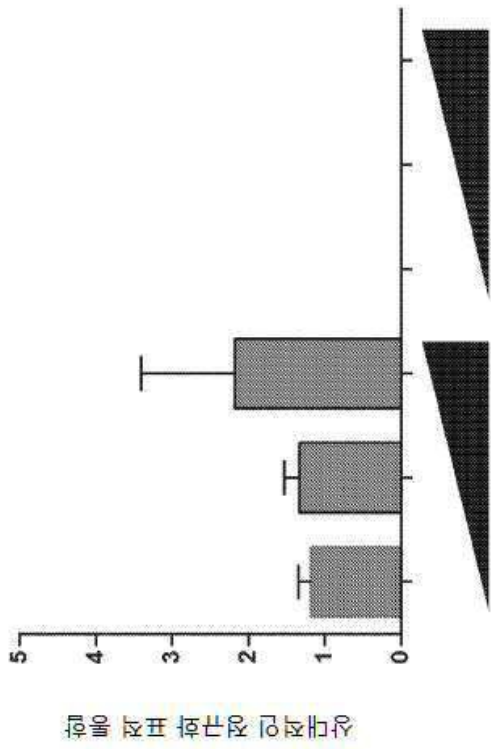
도 36A



= 트랜지스AAV 용량 : 3.0E+04 -> 1.2E+05

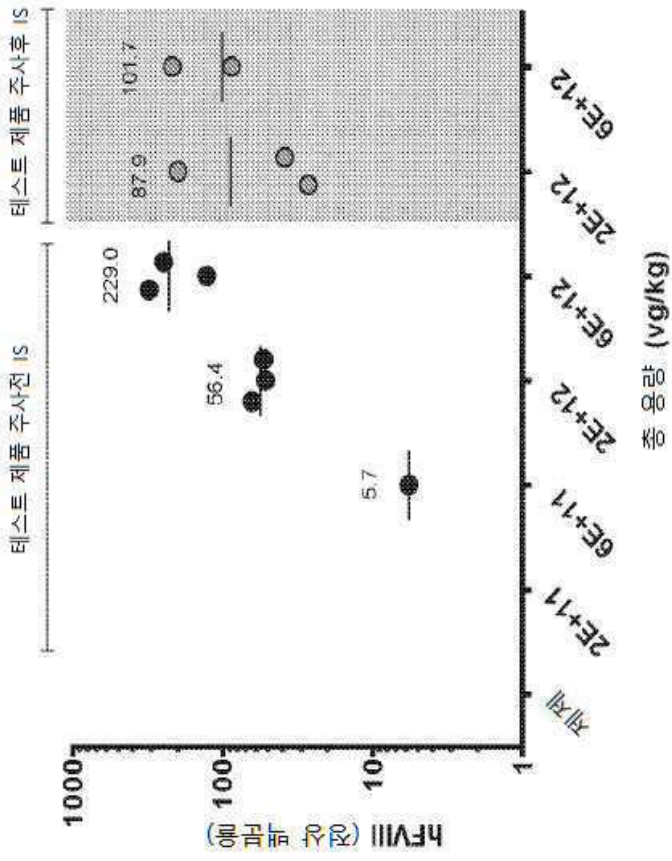
도면37

ZFN + CRMSBS2 인터론 없음 CRMSBS2 인터론 있음 단독

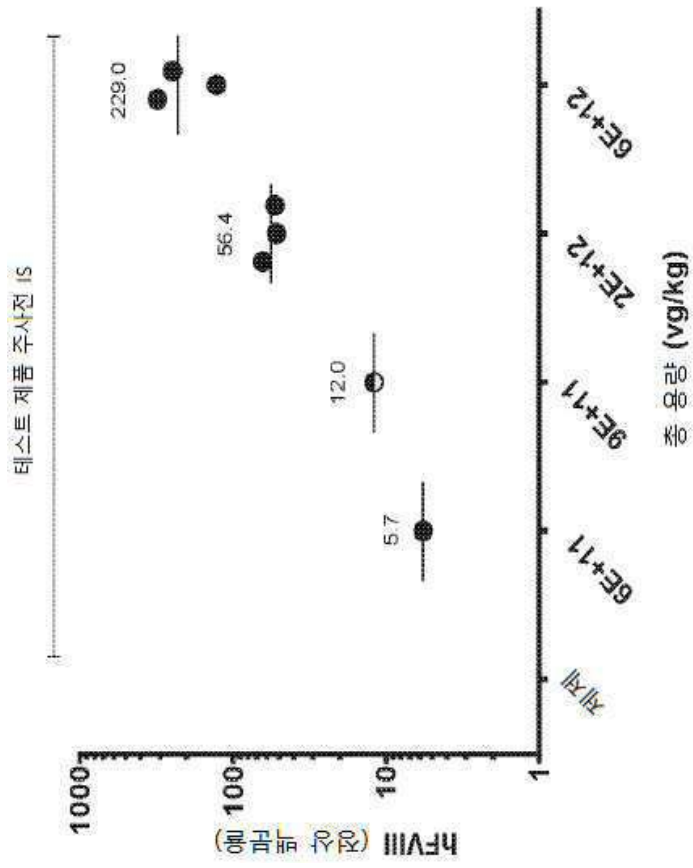


= 3.0E+04 -> 1.2E+05

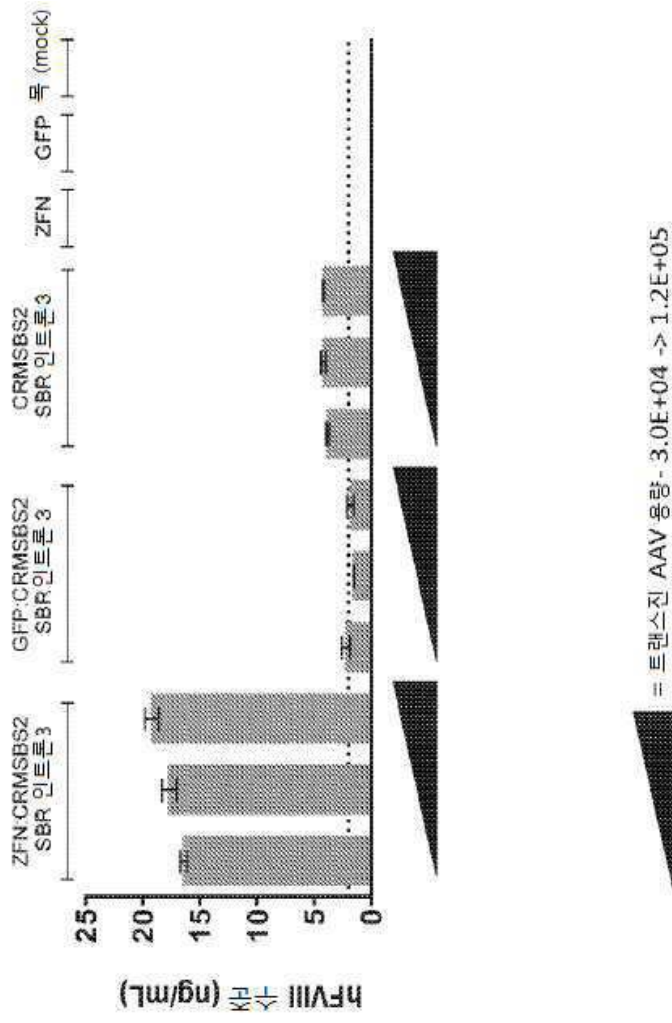
도면38



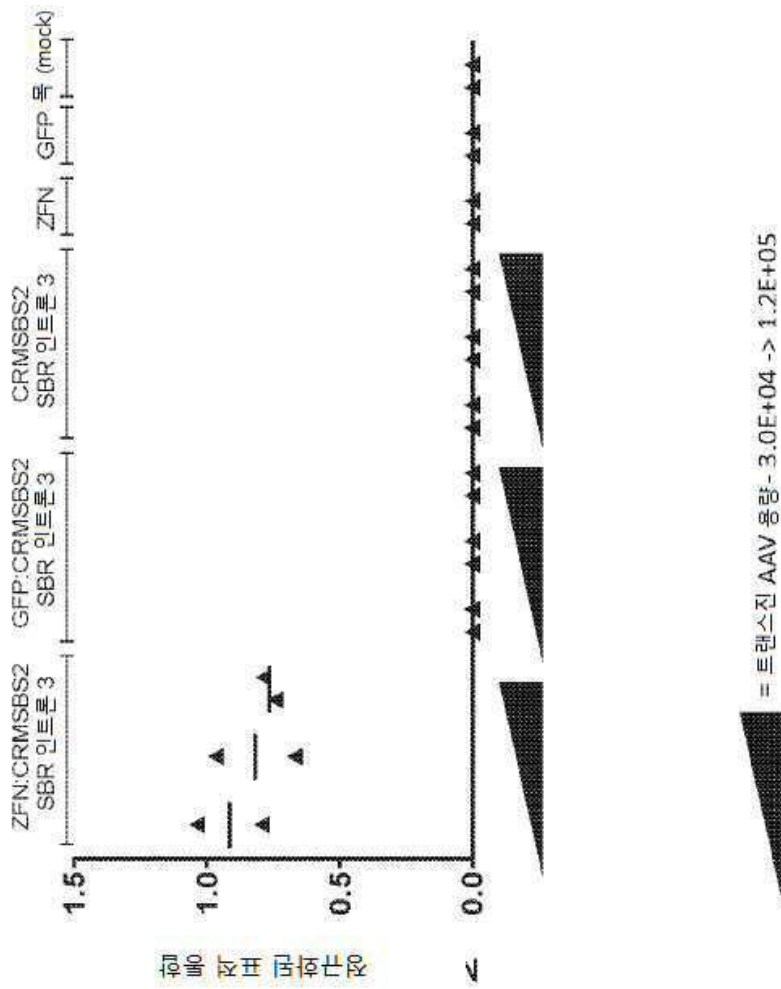
도면39



도면40a



도면40b



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> SANGAMO BIOSCIENCES, INC.

<120> LIVER-SPECIFIC CONSTRUCTS, FACTOR VIII EXPRESSION CASSETTES AND METHODS OF USE THEREOF

<130> 8325-0150.40

<140> PCT/US2016/042099

<141> 2016-07-13

<150> 62/355,106

<151> 2016-06-27

<150> 62/326,229

<151> 2016-04-22

<150> 62/315,438

<151> 2016-03-30

<150> 62/307,897
 <151> 2016-03-14
 <150> 62/247,469
 <151> 2015-10-28
 <160> 47
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 1
 gtcacccag ttatcggagg agcaaacagg ggctaagtcc 40
 <210> 2
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Pan troglodytes
 <400> 2
 gtcacccag ttatcggagg agcaaacagg ggctaagtcc 40
 <210> 3
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Gorilla sp.
 <400> 3
 gtcacccag ttatcggagg agcaaacagg ggctaagtcc 40
 <210> 4
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Pongo sp.
 <400> 4
 gtcacccag ttatcggagg agcaaacagg ggctaagtcc 40
 <210>
 > 5
 <211> 40
 <212> DNA

<213> Unknown
 <220><223> Description of Unknown: Oligonucleotide from
 Gibbon species
 <400> 5
 gtcacccag ttatcggagg agcaaacagg ggctaagtcc 40
 <210> 6
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Macaca mulatta
 <400> 6
 atcacccag ttaccggagg agcaaacagg gactaagttc 40
 <210> 7
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Macaca fascicularis
 <400> 7
 atcacccag ttaccggagg agcaaacagg gactaagttc 40
 <210> 8

 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Papio sp.
 <400> 8
 atcacccag ttaccggagg agcaaacagg gactaagttc 40
 <210> 9
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Chlorocebus sabaues
 <400> 9
 atcacccag ttaccggagg agcaaacagg gactaagttc 40
 <210> 10
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Unknown
 <220><223> Description of Unknown: Oligonucleotide from

Callitrichidae family

<400> 10
 gtcagcccag ttatcggagg agcaaacagg ggctaagtcc 40
 <210> 11

 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Saimiri sp.
 <400> 11
 gtcagcccag ttaccggagg agcaaacagg gctaagtcc 39
 <210> 12
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Unknown
 <220><223> Description of Unknown: Oligonucleotide from
 Bush baby species
 <400> 12
 gtcaccagtt taccaggagg caaacaggag ctaagtcc 38
 <210> 13
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Mus sp.
 <400> 13
 gtcaccacag ttattgtag agcaaacagg ggctatgtcc 40
 <210> 14
 <211> 88

 <212> DNA
 <213> Minute virus of mice
 <400> 14
 aagaggtaag ggtttaaggg atggttggtt ggtgggtat taatgtttaa ttacctgttt 60
 tacaggcctg aatcacttg gttttagg 88
 <210> 15
 <211> 92
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 15
 aagagtaag ggtttaagg atggttggtt ggtggggcat taatgtttaa ttacctgaac 60
 gacgcgccac taatcacttt ttttcaggtt gg 92

<210> 16
 <211> 92
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 16
 aagagtaag ggtttaagg atggttggtt ggtggggcat taatgtttaa ttacgacaac 60
 gacgcgctg aaatcacttt ttttcaggtt gg 92

<210> 17
 <211> 94
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 17
 aagagtaag ggtttaagtt atcgtagtt cgtgcacat taatgtttaa ttacctggag 60
 cacctgcctg aaatcacttt tttttcagg ttgg 94

<210> 18
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 18
 ggagatgaag aaggaggact ttg 23

<210> 19

<211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 probe
 <400> 19
 acatctacga cgaggacgag aacca 25

<210> 20
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 20
 tccacagcag caatgaagta g 21

<210> 21
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 21
 cctgggccag ttctgct 18

<210> 22
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 ><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 probe
 <400> 22
 ttctgccaca tcagcagcca cca 23

<210> 23
 <211> 18

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 23
 ggctccatg ccatcatg 18
 <210> 24
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 24
 agtgcaaagt aacttagagt gact 24
 <210> 25
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 probe
 <400> 25
 ccatcactag gggttcctgc ggcct 25
 <210> 26
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 26
 cctgaaggtg gcaatggt 18
 <210> 27
 <400> 27
 000

<210> 28
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 28
 ggaaccattg ccaccttca 19
 <210> 29
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 29
 ctatccattg cactatgct 19
 <210> 30
 <211> 18

 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 30
 tttcctgtaa cgatcggg 18
 <210> 31
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 31
 aataaaatat cttattttc attacatctg tgtgttggtt ttttgtgtgt t 51
 <210> 32
 <211> 69

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223

> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 32

ataaaatate tttattttca ttacatctgt gtgttggtt tttgtgtgtt ctatccattg 60

cactatgct 69

<210> 33

<211> 68

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 33

aataaaatat cttattttc attacatctg tgtgttggtt tttgtgtgt tttccgttaa 60

cgatcggg 68

<210> 34

<211> 4800

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 34

gcggcctaag cttggaacca ttgccacctt cagggggagg ctgctggtga atattaacca 60

agatcacccc agttaccgga ggagcaaaca gggactaagt tcacacgct ggtaccgtct 120

gtctgcacat ttcgtagagc gagtgttccg atactctaata ctccttaggc aaggttcata 180

tttgtgtagg ttacttattc tccttttgtt gactaagtca ataatacagaa tcagcaggtt 240

tggagtcagc ttggcagggg tcagcagcct gggttgggaag gagggggtat aaaagcccct 300

tcaccaggag aagccgtcac acagatccac aagctcctgc tagtatgcag atcgagctct 360

ccacctgctt ctttctgtgc ctgttgagat tctgcttcag cgccaccagg agatactacc 420

tggggctgt ggagctgagc tgggactaca tgcagtctga cctgggggag ctgcctgtgg 480

atgccaggtt ccccccaaga gtgcccaaga gcttcccctt caacacctct gtggtgtaca 540

agaagacct gtttgtggag ttcactgacc acctgttcaa cattgccaag cccaggcccc 600
 cctggatggg cctgctgggc cccaccatcc aggctgaggt gtatgacct gtggtgatca 660
 ccctgaagaa catggccagc caccctgtga gcctgcatgc tgtgggggtg agctactgga 720

 aggcctctga gggggctgag tatgatgacc agaccagcca gagggagaag gaggatgaca 780
 aggtgttccc tgggggcagc cacacctatg tgtggcaggt gctgaaggag aatggcccca 840
 tggcctctga ccccctgtgc ctgacctaca gctacctgag ccatgtggac ctggtgaagg 900
 acctgaactc tggcctgatt ggggcctgc tgggtgacag ggagggcagc ctggccaagg 960
 agaagacca gaccctgac aagttcatcc tgctgtttgc tgtgtttgat gagggaaga 1020
 gctggcactc tgaaccaag aacagcctga tgcaggacag ggatgctgcc tctgccaggg 1080
 cctggcccaa gatgcacct gtgaatggct atgtgaacag gagcctgcct gcctgattg 1140

 gctgccacag gaagtctgtg tactggcatg tgattggcat gggcaccacc cctgaggtgc 1200
 acagcatctt cctggagggc cacaccttc tggtcaggaa ccacaggcag gccagcctgg 1260
 agatcagccc catcaccttc ctgactgcc agaccctgct gatggacctg ggccagtcc 1320
 tgctgttctg ccacatcagc agccaccagc atgatggcat ggaggcctat gtgaaggtgg 1380
 acagctgccc ttaggagccc cagctgagga tgaagaaca ttaggaggct gaggactatg 1440
 atgatgacct gactgactct gagatggatg tggtaggtt tgatgatgac aacagccca 1500
 gcttcatcca gatcaggtct gtggccaaga agcaccacca gacctgggtg cactacattg 1560

 ctgctgagga ggaggactgg gactatgccc ccctggtgct ggcccctgat gacaggagct 1620
 acaagagcca gtacctgaac aatggccccc agaggattgg caggaagtac aagaaggtca 1680
 ggttcatggc ctacactgat gaaaccttca agaccaggga ggccatccag catgagtctg 1740
 gcatcctggg ccccctgctg tatggggagg tgggggacac cctgctgac atcttcaaga 1800
 accaggccag caggccctac aacatctacc cccatggcat cactgatgtg aggccctgt 1860
 acagcaggag gctgccaag ggggtgaagc acctgaagga cttcccac cctgctgggg 1920
 agatcttcaa gtacaagtgg actgtgactg tggaggatgg cccaccaag tctgaccca 1980

 ggtgcctgac cagatactac agcagctttg tgaacatgga gagggacctg gcctctggcc 2040
 tgattggccc cctgctgac tgctacaagg agtctgtgga ccagaggggc aaccagatca 2100
 tgtctgaaa gaggaatgtg atcctgttct ctgtgtttga tgagaacagg agctggtacc 2160
 tgactgagaa catccagagg ttctgcca acctgctgg ggtgcagctg gaggacctg 2220
 agttccagc cagcaacac atgcacagca tcaatggcta tgtgtttgac agcctgcagc 2280
 tgtctgtgtg cctgcatgag gtggcctact ggtacatcct gagcattggg gccagactg 2340

acttcctgtc tigtcttctc tctggctaca cttcaagca caagatgggtg tatgaggaca 2400

ccctgacct gttccccttc tctggggaga ctgtgttcat gagcatggag aaccctggcc 2460

tgtggattct gggtgccac aactctgact tcaggaacag gggcatgact gccttctga 2520

aagtctccag ctgtgacaag aacctgggg actactatga ggacagctat gaggacatct 2580

ctgcctacct gctgagcaag aacaatgcca ttgagcccag gagcttcagc cagaatccac 2640

ccgtccttaa gcgcatcag cgcgagatca ccaggaccac cctgcagtct gaccaggagg 2700

agattgacta tgatgacacc atctctgtgg agatgaagaa ggaggacttt gacatctacg 2760

acgaggacga gaaccagagc cccaggagct tccagaagaa gaccaggcac tacttcattg 2820

ctgctgtgga gaggctgtgg gactatggca tgagcagcag ccccatgtg ctgaggaaca 2880

gggcccagtc tgctctgtg cccagttca agaaggtggt gttccaggag ttcactgatg 2940

gcagcttca cccagccctg tacagagggg agctgaatga gcacctgggc ctgctgggcc 3000

cctacatcag ggctgaggtg gaggacaaca tcatggtgac cttcaggaac caggccagca 3060

ggccctacag ctctacagc agcctgatca gctatgagga ggaccagagg cagggggctg 3120

agcccaggaa gaactttgtg aagcccaatg aaaccaagac ctacttctgg aaggtgcagc 3180

accacatggc ccccaccaag gatgagtttg actgcaaggc ctgggcctac ttctctgatg 3240

tggacctgga gaaggatgtg cactctggcc tgattggccc cctgctggtg tgccacacca 3300

acaccctgaa ccctgcccac ggcaggcagg tgactgtgca ggagtttgcc ctgttcttca 3360

ccatctttga tgaaccaag agctggtact tctactgagaa catggagagg aactgcaggg 3420

ccccctgaa catccagatg gaggacceca cttcaagga gaactacagg ttccatgcca 3480

tcaatggcta catcatggac accctgcctg gcctggtgat ggcccaggac cagaggatca 3540

ggtggtacct gctgagcat ggcagcaatg agaacatcca cagcatccac ttctctggcc 3600

atgtgttca c tgtgaggaag aaggaggagt acaagatggc cctgtacaac ctgtaccctg 3660

gggtgtttga gactgtggag atgctgcca gcaaggctgg catctggagg gtggagtgcc 3720

tgattgggga gcacctgcat gctggcatga gcacctgtt cctggtgtac agcaacaagt 3780

gccagacccc cctgggcatg gcctctggcc acatcagga cttccagatc actgcctctg 3840

gccagtatgg ccagtgggcc cccaagctgg ccaggctgca ctactctggc agcatcaatg 3900

cctggagcac caaggagccc ttcagctgga tcaaggtgga cctgctggcc cccatgatca 3960

tccatggcat caagaccag ggggccaggc agaagttcag cagcctgtac atcagccagt 4020

tcatcatcat gtacagcctg gatggcaaga agtggcagac ctacaggggc aacagcactg 4080

gcacctgat ggtgttcttt ggcaatgtgg acagctctgg catcaagcac aacatcttca 4140
 acccccccatt cattgccaga tacatcaggc tgcacccac cactacagc atcaggagca 4200
 ccctgaggat ggagctgatg ggctgtgacc tgaacagctg cagcatgccc ctgggcatgg 4260
 agagcaaggc catctctgat gccagatca ctgccagcag ctacttcacc aacatgtttg 4320
 ccacctggag cccagcaag gccaggctgc atctgcaggg caggagcaat gcctggaggc 4380
 cccaggtcaa caacccaag gagtggctgc agtggactt ccagaagacc atgaaggtga 4440
 ctgggggtgac caccagggg gtgaagagcc tgctgaccag catgtatgtg aaggagtcc 4500

tgatcagcag cagccaggat ggccaccagt ggaccctgtt cttccagaat ggcaaggtga 4560
 aggtgttcca gggcaaccag gacagcttca ccctgtggt gaacagcctg gaccccccc 4620
 tgctgaccag atacctgagg attcaccacc agagctgggt gcaccagatt gcctgagga 4680
 tggaggtgct ggctgtgag gccaggacc tgtactgagg atccaataaa atatctttat 4740
 tttcattaca tctgtgtgtt ggtttttgt gtgttttct gtaacgatcg ggctcgagcg 4800

<210> 35

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 35

gggggaggct gctggtgaat attaaccaag atcagcccag ttaccggagg agcaaacagg 60
 ggctaagtac ac 72

<210> 36

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 36

gggggaggct gctggtgaat attaaccaag atcaccacag ttaccggagg agcaaacagg 60
 gactaagtac ac 72

<210> 37

<211> 4894

<212> DNA

<213

> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 37

```

gcggcctaag cttggaacca ttgccacctt cagggggagg ctgctggtga atattaacca      60
agatcacccc agttaccgga ggagcaaaca gggactaagt tcacacgctg ggtaccgtct      120
gtctgcacat ttcgtagagc gagtgttccg atactcta at ctccttaggc aaggttcata      180
tttgttagg ttacttattc tccttttgtt gactaagtca ataatcagaa tcagcaggtt      240
tggagtcagc ttggcaggga tcagcagcct gggttgaag gagggggtat aaaagccct      300
tcaccaggag aagccgtcac acagatccac aagctcctga agaggaagg gtttaagtta      360

tcgttagttc gtgcaccatt aatgtttaat tacctggagc acctgcctga aatcattttt      420
ttttcaggtt ggctagtatg cagatcgagc tctccacctg cttctttctg tcctgttga      480
gattctgctt cagcgcacc aggagatact acctgggggc tgtggagctg agctgggact      540
acatgcagtc tgacctgggg gagctgcctg tggatgccag gttccccccc agagtgccca      600
agagcttccc ctcaacacc tctgtggtgt acaagaagac cctgtttgtg gagttcactg      660
accacctgtt caacattgcc aagcccaggc cccctggat gggcctgctg ggccccacca      720
tccaggctga ggtgatgac actgtggtga tcacctgaa gaacatggcc agccacctg      780

tgagcctgca tgctgtgggg gtgagctact ggaaggcctc tgaggggct gagtatgatg      840
accagaccag ccagaggag aaggaggatg acaagggtt cctgggggc agccacacct      900
atgtgtggca ggtgctgaag gagaatggcc ccatggcctc tgacccctg tcctgacct      960
acagctacct gagccatgtg gacctggtga aggacctgaa ctctggcctg attggggccc      1020
tgctggtgtg cagggagggc agcctggcca aggagaagac ccagaccctg cacaagttea      1080
tcctgctgtt tgctgtgttt gatgagggca agagctggca ctctgaaacc aagaacagcc      1140
tgatgcagga cagggatgct gcctctgcca gggcctggcc caagatgcac actgtgaatg      1200

gctatgtgaa caggagcctg cctggcctga ttggctgcca caggaagtct gtgtactggc      1260
atgtgattgg catgggcacc acccctgagg tgcacagcat cttcctggag ggccacacct      1320
tcctggtcag gaaccacagg caggccagcc tggagatcag ccccatcacc ttctgactg      1380
cccagacct gctgatggac ctgggccagt tcctgctgtt ctgccacatc agcagccacc      1440
agcatgatgg catggaggcc tatgtgaagg tggacagctg ccctgaggag ccccagctga      1500
ggatgaagaa caatgaggag gctgaggact atgatgatga cctgactgac tctgagatgg      1560

```

atgtggtgag gttt gatgat gacaacagcc ccagcttcat ccagatcagg tctgtggcca 1620

 agaagcacc caagacctgg gtgcaactaca ttgctgctga ggaggaggac tgggactatg 1680
 cccccctggt gctggcccct gatgacagga gctacaagag ccagtacctg aacaatggcc 1740
 cccagaggat tggcaggaag tacaagaagg tcaggttcat ggcctacact gatgaaacct 1800
 tcaagaccag ggaggccatc cagcatgagt ctggcatcct gggccccctg ctgtatgggg 1860
 aggtggggga caccctgctg atcatcttca agaaccaggc cagcaggccc tacaacatct 1920
 acccccatgg catcactgat gtgaggcccc tgtacagcag gaggctgccc aaggggggtga 1980
 agcacctgaa ggacttcccc atcctgctctg gggagatctt caagtacaag tggactgtga 2040

 ctgtggagga tggccccacc aagtctgacc ccaggtgcct gaccagatac tacagcagct 2100
 ttgtgaacat ggagagggac ctggcctctg gcctgattgg cccctgctg atctgctaca 2160
 aggagtctgt ggaccagagg ggcaaccaga tcatgtctga caagaggaat gtgatcctgt 2220
 tctctgtgtt tgatgagaac aggagctggt acctgactga gaacatccag aggttctctgc 2280
 ccaaccctgc tggggtgcag ctggaggacc ctgagttcca ggccagcaac atcatgcaca 2340
 gcatcaatgg ctatgtgttt gacagcctgc agctgtctgt gtgcctgcat gagtggcct 2400
 actggtacat cctgagcatt ggggcccaga ctgacttctt gtctgtgttc ttctctggct 2460

 acaccttcaa gcacaagatg gtgtatgagg acaccctgac cctgttcccc ttctctgggg 2520
 agactgtgtt catgagcatg gagaacctg gcctgtggat tctgggctgc cacaactctg 2580
 acttcagaa caggggcatg actgcctgc taaaagtctc cagctgtgac aagaactg 2640
 gggactacta tgaggacagc tatgaggaca tctctgcta cctgctgagc aagaacaatg 2700
 ccattgagcc caggagcttc agccagaatc caccctcct taagcggcat cagcgcgaga 2760
 tcaccaggac caccctgac tctgaccagg aggagattga ctatgatgac accatctctg 2820
 tggagatgaa gaaggaggac tttgacatct acgacgagga cgagaaccag agccccagga 2880

 gcttcagaa gaagaccagg cactacttca ttgctgctgt ggagaggctg tgggactatg 2940
 gcatgagcag cagccccat gtgctgagga acagggccca gtctggctct gtgccccagt 3000
 tcaagaaggt ggigtccag gagttcactg atggcagctt caccagccc ctgtacagag 3060
 gggagctgaa ttagcacctg ggcctgctgg gccctacat cagggtgag gtggaggaca 3120
 acatcatggt gaccttcagg aaccaggcca gcaggcccta cagcttctac agcagcctga 3180
 tcagctatga ggaggaccag aggcaggggg ctgagcccag gaagaacttt gtgaagccca 3240
 atgaaaccaa gacctactt tggaggtgc agcaccacat ggccccacc aaggatgagt 3300

ttgactgcaa ggcttgggcc tacttctctg atgtggacct ggagaaggat gtgcactctg 3360
 gcctgattgg cccctgctg gtgtgccaca ccaacacct gaacctgcc catggcaggc 3420
 aggtgactgt gcaggagttt gccctgttct tcaccatctt tgatgaaacc aagagctggt 3480
 acttcaactga gaacatggag aggaactgca gggccccctg caacatccag atggaggacc 3540
 ccaccttcaa ggagaactac aggttccatg ccatcaatgg ctacatcatg gacacctgc 3600
 ctggcctggt gatggcccag gaccagagga tcaggtggta cctgctgagc atgggcagca 3660
 atgagaacat ccacagcatc cacttctctg gccatgtgtt cactgtgagg aagaaggagg 3720

agtacaagat ggcctgtac aacctgtacc ctgggtgtt tgagactgtg gagatgctgc 3780
 ccagcaaggc tggcatctgg aggggtggagt gcctgattgg ggagcacctg catgctggca 3840
 tgagcacctt gttctgtgtg tacagcaaca agtgccagac cccctgggc atggcctctg 3900
 gccacatcag ggacttccag atcactgcct ctggccagta tggccagtgg gcccccaagc 3960
 tggccaggct gcactactct ggcagcatca atgcctggag caccaaggag cccttcagct 4020
 ggatcaaggt ggacctgctg gccccatga tcatccatgg catcaagacc cagggggcca 4080
 ggcagaagtt cagcagcctg tacatcagcc agttcatcat catgtacagc ctggatggca 4140

agaagtggca gacctacagg ggcaacagca ctggcacct gatggtgttc tttggcaatg 4200
 tggacagctc tggcatcaag cacaacatct tcaaccccc catcattgcc agatacatca 4260
 ggctgcacc caccactac agcatcagga gcacctgag gatggagctg atgggctgtg 4320
 acctgaacag ctgcagcatg cccctgggca tggagagcaa ggccatctct gatgcccaga 4380
 tcactgccag cagctacttc accaacaatgt ttgccacctg gagccccagc aaggccaggc 4440
 tgcactctgca gggcaggagc aatgcctgga ggccccagg caacaacccc aaggagtggc 4500
 tgcaggtgga ctccagaag acctgaagg tgactggggt gaccaccag ggggtgaaga 4560

gcctgctgac cagcatgtat gtgaaggagt tcctgatcag cagcagccag gatggccacc 4620
 agtggaccct gttcttcag aatggcaagg tgaaggtgtt ccagggaac caggacagct 4680
 tcaccctgt ggtgaacagc ctggaccccc cctgctgac cagatactg aggattcacc 4740
 cccagagctg ggtgcaccag attgcctga ggatggagg gctgggctgt gaggccagg 4800
 acctgtactg aggatccaat aaaatatctt tattttcatt acatctgtgt gttggttttt 4860
 tgtgtgtttt cctgtaacga tcgggctcga gcgc 4894

<210> 38

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 38
 ttgaattcat aactatccca a 21
 <210> 39
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 39
 gtgtagcaga gaggaacat t 21
 <210> 40
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 probe
 <400> 40
 ccatcactag gggttcctgc ggcct 25
 <210> 41
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 41
 gttaatattc accagcagcc t 21
 <210> 42
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer

<400> 42
 agtgtagcag agaggaacca 20

<210> 43
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 probe

<400> 43
 ccatcactag gggttcctgc ggcct 25

<210> 44
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer

<400> 44
 cagggtgagc ccagaaac 18

<210> 45
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 ><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer

<400> 45
 aactttgagt gtagcagaga gg 22

<210> 46
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 probe

<400> 46

taccggagga gcaaacaggg acta 24

<210> 47

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 47

ctctacgaaa tgtgcagaca ga 22